

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-517529

(P2016-517529A)

(43) 公表日 平成28年6月16日(2016.6.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Q	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	
	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	
	GO 1 N 33/543 5 7 5	
	GO 1 N 33/543 5 4 5 F	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)	

(21) 出願番号 特願2016-503386 (P2016-503386)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月17日 (2014. 3. 17)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年11月13日 (2015. 11. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/030373
 (87) 国際公開番号 W02014/145581
 (87) 国際公開日 平成26年9月18日 (2014. 9. 18)
 (31) 優先権主張番号 61/791, 295
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/791, 879
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515256497
 ハイコア バイオメディカル インコーポ
 レイテッド
 アメリカ合衆国 4 6 2 8 0 インディア
 ナ州 インディアナポリス スイート2 2
 0 イーストナインティエイズストリート
 3 0 2 1
 (74) 代理人 100095407
 弁理士 木村 満
 (74) 代理人 100109449
 弁理士 毛受 隆典
 (74) 代理人 100132883
 弁理士 森川 泰司
 (74) 代理人 100148633
 弁理士 桜田 圭

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルギー及び自己免疫疾患に関する診断分析を行うための自動化された免疫分析システム

(57) 【要約】

固相複合体を形成するためにストレプトアビジンで被覆された媒質と共に捕捉試薬を培養すること、余分な捕捉試薬を除去するために固相複合体を洗浄すること、免疫複合体を形成するために血清サンプルと共に固相複合体を培養すること、いかなる結合していないサンプルを除去するために免疫複合体を洗浄すること、免疫共役複合体を生成するために共役体と共に免疫複合体を培養すること、いかなる結合していないサンプルを除去するために免疫共役複合体を洗浄すること、定量化可能な反応を生成することができる基質を導入すること、及び基質の導入により生成された反応を較正すること、を含む、自動化された診断分析を行うための定量的方法。

【選択図】 図 1

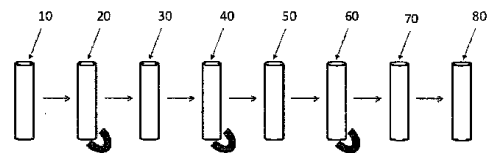


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

固相複合体を形成するためにストレプトアビジンで被覆された媒質と共に捕捉試薬を培養すること、

余分な捕捉試薬を除去するために前記固相複合体を洗浄すること、

免疫複合体を形成するために血清サンプルと共に前記固相複合体を培養すること、

いかなる結合していないサンプルを除去するために前記免疫複合体を洗浄すること、

免疫共役複合体を生成するために共役体と共に前記免疫複合体を培養すること、

いかなる結合していない共役体を除去するために前記免疫共役複合体を洗浄すること、

定量化可能な反応を生成することができる基質を導入すること、及び、

前記基質の導入により生成された前記反応を較正すること、

を含む、自動化された診断分析を行うための定量的方法。

10

【請求項 2】

前記ストレプトアビジンで被覆された媒質と共に前記捕捉試薬を培養するステップは、ビオチン化捕捉試薬と共に前記ストレプトアビジンで被覆された媒質を培養することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記血清サンプルと共に前記固相複合体を培養するステップは、前記血清サンプルに存在するアレルゲン特異的ヒト免疫グロブリン E (I g E) をビオチン化捕捉試薬に結合することを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記血清サンプルと共に前記固相複合体を培養するステップは、前記血清サンプルに存在する自己免疫特異的ヒト免疫グロブリン G (I g G)、自己免疫特異的ヒト免疫グロブリン M (I g M)、又は自己免疫特異的ヒト免疫グロブリン A (I g A) をビオチン化捕捉試薬に結合することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記捕捉試薬は、精製されたアレルゲン、プロテイン、酵素、又は抗体のビオチン化に由来する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記捕捉試薬は、多数のアレルゲンを含むアレルゲン抽出物のビオチン化に由来する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記捕捉試薬は、精製されたアレルゲン、プロテイン、酵素、抗体、及びアレルゲン抽出物から選択される多数のビオチン化捕捉試薬の混合物として存在する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ストレプトアビジンで被覆された媒質と共に前記捕捉試薬を培養するステップは、万能な (u n i v e r s a l) 蛍光標識磁気微粒子を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

1 又は複数の洗浄するステップは、反応キュベットの制限された領域内で洗浄されている前記複合体を磁氣的に隔離することにより前記複合体を洗浄することを含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記ストレプトアビジンで被覆された媒質と共に前記捕捉試薬を培養するステップは、高濃度のヒト血清アルブミン (H S A) を含む反応希釈剤により懸濁状態に保たれた前記捕捉試薬を培養することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記共役体と共に前記免疫複合体を培養するステップは、わずかな濃度のポリエチレングリコールを含む共役希釈剤により懸濁状態に保たれた免疫複合体を培養することを含む、請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

結合していないサンプルを除去するために前記免疫複合体を洗浄するときに、間接標識としてホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) を用いるステップをさらに含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

蛍光信号及び化学発光信号の両方が定量化される光学箱に前記基質と前記免疫共役複合体を移すこと、及び、

伝達値を計算するために、最後の蛍光に対する最初の蛍光の比率を採用して、前記定量化された化学発光信号を調整すること、により、

ビード保持のための前記定量化可能な反応を調整するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

前記光学箱に前記基質と前記免疫共役複合体を移すステップは、前記サンプルを吸引するための再利用可能なピペットチップを有する自動化されたピペットアームを用いることを含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

ビード保持を決定するために前記光学箱内で蛍光を測定すること、及び、

生成された相対光ユニット信号を検出するために前記光学箱内で発光を測定すること、をさらに含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

ビード保持が調整された相対光ユニット信号を生成するためのアルゴリズムに前記蛍光及び発光測定結果を入力すること、をさらに含む請求項 1 5 に記載の方法。

20

【請求項 1 7】

前記生成されたビード保持が調整された相対光ユニット信号を校正曲線の相対光ユニット信号と比較すること、をさらに含む請求項 1 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

この発明は、米国仮特許出願番号 61/791、295 及び 61/791、879 に関連しており、優先権を主張する。それぞれの出願は、2013年3月15日に出願され、これらの出願の完全かつ全ての開示は、ここに参照することにより明示的に援用される。

【0002】

本教示は、診断分析を行うためのシステム及びプロセス、より具体的には、アレルギー及び自己免疫疾患に関する診断分析を行うための自動化された免疫分析システム及びプロセスに関する。

【背景技術】

【0003】

40

このセクションでの陳述は、単に本開示に関連する背景情報を提供するにすぎず、先行技術を構成するものとして解釈されるべきでない。

【0004】

自動化された免疫化学分析の間において、患者の生物学的サンプル（例えば、血清又は血漿）における検体分子は常磁性粒子に付着する。その上、サンプルに存在し得る電位化学源に関連する背景信号を除去するために、多数の洗浄ステップが典型的にプロセスの間に行われる。しかしながら、これらの洗浄ステップの結果、その後の化学プロセスのための元の粒子のいくらかの割合が失われる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0005】

そのように、患者のサンプルからの発光信号を標準化するために、洗浄ステップの後に残っている粒子を定量化するプロセスが必要である。本願は、技術分野において知られたこれらの欠点のいくつかを改良し、解決することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本願の1つの特徴に従って、自動化された診断分析を行う定量的方法が提供され、そして、固相複合体 (complex) を形成するためにストレプトアビジンで被覆された媒質と共に捕捉試薬を培養 (定温放置) するステップ、余分な捕捉試薬を除去するために固相複合体を洗浄するステップ、免疫複合体を形成するために血清サンプルと共に固相複合体を培養するステップ、いかなる結合していないサンプルを除去するために免疫複合体を洗浄するステップ、免疫共役複合体を生成するために共役体と共に免疫複合体を培養するステップ、いかなる結合していない共役体を除去するために免疫共役複合体を洗浄するステップ、定量化可能な反応を生成することができる基質を導入するステップ、及び基質の導入により生成された反応を較正するステップ、を含む。

10

【0007】

本願のさらなる別の形態に従って、患者サンプル内の蛍光標識を粒子に結合するための制御されたプロセスが提供される。本開示のこの特徴に従って、プロセスは、発光標識を粒子に結合すること、及び、患者サンプルからの発光信号を標準化するために一連の洗浄ステップの後に残っている粒子を定量化することを含む。この具体的なプロセスにより、

