

(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2005-506515
(P2005-506515A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	2 GO 4 5
GO 1 N 30/48	GO 1 N 30/48	
GO 1 N 30/88	GO 1 N 30/88	
GO 1 N 33/53	GO 1 N 30/88	
	GO 1 N 33/53	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 50 頁)

(21) 出願番号	特願2002-559683 (P2002-559683)	(71) 出願人	591099809
(86) (22) 出願日	平成13年12月13日 (2001.12.13)		バイオーラッド ラボラトリーズ, インコーポレイティド
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月13日 (2003.6.13)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 94547, ハーキュلز, アルフレッド ノーベル ドライブ 1000
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/048252	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開番号	W02002/059617		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日	平成14年8月1日 (2002.8.1)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	60/255,561		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成12年12月13日 (2000.12.13)	(74) 代理人	100087413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100108903
			弁理士 中村 和広

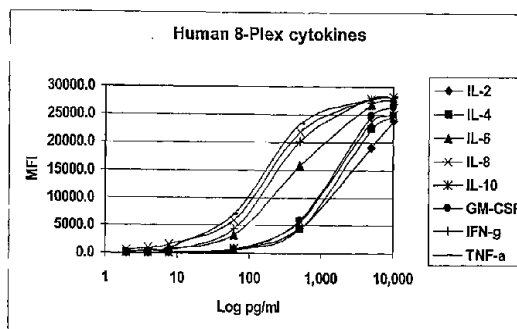
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多種検定用の標準希釈液

(57) 【要約】

本発明は、通常は2つ以上の異なる標的分析物を内含するもののこの2つ以上の異なる標的分析物を実質的に含んでいない標準希釈液、ならびに該標準希釈液に係るキット及び方法を提供する。本発明の標準希釈液は、単一の検定において多数の標的分析物の量を校正するための正確で信頼性の高い手段を提供する。

8 Human Cytokine Standard Curves Simultaneously Obtained from Human Cytokine Kits Using Standard Diluent



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 通常には 2 つ以上の異なる標的分析物を内含するものの、この 2 つ以上の標的分析物を実質的に含んでいない生体液を含む標準希釈液；及び

(b) 2 つ以上の異なる標的分析物を集合的に又は別々に含有する予め定められた量の単数又は複数の濃縮された材料、を含むキット。

【請求項 2】

アフィニティクロマトグラフィにより生体液から 2 つ以上の異なる標的分析物を除去することによって前記標準希釈液が生成される、請求項 1 に記載のキット。 10

【請求項 3】

前記標準希釈液が、2 つ以上の異なる標的分析物を実質的に含まない生体液をもつ宿主の生体液から得られる、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 4】

前記アフィニティクロマトグラフィが、標的分析物に結合する抗体を用いて 2 つ以上の異なる標的分析物を除去する段階を含む、請求項 2 に記載のキット。

【請求項 5】

前記生体液が、血清、血漿、尿、脳脊髄液、細胞抽出物、羊水、汗、涙、唾液又は鼻汁から成るグループの中から選択される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 6】

前記生体液がヒト又はマウスから得られる、請求項 5 に記載のキット。 20

【請求項 7】

前記 2 つ以上の異なる標的分析物がサイトカインである、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 8】

前記サイトカインが、インターロイキン、リンフォカイン、インターフェロン、コロニー刺激因子、血小板活性化因子及び/又は腫瘍壊死因子の中から選択される、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 9】

前記標的分析物が、IL - 2、IL - 4、IL - 6、IL - 8、IL - 10、GM - CSF、TNF - 及び IFN - のうちの 2 つ以上のものである、請求項 1 に記載のキット 30

【請求項 10】

前記 2 つ以上の異なる標的分析物が混合されて、部分 (b) 内の単一濃縮材料を形成する、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 11】

前記標準希釈液を使用して、異なる濃度の標的分析物を含む一連の対照材料を生成するための指示書をさらに含む、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 12】

前記標的分析物に結合する捕獲試薬が上に固定化された固体支持体をさらに含む、請求項 1 に記載のキット。 40

【請求項 13】

前記固体支持体を、各々識別パラメータにより他のグループと識別できかつ異なる標的分析物に結合する能力をもつ捕獲試薬が各々の上に固定化されているサブグループに分類できる、請求項 12 に記載のキット。

【請求項 14】

前記識別パラメータが固体支持体の色又は蛍光性である、請求項 13 に記載のキット。

【請求項 15】

前記固体支持体が微粒子である、請求項 12 に記載のキット。

【請求項 16】

前記捕獲試薬が、標的分析物に結合する抗体である、請求項 12 に記載のキット。 50

【請求項 17】

前記標的分析物に結合する検出試薬をさらに含む、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 18】

免疫検定内の試薬試料中の 2 つ以上の異なる標的分析物の量を換算するための対照材料において、

(b) 通常は 2 つ以上の異なる標的分析物を内含するものの、この 2 つ以上の異なる標的分析物を実質的に含んでいない生体液を含む標準希釈液と混合された 2 つ以上の異なる標的分析物を含む予め定められた量の濃縮材料を含んで成る、対照試料。

【請求項 19】

前記標的分析物がサイトカインである、請求項 18 に記載の対照試料。

10

【請求項 20】

血清又は血漿試料内で 2 つ以上の異なる標的分析物を検出するためのキットにおいて、

(a) 各々識別パラメータにより他のサブグループと識別できかつ異なる標的分析物に結合する捕獲試薬を各々の上に固定化させる能力をもつサブグループに分類できる固体支持体、及び

(b) 2 つ以上の異なる標的分析物を実質的に含まない血清又は血漿を含む標準希釈液を含んで成るキット。

【請求項 21】

前記識別パラメータが固体支持体の色又は蛍光性である、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 22】

前記固体支持体が微粒子である、請求項 20 に記載のキット。

20

【請求項 23】

各々の標的分析物のための捕獲試薬が固体支持体の各サブグループ上に固定化されている、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 24】

前記アフィニティークロマトグラフィによって血清又は血漿から 2 つ以上の異なる標的分析物を除去することによって標準希釈液が生成される、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 25】

前記標準希釈液が、検出不能な内因性レベルの 2 つ以上の異なる標的分析物を有する宿主の血清又は血漿から得られる、請求項 20 に記載のキット。

30

【請求項 26】

前記標準希釈液のための血清又は血漿がヒト又はマウスから得られる、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 27】

前記 2 つ以上の異なる標的分析物がサイトカインである、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 28】

前記サイトカインが、インターロイキン、リンフォカイン、インターフェロン、コロニー刺激因子、血小板活性化因子及び / 又は腫瘍壊死因子の中から選択される、請求項 27 に記載のキット。

【請求項 29】

前記標的分析物が、IL - 2、IL - 4、IL - 6、IL - 8、IL - 10、GM - CSF、TNF - 及び IFN - のうちの 2 つ以上のものである、請求項 27 に記載のキット。

40

【請求項 30】

前記 2 つ以上の異なる標的分析物を集合的に又は別々に含有する予め定められた量の単数又は複数の濃縮された材料、をさらに含む、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 31】

前記捕獲試薬が、標的分析物に結合する抗体である、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 32】

50

前記標準希釈液が単数又は複数の基準標準を希釈するために使用される、2つ以上の標的分析物について同時検定を行なう方法において、2つ以上の標的分析物を実質的に含まない生体液を標準希釈液として使用する段階を含む方法。

【請求項33】

前記検定が第1の生体液内の標的分析物について実施され、希釈液には基本的に第1の生体液と同じ基質成分を含む第2の生体液が含まれ、該第2の生体液が実質的に2つ以上の標的分析物を含んでいない、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

一連の生体液をスクリーニングし、予め定められた閾値より低い濃度で2つ以上の標的分析物を含有する単数又は複数の生体液を同定することによって第2の生体液が得られる、請求項33に記載の方法。

10

【請求項35】

予め定められた閾値より低い濃度までその濃度を減少させるべく標的分析物を除去するように生体液を処理することによって第2の生体液が得られる、請求項33に記載の方法。

【請求項36】

前記標的分析物がアフィニティークロマトグラフィにより除去される、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記標的分析物に結合する抗体と生体液を接触させることにより、標的分析物が除去される、請求項36に記載の方法。

20

【請求項38】

前記生体液が、インターロイキン、リンフォカイン、インターフェロン、コロニー刺激因子、血小板活性化因子及び/又は脳腫瘍壊死因子の中から選択される、請求項33に記載のキット。

【請求項39】

前記2つ以上の異なる標的分析物がサイトカインである、請求項33に記載の方法。

【請求項40】

前記サイトカインが、インターロイキン、リンフォカイン、インターフェロン、コロニー刺激因子、血小板活性化因子及び/又は腫瘍壊死因子の中から選択される、請求項33に記載の方法。

30

【請求項41】

前記標的分析物が、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、GM-CSF、TNF-及びIFN-のうち2つ以上のものである、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

予め定められた閾値より低い濃度までその濃度を減少させるべく標的分析物を除去するように標的分析物を含有する生体液を処理する段階を含んで成る、2つ以上の標的分析物についての同時検定において使用するための標準希釈液の調製方法。

【請求項43】

前記標的分析物がアフィニティークロマトグラフィにより除去される、請求項45に記載の方法。

40

【請求項44】

前記標的分析物に結合する抗体と生体液を接触させることにより、標的分析物が除去される、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記生体液が、インターロイキン、リンフォカイン、インターフェロン、コロニー刺激因子、血小板活性化因子及び/又は脳腫瘍壊死因子の中から選択される、請求項42に記載のキット。

【請求項46】

前記2つ以上の異なる標的分析物がサイトカインである、請求項42に記載の方法。

50

【請求項 47】

前記サイトカインが、インターロイキン、リンフォカイン、インターフェロン、コロニー刺激因子、血小板活性化因子及び/又は腫瘍壊死因子の中から選択される、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記標的分析物が、IL - 2、IL - 4、IL - 6、IL - 8、IL - 10、GM - CSF、TNF - 及びIFN - のうちの2つ以上のものである、請求項 47 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

発明の背景

標準希釈液は、免疫検定の主要成分である。それは、試験試料中の標的分析物を定量化するために用いられる基準標準を希釈するための緩衝液として使用される。一般に、試験試料中に存在する標的分析物の量を定量化するためには、異なる濃度の標的分析物を含有する一連の対照試料が調製される。次にこの一連の対照試料を用いて、一方の軸には標的分析物の濃度、もう一方の軸には検出信号強度がプロットされている標準曲線が作成される。試験試料中に存在する標的分析物の濃度は、かかる標準曲線から補間され得る。

【0002】

試験試料中の標的分析物の定量化が精確であるためには、標的分析物は標準希釈液中及び試験試料中で類似の形の挙動を示さなくてはならない。時として、試験試料中又は標準希釈液中に存在する成分は、その抗体に対する標的分析物の結合に影響を及ぼす可能性がある。例えば、標準希釈液中に存在するいくつかの未知の成分が、標的分析物に結合し、抗体に対するその結合を減少させる可能性がある。このような未知の成分は、試験試料中に存在しない可能性がある。そのような場合、標準希釈液を用いて生成された標準曲線から補間された試験試料中の標的分析物の濃度は、標的分析物と未知の成分の間の相互作用のため試験試料中の標的分析物の実際の濃度よりも高くなる。標準的には、標準希釈液及び試験試料を用いて生成された標準曲線が $\pm 20\%$ 以上の偏差を示さないように標準曲線が選択される。これは、免疫検定開発業者により、回復検定として一般に記述されている。

20

【0003】

単一の分析物の検出のためには、試験試料中の単一の抗体 - 分析物反応のみを模倣するよう標準希釈液を容易に最適化することができるため、標準希釈液を開発することは比較的容易である。標準希釈液は、一般に、検定すべき生体試験試料中に遭遇するものと同等の反応条件及び環境を提供するように処方されている。標準的には、単一の分析物を検出するため試験試料の条件を複製しうる標準希釈液として、タンパク質、緩衝液及び塩の人工的カクテルが用いられる。しかしながら、異なる標的分析物は異なる条件を必要とし、1つの標的分析物の分析に適した人工的カクテルがもう1つの標的分析物の分析に適さない可能性もある。

30

【0004】

近年、単一の検定プロセス（例えば単一のウェル内）で多数の異なる分析物を同時に検出する方法が開発されてきた。かかる方法は一般に、「多重検定」又は「多重免疫検定」といった語で知られている。多重免疫検定では、異なる分析物の全てに適した標準希釈液を選択することは、各々の抗体 - 分析物相互作用がその独自の条件セットの下で最もうまく行なわれることから、さらに複雑なものとなる。かくして、1つの分析物のための試験試料の条件を複製するように最適化された人工的カクテルを含む標準希釈液が、もう1つの分析物の検出及び計量にとって最適でない可能性がある。従って、多重検定に適した人工的標準希釈液を開発するのは、不可能とは言わないまでも困難でかつ時間のかかることである。特に同時に検出すべき標的分析物の数が例えば15～20まで増大すると、同時に標的分析物の全てにとって適切な作業環境を提供する標準希釈液を開発するのはむずかしい。

40

【0005】

50

従って、2つ以上の異なる標的分析物を同時に検出し高い信頼性で定量化できるように多重検定のための標準希釈液を開発する必要性が存在する。本発明の実施形態は、この必要性及びその他の必要性に対処するものである。

