

(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2010-511177
(P2010-511177A)

(43) 公表日 平成22年4月8日(2010.4.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 C	
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	
	GO 1 N 33/531 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願2009-539389 (P2009-539389)
 (86) (22) 出願日 平成19年10月26日 (2007.10.26)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年7月22日 (2009.7.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/082732
 (87) 国際公開番号 W02008/067091
 (87) 国際公開日 平成20年6月5日 (2008.6.5)
 (31) 優先権主張番号 60/861,771
 (32) 優先日 平成18年11月28日 (2006.11.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509148418
 ビクター リミテッド
 ニュージーランド オークランド グレン
 ドウィー マウント テイラー ドライブ
 63
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アッセイ膜およびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、試料中の少なくとも一つの標的分析物を検出するための微孔質膜を提供する。この膜は、膜の表面上にプリントされた少なくとも一つの捕捉要素および少なくとも一つの対照要素を含むアレイを含み、少なくとも一つの捕捉要素は、標的分析物に対応しかつそれに結合することができ、複数の対照要素は、存在する場合に (i) 少なくとも一つの基準点マーカー、(ii) バックグラウンドシグナルをモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、(iii) アッセイの特異性をモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、(iv) 少なくとも一つの陽性比色定量対照、(v) アッセイ性能をモニタリングするための、少なくとも一つの陽性対照、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

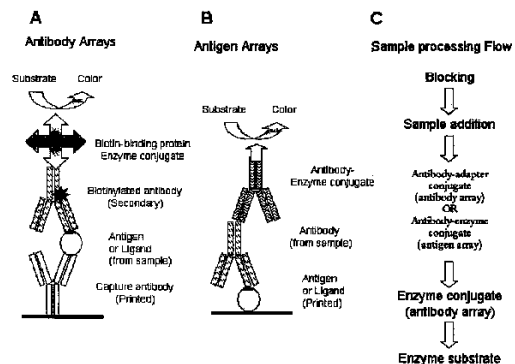


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

微孔質膜の表面上にプリントされた少なくとも一つの捕捉要素および少なくとも一つの対照要素を含むアレイを含む、試料中の少なくとも一つの標的分析物を検出するための微孔質膜であって、少なくとも一つの該捕捉要素が、標的分析物に対応し、かつそれに結合することができ、複数の該対照要素が、存在する場合に

(i) 少なくとも一つの基準点マーカー、
(ii) バックグラウンドシグナルをモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、

(iii) アッセイの特異性をモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、

(iv) 少なくとも一つの陽性比色定量対照、

(v) アッセイ性能をモニタリングするための、少なくとも一つの陽性対照、またはそれらの任意の組み合わせ

を含む、微孔質膜。

【請求項 2】

微孔質膜の表面上にプリントされた捕捉要素のアレイを含む、試料中の複数の標的分析物を検出するための微孔質膜であって、各捕捉要素が、標的分析物に対応し、かつそれに結合することができ、該アレイが、任意で、

(i) 少なくとも一つの基準点マーカー、

(ii) バックグラウンドシグナルをモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、

(iii) アッセイの特異性をモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、

(iv) 少なくとも一つの陽性比色定量対照、

(v) アッセイ性能をモニタリングするための、少なくとも一つの陽性対照、およびそれらの任意の組み合わせ

を含む複数の対照要素をさらに含む、微孔質膜。

【請求項 3】

捕捉要素の前記アレイが複数の捕捉要素群を含み、一つの群内の各捕捉要素が同一の標的分析物に結合することができ、かつ各捕捉要素群が他の任意の捕捉要素群とは異なる標的分析物に結合することができる、請求項2記載の微孔質膜。

【請求項 4】

前記複数の捕捉要素群が複数の標的分析物に結合することができ、複数の標的分析物が、表1に記載される一つまたは複数のヒトの疾患または状態の指標となる標的分析物の一つまたは複数のパネルを含む、請求項3記載の微孔質膜。

【請求項 5】

前記複数の捕捉要素群が複数の標的分析物に結合することができ、該複数の標的分析物が、表2に記載される一つまたは複数の処置の効力を決定する標的分析物の一つまたは複数のパネルを含む、請求項3記載の微孔質膜。

【請求項 6】

前記複数の捕捉要素群が複数の標的分析物に結合することができ、該複数の標的分析物が、表3に記載される動物試験のための標的分析物の一つまたは複数のパネルを含む、請求項3記載の微孔質膜。

【請求項 7】

捕捉要素の前記アレイが複数の捕捉要素対を含み、対の中の各捕捉要素が同一の標的分析物に結合することができ、各捕捉要素対が他の任意の捕捉要素対とは異なる標的分析物に結合することができる、請求項2記載の微孔質膜。

【請求項 8】

複数の捕捉要素群が複数の標的分析物に結合することができ、該複数の標的分析物が、表1に記載される一つまたは複数のヒトの疾患または状態の指標となる標的分析物の一つまたは複数のパネルを含む、請求項7記載の微孔質膜。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

複数の捕捉要素群が複数の標的分析物に結合することができ、該複数の標的分析物が、表2に記載される一つまたは複数の処置の効力を決定する標的分析物の一つまたは複数のパネルを含む、請求項7記載の微孔質膜。

【請求項 10】

複数の捕捉要素群が複数の標的分析物に結合することができ、該複数の標的分析物が、表3に記載される動物試験のための標的分析物の一つまたは複数のパネルを含む、請求項7記載の微孔質膜。

【請求項 11】

標的分析物が、タンパク質、タンパク質断片、ペプチド、ポリペプチド、ポリペプチド断片、抗体、抗体断片、抗体結合ドメイン、抗原、抗原断片、抗原決定基、エピトープ、ハプテン、免疫原、免疫原断片、金属イオン、金属イオンでコーティングされた分子、ピオチン、アビジン、ストレプトアビジン、阻害剤、共同因子、基質、酵素、受容体、受容体断片、受容体サブユニット、受容体サブユニット断片、リガンド、受容体リガンド、受容体アゴニスト、受容体アンタゴニスト、シグナル伝達分子、シグナル伝達タンパク質、シグナル伝達タンパク質断片、増殖因子、増殖因子断片、転写因子、転写因子断片、阻害剤、単糖、オリゴ糖、多糖、糖タンパク質、脂質、細胞、細胞表面タンパク質、細胞表面脂質、細胞表面炭水化物、細胞表面糖タンパク質、細胞抽出物、ウイルス、ウイルスコートタンパク質、ホルモン、血清タンパク質、乳タンパク質、高分子、乱用薬物、オリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の二つまたはそれ以上の、任意の組み合わせより選択される、請求項2記載の微孔質膜。 10 20

【請求項 12】

捕捉要素が、タンパク質、タンパク質断片、結合タンパク質 (BP)、結合タンパク質断片、抗体、抗体断片、抗体重鎖、抗体軽鎖、単鎖抗体、単ドメイン抗体 (例えば、VHH)、Fab抗体断片、Fc抗体断片、Fv抗体断片、F(ab')₂抗体断片、Fab'抗体断片、単鎖Fv (scFv)抗体断片、抗体結合ドメイン、抗原、抗原決定基、エピトープ、ハプテン、免疫原、免疫原断片、結合ドメイン; ピオチン、アビジン、ストレプトアビジン; 基質、酵素、アプザイム、共同因子、受容体、受容体断片、受容体サブユニット、受容体サブユニット断片、リガンド、阻害剤、ホルモン、結合部位、レクチン、ポリヒスチジン、連結ドメイン、オリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の二つまたはそれ以上の、任意の組み合わせより選択される、請求項2記載の微孔質膜。 30

【請求項 13】

(a) 請求項2記載の微孔質膜を含み、任意で、
(b) バックグラウンドを低下させる試薬、および
(c) 比色定量検出系
の一方または両方を含む、試料中の複数の標的分析物を検出するためのキット。

【請求項 14】

(a) 洗浄溶液、
(b) 捕捉要素に結合した抗原、リガンド、もしくは抗体の検出のための、または陽性対照の検出のための、一つまたは複数の抗体、
(c) 捕捉された標的分析物を分析するためのソフトウェア、および
(d) 試料中の標的分析物の存在を測定するためのプロトコル
からなる群より選択される一つまたは複数の品目をさらに含む、請求項13記載のキット。 40

【請求項 15】

検出のための抗体が、抗体-結合タンパク質 (BP) コンジュゲート、抗体-酵素標識コンジュゲート、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項14記載のキット。

【請求項 16】

(a) 請求項2記載の微孔質膜を準備する工程、
(b) 少なくとも一つの試料を膜に添加する工程、ならびに 50

- (c) (i) 少なくとも一つの基準点マーカー、
- (ii) 少なくとも一つの陽性比色定量対照、および

(iii) アッセイ性能をモニタリングするための、少なくとも一つの陽性対照のうちの一つまたはそれ以上により検出可能な結果が得られるよう膜を処理する工程を含む、マイクロアレイを処理する方法。

【請求項17】

請求項1記載の膜を準備する工程、少なくとも一つの試料を膜に添加する工程、および検出可能な結果が提供されるよう膜を処理する工程を含む、試料中の分析物を検出する方法。

【請求項18】

検出可能な結果が、試料中の分析物を検出するために、少なくとも一つの基準点マーカー、少なくとも一つの陽性比色定量対照、および少なくとも一つの陽性対照のうちの一つまたはそれ以上を含む、請求項17記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、試料中の少なくとも一つの分析物、好ましくは試料中の複数の分析物の比色定量検出の方法、および該方法において使用するための膜に関する。

【背景技術】

【0002】

背景情報

バイオマーカーは、対象の臨床症状が現れる前に疾患を同定することができ、従って、標的治療を使用して、疾患の分子的基盤を処置する能力を提供する。従って、バイオマーカーは、臨床的な徴候および症状が明白になる前に、標的治療薬の薬力学的効果を評価することを可能にする。

【0003】

新たなバイオマーカーは、質量分析および高速液体クロマトグラフィーのようなロースループットの労働集約的な技術を使用して、多数のプロテオミクス研究およびゲノミクス研究によって発見されている。これらの技術は、対象からの少数の試料において新規のバイオマーカーを同定するための優れた発見手段である。しかしながら、バイオマーカーは、臨床的に有効なバイオマーカーとして認められる前に、対象からの多数の試料を試験することにより認定されなければならない。対象からの多数の試料をスクリーニングするために現在利用可能な技術は、費用がかかり、かつ面倒である。

【0004】

比色定量イムノアッセイは、しばしば、単一のタンパク質測定のための一般に容認された標準と見なされている。これらのアッセイは、典型的には、試料由来の標的抗原に結合する一次抗原特異抗体を含み、抗原結合は、比色定量検出系に関連づけられた二次抗体を使用して検出される。最も広範に使用されている様式は、溶液中の単一のタンパク質測定のための十分に確立されたプロトコルを有する、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)である。

【0005】

生物学的試料中のバイオマーカーを検出するために使用され得る、簡単で、迅速で、かつ対費用効果の高い診断試験の必要性が存在する。試料中の複数のタンパク質の同時測定に対する関心が増加しつつあることから、マイクロアレイ様式での多重イムノアッセイの開発がもたらされた。タンパク質に基づくマイクロアレイは、多様な適用のために現在使用されている。しかしながら、この技術は、アッセイ試薬の感度、特異性、および交差反応性、ならびに高価な機器の必要性をとりまく技術的な問題のため、診断試験のための常用の方法としては未だ採用されていない。従って、大きな集団においてバイオマーカーの有用性を確認するための、ハイスループットで、スケーラブルで、かつ対費用効果の高い

10

20

30

40

50

スクリーニングに適したアッセイ法を、迅速に開発し実行することができる技術が必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

本発明の一つの局面は、微孔質膜の表面上にスポット、プリント等された少なくとも一つの捕捉要素および任意で複数の対照要素を含むアレイを含む、試料中の少なくとも一つの標的分析物を検出するための微孔質膜に関する。この、少なくとも一つの捕捉要素は、標的分析物に対応し、かつそれに結合することができる。複数の対照要素は、任意で含まれる場合に

- (i) 少なくとも一つの基準点マーカー、
 - (ii) バックグラウンドシグナルをモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、
 - (iii) アッセイの特異性をモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、
 - (iv) 少なくとも一つの陽性比色定量対照、
 - (v) アッセイ性能をモニタリングするための、少なくとも一つの陽性対照、またはそれらの任意の組み合わせ
- を含みうる。

【0007】

本発明は、比色定量および比色定量対照の使用に関して記載されるが、その他の検出系も利用され得ることが理解されるべきである。例えば、テキサスレッドのような蛍光色素および化学発光シグナルを発生する酵素基質が使用され得る。

