

(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2017-520769

(P2017-520769A)

(43) 公表日 平成29年7月27日(2017.7.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 1 5 A	4 B 0 5 0
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	4 B 0 6 3
C 1 2 N 9/04 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 1 2 N 9/04 D	
C 1 2 Q 1/28 (2006.01)	C 1 2 Q 1/26	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-575065 (P2016-575065)
 (86) (22) 出願日 平成27年6月17日 (2015. 6. 17)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年2月1日 (2017. 2. 1)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/063603
 (87) 国際公開番号 W02016/000966
 (87) 国際公開日 平成28年1月7日 (2016. 1. 7)
 (31) 優先権主張番号 14175033. 1
 (32) 優先日 平成26年6月30日 (2014. 6. 30)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 599132904
 ネステク ソシエテ アノニム
 スイス国, ブベイ, アブニュー ネスレ
 5 5
 (74) 代理人 100088155
 弁理士 長谷川 芳樹
 (74) 代理人 100107456
 弁理士 池田 成人
 (74) 代理人 100162352
 弁理士 酒巻 順一郎
 (74) 代理人 100140453
 弁理士 戸津 洋介
 (74) 代理人 100140888
 弁理士 渡辺 欣乃

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フローサイトメトリーを使用する協調的酵素増強反応性 (CEER) 免疫アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、タンパク質バイオマーカーなどの検体成分を迅速に特定及び定量するためのシステム、方法、装置、及びキットを提供する。本発明の多重化免疫アッセイでは、細胞可溶化液などの試料由来のバイオマーカーを捕捉及び保持させるため、複数の捕捉抗体を1つのビーズ又は複数のビーズに固定させる。特定の捕捉抗体を固定させたビーズは、細胞可溶化液から捕捉されたバイオマーカーを特定可能である。

【選択図】 図 1

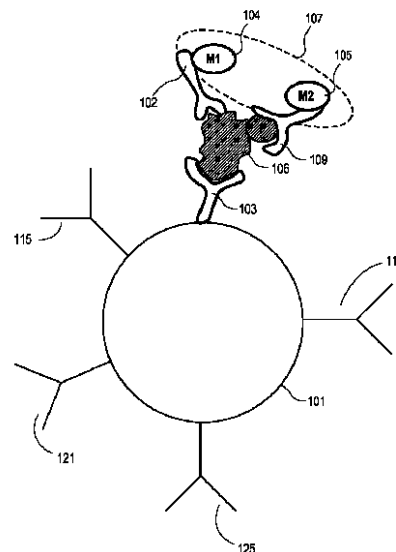


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フローサイトメトリーを使用して、サンプルに対し多重免疫アッセイを実施する方法であって、

(a) 血液、血漿、又は細胞可溶化液を、ビーズに固定されている複数の捕捉抗体と接触させて、捕捉された複数の検体成分を生成することと（ここで、ビーズは、少なくとも 1 種の検体成分に特異的である）、

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

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

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

を含む、方法。

【請求項 2】

前記ビーズが、蛍光色素又は検出可能なタグで標識される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記サンプルが、全血、血清、血漿、尿、痰、気管支洗浄液、涙、乳頭吸引液、リンパ液、唾液、細針吸引液（FNA）、脳脊髄液、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも 1 種の検体成分が、少なくとも 1 種のシグナル伝達分子、サイトカイン、代謝産物、病理学的分子、又は自己抗体を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 種の検出抗体が、少なくとも 2 種の検出抗体であり、

(i) 促進部分により標識されており、活性化状態に依存しない複数の抗体と、

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

を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記促進部分が、前記シグナル増幅対の前記第 1 のメンバーにチャネリングし、かつ反応する酸化剤を生成する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記検出抗体が、前記少なくとも 1 種の検体成分に特異的なシグナル増幅対の第 1 のメンバーで標識した複数の検出抗体である、検出抗体を 1 種含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記促進部分が、前記シグナル増幅対の前記第 1 のメンバーにチャネリングし、かつ反応する酸化剤を生成する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記促進部分が、グルコースオキシダーゼである、請求項 5 又は 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記酸化剤が、過酸化水素（ H_2O_2 ）である、請求項 6 又は 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記シグナル増幅対の前記第 1 のメンバーがペルオキシダーゼである、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

前記ペルオキシダーゼが、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

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

【請求項 1 4】

前記チラミド試薬が、蛍光色素分子により直接的に標識される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記チラミド試薬がビオチン - チラミドである、請求項 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 6】

前記増幅されたシグナルが、ペルオキシダーゼによりチラミドが酸化されて活性化チラミドが生成されることにより生じる、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記活性化チラミドが直接検出される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記活性化チラミドが、前記シグナル検出剤の添加により検出される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記シグナル検出剤が、ストレプトアビジン標識されたフルオロフォアである、請求項 1 8 に記載の方法。

20

【請求項 2 0】

前記シグナル検出剤が、ストレプトアビジン標識されたペルオキシダーゼと発色剤とを組み合わせたものである、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記発色剤が 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン（TMB）である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記方法が、ヒト疾患の診断検査として使用される、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 2 3】

前記疾患が、代謝疾患、脳及び認知疾患、胃腸疾患、又は癌である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記癌が、乳癌、結腸直腸癌、消化管間質腫瘍、消化管カルチノイド腫瘍、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌、前立腺癌、及び胃癌からなる群から選択されるものである、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記代謝疾患が糖尿病である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記脳及び認知疾患がアルツハイマー病である、請求項 2 3 に記載の方法。

40

【請求項 2 7】

前記少なくとも 1 種のシグナル伝達分子が、AMP 活性化タンパク質キナーゼ（AMPK）、AMPK キナーゼ（AMPKK）、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ（CAMKK）、LKB1、トランスフォーミング増殖因子 - 活性化キナーゼ 1（TAK1）、AKT、アディポネクチン、レプチン、グルコース、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 ~ 2 3 及び 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記少なくとも 1 種の自己抗体が、GAD65 自己抗体、インスリノーマ抗原 2（IAA-2）自己抗体、インスリン自己抗体（IAA）、亜鉛トランスポータータンパク質 8（

50

Z n T 8) 自己抗体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 ~ 23 及び 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記少なくとも 1 種の病理学的分子が、タウ、アミロイドベータ (A) ペプチド、可溶性アミロイド前駆体タンパク質 (s A P P)、V I L I P - 1、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 ~ 23 及び 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記少なくとも 1 種のシグナル伝達分子が受容体型チロシンキナーゼである、請求項 4 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記受容体型チロシンキナーゼが、H E R 1、H E R 2、H E R 3、H E R 4、V E G F R - 1、V E G F R - 2、V E G F R - 3、F L T - 3、F L K - 2、P D G F R、c - K I T、I N S R、I G F - I R、I G F - I I R、I R R、C S F - 1 R、c M E T、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記少なくとも 1 種の受容体型チロシンキナーゼが、非受容体型チロシンキナーゼを更に含む、請求項 30 又は 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記増幅されたシグナルが、反応速度結合パラメータに関連付けられる、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記ピーズが複数のピーズである、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記複数のピーズが、各集団のそれぞれが他方と区別可能である少なくとも 2 種の集団を有する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記ピーズの少なくとも 2 種の集団のそれぞれが、それぞれ異なる、少なくとも 2 種の各検体成分に特異的なものである、請求項 35 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

[0001] 数多くの疾患の診断、予後診断、及び治療領域において、細胞抽出物中のタンパク質、シグナル分子、及びその他の検体成分の測定は重要である。このような疾患の観察及び管理には、タンパク質バイオマーカー類の発現レベル及び活性化レベルの測定が必要とされる。医者に正しい治療法を正しい時間及び正しい投与量で指示させることのできる、迅速で正確な、それでいて費用効率のよい検体成分の測定法が求められている。

【0002】

[0002] バイオマーカーが特定されたならば、診断試験を使用してその有無を検証し、次に定量又は測定することができる。ある種の例では、臨床アプローチが用いられる。このアプローチでは、医療検査及び / 又は治療を行うことができる、患者を治療する場所又は患者を治療する場所付近でアッセイが実施される。例えば、臨床現場としては、病院、患者の自宅、診療所、又は救急対応が求められる場所などが挙げられるがこれらに限定されない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

[0003] 医学的状态を迅速に診断すること、適切な治療を選択すること、又は臨床での投与量を最適化することに伴う効果は数多くの利点を有する。薬剤、投与量及び治療計画を個別化することは、すなわち、患者が現代医療の恩恵を受ける最良の機会を得ることを意

10

20

30

40

50

味する。当該技術分野では、臨床サービスを使用して患者の臨床的な効果に関係するバイオマーカーを特定及び測定するための、新しい方法が必要とされている。本発明は、この必要性及びその他の必要性を満たすものである。

【課題を解決するための手段】

【0004】

[0004]本発明は、フローサイトメトリーを使用する、生物学的な検体成分用の多重免疫アッセイを提供する。ある例では、捕捉抗体は、特定の発光波長を有する蛍光ビーズなどのビーズに担持される。対象とする特定の検体成分を標的とするべく、捕捉抗体が使用される。その後、捕捉した抗体を検出し、検出可能な、捕捉された検体成分を生成するため、第1の検出抗体が使用される。第2の検出抗体は、検出可能な検体成分と接触させるために使用される。増幅されたシグナルを検出することにより、検体成分の濃度及び/又は活性化レベルが測定される。

10

【0005】

[0005]本発明の方法を使用すると、シグナル転写タンパク質、サイトカイン、増殖因子、タンパク質、及びその他の検体成分などの細胞産物を測定できる。本明細書に記載の方法及び装置は、1回のアッセイで複数の検体成分を識別するため、典型的には大きさ、蛍光強度の違い、又は発光により識別される、複数のビーズ集団を使用する。検体成分は、捕捉抗体を使用して捕捉される。捕捉された検体成分の量は、タンパク質の第2のエピトープに対する抗体により検出される。感度及び特異性を確実に向上させ、かつ、任意選択的に活性化レベルを測定するため、対象とする検体成分の第3のエピトープに対する第3の抗体を使用する。既知の濃度の検体成分を段階希釈して作成した標準曲線に対し、蛍光シグナルを比較することにより、サンプル中の対象とするタンパク質の濃度及び/又は活性を得ることができる。

20

【0006】

[0006]一実施形態では、本発明は、フローサイトメーターを使用してサンプルに対し協調的酵素増強反応(C E E R)による免疫アッセイなどの多重化された免疫アッセイを実施するための、方法を提供し、当該方法は、

(a) 血漿、血液、又は細胞抽出物細胞可溶化液を、ビーズに固定されている複数の捕捉抗体と接触させて、捕捉された複数の検体成分を生成することと(ここで、ビーズは、少なくとも1種の検体成分に特異的である)、

30

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

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

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

【0007】

[0007]いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、疾患の診断検査として使用される。いくつかの態様では、疾患は、代謝疾患、脳若しくは認知障害、胃腸疾患、又は癌である。

40

【0008】

[0008]いくつかの態様では、代謝疾患は、前糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、その他の形態の糖尿病、及び糖尿病に関係する疾患を含む、糖尿病である。

【0009】

[0009]いくつかの態様では、脳又は認知障害は、アルツハイマー病である。

【0010】

[0010]いくつかの例では、癌は、乳癌、結腸直腸癌、消化管間質腫瘍、消化管カルチノイド腫瘍、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌、前立腺癌、又は胃癌である。

50

【 0 0 1 1 】

[0011]いくつかの実施形態では、少なくとも1種の検体成分は、少なくとも1種のシグナル伝達分子、病的なタンパク質凝集体、又は自己抗体を含む。

【 0 0 1 2 】

[0012]本発明のこれらの及びその他の目的、特徴、及び利点は、以下の詳細な説明及び図面を参照することにより当業者にはより明白となろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 3 】

【 図 1 】 [0013]本発明の一実施形態を例示する。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 4 】

