DESCRIPTION OF THE SPECIFIC EMBODIMENTS

[0035] The present invention generally provides improved devices, systems, methods, compositions of matter, kits, and the like for identifying and/or tracking one or more particular items or elements of interest. The invention can take advantage of recently enhanced capabilities of new compositions of matter at generating signals in response to excitation energy. A particularly advantageous signal generation structure for use with the present invention is the semiconductor nanocrystal. Other useful signal emitting structures may also take advantage of the improvements provided by the present invention, including conventional fluorescent dyes, radioactive and radiated elements and compounds, Raman scattering materials (with or without surface enhancement and/or resonant signal excitation) and the like. The invention can be used to calibrate spectral codes formed of multiple signals, significantly facilitating interpretation and accurate reading of the emitted spectra. The invention may also enhance the clarity of codes by the use of improved encoding techniques which involve separating discrete signal peaks within a spectrum. The enhanced robustness of such a separated code may be used to pack more information into a spectral code, enhance the accuracy and reliability of the code, and/or allow simplification of the coding process (for example, by allowing sufficient information to be transmitted spectrally using a binary code in which a signal is either present or absent at a particular wavelength, rather than relying on proper intensity level interpretation). The invention can also facilitate the generation of spectral codes as well as the generation of an inventory of labels suitable for spectral identification.

Spectral Labeling of Libraries

[0036] Referring now to Fig. 1, an inventory system 10 includes a library 8 of labeled elements 12 and an analyzer 14. Analyzer 14 generally includes a processor 16 coupled to a sensor 18. An energy source 20 transmits an excitation energy 22 to a first labeled element 12a. In response to excitation energy 22, first labeled element 12a emits radiant energy 24 defining a spectral code. The spectral code of radiant energy 24 is sensed by sensor 18, and the spectral code is interpreted by processor 16 so as to identify labeled element 12a.

[0037] Library 8 may optionally comprise a wide variety of items of interest. In many embodiments, labeled elements 12a, 12b, 12c, 12d,... (collectively referred to as elements 12) may be separated. Analyzer 14 may be used to individually and/or sequentially identify such separated elements 12. In other embodiments, the various labeled elements 12a, 12b, 12c, ... are sensed simultaneously, such as when the labeled elements are intermingled within a test fluid 34. A plurality of the elements 12 of library 8 may be identified simultaneously by, for example, simultaneously imaging spectra generated by the plurality of elements with sensor 18. In many embodiments, maintaining each label as a spatially separated unit will facilitate identification of the spectra, this spatial separation being encompassed within the term "spatially resolved." Preferably, the spatial integrity of the elements and the space between elements will be sufficient to allow at least some of the elements to be individually resolved over all other elements, preferably allowing most of the elements to be individually resolved, and in many embodiments, allowing substantially all of the elements to be individually resolved. As imaging is facilitated by maintaining the labeled elements on or near a surface, fluid 34 may be contained in a thin, flat region between planar surfaces.

[0038] The spectral coding of the present invention is particularly well-suited for identification of small or fluid elements which may be difficult to label using known techniques. Elements 12 may generally comprise a composition of matter, molecules, a fluid, an article of manufacture, a consumer product, a component for an assembly, a bead, a cell or biological organism, or the like.

[0039] The labels included with labeled elements 12 may be adhered to, applied to a surface of, and/or incorporated within the elements or items of interest, optionally using techniques analogous to those of standard bar coding technologies. For example, spectral labeling compositions of matter (which emit the desired spectra) may be deposited on adhesive labels and applied to articles of manufacture. Alternatively, an adhesive polymer material incorporating the label might be applied to a surface of a small article, such as a jewel or a component of an electronic assembly. As the information in the spectral code does not depend upon the aerial surface of the label, such labels can be quite small.

[0040] In other embodiments, the library will comprise fluids such as biological samples, powders, cells, and the like. While labeling of such samples using standard bar coding techniques can be quite problematic, particularly when a large number of samples are to be accurately identified, the spectral bar codes of the present invention can allow robust identification of a particular element from among ten or more library elements, a hundred or more library elements, a thousand or more library elements, and even ten thousand or more library elements.

[0041] The labels of the labeled elements 12 will often include compositions of matter which emit energy with a controllable wavelength/intensity spectrum. To facilitate identification of specific elements from among library 8, the labels of the elements may include combinations of differing compositions of matter to emit differing portions of the overall spectral code. In other embodiments, the signals may be defined by absorption (rather than emission) of energy, by Raman scattering, or the like. As used herein, the term "markers" encompasses compositions of matter which produce the different signals making up the overall spectra. A plurality of markers can be combined to form a label, with the

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4401

signals from the markers together defining the spectra for the label. The present invention generally utilizes a spectral code comprising one or more signals from one or more markers. The markers may comprise semiconductor nanocrystals, with the different markers often taking the form of particle size distributions of semiconductor nanocrystals having different characteristic spectral emissions or marker signals. The combined markers define labels which can emit spectral codes, which are sometimes referred to as "spectral barcodes." These barcodes can be used to track the location of a particular item of interest or to identify a particular item of interest.

[0042] The semiconductor nanocrystals can be tuned to a desired wavelength to produce a characteristic spectral emission or signal by changing the composition and/or size of the semiconductor nanocrystal. Additionally, the intensity of the emission at a particular characteristic wavelength can also be varied (optionally by, at least in part, varying a number of semiconductor nanocrystals emitting at a particular wavelength), thus enabling the use of binary or higher order encoding schemes. The information encoded by the semiconductor nanocrystals can be spectroscopically decoded, thus providing the location and/or identity of the particular item or component of interest. As used herein, wavelength and intensity are encompassed within the term "signal characteristics." A first range is "separated" from a second range when the first range is both non-overlapping and discontinuous from the second range so that there is an intermediate range between the first range and the second range.

[0043] While spectral codes will often be described herein with reference to the signal characteristics of signals emitted with discrete, narrow peaks, it should be understood that semiconductor nanocrystals and other marker structures may generate signals having quite different properties. For example, signals may be generated by scattering, absorption, or the like, and alternative signal characteristics such as wavelength range, width, slope, shift, or the like may be used in some spectral coding schemes.

Semiconductor Nanocrystals

[0044] Semiconductor nanocrystals are particularly well-suited for use as markers in a spectral code system because of their unique characteristics. Semiconductor nanocrystals have radii that are smaller than the bulk exciton Bohr radius and constitute a class of materials intermediate between molecular and bulk forms of matter. Quantum confinement of both the electron and hole in all three dimensions leads to an increase in the effective band gap of the material with decreasing crystallite size. Consequently, both the optical absorption and emission of semiconductor nanocrystals shift to the blue (higher energies) with decreasing size. Upon exposure to a primary light source, each semiconductor nanocrystal distribution is capable of emitting energy in narrow spectral linewidths, as narrow as 15-30 nm, and with a symmetric, nearly Gaussian line shape, thus providing an easy way to identify a particular semiconductor nanocrystal. The linewidlhs are dependent on the size heterogeneity, i.e., polydispersity, of the semiconductor nanocrystals in each preparation. Single semiconductor nanocrystal complexes have been observed to have full width at half maximum peak intensities (FWHM) as narrow as 12-15 nm. In addition semiconductor nanocrystal distributions with larger linewidths in the range of 40-60 nm can be readily made and have the same physical characteristics as semiconductor nanocrystals with narrower linewidths.

[0045] Exemplary materials for use as semiconductor nanocrystals in the present invention include, but are not limited to group I-VII, II-VI, III-V, and group IV semiconductors such as ZnS, ZnSe. ZnTe, CdS, CdSe, CdTe, GaN, GaP, GaAs, GaSb, InP, InAs, InSb, AlS, AlP, AlSb, PbS, PbSe, Ge, Si, and ternary and quaternary mixtures or alloys thereof, as well as compositions involving these materials doped with other elements such as transition metals (e.g., yttrium vanadate doped with lanthanides). The semiconductor nanocrystals are characterized by their nanometer size. By "nanometer" size, it is meant less than about 150 Angstroms (Å), and preferably in the range of 12-150Å.

[0046] The selection of the composition of the semiconductor nanocrystal, as well as the size of the semiconductor nanocrystal, affects the signal characteristics of the semiconductor nanocrystal. Thus, a particular composition of a semiconductor nanocrystal as listed above will be selected based upon the spectral region being monitored. For example, semiconductor nanocrystals that emit energy in the visible range include, but are not limited to, CdS, CdSe, CdTe, and ZnTe. Semiconductor nanocrystals that emit energy in the near-TR range include, but are not limited to, CdTe, InP, InAs, InSb, PbS, and PbSe. Finally, semiconductor nanocrystals that emit energy in the blue to near-ultraviolet include, but are not limited to, ZnS and GaN. For any particular composition selected for the semiconductor nanocrystals to be used in the inventive system, it is possible to tune the emission to a desired wavelength within a particular spectral range by controlling the size of the particular composition of the semiconductor nanocrystal.

[0047] In addition to the ability to tune the signal characteristics by controlling the size of a particular semiconductor nanocrystal, the intensities of that particular emission observed at a specific wavelength are also capable of being varied, thus increasing the potential information density provided by the semiconductor nanocrystal coding system. In some embodiments, 2-15 different intensities may be achieved for a particular emission at a desired wavelength, however, more than fifteen different intensities may be achieved, depending upon the particular application of the inventive identification units. For the purposes of the present invention, different intensities may be achieved by varying the concentrations of the particular size semiconductor nanocrystal attached to, embedded within or associated with an item or

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4402

component of interest, by varying a yield of the nanocrystals, by varyingly quenching the signals from the semiconductor nanocrystals, or the like. Nonetheless, the spectral coding schemes may actually benefit from a simple binary structure, in which a given wavelength is either present our absent, as described below.

[0048] In a particularly preferred embodiment, the surface of the semiconductor nanocrystal is also modified to enhance the efficiency of the emissions, by adding an overcoating layer to the semiconductor nanocrystal. The overcoating layer is particularly preferred because at the surface of the semiconductor nanocrystal, surface defects can result in traps for electron or holes that degrade the electrical and optical properties of the semiconductor nanocrystal. The overcoating layer provides electronic and chemical insulation for the emissive core and removes or energetically displaces surface trap sites. This results in higher efficiency in the luminescent process and/or greater chemical/photochemical stability.

[0049] Suitable materials for the overcoating layer include semiconductors having a higher band gap energy than the semiconductor nanocrystal. In addition to having a band gap energy greater than the semiconductor nanocrystals, suitable materials for the overcoating layer should have good conduction and valence band offset with respect to the semiconductor nanocrystal. Thus, the conduction band is desirably higher in energy and the valence band is desirably lower in energy than those of the semiconductor nanocrystal. For semiconductor nanocrystals that emit visible light (e.g., CdS, CdSe, CdTe, ZnSe, ZnTe, GaP, GaAs) or near-IR (e.g., CdTe, InP, InAs, InSb, PbS, PbSe), a material that has a band gap energy in the ultraviolet regions may be used. Exemplary materials include ZnS, GaN, and magnesium chalcogenides, (e.g., MgS, MgSe, and MgTe). For semiconductor nanocrystal that emit in the near IR, materials having a band gap energy in the visible, such as CdS, or CdSe, may also be used. While the overcoating will often have a higher bandgap than the emission energy, the energies can be, for example, both within the visible range. The overcoating layer may include from 0.1 to 10 monolayers of the overcoating material. The preparation of a coated semiconductor nanocrystal may be found in U.S. Patent Application No. 08/969,302 filed November 13, 1997, entitled "Highly Luminescent Color-Selective Materials"; Dabbousi et al., J. Phys. Chem B., Vol. 101, 1997, pp. 9463; Kuno et al., J. Phys. Chem., Vol. 106, 1997, pp. 9869; and International Publication No. WO 99/26299, published on May 27, 1999. Fabrication and combination of the differing populations of semiconductor nanocrystals may be further understood with reference to U.S. Patent Application No. 09/397,432, previously incorporated herein by reference.

[0050] It is often advantageous to combine different markers of a label into one or more labeled body. Such labeled bodies may help spatially resolve different labels from intermingled items of interest, which can be beneficial during identification. These label bodies may comprise a composition of matter including a polymeric matrix and a plurality of semiconductor nanocrystals, which can be used to encode discrete and different absorption and emission spectra. These spectra can be read using a light source to cause the label bodies to absorb and/or emit light. By detecting the light absorbed and/or emitted, a unique spectral code may be identified for the labels. In some embodiments, the labeled bodies may further include markers beyond the label bodies. These labeled bodies will often be referred to as "beads" herein, and beads which have assay capabilities may be called "probes." The structure and use of such probes, including their assay capabilities, are more fully described in U.S. Patent Application No. 09/566,014, previously incorporated by reference.

Fabrication of Labeled Beads

[0051] A process for encoding spectra into label body materials using a feedback system can be based on the absorbance and luminescence of the semiconductor nanocrystals in a solution that can be used to dye the materials. More specifically, this solution can be used for encoding of a plurality of semiconductor nanocrystals into a material when that material is a polymeric bead.

[0052] A variety of different materials can be used to prepare these compositions. In particular, polymeric bead materials are an appropriate format for efficient multiplexing and demultiplexing of finite-sized materials. These label body beads can be prepared from a variety of different polymers, including but not limited to polystyrene, cross-linked polystyrene, polyacrylic, polysiloxanes, polymeric silica, latexes, dextran polymers, epoxies, and the like. The materials have a variety of different properties with regard to swelling and porosity, which are well understood in the art. Preferably, the beads are in the size range of approximately 10 nm to 1 mm, often being in a range from 50 nm to 1,000,000 nm, more preferably in a size range of approximately 100 nm to 0.1 mm, ideally being in a range from 1-10 micrometer, and can be manipulated using normal solution techniques when suspended in a solution.

[0053] Discrete emission spectra can be encoded into these materials by varying the amounts and ratios of different semiconductor nanocrystals, either the size distribution of semiconductor nanocrystals, the composition of the semiconductor nanocrystals, or other property of the semiconductor nanocrystals that yields a distinguishable emission spectrum, which are embedded into, attached to or otherwise associated with the material.

[0054] The semiconductor nanocrystals of the invention can be associated with the material by adsorption, absorption, covalent attachment, by co-polymerization or the like. The semiconductor nanocrystals have absorption and emission spectra that depend on their size and composition. These semiconductor nanocrystals can be prepared as described in Murray et. al., (1993) J. Am. Chem. Soc. 115:8706-8715; Guzelian et. al., (1996) J. Phys. Chem. 100;7212-7219; or

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4403

International Publication No. WO 99/26299 (inventors Bawendi et al.). The semiconductor nanocrystals can be made further luminescent through overcoating procedures as described in Danek et. al., (1966) Chem. Mat. 8(1):173-180; Hines et. al., (1996) J. Phys. Chem. 100:468-471; Peng et. al., (1997) J. Am. Chem. Soc. 119:7019-7029; or Daboussi et. al., (1997) J. Phys. Chem.-B, 101:9463-9475.

[0055] The desired spectral emission properties may be obtained by mixing semiconductor nanocrystals of different sizes and/or compositions in a fixed amount and ratio to obtain the desired spectrum. The spectral emission of this staining solution can be determined prior to treatment of the material therewith. Subsequent treatment of the material (through covalent attachment, co-polymerization, passive absorption, swelling and contraction, or the like) with the staining solution results in a material having the designed spectral emission property. These spectra may be different under different excitation sources. Accordingly, it is preferred that the light source used for the encoding procedure be as similar as possible (preferably of the same wavelength and/or intensity) to the light source that will be used for the decoding. The light source may be related in a quantitative manner, so that the emission spectrum of the final material may be deduced from the spectrum of the staining solution.

[0056] A number of semiconductor nanocrystal solutions can be prepared, each having a distinct distribution of sizes and compositions, and consequently a distinct emission spectrum, to achieve a desired emission spectrum. These solutions may be mixed in fixed proportions to arrive at a spectrum having the predetermined ratios and intensities of emission from the distinct semiconductor nanocrystals suspended in that solution. Upon exposure of this solution to a light source, the emission spectrum can be measured by techniques that are well established in the art. If the spectrum is not the desired spectrum, then more of a selected semiconductor nanocrystal solution can be added to achieve the desired spectrum and the solution titrated to have the correct emission spectrum. These solutions may be colloidal solutions of semiconductor nanocrystals dispersed in a solvent, or they may be pre-polymeric colloidal solutions, which can be polymerized to form a matrix with semiconductor nanocrystals contained within. While ratios of the quantities of constituent solutions and the final spectrum intensities need not be the same, it will often be possible to derive the final spectra from the quantities (and/or the quantities from the desired spectra.)

[0057] The solution luminescence will often be adjusted to have the desired intensities and ratios under the exact excitation source that will be used for the decoding. The spectrum may also be prepared to have an intensity and ratio among the various wavelengths that are known to produce materials having the desired spectrum under a particular excitation source. A multichannel auto-pipettor connected to a feedback circuit can be used to prepare a semiconductor nanocrystal solution having the desired spectral characteristics, as described above. If the several channels of the titrator/pipettor are charged or loaded with several unique solutions of semiconductor nanocrystals, each having a unique excitation and emission spectrum, then these can be combined stepwise through addition of the stock solutions. In between additions, the spectrum may be obtained by exposing the solution to a light source capable of causing the semiconductor nanocrystals to emit, preferably the same light source that will be used to decode the spectra of the encoded materials. The spectrum obtained from such intermediate measurements may be judged by a computer based on the desired spectrum. If the solution luminescence is lacking in one particular semiconductor nanocrystal emission spectrum, stock solution containing that semiconductor nanocrystal may be added in sufficient amount to bring the emission spectrum to the desired level. This procedure can be carried out for all different semiconductor nanocrystals simultaneously, or it may be carried out sequentially.

[0058] Once the staining solution has been prepared, it can be used to incorporate a unique luminescence spectrum into the materials of this invention. If the method of incorporation of the semiconductor nanocrystals into the materials is absorption or adsorption, then the solvent that is used for the staining solution may be one that is suitable for swelling the materials. Such solvents are commonly from the group of solvents including dichloromethane, chloroform, dimethylformamide, tetrahydrofuran and the like. These can be mixed with a more polar solvent, for example methanol or ethanol, to control the degree and rate of incorporation of the staining solution into the material. When the material is added to the staining solution, the material will swell, thereby causing the material to incorporate a plurality of semiconductor nanocrystals in the relative proportions that are present in the staining solution. In some embodiments, the semiconductor nanocrystals may be incorporated in a different but predictable proportion. When a more polar solvent is added, after removal of the staining solution from the material, material shrinks, or unswells, thereby trapping the semiconductor nanocrystal in the material. Alternatively, semiconductor nanocrystals can be trapped by evaporation of the swelling solvent from the material. After rinsing with a solvent in which the semiconductor nanocrystals are soluble, yet that does not swell the material, the semiconductor nanocrystals are trapped in the material, and may not be rinsed out through the use of a non-swelling, non-polar solvent. Such a non-swelling, non-polar solvent is typically hexane or toluene. The materials can be separated and then exposed to a variety of solvents without a change in the emission spectrum under the light source. When the material used is a polymer bead, the material can be separated from the rinsing solvent by centrifugation or evaporation or both, and can be redispersed into aqueous solvents and buffers through the use of detergents in the suspending buffer, as is well known in the art.

[0059] The above procedure can be carried out in sequential steps as well. A first staining solution can be used to stain the materials with one population of semiconductor nanocrystals. A second population of semiconductor nanoc-

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4404

rystals can be prepared in a second staining solution, and the material exposed to this second staining solution to associate the semiconductor nanocrystals of the second population with the material. These steps can be repeated until the desired spectral properties are obtained from the material when excited by a light source, optionally using feedback from measurements of the interim spectra generated by the partially stained bead material to adjust the process.

[0060] The semiconductor nanocrystals can be attached to the material by covalent attachment, and/or by entrapment in pores of the swelled beads. For instance, semiconductor nanocrystals are prepared by a number of techniques that result in reactive groups on the surface of the semiconductor nanocrystal. See, e.g., Bruchez et. al., (1998) Science 281:2013-2016; and Ghan et. al., (1998) Science 281:2016-2018, Golvin et. al., (1992) J. Am, Chem. Soc. 114:5221-5230; Katari et. al. (1994) J. Phys. Chem. 98:4109-4117; Steigerwald et. al. (1987) J. Am. Chem. Soc. 110:3046. The reactive groups present on the surface of the semiconductor nanocrystals can be coupled to reactive groups present on the surface of the material. For instance, semiconductor nanocrystals which have carboxylate groups present on their surface can be coupled to beads with amine groups using a carbo-diimide activation step, or a variety of other methods well known in the art of attaching molecules and biological substances to bead surfaces. In this case, the relative amounts of the different semiconductor nanocrystals can be used to control the relative intensities, while the absolute intensities can be controlled by adjusting the reaction time to control the number of reacted sites in total. After the bead materials are stained with the semiconductor nanocrystals, the materials are optionally rinsed to wash away unreacted semiconductor nanocrystals.

[0061] Referring once again to Fig. 1, labeled elements 12a, 12b (here in the form of semiconductor nanocrystal probes) may be useful in assays in a wide variety of forms. Utility of the probes for assays benefits significantly from the use of moieties or affinity molecules, which may optionally be supported directly by a label marker of the label, by the probe body matrix, or the like. Suitable moieties can have selective affinity for an associated detectable substance. The probes may, but need not necessarily, also include an integrated assay marker. In some embodiments, the assay marker will instead be coupled to the probes by coupling of a detectable substance to a moiety of the probe. In other words, the assay marker may (at least initially) be coupled to the detectable substance, typically by binding of a dye molecule, incorporation of a radioactive isotope or a different colored semiconductor nanocrystal, or the like. In other assays, the assay results may be determined by the presence or absence of the probe or bead (for example, by washing away probes having an unattached moiety) so that no dedicated assay marker need be provided.

[0062] In alternative embodiments, the material used to make the codes does not need to be semiconductor nanocrystals. For example, any fluorescent material or combination of fluorescent materials that can be finely tuned throughout a spectral range and can be excited optically or by other means might be used. For organic dyes, this may be possible using a number of different dyes that are each spectrally distinct.

[0063] This bead preparation method can be used generically to identify identifiable substances, including cells and other biological matter, non-biological chemicals, molecules, objects, and the like. Pro-made mixtures of semiconductor nanocrystals, as described above, are attached to objects to render them subsequently identifiable. Many identical or similar objects can be coded simultaneously, for example, by attaching the same semiconductor nanocrystal mixture to a batch of microspheres using a variety of chemistries known in the art. Alternatively, codes may be attached to objects individually, depending on the objects being coded. In this case, the codes do not have to be pre-mixed and may be mixed during application of the code, for example using an inkjet printing system to deliver each species of semiconductor nanocrystals to the object. The use of semiconductor nanocrystal probes in chemical and/or biological assays is more fully described in International Publication No. WO/0055631, the full disclosure of which is incorporated herein by reference.

[0064] The semiconductor nanocrystal probes may also be utilized to detect the occurrence of an event. This event, for example, may cause the source from which energy is transferred to assay marker 38 to be located spatially proximal to the semiconductor nanocrystal probe. Hence, the excitation energy from energy source 20 may be transferred either directly to assay markers 38, 38', or indirectly via excitation of one or more energy sources adjacent the semiconductor nanocrystal probes due to bonding of the test substances 35 to the moiety 35'. For example, a laser beam may be used to excite a proximal source such as a semiconductor nanocrystal probe 38' attached to one of the test substances 35 (to which the affinity molecule selectively attaches), and the energy emitted by this semiconductor nanocrystal 38' may then excite an assay marker 38 affixed to the probe matrix. Still further alternatives are possible. For example, any of the many assays in which the presence of an analyte causes a detectable label to bind to a moiety may be employed in the present invention so that binding of an assay marker binds to a bead indicates the presence of an analyte of interest.

Reading Beads

[0065] Referring once again to Fig. 1, energy source 20 generally directs excitation energy 22 in such a form as to induce emission of the spectral code from labeled element 12a. In one embodiment, energy source 20 comprises a source of light, the light preferably having a wavelength shorter than that of the spectral code. Energy source 20 may comprise a source of blue or ultraviolet light, optionally comprising a broad band ultraviolet light source such a deuterium

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4405

lamp, optionally with a filter. Alternatively, energy source 20 may comprise an Xe or Hg UV lamp, or a white light source such as a xenon lamp, a Hg lamp, or a deuterium lamp, preferably with a short pass or bandpass filter UV filter disposed along the excitation energy path from the lamp to the labeled element 12 so as to limit the excitation energy to the desired wavelengths. Still further alternative excitation energy sources include any of a number of continuous wave (cw) gas lasers, including (but not limited to) any of the argon ion laser lines (457 nm, 488 nm, 514 nm, etc.), a HeCd laser, a solid-state diode laser (preferably having a blue or ultraviolet output such as a GaN based laser, a GaAs based laser with frequency doubling, a frequency doubled or tripled output of a YAG or YLF based laser, or the like), any of the pulsed lasers with an output in the blue or ultraviolet ranges, light emitting diodes, or the like.

[0066] The excitation energy 22 from energy source 20 will induce labeled element 12a to emit identifiable energy 24 having the spectral code, with the spectral code preferably comprising signals having relatively narrow peaks so as to define a series of distinguishable peak wavelengths and associated intensities. The peaks will typically have a half width of about 100 nm or less, preferably of 70 nm or less, more preferably 50 nm or less, and ideally 30 nm or less. In many embodiments, a plurality of separate signals will be included in the spectral code as sensed by sensor 18. As semiconductor nanocrystals are particularly well-suited for generating luminescent signals, identifiable energy 24 from label 12a will often comprise light energy. To help interpret the spectral code from the identifiable energy 24, the light energy may pass through one or more monochromator. A Charge-Coupled Device (CCD) camera or some other two-dimensional detector or sensor 18 can sense and/or record the images for later analysis. In other embodiments, a scanning system may be employed, in which the labeled element to be identified is scanned with respect to a microscope objective, with the luminescence put through a single monochromator or a grating or prism to spectrally resolve the colors. The detector can be a diode array that records the colors that are emitted at a particular spatial position, a two-dimensional CCD, or the like. Alternatively, the spectral code can be read by imaging the identifiable items through a series of bandpass filters and measuring the signals at each wavelength.

[0067] Information regarding these spectra from the labeled elements 12 will generally be transmitted from sensor 18 to processor 16, the processor typically comprising a general purpose computer. Processor 16 will typically include a central processing unit, ideally having a processing capability at least equivalent to a Pentium I® processor, although simpler systems might use processing capabilities of a Palm® handheld processor or more. Processor 16 will generally have input and output capabilities and associated peripheral components, including an output device such as a monitor, an input such as a keyboard, mouse, and/or the like, and will often have a networking connection such as an Ethernet, an Intranet, an Internet, and/or the like. An exemplary processing block diagram is schematically illustrated in Fig. 1A.

[0068] Processor 16 will often make use of a tangible media 30 having a machine-readable code embodying method steps according to one or more methods of the present invention. A database 32, similarly embodied on a machine-readable code, will often include a listing of the elements included in library 8, the spectral codes of the labels associated with the elements, and a correlation between specific library elements and their associated codes. Processor 16 uses the information from database 32 together with the spectrum characteristics sensed by sensor 18 to identify a particular library element 12a. The machine-readable code of program instructions 30 and database 32 may take a wide variety of forms, including floppy disks, optical discs (such as CDs, DVDs, rewritable CDs, and the like), alternative magnetic recording media (such as tapes, hard drives, and the like), volatile and/or nonvolatile memories, software, hardware, firmware, or the like.

[0069] As illustrated in Fig. 1, methods for detecting and classifying spectral labels (such as encoded materials and beads) may comprise exposing the labels to light of an excitation source so that the semiconductor nanocrystals of the label are sufficiently excited to emit light. This excitation source is preferably of an energy capable of exciting the semiconductor nanocrystals to emit light and may be of higher energy (and hence, shorter wavelength) than the shortest emission wavelength of the semiconductor nanocrystals in the label. Alternatively the excitation source can emit light of longer wavelength if it is capable of exciting some of the semiconductor nanocrystals disposed in the matrix to emit light, such as using two-photon excitation. This excitation source is preferably chosen to excite a sufficient number of different populations of semiconductor nanocrystals to allow unique identification of the encoded materials. For example, using materials stained in a 1:2 ratio of red to blue and a 1:3 ratio of red to blue, it may not be sufficient to only excite the red emitting semiconductor nanocrystals (e.g., by using green or yellow light) of the sample in order to resolve these beads. It would be desirable to use a light source with components that are capable of exciting the blue emitting and the red emitting semiconductor nanocrystals simultaneously, (e.g., violet or ultraviolet). There may be one or more light sources used to excite the populations of the different semiconductor nanocrystals simultaneously or sequentially, but each light source may selectively excite sub-populations of semiconductor nanocrystals that emit at lower energy than the light source (to a greater degree than higher energy emitting sub-populations), due to the absorbance spectra of the semiconductor nanocrystals. Ideally, a single excitation energy source will be sufficient to induce the labels to emit identifiable spectra.

[0070] One potential practical problem with existing encoding schemes is that to read precise spectral codes, it is beneficial to dye the beads precisely. Since intensity is one of the parameters for currant spectral coding systems, the beads should be uniformly and reproducibly dyed. It is also important that no degradation in quantum yield results over

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4406

time, especially if degradation is not uniform between different colored fluorophores. While these problems are not an issue in theoretical coding systems, in practice this may result in severe physical limitations. Finally, in order to get a large number of possible codes using the currently available techniques, different signals or color channels may be placed spectrally very close to each other. Thus, the individual signals are highly overlapping, creating a technological difficulty in reading the codes, especially if there is some uncertainty or degradation in the intensity of each channel.

[0071] It would be valuable to have a spectral coding system that does not require the precise deconvolution of highly overlapping emission spectra, and/or does not require the precise distinction between many different peak intensities, especially in highly overlapping spectra. The current invention provides a spectral coding system that optionally uses only substantially separated spectral peaks without excessive spectral overlap, and often does not require stringent intensity regulation of the peaks. This method allows for approximately 100,000 to 10,000,000 or more unique codes. Surprisingly, maintaining sufficient wavelength separation between signals included in a code can actually enhance the robustness of the code and/or the amount of information which can be transmitted by the code.

Spectral Codes

[0072] This invention takes advantage of the fact that it is possible to fabricate semiconductor nanocrystals with very precise emission wavelengths that are tunable almost continuously over the available spectrum for each material. Nanocrystals with wavelengths that are tunable in approximately 1 nm steps can be prepared. While it may be necessary to separate two overlapping spectral peaks by many nanometers to distinguish them easily, it is straightforward to identify the wavelength of a single nor-overlapping peak within 1 nm. Hence, the information which can be effectively communicated by a spectral code is enhanced by maintaining a minimum spectral separation between the signals of the spectra, as the wavelengths of the separated peaks can be accurately identified. In other words, by separating signals within dedicated wavelength ranges, the peak wavelengths of each signal can be identified from among more tightly spaced predetermined allowable wavelengths within each range.

[0073] To understand the advantages of signal separation within a spectral code, it is helpful to review a simple spectral code in which only a single peak 40 is used. In the case of a single-peak spectral code, each signal wavelength is a different code (see Figs. 1B-D). When fabricated with CdSe, for example, a semiconductor nanocrystal with a spectral range of approximately 490-640 nm, can be used to generate about 150 single-peak codes, with allowable wavelengths being separated by only 1 nm. Although interpretation of codes having multiple overlapping signals separated by only 1 nm might be quite challenging, the use of a single isolated signal within this simple code avoids this problem, allowing relatively simple identification of the isolated peaks without having to resort to complex (and possibly error-prone) overlapping signal deconvolution.

[0074] While the single-peak coding system is limited in the number of potential codes, it is less sensitive to differences in single-code or code-to-code signal intensity. This robustness of the single peak code is in part a result of our ability to accurately measure the peak wavelength regardless of the intensity, as long as the peak is observable above the background noise. This code is also insensitive to degradation of quantum yield over time. Furthermore, the code is insensitive to the size distribution of each nanocrystal sample since the peak wavelength can be determined regardless of the peak width (expressed as full width at half maximum peak height or "FWHM"), assuming that the object(s) being coded are uniformly attached to the nanocrystals (and/or the nanocrystals are uniformly attached to the object or objects). Finally, this code is easy to read, since the fitting of a single Gaussian peak with no deconvolution of overlapping peaks is quite straightforward.

[0075] The single peak binary coding system of Figs. 1B-D not only eases the requirements for bead dying and semiconductor nanocrystal sample quality and sample degradation, it also eases the requirements on the excitation source. For example, while all semiconductor nanocrystals can be excited with a single excitation source, they may not be excited equally. A 488 nm excitation light may excite 600 nm semiconductor nanocrystals more efficiently than 500 nm nanocrystals. Codes relying on intensities often use different concentrations of semiconductor nanocrystals to normalize for the size-dependent cross-sections. However, if a code is developed using a given excitation wavelength, it should be read using that specific wavelength, since the relative extinction coefficient for each size nanocrystal may be significantly different at other excitation wavelengths, Thus, for every different light source, a different set of codes might be developed. In addition, if a lamp source is used, degradation of the lamp can result in changes in the excitation source, thereby compromising the codes. The relative intensity insensitivity of the coding system described herein can decrease such problems.

[0076] Referring now to Figs. 2A-E, many of the advantages of a single-peak system can be provided for multiple peak systems by maintaining a minimum wavelength separation between adjacent peaks 40a, 40b within each code. Using two peaks rather than one increases the number of potential codes. To retain the robust characteristics of the one-peak code, a two-peak code can limit the allowable codes to those having sufficient separation between the two peaks 40a, 40b to prevent excessive signal overlap within the spectral codes. As can be understood with reference to Fig. 3, each peak may still occupy any of the quite tightly spaced discrete wavelengths of our single-peak code, with the

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4407

exception of those which are excessively near the other peak.

[0077] Referring now to Fig. 4, as an example of a two-peak code, we can assume that each peak is chosen to reside within a 75 nm wavelength range, (e.g., peak 1 is tuned from 490-565 nm and peak 2 is tuned from 575-650 nm). These wavelength ranges are sometimes referred to herein as "windows". The wavelength of each peak can again be varied within its associated window in small steps to create a myriad of codes. Using 1 nm steps and a minimum peak separation of about 75 nm, this coding system produces approximately 3000 distinct codes. The system can be expanded to include many peaks, the minimum separation between peaks preferably being sufficient to allow precise determination of the peak wavelength of each.

[0078] With reference to Figs. 3 and 4, peak-to-peak separation may be imposed using predetermined separated windows, and/or by determining appropriate windows based on the signals within a spectral code. As can be understood with reference to Fig. 3., predetermined wavelength ranges or windows 42a, 42b, 42c, ... (generically referred to as predetermined windows 42) each have a single associated signal with a wavelength peak 40a, 40b, 40c,... respectively, disposed within the associated predetermined window. As mentioned above, predetermined wavelength intervals 48 within each window can then be quite close, so that if two signals had wavelength peaks at adjacent intervals, the signals could overlap sufficiently to mask the peak wavelengths, as shown in phantom in predetermined window 42a. A signal wavelength separation 44 may be disposed between each pair of adjacent predetermined windows 42, and the spectral code will preferably not have a signal with a peak disposed in the separations at sufficient intensity to mask an adjacent signal wavelength. As only a single peak is generally present within each window, and as the separations ensure a minimum spacing between adjacent peaks in different windows (see peaks 40b and 40c in Fig. 3), spectral deconvolution techniques may optionally be avoided despite the tight spacing of the wavelength intervals 48, and/or the discrete wavelength intervals can be decreased while maintaining reliability of the code. Predetermined windows 42 may optionally be common to some or all of the spectral codes of a library. This can facilitate accurate reading of the code, as the code reading hardware and software need only identify no more than a single peak wavelength within each predetermined window. Optionally, the system may also determine if there is an absence of a signal in one or more of the predetermined windows.

[0079] As can be understood with reference to Fig. 4, psak-to-peak signal separation 50 may alternatively be maintained by limiting the signals of each code of a library to selected wavelength increments based on the wavelengths of other signals of the code. Such a windowing system may be determined as each code is created and/or interpreted using a minimum separation rule, often in combination with established or predetermined discrete wavelength increments. The resulting acceptable codes may also have a single wavelength peak 40 disposed within an associated window 52a, 52b ... (generically, windows 52), and the size of the windows and/or the acceptable discrete wavelengths within each window may vary within the spectral code 46 depending on the locations of the peaks within adjacent windows so as to maintain the minimum separation.

[0080] Regardless of whether the windows are predetermined, common to some or all of the codes of the library, and/or derived from separation rules for each signal of each code, the peak-to-peak signal wavelength separation will generally be at least 5 nm, often being at least 15 nm, preferably being at least 30 nm, and in many cases being 50 nm or more. Such spacings facilitate the use of small discrete wavelength increments within the windows, with the increments typically being 10 nm or less, often being 5 nm or less, in many cases being 2 nm or less. Information-dense codes may benefit from increments of 1 nm or less, optionally being less than 1 nm. Within each window, codes will generally have a plurality of signal wavelength increments, typically being 5 or more wavelength increments, optionally being 10 or more wavelength increments. The spectra of some or all of the codes of a library will often have a plurality of signals, with each signal defining a wavelength, typically as a peak wavelength of a discrete signal, although other wavelengths defined by the signal are also possible.

[0081] As an example of the power of this type of system, the following is a relatively conservative example of a potential code using realistic parameters. The variables for this example are as follows: (1) spectral bandwidth is 300 nm; (2) coding-peak resolution, i.e., the minimum step size for identifying an isolated peak within a single channel, is 4 nm; (3) minimum spacing between peaks is 50 nm; and (4) the maximum number of peaks in each code is 6. In this case, the number of potential codes is approximately 200,000. This assumes a purely binary code, in which the peak within each channel is either "on" or "off". By adding a second intensity, i.e., wherein intensity is 0,1 or 2, the number of potential codes increases to approximately 5 million. If the coding-peak resolution is reduced to 1 nm, the number of codes increases to approximately 1×10^{10}.

[0082] For a binary code, the production requirements for dying levels, photostability, and size distribution are virtually eliminated. The addition of two intensities only marginally increases these requirements. Generally, spectral codes having a limited number of intensities and separated peaks are easier to read than codes employing overlapping peaks of many different intensities, since it is easier to read precisely the wavelength of the separated peaks. Nonetheless, as can be understood with reference to Fig. 5, the signal separations techniques of the present invention may find use within coding schemes having significant overlapping of adjacent peaks. By combining a separated-signal code with known spectral deconvolution methods (such as measuring intensities adjacent the discrete wavelengths using bandpass

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4408

filters 56, and using standard matrix deconvolution methods to determine individual signal intensities and wavelengths), a relatively robust and information-dense code may be established which allow a user to identify a variety of different intensities despite overlap between adjacent signals.

[0083] The calculations above may be based on the following model, which is again illustrated in Figure 4. If a code has at most two peaks, with a minimum allowable separation of 50 nm, and the possibility of tuning each peak is here assumed to be in steps of 5 nm, the system can be modeled as being two-peak, each peak residing within adjacent 50 nm spectral windows. When peak-2 is at 590 nm, peak-1 can be at any wavelength between 500-540 nm and meet the requirement that the peaks are at least 50 nm apart. If peak-2 is at 585 nm, then peak-i can be between from 500-535 nm, and the like. As described, this produces 55 distinct codes. Added to the combination of two peak codes are also additional codes that have only a single peak, yielding a total of 75 codes. Codes with N peaks are generated in a similar way, counting all possible codes involving N, N-1, N-2 ... 1 peaks.

[0084] Valid codes can be generated using an algorithm that evaluates all possible codes. Potential codes are represented as a binary code, with the number of digits in the code corresponding to the total number of colors. For example, a 16-bit code could represent 16 colors of semiconductor nanocrystals from 500 nm to 575 nm, at 5 nm spacing. A binary code 1000 0000 0000 0001. represents the presence of the 500 nm and 575 nm peaks. Each of these 16-bit numbers can be evaluated for validity, depending on the spacing that is required between adjacent peaks, for example 001 0 0100 0000 0000 is a valid code if peaks spaced by 15 nm or greater can be recognized, but is not valid if the minimum spacing between adjacent peaks is, for example, 20 nm. Using a 16-color code, as described above with 500 to 575 nm range and 5 nm spacing between colors, the different number of possible codes can be calculated using a simple algorithm (see Table 1), in which the number of codes versus minimum spectral spacing between adjacent peaks is displayed.

Table 1. The number of unique codes with a binary 16-color system.

Spectral Separation	5 nm	10 nm	15 nm	20 nm	25 nm	30 nm
Number of unique codes	65535	2583	594	249	139	91

[0085] If different intensities can be discerned within each color, then the number of codes can be increased dramatically. For example, using the 16-color code above, with 15 nm minimum spacing between adjacent peaks in a code, 7,372 different codes are possible if two discrete intensities, i.e., a ternary system, can be discerned for each color, and 38,154 for a quaternary system, i.e., wherein three discrete "on" intensities can be discerned.

[0086] If a simple combinatorial coding scheme had been used, with six colors spaced at 15 nm intervals using slightly more spectral range than above, then 64 codes would be possible with binary coding, 729 with base three coding, and 4096 with base four coding, compared with 594, 7392, and 38154, respectively.

[0087] In a preferred embodiment, this spectral coding system is created using polymer beads impregnated with semiconductor nanocrystals, as described above. Different size and/or composition nanocrystals are added to the beads in roughly equal amounts to create each code. The codes are then read by exciting with short wavelength optical excitation or any other suitable form of excitation, and the emission code is read either using a spectrometer or other device capable of high spectral resolution.

[0088] In an alternative embodiment, the material used to make the codes does not need to be semiconductor nanocrystals, but can be any material or combination of materials that can generate signals which can be finely tuned throughout a spectral range and can be excited optically or by other means. For organic dyes, this may be possible using a number of different dyes that are each spectrally distinct. The material used to make the codes may also comprise a mixture of semiconductor nanocrystals and other markers, for example, a mixture of semiconductor nanocrystals and organic dyes.

[0089] This method can be used generically to identify objects. Pre-made mixtures of semiconductor nanocrystals, as described above, are attached to objects to render them subsequently identifiable. Many identical or similar objects can be coded simultaneously, for example, by attaching the same semiconductor nanocrystal mixture to a batch of microspheres using a variety of chemistries known in the art. Alternatively, codes may be attached to objects individually, depending on the object being coded. In this case, the codes do not have to be pre-mixed and may be mixed during application of the code, for example using an inkjet printing system to deliver each species of semiconductor nanocrystal to the obj ect.

Spectral Process Cording

[0090] Window-based coding schemes will have useful applications in, for example, recording the process that an object or element has gone through. One or more selected semiconductor nanocrystal species from within a window

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4409

can be added at a given process step, with the added semiconductor nanocrystals representing the particular process that has been carried out on the object. By limiting the selection of markers (and particularly, the signal peaks) added at a given step to a predetermined and/or rule-derived window, and by limiting any other separate process steps to markers with signals in separate windows, the spectral code indicating each process step can be readily and individually interpreted without spatially resolving the markers. In other words, a plurality of codes can be read simultaneously and individually interpreted.

[0091] One example of a use for spectrally separated codes is in the field of combinatorial synthesis. Split-and-pool methods are often used in combinatorial synthesis to perform sequentially different monomer additions. In this application, separate spectral windows can be designated for each synthesis stage, for example, with six synthesis stages, 20 nm windows could be designated from 450-470 nm, 490-510 nm, 530-550 nm, 570-590 nm, 610-630 nm, 650-670 nm, thereby ensuring that adjacent peaks are at least 20 nm apart. If each synthesis stage has several different possible processes, then a semiconductor nanocrystal solution is added to the object to reflect the process that has just been carried out. In a six-stage reaction, there can be five different monomers added at each stage. In the first stage, addition of monomer-1 would also include addition of 450 nm semiconductor nanocrystals, monomer-2, 455 nm, monomer-3, 460 nm, monomer-4, 465 nm, monomer-5, 470 nm. In the second stage, monomer-1 is 490 nm, and so forth for each stage in the process. Following the process, the processing history of any object or element can be obtained by decoding the spectral code, (e.g., by reading the peaks in the emission spectrum and correlating them with the known processes carried out at each step). Similar codes might be established with more than one peak in each window (for example, to identify which of 2000 different test materials was added at a single step), with the different signals within each window optionally being disposed within separated sub-windows.

[0092] In light of the above, the wavelength separated signal code schemes described herein have advantages over existing schemes is their ease of implementation, ease of reading, and high information content.

Reference Signals

[0093] Referring once again to Fig. 1, the strength of the overall spectra sensed by sensor 18 can vary due to a large number of causes, including the distance between the label and sensor, orientation of the label bodies, ambient noise, and the like. Hence, reading an absolute intensity from labeled element 12a may be problematic. As a result, the absolute emission energy might be lost in the two-dimensional spectral image, potentially leading to ambiguity between different codes having similar wavelengths and intensity ratios, but different absolute intensities, as illustrated in Fig. 6A. As shown in this example, it may be difficult to properly distinguish between a first spectral code comprising red at an intensity value of 1 and blue at an intensity value of 3, and a second distinct code with similar colors but having intensities of 2 (red) and 6 (blue). Accurate identification of specific (and often discrete) absolute wavelengths may pose similar challenges, particularly when the allowable wavelength increments are tightly spaced and/or the spatial position of the label markers are not precisely controlled.

[0094] For spectrally encoded beads and other spectral labels, interpretation of the code can be facilitated if a calibration signal is included within the code. By including a reference marker to generate such a calibration signal (among the signal generating markers of the label) the reference signal from the reference marker can be compared to other signals of the code for calibration of discrete signal intensity ratios, to identify discrete signal wavelengths, and the like.

[0095] Spectral codes will generally be created using signals having different wavelengths (which may be referred to herein as code channels) and intensities. The calibration signal within the code may be referred to herein as the "reference channel." The intensity of each code channel will change in discrete amounts or unit steps, (e.g. intensity value 2 is twice intensity value 1 and 50% of the intensity value 4). As described above, however, fluctuations in manufacturing, sensing or experimental conditions, either static or dynamic, can make it difficult to determine the absolute intensity of the signals within a spectral code.

[0096] The presence of a calibration signal within a spectral code significantly facilitates code differentiation among otherwise ambiguous codes. Referring now to Fig. 6B, for example, a spectral code comprising red at an intensity value of 1 and blue at an intensity value of 3 may be readily distinguished from the second distinct code of 2 (red) and 6 (blue) by referencing the intensities of the signals to the intensity of a calibration peak 60 within each code. In a simple calibration scheme illustrated in Fig. 7, calibration peak 60 may always be deemed to have an intensity of (for example) 1, and all other intensities can be determined relative to that peak intensity from relative intensity ratios between the intensities of the other signals and the intensity of the reference signal. Note that the presence and strength of the reference signal may also provide a gauge of the quality of the spectra relative to, for example, the overall background noise. The intensity ratios may be limited to discrete ratios, such as integer multiples of the reference intensity (or some fraction thereof), or a wide variety of alternative intensity identification criteria might be established.

[0097] The reference channel is preferably chosen to be either the longest or shortest wavelength peak within the spectral code. Alternative reference signal standards may also be established, including the use of a highest or lowest intensity signal of a code, the use of a common reference wavelength for some or all of the codes of a library, the use

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4410

of a middle wavelength between an equal number of longer and shorter wavelengths, and the like. By use of standard reference signal identification criteria, even where the absolute emission energy is lost in, for example, a two dimensional spectral image, it can be regained, since the absolute energy of the reference channel is known and the spectral code can be calibrated relative to the internal reference channel.

[0098] In addition to intensity calibration, the reference channel can serve as a wavelength calibration. Measured wavelengths may differ from absolute wavelengths for a variety of reasons, including measurement error, spatial inaccuracies, and the like. As can be understood with reference to Fig. 7, a known reference wavelength of reference peak 60 may be compared with a measured wavelength of the reference peak to determine a wavelength correction factor $\Delta\lambda$. This wavelength correction factor might be directly applied to other peak wavelengths, or more sophisticated wavelength correlations might be derived, for example, based on the geometry and/or other characteristics of the sensor.

[0099] As can be understood with reference to Figs. 8A and B, (and as more fully described in parent provisional application Serial No. 60/195,520, previously incorporated herein by reference), simultaneous identification from a plurality of spectrally labeled beads might be accomplished by obtaining a two-dimensional image with a modified linear spectrometer without an entrance slit and a two-dimensional detector. The discrete images from individual beads may define the spatial position of the spectra entering the spectrometer, with the spectral resolution of the system defined, in part, by the size of the discrete images or beads. Since the spatial position of the light from each point or bead varies across the x axis relative to the original slit opening, the calibration for each spectral code might be significantly different. Splitting the original image and passing one portion through a dispersive grating to create a separate image and spectra might help to avoid this calibration error, as the location of the bead might be determined at least in part from the separated image. Use of an internal calibration signal peak 60 within each spectral code may also help to avoid wavelength ambiguity.

[0100] The internal intensity reference can also be used as a reference for the quantity of analyte bound to the surface of each bead. In that way, a calibration standard can be provided for assays that use spectrally encoded beads. This invention will be useful in any application where spectrally encoded beads are used, including static and flow imaging applications, as well as non-imaging based detection systems. It will also be useful in any application where it is necessary or desirable to quantify the amount of analyte detected in an assay.

Spectral Code Creation

[0101] The present invention will often make use of semiconductor nanocrystals (or other structures) to, at least in part, define spectral codes. Uses for these codes including identifying cells, beads, or other microscopic objects, in addition to providing an "invisible" code on items like jewelry, watches, and other small or awkward items, and the like. Codes can optionally be created by using substantially non-overlapping colors of semiconductor nanocrystals, and then combining the nanocrystals in unique ratios, or according to absolute levels. Alternative codes might be created by relying on overlapping signal deconvolution.

[0102] The code creation methods described herein optionally use a computer program to combine or mix together, *in silico* (that is, using computer modeling), emission signals from semiconductor nanocrystals. These individual marker signal spectra can be real spectra from nanocrystals that have already been manufactured, or simulated spectra for nanocrystal batches that can be manufactured. Candidate code spectra are then compared against one another, with acceptable codes added to the library in order to create an optimal set of codes that are sufficiently different from each other to allow robust code assignment given constraints such as code-number requirements and instrument resolution. A further method uses stored patterns of known code spectra against which to evaluate an unknown spectrum, in order to assign a code to the unknown spectrum, or to declare it as "no match." To do this, several steps are performed, some optional: (1) creation of a code; (2) creation of a template for the code; (3) comparison of a sample spectrum against all possible templates; and (4) assignment of "match" or "no match" to the sample based upon its degree of similarity to one of the templates and/or dissimilarity to the remainder.

[0103] Coded objects can be created by attaching one or more semiconductor nanocrystal batches to an object or to many objects simultaneously. One criterion for creating useful codes is that, when a code is analyzed, it can be uniquely identified within the statistical confines of the experiment or actual code reading equipment. Generally, all codes to be used in a given application should be spectrally resolvable, i.e., sufficiently spectrally dissimilar within manufacturing tolerances and/or reading error, such that the rate of incorrect decoding is very low. The acceptable error rate depends on the application. Codes may be created randomly or systematically. Using the random approach, mixtures of semiconductor nanocrystals are created and then used as codes. Using the systematic approach, semiconductor nanocrystal batches are chosen, and mixed together in the appropriate ratios to generate the codes. In both approaches, the composite emission spectrum of each new code is compared to the emission spectrum of all other codes that will be used in the application. This can be done prior to the actual physical creation of the code, by using predicted spectra, or can be done by reading the spectrum of the new code prior to, or after, attaching the code to the object(s). If the code is non-overlapping, i.e., will not be misclassified when noise, aging, reader differences, or other factors are taken into account, then the code is valid to be used. The emission spectrum of the new code is stored digitally so that putative new codes,

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4411

and unknown codes during code reading, can be compared against it. Preferably, reading accuracy will be incorporated into the comparison of prior codes with new codes, the reading accuracy generally being determined based on known properties of one or more of the excitation energy source, the sensor, and the data manipulation performed by the processor.

[0104] When many items are being coded with the same code, e.g., when attaching semiconductor nanocrystals to microspheres or beads in a batch mode, it is useful to analyze more than one of those objects and store an average, or representative, spectrum for the code. Once this has been done, the actual spectrum for each sample object can be compared with the average spectrum to ensure that they are correctly identified. They may also be compared against the spectra of other codes to ensure that they are not mis-identified. Furthermore, statistical information regarding, for example, reproducibility and confidence levels can be gleaned at this stage.

[0105] The stored emission spectrum may herein be called the code's "template" and can have been generated experimentally by analyzing coded object(s) or semiconductor nanocrystal mixtures, or can be generated *in silico* by adding together emission spectra from the semiconductor nanocrystals that make up the code, along with any required correction factors.

[0106] Template emission spectra may be generated by using the instrument (or a similar instrument, or a computer model of the instrument) that will be used for reading the code, optionally correcting for any instrument-to-instrument variation. For example, for semiconductor nanocrystal-dyed microsphere assays it is desirable to analyze wells that contain a single or a few different known coded beads that have been processed through assay conditions. The template emission spectra may be generated for each encoded bead reader instrument so that during analysis, the templates for a given reader or assay are used.

[0107] Many different systematic methods for creating codes can be envisaged. For example, two colors of semiconductor nanocrystals may be used and the ratio of color 1:color-2 varied to create different codes. Using additional colors, the different ratios can be varied to create codes that are more complex.

[0108] Semiconductor nanocrystal batches that have the same color, i.e., the same peak wavelength, but have different peak widths, can be used to create two different codes if sufficient spectral data is gathered to allow these to be defined as being significantly different. These batches can also be mixed to create intermediate linewidths and hence more unique codes.

[0109] A computer-based method that uses all physically available semiconductor nanocrystal spectra, or that uses electronically generated spectra of all manufacturable semiconductor nanocrystal batches, can be used. In this case, the computer is programmed to combine systematically or randomly different amounts of these semiconductor nanocrystal spectra, *in silico,* along with any correction factors desired due to energy or electron transfer, emission intensity variations, or wavelength changes that may occur. The electronically created spectra are compared against current codes and any that are sufficiently distinguishable are candidates for manufacturing into real physical codes. This type of approach can also be used to create code sets, i.e., manufacturable emission spectra that are chosen to be maximally different from one another according to predetermined comparison criteria such as the residual value from a least squares fitting, or other methods known in the art.

[0110] Data on the overall emission spectrum of a code can be gathered by exciting the semiconductor nanocrystals with an appropriate source, e.g., laser, lamp, light-emitting diode, or the like, and reading the emitted light with a device that provides spectral information for the object, e.g., grating spectrometer, prism spectrometer, imaging spectrometer, or the like, or use of interference (bandpass) filters. Using a two-dimensional area imager such as a CCD camera, many objects may be imaged simultaneously. Spectral information can be generated by collecting more than one image via different bandpass, longpass, or shortpass filters (interference filters, colored glass filters, or electronically tunable filters are appropriate). More than one imager may be used to gather data simultaneously through dedicated filters, or the filter may be changed in front of a single imager. Once this data has been gathered, it can be processed to generate spectral information about objects in the image, or for each pixel, or group of pixels in the image, via straightforward image processing techniques.

[0111] The emission spectrum from the sample object is compared against all the known templates. This can be done using many techniques known in the art such as least squares fitting, Fourier analysis, Kolmogorov-Smimov Test, Pearson Rank Correlation test, or the like (see Numerical Recipes in C, Press et al., Cambridge University Press, 1996). In each case, a measure of the goodness of fit of the unknown to each template is generated, (e.g., a residual value for a least squares approach, or other fit measure dependent on the fitting algorithm used such as one of the "robust" or absolute magnitude methods described by Press et al., supra). If this goodness of fit falls within the pre-determined range for only one of the codes then this is the identity of the unknown code, otherwise the unknown is classified as "no match," or as matching too many templates.

[0112] It might be desirable to make the matching process insensitive to absolute intensity variations. This can be done by including a linear or non-linear intensity normalization factor during the matching process, which is varied to generate the lowest residual value or other match parameter for each comparison. The normalization factor can be allowed to vary without limits or can be constrained to be within a given range to limit the amount of correction for intensity

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4412

variations.

[0113] The spectral data can also be normalized spectrally, i.e., shifting the data spectrally in a linear or nonlinear manner, to correct for variations in the wavelength that may occur due to the instrument or due to temperature changes, degradation, or other effects that cause the semiconductor nanocrystals to emit at different wavelengths. Again, the spectral shift factor may be constrained to be within a given range.

[0114] When the emission spectrum also contains signal from a reporter or reference semiconductor nanocrystal, e.g., in the case of encoded bead assays, this may be quantitated at the same time, and may also be normalized according to the factors described above. Any spectral overlap from the code into the assay signal may also be corrected for in this way.

[0115] Spectral data will often be collected from more windows and/or allowed discrete wavelengths than there are colors of semiconductor nanocrystals present. This allows semiconductor nanocrystals of only slightly differing wavelengths to be used to create the codes. Additional spectral data also makes the classification process more robust than simple one-color, one-data point approaches. An advantage of the pattern matching approach for analysis is that, independent of the method of code creation, any sufficiently different spectra can be used as unique codes. Since unique fingerprints can be obtained for each code based on individual raw spectra, concrete statistical estimates can be used in determinations such as goodness of fit, confidence intervals, and determination of uniqueness, In addition, this method allows for empirical determination of codes following chemical processing as blanks, removing much of the ambiguity associated with pre-formatted idealized code sets.

[0116] While the exemplary embodiments have been described in some detail, by way of example and for clarity of understanding, a variety changes, adaptations, and modifications will be obvious to those of skill in the art. Hence, the scope of the present invention is limited solely by the appended claims.

[0117] The present invention in particular pertains to the following subject matter:

1. An identification system comprising:

a plurality of identifiable elements;
a plurality of labels, each label associated with a unique or non-unique identifiable element, the labels including reference markers and other markers, the labels generating spectra in response to excitation energy; and
an analyzer for identifying the elements from the spectra of the associated labels, the analyzer calibrating the spectra using reference signals generated by the reference markers.

2. The identification system of item1, wherein the labels comprise semiconductor nanocrystals.

3. The identification system of item 2, wherein each reference marker comprises at least one reference semiconductor nanocrystal.

4. The identification system of item 3, wherein the reference markers comprise a plurality of reference semiconductor nanocrystals, the reference markers of each label generating a reference signal at a reference wavelength with a reference intensity.

5. The identification system of item 4, wherein the other markers comprise other semiconductor nanocrystals generating other signals at other wavelengths and with other intensities.

6. The identification system of item 1, wherein the other markers comprise code signal markers which generate code signals different than the reference signals, the spectra comprising the marker signals and the code signals, and wherein, for at least one label, the analyzer discretely quantifies the code signals emitted by the code signal markers of the label by comparison of the code signals with the reference signal and by selecting signal characteristics of the code signals from among a plurality of discrete, predetermined signal characteristics,

7. The identification system of item 6, wherein the reference signal of each label has a reference intensity, and wherein the code signals of the label have code signal intensities, the analyzer discretely quantifying the code signal intensities by comparison to the reference intensity of the label.

8. The identification system of item 7, wherein the code signal intensities define discrete ratios with the associated reference intensities.

9. The identification system of item 7, wherein, for each label, the reference intensity comprises at least one member selected from a group consisting of: a highest intensity of the spectra, a lowest intensity of the spectra, a shortest

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4413

wavelength peak of the spectra, and a longest wavelength peak.

10. The identification system of item 1, wherein at least some of the reference signals of the labels have common reference wavelengths.

11. The identification system of item 1, where the reference signals of at least some of the labels have different reference wavelengths.

12. The identification system of item 11, wherein each reference signal has a reference wavelength, the reference wavelength being a shortest or a longest wavelength of the spectra of the label,

13. The identification system of item 1, wherein the reference signals have reference wavelengths, and wherein the other signals have other wavelengths, the other wavelengths of each label being discretely quantifiable by reference to the reference wavelength of the label.

14. The identification system of item 1, wherein the spectrum of a first label comprises signals having a plurality of wavelengths, wherein a spectrum of a second label comprises signals having the plurality of wavelengths, and wherein the analyzer calibrates spectra intensities of the first and second labels based on the reference signals to distinguish the first and second labels.

15. The identification system of item 1, further comprising at least 1000 labels with associated identifiable elements.

16. The identification system of item 1, further comprising fewer than 1000 label with associated identifiable elements.

17. The identification system of item 1, wherein the analyzer comprises a tangible media embodying a machine readable code, the code comprising a listing of a plurality of distinguishable labels.

18. The identification system of item 17, wherein the code further comprises a listing of identifiable elements and a correlation between each distinguishable label and an associated identifiable element having the distinguishable label.

19. The identification system of item 1, wherein the identifiable elements comprise at least one member selected from the group consisting of a composition of matter, a fluid, an article of manufacture, a consumer product, and a component for an assembly.

20. A method for sensing a plurality of identifiable elements, the method comprising:

labeling each identifiable element with a reference marker and at least one associated other marker;
energizing the markers of a first label from a first identifiable element so that the markers generate signals;
measuring a spectrum of the signals; and
identifying a first identifiable element from the spectrum by calibrating the spectrum with reference to a reference signal from the reference marker of the first label.

21. A library of elements, the library comprising:

a plurality of identifiable elements, each identifiable element having an associated label with a reference marker, the labels generating spectra in response to an excitation energy, each spectrum including a spectral calibration reference signal from the reference marker.

22. The library of item 21, wherein the labels comprise semiconductor nanocrystals.

23. The library of item 22, wherein the semiconductor nanocrystals generate the signals in response to the excitation energy, each reference marker comprising at least one reference semiconductor nanocrystal.

24. The library of item 23, wherein at least some of the labels comprise at least one other semiconductor nanocrystal generating another signal at another wavelength in response to the excitation energy, the other wavelength different than a reference wavelength of the reference signal.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4414

25. The library of item 22, wherein at least some of the labels comprise other markers associated with the reference marker, the other markers generating other signals in response to the excitation energy, the other signals differing from the associated reference signals, and discretely quantifiable by comparison of the other signals with the associated reference signals.

26. The library of item 25, wherein the reference signals have reference intensities, and wherein the other signals have other intensities, the other intensities each being discretely quantifiable by comparison to the associated reference intensity.

27. The library of item 26, wherein ratios defined by the other intensities to the associated reference intensities define discrete intensity ratio increments.

28. The library of item 25, wherein, for each spectrum, the reference intensity is a highest intensity of the spectrum or a lowest intensity of the spectrum,

29. The library of item 25, wherein at least some of the labels have a first other intensity higher than the reference intensity, and a second other intensity lower than the reference intensity.

30. The library of item 25, wherein, for each label, the reference signal has a reference wavelength, the reference wavelength being a shortest or a longest wavelength of the spectra of the label.

31. The library of item 25, wherein the reference signals have reference wavelengths and the other signals have other wavelengths, at least some of the labels including a first other wavelength shorter than the reference wavelength of the label, and a second other wavelength longer than the reference wavelength of the label.

32. The library of item 25, where the reference signals of at least some of the labels have differing reference wavelengths.

33. The library of item 25, wherein at least some of the reference signals of the labels have common reference wavelengths.

34. The library of item 25, wherein the reference signals of the labels have differing reference wavelengths.

35. The library of item 21 wherein the spectrum of a first label comprises signals having a plurality of wavelengths, wherein a spectrum of a second label comprises signals having the plurality of wavelengths, the first and second spectra having differing overall intensities, the first and second labels distinguishable by calibration of the first and second spectra based on intensities of the reference signals of the first and second signals, respectively.

36. The library of item 21, further comprising at least 1000 differentiable labels.

37. The library of item 21, further comprising fewer than 1000 differentiable labels.

38. The library of item 21, further comprising a tangible media embodying a machine readable code, the code comprising a listing of the labels.

39. The library of item 38, wherein the code further comprises a listing of identifiable elements and a correlation between each label and an associated identifiable element having the label.

40. The library of item 21, wherein the identifiable elements comprise at least one member selected from the group consisting of a composition of matter, a fluid, an article of manufacture, a consumer product, a bead, and a component for an assembly.

41. A method comprising:

labeling an identifiable element with a label;
measuring a spectrum generated by the label, the spectrum comprising a plurality of signals; and
identifying the element by selecting a first wavelength range encompassing a first signal of the spectra, and by determining a wavelength of the first signal within the first range.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4415

42. The method of item 41, wherein the element is labeled by applying at least one semiconductor nanocrystals to the element, the semiconductor nanocrystal generating at least some of the signals in response to excitation energy.

43. The method of item 41, further comprising selecting a second wavelength range encompassing a second signal of the spectra, and by determining a wavelength of the second signal within the second range.

44. The method of item 43, further comprising, for each other signal of the spectra, selecting another wavelength range encompassing the other signal and determining a wavelength of the other signal, wherein no more than one signal of the spectra is disposed within each wavelength range.

45. The method of item 43, wherein the wavelengths of the first and second signals are determined by selecting the wavelengths of the signals from a plurality of discrete wavelengths within the ranges.

46. The method of item 45, wherein the discrete wavelengths within each range are sufficiently close that two signals at adjacent discrete wavelengths within the range would substantially overlap.

47. The method of item 45, wherein the discrete wavelengths within the ranges are predetermined.

48. The method of item 45, wherein the discrete wavelengths within the ranges are separated by about 5 nm or more.

49. The method of item 45, wherein the discrete wavelengths within the ranges are separated by about 30 nm or more.

50. The method of item 45, wherein the ranges are separated.

51. The method of item 50, wherein the ranges are sufficiently separated so that a pair of signals at adjacent discrete wavelengths within adjacent wavelength ranges are sufficiently separated for independent identification of the discrete wavelengths of each signal of the pair.

52. The method of item 50, wherein the ranges are separated by more than about 30 nm.

53. The method of item 50, wherein each wavelength range includes at least 5 predetermined discrete wavelengths.

54. The method of item 53, wherein there are at least three non-overlapping wavelength ranges.

55. The method of item 41, further comprising identifying a plurality of elements in response to spectra generated from other labels associated with the elements by selecting wavelength ranges encompassing signals of the spectra, and by determining wavelengths of the signals within the ranges.

56. The method of item 55, wherein no more than one signal from each spectrum is disposed within each wavelength range.

57. The method of item 55, further comprising establishing predetermined wavelength ranges, the plurality of elements being identified using the predetermined wavelength ranges.

58. The method of item 57, further comprising establishing predetermined discrete wavelengths within the predetermined wavelength ranges, the wavelengths of the signals being selected from the predetermined wavelengths.

59. The method of item 55, further comprising rejecting labels having excessive overlap between adjacent discrete wavelengths from different adjacent wavelength ranges.

60. The method of item 55, wherein the wavelength determining step comprises a binary determination between a presence of the discrete wavelength and an absence of the discrete wavelength.

61. The method of item 60, wherein the spectra of the labels comprise a plurality of separated luminescent signals including signals within the first range, the first range being predetermined, and a second predetermined wavelength range, a discrete wavelength of at least one of the signals of each spectrum being different than a discrete wavelength of the spectrum of every other spectrum.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4416

62. The method of item 55, further comprising measuring a discrete intensity of the discrete wavelength.

63. The method of item 55, wherein the label and the other labels comprise intermingled markers.

64. The method of item 63, wherein the signals of a first label are encompassed within the first predetermined wavelength range, and wherein the signals of a second label are encompassed within another wavelength range such that the spectra of the first and second labels are separated.

65. A method for sensing a plurality of intermingled labels, the method comprising:

energizing the labels so that the labels generate signals;
identifying a first label by measuring a first discrete wavelength from among a plurality of discrete wavelengths within a first wavelength range; and
identifying a second label by measuring a second discrete wavelength from among a plurality of discrete wavelengths within a second wavelength range, the first and second ranges being separated.

66. The method of item 65, further comprising adding a plurality of labels to a fluid at an associated plurality of process steps so that the labels indicate the process steps performed to the fluid.

67. An inventory system comprising:

a plurality of identifiable elements; and
a plurality of labels having markers, each label associated with an element, each marker generating a signal when energized so that each label emits an identifiable spectrum, at least some of the spectra comprising a plurality of the signals, each signal of the spectra having a discrete wavelength selected from within a dedicated wavelength range, the ranges sufficiently separated so that the signals in different ranges are independently identifiable.

68. The inventory system of item 67, further comprising an analyzer having a signal sensor in optical communication with the signals and a processor, the processor selecting a first discrete wavelength from among a plurality of discrete wavelengths within a first wavelength range in response to a first signal of a first spectra, the processor selecting a second discrete wavelength from among a plurality of adjacent discrete wavelengths within a second wavelength range, the first and second ranges being separated, the processor having a database of the identifiable elements and the associated labels and generating an element identification signal in response to the first and second selected wavelengths.

69. The inventory system of item 68, wherein the labels comprises at least one bead including a matrix, the markers including at least one semiconductor nanocrystal supported in the matrix.

70. The inventory system of item 67, wherein each label comprises at least one bead, and wherein at least some of the beads have a plurality of markers comprising an associated plurality of semiconductor nanocrystal populations, each population including a plurality of semiconductor nanocrystals that emit a substantially uniform wavelength when energized so as to define the signal of the marker.

71. The inventory system of item 67, wherein each label has a unique spectra including no more than one discrete wavelength selected from a plurality of predetermined wavelengths within each of a plurality of separated wavelength ranges.

72. An inventory label generating method comprising:

generating a plurality of candidate labels; and
selecting a plurality of acceptably distinguishable labels from among the candidate labels by determining spectra emitted by the candidate labels when the candidate labels are energized, and by comparing the spectra of the candidate labels.

73. The method of item 72, wherein the labels comprise semiconductor nanocrystals.

74. The method of item 72, wherein the candidate, labels are generated by combining a plurality of markers, each

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4417

marker emitting a marker signal at an associated signal wavelength in response to excitation energy.

75. The method of item 72, further comprising directing an excitation energy toward the markers and measuring the spectra emitted by the labels.

76. The method of item 72, wherein the spectra of the candidate labels are determined by modeling a combination of a plurality of marker signals.

77. The method of item 76, further comprising calculating at least one of the signals by modeling emissions from a manufacturable marker.

78. The method of item 77, further comprising adjusting the calculated signals from the manufacturable marker in response to measured marker signal variations.

79. The method of item 76, further comprising measuring at least one of the signals by energizing a marker so that the marker emits the signal.

80. The method of item 72, further comprising comparing at least some of the candidate labels with a library of distinguishable labels to determine if the candidate labels are acceptable, and adding acceptable candidate labels to the library.

81. A method for identifying a plurality of identifiable elements, the method comprising:

energizing a plurality of labels so that a first marker of each label generates a first signal with a first wavelength peak, at least some of the labels comprising multiple-signal labels, each multiple-signal label having a second marker generating a second signal with a second wavelength peak;
measuring the first wavelength peaks;
for each multiple-signal label, measuring the second wavelength peak at at least a predetermined minimum wavelength separation from the associated first peak; and
identifying the labels in response to the measured peaks.

82. The method of item 80, wherein each predetermined minimum wavelength separation is at least as large as a full width half maximum (FWHM) of at least one of the associated first peak and the associated second peak.

Claims

1. A method comprising:

labeling an identifiable element with a label;
measuring a spectrum generated by the label, the spectrum comprising a plurality of signals; and
identifying the element by selecting a first wavelength range encompassing a first signal of the spectra, and by determining a wavelength of the first signal within the first range.

2. The method of claim 1, wherein the element is labeled by applying at least one semiconductor nanocrystals to the element, the semiconductor nanocrystals generating at least some of the signals in response to the excitation energy.

3. The method of claim 1, further comprising selecting a second wavelength range encompassing a second signal of the spectra, and by determining a wavelength of the second signal within the second range.

4. The method of claim 3, further comprising, for each other signal of the spectra, selecting another wavelength range encompassing the other signal and determining a wavelength of the other signal, wherein no more than one signal of the spectra is disposed within each wavelength range.

5. The method of claim 3, wherein the wavelengths of the first and second signals are determined by selecting the wavelengths of the signals from a plurality of discrete wavelengths within the ranges.

6. The method of claim 1, further comprising identifying a plurality of elements in response to spectra generated from

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4418

other labels associated with the elements by selecting wavelength ranges encompassing signals of the spectra, and by determining wavelengths of the signals within the ranges.

7. A method for sensing a plurality of intermingled labels, the method comprising:

energizing the labels so that the labels generate signals;
identifying a first label by measuring a first discrete wavelength from among a plurality of discrete wavelengths within a first wavelength range; and
identifying a second label by measuring a second discrete wavelength from among a plurality of discrete wavelengths within a second wavelengths range, the first and second ranges being separated.

8. The method of claim 7, further comprising adding a plurality of labels to a fluid at an associated plurality of process steps so that the labels indicate the process steps performed to the fluid.

9. An inventory system comprising:

a plurality of identifiable elements; and
a plurality of labels having markers, each label associated with an element, each marker generating a signal when energized so that each label emits an identifiable spectrum, at least some of the spectra comprising a plurality of the signals, each signal of the spectra having a discrete wavelength selected from within a dedicated wavelength range, the ranges sufficiently separated so that the signals in different ranges are independently identifiable.

10. The inventory system of claim 9, further comprising an analyzer having a signal sensor in optical communication with the signals and a processor, the processor selecting a first discrete wavelength from among a plurality of discrete wavelengths within a first wavelength range in response to a first signal of a first spectra, the processor selecting a second discrete wavelength from among a plurality of adjacent discrete wavelengths within a second wavelength range, the first and second ranges being separated, the processor having a database of the identifiable elements and the associated labels and generating an element identification signal in response to the first and second selected wavelengths.

11. The inventory system of claim 10, wherein the labels comprises at least one bead including a matrix, the markers including at least one semiconductor nanocrystal supported in the matrix.

12. The inventory system of claim 9, wherein each label comprises at least one bead, and wherein at least some of the beads have a plurality of markers comprising an associated plurality of semiconductor nanocrystal populations, each population including a plurality of semiconductor nanocrystals that emit a substantially uniform wavelength when energized so as to define the signal of the marker.

13. An inventory label generating method comprising:

generating a plurality of candidate labels; and
selecting a plurality of acceptably distinguishable labels from among the candidate labels by determining spectra emitted by the candidate labels when the candidate labels are energized, and by comparing the spectra of the candidate labels.

14. The method of claim 13, wherein the labels comprise semiconductor nanocrystals.

15. A method for identifying a plurality of identifiable elements, the method comprising:

energizing a plurality of labels so that a first marker of each label generates a first signal with a first wavelength peak, at least some of the labels comprising multiple-signal labels, each multiple-signal label having a second marker generating a second signal with a second wavelength peak;
measuring the first wavelength peaks;
for each multiple-signal label, measuring the second wavelength peak at at least a predetermined minimum wavelength separation from the associated first peak; and identifying the labels in response to the measured peaks.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4419

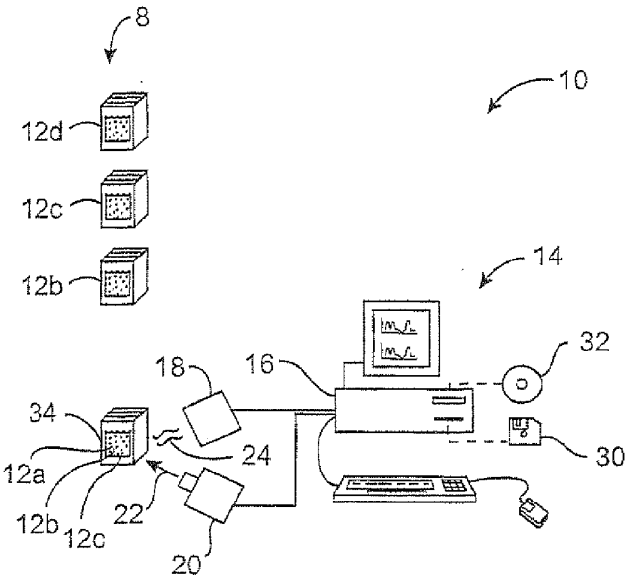


FIG. 1

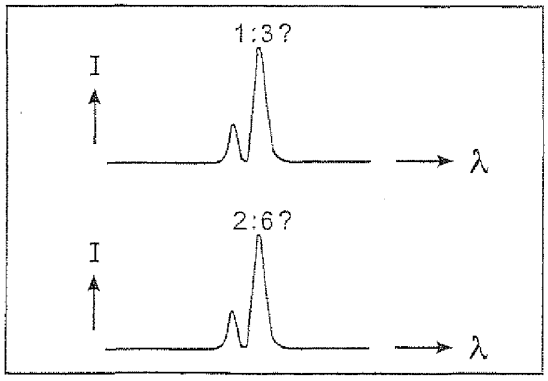


FIG. 6A

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4420

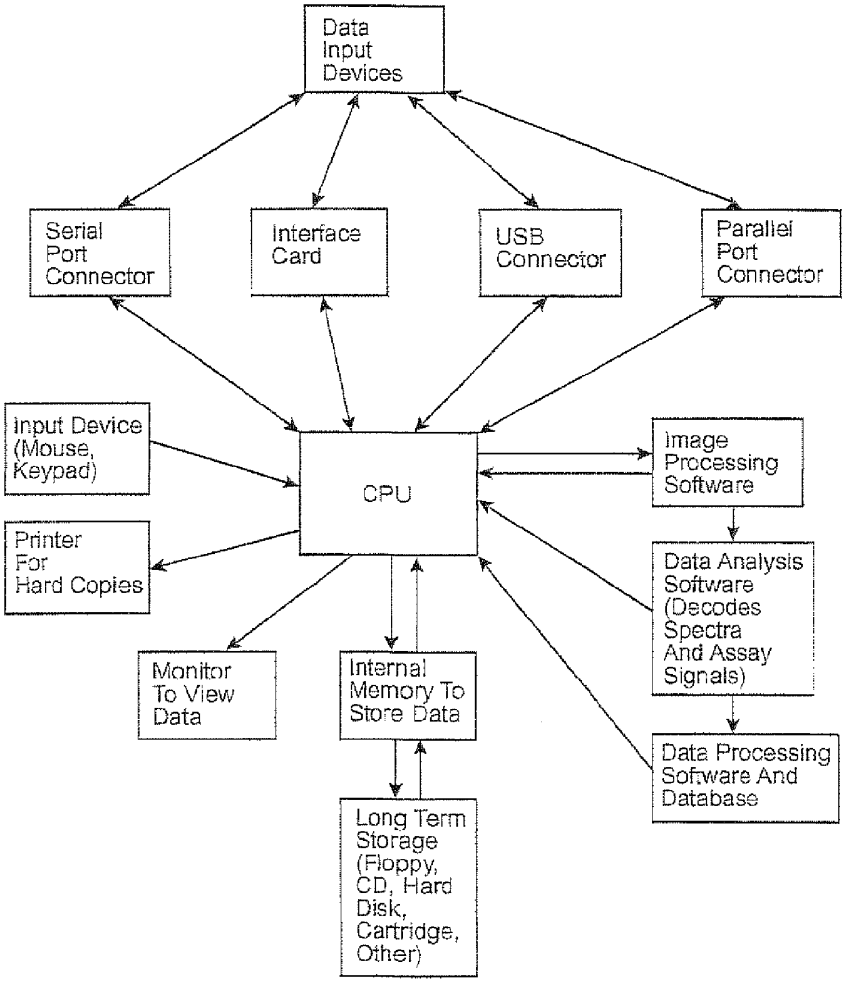


FIG. 1A

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4421

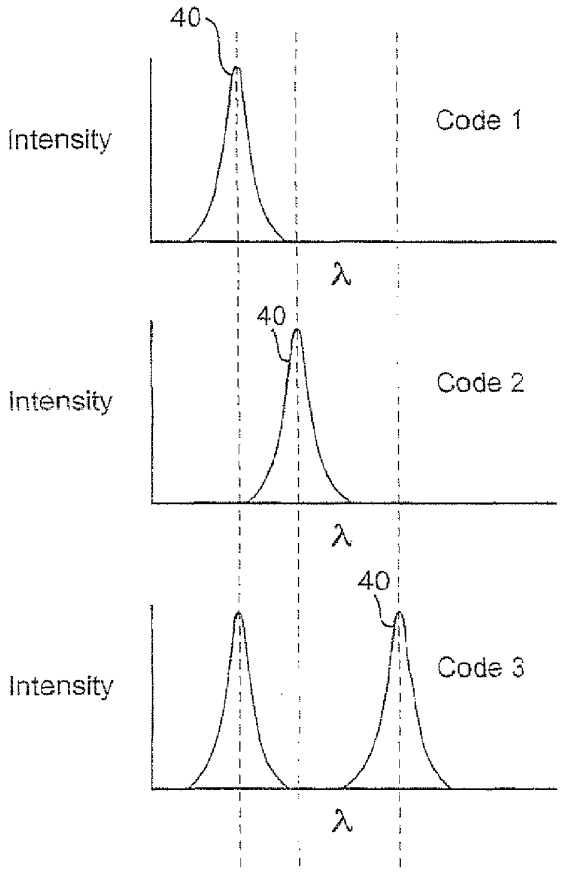


FIG. 1B

FIG. 1C

FIG. 1D

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4422

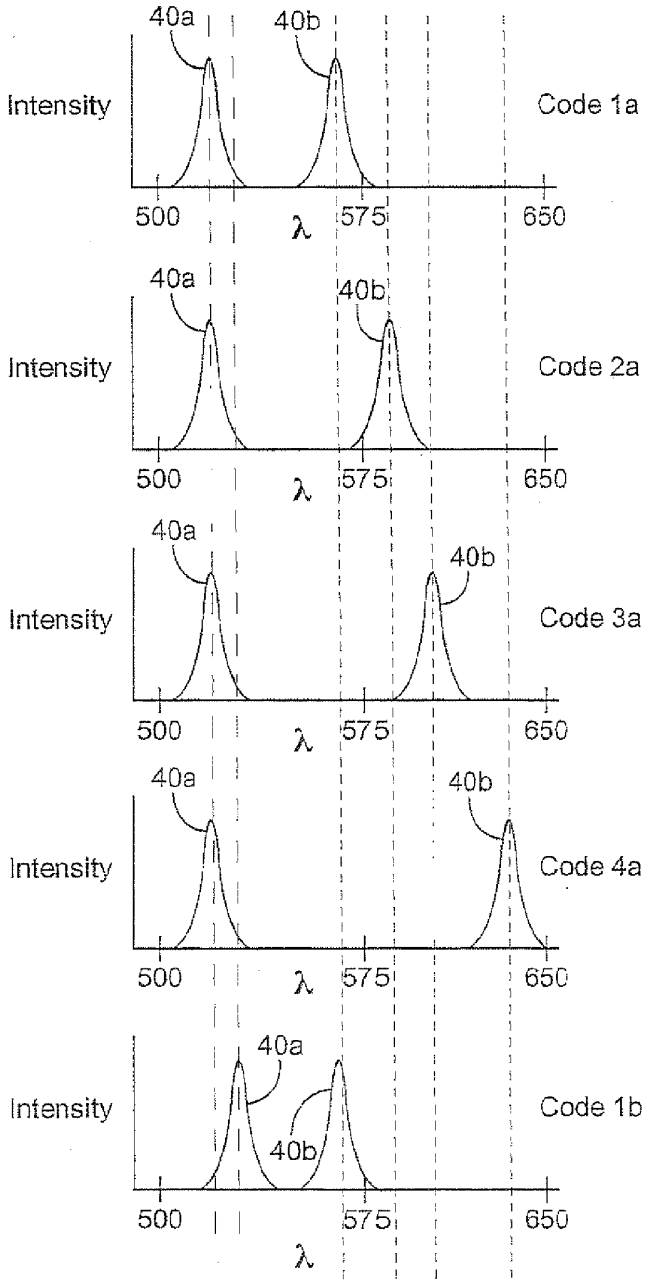


FIG. 2A

FIG. 2B

FIG. 2C

FIG. 2D

FIG. 2E

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4423

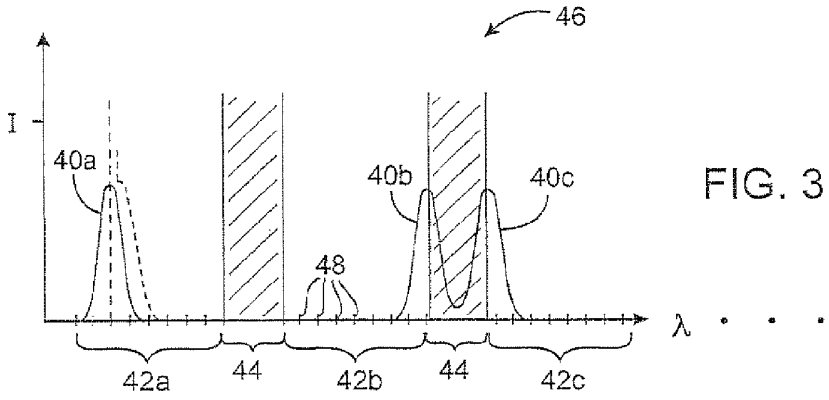


FIG. 3

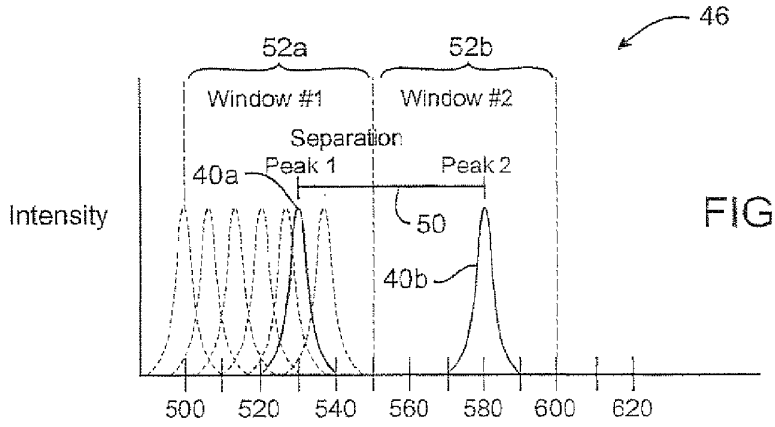


FIG. 4

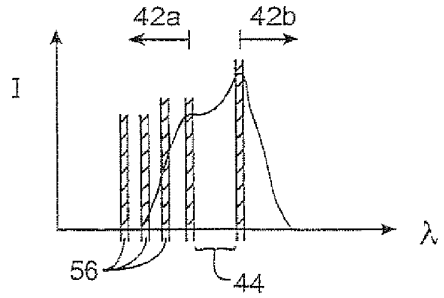


FIG. 5

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4424

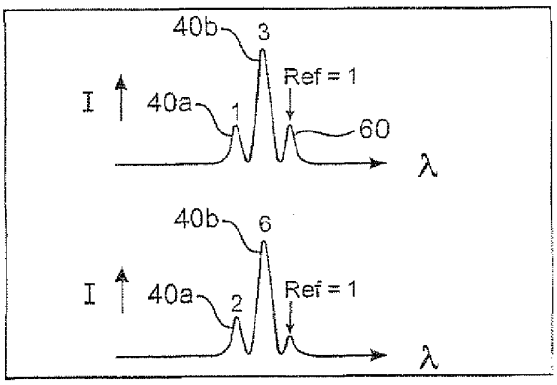


FIG. 6B

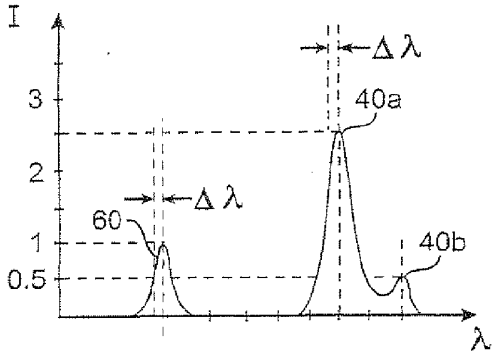


FIG. 7

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4425

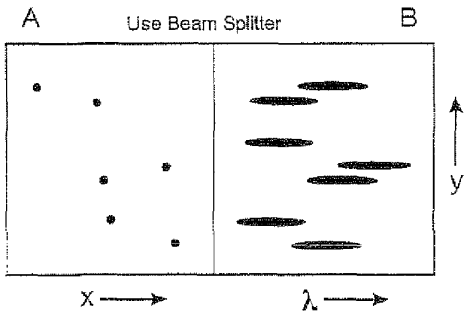


FIG. 8A

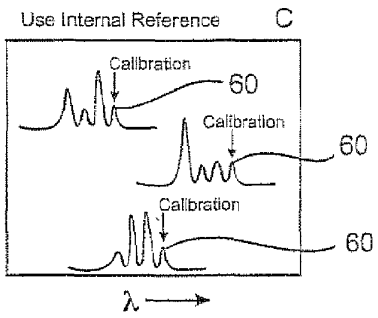


FIG. 8B

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4426

REFERENCES CITED IN THE DESCRIPTION

This list of references cited by the applicant is for the reader's convenience only. It does not form part of the European patent document. Even though great care has been taken in compiling the references, errors or omissions cannot be excluded and the EPO disclaims all liability in this regard.

Patent documents cited in the description

- US 60195520 B **[0001] [0099]**
- US 16045898 A **[0002]**
- US 39743299 A **[0002]**
- WO 9950916 A **[0002]**
- US 25998299 A **[0002]**
- US 397432 A **[0007] [0049]**
- US 96930297 A **[0049]**
- WO 9926299 A **[0049] [0054]**
- US 566014 A **[0050]**
- WO 0055631 A **[0063]**

Non-patent literature cited in the description

- **Dabbousi et al.** *J. Phys. Chem B.,* 1997, vol. 101, 9463 **[0049]**
- **Kuno et al.** *J. Phys. Chem.,* 1997, vol. 106, 9869 **[0049]**
- **Murray.** *J. Am. Chem. Soc.,* 1993, vol. 115, 8706-8715 **[0054]**
- **Guzelian.** *J. Phys. Chem.,* 1996, vol. 100, 7212-7219 **[0054]**
- **Danek.** *Chem. Mat.,* 1966, vol. 8 (1), 173-180 **[0054]**
- **Hines.** *J. Phys. Chem.,* 1996, vol. 100, 468-471 **[0054]**
- **Peng.** *J. Am. Chem. Soc.,* 1997, vol. 119, 7019-7029 **[0054]**
- **Daboussi.** *J. Phys. Chem.-B,* 1997, vol. 101, 9463-9475 **[0054]**
- **Bruchez.** *Science,* 1998, vol. 281, 2013-2016 **[0060]**
- **Ghan.** *Science,* 1998, vol. 281, 2016-2018 **[0060]**
- **Golvin.** *J. Am, Chem. Soc.,* 1992, vol. 114, 5221-5230 **[0060]**
- **Katari.** *J. Phys. Chem.,* 1994, vol. 98, 4109-4117 **[0060]**
- **Steigerwald.** *J. Am. Chem. Soc.,* 1987, vol. 110, 3046 **[0060]**
- **Press et al.** Numerical Recipes in C. Cambridge University Press, 1996 **[0111]**

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4427

(19) Japanese Patent Office (JP)

(11) Unexamined Patent Application No:

Kokai **2001-269196**

(12) Unexamined Patent Gazette (A)

(P2001-269196A)

(43) Date of Publication: October 2, 2001

(51) Int. Cl.[7]	Class. Symbols	FI		Subject Codes (Reference)	
C 12 Q 1/68		C 12 Q	1/68	A	2G045
G 01 N 33/50		G 01 N	33/50	P	4B063
33/58			33/58	A	

Request for Examination: Not yet submitted | Number of Claims: 7 OL | Total of 11 pages [in original]

(21) Application No.: 2000-85048 (P2000-85048)

(22) Date of Filing: March 24, 2000

Published in the "Proceedings of the 17th Biotechnology Symposium" published by the Research Association for Biotechnology on November 12, 1999 pursuant to paragraph 1 of article 30 of the Patent Law

(71) Applicant: 000236436
Hamamatsu Photonics Co., Ltd.
1126-1 Ichino-cho, Hamamatsu-shi Shizuoka-ken

(72) Inventor: Kenichi Hirano
c/o Hamamatsu Photonics Co., Ltd.
1126-1 Ichino-cho, Hamamatsu-shi Shizuoka-ken

(72) Inventor: Tadashi Fukami
c/o Hamamatsu Photonics Co., Ltd.
1126-1 Ichino-cho, Hamamatsu-shi Shizuoka-ken

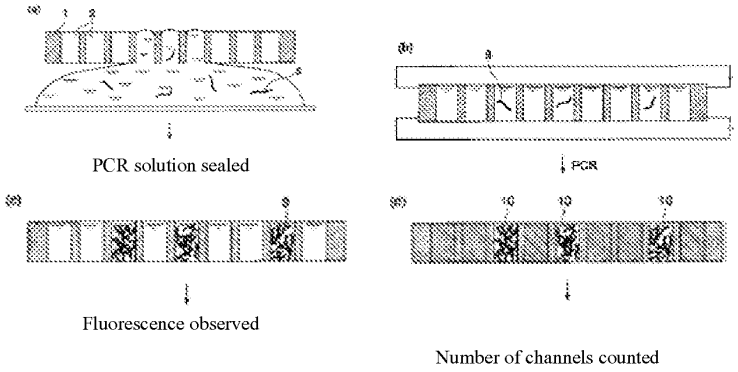
(74) Agent: 100088155
Yoshiki Hasegawa, Patent Attorney, and two others

(Continued on last page)

(54) [Title of the Invention] Method for Quantifying Specimen Nucleic Acid and Method for Counting Number of Specimen Nucleic Acid Molecules

(57) [Summary]

[Object] To accurately determine trace genes, mRNA, and other such specimen nucleic acid in a sample.
[Means of Achievement] The number of specimen nucleic acid molecules present in a sample at the start is counted and quantified by dispensing PCR solution containing target DNA derived from the specimen nucleic acid into the channels of a capillary plate, directly treating the capillary plate using PCR temperature cycling, amplifying the target DNA in the channels using PCR, and specifying and counting the channels in which the amplified target DNA emits fluorescence by image analysis.



Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4428

[Claims]

[Claim 1] A method for quantifying a specimen nucleic acid, the method for quantifying specimen nucleic acid characterized in comprising a first step for preparing a PCR solution containing target DNA derived from a specimen nucleic acid from a sample and a fluorescence reagent; a second step for placing the PCR solution in a capillary plate provided with a prescribed number of channels; a third step for closing both sides of the capillary plate using elastic, transparent plates, and sealing the PCR solution in the respective channels; a fourth step for exposing the capillary plate closed on both sides to a predetermined temperature cycling, and carrying out PCR of the target DNA derived from the specimen nucleic acid; and a fifth step for providing the capillary plate closed on both sides for fluorescence measurement and counting the number of fluorescent channels emitting fluorescence, the fluorescent channels being channels containing the target DNA derived from the specimen nucleic acid amplified by PCR.

[Claim 2] The method for quantifying a specimen nucleic acid according to Claim 1, characterized in comprising a step for determining the concentration of the specimen nucleic acid based on the number of fluorescent channels counted, the step being subsequent to the fifth step.

[Claim 3] The method for quantifying a specimen nucleic acid according to Claim 1, characterized in comprising a step for pretreating the capillary plate using a protein adsorption inhibitor.

[Claim 4] The method for quantifying a specimen nucleic acid according to Claim 1, characterized in that the fluorescence reagent comprises a minor-groove-binding fluorescence dye.

[Claim 5] The method for quantifying a specimen nucleic acid according to Claim 1, characterized in that the fluorescence reagent comprises a fluorescent probe oligonucleotide that utilizes fluorescence energy migration.

[Claim 6] The method for quantifying a specimen nucleic acid according to Claim 1, characterized in that the elastic, transparent plate is made of silicone rubber.

[Claim 7] A method for counting the number of molecules of specimen nucleic acid, the method for counting the number of molecules of specimen nucleic acid being characterized in comprising: a first step for preparing a PCR solution containing target DNA derived from a specimen nucleic acid from a sample and a fluorescence reagent; a second step for placing the

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4429

PCR solution in a capillary plate provided with a prescribed number of channels; a third step for closing both sides of the capillary plate using elastic, transparent plates, and sealing the PCR solution in the respective channels; a fourth step for exposing the capillary plate closed on both sides to a predetermined temperature cycling, and carrying out PCR of the target DNA derived from the specimen nucleic acid; and a fifth step for providing the capillary plate closed on both sides for fluorescence measurement and counting the number of fluorescent channels emitting fluorescence, the fluorescent channels being channels containing the target DNA derived from the specimen nucleic acid amplified by PCR.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Technological Field of the Invention] The present invention relates to a method for quantifying a gene, mRNA, and other such nucleic acids present in a sample in extremely small amounts. More specifically, the present invention relates to a method for counting the number of molecules of nucleic acid present in a sample at the start by amplifying target DNA derived from the gene, mRNA, or other such nucleic acids present in a sample in extremely trace amounts and a method of determining the concentration of nucleic acid from the results of counting.

[0002]

[Prior Art] In vitro nucleic acid amplification techniques provide powerful means for detecting and analyzing small amounts of nucleic acid. Such techniques have led to great progress in the diagnosis of infectious diseases and genetic conditions, isolation of genes for biochemical analysis, and detection of specific nucleic acids in forensic medicine. Currently, the most versatile technique is the polymerase chain reaction (referred to hereinafter as "PCR" or "PCR method") using heat-resistant polymerase (Taq polymerase), whereby DNA (fragments) can theoretically be amplified a billion or more times. However, the amplification efficiency and accuracy in PCR are controlled by the treatment temperature, base sequence of the nucleic acid, concentration and type of reaction solution components, and various other such factors. It is difficult to accurately determine the number (concentration) of nucleic acid molecules that are the object of measurement by measuring the concentration of the PCR final product or by real time measurement in the course of PCR.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4430

[0003] A technique called "digital PCR" was thus recently proposed as an attempt to accurately determine trace genes. Refer to Bert Vogelstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 96, pp. 9236-9241. According to this method, the gene sample to be quantified is subjected to limiting dilution by PCR solution and dispensed into the wells of a titer plate. PCR of the sample solution is carried out on the titer plate. After amplifying DNA derived from the gene, the fluorescence signal of each well is measured using a fluorescent probe or the like, and the number of wells in which the amplified DNA emits fluorescence is counted. Since one molecule of DNA may be assumed to be in each well due to the above limiting dilution, the number of wells that emit fluorescence corresponds to the number of DNA molecules in the sample, that is, the amount of mRNA in the sample, and the gene can be quantified. Unfortunately, this method has several hidden problems discussed below.

[0004] PCR is carried out on the titer plate, and about 60 cycles of PCR are necessary until DNA amplification can be detected. However, those skilled in the art recognize that when the number of PCR cycles exceeds 40, PCR products other than the target PCR amplification products are produced and contaminate the amplification product (referred to hereinafter as nonspecific DNA amplification). This has two causes. One is the fact that trace DNA incidentally admixed with the PCR solution is amplified by PCR. This is generally called "carry over." The lower the concentration of target DNA in the PCR solution, the more pronounced this phenomenon becomes. The other is that the primers form double strands that serve as a template and are amplified by PCR, leading to nonspecific amplification products. Persons skilled in the art avoid these problems by typically not conducting more than 40 cycles. In any case, since the above digital PCR method requires 60 or more cycles, it becomes difficult to distinguish the target PCR amplification products and undesirable, admixed PCR amplification products, which naturally makes accurate DNA quantification difficult. Several means of avoiding such nonspecific DNA amplification are already known. All, however, require complex procedures or expensive reagents. For example, methods such as the following are known: 1) DNA synthesis is carried out by adding dUTP instead of dTTP, one of the bases used as a DNA synthesis substrate, and an enzyme to cleave the site of the dUTP incorporated into the DNA is added in the next PCR. 2) Two-stage PCR is carried out using two different primer pairs. 3) The carry-over DNA is removed by adding a restriction enzyme to specifically cleave the proper base sequence in the DNA to be amplified to the solution before PCR high-temperature treatment.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4431

[0005] Moreover, the conditions must be established in digital PCR such that half the total number of wells of the titer plate, for example, contain DNA molecules by diluting to various multiples to obtain limiting dilution.

[0006] When limiting dilution is carried out so that half the total number of wells of the titer plate contain DNA molecules in digital PCR, one cannot overlook the fact that the probability of one well containing two molecules of DNA is 12% and probability of one containing three is 3% based on the Poisson distribution. Therefore, the number of wells counted and the number of DNA molecules do not match, the evaluation becomes blurred, and the reliability of assay is weakened.

[0007]

[Problems to Be Solved by the Invention] In view of problems such as the above with digital PCR, a method other than digital PCR is desired to accurately determine (that is, count) the number of molecules of trace genes, mRNA, and other such nucleic acid in a sample, including the nucleic acid concentration. Therefore, the object of the present invention is to solve the problems of digital PCR and to provide a method for quantifying specimen nucleic acid in a sample easily and accurately and a method for counting the number of specimen nucleic acid molecules.

[0008]

[Means Used to Solve the Above-Mentioned Problems] Specifically, the present invention provides a method for quantifying a specimen nucleic acid, the method for quantifying specimen nucleic acid characterized in comprising a first step for preparing a PCR solution containing target DNA derived from a specimen nucleic acid from a sample and a fluorescence reagent; a second step for placing the PCR solution in a capillary plate provided with a prescribed number of channels; a third step for closing both sides of the capillary plate using elastic, transparent plates, and sealing the PCR solution in the respective channels; a fourth step for exposing the capillary plate closed on both sides to a predetermined temperature cycling, and carrying out PCR of the target DNA derived from the specimen nucleic acid; and a fifth step for providing the capillary plate closed on both sides for fluorescence measurement and counting the number of

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4432

fluorescent channels emitting fluorescence, the fluorescent channels being channels containing the target DNA derived from the specimen nucleic acid amplified by PCR.

[0009] The present invention also provides the above method for quantifying a specimen nucleic acid characterized in comprising a step for determining the concentration of the specimen nucleic acid based on the number of fluorescent channels counted, the step being subsequent to the fifth step.

[0010] The present invention also provides the above method for quantifying a specimen nucleic acid characterized in comprising a step for pretreating the capillary plate using a protein adsorption inhibitor.

[0011] The fluorescence reagent preferably comprises a minor groove-binding fluorescence dye or a fluorescent probe oligonucleotide that utilizes fluorescence energy migration in the above method for quantifying a specimen nucleic acid.

[0012] The elastic, transparent plate for closing both sides of the capillary plate is preferably made of silicone rubber in the above method for quantifying a specimen nucleic acid.

[0013] Another aspect of the present invention is a method for counting the number of molecules of specimen nucleic acid, the method for counting the number of molecules of specimen nucleic acid being characterized in comprising: a first step for preparing a PCR solution containing target DNA derived from a specimen nucleic acid from a sample and a fluorescence reagent; a second step for placing the PCR solution in a capillary plate provided with a prescribed number of channels; a third step for closing both sides of the capillary plate using elastic, transparent plates, and sealing the PCR solution in the respective channels; a fourth step for exposing the capillary plate closed on both sides to a predetermined temperature cycling, and carrying out PCR of the target DNA derived from the specimen nucleic acid; and a fifth step for providing the capillary plate closed on both sides for fluorescence measurement and counting the number of fluorescent channels emitting fluorescence, the fluorescent channels being channels containing the target DNA derived from the specimen nucleic acid amplified by PCR.

[0014] The present invention is explained in detail below in accordance with a preferred embodiment.

[0015]

[Embodiment of the Invention] The key aspect of the present invention is a method for quantifying the number of molecules or concentration of specimen nucleic acid, the method for

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4433

quantifying a specimen nucleic acid being characterized in comprising a first step for preparing a PCR solution containing target DNA derived from a specimen nucleic acid from a sample and a fluorescence reagent; a second step for placing the PCR solution in a capillary plate provided with a prescribed number of channels; a third step for closing both sides of the capillary plate using elastic, transparent plates, and sealing the PCR solution in the respective channels; a fourth step for exposing the capillary plate closed on both sides to a predetermined temperature cycling, and carrying out PCR of the target DNA derived from the specimen nucleic acid; and a fifth step for providing the capillary plate closed on both sides for fluorescence measurement and counting the number of fluorescent channels emitting fluorescence, the fluorescent channels being channels containing the target DNA derived from the specimen nucleic acid amplified by PCR.

[0016] Therefore, the gist of the method for quantifying a specimen nucleic acid of the present invention is that the number of molecules of specimen nucleic acid present in a sample at the start is counted by sealing PCR solution containing target DNA derived from specimen nucleic acid in the channels of a capillary plate, amplifying the target DNA using PCR, and detecting and analyzing the fluorescence emitted by the amplified target DNA. Thus, the phrase "quantifying method of the present invention" is used below in a sense that includes either or both a method for quantifying the concentration of specimen nucleic acid and a method for counting the number of molecules of specimen nucleic acid in accordance with the present invention.

[0017] The term "specimen nucleic acid" used in this specification encompasses DNA and RNA (including mRNA) and may be either single-stranded or double-stranded. However, the base sequence of the specimen nucleic acid itself or the target DNA derived therefrom (discussed below) must be known, at least to the extent to permit PCR, for application of the quantifying method of the present invention. The specimen nucleic acid also need not be in pure form, but may be a fraction of part of a complex mixture (for example, part of a β-globulin gene). The specimen nucleic acid also may have any origin, such as natural or artificially synthesized, but DNA or RNA extracted from blood, cells, tissues, microorganisms, or viruses is preferred in view of the field of application of the present invention. The term "sample" used in this specification means a sample that contains such specimen nucleic acid and is not particularly restricted. However, biological samples (especially clinical specimens and cytology specimens) are preferably used in the quantifying method of the present invention for the same reason as

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4434

above. Examples of clinical specimens include urine, feces, sputum, blood, and the like. Examples of cytology specimens include liquid pleural effusion, ascites, and other such body cavity fluids, tumor cells obtained by aspiration biopsy and other such biopsy techniques, and the like. The nucleic acid is usually extracted by pretreating the specimen to obtain a specimen nucleic acid (DNA) from these specimens. The pretreatment method varies depending on the type of specimen, and the established treatment method should be used for each specimen. A phenol-chloroform method, guanidine thiocyanic acid method, and the like are known as nucleic acid extraction methods. On the other hand, when the specimen nucleic acid is RNA, the RNA itself cannot serve as the substrate for PCR. However, PCR can be applied to the analysis of RNA by synthesizing cDNA from RNA by reverse transcriptase. Therefore, the quantifying method of the present invention can be applied even if the specimen nucleic acid is RNA by combining the above reverse transcriptase reaction with PCR. In particular, this situation pertains to a specimen containing an RNA virus (HIV, HVC, hantavirus, and the like). This is because an RNA virus has RNA rather than DNA as chromosomes. Even if DNA is the object of analysis as the specimen nucleic acid, analyzing mRNA can be more useful than analyzing DNA in terms of sensitivity since there are sometimes more copies per cell of mRNA than DNA when mRNA is taken as the specimen nucleic acid instead of this DNA. Therefore, the phrase "target DNA derived from specimen nucleic acid" used in this specification is the DNA amplified by PCR, meaning DNA when the specimen nucleic acid is DNA and DNA obtained therefrom (cDNA) when the specimen nucleic acid is RNA (mRNA).

[0018] The above reverse transcriptase reaction can be carried out easily in accordance with the usual method. For example, a commercial standard cDNA synthesis kit (Time Saver cDNA Synthesis Kit, made by Amersham Pharmacia) is caused to act on a sample, and cDNA is synthesized from mRNA. The optimum pH (near 8.3) of the reverse transcriptase in the reverse transcriptase reaction is also close to the pH (for example, 8.4-8.8) of the PCR buffer solution, and the Mg^{2+} required in both reactions is also common to both. Therefore, buffer conditions suited to PCR can be obtained by diluting by the buffer used in PCR without exchanging the buffer after the reverse transcriptase reaction. The cDNA synthesized by reverse transcription can consequently be provided directly for amplification by PCR. Furthermore, in the same way as when PCR is carried out after producing single-stranded DNA by denaturing double-stranded DNA in ordinary PCR, single-stranded cDNA is produced in this case by denaturing double-

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4435

stranded mRNA-cDNA. The reverse transcriptase used is also inactivated simultaneously at this time.

[0019] The first step included in the quantifying method of the present invention consists of the preparation of PCR solution containing target DNA (single-stranded) derived from the specimen nucleic acid and fluorescence reagent. Specifically, PCR solution is prepared by mixing the target DNA, PCR buffer (consisting of primer, dNTP, Taq DNA polymerase, and the like), and fluorescence reagent. The primers used here are two primers of the 5' side and 3' side of the target DNA synthesized by the usual method. Commercial software such as GENETYX (software development) can be utilized in primer design.

[0020] A fluorescence reagent is used to detect the amplified target DNA and must have a property such that the fluorescence intensity increases in proportion to the amount of amplified DNA. A minor-groove-binding DNA-specific fluorescence dye is preferably used as the fluorescence reagent in the present invention. Since this type of fluorescence dye binds to the minor grooves of the DNA strand, it is incorporated proportionately into the amplified DNA. If DNA is not present, the fluorescence dye itself emits only weak fluorescence. Typical examples of such minor groove-binding fluorescence dyes include Hoechst 33258 and Hoechst 33342.

[0021] A fluorescent probe that utilizes fluorescence energy migration can also be used as a fluorescence reagent in the quantifying method of the present invention. Such a probe is an oligonucleotide that bonds a pair of two fluorescence dyes that act as a donor dye and a receptor dye or a pair of a fluorescence dye and a dye that quenches its fluorescence. DNA amplification can be estimated from fluorescence measurement since the fluorescence intensity of the donor dye increases as a result of fluorescence energy migration being eliminated by hybridization and decomposition of the probe as PCR progresses.

[0022] The second step included in the quantifying method of the present invention consists of placing the above PCR solution in a capillary plate provided with the prescribed number of channels. The capillary plate used here is preferably constructed from glass or silicon. FIGS. 1a and 1b show an example of a capillary plate used in the present invention. A typical plate is provided with the prescribed number (arbitrarily selected from several thousand to several million) of cylindrical columns having an outer diameter of from several to several tens of millimeters, inner diameter of from several to 200 μm, and depth (thickness) of 0.5 to several millimeters. The PCR solution is placed in the capillary plate 1, and the PCR solution is brought

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4436

into contact with one side (bottom surface) of the capillary plate 1. When this is done, the PCR solution is injected into each channel 2 by capillary action. FIG. 3(a) (discussed below) illustrates this injection step schematically. As another method, the PCR solution may be injected into the channels by pipetting from the top surface of the capillary plate.

[0023] The third step included in the quantifying method of the present invention consists of closing both sides of the capillary plate using elastic, transparent plates and sealing the PCR solution inside the channels. Here, as illustrated in FIG. 2a, both sides of the capillary plate 1 are closed by elastic, transparent plates (for example, silicone rubber plate 3) with the PCR solution in the state in which it was injected into each channel 2 of the capillary plate 1 in the second step. When the capillary plate 1 is closed, the PCR solution is sealed inside each channel 2, and the PCR solution does not move between channels. The outside of the silicone rubber plate 3 is then covered by a cover glass 4.

[0024] The fourth step included in the quantifying method of the present invention exposes the capillary plate that has been closed on both sides to predetermined temperature cycling and carries out PCR of the target DNA. This step is conducted in the same way as ordinary PCR. Reference should be made to FIGS. 2a and 2b. First, the capillary plate 1 that was closed on both sides and also covered by a cover glass 4 in the third step is placed in a chamber 5 designed for PCR. The outer frame of chamber 5 is made from a highly heat-conductive material, for example, oxygen-free copper or an aluminum alloy plate. Chamber 5 itself is directly heated/cooled as a heat block. After the capillary plate 1 has been positioned inside chamber 5, capillary plate 1 is fixed by tightening fixing screw 6 (FIG. 2b). Chamber 5 is placed in this state on top of the aluminum block 7 of a commercial thermal cycler. The temperature of each cycle, reaction time, and number of cycles are set on the thermal cycler, and PCR is conducted. The temperature cycling used in the present invention is not particularly different from that of ordinary PCR. Since the amplification reaction in the quantifying method of the present invention also does not differ in any way from ordinary PCR, it is preferable to minimize "carry over" from hybridized DNA and suppress nonspecific DNA amplification (background), as was described in the section on digital PCR. Various measures and devices known to those skilled in the art can be used to this end. Thus, PCR is carried out using the target DNA as a template, and the DNA is amplified.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4437

[0025] However, PCR sometimes does not progress when the PCR reaction solution is merely sealed in the channels of the capillary plate as above and PCR is attempted. This is because DNA polymerase is adsorbed on the inner walls of the channels and negatively affects PCR. Such protein adsorption can also occur when other reactors are used, but it is particularly pronounced in the case of a capillary plate because the total surface area of the reactor is extremely large. Therefore, in one preferred embodiment of the present invention, the capillary plate is treated by a substance having a protein adsorption-inhibiting effect (called a protein adsorption inhibitor) prior to PCR, and the above adsorption phenomenon is prevented. The pretreatment step by protein adsorption inhibitor is performed before the above second step. In another method, protein adsorption inhibitor may be mixed with the PCR solution and PCR conducted. In this case, the protein adsorption inhibitor is preferably an excess in relationship to the DNA polymerase concentration. Bovine serum albumin is one example of a protein adsorption inhibitor. An appropriate concentration is approximately 0.01-0.1%.

[0026] The fifth step included in the quantifying method of the present invention consists of providing the capillary plate sealed on both sides for fluorescence measurement and counting the number of fluorescent channels that emit fluorescence. Here, the fluorescent channels are channels that contain target DNA derived from specimen nucleic acid that has been amplified by PCR. Specifically, the capillary plate 1 is removed from the chamber 5 after step 4, and the surface of the capillary plate is examined under a fluorescence microscope with the cover glass attached. The fluorescence microscope used in the present invention may be a commercial product equipped with an excitation light source, excitation light wavelength selection filter (ultraviolet transmission filter in the case of Hoechst 33258), fluorescence wavelength selection filter, and the like. The fluorescence of the surface of the capillary plate is also photographed by a high-sensitivity camera (II-CCD camera), and the images obtained are analyzed by an image analysis system. This makes it possible to measure the fluorescence signal from the fluorescence reagent in each channel of the capillary plate. In image analysis, the appropriate threshold is set, and the background fluorescence signal below that level is removed by filter. When this is done, only channels of changed fluorescence signal (that is, fluorescent channels that emit fluorescence) are specified. In counting the number of such fluorescent channels, the number of high-brightness channels on the image-analyzed fluorescent image is counted visually. Alternatively, the information may be processed by microcomputer based on the fluorescence

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4438

signal in the image processing system and the number counted automatically. In either case, this series of fluorescence signals can be processed by a combination of known techniques.

[0027] The fluorescent channels contain target DNA amplified by PCR. This is because the PCR solution sealed inside the channel in the third step contains a target DNA molecule derived from the specimen nucleic acid. The target DNA molecule is amplified in the fourth step, and the amplified DNA emits fluorescence due to the fluorescence reagent, which changes the fluorescence signal of the channel in comparison to before PCR. On the other hand, if the PCR solution inside the channel contains no target DNA, amplified DNA is not produced by PCR. The fluorescence signal of the channel is unchanged from before PCR. This was confirmed by experiments as well in the working examples discussed below. Therefore, the number of channels in which target DNA was present before PCR can be determined by specifying the fluorescent channels and counting the total number of them on the capillary plate.

[0028] When the number of target DNA molecules before PCR is sufficiently small versus the total number of channels that constitute the capillary plate, virtually all channels that contain target DNA can be assumed based on the Poisson distribution to contain one molecule. Therefore, when the concentration of target DNA is sufficiently low in this way, the number of fluorescent channels corresponds to the number of target DNA molecules.

[0029] This assumption is also supported by the fact that the measured values basically concur with the values expected from the Poisson distribution in experiments in the working examples discussed below. As above, the number of target DNA molecules in the PCR solution and the number of molecules of specimen nucleic acid in the sample can be determined by counting the number of fluorescent channels in accordance with the quantifying method of the present invention. If desired, the concentration of target DNA (therefore, specimen nucleic acid) can also be determined based on the number of molecules determined in this way and the channel volume.

[0030] FIG. 3 schematically explains each step corresponding to steps one through four of the quantifying method of the present invention that has been discussed in detail above. The series of procedures in accordance with the quantifying method of the present invention can easily be understood by those skilled in the art based on the above explanation and FIG. 3.

[0031] The present invention is explained more concretely below through examples. However, the present invention is not limited by these examples.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4439

[0032]

[Examples] (Example 1) PCR solution of the following composition was prepared. The target DNA (corresponding to template DNA), 5' primer, and 3' primer used in this example each had the following base sequences. These DNA were purchased from a contract DNA synthesis manufacturer (Becks Co., Ltd.).

Target DNA: 5'-ATGGAAACCTGTTTGTTGGATATAAATACGTCGTAGATGGGCACAGTGTG-3' (SEQ ID NO: 1)

5' Primer: 5'-CACACTGTGCCCATCTACGA-3' (SEQ ID NO: 2)

3' Primer: 5'-ATGGAAACCTGTTTGTTGGA-3' (SEQ ID NO: 3)

PCR solution	
Target DNA	100 aM
5' Primer	1 μM
3' Primer	1 μM
Mg_2Cl	6 mM
BSA	0.1%
Respective dNTP	0.5 mM
Hoechst 33258	1 μM
Taq antibody	0.056 μM
Taq DNA polymerase	0.02 unit/μL
10× solution of Taq DNA polymerase	25 μL
Distilled water	Remainder
Total volume	250 μL

Using a capillary plate having an outside diameter of 25 mm provided with channels 0.05 mm in diameter and 1 mm in depth (approximately 100,000, volume approximately 2 nL), the above PCR solution was dispensed into the channels by capillary action. Both sides of the capillary plate were closed by transparent silicone rubber plates, and the outside was also covered by cover glasses [FIG. 2(a)]. This capillary plate was placed in a chamber, and the

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4440

chamber was placed on the aluminum block of a thermal cycler (DNA Thermal Cycler 488, made by Perkin Elmer) [FIG. 2(b)].

[0033] The temperature of each cycle, reaction time, and number of cycles were set as follows on the thermal cycler, and PCR was conducted. Specifically, pretreatment for three minutes at 95°C was performed once, followed by reaction for two minutes at 95°C and for two minutes at 45°C. Forty cycles of this were repeated. Furthermore, the instrument was held for five minutes at 68°C and allowed to cool to room temperature, and PCR was completed.

[0034] After PCR had been completed, the capillary plate was removed from the chamber, and the surface was examined under an inverted fluorescence microscope (Olympus I X70, objective lens: 10×) with the silicone rubber plates and cover glasses attached. The fluorescence of the surface was photographed by a high-sensitivity camera II-CCD camera (ARGUS 500, made by Hamamatsu Photonics), and the fluorescent images obtained were recorded by an image analysis system. This image is shown in FIG. 4(a).

[0035] New PCR solution of exactly the same composition as the above PCR solution except that it did not contain the target DNA was also prepared, and a control test was conducted. The image obtained is shown in FIG. 4(b).

[0036] A comparison of the fluorescent image of FIG. 4(a) with the fluorescent image of FIG. 4(b) shows that the former image clearly contains several tens of high-brightness (fluorescent) channels and that these channels are present scattered among low-brightness channels. On the other hand, the latter image shows darkness across all channels with not even one high-brightness channel. The fluorescent channels have increased brightness because the target DNA molecules in them have been amplified, and target DNA is understood to have been present in these channels before PCR. Even with the cycle count of 40 cycles used in the above PCR conditions, the DNA was adequately amplified and could be detected. The results of the above control test also made it clear that absolutely no nonspecific DNA amplification occurred under these PCR conditions.

[0037] (Working Example 2) PCR solutions of the same composition were prepared except that the concentration (100 aM) of target DNA was varied in the PCR solution used in Working Example 1. These PCR solutions were supplied for PCR in the same way as in Working Example 1. The fluorescent images were determined at each concentration, and the fluorescent channels were counted. The ratio of the number of fluorescent channels obtained to the total

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4441

number of channels in the capillary plate was determined. FIG. 5 shows a plot of the ratio to each concentration of target DNA. In FIG. 5, curve [1] is a plot of the ratio of measured values obtained (number of fluorescent channels: total number of channels), and curve [2] is a plot of the values expected from the Poisson distribution. First of all, curve [1] shows that the number of fluorescent channels increases in proportion to the concentration of target DNA. The similarity of the two curves also suggests that the PCR solutions used in this example accord with the Poisson distribution. In other words, only one molecule of target DNA is present in virtually all of the fluorescent channels in the low target DNA concentration range (for example, anticipated value of 0.1 or lower). That one molecule is amplified by PCR, and the channel that contains it emits fluorescence. It is understood from these findings and the results of Working Example 1 that the number of target DNA molecules in the PCR solution can be estimated accurately from the number of fluorescent channels. Furthermore, some of the fluorescent images that formed the basis of the data shown in FIG. 5 are shown directly in FIG. 6. In FIG. 6, the fluorescent images obtained when the target DNA concentration was 100, 10, and 1 aM are (a), (b), and (c), respectively. The left side and right side belong to separate diluted solution systems. Since the results of counting the right and left fluorescent images basically concur, the count in the quantifying method of the present invention is understood to be reproducible.

[0038]

[Effect of the Invention] The quantifying method of the present invention makes it possible to detect the fluorescence of the amplified DNA adequately even with a number of cycles that is permissible under ordinary PCR conditions. It therefore improves upon the lowering of the counting accuracy due to nonspecific DNA amplification in comparison to digital PCR and obtains reliable quantitative results.

[0039] The quantifying method of the present invention also suppresses nonspecific DNA amplification for the same reason as above and is therefore a simple quantitative method that does not require special methods or reagents.

[0040] Furthermore, the use of a capillary plate in the quantifying method of the present invention vastly increases the number of channels corresponding to the wells of the titer plate used in digital PCR. It typically has several tens of thousands or more in contrast to the several hundred of a titer plate and improves the DNA concentration range that can be analyzed (that is,

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4442

the number of quantifiable molecules of specimen nucleic acid). Moreover, this range makes it possible to decrease the size of the capillaries used, expand the total surface area of the capillary plate, or expand both of them. This means that the sample containing the specimen nucleic acid can be quantified in a single measurement without repeated dilution to various concentrations and quantification.

[0041] The quantifying method of the present invention is superior to digital PCR in terms of count accuracy and simplicity of procedure. It is very useful in quantification by detecting extremely trace levels of genes and other nucleic acids in a sample (particularly a biological sample) and counting the number of molecules. For example, it is possible to distinguish whether cells are normal or abnormal by counting the number of molecules of a specific gene expressed using the quantifying method of the present invention.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4443

[0042]

[Sequence listing]

<;110>; Hamamatsu Photonics K.K.

<;120>; Method for quantifying nucleic acid analyte and method for counting the molecular number of nucleic acid analyte

<;130>; P99HP-257

<;140>;

<;141>;

<;160>; 3

<;170>; PatentIn Ver. 2.1

<;210>; 1

<;211>; 50

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; PCR template

<;400>; 1

atggaaacct gtttgttgga tataaatacg tcgtagatgg gcacagtgtg

<;210>; 2

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; PCR primer

<;400>; 2

cacactgtgc ccatctacga

<;210>; 3

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; PCR primer

<;400>; 3

atggaaacct gtttgttgga

gga

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4444

[Brief Description of the Drawings]

FIG. 1 is (a) a partial, cut-away, oblique view of a capillary plate of the present invention, and (b) a schematic cross-sectional view of a capillary plate of the present invention;

FIG. 2 is (a) a cross-sectional drawing that schematically illustrates the capillary plate of the present invention housed in the chamber for PCR, and (b) a cross-sectional drawing that schematically illustrates placement of the chamber shown in (a) on top of the thermal cycler and performance of PCR;

FIG. 3 is a schematic drawing to explain the quantifying method of the present invention in a stepwise manner. In the drawing, (a) shows the step in which PCR solution is being dispensed into the channels of the capillary plate of the present invention. (b) shows the step in which the PCR solution is sealed in the channels. (c) shows the step in which the target DNA is amplified in several channels by PCR. (d) shows the step in which the fluorescence from the channels of the capillary plate is examined;

FIG. 4 is a fluorescent image (photograph) of a capillary plate taken in Working Example 1. In the drawing, (a) is a fluorescent image obtained from PCR of PCR solution containing target DNA. (b) is a fluorescent image obtained from PCR of PCR solution not containing target DNA;

FIG. 5 shows the test results of Working Example 2 and is a graph that plots the ratio of the number of fluorescent channels to the total number of channels versus the target DNA concentration. In the drawing, [1] is a plot of the measured values, and [2] is a plot of the values expected from the Poisson distribution; and

FIG. 6 is a fluorescent image (photograph) of a capillary plate obtained in Working Example 2. In the drawing, (a) is a fluorescent image obtained from PCR of PCR solution containing 100 aM of target DNA. (b) is a fluorescent image obtained from PCR of PCR solution containing 10 aM of target DNA. (c) is a fluorescent image obtained from PCR of PCR solution containing 1 aM of target DNA.

