

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-527495

(P2016-527495A)

(43) 公表日 平成28年9月8日 (2016.9.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 O 1 D
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	U
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 7 5
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 37/00	1 O 1
GO 1 N 33/552 (2006.01)	GO 1 N 33/545	A
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-524736 (P2016-524736)	(71) 出願人	599132904
(86) (22) 出願日	平成26年6月30日 (2014.6.30)		ネステク ソシエテ アノニム
(85) 翻訳文提出日	平成28年1月8日 (2016.1.8)		スイス国, ブベイ, アブニュー ネスレ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/063846		5 5
(87) 国際公開番号	W02015/003945	(74) 代理人	100088155
(87) 国際公開日	平成27年1月15日 (2015.1.15)		弁理士 長谷川 芳樹
(31) 優先権主張番号	61/844, 308	(74) 代理人	100107456
(32) 優先日	平成25年7月9日 (2013.7.9)		弁理士 池田 成人
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100162352
			弁理士 酒巻 順一郎
		(74) 代理人	100140453
			弁理士 戸津 洋介
		(74) 代理人	100140888
			弁理士 渡辺 欣乃
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 マイクロ流体を使用する協調的酵素増強反応 (CEER) による免疫アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、マイクロキャリアに対し近接二重検出アッセイを利用して、患者サンプル中の対象とする検体成分の有無、発現レベル及び/又は活性レベルを検出することにより、患者の疾患状態を診断するための方法を提供する。本発明は、本明細書に記載の方法を実施するためのアッセイ装置も提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サンプルに対し多重化免疫アッセイを実施する方法であって、

(a) 細胞可溶化物を、少なくとも 1 種の検体成分に対し特異的であり、コード化されたマイクロキャリアに固定されている複数の捕捉抗体と接触させて、複数の捕捉された検体成分を生成することと、

(b) 前記複数の捕捉された検体成分を、前記対応する検体成分に特異的である少なくとも 2 種の検出抗体と接触させて、検出可能な、捕捉された複数の検体成分を生成すること(ここで、少なくとも 1 種の検出抗体は、シグナル増幅対の第 1 のメンバーを有する)と、

(c) 前記検出可能な、捕捉された複数の検体成分を、前記シグナル増幅対の第 2 のメンバーと接触させて、増幅されたシグナルを生成することと、

(d) 前記シグナル増幅対の前記第 1 及び第 2 のメンバーから生成された、前記増幅されたシグナルを検出することと

を含む、方法。

【請求項 2】

前記コード化されたマイクロキャリアが、ラテックス、ポリスチレン、架橋されたデキストラン、ポリメチルスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、セルロース、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、フッ化エチレン-プロピレン、ガラス、 SiO_2 、シリコン、PMMA (ポリメチルメタクリレート)、金、銀、アルミニウム、スチール、及び SU-8 からなる群から選択される材料により作製される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記コード化されたマイクロキャリアがシリコン製である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記コード化されたマイクロキャリアが、前記コードの読み取りにより判定される機能を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記コード化されたマイクロキャリアが、球状、ウエハー状、正方形、ディスク形、矩形、円形、三角形、及び六角形からなる群から選択される形状に成形される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記コード化されたマイクロキャリアが、ウエハー状に成形される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記コード化されたマイクロキャリアが、複数のマイクロキャリアを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記複数のマイクロキャリアが少なくとも 2 群を有する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記少なくとも 2 群のコード化されたマイクロキャリアのそれぞれが、異なる機能を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記特異的な機能が前記コードにより識別可能である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記コードが、前記マイクロキャリアを横切る孔を構成する形態である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記特異的な機能が、複数の捕捉抗体の特定である、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 13】

前記サンプルが、全血、血清、血漿、尿、痰、気管支洗浄液、涙、乳頭吸引液、リンパ液、唾液、微細針吸引液（FNA）、脳脊髄液、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記少なくとも 1 種の検体成分が、少なくとも 1 種のシグナル伝達分子、病理学的分子、又は自己抗体を含む、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記検出抗体が、

10

（i）促進部分により標識されており、活性化状態に依存しない複数の抗体と、

（ii）シグナル増幅対の第 1 のメンバーにより標識されており、活性化状態に依存する複数の抗体と、を含む、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記促進部分が、前記シグナル増幅対の前記第 1 のメンバーにチャネリングし、かつ反応する酸化剤を生成する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記促進部分がグルコースオキシダーゼである、請求項 15 又は 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

20

前記酸化剤が過酸化水素（ H_2O_2 ）である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記シグナル増幅対の前記第 1 のメンバーがペルオキシダーゼである、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記ペルオキシダーゼが西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記シグナル増幅対の前記第 2 のメンバーがチラミド製剤である、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 22】

前記チラミド剤がビオチン - チラミドである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記増幅されたシグナルが、ビオチン - チラミドがペルオキシダーゼにより酸化されることにより生成され、活性化チラミドが生成される、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記活性化チラミドが直接検出される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記活性化チラミドが、シグナル検出剤の添加により検出される、請求項 23 に記載の方法。

40

【請求項 26】

前記シグナル検出剤がストレプトアビジン標識されたフルオロフォアである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記シグナル検出剤が、ストレプトアビジン標識されたペルオキシダーゼと発色剤とを組み合わせたものである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記発色剤が 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン（TMB）である、請求項 27 に記載の方法。

50

【請求項 29】

前記方法が、ヒト疾患の診断試験として使用される、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記疾患が、代謝疾患、脳及び認知疾患、胃腸疾患、又は癌である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記癌が、乳癌、結腸直腸癌、消化管間質腫瘍、消化管カルチノイド、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌、前立腺癌、及び胃癌からなる群から選択されるものである、請求項 30 に記載の方法。

10

【請求項 32】

前記代謝疾患が糖尿病である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

前記脳及び認知疾患がアルツハイマー病である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 34】

前記少なくとも 1 種のシグナル伝達分子が、AMP 活性化タンパク質キナーゼ (AMPK)、AMPK キナーゼ (AMPKK)、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ (CAMKK)、LKB1、トランスフォーミング増殖因子-β-活性化キナーゼ 1 (TAK1)、AKT、アディポネクチン、レプチン、グルコース、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 ~ 30 及び 32 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 35】

前記少なくとも 1 種の自己抗体が、GAD65 自己抗体、インスリノーマ抗原 2 (IA-2) 自己抗体、インスリン自己抗体 (IAA)、亜鉛トランスポータータンパク質 8 (ZnT8) 自己抗体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 ~ 30 及び 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記少なくとも 1 種の病理学的分子が、タウ、アミロイドベータ (Aβ) ペプチド、可溶性アミロイド前駆体タンパク質 β (sAPPβ)、VILIP-1、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 ~ 30 及び 33 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 37】

前記少なくとも 1 種のシグナル伝達分子が受容体チロシンキナーゼである、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記受容体チロシンキナーゼが、HER1、HER2、HER3、HER4、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、FLT-3、FLK-2、PDGFR、c-KIT、INSR、IGF-IR、IGF-IIR、IRR、CSF-1R、cMET、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記少なくとも 1 種の受容体チロシンキナーゼが、非受容体型チロシンキナーゼを更に含む、請求項 37 又は 38 に記載の方法。

40

【請求項 40】

前記サンプルが、コード化されたマイクロキャリアを含むマイクロチャネル中を流通する、請求項 1 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記マイクロチャネルの少なくとも一面が透明である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記増幅されたシグナルが、前記コード化されたマイクロキャリアの前記アイデンティティに関連付けられる、請求項 1 ~ 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

50

前記増幅されたシグナルが、反応速度結合パラメーターに関連付けられる、請求項 1 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記増幅されたシグナルを検出することが、光学手段と連結させた光学センサーアレイを利用して実施され、前記センサーは、CCD又はC-MOS光センサーである、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記方法が、インビトロ法として実施される、請求項 1 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

10

ポイント・オブ・ケア診断システムであって、

(a) 反応チャンバを含むアッセイ装置であって、前記反応チャンバはマイクロチャンネルを含むアッセイ装置と、

(b) i) 機能を有する個別にコード化されたマイクロキャリアの第 1 群と

i i) 少なくとも 2 種の検出抗体と

を含むキットと

を含み、

前記個別にコード化されたマイクロキャリアの第 1 群は、それらのマイクロキャリアに結合した第 1 の複数の捕捉抗体を有し、

前記少なくとも 2 種の検出抗体は、

20

a) 促進部分により標識されており、活性化状態に依存しない複数の抗体と、

b) シグナル増幅対の第 1 のメンバーにより標識されており、活性化状態に依存する複数の抗体と

を含む、

ポイント・オブ・ケア診断システム。

【請求項 4 7】

前記装置が、前記マイクロチャンネルの長手方向における前記マイクロキャリアの移動を制限しつつ、なおも前記マイクロチャンネル内に流体を流通させる手段を含む、請求項 4 6 に記載のポイント・オブ・ケア診断システム。

【請求項 4 8】

30

前記キットが、個別にコード化されたマイクロキャリアの第 2 群を更に含み、前記個別にコード化されたマイクロキャリアの第 2 群が、第 2 の複数の捕捉抗体を有する、請求項 4 6 ~ 4 7 のいずれか一項に記載のポイント・オブ・ケア診断システム。

【請求項 4 9】

前記個別にコード化されたマイクロキャリアの第 1 群が前記機能を有し、前記個別にコード化されたマイクロキャリアの第 2 群が異なる機能を有する、請求項 4 6 ~ 4 7 のいずれか一項に記載のポイント・オブ・ケア診断システム。

【請求項 5 0】

前記機能が前記コードにより特定可能である、請求項 4 9 に記載のポイント・オブ・ケア診断システム。

40

【請求項 5 1】

前記機能が、前記複数の捕捉抗体の特定である、請求項 4 9 に記載のポイント・オブ・ケア診断システム。

【請求項 5 2】

前記コードが、前記マイクロキャリアを横切る孔を構成する形態である、請求項 4 6 ~ 5 1 のいずれか一項に記載のポイント・オブ・ケア診断システム。

【請求項 5 3】

前記コード化されたマイクロキャリアが、ラテックス、ポリスチレン、架橋されたデキストラン、ポリメチルスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、セルロース、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、フッ化エチレン-プロピレン、ガラス、

50

S i O₂、シリコン、P M M A（ポリメチルメタクリレート）、金、銀、アルミニウム、スチール、及びS U - 8からなる群から選択される材料により作製される、請求項46～52のいずれか一項に記載のポイント・オブ・ケア診断システム。

【請求項54】

前記コード化されたマイクロキャリアがシリコン製である、請求項53に記載のポイント・オブ・ケア診断システム。

【請求項55】

前記コード化されたマイクロキャリアの前記機能が、前記コードを読み取ることにより判定される、請求項46～54のいずれか一項に記載のポイント・オブ・ケア診断システム。

10

【請求項56】

前記コード化されたマイクロキャリアが、球状、ウエハー状、正方形、ディスク形、矩形、円形、三角形、及び六角形からなる群から選択される形状に成形される、請求項46～55のいずれか一項に記載のポイント・オブ・ケア診断システム。

【請求項57】

前記コード化されたマイクロキャリアが、ウエハー状に成形される、請求項46～56のいずれか一項に記載のポイント・オブ・ケア診断システム。

【請求項58】

疾患を有する患者、患者の治療応答性の有無、又は患者に投与するのに適切な薬剤投与量を特定する診断目的で、多重化された、マイクロ流体協調的酵素増強反応（C E E R）免疫アッセイを実施して、検体成分を特定するためのインビトロ用途。

20

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

[0001]患者の大規模コホートを対象とした従来の疫学研究では、所定の集団に属する各個体の遺伝的多様性は考慮に入れていない。その結果、ある薬剤又は治療は、一部の個体には非常に有効なものになる一方、その他の個体には大して有効ではなくなる。個別化医療は、所定の薬剤を、正しい個体に正しい投与量で確実に投与することを目的としている。

【0002】

[0002]様々なバイオマーカー、例えば、遺伝子、S N P、酵素活性、タンパク質発現及び活性に加え、それらが代謝経路に与える影響などを利用して、治療を最適化するストラテジーを開発することができる。関連するバイオマーカーを特定すると、薬効及び副作用のリスクを把握するのに有用な診断アッセイを開発することができる。患者の応答を最適化し、かつ患者のリスクを最小限に抑えるには、適切な投与量又は投与スケジュールを選択することが非常に重要であり得る。

30

【0003】

[0003]個別化医療のための診断アッセイ及びキットの開発においては、適切なバイオマーカーを特定することが最初の重要な工程である。バイオマーカーが特定されたならば、診断試験を利用してその有無を検証し、次に定量又は測定することができる。ある種の例では、ポイント・オブ・ケア・アプローチが用いられる。このアプローチでは、医療検査及び/又は治療を行うことができる、患者を治療する場所又は患者を治療する場所付近でアッセイが実施される。例えば、ポイント・オブ・ケア（p o i n t o f c a r e）のための場所としては、病院、患者の自宅、診療所、又は救急車の中若しくは救急対応が求められる場所などが挙げられるがこれらに限定されない。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

[0004]医学的状态を迅速に診断すること、適切な治療を選択すること、又はポイント・オブ・ケアでの投与量を最適化することに伴う効果は数多くの利点を有する。薬剤、投与

50

量及び治療計画を個別化することは、すなわち、患者が現代医療の恩恵を受ける最良の機会を得ることを意味する。当該技術分野では、ポイント・オブ・ケア装置を使用して、患者の臨床的な効果のために、バイオマーカーを特定及び測定するための、新しい方法が必要とされている。本発明は、この必要性及びその他の必要性を満たすものである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

[0005]一実施形態では、本発明は、サンプルに対し、マイクロ流体協調的酵素増強反応 (collaborative enzyme enhanced reactive) (CEER) 免疫アッセイなどといった多重化された免疫アッセイを実施するための、インビトロ法などの方法を提供する。本方法は、

(a) 細胞可溶化物を、少なくとも1種の検体成分に対し特異的であり、コード化されたマイクロキャリアに固定されている複数の捕捉抗体と接触させて、複数の捕捉された検体成分を生成することと、

(b) 複数の捕捉された検体成分を、対応する検体成分に特異的である少なくとも2種の検出抗体と接触させて、検出可能な、捕捉された複数の検体成分を生成すること(ここで、少なくとも1種の検出抗体は、シグナル増幅対の第1のメンバーを有する)と、