20

20

【0008】

本開示のさらなる別の形態に従って、自動化されたプラットフォームの使用のために設計された血清サンプルにおけるアレルゲン特異的免疫グロブリンE (IgE) を評価するための定量的方法が提供される。この方法に従って、ビオチン化捕捉試薬は、ビオチン-ストレプトアビジンの相互作用の利用によって、捕捉試薬の固相への不正な付着をなくすために、ストレプトアビジンで被覆された固相と共に培養される。それから、捕捉試薬固相複合体は、余分なビオチン化捕捉試薬を除去するために洗浄される。それから血清サンプルは、血清に存在するアレルゲン特異的IgEの提供された捕捉試薬への不正な結合をなくし、免疫複合体を生成するために、捕捉試薬固相複合体と共に培養される。それから免疫複合体は、結合していないIgEを除去するために洗浄され、それから免疫複合体のアレルゲン特異的IgEコンポーネントへの共役体の不正な結合にて免疫共役複合体を生成するために、標識化された抗IgE共役体と共に培養される。免疫共役複合体は、結合していない標識化された抗IgEを除去するために洗浄され、それから定量化可能な反応を生成することができる基質が導入される。基質を加えることで生成された定量化可能な反応は較正され、伝達値はビード保持のために調整される。

30

30

【0009】

ここである特徴に従って、ストレプトアビジンで被覆された固相と共にビオチン化捕捉試薬を培養するステップは、精製されたアレルゲン、タンパク質、酵素、又は抗体のビオチン化に由来する。

40

【0010】

ここで別の特徴に従って、ストレプトアビジンで被覆された固相と共にビオチン化捕捉試薬を培養するステップは、多数のアレルゲンを含むアレルゲン抽出物のビオチン化に由来する。

【0011】

ここでさらなる別の特徴に従って、ストレプトアビジンで被覆された固相と共にビオチン化捕捉試薬を培養するステップは、インビボ (in vivo) でヒトの診断又は治療のために用いられるアレルゲン抽出物のビオチン化に由来する。

【0012】

本開示の特定の具体的な特徴に従って、ビオチン化捕捉試薬は、精製されたアレルゲン

50

、タンパク質、酵素、抗体及びアレルゲン抽出物を含む異なる由来の多数のビオチン化捕捉試薬の混合物として存在する。

【0013】

本開示のさらなる別の特定の具体的な特徴に従って、ストレプトアビジンで被覆された固相は、万能な(universal)蛍光標識磁気微粒子である。

【0014】

本開示のある特徴に従って、洗浄ステップの1つ又は複数は、反応キュベットの制限された領域内で複合体を磁氣的に隔離することにより固相複合体を洗浄することを含む。

【0015】

本開示のさらなる別の具体的な特徴に従って、捕捉試薬 - 固相複合体を血清サンプルと共に培養するステップは、高濃度のヒト血清アルブミン(HSA)を含む反応希釈剤により懸濁状態に保たれた捕捉試薬 - 固相複合体を培養することを含む。

【0016】

本開示のさらなる他の具体的な特徴に従って、免疫複合体を標識化された抗IgE共役体と共に培養するステップは、わずかな濃度のポリエチレングリコールを含む共役希釈剤により懸濁状態に保たれた免疫複合体を培養することを含む。本教示の特定の特徵に従って、共役希釈剤は100 ng/mL 抗IgE-HRP、100 µg/mL apo-HRP、50 mMリン酸ナトリウム、pH 6.7、150 mM NaCl、0.05% Tween-20、1% BSA、4% (w/v) PEG 6,000、1%(v/v) ProClin 950、0.015% (v/v) Antifoam Bを含む。本教示のさらなる他の特定の特徵に従って、共役希釈剤は、10 ng/mL 抗IgG-HRP、10 µg/mL apo-HRP、50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.7、150 mM NaCl、0.05% Tween-20、1% BSA、4% (w/v) PEG 6,000、1%(v/v) ProClin 950、0.015% (v/v) Antifoam Bを含む。

【0017】

本開示のある特定の特徵に従って、抗IgE抗体に共役されたホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)は、結合していないIgEを除去するために免疫複合体を洗浄するとき、特に、PS-AttoのHRPで標識された共役体との反応が、溶液分析における最大検出感度のための持続した高強度発光を生成するので、間接標識として用いられ得る。

【0018】

本開示のさらなる他の特定の特徵に従って、免疫共役複合体への基質の追加は、Lumigen PS-Attoを定量化可能な反応、すなわちHRP-PS-Atto伝達システムにより生成され、光学箱内の照度計により検出される化学発光信号として存在する定量化可能な反応を生成することができる基質として追加することを含む。

【0019】

本教示のある特徴に従って、ビード保持のための定量化可能な反応を調整するステップは、蛍光及び化学発光信号の両方が定量化される光学箱に基質と免疫共役複合体を移すステップ、ビード保持のために定量化された化学発光信号を調整するために最後の蛍光に対する最初の蛍光の比率を採用するステップ、及び、伝達値を計算するために調整された化学発光信号を較正するステップを含む。基質及び免疫共役複合体を光学箱に移すために、サンプルを吸引するための再利用可能なピペットチップを有する自動化されたピペットアームを利用することができる。光学箱の中において、蛍光はビード保持を決定するために測定され、発光は化学的性質により生成されるRLU信号を検知するために測定される。測定結果は、較正曲線RLUと比較される“ビード保持調整RLU”を生成するためにアルゴリズムに入力され、その後IgE濃度が割り当てられる。

【0020】

本開示のさらなる別の特徵に従って、蛍光標識がAlexa Fluor 594 Biocytinとして存在し、万能な磁気微粒子がThermo Scientific SA-Speed Bead又はBangs Lab BioMag Plus Streptavidinとして存在する。

【0021】

本発明の他の目的及び利益は、添付している図面と併せて以下に記された記述から明ら

10

20

30

40

50

かになるであろう。

【0022】

添付している図面と共に用いられる発明の形態に関する以下の記述を参照することにより、上記の本発明の特徴及びそれから得られる様式はより明らかになり、発明それ自体がさらに理解できるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】本願に従って自動化された診断分析を行うための方法の概略図を示す。

【図2】本願の教示に従って自動化された免疫化学分析計及び試薬システムの上概略図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

共通の参照符号は、いくつかの図を通して共通の部分を示す。いくつかの形式においてここで提示された例示は本発明の形態を説明するけれども、以下に開示される形態は、包括的であったり、本発明の範囲を開示された詳細な形式に限定するように解釈したりすることを意図しない。

【0025】

以下に記述される本願の形態は、包括的であったり、以下に詳細な記述において開示された詳細な形式に本願を限定したりすることを意図しない。むしろ、形態は、他の当業者が本願の原理及び実践を評価し、理解し得るように選択され、記述される。

【0026】

他に定義されない限り、ここで用いられる全ての技術及び科学用語はこの出願が属する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本願の実践及びテストにおいて、ここで記述されるのと類似又は同等のいかなる方法及び材料も用いることができるが、これから特定の方法及び材料が記述される。その上、ここで採用され、又は予期される技術は当業者によく知られた標準的な方法であり、材料、方法、及び実施例は、単なる実例であり、限定することを意図していない。

【0027】

本開示の具体的な自動化された免疫分析計システム及び方法について詳細に記述する前に、余分な又は結合しない材料からの背景信号を最小化する1つの手段として、免疫測定法は一般に反応キュベットにおいて実行される1又は複数の分離段階を要求することが、理解され、評価されるべきである。分離又は洗浄プロセスを容易にするために、これに限定されないが、ウェル被覆手法、ビード被覆手法、又は常磁性体粒子の使用を含む、様々な手法を用いることができる。これらの分離媒体のそれぞれは、患者の血液サンプル中の関心ある検体分子を結合する捕捉試薬で被覆される。本教示のある特徴に従って、ビオチン化捕捉試薬は混合物又は混在物（例えば、類似のカテゴリーであるが異なる属種からの捕捉試薬）として存在する。ここで当業者が理解し、評価するように、多くの捕捉試薬は、入手可能であり、本教示に従って使用することができ、混合されたスズメバチの毒のタンパク質（黄色の表皮、黄色スズメバチ、及び白スズメバチの混合物）のようなFDAから認可された入手可能なものを含む。本教示に従って用いられる個々の捕捉試薬のそれぞれの量及び体積は、それらの効能（すなわち、検知可能な反応を生成するそれらの能力）に依存することは理解されるべきである。

