

(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2018-510354
(P2018-510354A)

(43) 公表日 平成30年4月12日(2018.4.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564	2 GO 4 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
	GO 1 N 33/543 5 7 5	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-551241 (P2017-551241)
 (86) (22) 出願日 平成27年3月30日 (2015. 3. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年11月27日 (2017. 11. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/023408
 (87) 国際公開番号 WO2016/159960
 (87) 国際公開日 平成28年10月6日 (2016. 10. 6)

(71) 出願人 517299364
 ハイコア バイオメディカル エルエルシー
 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
 3021
 (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】 自己免疫および感染性疾患の診断アッセイを実施するための自動免疫分析システム

(57) 【要約】

ビオチン化自己抗原または感染性疾患抗原である捕獲試薬をストレプトアビジン被覆培地とインキュベートして、固相複合体を形成することと、固相複合体を洗浄して、過剰な捕捉試薬を除去することと、固相複合体を血清試料とインキュベートして、免疫複合体を形成することと、免疫複合体を洗浄して、非結合試料を除去することと、免疫複合体をコンジュゲートとインキュベートして、免疫コンジュゲート複合体を作製することと、免疫コンジュゲート複合体を洗浄して、任意の非結合コンジュゲートを除去することと、定量化可能な応答を生成することができる基質を導入すること、および基質から生成された応答を較正すること、を含む自己免疫疾患または感染性疾患の自動診断アッセイを行うための定量的方法。

【選択図】 図 1

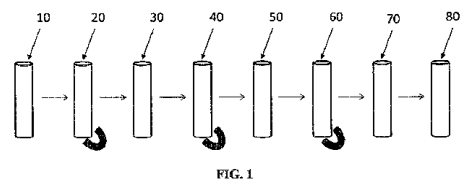


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ビオチン化自己抗原である捕獲試薬をストレプトアビジン被覆培地とインキュベートして、固相複合体を形成することと、

前記固相複合体を洗浄して、過剰な捕捉試薬を除去することと、

前記固相複合体を血清試料とインキュベートして、免疫複合体を形成することと、

前記免疫複合体を洗浄して、非結合試料を除去することと、

前記免疫複合体をコンジュゲートとインキュベートして、免疫コンジュゲート複合体を作製することと、

前記免疫コンジュゲート複合体を洗浄して、非結合コンジュゲートを除去することと、

定量化可能な応答を生成することができる基質を導入することと、

前記基質から生成された前記応答を較正することと、

を含む自己免疫疾患の自動診断アッセイを行うための定量的方法。

10

【請求項 2】

前記固相複合体を前記血清試料とインキュベートする工程は、前記血清試料中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) を前記捕捉試薬に結合させることを含む、

ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

前記自己抗原は、アグリカン、アラニル - t R N A 合成酵素 (P L - 1 2)、アルファベータクリスタリン、アルファフォドリン (S p t a n 1)、アルファアクチニン、 α 1 アンチキモトリプシン、 α 1 アンチトリプシン、 α 1 ミクログロブリン、アルソラーゼ、アミノアシル t R N A 合成酵素、アミロイド (例えば、アミロイドベータ、アミロイド P)、アネキシン (例えば、アネキシン I I、アネキシン V)、アポリポタンパク質 (例えば、A p o B、A p o E、A p o E 4、A p o J)、アクアポリン (例えば、A Q P 1、A Q P 2、A Q P 3、A Q P 4)、殺菌性 / 浸透性増加タンパク質 (B P I)、 α - グロビン前駆体 B P 1、 α - アクチン、 α - ラクトグロブリン A、 α 2 - 糖タンパク質 I、 α 2 - ミクログロブリン、血液型抗原 (例えば、R h 血液型抗原、I 血液型抗原、A B O 血液型抗原)、C 反応性タンパク質 (C R P)、カルモジュリン、カルレティキュリン、カルジオリピン、カタラーゼ、カテプシン B、セントロメアタンパク質 (例えば、C E N P - A、C E N P - B)、コンドロイチン硫酸、クロマチン、コラーゲン (例えば、タイプ I、I I、I I I、I V、V、V I コラーゲン)、シトクロム C、シトクロム P 4 5 0 2 D 6、サイトケラチン、デコリン、デルマタン硫酸、D N A (例えば、二本鎖 D N A、一本鎖 D N A)、D N A トポイソメラーゼ I、エラスチン、エプスタイン - バール核抗原 1 (E B N A 1)、エラスチン、エンタクチン、抽出可能な核抗原 (R o、L a、S m、R N P、S c l - 7 0、J o 1)、ファクター I、ファクター P、ファクター B、ファクター D、ファクター H、ファクター X、フィブリノーゲン (フィブリノーゲン I V、フィブリノーゲン S)、フィブロネクチン、フォルミミノトランスフェラーゼシクロデアミナーゼ (L C - 1)、グリアジンおよびアミド化グリアジンペプチド (D G P)、g p 2 1 0 核エンベロープタンパク質、G P 2 (主要チモーゲン顆粒膜糖タンパク質)、糖タンパク質 g p I I b / I I I a、グリア線維性酸性タンパク質 (G F A P)、糖化アルブミン、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (G A P D H)、ハプトグロビン A 2、熱ショックタンパク質 (例えば、H s p 6 0、H S P 7 0)、ヘモシアニン、ヘパリン、ヒストン (例えば、ヒストン H 1、H 2 A、H 2 B、H 3、H 4)、ヒスチジル - t R N A 合成酵素 (J o - 1)、ヒアルロニダーゼ、免疫グロブリン、インスリン、インスリン受容体、インテグリン (例えばインテグリン α 1 β 1、 α 2 β 1、 α 3 β 1、 α 4 β 1、 α 5 β 1、 α 6 β 1、 α 7 β 1、L 2、M 2、I I b 3、V 1、V 3、V 5、V 6、V 8、 α 6 β 3、 α 1 β 1)、間質レチノール結合タンパク質 3、内性ファクター、K u (P 7 0 / P 8 0)、乳酸デヒドロゲナーゼ、ラミニ

30

40

50

ン、肝細胞質抗原 1 型 (L C 1)、肝臓 / 腎臓ミクロソーム抗原 1 (L K M 1)、リゾチーム、メラノーマ分化関連タンパク質 5 (M D A 5)、M i - 2 (クロモドメインヘリカーゼ D N A 結合タンパク質 4)、ミトコンドリアタンパク質 (例えば、M 1、M 2、M 3、M 4、M 5、M 6、M 7、M 8、M 9、B C O A D C - E 2、O G D C - E 2、P D C - E 2)、ムスカリン受容体、ミエリン関連糖タンパク質、ミオシン、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、ミエロペルオキシダーゼ (M P O)、リウマチ因子 (I g M 抗 I g G)、ニューロン特異的エノラーゼ、ニコチン性アセチルコリン受容体 鎖、ヌクレオリン、ヌクレオポリン (例えば、N u p 6 2)、ヌクレオソーム抗原、P M / S c l 1 0 0、P M / S c l 7 5、膵臓細胞抗原、ペプシノゲン、ペルオキシレドキシニン 1、ホスホグルコースイソメラーゼ、リン脂質、ホスホチジルイノシトール、血小板由来成長因子、ポリメラーゼベータ (P O L B)、カリウムチャンネル K I R 4 . 1、増殖細胞核抗原 (P C N A)、プロテイナーゼ - 3、プロテオリピドタンパク質、プロテオグリカン、プロトロンビン、リカバリン、ロドプシン、リボヌクレアーゼ、リボ核タンパク質 (例えば、R o、L a、s n R N P、s c R N P)、リボソーム、リボソームリンタンパク質 (例えば、P 0、P 1、P 2)、R N A (二本鎖 R N A、一本鎖 R N A)、S m タンパク質 (例えば、S m B、S m B '、S m D 1、S m D 2、S m D 3、S m F、S m G、S m N)、S p 1 0 0 核タンパク質、S R P 5 4 (シグナル認識粒子 5 4 k D a)、セレクチン、平滑筋タンパク質、スフィンゴミエリン、連鎖球菌抗原、スーパーオキシドジスムターゼ、滑膜関節タンパク質、T 1 F 1 ガンマコラーゲン、トレオニル t R N A 合成酵素 (P L - 7)、組織トランスグルタミナーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、チログロブリン、甲状腺刺激ホルモン受容体、トランスフェリン、トリオースリン酸イソメラーゼ、チューブリン、腫瘍壊死アルファ、トポイソメラーゼ、U 1 - d n R N P 6 8 / 7 0 k D a、U 1 - s n R N P A、U 1 - s n R N P C、U - s n R N P B / B '、ユビキチン、血管内皮増殖因子、ピメンチンまたはピトロネクチンである、

10

20

ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ストレプトアビジン被覆培地は、ユニバーサル蛍光標識磁性微粒子を含む、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

1 つ以上の洗浄工程は、反応キュベットの閉鎖領域内で洗浄される前記複合体を磁氣的に引き離すことによって前記複合体を洗浄することを含む、

ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

捕獲試薬をストレプトアビジン被覆培地とインキュベートする工程は、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って懸濁液中に保持された捕捉試薬をインキュベートすることを含む、

ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記免疫複合体をコンジュゲートとインキュベートする工程は、公称濃度のポリエチレングリコールを含むコンジュゲート希釈剤によって懸濁液中に保持された免疫複合体をインキュベートすることを含む、

ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

非結合試料を除去するために前記免疫複合体を洗浄する際に、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) を使用する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

蛍光シグナルおよび化学発光シグナルの両方が定量化される光学ボックスに前記基質および前記免疫コンジュゲート複合体を移すこと、および

30

40

50

定量化された前記化学発光シグナルを調整するために初期の蛍光対最終の蛍光の比を使用して、報告された値を計算すること、

によりビーズ保持のための定量可能な前記応答を調整する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記光学ボックス内の蛍光を測定して、ビーズ保持を決定すること、および
前記光学ボックス内の発光を測定して、生成された相対光ユニット信号を検出すること

をさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

蛍光測定値および発光測定値をアルゴリズムに入力して、ビーズ保持調整相対光ユニット信号を生成することをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

生成された前記ビーズ保持調整相対光ユニット信号を、校正曲線相対光ユニット信号と比較する工程をさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

ビオチン化感染性疾患抗原である捕獲試薬をストレプトアビジン被覆培地とインキュベートして、固相複合体を形成することと、

前記固相複合体を洗浄して、過剰な捕捉試薬を除去することと、

前記固相複合体を血清試料とインキュベートして、免疫複合体を形成することと、

前記免疫複合体を洗浄して、非結合試料を除去することと、

前記免疫複合体をコンジュゲートとインキュベートして、免疫コンジュゲート複合体を作製することと、

前記免疫コンジュゲート複合体を洗浄して、非結合コンジュゲートを除去することと、

定量化可能な応答を生成することができる基質を導入することと、

前記基質から生成された前記応答を校正することと、

を含む感染性疾患の自動診断アッセイを行うための定量的方法。

【請求項 14】

前記固相複合体を前記血清試料とインキュベートする工程は、前記血清試料中に存在する感染性因子特異的ヒト I g G、I g M または I g A をビオチン化捕捉試薬に結合させることを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記感染性疾患抗原は、細菌、ウイルス、ウイロイド、プリオン、線虫、寄生虫、および真菌から選択される感染性因子に由来する、

ことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記捕捉試薬は、多数の抗原から構成される感染性因子抽出物のビオチン化に由来する

ことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記感染性疾患抗原は、タンパク質、糖タンパク質、核酸、酵素、脂質、リポサッカリド、抗体またはそれらの組み合わせである、

ことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

前記捕捉試薬は、精製されたタンパク質、酵素、抗体および感染性因子抽出物から選択される複数のビオチン化捕捉試薬のアマルガムである、

ことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 19】

前記ストレプトアビジン被覆培地は、ユニバーサル蛍光標識磁性微粒子を含む、

ことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 0】

1つ以上の洗浄工程は、反応キュベットの閉鎖領域内で洗浄される前記複合体を磁氣的に引き離すことによって前記複合体を洗浄することを含む、
ことを特徴とする請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 1】

捕獲試薬をストレプトアビジン被覆培地とインキュベートする工程は、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って懸濁液中に保持された捕捉試薬をインキュベートすることを含む、
ことを特徴とする請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記免疫複合体をコンジュゲートとインキュベートする工程は、公称濃度のポリエチレングリコールを含むコンジュゲート希釈剤によって懸濁液中に保持された免疫複合体をインキュベートすることを含む、
ことを特徴とする請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 3】