(c) 検出可能な、捕捉された複数の検体成分を、シグナル増幅対の第2のメンバーと接触させて、増幅されたシグナルを生成することと、

(d) シグナル増幅対の第1及び第2のメンバーから生成された、増幅されたシグナルを検出することと、を含む。

【0006】

[0006]いくつかの実施形態では、コード化されたマイクロキャリアは、ラテックス、ポリスチレン、架橋されたデキストラン、ポリメチルスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、セルロース、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、フッ化エチレン-プロピレン、ガラス、 SiO_2 、シリコン、PMMA (ポリメチルメタクリレート)、金、銀、アルミニウム、スチール、及びSU-8からなる群から選択される材料から作製される。一実施形態では、コード化されたマイクロキャリアは、シリコン製である。

【0007】

[0007]いくつかの実施形態では、コード化されたマイクロキャリアは、球状、ウエハー状、正方形、ディスク形、矩形、円形、三角形、及び六角形からなる群から選択される形状に成形される。一実施形態では、コード化されたマイクロキャリアはウエハー状に成形される。

【0008】

[0008]いくつかの実施形態では、コード化されたマイクロキャリアは、複数のマイクロキャリアを含む。

【0009】

[0009]いくつかの実施形態では、複数のマイクロキャリアは、少なくとも2群を有する。いくつかの例では、少なくとも2群のコード化されたマイクロキャリアのそれぞれは、異なる機能を有する。一例では、特異的な機能はコードにより識別可能である。

【0010】

[0010]いくつかの実施形態では、コード化されたマイクロキャリアは、コードの読み取りにより判定される機能を有する。いくつかの例では、コードは、マイクロキャリアを横切る孔を構成する形態である。別の例では、特異的な機能は、複数の捕捉抗体の特定である。

【0011】

[0011]いくつかの実施形態では、サンプルは、全血、血清、血漿、尿、痰、気管支洗浄液、涙、乳頭吸引液、リンパ液、唾液、脳脊髄液(CSF)、微細針吸引液(FNA)、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0012】

[0012]別の実施形態では、検出抗体は：

(i) 促進部分により標識されており、活性化状態に依存しない複数の抗体と、

(i i) シグナル増幅対の第 1 のメンバーにより標識されており、活性化状態に依存する複数の抗体と、を含む。

【 0 0 1 3 】

[0013]いくつかの態様では、促進部分は、シグナル増幅対の第 1 のメンバーにチャネリングし、かつ反応する酸化剤を生成する。ある種の例では、促進部分はグルコースオキシダーゼである。ある種の態様では、酸化剤は過酸化水素 (H_2O_2) である。いくつかの態様では、シグナル増幅対の第 1 のメンバーはペルオキシダーゼである。ある種の例では、ペルオキシダーゼは西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) である。

【 0 0 1 4 】

[0014]いくつかの態様では、シグナル増幅対の第 2 のメンバーはチラミド製剤である。ある種の例では、チラミド剤はビオチン - チラミドである。

【 0 0 1 5 】

[0015]いくつかの実施形態では、増幅されたシグナルは、ビオチン - チラミドがペルオキシダーゼにより酸化されることにより生成され、活性化チラミドが生成される。いくつかの態様では、活性化チラミドが直接検出される。他の態様では、活性化チラミドは、シグナル検出剤の添加により検出される。いくつかの例では、シグナル検出剤は、ストレプトアビジン標識されたフルオロフォアである。他の例では、シグナル検出剤は、ストレプトアビジン標識されたペルオキシダーゼと、発色剤とを組み合わせたものである。いくつかの実施形態では、発色剤は、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMB) である。

【 0 0 1 6 】

[0016]いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、ヒト疾患の診断試験として使用される。いくつかの態様では、疾患は、代謝疾患、脳及び認知障害、脳障害、認知障害、胃腸疾患、又は癌である。

【 0 0 1 7 】

[0017]いくつかの態様では、代謝疾患は、前糖尿病、1 型糖尿病、2 型糖尿病、その他の形態の糖尿病、及び糖尿病に関係する疾患、を含む、糖尿病である。

【 0 0 1 8 】

[0018]いくつかの態様では、脳及び認知障害は、アルツハイマー病である。

【 0 0 1 9 】

[0019]いくつかの例では、癌は、乳癌、結腸直腸癌、消化管間質腫瘍、消化管カルチノイド、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌、前立腺癌、及び胃癌からなる群から選択されるものである。

【 0 0 2 0 】

[0020]いくつかの実施形態では、少なくとも 1 種の検体成分は、少なくとも 1 種のシグナル伝達分子、病的なタンパク質凝集体、又は自己抗体を含む。

【 0 0 2 1 】

[0021]いくつかの例では、少なくとも 1 種のシグナル伝達分子は、AMP 活性化タンパク質キナーゼ (AMPK)、AMPK キナーゼ (AMPKK)、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ (CAMKK)、LKB1、トランスフォーミング増殖因子 - β - 活性化キナーゼ 1 (TAK1)、AKT、アディポネクチン、レプチン、グルコース、その他の AMPK モジュレーター、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【 0 0 2 2 】

[0022]他の例では、少なくとも 1 種の病的なタンパク質凝集体は、タウ、活性化 (リン酸化) タウ、アミロイドベータ ($A\beta$) ペプチド、可溶性アミロイド前駆体タンパク質 (APP β)、これらの断片、これらの複合体、及びこれらのオリゴマーからなる群から選択される。

【 0 0 2 3 】

10

20

30

40

50

[0023]他の例では、少なくとも1種の自己抗体は、G A D 6 5 自己抗体、インスリノーマ抗原2 (I A - 2) 自己抗体、インスリン自己抗体 (I A A)、亜鉛トランスポータータンパク質8 (Z n T 8) 自己抗体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【 0 0 2 4 】

[0024]更に他の例では、少なくとも1種のシグナル伝達分子は、受容体チロシンキナーゼである。ある種の実施形態では、受容体チロシンキナーゼは、H E R 1、H E R 2、H E R 3、H E R 4、V E G F R - 1、V E G F R - 2、V E G F R - 3、F L T - 3、F L K - 2、P D G F R、c - K I T、I N S R、I G F - I R、I G F - I I R、I R R、C S F - 1 R、c M E T、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである。その他の実施形態では、少なくとも1種の受容体チロシンキナーゼは、非受容体型チロシンキナーゼを更に含む。

10

【 0 0 2 5 】

[0025]いくつかの実施形態では、サンプルは、コード化されたマイクロキャリアを含むマイクロチャネル中を流通する。いくつかの態様では、マイクロチャネルは、少なくとも一面が透明である。

【 0 0 2 6 】

[0026]いくつかの実施形態では、増幅されたシグナルは、コード化されたマイクロキャリアのアイデンティティに関連付けられる。いくつかの例では、増幅されたシグナルは、反応速度結合パラメーターに関連付けられる。これらのパラメーターとしては、例えば、会合速度、 k_{on} ；解離速度、 k_{off} ；又は親和定数、 K_a などの、詳細な結合反応速度パラメーターが挙げられる。

20

【 0 0 2 7 】

[0027]本明細書に記載の方法は、好ましくはインビトロ法である。一実施形態では、本発明は、サンプルに対し、マイクロ流体協調的酵素増強反応 (C E E R) による免疫アッセイなどの多重化された免疫アッセイを実施するための、インビトロ法を提供し、本方法は、

(a) 細胞可溶化物を、少なくとも1種の検体成分に対し特異的であり、コード化されたマイクロキャリアに固定されている複数の捕捉抗体と接触させて、複数の捕捉された検体成分を生成することと、

30

(b) 複数の捕捉された検体成分を、対応する検体成分に特異的である少なくとも2種の検出抗体と接触させて、検出可能な、捕捉された複数の検体成分を生成すること (ここで、少なくとも1種の検出抗体は、シグナル増幅対の第1のメンバーを有する) と、

(c) 検出可能な、捕捉された複数の検体成分を、シグナル増幅対の第2のメンバーと接触させて、増幅されたシグナルを生成することと、

(d) シグナル増幅対の第1及び第2のメンバーから生成された、増幅されたシグナルを検出することと、を含む。

【 0 0 2 8 】

[0028]本方法のいくつかの実施形態では、増幅されたシグナルを検出することは、光学的手段と連結された光学センサーアレイを使用して実施され、センサーは、C C D又はC - M O S光センサーである。

40

【 0 0 2 9 】

[0029]別の実施形態では、本発明は、ポイント・オブ・ケア診断システムを提供する。本システムは：

(a) 反応チャンバを含むアッセイ装置であって、前記反応チャンバはマイクロチャネルを含むアッセイ装置と、

(b) i) 機能を有する個別にコード化されたマイクロキャリアの第1群と i i) 少なくとも2種の検出抗体とを含むキットとを含み、

この個別にコード化されたマイクロキャリアの第1群は、それらのマイクロキャリアに結合した第1の複数の捕捉抗体を有し、かつ

50

この少なくとも 2 種の検出抗体は、

a) 促進部分により標識されており、活性化状態に依存しない複数の抗体と、

b) シグナル増幅対の第 1 のメンバーにより標識されており、活性化状態に依存する複数の抗体とを含む。

【0030】

[0030]本システムのいくつかの実施形態では、装置は、マイクロチャネルの長手方向におけるマイクロキャリアの移動を制限しつつ、なおも流体を流通させる手段を含む。その他の実施形態では、本キットは、個別にコード化されたマイクロキャリアの第 2 群を更に含み、個別にコード化されたマイクロキャリアの第 2 群は、第 2 の複数の捕捉抗体を有する。別の実施形態では、個別にコード化されたマイクロキャリアの第 1 群は機能を有し、個別にコード化されたマイクロキャリアの第 2 群は異なる機能を有する。

10

【0031】

[0031]いくつかの態様では、機能は、複数の捕捉抗体の特定である。他の態様では、機能はコードにより特定可能である。いくつかの実施形態では、コードは、マイクロキャリアを横切る孔を構成する形態である。

【0032】

[0032]いくつかの実施形態では、コード化されたマイクロキャリアは、ラテックス、ポリスチレン、架橋されたデキストラン、ポリメチルスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、セルロース、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、フッ化エチレン-プロピレン、ガラス、 SiO_2 、シリコン、PMMA (ポリメチルメタクリレート)、金、銀、アルミニウム、スチール、及び SU-8 からなる群から選択される材料から作製される。一実施形態では、コード化されたマイクロキャリアは、シリコン製である。

20

【0033】

[0033]いくつかの実施形態では、コード化されたマイクロキャリアの機能は、コードの読み取りにより判定される。

【0034】

[0034]いくつかの実施形態では、コード化されたマイクロキャリアは、球状、ウエハー状、正方形、ディスク形、矩形、円形、三角形、及び六角形からなる群から選択される形状に成形される。一実施形態では、コード化されたマイクロキャリアはウエハー状に成形される。

30

【0035】

[0035]本発明のこれらの及びその他の目的、特徴、及び利点は、以下の詳細な説明及び図面を参照することにより当業者にはより明白となる。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図 1 A】図 1 は本発明の代表的な実施形態から得られる結果を示す。図 1 A は、ビオチン-チラミド (BT-Tyr) を高濃度 (1 : 500) で使用したときの、BT474 細胞可溶化物の希釈系列の蛍光を示す。図 1 B は、BT-Tyr を低濃度 (1 : 1000) で使用したときの、BT474 細胞可溶化物の希釈系列の蛍光を示す。

【図 1 B】図 1 は本発明の代表的な実施形態から得られる結果を示す。図 1 A は、ビオチン-チラミド (BT-Tyr) を高濃度 (1 : 500) で使用したときの、BT474 細胞可溶化物の希釈系列の蛍光を示す。図 1 B は、BT-Tyr を低濃度 (1 : 1000) で使用したときの、BT474 細胞可溶化物の希釈系列の蛍光を示す。

40

【図 2 A】図 2 は図 1 B に示す結果の顕微鏡画像を示す。図 2 A は、低濃度 (1 : 1000) のビオチン-チラミドをサンプルの 75 個の細胞とともにインキュベートしたマイクロキャリアの画像を示す。図 2 B は、低濃度 (1 : 1000) のビオチン-チラミドをサンプルの 75 個の細胞とともにインキュベートしたマイクロキャリアの画像を示す。

【図 2 B】図 2 は図 1 B に示す結果の顕微鏡画像を示す。図 2 A は、低濃度 (1 : 1000) のビオチン-チラミドをサンプルの 75 個の細胞とともにインキュベートしたマイクロキャリアの画像を示す。図 2 B は、低濃度 (1 : 1000) のビオチン-チラミドをサ

50

ンプルの 7 . 5 個の細胞とともにインキュベートしたマイクロキャリアの画像を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 7 】

I . 序論

[0038]本発明は、タンパク質バイオマーカーなどの検体成分を迅速に特定及び定量するための方法、装置、使用法、及びキットを提供する。本発明の多重化免疫アッセイでは、コード化されたマイクロキャリアに、例えば、細胞可溶化物由来のバイオマーカーを保持させるため、複数の捕捉抗体を結合させる。コード化されたマイクロキャリアは、特定の捕捉抗体を特定するために、ひいては、バイオマーカー、すなわち、捕捉した検体成分を特定するために使用することができる。ある種の例では、本発明は、疾患に罹患している患者を特定する、あるいは患者が治療に应答するかを特定する、あるいは患者に投与するのに適切な薬剤投与量を特定するなどの、診断目的で検体成分（例えば、バイオマーカー）を特定するために、多重化免疫アッセイのインビトロ利用を提供する。これらの目的は、特定される検体成分の発現又は活性レベルを測定することにより達成できる。

10

【 0 0 3 8 】

[0039]本発明の利用により、代謝疾患、脳及び認知疾患、胃腸疾患、又は癌などの医学的状态の迅速かつ正確な診断、適切な治療法の特定、並びに治療量の最適化が可能になり、患者及び医療従事者は著しい利益を得る。

【 0 0 3 9 】

[0040]有利な点として、本発明の方法、装置、使用法、及びキットは、リアルタイム又はほとんどリアルタイムで診断検査を実施でき、そのため、実施できる試験は、本発明のシステムを利用していない同様の試験よりも効率的に実施され、ポイント・オブ・ケアで提供可能な診断検査を促進する。ポイント・オブ・ケア診断検査は、診療所又は病院又はどこであろうと医療ケアが提供される場所などの、患者を治療する場所又は患者を治療する場所付近での検査である。アッセイ結果を得るまでの所用時間が短いことにより、リアルタイムのエビデンスベースの判断、患者の緊急治療、不必要な検査を最小限に抑える、副作用を最小限に抑える、及び著しい費用効果などの数多くの利点が提供される。

20

【 0 0 4 0 】

[0041]ある種の例では、本発明の方法及び装置により、中央検査室の外部、患者のすぐ近くでの臨床検査が実施可能になる。ある種の態様では、方法は、サンプル、すなわち、全血、血漿、血清、微細針吸引液（FNA）、又は脳脊髄液（CSF）と、レディ・トゥ・ユーズ（ready-to-use）試薬と、使い捨てアッセイカートリッジとを使用する。ある種の態様では、本発明の装置は、携帯式であり、かつ各個体のサンプル含量及び量を利用する。