【0006】

発明の要約

現在、多重免疫検定用の標準希釈液を、通常は免疫検定内で検出すべき2つ以上の異なる標的分析物を含有するもののこれらの標的分析物を実質的に含まなくなるように処理又はスクリーニングされている生体液から誘導できる、ということが発見されてきた。例えば、ヒト血清試料中で4つのタイプのサイトカインの同時検出が望まれる場合、サイトカインを定量化するべく基準標準を希釈するのに用いられる標準希釈液が、4つのタイプのサイトカインを実質的に含まないヒト血清から誘導される。「2つ以上の異なる標的分析物を実質的に含まない」標準希釈液というのは、生体液中に通常存在する内因性レベルの標的分析物が標準希釈液中ではもはや検出できないこと又は、生体液中に存在する標的分析物の量が選択された閾値レベル（例えば10 pg/mL）よりも低いことを意味する。標準的には、内因性レベルの標的分析物は、アフィニティークロマトグラフィにより生体液から除去される。代替的には、ドナーから得られた生体液は、検出可能でないか又は選択された閾値レベルより低い量で標的分析物を天然に含む生体液を同定するためにスクリーニングされ得る。このような処理又はスクリーニング済みの生体液は、基本的に、テストすべき試料と同じ基質成分を含み、標準希釈液として使用するのに理想的に適している。基本的に試験試料と同じ基質成分を提供することにより、本発明の標準希釈液は、生体試験試料と同等の多数の標的分析物のための反応条件及び環境を提供する。これらの長所により、本発明の標準希釈液は、生体試料中の標的分析物の信頼性の高い正確な計量を容易にする。

10

20

【0007】

本発明の標準希釈液は、さまざまな多重検定において、特に標的分析物の計量が正確である必要のある場合に有用である。例えば、該標準希釈液は、臨床試料内の標的分析物の量を監視するために多重検定中で使用可能である。例えば、標的分析物は、自己免疫疾患又はガンを患い、その疾病の進行度を見極めるために定期的にその免疫系を評価する必要のある患者における免疫系の成分（例えばサイトカイン）であり得る。代替的には、標的分析物は、ある種の疾病に結びつけられる様々なタンパク質であり得る。例えば、前立腺ガン患者においては、前立腺ガン抗原を含む多数のタンパク質が上昇することが知られている。前立腺ガン抗原及び前立腺ガンに付随するその他のタンパク質を実質的に含まない標準希釈液を用いて、臨床試料中のこれらのタンパク質の濃度を正確に決定することができる。もう1つの例では、検査薬により刺激される或る標的分析物の濃度の決定にあたっての薬物発見プログラムの中で該標準希釈液を使用することもできる。

30

【0008】

従って、1つの態様において、本発明は、通常は2つ以上の異なる標的分析物を内含するもののこの2つ以上の異なる標的分析物を実質的に含まなくなるように処理又はスクリーニングされた生体液を含む標準希釈液を提供する。好ましい実施形態においては、標準希釈液は、血清又は血漿から誘導され、標的分析物はサイトカインである。

40

【0009】

もう1つの態様において、本発明は、(a)通常は2つ以上の異なる標的分析物を内含するものの、この2つ以上の標的分析物を実質的に含んでいない生体液を含む標準希釈液；及び(b)2つ以上の異なる標的分析物を集合的に又は別々に含有する予め定められた量の単数又は複数の濃縮された材料、を含んで成るキットを提供している。かかるキットは、標準曲線を生成するべく異なる濃度の標的分析物を含有する一連の対照試料を作るために使用することができる。標準曲線は、その後試験試料中に存在する標的分析物の量を定量化するために使用できる。

【0010】

もう一つの態様では本発明は、血清又は血漿試料内で2つ以上の異なる標的分析物を検出

50

するためのキットにおいて、(a) 各々識別パラメータにより他のサブグループと識別できかつ異なる標的分析物に結合する捕獲試薬を各々の上に固定化させる能力をもつサブグループに分類できる固体支持体、及び(b) 2つ以上の異なる標的分析物を実質的に含まない血清又は血漿を含む標準希釈液を含んで成るキットを提供している。かかるキットは、血清又は血漿試料から多数の標的分析物を同時に検出しかつ定量化するために使用可能である。

【0011】

もう1つの態様では、本発明は、標準希釈液が単数又は複数の基準標準を希釈するために使用される、2つ以上の標的分析物について同時検定を行なう方法において、2つ以上の標的分析物を実質的に含まない生体液を標準希釈液として使用する段階を含む方法を含む。

10

【0012】

さらなる態様では、本発明は、予め定められた閾値より低い濃度までその濃度を減少させるべく標的分析物を除去するように標的分析物を含有する生体液を処理する段階を含む、2つ以上の標的分析物についての同時検定において使用するための標準希釈液の調製方法を含む。

【0013】

本発明のこれらの及びその他の特長、目的及び利点は、以下の記述からより容易に理解することができるだろう。

【0014】

特定の態様の説明

1態様では、本発明は、通常2つ以上の異なる標的分析物を内含するものの、本ケースではこれらの分析物を実質的に含まない生体液を含んで成る標準希釈液を提供している。標準希釈液を作るための生体液の選択は、標的分析物の検出が望まれる生体液の供給源によって左右される。「供給源」というのは、特定の個体を意味するのではなくむしろヒト又は1つのタイプ又は種の動物からの一般的タイプの生体液を意味するものとする。例えば、1被験者の免疫応答を監視するために血清中のさまざまなサイトカインの検出が、望まれる場合には、血清が、標準希釈液を作るための供給源とみなされる。従って、標的分析物の検出のための試験試料の選択に応じて、さまざまなタイプの生体液から標準希釈液を誘導することができる。例えば、その中で標的分析物が探究される生体液は、血清、血漿、尿素、脳脊髄液、組織又は細胞抽出物、羊水、汗、涙、唾液又は鼻汁であり得、それに相応して、標準希釈液は同じタイプの流体又は供給源から調製される。生体液は、ヒト又は非ヒト動物(例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギなど)のいずれからでも得ることができる。流体は必ずしも、標的のためにその流体を分析しなければならないものと同じ種から得る必要はない。

20

30

【0015】

標準希釈液を2つ以上の異なる標的分析物を含まない状態にするために、標的分析物は標準的に生体液から除去される。標的分析物を除去するために使用できる既知の適切な技術は数多く存在する。この目的で好ましい技術は、アフィニティークロマトグラフィである。例えば、標的分析物を除去し、標準希釈液として使用するための実質的に標的分析物を含まない溶離剤を得るためには、カラムクロマトグラフィ技術を応用することができる。生体液から標的分析物を選択的に除去する能力をもつかぎり、適切なあらゆる吸着剤を使用することができる。生体液から標的分析物を除去するためには、標的分析物に特異的に結合する抗体を利用することが好ましい。「抗体」という語には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体フラグメント、1本鎖抗体などが含まれる。抗体の製造方法は、以下で詳述される。問題の抗体は、カラム基質に接合され得る。生体液をカラムに塗布することが可能であり、標的分析物が除去された溶離剤を収集し標準希釈液として使用することができる。カラムクロマトグラフィ及びその他のアフィニティークロマトグラフィ方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、Scope, 「タンパク質の精製、原理と実践、第3版、Springer-Verlag New York, Inc. (1

40

50

994) ; 及び Deutcher , 「酵素学における諸方法 : タンパク質精製のための指針」第182巻、Academic Press , San Diego (1990)。

【0016】

代替的には、内因性標的分析物を天然には全く含まない(すなわち検出可能な量を含まない)か又は極くわずかな量しか(予め定められた閾値より低い)含まないさまざまな供給源から生体液をスクリーニングすることによって、実質的に2つ以上の異なる標的分析物を含まない標準希釈液を得ることができる。例えば、血清中のサイトカインの検出が望まれる場合、サイトカインを実質的に含まない標準希釈液を、さまざまなドナーからの血清試料をスクリーニングすることで得ることができる。サイトカイン又はその他の標的分析物のレベルは、集団の間で変動する可能性があり、標的分析物について集団からの一定数のドナーをスクリーニングし、かくして標的分析物を実質的に含まない生体液を同定し得ることが可能であるかもしれない。かかる生体試料をスクリーニングし選択することで、標準希釈液を作るために生体液から標的分析物を除去する必要性が回避されることになる。

10

【0017】

標準希釈液が、生体液から標的分析物を除去することによって得られるか、又はドナーから生体液をスクリーニングすることによって得られるかの如何に関わらず、免疫検定方法により標的分析物を検出できない場合又は標的分析物のレベルが選択された感受性閾値よりも低い場合、標準希釈液は、「2つ以上の異なる標的分析物を実質的に含まない状態」にあるものとして言及される。例えば、行なわれるべき検定に応じて、試料中の標的分析物の感受性レベルを、およそ例えば20 pg/mL、10 pg/mL未満、5 pg/mL未満、又は1 pg/mL未満で多様に選択することができる。このようないずれの場合でも、標準希釈液は、それらの濃度が選択された閾値より低い場合に「2つ以上の異なる標的分析物を実質的に含まない」と言うことができる。

20

【0018】

標的分析物は、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、炭水化物、ハプテン又はそれらの組合せといったような生体液中のあらゆる成分であり得る。一般に、標的分析物はタンパク質又はペプチドである。例えば、標的分析物は、さまざまなサイトカイン、ステロイドといったホルモン、リポタンパク質、糖タンパク質又は腫瘍抗原でありうる。1つの実施形態においては、標的分析物は、サイトカイン、例えばインターロイキン、リンフォカイン、インターフェロン、コロニー刺激因子、血小板活性化因子及び/又は腫瘍壊死因子である。好ましい1実施形態においては、標準希釈液を作るために用いられる生体液は、血清であり、標的分析物は、インターロイキン-2(「IL-2」)、インターロイキン-4(「IL-4」)、インターロイキン-6(「IL-6」)、インターロイキン-8(「IL-8」)、インターロイキン-10(「IL-10」)、顆粒球-マクロファージ-コロニー刺激因子(「GM-CSF<マ>」)、腫瘍壊死因子アルファ(「INF-」)及びインターフェロンガンマ(「IFN-」)のうちの2つ以上である。

30

【0019】

必要とあらば、標準希釈液を調製するために、生体液から逐次又は同時に、任意の数の標的分析物を除去することができる。例えば、1つの標準希釈液を作るため生体液から、2~500の標的分析物、又は2~100の標的分析物又は2~50の標的分析物又はこれらの範囲の間に任意の整数の標的分析物を除去することができる。標準的には、3~30の間、より標準的には3~20の間、より一層標準的には、4~15の間の標的分析物を生体液から除去して標準希釈液が作られる。明らかに、標準希釈液を調製するためには、試験試料の中で検出すべき標的分析物のみを生体液から除去することしか必要でない。

40

【0020】

標的分析物を実質的に含まない標準希釈液がひとたび調製されたならば、これを用いて基準標準(例えば標的分析物の濃縮材料)を希釈して、試験試料中の標的分析物の量を換算するための対照試料を作ることができる。この手順においては、一般に、2つ以上の異なる標的分析物を集合的に又は別々に含有する予め定められた量の濃縮材料が本発明の標準

50

希釈液と混合される。例えば、試験試料中の I L - 2、I L - 4、I L - 6、I L - 8 及び I L - 10 の較正が望まれる場合には、5 つのインターロイキン全てを含む予め定められた量の濃縮材料を標準希釈液に添加して対象試料を作ることができる。その後、異なる量の標的分析物を含有する対象試料を用いて標準曲線を生成し、次にこの曲線を用いて試験試料中のこれらのインターロイキンの量を定量化することができる。

【0021】

数多くのケースにおいて、試験試料又は適切に希釈されている試験試料中で予想できる濃度範囲にまたがる又は一括する標的分析物の異なる濃度での一連の対照試料を調製することが有利となる。例えば、一連の対照試料は、標的分析物の濃度が1つの疾病を患っていない患者のものにほぼ等しいような1つの対照試料、この第1の対照試料のものより実質的に高い濃度で標的分析物を含有する第2の対照試料、そして第1及び第2の両方の対照試料のものよりも実質的に高い濃度で標的分析物を含有する第3の対照試料を内含することができる。例えば、血清中のサイトカインの検出のためには、5000 pg/mL、500 pg/mL、50 pg/mL、8 pg/mL、4 pg/mL、2 pg/mL 及び 0 pg/mL のサイトカインを含む一連の対照試料を使用して標準曲線を生成することができる。

10

【0022】

従って、本発明の実施形態は同様に、(1) 本発明の標準希釈液及び (b) 2 つ以上の異なる標的分析物を集合的に又は別々に含有する単数又は複数の濃縮材料を含むキットをも提供する。かかるキットは、免疫検定のための対象試料をユーザーが作るのに便利な1つの方法を提供し、標的分析物を含む濃縮された材料をユーザーが正確に測定する必要性を回避させる。標的分析物を含む濃縮材料は、液体又は固体の形をしていてよい。例えば、標的分析物を含む濃縮材料を冷凍乾燥させ、後に対照試料を作るべくユーザーがこれを溶解できるようにすることも可能である。

20

【0023】

該キットはさらに、異なる濃度の標的分析物を含む一連の対照試料を生成するべく標準希釈液を使用するための教材も含むことができる。例えば、教材には、試験試料中に見い出されると予想される標的分析物濃度範囲についての推奨事項と合わせて、標準希釈液で各濃度の材料を希釈することによって、希釈系列をいかに開始すべきかが含まれている可能性がある。キットは同様に、本書で記述されている検定のいずれかにおける単数又は複数のその他の試薬の使用についての説明文書(指示書)も内含する可能性がある。キットはさらに、標識付き又は標識無しの検出試薬及び自由か又は固体支持体に拘束されている捕獲試薬のうちの単数又は複数のものが入ったコンテナを含むことができる。好ましくは、キットは同様に、検出可能な標識の存在下で検出するために有用な試薬を含めた、検定において使用される試薬も内含することになる。