【0008】

本発明のもう一つの局面は、微孔質膜の表面上にプリントされた捕捉要素のアレイを含む、試料中の複数の標的分析物を検出するための微孔質膜に関する。この捕捉要素のそれぞれは、標的分析物に対応し、かつそれに結合することができる。任意で、アレイは、

- (i) 少なくとも一つの基準点マーカー、
 - (ii) バックグラウンドシグナルをモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、
 - (iii) アッセイの特異性をモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、
 - (iv) 少なくとも一つの陽性比色定量対照、
 - (v) アッセイ性能をモニタリングするための、少なくとも一つの陽性対照、またはそれらの任意の組み合わせ
- を含む複数の対照要素をさらに含み得る。

【0009】

一つの態様において、捕捉要素のアレイは、複数の捕捉要素群を含む。一つの群内の各捕捉要素は同一の標的分析物に結合することができ、かつ各捕捉要素群は他の任意の捕捉要素群とは異なる標的分析物に結合することができる。別の態様において、捕捉要素のアレイは、複数の捕捉要素対を含む。対の中の各捕捉要素は同一の標的分析物に結合することができ、各捕捉要素対は他の任意の捕捉要素対とは異なる標的分析物に結合することができる。

【0010】

一つの態様において、複数の捕捉要素群は、表1に記載されるヒトの一つまたは複数の疾患または状態の指標となる標的分析物の一つまたは複数のパネルを含む複数の標的分析物に結合することができる。別の態様において、複数の捕捉要素群は、表2に記載される一つまたは複数の処置の効力を決定するための標的分析物の一つまたは複数のパネルを含む複数の標的分析物に結合することができる。もう一つの別の態様において、複数の捕捉要素群は、表3に記載される動物試験のための標的分析物の一つまたは複数のパネルを含む複数の標的分析物に結合することができる。もう一つの別の態様において、複数の標的分析物は、表1~3に記載される任意の二つまたはそれ以上のパネルの組み合わせを表す。

【0011】

10

20

30

40

50

一つの態様において、標的分析物は、タンパク質、タンパク質断片、ペプチド、ポリペプチド、ポリペプチド断片、抗体、抗体断片、抗体結合ドメイン、抗原、抗原断片、抗原決定基、エピトープ、ハプテン、免疫原、免疫原断片、金属イオン、金属イオンでコーティングされた分子、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、阻害剤、共同因子、基質、酵素、受容体、受容体断片、受容体サブユニット、受容体サブユニット断片、リガンド、受容体リガンド、受容体アゴニスト、受容体アンタゴニスト、シグナル伝達分子、シグナル伝達タンパク質、シグナル伝達タンパク質断片、増殖因子、増殖因子断片、転写因子、転写因子断片、阻害剤、単糖、オリゴ糖、多糖、糖タンパク質、脂質、細胞、細胞表面タンパク質、細胞表面脂質、細胞表面炭水化物、細胞表面糖タンパク質、細胞抽出物、ウイルス、ウイルスコートタンパク質、ホルモン、血清タンパク質、乳タンパク質、オリゴヌクレオチド、高分子、乱用薬物、またはそれらの任意の二つまたはそれ以上の、任意の組み合わせより選択される。

10

【0012】

一つの態様において、捕捉要素は、タンパク質、タンパク質断片、結合タンパク質 (BP)、結合タンパク質断片、抗体、抗体断片、抗体重鎖、抗体軽鎖、単鎖抗体、単ドメイン抗体 (例えば、VHH)、Fab抗体断片、Fc抗体断片、Fv抗体断片、F(ab')₂抗体断片、Fab'抗体断片、単鎖Fv (scFv)抗体断片、抗体結合ドメイン、抗原、抗原決定基、エピトープ、ハプテン、免疫原、免疫原断片、結合ドメイン；金属イオン、金属イオンでコーティングされた分子；ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン；基質、酵素、アブザイム、共同因子、受容体、受容体断片、受容体サブユニット、受容体サブユニット断片、リガンド、阻害剤、ホルモン、結合部位、レクチン、ポリヒスチジン、連結ドメイン、オリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の二つまたはそれ以上の組み合わせより選択される。

20

【0013】

一つの態様において、捕捉要素は抗体または抗体断片であり、かつ標的分析物は抗原である。もう一つの態様において、捕捉要素は抗原であり、かつ標的分析物は抗体または抗体断片である。

【0014】

一つの態様において、標的分析物は、感染性疾患、アレルギー性疾患、自己免疫疾患、心臓病、がん、または移植片対宿主病のような疾患または障害に関連した抗原である。

【0015】

もう一つの態様において、標的分析物は、血液バンク試料を試験するための血液汚染物質、移植片拒絶を評価するための適合性決定基、(ヒト絨毛膜性腺刺激ホルモン、hCGのような)妊娠または稔性の指標となる分析物、体液中に存在する薬物またはホルモン、増殖因子、サイトカイン、またはケモカインのような細胞活性化マーカーである。

30

【0016】

もう一つの態様において、標的分析物は、感染性疾患、アレルギー性疾患、自己免疫疾患、心臓病、がん、移植片対宿主病、または臓器移植拒絶のような疾患または障害に関連した抗体である。

【0017】

一つの態様において、膜は、ニトロセルロース、ナイロン、フッ化ポリビニリデン、ポリエステル、ポリスチレン、ポリエーテルスルホン、酢酸セルロース、混合セルロースエステル、またはポリカーボネート膜である。

40

【0018】

一つの態様において、膜は、底の無いマイクロタイタープレートに除去可能に付着させられる。

【0019】

一つの態様において、基準点マーカーは、色素、色素がコンジュゲートしたタンパク質、または色素生産性タンパク質、ハプテンがコンジュゲートしたタンパク質、または酵素がコンジュゲートしたタンパク質；例えば、クーマシーブルー、コロイド金、ポンソー (Ponceau) S、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) のようなペルオキシダーゼ酵素、また

50

は着色された分子量マーカーである。好ましくは、基準点マーカーは、アレイの方向付けおよびグリッド形成 (gridding) を可能にする。

【0020】

本発明の膜上に含有されるアレイは、スポットティングによるもの、プリンティングによるもの、または当業者に公知のその他の方法によるものであったとしても、典型的には、例えば、バックグラウンドシグナルをモニタリングするための少なくとも一つの陰性対照、アッセイの特異性をモニタリングするための少なくとも一つの陰性対照、少なくとも一つの陽性比色定量対照、およびアッセイ性能をモニタリングするための少なくとも一つの陽性対照を含む複数の対照要素を含む。

【0021】

一つの態様において、バックグラウンドシグナルをモニタリングするための陰性対照は、プリントバッファーである。

【0022】

一つの態様において、アッセイの特異性をモニタリングするための陰性対照は、一つもしくは複数の抗体アイソタイプ、異なる動物種に由来する対応する抗体もしくは抗体アイソタイプ、または密接に関連するリガンドを含む。

【0023】

一つの態様において、陽性比色定量対照は、検出可能な結果が生成するよう基質と反応することができる酵素である。一つの態様において、酵素標識は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、またはグルコースオキシダーゼを含む。一つの態様において、比色定量対照は、陽性の捕捉要素-標的分析物の結合を解明するために使用されるのと同じの比色定量系を含む。

【0024】

一つの態様において、アッセイ性能をモニタリングするための陽性対照は相補的な結合対の一方の結合パートナーを含み、他方の結合パートナーは、試料成分またはアッセイ試薬である。アッセイ性能の対照は、好ましくは、標的分析物、試料中に存在すると考えられる非標的分析物に対応しかつそれに結合することができる結合パートナー、アッセイ試薬に対応しかつそれに結合することができる結合パートナー、および比色定量酵素標識、またはそれらの任意の二つまたはそれ以上の、任意の組み合わせより選択される。

【0025】

もう一つの態様において、アレイは、アッセイ性能をモニタリングするための一つ、二つ、三つ、または四つの陽性対照を含む。好ましい態様において、アレイは、アッセイ性能をモニタリングするための少なくとも三つの陽性対照を含む。

【0026】

一つの態様において、アレイ上の各要素は、直径100 μm ~ 500 μm の不連続区域としてプリントされる。好ましくは、各不連続区域は、直径350 μm ~ 400 μm である。

【0027】

一つの態様において、アレイの不連続区域は、5 \times 5グリッドでプリントされるが、任意のアレイ様式が本発明の範囲内で有用である。アレイは対称である必要はない。

【0028】

一つの態様において、四つまたはそれ以上の異なる捕捉要素がアレイにプリントされる。もう一つの態様において、各捕捉要素の少なくとも二つの複製物がアレイにプリントされる。

【0029】

本発明のもう一つの局面は、微孔質膜の表面上にプリントされた捕捉要素のアレイを含む、試料中の複数の標的抗原または抗体リガンドを検出するための微孔質膜に関する。この捕捉要素のそれぞれは、標的抗原または抗体リガンドに対応しかつそれに結合することができ、この捕捉要素は、抗体または抗原断片を含む。アレイは、

(i) 少なくとも一つの基準点マーカー、

(ii) バックグラウンドシグナルをモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対

10

20

30

40

50

照、

(iii) アッセイの特異性をモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、

(iv) 少なくとも一つの陽性比色定量対照、

(v) アッセイ性能をモニタリングするための、少なくとも一つの陽性対照、またはそれらの組み合わせ

を含む複数の対照要素をさらに含み得る。

【0030】

本発明のもう一つの局面は、微孔質膜の表面上にプリントされた捕捉要素のアレイを含む、試料中の複数の標的抗体を検出するための微孔質膜に関する。この捕捉要素のそれぞれは、標的抗体に対応しかつそれに結合することができ、この捕捉要素は、抗原または抗体リガンドを含む。任意で、アレイは

(i) 少なくとも一つの基準点マーカー、

(ii) バックグラウンドシグナルをモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、

(iii) アッセイの特異性をモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、

(iv) 少なくとも一つの陽性比色定量対照、

(v) アッセイ性能をモニタリングするための、少なくとも一つの陽性対照、またはそれらの組み合わせ

を含む複数の対照要素をさらに含み得る。

【0031】

本発明のもう一つの局面は、微孔質膜の表面上にプリントされた捕捉要素のアレイを含む、試料中の複数の標的リガンドを検出するための微孔質膜に関する。この捕捉要素のそれぞれは標的リガンドに対応しかつそれに結合することができ、この捕捉要素は、受容体または受容体サブユニットを含む。アレイは、任意で

(i) 少なくとも一つの基準点マーカー、

(ii) バックグラウンドシグナルをモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、

(iii) アッセイの特異性をモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、

(iv) 少なくとも一つの陽性比色定量対照、

(v) アッセイ性能をモニタリングするための、少なくとも一つの陽性対照、またはそれらの任意の組み合わせ

を含む複数の対照要素をさらに含む。

【0032】

本発明のもう一つの局面は、微孔質膜の表面上にプリントされた捕捉要素のアレイを含む、試料中の複数の標的受容体または受容体サブユニットを検出するための微孔質膜に関する。この捕捉要素のそれぞれは、標的受容体または受容体サブユニットに結合することができ、この捕捉要素は、受容体リガンドまたは受容体サブユニットリガンドを含む。アレイは、任意で

(i) 少なくとも一つの基準点マーカー、

(ii) バックグラウンドシグナルをモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、

(iii) アッセイの特異性をモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、

(iv) 少なくとも一つの陽性比色定量対照、

(v) アッセイ性能をモニタリングするための、少なくとも一つの陽性対照、またはそれらの任意の組み合わせ

を含む複数の対照要素をさらに含む。

【0033】

本発明のもう一つの局面は、

(a) 前記のような少なくとも一つの膜

を含み、任意で

10

20

30

40

50

- (b) バックグラウンドを低下させる試薬（ブロッキング溶液としても公知）、
 - (c) 洗浄溶液、
 - (d) 捕捉要素に結合した抗原、リガンド、もしくは抗体の検出のための、または陽性対照の検出のための、一つもしくは複数の抗体（抗体-結合タンパク質（BP）コンジュゲートまたは抗体-酵素標識コンジュゲートまたはその両方を含む）、
 - (e) 比色定量検出系、
 - (f) 各スポットにおけるシグナル強度の決定、および結果の分析のための、ソフトウェア、ならびに
 - (g) 試料中の分析物の存在を測定するためのプロトコル、ならびにそれらの組み合わせ
- のうちの一つまたは複数を含む、試料中の複数の標的分析物の検出のためのキットに関する。

10

【0034】

一つの態様において、バックグラウンドを低下させる薬剤は、スキムミルク、カゼイン、ウシ血清アルブミン、サカナ、ブタ、またはその他の種に由来するゼラチン、およびデキストランを含む群より選択されるタンパク質ブロッキング剤である。ブロッキング剤には、トウイーン（Tween）20、トリトン（Triton）X-100、およびCHAPSのような界面活性剤が補足されてもよい。