30

【 0 0 4 1 】

I I . 定義

[0042]本明細書で使用するとき、以下の用語は、別途記載のない限りそれらの用語による意味を有する。

【 0 0 4 2 】

[0043]用語「検体成分」は、対象とする任意の分子を包含し、典型的には、有無、量、及び/又はアイデンティティが特定される、ポリペプチドなどの高分子を包含する。ある種の例では、検体成分は、固体腫瘍の循環細胞又は脳脊髄液、末梢血、若しくは血清の細胞成分である。好ましくは、検体成分又はバイオマーカーは、シグナル伝達分子、病理学的分子、又は自己抗体である。

40

【 0 0 4 3 】

[0044]用語「シグナル伝達分子」又は「シグナル伝達因子」は、細胞が、細胞外又は細胞内シグナルを変換する、すなわち典型的には、細胞内部の一連の生化学的反応に關与する应答を誘導することによりプロセスを実施するタンパク質及びその他の分子を包含する。シグナル伝達分子の例としては、それぞれ、受容体チロシンキナーゼ、例えば、EGFR（例えば、EGFR/HER-1/Erbb1、HER-2/Neu/Erbb2、H

50

ER - 3 / ErbB3、HER - 4 / ErbB4)、VEGFR - 1 / FLT - 1、VEGFR - 2 / FLK - 1 / KDR、VEGFR - 3 / FLT - 4、FLT - 3 / FLK - 2、PDGFR (例えば、PDGFRA、PDGFRB)、c - KIT / SCFR、INSR (インスリン受容体)、IGF - IR、IGF - IIR、IRR (インスリン受容体関連受容体)、CSF - 1R、FGFR 1 - 4、HGFR 1 - 2、CKK4、TRK A - C、MET、RON、EPHA 1 - 8、EPHB 1 - 6、AXL、MER、TYRO3、TIE 1 - 2、TEK、RYK、DDR 1 - 2、RET、c - ROS、V - カドヘリン、LTK (白血球チロシンキナーゼ)、ALK (未分化のリンパ腫キナーゼ)、ROR 1 - 2、MUSK、AATYK 1 - 3、RTK 106、及び切断された受容体チロシンキナーゼ、例えば、p95ErbB2；非受容体型チロシンキナーゼ、例えば、BCR - ABL、Src、Frk、Btk、Csk、Abl、Zap70、Fes / Fps、Fak、Jak、Ack、及びLIMK；チロシンキナーゼシグナル伝達カスケード構成要素、例えば、AKT、MAPK / ERK、MEK、RAF、PLA2、MEKKK、JNKKK、JNK、p38、Shc (p66)、PI3K、Ras (例えば、K - Ras、N - Ras、H - Ras)、Rho、Rac1、Cdc42、PLC、PKC、p70 S6キナーゼ、p53、cyclin D1、STAT1、STAT3、PIP2、PIP3、PDK、mTOR、BAD、p21、p27、ROCK、IP3、TSP - 1、NOS、PTEN、RSK 1 - 3、JNK、c - Jun、Rb、CREB、Ki67、及びパキシリン；核内ホルモン受容体、例えば、エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PR)、アンドロゲン受容体、グルココルチコイド受容体、ミネラルコルチコイド受容体、ビタミンA受容体、ビタミンD受容体、レチノイド受容体、甲状腺ホルモン受容体、及びオーファン受容体；核内受容体コアクチベーター及びリプレッサー、例えば、amplified in breast cancer - 1 (AIB1) 及び核内受容体コリプレッサー1 (NCOR)、及びこれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。シグナル伝達分子の更なる例としては、AMP活性化タンパク質キナーゼ (AMPK)、AMPKキナーゼ (AMPKK)、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ (CAMKK)、LKB1、トランスフォーミング増殖因子 - β - 活性化キナーゼ1 (TAK1)、AKT、アディポネクチン、レプチン、グルコース、グリコーゲン、AMP、及びATPが挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

30

【0044】

[0045]用語「病理学的分子」は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、認知症、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、及び同様の疾患を含む神経変性疾患などの疾患又は障害の病理に関係するタンパク質及びその他の分子を包含する。

【0045】

[0046]用語「捕捉抗体」は、細胞抽出物などのサンプル中の対象とする1種以上の検体成分に特異的な(すなわち、結合する、結合される、又は一緒に複合体を形成する)固定化抗体を包含することを意図する。好ましい実施形態では、捕捉抗体は、アレイ装置において、マイクロキャリア (例えば、固体支持体) 上に固定される。固体支持体上に何らかの様々なシグナル伝達分子を固定するのに好適な捕捉抗体は、Upstate (Temecula, Calif.)、Biosource (Camarillo, Calif.)、Cell Signaling Technologies (Danvers, Mass.)、R&D Systems (Minneapolis, Minn.)、Lab Vision (Fremont, Calif.)、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif.)、Sigma (St. Louis, Mo.)、及びBD Biosciences (San Jose, Calif.) から入手可能である。

40

【0046】

[0047]本明細書で使用する時、用語「検出抗体」は、サンプル中の対象とする1種以上の検体成分に特異的な(すなわち、結合する、結合される、又は一緒に複合体を形成す

50

る) 検出可能な標識を含む抗体を包含する。この用語は、対象とする 1 種以上の検体成分に特異的な抗体も包含し、この抗体は、検出可能な標識を含む別種の抗体により結合され得る。検出可能な標識の例としては、ビオチン/ストレプトアビジン標識、核酸(例えば、オリゴヌクレオチド)標識、化学反応性標識、蛍光標識、酵素標識、放射性標識、及びこれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。様々なシグナル伝達分子のうちのいずれかの活性化状態及び/又は総量を検出するのに好適な検出抗体は、Upstate (Temecula, Calif.), Bioscience Resource Project (Camarillo, Calif.), Cell Signaling Technologies (Danvers, Mass.), R&D Systems (Minneapolis, Minn.), Lab Vision (Fremont, Calif.), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif.), Sigma (St. Louis, Mo.), and BD Biosciences (San Jose, Calif.) から入手可能である。

【0047】

[0048]用語「活性化状態に依存する抗体」は、サンプル中の対象とする 1 種以上の検体成分の特定の活性化状態に特異的な(すなわち、結合する、結合される、又は一緒に複合体を形成する)検出抗体を包含する。好ましい実施形態では、活性化状態に依存する抗体は、1 種以上のシグナル伝達分子などの 1 種以上の検体成分のリン酸化、ユビキチン化、及び/又は複合体状態を検出する。いくつかの実施形態では、活性化状態に依存する抗体を使用して、受容体チロシンキナーゼの EGF R ファミリーのメンバーのリン酸化、及び/又は EGF R ファミリーメンバー同士のヘテロ二量体形成の検出を行う。活性化状態に依存する抗体による検出に好適な活性化状態(括弧内に掲載)の非限定例としては、EGF R (EGF R v I I I、リン酸化(p-) EGF R、EGF R : Shc、ユビキチン化(u-) EGF R、p-EGF R v I I I); Erb B 2 (p95 : truncated (Tr) - Erb B 2、p-Erb B 2、p95 : Tr - p-Erb B 2、HER-2 : Shc、Erb B 2 : PI3 K、Erb B 2 : EGF R、Erb B 2 : Erb B 3、Erb B 2 : Erb B 4); Erb B 3 (p-Erb B 3、Erb B 3 : PI3 K、p-Erb B 3 : PI3 K、Erb B 3 : Shc); Erb B 4 (p-Erb B 4、Erb B 4 : Shc); ER (p-ER (S118、S167)); IGF-1 R (p-IGF-1 R、IGF-1 R : IRS、IRS : PI3 K、p-IRS、IGF-1 R : PI3 K); INS R (p-INS R); KIT (p-KIT); FLT3 (p-FLT3); HGFR I (p-HGFR I); HGFR 2 (p-HGFR 2); RET (p-RET); PDGFRa (p-PDGFRa); PDGFRP (p-PDGFRP); VEGFR I (p-VEGFR I、VEGFR I : PLCg、VEGFR 1 : Src); VEGFR 2 (p-VEGFR 2、VEGFR 2 : PLCy、VEGFR 2 : Src、VEGFR 2 : ヘパリン硫酸、VEGFR 2 : VE-カドヘリン); VEGFR 3 (p-VEGFR 3); FGFR 1 (p-FGFR 1); FGFR 2 (p-FGFR 2); FGFR 3 (p-FGFR 3); FGFR 4 (p-FGFR 4); Tie 1 (p-Tie 1); Tie 2 (p-Tie 2); Eph A (p-Eph A); Eph B (p-Eph B); NFkB 及び/又は IKK (p-IKK (S32)、p-NFkB (S536)、p-P65 : IKBa); Akt (p-Akt (T308、S473)); PTEN (p-PTEN); Bad (p-Bad (S112、S136)、Bad : 14-3-3); mTor (p-mTor (S2448)); p70S6K (p-p70S6K (T229、T389)); Mek (p-Mek (S217、S221)); Erk (p-Erk (T202、Y204)); Rsk-1 (p-Rsk-1 (T357、S363)); Jnk (p-Jnk (T183、Y185)); P38 (p-P38 (T180、Y182)); Stat3 (p-Stat3 (Y705、S727)); Fak (p-Fak (Y576)); Rb (p-Rb (S249、T252、S780)); Ki67; p53 (p-p53 (S392、S200)); CREB (p-CREB (S133)); c-Jun (p-c-Jun (S63)); cSrc (p-cSrc (Y416)); パキシリン (p-パキシリン (Y118))

10

20

30

40

50

); AMPK (p - AMPK (T 1 7 2、T 1 8 3); 及びタウ (p - タウ (Y 1 8、Y 2 9、S 4 6、T 1 8 1、S 1 9 9、S 2 0 2、T 2 0 5、T 2 1 2、S 2 1 4、T 2 1 7、T 2 3 1、S 2 3 5、S 2 6 2、S 3 5 6、S 3 9 6、S 4 0 0、S 4 0 4、S 4 1 2、S 4 2 2、S 4 7 0、S 4 9 2、S 4 9 8、S 5 1 5、S 5 1 6、S 5 1 9、T 5 3 4、T 5 4 8、S 5 5 2、S 6 2 2、S 6 4 1、S 7 1 3、S 7 2 1、S 7 2 6、T 7 3 9 など) が挙げられる。

【 0 0 4 8 】

[0049]用語「活性化状態に依存しない抗体」は、活性化状態を問わずサンプル中の対象とする 1 種以上の検体成分に特異的な (すなわち、結合する、結合される、又は一緒に複合体を形成する) 検出抗体を包含する。例えば、活性化状態に依存しない抗体は、1 種以上のシグナル伝達分子などの 1 種以上の検体成分のリン酸化及び非リン酸化形態の両方を検出することができる。

10

【 0 0 4 9 】

[0050]用語「核酸」又は「ポリヌクレオチド」は、一本鎖又は二本鎖形態のいずれかの、例えば、DNA 及び RNA などのデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド及びそれらのポリマーを包含する。核酸は、合成物、天然に生じるもの、及び非天然に生じるものであり、かつ参照核酸配列と同様の結合特性を有する、既知のヌクレオチド類似体、又は修飾された骨格残基若しくは結合を含有する核酸を包含する。このような類似体の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロアミド酸、メチルホスホン酸、キラル - メチルホスホン酸、2' - O - メチルリボヌクレオチド、及びペプチド - 核酸 (PNA) が挙げられるがこれらに限定されない。別途記載のない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有する天然のヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸を包含する。別途記載のない限り、特定の核酸配列には、それらの保存的に修飾された変異体、並びに相補的配列及び明確に示される配列も暗に包含される。

20

【 0 0 5 0 】

[0051]用語「オリゴヌクレオチド」は、RNA、DNA、RNA/DNA ハイブリット、及び/又はそれらの模倣物の一本鎖オリゴマー又はポリマーを指す。ある種の例では、オリゴヌクレオチドは、天然に生じる (すなわち、未修飾の) 核酸塩基、糖、及びヌクレオシド間 (骨格) 結合から構成される。他のある種の例では、オリゴヌクレオチドは、修飾された核酸塩基、糖、及び/又はヌクレオシド間結合を含む。

30

【 0 0 5 1 】

[0052]用語「インキュベートする」は、「接触させる」及び「曝露させる」と同意語であり、かつ別途記載のない限り何らかの具体的な時間又は温度を暗示するものではない。

【 0 0 5 2 】

[0053]本明細書で使用する時、用語「希釈系列」は、濃度を漸減させた一連の特定のサンプル (例えば、細胞可溶化物) 又は試薬 (例えば、抗体) を包含することを意図する。希釈系列は、典型的には、初期濃度の一定量のサンプル又は試薬を希釈剤 (例えば、希釈緩衝液) と混合して、低濃度のサンプル又は試薬を生成するプロセスを、所望数の段階希釈を得るのに十分な回数だけ繰り返すことにより生成される。サンプル又は試薬を少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、500、又は 1000 倍希釈することで、サンプル又は試薬の濃度が少なくとも 1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9、1/10、1/11、1/12、1/13、1/14、1/15、1/16、1/17、1/18、1/19、1/20、1/25、1/30、1/35、1/40、1/45、又は 1/50 に低下している希釈系列を生成することができる。例えば、初期濃度 1 mg/mL で捕捉抗体製剤の 2 倍段階希釈を含む希釈系列は、ある量の初期濃度の捕捉抗体を、同量の希釈緩衝液と混合して、濃度 0.5 mg/mL の捕捉抗体を生成し、このプロセスを繰り返して 0.25 mg/mL、0.125 mg/mL、0.0625 mg/mL、0.0325 mg/mL などの濃度の捕捉抗体を得ることにより生成できる。

40

【 0 0 5 3 】

50

[0054]本明細書で使用する時、用語「優れたダイナミックレンジ」は、わずか1個の細胞又は数千個もの細胞において特異的な検体成分を検出するアッセイ性能を指す。例えば、本明細書に記載の免疫アッセイは、捕捉抗体の濃度希釈系列を使用して、1～10,000個（例えば、約1、5、10、25、50、75、100、250、500、750、1000、2500、5000、7500、又は10,000個）の細胞において、対象とする特定のシグナル伝達分子を有利に検出することから、優れたダイナミックレンジを保有する。