1. 序論

[0014]本発明は、タンパク質バイオマーカーなどの検体成分を迅速に特定及び定量するためのシステム、方法、装置、及びキットを提供する。本発明の多重免疫アッセイでは、細胞可溶化液などの試料由来のバイオマーカーを捕捉及び保持させるため、複数の捕捉抗体を1つのビーズ又は複数のビーズに固定させる。特定の捕捉抗体を固定させたビーズは、細胞可溶化液から捕捉されたバイオマーカーを特定可能である。

【 0 0 1 5 】

[0015]本発明の使用により、代謝疾患、脳若しくは認知疾患、胃腸疾患、又は癌などの医学的状態の迅速かつ正確な診断、適切な治療法の特定、並びに治療量の最適化が可能になり、患者及び医療従事者に大きな利益がもたらされる。

【 0 0 1 6 】

[0016]有利な点として、本発明のシステム、方法、及びキットは、リアルタイム又はほとんどリアルタイムで診断検査が実施され得る臨床で提供可能であり、提供される検査は、本発明のシステムを使用していない同様の検査よりも効率的に実施され、診断及び予後検査を促進する。臨床（POC）診断検査は、診療所又は病院又はどこであろうと医療ケアが提供される場所などの、患者を治療する場所又は患者を治療する場所付近での検査である。アッセイ結果を得るまでの所用時間が短いことにより、リアルタイムのエビデンスベースの判断、患者の緊急治療、不必要な検査を最小限に抑える、副作用を最小限に抑える、及び著しい費用効果などの数多くの利点が提供される。

【 0 0 1 7 】

[0017]ある種の例では、本発明のシステム、方法、装置、方法、及びキットにより、中央検査室の外部、患者のすぐ近くでの臨床検査が実施可能になる。ある種の態様では、方法は、サンプル、すなわち、全血、血漿、血清、細針吸引液（FNA）、又は脳脊髄液（CSF）と、レディ・トゥ・ユーズ（ready-to-use）試薬と、使い捨てアッセイ試薬とを使用する。ある種の態様では、本発明の装置は、携帯式であり、かつ各個体サンプルの量（quantities）及び総量（amount）を使用する。

【 0 0 1 8 】

[0018]本発明の方法及び装置は、フローサイトメトリーを使用して、サイトカイン、ケモカイン、シグナル分子、増殖因子、及びリン酸化シグナルタンパク質などといった多様な可溶性及び細胞内タンパク質を測定するために使用できる。ある例では、少量（例えば、25～100µL）のサンプルの多重化分析を使用して、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は更には12以上の検体成分を分析する。

II. 定義

【 0 0 1 9 】

[0019]本明細書で使用するとき、以下の用語は、別途記載のない限りそれらの用語による意味を有する。

【 0 0 2 0 】

[0020]用語「検体成分」は、対象とする任意の分子を包含し、典型的には、有無、量、及び/又はアイデンティティが特定される、ポリペプチドなどの高分子を包含する。ある

10

20

30

40

50

種の例では、検体成分は、固体腫瘍の循環細胞又は脳脊髄液、末梢血、若しくは血清の細胞成分である。好ましくは、検体成分は、シグナル伝達分子、病理学的分子、又は自己抗体である。

【0021】

[0021]用語「シグナル伝達分子」又は「シグナル伝達因子」は、細胞が、細胞外又は細胞内シグナルを変換する、すなわち典型的には、細胞内部の一連の生化学的反応に参与する応答を誘導することによりプロセスを実施するタンパク質及びその他の分子を包含する。シグナル伝達分子の例としては、EGFR（例えば、EGFR/HER-1/ErbbB1、HER-2/Neu/ErbbB2、HER-3/ErbbB3、HER-4/ErbbB4）、VEGFR-1/FLT-1、VEGFR-2/FLK-1/KDR、VEGFR-3/FLT-4、FLT-3/FLK-2、PDGFR（例えば、PDGFRA、PDGFRB）、c-KIT/SCFR、INSR（インスリン受容体）、IGF-IR、IGF-IIR、IRR（インスリン受容体関連受容体）、CSF-1R、FGFR 1~4、HGFR1~2、CCK4、TRK A~C、MET、RON、EPHA1~8、EPHB1~6、AXL、MER、TYRO3、TIE1~2、TEK、RYK、DDR 1~2、RET、c-ROS、V-カドヘリン、LTK（白血球チロシンキナーゼ）、ALK（未分化リンパ腫キナーゼ）、ROR1~2、MUSK、AATYK1~3、RTK106などの受容体型チロシンキナーゼ、及びp95ErbbB2などの受容体型チロシンキナーゼの切断型；BCR-ABL、Src、Frk、Btk、Csk、Abl、Zap70、Fes/Fps、Fak、Jak、Ack、及びLIMKなどの非受容体型チロシンキナーゼ；AKT、MAPK/ERK、MEK、RAF、PLA2、MEKK、JNK、JNK、p38、Shc(p66)、PI3K、Ras（例えば、K-Ras、N-Ras、H-Ras）、Rho、Rac1、Cdc42、PLC、PKC、p70S6キナーゼ、p53、サイクリンD1、STAT1、STAT3、PIP2、PIP3、PDK、mTOR、BAD、p21、p27、ROCK、IP3、TSP-1、NOS、PTEN、RSK1~3、JNK、c-Jun、Rb、CREB、Ki67、及びパキシリンなどのチロシンキナーゼシグナル伝達カスケード要素；エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PR)、アンドロゲン受容体、グルコルチコイド受容体、ミネラルコルチコイド受容体、ビタミンA受容体、ビタミンD受容体、レチノイド受容体、甲状腺ホルモン受容体及びオーファン受容体などの核ホルモン受容体；それぞれ、amplified in breast cancer-1(AIB1)及び核受容体補助因子1(NCCOR)などの、核受容体活性化補助因子及びリプレッサー；並びにそれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。シグナル伝達分子の更なる例としては、AMP活性化タンパク質キナーゼ(AMPK)、AMPKキナーゼ(AMPKK)、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ(CAMKK)、LKB1、トランスフォーミング増殖因子-活性化キナーゼ1(TAK1)、AKT、アディポネクチン、レプチン、グルコース、グリコーゲン、AMP、及びATPが挙げられるがこれらに限定されない。

【0022】

[0022]用語「病理学的分子」は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、認知症、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、及び同様の疾患を含む神経変性疾患などの疾患又は障害の病理に関係するタンパク質及びその他の分子を包含する。

【0023】

[0023]用語「捕捉抗体」は、細胞抽出物などのサンプル中の、対象とする1種以上の検体成分に特異的な(すなわち、結合する、結合される、又は一緒に複合体を形成する)、固定化された抗体を包含することを意図する。一実施形態では、捕捉抗体は、アレイ装置において、ビーズ(例えば、固体支持体)上に固定される。固体支持体上に何らかの様々なシグナル伝達分子を固定するのに好適な捕捉抗体は、Upstate(Temecula, Calif.)、Biosource(Camarillo, Calif.)、Ce

10

20

30

40

50

k t (T 3 0 8 、 S 4 7 3)) ; P T E N (p - P T E N) ; B a d (p - B a d (S 1 1 2 、 S 1 3 6) 、 B a d : 1 4 - 3 - 3) ; m T o r (p - m T o r (S 2 4 4 8)) ; p 7 0 S 6 K (p - p 7 0 S 6 K (T 2 2 9 、 T 3 8 9)) ; M e k (p - M e k (S 2 1 7 、 S 2 2 1)) ; E r k (p - E r k (T 2 0 2 、 Y 2 0 4)) ; R s k - 1 (p - R s k - 1 (T 3 5 7 、 S 3 6 3)) ; J n k (p - J n k (T 1 8 3 、 Y 1 8 5)) ; P 3 8 (p - P 3 8 (T 1 8 0 、 Y 1 8 2)) ; S t a t 3 (p - S t a t - 3 (Y 7 0 5 、 S 7 2 7)) ; F a k (p - F a k (Y 5 7 6)) ; R b (p - R b (S 2 4 9 、 T 2 5 2 、 S 7 8 0)) ; K i 6 7 ; p 5 3 (p - p 5 3 (S 3 9 2 、 S 2 0)) ; C R E B (p - C R E B (S 1 3 3)) ; c - J u n (p - c - J u n (S 6 3)) ; c S r c (p - c S r c (Y 4 1 6)) ; パキシリン (p - パキシリン (Y 1 1 8)) ; A M P K (p - A M P K (T 1 7 2 、 T 1 8 3)) ; 並びに t a u (p - t a u (Y 1 8 、 Y 2 9 、 S 4 6 、 T 1 8 1 、 S 1 9 9 、 S 2 0 2 、 T 2 0 5 、 T 2 1 2 、 S 2 1 4 、 T 2 1 7 、 T 2 3 1 、 S 2 3 5 、 S 2 6 2 、 S 3 5 6 、 S 3 9 6 、 S 4 0 0 、 S 4 0 4 、 S 4 1 2 、 S 4 2 2 、 S 4 7 0 、 S 4 9 2 、 S 4 9 8 、 S 5 1 5 、 S 5 1 6 、 S 5 1 9 、 T 5 3 4 、 T 5 4 8 、 S 5 5 2 、 S 6 2 2 、 S 6 4 1 、 S 7 1 3 、 S 7 2 1 、 S 7 2 6 、 T 7 3 9 など) が挙げられる。

10

【 0 0 2 6 】

[0026]用語「活性化状態に依存しない抗体」は、活性化状態を問わずサンプル中の対象とする1種以上の検体成分に特異的な(すなわち、結合する、結合される、又は一緒に複合体を形成する)検出抗体を包含する。例えば、活性化状態に依存しない抗体は、1種以上のシグナル伝達分子などの1種以上の検体成分のリン酸化及び非リン酸化形態の両方を検出することができる。

20

【 0 0 2 7 】

[0027]用語「インキュベートする」は、「接触させる」及び「曝露させる」と同意語であり、かつ別途記載のない限り何らかの具体的な時間又は温度を暗示するものではない。

【 0 0 2 8 】

[0028]本明細書で使用するとき、用語「希釈系列」は、濃度を漸減させた一連の特定のサンプル(例えば、細胞可溶化液)又は試薬(例えば、抗体)を包含することを意図する。希釈系列は、典型的には、初期濃度の一定量のサンプル又は試薬を、希釈剤(例えば、希釈緩衝液)と混合して、低濃度のサンプル又は試薬を生成するプロセスを、所望数の段階希釈を得るのに十分な回数だけ繰り返すことにより生成される。サンプル又は試薬を少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、500、又は1000倍に段階希釈することで、サンプル又は試薬の濃度が少なくとも1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9、1/10、1/11、1/12、1/13、1/14、1/15、1/16、1/17、1/18、1/19、1/20、1/25、1/30、1/35、1/40、1/45、又は1/50に低下している希釈系列を生成することができる。例えば、初期濃度1mg/mLの捕捉抗体試薬を二倍に段階希釈したものを含む希釈系列は、ある量の初期濃度の捕捉抗体を、同量の希釈緩衝液と混合して、濃度0.5mg/mLの捕捉抗体を生成し、このプロセスを繰り返して0.25mg/mL、0.125mg/mL、0.0625mg/mL、0.0325mg/mLなどの濃度の捕捉抗体を得ることにより生成できる。

30

40

【 0 0 2 9 】

[0029]本明細書で使用するとき、用語「優れたダイナミックレンジ」は、わずか1個の細胞又は数千個もの細胞において特異的な検体成分を検出するアッセイ性能を指す。例えば、本明細書に記載の免疫アッセイは、捕捉抗体の濃度希釈系列を使用して、1~10、000個(例えば、約1、5、10、25、50、75、100、250、500、750、1000、2500、5000、7500、又は10,000個)の細胞において、対象とする特定のシグナル伝達分子を有利に検出することから、優れたダイナミックレンジを保有する。