[Key]

1: Capillary plate

2: Channel

3: Silicone rubber plate

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4445

4: Cover glass

5: Chamber

6: Fixing screw

7: Aluminum block of thermal cycler

8: Target DNA molecule

9: Amplified DNA molecule

10: Fluorescent channel

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4446

FIG. 1

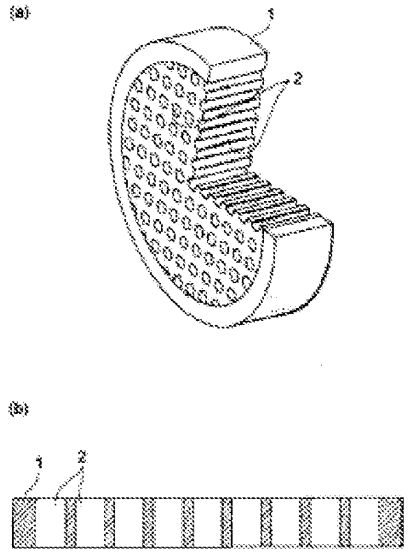
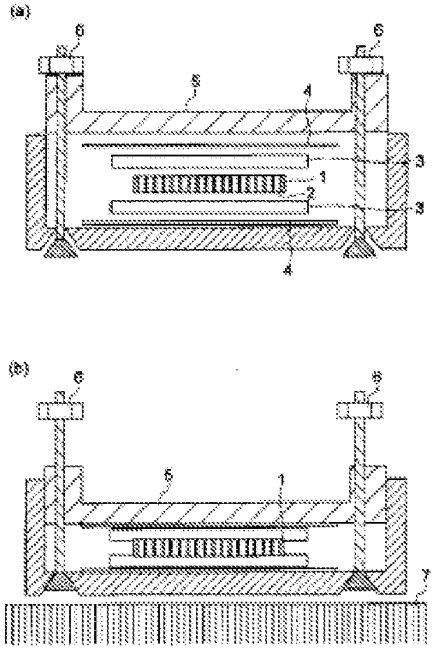


FIG. 2



Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4447

FIG. 3

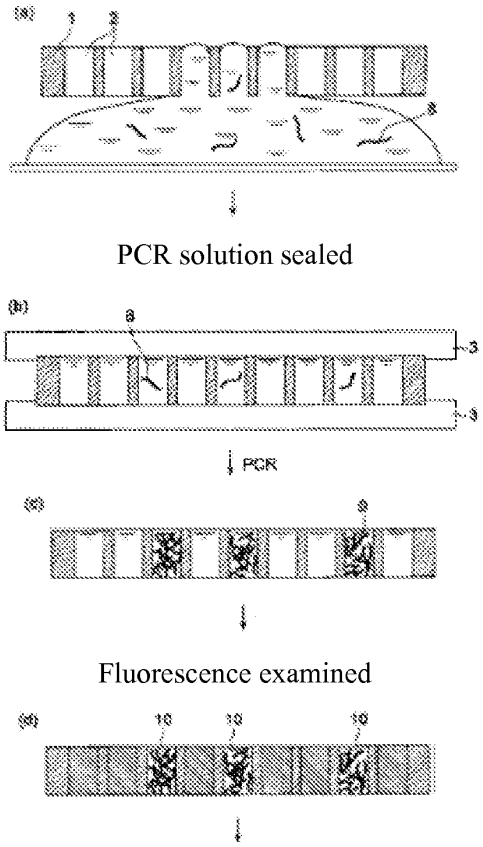
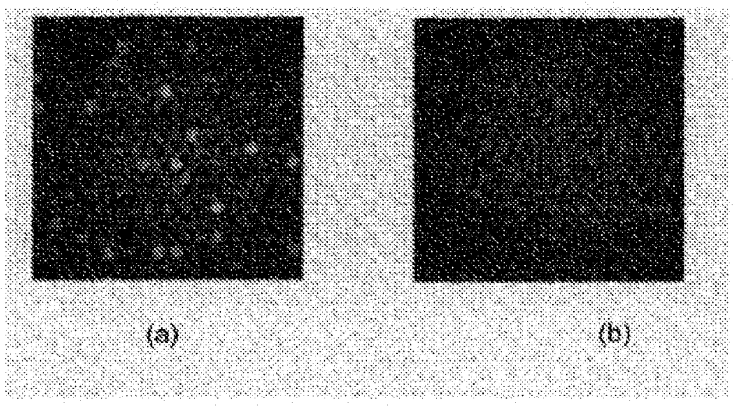


FIG. 4



Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4448

FIG. 5

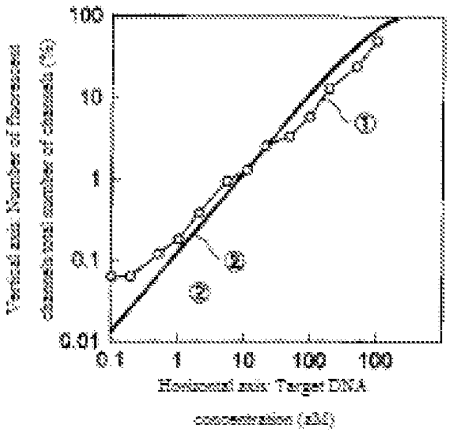
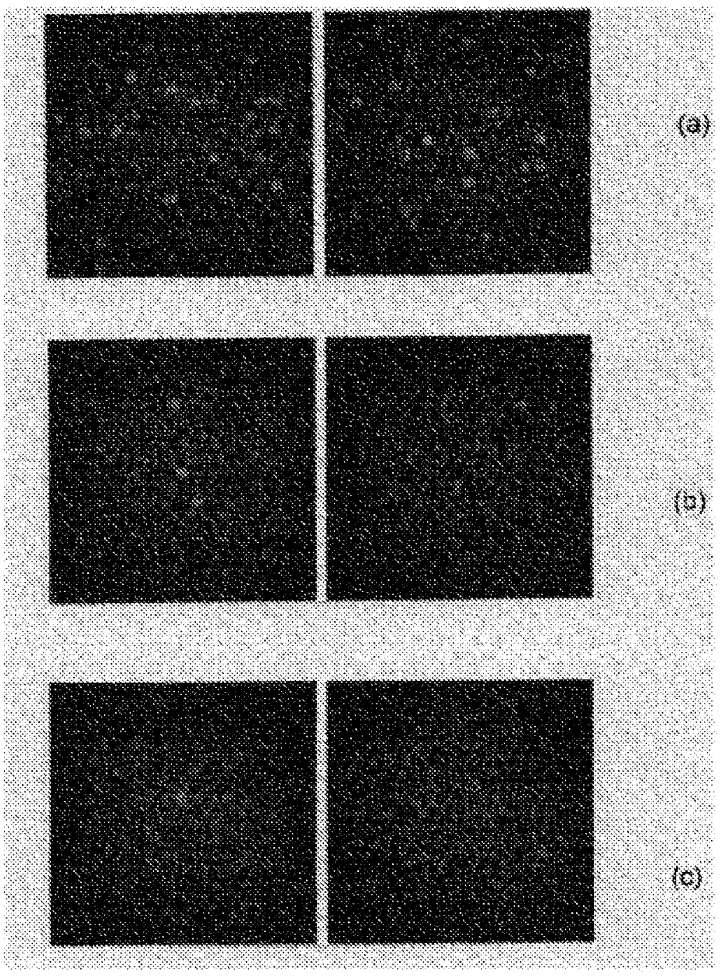


FIG. 6



Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4449

Continued from front page

F terms (reference)

2G045 AA40 BB60 DA12 DA13 DA14
FA11 FA16 FA19 FB12 GC15
JA01 JA07
4B063 QA01 QA18 QQ42 QR53 QR32
QR62 QR66 QS25 QS32 QX02

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4450

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) **公開特許公報（Ａ）**　(11)特許出願公開番号
特開2001－269196
（P2001－269196A）
(43)公開日　平成13年10月２日(2001.10.2)

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	ＦＩ		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ　1/68		Ｃ１２Ｑ　1/68	Ａ	２Ｇ０４５
Ｇ０１Ｎ　33/50		Ｇ０１Ｎ　33/50	Ｐ	４Ｂ０６３
33/58		33/58	Ａ	

審査請求　未請求　請求項の数７　ＯＬ　（全 11 頁）

(21)出願番号　特願2000－85048(P2000－85048)

(22)出願日　平成12年３月24日(2000.3.24)

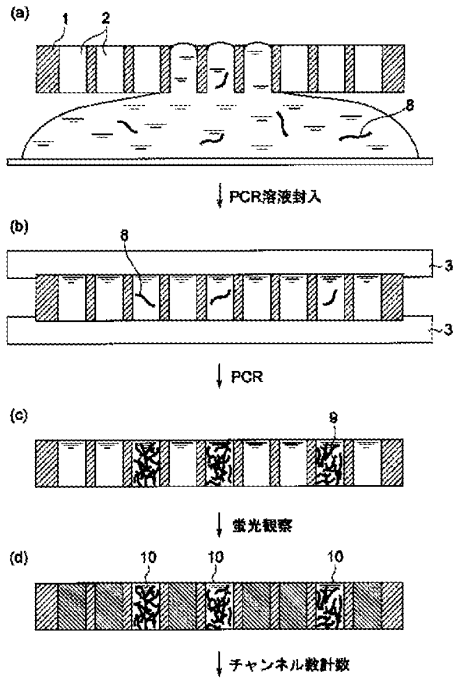
特許法第30条第１項適用申請有り　平成11年11月12日　バイオテクロノジー開発技術研究組合発行の「第17回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集」に発表

(71)出願人　000236436
浜松ホトニクス株式会社
静岡県浜松市市野町1126番地の１
(72)発明者　平野　憲一
静岡県浜松市市野町1126番地の１　浜松ホトニクス株式会社内
(72)発明者　深見　正
静岡県浜松市市野町1126番地の１　浜松ホトニクス株式会社内
(74)代理人　100088155
弁理士　長谷川　芳樹　（外２名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　被検体核酸の定量方法、および被検体核酸の分子数の計数方法

(57)【要約】
【課題】　試料中の微量な遺伝子やｍＲＮＡなどの被検体核酸を正確に定量する。
【解決手段】　被検体核酸に由来する標的ＤＮＡを含むＰＣＲ溶液をキャピラリープレートのチャンネル内に分注し、キャピラリープレートをそのままＰＣＲの温度サイクルで処理し、チャンネル内の標的ＤＮＡをＰＣＲにより増幅し、増幅された標的ＤＮＡが蛍光を発するチャンネルを画像解析により特定、計数することによって、最初に試料中に存在した被検体核酸の分子数を計数･定量する。



Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4451

【特許請求の範囲】
【請求項１】　被検体核酸の定量方法であって、試料からの被検体核酸に由来する標的ＤＮＡ、および蛍光試薬を含むＰＣＲ溶液を調製する第１の工程と、所定の数のチャンネルを備えたキャピラリープレートに前記ＰＣＲ溶液を載せる第２の工程と、前記キャピラリープレートの両面を弾力性のある透明な板で密閉し、前記ＰＣＲ溶液を前記各チャンネルに封入する第３の工程と、前記両面が密閉されたキャピラリープレートを予め設定した温度サイクルに曝し、前記被検体核酸に由来する標的ＤＮＡのＰＣＲを行わせる第４の工程と、前記両面が密閉されたキャピラリープレートを蛍光測定に供し、蛍光を発する蛍光性チャンネルの数を計数し、ここで前記蛍光性チャンネルは前記ＰＣＲによって増幅された被検体核酸に由来する標的ＤＮＡを含むチャンネルである第５の工程と、を含むことを特徴とする被検体核酸の定量方法。
【請求項２】　前記第５の工程に続いて、前記計数された蛍光性チャンネルの数に基づいて被検体核酸の濃度を求める工程を含むことを特徴とする、請求項１に記載の被検体核酸の定量方法。
【請求項３】　前記キャピラリープレートをタンパク質の吸着阻害剤で前処理する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項１に記載の被検体核酸の定量方法。
【請求項４】　前記蛍光試薬がマイナーグローブ結合型の蛍光色素からなることを特徴とする、請求項１に記載の被検体核酸の定量方法。
【請求項５】　前記蛍光試薬が蛍光エネルギー移動を利用した蛍光プローブオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする、請求項１に記載の被検体核酸の定量方法。
【請求項６】　前記弾力性のある透明な板がシリコンゴム製であることを特徴とする、請求項１に記載の被検体核酸の定量方法。
【請求項７】　被検体核酸の分子数の計数方法であって、試料からの被検体核酸に由来する標的ＤＮＡ、および蛍光試薬を含むＰＣＲ溶液を調製する第１の工程と、所定の数のチャンネルを備えたキャピラリープレートに前記ＰＣＲ溶液を載せる第２の工程と、前記キャピラリープレートの両面を弾力性のある透明な板で密閉し、前記ＰＣＲ溶液を前記各チャンネルに封入する第３の工程と、前記両面が密閉されたキャピラリープレートを予め設定した温度サイクルに曝し、前記被検体核酸に由来する標的ＤＮＡのＰＣＲを行わせる第４の工程と、前記両面が密閉されたキャピラリープレートを蛍光測定に供し、蛍光を発する蛍光性チャンネルの数を計数し、ここで該蛍光性チャンネルは前記ＰＣＲによって増幅された被検体核酸に由来する標的ＤＮＡを含むチャンネルである第５の工程と、を含むことを特徴とする被検体核酸の分子数の計数方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】本発明は、極微量で試料中に存在する遺伝子またはｍＲＮＡなどの核酸を定量する方法に関する。さらに詳しくは、本発明はＰＣＲに基づき、極微量で試料中に存在する遺伝子またはｍＲＮＡなどの核酸または該核酸に由来する標的ＤＮＡを増幅させて、もともと試料に存在した核酸の分子数を計数する方法、並びに該計数結果から核酸の濃度を定量する方法に関する。
【０００２】
【従来の技術】インビトロ核酸増幅技術は、少量の核酸の検出、および分析のための強力な手段を提供してきた。このような技術は、感染症および遺伝的疾患の診断、生化学的分析のための遺伝子の単離、並びに法医学における特定の核酸の検出のおいて格段の進歩をもたらした。現在、最も汎用性のある技術は、耐熱性ポリメラーゼ（Ｔａｑ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ）を用いたポリメラーゼ連鎖反応（Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ（以下ＰＣＲまたはＰＣＲ法という））であり、ＤＮＡ（断片）を理論的には１０億倍以上に増幅し得る。しかしながら、ＰＣＲにおける増幅効率および正確さは、処理温度、前記核酸の塩基配列、反応溶液成分の濃度や種類等の様々な要因によって左右され、測定対象である核酸分子の数（濃度）をＰＣＲ最終産物の濃度測定またはＰＣＲ過程におけるリアルタイム測定によって正確に決定することは、困難であった。
【０００３】このような状況下、微量な遺伝子を正確に定量する試みとして、最近「デジタルＰＣＲ」という技術が提案された。Ｂｅｒｔ Ｖｏｇｅｌｓｔｅｉｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９６巻，９２３６－９２４１頁を参照。この方法に従うと、定量すべき遺伝子試料をＰＣＲ溶液で限界希釈し、タイタープレートの穴（ウエル）に分注する。タイタープレート上で試料溶液のＰＣＲを行わせ、前記遺伝子に由来するＤＮＡを増幅した後、蛍光プローブ等を用いて、各穴の蛍光信号を計測し、増幅されたＤＮＡが蛍光を発する穴の数を計数する。前記限界希釈によって、各穴には１分子のＤＮＡが存在すると仮定してもよいので、蛍光を発する穴の数が試料中のＤＮＡ分子の数、すなわち試料中のｍＲＮＡ量に対応し、遺伝子を定量できることになる。この方法は、残念ながら以下に言及する幾つもの潜在的な問題を抱えている。
【０００４】タイタープレート上でＰＣＲを行わせ、ＤＮＡ増幅が検出できるまでにはＰＣＲのサイクルを６０回程度行う必要がある。しかしながら、ＰＣＲのサイクル回数が４０を超えると、目的のＰＣＲ増幅物以外のＰＣＲ産物が生成し、該増幅物を汚染する（以下、非特異的ＤＮＡ増幅という）ことが当業者に認識されている。これには、２つの原因が考えられる。その１つは、偶然にＰＣＲ溶液中に混入した微量のＤＮＡがＰＣＲによって増幅されることで、一般に「キャリーオーバー」と呼

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4452

ばれる。この現象はＰＣＲ溶液中の標的ＤＮＡの濃度が低くなれば、より顕著になる。他の１つは、プライマー同士が二本鎖を形成し、これが鋳型となり、ＰＣＲによって増幅されることで、非特異的増幅産物をもたらす。これを避けるために、サイクル数は、一般的に４０回以上としないことが当業者に了解されている。いずれにしろ、前記デジタルＰＣＲ法は、６０回以上のサイクル数を必要とするので、目的のＰＣＲ増幅物と所望でない混在ＰＣＲ増幅物との区別がつきにくくなり、正確なＤＮＡの定量は、当然難しくなる。このような非特異的ＤＮＡ増幅を回避するには、幾つかの対処策が既に知られているが、いずれも煩雑な操作または高価な試薬が要求される。例えば、１）ＤＮＡ合成の基質として用いる塩基の一つｄＴＴＰの替わりにｄＵＴＰを加えてＤＮＡ合成を行い、次のＰＣＲにおいてＤＮＡに取り込まれたｄＵＴＰの部分を切断する酵素を加える方法、２）異なるプライマー対を２種類用いて２段階のＰＣＲを行う方法、３）増幅するＤＮＡ中の適当な塩基配列を特異的に切断する制限酵素をＰＣＲ高温処理前の溶液に加えてキャリーオーバーＤＮＡを除去する方法等が公知である。

【０００５】さらに、デジタルＰＣＲ法では、限界希釈を得るために種々の倍率に希釈して、例えばタイタープレートの穴の総数の半分にＤＮＡ分子が含まれるように条件設定しなくてはならない。

【０００６】また、デジタルＰＣＲ法では、タイタープレートの穴の総数の半分にＤＮＡ分子が含まれるように限界希釈した場合、ポアソン分布から、１つの穴にＤＮＡ分子が２分子入る確率が１２％、３分子入る確率が３％、と無視できない。このため、計数した穴の数とＤＮＡ分子の数が一致せず、評価にぶれがでて、定量の信頼性が薄れる。

【０００７】

【発明が解決しようとする課題】以上のようなデジタルＰＣＲ法の問題点に鑑み、試料中の微量な遺伝子やｍＲＮＡなどの核酸の分子数を正確に決定（すなわち、計数する）し、核酸の濃度を含めて定量するためにデジタルＰＣＲ法にかわる方法が望まれる。従って、本発明は、デジタルＰＣＲ法の問題点を解決し、簡便かつ正確に試料中の被検体核酸を定量する方法、または被検体核酸の分子数の計数方法を提供することを目的とする。

【０００８】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明に従えば、被検体核酸の定量方法であって、試料からの被検体核酸に由来する標的ＤＮＡ、および蛍光試薬を含むＰＣＲ溶液を調製する第１の工程と、所定の数のチャンネルを備えたキャピラリープレートに前記ＰＣＲ溶液を載せる第２の工程と、前記キャピラリープレートの両面を弾力性のある透明な板で密閉し、前記ＰＣＲ溶液を前記各チャンネルに封入する第３の工程と、前記両面が密閉されたキャピラリープレートを予め設定した温度サイクルに曝し、前記被検体核酸に由来する標的ＤＮＡのＰＣＲを行わせる第４の工程と、前記両面が密閉されたキャピラリープレートを蛍光測定に供し、蛍光を発する蛍光性チャンネルの数を計数し、ここで該蛍光性チャンネルは前記ＰＣＲによって増幅された被検体核酸に由来する標的ＤＮＡを含むチャンネルである第５の工程と、を含むことを特徴とする被検体核酸の定量方法が提供される。

【０００９】また、本発明は、前記第５の工程に続いて、前記計数された蛍光性チャンネルの数に基づいて被検体核酸の濃度を求める工程を含むことを特徴とする上記被検体核酸の定量方法を提供する。

【００１０】また、本発明は、キャピラリープレートをタンパク質の吸着阻害剤で前処理する工程をさらに含むことを特徴とする上記被検体核酸の定量方法を提供する。

【００１１】好ましくは、上記被検体核酸の定量方法において、蛍光試薬がマイナーグローブ結合型の蛍光色素、または蛍光エネルギー移動を利用した蛍光プローブオリゴヌクレオチドからなる。

【００１２】また、好ましくは、上記被検体核酸の定量方法において、キャピラリープレートの両面を密閉する弾力性のある透明な板がシリコンゴム製である。

【００１３】さらに、本発明の別の側面によれば、被検体核酸の分子数の計数方法であって、試料からの被検体核酸に由来する標的ＤＮＡ、および蛍光試薬を含むＰＣＲ溶液を調製する第１の工程と、所定の数のチャンネルを備えたキャピラリープレートに前記ＰＣＲ溶液を載せる第２の工程と、前記キャピラリープレートの両面を弾力性のある透明な板で密閉し、前記ＰＣＲ溶液を前記各チャンネルに封入する第３の工程と、前記両面が密閉されたキャピラリープレートを予め設定した温度サイクルに曝し、前記被検体核酸に由来する標的ＤＮＡのＰＣＲを行わせる第４の工程と、前記両面が密閉されたキャピラリープレートを蛍光測定に供し、蛍光を発する蛍光性チャンネルの数を計数し、ここで該蛍光性チャンネルは前記ＰＣＲによって増幅された被検体核酸に由来する標的ＤＮＡを含むチャンネルである第５の工程と、を含むことを特徴とする被検体核酸の分子数の計数方法が提供される。

【００１４】以下、本発明を好適な実施の形態に従って、詳細に説明する。

【００１５】

【発明の実施の形態】本発明の主要な側面は、被検体核酸の分子数または濃度の定量方法であって、試料からの被検体核酸に由来する標的ＤＮＡ、および蛍光試薬を含むＰＣＲ溶液を調製する第１の工程と、所定の数のチャンネルを備えたキャピラリープレートに前記ＰＣＲ溶液を載せる第２の工程と、前記キャピラリープレートの両面を弾力性のある透明な板で密閉し、前記ＰＣＲ溶液を前記各チャンネルに封入する第３の工程と、前記両面が

密閉されたキャピラリープレートを予め設定した温度サイクルに曝し、前記被検体核酸に由来する標的ＤＮＡのＰＣＲを行わせる第４の工程と、前記両面が密閉されたキャピラリープレートを蛍光測定に供し、蛍光を発する蛍光性チャンネルの数を計数し、ここで前記蛍光性チャンネルは前記ＰＣＲによって増幅された被検体核酸に由来する標的ＤＮＡを含むチャンネルである第５の工程と、を含むことを特徴とする被検体核酸の定量方法である。

【００１６】従って、本発明の被検体核酸の定量方法の骨子は、被検体核酸に由来する標的ＤＮＡを含むＰＣＲ溶液をキャピラリープレートのチャンネル内に封入し、前記標的ＤＮＡをＰＣＲにより増幅し、増幅された標的ＤＮＡが発する蛍光を検出、解析することにより、最初に試料中に存在した被検体核酸の分子数を計数することにある。そこで、以下、「本発明の定量方法」とは、本発明に従う、被検体核酸の濃度の定量方法および被検体核酸の分子数の計数方法を含み、それら両方またはいずれかの意味で用いる。

【００１７】本明細書中で用いる「被検体核酸」とは、ＤＮＡまたはＲＮＡ（ｍＲＮＡを含む）を包含し、１本鎖または２本鎖のいずれであってもよいが、本発明の定量方法を適用するためには、被検体核酸自身、或いはそれに由来する標的ＤＮＡ（後述）の塩基配列が少なくともＰＣＲ可能な程度に知られている必要がある。また、被検体核酸は必ずしも純粋な形態である必要はなく、複雑な混合物のごく一部のフラクション（例えば、β－グロブリン遺伝子の一部）であってもよい。さらに、被検体核酸は、天然または人工的に合成されたもの等いかなる起源のものであってもよいが、本発明の応用分野を鑑みて、血液、細胞、組織、微生物またはウイルスから抽出されたＤＮＡまたはＲＮＡであることが好ましい。本明細書中で用いる「試料」とは、このような被検体核酸が含まれる試料を指し、これも特に限定はない。しかし、前記と同様の理由から、生体試料（特に、臨床検体および細胞診検体）が好適に本発明の定量方法において、用いられる。臨床検体としては、尿、糞便、喀痰、血液等が挙げられる。細胞診検体としては、液状の胸水、腹水等の体腔液および針窄刺吸引等の生検手法で得られる腫瘍細胞等が挙げられる。通常、これらの検体から被検体核酸（ＤＮＡ）を得るには、検体を前処理して、核酸を抽出する。前処理方法は、検体の種類により、異なっており、各検体について、確立された処理方法を適用すればよい。核酸の抽出方法としては、フェノール･クロロホルム法およびグアニジンチオシアン酸法等が公知である。一方、被検体核酸がＲＮＡである場合、ＲＮＡ自身は、ＰＣＲの基質とはなりえない。しかし、逆転写酵素によって、ＲＮＡからｃＤＮＡを合成することによりＰＣＲをＲＮＡの解析に応用することが可能である。従って、前記逆転写酵素反応をＰＣＲと組み合わせることにより、被検体核酸がＲＮＡであっても本発明の定量方法が適用できる。特に、検体がＲＮＡウイルス（ＨＩＶ、ＨＣＶ、ハンターウイルス等）を含むときがこのような場合にあたる。ＲＮＡウイルスは、染色体としてＤＮＡではなく、ＲＮＡを有しているからである。また、被検体核酸として、ＤＮＡが解析の対象となり得るときでも、該ＤＮＡの代わりにｍＲＮＡを被検体核酸とすると、ｍＲＮＡはＤＮＡに比べて細胞あたりのコピー数が多い場合があり、感度の点でｍＲＮＡを解析するほうがＤＮＡを解析するより有利となる。従って、本明細書中で用いる「被検体核酸に由来する標的ＤＮＡ」とは、ＰＣＲによって増幅されるＤＮＡであり、被検体核酸がＤＮＡの場合、該ＤＮＡを指し、被検体核酸をＲＮＡ（ｍＲＮＡ）とするとそれから得られるＤＮＡ（ｃＤＮＡ）を指す。

【００１８】前記逆転写酵素反応は、常法にしたがい容易に実施できる。例えば、試料に対して、市販の標準的なｃＤＮＡ合成キット（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製Ｔｉｍｅ　Ｓａｖｅｒ　ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｋｉｔ）を作用させ、ｍＲＮＡからｃＤＮＡを合成する。また、逆転写酵素反応での逆転写酵素の至適ｐＨ（８．３付近）は、ＰＣＲの緩衝液のｐＨ（例えば、８．４～８．８）と近く、さらに両反応で要求されるＭｇ$^{2+}$も共通である。そこで、逆転写酵素反応後、緩衝液を置き換えずそのままＰＣＲで使用する緩衝液で希釈することで、ＰＣＲに適した緩衝液条件を得ることができる。従って、逆転写によって合成されたｃＤＮＡを直接ＰＣＲにより増幅に供することが可能である。尚、この場合、通常のＰＣＲにおいて、２本鎖ＤＮＡを変性させて、１本鎖ＤＮＡとしてからＰＣＲを実施するのと同様に、ｍＲＮＡ－ｃＤＮＡ２本鎖を変性させて、１本鎖ｃＤＮＡとする。この時、同時に使用した逆転写酵素も失活する。

【００１９】本発明の定量方法に含まれる第１の工程は、被検体核酸に由来する標的ＤＮＡ（１本鎖）、および蛍光試薬を含むＰＣＲ溶液を調製することからなる。具体的には、前記標的ＤＮＡ、ＰＣＲ緩衝液（プライマー、ｄＮＴＰ、ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ等からなる）、および蛍光試薬を混合して、ＰＣＲ溶液を調製する。ここで用いるプライマーは、標的ＤＮＡの５'側と３'側での２種類のプライマーを常法に従って合成したものである。プライマーの設計に関しては、ＧＥＮＥＴＹＸ（ソフトウェア開発）等の市販のソフトウェアを利用することができる。

【００２０】蛍光試薬は、増幅された標的ＤＮＡを検出する目的で使用するものであり、増幅されたＤＮＡ量に比例して、その蛍光強度が増加する性質を有する必要がある。本発明では、好ましくは、マイナーグルーブ結合型のＤＮＡ特異的蛍光色素を蛍光試薬として使用する。この型の蛍光色素は、ＤＮＡ鎖のマイナーグルーブに結

合するので、増幅ＤＮＡにその量に比例して取り込まれる。ＤＮＡが存在しないとき、蛍光色素自身は弱い蛍光しか発しない。このようなマイナーグルーブ結合型の蛍光色素の代表的なものとして、Ｈｏｅｃｈｓｔ３３２５８およびＨｏｅｃｈｓｔ３３３４２が挙げられる。

【００２１】また、蛍光エネルギー移動を利用した蛍光プローブも蛍光試薬として本発明の定量方法に使用可能である。このようなプローブは、供与体色素および受容体色素として働く２種類の蛍光色素の対を、または１種類の蛍光色素とその蛍光を消光する色素の対を結合させたオリゴヌクレオチドであり、ＰＣＲ進行に伴って生じる、プローブのハイブリダイゼーションや分解により蛍光エネルギー移動が解消される結果、供与体色素の蛍光強度が増加するため、蛍光測定からＤＮＡ増幅を推定することができる。

【００２２】本発明の定量方法に含まれる第２の工程は、所定の数のチャンネルを備えたキャピラリープレートに前記ＰＣＲ溶液を載せることからなる。ここで使用されるキャピラリープレートは、ガラス製またはシリコン製の材料から構成されるものが好ましい。図１ａおよび図１ｂに、本発明で使用されるキャピラリープレート１の一例を示す。典型的なものは、外径数～数十ｍｍであり、直径数～２００μｍ程度かつ深さ（厚さ）０．５～数ｍｍの円筒状のカラム（チャンネル２ともいう）を所定の数（数千～数百万で任意に選択できる）を備える。キャピラリープレート１にＰＣＲ溶液を載せるには、ＰＣＲ溶液を、キャピラリープレート１の片側（底面）に接触させる。すると毛細管現象によりＰＣＲ溶液が、各チャンネル２に注入される。この注入段階の様子は、図３（ａ）（後述）に模式的に示される。別法として、キャピラリプレートの上面からピペット操作によりＰＣＲ溶液をチャンネル内に注入してもよい。

【００２３】本発明の定量方法に含まれる第３の工程は、前記キャピラリープレートの両面を弾力性のある透明な板で密閉し、前記ＰＣＲ溶液を前記各チャンネル内に封入することからなる。ここでは、図２ａに示すように、前記第２の工程でキャピラリープレート１の各チャンネル２にＰＣＲ溶液が注入されたままの状態で、キャピラリープレート１の両面を弾力性のある透明な板（例えば、シリコンゴム板３）で密閉する。キャピラリープレート１が密閉されると、ＰＣＲ溶液が各チャンネル２内に封入され、チャンネル間でＰＣＲ溶液の移動は起こらない。この後、シリコンゴム板３の外側をカバーガラス４で覆う。

【００２４】本発明の定量方法に含まれる第４の工程は、前記両面が密閉されたキャピラリープレートを予め設定した温度サイクルに曝し、前記標的ＤＮＡのＰＣＲを行わせることからなる。この工程は、通常のＰＣＲと同様にして実施される。図２ａさらに図２ｂを参照。まず、前記第３の工程で、両面が密閉され、さらにカバーガラス４で覆われたキャピラリープレート１をＰＣＲ用に設計されたチェンバー５内に収納する。チェンバー５の外枠は熱伝導性の高い材料、例えば、無酸素銅またはアルミ合金板で作られており、チェンバー５自体がヒートブロックとして、直接加熱／冷却される。キャピラリープレート１をチェンバー５内に載置した後、固定ネジ６を締めてキャピラリープレート１を固定する（図２ｂ）。チェンバー５をそのままの状態で、市販のサーマルサイクラーのアルミブロック７上に載置する。サーマルサイクラーでの各サイクルの温度、反応時間およびサイクル数を設定し、ＰＣＲを実施する。本発明で採用される温度サイクルは、通常のＰＣＲの温度サイクルと特に、異ならない。本発明の定量方法も増幅反応自体は、通常のＰＣＲとなんら異ならないので、デジタルＰＣＲ法の項で説明した、交雑ＤＮＡからくる「キャリーオーバー」を出来るだけ少なくし、非特異的ＤＮＡ増幅（バックグランド）を抑えることが好ましい。このための、様々な措置、工夫については、当業者に認識されているとおりである。このようにして、標的ＤＮＡを鋳型としてＰＣＲが行われ、該ＤＮＡが増幅されることとなる。

【００２５】しかし、前記のＰＣＲ反応溶液をそのままキャピラリープレートのチャンネルに封入して、ＰＣＲを試みると、ＰＣＲが進行しないことがある。これは、チャンネルの内壁にＤＮＡポリメラーゼが吸着されて、ＰＣＲに悪影響を及ぼすためである。このようなタンパク質の吸着現象は、他の反応容器を使用しても起こり得るが、キャピラリープレートの場合、反応容器の全表面積が非常に大きくなるため、特に顕著である。そこで本発明の好適な１つの実施の形態では、たんぱく質吸着阻害作用を有する物質（タンパク質吸着阻害剤という）でキャピラリープレートをＰＣＲに先立って処理し、前記吸着現象を防止する。タンパク質吸着阻害剤による前処理工程は、前記第２の工程の前に実施される。別法では、タンパク質吸着阻害剤を前記ＰＣＲ溶液に混入してＰＣＲを行ってもよい。この場合、タンパク質吸着阻害剤は、ＤＮＡポリメラーゼ濃度に対して、過剰であることが好ましい。タンパク質吸着阻害剤の一例として、ウシ血清アルブミンが例示される。その適当な濃度は、約０．０１～約０．１％である。

【００２６】本発明の定量方法に含まれる第５の工程は、両面が密閉されたキャピラリープレートを蛍光測定に供し、蛍光を発する蛍光性チャンネルの数を計数することからなる。ここで、前記蛍光性チャンネルは前記ＰＣＲによって増幅された被検体核酸に由来する標的ＤＮＡを含むチャンネルである。具体的には、前記第４の工程の後、チェンバー５からキャピラリープレート１を取り出し、カバーガラス４を取り付けたまま、蛍光顕微鏡下、キャピラリープレートの表面を観察する。本発明に使用される蛍光顕微鏡は、励起光源、励起光波長選択フィルター（Ｈｏｅｃｈｓｔ３３２５８の場合は、紫外線

透過フイルター）、蛍光波長選択フイルター等を備えた市販の製品でよい。さらに、キャピラリープレートの表面の蛍光像を高感度カメラ（II-CCDカメラ）で撮像し、得られた画像を画像処理システムで解析する。このようにして、蛍光試薬からの蛍光信号をキャピラリープレートの各チャンネル毎に計測することが可能である。画像処理に際して、適当な閾値を設定し、それ以下のバックグランド蛍光信号をフィルターで除去する。すると蛍光信号の変化した（すなわち、蛍光を発する蛍光性チャンネル）チャンネルのみが特定される。このような蛍光性チャンネルの数を計数するには、画像処理された蛍光画像上で輝度の高いチャンネル数を目視により計数する。或いは、画像処理システム内で蛍光信号に基づき、マイクロコンピューターに処理させ、自動的に計数するようにしてもよい。いずれにしろ、これら一連の蛍光信号のプロセシングは、公知技術の組み合わせによって、実行され得る。

【００２７】前記蛍光性チャンネルは、ＰＣＲによって増幅された標的ＤＮＡを含む。これは、該チャンネル内に前記第３の工程で封入されたＰＣＲ溶液が、被検体核酸に由来する標的ＤＮＡ分子を含むからである。その標的ＤＮＡ分子が前記第４の工程で増幅され、増幅されたＤＮＡが蛍光試薬により蛍光を発するのでチャンネルの蛍光信号がＰＣＲ前と比べると変化する。一方、チャンネル内のＰＣＲ溶液が標的ＤＮＡ分子を含まないとき、ＰＣＲによって増幅ＤＮＡは生じない。チャンネルの蛍光信号は、ＰＣＲ前と変化はなく、これは、後述の実施例における実験からも確かめられた。従って、蛍光性チャンネルを特定し、キャピラリープレート上でその総数を計数することによって、標的ＤＮＡ分子がＰＣＲ以前に存在したチャンネル数を決定できる。

【００２８】キャピラリプレートを構成するチャンネルの総数に対して、ＰＣＲ前の標的ＤＮＡ分子の数が充分に少ない条件下において、標的ＤＮＡを含むチャンネル

ＰＣＲ溶液	
標的ＤＮＡ	１００ａＭ
５’プライマー	１μＭ
３’プライマー	１μＭ
Mg_2Cl	６ｍＭ
ＢＳＡ	０．１％
各ｄＮＴＰ	０．５ｍＭ
Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３２５８	１μＭ
Ｔａｑ 抗体	０．０５６μＭ
Ｔａｑ ＤＮＡ ポリメラーゼ	０．０２ ｕｎｉｔ／μｌ
Ｔａｑ ＤＮＡ ポリメラーゼ用緩衝液１０倍溶液	２５μｌ
蒸留水	残部
全液量	２５０μｌ

直径０．０５ｍｍ、深さ１ｍｍのチャンネル（約１０万個、容積約２ｎｌ）を備える外径２５ｍｍのキャピラリープレートを用いて、上記ＰＣＲ溶液を毛細管現象により各チャンネルに分注した。キャピラリープレートの両面を透明なシリコンゴム板で密封し、さらに外側をカバーガラスで覆った［図２（ａ）］。このキャピラリープ

では、ほとんどのチャンネル内の標的ＤＮＡ分子の数は１分子であると、ポアソン分布から仮定することができる。従って、このような標的ＤＮＡの濃度が充分に低い場合、蛍光性チャンネルの数が標的ＤＮＡの分子の数に相当することになる。

【００２９】この仮定も、後述の実施例における実験において、実測値がポアソン分布からの期待値にほぼ一致することから支持される。以上のように、本発明の定量方法に従えば、蛍光性チャンネルの総数を計数することによって、ＰＣＲ溶液中の標的ＤＮＡの分子数を計数し、さらには試料中の被検体核酸の分子数を決定することが可能になる。所望ならば、このようにして決定された分子数とチャンネルの容積に基づいて標的ＤＮＡ（従って、被検体核酸）の濃度を求めることもできる。

【００３０】以上詳述してきた本発明の定量方法を上記第１ないし第４の工程に相当する段階毎に、模式的に説明したものが第３図である。本発明の定量方法に従う、一連の手順は、上記の説明とこの図を参照して、当業者に容易に理解されうる。

【００３１】以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって制限されるものではない。

【００３２】

【実施例】（実施例１）下記の組成を有するＰＣＲ溶液を調製した。本例で使用した標的ＤＮＡ（鋳型ＤＮＡに対応）、５’プライマー、および３’プライマーは、それぞれ次の塩基配列を有する。これらＤＮＡは、受託ＤＮＡ合成業者（ベックス株式会社）より入手した。

標的ＤＮＡ： 5’-ATGGAAACCTGTTTGTTGGATATAAATACGTCGTAGATGGGCACAGTGTG-3’(配列表の配列番号１に記載)

５’プライマー: 5’-CACACTGTGCCCATCTACGA-3’(配列表の配列番号２に記載)

３’プライマー： 5’-ATGGAAACCTGTTTGTTGGA-3’(配列表の配列番号３に記載)

レートをチェンバー内に収納し、チェンバーをサーマルサイクラー（パーキンエルマー社、DNA Thermal Cycler 488）のアルミブロック上に載置した［図2（ｂ）］。

【００３３】サーマルサイクラーでの各サイクルの温度、反応時間およびサイクル数を次のように設定し、ＰＣＲを実施した。すなわち、９５℃3分間の前処理を1回行い、次に９５℃で2分、次に４５℃で2分間反応させることとし、これを４０サイクル繰り返した。さらに、６８℃で5分間、保持し、室温まで放置しＰＣＲを終了した。

【００３４】ＰＣＲ終了後、チェンバーからキャピラリープレートを取り出し、シリコンゴム板およびカバーガラスを取り付けたまま、倒立蛍光顕微鏡下（オリンパス製ＩＸ70、対物レンズ：１０倍）、その表面を観察した。表面の蛍光像を高感度カメラ、ＩＩ－ＣＣＤカメラ（浜松ホトニクス製 ARGUS500）で撮像し、得られた蛍光画像を画像処理システムで記録した。この画像を図4（ａ）に示す。

【００３５】また、標的ＤＮＡを含ませず、それ以外は上記のＰＣＲ溶液と全く同一の組成で、新たなＰＣＲ溶液を調製し、対照試験を行った。得られた画像を図4（ｂ）に示す。

【００３６】図4（ａ）の蛍光画像と図4（ｂ）の蛍光画像とを比較すると、前者の画像は、明らかに輝度の高い（蛍光性）チャンネルを数十含み、これらのチャンネルが輝度の低いチャンネルの間に散在する様子を示している。一方、後者の画像は、すべてのチャンネルにわたって、暗く、輝度の高いチャンネルは、1つも存在しないことを示している。蛍光性チャンネルは、その中で標的ＤＮＡ分子が増幅されたために輝度が増したものであり、該チャンネルにＰＣＲ以前に標的ＤＮＡ分子が存在していたことが分かる。上記ＰＣＲ条件で採用された４０サイクルというサイクル数でも、ＤＮＡ増幅が充分に起こり、検出可能であった。また、前記対照試験の結果から、このＰＣＲ条件では、非特異的ＤＮＡ増幅が全く起こらないことが明らかとなった。

【００３７】（実施例２）実施例1で使用したＰＣＲ溶液において、標的ＤＮＡの濃度（１００ａＭ）を種々変化させて、それ以外の組成は同一のＰＣＲ溶液を調製した。これらのＰＣＲ溶液を実施例1と同様に、ＰＣＲに供し、それぞれの濃度について、蛍光画像を求め、蛍光性チャンネルを計数した。キャピラリープレートの総チャンネル数に対する得られた蛍光性チャンネル数の割合を求め、各標的ＤＮＡの濃度に対してプロットしたのが図5である。図5中、曲線①は、このようにして得られた実測値の割合（蛍光チャンネル数：総チャンネル数）をプロットしたものであり、曲線②は、ポアソン分布からの期待値のプロットである。まず、曲線①は標的ＤＮＡの濃度に比例して、蛍光性チャンネルの数が増加することを示している。また、両曲線の近似は、本例で使用したＰＣＲ溶液がポアソン分布に従うことを示唆している。すなわち、標的ＤＮＡの濃度が低い領域では（例えば、前記期待値が０．１以下）、蛍光性チャンネルのほとんどで、標的ＤＮＡが1分子のみ存在することになる。その1分子がＰＣＲによって増幅され、それが含まれるチャンネルが蛍光を発する。これらの事実と、実施例1の結果と合わせて、蛍光性チャンネルの数からＰＣＲ溶液中の標的ＤＮＡの分子数が正確に推定できることが分かる。なお、図5に示したデータの基になる一部の蛍光画像は、図6に直接示される。図中、標的ＤＮＡの濃度が１００、１０、１ａＭのときの蛍光画像がそれぞれ（ａ）（ｂ）（ｃ）であり、左側と右側は、別個の溶液を希釈した系に属するものである。左右の蛍光画像からの計数結果がほぼ一致することから、本発明の定量方法での計数は、再現性があることが分かる。

【００３８】

【発明の効果】本発明の定量方法は、通常のＰＣＲ条件として、許容されるサイクル数でも増幅されたＤＮＡが充分に蛍光検出できるので、デジタルＰＣＲ法と比較して、非特異的ＤＮＡ増幅による計数精度の低下が改善され、信頼性のある定量結果が得られる。

【００３９】また、本発明の定量方法は、同様の理由から、非特異的ＤＮＡ増幅を抑制するための特別な手法または試薬を必要とせず、簡便な定量方法である。

【００４０】さらに、本発明の定量方法では、キャピラリープレートの使用によって、デジタルＰＣＲ法で採用するタイタープレートのウエルに対応するチャンネルの数が飛躍的に増大する。典型的には、タイタープレートの数百に対して、数万以上に上り、解析できるＤＮＡ濃度範囲（すなわち、定量可能な被検体核酸の分子数）が１００倍以上に向上する。しかも、この範囲は、使用するキャピラリーのサイズを小さくするか、またはキャピラリープレートの総面積を拡大する、或いはそれらの両方でさらに広げ得る。これは被検体核酸を含む試料を、様々な濃度に希釈して定量を繰り返すことなく、単一の測定で定量が可能であることを意味する。

【００４１】本発明の定量方法は、デジタルＰＣＲ法より、計数精度および操作の簡便性が優れており、試料（特に、生体試料）中の極微量の遺伝子その他核酸を検出し、その分子数を計数して、定量するのに非常に有用である。例えば、本発明の定量方法を用いて、特定の遺伝子の発現分子数を計数することにより、細胞が正常か或いは異常か識別可能となる。

【００４２】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<;110>; Hamamatsu Photonics K.K.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4457

<;120>; Method for quantifying nucleic acid analyte and method
for counting the molecular number of nucleic acid
analyte
<;130>; P99HP-257
<;140>;
<;141>;
<;160>; 3
<;170>; PatentIn Ver. 2.1
<;210>; 1
<;211>; 50
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; PCR template
<;400>; 1
atggaaacct gtttgttgga tataaatacg tcgtagatgg gcacagtgtg 50
<;210>; 2
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; PCR primer
<;400>; 2
cacactgtgc ccatctacga 20
<;210>; 3
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; PCR primer
<;400>; 3
atggaaacct gtttgttgga 20
gga

【図面の簡単な説明】

【図１】（ａ）は、本発明に係るキャピラリープレートの部分切除斜視図である。（ｂ）は、本発明に係るキャピラリープレートの模式的断面図である。

【図２】（ａ）は、本発明に係るキャピラリープレートがＰＣＲ用のチェンバーに収容された様子を模式的に示す断面図である。（ｂ）は、（ａ）に示したチェンバーがサーマルサイクラー上に載置され、ＰＣＲが実施される様子を模式的に示す断面図である。

【図３】図３は、本発明の定量方法を、段階毎に説明するための模式図である。図中、（ａ）は、ＰＣＲ溶液が本発明に係るキャピラリープレートのチャンネルに分注されつつある段階を示し、（ｂ）は、ＰＣＲ溶液をチャンネルに封入する段階を示し、（ｃ）は、ＰＣＲによって、いくつかのチャンネルで標的ＤＮＡの増幅が起こっている段階を示し、（ｄ）は、キャピラリープレートのチャンネルからの蛍光を観察する段階を示す。

【図４】図４は、実施例１で得られた、キャピラリープレートの蛍光画像（写真）である。図中、（ａ）は、標的ＤＮＡを含むＰＣＲ溶液のＰＣＲから得られた蛍光画像であり、（ｂ）は、標的ＤＮＡを含まないＰＣＲ溶液のＰＣＲから得られた蛍光画像である。

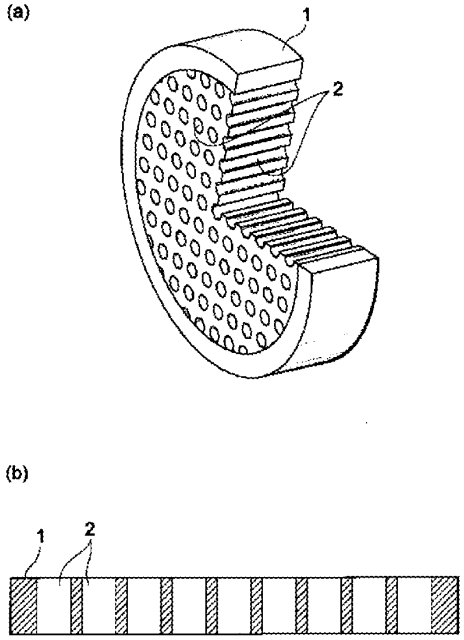
【図５】図５は、実施例２の試験結果を示し、標的ＤＮＡの濃度に対して、蛍光性チャンネル数の総チャンネル数に対する割合をプロットしたグラフである。図中、①は実測値のプロットであり、②はポアソン分布からの期待値のプロットである。

【図６】図６は、実施例２で得られた、キャピラリープレートの蛍光画像（写真）である。図中、（ａ）は、濃度１００ａＭの標的ＤＮＡを含むＰＣＲ溶液のＰＣＲから得られた蛍光画像であり、（ｂ）は、濃度１０ａＭの標的ＤＮＡを含むＰＣＲ溶液のＰＣＲから得られた蛍光画像であり、（ｃ）は、濃度１ａＭの標的ＤＮＡを含むＰＣＲ溶液のＰＣＲから得られた蛍光画像である。

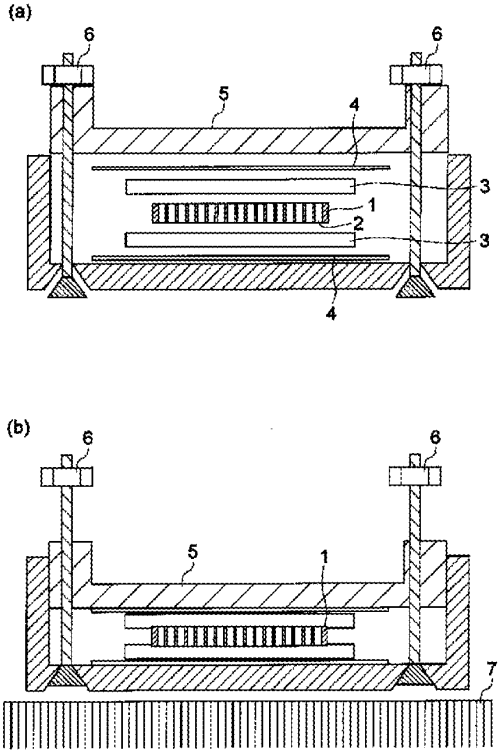
Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4458

【符号の説明】
1…キャピラリープレート、2…チャンネル、3…シリコンゴム板、4…カバーグラス、5…チェンバー、6…固定ネジ、7…サーマルサイクラーのアルミブロック、8…標的DNA分子、9…増幅されたDNA分子、10…蛍光性チャンネル

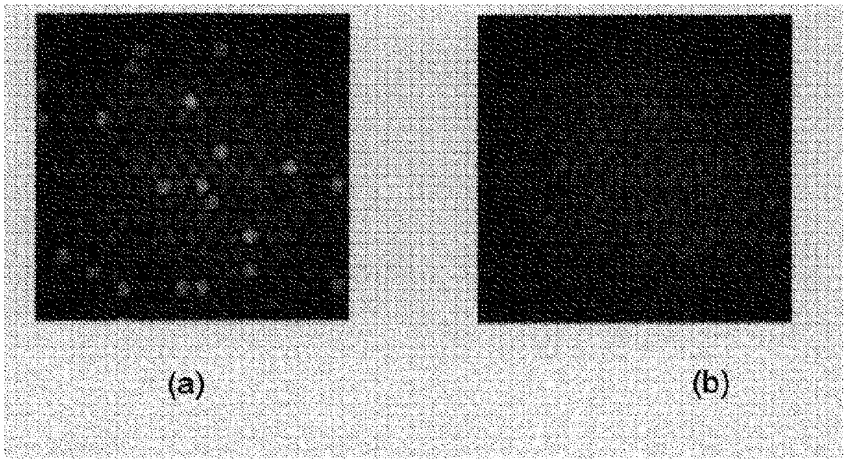
【図1】



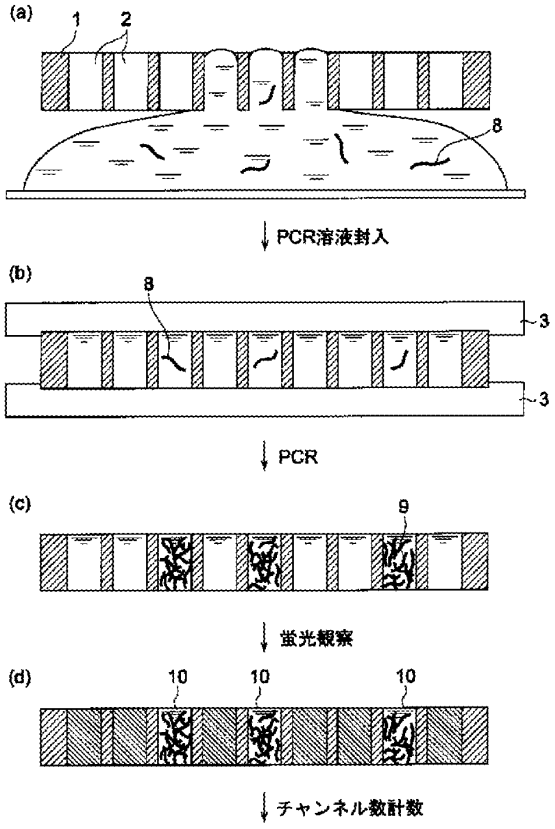
【図2】



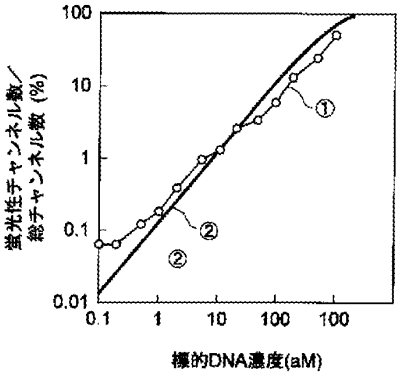
【図4】



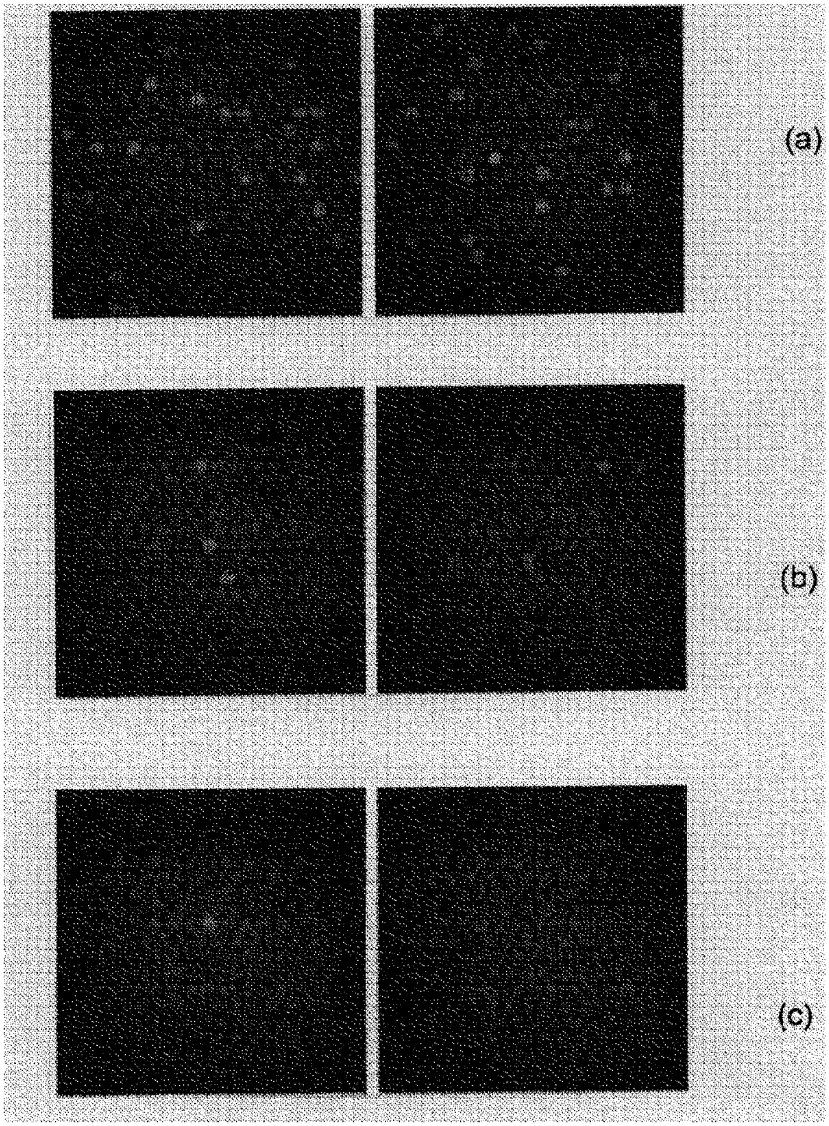
【図3】


(a)
1
2
8
PCR溶液封入
(b)
8
3
3
PCR
(c)
9
蛍光観察
(d)
10
10
10
チャンネル数計数

【図5】


100
10
1
0.1
0.01
0.1
1
10
100
100
蛍光性チャンネル数／総チャンネル数 (%)
標的DNA濃度(aM)
①
②
②

【図6】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB60 DA12 DA13 DA14
FA11 FA16 FA19 FB12 GC15
JA01 JA07
4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ53 QR32
QR62 QR66 QS25 QS32 QX02

(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2002－506200
（P2002－506200A）
(43)公表日　平成14年２月26日(2002.2.26)

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	ＦＩ		ﾃｰﾏｺｰﾄﾞ(参考)
Ｇ０１Ｎ　33/48		Ｇ０１Ｎ　33/48	Ｐ	２Ｇ０４５
Ｃ１２Ｑ　1/00		Ｃ１２Ｑ　1/00	Ｃ	４Ｂ０６３
1/02		1/02		
Ｇ０１Ｎ　33/483		Ｇ０１Ｎ　33/483	Ｃ	

審査請求　有　　予備審査請求　有　　（全 83 頁）

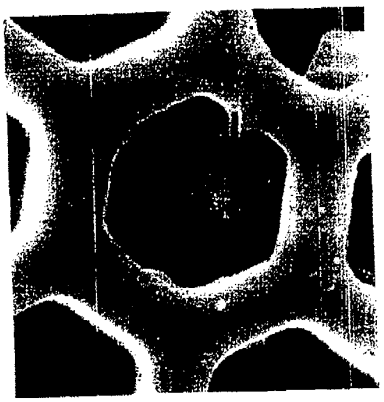
(21)出願番号　特願2000－534846(P2000－534846)
(86)(22)出願日　平成11年３月２日(1999.3.2)
(85)翻訳文提出日　平成12年９月４日(2000.9.4)
(86)国際出願番号　ＰＣＴ／ＵＳ９９／０４４７３
(87)国際公開番号　ＷＯ９９／４５３５７
(87)国際公開日　平成11年９月10日(1999.9.10)
(31)優先権主張番号　０９／０３３，４６２
(32)優先日　平成10年３月２日(1998.3.2)
(33)優先権主張国　米国（ＵＳ）

(71)出願人　トラスティーズ・オブ・タフツ・カレッジ
TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE
アメリカ合衆国02155マサチューセッツ州　メッドフォード、バルー・ホール、タフツ・ユニバーシティ
(72)発明者　デイビッド・アール・ウォルト
アメリカ合衆国02178マサチューセッツ州　レキシントン、キャンドルウィック・クロース４番
(74)代理人　弁理士　青山　葆　（外１名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　微細孔に閉じ込められたセル個体群を含むバイオセンサアレイ

(57)【要約】
化学的な及び生物的な物質に対して唯一の応答特性を有する、個々のセル又はランダムに混合されたセルの個体群が、基質内の複数のディスクリートサイトに配置されているバイオセンサ、センサアレイ、検出方法及び検出装置が提供される。１つの好ましい実施形態においては、ディスクリートサイトが光ファイバアレイ内の個々のファイバの末端部に形成されたマイクロウエルを含んでいる。バイオセンサアレイは、アレイ内の各タイプの位置及び個性を決定するために光学的に探査可能な符号化機構を利用し、かつ分析対象物に対する多数の個々のセルの応答の同時測定を可能にする。検出方法は、特徴的かつ検出可能な仕様で生物的に重要な化合物に応答するために、セル個体群の唯一の能力を利用する。バイオセンサアレイ及び測定方法は、生物的活性物質の研究、現場における環境監視、種々の生物プロセスの監視、及び多くの組み合わせの化学収集物の高処理能力でのろ過に用いられることができる。



エッチされたマイクロウェル中の、１つのＮＩＨ３Ｔマウス線維芽細胞の走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）写真。各々のウェルは７μｍの直径と、５μｍの深さと、～１４５ＦＬの容積を有する。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4462

【特許請求の範囲】

【請求項１】　ａ）複数のディスクリートサイトを含んでいる基質と、

ｂ）それぞれ、上記ディスクリートサイトの１つに分布されている複数のセルとを含んでいて、各セルが少なくとも１つの光学的に探査可能な物質で符号化されている、少なくとも１つの分析対象物に対する個々のセルの応答を検出するためのバイオセンサ。

【請求項２】　上記基質がそれぞれ末端部と基端部とを有している複数のファイバを含んでいる光ファイバアレイを含み、上記ディスクリートサイトがそれぞれ上記末端部の端面に形成された複数のマイクロウエルを含み、かつ上記複数のセルの各個が上記マイクロウエルの１つに分布させられ、上記セルの各々が、上記アレイ中の少なくとも１つの上記ファイバの末端部に光学的に結合されかつ光通信状態となっている、請求項１に記載のバイオセンサ。

【請求項３】　上記サイトが、約１μｍから約２００μｍまでの範囲の内直径と、約０．２５μｍから約２００μｍまでの範囲の深さと、約１ｆＬから約５ナノリットルまでの範囲の体積を有している、請求項１又は２に記載のバイオセンサ。

【請求項４】　上記ファイバが、さらに、約１μｍから約２００μｍまでの範囲の直径を有するファイバコアを含んでいる、請求項２又は３に記載のバイオセンサ。

【請求項５】　上記サイトの表面が、生物的に両立しうる物質で被覆されている、請求項１、２、３又は４に記載のバイオセンサ。

【請求項６】　上記セルの少なくとも１つに、指標化合物が付加又は挿入されている、請求項１、２、３、４又は５に記載のバイオセンサ。

【請求項７】　上記複数のセルが、少なくとも２セル個体群を含む、請求項１、２、３、４、５又は６に記載のバイオセンサ。

【請求項８】　各セル個体群が、染料、蛍光体、着色体、化学発光化合物及び生物発光化合物からなる群から選択された少なくとも１つの光学的に探査可能な物質で符号化されている、請求項７に記載のバイオセンサ。

【請求項９】　ｉ）複数のディスクリートサイトを含んでいる基質と、

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4463

ii）それぞれ上記ディスクリートサイトの１つに分布させられている複数のセルとを含んでいて、各セルが少なくとも１つの光学的に探査可能な物質で符号化されている、a）バイオセンサアレイと、

b）上記基質上で上記ディスクリートサイトに光学的に結合されかつ光通信状態となっていて、上記ディスクリートサイト内に分布させられている上記セルの、分析物に対する光学的な応答を検出することができる検出手段とを含んでいる、少なくとも１つの分析対象物に対する個々のセルの応答を検出するための装置。

【請求項１０】　上記基質が、それぞれ末端部と基端部とを有している複数のファイバを含んでいる光ファイバアレイを含み、

上記ディスクリートサイトが、それぞれ上記ファイバの上記末端部の端面に形成された複数のマイクロウエルを含み、

上記複数のセルの各個が上記マイクロウエルの１つに分布させられ、

かつ、上記検出手段が、上記ファイバ端末部で上記セルの光学的な応答を検出するために、上記ファイバの基端部と光学的に結合されかつ光通信状態となっている、請求項９に記載の装置。

【請求項１１】　さらに、上記ファイバの端部に結合された励起光エネルギ手段を含んでいる、請求項９又は１０に記載の装置。

【請求項１２】　さらに、複数の上記セルから、検出された光学的な応答の画像を把握するための画像把握手段を含んでいる、請求項９、１０又は１１に記載の装置。

【請求項１３】　上記画像把握手段が、電荷結合素子又はＣＣＤカメラを含んでいる、請求項１２に記載の装置。

【請求項１４】　i）複数のディスクリートサイトを含んでいる基質と、

ii）それぞれ上記ディスクリートサイトの１つに分布させられている複数のセルとを含んでいて、各セルが少なくとも１つの光学的に探査可能な物質で符号化されている、a）バイオセンサアレイを準備する過程と、

b）上記バイオセンサアレイを分析対象物と接触させる過程と、

c）上記セルの光学的な応答を検出するようになっている、少なくとも１つの

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4464

対象分析物に対する個々のセルの応答を検出する過程とを含んでいる、少なくとも１つの分析対象物に対する個々のセルの応答を検出するための方法。

【請求項１５】　ａ）上記のバイオセンサアレイを準備する過程が、

ｉ）それぞれ末端部と基端部とを有している複数のファイバを含んでいる光ファイバアレイを含んでいる基質を含み、

ii）上記ディスクリートサイトが、それぞれ上記ファイバの上記末端部の端面に形成された複数のマイクロウエルを含み、

iii）上記複数のセルの各個が、上記マイクロウエルの１つの中に分布させられ、

ｂ）上記の検出過程が、上記ファイバ末端部で上記セルの光学的応答を検出するために、上記ファイバの基端部に光学的に結合されかつ光通信状態にある検出手段を準備する過程を含んでいる、請求項１４に記載の方法。

【請求項１６】　上記分析対象物が、光学的に検出可能なラベルを含んでいる、請求項１４又は１５に記載の方法。

【請求項１７】　上記バイオセンサが、複数の分析物に接触させられるようになっている、請求項１４、１５又は１６に記載の方法。

【請求項１８】　ａ）複数のディスクリートサイトを含んでいる基質を準備する過程と、

ｂ）各セルが上記ディスクリートサイトの１つに分布させられるように、上記基質を複数のセルに接触させる過程とを含んでいる、少なくとも１つの分析対象物に対する個々のセルの応答を検出するためのバイオセンサアレイを製作する方法。

【請求項１９】　ａ）上記の基質を準備する過程が、

ｉ）それぞれ末端部と基端部とを有している複数のファイバと、

ii）それぞれ上記末端部の端面に形成された複数のマイクロウエルとを含んでいる光ファイバアレイとを含み、

ｂ）上記の接触させる過程が、各セルが上記マイクロウエルの１つに挿入されるように、上記光ファイバアレイを複数のセルと接触させるようになっている、請求項１８に記載の方法。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4465

【請求項２０】　上記複数のセルが、少なくとも２セル個体群を含んでいる、請求項１８又は１９に記載の方法。

【請求項２１】　各セル個体群が、染料、蛍光体、着色体、化学発光化合物及び生物発光化合物からなる群から選択された少なくとも１つの光学的に探査可能な物質で符号化されている、請求項１８、１９又は２０に記載の方法。

【請求項２２】　さらに、上記の符号化されたセルに励起光エネルギを照射することにより生成された発光エネルギにより、上記アレイ中の個々のセルの位置を表示する過程を含んでいる、請求項２１に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

（技術分野）

本発明は、概して、バイオセンサ、バイオセンサアレイおよび化学物質および生体物質の分析のための検出装置、検出方法に関する。より具体的には、本発明は、バイオセンサ、バイオセンサアレイ、細胞および細胞を混合した集団を利用して化学物質および生体物質を分析する検出装置、検出方法に関する。

【０００２】

（背景技術）

化学、生物学および医学の重要な技術的進歩は、微量なサンプルのミクロ分析能力によることが一般に知られている。しかし、微量で分析測定を行うことは、少量のサンプルの取り扱い、検体の単離および単一細胞生理機能のミクロ分析で生じる困難性のために、長い間の難題であった。

【０００３】

ナノリットル、ピコリットルおよびフェムトリットルの体積研究は、インビトロおよびインビボ細胞検査、電気化学、マトリックスアシストレーザ離脱イオン化質量分析、ミクロカラム液体クロマトグラフィ、ミクロ滴定およびキャピラリー電気泳動を含む応用の範囲内での探求であった。細胞検査は、R.M. Wightmanらによる Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:10754 (1991); R. H. Chowらによる Nature 356:60 (1992); T. K. Chenらによる Anal. Chem. 66:3031 (1994); S. E. Zerbyらによる Neurochem. 66:651 (1996); P. A. Garisらによる J. Neurosci. 14:6084 (1994); G. Chenらによる J. Neurosci. 15:7747 (1995) を参照されたい。電気化学は、R. A. Clarkらによる Anal. Chem. 69(2):259 (1997) を参照されたい。マトリックスアシストレーザ離脱イオン化質量分析は、S. Jespersenらによる Rapid Commun. Mass Spectrom. 8:581 (1994) を参照されたい。ミクロカラム液体クロマトグラフィは、I. A. Hollandらによる Anal. Chem. 67:3275 (1995); M.D. Oatesらによる Anal. Chem. 62:1573 (1990) を参照されたい。ミクロ滴定は、M. Gratzlらによる Anal. Chem. 65:2085 (1993); C. Yiらによる Anal. Chem. 66:1976 (1994) を参照されたい。キャピラリー電気泳動は、M. Jansso

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4467

nらによるJ. Chromatogr. 626:310 (1992); P. Beyer Hietpasらによる J. Liq. Chromatogr. 18:3557 (1995) を参照されたい。

【０００４】

Clarkらによる Anal. Chem. 69(2):259 (1997) は、従来のフォトリソグラフィマスクおよびフォトレジスト技術を用いて電気化学ミクロ分析のためのピコリットルのミクロ瓶を製造し、シリコンウェハテンプレート上のポリスチレンのミクロ瓶の型を移す方法を開示する。これらのミクロ瓶は、典型的には、型表面のレジストエッチングの制御および型移送プロセスの困難さのために、大きさおよび形状が一様ではない。

【０００５】

Parkらによる Science 276:1401 (1997) は、窒化シリコンの反応型イオンエッチングにおいて、ポリスチレン－ポリブタジエン順序ダイブロックコポリマー(polystyrene-polybutadiene, ordered, diblock copolymers) をマスクとして用いてナノメータサイズのホールアレイを生成する改良型リソグラフィ法を開示する。この複数ステップの方法は、ピコメーターサイズのホールアレイの生成が可能である。ピコメーターサイズのホールは、典型的には、２０ナノメーターの直径、２０ナノメーターの深さを有し、間隔が４０ナノメーターである。10^{11}ホール／cm^2までのホール密度が開示されている。この方法により生成されるホールのサイズおよび間隔の範囲は、コポリマーミクロドメインのサイズにより制限される。ホールを形成するのに用いられるエッチング法の制御の困難性に起因して、この方法でホールサイズおよび間隔を均一に維持するのは困難である。

【０００６】

Deutschらによる Cytometry 16:214 (1994) は、ブランク化 (blankened) ニッケルプレート内の、ミクロンサイズの円錐形ホールからなる多孔性電気めっきニッケルミクロアレイを開示する。ホールサイズは、上限値７μmから下限値３μmであり、８μmの深さである。アレイは、個々の細胞を捕らえ、そのミクロ環境の変化に対する反応を研究するための細胞担体として用いられる。米国特許第4,772,540号では、Deutschらはまた、フォトレジストおよび電気めっき技術を組み合わせて用いて、そのようなアレイを作成する方法を開示している。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4468

【０００７】

Corning Costar Corp（アクトン、マサチューセッツ州）は、商標PixWell™を用いて、小型化アッセイ向けの商業的ミクロウェルアレイを生産する。これらのアレイは、ミクロ形成されたガラスプレートから製造され、ウェル密度４３５６ウェル／ｃｍ^2、２０μｍの深さのテーパ状ウェルで直径４０μｍである。

【０００８】

ミクロウェルアレイは、生体細胞の研究に特に有用である。細胞研究では、ローカル環境における変化や操作に対する、個々の細胞の反応の測定が必要である。このような研究向けに設計されたどのような方法や装置も、細胞生存力を維持し、個々の細胞の位置を識別し、反応測定を個々の細胞と関連付けできなければならない。

【０００９】

細胞内の研究に用いられる、生存可能な蛍光プローブが利用できるので、生体細胞の蛍光測定は、細胞機能の研究に非常に有用である。よって蛍光光学測定は細胞研究によく利用される。蛍光光学測定は、３種類の一般的な細胞測定方法が利用できる。すなわち、細胞集団の体積測定、細胞集団または個々の細胞の動的測定、および個々の細胞の静的測定である。

【００１０】

全細胞集団の特性は、概して複数の細胞を有するサンプルボリュームの体積測定で研究できる。この方法は、細胞集団がかなり同質な場合には好ましい。一般的に認識されているこの方法の制限は、背景蛍光（background fluorescence）の存在である。背景蛍光は、測定の感度、および細胞集団内の相違や異種性の識別能力を減少させる。

【００１１】

フローサイトメトリー法は、体積細胞集団測定に生じた背景蛍光の問題を低減するのによく利用される［M. R. GauciらによるCytometry 25:388 (1996); R.C. BoltzらによるCytometry 17:128 (1994)］。これらの方法では、細胞蛍光発光は、励起光ビームを通して層流により細胞が移送されたときに測定される。フローサイトメトリー法は、後続の静的な細胞測定のため少量の細胞の予備的な分類

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4469

および基板上への沈積を行う静的な方法と組み合せることができる［Hoggらへの米国特許第4,009,435号、KanzらによるCytometry 7:491 (1986); SchildkrautらによるJ. Histochem Cytochem 27:289 (1979) ］。

【００１２】

Gauciらは、細胞のサイズ、形状および体積が、光の散乱により測定し、蛍光染料を利用して、細胞のタンパク質含有量および核酸総含有量を決定する方法を開示する。この方法はさらに、１秒に約１００細胞の速度で、さまざまな細胞の数を数え、大きさをそろえることができる。

【００１３】

フローサイメトリー技術は、一般的に各細胞を短期間で個別に測定する場合に制限される。この方法では、同一の細胞に時間をかけて反復して測定を行うことはできない。それは、励起光ビーム内の典型的な細胞のドウェル時間は、典型的には数マイクロ秒だからである。加えて、そのような短い測定時間では、個々の細胞蛍光発光による蓄積強度は低いので、正確さを欠き、その測定の信頼性に制限してしまう。

【００１４】

RegnierらによるTrends in Anal. Chem. 14 (4):177 (1995) は、単細胞分析のための、侵襲性の、電気泳動により媒介されたミクロ分析法が記載されている。この方法は、キャピラリー電気泳動カラムの注入端におけるテーパ状ミクロインジェクタを利用し、個々の細胞膜を突き破り、細胞質のサンプルを取り出す。この方法は、１度に１つの細胞の細胞含有量を測定する。この方法は、一般的に、酸化容易な種類の検出に制限される。

【００１５】

HoganらによるTrends in Anal. Chem. 12(1):4 (1993) は、マイクロカラム分離技術を開示する。マイクロカラム分離技術は、従来のガスクロマトグラフ質量分析計、小細胞容積のミクロ薄層クロマトグラフィーまたは高圧液体操作のいずれかと組み合わせて利用される。この方法の感度には制限があり、検出のための標的混合物の前選択が要求される。

静的な方法は、一般に個々の細胞を測定するには好ましい方法である。測定方

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4470

法は、従来の光学顕微鏡による個々の細胞の観察から、コンピュータ化されたイメージ分析システムによるレーザスキャン顕微鏡の利用までに及ぶ。L. Hartらによる Anal. Quant. Cytol. Histol. 12:127 (1990) を参照されたい。このような方法は、典型的には実際の測定に先立って、個々の細胞を基板に接着する必要がある。ここで、単一の細胞または単一の細胞層を基板に接着する際に、および細胞環境の分析または操作の間、固定位置に細胞を維持する際に問題が生じる。加えて、個々の細胞の反復測定には、典型的には個々の細胞の位置の物理的なインデックス付け、各細胞を順次スキャニングする機構の提供、および個々の細胞の反復分析のためのインデックス付けした位置への復帰が必要である。

【００１６】

HuangらによるTrends in Anal. Chem. 14(4) 158 (1995) は、静的な電気化学法と、単一細胞の生化学環境をモニタする電極を開示する。この方法は、微小電極リファレンスの製造および手動の位置付けと、細胞内での動作電極 (working electrode) が必要である。この方法は、単一細胞または細胞外部でのインシュリン、酸化窒素およびグルコースを検出するのに利用される。この方法は、一般に細胞内の酸化還元反応の研究に限定されている。

【００１７】

Inceらによる、J. Immunol. Methods 128:227 (1990) は、制御された環境下で、単一細胞の研究のための閉チャンバ装置を開示する。この方法は、細胞研究のため、極端な環境条件を生成可能な、ミクロ灌流チャンバを利用する。様々な溶解液がチャンバ内を通過すると、個々の細胞は、２枚のカバーグラスによって適当な位置に保持される。この方法の１つの制限は、封じられたガス気泡を除去するのが困難なことである。ガス気泡は、高い度合いで自己蛍光を引き起こし、よって背景蛍光のために測定感度が減少する。

【００１８】

従来の静的な方法で生じた制限を克服するために、DeutschらによるCytometry 16:214 (1994) および、Weinreb およびDeutschは、米国特許第4,729,949号、第5,272,081号および第5,310,674号および第5,506,141号は、細胞集団内での個々の細胞の反復光学測定装置および方法を開示する。ここでは各細胞の位置は、

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4471

細胞環境の操作の間保護される。

【００１９】

ドイッシュ等（Deutsch, et al.,）により開示された装置の中心的な特徴はセルキャリヤ（cell carrier）であり、該セルキャリヤは、吸引力を作用させることによって個々の細胞（セル：cell）を捕捉し保持するために、円錐形をしたアパーチュア（aperture）若しくはトラップ（trap）の二次元的な配列を備えている。上記セルキャリヤは、典型的には、ドイッシュ等に付与された米国特許第４，７７２，５４０号に開示されている電気メッキーフォトレジスト（photoresist）法によって製作される。セルキャリヤの目的は、セル周囲をマニピュレート（manipulate）している間、セルを定まったアレイ（array）位置に維持するための手段を設けることである。個々のセルは、吸引力によってセルキャリヤの穴部内に付勢され、そして、ウェルズ（wells）は、その後に、バックーエミッテッド（back-emitted）偏光および強度を読み出す低強度の偏光ビーム（beam）で照射される。二つの異なるリエージェント（reagent）が連続してセルと反応したときには測定値が比較される。開示された方法では、ベースライン（baseline）制御とアナライト（analyte）測定の両方のために二つの別々のセルキャリヤが必要である。

【００２０】

ドイッシュ等の方法および装置は、患者から採取したセルサンプル（cell sample）の健康状態と生存能力を調べるための診断的な試験において病理医によって採用されてきた。その方法および装置は、癌のスクリーニング（screening）［ドイッシュ等；サイタメトリ（Cytometry）１６：２１４（１９９４），サイタメトリ １６：２１４（１９９４）及びヨーロピアン Ｊ．癌 ３２Ａ（１０）：１７５８（１９９６）］並びにリウマチ様の関節炎［ツルジル等（Zurgil et al.,） Isr. J. Med. Sci. ３３：２７３（１９９７）］の両方に適用されており、そこでは、腫瘍抗原および細胞分裂誘起物質に曝すことによって誘発される細胞質のマトリックス（matrix）の内部粘性率およびストラクチュアードネス（structuredness）における変化に基づいて、健康な細胞に対して悪性のリンパ球を識別するのに蛍光の偏光測定が用いられる。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4472

【００２１】

ドイッシュ等の方法および装置は、３個のステッピングモータで駆動されるスキャニングテーブル（scanning table）と、マッピング（mapping），インデックシング（indexing）及び個々のセルをセルキャリヤ内に位置させるためにコンピュータ制御システムの使用を必要とする。かかる機械的なスキャニング方法を用いることは、バックラッシュ（backlash）及び繰り返し測定のための個々のセル位置の再現可能なポジショニング（positioning）で遭遇する従来の機械的な問題のために、測定の再現性と精度における制限を招くことになる。更に、全配列の機械的なスキャニングは、配列中の各セルの測定時間を長くしてしまう。

【００２２】

ドイッシュ等の方法は、更に、蛍光の発光レスポンス（response）がセルキャリヤから光学的な検出体に通されるときの偏光上の種々の光学システム要素の著しい影響に起因するある固有の制限を有している蛍光の偏光測定による制限を受ける。バーリンデリ等（Birindelli, et al.,）［ヨーロピアン Ｊ．癌 ３３（８）：１３３３（１９９７）］は、また、信頼できる測定値を得るためには各条件に対して少なくとも３つの測定スキャンの平均をとることを必要とするエレクトロ・ポラリセーション値（electropolarisation values）における変動に起因する、この方法における制限を明らかにしている。更に、セルの研究のためには、偏光測定は、一般に、偏光における検出可能な変化を生み出すために細胞質粘性率における十分な変化を創生する、セルレスポンスに制限される。全てのセルレスポンスが検出可能な粘度変化によって達成されるわけではないので、その方法は、更に、細胞質におけるかかる粘度変化を創り出す細胞活動に限られることになる。

【００２３】

ザール等（Zare, et al.,）［サイエンス（Science）２６７：７４（１９９５）；バイオフォトニクス　インターナショナル（Biophotonics International）；３月－４月号，第１７頁（１９９５）］は、マイクロコラム（microcolumn）分離技術によって分別された複合的な生物化学上の材料に対する生体細胞の反応に基づいたバイオセンサ・システム（biosensor system）を開示している。ガラ

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4473

ス製のカバースリップ（cover slip）上に配置された細胞は、蛍光性のプロウブ（probe）で取り扱われ、その後、細胞内でのカルシウム・レベル（calcium level）の変化と同様に、アセチルコリン（acetylcoline），ブラジキニン（bradykinin）およびアデノシン（adenosine）三燐酸塩を含む一連の生物化学的なコンパウンド（compound）に対して敏感であることが示される。

【００２４】

ヨング等（Yeung, et al.,）［Acc. Chem. Res. ２７：４０９（１９９４）］は、単一セルレスポンスの研究のための数多くの方法を再検討し、アナライト測定に基づいてセル母集団内での著しい変動や不均一性を考察している。例えば、引用文献は、生物化学的に反応性のあるコンパウンドに細胞を曝すための、かかるコンパウンドに反応して創り出された個々の細胞の細胞内の流体を抽出するための、そして、キャピラリ・コラム（capillary）内で移動回数からアナライトを識別するための、キャピラリ電気泳動法を開示している。他の蛍光性に基づいた分析も開示されている。セル母集団内での個々のセルレスポンスにおける顕著なセル・ツウ・セル（cell-to-cell）の変動および不均一が観察され、その差異が、個々のセルと接触して生物学的なコンパウンドと化学的なコンパウンドとを識別する方法を与え得る。

【００２５】

マコンネル等（McConnell, et al.,）［サイエンス（Science）２５７：１９０６（１９９２）］は、セルがその周囲のものを酸性化する速度を測定するためのライト（light）呼び出し可能な電位差計センサを用いる、”サイトセンサ（Cytosensor）”として知られるマイクロフィジオメータ（microphysiometer）装置を開示している。このセンサは、局部的なペーハ（pH）における検出可能な変化を生み出すセルレスポンスを監視するための小型化されたペーハ（pH）電極として作用する。開示された装置は、セルからの陽子の排出の測定に限られ、従って、アナライトに対する酸を出すセルレスポンスの検出しかできない。

【００２６】

キム等（Kim, et al.,）に付与された米国特許第５，１７７，０１２号は、ブドウ糖と果糖を調べるためのバイオセンサを開示している。そのバイオセンサは

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4474

、セル全体を有機溶剤で処理し、処理したセルの残留物を支持体に固定してペーハ（pH）電極に適用されるセル全体の膜を形成することにより作成される。

【００２７】

ピンケル等（Pinkel, et al.,）に付与された米国特許第５，６９０，８９４号は、例えば、核酸，抗体，蛋白質，レクチン（lectins）、および細胞，組織，自然の若しくは遺伝子工学的な微生物から誘導された他の材料などの材料である生物学上の”バインディング・パートナ（binding partner）”を用いるバイオセンサを開示している。これらのエイジェント（agent）はファイバ光アレイ（fiber optic array）と結び付けて使用され、そこでは、バインディング・パートナの各種が光検出器と組み合わされた光ファイバの束内のファイバのグループによって、独特のやり方でアドレス付けられる。上記アレイは、生物学的なバインディング・パートナの広範なアレイをスクリーニング（screening）できるように設計されている。

【００２８】

数多くの先行技術に係る方法がセル単体またはセルの母集団の分析をもたらしており、これら方法の幾つかのものは対象とするアナライトに対するセルレスポンスの監視を提供しているが、開示された方法は、いずれも、化学的および生物学的なアナライトによってもたらされた生物学的な刺激に対する個々のセルのレスポンスを同時に監視するために、大規模なモノカルチュア（monoculture）の集団または生体セルの混ざり合った集団を採用することを提供するものではない。従って、ユニークで検出可能なやり方で生物学的に重要なコンパウンドに反応する生体セルの集団の能力を有効に利用するバイオセンサ・アレイ及び方法が求められている。そのようなコンパウンドに対する生体セルの選択性は、薬剤のスクリーニングや複合的な生物学的流体の分析において相当な価値と有用性があるので、生体セルのユニークな特性を利用するバイオセンサは、数十万の候補の医薬的なコンパウンドが評価されなければならない組み合わせのライブラリ（library）の高いスループット（throughput）スクリーニングにおいて明確な有利性をもたらすであろう。これに加えて、かかるセンサは、生体セルの周囲に対する高い感受性が活用され得るバイオプロセス（bioprocess）や環境汚染の監視にも

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4475

役立つであろう。

【００２９】

発明の要旨

概説的に言えば、本発明は、化学上の及び生物学上の材料を分析するための、バイオセンサ、バイオセンサ・アレイ、バイオセンサ検出システム及び検出方法を提供するものである。より詳しく言えば、本発明は、化学上の及び生物学上の材料を分析するために、生体セル及び生体セルの混ざり合った母集団を用いたバイオセンサ、バイオセンサ・アレイ、検出装置および検出方法を提供するものである。

【００３０】

本発明のバイオセンサ・アレイは、生体セルのモノカルチュアか、生体セルの無作為に混合させた母集団のいずれかを備えており、そこでは、アレイ内の個々のセルが、基体上で光学的に読み出し可能で離散した、個々のセルの大きさ及び形状に順応した部位に位置する。ある一つの実施態様においては、上記離散した部位は、個々のセルの大きさ及び形状に順応するために予備成形されたマイクロウェル（microwell）又は微小空洞（マイクロキャビティ：microcavity）を備えている。バイオセンサ・アレイ検出方法は、セル周囲内に生物学的な又は化学的な材料の存在することによって化学的に又は生物学的に刺激された個々のセルが、セル内の又は細胞質周囲における変化を創り出すことにより反応するという良く知られた事実に依存しており、上記変化とは、セル自体内部で、又は、セルに付着するか、セル内に取り込まれるか、若しくは局部的なセル周囲に付け加えられた、例えば、フルオロフォール、クロモフォール又は染料のような指示コンパウンドから、光学的に応答指令信号を与えられることができ、また検出され得るものである。本発明のバイオセンサは、このように生体セルの生物学的に重要なコンパウンドに反応する能力を利用している。そのようなコンパウンドに対する生体セルの選択性は、薬剤のスクリーニングや複合的な生物学的流体の分析において相当な価値と有用性があるので、本発明のバイオセンサは、数十万の候補のコンパウンドが評価されなければならない組み合わせのライブラリの高いスループット・スクリーニングにおいて明確な有利性を提供する。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4476

【００３１】

当該技術分野において熟練した者であれば分かるように、本発明のバイオセンサ・アレイには、種々の基体材料および基体形状が採用され得る。個々のセルの付着または組み合わせのために適切な、そして、セルアレイの光学的な呼びかけ信号およびセル・レスポンスの検出にアクセス可能な離散した部位を与えるために採用され得る如何なる基体または材料も、アレイ基体として特に有用であろう。候補となる基体材料は、これらに限定されるものではないが、ガラス、ポリマー、セラミック、金属、及びこれらの材料で形成される複合物を含む。基体表面の幾何学形状は、平面状、球面状、凹面状、凸面状および織り目状であり得る。好ましくは、好適な基体は、アレイの光学的な呼びかけ信号および重要なアナライトに対するセル・レスポンスの検出をもたらすように形作られるであろう。

【００３２】

好適な実施の形態では、本発明のバイオセンサアレイが、細胞配置用のサブストレートとして作用するファイバオプティックアレイ（fiber optic array）に組み込まれる。「ファイバオプティックアレイ」又は他の文法的に同等なものは、ここで、ファイバ束における分離した個々のファイバとしてグループ化される、若しくは、予め形成された単一のファイバオプティックアレイとして軸方向に沿って組み付けられる、複数の個々のファイバ又はファイバストランド（fiber strands）を意味するものである。かかるアレイ内の個々のファイバは、例えば、イメージングファイバの場合など、一様にすなわち一貫した構成で配置されても、あるいは、ランダムに方向付けられ、一貫していなくてもよい。ファイバオプティックアレイが、センササブストレートとして採用される場合、ファイバオプティック束又はファイバオプティックアレイにおける各ファイバの末端部は、キャビティ又はマイクロウェル（microwell）を作るべく、化学的にエッチングされる。本発明のバイオセンサアレイの概念をあらわす模式図が、図１に示される。好適な実施の形態では、細胞のモノカルチャ（monoculture）又は細胞ライン（cell line）の混合集団による個々の生きた細胞が、マイクロウェル内にて分散させられる。マイクロウェルは、ファイバ束又はファイバアレイにおける個々のファイバのコアの異方性エッチングにより形成される。マイクロウェルは、

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4477

周囲の外装材を損なわれないままに残しつつ、個々のファイバストランドの中心に集められたコアの部分を移動させるよう、エッチング工程を制御することにより形成される。結果的なエッチング済みのキャビティは、個々の細胞を収容するように寸法付けられている。その個々のファイバコアが適切にサイズ設定されるファイバオプティック束又はファイバオプティックアレイを選択することにより、また、エッチングの状態を慎重に制御することにより、マイクロウェルの直径及び奥行が、いかなる所望の細胞のタイプのサイズにも調和するように、あらゆる都合のよい寸法範囲において、制御されまた調整され得る。

【００３３】

１つの実施の形態では、分離したサブストレートのサイト（cite）又はマイクロウェルの内面が、コラーゲン，フィブロネクチン（fibronectin），ポリリシン（polylysine），ポリエチレン・グリコール（polyethylene glycol），ポリスチレン（polystyrene）、又は、金，プラチナ若しくはパラジウム（palladium）のような金属などの薄膜の生物学的に融和し得る材料で被覆されている。別の実施の形態では、例えば、発螢光団（fluorophore），発色団（chromophore）又は色素などの指標合成物（indicator compound）が、化学的な若しくは生物学的な刺激に対する細胞のレスポンスを検出するために、マイクロウェルの表面に付着させられている。

【００３４】

バイオセンサを、光学的に呼掛け可能な（interrogatable）サブストレート又はファイバオプティックアレイへ組み込むことにより、本発明のバイオセンサのイノベーション（innovation）は、分離した検出素子，ＣＣＤカメラ又はかかるデバイスと光学的に通信し得るファイバオプティックアレイ又は束内の個々の光ファイバを備えた、分離したサブストレートのサイト又はマイクロウェルに配置される個々の細胞の光結合を規定するということにある。「光結合」，「光通信」又は「オプティカル・コーペレーション（optical cooperation）」又は他の文法的に同等なものは、ここで、従来の光学的なトレイン素子（train element）又は光学ファイバを用いて、アレイ内の分離したサイトに配置される個々の細胞に対して若しくはそれらから光を伝えることにより、励起光を用いて、バイオ

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4478

センサ内の個々の細胞を光学的に刺激する、若しくは、検体に対するアレイ内の個々の細胞の光学的なレスポンスを光学的に呼び掛ける性能を意味する。典型的なファイバオプティックアレイは、数千の分離した個々のファイバストランドを含んでおり、その結果、本発明は、アレイ内の数千の細胞の個々の光結合及び呼掛けに備えるもので、それによって、アレイ内の各細胞集団用に、多数の独立した細胞のレスポンスの測定を規定している。有用な細胞集団の数、及び、それに対応した各細胞集団における多数の個々の細胞の両方のため、本発明の重要なイノベーションは、各細胞集団内の細胞から得られる複数の独立した測定の特質のあるオプティックレスポンスの特性の積算したり増加させたりすることを規定するもので、それによって、バイオセンサの検出限界及び感度を改良することができる。

【００３５】

本発明の付加的なイノベーションは、アレイ内の多数の細胞集団を分散させ、また、各集団における多数の個々の細胞を与えることにより、生物学的及び化学的検体についてのバイオセンサアレイの識別性能が、多数の細胞集団からの数千の細胞のレスポンスに備えて、著しく向上させられることである。この特徴は、人間の嗅覚系の実際の性質を擬態するものである。該嗅覚系では、上皮層内に見出される、それら自体では特に感度を有しない、ほぼ１千の異なるレセプタ細胞のタイプの各グループ化に際して、数千のレセプタ細胞からの合成信号が、大きく増幅された香りに対する感覚レスポンスを導く［コーエル（Kauer）他，トレンド・ニューロサイ（Trends Neurosci）．１４：７９（１９９１）を参照のこと。そのため、本発明の１つの実施の形態は、バイオセンサアレイにおける多数の細胞の低レベルのレスポンスを積算することにより、検体に対するバイオセンサアレイの感度を著しく向上させるべく、人間の嗅覚系にて見出される、発展する香りの増幅プロセスを擬態する。低い検体濃度における複数の細胞からのレスポンスを積算することにより、ノイズに対する信号の比の実質的な改良が、実現され、また、それに対応して、バイオセンサアレイの検出限界の抑制が得られる。

【００３６】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4479

本発明のバイオセンサアレイの独自の特徴は、アレイにおける個々の細胞及び細胞集団の各々が、細胞のタイプの同一性およびランダムに混合した細胞集団が採用される場所を維持するために、コード化され得ることである。細胞は、マイクロウェル内にそれらを配置するのに先立って、若しくは、マイクロウェル内の配置に続いて、コード化されてもよい。本発明は、ランダムに混合した個々の細胞および発螢光団の又は発色団の色素の合成物を備えた細胞集団をコード化するために、若しくは、螢光を発すべく遺伝学的に処理された、自己コード化された細胞を用いるのに備えるものである。細胞集団はランダムに混合され得るものであるが、この革新的な特徴は、細胞のアレイが励起光のエネルギーにより照明された場合に、若しくは、生物学的な刺激を被った場合に、特質のあるオプティカルレスポンス・シグニチャアを介して決定されるべき各細胞のタイプの同一性及び場所を規定する。

【００３７】

１つの実施の形態では、細胞又は細胞集団が、化学ルミネセンス，生物ルミネセンスをあらわす、又は、その生物学的な刺激に対するオプティカルレスポンスが、独特な検出可能の螢光信号を生ずる、緑の発螢光団の蛋白質の変異体などの、細胞集団を選択することにより、自己コード化される。集団内の細胞が刺激に対する独特な一時のオプティカルレスポンスを生ずる場合には、他の細胞集団が採用されてもよい。遺伝学的に処理された細胞株が自然に発生することが採用されてもよい。

【００３８】

他の様々な実施の形態では、細胞が、細胞に付着された，細胞により吸収された若しくは局部的な細胞の環境に与えられた色素合成物で、コード化されてもよい。有用なコード化色素の例としては、発螢光団，発色団、ステイン（stain）又は色素合成物が含まれる。例えば、フルオレセイン（fluorescein），ローダミン（rhodamine），ナフサリミド（naphthalimides），フィコビリプロテイン（phycobiliprotein），ニトロベンゾクサジアゾール（nitorobenzoxadiazole）などの、従来の細胞の発螢光団プローブが採用されてもよい。適切なコード化色素を選択するために特に有用な参照文献は、Ｒ．Ｐ．ホーグランド（Haugland）

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4480

，蛍光プローブ及びリサーチ化学のハンドブック（第六版），モレキュラー・プローブ社（Molecular Probes Inc.）（ユージン（Eugene），オーアール（OR），１９９６）であり、ここでは、引用することにより組み込まれる。

【００３９】

色素合成物がコード化のために採用される場合、バイオセンサアレイ内の細胞集団は、励起光を用いて上記アレイを励起させ、ランダムに分散した集団内の細胞のタイプを、励起に対するそれらのレスポンスにより、インデックス付けすることによって、容易に解読される。１つの実施の形態では、単一の発蛍光団の若しくは発色団の材料又は色素が、細胞のコード化に用いられる。他の実施の形態では、２つ又はそれ以上のコード化用の材料若しくは色素が、細胞集団をコード化するために用いられてもよく、また、励起光のエネルギーに曝されることにより生成される、上記色素についてのオプティカルレスポンス強度の比が、上記アレイを備えた細胞集団の構成要素をコード化し識別するのに採用される。また別の実施の形態では、共通の検体に対して曝される場合に、細胞が、励起光により解読されてもよい。また別の実施の形態では、コード化された細胞が、ｐＨ又はCa^{+2}表示器を用いて、属の細胞活性体に対するそれらのレスポンスにより解読されてもよい。

【００４０】

本発明の革新的な細胞コード化の特徴は、アレイを機械的に走査し、細胞の場所を機械的に指し示し（indexing）、アレイ内の個々の細胞の測定用に、上記アレイを機械的に位置決めする必要をなくすることにより、従来技術のデバイスの制限を克服するものである。本発明は、そのため、各細胞についての一連の測定値を取得すべく、アレイを機械的に走査する必要なく、アレイ内の全ての細胞及び細胞集団の迅速な同時の測定を規定する。その結果、アレイ内の全ての細胞のレスポンスの監視および測定が、第１の細胞の測定と最後の細胞の測定との間に、長期の遅れをもたらすことなしに、同時に実行される。全ての細胞のレスポンスを測定する能力は、同時に、短期の細胞のレスポンス及び長期の細胞レスポンスの両方を監視する性能を規定する。この革新的な特徴は、迅速で生物学的に重要な細胞の処理および短い時間尺度での細胞のレスポンスを監視することを可能

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4481

とする。加えて、短い時間尺度上での細胞のレスポンスを同時に測定する能力は、バイオセンサアレイの環境における変化に対する、個々の細胞及び細胞集団のレスポンス比の測定を可能とする。この特徴は、生物学的又は化学的検体について有用な、付加的な識別用レスポンスの情報に備えるものである。

【００４１】

本発明のバイオセンサアレイは、自然に存在する細胞及び細胞集団、又は、遺伝学的に処理された細胞株を採用することができる。実質的には、いかなる細胞のタイプ及びサイズも、細胞のサイズを、個々の光ファイバのオプティックコアの直径やエッチングの条件に一致させることにより、適応させることが可能である。１つの実施の形態では、ＮＩＨ　３Ｔ３のマウス繊維芽細胞が採用された。また別の実施の形態では、大腸菌，ブドウ状球菌，骨格筋細胞の先駆物質である筋芽細胞，中性好性白血球細胞，リンパ球細胞，赤芽細胞，骨芽細胞，軟骨細胞，好塩基性白血球，エオシン好性白血球，含脂肪細胞，無脊髄動物のニューロン（ヘリックス・アスペリア（Helix aspera）），哺乳類のニューロン、若しくは、副腎髄質の細胞などの他の細胞のタイプが、同様に採用されてもよい。上記マイクロウェルが個々の細胞のサイズに適応し得ることを条件とすれば、いかなる細胞のタイプ又は細胞集団のタイプの組合せも採用することができる。

【００４２】

化学的な刺激または生物的な刺激に対する細胞集団および個々の細胞の光学的反応は、個々の細胞と適当な指標を結びつけることによって、一般に応答信号が送信され、検出される。この適当な指標は、発蛍光団、発色団、ステイン、色素化合物のいずれかであってもよい。例えば、フルオレセイン(fluoresceins)、ローダミン(rhodamines)、ナフサリミド(naphthalimides)、フィコビリンプロテイン(phycobiliproteins)、ニトロベンゾクサジアゾール(nitrobenzoxadiazole)等の従来の細胞の発蛍光団プローブが採用されてもよい。その代わりとして、浸透細胞膜プロテイン指標または不浸透細胞膜プロテイン指標、イオン指標、活性酸素指標、ｐＨ指標が採用されてもよい。適当な指標を選択するための特に有用な参考文献は、アール．ピー．ホーグランド(R.P.Haugland)、蛍光プローブおよびリサーチ化学のハンドブック（第６版）、モレキューラ・プローブ社(Molecular

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4482

Probes Inc.)(ユージン(Eugene)、オーアール(OR)、１９９６)であり、ここでは、引用することにより組み込まれる。細胞の反応を変化させない指標を与えるいずれかの適切な指標または指標の組み合わせが採用されてもよい。別の実施の形態の変形において、指標は、例えば細胞膜に付着させることによって、または細胞質に吸収もしくは注入させることによって、細胞に直接組み込ませてもよく、またはマイクロウェル内に含まれる液体のような細胞の外部環境に加えられてもよい。また別の実施の形態において、指標は、マイクロウェルの表面に取りつけられてもよい。

【００４３】

個々の細胞、または細胞のアレイおよび細胞集団は、光学的な応答信号が送信されてもよく、検体に対する細胞の反応は、当業者に知られている従来の光学的方法および器具によって測定されてもよい。細胞は、アークランプ、レーザ、または発光ダイオード等の適切な励起光エネルギー源で光学的な応答信号が送信されてもよい。この光エネルギー源は、色素指標を活性化させるために、適当な波長の光を生じることができる。この色素指標は、細胞集団をコード化するために、または対象としている検体に対して応答するために採用されてもよい。個々の細胞または細胞集団の光学的反応は、適切な光学的検出手段でモニターされ、測定されてもよい。この適切な光学的検出手段は、フィルムまたは、光導電セル、光電管、光ダイオード、電荷結合素子（ＣＣＤ）カメラ等の従来の光学的検出器を含むが、これらに限定されない。好ましい実施の形態において、検体に対する各細胞とさまざまな細胞の副次集団の反応を検出するためのバイオセンサアレイの蛍光像を捕らえるために、ＣＣＤカメラが採用されてもよい。この実施の形態において、個々の細胞の反応と、アレイ反応の捕らえられた像の両方が、検体を検出するために採用されてもよい。

【００４４】

要約すれば、本発明に係るバイオセンサアレイと検出方法は、先行技術の装置の限界を克服することにおいて、多くの明確な利点を提供する。センサアレイは、市販のオプティカルイメージングファイバから容易に作成されて、精巧な機械加工または成形プロセスを必要としない、費用効率の高い、高密度で、精密に成

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4483

形されたバイオセンサアレイとなる。光ファイバおよびファイバオプティックアレイは、さまざまな直径のファイバコアを入手可能であるために、多くの細胞のタイプおよび大きさは、本発明に係る装置および方法に適応させることが可能である。さらに、細胞は、すぐにランダムな方法でマイクロウェルアレイに分散させることが可能である。このときに、新規な細胞コード化技術により、個々の細胞または細胞集団を配置するために、物理的に指し示す、または探知する必要がない。本発明のバイオセンサおよびセンサアレイを採用する検知方法および検知システムは、先行技術の装置が直面した細胞の操作における限界の多くを回避する。細胞がアレイのマイクロウェル内に配置されたならば、機械的な走査機構を必要としないイメージングカメラおよび従来の光学機器を採用する従来のイメージングシステムおよびその方法は、何千もの細胞の反応を同時にモニターすることができる。測定データの分析は、市販のイメージングソフトウェアを実行することによって容易に行われ、ニューラルネットワークとその他の統計的方法を組み合わせたパターン認識技術を用いてバイオセンサーアレイの画像を処理する。

【００４５】

本発明に係るバイオセンサアレイおよび検知方法は、多数の有用なアプリケーションのために使用される。この場合、個々の細胞は、局所的な細胞環境において生物的または化学的な物質の存在によって化学的または生物的に刺激される。さらに、個々の細胞は、適当な指標の存在により、または自然的なもしくは遺伝工学的な化学ルミネセンスもしくは生物発光のいずれかを表に出す特別な細胞タイプの独特の光学的反応により、光学的に検出可能な反応を生じることによって環境に対して反応する。したがって、本発明に係るバイオセンサアレイおよび方法は、生物的に意味のある化合物に対する生きている細胞の反応する能力を利用している。当該化合物に対する生きている細胞の選択性は、複雑な生物的な液体の分析および薬剤の選抜において、かなり有用性、有効性を有するので、本発明のバイオセンサは、組み合わせライブラリのハイスループット選抜に対して利点を与える。この組み合わせライブラリは、数十万の候補化合物が評価されたものであるはずである。

【００４６】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4484

構造および方法の新規のさまざまな詳細と、その他の利点を含む本発明の上記およびその他の特徴は、添付図面と添付クレームの参照と共により詳しく記載されるであろう。本発明を実施する特定の装置および方法は、説明として示されており、本発明を限定するものではないことは当業者には理解できるであろう。本発明の原則と特徴は、本発明の範囲から離れることなくさまざまな実施の形態および多数の実施の形態において使用されてもよい。

【００４７】

本発明は、添付クレームによって特に示されている。本発明のその他の特徴および利点は、明細書および添付図面を参照することによってより明確になるはずである。

【００４８】

好ましい実施の形態の詳細な説明

Ａ．マイクロウェルアレイの作成

本発明は、少なくとも第１基質を含むアレイ化合物に、個々のサイトを含む表面を与える。ここの「アレイ(array)」とはアレイ形状である複数の細胞を意味する。アレイの大きさは、化合物と、アレイの最終用途とに左右される。ほぼ２つの異なる細胞から数百万の細胞を含むアレイまで、作成されることが可能であり、非常に大きなファイバオプティクスアレイも可能である。一般的に、アレイは、細胞および基質の大きさに依存して、２つから百万ぐらいまたはそれ以上含み、同様に、アレイの最終用途に応じて、超高密度、高密度、中密度、低密度、超低密度のアレイが作成されてもよい。超高密度アレイの好ましい範囲は、ほぼ１０，０００，０００からほぼ２，０００，０００，０００であり（ここの全ての数はｃｍ２当たりである）、ほぼ１００，０００，０００からほぼ１，０００，０００，０００が好ましい。高密度アレイは、ほぼ１００，０００からほぼ１０，０００，０００の範囲にあり、ほぼ１，０００，０００からほぼ５，０００，０００が特に好ましい。中密度アレイは、ほぼ１０，０００からほぼ１００，０００の範囲にあることが特に好ましく、ほぼ２０，０００からほぼ５０，０００にあることがさらに好ましい。低密度アレイは一般に１０，０００より少なく、ほぼ１，０００からほぼ５，０００が好ましい。超低密度アレイは、１，００

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4485

０より少なく、ほぼ１０からほぼ１０００が好ましく、ほぼ１００からほぼ５００が特に好ましい。一部の実施の形態において、本発明の化合物は、アレイ形状でなくてもよく、つまり一部の実施の形態の場合、単一の細胞を含む化合物が作成されてもよい。さらに、一部のアレイにおいて、異なる化合物または同一の化合物のいずれかで複数の基質が使用されてもよい。したがって例えば、大きなアレイは、複数の小さな基質を含んでもよい。

【００４９】

さらに、本化合物の１つの利点は、特にファイバオプティックを使用することによって非常に高密度アレイを作成することが可能なことである。したがって、例えば、細胞はだいたい２００ｆｍまたはそれ以下であり、非常に小さなファイバが知られているので、１ｍｍ２のファイバオプティック束において、２５０，０００と同じぐらいまたはそれ以上（ある例では、１００万）の異なるファイバを有することが可能である。密度に関しては、０．５ｃｍ２当たり１５，０００，０００個（ある例では、２５－５０万）の細胞およびファイバより多いものも得られる。

【００５０】

ここで、「基質(substrate)」または「ソリッドサポート(solid support)」または他の文法的に同等なものは、細胞の結合および付着に適当な別々のサイトを含むように改質されることが可能な物質であり、さらに少なくとも１つの検出方法に対して敏感に反応する物質であることを意味する。当業者が理解しているように、可能な基質の数は非常に多い。可能な基質は、ガラス、改質または機能的ガラス、プラスチック（アクリル、ポリスチレン、スチレンおよびその他の材料の共重合体、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタン、テフロンＪ等を含む）、多糖類、ナイロン、ニトロセルロース、シリコンおよび改質シリコンを含むシリカまたはシリカベース材料、樹脂、カーボン、金属、無機ガラス、プラスチック、オプティカルファイバ束、他の重合体の変形を含むが、これらに限定されない。一般に、基質は光学的に検出可能であるが、それ自体は、それほど蛍光性を有しない。

【００５１】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4486

当業者に理解されるように一般に基板は平坦（平面又はプレーナー）であるが、さらに基板の別の構成を用いてもよい。例として、例えば複数のセルをプラスチックの多孔のブロックに埋め込むことによって、三次元構成を用いることができ、上記多孔のブロックは複数のセルへのサンプルアクセスと、共焦点型顕微鏡を用いて検出することとを可能にする。同様に、フロースルーのサンプル解析をし、サンプルボリュームを最小化するために、複数のセルは管の内側の表面に配置してもよい。好ましい基板は、以下に記述されるような光ファイバー束と、ガラス、ポリスチレン及び別のプラスチック及びアクリルのような平面のプレーナー基板とを含む。

【００５２】

ある好ましい実施形態において、一般に、米国特許出願シリアル番号第０８／９４４，８５０号及び米国特許出願シリアル番号第０８／５１９，０６２号、国際出願ＰＣＴ／ＵＳ９８／０５０２５号及び国際出願ＰＣＴ／ＵＳ９８／０９１６３号に記述されているように、基板は光ファイバー束又はアレーであり、これら先行文献のすべては参照され、特にここに参照文献として含まれている。好ましい実施形態は、予め形成されたユニタリのファイバー光アレーを利用する。「予め形成されたユニタリのファイバー光アレー」によって、ここでは、同軸に配置され、それらの長さ方向に沿って結合された、互いに分離した個別のファイバー光撚り線を意味する。上記複数のファイバーの撚り線は個別にクラッディングされている。しかしながら、予め形成されたユニタリのアレーが別のファイバー光フォーマットから特徴付けられる１つの事実は、上記ファイバーを個別に物理的に取り扱うことができないということである。すなわち１つの撚り線は、一般に、その長さ方向に沿ったどの点においても、別のファイバー撚り線から物理的に分離することができないということである。一般に、本明細書の議論はファイバー光アレーに集中しているが、当業者には理解されるように、ここに記述された任意の実施形態において、上に記述されたような別の基板を用いてもよい。

【００５３】

基板の少なくとも１つの表面は、互いに分離した、個別のサイトを含み、のちに複数のセルを結合するために修正される。これらのサイトは物理的に変えられ

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4487

たサイト、すなわち複数のセルを保持できる、基板上の複数のウェル又は小さな凹部のような物理的に構成した複数のサイトを備え、それによってセルはウェルの中に静止し、又は別の力（磁力又は圧縮力）を用いる複数のサイトを備え、又は生物学的又は化学的に機能的にされた複数のサイト、静電的に変えられた複数のサイト、疎水的／親水的に機能的にされた複数のサイト、粘着性の複数のスポットなどのような、化学的に変えられたサイト又は活性のサイトを備える。

【００５４】

上記サイトは１つのパターン、すなわち規則的なデザイン又は構成でもよく、又はランダムに分布されたパターンでもよい。１つの好ましい実施形態は複数のサイトの規則的なパターンを用い、上記複数のサイトはＸ―Ｙ座標平面にアドレス指定される。この意味の「パターン」は、反復する単位セル、好ましくは基板上に高密度の複数のセルを割り当てるものを含む。しかしながら、これらのサイトは分離したサイトでありえないことを注意するべきである。すなわち、接着剤又は化学的な機能性からなる一様な表面を用いることができ、例えば、このことはセルを任意の位置において付着することを可能にする。すなわち、基板の表面は、個別のサイトが別のサイトと連続であるか非連続であるかにかかわらず、上記個別のサイトにおいて複数のセルの付着を可能にするように修正される。このように、基板の表面は修正され、それによって結合された単一のセルのみを有する分離した複数のサイトを形成し、又はそれに代わって、基板の表面は修正され、複数のセルは任意の場所に行くことができるが、それらは分離した複数のサイトで終わる。

【００５５】

好ましい実施形態において、基板の表面は複数のマイクロウェル（microwell）、すなわち基板の表面の複数の凹部を含むように修正される。このことは、本技術において一般に知られているように、フォトリソグラフィー、スタンプ技術、プレス加工、鋳造、成型、マイクロエッチング、電解析出、化学的又は物理的な蒸気蒸着、マスク又はテンプレートの使用、電気化学機械加工、レーザ機械加工又は切除又は剥離（ablation）、電子ビームの機械加工又は切除又は剥離、及び従来の機械加工を含み、しかしそれらに制限されないさまざまな技術を用いて

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4488

実行することができる。当業者には理解されるように、用いられる技術は基板の組成及び形状に依存する。

【００５６】

ある好ましい実施形態において、複数の物理的な改変が基板の表面に形成され、複数のサイトが生成される。ある好ましい実施形態において、基板はファイバー光束であり、基板の表面は、一般に米国出願シリアル番号第０８／８１８，１９９号及び第０９／１５１，８７７号に記述されているように、ファイバー束の末端であり、これによって上記先行文献の双方は参照され、特にここに参照文献として含まれている。この実施形態において、複数のウェルは個別の複数のファイバーを備えるファイバー光束の末端又はディスタルエンドに形成される。この実施形態において、個別のファイバーのコアはクラッディングに対してエッチングされ、小さなウェル又は凹部がファイバーの１つの末端に形成される。ウェルの要求された深さは、ウェルに付加されるべきセルのサイズに依存する。

【００５７】

この実施形態においては一般に、複数のセルは複数のウェルに電子対を共有せずに結合されているが、さらに以下に略述されるようにウェルは生物学的又は化学的に機能的にされている。それには架橋剤を用いてもよく、又は物理的なバリアー、すなわちセル上にフィルム又は膜を用いてもよい。

【００５８】

ある好ましい実施形態において、基板の表面は生物学的又は化学的に修正された複数のサイトを含むように修正され、上記修正された複数のサイトは、電子対を共有する方法又は電子対を共有しない方法のいずれかで、本発明のセルを基板上の互いに分離した複数のサイト又は位置に結合するために用いることができる。この文脈における「化学的に修正されたサイト」は、

アミノ基、カルボキシル基、オキソ基、チオール基を含む複数の化学的な官能基のパターンを付加することを含み、上記の官能基を用いて、対応する反応性の官能基を一般にそれらの表面にも含む複数のセルを結合することができ、

（前もって化学的に機能化しておき接着剤を付加するか、又は接着剤を直接付加するかのいずれかにより）、複数のセルを結合するために用いることができる

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4489

接着剤のパターンを付加することと、

複数のセルの静電的な結合のために、すなわち複数のセルが複数のサイトに向かい合う荷電した基を備えるときに、荷電した複数の基（化学的な官能性に類似である）のパターンを付加することと、

複数のサイトを区別的に疎水的又は親水的にする複数の化学的な官能基のパターンを付加することとを含み、適当な実験的条件下での同様な疎水的又は親水的なセルの上記付加は、水への親和性の基準に基づいて複数のセルの複数のサイトへの結合をもたらすが、

これらに制限されない。それにかわって、生物学的な修正は、抗原／抗体の対、酵素／基質又は阻害剤の対、受容基－リガンドの対、炭水化物及びそれらの結合パートナー（レクチンなど）を含むが、それらに制限されない、結合リガンド又は結合パートナーの対を用いることを含む。

【００５９】

ある好ましい実施形態において、コア及びクラッディングする材料の間でエッチング速度が異なるという利点がある選択的なエッチング処理によって、光画像ファイバーのディスタル面（distal face）においてマイクロメーターのサイズの複数のウェルのアレーが生成される。この処理は以前に、パンタノ（Pantano）他によってChem. Mater. 8:2832 (1996)に、及びウォルト（Walt）他によって米国特許出願シリアル番号第０８／８１８，１９９号に開示されている。エッチングの反応時間と条件を調整し、結果として生じるマイクロウェルのサイズ及び体積に対して、望まれた制御を及ぼすことを達成する。このように、マイクロウェルはサイズを調整され、任意の所望されたセルの型の１つのセルに適応させる。

【００６０】

センサーアレーのデザインは、商業的に利用可能な光ファイバー及びファイバー光アレー、又は注文生産のファイバー及びファイバーアレーのいずれかを用いる、さまざまなセルのサイズ及び構成を調整適応化する。センサーを製作するための候補となるファイバー又は光ファイバーアレーの主な必要条件は、個別のファイバーがエッチング可能なコアを有するということである。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4490

【００６１】

１つの実施形態において、マイクロウェルの内側の表面は、上で概略が述べられた基板の生物学的な修正に類似の、生物学的に適合性のある材料の薄いフィルム又は保護層でコーティングしてもよい。例えば、フィブロネクチン、コラーゲンを含む任意の数の既知のポリマー、ポリリシン及び別のポリアミノ酸、ポリエチレングリコール及びポリスチレン、発育因子、ホルモン、サイトカインなどを含むが、それらに制限されない、セルの成長又は付着又は接続をサポートすることが知られている材料を用いることができる。同様に、上で概略が述べられたような結合リガンドを、ウェルの表面上にコーティングしてもよい。それに加えて、例えば金のような金属、白金、又はパラジウムのような金属のコーティング又はフィルムを用いてもよい。それに代わる実施形態において、例えば発蛍光団（fluorophore）、発色団（chromophore）又は染料のような指標化合物を、化学的又は生物学的な刺激物へのセルの応答を検出するために、マイクロウェルの表面に結合してもよい。

【００６２】

マイクロウェルを製造する方法は、適当なサイズのマイクロウェルに結合するために広範囲のサイズのセルを調整するように、任意のサイズのファイバーに適応される。例えば、１．６から１００μｍの範囲の直径のコアを有する光ファイバーは、ガリレオ・エレクトローオプティクス・コーポレーション（Galileo Electro-Optics Corp.）（スターブリッジ、マサチューセッツ）又はエドムンド・サイエンティフィック（Edmund Scientific）（バリントン、ニュージャージー）のいずれかより商業的に利用可能である。それに加えて、より大きなサイズは注文によって利用可能である。このように、適当なサイズのファイバーを利用して、典型的には０．７から１．５μｍの細胞の寸法を持つ大腸菌や、典型的には上は１５０μｍまでの細胞の寸法を持つ哺乳類の神経のような、異なるサイズのセルを研究することができる。

【００６３】

１つの実施形態において、ガリレオ・エレクトローオプティクス・コーポレーション（スターブリッジ、マサチューセッツ）から利用可能な、１ｍｍの外径と

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4491

７μｍの個別のファイバーコア直径を持つファイバー光アレーが用いられた。ファイバー光アレーの１つの端部は、マークファイブラブ（Mark V Lab）（イーストグランビー、コネチカット）から利用可能な１２，９，３，１，０．３μｍのアルミニウム酸化物の一連のラッピングフィルムを用いて研磨されている。次いで上記ファイバーは約１分間の超音波処理をされ、研磨手順からのすべての残留物を除去する。１００μＬのフッ化水素酸（５０％）と、０．２ｇのフッ化アンモニウムと、６００μＬの脱イオン化水とを含む緩衝処理をされた７００μＬのフッ化水素酸溶液に、ファイバーのディスタル面を垂直にほぼ６５秒間浸すことによって、エッチング手順が実行された。次いで上記ファイバーは脱イオン化水によってすすがれ、１分間超音波処理をされ、エッチング手順の間に形成されたかもしれないすべての塩を除去する。この実施形態において、エッチングの反応時間は、ウェルのサイズが直径において７ミクロン、深さにおいて３ミクロン、かつ体積において約９０ｆＬであるように調整される。走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）及び原子間力顕微鏡（ＡＦＭ）の双方を、エッチングされたマイクロウェルを特徴付けるために用いてもよい。図２ａにおいて、エッチング手順によって形成された典型的なマイクロウェルアレーが、ＡＦＭ顕微鏡写真で図示されている（ディジタル・インスツルメンツ・ナノスコープ・ＩＩＩａ（Digital Instruments Nanoscope IIIa）、サンタバーバラ、カリフォルニア）。図２において、マイクロウェルアレーの斜視図が提供されている。これらの図において図示されているように、この処理によって形成されたマイクロウェルは、ファイバー光アレーの一様な特徴構造のために非常に均一である。

【００６４】

Ｂ．セルの型の選択

事実上は、光ファイバーの光学的なコアの直径にセルのサイズを一致させることによって、任意の型及びサイズのセルを調整して、本発明のセンサーを製造することができる。事実上は、自然に発生した、又は遺伝子工学で作られた（すなわち外来性核酸を含む）真核生物又は原核生物の細胞の型を、植物、無脊椎動物、細菌及び哺乳類の細胞に対して用いてもよく、上記哺乳類の細胞は、緑の蛍光を発する変成たんぱく質（green fluoresent protein mutants）、霊長類の動物

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4492

、げっ歯類の動物及び人間の細胞を含み、細胞系（cell line）が複数の細胞型の組合わせと同様に好ましい。

【００６５】

一実施の形態としては、ＮＩＨ３Ｔ３マウスの繊維芽細胞が利用される。この細胞は、およそ１５～２０μｍの大きさである。また、別の細胞としては、Ｅ．ｃｏｌｉバクテリアは１×３μｍ、ブドウ球菌はおよそ１μｍ、骨格筋の基となる筋芽細胞は１５～２０μｍ、好中球白血球細胞は１０μｍ、リンパ球白血球細胞は１０μｍ、赤血球細胞は５μｍ、骨芽細胞は１５～２０μｍ、軟骨細胞は１５～２０μｍ、好塩基性白血球細胞は１０μｍ、好酸球白血球細胞は１０μｍ、脂肪性肥満細胞は２０μｍ、無脊椎動物のニューロン（Ｈｅｌｉｘ　ａｓｐｅｒａ）は１２５μｍ、哺乳類のニューロンは、４～１４０μｍ、また、アドレノ骨髄(adrenomedullary)細胞は１３～１６μｍ、メラノサイト(melanocyte)は２０μｍ、上皮細胞は２０μｍ、それに内皮細胞は１５～２０μｍのものを同様に利用してもよい。さらに、以下のものに限られるわけではないが、適当な細胞には、全ての型の腫瘍細胞（特に、メラノーマ、骨髄性白血病、それに肺臓、乳房、卵巣、結腸、腎臓、前立腺、すい臓、こう丸の癌細胞）、心筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、リンパ球細胞（Ｔ細胞、Ｂ細胞）、肥満細胞、好酸球白血球、肝細胞、単核白血球を含む白血球、造血(haemopoetic)性幹細胞や神経、皮膚、肺臓、腎臓、肝臓、それに筋肉等の幹細胞、破骨細胞、軟骨細胞、それに接合性の組織細胞、ケラチン細胞、メラノサイト、肝細胞、腎臓細胞、それに脂肪細胞である。また、適当な細胞には、これに限られるわけではないが、公知の研究された細胞、ＪｕｒｋａｔのＴ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞、ＣＨＯ、ＣＯＳ等を含む。特に有用な細胞列は、American Type Culture Co.(Rockville, MD)から発行されていて入手できる「ATCC Cell Lines and Hybridomas」(8thed.,1994)、「Bacteria and Bacteriophages」(19thed.,1996)、「Yeast」(1995)、「Mycology and Botany」(19thed.,1996)、「Protists:Algae and Protozoa」(18thed.,1993)に見出すことができ、これらの全ては参考文献としてここに含まれる。

【００６６】

Ｃ．マイクロウエル(Microwell)中への細胞分散

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4493

いったんマイクロウエルの大きさを特定の細胞の大きさに適合するように調整したならば、細胞アレーを生成する次のステップは、細胞をそのマイクロウエル内にランダムに分散させることである。図３は、マイクロウエルアレーに細胞を分散させて配置する方法を示す略線図である。細胞の集団は、通常のように細胞が必要とする条件に適合する成長培養液(growth media)で培養される。培養液(culture media)は、細胞系(cell line)プロバイダ、雑誌記事、それに参考テキストで提供されているいずれかの作り方で作られる。特に培養液の準備に有用な参考資料は、参考文献としてここに含まれるAmerican Type Culture Co. (Rockville, MD)から提供されるATCC Quality Control Methods for Cell Lines(2thed.,)である。培養後、通常は、無菌技術を用いてトリプシン処理を行って、細胞を細胞培養皿から引き離し、成長培養液中に懸濁させる。

【００６７】

ある実施形態では、ＮＩＨ３Ｔ３のマウスの繊維芽細胞は、American Type Culture Co. (Rockville, MD)から入手可能である。トリプシンーＥＤＴＡ（０．０５％トリプシン、０．５３ｍＭ　ＥＤＴＡ．４Ｎａ）等のたんぱく質分解酵素によって付着している細胞を培養皿から除去することで細胞をウエル内にランダムに分散させている。このトリプシンーＥＤＴＡは、ＧｉｂｃｏＢＲＬ(Grand Island, NY)から提供されている。また、無菌技術を用いて、１％のストレプトマイシン、１％のＬーグルタミン２００ｍＭ、それに１０％の子牛胎児の血清を用いてなる、ダルベッコ(Dulbecco)による変形イーグル培地（ＧｉｂｃｏＢＲＬ(Grand Island, NY)から入手）等の単一細胞懸濁液中に細胞を入れる。

【００６８】

ウエル内に細胞を分散させるために、約１．５ｍｌの細胞懸濁液が２０００ＲＰＭで３．５分間、遠心法によって濃縮される。上澄みを流して、遠心分離チューブを軽くたたいて細胞を再分散させる。次いで、細胞の懸濁液は、直径１．５ｍｍの毛細管(capillary tube)に加えられる。マイクロウエルアレーに細胞を加える前に、マイクロウエルを含む光ファイバアレーの端部は、約１５分間、細胞培養液を真空で超音波処理して、フラッシュして、培養液でマイクロウエルを満たす。ファイバのマイクロウエル末端は、毛細管に挿入され、試験用フィルムの

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4494

薄い細片で適所に確保される。毛細管／ファイバ組織(set-up)は、垂直位置で１～２時間培養され、懸濁した細胞をウエルに住みつかせ、ウエルの底に付着させる。マイクロウエルを満たすために必要な時間の長さは、細胞がマイクロウエルの底に付着するのに必要な時間に依存するのみである。ウエルに適応しない過剰な細胞は、成長培養液から湿った綿棒で除去される。図４は、エッチングされたマイクロウエル内に分散している一つの細胞のＳＥＭ写真である。

【００６９】

いったん細胞がマイクロウエル内に置かれたら、細胞はおよそ１～２時間でたんぱく質接触でマイクロウエルの表面に付着する。マイクロウエル内の細胞培養液は、光ファイバアレーの末端面を新しい培養液にさらして周期的に培養液を補給してもよく、マイクロウエルのキャビティに栄養物を分散させてもよい。およそ、細胞は１２～１５時間ごとに分裂する。マイクロウエルのサイズによって個々の細胞を制限する傾向がある一方、アレーは、制限された細胞分裂の超過時間に適応する。マイクロウエルの容積によって、細胞分裂を制限するが、それは、細胞同士が接触する場合に生じる周知の接触活動抑制(contact inhibition)の現象によるためである。

【００７０】

Ｄ．細胞生存能力の確立

ある実施形態では、ウエル内の細胞生存能力は、ｐＨ指標として、２’－７’－ビス－（２カルボキシエチル）－５－（６－）－カルボキシフルオレセイン（ＢＣＥＣＦ－ＡＭ）を用いて研究されている。このｐＨ指標は、５０５ｎｍの波長での励起と、５３５ｎｍの波長での光放出を持ち、モレキュラープローブ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）（Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）から入手できる。ＢＣＥＣＦ骨格のアセトキシメチル（ＡＭ）は、溶液中で非蛍光性である。ＢＣＥＣＦ－ＡＭは、細胞膜を透過して細胞内に入っていき、いったん細胞内に入ると、非特異性のエステラーゼによって親油性のブロッキング群は分裂して、その結果、蛍光強度を増加させる。この蛍光性強度の増加は、細胞生存能力を示している。図５は、細胞生存能力の確立のためにセンサアレーで使用される方法のある実施形態を概略的に示すものである。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4495

【００７１】

生存能力のテストのために、あらかじめマイクロウエルに分散された符号化された細胞のアレーを１分間、１μＭのＢＣＥＣＦ－ＡＭ溶液に浸す。細胞アレーを移動して、残りの染料を完全に除去するようにすすぐ。細胞反応としての蛍光イメージは、健康な細胞のｐＨにより蛍光強度が増加するのをモニタするため、１．０秒の取得時間を使って３０秒ごとに取得される。生存能力測定の前に、細胞位置のテンプレートは、ここに記載された符号化法を用いて符号化された細胞の励起を介して生成され、個々の細胞の位置は、アレー内で健康な細胞の位置を特定するために生存能力測定イメージに置かれる。符号化された細胞の蛍光イメージは図６と図７に示され、親油性群が細胞内のＢＣＥＣＦ－ＡＭ染料から分離されることにより、細胞の蛍光強度反応は、漸進的な増加を示す。細胞を含まないウエルの蛍光強度反応は、無視しうる。

【００７２】

別の実施形態では、モレキュラープローブから提供を受けることができるＢＣＥＣＦ－デキストラン(Dextran)は、細胞生存能力測定に用いられる。この染料の０．１μＭ溶液がマイクロウエルアレーに含まれる細胞培養液に加えられる。ＢＣＥＣＦは２つの波長４９０ｎｍと４４０ｎｍでの励起を必要とし、各波長について５３０ｎｍで放出される光強度はｐＨに比例する。この染料は、細胞膜を介して細胞内に入るのを妨げるために大きなデキストラン群を共役させている。そのため、ＢＣＥＣＦ－デキストランは、細胞代謝による外部細胞環境のｐＨの低下をモニタできる。図１０は、細胞代謝によって細胞環境のｐＨが徐々に低下している９つの細胞の平均的反応を示している。

【００７３】

別の実施形態では、市販の細胞生存能力検定物のモレキュラープローブ（Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）から入手可能なＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（商標）が利用される。この検定物によって、細胞間のエステラーゼ活性と形質膜の完全な状態に基づく２色蛍光の細胞生存能力検定できる。生きている細胞は、酵素による細胞透過性の非蛍光性カルセインＡＭから蛍光性カルセインへの変化で見分けることができ、この蛍光性カルセインは、４９５ｎｍの波長での励起と５１５ｎｍの波長での放

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4496

出を伴う。死んだ細胞は、エチジウムのホモ二量体（ＥｔｈＤ－１）の核酸との結合によって見分けることができ、このホモ二量体は、４９５ｎｍの波長での励起と６３５ｎｍの波長での光放出を伴い、核酸との結合で蛍光強度は４０倍に増加する。ＥｔｈＤ－１は、生きている細胞の完全な形質膜によって遮断される。この染料は事実上細胞との相互作用の前は非蛍光性であるので、バックグランドの蛍光レベルは、この検定方法では本質的に低い。

【００７４】

通常の手順では、２μＭのカルセインと４μＭのＥｔｈＤ－１作用溶液は、血清(serium)フリーの培養液に準備される。ＮＩＨ３Ｔ３のマウスの繊維芽細胞は、マイクロウエルアレーの末端面で培養される。イメージファイバの基部面は、イメージシステムに合焦される。イメージファイバの末端面の細胞アレーは、染料なしで、血清(serium)フリーの培養液に置かれる。細胞アレーは、４９５ｎｍの波長で励起して、２５の細胞の集団からの光放出値は、５１５ｎｍ（生きている細胞）と６３５ｎｍ（死んだ細胞）の波長で３００ｍｓの間、取得される。これらの値は、これらの測定を研究するバックグランドとして役立つ。そして、細胞アレーは、染料溶液に置かれ、その細胞アレーは、４９５ｎｍで励起され、２５細胞からの光放出値は、５１５ｎｍ（生きている細胞）と６３５ｎｍ（死んだ細胞）の波長で１分ごとに３００ｍｓ間取得され、３０分間にわたって繰り返される。全測定は室温で行われる。生きている細胞と死んだ細胞の平均的な蛍光強度は、各光放出波長でのバックグランド蛍光を取り去った後に時間についてプロットされる。

【００７５】

この検定は、バイオセンサーアレーのマイクロウエルを細胞挿入前に培養液で満たす前処理方法を評価するために用いられる。好ましい実施形態では、種々の処理後にマイクロウエルに置かれた細胞の生存能力を比較することによって、細胞挿入前に真空下で１５分間マイクロウエルアレーを音波処理することが、マイクロウエルが培養液で満たされるのを確実にするので、生存能力を改善することがわかる。図１１ａでは、なにも前処理をすることなく行われた場合について、死んだ細胞と生きている細胞の平均的な蛍光強度が時間についてプロットされて

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4497

いる。図１１ｂでは、所定のマイクロウエルアレーについての結果がプロットされている。２つの図を比較することで、細胞挿入前にマイクロウエルをあらかじめ培養液で満たすことの有利さを明らかにしている。この例では、細胞を加える前にマイクロウエルアレーが音波処理されていないと、細胞は、即時に死を迎える。一方、この例では、マイクロウエルアレーに培養液を満たすために、マイクロウエルが真空下で音波処理された場合には、細胞は約２０分間生育できることを示している。

【００７６】

Ｅ．細胞集団の符号化

本発明におけるバイオセンサアレーの特有の特徴は、ランダムに混合された細胞集団が利用されている場合に、アレー内の細胞の同一性を維持するために各細胞集団の細胞が個々に符号化されていることである。細胞は、単一の発蛍光団や発色団の染料、又はこれらの染料の比で符号化されていてもよい。別の場合には、細胞に無毒の蛍光性化合物を細胞質に注入するか、緑色蛍光性のたんぱく質変異体のような化学ルミネセンスやバイオルミネセンスを示す自然物や遺伝的に設計された細胞系(cell line)を利用してもよい。多数の細胞集団は、バイオセンサアレー内にランダムに混合されていてもよいが、アレーが励起光エネルギーによって照射された場合には、各細胞タイプと位置は、特性光反応サインを介して決定される。細胞はマイクロウエル内に配置される前に符号化されていてもよく、別の場合には、以下の配置でもよい。ある実施形態では、単一の発蛍光団や発色団の物質や染料が細胞の符号化に用いられる。別の実施形態では、２以上の符号化物質や染料は、細胞集団を符号化するためや、励起光エネルギーにさらされて発生する各物質や染料からの光学反応の光強度比を符号化するために用いられてもよく、この２以上の符号化物質や染料は、細胞集団内にある個々の細胞の位置を特定し、それらをアレー内に配置するために用いられる。別の種々の実施形態では、細胞は、染料化合物によって符号化されていてもよく、この染料化合物は、細胞に吸収されて、又は、局所的な細胞環境で供給されて細胞と結合する。

【００７７】

広範な種類の発蛍光団、発色団、染料または色素化合物がエンコーディング細

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4498

胞として使用されてもよい。エンコーディング色素は、細胞膜に対して浸透性または非浸透性であってよい。非浸透性の色素はアセトキシメチルエステルとコンジュゲートし、細胞により取りこまれる。一つの実施形態において、従来のコンジュゲートまたは反応性細胞膜染料、細胞トレーサ、又は、フルオレセイン、ローダミン、エオシン、ナフタリミド、フィコビリンプロテイン、ニトロベンゾオキサジアゾールのような細胞プローブが使用されてもよい。別の実施形態では、ＳＹＴＯ（分子プローブ）（登録商標）のようなシアニン色素、アミン反応性色素、チオール反応性色素、親油性色素や、アクリンオレンジのようなＤＮＡ挿入剤（DNA intercalator）が使用されてもよい。一つの実施形態において、蛍光体または発色体のエンザイム基板が、細胞に取りこまれてもよい。グリコシダーゼ、フォスファターゼ、ルシファラーゼまたはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼのような細胞間エンザイムにより処理され、かつ、細胞集団に対しエンコーディングを行なってもよい。別の実施形態において、細胞有機色素プローブがエンコーディングのために使用されてもよい。１つの実施形態において、カーボシアニンや親油性アミノスタイラルス（lipophilicaminostyrls）のような細胞膜プローブがエンコーディングのために使用されてもよい。

【００７８】

例として、テーブル１とテーブル２は、種々の色素と、それらに対応する本発明のセンサアレイの細胞集団のエンコーディングに役に立つ励起及び発光波長の一部分的のリストを与える。さらに、他の種類のエンコーディング色素について特に有効となる参考文献は、「蛍光プローブと調査化学薬品のハンドブック（６版）」（Ｒ．Ｐホーグランド著、分子プローブ社（ウジェーヌ、ＯＲ、１９９６））である。

【００７９】

細胞をエンコーディングすることにより、アレイを機械的な走査、細胞の位置の機械的なインデックス、各細胞の測定のためのアレイの機械的な配置の必要性が消滅する。さらに、各細胞がエンコードされるため、各細胞の応答が特定の細胞集団のタイプに直ちに関連しているので、アレイ内の全ての細胞をエンコードすることにより、同時にアレイ全体の測定が可能となる。このように細胞をエン

