

(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2009-520210

(P2009-520210A)

(43) 公表日 平成21年5月21日(2009.5.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 D	2 GO 4 1
GO 1 N 30/72 (2006.01)	GO 1 N 27/62 X	
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	
	GO 1 N 30/72 G	
	GO 1 N 30/88 J	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁)

(21) 出願番号 特願2008-547420 (P2008-547420)
 (86) (22) 出願日 平成18年12月19日 (2006.12.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年8月15日 (2008.8.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/048344
 (87) 国際公開番号 W02008/005043
 (87) 国際公開日 平成20年1月10日 (2008.1.10)
 (31) 優先権主張番号 60/751, 715
 (32) 優先日 平成17年12月19日 (2005.12.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

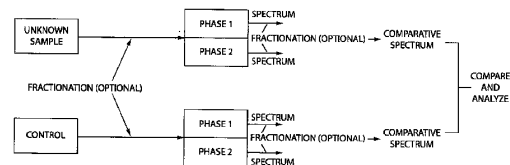
(71) 出願人 504181812
 アナリザ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 オハイオ 44140,
 ベイ ビレッジ, グレン パーク ド
 ライブ 408
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 チェイト, アーノン
 アメリカ合衆国 オハイオ 44140,
 ベイ ビレッジ, グレン パーク ド
 ライブ 408

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スペクトルバイオマーカーのようなデータパターンに関するシステムおよび方法

(57) 【要約】

本発明は一般的に混合物 1 個以上中の分子及び/又は生体分子の分離、分画、及び/又は、特徴化に関する。分画後、分配系の異なる相をスペクトル分析、クロマトグラフィー等のような分析手法により分析することにより、分画後の種のスペクトル又は他の象徴的な表示、及び、マーカーとして、或いは混合物中の分子の存在度の元のレベルとは独立した情報を包含する試料に関する情報を別様に提供するものとして比較スペクトルを定義するために比較される種々の分画/相のスペクトルを作成することができる。種々の試料の比較スペクトルを相互に、及び/又は、対照又はレファレンススペクトル及び/又は比較スペクトルと比較することにより種々の情報を決定することができる。一部の実施形態においては、種の混合物におけるパターン、及び/又は、第2の混合物における種の相当するパターンを発見及び/又は同定するために使用できる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

複数種の少なくとも 1 つの特徴を決定する方法であって、下記工程：

少なくとも第 1 及び第 2 の相を包含する水性分配系に複数種を曝露すること；

質量スペクトル分析を使用して、水性分配系の第 1 の相に関連する 1 つ以上の種の第 1 の試料から累積スペクトル情報を含む第 1 のスペクトルデータパターンを得ること；

質量スペクトル分析を使用して、以下のもの、即ち (1) 水性分配系の第 2 の相に関連する 1 つ以上の種の第 2 の試料、又は (2) 曝露工程の前の複数種の一部、の 1 つ以上から第 2 のスペクトルデータパターンを得ること；及び、

第 1 のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分を第 2 のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分と比較することにより複数種の少なくとも 1 つの特徴を決定すること；

を含む、方法。

【請求項 2】

水性分配系に少なくとも 1 つの種を曝露した後に、複数種における少なくとも 1 つの種のアイデンティティーを決定することなく方法を実施することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

水性分配系に複数種を曝露した後に、複数種の何れかのレベル、存在度、濃度及び / 又はアイデンティティーを決定することなく方法を実施することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

水性分配系に複数種を曝露した後に、複数種の何れかのレベル、存在度、濃度及び / 又はアイデンティティーに関する情報を使用することなく方法を実施することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

水性分配系に少なくとも 1 つの種を曝露する前に、複数種における少なくとも 1 つの種のアイデンティティーを決定することなく方法を実施することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

水性分配系に複数種を曝露する前に、複数種の何れかのレベル、存在度、濃度及び / 又はアイデンティティーを決定することなく方法を実施することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

水性分配系に複数種を曝露する前に、複数種の何れかのレベル、存在度、濃度及び / 又はアイデンティティーに関する情報を使用することなく方法を実施することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

水性分配系に少なくとも 1 つの種を曝露する前又は後に、複数種における少なくとも 1 つの種のアイデンティティーを決定することなく方法を実施することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

水性分配系に複数種を曝露する前又は後に、複数種の何れかのレベル、存在度、濃度及び / 又はアイデンティティーを決定することなく方法を実施することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

水性分配系に複数種を曝露する前又は後に、複数種の何れかのレベル、存在度、濃度及び / 又はアイデンティティーに関する情報を使用することなく方法を実施することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

水性分配系に複数種を曝露する前又は後に、複数種の何れかのレベル、存在度、濃度及び / 又はアイデンティティーに関する情報を使用することなく方法を実施することを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

水性多相分配系が少なくとも3つの相を含有する、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

下記工程：

第1のスペクトルデータパターンと第2のスペクトルデータパターンとを比較することにより比較パターンを定義すること；及び、

比較パターンをレファレンスパターンと比較することにより少なくとも1つの特徴を決定すること；

を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

比較の作業が、少なくとも2つのデータパターンのポイント・バイ・ポイントの比較において、第1のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分を第2のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分と比較することを含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項14】

水性分配系への複数種の曝露の作業の前に複数種をまず分画する、請求項1に記載の方法。

【請求項15】

複数種が患者から生じるものである、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

第2のデータパターンが対照である、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

第1のスペクトルデータパターンを得る作業より前に一定期間、第2のデータパターンを電子的に格納する、請求項16に記載の方法。

20

【請求項18】

第1の相と第2の相との間で複数種のある種の分配係数を決定することなく、第1及び第2のデータパターンを比較する、請求項1に記載の方法。

【請求項19】

複数種が異なる化学組成の複数種を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

複数種が同一の化学組成の複数種を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項21】

複数種が構造的な相違に基づいて第1の相と第2の相との間で分配する、請求項1に記載の方法。

30

【請求項22】

比較の作業が生物学的系の状態を決定するために第1のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分を第2のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分と比較することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項23】

状態が生理学的状態である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

第2のデータパターンが一有機体の未知の状態を示す試料を表すものであり、そして第2のデータパターンが有機体の正常な状態及び異常な状態の両方を示す試料から誘導される、請求項1に記載の方法。

40

【請求項25】

第1の試料及び第2の試料を、同時に一有機体から採取する、請求項1に記載の方法。

【請求項26】

第1の試料及び第2の試料を、異なる時間に一有機体から採取する、請求項1に記載の方法。

【請求項27】

第1の試料及び第2の試料を、同一個体の生物学的有機体から採取する、請求項1に記載の方法。

50

【請求項 28】

第1の試料及び第2の試料を、ある生理学的状態を有する同一個体から採取する、請求項1に記載の方法。

【請求項 29】

第1の試料及び第2の試料を、ある生理学的状態を有する異なる個体から採取する、請求項1に記載の方法。

【請求項 30】

複数種の何れかの化学的アイデンティティ又は生物学的アイデンティティを決定することなく方法を実施する、請求項1に記載の方法。

【請求項 31】

水性分配系の少なくとも1つの相が水性である、請求項1に記載の方法。

【請求項 32】

水性分配系の各相が水性である、請求項1に記載の方法。

【請求項 33】

少なくとも1つの相が重合体を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 34】

少なくとも1つの相が塩を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 35】

少なくとも1つの相が界面活性剤を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 36】

複数種の少なくとも1つの種が生体分子である、請求項1に記載の方法。

【請求項 37】

複数種の少なくとも1つの種が蛋白である、請求項1に記載の方法。

【請求項 38】

複数種の少なくとも1つの種が医学的状态に関する被疑マーカーである、請求項1に記載の方法。

【請求項 39】

複数種の少なくとも1つの特徴を決定する方法であって、下記工程：

複数種を少なくとも第1及び第2の相互作用成分に曝露することにより複数種を少なくとも部分的に分離すること；

質量スペクトル分析を使用して、少なくとも部分的に分離された複数種の第1の試料を処置することにより第1のスペクトルデータパターンを作成すること；

質量スペクトル分析を使用して、以下のもの、即ち(1)第1の試料と同一ではない少なくとも部分的に分離された複数種の第2の試料、又は(2)曝露行程前の複数種の一部、の1つ以上を処置することにより第2のスペクトルデータパターンを作成すること；及び、

第1のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分を第2のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分と比較することにより複数種の少なくとも1つの特徴を決定すること；

を含む、方法。

【請求項 40】

少なくとも第1及び第2の相互作用成分に少なくとも1つの種を曝露する前又は後に、複数種における少なくとも1つの種のアイデンティティを決定することなく方法を実施することを含む、請求項39に記載の方法。

【請求項 41】

少なくとも第1及び第2の相互作用成分に複数種を曝露する前又は後に、複数種の何れかのレベル、存在度、濃度及び/又はアイデンティティを決定することなく方法を実施することを含む、請求項39に記載の方法。

【請求項 42】

少なくとも第1及び第2の相互作用成分に複数種を曝露する前又は後に、複数種の何れか

10

20

30

40

50

のレベル、存在度、濃度及び/又はアイデンティティに関する情報を使用することなく方法を実施することを含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 43】

下記工程：

第 1 のスペクトルデータパターンと第 2 のスペクトルデータパターンとを比較することにより比較パターンを定義すること；及び、

比較パターンをレファレンスパターンと比較することにより少なくとも 1 つの特徴を決定すること；

を含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 44】

比較の作業が、少なくとも 2 つのデータパターンのポイント・バイ・ポイントの比較において、第 1 のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分を第 2 のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分と比較することを含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 45】

第 1 の相互作用成分が第 2 の相互作用成分中で非混和性である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 46】

第 1 の相互作用成分が液体であり、そして第 2 の相互作用成分が液体である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 47】

第 1 の相互作用成分が液体であり、そして第 2 の相互作用成分が固体である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 48】

第 1 及び第 2 の相互作用成分がクロマトグラフィー系の成分を定義する、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 49】

複数種の少なくとも 1 つの特徴を決定する方法であって、下記工程：

少なくとも第 1 及び第 2 の相を包含する水性分配系に複数種を曝露すること；

水性分配系の第 1 の相に関連する 1 つ以上の種の第 1 の試料から累積情報を含む第 1 のデータパターンを得ること；

以下のもの、即ち (1) 水性分配系の第 2 の相に関連する 1 つ以上の種の第 2 の試料、又は (2) 曝露行程の前の複数種の一部分、の 1 つ以上を処置することにより累積情報を含む第 2 のデータパターンを得ること；及び、

第 1 のデータパターンの少なくとも一部分を第 2 のデータパターンの少なくとも一部分と比較することにより複数種の少なくとも 1 つの特徴を決定すること；

を含む、方法。

【請求項 50】

第 1 のデータパターンを得る作業が、第 1 の試料に関連するデータを数学的に処理して第 1 のデータパターンを得ることを含む、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

第 1 のデータパターンの少なくとも一部分を第 2 のデータパターンの少なくとも一部分と比較する作業が、第 1 及び第 2 の試料に関連するデータを数学的に処理することを含む、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 52】

少なくとも 1 つの特徴を決定する前に第 1 のデータパターン及び第 2 のデータパターンの少なくとも 1 つを数学的に処理する、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 53】

第 1 のデータパターンを得る作業が、質量スペクトル分析を用いて第 1 の試料を処置することである、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 54】

10

20

30

40

50

第 2 のデータパターンを得る作業が、質量スペクトル分析を用いて第 1 の試料を処置することである、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 55】

第 1 のデータパターンを得る作業が、クロマトグラフィーを用いて第 1 の試料を処置することである、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 56】

第 2 のデータパターンを得る作業が、クロマトグラフィーを用いて第 1 の試料を処置することである、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 57】

複数種の少なくとも 1 つの特徴を決定する方法であって、下記工程：

少なくとも 2 相を包含する第 1 の系の少なくとも第 1 の相及び第 2 の相をそれぞれ定義する、少なくとも第 1 及び第 2 の相互作用成分に複数種を曝露すること；

曝露後の系の第 1 の相に関連する複数種から累積スペクトル情報を含む第 1 のスペクトルデータパターンを得ること；

下記成分：

曝露後の系の第 2 の相に関連する複数種に由来する累積スペクトル情報、及び / 又は

系への曝露前の複数種に由来する累積スペクトル情報；

を含む第 2 のスペクトルデータパターンを得ること；及び、

第 1 のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分と第 2 のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分との比較から累積スペクトル情報を誘導することにより複数種の特徴を決定すること；

を含む、方法。

【請求項 58】

系への種の曝露後に、第 1 又は第 2 の相における複数種の少なくとも 1 つの種のアイデンティティを決定することなく方法を実施することを含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

系への種の曝露後に、第 1 又は第 2 の相における複数種の何れかのレベル、存在度、濃度又はアイデンティティを決定することなく方法を実施することを含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 60】

複数種の特徴を決定するために、系への種の曝露後に、第 1 又は第 2 の相における複数種の何れかのレベル、存在度、濃度又はアイデンティティに関する情報を使用することなく方法を実施することを含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 61】

系への種の曝露前に、複数種における少なくとも 1 つの種のアイデンティティを決定することなく方法を実施することを含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 62】

系への種の曝露前に、複数種の何れかのレベル、存在度、濃度又はアイデンティティを決定することなく方法を実施することを含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 63】

複数種の特徴を決定するために、系への種の曝露前に、第 1 又は第 2 の相における複数種の何れかのレベル、存在度、濃度又はアイデンティティに関する情報を使用することなく方法を実施することを含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 64】

系への種の曝露の前又は後に、複数種における少なくとも 1 つの種のアイデンティティを決定することなく方法を実施することを含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 65】

系への種の曝露の前又は後に、複数種の何れかのレベル、存在度、濃度又はアイデンティティを決定することなく方法を実施することを含む、請求項 57 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 6】

複数種の特徴を決定するために、系への種の曝露の前又は後に、第 1 又は第 2 の相における複数種の何れかのレベル、存在度、濃度又はアイデンティティーに関する情報を使用することなく方法を実施することを含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 7】

第 1 の系に複数種を曝露することが、少なくとも 2 相を包含する分配系の第 1 の相と第 2 の相との間で複数種を分配することを含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 8】

分配系が更に少なくとも第 3 の相を含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

下記工程：

第 1 のスペクトルデータパターンと第 2 のスペクトルデータパターンとを比較することにより比較スペクトルを定義すること；及び、

比較スペクトルをレファレンス比較スペクトルと比較することにより特徴を決定すること；

を含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 7 0】

比較スペクトルが 2 スペクトルのポイント・バイ・ポイントの分割を含むことにより分配係数のスペクトルを含むことになる、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 7 1】

比較スペクトルを誘導する前にスペクトルデータをまず数学的に処理する、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 7 2】

複数種の特徴を決定する前に比較スペクトルデータを数学的に処理する、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 7 3】

分配系に接触させる前に複数種をまず分画する、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 7 4】

分配系に接触させることにより得られる複数種を更に、スペクトル分析前に分画する、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 7 5】

比較スペクトルが患者由来の試料に関連するものであり、そして、レファレンス比較スペクトルが対照である、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 6】

請求項 1 の方法に従ってレファレンス比較スペクトルを得る、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 7】

請求項 1 3 の比較プロセスの前の一定期間、レファレンス比較スペクトルを電子的に格納する、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

第 1 のスペクトルデータパターンが質量スペクトルを含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

第 2 のスペクトルデータパターンが質量スペクトルを含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 8 0】

第 1 及び第 2 のスペクトルデータパターンがクロマトグラフィー溶出プロファイルを含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 8 1】

第 1 の相と第 2 の相との間の種の分配係数を決定することなく第 1 及のスペクトルパターンと第 2 のスペクトルデータパターンとを比較する、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 8 2】

複数種が異なる化学組成の複数種を含む、請求項 5 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8 3】

複数種が同一の化学組成の複数種を含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 8 4】

複数種が構造的相違に基づいて異なる相の間では異なって分配する、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

第 1 のスペクトルデータパターンと第 2 のスペクトルデータパターンとを比較することにより生物学的系の状態を決定することを含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 8 6】

状態が生理学的状態である、請求項 8 5 に記載の方法。

10

【請求項 8 7】

比較スペクトルが一有機体の未知の状態を示す試料を表すものであり、そしてレファレンス比較スペクトルが有機体の正常な状態及び異常な状態の両方を示す試料から誘導される、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 8 8】

複数種及び比較スペクトルの入手元である試料が同時に有機体から採取される、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

複数種及び比較スペクトルの入手元である試料が異なる時点において有機体から採取される、請求項 8 7 に記載の方法。

20

【請求項 9 0】

複数種及び比較スペクトルの入手元である試料が同一個体の生物学的有機体から採取される、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 1】

比較スペクトルがある生理学的状態を有する同一個体から得られた比較スペクトルの平均である、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 2】

比較スペクトルがある生理学的状態を有する異なる個体から得られた比較スペクトルの平均である、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 3】

複数種の何れかの化学的なアイデンティティ又は生物学的なアイデンティティを決定することなく方法を実施する、請求項 8 7 に記載の方法。

30

【請求項 9 4】

分配系の第 1 の相及び第 2 の相の少なくとも 1 つが水性である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 9 5】

第 1 の分配系の第 1 の相及び第 2 の相の各々が水性である、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

分配系が水性多相系である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 9 7】

分配系の第 1 の相及び第 2 の相の少なくとも 1 つが重合体を含む、請求項 5 7 に記載の方法。

40

【請求項 9 8】

分配系の第 1 の相及び第 2 の相の少なくとも 1 つが塩を含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

分配系の第 1 の相及び第 2 の相の少なくとも 1 つが界面活性剤を含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