50

【0030】

[0030]本明細書で使用するとき、用語「サンプル」は、患者から得られる何らかの生体標本を包含する。サンプルとしては、全血、血漿、血清、赤血球細胞、白血球細胞（例えば、末梢血単核細胞）、脳脊髄液、乳管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液（例えば、リンパ管の播種性腫瘍細胞）、骨髓穿刺液、唾液、尿、排泄物（すなわち、糞便）、痰、気管支洗浄液、涙、細針吸引液（例えば、乳輪周囲の無作為な細針吸引により採取）、何らかのその他の体液、腫瘍の細胞診（例えば、針生検）などの組織サンプル（例えば、腫瘍組織）、又はリンパ管（例えば、センチネルリンパ節生検）、及びこれらの細胞抽出物が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、サンプルは、全血、又は血漿、血清、又は細胞ペレットなどの分画成分である。その他の実施形態では、サンプルは、当該技術分野で既知の何らかの手法により、全血又はそれらの細胞画分由来の固形腫瘍循環細胞を単離することにより得られる。その他の実施形態では、サンプルは、例えば、胸部固形腫瘍由来のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織サンプルである。

10

【0031】

[0031]「生検」は、診断又は予後評価のために組織サンプルを切除するプロセス、及び組織標本そのものを指す。本発明の方法及び組成物には、当該技術分野で既知の任意の生検法を使用することができる。使用する生検法は、概して、数ある因子の中でも、評価する組織、並びに腫瘍の大きさ及び種類（すなわち、固体又は懸濁（すなわち、血液又は腹水））に応じ変更されるであろう。代表的な生検法としては、切除生検、切開生検、針生検（例えば、針生検、細針吸引生検など）、外科生検、及び骨髓生検が挙げられる。生検法は、例えば、ハリソン内科学、Kasperら編、第16版、2005年、第70章、パートVまでに議論されている。当業者であれば、所定の組織サンプルにおいて対象とする細胞を特定することのできる生検法を認識されるであろう。

20

【0032】

[0032]用語「対象」又は「患者」又は「個体」は、典型的には、ヒトを包含するものの、その他の動物、例えば、その他の霊長類、げっ歯類、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタ、及び同様の動物も包含され得る。

【0033】

[0033]本発明は、臨床現場、すなわち検査室ベースの臨床化学検査が行われる場所で有用である。本明細書で使用するとき、臨床（POC）現場は、病院検査、ベッドサイド検査、緊急治療室、診療所、外来診療所、血液バンク、手術室、家庭、実験室又は養護施設での検査、遠隔検査、などの場所を意味する。サンプル、及び、臨床検査と同じ場所で行われる試験若しくはアッセイの結果が収集される、分析システム又は装置において実施される場合、特に有用である。しかしながら、本発明は、臨床検査施設以外の施設でも使用できることは理解されたい。

30

【0034】

[0034]本明細書において、用語「代謝疾患」、「代謝障害」、及び「代謝症候群」は互換的に使用され、正常な代謝（例えば、代謝のバランス）に障害が生じることにより引き起こされる状態を指す。代謝は、食物を細胞レベルでエネルギーに変換するプロセスである。典型的には、代謝疾患は、血圧上昇、高血糖、腹部の過剰な体脂肪、インスリン抵抗性、耐糖能障害、及び/又は異常なコレステロール値により特徴づけられる。代謝疾患/障害の非限定例としては、1型糖尿病、2型糖尿病、糖尿病前症、糖尿病の関連疾患、高インスリン血症、リソソーム蓄積症、ゴーシェ病、耐糖能障害、空腹時高血糖、インスリン抵抗性、及び脂質異常症が挙げられる。

40

【0035】

[0035]用語「脳若しくは認知疾患」又は「脳若しくは認知障害」は主に、学習、記憶、知覚及び問題解決に影響を及ぼす神経疾患/障害及び/又は心の健康に関係する疾患/障害を指す。この用語には、せん妄、重度及び軽度の認知神経科学的障害、認知症、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、及びヒトの心の働きを低下させ、日常生活に悪影響を及ぼす

50

ことを特徴とするすべての既知の神経疾患／障害が包含される。

【0036】

[0036]用語「癌」は、異常細胞の非制御的増殖を特徴とする疾患クラスのメンバーを包含することを意図する。この用語は、悪性、良性、軟組織、又は固体であることを特徴とするすべての既知の癌及び腫瘍性疾患、並びに遊走前及び遊走後の癌を含むすべてのステージ及び悪性度の癌を包含する。異なる種類の癌の例としては、乳癌；肺癌（例えば、非小細胞肺癌）；結腸直腸癌、消化管間質腫瘍、消化管カルチノイド腫瘍、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌、及び胃癌；食道癌；胆嚢癌；肝癌；膵癌；虫垂癌；卵巣癌；腎臓癌（例えば、腎細胞癌）；中枢神経系の癌；皮膚癌；リンパ腫；絨毛癌；頭頸部癌；骨肉腫；及び血液癌が挙げられるがこれらに限定されない。本明細書で使用する時、「腫瘍」は、1種以上の癌細胞を含む。

10

III. 実施形態

【0037】

[0037]一実施形態では、本発明は、フローサイトメトリーを使用してサンプルに対し協調的酵素増強反応（CEER）による免疫アッセイなどの多重化された免疫アッセイを実施するための、方法を提供し、当該方法は、

(a) 血漿、血液、又は細胞可溶化液を、ビーズに固定されている複数の捕捉抗体と接触させて、捕捉された複数の検体成分を生成することと（ここで、ビーズは、少なくとも1種の検体成分に特異的である）、

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

20

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

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

【0038】

[0038]ある例では、ビーズは、蛍光色素若しくは検出可能なタグにより標識され、又はそれらに組み込まれる。

30

【0039】

[0039]いくつかの例では、サンプルは、全血、血清、血漿、尿、痰、気管支洗浄液、涙、乳頭吸引液、リンパ液、唾液、細針吸引液（FNA）、脳脊髄液（CSF）、又はこれらの組み合わせである。

【0040】

[0040]ある例では、少なくとも1種の検体成分は、少なくとも1種のシグナル伝達分子、サイトカイン、代謝産物、病理学的な分子、又は自己抗体を含む。

【0041】

[0041]別の実施形態では、検出抗体は、少なくとも2種の検出抗体、すなわち、

(i) 促進部分により標識されており、活性化状態に依存しない複数の抗体と、

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

40

【0042】

[0042]いくつかの態様では、促進部分は、シグナル増幅対の第1のメンバーにチャネリングし、かつ反応する酸化剤を生成する。ある種の例では、促進部分はグルコースオキシダーゼである。ある種の態様では、酸化剤は過酸化水素（ H_2O_2 ）である。いくつかの態様では、シグナル増幅対の第1のメンバーはペルオキシダーゼである。ある種の例では、ペルオキシダーゼは西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）である。いくつかの例では、チラミド試薬は、蛍光色素分子で直接標識されている。

【0043】

50

[0043]いくつかの態様では、シグナル増幅対の第2のメンバーはチラミド製剤である。ある種の例では、チラミド剤はビオチン-チラミドである。

【0044】

[0044]いくつかの実施形態では、増幅されたシグナルは、ビオチン-チラミドがペルオキシダーゼにより酸化されることにより生成され、活性化チラミドが生成される。いくつかの態様では、活性化チラミドが直接検出される。他の態様では、活性化チラミドは、シグナル検出剤の添加により検出される。いくつかの例では、シグナル検出剤は、ストレプトアビジン標識された蛍光色素分子である。他の例では、シグナル検出剤は、ストレプトアビジン標識されたペルオキシダーゼと、発色剤とを組み合わせたものである。いくつかの実施形態では、発色剤は、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB)である。

10

【0045】

[0045]代替的な実施形態では、少なくとも1種の検出抗体は、少なくとも1種の検体成分に特異的なシグナル増幅対の第1のメンバーで標識した複数の検出抗体を含む。

【0046】

[0046]いくつかの態様では、複数の検出抗体は、活性状態に依存する抗体である。いくつかの態様では、複数の検出抗体は、活性化状態に依存しない抗体である。

【0047】

[0047]いくつかの態様では、複数の検出抗体は、シグナル増幅対の第1のメンバー、すなわちペルオキシダーゼにより標識されている。ある種の例では、ペルオキシダーゼは西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)である。

20

【0048】

[0048]グルコースオキシダーゼなどの促進部分は、抗体に固定させていない免疫アッセイに導入することができる。すなわち、当該促進部分をデキストランなどの基質に固定させることができる。複数のGO部分をデキストランに固定させることができる。グルコースの存在下で、グルコースオキシダーゼは、シグナル増幅対の第1のメンバー(例えば、HRP)と反応する酸化剤を生じる。ある種の態様では、酸化剤は過酸化水素(H₂O₂)である。

【0049】

[0049]いくつかの態様では、シグナル増幅対の第2のメンバーはチラミド製剤である。ある種の例では、チラミド剤はビオチン-チラミドである。

30

【0050】

[0050]いくつかの実施形態では、増幅されたシグナルは、ビオチン-チラミドがペルオキシダーゼにより酸化されることにより生成され、活性化チラミドが生成される。いくつかの態様では、活性化チラミドが直接検出される。他の態様では、活性化チラミドは、シグナル検出剤の添加により検出される。いくつかの例では、シグナル検出剤は、ストレプトアビジン標識された蛍光色素分子である。他の例では、シグナル検出剤は、ストレプトアビジン標識されたペルオキシダーゼと、発色剤とを組み合わせたものである。いくつかの実施形態では、発色剤は、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB)である。

40

【0051】

[0051]いくつかの態様では、方法は、ヒト疾患の診断検査として使用される。疾患としては、代謝疾患、脳及び認知疾患、胃腸疾患、又は癌が挙げられるがこれらに限定されない。

【0052】

[0052]癌としては、乳癌、結腸直腸癌、消化管間質腫瘍、消化管カルチノイド腫瘍、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌、前立腺癌、又は胃癌が挙げられるがこれらに限定されない。

【0053】

[0053]いくつかの態様では、代謝疾患は糖尿病である。

50

【 0 0 5 4 】

[0054]いくつかの態様では、脳又は認知疾患は、アルツハイマー病である。

【 0 0 5 5 】

[0055]いくつかの態様では、増幅されたシグナルは、反応速度結合パラメータに関連付けられる。

【 0 0 5 6 】

[0056]いくつかの態様では、ピーズは複数種のピーズである。例えば、複数種のピーズは、各集団のそれぞれが他方と区別可能である少なくとも2つのピーズ集団を有し得る。更に、ある種の態様では、少なくとも2つのピーズ集団のそれぞれは、それぞれ異なる、少なくとも2種の各検体成分に特異的なものである。

10

A . 検体成分

【 0 0 5 7 】

[0057]患者のサンプル中の、対象とする検体成分の有無、発現（例えば、総量）レベル、及び/又は活性（例えば、リン酸化）レベルは、本発明のシステム及び方法を使用して測定可能である。次に、患者が代謝疾患、胃腸疾患、脳及び認知疾患、癌、異常調節、又は機能障害を有しているのかを診断するために、この測定値を使用できる。

【 0 0 5 8 】

[0058]いくつかの例では、HER 1、HER 2、HER 3、HER 4、VEGFR - 1、VEGFR - 2、VEGFR - 3、FLT - 3、FLK - 2、PDGR、c - KIT、INSR、IGF - IR、IGF - IIR、IRR、CSF - IR、cMET、及びこれらの組み合わせなどのシグナル伝達分子のうち1種以上の有無、発現（例えば、総量）レベル及び/又は活性（例えば、リン酸化）レベルが、患者の癌、疾患、異常調節、又は機能障害を診断するのに使用される。