30

【0024】

もう1つの態様においては、本発明は同様に、標的分析物に結合する捕獲試薬が上に固定化されている固体支持体をさらに含んで成る、試験試料中の多数の標的分析物の同時検出用キットをも提供している。かかるキットを使用する検定においては、異なる標的分析物に結合する捕獲試薬を含む固体支持体を単一のウェル(例えば)の中で混合し、試験試料を導入することができる。標的分析物は、当該技術分野において既知の検出方法を用いて検出することができる。多数の標的分析物の各々の量は、本発明の対照試料を用いて高い信頼性で決定することができる。試験試料からの多数の標的分析物のこの同時分析は、コスト及び便利さの面であきらかな利点をもつ。その上、単一のウェル内で多数の標的分析物を同時に検定できることから、少量の試験試料しか必要とされない。

40

【0025】

かかるキット内で標的分析物を結合させるためには、適切なあらゆる CPA を使用することができる。例えば捕獲試薬は、標的分析物に特異的に結合する抗体(例えばモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体)、抗体フラグメント、1本鎖抗体などであり得る。抗体は通常、少なくとも約 0.1 mM、より普通には少なくとも約 1 μ M、好ましくは少なく

50

とも約0.1 μ M以上、そして最も好ましくは0.01 μ M以上のKdで結合することになる。

【0026】

当該技術分野において既知のさまざまな手順を、標的分析物に特異的に結合する抗体の産生のために使用することができる。ポリクローナル抗体の産生のためには、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどを含めた（ただしこれらに制限されない）さまざまな宿主動物のいずれにでも接種するべく標的分析物を使用することができる。モノクローナル抗体は、もともとKohler及びMilsteinにより開発されたハイブリドーマ技法（Nature 256: 495-497 (1975)）、ならびにトリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法（Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983)）、及びヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ技法（Cole et al. 「モノクローナル抗体及びガン療法」中Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)）を含めた、培養中の連続細胞系統による抗体分子の産生を提供するあらゆる技術によって調製可能である。

10

【0027】

結合部分としては、抗体のフラグメントも同様に有用である。さまざまな抗体フラグメントを、無傷の抗体の消化によって得ることができるが、当業者であれば、かかるフラグメントを、化学的に又は組換え型DNA方法を利用することによって新たに合成できるということがわかるだろう。検出部分を構築するためには、一本鎖抗体も同じく有用である。1本鎖抗体を産生するための方法は、例えば米国特許第4,946,778号の中で記述された。Fab発現ライブラリの構築のための技術は、Huse et al., Science 246: 1275-1281 (1989)によって記述された。これらの技術は、標的分析物に対する所望の特異性によるモノクローナルFab生体液Gの高速同定を容易にする。適切な結合部分には、ファージ・ディスプレイといったような方法を用いて得られるものも含まれる。

20

【0028】

捕獲試薬は、当該技術分野において知られているような共有又は非共有方法のいずれかによって、支持体上に固定され得る。例えばPluskal et al., BioTechniques 4: 272-283 (1986)参照のこと。適切な支持体としては、例えば、ガラス、プラスチック、重合体、金属、半金属、セラミクス、有機材料などが含まれる。特定の例としては、マイクロタイプレート、平坦な基板（例えばチップ）、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、及び誘導体化されたナイロン膜と同様に、アガロース、デキストランなどのビーズといった微粒子又はビーズが含まれるが、これらに制限されるわけではない。多重検定のための適切な固体支持体及び分析方法は同様に、米国特許第5,567,627号、米国特許第5,981,180号、米国特許第5,641,640号、国際出願WO98/59360号及びMichael et al., Anal. Chem. 70: 1242-8 (1998)にも記述されている。

30

【0029】

1つの実施形態においては、固体支持体は、サブグループに分類可能な微粒子の集団であり、ここで、各サブグループは、識別パラメータにより他と識別でき、各サブグループは又、異なる標的分析物に結合する能力をもつ捕獲試薬を上固定化された状態で有している。識別パラメータというのは、ここで1つのサブグループにおける検定結果の検出をもう1つのサブグループにおけるものから分離できるようにする区別可能な特性を示すべく使用されている語である。例えば、微粒子のさまざまなサブグループの間で区別するのに用いることのできる識別パラメータとしては、粒度、粒子蛍光、粒子光散乱、発光及び吸光特性が含まれる。各標的分析物のための捕獲試薬をこのとき、各微粒子サブグループにカップリングさせることができる。多重検定では、異なる微粒子サブグループが一緒にプールされるが、各微粒子サブグループに付随する識別パラメータにより、ユーザーは、どの標的分析物がどの微粒子サブグループに結合させられるかを決定することができる。

40

50

【0030】

好ましい1実施形態では、さまざまな微粒子サブグループの間で区別するのに用いられる識別パラメータは、蛍光染料又は顔料である。例えば、微粒子は、各サブグループ内の微粒子を蛍光色素濃度といったような蛍光特性に基づいて他から識別できるような形で、それらの中に取り込まれた状態で2つ以上の蛍光色素を有することができる。例えば、各々の微粒子サブグループは、異なる濃度のCy5.5といったようなオレンジ蛍光色素と合わせて、異なる濃度のCy5といった赤色蛍光色素を有することができる。2つの蛍光色素の各々の濃度を変動させることにより、異なる蛍光発光をもつ何百又は何千もの微粒子サブグループを得ることができる。多重検定内で使用できる微粒子サブグループの数をさらに拡大させるべく、付加的な蛍光色素を微粒子の中に取り込むことができる。すでに取込まれかくして本発明の中で使用するのに適した染料を伴う微粒子は、Luminex Corporation (Austin, Texas) 及びMolecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon) といったような供給業者から市販されている。

10

【0031】

もう1つの態様においては、本発明のキットはさらに、検出試薬を含んでいる。標的分析物の存在は、一般に、標的分析物に特異的に結合する結合部分から成る検出試薬を用いて検出される。検出試薬は、直接標識づけされるすなわち、検出可能な標識を含むかこれを産生するように反応するか、又は、間接的に標識づけされる、すなわち検出可能な標識を含むか又はこれを産生するように反応する分子に結合するかのいずれかである。標識は、化学的又は組換え型方法により検出試薬に直接付着されても又は検出試薬内に取込まれてもよい。例えば、標識は、化学的リンカーを通して標的分析物に特異的に結合する抗体といったような分子にカップリングさせられる。

20

【0032】

検出試薬に付着させられる本発明の検定中で使用される検出可能な標識は、一次標識(標識が直接的に検出されるか又は直接的に検出可能な要素を産生する要素を含む場合)又は二次標識(検出された標識が、例えば免疫学的標識付けにおいて一般的であるように一次標識に結合する場合)でありうる。標識、標識づけ手順及び標識の検出に対する導入は、Polak and Van Noorden (1997). 免疫細胞化学入門、第2版、Springer Verlag, NY 及びMolecular Probes, Inc., Eugene OR により刊行された便覧とカタログの組合せであるHaugland (1996) の「蛍光プローブ及び研究用化学物質便覧」の中に見い出される。かかる標識の使用について記述した特許としては、米国特許第3,817,837号; 同第3,850,752号; 同第3,939,350号; 同第3,996,345号; 同第4,277,437号; 同第4,275,149号; 及び同第4,366,241号が含まれる。

30

【0033】

一次及び二次標識は、未検出元素ならびに検出済み元素を内含しうる。本発明において有用な一次及び二次標識には、分光標識例えば緑色蛍光タンパク質、蛍光染料〔例えばフルオレセイン及びフルオレセインイソチオシアネート(FITC<マ>)及びオレゴングリーンといったような誘導体、ローダミン及び誘導体(例えばテキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート(TRITC)など)、ジゴキシゲニン、ピオチン、フィコエリスン、AMCA, CyDyes (商標) など〕、放射性標識(例えば³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²P、³³P、など)、酵素(例えばホースラディッシュペルオキシターゼ、アルカリホスファターゼなど)、分光比色標識例えばコロイド金又は着色ガラス又はプラスチック(例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど)ビーズが含まれ得る。標識は、当該技術分野において周知の方法に従って、検出検定の一成分(例えば検出試薬)に対し直接的又は間接的にカップリングされ得る。上述のように、多様な標識を使用することができ、標識の選択は、所要選択性、化合物との接合の安易さ、安定性必要条件、利用可能な計装、及び廃棄規定により左右される。

40

50

【0034】

多数の標的分析物を検出するための検定は、複数の方式のうちいずれかで実施できる。例えば、標的分析物に結合する固定化された捕獲試薬が上に固定化される固体支持体と接触した状態に試験試料を置くことによって、サンドイッチ検定を実施することができる。固体支持体上に固定化された捕獲試薬は、標的分析物の全てが結合するように標的分析物について疑われている数量範囲と比べて余剰に存在する。標的分析物は、試料内に存在する場合、捕獲試薬に結合する。固体支持体はこのとき、標的分析物上の異なるエピトープに結合する検出試薬と接触させられる。固定化された標的分析物に結合するのに十分な時間、検出済み試薬をインキュベートした後、未結合の検出試薬があればそれを例えば洗浄により除去する。検出試薬に付随する検出可能標識（例えばフィコエリスリン）を次に検出する。例えば、検出可能標識が蛍光である場合には、蛍光は、試料中に存在する特定の標的分析物の量に比例して観察されることになる。

10

【0035】

もう1つの例では、1つの試料中の標的分析物を検出するために、競合的結合測定法を用いることもできる。この検定は、1つの試料に対し標的分析物の標識付けされた類似体を添加することによって実施される。これらの検定では、固体支持体に結合した捕獲試薬は、全ての分析物が結合するような形で標的分析物について疑われている数量範囲に比べて余剰に存在する。試料中に存在する標識付けされた類似体及び標的分析物は、固体支持体上に固定化された捕獲試薬の結合部位について競合する。適当なインキュベーション時間の後、残った未結合の分析物及び標識があれば全て洗い流される。固体支持体に結合した標的分析物の標識された類似体の量は、試料中の標的分析物の濃度と反比例する。

20

【0036】

標識の存在は、検査によって検出可能であるか又は、検出試薬標識を検出するために、特定のプローブ又はプローブ組合せを監視する検出器が用いられる。標準的な検出器としては、分光光度計、光電管及びフォトダイオード、顕微鏡、シンチレーションカウンタ、カメラ、フィルムなど、ならびにその組合せが含まれる。適切な検出器の例は、当業者にとっては周知のさまざまな商業的供給源から広く入手可能である。

【0037】

好ましい実施形態においては、固体支持体は、微粒子であり、試料中の標的分析物の存在を検出するためにフローサイトメトリーが使用される。フローサイトメトリーの方法及びそのための計装は、当該技術分野において既知である。フローサイトメトリーは一般に、領域の中を一度に1つの微粒子だけが通るような形での、光ビーム及び電気光学センサーを通過する1つの流れとしての微粒子の浮遊物の通過にある。各々の微粒子がこの領域を通過するにつれて、光ビームはこの微粒子の存在により混乱させられ、結果として散乱した蛍光が検出される。個別の検定結果が達成されるように、標識の有無と量と共に各々の微粒子が属するサブグループを同定するために計装によつた光信号が使用される。フローサイトメトリー用の計装及び方法の説明は、例えば、McHughの「多数の可溶分析物の定量的な同時検出のためのフローマイクロスフェア免疫検定法」、*Methods in Cell Biology* 42, Part B (Academic Press, 1994); McHugh et al., 「フローサイトメトリー計装を用いたマイクロスフェアベースの蛍光免疫検定法」、*Clinical Flow Cytometry*, Bauer, K. D., et al., eds. (Baltimore, Maryland, USA: Williams and Williams, 1993), pp. 535 - 544の中に見い出される。

30

40

【0038】

一例としては、標的分析物Aに結合する抗体が、緑色蛍光色素を含む微粒子サブグループに固定化され；標的分析物Bに結合する抗体が赤色蛍光色素を伴う微粒子サブグループに固定化され；標的分析物Cに結合する抗体は、黄色蛍光色素を伴う微粒子サブグループに固定化される。各サブグループ内の微粒子をそのそれぞれの抗体とカップリングさせた後、それらは一緒にプールされ、試料が適用される。その後、標的分析物に結合する検出試

50

薬が混合物に添加される。一般に、検出試薬は微粒子中に含まれた蛍光色素と区別できるもう1つの測定可能標識で標識付けされる。その後、捕獲試薬及び検出試薬は、標的分析物のまわりにサンドイッチを形成する。その後、この結合を、検出試薬と会合した標識（例えばフィコエリスリン）で視覚化することができる。

【0039】

その後、微粒子をフローサイトメトリーを通して走行させ、各々の微粒子を、その区別用特性により分類する。捕獲試薬に特異的な標的分析物の存在は、各々の微粒子のフィコエリスリンを測定することによって検出できる。サイズ又は色といった微粒子のパラメータの差により、微粒子上に担持された捕獲試薬を同定するものとして役立つ、微粒子が属するサブグループを決定することが可能となる。微粒子のフィコエリスリン由来のパラメータは、試験試料中に存在する捕獲試薬と標的分析物の反応度表わす。これらの多重検定方法は、例えば米国特許第5,981,180号及び米国特許第5,567,637号の中で詳述されている。上述の多重検定は、本発明の用途の例示にすぎない。当業者であれば、本発明の標準希釈液をその他の多重検定方式でも使用できるということを認識することだろう。