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4499

コードすることにより、各細胞を連続的に測定するためにアレイを機械的に走査することなく、全ての細胞及びアレイ内の細胞集団を迅速に同時に測定することができる。最初の細胞の測定と最後の細胞の測定の間で遅延を増大させずにアレイ内の全ての細胞の応答の監視と測定を同時に行なうため、本発明のバイオセンサアレイは、生物学的な刺激に対する細胞の短い期間の応答と長い期間の応答の双方とも監視することができる。このように本発明のバイオセンサアレイは、細胞の応答と検体に関する応答の双方を測定できる独特の機能を有する。この特徴により、関心のある生物学的または化学的な検体の検出に対して有効な応答情報の識別が可能となる。

【００８０】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4500

表１

１．原形質膜染色剤群

ＰＫＨ２２ 緑色蛍光色素　　５５１ｅｘ／５６７ｅｍ

ＰＫＨ６７ 緑色蛍光色素　　４９０ｅｘ／５０２ｅｍ

ＰＫＨ２６ 赤色蛍光色素　　５５１ｅｘ／５６７ｅｍ

親油性カルボシアニン群

ＤｉＩ－橙（オレンジ）色蛍光

ＤｉＯ－緑色蛍光

ＤｉＤ－赤色蛍光

ＦＭ 1-43 －緑色蛍光　５１０ｅｘ／６２６ｅｍ

ＦＭ 4-64 －赤色蛍光　５１５ｅｘ／６４０ｅｍ

ＲＨ 414 －橙色蛍光　５３２ｅｘ／７１６ｅｍ

親油性デキストラン群

テトラメチルローダミンデキストラン群（10,000 MW）　470ex/500em

フルオレセインデキストラン（10,000 MW）　495ex/530em

２．追跡用プローブ群（Tracker Probes）

青色

7－アミノ－4－クロロメチルクマリン	354ex/466em
4－クロロメチル－6,8－ジフルオロ－7－ヒドロキシクマリン	371ex/464em
4－クロロメチル－7－ヒドロキシクマリン	372ex/470em

緑色

5－クロロメチルフルオレセインジアセテート	492ex/516em
8－クロロメチルBODIPY	522ex/528em

黄色－緑色

5－クロロメチルエオシンジアセテート	524ex/544em

橙色

5-(and 6)-(((4-クロロメチル)ベンゾイル)アミノ)テトラメチルローダミン	540ex/566em

３．アミン反応性プローブ群

フルオレセインイソチオシアネート	494ex/519em
カルボキシフルオレセイン スクシンイミジルエステル群	504ex/529em
カルボキシエオシン スクシンイミジルエステル群	492ex/517em

【００８１】

一つの実施形態においては、多くのエンコーディング色素と方法が利用可能で

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4501

あり、外部蛍光細胞膜ラベル、励起波長４９０ｎｍで発光波長５０２ｎｍについてＰＫＨ６７、及び、励起波長５５１ｎｍで発光波長５６７ｎｍについてＰＫＨ２６が利用された。ＰＫＨ２６とＰＫＨ６７は、ザイナクシス・セル・サイエンス（Zynaxis Cell Science）社（マーベルン、ＰＡ）により製造されてZyn-Linkerの商標（ファノス・テクノロジー社）で販売され、ホーガン等による米国特許第５，６６５，３２８号の方法により製造され、シグマ（Sigma）社（セントルイス、Ｍｏ）により利用可能な色素のファミリーの一部分である。本実施形態において、双方の色素は繊維芽細胞に供給され、センサアレイ内に配置される前の細胞をエンコードした。エンコードされた細胞は、増殖媒体（growth media）で充填されたマイクロウェルに配置された。そして、エンコードされた細胞は、ファイバ光アレイを介して伝送された励起光により照射され、発生した細胞の蛍光発光応答は同じファイバを通して集められ、検出システムに入力される。図６は、本発明のバイオセンサアレイ内のエンコードされた細胞集団ＰＫＨ２６の典型的な蛍光光学画像を示す。図８は、本発明のバイオセンサアレイ内のエンコードされた細胞集団ＰＫＨ６７の典型的な蛍光光学画像を示す。エンコードされた細胞を含むそれらのマイクロウェルのみが、エンコーディング色素波長で励起により蛍光信号を発生することに注意すべきである。

【００８２】

典型的なエンコーディング手順において、外部または内部のエンコーディングラベルが、センサアレイ内に配置する前に細胞集団を懸濁する（suspend）ために与えられる。一つの実施形態において、外部のラベルは、細胞に対して、漿(しょう)液（serum）を含まない媒体により懸濁された細胞を洗浄し、その後、２０００ＲＰＭ（回転／分）で５分間細胞を遠心分離し、やわらかいペレットにすることにより、与えられる。上清は除去され、遠心分離チューブは、再度懸濁するために液がとられる。シグマ社による、染料材料として利用できる約１ｍＬの希釈液Ｃが、細胞に加えられ、チューブは混合のために反転させられる。エンコーディングする直前に、4×10^{-5}Mの希釈溶液Ｃの色素溶液が準備される。懸濁された細胞は、色素の溶液に加えられ、細胞／色素溶液をピペットで取ることにより混合され、５分間保温される。エンコーディング反応を停止するために、

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4502

細胞に２ｍＬの牛の胎児の漿(しよう)液が加えられ、１分間保温され、その後、４ｍＬの成長媒体を加えることにより希釈される。そして、細胞は、２０００ＲＰＭで１０分間遠心分離にかけられ、細胞を染料溶液から抽出する。上清は除去され、細胞は新しいチューブに移される。最後に、細胞は、１０ｍＬの増殖媒体を加え、遠心分離し、細胞を再度懸濁することにより、最小の３度の洗浄がなされる。

【００８３】

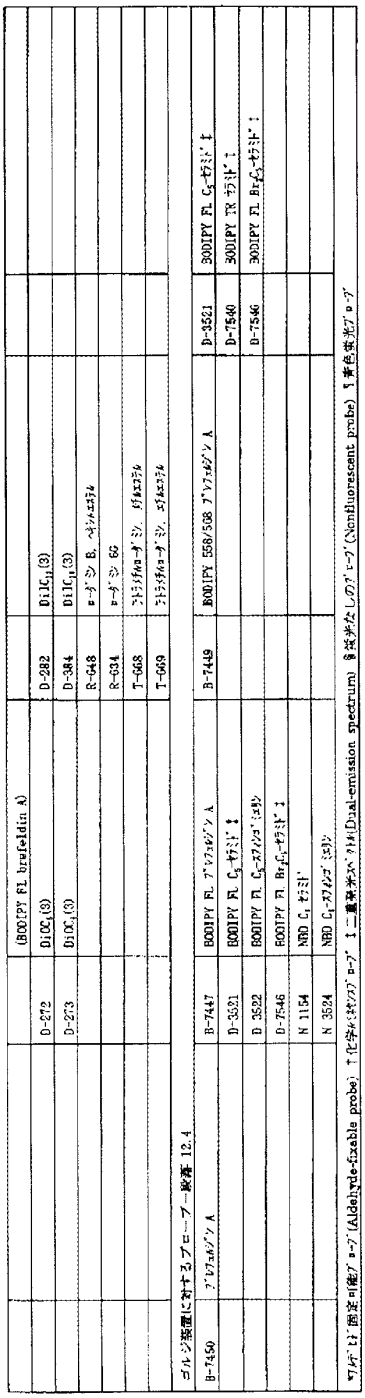
表２

表 12.1 Molecular Probes 社の細胞小器官選択的プローブ群

青色蛍光および蛍光なしのプローブ		緑色蛍光プローブ		黄色および橙色蛍光プローブ		赤色蛍光プローブ	
ｶﾀﾛｸﾞ番号	プローブ	ｶﾀﾛｸﾞ番号	プローブ	ｶﾀﾛｸﾞ番号	プローブ	ｶﾀﾛｸﾞ番号	プローブ
ミトコンドリアに対するプローブ－段落 12.2							
L-6868	ﾙｼｹﾞﾆﾝ(Lucigenin†)	A-1372	ﾉﾆﾙｱｸﾘｼﾞﾝｵﾚﾝｼﾞ (Nonyl acridine orange)	D-288	4-Di-1-ASP(DASPMI)	M 7512	MitoTracker ﾚｯﾄﾞ CMXRos*
		D-273	$DiOC_6(3)$	U-308	2-Di-1-ASP(DASPMI)	T 3168	JC-1‡
		D-303	$DiOC_2(5)$	D 426	DASPEI		
		D-378	$DiOC_7(3)$ (植物ﾐﾄｺﾝﾄﾞﾘｱ用)	M-7510	MitoTracker ｵﾚﾝｼﾞ CMTMRos*		
		M-7502	MitoFluor グリーン	R-634	ﾛｰﾀﾞﾐﾝ 6G		
		M-7514	MitoTracker グリーン FM*	R-648	ﾛｰﾀﾞﾐﾝ B, ｴﾁﾙｴｽﾃﾙ		
		R-302	ﾛｰﾀﾞﾐﾝ 123(Rhodamine 123)	T-639	ﾃﾄﾗﾒﾁﾙﾛｰｻﾞﾐﾝ(Tetramethylrosamine)		
		S-7529	SYTO 16 酵母ﾐﾄｺﾝﾄﾞﾘｱ染色対	T-668	ﾃﾄﾗﾒﾁﾙﾛｰﾀﾞﾐﾝ, ﾒﾁﾙｴｽﾃﾙ		
		T-3168	JC-1‡	T-669	ﾃﾄﾗﾒﾁﾙﾛｰﾀﾞﾐﾝ, ｴﾁﾙｴｽﾃﾙ		
ミトコンドリアに対するプローブ（細胞内酸化に必要とされるプローブ）－段落 12.2							
		D 632	ｼﾞﾋﾄﾞﾛﾛｰﾀﾞﾐﾝ 123	D-633	ｼﾞﾋﾄﾞﾛﾛｰﾀﾞﾐﾝ 6G	M-7513	MitoTracker ﾚｯﾄﾞ CM-H_2XRos*
				D-638	ｼﾞﾋﾄﾞﾛﾃﾄﾗﾒﾁﾙﾛｻﾞﾐﾝ		
				M-7511	MitoTracker ｵﾚﾝｼﾞ CM-H_2TMRos*		
リソソームを含む、酸性細胞小器官に対するプローブ－段落 12.3							
D-1552	DAMP§	L-7526	LysoTracker ｸﾞﾘｰﾝ DND-26	D-113	ﾀﾞﾝｼﾙｶﾀﾞﾍﾟﾘﾝ(Dansyl cadaverine)	L-7528	LysoTracker ﾚｯﾄﾞ DND-99
H-7599	ﾋﾄﾞﾛｷｼｽﾁﾙﾍﾞﾐｼﾞﾝ (Hydroxystilbamidine)¶	L-7542	LysoTracker ｸﾞﾘｰﾝ Br_2	L-7527	LysoTracker ｲｴﾛｰ DND-68		
L-7525	LysoTracker ﾌﾞﾙｰ DND-22¶						
L-7537	LysoTracker ﾋﾞｵｻﾝ§						
L-7538	LysoTracker ﾋﾞｵｻﾝ/DNA§						
リソソームを含む、酸性細胞小器官に対するプローブ（pH感受性プローブ） 段落 12.3							
L-7532	LysoSensor ﾌﾞﾙｰ DND-192¶	L-7534	LysoSensor ｸﾞﾘｰﾝ DND-153	A-1301	ｱｸﾘｼﾞﾝｵﾚﾝｼﾞ	N-3246	ﾆｭｰﾄﾗﾙﾚｯﾄﾞ(Neutral red)
L-7533	LysoSensor ﾌﾞﾙｰ DND-167¶	L-7535	LysoSensor ｸﾞﾘｰﾝ DND-189	L-7545	LysoSensor ｲｴﾛｰ/ﾌﾞﾙｰ DND-160‡		
L-7545	LysoSensor ｲｴﾛｰ/ﾌﾞﾙｰ DND-160‡						
小胞体に対するプローブ－段落 12.4							
		B-7447	BODIPY FL ｼﾞﾌﾙｵﾚﾝｼﾞﾝ A	B-7449	BODIPY 558/568 ｼﾞﾌﾙｵﾚﾝｼﾞﾝ A		

特表2002-506200

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4504



【００８４】

ＰＫＨ２６とＰＫＨ６７の色素を用いて、エンコーディング方法を説明するた

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4505

めに、エンコードされたＮＩＨ３Ｔ３マウス繊維芽細胞がセンサアレイ内のマイクロウェル内に分散させられ、アレイ内のエンコードされた細胞の位置は５５１ｎｍの波長での細胞の励起により決定される。励起したとき、エンコードされた細胞は、センサアレイ内で独特の検出可能な蛍光パターンを形成する。そのとき、センサアレイにおいては、そのパターンが、ＢＣＥＣＦと５０５ｎｍの励起波長を用いて細胞の生存能力（cell viability）の測定のための位置のテンプレートを与える。ラベルとＢＣＥＣＦ－ＡＭ色素をエンコードするＰＫＨ２５の励起波長及び発光波長は２つの色素間で干渉しないように十分に分離される。図６は、バイオセンサにおけるエンコードされた細胞ＰＫＨ２６の位置を特定する特徴的な蛍光画像パターンである。類似のプロシージャが、対応する特徴的な蛍光画像パターンが図８に示されるＰＫＨ６７のマウス繊維芽細胞をエンコードするために、続いて行なわれた。

【００８５】

単一の色素を持つ各細胞集団をエンコードすることに加え、アレイ内の各細胞集団は、個別の波長範囲で特徴的な蛍光強度比を発生する独特の色素比でエンコードされてもよい。色素比の範囲は、多数の細胞集団を識別するために有効な一連のエンコード比を発生さ細胞２つ以上の色素の組み合わせが採用されてもよい。細胞集団をエンコードするために使用される特定の色素比により生成される蛍光強度比は、各発光波長で平均強度から背景強度を引き、２つの値を除算して、その特定の比の範囲を得る。

【００８６】

１つの実施形態において、２つの別々のＮＩＨ３Ｔ３マウス繊維芽細胞の集団が、ＰＨＫ６７とＰＨＫ２６の色素の比が１：５または５：１のいずれかで細胞膜によりラベリングされることによりエンコードされた。各細胞集団は約１２５のエンコードされた細胞からなっていた。細胞集団は、４９０ｎｍと５５１ｎｍの励起波長で照射され、発光した蛍光強度比は５０２ｎｍと５６７ｎｍに測定された。各色素比に対する平均強度比は２日間にわたって測定された。ＰＫＨ６７／ＰＫＨ２６が１：５のときの初期の平均強度比は、０．０８６３であり、５：１の色素比のとき、その比は０．７０１４であった。１：５の比のときの最後の

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4506

平均の強度比は０．２６５５であった。５：１の比に対しては０．９０９０であり、それは、細胞の分離が起こった場合であっても、それらの比が合理的に安定し、また、まだ色素比が時間的に分離可能のままであることを示す。このように、色素比は、本発明のバイオセンサアレイの上に無秩序に散在された細胞集団を識別し、かつ、配置するための有効な代替のエンコーディング機構を提供することができる。

【００８７】

Ｆ．インジケータ色素

個々の細胞及び細胞集団の化学的または生物学的な刺激に対する光学的な応答は、典型的には、結合した個々の細胞を、発蛍光団、発色団、染料、色素化合物のいずれかであってもよい適当なインジケータと結合させることにより、尋問され、検出される。もし、インジケータが細胞応答を含まなければ、任意の適当なインジケータ又はインジケータの組み合わせが利用されてもよい。

【００８８】

例えば、フルオレセイン、ローダミン、ナフタリミド、フィコビリンプロテイン、ニトロベンゾールジアゾールのような従来の細胞発蛍光団プローブが利用されてもよい。代わりに、浸透性または非浸透性の細胞膜ポテンシャルインジケータ、イオンインジケータ、反応オゾンインジケータ、及び、ｐＨインジケータが採用されてもよい。一例として、本発明のバイオセンサアレイに対して特定の利用を有する多数のインジケータがテーブル３とテーブル８にそれらの特有の励起及び発光波長とともにリストに挙げられている。適当なインジケータを選択するために特に有効となる参考文献は、「蛍光プローブと調査化学薬品のハンドブック（６版）」（Ｒ．Ｐホーグランド著、モレキュラ・プローブ社（ウジェーヌ、ＯＲ、１９９６））である。

【００８９】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4507

表３

表 23.1　Molecular Probes 社のｐＨ指示薬ファミリー（ｐＫ$_a$降順）

親発蛍光団	pH範囲	典型的な測定
SNAFL指示薬	7.2-8.2	励起比490/540nmまたは発光比540/630nm
SNARF指示薬	7.0-8.0	発光比580/640nm
HPTS(ﾋﾟﾗﾆﾝ)	7.0-8.0	励起比450/405nm
BCECF	6.5-7.5	励起比490/440nm
ﾌﾙｵﾚｾｲﾝおよび ｶﾙﾎﾞｷｼﾌﾙｵﾚｾｲﾝ	6.0-7.2	励起比490/450nm
ｵﾚｺﾞﾝｸﾞﾘｰﾝ色素(Oregon Green dyes)	4.2-5.7	励起比510/450nmまたは励起比490/440nm
ﾛﾄﾞﾙ(Rhodols, NERF色素を含む)	4.0-6.0	励起比514/488nmまたは励起比500/450nm
LysoSensor ﾌﾟﾛｰﾌﾞ	3.5-8.0*	励起比340/380nm†
*選択されたプローブのｐＫ$_a$に依存；各LysoSensorプローブのｐＫ$_a$に関しては表23.2を参照のこと。†L-7545にのみ適用。他のLysoSensorプローブは単一の励起および発光測定のみを与える；波長に関しては表23.2を参照のこと。		

【００９０】

表 23.2　我々の LysoSensor プローブのｐＨ応答一覧

ｶﾀﾛｸﾞ番号	LysoSensorﾌﾟﾛｰﾌﾞ	Abs/Em*(nm)	pK$_a$†	有用なpH範囲†
L-7532	LysoSensor ﾌﾞﾙｰ DND-192	374/424	7.5	6.5-8.0
L-7533	LysoSensor ﾌﾞﾙｰ DND-167	373/425	5.1	4.5-6.0
L-7534	LysoSensor ｸﾞﾘｰﾝ DND-153	442/505	7.5	6.5-8.0
L-7535	LysoSensor ｸﾞﾘｰﾝ DND-189	443/505	5.2	4.5-6.0
L-7545	LysoSensor ｲｴﾛｰ/ﾌﾞﾙｰ DND-160	384/540 ‡ 329/440 §	4.2	3.0-5.0
*ｐＨ５での吸光度（absorption, Abs）および蛍光発光（Em）最大値；値は細胞環境において幾分変化し得る。†すべてのｐＫ$_a$値はインビトロで測定した；細胞内では値が異なる可能性がある。‡ｐＨ３での値。§ｐＨ７での値。				

【００９１】

表 23.4　反応性ｐＨ指示薬色素

pH指示薬	好ましい反応形態
BCECF	BCECF (B-1151, 段落23.2を参照のこと)*
ｶﾙﾎﾞｷｼﾌﾙｵﾚｾｲﾝ	5-(and-6)-ｶﾙﾎﾞｷｼﾌﾙｵﾚｾｲﾝ, ｽｸｼﾝｲﾐｼﾞﾙｴｽﾃﾙ (C-1311, 段落1.3を参照のこと)
Cl-NERF	Cl-NERF (C-6831, 段落23.3を参照のこと) *
ｼﾞｸﾛﾛﾌﾙｵﾚｾｲﾝ	2',7'-ｼﾞｸﾛﾛﾌﾙｵﾚｾｲﾝ-5-ｲｿﾁｵｼｱﾈｰﾄ (D-6078, 段落1.5を参照のこと)
ｼﾞﾒﾁﾙﾌﾙｵﾚｾｲﾝ	5-(and-6)-ｶﾙﾎﾞｷｼ-4',5'-ｼﾞﾒﾁﾙﾌﾙｵﾚｾｲﾝ (C-366, 段落23.2を参照のこと)*
DM-NERF	DM-NERF (D-6830, 段落23.3を参照のこと)*
ﾅﾌﾄﾌﾙｵﾚｾｲﾝ	5-(and-6)-ｶﾙﾎﾞｷｼﾅﾌﾄﾌﾙｵﾚｾｲﾝ, ｽｸｼﾝｲﾐｼﾞﾙｴｽﾃﾙ (C-653)
ｵﾚｺﾞﾝｸﾞﾘｰﾝ 488	ｵﾚｺﾞﾝｸﾞﾘｰﾝ 488 ｶﾙﾎﾞﾝ酸, ｽｸｼﾝｲﾐｼﾞﾙｴｽﾃﾙ (O-6147, O-6149)
ｵﾚｺﾞﾝｸﾞﾘｰﾝ 500	ｵﾚｺﾞﾝｸﾞﾘｰﾝ 500 ｶﾙﾎﾞﾝ酸, ｽｸｼﾝｲﾐｼﾞﾙｴｽﾃﾙ (O-6136)
ｵﾚｺﾞﾝｸﾞﾘｰﾝ 514	ｵﾚｺﾞﾝｸﾞﾘｰﾝ 514 ｶﾙﾎﾞﾝ酸, ｽｸｼﾝｲﾐｼﾞﾙｴｽﾃﾙ (O-6139)
ﾛﾄﾞﾙｸﾞﾘｰﾝ (Rhodol Green)	ﾛﾄﾞﾙｸﾞﾘｰﾝ ｶﾙﾎﾞﾝ酸, ｽｸｼﾝｲﾐｼﾞﾙｴｽﾃﾙ (R-6108)
SNAFL-1	5-(and-6)-ｶﾙﾎﾞｷｼ SNAFL-1, ｽｸｼﾝｲﾐｼﾞﾙｴｽﾃﾙ (C-3061)
SNAFL-2	5-(and-6)-ｶﾙﾎﾞｷｼ SNAFL-2, ｽｸｼﾝｲﾐｼﾞﾙｴｽﾃﾙ (C-3062)
SNARF-1	5-(and-6)-ｶﾙﾎﾞｷｼ SNARF-1 (C-1270, 段落23.2を参照のこと)*
*カルボン酸は、アミンと反応させる前に、EDAC/NHSSで活性化する必要がある（段落1.1を参照のこと）。	

【００９２】

表４

表 23.3　Molecular Probes 社のｐＨ指示薬デキストラン（ｐK_a降順）

色素	ｶﾀﾛｸﾞ番号	pK_a*	測定波長	適用注記
SNAFL	D-3301, D-3302	～7.8	励起比490/540nm (580nmで検出) 発光比540/630nm (514nmで励起)	酸性形態は高い量子収率を有する(図23.7を参照)。 蛍光は酸性の細胞小器官において増加する。
SNARF	D-3303, D-3304	～7.5	発光比580/640nm (514または488nmで励起)	ｶﾙﾎﾞｷｼSNARF-1と類似のｽﾍﾟｸﾄﾙを有する、比率測定性発光測定(ratiometric emission measurements)に関して最適な共役物(図23.6を参照)
HPTS	D-7179	～7.0	励起比470/380nm (530nmで検出)	ﾃﾞｷｽﾄﾗﾝ共役物のｽﾍﾟｸﾄﾙは、遊離の色素と比べて有意にｼﾌﾄする(～20nm)。
BCECF	D-1878, D-1879, D-1880	～7.0	励起比490/440nm (530nmで検出)	BCECFと類似のｽﾍﾟｸﾄﾙを有する、比率測定性励起測定に関して最適な共役物(図23.3を参照)
ﾌﾙｵﾚｾｲﾝ	D-1821, D-1823, D-1844, D-1899, D-3305	～6.4	励起比490/450nm (520nmで検出)	酸性の細胞小器官に取り込まれると、蛍光が強くクエンチされる(図23.2Bを参照)。

特表2002-506200

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4510

【００９３】

フルオレセインおよびテトラメチルローダミン	D-1950, D-1951	～6.4	励起比495/555nm (580nmで検出) †	pH感受性およびpH非感受性の蛍光色素の両者を包含している共役物(図23.14を参照)
ロドルクリーン	D-7148, D-7150	～5.6	励起比500/450nm (530nmで検出)	・高い光安定性・pH6以下で最も有用(図23.15を参照)
DM-NERF	D-3319, D-3320	～5.4	励起比510/450nm (540nmで検出)	・Cl-NERFデキストランより高いpHで有用(図23.1‡を参照)
オレゴングリーン 488	D-7170, D-7172	～4.7	励起比490/440nm (520nmで検出)	・良好な光安定性・DM-NERFとCl-NERFの間の至適pH感受性範囲
オレゴングリーン 514	D-7174, D-7176	～4.7	励起比510/450nm (530nmで検出)	・優れた光安定性・DM-NERFとCl-NERFの間の至適pH感受性範囲(図23.11を参照)
Cl-NERF	D-3324, D-3325	～3.8	励起比510/450nm (540nmで検出)	・DM-NERFデキストランより低いpHで有用(図23.12を参照)
*pK_a値は遊離の色素に対して測定されたものである。デキストラン共役物に対する実際の値は、+/-0.3pH単位まで変化し、生成物のロットによって変化し得る。†原理的には、520/580nmでの比率測定性発光測定(495nmで励起)もまた可能である；しかし蛍光共鳴エネルギー転移(fluorescence resonance energy transfer)によって、その応答は複雑になり得る。				

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4511

表５

表 22.1　Molecular Probes 社から入手可能な蛍光Ｃａ$^{2+}$指示薬一覧

Ca^{2+}指示薬	塩*	AMｴｽﾃﾙ†	ﾃﾞｷｽﾄﾗﾝ‡	ﾓｰﾄﾞ§	K_d(nM)¶	注記
ﾋﾞｽ-ﾌﾗ (Bis-fura)	B 6810			Ex 340/380	370	1
BTC	B-6790	B-6791		Ex 400/480	7000	2
ｶﾙｼｳﾑｸﾞﾘｰﾝ-1 (Calcium Green-1)	C-3010	C-3011, C-3012	C6765, C-3713. C-3714, C-6766	Em 530	190	3, 4
ｶﾙｼｳﾑｸﾞﾘｰﾝ-2	C-3730	C-3732		Em 535	550	3, 5
ｶﾙｼｳﾑｸﾞﾘｰﾝ 5N	C-3737	C-3739		Em 530	14, 000	3
ｶﾙｼｳﾑｵﾚﾝｼﾞ	C-3013	C-3015		Em 575	185	2
ｶﾙｼｳﾑｵﾚﾝｼﾞ-5N	C-6770	C-6771		Em 580	20, 000	2
ｶﾙｼｳﾑｸﾘﾑｿﾞﾝ	C-3016	C-3018	C-6824, C-6825	Em 615	185	2
ﾌﾙｵ-3 (Fluo-3)	F-1240, F-3715	F-1241, F-1242		Em 525	390	3, 4
ﾌﾗ 2	F-1200, F-6799	F-1201, F-1221, F-1225	F-6764, F-3029, F-3030	Ex 340/380	145	2
ﾌﾗ ﾚｯﾄﾞ	F-3019	F-3020, F-3021		Ex 420/480	140	2, 6, 7
ｲﾝﾄﾞ-1 (Indo-1)	I-1202	I-1203, I-1223, I-1226	I-3032, I-3033	Em 405/485	230	2
ﾏｸﾞ-ﾌﾗ-2 (Mag-fura-2)	M-1290	M-1291, M-1292		Ex 340/380	25, 000	2
ﾏｸﾞ-ﾌﾗ-5	M-3103	M-3105		Ex 340/380	28, 000	2
ﾏｸﾞ-ｲﾝﾄﾞ-1	M-1293	M-1295	M-6907, M-6908	Em 405/485	35, 000	2, 8
ﾏｸﾞﾈｼｳﾑｸﾞﾘｰﾝ	M-3733	M-3735		Em 530	6000	3
ｵﾚｺﾞﾝｸﾞﾘｰﾝ488 BAPTA-1	O-6806	O-6807	O-6798, O-6797	Em 520	170	3
ｵﾚｺﾞﾝｸﾞﾘｰﾝ488 BAPTA-2	O-6808	O-6809		Em 520	580	3, 9
ｵﾚｺﾞﾝｸﾞﾘｰﾝ488 BAPTA-5N	O-6812	O-6813		Em 520	20, 000	3
ｸｲﾝ-2 (Quin-2)	Q-1287	Q-1288, Q-1289		Em 495	60	2, 10
ﾛﾄﾞ-2 (Rhod-2)	R-1243	R-1244, R-1245		Em 570	570	2
ﾃｷｻｽﾚｯﾄﾞ-ｶﾙｼｳﾑｸﾞﾘｰﾝ			C-6800	Ex 535/615	370	11

*細胞不浸透性塩に関するカタログ番号。†細胞浸透性AMエステルに関するカタログ番号。‡デキストラン共役物に関するカタログ番号。§測定波長(nm)。Ex=蛍光励起およびEm=蛍光発光。一対の波長が表記されている指示薬は二波長比率測定能(dual-wavelength ratio-measurement capability)を有する。¶Ca^{2+}解離定数(特に記載しないかぎり、Molecular Probesにて、100mM KCl, 10mM MOPS, pH7.2中、22℃、インビトロで測定)。K_d値は温度、イオン強度、pHおよび他の要因に依存し、通常、インビボではより高くなる。指示薬デキストランは本来多分散系であり、種々の程度に置換されているため、ほとんどの場合、ロットに特定のK_d値がビンに印刷されている。

1. フラ-2と同様のCa^{2+}依存性の蛍光応答であるが、モル吸光率は~75%高い；2. AMエステル形態は蛍光あり(Ca^{2+}測定におけるエラ- の主要な潜在的原因である)；3. AMエステル形態は蛍光なし；4. カルシウムグリーン-1は、Ca^{2+}結合形態およびCa^{2+}を含まない形態の両方においてフルオ-3より高い蛍光性を示す。Ca^{2+}依存性の蛍光増加の大きさはフルオ-3に関するほうが大きい；5. カルシウムグリーン-1より大きなCa^{2+}依存性の蛍光増加；6. フルオ-3と組み合わせて、二波長比率測定、Ex=488nm、Em=530/670nmに用いることもできる [Cytometry 17, 135 (1994); Cell Calcium 14, 359 (1993)]；7. マグ-フラレッドは、Ca^{2+}に関するK_dが17μMである、同様のスペクトル性を有する；8. 100mM KCl, 40mM HEPES, pH 7.0中、22℃で測定されたK_d [Biochem Biophys Res Comm 177, 184 (1991)]；9. オレゴングリーン488 BAPTA-1より大きなCa^{2+}依存性の蛍光増加；10. 120mM KCl, 20mM NaCl, pH 7.05中、37℃で測定されたK_d [Meth Enzymol 172, 230 (1989)]；11. この指示薬は、同じデキストランに結合している、Ca^{2+}感受性のカルシウムグリーン-1およびCa^{2+}非感受性のテキサスレッド色素から構成される。

【００９４】

表６

O_2指示薬

１，３－ジフェニルイソベンゾフラン　　－膜内および細胞内の一重項の酸素

Ａｂ－４０９　Ｅｍ－４７６

ルブレン（rubrene）

９，１０－ジフェニルアントラセン　Ａｂ－３９１　Ｅｍ－４０５

トランス－１－（２’－メトキシビニル）ピレン　　－ピコモル検出

Ａｂ－３５２　Ｅｍ－４０１

亜硝酸塩指示薬

２，３－ジアミノナフタレン　　１０ｎＭ～１０μＭ検出

Ａｂ－３４０　Ｅｍ－３７７

ＮＯ指示薬

ルミノール（luminol）　　Ａｂ－３５５　Ｅｍ－４１１

ジヒドロローダミン

－ＮＯは超酸化物または過酸化水素と反応して、該色素を酸化する過酸化亜硝酸アニオンを生じる。

Ａｂ－２８９　Ｅｍ－なし

Ca^{2+}指示薬

ビスーフラ	３４０／３８０		
カルシウムグリーン	Ｅｍ５３０	可視光で励起	
フラ ２	３４０／３８０	ＵＶで励起可能	比率測定性
インド １	４０５／４８５	ＵＶで励起可能	Ca^{2+}指示薬
フルオー３	Ｅｍ５２５	可視光で励起	
ロドー２	Ｅｍ５７０	可視光で励起	

【００９５】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4513

表７

Mg^{2+}指示薬

マグーフラー２	３４０／３８０	ＵＶで励起可能
マグーフラー５	３４０／３８０	ＵＶで励起可能
マグーインドー１	４０５／４８５	ＵＶで励起可能
マグネシウムグリーン	４７５／Ｅｍ５３０	
マグネシウムオレンジ	５４５ｅｘ	

Zn^{2+}指示薬

ニューポートグリーン（Newport Green）　５０６／５３５

ＴＳＱ　Ｎ－（６－メトキシ－８－キノリル）－ｐ－トルエンスルホンアミド

３３４／３８５

－中枢神経系においてＺｎ$^{2+}$プールを局在化させるのに使用

Cu^{+}指示薬

フェングリーン（Phen Green）　４９２／５１７

－マイクロモル濃度以下のＦｅ$^{2+}$、Ｈｇ$^{2+}$、Ｐｂ$^{2+}$、Ｃｄ$^{2+}$、Ｎｉ$^{2+}$も検出

Na^{+}指示薬

ＳＢＦＩ　Ａｂ３３９／Ｅｍ５６５　－　ｕｖで励起

ＳＢＦＯ　３５４／５７５

ナトリウムグリーン（Sodium Green）　５０６／５３５　可視光で励起

－クラウンエーテルを使用

K^{+}指示薬

ＰＢＦＩ　Ａｂ３３６／Ｅｍ *** ５５７

Cl^{-}指示薬

ＳＰＱ　３４４／４４３　ｍｓ時間分解能でＣｌ$^{-}$輸送を追跡

ＭＱＡＥ　３５０／４６０　高い蛍光量子収率

【００９６】

表８

Ｆｃオキシバーストグリーン（Fc OxyBurst Green）

－食胞（phagovacuoles）において生じる酸化的破裂を検出

Ｆｃオキシバーストオレンジ　　５５０／５７４

－食胞で生じる酸化的破裂を検出

ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート（H_2ＤＣＦＤＡ）

ｅｍ５０４／５２９ｅｘ

－酸化的活性化をモニター

－細胞浸透

ジヒドローダミン １２３　　ｅｍ５０７／５２９ｅｘ

－食細胞によって生産された反応性酸素中間体（reactive oxygen intermediates）の調査

フラレッド（Fura Red（登録商標））－カルシウム指示薬－カルシウム流量

ジヒドロエチジウム　　ｅｍ５１８／６０５ｅｘ

－食細胞における呼吸的破裂（respiratory burst）

エクオリン（Aequorin）　　ｅｍ４３０／４６５ｅｘ

－生物発光性Ｃａ$^{2+}$指示薬

【００９７】

１つの実施の形態において、インジケータは、細胞膜の付着物、膜浸透インジケータによる細胞質への吸着、又は、細胞質へのミクロ注入によって直接細胞に組み込まれてもよい。他の実施の形態において、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ　ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ™のような超微細な蛍光を発するミクロスフェアは、細胞により摂取され、インジケータとして用いられる。もう１つの環境において、インジケータは、マイクロウェル（ｍｉｃｒｏｗｅｌｌ）に含まれる培養基フルードに加えられる。もう１つの実施の形態において、インジケータは、従来のインジケータをガラス表面へ結合するためのシラニゼーション（ｓｉｌａｎｉｚａｔｉｏｎ）処置によりマイクロウェルの表面に付着されてもよい。

【００９８】

１つの実施の形態において、刺激を与えたときに化学ルミネセンス、生物ルミ

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4515

ネセンス又は、変色を発生する天然の又は遺伝子学的に強化された細胞列は、内因性の光の応答を生成するという理由から、分離したインジケータを必要とせず単独で利用される。そのような細胞の標本は、緑色の蛍光性の蛋白質変異体を含む。他の実施の形態において、酵素を生成する細胞は、蛍光性生成物を発生するような光の応答を可能とする試薬を用いて利用される。例えば、ルシフェレン（ｌｕｃｉｆｅｒｅｎ）の面前で細胞により発行酵素が発生する時、生物学的刺激を受ければ、細胞は、蛍光性の応答を生成する。

【００９９】

もう１つの実施の形態において、マルチプルインジケータは、細胞配列の中、細胞群の中、又は、化学または生物学上異なる物質の変種に対して行う細胞応答を同時に監視するため提供されるような個々の細胞の中において利用されてもよい。２つ又はそれ以上のインジケータが利用される場合は、狭いスペクトル帯域幅のスペクトル分類を用いた色素が特に有益であって、例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ　ＢＯＤＩＰＹ™がある。

【０１００】

（Ｇ．光学的測定）

本発明のバイオセンサー配列の中にある個々の細胞と細胞群は、光学的に検査されてもいいし、細胞応答は、当業者に周知で従来の光学的構成要素を用いることによりモニターされてもよい。細胞に対する外部の光学的刺激が光学的応答を引き出すために利用されている場合は、アークランプ、フォトダイオード、又はレーザーのような公知の光源が励起光エネルギーとして利用されてもよい。細胞応答は、光電子増倍管、フォトダイオード、フォトレジスター、電荷結合装置（ＣＣＤ）カメラのような公知の検波器によりモニターされてもよい。レンズ、フィルタ、ビームスプリッタ、ダイコロイック、プリズム及び鏡のような公知の光学縦列構成要素は、光源や検波器からの光を搬送し、分離した培養基に光を送るか、あるいは、光ファイバー線を経由して個々の細胞に光を送るかのどちらで利用されてもよい。光学的測定で利用されるいくつかの特定の装置構成において重要な必要条件は、光学的基盤の組み合せが光学的に配列状に結合している細胞のための検波器と光源を設けていることである。特定の装置構成が実験上の光学測

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4516

定で利用されている場合については後述しているが、他の構成であっても、機能的に同等で特定の測定要件に適したものであればよい。

【０１０１】

蛍光性の測定のために利用される計測器は、オリンパス社（Ｌａｋｅ　Ｓｕｃｃｅｓｓ，ＮＹ）製の垂直構造から水平構造へ改造されたエピフルアーレセンスマイクロスコープである。計測システム１００の概略図を図９に示す。７５Ｗのキセノンランプ１１０からの白光は、集光レンズ１１２により視準（光を平行にする。）され、励起フィルタ１２０を経由し、ダイコロイックミラー１３０により反射され、対物レンズ１４０を用いてイメージングファイバー２００の最も近い端部２１０にフォーカスされる。中間濃度フィルタ１２２は、励起の光明暗度の調整に利用されてもよい。イメージングファイバー２００は、スピンドルアンドホイヤー社（Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡ）により提供されるＸ－Ｙポジショナー１５０とＺ－トランスレーション１５２により精密に位置付けられる。励起光は、ファイバー２００の中を伝送され、ファイバー末端の端部１２１にあるバイオセンサー配列３００に到達する。放射された蛍光性の光は、バイオセンサー配列から、ファイバー２００、ダイコロイックミラー１３０を経由し、エッミッションフィルタ１６０によりフィルタ処理された後、フォトメトリックス社（Ｔｕｓｃｏｎ，ＡＺ）製の電荷結合装置（ＣＣＤ）カメラ１７０であるＰＸＬ™により検出される。倍率レンズ１６５は、必要ならば利用されてもよい。データは、シグナルアナリスティックス社（Ｖｉｅｎｎａ，ＶＡ）により提供される工業用の画像処理ソフトウェアＩＰＬａｂ３．０が搭載されたアップルパワーマッキントッシュ４４０（Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）であるデスクトップコンピュータ１８０で処理される。１つの実施の形態において、ベンチ－トップ（ｂｅｎｃｈ－ｔｏｐ）測定システムは、このような計測のために利用される一方、コンパクトで携帯性にすぐれた測定システムは、光学的で電子的な従来の構成要素により組み立てられてよい。

【０１０２】

Ｈ．バイオセンサー配列の適用

本発明のバイオセンサー、バイオセンサー配列、検出装置及び検出方法は、ス

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4517

クリーニングと検出を目的とする従来のさまざまな分析評価に適用することができる。バイオセンサーは、事実上のいくらかの分析評価のために形成され、多数の符号化された細胞群が小さいサンプル上で大多数の分析評価の伝導するためにシングルセンサー配列で利用されているような高スループットなスクリーニングに対して明確な優位性を与える。多数の符号化された細胞群は、特定の検査評価で利用され、検体に対して一意の応答を提供するために遺伝子学的に強化された細胞である。バイオセンサー配列は、このようにして結合ライブラリーをスクリーニングする時に強大な有効性を発揮すると共に、ミクロンサイズのビーズにおいて結合された生物学上重要な分子のような、極めて微細なサンプルにおける大多数の分析評価の伝導を可能とする。本発明のバイオセンサーは、生物学上の刺激を与えた検体において検出細胞応答が存在する実質的ないくらかの検体測定に適用される。

【０１０３】

本発明のバイオセンサー配列及び方法は、生きた細胞群の独特の能力を独特な検出方法を用いて生物学上重要な化合物に対して応答するために利用する。そのような化合物のために生きた細胞を選択することは、極めて価値があり、薬品を用いたスクリーニングや複合生物製剤液の分析において有益であるため、生きた細胞群の独特な特性を利用するバイオセンサーは、１０万種の候補製薬化合物が評価される組み合せライブラリの高スループットなスクリーニングにおいて明確な優位性を提供する。加えて、そのようなバイオセンサー及び検出手段は、バイオプロセスのオフライン監視か、あるいは、生きた細胞のローカルな環境に対して生きた細胞の高められた刺激反応性が活用される場合の環境汚染に対する適切な監視かのどちらかのために利用される。

【０１０４】

このように、本発明は、重要な検体に対する個々の細胞の応答を検出する手段を提供する。“重要な検体”、“標的検体”、“候補活性エージェント”、“候補薬品”または、ここで述べられている文法的に同義な言い回しは、いくらかの分子、例えば、蛋白質、オリゴペプチド、小さな有機分子、多糖類、ポリスクレオチド、などを意味し、光学的性質を含む細胞表現型を直接または、間接的に改

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4518

めるためにその機能が試される。一般に、多数の分析評価の混合物は、多様な濃縮に対して異なる応答を獲得するために異なる薬品と並行して精製される。一般的には、これらの濃縮の１つは、負の制御、即ち、零濃縮または、検出レベル以下で有効に働く。

【０１０５】

非常に多くの化学的分類を包含する検体は、一般的に有機分子なのだが、好ましくは、分子重量が１００以上２５００ダルトン以下の小さい有機化合物であるほうがよい。検体は、蛋白質を伴う構造上の相互作用に必要な機能グループを有し、特に水素結合が重要で、一般的には、アミン、カルホルニ基、ヒドロキシル基又は、カルボキシル基グループを少なくとも含み、好ましくは、機能上の化学グループの２つを含む。候補エージェントは、上述の機能上のグループの１つ又はそれ以上の代用として、環状炭素又は、複素環式の構造及び、又は、芳香族、ポリアロマティク（ｐｏｌｙａｒｏｍａｔｉｃ）構造をしばしば有する。候補エージェントは、ペプチドを含む生体分子、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、生体構造アナログまたは、それらの化合物においても発見される。特に好ましいのはペプチドである。

【０１０６】

候補エージェントは、合成物または、天然化合物のライブラリーを含む多様なソースから獲得される。例えば、無作為化されたオリゴヌクレオチドの圧搾を含む有機化合物及び生体分子には、結合に対して広い多様性があり、手段の多くは、任意で且つ管理されたその結合に対して有効である。もうひとつは、バクテリア、菌類、植物及び動物のエキスに属する天然化合物のライブラリが有効であり、容易に精製可能である。その上、天然または人工的に生成されたライブラリと化合物は、従来の化学的、物理的及び生物学的手段により容易に修飾可能である。公知の薬理学上のエージェントは、化学構造アナログを生成するためにアシル化、アルキレート化、エステル化、アミディフィケーション（ａｍｉｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ）のような管理されたまたは任意の化学的改良を受けてもよい。

【０１０７】

好ましい実施の形態においては、候補活性エージェントは、自然発生の蛋白質

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4519

または、自然発生の蛋白質の断片である。このように、例えば、蛋白質を含む細胞の抽出物、又は、任意または管理された蛋白質からなる細胞の抽出物のダイジェストが利用されてもよい。このように、原核生物的又は、真核生物的な蛋白質は、本発明の方法においてはスクリーニングで利用される。本実施の形態で特に好ましいのは、バクテリア、菌類、ウィルス、哺乳類の蛋白質のライブラリであって、後者になるほど好ましく、人間の蛋白質がことのほか好ましい。

【０１０８】

ペプチドは、あらましは上述した通り、任意のペプチドまたは、“偏りのある”任意のペプチドとしての天然発生の蛋白質のダイジェストであってよい。“無作為化”、又は、ここに述べられる文法的に同義な言い回しは、核酸及びペプチドがそれぞれ本質的に任意のヌクレオチド及びアミノ酸からなることを意味する。一般的に、これらの任意のペプチドは（又は、以下で論ずる核酸。）は、化学的に合成され、それらは、任意の位置でいくらかのヌクレオチド又は、アミノ酸と結合してもよい。その合成処理は、無作為化された蛋白質か又は、核酸を生成するため、合成シーケンス期間中の全ての構成又は、ほとんどの採り得る結合を可能とするために設計され、かようにして、無作為化された候補活性の蛋白質のエージェントのライブラリを形成する。

【０１０９】

１実施形態では、いずれのポジションにおいても、好みの順番や一定を持たないライブラリが十分にランダム化される。好ましい実施例では、ライブラリはバイアスされる。つまり、順番ないのいくつかの位置が一定に保たれるか、限られた可能な番号から選択される。例えば、好ましい実施例では、核またはアミノ酸の残滓、例えば、ハイドロフォビックアミノ酸、ハイドロフィリックの残滓、ドメインを結びつける核酸を形成する(小さいか大きい)残滓に基づくステリカリィ、クロスリンクのための結晶の生成、ＳＨ－３ドメインのためのプロリン、シリネス、スレオニン、ティロシンまたはフォスフォリエーションサイトのためのヒスティディンその他またはパーネスなどは、限定したクラスないでランダム化される。

【０１１０】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4520

プロテンに対して一般に上述したように、核酸選出の薬品は自然に核酸、ランダムの核酸または“バイアス”のランダム核酸を発生させる。例えば、プロカリオティクのダイジェストまたはオイカリオティクのゲノムは上述のプロテインとして使用されてもよい。

【０１１１】

本文における“核酸”はＤＮＡおよびＲＮＡの双方を含み、そして核酸類似物はＰＮＡを含む。好ましい実施例では、選出薬品剤は有機のケミカルの一部であり、それの広い変化は文献で利用できる。

【０１１２】

以下の例では、バイオセンサアレイやこの発明の方法を実行し採用することに有用な、多くの特定の分析を提供するが、それらは、想像されるこの出願の範囲または、この発明のバイオセンサに伴う多数のセルの集団に採用できる検知法を制限するものではない。

【０１１３】

一つの実施例では、バイオセンサアレイは、バイオプロセス内の個々のセルまたはセルの固体の酸化還元状態を遠隔にモニターするために採用できる。例えば、ＮＡＤＨに依存の蛍光は、バクテリア、菌類、プラントまたは動物のセルで測定できる。ＮＡＤ(Ｐ)／ＮＡＤ(Ｐ)Ｈは、Luong その他による Practical Fluorescence G.Guilault ed.,Marcel Dekker(ニューヨーク,1990 により開示された方法を用いたて発酵プロセスにおいて、好気性から非好気性の物質交代への変化をモニターすることで測定できる。

【０１１４】

替わりに、バイオセンサアレイは、アレイ内でセル集団の応答を識別可能とするために、Hughes その他による Analytica Chimica Acta 307:393(1995)により開示された方法を用いることにより、環境中の汚染菌に応答するセルのプロセスの適したモニター装置のために採用されてもよい。この方法では、蛍光体でみたされ、蛍光遺伝子の酵素プローブで表面が変更されたミクロンサイズの領域は、セルにより取り込まれ、そして酵素の活動がその領域の表面で発生し、検出可能な蛍光信号を生じる。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4521

【０１１５】

更に別の実施例では、バイオセンサアレイは、金属化合物の適したモニタリングおよび光学検出のために、遺伝子技術のバイオ発光のバクテリアに採用できる。例えば、アンチモナイトおよび亜ヒ酸塩に応答するセル集団は、Ramanathan その他によるAnal Chem.69:3380(1997)に開示の方法を採用することにより、バイオセンサ内のセル集団内に用いられてもよい。この方法では、セルの染色体は、金属濃度に応じてバクテリア発光の表れを調整する。

【０１１６】

別の実施例では、バイオセンサ内のセル集団は、蛍光タンパク質に依存するＡＴＰでエンコードできる。例えば蛍の発光素であり、Koop その他による Biochem.J.295:165(1993)で開示された方法に基づき病理学研究のためにねずみの肝臓に注入される。病理学的な外傷にさらされた時、それらのセルは、細胞質のＡＴＰ内で減少を示し、セル内に毒素の入った程度に関係して直接的に発光が変化する。

【０１１７】

一つの実施例では、バイオセンサ内のセル集団は、緑の蛍光たんぱく質でエンコードされてもよい(T.Gura,Science276:1989(1997),Niswender その他によるJ.Microscopy 180(2):109(1995),Cubitt その他によるTIB 20:448(1995),Miyawaki その他によるNature 388:882(1997を参照)。区別できる蛍光発光の波長をもつＧＦＰのいくつかの遺伝子的技術の変位は利用可能である。これらのたんぱく質は、セル内の遺伝子表現およびＣａ+レベルの指示を発光する付加的なユーティリティをもつ。

【０１１８】

別の実施例では、バイオセンサアレイは、Cobbold その他によるCellBiology1:311(1990)で開示された方法に基づくaequorinまたはfura-2のごとき蛍光マーカーを用い、単一のセル内のカルシウムレベルおよびカルシウム発振の適したモニターにより、セルの分裂の測定に用いられる。

【０１１９】

この分野のこれらにより理解されるように、本発明の分析は広く多種の方法で

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4522

、又、広く多種の目的で実行される。例えば、セルは特定の分析に対する検知システムとして用いられ、セルは、特定の解析で特性が光学的に検知可能に変化を受ける。これとは別に、セルは、光学的に検出可能なセルの表現型を変える能力のために、薬剤選出のライブラリを覆うために用いられる。例えば、治療力のある適切なセルの表面の受容器官の表現は増大されてもよく、そのため、受容器官は蛍光のリーガンドを束ねることができ、同様に、治療学的に適切な酵素は活動化され、その結果、蛍光反応が発生する。このように、増大および減少の双方を含むあらゆる調整がモニターされてもよい。同様に、緑の蛍光タンパクおよびそれらの誘導体のごときリポーターのゲネスの使用は、例えば誘導できるプロモーターの使用を通じて、内部反応の適切な解析のために、スクリーン処理の高いスループットを容易にする。

【０１２０】

一般に、好ましい実施例では、解析前に候補の影響薬剤はセルに加算され、セルはいくらかの期間のために、培養するために許可される。“管理”または“実行”はここでは、理解および内部反応動作により、またはセル表面の動作により、薬剤がセルに作用する方法で、候補薬剤がセルに加算されることを意味する。いくつかの実施例では、タンパク質性候補薬剤(つまりペプチド)をエンコードする核酸は、retrovial構成のごときウイルス構成に置かれ、そしてセルに加算される。その結果、ペプチド薬剤の表現は、達成される。ＰＣＴ US97/01019を参照。

【０１２１】

候補薬剤がセルに与えられると、もし、しばらくの期間、好ましい生理学上の状況下で培養することが所望され、許可されるなら、セルは洗浄され得る。

【０１２２】

ここで概略した反応は、当業者にはわかるように種々の方法で達成できる。反応のコンポーネントは同時に加算されてもよく、あるいはいずれかの順にしてもよい。更に、他の様々な試薬を含む反応は、分析物に含まれてもよい。これらは、光学検知を容易にするために使用され、そして／または無特性またはバックグランドの内部反応を減じる、塩、緩衝剤、アルブミンのごとき中性タンパク、洗

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4523

浄剤、その他、を含んでもよい。又、プロテーゼ防止剤、ヌクレアーゼ防止剤、反ミクロバイアル薬剤その他のごとき、他方で分析効率を改善する試薬が使用されてもよい。

【０１２３】

一般に少なくとも薬剤の少なくとも１つのコンポーネントがラベル化される。“ラベル化”は、ここでは合成物が直接にまたは非直接的に検出可能な信号、例えば、デジオソトープ、蛍光、酵素、抗体、電磁粒子のような粒子、を与えるラベルでラベル化されることを意味する。特定の拘束分子はバイオチンおよびストレプタビディン、ディグオキシンおよび非ディグオキシンその他のように対を含む。特定の拘束部材のために、補足的部材は通常、上述の公知の手順に従い、検出を与える分子でラベル化される。そのラベルは直接的または非直接的に検出可能な信号を与える。

【０１２４】

アレイが実行されると、実験結果、つのまり、ターゲットの解析の有無、分子タイプの選出薬剤、その他を決定するためにデータが分析される。これは一般にコンピュータで実行される。

【０１２５】

このように、薬剤の影響は認識される。薬学的な活動との化合物はセルのタイプを変更できる。上述のように薬学的な活動をもつ化合物は、生理学的な許容可能なキャリァ内でホストに与えられる。薬剤は多種多用な方法、口頭、表示例えば皮下的に与えられる。イントラダクションの方法に基づき、化合物は種々の方法で公式化される。その公式における治療学的な活動化合物の集中は０．１－ｗｔ％で変化する。

【０１２６】

薬学的の組成は種々の形態、粒状、タブレット、ピル、座薬、カプセル、懸濁液、軟膏、ローションおよび同様なもので与えられる。薬学的なグレードの組織または非組織的なキャリァおよび／または口および局部使用に適した希釈剤を、治療学活動の化合物を含む組成を作るために使用できる。この分野で公知の希釈剤は、水性のメディア、植物および動物オイルおよび脂肪を含む。安定化薬剤、

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4524

湿ったおよび乳化薬剤、適したｐＨ値を安全にするために浸透圧または緩衝剤を変える塩および皮膚浸透増強剤を補助剤として使用できる。

【０１２７】

この発明は好ましい実施例に基づき説明したが、当業者であれば、本発明の趣旨から逸脱することなく種々の変形をが可能であろう。

【図面の簡単な説明】

【図１】　本発明のバイオセンサアレイ概念の概略図である。

【図２】　ａ－ｂは、本発明のバイオセンサアレイにおいて使用されるマイクロウェルアレイの原子間力顕微鏡写真である。

【図３】　本発明のバイオセンサアレイのために使用されるマイクロウェルにおいて細胞を配置するための方法の概略図である。

【図４】　マイクロウェルにおける単一のＮＩＨ　３Ｔ３のマウス繊維芽細胞のＳＥＭ顕微鏡写真である。

【図５】　本発明のバイオセンサアレイ内の細胞集団の細胞生存力を安定させるための方法の概略説明図である。

【図６】　本発明のバイオセンサアレイにおける細胞生存力を確実にテストするために細胞の位置を識別する独特の蛍光イメージパターンである。

【図７】　図６において識別された生存できる細胞集団の合わせた蛍光強度の時間的な反応を示す。

【図８】　本発明のバイオセンサアレイ内のコード化された細胞集団の蛍光性オプティカルイメージである。

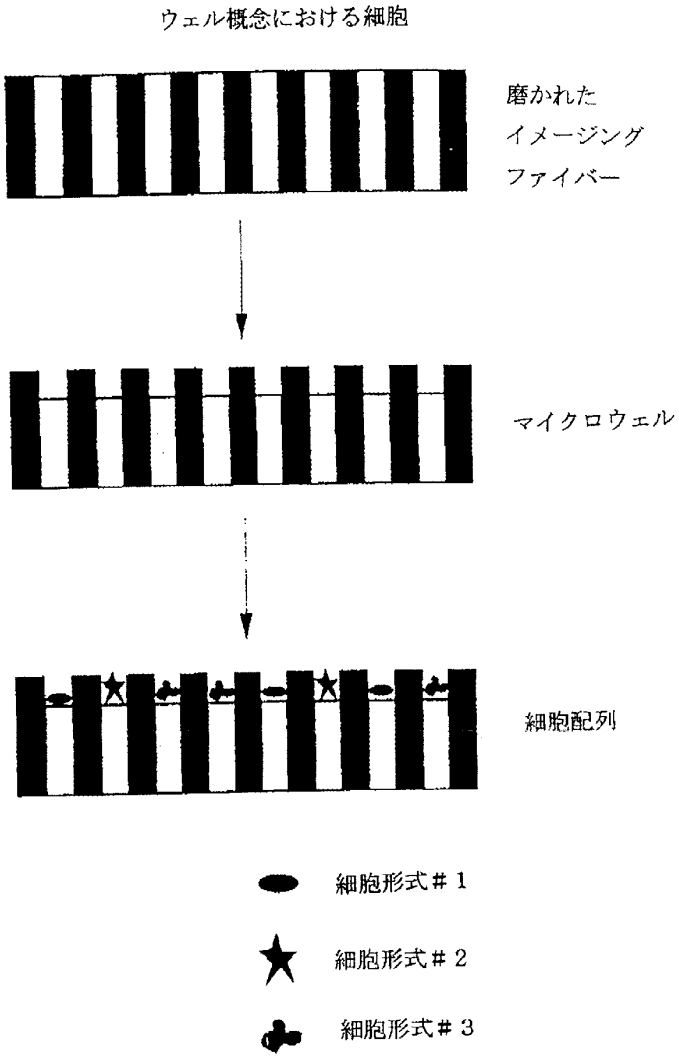
【図９】　マイクロウェルセンサアレイの光学測定のために使用される測定システムの概略ブロック図である。

【図１０】　９個のバイオセンサアレイ細胞の時間に対する平均ＢＣＥＣＦ蛍光性のプロットである。

【図１１】　ａ－ｂは、マイクロウェルを培養基で満たすために前処理を行う場合と行わない場合の両方について、マイクロウェルに挿入される細胞の生存力を比較する。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4525

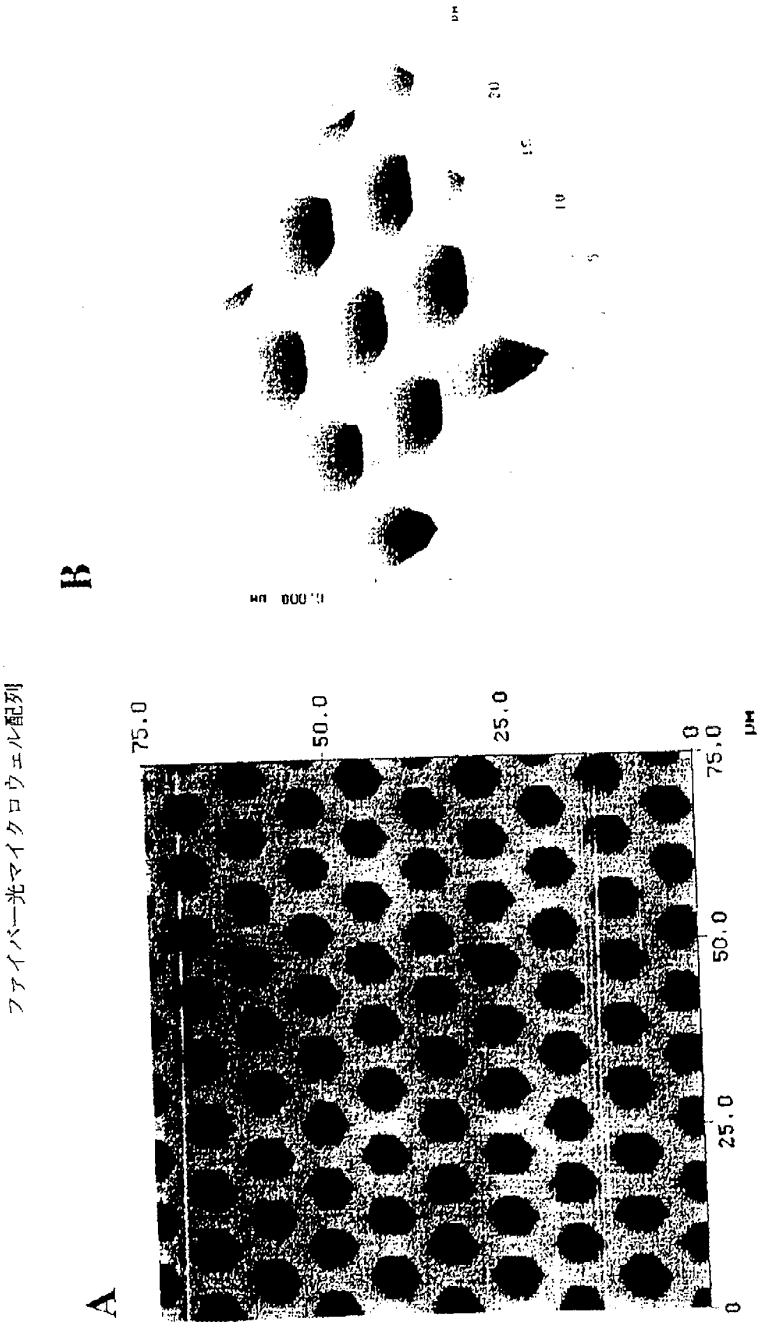
【図１】



培養された細胞の光センサー配列の略概念図。磨かれたイメージング光ファイバーが、そのファイバーの遠位面にミクロンサイズの配列を生成するために化学的にエッチされる。ウェルの配列の上にある媒質に懸濁した細胞がそのウェルに沈殿して、ウェルの底に付着する。ウェルは、各々のウェルが１つの細胞を受け入れるようにエッチされる。コアの直径やエッチ時間の違いは、多種類の細胞形式や細胞の大きさに適合できる。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4526

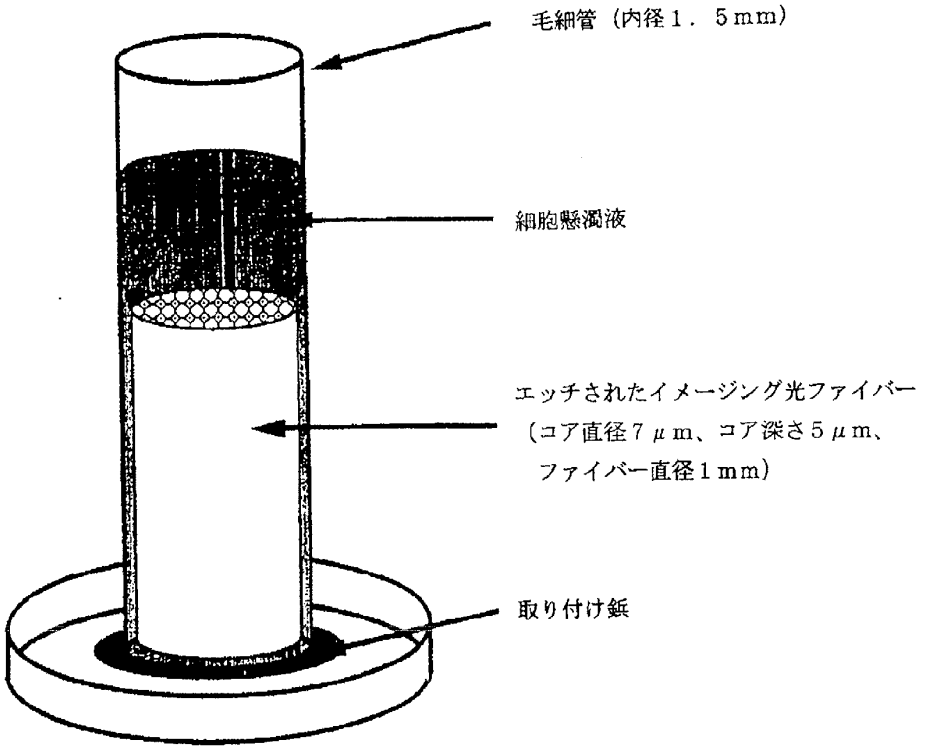
【図２】



エッチされたマイクロウェルの（Ａ）７５μｍ×７５μｍ２次元配列と（Ｂ）２５μｍ×２５μｍ３次元配列の原子間力顕微鏡（ＡＦＭ）画像。ミクロンサイズのウェルの配列は、コアおよびグラッドのエッチ速度の違いを利用するウェットエッチ処理によって、イメージング光ファイバーの遠位端に形成される。

【図３】

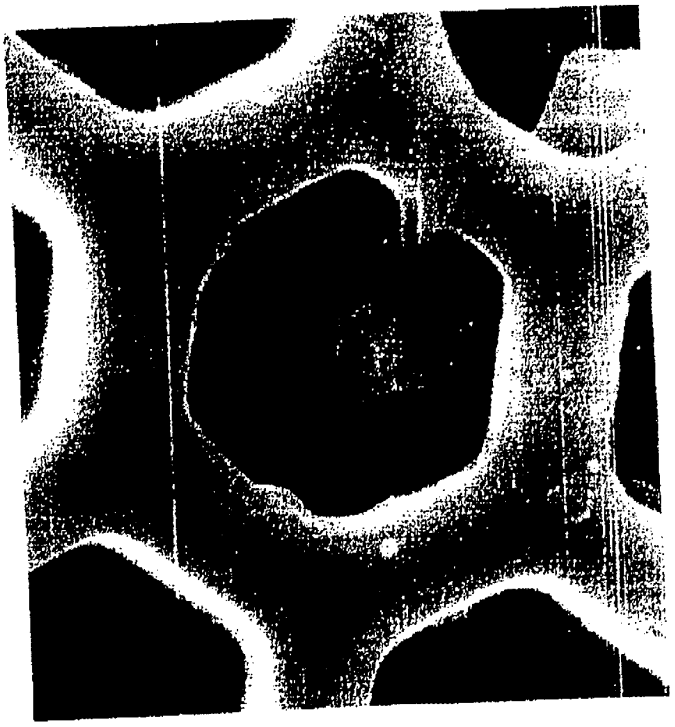
ウェル機構中の細胞



細胞は、イメージング光ファイバーの遠位面のウェルに沈殿する。細胞培養皿から細胞を取り除いて成長媒質に懸濁するために、細胞は無菌技術を用いてトリプシン処理（ｔｒｙｐａｎｉｓｅ）される。細胞懸濁液の一部は、遠心分離を用いて濃縮され、直径が１．５ｍｍの毛細管に加えられる。ファイバーイド（ｉｄ）のエッチされた面は、その管に挿入され、適所に実験用フィルムの細いストリップで固定される。その管／ファイバー機構は、細胞付着が発生するように直立状態で１２－１５時間インキュベートされる。

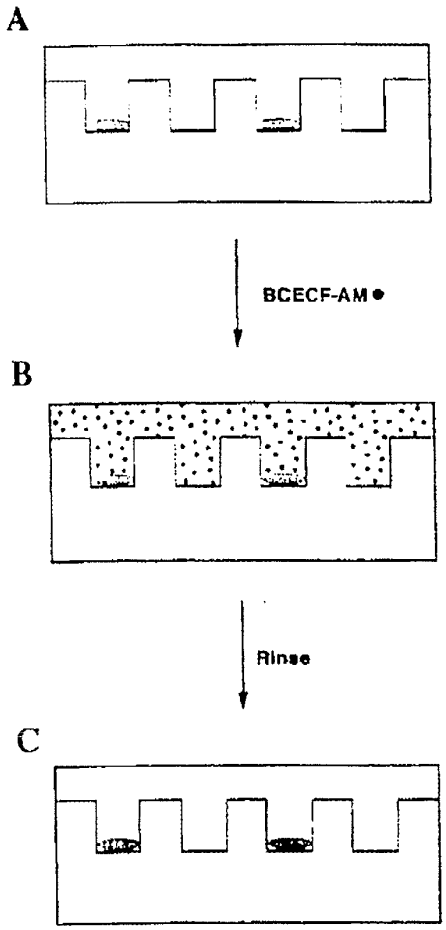
Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4528

【図４】



エッチされたマイクロウェル中の、１つのＮＩＨ３Ｔマウス線維芽細胞の走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）写真。各々のウェルは７μｍの直径と、５μｍの深さと、～１４５ｆＬの容積を有する。

【図５】

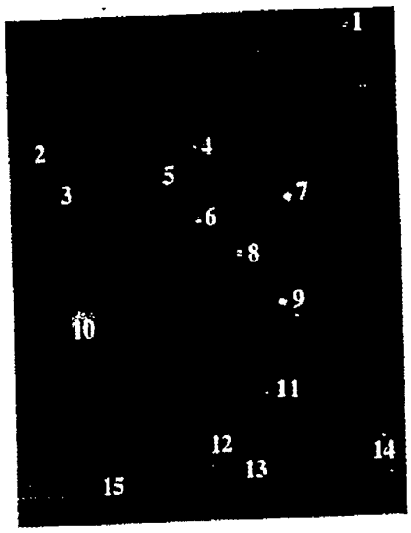


ウェル中に付着した細胞の、フルオレセイン誘導体、ビスカルボキシエチル、ビスカルボキシフルオレセイン（ＢＣＥＣＦ）のアセテートメチル（ＡＭ）エステル型に対する反応の略図。細胞の配列（Ａ）は、ＢＣＥＣＦ－ＡＭ（Ｂ）溶液中でインキュベートされ、その後、完全にすすぎ落とされる。非蛍光性のＢＣＥＣＦ－ＡＭは、容易に化合せず細胞に入る。一旦細胞内に入ると、親液阻止（ｌｙｐｏｐｈｉｌｌｉｃ ｂｌｏｃｋｉｎｇ）基に非特効エストラーゼが付着し、蛍光強度の増加につながる（Ｃ）。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4530

【図６】

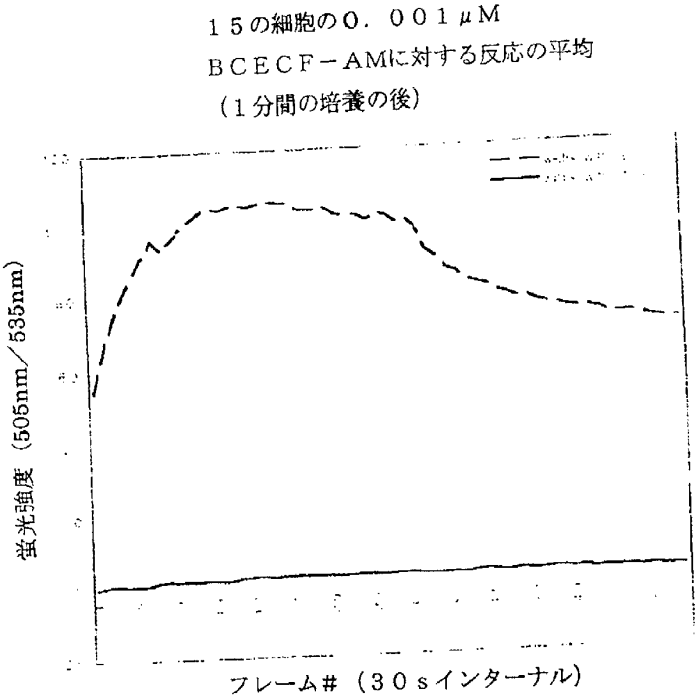
ＰＫＨ２６で標識付けされたＮＩＨ３Ｔ３
マウス繊維芽細胞（５５１ｎｍ／５６７ｎｍ）



蛍光標識が付された（５５１ｅｘ、５６７ｅｍ）ＮＩＨ３Ｔ３マウス繊維芽細胞は、イメージング光ファイバーの遠位面のウェルに沈殿された。その付着した細胞の位置は、細胞標識と作用しない波長で励起することによって正確に示される。その重要な指示領域内の１５の細胞は、ＢＣＥＣＦ（５０５ｅｘ、５６７ｅｍ）の励起波長で、フルオレセイン測定の局所的テンプレートとして作用する特徴パターンを形成する。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4531

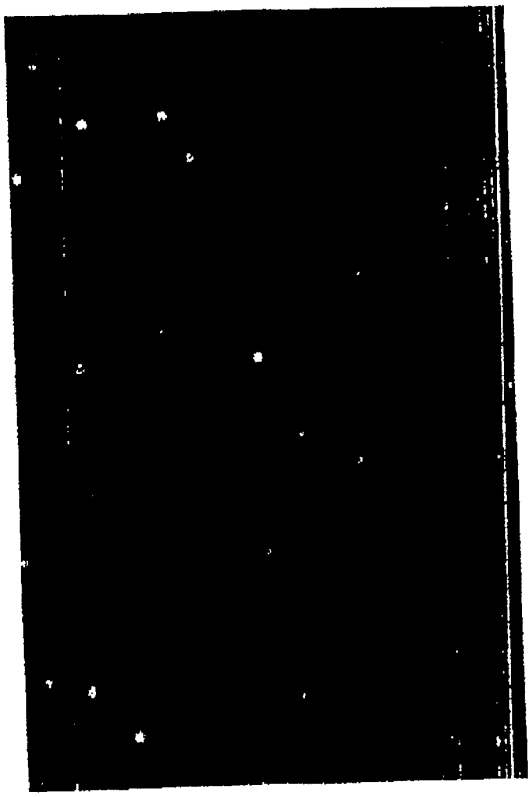
【図７】



ウェル内に付着した細胞の配列は、セラム（ｓｅｒｕｍ）のない媒質で生成された０．００１ｍＭのＢＣＥＣＦ－ＡＭ溶液に１分間浸された。その細胞配列は取り除かれ、任意の残余色素を取り除くためにセラムのない媒質で徹底的にすすがれる。蛍光画像（ｌｅｘ５０５ｎｍ、ｌｅｍ５３５ｎｍ）は、３０秒毎に１秒の取得時間で得られる。蛍光性細胞標識によって生成された位置テンプレートは、細胞を含むウェルを位置するために測定画像に変えられる。その細胞の反応蛍光強度は、細胞内のＢＣＥＣＥＦ－ＡＭ色素から親液基が除かれるので緩やかな増加を示す。細胞を含まないウェルのフルオレセイン反応強度はごくわずかである。

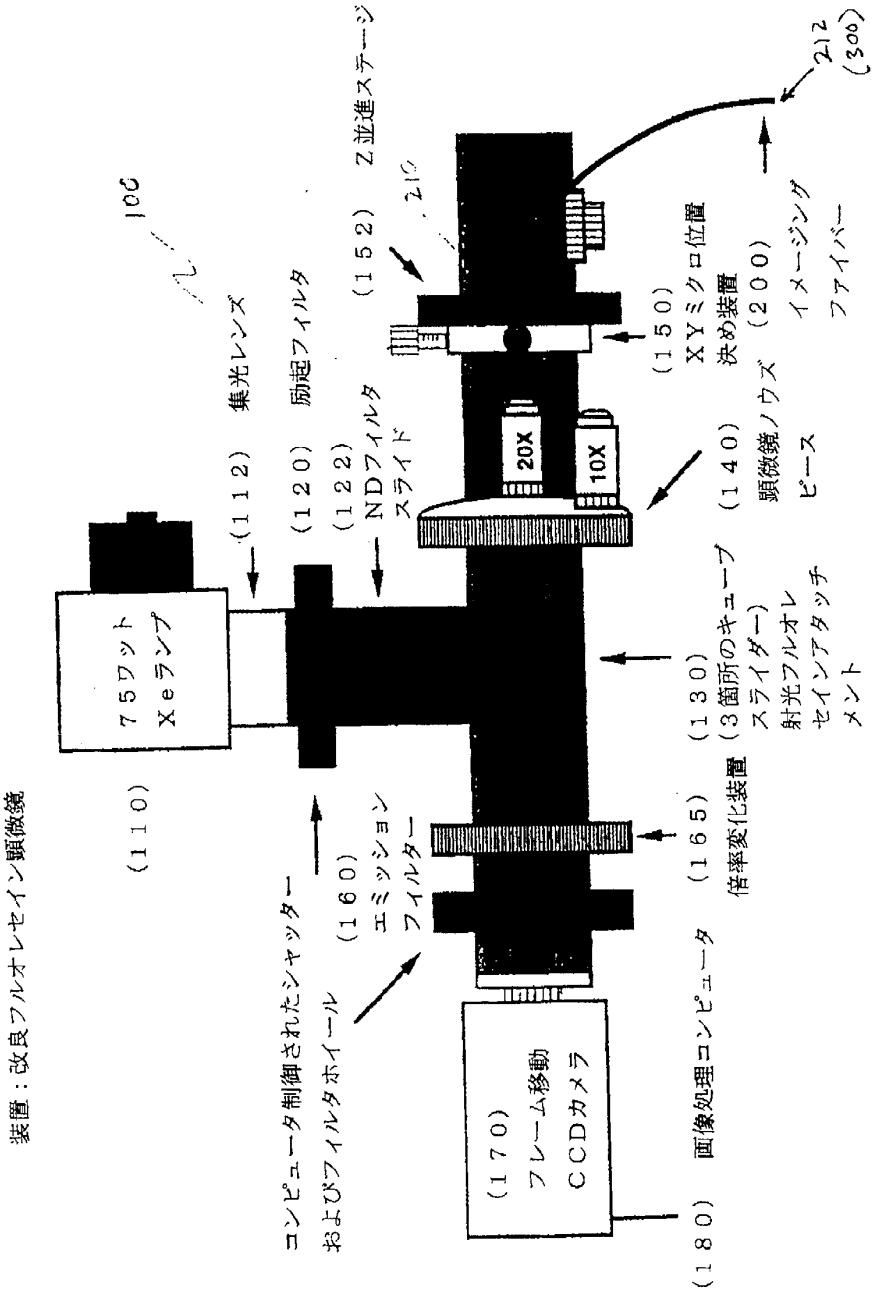
Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4532

【図８】

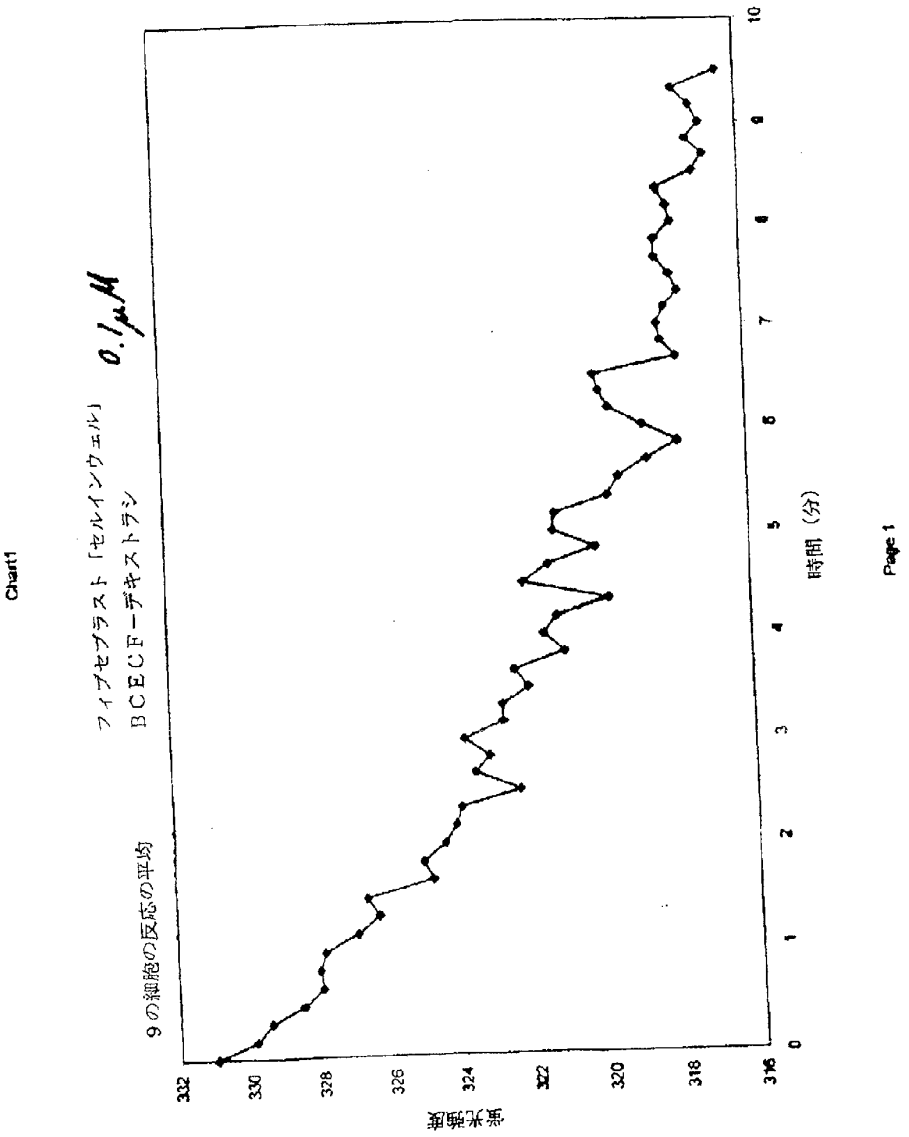


蛍光標識が付された（１ｅｘ４９０ｎｍ、１ｅｍ５０２ｎｍ）ＮＩＨ３Ｔ３マウス繊維芽細胞が、直径１ｍｍのイメージング光ファイバーの遠位面にエッチされたウェル中で培養された。余分な細胞（これらはウェルに収容されない）は、培養媒質で湿らせた綿棒で除去された。その細胞はファイバーを通して励起された。細胞パッキング密度は、～１０６のオーダーで得ることができる。

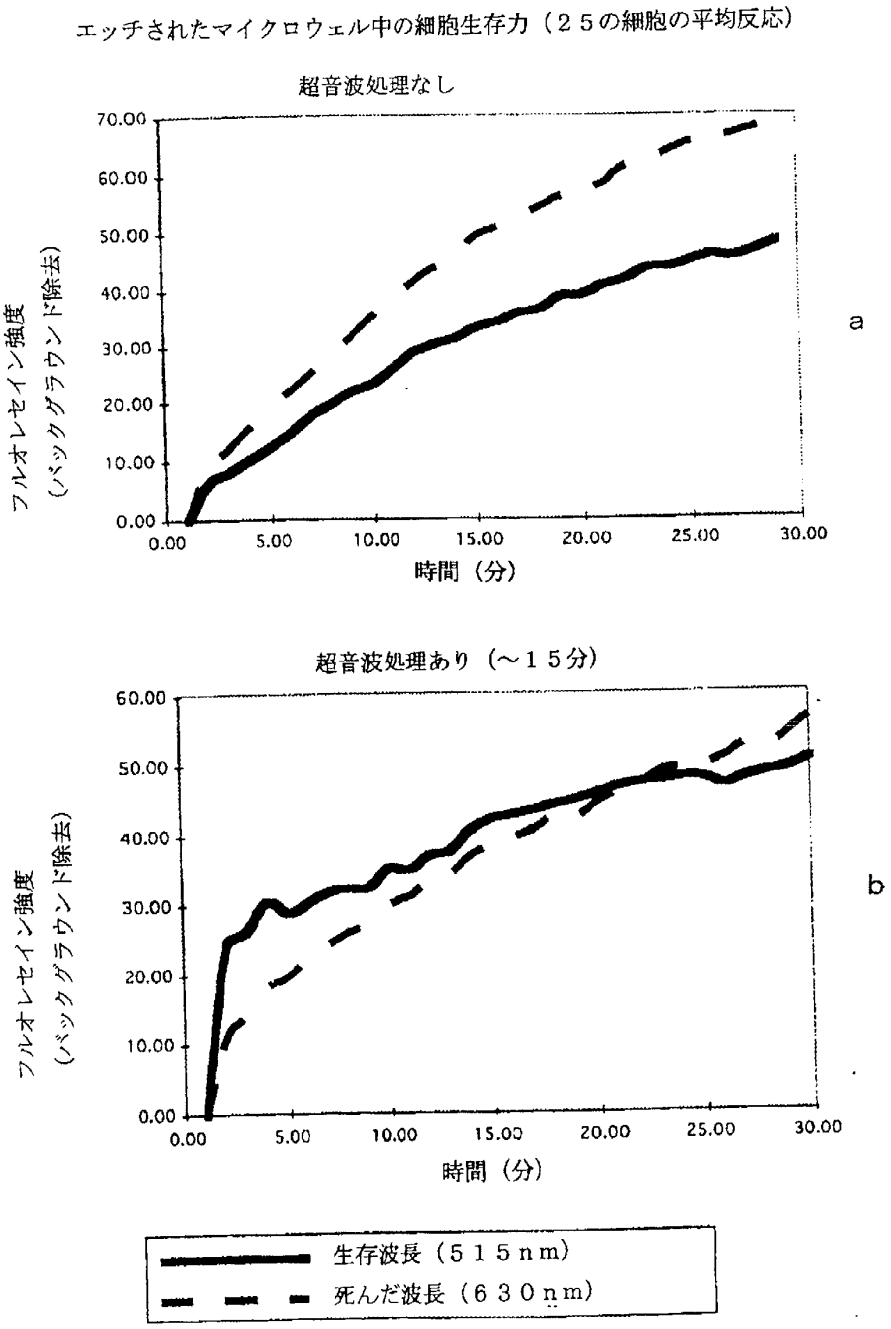
【図9】


装置：改良フルオレセイン顕微鏡
（１１０）
７５ワット
Ｘｅランプ
（１１２）　集光レンズ
（１２０）　励起フィルタ
（１２２）
ＮＤフィルタ
スライド
（１５２）　Ｚ並進ステージ
（１５０）
ＸＹミクロ位置
決め装置
（１４０）
顕微鏡ノウズ
ピース
（１３０）
（３箇所のキューブ
スライダー）
射光フルオレ
セインアタッチ
メント
倍率変化装置
（１６５）
（１６０）
エミッション
フィルター
コンピュータ制御されたシャッター
およびフィルタホイール
（１７０）
フレーム移動
ＣＣＤカメラ
（１８０）　画像処理コンピュータ
イメージング
ファイバー
20X
10X

【図１０】


Chart1
フィブセプラスト「セルインウェル」
ＢＣＥＣＦ－デキストラシ
0.1μM
９の細胞の反応の平均
蛍光強度
時間（分）
332
330
328
326
324
322
320
318
316
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Page 1

【図１１】


エッチされたマイクロウェル中の細胞生存力（２５の細胞の平均反応）
超音波処理なし
フルオレセイン強度
（バックグラウンド除去）
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
時間（分）
a
超音波処理あり（～１５分）
フルオレセイン強度
（バックグラウンド除去）
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
時間（分）
b
生存波長（５１５ｎｍ）
死んだ波長（６３０ｎｍ）

【手続補正書】

【提出日】平成１３年２月５日（２００１．２．５）

【手続補正１】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項１】　ａ）複数のディスクリートサイトを含んでいる基質と、

ｂ）セルの個体群であって、該個体群が複数のセルの副個体群を含み、副個体群の各々が、異なる光学的に探査可能な信号を含んでいるものとを含んでいる、少なくとも１つの分析対象物に対する個々のセルの応答を検出するためのバイオセンサ。

【請求項２】　それぞれ、光ファイバの束を含んでいる基質上の複数のディスクリートサイトの１つに分布させられている、セルの個体群を含むバイオセンサ。

【請求項３】　上記個体群が複数のセルの副個体群を含み、副個体群の各々が、異なる光学的に探査可能な信号を含んでいる、請求項２に記載のバイオセンサ。

【請求項４】　上記基質が、それぞれ末端部と基端部とを有している複数のファイバを含んでいる光ファイバの束を含んでいて、上記各ディスクリートサイトが、上記末端部の端面に形成されたマイクロウェルを含み、上記セルが上記マイクロウェル中に分布させられている、請求項１、２又は３に記載のバイオセンサ。

【請求項５】　上記マイクロウェルが、約１μｍから約２００μｍまでの範囲の内直径と、約０．２５μｍから約２００μｍまでの範囲の深さと、約１ｆＬから約５ナノリットルまでの範囲の体積を有している、請求項４に記載のバイオセンサ。

【請求項６】　上記ファイバが、さらに、約１μｍから約２００μｍまでの

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4537

範囲の直径を有するファイバコアを含んでいる、請求項４又は５に記載のバイオセンサ。

【請求項７】　上記サイトの表面が、生物的に両立しうる物質で被覆されている、請求項１、２、３、４、５又は６に記載のバイオセンサ。

【請求項８】　セルの副個体群の各々が、染料、蛍光体、着色体、化学発光化合物及び生物発光化合物からなる群から選択された少なくとも１つの光学的に探査可能な物質で符号化されている、請求項１、３、４、５、６又は７に記載のバイオセンサ。

【請求項９】　ｉ）複数のディスクリートサイトを含んでいる基質と、

ii）それぞれが、異なる光学的に探査可能な信号を含んでいる複数の副個体群を含むセルの個体群とを含んでいる、ａ）バイオセンサアレイと、

ｂ）上記基質上で上記ディスクリートサイトに光学的に結合されかつ光通信状態となっていて、上記ディスクリートサイト内に分布させられている上記セルの、分析物に対する光学的な応答を検出することができる検出手段とを含んでいる、少なくとも１つの分析対象物に対する個々のセルの応答を検出するための装置。

【請求項１０】　上記基質が、それぞれ末端部と基端部とを有している複数のファイバを含んでいる光ファイバの束を含み、

上記ディスクリートサイトの各々が、上記末端部の端面に形成されたマイクロウエルを含み、

上記セルが上記マイクロウェル中に分布させられ、

かつ、上記検出器が、上記ファイバ端末部で上記セルの光学的な応答を検出するために、上記ファイバの基端部と光学的に結合されかつ光通信状態となっている、請求項９に記載の装置。

【請求項１１】　さらに、上記ファイバの端部に結合された励起光エネルギ源を含んでいる、請求項９又は１０に記載の装置。

【請求項１２】　さらに、複数の上記セルから、検出された光学的な応答の画像を把握するための画像把握装置を含んでいる、請求項９、１０又は１１に記載の装置。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4538

【請求項１３】　上記画像把握装置が、電荷結合素子又はＣＣＤカメラを含んでいる、請求項１２に記載の装置。

【請求項１４】　ｉ）複数のディスクリートサイトを含んでいる基質と、

ｉｉ）それぞれが、異なる光学的に探査可能な信号を含んでいる複数の副個体群を含むセルの個体群とを含んでいる、ａ）バイオセンサアレイを準備する過程と、

ｂ）上記バイオセンサアレイを分析対象物と接触させる過程と、

ｃ）上記セルの少なくとも１つの光学的な応答を検出する過程とを含んでいる、少なくとも１つの分析対象物に対する個々のセルの応答を検出するための方法。

【請求項１５】　上記基質が、それぞれ末端部と基端部とを有している複数のファイバを含んでいる光ファイバの束を含んでいて、上記ディスクリートサイトの各々が、上記末端部の端面に形成されたマイクロウェルを含み、上記セルが上記マイクロウェル中に分散させられている、請求項１４に記載の方法。

【請求項１６】　上記分析対象物が、光学的に検出可能なラベルを含んでいる、請求項１４又は１５に記載の方法。

【請求項１７】　上記バイオセンサが、複数の分析物に接触させられるようになっている、請求項１４、１５又は１６に記載の方法。

【請求項１８】　ａ）複数のディスクリートサイトを含んでいる基質を準備する過程と、

ｂ）上記セルが上記サイトに分布させられるように、上記基質をセルの個体群に接触させる過程であって、上記個体群が、それぞれ異なる光学的に探査可能な信号を含む複数のセルの副個体群を含んでいる、少なくとも１つの分析対象物に対する個々のセルの応答を検出するためのバイオセンサアレイを製作する方法。

【請求項１９】　ａ）複数のディスクリートサイトを含む光ファイバの束を含んでいる基質を準備する過程と、

ｂ）上記セルが上記サイトに分布させられるように、上記光ファイバの束を、複数のセルの副個体群を含んでいるセルの個体群に接触させる過程とを含んでいる、少なくとも１つの分析対象物に対する個々のセルの応答を検出するためのバ

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4539

イオセンサアレイを製作する方法。

【請求項２０】　上記サイトがマイクロウェルである、請求項１８又は１９に記載の方法。

【請求項２１】　セルの副個体群の各々が、染料、蛍光体、着色体、化学発光化合物及び生物発光化合物からなる群から選択された少なくとも１つの光学的に探査可能な物質で符号化されている、請求項１８、１９又は２０に記載の方法。

【請求項２２】　さらに、上記の符号化されたセルに励起光エネルギを照射することにより生成された発光エネルギにより、上記アレイ中の個々のセルの位置を表示する過程を含んでいる、請求項１８、１９、２０又は２１に記載の方法。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4540

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int tional Application No
PCT/US 99/04473

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12M3/04 C12M1/34

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 6 C12M

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	FR 2 741 357 A (CORNING INC) 23 May 1997 (1997-05-23) the whole document	1-22 2,5,6,9, 10,15,19
X Y	EP 0 539 888 A (SHIMADZU CORP) 5 May 1993 (1993-05-05) figures 6,8	1,3,4, 6-9, 12-14, 16,18, 20,22 2,5,6,9, 10,15,19
E	WO 99 18434 A (TUFTS COLLEGE ;WALT DAVID R (US); DICKINSON TODD A (US)) 15 April 1999 (1999-04-15) the whole document	1-13

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.　　[X] 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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 March 2000	09/03/2000

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Coucke, A

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

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 99/04473

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 690 894 A (PINKEL DANIEL ET AL) 25 November 1997 (1997-11-25) cited in the application claims; figures	2,5,6,9, 10,15,19

1

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

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4542

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int　　ional Application No
PCT/US 99/04473

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2741357 A	23-05-1997	EP 0862540 A	09-09-1998
		WO 9719027 A	29-05-1997
EP 0539888 A	05-05-1993	JP 5127099 A	25-05-1993
		DE 69210753 D	20-06-1996
		DE 69210753 T	02-10-1996
		US 5348883 A	20-09-1994
WO 9918434 A	15-04-1999	AU 1269599 A	27-04-1999
US 5690894 A	25-11-1997	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

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

(72)発明者　ローラ・テイラー
アメリカ合衆国02155マサチューセッツ州
メッドフォード、ブラッドベリー・アベニュー15エイ番

Fターム(参考)　2G045 AA40 BB20 BB31 BB51 CA01
CB01 DA12 DA13 DA14 DA30
DA36 DA80 DB07 FA11 FA12
FA16 FA19 FA20 FA29 FA40
FB03 FB07 FB11 FB12 FB15
GC22 GC30 HA09 HA11 HA14
HA16 HA20 JA01 JA02 JA07
JA20
4B063 QA01 QQ05 QR58 QR66 QR84
QS36 QS39 QX02

(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2002－525587
（P2002－525587A）
(43)公表日　平成14年８月13日(2002.8.13)

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	ＦＩ		テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ　21/78		Ｇ０１Ｎ　21/78		２Ｇ０２０
Ｇ０１Ｊ　3/51		Ｇ０１Ｊ　3/51		２Ｇ０４３
Ｇ０１Ｎ　21/64		Ｇ０１Ｎ　21/64	Ｆ	２Ｇ０４５
33/483		33/483	Ｃ	２Ｇ０５４
33/532		33/532	Ｚ	

審査請求　未請求　予備審査請求　有　（全 62 頁）　最終頁に続く

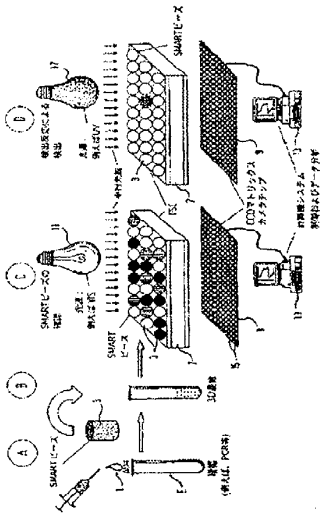
(21)出願番号　特願2000－571025(P2000－571025)
(86)（22)出願日　平成11年８月27日(1999.8.27)
(85)翻訳文提出日　平成13年２月28日(2001.2.28)
(86)国際出願番号　ＰＣＴ／ＥＰ９９／０６３１５
(87)国際公開番号　ＷＯ００／１２１２３
(87)国際公開日　平成12年３月９日(2000.3.9)
(31)優先権主張番号　１９８　３９　２５４．０
(32)優先日　平成10年８月28日(1998.8.28)
(33)優先権主張国　ドイツ（ＤＥ）
(31)優先権主張番号　１９８　３９　２５５．９
(32)優先日　平成10年８月28日(1998.8.28)
(33)優先権主張国　ドイツ（ＤＥ）

(71)出願人　フェビット　フェラリウス　バイオテクノロジー　ゲゼルシャフト　ミット　ベシュレンクテル　ハフツング
ドイツ連邦共和国　ヴァインハイム　ゲッセルヴェーク　15
(72)発明者　コルト　エフ　シュテーラー
ドイツ連邦共和国　ヴァインハイム　ジークフリートシュトラーセ　9
(72)発明者　ペール　エフ　シュテーラー
ドイツ連邦共和国　マンハイム　リートフェルトシュトラーセ　3
(74)代理人　弁理士　矢野　敏雄　（外４名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　試料中の分析物を測定するための方法および装置

(57)【要約】
次の過程：（ａ）試料を（ｉ）数多くの種の微粒子、この場合全ての種は、一定の分析物の検出に適しておりかつ別の種と光学的に区別しうる一定のコーディングを有し、および（ｉｉ）信号を発する群を支持するかまたは信号を発する群と結合しうる、数多くの可溶性の分析物特異性の検出試薬と接触させ、（ｂ）引続き微粒子を支持体上にもたらし、少なくとも（ｃ）コーディングおよび少なくとも１つの種の個々の微粒子上で信号を発する群の量、存在または／および不在を支持体上で光学的に検出することによって、分析物を測定することを含む、試料中の数多くの分析物を測定する方法が記載される。更に、本発明の対象は、前記方法を実施するための測定装置である。



Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4545

【特許請求の範囲】

【請求項１】　次の過程：

（ａ）試料を

（ｉ）数多くの種の微粒子（３）、この場合全ての種は、一定の分析物の検出に適しておりかつ別の種と光学的に区別しうる一定のコーディングを有し、および

（ｉｉ）信号を発する群を支持するかまたは信号を発する群と結合しうる、数多くの可溶性の分析物特異性の検出試薬と接触させ、

（ｂ）引続き微粒子（３）を支持体（７；７ａ）上にもたらし、少なくとも

（ｃ）コーディングおよび少なくとも１つの種の個々の微粒子（３）上の信号を発する群の量、存在または／および不在を支持体（７；７ａ）上で光学的に検出することによって、分析物を測定することを含む、試料中の数多くの分析物を測定する方法。

【請求項２】　分析物を細胞、細胞内粒子、核酸、ポリペプチド、ペプチド、糖蛋白質、リポ蛋白質、単糖類、オリゴ糖類および多糖類、脂質、代謝物、ホルモン、媒介物質、神経伝達物質、農薬、殺虫剤、毒性物質、薬理学的に有効な物質およびこれらの組合せ物から選択する、請求項１記載の方法。

【請求項３】　試料として体液、例えば血清、血液、血漿、尿、リンパ液、脳延髄液、精液、唾液等、組織、組織抽出液、細胞、細胞抽出液、植物性試料、環境試料および排泄物試料から選択された生体試料を使用する、請求項１または２記載の方法。

【請求項４】　有機粒子、例えば有機ポリマーラテックス、または多糖類粒子、無機粒子、例えば磁性体粒子およびガラス粒子、ならびに有機無機複合体粒子から選択された微粒子（３）を使用する、請求項１から３までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項５】　光学的に透明または光学的に不透明の微粒子（３）を使用する、請求項１から４までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項６】　10^6までの数の種の微粒子（３）を使用する、請求項１から５までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項７】　全ての種の微粒子（３）がこの微粒子の表面上で少なくとも

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4546

１つの不動態化された、異なる分析物特異性の受容体を含む、請求項１から６までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項８】　不動態化された分析物特異性の受容体を、核酸、例えばＤＮＡおよびＲＮＡ、核酸類似物、例えばペプチド核酸（ＰＮＡ）、抗体、抗体断片、抗原、ペプチド、ハプテンおよび合成受容体から選択する、請求項７記載の方法。

【請求項９】　微粒子（３）のコーディングを、色コーディング、例えば物質の呈色、表面の着色または／および着色剤の埋設によって発生させる、請求項１から８までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１０】　測定（６）を少なくとも２つの種の異なる微粒子上で行なう、請求項１から９までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１】　全ての分析物の測定のために、分析物特異性の受容体および分析物類似物から選択される、少なくとも１つの可溶性の分析物特異性の検出試薬を使用する、請求項１から１０までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２】　可溶性の分析物特異性の検出試薬を、核酸、例えばＤＮＡおよびＲＮＡ、核酸類似物、例えばペプチド核酸（ＰＮＡ）、抗体、抗体断片、抗原、ペプチド、ハプテンおよび合成受容体から選択する、請求項１１記載の方法。

【請求項１３】　可溶性の分析物特異性の検出試薬を、信号を発する基と直接にカップリングする、請求項１から１２までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１４】　可溶性の分析物特異性の検出試薬が信号を発する基、有利に高度に親和性の生体交換作用により結合しうる基を有する、請求項１から１２までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１５】　数多くの分析物の測定のために、同じ信号を発する基を使用する、請求項１３または１４記載の方法。

【請求項１６】　信号を発する基として発光性基、蛍光性基または燐光性基を使用する、請求項１から１５までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１７】　平面状の支持体（７）を使用する、請求項１から１６までのいずれか１項に記載の方法。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4547

【請求項１８】　プラスチック、ガラス、半導体材料および金属から選択された表面を有する支持体（７）を使用する、請求項１から１７までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１９】　支持体としてチップ（７ａ）を使用する、請求項１８記載の方法。

【請求項２０】　光学的に透明な支持体（７；７ａ）を使用する、請求項１から１９までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項２１】　構造化された表面領域を有する支持体を使用する、請求項１から２０までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項２２】　施与が支持体（７）上への微粒子を含有する懸濁液の刷毛塗り、ロール塗り、型押しまたはスポッティングを含む、請求項１から２１までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項２３】　施与が毛管作用による支持体（７ａ）上への微粒子の移動を含む、請求項１から２２までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項２４】　支持体上での微粒子の静的または動的な配置を定める、請求項１から２３までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項２５】　高解像度の画像検出装置（９）、例えばＣＣＤカメラを用いて測定を行なう、請求項１から２４までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項２６】　各微粒子（３）が少なくとも２個、有利に少なくとも４個、特に有利に少なくとも９個、最も多くの場合に有利に少なくとも１６個の個々のピクセルの１つの面積を覆う程度に、微粒子（３）の大きさを選択する、請求項２５記載の方法。

【請求項２７】　微粒子（３）が少なくとも１０μｍ、有利に２０μｍ、特に有利に２５μｍ～８０μｍの平均直径を有する、請求項１から２６までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項２８】　臨床的パラメーターの診断、例えば核酸の診断、生物学的な基礎研究、法医学、食品分析および医薬製品のスクリーニングのための請求項１から２７までのいずれか１項に記載の方法の使用。

【請求項２９】　次のもの：

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4548

（ａ）遊離形での数多くの種の微粒子（３）、この場合全ての種は、一定の分析物の検出に適しておりかつ別の種と光学的に区別しうる一定のコーディングを有し、

（ｂ）数多くの可溶性の分析物特異性の検出試薬および

（ｃ）支持体（７；７ａ）

を含む、殊に請求項１から２７までのいずれか１項に記載の方法を実施するためのキット。

【請求項３０】　次のもの：

－　試料と接触される、支持体（７；７ａ）上にもたらされる微粒子（３）の集団の光学的挙動を本質的に拡大されずに画像に応じて検出するための電子的画像検出センサー（９）と、

－　支持体（７；７ａ）上での微粒子の集団内で微粒子（３）に対して信号を発する基の信号の発信を励起させるための装置（１７）と、

－　微粒子（３）の集団の検出された光学的挙動を基礎とする試料内で一定の分析物の存在に関する情報を準備するために、電子的画像検出センサーの画像データを評価するデータ処理装置（１３）とを含む、殊に請求項１から２７までのいずれか１項に記載の方法により、試料中の数多くの分析物を測定するために測定装置。

【請求項３１】　画像検出センサーがＣＣＤ画像撮影機である、請求項３０記載の測定装置。

【請求項３２】　微粒子（３）が色コーディングされており、画像検出センサー（９）が、検出される画像点の位置に対応配置されて微粒子（３）の集団のそれぞれ撮影される画像の画像点の色の差を検出するのに適しており、微粒子の集団の光学的挙動を画像に応じて検出するために、支持体（７；７ａ）上でそれぞれ同じ色コーディングの微粒子（３）の状態を測定することができる、請求項３０または３１記載の測定装置。

【請求項３３】　画像検出センサー（９）を用いて微粒子（３）の集団の個々の個体の光学的吸収挙動または反射挙動を並行に測定するための殊にスペクトルの幅広のバンドの光を準備する少なくとも１つの光源（１１）を含む、請求項

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4549

３０から３２までのいずれか１項に記載の測定装置。

【請求項３４】　信号の発信を励起させるための装置（１７）が信号を発する基を有する少なくとも１つの種の微粒子（３）を蛍光励起させるための少なくとも１つの光源を含み、画像検出センサー（９）が微粒子（３）の各集団の光学的挙動を画像に応じて検出する際に場合によっては蛍光を発する個体の画像点の位置に対応配置されて蛍光を検出するのに適している、請求項３０から３３までのいずれか１項に記載の測定装置。

【請求項３５】　微粒子（３）がその形状に関連してコーディングされており、画像検出センサー（９）とデータ処理装置（１３）とからなる光学的測定装置が、個々の種の微粒子（３）を異なる形状輪郭に基づいてそれぞれ吸収される画像で区別するのに適している、請求項３０から３４までのいずれか１項に記載の測定装置。

【請求項３６】　支持体が画像検出センサーの殊に平面状の窓であり、この窓が画像検出センサーの画像撮影の場を外向きに覆っている、請求項３０から３５までのいずれか１項に記載の測定装置。

【請求項３７】　支持体（７）と画像検出センサー（９）が定義された位置で互いに相対的に１つの共通のホルダーで固定することができるかまたは互いに直接に交換可能であるように固定することができる、請求項３０から３６までのいずれか１項に記載の測定装置。

【請求項３８】　支持体（７ａ）が微粒子（３）のための少なくとも１つの流路を有し、測定装置は、微粒子（３）の集団が流路に沿って移動する間に微粒子（３）の光学的挙動を画像に応じて検出する目的で設置されている、請求項３０から３７までのいずれか１項に記載の測定装置。

【請求項３９】　支持体（７ａ）が空隙（１９）、殊に微粒子（３）の平面側で互いに対向する２つの板（２１、２３）の間で微粒子（３）の集団を受け容れるための平らに延びた毛管間隙を有し、その中の少なくとも１つが透明である、請求項１から２７までのいずれか１項に記載の方法を実施するため、殊に請求項３０から３８までのいずれか１項に記載の測定装置のための支持体。

【請求項４０】　２つの板の間の間隔は、空隙（１９）内でそれぞれ並んで

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4550

存在する微粒子の１つの層だけが適合するように選択されている、請求項３９記載の支持体。

【請求項４１】　板（２１；２３）の間の間隔が選択的に調節可能である、請求項３９または４０記載の支持体。

【請求項４２】　支持体が数多くの殊に互いに平行に走る毛管通路を有し、少なくとも毛管通路の範囲内で光学的に透明である、請求項１から２７までのいずれか１項に記載の方法を実施するため、殊に請求項１から３８までのいずれか１項に記載の測定装置のための支持体。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4551

【発明の詳細な説明】

【０００１】

本発明は、試料中の数多くの分析物を測定するための方法および装置に関する。更に、本発明の対象は、本方法を実施する際に使用するためのキットおよび測定物質用支持体である。

【０００２】

１使用分野

１．１背景

生物科学における基礎研究および医学的診断学のための基礎研究ならびに若干の別の学問分野のための基礎研究には、定義された試験物質において生物学的に該当する分子の正確な検出が著しく重要である。全ての有機体は、最終的に種々の生物学的巨大分子、しばしばポリマー、例えば核酸および蛋白質、およびこれらから誘導される物質ならびに特異的な酵素合成効率の産物から構成されている。この場合には、ＤＮＡの多種多様な異なる核酸配列の形の遺伝子情報が存在する。この情報の実現により、ＲＮＡへのＤＮＡの転写の作成を経て多くの場合に蛋白質の合成が生じ、この蛋白質は、その側でしばしば生化学反応に関与する。それによって、二次的に数多くの有機化合物、一部は低分子量化合物が形成されかつ分解される。

【０００３】

それによって、多種多様の物質が体内で生じる。その上、さらに身体に外側から供給される別の分子、例えば薬物または乱用されている薬物も加わる。

【０００４】

有機体の健康状態ならびに疾病状態の記述に関連して、少なくとも重要な前記分子の存在、量および変換率についての知識は、極めて有用である。この知識が増えるにつれて、相関関係および有用性についての理解が指数的に増す。医学において、著しく大量にインビトロ診断（ＩＶＤ）によって患者の重要なパラメーターを測定するための器具が開発され、治療する医師に提供されることができた。多数の疾病には、この器具なしでは十分に早期の時点での診断は不可能であろう（例えば、ＨＩＶ、ＨＢＶ等のような感染症）。同様のことは、特異的なパラ

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4552

メーターを有する疾病を随伴する対照についても云えることである（糖尿の場合の血糖値）。基礎研究と臨床的研究の狭い噛み合わせの点で、生物医学においては、若干の病状の分子的誘因および（病理学的）関連を遺伝情報が平均化するまで解明することができた。しかし、この開発は、なお初歩的であり、まさに治療戦略に移るためには、徹底した努力が著しく必要とされた。

【０００５】

１．２要件

臨床的診断学において、ＩＶＤ法は、断念不可能な補助手段になっている。この場合には、決定可能なパラメーターの数を増加させることがますます試みられている。新規の技術は、所謂多重化分析を生じ、この場合には、多数の分析または数多くの分析物を１つの方法に組み込むことが試みられている。この場合には、同時に装置を小型化するかまたは極小化することが試みられている。多くの場合、ＩＶＤ法は、僅かなパラメーター、即ち１００未満だけを１回の通過のうちに検出する。例えば、遺伝子の前析出を確認するために、核酸および別のファクター、例えば：自動免疫疾病の範囲内の自動抗体、例えばリュウマチの同時の検出は、これまで行なわれていない。例えば、ＨＩＶでの感染を検出しうる核酸診断は、これまで分子生物学的方法、例えばポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）または配列決定を設定し、この場合これらの方法は、制限されてのみ情報を供給するかまたは極めて費用がかかり、ひいては高価である。従って、この核酸診断は、幅広い使用における大きなデータ量の増加のためには、既に費用の理由から部分的に不適当である。新規で数多くの注目される発端は、固体の下地上、例えば珪素マトリックス上での不動態化されたオリゴヌクレオチド（オリゴス（Oligos））でのハイブリダイズによる核酸分析である。このような所謂ＤＮＡチップの場合、不動態化されたオリゴスへの相補鎖の結合によって１つの信号が発生され、この場合には、チップ上でのオリゴスの極めて緻密で極小化された配置が例えばフォトリソグラフィー合成によって達成され、それによって試験１回当たりの測定点の数は、極めて高められる。しかし、このようなＤＮＡチップの調製には、極めて費用がかかり、高価であり；さらに、オリゴスの長さは制限されている。全ての付加的な構成成分は、大規模な合成過程および洗浄過程を必要とする、この

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4553

ようなバイオチップスの使用は、現在、核酸分析に限定されている。遺伝子、即ち核酸を基礎とするにすぎない生理的な関係の分析は、不可能である。所謂機能遺伝子学は、例えばバイオチップを用いての遺伝子分析に基づき、数多くの遺伝子の相互作用を解読することを試みている（機能遺伝子学）。遺伝子産物（多くの場合、蛋白質）の分析および遺伝子の相互作用は、全体的に超概念の蛋白質化学の下で行なわれる。しかし、この場合には、核酸分析とは異なり、高度の組み込まれた形成体、例えばＤＮＡチップスのための発端は殆んど存在せず、この作業は、僅かに組み込まれかつ多くの場合に連続的な機能法で実施される。それにも拘わらず、既に疾病の診断および治療についての前記機能法に基づいて極めて有用な知識が得られる。将来の前記作業については、新規の方法的前提条件および装置的前提条件が必要とされる。生物学的基礎研究および生体医学的基礎研究においては、まさに遺伝子産物の分析ならびに細胞および有機体の記載内容での意味において、今日まで一般に手動的な作業過程が著しく支配的であった。それによって、一面で、変動は、例えば実験およびアッセイの実施に結び付いているが、しかし、発生された情報１回当たりの相応する個人的費用および多くの場合に高い時間的費用と結び付いている。

【０００６】

患者の世話に対する現在の生体医学の期待を果たすために、１０２～１０６のパラメーターの多重化分析を高度に並行に可能にしなければならず、理想的には、多種多様な分析物、例えば蛋白質、ホルモンまたは核酸の共通の検出を、相対的に高い費用をかけることなく、可能にしなければならない。このような技術は、本明細書中に記載されている。

【０００７】

１．３発明の使用分野

インビトロ診断および臨床的診断

急性診断および日常的試験（予防医学）への数多くのパラメーターの合一；これから、多種多様の病状の（極端に）早期の診断に対して統計的に評価すべき有用な知識が導かれ；生じたデーター量は、情報工学における展開によって初めて評価可能になる。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4554

【０００８】

ＤＮＡおよびＲＮＡの診断

－　感染症（ＨＩＶ、ＨＢＶ等）、

－　腫瘍の早期認識、

－　腫瘍の分類（型および状態）、

－　遺伝子疾病、

－　腫瘍学。

【０００９】

生物学的基礎研究、殊に遺伝子学および蛋白質化学

試験された系、例えば実験された全ての遺伝子、または培地から放出される全ての蛋白質および成長因子の検出；これから、生物学的基礎研究（開発生物学、菌株細胞培養、組織工学、移植医学、再生）における膨大な知識の獲得が導かれ、この知識の獲得により、生体医学における重要な突破口および対応する使用が導かれる。

【００１０】

法医学

遺伝学的パラメーターならびに免疫学的パラメーターは、痕跡分析に使用される。

【００１１】

食品分析

本発明によれば、例えば一定の遺伝子または蛋白質の存在についての食品の迅速で安価な分析を可能にするはずである。

【００１２】

医学製品のスクリーニング

例えば、血液調製物の製造は、依然として純度に対する安全性の予防対策に係る高い費用と結び付いている。このような試料を時間を掛けずに安価にスクリーニングすることは、本発明により可能になる。

【００１３】

２．公知技術水準

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4555

バイオチップは、例えば特異的な相互作用成分として使用することができる、生物学的成分および工業的成分、例えば表面で不動態化された生体材料を有する、極小化されたハイブリッド機能素子および珪素マトリックスである。多くの場合、この機能素子が列および段をなして配置されている場合には、バイオチップアレイと呼ばれる。バイオチップ上には数千個の生化学的機能素子が配置されていてもよいので、この機能素子は、ミクロ技術的方法で製造されなければならない。

【００１４】

これまで、公知のバイオチップは、次の判断基準により分級することができる：

検出原理：

クロマトグラフィー法

－　分析物と固定相、多くの場合に不動態化された相互作用成分との相互作用（例えば、ＤＮＡオリゴヌクレオチドでの核酸のハイブリダイズ）。

【００１５】

－　検出法（光学的、電気的）。

【００１６】

標識を基礎とする（例えば、吸収、蛍光または発光）かまたは標識なしの検出法（反応検出のための光の発生）。

【００１７】

－　分析物とその支持体［固定相］との相互配置

（支持体１個当たり１個よりも多い不動態化された相互作用成分を有するARRAYまたは支持体１個当たり１個だけの不動態化された相互作用成分を有するSINGLE）。

【００１８】

製造方法（例えば、オリゴヌクレオチドを直接にバイオチップ上で光活性化して合成し、完成合成されたオリゴヌクレオチドを点在させ、ビーズまたはチューブを被覆する）。

【００１９】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4556

支持体の種類（ガラスチップ、プラスチックチップ、微量滴定板、チューブまたはビーズ）。

【００２０】

－ 検出のための表示（連続、平行）。

【００２１】

光学的検出（スキャナーで連続的またはＣＣＤカメラで並行に）。

【００２２】

バイオチップの周囲で、フォトリトグラフィー技術により平面状の支持体の表面上でオリゴヌクレオチドの形のポリマー試料を調製することは、例えば米国特許第５７４４３０５号明細書の記載から公知である。この場合には、１ｃｍ^{2}当たり数千個の試料を有する特に高い程度の極小化を達成することができ、この場合には、試料は１つのアレイで配置されている。

【００２３】

しばしば、異なる撮影機または流体中に存在する試料を小型ないし極めて小型の液滴の形で固体の支持体上にもたらし、そこで場合によっては不動態化するような方法が記載されている。支持体のこの種の製造に関する技術的解決の一部分は、インキジェット印刷技術に由来する。この種の方法は、個々の貯蔵容器中で貯蔵される、流体中での完成試料の取扱いによって、支持体上での異なる撮影機の数の点で制限されている。現在公知の使用は、極めて費用のかかる実施形式の場合に支持体１個当たり１００００個の異なる試料が達成される。

【００２４】

微粒子を用いての方法の場合には、細胞計算機（蛍光により活性化された細胞のソーティング（Fluorescent activated cell sorting FACS））と関連させて、このような粒子を使用することが記載されている。更に、極めて小さな粒子は、微粒子の蛍光標識で支持されている方法で、エッチングされたガラス繊維マイクロウェルの使用によって逆光で検査されることができ、その上、１つの分析測定法が形成される。

【００２５】

米国特許第４７６７２０５号明細書には、選択された対象をコーディングによ

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4557

り同定する方法が記載されており、この場合２～２０μｍの大きさを有する同形の微粒子は、大きさ、形状および色の特定の組合せに関連してコーディングされ、かつ同定すべき対象中に導入される。この特許明細書には、分析物を測定するための方法については何も指摘されていない。

【００２６】

ドイツ連邦共和国特許出願公開第３６２８８号明細書には、１つの免疫学的試験方法が記載されており、この方法の場合には、その表面で多数の分析物特異性の抗体が不動態化されている反応容器が使用される。試料中に存在する分析物の不動態化後、同様に分析物特異性の抗体を有する標識粒子が添加され、こうして不動態化された分析物が測定される。微粒子を粒子状固定相として使用することは、この刊行物には、指摘されていない。

【００２７】

ＷＯ　９８／００２９２には、試料中の抗原を検出する１つの方法が記載されており、この場合には、着色された固定相、例えば微量滴定板が使用される。粒子状固定相については何も指摘されていない。

【００２８】

米国特許第４４９４８３０号明細書には、生体液中の分析物を種々に着色される試験棒を使用しながら免疫学的に検出する方法が記載されている。微粒子の使用については、何も指摘されていない。

【００２９】

３．本発明の対象およびそれによって解決される課題

本発明は、例えばバイオチップまたは”被覆されたチューブ”によって表わされているように、別の並行の方法および多重化形成体に対する１つの重要な選択を表わす。

【００３０】

本発明の対象は、請求項１の記載によれば、

次の過程：

（ａ）試料を

（ｉ）数多くの種の微粒子、この場合全ての種は、一定の分析物の検出に適して

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4558

おりかつ別の種と光学的に区別しうる一定のコーディングを有し、および

（ｉｉ）信号を発する群を支持するかまたは信号を発する群と結合しうる、数多くの可溶性の分析物特異性の検出試薬と接触させ、

（ｂ）引続き微粒子を支持体上にもたらし、少なくとも

（ｃ）コーディングおよび量、支持体上での少なくとも１つの種の個々の微粒子上の信号を発する群の存在または／および不在を光学的に検出することによって、分析物を測定することを含む、試料中の数多くの分析物を測定する方法である。

【００３１】

本方法の好ましい他の態様は、請求項２から２７までのいずれか１項に記載されている。

【００３２】

本発明による方法は、殊に臨床的パラメーターの診断、例えば核酸の診断、生物学的基礎研究、法医学、食品分析および医薬製品のスクリーニングに使用可能である。

【００３３】

更に、本発明の対象は、請求項２９記載に記載された、殊に請求項１から２７までのいずれか１項に記載の方法を実施するためのキットである。このキットは、

（ａ）数多くの種の遊離形での微粒子、この場合全ての種は、一定の分析物の検出に適しておりかつ別の種と光学的に区別しうる一定のコーディングを有し、

（ｂ）数多くの可溶性の分析物特異性の検出試薬および

（ｃ）支持体

を含む。

【００３４】

更に、対象は、試料中の数多くの分析物を測定するため、殊に本発明の方法により、請求項３０に記載された測定装置である。この測定装置は、試料と接触される、支持体上にもたらされる微粒子の集団の光学的挙動を本質的に拡大されない画像に応じて検出するための電子的画像検出センサーと、支持体上での微粒子

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4559

の集団内で微粒子に対して信号を発する基の信号の発信を励起させるための装置と、微粒子の集団の検出された光学的挙動を基礎とする試料内で一定の分析物の存在に関する情報を準備するために、電子的画像検出センサーの画像データを評価するデータ処理装置とを含む。

【００３５】

電子的画像検出センサーは、有利にカラー効率を有するＣＣＤ画像撮影機である。この画像撮影機は、直接に支持体と結合されていてもよく、したがって煩雑な像伝送レンズ、光導波路および光学的拡大素子は省略することができる。

【００３６】

本発明による請求項３０に記載された測定装置の好ましい他の態様は、請求項３１から３８までのいずれか１項に記載されている。

【００３７】

更に、本発明の対象は、本発明による方法を実施するための支持体であり、この場合この支持体は、空隙、殊に微粒子の平面側で互いに対向する２つの板の間で微粒子の集団を受け容れるための平らに延びた毛管間隙を有し、その中の少なくとも１つは透明である。

【００３８】

２つの板の間の間隔は、空隙内でそれぞれ並んで存在する微粒子の１つの層だけが適合するように選択されている。場合によっては、板の間の間隔は、選択的に調節可能であってもよい。

【００３９】

更に、本発明の対象は、本発明による方法を実施するための支持体であり、この場合この支持体は、殊に互いに平行に走る多数の毛管通路を有しかつ少なくとも毛管通路の範囲内で光学的に透明である。最後に記載された支持体は、簡単な方法で光学的検出の間に微粒子の運動による提示を可能にする。

【００４０】

本明細書中で”フラクタルSMARTチップ－FSC”と呼称されている支持体を用いた場合には、数千の異なるアッセイ（測定法）を１つの測定過程で実施されてよい。フラクタルバイオチップの原理は、不動態化成分として使用される、微粒子

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4560

（ビーズ）からなる固定相の二重のコーディングに基づく。このコーディングされたビーズ（例えば、色コーディングされたガラス玉またはポリマービーズ）に対して捕捉分子（例えば、オリゴヌクレオチド）が不動態化され、それによって”識別力を有する個別的な”SMARTビーズが生成される。SMARTビーズのコーディングによって、捕捉分子は、SMARTビーズの表面上で常に局在化可能であり、かつ確認することができる。他面、例えば試料中で見い出された目的分析物（例えば、DNA分析物）もコーディングされてよい（例えば、蛍光ラベル）。更に、分析系中で捕捉分子に接してそのつど通過する目的分析物分子は、SMARTビーズ表面上に堆積される。この堆積は、有利に立体容器中で相応する有利な流動技術的混合条件の下で行なわれる。

【００４１】

そのつどの分子堆積の検出および評価のために、SMARTビーズは、支持体上にもたらされ、この支持体は、有利に平面状の配置を形成する。この場合、SMARTビーズは、固定格子または幾何学的ラスター中に導入する必要はない。SMARTビーズおよび二重の光化学的コーディングの平面状の方向付けに基づき、全てのSMARTビーズの検出は、ＣＣＤ技術により並行に行なうことができ、実際にSMARTビーズの静止状態ならびに運動状態で行なうことができる。

【００４２】

平行な方向を示す光が使用されかつSMARTSの大きさがカラーＣＣＤチップスの十分な数のピクセル素子を覆うように選択される場合には、検出の際に光学的に結像するレンズ形を省略することができる。ピクセル（光学的測定点もしくはセンサー）の大きな数（現在、１ｃｍ^{2}当たり８百万個のカラーピクセル）を有する高度に平行なＣＣＤマトリックスの前記の直接的な利用（光学素子なし）によって、数多くのSMARTビーズをその特異的な色コーディング（スペクトルによる同定）につき検出することが可能である。支持体（チップ）のための費用のかかる運動装置、またはスキャナーに必要とされるような検出単位装置は全く不要である。ＣＣＤチップスの所定の寸法決定（数ｃｍ^2）は、中程度の粒径（数１０μｍ）を有する数多くのSMARTビーズ（数１００００００個）の使用を可能にし、この使用は、吸収原理によるスペクトルの同定をも可能にする。それによって、

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4561

蛍光着色の際に可能である同一性よりも本質的に多数の同一性（色）が欠陥なしに確認されることができる。現在、ＣＣＤチップスは、約１６百万の色を確認することができる。なお欠陥なしに検出することができる、最大数の異なるスペクトルの同一性は、光学的測定のために必要とされるスペクトルの段階付けならびに再生プロセスにおいてSMARTビーズの再生可能な着色の可能性によって記載される。

【００４３】

確認は、SMARTビーズ種（色）の測定ならびに正確な位置を含む。これは、SMARTビーズ毎に検出に提供される、数多くのＣＣＤピクセルによって可能になる。この多数の測定値は、個々のSMARTビーズの確認の際に二次元アレイで数多くの数学的倍数化を可能にする基礎を提供する。生じるデータ量の処理は、性能の展開によって同時の現在の計算機システムの価格崩壊で問題なしに可能である。

【００４４】

検出反応の検出は、定性的ならびに定量的に述べることができる。

【００４５】

＊捕捉分子もしくはポリマー試料（ビーズの色または場合によっては特性を示す形状の輪郭についての評価）が如何なるものであるかにより、堆積成分が見い出された（局在化されたビーズについての蛍光標識されたラベルの評価）。

【００４６】

＊１つの種類の捕捉分子が幾つあるかにより、ハイブリダイジング成分が見い出された。

【００４７】

別のビーズ法に対して比較的大きなSMARTビーズは、生産（製造および生化学的被覆）の際ならびに検出単位装置を含めて分析系の場合に簡単に流動的取扱いを可能にし、この流動的取扱いにより、個々の微粒子の取扱いにまで最適にされることができる。同様のことは、検出についても云えることである。この場合も、特にＤＮＡ分析における使用に対して、個々のSMARTビーズの同一であることの確認を可能にする。

【００４８】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4562

従って、本発明は、臨床的診断において次の要件を保証する：

＊同時に決定可能な多数のパラメーター（極小化されたSMARTビーズおよび高解像度の光学的検出によって達成される）。

【００４９】

＊迅速な評価（なおも可動するSMARTビーズの検出によって促進されうる平面状の施与における並行な光学的評価によって達成される）。

【００５０】

＊安価（高価でマイクロシステム技術的成分および光学的成分ならびにバイオチップ製造の際に費用のかかる合成過程の省略によって達成される）。

【００５１】

本発明の価値は、顕著に前記技術の適当な組合せにある。

【００５２】

４．解決法の根本的特質

前記系における原理的な解決法は、提示および検出されるまで分析系においてSMARTビーズと試験すべき試料との混合により、SMARTビーズの検出法（ラベリングまたはコーティング）のための表面の生化学的被覆に関連するコーディング（個々の微粒子の特異的な同一性）から出発する。

【００５３】

４．１フラクタル固定相（SMARTビーズ）および特異的なコーディング

個々のSMARTビーズ（定義された大きさおよび幾何学的寸法の微粒子）を後に明らかに定義しうるために、ビーズは個別的にコーディングされる。意味のある全てのSMARTビーズの種類は、固有の同一性を維持しており、それによって単一の支持体から同一であることを確認することができる個体になし、このことは、個々のSMARTビーズの種類（この場合、１つの種類は、同じ同一性を有するSMARTビーズよりも多い）の再認識を検出単位装置中で可能にする。微粒子（ビーズまたは微小球面）は、個別的なコーディングによって初めて固有のSMARTビーズになる。

【００５４】

一般にコーディングの場合には、例えば粒径、粒子の幾何学的寸法、粒子の質

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4563

量および物理的性質、例えば磁性化可能性等を使用することができる。しかし、この原理は、極めて減縮された数の”段階付け”を有し、したがって僅かな異なるコーディングを生じさせることができる。

【００５５】

SMARTビーズは、有利に少なくとも１０μm、特に少なくとも２０μm、特に有利に２５～２００μm、殊に有利に２５～８０μmの平均直径を有する。光学的に透明または光学的に不透明のビーズが使用されてよく、この場合には、できるだけ高い光学的透明度を有するビーズが有利であり、この高い光学的透明度は、透過光法で簡単な分析を可能にする。更に、好ましいのは、できるだけ僅かな大きさの変動を有するSMARTビーズの使用であり、この場合には、ビーズの少なくとも５０％、特に有利に少なくとも７０％および多くの場合に有利に少なくとも９０％は、最大で２０％まで、有利に１０％までがそれぞれSMARTビーズ種の平均直径から偏倚している直径を有している。

【００５６】

SMARTビーズの色コーディングのための方法としては、なかんずく材料の光透過性着色、表面の光透過性着色、材料の光不透過性着色、表面の光不透過性着色、蛍光染料の埋設または発光法が考えることができる。

【００５７】

これに対して、色コーディングまたは電磁的コーディングは、多数の段階付けを有し、このことは、極めて多数のSMARTビーズの同一性の確認を可能にする。本発明の理想は、光学的検出のためにＣＣＤマトリックスチップの絶えず成長する性能との組合せで色コーディングの利用、即ちSMARTビーズのスペクトル同一性に基づく。このチップは、現在約７０百万の色を確認することができる。

【００５８】

４．２分析物の測定－基本原理

分析物を測定するための一般的な原理として、特異的に不動態化された相互作用成分への分析物の結合は、定義されたSMARTビーズの表面上で利用される。

【００５９】

この場合、この相互作用の特異性は、そのために相応して備えられた、即ち不

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4564

動態化された相互成分を有するSMARTビーズだけへの分析物の選択的結合を可能にし、ひいては分子の確認および不均質混合物中での分析物の引続く検出を可能にする。同じスペクトル特性（色）によってクラスとして定義された全てのSMARTビーズは、不動態化された相互作用成分を同様に備えており、この場合相互作用成分の結合は、有利に共有結合形で行なうことができるが、しかし吸収的または特異的な高度に親和性の相互作用（例えば、ビチオン／アビジンもしくはストレプトアビジンまたはハプテン／抗アプテン（Anti-Apten）抗体）により行なうこともできる。それによって、試験物質中での分析物の存在により、SMARTビーズについての前記のスペクトルで確認可能なクラスについてのみ結合、ひいては信号の発生を生じる。この信号は、クラスに特異的なそれぞれの装備を認識する際に、結合された分析物の確認、ひいては試験物質中での検出のために使用される。