複数種の少なくとも 1 つの種が生体分子である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

50

複数種の少なくとも1つの種が蛋白である、請求項100に記載の方法。

【請求項102】

複数種の少なくとも1つの種が医学的状態に関する被疑マーカーである、請求項57に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本願は、Chaitらにより2005年12月19日に出願された米国仮特許出願第60/751,715号(発明の名称「Systems and Methods Involving Spectral Biomarkers」)の利益を主張し、この出願は、本明細書中に参考として援用される。

10

【0002】

(発明の分野)

本発明は一般的に身体試料の特徴化を試料の少なくとも1つの成分又は種の分析から行うことに関する。一部の特定の実施形態においては、本発明は試料内の種の分画及び異なる画分の比較分析を行うことにより比較データを定義し、これを他の同様のデータと比較することにより試料及び/又は試料内の種に関する情報を提供することに関する。

【背景技術】

20

【0003】

(背景)

多くの疾患及び/又は他の病理学的過程又は状態は特定の蛋白の機能不全及び/又は調節不全により誘発される。疾患関連の蛋白は、「正常」又は「野生型」の相当物と相対比較してそれらの構造が改変されている場合があり、及び/又は、ある疾患状態においては「正常な」生理学的状態と相対比較してより大量(アップレギュレートされた発現)又はより少量(ダウンレギュレートされた発現)で発現される場合がある。一部の場においては、改変された構造及び/又は機能を有する蛋白は特定のヒト又は動物の疾患に関連するマーカーとして、例えば疾患のより早期の検出の為に診断薬等として使用してよい。多くの場合において、疾患または他の状態のある病理学的過程に関連する特定の蛋白は未知である。そのような蛋白の同定は新しい診断試験等の開発のために有用である。

30

【0004】

蛋白マーカーの同定及び特徴化の一般的アプローチは高分解能の分離技術を用いた生物学的物質(生体液、例えば血液、血清、血漿、脳脊髄液、組織、細胞等)の試料の蛋白組成の分析に基づいている。例えば対照及び被験の試料又は集団から単離した蛋白を蛋白分解性の切断に付し、そしてその切断産物を、液体クロマトグラフィー(LC)を直列型の質量スペクトルに結合させたもの(LC-MS-MS)を使用して同定することができる。多くの蛋白分離手法は、典型的には二次元ゲル電気泳動(2-DE)又は2次元の高速液体クロマトグラフィー(2D-HPLC)による試料からの蛋白の多次元の分離に基づいている。病理学的試料に関わる二次元(2-D)蛋白マップを得てレファレンス試料に関するものと比較してよく;(2-DE)マップ上の「スポット」として、又は、2D-HPLCマップ上の「ピーク」として観察される蛋白の位置を比較し、そして病理学的試料から得られたマップ上には存在する(存在しない)が、レファレンス試料から得られたマップ中には存在しない(存在する)ものは病理学的に関連する蛋白に相当する可能性があるものと判断してよい。追加的にスポット(又はピーク)の強度として推定される蛋白の量を評価し、病理学的試料とレファレンス試料の間で比較してよい。有意に異なるものは一部の場において病理学的に関連するものとみなしてよい。

40

【0005】

さらにまた近年、多数の蛋白(「サイン」)の存在/非存在、及び/又は相対的量のパターンもまた診断上関連性がある場合があることが明らかにされており、その場合、目的

50

のものであると判断された蛋白はペプチドマッピング及び/又は質量スペクトル分析により同定される。数学的又は統計学的手法、例えばパターン認識手法を用いてこれらの実験的手法により作成されたパターンを分析し、そして診断上の分類を行うことができる。しかしながら、このアプローチは場合により、例えば所定の試料中の蛋白の全てを分析することが本来必要であるが蛋白の僅かな部分のみしか何らかの病理学的関連性を有さないという理由から、極めて非効率的である場合が多い。

【0006】

蛋白混合物の分析上の複雑性を低減するための数種の異なる方法が開発されている。これらの方法は典型的にはゲル電気泳動または2D-HPLCによる2D分析の前の元の混合物の分画に基づいている。1つのそのような方法はフリーフロー電気泳動の手法による蛋白の分離である。しかしながらこの手法は元の蛋白混合物を分画するものの単純化された画分の複数の2D分析を生じさせる場合があり、即ち、分析の複雑性を低減して分解能を向上させるものの更に分析を要する試料の数量を本来大きく増大させる。

10

【0007】

他の方法は異なる天然のリガンド及び/又は薬理学的化合物に対する蛋白の親和性に基づいた分画であるが；この方法は蛋白機能に従った蛋白の分離を可能にするものの、更に分析するための試料の数量を大幅に増大させ、そして試料間の相違に関する追加的な知見又は予測を必要とする場合が多い。

【0008】

大部分の分画手法の1つの難点はそれらが一般的に蛋白-蛋白又は蛋白-リガンドの相互作用を温存できない点にある。生物学的相互作用の間の相違点は試料内の変化を解明して検出するために重要である場合が多い。更に又、分画手法の大部分は分子サイズ又は実質電荷のような固定された物理的屬性による分離に依存している。これらの属性は複雑な混合物中の生体分子内の区別のためには極めて重要であるが、それらは一般的に、例えば正常対疾患状態、配置の相違等を示す生体分子間の潜在的な相違の全てを網羅していない。現在の分画手法の別の重要な難点は、例えばグリコシル化パターンにおける構造的変化及び/又はコンホメーションの変化の間の相違に基づいて混合物を分離する能力をそれらが有していない点に関連している。これらの変化は疾患状態に関与している、及び/又は、その結果である蛋白を同定するために重要である場合が多い。例えば、遺伝子突然変異の結果として蛋白が誤って折り置まれた場合、蛋白の実質電荷及びサイズは大きく変化しない場合があり、そしてより重要な点として、蛋白の発現レベルは伏在する正常対疾患状態に対して同じである場合がある。最終的に、個体内の天然の遺伝子的変動性は生物学的試料中の生体分子の発現レベル(濃度)における極めて大きい散乱に寄与している場合がある。この変動性は一般的に遺伝子的変動性よりはむしろ特定の病理学的状態に固有の相違を確実に検出するために統計学的に多くの数量の試料を使用することを必要とする。天然の遺伝子的変動は、蛋白マーカー系の診断を実施するには、診断試験の感度及び/又は特異性の低減のために、多大な障害となる場合が多い。

20

30

【0009】

分子及び/又は試料特徴化の分野における多大な進歩があったにもかかわらず、特異性、汎用性、利便性を付加、及び/又は、効率を向上させるための改善がなお必要とされている。

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0010】

(発明の要旨)

本発明は一般的に分子及び/又は生体分子又は他の種の混合物の分離、分画及び/又は特徴化に関する。例えば一部の実施形態においては、本発明は生体分子の混合物、生体分子を含む複合体、生体分子と相互作用する分子、及び/又はそれらの類縁の種の分析及び特徴化の為の系および方法を提供する。例えば、生体分子の混合物の分析の全体的パターンにおける相違は生存有機体の疾患及び/又は生理学的状態の蛋白マーカーを示す場合が

50

ある。

【0011】

本出願の要件には、一部の例において、相互に関連する製品、特定の問題に対する代替となる解決法、及び/又は、単一の系又は物品の複数の異なる使用が関与している。

【0012】

本発明の1つの態様は複数種の特徴を決定する方法に関する。実施形態の1セットによれば、方法は、少なくとも2相を包含する第1の系のそれぞれ少なくとも第1の相及び第2の相を定義する少なくとも第1及び第2の相互作用成分に複数種を曝露する作業、曝露後の系の第1の相の複数種から累積スペクトル情報を含む第1のスペクトルデータパターンを得る作業、曝露後の系の第2の相の複数種に由来する累積スペクトル情報及び/又は系への曝露の前の複数種の複数に由来する累積スペクトル情報を含む第2のスペクトルデータパターンを得る作業、及び、第1のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分と第2のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分との比較から比較スペクトル情報を誘導することにより複数種の特徴を決定する作業を包含する。

10

【0013】

1つの実施形態において、本発明は多相系の異なる相の種の相互作用の相対的尺度における相違の作用を利用するための方法、例えば分子及び/又はそのような分子と相互作用する分子の混合物の構造的及び/又は機能的特徴に関連する混合物間の相違を反映する場合がある混合物2つ、3つ以上の多相分配を介した例えば分画又は分離を発生させること及び使用することを含む。これらの手法は例えば試料の質量スペクトル分析又は他の分析を用いてこのようなマーカーの独特のパターンを同定するため、及び/又は、診断及び他の関連する用途の為にマーカーのこのようなパターンを用いるために使用できる。

20

【0014】

1つの態様において、本発明は複数種の特徴を決定する方法である。実施形態の1セットにおいて、方法は、少なくとも2相を包含する第1の系のそれぞれ少なくとも第1の相及び第2の相を定義する少なくとも第1及び第2の相互作用成分に複数種を曝露し、それへの曝露時に複数種を相互に相対的に異なるように相互作用させる作業；曝露後の系の第1の相の複数種から累積スペクトル情報を含む第1のスペクトルデータパターンを得る作業であって、そのスペクトルデータパターンは異なる相との種の相互作用の相対的尺度のものの作用を表すものである；曝露後の系の第2の相の複数種に由来する累積スペクトル情報及び/又は元の複数種の複数に由来する累積スペクトル情報を含む第2のスペクトルデータパターンを得る作業；及び、第1のスペクトルデータパターンと第2のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分から比較スペクトル情報を誘導することにより複数種の特徴を決定する作業を包含する。

30

【0015】

実施形態の別のセットにおいて、方法は、少なくとも2相を包含する分配系の第1の相と第2の相の間に複数種を分配する作業；分配後の系の第1の相の複数種から累積スペクトル情報を含む第1のスペクトルデータパターンを得る作業；分配後の系の第2の相の複数種に由来する累積スペクトル情報及び/又は元の複数種の複数に由来する累積スペクトル情報を含む第2のスペクトルデータパターンを得る作業；及び、第1のスペクトルデータパターンと第2のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分から比較スペクトル情報を誘導することにより複数種の特徴を決定する作業を包含する。

40

【0016】

別の態様において、本発明は生物学的系の生理学的状態を決定することを包含する。1つの実施形態において、そのようにするための方法は生物学的系に由来する試料の種の混合物に由来する比較パターンを決定することを包含し、ここで比較パターンは第1の分配系のそれぞれ少なくとも第1の相及び第2の相を定義する少なくとも第1及び第2の相互作用成分の分析から得られるデータのパターンから誘導される。種の混合物及び第1の分配系の第1及び第2の相互作用成分の間の比較パターンを決定するプロセスから、生物学的系の生理学的状態を決定することができる。

50

【 0 0 1 7 】

別の実施形態においては、方法は、生物学的系から得られた本明細書中に記載する比較パターンと、生物学的系のレファレンス状態を表す、相当する比較パターンの間の相違を決定することにより、そのようなパターンをもたらず種の混合物における個体種の化学的又は生物学的なアイデンティティーを知ることなく、生物学的系の生理学的状態を決定することを包含する。

【 0 0 1 8 】

別の実施形態においては、方法は生物学的系から得られた比較パターン及びレファレンス状態の少なくとも1つを有する試料の少なくとも1つから得られた比較パターンに関連する第1の特性及び/又は特性の値の間の相違及び/又は同様性を決定することにより生物学的系の生理学的状態を決定することを包含する。

10

【 0 0 1 9 】

更に別の実施形態においては、方法は、生物学的系から得られた数学的又は統計学的に処理された分析パターンと、レファレンス状態の少なくとも1つを有する試料の少なくとも1つから得られた相互作用の相対的尺度の同様な数学的又は統計学的に処理された分析パターンとの間の相違及び/又は同様性を決定することにより生物学的系の生理学的状態を決定することを包含する。

【 0 0 2 0 】

別の態様において、本発明は、生理学的分析のための1つ以上のツールを同定する方法に関する。1つの実施形態において、方法は、種の第1の混合物を含む種、及び、第1の分配系の少なくとも第1の相及び第2の相をそれぞれ定義する少なくとも第1及び第2の相互作用成分の分析から得られるデータパターンの間の比較パターンを決定することを包含する。比較パターンはまた種の第1の混合物の種に相当する種の第2の混合物と第1の系を含む種との間においても同様に決定する。相違は、第1の混合物の種の比較パターン対第2の混合物の種の比較パターンにおいて、第1の系で決定する。この相違に基づき、第1の系を生物学的系の生理学的状態を決定するためのツールとして選択する。或いは、又は追加的に、第1の混合物を含む種の比較パターン及び第2の混合物を含む種の比較パターンを、生物学的系の生理学的状態を決定するために選択する。

20

【 0 0 2 1 】

本発明は、更に別の態様において、複数種の少なくとも1つの特徴を決定する方法に関する。実施形態の1つのセットによれば、方法は、少なくとも第1及び第2の相を包含する水性分配系に複数種を曝露する作業；質量スペクトル分析を使用して、水性分配系の第1の相に関連する1つ以上の種の第1の試料から累積スペクトル情報を含む第1のスペクトルデータパターンを得る作業；質量スペクトル分析を使用して、以下のもの、即ち(1)水性分配系の第2の相に関連する1つ以上の種の第2の試料、又は(2)曝露工程の前の複数種の一部、の1つ以上から第2のスペクトルデータパターンを得る作業；及び、第1のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分を第2のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分と比較することにより複数種の少なくとも1つの特徴を決定する作業を包含する。

30

【 0 0 2 2 】

方法は、実施形態の別のセットによれば、複数種を少なくとも第1及び第2の相互作用成分に曝露することにより複数種を少なくとも部分的に分離する作業；質量スペクトル分析を使用して、少なくとも部分的に分離された複数種の第1の試料を処置することにより第1のスペクトルデータパターンを作成する作業；質量スペクトル分析を使用して、以下のもの、即ち(1)第1の試料と同一ではない少なくとも部分的に分離された複数種の第2の試料、又は(2)曝露行程前の複数種の一部、の1つ以上を処置することにより第2のスペクトルデータパターンを作成する作業；及び、第1のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分を第2のスペクトルデータパターンの少なくとも一部分と比較することにより複数種の少なくとも1つの特徴を決定する作業を包含する。

40

【 0 0 2 3 】

50

実施形態の更に別のセットにおいては、方法は、少なくとも第1及び第2の相を包含する水性分配系に複数種を曝露する作業；水性分配系の第1の相に関連する1つ以上の種の第1の試料から累積情報を含む第1のデータパターンを得る作業；以下のもの、即ち(1)水性分配系の第2の相に関連する1つ以上の種の第2の試料、又は(2)曝露行程の前の複数種の一部分、の1つ以上を処置することにより累積情報を含む第2のデータパターンを得る作業；及び、第1のデータパターンの少なくとも一部分を第2のデータパターンの少なくとも一部分と比較することにより複数種の少なくとも1つの特徴を決定する作業を包含する。

【0024】

本発明の他の利点及び新規な特質は添付図面と共に考察すれば本発明の種々の非限定的な実施形態の以下に示す詳細な説明から明確化されることになる。本明細書及び参考として援用される文書が矛盾及び/又は不一致のある開示を包含する場合は、本明細書が優先する。参考として援用される文書2つ以上が相互に対して矛盾及び/又は不一致のある開示を包含する場合は、より遅い有効日を有する文書が優先する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

(詳細な説明)

本発明は一般的に、分子又は種の少なくとも一部の相互からの分離を起こすことができる媒体との分子又は他の種の複数の相互作用、及び、パターンを定義するための分離から生じる分子/種の少なくとも一部分の処置に関する。パターンは分離から生じる分子/種の別の部分に由来する、及び/又は、分離よりも前に分子又は他の種の元の複数から得られたパターンに由来するパターンに対して比較することができ、これにより分子及び/又は生体分子又は他の種の複数の特性化、及び/又は、何れかの分子又は生体分子等の何れかの特定の特性化を伴うか伴わない分子/種に関連する実態に関連する状態の特性化をもたらす。分離媒体は以下において考察する多相分配系又は他の分離物質を包含できる。混合物は部分的又は完全に分離してよい。一部の実施形態においては、本発明は例えば混合物中の種の相互作用の尺度となるデータの相当するパターンの特性又は挙動の間の相違の検出、同定、及び/又は特性化の為に系および方法を提供する。何れかの手法、例えば、質量スペクトル分析、NMRスペクトル分析、UV及び/又は可視光スペクトル分析等のスペクトル分析手法を用いてパターンを発生させてよい。複数の分子は生体分子及び/又は生体分子と相互作用することができる分子を包含してよい。パターンは達成すべき比較に応じて、混合物の試料を用いて(分離の前又は後に)作成してよい。

【0026】

本発明の1つの特徴では、試料又は試料の画分(例えば生物学的起源の試料)から得られた、例えば質量スペクトル分析器から得られたスペクトルデータ(パターンとして)の使用を含み、この場合試料は、まず相互作用系と相互作用する。相互作用系は試料中の種の一部と優先的に相互作用することにより、元の試料とは異なる試料の少なくとも1つ(そして場合により1つより多く)の画分をもたらす。次にスペクトルデータを、同じ相互作用系と相互作用できるようにされていた同じ試料の第2の画分から、又は試料そのもののスペクトルデータから得られた何れかの別のスペクトルデータと比較する。