非結合試料を除去するために前記免疫複合体を洗浄する際に、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) を使用する工程をさらに含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 4】

蛍光シグナルおよび化学発光シグナルの両方が定量化される光学ボックスに前記基質および前記免疫コンジュゲート複合体を移すこと、および、
定量化された前記化学発光シグナルを調整するために初期の蛍光対最終の蛍光の比を使用して、報告された値を計算すること、
によりビーズ保持のための定量可能な前記応答を調整する工程をさらに含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記光学ボックス内の蛍光を測定して、ビーズ保持を決定すること、および、
前記光学ボックス内の発光を測定して、生成された相対光ユニット信号を検出すること、
をさらに含む、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

蛍光測定値および発光測定値をアルゴリズムに入力して、ビーズ保持調整相対光ユニット信号を生成することをさらに含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

生成された前記ビーズ保持調整相対光ユニット信号を、較正曲線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 2 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本教示は、診断アッセイを実施するためのシステムおよびプロセス、より詳細には、感染および自己免疫疾患の診断アッセイを実施するための自動免疫分析システムおよびプロセスに関する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 2】

本出願の特定の態様によれば、自己免疫疾患または感染性疾患の自動診断アッセイを実施するための定量的方法が提供され、ピオチン化自己抗原または感染性疾患抗原である捕獲試薬をストレプトアビジン被覆培地とインキュベートして、固相複合体を形成することと、固相複合体を洗浄して、過剰な捕捉試薬を除去することと、固相複合体を血清試料とインキュベートして、免疫複合体を形成することと、免疫複合体を洗浄して、非結合試料

10

20

30

40

50

を除去することと、免疫複合体をコンジュゲートとインキュベートして、免疫コンジュゲート複合体を作製することと、免疫コンジュゲート複合体を洗浄して、任意の非結合コンジュゲートを除去することと、定量化可能な応答を生成することができる基質を導入すること、および基質から生成された応答を較正すること、を含む。

【0003】

本出願のさらに他の態様によれば、患者試料内の粒子に蛍光標識を結合させる制御されたプロセスが提供される。本開示のこの態様によれば、このプロセスは、発光標識を粒子に結合させ、患者試料からの発光シグナルを標準化するために一連の洗浄ステップ後に残った粒子を定量することを含む。この例示的なプロセスによれば、発光標識は、結合検体分子の数に比例して粒子に結合される。

10

【0004】

本開示のさらなる他の態様によれば、自動化プラットフォーム上で使用するように設計された血清試料中の自己免疫特異的免疫グロブリンを評価するための定量的方法が提供される。この方法によれば、ビオチン化捕捉試薬がストレプトアビジン被覆固相とインキュベートされて、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用の利用によって、固相への捕捉試薬の接着が引き起こされる。次いで、捕獲-試薬固相複合体を洗浄して、過剰のビオチン化捕獲試薬を除去する。次いで、血清試料が捕捉試薬固相複合体とインキュベートされて、血清中に存在する自己抗原特異的免疫グロブリン(IgG、IgMまたはIgA)の提示された捕捉試薬への結合が引き起こされ、免疫複合体が作製される。次いで、免疫複合体を洗浄して非結合免疫グロブリンを除去し、次いで標識抗免疫グロブリンコンジュゲートとインキュベートして、コンジュゲートの、免疫複合体の自己抗原特異的免疫グロブリン成分への結合を引き起こし、免疫コンジュゲート複合体を作製する。免疫コンジュゲート複合体を洗浄して、非結合標識抗免疫グロブリンを除去し、次いで定量化可能な応答を生じさせることができる基質を導入する。基質の添加によって生成された定量化可能な応答を較正し、報告された値をビーズ保持のために調整する。

20

【0005】

本開示のさらなる他の態様によれば、自動化プラットフォーム上で使用するように設計された血清試料中の感染性因子特異的免疫グロブリンを評価するための定量的方法が提供される。この方法によれば、ビオチン化捕捉試薬がストレプトアビジン被覆固相とインキュベートされ、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用の利用によって、固相への捕捉試薬の接着が引き起こされる。次いで、捕獲-試薬固相複合体を洗浄して、過剰のビオチン化捕獲試薬を除去する。次いで、血清試料を捕捉試薬固相複合体とインキュベートして、血清中に存在する感染性因子特異的免疫グロブリン(IgG、IgMまたはIgA)の提示された捕捉試薬への結合を引き起こし、および免疫複合体を作製する。次いで、免疫複合体を洗浄して非結合免疫グロブリンを除去し、次いで標識抗免疫グロブリンコンジュゲートとインキュベートして、免疫複合体の自己抗原特異的免疫グロブリン成分へのコンジュゲートの結合を引き起こし、および免疫コンジュゲート複合体を作製する。免疫コンジュゲート複合体を洗浄して、非結合標識抗免疫グロブリンを除去し、次いで定量化可能な応答を生じさせることができる基質が導入される。基質の添加によって生成された定量化可能な応答を較正し、報告された値をビーズ保持のために調整する。

30

40

【0006】

本明細書の特定の態様によれば、ビオチン化捕捉試薬は、ビオチン化自己抗原またはビオチン化感染性因子である。

【0007】

本明細書の特定の態様によれば、ビオチン化捕捉試薬は、精製されたタンパク質、酵素、または抗体のビオチン化から誘導される。

【0008】

本明細書の他の態様によれば、ビオチン化捕捉試薬は、多数の抗原から構成される感染性因子抽出物のビオチン化に由来する。

【0009】

50

本開示の特定の例示的な態様によれば、ビオチン化捕捉試薬は、精製されたタンパク質、酵素、抗体および抽出物を含む様々な起源の複数のビオチン化捕捉試薬のアマルガムとして存在する。

【0010】

本開示のさらに別の特定の例示的な態様によれば、ストレプトアビジン被覆固相は、ユニバーサル蛍光標識磁性微粒子である。

【0011】

本開示の特定の態様によれば、1つ以上の洗浄工程は、反応キュベットの閉鎖領域内で洗浄される複合体を磁氣的に引き離すことによって固相複合体を洗浄することを含む。

【0012】

本開示のさらに別の特定の例示的な態様によれば、捕獲試薬固相複合体を血清試料とインキュベートする工程は、高濃度のヒト血清アルブミン(HSA)を含む反応希釈剤によって懸濁液中に保持された捕捉試薬固相複合体をインキュベートすることを含む。

【0013】

本開示のさらに別の特定の例示的な態様によれば、標識抗免疫グロブリンコンジュゲートと免疫複合体をインキュベートする工程は、公称濃度のポリエチレングリコールを含むコンジュゲート希釈剤によって懸濁液中に保持された免疫複合体をインキュベートすることを含む。

【0014】

本開示の特定の態様によれば、特に、PS-AttoとHRP標識コンジュゲートとの反応が、溶液アッセイにおける最大検出感度に対して持続的な高強度発行を生成するため、非結合試料を除去するために免疫複合体を洗浄する際に、間接標識として、抗免疫グロブリン抗体とコンジュゲートされたホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)を使用する工程をさらに含む

【0015】

本開示のさらに他の特定の態様によれば、免疫コンジュゲート複合体への基質の添加は、定量可能な応答を生成することができる基質としてLumigen PS-Attoを添加することを含み、定量可能な応答は、HRP-PS-Attoレポーターシステムによって生成され、光学ボックス内の照度計によって検出される化学発光シグナルとして存在する。

【0016】

本開示の特定の態様によれば、ビーズ保持のための定量可能な応答を調節する工程は、蛍光および化学発光シグナルの両方が定量される光学ボックスに基質および免疫コンジュゲート複合体を移す工程；ビーズ保持のために定量化された化学発光シグナルを調整するために初期蛍光対最終蛍光の比を使用する工程；報告された値を計算するために調整された化学発光シグナルを較正することを含む。基質および免疫コンジュゲート複合体を光学ボックスに移すために、試料を吸引する再使用可能なピペットチップを備えた自動ピペットアームを利用することができる。光学ボックス内で、ビーズ保持を決定するために蛍光を測定し、化学作用によって生成されたRLUシグナルを検出するために発光を測定する。測定値をアルゴリズムに入力して、「ビーズ保持調整RLU」を生成し、これを較正曲線RLUと比較し、その後、免疫グロブリン濃度を割り当てる。

【0017】

本発明のさらに他の目的および利点は、添付図面とともに以下の記載から明らかになるであろう。

【0018】

本開示の上記の態様およびそれらを得る方法は、添付の図面と関連してなされる本開示の実施形態の以下の説明を参照することにより、より明らかになるであろうし、その開示自体がよりよく理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0019】

10

20

30

40

50

【図1】本出願による自動診断アッセイを実施するための方法の概略図である。

【図2】本出願の教示による自動免疫化学分析装置および試薬システムの上概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

対応する参照符号は、いくつかの図を通して対応する部分を示す。本明細書に記載された例示は本開示の実施形態を示すが、いくつかの形態において、以下に開示される実施形態は網羅的であること、または開示の正確な形態に本開示の範囲を限定するものとして解釈されることを意図するものではない。

【0021】

本明細書では、自動免疫分析装置、試薬システム、および感染性および自己免疫疾患の診断アッセイを実施するための方法が開示される。

【0022】

詳細に本開示の例示的な自動免疫分析システムおよび方法を説明する前に、過剰または非結合物質からのバックグラウンド信号を最小化する方法として、免疫アッセイは一般に、1つの以上の分離相が反応キュベット中で行われることを必要とすることが本明細書で理解され、認識されるべきである。分離または洗浄プロセスを容易にするために、ウェルコーティング技術、ビーズコーティング技術、または常磁性粒子の使用を含むが、これらに限定されない様々な技術を使用することができる。これらの分離媒体の各々は、患者の血液試料中の目的の検体分子に結合する捕捉試薬で被覆されている。本教示の特定の態様によれば、ビオチン化捕捉試薬は、アマルガムまたは混合物（すなわち、類似のカテゴリーであるが異なる属由来の捕捉試薬）として存在し得る。当業者が本明細書において理解し認識するように、多数の捕捉試薬が利用可能であり、本教示に従って使用することができる。本教示に従って使用される個々の捕捉試薬のそれぞれの量および容量は、それらの効力（すなわち、検出可能な応答を生じるそれらの能力）に依存することが理解されるべきである。

【0023】

常磁性粒子が分離媒体として使用される場合、常磁性粒子は、洗浄プロセスの間に磁石によってキュベットの壁に引っ張られ、次いですべての液体が吸引される。当業者は、本明細書で理解し認識するように、従来の洗浄プロセスの間に、常磁性粒子の一部は液体とともに吸引され、したがって更なる化学処理のために失われることになる。免疫アッセイ手順がいくつかの洗浄工程を含む場合、磁性粒子の損失はさらに顕著になる。

【0024】

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装置で生じる常磁性粒子の損失を考慮に入れることである。これを達成するために、本教示の特定の態様によれば、患者の血液試料中の目的の分析検体は、常磁性粒子の表面に結合した捕捉試薬に結合する。次いで、発光標識がこれらの検体分子に結合される。発光試薬または基質がキュベットに加えられると、それは発光標識と反応して、分析装置の光検出器によって検出可能な光を生成する。さらに、常磁性粒子が蛍光標識を付着させる場合、キュベット内の内容物を蛍光的に読み取ることにより、洗浄工程中に失われた粒子の割合を決定する手段が提供される。

【0025】

本開示の特定の態様によれば、自動分析装置は、磁気ビーズまたは微粒子を含むがこれに限定されないアッセイのための共通の常磁性粒子を利用する。分析装置に搭載された各アッセイについて、捕捉試薬をインキュベートし、反応キュベット中のユニバーサル粒子に結合させて、時には捕捉試薬固相複合体として本明細書に言及する、アッセイ特異的粒子ベース試薬を生成する。本開示の特定の態様によれば、診断免疫アッセイを実施するために使用され得る捕捉試薬は、ビオチン - 抗原、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5% (v/v) グリセロールからな

10

20

30

40

50

る。本開示のさらに他の態様によれば、診断免疫アッセイを実施するために使用され得る別の捕捉試薬は、ビオチン - 抗原、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カクテル、0.1 mM DTT、25% (最大30%) (v/v) グリセロールからなる。