10

【0040】

以下の例は、本発明を例示するものであるが、いかなる形であれ、その範囲を制限することが意図されているわけではない。

【0041】

例1

20

【0042】

本例は、ヒト血清由来の本発明に従った標準希釈液の調製、及び血清試料中の8つのサイトカイン分析物を決定するためのプロセスにおけるその使用を例示している。

【0043】

標準希釈液の調製

【0044】

以下のとおり血清試料から8つの標的分析物を実質的に除去するために、アフィニティークロマトグラフィカラムを調製した。

【0045】

標的分析物は、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、GM-SCF、IFN 及びTNF であった。各々の標的分析物に特異的なモノクローナル抗体を獲得し、塩を精製し、氷上に保管した。

30

【0046】

特異的モノクローナル抗体を用いて各標的分析物を分離するために1本ずつの計8本のカラムを構築した。各々50 μ Lのビーズを含む100 μ Lの分量の形で、Affigel（商標）ビーズのスラリーを調製した。これらのビーズは、ビーズに対する抗体の共有カップリングを可能にする中性の10原子スパーアームを含んでいる。スラリーを脱イオン水で洗浄し、カラム内に設置した。カラムに各抗体を5 μ g添加した。次にカラムを回転する振とう機上で40 で4~16時間インキュベートさせた。次に、リン酸緩衝液でビーズを洗浄した。

40

【0047】

その後、直列状態の8本のカラムにヒト血清を通過させた。今や8つの標的分析物を実質的に含まない状態となった血清を、後続する検定で標準希釈液として使用するために収集した。

【0048】

標的分析物についての検定

【0049】

各患者の血液試料を凝固させ、次にこれを遠心分離し、血清を収集した。試料1体積につき希釈液3体積の比で、以上で調製した標準希釈液で分量の血清を希釈することにより、希釈試料を調製した。

50

【0050】

それぞれのサイトカイン500, 000 pg/mL含む標準原料を生成するため、無菌精製水でもどした凍結乾燥状態のサイトカインから、サイトカイン標準を調製した。次に各々の標準原料を希釈して、それぞれ50, 000, 5000、500、50、8、4、2及び0 pg/mLの濃度の該当するサイトカインを有する一連の希釈標準を生成した。

【0051】

標的分析物の決定のため、異なる蛍光色素で各々特徴づけされた8つの5.5ミクロンのポリスチレンビーズグループを選択した。8つの標的分析物に特異的なモノクローナル抗体を各々、特定の蛍光色素を含むビーズに共有カップリングさせた。標的分析物1つにつき合計 2.6×10^6 ビーズ/mLを調製した。

10

【0052】

検定緩衝液で予備加湿することによって、96ウェルの平板を1枚調製した。1つのウェルを各患者の試料に利用し、対照(単複)のために単数又は複数の付加的なウェルを利用した。各ウェルには、8つのビーズ-抗体接合体の各々を2 μ lずつ(すなわち合計16 μ Lの接合済みビーズ)と残りの量のBioRad Bio-Plex(商標)検定緩衝液(この場合34 μ Lの緩衝液)を内含する50 μ Lの材料を充てんした。組合せたビーズ原料を、試験で合計ウェル数に必要なだけ十分な体積で(1ウェルあたり50 μ Lのビーズ原料)調製し、ウェルに添加する前に渦流に付した。

【0053】

充てんした平板にカバーをつけ、次にまずは1100rpmで30秒間、次に30分間300rpmで振とうさせた。(望まれる場合、300rpmで振とうしながら4で一晩インキュベートすることにより試験の感受性を改善することができる)。ビーズをBio-Plex Bufferで3回洗浄した。平板を暗所に置いた。

20

【0054】

8つのサイトカイン抗体に特異的な一連のビオチニル化された検出抗体の原料を調製した。検定抗体原料(100x)をBio-Rad Bio-Plex(商標)検出抗体希釈液で希釈して、各ウェルが0.5 μ Lの各検出抗体を収容している状態で、1つのウェルあたり最終体積50 μ Lの希釈した検出抗体を得た。

【0055】

希釈した検出抗体原料を渦流に付し、その後、50 μ Lを各ウェルに添加した。平板をカバーし、まずは室温で30秒間1100rpmで、次に300rpmで30分間振とうした。ビーズを再び、洗浄緩衝液で3回洗浄した。平板を乾燥させ、再び暗所に保った。

30

【0056】

その後、ビーズ-抗体接合体にストレプトアビジン-フィコエリスリン接合体をカップリングさせた。ストレプトアビジン-フィコエリスリン接合体(もとの濃度100x)を、検定緩衝液で1xまで希釈し、次に50 μ Lの希釈接合体を渦流に付し、各ウェルに添加した。平板を再びカバーし、振とうさせ、洗浄した。各ウェル内のビーズを検定緩衝液内で再度懸濁させ、振とうし、試料を読取るまで暗所に保った。

【0057】

患者試料及び対照中の8つのサイトカインを、フローサイトメトリーを用いて決定した。結果を以下の下表1に示す。標準曲線を図1に示す。

40

【0058】

【表1】

表1
8-Plexサイトカイン・アッセイによりスクリーンされた患者血清サンプル
(pg/mLで与えられるサイトカイン濃度)

患者	IL-2	IL-4	IL-10	GM-CSF	IFN γ	TNF α	IL-8	IL-6
F38	0	0	0	0	0	0	0	0
F45	50	111	70	300	822	1200	58	1815
F49	0	0.1	58	0.1	0	0.1	0	0.5
F51	0	0.2	0	0	0.5	0.1	0	0.5
F54	40	96	60	285	741	1100	47	1798
F59	0	11	10	250	170	734	0	15
M61	0	7.2	8	250	144	668	0	3.5
M67	0.1	1.5	10	11	12	10	0	4
M71	0.5	77	11	150	963	1257	1.5	337
M74	0.5	40	8	150	928	1215	1.5	339
M75	0.5	72	5	145	926	1077	1	355

M=男性 F=女性

10

20

【0059】

例2

【0060】

本例は、本発明に従った標準希釈液及び3つの異なる供給源からの血清を内含する回復検定を例示している。決定されたサイトカインは、IL-2、IL-10及びTNFであった。0~10、000pg/mLという量の抗原を、本発明に従って調製し3つの標的サイトカインが欠如した50 μ Lの標準希釈液内及び3つの患者血清の1:4の希釈液内にスパイクした。試料を、同一条件で2回走らせた。結果を図2に示す。

30

【0061】

例3

【0062】

本例は、多重検定におけるマウス血清中のサイトカインの決定のための本発明に従った標準希釈液の使用を例示している。

【0063】

例1と類似の形で、同じ8つのサイトカインについてマウス血清をテストした。本試験で決定された標準曲線を、図3に示す。

【0064】

例4

【0065】

本例は、マウス内の回復検定を例示する。手順は、プールされたマウス血清の3つの異なるパッチの50 μ Lの標準希釈液内に0~50、000pg/mLの抗原をスパイクしたという点を除いて、例2のものと類似していた。結果を、図4に示す。

40

【0066】

本発明は、多重検定用の標準希釈液、キット及び該標準希釈液に関連する方法を提供する。特定の例が提供されたものの、以上の記述は例示を目的とし、制限的な意味をもつものではない。前述の実施形態(態様)の特長のうちのいずれか単数又は複数のを、本発明の中のその他のあらゆる実施形態の単数又は複数の特長とあらゆる形で組み合わせること

50

が可能である。さらに、明細書をみれば、当業者には、発明の多くの変形形態が明らかになるであろう。従って、本発明の範囲は、以上の記述を基準にして決定されるべきではなく、添付の特許請求の範囲及びその均等物全体を基準にして決定されるべきである。

【0067】

本出願に引用されている全ての刊行物及び特許文書を、個々の刊行物又は特許文書の各々がそのように個々に示されている場合と同じ範囲で、あらゆる目的のために、全体として援用する。本出願人は、本書中にさまざまな参考文献を引用することで、いずれか特定の参考文献が自らの発明に対する「先行技術」であることを認めるものではない。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、11名の患者から得られた血清試料内で同時に測定された8つのサイトカインの量を例示している。

【図2】

図2は、3人の人間の患者において標準希釈液及び血清試料を比較する回復研究を例示する。

【図3】

図3は、マウス血清中の図1の場合と同じ8つのサイトカインの同時決定からの標準曲線を例示している。

【図4】

図4は、マウスの2つのロットから血清試料が採取されたマウス血清回復研究を例示している。

10

20

【図1】

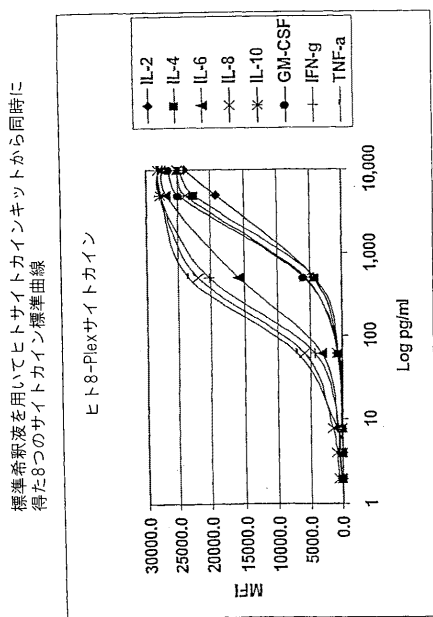


Figure 1

【図2】

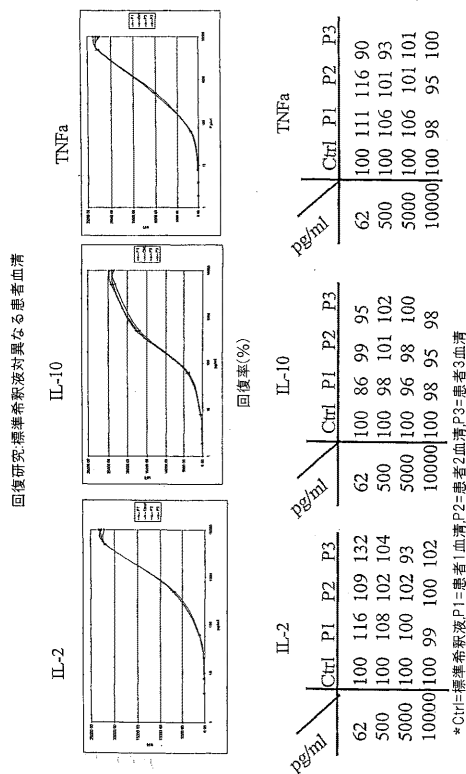


Figure 2

【 図 3 】

標準希釈液を用いたマウスサイトカインキットから同時に
得た8つのマウスサイトカイン標準曲線

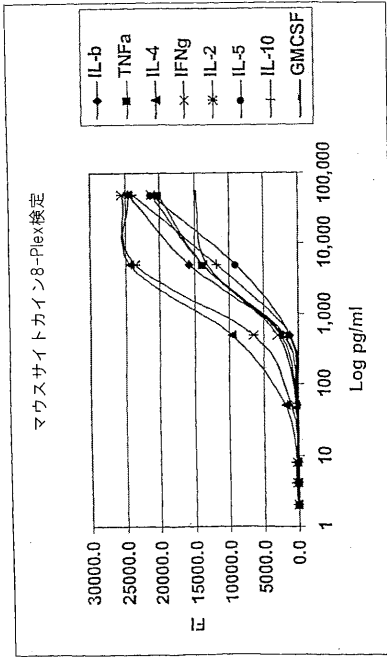
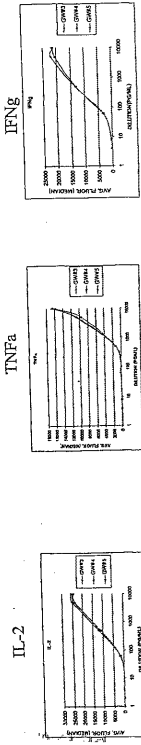


Figure 3

【 図 4 】

回復研究マウス標準希釈液対異なるマウス血清ロット



pg/ml	IL-2		TNFa		IFNg	
	Ctrl	Lot1 Lot2	Ctrl	Lot1 Lot2	Ctrl	Lot1 Lot2
10000	100	96 95	100	96 102	100	101 101
500	100	94 89	100	112 116	100	98 97
7.8	100	81 62	100	104 94	100	88 73
					7.8	

*Ctrl=標準希釈液Lot1=ロット1のマウス血清Lot2=ロット2のマウス血清

Figure 4

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059617 A2

(51) International Patent Classification: G01N 33/68, 33/543, 33/96

ZHANG, Aiguo [CN/US]; Carlos Bee Boulevard #210, Hayward, CA 94542 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/48252

(74) Agents: ACKERMAN, Joel, G. et al.; Townsend and Townsend and Crew LLP, Two Embarcadero Center, 8th Floor, San Francisco, CA 94111-3834 (US).

(22) International Filing Date: 13 December 2001 (13.12.2001)

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/255,561 13 December 2000 (13.12.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BIO-RAD LABORATORIES, INC. [US/US]; 1000 Alfred Noble Drive, Hercules, CA 94547 (US).

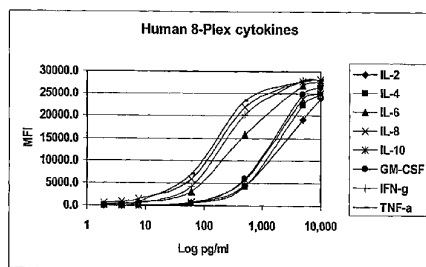
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GL, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): NGUYEN, Quan [US/US]; 249 Golf Links, Pleasant Hill, CA 94523 (US).