【0054】

[0055]本明細書で使用する時、用語「マイクロキャリア」は、少なくとも1つの表面上が機能化されているマイクロ粒子又はマイクロスケールの固体支持体であり、このことから、サンプル中の検体成分を分析するのに使用でき、及び/又はこのような検体成分と反応させることができるものである。本明細書において、同時に用語「機能化されたマイクロキャリア」が使用される。「一組のマイクロキャリア」は、1種の特定の標的検体成分を捕捉及び/又は検出するのに使用される1種以上のマイクロキャリアを指す。この組は、1種のみマイクロキャリアによるものであっても、又は1種以上のマイクロキャリアによるものであってもよい。1組のマイクロキャリアは、標的とする検体成分の2種以上の分子を捕捉する目的で、1種以上の捕捉分子（例えば、捕捉抗体又は捕捉リガンド）を担持してもよいが、これはなおも1つの機能として言及する。それぞれ区別することのできる異なる2組のマイクロキャリアは、表面に結合している捕捉分子が異なる。

【0055】

[0056]本明細書で使用する時、用語「コード」は、観察又は検出時に識別可能な、マイクロキャリアの何らかの特性又は特徴であり、マイクロキャリアの特定、又はマイクロキャリアの特定集団（例えば、所定の機能を有する一群のマイクロキャリア）への関連付けに使用される。マイクロキャリア上のコードは、位置とは無関係に測定でき、及びアッセイの結果とは無関係に測定でき、すなわち、検出される標的検体成分が存在する必要はない。典型的には、コードは、観察時の、マイクロキャリアの光学的又は磁氣的応答により特徴づけられる。この応答は、マイクロキャリア全体について定義可能であり（例えば、マイクロキャリアの色）、又はマイクロキャリア中又はマイクロキャリア上において空間的に変化させることによって、パターン化されたレイアウト（例えば、マイクロキャリアの色の変化により得られるバーコード）を得てもよい。コードの例としては、色、形状、大きさ、刷り込み又は彫り込まれたパターン、孔の配置、ホログラフパターン、磁気符号、化学組成、光透過又は反射特性の変化、量子ドットの発光、特有の検出可能な外来分子（例えば、オリゴヌクレオチド又はその他のポリマー）、ICチップの取り付けられた又は埋め込まれた表面が挙げられるがこれらに限定されない。

【0056】

[0057]用語「コード化マイクロキャリア」は、コードを有するマイクロキャリアを指す。マイクロキャリアはそれぞれコード化され、すなわち、各マイクロキャリアは、複数のマイクロキャリア（典型的には、1組のマイクロキャリア）が同値のコードを担持し得る（すなわち、マイクロキャリアが、このマイクロキャリアそのもののコードだけでは区別できない）場合にも、自身のコードを担持している。異なる組の、コード化されたマイクロキャリアは、マイクロキャリアのマイクロチャンネルにおける位置とは独立に、及びアッセイの結果とは独立に識別及び/又は特定できる。

【0057】

[0058]用語「反応チャンバ」は、標的検体成分及び捕捉分子（例えば、捕捉抗体又は捕捉リガンド）及び/又は検出抗体間に生じる反応を捕捉する及び/又は検出する空間を指す。

【0058】

[0059]本明細書で使用する時、用語「循環細胞」は、固形腫瘍から転移した又は微小転移した腫瘍外部の細胞（extratumoral cell）を含む。循環細胞の例としては、循環腫瘍細胞、癌幹細胞、及び/又は腫瘍内に移動する細胞（例えば、循環内皮前駆細胞、循環

内皮細胞、血管新生する循環骨髓細胞、循環樹状細胞など)が挙げられるがこれらに限定されない。

【0059】

[0060]本明細書で使用する時、用語「サンプル」は、患者から得られる何らかの生体標本を包含する。サンプルとしては、全血、血漿、血清、赤血球細胞、白血球細胞(例えば、末梢血単核細胞)、脳脊髄液、乳管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液(例えば、リンパ管の播種性腫瘍細胞)、骨髓穿刺液、唾液、尿、排泄物(すなわち、糞便)、痰、気管支洗浄液、涙、微細針吸引液(例えば、無作為な乳輪周囲の微細針吸引により採取)、何らかのその他の体液、腫瘍の細胞診(例えば、針生検)などの組織サンプル(例えば、腫瘍組織)、又はリンパ管(例えば、センチネルリンパ節生検)、及びこれらの細胞抽出物が

10

【0060】

[0061]「生検」は、診断又は予後評価のために組織サンプルを切除するプロセス、及び組織標本そのものを指す。本発明の方法及び組成物には、当該技術分野で既知の任意の生検法を利用することができる。利用する生検法は、概して、数ある因子の中でも、評価する組織、並びに腫瘍の大きさ及び種類(すなわち、固体又は懸濁(すなわち、血液又は腹水))に応じ変更されるであろう。代表的な生検法としては、切除生検、切開生検、針生検(例えば、針生検、微細針吸引生検など)、外科生検、及び骨髓生検が挙げられる。生検法は、例えば、ハリソン内科学、Kasperら編、第16版、2000年、第70章、パートVまでに議論されている。当業者であれば、所定の組織サンプルにおいて対象とする細胞を特定することのできる生検法を認識されるであろう。

20

【0061】

[0062]用語「対象」又は「患者」又は「個体」は、典型的には、ヒトを包含するものの、その他の動物、例えば、その他の霊長類、げっ歯類、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタ、及び同様の動物も包含され得る。

【0062】

[0063]本発明は、ポイント・オブ・ケアのなされる場所又は検査室ベースの臨床化学検査が行われる場所でも有用である。本明細書で使用する時、ポイント・オブ・ケア(POC)のなされる場所は、病院検査、ベッドサイド検査、緊急治療室、診療所、外来診療所、血液バンク、手術室、家庭、実験室又は養護施設での検査、遠隔検査、などの場所を意味する。サンプル、及び、ポイント・オブ・ケア検査と同じ場所で行われる試験若しくはアッセイの結果が収集される、分析システム又は装置において実施される場合、特に有用である。しかしながら、本発明は、臨床検査施設以外の施設でも使用できることは理解されたい。

30

【0063】

[0064]本明細書において、用語「代謝疾患」、「代謝障害」、及び「代謝症候群」は互換的に使用され、正常な代謝(例えば、代謝のバランス)に障害が生じることにより引き起こされる状態を指す。代謝は、食物を細胞レベルでエネルギーに変換するプロセスである。典型的には、代謝疾患は、血圧上昇、高血糖、腹部の過剰な体脂肪、インスリン抵抗性、耐糖能障害、及び/又は異常なコレステロール値により特徴づけられる。代謝疾患/障害の非限定例としては、1型糖尿病、2型糖尿病、糖尿病前症、糖尿病の関連疾患、高インスリン血症、リソソーム蓄積症、ゴーシェ病、耐糖能障害、空腹時高血糖、インスリン抵抗性、及び脂質異常症が挙げられる。

40

【0064】

[0065]用語「脳及び認知疾患」又は「脳及び認知障害」は、主に、学習、記憶、知覚及び問題解決に影響を及ぼす、神経疾患/障害及び/又は心の健康に係る疾患/障害

50

を指す。この用語には、せん妄、重度及び軽度の認知神経科学的障害、認知症、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、及びヒトの心の働きを低下させ、日常生活に悪影響を及ぼすことを特徴とする全ての既知の神経疾患／障害が包含される。

【0065】

[0066]用語「癌」は、異常細胞の非制御的増殖を特徴とする疾患クラスのメンバーを包含することを意図する。この用語は、悪性、良性、軟組織、又は固体であることを特徴とする全ての既知の癌及び腫瘍性疾患、並びに遊走前及び遊走後の癌を含む全てのステージ及び悪性度の癌を包含する。異なる種類の癌の例としては、乳癌；肺癌（例えば、非小細胞肺癌）；消化器及び胃腸癌、例えば、結腸直腸癌、消化管間質腫瘍、消化管カルチノイド、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌、及び胃癌；食道癌；胆嚢癌；肝臓癌；膵臓癌；虫垂癌；卵巣癌；腎臓癌（例えば、腎細胞癌）；中枢神経系の癌；皮膚癌；リンパ腫；絨毛種；頭部及び頸部癌；骨肉腫；及び血液癌が挙げられるがこれらに限定されない。本明細書で使用する時、「腫瘍」は、1種以上の癌細胞を含む。

10

【0066】

III. 発明を実施するための形態

[0067]一態様では、本発明は、アッセイ装置中のマイクロキャリアにおいて、近接二重検出（proximity dual detection）アッセイによる多重化アッセイを実施することにより、癌、代謝疾患、胃腸疾患又は脳及び認知疾患、脳疾患、又は認知疾患を診断するための方法を提供する。本方法は、a)患者サンプルを、アッセイ装置のマイクロチャンネルに配置又は固定された、複数のコード化されたマイクロキャリアと接触させて、複数の捕捉された検体成分を生成することと；b)マイクロキャリア上の複数の捕捉された検体成分を少なくとも2種の検出抗体と接触させることと[少なくとも1種の検出抗体はシグナル増幅対のメンバーを有し、検出可能な、捕捉された複数の検体成分を生成する]；c)検出可能な、捕捉された複数の検体成分を、シグナル増幅対の第2のメンバーと接触させて、増幅されたシグナルを生成することと；及びd)シグナル増幅対の第1及び第2のメンバーから生成された、増幅されたシグナルを検出することと、を含む。

20

【0067】

[0068]患者サンプル中の標的検体成分の有無、発現（例えば、総量）レベル及び／又は活性（例えば、リン酸化）レベルを利用して、患者が代謝疾患、胃腸疾患、脳及び認知疾患、又は癌に罹患しているかを判断する。

30

【0068】

[0069]いくつかの例では、HER1、HER2、HER3、HER4、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、FLT-3、FLK-2、PDGR、c-KIT、INSR、IGF-IR、IGF-IIR、IRR、CSF-IR、cMET、及びこれらの組み合わせなどのシグナル伝達分子のうちの1種以上の有無、発現（例えば、総量）レベル及び／又は活性（例えば、リン酸化）レベルを利用して、患者の癌を診断する。

【0069】

[0070]他の例では、AMP活性化タンパク質キナーゼ（AMPK）、AMPKキナーゼ（AMPKK）、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ（CAMKK）、LKB1、トランスフォーミング増殖因子-β-活性化キナーゼ1（TAK1）、AKT、アディポネクチン、レプチン、グルコース、その他のAMP修飾因子、及びこれらの組み合わせなどのシグナル伝達分子のうちの1種以上の有無、発現（例えば、総量）レベル及び／又は活性（例えば、リン酸化）を利用して、患者の糖尿病を診断する。

40

【0070】

[0071]他の例では、GAD65自己抗体、インスリノーマ抗原2（IA-2）自己抗体、インスリン自己抗体（IAA）、亜鉛トランスポータータンパク質8（ZnT8）自己抗体、及びこれらの組み合わせなどの1種以上の自己抗体の有無及び／又は発現（例えば、総量）レベルを利用して、患者の糖尿病を診断する。

【0071】

50

[0072]他の例では、タウ、アミロイドベータ ($A\beta$) タンパク質、アミロイド前駆体タンパク質 (APP)、アミロイドベータ ($A\beta$) ペプチド (例えば、 β -アミロイドタンパク質 28、 β -アミロイドタンパク質 40、 β -アミロイドタンパク質 42、 β -アミロイドタンパク質 43、可溶性アミロイド前駆体タンパク質ベータ ($sAPP\beta$)、及び同様のタンパク質等)、何らかの $A\beta$ タンパク質断片、VILIP-1、及びこれらの組み合わせなどの 1 種以上の病理学的分子の有無、発現 (例えば、総量) レベル及び / 又は活性 (例えば、リン酸化) レベルを利用して、患者のアルツハイマー病を診断する。

【0072】

[0073]更に他の例では、サンプル中の少なくとも 1 種のサイトカイン又は複数のサイトカイン有無又はレベルは、本発明に特に有用である。本明細書で使用する時、用語「サイトカイン」は、免疫細胞により分泌され、免疫システムの機能範囲を制御する、様々なポリペプチド又はタンパク質を包含し、かつケモカインなどの低分子量のサイトカインも包含する。用語「サイトカイン」は、脂肪細胞により分泌され、例えば、体重の制御、血球新生、血管新生、創傷治癒、インスリン抵抗性、免疫応答、及び炎症応答において機能するサイトカイン群を含むアディポサイトカインも包含する。サイトカインは、疾患、調節不全、又は機能不全のバイオマーカーとして利用することもできる。

10

【0073】

[0074]ある種の態様では、サンプル中の、TNF- α 、TNFに関連するアポトーシスの弱い誘導因子 (TWEAK)、破骨細胞形成抑制因子 (OPG)、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1ra)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R)、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-23、及び IL-27 が挙げられるがこれらに限定されない、少なくとも 1 種のサイトカインの有無及びレベルが、評価される。ある種の他の態様では、サンプル中の、例えば、CXCL1/GRO1/GRO α 、CXCL2/GRO2、CXCL3/GRO3、CXCL4/PF-4、CXCL5/ENA-78、CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、CXCL9/MIG、CXCL10/IP-10、CXCL11/I-TAC、CXCL12/SDF-1、CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15、CXCL16、CXCL17/DMC、CCL1、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1 α 、CCL4/MIP-1 β 、CCL5/RANTES、CCL6/C10、CCL7/MCP-3、CCL8/MCP-2、CCL9/CCL10、CCL11/エオタキシン、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14/HCC-1、CCL15/MIP-5、CCL16/LEC、CCL17/TARC、CCL18/MIP-4、CCL19/MIP-3 β 、CCL20/MIP-3 α 、CCL21/SLC、CCL22/MDC、CCL23/MPIF1、CCL24/エオタキシン-2、CCL25/TECK、CCL26/エオタキシン-3、CCL27/CTACK、CCL28/MEC、CL1、CL2、及び CX₃CL1 などの少なくとも 1 種のケモカインの有無又はレベルが評価される。

20

30

【0074】

[0075]ある種の更なる態様では、サンプル中の、レプチン、アディポネクチン、レジスチン、プラスミノーゲン活性化因子阻害因子-1 (PAI-1) の活性又は総量、ビスファチン、及びレチノール結合タンパク質 4 (RBP4) が挙げられるがこれらに限定されない、少なくとも 1 種のアディポサイトカインの有無又はレベルが評価される。

40

【0075】

[0076]他の例では、本発明の方法及びシステムを利用して、サンプル中の 1 種以上の増殖因子の有無又はレベルを評価できる。本明細書で使用する時、用語「増殖因子」には、細胞の増殖及び / 又は細胞の分化を刺激することのできる様々なペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質が包含される。