【0026】

洗浄プロセスを受けた後、患者試料、および必要に応じて任意の希釈剤をキュベット内の粒子に添加し、インキュベートする。これにより、患者の血液試料中の特定の検体分子が捕捉される。本開示の1つの特定の例示的な態様によれば、反応希釈剤（試料希釈剤）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IgG、1% (v/v) ProClin 950、0.005% Antifoam-B v/v、2% (w/v) PEG 6,000からなる。本開示のさらに別の特定の例示的な態様によれば、反応希釈剤（試料希釈剤）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からなる。

10

【0027】

これらの例示的な実施形態によれば、高割合のHSA（25%）は、インキュベーション工程の間に懸濁液中にビーズを保持するために、反応媒体の粘度を増加させるように部分的に機能することが理解されるべきである。さらに、高HSAは、このインキュベーションの間の非特異的結合も減少させ、患者試料の希釈時の相対光単位（RLU）直線性を改善する。

20

【0028】

次いで、過剰の又は非結合試料を除去するために別の洗浄プロセスが実施され、次いで発光ラベル及びコンジュゲートがキュベットに加えらる。キュベットに添加すると、インキュベーション期間の後にコンジュゲートの一部が常磁性粒子上の捕捉試薬/試料複合体に結合することが予想される。次いで、粒子は非結合コンジュゲートを除去するために別の洗浄プロセスを受け、次いで基質をキュベットに添加し、化学発光グロー反応が平衡に達するまでの短時間インキュベートする。

【0029】

平衡に達した後、試料の発光および蛍光測定値がとられる。常磁性粒子は、共通の試薬バイアル内の分析装置に含まれ、反応キュベットにピペットで移される前に均一な懸濁状態に維持されるので、各試験に対する最終的な蛍光測定値と組み合わせられたとき、キュベットにピペットで移された後の粒子の初期蛍光測定値は、免疫アッセイプロセス後にキュベット内に残っている初期の粒子の画分を決定するために使用することができる。残りの画分は次の式で与えられる。

30

【0030】

【数1】

$$\text{粒子画分残存} = \frac{F_{\text{最終}} - F_{\text{バックグラウンド}}}{F_{\text{初期}} - F_{\text{バックグラウンド}}},$$

40

【0031】

ここで、Fは、補正された蛍光信号（すなわち、光検出器の計数効率によって補正された測定信号）を表す。光検出器は特定の時間分解能を有するので、単位時間当たりに検出される光子の数が増加すると、その時間分解能内で検出器に到達する2つの光子の可能性も増加する。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ので、単一の光子としてカウントされる。したがって、光検出器の検出効率は、入射光子束が増加する

50

につれて減少する。

【0032】

常磁性粒子のための容器壁と相互作用し、常磁性粒子のための容器壁から散乱する非常に高い蛍光励起光子の束のために、蛍光物質が存在しない場合であっても光検出器によって計数される特定数の光子が存在する。この補正されたバックグラウンド信号は、 $F_{background}$ で表される。

【0033】

免疫アッセイプロセスを通じて反応キュベット内に残る初期常磁性粒子のパーセンテージを決定するための蛍光測定の使用は、プロセスがシステムスループットを制限しないため、特に、プロセスが達成され得るタイミングまたは並列処理を制限しないために、有益である。他方、ほとんどの従来の免疫アッセイ分析装置は、常磁性粒子および試料の非常に再現性のある処理に依存しており、それは達成され得るタイミングまたは並列処理を実際に制限し、その結果としてシステムスループットも制限する。これらの従来の免疫アッセイ分析装置では時間の経過に伴う処理効率の変化は検出されなくなる可能性があるが、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、マイナーな機械的整列または流体の相違に起因する洗浄効率が増加する並列処理（例えば、複数の洗浄アーム）の使用を可能にする。免疫アッセイプロセスの各ステップ後にとられた蛍光測定値は、並行プロセスの同等の機能性を検証するのに有用である。

【0034】

上記の方法および技術に従って、感染および自己免疫疾患の診断アッセイを実施するための自動免疫分析装置および試薬システムを、以下により詳細に記載する。このプロセスが記載されているので、アッセイを実施するために使用される開示された機器は、システムによって様々な異なる試験が実施され得るように、標準またはユニバーサル収集チューブを受け入れるように構成され得る。当業者はまた、原材料から感染性疾患および自己免疫抗原を含む抗原を単離するための多くの既知の方法が存在することを、本明細書において理解および認識するであろう。これらの単離方法は広く知られており、当技術分野で受け入れられているので、ここに詳細に議論しなくても、本発明の精神または範囲から逸脱することなく、任意の許容される抗原単離方法を本発明のシステムに組み込むことができることを当業者は認識するであろう。感染症または自己免疫抗原を単離した後、それらをビオチンとコンジュゲートさせてビオチン化抗原または捕捉試薬を作製することができる。次いで、ビオチン化抗原をストレプトアビジン結合固体支持体または膜と接触させる。本開示の特定の態様によれば、ビオチン化捕捉試薬は、精製タンパク質、酵素、抗体、DNA、核抽出物、細胞抽出物および非タンパク質抗原（例えば、薬物またはタンパク質に架橋された物質）を含むがこれに必ずしも限定されない成分に由来し得る。

【0035】

当業者が本明細書において理解し、認識するように、診断的感染および自己免疫疾患の免疫アッセイに共通して使用される標準的なビオチン化プロセスおよび技術を、本教示に従って利用することができる。しかしながら、化学で使用される複数のビオチン化試薬の最適な性能を保証するために、必要に応じて反応のビオチン/タンパク質比を最適化することができる。本教示の特定の態様によれば、ビオチン試薬の特定のサイズのリンカーアームは、 $NHS-PEG_{12}$ -ビオチンである。さらに、非タンパク質抗原については、材料をストレプトアビジンビーズ固相へのコーティングのためにビオチン化タンパク質に架橋することができ、一方、DNAなどの自己免疫抗原についてはビオチン化ジデオキシヌクレオチドをDNAに組み込むことができる。

【0036】

本開示の特定の態様による自動診断アッセイプロセスの概略図を図1に示す。この例示的な実施形態によれば、ストレプトアビジン被覆で製造された磁気ビーズまたは微粒子は、既知のビオチン化抗原と混合（インキュベート）される（工程10）。当業者が理解し、認識するように、ストレプトアビジンとビオチンとの間の周知の親和性結合は、ビーズ表面への抗原被覆を容易にし、それにより、オンボード試薬調製物とのユニバーサルビー

10

20

30

40

50

ズの使用が可能になる。本教示によるビオチン化捕捉試薬のストレプトアビジン被覆固相とのインキュベートに必要な時間および関連する実験室条件は、実施される特定の実験の観点から変化するが、本開示の特定の態様によれば、特に有用なインキュベーション時間範囲は、約1分～約15分、より具体的には約5分～約10分であり、温度は、約2～約40、より具体的には約36.8～約37.2であることも理解され、認識されるべきである。

【0037】

以下の表1に示されるように、本開示のこの態様によれば、以下のビーズが、本明細書に開示される磁性支持体に使用され得る。

【0038】

10

【表1】

ビーズ	1	2	3
販売会社	Thermo Scientific	B: Bangs Lab	Pierce
製品	SA-Coated Magnetic Bead	BioMag Plus Streptavidin (Cat # BP628)	SA-Coated Magnetic Bead
平均粒径	1 μm	~1.5 μm	1 μm
サイズ分布 (ロットCV内)	±10%	CV: 30% (1.242±0.402)	NA
ビオチン結合能 (mgビーズあたり)	4 nmol Biotin	> 2 μg Biotin (8-26 μg) (Biotin-ALP)	3.5 nmol Biotin fluorescein

20

【0039】

特定の実施形態によれば、ビオチン化抗原をストレプトアビジン被覆ビーズと混合またはインキュベートするために多数のプロセスを利用することができるが、抗原がビオチン/ストレプトアビジン相互作用によりビーズを被覆するように、生成物を反応キュベット中で混合する。例示的な一実施形態によれば、10 μLのストレプトアビジン(SA)被覆ビーズが反応キュベットに分散され、続いて、40 μLのビオチン化抗原が分散の間に混合される。混合物を1～15分間インキュベートする。磁気ビーズを反応キュベットの一方の側に引っ張り、それらを固定化する一方、緩衝液を反応キュベット中に流して洗浄することによって過剰のビオチン化抗原を洗い流すことができる(工程20)。1つの例示的な実施形態によれば、緩衝液は、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および1% (v/v) ProClin 950からなり得る。当業者は、磁気ビーズを反応キュベットの一方の側に留まらせるために当技術分野で知られている任意の容易に利用可能な固定化技術を利用することができるが、特定の例示的な実施形態によれば、洗浄ステップが実行されている間、磁気ビーズを固定するために外部磁石が使用される。

30

【0040】

次いで、ストレプトアビジン被覆磁気ビーズを磁場から解放し、反応キュベット内で自由に移動させる。次いで、生物学的試料(血清または血漿)を反応キュベットに添加し、続いて40 μLの反応緩衝液を添加して、磁性ビーズを再懸濁する(工程30)。生物学的試料に加えて、本開示の特定の態様によれば、高濃度のヒト血清アルブミン(HSA)も懸濁液内で使用して、高分子結合を促進し、磁気ビーズを溶液内に保持する。反応を直線的に保つために、ヒトIgGを緩衝液に添加する。

40

【0041】

試料が任意の抗原ビーズコーティングのいずれかに反応性の任意の抗体(例えば、IgE、IgG、IgM、IgA)を含有する場合、このような抗体はこの試料インキュベーション工程中に結合する。試料のインキュベーションを37で40分間維持する。患者試料内の任意の抗体がビーズと結合した後、第2の洗浄ステップを実施して、結合していない患者試料を除去する(工程40)。150 μLの洗浄緩衝液濃縮液(50 mM リン

50

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) を添加してビーズを再懸濁させ、次いでビーズを1.5分間磁石で引っ張り下ろす。溶液を除去した後、磁石を離し、200 μ Lの洗浄緩衝液を添加してビーズを再懸濁する。次いで、洗浄をもう一度繰り返す。

【0042】

第2の洗浄工程が行われた後、ビーズは、ヒト免疫グロブリンG、M、EまたはA (IgG/M/E/A) に特異的な抗体に再懸濁される。本開示の特定の態様によれば、抗体は、ビーズによって捕捉された任意の特定の患者の抗体に結合する酵素 (西洋ワサビペルオキシダーゼなど) にコンジュゲートされる (工程50)。次いでビーズを再度洗浄して過剰の抗体を除去し (工程60)、検出感度を最大にするために高感度光形成試薬 (例えば化学発光基質) を加える (工程70)。本開示の教示に従って化学発光基質として使用することができる例示的試薬には、Lumigen (登録商標) PS-atto、SuperSignal (登録商標) ELISA Pico Chemiluminescent Substrate または SuperSignal (登録商標) ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate が含まれるが、これらに限定されない。当業者は、キサンテン染料、芳香族アミン及び複素環式アミンを含む様々な構造クラスの多数の化合物を用いて、これらの条件下で化学発光を生成できることを理解し、認識するであろう。これらの化合物は、特許文献中によく知られており、多くの商業的販売業者を通じて容易に入手可能である。非限定的な化学発光化合物には、ジオキセタン型分子、ルシフェリン、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 が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【0043】

高感度の光形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 (工程80)。特定の実施形態によれば、ピペットチップ中の溶液を読み取りステーションに移して、発光シグナルおよび蛍光シグナルの両方を読み取ることによって、この光を測定することができる。しかし、本開示に従って放出される光は、限定されることなく、ルミノメーター、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、ケミカルアクチノメーター、または視覚的なものを含む、本技術分野内で使用可能な、任意の適切な公知の検出手段によって検出され得る。当業者が容易に理解し認識するように、各検出手段は、適用および使用、コストおよび利便性を含むいくつかの要因によって影響され得る選択された検出装置といった、異なるスペクトル感度を有する。さらに、本明細書中で使用される場合、本開示に従って測定され得る定量可能または検出可能な応答は、抗原特異的免疫グロブリン (Ig、例えば、IgE、IgG、IgM、IgA) を有する陽性試料が、基質の添加時に光度 (すなわち、RLU = 相対光単位) を生成する抗Ig-HRPの結合を引き起こしたことを示唆する。さらに、定量可能または検出可能な応答はまた、陰性試料によって生成される定量可能な応答に適用され得ることも、ここで理解されるべきである。

30

【0044】

本教示の特定の態様に従って、任意の抗原特異的Ig (sIg) に対する陽性/陰性試料によって生成されたRLUを、全IgE (tIg) 較正曲線によって生成されたRLUと比較される。較正曲線は、ピオチン化抗Ig捕捉試薬を用いて評価されたある範囲の予め希釈された全Ig (tIg) を較正器 (WHO標準から生成される) にかけることによって生成される。