20

【 0 0 5 9 】

[0059]細胞抽出物における発現（例えば、総量）レベル及び/又は活性（例えば、リン酸化）レベルについて調査することのできるシグナル伝達分子などの検体成分の非限定例としては、受容体型チロシンキナーゼ、非受容体型チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナル伝達カスケード構成要素、核内ホルモン受容体、核内受容体コアクチベーター、核内受容体リプレッサー、リガンド、受容体、シグナル伝達カスケード構成要素、及びこれらの組み合わせが挙げられる。検体成分の更なる例としては、自己抗体、神経変性分子、及び病理学的分子が挙げられるがこれらに限定されない。

30

【 0 0 6 0 】

[0060]一実施形態では、本発明の方法は、細胞抽出物中の、以下の検体成分：HER 1、HER 2、HER 3、HER 4、VEGFR - 1、VEGFR - 2、VEGFR - 3、FLT - 3、FLK - 2、PDGR、c - KIT、INSR、IGF - IR、IGF - IIR、IRR、CSF - IR、cMET、及びこれらの組み合わせのうち少なくとも1種以上の有無、発現レベル（例えば、総量）及び/又は活性レベル（例えば、リン酸化レベル又は複合体形成）を測定することを含む。

【 0 0 6 1 】

[0061]他の例では、AMP活性化タンパク質キナーゼ（AMPK）、AMPKキナーゼ（AMPKK）、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ（CAMKK）、LKB 1、トランスフォーミング増殖因子 - 活性化キナーゼ1（TAK1）、AKT、アディポネクチン、レプチン、グルコース、その他のAMP修飾因子、及びこれらの組み合わせなどのシグナル伝達分子のうち1種以上の有無、発現（例えば、総量）レベル及び/又は活性（例えば、リン酸化）を使用して、患者の糖尿病を診断する。

40

【 0 0 6 2 】

[0062]他の例では、GAD 65自己抗体、インスリノーマ抗原2（IA - 2）自己抗体、インスリン自己抗体（IAA）、亜鉛トランスポータータンパク質8（ZnT8）自己抗体、及びこれらの組み合わせなどの1種以上の自己抗体の有無及び/又は発現（例えば、総量）レベルを使用して、患者の糖尿病を診断する。

50

【0063】

[0063]グルタミン酸脱炭酸酵素65 (GAD65)は、神経細胞の酵素であり、 γ -アミノ酪酸 (GABA) の合成に関与する。これまでに、GAD65自己抗体は、1型糖尿病に関係する自己免疫疾患のバイオマーカーとして使用できることが示されている (Atkinson et al., Lancet, 335:1357-60 (1990))。更に、1型糖尿病の予想には、GAD65、IA-2、IAA、ZnT8自己抗体が提案されている (Mueller et al., Clinical Laboratory News, 36(10), October 2010; Bingley, P.J., J. Clin. Endocrinol. Metab., 95(1):25-33 (2010))。

10

【0064】

[0064]他の例では、タウ、アミロイドベータ (A β) タンパク質、アミロイド前駆体タンパク質 (APP)、アミロイドベータ (A β) ペプチド (例えば、 γ -アミロイドタンパク質28、 β -アミロイドタンパク質40、 β -アミロイドタンパク質42、 β -アミロイドタンパク質43、可溶性アミロイド前駆体タンパク質ベータ (sAPP β)、及び同様のタンパク質等)、何らかのA β タンパク質断片、VILIP-1、及びこれらの組み合わせなどの1種以上の病理学的分子の有無、発現 (例えば、総量) レベル及び/又は活性 (例えば、リン酸化) レベルを使用して、患者のアルツハイマー病、異常調節又は機能障害を診断する。

20

【0065】

[0065]更に他の例では、サンプル中の少なくとも1種のサイトカイン又は複数のサイトカインの有無又はレベルは、本発明に特に有用である。本明細書で使用する時、用語「サイトカイン」は、免疫細胞により分泌され、免疫システムの機能範囲を制御する、様々なポリペプチド又はタンパク質を包含し、かつケモカインなどの低分子量のサイトカインも包含する。用語「サイトカイン」は、脂肪細胞により分泌され、例えば、体重の制御、血球新生、血管新生、創傷治癒、インスリン抵抗性、免疫応答、及び炎症応答において機能するサイトカイン群を含むアディポサイトカインも包含する。サイトカインは、疾患、調節不全、又は機能不全のバイオマーカーとして使用することもできる。

【0066】

[0066]ある種の態様では、サンプル中の、TNF- α 、TNFに関連するアポトーシスの弱い誘導因子 (TWEAK)、破骨細胞形成抑制因子 (OPG)、IFN- γ 、IFN- β 、IFN- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1受容体アンタゴニスト (IL-1ra)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、可溶性IL-6受容体 (sIL-6R)、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-23、及びIL-27が挙げられるがこれらに限定されない、少なくとも1種のサイトカインの有無及びレベルが、評価される。ある種の他の態様では、サンプル中の、例えば、CXCL1/GRO1/GRO、CXCL2/GRO2、CXCL3/GRO3、CXCL4/PF-4、CXCL5/ENA-78、CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、CXCL9/MIG、CXCL10/IP-10、CXCL11/I-TAC、CXCL12/SDF-1、CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15、CXCL16、CXCL17/DMC、CCL1、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1、CCL4/MIP-1、CCL5/RANTES、CCL6/C10、CCL7/MCP-3、CCL8/MCP-2、CCL9/CCL10、CCL11/エオタキシン、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14/HCC-1、CCL15/MIP-5、CCL16/LEC、CCL17/TARC、CCL18/MIP-4、CCL19/MIP-3、CCL20/MIP-3、CCL21/SLC、CCL22/MDC、CCL23/MPIF1、CCL24/エオタキシン-2、CCL25/TECK、CCL26/エオタキシン-3、CCL27/CTACK、CCL28/MEC、CL1、CL2、及びCX₃CL1などの少なくとも1種のケモカインの有無又はレベルが評価される。

30

40

50

【0067】

[0067]ある種の更なる態様では、サンプル中の、レプチン、アディポネクチン、レジスチン、プラスミノゲン活性化因子阻害因子-1 (PAI-1)の活性又は総量、ビスファチン、及びレチノール結合タンパク質4 (RBP4)が挙げられるがこれらに限定されない、少なくとも1種のアディポサイトカインの有無又はレベルが評価される。

【0068】

[0068]他の例では、本発明の方法及びシステムを使用して、サンプル中の1種以上の増殖因子の有無又はレベルを評価できる。本明細書で使用する時、用語「増殖因子」には、細胞の増殖及び/又は細胞の分化を刺激することのできる様々なペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質が包含される。

10

【0069】

[0069]ある種の態様では、サンプル中の、上皮増殖因子 (EGF)、ヘパリン結合上皮増殖因子 (HB-EGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、色素上皮由来因子 (PEDF; SERPINF1としても既知)、アンフィレギュリン (AREG; シュワン腫由来増殖因子 (SDGF)としても既知)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、トランスフォーミング増殖因子- (TGF-)、トランスフォーミング増殖因子- (TGF-)、骨形成タンパク質 (例えば、BMP1 - BMP15)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、神経増殖因子 (NGF)、 - 神経増殖因子 (- NGF)、神経栄養因子 (例えば、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、ニューロトロフィン3 (NT3)、ニューロトロフィン4 (NT4)など)、増殖分化因子-9 (GDF-9)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、ミオスタチン (GDF-8)、エリスロポエチン (EPO)、及びトロポポエチン (TPO)が挙げられるがこれらに限定されない少なくとも1種の増殖因子の有無又はレベルが評価される。一態様では、EGF、VEGF、PEDF、アンフィレギュリン (SDGF)、及び/又はBDNFの有無又はレベルが評価される。

20

【0070】

[0070]更に、多様な反応速度結合パラメータを評価できる。例えば、かかるパラメータとしては、「結合反応速度」パラメータを挙げることができる (例えば、会合速度、 k_{on} ; 解離速度、 k_{off} ; 及び親和定数、 K_d)。これらのパラメータを使用して、例えば、受容体-リガンド相互作用、酵素-基質相互作用、タンパク質-核酸相互作用、タン

30

【0071】

[0071]特定の実施形態では、本発明は、多重アッセイにおいて、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10以上の検体成分の有無、発現レベル (例えば、総量) 及び/又は活性レベル (例えば、リン酸化レベル又は複合体形成) を測定することを含む。

【0072】

[0072]ある種の実施形態では、本発明は、細胞抽出物中で、1種以上 (例えば、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、又は50以上) の更なる検体成分の発現レベル (例えば、総量) 及び/又は活性レベル (例えば、リン酸化レベル又は複合体形成) を測定することを更に含む。いくつかの実施形態では、1種以上 (例えば、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、又は50以上) の追加の検体成分は、受容体型チロシンキナーゼ、非受容体型チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナル伝達カスケード構成要素、核内ホルモン受容体、核内受容体コアアクチベーター、核内受容体リプレッサー、リガンド、受容体、シグナル伝達カスケード構成要素; 1種以上の神経変性タンパク質; 1種以上の病的なタンパク質凝

40

50

集体；及びこれらの組み合わせからなる群から選択される1種以上のシグナル伝達分子を含む。

B. ビーズ/粒子

【0073】

[0073]ある例では、本発明は、蛍光マイクロビーズなどの1種以上のビーズ集団を提供する。例えば、ある集団は蛍光染料を含むマイクロビーズ集団とし、別のマイクロビーズ集団はオーバーラップする又はオーバーラップしない蛍光染料を含むものとしてもよい。本明細書で使用するとき、用語「マイクロビーズ」、「ビーズ」、又は「粒子」は、フローサイトメーターなどの蛍光装置による測定に適した、実質上任意の形状を有する、任意の固体粒子を含むものとする。本明細書で使用するとき、「蛍光染料」により、所定の波長の電磁放射線により励起され、別の波長の光子を放出し得る染料、分子、複合体、又は粒子を含むものとする。蛍光染料をビーズに組み込むこともできる。

10

【0074】

[0074]用語「蛍光染料」、「蛍光プローブ」、「蛍光分子」、「蛍光色素分子」、「蛍光色素」、「蛍光ナノ結晶」は、本明細書において蛍光染料を挙げる際に互換的に使用される。本明細書で使用するとき、「オーバーラップ」は、任意の所定の波長の光により励起されたときに、第1の蛍光染料が、第2の蛍光染料により放出されるものと同じ波長を有する光子をある程度放出することを意味する。非オーバーラップ染料は、第2の蛍光染料により放出されるものとは異なる波長の光子をある程度放出する。

【0075】

[0075]多くの種類のビーズ及び染料が本発明への使用に適する。本発明のいくつかの実施形態では、マイクロビーズは商業的供給元から入手することができ、例えば、商業的供給元としては、Bangs Laboratories, Inc (9025 Technology Drive, Fishers, Ind, 46038-2886); Life Technologies Corporation (5791 Van Allen Way, Carlsbad, Calif, 92008); Brookhaven Instruments Limited (Chapel House, Stock Wood Redditch, Worcestershire B96 6ST, UK); Spherotech, Inc. (27845 Irma Lee Circle, Unit 101, Lake Forest, Ill. 60045); Polysciences, Inc. (400 Valley Road, Warrington, Pa. 18976); BD (1 Becton Drive, Franklin Lakes, N.J., 07417); and Beckman Coulter, Brea, Califが挙げられる。当業者であれば、本発明に適した他のビーズもご存知であろう。

20

30

【0076】

[0076]ある種の好ましい実施形態では、多重検体成分は、同じサンプルから分析される。多重化は、入手可能なサンプル量がごく少量であるときに、分析可能なタンパク質数を最大化するのに特に有用である。例えば、ある例では、検体成分のうち1種以上、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、又は更には12種以上が、少量(例えば、25~100 μ L)のサンプルを使用する本発明の多重化分析を用い分析される。ある例では、ピコグラム量のタンパク質が、本発明の多重アッセイにおいて測定される。