【0035】

一つの態様において、比色定量検出系は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、またはグルコースオキシダーゼを含む群より選択される酵素標識、ならびに3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、ジアミノベンジジン、金属増感型ジアミノベンジジン、4-クロロ-1-ナフトール、コロイド金、ニトロブルーテトラゾリウムクロリド、5-プロモ-4-クロロ-3'-インドリルホスフェートp-トルイジン塩、およびナフトールAS-MXホスフェート+ファストレッド（Fast Red）TR塩を含むリストより選択される基質を含む。

20

【0036】

もう一つの局面において、本発明は、

- (a) 前記の膜を準備する工程、
- (b) 少なくとも一つの試料を膜に添加する工程、ならびに
- (c) (i) 少なくとも一つの基準点マーカー、
- (ii) 少なくとも一つの陽性比色定量対照、および
- (iii) アッセイ性能をモニタリングするための、少なくとも一つの陽性対照

30

のうちの二つまたはそれ以上により検出可能な結果が得られるよう膜を処理する工程を含む、マイクロアレイを処理する方法、または試料中の分析物を検出する方法に関する。

【0037】

一つの態様において、膜を処理する工程は、膜上の利用可能なタンパク質結合部位がブロックされるブロッキング工程、随意の洗浄工程、一つまたは複数の被測定分析物を含有している試料と膜とを接触させる工程、結合していない物質を膜から除去するための洗浄工程、一つまたは複数の標的分析物、およびアッセイ性能の対照に結合した非標的分析物に対応し、かつそれらに結合すると考えられる、一つまたは複数の二次抗体と、膜とを接触させる工程、随意の洗浄工程、ならびに検出可能な結果が生じるように酵素コンジュゲートまたは酵素基質の一方または両方と膜とを接触させる工程を含む。

40

【0038】

本明細書に開示された数字の範囲（例えば、1~10）の言及には、その範囲内の全ての有理数（例えば、1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9、および10）の言及も組み入れられ、かつその範囲内の有理数の任意の範囲（例えば、2~8、1.5~5.5、および3.1~4.7）の言及も組み入れられることが意図される。従って、本明細書に明示的に開示された全ての範囲の全ての部分範囲が、本明細書に明示的に開示される。これらは、特に意図されるものの例に過ぎず、列挙された最低値と最高値との間の数値の、全ての可能性の

50

ある組み合わせが、類似した様式で、本出願において明示的に記述されていると見なされるべきである。

【0039】

本発明はまた、部分、要素、または特色のうちの一つまたはそれ以上の、任意または全ての組み合わせにおいて、個々にまたは集合的に本願の明細書中に言及されたまたは示された部分、要素、および特色からなると広く言うことができ、本発明が関する技術分野において公知の等価物を有する特定の整数が本明細書において言及される場合、そのような公知の等価物はあたかも個々に示されたかのごとく本明細書に組み入れられると見なされる。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】(1A) 抗原検出のための本発明の抗体アレイの処理、(1B) 抗体検出のための本発明の抗原アレイの処理、および(1C) 本発明のプリントアレイを処理するための工程を要約している絵図である。

【図2】本発明のアッセイ膜上にプリントされたアレイに存在する対照スポットの機能および処理を要約している絵図である。

【図3】サイトカインを加えた(spiked)ヒト血清の処理から得られた実施例5の結果を要約しているグラフである。破線は、それより上であれば結果が陽性で見なされるシグナルの閾値を表す。閾値は、陰性対照スポット(バッファースポット)のシグナル強度の2倍に設定される。

【図4】B型肝炎表面抗原に対する抗体を加えたヒト血清試料の処理から得られた実施例6の結果を要約しているグラフである。破線は、それより上であれば結果が陽性で見なされるシグナルの閾値を表す。閾値は、陰性対照スポット(バッファースポット)のシグナル強度の2倍に設定される。

【図5】本発明の一つの態様の基準点マーカーの効力を評価する実施例7の結果を要約しているグラフである。X軸の単位は、チューブ番号を示し、従って、希釈係数を示す。

【図6】血清試料中の抗体を検出するための上気道ウイルス病原体のアレイを例証する実施例10の結果を示すグラフである。アレイ上の6種のウイルス抗原の各々に対する抗体の存在に関して、6個のヒト血清試料を800分の1の希釈率で試験した。100000というシグナル強度の閾値を、陽性試験のため設定した。この閾値に基づき、表20に示される結果を得た。

【図7】アレイ上の4種のB型肝炎抗原の各々に対する抗体の存在に関して、4000分の1の希釈率で試験された10個のヒト血清試料からの結果を示す、実施例11の結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0041】

発明の詳細な説明

本発明は、試料中の少なくとも一つの標的分析物または複数の標的分析物を検出するためのアッセイ膜に関し、該標的分析物を検出するためのキットおよびアッセイ膜を処理する方法にも関する。

【0042】

バイオマーカーは、対象の臨床症状が現れるに疾患を同定することができ、従って、標的治療を使用して疾患の分子的な基盤を処置する能力を提供する。対象を層別化するための基礎は、疾患の分子的な不均一性と、治療に対する応答の不均一性ととの相関にある。そのため、薬物が有効であるためには、薬物の標的が存在しなければならず、かつ対象の疾患状態の維持または悪化において役割を有していなければならない。従って、この標的は、対象がその特定の治療による処置のための候補であるか否かを決定するためのバイオマーカーとして役立つであろう。例えば、ハーセプチンのような抗Her2抗体による有効な処置のためには、腫瘍中のHer2/neuの存在が必要とされる。バイオマーカーは、応答の差異の原因となると予想された共変動を明らかにするためにサブグループ分析を実施するため

10

20

30

40

50

、臨床試験が完了した後、または新薬の市販後分析の後、後向き試料分析のためにも使用され得る。

【0043】

従って、本発明は、多様なアッセイのために使用され得る一つまたは複数の（即ち、パネル）標的分析物（即ち、バイオマーカー）を検出するために並べられた複数の捕捉剤を企図する。例えば、バイオマーカーのパネルは、副作用またはその他の任意の有害事象が無いことを同時に保証しつつ、治療の有効性を決定するため、臨床試験中にモニタリングされ得る。従って、バイオマーカーのパネルは、多様な状態を試験するため、かつ/または一つもしくは複数の可能性のあるバイオマーカーをさらに検証するために使用され得る。例示的な状態には、ヒトの疾患またはアレルギー、妊娠の検出、動物の疾患、および輸出前に実施される動物試験が含まれるが、これらに限定はされない。バイオマーカーのパネルは、薬物の承認および一般投与の前に、集団において薬物機序のより深い理解を得るための臨床試験の全ての相において使用され得ることが理解されるべきである。さらに、バイオマーカーは、有効性研究がもたらす臨床的な結果を支持し、対象に対する実際の臨床的恩恵の測定を補助することができる。

10

【0044】

バイオマーカーは、どの対象が特定の治療薬に応答する可能性が高いかを決定するために使用され得る。バイオマーカーは、様々な疾患パラメーターのレベルを同時に測定することにより疾患の進行および処置の有効性をモニタリングし、それにより、対象に対する処置の恩恵を増加させるためにも使用され得る。これらのバイオマーカーパネルは、正しい時間における正しい対象のための正しい薬物を同定することを目標としている。

20

【0045】

特定の疾患、障害、または状態の予測のためのバイオマーカーの検証とは、疾患、障害、または状態の検出におけるバイオマーカーの精度、再現性、および有効性の確認をさす。バイオマーカーの検証のための主要な問題は、ヒト集団内のバイオマーカーレベルの可変性の程度が高いこと、および単一の組織ですら特定の疾患について少なからず分子的不均一性が存在することである。新たに発見されたバイオマーカーは、研究環境から臨床診断実験室に移行する際に、明確な確認の段階を進むべきである。バイオマーカーの検証の第一の課題は、研究の技術、性能、および仕様の評価である（分析的検証）。しかしながら、最終的な目標は、早期の疾患、障害、または状態を同定するための、バイオマーカーの初期の検証である（臨床的検証）。技術的および臨床的な確認によって、バイオマーカーを含むアッセイは、臨床診断の実施のための、標準化された再現性のあるハイスループット様式へと体系的に移動する。実験室での性能が厳格に確立された後、臨床的な変数が、限界、適用、および臨床的有用性を明確にするために分析され得る。

30

【0046】

定義

他に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるのと同じの意味を有する。本明細書に記載されたものに類似しているかまたは同等である任意の方法および材料が本発明の実施または試験において使用され得るが、好ましい方法および材料がここでは記載される。

40

【0047】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用されるように、単数形「a」、「an」、「the」は、そうでないことを文脈が明白に指示しない限り、複数の言及を含む。従って、例えば、「方法（the method）」との言及には、この開示を参照することにより当業者に明白になると考えられる本明細書に記載された種類の一つまたは複数の方法および/または工程が含まれ、その他も同様である。

【0048】

「バイオマーカー」という用語は、生物学的状態の指標として使用される任意の物質をさす。従って、バイオマーカーは、その検出が特定の疾患状態を示すような任意の物質で

50

あり得る（例えば、抗体の存在は、感染を示し得る）。さらに、バイオマーカーは、疾患のリスクもしくは進行、または与えられた処置に対する疾患の感受性と相関するタンパク質の発現または状態の変化の指標となり得る。提案されたバイオマーカーが検証されたならば、それは、個体における疾患のリスク、疾患の存在を診断するため、または個体における疾患のための処置を調整するために使用され得る（例えば、薬物処置または投与計画の選択）。可能性のある薬物治療の評価において、バイオマーカーは、生存または不可逆的罹患のような自然のエンドポイントのための代替として使用され得る。処置が、改善された健康との直接の関係を有するバイオマーカーを変える場合、そのバイオマーカーは、臨床的な恩恵を評価するための「代替エンドポイント」として役立つ。

【0049】

本明細書において使用されるように、「アッセイ要素」という用語は、本発明のアレイにおいて使用するための多数の異なる要素のうちのいずれかをさす。例示的なアッセイ要素には、捕捉要素および対照要素が含まれるが、これらに限定はされない。

【0050】

「捕捉要素」という用語は、標的分析物に結合することができる分子をさす。有用な捕捉要素の例には、タンパク質、タンパク質断片、結合タンパク質、結合タンパク質断片、抗体（ポリクローナル、モノクローナル、またはキメラ）、抗体断片、抗体重鎖、抗体軽鎖、単鎖抗体、単ドメイン抗体（例えば、VHH）、Fab抗体断片、Fc抗体断片、Fv抗体断片、F(ab')₂抗体断片、Fab'抗体断片、単鎖Fv（scFv）抗体断片、抗体結合ドメイン、抗原、抗原決定基、エピトープ、ハプテン、免疫原、免疫原断片、結合ドメイン；金属イオン、金属イオンコーティングされた分子、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン；基質、酵素、アプザイム、共同因子、受容体、受容体断片、受容体サブユニット、受容体サブユニット断片、リガンド、阻害剤、ホルモン、結合部位、レクチン、ポリヒスチジン、連結ドメイン、およびオリゴヌクレオチドが含まれる。有用な捕捉要素は、被験試料中に存在する分子または分子種のような特定の標的分析物に対応し、かつそれに結合することができるであろう。

【0051】

同様に、「対照捕捉要素」という用語は、対照として機能する捕捉要素、いかなる分析物にも結合しない陰性対照、または非標的分析物に結合すると考えられる陽性対照のいずれかをさす。

【0052】

「対照要素」という用語は、アッセイの機能に関する情報、例えば、結合特異性、非特異的なバックグラウンド結合のレベル、結合交差反応性の程度、ならびにアッセイ試薬および検出系の性能を提供するために使用される要素をさす。本明細書において有用な好ましい対照には、バックグラウンドシグナルをモニタリングするための少なくとも一つの陰性対照、アッセイの特異性をモニタリングするための少なくとも一つの陰性対照、少なくとも一つの陽性比色定量対照、およびアッセイ性能をモニタリングするための少なくとも一つの陽性対照が含まれる。

【0053】

「アッセイ性能をモニタリングするための対照」という用語は、アッセイ中に相補的な結合の相互作用の一部を形成し、アッセイ結果の精度に関する情報を提供することを目的とした要素をさす。一つの態様において、アッセイ性能をモニタリングするための陽性対照は、他方の結合パートナーが試料成分またはアッセイ試薬であるような相補的な結合対の一方の結合パートナーを含む。アッセイ性能対照は、好ましくは、標的分析物、試料中に存在すると考えられる非標的分析物に対応しかつそれに結合することができる結合パートナー、アッセイ試薬に対応し、かつそれに結合することができる結合パートナー、および比色定量酵素標識、またはそれらの任意の二つまたはそれ以上の、任意の組み合わせより選択される。試料中に存在すると考えられる非標的分析物に対応しかつそれに結合することができる結合パートナーの例は、血清試料中に存在する免疫グロブリンに結合し、従って、試料が添加されたことを確認する抗Ig抗体である。アッセイ試薬に対応しかつそれ