40

【0045】

本開示の機械的態様をよりよく理解するために、図2は、本開示の教示に従って検体試料の発光シグナルを定量し、正規化するために使用され得る自動免疫化学分析装置および試薬システム100を示す。この例示的な態様によれば、自動化免疫化学分析装置100は、最初に蛍光標識された常磁性粒子またはフルオビーズ (fluo-bead) を反応

50

ローター 106 内に配置されたキュベットに分注することによって開始する。本明細書の一実施形態によれば、例示的なフルオビーズは、Fluo-Bead (SA-Speed Bead、Atto 590)、1mg/mLである。

【0046】

フルオビーズは最初、ボルテックス装置 102 内に配置され、R1ピペッター 104 によって反応ローター 106 に移される。R1ピペッター 104 は、所望量のフルオビーズ混合物を吸引し、吸引された量を反応ローター 106 に移すことができ、その結果、フルオビーズを反応ローター 106 のキュベット内に注入することができる。キュベットへの注入に続いて、光学ピペット 108 が反応ローター 106 のキュベットから試験試料を吸引し、試験試料を光学ボックス 110 に移送することができる。試料が光学ボックス 110 内に配置されると、蛍光測定値および発光測定値を記録することができる。蛍光および発光信号の初期記録は、試料中のフルオビーズの初期濃度に対応することができる蛍光信号のベースライン測定値として使用することができる。測定値を記録した後、マルチリンスピペッター 112 は、洗浄緩衝液を用いてキュベットをリンスすることができる。

10

【0047】

次に、R1ピペッター 104 を介してボルテックスサー 102 から反応ローター 106 のキュベットにフルオビーズを移動させ得る。その後、R1ピペッター 104 が試薬ローター 114 から捕捉試薬を吸引して、捕捉試薬を反応ローター 106 に配置されるキュベットに注入し得る。インキュベーション期間の後、単一のリンスピペッター 116 は、フルオビーズを再懸濁するためにリンス緩衝液を注入することができる。実質的な量の懸濁したフルオビーズは、その後、一定時間にわたって反応ローター 106 内の磁石によって局在化され得る。マグネットがキュベット内のフルオビーズを実質的に局在化させた後、マルチリンスピペッター 112 はリンス緩衝液の一部を吸引して廃棄し、キュベット内に局在化したフルオビーズの一部を残す。マルチリンスピペッター 112 は、反応ローター 106 のキュベットに洗浄緩衝液を注入して、フルオビーズを再懸濁するように進行してもよい。反応ローター 106 内の磁石によって、フルオビーズが再び局在化され、マルチリンスピペッター 112 が、反応ローター 106 のキュベットから局在化されていない試料の一部を吸引して廃棄してもよい。

20

【0048】

患者試料は、試料ローター 118 上の試料チューブに収容されてもよい。患者試料は、さらに、試料希釈剤で部分的に希釈されてもよい。この時点で、試料ピペッター 120 は、患者試料の一部を吸引して、反応ローター 106 のキュベットに患者試料を注入してフルオビーズを再懸濁することができる。次いで、反応ローター 106 内の患者試料を含むキュベットを、特定の時間、特定の温度でインキュベートすることができる。インキュベーション後、単一のリンスピペッター 116 は、再びリンス緩衝液を注入して、再びふるいビーズを再懸濁することができる。フルオビーズが反応ローター 106 の磁石の近くのキュベット内に実質的に集まるようにすることにより、反応ローター 106 によって別の局在化プロセスが行われる。フルオビーズの局在化後、マルチリンスピペッター 112 は、局在化プロセス中に局在化されなかった反応ローター 106 のキュベット内の流体の一部を吸引し、廃棄する。

30

40

【0049】

2~3回のリンスサイクルは、反応ローター 106 のキュベット内の試料上で実行されてもよい。リンスサイクルは、マルチリンスピペッター 112 を使用してフルオビーズを再懸濁するためにキュベット内に洗浄緩衝液を注入することを含んでもよい。別の局在化ステップは、反応ローター 106 内の磁石によってキュベット内にフルオビーズが収集されることを可能にしてもよい。フルオビーズの十分な局在化を可能にする期間の後、マルチリンスピペッター 112 は、一部の試料を吸引し、および非意図的に破棄し、反応ローター 106 のキュベット内に一部のフルオビーズを残してもよい。別のリンスサイクルが、マルチリンスピペッター 112 を使用することによって起こり、再びキュベット内に洗浄緩衝液を注入し、フルオビーズを再懸濁することを可能にしてもよい。別のフルオ

50

ビーズ局在化プロセスは、反応ローター 106 内の磁石を利用して、フルオビーズを試料の残りの部分から局在化することができる。最後に、マルチリンスピベッター 112 は、局在化プロセスによって局在化されなかった試料の一部を吸引することができる。

【0050】

この時点で、R2ピベッター 122 は、試薬ロータ 114 内のコンジュゲートキュベットに含まれるコンジュゲートを吸引することができる。次に、R2ピベッター 122 は、以前に吸引されたコンジュゲートを反応ローター 106 のキュベットに注入することができる。反応ローター 106 のキュベットを制御された時間および温度の下でインキュベートした後、単一のリンスピベッター 116 は、反応ローター 106 のキュベットにリンス緩衝液を注入することができる。別のフルオビーズ局在化サイクルを実施して、反応ローター 106 内の磁石により実質的にキュベット内のフルオビーズを局在化させることもできる。マルチリンスピベッター 112 は、局在化サイクル中に局在化されていないキュベット内の試料の一部を吸引し廃棄することができる。

10

【0051】

反応ローター 106 のキュベット内の試料に対して 2 回以上のリンスサイクルを実施することができる。マルチリンスピベッター 112 は、キュベット内にフルオビーズを再懸濁するために洗浄緩衝液を注入することができる。別のフルオビーズ局在化サイクルは、適切な時間にわたって反応ローター 106 の磁石に近接してキュベットを配置することによって、フルオビーズを局在化することができる。局在化サイクルの後、マルチリンスピベッター 112 は、局在化サイクル中に局在化されなかった試料の一部を吸引し廃棄することができる。次いで、マルチリンスピベッター 112 を使用して洗浄緩衝液を注入してフルオビーズを再懸濁することにより、第 2 の洗浄サイクルを行うことができる。別の局在化サイクルは、反応ローター 106 内の磁石を利用してキュベット内のフルオビーズを局在化することができる。局在化プロセスの後、マルチリンスピベッター 112 は、局在化サイクルの間に局在化されなかった試料の一部を吸引して廃棄してもよい。

20

【0052】

この時点で、R2ピベッター 122 は、試薬ロータ 114 からコンジュゲートの一部を吸引し、コンジュゲートを混合基質容器 124 に注入して、混合基質試料を作製することができる。次いで、R2ピベッターは、混合基質試料を混合基質容器 124 から吸引し、混合基質試料を反応ローター 106 のキュベットに注入し、混合基質試料と共にフルオビーズを再懸濁することができる。次いで、反応ローター 106 のキュベット内の試料を、光学ピベッター 108 によって吸引し、光学ボックス 110 内に置くことができる。光学ボックスが蛍光および発光光学観察を行った後、試料を廃棄し、マルチリンスピベッターが反応ロータ 106 のキュベットを次の試験の準備のためにリンスする。

30

【0053】

抗原は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、脂質、酵素、免疫グロブリン、またはヌクレオチドであり得る。本明細書中で使用される場合、用語「タンパク質」は、100 アミノ酸より長いアミノ酸配列を指す。本明細書中で使用される場合、用語「ポリペプチド」は、10 ~ 100 アミノ酸長のアミノ酸配列を指す。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド」は、10 アミノ酸長未満の長さのアミノ酸配列を指す。本明細書で使用する場合、「ヌクレオチド」は単一のプリンまたはピリミジン分子を指し、「核酸」という用語はヌクレオチド配列を指す。例えば、DNA は核酸であり、グアニンはヌクレオチドである。

40

【0054】

自己免疫疾患の診断のための被験体由来の血清試料中の自己抗原特異的抗体の検出のための自動診断アッセイを実施するための定量的方法も本明細書に開示される。

【0055】

本明細書に開示される方法を使用して診断することができる自己免疫疾患の非限定的な例は、急性播種性脳脊髄炎 (ADEM)、アジソン病、抗リン脂質抗体症候群 (APS)、関節炎 (例えば、一関節炎または関節リウマチ、変形性関節症、若年性特発性関節炎、

50

敗血症性関節炎のような多発性関節炎)、脊椎関節症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、水疱性類天疱瘡、セリアック病、シャーガス病、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、1型真性糖尿病(IDDM)、子宮内膜症、胃腸障害(例えば、過敏性腸疾患またはクローン病もしくは潰瘍性大腸炎のような炎症性腸疾患)、グッドパス病、グレーブス病、ギラン・バレー症候群(GBS)、橋本甲状腺炎、汗腺膿瘍、特発性血小板減少性紫斑病、間質性膀胱炎、ループス(例えば、円板状紅斑性狼瘡、薬物誘発性エリテマトーデス、ループス腎炎、新生児狼瘡、亜急性皮膚エリテマトーデス、全身性エリテマトーデス)、モルフェア、多発性硬化症(MS)、重症筋無力症、筋障害(例えば、皮膚筋炎、封入体筋炎、多発性筋炎、筋炎)、神経炎、パーキンソン病、尋常性天疱瘡、悪性貧血、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、再発性播種性脳脊髄炎、リウマチ熱、統合失調症、強皮症、シェーグレン症候群、皮膚疾患(例えば、皮膚炎、湿疹、静脈皮膚炎、汗腺炎、乾癬、酒さまたは潰瘍性大腸炎)、腱鞘炎、ブドウ膜炎、血管炎(例えば、バージャー病、脳血管炎、チャージ-シュトラウス動脈炎、クリオグロブリン血症、必須クリオグロブリン血症、巨細胞性動脈炎、ゴルフア-脈管炎、ヘノッホ-シェーンライン紫斑病、過敏性血管炎、川崎病、顕微鏡下の多発動脈炎/多発性血管炎、結節性多発動脈炎、リウマチ性多発筋痛(PMR)、リウマチ性血管炎、高安動脈炎、ウェゲナー肉芽腫症)、または白斑が挙げられる。

【0056】

自己抗原の非限定的な例は、限定されるものではないが、アグリカン、アラニル-tRNA合成酵素(PL-12)、アルファベータクリスタリン、アルファフォドリン(Sp t a n 1)、アルファアクチニン、 α 1アンチキモトリプシン、 α 1アンチトリプシン、 α 1ミクログロブリン、アルソラーゼ、アミノアシルtRNA合成酵素、アミロイド(例えば、アミロイド、アミロイドP)、アネキシン(例えば、アネキシンII、アネキシンV)、アポリポタンパク質(例えば、ApoB、ApoE、ApoE4、ApoJ)、アクアポリン(例えば、AQP1、AQP2、AQP3、AQP4)、殺菌性/浸透性増加タンパク質(BPI)、 α -グロビン前駆体BP1、 α -アクチン、 α -ラクトグロブリンA、 β 2-糖タンパク質I、 β 2-ミクログロブリン、血液型抗原(例えば、Rh血液型抗原、I血液型抗原、ABO血液型抗原)、C反応性タンパク質(CRP)、カルモジュリン、カルレチキュリン、カルジオリピン、カタラーゼ、カテプシンB、セントロメアタンパク質(例えば、CENP-A、CENP-B)、コンドロイチン硫酸塩、クロマチン、コラーゲン(例えば、タイプI、II、III、IV、V、VIコラーゲン)、補体成分(例えばC1q、C3、C3a、C3b、C4、C5、C6、C7、C8、C9)、シトクロムC、シトクロムP450 2D6、サイトケラチン、デコリン、デルマタン硫酸塩、DNA(例えば、二本鎖DNA、一本鎖DNA)、DNAトポイソメラーゼI、エラスチン、エプスタイン-パール核抗原1(EBNA1)、エラスチン、エンタクチン、抽出可能な核抗原(Ro、La、Sm、RNP、Scl-70、Jo1)、ファクターI、ファクターP、ファクターB、ファクターD、ファクターH、ファクターX、フィブリノーゲン(フィブリノーゲンIV、フィブリノーゲンS)、フィブロネクチン、フォルミミノトランスフェラーゼシクロデアミナーゼ(LC-1)、グリアジンおよびアミド化グリアジンペプチド(DGP)、gp210核エンベロープタンパク質、GP2(主要チモーゲン顆粒膜糖タンパク質)、糖タンパク質gpIIb/IIIa、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)、糖化アルブミン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)、ハプトグロビンA2、熱ショックタンパク質(例えば、Hsp60、Hsp70)、ヘモシアニン、ヘパリン、ヒストン(例えば、H1、H2A、H2B、H3、H4)、ヒスチジル-tRNA合成酵素(Jo-1)、ヒアルロニダーゼ、免疫グロブリン、インスリン、インスリン受容体、インテグリン(例えばインテグリン α 1、 α 2、 α 1、 α 3、 α 1、 α 4、 α 1、 α 5、 α 1、 α 6、 α 1、 α 7、 α 1、L2、M2、IIb、 α 3、V1、V3、V5、V6、V8、 α 6、 α 3、 α 1、 α 1)、間質レチノール結合タンパク質3、内性ファクター、Ku(P70/P80)、乳酸デヒドロゲナーゼ、ラミニン、肝細胞質抗原1型(LC1)、肝臓/腎臓ミクロ