【0027】

しかしながら、本発明がスペクトルデータのみを使用に限定されると理解してはならない。一般的に、データパターンを作成するために使用できる試料の処置の何れかの方法を用いることができる。例えば、試料の一部分又は試料の画分は、何れかの適当な手法、例えばNMRスペクトル分析、UV及び/又は可視光スペクトル分析、IRスペクトル分析、ラマンスペクトル分析、蛍光スペクトル分析、質量スペクトル分析、クロマトグラフィー(例えば液体クロマトグラフィー、HPLC、クロマトグラフィー溶出プロファイル分析等)、GPC、ELISA、シンチレーション計数等を使用してデータパターンを作成するために処置してよい。一部の場においては、例えば数学的処理、データ変換、データスムージング、ノイズフィルター等により、データ自体を処置することによりデータパ

10

20

30

40

50

ターンを作成してよい。従って、本明細書において「スペクトルデータ」又は「比較スペクトル」を考察する場合は、これは例示に過ぎず、そして本明細書において記載する他のデータパターン又は比較データパターンもまた、本発明の他の実施形態において使用してよいものとする。

【0028】

1つの態様において、本発明では分配を行い、そして一部の例においては、分配の後に、分配成分を質量スペクトル分析のようなスペクトル分析、又は、データパターンを作成するための他の適当な方法に付すことができ、その際、異なる成分のスペクトルを分析する必要はなく、そして、特定の実施形態においては、これらの成分の特徴を同定する試みを行う必要はない（ただしこれは一部の実施形態においては行うことができる）。異なる成分又は相のスペクトルデータ又は他のデータパターン、及び/又はそれらの内部の種を、一部の実施形態において比較することにより比較スペクトル又はパターンを定義することができ、これはそれら自体において、又はそれら自体が、種の混合物に関連するマーカであることができ、及び/又は、種の混合物に関する情報を明らかにすることができる。この情報はその種の誘導元である実態の条件に関する情報、例えば比較スペクトル又はパターンを、対照を定義するレファレンス比較スペクトル又はパターンと比較した場合の、患者の医学的状態及び/又は生理学的状態を包含できる。比較スペクトル又はパターンは一部の場において引き算、割り算、掛け算又は他の変換のような数学的操作の1つ以上を用いて成分又は相のスペクトル又は他のデータパターンから誘導できる。1つの実施形態において、比較スペクトル又はパターンは、割り算がやはり規格化の操作であることから、成分又は相のデータパターンのポイント・バイ・ポイントの割り算により得られる。この点における規格化操作とは比較されるパターンの2つ以上における特定のピーク又は他の特異的な情報をもたらす伏在する蛋白、蛋白フラグメント又はペプチドに帰属するデータパターンの絶対値の取り消し又は除去を意味する。即ち、ポイント・バイ・ポイントの割り算を用いて成分又は相のデータパターンを割ることにより得られる比較スペクトル又はパターンは、伏在する蛋白の相の各々に対する親和性の間の相対的变化を示すのみであって、元の試料中のそれらの絶対量に対するものではない。

10

20

【0029】

他の信号処理手法及び変換を用いて比較パターンの構築の前又は後にデータパターンを前処理又は後処理することができる。そのような手法は限定しないが、フーリエ変換又は小波変換のような変換を伴うか伴わない、そして、デジタル又は他のフィルターの使用を伴うか伴わない、スペクトルのデータスムージング、ノイズフィルター、補間法等を包含する。

30

【0030】

例えば健常患者由来の血液試料のようなレファレンス実態から試料を取り出すことにより対照を樹立できる（何れかの他の試料、例えば尿、血漿及び当該分野で知られたものを標準的手法に従って使用及び/又は使用前処理することができる）。試料は多相分配系（又は本明細書に開示する他の手法）において分画に付すことができる。2相分配系を使用する場合は、第1及び第2の相（又は、場合により、より多くの相が存在する場合はより多くの相）の少なくとも一部分又は数部分をスペクトル分析（又は本明細書に開示する他のデータパターン化手法）に付すことができ、そしてそれらのスペクトル（又は他のデータパターン）を比較して比較スペクトルを作成する。或いは、又は追加的に、分配前の元の試料をスペクトル分析に付し、そのスペクトルデータを第1及び/又は第2の相のスペクトルデータの項目1つ以上と比較することにより比較スペクトルを作成できる。これらのアレンジメントの一部において、分配前の混合物のスペクトルの何れかの数量、及び分配後の相の何れかの数量を得ることができる。一部の場において、少なくとも2つのスペクトルデータを比較することにより対照を定義する情報を（場合により他の情報、例えば温度、血圧等と組み合わせる）得る。比較スペクトルは場合により、後の使用のために格納、例えばスペクトル比較の紙上のプリントアウトとして格納するか、コンピュータ中、又は何れかの他の知られた格納媒体上に電子的に格納することができる。

40

50

【0031】

特定の実体が特定の状態を呈するかどうか、例えば患者が特定の生理学的状態を有するかどうかに関して疑問がある場合、試料（例えば対照のものと類似、同様又は同一の試料）を実体から取り出し、そして試料を少なくとも部分的に分離することができる系（例えば分配系）に付すことができる。データは、分配相由来のデータ、又は元の分配前の混合物の相及び/又はデータパターンを用いて分析し、そして次に比較してよい（例えば比較スペクトルを形成することにより）。未知の比較スペクトルを対照の比較スペクトルと比較することにより試料が実質的に対照から偏移しているか、又は対照と本質的に同じであるかを決定することができる。これは、試料が患者における疾患を示しているか否かについての教示を与えることができる。対照は当然ながら、健常患者のもの、又は生理学的機能不全又は疾患の多くのうちの何れかを有する患者のものであることができる。或いは、2つ以上の対照を使用して健常状態及び/又は多くの機能不全状態の何れかを定義し、そして未知試料の分画に由来する比較スペクトル又はパターンをこれらの対照の何れか又は全てと比較することにより試料の入手元である実体の状態を決定することができる。実際には同じ機能不全状態を呈する異なる実体を起源とする多重比較スペクトル又はパターンを平均することにより複合比較スペクトル又はパターンとすることができる。

10

【0032】

一部の実施形態においては、方法は種の混合物におけるパターン及び/又は第2の混合物における種の相当するパターンを発見及び/又は同定するために使用することができ、その場合、種の各混合物は特定の診断に関連するマーカーとして異なる生理学的条件を有する生物学的系を起源とするものであり、そして、診断スクリーニングの間に発見され同定された後にそのようなマーカーを得るためのスクリーニングのために使用することができる。

20

【0033】

以下の文書、即ちChaitら「Method for Evaluation of the Ratio of Amounts of Biomolecules of Their Sub-populations in a Mixture」と題された2000年10月24日発行の米国特許第6,136,960; A. Chaitら「Characterization of Molecules」と題された2003年5月22日公開のPCT公開第WO03/042694; A. Chaitら「Systems and Methods for Characterization of Molecules」と題された2003年6月13日出願の米国特許出願第60/478,645; Chaitら「Systems and Methods for Characterization of Molecules」と題された2004年4月14日出願の米国特許出願第60/561,945; A. Chaitら「Systems and Methods for Characterization of Molecules」と題された2004年6月14日出願の国際特許出願第PCT/US04/19343; A. Chaitら「Spectral and Other Analysis of Partitioned Samples」と題された2004年12月9日出願の米国特許出願第60/634,586; 及びA. Chaitら「Systems and Methods Involving Spectral Biomarkers」と題された2005年12月19日出願の米国特許出願第60/751,715; は参考として全体が本明細書中に援用される。

30

40

【0034】

定義

明細書及び添付の請求項において使用する場合、単数表記のものは特段の記載が無い限り複数の指示対象を包含するものとする。即ち、「生体分子」に言及した場合、生体分子の混合物等も包含されるものとする。

【0035】

範囲は本明細書においては「約」1特定値から、及び/又は「約」他特定値までとして

50

表示してよい。そのような範囲を表示する場合、他の実施形態は1特定値から、及び/又は、他特定値までを包含する。同様に、「約」という接頭語を使用することにより値を概数として表示する場合、特定の値は別の実施形態を形成するものと理解されることになる。更に又、範囲の各々の終点は他の終点と関連して、そして、他の終点から独立して、双方の意義を有すると理解されることになる。

【0036】

「任意の」又は「場合により」とはその後に記載される事象又は状況が起こるか起こらなくてよく、そして記述は当該事象又は状況が起こる場合及び起こらない場合を包含することを意味する。

【0037】

「分析対象」、「分析対象分子」又は「分析対象種」とは、例えば、自身の存在、量及び/又はアイデンティティーが決定されるべきである分子、例えばポリヌクレオチド又はポリペプチドのような巨大分子を指す。

【0038】

「抗体」とは、本明細書においては、ポリクローナル又はモノクローナル抗体を意味する。更に又、「抗体」は、限定しないが、未損傷の免疫グロブリン分子、キメラ免疫グロブリン分子、又はFab又はF(ab')₂フラグメントを包含する。そのような抗体及び抗体フラグメントは、例えば各々が参考として本明細書中に援用されるHarlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)), Kohlerら (Nature 256: 495-97 (1975)) に記載されているものを包含する、当該分野で良く知られた手法により作成できる。相応して、抗体は本明細書においては単鎖抗体(ScFv)も包含し、これは連結したV_H及びV_Lドメインを含んでよく、そして抗体のネイティブのイデオタイプのコンホーメーション及び特異的結合活性を保持してよい。このような単鎖抗体は当該分野で良く知られており、そして標準的な方法により製造できる。例えばAlvarezら、Hum. Gene Ther. 8: 229-242 (1997)を参照。本発明の抗体は何れかのアイソタイプ、例えばIgG、IgA、IgD、IgE又はIgMであることができる。

【0039】

「水性」とは、本明細書においては、溶媒和物質が主に親水性の特徴を有する溶媒/溶質の系の特徴的な特性を指す。水性の溶媒/溶質の系の例は、水又は水を含む組成物が主な溶媒であるものを包含する。1つの実施形態において、水性物質は水中に混和性であり、そして周囲条件下で(例えば1気圧及び室温、約25°Cにおいて)一日未攪乱で放置した後水以外の別個の同定可能な相を形成しない(水はそれ自体混和性であることに留意)。

【0040】

「分配系」とは本明細書においては、少なくとも2つの相、区分、区域、成分等を有する何れかの物質を差し、その少なくとも2つはそれらが曝露されている種の少なくとも1つと、異なった様式で相互作用できる。例えば、分配系は、異なる区分に曝露されている特定の分子と異なった様式で相互作用できる固体表面の異なる区域(例えば液体クロマトグラフィー又はHPLCの場合等)、種1つ以上が曝露され、そして場合により溶解されることができ、そしてその種の少なくとも一部が異なる相と異なった態様で相互作用できる多相液体系(例えば水性/非水性の系又は水性の多相系(後に定義))のような多相系を包含することができる。例えば、特定の種は、多相分配系が混合物からある種を単離するか、又はある種を少なくとも一部の様式において相間で異なる態様において分配させることができる程度にまで、ある相に対して別の相よりも大きい親和性を有してよい。二相系を本明細書において記載する場合は、より多くの相を使用できることと理解すべきである。

【0041】

「水性多相系」とは、本明細書においては、分析対象種が滞留することができ、そして本明細書に記載した方法に従って分析対象種の構造的状態を特性化するために使用できる1水相より多くを包含する水性の系を指す。例えば、水性多相系は平衡時に2、3又はそれ以上の非混和性の相に分離することができる。水性多相系は当該分野で知られており、そしてこの表現は、本明細書においては、当該分野における許容された意味と不整合であることを意味しない。種々の水性多相系の例及びそれらの組成は後に詳述する。

【0042】

「累積スペクトル情報」とは種の混合物を示す複数種に由来するインプット、例えばスペクトル（これは質量スペクトル報告であることができる）を包含するスペクトル情報を意味する。

10

【0043】

「相互作用成分」とは、ある種と相互作用してその種に関する情報（例えば種に対する親和性）を提供することができる、多相系の相、又はクロマトグラフィーカラムの成分、又は分離を起こすことができる他の組成物のような成分を意味する。種に曝露された多重相互作用成分は各成分と種との間の「相互作用の相対的尺度」を提供することができる系を定義することができる。相互作用成分は固体又は液体、水性又は非水性であることができ、重合体、有機物（例えば蛋白、小分子等）、無機物（例えば塩）、界面活性剤等、又はこれらの何れかの組み合わせであることができる。相互作用成分のセットは本明細書に記載する方法に従って分析対象種のような種の構造的状態を特性化するために使用される何れかの実験方法を定義する場合に少なくとも部分的に有用な系を形成できる。典型的には、相互作用成分の系は種と少なくとも2つの相互作用成分との間の相対的相互作用を計測することができる。

20

【0044】

水性多相系は相互作用成分の系の一例であり、そして「水性の系」又は「水性多相系」を本明細書において使用する場合、これは例示に過ぎず、そして如何なる適当な相互作用成分の系も使用できると理解すべきである。水性2相及び水性多相の系を本明細書において記載するが、他の系、本明細書においては水性の溶液又は懸濁液のみを含むものに類似する系を使用できると理解すべきである。例えば、水性の二相の系は特性として液体ではない相1つ以上における非水性の成分を包含することができる。この態様において、多相系は又1つの媒体対他の媒体に対する生体分子の示差的親和性に依存している関連の手法を指し、この場合1つの媒体と場合により別の媒体との間の生体分子の輸送は水性又は非水性の環境において起こる。そのような多相系の例は限定しないが、当業者の知る通り、HPLCカラムまたは液-液分配クロマトグラフィー又は他の形態のクロマトグラフィー用の系を包含し、このような場合、1つの相は固相であり、そしてもう1つの相は担持された種が固相に接近する液体であってよく、そして、固相及び/又は液相に対する種々の種の間異なる親和性が分離を誘発できる。本発明は水性の多相系に限定されないと理解すべきであり；一部の場合においては、単一の非分配相を有する系を使用してよく；例えば、2つ以上の相互作用成分が複数種を含有する溶媒を定義してよく、そして成分は少なくとも部分的に分離してよい（ただし、分離された成分の間には、例えば濃度等に関して、明確な分割が必ずしも無くともよい）。

30

40

【0045】

本明細書において特定の種に言及する場合の「相互作用の相対的尺度」とは、相対的な意味において、種が他の種と、又は多相系のある相と相互作用する程度を意味する。例えば、特定の種は多相系の1つの相に対して、他の相に対するよりも大きい親和性を有してよく、そしてそれがその相と相互作用するかその内部に滞留する程度は、他の相とは異なり、相互作用のその相対的尺度を定義する。相互作用の相対的尺度は、本発明に関する場合、一部の例においては絶対的態様を使用できるものの、一般的には、絶対的態様ではなくむしろ比決定的な態様において決定される。限定しない例として、種が2相系の各相と相互作用できるが1方の相において他相よりも好ましく滞留する場合、本発明は典型的には2相の各々における、又は相の1方及び元の試料における、種の濃度の比に関するもの

50

であるが、必ずしも各相における種の絶対的な濃度ではない情報を使用する。他の場合において、相互作用は特定の溶媒又は流体の担体内の特定の種の滞留にではなくクロマトグラフィーカラムの固相のような固体表面との相互作用に基づくことができ、その場合、相対的尺度は溶出時間において自信を顕在化させ、及び/又は、異なる種又は異なる基質の場合とは異なって多孔性の基質との特定種の相互作用のような幾何学的または空間的な相互作用を包含することができる。一部の場においては、相互作用の相対的尺度は1つの型より多くの相互作用を包含する。

【0046】

「分配係数」とは、本明細書においては、平衡時における多相系の2, 3又はそれ以上の相の化学的活性又は濃度の比、又は、平衡時における多相系の1相中の種及び元の試料中における相当する種の化学的活性又は濃度の比により定義される係数を指す。例えば、2相系における分析対象の分配係数(「K」)は第1の相における分析対象の濃度の第2の相におけるそれに対する比として定義される。多相系については、多数の分配係数が存在してよく、その場合、各分配係数は第1の選択された相と第2の選択された相における種の比を定義する。当然ながら、何れの多相系における分配係数の総数は典型的には相の総数マイナス1に等しくなる。本明細書においては、「分配係数」は又、2相系の第1の相における種の混合物の分析に由来する特定の m/z (質量の電荷に対する比)の位置におけるピーク高さの、同じ二相系の第2の相における種の混合物の分析に由来する同じ特定の m/z の位置における相当する高さに対する比を指すか、又は、そのような系の2, 3又はそれ以上の異なる相に由来する試料の間のクロマトグラフィー分析における特定の溶出時間におけるピーク高さ比を指すことができる。

10

20

【0047】

不均質な相の系に関しては、「見かけの分配係数」は、本明細書においては、相の間の相対的な分配に送還する代替の手法から得られた情報を説明する係数を指す。非限定的な例として、使用される不均質な二相系がHPLCカラム又は他のクロマトグラフィーカラムである場合、この「見かけの分配係数」は分析対象に対する相対的保持時間であることができる。当業者には当然であるが、クロマトグラフィーカラム内の分析対象の保持時間は多くの場合において第1の移動相と第2の非移動相の間の分析対象の平均の分配を反映している。更に又、分析対象の他の同様に決定することができる特性もまた分析対象の物理的特性における相違を定量するために使用でき(例えば他の手法において)、そしてこのため、見かけの分配としての使用のために適している。

30

【0048】

「結合する」とは本明細書においては、十分理解されている受容体/リガンド結合並びに生体分子とその結合相手との間の他の非ランダムな会合を意味する。「特異的に結合する」とは、本明細書においては、特定の生体分子以外の何れの生体分子とも実質的に交差反応しない結合相手又は他のリガンドを説明するものである。一般的に、相互に優先的に結合する分子は「特異的結合対」と称する。そのような対は限定しないが、抗体とその抗原、レクチンとそれが結合する炭水化物、酵素とその基質、及び、ホルモンとその細胞内受容体を包含する。結合機序の例は限定しないが、共有結合、イオン結合、ファンデルワールス結合、水素結合等を包含する。