【００６０】

それによって、検出原理は、例えばELISA試験（固相酵素免疫検定法）の開発の際に確定された方法に相当する。不動態化された相互作用成分でのビーズの被覆は、”人造の立場”である（例えば、磁性体ビーズのアビジン被覆、ジナール（Dynal）；ELISA形成体中での抗体被覆、ルミネックス（Luminex）のフローメトリックス（Flowmetrix））。

【００６１】

４．３分析系中でのSMARTビーズと試料との混合

特異的に色コーディングおよび分析物コーディングされたSMARTビーズは、分析系中で試験すべき試料と混合される。この方法は、”場所的に自由な”固相（例えば、LuminexのFlowmetrix）を用いる、ビーズを基礎とする別の方法と同一である。これは、例えば１００個のクラスの中の１００個のSMARTビーズ当たり１００００個の微粒子からなる、特殊な使用のために構成された、１組のSMARTビーズが相応して準備された試料と一緒に容器中に導入され、恒温保持され、適当な条件下で、例えば適当なハイブリダイゼーション条件下で、十分な確率で全てのSMARTビーズが反応体を見出すという可能性を有していたことから出発することができるまで、混合される。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4565

【００６２】

４．４検出のためのSMARTビーズの提示

検出のためにSMARTビーズを提示する全ての方法および技術の場合には、できるだけ迅速で、同時に確実、ひいては有効な検出を達成するという目的が存在する。それというのも、測定結果に対して正確に測定される事実だけが貢献するからである。

【００６３】

検出の際に高い通過量で１つの方法を達成することは、フロー・サイトメーターの原理と同様に、検出器でのSMARTビーズのできるだけ迅速な提示にあり、この場合には、粒子は、高速で毛管によって圧縮され、出口で”オンライン”で”粒子噴射”中に測定される。本発明によれば、好ましい可能性は、例えば検出器でのSMARTビーズの二次元的な提示によって、検出を並行に行なうことである（SMARTビーズアレイ）。

【００６４】

勿論、使用される検出器は、信号を十分に迅速かつ並行に検出する状態になければならない。このために、有利にＣＣＤチップスは、直接に、即ち光学素子の使用なしに使用されるべきである。それによって、SMARTビーズの検出の準備をする表面に対する寸法決定が予め定められる。即ち、現在、高解像度の標準チップ（特殊に完成されていない）は、約２５×３７ｍｍの外形寸法を有する。この表面上には、例えば約２００００００個のSMARTビーズが配置されるので、全てのSMARTビーズは、６０μｍの直径を有するが、しかし、それにも拘わらず、全てのSMARTビーズは、なお約４０個のカラーピクセルを覆い、このことは、信頼できる検出を初めて可能にする。列をなすことによって最も緻密に梱包した場合には、むしろなお多数のSMARTビーズを入れることができるか、またはSMARTビーズは、なおさらに大きくともよい。極小化、ひいてはさらに並行化も考えることができる。SMARTビーズを支持体上で平らにもたらすための方法としては、次の技術が可能である：二次元の毛管間隙、平行な毛管または管、刷毛塗り、型押し（血液の刷毛塗りと同様）またはロール塗り、または点滴。

【００６５】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4566

４．５励起光源

SMARTビーズを平面状の施与の際に認識することができるようにするために、１つの励起光源が必要とされ、この励起光源は、SMARTビーズの表面上に対して行なわれた反応に対して選択された検出法と同様に、使用される色コーディング法の要件にとって十分なものである。場合により、例えばSMARTビーズの同一性を吸収性の測定によって行ない、反応の検出を蛍光信号によって行なう場合には、２つの過程のために２つの別個の光源を設けることができる。可能な光の種類は、平行で平面状の光（連続的または閃光として）であるか、例えば光の縞または光の点によるその場所に限った局所的な励起である。

【００６６】

この光の種類は、要件に応じて単色である（例えば、蛍光励起のためのレーザー光）かまたは不均質である（例えば、吸収測定のための白色光）。

【００６７】

４．６SMARTビーズの確認

SMARTビーズアレイ中での個々のSMARTビーズのスペクトル同一性の光学的認識は、次の２つの情報を生じる：

（１）何れかのSMARTビーズクラス（例えば、同一の色を有するSMARTビーズ）には、一定のSMARTビーズが属し、その上、このSMARTビーズ上で結合された分析物を測定することができる（同一性：”私は誰であり、したがって表面上に結合された分析物は何が重要であるのか”）。

【００６８】

（２）平面状のSMARTビーズアレイの何処にそれぞれSMARTビーズが正確に存在するのか（位置：”私は何処にいるのか”）。

【００６９】

SMARTビーズの検出のために、有利に現在の高解像度のＣＣＤカメラチップが利用される。このＣＣＤカメラチップは、光信号の極めて迅速な検出ならびに光信号の高度に並行の検出を可能にする。

【００７０】

位置認識の第２の情報は、正確な所定の位置（毛管間隙、刷毛塗り等）なしの

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4567

提示方法の場合に必要とされ、検出方法の引続く信号は、正確にSMARTビーズに対応配置することができる。所定の位置（斑点等）を有する方法の場合には、情報は、品質の保証のために使用されることができる。

【００７１】

４．７特異的な検出反応（分析物の結合）のＣＣＤ検出

６．２．３において詳細に記載されているように、分析物の結合は、直接的または間接的に検出可能な信号、有利に光信号を生じる。これは、例えば励起光（蛍光）によって行なうことができるかまたはフォトン放出（発光）によって行なうことができる。分析物信号の検出およびビーズコーディングの認識の過程は、任意の順序で行なうことができる。

【００７２】

光信号は、ＣＣＤチップ上に検出され、実際に波長（色）ならびに同一性により区別される。吸収されたスペクトルは、定量的または定性的に評価することができる。その上、波長と同一性との区別は、信号源の区別を可能にする。

【００７３】

５．存在する系と比較して発展された改善、ひいては得られた利点

本発明によるフラクタルチップ（ＦＳＣ）は、フラクタル成分のコーディングのために、局在化された合成または被覆（例えば、フォトリソグラフィー、スポッティング）の測定点を装備することにより、情報を移動する。それによって、多重化分析のために巨大な潜在能力を有する極端に融通の利く装置が生じる。

【００７４】

更に、前記形成体において、固有のセンサー（即ち、SMARTビーズ）の合成と試験物質を有する恒温保持との分離により、生化学的診断の極めて異なる範囲を結合させることに成功する。具体的には、ＤＮＡと、蛋白質と、別の重要なパラメーターとの同時の分析を可能にする。

【００７５】

１組の試験のために確実なSMARTクラスを常に新しく組み合わせることによって、バッチ法で得られたSMARTビーズは、数多くの診断学的疑問および分析学的疑問のために提供することができる。このことから、まさに生産のために大きな

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4568

利点が得られ、このことは、費用を減少させる。

【００７６】

前記配合物中で、なかんずくSMARTビーズの中程度の大きさ、直接の検出および高度に発展されたＣＣＤ技術の利用によって、測定路内で１０３～１０６の区分可能なSMARTビーズクラスを実現しようと努力される。これは、公知技術水準の本質的な改善を意味する。それというのも、例えばビーズの蛍光により支持されるコーディングの場合には、既に６４の区分可能な種類から大きな問題が起こるからである。それによって、測定点の密度に対してまさに発達されたＤＮＡアレイと競合しうる多重化法が提供されるが、しかし、この場合には、ＤＮＡ分析に限定されることもないし、費用のかかる高価な全チップ合成に限定されることもない。個々の成分の融通性および使用者により決定される分解可能性は、本発明の本質的な利点である。

【００７７】

５．１吸収測定のための色コーディングされたSMARTビーズ

現在約２５×３７ｍｍのＣＣＤチップの大きさに相当する面積上でのSMARTビーズの並行および直接的な検出の利点は、着色の観点から粒径が中程度であることにある。即ち、約６０μｍの直径を有するSMARTビーズは、良好に製造することができ、色コーディング、生化学的に標識化することができ、流動的に取り扱うことができ、かつSMARTビーズの確認の場合ならびに引続く反応検出の場合に強い光信号を供給する。

【００７８】

それによって、SMARTビーズ確認のための光学的測定方法としての吸収測定は、概して初めて可能になり、この場合この吸収測定は、次の特性を有する：明らかに測定可能な色の変化（段階付け）に対して極めて大きな多様化を達成することができ、このことは、例えば蛍光法の場合には、明らかに制限されており、低い光学的分解可能性が必要とされ、即ち粒子は、蛍光測定の場合に必要とされるものよりも大きくてもよい。

【００７９】

この特性は、ＣＣＤチップの大きさによって制限された、SMARTビーズの相対

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4569

的大きさに合致している。即ち、SMARTビーズを用いた場合には、極めて多数の種々の色コーディングされたマイクロ支持体を製造することができ、このことは、特にＤＮＡ分析において系ＦＳＣの使用にとって重要である。

【００８０】

ＦＳＣの場合に種々の色のSMARTビーズに対して達成可能な最適化は、次のパラメーターによって定められる：SMARTビーズを明らかに確認するための化学的に可能な着色の数、SMARTビーズの欠陥のない確認（十分に強い光信号）のための許容される最少の数および欠陥のない確認のためのSMARTビーズ１個当たりのＣＣＤピクセルの十分な数。

【００８１】

系の電位およびSMARTビーズの場合による他の最少化は、他の最少化とともに同時に感度を上昇させた場合にＣＣＤセンサーに先行して動作される。

【００８２】

絶対的な試料量は、例えば３ｍｌでSMARTビーズ６０μｍの２００００個の断片の利用のために極めて道理に適った体積範囲内にある。殊に、全てのSMARTビーズを測定に取り入れる、即ち吸収測定に対してSMARTビーズの材料の光透過生の色またはSMARTビーズの表面の光透過生の色を有する全てのSMARTビーズの１００％の測定を実施することが可能である。

【００８３】

SMARTビーズを被覆する場合の生化学的方法の利点は、次に記載された観点にある：

＊　個々の種の別個の合成は、極めて異なる不動態化された相互作用成分をビーズに結合させることを可能にする。

【００８４】

＊　最初にＤＮＡ、ＰＮＡ、蛋白質等を１つの形成体に合わせることができる。

【００８５】

＊　ＤＮＡ分析、特に実験される遺伝子の測定のためには、全部のｃＤＮＡまたはＥＳＴ’ｓ（発現された配列ｔａｇ）の潜在的な結合は、”古典的”なＤＮＡチップと比較して大きな利点である。それというのも、ＲＮＡまたはＤＮＡの明

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4570

らかな確認のためには、短いオリゴヌクレオチドのアレイの場合よりも極めて僅かな測定点で十分である（理想的な場合には、１つだけの測定点）。

【００８６】

５．２着色されたSMARTビーズの分析物特異性の標識化（被覆）

生産技術の観点からSMARTビーズを生化学的に被覆する場合の利点は、使用物質と支持体粒子との多重化の可能性および高い通過量でのバッチ法における並行化可能な生産にある。この場合、全ての取扱い過程および生産過程は、流動的に物理的に好ましい流動過程を利用しながら実施されてよい。更に、この方法は、簡単であり、ひいては自動化可能である（減少された作業費、ひいては安価な生産）。

【００８７】

生産においてSMARTビーズを生化学的に被覆する場合には、使用物質（例えば、Ｇ、Ａ、Ｃ、Ｔまたは長いオリゴ配列）または洗浄液ならびにSMARTビーズクラス（１つの色の微粒子）の融通の利く多重化による進行は、簡単に最適化されうる。即ち、SMARTビーズ調製の並行化、分析物調製の並行化およびバッチ法における調製の場合の自由に選択可能な装入量の大きさからの有効試験の組合せが得られる。

【００８８】

５．３最適な流動過程および取扱い過程

有利な流動技術的混合過程から、定義された洗浄過程およびすすぎ過程と同様に結合成分（分析物）を有するSMARTビーズの表面の極めて良好な湿潤が得られる。このことから、殊に例えば平面状のＤＮＡチップの場合に支持体上で使用されるような流動技術的に極めて不利な平面的方法と比較して、明らかに僅かな使用物質消費量が生じる。それによって、全体的に極めて良好な再生可能性および品質の保証が達成される。

【００８９】

SMARTビーズの大きさのために、個々のSMARTビーズの取扱いは簡易化され、このことは、生産ならびに分析において、定性的な混合過程および分離過程もしくは選択過程の利点を維持する。これに対して、極めて小さな粒子の場合、定量的

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4571

な取扱いのみが可能である。これは、流量を１つのクラスの粒子の静的に測定可能な含量と分離または混合することを意味する。SMARTビーズは、個々の利点を有する２つの方法を可能にする。

【００９０】

従って、既に生産において２次元的に緻密に包装されたアレイで製造されるバイオチップと比較して本発明による系の利点は、一面で卓越した流動過程にあり、したがって僅かな試料物質が必要とされ、試料物質でのSMARTビーズの表面の良好な湿潤が達成される。これは、試料中で低い濃度を有する希有な試料成分の検出を可能にする。他面、簡単で自動化可能な流動過程によって、より高い情報収量および信頼できる結果を達成することができる。

【００９１】

５．４ARRAY装置およびSMARTビーズの検出

ＦＳＣ技術の測定原理は、高解像度の画像検出センサー、殊に多数のSMARTビーズを並行に検出するためのＣＣＤチップスの絶えず成長する電位を利用することにある。これは、有利に検出のために最適なＣＣＤチップセンサーにつき二次元のアレイでできるだけ緻密に準備される（検出器での提示）。

【００９２】

ＣＣＤチップスの利用に応じて、通過量を上昇させるために、検出の並行化に系を焦点合わせさせる。それによって、同時に測定の速度が上昇されるだけでなく、数多くのできるだけ並行の参照測定に基づく測定品質が高められる。

【００９３】

それによって、できるだけ緻密に包装された平面状のアレイがSMARTビーズから製造され、この場合には、個々のSMARTビーズは、有利に直接に並置しており、したがってこのSMARTビーズは、ＣＣＤカメラにより同時に検出することができる。

【００９４】

５．４．１SMARTビーズの識別および／または状態の確認

SMARTビーズの識別の確認：

本発明の範囲内には、微粒子（SMARTビーズ）を所定の幾何学的配置で支持体

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4572

上に位置決めすることが設けられていてよい。

【００９５】

前記変法において、アレイには、位置決めもしくは提示の処理過程により、マイクロビーズの幾何学的配置が型押しされ、この場合マイクロビーズの確認は、色に基づいてマイクロビーズのクラスの区別にのみ利用され、マイクロビーズの状態の測定には利用されない。それというのも、この確認は、まさに格子構造によって既に予め設定されているからである。

【００９６】

SMARTビーズを提示、引続く検出の際に既に位置に合わせて位置決めする、もう１つの新規方法は、支持体上にSMARTビーズを点在させることである。この方法は、新規である。それというのも、個々の微粒子は、点在され、液体ではないからである。考えることができる支持体は、ガラス小板またはプラスチック小板（固有の意味でのチップス）、可動ベルト、支持体上のシート等である。

【００９７】

選択的に、毛管の二次元の平面状の間隙（Neubauer Kammer参照）を使用することができ、この間隙の表面上には、疎水性の格子が施こされており、この格子は、間隙内に分布されたSMARTビーズに正確な位置を間隙内で割り当てる。

【００９８】

SMARTビーズの所定の位置に合わせた配置を有する前記変法と比較して本質的に優雅な、本発明による方法は、二次元アレイにおけるSMARTビーズの定義されていない、自由で常に新しい、前述のフラクタルな配置、”フラクタルSMARTチップ　－　ＦＳＣ”である。この場合、ＣＣＤチップスの高い分解能（１９９８年５月での研究の状況：８１百万個の色ピクセル）は、状態検出のためにも利用される。この場合ビーズの提示は、毛管の二次元の平面状の間隙（Neubauer Kammer参照）、平行な毛管（２つの寸法での強制原理、流動方向でのみ必要とされる状態検出）、刷毛塗りまたは型押し法（血液の刷毛塗りと同様）またはロール塗りによって行なうことができる。

【００９９】

この測定原理により、アレイは、そのつど新規に未定義の空間的配置で検出器

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4573

の表面上で生じる。個々の結合位置の同一性は、ビーズに内在しているコードによって定められ、１つのチップ上での所定の局在化によって定められるわけではない。

【０１００】

５．５並行の検出および動的検出

微粒子（SMARTビーズ）を検出（スキャニング過程なし）するための平面状のＣＣＤチップスを利用することのもう１つの潜在性は、可動SMARTビーズを動的に検出する”効率上昇電位”を同時に利用することの可能性にある。それによって、速度と並行性の潜在能力を１つの系中で合わせられ、このことは、３つの記載された公知の系の中の何れも不可能である。

【０１０１】

この場合、ＣＣＤチップ検出器でのSMARTビーズの動的（可動）提示は、有利に並行な通路、例えば毛管として構成されている、例えば多数の液体区画または二次的空間内で行なうことができる。

【０１０２】

５．６光学的な拡大素子なしの直接的検出

透過光信号（SMARTビーズ支持体と検出器、有利にＣＣＤ画像撮影機との間に光学的素子なし）の好ましい直接的な検出は、エネルギー量が本質的に低いという利点を有し、この場合このエネルギー量は、欠陥のない検出のための光を必要とする。ＣＣＤ画像変換器とSMARTビーズ支持体との間の光学的素子は、光を吸収し、それによって測定装置の感度を減少させる。僅かな光強さにより、望ましくない散乱光効果は、使用される光源の場合により必要とされる冷却と同様に著しく減少される。更に、光学素子の排除は、大きな場所の節約ならびに検出単位装置の製造費の減少を意味する。

【０１０３】

５．７”一体で（in one）”の確認および検出方法

現在の高度に並行なＣＣＤチップスの使用は、SMARTビーズの確認と一緒にクラスおよび状態によりアレイ中で測定の際にそれぞれの検出反応を検出する方法を開示する。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4574

【０１０４】

この場合、信号の検出は、スペクトル（色）標識されたSMARTビーズの共局在化および分析物結合によって発生される信号に基づく。それによって、信号検出以外に非特異的な背景を最少化することもできる。それによって、光強さの差または色の変化の検出は、SMARTビーズの表面上で行なわれた反応に基づいて可能である。勿論、それにも拘わらず、明らかな区別可能性は、維持されたままでなければならない。即ち、SMARTビーズは、表面上での反応なしに現在４０９６の強さの段階の中の１０だけ色通路内で区別され、結合成分が見い出されたSMARTビーズは、生化学的反応によって２～３の強さの段階だけ下方にあるかまたは上方にある。

【０１０５】

５．８廃棄可能なチップス　－　連行なし

ＣＣＤチップを用いての直接的な検出のためのSMARTビーズの平面的な提示に対して本発明による系にとって考えることができる全ての方法は、微粒子の点在を例外として、簡単に廃棄可能な方法（使い捨て製品としての支持体チップ）として実施することができる。実際に、フォトリソグラフィーにより得られるＤＮＡチップスは、使い捨て製品として提供されるが、しかし、この場合には、チップスの製造に費用がかかることに基づいて、１回だけの測定後に廃棄されることに対して極めて高い価格であると云える。

【０１０６】

５．９使用の融通性および使用分野の幅

使用の幅は、試料の希有な成分による試験、極端な場合には、唯一のSMARTビーズクラス（１つの色コーディング）だけを有する”干し草の山の中の針”による試験ないし常に１つのクラスの唯一のSMARTビーズだけを有する超高処理量スクリーニング（Ultra High Throughput Screening）-UHTS-により達成される。それによって、全ての公知の現在見通しのつく使用は、”古典的な”免疫学”から現在の将来性のあるＤＮＡ分析に到るまで本発明による系で可能になる。

【０１０７】

測定の結果が満足できないものであるか、またはなお第１の測定によって明ら

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4575

かにされる、特殊な解明が必要とされる場合には、簡単になお付加的にSMARTビーズが添加され、検出され、このことは、系に同様に公知のGenChipsに対して著しい融通性の利点を提供する。

【０１０８】

６　本発明の一致した好ましい外観の概要

６．１SMARTビーズの個別的なコーディング

色コーディングのために、種々の方法、例えばSMARTビーズ（微粒子）が製造される、物質（例えば、ガラス、多糖類またはプラスチック）の光透過性の着色、SMARTビーズの表面の光透過性の着色および適当な色を有するビーズの恒温保持、SMARTビーズ中への蛍光染料（もしくは標識体）の埋設、SMARTビーズ中への吸収性染料の埋設または発光性標識体を用いての粒子表面の化学的被覆が該当する。

【０１０９】

また、他の秩序原理、例えば粒子の形状もしくは大きさまたは電磁的性質ならびに材料特性（磁気的、非磁気的）は、補足事項として考えることができる。

【０１１０】

６．２分析物の測定

６．２．１分析物

本発明による方法は、任意の分析物の測定に適当である。例として挙げることができるのは、全ての外観形の核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡ、特殊な場合には、ＰＮＡも）、蛋白質、ポリペプチドおよびペプチド、例えばホルモン、成長因子、酵素、腫瘍抗原、血清因子、抗体、種々の組合せ物の炭水化物、例えば食品中または農業用植物中の種々の糖、機能性糖、ポリマー、脂質、例えばステロイド、”第２メッセンジャー”、膜脂質、コレステロールまたは別の有機分子、例えば”濫用される薬剤”、医薬品、代謝物、アミノ酸、伝達物質、農薬、殺虫剤、塗料、種々の毒素等である。更に、細胞、細胞より小さい粒子またはウィルス性粒子を測定することもできる。

【０１１１】

６．２．２不動態化された相互作用成分の変種

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4576

微粒子への分析物の結合は、不動態化された相互作用成分での特異的な結合により行なわれる。唯一の測定の間に、多数のクラスの微粒子を使用する場合には、それぞれの相互作用成分への種々の分析物の結合が行なわれる。この方法は、種々の型の分析物結合反応の使用、例えば相補的な核酸のハイブリダイゼーションを可能にし、この場合には、より長い分子、例えばｃＤＮＡ、合成オリゴヌクレオチド、ＰＮＡ、ＲＮＡが相互作用成分として使用されることができる。また、分析物は、受容体－配位子反応または抗体－抗原反応によって測定されることができ、この場合に、例えば天然の抗体、組換え抗体およびその下位単位、抗原、一般的な蛋白質およびポリペプチドが不動態化された相互作用成分として使用されることは重要である。また、ペプチド、例えば合成ペプチド、天然ペプチドは、不動態化された相互作用成分として使用されてもよい。更に、組合せ化学の生成物は、直接にビーズ上に合成されてもよい。

【０１１２】

６．２．３信号発生のための変法

信号発生のための２つの原理が優先的に使用される：先にかまたは反応で標識化された分析物の直接の検出および分析物と同じ物質の標識化された標準との競合反応による間接的な検出。第１の変法は、若干の使用にとっては良好に確立されているが、しかし、例えば血清成分の診断のためには、むしろ劣悪に不適当である。従って、第２の変法は、前記使用にとって好ましく、さらに原理的には、使用者による簡単な試料調製を可能にする。

【０１１３】

直接的な検出は、蛍光染料、リポーター酵素での分析物の標識化および例えば介在（蛍光）染料による核酸、二重鎖を結合する蛋白質または抗体の場合に結合された分析物の選択的な標識化による反応（例えば、化学発光および生体発光）によって行なうことができる。

【０１１４】

二次的検出は、第二の成分を有する結合された分析物の検出、例えばＰＮＡ－ＤＮＡハイブリッドの場合にＤＮＡ特異的抗体によって可能である。

【０１１５】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4577

競合的検出反応にとって標識化された標準としては、線量結合、蛍光結合または酵素結合（例えば、アルカリ性ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ等を用いての化学発光および生体発光）した分析物分子を使用することができる。蛋白質標準は、融合蛋白質としてリポーター酵素（上記参照）を用いて得られるかまたは自動蛍光蛋白質（例えば、ＧＦＰ）は、例えば組換え抗体、蛋白質ホルモン、成長因子等にために得られる。

【０１１６】

６．３検出のためのビーズの提示

ＣＣＤチップを用いての光学的検出のためのSMARTビーズの提示のためには、殊に次の実施態様の変法が設けられている：

＊　二次元（平面状）の毛管間隙（Neubauer-KammerまたはThoma-Kammer参照）：

場合によっては、間隙を充填するために毛管力で十分であり、さもなければSMARTビーズは、間隙入口側での過圧で間隙中に輸送されおよび／または間隙出口側での低圧で間隙中に輸送される。更に、理論的に４０ｇまでを達成することができる毛管力は、相応する吸引能を有する物質（フリース）によって間隙出口側で強化されてよい。２Ｄの毛管を有する支持体のための材料としては、例えばガラスまたはプラスチックが可能であり、この場合には、毛管を有する支持体は、なかんずく射出成形法の場合には、安価に廃棄物（使い捨て製品）として形成されていてよい。

【０１１７】

＊　ガラスチップまたはプラスチックチップ中での並行な毛管。この場合には、いずれにせよ、毛管間隙に関する場合と同様に、同一のフレーム条件が当てはまり、この場合この変法は、特に可動性SMARTビーズの測定に適している。

【０１１８】

＊　血液の刷毛塗りに使用される方法に基づく刷毛塗りまたは型押し法。

【０１１９】

＊　支持体上、例えばガラス小板またはプラスチック小板（透過光測定も可能である）、適当な材料、支持体上のシート等からなる可動ベルト上の点滴。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4578

【０１２０】

必要とされる”Single Microparticle Handling”は、個々のSMARTビードキッツ（Bead Kits）を組み合わせた場合に選択的な過程に使用可能である。

【０１２１】

６．４　励起／検出単位装置

SMARTビードアレイ（Bead Array）からの情報の読取りは、有利に組み合わされた励起／検出単位装置中で行なうことができ、この場合には、卓越した系としては、励起光源の装置は、直接にSMARTビードアレイの上方に配置され、ＣＣＤチップスの配置は、直接にアレイの下方に（もしくは可逆的に）配置される。このできるだけコンパクトな構造形式によって、光の走行路、ひいては必要とされる光の強さは、隣接したSMARTビーズの重なり効果と同様に最少化される。費用がかかり、場所をとり、光を吸収する高価な光学素子の使用は、励起側ならびに検出側で有利に省略される。

【０１２２】

もう１つの変法は、チップスの垂直方向での配向にあり、したがってSMARTビーズを用いてのチップスの積載および荷下ろしのために重量が使用されてもよい。

【０１２３】

６．４．１　励起光源

光源としては、SMARTビーズの色コーディング（吸収または蛍光等）および例えば分析物結合のために選択された検出法（蛍光または発光等）に応じて、電灯（白色光）からの高度に並行な光、閃光管からの高度に並行な光、高度に並行な単色光、単色光のレーザー光の線（局部的な励起は、スキャナーの原理に相当し、したがってもはやＣＣＤカメラの並行性を利用しない）または単色光のレーザー光（局部的な励起は、スキャナーの原理に相当し、したがってもはやＣＣＤカメラの並行性を利用しない）がこれに該当する。

【０１２４】

この場合には、相応する光学的格子および／または相応する光学素子が励起光源とSMARTビードチップとの間に存在していてよい。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4579

【０１２５】

６．４．２　ＣＣＤカメラによる検出

検出単位装置は、ＣＣＤチップを含む。この検出単位装置は、実際に約２５×３７ｍｍの面積に約２０００×３０００個の色ピクセルを有し、これは、６百万個の色ピクセルまたは１８百万個の個別的なピクセル（ピクセルの前方で極小化された色フィルターによるＲＧＢ原理）に相当する（Cannon社）。２５×３７ｍｍのこのような表面上には、６０μｍの直径を有する微粒子（SMARTビーズ）が直接的な検出のために配置されており、こうして少なくとも２００００００個の微粒子（SMARTビーズ）が得られる。この場合、全ての微粒子は、９～１０μｍの辺の長さを有する約４０個の正方形の色ピクセルを覆う。それによって、白黒ピクセル１個当たり４０９６個の離散した輝度段階のデジタルの光の強さの段階でSMARTビーズ１個当たり４０の色信号または１２０の白黒信号が得られる。従って、全ての場合に静的な信号を証明するのに十分な量のデータが存在する。

【０１２６】

最大で同期的に検出可能な種々に色コーディングされたSMARTビーズの限界は、SMARTビーズの特異的なコーディング可能性（再現可能な色発生の化学的限界）の方法ならびにＣＣＤチップを用いて色の差異を光学的に検出する方法にある。１つの色（ＲＧＢ）につき２５６の強さの段階を１０段階に分割した場合には、検出することができる25^3＝１５６２５の可能な色が得られる。色クラスの数を他の色フィルターによって構成する場合には、検出可能な色の数をさらに高めることができる。上記のＣＣＤチップの前方に多重にカラーフィルター（例えば、ＲＧＢおよびマゼンタ）を用いた場合には、理論的に$25*25^3$＝３９０６２５色の色を認識することができた。勿論、なお約３０の多重色ピクセルを用いてよい。ＣＣＤ技術における大きな進歩のために、記載された数を用いた場合には、実際に公知技術水準だけが記載されている。第１のプロト型は、既に同じ面積で８１百万個のピクセルを有する。それによって、ＣＣＤチップ技術の記載された適用にとって大きな成長の潜在性が生じ、10^6個の個別的なSMARTビーズの並行の検出は、工業的に行なうことができる。

【０１２７】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4580

場合によっては相応する光学的格子および／または相応する光学素子は、SMARTビードーアレイとＣＣＤカメラチップとの間に存在する。

【０１２８】

６．４．３　並行な検査単位装置

本発明の範囲内での特に重要な観点は、”並行な検査単位装置”の使用にある。

【０１２９】

この場合には、制御可能な光源マトリックスを有する光放出－検出装置が重要であり、この光源マトリックスは、例えばリフレクターマトリックス、光弁マトリックス（例えば、ＬＣＤ）または自己発光する照射マトリックスであることができ、光源マトリックスに対向して所属する光センサーマトリックスの１つ、即ちＣＣＤ画像撮影機であることもでき、この場合には、支持体上または支持体中に存在するSMARTビーズを有する支持体は、光源マトリックスとＣＣＤセンサーとの間に配置することができる。

【０１３０】

この検査単位装置の１つの利点は、（場所的または／および時間的に）意図的な励起および意図的な検出を、制御および信号評価のための現在の高性能の計算機と関連して組み合わせたことから明らかになる融通の利く可能性にある。それによって、まさに光学的な検査方法および検出方法に対して新しい技術的プラットフォームが得られる。ＣＣＤ検出および信号の評価に適当なアルゴリズムと一緒に作用する、個々の光点もしくは光点列の”十分な調整（Durchtunen）”または”走査パターン（Abraster）”によって、”LCD-CCD光格子”（検査単位装置）中の個々の測定点における最も小さな変化が可能になる。本発明の範囲内でＤＮＡ分析の範囲で測定場所でのハイブリダイゼーションの直接的な検出を考慮することができる。二次元の光源マトリックスとしてのＬＣＤ単位装置は、それぞれの場所を測定するための吸収測定用の光源としてならびに分析物測定の際（場合によっては別の背景の照明を有する）の蛍光励起のための吸収測定用光源として採用されることができる。

【０１３１】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4581

7．注釈

場合によっては、本発明による方法の次の変法もしくは変化は、独立的に重要である：

請求項１記載の方法は、次のように変えることができる：特徴ｂ）による支持体上に微粒子をもたらす過程は、試料を接触させる過程ａ）の前に数多くの種の微粒子を用いて行なうことができる。本方法の前記の変法の場合には、支持体として有利に毛管間隙を有する平面上の支持体もしくはチップが使用され、この場合このような平面状（場合によっては中空）の板状支持体は、直接にＣＣＤ画像撮影機と結合され、微粒子を試料と接触させた際に事象の拡大せずに画像に応じての検出を実施することができる。

【０１３２】

場合によっては、SMARTビーズの集団が可動する際にＣＣＤ画像撮影機を用いての検出の外観もしくはSMARTビーズの観察は、独立的に重要であり、この場合この種の動的な測定には、殊に毛管を有する支持体がこれに該当する。

【０１３３】

8．例示的な実施態様

8．1　着色された微粒子

クロマトグラフィーマトリックスの粒子、例えばDEAEIセファロース、セファクリル（Sephacryl）、セファデックス（Sephadex）またはセファセル（Sephacel）を５分間の恒温保持によって染料エオシンレッド（Eosinrot）、エバンブルー（Evanblau）およびライトグリーン（Lichtgruen）で着色した。この場合には、着色されたビーズが得られ、このビーズは、透過光法によって明らかに分級することができた。

【０１３４】

8．2　光源

キセノン灯およびハロゲン灯ならびに冷たい光源は、光源として適当であることが証明された。

【０１３５】

光学素子を光源と支持体との間に挿入することによって、支持体上に衝突する

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4582

光の並行性は、改善することができた。適当な光学素子は、例えば８０～２００ｎｍのテレオプティーク（Teleoptik）（対物レンズ　Tokina）、色消しテレオプティーク（Teleoptik）（対物レンズ　３００ｎｍ　Achromat）またはコリメーター（Melis-Criot）であった。

【０１３６】

更に、６０mm^{2}のチップ面積（対角線４６mm、側面比５：４）、７８６４３２個のピクセル数（８３０μm^{2}のピクセル面積に相当する）を有するＬＣＤマトリックス　LCX017AL　(Sony)は、成果を収めて試験した。

【０１３７】

８．４　ＣＣＤチップ

１６９３３mmの対角線、５：４の側面比（１０．５７mm×８．５mm）および１３００×３０３０の有効ピクセル数（計算されたピクセル面積７．９５μm^2）を有するＣＣＤチップ　ICX085AK（Sony）は、成果を収めて試験した。

【０１３８】

次に、本発明を図面に関連して例につき詳説する。

【０１３９】

図１によれば、過程Ａにおいて、試料物質１は、調製された微粒子（SMARTビーズ）と混合装置５中で混合される。このために導入された、微粒子３の集団は、多数の異なる着色された透明な微粒子３を含み、この場合には、均一に着色された微粒子３は、均一に微粒子３で不動態化された捕捉分子（例えば、オリゴヌクレオチド）を有する１つの種に属する。試料中に存在する目的分析物の存在は、分析物に特異的な標識化された検出試薬の使用によって、ビーズへの目的分析物の結合により検出することができる溶解された形で検出される。

【０１４０】

次に、過程Ａの間に、水素化条件下でそれぞれに適合する目的分析物の分子は、当該微粒子（SMARTビーズ）の表面上で捕捉分子に付着されることができる。

【０１４１】

図１によれば、混合過程Ａには、増幅過程（例えば、ＰＣＲ増幅等）を続けることができる。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4583

【０１４２】

試料１と接触された微粒子３からの測定物質は、測定物質支持体７上で微粒子３の任意の分布で平面状の配置にもたらされる。測定物質支持体７は、最も簡単な場合には、ガラス板または透明なプラスチック板であることができ、これらの板の上には、微粒子の測定物質３が例えば刷毛塗りされるか、ロール塗りされるか、または型押しされる。

【０１４３】

図１における過程Ｃによれば、第１の測定通路内で測定物質支持体７上に配置された、微粒子３からの集団を画像に応じて吸収測定し、この場合には、画像検出センサーとしてＣＣＤ画像撮影機が使用される。示された例において、測定物質支持体７は、ＣＣＤ画像撮影機と広幅のバンドでスペクトルを発光する光源との間に存在し、この場合この光源は、図１においてグロー放電灯で示されている。有利に、過程Ｃによる吸収測定の場合には、測定物質支持体７およびその上に設けられた測定物質層の透過照明は、光源１１の平行光線で行なわれる。この場合、ＣＣＤ画像撮影機９は、測定物質支持体７上で微粒子３の集合の画像を検出し、この場合データ処理／制御装置１３は、ＣＣＤ画像撮影機の画像データを評価し、ＣＣＤ画像撮影機９の画像点の場所が何処にあるかを記憶し、この場合このＣＣＤ画像撮影機は、一定の色の微粒子３を記録する。

【０１４４】

図１に示されたように、微粒子３の大きさは、それぞれの微粒子３が平面の投影においてＣＣＤ画像撮影機９の多数のピクセル（画像点センサー）１５を覆うように選択されている。

【０１４５】

過程Ｃにおいて、種々の微粒子種がその位置に対応配置されて撮影された画像内で確認された後で、過程Ｄにおいて、検出反応が検出される。この例の場合には、反応の検出は、微粒子３から出発する蛍光信号によって行なわれ、この場合この微粒子には、分析物に特異的な検出試薬が付着されていた。蛍光励起光源としては、ＵＶ光源１７が使用され、このＵＶ光源は、図１においてグロー放電灯によって表わされ、平行光線を放出する。蛍光ビームは、画像撮影機９により、

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4584

それぞれの蛍光性微粒子３の位置に対応配置されて記録される。次に、データ処理系は、当該蛍光信号を放出する微粒子３が如何なる種の微粒子３に属するのかという過程ＣおよびＤの結果から測定することができる。こうして確認された微粒子３またはそれに対して不動態化された捕捉分子は、試料からの一定の目的分析物とのみ反応することができたので、それによって、目的分析物は試料中に存在することが確認された。

【０１４６】

図２は、ＣＣＤ画像撮影機９についての測定装置中での測定物質支持体チップ７ａを示す。更に、測定物質支持体チップ７ａ（フラクタルSMARTチップもしくはFSCとも呼称される）は、図３において平面図で示されている。チップ７ａは、円盤状の毛管間隙または空隙１９を有し、これら毛管間隙または空隙は、下方および上方から図２に示されているように透明な板区間２１、２３によって制限されている。間隙高さｈ（図４参照）は、これが微粒子３の平均直径Ｄよりも大きく、微粒子３の二倍の直径（２Ｄ）よりも小さいように選択されており、したがってそれぞれ並んで存在する微粒子３の１つの層だけが毛管間隙１９中の板状区間２１、２３内に場所を有する。

【０１４７】

測定物質支持体チップ７ａは、図３および４の右側端部で測定物質（試料との混合後の微粒子３）を供給するための試料注入部２５を有する。試料注入部２５は、毛管間隙１９と結合している。図３から判断することができるように、毛管間隙１９は、平面状に検出領域２７に亘って延在し、画像撮影機９と支持体チップ７ａとが図２に示された検出単位装置に組み立てられている場合には、前記の検出領域は、図２によれば、２９で示された、ＣＣＤ画像撮影機９の活性の画像検出場と並置されている。

【０１４８】

図２および３において左側にある、毛管間隙１９の出口側には、示された実施例において、吸着性材料３０がチップ７ａの１つの室内に設けられており、このチップは、間隙１９を測定物質で充填するために毛管力を測定物質の吸引作用によって強化する。測定物質支持体７ａは、有利に射出成形法でプラスチックから

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4585

完成されており、したがってこの測定物質支持体は、安価に使い捨て商品（ディスポーザブル）として使用されることができる。

【０１４９】

なお、追記すべきことは、チップ７ａの検出領域２７の大きさがＣＣＤセンサーの活性の画像検出場２９の大きさに本質的に相当することである。１つの実施形式の場合には、検出領域は、２．５ｃｍ×３．７ｃｍの寸法を有する。

【０１５０】

図５は、ＬＣＤマトリックス３５を有する図２による装置を二次元の測定光源もしくは励起光源として略示し、これら光源の光源素子は、意図的に光の強さおよび色により場所および時間に依存して制御されることができ、この場合には、当該の制御装置は、ＬＣＤマトリックスとＣＣＤマトリックスにとって共通の制御装置である。

【図面の簡単な説明】

【図１】

本発明による実施態様を説明するための略図。

【図２】

ＣＣＤ画像撮影機および測定物質支持体からなる検出単位装置を示す略示斜視図。

【図３】

図２による測定物質支持体を示す平面図。

【図４】

図３においてＩＶ－ＩＶで示された区間面に沿って測定物質支持体を示す略示断面図。

【図５】

ＬＣＤマトリックス（液晶表示マトリックス）、図２による支持体チップおよびＣＣＤマトリックスからなるサンドイッチ状配置での検査単位装置を示す略図。

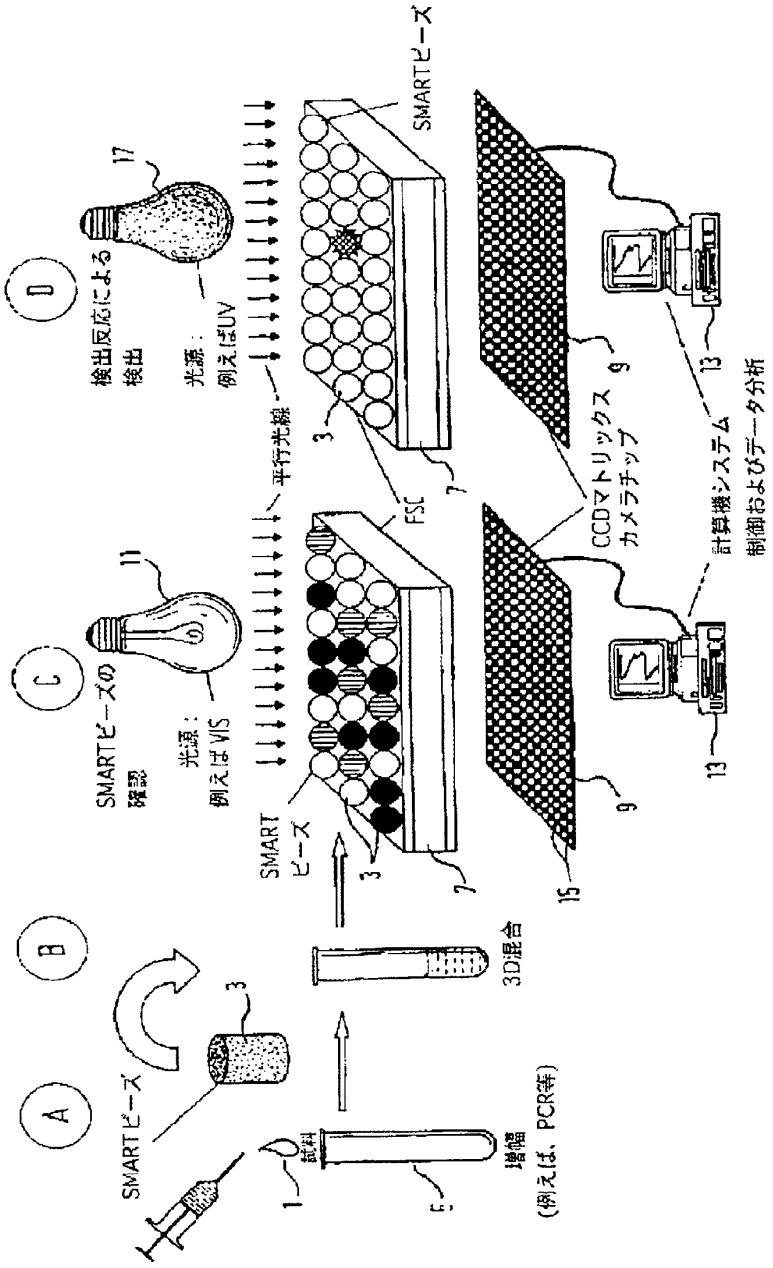
【符号の説明】

１　試料物質、　３　微粒子、　５　混合装置、　７、７ａ　支持体、　９

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4586

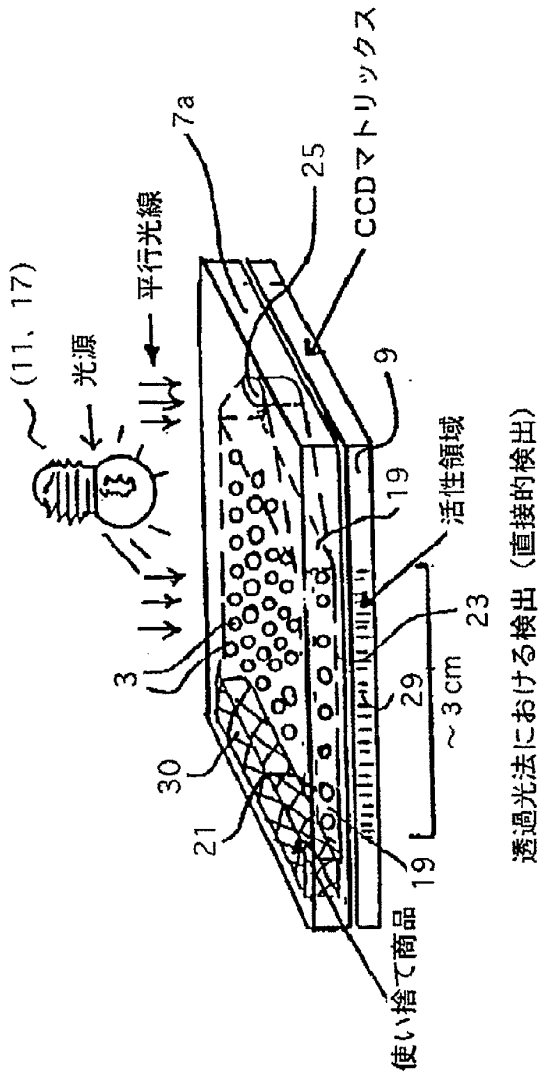
画像検出装置、　１１　光源、　１３　データ処理装置、　１５　ピクセル、１７　UV光源、　１９　毛管間隙、　２１、２３　板状区間、　２５　試料注入部、　２７　検出領域、　２９　活性の画像検出場、　３０　吸着性材料

【図１】



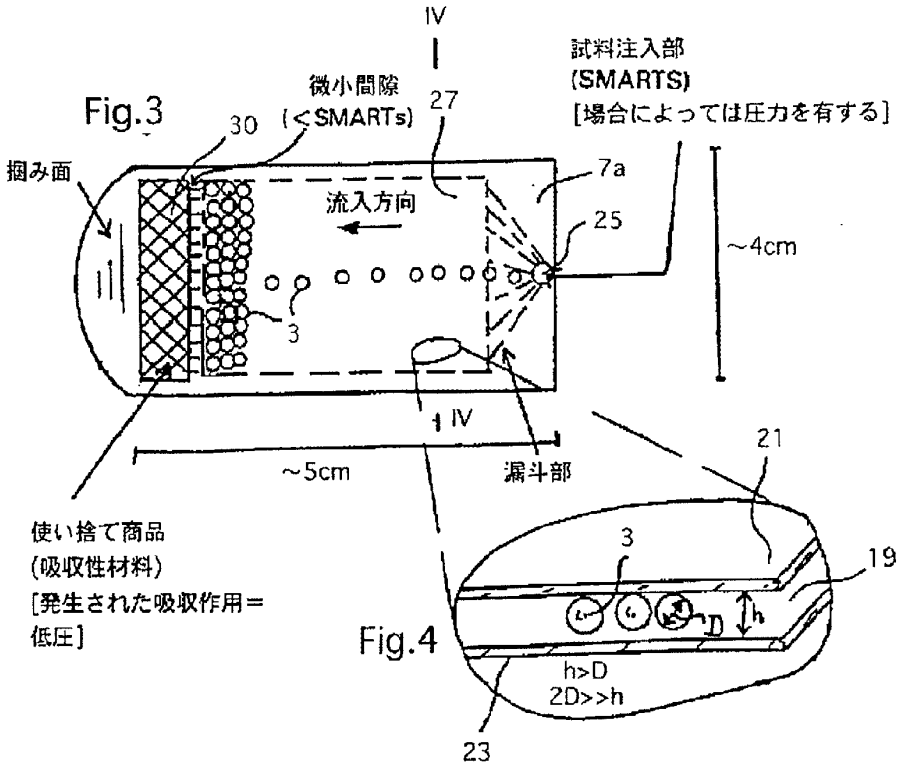
Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4587

【図２】

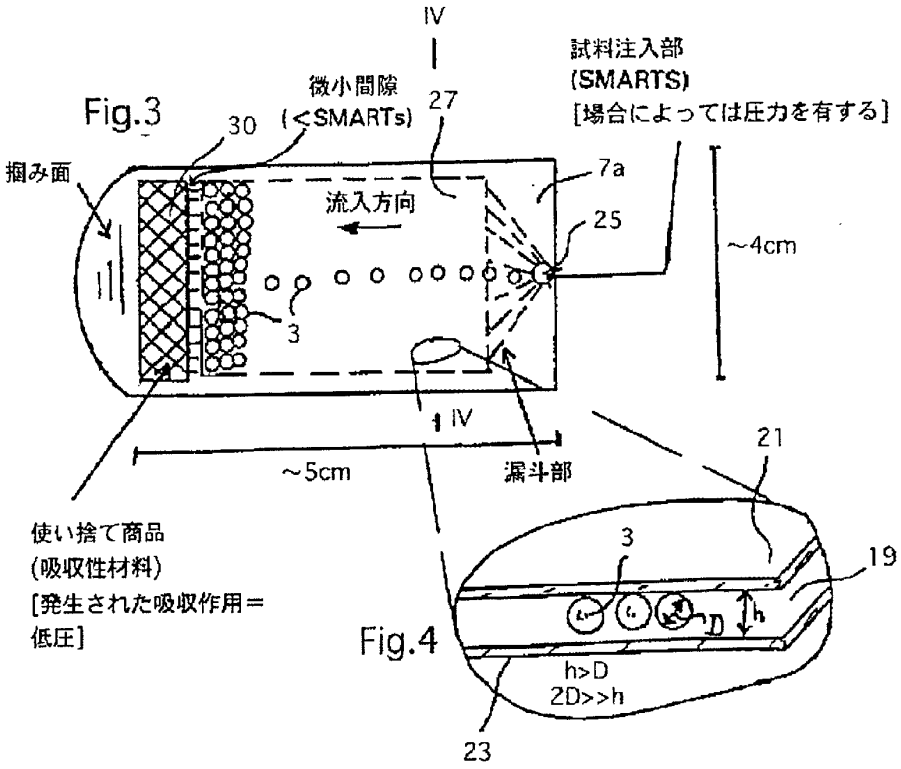


Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4588

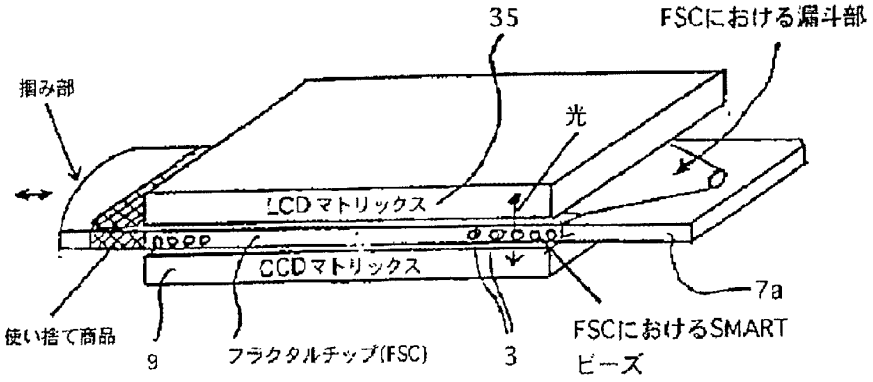
【図３】


Fig.3
IV
試料注入部
(SMARTS)
[場合によっては圧力を有する]
微小間隙
(≦SMARTs)
27
30
掴み面
流入方向
7a
25
~4cm
3
IV
~5cm
漏斗部
21
使い捨て商品
(吸収性材料)
[発生された吸収作用＝
低圧]
3
19
D
h
Fig.4
h>D
2D>>h
23

【図４】


IV
試料注入部
(SMARTS)
[場合によっては圧力を有する]
微小間隙
(≦SMARTs)
27
Fig.3
30
掴み面
7a
流入方向
25
~4cm
3
IV
~5cm
漏斗部
21
使い捨て商品
(吸収性材料)
[発生された吸収作用＝
低圧]
3
19
h
D
Fig.4
h>D
2D>>h
23

【図５】


35
FSCにおける漏斗部
掴み部
光
LCDマトリックス
CCDマトリックス
7a
使い捨て商品
9
フラクタルチップ(FSC)
3
FSCにおけるSMART
ビーズ

【手続補正書】

【提出日】平成１３年３月１日（２００１．３．１）

【手続補正１】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項１】　次の過程：

（ａ）試料を

（ｉ）数多くの種の微粒子（３）、この場合全ての種は、一定の分析物の検出に適しておりかつ別の種と光学的に区別しうる一定のコーディングを有し、および（ｉｉ）信号を発する群を支持するかまたは信号を発する群と結合しうる、数多くの可溶性の分析物特異性の検出試薬と接触させ、

（ｂ）引続き微粒子（３）を、平面側で互いに対向して存在する２つの板（２１、２３）の間で微粒子（３）の集団を受け容れるための空隙（１９）を有する支持体（７；７ａ）上にもたらし、この場合板（２１、２３）の間の間隔は、空隙（１９）内で並んで存在する微粒子の１つの層だけがそれぞれ適合するように選択されており、

（ｃ）コーディングおよび少なくとも１つの種の個々の微粒子（３）上の信号を発する群の量、存在または／および不在を平面状の支持体（７；７ａ）上で光学的に検出することによって、分析物を測定することを含む、試料中の数多くの分析物を測定する方法。

【請求項２】　分析物を細胞、細胞内粒子、核酸、ポリペプチド、ペプチド、糖蛋白質、リポ蛋白質、単糖類、オリゴ糖類および多糖類、脂質、代謝物、ホルモン、媒介物質、神経伝達物質、農薬、殺虫剤、毒性物質、薬理学的に有効な物質およびこれらの組合せ物から選択する、請求項１記載の方法。

【請求項３】　試料として体液、例えば血清、血液、血漿、尿、リンパ液、脳延髄液、精液、唾液等、組織、組織抽出液、細胞、細胞抽出液、植物性試料、

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4591

環境試料および排泄物試料から選択された生体試料を使用する、請求項１または２記載の方法。

【請求項４】　有機粒子、例えば有機ポリマーラテックス、または多糖類粒子、無機粒子、例えば磁性体粒子およびガラス粒子、ならびに有機無機複合体粒子から選択された微粒子（３）を使用する、請求項１から３までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項５】　光学的に透明または光学的に不透明の微粒子（３）を使用する、請求項１から４までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項６】　10^6までの数の種の微粒子（３）を使用する、請求項１から５までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項７】　全ての種の微粒子（３）がこの微粒子の表面上で少なくとも１つの不動態化された、異なる分析物特異性の受容体を含む、請求項１から６までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項８】　不動態化された分析物特異性の受容体を、核酸、例えばＤＮＡおよびＲＮＡ、核酸類似物、例えばペプチド核酸（ＰＮＡ）、抗体、抗体断片、抗原、ペプチド、ハプテンおよび合成受容体から選択する、請求項７記載の方法。

【請求項９】　微粒子（３）のコーディングを、色コーディング、例えば物質の呈色、表面の着色または／および着色剤の埋設によって発生させる、請求項１から８までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１０】　測定（６）を少なくとも２つの種の異なる微粒子上で行なう、請求項１から９までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１】　全ての分析物の測定のために、分析物特異性の受容体および分析物類似物から選択される、少なくとも１つの可溶性の分析物特異性の検出試薬を使用する、請求項１から１０までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２】　可溶性の分析物特異性の検出試薬を、核酸、例えばＤＮＡおよびＲＮＡ、核酸類似物、例えばペプチド核酸（ＰＮＡ）、抗体、抗体断片、抗原、ペプチド、ハプテンおよび合成受容体から選択する、請求項１１記載の方法。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4592

【請求項１３】　可溶性の分析物特異性の検出試薬を、信号を発する基と直接にカップリングする、請求項１から１２までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１４】　可溶性の分析物特異性の検出試薬が信号を発する基、有利に高度に親和性の生体交換作用により結合しうる基を有する、請求項１から１２までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１５】　数多くの分析物の測定のために、同じ信号を発する基を使用する、請求項１３または１４記載の方法。

【請求項１６】　信号を発する基として発光性基、蛍光性基または燐光性基を使用する、請求項１から１５までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１７】　平面状の支持体（７）を使用する、請求項１から１６までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１８】　プラスチック、ガラス、半導体材料および金属から選択された表面を有する支持体（７）を使用する、請求項１から１７までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項１９】　支持体としてチップ（７ａ）を使用する、請求項１８記載の方法。

【請求項２０】　光学的に透明な支持体（７；７ａ）を使用する、請求項１から１９までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項２１】　構造化された表面領域を有する支持体を使用する、請求項１から２０までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項２２】　施与が支持体（７）上への微粒子を含有する懸濁液の刷毛塗り、ロール塗り、型押しまたはスポッティングを含む、請求項１から２１までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項２３】　施与が毛管作用による支持体（７ａ）上への微粒子の移動を含む、請求項１から２２までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項２４】　支持体上での微粒子の静的または動的な配置を定める、請求項１から２３までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項２５】　高解像度の画像検出装置（９）、例えばＣＣＤカメラを用いて測定を行なう、請求項１から２４までのいずれか１項に記載の方法。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4593

【請求項２６】　各微粒子（３）が少なくとも２個、有利に少なくとも４個、特に有利に少なくとも９個、最も多くの場合に有利に少なくとも１６個の個々のピクセルの１つの面積を覆う程度に、微粒子（３）の大きさを選択する、請求項２５記載の方法。

【請求項２７】　微粒子（３）が少なくとも１０μm、有利に２０μm、特に有利に２５μm～８０μmの平均直径を有する、請求項１から２６までのいずれか１項に記載の方法。

【請求項２８】　臨床的パラメーターの診断、例えば核酸の診断、生物学的な基礎研究、法医学、食品分析および医薬製品のスクリーニングのための請求項１から２７までのいずれか１項に記載の方法の使用。

【請求項２９】　次のもの：

（ａ）遊離形での数多くの種の微粒子（３）、この場合全ての種は、一定の分析物の検出に適しておりかつ別の種と光学的に区別しうる一定のコーディングを有し、

（ｂ）数多くの可溶性の分析物特異性の検出試薬および

（ｃ）平面側で互いに対向して存在する２つの板（２１、２３）の間で微粒子（３）の集団を受け容れるための空隙（１９）を有する平面状の支持体（７；７ａ）、この場合板（２１、２３）の間の間隔は、空隙（１９）内で並んで存在する微粒子の１つの層だけがそれぞれ適合するように選択されており、

を含む、殊に請求項１から２７までのいずれか１項に記載の方法を実施するためのキット。

【請求項３０】　次のもの：

－　平面側で互いに対向して存在する２つの板（２１、２３）の間で微粒子（３）の集団を受け容れるための空隙（１９）を有する、少なくとも１つが透明である平面状の支持体（７；７ａ）、この場合板（２１、２３）の間の間隔は、空隙（１９）内で並んで存在する微粒子の１つの層だけがそれぞれ適合するように選択されており、

－　試料と接触される、支持体（７；７ａ）上にもたらされる微粒子（３）の集団の光学的挙動を本質的に拡大されずに画像に応じて検出するための電子的画像

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4594

検出センサー（９）と、

－　支持体（７；７ａ）上での微粒子の集団内で微粒子（３）に対して信号を発する基の信号の発信を励起させるための装置（１７）と、

－　微粒子（３）の集団の検出された光学的挙動を基礎とする試料内で一定の分析物の存在に関する情報を準備するために、電子的画像検出センサーの画像データを評価するデータ処理装置（１３）とを含み、この場合には、支持体（７；７ａ）が電子画像検出センサー（９）と信号の発信を励起させるための装置（１７）との間に配置されている、殊に請求項１から２７までのいずれか１項に記載の方法により、試料中の数多くの分析物を測定するために測定装置。

【請求項３１】　画像検出センサーがＣＣＤ画像撮影機である、請求項３０記載の測定装置。

【請求項３２】　微粒子（３）が色コーディングされており、画像検出センサー（９）が、検出される画像点の位置に対応配置されて微粒子（３）の集団のそれぞれ撮影される画像の画像点の色の差を検出するのに適しており、微粒子の集団の光学的挙動を画像に応じて検出するために、支持体（７；７ａ）上でそれぞれ同じ色コーディングの微粒子（３）の状態を測定することができる、請求項３０または３１記載の測定装置。

【請求項３３】　画像検出センサー（９）を用いて微粒子（３）の集団の個々の個体の光学的吸収挙動または反射挙動を並行に測定するための殊にスペクトルの幅広のバンドの光を準備する少なくとも１つの光源（１１）を含む、請求項３０から３２までのいずれか１項に記載の測定装置。

【請求項３４】　信号の発信を励起させるための装置（１７）が信号を発する基を有する少なくとも１つの種の微粒子（３）を蛍光励起させるための少なくとも１つの光源を含み、画像検出センサー（９）が微粒子（３）の各集団の光学的挙動を画像に応じて検出する際に場合によっては蛍光を発する個体の画像点の位置に対応配置されて蛍光を検出するのに適している、請求項３０から３３までのいずれか１項に記載の測定装置。

【請求項３５】　微粒子（３）がその形状に関連してコーディングされており、画像検出センサー（９）とデータ処理装置（１３）とからなる光学的測定装

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4595

置が、個々の種の微粒子（３）を異なる形状輪郭に基づいてそれぞれ吸収される画像で区別するのに適している、請求項３０から３４までのいずれか１項に記載の測定装置。

【請求項３６】　支持体が画像検出センサーの殊に平面状の窓であり、この窓が画像検出センサーの画像撮影の場を外向きに覆っている、請求項３０から３５までのいずれか１項に記載の測定装置。

【請求項３７】　支持体（７）と画像検出センサー（９）が定義された位置で互いに相対的に１つの共通のホルダーで固定することができるかまたは互いに直接に交換可能であるように固定することができる、請求項３０から３６までのいずれか１項に記載の測定装置。

【請求項３８】　支持体（７ａ）が微粒子（３）のための少なくとも１つの流路を有し、測定装置は、微粒子（３）の集団が流路に沿って移動する間に微粒子（３）の光学的挙動を画像に応じて検出する目的で設置されている、請求項３０から３７までのいずれか１項に記載の測定装置。

【請求項３９】　支持体（７ａ）が空隙（１９）、殊に微粒子（３）の平面側で互いに対向する２つの板（２１、２３）の間で微粒子（３）の集団を受け容れるための平らに延びた毛管間隙を有し、その中の少なくとも１つが透明であり、この場合２つの板（２１、２３）の間の間隔は、空隙（１９）内でそれぞれ並んで存在する微粒子の１つの層だけが適合するように選択されている、請求項１から２７までのいずれか１項に記載の方法を実施するため、殊に請求項３０から３８までのいずれか１項に記載の測定装置のための支持体。

【請求項４０】　板（２１；２３）の間の間隔が選択的に調節可能である、請求項３９記載の支持体。

【請求項４１】　支持体が数多くの殊に互いに平行に走る毛管通路を有し、少なくとも毛管通路の範囲内で光学的に透明である、請求項３９または４０記載の支持体。

【手続補正２】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】００５９

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4596

【補正方法】変更

【補正内容】

【００５９】

この場合、この相互作用の特異性は、そのために相応して備えられた、即ち不動態化された相互成分を有するSMARTビーズだけへの分析物の選択的結合を可能にし、ひいては分子の確認および不均質混合物中での分析物の引続く検出を可能にする。同じスペクトル特性（色）によってクラスとして定義された全てのSMARTビーズは、不動態化された相互作用成分を同様に備えており、この場合相互作用成分の結合は、有利に共有結合形で行なうことができるが、しかし吸収的または特異的な高度に親和性の相互作用（例えば、ビチオン／アビジンもしくはストレプトアビジンまたはハプテン／抗ハプテン（Anti-Apten）抗体）により行なうこともできる。それによって、試験物質中での分析物の存在により、SMARTビーズについての前記のスペクトルで確認可能なクラスについてのみ結合、ひいては信号の発生を生じる。この信号は、クラスに特異的なそれぞれの装備を認識する際に、結合された分析物の確認、ひいては試験物質中での検出のために使用される。

【手続補正３】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０１３３

【補正方法】変更

【補正内容】

【０１３３】

８．例示的な実施態様

８．１　着色された微粒子

クロマトグラフィーマトリックスの粒子、例えばDEAEセファロース、セファクリル（Sephacryl）、セファデックス（Sephadex）またはセファセル（Sephacel）を５分間の恒温保持によって染料エオシンレッド（Eosinrot）、エバンブルー（Evanblau）およびライトグリーン（Lichtgruen）で着色した。この場合には、着色されたビーズが得られ、このビーズは、透過光法によって明らかに分級する

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4597

ことができた。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4598

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter　　onal Application No
PCT/EP 99/06315

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7　G01N33/543

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　C12Q　B01L　B01J

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, WPI Data, PAJ, BIOSIS, INSPEC, COMPENDEX, IBM-TDB

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EP 0 126 450 A (TRIPATZIS IOANNIS) 28 November 1984 (1984-11-28) abstract page 6, line 18,19 page 7, line 8-26 page 8, line 1-11 claims 13-28	1-24, 27-29 25,26, 39-42
Y	EP 0 713 089 A (BIO SENSOR KENKYUSHO KK) 22 May 1996 (1996-05-22) abstract column 4, line 20-32	25,26
Y	EP 0 422 708 A (ARES SERONO RES & DEV LTD) 17 April 1991 (1991-04-17) claim 1 figure 1	39-42

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.　　[X] 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.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 November 2000	11 12. 2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Thomas, R.M.

3

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

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4599

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nal Application No.
PCT/EP 99/06315

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 296 136 A (WALLAC OY) 21 December 1988 (1988-12-21) abstract column 3, line 43-45,53-58 claim 1	1-29, 39-42
A	WO 96 22531 A (SOINI ERKKI ;HAENNINEN PEKKA (FI); SOINI JUHANI (FI)) 25 July 1996 (1996-07-25) abstract claim 1	1-29, 39-42
A	US 5 162 863 A (ITO YUJI) 10 November 1992 (1992-11-10) claims	1-29, 39-42
Y	EP 0 723 146 A (SRI) 24 July 1996 (1996-07-24) page 9, line 6 - line 7 page 14, line 15 - line 37 page 22, line 39 -page 23, line 5 page 24, line 14 - line 17 page 31, line 9 - line 16	30,31, 34,36,38
A	figures 7A,10,24	32,33
Y	D.R. WALT: "Fiber-optic imaging sensors" ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH., vol. 31, no. 5, 19 May 1998 (1998-05-19), pages 267-278, XP002140931 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. WASHINGTON., US ISSN: 0001-4842 page 275, right-hand column, last paragraph -page 277, right-hand column, line 33; figure 17	30,31, 34,36,38
X	WO 97 35189 A (UNIVERSITY OF WASHINGTON) 25 September 1997 (1997-09-25) page 9, paragraph 1 - paragraph 2 page 10, line 4 - line 27	42
Y	figures 4,5	39,40
Y	WO 96 28538 A (MESO SCALE TECHNOLOGIES) 19 September 1996 (1996-09-19) page 73, line 6 - line 12 page 76, line 22 - line 35 page 132, line 10 - line 13 figures 8,42	39,40
A	GB 2 318 636 A (CAMBRIDGE IMAGING) 29 April 1998 (1998-04-29) page 17, line 10 - line 13 figure 7	30

-/--

3

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

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/EP 99/06315

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	S. SAVOY et al.: "Solution-based analysis of multiple analytes by a sensor array: towards the development of an 'electronic tongue'". Conference on Chemical Microsensors and Applications, Boston Massachusetts, US, 4-5 November 1998, PROCEEDINGS SPIE, Bd. 3539, Seiten 17-26. XP000964999 abstract page 20, last paragraph -page 21, line 4 page 23, line 3 - line 5 page 24, line 1 -page 25, last line figures 2,8-10	30,31, 33,34, 36,37
P,X	J.J. LAVIGNE et al.: "Single analyte to multi-analyte fluorescence sensors". Conference on Advances in Fluorescence Sensing Technologies IV, San Jose, California, US, 24-27 Januar 1999. PROCEEDINGS SPIE, Bd. 3602, Seiten 220-231 XP000964998 page 226, paragraph 2 -page 227, last line; figures 6B-8	30,31, 33,34, 36,37
E	WO 00 04372 A (UNIVERSITY OF TEXAS) 27 January 2000 (2000-01-27) page 7, line 31 -page 8, line 4 page 8, line 20 - line 30 page 23, line 17 - line 20 page 26, line 9 - line 14 figure 1	30,31, 33,34, 36,37
P,X	WO 98 53300 A (LYNX THERAPEUTICS) 26 November 1998 (1998-11-26) page 5, line 18 -page 6, line 5 page 6, line 18 - line 24 page 7, line 20 - line 23 figures 1-3	39-42

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

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4601

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 00/06315

Box I　Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

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

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

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

Box II　Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 00/06315

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1-29, 39-42 (in part)

Method for determining a plurality of analytes in a sample comprising the following steps:
1) Bringing the sample into contact; (a) with a plurality of species of microparticles, whereby each species is suited for detecting certain analytes and has a certain coding which can be optically differentiated from other species, and; (b) with a plurality of soluble analyte-specific analytical reagents which support a signal-emitting group or which can bind with a signal-emitting group;
2) depositing the microparticles onto a support, and;
3) determining the analytes by optically detecting the coding and the quantity, and determining the presence and/or the absence of the signal-emitting groups on at least one species of individual microparticles located on the support.

2. Claims Nos. 30-38, 39-42 (in part)

Measuring device for determining a plurality of analytes in a sample comprising:
a) an electronic image recording sensor for carrying out an essentially non-enlarged image-like detection of the optical behavior of an ensemble of microparticles which are brought into contact with the sample and are deposited onto a support;
b) means for exciting the signal emission of signal-emitting groups on microparticles in the ensemble of microparticles located on the support;
c) a data processing device which evaluates image data of the electronic image recording sensor and which provides information concerning the presence of certain analytes in the sample based on the detected optical behavior of the ensemble of microparticles.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4603

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Interna[illegible]nal Application No
PCT/EP 99/06315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0126450 A	28-11-1984	DE 3322373 A	22-11-1984
		AT 80469 T	15-09-1992
		CA 1248873 A	17-01-1989
		DE 3485912 A	15-10-1992
		JP 2040626 C	28-03-1996
		JP 7054324 B	07-06-1995
		JP 60035265 A	23-02-1985
		DK 305084 A	23-12-1984
		NO 842501 A	27-12-1984
EP 0713089 A	22-05-1996	JP 8136546 A	31-05-1996
		US 5981202 A	09-11-1999
EP 0422708 A	17-04-1991	AT 62752 T	15-05-1991
		AT 52856 T	15-06-1990
		AT 41526 T	15-04-1989
		AT 143289 T	15-10-1996
		AU 2967289 A	25-05-1989
		AU 583040 B	20-04-1989
		AU 4491085 A	10-01-1986
		AU 588245 B	14-09-1989
		AU 4491185 A	10-01-1986
		AU 581669 B	02-03-1989
		AU 4491385 A	10-01-1986
		CA 1231136 A	05-01-1988
		CA 1246891 A	20-12-1988
		CA 1261256 A	26-09-1989
		DE 3568874 D	20-04-1989
		DE 3577748 D	21-06-1990
		DE 3582532 D	23-05-1991
		DE 3588124 D	31-10-1996
		DE 3588124 T	20-02-1997
		EP 0171148 A	12-02-1986
		EP 0170375 A	05-02-1986
		EP 0170376 A	05-02-1986
		WO 8600135 A	03-01-1986
		WO 8600141 A	03-01-1986
		WO 8600138 A	03-01-1986
		JP 3010902 B	14-02-1991
		JP 61502418 T	23-10-1986
		JP 2527933 B	28-08-1996
		JP 61502419 T	23-10-1986
		JP 2024459 B	29-05-1990
		JP 61502420 T	23-10-1986
		US 4978503 A	18-12-1990
		US 4810658 A	07-03-1989
EP 0296136 A	21-12-1988	SE 458968 B	22-05-1989
		DE 3870324 A	27-05-1992
		JP 1035268 A	06-02-1989
		JP 2638085 B	06-08-1997
		SE 8702511 A	17-12-1988
		US 5028545 A	02-07-1991
WO 9622531 A	25-07-1996	FI 96641 B	15-04-1996
		FI 951040 A	08-09-1996
		EP 0804732 A	05-11-1997
		JP 10512670 T	02-12-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4604

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter... nal Application No
PCT/EP 99/06315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9622531 A		US 5891738 A	06-04-1999
		EP 0815447 A	07-01-1998
		WO 9627798 A	12-09-1996
		JP 11503824 T	30-03-1999
US 5162863 A	10-11-1992	JP 1207663 A	21-08-1989
		JP 1989593 C	08-11-1995
		JP 7018879 B	06-03-1995
		JP 1270643 A	27-10-1989
		JP 1996884 C	08-12-1995
		JP 7031114 B	10-04-1995
		JP 2024560 A	26-01-1990
		FR 2627286 A	18-08-1989
EP 0723146 A	24-07-1996	AT 170004 T	15-09-1998
		CA 2144527 A	31-03-1994
		DE 69320484 D	24-09-1998
		DE 69320484 T	24-12-1998
		DK 660936 T	25-05-1999
		EP 0660936 A	05-07-1995
		ES 2123063 T	01-01-1999
		JP 8501632 T	20-02-1996
		WO 9407142 A	31-03-1994
		US 5674698 A	07-10-1997
		US 5736410 A	07-04-1998
		US 5891656 A	06-04-1999
WO 9735189 A	25-09-1997	US 5747349 A	05-05-1998
		AU 4000197 A	10-10-1997
WO 9628538 A	19-09-1996	AU 720625 B	08-06-2000
		AU 5420596 A	02-10-1996
		BR 9607193 A	11-11-1997
		CA 2213854 A	19-09-1996
		CN 1186513 A	01-07-1998
		CZ 9702844 A	14-10-1998
		EP 0821726 A	04-02-1998
		HU 9801679 A	28-10-1998
		JP 11502617 T	02-03-1999
		US 6066448 A	23-05-2000
		US 6140045 A	31-10-2000
		US 6090545 A	18-07-2000
GB 2318636 A	29-04-1998	EP 0937238 A	25-08-1999
		WO 9815814 A	16-04-1998
WO 0004372 A	27-01-2000	AU 5316599 A	07-02-2000
WO 9853300 A	26-11-1998	AU 7715598 A	11-12-1998
		EP 0985142 A	15-03-2000
		US 6013445 A	11-01-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4605

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷	識別記号	FI	ﾃｰﾏｺｰﾄﾞ(参考)
G01N 33/543	501	G01N 33/543	501D

(31)優先権主張番号　198 39 256.7
(32)優先日　平成10年8月28日(1998. 8. 28)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)
(31)優先権主張番号　199 07 080.6
(32)優先日　平成11年2月19日(1999. 2. 19)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)
(31)優先権主張番号　199 24 327.1
(32)優先日　平成11年5月27日(1999. 5. 27)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)
(81)指定国　EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US
(72)発明者　マンフレート　ミュラー
ドイツ連邦共和国　ミュンヘン　ロイターシュトラーセ　76／ベー
(72)発明者　フリッツ　シュテーラー
ドイツ連邦共和国　ヴァインハイム　ゲッセルヴェーク　15
(72)発明者　ハンス　リントナー
ドイツ連邦共和国　シユツツトガルト　フィールライヒェンヴェーク　27
Fターム(参考)　2G020 AA08 DA05 DA13 DA23 DA31 DA63
2G043 AA04 BA16 CA04 DA02 EA01 HA01 KA02 KA03 KA09 LA03 NA01
2G045 BB22 BB24 CA25 CA26 CB01 CB03 CB07 CB14 DA30 DA36 DA60 FA11 FA19 FB12
2G054 AA06 AA07 AA08 BB08 CA21 CA22 CA23 CE01 CE02 EA01 EA03 FB01 GA04 GB10 GE01 GE07 GE09

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4606

(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2002－526743
（P2002－526743A）
(43)公表日　平成14年８月20日(2002.8.20)

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	ＦＩ		テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ　21/21		Ｇ０１Ｎ　21/21	Ｚ	２Ｇ０４５
// Ｇ０１Ｎ　33/483		33/483	Ｃ	２Ｇ０５９

審査請求　未請求　　予備審査請求　有　　（全 57 頁）

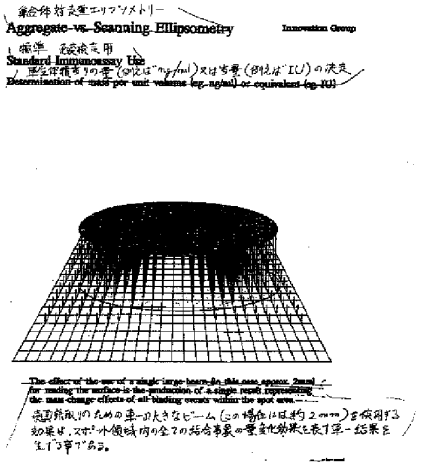
(21)出願番号　特願2000－548701(P2000－548701)
(86)（22)出願日　平成11年５月13日(1999.5.13)
(85)翻訳文提出日　平成12年11月13日(2000.11.13)
(86)国際出願番号　ＰＣＴ／ＵＳ９９／１０９１７
(87)国際公開番号　ＷＯ９９／５８９４８
(87)国際公開日　平成11年11月18日(1999.11.18)
(31)優先権主張番号　６０／０８５，２５９
(32)優先日　平成10年５月13日(1998.5.13)
(33)優先権主張国　米国（ＵＳ）

(71)出願人　アクセラ８　テクノロジー　コーポレイション
アメリカ合衆国、コロラド、デンバー、イースト　セブンテイーンス　アベニュー　303、ナンバー　108
(72)発明者　スタルジイ、ティモシイ、ダブリュ
アメリカ合衆国　コロラド、ボールダー、ジャクソン　サークル　4734
(72)発明者　クラーク、スコット
アメリカ合衆国　コロラド、デンバー、イー、ウォーレン　ドライブ　7423
(74)代理人　弁理士　浅村　皓　（外３名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　アナライト検出算出法

(57)【要約】
本発明は、固相固定、信号発生に適合する特定のアナライト標識及びその利用のための対応する処理を用いたアナライト検出のための光学的方法及び装置に関する。ここに記載する算出検出法は、信号観察のための領域を狭め、それにより検出可能な信号対背景比を改良する。装置は、標識付けした試料（アナライト錯体）を結合した試料台を固定するためのプラットホーム／支持体、放射線源、放射線を発生し、前記試料にそれを向けるための光学的装置、及びデーターを収集分析するため機構からなる。その装置を連携させることにより、試料は背景信号から区別することができる信号を発生し、それらの両方を信号検出器で収集し、影像し、データー処理装置への試料像を発生する。前記装置は信号測定値を受け、今度は個々の結合事象を列挙する。発生した信号は選択した量増大により増大することができる。本発明の個々の結合事象を検出する算出検定方法は、例えば、アナライトの検出、又は研究、商業的及び注意点適用の両方での結果を確認するための分析に使用することができる。



Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4607

【特許請求の範囲】

【請求項１】　個々の目的アナライト結合事象の固相光学的検出及び算出法において、

反射性又は透過性基体上に溶液から直接アナライト錯体を固定し、然も、前記錯体が、少なくとも一つの第二アナライト特異結合性素子に接合した少なくとも一つの信号発生素子と錯化した目的アナライトを有し、

アナライト錯体が固定された基体から又はその基体を通して電磁波を反射又は透過し、

前記電磁波の反射又は透過により発生した信号を捕捉し、そして

存在するアナライトのその存在及び（又は）量について前記信号を分析する、諸工程からなる検出算出法。

【請求項２】　アナライト錯体の固定を、固相又は固相マトリックスへの吸着、共有結合、立体結合、化学的に媒介された結合、結合剤による結合、自己集合結合、又は自己集合力媒介結合により達成する、請求項１に記載の方法。

【請求項３】　固定が、基体とアナライト錯体との間に配置された一つ又は複数の中間層を更に用いて行われる、請求項２に記載の方法。

【請求項４】　目的アナライトが、固定により材料（単数又は複数）から分離される、請求項１に記載の方法。

【請求項５】　アナライトが液相又は固相状態で錯化されている、請求項１に記載の方法。

【請求項６】　信号発生素子が、自己集合性物質、凝集性物質、酵素、化学的活性物質、フイルム形成性物質、及び光学的特異性物質からなる群から選択される、請求項１に記載の方法。

【請求項７】　信号発生素子が、微粒子、コロイド金属又は非金属、重合体、ガラス、シリアル化合物、光学活性物質、巨大分子、及び核酸からなる群から選択される、請求項６に記載の方法。

【請求項８】　信号発生素子が、アナライト錯体に量を追加する、請求項６に記載の方法。

【請求項９】　複数の信号発生素子がアナライト錯体と錯化され、明確な結

合事象を示す複数の明確な信号を生ずる、請求項１に記載の方法。

【請求項１０】　第二結合性素子が、抗体、抗原、巨大分子、核酸、及び特異結合性分子からなる群から選択される、請求項１に記載の方法。

【請求項１１】　電磁波源がレーザーダイオードである、請求項１に記載の方法。

【請求項１２】　個々の目的アナライト結合事象の固相光学的検出及び算出装置において、

少なくとも一つの第二アナライト特異結合性素子に接合した少なくとも一つの信号発生素子と錯化した目的アナライトを有するアナライト錯体が固定された基体からなる、目的アナライトを捕捉するための機構、

前記信号発生素子と既知の相互作用を及ぼし、アナライト結合事象（単数又は複数）を証明する検出可能な信号を発生する、電磁波からなる信号キャリヤー機構、

光学的解像素子（単数又は複数）を有し、信号キャリヤーから発生した情報を受け取るように構成された信号捕捉機構、及び

前記信号捕捉機構により発生した情報を処理し、アナライトを定性的及び（又は）定量的に検出するための信号分析機構、

を具えた検出算出装置。

【請求項１３】　電磁波が４００ｎｍ～７００ｎｍの範囲内の単色波長を持つ、請求項１２に記載の装置。

【請求項１４】　電磁波が４００ｎｍ～７００ｎｍの範囲内の多重波長を持つ、請求項１２に記載の装置。

【請求項１５】　解像素子が、拡大、焦点一致、及び（又は）信号キャリヤー機構の制御を行う、請求項１２に記載の装置。

【請求項１６】　解像素子が、信号発生素子から発生した集合信号から個々の信号を解析する、請求項１２に記載の装置。

【請求項１７】　信号キャリヤー機構が、干渉、回折、反射、偏光、散乱、複屈折、吸収、及び屈折からなる群から選択される、請求項１２に記載の装置。

【請求項１８】　アナライト錯体が、目的アナライトの存在に関連した検出

信号を増幅する量増大手段を更に有する、請求項１２に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

（技術分野）

本発明は、分子生物学、生化学、微生物学、及び生化学的研究、特にアナライト(analyte)を検出する一般的分野に関し、一層特別には、個々の結合事象(binding event)を検出するための算定検定法及び装置に関する。本発明は、量(mass)の変化を発生、検出、及び測定することができる固相固定及び光学的信号を用いて低い濃度の問題の特定分子（アナライト）を検出することができる。

【０００２】

（背景技術）

検出下限（化学的検出感度の閾値）を向上させることは、リガンド結合検定発展の、その発端以来の主要な目的になっている。固相上の物質量との種々の光学的相互作用の関係により定まる光学的検出方法は、特定のエリプソメトリーでは、原理的に別の信号発生方法と比較して、標準的結合反応、例えば、酵素／基質相互作用、蛍光発光、放射線発光、及び着色発光に対し高度の感度を与えることができることは以前から認識されている。結合用錯体の量を増加して、発生する光学的信号を増幅することができることも認識されている。この目的のために、結合用錯体に多量の物質を接合(conjugate)することに成功できることも実証されている。この方法の一例は、光学的エリプソメトリー免疫検定〔オプテスト(OpTest)(商標名)、ＤＤｘ社(DDx, Inc.)〕、即ち、生物学的試料と光との相互作用を測定する分子微視的規模の事象についての検出装置によって与えられている。

【０００３】

従来技術では、アナライトを検出するための幾つかの影像法が報告されている。「特殊結合事象を検出するための光散乱光学的導波管法」(Light Scattering Optical Waveguide Method of Detecting Specific Binding Events)と題するスティンプソン(Stimpsom)その他による米国特許第５，５９９，６６８号明細書には、ビデオ影像により組合せた標識付けされた微小球（ビーズ）と肉眼観察とを用いて、導波管へ導入した光の散乱を検出するＤＮＡハイブリッド形成(hybridi

zation)影像器が記載されている。導波管装置は固相として要求されており、影像はＣＣＤカメラ及びフレーム・グラバー(frame grabber)ソフトウエアーにより達成されている。

【０００４】

「デジタルアナライト検出装置」(Degital Analyte Detection System)と題するアレン(Allen)その他による米国特許第５，４８８，５６７号明細書は、アナライト粒子の存在を、その照射に基づいてデジタル検出することに関する。試料の明確なピクセル領域を照射し、発生した信号を検出する。

【０００５】

「生物分子相互作用の可視化のための影像エリプソメトリーに基づくバイオセンサーの概念」(A Biosensor Concept Based on Imaging Ellipsometry for Visualization of Biomolecular Interactions)〔ジン(Jin)その他、Anal. Biochem., 232:69 (1995)〕には、新規な光学的バイオセンサー装置が教示されている。このバイオセンサー装置は、データーを収集するために、蛋白質パターン化表面及び影像エリプソメトリー及びＣＣＤカメラと組合せて、生物分子相互作用の特異性を利用している。

【０００６】

ＣＣＤカメラとフレームグラバー板と組合せた影像エリプソメトリーの一般的使用は、「微視的影像エリプソメーターの性能」(Performance of Microscopic Imaging Ellipsometer)〔ビーグルホール(Beaglehole)、Rev. Sci. Instrum., 59(12):2557 (1988)〕に記載されている。生命科学又は生物学的装置の型の影像適用については何も示唆されていない。

【０００７】

「金標識付け抗体及び試験キットを用いた抗体存在の検出方法」(A Method for Detecting the Presence of Antibodies using Gold-Labeled Antibodies and Test Kit)が、ハリー(Hari)その他による米国特許第５，０７９，１７２号明細書に教示されている。この方法論は、顕微鏡、例えば電子顕微鏡影像装置を用いて標識付けした微粒子を検出することに関する。

【０００８】

光の検出及び定量化を含めた化学的及び生化学的分析は、種々の状況で行われている。一つの用途は、特定のアナライトの存在又は量を決定するためのアナライト検出である。多くのアナライト分析法では、光輻射線（例えば、蛍光又は化学ルミネッセンス）の吸収又は発光と重要な関係が存在する。そのような場合、試料を照射し、伝送された又は発光した光に対する試料の効果を検出する。照射により得られた発光の場合には、非アナライト分子も発光し、比較的大きな背景ノイズを生じ、測定に実質的な誤差を生ずる結果になる。測定に伴われるノイズには、その他装置上の誤差も集約的に寄与することがある。

【０００９】

光を含む化学的測定の品質は、アナライトの存在による試料からの光学的信号の適当な測定値対装置に固有のためのノイズ変動の比として定義することができる。結果に影響を与えるノイズ源は、試料、信号源、検出器変動及び環境による干渉を含めた光路内のどこからでも入ってくる。しかし、これらの変動は必ずしも固有のものではなく、外部から付加されるか又は誘導された変動も含んでいる。一般に、これらの信号対ノイズ比（Ｓ／Ｎ）に対する議論は、特定のアナライトに伴われる「検出限界」を小さくするように、測定装置の感度を改良することに重点をおいて行われてきた。検出限界とは、試料内のアナライト濃度で、それより高くなるとアナライトの存在に起因する信号が希望のＳ／Ｎ比に到達するようなものになるアナライト濃度を指す。実際には、この検出限界は、アナライト濃度に関連した光学的信号を誘発するように設計された実験方法を実施することにより確認する。特に信号及びノイズの強度に関連したデーターを、アナライトの濃度範囲に亙って較正曲線の形でプロットし、それにより検出限界を直接決定することができる。

【００１０】

次に、未知の試料から実験的に得られた信号を較正曲線と比較することにより、未知の試料中の濃度の決定を行う。化学的測定の典型的な濃度単位はモル／リットル〔即ち、モル量（Ｍ）〕であり、１モルはアボガドロ数（６．０２２５×１０２３）として定義されている。残念ながら、最も感度の高い従来の実験方法でも、検出限界は約１フェムトモル（ｆＭ）の程度、即ち、１リットル当たりほ

ほ１０９個のアナライト粒子にしかならない。

【００１１】

較正曲線を参照して濃度を決定する測定方法は、本来「デジタル」よりはむしろ「アナログ」であるとして特徴付けることができる。即ち、アナライト濃度に関連した信号を、最初測定装置により生じさせる。次に較正曲線を参照してアナライト濃度の近似値を求める。較正曲線は濃度の関数として連続的なので、較正曲線から誘導された濃度は一般に整数ではない。これに対し、デジタル測定データーは、屡々特定の整数を明確に表す二元（即ち、２進）信号で具体化されている。従って、測定のアナログ式とデジタル式との基本的差は、アナログ手段を用いると、分析した試料に更に別の一つのアナライトが付加されても、明確に検出することは出来ないことである。化学的測定の制度について劇的な改良が行われてきたが、そのような進歩は信号を増大し、ノイズを減少する基本的にアナログの概念に基づくものであった。

【００１２】

低い濃度水準でアナライトを含む分子状試料では、デジタル測定方法は少なくとも二つの利点を与える：較正曲線との照合がないこと及び試料中の単一分子の検出である。列挙方法論(enumeration methodology)は、アナライト濃度が充分に低く、各二元測定値に伴われる統計的ノイズが、連続する整数の差よりも小さく留まっているような試料では有用である。従って、本発明の目的は、個々の結合事象の検出に適合する本質的にデジタル測定方式によって低い水準のアナライト濃度を決定するための光学的方法を与えることである。

【００１３】

今日まで、従来技術の発展は、明確なビデオピクセル（デジタル化画素の配列）又は個々の結合部位とは対照的に、結合領域の影像化に向けられてきた。従来技術の種々の問題は、本発明により解決される。従来技術の欠点には、例えば、放射に基づく反応検出への限定、領域又は複数のピクセル上の反応の平均化及び（又は）検出、信号発生及び信号不発生の両方の領域及び分布決定の必要性が含まれる。本発明は、これらの欠点を、個々の結合事象の列挙によりアナライト検出のための一体化した装置及び方法を与えることにより解決する。従来法は定性

的及び限定された定量的決定には適しているが、従来法の中で個々のアナライト結合事象の正確な算定に簡単且つ効果的に用いることができるものは一つもなく、ここに記載する向上した性能特性を教示するものはない。本発明は、改良された算出感度及び精度を与え、それによってここに記載した従来法に対処するものである。

【００１４】

従来技術での研究は、本発明を開示する文献を全く挙げておらず、本発明を当業者に容易に想到させるものではない。更に、従来法の文献の開示を組合せても本発明を教示することはできず、そのような組合せは何等本発明を容易に想到させるものではない。分子対分子に基づく固相結合アナライトの即時検出で用いられる新規な特性或は組合せを教示又は示唆する文献は一つもない。ここに開示する方法は、例えば、結合事象の頻度、密度又は分布が、慣用的免疫検定、ＤＮＡプローブ、及び免疫クロマトグラフ検出方法の検出可能な閾値よりも低い場合の生物学的標識の固相検出に有用である。

【００１５】

（発明の開示）

本発明は、固相固定及び光学的信号発生を用いた特定分子を検出するための手段としてアナライト検出の新規な方法に基づいている。特に本発明は、アナライトを検出する結果になる量変化を検出及び測定することができる光学的信号及び検出器を使用することを含んでいる。この方法は、更に現存する検定方法と連結し、検出を自動化するための商業的機器に関し、従って、それ自体商業的用途、例えば、高生産性医薬スクリーニング及び注目点検出の用途に利用される。即ち、本発明は、特別な結合相互作用により媒介される個々の結合事象の固相光学的検出及び算出に関する。

【００１６】

本発明は、アナライト固相固定、信号発生体(signal generator)、光の通路を含めた信号キャリヤー、信号検出手段、及び新規なデーター分析により規定される。それは、狭い光ビーム幅を用いるか、又は大きなビームを、ダイオード配列体又は帯電結合装置（ＣＣＤ）検出器を用いて小さな仮想ビームへ分解するか又

は分割することにより、個々の結合事象の検出性を改良する方法も包含する。種々の光学的信号及び物理的増幅素子を使用することについてここで論ずる。

【００１７】

最も広い態様として、本発明は、個々の目的アナライト結合事象の固相光学的検出及び算出のための方法及び装置において:反射性又は透過性基体上に溶液から直接アナライト錯体を固定し、然も、前記錯体が、少なくとも一つの第二アナライト特異結合素子に接合(conjugate)した少なくとも一つの信号発生素子と錯化した目的アナライトを有し；アナライト錯体が固定された基体から又はその基体を通して電磁波を反射又は透過し；前記電磁波の反射又は透過により発生した信号を捕捉し；そして存在するアナライトのその存在及び（又は）量についての信号を分析する；諸工程からなる検出及び算出法及び装置に関する。

【００１８】

特に、試料内のアナライト粒子の存在をデジタル検出する装置及び方法をここに開示する。各アナライト錯体は既知のやり方で刺激（例えば、照明）により光学的に検出可能な応答を発生するように配置する。更に、信号発生体は受動又は能動性にすることができる。受動信号発生体には、照明と相互作用するが、処理、例えば吸収、散乱はしないようなものが含まれる。能動信号発生体は、状態変化、即ち、蛍光、化学ルミネッセンス、及びプラズモン共鳴を通して光エネルギーを能動的に変換するものである。刺激又は照明のために、デジタル式アナライト検出装置は、試料内の多数の明確なピクセル領域を照明し、その中に含まれているアナライト錯体の各々から光学的信号、即ち、ホトンを発生させる光学的装置を含んでいる。ここで論ずるように、スティンプソンその他及びアレンその他は、検出する目的のためにＣＣＤ及びピクセルを使用することを採用している。本発明では、ピクセル領域は、夫々の領域内に含まれるアナライト錯体の数が充分小さく、各領域によって発生する光学的集合信号が最大検出閾値、好ましくはピクセル当たり１粒子又は１粒子当たり複数のピクセルよりも小さくなるような大きさになっている。

【００１９】

デジタル検出装置は、更に各ピクセル領域から発生する光学的信号を測定する

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4616

ための装置を有する。データー処理ネットワークは光学的信号を受け、それら信号を定量化し、測定値に基づき各ピクセル領域内のアナライト粒子の数を計数し、試料内のアナライト粒子の数を決定する。

【００２０】

本発明の検出方法を用い、広範な種類のアナライトを検出することができる。ここで用いる用語「光学的応答」とは、単一のアナライト錯体からの信号発生であるが、誘発されたものを集約的に言及するのに用いられている。更に、ここで用いられている用語「発生した信号」とは、特定のピクセル又はピクセル領域から検出された光学的応答の測定に対応する。検定試料媒体は、アナライトに結合されていない検出可能な標識が慣用的洗浄方法により除去される、固相結合アナライト錯体であるのが好ましい。

【００２１】

好ましい態様として、各ピクセル領域内のアナライト粒子は、個々の信号単位に基づいて個々に測定し、背景ノイズレベルより実質的に高い光学的応答を与える。各光学的応答の大きさは、用いられる特定の光検出装置が光学的応答と周囲の背景ノイズとを区別することができるようにするのに充分な大きさである必要がある。信号単位の一つ以上の光学的応答は、単一のアナライト粒子に伴われているが、それら単位の数は各アナライト粒子について実質的に同じになる。殆どの部分に対し、アナライト錯体一つ当たりの信号単位数は１より大きいであろう。

【００２２】

検定試料媒体は、屡々低い濃度のアナライト、一般にピコモル以下、屡々フェトモル以下アナライトを含む。検定体積は通常１００μｌより少なく、屡々１０μｌより少なく、１μｌ以下のことがある。標識を個々に検出することができるように、５０ｎｍより５μの大きさの範囲で信号発生標識にＣＣＤピクセルを合わせることが望ましい。ＣＣＤピクセルの実際的大きさは、それが拡大用光学系によって達成される点で無関係である。

【００２３】

検定は通常特殊の結合対を含み、その特異な結合対により分子が補足分子を有

することが考えられており、特異の結合対のそれら素子の結合は無作為的な錯体形成よりも実質的に高い親和力で行われる。特異の結合対の素子は、「リガンド」及び「レセプタ」と呼ぶことができる。一般にレセプタは固相に固定され、流体試料から問題のアナライト（リガンド）を捕捉又は固定する。このように、特異の結合対はハプテン及び抗原（「リガンド」として言及する）及びそれらの相補的結合用素子、例えば、抗体、酵素、表面膜蛋白質レセプタ、レクチン等（一般に「レセプタ」として知られている）を含んでいてもよい。特異の結合対は、天然及び合成の両方の相補的核酸配列、ＲＮＡ又はＤＮＡを含んでいてもよく、この場合簡単にするため、核酸はリガンド及びレセプタを有する特異結合素子の概念内に含まれるものとする。

【００２４】

検定を行う場合、特異結合素子と、検出可能な個々の標識との接合が含まれる。これらの接合体を形成する方法はよく知られており、従って、ここで論ずることはしない。アナライトにより、市販の試薬又は変性してもよいそのような試薬に伴われる種々のプロトコルを用いることができる。

【００２５】

本発明の他の特徴及び利点は、本発明の原理を例として例示する図面に関連して行う次の詳細な説明から明らかになるであろう。

【００２６】

（好ましい態様についての詳細な説明）

上の一般的記述及び次の詳細な記述の両方共、単なる例として説明するためのものであり、特許請求される本発明を限定するものではないことは分かるであろう。アナライト検出、取扱い（ハイブリッド形成及び増幅）、及び光学系（レーザー及びエリプソメトリー）についての一般的原理及び条件は当分野でよく知られている。本発明は、個々の結合事象を検出するための新規な方法について記述する。

【００２７】

ここに開示する本発明は、広い範囲の試料について行うことができることは当業者も認めるであろう。そのような試料には、例えば、農業起源、バクテリア及

びウイルス起源、及び人又は他の動物起源から誘導された生物学的試料の外、排水又は飲料水、農産物、加工食品及び空気のような他の試料が含まれる。本発明は、固定された特定分子の僅かな数を検出するのに有用である。

【００２８】

本発明は、試料検定領域中の量変化を検出及び測定することができる光学的信号及び検出器を用いた方法によって具体化する。本発明の特定の用途とは無関係に、方法論的詳細な点は。ここに開示するものと同様、当分野でよく知られたプロトコルによって計算することができる。更に、前記必要な計算の精密化は、当業者によって日常的に行われているものであり、過大な実験を行うことなく彼らによって日常的に行われる仕事の範囲内に入るものである。

【００２９】

本願は光学的方法としてエリプソメトリーを使用することに言及し、特にそれについて論ずるが、このやり方は便宜的なものに過ぎない。この方法論は、図１２で引用したものを含めた或る範囲の光学的信号型に適用されることは分かるであろう。特に、種々の光学的方法の性能を、ここに記載する一般的方法を適用することにより実質的に向上させることも考慮に入れられている。特に、散乱法は、エリプソメトリーとは異なった種類の装置の基礎を形成する。本質的に同じ光学的構成で、吸収、屈折率変化、及び回折のような他の効果を用い、特別な結果の利点を与えることができる。適用した場合、光学的信号フォーマットの規定により、個々の結合事象を区別する目的のための適当な固定表面及び適当なデーター分析法の選択が行われる。従って、固定装置及びデーター分析装置の所属は、選択される光学的信号フォーマットの種類によって決まる。光学的信号フォーマット（信号キャリヤー、信号発生体及び信号検出器の関連性）の目的は、信号を発生し、検出することである。信号発生体標識によって発生した信号を、装置作動の背景になるプラットホーム、固相、により生ずる信号から区別する能力は、光学的信号フォーマットに基本的なものである。

【００３０】

明細書及び特記請求の範囲を理解するのに役立つ定義が本明細書全体に亙って含まれている。ここに与える定義は、それらの用語が次の実施例中及び本願全体

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4619

に亙って用いられた時に念頭に入れるべきである。ここで行う開示は、簡単化及び便宜上、量の付加に関連した検定（例えば、リガンド結合検定）に限定されているが、免疫検定法にも言及することができる。しかし、光学的信号検出の同じ原理は、一般に系から量を除去する方式（例えば、溶菌又は解離検定）に適用され、従って、本発明は、量変化及びその誘導体を測定する検定に適用することができる。更に、本発明は、透過及び反射の両方に基づく固相検定に関する。

【００３１】

当業者は、本発明がここに記載する技術分野で広範囲に適用できることを容易に認めるであろう。次の実施例及び詳細な記述は、本発明を説明し、例示するのに役立つ。それら実施例は本発明を何等限定するものではない。本発明の範囲内で種々の修正を行うことができる。

【００３２】

小さなビーズ、２５ｎｍ～２０μの直径範囲のビーズの接合の開発により、新しい形の信号検出への道が開かれた。その信号検出を本願では記述し、今後算出法として言及する。本発明は、個々の結合事象の検出を可能にする。信号について観察される領域の実際的又は仮想的大きさを狭くし、それによって真の信号対背景信号の比を改善し、同時に、選択された量増大素子を用いて発生信号を増大することが原理になっている。強い信号発生体だけが、分子レベルで起きる個々の事象について検出することができる。光学的薄膜系で典型的な検出可能性の尺度として、５０ｎｍ～５μの範囲の量の添加は、個々の結合事象検出を可能にする大きな信号を発生する。更に、或る巨大分子又は細胞物体は、付加的量増大を行うことなく、即ち第二標識又は試薬を用いなくてもそれらを検出することができる程充分大きい。従って、本発明は、固相固定及び量変化を検出測定することができる光学的信号を用いて、低い濃度の問題の特定分子（アナライト）の検出問題を解決する。

【００３３】

一つの態様として、そのような量変化は、リガンド結合対との立体的、形状媒介又は他の非共有結合相互作用により、アナライトを錯化又は結合することにより付加的に達成又は媒介される。そのような相互作用の例には、抗原・抗体結合

、核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡ）結合、及び他の特定の巨大分子（蛋白質、糖蛋白質、又は炭水化物結合）相互作用が含まれる。別法として、量変化は、特定の酵素、化学的、又は他の特定の解離又は溶菌剤によって減法的に達成される。量変化分析もに適した特異結合又は溶菌相互作用を用いた検定方式の例には、例えば、免疫検定、ハイブリット形成検定、蛋白質結合検定、及び酵素活性度検定が含まれる。

【００３４】

本発明の別の態様には、結合又は溶菌事象に伴われる光学的信号を、その信号の特定の増大又は変化により増幅又は区別するのに用いられる第二試薬が含まれる。そのような増大には、錯体形成事象に単に量を付加すること、又は特定物質又は過程からの区別可能な種類の信号を発生させることが含まれる。別法として、そのような増大には、区別可能な光学的信号を発生する結合又は溶菌事象の一つ以上の要素の変化が含まれ、或は増大は検出可能な自己集合又は凝集過程を開始する。

【００３５】

ここに記載した種類の固相検定では、典型的には、検定信号と背景ノイズとの統計的差から結果が導かれる。この種の検定は、典型的には、液体試料又は懸濁物をマクロ規模の体積（＞１μｌ）を用いて行われる。同様に、この種の検定のために典型的に用いられる固定領域もマクロ規模（＞１０００μ）になっている。これらの検定は、多数の結合又は溶菌事象により発生する信号の検出及び測定により、目的アナライトを検出及び（又は）定量する。個々の結合又は溶菌事象の数万から数億により発生した信号を、典型的には一つの光学的信号路と事象の全てとの相互作用により集合させ、一つの結果を与える。この慣用的方法の一つの理由は、検出すべき結合又は溶菌事象が分子の規模で起き、そのため検出可能な信号を発生させるのにそれら事象が多数必要になることにある。更に、この大きな数の事象は、結果に対し、統計的に意味のある根拠を与える。

【００３６】

この慣用的方法の明確な限界は、アナライトの濃度が非常に低い場合に証明されている。まばらな結合事象により発生する信号は、背景ノイズに対して区別さ

れるのに充分な大きさになっていなければならない。別法として、発生する信号は、反応領域の全表面領域に亙って信号の変化を平均することにより起こされる否定的信号の領域に対して区別できるものでなければならない。固相検定では、この領域の信号強度は、従って、試料の体積又は反応表面の面積の関数である。これらの場合に、まばらな結合又は溶菌事象により発生する信号は、試験面積の遥かに大きな未影響を領域によって発生した信号を併合している。非常に低い濃度のアナライトの場合、これは、正の信号と負の信号との非常に僅かな差しか生じない効果をもち、そのことが達成可能な低い検出レベルを限定する。

【００３７】

本発明は、結合事象の頻度、密度、又は分布が、慣用的免疫検定、ＤＮＡプローブ、免疫・クロマトグラフ又は他のリガンド結合法により検出できるもより遥かに低い場合の生物学的標識のための固相検出方法及び装置にある。

【００３８】

固定(Immobilization)

固相法は、多成分流体試料から問題のアナライト（「リガンド」又は「アナライト」）を分離又は捕捉する手段として検定開発の分野でよく知られている。固相検定は、特に問題のアナライトに結合する固相へ固定され、リガンド・レセプタ錯体を形成する捕捉物質(capture material)（レセプタ）を必要とする。

【００３９】

リガンドとレセプタは、一般にイオン性及び疎水性相互作用、ファンデルワールス力及び水素結合のような非共有結合機構により互いに特異的に結合する。或るリガンド・レセプタの組合せは当分野でよく知られており、例えば抗体又は抗体Ｆａｂ断片と、その抗原、ハプテン、又はエピトープとの間の免疫学的相互作用；蛋白質又は小分子の対応するレセプタへの生化学的結合；核酸鎖間の相補的塩基対の形成；が含まれる。

【００４０】

レセプタ物質の固相固定は当分野でよく知られている。一般的種類の固定には、例えば、吸着、共有結合、及び結合基介在(linker-mediated)が含まれるが、それらに限定されるものではない。吸着結合は一般に非特異的なものであり、固

相と捕捉物質との非共有結合相互作用に依存する。共有結合とは、化学結合の形成により捕捉物質が固相に結合されることを指す。結合基介在固定には、表面に結合される第二分子及び（又は）巨大分子及び結合構造を形成するため特異的に相互作用する捕捉物質との特別な使用を含んでいる。固定法は、一般に捕捉物質が問題のアナライトに結合するためにその特異性を維持するように選択される。

【００４１】

捕捉物質が固相に固定されたならば、その固体担体はアナライト結合に対し反応性になる（反応性表面）。問題のアナライトを含有する流体試料を添加する前に、その反応性表面を更に別の材料で処理して、試験される流体試料の非アナライト成分の非特異結合（ＮＳＢ）を防ぐ（ブロックする）ことが必要である。典型的なブロック材料には、例えば、カゼイン及びウシ血清アルブミンような蛋白質、界面活性剤、及び長鎖重合体が含まれる。

【００４２】

典型的には選択されたレセプタを固相に固定する。問題のアナライトを含有する試験溶液を、その固定レセプタと接触させ、それにより固相上にリガンド・レセプタ錯体を形成する。この錯体が形成されたならば、試験溶液の他の成分を全て、通常固相を濯ぐことにより除去する。固相に結合されたアナライトは、第二の特定のレセプタを結合することにより量増幅剤と付加的に錯化し、アナライト錯体を形成するようにしてもよい。この錯体は、試料が反応性表面と接触する前、又はアナライトを反応性表面に結合した後、アナライト含有流体試料中で形成することができる。反応性表面へのアナライト又はアナライト錯体の結合が完了した後、この結合を幾つかの手段のいずれかにより測定することができる。

【００４３】

記載した固相結合用プラットホームを作るのに有用な基体には、光学的又は「近光学的(near optical)」波長の読取りに適した反射性及び透過性材料が全て含まれる。適当な基体には、例えば一貫した有意の結果を与えるために、光と充分一貫した、又は正確な相互作用を与える基体である。この目的のために、高度に吸収性の表面又は結合層を使用して、ここに開示する散乱用途で光学的コントラストを生じさせることができる。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4623

【００４４】

光学的信号フォーマット

本発明の光学的信号フォーマットは、少なくとも信号キャリヤー、信号発生体、及び信号検出器からなる。

【００４５】

光学的信号フォーマット：信号発生体

本発明は、特に信号対非信号表面積の比率を変え、一層鋭敏な結果を与える方法に関する。また、本発明は、特定の種類の光学的ビームと相互作用するように選択された特定の標識を用い、増大した区別可能な又は増幅した信号を発生させる。

【００４６】

結合検定方法の慣習的目的は、単位体積当たりの量（例えば、ｎｇ／ｍｌ）又は当量（例えば、ＩＵ）の決定である。図１を参照して、アナライトを試料の他の成分及び過剰の試薬から分離するために、分離プラットホームとして固相を用いるのが典型的である。或る型の検定の場合、信号発生体は結合錯体に付着されたままになっており、そのため固相から読取られる（例えば、論ずる赤外又は蛍光のような光学的方法）。体積測定試料中に見出されるアナライトの量は、比例したやり方で固相に固定された量に変換される。

【００４７】

ここで用いる信号発生体とは、信号キャリヤーと相互作用して信号を生ずる本発明の成分である。この概念に対する重要な点は、二つの間の既知の特定の予測可能な相互作用である。信号発生体素子は、固定された目的アナライトに伴われる検出可能な信号を特異的に標識付け、増幅、区別、印付け又は発生し、それにより結合をその不在部分から区別するのに用いることができる材料が含まれる。

【００４８】

信号発生体の選択に対する限界は、信号キャリヤー、第二試薬接合特異性、目的アナライト、及び物理的、化学的及び（又は）電気的反応の選択により左右される。これらの限界内で、多数の信号発生体が存在する。これらには、例えば、アナライト錯体へかなりの量を付加する材料、自己集合性、凝集性、酵素又は化

学的に活性な材料、フイルム形成性材料、光学的信号又は明確な光学的性質、即ち高屈折率、キラル特性、高吸収性、高度の散乱を生ずる材料が含まれる。更に、異なった結合事象のための別々の信号を発生するのに複数の信号発生体を用いることもできる。

【００４９】

光散乱標識

ここに記載する散乱態様の信号発生体成分は、光散乱標識と呼ぶことができる。光散乱標識は、入射光を弾性的に散乱、即ち、光エネルギーを吸収することなく実質的に散乱させる分子又は材料、屡々粒子である。標識の例には、コロイド状金又はセレン；赤血球；ラテックス、ポリスチレン、ポリメチルアクリレート、ポリカーボネート、又は同様な材料から作られた染色重合体粒子及び微小粒子（ビーズ）；のような金属及び非金属標識が含まれる。そのような粒状標識の大きさは１０ｎｍ～１０μｍ、典型的には５０～９００ｎｍ、好ましくは５０ｎｍ～５μの範囲にある。粒子が大きくなる程光散乱効果は大きくなるが、これは結合及びバルク溶液粒子について当て嵌まる。適当な粒子標識は、バングス・ラボラトリーズ社(Bangs Laboratories, Inc.)及びフィシャーズ(Fishers)から入手することができる。

【００５０】

本発明では、標識は、検定のフォーマットにより、問題のアナライトに特異的に結合する第二レセプタ（標識付けされた第二レセプタ）、又はアナライトの類似体（標識付けされた類似体）に付ける。競合検定フォーマットの場合、標識付けされた類似体は、問題のアナライトと競合して反応性表面と特異的に結合する。直接サンドイッチ検定フォーマットでは、標識付けされた第二レセプタは、アナライトの第二エピトープに対して特異的である。これは、アナライトを、固定したレセプタとその標識第二レセプタとの間に「挟む(sandwich)」ことができる。直接サンドイッチ検定フォーマットでは、第二レセプタはアナライトの第二エピトープに対しても特異的であり、付加的光散乱標識と特異的に結合する材料で標識付けする。例えば、アナライトが反応性表面によって捕捉されたならば、ビオチニル化抗体を用いてアナライトを挟むことができ、信号発生のためにアビジ

ン化光散乱標識を用いる。

【００５１】

検定フォーマットとは無関係に、「標識付けされた接合体(labeled conjugate)」を形成するためにレセプタ又は類似体を光散乱標識に付着されなければならない。捕捉リガンドの固相への固定と共に、光散乱標識はレセプタ又は類似体に共有結合することができるが、これは必須のことではない。物理的吸着も適切である。そのような場合には、標識付け接合体を形成するための付着は、洗浄又は乾燥のような、後の或る検定段階での力に耐えるのに充分な強さを持ちさえすればよい。

【００５２】

好ましい態様として、信号発生体は結合用試薬に接合しており、その試薬が今度は目的アナライト、アナライト錯体、又は固定捕捉材料と特異的に相互作用することができる。そのような信号発生体には、前に論じたように、例えばビーズ及び微小粒子及びコロイド金属が含まれる。信号発生体には、自己集合性及び合成重合体、ガラス、シリカ、シリアル(silial)化合物、シラン、液晶又は他の光学活性物質、巨大分子、核酸、触媒化、自動触媒化、又は開始凝集体、及び内因性又は外因性試料成分も含めることができる。有用な結合用試薬には、一般に抗体、抗原、特異結合性蛋白質、炭水化物、レクチン、脂質、酵素、巨大分子、核酸、及び他の特異結合性分子が含まれる。

【００５３】

光学的信号フォーマット：信号キャリヤー

本発明で有用な信号キャリヤーは、光学的及び近光学的行路である。これらの行路は信号発生体と相互作用し、単一事象検出を可能にする。試料から反射した又は試料を透過した単色又は多色波長電磁波を用いて信号の変化を検出することができる。

【００５４】

光学的信号フォーマット：信号検出

歴史的には、表面を読取るための単一光ビーム、例えば、レーザービームを使用する効果は、検定領域内の全ての結合事象の量変化効果を表す単一の結果を生

ずることである。固定物質に大きなビームを与え、その結果を単一検出器によって積分した場合、効果的結果は同じになる。

【００５５】

図２に示したように、この方法について歴史的に理想化されたモデルは、統計的に意味のある領域又は全検定領域に亙って行われる光学的平均化であり、検定領域に亙って結合事象のほぼ正規分布により表される。実質的に全ての実際的場合において、検定領域に亙る結合分布は極めて不均一である。図３を参照する。ＯＴＥＲ（商標名）（ＤＤｘ社）として今後言及する大きな単一ビーム及び単一検出器を用いた現在の光学的エリプソメトリー読取り方法の利点は、それが本来分布に関係なく検定領域内の全ての結合事象を積分し、無数の個々の結合事象を単一の平均結果へ集約させることである。

【００５６】

この方法の欠点は、その同じ光学的平均化効果から生ずる。図４に描いたように、目的アナライトが小さな分子粒径の粒子からなる場合、又はまだらな結合事象が存在する場合には、この方法は、その比較的大きな検定領域に亙って平均化した時、それらの結果を統計的に無意味なものに帰結させる傾向がある。従って、非常に低い濃度の肯定事象を含む結果は、検定装置の背景ノイズ又は可変性に対する否定結果から区別することができない。

【００５７】

本発明の一つの態様は、エリプソメトリー方法論の新規な微生物学的使用、即ち、個々の結合事象を列挙法により決定することを含んでいる。この方法は、分析される表面を多数の個々の「局部的」検出領域へ分割することにより、信号平均化問題を解決する。そのような局部的読取り領域内で発生した全ての信号を、遥かに小さな領域又は場に亙って平均化し、それによって他の点では否定的な背景に対する「希釈(diluted)」の程度は遥かに小さくなる。

【００５８】

低濃度のアナライトの場合、この方法は与えられた試験表面について無数の局部的結果を生じ、その殆どは否定的結果を報ずる。しかし、肯定的結合が起きている場合には、局部的反応領域は非常に高い肯定的信号を報ずる。全領域に亙っ

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4627

て平均しても、その肯定的信号を希釈しない。従って、非積分結果プロファイルが発生し、それによって殆ど否定的になっていることがある全試験領域に亙ってばらばらな肯定的結果を報告し、同時に遥かに大きな個々の信号を局部的肯定的事象に対して発生させることができる。

【００５９】

従って、列挙方法論は個々の結合事象の決定を含め、極めて感度の高い検定方法を可能にする。この方法（図５で参照されるような）の明白な用途は、少数の微生物を検出するための微生物学の分野である。個々の細胞又は細胞群（コロニー形成単位）を検出することができることは、時間のかかる培養工程を省略することを可能にする。このことは、唯一つの有機体でさえもそれが存在することが肯定的結果と考えられなければならない病理学的有機体にとっては特に重要である。即ち、許容誤差０レベルである。本発明の別の有用な用途は、反応生成物が極めて少量しか存在しない場合のハイブリット形成検定の分野である。この場合には個々の結合事象検出が、面倒な増幅技術、例えば、ＲＣＡ、ＮＡＳＢＡ及びＳＤＡの必要性を無くす。臨床的に関連のある検出閾値が、慣用的検定方法により容易に達成されるものよりも低い全ての検定装置は、本発明によって恩恵を蒙る。

【００６０】

局部的読取り領域を与えるための小さなビーム直径を用いた算出法の原理は、図５に例示されている。このビームは、遥かに小さなスポット領域に亙って平均化されると、個々の結合事象に対して極めて高い相対的信号を与える。特に、平行光ビームをラスター（Ｘ－Ｙ）方式で試験片上を走査する。外径（ＯＤ）約２０μのビームを一つの細胞又は細胞群に対し走査し、検出器で受光して、反射光の性質の劇的な変化を証明する。これらの変化の振幅は、例えば、光ビームの大きさ及び（又は）細胞又は細胞群の大きさに依存する。特に、ビームに比較して小さな細胞は、背景光及び検出器増幅に伴われる一般的ノイズ以上に検出することは困難であろう。ビームＯＤ及び細胞径が互いに近くなる程、光学的性質の変化は大きくなる。本発明を適用するための実際的光源には約０．６５０～１．５５０μの範囲のＯＤを有するビーム、即ち、レーザーダイオードが含まれる。レ

ーザーダイオードは小型で、光を操作するのに小さな直径のレンズを用いており、従って、例えば、ベンチトップ、ラップトップ、及び携帯装置のように種々の装置の大きさを容易に与えることができる。更に、ＣＣＤ検出器は、感度を著しく向上する結果を与え、検定操作時間を短くすることができる。従って、ＯＴＥＲと列挙法との基本的差は、用いられる光学的行路である。

【００６１】

一般に、信号検出器は信号キャリヤーの波長で受信できなければならず、系の情報を受信できるように構成されていなければならない。信号検出器には、ＣＣＤカメラ、単結晶珪素検出器、及びダイオード配列検出器が含まれる。ＣＣＤと組合せたエリプソメーターは、全反応領域を見て、それを複数の領域に分割する。従って、否定的領域を除外し、肯定的領域を総計する必要がある。ここに開示した本発明は、反応領域のスポットを拡大し、そのスポットを複数の領域に分割し、個々の結合事象、例えば、ビーズ、細胞、コロニー形成単位を探す。図６は、個々の結合事象の列挙を証明する表面の位相学的解像を描いている。

【００６２】

実際に、個々の又はばらばらの結合事象の同定を近似するためにこの方法を用いるのは、結合事象を表面に亙って積分しないからである。算出法を実施するための鍵は、高度に焦点を合わせた読取りのために信号の個々の領域を分断し、分析し、隔離することができることであり、それによって否定的結果から肯定的結果を分離する能力を増大する。信号解析は、本発明のキャリヤー特性又は検出器特性内で行われる。これらの結果は、一連の個々の信号値として表示され、予め定められた切り捨て点と比較し、それによりどのような局部的読み取り領域内でも肯定的結合事象を決定する。このようにして個々の結合事象を表面上に列挙し、解像力は読み取り領域の大きさによって決定される。真の信号対背景信号即ちノイズの相対的アスペクト比を変化させることは、真の信号を平均する場所の背景の量を変化することを含む。次第に小さくなっていく背景信号について平均化した一定の信号は次第に一層明確になり、個々の信号発生体が容易に列挙されるようになる。

【００６３】

図７及び図８は、現在のＯＴＥＲ装置の構成と、列挙可能装置構成の一つとの差を比較できるように示している。ＯＴＥＲ構成中の交差ビームは、約１３ｍｍ２の表面積〔Ｐｉ＊ｒ２＝ＳＡ（ｍｍ２）＝３．１４１５９×２２＝１２．６５６６ｍｍ２〕を有し、その表面積に亙って肯定的結合事象を平均化する。遥かに小さな直径（即ち、２０μｍ）のビームを使用することによる信号の解析は図８に例示されている。同じ全表面領域に亙って個々の局部的読み取りを行いながら、表面を横切ってビームを走査する。この例では、反応領域は直径２ｍｍであり、走査ビームは直径２０μｍである。標準的換算を用いることにより（図９参照）、全反応領域表面積は３，１４１，５９０μｍ２であるのに対し、小さな走査ビームは、各局部的領域で３１４．１５９μｍ２を読み取る。直径に沿って１００個の測定点があると、２０μｍのビームでは反応領域内に１０，０００個の読み取りが行われる。

【００６４】

各結合事象により固有の信号が発生する。その信号は読み取り領域の減少によって変化することはない。各事象は、ＯＴＥＲ構成の場合と同じ応答を局部的に発生する。しかし、この信号が平均される領域は１０，０００分の１に減少し、従って、この算出装置では背景に対して信号が１０，０００倍に効果的に増幅される。この変化は否定的結果から肯定的結果を区別する能力を膨大に増大し、検定方法の検出下限（検出の化学的感度又は閾値）を１０，０００倍効果的に改良することを意味している。

【００６５】

図９は、ＯＴＥＲ及び列挙法を用いて可能な検出限界に関する予備的計算を示している。選択された特定の数字及び例は、開示に対して意味のあるものではなく、その範囲を限定するものと解釈すべきではない。むしろそれらは二つの方式の間で可能な感度の差の一例としてここに含まれている。列挙法は、単一の結合事象を検出することができ、１００位の僅かな結合事象でも装置及び生物学的ノイズに対し、明確に算出できる肯定的結果を発生する。比較可能な条件下で未増幅ＯＴＥＲシステムで予想される検出限界は２×１０６ｃｆｕ／ｍｌである。増幅によりシステムに量を追加しても、領域平均化の拡張効果のため感度の実質的

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4630

な改良を与える結果にはならない。

【００６６】

信号解析は、検出器でも行うことができる。検出装置により、集合信号を試験片上の個々の領域に関連した個々の情報経路へ、幅の広い又は大きいビームを用いて分割することができる。例えば、ＣＣＤ又はダイオード配列検出器をこのように用いることができる。このような場合には、解析された信号は検出及び報告過程中、個々に比例的に維持されなければならない。拡大、焦点一致、及びキャリヤー：検出器位置制御は、装置全体を通して情報量を維持する方法である。一体的又は単結晶ダイオード検出器を使用することは、信号キャリヤー内で適当な小さな単位へ信号が分割されることを必要とする。

【００６７】

小さなビーム走査方法に対する別の態様は、読取り及び一層小さな個々の信号へレーザービームを解析するためにＣＣＤ又はダイオード配列体を用いることである。この態様の目的は、大きなビームスポット領域内で小さなスポットの応答の決定を維持することである。しかし、この場合、小さな読取り領域の定義（局部的結果）は、交差するビームの直径によって与えられるものではなく、ビームを受ける検出器の構造によって与えられる。更に、光ダイオード配列体、ＣＣＤ又は他の非積分信号受信機のような検出器は、大きなビーム中に含まれる情報を受け、その情報を一層小さな局部的結果として保存し、処理する。これは、特定の検出点として配列体と交差する光が通る経路によって定められる多数の仮想ビームを効果的に生じ、全てが同時に操作される。全ての仮想ビームについての集合信号は、大きなビーム信号に等しく（各仮想ビームは限定された表面領域にしか関係しない）、結果は一緒に積分されることはない。

【００６８】

この方法の利点は、それが迅速に処理（平行信号処理）されることである。走査方法は、各読取りが連続して行われる一連の過程である。更に、この態様を実施するための技術的困難さは、実質的には、小さなビームレーザー及び正確な走査制御機構の開発に含まれているものほどではない。

【００６９】

上で論じたように、この装置内で種々の光学的信号を用いることができる。特定の光学的信号は、検出すべき物質の性質及び希望の解像力に基づき、情報の適当なレベルを与えるように選択する。ここで与える実施例は、エリプソメトリー及び散乱計数法(scatterometry)を用いている。図１１参照。しかし、ここに記載する一般的概念及び方法論を使用することにより種々の光学的方法が実質的に改良される。特に、吸収、屈折率変化、キラル効果、及び回折のような効果を、本質的に同様な光学的構成内で用いることができる。図１２は可能な光学的信号型を列挙しており、従って列挙法に順応できる範囲の方法を示している。それは、その完全なリストを含むものではなく、それを限定するものでもない。

【００７０】

量増大標識は、大きな感度でこの算出法の実施で中心的役割を果たすことができる。図１３及び１４は、信号発生体として用いることができる種々の大きさの材料のアスペクト比、又は相対的高さ：幅：広さを比例的に例示している。これらの図で示したように、小区画式目盛で有機体は装置内で増幅することなく非常に顕著な信号を発生する。比較として読取り領域表面の底に沿って表された薄い付属層は、現在のＯＴＥＲフォーマットでは明確に区別できる信号を生ずる。標識として用いられる遥かに大きな目的物中に含まれる量によって発生する信号は、著しく感度を改良する。

【００７１】

更に、論じたような走査（小さなビーム）又は配列（仮想ビーム）法のいずれに対しても、光学に基づく量検出装置の独特の特性を用いて信号検出性の実質的な改良が可能である。与えられた量増大標識の特別な性質を用いて、光学的特性：屈折率、散乱、キラル効果、一般的吸着、波長比吸収率、及び回折に対するその効果を含めた物理的特性に基づく光学的信号を変化させるのに用いることができる。

【００７２】

独特の又は明確な光学的効果を生ずるように選択された標識を用いることにより、錯体へ標識を結合することにより発生した信号を、表面背景又は特異結合事象が存在しない所で生じた信号から区別する改良された能力を生ずる。これは、

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4632

通常の物質によって生ずる信号よりも、増大又は減衰した見かけの信号の発生により作動する。

【００７３】

図１４は、特にエリプソメトリーフォーマットで高屈折率物質を使用することによるこの種の効果の例を与えている。エリプソメトリーによって検出される偏光状態の変化は、二つの明確な因子（絶対量及び屈折率）により起こされるので、量増大標識として高屈折率物質を用いることは、エリプソメーターにより検出される見かけの量を効果的に増大し、これによって結合事象からの信号を増幅する。

【００７４】

信号の強度を増幅又は増大するか、又は独特の型の信号を生ずるように設計した特別な種類の材料を用いた任意の数の光学的相互作用が想定され、参考としてここに含ませる。

【００７５】

散乱光の検出（散乱計数法）は、目で見て行われるか、又は光電子手段により行われる。目で見て検出する場合、観察者の目及び脳が影像処理工程を行い、それが散乱、即ち特定の場所ではない決定を与える結果になる。ここでの用語「場所(situs)」及び「部位(site)」は、一つのリガンドによって覆われる領域を指す。その場所が周囲の背景よりも明るく見える場合に散乱が観察される。もし部位の数が小さく、恐らく１ダース以下であるならば、処理工程を本質的に同時に行うことができる。もし部位の数が大きい（数百以上）ならば、光電子検出装置が望ましい。

【００７６】

光電子検出装置には、場所による光強度により変調される電気信号を用いたどのような装置でも含まれる。例えば、光ダイオード、帯電結合装置、光トランジスタ、ホトレジスタ、及び光電子倍増管が適切な光電子検出装置である。好ましくは、検出器の配列（ピクセル）は、信号解析のための反応性表面上の部位の配列に相当し、或る検出器は場所外部分に対応する。しかし、入手可能なフレームグラバー及び像処理ソフトウエアーと組合された帯電結合装置（ＣＣＤ）カメラ

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4633

により行われるもののような反応性表面のデジタル表示が一層好ましい。本発明で好ましい像処理法は、ウィンドーズ(Windows)(商標名)のためのイメージ・プロ(Image-Pro)(登録商標名)プラス(Plus)〔メディア・サイバーメトリクス(Media Cybermetrics)〕から誘導される。

【００７７】

ＣＣＤカメラ又はビデオカメラは、全ての標識及び非標識領域を含めた全反応性表面の像を形成し、この像をコンピューターのフレームグラバーカードへ供給する。そのイメージは、各ピクセルに数値を当て嵌めることにより、デジタル情報へフレームグラバーにより変換される。デジタル方式は二元系(例えば、明＝１、暗＝０)にすることができるが、８ビットグレースケールが好ましく、この場合０が黒い像を表し、２５５が白い像を表し、中間の数値は各ピクセルの種々のグレー色調に相当するように数値が各ピクセルに割り当てられている。

【００７８】

データー解析

デジタル情報はモニターに表示するか、又は更に操作するため、例えば、影像印刷及び保存のためにＲＡＭ又は記憶装置に記憶させる。ウィンドーズのためのイメージ・プロ・プラス(ＩＰＰ)のような像処理ソフトウエアーを用いてデジタル情報を分析し、各場所の境界又は輪郭を決定し、各場所での強度値を決定する。ＩＰＰはデジタル像獲得、処理及び分析のための市販ソフトウエアーである。ＩＰＰは像内の目的物を自動的に計算及び測定し、然る後、例えば、角度、面積、長さ、幅、直径、半径、円周、領域又はアスペクト比、色、位置、光学密度、及びホール領域を含めた特性により目的物を分類する。ＩＰＰは目的物の集団内に含まれる目的物の数を推定することもできる。

【００７９】

ＩＰＰは、真のアナライト錯体粒子を他の粒子又は光学的特徴、例えば、塵、非特異結合、固相アノモリー(anomoly)、マスキングから区別するために、特定の一連の機能及び分析を行うようにプログラムすることができる、即ち、ここで論じた目的測定特性を用いて、信号：非信号フィルターを形成することができる。

【００８０】

屡々、像は個々の結合事象を算出するソフトウエアーの能力を改良するため、増強を必要とする。増強法には、例えば輝度：コントラスト調節、及び空間：形態学的フィルターが含まれる。特に像増強には三つの基本的範疇が存在する：強度指数変更、空間フィルター、及び影像頻度操作。

【００８１】

強度指数変更は、各ピクセルの強度値を解釈する仕方の変更に関する。強度指数の態様には、例えば、輝度、コントラスト、ガンマー修正、閾値決定、背景平坦化、背景差引き、強度均等化が含まれる。

【００８２】

空間沪過法は、小さな領域のピクセル内の像を分析し、処理する。特に、像内の強度変化で起きる変化速度を減少又は増大することによる。この沪過には、旋回（線状）及び非旋回（非線状）が含まれる。

【００８３】

像頻度の操作は、像を一組の頻度に変換し、ノイズ問題を起こす頻度を削除することにより像中の周期的又は固有のノイズを除去することに関する。このために用いられる一般的技術は、フーリエ変換である。

【００８４】

必要なデジタル像処理機能は、全てのソフトウエアーに基づく算出工程を半自動的及び（又は）自動的に行うために適合し、それが出来る実験室規模の装置へ統合することも考慮されている。表面像を表示することは本発明の本質的な要素ではない。ソフトウエアー像処理が、完全に像のデジタル化により与えられるデーターを用いて行われることだけが本質的なものである。

【００８５】

米国特許第５，３２９，４６１号明細書に記載されているような発明の集合制御(clustering)法は、種々の用途で本発明と組合せて個々のアナライト粒子又は個々の結合事象を空間的に解像し、計算するために利用するのに適合させることができる。例えば、分子からなるアナライト粒子の検出及び試料の像内の問題の領域の位置を定めるため迅速な走査を行うための労働である。

【００８６】

機械

一般に、調製した試験片を試料台に固定し、対物レンズの中心と試験スポットの中心とが道線状上に来るように手で配置する。試験片は多数の試験スポットを含むように調製し、従って、１、即ち第一のものとして指定した試験スポットを中心へ持ってきて開始する。試料台の平行移動能力を用いて、検出器を手で操作し散乱粒子に焦点を合わせる。次に、光散乱によって生じた像を収集し、保存する。最後に、試料台を二つの交互になった位置、中心の左及び右に夫々一つずつの位置へ移動させ、像の獲得を各場所で繰り返す。検出工程では、一般にここに記載した夫々の工程を、試験片に含まれるどのような数の試験スポットに対しても繰り返すことができる。

【００８７】

ここに記載した算出法で用いられる機械は、試料台、固定アナライト錯体に対応する光学的信号フォーマット、及びデーター収集及び分析のための機構の３つの規定モジュールからなる。各モジュールは少なくとも二つの軸上で独立に平行移動するのに適合し、それにより最適光学的効果、配列、及び焦点の一致を促進する。機械及びそのモジュールは、例えば、固体平面状水平プラットホームへの標準的取付け手段により互いに対し静止するように全て固定されている。図１５に示したように、特に算出装置１００は、コンピューター８０及び試料台１０と機能的に組合されたビデオ表示端子６０から本質的になるデーター収集のための機構及び分析器８５；及び信号キャリヤー４０及び光散乱標識のような信号発生体が照射された時に算出装置１００によって検出できるように構成された信号検出器２５から本質的になる光学的信号フォーマットからなる。

【００８８】

試料台１０は、取付けジグ１５を上に乗せ、固定するために適合するどのような平らな台、即ちプラットホームでもよく、その上に試験片７０を乗せて取付けジグ１５へ固定する。試験片７０は、両面接着テープ又は機械的取付け手段のような適当な手段により固定することができる。前記台１０は、少なくともＸ－Ｙ軸に沿って平行移動し、好ましい態様として、付加的に回転及び角度の制御機能

を有する。試験片７０は、更にここに記載するように調製された試験スポットを有する。

【００８９】

光学的信号フォーマットは、ここに記載するような試験スポットに結合された光散乱標識のような信号発生体、信号キャリヤー４０、及び信号検出器２５からなる。好ましい態様として、信号キャリヤー４０は電磁波源であり、一層好ましくは回転及び角度制御機能の両方を有するように適合取付けされたレーザーダイオードである。信号検出器２５、一体的に接続された顕微鏡焦点管３０、及び光検出器と機能的に接続された対物レンズ２０、及び好ましくはＣＣＤカメラ５０が、標準的取付け手段により、試料台１０の垂直上に配置されている。信号検出器２５は、標準的手段によりＰＣ８０及びビデオ表示端子６０からなるデーター収集及び分析機構８５と機能的に接続されており、従ってそれらの各々は適当なソフトウエアー及びエレクトロニクスが装備されている。

【００９０】

使用する際、ＰＣ８０及びビデオ表示端子６０、及び信号キャリヤー４０に電力を入れ、少なくとも３０分間ウォームアップする。装置をウォームアップしながら、試験片７０を取付けジグ１５に接着し、そのシグを今度は試料台１０へ直接固定し、信号検出器２５の垂直下に来るようにする。目的アナライトが結合された試験片７０の試験スポットを、次に中心に持って行き、信号検出器２５と信号キャリヤー４０との間に配列し、焦点を結ばせる。算出機１００を連動させ、像を得、示し且つ（又は）それによって記憶する。試験片７０は、ここに記載したように試験スポットの右及び左に付加的像捕捉のために配列しなおす。算出装置１００と像捕捉との噛み合わせを、試験片７０の試験スポットの各々について同様なやり方で繰り返す。

【００９１】

算出装置１００のその噛み合わせの前に、適当なソフトウエアーの製造を行なう。例えば、サブホールダー、省略時設定、及びマクロを組み立てる。

【００９２】

一般に表面結合微小球により散乱された光を、顕微鏡対物レンズにより、収集

拡大し、ＣＣＤ配列体、例えば６４０×４８０ピクセル上に焦点を結ばせる。ＣＣＤ信号出力を白黒モニター、及びデーター・トランスレーション(Data Translation)ＤＴ３１５５高精度科学フレームグラバー（データー・トランスレーション社）のようなデーター翻訳フレームグラバーの両方に送る。散乱光により形成された像の獲得及び分析は、そのような機能に適合し且つ（又は）特別に関連したソフトウエアー、例えばイメージ・プロ・プラス（メディア・サイバネテクス）によって達成される。

【００９３】

像内の散乱目的物の区別及び計数を含むデーター分析は、そのような目的のために設計されたソフトウエアーにより達成される。そのようなソフトウエアー中へ、例えば、マクロプログラムにより適合される注文された機能には、フィルター、像強度平均化、及び二元フィルターにより目的物計数から非結合事象を排除することが含まれる。本発明の好ましい態様で用いるのに適合したマクロの例には次のものが含まれる：光輝散乱目的物の標準３×３クロス(cross)への変換；散乱目的物を分離するための分岐点フィルターの得られるクレス(cress)への適用；平均像強度及びその平均の標準偏差の決定；平均像強度に基づく二元フィルターのための下限強度閾値の決定；下限の閾値を有する二元フィルターの適用；及び平均直径、例えば１０ピクセル未満の得られた目的物の自動計数。各像について計算された目的物の数を、各々試験スポットについて生じた三つの像（中心、左及び右）についての平均する。

【００９４】

例１：特異結合検定

全ウエーハ試験片の調製．　用いた試験片は市販の５’珪素（Ｓｉ）ウエーハであった。標準回転被覆法を用いてウエーハの反射性表面上にポリウレタンを置くことにより薄層ポリウレタン被覆ウエーハを製造した。簡単に述べると、それらウエーハは、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡＣ）〔シグマ・ケミカル社(Sigma Chemical Co.)〕中に入れたポリメディカ(Polymedica)Ｍ１０２０ポリウレタン〔ポリメディカ社(Polymedica, Inc.)〕の完全に混合した１．２５％溶液５００μｌを、５０００ｒｐｍで回転する珪素ウエーハ〔アディソン・エンジ

ニアリング(Addison Engineering)〕の中心へ添加することにより調製した。ウエーハを空気乾燥し、次に７０℃で１６～２０時間焼き付けた。次にＲＴＶ１０８シリコーンゴム接着密封材〔ＧＥシリコーンズ社(GE Silicones, Inc.)〕を被覆した３．５″×３．５″ゴムスタンプを用いて非反射性ウエーハ表面に１０サークル(circle)×１０サークル模様を適用した。得られた円状輪郭は、各円状ポリウレタン被覆試験スポット（～０．２５″直径）を分離する手段として働いた。接着剤を室温で約２４時間硬化した後、検定に使用した。

【００９５】

ビオチニル化表面へのストレプタビジン(Streptavidin)被覆微小球の吸着.