10
20
30
40
50

ソーム抗原 1 (L K M 1)、リゾチーム、メラノーマ分化関連タンパク質 5 (M D A 5)、M i - 2 (クロモドメインヘリカーゼ D N A 結合タンパク質 4)、ミトコンドリアタンパク質 (例えば、M 1、M 2、M 3、M 4、M 5、M 6、M 7、M 8、M 9、B C O A D C - E 2、O G D C - E 2、P D C - E 2)、ムスカリン受容体、ミエリン関連糖タンパク質、ミオシン、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、ミエロペルオキシダーゼ (M P O)、リウマチ因子 (I g M 抗 I g G)、ニューロン特異的エノラーゼ、ニコチン性アセチルコリン受容体 鎖、ヌクレオリン、ヌクレオポリリン (例えば、N u p 6 2)、ヌクレオソーム抗原、P M / S c l 1 0 0、P M / S c l 7 5、膵臓 細胞抗原、ペプシノゲン、ペルオキシレドキシニン 1、ホスホグルコースイソメラーゼ、リン脂質、ホスホチジルイノシトール、血小板由来成長因子、ポリメラーゼベータ (P O L B)、カリウムチャンネル K I R 4 . 1、増殖細胞核抗原 (P C N A)、プロテイナーゼ - 3、プロテオリピドタンパク質、プロテオグリカン、プロトロンビン、リカバリン、ロドプシン、リボヌクレアーゼ、リボ核タンパク質 (例えば、R o、L a、s n R N P、s c R N P)、リボソーム、リボソームリンタンパク質 (例えば、P 0、P 1、P 2)、R N A (二本鎖 R N A、一本鎖 R N A)、S m タンパク質 (例えば、S m B、S m B '、S m D 1、S m D 2、S m D 3、S m F、S m G、S m N)、S p 1 0 0 核タンパク質、S R P 5 4 (シグナル認識粒子 5 4 k D a)、セレクトリン、平滑筋タンパク質、スフィンゴミエリン、連鎖球菌抗原、スーパーオキシドジスムターゼ、滑膜関節タンパク質、T 1 F 1 ガンマコラーゲン、トレオニル t R N A 合成酵素 (P L - 7)、組織トランスグルタミナーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、チログロブリン、甲状腺刺激ホルモン受容体、トランスフェリン、トリオースリン酸イソメラーゼ、チューブリン、腫瘍壊死アルファ、トポイソメラーゼ、U 1 - d n R N P 6 8 / 7 0 k D a、U 1 - s n R N P A、U 1 - s n R N P C、U - s n R N P B / B '、ユビキチン、血管内皮増殖因子、ビメンチンまたはピトロネクチンである。

【 0 0 5 7 】

自己免疫疾患の診断のための被験体由来の血清試料中の感染因子に対する抗体を検出することにより、感染性疾患の検出のための自動診断アッセイを行うための定量的方法も本明細書に開示される。

【 0 0 5 8 】

感染因子としては、細菌、ウイルス、ウイロイド、プリオン、線虫 (例えば、回虫、虫垂)、寄生虫 (マラリア、虫食き) および真菌 (例えば、酵母、白癬) が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中で使用される場合、用語「感染性因子」、「病原体」、「病原性微生物」および「微生物」はすべて、上記の感染因子を指す。

【 0 0 5 9 】

感染因子由来の抗原は、感染因子由来の任意の単離されたタンパク質、糖タンパク質、核酸、酵素、脂質、リボサッカリド、またはそれらの組み合わせであり得る。抗原はまた、複数の異なる抗原性部分を含む感染性因子からの抽出物またはホモジナイズされた調製物を含むことができる。

【 0 0 6 0 】

試料が自己抗原 (s e l f a n t i g e n) (自己抗原 (a u t o a n t i g e n)) に対する自己免疫抗体または感染性因子に対する抗体を含有するかどうかを決定するために、蛍光標識された常磁性微粒子 (例えばフルオビーズ) は、本明細書中に開示される方法に従って自己抗原または感染性疾患抗原に結合して、捕捉試薬を形成する。反応キュベット中の磁気ビーズの開始数を決定するために蛍光読み取りのために洗浄する前に、キュベットの試料を得る。

【 0 0 6 1 】

洗浄プロセスを受けた後、患者試料、および必要に応じて希釈剤をキュベット内の粒子に添加し、インキュベートする。これにより、患者の血液試料中の特定の検体分子 (抗体) が捕捉される。次いで、過剰のまたは未結合の試料を除去するために別の洗浄プロセスが実施され、次いで、発光標識およびコンジュゲートがキュベットに添加される。キュベ

ットに添加されると、インキュベーション期間の後にコンジュゲートの一部が常磁性粒子上の捕捉試薬/試料複合体に結合することが予想される。次いで、粒子は未結合コンジュゲートを除去するために別の洗浄プロセスを受け、次いで基質をキュベットに添加し、化学発光グロー反応が平衡に達するまで短時間インキュベートする。

【0062】

平衡に達した後、試料の発光および蛍光読み取りを行い、抗原に対する抗体のレベルを本明細書に開示するように決定する。

【0063】

本開示のプロセスおよび方法の利点および改良は、以下の実施例において実証される。これらの実施例は例示的なものに過ぎず、本開示の他の実施形態を限定または排除することを意図するものではない。

10

【実施例】

【0064】

実施例1：抗ヒトIgまたは抗原抽出物のビオチン化：

DMSO中250mMのNHS-PEG12-ビオチン(Pierce)2マイクロリットルをリン酸緩衝化生理食塩水中(PBS)中5.0mg/mLのアフィニティー精製抗ヒトIg(例えばIgE、IgG、IgA、IgM)1mLに添加する。または、DMSO中250mMのNHS-PEG12-ビオチン(Pierce)1.6μLをPBS中1.0mg/mLの抗原抽出物1mLに添加する。

【0065】

試薬溶液を混合し、氷上に2時間置く。遊離のビオチン試薬は、2~8で4時間および一晩、2回のPBSの交換(抗体対緩衝液の体積比-1:100)に対する透析によってビオチン化抗体から分離される。

20

【0066】

実施例2：フルオビーズの調製

ddH₂O中1mMのBiotin-Fluo(Alexa Fluor 594 Biotin, Sodium Salt, ライフテクノロジ)5マイクロリットルをPBSTHP緩衝液(10mMリン酸ナトリウム、pH7.4、0.9%(w/v)NaCl、0.05%(v/v)Tween-20、10mg/mL HSA、1%(v/v)ProClin 950)45mLに加える。よく混合する。

30

【0067】

5ミリリットルのSA-スピードビーズ(Sera-mag スピードビーズ ストレプトアビジン被覆磁気粒子、サーモ)10mg/mLをBiotin-Fluo溶液に添加し、よく混合する。

【0068】

実施例3：抗原に対する特異的免疫グロブリンレベルのアッセイ

ビーズ濃度1mg/mLでの10マイクロリットルのFluo-Bead(蛍光標識された常磁性微粒子)を反応キュベットに分注する。40μLのビオチン抗原(例えば、感染性疾患抗原、自己抗原など)またはビオチン抗Ig抗体を分注し、Fluo-Beadに混合し、37で1~10分間インキュベートする。洗浄後、抗原または抗Ig被覆ビーズを40μLの反応緩衝液に再懸濁する。適切な個体から得られた血清試料を抗原に対してアッセイする。10μLの試料を、反応キュベット中の懸濁した抗原被覆ビーズ40μLに添加した。6点標準曲線については、10μLの血清標準(WHO Ig標準に対して校正された二次標準)を反応キュベット中の抗Ig被覆ビーズ40μLにそれぞれ添加する。様々な異なる標識抗Igコンジュゲートを本教示に従って利用することができるが、以下の抗Igコンジュゲートを利用する：アッセイのために：抗IgE-HRP；抗IgA-HRP、抗IgG-HRP、抗IgM-HRP、抗ECP-HRPおよび抗トリプターゼ-HRPである。さらに、本明細書中で使用される場合、各コンジュゲートは、化学において使用するための最適化されたHRP取り込み比を有する。本教示の特定の態様によれば、列挙されたコンジュゲートに使用されるHRP取り込み比の範囲は、約1.

40

50

2 ~ 約 5 . 4 である。さらに、本教示は、アルカリホスファターゼコンジュゲートおよび
- ガラクトシダーゼコンジュゲートを含むがこれに限定されない他のタイプのコンジュ
ゲート - レポーターシステムの組み込みも企図する。

【 0 0 6 9 】

溶液を混合し、37 で40分間インキュベートする。洗浄後、ビーズを50 μ L の抗
ヒト I g E - H R P コンジュゲートに再懸濁し、37 で30分間インキュベートする。
P S - a t t o (L u m i g e n) 5 0 μ L を各キュベットに加え、ビーズを再懸濁する
。ビーズ懸濁液をピペットチップに移し、蛍光および発光信号の両方について視覚ボック
ス内に読み込む。標準曲線は、4パラメーターロジスティック関数式および標準曲線から
補間された抗原に対する特異的 I g のレベルを使用して決定した。

10

【 0 0 7 0 】

本教示に従って使用することができる例示的試薬および成分のリストは、限定されるこ
となく、ビーズ：F l u o - B e a d (S A - S p e e d B e a d 、 A t t o 5 9 0
標識)、1 m g / m L ; 捕獲試薬希釈剤：I g E : 1 0 m M リン酸ナトリウム、p H 7
. 4、0 . 9 % (w / v)、N a C l、0 . 0 5 % T w e e n - 2 0、1 % (w / v)
ヒト血清アルブミン、1 % (v / v) P r o C l i n 9 5 0、上限5 % (v / v) グリ
セロール；A N A : 1 0 m M リン酸ナトリウム、p H 7 . 4、0 . 9 % (w / v) N a C
l、0 . 0 5 % T w e e n - 2 0、1 % (w / v) ウシ血清アルブミン、1 % プロテア
ーゼ阻害剤カクテル、0 . 1 m M D T T、1 % (v / v) P r o C l i n 9 5 0、上
限25 % (3 0 %) (v / v) グリセロール；洗浄緩衝液濃縮液 (5 x) 5 0 m M リン酸
ナトリウム、p H 7 . 4、4 . 5 % (w / v) N a C l、0 . 0 5 % T w e e n - 2 0、
0 . 0 5 % (v / v) P r o C l i n 9 5 0、0 . 0 2 % (v / v) A n t i f o a m
- C v / v ; 試薬希釈剤 (反応希釈剤および試料希釈剤) I g E - 1 0 m M リン酸ナト
リウム、p H 7 . 4、5 0 0 m M N a C l、0 . 0 2 % T w e e n - 2 0、1 % (w /
v) ヒト血清アルブミン、1 % (v / v) ヒト I g G、1 % (v / v) P r o C l i n
9 5 0、0 . 0 0 5 % A n t i f o a m - B v / v、2 % (w / v) P E G 6、0 0
0 ; A N A - 1 0 m M リン酸ナトリウム、p H 7 . 4、5 0 0 m M N a C l、0 . 0 2
% T w e e n - 2 0、2 5 % (w / v) ヒト血清アルブミン、1 % (v / v) P r o C l
i n 9 5 0 ; キャリブレーションおよびコントロール：キャリブレーション；試料希釈剤に希釈
された患者試料；コントロール：患者試料プール；コンジュゲート；コンジュゲート希釈
剤：5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 6 . 7、1 5 0 m M N a C l、0 . 0 5 % T w e
e n - 2 0、1 % B S A、5 % (w / v) P E G 6、0 0 0、1 % (v / v) P r o C
l i n 9 5 0 ; I g E : 1 0 0 n g / m L 抗 I g E - H R P、1 0 0 μ g / m L a
p o - H R P、希釈剤中、0 . 0 1 5 % A n t i f o a m - B v / v ; および基質：
P S - a t t o A & B、0 . 0 1 % A n t i f o a m - B v / v。