【0028】

常磁性体粒子が分離媒質として用いられるとき、常磁性体粒子は、洗浄プロセスの間に磁石によりキュベットの壁に向かって引っ張られ、液体のすべてが吸引される。ここで当業者が理解し、評価するように、従来の洗浄プロセスの間に、常磁性体粒子のいくらかが液体と共に吸引され、そのためさらなる化学プロセスの前に喪失する。もし免疫測定法の手順がいくつかの洗浄ステップを含むならば、磁気粒子の喪失はより重大にさえなる。

【0029】

本教示の目的の1つは、これらの洗浄プロセスの間に免疫化学分析計において生じる常

10

20

30

40

50

磁性体粒子の損失を考慮することである。これを達成するために、本教示のある特徴に従って、患者の血液サンプル中の関心ある検体は、常磁性体粒子の表面に次々に結合した捕捉試薬に結合する。それから発光標識はこれらの検体分子に結合する。発光試薬又は基質がキュベットに加えられるとき、分析計の光学検出器により検出可能である光が生成されるため、発光標識と反応する。加えて、もし常磁性体粒子が取り付けられた蛍光標識を有しているならば、キュベット内の内容物を読み取る蛍光は、洗浄ステップの間に喪失した粒子の割合を決定するための手段を提供する。

【0030】

本開示のある特徴に従って、自動化された分析計は、これに限定されないが、磁気ビード又は微粒子を含む、分析のための一般的な常磁性体粒子を利用する。分析計で行われる個々の分析のために、捕捉試薬は培養され、ときおり捕捉試薬固相複合体としてここで言及される分析固有の粒子ベースの試薬を生成するために、反応キュベットにおいて万能粒子に結合する。本開示のある特徴に従って、診断免疫測定法を行うために用いることができる捕捉試薬は、Biotin-pAb 又はビオチン - アレルゲン、10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.4、0.9% NaCl、0.05% Tween-20、1% (w/v) ヒト血清アルブミン、1%(v/v) ProClin 950、最大で 5% (v/v) グリセロールを含む。本開示の別の特徴に従って、診断免疫測定法を行うために用いることができる他の捕捉試薬は、Biotin-Ags、10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4、0.9% (w/v) NaCl、0.05% Tween-20、1% (w/v) ウシ血清アルブミン、1%(v/v) ProClin 950、1% プロテアーゼ阻害剤混合物、0.1 mM DTT、25% (最大で30%) (v/v) グリセロールを含む。

10

20

【0031】

洗浄プロセスを受けた後、患者のサンプル、もし必要であれば任意に希釈剤がキュベットにおいて粒子に加えられ、培養される。これは患者の血液サンプルにおいて固有の検体分子を捕捉する結果となる。本開示のある特定の具体的な特徴に従って、反応希釈剤（サンプル希釈剤）は、10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.4、500 mM NaCl、0.02% Tween-20、1% (w/v) ヒト血清アルブミン、1% (v/v) ヒト Ig G、1%(v/v) ProClin 950、0.005% Anti foam-B v/v、2% (w/v) PEG 6,000を含む。本開示のさらなる別の特定の具体的な特徴に従って、反応希釈剤（サンプル希釈剤）は、10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.4、500 mM NaCl、0.02% Tween-20、25% (w/v) ヒト血清アルブミン、1%(v/v) ProClin 950を含む。

30

【0032】

これらの具体的な形態に従って、高いパーセンテージのHSA（25%）は、培養ステップの間にビードを懸濁状態に保持するために、反応媒質の粘度を増加するために部分的に機能することが理解されるべきである。加えて、高いHSAはまた、この培養の間に非特異的な結合を低減し、患者サンプルの希釈に対して相対光ユニット（RLU）の線形性を改善する。

【0033】

他の洗浄プロセスは、余分な又は結合しないサンプルを除去するために行われ、発光標識と共役体がキュベットに加えられる。キュベットに加えられたとき、培養期間の後、共役体のある部分は捕捉試薬/サンプル複合体に常磁性体粒子を結合するであろうことが期待される。粒子はいかなる結合しない共役体をも除去するために他の洗浄プロセスを受け、それから基質はキュベットに加えられ、化学発光法による成長反応が平衡に達せしめる短い期間、培養される。

40

【0034】

平衡に達した後、サンプルの発光及び蛍光の読み取りが行われる。常磁性体粒子は、一般的な試薬ビンにおいて分析計に収容され、ピペットで取られて反応キュベットに入れられる前に均一な混濁状態に保たれるため、それぞれの試験の最後の蛍光測定と組み合わされたときに、ピペットで取られてキュベットに入れられた後の粒子の最初の蛍光測定は、免疫分析法プロセスの後にキュベットに残された最初の粒子の割合を決定するために用いることができる。残された割合は以下の式により与えられる。

【0035】

50

【数 1】

$$\text{粒子の残存割合} = \frac{F_{\text{final}} - F_{\text{background}}}{F_{\text{initial}} - F_{\text{background}}}$$

ここで、F は訂正された蛍光信号（すなわち、光学検出器のカウント効率により訂正される測定信号）を表している。光学検出器はある時間分解能を有しているため、単位時間あたりに検出される光子の数が増加するにつれて、その時間分解能の範囲内で検出器に到達する 2 つの光子の尤度もまた増加する。これらの 2 つの光子は検出器によって分解することができないから、それらはただ 1 つの光子としてカウントされるであろう。このように、入射する光子束が増加するにつれて、光学検出器の検出能力は低下する。

10

【0036】

常磁性体粒子のために容器壁に作用し、散乱する蛍光励磁光子の非常に高い束のゆえに、蛍光材料が存在しないときでさえ、光学検出器でカウントされるいくらかの光子がある。この訂正された背景信号は $F_{\text{background}}$ で表される。

【0037】

プロセスはシステムの処理能力を制限しないため、特に、プロセスが、達成され得るタイミング又は並行処理を制限しないため、免疫測定法プロセスを通して反応キュベットに残された最初の常磁性体粒子の割合を決めるために、蛍光測定の使用は有益である。一方で、ほとんどの従来の免疫測定法分析計は、常磁性体粒子及びサンプルの非常に再現性のある処理に依存しており、それらは、達成され得るタイミング及び並行処理を実際に制限し、結果としてシステムの処理能力を制限する。これらの従来の免疫測定法分析計における長い時間をかけた処理効率では変化は検知することができないかもしれないが、これらの変化は蛍光検出で検出することができる。本開示の教示は、並行処理（例えば、多重洗浄アーム）の使用を許容し、それらは小さな機械的な調整又は流体の違いのために洗浄能力を変化させる。免疫測定法プロセスのそれぞれのステップの後に行われる蛍光の読み取りは、並行処理と同等の機能性を検証するのに有益である。

20

【0038】

上記の方法や手法に従ってアレルギー及び自己免疫疾患のための診断分析を行う自動化された免疫分析計装置及び試薬のシステムは、これからより詳細に記述される。このプロセスが記述されるにつれて、さまざまな異なるテストがシステムにより実施されるように、分析を行うために使用される開示された装置は標準的又は万能な収集チューブを受け入れるように構成し得ることがここで理解され、評価されるべきである。原材料からアレルゲン及び自己免疫抗原を含む抗原を分離するための多くの公知の方法があることを、当業者は理解し評価するであろう。これらの分離方法は広く知られており、技術分野において受け入れられているため、特に、いずれの受け入れ可能な抗原分離方法が、その精神又はスコープから外れることなく本発明のシステムに組み込み得ることを当業者は認識するものとして、ここで詳細については説明しない。アレルゲン又は自己免疫抗原が分離された後に、それらは、ピオチン化抗原又は捕捉試薬を生成するためにピオチンに接合され得る。ピオチン化抗原はストレプトアビジンと結合した固体支持物又は膜と接触する。本開示のある特徴に従って、ピオチン化捕捉試薬は、精製されたアレルゲン、タンパク質、酵素、抗体、DNA、核抽出物、細胞抽出物、及び非タンパク質抗原（例えば、タンパク質に架橋された薬物又は材料）を含み、これに限られない成分に由来し得る。