【0076】

[0077]ある種の態様では、サンプル中の、上皮増殖因子 (EGF)、ヘパリン結合上皮

50

増殖因子 (H B - E G F)、血管内皮増殖因子 (V E G F)、色素上皮由来因子 (P E D F ; S E R P I N F 1 としても既知)、アンフィレギュリン (A R E G ; シュワン腫由来増殖因子 (S D G F) としても既知)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F)、肝細胞増殖因子 (H G F)、トランスフォーミング増殖因子 - α (T G F - α)、トランスフォーミング増殖因子 - β (T G F - β)、骨形成タンパク質 (例えば、B M P 1 - B M P 1 5)、血小板由来増殖因子 (P D G F)、神経増殖因子 (N G F)、 β - 神経増殖因子 (β - N G F)、神経栄養因子 (例えば、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、ニューロトロフィン 3 (N T 3)、ニューロトロフィン 4 (N T 4) など)、増殖分化因子 - 9 (G D F - 9)、顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F)、ミオスタチン (G D F - 8)、エリスロポエチン (E P O)、及びトロンボポエチン (T P O) が挙げられるがこれらに限定されない少なくとも 1 種の増殖因子の有無又はレベルが評価される。一態様では、E G F、V E G F、P E D F、アンフィレギュリン (S D G F)、及び / 又は B D N F の有無又はレベルが評価される。

【0077】

[0078] 様々な反応速度結合パラメーターを評価できる。そのようなパラメーターとしては、例えば、結合反応速度パラメーター (例えば、会合速度、 k_{on} ; 解離速度、 k_{off} ; 及び親和定数、 K_a) が挙げられる。これらのパラメーターを利用して、例えば、受容体 - リガンド相互作用、酵素 - 基質相互作用、タンパク質 - 核酸相互作用、タンパク質 - 抗体相互作用、及びタンパク質 - タンパク質相互作用などの、直接的な分子間相互作用を確認及び測定することができる。

【0078】

[0079] 増幅されたシグナルを検出する工程は、蛍光を読み取り、蛍光強度を、患者サンプル中の標的検体成分のレベル (例えば、量、有無、濃度) と相関させることを含む。この工程には、マイクロキャリアを特定することを包含させることもできる。いくつかの実施形態では、蛍光検出は、限定するものではないが C C D 又は C - M O S 光センサーなどの光学センサーを利用して実施される。

【0079】

[0080] 当業者であれば、多重化アッセイ工程の (a) ~ (c) が、1 種以上の特異的な標的検体成分を検出するような方法で実施されることを認識されるであろう。例えば、本発明の多重アッセイは、少なくとも 2 種類の異なる標的検体成分のレベルを測定する。

【0080】

[0081] いくつかの実施形態では、本発明の方法は、ダイナミック多重検体成分法 (Dynamic Multi-Analyte Technology) (D M A T) 装置 (B i o c a r t i s , M e c h e l e n , B e l g i u m) などのマイクロ流体装置で実施される。

【0081】

A . 検体成分検出アッセイ

[0082] 単検出アッセイ及び近接二重検出アッセイについての詳細は、例えば、米国特許第 8 , 1 6 3 , 4 9 9 号に見ることができ、当該出願は、全ての目的に関しその全容が参照により本明細書に援用される。

【0082】

1 . 一重検出アッセイ

[0083] いくつかの実施形態では、本アッセイは、代謝疾患、又は脳の認知障害、神経疾患 / 障害及び / 若しくは心の健康に係る障害、又は癌に係る対象とする検体成分など、細胞抽出物中の、対象とする活性化状態の特定の検体成分 (例えば、シグナル伝達分子又は神経変性分子) を検出するためのものである。ある種の例では、固形腫瘍の循環細胞などの腫瘍細胞内部のものを検体成分とすることができる。非常に有利なことに、本発明は、優れたダイナミックレンジを備えた多重ハイスループット 2 抗体アッセイを提供する。非限定例として、アッセイに使用する 2 種類の抗体は、(1) 検体成分に特異的な捕捉抗体 ; 及び (2) 活性化形態の検体成分に特異的な検出抗体 (すなわち、活性化状態に依存する抗体) から構成され得る。活性化状態に依存する抗体は、例えば、検体成分の

10

20

30

40

50

リン酸化、ユビキチン化、及び／又は複合体状態を検出することのできるものである。あるいは、検出抗体は、細胞抽出物中の検体成分の総量を検出する、活性化状態に依存しない抗体を含む。活性化状態に依存しない抗体は、概して、活性化及び非活性化形態の検体成分の両方を検出することができる。

【 0 0 8 3 】

[0084]好ましい実施形態では、2抗体アッセイは、(i)細胞抽出物を、捕捉抗体の複数の希釈系列とともにインキュベートして、複数の捕捉された検体成分を生成することと、(i i)複数の捕捉された検体成分を、対応する検体成分に特異的な、活性化状態に依存する抗体とともにインキュベートして、検出可能な、捕捉された複数の検体成分を生成することと；(i i i)検出可能な、捕捉された複数の検体成分を、シグナル増幅対の第1及び第2のメンバーとともにインキュベートして、増幅されたシグナルを生成することと；(i v)シグナル増幅対の第1及び第2のメンバーから生成された、増幅されたシグナルを検出することと、を含む。

10

【 0 0 8 4 】

[0085]本明細書に記載の2抗体アッセイは、典型的には、マイクロキャリア表面に結合させた捕捉抗体の濃度の範囲で、複数の異なる捕捉抗体を含む、抗体ベースのアレイである。

【 0 0 8 5 】

[0086]捕捉抗体及び検出抗体は、好ましくは、検体成分の結合において競合が最低限に抑えられるように選択される（すなわち、捕捉及び検出抗体は、それらの対応するシグナル伝達分子又は神経変性分子に同時に結合することができる）。

20

【 0 0 8 6 】

[0087]そのため、一実施形態では、本発明は、サンプルに対し多重化免疫アッセイを実施する方法を提供し、本方法は、

(a)コード化されたマイクロキャリアに固定されている、少なくとも1種の検体成分に対し特異的である複数の捕捉抗体に、細胞可溶化物を接触させて、複数の捕捉された検体成分を生成することと、

(b)複数の捕捉された検体成分を、対応する検体成分に特異的である少なくとも1種の検出抗体と接触させて、検出可能な、捕捉された複数の検体成分を生成することと〔ここで、少なくとも1種の検出抗体は、シグナル増幅対の第1のメンバーを有する〕；

30

(c)検出可能な、捕捉された複数の検体成分を、シグナル増幅対の第2のメンバーと接触させて、増幅されたシグナルを生成することと；

(d)シグナル増幅対の第1及び第2のメンバーから生成された、増幅されたシグナルを検出することと、を含む。

【 0 0 8 7 】

[0088]ある種の態様では、検出抗体は、少なくとも1種の検体成分に特異的なシグナル増幅対の第1のメンバーで標識した複数の検出抗体から構成される検出抗体を1種含む。促進部分は、シグナル増幅対の第1のメンバーと反応する酸化剤を生成する。ある種の態様では、促進部分はグルコースオキシダーゼ(G O)である。G Oには、デキストランなどの基質が結合し得るが、抗体は結合しない。複数のG O部分をデキストランに結合させることができる。

40

【 0 0 8 8 】

[0089]一実施形態では、検出抗体は結合対の第1メンバー（例えば、ビオチン）を含み、シグナル増幅対の第1のメンバーは、結合対の第2のメンバー（例えば、ストレプトアビジン）を含む。結合対のメンバーには、当業界で周知の方法を利用して、検出抗体又はシグナル増幅対の第1のメンバーを直接的に又は間接的に結合させることができる。ある種の例では、シグナル増幅対の第1のメンバーは、ペルオキシダーゼ（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(H R P)、カタラーゼ、クロロペルオキシダーゼ、シトクロム c ペルオキシダーゼ、好酸球ペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、脱ヨード酵素など）

50

であり、及びシグナル増幅対の第2のメンバーは、チラミド製剤（例えば、ビオチン - チラミド）である。

【0089】

[0090]あるいは、シグナル増幅対の第1のメンバーを、検出抗体に直接結合させることができる。ある種の例では、チラミド剤のペルオキシダーゼ酸化により、増幅されたシグナルが生じ、過酸化水素（ H_2O_2 ）の存在下で活性化チラミドが生成される。

【0090】

[0091]一態様では、過酸化水素（ H_2O_2 ）はインサイチュで生成される。例えば、グルコースオキシダーゼ（GO）などの促進部分は、抗体に結合させていない免疫アッセイに導入することができる。すなわち、GOは、デキストランなどの基質に結合させることができる。複数のGO部分をデキストランに結合させることができる。グルコースの存在下で、グルコースオキシダーゼは、シグナル増幅対の第1のメンバー（例えば、HRP）と反応する過酸化水素などの酸化剤を生じる。

【0091】

[0092]活性化チラミドは直接検出され、あるいは例えば、ストレプトアビジン標識されたフルオロフォア、又は、ストレプトアビジン標識されたペルオキシダーゼと発色剤とを組み合わせたもの、などのシグナル検出剤の添加により検出される。好適な本発明で利用するのに好適なフルオロフォアの例としては、Alexa Fluor（登録商標）dye（例えば、Alexa Fluor（登録商標）555、Alexa Fluor（登録商標）647）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、Oregon Green（商標）ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（TRITC）、CyDye（商標）fluor（例えば、Cy2、Cy3、Cy5）などが挙げられるがこれらに限定されない。当業界で周知の方法を利用して、ストレプトアビジン標識を、フルオロフォア又はペルオキシダーゼに直接的に又は間接的に結合させることができる。本発明で利用するのに好適な発色剤の非限定例としては、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）、3,3'-ジアミノベンジジン（DAB）、2,2'-アジノ-ビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS）、4-クロロ-1-ナフトール（4CN）、及び/又はポルフィリノーゲンが挙げられる。

【0092】

[0093]別の実施形態では、本発明は、上記の2抗体アッセイを実施するためのキットを提供し、キットは、（a）マイクロキャリアに固定された、複数の捕捉抗体の希釈系列；及び（b）複数の検出抗体（例えば、活性化状態に依存しない抗体及び/又は活性化状態に依存する抗体）を含む。いくつかの例では、キットは、キットを使用して固形腫瘍の循環細胞の複数のシグナル伝達分子の活性化状態を検出する方法についての使用説明書を更に含有し得る。キットには、本発明の特異的な方法を実施する観点から、上記のもの他に追加の試薬を含有させてもよく、例えば、シグナル増幅対の第1及び第2のメンバー、チラミドシグナル増幅剤、GOデキストラン、洗浄緩衝液などを含有させてもよい。

【0093】

[0094]2抗体アプローチの別の実施形態では、本発明は、切断された受容体（truncated receptor）の有無を検出する方法を提供し、本方法は（a）細胞抽出物を、細胞外ドメイン（ECD）結合領域に特異的な複数のピーズとともにインキュベートすることと[ECD結合領域は完全長の受容体に特異的なものである]；（b）細胞抽出物から複数のピーズを取り除くことにより、完全長の受容体を除去して、完全長の受容体を含まない細胞抽出物を生成することと；（c）この完全長の受容体を含まない細胞抽出物を複数の捕捉抗体とともにインキュベートすることと[複数の捕捉抗体は、この切断された受容体の細胞内ドメイン（ICD）結合領域に特異的なものであり、かつこの複数の捕捉抗体は固体支持体に固定されており、複数の捕捉された切断された受容体を生じる]；（d）複数の捕捉された切断型受容体を、対応する切断型受容体に特異的な検出抗体とともにインキュベートして、複数の、検出可能な、捕捉された切断された受容体を生じさせることと；（

e) 複数の、検出可能な、捕捉された切断された受容体をシグナル増幅対の第1及び第2のメンバーとともにインキュベートして、増幅されたシグナルを生成することと；(f) シグナル増幅対の第1及び第2のメンバーから生成された増幅されたシグナルを検出することと、を含む。

【0094】

[0095]ある種の実施形態では、切断された受容体はp95 ErbB2であり、完全長の受容体はErbB2(HER-2)である。ある種の他の態様では、細胞外ドメイン(ECD)結合領域に特異的な複数のピーズは、ストレプトアビジン-ビオチン対を含み、ビオチンはピーズに結合しており、かつビオチンは抗体(例えば、この抗体は完全長の受容体のECD結合領域に特異的なものである)に結合している。

10

【0095】

[0096]本発明は、2抗体アプローチの別の実施形態では、切断されたタンパク質の有無を検出する方法を提供し、方法は(a)細胞抽出物を、完全長のタンパク質に特異的な複数のピーズとともにインキュベートすることと；(b)細胞抽出物から複数のピーズを取り除くことにより、完全長のタンパク質を除去して、完全長の受容体を含まない細胞抽出物を生成することと；(c)この完全長のタンパク質を含まない細胞抽出物を複数の捕捉抗体とともにインキュベートすることと[複数の捕捉抗体は、切断されたタンパク質に特異的なものであり、かつこの複数の捕捉抗体は、マイクロキャリアに固定されており、複数の捕捉された切断されたタンパク質を生じる]；(d)複数の捕捉された切断されたタンパク質を、対応する切断されたタンパク質に特異的な検出抗体とともにインキュベートして、複数の、検出可能な、捕捉された切断されたタンパク質を生じさせることと；(e)複数の、検出可能な、捕捉された切断されたタンパク質をシグナル増幅対の第1及び第2のメンバーとともにインキュベートして、増幅されたシグナルを生成することと；(f)シグナル増幅対の第1及び第2のメンバーから生成された増幅されたシグナルを検出することと、を含む。

20

【0096】

2. 近接二重検出アッセイ

[0097]いくつかの実施形態では、循環細胞などといった細胞の細胞抽出物中の、対象とする活性化状態の特定の検体成分(例えば、シグナル伝達分子、例えば、AMPK修飾因子、又は病理学的分子、例えば、タウ、Aβペプチド、など)を検出するためのアッセイは、優れたダイナミックレンジを備えた多重ハイスループット近接(すなわち、3抗体)アッセイである。非限定例として、近接アッセイに使用される3種の抗体には、(1)検体成分に特異的な捕捉抗体；(2)活性化形態の検体成分に特異的な検出抗体(すなわち、活性化状態に依存する抗体)；及び(3)検体成分の総量を検出する検出抗体(すなわち、活性化状態に依存しない抗体)を含ませることができる。活性化状態に依存する抗体は、例えば、検体成分のリン酸化、ユビキチン化、及び/又は複合体状態を検出することのできるものである。活性化状態に依存する抗体は、概して、活性化及び非活性化形態の検体成分を両方検出することができる。

30

【0097】

[0098]一実施形態では、近接アッセイは、

40

(i) 例えば、脳脊髄液由来の細胞抽出物を、タウタンパク質に対する捕捉抗体の複数の希釈系列とともにインキュベートして、複数の捕捉されたタウタンパク質を生じさせることと；