20

30

【 0 0 7 1 】

実施例 4 : 自己抗原に対する特異的免疫グロブリンレベルのアッセイ

ビーズ濃度 1 m g / m L での 1 0 マイクロリットルの F l u o - B e a d (蛍光標識さ
れた常磁性微粒子) を反応キュベットに分配する。ビオチン抗原 (例えば、ミエリン塩基
性タンパク質、コラーゲン、インスリンなど) またはビオチン抗 I g G 抗体 (あるいは抗
I g M または抗 I g A) 4 0 μ L を分注し、F l u o - B e a d に混合し、37 で 1 ~
1 0 分間インキュベートする。ビーズの開始数を決定するために、標識した F l u o - B
e a d の試料を得る。洗浄後、抗原または抗 I g G 被覆ビーズを 4 0 μ L の反応緩衝液に
再懸濁する。個体から得られた血清試料を抗原に対してアッセイする。1 0 μ L の試料を
反応キュベット中の懸濁した抗原被覆ビーズ 4 0 μ L に添加する。6 点標準曲線につい
ては、1 0 μ L の血清標準 (W H O I g G 標準に対して校正された二次標準) を、反応キ
ュベット中の抗 I g G 被覆ビーズ 4 0 μ L にそれぞれ添加する。

40

【 0 0 7 2 】

溶液を混合し、37 で40分間インキュベートする。洗浄後、ビーズを50 μ L の抗
ヒト I g G - H R P コンジュゲートに再懸濁し、37 で30分間インキュベートする。

50

PS - atto (Lumigen) 50 μ L を各キュベットに加え、ビーズを再懸濁する。ビーズ懸濁液をピペットチップに移し、蛍光および発光シグナルの両方について視覚ボックス内に読み込む。標準曲線は、4パラメーターロジスティック関数式および標準曲線から補間された自己抗原に対する特異的 Ig G のレベルを用いて決定される。

【0073】

実施例5：感染性因子抗原に対する特異的 Ig G レベルのアッセイ

ビーズ濃度 1 mg / mL での 10 マイクロリットルの Flu o - Be ad (蛍光標識された常磁性微粒子) を反応キュベットに分配する。ビオチン抗原 (例えば、ヒト免疫不全ウイルス、エボラウイルス、結核菌など) またはビオチン抗 Ig G 抗体 (あるいは、抗 Ig M または抗 Ig A) 40 μ L を分注し、Flu o - Be ad に混合し、37 で 1 ~ 10 分間インキュベートする。ビーズの開始数を決定するために、標識した Flu o - Be ad の試料を得る。洗浄後、抗原被覆ビーズまたは抗 Ig G 被覆ビーズを 40 μ L の反応緩衝液に再懸濁する。個体から得られた血清試料を抗原に対してアッセイする。10 μ L の試料を反応キュベット中の懸濁した抗原被覆ビーズ 40 μ L に添加する。6点標準曲線については、10 μ L の血清標準物質 (WHO Ig G 標準に対して校正された二次標準物質) を、反応キュベット中の抗 Ig G 被覆ビーズ 40 μ L にそれぞれ添加する。

【0074】

溶液を混合し、37 で 40 分間インキュベートする。洗浄後、ビーズを 50 μ L の抗ヒト Ig G - HRP コンジュゲートに再懸濁し、37 で 30 分間インキュベートする。PS - atto (Lumigen) 50 μ L を各キュベットに加え、ビーズを再懸濁する。ビーズ懸濁液をピペットチップに移し、蛍光および発光シグナルの両方について視覚ボックス内に読み込む。標準曲線は、4パラメーターロジスティック関数式および標準曲線から補間された感染性因子抗原に対する特異的 Ig G のレベルを使用して決定される。

【0075】

他に示されない限り、明細書および特許請求の範囲で使用される成分の量、分子量、反応条件などの特性を表すすべての数字は、すべての場合において「約」という用語によって修飾されるものとして理解されるべきである。本明細書で使用する「約」および「およそ」という用語は、10 ~ 15 %、好ましくは 5 ~ 10 % の範囲を意味する。したがって、反対に示されない限り、本明細書および添付の特許請求の範囲に記載される数値パラメータは、本発明によって得られることが求められる所望の特性に依存して変化し得る近似値である。最低限、クレームの範囲に対する均等論の適用を制限する試みとしてではなく、各数値パラメータは、報告された有効数字の数と通常の周辺技術を適用することによって少なくとも解釈されるべきである。本発明の広い範囲を示す数値範囲およびパラメータが近似値であるにもかかわらず、特定の実施例に示される数値は可能な限り正確に報告される。しかしながら、いずれの数値も、それぞれの試験測定値に見られる標準偏差から必然的に生じる特定の誤差を本質的に含む。

【0076】

本発明を説明する文脈において (特に添付の特許請求の範囲の文脈において) 使用される用語「a」、「an」、「the」および類似の指示対象は、単数形および複数形の両方を包含するものと解釈されるべきであり、本明細書中に別段の指示がない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、本明細書における値の範囲の列挙は、その範囲内の各別個の値を個々に参照する略式の方法として役立つことを単に意図するものである。本明細書中で他に示されない限り、個々の値は、個々に記載されているかのように本明細書に組み込まれる。本明細書中に記載される全ての方法は、本明細書中で他に指示されない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施され得る。本明細書で提供される任意のおよびすべての例、または例示的な言語 (例えば、「~ など」) の使用は、単に本発明をよりよく説明することを意図しており、他に請求される本発明の範囲を限定するものではない。本明細書中のいかなる言葉も、本発明の実施に不可欠な任意の請求されていない要素を示すものとして解釈されるべきではない。

【0077】

10

20

30

40

50

本明細書で開示される本発明の代替要素または実施形態のグループ分けは、限定として解釈されるべきではない。各グループのメンバーは、個別に、またはグループ内の他のメンバーまたはここに記載されている他の要素と任意の組み合わせで参照され、請求されることがある。利便性および/または特許性の理由から、1つまたは複数のグループのメンバーがグループに含まれるか、グループから削除されることが予想される。そのような包含または削除が生じた場合、明細書は修正されたグループを含むとみなされ、したがって、添付の特許請求の範囲で使用されるすべてのマーカッシュグループの記述を満たすものとみなされる。

【0078】

本発明を実施するために本発明者らに知られている最良の形態を含む、本発明の特定の実施形態を本明細書に記載する。当然のことながら、これらの記載された実施形態の変形は、上記の説明を読むことによって当業者には明らかになるであろう。本発明者は、当業者がそのような変形を適切に使用することを期待しており、本発明者らは本発明が本明細書に具体的に記載されている以外の方法で実施されることを意図する。したがって、本発明は、適用法によって許容されるように、添付の特許請求の範囲に記載された主題のすべての改変および均等物を含む。さらに、本明細書中で他に指示されない限り、あるいは文脈によって明らかに否定されない限り、それらのすべての可能な変形における上記の要素の任意の組み合わせが本発明に包含される。

【0079】

本明細書で開示された特定の実施形態は、言語で構成された、または本質的に言語からなる用語を使用している請求項においてさらに限定されている。特許請求の範囲において使用される場合、特許請求の範囲に記載されているか否かに関わらず、「からなる」という移行用語は、特許請求の範囲に記載されていない要素、ステップまたは成分を排除する。「本質的に～からなる」という移行用語は、特定の材料またはステップ、および基本的および新規な特性に重大な影響を及ぼさないものに、請求の範囲を限定する。そのように請求された本発明の実施形態は、本質的にまたは明示的に記載され、有効にされる。

【0080】

さらに、本明細書を通して特許および刊行物に多数の参考文献がなされている。上に引用した参考文献および印刷された刊行物のそれぞれは、参照によりその全体が個々に本明細書に組み込まれる。

【0081】

最後に、本明細書に開示された本発明の実施形態は、本発明の原理の例示であることを理解されたい。使用され得る他の修飾も本発明の範囲内である。したがって、限定ではなく例として、本発明の代替構成を本明細書の教示に従って利用することができる。したがって、本発明は図示され説明されたものに厳密に限定されるものではない。

【0082】

(付記)

(付記1)

ビオチン化自己抗原である捕獲試薬をストレプトアビジン被覆培地とインキュベートして、固相複合体を形成することと、

前記固相複合体を洗浄して、過剰な捕捉試薬を除去することと、

前記固相複合体を血清試料とインキュベートして、免疫複合体を形成することと、

前記免疫複合体を洗浄して、非結合試料を除去することと、

前記免疫複合体をコンジュゲートとインキュベートして、免疫コンジュゲート複合体を作製することと、

前記免疫コンジュゲート複合体を洗浄して、非結合コンジュゲートを除去することと、

定量化可能な応答を生成することができる基質を導入することと、

前記基質から生成された前記応答を校正することと、

を含む自己免疫疾患の自動診断アッセイを行うための定量的方法。

【0083】

10

20

30

40

50

(付記2)

前記固相複合体を前記血清試料とインキュベートする工程は、前記血清試料中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)を前記捕捉試薬に結合させることを含む、

ことを特徴とする付記1に記載の方法。

【0084】

(付記3)

前記自己抗原は、アグリカン、アラニル - t R N A 合成酵素 (P L - 1 2)、アルファベータクリスタリン、アルファフォドリン (S p t a n 1)、アルファアクチニン、
1 アンチキモトリプシン、
1 アンチトリプシン、
1 ミクログロブリン、アルソラーゼ、
アミノアシル t R N A 合成酵素、アミロイド (例えば、アミロイドベータ、アミロイド P)、アネキシン (例えば、アネキシン I I、アネキシン V)、アポリポタンパク質 (例えば、A p o B、A p o E、A p o E 4、A p o J)、アクアポリン (例えば、A Q P 1、A Q P 2、A Q P 3、A Q P 4)、殺菌性 / 浸透性増加タンパク質 (B P I)、
- グロビン前駆体 B P 1、
- アクチン、
- ラクトグロブリン A、
2 - 糖タンパク質 I、
2 - ミクログロブリン、血液型抗原 (例えば、R h 血液型抗原、I 血液型抗原、A B O 血液型抗原)、C 反応性タンパク質 (C R P)、カルモジュリン、カルレティキュリン、カルジオリピン、カタラーゼ、カテプシン B、セントロメアタンパク質 (例えば、C E N P - A、C E N P - B)、コンドロイチン硫酸、クロマチン、コラーゲン (例えば、タイプ I、I I、I I I、I V、V、V I コラーゲン)、シトクロム C、シトクロム P 4 5 0
2 D 6、サイトケラチン、デコリン、デルマタン硫酸、D N A (例えば、二本鎖 D N A、一本鎖 D N A)、D N A トポイソメラーゼ I、エラスチン、エプスタイン - バール核抗原 1 (E B N A 1)、エラスチン、エンタクチン、抽出可能な核抗原 (R o、L a、S m、R N P、S c l - 7 0、J o 1)、ファクター I、ファクター P、ファクター B、ファクター D、ファクター H、ファクター X、フィブリノーゲン (フィブリノーゲン I V、フィブリノーゲン S)、フィブロネクチン、フォルミミノトランスフェラーゼシクロデアミナーゼ (L C - 1)、グリアジンおよびアミド化グリアジンペプチド (D G P)、g p 2 1 0 核エンベロープタンパク質、G P 2 (主要チモーゲン顆粒膜糖タンパク質)、糖タンパク質 g p I I b / I I I a、グリア線維性酸性タンパク質 (G F A P)、糖化アルブミン
30
、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (G A P D H)、ハプトグロビン A 2、熱ショックタンパク質 (例えば、H s p 6 0、H S P 7 0)、ヘモシアニン、ヘパリン、ヒストン (例えば、ヒストン H 1、H 2 A、H 2 B、H 3、H 4)、ヒスチジル - t R N A 合成酵素 (J o - 1)、ヒアルロニダーゼ、免疫グロブリン、インスリン、インスリン受容体、インテグリン (例えばインテグリン
1 1、
2 1、
3 1、
4
1、
5 1、
6 1、
7 1、
L 2、
M 2、
I I b 3、
V 1、
V 3、
V 5、
V 6、
V 8、
6 3、
1 1)、間質レチノール結合タンパク質 3、内性ファクター、K u (P 7 0 / P 8 0)、乳酸デヒドロゲナーゼ、ラミニン、肝細胞質抗原 1 型 (L C 1)、肝臓 / 腎臓マイクロソーム抗原 1 (L K M 1)、リゾチーム、メラノーマ分化関連タンパク質 5 (M D A 5)、M i - 2 (クロモドメインヘリカーゼ D N A 結合タンパク質 4)、ミトコンドリアタンパク質 (例えば、M 1、M 2、M 3、M 4、M 5、M 6、M 7、M 8、M 9、B C O A D C - E 2、O G D C - E 2、P D C - E 2)、ムスカリン受容体、ミエリン関連糖タンパク質、ミオシン、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、ミエロペルオキシダーゼ (M P O)、リウマチ因子 (I g M 抗 I g G)、ニューロン特異的エノラーゼ、ニコチン性アセチルコリン受容体 鎖、ヌクレオリン、ヌクレオポリン (例えば、N u p 6 2)、ヌクレオソーム抗原、P M / S c l 1 0 0、P M / S c l 7 5、膵臓 細胞抗原、ペプシノゲン、ペルオキシレドキシン 1、ホスホグルコースイソメラーゼ、リン脂質、ホスホチジルイノシトール、血小板由来成長因子、ポリメラーゼベータ (P O L B)、カリウムチャネル K I R 4 . 1、増殖細胞核抗原 (P C N A)、プロテイナーゼ - 3、プロテオリピド
40
50