40

【0077】

[0077]ある例では、アレイのある集団におけるそれぞれの捕捉ビーズは、固有の蛍光強度又は固有の蛍光染料の発光を有し、かつ単一の検体成分に特異的な捕捉抗体により被覆される。異なるビーズの組み合わせをサンプル又は標準と混合する。次に、捕捉された検体成分を有するサンプルを、検体成分に特異的な少なくとも1種の検出抗体、又は少なくとも2種の検出抗体とインキュベートする。ある例では、検出抗体は、

(i) 促進部分により標識されており、活性化状態に依存しない複数の抗体と、

(ii) シグナル増幅対の第1のメンバーにより標識されており、活性化状態に依存す

50

る複数の抗体と、を含む。

【0078】

[0078]いくつかの態様では、促進部分は、シグナル増幅対の第1のメンバーにチャネリングし、かつ反応する酸化剤を生成する。ある種の例では、促進部分はグルコースオキシダーゼである。ある種の態様では、酸化剤は過酸化水素 (H_2O_2) である。いくつかの態様では、シグナル増幅対の第1のメンバーはペルオキシダーゼである。ある種の例では、ペルオキシダーゼは西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) である。

【0079】

[0079]いくつかの態様では、シグナル増幅対の第2のメンバーはチラミド製剤である。ある種の例では、チラミド剤はビオチン - チラミドである。

10

【0080】

[0080]いくつかの実施形態では、増幅されたシグナルは、ビオチン - チラミドがペルオキシダーゼにより酸化されることにより生成され、活性化チラミドが生成される。いくつかの態様では、活性化チラミドが直接検出される。他の態様では、活性化チラミドは、シグナル検出剤の添加により検出される。いくつかの例では、シグナル検出剤は、ストレプトアビジン標識された蛍光色素分子である。他の例では、シグナル検出剤は、ストレプトアビジン標識されたペルオキシダーゼと、発色剤とを組み合わせたものである。いくつかの実施形態では、発色剤は、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMB) である。

【0081】

[0081]上記のとおり、代替的な実施形態では、検出抗体は、少なくとも1種の検出抗体を含む。少なくとも1種の検出抗体は、少なくとも1種の検体成分に特異的なシグナル増幅対の第1のメンバーで(1種の)標識をした複数の検出抗体であり得る。

20

【0082】

[0082]いくつかの態様では、複数の検出抗体は、シグナル増幅対の第1のメンバー、すなわちペルオキシダーゼにより標識されている。グルコースオキシダーゼなどの促進部分は、抗体に固定させていない免疫アッセイに導入することができる。すなわち、当該促進部分を、デキストランなどの基質に固定させることができる。ある例では、複数のGO部分を固定させることができる。グルコースの存在下で、グルコースオキシダーゼは、シグナル増幅対の第1のメンバー(例えば、HRP)と反応する酸化剤を生じる。

30

【0083】

[0083]いくつかの態様では、シグナル増幅対の第2のメンバーはチラミド製剤である。ある種の例では、チラミド剤はビオチン - チラミドである。増幅されたシグナルは、ビオチン - チラミドをペルオキシダーゼで酸化して活性化チラミドを生成することにより生じ得る。いくつかの態様では、活性化チラミドが直接検出される。他の態様では、活性化チラミドは、シグナル検出剤の添加により検出される。いくつかの例では、シグナル検出剤は、ストレプトアビジン標識された蛍光色素分子である。他の例では、シグナル検出剤は、ストレプトアビジン標識されたペルオキシダーゼと、発色剤とを組み合わせたものである。いくつかの実施形態では、発色剤は、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMB) である。

40

【0084】

[0084]アレイ分析ソフトウェアは、各ピーズ集団のそれぞれに対しゲーティングし、アレイにおける各検体成分について、蛍光色素分子の中央蛍光強度の測定又は識別を行う。

【0085】

[0085]蛍光色素分子は、「小分子」蛍光色素、又は「タンパク質性蛍光色素(例えば、緑色蛍光タンパク質及びそれらのすべての変異体)のいずれかであってよい。いくつかの実施形態では、蛍光染料は、Alexa Fluor (登録商標) 350、Alexa Fluor (登録商標) 405、Alexa Fluor (登録商標) 430、Alexa Fluor (登録商標) 488、Alexa Fluor (登録商標) 500、Alexa Fluor (登録商標) 514、Alexa Fluor (登録商標) 532、

50

Alexa Fluor (登録商標) 546、Alexa Fluor (登録商標) 555、Alexa Fluor (登録商標) 568、Alexa Fluor (登録商標) 594、Alexa Fluor (登録商標) 610、Alexa Fluor (登録商標) 633、Alexa Fluor (登録商標) 647、Alexa Fluor (登録商標) 660、Alexa Fluor (登録商標) 680、Alexa Fluor (登録商標) 700、及びAlexa Fluor (登録商標) 750を含むAlexa Fluor (登録商標) dyeであり得る。

【0086】

[0086]本明細書に記載の多重免疫アッセイ法は、多様な市販の装置で実施することができる。多重ビーズアッセイは、Becton Dickinson、Beckman-Coulter、Dako-Cytomation、Diasorin、Partec、又はLuminex systemsの臨床的サイトメーターで実施することができる。

10

C. 手術時の近接アッセイ

【0087】

[0087]いくつかの実施形態では、循環細胞などといった細胞の細胞抽出物中の、対象とする活性化状態の特定の検体成分(例えば、シグナル伝達分子、例えば、AMPK修飾因子、又は病理学的分子、例えば、タウ、Aペプチド、など)を検出するためのアッセイは、優れたダイナミックレンジを備えた、フローサイトメーターを使用した多重ハイスループット近接(すなわち、3抗体)アッセイである。非限定例として、近接アッセイにおいて使用される3種の抗体は、(1)検体成分に特異的な捕捉抗体;(2)活性化形態の検体成分に特異的な検出抗体(すなわち、活性化状態に依存する抗体);及び(3)検体成分の総量を検出する検出抗体(すなわち、活性化状態に依存しない抗体)を含み得る。活性化状態に依存する抗体は、例えば、検体成分のリン酸化、ユビキチン化、及び/又は複合体状態を検出することのできるものである。活性化状態に依存する抗体は、概して、活性化及び非活性化形態の検体成分を両方検出することができる。

20

【0088】

[0088]一実施形態では、近接アッセイは、

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

30

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

40

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

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

【0089】

[0089]好ましい実施形態では、近接アッセイは、(i)細胞抽出物を、捕捉抗体の複数の段階希釈物とインキュベートして、複数の捕捉された検出成分を生成することと(ここで、捕捉抗体はビーズ上に存在する)、(ii)捕捉された複数の検体成分を、活性化状態に依存しない複数の抗体及び対応する検体成分に特異的な活性化状態に依存する複数の

50

抗体を含む、検出抗体とインキュベートして、検出可能な、捕捉された複数の検体成分を生成することと（ここで、活性化状態に依存しない抗体は、促進部分により標識されており、活性化状態に依存する抗体は、シグナル増幅対の第1のメンバーで標識され、促進部分は、シグナル増幅対の第1のメンバーにチャネリングし、かつ反応する、酸化剤を生成する）、(iii) 検出可能な、複数の検体成分を、シグナル増幅対の第2のメンバーとインキュベートして、増幅されたシグナルを生成することと、(iv) シグナル増幅対の第1及び第2のメンバーから生成された増幅されたシグナルを検出することと、を含む。

【0090】

[0090]あるいは、活性化状態に依存する抗体を促進部分により標識することができ、活性化状態に依存しない抗体をシグナル増幅対の第1のメンバーにより標識することができる。

10

【0091】

[0091]捕捉抗体、活性化状態に依存しない抗体、及び活性化状態に依存する抗体は、好ましくは、検体成分への結合において競合が最低限に抑えられるように（すなわち、すべての抗体は、それらの対応するシグナル伝達分子に同時に結合することができる）選択されるのが好ましい。

【0092】

[0092]いくつかの実施形態では、活性化状態に依存しない抗体は、検出可能な部分を更に含む。このような例では、検出可能な部分の量は、細胞抽出物中の1以上の検体成分の量に相当する。検出可能な部分の例としては、蛍光標識、化学反応性標識、酵素標識、放射性標識などが挙げられるがこれらに限定されない。好ましくは、検出可能な部分は、Alexa Fluor（登録商標）dye（例えば、Alexa Fluor（登録商標）647）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、Oregon Green（商標）；ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（TRITC）、CyDye（商標）fluor（例えば、Cy2、Cy3、Cy5）などの蛍光色素分子である。当業界で周知の方法を使用して、検出可能な部分を、活性化状態に依存しない抗体に直接的に又は間接的に結合させることができる。

20

【0093】

[0093]ある種の例では、活性化状態に依存しない抗体は、促進部分により直接的に標識される。当業界で周知の方法を使用して、促進部分を、活性化状態に依存しない抗体に結合させることができる。本発明で使用するのに好適な促進部分としては、酸化剤を生成することのできる任意の分子が挙げられ、この酸化剤は、促進部分に近接する（すなわち、空間的に近い又は近傍にある）別の分子にチャネリングし（すなわち、指向して）、かつ反応する（すなわち、結合する、結合される、又は一緒に複合体を形成する）ものである。促進部分の例としては、酵素、例えば、グルコースオキシダーゼ、又は、電子受容体として酸素分子（ O_2 ）が関与する酸化/還元反応を触媒する任意のその他の酵素、などの酵素、並びに光増感剤、例えば、メチレンブルー、ローズベンガル、ポルフィリン、スクアレート染料、フタロシアニンなどが挙げられるが、これらに限定されない。酸化剤の非限定例としては、過酸化水素（ H_2O_2 ）、一重項酸素、及び酸化/還元反応において、酸素原子を伝達する、又は、電子を得る、任意のその他の化合物が挙げられる。好ましくは、好適な基質（例えば、グルコース、光など）の存在下で、促進部分（例えば、グルコースオキシダーゼ、光増感剤など）は、酸化剤（例えば、過酸化水素（ H_2O_2 ）、一重項酸素など）を生じ、この酸化剤は、2つの部分が互いに近接したときに、シグナル増幅対の第1のメンバー（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、保護基により保護されているハプテン、酵素阻害剤にチオエーテル結合させることにより不活性化させた酵素など）にチャネリングし、かつ反応する。

30

40

【0094】

[0094]他のある種の例では、活性化状態に依存しない抗体は、活性化状態に依存しない抗体に複合させたオリゴヌクレオチドリンカーと、促進部分に複合させた相補的なオリゴヌクレオチドリンカーとの間のハイブリダイゼーションを介し、間接的に促進部分により

50

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

【0095】

[0095] 促進部分又は活性化状態に依存しない抗体に複合したオリゴヌクレオチドリンカーの長さは、変更することができる。概して、リンカー配列は、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、又は100ヌクレオチドの長さとするることができる。典型的には、カップリングのためにランダム核酸配列が生成される。非限定例として、連続する3つの異なるドメイン：スペーサードメイン；シグネチャードメイン；及び複合ドメイン、を有する、オリゴヌクレオチドリンカーのライブラリを設計することができる。好ましくは、オリゴヌクレオチドリンカーは、促進部分の機能を損なわずに、又はそれらを複合させる、活性化状態に依存しない抗体の機能を損なわずに、効率的に結合するよう設計する。

【0096】

[0096] オリゴヌクレオチドリンカー配列は、様々なアッセイ条件下での任意の副次的な構造体の形成を防止又は最小限に抑えるよう設計することができる。典型的には、リンカー内部の各断片が、アッセイ法全体において関与するように、それらの融解温度を注意深くモニターする。概して、リンカー配列断片の溶解温度は、1~10である。既定のイオン濃度下で、溶解温度、二次構造、及びヘアピン構造を測定するためのコンピュータアルゴリズム（例えば、OLIGO6.0）を使用して、各リンカー内の3つの異なるドメインのそれぞれを分析することができる。結合配列を、全体的に、構造特性、並びに、その他の複合オリゴヌクレオチドリンカー配列に対する類似性、例えば、厳密な条件下で相補的なオリゴヌクレオチドリンカーにハイブリダイズするかについて分析することもできる。