ポリウレタン被覆ウエーハ試験スポットの各々を、１μｇ／ｍｌのビオチニル化ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）（シグマ・ケミカル社）の２０μｌで被覆するか、又は別法として否定対照(negative control)として用いるために非ビオチニル化ＢＳＡで被覆した。ウエーハを３７℃で１時間、湿度１００％の室内で保温した。保温後、ウエーハを脱イオン水で３回濯ぎ、圧縮空気で乾燥した。ＢＳＡ固定後、試験スポットを３％のＢＳＡ３０μｌで１時間３７℃でブロックし、次に脱イオン水で３回濯ぎ、圧縮空気で乾燥した。

【００９６】

ストレプタビジン被覆ポリスチレン微小球（直径３５０ｎｍ）〔バングス・ラボラトリーズ(Bangs Laboratories)〕を連続的に硼酸塩緩衝液〔０．１Ｍ、ｐＨ８．５＋０．０１％トウィーン(Tween)－２０〕中で希釈し、得られる希釈範囲を１：１０～１：１０，０００にした。次に各希釈物２０μｌをビオチニル化及び非ビオチニル化試験スポットへ適用し、そのウエーハを３７℃で１時間保温し、脱イオン水で１０秒間濯ぎ、圧縮空気で乾燥し、ここに記載した本発明で分析した。その結果を表Ｉに示す。これらのデーターは、表面に結合した光散乱標識を、本発明を用いて検出し、算出することができること；ストレプタビジン被覆微小球はビオチニル化表面に特異的に結合すること；及び表面上で計算された微小球の数は、表面に適用された数に依存することを示している。

【００９７】

例２：ぶどう球菌エントロトキシンＢ（ＳＥＢ）検出検定

全ウエーハ試験片の調製．　用いた試験片は市販の５’珪素（Ｓｉ）ウエーハであった。標準回転被覆法を用いてウエーハの反射性表面上にポリウレタンを置くことにより薄層ポリウレタン被覆ウエーハを製造した。簡単に述べると、それらウエーハは、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡＣ）（シグマ・ケミカル社）中に入れたポリメディカＭ１０２０ポリウレタン（ポリメディカ社）の完全に混合した１．２５％溶液５００μｌを、５０００ｒｐｍで回転する珪素ウエーハ（アディソン・エンジニアリング）の中心へ添加することにより調製した。ウエーハを空気乾燥し、次に７０℃で１６～２０時間焼き付けた。次にＲＴＶ１０８シリコーンゴム接着密封材（ＧＥシリコーンズ社）を被覆した３．５″×３．５″ゴムスタンプを用いて非反射性ウエーハ表面に１０サークル×１０サークル模様を適用した。得られた円状輪郭は、各円状ポリウレタン被覆試験スポット（～０．２５″直径）を分離する手段として働いた。接着剤を室温で約２４時間硬化した後、試験片上に試験スポットを取付け、検定に使用した。

【００９８】

ＳＥＢ検出．　完全サンドイッチ検定を、試料緩衝液中のＳＥＢを検出するために用いた。一般的プロトコルは、捕捉抗体を個々の試験スポットへ被覆し、ブロッキングし、種々の濃度のＳＥＢを被覆試験スポットへ添加し、ビオチニル化二次応答抗体を適用し、結合二次抗体をアビジン化ポリスチレン微小球で標識付けすることからなっていた。

【００９９】

試験ウエーハを、各々検定試験スポットへ３０μｇ／ｍｌ（０．１Ｍ　ＰＢＳ中、ｐＨ７．２）溶液を２０μｌ適用することにより多クローン性∝－ＳＥＢ捕捉抗体で被覆した。ウエーハを３７℃で１時間保温し、捕捉抗体をポリウレタンへ受動吸着させた。保温後、ウエーハを脱イオン水で３回濯ぎ、圧縮空気で乾燥した。

【０１００】

捕捉抗体固定後、後の検定工程での非特異性蛋白質吸着を減少させるため、各試験スポットを３％ＢＳＡ溶液（０．１Ｍ　ＰＢＳ、ｐＨ７．２）４０μｌでブロックした。ウエーハを３７℃で１時間保温し、次に脱イオン水で３回濯ぎ、圧

縮空気で乾燥した。

【０１０１】

ＳＥＢ試料を、１ｍｇ／ｍｌストックを試料緩衝液（０．１Ｍ　ＰＢＳ＋１％ＢＳＡ＋０．０１％トウィーン−２−、ｐＨ７．２）中へ連続的に希釈することにより調製し、最終的トキシン濃度を０．１ｎｇ／ｍｌ〜１００ｍｇ／ｍｌの範囲にした。ＳＥＢを含まない緩衝液を否定対照として用いた。ウエーハ表面を横切って別々の試験スポットへ希釈物及び否定対照の各々を２０μｌ適用した。ウエーハを３７℃で３０分間保温し、次に脱イオン水で３回濯ぎ、圧縮空気で乾燥した。

【０１０２】

ビオチニル化∝−ＳＥＢ抗体を試料緩衝液中に入れて４μｇ／ｍｌに希釈した。各試験スポットをこ二次抗体希釈液２０μｌで被覆した。ウエーハを３７℃で３０分間保温し、次に脱イオン水で３回濯ぎ、圧縮空気で乾燥した。

【０１０３】

ストレプタビジンを被覆した直径３５０ｎｍのポリスチレン微小球を硼酸塩緩衝液（０．１Ｍ、ｐＨ８．５＋０．０１％トウィーン−２０）中に１：１００に希釈したものを２０μｌ試験スポットに被覆した。そのウエーハを３７℃で３０時間保温し、次に各試験スポットを１０秒間濯ぎ、圧縮空気で乾燥し、分析した。その分析結果を表IIに示す。これらのデーターは、本発明を用いて、抗体の固相への結合を特定の定量的やり方で算出するのに用いることができることを示している。この方法の検出下限は５５０ｐｇ／ｍｌであった。

【０１０４】

ここに一般的に記述したように、データー取得及び分析を行なった。ウエーハ又は試験片を台の上に取付け、位置を定め、焦点を結び、像を捕捉した。データー分析は、イメージ・プロ・プラス内でマクロプログラムを用いることを含んでいた。

【０１０５】

上の記述は多くの特殊性を含んでいるが、これらの特殊性は本発明の範囲を限定するものと考えるべきではなく、むしろその好ましい態様の例示と考えるべき

である。即ち、本発明の前記記載は、例示及び説明のための見本である。本発明の本質及び範囲から離れることなく、本発明を種々の用途及び条件に適合させるために本発明に種々の変化及び修正を当業者は行うことができる。そのようなものとして、それらの変更及び修正は適切に、正当に特許請求の範囲と同等の全範囲内に入るものと考えられる。従って、本発明の範囲は、ここに与えた実施例によるものではなく、特許請求の範囲及びその合法的な同等ものによって決定されるべきである。

【０１０６】

表Ｉ

ビオチニル化表面へのビーズの特異的吸着

ビーズ希釈	＃目的物： ビオチニル化表面	＃目的物： 非ビオチニル化表面
1:10	2263	201
1:100	2019	27
1:500	1375	9
1:1000	849	13
1:10,000	115	8

【０１０７】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4642

表II

ＳＥＢ検出検定

ＳＥＢ濃度(ng/ml)	＃目的物	標準偏差
0	62	5
0.1	72	12
0.5	121	10
1	203	51
10	906	281
100	1800	353

【図面の簡単な説明】

【図１】

標準免疫検定法での単位体積当たりの量の決定を例示する図である。

【図２】

検定領域に亙って行われる光学的平均化の図である。

【図３】

高度に不均質な検定領域積分を表す図である。

【図４】

わずかな数の結合事象を大きな検定領域に亙って平均した場合の統計的無意味への帰結を例示する図である。

【図５】

個々の結合事象に対し大きな相対的信号を与える小さなビームのエリプソメトリー又は散乱計数法を示す図である。

【図６】

表面解像し、それにより個々の結合事象の同定に近似させる方法論的アプローチを例示する図である。

【図７】

集合応答のレーザー決定法を例示する図である。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4643

【図８】

個々の細胞規模の読取りを決定するための走査マイクロレーザー構成の図である。

【図９】

検出に関連した相対的大きさを例示する図である。

【図１０】

レーザービームを個々の信号に解析するのに用いられるＣＣＤ及び（又は）ダイオード配列ビームの図である。

【図１１】

検出及び解像目的に有用な種々の光学的信号を示す図である。

【図１２】

光学的信号フォーマット：過去、現在及び未来の例を示す。

【図１３】

可能な走査マイクロレーザー構成の規模を例示する図である。

【図１４】

光学的増大ポテンシャルの図である。

【図１５】

本発明の好ましい機械の態様を例示する図である。

【図１】

集合体対走査エリプソメトリー

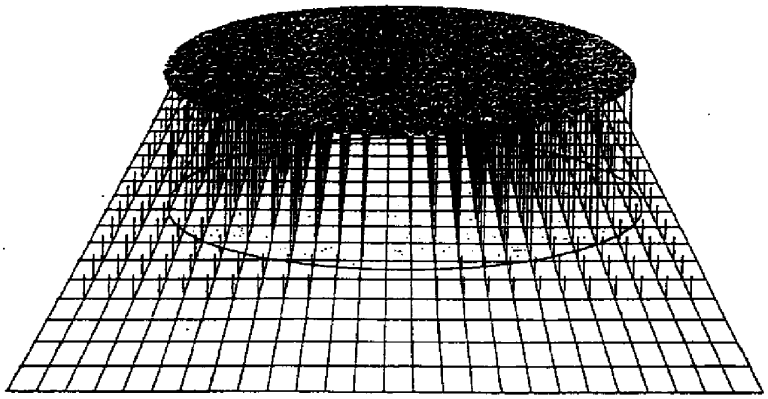
Aggregate vs Scanning Ellipsometry Innovation Group

標準 免疫検定用

Standard Immunoassay Use

単位体積当りの量(例えば"mg/ml)又は当量(例えば"IU)の決定

Determination of mass per unit volume (eg. ng/ml) or equivalent (eg. IU)



The effect of the use of a single large beam (in this case approx. 2mm) for reading the surface is the production of a single result representing the mass change effects of all binding events within the spot area.

表面読取りのための単一の大きなビーム(この場合には約2mm)を使用する効果は，スポット領域内の全ての結合事象の質量変化効果を表す単一結果を生ずる事である。

【図２】

集合体対走査エリプソメトリー

~~Aggregate vs. Scanning Ellipsometry~~

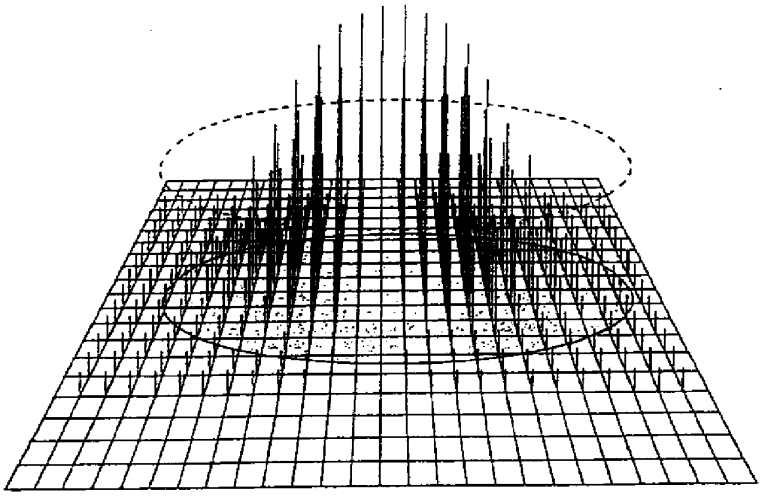
Innovation Group

標準免疫検定用

~~Standard Immunoassay Use~~

単位体積当りの量(例えばng/ml)又は当量(例えばIU)の決定

~~Determination of mass per unit volume (eg. ng/ml) or equivalent (eg. IU)~~



~~The idealized model for this method is the optical averaging occuring over the entire read area (in this case represented by an approx. normal distribution of binding events over the spot area).~~

この方法の理想化したモデルは,全読取り領域(この場合にはスポット領域上の結合事象のほぼ正規分布によって表わされる)上で行われる光学的平均化である。

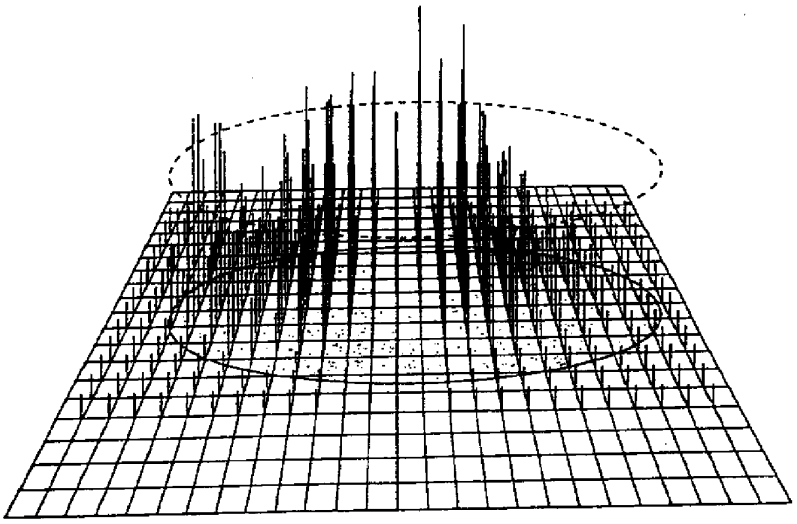
【図３】

集合体対走査エリプソメトリー
Aggregate vs. Scanning Ellipsometry

Innovation Group

標準免疫検定用
Standard Immunoassay Use

単位体積当りの量(例えば ng/ml)又は当量(例えば IU)の決定
Determination of mass per unit volume (eg. ng/ml) or equivalent (eg. IU)



In virtually all cases the binding distribution over the spot area is actually highly inhomogenious. The advantage of this method is that it inherently integrates all of the binding events within the spot area, without regard to their distribution.

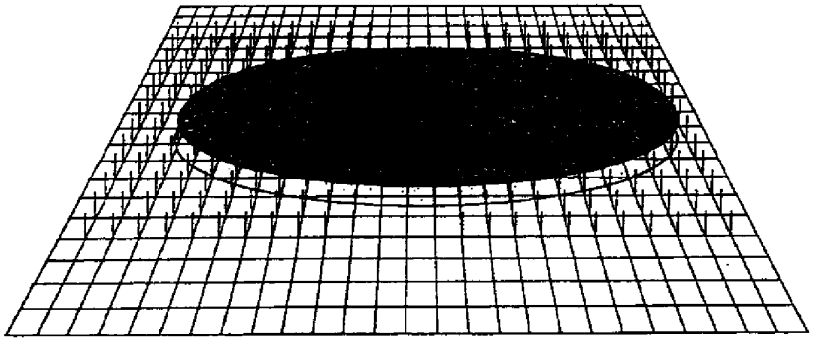
実際に全ての場合で、スポット領域上の結合分布は、実際に極めて不均一である。この方法の利点は、それらの分布には無関係に、スポット領域内の結合事象の全てを本来積分することである。

【図４】

集合体対応型エリプソメトリー
~~Aggregate vs. Scanning Ellipsometry~~

Innovation Group

標準免疫検定用
~~Standard Immunoassay Use~~
単位体積当りの量(例えばmg/ml)又は当量(例えばIU)の決定
~~Determination of mass per unit volume (eg. ng/ml) or equivalent (eg. IU)~~



~~The disadvantage is that very small or very sparce binding events tend to be statistically reduced to insignificance when averaged over this relatively large spot area.~~

欠点は，非常に小さな、又は非常にまばらな結合事象は，この比較的大きなスポット領域に亘って平均すると統計的に無意味な事になってしまう傾向があることである。

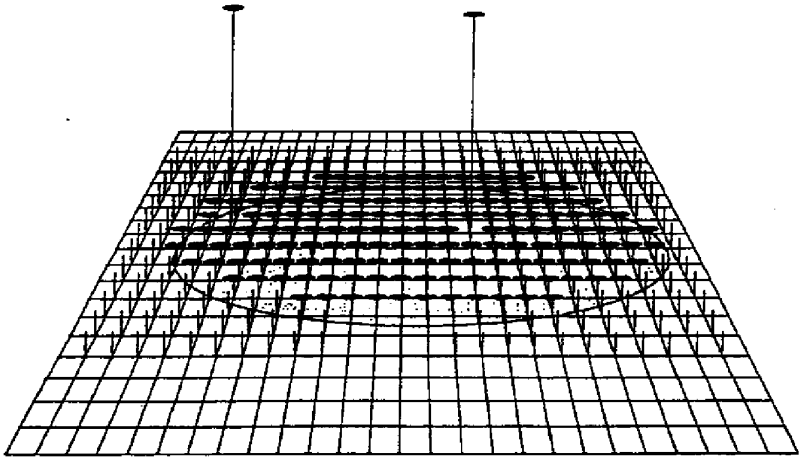
【図５】

集合体対走査エリプソメトリー
~~Aggregate vs. Scanning Ellipsometry~~

Innovation Group

新規な微生物学的用途
~~New Microbiological Use~~

個々の結合事象又はCFUの決定
~~Determination of individual binding events or CFUs~~



A scanning ellipsometric method or scatterometric method or both, when used with a very small beam diameter (in this case 20um) can provide a vastly higher relative signal for discreet binding events (that is as averaged over a much smaller spot area).

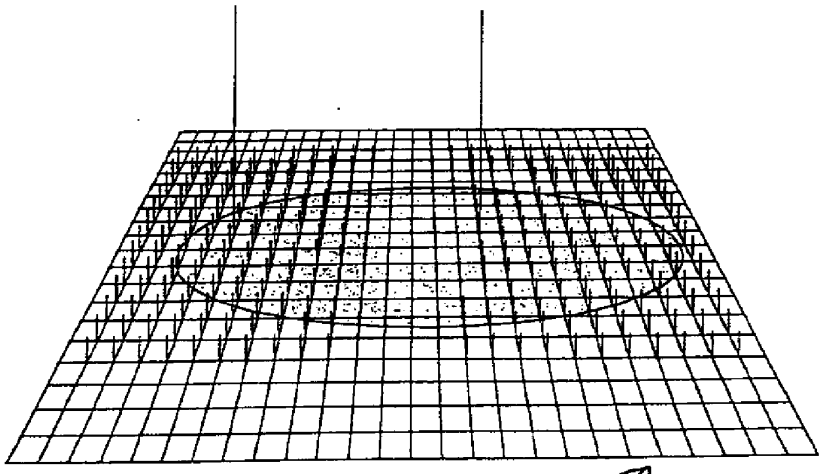
走査エリプソメトリー法又は散乱計測法、又はその両方は、非常に小さなビーム直径(この場合には20μm)で用いること、個々の結合事象に対し、極めて高い相対的信号(即ち、はるかに小さな又ポット領域に亘って平均して)を与えることができる。

【図６】

集合体対走査エリプソメトリー
~~Aggregate vs. Scanning Ellipsometry~~

Innovation Group

新規な微生物学的用途
~~New Microbiological Use~~
個々の結合事象又はCFUの決定
~~Determination of individual binding events or CFUs~~



This approach allows for the surface to be ~~[illegible]~~ resolved as a type of topology. It is, in fact, because the binding events are not integrated over the surface that this method can be used to approximate individual or discreet binding event identification (depending upon the diameter of the beam used).

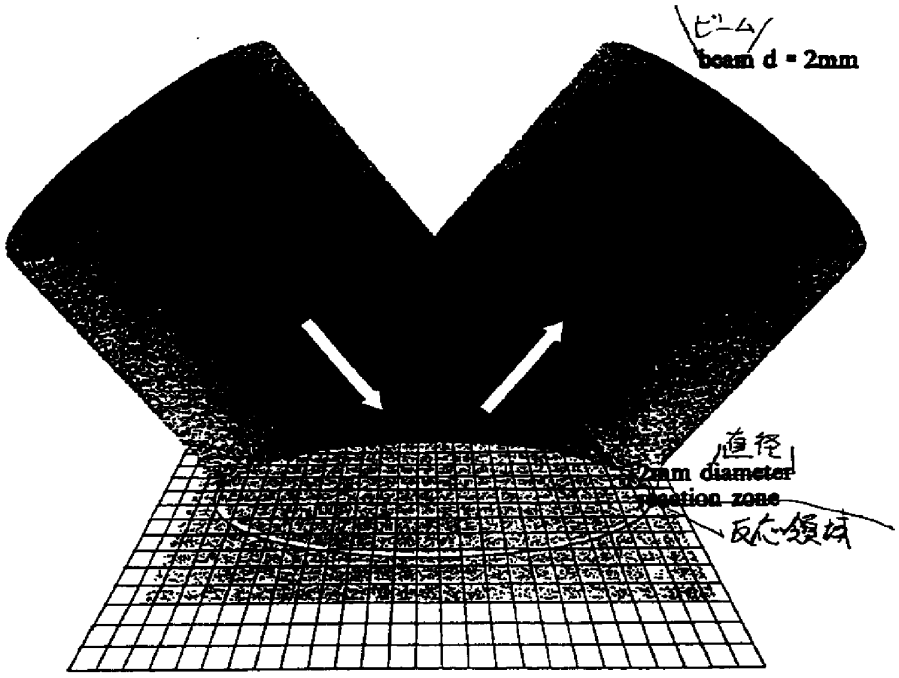
この方法は，表面を一種のトポロジーとして解像できるようにする。実際，この方法も用いて個々のそはばらばらの結合事象の同定（使用するビームの直径に依存して）の近似値も求めるのに用いることができる。

【図７】

集合体対走査エリプソメトリー
Aggregate vs. Scanning Ellipsometry

Innovation Group

現在のOTERレーザー構成
Current OTER Laser Configuration
Determination of aggregate response over the beam spot area
ビームスポット領域に亘る集合体応答の決定



pi_{r^2} = SA (in mm^2) = 3.14159 x 1^2 = 3.14159 mm^2

【図８】

集合体対走査エリプソメトリー

~~Aggregate vs. Scanning Ellipsometry~~

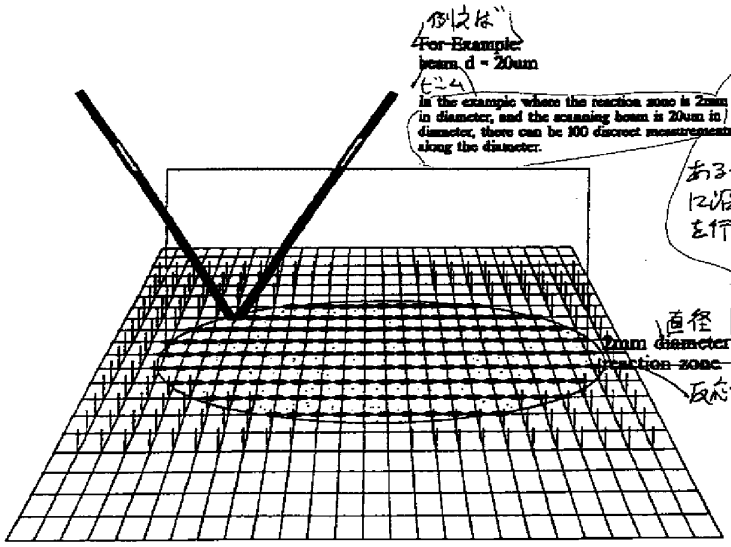
Innovation Group

走査マイクロレーザー構成

~~Scanning Micro-Laser Configuration~~

~~Determination of individual cellular-scale readings~~

個々の細胞規模の読み取りの決定



10,000 A = 1um

1,000um = 1mm

~~Angstrom Unit = 3.937x10^-9 inch, 1x10^-10 meters, 1x10^-4, microns, 0.1 milli-micron (micro-millimeter)~~

~~Micron = 3.937x10^-5 inch, 0.039370 mil, 1x10^-6 meter, 0.001 millimeter, 1x10^4 Angstrom units~~

Å単位

1μ　1ミル　1mm　1m　1μ　1mμ　1μmm　Å単位

1 mm² = 1,000,000 mm²

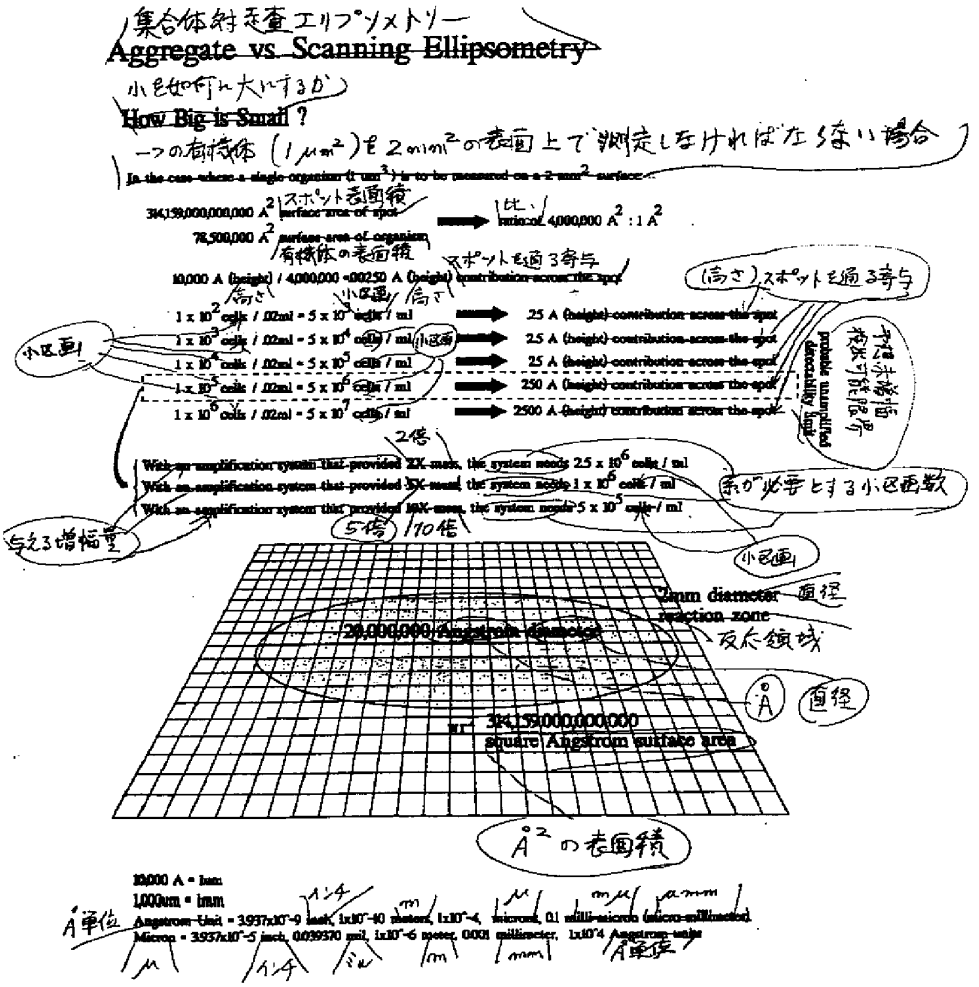
~~Reaction zone SA = 3,140,590 mm²~~ 反応領

~~Scanning beam reads 314,159 mm²~~ 走査ビーム読取り

~~Thus a 20um beam can make 10,000 discreet readings within the reaction zone~~

従って，20μmのビームは，反応領域内で10,000個の読み取りを行うことができる。

【図９】


集合体対走査エリプソメトリー
Aggregate vs. Scanning Ellipsometry
小ビは何ㇾ大いするか
How Big is Small ?
一つの有機体(1μm²)を2mm²の表面上で測定しなければならない場合
In the case where a single organism (1 um²) is to be measured on a 2 mm² surface...
314,159,000,000,000 A² surface area of spot
スポット表面積
比、
ratio of 4,000,000 A² : 1 A²
78,500,000 A² surface area of organism
有機体の表面積
10,000 A (height) / 4,000,000 =.00250 A (height) contribution across the spot
スポットを通る寄与
高さ
小区画
1 x 10² cells / .02ml = 5 x 10⁴ cells / ml
1 x 10³ cells / .02ml = 5 x 10⁵ cells / ml
1 x 10⁴ cells / .02ml = 5 x 10⁶ cells / ml
1 x 10⁵ cells / .02ml = 5 x 10⁷ cells / ml
1 x 10⁶ cells / .02ml = 5 x 10⁸ cells / ml
25 A (height) contribution across the spot
250 A (height) contribution across the spot
2500 A (height) contribution across the spot
2倍
With an amplification system that provided 2X more, the system needs 2.5 x 10⁶ cells / ml
With an amplification system that provided 5X more, the system needs 1 x 10⁶ cells / ml
With an amplification system that provided 10X more, the system needs 5 x 10⁵ cells / ml
5倍
10倍
与える増幅量
必要とする小区画数
小区画
2mm diameter reaction zone
直径
反応領域
20,000,000 Angstrom diameter
Å
直径
314,159,000,000,000 square Angstrom surface area
Å² の表面積
10,000 A = 1um
1,000nm = 1mm
Angstrom Unit = 3.937x10⁻⁹ inch, 1x10⁻¹⁰ meters, 1x10⁻⁴ microns, 0.1 milli-micron (micro-millimeter)
Micron = 3.937x10⁻⁵ inch, 0.039370 mil, 1x10⁻⁶ meter, .0001 millimeter, 1x10⁻⁴ Angstrom units
Å単位
インチ
m
μ
mμ
μm
mm
Å単位
μ
インチ
mm
m

【図１０】

走査対配列体エリプソメトリー

Scanning vs. Array Ellipsometry

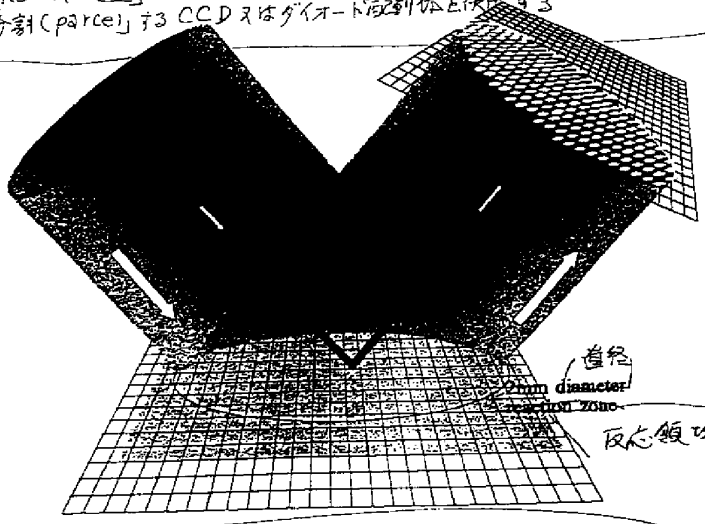
Innovation Group

An alternative to the small beam "Scanning" approach is the use of a CCD or diode array to read and "parce" the larger laser beam into smaller discreet signals.

大きなビームスポット領域内で小さなスポット応答の決定

Determination of small spot response within the large beam spot area

小ビーム「走査」方法の別法は，大きなレーザビームを読み取り小さな個々の信号へ「分割(parce)」するCCDまたはダイオード配列体を使用する



This effectively creates a "virtual" beam (defined by the path that the light intersecting the array at a specific dection point has taken).

The aggregate signal for all virtual beams equals the large beam signal, but each virtual beam references only a limited surface area. The virtual beam approach may be subject to greater error than the small beam approach, due in part to the potential for signal mixing across the array, however it allows for a major increase in sensitivity over the large beam approach.

これは(特定の検出点で配列体と交差する光が通る光路により定められる)「仮想」ビームも効果的に生ずる。

全ての仮想ビームについての集合信号は，大きなビーム信号と等しいが各仮想ビームに限定された表面域だけに関する。仮想ビーム方法は配列体を通る信号混の可能性のため，小さなビーム法よりも大きな誤差を生じ易いが，大きなビーム法よりも感度を大きくすることができる

【図１１】

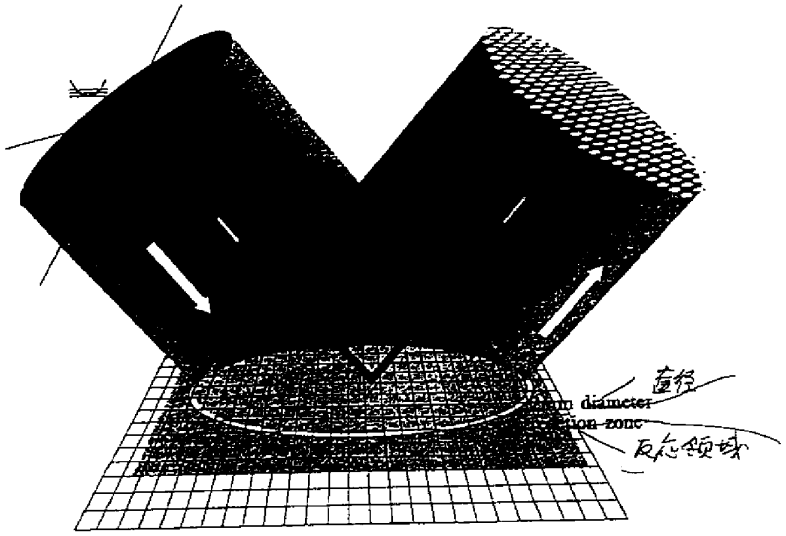
種々の光学的信号フォーマット

Various Optical Signal Formats

Innovation Group

特定の光学的信号は、検出される材料の性質及び希望の解像力に基き、適当なレベルの情報を与えるように選択できる。

The specific optical signal can be selected so as to provide the appropriate level of information, based upon the nature or the material to be detected, and the resolution desired.



A variety-of-optical signals may be used within this system.

The examples provided in this discussion use ellipsometry as the example optical method. However it is expected that a variety of optical methods will be substantially improved by adopting the general approach described here. In particular we have demonstrated that scattering methods will form the basis of one class of instruments that is distinct from ellipsometry. Other effects such as absorption, refractive index change, chiral effects, and diffraction may be used within an essentially similar optical configuration, and may provide particular and significant benefits.

この方式で種々の光学的信号を用いることができる。

本明細書で与える例は、光学的技法の例としてエリプソメトリーを使用しているが、ここに記載した後の光学的方法を適用することにより種々の光学的方法を実質的に改良することが予想される。特に我々は散乱法が、エリプソメトリーとは区別される計器の基礎になることを示した。吸収、屈折率変化、キラル効果及び回折のような他の効果を本質的に同様な光学的構成で用いることができ、特別な重要な利点を与える。

【図１２】

光学的信号フォーマットの例

Examples of Optical Signal Formats

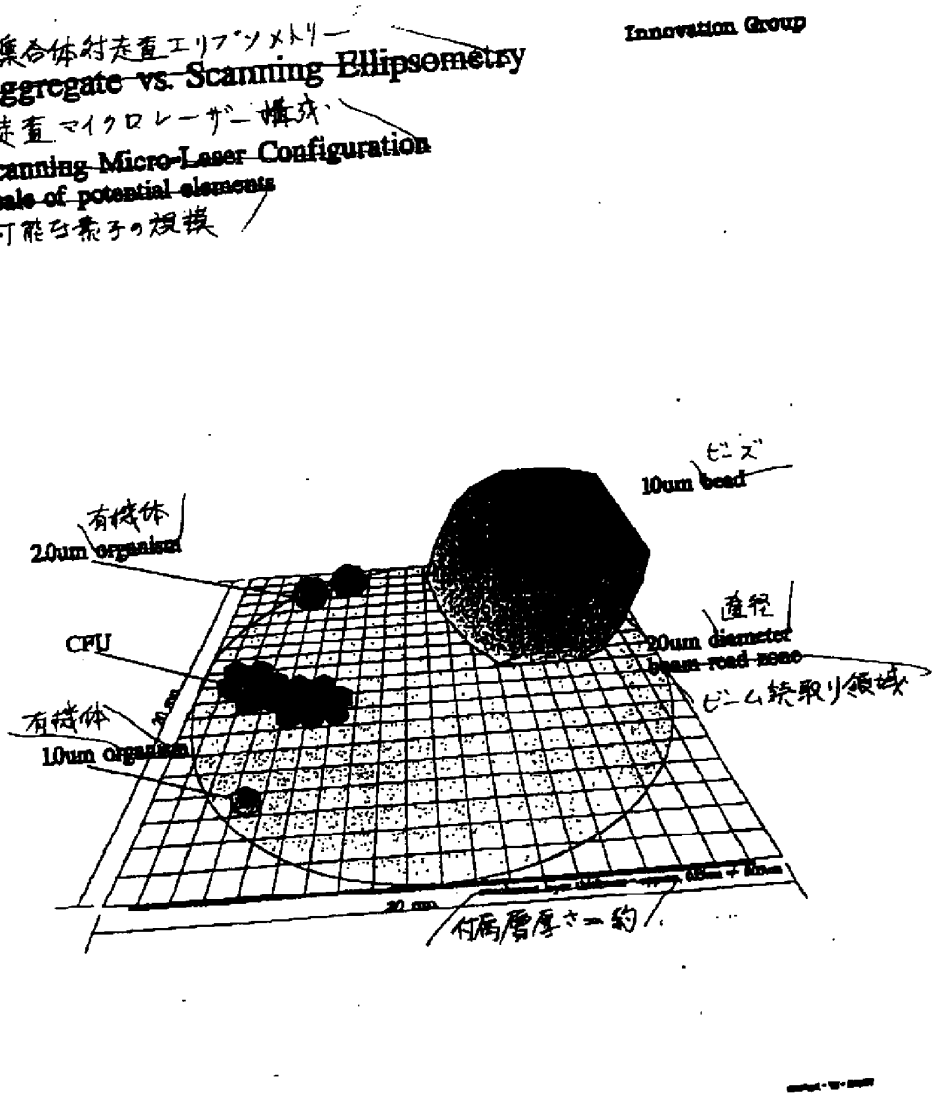
Innovation Group

Principle 原理	Label Type 標識	Instrument 装置	DDx Status 状態
Scatter 散乱	polymer beads 重合体ビーズ silica beads シリカビーズ magnetic beads 磁気ビーズ	nephelometry 散乱計測法	demonstrated デモンストレート
Optical absorption 光学的吸収	colloidal gold コロイド金 magnetic beads 磁気ビーズ	reflectometry 反射計 photometry フォトメトリー	scheduled 計画済
Change in polarization state 偏光状態の変化	polymer beads 重合体ビーズ silica beads シリカビーズ	ellipsometry エリプソメトリー（補正器使用） (with compensator) polarimetry (wout compensator) 偏光法（補正器使用）	scheduled 計画済
Change in refractive index 屈折率変化	high refractive index or optically active materials 高屈折率又は光学的活性物質	ellipsometry (with compensator) エリプソメトリー（補正器使用） polarimetry (wout compensator) 偏光法（補正器使用）	scheduled 計画済
Chiral effects キラル効果	auto dyes アゾ染料 chiral compounds キラル化合物		envisioned 予定
Diffraction effects 回折効果	patterned surface パターン化表面	interferometry 干渉法	envisioned 予定
Spectroscopic effects 分光効果	wavelength selective materials 波長選択性物質	spectrometer 分光法	envisioned 予定

Signal reception techniques might include:
single diode detector - e.g. scanning (small beam method)
diode array detector - e.g. array (virtual beam method)
CCD detector - e.g. array (virtual beam method)

信号受信法には次のものが含まれるであろう：
単一ダイオード検出器、例えば走査（小ビーム法）
ダイオード配列検出器、例えばアレー（仮想ビーム法）
CCD 検出器、例えばアレー（仮想ビーム法）

【図１３】


集合体対走査エリプソメトリー
Aggregate vs. Scanning Ellipsometry
Innovation Group
走査マイクロレーザー構成
Scanning Micro-Laser Configuration
Scale of potential elements
可能な素子の規模
ビーズ
10um bead
有機体
2.0um organism
直径
20um diameter
CFU
ビーム読取り領域
有機体
10um organism
付属層厚さ一約

【図１４】

光学的増強のための可能性

Potential for Optical Enhancement

Innovation Group

走査(小ビーム)又はアレー(仮想ビーム)法のいずれについても信号検出能力の実質的な向上は、光学的な物質量捕捉装置の特性を用いることにより可能と行う。

For either the Scanning (small beam) or the Array (virtual beam) approach, a substantial improvement in signal detectability may be possible by using unique characteristics of optically based mass detection systems.

質増大標識の性質は多数の物理的特性による光学的信号を変化することができ、次のものが含まれる：

Properties of the mass enhancement label may alter the optical signal due to a number of physical characteristics, including:

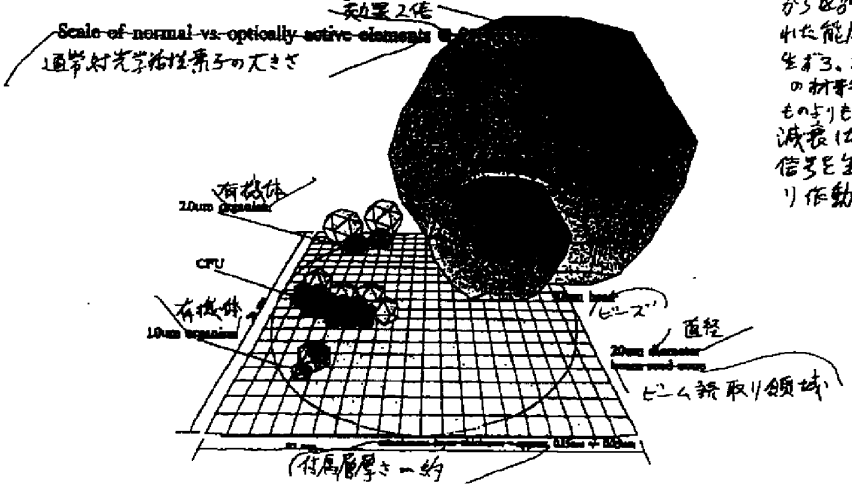
- refractive index 屈折率
- scatter 散乱
- chiral effect キラル効果
- general adsorption 一般的吸着
- wavelength specific adsorption 波長比吸着率
- diffraction 回折

effectively creating an improved ability to discriminate the signal generated by the binding of the label to the complex from that created by surface background or in the absence of specific binding events. This may operate through the creation of an enhanced or attenuated "apparent" signal over that which would be created by "normal" materials.

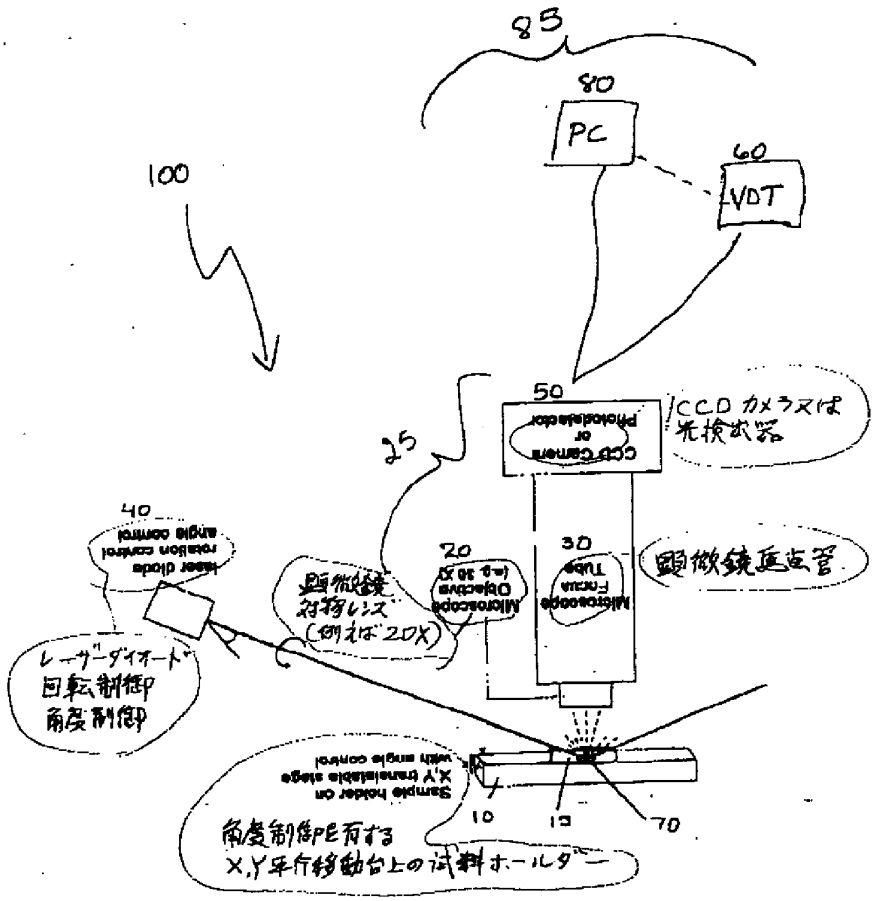
標識の錯体への結合により発生した信号を、表面背景により、又は特異結合事象が無い場合に生ずるものから区別する改良された能力と効果的に生ずる。これは「通常」の材料により生ずるものよりも増大した又は減衰した「見掛け」の信号を生ずることにより作動する。

効果と低

通常対光学活性素子の大きさ



【図１５】


85
80
PC
60
VDT
100
50
CCD Camera or Photodetector
CCDカメラまは光検出器
25
40
laser diode rotation control angle control
レーザーダイオード回転制御角度制御
顕微鏡対物レンズ(例えば20X)
20
Microscope Objective (e.g. 10 X)
30
Microscope Focus Tube
顕微鏡直筒
Sample holder on X,Y translatable stage with angle control
角度制御Pを有するX,Y平行移動台上の試料ホールダー
10
15
70

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

rnational application No.
PCT/US99/10917

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) :Please See Extra Sheet.
US CL :Please See Extra Sheet.
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)

U.S. : Please See Extra Sheet.

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

NONE

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

WEST, STN, EAST

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4,521,522 A (LUNDSTROM et al.) 04 June 1985 (04.06.85), col. 1, line 52-col. 2, line 45.	1-18
Y	US 4,508,832 A (CARTER et al.) 02 April 1985 (02.04.85), col. 5, line 30-col. 7, line 15.	1-18
A	US 5,017,009 A (SCHUTT et al.) 21 May 1991 (21.05.91), col. 3, line 10-col. 4, line 50.	1-18
A	US 4,876,208 A (GUSTAFSON et al.) 24 October 1989 (24.10.89), col. 2, lines 15-55.	1-18
A	US 5,496,701 A (POLLARD-KNIGHT) 05 March 1996 (05.03.96), col. 2, line 1-col. 3, line 14.	1-18
A	US 5,622,868 A (CLARKE et al.) 22 April 1997 (22.04.97), col. 2, line 1-col. 3, line 35.	1-18

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"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
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"B"	earlier document published on or after the international filing date	"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
"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)	"&"	document member of the same patent family
"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		

Date of the actual completion of the international search 19 SEPTEMBER 2000	Date of mailing of the international search report 30 JUL 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer D. Olsen for PENSEE T. DO Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Ir. ational application No.
PCT/US99/10917

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4,805,623 A (JOBSIS) 21 February 1989 (21.02.89), col. 3, line 60-col. 7, line 68.	1-18
A	US 4,885,077 A (KARAKELLE et al.) 05 December 1989 (05.12.89), col. 2, line 43-col. 3, line 22.	1-18

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)★

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

rnational application No.
PCT/US99/10917

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

G01N 33/543, 33/553, 33/552, 33/53, 33/537, 21/00, 31/22, 15/06, 33/00, 21/29, 21/41, 21/47, 21/27, 21/31, 21/59, 21/01, 21/17, 21/75; B01L 3/00; G01D 11/26; B01J 19/08; A61L 2/00.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

435/7.1, 7.72, 7.9, 7.92, 7.94, 8.08; 422/22, 24, 49, 50, 55, 56, 57, 68.1, 82.05, 82.09, 82.11, 99, 119, 186; 436/518, 523, 525, 526, 527, 528, 805, 807; 356/41, 320, 39, 445, 318; 385/129, 130, 131.

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched
Classification System: U.S.

435/7.1, 7.72, 7.9, 7.92, 7.94, 8.08; 422/22, 24, 49, 50, 55, 56, 57, 68.1, 82.05, 82.09, 82.11, 99, 119, 186; 436/518, 523, 525, 526, 527, 528, 805, 807; 356/41, 320, 39, 445, 318; 385/129, 130, 131.

フロントページの続き

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

(72)発明者　ロビンソン、メアリイベス
アメリカ合衆国　コロラド、ボールダー
パイン　ストリート　1735

Fターム(参考)　2G045 BB14 BB48 CB21 FB15 GC11
2G059 AA05 BB12 CC16 DD13 EE01
EE02 EE05 EE11 FF01 FF03
HH02 KK04

[JP,2004-354164,A]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2.**** shows the word which can not be translated.
3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]
[Claim 1]
Identification information is given separately and this probe can transmit fine particles and this solution of solid-phase-ized variety a large number in a solution in which a probe reacted to a predetermined sample is contained, And an inspection method of a sample characterized by detecting both the above-mentioned identification information and information on a coupling amount of a sample by the above-mentioned probe from fine particles which have a catch member which can catch the above-mentioned fine particles, contacted this fine particle and a solution which flows including a sample, and were caught by the aforementioned catch member.
[Claim 2]
Identification information is given separately and this probe can transmit fine particles and this solution of solid-phase-ized variety a large number in a solution in which a probe reacted to a predetermined sample is contained, And an inspection method of a sample which has a catch member which can catch the above-mentioned fine particles, contacts this fine particle and a sample solution which flows including a sample, and is characterized by detecting both the above-mentioned identification information and information on a coupling amount of a sample by the above-mentioned probe from fine particles.
[Claim 3]
An inspection method of the sample according to claim 1 with which quantity from which area which the catch member surface occupies will be 20 to 80% when the above-mentioned fine particles are caught by the surface of the above-mentioned catch member is characterized by being mixed in the above-mentioned sample solution.
[Claim 4]
It is used for detection method which reacts a sample to various probes within one system, Fine particles characterized by solid-phase-izing this probe in a reaction solution in which a probe which identification information is given separately and reacts to a sample is contained.
[Claim 5]

The fine particles according to claim 4 which are what depends identification information of the above-mentioned fine particles on a difference of size, a difference of form, a difference of a color, and either of the individual identification (ID) information.
[Claim 6]
The fine particle according to claim 5, wherein the above-mentioned size of the above-mentioned fine particles is 10-100 micrometers.
[Claim 7]
Fine particles of variety a large number by which this probe was solid-phase-ized in a solution in which a probe which identification information is given separately and reacts to a predetermined sample is contained,
A container with which fine particles of above-mentioned variety a large number and a solution containing a sample are mixed,
A catch member [transmit / and / the above-mentioned solution] which can catch fine particles,
A temperature control means which controls the above-mentioned solution to a desired temperature,
A driving means which makes the above-mentioned solution flow,
A detection means to incorporate the above-mentioned fine particles as image data,
An analysis means to analyze probe information which reacted to the above-mentioned identification information from image data which associated the given above-mentioned identification information and the solid-phase-ized above-mentioned probe, and was obtained by the above-mentioned detection means,
An inspection system of a sample using providing fine particles.
[Claim 8]
An inspection system of a sample using the fine particle according to claim 7, wherein the above-mentioned primary detecting element means consists of either a camera which mounts a solid state image pickup device, or a microscope.
[Claim 9]
An inspection system of the sample according to claim 7 with which two or more concave parts of size where these fine particles lock the surface of the above-mentioned catch member which catches the above-mentioned fine particles are provided.
[Claim 10]
An inspection system of the sample according to claim 7 with which two or more uneven parts of size to which this fine particle locks all the surfaces of the above-mentioned catch member which catches the above-mentioned fine particles are provided.

TECHNICAL FIELD

[Field of the Invention]
The present invention relates to the inspection method which detects the biological substance in the analyte by the probe solid-phase-ized by fine particles, and its inspection system using the fine particles to which identification information was given individually.

[0002]

PRIOR ART

[Description of the Prior Art]
The technique of generally calling the many substance in publicly known analyte the microarray measured simultaneously is known, and it is used widely. In this technique, in order to separate a measurement signal, the solid phase of the many probe separated spatially is carried out to spot form on carriers, such as glass. Then, after performing hybridization, it is identifying by reading the fluorescence color in each probe.
[0003]
The bead array is proposed by the Patent document 1 and the Patent document 2 as the same technology as a microarray. This bead array is making 1 or two kinds of fluorescent substances form, in order to identify an individual bead. However, when a bead array is used, since discrimination precision is low, there is a fault which wrong measurement tends to produce.
[0004]
Then, a Patent document 3 has disclosed what processed these beads into bar code form, and gave the information on identification. In this method, protein etc. are combined with the particles of the bar code form processed by the photolithograph, and it detects in flow cytometry.
[0005]
A probe is solid-phase-ized on a catch member with porous structure, for example, a filter, and the technology which accelerates a reaction is known for making a vertical direction drive a sample solution to a catch member surface by the Patent document 4.
[0006]
[Patent document 1]
JP,2001-520323,A
[0007]
[Patent document 2]
JP,2002-501184,A
[0008]
[Patent document 3]
International patent applications 00/16893 (JP,2002-526755,A)
[0009]
[Patent document 4]
Patent number 3208390 gazette
[0010]

EFFECT OF THE INVENTION

[Effect of the Invention]
As explained in full detail above, according to the present invention, by simple composition using the fine particles where identification information is given separately and which can

perform exchange of a probe easily, It has highly precise discrimination precision and the inspection method of the biological substance using the fine particles in which the high speed processing of probe information is possible, and its inspection system can be provided.

TECHNICAL PROBLEM

[Problem to be solved by the invention]

The method using the microarray mentioned above needs many image processings because of decision of a position, and those apparatus is expensive. Since the probe once fixed to the predetermined position on a microarray at the time of a design cannot be moved afterwards, its flexibility of item design is low.

Since each must be produced individually and the quality of a microarray between microarrays is not fixed by the same specification, either, the sampling inspection of it was not completed theoretically, but it has required the time and effort of an all-articles inspection.

[0011]

Also in the method by a bead array, an identification unit becomes large-scale and is expensive. Since discrimination precision is low, there is a fault which wrong measurement tends to produce. A fluorescent substance deteriorates in prolonged storage and there is a problem in treating.

[0012]

It is difficult that that operations -- the detection by flow cytometry serves as a reaction and the process that detection is separate -- are complicated, adjustment of equipment itself, and analysis take skill to the technology which processed into bar code form the bead currently disclosed in the Patent document 3 mentioned above, and to accelerate a reaction. Also in this technique, equipment becomes large-scale.

[0013]

Thus, production of a microarray requires a large-scale manufacturing installation, it is dramatically difficult for a user to manufacture a microarray, and the flexibility of use and expansion of a use had a limit. For example, accidentally [design / of selection and the probe of a probe], when a microarray was produced, the whole microarray needed to be reproduced for the creation mistake of one probe.

[0014]

In the Patent document 4, while improvement in the speed of a reaction can be attained, in order to have to solid-phase-ize a probe on a catch member, it is the work which has the same problem as a microarray, and requires time and effort.

[0015]

Then, identification information is given separately, by simple composition using the fine particles which can perform exchange of a probe easily, the present invention has highly precise discrimination precision, and an object of the present invention is to provide the inspection method of the biological substance using the fine particles in which the high speed processing of probe information is possible, and its inspection system.

[0016]

MEANS

[Means for solving problem]
To achieve the above objects, identification information is given separately and the present invention can transmit the fine particles and this solution of variety a large number by which this probe was solid-phase-ized in the solution in which the probe reacted to a predetermined sample is contained, And it has a catch member which can catch the above-mentioned fine particles, this fine particle and the solution which flows including a sample are contacted, and the inspection method of the sample which detects both the above-mentioned identification information and the information on the coupling amount of the sample by the above-mentioned probe is provided from the fine particles caught by the aforementioned catch member.
[0017]
The reaction of a probe and the sample in a sample solution is promoted and accelerated, a sample solution flowing and fine particles moving in connection with it according to the inspection method of the sample of the above composition. Fine particles are caught by the catch member surface with a flow of a sample solution that there is [temporarily and] no lap, the fine particles which exist on a filter surface in the analysis of the image data which imaged this state are detected, and only the target reactant is measured effectively.
[0018]
The fine particles of variety a large number by which this probe was solid-phase-ized in the solution in which the probe which identification information is given separately and reacts to a predetermined sample is contained, The container with which the fine particles of above-mentioned variety a large number and the solution containing a sample are mixed, and the above-mentioned solution can be transmitted, And the catch member which can catch fine particles and the temperature control means which controls the above-mentioned solution to a desired temperature, The driving means which makes the above-mentioned solution flow, and a detection means to incorporate the above-mentioned fine particles as image data, The given above-mentioned identification information and the solid-phase-ized above-mentioned probe are associated, and an inspection system provided with an analysis means to analyze the probe information which reacted to the above-mentioned identification information from the image data obtained by the above-mentioned detection means is provided.
[0019]
The inspection system of the above samples of composition is added to the same operation effect as the inspection method mentioned above, It is smaller than the composition using the conventional microarray of equipment, and simple, and low cost, and also in the method of depending for using a bead array, rather than an identification unit, discrimination precision can be high at simple work, and exact measurement can be performed.
[0020]
[Mode for carrying out the invention]
Hereafter, with reference to Drawings, it describes in detail about the embodiment of the present invention.
First, it describes about the embodiment concerning the inspection method and inspection apparatus of a biological substance of the present invention. Here, it describes about the fine particles to which the probe used for this inspection method was fixed.

A probe is fixed and used for two or more fine particles which gave identification information previously in this inspection method. As identification information of these fine particles, it is possible to use either the difference of size and form, the difference of a color or ID information and these combination, and a primary detecting element suitable for each is provided. With ultra-fine processing technology by adding a numerical value and form or giving information, including a code, a bar code, etc., to using the technology of micro fabrication for fine particles, and giving peculiar form as an example, and the fine particle itself, It becomes discriminable by data processing of an optical means or an obtained image.

[0021]

as fine particles, addition and recognition are easy in identification information -- the substance in which the probe to not ** but the detection object made into the purpose is solid-phase-ized easily is suitable. Although what can realize both simultaneously is preferable, depending on the case,-like secondary processing may perform solid phase-ization of a probe. For example, the product made of resin, glass beads, etc. can be used effectively.

[0022]

To these fine particles, it processes for making a probe easy to combine previously. As this processing, it is charging the electric charge on the surface of a fine particle to minus, and the molecule which has a functional group is combined with the method that it is made easy to combine with nucleic acid with plus charge, and the fine particle surface, and there is changing into the state of being easy to combine with the nucleic acid probe which performed chemical modification etc. If it is a case where nucleic acid is used for a probe, as a specific example, to a probe An amino group, Embellish an aldehyde group, a thiol group, biotin, etc. and the fine particle surface An amino group, It can embellish with an aldehyde group, a thiol group, avidin, etc., and fine particles and a probe can be combined using making it join together using each reaction, or divalent nature or a monovalent cross linking agent. Of course, it is not limited to these.

[0023]

A probe creates the solid-phase-ized fine particles by preparing fine particles with such identification information two or more type, distributing these fine particles in a reaction solution, and making it react to a probe. It is possible to perform the reaction of this probe and fine particles very simple by pipette operation. The data which connected the classification of the identification information in fine particles and the solid-phase-ized probe at this time for the analysis conducted behind is created.

[0024]

By using such fine particles, large-scale equipment like a microarray manufacturing installation is unnecessary, and its flexibility of production is high. For example, even if it is a case where the design of a probe is mistaken, it can respond by remaking and replacing only the fine particles which have the probe by pipette operation. Many fine particles which gave various identification information previously are prepared, and according to the required number of probes, it can choose from these and can also use.

[0025]

In the inspection method by the present invention, it is possible to identify using the primary detecting element which performs optical detection which mentions fine particles later. Therefore, the identifying method of the fine particle itself can be chosen in accordance with the primary detecting element for measuring reacting weight with a probe. For example, if detection of fine particles is also made into fluorescence detection when a sample is labeled fluorescently

and a fluorescence microscope is made into a primary detecting element, an entire configuration is sometimes simplified possible. However, a primary detecting element is not limited to this.
[0026]
Next, the inspection system using the fine particles mentioned above is notionally shown in Fig.1, and Fig.2 shows the block configuration of this inspection system to it.
This inspection system is provided with the following.
The capture components (for example, filter etc.) 1a and 1b of two sheets formed by a base material which can transmit a sample solution.
The transparent tube 4 which these catch members 1a and 1b open an interval, are inserted in, and functions also as a reaction capillary tube.
The catch member 1a, the fine particles (probe) 3 sealed among 1b.
The primary detecting element 5 containing an imaging part for reading identification information, probe information, etc. in the fine particles 3 which have been arranged between these catch members 1a and 1b, and reacted optically.
This tube 4 is formed of transparent members, such as glass and resin, and is put into the sample solution. The sample solution into which it was put in this tube 4 is maintained at prescribed temperature by temperature and the liquid driving part 7, and as shown in an arrow (Fig.1), it flows by it. Therefore, the catch member 1a and the fine particles 3 currently sealed among 1b are ridden and moved to this flow. The catch members 1a and 1b, the tube 4, and a sample solution constitute the reaction part 6 to the probe of the fine particles 3. The primary detecting element 5 mounts the camera imaged with solid state image pickup devices (CCD etc.), and the imaging lens 5a approaches the tube 4, and it is stationed.
[0027]
Temperature, the liquid driving part 7, and the primary detecting element 5 are controlled, the identification information and probe information which were detected in the primary detecting element 5 are analyzed, and the computer 8 for control / analysis displayed on the display parts 9, such as a liquid crystal display, is provided in the result. The illumination part 10 which irradiates with visible light to the fine particles 3 is provided, and the luminance of the fine particles 3 can be detected by fluorescence. Although not illustrated, an interface function may be mounted on the computer 8 for control / analysis, it may connect with an external device, for example, a host computer, via a network etc., and communication may perform an exchange of data and a control signal (control from an external device).
[0028]
In such a system configuration, it is possible to accelerate the reaction of the probe of the fine particles 3 and the sample in a sample solution by making a sample solution flow in the direction which intersects perpendicularly to a catch member surface. That is, the collision frequency of a probe molecule and a sample molecule is raised by flow (stirring) of a sample solution. For this reason, a reaction is promoted and it becomes possible to speed up reaction velocity (reaction time) by leaps and bounds to what reacts a common sample solution by a state of rest.
[0029]
When this principle is applied to the reaction by the fine particles 3 of this embodiment, a reaction is not only accelerated, but, Only the target reactant can be effectively measured by detecting the fine particles 3 which two or more fine particles 3 were temporarily caught by the near catch member surface on which a sample solution flows in (suction), and were caught by the catch member at this time.
[0030]

The inspection system of this embodiment is simpler than the composition of the equipment using the conventional microarray, and its discrimination precision is high also in the method of depending for using a bead array at work simpler than an identification unit, and it can perform exact measurement.

[0031]

B/F separation becomes possible by being able to catch by a catch member and detecting this by using the thing finer than the size of the fine particles 3 as granularity (pore diameter) from which the sample solution in these catch members 1a and 1b flows through and escapes, without the fine particles 3 transmitting the catch members 1a and 1b.

[0032]

In this case, there is little restriction of the selection range of the base material of the catch members 1a and 1b, and what is necessary is just to use the catch member base material which carries out preferable in accordance with the primary detecting element 5, since solid-phase-izing of the probe to catch member 1a andb [1] top is unnecessary and it is not necessary to choose a catch member base material suitable for a solid phase-ized reaction. For example, when a sample is labeled fluorescently, it is preferable to use for the base material of the catch members 1a and 1b what has few autofluorescence. However, it is not restrained by the autofluorescence of the catch members 1a and 1b, when observing the caught fine particles 3 from other than the direction which meets the catch member surface and inspecting only the caught fine particles 3.

[0033]

The acquisition of an image with the camera of the primary detecting element 5 can carry out the package acquisition of the image of two or more particles which spread within a wide view, and it becomes possible to acquire an examination image efficiently. The primary detecting element 5 can consider the inspection apparatus not only adapting a camera but a microscope. The fine particles 3 in a sample solution are developed by the drive of the solution to a catch member on a catch member surface. In the state where the sample solution is sucked, in the catch member surface, since only the fine particles 3 are scattered, these are acquired as an image with the inspection apparatus currently provided by being attached to a microscope. Not only acquisition of the image using a camera but the primary detecting element 5 can incorporate by scanning etc.

[0034]

It is effective in improvement in S/N to sample a sample solution, in order to perform B/F separation more reliably, and to wash in this case. In this case, a sample solution is sucked and discarded, a washing solution is newly added, and a flow of a sample solution is repeated again. It becomes possible by repeating the same washing two or more times if needed to improve S/N more.

[0035]

No matter the fine particles 3 in this embodiment may not be limited to a spherical shape but may be what form, such as an ellipsoid, a rectangular parallelepiped, and a pillar, they are satisfactory. Although not limited as construction material of the fine particles 3, inorganic substances, such as a glassy metal, micro processing and a chemical modification, It is advantageous to the problem of the background by autofluorescence, and the thing made of resin can be [thing] inexpensive, and can prepare the fine particles 3 to which particle diameter was equal to preparation, and using properly according to a use is desirable.

[0036]

Although the degree of distribution into a sample solution is not limited, it is desirable for the area which the fine particles 3 to a control surface fasten to be about 20 to 80%. If less than 20%,

the accuracy of an inspection will be deteriorated, and if it exceeds 80%, the lap of the fine particles 3 will occur on the catch member surface, and inspecting correctly becomes difficult.
[0037]
Thus, various methods can be considered in order to prevent the lap of the fine particles 3.
[0038]
For example, although the fine particles 3 are caught by the drive of the solution to a catch member surface, it is that the driving direction of a solution shakes the whole system in the plane direction which intersects perpendicularly in this case, and it becomes possible to make it distribute uniformly on the catch member surface. A dispersion state can be controlled by the voltage impressing from the outside, and magnetism, and it can be made to distribute to up to the catch member surface uniformly otherwise by the method of using an ultrasonic wave and distributing, and giving fine particle 3 the very thing an electric charge and magnetism.
[0039]
It is also effective to form the many concave part 2 by micro processing so that it may continue all over the catch member 1 surface and the fine particles 3 can be caught uniformly, as shown in Fig.3 (a). In this case, as shown in Fig.3 (b), it is caught by each concave part 2 and the fine particles 3 can prevent a lap.
[0040]
The many uneven part 11 may be formed by micro processing so that it may continue all over the 1 surface and the fine particles 3 can be caught uniformly, as shown in Fig.4 (a) and (b). They are able for the fine particles 3 to be caught by the concave portion of each uneven part 11, and to prevent a lap by this uneven part 11, as shown in Fig.4 (c).
[0041]
By putting the fine particles 3, arranging the tube 4 to a longitudinal direction, inserting in the catch members 1a and 1b up and down, and making a sample solution flow up and down, as shown in Fig.5, A dispersion state can be controlled and it becomes possible to suppress deterioration of the inspection accuracy by the overlap of the fine particles 3. In the composition shown in Fig.1, when imaging tube 4 portion between the catch members 1a and 1b rather than imaging the catch member surface, it is not necessary to perform surface treatment etc. which were mentioned above to the catch members 1a and 1b. As shown in Fig.5, when imaging from above by the case where the tube 4 has been arranged to the longitudinal direction, it is constituted so that an upper catch member may transmit the fluorescence of transparence or the fine particles 3.
[0042]
Although it is preferable to carry out by fluorescence as for the sign to the sample contained in a sample solution, it is not limited to this. Fluorescence is widely used for the inspection of the sample of living body origin from that the sign and handling to the sample of living body origin are easy, and a comparatively inexpensive thing. For example, in using cDNA for a sample. For example, it can embellish with the method currently performed by the usual molecular biology technique making it incorporate as a fluorescent-labeling substrate in the case of the reverse transcription reaction from RNA, or amplification by PCR performing a sign by labeling fluorescently of an etching primer in a sample easily.
[0043]
The probe solid-phase-ized to the fine particles 3 can solid-phase-ize things, such as protein and an antibody, for example as a substance not only of nucleic acid but living body origin, and the application to broad assay is possible for it.

[0044]
In order to discriminate the specific fine particles 3 from the image detected in the primary detecting element 5, various processings are performed to the image. For example, the acquired image is divided into two or more regions according to the spraying state of the fine particles 3. To each divided region, the identification information of the fine particles 3 is detected and the strength is measured simultaneously. It has the relation between this identification information and bond strength, and is considered as the output value of a result.
[0045]
Here, each fine particle 3 of an image has preferable things so that it may not lap and be put together on an image. The expanded state of the fine particles 3 by which the trap was carried out on the catch member surface using the flow of a sample solution, Whenever a sample solution goes back and forth, in order to change, whenever a sample solution flows, an image is acquired and it becomes possible from two or more images to draw a result by evaluating adopting the optimal state for each fine particle 3 as a result, the average value of two or more results, etc. Of course, sprinkling positively is also possible.
[0046]
The particle diameter of the optimal fine particles 3 for such the system of reaction has an effective diameter of 10 micrometers - about 100 micrometers, and more, in being minute, processing of the fine particles 3 and addition of identification information become difficult. When the kind of probe which it introduces in one system more in being large is increased, the quantity of the fine particles 3 increases and detection becomes difficult. Experientially, although the particle diameter of the above-mentioned degree is suitable, of course, it is not limited to this.
[0047]
It describes about the first example that enforced the inspection method of the biological substance using the inspection system mentioned above below.
[0048]
As the fine particles 3, the spherical shape of 4 type of sizes which consist of products made from polystyrene was prepared. Mean particle diameter shall be 25 micrometers, 50 micrometers, 75 micrometers, and 100 micrometers, respectively. The particle diameter of each fine particle 3 has gathered very precisely, variation is about **5 micrometers, and identification of the kind by the size is easy. The number of the classification which can be used increases, so that there is little variation in size.
[0049]
The amino group was introduced into the surface of the fine particles 3 of each particle diameter, and the amino group modification of the end of the synthesis nucleic acid of a probe was carried out, and each was combined using Bis[Sulfosuccinimidyl] suberate. In this example, it was considered as 4 type of probes which differ at a time in one base to each fine particle 3 for the purpose of analyzing the variation of DNA.
[0050]
Probe 1 GTTGGAGCTGGTGGCGTAGG
Probe 2 GTTGGAGCTCGTGGCGTAGG
Probe 3 GTTGGAGCTTGTGGCGTAGG
Probe 4 GTTGGAGCTAGTGGCGTAGG
The fine particles 3 which carried out the solid phase of these probes were mixed with the labeled fluorescently fluorescently K-ras oncogene (what was amplified by PCR using the primer which amplifies the K-ras codon 12) in FITC. The mixed sample solution was dropped on the

porous thin film obtained by anodization, and the hybridization reaction in 65 degrees C was performed using the detection system by the composition shown in Fig.2. It has the composition that the illumination part 10 and the primary detecting element 5 can be suitably changed by composition (put together) of the fine particles 3. As an example, the epi-illumination of visible light performs form of the fine particles 3, and what detects the luminance of the fine particles 3 by fluorescence is shown.

[0051]

The fluorescence incident light unit made from OLYMPUS was used for the illumination part 10 at the overhead light study system using the metal halide light source. The catch member set of BFL made from OLYMPUS was used for the incident light of visible light. About measurement of a fluorescent image, the catch member set corresponding to various kinds of fluorochromes was controlled from software, and change of it was enabled. Here, it labeled fluorescently in FITC and the product WIBA catch member set made from OLYMPUS was used for the detection.

[0052]

It had composition which interlocks and can control the drive of photography with a camera, and a solution simultaneously, and the fluorescent image and the light field image were acquired in conjunction with the reaction to which a flow of a sample solution is made to go and come back. By the software of the image processing, the size of each fine particle 3 was measured from the light field image, and the fluorescence intensity was measured for this from the fluorescent image. Thereby, the following results were obtained. A result is calculated from the output gradation (luminance) of a camera, and displays the maximum of a detection value as 100%.

Probe 1 4%

Probe 2 100%

Probe 3 3%

Probe 4 7%

From this result, it was checked that a sample is a thing with the variation which is a perfect match with the probe 2.

[0053]

Next, it describes about the second example which enforced the inspection method of the biological substance of the present invention. After using photolithography technology for a silicon substrate and providing the identification mark of two or more minute barcode form, the fine particles 3 wafer-ize these by dicing, and are produced. 100 type of identification information were given to this fine particle 3, and the probe of the cancer-related gene of 100 was solid-phase-ized to it.

[0054]

Probe nucleic acid embellishes an end with an amino group, made the silane coupling agent which has a thiol group react to the surface of the fine particles 3 beforehand, and made each probe nucleic acid cross-bridge to it in N-(4-Maleimidobutyryloxy) succinimide. The solution with which the obtained fine particles 3 were mixed every in equivalent amount was prepared. To a sample, total RNA of the normal Homo sapiens fibrocyte stock TIG-1 (it abbreviates to TIG-1 hereafter) origin, 25microeach g preparation of total RNA of Homo sapiens colon cancer cell strain COLO320DM (it abbreviates to COLO320DM hereafter) origin was done, and FITC sign single-strand cDNA was produced by the reverse transcription method using oligo dT primer by making these into a mold. Dissolved this cDNA by which the FITC sign was carried out in sterile-distilled-water 35mul, and heat for 5 minutes, and it was made to denaturalize at 95

degrees C, and quickly cooled in ice water after that. The 20xSSPE solution was 15microl Added to this cDNA solution (last salt concentration 6xSSPE solution), and it was considered as the liquid sample. The hybridization reaction was performed at 50 degrees C using the inspection system which mentioned each sample sample above in the catch member made of nylon of 10 micrometers of average pore sizes, and 100 micrometers of thickness.

[0055]

And while analyzing the light field image detected by the primary detecting element 5 by computer 8 for control / analysis and deciphering the identification information of each fine particle 3, From the fluorescent image acquired simultaneously, the fluorescence intensity of each fine particle 3 was measured, the detection signal to each probe was made into the table, and expression amount analysis of RNA of each probe was conducted.

[0056]

Among these, in one gene (negative control; NC) and COLO320DM which do not exist in a human genome, One gene (c-myc), one typical housekeeping gene (beta-action) which are predicted that a manifestation goes up specifically, One gene (GAPDH:internal control; IC) predicted that there is no change of an expression amount among both cells was chosen, and it evaluated in each cDNA arrangement paying attention to the specific base sequence. As a result, with both NC (negative control), since fluorescence was not accepted, it was shown that the hybridization reaction advanced specifically. When observed about the signal of c-myc and beta-action, compared with TIG-1, it was admitted that the fluorescence intensity of the way of COLO320DM was strong certainly.

[0057]

When the fluorescence intensity about each gene was computed, the luminance of GAPDH (IC) was corrected to 1:1, when the ratio of each amount of gene expression was compared, in COLO320DM, 5.5 times were accepted for c-myc and 1.4 times as many rises were accepted for beta-action. When this result was compared with the result of RT-PCR, the substantially same result was obtained. The gene cluster it is similarly supposed about the result of other probes that an expression amount rises from cancer, and the gene cluster it is supposed that an expression amount is deteriorated were alike, respectively, and it has checked that the expression amount to TIG-1 which is a reference was analyzed correctly in COLO320DM.

[0058]

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1]It is a figure showing notionally the inspection system using the fine particles in the embodiment of the present invention.

[Drawing 2]It is ****** about the block configuration of the inspection system in the embodiment of the present invention.

[Drawing 3]It is a figure showing the appearance composition of the catch member used for the embodiment of the present invention.

[Drawing 4]It is a figure showing the appearance composition of the modification of the catch member used for the embodiment of the present invention.

[Drawing 5]It is a figure showing the modification of the reaction part in the embodiment of the present invention.
[Explanations of letters or numerals]
1, 1a, and 1b -- a catch member and 2 -- a concave part and 3 -- fine particles and 4 -- a tube and 5 -- a primary detecting element and 5a -- an imaging lens and 6 -- a reaction part and 7 -- temperature and a liquid driving part, and 8 -- the computer for control / analysis, and 9 -- a display part and 10 -- an illumination part.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]
[0001]
[Field of the Invention]
The present invention relates to the inspection method which detects the biological substance in the analyte by the probe solid-phase-ized by fine particles, and its inspection system using the fine particles to which identification information was given individually.
[0002]
[Description of the Prior Art]
The technique of generally calling the many substance in publicly known analyte the microarray measured simultaneously is known, and it is used widely. In this technique, in order to separate a measurement signal, the solid phase of the many probe separated spatially is carried out to spot form on carriers, such as glass. Then, after performing hybridization, it is identifying by reading the fluorescence color in each probe.
[0003]
The bead array is proposed by the Patent document 1 and the Patent document 2 as the same technology as a microarray. This bead array is making 1 or two kinds of fluorescent substances form, in order to identify an individual bead. However, when a bead array is used, since discrimination precision is low, there is a fault which wrong measurement tends to produce.
[0004]
Then, a Patent document 3 has disclosed what processed these beads into bar code form, and gave the information on identification. In this method, protein etc. are combined with the particles of the bar code form processed by the photolithograph, and it detects in flow cytometry.
[0005]
A probe is solid-phase-ized on a catch member with porous structure, for example, a filter, and the technology which accelerates a reaction is known for making a vertical direction drive a sample solution to a catch member surface by the Patent document 4.
[0006]
[Patent document 1]
JP,2001-520323,A
[0007]

[Patent document 2]
JP,2002-501184,A
[0008]
[Patent document 3]
International patent applications 00/16893 (JP,2002-526755,A)
[0009]
[Patent document 4]
Patent number 3208390 gazette
[0010]
[Problem to be solved by the invention]
The method using the microarray mentioned above needs many image processings because of decision of a position, and those apparatus is expensive. Since the probe once fixed to the predetermined position on a microarray at the time of a design cannot be moved afterwards, its flexibility of item design is low.
Since each must be produced individually and the quality of a microarray between microarrays is not fixed by the same specification, either, the sampling inspection of it was not completed theoretically, but it has required the time and effort of an all-articles inspection.
[0011]
Also in the method by a bead array, an identification unit becomes large-scale and is expensive. Since discrimination precision is low, there is a fault which wrong measurement tends to produce. A fluorescent substance deteriorates in prolonged storage and there is a problem in treating.
[0012]
It is difficult that that operations -- the detection by flow cytometry serves as a reaction and the process that detection is separate -- are complicated, adjustment of equipment itself, and analysis take skill to the technology which processed into bar code form the bead currently disclosed in the Patent document 3 mentioned above, and to accelerate a reaction. Also in this technique, equipment becomes large-scale.
[0013]
Thus, production of a microarray requires a large-scale manufacturing installation, it is dramatically difficult for a user to manufacture a microarray, and the flexibility of use and expansion of a use had a limit. For example, accidentally [design / of selection and the probe of a probe], when a microarray was produced, the whole microarray needed to be reproduced for the creation mistake of one probe.
[0014]
In the Patent document 4, while improvement in the speed of a reaction can be attained, in order to have to solid-phase-ize a probe on a catch member, it is the work which has the same problem as a microarray, and requires time and effort.
[0015]
Then, identification information is given separately, by simple composition using the fine particles which can perform exchange of a probe easily, the present invention has highly precise discrimination precision, and an object of the present invention is to provide the inspection method of the biological substance using the fine particles in which the high speed processing of probe information is possible, and its inspection system.
[0016]
[Means for solving problem]

To achieve the above objects, identification information is given separately and the present invention can transmit the fine particles and this solution of variety a large number by which this probe was solid-phase-ized in the solution in which the probe reacted to a predetermined sample is contained, And it has a catch member which can catch the above-mentioned fine particles, this fine particle and the solution which flows including a sample are contacted, and the inspection method of the sample which detects both the above-mentioned identification information and the information on the coupling amount of the sample by the above-mentioned probe is provided from the fine particles caught by the aforementioned catch member.
[0017]
The reaction of a probe and the sample in a sample solution is promoted and accelerated, a sample solution flowing and fine particles moving in connection with it according to the inspection method of the sample of the above composition. Fine particles are caught by the catch member surface with a flow of a sample solution that there is [temporarily and] no lap, the fine particles which exist on a filter surface in the analysis of the image data which imaged this state are detected, and only the target reactant is measured effectively.
[0018]
The fine particles of variety a large number by which this probe was solid-phase-ized in the solution in which the probe which identification information is given separately and reacts to a predetermined sample is contained, The container with which the fine particles of above-mentioned variety a large number and the solution containing a sample are mixed, and the above-mentioned solution can be transmitted, And the catch member which can catch fine particles and the temperature control means which controls the above-mentioned solution to a desired temperature, The driving means which makes the above-mentioned solution flow, and a detection means to incorporate the above-mentioned fine particles as image data, The given above-mentioned identification information and the solid-phase-ized above-mentioned probe are associated, and an inspection system provided with an analysis means to analyze the probe information which reacted to the above-mentioned identification information from the image data obtained by the above-mentioned detection means is provided.
[0019]
The inspection system of the above samples of composition is added to the same operation effect as the inspection method mentioned above, It is smaller than the composition using the conventional microarray of equipment, and simple, and low cost, and also in the method of depending for using a bead array, rather than an identification unit, discrimination precision can be high at simple work, and exact measurement can be performed.
[0020]
[Mode for carrying out the invention]
Hereafter, with reference to Drawings, it describes in detail about the embodiment of the present invention.
First, it describes about the embodiment concerning the inspection method and inspection apparatus of a biological substance of the present invention. Here, it describes about the fine particles to which the probe used for this inspection method was fixed.
A probe is fixed and used for two or more fine particles which gave identification information previously in this inspection method. As identification information of these fine particles, it is possible to use either the difference of size and form, the difference of a color or ID information and these combination, and a primary detecting element suitable for each is provided. With ultra-fine processing technology by adding a numerical value and form or giving information,

including a code, a bar code, etc., to using the technology of micro fabrication for fine particles, and giving peculiar form as an example, and the fine particle itself, It becomes discriminable by data processing of an optical means or an obtained image.
[0021]
as fine particles, addition and recognition are easy in identification information -- the substance in which the probe to not ** but the detection object made into the purpose is solid-phase-ized easily is suitable. Although what can realize both simultaneously is preferable, depending on the case,-like secondary processing may perform solid phase-ization of a probe. For example, the product made of resin, glass beads, etc. can be used effectively.
[0022]
To these fine particles, it processes for making a probe easy to combine previously. As this processing, it is charging the electric charge on the surface of a fine particle to minus, and the molecule which has a functional group is combined with the method that it is made easy to combine with nucleic acid with plus charge, and the fine particle surface, and there is changing into the state of being easy to combine with the nucleic acid probe which performed chemical modification etc. If it is a case where nucleic acid is used for a probe, as a specific example, to a probe An amino group, Embellish an aldehyde group, a thiol group, biotin, etc. and the fine particle surface An amino group, It can embellish with an aldehyde group, a thiol group, avidin, etc., and fine particles and a probe can be combined using making it join together using each reaction, or divalent nature or a monovalent cross linking agent. Of course, it is not limited to these.
[0023]
A probe creates the solid-phase-ized fine particles by preparing fine particles with such identification information two or more type, distributing these fine particles in a reaction solution, and making it react to a probe. It is possible to perform the reaction of this probe and fine particles very simple by pipette operation. The data which connected the classification of the identification information in fine particles and the solid-phase-ized probe at this time for the analysis conducted behind is created.
[0024]
By using such fine particles, large-scale equipment like a microarray manufacturing installation is unnecessary, and its flexibility of production is high. For example, even if it is a case where the design of a probe is mistaken, it can respond by remaking and replacing only the fine particles which have the probe by pipette operation. Many fine particles which gave various identification information previously are prepared, and according to the required number of probes, it can choose from these and can also use.
[0025]
In the inspection method by the present invention, it is possible to identify using the primary detecting element which performs optical detection which mentions fine particles later. Therefore, the identifying method of the fine particle itself can be chosen in accordance with the primary detecting element for measuring reacting weight with a probe. For example, if detection of fine particles is also made into fluorescence detection when a sample is labeled fluorescently and a fluorescence microscope is made into a primary detecting element, an entire configuration is sometimes simplified possible. However, a primary detecting element is not limited to this.
[0026]
Next, the inspection system using the fine particles mentioned above is notionally shown in Fig.1, and Fig.2 shows the block configuration of this inspection system to it.

This inspection system is provided with the following.
The capture components (for example, filter etc.) 1a and 1b of two sheets formed by a base material which can transmit a sample solution.
The transparent tube 4 which these catch members 1a and 1b open an interval, are inserted in, and functions also as a reaction capillary tube.
The catch member 1a, the fine particles (probe) 3 sealed among 1b.
The primary detecting element 5 containing an imaging part for reading identification information, probe information, etc. in the fine particles 3 which have been arranged between these catch members 1a and 1b, and reacted optically.
This tube 4 is formed of transparent members, such as glass and resin, and is put into the sample solution. The sample solution into which it was put in this tube 4 is maintained at prescribed temperature by temperature and the liquid driving part 7, and as shown in an arrow (Fig.1), it flows by it. Therefore, the catch member 1a and the fine particles 3 currently sealed among 1b are ridden and moved to this flow. The catch members 1a and 1b, the tube 4, and a sample solution constitute the reaction part 6 to the probe of the fine particles 3. The primary detecting element 5 mounts the camera imaged with solid state image pickup devices (CCD etc.), and the imaging lens 5a approaches the tube 4, and it is stationed.
[0027]
Temperature, the liquid driving part 7, and the primary detecting element 5 are controlled, the identification information and probe information which were detected in the primary detecting element 5 are analyzed, and the computer 8 for control / analysis displayed on the display parts 9, such as a liquid crystal display, is provided in the result. The illumination part 10 which irradiates with visible light to the fine particles 3 is provided, and the luminance of the fine particles 3 can be detected by fluorescence. Although not illustrated, an interface function may be mounted on the computer 8 for control / analysis, it may connect with an external device, for example, a host computer, via a network etc., and communication may perform an exchange of data and a control signal (control from an external device).
[0028]
In such a system configuration, it is possible to accelerate the reaction of the probe of the fine particles 3 and the sample in a sample solution by making a sample solution flow in the direction which intersects perpendicularly to a catch member surface. That is, the collision frequency of a probe molecule and a sample molecule is raised by flow (stirring) of a sample solution. For this reason, a reaction is promoted and it becomes possible to speed up reaction velocity (reaction time) by leaps and bounds to what reacts a common sample solution by a state of rest.
[0029]
When this principle is applied to the reaction by the fine particles 3 of this embodiment, a reaction is not only accelerated, but, Only the target reactant can be effectively measured by detecting the fine particles 3 which two or more fine particles 3 were temporarily caught by the near catch member surface on which a sample solution flows in (suction), and were caught by the catch member at this time.
[0030]
The inspection system of this embodiment is simpler than the composition of the equipment using the conventional microarray, and its discrimination precision is high also in the method of depending for using a bead array at work simpler than an identification unit, and it can perform exact measurement.
[0031]

B/F separation becomes possible by being able to catch by a catch member and detecting this by using the thing finer than the size of the fine particles 3 as granularity (pore diameter) from which the sample solution in these catch members 1a and 1b flows through and escapes, without the fine particles 3 transmitting the catch members 1a and 1b.
[0032]
In this case, there is little restriction of the selection range of the base material of the catch members 1a and 1b, and what is necessary is just to use the catch member base material which carries out preferable in accordance with the primary detecting element 5, since solid-phase-izing of the probe to catch member 1a andb [1] top is unnecessary and it is not necessary to choose a catch member base material suitable for a solid phase-ized reaction. For example, when a sample is labeled fluorescently, it is preferable to use for the base material of the catch members 1a and 1b what has few autofluorescence. However, it is not restrained by the autofluorescence of the catch members 1a and 1b, when observing the caught fine particles 3 from other than the direction which meets the catch member surface and inspecting only the caught fine particles 3.
[0033]
The acquisition of an image with the camera of the primary detecting element 5 can carry out the package acquisition of the image of two or more particles which spread within a wide view, and it becomes possible to acquire an examination image efficiently. The primary detecting element 5 can consider the inspection apparatus not only adapting a camera but a microscope. The fine particles 3 in a sample solution are developed by the drive of the solution to a catch member on a catch member surface. In the state where the sample solution is sucked, in the catch member surface, since only the fine particles 3 are scattered, these are acquired as an image with the inspection apparatus currently provided by being attached to a microscope. Not only acquisition of the image using a camera but the primary detecting element 5 can incorporate by scanning etc.
[0034]
It is effective in improvement in S/N to sample a sample solution, in order to perform B/F separation more reliably, and to wash in this case. In this case, a sample solution is sucked and discarded, a washing solution is newly added, and a flow of a sample solution is repeated again. It becomes possible by repeating the same washing two or more times if needed to improve S/N more.
[0035]
No matter the fine particles 3 in this embodiment may not be limited to a spherical shape but may be what form, such as an ellipsoid, a rectangular parallelepiped, and a pillar, they are satisfactory. Although not limited as construction material of the fine particles 3, inorganic substances, such as a glassy metal, micro processing and a chemical modification, It is advantageous to the problem of the background by autofluorescence, and the thing made of resin can be [thing] inexpensive, and can prepare the fine particles 3 to which particle diameter was equal to preparation, and using properly according to a use is desirable.
[0036]
Although the degree of distribution into a sample solution is not limited, it is desirable for the area which the fine particles 3 to a control surface fasten to be about 20 to 80%. If less than 20%, the accuracy of an inspection will be deteriorated, and if it exceeds 80%, the lap of the fine particles 3 will occur on the catch member surface, and inspecting correctly becomes difficult.
[0037]
Thus, various methods can be considered in order to prevent the lap of the fine particles 3.
[0038]

For example, although the fine particles 3 are caught by the drive of the solution to a catch member surface, it is that the driving direction of a solution shakes the whole system in the plane direction which intersects perpendicularly in this case, and it becomes possible to make it distribute uniformly on the catch member surface. A dispersion state can be controlled by the voltage impressing from the outside, and magnetism, and it can be made to distribute to up to the catch member surface uniformly otherwise by the method of using an ultrasonic wave and distributing, and giving fine particle 3 the very thing an electric charge and magnetism.

[0039]

It is also effective to form the many concave part 2 by micro processing so that it may continue all over the catch member 1 surface and the fine particles 3 can be caught uniformly, as shown in Fig.3 (a). In this case, as shown in Fig.3 (b), it is caught by each concave part 2 and the fine particles 3 can prevent a lap.

[0040]

The many uneven part 11 may be formed by micro processing so that it may continue all over the 1 surface and the fine particles 3 can be caught uniformly, as shown in Fig.4 (a) and (b). They are able for the fine particles 3 to be caught by the concave portion of each uneven part 11, and to prevent a lap by this uneven part 11, as shown in Fig.4 (c).

[0041]

By putting the fine particles 3, arranging the tube 4 to a longitudinal direction, inserting in the catch members 1a and 1b up and down, and making a sample solution flow up and down, as shown in Fig.5, A dispersion state can be controlled and it becomes possible to suppress deterioration of the inspection accuracy by the overlap of the fine particles 3. In the composition shown in Fig.1, when imaging tube 4 portion between the catch members 1a and 1b rather than imaging the catch member surface, it is not necessary to perform surface treatment etc. which were mentioned above to the catch members 1a and 1b. As shown in Fig.5, when imaging from above by the case where the tube 4 has been arranged to the longitudinal direction, it is constituted so that an upper catch member may transmit the fluorescence of transparence or the fine particles 3.

[0042]

Although it is preferable to carry out by fluorescence as for the sign to the sample contained in a sample solution, it is not limited to this. Fluorescence is widely used for the inspection of the sample of living body origin from that the sign and handling to the sample of living body origin are easy, and a comparatively inexpensive thing. For example, in using cDNA for a sample. For example, it can embellish with the method currently performed by the usual molecular biology technique making it incorporate as a fluorescent-labeling substrate in the case of the reverse transcription reaction from RNA, or amplification by PCR performing a sign by labeling fluorescently of an etching primer in a sample easily.

[0043]

The probe solid-phase-ized to the fine particles 3 can solid-phase-ize things, such as protein and an antibody, for example as a substance not only of nucleic acid but living body origin, and the application to broad assay is possible for it.

[0044]

In order to discriminate the specific fine particles 3 from the image detected in the primary detecting element 5, various processings are performed to the image. For example, the acquired image is divided into two or more regions according to the spraying state of the fine particles 3. To each divided region, the identification information of the fine particles 3 is detected and the

strength is measured simultaneously. It has the relation between this identification information and bond strength, and is considered as the output value of a result.
[0045]
Here, each fine particle 3 of an image has preferable things so that it may not lap and be put together on an image. The expanded state of the fine particles 3 by which the trap was carried out on the catch member surface using the flow of a sample solution, Whenever a sample solution goes back and forth, in order to change, whenever a sample solution flows, an image is acquired and it becomes possible from two or more images to draw a result by evaluating adopting the optimal state for each fine particle 3 as a result, the average value of two or more results, etc. Of course, sprinkling positively is also possible.
[0046]
The particle diameter of the optimal fine particles 3 for such the system of reaction has an effective diameter of 10 micrometers - about 100 micrometers, and more, in being minute, processing of the fine particles 3 and addition of identification information become difficult. When the kind of probe which it introduces in one system more in being large is increased, the quantity of the fine particles 3 increases and detection becomes difficult. Experientially, although the particle diameter of the above-mentioned degree is suitable, of course, it is not limited to this.
[0047]
It describes about the first example that enforced the inspection method of the biological substance using the inspection system mentioned above below.
[0048]
As the fine particles 3, the spherical shape of 4 type of sizes which consist of products made from polystyrene was prepared. Mean particle diameter shall be 25 micrometers, 50 micrometers, 75 micrometers, and 100 micrometers, respectively. The particle diameter of each fine particle 3 has gathered very precisely, variation is about **5 micrometers, and identification of the kind by the size is easy. The number of the classification which can be used increases, so that there is little variation in size.
[0049]
The amino group was introduced into the surface of the fine particles 3 of each particle diameter, and the amino group modification of the end of the synthesis nucleic acid of a probe was carried out, and each was combined using Bis[Sulfosuccinimidyl] suberate. In this example, it was considered as 4 type of probes which differ at a time in one base to each fine particle 3 for the purpose of analyzing the variation of DNA.
[0050]
Probe 1 GTTGGAGCTGGTGGCGTAGG
Probe 2 GTTGGAGCTCGTGGCGTAGG
Probe 3 GTTGGAGCTTGTGGCGTAGG
Probe 4 GTTGGAGCTAGTGGCGTAGG
The fine particles 3 which carried out the solid phase of these probes were mixed with the labeled fluorescently fluorescently K-ras oncogene (what was amplified by PCR using the primer which amplifies the K-ras codon 12) in FITC. The mixed sample solution was dropped on the porous thin film obtained by anodization, and the hybridization reaction in 65 degrees C was performed using the detection system by the composition shown in Fig.2. It has the composition that the illumination part 10 and the primary detecting element 5 can be suitably changed by composition (put together) of the fine particles 3. As an example, the epi-illumination of visible

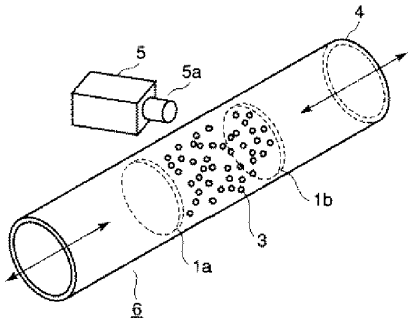
light performs form of the fine particles 3, and what detects the luminance of the fine particles 3 by fluorescence is shown.
[0051]
The fluorescence incident light unit made from OLYMPUS was used for the illumination part 10 at the overhead light study system using the metal halide light source. The catch member set of BFL made from OLYMPUS was used for the incident light of visible light. About measurement of a fluorescent image, the catch member set corresponding to various kinds of fluorochromes was controlled from software, and change of it was enabled. Here, it labeled fluorescently in FITC and the product WIBA catch member set made from OLYMPUS was used for the detection.
[0052]
It had composition which interlocks and can control the drive of photography with a camera, and a solution simultaneously, and the fluorescent image and the light field image were acquired in conjunction with the reaction to which a flow of a sample solution is made to go and come back. By the software of the image processing, the size of each fine particle 3 was measured from the light field image, and the fluorescence intensity was measured for this from the fluorescent image. Thereby, the following results were obtained. A result is calculated from the output gradation (luminance) of a camera, and displays the maximum of a detection value as 100%.
Probe 1 4%
Probe 2 100%
Probe 3 3%
Probe 4 7%
From this result, it was checked that a sample is a thing with the variation which is a perfect match with the probe 2.
[0053]
Next, it describes about the second example which enforced the inspection method of the biological substance of the present invention. After using photolithography technology for a silicon substrate and providing the identification mark of two or more minute barcode form, the fine particles 3 wafer-ize these by dicing, and are produced. 100 type of identification information were given to this fine particle 3, and the probe of the cancer-related gene of 100 was solid-phase-ized to it.
[0054]
Probe nucleic acid embellishes an end with an amino group, made the silane coupling agent which has a thiol group react to the surface of the fine particles 3 beforehand, and made each probe nucleic acid cross-bridge to it in N-(4-Maleimidobutyryloxy) succinimide. The solution with which the obtained fine particles 3 were mixed every in equivalent amount was prepared. To a sample, total RNA of the normal Homo sapiens fibrocyte stock TIG-1 (it abbreviates to TIG-1 hereafter) origin, 25microeach g preparation of total RNA of Homo sapiens colon cancer cell strain COLO320DM (it abbreviates to COLO320DM hereafter) origin was done, and FITC sign single-strand cDNA was produced by the reverse transcription method using oligo dT primer by making these into a mold. Dissolved this cDNA by which the FITC sign was carried out in sterile-distilled-water 35mul, and heat for 5 minutes, and it was made to denaturalize at 95 degrees C, and quickly cooled in ice water after that. The 20xSSPE solution was 15microl Added to this cDNA solution (last salt concentration 6xSSPE solution), and it was considered as the liquid sample. The hybridization reaction was performed at 50 degrees C using the inspection

system which mentioned each sample sample above in the catch member made of nylon of 10 micrometers of average pore sizes, and 100 micrometers of thickness.
[0055]
And while analyzing the light field image detected by the primary detecting element 5 by computer 8 for control / analysis and deciphering the identification information of each fine particle 3, From the fluorescent image acquired simultaneously, the fluorescence intensity of each fine particle 3 was measured, the detection signal to each probe was made into the table, and expression amount analysis of RNA of each probe was conducted.
[0056]
Among these, in one gene (negative control; NC) and COLO320DM which do not exist in a human genome, One gene (c-myc), one typical housekeeping gene (beta-action) which are predicted that a manifestation goes up specifically, One gene (GAPDH:internal control; IC) predicted that there is no change of an expression amount among both cells was chosen, and it evaluated in each cDNA arrangement paying attention to the specific base sequence. As a result, with both NC (negative control), since fluorescence was not accepted, it was shown that the hybridization reaction advanced specifically. When observed about the signal of c-myc and beta-action, compared with TIG-1, it was admitted that the fluorescence intensity of the way of COLO320DM was strong certainly.
[0057]
When the fluorescence intensity about each gene was computed, the luminance of GAPDH (IC) was corrected to 1:1, when the ratio of each amount of gene expression was compared, in COLO320DM, 5.5 times were accepted for c-myc and 1.4 times as many rises were accepted for beta-action. When this result was compared with the result of RT-PCR, the substantially same result was obtained. The gene cluster it is similarly supposed about the result of other probes that an expression amount rises from cancer, and the gene cluster it is supposed that an expression amount is deteriorated were alike, respectively, and it has checked that the expression amount to TIG-1 which is a reference was analyzed correctly in COLO320DM.
[0058]
[Effect of the Invention]
As explained in full detail above, according to the present invention, by simple composition using the fine particles where identification information is given separately and which can perform exchange of a probe easily, It has highly precise discrimination precision and the inspection method of the biological substance using the fine particles in which the high speed processing of probe information is possible, and its inspection system can be provided.
[Brief Description of the Drawings]
[Drawing 1]It is a figure showing notionally the inspection system using the fine particles in the embodiment of the present invention.
[Drawing 2]It is ****** about the block configuration of the inspection system in the embodiment of the present invention.
[Drawing 3]It is a figure showing the appearance composition of the catch member used for the embodiment of the present invention.
[Drawing 4]It is a figure showing the appearance composition of the modification of the catch member used for the embodiment of the present invention.
[Drawing 5]It is a figure showing the modification of the reaction part in the embodiment of the present invention.
[Explanations of letters or numerals]

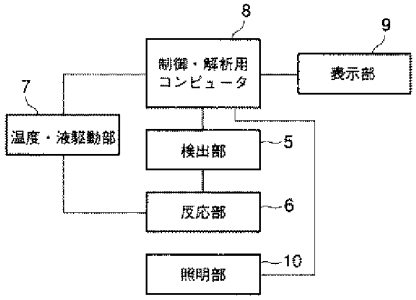
1, 1a, and 1b -- a catch member and 2 -- a concave part and 3 -- fine particles and 4 -- a tube and 5 -- a primary detecting element and 5a -- an imaging lens and 6 -- a reaction part and 7 -- temperature and a liquid driving part, and 8 -- the computer for control / analysis, and 9 -- a display part and 10 -- an illumination part.

DRAWINGS

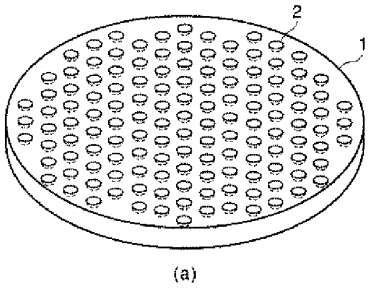
[Drawing 1]



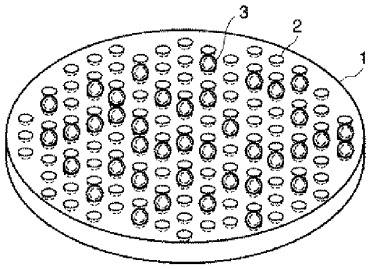
[Drawing 2]



[Drawing 3]

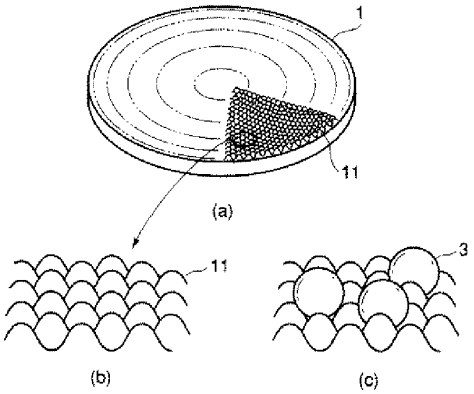


(a)

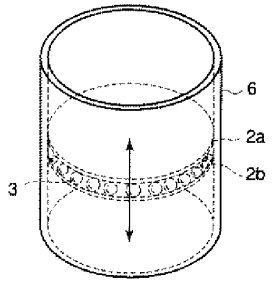


(b)

[Drawing 4]



[Drawing 5]



WRITTEN AMENDMENT

[Written Amendment]
[Filing date]Heisei 15(2003) June 20 (2003.6.20)
[Amendment 1]
[Document to be Amended]Description
[Item(s) to be Amended]0051
[Method of Amendment]Change
[The contents of correction]
[0051]
The fluorescence incident light unit made from OLYMPUS was used for the illumination part 10 at the overhead light study system using the metal halide light source. The filter set of BFL made from OLYMPUS was used for the incident light of visible light. About measurement of a fluorescent image, the filter set corresponding to various kinds of fluorochromes was controlled from software, and a change was made possible. Here, it labeled fluorescently in FITC and the WIBA filter set made from OLYMPUS was used for the detection.
[Amendment 2]
[Document to be Amended]Description
[Item(s) to be Amended]Fig.2
[Method of Amendment]Change
[The contents of correction]
[Drawing 2]It is a figure showing the block configuration of the inspection system in the embodiment of the present invention.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2004-354164
(P2004-354164A)
(43)公開日　平成16年12月16日(2004.12.16)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
G01N 33/543	G01N 33/543	525C	4B024
C12M 1/00	C12M 1/00	A	4B029
C12N 15/09	C12Q 1/68	A	4B063
C12Q 1/68	G01N 33/566		
G01N 33/566	C12N 15/00	ZNAA	

審査請求 未請求　請求項の数 10　OL　（全 12 頁）

(21)出願番号　特願2003-151094(P2003-151094)
(22)出願日　平成15年5月28日(2003.5.28)

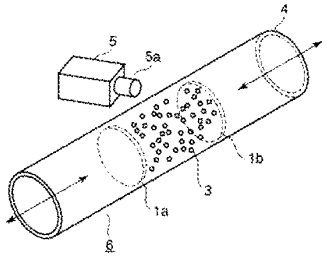
(71)出願人　000000376
オリンパス株式会社
東京都渋谷区幡ヶ谷２丁目４３番２号
(74)代理人　100058479
弁理士　鈴江　武彦
(74)代理人　100091351
弁理士　河野　哲
(74)代理人　100084618
弁理士　村松　貞男
(74)代理人　100100952
弁理士　風間　鉄也
(72)発明者　小池　尚
東京都渋谷区幡ヶ谷２丁目４３番２号　オリンパス光学工業株式会社内

Ｆターム(参考)　4B024 AA11　CA09　HA12

最終頁に続く

(54)【発明の名称】微粒子を用いた検体の検査方法及びその検査システム

(57)【要約】
【課題】従来のマイクロアレイを用いた検査方法は、画像処理が複雑であり識別装置が高価であり、マイクロアレイ上のプローブは固定されており項目設計の自由度が低い。またビーズアレイによる方法は、識別装置が大掛かりで高価であり、識別精度が低くく誤測定が生じやすい。
【解決手段】本発明は、個別に識別情報を持ち、プローブが固定された微粒子３を捕捉部材１ａ，１ｂ間に封止して検体を含む検体溶液に浸して、温度・液駆動部７により検体溶液を所望温度に保持しつつ流動させて反応させ、一方の捕捉部材表面に重なり無く捕捉された微粒子３を検出部５で撮像し、その撮像から識別情報とプローブ情報とを読み出し解析を行う微粒子を用いた生体物質の検査方法及びその検査システムである。
【選択図】　図１



Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4689

【特許請求の範囲】
【請求項1】
個々に識別情報が付与され、所定の検体に反応するプローブが含まれる溶液中で該プローブが固相化された多種多数の微粒子と、該溶液を透過可能で、かつ、上記微粒子を捕捉可能な捕捉部材を有し、該微粒子と検体を含み流動する溶液とを接触させ、前記捕捉部材により捕捉された微粒子から、上記識別情報と上記プローブによる検体の結合量の情報との両者を検出することを特徴とする検体の検査方法。
【請求項2】
個々に識別情報が付与され、所定の検体に反応するプローブが含まれる溶液中で該プローブが固相化された多種多数の微粒子と、該溶液を透過可能で、かつ、上記微粒子を捕捉可能な捕捉部材を有し、該微粒子と検体を含み流動する検体溶液とを接触させ、微粒子から、上記識別情報と上記プローブによる検体の結合量の情報との両者を検出することを特徴とする検体の検査方法。
【請求項3】
上記微粒子は、上記捕捉部材の表面に捕捉された際に、その捕捉部材表面の占める面積が２０～８０％となる数量が上記検体溶液に混入されていることを特徴とする請求項１に記載の検体の検査方法。
【請求項4】
多種のプローブに対する検体の反応を１つの系内で行う検査法に用いられ、
個々に識別情報が付与され、検体に反応するプローブが含まれる反応溶液中で、該プローブが固相化されることを特徴とする微粒子。
【請求項5】
上記微粒子の識別情報は、サイズの差、形状の差、色の差、個別識別（ＩＤ）情報のいずれかによるものである請求項４に記載の微粒子。
【請求項6】
上記微粒子の上記サイズは、１０～１００μｍであることを特徴とする請求項５に記載の微粒子。
【請求項7】
個々に識別情報が付与され、所定の検体に反応するプローブが含まれる溶液中で該プローブが固相化された多種多数の微粒子と、
上記多種多数の微粒子と検体を含む溶液とが混入される容器と、
上記溶液を透過可能で、かつ、微粒子を捕捉可能な捕捉部材と、
上記溶液を所望する温度に制御する温度制御手段と、
上記溶液を流動させる駆動手段と、
上記微粒子を画像データとして取り込む検出手段と、
付与された上記識別情報と固相化された上記プローブとを関連づけて、上記検出手段により得られた画像データから上記識別情報と反応したプローブ情報とを解析する解析手段と、
を具備することを特徴とする微粒子を用いた検体の検査システム。
【請求項8】
上記検出部手段は、固体撮像素子を搭載するカメラ若しくは、顕微鏡のいずれかからなることを特徴とする請求項７に記載の微粒子を用いた検体の検査システム。
【請求項9】
上記微粒子を捕捉する上記捕捉部材の表面は、該微粒子が係止するサイズの凹部が複数設けられている請求項７に記載の検体の検査システム。
【請求項10】
上記微粒子を捕捉する上記捕捉部材の全表面は、該微粒子が係止するサイズの凹凸部が複数設けられている請求項７に記載の検体の検査システム。

【発明の詳細な説明】
【０００１】

【発明の属する技術分野】
本発明は、個別に識別情報が付与された微粒子を用いて、微粒子に固相化されたプローブによる被検体中の生体物質を検出する検査方法及びその検査システムに関する。
【０００２】
【従来の技術】
一般に、公知な被検体中の多数の物質を同時に測定するマイクロアレイと称する手法が知られており、広く利用されている。この手法では、測定信号を分離するために空間的に分離した多数のプローブをガラス等の担体上にスポット状に固相している。その後、ハイブリダイゼーションを行った後、各プローブにおける蛍光色を読み取り、識別を行っている。
【０００３】
また、マイクロアレイと同様な技術として、特許文献１及び特許文献２には、ビーズアレイが提案されている。このビーズアレイは、個別のビーズを識別するために１または２種類の蛍光物質を形成させている。但し、ビーズアレイを用いた場合、識別精度が低いため、誤測定が生じやすい欠点がある。
【０００４】
そこで、特許文献３には、これらのビーズをバーコード形状に加工し、識別の情報を持たせたものが開示されている。この方法においては、フォトリソグラフにより加工したバーコード形状の粒子に、タンパク等を結合させ、フローサイトメトリーにて検出する。
【０００５】
また、特許文献４には、多孔質構造を持つ捕捉部材、例えばフィルタ上にプローブを固相化し、捕捉部材面に対して検体溶液を上下方向に駆動させることで、反応を高速化する技術が知られている。
【０００６】
【特許文献１】
特表２００１－５２０３２３号公報
【０００７】
【特許文献２】
特表２００２－５０１１８４号公報
【０００８】
【特許文献３】
国際特許出願００／１６８９３（特表２００２－５２６７５５号公報）
【０００９】
【特許文献４】
特許番号３２０８３９０公報
【００１０】
【発明が解決しようとする課題】
前述したマイクロアレイを用いた方法は、位置の確定のために多くの画像処理が必要であり、それらの機器が高価となっている。また、設計時にマイクロアレイ上の所定位置へ一度固定したプローブは後から動かせないので、項目設計の自由度が低い。
さらに、マイクロアレイは、それぞれを個別に作製しなければならないので、同じ仕様でもマイクロアレイ間における品質が一定していないため、原理的に抜き取り検査ができず、全品検査という手間が掛かっている。
【００１１】
また、ビーズアレイによる方法においても、識別装置が大掛かりになり、高価となっている。また、識別精度が低いため、誤測定が生じやすい欠点がある。さらに、蛍光物質は長期保管において劣化してしまい、取り扱いに問題がある。
【００１２】
前述した特許文献３に開示されているビーズをバーコード形状に加工した技術は、フローサイトメトリーでの検出は、反応と検出が別々の工程となる等、操作が煩雑であることや

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4691

、装置自体の調整や解析に熟練を要すること、また反応を高速化することが難しい。この手法においても、装置が大掛かりとなる。

【００１３】

このように、マイクロアレイの作製には大掛かりな製造装置が必要であり利用者がマイクロアレイを製造することは非常に困難であり、利用の自由度や、用途の拡大に限界があった。例えば、プローブの選択・プローブの設計を誤って、マイクロアレイを作製した場合には、ひとつのプローブの作成ミスのために、マイクロアレイ全体を作製し直す必要があった。

【００１４】

また、特許文献４においては、反応の高速化が図れる反面、捕捉部材上にプローブを固相化しなければならないため、マイクロアレイと同様な課題があり、また、手間が掛かる作業となっている。

【００１５】

そこで本発明は、個々に識別情報が与えられ、プローブの交換が容易にできる微粒子を用いた簡素な構成により、高精度な識別精度を有し、プローブ情報の高速処理が可能な微粒子を用いた生体物質の検査方法及びその検査システムを提供することを目的とする。

【００１６】

【課題を解決するための手段】

本発明は上記目的を達成するために、個々に識別情報が付与され、所定の検体に反応するプローブが含まれる溶液中で該プローブが固相化された多種多数の微粒子と、該溶液を透過可能で、かつ、上記微粒子を捕捉可能な捕捉部材を有し、該微粒子と検体を含み流動する溶液とを接触させ、前記捕捉部材により捕捉された微粒子から、上記識別情報と上記プローブによる検体の結合量の情報との両者を検出する検体の検査方法を提供する。

【００１７】

以上のような構成の検体の検査方法によれば、検体溶液が流動されて、それに伴い微粒子が移動しつつ、プローブと検体溶液中の検体との反応が促進されて高速化される。また、検体溶液の流動に伴い捕捉部材表面に微粒子が一時的且つ重なり無く捕捉され、この状態を撮像した画像データの解析によりフィルタ表面上に存在する微粒子を検出して、目的とする反応物のみが有効に測定される。

【００１８】

さらに、個々に識別情報が付与され、所定の検体に反応するプローブが含まれる溶液中で該プローブが固相化された多種多数の微粒子と、上記多種多数の微粒子と検体を含む溶液とが混入される容器と、上記溶液を透過可能で、かつ、微粒子を捕捉可能な捕捉部材と、上記溶液を所望する温度に制御する温度制御手段と、上記溶液を流動させる駆動手段と、上記微粒子を画像データとして取り込む検出手段と、付与された上記識別情報と固相化された上記プローブとを関連づけて、上記検出手段により得られた画像データから上記識別情報と反応したプローブ情報とを解析する解析手段とを備える検査システムを提供する。

【００１９】

以上のような構成の検体の検査システムは、前述した検査方法と同様な作用効果に加えて、従来のマイクロアレイを利用する装置の構成よりも小型で簡易で且つ低コストであり、ビーズアレイを利用するによる方法においても、識別装置よりも、簡易な作業で識別精度が高く、正確な測定を行うことが出来る。

【００２０】

【発明の実施の形態】

以下、図面を参照して本発明の実施形態について詳細に説明する。

まず、本発明の生体物質の検査方法及び検査装置に係る実施形態について説明する。ここでは、この検査方法に用いられるプローブが固定された微粒子について説明する。

この検査方法では、予め識別情報を持たせた複数の微粒子にプローブを固定して用いる。これらの微粒子の識別情報としては、サイズ、形状の差、色の差又はＩＤ情報等のいずれか、又はこれらの組合せを利用することが可能であり、それぞれに適した検出部を設ける

。例として、微粒子にマイクロファブリケーションの技術を用いて、固有の形状を持たせることや、微粒子自体に微細加工技術により、数値、形状を付加することや、暗号、バーコードなどの情報を持たせることで、光学的手段、あるいは取得画像の演算処理によって識別が可能となる。

【００２１】

さらに、微粒子としては、識別情報を付加・認識が容易だけではなく、目的とする検出物に対するプローブが容易に固相化される物質が適している。両者を同時に実現できるものが好ましいが、場合によっては、２次的な加工により、プローブの固相化を行っても構わない。例えば、樹脂製、ガラス製のビーズなどを有効に用いることができる。

【００２２】

これらの微粒子には、予めプローブが結合しやすくするための処理を施す。この処理としては、微粒子表面の電荷をマイナスにチャージすることで、プラスチャージを持つ核酸と結合しやすくする様な方法や、微粒子表面に官能基を有する分子を結合させて、化学修飾を施した核酸プローブと結合しやすい状態にする等がある。具体的な例として、核酸をプローブに用いる場合であれば、プローブにアミノ基、アルデヒド基、チオール基、ビオチンなどの修飾を行い、微粒子表面をアミノ基、アルデヒド基、チオール基、アビジンなどで修飾し、それぞれの反応を利用して結合させることや、または、２価性若しくは、１価性の架橋剤を用いて微粒子とプローブを結合させることができる。勿論、これらに限定されるものではない。

【００２３】

このような識別情報を持つ微粒子を複数種用意し、これらの微粒子を反応溶液中で分散させプローブと反応させることにより、プローブが固相化された微粒子を作成する。このプローブと微粒子の反応は、ピペット操作により非常に簡便に行うことが可能である。また、後に行われる解析のために、この時に微粒子における識別情報と固相化されたプローブの種別を関係づけたデータを作成する。

【００２４】

このような微粒子を用いることにより、マイクロアレイ製造装置のような大掛かりな装置は必要なく、作製の自由度が高い。例えば、プローブの設計を誤った場合であっても、そのプローブを有する微粒子のみをピペット操作にて作り直して、入れ替えることで対応することができる。また、予め多種の識別情報を施した微粒子を多数用意しておき、必要なプローブ数に応じて、これらの中から選択して利用することもできる。

【００２５】

また、本発明による検査方法においては、微粒子を後述するような光学的な検出を行う検出部を用いて識別することが可能である。従って、プローブとの反応量を測定するための検出部にあわせて、微粒子自体の識別方法を選択することができる。例えば、検体を蛍光標識し、蛍光顕微鏡を検出部とした場合には、微粒子の検出も蛍光検出とすれば、全体構成を簡略化することが可能にある。但し、検出部は、これに限定されるものではない。

【００２６】

次に図１には、前述した微粒子を用いた検査システムを概念的に示し、図２は、この検査システムのブロック構成を示す。

この検査システムは、検体溶液が透過可能な基材により形成された２枚の捕獲部材（例えば、フィルタ等）１ａ、１ｂと、これらの捕捉部材１ａ、１ｂが間隔をあけて嵌め込まれ、反応キャピラリーとしても機能する透明なチューブ４と、捕捉部材１ａ、１ｂ間に封止された微粒子（プローブ）３と、これらの捕捉部材１ａ、１ｂ間に配置され、反応した微粒子３から識別情報及びプローブ情報等を光学的に読み取るための撮像部を含む検出部５とを備えている。このチューブ４は、ガラスや樹脂等の透明部材により形成され、検体溶液が入れられている。温度・液駆動部７により、このチューブ４内に入れられた検体溶液は、所定温度に保たれ、矢印（図１）に示すように流動される。従って、捕捉部材１ａ、１ｂ間に封止されている微粒子３は、この流れに乗って移動されている。捕捉部材１ａ、１ｂ、チューブ４及び検体溶液により、微粒子３のプローブに対する反応部６を構成する

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4693

。また、検出部５は、固体撮像素子（ＣＣＤ等）により撮像するカメラを搭載し、撮像レンズ５ａがチューブ４に近接して配置されている。

【００２７】

さらに、温度・液駆動部７及び検出部５を制御し、検出部５で検出された識別情報やプローブ情報を解析し、その結果を例えば、液晶表示装置等の表示部９に表示させる制御・解析用コンピュータ８が設けられている。また微粒子３へ可視光を照射する照明部１０が設けられ、微粒子３の輝度の検出を蛍光で行うことができる。尚、図示していないが、制御・解析用コンピュータ８にインターフェース機能を搭載して、ネットワーク等を介して外部装置例えば、ホストコンピュータと接続して、通信によりデータや制御信号（外部装置からの制御）のやり取りを行ってもよい。

【００２８】

このようなシステム構成において、検体溶液を捕捉部材面に対して直交する方向に流動させることにより、微粒子３のプローブと検体溶液中の検体との反応を高速化することが可能である。つまり、検体溶液の流動（撹拌）により、プローブ分子と検体分子の衝突頻度が高められる。このため反応が促進され、一般的な検体溶液を静止状態で反応されるものに対して、飛躍的に反応速度（反応時間）を速めることが可能となる。

【００２９】

この原理を本実施形態の微粒子３による反応に適用すると、反応が高速化されるだけでなく、検体溶液が流れ込む（吸引）側の捕捉部材表面に複数の微粒子３が一時的に捕捉され、この時の捕捉部材で捕捉された微粒子３を検出することで、目的とする反応物のみを有効に測定することができる。

【００３０】

また本実施形態の検査システムは、従来のマイクロアレイを利用する装置の構成よりも簡易であり、ビーズアレイを利用するによる方法においても、識別装置よりも、簡易な作業で識別精度が高く、正確な測定を行うことが出来る。

【００３１】

この捕捉部材１ａ、１ｂにおける検体溶液が流れ抜ける粗さ（孔径）としては微粒子３のサイズよりも細かいものを利用することで、微粒子３が捕捉部材１ａ、１ｂを透過することなく、捕捉部材で捕捉することができ、これを検出することでＢ／Ｆ分離が可能となる。

【００３２】

この際に、捕捉部材１ａ、１ｂ上へのプローブの固相化が不要であることから、固相化反応に適した捕捉部材基材を選択する必要がないため、捕捉部材１ａ、１ｂの基材の選択範囲の制限が少なく、検出部５にあわせて、好適する捕捉部材基材を利用すればよい。例えば、検体を蛍光標識した場合には、捕捉部材１ａ、１ｂの基材に自家蛍光の少ないものを用いることが好ましい。但し、捕捉された微粒子３をその捕捉部材面と対面する方向以外から観察し、捕捉された微粒子３のみを検査するような場合には、捕捉部材１ａ、１ｂの自家蛍光により制約されることはない。

【００３３】

また、検出部５のカメラによる画像の取得は、広い視野に広がる複数の粒子の画像を一括取得することができ、効率よく検査画像を取得することが可能となる。尚、検出部５は、カメラだけでなく顕微鏡を応用した検査装置が考えられる。捕捉部材に対する溶液の駆動によって検体溶液中の微粒子３は捕捉部材面上に展開される。検体溶液が吸引されている状態では捕捉部材表面には、微粒子３だけが散在するため、これらを顕微鏡に付属して設けられている検査装置によって、画像として取得する。さらに、検出部５は、カメラを利用した画像の取得に限らず、スキャニングなどにより取り込むことも可能である。

【００３４】

また、この際に、Ｂ／Ｆ分離をより確実に行うために検体溶液を抜き取り、洗浄を行うことはＳ／Ｎの向上に有効である。この場合には、検体溶液を吸引して廃棄し、新たに洗浄溶液を添加し、再度、検体溶液の流動を繰り返す。また、必要に応じて同様な洗浄を複数