30

40

【0039】

当業者が理解し、評価するにつれて、診断アレルギー免疫測定法のために一般的に使用される標準的なピオチン化プロセスおよび手法は、本教示に従って利用され得る。しかしながら、化学的性質に用いられる多数のピオチン化試薬の最適な性能を確保するために必要とされるように、反応に関するピオチン/タンパク質の比は最適化され得る。本教示のある特徴に従って、ピオチン試薬の固有サイズのリンカーアーム（linker arm）は NHS-PEG₁₂-Biotin である。その上、非タンパク質抗原のために、材料はストレプトアビジンビード固相に被覆するためにピオチン化タンパク質に架橋され得るが、一方で DNA のような

50

自己免疫抗原のために、ビオチン化ジデオキシヌクレオチドがDNAに組み込まれ得る。

【0040】

本開示のある特徴に従って自動化された診断分析プロセスの概略的な具体例は、図1に示される。この具体的な形態に従って、ストレプトアビジンの被覆で製造された磁気ビード又は微粒子は、公知のビオチン化アレルゲン又は自己免疫抗原と混合される（培養される）（ステップ10）。ここで当業者が理解し、評価するように、ストレプトアビジンとビオチンを結合するよく知られた親和性は、抗原がビードの表面に被覆するのを促進することにより、被覆された試薬の製品と共に万能ビードの使用を許容する。本教示に従って、ストレプトアビジンで被覆された固相と共にビオチン化捕捉試薬を培養するために要求される時間及び関連する研究室の状態は、実施される固有の実験を考慮して変化され得ることは理解され、評価されるべきである。しかしながら、本開示のある特徴に従って、特に有益な培養時間の範囲は、約2 から約40 の温度、さらに特に、約36.8 から約37.2 において、約1分から約15分であり、さらに特に、約5分から約10分である。

10

【0041】

表1に示されるように、本開示のこの特徴に従って、以下のビードがここで開示される磁気支持体のために用いられ得る。

【表1】

ビード	1	2	3
販売業者	Thermo Scientific	B: Bangs Lab	Pierce
製品	SA-Coated Magnetic Bead	BioMag Plus Streptavidin (Cat # BP628)	SA-Coated Magnetic Bead
平均直径	1 μm	~1.5 μm	1 μm
サイズ分布 (ロットCV以内)	$\pm 10\%$	CV: 30% (1.242 \pm 0.402)	NA
ビオチン結合容量 (ビード1mgあたり)	4 nmol Biotin	> 2 μg Biotin (8-26 μg) (Biotin-ALP)	3.5 nmol Biotin fluorescein

20

【0042】

多数のプロセスがビオチン化アレルゲン又は自己免疫抗原をストレプトアビジンで被覆されたビードと混合又は培養するために利用され得る一方で、ある特定の態様に従って、ビオチン/ストレプトアビジンの相互作用のために、アレルゲン又は抗原がビードを被覆するように、製品は反応キュベット内で混合される。1つの具体的な態様によると、10 μL のストレプトアビジン(SA)に被覆されたビードが反応キュベットに分配され、続いて、40 μL のビオチン化アレルゲン又は自己免疫抗原が追加され、それらは分配の間に混合される。混合物は1~15分の間、培養される。反応キュベットの1つの側面に磁気ビードを引き寄せ、バッファが反応キュベットを通して洗浄される間にそれらを固定化することにより、余分なビオチン化アレルゲン又は自己免疫抗原は洗い落とされる（ステップ20）。1つの具体的な態様に従って、バッファは10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.4、0.9% (w/v) NaCl、0.05% (v/v) Tween-20、10 mg/mL HSA and 1% (v/v) ProClin 950を含む。磁気ビードを反応キュベットの1つの側面に留まらせる技術分野において、公知のいずれの直ちに入手可能な固定化手法を当業者が利用し得る一方で、ある特定の具体的な態様に従って、洗浄ステップが行われている間に、外部の磁石が磁気ビードを固定するために用いられる。

30

40

【0043】

それからストレプトアビジンで被覆された磁気ビードは磁場から解放され、反応キュベットの中を自由に動くことができる。生物学的サンプル(血清又は血漿)は反応キュベットに加えられ、続いて、40 μL 反応バッファが追加され、磁気ビードを再混濁する（ステップ30）。生物学的サンプルに加えて、本開示のある特徴に従って、高分子結合を促進するためだけではなく、磁気ビードを溶液の中に保持するために、高濃度のヒト血清

50

アルブミン (H S A) が懸濁液に用いられる。反応を線形に保つために、ヒト I g G がバッファーに加えられる。

【 0 0 4 4 】

もしサンプルがいずれのアレルゲン又は抗原ビード被覆に反応するいずれかの抗体 (例えば、I g E、I g G) を含んでいるならば、そのような抗体はこのサンプルの培養ステップの間に結合される。サンプルの培養は 3 7 で 4 0 分間、保たれる。患者サンプルの中のいずれの抗体がビードと結合した後、それから第 2 の洗浄ステップはいかなる結合しない患者サンプルを除去するために行われる (ステップ 4 0)。1 5 0 μ L の洗浄バッファー濃縮物 (5 0 mMリン酸ナトリウム、pH 7.4、4.5% (w/v) NaCl、0.05% Tween-20、0.05% (v/v) ProClin 950、0.02% (v/v) Antifoam-C v/v) は、ビードを再懸濁するために加えられ、それからビードが 1 . 5 分の間、磁石に引きつけられる。溶液が除去された後に、磁石は引き離され、そして 2 0 0 μ L の洗浄バッファーがビードを再懸濁させるために加えられる。洗浄はもう一度繰り返される。

10

【 0 0 4 5 】

第 2 の洗浄ステップが行われた後、アレルギー分析の場合にヒト免疫グロブリン E (I g E) に特異的であるか、自己免疫分析の場合にヒト免疫グロブリン G、M、A (I g G / M / A) に特異的である抗体において、ビードは再懸濁される。本開示のある特徴に従って、ビードによって捕捉されたいずれの固有の患者抗体と結合するため、抗体は酵素 (ホースラディッシュペルオキシダーゼのような) と接合される (ステップ 5 0)。それからビードは、いかなる余分な抗体を除去するためにもう一度洗浄され (ステップ 6 0)、そして、高感度光生成試薬 (例えば、化学発光基質) は検出精度を最大化するため加えられる (ステップ 7 0)。本開示の教示に従って、化学発光基質として用いることのできる具体的な試薬は、これに限られないが、Lumigen (登録商標) PS-atto、SuperSignal (登録商標) ELISA Pico Chemiluminescent Substrate 又は SuperSignal (登録商標) ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate を含む。キサンテン染料、芳香族アミン、複素環アミンを含む、様々な構造クラスの多数の化合物が、これらの条件の下で化学発光を生成するために用いられることを、当業者は理解し、評価するであろう。これらの化合物は、特許文献でよく知られており、多くの販売業者を通して直ぐに入手可能である。いくつかの限定されない化学発光化合物は、これに限定されないが、dioxetane type molecules、luciferin、Lumigen (登録商標) PS-2、Lumigen (登録商標) PS-3、Lumigen (登録商標) TMA-6、Lumigen (登録商標) TMA-3 を含む。

20

30

【 0 0 4 6 】

いったん高感度光生成試薬が反応キュベットに加えられると、光が生成される (ステップ 8 0)。ある形態に従って、発光信号及び蛍光信号の両方を読み出すためにピペットチップ内の溶液を読み取り部 (reading station) に移すことにより、光は測定される。しかしながら、本開示に従って放出される光は、これに限定されないが、照度計、X線フィルム、高速写真フィルム、CCDカメラ、シンチレーションカウンター、化学光量計、又は視覚的なもの (visually) を含む、当該分野で収取可能な、いかなる公知の適切な検出手段により検知され得ることが理解されるべきである。当業者が直ちに理解し、評価するように、選ばれた検出装置が、適用、使用、コスト及び利便性といったいくつかの要因により支配されるように、それぞれの検出手段は異なるスペクトル感度を有する。その上、ここで用いられるように、本開示に従って測定し得る定量化可能又は検出可能な反応は、アレルゲン特異的 I g E を有する陽性サンプルが、基質の追加で光度 (すなわち、R L U = 相対照明ユニット) を生成する抗 I g E - H R P の結合を引き起こしたことを暗示する。加えて、定量化可能又は検出可能な反応は、陰性サンプルにより生成される定量化可能な反応に適用することもできることが理解されるべきである。