40

【0049】

一般的に使用されている通り、「受容体」及び「リガンド」という用語は結合分子の対を同定するために使用される。通常は「受容体」という用語は、例えば抗体のようなその結合活性に関して既知である分子のクラスのものである特定の結合対のメンバーに割りつけられる。「受容体」という用語はまた、例えばレクチン炭水化物対の場合のレクチン上のような、より大きなサイズの対のメンバーに対して優先的に付与される。しかしながら、当業者には当然であるが受容体及びリガンドの同定は幾分自由裁量的であり、そして「リガンド」という用語は別様には「受容体」と称される分子をさすために使用してもよい。「抗リガンド」という用語は場合により「受容体」の代わりに使用される。

【0050】

50

「分子 - 分子相互作用」、例えば生体分子 - 生体分子相互作用、蛋白 - 蛋白相互作用等は、典型的には、「結合」よりも弱い相互作用、即ち水素結合、ファンデルワールス結合、ロンドン力、又はある分子の他の分子に対する親和性に寄与する他の非共有結合性相互作用に基づく相互作用を意味し、その場合の親和性はある分子が他の分子又は他の分子の区分に順応する能力のような構造上の特質により支援されることができる。分子 - 分子相互作用は結合を包含できるが、必須ではない。

【 0 0 5 1 】

「生体分子」とは本明細書においては、典型的には有機体から誘導され、そして典型的にはヌクレオチド等を包含するビルディングブロックを包含する分子を意味する。非限定的な例はペプチド、ポリペプチド、蛋白、蛋白複合体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、核酸複合体、単糖類、オリゴ糖、炭水化物、脂質並びにこれらの組み合わせ、エナンチオマー、相同体、類縁体、誘導體及び / 又はミメティックを包含する。

10

【 0 0 5 2 】

「種」とは本明細書においては、分子又は分子の収集物を指す。例えば、無機の化学物質、有機の化学物質、生体分子等が種であってよい。本発明においては、種は一般的に生体分子である。

【 0 0 5 3 】

「相当する種」とは本明細書においては、化学的に同一である少なくとも2つの異なる種を意味するか、または、それらが化学的に、及び / 又は分子量により異なる場合でも、僅かにしか異ならないことを意味する。相当する種の非限定的な例は、他の種又は複数の種に関して本質的には同一であるが結合親和性において異なり、より高次の構造を有し、例えば二次又は三次の構造においては異なるが、化学配列においては有意に異なっていない、蛋白の構造的アイソフォーム、蛋白又は他の分子を包含する。一般的に、相当する種は、異なって配置してよい（アイソフォーム、異性体等）が、同じか本質的に同じ化学ビルディングブロックよりなる種である。

20

【 0 0 5 4 】

「検出可能」とは本明細書においては、判別すべき種の能力及び / 又は種の特性を指す。種を検出可能とする方法の一例は、第1の種と結合又は相互作用する別の種を準備することであり、その場合、種は検出可能な標識を含む。検出可能な標識の例は、限定しないが、核酸標識、化学反応性の標識、蛍光標識、酵素標識及び放射性標識を包含する。

30

【 0 0 5 5 】

本明細書においては、「決定する」という用語は一般的に例えば定量的又は定性的に種を分析すること、及び / 又は、種の存在又は非存在を検出することを指す。「決定する」とはまた、例えば定量的又は定性的に種2つ以上の間の相互作用を分析すること、及び / 又は相互作用の存在又は非存在を検出することによるものを指す。

【 0 0 5 6 】

「ミメティック」とは、本明細書においては、自身の構造が抗体又は抗原の結合領域に基づくかそれより誘導されたものである、化学的な化合物、有機性の分子、又は、何れかの他のミメティックを包含する。例えば、ペプチドの結合ループのような結合領域の構造を模倣する予測された化学構造をモデリングすることができる。そのようなモデリングは標準的な方法を用いて実施できる（例えばZhaoら、Nat. Struct. Biol. 2 : 1131 - 1137 (1995)を参照）。このような方法により同定できるミメティックは更に、本明細書に記載された結合試験に従って、目的の元の同定された分子と同じ結合機能を有するものとして特性化できる。或いは、ミメティックは又コンビナトリアルな化学ライブラリから、ペプチドと全く同じ態様において選択することができる。例えばOstreshら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 : 11138 - 11142 (1994) ; Dornerら、Bioorg. Med. Chem. 4 : 709 - 715 (1996) ; Eichlerら、Med. Res. Rev. 15 : 481 - 96 (1995) ; Blondelleら、Biochem. J. 313 : 1

40

50

41-147(1996);又はPerez-Payara、J. Biol. Chem. 271:4120-6(1996)を参照。

【0057】

「固体支持体」とは本明細書においては、本発明の種々の成分が物理的に結合されることにより本発明の成分を固定化する十分理解された固体物質を意味する。「固体支持体」という用語は本明細書においては、非液体の物質を意味する。固体支持体は、限定しないが、膜、シート、ゲル、ガラス、プラスチック又は金属であることができる。本発明の固定化された成分は共有結合によるか、及び/又は、非共有結合の誘因力、例えば水素結合相互作用、疎水性誘因力及びイオン力などを介して固体支持体に会合させてよい。

【0058】

「構造」、「構造的状態」、「配置」又は「コンホメーション」は、本明細書においては、例えば、それらが生体分子、例えば蛋白及び核酸並びに薬学的に活性な小分子に適用される場合のように、全て該当する用語の一般的に理解される意味を指す。異なる観点において、これらの用語の意味は当業者が知る通り変動することになる。分子の構造及び構造上の状態は一般的には分子を定義するビルディングブロックではなく、これらのビルディングブロックの空間的配列を指す。配置及びコンホメーションは典型的にはこの配列を定義する。例えば、蛋白構造に言及する場合の第1、第2、第3又は第4という用語の使用は、当該分野で許容される意味を有し、これは核酸構造に言及する場合のそれらの意味とは一部の点において異なる(例えばCantor and Schimmel, Biophysical Chemistry, Parts I-IIIを参照)。特段の記載が無い限り、これらの用語の意味は当業者により一般的に許容されているものとなる。

【0059】

「生理学的条件」とは本明細書においては、有機体の物理的、化学的又は生物物理学的な状態を意味する。本発明に関する場合に最も典型的に使用されるものとしては、生理学的条件は正常(例えばヒト及び他の有機体に関する場合に健常)、又は異常(例えばヒト及び他の有機体に関する場合に疾患状態)な状態を指す。

【0060】

「パターン」とは本明細書においては、種の物理的特性の連続体又は物理的特性と他の特性の組み合わせを意味する。

【0061】

「相当するパターン」とは本明細書においては、生物学的な系の異なる試料から典型的に得られる第2のパターンを意味し、そして、性質が数又はカテゴリのいずれであるかに関わらず、連続体における各位置が記述語の同じ値を保有するように、物理的又は他の特性の同じ連続体を有する。

【0062】

「マーカー」とは本明細書においては、自身が滞留する生物学的環境の構造的又は生理学的な状態に関する情報のキャリアとなることのできる種の物理的特性のパターン(例えば種の混合物の質量スペクトル分析実験から得られる m/z 値のスペクトル)である。そのような物理的特性のパターンはまた、数学的又は統計学的に処理、削減、変換又は別様に表示することができる。「処理されたマーカー」とは本明細書においてはそのような処理されたパターンであるが、本明細書においては、マーカーは特定の関連に応じて物理的特性のパターン又はそのような特性の処理されたパターンを命名するために代替として使用される。マーカーは、自身が滞留する環境の生理学的状態の2つ以上に相当し、そしてそれに関する情報を表す少なくとも2つの異なる特性又は特異的な特性(例えば構造コンホメーション、他の種に対する結合親和性等であって、種の単に異なる量ではない)の値を示すことができる。例えばマーカーは、自身が滞留する健常な系を表す第1の状態と自身が滞留する疾患の系を表す第2の構造的状態(例えば異なるコンホメーション)との間で一部が構造的に修飾されている蛋白のシリーズから得られたパターンであってよい。本明細書においては、マーカーは又、自身が滞留する生物学的環境の生理学的状態に関する情報のキャリアとなることのできる比較パターン、及び/又は、そのようなパターン

10

20

30

40

50

と他の特性に関する他の情報の組み合わせである。

【0063】

「スペクトルデータ」とは、目視可能な、紙上に記録された、電子的に記録されたもの等に関わらず、質量スペクトル検査、赤外スペクトル検査、UV及び/又は可視光のスペクトル分析、NMRスペクトル分析、又は独立変数が波長、溶出時間等を包含する試料分析から得られたデータの何れかの他の連続体のようなスペクトル手法の1つ以上の試料に対する適用に関する何れかの情報を意味する。そのようなスペクトル分析は定型的な技術を超えることなく当業者により実施される。

【0064】

スペクトルデータは電磁気学的波長に対して試料に応答を求める手法に限定されないデータパターンの一例である。データパターンは他の手法により、例えば波長に対してではなく溶出時間に対してデータストリームを作成するクロマトグラフィー的手法により、NMR等により得られた分析データの何れかの連続体を包含する。

【0065】

「比較する」とは、スペクトル又はスペクトルデータ(又は他のデータパターン)の関連においては、スペクトルデータ(又は他のデータパターン)の何れかのセクションの比較の何れかの型を意味する。例えば、質量スペクトル分析に由来する2つの典型的なプリントアウトを並置して比較することができ、そして人が各スペクトルの質量スペクトルピークの1つ以上の高さを観察し、それらのピークの間について注記することができるか、又は、そのようなピークに関連する質量対電荷の比を示すコンピュータ分析に関連する数を観察し、これらの数を比較することができる。或いは、種々の質量スペクトルの種々の質量対電荷のピークを相互に比較することによりそのような比較を表す比較スペクトル又は比較スペクトル情報を作成するようにコンピュータをプログラムすることができる。従って、比較スペクトル情報は2つのスペクトル又は他のデータパターンにおける相違を表す数を定義してよく、及び/又は、数は特定の質量対電荷の比の位置(質量スペクトルデータの例による)における2つの異なるスペクトルのピーク高さ又は範囲の比を定義することができる。或いは、比較スペクトルはスペクトルデータポイント複数においてデータパターン2つ以上における相違を記録することができ、即ち質量スペクトルの場合は、特定の質量対電荷の比のピーク複数が2つのスペクトルの間の相違又は比の何れかとして記録される。別の例として、2つの質量スペクトルの全てのデータポイントは、各スペクトルの特定の質量対電荷の比のピークの間での相違又は各々間の比として比較することができ、そして数のシリーズとして、または新しいスペクトルプリントアウトとして表示するか、又は何れかの他の方法で表示することができ、その場合、観察者又は機材(例えばプロセッサ)がこのデータを観察及び/又は分析することができ、そしてこれにより各スペクトルの誘導元である異なる試料の間の相違を観察及び/又は記録することができる。全てのそのようなスペクトルデータ及び比較スペクトルはスペクトルデータの入手元の試料の種の何れか1つ以上の同定をもたらす型のデータの分析を伴うか伴わずに得ることができる。データパターンはまた、まず数学的に処理し、例えばフーリエ変換又は小波変換を使用して又は他のドメインに変換し、そして処理又は変換されたデータを当業者の知る手法、例えば単純な数学的操作、データ削減手法、例えば固有値分析等を用いて他のスペクトルに比較することができる。スペクトル比較及び「比較スペクトル」という用語の使用は一般的に同じ試料の少なくとも2つのデータパターンを包含し、そのうち少なくとも1つは多相系を有する試料に相互作用することにより得られる。比較の作業は一般的にはスペクトル分析又はクロマトグラフィー的分析において慣用的に行われているような例えばベースラインを得るためデータパターンを単に規格化することを包含しない。比較スペクトルは又、一般的に、それがもとの試料を含む種の濃度に依存せず、そして、元の試料の種の濃度又は存在度のレベルに関する情報を必ずしも担持していなくてよいような態様において誘導される。

【0066】

「比較スペクトルデータ」はIRスペクトル、UV/VISスペクトル等から、並びに

10

20

30

40

50

、例えばクロマトグラフィーの溶出プロファイルから得られる時間におけるデータポイントの連続体から同様に誘導できる。少なくともV/V_{is}及びIRスペクトルに関連する比較スペクトルデータ、及び、そのようなデータの記録及び/又は表示の為の種々の手法は当業者がよく知る通りである。本発明との関連において、スペクトルデータ及び/又は比較スペクトルデータはスペクトルに関連するデータポイントの何れか1つ又は多く(何れかの数の質量対電荷比、波長、溶出時間等)において、特定の試料との関連において獲得及び/又は誘導することができることが強調される。

【0067】

実施形態

スペクトル分析、例えば蛋白及び血清又は他の生物学的流体から得られた混合物の質量スペクトル分析のパターンの研究における近年の進歩が明らかにしたことは、2試料間で異なる蛋白を明確に同定することによりそれらを区別可能とする必要はないことである。(例えば質量スペクトルのような特定のスペクトル手法を記載する本出願の何れの箇所においても、特定のスペクトル手法は例えば本明細書に開示した何れかの他のスペクトル又はクロマトグラフィーの手法により置換することができることと理解すべきである。本発明の実施形態の1つの特定のセットにおいては、質量スペクトルを使用する。)即ち、一部の態様において、シグナルパターン手法を用いる場合、スペクトルの相違はそれらの同定を必要とすることはなく混合物のパターン(「データパターン」)をキャプチャする数学的項目において表示できる。特定の蛋白(バイオマーカー)又は他の種の濃度レベルにおける変化を検出することにより試料間の相違を同定する代わりに、試料中の蛋白又は他の種の完全な混合物を表すパターンを比較し、その後、試料を分類するために使用する。これらの手法は分析中の試料に相当する例えば病理学的又は生理学的な変化には関連しない濃度レベルの変化に対して特に高感度である。特定の用途、例えば一般的集団における比較的稀少な疾患の診断の為には、特異性及び感度の必要レベルは極めて高い場合がある。このような高い性能レベルと、それに組み合わせられる試料中の濃度レベルの非関連の変化に対するパターン認識手法の固有の感度は、本発明の特定の系及び方法を使用しながら目標とすることができる。本明細書に記載したパターン認識系の方法は、発現の絶対的レベルに対しては固有には低感度であり、そして、より多くの信頼できるパターンをもたらす。更に又、そのようなパターンは試料間に伏在する相違に対してより緊密に相関付けることができる。上記した通り、そのような比較の手法は質量スペクトル分析にのみ限定されるわけではなく、試料の種1つ以上に関連して作成される如何なるデータパターンにも適用することができる、例えばNMRスペクトル分析、UV及び/又は可視光のスペクトル分析、クロマトグラフィー(例えば液体クロマトグラフィー又はHPLC)、GPC、ELIZA等を挙げることができる。

【0068】

分子又は他の種(例えば分子の凝集塊、多重サブユニット蛋白等)、例えば生体分子の状態は多くの要因、例えば限定しないが化学構造の変化(例えば蛋白におけるアミノ酸の付加、欠失又は置換、化学物質による共有結合の修飾又は化学的又は熱的な分解による切断、構造への炭水化物の付加又は欠失等)、生体分子又はリガンドのような他の種1つ以上との相互作用等により影響される場合がある。異なる状態の評価は異なる分子(または他の種)の潜在的有効性、分子の状態、分子又は種が滞留している環境(例えば種の混合物)の状態又は状況などを決定する1つの方法として使用できる。

【0069】

本発明は一部の実施形態において分子の状態の検査を包含する。本発明は生体分子及び/又は生体分子と相互作用できる分子の関与する試験の関連において記載するが、本発明は、生物学的、生化学的、化学的又は他の種であるかを問わず、本質的に如何なる分子種及び/又は相互作用にも適用することができる、そして非生物学的分子の関連において本発明をどのようにして使用できるかについては、当業者の知る通りである。「生体分子」を本発明の説明において使用する場合は常時、如何なる非生物学的分子も使用又は試験できると理解しなければならない。

10

20

30

40

50

【0070】

1つの態様において、本発明は生体分子（又は他の種）及び／又は生体分子と相互作用する分子の混合物の組成に関する情報を決定するための手法を包含する。混合物は生物学的材料、例えばヒトの臨床試料又は他の生物学的流体、組織、細胞、対象等を起源とするものであってよく、及び／又は、混合物は合成混合物であってよい。混合物は生物学的な系に由来するものであることができ、これは、本明細書においては、ヒト又は非ヒト哺乳類、例えば限定しないが、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、霊長類、ラット及びマウス、他の動物（例えばカエル）又は細菌、ウィルス、カビ又は植物起源のものを意味する。混合物はヒト又は他の動物の内部の何れかの適当な原料から、例えば組織生検試料、全血、血清又は他の血液画分、尿、眼内液、唾液、脳脊髄液、扁桃、リンパ節由来の液体又は他の試料、穿刺生検試料等から採ってよい。