(ii) 複数の捕捉されたタウタンパク質を、全てのタウタンパク質に対する複数の抗体(例えば、活性化状態に依存しない抗体)と、リン酸化タウタンパク質に対する複数の抗体(例えば、活性化状態に依存する抗体)とを含む検出抗体とともにインキュベートして、複数の、検出可能な、捕捉された活性化タウタンパク質成分を生じさせることと[全てのタウタンパク質に対する抗体は促進部分(例えば、グルコースオキシダーゼ)により標識され、リン酸化タウタンパク質に対する抗体はシグナル増幅対の第1のメンバー(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ)により標識され、かつ促進部分(例えば、グルコースオキ

50

シダーゼ)は、酸化剤を生成し、この酸化剤は、シグナル増幅対の第1のメンバーにチャネリングして、反応する]；

(iii)複数の、検出可能な、捕捉された活性化タウ検体成分を、シグナル増幅対の第2のメンバー(例えば、ビオチン-チラミド)とともにインキュベートして、増幅されたシグナルを生成することと；

(iv)シグナル検出剤としてストレプトアビジン-Alexa Fluor(登録商標) dyeを利用して、西洋ワサビペルオキシダーゼ及びビオチン-チラミドから生じた増幅されたシグナルを検出することと、を含む。

【0098】

[0099]好ましい実施形態では、近接アッセイは、(i)細胞抽出物を、捕捉抗体の複数の希釈系列とともにインキュベートして、複数の捕捉された検体成分を生成することと；

(ii)複数の捕捉された検体成分を、対応する検体成分に特異的な、活性化状態に依存しない複数の抗体と活性化状態に依存する複数の抗体とを含む検出抗体とともにインキュベートして、検出可能な、捕捉された複数の検体成分を生成することと[活性化状態に依存しない抗体は促進部分により標識され、活性化状態に依存する抗体はシグナル増幅対の第1のメンバーにより標識され、促進部分は酸化剤を生じさせ、この酸化剤は、シグナル増幅対の第1のメンバーにチャネリングして、反応する]；(iii)検出可能な、捕捉された複数の検体成分を、シグナル増幅対の第2のメンバーとともにインキュベートして、増幅されたシグナルを生成することと；(iv)シグナル増幅対の第1及び第2のメンバーから生成された、増幅されたシグナルを検出することと、を含む。

【0099】

[0100]あるいは、活性化状態に依存する抗体を促進部分により標識することができ、活性化状態に依存しない抗体をシグナル増幅対の第1のメンバーにより標識することができる。

【0100】

[0101]捕捉抗体、活性化状態に依存しない抗体、及び活性化状態に依存する抗体は、好ましくは、検体成分への結合において競合が最低限に抑えられるように(すなわち、全ての抗体は、それらの対応するシグナル伝達分子に同時に結合することができる)選択されるのが好ましい。

【0101】

[0102]いくつかの実施形態では、活性化状態に依存しない抗体は、検出可能な部分を更に含む。このような例では、検出可能な部分の量は、細胞抽出物中の1以上の検体成分の量に相当する。検出可能な部分の例としては、蛍光標識、化学反応性標識、酵素標識、放射性標識などが挙げられるがこれらに限定されない。好ましくは、検出可能な部分は、Alexa Fluor(登録商標) dye(例えば、Alexa Fluor(登録商標) 647)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、Oregon Green(商標)；ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート(TRITC)、CyDye(商標) fluor(例えば、Cy2、Cy3、Cy5)などのフルオロフォアである。当業界で周知の方法を利用して、検出可能な部分を、活性化状態に依存しない抗体に直接的に又は間接的に結合させることができる。

【0102】

[0103]ある種の例では、活性化状態に依存しない抗体は、促進部分により直接的に標識される。当業界で周知の方法を利用して、促進部分を、活性化状態に依存しない抗体に結合させることができる。本発明で利用するのに好適な促進部分としては、酸化剤を生成することのできる任意の分子が挙げられ、この酸化剤は、促進部分に近接する(すなわち、空間的に近い又は近傍にある)別の分子にチャネリングして(すなわち、指向して)、及び反応する(すなわち、結合する、結合される、又は一緒に複合体を形成する)ものである。促進部分の例としては、酵素、例えば、グルコースオキシダーゼ、又は、電子受容体として酸素分子(O_2)が関与する酸化/還元反応を触媒する任意のその他の酵素、などの酵素、並びに光増感剤、例えば、メチレンブルー、ローズベンガル、ボルフィリン、ス

10

20

30

40

50

クアレート染料、フタロシアニンなどが挙げられるが、これらに限定されない。酸化剤の非限定例としては、過酸化水素 (H_2O_2)、一重項酸素、及び酸化/還元反応において、酸素原子を伝達する、又は、電子を得る、任意のその他の化合物が挙げられる。好ましくは、好適な基質 (例えば、グルコース、光など) の存在下で、促進部分 (例えば、グルコースオキシダーゼ、光増感剤など) は、酸化剤 (例えば、過酸化水素 (H_2O_2)、一重項酸素など) を生じ、この酸化剤は、2つの部分が互いに近接したときに、シグナル増幅対の第1のメンバー (例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、保護基により保護されているハプテン、酵素阻害剤にチオエーテル結合させることにより不活性化させた酵素など) にチャネリングして、反応する。

【0103】

[0104] 他のある種の例では、活性化状態に依存しない抗体は、活性化状態に依存しない抗体に複合させたオリゴヌクレオチドリンカーと、促進部分に複合させた相補的なオリゴヌクレオチドリンカーとの間のハイブリダイゼーションを介し、間接的に促進部分により標識される。当業界で周知の方法を利用して、オリゴヌクレオチドリンカーを、促進部分又は活性化状態に依存しない抗体に結合させることができる。いくつかの実施形態では、促進部分を複合させたオリゴヌクレオチドリンカーは、活性化状態に依存しない抗体を複合させたオリゴヌクレオチドリンカーと100%の相補性を有する。その他の実施形態では、オリゴヌクレオチドリンカー対は、例えば、厳密なハイブリダイゼーション条件下でのハイブリダイゼーション時に、少なくとも1、2、3、4、5、又は6以上のミスマッチ領域を有する。当業者であれば、異なる検体成分に特異的である、活性化状態に依存しない抗体を、同じオリゴヌクレオチドリンカー又は異なるオリゴヌクレオチドリンカーのいずれかに結合させることができることを認識されるであろう。

【0104】

[0105] 促進部分又は活性化状態に依存しない抗体に複合したオリゴヌクレオチドリンカーの長さは、変更することができる。概して、リンカー配列は、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、又は100ヌクレオチドの長さとすることができる。典型的には、カップリングのためにランダム核酸配列が生成される。非限定例として、連続する3つの異なるドメイン：スパーサードメイン；シグネチャードメイン；及び複合ドメイン、を有する、オリゴヌクレオチドリンカーのライブラリを設計することができる。好ましくは、オリゴヌクレオチドリンカーは、促進部分の機能を損なわずに、又はそれらを複合させる、活性化状態に依存しない抗体の機能を損なわずに、効率的に結合するよう設計する。

【0105】

[0106] オリゴヌクレオチドリンカー配列は、様々なアッセイ条件下での任意の副次的な構造体の形成を防止又は最小限に抑えるよう設計することができる。典型的には、リンカー内部の各断片が、アッセイ法全体において関与するように、それらの融解温度を注意深くモニターする。概して、リンカー配列断片の溶解温度は、1~10である。既定のイオン濃度下で、溶解温度、二次構造、及びヘアピン構造を測定するためのコンピュータアルゴリズム (例えば、OLIGO 6.0) を使用して、各リンカー内の3つの異なるドメインのそれぞれを分析することができる。結合配列を、全体的に、構造特性、並びに、その他の複合オリゴヌクレオチドリンカー配列に対する類似性、例えば、厳密な条件下で相補的なオリゴヌクレオチドリンカーにハイブリダイズするかについて分析することもできる。

【0106】

[0107] オリゴヌクレオチドリンカーのスパーサー領域により、オリゴヌクレオチド架橋部分と複合ドメインが十分な距離を保つ。複合ドメインは、相補的なオリゴヌクレオチドリンカー配列により標識されている分子を、核酸ハイブリダイゼーションにより複合ドメインに結合させるよう機能する。核酸により介在されるハイブリダイゼーションは、抗体-検体成分 (すなわち、抗原) 複合体形成の前又は後のいずれかに実施することができ、より柔軟なアッセイフォーマットを提供する。多くの直接的に抗体を複合させる方法とは

異なり、抗体又はその他の分子に対し比較的小さなオリゴヌクレオチドを結合させることで、標的検体成分に対する抗体の特異的親和性に対する影響、又は、複合分子の機能に対する影響が最小限に抑えられる。

【0107】

[0108]いくつかの実施形態では、複雑な多重化タンパク質アッセイにおいて、オリゴヌクレオチドリンカーのシグネチャー配列ドメインを使用することができる。複数の抗体を、異なるシグネチャー配列を有するオリゴヌクレオチドリンカーと複合させることができる。多重免疫アッセイにおいて、適切なプローブで標識したレポーターオリゴヌクレオチド配列を利用して、多重アッセイフォーマットで抗体及びそれらの抗原の交差反応性を検出することができる。

10

【0108】

[0109]幾つかの異なる方法を利用して、オリゴヌクレオチドリンカーを抗体又はその他の分子に複合させることができる。例えば、5'又は3'末端のいずれかにチオール基を備えるオリゴヌクレオチドリンカーを合成できる。チオール基は還元剤（例えば、TCEP-HCl）により脱保護することができ、得られたリンカーは、脱塩スピンカラムを利用することで精製できる。これにより得られる脱保護されたオリゴヌクレオチドリンカーは、SMCCなどのヘテロ二官能性の架橋リンカーを利用して、抗体又はその他の種類のタンパク質の一級アミンに複合させることができる。あるいは、オリゴヌクレオチド上の5'リン酸基を、水溶性カルボジイミドEDCにより処理して、リン酸エステルを形成させることができ、続いてアミン含有分子に結合させることができる。ある種の例では、3'リボース残基上のジオールをアルデヒド基へと酸化させた後、還元的アミノ化により、抗体又はその他の種類のタンパク質のアミノ基に複合させることができる。他のある種の例では、3'又は5'末端のいずれかにビオチン修飾を施し、ストレプトアビジン標識された分子に複合させることにより、オリゴヌクレオチドリンカーを合成できる。

20

【0109】

[0110]オリゴヌクレオチドリンカーは、Usman et al., J. Am. Chem. Soc., 109:7845 (1987); Scaringe et al., Nucleic Acids Res., 18:5433 (1990); Wincott et al., Nucleic Acids Res., 23:2677~2684 (1995); 及び Wincott et al., Methods Mol. Bio., 74:59 (1997) に記載のものなどの当業界で既知の様々な手法のいずれかを利用して合成できる。概して、オリゴヌクレオチドの合成は、5'末端のジメトキシトリチル及び3'末端のホスホルアミダイトなどの、一般的な核酸保護基及びカップリング基を利用する。オリゴヌクレオチド合成に好適な試薬、核酸脱保護法、及び核酸精製法は、当該技術分野において既知である。

30

【0110】

[0111]ある種の例では、活性化状態に依存する抗体は、シグナル増幅対の第1のメンバーにより直接的に標識される。当業界で周知の方法を利用して、シグナル増幅対のメンバーを、活性化状態に依存する抗体に結合させることができる。他のある種の例では、活性化状態に依存する抗体は、活性化状態に依存する抗体に複合させた結合対の第1メンバーと、シグナル増幅対の第1のメンバーに複合させた結合対の第2のメンバーとの結合を介し、シグナル増幅対の第1のメンバーにより間接的に標識される。当業界で周知の方法を利用して、結合対のメンバー（例えば、ビオチン/ストレプトアビジン）を、シグナル増幅対のメンバー又は活性化状態に依存する抗体に結合させることができる。シグナル増幅対のメンバーの例としては、限定するものではないが、ペルオキシダーゼ、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、カタラーゼ、クロロペルオキシダーゼ、シトクロムcペルオキシダーゼ、好酸球ペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、脱ヨード酵素などが挙げられる。シグナル増幅対のメンバーのその他の例としては、保護基により保護されたハプテン、及び、酵素阻害剤に対するチオエーテル結合により不活性化させた酵素、

40

50

などが挙げられる。

【0111】

[0112]近接チャネリングの一例では、促進部分はグルコースオキシダーゼ（GO）であり、シグナル増幅対の第1のメンバーは西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）である。GOをグルコースなどの基質と接触させると、酸化剤（すなわち、過酸化水素（ H_2O_2 ））が生じる。HRPがGOの近接するチャネリング内に存在する場合、GOにより生成された H_2O_2 はHRPへチャネリングして、HRP- H_2O_2 複合体を形成し、この複合体は、シグナル増幅対の第2のメンバー（例えば、ルミノール若しくはイソルミノールなどの化学発光基質、又は、チラミド（例えば、ピオチン-チラミド）、ホモバニリン酸、又は4-ヒドロキシフェニル酢酸などの蛍光発生基質）の存在下で増幅されたシグナルを生成する。近接アッセイにおいてGO及びHRPを利用する方法は、例えば、Langry et al., U.S. Dept. of Energy Report No. UCRL-ID-136797 (1999)に記載されている。ピオチン-チラミドをシグナル増幅対の第2のメンバーとして利用するとき、HRP- H_2O_2 複合体が、チラミドを酸化して反応性チラミドラジカルを生成し、これが近くの求核性残基に共有結合する。活性化チラミドは、直接検出され、あるいはシグナル検出剤、例えば、ストレプトアビジン標識されたフルオロフォア、又は、ストレプトアビジン標識されたペルオキシダーゼと発色剤とを組み合わせたものなど、の添加により検出される。本発明で利用するのに好適なフルオロフォアの例としては、Alexa Fluor（登録商標）dye（例えば、Alexa Fluor（登録商標）555、Alexa Fluor（登録商標）647など）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、Oregon Green（商標）；ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（TRITC）、CyDye（商標）fluor（例えば、Cy2、Cy3、Cy5）などが挙げられるがこれらに限定されない。当業界で周知の方法を利用して、ストレプトアビジン標識を、フルオロフォア又はペルオキシダーゼに直接的に又は間接的に結合させることができる。本発明で利用するのに好適な発色剤の非限定例としては、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMB）、3, 3'-ジアミノベンジジン（DAB）、2, 2'-アジノ-ビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS）、4-クロロ-1-ナフトール（4CN）、及び/又はボルフィリノーゲンが挙げられる。