[Continued on next page]

(54) Title: STANDARD DILUENT FOR MULTIPLEX ASSAYS

8 Human Cytokine Standard Curves Simultaneously
Obtained from Human Cytokine Kits Using
Standard Diluent



(57) Abstract: The present invention provides standard diluents for use in multiplex assays comprising a biological fluid that normally includes two or more different target analytes but that is substantially free of the two or more different target analytes, as well as kits and methods relating to the standard diluent. The standard diluents of the invention provide an accurate and reliable means to calibrate the amount of multiple target analytes in a single assay.

WO 02/059617 A2

WO 02/059617 A2 

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/059617

PCT/US01/48252

STANDARD DILUENT FOR MULTIPLEX ASSAYS

BACKGROUND OF THE INVENTION

[01] A standard diluent is a key component of immunoassays. It is used as a buffer for diluting a reference standard that is used to quantify target analytes in a test sample.

5 Generally, to quantify the amount of target analytes present in a test sample, a series of control materials containing different concentrations of the target analytes are prepared. The series of control materials are then used to prepare a standard curve with the concentration of the target analyte plotted on one axis and a detection signal strength on the other axis. The

10 concentration of the target analyte present in a test sample can be interpolated from such a standard curve.

[01] In order for the quantitation of target analytes in a test sample to be accurate, the target analyte must behave similarly in the standard diluent and in the test sample. Sometimes components present in the test sample or in the standard diluent may influence

15 binding of the target analyte to its antibodies. For example, some unknown components present in a standard diluent may bind to the target analytes and reduce their binding to antibodies. Such unknown components may not be present in the test sample. In such an instance, the concentration of the target analytes in the test sample interpolated from the standard curve generated using the standard diluent would be higher than the actual

20 concentration of the target analytes in the test sample because of the interaction between the target analytes and the unknown components. Typically, a standard diluent is selected so that the standard curve generated using the standard diluent and the test sample deviates no more than $\pm 20\%$. This is commonly described as a recovery assay by immunoassay developers.

[01] For the detection of a single analyte, it is relatively easy to develop a standard diluent

25 since the standard diluent can be readily optimized to mimic only a single antibody-analyte reaction in a test sample. A standard diluent is generally formulated to provide reaction conditions and an environment that are equivalent to those encountered in the biological test sample to be assayed. Typically, an artificial cocktail of proteins, buffers and salt is used as a standard diluent that can duplicate the condition of a test sample to detect a single analyte.

30 However, different target analytes require different conditions, and an artificial cocktail that is suitable for analysis of one target analyte may not be suitable for analysis of another target analyte.

WO 02/059617

PCT/US01/48252

[01] In recent years, methods have been developed to simultaneously detect multiple different analytes in a single assay process (e.g., in a single well). Such methods are generally known by terms such as "multiplex assays" or "multiplex immunoassays." In a multiplex immunoassay, selecting a standard diluent that is suitable for all of the different analytes is more complex, since each antibody-analyte interaction operates best under its own set of conditions. Thus, a standard diluent comprising an artificial cocktail optimized to duplicate the condition of a test sample for one analyte may not be optimal for the detection and quantitation of other analytes. Hence, developing an artificial standard diluent that is suitable for multiplex assay is difficult and time-consuming, if not impossible. In particular when the number of target analytes to be simultaneously detected increases to, for example, fifteen to twenty, it is difficult to develop a standard diluent that provides the appropriate operating environment for all of the target analytes at the same time.

[01] Accordingly, there is a need to develop a standard diluent for multiplex assays so that two or more different target analytes can be simultaneously detected and reliably quantified. Embodiments of the invention address this and other needs.

SUMMARY OF THE INVENTION

[01] It has now been discovered that a standard diluent for multiplex immunoassays can be derived from a biological fluid that normally contains two or more different target analytes to be detected in an immunoassay, but is processed or screened to be substantially free of these target analytes. For example, if the simultaneous detection of four types of cytokines in a human serum sample is desired, a standard diluent used to dilute a reference standard to quantify cytokines is derived from a human serum that is substantially free of the four types of cytokines. A standard diluent "substantially free of two or more different target analytes" means that the endogenous level of target analytes normally present in the biological fluid is no longer detectable in the standard diluent or that the amount of target analytes present in the biological fluid is below a selected threshold level (e.g., 10 pg/mL). Typically, the endogenous level of target analytes is removed from the biological fluid by affinity chromatography. Alternatively, biological fluids obtained from donors can be screened to identify a biological fluid that naturally contains the target analytes in amounts that are not detectable, or that are below a selected threshold level. Such processed or screened biological fluids comprise essentially the same matrix components as a sample to be tested, and are ideally suited for use as a standard diluent. By providing essentially the same matrix components as a test sample, the standard diluent of the invention provides reaction

WO 02/059617

PCT/US01/48252

conditions and an environment for multiple target analytes that are equivalent to the biological test sample. These qualities enable the standard diluent of this invention to facilitate reliable and accurate quantitation of target analytes in a biological sample.

5 [01] The standard diluent of the present invention has utilities in various multiplex assays, particularly when quantitation of target analytes needs to be accurate. For example, the standard diluent can be used in multiplex assays for monitoring the amount of target analytes in a clinical sample. For instance, the target analytes can be components of an immune system (e.g., cytokines) in patients who are suffering from autoimmune diseases or cancer and whose immune system needs to be evaluated periodically to determine progress of their
10 disease. Alternatively, the target analytes can be various proteins that are associated with a certain disease. For instance, multiple proteins, including prostate cancer antigen, are known to be elevated in patients having prostate cancer. A standard diluent that is substantially free of prostate cancer antigen and other proteins associated with prostate cancer can be used to accurately determine the concentration of these proteins in a clinical sample. In another
15 example, the standard diluent can also be used in a drug discovery program in determining the concentration of certain target analytes that are stimulated by a test drug.

[01] Accordingly, in one aspect the invention provides a standard diluent comprising a biological fluid normally including two or more different target analytes but that has been processed or screened to be substantially free of the two or more different target analytes. In
20 a preferred embodiment, the standard diluent is derived from serum or plasma, and the target analytes are cytokines.

[01] In another aspect, the invention provides a kit comprising: (a) a standard diluent comprising a biological fluid normally including two or more different target analytes but that is substantially free of the two or more different target analytes; and (b) a predetermined
25 amount of one or more concentrated materials that collectively or separately contain the two or more different target analytes. Such a kit can be used to make a series of control materials containing different concentrations of target analytes to generate a standard curve. The standard curve can then be used to quantify the amount of target analytes present in test samples.

30 [01] In another aspect, the invention provides a kit for detecting two or more different target analytes in a serum or plasma sample, the kit comprising: (a) solid supports that are classifiable into subgroups, each subgroup differentiable from others by a differentiation parameter and each subgroup capable of having immobilized thereon a capture reagent that binds to a particular target analyte; and (b) a standard diluent comprising serum or plasma

WO 02/059617

PCT/US01/48252

that is substantially free of the two or more different target analytes. Such a kit can be used to simultaneously detect and quantify multiple target analytes from a serum or plasma sample.

5 [01] In another aspect, the invention comprises a method of conducting a simultaneous assay for two or more target analytes in which a standard diluent is used to dilute one or more reference standards, the method comprising using as the standard diluent a biological fluid that is substantially free of the two or more target analytes.

[01] In a further aspect, the invention comprises a method of preparing a standard diluent for use in a simultaneous assay for two or more target analytes, comprising treating a 10 biological fluid containing the target analytes to remove the target analytes so as to decrease the concentrations thereof to concentrations below predetermined thresholds.

[01] These and other features, objects, and advantages of the invention will be more readily understandable from the description that follows.

15 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[01] Figure 1 illustrates the amount of eight cytokines measured simultaneously in serum samples obtained from eleven patients.

[15] Figure 2 illustrates a recovery study comparing standard diluent and serum samples in three human patients.

20 [16] Figure 3 illustrates standard curves from a simultaneous determination of the same eight cytokines as in Figure 1, in mouse sera.

[17] Figure 4 illustrates a mouse sera recovery study in which serum samples were taken from two lots of mice.

25 DESCRIPTION OF SPECIFIC EMBODIMENTS

[18] In one aspect, the invention provides a standard diluent comprising a biological fluid that normally includes two or more different target analytes but that in the present case is substantially free of these analytes. The selection of a biological fluid to make a standard diluent depends on the source of biological fluid in which the detection of the target analytes 30 is desired. By "the source" it is not meant to refer to a specific individual but rather to a general type of biological fluid from a human or from a type or species of animal. For example, if the detection of various cytokines in blood serum is desired to monitor a subject's immune response, then a blood serum is considered to be the source from which to make a standard diluent. Hence, a standard diluent can be derived from various types of biological

WO 02/059617

PCT/US01/48252

fluids depending on the selection of a test sample for the detection of target analytes. For example, the biological fluid in which the target analytes are sought can be a serum, plasma, urine, cerebrospinal fluid, tissue or cell extract, amniotic fluid, sweat, tear, saliva or nasal secretion, and, correspondingly, the standard diluent is prepared from the same type of fluid or source. The biological fluid can be obtained from either a human or a non-human (e.g., mouse, rat, guinea pig, rabbit, etc.); the fluid need not be obtained from the same species as that whose fluid is to be analyzed for the targets.

[19] To make a standard diluent substantially free of two or more different target analytes, the target analytes are typically removed from the biological fluid. There are a number of known suitable techniques that can be used to remove the target analytes. A preferred technique for this purpose is affinity chromatography. For example, column chromatography techniques can be applied to remove the target analytes and to obtain an eluent substantially free of the target analytes for use as a standard diluent. Any suitable adsorbents can be used, as long as they are capable of selectively removing the target analytes from the biological fluid. It is preferred that antibodies that specifically bind to the target analytes are employed to remove the target analytes from the biological fluid. The term "antibodies" include monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, antibody fragments, single chain antibodies, etc. Methods for making antibodies are described in detail below. The antibodies in question can be conjugated to column matrices. A biological fluid can be applied to the column, and an eluent from which the target analytes have been removed may be collected and used as a standard diluent. The column chromatography and other affinity chromatography methods are well known in the art and are described in, e.g., Scope, *Protein Purification, Principles and Practice*, 3rd ed., Springer-Verlag New York, Inc. (1994); and Deutscher, *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*, Vol. 182, Academic Press, San Diego (1990).

[20] Alternatively, a standard diluent substantially free of two or more different target analytes may be obtained by screening biological fluids from various sources that naturally do not contain any (i.e. do not contain detectable amounts) or contain a very low amount (below a predetermined threshold) of endogenous target analytes. For example, if detection of cytokines in blood serum is desired, a standard diluent substantially free of the cytokines can be obtained from screening blood serum samples from various donors. The level of cytokines or other target analytes may vary among the population, and it may be possible to screen a number of donors from the population for the target analytes and thus identify and obtain a biological fluid that is substantially free of target analytes. Screening and selecting

WO 02/059617

PCT/US01/48252

such a biological sample would avoid the necessity of removing the target analytes from biological fluids to make a standard diluent.

[21] Whether the standard diluent is obtained by removing target analytes from a biological fluid or by screening biological fluids from donors, a standard diluent is referred to as being "substantially free of two or more different target analytes" when the target analytes are undetectable by immunoassay methods or when the level of the target analytes is lower than a selected sensitivity threshold. For example, depending on the assay to be conducted, the sensitivity level of a target analyte in a sample may variously be selected at less than about, *e.g.*, 20 pg/mL, less than 10 pg/mL, less than 5 pg/mL, or less than 1 pg/mL. In any such case the standard diluent may be said to be "substantially free of two or more different target analytes" when their concentrations are below the selected threshold.

[22] The target analytes can be any components in a biological fluid, such as proteins, peptides, nucleic acids, lipids, carbohydrates, haptens, or combinations thereof. Generally, the target analytes are proteins or peptides. For example, the target analytes can be various cytokines, hormones such as steroids, lipoproteins, glycoproteins, or tumor antigens. In one embodiment, the target analytes are cytokines, such as interleukins, lymphokines, interferons, colony stimulator factors, platelet-activating factors, and/or tumor necrosis factors. In a preferred embodiment, the biological fluid used to make a standard diluent is blood serum, and the target analytes are two or more of interleukin-2 ("IL-2"), interleukin-4 ("IL-4"), interleukin-6 ("IL-6"), interleukin-8 ("IL-8"), interleukin-10 ("IL-10"), granulocyte-macrophage-colony stimulating factor ("GM-CSF"), tumor necrosis factor alpha ("TNF- α ") and interferon gamma ("IFN- γ ").

[23] If necessary, any number of target analytes can be removed, sequentially or simultaneously, from a biological fluid to prepare a standard diluent. For example, two to five hundred target analytes, or two to one hundred target analytes, or two to fifty target analytes, or any integer number in between these ranges can be removed from a biological fluid to make a standard diluent. Typically, between three to thirty, more typically between three to twenty target analytes, even more typically between four to fifteen target analytes are removed from a biological fluid to make a standard diluent. Obviously, only the target analytes that are to be detected in test samples need to be removed from a biological fluid to prepare a standard diluent.