40

【 0 0 4 7 】

本教示のある特徴に従って、アレルゲン特異的 I g E (s I g E) に関する陽性 / 陰性サンプルにより生成される R L U は、全 I g E (t I g E) 較正曲線により生成される R U L と比較される。較正曲線は、ビオチン化されたアンチ抗 I g E 捕捉試薬を使用して評

50

価される、様々な予め希釈された全 IgE (t IgE) 較正器 (WHO 標準により生成される) にかけることにより、生成される。

【 0 0 4 8 】

この開示の機械的な特徴についてさらに理解するために、図 2 は、本開示の教示に従って、検体サンプルの発光信号を定量化し、標準化するために用いることができる自動化された免疫化学分析計及び試薬システム 1 0 0 を説明する。この具体的な特徴に従って、自動化された免疫化学分析計 1 0 0 は、反応ロータ 1 0 6 の内部に設置されたキュベットに蛍光標識化常磁性体粒子又は流体ビードを最初に分配することにより開始する。1つの形態に従って、典型的な流体ビードは、流体ビード (SA-Speed Bead、Atto 590 labeled) 、1 mg/mL を含む。

10

【 0 0 4 9 】

流体ビードは、始めに渦生成器 (vortexer) 1 0 2 に配置され、R 1 ピペット 1 0 4 により反応ロータ 1 0 6 に移され得る。R 1 ピペット 1 0 4 は、流体ビード混合物の所望量を吸引し、当該混合物が反応ロータ 1 0 6 のキュベットに注入される場所である、反応ロータ 1 0 6 に吸引量を移すことができる。キュベットへの注入に引き続いて、光学ピペット 1 0 8 は反応ロータ 1 0 6 のキュベットからテストサンプルを吸引し、光学箱 1 1 0 にテストサンプルを移し得る。いったんサンプルが光学箱 1 1 0 の内部に配置されると、蛍光及び発光測定が記録され得る。蛍光及び発光信号の最初の記録は、サンプルにおける流体ビードの初期濃度と対応し得る蛍光信号のための基準値測定として用いられ得る。測定を読み取った後、多数すすぎピペット 1 1 2 が洗浄バッファを用いてキュベットをすすぐ。

20

【 0 0 5 0 】

次に、流体ビードは、渦生成器 1 0 2 から R 1 ピペット 1 0 4 を経由して反応ロータ 1 0 6 にあるキュベットに移され得る。それから、R 1 ピペット 1 0 4 は、試薬ロータ 1 1 4 から捕捉試薬を吸引し、反応ロータ 1 0 6 に配置されたキュベットに捕捉試薬を注入し得る。培養期間の後に、単一すすぎピペット 1 1 6 は、流体ビードを再懸濁するためにすすぎバッファが注入され得る。かなりの量の再懸濁された流体ビードは、しばらくの間、反応ロータ 1 0 6 の内部にある磁石により局在する。磁石がキュベットの内部の流体ビードを実質的に局在させた後に、多数すすぎピペット 1 1 2 は、キュベットの内部の局在した流体ビードの一部を残しながら、すすぎバッファの一部を吸引し、廃棄する。流体ビードを再懸濁しながら、多数すすぎピペット 1 1 2 が、洗浄バッファを反応ロータ 1 0 6 のキュベットに注入することを促進し得る。多数すすぎピペット 1 1 2 が、反応ロータ 1 0 6 のキュベットから局在されないサンプルの一部を吸引し、廃棄する前に、流体ビードは反応ロータ 1 0 6 の内部の磁石により再び局在され得る。

30

【 0 0 5 1 】

患者サンプルはサンプルロータ 1 1 8 のサンプルチューブに収容され得る。患者サンプルはサンプル希釈剤で部分的に希釈され得る。この時点では、サンプルピペット 1 2 0 は患者サンプルの一部を吸引し、流体ビードを再懸濁するために患者サンプルを反応ロータ 1 0 6 のキュベットに注入する。反応ロータ 1 0 6 の内部の患者サンプルを収容するキュベットは、特定の温度で、特定の期間、培養され得る。培養の後、単一すすぎピペット 1 1 6 は、流体ビードを再懸濁するために、すすぎバッファを注入し得る。他の局在化プロセスは、流体ビードが反応ロータ 1 0 6 にある磁石の近くのキュベット内部で実質的に集められることにより、反応ロータ 1 0 6 によって行われる。流体ビードの局在化の後に、多数すすぎピペット 1 1 2 は、局在化プロセスの間に局在されない反応ロータ 1 0 6 のキュベットの内部の流体の一部を吸引し、廃棄し得る。

40

【 0 0 5 2 】

数度のすすぎサイクルは、反応ロータ 1 0 6 のキュベット内部のサンプルについて行われ得る。すすぎサイクルは、流体ビードを再び再懸濁するためにキュベットに洗浄バッファを注入するために多数すすぎピペット 1 1 2 を用いることを含み得る。他の局在化ステップでは、流体ビードを反応ロータ 1 0 6 内部の磁石によりキュベットの内部に集めら

50

れる。流体ビードの十分な局在化を許可する期間の後、反応ロータ106のキュベットの内部にある流体ビードの一部をそのままにしておくようにして、多数すすぎピペット112はサンプルの一部を吸引し、何気なく廃棄される。他のすすぎサイクルは、再びキュベットに洗浄バッファを注入し、流体ビードを再懸濁させるために、多数すすぎピペット112を用いることにより引き起こされる。他の流体ビード局在化プロセスは、サンプルの残りから流体ビードを局在化するために反応ロータ106内部の磁石を利用し得る。最後に、多数すすぎピペット112は局在化プロセスにより局在化されなかったサンプルの一部を吸引し得る。

【0053】

この時点では、R2ピペット122は、試薬ロータ114の内部の共役体キュベットに収容される共役体を吸引し得る。R2ピペット122は、反応ロータ106のキュベットに以前に吸引された共役体を注入する。反応ロータ106において制御された時間及び温度の下でキュベットを培養した後、単一のすすぎピペット116は、反応ロータ106にあるキュベットにすすぎバッファを注入し得る。他の流体ビード局在化サイクルは、反応ロータ106の内部の磁石がキュベット内部の流体ビードを実質的に局在化させることにより行われ得る。多数すすぎピペット112は、局在化サイクルの間、局在されなかったキュベット内部のサンプルの一部を吸引し、廃棄し得る。

10

【0054】

2回以上のすすぎサイクルは、反応ロータ106のキュベット内部のサンプルについて行われる。多数すすぎピペット112は、キュベット内部の流体ビードを再懸濁するために、洗浄バッファを注入し得る。他の流体ビード局在化サイクルは、十分な時間をかけてキュベットを反応ロータ106にある磁石に近接して配置することにより、流体ビードを局在化し得る。局在化サイクルの後に、多数すすぎピペット112は、局在化サイクルの間に局在されなかったサンプルの一部を吸引し、廃棄し得る。それから第2の洗浄サイクルは、洗浄バッファを注入して、流体ビードを再懸濁するために、多数すすぎピペット112を用いることにより生じる。他の局在化サイクルは、キュベット内部の流体ビードを局在化するために、反応ロータ106内部の磁石を利用し得る。局在化プロセスの後に、多数すすぎピペット112は、局在化サイクルの間に局在されなかったサンプルの一部を再び吸引し、廃棄し得る。

20

【0055】

この時点において、R2ピペット122は試薬ロータ114から共役体の一部を吸引し、混合基質サンプルを生成する混合基質容器124に共役体を注入し得る。混合基質サンプルで流体ビードを再懸濁しながら、R2ピペットは、混合基質容器124から混合基質サンプルを吸引し、反応ロータ106のキュベットに混合基質サンプルを注入する。反応ロータ106のキュベットにおけるサンプルは、光学ピペット108により吸引され、光学箱110に配置され得る。光学箱が蛍光及び発光を光学的に観察した後、次のテストに備えて、サンプルは廃棄され、多数すすぎピペットは反応ロータ106のキュベットをすすぐ。