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4694

回繰り返すことによって、Ｓ／Ｎをより向上させることが可能となる。

【００３５】

本実施形態における微粒子３は、球形状に限定されず、楕円体、直方体、円柱等のいかなる形状であっても問題ない。また、微粒子３の材質としては、限定されるものではないが、ガラス・金属などの無機物が微細加工や化学的な修飾、自家蛍光によるバックグラウンドの問題に対して有利であり、樹脂製のものは、安価で用意に粒径の揃った微粒子３を用意することが可能であり、用途に応じて使い分けることが望ましい。

【００３６】

また、検体溶液中への分散の度合いは、限定されるものではないが検査面に対する微粒子３の締める面積が２０～８０％程度となることが望ましい。２０％より少ないと、検査の精度が低下し、また、８０％を超えると捕捉部材表面で微粒子３の重なりが発生し、正確に検査することが困難となる。

【００３７】

このように微粒子３の重なりを防止するために、種々の方法が考えられる。

【００３８】

例えば、捕捉部材面に対する溶液の駆動により微粒子３が捕捉されるが、この際に溶液の駆動方向とは直交する面方向に系全体を振盪することで、捕捉部材表面上に均一に分散させることが可能となる。他にも、超音波を用いて分散させる方法や、微粒子３自体に電荷や磁気を持たせることで、外部からの電圧印加や、磁力により分散状態を制御し、均一に捕捉部材表面上へ分散させることができる。

【００３９】

また、図３（ａ）に示すように捕捉部材１表面の全面に亘り微粒子３を均一に捕捉できるように、微細加工により多数の凹部２を形成することも有効である。この場合には、図３（ｂ）に示すように微粒子３は、それぞれの凹部２に捕捉され、重なりを防止することが可能である。

【００４０】

さらに、図４（ａ）、（ｂ）に示すように１表面の全面に亘り微粒子３を均一に捕捉できるように、微細加工により多数の凹凸部１１を形成してもよい。この凹凸部１１により、図４（ｃ）に示すように、微粒子３が、それぞれの凹凸部１１の凹部分に捕捉され、重なりを防止することが可能である。

【００４１】

また図５に示すように、チューブ４を縦方向に配置して、上下に捕捉部材１ａ、１ｂを嵌め込み、検体溶液を上下に流動させつつ、微粒子３を挟み込むようにすることにより、分散状態を制御することができ、微粒子３の重なり合いによる検査精度の低下を抑えることが可能となる。尚、図１に示した構成において、捕捉部材表面を撮像するのではなく、捕捉部材１ａ、１ｂの間のチューブ４部分を撮像する場合には、捕捉部材１ａ、１ｂには、前述したような表面加工等を施す必要はない。また図５に示すように縦方向にチューブ４を配置した場合で上方向から撮像する場合には、上側の捕捉部材が透明か又は、微粒子３の蛍光を透過するように構成される。

【００４２】

また、検体溶液に含まれる検体への標識は、蛍光で行うことが好ましいがこれに限定されるものではない。蛍光は、生体由来の検体に対する標識や取り扱いが容易であること、比較的安価であることから生体由来の検体の検査に広く利用されている。例えば、検体にｃＤＮＡを利用する場合には、例えばＲＮＡよりの逆転写反応の際に、蛍光標識基質として取り込ませたり、プライマの末端に蛍光標識することで、ＰＣＲによる増幅により標識を行ったりと、通常の分子生物学的な手法にて行われている方法にて容易に検体に修飾を行うことができる。

【００４３】

また、微粒子３に固相化するプローブは、核酸のみならず生体由来の物質として、例えば、タンパク質や抗体といったものを固相化することが可能であり、幅広いアッセイへの応

用が可能である。

【００４４】

検出部５で検出された画像から特定の微粒子３を識別するためには、その画像に対して種々の処理を施す。例えば、取得された画像を、微粒子３の散布状態に応じて、複数の領域に分割する。それぞれの分割された領域に対し、微粒子３の識別情報を検出し、同時にその強度を測定する。この識別情報と結合強度の関係をもって、結果の出力値とする。

【００４５】

ここで、画像の個々の微粒子３は、画像上で重なり合わさらないようにことが好ましい。検体溶液の流動を利用して捕捉部材表面上にトラップされた微粒子３の展開状態は、検体溶液が往復する毎に変わるため、検体溶液が流動するごとに画像を取得し、複数の画像から個々の微粒子３に最適な状態を結果として採用することや、また、複数の結果の平均値などを評価することで、結果を導くことが可能となる。勿論、積極的に散布することも可能である。

【００４６】

このような反応系に最適な微粒子３の粒径は、１０μｍ～１００μｍ程度の直径が有効であり、これ以上微小な場合には、微粒子３の加工や識別情報の付加が難しくなる。また、これ以上大きい場合には１つの系内に導入するプローブの種類を多くした場合には、微粒子３の数量が多くなり、検出が困難となる。経験的には、上記程度の粒子径が適当であるが、勿論、これに限定されるものではない。

【００４７】

以下に、前述した検査システムを用いた生体物質の検査方法を実施した第１の例について説明する。

【００４８】

微粒子３として、ポリスチレン製からなる４種のサイズの球形状を用意した。それぞれ平均粒径は、２５μｍ、５０μｍ、７５μｍ、１００μｍとする。それぞれの微粒子３の粒径は非常に精度よく揃っており、バラツキは±５μｍ程度であり、そのサイズによる種の識別は容易である。尚、サイズのバラツキが少ない程、使用できる種別の数が多くなる。

【００４９】

夫々の粒径の微粒子３の表面にアミノ基を導入し、またプローブの合成核酸の末端をアミノ基修飾し、それぞれをＢｉｓ［Ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ］ｓｕｂｅｒａｔｅを用いて結合させた。本例ではＤＮＡの変異を解析することを目的として、それぞれの微粒子３に１塩基ずつ異なる４種のプローブとした。

【００５０】

プローブ１　ＧＴＴＧＧＡＧＣＴＧＧＴＧＧＣＧＴＡＧＧ
プローブ２　ＧＴＴＧＧＡＧＣＴＣＧＴＧＧＣＧＴＡＧＧ
プローブ３　ＧＴＴＧＧＡＧＣＴＴＧＴＧＧＣＧＴＡＧＧ
プローブ４　ＧＴＴＧＧＡＧＣＴＡＧＴＧＧＣＧＴＡＧＧ

これらのプローブを固相した微粒子３をＦＩＴＣにて蛍光標識済みのＫ－ｒａｓガン遺伝子（Ｋ－ｒａｓコドン１２を増幅するプライマーを利用してＰＣＲによって増幅しておいたもの）と混合した。混合した検体溶液を、陽極酸化により得られた多孔質薄膜上に滴下し、図２に示した構成による検出システムを用いて６５℃でのハイブリダイズ反応を行った。尚、微粒子３の構成（組合せ）により照明部１０及び検出部５を適宜、変更できるような構成となっている。一例として、微粒子３の形状を可視光の落射照明により行い、微粒子３の輝度の検出を蛍光で行うものを示す。

【００５１】

照明部１０にはメタルハライド光源を用い、落射光学系にはＯＬＹＭＰＵＳ製の蛍光落射ユニットを用いた。可視光の落射には、ＯＬＹＭＰＵＳ製のＢＦＬの捕捉部材セットを用いた。また、蛍光画像の測定に関しては、各種の蛍光色素に対応した捕捉部材セットをソフトウエアより制御し変更可能とした。ここでは蛍光標識をＦＩＴＣにて行い、その検出には、ＯＬＹＭＰＵＳ製ＷＩＢＡ捕捉部材セットを用いた。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4696

【００５２】
同時にカメラによる撮影と溶液の駆動を連動して制御できる構成とし、検体溶液の流動を往復させる反応と連動して，蛍光画像及び、明視野画像を取得した。これを画像処理のソフトウエアにて、明視野画像より各微粒子３のサイズを、蛍光画像よりその蛍光強度を測定した。これにより、以下の結果が得られた。結果はカメラの出力階調（輝度）から計算し、検出値の最大を１００％として表示したものである。
プローブ１　４％
プローブ２　１００％
プローブ３　３％
プローブ４　７％
この結果より、検体はプローブ２とのパーフェクトマッチである変異を持つものであることが確認された。
【００５３】
次に、本発明の生体物質の検査方法を実施した第２の例について説明する。　微粒子３は、シリコン基板にフォトリソグラフィー技術を用いて複数の微小なバーコード状の識別記号を設けた後、これらをダイシングにより小片化して作製される。この微粒子３には、１００種の識別情報を付与し、癌関連の１００の遺伝子のプローブを固相化した。
【００５４】
プローブ核酸は、末端をアミノ基にて修飾し、微粒子３の表面には、チオール基を有するシランカップリング剤をあらかじめ反応させ、それぞれのプローブ核酸とをＮ－（４－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｂｕｔｙｒｙｌｏｘｙ）ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅにて架橋させた。得られた微粒子３を等量ずつ混合させた溶液を調製した。サンプルには、正常ヒト繊維芽細胞株ＴＩＧ－１（以下、ＴＩＧ－１と略す）由来のｔｏｔａｌ　ＲＮＡと、ヒト大腸癌細胞株ＣＯＬＯ３２０ＤＭ（以下、ＣＯＬＯ３２０ＤＭと略す）由来のｔｏｔａｌ　ＲＮＡを各２５μｇ用意し、これらを鋳型としてｏｌｉｇｏ　ｄＴ　ｐｒｉｍｅｒを用いて逆転写法によって、ＦＩＴＣ標識１本鎖ｃＤＮＡを作製した。このＦＩＴＣ標識されたｃＤＮＡを滅菌蒸留水３５μｌに溶解させ、９５℃で５分間加熱して変性させ、その後、氷水中で急冷した。このｃＤＮＡ溶液に、２０×ＳＳＰＥ溶液を１５μｌ加えて（最終塩濃度６×ＳＳＰＥ溶液）、液体試料とした。それぞれの検体サンプルを平均孔径１０μｍ、膜厚１００μｍのナイロン製の捕捉部材にて、前述した検査システムを用いて５０℃でハイブリダイズ反応を行った。
【００５５】
そして検出部５により検出された明視野画像を制御・解析用コンピュータ８で解析して、各微粒子３の識別情報を判読するとともに、同時に取得された蛍光画像より、各微粒子３の蛍光強度を測定し、各プローブに対する検出シグナルを表にして各プローブのＲＮＡの発現量解析を行った。
【００５６】
このうち、ヒトゲノム中に存在しない遺伝子１個（ネガティブコントロール；ＮＣ）、ＣＯＬＯ３２０ＤＭにおいて、特異的に発現が上昇すると予測される遺伝子１個（ｃ－ｍｙｃ）、代表的なハウスキーピング遺伝子１個（β－ａｃｔｉｏｎ）、両細胞間で発現量の変動がないと予測される遺伝子１個（ＧＡＰＤＨ：インターナルコントロール；ＩＣ）を選択し、それぞれのｃＤＮＡ配列に特異的な塩基配列に着目し、評価を行った。その結果、ＮＣ（ネガティブコントロール）では共に蛍光が認められないことから、ハイブリダイゼーション反応が特異的に進行したことが示された。また、ｃ－ｍｙｃとβ－ａｃｔｉｏｎのシグナルについて観察してみると、ＴＩＧ－１に比べて、ＣＯＬＯ３２０ＤＭのほうが確かに蛍光強度が強くなっていることが認められた。
【００５７】
また、各遺伝子についての蛍光強度を算出したところ、ＧＡＰＤＨ（ＩＣ）の輝度を１：１に補正し、各遺伝子の発現量の比を比較したところ、ＣＯＬＯ３２０ＤＭでは、ｃ－ｍｙｃが５．５倍、β－ａｃｔｉｏｎが１．４倍の上昇が認められた。この結果を、ＲＴ－

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4697

ＰＣＲの結果と比較したところ、ほぼ同様の結果が得られた。また、他のプローブの結果についても同様に、癌にて発現量が上昇するとされる遺伝子群、及び発現量が低下するとされる遺伝子群のそれぞれにて、ＣＯＬＯ３２０ＤＭでは、リファレンスであるＴＩＧ－１に対する発現量が正しく解析されていることが確認できた。

【００５８】

【発明の効果】

以上詳述したように本発明によれば、個々に識別情報が与えられ、プローブの交換が容易にできる微粒子を用いた簡素な構成により、高精度な識別精度を有し、プローブ情報の高速処理が可能な微粒子を用いた生体物質の検査方法及びその検査システムを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図１】本発明の実施形態における微粒子を用いた検査システムを概念的に示す図である。

【図２】本発明の実施形態における検査システムのブロック構成を示すずである。

【図３】本発明の実施形態に用いる捕捉部材の外観構成を示す図である。

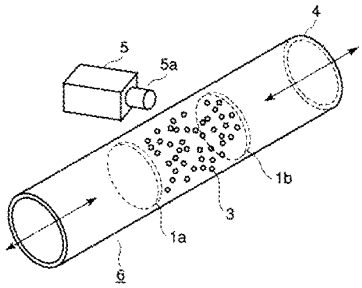
【図４】本発明の実施形態に用いる捕捉部材の変形例の外観構成を示す図である。

【図５】本発明の実施形態における反応部の変形例を示す図である。

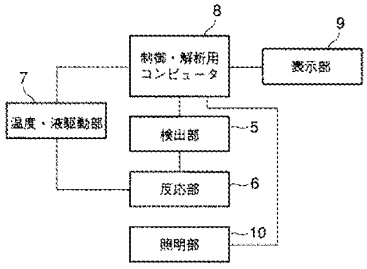
【符号の説明】

１，１ａ，１ｂ…捕捉部材、２…凹部、３…微粒子、４…チューブ、５…検出部、５ａ…撮像レンズ、６…反応部、７…温度・液駆動部、８…制御・解析用コンピュータ、９…表示部、１０…照明部。

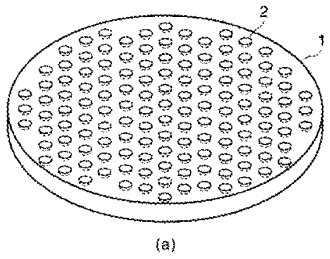
【図1】

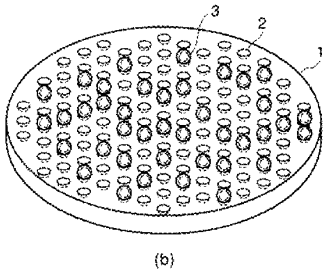


【図2】

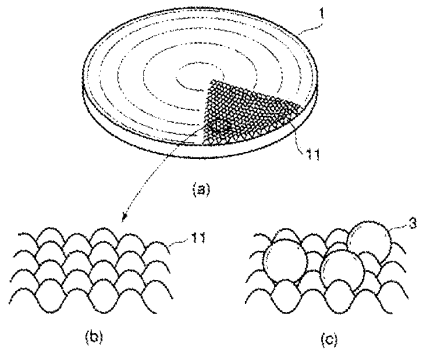


【図3】

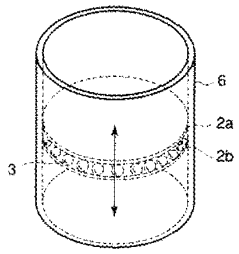




【図4】



【図5】



【手続補正書】
【提出日】平成15年6月20日(2003.6.20)
【手続補正1】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５１】
照明部１０にはメタルハライド光源を用い、落射光学系にはＯＬＹＭＰＵＳ製の蛍光落射ユニットを用いた。可視光の落射には、ＯＬＹＭＰＵＳ製のＢＦＬのフィルタセットを用いた。また、蛍光画像の測定に関しては、各種の蛍光色素に対応したフィルタセットをソフトウエアより制御し変更可能とした。ここでは蛍光標識をＦＩＴＣにて行い、その検出には、ＯＬＹＭＰＵＳ製ＷＩＢＡフィルタセットを用いた。
【手続補正2】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】図２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【図２】本発明の実施形態における検査システムのブロック構成を示す図である。

Ｆターム(参考) 4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15
4B063 QA18 QA19 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34 QS39 QX02

(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2005-518553
(P2005-518553A)
(43)公表日　平成17年6月23日(2005.6.23)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
G01N 33/53	G01N 33/53	Y	2G054
C12Q 1/06	C12Q 1/06		4B063
C12Q 1/68	C12Q 1/68	A	
C12Q 1/70	C12Q 1/70		
G01N 21/76	G01N 21/76		

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 119 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-572353 (P2003-572353)
(86)(22)出願日　平成14年9月6日 (2002.9.6)
(85)翻訳文提出日　平成16年4月30日 (2004.4.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/028434
(87)国際公開番号　WO2003/073817
(87)国際公開日　平成15年9月12日 (2003.9.12)
(31)優先権主張番号　60/317,658
(32)優先日　平成13年9月6日 (2001.9.6)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　501486165
ジェノミック　プロファイリング　システムズ　インコーポレイティッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　ベッドフォード　ワン　オーク　パーク　ドライブ　フロアー　2
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100108774
弁理士　橋本　一憲
(74)代理人　100128048
弁理士　新見　浩一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞およびウイルスの迅速かつ高感度な検出方法

(57)【要約】
本発明は、医学的試料、工業的試料、および環境試料中の細胞標的およびウイルス標的を迅速かつ高感度に同定するための効率的な方法を提供する。本発明は標的を標識し、次いで、広域画像処理を使用してそれらを検出する。本発明に基づく診断試験は迅速で、超高感度で、定量的で、多重化され、かつ自動化され得る。この試験は、試料の調製を最小限とし、核酸増幅または細胞培養は必要としない。広範囲の細胞およびウイルスがこの試験によって検出され得る。本発明に基づく試験により、核酸増幅試験の高レベルの感度、使い勝手のよさ、およびイムノアッセイの速度、ならびに微生物学的試験によって提供される費用対効果および定量性が実現され得る。本発明は、診断レパートリーにおける格差に取り組みながら、現在の診断技術における最良の属性を具体化する。

【特許請求の範囲】
【請求項1】
試料中の標的細胞またはウイルスを検出するための方法であって、該標的は、
a.少なくとも2つの直行する次元において50ミクロン未満を測定し、かつ
b.密度が㎟あたり標的細胞100個未満の検出領域を含む検出ゾーンに無作為に分散しており、
該方法は、
a.該標的細胞に照射して検出可能なシグナルを生成する工程、および
b.該検出領域の区画における該シグナルを同時に検出する工程であって、該区画の最も長い直線寸法は、20倍以下の倍率を使用して1㎜より長い、工程、
を含む、方法。
【請求項2】
工程（a）の前に、標的のカテゴリー特異的結合部位にカテゴリー結合分子を特異的に結合させる条件下で、該標的を該カテゴリー結合分子と接触させ、複合体を形成する、請求項1記載の方法。
【請求項3】
カテゴリー結合分子が、1つまたはそれ以上のシグナリング部分で直接的または間接的のいずれかにより標識される、請求項2記載の方法。
【請求項4】
検出工程が複合体を検出する、請求項3記載の方法。
【請求項5】
標的細胞と直接的または間接的のいずれかにより結合するシグナリング部分に試料を接触させる．請求項1記載の方法。
【請求項6】
複合体が、検出領域㎟あたり10複合体未満の密度で検出ゾーン中に無作為に分散される、請求項2記載の方法。
【請求項7】
標的が、検出領域㎟あたり1複合体未満の密度で検出ゾーン中に無作為に分散される、請求項1記載の方法。
【請求項8】
検出が5倍より大きい倍率を必要としない、請求項1記載の方法。
【請求項9】
検出が2倍より大きい倍率を必要としない、請求項8記載の方法。
【請求項10】
検出が1倍より大きい倍率を必要としない、請求項9記載の方法。
【請求項11】
検出が0.2倍より大きい倍率を必要としない．請求項10記載の方法。
【請求項12】
標的が細菌細胞または真核生物細胞である、請求項1記載の方法。
【請求項13】
標的がウイルスである、請求項1記載の方法。
【請求項14】
カテゴリー複雑性が存在する、請求項1記載の方法。
【請求項15】
標的が存在する、請求項14記載の方法。
【請求項16】
標的細胞が、分類学的群：ウイルス、細菌、真菌、植物、多細胞動物、および原生生物のうちの2つまたはそれ以上に由来する細胞を含む、請求項1記載の方法。
【請求項17】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4702

検出工程が、標的に関する非重複カテゴリーの1つより多くを検出および同定する、請求項1記載の方法。
【請求項18】
カテゴリー結合分子が、天然または組換えの抗体またはアプタマーに特異的に結合する、請求項2記載の方法。
【請求項19】
カテゴリー結合分子が、DNA、RNA、またはPNAのプローブに特異的に結合する、請求項2記載の方法。
【請求項20】
カテゴリー結合分子が、一塩基多型を含む核酸多型に直接隣接する部位に特異的に結合する、請求項2記載の方法。
【請求項21】
試料が、多細胞生物から得られた液体または組織を含む、請求項1記載の方法。
【請求項22】
試料が動物の体液または組織を含む、請求項21記載の方法。
【請求項23】
試料がヒト由来である、請求項22記載の方法。
【請求項24】
試料が非ヒト脊椎動物由来である、請求項22記載の方法。
【請求項25】
試料が、呼吸器、尿生殖器、生殖器、中枢神経系、尿、血液、真皮、血漿、血清、唾液、創傷組織、滲出液、生検、糞便、および固体組織の試料、からなる群のメンバーであるか、またはそれらのメンバーに由来する、請求項22記載の方法。
【請求項26】
試料が植物に由来する、請求項1記載の方法。
【請求項27】
試料が環境の大気もしくは水、または、環境に曝されている表面、物体、もしくは生物を採取することによって得られる、請求項1記載の方法。
【請求項28】
試料が、ヒトまたは動物における局所または体内での使用のための、医薬、化粧品、血液、または他の製品の製造における生の材料、完成した材料、または製造過程中の材料；食品または飲料の製造における生の材料、製造過程中の材料、または完成した材料；医療装置またはインビトロ診断装置の製造における生の材料、製造過程中の材料、または完成した材料；化学製品；工業的表面；器具類；および機械類からなる群より選択されるか、それらに由来するか、またはそれらから得られる、請求項1記載の方法。
【請求項29】
方法が、標的細胞に対して1つまたはそれ以上の物質または処理の効果を検出する、請求項1記載の方法。
【請求項30】
選択方法が、検出表面上に標的を沈着させるために用いられ、かつ該選択方法が磁気選択、遠心分離、沈殿、および沪過からなる群より選択される、請求項1記載の方法。
【請求項31】
方法が、カテゴリー結合分子に結合体化された磁気粒子と試料とを接触させる工程を含む、請求項30記載の方法。
【請求項32】
選択部分を使用することなく選択方法の1つを用いて、標的を検出ゾーンに沈着させる、請求項30記載の方法。
【請求項33】
標的を、液体中で、該液体の平均密度よりも大きい平均密度を有する標的特異的選択部分と接触させ、重力、遠心力、または求心力を用いて検出表面上に実質的に沈着させる、

請求項30記載の方法。
【請求項34】
試料を液化および/または均質化するために該試料を処理する、請求項1記載の方法。
【請求項35】
接触を液相中で行う、請求項1記載の方法。
【請求項36】
接触を、液相と固相との間の界面で行う、請求項1記載の方法。
【請求項37】
標的以外の物質または物体を除去するために試料を処理する、請求項1記載の方法。
【請求項38】
接触工程の前に、標的が検出表面上に固定化される、請求項2記載の方法。
【請求項39】
標的が、検出ゾーンのマトリックスまたは部材に結合しているカテゴリー結合分子によって検出ゾーン中に特異的に結合している、請求項1記載の方法。
【請求項40】
標的が、検出ゾーンのマトリックスまたは部材への化学結合の形成によって検出ゾーン中に特異的に結合している、請求項1記載の方法。
【請求項41】
標的が、風乾、熱固定、および化学固定からなる群より選択されるプロセスによって検出ゾーン中に固定化される、請求項1記載の方法。
【請求項42】
標的上のカテゴリー特異的結合部位がカテゴリー結合分子による接触に対して接近可能となるように、試料が処理される、請求項2記載の方法。
【請求項43】
結合していないシグナリング分子が、検出工程の前に複合体から除去される、請求項3記載の方法。
【請求項44】
シグナリング部分が光子性シグナリング特性を有し、かつコロイド性または可溶性物質が、検出ゾーンにないシグナリング部分により放射されるシグナルを吸収するために付加される、請求項3記載の方法。
【請求項45】
試料が、標的に関する異なる非重複カテゴリーの存在について並行して試験するための個々のアリコートに再分割される、請求項1記載の方法。
【請求項46】
アリコートの各々を、カテゴリー結合分子に関する異なる非重複ファミリーに結合体化された標識粒子の集団と接触させる、請求項45記載の方法。
【請求項47】
試料を、標的実体の非重複カテゴリーに特異的に結合するカテゴリー結合分子の別個のファミリーと連続的に接触させる、請求項45記載の方法。
【請求項48】
検出ゾーンが、固体ガラス、固体プラスチック、マイクロタイタープレートのウェルの表面、吸水性メンブレン、プラスチックストリップ、キャピラリー管の表面、微小流体チャンバーの表面、および微小流体チャネルの表面からなる群より選択される物質を含む、請求項1記載の方法。
【請求項49】
方法がラテラルフロークロマトグラフィーを含む、請求項1記載の方法。
【請求項50】
方法が一連の試料で自動的に反復される、請求項1記載の方法。
【請求項51】
試料が、検出のための手段を備える機器に自動的にロードされる、請求項50記載の方法

。
【請求項52】
検出のための手段を備える機器に物理的に結合しておりそして機器へと自動的かつ連続的にロードされる一連の検出ゾーンに、試料を自動的に沈着させる、請求項50記載の方法。
【請求項53】
方法が、複合体の照射の結果として、放射光、散乱光、反射光、または吸収光を検出する、請求項3記載の方法。
【請求項54】
検出工程が蛍光を検出する、請求項1記載の方法。
【請求項55】
検出工程が非発光性の化学発光を検出する、請求項1記載の方法。
【請求項56】
照射のための手段が1つまたはそれ以上のレーザーを含む、請求項1記載の方法。
【請求項57】
照射のための手段が1つまたはそれ以上の発光ダイオードを含む、請求項1記載の方法。
【請求項58】
照射のための手段が白色光の光源を含む、請求項1記載の方法。
【請求項59】
照射のための手段が、複合体の検出に適切な波長の光による試料の照射用に適合させた1つまたはそれ以上の光学フィルターを含む、請求項1記載の方法。
【請求項60】
照射のための手段が、シグナリング部分の検出に適切な波長の光による試料の照射用に適合させた1つまたはそれ以上の光学フィルターを含む、請求項3記載の方法。
【請求項61】
放射光、散乱光、透過光、または吸収光を検出するための手段が、シグナリング部分の照射に由来するシグナルの検出用に適合させた光学フィルターを含む、請求項3記載の方法。
【請求項62】
検出工程が熱放射を検出する、請求項1記載の方法。
【請求項63】
検出工程が光吸収を検出する、請求項1記載の方法。
【請求項64】
光吸収が赤外領域にある、請求項63記載の方法。
【請求項65】
検出工程が蛍光を検出する、請求項1記載の方法。
【請求項66】
検出工程が細胞の自己蛍光を検出する、請求項1記載の方法。
【請求項67】
検出工程が蛍光偏光を検出する、請求項1記載の方法。
【請求項68】
検出工程が光の反射を検出する、請求項1記載の方法。
【請求項69】
検出工程が光散乱を検出する、請求項1記載の方法。
【請求項70】
検出工程がラマン散乱を検出する、請求項1記載の方法。
【請求項71】
カテゴリー結合分子が直接的または間接的に標識粒子に結合体化される、請求項2記載の方法。
【請求項72】

標識粒子が20ミクロン未満のサイズである、請求項71記載の方法。
【請求項73】
標識粒子が10ミクロン未満のサイズである、請求項71記載の方法。
【請求項74】
標識粒子が5ミクロン未満のサイズである、請求項73記載の方法。
【請求項75】
標識粒子が1ミクロン未満のサイズである、請求項74記載の方法。
【請求項76】
標識粒子が100nm未満のサイズである、請求項75記載の方法。
【請求項77】
標識粒子が10nm未満のサイズである、請求項76記載の方法。
【請求項78】
標識粒子が、立方ミクロンの粒子体積あたり酵素シグナリング部分2つ以上の平均密度で酵素シグナリング部分を含む、請求項71記載の方法。
【請求項79】
蛍光シグナル特性を有し、かつ有機蛍光団、アップレギュレートされた蛍光体、ランタニド、量子ドット、および非蛍光部材から蛍光生成物を生成する酵素、からなる群より選択されるシグナリング部分で着色されたか、または結合体化された粒子であるシグナリング部分を、標識粒子が含む、請求項71記載の方法。
【請求項80】
標識粒子がラテックス粒子、シリカ粒子、量子ドット、共鳴光散乱粒子、アップコンバートされた蛍光体であるか、または主に金もしくは銀からなる粒子である、請求項71記載の方法。
【請求項81】
シグナリング部分が酵素的シグナリング部分である、請求項3記載の方法。
【請求項82】
シグナリング部分がアルカリホスファターゼ酵素または西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素である、請求項81記載の方法。
【請求項83】
シグナリング部分が、有機蛍光団、アップレギュレートされた蛍光体、ランタニド、量子ドット、および非蛍光部材から蛍光生成物を生成する酵素、からなる群より選択される、請求項3記載の方法。
【請求項84】
シグナリング部分が蛍光シグナリング特性を有する、請求項3記載の方法。
【請求項85】
シグナリング部分が化学発光シグナリング特性を有する、請求項3記載の方法。
【請求項86】
分子がアクリジニウムエステルである、請求項85記載の方法。
【請求項87】
シグナリング部分が色素原性シグナリング特性を有する、請求項3記載の方法。
【請求項88】
シグナリング部分が光散乱シグナリング特性を有する、請求項3記載の方法。
【請求項89】
カテゴリー結合分子が抗体を含む、請求項2記載の方法。
【請求項90】
カテゴリー結合分子がアプタマーを含む、請求項2記載の方法。
【請求項91】
カテゴリー結合分子が核酸またはペプチド核酸を含む、請求項2記載の方法。
【請求項92】
カテゴリー結合分子がリガンドを含む、請求項2記載の方法。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4706

【請求項93】
カテゴリー結合分子が、100kD未満の分子量を有する分子を含む、請求項2記載の方法。
【請求項94】
カテゴリー結合分子が、10kD未満の分子量を有する分子を含む、請求項93記載の方法。
【請求項95】
カテゴリー結合分子が、1kD未満の分子量を有する分子を含む、請求項94記載の方法。
【請求項96】
試料をカテゴリー結合分子の集合に接触させる方法であって、該集合は、検出される標的実体の各非重複カテゴリーに特異的なカテゴリー結合分子の1つのファミリーを含む、請求項2記載の方法。
【請求項97】
カテゴリー結合分子のファミリーのすべてが、同じシグナル特性およびシグナルクラスのシグナルを放出するシグナリング部分で標識される、請求項96記載の方法。
【請求項98】
カテゴリー結合分子のファミリーの各々が、別個のシグナルクラスのシグナルを放出するシグナリング部分で標識される、請求項96記載の方法。
【請求項99】
カテゴリー結合分子の集合が、ファミリー複雑性1を有する、請求項96記載の方法。
【請求項100】
カテゴリー結合分子の集合が、1より大きいファミリー複雑性を有する、請求項96記載の方法。
【請求項101】
集合が、5以上のファミリー複雑性を有する、請求項100記載の方法。
【請求項102】
集合が、10以上のファミリー複雑性を有する、請求項101記載の方法。
【請求項103】
集合が、20以上のファミリー複雑性を有する、請求項102記載の方法。
【請求項104】
集合が、少なくとも10種類の別個のカテゴリー結合分子を含む、請求項96記載の方法。
【請求項105】
集合が、少なくとも50種類の別個のカテゴリー結合分子を含む、請求項104記載の方法。
【請求項106】
カテゴリー結合分子の各カテゴリー特異的ファミリーが、少なくとも2つの別個のカテゴリー結合分子を含む、請求項96記載の方法。
【請求項107】
各カテゴリー特異的ファミリーが、少なくとも10個の別個のカテゴリー結合分子を含む、請求項106記載の方法。
【請求項108】
標的細胞の非重複カテゴリーが、検出領域におけるそれらの異なる局在化によって同定される、請求項96記載の方法。
【請求項109】
カテゴリー結合分子の各ファミリーが、同じシグナルシグニチャーを有する、請求項96記載の方法。
【請求項110】
シグナリング部分によりカテゴリー結合分子のカテゴリー特異的ファミリーに与えられる別個のシグナルシグニチャーを検出し、それらのシグニチャー間を識別することによって標的細胞の非重複カテゴリーが同定される、請求項96記載の方法。
【請求項111】
標識粒子が異なる集団を含み、各集団は、カテゴリー結合分子に関する異なる非重複フ

ファミリーに結合体化されている、請求項1記載の方法。
【請求項112】
ファミリーの各々が、検出ゾーンの部分に安定に結合しているカテゴリー結合分子のファミリーにも特異的に結合する標的のカテゴリーに特異的に結合し、ここで、検出ゾーンに結合している該ファミリーの各々は別個の部位に結合しており、該部位は検出工程によって区別され得る、請求項96記載の方法。
【請求項113】
ファミリーの各々が、同じシグナリングのクラスおよびシグニチャーを有する、請求項96記載の方法。
【請求項114】
集団の各々が、別個のシグナリングのシグニチャーおよびクラスを有する、請求項96記載の方法。
【請求項115】
方法が、カテゴリー結合分子ファミリーのシグナルシグニチャー間を識別するために適合させた光学フィルターを含む、請求項96記載の方法。
【請求項116】
カテゴリー結合分子のファミリーが、1より大きいファミリー複雑性を有する、請求項96記載の方法。
【請求項117】
カテゴリー結合分子のファミリーが、5以上のファミリー複雑性を有する、請求項96記載の方法。
【請求項118】
カテゴリー結合分子のファミリーが、10以上のファミリー複雑性を有する、請求項96記載の方法。
【請求項119】
カテゴリー結合分子のファミリーが、20以上のファミリー複雑性を有する、請求項96記載の方法。
【請求項120】
検出工程が、試料を自動的に追跡するためのバーコードまたはそれに相当する標識がある容器中で行われる、請求項1記載の方法。
【請求項121】
検出工程が、同じ表面の複数の画像の整列を容易にするための位置決めマークを有する表面上で行なわれる、請求項1記載の方法。
【請求項122】
方法が、検出ゾーンの特定の領域中の対照マークまたは対照細胞を検出する、請求項1記載の方法。
【請求項123】
放射光、散乱光、透過光、または吸収光を検出するための手段が、複合体の発光に由来するシグナルの検出用に適合させた光学フィルターを含む、請求項53記載の方法。
【請求項124】
検出工程が光電検出器の使用を含む、請求項1記載の方法。
【請求項125】
検出工程が光電アレイ検出器の使用を含む、請求項1記載の方法。
【請求項126】
光電検出器がCCD検出器またはCMOS検出器を含む、請求項125記載の方法。
【請求項127】
放射光、散乱光、または吸収光を検出するための手段が画像増感装置を含まない、請求項53記載の方法。
【請求項128】
検出工程が光電子増倍管検出器の使用を含む、請求項1記載の方法。

【請求項129】
検出工程が光ダイオード検出器の使用を含む、請求項1記載の方法。
【請求項130】
標的を検出および同定するための手段が感光性フィルムを含む、請求項1記載の方法。
【請求項131】
検出工程が直接視覚的検出を含む、請求項1記載の方法。
【請求項132】
検出工程によって得られた画像を分析することによって、該検出工程から標的の数を推測する、請求項1記載の方法。
【請求項133】
画像分析ソフトウェアを使用して、検出工程から標的のカテゴリーを推定する、請求項1記載の方法。
【請求項134】
画像分析ソフトウェアが、他のシグナルから複合体によって生成されたシグナルを識別するための機能をさらに含む、請求項133記載の方法。
【請求項135】
試料中の標的細胞を検出するための方法であって、該標的細胞は、
a.少なくとも2つの直行する次元において50ミクロン未満を測定し、かつ
b.密度が㎟あたり標的細胞100個未満の実質的に平面の検出領域に無作為に分散しており、
c.該方法は、照射されていない検出領域の区画における標的実体を同時に検出するために画像増感装置を含まない光電検出器を使用する工程を含み、該区画の最も長い直線寸法は1㎜より長い、
方法。
【請求項136】
試料中の標的細胞を検出するための方法であって、該標的細胞は、
a.少なくとも2つの直行する次元において50ミクロン未満を測定し、かつ
b.密度が㎟あたり標的細胞100個未満の検出領域を含む実質的に平面の検出表面に無作為に分散しており、
c.該方法は、該検出領域の区画における該標的細胞を同時に検出し、該区画の最も長い直線寸法は1㎜よりも長く、そして該検出は、
i.光検出器を使用する工程、または
ii.該検出領域を照射する工程
iii.細胞もしくはウイルスの培養工程
を含まない、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【0001】
発明の背景
本発明は、医学的、工業的、または環境的試料における細胞およびウイルスの同定に関する。
【0002】
概要
低レベルの特定の細胞およびウイルスを検出、計数、および同定することは、慣用的な医学的、工業的、および環境的な診断の基礎である。例えば、試料は、感染性の因子、癌細胞、食品病原体、薬品および化粧品の製品の微生物夾雑物、ならびに水および環境中の微生物を検出するために分析される。
【0003】
単純に言えば、以下の議論は慣用的な医学的診断に焦点を当てており；同様の方法が工業的および環境的な適用についても使用される。
【背景技術】

【0004】
微生物学的方法
微生物培養は、大量に迅速に増殖するそれらの性向を利用することによって、微生物（例えば、細菌、ウイルス、および真菌）の単純な視覚的検出を可能にする。例えば、栄養ブロス中に置いた場合、個々の細菌細胞（眼で見るにははるかに小さすぎる（約100万分の1メートル）個々の細菌細胞は、そのブロスを24時間未満で見た目に混濁させ得る。
【0005】
関連する微生物培養技術（微生物計数またはコロニー計数と呼ばれる）は、試料中の微生物細胞の数を定量する。インサイチューの微生物の複製に基づくこの微生物計数法は、一般的に、試料中の各々の微生物細胞について1つの視覚的に検出可能な「コロニー」を産生する。従って、目に見えるコロニーを計数することにより、微生物学者が試料中の微生物細胞の数を正確に決定することが可能となる。微生物の計数を実行するために、細菌細胞をペトリ皿中の栄養寒天（「寒天プレート」）の表面に播き、そしてインサイチューで細菌を複製させる条件下でインキュベートしてもよい。個々の視覚的に検出できない微生物は繰り返し複製して、始祖の微生物細胞が沈着した物理的な部位で、大量の娘の微生物を生成する。この娘の細胞はもともとの細胞とともに同時に局在化しているので（本質的に接触している）、その結果、娘細胞のコホート（1000万個または1億個の細胞にまで増殖し得る）は、最終的にはプレート上で目に見えるコロニーを形成する。
【0006】
微生物培養は、1世紀以上経っていても医学的微生物学および工業的微生物学における品質管理試験（例えば、製薬、食品、および飲料の製造）においてなお大半を占める方法であるという事実から証明されるように、著しく首尾よい方法である。この方法は安価であり、比較的単純で、かつ非常に感度が高い。微生物培養の感度は、牛挽き肉中の食物に起因する病原体についての一般的な試験において見ることができる。個々の顕微鏡的な細菌病原体細胞は、微生物培養を使用して、牛挽き肉25グラム中で検出され得る。微生物培養の別の利点は、医学的および工業的に重要性がある広い範囲の微生物を検出するその能力である。
【0007】
いくつかのウイルスは培養で増殖され得る。ウイルス培養は、研究の応用において、迅速に増殖するバクテリオファージ（細菌に感染するウイルス）について特に有用であった。核酸増幅のような方法が代わりに増加しているが、ウイルス培養は、時折、臨床的感染を診断するために使用される。
【0008】
慣習的な微生物培養は遅い。視覚的な検出のために必要とされる細胞またはウイルスの数を生成するために時間がかかる。微生物培養のために必要とされる増殖期間が長期であることは、医療および産業の両方において著しい問題である。例えば、患者の血液の感染を引き起こす微生物を培養および同定するには何日も要するため、真菌の血液感染を有する患者は、抗真菌治療が開始される前に死ぬ可能性がある。いくつかの感染性の因子（例えば、結核を引き起こす細菌）は、一般的に、培養で増殖するのに数週間を要する。M.ツベルクローシス（M.ツベルクローシス）を検出するために必要とされる期間が長いことで、結核を有する患者が、この伝染性の高い疾患を多くの他のヒトに感染させたり、または結核を有しない患者の隔離に費用がかかる。食品の製造においては、長時間の試験サイクルにより食品の変質が増加し得る。遅い微生物培養はまた、生物薬剤およびワクチンの製造にも有害な影響を与える。
【0009】
より迅速な微生物計数のための多数の微生物培養方法が開発されてきた。1つの迅速方法は、栄養培地でコートした顕微鏡スライド上に細菌細胞を沈着させる。顕微鏡試験を使用することで、微生物増殖が肉眼よりもはるかにより早期に検出され得る。なぜなら、顕微鏡は、少数の細胞分裂から生じる微小なコロニーを検出し得るからである。市販のシステムである、コリファースト迅速マイクロコロニーカウンター（Colifast Rapid Microco

lony Counter）(Colifast）は、目で観察され得る何時間も前に、蛍光標識された小さな大腸菌のコロニーを検出し得る。コリファーストシステムは、栄養寒天培地中に含まれる蛍光発生性の化合物（大腸菌によって代謝されるまでは蛍光性でない基質）を使用することによって検出の増強を達成する。生物発光標識を使用した微生物コロニーの迅速計数のためのシステムが最近市販されている。マイクロスター（MicroStar）システム（Millipore）は、適用するルシフェラーゼ酵素および基質の作用を介して光を生成するために微小なコロニー中の細胞ATPを使用する。この方法は、検出の時間を実質的に減少させる。マイクロスター画像化システムもまた、特定の細菌を同定するために標識されたプローブとともに使用されてきた（Stender, H.ら（2001）J. Microbiol Methods 46: 69-75）。

【0010】

免疫学的方法

免疫学的試験、すなわちイムノアッセイ法は、医学的診断において特定の細胞およびウイルスを同定するために頻繁に使用される。イムノアッセイ法は、標的およびウイルスの分子的成分上の部位に対する抗体の特異的結合を検出し得る。血清学的な試験は、抗原についての直接的な試験よりはむしろ、抗原に対し以前の曝露に応答する宿主の免疫学的応答について試験する免疫学的アッセイ法である。例えば、これらは、特定の細胞およびウイルスに対する宿主の抗体の存在について試験し得る。多数のイムノアッセイシステムは、大規模な自動化された中央検査室システムから、店頭で入手可能な妊娠検査薬に至るまでの範囲において利用可能である。この試験は、凝集アッセイ、沈降アッセイ、酵素結合免疫アッセイ、直接蛍光アッセイ法、免疫組織学的試験、補体結合アッセイ法、血清学的試験、免疫電気泳動的アッセイ法、および迅速「ストリップ」試験（例えば、ラテラルフロー試験およびフロースルー試験）を含む、広範囲の形式を網羅している。免疫学的試験は、極度に単純かつ迅速であり得る。従って、医院で、または患者が家で行い得る最も所望される試験の多くは、免疫学的試験である。

【0011】

遺伝子による方法

遺伝子による方法は、細胞およびウイルスからの核酸分子を検出および同定するための一般的かつ強力な手段である。核酸増幅に基づいて細胞およびウイルスの核酸含量を超高感度で検出および区別するための革命的な新規な方法が最近開発された。例えば、市販されている試験は、顕微鏡下での少数のHIVウイルス粒子（例えば、50粒子/ml）からの核酸を検出し得る。増幅技術には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、核酸配列に基づく増幅（NASBA）、転写媒介増幅（TMA）、およびローリングサークル増幅（RCA）が含まれる。増幅方法は、印象的な分析感度を与え、かつ、適度に迅速であり得る。例えば、スマートサイクラー（Smart Cycler）（Cepheid）は、1時間以内に結果が得られ得る（Belanger, S.D.ら（2002）Journal of Clinical Microbiology 40: 1436-40）。

【0012】

顕微鏡的画像処理方法

顕微鏡的画像処理は細胞およびウイルスを検出するための最も一般的な方法の1つである。標的は、例えば、染料、抗体、または核酸プローブを用いた標識によって顕微鏡的に可視化され得る。顕微鏡分析の感度は、触媒レポーター沈着（CARD）（これは、ヒト細胞中の単一コピーレベルのウイルスゲノムを検出するために使用されてきた（Huang, C.C.ら、Modern Pathology 11: 971-7, 1998））のような方法を用いて増強され得る。インサイチューハイブリダイゼーションの感度を増加させるための他の方法は、例えば、分枝DNAまたはデンドリマー技術（例えば、Orentas, R.J.ら、Journal of Virological Methods 77: 153-63, 1999）を使用するインサイチュー増幅もしくは複製、またはシグナル増幅に依存する。

【0013】

複数の蛍光標識が、インサイチュー分析を使用して一度に数種類の病原体を検出するために使用され得る。例えば、異なるカテゴリー特異的抗原に対する抗体は、異なる蛍光タ

グで標識され得る。コンビナトリアル標識ストラテジーもまた、いくつもの細菌病原体を同時に同定するために顕微鏡とともに使用されてきた（Amann, R.ら、Journal of Bacteriology 178: 3496-500, 1996；米国特許第6,007,994号）。

【0014】

顕微鏡的標的のハイスループットインサイチュー顕微鏡的分析を達成するいくつかの市販のシステムが開発されてきた（例えば、国際公開公報第98/22618号および同第93/21511号）。代表的には、微生物または細胞はスライドまたはマルチウェルプレートのウェルの底に沈着される。次いで、ウェル中の標識された標的は顕微鏡的に画像処理される。

【0015】

非顕微鏡的画像処理方法

非顕微鏡的画像処理方法によって、より広い領域が細胞の存在について調査され得る。例えば、ハママツコーポレーション（Hamamatsu Corporation）の研究者は、拡大なしで個々の細菌細胞を画像化し得るシステムを開発した（Masuko, M.ら、FEMS Microiol Lett 67: 231-8, 1991；Masuko, M.ら、FEMS Microbiol Lett 65: 287-90, 1991；Yasui, T.ら、Appl.Environ Microbiol 63: 4528-33, 1997）。このシステムは、光ファイバーシステム、画像増感装置、および画像処理装置に連結された、超高感度光子計数CCDカメラを使用する。ELISAスポット試験法は、特定の抗体（または他の豊富に分泌される産物；Logtenberg,T.ら、Immunol Lett 9: 343-7, 1985）を産生する単一の細胞を計数するための特殊化された技術である。この方法の感度は、多数の標的（分泌されたタンパク質分子）が分泌細胞の周りに局在化しているという事実に由来する。

【0016】

フローサイトメトリー法

フローサイトメトリーは、臨床診断検査室において細胞を特徴付けするための重要な手段である。フローサイトメトリー法は、それらの物理的特性および標識されたプローブ（例えば、染色剤、抗体、または核酸）を結合するそれらの能力に基づいて、特定の細胞型を定量的に検出するために使用される。個々の細胞または粒子は、レーザービームの先に、狭いチャネルを通って一度に1つ流されることを強いられる。蛍光照射およびサイズ/形状の情報が、生物/粒子によって引き起こされるスペクトルおよび光散乱を分析することによって収集される。何千もの個々の細胞または粒子が1分間あたりに分析され得る。例えば、フローサイトメトリーは、AIDS患者におけるリンパ球のクラスの集団サイズを定量するために使用される。タンパク質または核酸のような非細胞分子を検出および同定し得る高度に多重化されたフローサイトメトリー法は、ルミネックス（Luminex）から市販されている（米国特許第5,981,180号）。

【0017】

レーザー走査法

レーザー走査は、表面に沈着された細胞およびウイルスを検出するための強力かつ高感度の方法である。代表的には、顕微鏡的レーザービーム（例えば、直径20μm）が、多数の連続的で直線的な流路中の、固体表面に蛍光標識された標的を含む二次元試料にわたって追跡される。これらの流路の各々は前のものよりもわずかに片寄っており、その結果、試料全体の領域が最終的に走査される。蛍光標識された標的細胞がビームの下に落下したとき、放射された蛍光の閃光が、光電子増倍管のような検出装置によって検出される。顕微鏡的標的の数および位置はレーザーマルチビーム走査によって得られ得る。

【0018】

レーザー走査のための多数のシステムが開発されてきた。ScanRDI（登録商標）システム（Chemunex）は、フィルター上で微生物細胞を標識するための非特異的な蛍光色素を使用する（米国特許第5,663,057号；Mignon-Godefroy, K.ら、Cytometry 27: 336-44, 1997）。蛍光定量的微量アッセイ技術（FMAT；PE Biosystems and Biometric Imaging；Miraglia, S.ら、J Biomol Screen 4: 193-204, 1999）もまた、マイクロタイターウェル中で細胞を検出するために使用されてきた。洗練されたレーザー走査システムは、コンピューサイトコーポレーション（CompuCyte Corporation）（Kamentsky, L., 2001,「Laser Sca

nning Cytometry」、「Cytometry」、Z. Darzynkiewicz, H. CrissmanおよびJ. Robinsnon編、Methods in Cell Biology 第63巻、A部、第3版、シリーズ編者L. WilsonおよびP.Matsudaira (San Diego: Academic Press))によって開発および販売されている。液体試料（例えば、全血）中で個々の顕微鏡的標的を検出するマイクロビームレーザー走査システムは、イムニコンコーポレーション（Immunicon Corporation）およびトゥエンテ（Twente）大学の共同研究者によって開発された（Tibbe, A.G.ら、Nat Biotechnol 17: 1210-3、1999）。

【0019】

生化学的、化学的、および物理的方法

細胞およびウイルス、またはそれらの分子的成分、細胞およびウイルスの分子的成分の高感度検出のための他の技術には、とりわけ、フローサイトメトリー、質量分析法、バイオセンサー、吸収スペクトル分析、蛍光偏光、蛍光変動スペクトル分析、電気泳動、クロマトグラフィー、その他が含まれる。

【0020】

バイオセンサー技術はまた、細胞およびウイルスの高感度分析のために期待される。バイオセンサーは、生物学的な事象を転換するための物理的方法、例えば、抗原への抗体の結合の検出可能なシグナルへの転換を使用する。分子検出のために使用される1つの評判のよいバイオセンサーは、表面プラズモン共鳴を使用する（Mullett, W.M.ら（2000）Methods 22: 77-91）。サーモバイオスター（Thermo BioStar）の光学的イムノアッセイ法（Schultze, D.ら（2001）Eur J Clin Microbiol Infect Dis 20: 280-3）は、抗体への抗原の結合を検出するための光学的な干渉の原理を使用する。BARCバイオセンサー技術は、単一の磁気微粒子でタグ化された分析物の磁気抵抗検出（ハードディスク保存のために使用されるように）を使用する（Edelstein, R. L.ら、Biosens Bioelectron 14: 805-13, 2000）。

【0021】

細胞およびウイルスの検出についてまだ知られていない必要性

低レベルの細胞およびウイルスの慣用的な検出についての多数の異種かつ強力な方法が市販されているが、試験するレパートリーにはなお格差が存在する。特に、非常に低レベルの細胞およびウイルスを検出するための、迅速であり、実験室中で増殖させる必要がなく、使い勝手がよく、そして費用効果の高い試験についてはその必要性が存在する。

【発明の開示】

【0022】

本発明の背景

本発明は、医学的、工業的、および環境的試料中の細胞およびウイルスの標的を迅速かつ高感度に同定するための効率的な方法を提供する。本発明は、標的を標識し、次いで、広域画像処理を使用してその標識を検出する。本発明に基づく診断試験は、迅速で、超高感度で、定量的であり、多重化され、かつ自動化され得る。この試験は、試料調製を最小化し、核酸増幅または細胞培養を必要としない。広範な細胞およびウイルスがこの試験によって検出され得る。本発明に基づく試験は、核酸増幅試験の高レベルの感度、使い勝手のよさ、およびイムノアッセイ法の迅速性、ならびに、微生物学的試験によって提供される費用効果のよさおよび定量性を与え得る。本発明は、現在の診断技術の最も良好な属性を具体化しながら、診断レパートリーの格差に取り組むものである。

【0023】

低レベルの標的およびウイルスを迅速かつ安価に検出する本発明の能力は、既製品の市販の構成要素から作られた器具を使用するか、または全く器具を使用しないかのいずれかに基づき、高い強度の標識、迅速な反応速度論を容易にする形式、および広域画像処理、を組み合わせる利点から生じる。表1は、本発明の利点のいくつかを列挙したものである。

【0024】

（表１）

選択される本発明の利点
- 迅速な結果
- 超高感度
- 使用が容易
- 高い費用効果
- 複数の標的の同時分析

- 全ての種類の細胞およびウイルスについて走査
- 大容量または小容量で分析
- 自動化された定量的分析
- 最低限の試料調製

【0025】
本発明は、低レベルの細胞およびウイルスを特異的に標識して、高い強度のシグナルを生成することによってそれらを検出する。種々のシグナル生成複合体を使用でき、これらには、蛍光染色、光散乱、量子ドット、蛍光体、および酵素コートされた粒子が含まれる。これらの粒子は、次には、様々な種類のシグナルを生成でき、これらには、蛍光、化学発光、および比色的なシグナルが含まれる。同様に、種々の分子が、シグナル生成標識の特異的結合を達成するために使用でき、これらには、抗体、核酸、リガンド、およびアプタマーが含まれる。

【0026】
大きな容積での少ない数の標的およびウイルスの検出は、いくつかの臨床、環境、および製造に関わる試料を試験する場合に必要性がある。低レベルの標的について大きな試料を調査する本発明の能力は、部分的には、拡大を行わずに個々の細胞およびウイルスを検出するその能力に基礎を置いている。非拡大検出は、広い領域を単一の画像中で少ない数の粒子について調査することを可能にする。広域の画像処理は、次には、大容量の試料を効率的に分析する本発明の能力にとって重要となる。強力な顕微鏡または微小流体工学を使用して大容量中で標識された粒子を検出するには、困難な濃縮段階および何千もの画像の分析を必要とし得る。顕微鏡的なビームを使用して少ない数の粒子を走査する方法は、広域に適用された場合に非常に時間がかかりかつ高価となる。

【0027】
個々の顕微鏡的標識を計数することは、本発明に基づく試験の結果に強固さを付与する。細胞およびウイルスの標的を分析するための多くの広域画像処理方法とは対照的に、本発明は、一般的に、個々のシグナルを狭い隣接した領域に対して直接的に比較する。この比較により、広域における総シグナルおよびバックグラウンドを積算する方法と比べて、標識された標的を少量含む試料についてのシグナル対バックグラウンドの比率が改善される。

【0028】
個々の細胞またはウイルスの検出における別の利点は、検出領域のサイズの比例的な増加に伴い試料容量が増加してもその速度を犠牲とはせずに試験の感度を増大できることにある。

【0029】
広域画像における個々のシグナルを計数することはまた、偽陽性結果の割合を減少させる（偽陽性結果とは、実際の標的が存在しない場合に生じる陽性の試験結果である）。この計数方法は、試料中の分子（例えば、ATP、抗原、または核酸）の全体量を測定する方法のような単純な積算シグナルを検出する方法と比較して、利点である。シグナルを生じるいかなる人為産物（artifact）も、シグナルの積算を基礎とする方法を使用する場合には偽陽性を生じ得る。482の陽性シグナルを含む試料を考慮すると、これらの各々が100の蛍光単位を生成する。積算方法の結果は、ただ1つの数（48,200蛍光単位）である。同様の数の蛍光単位を生成する人為産物（例えば、大きな蛍光性のほこり粒子）は区別することができないかもしれない。対照的に、本発明は、単一の大きな蛍光性のほこり粒子と482個の陽性シグナルとの間を容易に区別できる。

【0030】
本発明を使用して構築された試験は、非常に低いレベルから高レベルまで、広い範囲の

濃度にわたって標的およびウイルスを検出し得る。本発明のこの特性、この広いダイナミックレンジにより、使用者は、狭いダイナミックレンジを有する技術にしばしば必要とされる試料調製の工程（例えば、複数回の希釈）を行わずに済む。

【0031】

本発明に基づく試験は、単純で、器具なしで、かつ費用効果のよい、単回使用のストリップ試験から、洗練された自動化ベンチトップシステムに至るまでの範囲にわたって、種々の有用な形式を開発し得る。

【0032】

種々の検出方法が本発明に使用でき、これらには、視覚的検出、フィルムに基づく検出、および電子的検出が含まれる。検出方法の範囲は、広範囲の診断問題および試験現場に取り組む際に利点となる。

【0033】

本発明の他の特色および利点は以下の記載および特許請求の範囲から明らかである。

【0034】

「標的」とは、試料中に潜在的に存在する細胞またはウイルスを意味し、その存在が本発明によって試験される。

【0035】

標的の「カテゴリー」とは、共通の1つまたはそれ以上の特徴を有し、かつ本発明を使用して構築される試験の目的のために同一であると見なされる複数の標的を意味する。例えば、すべてのHIVウイルスを検出するために設計された試験については、このカテゴリーは単にHIVである。このような試験は、HIV-1およびHIV-2の変異型を区別することなく、すべてのHIVウイルスを検出する。この場合において、標的のカテゴリーは、HIV-1とHIV-2の両方を含む。別の試験の目的が、HIV-2からHIV-1を区別することであってもよい。この場合においては、HIVの各タイプが異なるカテゴリーとして考慮される。

【0036】

標的の「非重複カテゴリー（non-overlapping categories）」とは、その和集合が空集合である標的のカテゴリーを意味する。すべての大腸菌（E.coli）の細菌のカテゴリー、すべてのシュードモナス（Pseudomonas）属の細菌のカテゴリー、すべての真菌のカテゴリー、およびすべてのHIVウイルスのカテゴリーは非重複カテゴリーである。すなわち、どのカテゴリーのメンバーも、他のセットのいかなるメンバーとはならない。対照的に、HIV-1ウイルスのカテゴリーおよびHIVウイルスのカテゴリーは、標的に関する重複カテゴリーである。なぜなら、HIV-1カテゴリーの各メンバーは、すべてのHIVウイルスのカテゴリーのメンバーでもあるからである。

【0037】

複数のカテゴリーを検出および同定する試験は、一般的に、標的に関する複数の非重複カテゴリーを検出する。例えば、血液中のHIVウイルス、HCVウイルス、およびHBVウイルスを同定するために設計された試験を考慮する。このような試験は、標的に関する3つの非重複カテゴリー（3種類のウイルスの各々に対して1つのカテゴリー）を区別する。ウイルスの各種類は3つのカテゴリーの1つにのみ存在することに注意されたい（例えば、HCVカテゴリーにはHIVウイルスは存在しない）。

【0038】

試験の「カテゴリー複雑性」とは、試験において検出される標的の非重複カテゴリーの数を意味する。

【0039】

「カテゴリー特異的結合部位」とは、「特異的結合条件」下でカテゴリー結合分子に「特異的に結合する」標的上の部位であり（「」内の用語については定義を参照されたい）、かつ、そのカテゴリーのメンバーではないが試験試料中にも存在し得るような標的と、試験より同定しようとする特定のカテゴリーのメンバーである標的とを区別する、標的上の部位を意味する。すなわち、この部位は、代表的には、1つのカテゴリーのすべてのメンバー上に存在し、そして代表的には、非重複カテゴリーの任意のメンバー上には存在し

ない。カテゴリー特異的結合部位は、「カテゴリー特異的結合分子」に「特異的に結合する」。

【0040】

カテゴリー特異的結合部位は、常に標的と物理的に結合している。蛍光抗原を結合し、かつもともとの分泌細胞の近傍に固定化されている多数の抗体タンパク質を検出することによって単一の抗体分泌ハイブリドーマ細胞が同定される、ELISAスポットアッセイ法を考慮する。この場合において、抗原に対する結合部位を含む分泌抗体分子は、ハイブリドーマ細胞とは物理的に結合していない。従って、遊離の抗体上の抗原結合部位はカテゴリー特異的結合部位ではない。

【0041】

試験が分類学的な群を構成する標的のカテゴリーについて試料を走査する場合、カテゴリー特異的結合部位は、その分類学的な群の本質的にすべてのメンバーに存在しているものであるが、試験試料中に存在し得る他の分類学的な群の本質的にすべてのメンバーに存在しているわけではない。1つの例は、特定のモノクローナル抗体に結合するHIVの膜タンパク質上の部位である。

【0042】

または、試験は、異なる分類学的な群のメンバーによって共有されるカテゴリー特異的結合部位について試料を走査し得る。この種類のカテゴリー特異的結合部位の例には、抗生物質耐性を付与し、病原性を付与し、または生存度を示す種々の高分子（例えば、DNA）および遺伝子、mRNA、ならびにタンパク質が含まれる。カテゴリー特異的結合部位は、しばしば、より大きな分子または複合体の一部である。例えば、カテゴリー特異的なゲノム配列は、試験においてカテゴリー特異的結合部位として使用され得る。このようなカテゴリー特異的結合部位は、以下を含み得る、はるかにより大きなゲノムの一部となる：（1）カテゴリー特異的でない区画；（2）カテゴリー特異的結合部位であるが試験が走査しない区画；および（3）試験が走査しない別個のカテゴリー特異的配列である他の区画。

【0043】

カテゴリーのメンバーである標的の、例えば、80％、90％、95％、または99％より多くに存在するが、同じクラスで他のすべてのカテゴリーのメンバーである標的の、例えば、80％、90％、95％、または99％より多くに存在しない結合部位は、カテゴリー特異的部位と見なされる。カテゴリー特異的結合部位は、些細にまたは例外的に、そのカテゴリーのメンバーである標的に欠けていてもよいことに注意されたい。

【0044】

同様に、カテゴリー特異的結合部位は、些細にまたは例外的に、あるカテゴリーのメンバーでない標的に存在していてもよい。例えば、本質的にすべての大腸菌の細菌に存在するが、他の細菌種には存在しないタンパク質部位を考慮する。何百万もの細菌のなかで1細胞未満という場合であってもよいが、変異によりそのタンパク質が産生されなくなった場合、そのマーカーはその大腸菌株には存在しない。しかし、このタンパク質部位は、なおカテゴリー特異的結合部位と見なされる。または、同じタンパク質についての遺伝子が、組換えDNA技術または天然の手段（例えば、ウイルス形質導入）によって異なる種の細菌株に遺伝子導入される。この場合において、大腸菌のカテゴリーのメンバーではない細菌株が、なお大腸菌特異的結合部位と見なされるものを発現する。

【0045】

「カテゴリー結合分子」とは、カテゴリー特異的結合部位に「特異的に結合する」分子または分子複合体を意味する。カテゴリー結合分子の例は、ゲノムDNAにハイブリダイズする核酸プローブ；タンパク質上の部位に特異的に結合するように選択されたか、またはインビトロで「進化した」核酸アプタマー；細胞抗原または血清タンパク質に結合する抗体；および、ホルモンレセプターまたは結合分子（例えば、アビジン）に特異的に結合する上皮増殖因子またはビオチンのようなリガンドである。2つのカテゴリー結合分子は、それらが別個かつ非重複のカテゴリー特異的結合部位に結合する場合に、別個であるといわれる。カテゴリー結合分子は、それらの分子的組成に従って呼ばれ得る（例えば、カテ

ゴリー結合オリゴヌクレオチド、プローブ、抗体、リガンドなど）。

【0046】

「捕捉分子」とは、表面，メンブレン、または粒子ではない他のマトリックスに安定に結合するカテゴリー結合分子を意味する。

【0047】

標的のカテゴリーに「特異的に結合する」カテゴリー結合分子とは、試験によって走査されるカテゴリーのメンバーである本質的にすべての標的に、定義された「結合条件」下で結合するが、カテゴリーのメンバーではないが試料中に存在する可能性のある本質的に他の種には結合しない、カテゴリー結合分子を意味する。走査するカテゴリー中の標的に結合されるカテゴリー結合分子の数は、このようなカテゴリーには存在しない標的に結合される数と比較して、例えば、2倍、5倍、10倍、または15倍より多い。

【0048】

「結合条件」とは、カテゴリー特異的結合部位へのカテゴリー結合分子の特異的結合を達成するための試験において使用される条件を意味する。例えば、カテゴリー結合分子がカテゴリー特異的DNAプローブである場合、特定の試験についての結合条件は、ストリンジェントなDNAハイブリダイゼーション条件であり得る。適切なストリンジェントなDNAハイブリダイゼーション条件は、当業者によって周知であるように、プローブの性質に依存する。例えば、500塩基より長い長さの代表的なDNAプローブについては、適切な結合条件（通常、ハイブリダイゼーションの用語で「洗浄条件」という）は、0.2×SSCで65℃である。抗原への抗体の結合については、代表的な結合条件は、PBS-TB中、室温である。

【0049】

カテゴリー結合分子の「ファミリー」とは、特定の標的のカテゴリーに特異的に結合するカテゴリー結合分子のセットを意味する。

【0050】

C型肝炎ウイルスに対して惹起されたポリクローナル抗体調製物は、カテゴリー結合分子のファミリーを構成する。なぜなら、この場合調製物は、標的であるHCVの同じカテゴリーに特異的に結合する複数の別個の抗体を含むからである。ポリクローナル抗体は、一般的に、カテゴリー結合分子のファミリーを構成する。なぜなら、これらは、一般的に、標的の同一カテゴリーに結合する複数の別個のカテゴリー結合分子を含むからである。アフィニティー精製が使用されない限り、ポリクローナル抗体調製物は、代表的には、選択された標的のカテゴリーに結合「しない」抗体もまた含むこと、および、他のカテゴリーに結合する抗体を含み得ることに注意されたい。なぜなら、動物の抗体レパートリーは、動物の感染の履歴によって決定されるからである。従って、ポリクローナル抗体は、好ましくは、アフィニティー法によって精製される。

【0051】

ファミリーにおけるカテゴリー結合分子は、カテゴリー中のいくつかの標的に結合し得るが、他には結合し得ない。例えば、HIV-2とは交差反応しないHIV-1特異的抗体、およびHIV-1とは交差反応しないHIV-2特異的抗体を考慮する。HIV-1とHIV-2の間を区別しない試験において1つのカテゴリーとしてHIVが検出される場合、2種類の抗体の混合物は、同じシグナルのシグニチャーを有するシグナリング部分で標識され得る。このカテゴリー結合分子のファミリー（これは、2つの抗体調製物の混合物である）が試験において使用される場合、HIV-1またはHIV-2が存在するか否かで同一のシグナルが得られる（この例において、抗体が、検出領域における部位でHIV標的を捕捉するために使用される場合には、抗HIV-1捕捉抗体および抗HIV-2捕捉抗体の混合物がこの部位で使用されることに注意されたい）。

【0052】

カテゴリー結合分子のファミリーの別の例は、すべての大腸菌O157:H7株に存在するが細菌の他の群のメンバーには存在しない、80のカテゴリー特異的ゲノムDNA配列のセットである。このカテゴリー結合分子のファミリーは、適切に調製した大腸菌O157:H7細胞に群としてハイブリダイズし得るが、他のカテゴリーの細胞にはハイブリダイズしない。フ

ファミリーは、異なるタイプのカテゴリー結合分子を含み得る。例えば、0157抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体およびインチミン（intimin）タンパク質（病原性因子）に結合するモノクローナル抗体はまた、カテゴリー結合分子の上記のファミリーに含まれ得る。カテゴリー結合分子のファミリーは、任意の数（すなわち、1またはそれ以上）のカテゴリー結合分子を含み得る。

【0053】

カテゴリー結合分子の「非重複ファミリー」とは、各ファミリーが、非重複カテゴリーのセット中の1つに、および1つのみのカテゴリーに特異的に結合する際のカテゴリー結合分子のファミリーを意味する。すなわち、カテゴリー結合分子の非重複ファミリーのセットは、非重複カテゴリーの一致したセットに対応付けられる。例えば、4つのUSPで対象となっている生物、大腸菌、サルモネラ菌、シュードモナス属種（Pseudomonas spp.）、およびスタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）を走査する試験において、4つの重複しないカテゴリーが存在する。このような試験には、試験カテゴリーの1つに対して各々特異的な、4つの異なる交差反応しないポリクローナル抗体を組み入れ得る。従って、試験には、カテゴリー結合分子の4つの非重複ファミリーが含まれる。試験におけるカテゴリー結合分子の非重複ファミリーは、カテゴリー結合分子の集合と呼ばれる（以下の定義を参照されたい）。

【0054】

「カテゴリー結合分子の集合」とは、特定の試験のために混合物中に組み合わせるカテゴリー結合分子の1つまたはそれ以上の非重複ファミリーのセットを意味する。標的の複数の非重複カテゴリーについて走査する試験は、カテゴリーあたりにカテゴリー結合分子の1つのファミリーを含む。これらのファミリーを含むカテゴリー結合分子の全体のセットは集合といわれる。例えば、5つのウイルス特異的なモノクローナル抗体を使用して、5種類の上気道ウイルス（RSV、A型インフルエンザ、B型インフルエンザ、パラインフルエンザ、およびアデノウイルス）の存在について走査する試験を考慮する。この5つのモノクローナル抗体は、カテゴリー結合分子の5つの非重複ファミリーを構成する。この抗体の合わせは、カテゴリー結合分子の集合である。

【0055】

集合の「カテゴリー結合分子複雑性」とは、集合中の別個のカテゴリー結合分子または部分の数を意味する。例えば、カテゴリー結合分子の集合が234個のオリゴヌクレオチドプローブからなる場合、この集合のカテゴリー結合分子の複雑性は234である。

【0056】

集合の「ファミリー複雑性」とは、集合中のカテゴリー結合分子の非重複ファミリーの数を意味する。ファミリー複雑性は、集合の各ファミリーにあるカテゴリー結合分子を結合するために必要とされる標的の最小数と同じである。試験のファミリー複雑性は、試験のカテゴリー複雑性に一致する。すなわち、試料はカテゴリーについて走査されるが、その別個のカテゴリーの数である。プローブに関し3つのファミリーからなるDNAプローブの集合を考慮する。1つのファミリーが12個の大腸菌カテゴリー結合DNA配列のセットからなり、別のファミリーが10個のロタウイルスカテゴリー結合DNA配列のセットからなり、そして別のファミリーが15個のジアルジア（Giardia）カテゴリー結合DNA配列のセットからなる。このプローブ集合のファミリー複雑性は3である。なぜなら、少なくとも3種類の標的（大腸菌、ロタウイルス、およびジアルジア）のゲノムが、集合におけるプローブすべてに結合するために必要とされるからである。

【0057】

「シグナルエレメント」とは、検出可能なシグナルを直接生成する分子または粒子を意味する。「直接的に生成する」という語句は、シグナルエレメントが、検出可能なシグナルの直接的な供給源または決定的な調節因子であるという事実を意味する。従って、シグナルが蛍光団から生じる光子である場合、蛍光団は光子の直接的な供給源であり、従って、シグナルエレメントである。シグナルがRLS粒子によって散乱された光子である場合、RLS粒子がシグナルエレメントである。あるいは、シグナルが、酵素西洋ワサビペルオキシ

ダーゼの色素原性沈殿産物から透過または散乱した光である場合、色素原産物がシグナルエレメントである。

【0058】

シグナルエレメントの特性は、このようなエレメントが、各部分は全体に対して比較し得るシグナルを生成するような部分に分割することができないということである（特性としてであり、強度においてでは必ずしもない）。従って、2nM直径の量子ドットは、それを分割することが、得られるナノクリスタルの特性（照射スペクトル）を変化させるので、シグナルエレメントである。フルオレセインのような蛍光色素を浸透させた5μm粒子はシグナリングエレメントではない。なぜなら、これは、各部分が、インタクトな粒子と比較し得るシグナリング特性を有するように部分に分割され得るからである。分子フルオレセインは、対照的に、シグナリングエレメントである。シグナル生成酵素（例えば、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ）の検出可能な産物もまた、シグナルエレメントと見なされる。このようなシグナルエレメント（または、前駆体からシグナルエレメントへの化学的転換が存在する場合、それらの前駆体）は、拡散性の基質、不溶性の産物、および/または不安定な中間体であり得る。例えば、酵素アルカリホスファターゼは化学発光性の基質CDPスター（CDP-Star）（NEN；カタログ番号NEL-601）を、活性化された生成物に転換する。この活性化した生成物が光子を放射する「シグナルエレメント」である。

【0059】

「シグナルリング部分」とは、1つまたはそれ以上のシグナルエレメントを含むかまたは産生（酵素の場合）する、分子、粒子、または基質を意味し、そしてこれは、カテゴリー結合分子に結合体化され得る分子、粒子、または基質を意味する。シグナリング部分は、共有結合的または非共有結合的のいずれかで、および直接的または間接的のいずれかで、カテゴリー結合分子に結合され得る（例えば、1つもしくはそれ以上のアダプターまたは「化学リンカー」部分を介して、あるいは同じ粒子に結合体化された両方の部分によって）。シグナリング部分の例には、カルボキシル化された量子ドット；核酸プローブまたは抗体プローブへの結合のために修飾されたテキサスレッド（Texas Red）のような蛍光団；ストレプトアビジンコートされた蛍光ポリスチレン粒子（これは、ビオチン化されたカテゴリー特異的結合タンパク質に結合体化され得る）；反復核酸配列を含むローリングサークル複製産物（これらの各々は尾部に蛍光修飾したヌクレオチドを有するいくつかのオリゴヌクレオチドとハイブリダイズでき、これらは5'末端にカテゴリー特異的結合オリゴヌクレオチドを含む）が含まれる。シグナリング部分は、物理的に異なるエレメントを含み得る。例えば、いくつかの場合において、シグナリング部分は、カテゴリー結合分子（例えば、抗体）と結合体化された酵素（例えば、アルカリホスファターゼ）である。シグナルは、アルカリホスファターゼの基質（例えば、それぞれ、NENおよびRocheからのCDP-StarまたはBM purple）がシグナルエレメントである生成物（例えば、光子を放出する不安定な中間体または沈着可能な色素原性産物）に転換された場合に、生成される。カテゴリー結合分子、酵素的シグナリング部分、および基質を、別個の時間に反応に適用することは珍しいことではない。

【0060】

「シグナリング部分複合体」とは、1つより多いシグナリング部分および1つより多いカテゴリー結合分子を含む物理的実体を意味する。シグナリング部分複合体におけるシグナリング部分およびカテゴリー結合分子の物理的結合は安定でなくてはならない（例えば、シグナリング部分およびカテゴリー結合分子は、PBS中、4℃において、複合体との結合の平均半減期は少なくとも1日を有すべきである）。シグナリング部分複合体の例として、2種類：標的特異的抗体およびアルカリホスファターゼ、の何千もの分子によりコートされるポリスチレン微粒子を考慮する。このようなシグナリング部分複合体は、結合体化された抗体カテゴリー結合分子を介して標的に結合する。色素原性アルカリホスファターゼ基質（シグナルエレメント；例えば、BM purple, Roche）とともにインキュベートした場合、着色スポットを生成でき、これは、肉眼で検出できる。または、同じシグナリング部分

複合体を、化学発光性または蛍光性のいずれかのアルカリホスファターゼ基質とともにインキュベートした場合、化学発光性または蛍光性のいずれかのシグナルが生成する。シグナリング部分複合体のさらなる例には、フルオレセイン標識抗体に結合体化されたナノゴールド粒子、およびオリゴヌクレオチドカテゴリー結合分子と、過酸化水素の添加に際して化学発光を生じるアクリジニウムエステルとの両方に結合体化されたラテックス粒子が含まれる。

【0061】

「粒子」とは、50ミクロンのサイズ未満である物体またはマトリックスを意味する。粒子の集団またはバッチのサイズは、粒子の試料について直交性の次元の最も長い対の平均の長さとして定義される。直交性の次元の最も長い対は、その長さの合計が粒子のすべてのこのような合計において最大となるような、粒子の直交性の次元の対である。2つの粒子の試料が、それぞれ、1ミクロン×2ミクロンおよび2ミクロン×3ミクロンの直交性の次元の最も長い対を有する場合、直交性の次元の最も長い対の平均の長さは2ミクロンである（（1+2+2+3）/4=2ミクロン）。粒子の試料についての直交性の次元の最も長い対の平均の長さは、例えば、50ミクロン未満、20ミクロン未満、または5ミクロン未満である。

【0062】

多くの粒子がある程度固体の特性を有する。しかし、分子骨格または複合体（これらは強固でないかもしれない）もまた、粒子として定義される。例えば、デンドリマーまたは他の分枝状分子構造は粒子と見なされる。同様に、リポソームは、別のタイプの粒子である。粒子は、シグナルエレメントで染色するか、またはシグナルエレメントに結合体化することができる。粒子は、しばしば、それらの寸法または幾何的構造を反映する用語で呼ばれる。例えば、「ナノスフェア」、「ナノ粒子」、または「ナノビーズ」という用語は、任意の所定の座標軸に沿って1ミクロン未満の大きさである粒子を指すために使用される。同様に、「マイクロスフェア」、「マイクロ粒子」、または「マイクロビーズ」という用語は、任意の所定の座標軸に沿って1mm未満の大きさである粒子をいうために使用される。粒子の例には、ラテックス粒子、ポリアクリルアミド粒子、マグネタイト微粒子、フェロフルイド（磁気ナノ粒子）、量子ドットなどが含まれる。

【0063】

「標識粒子」とは、標的に特異的に結合しかつシグナルを生成し得る粒子を意味する。標識粒子は、シグナリング部分およびカテゴリー結合分子の両方と結合体化されるか、または安定に結合される。

【0064】

標的：「標識粒子複合体」とは、1つまたはそれ以上の標的が特異的に結合している標識粒子を意味する。

【0065】

標的：「標識複合体」とは、1つまたはそれ以上のカテゴリー結合分子に特異的に結合し、かつ1つまたはそれ以上のシグナリング部分を結合している標的を意味する。

【0066】

「標識比」とは、接触工程における標識粒子に対する標的の比率を意味する。例えば、1×10^{7}の標識粒子を、$1/10^{6}$の標的を含む試料と接触させる場合、標識比は10である。

【0067】

シグナルエレメントまたはシグナル部分の「シグナル特性」とは、他のシグナルエレメントまたはシグナリング部分から区別するために有用であるシグナルエレメントまたはシグナリング部分によって生成されるシグナルの局面を意味する。例えば、フルオレセインおよびローダミンで標識されたシグナリング部分のシグナル特性は「蛍光」である。放射性トランスポンダーの特性は「放射性頻度」である。光子性シグナリング特性の例は蛍光、光散乱、燐光、反射率、吸光度、化学発光、および生物発光である。光子性シグナリング特性の最後の2つの例以外は、外因性の照射（例えば、白色光光源、レーザー光光源、または日光）に依存する。対照的に、化学発光および生物発光は、外因性の光源とは独立

したシグナリング特性である。

【0068】

シグナルエレメントまたはシグナリング部分の「クラス」とは、他のシグナルエレメントまたはシグナリング部分から区別するため有用であるシグナルの別個の性質を意味する。例えば、赤色色素で標識されたリポソームは、異なる色で着色されたリポソームから区別される。赤色はそのクラスである。特定のラジオ周波数シグナルを送信するマイクロ電子送信機については、他のマイクロ電子送信機からそのマイクロ電子送信機を区別するラジオ周波数シグナルの性質がシグナルエレメントクラスを構成する。

【0069】

「シグナルシグニチャー」とは、試験において標的のカテゴリーに結合するシグナリング部分の組み合わせの別個のシグナリングの性質を意味する。4種類の抗体に結合する標的は、それらの1つがフルオレセイン分子に結合体化され、そして他の3つがローダミン分子に結合体化されていれば、組み合わせて重みをつけたフルオレセインおよびローダミンの吸収スペクトルおよび発光スペクトルによって記載されるシグナルシグニチャーを有する。

【0070】

試験または標識されたカテゴリー結合分子の集合の「シグナル複雑性」とは、試験において、または集合に対する結合によって明瞭に標識され得る標的のカテゴリーの数を意味する。または、シグナル複雑性は、各々の標的のカテゴリーのメンバーが存在する場合に生じると予測される別個の「シグナルシグニチャー」の数として定義される。いくつかの試験について、カテゴリー結合分子の集合のシグナル複雑性は、試験が走査するカテゴリーの数と同じである。多くのカテゴリーについて走査する他の試験は、1のシグナル複雑性のみを有し得る。

【0071】

「選択力」とは、標的を捕捉、単離、移動、または隔離するために使用される力を意味する。選択力の例には、重力、磁力、電気的ポテンシャル、遠心力、求心力、浮力、および圧力が含まれる。標的は、標的単独に作用する選択力によって移動され得る。あるいは、選択力は、選択部分に結合した標的上に特異的に作用し得る（以下の定義を参照されたい）。

【0072】

標的を移動させる選択力の適用の例には、標的の遠心力；磁気粒子に結合した標的の磁気選択；金属粒子で標識した標的の重力沈殿；および真空沪過による他孔性メンブレンへの標的の沈着が含まれる。選択力の使用のさらなる例は、以下の実施例に含まれる。

【0073】

「選択部分」とは、カテゴリー結合分子に結合体化され、かつ選択力によって選択的に捕捉、単離、移動、または隔離されるための能力をカテゴリー結合分子に付与する、原子、分子、粒子、または他の実体を意味する。カテゴリー結合分子：選択性部分複合体が標的に特異的に結合する場合、標的はまた、一般的に、選択力によって、選択的に捕捉、単離、移動、または隔離され得る。本明細書中で使用される意味において、選択的とは、選択力によって、選択部分および結合している実体に対して、選択部分と結合していない実体よりも移動に対する感受性を優先的に付与することをいう。

【0074】

常磁性粒子およびフェリチンは、選択部分の例である。溶液中で沈む高密度シリカ粒子は、別のタイプの選択部分である。このような粒子は、カテゴリー結合分子でコートされ、標的に結合した場合、水溶液中で標的が沈むことを引き起こし、従って、他の試料が結合していない構成成分からの結合した標的の分離を可能にする。

【0075】

「選択特性」とは、選択部分を捕捉、選択、または移動させるために有用な選択部分の局面を意味する。例えば、常磁性粒子の選択特性は「磁気」である。水溶液中で迅速に沈むシリカ粒子の選択特性は「質量」である。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4721

【0076】
「粗平面」の表面または基材とは、平面上の任意の1mm／1mmの正方形の中の点から架空の平面上の最も近接する点までの距離を測定した場合、その平均距離の絶対値が50μm未満であるような、架空の平面に対して平行に整列され得る表面を意味する。
【0077】
「検出表面」とは、標的が沈着される粗平面基材の表面を意味する。光子性シグナリング特性を使用する実施態様において、この検出表面が光学的に透明である場合、検出は検出表面の面のいずれかを介してもたらされ得る。検出表面が不透明である場合、検出は標的が沈着される検出表面の面を介してもたらされる。
【0078】
「検出領域」とは、本発明によって同時に分析される検出表面または検出ゾーンの領域を意味する。検出領域は、代表的には、その最も長い直線寸法において、1mmより長く、例えば、5mmより長く、10mmより長く、または15mmより長い。例えば、集光レンズおよびCCDチップを備えた光学的装置によって同時に画像処理されるガラススライドの部分は、0.8cm×0.5cmの大きさであってもよい。このときの検出領域は0.4cm^{2}である。
【0079】
「検出ゾーン」とは、標的が検出され得る容積を意味する。この検出ゾーンは、検出領域と同じ寸法を有するが、シグナリング部分は、検出および同定され得る奥行きに対応させた奥行きを有する。従って、検出ゾーンの奥行きは、陽性シグナルについて点数付けするために使用される閾値の判断基準に依存する。光学的検出が使用される場合、検出ゾーンの奥行きは、視野の光学的な奥行きに依存する。
【0080】
検出領域の「最も長い寸法（dimention）」とは、検出領域の周囲の2点間に引かれ得る最長の長さの線を意味する。例えば、検出領域は、0.3cm／0.4cmの大きさの長方形であり、この検出領域の最も長い寸法は、対角線の0.5cmである。検出領域が、長軸の半分が7mmの長さであり、そして短軸の半分が2.5mmの長さである楕円である場合には、検出領域の最も長い寸法は14mmである。
【0081】
「広域検出または広域画像処理」とは、検出領域（検出装置によって同時に分析される領域）が標的よりもはるかに大きな、顕微鏡的標的を検出するための方法を意味する。広域検出のための検出領域は、少なくとも1mm以上である1つの直線寸法を有する。対照的に、顕微鏡的標的とは、実質的にはより小さいものであり、代表的には、少なくとも2つの直交性の次元が50μm未満の測定値となる。広域検出の例には、CCDカメラを用いた9mm直径の検出領域の画像処理；1cmの長い寸法を有するCCDラインスキャナーを用いた走査による2cm×1cmの長方形の画像処理；写真フィルム上の直接的露光を使用した微生物標識を含む4cm×4cmフィルターの画像処理；および、迅速ラテラルフローストリップ試験における1cm×3cm試験領域上の顕微鏡的標的に対応した着色スポットの視覚的検出が含まれる。
【0082】
いくつかの技術が顕微鏡的標的について試料を走査するが、広域検出を利用しない。例としては、フローサイトメトリー；固相レーザーマイクロビーム走査サイトメトリー；液相走査（Tibbeら、Nat Biotechnol 17: 1210-3, 1999におけるような）；およびスライド上の複数の高出力顕微鏡視野の検査/画像処理が含まれる。
【0083】
「結合体化された」または「安定に結合した」とは、平均の結合の半減期がPBS中で4℃において少なくとも1日である、2つの実体間の物理的結合を意味する。例えば、ポリスチレン粒子への受動的なタンパク質吸着の複合体の場合を考慮する。いくつかの異なる吸着したタンパク質のクラスが存在する。いくつかのタンパク質は、何ヶ月もの半減期で表面に安定に結合する。他のタンパク質（例えば、吸着したタンパク質の外側の層にゆるく結合するもの）は、粒子と安定に結合しない可能性があり、そして1時間以内に浸出し得る。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4722

【0084】
「画像増感装置」または「画像チューブ」とは、Inoue, Shninyaら、「Video microscopy: the fundamentals」(Plenum Press, New York, 1997; 665頁) :「感度を増加させるためにビデオカメラチューブに（光ファイバーまたはレンズによって）接続された装置。増感装置は、焦点を当てた画像に従って電子を放出する前部に光陰極を有し、後部に燐光に電子の焦点を当てる電子レンズおよび/またはマイクロチャンネルプレートを有し、ならびに、電子のエネルギーを増大させる高電圧加速器を有する真空管である。単一または複数のステージであり得る。」の用語において定義されているような、光子性のシグナルを増幅する装置を意味する。種々のこのような画像増感装置が同じ引用文献の第8章に詳細に記載されている。
【0085】
検出領域の区画における標的を「同時に検出すること」は、1回の工程で粗平面の検出表面の区画からのシグナルの検出を意味する。CCDチップ、視覚的検出、または光ダイオードに基づくシグナル積算を使用する検出領域中の標的の広域画像処理は、同時検出の例である。
【0086】
「静止相」における標的は、非移動性の標的を意味する。例えば、ガラススライド上に固定された標的は静止相にある。マイクロタイターディッシュのウェルの底に固定された位置においてカテゴリー結合分子によって捕捉された標的は静止相にある。このような標的が表面に固着されていない場合でさえ、そして流体力学的または他の力によって移動され得る場合でさえ、検出/画像処理の間、10秒より長い間隔で取られた連続的な画像が、本質的に同じ相対位置で本質的に同じ標的を検出する場合に、標的は静止相にあると見なされる。フローサイトメトリーの適用における標的は静止相にはない。しかし、ラテラルフロー試験の固相試験ゾーンに結合した抗体によって捕捉された標的は、静止相にある。
【0087】
「同種アッセイ法」または「同種イムノアッセイ法」とは、完了したアッセイの生成物から反応物が物理的に除去されないアッセイ法またはイムノアッセイ法を意味する。
【0088】
「同定」とは、標的がメンバーであるカテゴリーを決定することを意味する。例えば、標的のいくつかのカテゴリーについて走査するラテラルフロー試験を考慮する。これらの各々は1つの試料中に潜在的に存在する。特定のカテゴリーに属する標的は、対応するカテゴリー特異的抗体が結合するメンブレンの領域に捕捉される。どのメンブレンゾーンがどの捕捉抗体を含むか知られているので、標的は捕捉が生じるゾーンによって同定される。
【0089】
「試料」とは、標的の存在について本発明によって走査される材料を意味する。
【0090】
「直接的視覚的検出」とは、装着する集光レンズ以外は器具の補助なく行う視覚的検出を意味する。例えば、直接的視覚的検出は、いくつかの迅速ラテラルフロー試験におけるナノゴールド粒子の赤みがかった反射シグナルを検出するために使用され得る。
【0091】
「光電検出器」とは、光子シグナルを電子シグナルに変換する人工の装置または機器を意味する。光電検出器の例には、CCD検出器、光電子増倍管検出器、および光ダイオード検出器（例えば、アバランシェ光ダイオード）が含まれる。
【0092】
「エンサークルドエネルギー（encircled energy）」または「エンスクエアドエネルギー（ensquared energy）」とは、光検出器アレイのピクセル上で捕捉される無限に小さな光源からの光子のパーセンテージを意味する。
【0093】
「熱放射」とは、黒体放射を意味する。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4723

【0094】
「細胞自己蛍光」または「自己蛍光」とは、NADHおよび酸化されたフラボタンパク質のような天然の固有の細胞成分の蛍光に起因して、細胞によって発現される蛍光を意味する。緑色蛍光タンパク質のような組換え蛍光タンパク質に起因する蛍光を発現する細胞は、自己蛍光とは見なされない。
【0095】
「照射」とは、電磁気的な放射を伴う照射を意味する。種々の波長の電磁気的な放射が照射するために使用され得る。これには、例えば、X線、UV、可視光、または赤外スペクトル領域の波長を用いた照射が含まれる。放射線を照射することは必ずしも可視範囲におけるものではないことに注意のこと。
【0096】
「光子性シグナリング特性」を有するシグナルエレメントまたはシグナリング部分とは、光子の発光、散乱、反射、吸収、捕捉、もしくは再方向付け、または光子の振る舞いの他の調節もしくは組み合わせを介して検出可能な、シグナルエレメントまたはシグナリング部分を意味する。光子性シグナリング特性を有するシグナルエレメントまたはシグナリング部分のいくつかの例には、蛍光団テキサスレッド（蛍光シグナリング特性）；CDPスター（化学発光シグナリング特性）；ルシフェラーゼ（生物発光シグナリング特性）；共鳴光散乱粒子（光散乱シグナリング特性）；BMパープル（BM purple）（光吸収または色素原性シグナリング特性）；およびアップコンバーティング燐光（2つの長波長光子の吸収および1つの短波長光子の発光）が含まれる。
【0097】
「数字」×「溶液名」は、その溶液（水を除く）の濃度を倍数の数字で示した、溶液の構成成分を含む水溶液を意味する。例えば、10×EEは、10mM EDTA/100mM EPPSを含む（EE、すなわち1×EEは、1mM EDTA/10mM EPPSを含む）。
【0098】
「EE」は、1mM EDTA/10mM EPPSの溶液である。これらを互いに混合する前に、両方の成分の共役酸は、NaOHでpH8.0に調整される。
【0099】
「HYB」は、1M NaCl、50mM EPPS pH8.0、2%ブロッキング試薬（Boehringer Mannheim）；0.5%v/vトゥイーン（Tween）、20μg/ml　酵母tRNA（Sigma）を含むハイブリダイゼーションのために使用される溶液である。
【0100】
「UBB」（ユニバーサル結合緩衝液）は、250mM NaCl、50mM EPPS pH8.0、2%ブロッキング試薬（Boehringer Mannheim）；0.5%v/vトゥイーン、20μg/ml　酵母tRNA（Sigma）を含む、様々な種類のカテゴリー結合分子（例えば、抗体および核酸）の結合混合物のために有用な溶液である。
【0101】
「BB」（ブロッキング緩衝液）は、100mM EPPS pH8.0/150mM NaCl/2%ブロッキング試薬（Boehringer Mannheim）を含む。
【0102】
「PB」は、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4である。
【0103】
「PBS」は、120mM NaCl、2.7mM KClおよび10mMリン酸緩衝液（ナトリウム塩）pH7.4を含む、リン酸緩衝化生理食塩水である。
【0104】
「PBS-B」は、PBS中0.1%BSA（IgGフリー；Sigmaカタログ番号A-7638）である。
【0105】
「PBS-T」は、PBS中0.05%トリトン（Triton）X-100（Sigmaカタログ番号X-100）である。
【0106】

「PBS-T」は、PBS/0.1%BSA/0.05トリトンX-100である。

【0107】

「PBT」は、PBS/0.1%BSA（IgGフリー；Sigmaカタログ番号A-7638）/0.05%トリトン20（Sigmaカタログ番号X-100）である。

【0108】

「LB」は、細菌増殖のためのルリア（Luria）ブロスであり、以前に記載されているように作製する（Ausubel 1987, 前出）。

【0109】

「SSC」は、HClでpH7.0に調整した150mM NaCl/15mMクエン酸三ナトリウムである。

【0110】

「MES」（2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸）。

【0111】

「MESB」は、0.05M MES（2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸）、pH6.1である。

【0112】

「EDAC」（1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド）。

【0113】

「ライゲーション液（ligation buffer）」は、10mM $MgCl_2$/50mMトリス-HCl/10mMジチオスレイトール/1mM ATP/25μg/μlウシ血清アルブミンである。

【0114】

「プレ溶菌溶液」：この溶液はGraves, L.ら（1993）、「Universal Bacterial DNA isolation procedure」、「Diagnostic molecular microbiology: principles and applications」、D. Persing、T. Smith、F. TenoverおよびT. White編（Washington, D.C.: American Society for Microbiology）に従って調製される。この溶液（用時調製し、氷上に維持する）は以下を含む：2Mトリス（pH7.0）0.25ml、膵臓リパーゼ3.1ml（膵臓リパーゼ（Sigma）6.1mgを59.8mlの水に溶解し、0.1M $CaCl_2$を1.2ml添加することによって調製し；3.1mlのアリコートで-20℃に保存する）、1%タウロコール酸ナトリウム（Difco）0.3ml、0.1M $CaCl_2$ 0.5ml、5.25mlスクロース、およびリゾチーム0.05g。

【0115】

「標準PCRプロトコール」：すべてのPCR反応は、（特に注記されない限りは）50mM KCl、1.5mM $MgCl_2$、10mMトリス-HCl pH8.3、250μM（各）dNTP、および10μM（各）プライマー中で、パーキンエルマージーンアンプ（Perkin-Elmer Geneamp）9700サーモサイクラーで、30サイクル、その後72℃で10分間のインキュベーションで実行する。1サイクルは以下の3つの工程：94℃、30秒間；55℃、30秒間；72℃、90秒間からなる。

【0116】

「AP」：アルカリホスファターゼ。

【0117】

「BAL」：気管支肺胞洗浄液。

【0118】

「BSA」：ウシ血清アルブミン。

【0119】

「CCD」：電荷結合素子。

【0120】

「CFTR」：嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子。

【0121】

「cfu」：コロニー形成単位（生存可能な細菌細胞の数に対応する細菌濃度の測定値）。

【0122】

「CMV」：サイトメガロウイルス。

【0123】

「FITC」：フルオレセインイソチオシアネート。

【0124】
「HBV」：B型肝炎ウイルス。
【0125】
「HCV」：C型肝炎ウイルス。
【0126】
「HIV」：ヒト免疫不全ウイルス。
【0127】
「pfu」：プラーク形成単位（感染可能なウイルス粒子の数に対応するウイルス濃度の測定値）。
【0128】
「PNA」：ペプチド核酸。
【0129】
「RSV」：呼吸器合胞体ウイルス。
【0130】
「$TCID_{50}$」：50%のフラスコが感染を実証する組織培養感染用量。
【0131】
オリゴヌクレオチド配列は、文字として書かれる場合、特に注記されない限り、5'から3'方向で示される。
【0132】
特に注記されない限り、本明細書中に記載される微生物株は、アメリカン・タイプカルチャー・コレクション（American Type Culture Collection）（ATCC）、バージニア州マナッサスから入手する。
【0133】
発明の詳細な説明
発明の概要
本発明は、多種（例えば、細胞、ウイルス、またはタンパク質分子）で数の少ない顕微鏡的および超顕微鏡的な標的について、最小限に処理した試料を、迅速かつ高い費用対効果で走査する。本発明によって提供される強力な特色は、現代の高強度の標識、低コストの画像処理技術、および非拡大的な広域検出を組み合わせた、新規な診断学的アプローチから生じる。
【0134】
本発明がいかにして相対的に大きな試料中で少数の顕微鏡的な標的を検出するかを理解するために、最初に特定の実施態様を調べることが手助けとなる。図1は、広い領域にわたって広がった少数の細菌を検出する本発明の1つの実施態様の単純な図式を示し、この場合は、顕微鏡スライドの一部である。細菌は標識され、その結果、手短に述べるように、細菌は光を放射する。以下の実施例の多くにおいて使用されている、「増殖している」細菌を検出するために使用されるこのアプローチは、個々の細菌よりもはるかに大きな試料の領域の画像をキャプチャーするためにデジタルカメラ（CCDチップ）を使用する。このCCDチップは、光感受性のピクセルエレメントのアレイを有する。試料の1つの位置での「増殖している」細菌からの光は、CCDチップの対応する位置のピクセルエレメントに衝突する。エンドユーザは、CCDチップから得られた画像データ（すなわち、照射されたピクセルの数および強度）を処理するコンピュータからの試料中の細菌の数についての情報を受け取る。
【0135】
次に、重要な細菌性の病原体である、マイコバクテリウム・ツベルクローシス（Mycobacterium tuberculosis）の存在について呼吸器の試料を走査する実施態様の特定の応用を考慮する（図1）。本明細書において、実施例2に示されるように、細菌は蛍光性の化学物質、蛍光団で標識され、その結果、これらは異なる色の光（励起スペクトル）により照射された場合、特定の色の光（発光スペクトル）を放射する。細菌を標識するための試薬を発色させるために、カテゴリー結合分子が最初に選択される。理想的なカテゴリー結合分

子は、M.ツベルクローシスに結合するが、呼吸器試料に存在し得る他のタイプの細菌または物質には結合しないモノクローナル抗体である。抗体は、例えば、M.ツベルクローシス細菌の表面上にのみ見い出されている特定の分子の部位「カテゴリー特異的結合部位」に特異的に結合し得る。次に、M.ツベルクローシス特異的カテゴリー結合部位は、蛍光団（例えば、フルオレセイン）への結合体化によって標識される。このフルオレセイン分子は「シグナリング部分」と呼ばれる。なぜなら、これは試験において検出されるシグナルを提供するからである。シグナリング部分（フルオレセイン）で標識されたカテゴリー結合分子（抗M.ツベルクローシス抗体）を調製して、M.ツベルクローシスについての診断試験が実行され得る。

【0136】

図2は、試験が、患者がM.ツベルクローシスに感染しているか否かをいかにして決定するかを例証する。痰試料がガラススライド上に塗布されかつ貼付される。このスライドを蛍光団標識した抗体とともにインキュベートした後、未結合の抗体は洗浄によって試料から取り除かれる。フルオレセインの励起範囲の光で試料を照射することは、試料中に存在するM.ツベルクローシス細胞の表面をコートするフルオレセインタグ化抗体による蛍光放射を誘発する。拡大なしでCCDチップの表面の放射光に焦点を当てて、細胞の蛍光画像を収集する。このようにして、塗沫試料の広い領域（代表的には、約1～2cm^2）がM.ツベルクローシス細胞について協同的に走査される。各細胞からの蛍光は、CCDチップからコンピュータ（ここで電子シグナルは画像ファイルの形態で保存され得る）に中継される局在化電子シグナルを生じるピクセルの小クラスターに衝突する。画像分析ソフトウェアは、細胞からの光に反応するピクセルクラスターの数を計数すること、および反応するピクセルの全体の光子の強度を積算することによって試料中のM.ツベルクローシスを計数する。

【0137】

本発明は、多種類の、形式、標識方法、カテゴリー結合分子、および検出方法を使用して、試験を構築するために使用され得る。しかし、この試験は共通したいくつかの鍵となる特色を有する。本発明の多くの実施態様に共通の工程および処理を以下に示す。

【0138】

本発明の適用の一般的な構成は以下の工程からなる。

工程1：試験の問題の定式化、標的を検出するためのカテゴリー結合分子の選択

工程2：シグナリング部分の選択および調製

工程3：生物試料の調製

工程4：試料中の標的のカテゴリー結合分子およびシグナリング部分への結合

工程5：標的および結合したカテゴリー結合分子の選択

工程6：標的に結合したシグナリング部分を検出することによる、試料中に存在する標的の同定および定量

【0139】

工程1：試験の問題の定式化、標的を検出するためのカテゴリー結合分子の選択

試験によって検出される標的のカテゴリーの選択

カテゴリーは、試験の目的のために同一であると見なされる関連する標的の範囲として機能的に定義される。試験によって同定される標的のカテゴリーを選択することは、診断試験の目的を定義することと同義である。カテゴリーを選択することは、試験において使用される分子試薬、カテゴリー結合分子を定義するために中心的なことでもある。

【0140】

本発明に基づく新規な試験を構築する場合、第1の工程は、標的のどのカテゴリーを試験が同定および区別すべきかを決定することである。例えば、患者に肺炎を引き起こす感染性の因子を同定するための試験を構築するためには、一般的に肺炎を引き起こす病原体（例えば、呼吸器合胞体ウイルスおよびストレプトコッカス・ニューモニエ（Streptococcus pneumoniae）のカテゴリーを選択し;または、食物由来の病原体について試験するためには、毒性を引き起こす細菌のカテゴリーを選択する。本発明は、多細胞生物、細菌、およびウイルスを含む広範な標的を同定し得る。さらに、種々のカテゴリーからの標的（

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4727

例えば、細菌およびウイルス）が同一アッセイにおいて試験され得る。

【0141】

本発明の重要な用途は、ヒト身体の液体試料（例えば、血液、尿、脳脊髄液、痰、または糞便）中の病原体の同定にある（本発明の方法はまた、組織試料を含む他のタイプの臨床試料への適用としても重要である）。試料の身体的な供給源および患者の症候に依存して、同定される生物の重要なタイプに関しての決定がなされる。例えば、下気道症候を有する患者からの痰試料の場合は、一般的に肺炎を引き起こすウイルス、細菌、および真菌を検出することを選択し得る。

【0142】

カテゴリーの選択は、試験によって取り組まれる診断的な問題に依存する。従って、2つの試験が2つの異なる診断的な問題に答える場合、試験が両方同じ標的について同じ種類の試料を走査する場合でさえ、異なるカテゴリーを選択できる。尿道感染について尿試料をスクリーニングするための試験を考慮する場合、効力のある診断的な問題はしばしば：「有意な数の細菌細胞が尿中に存在しているか」である。このような試験のために、試験のカテゴリーはすべての細菌を含み得る。すなわち、この試験は、異なる細菌の種を互いに区別しない。従って、例えば、大腸菌とエンテロコッカス・フェシウムの両方が、このタイプのスクリーニング試験の目的としては同じ「全細菌（pan-bacterial）」のカテゴリーに入る。対照的に、尿道感染の試験の異なるタイプの目的は、種のレベルで病原体を同定することである。このタイプの試験では、一般的に尿道感染を引き起こす細菌の各々の種が異なるカテゴリーとして定義される（例えば、大腸菌およびエンテロコッカス・フェシウムは、別々の試験カテゴリーである）。

【0143】

いくつかの試験のために、複数の界にわたる複数の生物のカテゴリーが選択される。異なる病原体のパネルのどれが患者の症候の原因であるかを決定することがしばしば臨床的に重要である。本発明は、患者の試料を、種々のウイルス、細菌、および真菌の存在について同時に走査する、費用効率のよい効果的な試験についての決定的なまだ対処されていない必要性に取り組む。「カテゴリー複雑性」は、試験が走査する標的のカテゴリーの数の測定値である（定義の部分もまた参照されたい）。

【0144】

カテゴリー特異的結合部位およびカテゴリー結合分子

標的の異なるカテゴリーは、それらの別個の分子成分によって区別される。例えば、各々が下気道疾患を引き起こす異なる病原体の以下のセット：A型インフルエンザウイルス、RSV、ヘモフィルス・インフルエンゼ（Haemophilus influenzae）、ストレプトコッカス・ニューモニエ、およびM.ツベルクローシスを考慮する。各々の病原体のカテゴリーは、カテゴリーに特徴的であるが、他のカテゴリーのメンバーまたは呼吸器試料の他の成分には存在しない分子的成分を有する。本発明に基づく試験は、カテゴリー特異的分子成分の存在について走査することによって特定のカテゴリーのメンバーを検出する。

【0145】

標的のカテゴリーの存在を検出するために、本発明は、カテゴリー特異的分子成分に特異的に結合する分子を配置する。標的上に存在するカテゴリー特異的分子成分は、「カテゴリー特異的結合部位」と呼ばれ、そしてそれらに特異的に結合する分子は「カテゴリー結合分子」と呼ばれる。カテゴリー特異的結合部位は、試験される試料中に潜在的に存在する標的の特性であることに注意されたい。対照的に、カテゴリー結合分子は診断試験キットにおいて提供される試薬である。

【0146】

本発明の1つの利点は、広いスペクトルのカテゴリー結合分子が使用され得ることである。このことは重要である。なぜなら、異なるタイプのカテゴリー結合分子が、異なるタイプの診断的な問題を尋ねるために使用されるからである（例えば、広い界（kingdom）のレベルでのスクリーニング対狭い亜種レベルの同定）。カテゴリー結合分子（時折、プローブともいわれる）のクラスには、核酸（オリゴヌクレオチド、アプタマー、クローニ

ングされた配列、ゲノムDNA、RNAなど）；核酸に関連する化学的改変体（例えば、ペプチド核酸（PNA））；抗体；酵素（これは、標的基質に結合し得る）；非酵素的タンパク質（例えば、アビジン（これは、標的分子ビオチンに結合し得る））；細胞成分に特異的に結合する分子（例えば、アクチンまたはアビジンを結合するビオチンを結合するファロイジン）；色素または染色剤（例えば、ヨウ化プロピジウム、オーラミン-ローダミンン、またはSYTO 17）；リガンド（例えば、上皮増殖因子レセプターに特異的に結合する上皮増殖因子）；およびインビトロ進化技術（例えば、Zhangら、Nat. Biothch.18: 71-74, 2000）を使用して選択されたポリペプチドまたは核酸結合試薬が含まれる。

【0147】

カテゴリー結合分子は他の機能的ドメインまたは修飾を取り込み得る。例えば、カテゴリー結合分子は、しばしば、シグナリング部分（すなわち、蛍光団または色素化された微粒子のような標識ドメイン）または選択部分（例えば、磁気粒子または固体表面）と、共有結合的または非共有結合的に結合される。あるいは、カテゴリー結合分子はアダプター部分に連結でき、これは、次には、別の機能的部分への連結を容易にする。時折、カテゴリー結合分子は、二重の、分離されない機能を有する。例えば、核酸染色剤であるヨウ化プロピジウムは、カテゴリー結合分子として使用され得る（例えば、カテゴリー特異的結合部位は、酵母における細胞の核酸であり得る）のに対して、同時に、この結合した色素はシグナリング部分として機能する（すなわち、これは、カテゴリー特異的結合部位に結合した場合に蛍光を発し得る）。本発明に基づく試験は、1つより多いカテゴリー結合分子のクラスを組み入れ得る（例えば、抗体および核酸染色、または抗体およびオリゴヌクレオチド）。

【0148】

最も単純な試験は、単一の標的のカテゴリーについて走査するために、単一の種類のカテゴリー結合分子を組み入れ得る。例えば、M.ツベルクローシスについての試験は、M.ツベルクローシスの表面上のカテゴリー特異的結合部位に特異的に結合するモノクローナル抗体を使用し得る。あるいは、例えば、尿道感染についてスクリーニングする場合には、単一のカテゴリーは「すべての細胞」であり、一または、ヒト細胞が溶解される場合には、「すべての非ヒト細胞」であり－かつカテゴリー結合分子の単一の種類が核酸染色（例えば、ヨウ化プロピジウム）であり得る。

【0149】

カテゴリー結合分子の「ファミリー」は、標的の同じカテゴリーのメンバーに結合する別個のカテゴリー結合分子のセットである。例えば、C型肝炎ウイルスに対して惹起されたポリクローナル抗体は抗体のファミリーである。なぜなら、これは、標的の同じカテゴリー（この場合はHCV）に特異的に結合する複数のカテゴリー結合分子を含むからである。カテゴリー結合分子のファミリーの別の例は、すべての大腸菌O157:H7株に存在するが細菌の他の群のメンバーには存在しない、80のカテゴリー特異的ゲノムDNA配列のセットである。カテゴリー結合分子のこのファミリーは、適切に調製した大腸菌O157:H7細胞に群としてハイブリダイズできるが、他の細胞のタイプにはハイブリダイズしない。

【0150】

標的の複数のカテゴリーを検出するために、試験は、各カテゴリーについてカテゴリー結合分子の1つのファミリーを含む。カテゴリー結合分子のファミリーのセットは、カテゴリー結合分子の「集合」と呼ばれる。例えば、肺炎についての試験または薬物の乱用についての試験は、多数の標的のカテゴリーを互いに区別しなくてはならない。カテゴリー結合分子の1つのファミリーは、各々の標的のカテゴリーについて使用される。肺炎試験のために、肺炎を引き起こす微生物の表面上のカテゴリー特異的抗原に反応する抗体の集合が使用され得る。このカテゴリー結合分子集合の1つのファミリーは、ウサギ宿主において惹起され、ストレプトコッカス・ニューモニエに対して指向される抗血清の免疫グロブリン画分からのポリクローナル抗体を含み得る。別のファミリーは、アデノウイルスのコートタンパク質に対して指向される組換え抗体またはモノクローナル抗体を含み得る。

【0151】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4729

集合によって試験される標的の別個の群またはカテゴリーの数、すなわち、「カテゴリー複雑性」は、集合におけるカテゴリー結合分子のファミリーの数によって反映される。集合におけるファミリーの数は、次には、集合の「最小カテゴリー偏差」と呼ばれる量によって正確に規定される。「ファミリー複雑性」は、試験集合においてカテゴリー結合分子のファミリーの各々からのメンバーを結合するために必要である別個の標的の最小数である。例えば、マイコバクテリウム・ツベルクローシス、レジオネラ属種（Legionella spp）、コクシジオイデス・イミチス、インフルエンザウイルス、および呼吸器合胞体ウイルスの存在について、痰試料を同時に試験するために使用されるカテゴリー特異的抗体の集合を考慮する。集合のファミリー複雑性は5である。なぜなら、各病原体カテゴリーから1つの、最小で5つの標的が、集合におけるカテゴリー結合分子の各ファミリーのメンバーに結合することが必要とされるからである。単回の試験において標的の広いスペクトルを同定する本発明の能力は、大きなファミリー複雑性を有するカテゴリー結合分子の集合を使用して試料を走査するその能力の結果である。

【0152】

本発明とともに使用されるカテゴリー結合分子は、所望の標的（分析物）にアッセイ条件下で結合すべきであるが、他の種類の標的、または試料もしくは試験の他の可能な構成成分には結合すべきでない（アッセイによって区別されることを意味する）という意味で、特異的であるべきである。従って、上気道細菌感染についての試験において、強力なカテゴリー結合分子は、上気道の正常な（共生的な）微生物の構成成分と交差反応するものを除外するようにスクリーニングされる。

【0153】

カテゴリー結合分子を獲得および特徴付けるための代表的な方法は、以下の実施例に含まれる。

【0154】

工程2：シグナリング部分の選択および調整

シグナリング部分を用いたカテゴリー結合分子の標識

光学的な拡大または高価な機器なしで個々の顕微鏡的な標的を検出する本発明の能力は、一般的に、高いシグナル強度で標的を特異的に標識することに依存する。標識は、カテゴリー結合分子との結合を介する、シグナル分子の標的への特異的結合によって達成される。しかし、シグナリング部分として標的の固有の特性（例えば、細胞の自己蛍光）を使用する本発明の特定の使用のためには、標識は必要とされないことに注意されたい。

【0155】

本発明は、2つの一般的な方法で標的のカテゴリー間を識別する。シグナルの差別化と呼ばれる1つの方法は、シグナリング部分でカテゴリー結合分子の各カテゴリー特異的ファミリーを標識し、その結果、これは独特なシグナルシグニチャーを有する。多数の別個のシグナルシグニチャー（すなわち、高いシグナル複雑性）を生成および検出する能力は、多数の標的のカテゴリーについて走査する試験の構成（すなわち、高度に多重化された試験）を可能にする。複数の標的のカテゴリー、幾何学的な区別の間を区別するための他の方法は、検出領域の異なる領域において標的の異なるカテゴリーを沈着させることに頼っている。シグナリング部分のシグナルシグニチャーから独立し得る幾何学的な区別は、以下に議論される（工程5）。

【0156】

本発明は、様々な種類のシグナル特性を使用し得る。これらには、蛍光、散乱光、偏光、電磁波、粒子サイズ、磁場、化学発光、および放射能が含まれる。種々のシグナル特性を使用するシグナリング部分および検出スキームの例は以下に見られる。シグナル特性の中に複数のシグナルクラスが存在し得る。例えば、シグナル特性が蛍光である場合には、種々の特徴的な放射スペクトルはシグナルクラス（例えば、赤色蛍光、緑色蛍光、および青色蛍光）を含む。あるいは、別の例として、同じ蛍光団の異なる濃度で色素化された赤色蛍光微粒子を考慮する。蛍光はまた、シグナリング特性であるが；しかし、この場合は、異なる強度の粒子がシグナル特性のクラスを構成する。すなわち、蛍光強度は、1つの

粒子の群を別の群から区別するシグナル特性の性質である。

【0157】

以下の実施例において実証するように、多数の種々のシグナリング部分が本発明とともに使用され得る。シグナリング部分は、単一の蛍光団、アップレギュレートされた燐光、天然の蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質およびその関連物）。色素、酵素：基質系（基質：生成物の色の変化または化学発光を生じる）、蛍光微粒子、光散乱粒子、磁気粒子、またはラジオ送信マイクロ装置を含み得る。

【0158】

高いシグナル複雑性は多数のタイプの標的について走査する試験（すなわち、高いカテゴリー複雑性を有する試験）を開発するために有用である。

【0159】

高いシグナル複雑性の達成

混合物中の区別可能な標識（またはシグナリング部分）の数はシグナル複雑性と呼ばれる。時折、高度に複雑化された試験のために、高いシグナル複雑性を有するシグナリング部分を使用することが有利である。高いシグナル複雑性を生成するために、本発明とともに使用され得る3つの一般的なアプローチは：（1）別個の標識、（2）コンビナトリアル標識、および（3）比標識である。

【0160】

1.別個の標識のために、異なるプローブファミリーのプローブは、実験においてすべての他のシグナリング部分の存在下で容易に検出され得る単一のシグナリング部分とタグ化される。これまでは、高いシグナル複雑性で別個の標識を達成することは難しかった。なぜなら、大部分の標識方法は、光学的シグナル（例えば、色素原性、蛍光性、化学発光性）または放射性標識を使用するからである。光学的シグナルのスペクトルのバンド幅および現在の機器による検出可能なシグナルの制限された範囲のため、光学的シグナルを使用して解像され得るシグナル複雑性は、むしろ小さい。例えば、スペクトルの重複に起因して、異なる放射スペクトルを有する何十もの蛍光団の解像は現在不可能である。

【0161】

2.本発明において使用される高いシグナル複雑性を達成するための別の方法は、コンビナトリアル標識アプローチを適用することである。コンビナトリアル標識は、比較的少ない数の別個のシグナリング部分を使用して、高いシグナル複雑性を達成するための技術である。このアプローチを用いると、シグナリング部分の別個の組み合わせは異なる標的に結合する。この概念は図5（実施例1もまた参照されたい）に例証されている。現在、蛍光団は、分子的診断のためのシグナル部分の好ましいクラスである。しかし、複数の別個の蛍光団（励起スペクトルおよび放射スペクトルの重複から多くの部分が生じる）の分析に関与する複雑性が与えられた場合、約7以下の慣習的な蛍光団を組み入れることのみが現在実用的である。しかし、組み合わせて使用される場合、7種の蛍光団は127の別個のシグナルを生成するために使用され得る（N種の蛍光団は2^N-1の組み合わせを生じる）。高いシグナル複雑性はまた、他のタイプのシグナリング部分を使用するコンビナトリアル標識を介して達成され得る。例えば、異なる色素を浸漬させた粒子、異なる別個のサイズのクラスに入る粒子、または別個の放射シグナルを放射する中継器は、このアプローチとともに使用され得る。蛍光団を使用するコンビナトリアル標識は、最近、ヒトの核型決定に首尾よく応用された（Speicherら、1996、前出；Schrockら、1996、前出）。コンビナトリアル標識実験の分析のための機器およびソフトウェアは市販されている。

【0162】

3.高いシグナル複雑性はまた、比標識アプローチを使用して得られ得る（Fultonら、1997、前出）。比標識においては、コンビナトリアル標識と同様に、多くの別個のタイプのシグナリング部分が、比較的少数の別個のシグナリングエレメントを使用して生成される。しかし、コンビナトリアル標識と対照的に、比標識におけるシグナリング部分は、シグナリングエレメントの比によって区別される。例えば、異なる励起/放射特性を有する2つの蛍光団XおよびYは、ポリスチレン粒子に色素を付けるために使用され得る。蛍光団（{X

]、[Y]）の異なる相対的濃度は、粒子の異なるセットに適用される。例えば、Xの8つの異なる濃度およびYの8つの異なる濃度が、すべての組み合わせ（X_1Y_1、X_1Y_2、X_8Y_7、X_8Y_8）の粒子に色素を付けるために使用され、64のクラスの区別し得る粒子を生じる。比標識は機器の使用を単純化する。少数のシグナルタイプのみが使用される必要があるからである。蛍光団以外であり、非光学的なシグナルエレメントを含むシグナルエレメントはまた、非標識アプローチを使用して、高いシグナル複雑性を生成するために使用され得る。

【0163】

強いシグナルを生成することは個々の顕微鏡的標的の検出を容易にする

必要とされるシグナル強度のレベルは、当然、シグナルの性質（光学的、粒子サイズなど）および検出の方法/機器に依存する（以下を参照されたい）。

【0164】

カテゴリー結合分子を標識するための種々のアプローチが、必要とされる感度を達成するために使用され得る。シグナル強度を最適化するための1つの方法は、高度に蛍光性のシグナリング部分を用いて標的分子を標識することである。例えば、量子ドット、蛍光を染色されたナノスフェア、およびポリマー化された蛍光団分子は、強力な蛍光シグナルを生成する。多数のシグナルエレメントを組み入れることは、シグナリング部分の蛍光強度を増加させ得る。例えば、蛍光ナノスフェア（直径～20nm；Molecular Probes）は、約180個のフルオレセイン分子と等価なシグナルを生成し得る。蛍光染色されたポリスチレン微粒子（例えば、直径1μm）は、何百万もの蛍光団のシグナリングエレメントを組み入れ得る。核酸カテゴリー結合分子と結合しているシグナル部分に複数の蛍光団を組み入れるための方法は、クローニングされたカテゴリー特異的配列のPCR増幅の間に蛍光団-dNTP結合体を組み入れることである。核酸カテゴリー結合分子に複数の蛍光団を組み入れるための代替的な方法には、複数のシグナル部分に結合したか、または多数のポリマー化した蛍光団で標識したヌクレオチドを末端に付与した、デンドリマー、分枝DNA、またはローリングサークルテンプレートを使用するアプローチが含まれる。複数のシグナリング部分にカテゴリー結合分子を結合体化させることもまた、シグナル強度を増大させる。例えば、シグナル増幅はまた、多数のシグナリング酵素（例えば、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ）をナノ粒子に結合体化させることによって達成され得る。

【0165】

強力なシグナルを得るための別のアプローチは、各標的に多数の標識したカテゴリー結合分子を結合させることである。このことは、以下を含む種々の手段によってなされ得る：複数のカテゴリー結合分子を使用すること（同じ標的中で複数のカテゴリー特異的結合部位を認識すること）、または、標的中に高度に表されている標的分子に結合するカテゴリー結合分子を選択することによる。例えば、標識された微生物特異的ポリクローナル抗体は、微生物標的上の多数の別個のエピトープに結合することによって、高いシグナル強度を達成し得る（例えば、実施例11を参照されたい）。実施例1はまた、各標的生物において、多くの別個のカテゴリー特異的結合部位に結合する標識されたカテゴリー結合分子を使用して記載される。各標的に多くの数が存在するカテゴリー特異的結合部位を選択するストラテジーは、以前に頻繁に使用されてきた。このストラテジーの例には、リボソームRNAについての核酸プローブの使用が含まれる（これは、標的生物および細胞タイプに依存して、細胞あたり数1000コピーで存在し得る）。同様に、いくつかの抗原性標的分子が、標的生物の各々の細胞に、数百コピーまたは数千コピーで存在する。本発明は、これらのストラテジーの両方を利用し得る。別の例として、細菌に存在する多数のカテゴリー特異的結合部位は、核酸結合蛍光色素シーバーグリーンI（Syber Green I）をカテゴリー結合分子/シグナリング部分として使用する場合に、強いシグナル強度を産生する（例えば、実施例を参照されたい）。

【0166】

標的への多数のシグナル部分の結合は、シグナル強度を増大させるだけではなく、本発明に強固さを与える。なぜなら、標的の非存在下では予測される複合性のシグナルシグニチャーを有する多数のシグナリング部分の多数のクラスターを観察する機会は少ないから

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4732

である。

【0167】

カテゴリー結合分子へのシグナリング部分の結合体化

本発明は、多数のタイプのシグナリング部分を組み入れ得る。このシグナリング部分は、当業者に公知の種々の方法を使用して、カテゴリー結合分子に直接的に結合体化され得る（例えば、Hemanson, G., 「Bioconjugate Techniques」 (Academic Press, 1996) および以下の特定の実施例を参照されたい）。例えば、抗体またはオリゴヌクレオチドのカテゴリー結合分子は、蛍光団または量子ドットシグナリング部分に直接的に結合体化され得る。あるいは、例えば、抗体またはオリゴヌクレオチドのカテゴリー結合分子は、蛍光微粒子ベースのシグナリング部分または光散乱ナノ粒子ベースのシグナリング部分をコートするために使用され得る。シグナリング部分は、カテゴリー結合分子に間接的に結合体化され得る。例えば、図6に示されるように、シグナル部分は、タグ相補物に直接的に結合体化でき、次いで、これは、カテゴリー結合配列も含むオリゴヌクレオチドの一部である、タグ配列にハイブリダイズされる。または、例えば、アビジンが、シグナリング部分を構成する複数のシグナルエレメントに直接的に結合体化され得る。次いで、標識されたアビジン分子は、ビオチン化されたカテゴリー特異的抗体に結合され得る。シグナリング部分は、結合工程の前、その間、またはその後に、カテゴリー結合分子に結合体化され得る。例えば、本発明の1つの実施態様において、ジゴキシゲニン標識された核酸プローブは、カテゴリー結合分子として使用される。試料中の標識中のカテゴリー特異的結合部位にカテゴリー結合分子を結合させた後で、未結合のプローブは洗い流される。次いで、抗ジゴキシゲニン抗体：アルカリホスファターゼ結合体（シグナリング部分）は、結合したジゴキシゲニン標識されたプローブに結合体化される。次いで、アルカリホスファターゼ基質（例えば、化学発光基質CDP-Star；NEN）が、シグナルを生成するために結合したアルカリホスファターゼに加えられる。

【0168】

工程3：生物試料の調製

試料の調製

本発明の重要な属性は、迅速かつ単純な試料調製プロトコールとのその適合性である。このことは、他の高感度の診断方法（例えば、核酸増幅に基づく技術、これは、酵素阻害剤を除去するためにより多くの試料調製手順を必要とする）よりも主要な有利な点を表す。

【0169】

試料調製は、試料の性質および試験の形式に依存する、いくつかの機能を有し得る。いくつかの場合において、試料調製は、標的を濃縮し、および/または標的を基材上に沈着させる。例えば、水由来の微生物についての試験は、沪過によって微生物を濃縮でき、検出のための沪紙上に細胞を沈着させる。他の試料は、固体基材上（例えば、顕微鏡ガラススライド）に塗布される。

【0170】

カテゴリー結合分子による結合に対して標的上で接近可能なカテゴリー特異的結合部位を作製することは、試料調製の重要な機能である。いくつかの場合において、例えば、カテゴリー特異的結合部位がカテゴリー特異的抗体に自由に接近可能な水性試料中の微生物の表面上のエピトープである場合、処理はほとんど必要ないか、または全く必要ない（例えば、実施例8を参照されたい）。他の場合において、試料調製は、内部のカテゴリー特異的結合部位を接近可能にするために必要とされる。これは、例えば、カテゴリー特異的DNA配列がゲノムDNA上のカテゴリー特異的結合部位に結合するために使用される場合である。標的細胞は、プローブに対して透過性にしなければならず、かつ、それらのゲノムDNAは変性されなくてはならない。大量の異なる種類の標的が同じ試料中で試験された場合、試料調製は、標的の全体のスペクトルについて有効でなくてはならない。試料調製方法のさらなる特異的な例は、以下の実施例に詳述される。

【0171】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4733

アッセイが陰性の結果を生じる場合、試料が標的生物を本当に含んでいないか、またはアッセイそれ自体が失敗であったか、すなわち、その結果が偽陰性であるか否かを知ることは重要である。偽陰性の結果を同定するために、1つまたはそれ以上の陽性対照標的が実験試料に加えられ得る。陽性対照標的は、試験される標的の範囲には存在しないカテゴリー特異的結合部位を含む。陽性対照標的に対応するカテゴリー結合分子は、使用される他のカテゴリー結合分子とともに試験に含まれる。1つまたはそれ以上のアッセイ工程が成功する限りは、3つの標的がすべてのアッセイにおいて検出される。従って、陽性対照からのシグナルを検出することの失敗は、偽陰性結果を示し得る。

【0172】

工程4：試料中の標的の、カテゴリー結合分子およびシグナリング部分への結合

この工程において、カテゴリー結合分子および結合したシグナリング部分は、特異的結合を容易にする条件下で、試料中の標的と接触させられる。例えば、カテゴリー特異的核酸配列の集合は、この工程で試料中の相補的標的配列にハイブリダイズする。同様に、試料中のカテゴリー特異的抗原は、対応するカテゴリー特異的抗体に結合することを可能にする。結合工程のための7つの可能な物理的構成が存在する。例えば、結合は、液相中で（例えば、実施例8を参照されたい）、顕微鏡スライド上で（例えば、実施例を参照されたい）、またはニトロセルロースストリップ上で、ラテラルフロークロマトグラフィーを使用して（例えば、実施例38を参照されたい）、実行され得る。カテゴリー結合分子の濃度は、迅速な結合反応速度論を達成するために最適化される。特異的結合を選択するために選択される条件は、カテゴリー結合分子およびそれらの標的分子との相互作用に依存する。特異的条件および手順は、以下の実施例に記載される。

【0173】

工程5：カテゴリー結合分子およびシグナリング部分と結合体化した標的の選択

未結合のシグナリング部分からの、シグナリング部分に結合する標的の物理的分離は、引き続く検出プロセスを増強する。選択工程のさらなる目的は、検出ゾーン（例えば、画像処理装置の焦点のある平面の領域）において標的を沈着させることである。複合体は一般的に固相に結合するのに対して、未結合のカテゴリー結合分子およびシグナリング部分は、液相に残存する。いくつかの場合において、未結合の物質は洗い流される。他の試験形式において（例えば、同質の液相形式およびメンブレンに基づくアッセイ法において）、洗浄は必要でない。

【0174】

結合工程の前に、試料が固体基材に固定されるアッセイ法では、未結合のカテゴリー結合分子およびシグナリング部分が一般的には洗浄によって取り除かれる。以下の代表的な例には、インサイチューハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学の方法を使用するものが含まれる。

【0175】

他の試験形式は、液相中（例えば、マイクロタイターウェル中）で実施される。これらの例において、標的/カテゴリー結合分子/シグナリング部分複合体は、一般的に結合工程後に表面に沈着される（例えば、実施例8を参照されたい）。表面上の標的複合体を沈着させるための方法には、遠心分離、沪過、重力沈降、磁気選択、または表面に結合したカテゴリー結合分子への結合（例えば、実施例18におけるような捕捉抗体）が含まれる。いくつかの場合において（例えば、磁気分離）、別個の部分、選択部分が使用される。カテゴリー特異的抗体でコートされた磁気微粒子は選択部分の例である（例えば、実施例8を参照されたい）。未結合のカテゴリー結合分子およびシグナリング部分は一般的に液相に残存しており、取り除かれ得る。検出手順（例えば、画像処理）が、狭い奥行きの視野で固体表面を選択的に分析する場合、未結合の物質（焦点の表面の外側に存在する）は時折取り除かれる必要はない（例えば、実施例8を参照されたい）。これらおよび他の方法の各々のさらなる例は、以下に提供される。

【0176】

ラテラルフロー形式およびフロースルー形式は、ポイントオブケア（point of care）

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4734

試験において論証できる、最も首尾よい試験形式である。これらの形式は、吸収剤のメンブレン中におけるキャピラリーフローの利点を利用する。これらは、一般的に、表面結合カテゴリー結合分子を使用して標的複合体を選択する。未結合のカテゴリー結合分子およびシグナリング部分は、キャピラリー作用によって捕捉ゾーンから流れ出る。メンブレンに基づくアッセイ法の別の重要な利点は、幾何学的な区別を使用することによって多重化することの容易さである（以下を参照されたい）。

【0177】

多重化された試験を構築するための幾何学的な区別

幾何学的な区別は、標的の複数のカテゴリーについて走査する場合、重要な方法である（すなわち、多重化された試験）。幾何学的な区別は、高いシグナル複雑性の多重化された試験（工程2を参照されたい）と比較した場合に、多重化された試験についての単一のシグナルシグニチャーしか必要としないことに利点を有する。幾何学的な区別を使用する代表的なイムノアッセイ法において、異なるカテゴリー特異的捕捉抗体が、検出ゾーンの別個の領域に沈着される（例えば、ラテラルフロー試験における異なるストリップ、またはフロースルーもしくはマイクロタイターウェルに基づく試験における異なるスポット）。従って、標的の異なるカテゴリーは、捕捉ゾーンの異なるあらかじめ決定された領域に捕捉される。捕捉抗体に類似する他のタイプの捕捉部分には、抗原、リガンド、および核酸が含まれる。幾何学的な区別のいくつかの例は以下に見られる（例えば、実施例38および実施例34を参照されたい）。