【0097】

[0097] オリゴヌクレオチドリンカーのスペーサー領域により、オリゴヌクレオチド架橋部分と複合ドメインが十分な距離を保つ。複合ドメインは、相補的なオリゴヌクレオチドリンカー配列により標識されている分子を、核酸ハイブリダイゼーションにより複合ドメインに結合させるよう機能する。核酸により介在されるハイブリダイゼーションは、抗体-検体成分（すなわち、抗原）複合体形成の前又は後のいずれかに実施することができ、より柔軟なアッセイフォーマットを提供する。多くの直接的に抗体を複合させる方法とは異なり、抗体又はその他の分子に対し比較的小さなオリゴヌクレオチドを結合させることで、標的検体成分に対する抗体の特異的親和性に対する影響、又は、複合分子の機能に対する影響が最小限に抑えられる。

【0098】

[0098] いくつかの実施形態では、複雑な多重化タンパク質アッセイにおいて、オリゴヌクレオチドリンカーのシグネチャー配列ドメインを使用することができる。複数の抗体を、異なるシグネチャー配列を有するオリゴヌクレオチドリンカーと複合させることができる。多重免疫アッセイにおいて、適切なプローブで標識したレポーターオリゴヌクレオチド配列を使用して、多重アッセイフォーマットで抗体及びそれらの抗原の交差反応性を検出することができる。

【0099】

[0099] 幾つかの異なる方法を使用して、オリゴヌクレオチドリンカーを抗体又はその他の分子に複合させることができる。例えば、5'又は3'末端のいずれかにチオール基を

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

【0100】

[0100]オリゴヌクレオチドリンカーは、Usman et al., J. Am. Chem. Soc., 109:7845 (1987); Scaringe et al., Nucl. Acids Res., 18:5433 (1990); Wincott et al., Nucl. Acids Res., 23:2677-2684 (1995); 及び Wincott et al., Methods Mol. Bio., 74:59 (1997) に記載のものなど、当業界で既知の多様な手法のいずれかを使用して合成することができる。概して、オリゴヌクレオチドの合成は、5'末端のジメトキシトリチル及び3'末端のホスホルアミダイトなどの、一般的な核酸保護基及びカップリング基を使用する。オリゴヌクレオチド合成に好適な試薬、核酸脱保護法、及び核酸精製法は、当該技術分野において既知である。

【0101】

[0101]ある種の例では、活性化状態に依存する抗体は、シグナル増幅対の第1のメンバーにより直接的に標識される。当業界で周知の方法を使用して、シグナル増幅対のメンバーを、活性化状態に依存する抗体に結合させることができる。他のある種の例では、活性化状態に依存する抗体は、活性化状態に依存する抗体に複合させた結合対の第1メンバーと、シグナル増幅対の第1のメンバーに複合させた結合対の第2のメンバーとの結合を介し、シグナル増幅対の第1のメンバーにより間接的に標識される。当業界で周知の方法を使用して、結合対のメンバー（例えば、ビオチン/ストレプトアビジン）を、シグナル増幅対のメンバー又は活性化状態に依存する抗体に結合させることができる。シグナル増幅対のメンバーの例としては、限定するものではないが、ペルオキシダーゼ、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、カタラーゼ、クロロペルオキシダーゼ、シトクロムcペルオキシダーゼ、好酸球ペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、脱ヨード酵素などが挙げられる。シグナル増幅対のメンバーのその他の例としては、保護基により保護されたハプテン、及び、酵素阻害剤に対するチオエーテル結合により不活性化させた酵素、などが挙げられる。

【0102】

[0102]近接チャネリングの一例では、促進部分はグルコースオキシダーゼ（GO）であり、シグナル増幅対の第1のメンバーは西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）である。GOをグルコースなどの基質と接触させると、酸化剤（すなわち、過酸化水素（ H_2O_2 ））が生じる。複数のGO部分がデキストラン分子に担持されてよい。HRPがGOの近接するチャネリング内に存在する場合、GOにより生成された H_2O_2 はHRPへチャネリングして、HRP- H_2O_2 複合体を形成し、この複合体は、シグナル増幅対の第2のメンバー（例えば、ルミノール若しくはイソルミノールなどの化学発光基質、又は、チラミド（例えば、ビオチン-チラミド）、ホモバニリン酸、又は4-ヒドロキシフェニル酢酸などの蛍光発生基質）の存在下で増幅されたシグナルを生成する。ビオチン-チラミドをシグナル増幅対の第2のメンバーとして使用するとき、HRP- H_2O_2 複合体が、チラミドを酸化して反応性チラミドラジカルを生成し、これが近くの求核性残基に共有結合

する。

【0103】

[0103] 図1は、2つの検出抗体（すなわち、活性化状態に依存しない抗体102、及び活性化状態に依存する抗体109）と、ビーズ101に担持されている捕捉抗体103とに検体成分が結合している、例示的な近接アッセイを示す。捕捉抗体103及び活性化状態に依存しない抗体102の各々は、活性化状態に依存せずに検体成分106に結合する。活性化状態に依存する抗体109は、検体成分の活性化状態に依存して、かかる成分に結合する（例えば、活性化状態に依存する抗体は、リン酸化残基を有する検体成分の活性化状態にのみ結合する）。活性化状態に依存しない抗体は、促進部分（M1、104と表記）で標識され、活性化状態に依存する抗体は、シグナル増幅対の第1のメンバー（M2、105と表記）で標識される。検体成分に対し両方の検出抗体が結合すると、シグナル増幅対の第1のメンバーに対し促進部分が十分近接し（点線107の内側の領域として示す）、促進部分により生成されたシグナルはシグナル増幅対の第1のメンバーにチャネリングして、検出可能なシグナル及び/又は増幅シグナルが生じる。近接チャネリングのための多様な方法が当業界で既知であり、かつ例えば、FRET、時間分解蛍光-FRET、及びLOCIなどを挙げることができる。本発明の方法に使用するとき、近接チャネリングの利点は、3種類の抗体のすべてが結合したこれらの検体成分についてのみ、単独で検出可能なシグナルが生成され、結果としてアッセイの特異性が向上し、バックグラウンドが低減され、検出が簡略化されるというものである。ある種の態様では、ビーズ101は、検体成分を結合していない他の捕捉抗体110、125、121、及び115を含む。

10

20

【0104】

[0104] 活性化チラミドは直接検出され、あるいは例えば、ストレプトアビジン標識された蛍光色素分子、又は、ストレプトアビジン標識されたペルオキシダーゼと発色剤とを組み合わせたもの、などのシグナル検出剤の添加により検出される。本発明で使用するのに好適なフルオロフォアの例としては、Alexa Fluor（登録商標）dye（例えば、Alexa Fluor（登録商標）555、Alexa Fluor（登録商標）647など）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、Oregon Green（商標）；ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（TRITC）、CyDye（商標）fluor（例えば、Cy2、Cy3、Cy5）などが挙げられるがこれらに限定されない。当業界で周知の方法を使用して、ストレプトアビジン標識を、蛍光色素分子又はペルオキシダーゼに直接的に又は間接的に結合させることができる。本発明で使用するのに好適な発色剤の非限定例としては、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）、3,3'-ジアミノベンジジン（DAB）、2,2'-アジノ-ビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS）、4-クロロ-1-ナフトール（4CN）、及び/又はポルフィリノーゲンが挙げられる。

30

【0105】

[0105] 近接チャネリングの別の例では、促進部分は光増感剤であり、シグナル増幅対の第1のメンバーは複数のハプテンにより標識された大型分子であり、ここで、複数のハプテンは、特異的な結合パートナー（例えば、リガンド、抗体など）に対するハプテンの結合を防ぐ保護基により保護されている。例えば、保護されたビオチン、クマリン、及び/又はフルオレセイン分子により標識されたデキストラン分子をシグナル増幅対メンバーとすることができる。好適な保護基としては、フェノキシ保護基、アナリノ保護基、オレフィン保護基、チオエーテル保護基、及びセレノエーテル保護基が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の近接アッセイに好適なその他の光増感剤及び保護ハプテン分子は、米国特許第5,807,675号に記載される。光増感剤が光により励起されると、酸化剤（すなわち、一重項酸素）が生成される。ハプテン分子が、光増感剤に近接するチャネリング内に存在する場合、光増感剤により生成された一重項酸素は、ハプテンの保護基上のチオエーテルのもとにチャネリングされ、これと反応し、カルボニル基（ケトン又はアルデヒド）及びスルフィン酸を生成し、ハプテンから保護基を遊離させる。保護の外れた

40

50

ハプテンは、次に、シグナル増幅対の第2のメンバー（例えば、検出可能なシグナルを生成し得る、特異的な結合パートナー）に特異的に結合できる。例えば、ハプテンがビオチンであるとき、特異的な結合パートナーは標識されたストレプトアビジンであり得る。酵素の例としては、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、HRPなどが挙げられる。未結合の試薬を洗浄し除去した後、酵素により検出可能な（例えば、蛍光、化学発光、発色など）基質を添加することにより、検出可能なシグナルを生成し、好適な方法及び当該技術分野で既知の計測手段により検出することができる。あるいは、チラミドシグナルの増幅により、検出可能なシグナルを増幅させて、活性化チラミドを直接的に検出することができ、あるいは上記のシグナル検出剤の添加により検出することができる。

【0106】

[0106]近接チャネリングの更に別の例では、促進部分は光増感剤であり、シグナル増幅対の第1のメンバーは酵素-阻害剤複合体である。酵素及び阻害剤（例えば、ホスホン酸標識されたデキストラン）は、開裂可能なリンカー（例えば、チオエーテル）によりともに結合される。光増感剤が光により励起されると、酸化剤（すなわち、一重項酸素）が生成される。酵素-阻害剤複合体が、光増感剤に近接するチャンネル内に存在する場合、光増感剤により生成された一重項酸素は、開裂可能なリンカーのもとにチャネリングされ、これと反応し、酵素を活性化させることにより酵素から阻害剤を遊離させる。酵素基質を添加して、検出可能なシグナルを生成し、あるいは、増幅試薬を添加して増幅されたシグナルを生成する。

【0107】

[0107]近接チャネリングの更なる例では、促進部分がHRPであり、シグナル増幅対の第1のメンバーは上記のとおり、保護されたハプテン又は酵素-阻害剤複合体であり、保護基はp-アルコキシフェノールを含む。フェニレンジアミン及び H_2O_2 の添加は、反応性フェニレンジイミンを生成し、この分子は保護されたハプテン又は酵素-阻害剤複合体のもとにチャネリングし、かつp-アルコキシフェノール保護基と反応し、露出したハプテン又は反応性酵素を生成する。増幅されたシグナルは、上記（例えば、米国特許第5,532,138号及び同第5,445,944号）のとおり生成及び検出される。

【0108】

[0108]別の実施形態では、本発明は、(a)ビーズ上に保持された複数の捕捉抗体の段階希釈物と、(b)複数の検出抗体（例えば、活性化状態に依存しない抗体、及び活性化状態に依存する抗体）と、を含む、上記の近接アッセイを実施するためのキットを提供する。いくつかの例では、キットは、キットを使用して固形腫瘍の循環細胞の複数のシグナル伝達分子の活性化状態を検出する方法についての使用説明書を更に含有し得る。キットには、本発明の特異的な方法の実施のため、例えば、シグナル増幅対の第1及び第2のメンバー、チラミドシグナル増幅剤、促進部分のための基質、洗浄緩衝液などの上記の任意の追加の試薬を含有させてもよい。