[24] Once a standard diluent substantially free of target analytes is prepared, it can be used to dilute a reference standard (*e.g.*, a concentrated material of target analytes) to make control materials for calibrating the amount of the target analytes in a test sample. In this procedure,

WO 02/059617

PCT/US01/48252

generally, a predetermined amount of concentrated material that collectively or separately contains two or more different target analytes is mixed with the standard diluent of the invention. For example, if calibrating IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, and IL-10 in a test sample is desired, then a predetermined amount of a concentration material comprising all five

5 interleukins can be added to a standard diluent to make a control material. Then the control materials containing different amounts of target analytes can be used to generate a standard curve that can then be used to quantify the amount of these interleukins in a test sample.

[25] In many cases, it will be useful to prepare a series of control materials at different concentrations of the target analytes, spanning or bracketing the range of concentrations that might be expected in test samples or test samples that are appropriately diluted. For example, a series of control materials may include one control material in which the concentration of the target analytes is approximately equal to that of a patient not suffering from a disease, a second control material containing the target analytes at a concentration substantially higher than that of the first control material, and a third control material containing the target

10

15 analytes at a concentration substantially higher than those of both the first and second control materials. For example, for detection of cytokines in serum, a series of control materials comprising 5,000 pg/mL, 500 pg/mL, 50 pg/mL, 8 pg/mL, 4 pg/mL, 2 pg/mL and 0 pg/mL of cytokines can be used to generate a standard curve.

[26] Accordingly, embodiments of the invention also provide a kit comprising (a) a standard diluent of the invention; and (b) a predetermined amount of one or more concentrated materials that collectively or separately contain two or more different target analytes. Such a kit provides a convenient way for the user to make control materials for an immunoassay, and avoids the need for the user to accurately measure concentrated materials comprising the target analytes. The concentrated materials comprising the target analytes may be in a liquid or solid form. For example, the concentrated material comprising the target analytes may be lyophilized, which can be later dissolved by the user to make control materials.

20

25

[27] The kit can further comprise instruction materials for using the standard diluent to produce a series of control materials comprising different concentrations of the target analytes. For example, instructional materials can include how to initiate the dilution series by diluting each concentration material with a standard diluent, together with recommendations for the range of concentrations of target analytes that are expected to be found in a test sample. The kit can also include written instructions for the use of one or more of other reagents in any of the assays described herein. The kit can further include a

30

WO 02/059617

PCT/US01/48252

container containing one or more of the detection reagents with or without labels, and capture reagents, either free or bound to solid supports. Preferably, the kits will also include reagents used in the assays, including reagents useful for detecting the presence of the detectable labels.

5 [28] In another aspect, the invention also provides a kit for the simultaneous detection of multiple target analytes in a test sample that further comprises solid supports upon which are immobilized capture reagents that bind to the target analytes. In assays using such a kit, solid supports comprising capture reagents that bind to different target analytes can be mixed in a single well (for example), and a test sample can be introduced. The target analytes can be
10 detected using the detection methods known in the art. The amount of each of the multiple target analytes can be determined reliably using the control materials of the present invention. This simultaneous analysis of multiple target analytes from a test sample has obvious cost and convenience benefits. Moreover, only a small amount of a test sample is required since the multiple target analytes can be assayed simultaneously in a single well.

15 [01] Any suitable capture reagents can be used to bind the target analytes in such kits. For example, capture reagents can be antibodies (e.g., monoclonal antibodies, polyclonal antibodies), antibody fragments, single chain antibodies, etc., that specifically bind to the target analytes. Antibodies will usually bind with a K_d of at least about 0.1 mM, more usually at least about 1 μ M, preferably at least about 0.1 μ M or better, and most preferably,
20 0.01 μ M or better.

[30] Various procedures known in the art can be used for the production of antibodies that specifically bind to target analytes. For the production of polyclonal antibodies, one can use target analytes to inoculate any of various host animals, including but not limited to rabbits, mice, rats, sheep, goats, and the like. Monoclonal antibodies can be prepared by any
25 technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture, including the hybridoma technique originally developed by Kohler and Milstein (*Nature* 256: 495-497 (1975)), as well as the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983)), and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole *et al.* in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)).
30

[31] Fragments of antibodies are also useful as binding moieties. While various antibody fragments can be obtained by the digestion of an intact antibody, those skilled in the art will appreciate that such fragments may be synthesized *de novo* either chemically or by utilizing recombinant DNA methodology. Single chain antibodies are also useful to construct

WO 02/059617

PCT/US01/48252

detection moieties. Methods for producing single chain antibodies were described in, for example, U.S. Patent No. 4,946,778. Techniques for the construction of Fab expression libraries were described by Huse *et al.*, *Science* 246: 1275-1281 (1989). These techniques facilitate rapid identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for target analytes. Suitable binding moieties also include those that are obtained using methods such as phage display.

[32] The capture reagents can be immobilized on the support either by covalent or non-covalent methods, as known in the art. *See, e.g.*, Pluskal *et al.*, *BioTechniques* 4: 272-283 (1986). Suitable supports include, for example, glasses, plastics, polymers, metals, metalloids, ceramics, organics, and the like. Specific examples include, but are not limited to, microtiter plates, a flat substrate (*e.g.*, a chip), nitrocellulose membranes, nylon membranes, and derivatized nylon membranes, and also microparticles or beads, such as beads of agarose, dextran, and the like. Suitable solid supports and analysis methods for multiplex assays are also described in, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,567,627, U.S. Patent No. 5,981,180, U.S. Patent No. 5,641,640, International Application WO98/59360, and Michael *et al.*, *Anal. Chem.* 70:1242-8 (1998).

[33] In one embodiment, solid supports are a population of microparticles that are classifiable into subgroups, wherein each subgroup is differentiable from others by a differentiation parameter and each subgroup also has capture reagents immobilized thereon which are capable of binding to a different target analyte. A differentiation parameter is a term used herein to denote a distinguishable characteristic that permits separate detection of the assay result in one subgroup from that in another. For example, differentiation parameters that can be used to distinguish among the various subgroups of microparticles include particle size, particle fluorescence, particle light scatter, light emission and absorbance properties. A capture reagent for each target analyte can then be coupled to each subgroup of microparticles. Although different subgroups of microparticles are pooled together in multiplex assays, the differentiation parameter associated with each subgroup of microparticles allows the user to determine which target analyte is bound to which subgroup of microparticles.

[34] In a preferred embodiment, a differentiation parameter that is used to distinguish among various subgroups of microparticles is fluorescence dye or color. For example, the microparticles can have two or more fluorochromes incorporated within them so that microparticles in each subgroup can be differentiated from another based on fluorescence characteristics, such as fluorochrome concentration. Each subgroup of microparticles, for

WO 02/059617

PCT/US01/48252

instance, can have different concentrations of a red fluorochrome such as Cy5 together with different concentrations of an orange fluorochrome such as Cy5.5. By varying the concentration of each of the two fluorochromes, hundreds or thousands of subgroups of microparticles with different fluorescent emissions can be obtained. Additional

5 fluorochromes can be incorporated into microparticles to further expand the number of subgroups of microparticles that can be used in a multiplex assays. Microparticles with dyes already incorporated and thereby suitable for use in the present invention are commercially available from suppliers such as Luminex Corporation (Austin, Texas) and Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon).

10 [35] In another aspect, the kit of the present invention further comprises detection reagents. The presence of target analytes is generally detected using a detection reagent that is composed of a binding moiety that specifically binds to the target analytes. The detection reagents are either directly labeled, *i.e.*, comprise or react to produce a detectable label, or are indirectly labeled, *i.e.*, bind to a molecule comprising or reacting to produce a detectable

15 label. Labels can be directly attached to or incorporated into the detection reagent by chemical or recombinant methods. For example, a label is coupled to a molecule, such as an antibody that specifically binds to a target analyte through a chemical linker.

[36] The detectable labels used in the assays of the present invention, which are attached to the detection reagent, can be primary labels (where the label comprises an element that is

20 detected directly or that produces a directly detectable element) or secondary labels (where the detected label binds to a primary label, *e.g.*, as is common in immunological labeling). An introduction to labels, labeling procedures and detection of labels is found in Polak and Van Noorden (1997) *Introduction to Immunocytochemistry*, 2nd ed., Springer Verlag, NY and in Haugland (1996) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, a

25 combined handbook and catalogue published by Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. Patents that described the use of such labels include U.S. Patent Nos. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; and 4,366,241.

[37] Primary and secondary labels can include undetected elements as well as detected elements. Useful primary and secondary labels in the present invention can include spectral

30 labels such as green fluorescent protein, fluorescent dyes (*e.g.*, fluorescein and derivatives such as fluorescein isothiocyanate (FITC) and Oregon Green, rhodamine and derivatives (*e.g.*, Texas Red, tetrahydroamine isothiocyanate (TRITC), *etc.*), digoxigenin, biotin, phycoerythrin, AMCA, CyDyes™, and the like), radiolabels (*e.g.*, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, *etc.*), enzymes (*e.g.*, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase *etc.*), spectral colorimetric

WO 02/059617

PCT/US01/48252

labels such as colloidal gold or colored glass or plastic (e.g. polystyrene, polypropylene, latex, etc.) beads. The label can be coupled directly or indirectly to a component of the detection assay (e.g., the detection reagent) according to methods well known in the art. As indicated above, a wide variety of labels may be used, with the choice of label depending on sensitivity required, ease of conjugation with the compound, stability requirements, available instrumentation, and disposal provisions.

[38] The assays for detecting multiple target analytes can be performed in any of several formats. For example, a sandwich assay can be performed by placing a test sample in contact with solid supports on which are immobilized capture reagents that bind to the target analytes. The capture reagents immobilized on the solid supports are present in excess relative to the suspected quantity range of the target analytes so that all of the target analytes bind. The target analytes, if present in the sample, bind to the capture reagents. The solid supports are then contacted with detection reagents which bind to different epitopes on the target analytes. After incubation of the detected reagents for a sufficient time to bind to the immobilized target analytes, any unbound detection reagents are removed by, e.g., washing. The detectable label (e.g., phycoerythrin) associated with the detection reagents is then detected. For example, if a detectable label is fluorescence, then the fluorescence will be observed in proportion to the amount of the specific target analytes present in the sample.

[39] In another example, competitive binding assays can also be used to detect the target analytes in a sample. The assays are performed by adding labeled analogs of target analytes to a sample. In these assays, the capture reagents bound to the solid supports are present in excess relative to the suspected quantity range of the target analytes so that all of the analytes bind. The labeled analogs and the target analytes present in the sample compete for the binding sites of the capture reagents immobilized on the solid supports. After a suitable incubation period, any remaining unbound analytes and labels are washed away. The amount of labeled analogs of target analytes bound to the solid supports is inversely proportional to the concentration of target analytes in the sample.

[40] The presence of a label can be detected by inspection, or a detector that monitors a particular probe or probe combination is used to detect the detection reagent label. Typical detectors include spectrophotometers, phototubes and photodiodes, microscopes, scintillation counters, cameras, film and the like, as well as combinations thereof. Examples of suitable detectors are widely available from a variety of commercial sources known to persons of skill.

WO 02/059617

PCT/US01/48252

[41] In a preferred embodiment, the solid supports are microparticles and a flow cytometer is used to detect the presence of target analytes in a sample. Methods of and instrumentation for flow cytometry are known in the art. Flow cytometry in general resides in the passage of a suspension of the microparticles as a stream past a light beam and electro-optical sensors, in such a manner that only one microparticle at a time passes through the region. As each microparticle passes this region, the light beam is perturbed by the presence of the microparticle, and the resulting scattered and fluorescent light are detected. The optical signals are used by the instrumentation to identify the subgroup to which each microparticle belongs, along with the presence and amount of label, so that individual assay results are achieved. Descriptions of instrumentation and methods for flow cytometry are found in, e.g., McHugh, "Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes," *Methods in Cell Biology* 42, Part B (Academic Press, 1994); McHugh et al., "Microsphere-Based Fluorescence Immunoassays Using Flow Cytometry Instrumentation," *Clinical Flow Cytometry*, Bauer, K. D., et al., eds. (Baltimore, Maryland, USA: Williams and Williams, 1993), pp. 535-544.

[42] As an illustration, antibodies that bind to target analyte A are immobilized to a subgroup of microparticles comprising a green fluorochrome; antibodies that bind to target analyte B are immobilized to a subgroup of microparticles with a red fluorochrome; and antibodies that bind to target analyte C are immobilized to a subgroup of microparticles with a yellow fluorochrome. After coupling the microparticles in each subgroup with their respective antibodies, then they are pooled together and a sample is applied. Then the detection reagents that bind to the target analytes are added to the mixture. Generally, the detection reagent is labeled with another measurable label, which is distinguishable from fluorochromes contained in the microparticles. Then, the capture reagents and the detection reagents form a sandwich around the target analytes. Then, this binding can be visualized by the label (e.g., phycoerythrin) associated with the detection reagents.

[43] The microparticles are then run through a flow cytometer, and each microparticle is classified by its distinguishing characteristics. The presence of target analytes specific for capture reagents can be detected by measuring phycoerythrin of each microparticle. The difference in parameters of microparticles, such as size or color, allows one to determine the subgroup to which a microparticle belongs, which serves as an identifier for the capture reagents carried on the microparticles. The parameter from phycoerythrin of the microparticles indicates the extent to which the target analytes are reactive with the capture reagents are present in a test sample. These multiplex analysis methods are described in

WO 02/059617

PCT/US01/48252

detail in, e.g., U.S. patent No. 5,981,180 and U.S. Patent No. 5,567,637. The above-described multiplex assays are only illustrations of the use of the invention; those of ordinary skill in the art will recognize that standard diluents of the present invention may be used in other multiplex assay formats as well.

- 5 [44] The following examples are illustrative of the invention, but are in no way intended to limit the scope thereof.