【0178】

工程6：試料中の標的に結合するシグナリング部分を検出することによる試料中に存在する標的生物の検出、同定、および定量

本発明の顕著な利点（その感度および標的を定量するその能力を含む）は、個々の標的を検出するための広域画像処理を使用する能力に由来する。シグナリング部分で標識した標的の検出は、一旦複合体が検出ゾーンに配置されるともたらされる。使用される検出プロセスはシグナリング部分のシグナル特性（例えば、蛍光、化学発光、または光散乱）に依存する。いくつかのシグナル特性（例えば、光散乱および蛍光）については、検出ゾーンにおける複合体は、光源から照射されなくてならない。他のシグナル特性（例えば、化学発光、放射送信、または磁場）については、照射は必要とされない。CCDカメラ、フィルム、および直接的可視化を含む種々の検出モードが使用され得る。

【0179】

非顕微鏡的な広域画像処理は、感度を非常に増大させ得る。顕微鏡なしで標的を検出することは、本発明の重要な局面である。なぜなら、これは、多くの場合において、標準的なインサイチュー分析方法において使用される顕微鏡的方法よりも、より迅速で、効率がよく、および感度の高い試料分析を達成し得るからである。顕微鏡的な検出よりも非顕微鏡的な広域検出の感度の増大は、標的について試料のはるかにより大きな容量を走査する能力から生じる。例えば、本発明は、顕微鏡的な画像処理を使用して画像化された代表的な領域よりも数千倍広い顕微鏡スライド上の領域を画像化し得る。得られる感度の増加は、肺炎の患者からのミリリットルあたり10,000個の細菌を含む痰試料を考慮することによって例証される。インサイチュー分析については、試料の一部を（例えば、約100のマイコバクテリウム・ツベルクローシス細菌を含む約10μl）が顕微鏡スライド上の約1cm^{2}のサイズの領域にわたって塗布される。この場合、本発明は、1cm^{2}のサイズの視野全体を画像化し、同時に100の個々の細胞を検出する。対照的に、顕微鏡分析を使用した場合、検査される狭い視野のサイズによっては、単一の視野が全く細菌を含んでいないという可能性が高い。従って、顕微鏡分析を使用する場合には、多数の（しばしば何百の）視野が注意深く検査されなければならない。これは、コスト、労力、そして時間のかかるプロセスであるが、本発明に基づく試験によって回避される。

【0180】

単一の標的の検出は本質的に定量的である、検出または画像処理工程の間、本発明は、試料の規定された容量中の個々の標的を検出し得る。定量は、写真もしくはデジタル画像

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4735

中の個々の細胞を計数することによって手動で、またはデジタル画像の場合には、ソフトウェア分析によって自動的に達成され得る。試料にわたってシグナル強度を積算することもまた、標的を定量するために使用され得る。シグナルの積算は、高濃度の標的を含む試料または物理的に連結された標的（例えば、糸状菌）を用いると特に有用である。これらの場合において、同時発生的なシグナルを分解することは常に可能であるとは限らないかもしれない。それらを一緒に使用することが適切である場合（例えば、標的のレベルが十分に低くて分散した標的が区別され得る場合）、自動化されたシグナル積算および粒子の計数が強固さを提供し、従って好ましい定量の方式を提供する。

【0181】

標識されたプローブファミリーのシグニチャーを解読することは、標的の多数のカテゴリーの同定を可能にする。この工程の重要な最終目的は、試料に付着した標識されたカテゴリー結合分子のシグニチャーを決定することによって試料中の標的のカテゴリーを同定することである。

【0182】

画像処理対照標準は、同定の参照を提供し、アッセイが正しく機能していることを示す。強固性および再現性は、本発明において内部標準および対照を容易に組み入れる能力によって大きく増強される。例えば、一般的に肺炎を引き起こす24種類の病原体について下気道試料を走査する場合、各々の病原体を含む内部標準のセットが並行して走査され得る（例えば、実施例1を参照されたい）。すべての試薬および手順の包括的かつ高度に重複したチェックを提供するうえに、内部標準は、試料のシグナルが同定のために比較される参照シグナルのセットを提供する。

【0183】

図3に示すCCDカメラに基づく画像処理装置は、蛍光がシグナル特性として使用される場合に、広域画像処理のために使用する有用な装置である。この装置は、以下の実施例の多くについてデータを収集するために使用された。励起光は、高強度白色光源（1000Wキセノンアークランプ、モデルA-6000、Photon Technology Incorporated, Monmouth Junction, NJ）から、液体光導体（5mmコア直径、モデル380、Photon Technology Incorporated, Monmouth Junction, NJ）に光を導入することによって提供された。液体光導体は、光を励起フィルターホイール（BioPoint FW, Ludl Electronics, Hawthorne, NY）に運び、そしてフィルターを通ったビーム（代表的には、直径9mm）を標識された標的を含む検出表面に指向させる。図3に示された装置は、種々の検出表面（例えば、マイクロタイターウェル、顕微鏡スライド、カバーガラス、および平らな、光学的に透明な底を有するチューブ）上で標識された標的を検出し得る。入射光は検出表面に当たり、カテゴリー結合分子を介して標的に結合するシグナリング部分中で蛍光を誘発する。放射された蛍光の一部が高集光効率レンズシステムによって集光され、そして放射フィルターホイール（BioPoint FW, Ludl Electronics）を通してCCDカメラ（Orca II, Hamamatsu, Bridgewater, NJ）に伝達される。光学的方向の設計および構成は、当業者に公知の原理および実務に基づいている。

【0184】

以下の実施例の実験は、実施例3に図解される機器を使用し、これは、試料用容器（例えば、マイクロタイタープレート）を、励起および集光用の光学機器にわたって移動させるためのX-Y位置決めステージ（BioPoint XY, Ludl Electronics）を備える（このステージは図には示されていない）。Image-proおよびImage-Proアドインはすべての機器の要素および画像の獲得を制御する。フィルターホイールは、ScopeProアドイン（Media Cybernetics, Baltimore MD）で管理され、そしてStageProアドイン（Media Cybernetics, Baltimore MD）はステージの位置を処理するのに対して、カメラの制御はハママツオルカII（Hamamatsu Orca II）ドライバー（Hamamatsu, Bridgewater, NJ）を介する。Image-Pro Plusもまた、以下に記載するように、画像処理および分析のために使用される。

【0185】

試料領域の中程度の解像度の画像をキャプチャーする低コストカメラが使用され得る。

代表的な感染疾患に適用するためには、各試料は20×20mmの試料領域にわたって散らばった、1個の標的～10,000個の標的のオーダーを有することが予想される。単一の、非糸状の、原核生物は、直径10μm未満の点光源として見えることが予想される。コスト意識のある医学的診断の研究室において実行される日常的な試験のために、中程度の解像度のカメラが使用され得る。例えば、優れた感度およびノイズの特性を有する高価でないカメラ（例えば、Roper ScientificのSenSys CCD）が容易に利用可能である。これらのシステムは、代表的には、500×500ピクセルまたはそれ以上の解像度を有する。20mm四方の試料領域を500×500ピクセルの解像度で画像化することは、250,000ピクセルを提供し、これは、代表的なアッセイ法において予想される1標的～10,000標的の大部分を区別するのに十分であり、それ以上のものである。

【0186】

より高感度のカメラを選択することによって、画像処理システムの感度が増大され得る（例えば、より低い温度にまで冷却したカメラ、または背部が薄くなったチップを使用するカメラ）。あるいは、検出感度および解像度は、ライン走査システムを実行することによって増大され得る（例えば、BT Image Array; Hamamatsu）。ライン走査のために、リニアCCDまたは光ダイオードアレイ（例えば、1×500または1×1000ピクセル）が画像をキャプチャーするために使用される。1つの次元における解像度は、アレイエレメントの数に対応するのに対して、2番目の次元は、一般的に、リニアアレイの下に垂直的に試料スライドを移動させることによってキャプチャーされる。より少ないエレメントが存在するので、同様の感度のリニアアレイは、代表的には、領域形式のCCDカメラよりもより安価である。

【0187】

白色光照射を使用する本発明の実施態様は、各々の蛍光団について最適な励起ピークを供給するためのスペクトルフィルターを使用する。白色光スペクトルは広いため、広範な種々の蛍光団が重複する放射スペクトルを除外するように選択可能である。白色光照射装置を用いて達成可能な代表的なスポットサイズ（例えば、2mm～5mm）は、広域画像処理に適切である。フィルターの変更は比較的単純であり、かつ自動化できるので、白色光のシステムは非常に適合性があり、同じ装置が別個の蛍光団のセットを使用する試験に使用可能である。

【0188】

図3に示すシステムの集光効率は、2つの要素：集光対物レンズおよび焦点エレメントからなる、カスタム設計の集光装置を組み入れることによって最大化される。この集光対物レンズは高い集光効率（≧f#/1.2）を有し、比較的平行なビームを出力する。焦点レンズは集光対物レンズからの光出力を捕捉し、そしてそれをCCDの検出表面に焦点を合わせる。この光学機器は、2つの部分に設計されており、フィルターホイールは集光レンズの光路に挿入可能である。本発明の特定の実施態様、例えば、フィルターの変更を必要としないいくつかの実施態様のために、高い集光効率を達成するには、先細りした光ファイバー繊維を含むことが所望され得る。この光ファイバー繊維は、試料に対して近位で光を集光し、およびCCDチップに直接光を伝達する繊維を含む。あるいは、本発明は、試料がCCDチップに直接適用されるか、またはCCDチップに非常に近接して適用される（最も高い感度のためには、背面が薄いCCDチップの背面に適用される）ような直接的な近位検出を使用して、シグナルを非常に高感度に検出し得る。

【0189】

白色光、上記のマルチスペクトルシステムに加えて、本発明者らはまた、非拡大的な広域画像処理のための、より単純な単色蛍光画像処理システムを開発した。このシステムにおいては、励起光は532nm周波数二重ダイオードレーザー（50mMW，モデル#BWT-50E，B&W Tek，Newark，DE）によって供給される、角度を付けた照射を使用するこのシステムは、図3に示される。

【0190】

図3に示される検出システムが単色光であるので、フィルターホイールは必要ではない

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4737

。単一の励起フィルター（モデルHQ532/10x, Chroma Technology, Brattleboro, VT）により高調波スペクトルがレーザー出力から除去され、かつ単一の放射フィルター（モデルHQ620/60m, Chroma Technology, Brattleboro, VT）により、特定の蛍光シグナルのみをCCDカメラにまで通過させる。これらのシステムはまた、画像をキャプチャーするために、以前に記載したものよりも安価なCCDカメラ（モデルKX-2E, Apogee CCD, Auburn, CA）を使用する。これらの図に示す機器は、複数のレーザーおよびフィルターセットを組み入れることによって多色分析に容易に適用され得る。

【0191】

検出表面上に標的を沈着させるための手段が、検出システムに組み入れられてもよい。例えば、磁気ステーションが機器に組み込まれ得る。磁石（Dexter Laboratories）が、96ウェル形式マイクロタイターディッシュの底面に磁気ビーズを沈着させるために構成され得る。自動化ステージを使用して、マイクロタイターディッシュを、磁気ビーズが沈着するのに十分な時間をかけて、磁石を越える位置にまで移動し、そしてウェルの底面に標的を結合させる（一般的に、数分間が必要である）。次いで、マイクロタイターディッシュを磁気ステーションから移動し、ウェルを個々に画像化する。

【0192】

選択のための他の手段はまた、検出機器を含むシステムに組み入れられ得る。例えば、沪過ステーションが、標的をフィルター上に沈着させるために使用できる。これは、次いで、自動的に画像化され得る。同様に、標的は、オンボード遠心分離機における遠心分離によって検出表面法に沈着され得る。高密度の粒子を用いて標識された標的の重力による選択では、単に検出機器内のインキュベーションを必要とする。

【0193】

他のモジュールは、検出装置を備えた機器システムに接続するか、またはそれに組み入れてもよい。試料容器（例えば、マイクロタイターディッシュ）を扱うための自動化モジュールは1つの例である。

【0194】

本発明に組み入れられるCCDカメラは、一般的に、積算のために十分な時間、10秒間～約2分間（カメラの感度に依存）、累積したカメラのノイズが最小となるように、-5℃～-20℃の間の温度に冷却される。一般に、積算時間をより長くすると、延長された時間にわたって蛍光団から放射される光子の集光が可能になることで、より高い感度が提供される。長い積算時間はライン走査のためには不適切である；しかし、感度の増大と、非常に高い量子効率とを有する、背面が薄い利用可能なリニアアレイが存在する。

【0195】

本発明はまた、シグナルの検出および解読のために干渉計に基づくスペクトル画像処理を使用し得る（Schrock, E., 1997、前出）。この技術を使用して、シグナリング部分によって放射または散乱された光は、2つの光路に分けられ、プリズムを通され（その結果、異なる波長は異なる距離を移動する）、そして干渉パターンを作製するために組換えることが許容される。干渉パターンのフーリエ解析は、画像の各点についての分光写真を生成する。

【0196】

または、写真フィルムを使用して、試料中の標的の画像を安価に記録してもよい。シグナリング特性が化学発光である場合、このアプローチは最も容易に実施される（例えば、実施例15を参照されたい）。

【0197】

画像処理検出器をシグナリングを使用する本発明の実施態様については、コンピュータソフトウェアが標的を同定および定量する。一般的に、ソフトウェアは：（1）照射の不均一性を修正する；（2）必要な場合、逆重畳積分マトリックスを通して蛍光のクロストークを修正する；（3）必要な場合、基材上に刻印された登録標識を使用して画像を整列させる；（4）標的を他のシグナルから区別するためのアルゴリズムを実行する；（5）試料中の各々の画像化された標的に身元を割り当てる；（6）各カテゴリーにおける標的の

総数を計算する；（7）試料の同定のために試料のバーコードを画像化および記録する；ならびに（8）出力データ（内部標準および試料データを含む）、画像、およびバーコードを、ウェブブラウザインターフェースを介して照会可能なデータベースに自動的に保存する。市販の画像分析パッケージがこれらの機能を提供するために使用され得る。多色画像分析のためのソフトウェアパッケージが使用され得る（例えば、Image-Pro, Media Cybernetics; MetaMorph, Universal Imaging, MatLab, The Mathworks）。

【0198】

本発明は、個々に散らばった標的を計数できるが、標的は、物理的に連結されているか（例えば、糸状菌の場合）、または重複もしくは同時発生的であり得る。従って、本発明とともに使用されるソフトウェア分析パッケージは、好ましくは、画像処理した領域にわたってシグナルシグニチャーについてシグナル強度を積算することによって標的を定量するモジュールを含む。試料中の標的の数は、しばしば、試料の画像の積算されたシグナル強度を、内部標準対照における個々の標的の平均シグナル強度と比較することによって決定され得る。このソフトウェア定量モジュールは、好ましくは、多数の試料についての出力を「ゴールド標準」方法に対して比較することによって標的の各々のタイプについて「調整」される。例えば、糸状菌を含む試料は、好ましくは、顕微鏡的な定量に対する比較によって較正されたソフトウェアモジュールを使用して定量される。または、特定の細菌については、微生物培養による定量または染色された細菌の顕微鏡的検査による定量は、ソフトウェアを較正するために使用され得る。以下の実施例では、本発明を使用して得られる画像のソフトウェア分析の特定の例を提供する。

【0199】

以下に続く実施例の多くで収集された蛍光データを分析するために使用されたソフトウェアパッケージおよび方法をここで概観することは有用である。検出表面は蛍光標識された複合体の数および/または全体の蛍光シグナルを測定するために画像処理される。蛍光は、アッセイコンテナの底からCCDカメラによって捕捉され、そしてピクセルの位置および強度の記録を含むTIFF（Tagged Image File Format）画像ファイルとして保存された。3つのアプローチが、アッセイ結果を定量するために使用された。画像処理された検出ゾーンの全体の集積されたシグナルは、すべてのピクセルからの蛍光シグナルを合計することによって決定された。試料から積算されたシグナルは、陰性対照のそれと比較された。全体の積算されたシグナルを測定することは、多数の標的を含む試料に対してとりわけ有用である。第2のアプローチは、検出領域中の対象物を計数することであった。第3のアプローチは、蛍光対象物中に含まれるすべてのピクセルの強度を積算することであった（画像中のすべてのピクセルの強度を合計することとは反対に）。すべての画像分析は、Image-Pro v4.0（Media Cybernetics, Silver Springs, MD）を使用して実行された。

【0200】

全体の積算シグナルを得ることは、コンテナの底を表す画像（関心対象の領域）上の領域を最初に規定することによって達成された。Image-Proは、関心対象の領域が、単一の対象物に転換されることを可能にし、そして他のImage-Proツールは、この対象物中に表されるピクセルの全体のシグナルが合計されることを可能にする。次いで、標的が加えられていないアッセイコンテナからの同様の画像が同様の方法で分析され、かつ陰性対照として使用された。陰性対照の値は、標的を含む試料の値から減算された。このことは、アッセイノイズと電子的ノイズの両方を除去する。

【0201】

第2および第3の定量方法は、Image-Proの対象発見ユーティリティーを使用した。このユーティリティーは、自動的またはユーザー定義された閾値より上の値（シグナル）を有した近接するピクセルを結合させる。このことは、対象の周囲に輪郭線を確立する。周囲のピクセルおよび内部のピクセルは対象として定義され、そしてこれらのピクセル値を合計することは対象の集積値を生じる。次いで、試料コンテナの底を示す、目的の領域中のすべての対象物は分析ソフトウェアを使用して自動的に計数され、そしてさらに、見つかったすべての対象物の集積シグナル強度が計算され得る。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4739

【0202】
IPP Image-Proマクロ言語を使用して、上記のユーティリティーは一度にいくつかの画像のバッチ処理を可能にするように自動化され得る。さらに、データは、他のユーザー定義されたIPPスクリプトを用いて操作され得る。例えば、特定のサイズ（領域）または強度を、下回るまたは上回る対象物は、含まれても排除されてもよい。これは、ほこりを排除するための有用な手段であり得る。
【0203】
実施例
以下の実施例は、応用の範囲と関連した使用のための本発明の種々の実施態様を実施するための技術的詳細を提供する。この実施例は限定を意図するものではない。
【0204】
実施例1．蛍光DNA結合染色剤で標識した個々の細菌の広域画像処理
概要：この実施例は、拡大なしで多孔性膜上の個々の細菌細胞を検出するための本発明の使用を実証する。大腸菌の細菌細胞標的を蛍光核酸染色剤で標識し、メンブレンを通して沪過し、そして広域画像処理を使用してCCDカメラを用いて蛍光画像をキャプチャーした。
【0205】
実験方法：大腸菌ATCC 8739の培養は、トリプチケースソイブロス（Trypticase Soy Broth）（TSB, BDカタログ番号211822）中で、37℃、18時間増殖させた。細胞の1mlアリコートを、微量遠心分離機で遠心分離し、等量の水に再懸濁した。細胞を、1mlのアリコートを100℃で5分間加熱することによって死滅させた。核酸染色剤シーバーグリーンI（Molecular Probes; カタログ番号S-7563）を、死滅した細胞に「10×」の最終濃度まで添加した（シーバーグリーンIのストックは10,000×と定義される）。染色された大腸菌細胞を水で段階希釈し、真空沪過装置およびプラスチックフンネルキャップ（Millipore Microfil V User Guide, PF07114, Rev A 3/00）を使用して、0.22μmブラックポリカーボネート沪過メンブレン（Osmonicsカタログ番号K02BP04700）を通して沪過した。蛍光を、広域画像用の非拡大的なCCD画像処理装置（上記の工程6；図3において記載した）を使用して、FITC光学フィルターセット（色度/励起470/40nm、放射522/40nm）を用いて検出した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。
【0206】
結果：図7の左のパネルは、シーバーグリーンIで染色し、および非拡大的な広域画像処理を使用して画像処理した個々の大腸菌細胞を示す。白色スポットとして見られる蛍光シグナルの数は、使用された希釈および視野の面積に基づいて、予測された約100個の大腸菌細胞の数と相関する。右のパネルは、細胞が同一の様式でメンブレンを通して沪過「されず」および画像処理され「なかった」陰性対象を示す。
【0207】
実施例2．DNA結合蛍光色素で染色した単一の細菌の広域画像処理
概要：この実施例において、カバーガラス上での広域画像処理を使用して、蛍光核酸染色で標識された単一の大腸菌の細菌細胞標的を検出した。染色された細胞を白色光で照射し、CCDカメラで画像処理した。
【0208】
実験設計：大腸菌MG1655の培養は、LBブロス（BD; Sparks, MD）中で、37℃、18時間増殖させた。細胞を、ヒートブロック中で、18時間培養物の1mlアリコートを、95℃まで、5分間加熱することによって固定した。核酸染色剤シーバーグリーンI（Molecular Probes; カタログ番号S-7563）を、固定した培養物に添加し、染色剤ストックの1：1000希釈を達成した（999μlの熱固定培養物に1μlのシーバーグリーンIのストック（10,000×））。大腸菌細胞を10分間染色した。次いで、細胞を、11700gで10分間、微量遠心分離機で遠心分離した。上清を除去し、そして細胞のペレットを等量の水（タイプ1品質）に再懸濁した。染色した細胞を段階希釈し、10^8～10^4細胞/mlの範囲の濃度を達成した。1：10希釈の

ポリ-L-リジン溶液（45mlのタイプ1の水に5mlのポリ-L-リジン（Sigma Diagnostics; カタログ番号P-8920））にスライドを浸すことによって、Corning No.1 1/2カバーガラスをポリ-L-リジンでコートした。コートされたカバーガラスを1回水（タイプ1品質）で洗浄し、そして風乾させた。希釈した染色した細胞の5μlアリコートを、ポリ-L-リジンカバーガラスにピペッティングし、そして室温で乾燥させた（約20分間）。蛍光を、CCD画像処理装置（上記の工程6；図3において記載した）を使用して、FITC光学フィルターセット（色度/励起470/40nm、放射522/40nm）を用いて検出した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。画像処理装置で検出された陽性シグナルを、同じフィルターセットを備えるAxioplan II蛍光顕微鏡（Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY）を使用することによって、大腸菌であると確認した。

【0209】

結果：図8は、シーバーグリーンIで染色した細胞を、非拡大的な広域画像処理を使用して検出したことを示す。白色スポットとして見られる蛍光シグナルは、高拡大蛍光顕微鏡法（1000倍；図8）を使用することによって、単一の大腸菌細胞またはグループ化された細胞のいずれかに対応することが示された。

【0210】

実施例3. 蛍光標識されたオリゴヌクレオチドカテゴリー結合分子へのハイブリダイゼーションによって標識された個々の細菌の広域画像処理

概要：この実施例において、広域画像処理を使用して、蛍光標識されたオリゴヌクレオチドカテゴリー結合分子への細胞rRNAのハイブリダイゼーションによって標識された、単一の大腸菌細菌細胞標的を検出した。細胞を実施例2と同様に画像処理した。

【0211】

実験手順：大腸菌細胞を実施例2と同様に増殖させた。細胞を、PBS中2.5%のホルムアルデヒド溶液中で、室温で30分間固定した。細胞を、11,700gで10分間、微量遠心分離機で遠心分離し、続いて細胞のペレットを等量のPBSに再懸濁することによって「洗浄」した。細胞を、前と同様に遠心分離し、50%エタノール中で再懸濁し、20℃で14時間放置し、そして上記のようにPBSで洗浄した。次いで、細胞を前と同様に遠心分離し、そしてハイブリダイゼーション緩衝液（1M NaCl/50mM EPPS/0.5%トゥイーン20/0.4μg/μl 酵母t-RNA/2%ブロッキング剤（ここでブロッキング剤は100mMマレイン酸 pH7.65/150mM NaCl/10%ブロッキング剤（Boehringer Mannheim）であった））中に再懸濁した。次いで、細胞を49℃で30分間インキュベートした（プレハイブリダイゼーション工程）。FITC結合体化DNAリボソームプローブ（1μl；Synthetic genetics）

5' FITC-GCTGCCTCCCGTAGGAGT

）を添加し、そして細胞を49℃で1時間インキュベートした（ハイブリダイゼーション工程）。ハイブリダイゼーションの後、細胞を洗浄緩衝液（PBS-TB）で洗浄し、49℃で10分間インキュベートした。洗浄工程をさらに2回反復して、合計3回の洗浄を行った。標識された細胞（5μl）を、ポリ-L-リジンコートされたカバーガラス上に沈着させ（実施例2に記載）、そしてCCD画像処理装置（詳細な説明の項の工程6に記載され、および図3に示される）を使用して画像処理した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。

【0212】

蛍光顕微鏡（1000倍；図8）を使用する試料の検査を使用して、非拡大的なデジタル画像におけるスポットが大腸菌細胞に対応することを確認した。

【0213】

結果：FITC結合体化大腸菌特異的rRNAオリゴヌクレオチドプローブを用いて大腸菌細胞を探索後、個々の細胞はCCD画像処理装置を使用して容易に見られた（図8）。白色スポットとして見られる蛍光シグナルは、高拡大蛍光顕微鏡法（1000倍；図8）を使用することによって、単一の大腸菌細胞またはグループ化された細胞のいずれかに対応することが示された。

【0214】
実施例4．蛍光標識されたPNAカテゴリー結合分子へのハイブリダイゼーションによって標識された単一の細菌の広域画像処理
概要：この実施例において、広域画像処理を使用して、蛍光標識されたPNAカテゴリー結合分子への細胞rRNAのハイブリダイゼーションによって標識された、単一の大腸菌の細菌細胞標的を検出した。細胞を実施例2と同様に画像処理した。
【0215】
実験手順：大腸菌細胞を実施例2と同様に増殖させた。細胞をハイブリダイゼーションのために調製し、そして、PNAマイクロDxフィッシュ試薬キット（Boston Probes; カタログ番号KT11000）において製造者によって指示されるように、大腸菌に特異的なPNAプローブを用いてハイブリダイズさせた。標識された細胞（5μl）を、実施例2と同様に、ポリ-L-リジンコートされたカバーガラス上にスポットし、そして画像処理した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。
【0216】
結果：図8は、蛍光団標識種特異的PNAプローブでタグ化された単一の細菌細胞を拡大なしで広域CCD画像処理によって検出したことを示す。CCDを用いて得られた画像中の白色スポットは、高拡大蛍光顕微鏡法（1000倍；図8）を使用して同じ試料を分析することによって、単一の大腸菌細胞またはいくつかの細胞の群のいずれかに対応することが示された。
【0217】
実施例5．蛍光標識された抗体への結合によって標識された単一の細菌の広域画像処理
実験手順：細胞を実施例2と同様に増殖させた。FITC標識ウサギ抗大腸菌ポリクローナル抗体（1:200希釈；Biodesign; カタログ番号C65110M）を、10^5～10^9細胞/mlの範囲の細胞の希釈液に添加し、そして室温で1時間インキュベートさせた。次いで、遠心分離（11,700g、10分間）によって細胞をスピンダウンし、そしてPBT中に再懸濁することにより、細胞を2回「洗浄」した。次いで、洗浄した細胞を、実施例2と同様に、ポリ-L-リジンコートされたカバーガラス上にスポットした。CCD画像処理および顕微鏡による確認を、実施例2に記載されるように実行した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。
【0218】
結果：図8は、蛍光団標識カテゴリー特異的抗体プローブでタグ化された単一の細菌細胞を拡大なしで広域CCD画像処理によって検出したことを示す。CCDを用いて得られた画像中の白色スポットは、高拡大蛍光顕微鏡法（1000倍；図8）を使用して同じ試料を分析することによって、単一の大腸菌細胞またはいくつかの細胞の群のいずれかに対応することが示された。
【0219】
実施例6．蛍光発生性エステラーゼ基質で染色した個々の生きている細菌の広域画像処理
概要および目的：この実施例において、広域画像処理を使用して、蛍光発生性エステラーゼ基質（シグナリング部分）の組み合わせで染色した個々の生きている大腸菌の細菌細胞標的を検出した。この基質は、インタクトな生きている細胞の細胞膜（ここで、代謝的に活性な細胞において見い出されるエステラーゼ酵素が作用する場合、基質は蛍光性および電荷の両方を帯びることとなる）を通して拡散し得る。これらの電荷をおびた生成物は、もはや細胞膜を通して受動的に拡散することはできず、インタクトな細胞によってトラップされる。この技術は、生きている細胞を死滅した細胞から区別することが重要である場合に有用であり得る。なぜなら、活性なエステラーゼおよびインタクトな細胞膜を有する細胞のみが適切に染色されるからである。この実施例において、生きている細胞または死滅した大腸菌細胞のいずれかをブラックポリエステルメンブレンを通して沪過し、蛍光発生性基質フルオレセインジアセテート（FDA）およびカルボキシフルオレセインジアセテート（CFDA）とともにインキュベートし、そして非拡大的な広域CCD画像処理を使用し

て画像処理した。

【0220】

実験方法：大腸菌ATCC 8739をトリプチケースソイブロス（TSB, BDカタログ番号211822）中で一晩増殖させ、大量の細胞を遠心分離し、上清を除去し、そして等量のPBS中でペレットを再懸濁することによって1回洗浄した。死滅した細胞は、洗浄した細胞の1mlアリコートを100℃、20分間加熱することによって調製した。生きている細胞および死滅した細胞の両方の適切な希釈物を、PBS中で作製した。ミリポア（Millipore）1225マニホールドを使用して、細胞を、吸着パッド（Chemunexカタログ番号200-C3012-02）上に装着したブラックポリエステルメンブレン（Chemunexカタログ番号200-C2010-01）を通して沪過した。沪過マニホールド中になお存在する間、細胞に、500μ1の沪過したTSBを重層し、そして30℃で60分間インキュベートした。培地を、メンブレンを通して吸引し、そして500μ1のChemSolB16（Chemunexカタログ番号200-R2023-02）中、20μM CFDA（Molecular Probesカタログ番号C-195）、10μM FDA（Polysciencesカタログ番号00615）で置き換え、そして37℃で60分間インキュベートした。試薬をメンブレンを通して吸引した。マニホールドを分解し、ポリエステルメンブレンをガラススライド上に装着し、そして乾燥させた。ポリエステルメンブレン上の蛍光シグナルを、FITC光学フィルターセット（色度/励起470/40nm、放射522/40nm）を用いて、CCD画像処理装置（上記の工程6；図3において記載される）を使用して捕捉した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。

【0221】

結果：図9は、生きている大腸菌細胞（左のパネル）が明るい蛍光スポットとして検出されるのに対して、死滅した大腸菌細胞（右のパネル）が検出可能な蛍光シグナルを有しないことを示す。生きている細胞の視野におけるスポットの数は約400であり、これは、フィルターに加えられた細胞の希釈物および視野の面積に基づく予測される細胞の数とよく相関する。

【0222】

変法（variation）：生きている細胞または死滅した細胞を区別する他の色素が使用され得る。例えば、細胞膜と交差反応し得るか、または交差反応し得ない他の蛍光発生性基質またはDNA染色剤が、FDAおよびCFDAの代わりに、またはこれらと組み合わせて使用され得る。複数の染色剤および色素が、蛍光検出のための複数の励起波長および放射波長を使用することによって区別され得る。対象物と結合された蛍光のスペクトルは、細胞が生きていると計数されるかまたは死滅していると計数されるかを決定するために使用され得る。さらに、特定のタイプの細菌の生化学的活性について特異的である蛍光発生性基質が、その存在を決定するために使用され得る。例えば、蛍光発生性のβ-ガラクトシダーゼ基質は、大腸菌に特異的である、β-ガラクトシダーゼによるその蛍光生成物に切断され得る。

【0223】

実施例7．高度に蛍光性の粒子で標識された個々の細菌の非拡大的な広域画像処理

概要：この実施例において、広域画像処理を使用して、高度に蛍光性の粒子で標識された個々の大腸菌の細菌細胞標的を検出した。個々の細菌：粒子複合体を、3つの別個の波長の光で照射し、そして実施例2と同様にCCDカメラで画像処理した。

【0224】

実験手順：大腸菌MG1665培養物を、LBブロス（BD, Sparks, MD）中で37℃、18時間増殖させた。大腸菌細胞を、光学的に透明な底を有するマイクロタイタープレート（Greiner America, Inc.；カタログ番号655896）に、ウェルあたり10^5細胞の最終濃度で加えた（50μ1あたり10^5細胞）。次いで、マイクロタイタープレートを、細胞を含む溶液が完全に乾燥するまで、ヒートブロック上で95℃に加熱した。核酸染色剤であるシーバーグリーンI（Molecular Probesカタログ番号S-7563）を、固定した培養物に、染色ストックの1：1000希釈を達成するように加えた（999μ1の熱固定した培養物に1μ1のシーバーグリーンIストック（10,000×））。染色剤に10分間曝した後、細胞を水で2回「洗浄」した（各洗浄

について200μl、続いて吸引）。希釈していないヒツジ血清（Fitzgerald；カタログ番号88-NS55）を各ウェルに加え、室温で30分間インキュベートした。ウェルを吸引し、次いで、ヒツジ血清中で1：500に希釈したウサギ抗大腸菌抗体（Biodesign；カタログ番号C65110M）を適切なウェルに加え、そして37℃で2時間インキュベートした。次いで、ウェルを3回洗浄した（洗浄溶液1（PBT）で2回、洗浄溶液2（PBS-B）で1回）。次に、ヒツジ血清中で1：500に希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギIgG抗体（Jackson；カタログ番号111-005-003）を適切なウェルに加えた。抗体を、37℃で2時間インキュベートした。ウェルを洗浄溶液1で2回洗浄し、洗浄溶液2で1回洗浄した。アビジンコートしたテキサスレッド蛍光粒子（0.45μm；Spherotech；カタログ番号VFP-0562-5）を、すべてのウェルにウェルあたり10^6粒子の最終濃度で加えた。プレートを、室温で一晩インキュベートした。次いで、ウェルを溶液1で5回洗浄し、続いて水で2回洗浄した。蛍光を、シーバーグリーンIについてはFITC光学フィルターセット（色度/励起470/40nm、放射522/40nm）、アビジンコートしたテキサスレッド赤色粒子についてはテキサスレッド光学フィルター（色度/励起560/55nm、放射645/75nm）、およびSyber Green染色細胞とテキサスレッド粒子の両方を見るためにはGFPロングパスフィルターセット（色度/励起470/40nm、放射500LP）を備えたCCD画像処理装置上で画像処理することによって（詳細な説明の節の工程6に記載され、図3に示されるように）検出した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。画像処理装置上で検出された陽性シグナルを、同じフィルターセットを備えたAxioplan II蛍光顕微鏡（Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY）を使用することによって、個々の大腸菌細胞であることを確認した。

【0225】

結果：図10は、非拡大的な広域CCDに基づく画像処理を使用した、カテゴリー特異的抗体および蛍光粒子シグナリング部分でタグ化された個々の大腸菌細胞の検出を示す。白色スポットとして見える蛍光シグナルは、高拡大蛍光顕微鏡（1000倍；図10）を使用することによって、複数の粒子を有する個々の大腸菌細胞であるか、または粒子で取り囲まれた細胞の群であるかのいずれかに対応することが示された。これらはアビジンコートされた粒子であった。細胞は、群特異的抗体で、次いで抗-抗体-ビオチン、次いでアビジン粒子で標識された。

【0226】

実施例8．非拡大的な広域画像処理を使用して個々の細菌を検出する同種イムノアッセイ法

目的：この実施例は、個々の細菌細胞を検出するためのイムノアッセイ法を実証し、これには、少数の病原性大腸菌O157：H7細胞を検出するための使い勝手のよい同種イムノアッセイ法が含まれる。

【0227】

図11は、この実施例および引き続く実施例において使用される同種アッセイ法のアプローチを図示する。同種イムノアッセイ法は診断において好まれる。なぜなら、これらは、単純、迅速、安価、および容易に自動化可能であるからである（同種は、ここで使用される意味においては、抗体および分析物の結合が、試薬および試料を混合した後で検出されるが、未反応のカテゴリー結合分子のカテゴリー結合分子：標的複合体からの物理的な除去（例えば、吸引による除去））を伴わないことを意味する。しかし、大部分の同種イムノアッセイ法は、非感受性（核酸増幅のような方法と比較して）、非定量的、および非多重化的（または非常に浅い程度に多重化される）である。ここで、対照的に、本発明は、感受性であり、定量的であり、および多重化される同種イムノアッセイ法を作製するために使用される。

【0228】

この実施例において、大腸菌O157：H7細胞を含む試料を磁気および蛍光粒子と混合し、磁気的に選択し、そして非拡大的な広域CCD画像処理を使用して画像処理した。洗浄工程は必要でなかった。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4744

【0229】

実験方法：抗大腸菌磁気粒子を、活性トシル基を有する磁気粒子（Dynal, Oslo, Norway, カタログ番号140.03）を大腸菌0157：H7細胞に対して惹起されたポリクローナル抗体（BioTraceアフィニティー精製；Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, カタログ番号01-95-90）にカップリングすることにより作製した。磁気粒子（30mg/ml；100μl；Dynal, Oslo, Norway, Dynaparticles M-280 Tosylactivatedカタログ番号140.03）を、粒子の磁気選択を使用して微量遠心チューブ（1.5ml）中でPB（3回の洗浄の反復、各1ml）中で洗浄し、続いて上清の除去を行った（この実施例におけるすべての磁気分離は、注記する以外は、Polysciences Inc.；カタログ番号8MB4111Sからの装置を使用して実行した）。粒子を、PB（70μl）に再懸濁した。大腸菌0157:H7に対して惹起された、アフィニティー精製されたポリクローナル抗体（60μg；Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, カタログ番号01-95-90）を、遠心分離沪過装置（Millipore MicroconモデルNo.YM-30）を通して製造業者の指示書に従って、名目上の分子量限界30,000ダルトン、製造業者から入手した溶液を通過させることによって精製した。フィルター上に収集された抗体を、PB（30μl）に再懸濁した。抗体（30μl）を、微量遠心チューブ（1.5ml）中で磁気粒子（70μl）と合わせ、手短にボルテックスした。この反応物を、回転機を用いて（特に注記されない限り、約30rpm）、37℃で20分間インキュベートした。20分後、BSA（IgGフリー）を0.1%の最終濃度で加え、そして回転させながら37℃で一晩インキュベートした。磁気粒子をPBS-Bで2回洗浄した（各1ml；磁気分離を使用）。この磁気粒子を緩衝液（0.1%（w/v）BSA（IgGフリー）を補充した、0.2Mトリス pH8.5））中に再懸濁し、そして回転させながら37℃で4時間インキュベートした。最終的に、磁気粒子を2回洗浄し（磁気粒子を使用して、PBS-B中で）、そして再懸濁した（最終濃度はPBS-B中1%固体）。

【0230】

抗大腸菌蛍光粒子を、磁気粒子をコートするために使用する同じ抗体の受動的吸着によって蛍光粒子（Fluospheres; Molecular Probes, Sulfate Microspheres, 1μm, 赤色蛍光（580/605） カタログ番号F-8851）をコートすることによって作製した。ウサギ抗カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）抗体（1.25nmolタイプAポリクローナル精製IgG；Biodesignカタログ番号B65411R, ロット番号3B03200）抗体を上記に記載したように精製した。表面硫酸基に抗体を受動的に吸着させるために、粒子（62.5μl；2%固体；Molecular Probesカタログ番号F8851、1μm、赤色蛍光（580/605））を、遠心分離によって反復して（3回反復）洗浄し（5分間；10,200×g；Eppendorf Centrifugeモデル5417C、Eppendolf Swinging Bucket RotorモデルA-12-11）、そして粒子ペレットを再懸濁した（1ml PBS/.15M NaCl）。この粒子ペレットをPBS（125μl、濃度は1%固体）中に再懸濁し、続いて精製した抗体をボルテックスしながら滴下して加えた（1nmol抗体/mg粒子の比で1.25nmol）。懸濁物を回転させながら25℃で2時間インキュベートし、続いて4℃で一晩インキュベートした。粒子を洗浄し（上記のように3回反復、しかしPBS-TB中で遠心分離後再懸濁）、PBS-TB（200μl）中に再懸濁し、そして回転させながらインキュベートした（25℃で30分間）。粒子を、上記のように2回洗浄し、そしてPBS-TB中で再懸濁した（125μl、濃度は1%固体）。

【0231】

粒子調製の後、大腸菌0157:H7（DEC 3B株、Tom Whittam博士、Pennsylvania State University）の接種物（一晩培養もの200μl）を培養し（200ml LB；4時間；250rpm、37℃）、そして以下のように段階希釈物を播くことによって滴定した。培養物を、さらなる増殖を妨害するために氷上ですぐに播いた。10mlアリコートを、細菌を含む培地への直接的なホルマリンの付加によって固定した（最終濃度＝2.5%）。培養物のアリコート（100μl）の段階希釈を作製し（PBS中1：10）、そして各希釈物のアリコートを、固定した細菌のストック溶液中の細菌の濃度を決定するために播いた。このストック溶液は、1×10^{8}細菌/mlの濃度を達成するように希釈した。ストック溶液（1ml）を、遠心分離（950×g）および再懸濁（1ml；PBS）、続いてPBS（1ml）中の細菌ペレットの再懸濁によって洗浄した

。

【0232】

抗大腸菌磁気および蛍光粒子（10μlあたり各タイプ1×10^6）の混合物を超音波処理した（1分間；設定8；Fisher Scientific 550 Sonic Dismembrator）。96ウェルガラス底プレート（Whatman Inc., Clifton, NJ, カタログ番号7706-2370）のウェルを、Gel Slick（Biowhittaker Molecular Applications, カタログ番号50640）を用いて1分間処理した。このGel Slickを吸引によって除去し、各ウェルへの滅菌水の付加、続いて吸引によって3回洗浄した。ウェルを5分間乾燥させ、その後試料を加えた。ウェルに緩衝液（PBS-TB；6ウェル各々に115μl）または血液（6ウェル各々に115μl）を加え、続いて、超音波処理した粒子スラリー（各ウェルに10μl）を加えた。固定した大腸菌0157：H7細胞（10μl中に1×10^3）を、緩衝液を含む3つのウェルおよび血液を含む3つのウェルに加えた。ウェルを、保存マット（Corning COSTAR, カタログ番号3080）を使用してシールした。試料を、回転させながら（30rpm；Dynal Sample Mixer, Oslo, Norway, カタログ番号947.01）室温で1時間インキュベートした。磁気粒子を、磁気分離装置（Dexter Magnetics, Silver Spring, MD, LifeSep, カタログ番号2501008）を使用することによって、ウェルの底の検出表面上で捕捉した。

【0233】

血液中の個々の細菌細胞を検出する同種イムノアッセイ法の効力を試験するために、マウスの血液中で実行されたイムノアッセイを、図3Aに示すようにCCD画像処理装置を使用して画像処理した。検出領域の画像、すなわち、マイクロタイターウェルの光学的に透明な底を、テキサスレッドフィルターセット（励起560/55、放射645/75）（20msec露出）およびImage-Pro Plusデジタル画像処理ソフトウェア（Media Cybermetics, Silver Spring, MD）を使用してキャプチャーした。次に、洗浄工程を組み入れたイムノアッセイ法の効力を試験するために、試料のすべて（すなわち、緩衝液および以前に画像処理した血液を含む試料を含む試料）を緩衝液で洗浄した（PBS-TB；200μl；10回ピペッティングにて吸引および吐出を行うことによる3回の洗浄）。洗浄工程の間、磁気分離装置（Polysciences, Inc., Warrington, PA, カタログ番号8MB4111S）を使用して、磁気粒子および磁気粒子を含む複合体をウェルの表面に捕捉および確保した。各洗浄に続いて磁気分離（5分間）および上清の吸引を行った。試料を、蛍光DNA挿入色素YOYO-1（10nm；Molecular Probes, カタログ番号Y-3601）を含むPBS-TB（200μl）中に再懸濁し、そして磁気選択した（Dexter Magneticsによる装置を使用して）。96ウェルプレートを、上記のようにCCD画像処理装置を使用して画像処理した。CCD画像処理した後、プレートを裏返し、蛍光顕微鏡法を使用して調べた（Axioplan II fluorescent microscope, carl, Zeiss inc., Thornwood, NY）。血液の同種イムノアッセイ（3連；20msec露出）において得られた画像（すなわち、洗浄工程の前に得られた画像）を、ソフトウェア分析を使用して定量した。マクロ（Image-Pro Plus）を使用して、各ウェルの外周内に含まれる検出領域を含む関心対象の領域を囲んだ。囲まれた領域内の対象物の計数および対象物の強度積算を、一連のビジュアルベーシック（Visual Basic）スクリプトを使用して実行して、Image-Pro Plus分析データを分析した（詳細な説明の項の工程6において記載されるように）。血液中の同種イムノアッセイに対する分析を表す2つの棒グラフをプロットした（図12；Microsoft Excel；Microsoft Corp.）。同一の閾値の値の設定を、各実験において、比較された試料について使用した。

【0234】

結果：図12は、非拡大的な広域画像処理によって大腸菌を高感度に検出するイムノアッセイの結果を示す。カテゴリー特異的抗体でコートされた磁気および蛍光粒子は最初細菌細胞に結合し、次いでこの複合体は、磁力を使用して光学的に透明なウェル（検出領域）の底面に引き付けられる。そしてこの複合体を、非拡大的な広域CCDに基づく画像処理を使用して検出した。図12は、血液の同種イムノアッセイ（下のパネル）ならびに、血液（上のパネル）および緩衝液（中央のパネル）における非同種（洗浄した）イムノアッセイの結果を比較する。最も単純な形式である、同種イムノアッセイ法は、優れたシグナル対

バックグラウンド比で効果的に細胞を検出した（この図の同種アッセイ法の定量を参照されたい（下の右のパネルの棒グラフ））。

【0235】

2つの左よりのパネルは、非拡大的な広域CCDに基づく画像処理を使用して得られた画像を示す。3つすべてのアッセイが、大腸菌が存在した場合に（左のパネル）強力なシグナルを与えたが、大腸菌が加えられなかった場合には、低いバックグラウンドシグナルであった。CCDカメラを使用して得られるシグナルが、粒子でコートされた大腸菌細胞に一致することのさらなる確認を、高出力の蛍光顕微鏡分析を使用して得た（1000倍；上の2つの行、右よりの2つのカラム）。大腸菌細胞、磁気粒子、および蛍光粒子を含む代表的な複合体の画像を示す。各複合体の2つの画像を2つのフィルターセットを使用して作製した：1つはDNA蛍光を可視化するためのもの（シーバーグリーンI；右から2つめのパネル）および蛍光粒子を可視化するためのもの（最も右のパネル）。この図は、磁気および蛍光粒子によって取り囲まれた大腸菌細胞からなる複合体を示す。

【0236】

イムノアッセイ法によって選択された大腸菌細胞のパーセンテージは、選択されなかった物質を測定する実験ならびにイムノアッセイ前後での試料の顕微鏡による比較（ここでは示していない）によって示されるように、一貫して95％より高い。顕微鏡的な調査は、大腸菌細胞を含む選択された複合体が、細胞あたり平均3.33蛍光粒子（n＝10；最小値＝2；最大値＝10）で結合したことを示した。

【0237】

画像の定量的分析を、蛍光対象物の数を計数し（図12，下のパネル、左の棒グラフ）、そして対象物のすべての強度を積算する（図12、下のパネル、右の棒グラフ）ソフトウェアによって実行した。両方の測定において、大腸菌（1000細胞）を含む試料は、大腸菌を含まない試料よりも有意に高いスコアである。このソフトウェア分析において見い出される全体の対象物は、試料における細胞の数よりも約15倍多いことに注意のこと（1.5×10^4対象物）。この観察は、以下の段落において記載される複合体の顕微鏡的な分析と一致する。ソフトウェア分析によって、大腸菌を含む試料は、大腸菌を含まない試料と比較して75倍より多い対象物および約400倍の積算強度を有した。両方の分析は、試料中の1×10^3大腸菌細胞を用いて得られるシグナルが、細胞なしの対照から生じたシグナルより3標準偏差より上であることを示す。

【0238】

複合体の形成は、イムノアッセイにおける大腸菌細胞の存在に強く依存するが（図の最も左よりの2つのカラムを比較して見られ得るように）、顕微鏡的検査は、大腸菌細胞を欠く多くの複合体を示す。このことは、大腸菌イムノアッセイの一貫した特色である。細胞を含まない複合体の形成が非細胞構造（例えば、顕微鏡では見えない大腸菌鞭毛（flagella）のフラグメント）の存在に起因することは、あり得ることである。あるいは、大きな粒子：細胞複合体が、アッセイの間に分かれて細胞を伴ういくつかのフラグメントおよび細胞を伴わないいくつかのフラグメントを生じることはあり得ることである。単一の細胞を含む複合体および細胞を欠く複合体に加えて、顕微鏡分析は、1つより多い細胞を含む複合体のいくつかを示した。

【0239】

これらの結果に基づいて、非拡大的な広域画像処理と組み合わせた、単純、迅速、および使い勝手のよい同種イムノアッセイ法により、血液中における少数の細菌を検出および同定する。

【0240】

変法：引き続く実施例に示されるように、この実施例の方法は、多種類の試料（生物試料および非生物試料）において他の標的を検出するために応用され得る。例えば、粒子をコートするための適切な抗体を使用することによって、この実施例に記載される方法は、特定のウイルス（例えば、HIV）、細菌、真菌、寄生生物、タンパク質、低分子、またはヒト細胞（例えば、癌細胞または感染細胞）を検出するために応用され得る。

【0241】
代替的な形式もまた、この実施例の方法と合わせて使用され得る。この実施例において記載される機器のために記載される磁石および光学モジュールの適切な再構成によって、種々のコンテナが適応され得る。例えば、より大きな容量またはより小さな容量の試料が、他のタイプの容器において使用され得る（例えば、光学的に透明な底および/または側面を有する試験管）。
【0242】
カテゴリー結合分子を標識する種々の方法もまた、可能である。種々のサイズの粒子および種々のシグナリング特性を有する粒子が使用され得る。種々のスペクトル特性を有するか、または蛍光カスケードを含む1つまたはそれ以上の蛍光色素を含む蛍光粒子が使用され得る（例えば、Molecular ProbesからのTransfluorosphere）。他のタイプの蛍光粒子（例えば、量子ドット）もまた、使用され得る。光を散乱させる粒子（例えば、RLS、PRP、またはナノゴールド粒子）は、この実施例において蛍光粒子と置き換えられ得る。目に見える色素で標識された粒子（例えば、色素をつけたポリスチレン粒子または色素を含むリポソーム）が使用され得る。あるいは、抗体または他のタイプのカテゴリー結合分子は、蛍光団（または他のシグナリング部分）で直接標識され得る。このような直接標識された抗体は、標的をコートし得、これらを検出可能にする。同様に、カテゴリー結合分子は、選択部分で直接標識され得る。例えば、抗体はフェリチン（磁気選択部分）にカップリングされ得る。
【0243】
標的を染色することはまた、蛍光粒子の代わりに検出のために使用され得る。この場合、特異性は選択部分、カテゴリー特異的磁気粒子によって付与される。例えば、核酸染色剤（例えば、ヨウ化プロピジウム、STYO 17、またはDAPI）が使用されて標的を非特異的に標識し得る。病原体特異的磁気粒子に結合する標的は、試料ウェルの底に選択的に運ばれて、非特異的な染色剤によって可視化される。カテゴリー特異的染色手順もまた、使用され得る（例えば、実施例9を参照されたい）。
【0244】
粒子に抗体をカップリングするための代替的な方法もまた、可能である。このような方法は当業者に公知であり、そして多数の参考文献に詳述されている（例えば、Hermanson、「Bioconjugate Techniques」（Academic Press, San Diego, CA, 1996）；およびEdwards編（1999）「Immunodiagnostics: A Practical Approach」Oxford:Oxford University Press）。
【0245】
他の形態の抗体もまた使用され得る（例えば、Fab、Fab'、Fv）。異なるカテゴリー特異的抗体が組み合わせて使用され得る。例えば、上記の応用において、異なるM.ツベルクローシス抗原についての抗体が結合され得、黄色-緑色蛍光粒子を分離し、次いで合わされる。あるいは、異なる抗体が同じ粒子に結合し得る。他の種類のカテゴリー結合分子（例えば、レクチン、ポリペプチド、またはリガンド）が抗体と置き換えられ得る。
【0246】
実施例9.「模擬痰」中での抗酸染色マイコバクテリアの広域画像処理
背景：結核は、1995年において三百万人より多くの死亡例を起こしており、これは同じ年のAIDS/HIVの死亡数の約3倍である。発展途上国において避けることのできる死亡例の約25%は、マイコバクテリウム・ツベルクローシス感染によって引き起こされる。不運なことに、マイコバクテリウム・ツベルクローシス感染の診断には問題がある。結果的に、高価でない、高速な、単純な、および迅速な診断試験に対する、まだ対処されていない、地球規模の大きな必要性が存在する。結核の大部分の症例が発生する発展途上国において優勢である抗酸性のバチルス（AFB）試験法は感度が低く、従って、感染した患者の多くの割合を見逃してしまう。結果として、偽陰性の試験結果を伴って処置されない結核患者は、その地域社会においてこの非常に感染性の高い疾患を伝染させ続ける。AFB試験はまた、時間がかかりかつ労力を要する。なぜなら、多くの顕微鏡の視野を、染色された細胞

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4748

の存在について注意深く検査しなければならないからである。培養は、最も基準になる検査であるが、極端に遅い。一般に、研究室でマイコバクテリウム・ツベルクローシスのコロニーを増殖させるのには数週間を要する。増幅に基づく新しい分子試験は迅速かつ高感度であるが、高い費用がかかり、最も裕福な国々においてさえ、試験の定着を阻害している。

【0247】

目的：この実施例において、本発明は、迅速かつ高感度な蛍光抗酸性バチルス試験を構築するために使用される。この試験は、この試験の顕微鏡に基づくバージョンにおいて試験されるよりもより大きな領域を画像処理（1秒未満）することによって、その感度および労力の低減を達成する。

【0248】

実験方法：「模擬痰」およびマイコバクテリア（マイコバクテリウム・スクロフラセウム（Mycobacterium scrofulaceum））（これは、結核を引き起こす因子に非常に類似している）の塗沫を含む準備したスライド（Remel；カタログ番号40-146）を、オーラミンOおよびオーラミン-ローダミンで染色した。各スライドは、模擬痰塗沫中に陽性対照（M.スクロフラセウム）および陰性対照（大腸菌）を含んだ。スライドを、TBオーラミン-ローダミン染色（Remel；カタログ番号40090）またはTBオーラミンO染色キット（Remel；カタログ番号40086）のいずれかを使用して調製した。スライドを、手短に4回、炎に通した。このスライドを、オーラミンO染色またはオーラミン-ローダミン染色のいずれかに浸漬し、そして室温で15分間インキュベートし、続いて脱イオン水で3回すすいだ。スライドを、TB脱色剤（Remel；カタログ番号40-107）で2分間脱色し、続いて脱イオン水中で3回すすいだ。スライドを、過マンガン酸カリウム対比染色剤（カタログ番号40-092）に3分間浸漬し、続いて脱イオン水で3回すすいだ。次いで、スライドを風乾した。オーラミン-ローダミン染色したスライドを、蛍光顕微鏡法を用いて（Axioplan II蛍光顕微鏡；Carl，Zeiss Inc.，Thornwood，NY；Cy3チャンネル；励起546/11、放射567/15、400倍拡大；500msec露出）、およびCCD画像処理装置を使用する非拡大的な広域画像処理によって（詳細な説明の項の工程6において記載され、および図3Aにおいて示されるように；TRITCのために最適化されたフィルターセット（励起545/30、放射610/75、1秒間露光）を使用して）画像処理した。

【0249】

結果：図13は、蛍光に基づく広域画像処理がオーラミン-ローダミン試薬を用いて染色された個々のマイコバクテリア細胞を検出することを示す。広域画像処理における蛍光シグナルは、高倍率の蛍光顕微鏡法（1000倍；図13）を使用することによって、個々のマイコバクテリア細胞または細胞の小クラスターに一致することが示された。同じ手順に供された大腸菌は、有意な蛍光を示さなかった。

【0250】

変法：他のマイコバクテリア種（例えば、M.アビウム（M.avium））とM.ツベルクローシス感染との区別はしばしば重要である。実施例27は、カテゴリー特異的抗M.ツベルクローシス抗体を使用してM.ツベルクローシスを特異的に同定する、この実施例の変法を提供する。

【0251】

実施例10．広域画像処理を使用する、迅速な抗微生物剤感受性試験

概要：抗微生物剤感受性試験の目的は、患者から単離された病原体を無効にする際に、種々の抗微生物治療のどれが最も効果的であるかを決定することである。迅速な抗微生物剤感受性試験は、感染性の疾患診断において、決定的な（時折、救命的な）適用である。タイミングよく、かつ有効な抗微生物治療の選択は、抗微生物剤感受性試験の結果に依存する。

【0252】

同定後、感染性因子は、一般的に、種々の濃度のいくつかの抗微生物化合物に抵抗するそれらの能力について試験される。固定する方法では、結果が出るまでに長く時間がかか

る（最も頻繁には、試料収集時間から2～4日）ことが欠点である。このことは、時間が致命的である医学的な救命（例えば、中枢神経系および血流の感染）のためには特に問題である。

【0253】

この実施例において、広域画像処理を使用して、モデルの大腸菌細胞の抗生物質テトラサイクリンに対する感受性を迅速に検出した。2つの株の細胞（1つは耐性、1つは感受性）は抗生物質中で数時間の間に増殖するそれらの能力について試験された。増殖を、蛍光核酸染色剤で染色した個々の細胞の広域画像処理によって検出した。

【0254】

実験手順：テトラサイクリン感受性試験を、抗微生物剤感受性についてのNCCLSガイドラインに概略されるブロス希釈法（「Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria That Grow Aerobically」第5版，NCCLS，M7-A5 第20巻第2号，2000年1月）に従って、2つの大腸菌株：MG1655（感受性株）およびMG1655/pLAFR1（耐性株）で実行した。試験培地の接種後6つの時点で（0、1、2、4、6、および18時間）、1mlのアリコートを各テトラサイクリン希釈物から、耐性株および感受性株の両方から採取した（耐性株および感受性株について、それぞれ、0μg/ml～320μg/mlおよび0μg/ml～4μg/ml）。これらの時点においてまた、目視の濁度での増殖チェックおよびプレート計数の両方を実行した。濁度チェックを、NCCLSブロス希釈ガイドラインに従って実行した。「＋」は、濁った培養物について記録し、「－」は濁っていない培養物について記録した。次いで、1mlのアリコートを実施例2と同様に　シーバーグリーンIを用いて染色した。染色された細胞のアリコート（10μl）を、90μlの水（タイプI品質）を含む、96ウェルプレート（Greiner America，Inc.；カタログ番号655896）の別々のウェル（光学的に透明な底を有する）に配置した。プレートを遠心分離機（Beckman Allegra）にて600g、10分間遠心分離し、次いで画像処理した。蛍光を、FITC光学フィルターセット（色度/励起470/40nm、放射522/40nm）を備えたCCD画像処理装置（詳細な説明の項の工程6に記載され、および図3に示される）を使用する画像処理によって検出した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。広域画像処理によって検出された陽性シグナルを、同じフィルターセットを備えたAxioplan II蛍光顕微鏡（Carl，Zeiss Inc.，Thornwood，NY）を使用することによって、単一の大腸菌細胞であることを確認した。

【0255】

結果：図14は、非拡大的な広域画像処理による個々の細胞検出および定量を使用した抗微生物剤感受性試験の結果を示す。この図の下の2つのパネルの比較からは、細胞増殖を決定するために、非拡大的な広域画像処理が培養と比較可能であることが示される（寒天プレート上のコロニーを計数することによる定量もまた、比較可能な結果を与えた）。CCD画像処理および培養によって決定された、抗生物質の最小阻害濃度（MIC）は比較し得るものであったが、一晩増殖後に決定されたMICよりもいくぶん低いものであった（図14の一番上のパネルから2番目のパネル）。

【0256】

この図は、この迅速な画像処理方法が、抗生物質耐性株（図14の右のパネル）を抗生物質感受性株（図14の左のパネル）から容易に区別することを実証する。増殖の4時間後、耐性株の劇的な増殖は、1つの抗生物質濃度（64μg/ml）中で明らかであった。この濃度は、抗生物質感受性株の増殖を阻害した濃度（0.25μg/ml）の数百倍であった。この結果は、CCD画像処理（一番下のパネル）、液体培養（一番下から2番目のパネル）、またはコロニー計数（示さず）によってアッセイされた場合と比較し得るものであった。

【0257】

従って、4時間のインキュベーションの後、非拡大的な広域画像処理は、培養アッセイ（濁度として点数付けされる）およびプレート計数の両方に比較し得る、抗微生物剤感受性試験の結果を提供する。

【0258】

利点および応用：この実施例で記載した方法について、慣習的な抗微生物剤感受性試験技術を超えたいくつかの臨床的な重要な利点が存在する。カテゴリー特異的結合分子で標識することによって（例えば、実施例2～実施例6を参照されたい）、細菌の同定は、抗生物質の存在下での細菌の増殖を定量するのと同じ時間で達成され得る。少数の同定された細胞を検出および定量する能力は、未だ達成されていない重要な診断的な必要性：細菌の継代培養を伴わない、臨床試料中での抗微生物剤感受性試験、に合致する。この目的を達成することで、適切な抗微生物治療を決定するために必要とされる時間を有意に減少させることによって、患者に大きな利益を提供する。

【0259】

実施例11．磁気選択された、個々の蛍光標識されたカンジダ・アルビカンス細胞の広域画像処理

目的：この実施例は、マイクロタイタープレートの底の検出ゾーンで磁気選択および沈着された個々の細胞を検出するための非拡大的な広域画像処理の有用性を実証する。カンジダ・アルビカンスは、血管由来の感染および膣の酵母感染を含む疾患を引き起こす一般的なヒト病原体である。この実施例では、C.アルビカンス細胞が蛍光核酸染色剤で染色され、ウサギIgG抗カンジダ・アルビカンス抗体で標識され、次いで、マイクロタイタープレートのウェル中で、抗ウサギIgG抗体でコートされた磁気粒子と混合される。磁場の適用は、細胞：粒子の複合体がウェルの底に配置されることを引き起こす。次いで、細胞がCCDに基づく非拡大的な広域画像処理を使用して検出された。

【0260】

実験手順：カンジダ・アルビカンス株10453（American type Culture Collection, Manassas VA）をYM培地（BD, Sparks, MD）中、22℃で18時間増殖させた。細胞を、PBS中2.5％のホルムアルデヒド溶液中で5分間固定し、PBS-Bで洗浄し、次いで、YOYO-1（1μl）核酸染色剤（Y-3601 Molecular Probes, Eugene, OR）およびウサギ抗カンジダ・アルビカンスポリクローナル抗体（B65411R, Biodesign International, Saco, ME）で30分間、染色および標識した。次いで、細胞をPBS-TBで3回洗浄し、未結合の染色剤および抗体を除去した。細胞のアリコートを、光学的に透明で、平らな、ガラス底のマイクロタイタートレイ（Uniview; カタログ番号7706-2370, Whatman, Inc. Ann Arbor, MI）のウェル中、PBS-TB中で、表面に結合したヤギ抗ウサギIgG抗体（8430050, Polysciences inc., Warrington, PA）を有する磁気粒子の懸濁液ともに混合した。15分後、磁場を、磁性鉄ブロック（Cortex Biochem, Inc., San Leandro, CA）を使用して適用し、その結果、磁気粒子がウェルの底面にわたって実質的に均一に整列された。ウェルの底の画像を、FITCフィルターセット（480/40nm励起、535/50nm放射；Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT）を使用するCCD画像処理装置（詳細な説明の項の工程6に記載し図3において示した）、およびMetaMorph画像キャプチャーソフトウェア（Universal Imaging Corp., West Chester, PA）を使用して、キャプチャーした。広域画像処理において見られる別個のシグナルが単一の細胞に一致することの確認を、同じFITCフィルターセットを使用するツァイスAxioplan II蛍光顕微鏡（Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY）を使用する、1200倍の拡大の高拡大率の顕微鏡を使用して達成した。

【0261】

結果：図15は、細胞を含むマイクロタイタートレイの反応ウェルの非拡大的な広域画像処理が、点状の蛍光シグナルを与えたことを示す。これらの蛍光シグナルは、同じ反応ウェルの高拡大（1200倍）蛍光顕微鏡法を使用することにより、個々のカンジダ・アルビカンス細胞または細胞の小さな群に一致することが示された。対照的に、細胞を含まないウェルまたは未染色の細胞を含むウェル（陰性対照ウェル）は、陽性シグナルを与えなかったか、または非常にわずかな陽性シグナルを与えた。陰性対照の画像中の少ない数の蛍光対象物は、ほこりの粒子または他の非生物的物質に起因する可能性が高い。

【0262】

実施例12．蛍光および常磁性ポリスチレン粒子に特異的に結合した個々のカンジダ・アルビカンス細胞の広域画像処理

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4751

目的：この実施例において、個々のC.アルビカンス細胞が、細胞特異的常磁性粒子を用いる分離およびC.アルビカンス特異的蛍光粒子を用いる標識の後、非拡大的な広域画像処理を使用して検出された。

【0263】

実験手順：以下の混合物を、光学的に透明で、平らな、ガラス底のマイクロタイタートレイ（Uniview; カタログ番号7706-2370, Whatman, Inc. Ann Arbor, MI）のウェル中で作製した：実施例6において以前に記載した、表面吸着したウサギ抗カンジダ・アルビカンスポリクローナル抗体（B65411R, Biodesign International, Saco, ME）を有する、YOYO-1（50nM）、5×10^7磁気粒子（MEOSN直径1μm；Bangs Labs Inc., Fishers, IN）を含むPBS-TB緩衝液、および、標準EDACカップリング化学を使用して表面に共有結合的にカップリングされた同じ抗体を有する5×10^7蛍光粒子（Fluospheres F-8821, 直径1μm, 赤色蛍光, Molecular Probes, Eugene, OR）。抗体を粒子に共有結合的にカップリングさせるために、蛍光カルボキシル化粒子（1μm、25ml、2%固体、赤色（580/605）、ポリスチレン、Molecular Probesカタログ番号F-8821）をMESB（2ml）中、室温での遠心分離によって（5分間；11,000×g；Eppendorf Centrifugeモデル5417C、Swinging Bucket Rotor A-12-11）洗浄し、そしてボルテックスおよびピペッティングによって再懸濁した。磁気粒子を使用するカップリング実験において、洗浄を、SPHERO（商標）FlexiMagセパレーターJr.デバイス（Spherotech, カタログ番号FMJ-1000）を使用して実行した。これは、懸濁液から磁気粒子の分離を5分間で可能にした。粒子の洗浄を2回反復し、続いてMESB中で粒子の再懸濁を行った（500μl；10mg/mlの濃度）。新鮮に調製したEDAC（Sigmaカタログ番号E-6383）を、0.2mg/mlの最終濃度で加え、そして室温で5分間穏やかに混合した。この懸濁物に、ウサギ抗C.アルビカンス抗体（5nmol；タイプAポリクローナル；Biodesignカタログ番号B65411R、ロット番号3B03200；実施例8に記載するように精製）を、ボルテックスしながら滴下して加え、回転させながら（約30rpm）室温で2時間インキュベートした。粒子を、上記のように遠心分離によって、MESB中で4回洗浄した。粒子を、エタノールアミンを含むMESB中に再懸濁し（0.03%；Sigmaカタログ番号E9508）、そして回転させながら室温で30分間インキュベートした。粒子を上記のように遠心分離によってMESB中で4回洗浄し、続いて0.1M酢酸ナトリウムpH4.0中で3回洗浄した。最終的に、粒子をPBT中で2回洗浄し、そしてPBT中1%固体に再懸濁した。

【0264】

PBS-TB緩衝液中に再懸濁されたカンジダ・アルビカンス細胞を加え、その結果、最終反応容量は200μlであった。この混合物を、振とう機上で60分間インキュベートした。未結合の蛍光粒子を、96ウェルマイクロタイタートレイ（8MB4109S Polysciences Inc., Warrington, PA）と境界を接して配列されたネオジニウム-鉄-ホウ素磁石のアレイを使用する磁場の適用後、3回の200μl PBS-TB緩衝液洗浄によって磁気粒子複合体から分離した。蛍光を、赤色蛍光粒子のために適切な光学フィルターセット（テキサスレッドフィルターセット、560/55nm励起、645/75nm放射；Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT）、および核酸結合色素YOYO-1（FITCフィルターセット、480/40nm励起、535/50nm放射）を用いたCCD画像処理装置を使用して（詳細な説明の項の工程6に記載され、図3に示される）、非拡大的な広域画像処理によって検出した。磁気粒子と同時に精製された蛍光粒子の存在は、カンジダ・アルビカンス細胞の存在を示す。CCD画像処理装置上で検出された陽性シグナルは、蛍光粒子を観察するためにセットされた同じテキサスレッドフィルターセットおよびYOYO-1染色細胞の核酸を見るためにセットされたFITCフィルターを装着したAxioplan II蛍光顕微鏡（Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY）を使用することによって、細胞、蛍光粒子、および磁気粒子の複合体であることを確認した。画像を、Image Pro Plus画像キャプチャーソフトウェア（Media Cybernetics, Silver Spring, MD）を使用して、100msの露出時間を使用してキャプチャーした。

【0265】

結果：図16は、細胞を含む反応の非拡大的な広域画像処理が点状の蛍光シグナルを与えたのに対して、細胞を有しない反応はこのようなシグナルを与えなかったことを示す。こ

れらの蛍光シグナルは、同じ反応ウェルの高倍率の蛍光顕微鏡法を使用することによって、単一のYOYO-1（緑色）染色カンジダ・アルビカンス細胞（または細胞の小さな群）を取り囲む赤色蛍光粒子に一致することが示された。

【0266】

実施例13．蛍光抗体および磁気粒子に特異的に結合した個々のカンジダ・アルビカンスの広域検出

目的：この実施例は、蛍光標識した抗体（シグナル部分：カテゴリー結合分子）および抗体コートされた常磁性粒子（選択部分）を使用して、個々の細胞を検出および同定するための非拡大的な広域画像処理の有用性を実証する。この実施例において、マイクロタイターディッシュ形式における非拡大的な広域画像処理を使用して、細胞への常磁性粒子および蛍光団標識抗体の結合後にカンジダ・アルビカンス細胞および大腸菌細胞を別々に検出した。

【0267】

実験手順：光学的に透明で、平らな、ガラス底のマイクロタイタートレイ（Uniview 7706-2370, Whatman, Inc. Ann Arbor, MI）のウェルを、「ブロックエイド（Block Aid）」（B-10710 Molecular Probes, Eugene, OR）を室温で30分間使用してブロックした。実施例6に記載するように調製した、表面吸着したウサギ抗C.アルビカンス（B65411R, Biodesign International, Saco, ME）または抗大腸菌ポリクローナル抗体（B65003R, Biodesign International, Saco, ME）を伴う約5×10^{7}の磁気粒子（MEO3N 直径1μm、Bangs Lab Inc., Fishers, IN）を、ウェル中で一定容量のPBS-TB緩衝液に加え、200μlの最終反応容量とした。C.アルビカンス細胞または大腸菌細胞を、5分間、PBS中ホルムアルデヒドの2.5%溶液中で固定し、PBS-B中で2回洗浄した。細胞を、常磁性粒子の懸濁物に添加し、そしてこの混合物を振とう機上で室温で30分間インキュベートした。FITC標識した抗カンジダ・アルビカンスポリクローナル抗体（5μg）（CR2155RF, Cortex Biochem, San Leandro, CA）またはAlexa Flour（商標）488（Molecular Probes, Eugene, OR., カタログ番号A10235）で標識した抗大腸菌抗体（1mg；Biodesign, Saco, ME.B65001R）（これらは、製造業者の指示書に従って標識した）を加え、この混合物をさらに15分間インキュベートした。未結合の抗体を、反復する洗浄および磁気鉄ブロック（CD2001、Cortex Biochem, Inc., San Leandro, CA）を使用する磁場の適用によって、磁気粒子：細胞複合体から分離し、その結果、磁気粒子がウェルの底面にわたって実質的に均一に整列された。蛍光を、CCD画像処理装置（詳細な説明の項の工程6に記載され；図3において示される）を使用して、FITC光学フィルターセット（480/40nm励起、535/50nm放射フィルター、FITCおよびAlexa488蛍光団の検出のため）を用いて検出した。磁気粒子と同時に精製された蛍光シグナルは、C.アルビカンス細胞または大腸菌細胞の存在を示す。画像上で検出された陽性シグナルを、赤色蛍光核酸結合色素YOYO-3（1μl）（Y-3636、Molecular Probes, Eugene, OR）で細胞核酸を染色後、Axioplan II蛍光顕微鏡（Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY）を使用する高拡大蛍光顕微鏡法（1200倍）によって、細胞：蛍光抗体複合体であることを確認した。

【0268】

結果：図17は、カンジダ・アルビカンス細胞または大腸菌細胞を含むウェルが多数の点状の蛍光スポットを与えたことを示す。これらの蛍光シグナルは、
高拡大蛍光顕微鏡法（1200倍）および赤色蛍光色素YOYO-3（Molecular Probes, Eugene, OR）を使用する核酸についての染色細胞を使用することにより、個々の細胞（または細胞の小クラスター）に一致することが示された。細胞を含まないウェル（または非常にわずかな細胞を含むウェル）はこのようなシグナルを与えなかった。陰性対照の画像中の数の少ない蛍光対象物は、ほこりの粒子または他の非生物的物質に起因する可能性が高い。

【0269】

実施例14．CCDカメラを使用した、個々の化学発光酵母細胞の非拡大的な広域検出

目的：この実施例の目的は、化学発光シグナリング部分で標識した個々の細胞を可視化するための非拡大的な広域画像処理を使用することであった。この実施態様において、C.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4753

アルビカンス細胞の表面は、フルオレセイン結合抗体でコートされ、続いて、アルカリホスファターゼ結合体化抗フルオレセイン抗体でコートされ、そしてCDPスター基質と反応して光を生成した。化学発光画像中での個々の細胞の存在は、蛍光顕微鏡法によって確認した。画像増感剤は、個々の細胞の検出には必要とされなかった。

【0270】

材料および方法：C.アルビカンス 90028（American Type Culture Collection）を、YM培地（VWRカタログ番号DF0711-17）中で25℃、48時間増殖させた。細胞を、PBS中2.5%ホルムアルデヒドにおいて5分間固定し、続いてPBS中で洗浄し、そして4℃で保存した。10容量のブロッキング緩衝液（0.5%NENブロッキング試薬 カタログ番号FP329、0.1Mトリス-HCl pH8、0.15M NaCl）を細胞のアリコートに添加し、そして懸濁物を30分間インキュベートした。ポリクローナルウサギ抗C.アルビカンス、フルオレセインイソチオシアネート結合抗体（Biodesignカタログ番号B65411F）を1/100希釈で加えた。細胞懸濁物を、穏やかに混合しながら60分間インキュベートした。細胞を遠心分離し、そしてブロッキング緩衝液で2回洗浄し、続いてブロッキング緩衝液中1/25希釈の抗フルオレセイン、アルカリホスファターゼ結合抗体（NENカタログ番号NEF-709）中に再懸濁した。再度細胞を穏やかに混合しながら60分間インキュベートした。細胞を遠心分離し、0.1Mトリス-HCl pH8、0.15M NaCl中で3回洗浄し、続いて0.1Mトリス-HCl pH9.5、0.1M NaCl中で1回洗浄した。最終的な細胞の懸濁物はpH9.5緩衝液中であった。

【0271】

広域画像処理のために、細胞の希釈物を、pH9.5緩衝液であらかじめ湿らせておいた、CDPスター試薬（NEN NEL-601）を重層したCASTナイロンコートガラススライド（Schleicher and Schuellカタログ番号10484181）上にスポットした。化学発光を、CCD画像処理装置（詳細な説明の項の工程6に記載し；図3において示した）を使用して、発光フィルターなしで、10分間の露光で可視化した。化学発光画像がキャプチャーされた後、スローフェード（Slow Fade）試薬（Molecular Probesカタログ番号S-2828）をスライド上にスポットし、カバーガラスをのせた。このスライドを、FITCフィルターキューブ（Chroma番号SP101）を備えた蛍光顕微鏡法を介して、個々の細胞を同定するために400倍の拡大率で観察した。

【0272】

結果：化学発光シグナリング部分で標識した個々のC.アルビカンス細胞は、図18に見られるように、拡大なしで検出することができた。3つの異なる希釈は、左から右に、それぞれ、約200、60、および20細胞を表す。最も低い希釈では、化学発光画像上の各スポットを、蛍光顕微鏡法によって観察した場合の細胞または細胞の小さな群と相関させることができた。空間的な配置は、鉛筆で書いたグリッド線の存在および相対的な細胞の位置によって補助された。左のパネルに特により大きく、より明るく見えるスポットは、1つより多い細胞を表す。

【0273】

実施例15．インスタントフィルムの直接的な露光を使用した、個々の化学発光酵母細胞の非拡大的な広域検出

目的：この実施例の最終目的は、化学発光シグナリング部分で標識した個々の細胞の非拡大的な広域検出を達成するためのインスタント写真フィルムを使用することであった。この実施態様において、C.アルビカンス細胞の表面は、フルオレセイン結合抗体カテゴリー結合分子でコートされ、アルカリホスファターゼ：抗体結合体に結合し、そしてCDPスター基質と反応して光を生成した。

【0274】

材料および方法：C.アルビカンス90028（American Type Culture Collection）を実施例14と同様に増殖および標識した。ポラロイドフィルム上での画像化のために、一片のハイボンドN（Hybond-N）メンブレン（Amersham-Pharmacia RPN1782B）を、一片の吸収性の沪紙上に置き、0.1Mトリス-HCl pH9.5、0.1M NaClであらかじめ湿らせた。細胞の希釈物をメンブレン上にスポットし、続いてCDPスター試薬（NEN NEL-601）を加えた。メンブレ

ンを、製造業者の指示書に従ってスポットライト（SpotLight）カメラ（Boston Probes DT10000）にマウントし、ASA 2000フィルム（Boston Probes DT20000）に30分間露光させた。

【0275】

結果：化学発光シグナリング部分で標識した個々のC.アルビカンス細胞を、図19に示されるようにインスタントフィルム上で直接的に検出することができた。この図は、標識細胞の3つの異なる希釈物の画像を示す。図19に示す試料の希釈物は実施例14（図18）において画像処理されたものと同じであり、約200、60、および20細胞（左から右に、それぞれ図において）を表す。左のパネルに特により大きく、より明るく見えるスポットは、多数の細胞を含むクラスターに対応する。この図の右のパネルにおけるスポットは、個々の細胞またはいくつかの細胞のクラスターのいずれかを表す。

【0276】

実施例16．非拡大的な広域画像処理を使用する、下気道感染に関与する生物体の検出

目的：非拡大的な広域画像処理を使用して、下気道感染に関与する生物体：クラミジア・ニューモニエ（Chlamydia pneumoniae）、マイコプラズマ・ニューモニエ（Mycoplasma pneumoniae）、およびレジオネラ・ニューモフィラ（Legionella pneumophila）を同定すること。

【0277】

概要：肺炎は、世界規模での主要な死因であり、米国において6番目に多い死因である。傾向としては、他の要因と同様に、65歳より高い年齢の個体の割合が高くなることが示される。現在の診断方法はしばしば経験的であるが、決定的な診断方法は適切な抗生物質を処方することによって患者の予後を改善すると考えられている。非拡大的な広域画像処理の能力と組み合わせた、痰の直接的な蛍光染色によって、特定の生物体（そのうちのいくつかは培養するのが困難である）の検出が診断を補助し、それによって肺炎ならびに医療費に起因する致死率の発生を減少させる。

【0278】

実験方法：クラミジア・ニューモニエ対照スライドおよびマイコプラズマ・ニューモニエ対照スライドを入手した（Bion, Park Ridge, IL; それぞれカタログ番号CP-4212およびMP-1212）。スライドを室温まで暖め、そしてブロッキング溶液でインキュベートした（PBS/1%BSA、15分間、25℃）。ブロッキング溶液を吸引によって取り除き、そしてブロッキング溶液中の一次抗体の希釈物を（抗クラミジア・ニューモニエ；DAKO Corporation, Carpinteria, CA, コードNM660, クローンRR402、1/5希釈、および抗マイコプラズマ・ニューモニエ；Fitzgerald International Industries, Inc., Concord, MA, カタログ番号10-M40, 1/1000希釈）、クラミジア・ニューモニエ対照スライドおよびマイコプラズマ・ニューモニエ対照スライドの個々のウェルに加えた。スライドをインキュベートし（25℃で30分間）、続いて洗浄手順を行い（PBS-BT、各4×5分間）、そしてCy3結合体化二次抗体とともにインキュベーションした（25℃で15分間、ヤギ抗マウスIgG-Cy3、Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, カタログ番号111-165-144）。スライドを、ウェルにPBS-BTおよびタイプ1滅菌水で浸すことによって洗浄した（それぞれ、各4×5分間および各2×5分間）。レジオネラ・ニューモフィラの広域画像処理の実証のために、L.ニューモフィラ血清型1に対するFITC結合抗体（カタログ番号92-103-FL）ならびに熱固定したレジオネラ・ニューモフィラ血清型1（Philadelphia 1, カタログ番号92-103-H）および6（Chicago 2, カタログ番号92-110-H）を入手した（mTECH（商標）Monoclonal Technologies, Alpharetta, GA）。2つの熱殺菌したレジオネラ・ニューモフィラ血清型（1および6）からの細胞の塗沫を、ポリリジンコートされたスライド（Sigma、カタログ番号P0425）上で調製した。ブロッキング溶液をスライド上に浸し、そしてインキュベートし（25℃で15分間）、続いて吸引を行った。レジオネラ・ニューモフィラ血清型1に対するFITC結合一次抗体をスライドに浸し（25℃で30分間）、続いて、吸引ならびにPBSおよびタイプ1水を用いた洗浄（それぞれ、各2×5分間および各2×5分間）を行った。すべてのスライドを風乾させ、続いて非拡大的な広域画像処理を使用して画像のキャプチャー

を行った（Cy3結合体についてはTRITCフィルターセット、Chroma Id. No. 41002b，励起544/30nm、放射610/75nm、およびFITC結合体についてはFITCフィルターセット、Chroma Id. No. SP101，470/40nm、放射522/40nm）。スライドをマウントし（Pro Long Antifade Reagent，Molecular Probes，Eugene，OR，カタログ番号P-4781）、そして蛍光顕微鏡法（Axioplan II蛍光顕微鏡、Carl，Zeiss Inc.，Thornwood，NY；Cy3結合体についてはCy3.5フィルターセット、Chroma Id. No. 41002b、励起544/30nm、放射610/75nm、またはFITCフィルターセット、Chroma Id. No. SP101，励起470/40nm、放射522/40nm）を実行して、詳細を観察した（400倍）。

【0279】

結果：この実施例は、下気道感染に関与する生物体が、直接的な蛍光抗体染色技術と組み合わせた、非拡大的な広域画像処理を使用して検出され得ることを実証する。陽性対照および陰性対照の広域画像処理は、この検出が特異的であることを示す（図20）。広域画像処理を使用して見られるシグナルが標識された細菌細胞によって生成されるものに対して特異的であることは、蛍光顕微鏡分析によって確認した。

【0280】

変法：非拡大的な広域画像処理の能力は、他の細菌、酵母、およびカビ、ならびに、尿路感染症、敗血症、および性感染症を含む他の疾患のカテゴリーに適用され得る。

【0281】

実施例17．非拡大的な広域画像処理を使用して3つの別個の微生物について試料を同時に走査する、多重化直接蛍光イムノアッセイ法

概要：この実施例において、非拡大的な広域画像処理を使用して、3種類の微生物を検出および同定する多重化試験において使用された。細胞を3つのカテゴリー特異的（この場合、種特異的）抗体（これらの各々が別個の蛍光色素で標識された）の混合物とともにインキュベートした。個々の細胞をCCD画像処理装置を使用して検出した。

【0282】

実験手順：大腸菌およびカンジダ・アルビカンスを、実施例2および実施例11にそれぞれ従って、増殖および固定させた。ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）を、Brain Heart Infusion（Difcoカタログ番号237500）中、37℃で一晩増殖させ、実施例2に従って固定および洗浄した。3つすべての種類の細胞を、個々に水で高解像度視野（40倍）あたり20～50細胞まで希釈し、これは、位相差顕微鏡によって観察できた。これらの希釈物のアリコート（3μl）を、ポリ-L-リジンコートしたカバーガラス上に配置し、そして直径約5mmの領域にわたって広げ、そして乾燥させた。

【0283】

抗大腸菌抗体（1mg；Biodesign，Saco，ME．B65001R）、抗C.アルビカンス抗体（1mg；Biodesign，Saco，ME．B65411R）、および抗ストレプトコッカスGrp A抗体（1mg；Biodesign，Saco，ME．B10601R）を、製造業者（Molecular Probes，Eugene，OR）の指示書に従って、Alexa Flour（商標）488（カタログ番号A10235）、Alexa Flour（商標）350（カタログ番号A10170）、およびAlexa Flour（商標）546（カタログ番号A10237）、タンパク質標識キットでそれぞれ標識した。

【0284】

標識された抗体の混合物を、正常ウサギ血清（カタログ番号88-NR50；Fitzgerald，Concord，MA）中（各20μg/ml）で調製した。カバーガラスにスポットした細胞を、抗体混合物で覆い、そして、水で飽和させたペーパータオルを含み、サランラップで覆った、湿らせたプラスチック製のピペットボックスのフタの中で室温で1時間インキュベートした。次いで、カバーガラスを、1%正常ウサギ血清を含むPBS中で1回洗浄し、次いで、PBS中で2回洗浄した（洗浄あたり10分間）。カバーガラスを、洗浄液から回収し、そしていかなる残った液体も圧縮空気を用いて吹き飛ばした。各カバーガラスの関連する領域を、FITC（励起480nm/40nmおよび放射535nm/50nm）（Alexa488特異的）チャンネル、テキサスレッド（励起560nm/55nmおよび放射645nm/75nm）（Alexa546特異的）チャンネルおよびDAPI（励起360nm/40nmおよび放射460nm/50nm）（Alexa350特異的）チャンネルにおいて、CCD画

像処理装置で（詳細な説明の項の工程6に記載され、および図3に示される）1秒間画像処理した。

【0285】

結果：多重化細菌アッセイ法の結果は図21に示される。各別個の細菌試料について、対象物の数および強度が予想される蛍光チャンネルにおいて最大であった。従って、FITC（Alexa488）チャンネルにおいて見られる対象物の数および強度は、大腸菌試料について最大であった。同様に、C.アルビカンス試料およびS.ピオゲネス試料は、DAPIチャンネルおよびテキサスレッドチャンネルにおいて、それぞれ最強の強度および最も多くの対象物を有した。従って、このアッセイは、非拡大的な広域画像処理を使用して、抗体カテゴリー結合分子の混合物を有する3つのカテゴリーの細胞を区別し得る。

【0286】

実施例18、アデノウイルスについての固相捕捉アッセイ法

目的：この実施例は、固体支持体上で捕捉された少数のウイルスを、蛍光粒子で標識でき、そして非拡大的な広域画像処理によって可視化できることを示す。最初に、96ウェルプレートのウェルが抗アデノウイルス抗体でコートされた。次に、アデノウイルスおよび抗アデノウイルス抗体でコートされた粒子がウェルに加えられ、そして抗体コートされた表面によって、ウイルスおよび粒子が捕捉された。未結合の粒子は除去され、そして捕捉された粒子（捕捉されたウイルスを示す）は、広域の蛍光画像処理によって検出された。

【0287】

材料および方法：96ウェルグライナー（Greiner）プレート（Greiner Labortechnikカタログ番号655097）に、100mM重炭酸ナトリウムpH10中の0.2mg/ml溶液50μlを加え、かつ室温で一晩インキュベートして、ビオチン化BSA（Sigmaカタログ番号A-8549）をコートした。ウェルを100μlPBSで1回洗浄した。次いで、ビオチン化BSA層を、50μlの、PBS中0.1mg/mlストレプトアビジン（Jackson Immunoresearch Laboratoriesカタログ番号016-000-013）で、室温にて2時間コートし、続いてPBSで洗浄し、次いで、50μlの、PBS中0.1mg/mlのビオチン化抗アデノウイルス抗体（Chemiconカタログ番号MAB8052、Molecular Probesキットカタログ番号F-6347でビオチン化した抗体）で、室温にて2時間コートした。ウェルを、100μlのPBS-TB中で3回洗浄し、そして4℃で保存した。

【0288】

2型アデノウイルス（ATCC VR-846）および呼吸器合胞体ウイルス（RSV）（ATCC VR-1302）を、4%ホルムアルデヒド/PBS（最終濃度）中で、室温で30分間再構成することによって固定した。グリセロールを最終濃度16%で加え、そしてアリコートを-80℃で凍結した。ウイルス粒子の力価（titer）を、$TCID_{50}$として表現される、製造業者によって提供される力価に基づいて見積もり、そして製造業者（ATCC）によって推奨されるように、0.7の因子を乗算することによりpfu（プラーク形成単位）に転換した。pfuが、調製物中のウイルス粒子の数にほぼ等しいという仮定がなされた。使用前に、アリコートを氷上で解凍した。解凍後、未使用の部分はさらなる実験のために4℃で保存した。

【0289】

粒子を、0.2μm直径の蛍光粒子を1%固体で使用した（Molecular Probesカタログ番号F-8848）以外は、実施例8に記載されるように抗アデノウイルス抗体（Chemiconカタログ番号MAB8052）でコートした。

【0290】

アッセイ法を実行するために、保存用緩衝液をウェルから取り除いた。約10,000ウイルス粒子および3×10^6粒子を、ブロックエイド緩衝液（Molecular Probesカタログ番号10701）中100μlの最終容量でウェルに加えた。マイクロタイタートレイを、振盪台の上で室温にて1時間インキュベートした。ウェルをPBS-TB中で3回、次いで水中で1回洗浄した。水を除去した後、ウェルを、FITC励起フィルター（470nm/40nm）および放射フィルター（522nm/40nm）のセットを使用して、CCD画像処理装置（詳細な説明の項の工程6に記載され、および図3に示される）を使用して画像処理した。画像を、Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、処理および分析した。対象物計数

ユーティリティーを使用して、ウェル中の粒子の数を見積もった。

【0291】

結果：この実施例は、固相上に捕捉されたウイルス粒子を蛍光粒子シグナリング部分で標識でき、そして図22に見られるように、拡大なしで検出できることを示す。Image-Pro Plusソフトウェアを使用する画像の分析（一番下のパネル）は、対象物（粒子）の数が約13,000であることを示し、これは、加えたアデノウイルス粒子のおよその数（～10,000）と大体一致する。しかし、調製物中のビリオンの数は正確に決定されていないことに注意すべきである。どれほどの数の感染組織培養細胞またはこのような細胞のフラグメントが調製物中に存在しているかもまた、未知であった。RSV陰性対照（一番上のパネル）における対象物の計数は約800であった。これは、非特異的なバックグラウンドを表す。

【0292】

実施例19．血中のウイルスの固相捕捉

目的：この実施例は、血液試料中の少数のウイルスが固体支持体上に捕捉され、蛍光粒子で標識され、そして非拡大的な広域画像処理によって可視化され得ることを示す。アデノウイルスが感染した血液を、96ウェルプレート中の抗アデノウイルス抗体でコートされたウェルに加えた。ウイルスの捕捉後、抗アデノウイルス抗体でコートされた蛍光粒子を加えた。未結合の粒子を除去し、そして捕捉された粒子（捕捉されたウイルスを表す）を、CCDに基づく蛍光画像処理によって検出した。

【0293】

材料および方法：96ウェルプレート（Greiner Labortechnikカタログ番号655097）のウェルを、ビオチン化抗アデノウイルス抗体でコートした。2型アデノウイルス（ATCC VR-846）およびRSV（ATCC VR-1302）を再構築し、実施例18と同様に固定した。粒子を、0.2μm直径の蛍光粒子（Molecular Probesカタログ番号F-8848）を1%固体で使用した以外は実施例8に記載されるように抗アデノウイルス抗体（Chemiconカタログ番号MAB8052）でコートした。このアッセイを実行するために、保存用緩衝液をウェルから除去した。約10,000ウイルス粒子を、最終容量100μl中、50%ブロックエイド緩衝液（Molecular Probesカタログ番号10701）、50%マウス血液中で、ウェルに加えた。マイクロタイタートレイを、振盪台上で室温にて1時間インキュベートした。ウェルを、PBS-TB中で2回洗浄し、続いて100μlブロックエイド緩衝液中、3×10^8粒子を加えた。振盪しながら1時間のインキュベーションの後、ウェルをPBS-TBで3回、水で1回洗浄し、そしてFITC励起フィルター（470nm/40nm）および放射フィルター（522nm/40nm）のセットを使用して、CCD画像処理装置（詳細な説明の項の工程6に記載され、および図3に示される）を使用して可視化した。

【0294】

結果：この実施例は、特定のウイルス粒子（この場合はアデノウイルス）を、50%血液の存在下で固相に捕捉でき、蛍光粒子シグナリング部分で標識でき、そして、図23に見られるように拡大なしで検出できることを示す。Image-Pro Plusソフトウェアを使用する画像の分析（一番下のパネル）は、対象物（粒子）の数が13,489であり、これは、加えたアデノウイルスのおよその数（10,000）と大体一致する。RSV陰性対照（一番上のパネル）における対象物の計数は約2,173であった。これは、非特異的なバックグラウンドを表す。このアッセイ法の結果は実施例18の結果（血液の存在は、固相へのウイルス粒子の捕捉、蛍光粒子を用いるそれらの標識、または拡大なしでのそれらの検出を妨害しないことを示す）と同様である。

【0295】

実施例20．アデノウイルスについての液相アッセイ法

目的：この実施例は、本発明が液相サンドイッチ形成方法を使用して少数のウイルスを走査できることを示す。アデノウイルスを含む試料を、抗ウイルス抗体でコートした磁気および蛍光粒子の組み合わせとインキュベートした。磁気および抗体粒子の複合体は、アデノウイルスの存在下で（しかし対照ウイルスの非存在下で）形成するように誘導された。これらの蛍光複合体は磁気的に選択され、光学的に透明な表面に沈着され、そして非拡大的な広域画像処理を使用して画像処理された。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4758

【0296】

材料および方法：アデノウイルスおよびRSVを、実施例18に記載されるように再構成および固定した。抗体コートされた蛍光および磁気粒子を、抗アデノウイルス抗体（Chemiconカタログ番号MAB8052）を用いて、1μm直径赤色蛍光粒子（Molecular Probesカタログ番号F-8851）および2.8μm直径磁気粒子（Dynal；カタログ番号142.03）を使用して、実施例8に記載されるように調製した。この実施例において、5×10^5赤色蛍光粒子を、ブロックエイド緩衝液（Molecular Probesカタログ番号B-10710）中で、5×10^8磁気粒子とともに、最終容量250μlに混合した。アデノウイルスまたはRSVを、試料あたり約1000ウイルス粒子の力価でアッセイに加えた。混合しながら室温で4時間後、磁気粒子および任意の結合粒子を、微量遠心チューブ用ポリサイエンス（Polysciences）BioMag磁気分離機を使用して分離し、PBS-TB中で3回洗浄した。洗浄した磁気粒子をマイクロタイターウェル（Greiner Labortechnikカタログ番号655097）に移し、そしてテキサスレッド励起フィルター（560nm/55nm）および放射フィルター（645nm/75nm）のセットを使用して、CCD画像処理装置（詳細な説明の項の工程6に記載され、および図3に示される）において可視化した。画像を、実施例18と同様に、Image-Pro Plusソフトウェア（Media cybernetics）を用いてキャプチャーおよび分析した。

【0297】

結果：この実施例は、特定のウイルス粒子が、磁気および蛍光粒子を用いる液相サンドイッチ形成方法を使用して捕捉され、そして、図24に見られるように拡大なしで検出され得ることを示す。およそ1000個のウイルス粒子がアッセイに加えられた。この図の一番下のパネルにおいて、Image-Pro Plus対象計数ユーティリティーを使用する分析は、2324個のアデノウイルス粒子を検出するのに対して、RSV陰性対照においては（一番上のパネル）、46粒子のみが検出された。これは、非特異的なバックグラウンド結合を表す。

【0298】

実施例21．血液中のアデノウイルスの同種アッセイ法

実施例の概要：効率的かつ費用対効果の高いウイルスロード試験（ヒト試料中のウイルス濃度を決定すること）は、医学的診断における未だ達成されていない主要な必要性を表す。この実施例は、本発明が試料中のウイルスをいかにして迅速に計数し得るかを実証する。この実施例は、重要なヒト病原体であるアデノウイルスについて試験する。技術的には、この実施例は実施例8と同様である。

【0299】

抗体を用いての粒子のコーティング：粒子を、実施例8におけるように抗体でコートし、そして2%固体の濃度に再懸濁する。この実施例において、抗アデノウイルスモノクローナル抗体（anti-hexon；カタログ番号MAB8052；Chemicon）を使用して、黄色-緑色蛍光粒子（TransFluoSpheres；カタログ番号T-8871；Molecular Probes）および磁気ナノ粒子（カルボキシポリマーコートしたフェロフルイド；Immunicon；カタログ番号F3000）をコートする。等量の蛍光および磁気粒子を混合し、その結果、混合物中の各タイプの粒子の最終濃度は1%固体となる。この粒子混合物は、実施例8におけるように超音波処理を使用して分散される。

【0300】

血液中のアデノウイルスの検出および定量：この実施例において記載される試験は血液中のアデノウイルスビリオンを検出する。種々の量（0、10^3、10^4、10^5pfu）の精製アデノウイルスビリオン（CsCl勾配精製；Frank Graham, McMaster University）を含む試料（PBS-B中10μl）を、全血および粒子混合物に加え、そして反応物を実施例8におけるように処理する。実験試料における蛍光粒子クラスターの数－陰性対照試料におけるクラスターの平均数は、試料におけるアデノウイルス粒子の数を示す。

【0301】

実施例22．細菌およびウイルスを同時に走査する、多重化された広域画像処理イムノアッセイ法

目的：この実施例は、本発明が、複数の異なった分析物（ここでは、細菌およびウイル

ス）について試料を同時に走査する試験を構築するために使用され得ることを実証する。対の抗体コートされた微粒子（1つは蛍光および1つは常磁性）を使用して、以前のいくつかの実施例におけるように（例えば、実施例8）標的に結合させた。しかし、この実施例では、2つのこのような対の粒子を使用した。1つは抗大腸菌抗体でコートしたセット、および1つは抗アデノウイルス抗体でコートしたセットであった。2種類の粒子：分析物複合体を互いから区別するために、各分析物について別個の蛍光粒子を使用した。大腸菌特異的粒子が緑色蛍光特性を有したのに対して、アデノウイルス特異的粒子は赤色蛍光特性を有した。試料および分析物特異的粒子を混合後、得られる粒子：分析物複合体を検出ゾーンに磁気選択し、そして非拡大的な広域画像処理を使用して画像処理した。赤色粒子または緑色粒子のいずれかについて調整された光学フィルターセットを使用し、そのとき得られた2つのCCD画像の分析によって、ウイルス標的および細菌標的を同定および定量した。

【0302】

材料および方法：大腸菌細胞を、実施例8に記載されるように増殖および固定し、そしてアデノウイルスを、実施例18に記載されるように、再構成および固定した。抗体コートされた蛍光および磁気粒子を、実施例8に記載されるように調製した。抗アデノウイルス抗体（Chemiconカタログ番号MAB8052）を使用して赤色蛍光粒子（Molecular Probesカタログ番号F-8851）をコートし、そして抗大腸菌抗体（KPLカタログ番号01-95-90）を使用して緑色蛍光粒子（Molecular Probesカタログ番号8852）をコートしたのに対して、磁気粒子（Dynal,カタログ番号142.03）のバッチを、各々の抗体を用いて作製した。アッセイ法のために、粒子を、以下の量：各蛍光粒子について2.5×10^{7}粒子および各磁気粒子について5×10^{6}粒子で、250μlの最終容量のブロックエイド緩衝液（Molecular Probesカタログ番号B-10710）中で混合した。アデノウイルスおよび/または大腸菌を、各々約1000ウイルス粒子/細胞でアッセイに加えた。室温で混合しながら1時間後、磁気粒子および任意の結合粒子を磁場で分離し、そしてPBS-TB中で3回洗浄した。洗浄した磁気粒子を、グライナーマイクロタイターウェル（Greiner Labortechnikカタログ番号655097）中で、FITCおよびテキサスレッド励起/放射フィルターの両方のセットを用いた（フィルターの詳細については実施例18および実施例20を参照されたい）CCD画像処理装置を使用して（詳細な説明の項の工程6に記載され、および図3に示される）可視化した。

【0303】

結果：この実施例は、細菌およびウイルスを同じ試料中で走査でき、そして非拡大的な広域画像処理を使用して検出できることを実証する。図25において見られるように、およそ1000個のアデノウイルスが混合物に加えられた場合、検出される粒子の大部分は抗アデノウイルス赤色蛍光粒子である（テキサスレッドフィルターセット）（一番上の行）。およそ1000個の大腸菌が加えられた場合、抗大腸菌緑色蛍光粒子がFITCフィルターセットを使用して検出されるのに対して（2番目の行）、アデノウイルスおよび大腸菌の両方が加えられた場合、粒子は両方のチャンネルで検出される（3番目の行）。いずれの病原体も加えられない場合、1桁低い強度の粒子が検出された。これは、非特異的なバックグラウンドを表す（一番下の行）。

【0304】

実施例23．非拡大的な広域画像処理を使用する個々の細菌を検出するためのフィルターフロースルーアッセイ法

概要：この実施例において、高度に蛍光性の粒子で標識された少数の細菌を検出するために迅速フロースルーアッセイを非拡大的な広域画像処理と組み合わせる。細菌およびビーズを一緒にインキュベートした後、細菌：ビーズ複合体を含む得られる溶液を、抗細菌抗体でコートしたフィルターに通過させる。次いで、フィルターによって捕捉された複合体を、実施例1におけるように、非拡大的な広域画像処理を使用して検出する。

【0305】

実験設計：ニトロセルロースメンブレン（Pall Biodyne A; 5μm孔; カタログ番号BNCF 810S）を、2つの1cm×1cmの正方形に切断した。この正方形を、抗大腸菌O157（PBS中200μg/ml）を含む溶液中に浸漬した。室温で乾燥後、このメンブレンをブロッキングした（

200ml；30分間；室温；PBS中、1%カゼイン（Hammerston grade; EM sciences; カタログ番号CX0525-1）および0.1%トゥイーン20（Sigma；カタログ番号P1379））。次いで、メンブレンを吸収ペーパー上にブロットし乾燥させた。このメンブレンをパラフィルムに移し、そしてこのメンブレンをPBS（300μl）で飽和させた。大腸菌O157（10^5細胞）の溶液および、抗大腸菌O157抗体（Kirkegaurd and Perry Laboratories; カタログ番号01-95-90；実施例8に記載されるように受動的に吸着された抗体）でコートした赤色蛍光ビーズ（10^6ビーズ/Molecular Probes；1μm；サルフェート；580/605nm；カタログ番号F-8851）をチューブ中で一緒に混合し、15分間インキュベートさせ、次いで、ニトロセルロース正方形の1つに加えた。他の正方形には、抗体のみをコートした蛍光ビーズを加えた（このフィルターは、「細菌を含まない」陰性対照であった）。さらなる15分間のインキュベートの後、メンブレンを一片の沪紙（Whatman 50μm孔）上に置き、余分の液体を吸収させた。次いで、メンブレンを洗浄した（PBS-T；50ml；20分間）。蛍光を、赤色蛍光ビーズのためのFITC光学フィルターセット（励起560/55nm、放射645/75nm）を用いてCCD画像処理装置を使用して画像処理することによって検出した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。画像処理装置で検出された陽性シグナルを、同じフィルターセットを備えたAxioplan II蛍光顕微鏡（Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY）を使用することによって、大腸菌に結合したビーズであると確認した。

【0306】

結果：図26は、特異的に結合する蛍光性が高度のビーズで修飾された細菌を検出するためのフロースルーアッセイ法を使用した結果を示す。細菌含有試料が通過した実験フィルターのCCD画像は、多数の白色スポットを含んだのに対して、細菌を欠く試料が通過した対照フィルターはほとんどビーズを含まなかった。高出力顕微鏡法は、実験のフィルターがビーズに取り囲まれた細菌からなる多数の複合体を含んだのに対して、対照フィルターが分散した単一のビーズ以外に複合体を含まなかったことを確認した。

【0307】

実施例24．蛍光発生性エステラーゼ基質で染色された細胞の広域画像処理を使用する細菌の定量

目的：多くの適用においては、生きている細菌細胞を定量するための広いダイナミックレンジを有することが必要である。理想的なシステムは、0もしくは1個の細菌細胞から数百万もしくは数千万個の細菌細胞までの正確な計数が可能であり、従って、慣習的な微生物学的プレーティング方法にかかせない段階希釈と、段階希釈特有の正確性の欠如とを除外する。この実施例において、本発明者らは、CCDに基づく、非拡大的な広域画像処理と共役させた、生細胞の蛍光発生性基質による染色が、いかにして少なくとも5オーダーの大きさにわたる細胞の定量に使用され得るかを示す。

【0308】

実験方法：大腸菌ATCC 8739細胞を、実施例Y（細胞指向実施例）において記載されるように増殖および処理した。10倍の細胞の段階希釈をPBS中で作製し、ミリポア1225マニホールド中で、吸収パッド（Chemunexカタログ番号200-C3012-02）に装着したブラックポリエステルメンブレン（Chemunexカタログ番号200-C2010-01）を通して2連の試料を沪過し、そして実施例Y（細胞指向実施例）において記載されるように染色した。さらに、10μlの10^{-5}希釈物を、TSA（BDカタログ番号236950）上に3連で播き、そして細胞の力価を得るために37℃で一晩増殖させた。ポリエステルメンブレン上の蛍光シグナルを、FITC光学フィルターセット（色度/励起470/40nm、放射522/40nm）を備えたCCD画像処理装置（上記の工程6；図3に記載される）を使用してキャプチャーした。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。各フィルターから生成したシグナルを、すべての対象物のピクセル強度の合計として定義した（ここで対象物は、この特定の実施例においては、350～65301のピクセル強度を含むと定義する）。このシグナルを定義する方法は、いかなる染色された細胞を含まないフィルターの領域から得たバックグラウンドを除外するが、重複する

対象物からの強度をマスクまたは実際より少なく数えることはない（なぜなら、細胞は小さく、全く透明であるので、細胞の層が薄い限りはシグナルは相加的であるからである）。

【0309】

結果：図28に示されるように、この方法から生成したシグナルは、少なくとも5オーダーの大きさにわたって直線的であり、これは、この試験のための広いダイナミックレンジと見なされる。

【0310】

変法：少ない数の対象物では、正確な定量は、それらのピクセル強度の合計を使用するよりも、個々の対象物を計数することによって達成され得る。なぜなら、対象物が重複する可能性は低いためである。このことは、1個もしくは0個の細胞までを正確に計数することに拡張され得る（とりわけ、複数の色素および複数の励起および/または放射波長が、どの対象物が生存している細胞を表すかを決定するために使用される場合）。さらに、より洗練された対象物発見アルゴリズムを利用して、局所的なバックグラウンド強度および照射のバリエーションを考慮に入れてもよい。

【0311】

実施例25．非拡大的な広域画像処理を使用した、フィルター上での個々の染色された細菌の検出

概略：この実施例においては、核酸に結合する蛍光色素を用いて染色される個々の大腸菌の細菌細胞標的を広域画像処理を使用して検出する。染色された細胞はブラックポリカーボネートフィルターを通して沪過され、白色光で照射され、そしてCCDカメラで画像処理される。

【0312】

実験設計：大腸菌MG1655の培養物を、実施例2におけるように、シーバーグリーンIを用いて染色した。この培養物を希釈し、そして約10^6細胞を、真空ポンプおよびプラスチックフンネルカップ（Millipore Microfil V User Guide, PF07114, Rev A 3/00）を使用して、ブラックポリカーボネートフィルターを通して沪過した。次いで、このフィルターを水（50ml；タイプ1品質）で洗浄した。蛍光を、広域CCDに基づく画像処理装置（図3）および、シーバーグリーンIを検出するために適切なFITC光学フィルターセット（励起470/40nm、放射522/40nm）を使用して検出した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。画像処理装置で検出された陽性シグナルを、同じフィルターセットを備えたAxio plan II蛍光顕微鏡（Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY）を使用することによって、細胞であると確認した。

【0313】

結果：図27は、フィルター上での細菌の捕捉および検出を示す。フィルターの表面上でシーバーグリーンI染色された細胞は白色スポットして観察される。高出力拡大下で観察した場合、スポットは染色された細胞として観察される。

【0314】

実施例26．機器不使用の、拡大なしで行う、少数の細菌細胞の検出

概要：この実施例において、アルカリホスファターゼおよび抗大腸菌抗体の両方でコートされた粒子を使用して、液体捕捉アッセイ法において大腸菌0157細菌を検出した。細菌は、液体中で二重にコートされた粒子および抗体コートされた磁気粒子の両方に結合し、そして粒子：分析物複合体は、未結合の粒子から粒子複合体を分離するために磁力を使用することによって分離および洗浄された。この複合体は、沪過を使用して0.2μm孔ニトロセルロースメンブレン上に沈着され、次いで、化学発光基質および比色定量基質の両方を使用して可視化された。

【0315】

実験手順：二重にコートされた粒子を、ビオチン化アルカリホスファターゼ（2.9mg/mlストックを5μl；Pierce；カタログ番号29339）およびビオチン化ロバ抗ヤギIgG抗体（1.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4762

6mg/mlストックを5μl；Jackson；カタログ番号705-065-147）の両方を、ストレプトアビジンコートされた粒子（10^8粒子；Bangs：0.95μm，非蛍光性；カタログ番号CP01N）に加えることによって作製した。反応レベルは、PBSで100μlまで上げられた。30分間のインキュベーション後、粒子を2回洗浄した。洗浄は、微量遠心チューブ中で、粒子を3000g、5分間、遠心分離し、次いで、上清を取り除き、かつPBS（100μl）中で粒子を再懸濁することから構成された。洗浄後、ヤギ抗大腸菌O157抗体（1mg/mlストックの5μl；Kirkegaurd and Perry Laboratories；カタログ番号01-95-90）を粒子に加えた。粒子を、室温で30分間インキュベートさせ、次いで、上記のように2回洗浄した。二重コートした粒子の作製後、大腸菌O157培養物を2.5%ホルムアルデヒド中で固定し（実施例1、蛍光DNA結合色素で染色した個々の細菌の広域画像処理を参照されたい）、10倍に増加する段階希釈を行い、10^7～10^8細胞/mlを達成した。別々の1.5mlチューブに、各希釈物10μl（2連で行う）を、ヤギ抗大腸菌O157抗体コートされた磁気粒子（10^8粒子；Dynal；2.8μm；トシル化；カタログ番号M-280；実施例8におけるように調製）および二重コートされた粒子（10^8粒子）と合わせた。粒子：細菌懸濁物は、PBS-TBで100μlにされ、室温で1時間、混合しながらインキュベートした。インキュベーション後、チューブを4回、PBS-TB中で洗浄した。洗浄は、磁気粒子：細菌：粒子サンドイッチをチューブの一方に引き付ける磁気分離、続いて上清を除去するための吸引、およびPBS-TB（100μl）中での再懸濁からなった。洗浄した粒子：細菌サンドイッチの各希釈の両方の複製を、別々に沪過した。各複製をPBS（50ml）に加え、そして真空ポンプおよびプラスチックフンネルカップ（Millipore Microfil V User Guide，PF07114，Rev A 3/00）を使用して、0.2μm孔ニトロセルロースメンブレンを通して沪過した。BMパープルAP基質（500μl；Roche；カタログ番号1442074）を、1つのフィルターのセットに加えた。他のフィルターのセットには、CDPスター（500μl；NEN；カタログ番号NEL-601）をそれらに加えた。1時間のインキュベーション後、BMパープルメンブレンを水中で洗浄し、BMパープルを除去し、そしてメンブレンを風乾させた。CDPスターメンブレンを、製造業者の指示書に従ってスポットライトカメラ（Boston Probes；カタログ番号DT10000）に装着し、ASA2000フィルム（Boston Probes；カタログ番号DT20000）に2秒間露光させた。次いで、同じフィルターを、非拡大的な広域画像処理を使用して露光させた。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。

【0316】

結果：図29は、カテゴリー特異的結合分子および酵素的シグナリング部分に結合体化された二機能性粒子が、色素原性または化学発光性シグナルエレメントのいずれかを使用して検出され得ることを示す。二重に標識された粒子を使用する、本明細書に記載のアッセイ法は、高感度で、少数の細菌を検出する（約100細胞）。肉眼で見る能力は、多くの酵素分子を含むこれらの粒子の莫大なシグナリング能力に起因する（大腸菌：ビーズ複合体は、通常は高解像度の顕微鏡下でのみ観察できる）。実際、単一の分散した顕微鏡的ビーズは、この実施例におけるように、調製され、フィルター上に沈着され、そして色素原性基質で処理された場合に肉眼で検出可能であった。この実施例において使用されたアプローチにより、単純で、高価でなく、かつ機器を使用しないポイントオブケア試験を提供する、現在の迅速な試験と対照的に極度に高感度である、本発明の潜在能力を実証する。

【0317】

実施例27．臨床試料中でのマイコバクテリウム・ツベルクローシスについての迅速、同種、高感度、および定量的イムノアッセイ法

概要：M.ツベルクローシスについての診断試験の医学的重要性は、実施例9の概要において議論している。この実施例において、本発明は、カテゴリー特異的抗M.ツベルクローシス抗体を使用する同種イムノアッセイ法（実施例8および図11を参照されたい）を構築するために使用される。この種の試験は、迅速、高感度、安価、および取り扱いが容易である。ここで記載されるアッセイ法は、実施例9において実証された抗酸バチルスアプローチを補足するものである。なぜなら、これは、M.ツベルクローシスを他のマイコバクテリア種から区別するからである。

【0318】
M.ツベルクローシス特異的抗体：この実施例におけるカテゴリー結合分子は、M.ツベルクローシスに特異的に結合する抗体である。この実施例は、M.ツベルクローシス複合体における種について特異的なモノクローナル抗体（MPB64-ICA）を利用する(Abeら、J.Clin. Microbiol. 37: 3693-2881, 1999)。あるいは、ポリクローナル抗体が使用され得る。例えば、本発明のために、M.ツベルクローシスと反応するウサギポリクローナル抗体（BioDesign，カタログ番号B65601R）を使用し得る。
【0319】
カテゴリー特異的ポリクローナル抗体は、当業者に公知の方法を使用して、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって好ましく精製される。この実施例において、M.ツベルクローシス特異的抗体は、活性化された粒子（例えば、Affigel 10; BioRad）上に固定化された標的病原体を含むカラムを使用して精製される（Harlowら、「Using Antibodies : A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999)）。この方法において所望の抗体の陽性選択の後、抗体は、他の下気道病原体および気道に典型的な共生フローラ（結核を引き起こさないマイコバクテリア種（例えば、M.アビウム、「Pathogens are fixed」(Amannら、Appl Environ Microbiol 56: 1919-25、1990)）を含む）との交差反応についてチェックされ（例えば、Murrayら編（1999）「Manual of Clinical Microbiology」第7版、Washington, D.C.: American Society for Microbiology、第3章、表1）、ポリリジンコートされたガラススライド（Sigma；カタログ番号P-0425）上にスポットされ、そして抗M.ツベルクローシス抗体で処理され（PBS-B中で1：500希釈；20分間；室温）、PBS-TB（50ml）で4回洗浄され、次いで、フルオレセイン標識ヤギ抗ウサギIgGで同様に処理された。次いで、抗体と交差反応する生物体を使用して、特異的に反応する抗体から交差反応する抗体を取り除いた。この交差反応する生物体は粒子に結合され、そして上記に記載したように、M.ツベルクローシス特異的抗体の陽性選択のために免疫アフィニティークロマトグラフィーによる交差反応抗体の吸着に使用される。しかし、交差反応抗体を取り除くために、未結合の抗体は収集され、そして結合した抗体が廃棄される。得られる抗体はM.ツベルクローシス特異的である。
【0320】
あるいは、市販されていない抗体（ポリクローナルもしくはモノクローナル）または組換え抗体が、種々の研究およびその中の引用文献（例えば、Coligan, J.ら編（1994）「Current Protocols in Immunology」New York; John Wiley & Sons; Knott, C.ら（1997）「Development of Antibodies for Diagnostic Assays. Principles and Practice of Immunoassay」C. Price および D.Newman編：Stockton Press; George, A.（1997）「Antibody Engineering: Potential Applications for Immunoassays」「Principles and Practice of Immunoassay」C. Price および D.Newman編：Stockton Press）において記載されている、当業者に公知の標準的な方法を使用することによって産生され得る。
【0321】
カテゴリー特異的抗体を用いた磁気粒子および蛍光粒子のコーティング：カテゴリー特異的抗体を使用して、実施例8に記載されるように、磁気粒子および蛍光染色されたポリスチレンを粒子コートした。
【0322】
M.ツベルクローシス特異的粒子の下気道試料への結合：次の工程において、蛍光性および磁性M.ツベルクローシス特異的粒子を、下気道試料中のM.ツベルクローシス細胞に結合させる。液体状態にした下気道試料（200μl）を、光学的に透明な底を有する96ウェルマイクロタイターディッシュのウェル（Greiner Labs; カタログ番号665097）中で、M.ツベルクローシス特異的粒子混合物（各タイプ1×10^6粒子）と混合する。BAL下気道試料を前処理なしで使用する。痰試料を、NALC-NaOH法（Isenberg編（1992）「Clinical microbiology procedures handbook. Washington, D.C.: American Society of Microbiology」3.4節）を使用して調製する。
【0323】

試料中のM.ツベルクローシスの検出および定量：試料を、実施例8に記載されるように処理、画像処理、および分析する。

【0324】

対照：陽性対照実験および陰性対照実験を、好ましくは、臨床試料と並行して処理する。陽性対照試料（これは、臨床試料と同じに処理される）は、好ましくは、PBS中に既知の量（約1000細胞）のM.ツベルクローシスを含む。陽性対照中の細胞の正確な量の検出は、生化学的および画像の分析手順が正しく機能していることを示す。陰性対照試料はPBSを含むが細胞を含まない。すべての手順が正しく機能した場合には、陰性対照実験において陽性シグナルは見られないはずである。

【0325】

変法：標的の染色はまた、蛍光粒子を使用することの代わりに、または蛍光粒子を使用することに加えて、検出のために使用され得る（実施例8における変法を参照されたい）。M.ツベルクローシスについての特異的染色手順（例えば、オーラミンOまたはオーラミン-ローダミン染色）もまた使用され得る（実施例9を参照されたい）。

【0326】

実施例28．蛍光染色を使用した、臨床試料中でのマイコバクテリウム・ツベルクローシスの迅速同種抗微生物感受性試験

概要：M.ツベルクローシスの迅速な同定（実施例9を参照されたい）および迅速な感受性試験に関連する、大きな医学的重要性が存在する。この実施例は、臨床試料中の直接的なM.ツベルクローシスの迅速な増殖を、単純であるが高感度の抗酸性塗擦技術（実施例9、図13）と組み合わせて、現在必要とされている数週間の時間を節約し、結核を有する患者についての感受性データを提供する。

【0327】

M.ツベルクローシスについて、感受性試験について結果が出るまでの時間は、数週間から数ヶ月の範囲にわたっており、この時間の間に、最適以下の抗微生物治療で処置された患者は、多くの他のヒトにこの疾患を伝染させ得る。存在する感受性試験は、培養した試料から開始する。従って、多くの生物体について、感受性試験の開始は、一般に試料収集後24～48時間であり、M.ツベルクローシスについては、試験の開始は一般に数週間遅れる。現在の迅速試験レジメは、一般に7～12日間を要し、抗生物質感受性試験の前に薬物を使わずに増殖させる。マイコバクテリウム・ツベルクローシスのためのより迅速な感受性試験が決定的に必要とされている。なぜなら、世界的規模で多剤耐性マイコバクテリウム・ツベルクローシスの伝染が増えているからである。

【0328】

この実施例に記載される抗微生物感受性アッセイ法は、臨床的に価値のある特色を提供し、これらには：最小限の増殖の必要性（数世代）、単純さ、費用対効果、多数の抗微生物レジメの並行分析、細菌の低い力価を含む生物学的に複雑な臨床試料を直接試験する能力が含まれる。この試験のこれらの固有の特色は、顕微鏡を使用せずに試料中の少数の微生物を同定および計数する本発明の能力の結果である。本発明は、別の薬物を含まない必須の培養工程をバイパスすることによって、および抗生物質を伴うインキュベーションを4日間まで短くすることによって、古典的な感受性試験の結果が出るまでの時間を数週間節約する。本発明を使用する試験の結果が出るまでの時間は、新しい迅速試験の最も速いもの（例えば、Nordenら、J. Clin. Micro. 33: 1231-1237, 1995）の半分未満である。本発明は、他の迅速感受性試験方法（例えば、BACTEC-460およびフローサイトメトリー）によって必要とされるよりもはるかに安価な機器しか必要としない。

【0329】

この実施例において使用されるアプローチはまた、抗微生物的治療を受けている患者をモニタリングするために使用され得る（別の重要な未だ達成されていない臨床的な必要性）。抗生物質を投与されている患者における生細胞の数をモニタリングすることは、治療的な効力を決定するために重要である。核酸増幅に基づくM.ツベルクローシスについての現在の迅速試験は、患者のモニタリングのためには使用することができない。これは、増

幅可能な核酸を含む生存していないマイコバクテリウム・ツベルクローシスが、治療が有効である場合でさえ、長期間にわたって存続しているからである。生存している生物体の数は、数世代の増殖のためのインキュベーションの前後で試料中の細胞の数を評価することによって決定され得る（この適用においては抗生物質の非存在下）。

【0330】

M.ツベルクローシスの同定：痰試料を、オーラミン-ローダミン抗酸バチルス法（Isenberg編、1992、前出）を使用して調製および染色し、そして実施例9に記載されるようにM.ツベルクローシスについて試験する。M.ツベルクローシスが存在する場合、痰のアリコートを使用して、病原体の抗微生物剤感受性を分析する。

【0331】

種々の抗生物質を用いた、臨床試料中のM.ツベルクローシスの直接増殖：抗生物質感受性試験を、ブロス微量希釈法を使用して、マイコバクテリウム・ツベルクローシスを含む試料で実行する。液体化した痰のアリコート（100μl；実施例27と同様に調製）を、濃縮した7H9ブロス（100μl；通常の濃度の3倍で調製；DIFCO番号211417）を含む試験管（2mlポリプロピレンスクリューキャップチューブ；Sarstedt）に加え、そして以前に記載されたように（Mooreら、J.Clin Microbiol 37: 479-83, 1999）、種々の濃度のエタンブトール、イソニアジド、およびリファンピン（各チューブに100μlの抗生物質を加える；Sigma）を接種する。2つのチューブには抗生物質ではなくPBS（100μl）を接種する。これらの一方のチューブを、感受性試験試料と並行してインキュベートして、薬物がない場合の細菌の増殖を測定する（陽性対照）。他のチューブは、増殖を妨げるために4℃でインキュベートする（陰性対照）。すべてのチューブを4日間インキュベートし、次いで、以前に記載されたように（Mooreら、1999、前出）、1%パラホルムアルデヒドを用いる処理によって死滅させる。

【0332】

蛍光抗酸バチルス試験を使用した、抗微生物剤感受性の確認：抗生物質の存在下または非存在下で増殖させた試料を、次に、実施例9に記載の蛍光抗酸バチルスを使用して計数する。試料のアリコート（例えば、100μl）を、上述したように（実施例9）、スライド上に塗布し、非拡大的な広域画像処理を使用して画像処理し、そして分析する。試験する各抗生物質について、試料計数データを使用して、2つの曲線をプロットする。1つの曲線は、画像の全体の積算強度に基づき、そして他方は、画像処理ソフトウェアを使用して見い出された対象物の総数に基づく。種々の抗生物質の最小阻害濃度（MIC）を、これらの曲線の検査によって決定する（実施例10を参照されたい）。

【0333】

同種イムノアッセイ形式を使用する変法：本発明の他の実施態様がこの適用に適用され得る。これは、例えば、実施例27において使用された同種イムノアッセイ形式である（図11もまた参照されたい）。液相形式を使用する場合、種々の抗生物質濃度において増殖した試料のアリコート（100μl）を、M.ツベルクローシス特異的蛍光および磁気粒子の混合物に加え、そして実施例27に記載されるように処理する。

【0334】

実施例29．血液中のヒト免疫不全ウイルスについての迅速、同種、定量的試験

概要：血液中のHIVレベルを検出および測定することは、HIV感染のあらゆるステージで決定的に重要である。HIV感染の初期の診断は、血漿中の低レベルのウイルスを検出する能力に依存する。血漿中のウイルスのレベルを定量することは、AIDS患者の健康をモニタリングするための鍵となるストラテジーであり、抗ウイルス処理の有効性を理解するために必須である。HIV検出方法に必要とされる感度は、100ビリオン/ml未満である。現在の超高感度方法は、核酸検出（例えば、PCR、TMA、およびbDNA）に基づいている。しかし、これらの方法は、イムノアッセイ法と比較して、高価でありかつ遅い。しかし、現在のイムノアッセイ法は、血漿中で低レベルのウイルスを測定するのに十分な感度がない。

【0335】

この実施例は、単純、迅速、かつ経済的な同種イムノアッセイ形式で核酸増幅試験の超

高感度を提供する本発明の能力を実証する。本発明の重要な特色である、非顕微鏡的試料中での個々の標的の検出および同定は、感度および簡易性の組み合わせを達成するために必須である。

【0336】

抗体での粒子コーティング：HIV特異的粒子を作製するために、黄色-緑色蛍光粒子（FluoSphere; カタログ番号T-8803；Molecular Probes）および磁気粒子（カルボキシポリマーコートしたフェロフルイド；Immunicon；カタログ番号F3000）を、抗HIV gp160/120（Chemicon; カタログ番号MAB8836）を使用する以外は、実施例8と同様に抗体でコートする。

【0337】

対照粒子：この実施例は、陽性および陰性の両方の内部対照を組み入れる。すべての手順および試薬が正しく機能した場合、陽性対照粒子は明白であるが、有意な数の陰性対照粒子は検出されない。陽性対照粒子はオレンジ蛍光粒子（TransFluoSpheres; 100nmカタログ番号T-8872）および磁気ナノ粒子（フェロフルイド）からなる。陽性対照粒子は、抗バクテリオファージFd抗体（Accurate；カタログ番号BYA-3163-1）でコートされる。既知の数（～1000）のバクテリオファージFdビリオンは各実験試料に加えられる。手順が正しく機能している場合、すべてのFdビリオンはFd特異的オレンジ蛍光ナノ粒子とFd特異的磁気ナノ粒子の両方に結合する。

【0338】

陰性対照粒子は、抗ジゴキシゲニン抗体（Roche; カタログ番号1 333 062）でコートされた暗赤色蛍光粒子である（TransFluoSpheres; 100nmカタログ番号T-8876）。アッセイ法において検出される暗赤色蛍光粒子はバックグラウンドレベルを示す（すなわち、磁気的に標識された標的との結合と独立して検出される粒子の数）。

【0339】

粒子の集合の作製：HIV特異的粒子および対照粒子を混合して、その結果、全体の合わせた粒子濃度は2%固体である。この粒子を、実施例8と同様に超音波処理によって分散させる。

【0340】

血漿の調製：血液を、EDTAを抗凝血剤として使用して滅菌チューブ（例えば、Bection-Dickinson; カタログ番号6454）内に収集する。血漿を、スクリューキャップ微量遠心チューブ（例えば、Sarstedt; カタログ番号782.694.006）中で、室温で10分間、900RPMの遠心分離によって、全血から分離する。血漿は、-20℃で数週間凍結して保存されてもよく、または冷却しない場合には1日以内に使用され得る。約1000Fdバクテリオファージ（PBS中100pfu/μlの10μl;ATCCカタログ番号15669-B2）を各血漿試料（200μl）に加える。

【0341】

イムノアッセイ法およびHIV検出：次いで、粒子混合物（100μl）および試料を、マイクロタイターディッシュのウェル中で互いに混合し、インキュベートし、磁気選択し、そして3種類の粒子に適切なフィルターセットを使用して3つの画像を収集する以外は、実施例22と同様に画像処理した。このフィルターセットには以下のものが含まれる：単一の励起フィルター（Chroma HQ480/40x）および3つの異なる放射フィルター（黄色-緑色粒子についてはChroma HQ522/40m、オレンジ粒子についてはChroma HQ567/15m、および暗赤色粒子についてはChroma HQ667/30m）。黄色-緑色粒子（HIV特異的）の数―暗赤色粒子（陰性対照）の数は、試料中のウイルスの数を示す。暗赤色粒子の数対インプットのFdバクテリオファージ粒子の数の比は、試験の効力を示す。

【0342】

実施例30．免疫表現型決定によるヒト細胞の分析：AIDS患者におけるCD4+細胞の定量

ヒト疾患の診断（癌および免疫不全の診断を含む）は、それらの別個の分子的な構成成分に基づくヒト細胞の同定に依存する。免疫表現型決定は、特定の細胞型を同定する重要な手段であり、標的細胞をタグ化および染色するために抗体を使用する。免疫表現型決定のための共通の技術的形式には、フローサイトメトリーおよび高倍率顕微鏡法（免疫組織

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4767

化学）が含まれる。しかし、フローサイトメトリーは高価な機器を必要とし、そして高倍率顕微鏡法は、感度が高くない可能性がある。対照的に、本発明を使用する免疫表現型決定アッセイ法は、高感度かつ比較的安価の両方であり得る。この実施例は、AIDS患者の免疫状態、従って健康状態を決定するための鍵となる試験に本発明を使用する。このアッセイ法は、血液中のCD4+T細胞の濃度を決定する。この実施例は、この実施例において標的細胞がヒト細胞であること、および試料が血液であること以外は、実施例8と技術的に同様である。

【0343】

磁気粒子および蛍光粒子の調製：CD4+特異的蛍光および磁気粒子を、CD4特異的抗体（Biodesign；カタログ番号P54400M）をこの実施例で使用すること以外は実施例8と同様に調製する。コートされた粒子を、実施例8と同様に混合し、そして、PBS-TB（175μl）を含む、光学的に透明な底を有する96ウェルマイクロタイターディッシュ（例えば、Greiner；カタログ番号655896）の6つのウェルの各々に加えた（1%懸濁物の25μl）。