D. 2抗体アプローチ**【0109】**

[0109]いくつかの実施形態では、本アッセイは、代謝疾患、又は脳の認知障害、神経疾患/障害及び/若しくは心の健康に係る障害、又は癌に係る対象とする検体成分など、細胞抽出物中の、対象とする活性化状態の特定の検体成分（例えば、シグナル伝達分子又は神経変性分子）を検出するためのものである。ある種の例では、固形腫瘍の循環細胞などの腫瘍細胞内部のものを検体成分とすることができる。非常に有利なことに、本発明は、優れたダイナミックレンジを備えた多重ハイスループット2抗体アッセイを提供する。非限定例として、アッセイにおいて使用される2抗体は、(1)検体成分に特異的な捕捉抗体、及び(2)活性形態の検体成分に特異的な検出抗体（すなわち、活性化状態に依存する抗体）を含み得る。活性化状態に依存する抗体は、例えば、検体成分のリン酸化、ユビキチン化、及び/又は複合体状態を検出することのできるものである。あるいは、検出抗体は、細胞抽出物中の検体成分の総量を検出する、活性化状態に依存しない抗体を含む。活性化状態に依存しない抗体は、概して、活性化及び非活性化形態の検体成分の

10

20

30

40

50

両方を検出することができる。

【0110】

[0110]好ましい実施形態では、2抗体アッセイは、(i)細胞抽出物を、捕捉抗体の複数の段階希釈物とインキュベートして、捕捉された複数の検体成分を生成することと、(ii)捕捉された複数の検体成分を、対応する検体成分に特異的な活性化状態に依存する抗体とインキュベートして、検出可能な、捕捉された複数の検体成分を生成することと、(iii)検出可能な、複数の検体成分を、シグナル増幅対の第1及び第2のメンバーとインキュベートして、増幅されたシグナルを生成することと、(iv)シグナル増幅対の第1及び第2のメンバーから生成された増幅されたシグナルを検出することと、を含む。

【0111】

[0111]本明細書に記載の2抗体アッセイは、典型的には、ビーズ表面に結合させた捕捉抗体の濃度の範囲で、複数の異なる捕捉抗体を含む、抗体ベースのアレイである。

【0112】

[0112]捕捉抗体及び検出抗体は、好ましくは、検体成分の結合において競合が最低限に抑えられるように選択される(すなわち、捕捉及び検出抗体は、それらの対応するシグナル伝達分子又は神経変性分子に同時に結合することができる)。

【0113】

[0113]一実施形態では、検出抗体は結合対の第1メンバー(例えば、ビオチン)を含み、シグナル増幅対の第1のメンバーは、結合対の第2のメンバー(例えば、ストレプトアビジン)を含む。結合対のメンバーには、当業界で周知の方法を使用して、検出抗体又はシグナル増幅対の第1のメンバーを直接的に又は間接的に結合させることができる。ある種の例では、シグナル増幅対の第1のメンバーは、ペルオキシダーゼ(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、カタラーゼ、クロロペルオキシダーゼ、シトクロムcペルオキシダーゼ、好酸球ペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、脱ヨード酵素など)であり、及びシグナル増幅対の第2のメンバーは、チラミド製剤(例えば、ビオチン-チラミド)である。あるいは、シグナル増幅対の第1のメンバーを、検出抗体に直接結合させることができる。ある種の例では、チラミド剤のペルオキシダーゼ酸化により、増幅されたシグナルが生じ、過酸化水素(H_2O_2)の存在下で活性化チラミドが生成される。

【0114】

[0114]一態様では、過酸化水素(H_2O_2)はインサイチュで生成される。例えば、グルコースオキシダーゼなどの促進部分は、抗体に固定させていない免疫アッセイに導入することができる。すなわち、当該促進部分を、デキストランなどの基質に固定させることができる。複数のGO部分をデキストランに固定させることができる。グルコースの存在下で、グルコースオキシダーゼは、シグナル増幅対の第1のメンバー(例えば、HRP)と反応する過酸化水素などの酸化剤を生じる。

【0115】

[0115]活性化チラミドは直接検出され、あるいは例えば、ストレプトアビジン標識された蛍光色素分子、又は、ストレプトアビジン標識されたペルオキシダーゼと発色剤とを組み合わせたもの、などのシグナル検出剤の添加により検出される。本発明で使用するのに好適な蛍光色素分子の例としては、Alexa Fluor(登録商標)dye(例えば、Alexa Fluor(登録商標)555、Alexa Fluor(登録商標)647)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、Oregon Green(商標)ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート(TRITC)、CyDye(商標)fluor(例えば、Cy2、Cy3、Cy5)などが挙げられるがこれらに限定されない。当業界で周知の方法を使用して、ストレプトアビジン標識を、蛍光色素分子又はペルオキシダーゼに直接的に又は間接的に結合させることができる。本発明で使用するのに好適な発色剤の非限定例としては、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)、3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(AB

10

20

30

40

50

T S)、4 - クロロ - 1 - ナフトール (4 C N)、及びノ又はボルフィリノーゲンが挙げられる。

【 0 1 1 6 】

[0116]別の実施形態では、本発明は、(a) マイクロキャリア上に保持された複数の捕捉抗体の段階希釈物と、(b) 複数の検出抗体 (例えば、活性化状態に依存しない抗体、及び活性化状態に依存する抗体) と、を含む、上記の 2 抗体アッセイを実施するためのキットを提供する。いくつかの例では、キットは、本キットを使用して固形腫瘍の循環細胞に関係する複数のシグナル伝達分子の活性化状態を検出する方法についての使用説明書を更に含有し得る。キットには、本発明の特異的な方法を実施する観点から、上記のもの他に追加の試薬を含有させてもよく、例えば、シグナル増幅対の第 1 及び第 2 のメンバー、チラミドシグナル増幅剤、洗浄緩衝液などを含有させてもよい。

10

I V . 実施例

実施例 1 . 患者サンプルにおけるリン酸化 H E R 2 レベルを測定するためのフローサイトメトリー C E E R

【 0 1 1 7 】

[0117]本実施例は、ビーズに固定した C E E R (登録商標) と、フローサイトメーターとを使用して、細胞可溶化液試料中の活性化型 (リン酸化) H E R 2 レベルを検出する方法を示す。

【 0 1 1 8 】

[0118]細胞可溶化液は次のとおり調製する。H E R 2 を過剰発現している細胞 (すなわち、B T 4 7 4 細胞) を陽性対照サンプルとして使用し、患者のサンプルと並行して処理する。細針吸引サンプルなどの生物学的サンプルを患者から採取する。サンプルの細胞を回収し、P B S で 2 回洗浄し、プロテアーゼ阻害剤のカクテルを含有させた R I P A 緩衝液などの標準細胞溶解緩衝液を使用して溶解する。溶解反応は、氷上で 3 0 分間、又は細胞を十分に溶解するまで実施できる。細胞を遠心分離し、更なる解析のため上清 (細胞可溶化液) を用意する。

20

【 0 1 1 9 】

[0119]ポリスチレンビーズ (例えば、約 1 0 μ m) を H E R 2 捕捉抗体で被覆する。陰性対照として、I g G を別の組のビーズ上に被覆する。被覆したビーズを 5 % B S A - P B S T で 1 時間ブロックした。細胞可溶化サンプル (すなわち、細胞約 7 5 個、7 . 5 個、及び 0 . 7 5 個に相当する溶解液) と被覆ビーズとを約 8 0 分間インキュベートする。このときビーズを洗浄できる。検出抗体 (例えば、4 G 1 0 - H R P 及び H E R 2 - A B 4 - G O) と被覆ビーズとを 2 0 分間インキュベートする。抗体 4 G 1 0 - H R P はホスホチロシンに特異的に結合し、抗体 H E R 2 - A B 4 - G O は H E R 2 ポリペプチドを認識する。次にビーズを洗浄できる。その後、ビオチン - チラミド (B T - t y r) を加え、ビーズと共に 3 0 分間インキュベートする。この時点で、2 とおり (1 : 5 0 0 及び 1 : 1 0 0 0) の B T - t y r 希釈液を試験することができる。次に、シグナル検出試薬ストレプトアビジン - A l e x a F l u o r (登録商標) 6 4 7 を加え、5 分間インキュベートする。得られる蛍光ビーズを検出し、標準フローサイトメーターを使用して定量する。

30

40

【 0 1 2 0 】

[0120]測定される蛍光は、サンプル中の活性化型 H E R 2 のレベルに比例する。活性化型 H E R 2 レベルを使用して、患者が例えば、乳癌非小細胞肺癌、卵巣癌、胃癌、精巣胚細胞性癌、食道腫瘍、又は別の癌などの疾患を有するかを判断することができる。

実施例 2 . 患者サンプルにおけるリン酸化タウレベル又は全タウレベルを測定するための、フローサイトメトリーによる C E E R

【 0 1 2 1 】

[0121]本例には、アルツハイマー病の疑いのある患者又はアルツハイマー病のリスクのある患者から得られた血清サンプル中のリン酸化タウレベルを測定する、本明細書に記載のフローサイトメトリーによる C E E R アッセイの使用方法を記載する。

50

【 0 1 2 2 】

[0122]ビーズを抗体被覆する標準的なプロトコルを用い、リン酸化されていないタウを特異的に認識する抗タウ捕捉抗体をポリスチレンビーズに結合させる。結合したビーズを5% BSA - PBSで1時間ブロッキングする。患者の血清サンプルを、被覆ビーズと共に約80分間インキュベートする。検出抗体は、例えば、非リン酸化タウに対するものでありグルコースオキシダーゼ(GO)を結合した第1の抗体、及びリン酸化タウ又は全タウに対するものであり西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を結合した第2の抗体など。検出抗体と結合ビーズとを20分間インキュベートする。この手順ではこの時点でビーズを洗浄できる。次に、ビオチン-チラミドをビーズに加え、30分間インキュベートする。次に、シグナル検出試薬のストレプトアビジン-AlexaFluor(登録商標)647とビーズとを5分間インキュベートする。得られる蛍光ビーズを、標準フローサイトメーターを使用して検出し、定量する。

10

【 0 1 2 3 】

[0123]測定される蛍光は、サンプル中の活性化型タウのレベルに比例する。非AD対照と比較して、患者のサンプルのリン酸化されたタウのレベルが上昇した場合、次に、患者がADであるのか、又はADを発症するリスクがあるのかを判断する。表1は、フローサイトメトリ解析により検出された全タウ及び対応する蛍光値についての標準曲線を示す。上記のとおりCEER増幅工程を使用してシグナルを生成した。

【表1】

表1

20

pg/mL	蛍光
250.000	1055.77
62.500	361.03
15.625	296.07
3.900	285.42
0.000	266.96

【 0 1 2 4 】

[0124]これまでに、理解を明瞭にするため、図示及び例示目的により本発明を程度詳細に記載したものの、当業者であれば、添付の特許請求の範囲内である種の変更及び改変を実施できることを認識されるであろう。更に、本明細書に提供される各参照は、各参照が参照によりそれぞれ援用されている場合と同程度に、その全容が参照により援用される。

30

【 図 1 】

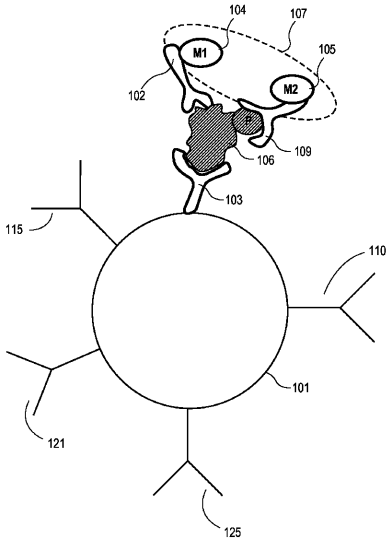


FIG. 1

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成29年4月5日(2017.4.5)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