10

【0071】

本発明は又、一部の場合において、元の混合物における生体分子又は生体分子と相互作用する分子の特定の構造的及び／又は機能的特徴を反映することができる、例えば本明細書に記載した多相分配または他の分離手法（例えばクロマトグラフィー）を用いた処理を介して得られる混合物の特徴（定量的及び／又は定性的）を発生させ決定することに関する。これらの特徴は例えば混合物の組成と混合物の生物学的原料の生理学的な状態、例えば対象の健康状態又は疾患との間の関連性を確立するために使用できる。これらの特徴はまた、分析の目的のために意図する分子においてリッチ化されたサブセットへの混合物の後の分画のための実験条件を設計すると同時に、一部の場合における異なる分子の総数を削減するために使用することもできる。分離は完全か部分的であってよく、即ち、種1個以上が、全体の試料と相対比較してサブセット中により高濃度で存在するが、他の種もなおサブセット中に存在してよい。本発明の系及び方法はまた生体分子又は生体分子と相互作用する分子の混合物中の変化を検出、分類及び／又は予測するためにも有用である。例えば、混合物は合成の混合物であるか生存有機体、細胞、組織または生物学的液体の特定の疾患又は生理学的状態に関連する混合物であってよい。本発明の系および方法は又、生物学的混合物中の分子又は生体分子の1つ以上に対する変化を検出するためにも使用でき、そしてこれらの変化は更に、一部の実施形態においては、そのような変化に関連する診断を検出及び分類するために使用される。しかしながら、1つの実施形態において、本発明の系及び方法は、本明細書に記載した態様において多相系に混合物を相互作用させ、そして比較スペクトルを誘導するよりも前（又は後）に混合物の前（又は後）処理として分画が行われるとしても、分析の前に元の混合物の種のサブセットを単にそのように除去するために使用されるのではない。

20

30

【0072】

混合物におけるそのような変化の例は混合物の種のパターンの特性における相違であることができ、例えば種のコンホーメーション、構造及び／又は他の分子に対する相互作用傾向（例えば他の分子または他の種に対する結合親和性又は他の相互作用の特徴）における相違に関連するものが挙げられる。例えば、混合物が蛋白又は他の生体分子を包含する場合、そのような変化は一次配列修飾を介して、化学的、熱的または他の分解機序を介した蛋白または他の生体分子の分解により、他の分子及び／又は生体分子との相互作用により、低分子量成分（例えばホルモン、ペプチド、ビタミン、コファクター等）との相互作用により、混合物の構成成分の相対的含有量または濃度の変化により、酵素反応のような反応により、ホスホリル化又はグリコシル化等のような特定の変化により誘導される場合がある。本発明の系及び方法は、一部の場合においては、特定の疾患又は生理学的状態又はその発祥の検出、その進行のモニタリング、治療等の目的のために、生物学的種、例えば限定しないが、ポリペプチド、蛋白、炭水化物、核酸、ポリヌクレオチド、脂質及び／又はステロール、及びこれらの混合物又は誘導体を検出、分析及び／又は特性化するために使用できる。

40

【0073】

本発明に關与する比較及び分類は本発明の分析方法に必ずしも関連しない（直接誘導さ

50

れない) 追加的情報の使用を行うことができる。例えば、血圧、温度、血糖値及び/又は本質的に如何なる他の決定可能な生理学的状態も本発明の手法と組み合わせて使用することにより1つ以上の生理学的状態を分析することができる。

【0074】

本発明の一部の実施形態においては、複数種(分子、生体分子等)を第1及び第2の相互作用成分に曝露し、これにより少なくとも部分的に複数種が、例えば第1の部分及び第1の部分とは異なる組成を有する第2の部分に分離又は「分配」される。例えば、第1の部分は第1の種(又は第1の種の第1のコンホーメーション)がリッチ化されていてよく、一方第2の部分は第1の種又はコンホーメーションが欠損してよい。このような分離は一部の場合においては部分的又は完全であってよい。一部の場合においては、系は本明細書に開示する通り、分配系である。非限定的な例は水性/非水性の分配系、水性の多相分配系、液体クロマトグラフィー、HPLC、カラム液-液分配クロマトグラフィー(LLPC)、不均質2相系、多相不均質系などを包含する。

10

【0075】

多重分配及び/又は他の分離工程は、追加的な情報及び/又は感度を得られるように、本発明の一部の実施形態において行うことができる。例えば2つ以上の異なる混合物の各々における種の比較パターンを決定する前に、そして、同一(又はほぼ同一)の組成の分配系2つ、3つ又はそれ以上における両方の混合物の分配の後に、混合物を含有する両方の系の第1及び/又は第2の相互作用成分のある量を更に、相互作用成分少なくとも2つを有する同一(又はほぼ同一)の系の第2のセットに導入することができる。次に、両方の混合物に関する系の両方の第2のセットの分配を行うことができ、そして、各混合物の種の比較パターンを本明細書に記載する通り決定して使用することができる。他の非限定的な例として、混合物はまずクロマトグラフィーに付し、その後、分配(又はその逆)してもよい。

20

【0076】

当業者の知る通り、これらの生物学的な種は何れかの適当な形態において、例えば天然原料からの抽出物、生物学的液体、細胞及び組織の試料、細菌、ウイルス又はカビ、コンビナトリアルな化学的又は生化学的手法により発生された分子の収集物、及び、これらの組み合わせ、合成により創作されたもの等の形態において存在することができる。

【0077】

1つの実施形態において、本発明は異なる組成を呈する試料(又は種の混合物)の間の変動が検出できる特定の条件を決定するための方法を提供し、即ちこれにより、情報を決定するための「ツール」として、又はツールの一部分としての基準及び/又は系の成分のセットを決定する。例えば、種の比較パターンを決定する多相系の能力は重要なツール又はそのようなツールの成分として機能することができる。具体的には、1つの非限定的な例として、溶媒構造のような異なる化学的又は生化学的な親和性または他の特徴を有する2つの相の間の試料の構成成分の分配は、構成成分を、異なる特性又は組成の媒体に対するそれらの相対的親和性により分離するものであってよい。即ちこの分離手法はプロテオミクス又は同様の手法、例えば電荷及び大きさの相違が試料の構成成分を分離するために使用される2つの次元である2Dゲル電気泳動において典型的に使用されているものを包含するか、或いはそれらとは異なることができる。一部の場合においては、例えばプロテオミクスにおける多くの用途について、本発明は同じか異なる条件の何れかをを用いて逐次的及び/又は連続的な分配を実施するための能力を提供し、それは分画された試料中の追加的な増幅または相違をもたらす場合がある。このような画分を含む種の物理的特性のこのようなパターンは更に、一部の場合においては質量スペクトル分析のような手法を用いて分析してよい。しかしながら、本発明に関する場合、混合物を含む一部の種を単に分画又は除去するためにそのような操作を必ずしも意図しておらず、むしろ、混合物中の元の種の濃度又は存在度のレベルに関する情報とは独立することができる比較スペクトルを誘導するための手段を提供するものである。

30

40

【0078】

50

上記した通り、水性多相（例えば2相）の分配系は本発明の多くの実施形態における使用に十分適しているが、他の分配系も他の実施形態に従って同様に使用できる。即ち「水性2相分配」又は「水性多相分配」を用いる場合、これは他の系、例えば水性/非水性の2相分配、非水性/非水性の2相分配、液体クロマトグラフィー等も使用できることと理解しなければならない。水性2相系におけるバイオポリマーの分配はその電荷、大きさ、3次元構造、型、溶媒に曝露されている化学基の局所構造等のような要因に応じたものであってよい。例えば、何らかの作用により、例えばリガンド結合の結合により、及び/又は、構造的分解により誘導された受容体の3D構造における変化は、また、生体分子における溶媒接触可能な化学基の局所構造又は溶媒に接触できる基の局所構造及び型の両方をも変化させることができる。これらの変化の1つの結果は、本発明の特定の実施形態によれば、生体分子及び/又はリガンド結合受容体の分配挙動における改変であってよい。

10

【0079】

一部の場合において、生物学的試料中の生体分子の濃度のレベルは、遺伝子タイピングまたは検査中の生理学的状態に関連するもの以外の理由に依存している。即ち、疾患対正常状態に起因する生体分子における相違の同定は、本発明の一部の実施形態においては、天然の遺伝子的又は他の変動の作用を無視するために、統計学的に有意な数量の試料を使用することを必要とさせる場合がある。一部の場合においては、過少又は過剰発現をもたらす遺伝子的又は他の変動の作用は、その疾患対正常状態に追跡される生体分子に対する相違から分離（分画）することができる。この分離は、種々の実施形態に従って、試料又は生体分子又は他の分子を含有する種の他の混合物を1つ以上の異なる系における分配又は分離に付し、そして、試料/系の種々の成分との混合物中の種の比較パターンを決定することにより、達成することができる。これは例えば、各試料の2つの相互作用成分を従来の手法を使用して分離及び/又は分画し、疾患及び正常の試料中の各種に対して計算した分配係数のパターンを計算し、そして、そのようなパターンをその後の分析のために利用することにより遂行することができる。特定の非限定的な例として、比較パターンを得ることは、系の第1の部分及び第2の部分（及び/又はより多くの部分）の少なくとも一部分における分画及び/又は分離を包含できる。この分画又は分離では、電気泳動、例えば一次元電気泳動、二次元電気泳動、液体又は他のクロマトグラフィー、系の第1、第2（及び代替例では更に多くの部分）の少なくとも一部分に対する質量スペクトル分析を実施する直接又は後の分析等を包含する手法を使用することができ、そして一部の場合においては、ポイント・バイ・ポイントによる比較を使用することができる。他の手法は他のスペクトル分析的手法（例えばUV、可視光、IR、ラマン等）等を包含する。異なる分配係数は各種の発現の絶対的レベルには関係しなくてよく、むしろ、構造、他の分子への結合に関する変化又はそれらの生物学的作用等に関連する他の変化に関係するものであってよい。即ち、本発明は実施形態の1つのセットにおいて、自身の構造において固有であり、そしてこのため自身の絶対的レベルではなく自身の機能に対してより緊密であって、そして一部の場合においては発現レベルの個々の変動性の作用を無視するために統計学的に大量の試料を必ずしも必要としない、生物学的混合物中の生体分子に対する変化の同定の為の方法を提供する。

20

30

【0080】

多重系から得られる分配係数の値のパターン（「サイン」）の使用は本発明の特定の方法の特異性を増強させるために使用できる。更に別の実施形態においては、多重系における試料の分配及び上記した行程の実施、次いで、生体分子の1つ以上の値のパターンを観察することは、感度の高い特異的な診断方法を構築する別の方法を提供できる。

40

【0081】

一部の実施形態においては、そのような変化は局所構造及び/又は溶媒接触可能な基の型に対する伏在する依存性を有する他の系及び方法を使用しながら検出してよい。そのような他の方法の例は限定しないが、カラム液-液分配クロマトグラフィー（LLPC）、不均質2相系、多相不均質系等を包含する。一部の場合においては、第1の相と第2の相との間の平均の分配における相対的变化を表す見かけの分配係数を発生させてよい。例え

50

ば、LLPCにおいては、受容体の保持容量を見かけの分配係数として使用してよい。

【0082】

水性2相系は当業者に良く知られており、異なる種類の水溶性重合体または単一の重合体及び特定の塩の水性混合物として生じることができる。2つ以上の特定の重合体、例えばデキストラン(「Dex」)及びポリエチレングリコール(「PEG」)又は1つ以上の特定の重合体及び1つ以上の無機塩、例えばポリビニルピロリドン(「PVP」)及び硫酸ナトリウムを特定濃度を超えて水中で混合する場合、混合物は特定の条件下では2つの非混和性の水相に分離する場合がある。それらは例えば一方では1つの重合体がリッチ化され、そして他方の相では他の重合体又は無機塩がリッチ化されているように、2つの相を分離する別個の界面境界が存在する場合がある。一方又は両方の相における水性の溶媒は生物学的又は他の種に対して適当な媒体を提供してよい。2相系は又、異なる種々の化学成分を使用することにより多重の相の系に一般化することができ、10以上の相を有する水性の系は当該分野で知られており、そして本発明と共に使用できる。

10

【0083】

種をこのような2相系に導入する場合、それは2相の間に分布する場合がある。この系及び他の系(例えば3つ以上のこのような相を有する多相系)においては、種は各相内で異なる濃度で存在することができ、或いは、各相内で同じ濃度であることができる。溶質の分配は、平衡している2つの非混和性の相の溶質の濃度の間の比として定義される分配係数「K」により特性化することができる。水性重合体系における相分離は水の構造に対する2重合体(又は単一の重合体と塩)の異なる作用に起因する可能性があることが以前よりわかっている(例えばB. Zavlavsky, Aqueous Two-Phase Partitioning: Physical Chemistry and Bioanalytical Applications, Marcel Dekker, New York, 1995を参照)。水の構造に対する異なる作用の結果として、共存している相における水性媒体の溶媒の特質は相互に異なることができる。相間の相違は誘電体、溶媒和発色性、電位差滴定、分配決定等のような手法により決定してよい。

20

【0084】

水性2相系における溶質の分配の基本的規則は水-有機溶媒系におけるもの(これもまた本発明における系として使用できる)と同様であることがわかっている。しかしながら水性重合体系の2相の特性において相違が実際に存在するとしても、同じ(水性)の性質の溶媒の対に関して予測されるとおり、水-有機溶媒系中で観察されるものと相対比較して、極めて小さい場合が多い。水性2相または多相の系における相の溶媒特質の小さな相違は、特定の構造的特質が存在する場合に生じる観察される分配を増幅するように変更することができる。

30

【0085】

相の各々の重合体及び/又は塩の組成は水性2相系の全重合体及び/又は塩の組成に依存している場合がある。ある所定の相の重合体及び/又は塩の組成もまた、この相の水性の媒体の溶媒特質を支配することができる。これらの特質は、例えば限定しないが、誘電特性、溶媒の極性、溶質との疎水性水和相互作用に参加する溶媒の能力、溶質との静電的相互作用に参加する溶媒の能力、及び、溶媒の水素結合酸性度及び塩基性度を包含する。共存する相における水性媒体の全てのこれら及びその他の溶媒特質は、水性2相系の重合体と塩の組成の選択により操作してよい。媒体のこれらの溶媒特質は受容体における溶媒接触可能な化学基の特定の型に対する所定の水性2相系の感度を支配する場合がある。この感度、型および例えば2種の異なる蛋白中の溶媒接触可能な基の局所構造は所定の水性2相系中の蛋白を分離する可能性を決定することができる。

40

【0086】

一部の場合においては、特に高感度の系、例えば、2つの極めて同様の種に対して極めて高感度の系、又は、単一の種のコンホーメーションにおける相違を検出することができる系等が必要となる場合がある。この感度は例えば、緊密に関連する化学的化合物の結合により誘導される受容体におけるコンホーメーションの変化の間で僅かな相違を検出して

50

いる場合に重要となる場合がある。本発明は一部の実施形態においては、2つの混合物の組成の間の相違を同定及び/又は増幅するために組成物をスクリーニングするための効率的で良好な系及び方法を提供する。本明細書に記載するように、各分子をスクリーニングする為に広範な種類の異なる条件を利用することにより、異なる分配または分離の挙動が信頼性を持って得られ、その際、水性2相分配、又は、他の関連する、又は代替可能な分離手法の何れかの根本理論を十分に理解する必要はない。

【0087】

蛋白、核酸等の生体分子は、2つ以上の相の間では、そのような系におかれた場合には分布する場合がある。例えば、相形成重合体を使用する場合において、1つ以上の2重合体及び生体分子を含む溶液を、両方の相形成重合体及び生体分子が混合されるように、共に混合してよい。得られた溶液を分割し、そして2相系を形成する。場合により、遠心分離を使用することにより相の分離を増強することができる。更に別の実施形態においては、分配はマイクロ流体装置中で実施してよく、その場合、2つの液流を狭小なチャンネル中で緊密に接触させることにより攪拌及び遠心分離を必要とすることなく種の分配を促進する。当業者に知られる通り、生体分子の分配挙動は多くの変数、例えばpH、使用する重合体、使用する塩、系の組成に関連する要因、並びに温度、容量等のような他の要因により影響を受ける場合がある。所望の作用のためにこれらの要因を最適化することは、本開示と組み合わせ、当業者により定型的な慣行で行うことができる。

10

【0088】

生体分子又は他の種の分画に由来するデータの評価では、一部の実施形態においては、分配係数を使用する。例えば、蛋白の分配係数は2相系における第1の相における蛋白の第2の相におけるそれに対する比としてとらえることができる。多相系が形成される場合、多数の独立した分配係数が存在でき、その各々が何れかの2相の間において定義される。当然ながら、所定の生体分子又は所定のコンホメーションにおける他の種に関する分配係数は、それらが付される2相系の条件と組成が一定に維持される場合には一定となる。即ち、例えば、潜在的結合相手の添加時に蛋白に対する分配係数において変化が観察される場合、それらの変化は蛋白-結合相手複合体の形成により誘発される蛋白構造の変化に起因すると推測できる。そのような場合における分配係数は特定の数学的に定義される量であり、そして用語には、種及び少なくとも2つの相互作用成分の間の相互作用の相対的尺度を表す係数が包含される。やはり当然ながら、2つ以上の混合物中の相当する種の分配係数の間の相違は、潜在的な構造の変化に加えて、そのような種の混合物中の他の種への結合又は結合の欠如を示す場合がある。本発明は分配係数のパターンの特定の使用を行うが、それらの個々の相当物は本明細書に記載した目的の為に必ずしも使用しない。

20

30

【0089】

1つの分配系の非限定的な例において、水性多相系は種々の物質から形成可能であることがわかっている。例えば分析すべき蛋白（又は他の化合物との蛋白の混合物）の分配係数を決定するためには、水中の全ての成分（重合体1、例えばデキストラン；重合体2、例えばPEG、ポリビニルピロリドン、塩等）の濃縮保存溶液を別個に製造できる。相の重合体、塩及び蛋白の混合物の保存溶液は、系が所望の組成となるために適切な量及び条件（例えば約3.0~約9.0のpH、約4~60の温度、0.001mol/kg~5mol/kgの塩分濃度）において混合し、そして激しく振とうすることができる。次に系を平衡とすることができる（相の分割）。平衡は溶液を未攪乱に維持することにより達成することができる、又は、約1000g~約4000g、又は一部の場合にはより高値において例えば2~30分間遠心分離することにより加速することができる。各々の沈着（分割）した相の細分量を上層及び/又は低層から（又は多相が存在する場合1つ以上の相から）取り出すことができる。次に分子又は他の種の濃度を各相に関して決定することができる。