10

20

30

40

50

に結合することができる結合パートナーの例は、ビオチン化抗標的分析物抗体のようなアッセイを処理するために使用される二次免疫グロブリンに結合すると考えられる抗Ig抗体である。アッセイ試薬に対応しかつそれに結合することができる結合パートナーのもう一つの例は、アッセイを処理するために使用されるストレプトアビジン-ペルオキシダーゼコンジュゲートに結合すると考えられるビオチン化抗体である。

【0054】

「アッセイの特異性をモニタリングするための対照」という用語は、アッセイ中に存在する相補的な結合対の少なくとも一方の結合パートナーに密接に関連しており、相補的な結合の特異性の情報を提供することを目的とした要素をさす。この対照は、正常なアッセイ処理中に検出可能な結果を生じないと予想される陰性対照である。例えば、抗原検出のための抗体アレイにおいて、アッセイの特異性の対照は、試料中のいずれの抗原にも結合すべきでない抗体を含むであろう。または、抗体検出のための抗原アレイにおいて、アッセイの特異性の対照は、試料中のいずれの抗体にも結合すべきでない抗原を含むであろう。

10

【0055】

「基準点マーカー」という用語は、好ましくは、アッセイの性能または膜の処理に関係なく、常に膜上に検出可能であると考えられる有色のマーカーまたは標識をさす。従って、基準点マーカーは、「真の」陽性対照としての役割を果たす。

【0056】

「微孔質膜」という用語は、タンパク質と結合する特徴、および狭い孔サイズの分布を有する膜をさす。一つの態様において、膜の多孔度は、膜を通る流速を調節することにより、試薬が膜結合成分に曝露される時間を決定し得る。本発明において使用するための微孔質膜には、ニトロセルロース、ナイロン、フッ化ポリビニリデン、ポリエステル、ポリスチレン、ポリエーテルスルホン、酢酸セルロース、混合セルロースエステル、およびポリカーボネートが含まれる。

20

【0057】

「陰性対照」という用語は、プリントバッファー、または相補的な結合パートナーがアッセイ中に存在しないことが意図される無関係のタンパク質を含む要素をさす。陰性対照からの任意の検出可能なシグナルは、アッセイのバックグラウンドの閾値および任意の陽性結果の精度を決定するために使用され得る。一つの態様において、バックグラウンドシグナルをモニタリングするための陰性対照は、プリントバッファーである。プリントバッファーは、膜上に捕捉要素および対照要素を保持しプリントするために使用される溶液であり、緩衝生理食塩水、グリセロール、および界面活性剤、好ましくは、トゥイーン20のようなポリソルベート界面活性剤を含み得る。ブロッキング溶液は、膜表面に対する、非特異的なタンパク質の結合を低下させるために使用され、好ましくは、スキムミルク、カゼイン、ウシ血清アルブミン、サカナ、ブタ、もしくはその他の種に由来するゼラチン、デキストラン、またはそれらの任意の二つまたはそれ以上の任意の混合物を、好ましくは、リン酸緩衝生理食塩水および例えばトゥイーン20などの界面活性剤の溶液中に含む。

30

【0058】

「陽性比色定量対照」という用語は、本明細書において使用されるように、酵素基質の添加により検出可能なシグナルを提供する、酵素または酵素コンジュゲートをさす。

40

【0059】

「プリンティング」という用語は、本明細書において使用されるように、膜と要素との間にアダプター分子を含む、または含まない、膜表面へのアッセイ要素（対照要素および捕捉要素）の設置をさす。好ましくは、アッセイ要素は、共有結合性または非共有結合性の相互作用により膜と結合する。当業者は、膜上にアッセイ要素を設置する方法が、プリンティング、スポットティング、または当技術分野において公知のその他の技術を含むことを認識するであろう。本出願の目的のため、「プリンティング」という用語は、膜上にアッセイ要素を設置する任意の方法を含むよう使用され得る。

【0060】

50

「試料」および「標本」という用語は、本明細書において使用されるように、生物学的または環境的な起源より入手され、かつ/またはそれらに由来する任意の組成物、ならびに生物学的または環境的試料と接触させられるサンプリング手段（例えば、綿棒）を含むよう、それらの最も広い意味で使用される。「生物学的試料」には、動物（ヒト、家畜、ならびに例えば有蹄類、クマ、サカナ、ウナギ目、げっ歯類等などの野生化したまたは野生の動物を含む）より入手されたもの、尿、血液、血漿、排泄物、乳、乳頭浸出物、脳脊髄液（CSF）、精液、痰、および唾液のような体液、ならびに固形組織が含まれる。生物学的試料には、細胞（例えば細胞系、組織からの単離の後に培養されてもよいし、または培養されなくてもよい組織から単離された細胞、組織学的および/または免疫組織化学的な分析のために固定された細胞のような固定細胞）、組織（例えば生検材料）組織、細胞抽出物、組織抽出物、ならびに、細胞および/または組織から単離された核酸（例えば、DNAおよびRNA）等も含まれる。また、乳製品、野菜、食肉、食肉副産物、および廃棄物のような食品および食品成分より入手された材料も含まれる。「環境的試料」には、表面物質、土壌、水、および産業材料、ならびに食品および乳製品を処理する機器、装置、設備、使い捨て品、および、非使い捨て品より入手された材料のような環境的材料が含まれる。一つの態様において、生物学的試料は、哺乳動物から入手された細胞、組織、およびまたは液体であって、それらは、例えば、上気道組織由来のもの（例えば鼻咽頭洗浄液、鼻咽頭吸引液、鼻咽頭拭き取り検体、および中咽頭拭き取り検体）、下気道組織由来のもの（細気管支洗浄液、気管吸引液、胸膜穿刺、痰のような）、血液、血漿、血清、大便、乳、乳首浸出物、ならびに、以下に限定はされないが、肺、心臓、脾臓、肝臓、脳、腎臓、および副腎などの任意の器官からの組織を含む。これらの例は例示的なものであり、本発明に適用可能な試料の種類を限定するものとして解釈されるべきではない。

10

20

【0061】

「抗体」という用語は、本明細書において使用されるように、天然に存在する抗体のみならず、例えば、単鎖抗体、キメラ抗体、二機能性抗体、およびヒト化抗体を含む、天然には存在しない抗体を含み、それらの抗原結合断片も含む。そのような天然には存在しない抗体は、固相ペプチド合成を使用して構築されてもよいし、組換えにより作製されてもよいし、または、例えば、可変重鎖および可変軽鎖からなるコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって入手されてもよい（参照により本明細書に組み入れられるHuse et al., *Science* 246:1275-1281, 1989を参照のこと）。例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、CDRグラフト抗体、単鎖抗体、および二機能性抗体を作製するこれらおよびその他の方法は、周知である（Winter and Harris, *Immunol. Today* 14:243-246, 1993 ; Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989 ; Harlow and Lane, *Antibodies: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) ; Hilyard et al., *Protein Engineering: A practical approach* (IRL Press 1992) ; Borrabeck, *Antibody Engineering*, 2d ed. (Oxford University Press 1995) ; これらは、各々、参照により本明細書に組み入れられる)。さらに、ペグ化された（ポリエチレングリコールで修飾された）抗体のような、修飾された、もしくは誘導体化された抗体、または抗体の抗原結合断片が、本発明の方法のため有用であり得る。そのため、特異的結合活性を保持している抗体のFab、F(ab')₂、Fd、およびFv断片が、抗体の定義内に含まれる。

30

40

【0062】

「二次抗体」という用語は、標的分析物に結合すると考えられかつビオチンのようなアダプター分子または西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）のような酵素標識のいずれかとコンジュゲートしている抗体をさす。抗体-アダプターコンジュゲートは、抗体-アダプターコンジュゲートをアダプター-酵素コンジュゲートと接触させ、次いで酵素基質と接触させることにより、検出可能な結果を与えるよう処理される；例えば、抗体-ビオチンコンジュゲートはストレプトアビジン-HRPコンジュゲートに結合するであろう。抗体-酵素標識コンジュゲートは抗体-HRPコンジュゲートを含む。二次抗体の使用は、以下に記述され例示される。

【0063】

50

「特異的に結合する」または「特異的結合活性」等の用語は、二つの分子が、生理学的条件下で比較的安定な複合体を形成することを意味する。該用語は、例えば、抗原結合ドメインが多数の抗原により保持される特定のエピトープに対して特異的である場合にも適用可能であり、その場合、抗原結合ドメインを保持している抗体は、エピトープを保持している様々な抗原に結合できると考えられる。特異的結合は、高い親和性および低～中程度の能力を特徴とする。典型的には、親和性定数が約 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、一般には少なくとも約 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、通常少なくとも約 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、および特に少なくとも約 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ または $1 \times 10^{-10} \text{M}$ またはそれ未満である場合、その結合は特異的であると見なされる。

【0064】

アレイの設計

上記のように、本発明の一つの局面は、微孔質膜の表面上にプリントされた少なくとも一つの捕捉要素および複数の対照要素を含むアレイを含む、試料中の複数の（即ち、パネル）標的分析物（例えば、バイオマーカー）を検出するための微孔質膜に関する。この、少なくとも一つの捕捉要素は、標的分析物に対応し、かつそれに結合することができる。任意で含まれる場合、複数の対照要素は、

- (i) 少なくとも一つの基準点マーカー、
- (ii) バックグラウンドシグナルをモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、
- (iii) アッセイの特異性をモニタリングするための、少なくとも一つの陰性対照、
- (iv) 少なくとも一つの陽性比色定量対照、
- (v) アッセイ性能をモニタリングするための、少なくとも一つの陽性対照、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0065】

膜の選択は、三つの主な膜の特徴：タンパク質結合能力、多孔度、および強度に依存する。膜はアッセイにおいて使用される固相としての役割を果たすため、高分子、特にタンパク質を固定化する膜の能力は非常に重要である。しかしながら、この能力は、膜上で非特異的な相互作用をブロッキングするための適切な試薬（即ち、ブロッカー）の利用可能性と釣り合っていないなければならない。同様に、フロースルー配置において、膜の多孔度は、膜を通る流速を調節することにより、試薬が膜結合成分に曝露される時間を決定し得る。しかしながら、多孔度は、シグナル強度の低下または隣接するスポット間の相互汚染をもたらし得る、アレイ製造中のアレイスポットの拡散の度合いと釣り合っていないなければならない。膜の強度は、装置の製造および最終的な使用にとって重要である。異なる特徴を有する広範囲の膜が入手可能であり、従って、アッセイの要件に依って特定の膜を選ぶことが可能である。

【0066】

好ましい態様において、本発明において使用するための微孔質膜には、ニトロセルロース、ナイロン、フッ化ポリビニリデン、ポリエステル、ポリスチレン、ポリエーテルスルホン、酢酸セルロース、混合セルロースエステル、およびポリカーボネートが含まれる。

【0067】

酢酸セルロースのようないくつかの膜は、診断用のイムノアッセイにとっては不十分な結合能力を有しているかもしれないが、そのような膜の特徴は、比較的低いレベルの精度または感度で十分であるアッセイには適用可能である可能性がある。

【0068】

微孔質膜は、好ましくは、底の無いマイクロタイタープレートに除去可能に付着可能である。従って、膜は、ウェル間の試料の混合を防止するための物理的な障壁により、互いに分離された個々のマイクロタイターウェルに分割され得る。さらに、異なるアッセイを別々のウェルにおいて実施することができ、その結果、必要なアッセイ試薬はより少量となる。

【0069】

10

20

30

40

50

標的分析物に特異的な捕捉要素が、試料中の分析物の有無を検出するために使用される。広範囲の相補的な結合または連結パートナーが公知であり、捕捉要素の選択は、被検出分析物、アダプター分子に関する要件、およびアッセイに必要とされる特異性のレベルにより決定される。

【0070】

一つの態様において、標的分析物は、タンパク質、タンパク質断片、ペプチド、ポリペプチド、ポリペプチド断片、抗体、抗体断片、抗体結合ドメイン、抗原、抗原断片、抗原決定基、エピトープ、ハプテン、免疫原、免疫原断片、金属イオン、金属イオンでコーティングされた分子、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、阻害剤、共同因子、基質、酵素、受容体、受容体断片、受容体サブユニット、受容体サブユニット断片、リガンド、受容体リガンド、受容体アゴニスト、受容体アンタゴニスト、シグナル伝達分子、シグナル伝達タンパク質、シグナル伝達タンパク質断片、増殖因子、増殖因子断片、転写因子、転写因子断片、阻害剤、単糖、オリゴ糖、多糖、糖タンパク質、脂質、細胞、細胞表面タンパク質、細胞表面脂質、細胞表面炭水化物、細胞表面糖タンパク質、細胞抽出物、ウイルス、ウイルスコートタンパク質、ホルモン、血清タンパク質、乳タンパク質、オリゴヌクレオチド、高分子、乱用薬物、またはそれらの任意の二つまたはそれ以上の、任意の組み合わせより選択される。