30

【0056】

本開示のプロセス及び方法の利点及び改善点は、以下の実施例により実証される。これらの実施例は、単なる実例であり、限定したり、本開示の他の形態を除外したりすることを意図していない。

40

【0057】

(実施例1)

抗ヒトIgE又はアレルゲン抽出物のビオチン化

DMSO中の250 mMの濃度のNHS-PEG12-Biotin (Pierce) 2 μ Lが、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中の5.0 mg/mLの濃度の精製された親和性抗ヒトIgE (免疫試薬) 1 mLに加えられる。又は、DMSO中の250 mMの濃度のNHS-PEG12-Biotin (Pierce) 1.6 μ Lが、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中の1.0 mg/mLの濃度のアレルゲン抽出物 1 mLに加えられる。

【0058】

50

試薬溶液は混合され、2時間、氷の上に配置される。2～8℃で4時間と一晚の間に、PBS（バッファーに対する抗体（抗体：バッファー）の体積比率 - 1：100）の2つの変化に対する透析により、ビオチンを含まない試薬はビオチン化抗体から分離される。

【0059】

（実施例2）

流体ビードの準備

ddH₂O中の1 mMの濃度のBiotin-Fluo (Alexa Fluor 594 Biocytin, Sodium Salt, Life Technologies) 5 μLが、PBSTHP Buffer (10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4、0.9% (w/v) NaCl、0.05% (v/v) Tween-20、10 mg/mL HSA、1% (v/v) ProClin 950) 45 mLに加えらる。よく混合する。

10

【0060】

10 mg/mLの濃度のSA-Speed Bead (Sera-mag Speedbeads Streptavidin-Coated Magnetic Particles, Thermo) 5 mLがビオチン流体溶液 (Biotin-Fluo solution) に加えられ、よく混合される。

【0061】

（実施例3）

アレルギー特異的IgEレベルのための分析

ビード濃度1 mg/mLにおける10 μL流体ビード（蛍光標識化された常磁性体微粒子）は、反応キュベットに分配される。40 μLのビオチン - アレルゲン（例えば、卵白、ミルク、ピーナッツ等）又はビオチン - 抗IgE抗体は、流体ビードに分配され、混合される、37℃で1～10分、培養される。洗浄後、アレルゲン又は抗IgEで被覆されたビードは40 μLの反応バッファーで再懸濁される。アトピー及びアトピーでない個人から得られた血清サンプルがアレルゲンに対して分析される。10 μLのサンプルが反応キュベットにおいて40 μLの懸濁されたアレルゲンで被覆されたビードに加えられた。6点標準曲線 (six point standard curve) に関して、10 μLの血清標準 (WHO IgE標準75/502に対して校正された第2標準) がそれぞれ反応キュベットにおける40 μLの抗IgEで被覆されたビードに加えらる。様々な異なる標識化された抗IgE共役体が本教示に従って利用され得るが、ある教示に従って、以下の抗IgE共役体を利用される。アレルギーの分析のために - 抗IgE-HRP、自己免疫分析のために - 抗IgA-HRP、抗IgG-HRP及び抗IgM-HRP、ECPのために - 抗ECP-HRP、及びトリプターゼのために - 抗Tryptase-HRP。その上、ここで用いられるように、それぞれの共役体は化学的性質において使用のための最適化HRP取り込み比率を有する。本教示のある特徴に従って、リストアップされた共役体のために使用されるHRPの取り込み比率の範囲は、約1.2～約5.4の間である。加えて、本教示はまた、アルカリ性ホスファターゼ共役体及びb - ガラクトシダーゼ共役体を含み、これらに限られない共役伝達システムの他のタイプの組み込みを予期する。

20

30

【0062】

溶液は混合され、40分間、37℃で培養される。洗浄の後、ビードは、50 μLの抗ヒトIgE - HRP共役体において再混濁され、37℃で30分、培養される。50 μLのPS - atto (lumigen) がそれぞれのキュベットに加えられ、ビードが再混濁される。ビードの懸濁液はピペットチップに移され、蛍光及び発光信号の両方について光学箱で読み取られる。標準曲線は、4パラメータ論理関数式と、標準曲線から補間されるアレルギー特異的IgEのレベルを用いて決定される。

40

【0063】

本教示に従って用いられ得る具体的な試薬及び成分のリストには、これに限られないが、以下のものが含まれる。

ビード：流体ビード(SA-Speed Bead, Atto 590 labeled)、1 mg/mL、

捕捉試薬希釈剤：IgE:10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.4、0.9% (w/v) NaCl、0.05% Tween-20、1% (w/v) ヒト血清アルブミン、1%(v/v) ProClin 950、最大で5% (v/v) グリセロール、

50

ANA : 10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4、0.9% (w/v) NaCl、0.05% Tween-20、1% (w/v) ウシ血清アルブミン、1% プロテアーゼ阻害剤混合物、0.1 mM DTT、1%(v/v) ProClin 950、25% (最大で30%) (v/v) グリセロール、
 洗浄バッファー濃縮物 (5 ×) : 50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4、4.5% (w/v) NaCl、0.05% Tween-20、0.05%(v/v) ProClin 950、0.02% (v/v) Antifoam-C v/v、
 試薬希釈剤 (反応希釈剤及びサンプル希釈剤) IgE - 10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4、500 mM NaCl、0.02% Tween-20、1% (w/v) ヒト血清アルブミン、1% (v/v) ヒト I g G、1% (v/v) ProClin 950、0.005% Antifoam-B v/v、2% (w/v) PEG 6,000、
 ANA - 10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4、500 mM NaCl、0.02% Tween-20、25% (w/v) ヒト血清アルブミン、1%(v/v) ProClin 950、
 較正器及び制御器 : 較正器 : サンプル希釈剤に希釈された患者サンプル、制御器 : 患者サンプルプール、
 共役体 : 共役希釈剤 : 50 mMリン酸ナトリウム、pH 6.7、150 mM NaCl、0.05% Tween-20、1% BSA、5% (w/v) PEG 6,000、1%(v/v) ProClin 950、
 IgE : 100 ng/mL 抗IgE-HRP、100 µg/mL apo-HRP、希釈剤中、0.015% Antifoam-B v/v、及び
 基質 : PS-atto A & B、0.01% Antifoam-B v/v。

10

【 0 0 6 4 】

本願の原理を具体化する典型的な形態が上記で開示されてきたが、本願は開示された形態に限定されない。代わりに、この出願は、一般的な原理を用いた出願のいずれの変化、用途、又は適応を包含することを意図する。さらに、この出願は、直ぐに把握し得る本開示からの発展、及びこの本願に付随して付加的なクレームの限定に含まれる技術分野における慣習的実践を包含することを意図する。

20

【 0 0 6 5 】

ここで用いられる専門用語は特定の具体的な形態のみを記述する目的のためであり、限定することを意図していない。ここで用いられるように、文脈がはっきりと他の意味を示さない限り、単数形 “ a ”、“ a n ” 及び “ t h e ” は、同様に複数形を含むことを意図される。用語 “ c o m p r i s e ”、“ c o m p r i s i n g ”、“ i n c l u d i n g ” 及び “ h a v i n g ” は、包括的であり、そのため言及された特徴、整数、ステップ、操作、要素、及び / 又は部品の存在を明確に記述し、1つ又は複数の他の特徴、整数、ステップ、操作、要素、部品、及び / 又はそのためのグループの存在又は追加を除外するものでない。特に動作の順番として特定されない限り、ここで記述される方法のステップ、プロセス、及び操作は、特に議論され又は説明された順位で必ず動作を要求されるものとして解釈されない。追加の又は代替的なステップが採用され得ることもまた理解される。