サンプルに対し多重化免疫アッセイを実施する方法であって、

(a) 血液、血漿、又は細胞可溶化液を、ビーズに固定されている複数の捕捉抗体と接触させて、捕捉された複数の検体成分を生成することと(ここで、ビーズは、少なくとも1種の検体成分に特異的である)、

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

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

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

を含む、方法。

【 請求項 2 】

前記ビーズが、蛍光色素又は検出可能なタグで標識される、請求項1に記載の方法。

【 請求項 3 】

前記サンプルが、全血、血清、血漿、尿、痰、気管支洗浄液、涙、乳頭吸引液、リンパ液、唾液、細針吸引液（FNA）、脳脊髄液、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記少なくとも1種の検体成分が、少なくとも1種のシグナル伝達分子、サイトカイン、代謝産物、病理学的分子、又は自己抗体を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記少なくとも1種の検出抗体が、少なくとも2種の検出抗体であり、

(i) 促進部分により標識されており、活性化状態に依存しない複数の抗体と、

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

を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記促進部分が、前記シグナル増幅対の前記第1のメンバーにチャネリングし、かつ反応する酸化剤を生成する、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記検出抗体が、前記少なくとも1種の検体成分に特異的なシグナル増幅対の第1のメンバーで標識した複数の検出抗体である、検出抗体を1種含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記促進部分が、前記シグナル増幅対の前記第1のメンバーにチャネリングし、かつ反応する酸化剤を生成する、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記促進部分が、グルコースオキシダーゼである、請求項5又は8に記載の方法。

【請求項10】

前記酸化剤が、過酸化水素（ H_2O_2 ）である、請求項6又は8に記載の方法。

【請求項11】

前記シグナル増幅対の前記第1のメンバーがペルオキシダーゼである、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記ペルオキシダーゼが、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記シグナル増幅対の前記第2のメンバーが、チラミド試薬である、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記チラミド試薬が、蛍光色素分子により直接的に標識される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記チラミド試薬がビオチン-チラミドである、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

前記増幅されたシグナルが、ペルオキシダーゼによりチラミドが酸化されて活性化チラミドが生成されることにより生じる、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記活性化チラミドが直接検出される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記活性化チラミドが、前記シグナル検出剤の添加により検出される、請求項16に記載の方法。

【請求項19】

前記シグナル検出剤が、ストレプトアビジン標識されたフルオロフォアである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記シグナル検出剤が、ストレプトアビジン標識されたペルオキシダーゼと発色剤とを組み合わせたものである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記発色剤が 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMB) である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記方法が、ヒト疾患の診断検査として使用される、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記疾患が、代謝疾患、脳及び認知疾患、胃腸疾患、又は癌である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記癌が、乳癌、結腸直腸癌、消化管間質腫瘍、消化管カルチノイド腫瘍、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌、前立腺癌、及び胃癌からなる群から選択されるものである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記代謝疾患が糖尿病である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記脳及び認知疾患がアルツハイマー病である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

前記少なくとも 1 種のシグナル伝達分子が、AMP 活性化タンパク質キナーゼ (AMPK)、AMPK キナーゼ (AMPKK)、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ (CAMKK)、LKB1、トランスフォーミング増殖因子 - 活性化キナーゼ 1 (TAK1)、AKT、アディポネクチン、レプチン、グルコース、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 ~ 23 及び 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記少なくとも 1 種の自己抗体が、GAD65 自己抗体、インスリノーマ抗原 2 (IA-2) 自己抗体、インスリン自己抗体 (IAA)、亜鉛トランスポータータンパク質 8 (ZnT8) 自己抗体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 ~ 23 及び 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記少なくとも 1 種の病理学的分子が、タウ、アミロイドベータ (A β) ペプチド、可溶性アミロイド前駆体タンパク質 (sAPP β)、VILIP-1、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 ~ 23 及び 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記少なくとも 1 種のシグナル伝達分子が受容体型チロシンキナーゼである、請求項 4 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記受容体型チロシンキナーゼが、HER1、HER2、HER3、HER4、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、FLT-3、FLK-2、PDGFR、c-KIT、INSR、IGF-IR、IGF-IIR、IRR、CSF-1R、cMET、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記少なくとも 1 種の受容体型チロシンキナーゼが、非受容体型チロシンキナーゼを更に含む、請求項 30 又は 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記増幅されたシグナルが、反応速度結合パラメータに関連付けられる、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記ピーズが複数のピーズである、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記複数のピーズが、各集団のそれぞれが他方と区別可能である少なくとも 2 種の集団を有する、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記ピーズの少なくとも 2 種の集団のそれぞれが、それぞれ異なる、少なくとも 2 種の各検体成分に特異的なものである、請求項 3 5 に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/063603

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 G01N33/58 G01N33/537 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N B01D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Emma Burgos-Ramos ET AL: "Multiplexed Bead Immunoassays: Advantages and Limitations in Pediatrics" In: "Pediatrics, Advances in Immunoassay Technology", 23 March 2012 (2012-03-23), InTech, XP055158475, pages 165-180,	1-4
Y	page 167, lines 8-10 page 169 figures 1C, 1E, 2	5-36
Y	W0 2013/033623 A1 (NESTEC SA) 7 March 2013 (2013-03-07) claims 1,15,16 ----- ----- -/--	5-36
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 June 2015		15/07/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gunster, Marco

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/063603

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PHILLIP KIM ET AL: "Highly sensitive proximity mediated immunoassay reveals HER2 status conversion in the circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients", PROTEOME SCIENCE, vol. 9, no. 1, 2011, page 75, XP021130852, page 12</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	5-36
Y	<p>JEEYUN LEE ET AL: "A Novel Proteomics-Based Clinical Diagnostics Technology Identifies Heterogeneity in Activated Signaling Pathways in Gastric Cancers", PLOS ONE, vol. 8, no. 1, 25 January 2013 (2013-01-25), page e54644, XP055134461, page 3, left-hand column, paragraph 2-3; figure 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	5-36
Y	<p>M. R. CLUTTER ET AL: "Tyramide signal amplification for analysis of kinase activity by intracellular flow cytometry", CYTOMETRY PART A, vol. 77A, no. 11, 2010, pages 1020-1031, XP055158470, figure 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	5-36
Y	<p>Anja Rodenbrock ET AL: "Flow Cytometric Detection of pAKT and FoxP3 in Jurkat T Cells Using TSA Plus Signal Amplification Technology", Application Note, 2012, pages 1-16, XP055158476, Retrieved from the Internet: URL:http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-149814APP_FlowCytometricDetectiononpAKTandFoxP3JurkatTCellsUsingTSAPlusSignalAmplificationTechnology.PDF [retrieved on 2014-12-12] figure 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	5-36
A	<p>"Abstract 3497: Pathway profiling for personalized medicine: Comparison of two immunoassays. -- Stresemann et al. 73 (1008): 3497 -- Cancer Research", 15 April 2013 (2013-04-15), XP055139142, Retrieved from the Internet: URL:http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/short/73/8_MeetingAbstracts/3497 [retrieved on 2014-09-09] abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-36
	-----	-/--

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/063603

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SACHIN WANI ET AL: "Evaluation of Phosphorylation Signatures in Suspected Pancreatic Cancer Using Endoscopic Ultrasound-Guided Fine Needle (EUS-FNA) Aspirates: A Feasibility Study", GASTROENTEROLOGY, vol. 142, no. 5, suppl. 1, 2012, page S533, XP055139076, abstract	1-36
A	----- US 2012/149128 A1 (MANNEH VICTOR [US]) 14 June 2012 (2012-06-14) paragraphs [0147], [0006] - [0007], [0135], [0138]	1-36
A	----- US 2008/160630 A1 (LIU DAVID J [US] ET AL) 3 July 2008 (2008-07-03) the whole document	1-36
A	----- WO 2013/055829 A1 (NESTEC SA) 18 April 2013 (2013-04-18) the whole document	1-36
A	----- HAROLD N. BAKER ET AL: "Conversion of a Capture ELISA to a Luminex xMAP Assay using a Multiplex Antibody Screening Method", JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS, no. 65, 6 July 2012 (2012-07-06), page e4084, XP055158474, the whole document	1-36
A	----- WO 2010/072011 A1 (BIOCARTIS SA) 1 July 2010 (2010-07-01) page 17, lines 2-8; claim 1	1-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/063603

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013033623 A1	07-03-2013	EP 2751562 A1 JP 2014525585 A KR 20140059273 A US 2015017659 A1 WO 2013033623 A1	09-07-2014 29-09-2014 15-05-2014 15-01-2015 07-03-2013
US 2012149128 A1	14-06-2012	NONE	
US 2008160630 A1	03-07-2008	US 2008160630 A1 US 2012322683 A1	03-07-2008 20-12-2012
WO 2013055829 A1	18-04-2013	NONE	
WO 2010072011 A1	01-07-2010	AU 2009329750 A1 CA 2745580 A1 CN 102264474 A EP 2367633 A1 JP 5535237 B2 JP 2012513593 A KR 20110110209 A RU 2011130925 A US 2011306506 A1 WO 2010072011 A1	30-06-2011 01-07-2010 30-11-2011 28-09-2011 02-07-2014 14-06-2012 06-10-2011 27-01-2013 15-12-2011 01-07-2010

フロントページの続き

(51) Int. Cl.			F I			テーマコード (参考)
C 1 2 N	9/12	(2006.01)	C 1 2 Q	1/28		
C 1 2 Q	1/48	(2006.01)	C 1 2 N	9/12		
			C 1 2 Q	1/48	Z	

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

(72) 発明者 パリーニ, アレッシオ
 スイス, シーエイチ 1 0 0 5 ローザンヌ, アヴニユ ドゥ レマン 6 4

(72) 発明者 セヴラン, インディア シー.
 スイス, シーエイチ 1 0 0 7 ローザンヌ, アヴニユ ド モントワ 5

F ターム(参考) 4B050 CC07 DD11 KK18 LL03
 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ22 QQ23 QQ27 QR02 QR03 QR07 QR64
 QR66 QR67 QS22 QS36 QX01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017520769A5	公开(公告)日	2018-07-26
申请号	JP2016575065	申请日	2015-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	雀巢产品技术援助有限公司		
申请(专利权)人(译)	Nesuteku兴业ANONYME		
[标]发明人	パリーニアレッシオ セヴランインディアシー		
发明人	パリーニ, アレッシオ セヴラン, インディア シー.		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 C12N9/04 C12Q1/26 C12Q1/28 C12N9/12 C12Q1/48		
CPC分类号	G01N33/542 G01N33/537 G01N33/54313 G01N33/54393 G01N33/57415 G01N33/581 G01N33/582 G01N33/585 G01N33/6896 G01N2333/908 G01N2440/14		
FI分类号	G01N33/543.515.A G01N33/543.575 G01N33/53.D C12N9/04.D C12Q1/26 C12Q1/28 C12N9/12 C12Q1/48.Z		
F-TERM分类号	4B050/CC07 4B050/DD11 4B050/KK18 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063 /QQ22 4B063/QQ23 4B063/QQ27 4B063/QR02 4B063/QR03 4B063/QR07 4B063/QR64 4B063/QR66 4B063/QR67 4B063/QS22 4B063/QS36 4B063/QX01		
代理人(译)	长谷川良树 池田 成人 小泉纯酒卷		
优先权	2014175033 2014-06-30 EP		
其他公开文献	JP2017520769A		

摘要(译)

本发明提供了用于快速鉴定和定量分析物组分例如蛋白质生物标志物的系统，方法，装置和试剂盒。在本发明的多重免疫测定中，将多种捕获抗体固定在一个珠子或多个珠子上，以便捕获和保留衍生自样品如细胞裂解物的生物标记。固定有特异性捕获抗体的珠子可以识别从细胞裂解物中捕获的生物标志物。[选型图]图1