40

【0090】

種々の実施形態において、例えば、多相系の各相における生体分子の濃度の形態におい

50

て、種と相互作用成分との間の相互作用の相対的尺度を決定するために種々の異なる試験方法を使用してよい。試験は頻繁には存在する生体分子又は他の種のアイデンティティー及び型に依存している。適当な試験の手法の例は限定しないが、立体顕微鏡試験、免疫化学試験、化学試験、蛍光試験、放射線試験及び酵素試験を包含する。生体分子がペプチド又は蛋白である場合、共通のペプチド又は蛋白の検出手法を使用できる。これらには、限定しないが、直接の分光分析（例えば280ナノメートルにおける吸収をモニタリングする）及びクーマシーブルーG-250またはフルオレスカミン、*o*-フタルジアルデヒド又は他の染料及び/又は試薬を用いた染料結合反応を包含する。或いは、蛋白が抗体又は抗原の何れかである場合は、特定の免疫化学的試験を一部の場において使用できる。質量スペクトルの場合、特定の m/z のスペクトルの位置におけるピーク高さは一部の場において特定の蛋白の濃度に比例する場合があります、又は、特定の溶出時間におけるピーク高さが同様に比例する場合があります。

【0091】

各相における、又は1つの相と元の試料における生体分子又は他の種の濃度は、本発明の一部の実施形態においては、特定の系の条件の下に試料の分配係数を決定するために使用できる。分配係数は2つの濃度の比を反映するのみであるため、絶対値は必要とされなくてよい。当然ながら、これは特定の分析手法を単純化することができ、例えばカリブレーションは一部の場において省略され得る。更に、2つ以上の試料を比較する場合に例えば生物学的系から得られた試料中の蛋白の絶対的な濃度における天然の変動性の作用を無視するためには多大な利点を有する場合があります、これにより、試料中の個々の種の構造の変化に関連する分配係数の相違として検出されるこれらの変化に集中することができる。

【0092】

当業者の知る通り、分配係数を得るための上記した工程は他のもので代替することができる。生体分子の大きさ、体積、量、検出系に応じて、液-液又は液-固の分配、クロマトグラフィー又は本明細書に記載する結果を効果的にもたらす他の方法の何れかを用いた個別又は連続的操作を使用してよい。そのような変更および異なるプロセスは本発明の範囲を限定しない。

【0093】

分配係数は又、本発明の一部の実施形態においては他の分配係数と比較することができる。例えば、ある種に関する分配係数は異なる条件下の種に関する分配係数と比較することができ、ある種に関する分配係数は他の種と組み合わせた場合の種の分配係数と比較することができ、ある種に関する分配係数のセットを分配係数の他のセットと比較すること等が可能である。例えば質量スペクトル分析を用いた m/z 又はHPLC又は他のクロマトグラフィー手法に関する溶出時間等に対する分配係数のシリーズから得られたパターンを異なる条件下で得られた他のパターン等と比較できる。質量スペクトル分析の場合は、例えば分配系の上層に関する各 m/z におけるシグナルの値を一部の場においては同じ分配系の下層の同じ m/z におけるシグナルの値で割ることにより、同じ特定の m/z における分配係数の値を得てよい。別の非限定的な例として、上層に関するHPLCクロマトグラムにおける各所望時間における吸光度の値を、ある場においては、同じ時間に相当するその対応物である下層の値で割ることにより分配係数のクロマトグラムを得てよい。これらのスペクトル又はクロマトグラムも又、本発明においてはパターン又はデータパターンと称してよい。この比較情報は、一部の場においては、目的の分子の相互作用の特徴を決定するために使用される場合と同じ時間又はほぼ同じ時間に同じ系又は同様の系において得ることができ、又は、チャート、表又は電子的に格納された情報（インターネット上で入手されるもの、ディスク等）の形態で予備作成されたデータとして提供することができる。

【0094】

本発明の1つの実施形態において、実験試料に由来する、及び、レファレンス試料（上記した通り同時、先行、又は後続して決定）に由来する蛋白又は生体分子の混合物は種々

10

20

30

40

50

の異なる水性の2相系、例えば、デキストランとPEG又はデキストランとFicollのような異なる型の重合体によるか、デキストラン-70とPEG-600またはデキストラン-70とPEG-8000のような異なる分子量の同じ型の重合体によるか、同じ重合体であるが型及び/又は濃度の異なる塩添加物、異なるpH及び濃度の異なる緩衝物質などを含有するものにより形成されたものの中に分配させてよい。一部の場合においては、特定の試験の操作法(両方の試料に対して同じ)を用いて決定される混合物に関する全体的な分配係数を全ての系において決定できる。1つの実施形態において、比較下にある混合物について異なる分配係数を呈する系は例えばその後の混合物の分画及び/又は特性化のための分離媒体として選択してよい。別の実施形態においては、混合物を分配するか、既知特性の標準的な系、例えば疎水性又はイオン性の相互作用に対して増強された感度のレベルを与えるもの1つ以上を用いて別様に分離する。そのような場合において、混合物を含む種の個々の分配係数のパターンを相内の混合物の分離の後に決定及び/又は2つ以上の混合物の間で比較してよい。

10

20

30

40

50

【0095】

2試料の分配挙動における観察された相違の原因は、必ずしも多くの用途のため、例えば診断のために有用であるものとしてそのような相違を化学的に特性化する必要はない。分配挙動をもたらすそのような相違は、異なる溶媒構造の水性媒体に曝露された場合の試料における相対的な組成、構造又はコンホメーションの相違を包含する多数の原因から生じる場合がある。更に又、2試料の分配挙動のパターンに含有される種のアイデンティティーは特定の用途のために有用であるものとして2パターンの中の相違に関して知られる必要はない。

【0096】

実施形態の1つのセットにおいて、本明細書において提案する系および方法は、試料間で区別することが有利である場合がある、複合体及び生体分子を温存しつつ、蛋白を分離及び分画するための手法を提供する。水性分画における溶媒媒体は生体分子の混合物と適合するように選択してよい。溶媒媒体は又、より高次の構造並びに蛋白、小分子量リガンド等のような生体分子間の非共有結合を温存するように選択してよい。例えば本発明の方法による複合体の出現または消失は診断及び他の用途のために有用である場合がある。そのような実施形態の結果として、何れかの特定のm/z又は溶出時間における分配係数はそのような生体分子の相互作用の存在又は非存在を反映している場合がある。

【0097】

本発明の1つの態様は少ない分離回数または電荷及び/又は大きさのような変数に堅固に拘束されることなく異なる試料の間の区別を可能にする系および方法を提供する。本発明の1つの非限定的な例の用途は調節可能な分離回数を提供することであり、その場合、個々の種のパターンの変化は、個々の分配係数のそれらのパターン又はデータパターンの決定を介して判明させることができ、これにより分子の大きさ又は電化のような従来の分離手段を用いて検出することができない変化の検出及び同定が可能となり、そしてその場合、そのような個々の種の濃度の絶対的レベルはパターン自体を反映するものではない。

【0098】

本発明の1つの実施形態は、一部の場合においては、伏在する有機体の正常及び疾患の状態の間で変動する場合がある生物学的試料における生体分子のパターンを発見するための系および方法を提供する。一部の場合においては、相互作用成分との自身の疎水性、イオン性などの相互作用における相違をもたらす構造的変化に対する感度を与えることが各々わかっている典型的には多数の系のセットを同じ試料で処置することができる。特定の実施形態において、本明細書に記載した手法を使用して、系1つ以上におけるマーカーとしてパターン1つ以上を同定することができる。このマーカーは又、後に診断用途のために使用することもできる。

【0099】

さらに別の実施形態においては、マーカー及びそのようなマーカーが発見された関連の系のセットを診断スクリーニングのために使用できる。例えば、診断試験はそのようなス

クリーニングのために適当な何れかの順序で実施できる以下の工程、即ち(1)マーカー発見試験中に使用された系の1つ以上における試料を分画するか、又は別様に分離すること；(2)種濃度対 m/z または溶出時間のパターン2つ以上を得るための分配された試料の処理；(3)各々2つの相当するパターンから分配係数対 m/z または溶出時間の比較パターンを計算すること；(4)統計学的又は数学的な手法の何れかの組み合わせを使用してマーカー発見試験中に得られた正常及び疾患状態を表すものに比較パターンを比較すること；及び(5)単独又は他の情報と組み合わせたそのような比較に基づいて診断薬を指名すること；の1つ以上を包含できる。

【0100】

特定の非限定的な例として、一般性を失うことなく、分配系の相少なくとも2つから、または、1相及び元の系から得られたデータのパターンを比較することは、典型的な場合少なくとも2つをもたらす場合がある。一部の場において、パターンを記述するために使用される同じ(又は現実上同じ)縦座標のパラメーター、例えば、特定の m/z 値又は溶出時間において、決定された物理的特性(例えば濃度)の2つの有限値が2相において存在する場合がある。一部の場において、縦座標位置に特異的な分配係数をそのような特性の比として数学的に定義することができる。

【0101】

別の場において、同じ(または現実上同じ)縦座標の位置において、相の一方に由来する試料は決定された物理的特性の有限値を示すが、他方は示さない。そのような場合はその縦座標位置に相当する個々の種は相の一方に全体的に又は現実上全体的に分離されている。特定の場において、縦座標上の位置に特異的な分配係数は数学的には、ゼロ、無限大または数値ではない他のカテゴリとして記載できる。

【0102】

第1の場合の特定の非限定的な例として、決定された特性のパターン及び分配係数の処理されたパターンは以下の通り示してよい。

【0103】

【表1】

m/z	350	400	1100	12000	13500	17000
上相ピーク	3000	4000	1000	5000	14000	28000
下相ピーク	1000	2000	2000	7500	14000	100000
分配係数	3	2	0.5	0.714	1	0.28

第2の場合の特定の非限定的な例として、決定された特性のパターン及び分配係数の処理されたパターンは以下の通り示してよい。

【0104】

【表2】

m/z	100	450	1500	11000	11500	18000
上相ピーク	3000	0	0	5000	14000	0
下相ピーク	0	2000	2000	0	0	1000
分配係数	INF	ゼロ	ゼロ	INF	INF	ゼロ

一般性を失うことなく、これらのパターンはそのような実施形態によれば以下の4つの場合：

1. 分配係数対縦座標位置のパターン。
2. 特定の縦座標位置の特性の値対縦座標位置のパターンの相違。
3. ゼロ又は無限大の分配係数値に相当するカテゴリ値対縦座標位置のパターン。
4. 上記の場合の何れかの混合型。

により記載することができる。そのような場合、パターンは一連の数およびカテゴリ値対縦座標値、並びにパターンにおける特定のエントリの意味のアノテーションを与える同じ縦座標値における象徴的指示子の相当するシリーズを含む。

【0105】

別の非限定的な例として、パターンは以下の通り記載してよい。

【0106】

【表3】

m/z	1000	4500	15000	19000	20000	21000
分配係数	INF	0.35	ゼロ	5.1	INF	1.15

10

一般性を失うことなく、一部の実施形態によりバイオマーカー又はバイオマーカーのセットを検索すること（例えば臨床的特異性を増大させるため）、そして、疾患を指名することは、何れかの適当な順序で実施される以下の工程：

- 1つ以上の水性2相分配系を製造すること。
 - 正常及び疾患状態の起源に相当する血漿（ホモゲナイズされた組織、尿、唾液等）の試料を添加すること；
 - 水性2相系に試料を分配すること。
 - 各試料につき水性2相系の両方の相に由来する（又は1相及び元の試料に由来する）細分量を取り出すこと。この工程の後に各試料につき2細分量が存在する。
 - 場合により、追加的分離工程（例えばHPLCまたは蛋白の特定のクラスを優先する固体支持体への吸着）を行うことにより特定の物理的特性、例えば大きさ又は電荷に従って各細分量中の蛋白の群を分離すること。
 - 質量スペクトル分析機を用いた各細分量中の試料の質量スペクトルパターン対そのm/z値を作成すること；
 - 2相の何れかの特定のm/z値における特性値の不在を指名するためのカテゴリ値を用いて同じ試料に由来する細分量の各セットにおけるポイント・バイ・ポイントの相当するスペクトルデータの比を計算すること。
 - 数学的又は統計学的手法を用いて、正常対疾患状態について比及び/又はカテゴリ値の比較パターンを比較すること。
 - パターン1つ以上を、そのようなパターンを定義するために使用された分配系及び他の分離工程と共に、試料の2つの型に対して数学的又は統計学的手法を用いた場合の相違としてのそれらの指名により潜在的バイオマーカーとして選択すること。
- の1つ以上を包含できる。

20

30

【0107】

上記したようにマーカーを発見して選択することは、蛋白を同定することを必ずしも必要としない。一部の場合においては、マーカーは本明細書に記載した態様において選択された種のパターンを含んでよい。1つの実施形態において、水性2相分配系又は他の系の特定の組成を使用することにより分配係数としての比を決定してよい。異なる組成の複数の分配系も上記したものと同様の方法において使用できる。後の診断薬のためのマーカーのセットの選択もまた、特異性における増大の競合的属性、追加的バイオマーカーを最終セットに含めた場合の費用などのような要因に依存してよい。

40

【0108】

上記したものと同様の手法を用いてバイオマーカーが発見された後、診断薬スクリーニング試験を本発明の一部の実施形態に従って考案することができる。非限定的な例として、一般性を失うことなく、試験は以下の通り実施してよい。

1. 未知状態（正常または疾患）に相当する血漿（ホモゲナイズされた組織、尿、唾液等）の試料を得る。
2. バイオマーカーの発見中に使用した分配系に試料の細分量を添加する。1つより多い系を使用した場合は、各々の異なる分配系に対して同じ工程を反復する。

50

3. 系の各々において試料の分配を実施する。
4. 試料の異なる状態に相当するパターンを定義、及び選択するために用いる工程に従って、追加の分離工程を実施する。
4. 分配された相の各々の質量スペクトルを得る。
5. 分配された相の各々の分配係数のパターンを計算する（上記した通り必要に応じてカテゴリ値を使用する）。
6. 適切な数学的又は統計学的手法を用いて、未知起源の試料由来の分配係数及び/又はカテゴリ値よりなる比較パターンを正常及び疾患状態に相当するものと比較する。
7. 既知試料の1つと診断上同様であるとして未知試料を分類する。

【0109】

10

一部の実施形態においては、バイオマーカーは、同じ蛋白の形態の混合物及び/又は生体分子間又は生体分子と正常及び疾患状態の間で出現または消失すると考えられる他の分子の間で複合体を形成する混合物を示す場合がある。同じ蛋白の異なる形態の分布または相対量における変化は、一部の場においては、同じ蛋白の異なる分配挙動をもたらす場合があり、そして、複合体の出現または消失は例えばスペクトルピークの出現または消失をもたらす場合がある。

【0110】

20

本発明の一部の特徴は、生理学的分析のため、及び/又は、生理学的分析を実施するためのツールを決定するというレベルにおいて、種々の試験を提供する。例えば、分析操作法を決定するためのツールは単一の個体または複数の個体から試料を採取することを包含できる。1つの実施形態において、陽性試料及び対照試料を単一の個体から採取できる。例えば、個体は腫瘍を有してよく、そして陽性試料は腫瘍の一部分であってよく、その場合、対照試料は個体の非腫瘍部分に由来する。陽性及び対照の両方の試料は同じ時間に、又は異なる時間に個体から採取できる。例えば、有機体の腫瘍部分に由来する試料を異なる時間に採取し、腫瘍の進行の分析のためのツールとしての試料のパターンの相違を決定するために使用できる。

【0111】

30

一部の場においては、単一のパターン又は複数のパターンをマーカーとして使用できる。単一の試料に由来する複数のパターンを特定の状態に対する別個のマーカーとして同定することができ、そして、分析中は別個のパターンを特定の例において試験することができる。一例として、単一のパターンは単一の分配系により同定、及び/又は、それとの関連において研究されるマーカーを定義できる。別の実施形態においては、単一の試料に由来する複数のパターンは複数の分配系を用いて特定の条件に関して別個のマーカーとして同定することができ、そして分析の間、別個のパターンを試験できる。

【0112】

40

分配係数またはカテゴリ値のパターンを評価するために使用される分析ツールは例えば質量スペクトル分析器、液体クロマトグラフィー、例えばHPLC、又は他のスペクトル手法、例えばUV、IR、ラマン、又は他の吸光度及び/又は散乱の手法であってよい。各々の場合のパターンに関する縦座標は手法により変動し、例えば、質量スペクトルに対しては m/z 、HPLCに対しては時間、大部分のスペクトル手法に対しては波長等となる。方法の技術的特徴は1つ以上のピーク（例えば特定の m/z における値）のパターン又は各々の特定の波長における多くの分子からの応答の総和物として得られる散漫パターン（例えばHPLCクロマトグラム又はUV-Vis吸光度スペクトル）をもたらす。このようなパターンを分析するために使用される数学的手法は当業者の知る通り使用する手法に応じて変動する場合があり、そして各分析ツールの相対的選択は、本発明の一般性を失うことなく、その感度、解像度及び他の操作上の特徴によりおもに決定されることになる。