10

【0071】

一つの態様において、捕捉要素は、タンパク質、タンパク質断片、結合タンパク質、結合タンパク質断片、抗体、抗体断片、抗体重鎖、抗体軽鎖、単鎖抗体、単ドメイン抗体（例えば、VHH）、Fab抗体断片、Fc抗体断片、Fv抗体断片、F(ab')₂抗体断片、Fab'抗体断片、単鎖Fv (scFv) 抗体断片、抗体結合ドメイン、抗原、抗原決定基、エピトープ、ハプテン、免疫原、免疫原断片、結合ドメイン；金属イオン、または金属イオンでコーティングされた分子、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン；基質、酵素、アブザイム、共同因子、受容体、受容体断片、受容体サブユニット、受容体サブユニット断片、リガンド、阻害剤、ホルモン、結合部位、レクチン、ポリヒスチジン、連結ドメイン、オリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の二つまたはそれ以上の組み合わせより選択される。

20

【0072】

もう一つの態様において、相補的な結合パートナーは、抗体-抗原相互作用または抗体-リガンド相互作用を含む。

30

【0073】

もう一つの態様において、捕捉要素は、膜表面上に固定されており、かつ試料中に存在する可能性がある異なる抗原またはリガンドに対して特異的である抗体またはそれらの断片を含み得る。

【0074】

もう一つの態様において、捕捉要素は、抗原またはリガンドを含み得、アッセイは、試料中に存在する可能性がある特異的な抗体の検出を含む。

【0075】

さらなる態様において、捕捉要素は、特異的なリガンドに結合する受容体または受容体のサブユニットを含み得る。

40

【0076】

一つの態様において、標的分析物は、感染性疾患、アレルギー性疾患、自己免疫疾患、心臓病、がん、または移植片対宿主病に関連している。

【0077】

一つの態様において、標的分析物は、Ang-2、FGF basic、HB-EGF、HGF、KGF、PDGF-BB、TIMP-1、TIMP-2、TPO、およびVEGFのような血管新生因子；A-SAA、Acip-30（アディポネクチン）、AR（アンフィレギュリン）、Apo A-1、Apo B-100、C-ペプチド、sCD14、sCD30（TNFRSF8）、CD40L、CRP（C反応性タンパク質）、ErbB2、FasL、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、IGFBP-1、IGFBP-3、レプチン、LIF、MPO（ミエロペルオキシダーゼ）、NT-proBNP、OPG（オステオプロテグリン（Osteoprotegrin））、OPN（オステオポンチ

50

ン)、活性型PAI-1、総PAI-1、PAPP-A、PIGF(胎盤増殖因子)、プロラクチン、RANK、RANKL、レジスチン、組織因子、およびTRAILのようなバイオマーカー; E-カドヘリン、E-セレクトリン、ICAM-1、L-セレクトリン、P-セレクトリン、およびVCAM-1のような細胞接着分子、例えばENA-78、エオタキシン、エオタキシン-2、エキソダス-2、GRO、GRO、HCC-4(CCL-16)、I-309、IP-10、ITAC、リンホタクチン、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC、MIF、MIG、MIP-1、MIP-1、MIP-1、MIP-3、MIP-3、MIP-4(PARC)、MPIF-1、NAP-2、RANTES、SDF-1、およびTARCのようなケモカイン; 例えばGM-CSF、G-CSF、IFN、IFN、IL-1、IL-1、IL-1ra、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12p40、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、およびTNFのようなサイトカイン; 例えばIL-2R、IL-2R、IL-6R、TNF-R1、およびTNF-R1Iのようなサイトカイン受容体; 例えばEGF、HGH、TGF、およびTGFのような増殖因子; 例えばIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMのような免疫グロブリン; 例えばMMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、およびMMP-13のようなマトリックスメタロプロテイナーゼ; ならびに例えば-NGF、BDNF、CNTF、およびNT3のような神経栄養因子、またはそれらの任意の二つまたはそれ以上の、任意の組み合わせを含むリストより選択される。

10

20

30

40

50

【0078】

もう一つの態様において、標的分析物は、科、属、種、亜類型、または個々の微生物に由来する抗原である。例示的な微生物には、マイコバクテリウム(Mycobacterium)、ブルセラ(Brucella)、バチルス(Bacillus)、トレポネーマ(Treponema)、クロストリジウム(Clostridium)、スタフィロコッカス(Staphylococcus)、エンテロコッカス(Enterococcus)、ストプレトコッカス(Streptococcus)、ヘモリティクス(Haemolyticus)、シュードモナス(Pseudomonas)、カンピロバクター(Campylobacter)、エンテロバクター(Enterobacter)、ナイセリア(Neisseria)、プロテウス(Proteus)、サルモネラ(Salmonella)、シモンシエラ(Simonsiella)、リエメレラ(Riemerella)、エスケリキア(Escherichia)、ナイセリア(Neisseria)、メニンゴコッカス(Meningococcus)、モラキセラ(Moraxella)、キングセラ(Kingella)、クロモバクテリウム(Chromobacterium)、およびブランハメラ(Branhamella)、または例えばアデノウイルス、インフルエンザウイルス、サイトメガロウイルス、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、トリインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、単純ヘルペスウイルス、パラインフルエンザウイルス、ペスチウイルス、ブタパルボウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ロタウイルス、カリシウイルス、イヌジステンパーウイルスなどのウイルス、またはレプトスピラ(Leptospira)、トキソプラズマ(Toxoplasma)、トリパノソーマ(Trypanosoma)、もしくはプラスモジウム(Plasmodium)のようなその他の微生物、またはそれらの任意の二つまたはそれ以上の、任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定はされない。

【0079】

その他の例示的な標的分析物には、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、成長ホルモン、インスリン、グルカゴン、副腎皮質刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、 α -フェトプロテイン、ヒト胎盤性ラクトゲン、レプチン、インヒピンA、アクチピンA、妊娠関連血漿タンパク質A、胎盤増殖因子、妊娠特異的-1糖タンパク質; テストステロン、エストリオール、コルチゾール、プロゲステロン、コルチコステロン、アルドステロンのようなステロイド; チロキシン、トリヨードチロニンのような甲状腺ホルモン; 甲状腺結合グロブリン(TBG); ブラジキニン、ガストリン、アンギオテンシン、甲状腺ホルモン放出ホルモン、黄体形成ホルモン放出ホルモンのような活性ペプチド; エピネフリン、ノルエピネフリン、ヒスタミン、セロトニンのような生理的に活性なアミン; PGF2a、PGE、トロンボキサン、およびプロスタサイクリンのようなプロスタグランジン、またはそれらの任意の二つまたはそれ以上の、任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定はされない。

【0080】

もう一つの態様において、標的分析物はアレルゲンである。例示的なアレルゲンには、ダニ、Tyr. put、Lep. destまたは .mayrei、ネコ属(Felis)、ウシ(Bos)、アルブミン、Pen. cit.、Pen. not.、アスペルギルス フミガツス(Asp. fumigatus)、Alt. alt.

、マラセチア フルフル (Malassezia furfur)、ラテックス (Latex)、ノシメコクガ (P lodia)、チャバネゴキブリ属 (Blatella) のような屋内アレルゲン ; シラカンバ (Betul a)、ビャクシン属 (Juniperus)、フレウム (Phleum)、パリエタリア (Parietaria)、およびジュディセア (judicea) のような戸外アレルゲン ; ネコ、イヌ、マウス、ラット、ブタ、ヒツジ、ニワトリ、ウサギ、ハムスター、ウマ、およびハトに由来する代表的なアレルゲン、セロリ、ニンジン、ピーナッツ、リンゴ、エビ、およびサカナのような食物アレルゲン ; ハチまたはスズメバチのような毒アレルゲン、肝臓膜抗原、ssDNA抗原、および骨格筋細胞内または骨格筋細胞上の抗原のような自己アレルゲン、ならびにそれらの任意の二つまたはそれ以上の、任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定はされない。

10

【 0 0 8 1 】

もう一つの態様において、一つまたは複数の捕捉剤は、特定のヒトの状態または疾患の指標となると考えられる一つまたは複数の (即ち、パネル) 標的分析物 (即ち、バイオマーカー) を検出するために並べられる。そのような試験は、局所的な要件に依って、表1に挙げたパネルの任意の組み合わせからなり得る。

【 0 0 8 2 】

(表1) ヒトの状態 / 疾患パネル

発展途上国における疫学研究のための 感染性疾患スクリーニング	ヒト免疫不全ウイルス(HIV)-1、HIV-2、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV)-1、HSV-2、トレポネーマ パリダム(<i>Treponema pallidum</i>)、マイコバクテリウム ツベルクローシス(<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)、ナイセリア ゴノロエ(<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)、プラスモジウム ファルシパルム(<i>Plasmodium falciparum</i>)	
上気道ウイルス感染	アデノウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、インフルエンザA、インフルエンザB、パラインフルエンザ1、パラインフルエンザ2、パラインフルエンザ3、および呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、A群連鎖球菌	
急性下気道感染	ストレプトコッカス ニューモニエ(<i>Streptococcus pneumoniae</i>)、ヘモフィルス インフルエンゼ(<i>Haemophilus influenzae</i>)、マイコプラズマ ニューモニエ(<i>Mycoplasma pneumoniae</i>)、クラミジア ニューモニエ(<i>Chlamydia pneumoniae</i>)、モラクセラ カタラリス(<i>Moraxella catarrhalis</i>)、C反応性タンパク質、プロカルシトニン	10
胃腸病原体パネル	サルモネラ、シゲラ、カンピロバクター、ビブリオ	
肝臓ウイルス性疾患試験のためのパネル	A、B、C、D、E、およびG型肝炎ウイルスの表面抗原およびコア抗原、抗A、B、C、D、E、およびG型肝炎血清抗体	
性感染性疾患パネル	ヒト免疫不全ウイルス(HIV)-1、HIV-2、トレポネーマ パリダム、ナイセリア ゴノロエ、クラミジア トラコマチス(<i>Chlamydia trachomatis</i>)	
血液媒介疾患パネル	プラスモジウム ファルシパルム(マラリア)、トリパノソーマ クルジ(<i>Trypanosoma cruzi</i>) (シャーガス病)、ブルセラ spp (ブルセラ症)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)-1、HIV-2、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス	20
ToRCHパネル	トキソプラズマ ゴンジ(Toxoplasma gondii)、ルベラウイルス、サイトメガロウイルス、ならびに単純ヘルペスウイルス1およびHSV2	
生物学的安全性パネル	パチルス アントラシス(<i>Bacillus anthracis</i>) (炭疽)、クロストリジウム ボツリナム(<i>Clostridium botulinum</i>) (ボツリヌス中毒)、クロストリジウム パーフリンジェンス(<i>Clostridium perfringens</i>)、エルシニア ペスチス(<i>Yersinia pestis</i>) (ペスト)、コキシエラ ブルネティ(<i>Coxiella burnetii</i>) (Q熱)、ブドウ球菌エンテロトキシンB、ビブリオ コレレ(<i>Vibrio cholerae</i>) (コレラ)	
妊性パネル	エストラジオール、卵胞刺激ホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、黄体形成ホルモン、プロゲステロン、プロラクチン、テストステロン、副甲状腺ホルモン	
乱用薬物パネル	アセトアミノフェン、アンフェタミン、バルビツール酸、カンナビノイド、コカイン代謝物、メサドン、オピエート、サリチル酸、および三環系抗うつ薬	30
心血管疾患試験のためのパネル	脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、N末端proBNP(Nt-proBNP)、クレアチンキナーゼ(CK)-MB、ミオグロビン、心筋トロポニンI、心筋トロポニンT、高感度C反応性タンパク質	
自己免疫疾患試験のためのパネル	リウマチ因子、C反応性タンパク質、可溶性ヒト白血球抗原(HLA)-DR、二本鎖DNAに対する抗体、シトルリン化(citrullinated)ペプチド、核内低分子リボ核タンパク質、好中球細胞質(ANCA)、および核抗原(ANA)	