タンパク質、プロテオグリカン、プロトロンピン、リカバリン、ロドプシン、リボヌクレアーゼ、リボ核タンパク質（例えば、Ro、La、snRNP、scRNP）、リボソーム、リボソームリンタンパク質（例えば、P0、P1、P2）、RNA（二本鎖RNA、一本鎖RNA）、Smタンパク質（例えば、SmB、SmB'、SmD1、SmD2、SmD3、SmF、SmG、SmN）、Sp100核タンパク質、SRP54（シグナル認識粒子54kDa）、セレクチン、平滑筋タンパク質、スフィンゴミエリン、連鎖球菌抗原、スーパーオキシドジスムターゼ、滑膜関節タンパク質、T1F1ガンマコラーゲン、トレオニルtRNA合成酵素（PL-7）、組織トランスグルタミナーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、チログロブリン、甲状腺刺激ホルモン受容体、トランスフェリン、トリオースリン酸イソメラーゼ、チューブリン、腫瘍壊死アルファ、トポイソメラーゼ、U1-dnRNP 68/70kDa、U1-snRNP A、U1-snRNP C、U-snRNP B/B'、ユビキチン、血管内皮増殖因子、ビメンチンまたはビトロネクチンである、

10

ことを特徴とする付記1に記載の方法。

【0085】

（付記4）

前記ストレプトアビジン被覆培地は、ユニバーサル蛍光標識磁性微粒子を含む、ことを特徴とする付記1に記載の方法。

【0086】

（付記5）

1つ以上の洗浄工程は、反応キュベットの閉鎖領域内で洗浄される前記複合体を磁氣的に引き離すことによって前記複合体を洗浄することを含む、

20

ことを特徴とする付記1に記載の方法。

【0087】

（付記6）

捕獲試薬をストレプトアビジン被覆培地とインキュベートする工程は、高濃度のヒト血清アルブミン（HSA）を含む反応希釈剤によって懸濁液中に保持された捕捉試薬をインキュベートすることを含む、

ことを特徴とする付記1に記載の方法。

【0088】

（付記7）

前記免疫複合体をコンジュゲートとインキュベートする工程は、公称濃度のポリエチレングリコールを含むコンジュゲート希釈剤によって懸濁液中に保持された免疫複合体をインキュベートすることを含む、

30

ことを特徴とする付記1に記載の方法。

【0089】

（付記8）

非結合試料を除去するために前記免疫複合体を洗浄する際に、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）を使用する工程をさらに含む、付記1に記載の方法。

40

【0090】

（付記9）

蛍光シグナルおよび化学発光シグナルの両方が定量化される光学ボックスに前記基質および前記免疫コンジュゲート複合体を移すこと、および

定量化された前記化学発光シグナルを調整するために初期の蛍光対最終の蛍光の比を使用して、報告された値を計算すること、

によりビーズ保持のための定量可能な前記応答を調整する工程をさらに含む、付記1に記載の方法。

【0091】

（付記10）

50

前記光学ボックス内の蛍光を測定して、ピーズ保持を決定すること、および
前記光学ボックス内の発光を測定して、生成された相対光ユニット信号を検出すること

をさらに含む、付記 9 に記載の方法。

【 0 0 9 2 】

(付記 1 1)

蛍光測定値および発光測定値をアルゴリズムに入力して、ピーズ保持調整相対光ユニット信号を生成することをさらに含む、付記 1 0 に記載の方法。

【 0 0 9 3 】

(付記 1 2)

生成された前記ピーズ保持調整相対光ユニット信号を、較正曲線相対光ユニット信号と比較する工程をさらに含む、付記 1 0 に記載の方法。

10

【 0 0 9 4 】

(付記 1 3)

ビオチン化感染性疾患抗原である捕獲試薬をストレプトアビジン被覆培地とインキュベートして、固相複合体を形成することと、

前記固相複合体を洗浄して、過剰な捕捉試薬を除去することと、

前記固相複合体を血清試料とインキュベートして、免疫複合体を形成することと、

前記免疫複合体を洗浄して、非結合試料を除去することと、

前記免疫複合体をコンジュゲートとインキュベートして、免疫コンジュゲート複合体を作製することと、

20

前記免疫コンジュゲート複合体を洗浄して、非結合コンジュゲートを除去することと、

定量化可能な応答を生成することができる基質を導入することと、

前記基質から生成された前記応答を較正することと、

を含む感染性疾患の自動診断アッセイを行うための定量的方法。

【 0 0 9 5 】

(付記 1 4)

前記固相複合体を前記血清試料とインキュベートする工程は、前記血清試料中に存在する感染性因子特異的ヒト I g G、I g M または I g A をビオチン化捕捉試薬に結合させることを含む、付記 1 3 に記載の方法。

30

【 0 0 9 6 】

(付記 1 5)

前記感染性疾患抗原は、細菌、ウイルス、ウイロイド、プリオン、線虫、寄生虫、および真菌から選択される感染性因子に由来する、

ことを特徴とする付記 1 3 に記載の方法。

【 0 0 9 7 】

(付記 1 6)

前記捕捉試薬は、多数の抗原から構成される感染性因子抽出物のビオチン化に由来する、

ことを特徴とする付記 1 3 に記載の方法。

40

【 0 0 9 8 】

(付記 1 7)

前記感染性疾患抗原は、タンパク質、糖タンパク質、核酸、酵素、脂質、リボサッカリド、抗体またはそれらの組み合わせである、

ことを特徴とする付記 1 3 に記載の方法。

【 0 0 9 9 】

(付記 1 8)

前記捕捉試薬は、精製されたタンパク質、酵素、抗体および感染性因子抽出物から選択される複数のビオチン化捕捉試薬のアマルガムである、

ことを特徴とする付記 1 3 に記載の方法。

50

- 【0100】
(付記19)
前記ストレプトアビジン被覆培地は、ユニバーサル蛍光標識磁性微粒子を含む、
ことを特徴とする付記13に記載の方法。
- 【0101】
(付記20)
1つ以上の洗浄工程は、反応キュベットの閉鎖領域内で洗浄される前記複合体を磁氣的
に引き離すことによって前記複合体を洗浄することを含む、
ことを特徴とする付記13に記載の方法。
- 【0102】
(付記21)
捕獲試薬をストレプトアビジン被覆培地とインキュベートする工程は、高濃度のヒト血
清アルブミン(HSA)を含む反応希釈剤によって懸濁液中に保持された捕捉試薬をイン
キュベートすることを含む、
ことを特徴とする付記13に記載の方法。
- 【0103】
(付記22)
前記免疫複合体をコンジュゲートとインキュベートする工程は、公称濃度のポリエチレ
ングリコールを含むコンジュゲート希釈剤によって懸濁液中に保持された免疫複合体をイ
ンキュベートすることを含む、
ことを特徴とする付記13に記載の方法。
- 【0104】
(付記23)
非結合試料を除去するために前記免疫複合体を洗浄する際に、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)を使用する工程をさらに含む、付記13に記載の
方法。
- 【0105】
(付記24)
蛍光シグナルおよび化学発光シグナルの両方が定量化される光学ボックスに前記基質お
よび前記免疫コンジュゲート複合体を移すこと、および、
定量化された前記化学発光シグナルを調整するために初期の蛍光対最終の蛍光の比を使
用して、報告された値を計算すること、
によりビーズ保持のための定量可能な前記応答を調整する工程をさらに含む、付記13
に記載の方法。
- 【0106】
(付記25)
前記光学ボックス内の蛍光を測定して、ビーズ保持を決定すること、および、
前記光学ボックス内の発光を測定して、生成された相対光ユニット信号を検出すること
、
をさらに含む、付記24に記載の方法。
- 【0107】
(付記26)
蛍光測定値および発光測定値をアルゴリズムに入力して、ビーズ保持調整相対光ユニッ
ト信号を生成することをさらに含む、付記25に記載の方法。
- 【0108】
(付記27)
生成された前記ビーズ保持調整相対光ユニット信号を、校正曲線相対光ユニット信号と
比較することをさらに含む、付記25に記載の方法。

10

20

30

40

【 図 1 】

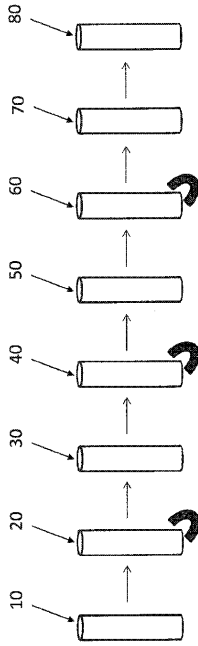


FIG. 1

【 図 2 】

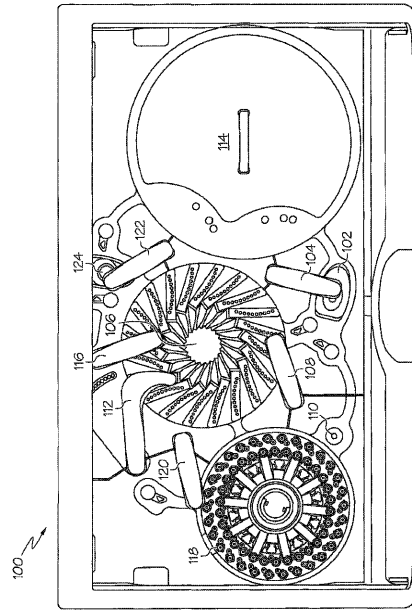


Fig. 2

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成30年2月5日 (2018.2.5)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

ビオチン化自己抗原である捕獲試薬をストレプトアビジン被覆培地とインキュベートして、固相複合体を形成することと、

前記固相複合体を洗浄して、過剰な捕捉試薬を除去することと、

前記固相複合体を血清試料とインキュベートして、免疫複合体を形成することと、

前記免疫複合体を洗浄して、非結合試料を除去することと、

前記免疫複合体をコンジュゲートとインキュベートして、免疫コンジュゲート複合体を作製することと、

前記免疫コンジュゲート複合体を洗浄して、非結合コンジュゲートを除去することと、

定量化可能な応答を生成することができる基質を導入することと、

前記基質から生成された前記応答を校正することと、

を含む自己免疫疾患の自動診断アッセイを行うための定量的方法。

【 請求項 2 】

前記固相複合体を前記血清試料とインキュベートする工程は、前記血清試料中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) を前記捕捉試薬に結合させることを含む、

ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記自己抗原は、アグリカン、アラニル - tRNA 合成酵素 (PL - 12)、アルファベータクリスタリン、アルファフォドリン (Sptan1)、アルファアクチニン、1アンチキモトリブシン、1アンチトリブシン、1ミクログロブリン、アルソラーゼ、アミノアシル tRNA 合成酵素、アミロイド (例えば、アミロイドベータ、アミロイド P)、アネキシン (例えば、アネキシン I I、アネキシン V)、アポリポタンパク質 (例えば、ApoB、ApoE、ApoE4、ApoJ)、アクアポリン (例えば、AQP1、AQP2、AQP3、AQP4)、殺菌性 / 浸透性増加タンパク質 (BPI)、- グロビン前駆体 BP1、- アクチン、- ラクトグロブリン A、2 - 糖タンパク質 I、2 - ミクログロブリン、血液型抗原 (例えば、Rh 血液型抗原、I 血液型抗原、ABO 血液型抗原)、C 反応性タンパク質 (CRP)、カルモジュリン、カルレティキュリン、カルジオリピン、カタラーゼ、カテプシン B、セントロメアタンパク質 (例えば、CENP - A、CENP - B)、コンドロイチン硫酸、クロマチン、コラーゲン (例えば、タイプ I、II、III、IV、V、VI コラーゲン)、シトクロム C、シトクロム P450 2D6、サイトケラチン、デコリン、デルマタン硫酸、DNA (例えば、二本鎖 DNA、一本鎖 DNA)、DNA トポイソメラーゼ I、エラスチン、エプスタイン - バール核抗原 1 (EBNA1)、エラスチン、エンタクチン、抽出可能な核抗原 (Ro、La、Sm、RNP、Sc1 - 70、Jo1)、ファクター I、ファクター P、ファクター B、ファクター D、ファクター H、ファクター X、フィブリノーゲン (フィブリノーゲン IV、フィブリノーゲン S)、フィブ्रोネクチン、フォルミミノトランスフェラーゼシクロデアミナーゼ (LC - 1)、グリアジンおよびアミド化グリアジンペプチド (DGP)、gp210 核エンベロープタンパク質、GP2 (主要チモゲン顆粒膜糖タンパク質)、糖タンパク質 gpIIb / IIIa、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP)、糖化アルブミン、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、ハプトグロビン A2、熱ショックタンパク質 (例えば、Hsp60、HSP70)、ヘモシアニン、ヘパリン、ヒストン (例えば、ヒストン H1、H2A、H2B、H3、H4)、ヒスチジル - tRNA 合成酵素 (Jo - 1)、ヒアルロニダーゼ、免疫グロブリン、インスリン、インスリン受容体、インテグリン (例えばインテグリン 1 1、2 1、3 1、4 1、5 1、6 1、7 1、L 2、M 2、IIIb 3、V 1、V 3、V 5、V 6、V 8、6 3、1 1)、間質レチノール結合タンパク質 3、内性ファクター、Ku (P70 / P80)、乳酸デヒドロゲナーゼ、ラミニン、肝細胞質抗原 1 型 (LC1)、肝臓 / 腎臓ミクロソーム抗原 1 (LKM1)、リゾチーム、メラノーマ分化関連タンパク質 5 (MDA5)、Mi - 2 (クロモドメインヘリカーゼ DNA 結合タンパク質 4)、ミトコンドリアタンパク質 (例えば、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M7、M8、M9、BCOADC - E2、OGDC - E2、PDC - E2)、ムスカリン受容体、ミエリン関連糖タンパク質、ミオシン、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、ミエロペルオキシダーゼ (MPO)、リウマチ因子 (IgM 抗 IgG)、ニューロン特異的エノラーゼ、ニコチン性アセチルコリン受容体 鎖、ヌクレオリン、ヌクレオポリン (例えば、Nup62)、ヌクレオソーム抗原、PM / Sc1100、PM / Sc1 75、膵臓細胞抗原、ペプシノゲン、ペルオキシレドキシシン 1、ホスホグルコースイソメラーゼ、リン脂質、ホスホチジルイノシトール、血小板由来成長因子、ポリメラーゼベータ (POLB)、カリウムチャネル KIR4.1、増殖細胞核抗原 (PCNA)、プロテイナーゼ - 3、プロテオリピドタンパク質、プロテオグリカン、プロトロンビン、リカバリン、ロドプシン、リボヌクレアーゼ、リボ核タンパク質 (例えば、Ro、La、snRNP、scRNP)、リボソーム、リボソームリントタンパク質 (例えば、P0、P1、P2)、RNA (二本鎖 RNA、一本鎖 RNA)、Sm タンパク質 (例えば、SmB、SmB'、SmD1、SmD2、SmD3、SmF、SmG、SmN)、Sp100 核タンパク質、SRP54 (シグナル認識粒子 54 kDa)、セレクチン、平滑筋タンパク質、スフィンゴミエリン、連鎖球菌抗

原、スーパーオキシドジスムターゼ、滑膜関節タンパク質、T1F1ガンマコラーゲン、トレオニルトRNA合成酵素(PL-7)、組織トランスグルタミナーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、チログロブリン、甲状腺刺激ホルモン受容体、トランスフェリン、トリオースリン酸イソメラーゼ、チュープリン、腫瘍壊死アルファ、トポイソメラーゼ、U1-dnRNP 68/70kDa、U1-snRNP A、U1-snRNP C、U-snRNP B/B'、ユビキチン、血管内皮増殖因子、ビメンチンまたはビトロネクチンである、

ことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】

ビオチン化感染性疾患抗原である捕獲試薬をストレプトアビジン被覆培地とインキュベートして、固相複合体を形成することと、

前記固相複合体を洗浄して、過剰な捕捉試薬を除去することと、

前記固相複合体を血清試料とインキュベートして、免疫複合体を形成することと、

前記免疫複合体を洗浄して、非結合試料を除去することと、

前記免疫複合体をコンジュゲートとインキュベートして、免疫コンジュゲート複合体を作製することと、

前記免疫コンジュゲート複合体を洗浄して、非結合コンジュゲートを除去することと、

定量化可能な応答を生成することができる基質を導入することと、

前記基質から生成された前記応答を較正することと、

を含む感染性疾患の自動診断アッセイを行うための定量的方法。

【請求項5】

前記固相複合体を前記血清試料とインキュベートする工程は、前記血清試料中に存在する感染性因子特異的ヒトIgG、IgMまたはIgAをビオチン化捕捉試薬に結合させることを含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記感染性疾患抗原は、細菌、ウイルス、ウイロイド、プリオン、線虫、寄生虫、および真菌から選択される感染性因子に由来する、

ことを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記捕捉試薬は、多数の抗原から構成される感染性因子抽出物のビオチン化に由来する、

ことを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項8】

前記感染性疾患抗原は、タンパク質、糖タンパク質、核酸、酵素、脂質、リポサッカリド、抗体またはそれらの組み合わせである、

ことを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項9】

前記捕捉試薬は、精製されたタンパク質、酵素、抗体および感染性因子抽出物から選択される複数のビオチン化捕捉試薬のアマルガムである、

ことを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項10】

前記ストレプトアビジン被覆培地は、ユニバーサル蛍光標識磁性微粒子を含む、

ことを特徴とする請求項1または4に記載の方法。

【請求項11】

1つ以上の洗浄工程は、反応キュベットの閉鎖領域内で洗浄される前記複合体を磁氣的に引き離すことによって前記複合体を洗浄することを含む、

ことを特徴とする請求項1または4に記載の方法。

【請求項12】

捕獲試薬をストレプトアビジン被覆培地とインキュベートする工程は、高濃度のヒト血清アルブミン(HSA)を含む反応希釈剤によって懸濁液中に保持された捕捉試薬をイン

キュベートすることを含む、

ことを特徴とする請求項1または4に記載の方法。

【請求項 13】

前記免疫複合体をコンジュゲートとインキュベートする工程は、公称濃度のポリエチレングリコールを含むコンジュゲート希釈剤によって懸濁液中に保持された免疫複合体をインキュベートすることを含む、

ことを特徴とする請求項1または4に記載の方法。

【請求項 14】

非結合試料を除去するために前記免疫複合体を洗浄する際に、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) を使用する工程をさらに含む、請求項1または4に記載の方法。

【請求項 15】

蛍光シグナルおよび化学発光シグナルの両方が定量化される光学ボックスに前記基質および前記免疫コンジュゲート複合体を移すこと、および、

定量化された前記化学発光シグナルを調整するために初期の蛍光対最終の蛍光の比を使用して、報告された値を計算すること、

によりビーズ保持のための定量化可能な前記応答を調整する工程をさらに含む、請求項1または4に記載の方法。

【請求項 16】

前記光学ボックス内の蛍光を測定して、ビーズ保持を決定すること、および、

前記光学ボックス内の発光を測定して、生成された相対光ユニット信号を検出すること

、

をさらに含む、請求項1または5に記載の方法。

【請求項 17】

蛍光測定値および発光測定値をアルゴリズムに入力して、ビーズ保持調整相対光ユニット信号を生成することをさらに含む、請求項1または6に記載の方法。

【請求項 18】

生成された前記ビーズ保持調整相対光ユニット信号を、校正曲線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または7に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/23408
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - G01N 33/564, G01N 33/543, G01N 33/68 (2015.01) CPC - G01N 35/1011, G01N 33/54393, G01N 33/564 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(B): G01N 33/564, G01N 33/543, G01N 33/68 (2015.01) CPC: G01N 35/1011, G01N 33/54393, G01N 33/564 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/7.92, 436/501 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google Web, search terms: automated diagnostic assay, autoimmune disease, capture reagent, streptavidin-coated, biotinylated, solid phase complex, immune complex, immunconjugate, calibrating response, IgM, IgG, IgA, fluorescent-labeled magnetic microparticle, human serum albumin, polyethylene glycol		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2014/0274784 A1 (VAN CLEVE et al.) 18 September 2014 (18.09.2014) claims 4, 12 para [0002], [0006], [0008], [0012]-[0016], [0019], [0038].	1-12 13-27
Y	US 2011/0151582 A1 (BASILE) 23 June 2011 (23.06.2011) para [0006], [0007], [0091], [0114], [0129]	13-27
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 01 June 2015 (01.06.2015)		Date of mailing of the international search report 02 JUL 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/64 F

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

(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 9 0 8 0 3 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
3 3 4 8

(72)発明者 テーヌ、エレイン グレース

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220 イースト
ナインティエイスストリート3021

(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 4 9 4 3 1 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 トゥヴィ オルテガ、ステファニー

アメリカ合衆国 9 2 7 0 4 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
9 0 2

(72)発明者 リード、テイラー アディソン

アメリカ合衆国 9 2 0 1 1 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
2 8

Fターム(参考) 2G043 AA06 BA16 CA03 DA02 EA01

专利名称(译)	自动免疫测定系统，用于进行自身免疫和传染病的诊断测定		
公开(公告)号	JP2018510354A	公开(公告)日	2018-04-12
申请号	JP2017551241	申请日	2015-03-30
[标]发明人	ファンクレーフマークデイビッド テーヌエレイングレース カンフィールドダグラスジョン トゥヴィオルテガステファニー リードテイラーアディソン		
发明人	ファンクレーフ、マークデイビッド テーヌ、エレイングレース カンフィールド、ダグラスジョン トゥヴィオルテガ、ステファニー リード、テイラーアディソン		
IPC分类号	G01N33/564 G01N33/53 G01N33/543 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/54353 G01N33/564 G01N33/569		
FI分类号	G01N33/564 G01N33/53.N G01N33/543.541.A G01N33/543.545.A G01N33/543.575 G01N21/64.F		
F-TERM分类号	2G043/AA06 2G043/BA16 2G043/CA03 2G043/DA02 2G043/EA01		
代理人(译)	木村充 箕櫻		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

将生物素化的自身抗原或传染病抗原捕获试剂与链霉亲和素包被的培养基一起孵育以形成固相复合物，并洗涤固相复合物以去除过量的捕获试剂。将固相复合物与血清样品孵育以形成免疫复合物，洗涤免疫复合物以除去未结合的样品，然后将免疫复合物与缀合物一起孵育。制备免疫偶联物复合物，洗涤免疫偶联物复合物以除去任何未结合的偶联物，并引入能够产生可定量反应的底物，并校准从底物产生的反应，以对自身免疫或感染性疾病进行自动诊断测定。 [选型图]图1

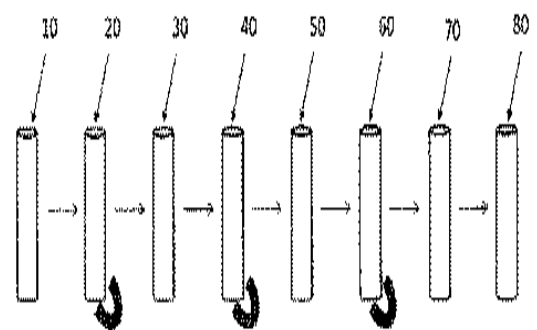


FIG. 1