Example 1.

[45] This example illustrates the preparation of a standard diluent according to this invention from a human serum, and its use in a process for determining eight cytokine
10 analytes in a serum sample.

Preparation of standard diluent:

[46] An affinity chromatographic column was prepared to substantially remove the eight target analytes from a serum sample as follows.

[01] The target analytes were IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-SCF, IFN γ and TNF α .

- 15 Monoclonal antibodies specific to each target analyte were obtained, purified of salt, and stored on ice.

[48] Eight columns were constructed, one for separation of each target analyte using the monoclonal antibody specific for it. Slurries of Affi-gel® beads were prepared, in 100- μ L portions, each containing 50 μ L of beads. These beads contain a neutral 10-atom spacer arm
20 that allows for covalent coupling of the antibodies to the beads. The slurries were washed with deionized water and placed in the columns. Five μ g of each antibody was added to a column; the columns were then incubated for 4-16 hours at 40°C on a rotating shaker. The beads were then washed with phosphate buffered saline.

- [49] Human blood serum was then passed through the eight columns in series. The serum,
25 now substantially free of the eight target analytes, was collected for use as a standard diluent in the following assay.

Assay for target analytes

- [50] Each patient's blood sample was allowed to clot; then it was centrifuged and the serum collected. Diluted samples were prepared by diluting portions of the serum with the
30 standard diluent prepared above, in a ratio of 3 volumes diluent per volume sample.

[51] Cytokine standards were prepared from lyophilized cytokines reconstituted with sterile distilled water to produce standard stocks containing 500,000 pg/mL of the respective cytokine. Each standard stock was then diluted to produce a series of diluted standards

WO 02/059617

PCT/US01/48252

having concentrations of 50,000, 5000, 500, 50, 8, 4, 2 and 0 pg/mL of the cytokine question, respectively.

[52] For determination of the target analytes, eight groups of 5.5-micron polystyrene beads were selected, with each group of beads characterized by a different fluorochrome.

- 5 Monoclonal antibodies specific to the eight target analytes were each covalently coupled to beads containing a particular fluorochrome. A total of 2.6×10^6 beads/mL per target analyte was prepared.

- [01] A 96-well plate was prepared by pre-wetting with an assay buffer. One well was utilized for each patient sample, with one or more additional wells being utilized for
10 control(s). Each well was filled with 50 μ L of materials, including 2 μ L of each of the eight bead-antibody conjugates (i.e., a total of 16 μ L of conjugated beads) and the remainder Bio-Rad Bio-Plex® assay buffer (in this case, 34 μ L of buffer). A combined bead stock was prepared, with sufficient volume as needed for the total number of wells in the test (50 μ L bead stock per well), and was vortexed before being added to the wells.

- 15 [54] The filled plate was covered, then shaken at 1100 rpm, for 30 seconds, followed by 300 rpm, for 30 minutes. (If desired, sensitivity of the test may be improved by overnight incubation at 4°C with shaking at 300 rpm.) The beads were washed three times with Bio-Plex buffer. The plate was placed in the dark.

- [01] A stock of a series of biotinylated detection antibodies specific to the eight cytokine
20 antibodies was prepared. The detection antibody stock (100X) was diluted with Bio-Rad Bio-Plex® detection antibody diluent to provide a final volume of 50 μ L diluted detection antibody per well, with each well receiving 0.5 μ L of each detection antibody.

- [56] The diluted detection antibody stock was vortexed, then 50 μ L was added to each well. The plate was covered and shaken at room temperature for 30 seconds at 1100 rpm,
25 then for 30 minutes at 300 rpm. The beads were again washed three times with the wash buffer. The plate was dried and again kept in the dark.

- [01] A streptavidin-phycoerytherin conjugate was then coupled to the bead-antibody conjugates. The streptavidin-phycoerytherin conjugatae (original concentration 100X) was diluted to 1X with the assay buffer; then 50 μ L of the diluted conjugate was vortexed and
30 added to each well. The plate was again covered, shaken and washed. The beads in each well were resuspended in the assay buffer, shaken and kept in the dark until the samples were read.

WO 02/059617

PCT/US01/48252

[58] The eight cytokines in the patient samples and controls were determined using a flow cytometer. The results are shown in the following Table 1. Standard curves are shown in Figure 1.

Table 1
Patient Serum Samples Screened By 8-Plex Cytokine Assays

(Cytokine concentrations given in pg/mL)

Patient	IL-2	IL-4	IL-10	GM-CSF	IFN γ	TNF α	IL-8	IL-6
F38	0	0	0	0	0	0	0	0
F45	50	111	70	300	822	1200	58	1815
F49	0	0.1	58	0.1	0	0.1	0	0.5
F51	0	0.2	0	0	0.5	0.1	0	0.5
F54	40	96	60	285	741	1100	47	1798
F59	0	11	10	250	170	734	0	15
M61	0	7.2	8	250	144	668	0	3.5
M67	0.1	1.5	10	11	12	10	0	4
M71	0.5	77	11	150	963	1257	1.5	337
M74	0.5	40	8	150	928	1215	1.5	339
M75	0.5	72	5	145	926	1077	1	355

M = Male F = Female

Example 2.

[01] This example illustrates a recovery assay including a standard diluent according to this invention and sera from three different patients. Cytokines determined were IL-2, IL-10 and TNF α . Amounts of from 0 – 10,000 pg/mL of antigens were spiked into 50 μ l of standard diluent prepared according to this invention (“control”) and lacking the three target cytokines, and into 1:4 dilutions of the three patient sera. Samples were run in duplicate. The results are shown in Figure 2.

WO 02/059617

PCT/US01/48252

Example 3.

[60] This example illustrates the use of a standard diluent according to the invention for determination of cytokines in mouse sera in a multiplex assay.

5 [61] Similarly to Example 1, mice sera were tested for the same eight cytokines. The standard curves determined in this test are shown in Figure 3.

Example 4.

[62] This example illustrates a recovery assay in mice. The procedure was similar to that of Example 2, except that 0-50,000 pg/mL of antigens was spiked into 50 μ L of a standard dilution of three different batches of pooled mouse sera. The results are shown in Figure 4.

10 [63] The present invention provides standard diluents for multiplex assays, kits and methods relating to the standard diluent. While specific examples have been provided, the above description is illustrative and not restrictive. Any one or more of the features of the previously described embodiments can be combined in any manner with one or more features of any other embodiments in the present invention. Furthermore, many variations of the
15 invention will become apparent to those skilled in the art upon review of the specification. The scope of the invention should, therefore, be determined not with reference to the above description, but instead should be determined with reference to the appended claims along with their full scope of equivalents.

[64] All publications and patent documents cited in this application are incorporated by
20 reference in their entirety for all purposes to the same extent as if each individual publication or patent document were so individually denoted. By their citation of various references in this document, Applicants do not admit any particular reference is "prior art" to their invention.

WO 02/059617

PCT/US01/48252

WHAT IS CLAIMED IS:

- 1 1. A kit comprising:
2 (a) a standard diluent comprising a biological fluid normally including two
3 or more different target analytes but substantially free of the two or more different target
4 analytes; and
5 (b) a predetermined amount of one or more concentrated materials that
6 collectively or separately contain the two or more different target analytes.
- 1 2. The kit in accordance with claim 1 in which the standard diluent is
2 produced by removing the two or more different target analytes from the biological fluid by
3 affinity chromatography.
- 1 3. The kit in accordance with claim 1 in which the standard diluent is
2 obtained from a biological fluid of a host having the biological fluid substantially free of the
3 two or more different target analytes.
- 1 4. The kit in accordance with claim 2 in which the affinity
2 chromatography comprises removing the two or more different target analytes using
3 antibodies that bind to the target analytes.
- 1 5. The kit in accordance with claim 1 in which the biological fluid is
2 selected from the group consisting of serum, plasma, urine, cerebrospinal fluid, cell extracts,
3 amniotic fluid, sweat, tear, saliva or nasal secretions.
- 1 6. The kit in accordance with claim 5 in which the biological fluid is
2 obtained from human or mouse.
- 1 7. The kit in accordance with claim 1 in which the two or more different
2 target analytes are cytokines.
- 1 8. The kit in accordance with claim 7 in which the cytokines are selected
2 from interleukins, lymphokines, interferons, colony stimulator factors, platelet-activating
3 factors, and/or tumor necrosis factors.
- 1 9. The kit in accordance with claim 1 in which the target analytes are two
2 or more of IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF- α and IFN- γ .

WO 02/059617

PCT/US01/48252

1 10. The kit in accordance with claim 1 in which the two or more different
2 target analytes are mixed together to form a single concentrated material in part (b).

1 11. The kit in accordance with claim 1, the kit further comprising
2 instruction materials for using the standard diluent to produce a series of control materials
3 comprising different concentrations of the target analytes.

1 12. The kit in accordance with claim 1, the kit further comprising solid
2 supports having immobilized thereon capture reagents that bind to the target analytes.

1 13. The kit in accordance with claim 12 in which the solid supports are
2 classifiable into subgroups, each subgroup differentiable from others by a differentiation
3 parameter and each subgroup having immobilized thereon a capture reagent capable of
4 binding to a different target analyte.

1 14. The kit in accordance with claim 13 in which the differentiation
2 parameter is color or fluorescence of the solid supports.

1 15. The kit in accordance with claim 12 in which the solid supports are
2 microparticles.

1 16. The kit in accordance with claim 12 in which the capture reagents are
2 antibodies that bind to the target analytes.

1 17. The kit in accordance with claim 16, the kit further comprising
2 detection reagents that bind to the target analytes.

1 18. A control material for calibrating the amount of two or more different
2 target analytes in a test sample in an immunoassay, the control material comprising:
3 (a) a predetermined amount of a concentrated material comprising the two or
4 more different target analytes mixed with (b) a standard diluent comprising a biological fluid
5 normally including the two or more different analytes but substantially free of the two or
6 more different target analytes.

1 19. The control material in accordance with claim 18 in which the target
2 analytes are cytokines.

WO 02/059617

PCT/US01/48252

- 1 20. A kit for detecting two or more different target analytes in a serum or
2 plasma sample, the kit comprising:
3 (a) solid supports that are classifiable into subgroups, each subgroup
4 differentiable from others by a differentiation parameter and each subgroup capable of having
5 immobilized thereon a capture reagent that binds to a different target analyte; and
6 (b) a standard diluent comprising serum or plasma that is substantially free
7 of the two or more different target analytes.
- 1 21. The kit in accordance with claim 20, wherein the differentiation
2 parameter is color or fluorescence of the solid supports.
- 1 22. The kit in accordance with claim 20 in which the solid supports are
2 microparticles.
- 1 23. The kit in accordance with claim 20 in which the capture reagent for
2 each target analyte is immobilized on each subgroup of the solid supports.
- 1 24. The kit in accordance with claim 20 in which the standard diluent is
2 produced by removing the two or more different target analytes from the serum or plasma by
3 affinity chromatography.
- 1 25. The kit in accordance with claim 20 in which the standard diluent is
2 obtained from a host's serum or plasma which has an undetectable endogenous level of the
3 two or more different target analytes.
- 1 26. The kit in accordance with claim 20 in which the serum or plasma for
2 the standard diluent is obtained from human or mouse.
- 1 27. The kit in accordance with claim 20 in which the two or more different
2 target analytes are cytokines.
- 1 28. The kit in accordance with claim 27 in which the cytokines are selected
2 from interleukins, lymphokines, interferons, colony stimulator factors, platelet-activating
3 factors, and/or tumor necrosis factors.
- 1 29. The kit in accordance with claim 27 in which the target analytes are
2 two or more of IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF- α , and INF- γ .

WO 02/059617

PCT/US01/48252

3 30. The kit in accordance with claim 20, the kit further comprising a
4 predetermined amount of one or more concentrated materials that collectively or separately
5 contain the two or more different target analytes.

1 31. The kit in accordance with claim 20, the kit further comprising
2 detection reagents that bind to the target analytes.

1 32. A method of conducting a simultaneous assay for two or more target
2 analytes in which a standard diluent is used to dilute one or more reference standards, the
3 method comprising using as the standard diluent a biological fluid substantially free of the
4 two or more target analytes.

1 33. The method in accordance with claim 32 in which the assay is
2 conducted for the target analytes in a first biological fluid, and the diluent comprises a second
3 biological fluid comprising essentially the same matrix components as the first biological
4 fluid, the second biological fluid being substantially free of the two or more target analytes.

1 34. The method in accordance with claim 33 in which the second
2 biological fluid is obtained by screening a series of biological fluids and identifying one or
3 more biological fluids containing the two or more target analytes at a concentration below a
4 predetermined threshold.

1 35. The method in accordance with claim 33 in which the second
2 biological fluid is obtained by treating a biological fluid to remove the target analytes so as to
3 decrease the concentrations thereof to concentrations below predetermined thresholds.

1 36. The method in accordance with claim 35 in which the target analytes
2 are removed by affinity chromatography.

1 37. The method in accordance with claim 36 in which the target analytes
2 are removed by contacting the biological fluid with antibodies that bind to the target analytes.

1 38. The method in accordance with claim 33 in which the biological fluid
2 is selected from interleukins, lymphokines, interferons, colony stimulator factors, platelet-
3 activating factors, and/or tumor necrosis factors.