ホルモンレベルを測定するためのパネル	インスリン、レプチン、チロキシン3および4、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、増殖ホルモン、テストステロン、エストロゲン、黄体形成ホルモン
一般的ながん試験のためのパネル	遊離型前立腺特異抗原(PSA)および総PSA、がん胎児抗原(CEA)、CA125、CA15-3、CA19-9、CA24-2、CA72-4、アルファフェトプロテイン(AFP)
炎症マーカー	インターロイキン(IL)-1 α および β 、IL1受容体アンタゴニスト、IL2、IL4、IL6、IL8、IL10、IL12、IL13、IFN γ 、TNF α 、MIP1 α および β 、MCP1、RANTES、可溶性VCAM、C反応性タンパク質、可溶性TNF α 受容体IおよびII
血清IgE結合に関してスクリーニングするためのアレルゲンパネル	組換え法により入手されたアレルゲン、またはチリダニ、草、および木の花粉に由来するアレルゲン、動物のフケ、カビ、昆虫毒、ならびにダイズタンパク質、乳タンパク質、様々な木の実、穀類、および豆科植物に由来するタンパク質、エビ、アワビ、およびロブスターのような魚介類に由来するタンパク質のような食品

10

【0083】

もう一つの態様において、一つまたは複数の捕捉剤は、示された疾患に対する処置の有効性の決定において有用と考えられる一つまたは複数の(即ち、パネル)標的分析物(即ち、バイオマーカー)を検出するために並べられる。そのような試験は、局所的な要件に依って、表2に挙げたパネルの任意の組み合わせからなり得る。

【0084】

(表2) 処置の効力を決定するためのパネル

20

自己免疫疾患	CTLA4、腫瘍壊死因子アルファ(TNF α)、bLyS(BAFF)、インターフェロンガンマ(IFN γ)、エオタキシン、CXCL10またはIP10、オステオポンチン、オステオプロテグリン、およびRANKLを含むサイトカインおよびケモカイン
	ピリジノリン、デオキシピリジノリン、軟骨オリゴマー基質タンパク質のようなその他の生体分子
	二本鎖DNAに対する抗体、核内低分子リボ核タンパク質、シェーグレン症候群抗原(SS)-AおよびSS-Bのような核タンパク質、核抗原、Sm抗原、リボソームPタンパク質、カルジオリピン、ならびにトポイソメラーゼI
	アバタセプト(CTLA4の外部ドメインと融合した免疫グロブリン)、リツキシマブ(キメラ抗CD20抗体)、トシリズマブ(抗IL6受容体抗体)、エタネルセプト(IgGと融合した組換え可溶性ヒトTNF α)、インフリキシマブ(キメラ抗TNF α 抗体)、アダリムマブ(ヒト化抗TNF α 抗体)、アナキンラ(ヒトIL6受容体アンタゴニストタンパク質)、およびその他のような治療用タンパク質に対する抗体

30

40

がん	<p>ヒト絨毛性ゴナドトロピン、チロシナーゼ、HMGB1、S100-ベータ、メラノーマインヒビトリー活性 (MIA)、可溶性HLA-DR、MMP-1およびMMP-9のようなマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP)、インターロイキン (IL) -6、IL8、およびIL10を含むサイトカイン、高分子量メラノーマ関連抗原 (HMW-MAA)、ハプトグロビン、オステオポンチン、モエシン、トランスフェリン、FK506、ハプトグロビン前駆体タンパク質、プロゲステロン受容体、エストロゲン受容体、セリンプロテアーゼウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベーター、プラスミノージェンアクチベーターインヒビターI型、ヒトパピローマウイルス、エプスタインバーウイルス、グルタチオンS-トランスフェラーゼPI</p>	10
心血管疾患および発作リスクの評価	<p>リツキシマブ (キメラ抗CD20抗体)、セツキシマブ (キメラ抗EGF抗体)、トラスツズマブ (ヒト化抗Her2/neu抗体)、トシツモマブ (マウスモノクローナル抗CD20抗体)、ゲムツズマブ (ヒト化抗CD33抗体)、ベバシムマブ (ヒト化抗VEGF抗体)、アレムツズマブ (ヒト化抗CD52抗体)、およびイブリツモマブチウキセタン (マウス抗CD20抗体) のような治療用タンパク質に対する抗体</p> <p>インターロイキン (IL) -1、IL-6、IL-10、虚血修飾アルブミン、単球走化性タンパク質 (MCP) -1、プラスミノージェンアクチベーター-1、TNFα、フォンウィルブランド因子、可溶性CD40リガンド、ミエロペルオキシダーゼ、胎盤増殖因子、フィブリノーゲン、および心臓型脂肪酸結合タンパク質 (H-FABP)、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) -9、B型神経栄養増殖因子 (BNGF)、血清アミロイドA、フィブリノーゲン、sICAM、およびS-100b</p>	20

【 0 0 8 5 】

もう一つの態様において、一つまたは複数の捕捉剤は、動物試験において有用と考えられる一つまたは複数の (即ち、パネル) 標的分析物 (即ち、バイオマーカー) を検出するために並べられる。そのような試験は、局所的な要件に依って、表3に挙げたパネルの任意の組み合わせからなり得る。

30

【 0 0 8 6 】

(表3) 動物試験パネル

トリ	トリインフルエンザウイルス、トリニューモウイルス、トリレオウイルス、トリ鼻気管炎ウイルス、ニワトリ貧血ウイルス	
ウシ	ウシアデノウイルス、ウシコロナウイルス、レプトスピラ spp、ウシ白血症ウイルス、ウシ呼吸器合胞体ウイルス、ウシ海綿状脳症、ウシウイルス性下痢ウイルス、ブルセラ アボルトス (<i>Brucella abortus</i>)、ネオスポラ カニナム (<i>Neospora caninum</i>)、マイコプラズマ ボビス (<i>Mycoplasma bovis</i>)、ウシバベシア症、ロタウイルス、伝染性ウシ胸膜肺炎、ウシヘルペスウイルス I および II 型、ウシパラインフルエンザ 3	
イヌ	イヌジステンパーウイルス、イヌコロナウイルス、イヌヘルペスウイルス、イヌパルボウイルス、ボレリア プルグドルフェリ (<i>Borrelia burgdorferii</i>)、リケッチア リケッチー (<i>Rickettsia rickettsii</i>)、エーリキア カニス (<i>Ehrlichia canis</i>)、リケッチア コノリ (<i>Rickettsia conorii</i>)、イヌリウマチ因子、イヌ赤血球抗原、イヌ肝炎ウイルス 1 および 2、イヌパラインフルエンザ 1、ボレリア アフゼリー (<i>Borrelia afzelii</i>)、リーシュマニア ドノバニ (<i>Leishmania donovani</i>)、エーリキア エクイ (<i>Ehrlichia equi</i>)、リケッチア コノリー (<i>Rickettsia conorii</i>)	10
ウマ	ウマ動脈炎ウイルス、ウマ感染性貧血ウイルス、ウマヘルペスウイルス I 型、ウマアデノウイルス、ウマインフルエンザウイルス、バベシア エクイ (<i>Babesia equi</i>)、バベシア カバリ (<i>Babesia caballi</i>)、ボレリア プルグドルフェリ、ボレリア アフゼリー、エーリキア エクイ、リーシュマニア ドノバニ	
ネコ	ネココロナウイルス、ネコカリシウイルス、ネコ白血病ウイルス、ネコヘルペスウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ネコ感染性腹膜炎ウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルス、ネコウイルス性鼻気管炎ウイルス、ネコ腸コロナウイルス	20
ブタ病原体	ブタインフルエンザ A ウイルス、ブタパルボウイルス、ブタ繁殖および呼吸障害症候群ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ブタロタウイルス、ブタブルセラ スイス (<i>Brucella suis</i>)、伝染性胃腸炎 (TGE) ウイルス、ブタコレラウイルス、ブタ呼吸器コロナウイルス	
ヒツジ病原体	ヒツジヘルペスウイルス、ブルセラ オビス (<i>Brucella ovis</i>)、仮性狂犬病ウイルス (オーエスキー)	
全ての種のためのタンパク質および内分泌パネル	硫酸エストロン、プロゲステロン、増殖ホルモン、血清コルチゾール、テストステロン、チロキシン (T)-3、T-4、血清アルブミン、血清グロブリン、インスリン、副甲状腺ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン	30
輸出用試験のための病原体のパネル	ウシウイルス性下痢ウイルス、地方病性ウシ白血症ウイルス、ウシヘルペスウイルス I 型、マエディ ビスナ (<i>Maedi visna</i>) ウイルス、ブルセラ オビス、マイコバクテリウム パラツベルクローシス (<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>) (ヨーネ病)、カンピロバクター フェツス (<i>Campylobacter fetus</i>)、トリコモナス フェツス (<i>Trichomonas foetus</i>)、レプトスピラ spp、ストレプトコッカス エクイ (<i>Streptococcus equi</i>)、伝染性ウシ鼻気管炎ウイルス	
ウシ乳腺炎の試験のためのパネル	ストレプトコッカス アガラクチエ (<i>Streptococcus agalactiae</i>)、ストレプトコッカス ウベリス (<i>Streptococcus uberis</i>)、スタフィロコッカス アウレウス (<i>Staphylococcus aureus</i>)、マイコプラズマ spp、エスキエリキア コリ (<i>Escherichia coli</i>)、クレブシエラ (<i>Klebsiella</i>) spp、シュードモナス (<i>Pseudomonas</i>) spp、プロトテカ (<i>Prototheca</i>) spp、ハプトグロビン、血清アミロイド A、免疫グロブリン、ラクトフェリン、血清アルブミン	40
炎症マーカー	インターロイキン (IL) -1 α および β 、IL1 受容体アンタゴニスト、IL2、IL4、IL6、IL8、IL10、IL12、IL13、IFN γ 、TNF α 、MIP1 α および β 、MCP1、RANTES、可溶性 VCAM、C 反応性タンパク質、可溶性 TNF α 受容体 I および II	

【 0 0 8 7 】

アレイ製造の後、試料添加の前に、膜表面上の全ての利用可能なタンパク質結合部位が、試薬または試薬の組み合わせの添加およびインキュベーションによりブロックされる。これらの試薬は、「ブロッカー」と呼ばれ、膜表面における試料由来の非特異的タンパク

質の結合を減少させるか、または最大で排除し、それにより全体のバックグラウンドシグナルを減少させる役割を果たす。これは、信号対雑音比を増加させ、それにより、アッセイの全体的な感度を増加させる。ブロッカーは、試料およびその他のアッセイ試薬と膜上の固定化されたタンパク質との間のその後の反応においては活性を示さない。例示的なブロッカーには、ウシ血清アルブミン、カゼイン、無脂肪粉乳、サカナ、ブタ、およびその他の起源に由来するゼラチン、デキストラン、ニジマスサケ、モルモット、ハムスター、ウサギ、およびその他の起源に由来するような、分析される試料以外の起源に由来する血清、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ならびにHeteroBlock (Omega Biologicals, Bozeman, MT)、SuperBlock、StartingBlock、SEA BLOCK (Pierce, Rockford, IL) を含む市販の調製物が含まれるが、これらに限定はされない。典型的には、ブロッカーは、例えば、リン酸バッファー、リン酸緩衝生理食塩水、トリスバッファー、酢酸バッファー、およびその他のバッファーのような緩衝溶液で調製される。ブロッカーには、例えば、トゥイーン20、トゥイーン80、ノニデット (Nonidet) P40、ドデシル硫酸ナトリウム、およびその他のような界面活性剤が補足されてもよい。

10

【0088】

本発明の膜は、膜上に常に検出可能であると考えられ、好ましくは、アッセイの性能または膜の処理に関係なく検出可能であると考えられ、少なくとも一つの基準点マーカを含む。

【0089】

好ましい態様において、基準点マーカは、色素、色素がコンジュゲートしたタンパク質、またはヘモグロビンのような色素生産性タンパク質である。

20

【0090】

少なくとも一つの基準点マーカの使用は、陽性比色定量対照と比較して、成功したアレイ処理に基づいて、この要素が検出される必要性を回避するであろう。従って、基準点マーカは、アレイ処理に関わらず常に検出可能であると考えられる「真の」陽性対照であり、アレイを方向付け、グリッド形成を補助するために使用され得る。

【0091】

本発明の膜は、アッセイの特異性をモニタリングするための少なくとも一つの対照も含む。該対照は、捕捉要素と標的分析物との間の、またはアッセイ検出工程の結合パートナー間の、結合の特異性の情報を提供することを目的とする。

30

【0092】

一つの態様において、アッセイの特異性の対照は、一つもしくは複数の抗体アイソタイプ、異なる動物種に由来する対応する抗体もしくは抗体アイソタイプ、または密接に関連するリガンドを含む。例えば、ヒト抗体アレイにおいては、ヒトIgMおよび抗ヒトIgMが、アッセイの特異性をモニタリングするための対照として使用され得る。

【0093】

本発明の膜は、アッセイ性能をモニタリングするための少なくとも一つの対照も含む。該対照は、相補的な結合相互作用の効率または使用される試薬の品質もしくは性能の情報を提供することを目的とする。