【0112】

[0113]近接チャネリングの別の例では、促進部分は光増感剤であり、シグナル増幅対の第1のメンバーは複数のハプテンにより標識された大型分子であり、ここで、複数のハプテンは、特異的な結合パートナー（例えば、リガンド、抗体など）に対するハプテンの結合を防ぐ保護基により保護されている。例えば、保護されたピオチン、クマリン、及び/又はフルオレセイン分子により標識されたデキストラン分子をシグナル増幅対メンバーとすることができる。好適な保護基としては、フェノキシ-、アナリノ-、オレフィン-、チオエーテル-、及びセレノエーテル-保護基を挙げられるがこれらに限定されない。本発明の近接アッセイに好適なその他の光増感剤及び保護ハプテン分子は、米国特許第5, 807, 675号に記載されている。光増感剤が光により励起されると、酸化剤（すなわち、一重項酸素）が生成される。ハプテン分子が、光増感剤に近接するチャネリング内に存在する場合、光増感剤により生成された一重項酸素は、ハプテンの保護基上のチオエーテルのもとにチャネリングされ、これと反応し、カルボニル基（ケトン又はアルデヒド）及びスルフィン酸を生成し、ハプテンから保護基を遊離させる。保護の外れたハプテンは、次に、シグナル増幅対の第2のメンバー（例えば、検出可能なシグナルを生成し得る、特異的な結合パートナー）に特異的に結合できる。例えば、ハプテンがピオチンであるとき、特異的な結合パートナーは標識されたストレプトアビジンであり得る。酵素の例としては、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、HRPなどが挙げられる。未結合の試薬を洗浄し除去した後、酵素により検出可能な（例えば、蛍光、化学発光、発色など）基質を添加することにより、検出可能なシグナルを生成し、好適な方法及び当該技術

分野で既知の計測手段により検出することができる。あるいは、チラミドシグナルの増幅により、検出可能なシグナルを増幅させて、活性化チラミドを直接的に検出することができ、あるいは上記のシグナル検出剤の添加により検出することができる。

【0113】

[0114]近接チャネリングの更に別の例では、促進部分は光増感剤であり、シグナル増幅対の第1のメンバーは酵素-阻害剤複合体である。酵素及び阻害剤（例えば、ホスホン酸標識されたデキストラン）は、開裂可能なリンカー（例えば、チオエーテル）によりともに結合される。光増感剤が光により励起されると、酸化剤（すなわち、一重項酸素）が生成される。酵素-阻害剤複合体が、光増感剤に近接するチャネル内に存在する場合、光増感剤により生成された一重項酸素は、開裂可能なリンカーのもとにチャネリングされ、これと反応し、酵素を活性化させることにより酵素から阻害剤を遊離させる。酵素基質を添加して、検出可能なシグナルを生成し、あるいは、増幅試薬を添加して増幅されたシグナルを生成する。

10

【0114】

[0115]近接チャネリングの更なる例では、促進部分がHRPであり、シグナル増幅対の第1のメンバーは上記の通り、保護されたハプテン又は酵素-阻害剤複合体であり、保護基はp-アルコキシフェノールを含む。フェニレンジアミン及びH₂O₂の添加は、反応性フェニレンジイミンを生成し、この分子は保護されたハプテン又は酵素-阻害剤複合体のもとにチャネリングされ、p-アルコキシフェノール保護基と反応し、露出したハプテン又は反応性酵素を生成する。増幅されたシグナルは、上記（例えば、米国特許第5,532,138号及び米国特許第5,445,944号）の通りに生成され検出される。

20

【0115】

[0116]別の実施形態では、本発明は、上記の近接アッセイを実施するためのキットを提供し、キットは、(a)マイクロキャリア上に固定された複数の捕捉抗体の希釈系列と；(b)複数の検出抗体（例えば、活性化状態に依存しない抗体及び活性化状態に依存する抗体）とを含む。いくつかの例では、キットには、固形腫瘍の循環細胞に関する複数のシグナル伝達分子の活性化状態を検出するために、本キットの使用法についての使用説明書を、更に含有させることができる。キットには、本発明の特異的な方法の実施のため、例えば、シグナル増幅対の第1及び第2のメンバー、チラミドシグナル増幅剤、促進部分のための基質、洗浄緩衝液などの上記の任意の追加の試薬を含有させてもよい。

30

【0116】

B. マイクロキャリア

[0117]本発明の、上記の検体成分捕捉及び検出アッセイでは、特に捕捉抗体がマイクロキャリアに結合される。本発明に有用なマイクロキャリアについての詳細は、例えば、国際公開第WO 2012/106827号及び米国特許第2011/0306506号及び米国特許第2013/0095574号に記載されており、当該出願は、全ての目的に関しその全容が参照により本明細書に援用される。

【0117】

[0118]ある種の態様では、提供されるマイクロキャリアは、球状、ウエハー状、正方形、ディスク形、矩形、円形、三角形、六角形、又は多角形の形状の固体支持体である。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの高さは、実施形態の幅及び高さのいずれよりも小さい。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアは、上部と下部のそれぞれに、本質的に平行でかつ本質的に平坦な表面を有する。

40

【0118】

[0119]いくつかの実施形態では、マイクロキャリアは、円形の形状の検出表面を備えるディスク様の形状（例えば、ウエハー形状）を有する。いくつかの例では、マイクロキャリアの本体は、コード化されたマイクロキャリアの検出面を平面に向かい合わせて平面上に配置するとき、平面と検出面との間に確実に隙間が存在するように、少なくとも本体から突き出ている間隔部材を有している。

【0119】

50

[0120]いくつかの実施形態では、ディスク様形状の直径は、約 1 ~ 約 300 μm 、例えば、1、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、又は300 μm などである。

【0120】

[0121]マイクロキャリアは、マイクロキャリア中を横切る孔を構成し得るデジタルコードなどのコードにより識別可能である。一組（例えば、一群）のマイクロキャリアは、同じコードを備え、かつ同一の機能を有する個々のマイクロキャリアから構成される。マイクロキャリアの2つの異なるセットは、異なる機能及び異なるコードを有してもよい。

【0121】

[0122]コードは、検出面を含むマイクロキャリアの全厚を貫き横切る任意のパターンの孔であってよい。いくつかの例では、コードは、三角形又はL形状のサインなどの非対称の方向マークも包含する。

【0122】

[0123]いくつかの実施形態では、コードは、読み取る（イメージングする）ことにより測定される。コードは、一般的なイメージング及びデコーディング法を利用して特定できる。コードは、マイクロキャリアの機能を特定するために好ましく利用される。

【0123】

[0124]いくつかの実施形態では、1組のマイクロキャリアは、特定の検体成分を捕捉及び/又は検出するなどの同じ機能を有する。例えば、1組のマイクロキャリアは、特定の対象とする検体成分と関係する、コード化された複数の個々のマイクロキャリアから構成される。ある種の態様では、マイクロキャリアの機能は、表面に結合させた捕捉抗体又は捕捉リガンドの特定に対応する。

【0124】

[0125]マイクロキャリアは、ハイスループットのスクリーニング法及び診断法に常用される任意の材料から作成できる。これらの材料の非限定例としては、ラテックス、ポリスチレン、架橋されたデキストラン、ポリメチルスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、セルロース、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、フッ化エチレン-プロピレン、並びにマイクロファブリケーション又はマイクロミリングで一般に利用される材料、例えば、ガラス、 SiO_2 、シリコン、PMMA（ポリメチルメタクリレート）、金、銀、アルミニウム、スチール、又はその他の金属など、あるいはエポキシ系感光剤、例えば、SU-8などが挙げられる。マイクロキャリアは、任意の形状及び大きさであってよい。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアはシリコン製である。

【0125】

[0126]マイクロキャリアは、本発明の1種以上の捕捉抗体によりバイオ機能化することができる。任意の既知の方法を利用して、捕捉抗体をマイクロキャリアに結合させることができる。

【0126】

C. 診断システム

[0127]本明細書に提供される診断システムでは、コード化されたマイクロキャリアが、マイクロ流体機器のアッセイ装置のマイクロチャンネルに配置される。いくつかの実施形態では、マイクロチャンネルは、少なくとも1組以上のマイクロキャリアを含む反応チャンバとして提供される。典型的には、マイクロキャリアにより放出される蛍光を検出可能にするため、マイクロチャンネルの少なくとも一面は透明にする。いくつかの実施形態では、マイクロ流体チャンネルは、透明な観察壁を有する。

【0127】

[0128]用語「マイクロ流体チャンネル」又は「マイクロチャンネル」は、約 1 ~ 約 500 μm 、好ましくは約 10 ~ 約 300 μm 、例えば、1、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、又は300 μm などの断面を備える閉鎖チャンネル（例えば、流体のための細長い経路）を指す。マイクロ流体チャンネルは、必ずしも真っ直ぐではなく、かつマイクロ流体チ

チャンネル内で誘導される流体方向に一致する長手方向を有する。その方向が、流体の平均速度ベクトルに一致し、これにより層流域にあると考えられる場合が、好ましい。

【0128】

[0129] マイクロチャンネルの全長にわたってマイクロキャリアが単層を形成し、確実にサンプルが最大数のマイクロキャリアを通過するようにマイクロキャリア周囲の容量を制限し、かつサンプルと試薬の流体が流動するあいだ、マイクロチャンネルの長さに沿ったマイクロキャリアの移動が制限されるように、マイクロチャンネルを設計する。

【0129】

[0130] マイクロチャンネルは、シリコン、SU-8（エポキシ系フォトレジスト）、ポリイミド（PI）、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、シリコーン、又はその他の熱可塑性エラストマー（TPE）、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、Teflon（PTFE）、熱可塑性エラストマー（TPE）、Vitrex PEEK（商標）、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニル（PVC）、ポリプロピレン（PP）、ポリエチレン（PE）、ポリスチレン（PS）、フッ化エチレン-プロピレン（FEP）、環状オレフィン（コ）ポリマー（COP若しくはCOC）、又はその他の熱可塑性ポリマー、石英、ガラス、又はプレート化（plateable）することのできる、例えば、ニッケル、銀、若しくは金などの金属、最も好ましくは透明なポリマーが挙げられる（including）がこれらに限定されない。

10

【0130】

[0131] アッセイ装置のマイクロキャリアは、マイクロチャンネルの断面形状に対して、少なくとも2つの任意のマイクロキャリアが、マイクロチャンネルの全長にわたって、互いに接触せずに、かつマイクロチャンネルの外周に接触せずに隣りあわせて配置することのできるような形状を有している。

20

【0131】

D. 検体成分

[0132] 細胞抽出物における発現（例えば、総量）レベル及び／又は活性（例えば、リン酸化）レベルについて調査することのできるシグナル伝達分子などの検体成分の非限定例としては、受容体チロシンキナーゼ、非受容体型チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナル伝達カスケード構成要素、核内ホルモン受容体、核内受容体コアクチベーター、核内受容体リプレッサー、リガンド、受容体、シグナル伝達カスケード構成要素、及びこれらの組み合わせが挙げられる。検体成分の更なる例としては、自己抗体、神経変性分子、及び病理学的分子が挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0132】

[0133] 一実施形態では、本発明の方法は、細胞抽出物中の、以下の検体成分：HER1、HER2、HER3、HER4、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、FLT-3、FLK-2、PDGR、c-KIT、INSR、IGF-IR、IGF-IR、IRR、CSF-IR、cMET、及びこれらの組み合わせのうちの少なくとも1種以上の有無、発現レベル（例えば、総量）及び／又は活性レベル（例えば、リン酸化レベル又は複合体形成）を測定することを含む。

【0133】

40

[0134] 別の実施形態では、本発明の方法は、細胞抽出物中の、以下の検体成分：AMP活性化タンパク質キナーゼ（AMPK）、AMPKキナーゼ（AMPKK）、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ（CAMKK）、LKB1、トランスフォーミング増殖因子-β-活性化キナーゼ1（TAK1）、AKT、アディポネクチン、レプチン、グルコース、その他のAMP調節因子、及びこれらの組み合わせのうちの少なくとも1種以上の有無、発現レベル（例えば、総量）及び／又は活性レベル（例えば、リン酸化レベル又は複合体形成）を測定することを含む。

【0134】

[0135] 更に別の実施形態では、本発明の方法は、自己抗体、例えば、GAD65自己抗体、インスリノーマ抗原2（IA-2）自己抗体、インスリン自己抗体（IAA）、亜鉛

50

トランスポータータンパク質 8 (Z n T 8) 自己抗体、及びこれらの組み合わせなどのうちの少なくとも 1 種以上の有無及び / 又は発現レベル (例えば、総量) を測定することを含む。

【 0 1 3 5 】

[0136] グルタミン酸脱炭酸酵素 6 5 (G A D 6 5) は、神経細胞の酵素であり、 γ -アミノ酪酸 (G A B A) の合成に關与する。これまでに、G A D 6 5 自己抗体は、1 型糖尿病に關係する自己免疫疾患のバイオマーカーとして使用できることが示されている (A t k i n s o n e t a l . , L a n c e t , 3 3 5 : 1 3 5 7 ~ 6 0 (1 9 9 0)) 。更に、1 型糖尿病の予想には、G A D 6 5 、 I A - 2 、 I A A 、 Z n T 8 自己抗体が提案されている (M u e l l e r e t a l . , C l i n i c a l L a b o r a t o r y N e w s , 3 6 (1 0) , O c t o b e r 2 0 1 0 ; B i n g l e y , P J . , J . C l i n . E n d o c r i n o l . M e t a b . , 9 5 (1) : 2 5 ~ 3 3 (2 0 1 0)) 。

10

【 0 1 3 6 】

[0137] 別の実施形態では、本発明の方法は、細胞抽出物中の、以下の検体成分：タウ、アミロイドベータ (A β) ペプチド (例えば、 β -アミロイドタンパク質 4 2) 、可溶性アミロイド前駆体タンパク質 β (s A P P β) 、 V I L I P - 1 、及びこれらの組み合わせのうち少なくとも 1 種以上の有無、発現レベル (例えば、総量) 及び / 又は活性レベル (例えば、リン酸化レベル又は複合体形成) を測定することを含む。 β -アミロイドタンパク質 4 2 (A β 4 2) 、 s A P P β 、全タウタンパク質、及びリン酸化タウなどの幾つかの検体成分の濃度は、アルツハイマー病と関連付けられている。

20

【 0 1 3 7 】

[0138] 特定の実施形態では、本発明は、多重アッセイにおいて、少なくとも 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、又は 1 0 以上の検体成分の有無、発現レベル (例えば、総量) 及び / 又は活性レベル (例えば、リン酸化レベル又は複合体形成) を測定することを含む。