30

【図 1】

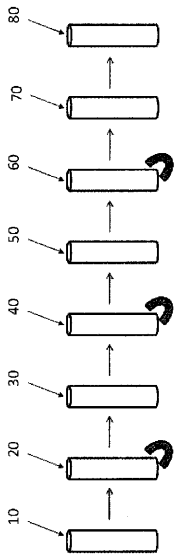


FIG. 1

【図 2】

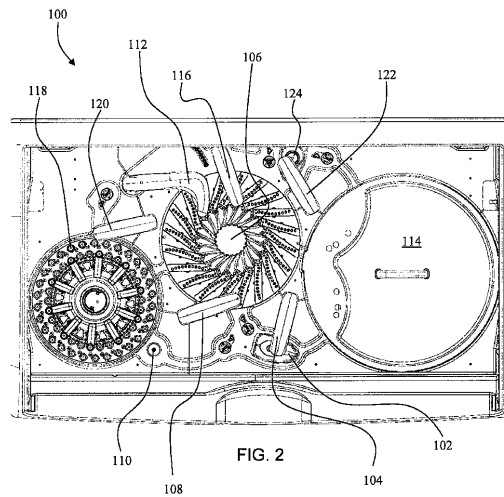


FIG. 2

【手続補正書】

【提出日】平成26年9月29日(2014.9.29)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

万能な (universal) 蛍光標識磁気微粒子を含むストレプトアビジンで被覆された媒質を、アレルゲン抽出物、単一アレルギー誘発タンパク質、及び自己免疫疾患に関与しているヒトタンパク質の少なくとも1つに由来するビオチン化捕捉試薬と共に培養することにより固相複合体を形成すること、

余分な捕捉試薬を除去するために前記固相複合体を洗浄すること、

免疫複合体を形成するために血清サンプルと共に前記固相複合体を培養すること、

いかなる結合していないサンプルを除去するために前記免疫複合体を洗浄すること、

免疫共役複合体を生成するために共役体と共に前記免疫複合体を培養すること、

いかなる結合していない共役体を除去するために前記免疫共役複合体を洗浄すること、

定量化可能な反応を生成することができる基質を導入すること、及び、

前記基質の導入により生成された前記反応を較正すること、

を含む、自動化された診断分析を行うための定量的方法。

【請求項 2】

前記血清サンプルと共に前記固相複合体を培養するステップは、前記血清サンプルに存在するアレルゲン特異的ヒト免疫グロブリン E (IgE) を前記ビオチン化捕捉試薬に結合することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記血清サンプルと共に前記固相複合体を培養するステップは、前記血清サンプルに存在する自己免疫特異的ヒト免疫グロブリン G (I g G)、自己免疫特異的ヒト免疫グロブリン M (I g M)、又は自己免疫特異的ヒト免疫グロブリン A (I g A) を前記ビオチン化捕捉試薬に結合することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ビオチン化捕捉試薬は、精製されたアレルゲン、プロテイン、酵素、又は抗体のビオチン化に由来する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記アレルゲン抽出物は、多数のアレルゲンを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ビオチン化捕捉試薬は、精製されたアレルゲン、プロテイン、酵素、抗体、及びアレルゲン抽出物から選択される多数のビオチン化捕捉試薬の混合物として存在する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

1 又は複数の洗浄するステップは、反応キュベットの制限された領域内で洗浄されている前記複合体を磁氣的に隔離することにより前記複合体を洗浄することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ストレプトアビジンで被覆された媒質を培養することにより前記固相複合体を形成するステップは、高濃度のヒト血清アルブミン (H S A) を含む反応希釈剤により懸濁状態に保たれた前記ビオチン化捕捉試薬を培養することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記共役体と共に前記免疫複合体を培養するステップは、わずかな濃度のポリエチレングリコールを含む共役希釈剤により懸濁状態に保たれた免疫複合体を培養することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

結合していないサンプルを除去するために前記免疫複合体を洗浄するときに、間接標識としてホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) を用いるステップをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

蛍光信号及び化学発光信号の両方が定量化される光学箱に前記基質と前記免疫共役複合体を移すこと、及び、

伝達値を計算するために、最後の蛍光に対する最初の蛍光の比率を採用して、前記定量化された化学発光信号を調整すること、により、

ビード保持のための前記定量化可能な反応を調整するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記光学箱に前記基質と前記免疫共役複合体を移すステップは、前記サンプルを吸引するための再利用可能なピペットチップを有する自動化されたピペットアームを用いることを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

ビード保持を決定するために前記光学箱内で蛍光を測定すること、及び、

生成された相対光ユニット信号を検出するために前記光学箱内で発光を測定すること、をさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

ビード保持が調整された相対光ユニット信号を生成するためのアルゴリズムに前記蛍光及び発光測定結果を入力すること、をさらに含む請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記生成されたビード保持が調整された相対光ユニット信号を校正曲線の相対光ユニッ

ト信号と比較すること、をさらに含む請求項 1 4 に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/030373

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 G01N33/68 G01N35/00 G01N33/564 G01N33/53 G01N33/58 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, 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 Y X Y	US 2012/077286 A1 (BROWN CHRISTOPHER R [US] ET AL) 29 March 2012 (2012-03-29) the whole document ----- US 2009/286258 A1 (KAUR SURINDER [US] ET AL) 19 November 2009 (2009-11-19) abstract paragraphs [0155] - [0158], [0182] - [0183] ----- -/--	1-7,10 13-17 1,2,5,8, 9,11,12 13-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 July 2014		Date of mailing of the international search report 30/07/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stricker, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/030373

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>RAMAKRISHNA S. SISTA ET AL: "Heterogeneous immunoassays using magnetic beads on a digital microfluidic platform", LAB ON A CHIP, vol. 8, no. 12, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 2188-2196, XP055033295, GB ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/b807855f abstract page 2191, column 1, paragraph 3 - page 2191, column 2, paragraph 1 page 2193, column 2, paragraph 2 - page 2194, column 1, paragraph 2 -----</p>	13,15-17
Y	<p>EP 0 353 592 A2 (ABBOTT LAB [US]) 7 February 1990 (1990-02-07) the whole document figure 9 -----</p>	14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/030373

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012077286	A1	29-03-2012	AT 457459 T 15-02-2010
			AU 2002351281 A1 23-06-2003
			DK 1461618 T3 07-06-2010
			EP 1461618 A1 29-09-2004
			ES 2340667 T3 08-06-2010
			JP 2005512091 A 28-04-2005
			US 2003109067 A1 12-06-2003
			US 2003232397 A1 18-12-2003
			US 2007190668 A1 16-08-2007
			US 2009104625 A1 23-04-2009
			US 2011104010 A1 05-05-2011
			US 2011110828 A1 12-05-2011
			US 2011111530 A1 12-05-2011
			US 2012077286 A1 29-03-2012
			US 2012264230 A1 18-10-2012
			WO 03050539 A1 19-06-2003
US 2009286258	A1	19-11-2009	AU 2009246516 A1 19-11-2009
			CA 2720124 A1 19-11-2009
			EP 2277044 A1 26-01-2011
			JP 2011524001 A 25-08-2011
			US 2009286258 A1 19-11-2009
			WO 2009140242 A1 19-11-2009
EP 0353592	A2	07-02-1990	AT 137337 T 15-05-1996
			AU 636568 B2 06-05-1993
			AU 3915489 A 08-02-1990
			CA 1340209 C 15-12-1998
			DE 68926323 D1 30-05-1996
			DE 68926323 T2 09-01-1997
			EP 0353592 A2 07-02-1990
			ES 2088880 T3 01-10-1996
			JP H0278959 A 19-03-1990
			US 5320808 A 14-06-1994