【0094】

一つの態様において、アッセイ性能対照は、他方の結合パートナーがアッセイ試薬であるような相補的な結合対の一方の結合パートナーを含む。アッセイ性能対照は、好ましくは、標的分析物、非特異的結合パートナー、または比色定量酵素標識を含むリストより選択される。

40

【0095】

一つの態様において、陽性比色定量対照は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -Dガラクトシダーゼ、またはグルコースオキシダーゼを含むリストより選択される酵素を含む、比色定量基質と反応することができる酵素標識コンジュゲートである。

【0096】

50

アッセイ対照の同一性は、アレイの種類、標的分析物の同一性、および分析される試料の種類に依存するであろう。

【0097】

例えば、抗ヒトIgG-HRPまたは抗マウスIgG-HRPのいずれかが、それぞれ、抗原および抗体がプリントされたアレイにおいて使用され得る。抗原アレイにおける最終的な検出抗体は、しばしば、抗ヒトIgG-HRPであると考えられ、一方、抗体アレイの場合は、しばしば、ビオチン化マウスIgGであると考えられる。これらの対照は、HRP基質の性能または品質に関する情報を提供するのみならず、陽性対照を提供することができる。

【0098】

抗原または抗体アレイ上に存在するマウスIgG、ヒトIgG、および抗ヒトIgGは、アッセイの特異性の情報を提供するのみならず、アレイ様式に依って、陽性対照または陰性対照のいずれかとして作用することができる。例えば、マウスIgGは、抗体アレイにおいて陽性シグナルを提供するはずであり、後者の二つは、抗原アレイにおいて陽性シグナルを提供するはずである。アレゲンアレイにおいては、ヒトIgMおよび抗ヒトIgMが、対照として、ヒトIgEおよび抗ヒトIgEと交換され得る。これらの対照は、全体のアッセイ性能に関する対照としての役割を果たすことができる。

【0099】

好ましい態様において、アレイ上の要素は、直径100 μm~500 μmの不連続区域にプリントされる。より好ましくは、不連続区域は、直径350 μm~400 μmである。

【0100】

好ましい態様において、アレイの不連続区域は、5×5グリッドでプリントされる。好ましくは、アレイは、最大9種の対照要素および8種の異なる捕捉要素の各々の二つの複製物を含む。

【0101】

好ましい態様において、捕捉要素は、4種の異なる捕捉要素の二つまたはそれ以上の複製物、およびその倍数でプリントされる。

【0102】

標的分析物の検出

本発明の膜と共に使用されるアッセイ技術は、多数の周知の比色定量酵素連結アッセイのうちの一つを含む。そのような系の例は、当技術分野において周知である。アッセイ技術は、相補的な結合対間の複合体の形成に続く、酵素コンジュゲートの標識および比色定量基質を含む比色定量検出系による検出に基づく。本発明において、固相担体または基質は微孔質膜である。検出系は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)に関して記載されるであろうが、そのような技術が抗体の使用に制限されず、任意の比色定量アッセイに同様に適用可能であることを当業者は認識するであろう。

【0103】

図1は、アッセイ様式および試料処理の流れの模式図を示す。パネル(A)は、生物学的試験試料からの抗原またはリガンドの検出のための抗体アレイの処理工程を示す。パネル(B)は、生物学的試験試料中の抗体の検出のための抗原またはリガンドアレイの処理を示す。パネル(C)は、下記および実施例に記載される試薬の各々が、実施例1に従ってプリントされたアレイに添加される、一般的な試料処理の流れを示す。

【0104】

図2は、抗原検出のための抗体アッセイの処理における、対照要素の機能および添加された様々な試薬とのそれらの結合を示す模式図を示す。様々な試薬の添加は、図の左側に示されており、逐次の添加は下から上へとなされる。適切な機能的な試薬が対照要素に結合した場合にのみ、発色が起こる。

【0105】

一つの態様において、ELISAは「サンドイッチ」アッセイ様式である。この様式において、測定される標的分析物は、二つの抗体、捕捉抗体および検出抗体の間に結合する。もう一つの態様において、ELISAは、抗体が捕捉抗原と結合し、結合した抗体の量が二次検

10

20

30

40

50

出抗体により決定される、非競合アッセイである。

【0106】

もう一つの態様において、ELISAは、標識された抗体の代わりに、標識された抗原が使用される、競合アッセイである。標識されていない抗原および標識された抗原が、捕捉抗体との結合に関して競合し、結合した標的分析物の量が、検出された標識された抗原の割合により決定され得る。

【0107】

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかが、サンドイッチELISA系における捕捉抗体および検出抗体として使用され得る。モノクローナル抗体は、抗原の小さな差異の微細な検出および定量を可能にする単一のエピトープに対する固有の単一の特異性を有する。ポリクローナル抗体も、可能な限り多くの抗原と結合する捕捉抗体として使用され得、続いて、改良された特異性を提供するために、サンドイッチアッセイにおける検出抗体としてモノクローナル抗体が使用される。モノクローナル抗体も、特異的な分析物の捕捉をもたらすための捕捉抗体として使用され得、続いて、サンドイッチアッセイにおける検出抗体としてポリクローナル抗体が使用される。

10

【0108】

アレイ設計における重要な考慮すべき事項は、抗原が捕捉抗体と結合する際に、検出抗体により認識されるエピトープが不明瞭にならないよう、または改変されないよう、各結合対の捕捉抗体および検出抗体が、二つのオーバーラップしないエピトープを認識しなければならないということである。多数の相補的な結合対が、ELISAのために既に開発されており、本発明において使用することができる。

20

【0109】

多重アッセイの場合、交差反応性を排除するため、結合対の各々の間にオーバーラップが存在しないことも重要である。多数の多重ELISAが開発されており、結合対のその他の組み合わせが試験を通して構成され得ることが期待される。

【0110】

一つの態様において、酵素コンジュゲートの標識は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、またはグルコースオキシダーゼを含むリストより選択される酵素を含む。

【0111】

一つの態様において、酵素標識は、一次抗体と直接コンジュゲートされてもよいし、または一次抗体を認識する二次抗体を通して導入されてもよい。一次抗体がビオチンで標識されている場合、それは、ストレプトアビジンのようなタンパク質とコンジュゲートされていてよい。

30

【0112】

一つの態様において、アッセイ検出系は、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、ジアミノベンジジン、金属増感型ジアミノベンジジン、4-クロロ-1-ナフトール、コロイド金、ニトロブルーテトラゾリウムクロリド、5-プロモ-4-クロロ-3'-インドリルホスフェートp-トルイジン塩、およびナフトールAS-MXホスフェート+ファストレッドTR塩を含むリストより選択される比色定量の検出基質を含む。

40

【0113】

好ましい態様において、比色定量反応は、検出され、任意で、定量され、コンピューターに接続されたデジタルカメラまたはデスクトップスキャナのような画像取り込み装置を使用して分析され得る。画像分析のための公知の方法が使用され得る。例えば、既知の標準要素の密度値が、標準曲線を作成するために使用され得る。未知の分析物のための密度値は、実際の濃度を計算するため、各分析物について、標準曲線を使用して分析され得る。各分析物の値は、アレイ内の各捕捉要素のスポットティング位置に基づき同定され得る。

【0114】

本発明の膜は、標的分析物の検出のためのキットにおいて特に使用に適している。その

50

ようなキットは、説明書および必要とされる任意のアッセイ消耗品と共に膜を含み得る。異なるキットが、異なる標的分析物およびアレイの種類のために構想される。従って、一つの局面において、本発明は、本発明の膜を含み、任意で、一つまたは複数の処理試薬を含むキットに関する。例えば、本発明のキットは、任意で

- (a) バックグラウンドを低下させる試薬（ブロックング溶液としても公知）、
- (b) 洗浄溶液、

(c) 捕捉要素に結合した抗原、リガンド、もしくは抗体の検出のための、または陽性対照の検出のための一つもしくは複数の抗体（抗体-結合タンパク質コンジュゲートまたは抗体-酵素標識コンジュゲートまたはその両方を含む）、

- (d) 比色定量検出系、

(e) 各スポットにおけるシグナル強度の決定および結果の分析のためのソフトウェア、ならびに

- (f) 試料中の分析物の存在を測定するためのプロトコル

のうちの一つもしくは複数、またはそれらの任意の二つまたはそれ以上の、任意の組み合わせを含む。

【0115】

もう一つの局面において、本発明は、本発明の膜を処理する方法にも関する。そのような方法は、

- (a) 前記のように、本発明の膜を準備する工程、
- (b) 少なくとも一つの試料を膜に添加する工程、ならびに
- (c) (i) 少なくとも一つの基準点マーカー、

- (ii) 少なくとも一つの陽性比色定量対照、および

- (iii) アッセイ性能をモニタリングするための、少なくとも一つの陽性対照

のうちの二つまたはそれ以上により検出可能な結果が得られるよう膜を処理する工程を含む。

【0116】

一つの態様において、膜を処理する工程は、膜上の利用可能なタンパク質結合部位がブロッカーによりブロックされるブロックング工程、随意的洗浄工程、一つまたは複数の被測定分析物を含む試料と膜とを接触させる工程、膜から結合していない物質を除去するための洗浄工程、一つまたは複数の標的分析物、およびアッセイ性能対照に結合した非標的分析物に対応しかつそれらに結合すると考えられる一つまたは複数の二次抗体と膜を接触させる工程、洗浄工程、ならびに検出可能な結果が生じるように、酵素コンジュゲートまたは酵素基質の一方または両方と膜とを接触させる工程を含む。

【0117】

もう一つの態様において、本発明の微孔質膜は、試料中の少なくとも一つの標的分析物、好ましくは試料中の複数の異なる標的分析物の同時検出のために使用され得、診断アッセイおよびスクリーニングアッセイにおける有用性を有する。

【0118】

従って、本発明の微孔質膜は、それらをハイスループット（または超ハイスループット）分析に適応させることができ、従って、使用される特定の支持体に依って、任意の数の試料（例えば、96、1024、10,000、100,000、またはそれ以上）を平行して試験することができるという利点を提供する。ハイスループット分析に微孔質膜を適応させることの特有の利点は、様々な時間に、試薬を添加するため、もしくは試料の一つもしくは複数から試薬を除去するため、特定の試料に異なる試薬を添加するため、または様々な加熱サイクルに試料を供するために、自動化された系を使用することが可能であるという点である。

【0119】

例えば、自動化された系は、一つまたは複数の温度調節されたチャンバー、および96穴プレートを保持するために構成されたプラットフォームを有するデッキ上に設置された一つまたは複数のロボットアームからなり得る。ロボットアームの運動およびチャンバー内の温度は、中央のコンピューターユニットにより調節される。アレイプレートが装置のデ

10

20

30

40

50

ッキ上に積み重ねられる。一つの態様において、分析すべき試料を含有しているプレートが、4 の温度を有するチャンバー内に積み重ねられる。次いで、一つのロボットアームが、一つのプラットフォーム上の個々の各アレイプレートを連続的に移し、その一方で、他方のアームが、第二のプラットフォーム上の個々の各試料プレートを連続的に移す。次いで、96個の使い捨てチップを含有しているノズルが、試料プレートの各ウェルから所定の量の試料を吸引し、アレイプレートの対応するウェルに試料を移す。次いで、試料を含有しているアレイプレートが、37 の温度を有するチャンバーに移される。試料が、デッキ上に積み重ねられた全てのアレイプレートに添加されるまで、この過程が繰り返される。アレイプレートは、所定の時間、インキュベートされ、続いて96個の使い捨てチップを含有しているノズルによる洗浄バッファの添加のため、プラットフォームに各プレートが移される。所定の時間の後、洗浄バッファが吸引され、この洗浄過程が複数回（即ち、二回以上）繰り返される。次いで、各アレイプレートが二次抗体を受け入れ、続いて37 の温度を有するチャンバーに移される。アレイプレートが、所定の時間、インキュベートされ、続いて96個の使い捨てチップを含有しているノズルによる洗浄バッファの添加のためプラットフォームに各プレートが移される。所定の時間の後、洗浄バッファが吸引され、この洗浄過程が複数回（即ち、二回以上）繰り返される。次いで、各アレイプレートが検出試薬を受け入れ、続いて所定の時間インキュベーションが行われ、続いて96個の使い捨てチップを含有しているノズルによる洗浄バッファの添加のためプラットフォームに各プレートが移される。洗浄バッファは、所定の時間の後に吸引され、プレートが乾燥のため37 チャンバーに移される。プレートは、所定の期間の後にデッキに戻され、データの分析のために手動で処理される。