WO 02/059617

PCT/US01/48252

- 1 39. The method in accordance with claim 33 in which the two or more
2 different target analytes are cytokines.
- 1 40. The method in accordance with claim 33 in which the cytokines are
2 selected from interleukins, lymphokines, interferons, colony stimulator factors, platelet-
3 activating factors, and/or tumor necrosis factors.
- 1 41. The method in accordance with claim 40 in which the target analytes
2 are two or more of IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF- α and/or INF- γ .
- 1 42. A method of preparing a standard diluent for use in a simultaneous
2 assay for two or more target analytes, comprising treating a biological fluid containing the
3 target analytes to remove the target analytes so as to decrease the concentrations thereof to
4 concentrations below predetermined thresholds.
- 1 43. The method in accordance with claim 42 in which the target analytes
2 are removed by affinity chromatography.
- 1 44. The method in accordance with claim 43 in which the target analytes
2 are removed by contacting the biological fluid with antibodies that bind to the target analytes.
- 1 45. The method in accordance with claim 42 in which the biological fluid
2 is selected from interleukins, lymphokines, interferons, colony stimulator factors, platelet-
3 activating factors, and/or tumor necrosis factors.
- 1 46. The method in accordance with claim 42 in which the two or more
2 different target analytes are cytokines.
- 1 47. The method in accordance with claim 46 in which the cytokines are
2 selected from interleukins, lymphokines, interferons, colony stimulator factors, platelet-
3 activating factors, and/or tumor necrosis factors.
- 1 48. The method in accordance with claim 47 in which the target analytes
2 are two or more of IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF- α and/or INF- γ .

8 Human Cytokine Standard Curves Simultaneously
Obtained from Human Cytokine Kits Using
Standard Diluent

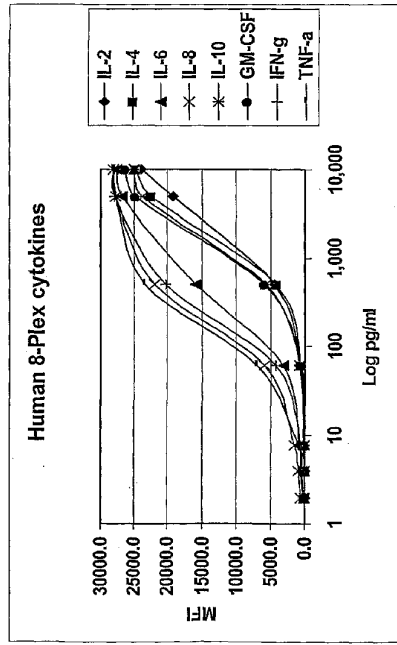
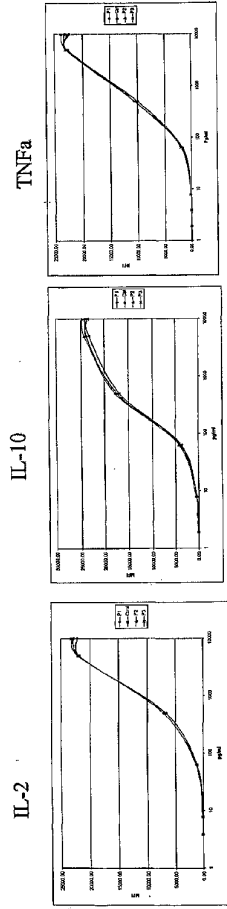


Figure 1

Recovery Study: Standard Diluent vs Different Patient Serum



IL-2				IL-10				TNFa						
pg/ml	Ctrl	P1	P2	P3	pg/ml	Ctrl	P1	P2	P3	pg/ml	Ctrl	P1	P2	P3
62	100	116	109	132	62	100	86	99	95	62	100	111	116	90
500	100	108	102	104	500	100	98	101	102	500	100	106	101	93
5000	100	100	102	93	5000	100	96	98	100	5000	100	106	101	101
10000	100	99	100	102	10000	100	98	95	98	10000	100	98	95	100

*Ctrl = standard diluent, P1=Patient 1 serum, P2=Patient 2 Serum, P3=Patient 3 Serum

Figure 2

8 Mouse Cytokine Standard Curves Simultaneously
Obtained from Mouse Cytokine Kits Using
Standard Diluent

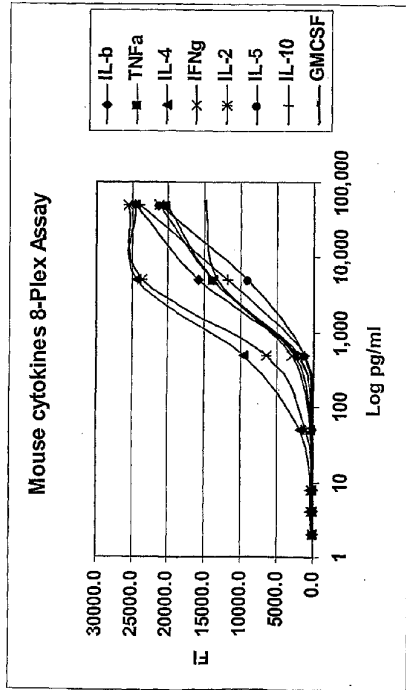
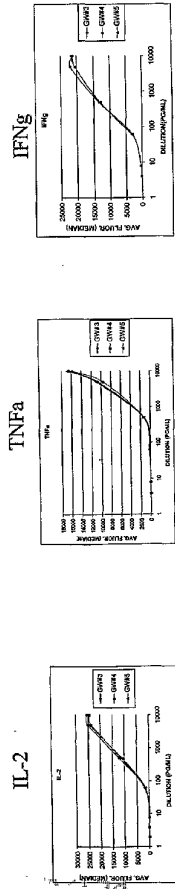


Figure 3

Recovery Study: Mouse Standard Diluent vs Different Lots of Mouse Serum



Recovery (%)

		IL-2			TNFα			IFNγ		
pg/ml		Ctrl	Lot1	Lot2	Ctrl	Lot1	Lot2	Ctrl	Lot1	Lot2
10000		100	96	95	100000	100	96	100	101	101
500		100	94	89	500	100	112	100	98	97
7.8		100	81	62	7.8	100	104	100	88	73

*Ctrl = standard diluent, Lot1=Lot 1 mouse serum, Lot2=lot 2 mouse serum

Figure 4

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059617 A3

(51) International Patent Classification: G01N 33/68, (74) Agents: ACKERMAN, Joel, G. et al.; Townsend and Townsend and Crew LLP, Two Embarcadero Center, 8th Floor, San Francisco, CA 94111-3834 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/48252

(22) International Filing Date:
13 December 2001 (13.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/255,561 13 December 2000 (13.12.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
BIO-RAD LABORATORIES, INC. [US/US]; 1000
Alfred Noble Drive, Hercules, CA 94547 (US).

(72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): NGUYEN, Quan
[US/US]; 249 Golf Links, Pleasant Hill, CA 94523 (US);
ZHANG, Aiguo [CN/US]; Carlos Bee Boulevard #210,
Hayward, CA 94542 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

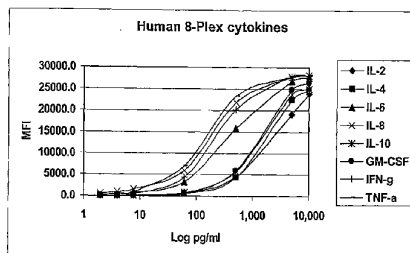
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Patristian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:
with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: STANDARD DILUENT FOR MULTIPLEX ASSAYS

8 Human Cytokine Standard Curves Simultaneously
Obtained from Human Cytokine Kits Using
Standard Diluent



(57) Abstract: The present invention provides standard diluents for use in multiplex assays comprising a biological fluid that normally includes two or more different target analytes but that is substantially free of the two or more different target analytes, as well as kits and methods relating to the standard diluent. The standard diluents of the invention provide an accurate and reliable means to calibrate the amount of multiple target analytes in a single assay.

WO 02/059617 A3

WO 02/059617 A3 

(88) Date of publication of the international search report: 21 August 2003 *For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/48252
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/543 G01N33/96 G01N33/531		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 02359 A (ASSAY RES INC) 4 February 1993 (1993-02-04) p. 9, lines 20 - 26, p. 20 - 32, p. 21, lines 20 - 34, p. 24, line 33 - p. 26, line 28	1-19, 42-48
Y	---	20-41
Y	KAKABAKOS S E ET AL: "MULTIANALYTE IMMUNOASSAY BASED ON SPATIALLY DISTINCT FLUORESCENT AREAS QUANTIFIED BY LASER-EXCITED SOLID-PHASE TIME-RESOLVED FLUOROMETRY" CLINICAL CHEMISTRY, vol. 38, no. 3, 1992, pages 338-342, XP002108659 ISSN: 0009-9147 p. 341, col. 2, lines 30 - 49 ---	20-41
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 16 January 2003	Date of mailing of the international search report 31/01/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentstr. 2 NL - 2280 LV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hoesel, H	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/US 01/48252

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 196 845 A (HYBRITTECH INC) 8 October 1986 (1986-10-08) p. 1, line 19 - p. 2, line 27p. 3, lines 6 - 16, p. 4, line 23 - 25, p. 6, lines 5 - 10	1,3,5,6, 11,12, 16-18
X	BRAILLY HERVE ET AL: "Total interleukin-6 in plasma measured by immunoassay." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 40, no. 1, 1994, pages 116-123, XP009003916 ISSN: 0009-9147 abstract, p. 116, col. 2, lines 19 - 33, p. 119, Fig. 2, and col. 2, line 33, p. 120, col. 2, line 27	1,3,5-8, 11,14, 16-19
X	WO 86 00992 A (SHAH VIPIN D) 13 February 1986 (1986-02-13)	1,3,5,6, 11,12, 15-18 20,32
Y	p. 19, line 24 - p. 20, line 19	
X	EP 0 684 477 A (BEHRING DIAGNOSTICS INC) 29 November 1995 (1995-11-29) p. 2, lines 24 - 44, p. 3, lines 5 - 50, claims 11 - 15	1,5,6, 11,13, 16-18, 42,43
A	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1994 KRICKA LARRY J: "Selected strategies for improving sensitivity and reliability of immunoassays." Database accession no. PREV199497239111 XP002227477 abstract the whole document & CLINICAL CHEMISTRY, vol. 40, no. 3, 1994, pages 347-357, ISSN: 0009-9147	20-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on parent family membersInternational Application No.
PCT/US 01/48252

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 9302359 A	04-02-1993	AT 184703 T	15-10-1999		
		AU 2392692 A	23-02-1993		
		CA 2113823 A1	04-02-1993		
		DE 69230000 D1	21-10-1999		
		DE 69230000 T2	11-05-2000		
		EP 0598758 A1	01-06-1994		
		JP 3183666 B2	09-07-2001		
		JP 6509418 T	20-10-1994		
		WO 9302359 A1	04-02-1993		
		US 5587294 A	24-12-1996		
		US 5965379 A	12-10-1999		
		EP 0196845 A	08-10-1986	AT 96910 T	15-11-1993
				AU 602861 B2	01-11-1990
AU 5482486 A	02-10-1986				
CA 1271420 A1	10-07-1990				
DE 3689240 D1	09-12-1993				
DE 3689240 T2	03-03-1994				
DK 134686 A ,B,	30-09-1986				
EP 0196845 A2	08-10-1986				
ES 8800440 A1	01-01-1988				
ES 8801730 A1	16-04-1988				
FI 861321 A ,B,	30-09-1986				
IE 62580 B1	08-02-1995				
JP 2547318 B2	23-10-1996				
JP 61274263 A	04-12-1986				
NO 861116 A ,B,	30-09-1986				
US 5242802 A	07-09-1993				
WO 8600992 A	13-02-1986	EP 0188608 A1	30-07-1986		
		WO 8600992 A1	13-02-1986		
EP 0684477 A	29-11-1995	AU 2033895 A	07-12-1995		
		CA 2148971 A1	27-11-1995		
		EP 0684477 A2	29-11-1995		
		JP 8304406 A	22-11-1996		

フロントページの続き

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

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 グイェン,クアン

アメリカ合衆国,カリフォルニア 94523,プレゼント ヒル,ゴルフ リンクス 249

(72)発明者 ツァン,アイグオ

アメリカ合衆国,カリフォルニア 94542,ヘイワード,カルロス ビー プールバード #
210

Fターム(参考) 2G045 AA20 BB42 CA26 CB03 CB07 CB11 CB12 CB17 DA36 FA37

FB03 FB06 FB07 FB08 FB11 FB13 FB15

专利名称(译)	用于多种测定的标准稀释剂		
公开(公告)号	JP2005506515A	公开(公告)日	2005-03-03
申请号	JP2002559683	申请日	2001-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-雷德实验室股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物 - Rad实验室 , Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	グイエンクアン ツアンアイグオ		
发明人	グイエン,クアン ツアン,アイグオ		
IPC分类号	G01N33/50 B01J20/281 G01N30/88 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68 G01N33/96 G01N30/48		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/6863 G01N33/96 G01N2496/00		
FI分类号	G01N33/50.F G01N30/48.R G01N30/88.E G01N30/88.J G01N33/53.P		
F-TERM分类号	2G045/AA20 2G045/BB42 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB11 2G045/CB12 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB07 2G045/FB08 2G045/FB11 2G045/FB13 2G045/FB15		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 中村弘 西山雅也		
优先权	60/255561 2000-12-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及标准稀释剂，其通常含有两种或更多种不同的靶分析物，但基本上不含两种或更多种不同的靶分析物和与标准稀释剂相关的试剂盒和方法。提供。本发明的标准稀释剂提供了用于在单次测定中校准多种靶分析物的量的准确且可靠的手段。

8 Human Cytokine Standard Curves Simultaneously Obtained from Human Cytokine Kits Using Standard Diluent