【0113】

50

一部の場においてはデータを分析するために数学的および統計学的なパターン認識手法、例えば主成分分析、部分的最小自乗、人工的ニューラルネットワーク、遺伝的アルゴ

リズム、フーリエ変換又は小波変換等を使用してよい。一部の場において、そのようなアルゴリズムの1つ以上を用いて、分配係数及び/又はカテゴリ値のシリーズを処理、変換、圧縮または操作してよい。種の所定の混合物(例えば陽性症例由来の血清試料)に相当する生データ又はそれらの処理されたデータを種の異なる混合物(例えば陰性症例由来)に相当する同様に得られ処理されたデータと比較してよい。パターン発見の間、そのような手法には異なるクラスの試料の多数の例を与えてよく、そして、データの分析判別特徴を発見し、数学的または統計学的な態様において提示する。特定の例においては、このような手法は同様に実施された実験から得られた新しいデータに応答を求め、そして後に、同定のためにそのようなデータを以前から知られている例と厳密に比較するために、以前に発見されている判別特徴を使用してよい。

10

【0114】

本発明の1つの特徴によれば、本明細書に記載した方法の何れかを自動的及び/又は反復して実施することができるコンピュータ及び/又は自動化された系が提供される。本明細書においては、「自動化された」装置とは人間に指示されずに操作できる装置を差し、即ち、自動化された装置は、何れかの人間が、例えばコンピュータに指示を入力することにより、機能を推進するための何れかの行動を取り終えた後の一定期間、機能を果たすことができる。典型的には、自動化された機材はこの時点の後に反復機能を果たすことができる。コンピュータ又は他の自動化された系の使用が可能な手法の1つの特定の非限定的な例は、系に由来する試料に由来する種1つ以上と分配系の種々の相互作用成分との間の相互作用の相対的尺度を決定することにより系の生理学的状態が決定されるプロセスにおけるものである。臨床状況においては、これは例えば血液の試料(ミリリットル規模又は一滴以下のようなきわめて少量の試料)を採取し、そして血液試料またはそのサブセット(例えば血漿)を多相分配プロセスに付すことにより行ってよい。次にこのプロセスの結果を、電子的に格納されたデータの形態をとることができる同様の系におけるマーカーの同様の挙動と比較することができる。

20

【0115】

図1は本発明の1つの実施形態により例示される系の模式的ブロックダイアグラムである。図1に示した実施形態においては、コントローラ200を従来のパーソナルコンピュータ250上にインプリメントし、これにはプロセッサ251、メモリ252、インプット装置253、場合により着脱式ストレージ装置254、ポインティング装置255、ディスプレイ装置256及びコミュニケーション装置257が包含され、全てバス258を介して連結されている。従来の態様においては、メモリ252が種々のメモリ装置、例えばハードディスク装置、光ディスク装置、RAM、ROMまたは他のメモリ装置及びそれらの組み合わせを包含してよく、そしてインプット装置253はキーボード、マイクロフォン、又はコントローラ200のユーザーからインプット210の1つ以上を受領することができるインプット装置の何れかの他の形態を包含してよい。着脱式ストレージ装置254はCD-ROMドライブ、テープドライブ、ディスクドライブ等を包含してよく、そして本明細書に記載する本発明の種々の実施形態を実施するためのソフトウェアを包含するアプリケーションソフトウェアをロードするために使用してよい。ディスプレイ256は従来のCRTディスプレイスクリーン、フラットパネルディスプレイスクリーン又はテキスト情報がユーザーに標示されるようにするディスプレイ装置の何れかの他の型を包含し、そして、ポインティング装置255はパッド、ジョイスティック、トラックボール、マウス又はディスプレイ装置256上に表示される種々のテキスト情報のうちからユーザーが選択できるようにするポインティング装置又はスクローリング装置の何れかの他の型を包含してよい。コミュニケーション装置257は流体取扱器具30からインプット220の1つ以上を受領し、そして流体取扱器具30にアウトプット1つ以上を提供することができるコミュニケーショントランシーバーの何れかの形態を包含してよい。例えば、コミュニケーション装置257はRS232/485コミュニケーショントランシーバー、4-20mAアナログトランシーバー、エターネットトランシーバー等を包含してよい。

30

40

50

【0116】

本発明の実施形態を実施するコードを包含するソフトウェアは着脱式格納媒体、例えばCD-ROM、テープ又はディスク又はインプリントされたメモリ252及び着脱式格納装置254に適する他のコンピュータ読み取り可能な媒体の何れかの型の上に格納してよい。ソフトウェアはバックアップ目的のために着脱式格納媒体を温存するためにコンピュータ250（例えば、ハードディスク）上の格納媒体の恒久的形態にコピーすることができる。使用に際しては、ソフトウェアは一般的に、そして少なくとも部分的にはRAMに格納され、そしてプロセッサ251上で実行される。

【0117】

本発明の種々の実施形態はまたハードウェアに限定して、又はソフトウェアとハードウェアの組み合わせにおいて実施することができる。例えば、1つの実施形態においては、従来のパーソナルコンピュータよりはむしろ、プログラム可能なロジックコントローラ（PLC）を使用する。当業者の知る通り、PLCは汎用型コンピュータに出費する必要のない種々のプロセス制御用途において頻繁に使用されている。PLCは1つ又は種々の制御プログラムを実行するために既知の態様において機器構成されていてよく、そして、パーソナルコンピュータと同様の態様においてユーザー又は他の装置からのインプットの受領及び/又はユーザー又は他の装置へのアウトプットの提供を行うことができる。従って、本発明の実施形態は汎用型コンピュータの観点において記載しているが、当然ながら、汎用型コンピュータの使用は例示に過ぎず、他の機器構成も使用してよい。

【0118】

図1に示す通り、コントローラ200は流体取扱器具30に連結するように適合されており、これにより流体取扱器具の操作が制御される。コントローラ200はインプット210を包含し、これは実施すべき所望の操作に関連するコントローラ200のユーザーからのパラメータ1個以上を受領する。コントローラ200はまた、流体取扱器具の操作状態に関連するシグナルを受領するための複数のインプット220及び流体取扱器具を機器構成して制御するためのアウトプット230、240の複数を包含する。インプット210上で受領されたユーザーインプットパラメータは流体取扱器具により処理されるべき蛋白及び/又は他の生体分子の型および量、例えば液-液分配のために流体取扱器具により使用される液体の組成等を包含してよい。

【0119】

本発明の一部の実施形態は流体取扱器具の操作に関連するインプットパラメータの1つまたは多くをユーザーが特定し、そしてその後、インプットパラメータに基づいて、流体取扱器具を機器構成及び制御できるようにする。ユーザーにより特定されるインプットパラメータの数に応じて、コントローラは流体取扱器具を機器構成する前に追加的なパラメータに関してユーザーにプロンプトしてよい。

【0120】

コントローラ200のインプット220は流体取扱器具の操作状態に関連するシグナル複数を受領するように適合される。インプット220上で受領してよいシグナルは一般的に、流体取扱器具内の物理的条件に相当し、そして例えば流体取扱器具内の蛋白又は他の分子の濃度、曝露時間、沈着が起こるまでの時間、攪拌の程度、操作温度又は圧力などを包含してよい。

【0121】

コントローラ200のアウトプット230、240はインプット210において受領されたユーザーパラメータ及び場合によりインプット220上で受領されたシグナル1つ以上に基づき、流体取扱器具を機器構成し、そして制御するように適合されている。アウトプット230は多くの別個のシグナル、例えば液体内に蛋白又は他の分子を導入するシグナル、操作温度を制御するシグナルなどを提供する。

【0122】

本発明の他の実施形態によれば、コントローラ200はプロセッサ251によりアクセスされることができるデータベース及び/又はナリッジベースを包含してよい。本発明の

10

20

30

40

50

1つの実施形態によれば、データベースは複数の記録を包含してよく、各記録は、相互作用の相対的尺度を決定するために流体処理器具を使用してよい対象となるパラメーターの特定のセットに相当する。特段の記載が無い限り、本明細書において、以降「パラメーター」という用語はプロセスパラメーター（例えば添加すべき蛋白又は他の生体分子の量、操作温度等）並びにプロセスパラメーターの特定のセットがある場合に実験の特徴（例えば濃度、分離時間等）の両方を指すために使用する。一般的に、データベース内に格納される記録の各々は、所定の条件下の流体処理器具の使用または所定の条件下の同様の流体処理器具の使用に基づいた実験データを反映している。即ちコントローラ200及びデータベースは「専門」系を形成するものとしてとらえてよい。データベースは着脱式格納媒体上に格納してよく、そして、プロセッサ251による使用のためにメモリ252にコピーされてよく、或いは、コントローラはデータベースを包含するように予め機器構成されてよい。

10

20

30

40

50

【0123】

一部の場合においては、データベース（又はナリッジベース）は流体取扱器具の特定の型（例えば流体取扱器具の特定の製造元からの特定のモデル）に対して機器構成してよく、又は、流体取扱器具の種々の型と共に使用するように機器構成してよい。一部の場合においては、データベースは蛋白及び/又は他の生体分子の特定の型に対して機器構成してよい。或いは、異なる蛋白、生体分子、水溶液等の多くを包含するより一般的なデータベースを使用してよく、これらと共に種々の異なる流体取扱器具を使用してよい。使用に際しては、データベースは流体取扱器具によりアクセスされ、そしてコントローラ200により実施されるルーチンを制御することにより自身に操作可能に連結されている流体取扱器具30を機器構成して制御してよい。当然ながら、データベース又はナリッジベースは初期的には同様の器材で得られた実験的データに基づいているが、データベースは定期的に更新（例えば新しい記録を付加してよく、及び/又は既存の記録を変更してよい）されることにより使用中に、又は同様の器材の使用により得られた追加的データを反映してよい。データベースの別の態様は分析機器から得られた生データ又は処理されたデータに関連するパターン情報の格納と検索のためのその容量に関連している。そのようなデータは値、カテゴリ情報、数学的な係数及び本明細書に記載した用途のためのそのようなパターンの発見及び使用のために有用な他の方法特異的および試料特異的な情報を包含してよい。

【0124】

本明細書に記載した手法及び器材はマーカーを発見するため、又は診断試験を実行するために使用できる。器具は当該分野で知られた他の装置及び器材、例えば自動化試料調製器材、液体クロマトグラフィーカラム、HPLCシステム、質量スペクトル分析機、吸光度決定機等にインターフェイスで接続されてよい。そのような装置及び器材から得られたデータはデータの削減及び分析を実施するため、及び、診断薬を明示するために、電子的にソフトウェアにチャンネルされる。

【0125】

以下の実施例は診断用途のための種々の異なる実験データから得られたパターンの分析を説明している。これらの実施例は本発明の特定の実施形態を説明することを意図しており、本発明の完全な範囲を例示しているわけではない。

【実施例】

【0126】

実施例1：診断と併せて考慮した場合に、これを未知試料中で決定するための手段を提供すると考えられる溶出プロファイルにおけるパターンの発見のための2D-HPLCデータの使用

本実施例は診断目的のための本発明の実施形態の使用を説明するものであり、そして、本発明により提供される1つの手法及び医学的状态を分析するための方法論を記載しているが、特定の医学的状态に関する特定のマーカー又は識別子を提供することを意図していない。

【0127】

4.5 mLを含有する血液試料を健常者ドナー（対照）及び心的外傷後ストレス障害（PTSD）を有する患者から採取した。血液試料を3.2%クエン酸ナトリウム0.5 mLを含有するガラス製のBDバクテナー試験管内に収集し、8 で45分間1,000 rpmで遠心分離した。血漿を慎重に分離し、細分量とし、そして-80 で凍結した。試料を解凍し、水性ポリ（エチレングリコール）-硫酸ナトリウム-Na/K-リン酸塩緩衝液、pH7.4の2相系における分配に付した。

【0128】

これらの実験に使用した水性2相系は15.70重量%ポリエチレングリコール-600（分子量約600）、9.47重量%硫酸ナトリウム、及び2.30重量%Na/K-リン酸塩緩衝液、pH7.4を含有していた。系は重量において保存重合体、塩及び緩衝液の適切な量を100×75mm試験管内に添加混合し、系の総重量を4.00gとすることにより製造した。各系の2相の容量の間の比（上層の容量の下層の容量に対する）は約1:1であった。血漿600マイクロリットルの固定量を系に添加した。系を激しく振とうし、相の沈着を加速するバケットローターを有する遠心分離機中約3500rpmにおいて30分間遠心分離した。試験管を遠心分離機から取り出し、そして上層及び下層の試料を採取した。上層約0.3mL及び下層約1.7mLを含有する細分量を採取し、各細分量を出発緩衝液（Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA）で2.50mL総容量に希釈した。各試料を回転混合し、以下の通りPD-10カラム（Amersham Pharmacia Biotech）を用いた緩衝液交換に付した。PD-10カラムを出発緩衝液25mLで平衡化させた。各試料（2.5mL）をPD-10カラムにロードし、カラムを出発緩衝液で洗浄し、そして最初の2.5mL画分を収集した。

10

20

【0129】

Beckman-Coulter（Fullerton, CA）から入手したProteomeLabPF2Dシステムを、2D-HPLC分析のために使用した。上記した操作法の後、2.00mLの試料を注入し、そして、標準的操作法を使用して流量0.2mL/分において、そして280nmにおいてカラム溶出液の吸光度をモニタリングすることにより、第1の次元の分離を実施した。8.0~4.0pHにわたる泳動のpH勾配部分の間、フラクションコレクターを制御するpHモニターにより検出されたものとして、0.3のpH間隔の画分を収集した。各収集画分を製造元による標準的プロトコルを用いた逆相HPLC（RP-HPLC）による第2の次元の分離に付した。注入された各画分の200マイクロリットル容量を用いたRP-HPLC実験を50において、流量0.75mL/分で実施し、そして、カラム溶出液の吸光度を214nmでモニタリングした。

30

【0130】

上層及び下層から得た試料に由来する相当する血漿画分（同じpH間隔で収集）に対する第2の次元のRP-HPLCの下に得られたクロマトグラムをシステムコンピュータ上にデジタルで格納した。健常者ドナー由来及びPTSD患者由来の試料のクロマトグラムを固定されたpH間隔における第2の分離次元の後に比較した。各場合において、ポイント・バイ・ポイントの分配係数の比較スペクトル（本明細書においては比較クロマトグラム）は、各試料の上部及び下部から得られたデータを分割することにより構築した。何れかのデータをシフト、スムージング、クリップまたは変換するための追加的数学的操作は、それらが各試料に対して同じ態様で実施される限り、全く自由裁量である。健常者ドナー（対照）を起源とする比較スペクトルは図3に示す通りであり、そしてPTSD患者に由来する相当する比較スペクトルは図4に示す通りであり、両方とも6.0及び6.4のpH範囲を有する画分から得た。2つの比較スペクトルは、目視上は異なっている。2つのスペクトルの間と同様性の程度を比較する別の数学的および統計学的手法は、本明細書において分析した試料の何れかと同様な未知の診断の追加的試料を分類するための自動化された操作法を使用して容易に実施してよい。そのような手法はそのような比較を用い

40

50

た診断に到達するため、或いはより典型的には他のデータ及び情報と組み合わせ、使用される。一部の用途においては、疾患の陰性及び陽性の状態の両方に属する多くの試料が当業者の知る手法により処理され組み合わせられることにより、感度及び特異性のレベルに関して統計学的に有効である診断ツールを定義することになる。

【0131】

実施例2：健常者及び卵巣癌患者から入手した血清試料を分析するために質量スペクトルのパターンを使用できる。

【0132】

本実施例は診断目的のための本発明の実施形態の使用を説明するものであり、そして、本発明により提供される1つの手法及び医学的状态を分析するための方法論を記載しているが、特定の医学的状态に関する特定のマーカー又は識別子を提供することを意図していない。

10

【0133】

健常者(試料識別子0651)及び卵巣癌患者(試料識別子4850)由来のプールされた血清試料をClinical Proteomics Reference Laboratory (Gaithersburg, MD)より入手した。これらの実験に使用した水性2相系は15.70重量%ポリエチレングリコール-600(分子量約600)、9.5重量%硫酸ナトリウム、4.8重量%NaCl及び0.64重量%Na/K-リン酸塩緩衝液、pH7.4を含有していた。数点のこのような系は重量において保存重合体、塩及び緩衝液の適切な量をマイクロ試験管内に添加混合し、系の総重量を0.425gとすることにより製造した。各系の2相の容量の間の比(上層の容量の下層の容量に対する)は約1:1であった。血清75マイクロリットルの固定量を系に添加した。系を激しく振とうし、相の沈着を加速するパケットローターを有する遠心分離機中約3500rpmにおいて30分間遠心分離した。マイクロ試験管を遠心分離機から取り出し、そして上層及び下層の試料を採取した。上層60マイクロリットル及び下層60マイクロリットルを含有する細分量を採取し、別個のマイクロ試験管に分注し、その後各マイクロ試験管に水240マイクロリットルを添加した。

20

【0134】

細分量を以下のプロトコルに従って表面増強レーザー脱着イオン化質量スペクトル分析機(Ciphergen, Fremont, CA)を使用してClinical Proteomics Reference Laboratoryにおける質量スペクトル分析のために送付した。(1)Q10チップ(Ciphergen)を5分間リン酸塩緩衝液で2回処理し;(2)各細分量をチップの各ウェルに添加し、室温で60分間インキュベートし;(3)チップを10混合サイクルを使用してリン酸塩緩衝液150マイクロリットルで3回洗浄し、その後、水で1回洗浄し;(4)チップを10分間風乾し;(5)0.5%TFA添加50%アセトニトリル/水中のSPAのマトリックス1マイクロリットルをチップに添加し、次にこれを15分間風乾し;(6)工程(5)を反復した。次にチップを質量スペクトル分析器に入れた。上記プロトコルを各試料に一回反復した(合計2反復)。