【 0 1 3 8 】

[0139] ある種の実施形態では、本発明は、細胞抽出物中で、1 種以上 (例えば、少なくとも約 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 7 、 2 8 、 2 9 、 3 0 、 3 5 、 4 0 、 4 5 、又は 5 0 以上) の更なる検体成分の発現レベル (例えば、総量) 及び / 又は活性レベル (例えば、リン酸化レベル又は複合体形成) を測定することを含む。いくつかの実施形態では、1 種以上 (例えば、少なくとも約 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 7 、 2 8 、 2 9 、 3 0 、 3 5 、 4 0 、 4 5 、又は 5 0 以上) の追加の検体成分は、受容体チロシンキナーゼ、非受容体型チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナル伝達カスケード構成要素、核内ホルモン受容体、核内受容体コアクチベーター、核内受容体リプレッサー、リガンド、受容体、シグナル伝達カスケード構成要素；1 種以上の神経変性タンパク質；1 種以上の病的なタンパク質凝集体；及びこれらの組み合わせからなる群から選択される 1 種以上のシグナル伝達分子を含む。

30

40

【 実施例 】

【 0 1 3 9 】

I V . 実施例

[0140] 以下の実施例は例示のために提供するものであり、本発明の特許請求の範囲を制限するためのものではない。

【 0 1 4 0 】

実施例 1 . 患者サンプルにおけるリン酸化 H E R 2 レベルを測定するためのマイクロ流体 C E E R

[0141] 本例は、近接二重検出アッセイ (例えば、C E E R アッセイ) が結合されたマイ

50

クロキャリアと、マイクロ流体装置とを利用して、細胞溶解サンプルにおける活性化HER2レベルを検出する方法を例示する。

【0141】

[0142]本試験は、細胞由来のサンプル中の活性化検体成分を測定するための最適条件を決定することを目的とした。試験パラメーターには、捕捉抗体の量（例えば、濃度）、サンプルの量、及びシグナル増幅対の第2のメンバーの量（例えば、希釈率）を含んだ。

【0142】

[0143]バーコード化させたマイクロキャリアに濃度0.5mg/ml及び1.0mg/mlのHER2捕捉抗体を結合させた。アッセイの陰性対照として用意したIgGも別の組のマイクロキャリアに結合させた。次に、結合させた、コード化されたマイクロキャリアを5%BSA-PBSTで1時間ブロッキングし、次にアッセイカートリッジ（アッセイ装置）に充填した。

【0143】

[0144]次に、HER2過剰発現細胞（すなわち、BT474細胞）由来の細胞可溶化サンプルをカートリッジに充填し、反応チャンバ内で、先ほどの結合させたマイクロキャリアとともに80分間インキュベートした。試験サンプルには、細胞75個（例えば、80μl容量中100個）、7.5個（例えば、80μl容量中10個）及び0.75個（例えば、80μl容量中1個）に相当する可溶化物を含有させた。インキュベート時間後、マイクロ流体装置により排出口からサンプルを排出させた。

【0144】

[0145]結合させたマイクロキャリアと、検出抗体（例えば、4G10-HRP及びHER2-AB4-GO）を20分間インキュベートした後、マイクロ流体装置により排出させた。抗体4G10-HRPは、ホスホチロシン（phosphotyrosine）に特異的に結合し、抗体HER2-AB4-GOはHER2ポリペプチドを認識する。

【0145】

[0111]次に、ビオチン-チラミド（BT-tyr）、すなわちシグナル増幅対の第2のメンバーを反応チャンバに添加して30分間インキュベートし、反応チャンバから除去した。ビオチン-チラミドの2種類の希釈液（1:500及び1:1000）を試験した。ビオチン-チラミドの濃度（例えば、レベル）を高くする程、蛍光の読み取りに干渉する蛍光分子の凝集体が生成されることが判明した。濃度0.5μg/mlで、シグナル検出試薬ストレプトアビジン-Alexa647を添加し、5分間インキュベートした。

【0146】

[0146]標準的な顕微鏡イメージング法及び蛍光解析ソフトウェアを利用して、マイクロキャリアの蛍光を検出し、定量した。

【0147】

[0112]結果は、わずか0.75個の細胞を含有するサンプルにおいてさえ、活性化HER2レベルが検出され、定量されたことを示す（図1A及び1B）。図1Aには、高BT-tyrの希釈系列の蛍光強度を示す。左から右に、それぞれ抗HER2（0.5mg/ml; 114）、抗HER2（1.0mg/ml; 133）、及びIgG（陰性対照）（1.0mg/ml; 41.2）である。図1Bには、低BT-tyrの希釈系列の蛍光強度を示す。左から右に、それぞれ抗HER2（0.5mg/ml; 104.2）、抗HER2（1.0mg/ml; 131.5）、及びIgG（陰性対照）（1.0mg/ml; 38.5）である。更に、いずれの捕捉抗体及びビオチン-チラミド濃度でもHER2レベルが検出可能であった。このデータは、マイクロキャリア-ベースのアッセイの感度が、ニトロセルロースコートし捕捉抗体を結合させたスライドを利用する従来のCEERアッセイに匹敵していたことを示す。

【0148】

[0112]図2は、反応チャンバに充填した細胞が少ない方が、シグナルバックグラウンド比が低かったことを示す。特に、図2Aは、サンプルの75個のBT474細胞とともにインキュベートしたアッセイ装置における蛍光マイクロキャリアを示す。図2Bは、サン

ブルの 7 . 5 個の細胞とともにインキュベートした同様の蛍光マイクロキャリアを示す。

【 0 1 4 9 】

[0147]この例は、近接二重検出アッセイ（例えば、C E E Rアッセイ）が結合されたマイクロキャリアとマイクロ流体装置とを利用して、細胞溶解サンプル中の活性化 H E R 2 レベルを検出する方法を例証する。

【 0 1 5 0 】

実施例 2 . 患者サンプルにおけるリン酸化タウレベルを測定するためのマイクロ流体 C E E R

[0148]本例には、本明細書に記載のマイクロ流体 C E E Rアッセイを利用して患者由来のサンプルにおけるリン酸化タウレベルを測定する方法を記載する。活性化タウのレベルを利用して、患者がアルツハイマー病（A D）を有しているか、あるいはA D発症のリスクが増加しているかを評価することができる。

10

【 0 1 5 1 】

[0149]標準的な外来診療プロトコルに従い腰椎穿刺を行い、患者から脳脊髄液サンプルを採取する。標準的な可溶化緩衝液を利用してサンプルの細胞を可溶化させ、細胞抽出液を生成する。

【 0 1 5 2 】

[0150]1組のコード化されたマイクロキャリアに、B i o c a r t i sの捕捉分子結合プロトコルなどの標準的な結合手順を利用して非リン酸化タウを認識する捕捉抗体を結合させる。結合させたマイクロキャリアを、5 % B S A - P B S T 溶液により1時間ブロッ

20

ッキングした。この結合させたマイクロキャリアを、マイクロ流体機器を利用してアッセイカートリッジの反応チャンバに充填した。

【 0 1 5 3 】

[0151]細胞抽出物を反応チャンバに充填し、結合させたマイクロキャリアと約80分間接触させた。流体の層流により細胞抽出物を除去し、検出抗体を反応チャンバに充填した。検出抗体は、非リン酸化タウに対するものでありグルコースオキシダーゼに結合された第1の抗体と、リン酸化タウに対するものであり西洋ワサビペルオキシダーゼに結合された第2の抗体とを含有する。検出抗体を、マイクロキャリアに結合された捕捉されたタウタンパク質とともに20分間インキュベートし、その後除去する。次に、マイクロキャリアに結合された、検出される捕捉されたタウタンパク質を含有する反応チャンバに、ピオチン - チラミドを充填する。シグナル増幅反応を30分間実施する。次に、シグナル検出試薬ストレプトアビジン - A l e x a F l u o r（登録商標）647を、検出される捕捉された検体成分とともに5分間インキュベートする。最後に、C C Dカメラを利用して、マイクロキャリアからの蛍光シグナルを検出し、標準的なイメージングソフトウェアを利用して定量する。更に、マイクロキャリア上のコードを読み取って、マイクロキャリアの機能を解読する。

30

【 0 1 5 4 】

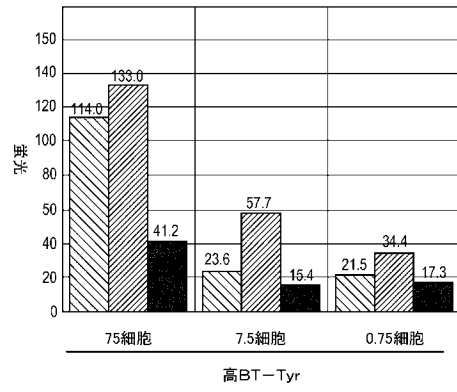
[0152]測定された蛍光は、サンプル中に存在する標的検体成分（例えば、活性化タウ）のレベルに相当する。患者サンプル中のリン酸化タウのレベルが非A D対象のものよりも高い場合、その患者はA Dを有しているか、あるいはA Dを発症するリスクが増加しているものと評価される。

40

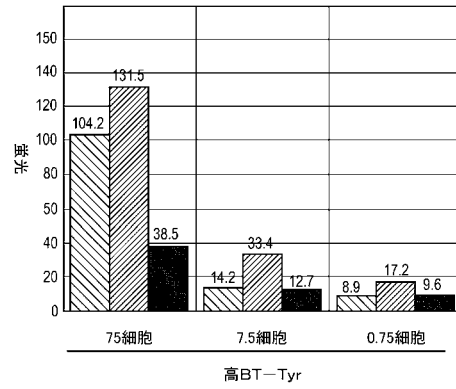
【 0 1 5 5 】

[0153]これまでに、理解を明瞭にするため、図示及び例示目的により本発明を程度詳細に記載したものの、当業者であれば、添付の特許請求の範囲内である種の変更及び改変を実施できることを認識されるであろう。更に、本明細書に提供される各参照は、各参照が参照によりそれぞれ援用されている場合と同程度に、その全容が参照により援用される。

【図 1 A】



【図 1 B】



【図 2 A】



FIG. 2A

【図 2 B】

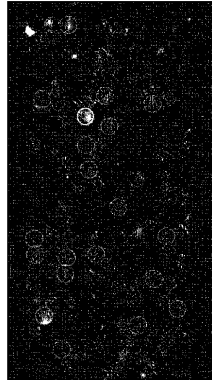


FIG. 2B

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/063846

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/543 G01N33/58
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N B01D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PHILLIP KIM ET AL: "Highly sensitive proximity mediated immunoassay reveals HER2 status conversion in the circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients", PROTEOME SCIENCE, vol. 9, no. 1, 2011, page 75, XP021130852, page 11, right-hand column, last paragraph - page 12, left-hand column, paragraph 1 ----- -/--	58

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 September 2014

Date of mailing of the international search report

26/09/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gunster, Marco

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/063846

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"Abstract 3497: Pathway profiling for personalized medicine: Comparison of two immunoassays. -- Stresemann et al. 73 (1008): 3497 -- Cancer Research", 15 April 2013 (2013-04-15), XP055139142, Retrieved from the Internet: URL:http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/short/73/8_MeetingAbstracts/3497 [retrieved on 2014-09-09] abstract -----	58
X	SACHIN WANI ET AL: "Evaluation of Phosphorylation Signatures in Suspected Pancreatic Cancer Using Endoscopic Ultrasound-Guided Fine Needle (EUS-FNA) Aspirates: A Feasibility Study", GASTROENTEROLOGY, vol. 142, no. 5, suppl. 1, 2012, page S533, XP055139076, abstract -----	58
X	JEEYUN LEE ET AL: "A Novel Proteomics-Based Clinical Diagnostics Technology Identifies Heterogeneity in Activated Signaling Pathways in Gastric Cancers", PLOS ONE, vol. 8, no. 1, 25 January 2013 (2013-01-25), page e54644, XP055134461, page 11, left-hand column, paragraph 2 -----	58
Y	WO 2013/033623 A1 (NESTEC SA) 7 March 2013 (2013-03-07) claims 1,15,16 -----	1-57
Y	WO 2010/072011 A1 (BIOCARTIS SA) 1 July 2010 (2010-07-01) page 17, lines 2-8; claim 1 -----	1-57
Y	US 2012/149128 A1 (MANNEH VICTOR [US]) 14 June 2012 (2012-06-14) paragraphs [0147], [0006] - [0007], [0135], [0138] -----	46-57
A	US 2008/160630 A1 (LIU DAVID J [US] ET AL) 3 July 2008 (2008-07-03) the whole document -----	1-58
A	WO 2013/055829 A1 (NESTEC SA) 18 April 2013 (2013-04-18) the whole document -----	1-58

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/063846

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013033623 A1	07-03-2013	EP 2751562 A1 KR 20140059273 A WO 2013033623 A1	09-07-2014 15-05-2014 07-03-2013
WO 2010072011 A1	01-07-2010	AU 2009329750 A1 CA 2745580 A1 CN 102264474 A EP 2367633 A1 JP 5535237 B2 JP 2012513593 A KR 20110110209 A RU 2011130925 A US 2011306506 A1 WO 2010072011 A1	30-06-2011 01-07-2010 30-11-2011 28-09-2011 02-07-2014 14-06-2012 06-10-2011 27-01-2013 15-12-2011 01-07-2010
US 2012149128 A1	14-06-2012	NONE	
US 2008160630 A1	03-07-2008	US 2008160630 A1 US 2012322683 A1	03-07-2008 20-12-2012
WO 2013055829 A1	18-04-2013	NONE	

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 33/552

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

(特許庁注 : 以下のものは登録商標)

1 . T E F L O N

(72) 発明者 セヴェリン , インディア シー .

スイス , シーエイチ - 1 0 0 7 ローザンヌ , アヴェニュー ド モントワ 5

(72) 発明者 マゴノヴァ , キャティア

アメリカ合衆国 , アリゾナ州 , テンピ , ウエスト セクレタリアット ドライヴ 4 1 6

专利名称(译)	使用微流体通过协同酶增强反应 (CEER) 进行免疫测定		
公开(公告)号	JP2016527495A	公开(公告)日	2016-09-08
申请号	JP2016524736	申请日	2014-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	雀巢产品技术援助有限公司		
申请(专利权)人(译)	Nesuteku兴业ANONYME		
[标]发明人	セヴェリンインディアシー マゴノヴァキャティア		
发明人	セヴェリン, インディア シー. マゴノヴァ, キャティア		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/545 G01N33/552		
CPC分类号	G01N33/581 G01N33/54313 G01N33/54366 G01N33/582		
FI分类号	G01N33/543.501.D G01N33/53.U G01N33/543.575 G01N37/00.101 G01N33/545.A G01N33/552		
代理人(译)	长谷川良树 池田 成人 小泉纯酒卷		
优先权	61/844308 2013-07-09 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明利用用于微载体的邻近双重检测测定法，通过检测患者样品中目的分析物组分的存在，存在和/或表达水平来诊断患者疾病状态。提供一种方法。本发明还提供了用于执行本文所述方法的测定装置。[选择图]
无