【0344】

全血中でのCD4+細胞の定量：AIDS患者からの全血（5μl）を、6つのマイクロタイターディッシュのウェルの各2つのウェルに粒子混合物を加える（2連の実験試料ウェルを構成する）。健常なドナーからの全血（5μl）（既知のCD4+細胞濃度を有する）を各2つのウェルに加える（2連の陽性対照ウェルを構成する）。ヒト血清（細胞枯渇；Biochemed；カタログ番号758AB）を、粒子混合物を含む3つ目の対のウェルに加える（2連の陰性対照ウェルを構成する）。細胞および粒子を室温で20分間インキュベートする。CD4+特異的磁気粒子と結合したCD4+細胞を、実施例8と同様に、磁石を使用してウェルの底面に引きつける。未結合物質を、磁場を維持しながら、洗浄（3回の洗浄；各洗浄200μl PBS-TB）によって除去する。CD4+細胞を、実施例8と同様に画像処理および定量する。試験の効力を、陽性対照におけるCD4+細胞計数を既知の濃度に対して比較することにより決定する。アッセイのバックグラウンドレベルを、陰性対照ウェルから決定する。

【0345】

実施例31．クラミジア・トラコマチス（Chlamydia trachomatis）およびナイセリア・ゴノレエ（Neisseria gonorrhoeae）についての迅速同種イムノアッセイ法

概要：この実施例において開発された診断アッセイ法は、2つの性感染症の病原体であるクラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエ（これらは共通して尿道炎を引き起こす）を試験する。これらの感染は、重篤な続発症を有する（骨盤炎症性疾患、不妊症、およびHIV感染に対する感受性の増加が含まれる）。約1億5千万人の人が、1995年にこれらの2つの病原体の1つに新規に感染したと見積もられている（米国において1998年にほぼ百万人の人が感染した）。ほぼ年間あたり10億ドルが、C.トラコマチスおよびN.ゴノレエについての試験に費やされる。現在の試験は、グラム染色（N.ゴノレエについて）からDNA増幅までの複雑な方法の範囲を使用する。不運なことに、この試験は、安価かつ低感度であるか（例えば、グラム染色、直接蛍光アッセイ法）、または高感度かつ高価であるか（例えば、核酸増幅試験）のいずれかである傾向がある。

【0346】

この実施例は、尿試料中のC.トラコマチスおよびN.ゴノレエを、安価かつ高感度で検出し、同定し、そして計数する試験を構築するために本発明を使用する。

【0347】

病原体特異的粒子および対照粒子の作製：病原体特異的粒子を、実施例8に記載する手順を使用して作製する。緑色蛍光粒子（FluoSpheres；カタログ番号T-8803；Molecular Probes）および磁気粒子は、抗クラミジア抗体（BioDesign；カタログ番号C65641M）でコートする。赤色蛍光粒子（Molecular Probes TransFluoSpheres；カタログ番号T-8861）および磁気粒子は、抗N.ゴノレエ抗体（BioDesign；カタログ番号C65618M）でコートする。陽性対照粒子および陰性対照粒子は実施例29と同様に作製する。

【0348】

尿中でのN.ゴノレエおよびC.トラコマチスの検出および定量：尿試料（10ml）を、市販

のキット（B-D尿採取キット（Urine Collection Kit）（Becton-Dickinson, BD Vacutainer（商標）Brand urine collection cups））を使用して収集する。尿を、4000／gで10分間遠心分離し、そして上清を取り除く。ペレットを400μlのPBS-B中に再懸濁する。試料を、実施例29と同様に、粒子と混合し、インキュベートし、磁気選択し、画像処理し、そして分析する。しかし、この実施例においては、4つの画像が試料から得られ、3つは、実施例29において記載されたフィルターセットを用い、そして1つは赤色蛍光粒子（Chroma HQ617/40m）を画像処理するために適切なフィルターを用いるものである。黄色-緑色蛍光粒子は、試料中のC.トラコマチスの数を示す。赤色蛍光粒子の数は、試料中のN.ゴノレエの数を示す。

【0349】

変法：この実施例における試験は、尿道炎を引き起こし得る他の病原体（例えば、膣トリコモナス（Trichomonas vaginalis）、ウレアプラズマ・ウレアリチカム（Ureaplasma urealyticum）およびマイコプラズマ・ボヴィゲニタリウム（Mycoplasma genitalium））についての走査を含むように拡張され得る。さらなる別個のシグナリング部分（すなわち、区別可能な蛍光特性を有する粒子）またはコンビナトリアル標識ストラテジーを使用して、さらなる標的が検出および同定され得る。多形核白血球の存在についての定量的試験（これは、尿道炎の診断において役立つ）は、これらの細胞に特異的な抗体でコートされた粒子を使用することによって試験に組み入れられ得る。

【0350】

実施例32．下気道病原体についての、迅速で、多重化された、同種のサイトメトリー試験

肺炎：肺炎は、米国における感染性の疾患による最も一般的な死因である。この疾患の病因論は、年齢および免疫状態に依存している。ウイルスは大部分の小児の肺炎を引き起こすのに対して、細菌病原体は、成人の肺炎を引き起こす最も一般的な病原体である。免疫無防備状態の宿主において肺炎を引き起こす病原体のスペクトルは大きく変化し、そして、免疫系または保護表面（粘膜または皮膚）に影響を与える癌を有する患者、移植被提供者、およびHIV感染患者については異なる。

【0351】

肺炎の首尾よい処置のために、病原体を迅速に同定することが本質的である。しかし、現在の診断実務は、効率的な病原体の同定ができない。肺炎の原因を決定するための診断的な努力の半分より多くが病因論の因子を同定し損なっている（このことは、病原体を同定するための試みがなされていない場合の大きな割合を含んでいない）。下気道感染を引き起こす多くの細菌およびすべてのウイルスおよび真菌の病原体は、日常的な微生物培養方法によって同定することはできない。例えば、結核、百日咳、レジオネラ症、およびマイコプラズマによって引き起こされる肺炎を引き起こす病原体を同定するためには、特別な方法が必要である。下気道診断は、正常な上気道フローラが夾雑していない下気道試料を得る際の困難さによって複雑化されている。さらに、上気道において害のない正常なフローラが、患者によって吸引された場合に肺炎を引き起こし得る。診断によって同定された株が上気道の夾雑物であるか、または病因論的な因子であるかを識別することは、注意深い試料品質の規制措置および微生物学的定量を必要とする。

【0352】

肺炎の症例は、一般的に2つのクラス：地域社会由来の肺炎および病院由来の肺炎、にあると見なされている。地域社会由来の肺炎は、約20,000例の死亡を引き起こし、かつ米国において年間80億より多い治療費用が課せられている。病院由来の肺炎は最も深刻であり、かつ2番目に最も一般的なタイプの病院由来の感染症である。集中治療室にいる患者の10%より多くが、病院にいながら肺炎になっている。死亡率は高い：院内肺炎患者の1/3がこの疾患で死亡している。迅速かつ正確な診断は決定的である。なぜなら、最適な救命抗生物質治療は、多数の潜在的な病原体のどれが疾患を引き起こしているかに依存する。広い範囲の潜在的な病原体（このうちのいくつかは表2に列挙される）は下気道診断のチャレンジに寄与する。

【0353】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4769

下気道感染を有する患者は、米国において経口抗生物質処方の75％を占めている。大部分の下気道感染において病原体を同定するための現在の診断の失敗に起因して、年間ほぼ10億ドルが役に立たない抗生物質に浪費されている。ウイルス感染に対する抗生物質治療の不正確な適用は、大部分、抗生物質の乱用および抗生物質耐性病原体の現在の世界的規模の蔓延の原因である。従って、下気道病原体の包括的なセットについて試験する単一の診断アッセイ法には大きな必要性が存在する。

【0354】

試験の利点：この実施例において、本発明は、超高感度、定量的、かつ高度に多重化された同種イムノアッセイ法を作製するために使用される。一般的な細菌、ウイルス、および真菌の病原体を同時に試験することによって、記載されるこの方法は、現在の実務を超えた実質的な改善を提供する。培養、増幅、または酵素的な工程を有しない高感度のイムノアッセイは、使い勝手がよく、費用対効果が高く、迅速で、かつ商品化されやすい（同種イムノアッセイ法の利点については実施例8を参照されたい）。この試験は、診断的に有効性のある主要な改善をもたらし、適切かつ時期を得た抗微生物学治療が導かれ、究極的には多くの生命を救う。

【0355】

この実施例の技術的概要：図32は、この実施例において使用されるスキームを図示する。下気道感染症候を有する患者からの下気道試料（例えば、BALまたは液体化した痰）を、各々が特定の標的病原体に結合する抗体でコートされた粒子の集合と混合する。各々の病原体特異的粒子を、比標識によって独特な色でコードした。実施例31において使用されるものと類似したアプローチを、より高度に多重化したこの試験において使用する。

【0356】

（表２）　一般的な下気道病原体

ストレプトコッカス・ニューモニエ	ヘモフィルス・インフルエンゼ	マイコプラズマ・ニューモニエ
モラクセラ・カタラーリス	クラミジア・ニューモニエ	アシネトバクター属種（*Acinetobacter spp.*）
レジオネラ属種（*Legionella spp.*）	スタフィロコッカス・アウレウス	大腸菌
クレブシエラ属種（*Klebsiella spp.*）	セラチア・マルセッセンス（*Serratia marcescens*）	シュードモナス・エルジノーサ
プロテウス属種（*Proteus spp.*）	エンテロバクター属種（Enterobacter spp.）	呼吸器合胞体ウイルス
アデノウイルス	A型インフルエンザウイルス	B型インフルエンザウイルス
パラインフルエンザウイルス	サイトメガロウイルス	カンジダ・アルビカンス
アスペルギルス属種（*Aspergillus spp.*）	クリプトコックス・ネオフォルマンス	ニューモシスチス・カリニ

【0357】

病原体特異的抗体：この実施例におけるカテゴリー結合分子は、表2に列挙された下気道病原体に特異的に結合する抗体である。各病原体に対する抗体は、可能な場合、商業的な供給源（例えば、BioDesign, Biotrend Gmbh, Cologne, Germany, Fitzgerald Industries International, Inc., Concord, MA, およびAccurate Chemical and Scientific Corporation, Westbury, NY）から得られる。あるいは、抗体は実施例27に記載されるように、入手され、アフィニティー精製され、そして試験され得る。

【0358】

抗体は、結合特異性および標的病原体を標識するための能力について試験される。最適な標識を得るために、特定の病原体に特異的ないくつかの抗体は、好ましくは互いに比較される。標的病原体（10μlのPBS-T中、約10^5病原体細胞またはウイルス感染した細胞）を、カテゴリー特異的抗体（10μlのPBS-T中、約10μg）および余分の（例えば、20μg）蛍光標識（例えば、フルオレセイン）二次抗体（例えば、ヤギ抗マウスまたはヤギ抗ウサギ、カテゴリー特異的一次抗体の供給源に依存する）とともに混合し、そして室温で20分

間インキュベートする。未結合の抗体を、PBS-T（1ml）中で2回洗浄することによって除去する。洗浄は、微量遠心チューブ中で希釈した生物を遠心分離することによって達成される（12,000×g；1分間）。次いで、蛍光標識された標的生物を、蛍光顕微鏡（Zeiss Axioplan 2）において画像処理し、そして画像処理ソフトウェアを使用して記録する（Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD））。

【0359】

類似のアッセイ法を使用して、標的病原体の最適な標識を提供する抗体が、気道の病原体のパネルおよび下気道において一般に見い出される共生フローラにそれらを結合させることによって、特異性について試験される。同様に、抗体が気道の内因性の成分とは反応しないことを保証するために、各抗体はまた、正常な患者および下気道疾患（これは、標的病原体によって引き起こされないことが既知である）を有する患者からの上気道および下気道の試料のパネルに結合することについて試験される。

【0360】

これらの試験を使用して、標的病原体に効率的に結合するが、気道試料において見い出されるいかなる他の微生物または成分にも結合しない抗体が選択される。

【0361】

カテゴリー結合分子でコートされた粒子の集合の構築：表2に列挙された下気道病原体の各々についてのカテゴリー特異的抗体を使用して、実施例8と同様に、2つの種類の粒子：ポリスチレンコートされた磁気粒子および蛍光染色されたポリスチレン粒子をコートする。しかし、この実施例において、病原体特異的抗体の各ファミリーは独特に比標識された蛍光粒子に結合体化される。従って、各病原体カテゴリーについて、磁気粒子および蛍光粒子のコードされたセットを含むカテゴリー特異的粒子のセットの対を作製する。この実施例において使用される蛍光粒子は、カスタムメイドの比標識された硫酸誘導体化ビーズ（Bangs Laboratories; 5つの異なる濃度のフルオレセイン（505/515）およびテキサスレッド（595/615）の組み合わせ）である。このビーズは標識される。この粒子の集合は、最終粒子濃度が2%固体（PBS-TB中）となるように合わされる。陽性および陰性の対照粒子を調製し、そしてこの実施例における対照粒子が、病原体特異的粒子から区別される色のコードを有する比標識粒子を使用して構築される以外は、実施例29と同様に粒子集合に含まれる。

【0362】

試料中の病原体の検出、同定、および定量：液体化された下気道試料（1000対照ファージが実施例29と同様に加えられた200μl BAL試料）をマイクロタイターディッシュ中の粒子集合で混合する。この試料を実施例8と同様にインキュベートし、磁気選択する。2つの画像を、比標識のために使用される2つの色素について適切な2つのフィルターセットを使用して収集する（フルオレセインについては：励起Chroma HQ480/40xおよび放射Chroma HQ535/50m；テキサスレッドについては：励起Chroma HQ560/55xおよび放射Chroma HQ645/75m）。画像をImage-Pro Plusソフトウェアを使用して整列させる。このソフトウェアによって見い出される各対象物の蛍光シグニチャー（すなわち、比標識のために使用される2つの色素の比）を点数付けし、蛍光シグニチャーと病原体特異性を相関させる検査表（look-up table）（比標識蛍光粒子の異なるクラスを使用して経験的に作製したもの）と比較する。対象物の数および分類を、ImagePro Plusソフトウェアパッケージを用いて作製されたカスタム化ソフトウェアモジュールを使用して表にする。試験の効力を、陽性対照粒子および陰性対照粒子に対応する対象物の計数によってモニターする。試験のバックグラウンドを、PBS（200μl）がBAL試料の代わりに置き換わっている並行した試験の実行の分析によって見積もる。

【0363】

Chroma HQ560/55xおよび放射（Chroma HQ645/75m）Chroma励起HQ560/55、放射HQ645/75M。

【0364】

実施例33．非拡大的な広域画像処理を使用する多数の下気道病原体について並行して走査

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4771

するイムノアッセイ法

概要：この実施例の医学的目的および重要性は、実施例32と同じである。本明細書においては、前の実施例と同様に、カテゴリー特異的抗体を使用して、肺炎を引き起こす多数の多岐にわたる病原体（ウイルス、細菌、および真菌を含む）について下気道試料を同時に走査する。しかし、この実施例では、試料をガラススライドに固着する。下気道病原体の同一性は、並行した免疫組織化学的分析、続いて非拡大的な広域画像処理による個々の標的の画像処理によって決定される。図33は、この実施例において使用されるスキームを示す。

【0365】

下気道試料の間接的な蛍光アッセイ法：下気道試料の塗沫をガラススライド上で調製し、以前に記載したように固着させる（例えば、Isenberg編、1992、前出；9.5節）。ガラススライドの異なる部分に異なる抗体を結合させるために、接着性ウェル（例えば、接着性シリコーンflexiPerm細胞培養チャンバー、30ウェルを有するカスタム製造品；IVSS；Sartorius）をスライドに固着させる。この実施例において使用されるカテゴリー特異的抗体は、実施例32において記載される。各々のタイプのカテゴリー特異的抗体（200μl；PBS中10μl/ml）を異なるウェルに加える。陰性対照として、免疫前のウサギ血清から精製したIgG（200μl；PBS中10μg/ml；ウサギIgG試薬等級，Sigma，カタログ番号I5006）および免疫前のマウス血清から精製したIgG（マウスIgG試薬等級，Sigma，カタログ番号5381）を、別々のウェルに加える。スライドを室温で30分間インキュベートする。ウェルをPBSで洗浄する（200μl；4回洗浄）。次いで、固着ウェルを移動して、全体のスライドが単一のユニットとして効率的に処理され得るようにする。PBS中、次いで蒸留水中にスライドを浸し（Coplinジャー中で）、スライドを風乾した。試料に、ヤギ抗ウサギおよびヤギ抗マウスビオチン化ポリクローナル二次抗体（PBS中5μg/μl各ポリクローナル抗体）の混合物を完全に重層させ、そして湿式スライドチャンバー（Boekel）中で室温で30分間、インキュベートさせた。すすいだ後（PBS中で2回；蒸留水で1回；Coplinジャー中で）、試料に、ストレプトアビジンコートされた蛍光粒子（Molecular Probes；カタログ番号F-8780；0.5%固体）を完全に重層し、インキュベートし、そして以前の工程と同様に洗浄した。

【0366】

画像処理および分析：試料を、以前と同様にCCDに基づく画像処理装置を使用して画像処理する（詳細な説明の工程6に記載され、図3に示される）。この画像処理装置は、病原体特異的抗体または対照抗体を含むウェルに対応するスライドの各区画の画像を獲得する。次いで、画像分析ソフトウェア（Image-Pro Plus）が、各画像中の全体の蛍光および蛍光染色された対象物の数を計算する。陰性対照ウェルよりも有意に多い蛍光対象物および蛍光強度を有するウェルは、対応する病原体によって引き起こされる感染の可能性を示す。

【0367】

変法および関連する実施態様：代表的には、下気道試料に夾雑する、口/食道領域において通常見い出される共生種についての試験は、この化合物アッセイ法における有用な抱き合わせ試験であり得る（さらなるウェルにおいて）。扁平上皮細胞（これは下気道の性質を示し得る）および/または免疫系の細胞（これは感染の可能性についての情報を与え得る）に特異的な抗体を含むこともまた有用であり得る。

【0368】

高いシグナル複雑性を達成するための潜在能力を有する他の種類のシグナリング部分が、比標識された粒子の代わりに使用され得る。例えば、蛍光団標識された抗体が類似して使用され得る。2つまたはそれ以上の蛍光団を有する各々の病原体特異的抗体の2つのプールを標識することは、高いシグナル複雑性を生成し得る。このアッセイ法において使用される最終的な抗体ファミリーは、ディファレンシャルに標識された独特な比の病原体特異的抗体を混合することによって作製される。例えば、病原体Xに特異的な抗体ファミリーは、1部赤色蛍光抗体、1部黄色抗体、および1部青色抗体を有し得る。病原体Yに特異的な

抗体ファミリーは、2部黄色抗体、および1部青色抗体を有し得る、などである。蛍光抗体で標識した標的のシグナル強度は、一般的には、この実施例において使用されるより高度な蛍光粒子と比較してはるかに減少していることに注意されたい。シグナル強度はまた、標的上の抗原の数に依存する。従って、小さな標的、および比較的少ない数のカテゴリー特異的結合部位を有する他の標的については、この方法はより高感度のシグナル検出機器を必要とし得る。

【0369】

この実施例におけるものに類似するアプローチはまた、インサイチュー核酸ハイブリダイゼーションに基づく試験のために使用され得る。この場合、細胞は、カテゴリー特異的プローブの各ファミリーがビオチンで標識される（標準的な方法を使用して；例えば、PCRの間の取り込み）以外は、実施例1に記載されるように調製、固定、およびハイブリダイズされる。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の後に、スライドは、この実施例におけるように処理および画像処理される（すなわち、未結合のビオチン化二次抗体を除去した後に行う工程）。

【0370】

実施例34．培養を伴わない、尿路感染の多重化された同定

尿路感染（UTI）は、一般的であり（年間約1億5千万件）、数十億ドルの保健医療のコストを示す。UTIの確認された診断は一般的に尿の培養を必要とする。これは時間がかかり、そしていくつかの病原体については、標準的な微生物学的な方法および培地を使用することができない（例えば、クラミジア・トラコマチス）。この実施例は、高度に多重化されており、かつ細菌培養を必要としない単純かつ高感度のUTI試験を構築するための本発明の使用を記載する。この試験方法のスキームは図34に示される。

【0371】

一般的なUTI病原体に結合する抗体：表3は、共通してUTIを引き起こす細胞病原体を示す。各病原体に特異的に結合する抗体は、実施例27および実施例32におけるものと類似して入手および選択する。種特異的抗体に加えて、広い群の細菌と反応する抗体がこの実施例において使用される。大部分のグラム陰性細菌と結合する抗体（カタログ番号15306、QED Bioscience, Inc., San Diego, CA）および大部分のグラム陽性細菌と結合する抗体（例えば、カタログ番号15711、QED Bioscience, Inc., San Diego, CA）が、種特異的抗体が含まれない、より一般的でない生物の検出のために含まれる。

【0372】

（表３）　尿路感染（UTI）を引き起こす細菌病原体

大腸菌	モルガネラ属種（*Morganella* spp.）
スタフィロコッカス・サプロフィチカス	シトロバクター属種（*Citrobacter* spp.）
クレブシエラ属種	B群連鎖球菌
エンテロバクター属種	D群連鎖球菌
プロテウス属種	腸球菌
クラミジア・トラコマチス	シュードモナス・エルジノーサ
ナイセリア・ゴノレエ	アシネトバクター属種
コリネバクテリウム・ウレアリチカム	セラチア属種（*Serratia* spp.）

【0373】

ガラススライドへの捕捉抗体の付着：抗体を、アルデヒドを含むガラススライド（TeleChem International；SuperAldehyde Substrates）に共有結合させる。ガラススライドの異なる部分に異なる抗体を結合させるために、接着性ウェル
（例えば、接着性シリコーンflexiPerm細胞培養チャンバー、24ウェルを有するカスタム製造品；IVSS；Sartorius）をスライドに固着させる。各々のタイプのカテゴリー特異的抗体を（PBS中100μg/ml；深さ約2.5mm）、異なるウェルに加え、次いで以前に記載されるように処理する（MacBeath, G.ら、Science 289: 1760-3, 2000; 著者によって供給される補足の材料を含む、http://www.sciencemag.org/feature/data/1053284.shlにおける

ワールドワイドウェブ上で）。遊離の抗体を洗浄によって除去した後、引き続く処理工程の前にシリコーンウェルを除去する。

【0374】

固定化された捕捉抗体への尿試料中のUTI病原体の直接結合：標準的な手順（Isenberg編、1992、前出）に従って尿試料を収集する。試料（50mlディスポーザブルポリプロピレンチューブ；Falcon中に28ml）を、1M EPPS pH8.0（4ml；ナトリウム塩）、100mM NaEDTA pH8.0（4ml；ナトリウム塩）、および10×PBS-TB（4ml；定義を参照のこと）の添加によって中性にする。捕捉抗体が結合した顕微鏡スライドを、尿試料中に浸し、そして穏やかに撹拌しながら（Bambino回転機；Boekel）室温で2時間インキュベートする。インキュベーションの間、細菌は、対応する捕捉抗体を含むスライドの部分に接触および付着する。このアッセイ法の実行実現性は、細菌UTI感染が一般的に高い病原体力価で生じる（例えば、10^{8}～10^{5}細胞/ml）という事実によって可能になる。

【0375】

捕捉細胞の染色および画像処理：スライドを尿試料から取り出し、洗浄し（3×；50ml PBS-TB；5分間；穏やかに撹拌しながら；続いて50ml EE洗浄；穏やかに撹拌しながら15秒間）、風乾し、そして熱固定する（100℃に加熱したヒートブロックの表面上で5分間）。次いで、スライドを、シーバーグリーンI（10,000×ストック溶液の1:1000希釈；Molecular Probesカタログ番号S7563）を含む溶液で覆い、インキュベートし（室温で10分間）、そして洗浄する（EE中で2回の50ml洗浄；各1分間；穏やかに撹拌しながら）。

【0376】

スライドの各区画を、図3Aに示され上記の詳細な説明の項の工程6に記載される画像処理装置を使用する非拡大的な広域の蛍光画像処理により分析する。

【0377】

代替的な試験、方法、および形式：この実施例において記載される試験は、多数の応用を有する（例えば、呼吸器、感染した外科的な傷、食品、または環境の試料における病原体を同定することを含む）。類似のアッセイ法が、代替的な標識技術（例えば、蛍光粒子、アルカリホスファターゼ/抗体コートされた粒子、西洋ワサビペルオキシダーゼ：抗体結合体、蛍光抗体、RLS粒子、磁気粒子）、形式（例えば、微流体またはラテラルフローおよびフロースルーの形式、ここで捕捉抗体は吸収性メンブレンに結合される）、および画像処理方法（例えば、色素発生性アッセイ法の可視的または反射率計検出ならびに化学発光性および生物発光性のアッセイ法のフィルムルミノグラフィー）を使用して構築され得る。これらの多くは本願の別の箇所に記載される。

【0378】

実施例35．血液由来のウイルス：HIV、HCV、HBV、およびCMVの迅速で、多重化された同定

血液由来のウイルスの検出は、個々の患者の試料および血液バンク申請の試料を試験するために不可欠である。血清学的な試験（標的ウイルスに特異的な抗体についての試験）が一般に用いられる。しかし、標的ウイルスについて直接的に試験する方法は、血清学的な方法よりも感染プロセスにおいてより初期に感染した試料を検出する利点を有する。このことは、病原体に特異的な抗体（セロコンバージョン）が、一般的には感染した個体の血液中に3～4週間現れないからである。不運にも、ウイルスについての直接的試験は、感受性が低いか（大部分の抗原試験）または高価であるか（大部分の核酸試験）のいずれかである。

【0379】

この実施例は、迅速で、多重化された試験を構築するための本発明の使用を記載する。この試験は、顕微鏡を使用することなく、血液試料中での個々の遊離のウイルス粒子を検出し得る。この試験のスキームを図35に示す。

【0380】

抗ウイルス抗体を用いた、蛍光粒子およびウェルのコーティング：標的ウイルスに特異的な抗体は、多数の商業的な供給源から購入できる。例えば、以下の抗体は示した業者から入手する：抗HIV（抗gp120；モノクローナル；Biodesign；カタログ番号C65199M）；抗

HCV（Biodesign；カタログ番号C8A024M）；抗HBV（抗B型肝炎表面抗原；モノクローナル；Biodesign；カタログ番号C86132M）；および抗CMV（抗糖タンパク質B；モノクローナル；Biodesign；カタログ番号C8A024M）。

【0381】

抗体は、受動的な吸収により、ウェルあたり4つの隣接した別個のスポットでマイクロタイターディッシュのウェルに結合する（抗体あたり1スポット）。各々の抗ウイルス抗体を、96ウェルマイクロタイタープレート（Greiner America; カタログ番号55896）のウェルにスポットし（1μl；1μg/μl）、そして湿式チャンバー中で（Boekel Slide Moat; モデル240000）、室温で2時間インキュベートする。次いで、記載されたように、ウェルを洗浄およびブロッキングする。

【0382】

別個の放射スペクトルを有する蛍光的に着色されたポリスチレン粒子に、実施例8に記載された方法を使用して抗ウイルス抗体でコートすることによって、色でコードされたウイルス特異的な蛍光粒子を作製した。蛍光粒子（Molecular Probes）を以下のようにコードする：HIV特異的粒子（黄色-緑色；カタログ番号F8823）；HCV特異的粒子（オレンジ色；カタログ番号F8820）；HBV特異的粒子（深い赤；カタログ番号F8816）；およびCMV特異的粒子（赤外；カタログ番号F8818）。4種類の抗体コートした粒子を、等しい濃度で混合する（PBS-T中10^7粒子/ml）。使用前に、抗体を超音波処理および洗浄する（実施例8）。種々の抗体がウェル中のスポットに分離されているので、各ウイルスについて同じタイプの蛍光粒子を使用することもまた可能であることに注意されたい。しかし、別個のシグナリング部分の使用は試験の強固さを増大させる。

【0383】

血液試料中のウイルスの検出：血液試料を以下を含む種々の供給源、例えば、患者から（例えば、Isenberg編、1992、前出において記載されるように、抗凝血剤EDTAでの処理を含む標準的な方法を使用する）；供与された血液の単位から；または血液画分（例えば、血漿）から収集する。全血（200μl）を、各捕捉抗体のスポットを含むマイクロタイターディッシュウェルに加える。この試料を、37℃で2時間インキュベートさせ、ウイルスがウェル表面上で捕捉抗体に吸着し得ることを確実にする。血液試料を、ウェルから徹底的に洗浄して除去する（4回；各洗浄について200μl PBS-TBを使用）。ウイルス特異的粒子の混合物（200μl）をウェルに加え、手短に遠心分離して（Beckman Allegra 6; GH-3.8ローター；1200g）、ウェルの底を粒子でコートする。短いインキュベーション（室温で10分間）の後、未結合の粒子を、撹拌しながら洗浄することによって（4回、200μl PBS-TB、ボルテックスを伴う;各洗浄1分間）除去する。最後に、ウェルをEEですすぎ（200μl）、乾燥させる。次いで、複数の画像が適切なフィルターセット（黄緑：励起Chroma HQ480/40xおよび放射Chroma HQ535/50m； オレンジ：励起Chroma HQ535/50xおよび放射Chroma HQ610/75；深い赤：励起Chroma HQ560/55xおよび放射Chroma HQ645/75m；および赤外：励起Chroma HQ710/75xおよび放射Chroma HQ810/90m）を使用して得られる以外は、実施例8に記載されるように、CCD画像処理装置を使用して、ウェルを画像処理および分析する。ウイルスを、付着した粒子に結合したスポットによって同定する。さらなる診断の強固さは、アッセイ法が成功した場合に、予想した色の粒子のみが特定のスポットに付着するという事実によって提供される。

【0384】

実施例36．非拡大的な広域画像処理を使用する、A型インフルエンザウィルスについての超高感度ラテラルフロー試験

目的：この実施例は、使い勝手のよいラテラルフローアッセイ形式および非拡大的な広域画像処理を用いて低レベルのウイルスを迅速に検出するための本発明の使用を実証する。以下に記載する実験において、A型インフルエンザ粒子の希釈物は、多孔性メンブレンストリップに適用され、結合体パッド中の標識粒子と接触され、そしてウイルス：標識粒子複合体を選択するために、キャピラリー作用によって捕捉抗体を過ぎて移動される。次いで、これらの捕捉された複合体は、非拡大的な広域画像処理を使用して可視化される。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4775

【0385】

実験方法：ラテラルフロー試験ストリップを、記載されるように組み立てた。抗体線を、A型インフルエンザ特異的捕捉線（QED、カタログ番号1302）および対照線（Jackson immuno Research Laboratories, Inc.；ビオチン抗マウスIgG、カタログ番号115-165-146）の両方を、メンブレン上で（wicking padより5～10mm）ストリップ化することによって作製した。使用前にこれらの線を乾燥させた（約15分間）。ストレプトアビジン標識した蛍光ビーズ（Bangs Laboratories Inc.；カタログ番号CP01F-5121）を、ビーズ（10μlの1.23×10^{11}ストック）、抗体（10μlの1.0μg/mlストック）、およびPBS（80μl）を合わせること、ならびに混合すること（1.5時間/室温）によって、ビオチン抗A型インフルエンザ抗体で標識した。次いで、このビーズを遠心分離し（5000g、10分間）、そしてPBS-B（100μl）中に再懸濁した。抗A型インフルエンザコートされた蛍光ビーズ（2μl）を各ストリップの結合体パッドに加えた。精製したA型インフルエンザのストック（Advanced Biotechnologies Inc.: Influenza A/PR/8/34 (H1N1)、カタログ番号10-210-000）を、PBS-Bを使用して段階希釈した。試験試料（100μlのIL-2希釈）をPBS-TB（50μl）と合わせて、試験ストリップの試料パッドに加えた。アッセイを実行した後（～15分間）、ストリップを、非拡大的な広域画像処理を使用して可視化した。

【0386】

結果：図36は、蛍光標識粒子で標識し、非拡大的な広域画像処理を使用して分析したA型インフルエンザウイルスについてのラテラルフロー試験の結果を示す。この図は、（左から右に）0、10^5、10^6、10^7、および10^8ビリオン/mlを含む試料をアプライした試験ストリップからの捕捉線および対照線の画像を示す。蛍光シグナルは、A型インフルエンザビリオンの濃度が増加するに従って増加する。示したデータは、この試験が少なくとも10^5ビリオン/mlまで低い濃度を検出し得ることを示す。従って、この実験は、本発明に基づくラテラルフロー試験の感度を実証する。

【0387】

実施例37．視覚的検出を使用するM.ツベルクローシスについての迅速ラテラルフロー試験

概要：迅速ラテラルフロー、すなわち「ストリップ」試験形式は、ポイントオブケア診断（例えば、医院、救命室、および家庭における試験）を提供するために重要性が増している。しかし、ラテラルフロー試験は、しばしば、感度が低すぎて、臨床試料に低レベルで存在し得る病原体によって引き起こされる感染を検出するために使用できない。例えば、痰中のM.ツベルクローシス感染を検出することは、痰の数千細胞/ml（これは、現在のストリップ試験の感度の閾値より下である）を検出することを必要とする。M.ツベルクローシスについての単純で機器を用いない試験について、発展途上国において、決定的な、未だ達成されていない、公的な健康に関する必要性が存在する。核酸増幅試験はM.ツベルクローシスの低い力価を検出し得るが、これらの試験は、あまりに高価かつ複雑で、大部分の臨床的な設定において利用できない。

【0388】

この実施例は、高価でなく、単純で、迅速な、かつ高感度な、M.ツベルクローシスについてのラテラルフロー試験を記載する。使用者は、機器の使用を伴うことなく、試験を視覚的に解釈する。

【0389】

ナノ粒子への抗M.ツベルクローシス抗体およびアルカリホスファターゼの結合：等モル濃度のモノクローナル抗M.ツベルクローシス抗体（MPB64-ICA; Abeら、1999、前出）およびアルカリホスファターゼ（Pierce；31391）を、製造業者の推奨に従う受動的吸着によって金結合体化粒子（30nm；Nanoprobes；CG3054）に結合させ、そして10^{11}粒子/mlで再懸濁させた

【0390】

ラテラルフローユニットを、ラテラルフロー試験の当業者に理解されている説明書、材料、および手順を使用して、設計および構築する。設計および構築の問題は、ラテラルフロー試験の製造業者によって提供されるテクニカルノート番号（例えば、「Millipore's

Short Guide for Developing Immunochromatographic Test Strips」第2版、Millipore, テクニカルノート番号TB500、1999；「Lateral Flow Tests」第1版、Bangs Laboratories、テクニカルノート番号303、1999）および他の文献（例えば、Chandler, J.ら、IVD Technology 6: 37-49, 2000；Weiss, Alan, IVD Technology 5: 48-57, 1999；Wild, D.編（2001）「Immunoassay Handbood」第2版、New York, NY: Nature Publishing Group, 2001）において記載されている。

【0391】

ラテラルフロー成分を、製造業者の指示書に従って、キット（Millipore:カタログ番号HFMI-DAK015；Hi-Flow Plus Membrane Assortment Assembly Kit）から組み立てる。試験ゾーン中の抗体および対照ゾーン中の因子を、製造業者の指示書に従って試薬分配装置（matrix 1600; Kinematics）を使用して、線として適用する。

【0392】

液体化した痰またはBAL試料（200μl；実施例27）を、試料パッドにスポットする。試料は、キャピラリー作用によってメンブレンを通って移動する。短い時間の後（3分間）、PBS-T（200μl）を試料パッドに適用し、試料がキャピラリー作用によってメンブレンを通って進行することを可能にする。このPBS-T洗浄工程を別の短い時間（3分間）の後で反復する。別の3分間の後、次いで、金結合体（10μl；抗M.ツベルクローシス/アルカリホスファターゼでコートされた10^9粒子）を試料に適用し、続いて2回のPBS-Tでの洗浄（前と同様）を行う。アルカリホスファターゼ基質（1ml；BM purple；Boehringer Mannheim）をメンブレンに直接的に適用し、そしてスポットが陽性対照ゾーンにおいて見られるまで（30分～1時間）発色させ、その後残りの比色定量用検出試薬を注ぎ出し、水（1ml）をメンブレンに直接的に適用する。3分後水を注ぎ出す。試験が正しく機能する場合には、陽性対照ゾーンにおいて見ることのできる約1000スポットが存在する。試験ゾーンにおけるスポットの数は試料中のM.ツベルクローシスの数を示す。

【0393】

「フロースルー」配置を含む種々の代替的な免疫クロマトグラフィーの構成もまた、可能である（実施例23を参照されたい）。

【0394】

実施例38．非拡大的な広域画像処理を使用する多数の異なる細菌戦因子（biowarfare agent）を検出するための迅速ラテラルフロー試験

細菌戦因子に起因する感染を診断することは、日常的な感染疾患の診断において遭遇するものを超えた、いくつかの困難を提供する。バイオテロリズムまたは細菌戦において利用される可能性のある因子は、通常の医学的な実務において見られるものとは異なることが予想され、従って、標準的な診断プロトコールを使用して認識することは困難であり得る。フィールドにおける非慣習的な因子の使用を診断することは、力価が非常に低い場合に初期の段階で感染を検出し得る、携帯型の、使い勝手のよいシステムを使用して、異なる因子（毒素、ウイルス、および細菌を含む）について走査することを必要とする。

【0395】

この実施例は、迅速な、携帯型の、かつ使い勝手のよい、ラテラルフローイムノアッセイ法を記載する。これは、臨床的または環境的試料において少ない数で存在する広範な因子について試料を走査し得る。技術的には、この実施例は、多数の病原体が1回のアッセイにおいて検出されること、および化学発光シグナルが電子的に検出されること以外は実施例36に類似している。

【0396】

（表４）　細菌戦またはバイオテロリズムにおいて使用される可能性のある非慣習的な因子

バシラス・アンスラシス	赤痢菌属種（*Shigella spp.*）	天然痘ウイルス
エルシニア・ペスティス	サルモネラ属種（*Salmonella spp.*）	マルブルクウイルス
フランシセラ・ツラレンシス	ビブリオコレラ	エボラウイルス
ブルセラ・スイス	リシン毒素	
コクシエラ・バーネッティイ	ボツリヌス毒素	

【0397】

細菌戦またはバイオテロリズムにおいて使用される可能性のある因子に特異的なナノゴールド抗体結合体：この実施例は、表4に列挙された因子（これらのいくつかは、細菌、ウイルス、およびタンパク質毒素である）について試料（例えば、血液）を走査する。表4における各因子に特異的な抗体は、実施例32および実施例27に記載されるように、入手、アフィニティー精製、および特異性について試験される。タンパク質毒素については、別個のかつ非重複的なエピトープを有するモノクローナル抗体がナノゴールド粒子への結合体化のために、またはラテラルフローメンブレン上の試験ゾーン（または捕捉ゾーン）のために使用されることに注意されたい（以下を参照されたい）。

【0398】

表4の因子に特異的なナノゴールド結合体は、実施例26に記載されるように、アフィニティー精製された各タイプの抗体、および等モルのアルカリホスファターゼの受動的吸収によって作製される。PBS-TB中の得られた因子特異的結合体を等モルの濃度で一緒に混合し、その結果、最終的な全体の結合体濃縮物はPBS-TB中での固形分である。

【0399】

ラテラルフロー装置：この実施例におけるラテラルフロー試験は、多数の分析物が試験されること、異なるシグナル特性（この実施例では化学発光、実施例36では比色分析）、およびこの実施例における結合体パッドの使用以外は、実施例36におけるアッセイ法と同様に構築および実施される。図38は、ラテラルフロー試験の構成を示す。この図は、明確化のために単純化されている（例えば、表4において試験は3つのみの因子についてのアッセイを示し、図の一番上の結合体パッド上に示される3つの結合体が因子特異的結合体の集団を表している）。ディスポーザブルのラテラルフロー装置は、実施例36におけるように、試験ゾーンおよび対照ゾーンを有するが、この場合、試験ゾーンは固着させた因子特異的な抗体の並行した線を含む（1本の線が各々の因子特異的抗体に対してである）。この対照ゾーンは固着した非慣習的な因子の並行した線を含む（1本の線が各々の標的因子に対してである）。因子特異的結合体の混合物は、種々の参考文献に記載されているように（例えば、Millipore，テクニカルノート番号TB500、1999、前出；Bangs Laboratories，テクニカルノート番号303、1999、前出；Chandler,J.ら、2000、前出；Weiss,A.、1999、前出；Wild、2001、前出）、結合体パッド中に包埋される。

【0400】

ラテラルフローアッセイ法：液体化した試料（200μ1の、例えば、唾液、液体化した痰、血清）を、試料パッドに適用し、続いて200μ1のPBS-TBの試料への3回の適用を行う（試料パッドへの適用の間は60秒間待つ）。液体化した試料は、結合体を動かす。それは、キャピラリー作用を介して、試料パッドから結合体パッドを通って動くからである（図38）。試料中に存在し得るいかなる標的因子も、対応するナノゴールド：抗体：AP結合体に結合する。因子：ナノゴールド複合体は、これらが、特定の因子に対応する試験ゾーンの線における対応する因子特異的抗体に接触するまで、キャピラリー作用によって移動し続ける。ここで因子：ナノゴールド複合体は固定化される。因子に結合していないナノゴールド結合体は、対照ゾーンまで進行し、そして対照抗原の対応する線に結合する。

【0401】

試験ストリップをCDPスター（PE Biosystems）で覆い、そして5分間インキュベートさせた。次いで、このストリップを、実施例38に記載されるように、CCD画像処理装置（Orca II; Hamamatsu）を使用して画像処理した。個々の因子（生物、ウイルス、またはタン

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4778

パク質）を、因子が結合しているアルカリホスファターゼコートされた粒子によって放射された化学発光によって検出する。このアッセイ法が正しく機能した場合、すべての対照の線は化学発光粒子でコートされる。1つ（またはそれ以上）の因子が試料中に存在した場合、対応する線が固定化された化学発光粒子を含む。因子の同一性は、対照の線からの陽性試験の線の距離によって決定される（対照の線から各因子の試験の線の距離）。画像処理ソフトウェア（Image-Pro Plus）は、試験の線におけるスポットの数を定量し、対照の線からの距離を測定することによって因子に対する同一性を割り当てるマクロを使用することにより、CCDカメラの収集した画像を処理する。

【0402】

実施例39．核酸プローブを使用する呼吸器系病原体についての包括的試験

目的および利点：この実施例において、単回のアッセイが、下気道疾患の症候を有する患者からの試料中の一般的な呼吸器系病原体の異なるアレイの存在について包括的に試験する。この実施例の医学的な目的および重要性は、実施例32と同じである。しかし、この実施例は、抗体カテゴリー結合分子およびイムノアッセイ形式ではなく、ゲノムDNAプローブおよびインサイチューハイブリダイゼーション形式を使用する。

【0403】

実施例の技術的概要：カテゴリー特異的配列はゲノム差分（細菌および真菌）またはコンピュータ分析（ウイルス）を使用して種々の下気道病原体から単離する。各病原体群に特異的なカテゴリー特異的配列に対応するオリゴヌクレオチドプローブのファミリーを合成する。カテゴリー特異的プローブの各ファミリーを、蛍光量子ドット標識の別個の組み合わせで標識する。全体のプローブ集合（すなわち、すべてのプローブファミリー）が試料とハイブリダイズされ、これは、スライドに固定され、次いで、未結合プローブが洗い流される。CCDカメラを使用して、病原体特異的プローブのどのファミリーが（すなわち、どの量子ドット標識の組み合わせが）試料中の微生物にハイブリダイズするかを確認することにより、臨床試料中の病原体の同一性が決定される。

【0404】

下気道疾患を引き起こす病原体からのカテゴリー特異的配列の単離：表2は、下気道感染を引き起こす一般的な病原体を列挙する。ゲノム差分方法（Straus 1995, 前出）を使用して、細菌および真菌（すなわち、非ウイルス）病原体からカテゴリー特異的配列を単離する。以下の節では、ストレプトコッカス・ニューモニエに特異的な診断マーカーを精製および同定するためのプロセスを記載することによって差分ストラテジーを例証する。S.ニューモニエは、肺炎のはるかに最も一般的な原因である；これは、一般社会での肺炎にかかったすべての場合の約30～50%の原因である（米国において年間500,000件）。

【0405】

ゲノム差分を使用した、S.ニューモニエカテゴリー特異的配列を含むDNAフラグメントのセットの単離：図39Aは、S.ニューモニエとその最も密接な関連物の系統学的な関連性を示す（Kawamuraら、International Journal of Systematic Bacteriology 45: 406-8, 1995）。カテゴリー特異的配列を単離するためのストラテジーは2つの工程に分けられ得る：ゲノム減算（genomic subtraction）工程（図39B）およびスクリーニング工程（図39C）である。最初に、ゲノム減算（Straus、1995、前出）が、系統学的な株（この場合、S.ニューモニエ）からのDNAを「＋」ゲノム差分試料として使用して実行される（図39B）。「-」ゲノム差分試料は、最も密接な関連物である株（肺炎を一般的に引き起こさない株）のいくつかをプールすることによって構築される。得られる減算産物は、病原体のゲノムにハイブリダイズするが密接に関連する種のゲノムにはハイブリダイズしないフラグメントである。次いで、これらのフラグメントは、パーシャルフィルイン法（Corrette-Bennettら、Nucleic Acids Res 26: 1812-8, 1998）を使用して、pBluscriptIIベクターのXhoI部位にクローニングされる。

【0406】

カテゴリー特異的配列である減算産物の同定：次の工程は、カテゴリー特異的である（すなわち、すべてのS.ニューモニエ株にハイブリダイズするが他の群のいかなる株にもハ

イブリダイズしない）S.ニューモニエ特異的な減算産物のサブセットを単離することである。すべての減算産物がカテゴリー特異的配列であるわけではないことに注意されたい。減算産物のセットは、所望のすべてのカテゴリー特異的配列フラグメントを含むが、いくつかのカテゴリー特異的でないフラグメントも含む。このことは、ゲノム差分実験（前の段落を参照されたい）が、
単一のS.ニューモニエ株（ゲノム差分における「＋」株）にハイブリダイズし、かついくつかの関連する種の単一の株にはハイブリダイズしないフラグメントを選択したことが原因である。従って、例えば、いくつかの減算産物は、他のいくつかのS.ニューモニエ株にハイブリダイズせず、そしていくつかは減算において使用されたS.ミチス（S.mitis）の異なる株にハイブリダイズする。

【0407】

カテゴリー特異的配列である減算産物のサブセットを同定するために、クローニングされたフラグメントが、多くの異なるストレプトコッカス単離物のゲノムDNAへのハイブリダイゼーションによってスクリーニングされる。すべてのS.ニューモニエ株へのハイブリダイゼーションについてプローブを試験することは不可能であるので、最も良好な推定は、世界中から単離され、かつ数十年の期間にわたって単離されてきた何百ものS.ニューモニエ株（S.ニューモニエ株については、American Type Culture Center、およびCenter for Disease Controlにおいて達成されたコレクションから得られる）に対するハイブリダイゼーションについてプローブを試験することによってなされる。同様に、各プローブは、ストレプトコッカスの多くの非S.ニューモニエ株に対するハイブリダイゼーションについて試験される。図39Cは、プローブがカテゴリー特異的配列であるか否かを試験するための便利な方法を示す。ゲノムDNAは、S.ニューモニエおよび関連するストレプトコッカスの種の異なった単離物から調製され（GravesおよびSwaminathan, Gravesら（1993）、「Universal Bacterial DNA isolation procedure」、「Diagnostic molecular microbiology: principles and applications」D. Persing, T.Smith, F. Tenover および T. White編（Washington, D.C.: American Society for Microbiology）,617-621頁の方法を使用する）、変性し、そして、ドットブロットアレイの形式で、プラスに荷電したナイロンフィルター（例えば、GeneScreen Plus, NEN）上にスポットされる（Ausubel 1987 前出）（「ドットブロッティング」ではなくコロニーハイブリダイゼーションに敏感な種については、株がナイロンフィルター上でインサイチューに増殖および溶菌され得、従って、多数の株からのDNAを精製することを避ける）。

【0408】

クローニングされた減算産物がカテゴリー特異的配列であるか否かを試験するために、これは、アレイ化されたゲノムDNAにハイブリダイズされる。クローンは、それがすべてのS.ニューモニエ株からのゲノムDNAにハイブリダイズするが、関連するストレプトコッカス属の種からのゲノムDNAにはハイブリダイズしない場合に、カテゴリー特異的配列として分類される（図39C）。クローニングされた減算産物は、クローニングされた組換えプラスミドのPCR増幅の間にジゴキシゲニンを取り込むことによって標識される。反応がジゴキシゲニン-dUTP（100μM；Boehringer Mannheim）で補充される以外は、XhoLおよびXhoRプライマー（これは、Bluescriptベクター中でクローニングされた減算産物にじかに隣接する）を用いた、標準的なPCR条件が使用される（定義を参照されたい）。次いで、個々の標識されたプローブが、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションのための標準的な方法を使用して、ゲノムDNAのドットブロットアレイにハイブリダイズされ（Ausubel 1987, 前出）、続いて製造業者（Boehringer Mannheim）の推奨するプロトコールに従って、アルカリホスファターゼ：抗ジゴキシゲニン抗体結合体（Genius; Boehringer Mannheim）およびCDPスター（NEN）を使用する検出を行う。化学発光画像を、遮光用の覆い（Alpha Innotech Corp., MultiImage II キャビネット, カタログ番号DE-500-110）の中に備えられたCCDカメラ（ORCA II; Hamamatsu）を使用して得、Image-Pro Plus画像処理ソフトウェアパッケージ（Media Cybernetics, Silverspring, MD）を使用して分析する。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4780

【0409】

カテゴリー特異的オリゴヌクレオチドのファミリーの合成：次に、上記に記載したドットブロット分析によって同定された30個のカテゴリー特異的クローンに対応するオリゴヌクレオチドプローブを合成する。最初に、30個の選択されたS.ニューモニエカテゴリー特異的配列の各々を配列決定する。すべてのDNA配列決定は、パーキンエルマー（Perkin Elmer）からのABI 377自動シークエンサーを使用して、および製造業者によって推奨される方法を使用して実行する。オリゴヌクレオチドプローブを合成するために、30個のカテゴリー特異的配列の各々からの約20塩基長の2つのサブ配列を、プログラム「プライマー3（Primer3）」（S.Rozen, H. Skaletsky (1998), コードはhttp://www-genome.wi.mit.edu/-genome_software/other/primer3.htmlから利用可能）を使用して、最低溶解温度を59℃に設定し、そして最高溶解温度を61℃で設定する以外は、内部ハイブリダイゼーションオリゴヌクレオチドピッキングのためのデフォルトのパラメーター設定を使用して、選択する。

【0410】

5'末端にアミノ基修飾を有する各オリゴヌクレオチドを合成する（Midland Certified Scientific Reagent Co.）。アミノ修飾オリゴヌクレオチドは、高度に蛍光性の量子ドットに共有結合的に結合され得る（以下を参照されたい）。

【0411】

（表５）　量子ドットを使用するコンビナトリアル標識

	ストレプトコッカス・ニューモニエ	ヘモフィルス・インフルエンゼ	マイコプラズマ・ニューモニエ	モラクセラ・カタラーリス	クラミジア・ニューモニエ	アシネトバクター属種	レジオネラ属種	スタフィロコッカス・アウレウス	大腸菌	クレブシエラ属種	セラチア・マルセッセンス	シュードモナス・エルジノーサ	プロテウス属種	エンテロバクター属種	呼吸器合胞体ウイルス	アデノウイルス	A型インフルエンザウイルス	B型インフルエンザウイルス	パライインフルエンザウイルス	サイトメガロウイルス	カンジダ・アルビカンス	アスペルギルス属種	クリプトコックス・ネオフォルマンス	ニューモシスチス・カリニ
紫色	◆	◆	◆	◆							◆	◆	◆	◆	◆	◆					◆		◆	◆
青色	◆				◆	◆	◆				◆	◆	◆				◆	◆	◆		◆	◆		◆
緑色		◆			◆			◆	◆		◆			◆	◆		◆	◆		◆	◆	◆	◆	
黄色			◆			◆		◆		◆		◆		◆		◆	◆		◆	◆	◆	◆	◆	◆
赤色				◆			◆		◆	◆			◆		◆	◆		◆	◆	◆		◆	◆	◆

5種類の別々に着色された量子ドットを組み合わせることによって、31（2^5-1）の異なる色の組み合わせが可能である。表2の一番上の行に列挙された24種の病原体の各々について、病原体特異的オリゴヌクレオチドのサブセットが、カラム中の菱形でマークした各々のタイプの量子ドットに結合される。従って、別個のシグナルシグニチャーを有するプローブのファミリーが各病原体について構築される。5つの標識の色の31の可能な組み合わせのうちの7つ（すなわち、色なし、1色、および5色に対応する組み合わせ）は表に示されていないことに注意のこと。

【0412】

量子ドットを用いた、カテゴリー特異的オリゴヌクレオチドプローブのコンビナトリアル標識：包括的な下気道感染試験の目的を達成するために、S.ニューモニエプローブファミリーは、表2における他の病原体に対応するプローブファミリーからそれを区別する方法で標識されなくてはならない。この実施例において、各々のプローブファミリーは、量子ドット標識の別個の組み合わせで標識される。コンビナトリアル標識の原理は図5に示される。量子ドットは、ナノメーターサイズの半導体結晶であり、これは、単純かつ安価な機器を用いて単一の粒子として容易に検出されるに十分明るい蛍光を発する（Bruchezら、Science 281: 2013-6, 1998; Chanら、Science 281: 2016-8, 1998; Service, Science 281: 1930-1, 1998）。要約すれば、本発明のために非常に有用である量子ドットの特性には、放射スペクトルが非常に狭い；放射スペクトルがナノクリスタルのサイズによっ

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4781

て決定される-変動するサイズによって、多数の別個の放射スペクトルを有する量子ドット標識試薬が生成される（この多色適用のために重要である）；発光が非常に強く、その結果、単一の粒子が画像化され得る；粒子のサイズが小さく、そのサイズは小さなタンパク質のサイズと比較され得る（インサイチュー分析の間に、固定された細胞中での標的へのプローブの接近しやすさを増強する）；量子ドットは生物学的に重要な分子（例えば、核酸、タンパク質、ビオチン）で共有結合的に修飾され得る；および、単一の光の波長が異なる放射スペクトルを有する量子ドットからの放射を引き起こす、という事実が含まれる。

【0413】

24種のカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドプローブファミリー（表2に列挙された呼吸器系の病原体に対応する）の各々を別々に標識するために、量子ドットの異なる組み合わせが使用される。別々に着色した5種類の量子ドットを組み合わせることによって、31（2^5-1）の異なる色の組み合わせが可能である（表2）。病原体特異的オリゴヌクレオチドの各セットについて、100のオリゴヌクレオチドが、表2の病原体のカラム中の菱形でマークした量子ドットの各々のタイプに結合体化される。従って、S.ニューモニエについて、100の異なるS.ニューモニエカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドは、紫色量子ドットで標識される。同様に、100の他のS.ニューモニエカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドが青色量子ドットで標識で標識される。200の量子ドット標識されたS.ニューモニエカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドは、S.ニューモニエカテゴリー特異的プローブファミリーを構成する。個々のS.ニューモニエ細胞に対するプローブファミリーのインサイチューハイブリダイゼーションは、青色および紫色の量子ドットのクラスターとして検出される。同様に、スタフィロコッカス・アウレウス細胞が、紫色および緑色の量子ドットの局在化したクラスターとして検出される（表2のカラム2において示されるように）。オリゴヌクレオチドは、製造業者の推奨する手順に従って、量子ドット（Quantum Dot Corp）に共有結合的に結合される。

【0414】

偶発的なオリゴヌクレオチドプローブは、それがカテゴリー特異的配列のサブ配列である場合でさえ、カテゴリー特異的配列として振る舞わないかもしれない。これは、より大きなカテゴリー特異的配列中のパッチ配列の分岐に起因して生じ得る。オリゴヌクレオチドがカテゴリー特異的配列であることの確認は、量子ドット標識されたオリゴヌクレオチドの、ドットブロットへのハイブリダイジングによって、上記に記載したように、しかし、オリゴヌクレオチドに適切なハイブリダイゼーション条件を使用して、達成される（Ausubel 1987, 前出）。このドットブロットは、ORACAII CCDカメラ（Hamamatsu）を使用して、ベンチトップの覆い（Alpha Innotech Corp., MutiImage II cabinet; カタログ番号DE-500-110）中のUV落射照明、および画像処理ソフトウェア（MetaMorph Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA）を用いて、分析される。カテゴリー特異的配列として振る舞わないプローブセット中のオリゴヌクレオチド（すべてのS.ニューモニエ株にハイブリダイズするが他のストレプトコッカス株にハイブリダイズしない）は、カテゴリー特異的オリゴヌクレオチドプローブファミリーには含まれない。

【0415】

他のシグナル生成部分が、この実施例において量子ドットの代わりに置き換え得ることに注意されたい。例えば、カルボキシレート修飾蛍光標識粒子（40ナノメーター直径、TransFluoSpheres, Molecular Probes）が、EDAC化学を使用して（製造業者の指示書に従って）、5'末端アミノ修飾オリゴヌクレオチドに結合され得る。次いで、別個の放射スペクトル（560、605、645、685、および720nm）を有するが、すべて同じ吸収極大（488nm）を有する、5種類のTransFluoSpheresを使用して、表5における5つの異なるタイプの量子ドットを使用するものと類似する組み合わせで、病原体特異的オリゴヌクレオチドを標識する。

【0416】

または、より大きなクローニングされたカテゴリー特異的配列は、修飾されたヌクレオ

チドの存在下で、核酸ポリメラーゼ（例えば、DNAポリメラーゼIのクレノウ（Klenow）フラグメント、逆転写酵素、またはTaqポリメラーゼ）を使用して標識され得る。有用なヌクレオチド修飾の例には、蛍光団に直接結合体化されたヌクレオチド（例えば、Molecular ProbesからのAlexaシリーズ、またはフルオレセイン-12-dUTP（NEN Life Sciences; カタログ番号NEL413））、一級アミンを含むヌクレオチド（これは、ポリヌクレオチドへの取り込みの後に蛍光団に結合体化され得る）、およびハプテン修飾ヌクレオチド（例えば、ジゴキシゲニン-dUTP；Boehringer Mannheim）が含まれる。ハプテン修飾ポリヌクレオチドについては、シグナリング部分（例えば、フルオレセイン標識抗ジゴキシゲニン抗体）は、プローブが試料にハイブリダイズされた後に、しばしば、プローブに結合体化される。ポリメラーゼ標識カテゴリー特異的配列を使用するコンビナトリアル標識のために、オリゴヌクレオチドについては、標識スキームは区別可能なシグナリング部分のセットを使用しなくてはならない。

【0417】

他の下気道病原体についてのカテゴリー特異的プローブの単離：表2における他の細菌および真菌の病原体についてのカテゴリー特異的プローブファミリーは、上記のように、S.ニューモニエについて作製される。しかし、上記および表5に示すように、各カテゴリー特異的プローブファミリーは、量子ドットの異なる組み合わせで標識される。この試験を開発するために使用される病原体は、アメリカン・タイプカルチャー・コレクション（ATCC; Manassas, VA)から入手する。

【0418】

ウイルスカテゴリー特異的プローブファミリーは、ウイルスカテゴリー特異的配列が公的に利用可能なゲノム配列の比較によって単離される以外は、同様に調製される。第一に、公的なデータベース（例えば、GenBank；http://www.ncbi.nlm.nih.gov）が、ウイルス病原体（例えば、A型インフルエンザウイルス）由来の配列について走査される。次いで、これらの配列は、プログラムMegAlign（DNAStar）中でインポートおよび整列される。カテゴリー特異的配列は、ゲノム中で不変であり、かつウイルスの1つより多い単離物から配列決定された領域より選択される。オリゴヌクレオチドは、設計され、合成され、量子ドットに結合され、そしてS.ニューモニエについて上記のように試験される。ウイルス単離物は、培養物レパートリー（例えば、American Type Culture Collection (ATCC)）から、ゲノム核酸（ドットブロットのために）を調製するために得られる。例えば、ATCCは、A型インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルスの大きなコレクションを維持している。ウイルス種の種々の単離物からの核酸は、標準的な方法によってゲノムドットブロットのために調製される（例えば、Stephensonら編（1988）「Diagnostic virology-Laboratory manuals」（Totaowa, NJ: Humana Press）307頁を参照されたい）。

【0419】

病原体特異的プローブファミリーは、下気道病原体プローブ集合を作製するために合わせられる。このプローブ集合は、EE緩衝液（定義を参照されたい）中で合わせられ、その結果、各プローブの濃度は10nMである。

【0420】

臨床試料中に存在する病原体の同定：病原体特異的プローブ集合を使用して、同時に24種の病原体について呼吸器系試料を走査する（図40）。試料の好ましいレイアウトおよび対照を図40に示す。顕微鏡スライドを、画像の整列を容易にするために試料および対照領域中に位置決めのマークでエッチングする（以下を参照のこと）。

【0421】

呼吸器系の試料（例えば、痰、気管支肺胞洗浄液、または保護された気管支ブラシ試料）は、対照標的とともに、ガラス製の顕微鏡スライドに塗布され、そして風乾する。スライド上の内部対照部分が各スライド上に構築され、その上で精製された呼吸器系の病原体を含むスポットが整列される。このスライドの対照部分の目的は、ハイブリダイゼーションが正確に進行していることを確認すること、および試料中のシグナルと比較される、内部の蛍光標識された標準を提供することである。プローブ集合中に示される24種の呼吸器

系の病原体（表2に列挙される）の各々がスライド上にスポットされ（0.1μl PBS中～250生物体）、そして風乾される。次いで、試料および対照を、Braun-Howlandらの方法（Braun-Howlandら、Biotechniques 13: 928-34, 1992）を使用して固定する。ハイブリダイゼーションの前に、固定した試料中の核酸は、試料を70%ホルムアミドで、75℃、10分間覆うことによって変性させた。過剰の液体を注ぎ出し、そしてスライドをEEですすぎ、風乾させた。

【0422】

次に、プローブ集合をガラススライド上で試料にハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションは5μlのプローブ集合（各プローブの最終濃度は1nMである）を含むHYB緩衝液（50μl；定義を参照されたい）中で実行する。ハイブリダイゼーション溶液はカバーガラスで覆い、湿式スライドモウト（Boekel）で、50℃、30分間インキュベートする。スライドを、HYB緩衝液中で、50℃で5回洗浄する（各洗浄30秒間）。スライドを室温まで冷却した後、これらをEEですすぎ風乾する。

【0423】

図3Aのものと同様のCCD画像処理装置（しかし、自動化ステージはついていない）を使用して、試料および内部標準の画像を得る。ローディングトレイは3つの位置を有する：オープン、第1の画像処理位置、および第2の画像処理位置である。量子ドット標識プローブを結合したスライドを、画像処理装置のローディングトレイに挿入する（オープン位置で）。内部標準部分の位置は画像処理装置の方に向かって配置している。ローディングトレイを、スライドの内部標準部分を見るための第1の画像処理位置に移動させる。標準を画像処理した後、スライドを、実験試料を分析するために第2の画像処理位置に移動させる。

【0424】

画像の獲得は、好ましくはコンピュータソフトウェア（Image-Pro Plus）によって制御される。5つの画像を自動的に獲得し、1つが各々の蛍光団シグナリング部分に対応する。各蛍光団を画像処理するために、このソフトウェアは、正しい励起フィルターおよび放射フィルターを自動的に選択し、そしてユーザ定義のパラメーター（例えば、露光時間、標準の強度値など）に従って画像を収集する。このソフトウェアは、5つの画像の各々からの情報を組み合わせることによって、合成画像を構築する。画像を、位置決めマークの補助で（マークは試料領域および対照領域にエッチングされ、その結果、これらは各画像中で見られる）自動的に整列させる。整列は必要である。なぜなら、連続した画像は、一般的には、フィルター交換の間の小さな機械的な摂動に起因して、わずかに補正されるからである。次いで、このソフトウェアは、合成画像における各ピクセルに、5つの画像の各々の強度に対応する値のマトリックスを割り当てる。

【0425】

標準のソフトウェアに基づく分析は2つの主な機能を有する。第1に、これは、実験手順が正しく機能しているかことを確認する。標準のアレイにおける24個の「スポット」の各々が、実験試料において存在し得る病原体と同じに処理された標的病原体の個々の細胞またはウイルスを含む。カテゴリー結合分子の各病原体特異的ファミリーについてのシグナル部分の組み合わせは既知である。従って、このソフトウェアは、各スポットにおける細胞/ウイルスがシグナリング部分の予想される組み合わせに一致するか否かをチェックする。さらに、各スポットにおいて観察される病原体の数が、既知の数（約250生物体）と実験的に比較される。正確な数の病原体が、結合したプローブによって予想されるように標識される場合、実験手順は正しく機能していると見なされる。このソフトウェア分析は、拒否の判断基準に対し結果を比較することを含む。これは、利用者によって設定され得る。実験は、好ましくは以下を含む理由によって拒否される：1つまたはそれ以上の病原体が、正確または効率的に標識されなかったため、過度のバックグラウンド（病原体を有しない画像の区画を分析することによって決定される）、および乏しいシグナル対ノイズ比。5つの画像の各々についてこのステージで評価されるバックグラウンド蛍光の値は、好ましくは、標準画像および試料画像から減算される。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4784

【0426】
標準の分析の第2の機能は、シグナルシグニチャーを既知の病原体と関連付けるための正確なキーを生成することである。各病原体について、5つの画像の各々についての予測値のマトリックスが構築される（すなわち、蛍光団最適化された励起/放射フィルターで収集された各々の画像について）。1つの画像における病原体についての予測される範囲を確立するために、1つのスポットにおける～250生物体の各々についての強度値が表にされる。本発明の好ましい実施態様において、閾値は、標準において検出される強度値の観察される範囲に基づいて選択される。従って、次に、各病原体について、各画像についての予測範囲のセットが構築される。偽の色を特定の病原体について予測される範囲内に収まる値のセットと関連付ける検査表もまた、構築される。偽の色を割り当てるプロセスは、核型分析のために使用されるものと同様である（Schrockら、1996、前出；Speicherら、1996、前出）。
【0427】
試料同定のためのバーコード（種々の厚さの黒い棒を適用することによって構築する）が、スライド上に好ましく配置され、その結果、これは、標準と同時に画像化される。バーコード適用および分析のための方法は、当業者によって理解されている。
【0428】
標準の分析の後、スライドローダーが第2の位置まで移動し、スライドの試料部分を画像処理領域中に配置する。ソフトウェアは、試料の5つの画像のコレクションを駆動する（標準については、先のように自動的に画像処理する）。標準の分析の間に構築された検査表を使用して、偽の色は、特定の病原体について予測される範囲内に収まる色の比の値のセットに対応する、個々の対象物に割り当てられる。偽の色の対象物の各々のタイプについての強度は合計され、対照試料中の標的の平均強度の値によって割り算され、各試料中に存在する標的の数の見積もりを得る。この画像分析の最初の関門は、標的の単一のカテゴリーを表す対象物中の病原体を同定および計数する。第2の関門において、このソフトウェアが、任意の標的病原体の複合物とは一致しない、値の比を登録するピクセルを試験して、これらが1つより多いタイプの病原体の登録と一致する比を有するか否かを決定する。最後に、このソフトウェアは、利用者のために、診断（すなわち、感染または感染なし）、試料中の病原体の同一性および数、試料のID番号（スライド上のバーコード化された情報から抽出されたもの）、ならびに標準および試料の両方の合成画像（偽の色のピクセルを伴う）を示す。
【0429】
実施例40．核酸プローブを使用する多数の病原体についての血液試料の同時試験
血流感染：心臓血管系の病原体侵入は、最も深刻な感染性疾患の1つである。米国において毎年約200,000件の血流感染が起こっており、そのうち20～50%が致命的である。特にリスクがあるのは、免疫無防備な患者、非常に若い患者および非常に年をとっている患者、皮膚または軟組織の感染および創傷を有する患者、ならびに侵襲的な医学的処置の受け手である。すべての主要な種類の病原体は、血流に感染し得、これらには、細菌、ウイルス、真菌、および寄生生物が含まれる。血流感染における病原体の迅速な同定は、適切な、潜在的な救命治療を設定するために決定的である。
【0430】
治療の選択は、病原体の同定に依存する。多くの試験および多くの費用が感染源を決定するために必要とされ得る。しかし、最適な治療の素早い開始は、しばしば、生死の問題である。従って、広範な一般的な血流感染源の同定を迅速に決定する単回のアッセイ法に必要性が存在する。
【0431】
実施例の概要：この実施例における試験は、インサイチューハイブリダイゼーションのための間接的に標識された病原体特異的プローブを使用することにより、血液試料中の広範な血流病原体の存在について走査する。一般的な細菌、ウイルス、および原生生物の病原体を同時に試験することによって、この方法は、現在の実務を超えて実質的な改善を提

供する。この試験の迅速性（これは、微生物の培養を必要としない）は、これを、血流病原体の迅速診断の決定的な作業のため、および適切かつ時期を得た治療を設定するために特に有用にする。

【0432】

（表６）　血流感染を引き起こす病原体

細菌	真核生物
ブドウ球菌属種（*Staphylococcus* spp.）	プラスモディウム属種（Plasmodium spp.）
スタフィロコッカス・アウレウス	熱帯リーシュマニア
ビリダンス連鎖球菌（*Viridans streptococci*）	トキソプラズマ属種（Toxoplasma spp.）
腸球菌属種（*Enterococcus* spp.）	ミクロフィラリア（Microfilariae）
連鎖球菌属種（*Streptococcus* spp.）	ヒストプラスマ・カプスラーツム
ストレプトコッカス・ニューモニエ	コクシジオイデス・イミチス
エシュリキア属種（*Escherichia* spp.）	クリプトコックス・ネオフォルマンス
クレブシエラ属種	カンジダ属種（Candida spp.）
シュードモナス属種（*Pseudomonas* spp.）	
エンテロバクター属種	ウイルス
プロテウス属種	HIV
バクテロイド属種（*Bacteroides* spp.）	単純ヘルペスウイルス
クロストリジウム属種（*Clostridium* spp.）	C型肝炎ウイルス
シュードモナス・エルジノーサ	B型肝炎ウイルス
コリネバクテリウム属種	サイトメガロウイルス
	エプスタインバーウイルス

【0433】

血流感染を引き起こす病原体からのコンビナトリアル標識されたカテゴリー特異的プローブの集合の組み立て：表6は、血流感染を引き起こすいくつかの一般的な病原体を列挙する。カテゴリー特異的配列が、Tinslayら（1996、前出）によって修飾された表示差分析方法によって、非ウイルス性（すなわち、細菌、真菌、および寄生生物）病原体から単離される。この方法は、実施例39において使用されるものと技術的に別であるが、これは、同一の特性を有する減算産物を単離する。ゲノム差試料は、実施例39において記載されるように構築され、その産物は、標準的な方法を使用して、Bluscript IIベクターにクローニングされる（Ausubel、1987、前出）。カテゴリー特異的配列の病原体特異的ファミリーは、実施例39におけるように同定および配列決定される。

【0434】

オリゴヌクレオチドプローブは、実施例39におけるように合成および試験される。スペクトル的に別個の5つの量子ドットを使用するコンビナトリアル標識が、以前の実施例と同様に、表5に示されるものと類似したスキームを使用して使用される。しかし、この実施例において、各オリゴヌクレオチドは、2つの部分を有するように設計される：カテゴリー特異的配列およびタグ配列である（図6および図41）。タグ部分は、オリゴヌクレオチドプローブの間接的標識のための手段を提供する。プローブ分子を間接的に標識するために、アンチタグ（またはタグ相補物）配列がシグナリング部分で標識され、次いで、二機能性のオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズされる（図41）。5つの別個のタグが使用され、1つが各々の色のクラスに対応する。例えば、S.アウレウスについての「色のコード」が緑色、紫色、および青色であると仮定する。約100個のS.アウレウス特異的なプローブが「緑色タグ」を用いて合成され、100個の別のプローブが「青色タグ」を用いて、そして100個の別のプローブが「紫色タグ」を用いて合成される。このタグ配列およびカテゴリー特異的配列が設計され、その結果、溶解温度（Tm：Suggs（Suggs, S.V.ら、Proc Natl Acad Sci USA 78: 6613-7, 1981）のアルゴリズムを使用して1M NaClで計算される）は、各部分およびその相補物について60℃（±1℃）である。このタグはまた設計されて、その結果、それらは互いに、各々の他の相補物、カテゴリー特異的オリゴヌクレオチド、またはカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドの相補物と、交差ハイブリダイ

ズしない（すなわち、オリゴヌクレオチドのすべてのこのような組み合わせは、好ましくは40℃（すなわち、Tm（perfectmuch）－ 20℃）の融解温度（Tm（mismuch））を有する）。このストラテジーの利点は、5つのみの標識アンチタグ配列が合成される必要があること（およびこれらは多数の適用のために使用され得る）、ならびにタグおよびアンチタグは試料へのハイブリダイゼーションの間に互いにハイブリダイズし得ることである（代替的な実施態様において、単一のユニバーサルタグ配列がすべてのオリゴヌクレオチド上で使用され得るか、またはファミリー特異的タグが使用され得ることに注意されたい）。

【0435】

オリゴヌクレオチドは、実施例39におけるように、それらが、ゲノムDNAのドットブロットへのハイブリダイゼーションによって、厳密なカテゴリー特異的配列として振る舞うことを確認するためにチェックされる。しかし、この実施例において、プローブは、酵素アルカリホスファターゼ（Synthetic Genetics）と共役するアンチタグで間接的に標識される。プローブは、HYB緩衝液中で、52℃（オリゴヌクレオチド/ゲノムDNAのハイブリッドの融解温度（Tm）（60℃）-8℃に等しい温度）でドットブロットにハイブリダイズされる。このブロットを、同じ緩衝液で同じ温度で洗浄し（10分間、3回）、150mM NaClおよび100 mMトリス-HCl pH9.5の溶液で手短にすすぎ、そしてCDPスター（NEN）を重層する。ブロットのデジタル画像は、以前の実施例において記載されるように得る。

【0436】

このように、病原体特異的プローブファミリーに対応するオリゴヌクレオチドの各々のセット（各プローブファミリーは表6に列挙した30個の病原体のうちの1つに特異的にハイブリダイズする）は、コンビナトリアル標識スキームを使用して、蛍光色素の独特の組み合わせで標識される。標識されたプローブファミリーは、実施例39におけるように、血流病原体特異的プローブ集合を形成するように組み合わされる。

【0437】

血液病原体プローブの集合の血液試料に対するインサイチューハイブリダイゼーション：血液試料を標準的な方法を使用して収集する（Isenberg編（1992）「Clinical microbiology procedures handbook」Washington, D.C.; American Society of Microbiology）。血液試料（0.5ml）を、インサイチューハイブリダイゼーションのために、Lischewskiら（Lischewskiら、J Clin Microbiol 35: 2943-8, 1997）の方法を使用して調製する。血液試料に隣接して、対照スポットのアレイを、この実施例ではスポットが表6に列挙される血流病原体からの生物を含む以外は、以前の実施例と同様にスポットする。スライドにまた、以前の実施例と同様にバーコードを付ける。ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程を、この実施例では、プローブの集合（最終濃度は各プローブ1nM）およびアンチタグ（プローブの集合における対応するタグ配列の対応する濃度と等モル）の両方が含まれる以外は、以前の実施例と同様に実行する。

【0438】

スライドは、実施例39と同様に画像処理および分析する。

【0439】

実施例41．核酸プローブを使用する多数の中枢神経系ウイルスについての迅速な協同的試験

実施例の概要：中枢神経系（CNS）の感染は、医学的な緊急事態である。感染因子の迅速な診断は、最適な治療結果のために決定的である。ウィルス感染の診断は特に問題であり、しばしば高価である。この実施例において記載される方法は、脳脊髄液（CSF）試料を、様々な種類のウイルスの存在について同時に試験するために使用され得る。

【0440】

この実施例は、試料調製、必要とされる機器、および実験的複雑さを最小化する、迅速な、高度に多重化された試験を詳述する。CSF試料を、ラテラルフロークロマトグラフィー法を使用して、フィルター上にスポットおよび固定し、変性させ、そしてウイルスプローブの集合（量子ドットでコンビナトリアルに標識されたもの）にハイブリダイズさせる。結合したプローブは、非拡大的な広域画像処理によって画像処理および同定される。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4787

【0441】

ウイルス特異的配列の集合の組み立て：表7に列挙されたウイルスのパネルにおけるウイルスの群の各々に特異的なカテゴリー特異的配列を選択する。いくつかの場合において、ウイルス特異的カテゴリー特異的配列は、文献にすでに記載されている。他の場合において、配列は、データベース中の他のウイルスと配列を比較した後で、公的なデータベース中のウイルスのゲノム配列から選択される。配列比較は、標準的な方法を使用してなされる（Ausubelら、1987、前出）。カテゴリー特異的オリゴヌクレオチドが、実施例39と同様に、選択され、合成され、そして量子ドットで標識される。コンビナトリアル標識スキームは、表7におけるウイルスからのカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドが量子ドットに結合体化される以外は、表5に示されるものと類似である。中枢神経系病原体特異的プローブ集合は、種々のカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドを、EE中で10nM（各オリゴヌクレオチド）の濃度で合わせることによって構築される。

【0442】

（表７）　CNS感染を引き起こすウイルス

A型コクサッキーウイルス	B型コクサッキーウイルス
単純ヘルペスウイルス	トガウイルス
セントルイス脳炎ウイルス	麻疹ウイルス
エプスタインバーウイルス	肝炎ウイルス
ミクソウイルス	パラミクソウイルス
JCウイルス	流行性耳下腺炎ウイルス
エコーウイルス	ウマ脳症ウイルス
ブンヤウイルス	リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス
サイトメガロウイルス	狂犬病ウイルス
水痘帯状疱疹ウイルス	BKウイルス
HIV	

【0443】

試料調製：CSFを、標準的な方法を使用して収集する（Isenberg、1992、前出）。試料（1ml）を、微量遠心分離（12,000×g；1分間）で、手短に遠心分離して、細胞および粒子状物質を除去する。上清中のウイルス（1ml）を、Biomax-5グレードウルトラフリー(grade Ultrafree)-4 遠心分離ユニット（カタログ番号UFV4 510XB; Millipore, Bedford, MA）中で、7,500gでの遠心分離によって濃縮する。保持物（10μl）を、95℃で5分間加熱し、核酸を変性させて、支持体のニトロセルロースストリップ（0.5×2cm；5μm孔径；Osmonics）にスポットする。試料とは別個のストリップの領域中で、表7におけるウイルスの各々からの変性したゲノム核酸の対照試料（各1×10^{5}ゲノム）を、以前に記載したように（Gravittら、Journal of Clinical Microbiology 36: 3020-7, 1998）隣接する線に配置する（バーコードにおけるように）。インクの参照線を同様に適用する。

【0444】

キャピラリー作用媒介ハイブリダイゼーション：量子ドット標識プローブ集合は、Reinhartzら（Reinhartz、1993、前出）によって記載されるペーパークロマトグラフィーハイブリダイゼーションアッセイ法を使用することによって、試料および対照の変性試料DNAと接触される。図42は、この実施例において使用される手順を図示する。ハイブリダイゼーション溶液中のプローブは、ストリップの一端に適用され、キャピラリー作用を介して、固定された変性された試料核酸を過ぎて流れることを可能にする。ハイブリダイゼーション溶液は、溶液に含まれるDNAが血液由来の病原体プローブ集合である（最終濃度は各量子ドットオリゴヌクレオチドプローブについて1nMである）以外は、1%ポリビニルポリピロリドンで補充した、Reinhartzらによって使用されたものである。このストリップをハイブリダイゼーション溶液（100μl）に沈め、そしてハイブリダイゼーションクロマトグラフィーを50℃で25分間実行する。試料を0.3%トゥイーン/PBS中、37℃で5分間、2回洗浄し、次いで、風乾させた。

【0445】

フィルターストリップのCCD画像処理による病原体の同定：病原体を、実施例39と同様に画像処理によって同定する。試料中のウイルス核酸分子は、量子ドット標識の特徴的な組み合わせを有するプローブとハイブリダイズする。量子ドットの各クラスターには偽の色を割り合てる。CSF試料中のウイルスの同定は、試料中のスポットの偽の色を、対照の線（既知のウイルスゲノムを含む）に割り当てられた偽の色と比較することにより、達成される。

【0446】

実施例42．ゲノムDNAプローブを使用した、マイコバクテリウム・ツベルクローシスについての迅速な同定および抗微生物剤感受性試験

概要：M.ツベルクローシスについての迅速感受性試験の医学的重要性は、実施例28の概要で議論している。この実施例は、M.ツベルクローシス特異的株、非特異的株、または抗体ではなく、M.ツベルクローシス特異的ゲノムDNA配列がカテゴリー結合分子として使用されるという点で以前の実施例（実施例9、実施例27、および実施例28）とは異なる。

【0447】

ゲノム減算によって得られるM.ツベルクローシス特異的ゲノムDNA配列は、ハプテンジゴキシゲニンによって修飾される。患者の痰試料のアリコートは、種々の濃度で種々の抗生物質を含む増殖培地中でインキュベートされる。フィルター上に試料を配列した後、ハプテン標識したM.ツベルクローシス特異的配列でプロービングし、化学発光および非拡大的な広域CCD検出を使用して、細胞を計数する。

【0448】

ハプテン修飾したM.ツベルクローシスカテゴリー特異的配列の調製：M.ツベルクローシス特異的配列は、実施例39に記載され、図40に示されるようなゲノム減算およびドットブロットスクリーニングによって単離される。ゲノム減算のために、プラスゲノム差分試料はM.ツベルクローシスであり、そしてマイナスゲノム差分試料はマイコバクテリウム・アビウム（Mycobacterium avium）である。どのクローニングされた減算産物がM.ツベルクローシス特異的配列であるかを決定するために、クローニングされた産物を使用して、50個のM.ツベルクローシス単離物（別々の地理的位置由来）および実施例39におけるようにドットブロットにおける関連するマイコバクテリウム属種の50個の単離物をプロービングする。プローブをジゴキシゲニン標識し、そしてドットブロットを実施例39に記載されるように画像処理する。ジゴキシゲニン標識カテゴリー特異的配列（n=96）をプールする（各プローブの最終濃度は250pg/μlである）。

【0449】

M.ツベルクローシスについての下気道試料の試験：痰試料を、NALC-NaOH法（Isenberg編（1992））を使用して調製する。次いで、調製した痰（100μl）をナイロンフィルター（GeneScreen；NEN）に適用し、以下のように一連のフィルターの配置によって調製する。フィルターを、プレ溶解溶液（溶液の節を参照されたい）で、37℃で45分間飽和させた数枚のフィルターの積み重ね（蒸発を防ぐためにプラスチックラップに包む）上に連続的に配置する（注記される以外は、各室温で5分間）；フィルターを乾燥させる（Whatman 3 MM）；フィルターを、1% SDS/100μg/ml プロテイナーゼK（Life Technologies）の溶液で、37℃、30分間飽和させる（プラスチックラップに包む）；フィルターを乾燥させる；フィルターを0.5N NaOHで飽和させる；フィルターを乾燥させる；フィルターを1Mトリス pH7.5で飽和させる；およびフィルターを乾燥させる。陽性対照として、M.ツベルクローシス（10μl中～1000生物体）を痰試料に隣接してスポットする。陰性対照として、大腸菌（～1000細胞）を陽性対照に隣接してスポットする。ハプテン標識したプローブを用いるインサイチューハイブリダイゼーションは、実施例39に記載されるように実行する。次いで、アルカリホスファターゼ（Genius kit; Boehringer Mannheim）に結合体化された抗ジゴキシゲニン抗体は、ハイブリダイズしたプローブに結合される。フィルターは、製造業者の推奨に従って、ガラススライド上に配置され、そしてCDPスター（NEN）とともにインキュベートされる。このスライドを、非顕微鏡的なCCD画像処理装置（図3）を使用して画像処理および分析する。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4789

【0450】
臨床試料の種々の抗生物質とのインキュベーション：抗生物質感受性試験を、実施例28と同様にM.ツベルクローシスを含む試料上で実行する。
【0451】
フィルター上の試料の配列およびハイブリダイゼーションのための調製：培養した試料（100μl）のアリコートを、真空フラスコに装着したディスポーザブル沪過装置（Millipore; Micro Funnel (100ml), カタログ番号MIHAWG072）を使用して、グリッド付きのナイロンフィルター上に配列する。試料（100μl）を、真空を適用しながら（例えば、Gast（モデル；DOA-P104-AA）真空ポンプを使用して1/3最大真空レベルで）、交互のグリッドの正方形上にピペッティングする。フィルターを取り出し、風乾する。次いで、このフィルターを、この実施例よりも先に記載したように、一連のフィルター上に置くことによってハイブリダイゼーション用に準備する。
【0452】
ハイブリダイゼーション、化学発光画像処理、および分析：M.ツベルクローシス特異的プローブ（上記のジゴキシゲニン標識）を、製造業者（Boehringer Mannheim）の推奨するプロトコールに従って、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションおよび洗浄（Ausubel 1987, 前出）、続いてアルカリホスファターゼ：抗ジゴキシゲニン抗体結合体（Genius; Boehringer Mannheim）への結合、ならびに、化学発光性アルカリホスファターゼ基質、CDPスター（NEN）とのインキュベーションを使用して、配列されたM.ツベルクローシスに結合させる。化学発光画像は、上記のように非拡大的なCCDカメラに基づく画像処理を使用して得られる。各試料スポット中の別個の対象物の数および積算された強度は、発明の詳細な説明、工程6において上述したように計算する。
【0453】
実験スポット中の標的の数は、陰性対照および陽性対照のスポットを比較して、種々の抗生物質希釈物中に存在する増殖の量を決定する。細胞数の減少は、エタンブトール、イソニアジド、およびリファンピンを含む試料について、それぞれ、45、50、または25%である。このことは、所定の抗生物質レジメに対する感受性を示す（Mooreら、1999、前出）。
【0454】
上記に記載するこのアプローチは、同じ様式で他の細菌に対して適用され得る。
【0455】
微小コロニーのインサイチュー増殖を非顕微鏡的にモニタリングすることによる、迅速な感受性試験：種々の抗生物質を含む培地中での微小コロニーの増殖（例えば、2～1000個のクローン的に関連する細胞からなるコロニー）はまた、株の抗生物質感受性プロフィールを評価するために使用され得る。概念的に、このアプローチは古典的なディスク希釈もしくは寒天希釈技術、またはより新しい固定グラジエント法（例えば、Eテスト）に類似する。これらのすべての方法において、細胞は、異なる濃度のいくつかの抗生物質を含む固形増殖培地上に配置される。株の抗生物質感受性プロフィールを確認するために、細菌単離物が種々の抗生物質上の増殖について点数付けされる。
【0456】
本発明は、このアプローチを使用して、決定的な抗生物質感受性試験データの獲得を非常に加速し得る。例えば、ディスク希釈感受性試験は、NCCLSによって推奨されるように実行され得る（「NCCLS Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests」；認可標準（Approved Standard）第7版 M2-A7 第20巻、第1号、2000年1月）。しかし、寒天プレート上に細菌を直接的に播くのではなく、細菌は、寒天培地プレート上に配置されたナイロンフィルター上に配置される。種々の抗生物質を含む小さなフィルターディスク（2.5mm直径）がナイロンフィルター上に配置され、そして細菌は約5の倍加時間で（速く増殖する細菌では通常数時間）増殖させられる。次に、フィルターは、引き続いて乾燥したフィルター上に置かれ（各Whatman 3MMフィルター上で室温で5分間）；フィルターを100%メタノールで飽和させ；フィルターを乾燥させ；フィルターをヨウ化プロ

ビジウム（水中10μg/μl）で飽和させ；フィルターを乾燥させる。次いで、この実施例で使用される、非拡大的な蛍光画像処理装置を使用して、ディスクを取り囲む個々の細胞を直接的に可視化する。増殖阻害の部分の直径を、古典的なディスク拡散抗生物質感受性試験において肉眼によるディスクの周りのゾーンまたはハローを測定するプロセスに類似して、画像処理ソフトウェア（Image-Pro Plus、バージョン4.1 Media cybernetics）により自動的に測定する。あるいは、細胞は、この実施例および他の実施例において記載されるように、病原体特異的染色、または、光散乱、もしくは蛍光、もしくは化学発光シグナリング部分を有するカテゴリー結合分子のような方法を使用して画像処理され得る。

【0457】

迅速な抗ウイルス感受性試験：多くの新規な抗ウイルス化合物が現在開発されている。抗ウイルス耐性の問題は、HIVにおける耐性の進化が急速であるために顕著になってきた。このように、感受性試験は重要になりつつある。耐性を決定するための遺伝子型決定方法は有用になりつつあるが、核酸配列における変異の組み合わせを検査することによる薬物耐性の評価は、極端に複雑であり、かつ常に正確に耐性を予測するわけでばない。不運なことに、ウイルス継代培養での表現型の感受性試験は時間がかかる。しかし、上記のM.ツベルクローシスについて記載されたものと類似して、細胞培養中でウイルス複製をモニターする方法を使用することによって、本発明は、ウイルス感受性試験のための結果が出るまでの時間を大幅に改善し得る。

【0458】

実施例43．核酸プローブを使用する性感染症病原体についての試験

実施例の概要：この実施例は、2つの主要な性感染症の病原体であるクラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエについて尿を同時に試験するために本発明を利用する。この試験の重要性についてのより多くの情報は、実施例31の概要を参照されたい。これらの株からのカテゴリー特異的配列は、ゲノム減算を使用して（ナイセリア・ゴノレエ）またはコンピュータに基づく仮想的な減算ストラテジー（クラミジア・トラコマチス）を使用して単離される。カテゴリー特異的配列を、ハプテンジゴキシゲニン（クラミジア・トラコマチス）またはフルオレセイン（ナイセリア・ゴノレエ）を用いて標識し、そしてフィルター上で濃縮かつ固定化された、固定された細胞にハイブリダイズされる。強いシグナリング部分（共鳴光散乱粒子（RLS粒子）と呼ばれる）を使用して、病原体を検出および同定する。抗ジゴキシゲニン抗体（赤色散乱RLS粒子）または抗フルオレセイン抗体（緑色散乱RLS粒子）に結合体化されたRLS粒子は、試料中の病原体に結合される。シグナリング部分の強度のために、病原体は、照射した試料の単純な視覚的検査によって同定され得る。赤色のスポットはクラミジア・トラコマチス感染を示し、緑色のスポットはナイセリア・ゴノレエ感染のシグナルを示す。

【0459】

仮想的減算を使用するクラミジア・トラコマチスカテゴリー特異的配列の単離：クラミジア・トラコマチスの株についての完全なゲノム配列（Stephensら、Science 282: 754-9, 1998）の存在は、クラミジア・ニューモニエ（Kalmanら、Nat Genet 21: 385-9, 1999）が、他のゲノムとは異なる1つのゲノムからの領域のコンピューターに基づく決定を可能にする。このプロセスは、ゲノム減算実験との類似性から仮想的減算と呼ばれる。公的なデータベース（NCBI；http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/-Genomes/bacbt.html）において利用可能であるゲノム配列は、全体のゲノムを整列および比較するソフトウェアによって処理される（MUMmer; Delcherら、Nucleic Acids Res 27: 2369-2376, 1999）。MUMer（最小MUM長さのパラメーターについて20bpを使用する）は、アラインメントにおいてすべてのギャップを示す詳細なファイルを生成する。これらのギャップには、挿入/欠失および高度に多型性の領域が含まれる。プログラム、プライマー3（S. Rozenら、1998、前出）を使用して、クラミジア・トラコマチスに存在するがクラミジア・ニューモニエには存在しない増幅領域（～200から500bp）についてPCRプライマーを選択した。これらのPCRプライマーは、図43に示される二成分性構造を有するように設計される。1つのプライマーは、クラミジア・トラコマチス における挿入/欠失領域の「左側」末端に対応する20

bpのプライマーに連結されたXhoLプライマー配列を有する（5'-XhoL-クラミジア・トラコマチス左側プライマー-3'）。他のプライマーは、構造5'-XhoR-クラミジア・トラコマチス右側プライマー-3'を有し、ここで、クラミジア・トラコマチス右側プライマーは、同じ挿入/欠失領域の「右側」末端に対応する20bpのプライマーである。これらのプライマーを使用して、EE緩衝液中、5分間の細胞の沸騰後、仮想的な減算配列がクラミジア・トラコマチス細胞（10μl EE中～10^5細胞；ATTCから入手）から増幅される。増幅産物をジゴキシゲニン-dUTPで標識し、実施例39におけるようにドットブロット分析を使用してカテゴリー特異性についてスクリーニングする。

【0460】

ゲノム減算を使用するナイセリア・ゴノレエカテゴリー特異的配列の単離：潜在的なナイセリア・ゴノレエが、実施例39において記載されるようなゲノム減算（Straus、1995、前出）を使用して、この実施例において単離される。プラスゲノム差分試料はナイセリア・ゴノレエゲノムDNAのSau3A消化物からなり、そしてマイナスゲノム差分は、剪断したナイセリア・メニンジティディス（Neisseria meningitidis）DNAからなる。ナイセリア・ゴノレエおよびナイセリア・メニンジティディス（ATTCから入手）を適切な培地中で増殖させ（ATCC；814 GC培地）、そしてCTAB法（Ausubel 1987, 前出）を使用して調製する。減算産物を、実施例39と同様に、クローニングし、標識し、そしてドットブロット（種々のナイセリア属種由来のDNAを含む）に対してスクリーニングする。蛍光標識したカテゴリー特異的配列を、製造業者の推奨する手順に従って、フルオレセイン-12-dUTP（NEN Life Sciences; カタログ番号NEL413）ならびにXhoLプライマーおよびXhoRプライマー（略号の節において配列を参照されたい）を使用する組換えプラスミドの増幅によって合成する。

【0461】

クラミジア・トラコマチス/ナイセリア・ゴノレエプローブ混合物の集合：ジゴキシゲニン標識したクラミジア・トラコマチスカテゴリー特異的配列（n=96）を、フルオレセイン標識したナイセリア・ゴノレエカテゴリー特異的配列（n=96）と合わせる（等量の増幅反応物が一緒に混合され、その結果、各プローブの最終濃度は約250pg/μlである）。

【0462】

プローブ特異的RLSシグナリング部分の作製：RLS粒子（これは、強力な光散乱によって容易に可視化される）を結合プローブに結合させることによって、個々の病原体細胞が検出および同定される。2つの異なるタイプのRLS粒子（米国特許第6,214,560号に記載されるように調製する）を使用して、クラミジア・トラコマチス結合プローブおよびナイセリア・ゴノレエ結合プローブをディファレンシャルに標識する。赤色散乱RLS粒子（160nm直径金粒子）を使用して、クラミジア・トラコマチスプローブに結合させるのに対して、緑色散乱RLS粒子（60nm直径金粒子）を使用して、ナイセリア・ゴノレエプローブに結合させる。クラミジア・トラコマチスプローブに特異的な赤色散乱粒子は、抗ジゴキシゲニン抗体（Roche、カタログ番号1 333 062）を、以前に記載されているように（Hermanson, 1996, 前出、およびその中の引用文献）粒子に結合体化することによって作製される。同様に、ナイセリア・ゴノレエプローブに特異的な緑色散乱RLS粒子は、抗フルオレセイン抗体（Roche、カタログ番号1 426 320）を粒子に結合体化することによって作製される。赤色および緑色散乱RLS：抗体結合体は、等濃度（3.8×10^{-11}M）で一緒に混合する。

【0463】

インサイチューハイブリダイゼーションのための尿試料の調製：市販のキット（B-D尿採取キット(Becton-Dickinson)）を使用して収集した尿試料（10ml）を、ブラックポリカーボネートメンブレン（0.22μm；Osmonics）を通して沪過し、存在し得る細菌を濃縮する。細菌DNAを変性させ、そしてフィルターを処理することによりコロニーの隆起に本質的に接近しやすくする（Ausubel 1987, 前出）。試料を含むフィルターを、連続して、0.5M NaOHで飽和させたフィルター（Whatman 3MM）（5分間）；乾燥したフィルター（5分間）；1Mトリス pH7.5で飽和させたフィルター（5分間）；および乾燥したフィルター（5分間）の上に配置する。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4792

【0464】
対照フィルターを同様に調製する。10ml PBS中のクラミジア・トラコマチス（～1000エレメンタルボディー；ATTC）をフィルターを通して沪過し、そして実験試料について記載したように調製する。GC培地（10ml）中のナイセリア・ゴノレエ（～1000細胞）を同様に収集し、別個のフィルター上で調製する。最後に、LB（10ml）中の大腸菌（～1000細胞）を含む陰性対照フィルターを、同じ様式で調製する。
【0465】
代替的な実施態様において、他の基材（例えば、ガラススライド、ポリリジン処理したガラススライド、シラン処理したガラススライド、ニトロセルロースフィルターなど）がナイロンフィルターの代わりに置き換えられてもよいことに注意されたい。また、尿試料は、沪過ではなく遠心分離によって濃縮してもよい（例えば、12,000×g、1分間）。あるいは、尿試料は、より少量で（例えば、100μl）、直接基材に適用し、続いて、固定化およびゲノムDNAを接近可能にする処置を行ってもよい。
【0466】
ハプテン標識したクラミジア・トラコマチス/ナイセリア・ゴノレエプローブ集合の、沪過した尿試料および対照への結合：上記に記載したようなプローブ集合混合物の1:2希釈物（各プローブの最終濃度は約125ng/μlである）を含む1ml HYB溶液（定義を参照されたい）中で、フィルターをハイブリダイズさせる。反応を、インキュベーター（Hybaid）中で、65℃、4時間実行する。未結合のプローブを、ガラスハイブリダイゼーションボトル（Hybaid）中で、0.2×SSC（100ml；定義を参照のこと）で2回洗浄することによって（各洗浄につき20分間）除去する。
【0467】
プローブ標識した病原体細胞へのプローブ特異的RLSシグナリング部分の結合：フィルターを、室温で（～22℃）、穏やかに振盪しながら（～60rpm）、回転プラットフォーム上で、プラスチックトレイ（RubberMaid）において、BB（ブロッキング緩衝液；100ml；定義を参照されたい）中でのインキュベーションによって「ブロック」する。1×BB（1ml）中でRLS粒子（200μlの上記の混合物）を、シールしたポーチ（Seal-A-Meal）中のフィルターに加え、そして穏やかに振盪しながら室温で1時間インキュベートする。未結合のRLS：抗体結合体を、穏やかに振盪しながら室温でBB（100ml）中で2回洗浄することによって除去した。可視化の前に、フィルターをガラススライド上で風乾する。
【0468】
試料中の病原体の視覚的同定：CCD画像処理装置中のキセノンアークランプからの光（詳細な説明の工程6に記載）を、フィルターの平面に対して傾斜した角度でフィルターに向ける。RLS粒子の2つのクラスに対応する励起フィルターおよび放射フィルターを使用して、2つを画像処理および加工する。実験手順は、対照フィルターを評価することによって評価する。クラミジア・トラコマチス対照フィルターは～1000個の赤色スポットを有し、ナイセリア・ゴノレエフィルターは同様の数の緑色スポットを有し、そして、陰性対照フィルター（大腸菌を含む）は、緑色または赤色のスポットを有していないはずである。最後に、臨床的な尿試料からの細胞を含むフィルターは、クラミジア・トラコマチスの存在（赤色スポット）、ナイセリア・ゴノレエの存在（緑色スポット）、混合感染（赤色および緑色スポット）およびクラミジア・トラコマチス/ナイセリア・ゴノレエ感染の非存在（陰性対照を超える統計学的に有意な数のスポットの欠如）について評価される。
【0469】
他の関連する適用：多くの関連する臨床的に重要な診断試験が、この実施例に記載されるものと同じ線に沿って容易に開発される。他の尿路病原体（例えば、大腸菌）についての試験が構築され得る。このような試験は、コンビナトリアル標識が使用される場合には、多数の病原体を含み得る。スワブ（swab）によって収集された試料を使用するクラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエ（および泌尿生殖器の他の感染因子）についての試験は、重要な関連する適用を表す（Isenberg、1992、前出）。例えば、尿道（男性または女性）、子宮頸部、および膣のスワブを使用して収集した資料は、泌尿生殖器病

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4793

原体診断のために重要である。スワブ上の試料は、これらの例において、フィルターまたはスライド上に直接的に塗布され得る。このような試験はまた、泌尿生殖器の重要なウイルス病原体（例えば、ヒトパピローマウイルス、1型単純ヘルペスウイルス、および2型単純ヘルペスウイルス、真菌（例えば、カンジダ）、ならびに寄生生物（例えば、膣トリコモナス））を診断するために価値があり得る。この実施例において使用される方法は（適切に修飾された試料収集技術と組み合わせて）、多くの異なるタイプの臨床試料（例えば、外科的創傷、血液、および呼吸器系の試料）に適用可能である。さらに、様々な種類のカテゴリー結合分子（例えば、抗体、mRNAについてのプローブ）と組み合わせて、同様の方法が非病原体分析物（罹患組織、血清タンパク質、および毒素を含む）に適用され得る。

【0470】

技術的変法：上述の試料収集および基材のバリエーションに加えて、本発明は、他の有用な技術的変法を取り込み得る。例えば、操作的により単純な試験が、蛍光団または蛍光粒子で標識した蛍光性カテゴリー特異的抗体を使用して構築され得る。このような試験は、いくつかの工程（例えば、ハイブリダイゼーション）を除外することを可能にする。多くのタイプのシグナリング分子（例えば、蛍光ナノ粒子、量子ドット、および慣習的な蛍光団）を取り込み、そしてCCDカメラを使用して自動的に画像処理できる。制限フラグメントサイズのカテゴリー特異的配列ではなく、いくつかの他の実施例に記載されるように、標識したオリゴヌクレオチドもまた使用され得る。この実施例のハイスループットの適用は、マイクロタイターフィルタープレート（例えば、384ウェルプレート）を組み入れ、ここでは、各ウェルが異なる試料を含むことができる。結合工程の後で、各ウェルのフィルター上の標識された細胞が、マイクロタイタープレートリーダーまたは光散乱を検出できるCCD画像処理装置を使用して画像処理され得る。

【0471】

他の実施態様

本願において参照されるすべての特許、特許出願、および刊行物は、本明細書に参照として組み入れられる。本発明の他の実施態様は、本明細書および本明細書中で開示される本発明の実施を考慮することから、当業者には明白である。本明細書および実施例は例示としてのみ見なされることを意図しており、本発明の真の範囲および精神は添付の特許請求の範囲によって示される。本明細書中に記載された方法に対して適用され得る他の実施態様の例は、2002年9月6日に出願された「RAPID AND SENSITIVE DETECTION OF REPLICATING CELLS」という標題の米国特許出願第_____号、および2002年9月6日に出願された「RAPID AND SENSITIVE DETECTION OF MOLECULES」という標題の米国特許出願第_____号において見い出される。これらの各々は、本明細書によって参考として組み入れられる。

【0472】

他の実施態様は特許請求の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

【0473】

（図１）CCDアレイを用いる個々のシグナル生成粒子の非拡大的な広域画像処理の原理を示す。この図は、CCDアレイ検出器を使用する個々の標的の画像処理の原理を示す。

（図２）非拡大的な広域画像処理を使用するM.ツベルクローシスの検出を示す。この図は、M.ツベルクローシス（結核を引き起こす細菌性の病原体）の存在について痰試料を走査する、本発明に基づく試験を示す。顕微鏡スライドへの痰試料の熱固定の後、この試料は、M.ツベルクローシスに特異的に結合する標識された抗体（抗MTB抗体）とともにインキュベートされる。結合していない抗体は、M.ツベルクローシス細菌に結合している抗体のみを残して除去される。この抗体は蛍光団で標識され、その結果、1種の光の色（励起スペクトル）で照射された場合に、第2の色を放射する（放射スペクトル）。励起スペクトルでスライドを照射することによって、細菌がスライドに固定されている部位に局在化している抗体が、放射スペクトルの光を放射することを可能にする。放射光はCCDチップのピクセルのアレイに焦点を合わせられる。蛍光性細菌の下にあるピクセルは照射され

、コンピュータに電子的シグナルを伝達し、ここで画像として保存される。ソフトウェアが画像を分析し、そしてユーザインターフェースが走査において見い出された細菌の数を報告する。

（図３）広域画像処理のためのCCD画像処理装置を示す。この図に示されたCCDに基づく画像処理装置は、実施例に記載されたデータの多くを収集するために使用された（詳細な記載の部分の工程6もまた参照されたい）。励起光は高強度の白色光源（1000ワットキセノンアークランプ、モデルA-6000、Photon Technology Incorporated, Monmouth Junction, NJ）から液体光導体（5mmコア直径；モデル380、Photon Technology Incorporated, Monmouth Junction, NJ）に導入することによって提供する。液体光導体は、光を励起フィルターホイール（BioPoint FW, Ludl Electronics, Hawthorne, NY）に運び、フィルターを通ったビーム（代表的には、9mm直径）を標識された標的を含む検出表面に方向付ける。この装置は、種々の検出表面（例えば、多孔性メンブレン、顕微鏡スライド、マイクロタイターディッシュ、カバーガラス、および、平らな光学的に透明な底を有するチューブ）上で標識された標的を検出し得る。入射光が検出表面に達し、カテゴリー結合分子を介して標的に結合しており、かつ光学的に透明な表面上に沈着しているシグナリング部分において蛍光を誘導する。放射された蛍光性の光の部分は、高集光効率レンズシステムによって集光され、そして放射フィルターホイールを通して、CCDカメラ（Orca II, Hamamatsu, Bridgewater, NJ）に伝達される。

（図４）非拡大的な広域画像処理のためのCCD画像処理システムを示す。この図は、角度を付けた照射の構成を有するCCD画像処理装置を示す。ここでは、光が、集光光学装置の側から一定の角度で検出表面（ここでは、マイクロタイタープレートのウェルの底として示される）に導入される。この角度は、集光の効率を最適化するため、および集光レンズによる入射ビームの妨害を避けるために選択される。この構成の利点は、試料ホルダーの底面からの反射が集光レンズによって集光されず、それゆえに蛍光バックグラウンドノイズに寄与しないということである。

（図５）コンビナトリアル標識を使用する、異なる病原体の検出を示す。複数のシグナリング部分（標識）を使用するコンビナトリアル標識が、高いシグナル複雑性を達成するために使用され得る（すなわち、多数の別個のシグナルシグニチャー；詳細な説明の項の工程2における議論もまた参照されたい）。図解において表されている3つの病原体の各々は、量子ドットの別個の組み合わせで標識される。従って、各病原体は、別個のコードされたシグナルを放出する（病原体の右側に色を付したカラーバーコードとして示すように）。示されるカテゴリー結合分子は、ゲノムDNAにハイブリダイズする病原体特異的オリゴヌクレオチドプローブである。各プローブは、蛍光性の量子ドットに結合体化されている。多くのタイプのカテゴリー結合分子（例えば、抗体、リガンド、PNAプローブなど）が他のタイプのシグナリング部分（蛍光団、蛍光粒子、RLS光散乱粒子など）が使用され得るのと同様に、コンビナトリアル標識のために使用され得る。

（図６）シグナル部分を結合体化するためのタグ相補物の使用を示す。この図は、カテゴリー特異的オリゴヌクレオチドカテゴリー結合分子を間接的に標識するための方法を示す。カテゴリー特異的結合部分およびタグ配列部分を含む二成分性のオリゴヌクレオチドが合成される。シグナリング部分は、タグ配列と相補的な、タグ相補物と呼ばれる第2のオリゴヌクレオチドと結合体化される。間接的な標識のためのこのシステムを使用して、タグを有するカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドのファミリーは、シグナリング部分の組み合わせで容易に合成およびコードされ得る。

（図７）蛍光性DNA結合染色剤で標識した個々の細菌の広域画像処理を示す。この図は、多孔性メンブレン支持体上で蛍光染色した個々の細菌細胞の検出を示す。細胞は、核酸染色剤シーバーグリーンIで染色し、そしてブラックポリカーボネートメンブレンを通して沪過した。蛍光シグナルは、CCDに基づく非拡大性の広域画像処理装置で、FITC光学フィルターセットを用いて画像処理した。左のパネルは、約100個の大腸菌細胞からの蛍光画像を示す。スポットの数は、メンブレンに加えた細胞の数と相関する。右のパネルは、細胞がメンブレンに加えられていない陰性対照を示す。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4795

（図８）種々のカテゴリー結合分子およびシグナリング部分で標識した個々の細菌細胞の広域画像処理を示す。この図は、カバーガラス上の大腸菌細胞が4種類のシグナリング部分（シーバーグリーンI、実施例2；蛍光団標識されたオリゴヌクレオチドプローブ、実施例3；蛍光団標識されたPNAプローブ、実施例4；蛍光団標識された抗体、実施例5）で標識された実験の結果を示す。個々の細胞は、図3に示された装置を使用して非拡大的な広域画像処理によって検出した。標識された細胞の希釈物は、ポリ-l-リジンでコートされたカバーガラス上にスポットした。標識された細胞をCCD画像処理装置を使用して画像処理した後、画像処理された物体は、蛍光顕微鏡によって、単一の細胞または偶発的ないくつかの細胞の群を含むことを確認した。画像の上のパネルは、CCD画像処理によって検出した場合の標識された細胞を示す。明るいスポットが標識された細胞に対応する。下のパネルは蛍光顕微鏡で見た場合（1000倍に拡大）の同じ標識された細胞を示す。

（図９）非拡大的な広域画像処理を使用する個々の生存可能な細菌細胞の検出を示す。この図は、本発明が、蛍光発生的に実行可能である染色剤を使用して生存している細菌を検出し得ることを示す。生存している大腸菌細胞（左のパネル）は、明るい蛍光スポットとして検出されたのに対して、死滅した大腸菌細胞（右のパネル）は、検出可能な蛍光シグナルを有しない。約400個の生存している大腸菌細胞が左のパネルの画像処理された領域中に存在し、約400の死滅した大腸菌細胞が左のパネルに存在する。

（図１０）蛍光性が高度の粒子で標識した個々の細菌の非拡大的な広域画像処理を示す。この図は、病原性大腸菌細胞がマイクロタイターディッシュウェルの光学的に透明な表面に結合され、蛍光粒子で標識し、そして非拡大的な広域画像処理を使用して画像処理した実験（実施例7）の結果を示す。大腸菌0157細胞（シーバーグリーンIで染色）は、熱を用いて96ウェルプレートの底に固定され、そして抗大腸菌0157抗体でコートされた蛍光粒子への結合によって標識された。左のパネルは、CCD画像処理装置で見られた細胞：粒子複合体を示す。中央のパネルは、低出力の蛍光顕微鏡法（50倍拡大）によって見られる同じ試料を示す。染色された大腸菌0157細胞は、高出力蛍光顕微鏡法（右のパネル；1000倍拡大）によって示されるような多数の蛍光粒子によって囲まれている。

（図１１）蛍光粒子：ウイルス：磁気粒子複合体の液相磁気選択、引き続いて非拡大的な広域画像処理を使用する、ウイルス（HCV）についての同種イムノアッセイ法を示す。この図は、液相試料中で、顕微鏡的な標的（この場合はC型肝炎ウイルス（HCV））について走査するための有用な方法を図示する。ウイルスに特異的に結合する抗体でコートされた磁気粒子および蛍光粒子は、潜在的にウイルスを含む試料とともにマイクロタイターディッシュのウェル中で混合される。次いで、試料中のウイルスはこれらの粒子に結合する。いくつかのウイルスは、図の突き出した拡大部分に表されるように、磁気粒子および蛍光粒子に結合する。この磁気粒子：ウイルス：蛍光粒子の複合体は、磁力または高度に蛍光性であることによって選択可能な特性を有する。マイクロタイターディッシュは磁石の上に置かれ、その結果、磁気粒子、ならびに磁気粒子と結合したHCVウイルスおよび蛍光粒子が、ウェルの光学的に透明な底面に引き付けられる。CCD画像処理装置（図3に示されるようなもの）を使用して、ウェルの底が画像処理される。ウイルス複合体は、ウイルスに結合する高度に蛍光性の粒子のために、画像中で明るいスポットとして見える。この画像のソフトウェア分析は、検出表面上の複合体の数を定量し、および標識された複合体由来のシグナルの全体の強度を積算する（同種イムノアッセイ法の結果を表す図8および図12を参照されたい）。

（図１２）非拡大的な広域画像処理を使用して個々の細菌を検出する同種イムノアッセイ法を示す。この図は、実施例8に記載される非拡大的な広域画像処理によって大腸菌を高感度に検出するイムノアッセイ法の結果を示す。カテゴリー特異的抗体でコートされた磁気粒子および蛍光粒子は、最初に細菌細胞に結合され、次いで、この複合体は、磁力を使用して光学的に透明なウェルの底面（検出領域）に引き付けられ、そしてこの複合体は、非拡大的な広域CCDに基づく画像処理を使用して検出された。この図は、血液における同種イムノアッセイ法の結果（一番下のパネル）、ならびに血液（一番上のパネル）と緩衝液（中央のパネル）の両方における同種でない（洗浄した）イムノアッセイ法の結果

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4796

の比較を示す。最も単純な形式である、同種免疫アッセイは、優れたシグナル対バックグラウンド比で細胞を効果的に検出した（図の最も下の右側のパネルにおける同種アッセイ法の定量を参照されたい）。

最も左のパネルは、非拡大的な、広域CCDに基づく画像処理を使用して得られた画像を示す。3つすべてのアッセイ法が、大腸菌の存在する場合に強力なシグナルを与えたが（左のパネル）、大腸菌が加えられなかった場合には、低いバックグラウンドシグナルであった。CCDカメラを使用して得られたシグナルが、粒子でコートした大腸菌細胞に一致することは、高解像度の蛍光顕微鏡分析（1000倍；上の2つの列、最も右の2つのカラム）を使用してさらに確認された。大腸菌細胞、磁気粒子、および蛍光粒子を含む代表的な複合体の画像が示される。各複合体の2つの画像は2つのフィルターセットを使用して作製された：1つはDNA蛍光についてのもの（シーバーグリーンI；右から2つめのパネル）および1つは蛍光粒子の可視化についてのもの（最も右のパネル）である。この図は、この複合体が磁気粒子および蛍光粒子によって取り囲まれた大腸菌細胞からなることを示す。画像の定量的分析は、蛍光物体の数を計数し（図12、一番下のパネル、左の棒グラフ）、および物体のすべての強度を積算する（図12、一番下のパネル、右の棒グラフ）ソフトウェアによって実行された。示されるデータは6つの試料の分析を表す：1000個の大腸菌細胞を含む3つの試料および細胞を含まない3つの試料である。両方の測定において、大腸菌（1000個の細胞）を含む試料は、大腸菌を含まない試料よりも有意に高いスコアであった。棒の高さは、3つの試料の平均値を示す。エラーバーは3つの試料の平均値からの3つの標準偏差を示す。

さらなる詳細および議論については、実施例8を参照されたい。

（図１３）「模擬痰」中における抗酸染色マイコバクテリアの広域画像処理を示す。この図は、実施例9において記載される試験の結果を示す。ここでは、結核を引き起こす病原体に密接に関連しているマイコバクテリアの株が、非拡大的な広域画像処理と組み合わせた抗酸バチルス（AFB）染色法を使用して検出された。「模擬痰」中にマイコバクテリア細胞（マイコバクテリア・スクロフラセウム；左のパネル：1A、2A）または大腸菌（右のパネル：1B、2B）のいずれかを含む市販のスライドガラスは、オーラミン-ローダミンで染色し、そして非拡大的な、広域の、CCDに基づく画像処理を使用して可視化した（一番上のパネル：1A、1B）。大腸菌を含む試料におけるはるかに少ないバックグラウンドスポット数と比べて、多数の対象物がマイコバクテリア細胞を含む試料中で検出された。蛍光顕微鏡分析（400倍；一番下のパネル：2A、2B）は、CCDカメラを用いて、拡大なしでキャプチャーされたシグナルが単一のマイコバクテリア細胞に対応することを確認した。

（図１４）広域画像処理を使用する迅速な抗微生物剤感受性試験を示す。この図は、非拡大的な広域画像処理を使用することによって、大腸菌の増殖に対する抗微生物剤の最小阻害濃度（MIC）を決定するために設計された実験の結果を示す（実施例10）。種々の時間点における2連の細胞のアリコートは、LB寒天上で培養され、そしてCCD画像処理装置（図3）を使用する画像処理のために96ウェルマイクロタイターディッシュのウェルの光学的に透明な表面上に沈着される。増殖（図中では、+/-の記号で定性的に表示される）は、LB寒天プレート上のコロニーを計数することで測定され（図には示していない）、そしてCCDカメラによってキャプチャーされた画像の対象物および強度を測定することで測定される。18時間の培養時間の点は、NCCLS標準プロトコールに対応する。4時間培養の結果および4時間のCCD画像処理結果もまた示される。培養およびCCD画像処理によって検出されるような、耐性株および感受性株の増殖に関し抗生物質濃度依存性を比較することにより、2つのアプローチが比較できることが示される。

（図１５）磁気的に選択された、個々に蛍光標識されたカンジダ・アルビカンス細胞の広域検出を示す。この図は、実施例11に記載される実験の結果を示す。C.アルビカンス細胞は、核酸染色剤（YOYO-1）およびウサギ抗カンジダポリクローナル抗体であらかじめ標識された。標識された細胞は、ガラス底のマイクロタイタートレイのウェル中で、ヤギ抗ウサギIgG抗体でコートされた磁気粒子に加えられた。細胞は、磁場の適用によって、ウェルの底にわたって均一に整列された。細胞は、CCD画像処理装置ならびに、YOYO-1蛍

光色素のために適切な励起フィルターおよび放射フィルター（FITCセット、480/40nm励起、535/50nm放射）を使用して、ウェルの底面全体を画像処理することによって検出された。

C.アルビカンス細胞を含むマイクロタイタートレイのウェルの非拡大的な広域CCD画像は、記載されるようにYOYO-1で染色された。蛍光シグナル（図中の白いスポット）は、高解像度の拡大（1000倍）の下で蛍光顕微鏡でマイクロタイターウェルを調べることによって単一または小さな群のC.アルビカンス細胞に対応することが示された。

C.アルビカンス細胞が加えられていないマイクロタイタートレイウェルの非拡大的な広域CCD画像（陰性対照）。

（図１６）蛍光性および常磁性のポリスチレン粒子に特異的に結合する個々のカンジダ・アルビカンス細胞の広域検出を示す。この図は、実施例12に記載される実験の結果を示す。細胞は、マイクロタイターディッシュ中で、抗カンジダ抗体でコートされた磁気粒子および赤色蛍光粒子の混合物に加えられた。磁石に結合した細胞は、磁場および流体洗浄の適用によって未結合の粒子から分離された。細胞-蛍光粒子複合体は、CCD画像処理装置（AおよびB）または蛍光顕微鏡法（C-E）ならびに蛍光粒子のための適切な励起フィルターおよび放射フィルターを使用して、ウェルの全体の底面を画像化することによって検出された。

A．複数の赤色蛍光粒子で標識されたC.アルビカンス細胞を含むマイクロタイターウェルの非拡大的な広域CCD画像。

B．C.アルビカンス細胞が加えられていないマイクロタイターウェルの非拡大的な広域CCD画像（陰性対照）。

C．Aにおいて十分に画像化されたのと同じウェルの領域の拡大的な蛍光顕微鏡画像（100倍拡大）。単一または小さな塊のC.アルビカンス細胞（緑色染色）が複数の赤色蛍光粒子によって取り囲まれている。

D．Bにおいて十分に画像化されたのと同じウェルの領域の拡大的な蛍光顕微鏡画像（100倍拡大）（細胞が加えられていない陰性対照）。

EおよびF．Aにおいて示されるのと同じ試料の領域の高解像度増幅（1000倍）蛍光顕微鏡画像。C.アルビカンス細胞（約5μm直径、緑色染色）が、複数の1μm直径の赤色蛍光粒子によって取り囲まれている。磁気粒子は見られない。

（図１７）蛍光抗体および磁気粒子に特異的に結合した個々のカンジダ・アルビカンスの広域検出を示す。この図は、実施例13に記載される実験の結果を示す。C.アルビカンス細胞は、ガラス底のマイクロタイタートレイのウェル中で、抗C.アルビカンス抗体または大腸菌抗体でコートされた磁気粒子と混合された。30分後、蛍光団標識された抗C.アルビカンス抗体または大腸菌抗体を加えた。磁気複合体は洗浄され、次いで、磁場の適用によって、ウェルの底にわたって均一に整列された。細胞は、本発明のCCD画像処理装置ならびに蛍光団のための適切な励起フィルターおよび放射フィルターを使用して、ウェルの全体の底面を画像化することによって検出された。

A．蛍光性抗C.アルビカンス抗体で標識されたカンジダ・アルビカンス細胞を含む反応ウェルの非拡大的な広域CCD画像。

B．細胞が加えられていない反応ウェルの非拡大的な広域CCD画像（陰性対照）。

C．蛍光性抗大腸菌抗体で標識された大腸菌細胞を含む反応ウェルの非拡大的な広域CCD画像。

D．細胞が加えられていない反応ウェルの非拡大的な広域CCD画像（陰性対照）。注記：点状の蛍光シグナルは、赤色蛍光性核酸結合色素（YOYO-3）を用いる染色および高解像度拡大（1200倍）下での蛍光顕微鏡におけるマイクロタイターウェルの検査による、単一または小さな群の細胞に対応することが示された。

（図１８）CCDカメラを使用した、個々の化学発光酵母細胞の非拡大的な広域検出を示す。この図は、実施例14に記載される実験の結果を示す。C.アルビカンス細胞は、FITC結合抗C.アルビカンス抗体で標識され、これは、次には、抗フルオレセイン抗体：アルカリホスファターゼ結合体に結合される。標識された細胞の希釈物は、ナイロンメンブレン

でコートされたスライド上にスポットされ、そして化学発光基質CDPスターが添加された。細胞は、CCD画像処理装置において拡大なしで画像処理された。単一の細胞の位置は、蛍光顕微鏡法によって確認された。左から右に、パネルは、およそ200、60、および20の個々のC.アルビカンス細胞を表す。多くの個々の細胞は、中央および右のパネル中に画像化されている。より大きく明るいスポットは、互いに近接している2つまたはそれ以上の細胞を表す。

（図１９）インスタントフィルムの直接的な露出を使用した、個々の化学発光酵母細胞の非拡大的な広域検出を示す。この図は、実施例15に記載される実験の結果を示す。C.アルビカンス細胞は、FITC結合抗C.アルビカンス抗体で標識され、これは、次には、抗フルオレセイン抗体：アルカリホスファターゼ結合体に結合された。標識された細胞の希釈物は、ナイロンメンブレン上にスポットされ、そして化学発光基質CDPスターが添加された。ナイロンメンブレンは、スポットライトカメラ（Boston Probe）上にロードされ、そしてASA 2000ポラロイドフィルム（Polaroid Film）で画像化した。

左から右に、パネルは、図15と同様に、およそ200、60、および20の個々のC.アルビカンス細胞を表す。各パネルにおいてスポットされた細胞の数が与えられるが、そのスポットの多くは個々の細胞、とりわけ、最も右のパネルにある細胞を表すことが結論され得る。

（図２０）非拡大的な広域画像処理を使用した、下気道感染に関与する生物の検出を示す。この図は、実施例16に記載される、蛍光標識された下気道生物から生成したシグナルを高感度で検出する非拡大的な広域画像処理を使用してキャプチャーされた画像の結果を示す。この図は、種々の下気道病原体からの非拡大的な広域画像処理を使用して生成されたシグナルを示す（左寄りの2つのパネル）。上から下に、クラミジア・ニューモニエ、マイコプラズマ・ニューモニエ、およびレジオネラ・ニューモフィラである。右寄りの2つのパネルは蛍光顕微鏡法を使用して得られた画像を示す。

（図２１）非拡大的な広域画像処理を使用して、3つの異なる微生物について1つの試料を同時に走査する、多重化直接蛍光イムノアッセイ法を示す。この図は、実施例17に記載される実験の結果を示す。3種類の異なる微生物（大腸菌、C.アルビカンス、およびS.ピオゲネス）を含む3つの試料はカバーガラスに固定され、そしてカテゴリー特異的（この場合、種特異的）抗体の集合とともにインキュベートされた。集合中の各抗体のファミリーは、異なる蛍光団と結合体化された（大腸菌＝緑色、C.アルビカンス＝青色、S.ピオゲネス＝赤色）。非結合の抗体を洗い流した後で、試料の画像は3つの異なるフィルターセット（緑色、青色、および赤色のチャンネル）を使用してキャプチャーされた。3つすべての試料について、最も強いシグナルが、試料中の微生物に結合する標識された抗体に対応するチャンネル中で得られた。

（図２２）アデノウイルスについての固相捕捉アッセイ法を示す。この図は、ウイルスを捕捉するために固相に結合した抗体を使用してアデノウイルスについて試料を走査する試験の結果を示す。マイクロタイタープレートのウェルは、抗アデノウイルス抗体でコートされた。固定されたアデノウイルス試料または固定されたRSV試料は、抗アデノウイルスコートされた蛍光粒子とともにウェルに添加された。1時間のインキュベーション後、すべての未結合の粒子が洗い流され、そして残りの結合粒子が、CCD画像処理装置において拡大なしで可視化された。

陰性対照（RSVのパネル）は、ウェルに残存する非常に少量の粒子を示す。アデノウイルスのパネルにおいて、抗アデノウイルスコートされたウェル、アデノウイルス、および抗アデノウイルスコートされた粒子の相互作用によって、何千もの蛍光粒子がウェル中に捕捉された。

（図２３）血中のウイルスの固相捕捉を示す。この図は、固相に結合した抗体を使用してウイルスを捕捉する、アデノウイルスに関し血液試料の走査用に使用された試験の結果を示す（実施例19）。マイクロタイタープレートのウェルは、抗アデノウイルス抗体でコートされた。固定されたアデノウイルス試料または固定されたRSV試料は、50%マウス血液中でウェルに添加された。1時間のインキュベーション後、すべての未結合の粒子が洗い流され、そして抗アデノウイルスコートされた蛍光粒子がウェルに添加された。洗浄

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4799

後、結合した粒子は、CCD画像処理装置において拡大なしで可視化された。陰性対照（RSVのパネル）は、ウェルに残存する非常に少量の粒子を示す。アデノウイルスのパネルにおいて、抗アデノウイルスコートされたウェル、アデノウイルス、および抗アデノウイルスコートされた粒子の相互作用によって、何千もの蛍光粒子がウェル中に捕捉された。アデノウイルス捕捉フェーズにおいて血液の存在はアッセイを妨害しなかった。

（図２４）アデノウイルスの液相アッセイ法を示す。この図は、「二重粒子」試験形式を使用してアデノウイルスを検出する試験の結果を示す（実施例20、図11の図解もまた参照されたい）。固定されたアデノウイルスおよび固定されたRSVは、抗アデノウイルスコートされた磁気粒子および蛍光粒子と混合された。4時間インキュベートした後、磁気粒子および任意の結合粒子が他の物資から分離され、マイクロタイタープレートに移され、そしてCCD画像処理装置において拡大なしで可視化された。

アデノウイルスのパネルは、アデノウイルスとのそれらの相互作用によって、磁気粒子によって捕捉された抗アデノウイルスコートされた何千もの蛍光粒子を示す。非常に少ない蛍光粒子がRSVパネルにおいて捕捉された。

（図２５）細菌およびウイルスについて同時に走査する多重化広域画像処理イムノアッセイを示す。この図は、大腸菌およびアデノウイルスの存在について試料を同時に走査する試験を用いた実験の結果を示す（実施例22）。抗アデノウイルスコートされた赤色蛍光粒子および磁気粒子、ならびに抗大腸菌コートされた緑色蛍光粒子および磁気粒子は、固定されたアデノウイルスの存在下、固定された大腸菌の存在下、両方の存在下、またはそのいずれも非存在下において混合された。1時間のインキュベーションの後、磁気粒子および任意の結合粒子が他の物質から分離され、マイクロタイタープレートに移され、そしてCCD画像処理装置において拡大なしで可視化された。

1番目の行：アデノウイルスのみが粒子混合物に加えられた。シグナルの大部分はテキサスレッドフィルターセットを用いて観察できた。このフィルターセットは、赤色蛍光抗アデノウイルス粒子を可視化する。

2番目の行：大腸菌のみが粒子混合物に加えられた。シグナルの大部分はFITCフィルターセットを用いて観察できた。このフィルターセットは、緑色蛍光抗大腸菌粒子を可視化する。

3番目の行：アデノウイルスと大腸菌の両方が混合物に加えられた。シグナルは、テキサスレッドフィルターセットとFITCフィルターセットの両方を用いて観察できた。

（図２６）非拡大的な広域画像処理を使用した、単一の細菌を検出するためのフィルターフロースルーアッセイ法を示す。この図は、液体試料中の単一の分散している細菌を検出する迅速な「フロースルー」アッセイ法の結果を示す（実施例23）。2枚のニトロセルロースメンブレンは、抗大腸菌0157抗体中に浸され、そして乾燥された。1枚のフィルターが蛍光性大腸菌特異的粒子とともにプレインキュベートされた大腸菌細胞を収集するために使用された（「大腸菌」；これらの粒子は大腸菌0157:H7特異的抗体でコートされた）。大腸菌特異的な粒子を含むが大腸菌細胞を含まない試料は他のフィルターを通した（「大腸菌なし」）。未結合の粒子はフィルターを洗浄することによって除去された。CCD画像処理装置は、非拡大的な広域画像処理を使用して蛍光シグナルを検出するために使用された（一番上のパネル）。2つのフィルターの、確認のための顕微鏡画像が中央のパネル（50倍拡大）および一番下のパネル（100倍拡大）に示される。

（図２７）蛍光発生性エステラーゼ基質を用いて染色した細胞の広域画像処理を使用して行う細菌の定量を示す。

目的：多くの応用において、生きている細菌細胞を定量するために広いダイナミックレンジを有することは有用である。理想的なシステムでは、0または1個の細菌細胞から数100万または数1000万個までの細胞を正確に計数でき、従って、慣習的な微生物学的プレーティング方法のためにかかせない段階希釈と、それに特有の正確性の欠如とを除外することができる。この実施例において、本発明者らは、CCDに基づく非拡大的な広域画像処理と連関した、蛍光発生性の基質を用いる生細胞の染色が、どのようにして、少なくとも5桁の大きさにわたる細胞の定量に使用され得るかを示す。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4800