30

【0135】

各試料につき生のスペクトル強度のデータ及び全イオン電流をその後の分析のためにANALIZA, Inc. (Cleveland, Ohio)に返送した。電荷に対する質量(m/z)及び強度の値を有する各スペクトルデータを総イオン電流に関して規格化し、次に同じ試料の第2の反復に相当する第2のベクトルと平均した。同じ試料に相当する上部及び下部の水層の平均スペクトルデータベクトルをポイント・バイ・ポイントのm/zを基本に分割し、相互作用の相対的尺度K対m/zのデータベクトルを得た。このプロトコルを健常者及び癌のプールされた試料の両方に対して反復した。

40

【0136】

2試料に関するスペクトルKベクトルの比較を図5において選択された範囲のm/z値について示す。癌及び正常なプール試料の間のある範囲のm/zに渡る一貫した相違は、

50

早期のスクリーニング及び/又は他の診断用途のための潜在的バイオマーカーを示している場合がある。相互作用の相対的尺度対 m/z のパターンをこのようなデータから発生させ、そしてその後当該分野で知られた手法を用いて診断用途のために使用できる。特異的なバイオマーカーはまた、質量スペクトル分析及び他の手法を用いて同定し、そしてその後免疫学的検定試験及び当該分野で知られた他の手法を用いてバイオマーカーに特異的な相互作用の相対的尺度を計測するための直接の試験を開発するために使用できる。

【0137】

本発明において説明した手法を用いて開発されたバイオマーカーは又、図6に示す通り早期及び後期の段階の卵巣癌の間を区別するために使用できる。使用される実験プロトコルは、実施例2において本明細書に記載したプロトコルと同一とした。2つの正常試料は異なるプールを包含し、そして、特定の変動性を示した。しかしながら、2つの正常試料の間の変動性は早期と後期の癌の試料の間にあるものより有意に低値である。本明細書に記載したバイオマーカーの他の使用は異なる用途のために開発してよい。

10

【0138】

実施例3：本発明を用いて発見された質量スペクトルのパターンは発現系スペクトルよりも特定の利点を有する。

【0139】

本実施例は診断目的のための本発明の実施形態の使用を説明するものであり、そして、本発明により提供される1つの手法及び医学的状态を分析するための方法論を記載しているが、特定の医学的状态に関する特定のマーカー又は識別子を提供することを意図していない。本実施例は更に、従来 of 蛋白発現プロテオミクス手法を用いて発見されたバイオマーカーより高度な本発明の手法を用いて発見されたバイオマーカーの特定の利点を説明している。

20

【0140】

本実施例において使用した実験手法は実施例2に詳述する通りであるが、異なる組成の水性2相系を使用している。水性2相系は18.0重量% Ficoll-70 (分子量約70,000)、13.0重量%デキストラン-75 (分子量約75,000)、0.15M NaCl及び0.01MのNa/K-リン酸塩緩衝液、pH7.4を含有するものとした。100 (正常値-癌値)/正常値として定義される規格化された相違は、総蛋白発現に関する本明細書に記載した相互作用の相対的尺度に関するデータから計算した。図7におけるデータは相互作用の相対的尺度に関する正常及び癌の間の規格化された相違は同じ m/z 値における蛋白発現を用いて得られるものよりも有意に高地に顕著であったことを示している。この観察結果は現実的な理由から重要であるが、その理由は当然ながら、伏在する疾患過程には関連しない発現の天然の変動は、その m/z パターンを包含する発現レベルバイオマーカーの発見及び臨床上の使用において大きな障壁となるからである。実際、発現レベルにおける50%の相違は図7に示すとおり天然の変動の境界及び発現パターンの範囲内に十分ふくまれる場合もある。同じ試料は、相互作用の相対的尺度及びその m/z パターンを用いて分析された場合、正常及び癌試料の間で有意により顕著な相違をもたらしており、これは本明細書において示したパターンへのその同様性により未知試料の臨床上の起源を明確化するために使用できる。

30

40

【0141】

本発明の幾つかの実施形態を本明細書において記載し、説明してきたが、本明細書に記載した機能を実施し、及び/又は、結果及び/又は利点の1つ以上を得るための種々の他の手段及び/又は構造は当業者の知る通りであり、そしてそのような変更及び/又は改変の各々は本発明の範囲内に包含されるものと見なす。より一般的には、当業者には当然であるが、本明細書に記載したすべてのパラメーター、単位、材料および機器構成は例示を意味しており、そして、実際のパラメーター、単位、材料および機器構成は本発明の教示が使用される特定の用途に応じて変動することになる。当業者であれば、本明細書に記載した本発明の特定の実施形態に対する多くの均等物を定型的な程度以下の実験を用いて認識するか、または確認できることとなる。従って、上記した実施形態は例示のみのために

50

提示しており、そして、添付した請求項及びその均等物の範囲内において、本発明は特定の記載及び請求項に提示したものと別様に実施してよいと理解すべきである。本発明は本明細書に記載した各々の個々の特徴、系、物品、材料、キット及び/又は方法に関する。更に又、2つ以上のそのような特徴、系、物品、材料、キット及び/又は方法の何れの組み合わせも、そのような特徴、系、物品、材料、キット及び/又は方法が相互に矛盾しなければ、本発明の範囲に包含される。

【0142】

本明細書において定義及び使用される全ての定義は辞書の定義、参考として本明細書中に援用される文書における定義、及び/又は、定義された用語の通常の意味よりも優先すると理解すべきである。

10

【0143】

「及び/又は」という表現は本明細書及び請求項においては、そのように統合された要素の「何れかまたは両方」即ち、一部の場においては組み合わせられて存在し、別の場においては分離されて存在する要素を意味するものと理解すべきである。「及び/又は」と共に列挙される多数の要素は同様の態様において、即ちそのように統合されている要素の「1個以上」と見なすべきである。他の要素は場合により「及び/又は」により特に識別される要素以外に存在してよく、それは特に識別されるこれらの要素に関連するか否かに関わらない。即ち、非限定的な例として、「A及び/又はB」という言及は、「含む」のような非固定の言語と組み合わせで使用される場合、1つの実施形態においては、Aのみ（場合によりB以外の要素を包含する）；別の実施形態においてはBのみ（場合によりA以外の要素を包含する）；更に別の実施形態においてはAとBの両方（場合により他の要素を包含する）を指すことができる。

20

【0144】

明細書及び請求項においては、「又は」とは上記定義した「及び/又は」と同じ意味を有すると理解すべきである。例えば、列挙された項目を分離する場合、「又は」又は「及び/又は」は包含的に、即ち、要素の多数又は列挙物、そして場合により追加的な列挙されない項目の少なくとも1つを包含するが、更に1つより多くを包含するように解釈すべきである。明確に反対であることを示された用語、例えば「僅か1つ」又は「厳密に1つ」又は請求項において使用される場合に「よりなる」は要素の多数又は列挙物の厳密に1つの要素の包含を指すことになる。一般的に「又は」という用語は本明細書においては「何れか」、「1つ」、「僅か1つ」または「厳密に1つ」のような排他的な用語により先行される場合に排他的な代替物（すなわち「1つまたは何れかであるが、両方ではない」）を指すものと解釈すべきである。「本質的になる」とは請求項で使用する場合、特許法の分野で使用されている通常の意味を有するものとする。

30

【0145】

明細書及び請求項で使用する場合、「少なくとも1つ」という表現は、1つ以上の要素の列挙物に言及する場合、要素の列挙物中の要素の何れかの1個以上から選択される少なくとも1つの要素を意味するものと理解すべきであるが、必ずしも要素の列挙物内に特に列挙された各々の要素の少なくとも1つを包含する必要はなく、そして要素の列挙物中の要素の何れかの組み合わせを排除するものではない。この定義は又、「少なくとも1つ」という表現が指す要素の列挙物内に特に識別される要素以外に要素が場合により存在してよいことを許容するものであり、特に識別されるこれらの要素に関連するかしないかに関わらない。即ち、非限定的な例として、「A及びBの少なくとも1つ」（又は均等的に、「A又はBの少なくとも1つ」又は均等的に「A及び/又はBの少なくとも1つ」）とは、1つの実施形態においては、少なくとも1つ、場合により1つより多くを包含するAであってBは存在しない（そして場合によりB以外の要素を包含する）；別の実施形態においては少なくとも1つ、場合により1つより多くを包含するBであってAは存在しない（そして場合によりA以外の要素を包含する）；更に別の実施形態においては、少なくとも1つ、場合により1つより多くを包含するA、及び、少なくとも1つ、場合により1つより多くを包含するB（そして場合により他の要素を包含する）；等を指すことができる。

40

50

【 0 1 4 6 】

明確に反対であることを示さない限り、1つより多い工程又は作業を包含する本明細書において請求項に記載した何れかの方法において、方法の工程または作業の順序は必ずしも方法の工程又は作業が説明されている順序に限定されるわけではない。

【 0 1 4 7 】

請求項並びに上記した明細書において、全ての通過的表現、例えば「含む」、「包含する」、「担持する」、「有する」、「含有する」、「関与する」、「保持する」、「含む」等是非固定と理解すべきであり、即ち包含するがそれらに限定されないことを意味する。通過的表現「よりなる」及び「より本質的になる」のみが、米国特許庁の Manual of Patent Examining Procedures, Section 2111.03に記載の通り、それぞれ、固定的又は半固定的な通過的表現であるものとする。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 4 8 】

本発明の非限定的な実施形態を添付図面を参照しながら例示により説明するが、これは模式的なものであり、正確な縮尺で描写することを意図していない。図面においては、図示された各々の同一又はほぼ同一の成分は、典型的には単一の数字で表す。明確化の目的のために、全ての成分を符号付けしたわけではなく、また、本発明を当業者が理解するために図示を必要としない場合は、本発明の各実施形態の全ての成分を示したわけではない。図においては以下のものが包含される。

20

【 図 1 】 図 1 は本発明の 1 つの実施形態による相互作用の相対的尺度のパターンを決定して使用することを実施するためのプロセスの模式的ブロックダイアグラムである。

【 図 2 】 図 2 は本発明によるユーザーに情報を提供する分配系由来の比較質量スペクトル情報の比較の模式的ブロックダイアグラムである。

【 図 3 】 図 3 は健常者（対照）の血漿試料の分画の後の 2 相の分配系の異なる相に由来する細分量の 2 D - H P L C クロマトグラムの比較から誘導された比較スペクトルである。

【 図 4 】 図 4 は図 3 の場合と同様であるが、心的外傷後ストレス障害を有すると以前に診断された患者から誘導された比較スペクトルである。

【 図 5 】 図 5 は本発明の 1 つの実施形態による 2 試料に関するスペクトル K ベクトルの比較を示す。

30

【 図 6 】 図 6 は本発明の別の実施形態による早期と後期の卵巣癌の間を区別するために有用な特定のバイオマーカーを図示する。

【 図 7 】 図 7 は本発明の更に別の実施形態における相互作用の相対的尺度について、正常者と癌患者との間の相違を図示するデータを示す。

【 図 1 】

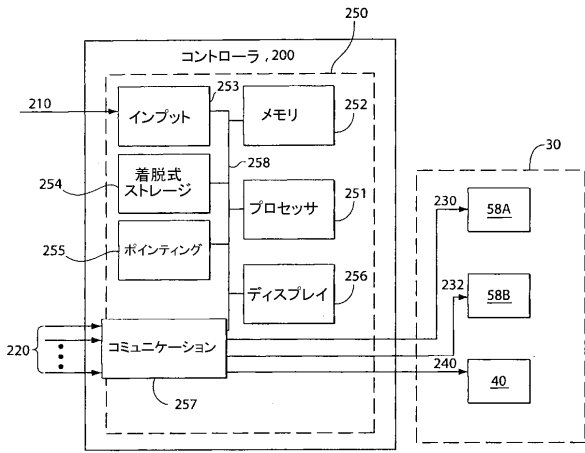


Fig. 1

【 図 2 】

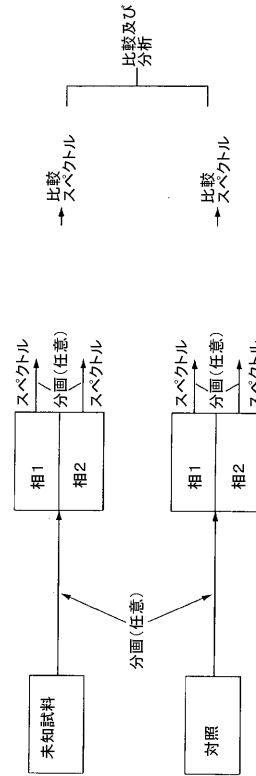


Fig. 2

【 図 3 】

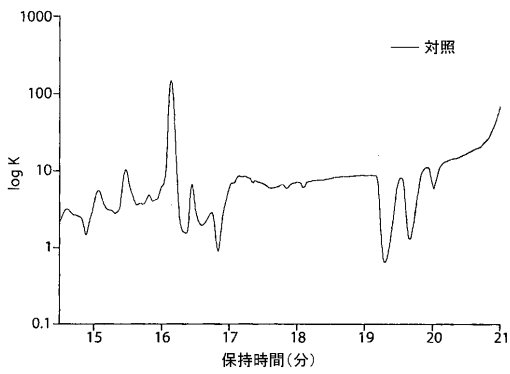


Fig. 3

【 図 4 】

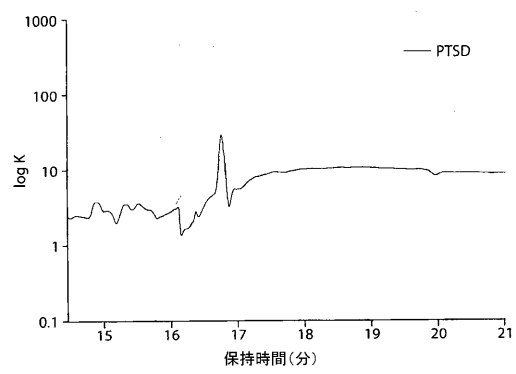


Fig. 4

【 図 5 】

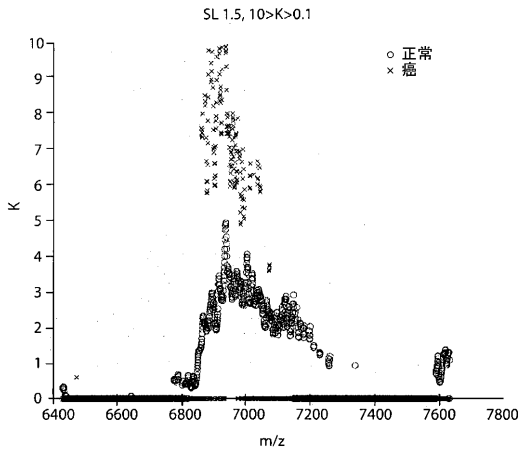


Fig. 5

【 図 6 】

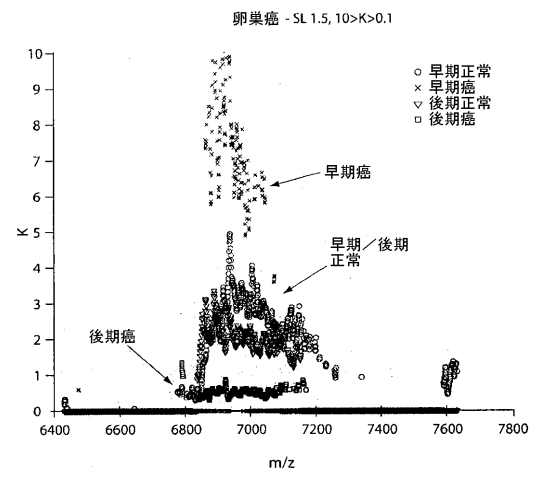


Fig. 6

【 図 7 】

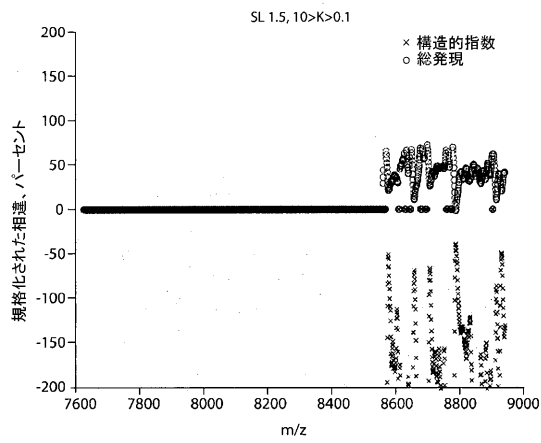


Fig. 7

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2006/048344
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/008247 A (STC UNM; LESLIE K K; MORBARAK C D) 27 January 2005 (2005-01-27) the whole document in particular p.33, 1.16 to p.38, 1.9 incl. tab.4-8; fig.2b-2e.	1-102
X	EVERBERG H ET AL: "Protein pre-fractionation in detergent-polymer aqueous two-phase systems for facilitated proteomic studies of membrane proteins" J CHROMATOGR, vol. 1029, no. 1-2, 12 March 2004 (2004-03-12), pages 113-124, XP004489245 the whole document in particular abstract; fig. 1,3-5.	1-102
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier 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 11 April 2008		Date of mailing of the international search report 24/04/2008
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 Weber, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/048344

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005008247 A	27-01-2005	NONE	

フロントページの続き

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

(72)発明者 ザスラフスキ, ボリス ワイ.

アメリカ合衆国 オハイオ 44139, ソロン, カントリー ビュー レーン 34200
Fターム(参考) 2G041 CA01 DA03 EA04 FA12 HA01 LA09