フロントページの続き

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

(74) 代理人 100147924

弁理士 美恵 英樹

(72) 発明者 ファン クレーフ、マーク デイビッド

アメリカ合衆国 90803 カリフォルニア州 ロングビーチ イーストファーストストリート
3348

(72) 発明者 ハン、ピクトリア

アメリカ合衆国 92130 カリフォルニア州 サンディエゴ アーモンドウッドウェイ487
5

(72) 発明者 ルオ、イ

アメリカ合衆国 90815 カリフォルニア州 ロングビーチ ハサウェイアベニュー3912
アパートメント950

(72) 発明者 リーガー、デニス エドウィン

アメリカ合衆国 90254 カリフォルニア州 ハモサビーチ トゥウェンティフォーストリ
ート504

(72) 発明者 トロンドル、リンダ マリー

アメリカ合衆国 92612 カリフォルニア州 アーヴィン パラティンアパートメント253
65

(72) 発明者 リード、テイラー アディソン

アメリカ合衆国 92011 カリフォルニア州 カールスパッド ブルーポイントドライブ67
28

(72) 発明者 マクメナミー、エヴァン フィリップ

アメリカ合衆国 90720 カリフォルニア州 ロスアラミトス サンボニートアベニュー39
62

(72) 発明者 ラガワン、ナンディタ

アメリカ合衆国 92627 カリフォルニア州 コスタメサ サンバーナディーノピーエル15
97 アpartmentシー

(72) 発明者 レリフォード、モーコア ブレイ

アメリカ合衆国 92804 カリフォルニア州 アナハイム ウェストコルチェスタードライブ
2276 アpartment2

(72) 発明者 カンフィールド、ダグラス ジョン

アメリカ合衆国 49431 ミシガン州 ラディントン イーストコートストリート405

(72) 発明者 テーヌ、エレイン グレース

アメリカ合衆国 92804 カリフォルニア州 アナハイム サウスマスターズレーン1221

(72) 発明者 シンソン、エドセル ローレンス ノーチェ

アメリカ合衆国 91709 カリフォルニア州 チノヒルズ ローリングリッジドライブ149
32

(72) 発明者 ヴァンデ ウェテリング、スコット ウィリアム

アメリカ合衆国 90803 カリフォルニア州 ロングビーチ ペラルタアベニュー491

(72) 発明者 テイラー、テリー

アメリカ合衆国 92618 カリフォルニア州 アーヴィン オークグレン788

- (72)発明者 ノックス、トラビス
アメリカ合衆国 90815 カリフォルニア州 ロングビーチ ラドノールアベニュー2759
- (72)発明者 ジャカルネ、フラン ズィロ クアレスマ
アメリカ合衆国 92806 カリフォルニア州 アナハイム テニーソンアベニュー2527
- (72)発明者 ウェストン、ジェームス
イギリス国 EH41 3TB スコットランド ハーディントンイーストロージアン ノズリ
ーパーク24
- (72)発明者 チャン、ジェニファー ボ-ゲイ
アメリカ合衆国 94127 カリフォルニア州 サンフランシスコ モンカーダウェイ280
- (72)発明者 トゥヴィ オルテガ、ステファニー
アメリカ合衆国 92704 カリフォルニア州 サンタアナ ウェストレンハートアベニュー3
902
- (72)発明者 シェル、レイチェル サラ
アメリカ合衆国 90501 カリフォルニア州 トーランス ミドルブルックロード1835
- (72)発明者 ダイヤモンド、ロナルド ノーマン
アメリカ合衆国 92807 カリフォルニア州 アナハイムヒルズ イーストパセオカンション
6690
- (72)発明者 ガン、スティーブ マイケル
アメリカ合衆国 92648 カリフォルニア州 ハンティントンビーチ デラウェアストリート
912
- (72)発明者 ホール、エリック ダーネル
アメリカ合衆国 92840 カリフォルニア州 ガーデングローブ メインストリート#218
13635
- (72)発明者 ファン、テ ホ
アメリカ合衆国 92821 カリフォルニア州 ブレア ロバートコート1301
- (72)発明者 モートン、ジョン ルイス
アメリカ合衆国 92587 カリフォルニア州 キャニオンレイク スタンピード29394
- (72)発明者 モスカレフ、アナトリー
アメリカ合衆国 92614 カリフォルニア州 アーヴィン ベルカント15
- (72)発明者 スタック、マリネラ ゴンボセフ
アメリカ合衆国 92673 カリフォルニア州 サンクレメンテ ティエラスアルタス7100
- (72)発明者 サージアント、ブルース アラン
アメリカ合衆国 92869 カリフォルニア州 オレンジ ノースコブルストーンドライブ13
7
- (72)発明者 ウィルソン、カイリー
アメリカ合衆国 46280 インディアナ州 インディアナポリス スイート220 イースト
ナインティエイズストリート3201
- (72)発明者 チュア、バネッサ カミーユ
アメリカ合衆国 91709 カリフォルニア州 チノヒルズ イーグルリッジ13268
- (72)発明者 フォーシャガー、ミシェル フレドリカ
アメリカ合衆国 98686 ワシントン州 バンクーバー ノースイーストサーティサードアベ
ニュー10710

專利名称(译)	自动免疫测定系统，用于对过敏和自身免疫疾病进行诊断分析		
公开(公告)号	JP2016517529A	公开(公告)日	2016-06-16
申请号	JP2016503386	申请日	2014-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	ハイコアバイオメディカルインコーポレイテッド		
申请(专利权)人(译)	Haikoa生物医学公司		
[标]发明人	ファンクレーフマークデイビッド ハンビクトリア ルオイ リーガーデニスエドウィン トロンドルリンダマリー リードテイラーアディソン マクメナミーエヴァンフィリップ ラガワンナンディタ レリフォードモーコアブレイ カンフィールドダグラスジョン テーヌエレイングレース シンソンエドセルローレンスノーチェ ヴァンデウエテリングスコットウィリアム テイラーテリー ノックストラビス ジャカルネフランズイロクアレスマ ウェストンジェームス チャンジェニファーボゲイ トゥヴィオルテガステファニー シェルレイチエルサラ ダイヤモンドロナルドノーマン ガンスティーブマイケル ホールエリックダーネル ファンテホ モートンジョンルイス モスカレファナトリー スタックマリネラゴンボセフ サージアントブルースアラン ウイルソンカイリー チュアバネツサカミーユ フォーシャガーミシエルフレドリカ		
发明人	ファンクレーフ、マークデイビッド ハン、ビクトリア ルオ、イ リーガー、デニスエドウィン トロンドル、リンダマリー リード、テイラーアディソン マクメナミー、エヴァンフィリップ ラガワン、ナンディタ レリフォード、モーコアブレイ カンフィールド、ダグラスジョン テーヌ、エレイングレース シンソン、エドセルローレンスノーチェ ヴァンデウエテリング、スコットウィリアム		

テイラー、テリー
 ノックス、トラビス
 ジャカルネ、フラン ズイロ クアレスマ
 ウェストン、ジェームス
 チャン、ジェニファー ボーゲイ
 トゥヴィ オルテガ、ステファニー
 シェル、レイチェル サラ
 ダイヤモンド、ロナルド ノーマン
 ガン、ステイブ マイケル
 ホール、エリック ダーネル
 ファン、テ ホ
 モートン、ジョン ルイス
 モスカレフ、アナトリー
 スタック、マリネラ ゴンボセフ
 サージアント、ブルース アラン
 ウィルソン、カイリー
 チュア、バネッサ カミーユ
 フォーシャガー、ミシェル フレドリカ

IPC分類号	G01N33/53 G01N33/543
CPC分類号	G01N21/6428 G01N21/645 G01N21/76 G01N33/5306 G01N33/54326 G01N33/54393 G01N33/564 G01N33/569 G01N33/582 G01N33/6854 G01N33/6893 G01N35/0098 G01N35/1011 G01N2021/6484 G01N2035/0453 G01N2035/1062 G01N2201/062 G01N2201/08 G01N2333/4703 G01N2333/62 G01N2333/78 G01N2800/24 Y10T436/119163 G01N33/5434 G01N33/5695 G01N33/56983
FI分類号	G01N33/53.Q G01N33/53.U G01N33/543.541.A G01N33/543.575 G01N33/543.545.F
代理人(译)	木村充 箕櫻
優先権	61/791295 2013-03-15 US 61/791879 2013-03-15 US
其他公开文献	JP6553020B2
外部链接	Espacenet

摘要(译)

将捕获试剂与涂有链霉亲和素的培养基一起孵育以形成固相复合物，洗涤固相复合物以去除过量的捕获试剂，形成免疫复合物 将固相复合物与血清样品一起孵育，洗涤免疫复合物以除去任何未结合的样品，将免疫复合物与缀合物一起孵育以产生免疫缀合物 洗涤免疫偶联物复合物以去除任何未结合的样品，引入能够产生可定量反应的底物，并校准通过引入底物而产生的反应 以及用于执行自动诊断分析的定量方法。 [选型图]

图1