10

20

【0120】

複数の試験薬剤および/または試料を同時に試験する便利さに加えて、そのようなハイスループットアッセイは、単一の試料の2つ組、3つ組、またはさらに多くのアリコートを試験し、従って、得られる結果の妥当性を増加させるための手段、および試験試料と同一の条件下で対照試料を試験し、従って、異なるアッセイからの結果の比較のための内部標準を提供するための手段を提供する。

【0121】

本発明の様々な局面が、以下の実施例を参照することにより、非限定的に例示される。

30

【0122】

実施例

実施例1

アレイ製造のための一般手順

底の無い96穴ポリスチレンプレート（ナイロン、Nalge Nunc International, USA等）に付着させられた膜またはフィルムを、マイクロアレイをプリントするために使用した。様々な方法が、底の無い96穴プレートに膜を付着させるために使用され得る。この実施例においては、長さ128mm、86mm、厚さ1mmという寸法を有するゴムシートを使用した。96個の円形の孔を、直径6.35mm、中心間距離9mmで、シート上に型押しした。次いで、シートの両側に接着剤をコーティングし、第二の粘着層が膜との結合のために未だ利用可能であるよう、底の無い96穴プレートの片側に接着した。次いで、ナイロン膜を、長さ128mmおよび幅86mmの寸法に切り取り、漏出のないウェルを作出するガスケットを作出するためにゴムシートの反対側に付着させた。

40

【0123】

底の無い96穴プレートに膜を付着させるもう一つの方法は、プレートの片側に適用される接着剤の使用を含む。その後、長さ128mmおよび幅86mmの寸法に切り取ったナイロン膜を、ウェル間の漏出がないよう、圧力を使用して付着させる。

【0124】

マイクロアレイを、10%グリセロールおよび0.005%トゥイーン20という最終濃度が得られるよう、リン酸緩衝生理食塩水、グリセロール、およびトゥイーン20を含有しているプリント緩衝溶液でタンパク質を混合することによりプリントした。

50

【 0 1 2 5 】

アレイを、350 μmの平均直径を有する均一のスロットを与えるように設計されたクイルピン (quill pin) (ChipMaker II, Telechem International Inc, USA) を使用して、ベンチトップ・コンタクト・マイクロアレイヤー (benchtop contact microarrayer) (Lab Next Inc, USA) を使用することによりプリントした。アレイを、外気温および60% (±10%) の湿度でプリントした。

【 0 1 2 6 】

最大96の複製物アレイを膜上にプリントした。各アレイは、5×5グリッド (カラムの数×列の数) でプリントされた最大25個のスロットを有していた。25個未満のスロットを有するアレイを、5×1、5×2、5×3、および5×4スロットのパターンで、5個、10個、15個、または20個のスロットを含有するようプリントした。

10

【 0 1 2 7 】

各アレイは、列1および行5にプリントされた一連の対照スポットを有していた。これらの対照スポットは、基準点マーカー (BlueRanger Prestained Protein Molecular Weight Marker, Pierce Biotechnology Inc, USA, カタログ番号 26681などの色素がコンジュゲートしたタンパク質)、陰性対照 (20%グリセロールおよび0.005%トウイーン20および非特異抗体を含有しているリン酸緩衝生理食塩水)、陽性対照 (ストレプトアビジンにコンジュゲートした西洋ワサビペルオキシダーゼ、Pierce, カタログ番号 21126のような酵素がコンジュゲートしたタンパク質)、およびアッセイの全体的な性能をモニタリングするための試料特異的対照を含んでいた。

20

【 0 1 2 8 】

試験タンパク質を、測定される分析物に対する特異的タンパク質の結合親和性により決定された0.05mg/ml ~ 1.0mg/mlの範囲の濃度で、通常は0.5mg/mlでプリントした。

【 0 1 2 9 】

プリンティングの後、アレイは、使用前に少なくとも4 時間で8時間維持した。

【 0 1 3 0 】

実施例2

アレイの処理および分析のための一般手順

アレイを、各ウェルに100 μlのブロッカー [0.1%トウイーン20を含有しているリン酸緩衝生理食塩水 (PBS-T) 中、1%カゼイン (Vector Labs, USA)] を添加した後、37 度で60分間インキュベートした。次いで、ブロッカーを吸引除去した。

30

【 0 1 3 1 】

分析物を含有している試料を、ブロッカーで希釈することにより50 μlの量で各ウェルに添加し、膜を37 度で60分間インキュベートした。膜を、過剰の結合していない分析物を除去するため、PBS-Tで3回洗浄した。

【 0 1 3 2 】

抗体アレイ (抗原検出用) については、アダプターコンジュゲート検出抗体を、製造業者により推奨された濃度または実験により経験的に決定された濃度でウェルに添加した。アダプターコンジュゲート抗体の例は、ビオチンコンジュゲート抗体のようなハプテンコンジュゲート抗体を含む。膜を、37 度で60分間インキュベートし、PBS-Tで3回洗浄した。次いで、膜を、酵素にコンジュゲートした抗アダプター抗体 (抗ビオチン抗体など)、またはアダプターコンジュゲート酵素 (ストレプトアビジンコンジュゲート酵素など) と共に、37 度で60分間インキュベートした。酵素の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼである。膜をPBS-Tで3回洗浄した。

40

【 0 1 3 3 】

または、抗原アレイ (抗体検出用) については、過剰の分析物を洗浄した後、膜を、西洋ワサビペルオキシダーゼのような酵素とコンジュゲートした抗免疫グロブリン抗体と共にインキュベートした。膜を37 度で60分間インキュベートした。膜をPBS-Tで3回洗浄した。

【 0 1 3 4 】

50

いずれの場合にも、結合した酵素を、タンパク質スポット上に有色沈殿物を沈着させる酵素基質を使用して検出し測定した。使用される基質の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼにより褐色の沈殿物を与える、金属増感型ジアミノベンジジン (Pierce, USA) である。または、結合した抗分析物抗体を、コロイド金とコンジュゲートした、二次抗体またはストレプトアビジンなどのアダプターを使用して検出し得る。

【0135】

膜を、外気温で60分間乾燥し、600dpiの解像度で走査するか、または少なくとも4メガピクセルの解像度を有するデジタルカメラを使用して撮影し、画像をTIFFフォーマットで保存した。

【0136】

各スポットにおける色の強度を、適切な位置でグリッドを整列化するため、基準点マーカーを使用して、全てのアレイにおいてグリッドを位置付けるグリッド形成ソフトウェアを使用して決定した。強度の値は、Microsoft Excel (商標) スプレッドシートファイルで取得した。次いで、それを結果の分析のために使用することが可能である。

【0137】

実施例3

抗体アレイ

自己免疫疾患、心血管疾患、がん、および感染性病原体のタンパク質マーカー、または、例えば増殖因子、ホルモン、サイトカイン、およびケモカインなどのリガンド等の抗原の検出のためのアレイを、抗原の特異的な捕捉のための捕捉要素として抗体のパネルをプリントすることにより作出する。一連の対照抗体および対照タンパク質もプリントする。これらの対照は多様な機能を果たし、個々の試薬の性能を含むアッセイ性能をモニタリングするための対照、捕捉抗体の特異性をモニタリングするための対照、およびアレイ中の各スポットにおけるシグナル強度の決定のために試料処理の後にアレイをグリッド形成するための基準点マーカーを含む。表4は、抗体アレイをプリントし処理するために使用され得る試薬を要約している。アッセイ性能対照の番号付けは、図2中の番号付けに関係している。

【0138】

(表4) 抗体アレイ試薬

10

20

試薬	機能	例	注釈
色素生産性色素を有するタンパク質または抗体	グリッド形成ソフトウェアが、アレイの各スポットの位置を特定し、そこにグリッドを設置することを可能にする基準点マーカー	BlueRanger色素とコンジュゲートしたタンパク質マーカー	基準点マーカーは必ず検出可能になるであろう
プリントバッファー	アレイ中のバックグラウンドシグナルを決定するための陰性対照		
ハプテン (例えば、ビオチン) とコンジュゲートした抗体	ストレプトアビジンとコンジュゲートした酵素またはその他のビオチン-結合タンパク質 (BP) の機能をモニタリングするための対照 (アッセイ性能 (3))	ビオチンがコンジュゲートした抗マウスIgG	
ハプテン結合タンパク質-酵素コンジュゲート	酵素基質の性能をモニタリングするための陽性比色定量対照	ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ	
抗IgG抗体	試料の添加を証明するための対照 (アッセイ性能 (1))		血清の添加は血清IgGのこのスポットとの結合をもたらす; 非ヒト試料が試験される場合には、抗体は試験される種に由来するIgGの捕捉のために適切なものに交換されるであろう
ハプテンとコンジュゲートした検出抗体の捕捉のためのIgG	二次検出抗体混合物の添加を証明するための対照 (アッセイ性能 (2))	抗マウスIgG	二次ビオチン化モノクローナル抗体が抗マウスIgGに結合するであろう
非特異抗体	抗原捕捉特異性 (アッセイ特異性) を決定するための陰性対照	ハムスターIgG	アレイパネルおよび検出試薬に提示されていない種に由来するIgG
抗原またはリガンドの捕捉のための試験抗体のパネル	疾患または健康のマーカーに関する診断試験 (捕捉要素)	抗サイトカイン抗体	試験抗体の各々は二つ組でまたは単一のスポットとしてプリントされ得る (16の試験のパネルの場合)

10

20

30

40

【 0 1 3 9 】

アレイを、下記表5に記載する5×5グリッドでプリントする。試験抗体および対照抗体を、その抗原に対する抗体の親和性、および対照抗体から得られたシグナルに依り、0.1mg/ml ~ 1mg/mlの範囲の濃度でプリントする。

【 0 1 4 0 】

(表5) 抗原検出のための抗体アレイの設計

基準点マーカー	試験抗体1	試験抗体1	試験抗体2	試験抗体2
プリントバッファー (陰性対照)	試験抗体3	試験抗体3	試験抗体4	試験抗体4
ハプテンとコンジュ ゲートした抗体 (アッセイ性能(3))	試験抗体5	試験抗体5	試験抗体6	試験抗体6
プリントバッファー (陰性対照)	試験抗体7	試験抗体7	試験抗体8	試験抗体8
HRP-ハプテンBP コンジュゲート (比色定量対照)	抗IgG抗体 (アッセイ性能(1))	抗マウス抗体 (アッセイ性能(2))	非特異的抗体 (アッセイ特異性)	基準点マーカー

10

【0141】

20

プリントされたアレイを、まず、37 で60分間ブロッカーと共にインキュベートすることにより、マーカータンパク質の存在を測定するために使用する。

【0142】

血清、血漿、またはその他の生物学的材料のような、最大96の異なる被験試料が、自己のウェルに添加する。試料は、希釈せずに添加してもよいし、または試験ウェルへの添加前にブロッカーで希釈してもよい。膜を37 で60分間インキュベートし、結合しなかった物質をPBS-Tで洗浄除去する。

【0143】

アレイされた抗体に結合した抗原またはリガンドが、ビオチン化二次抗体および酵素にコンジュゲートしたビオチン-結合タンパク質との逐次インキュベーションにより検出する。次いで、各スポットにおける酵素の量を、スポットに有色沈殿物を沈着させる基質を使用することにより測定する。

30

【0144】

この実施例において、陽性対照を、以下のように処理し検出する。酵素基質の添加により、発色の結果が生じるよう、比色定量対照を処理する。アッセイ性能対照を以下のように処理する。アッセイ性能対照(1)、抗IgG抗体は、血清試料中に存在するIgG(非標的分析物)に結合すると考えられる。IgGの結合は、二次抗体、抗体-アダプターコンジュゲート(例えば、抗IgG抗体-ビオチンコンジュゲート)または抗体-酵素コンジュゲート(例えば、抗体-HRPコンジュゲート)を使用して検出されるであろう。アッセイ性能対照(2)、抗マウス抗体は、ビオチン化二次抗体に結合すると考えられる。次いで、この相互作用は、ビオチン結合タンパク質-酵素コンジュゲートおよび酵素基質、またはコロイド金のような有色成分にコンジュゲートしたビオチン結合分子の添加により検出されるであろう。アッセイ性能対照(3)、抗体-ビオチンコンジュゲートは、ビオチン結合タンパク質-酵素コンジュゲートに結合し、この相互作用は酵素基質の添加により検出されると考えられる。

40

【0145】

実施例4

抗体検出のための抗原アレイ

自己免疫疾患、心血管疾患、がん、および感染性病原体のタンパク質マーカー、または、例えば増殖因子、ホルモン、サイトカイン、およびケモカインなどのリガンド等の、関

50

心対象の抗原に対する抗体の検出のためのアレイを、抗体の特異的な捕捉のための捕捉要素として抗原またはリガンドのパネルをプリントすることにより作出する。一連の対照抗体および対照タンパク質もプリントする。これらの対照は多様な機能を果たし、個々の試薬の性能を含むアッセイ性能をモニタリングするための対照、アッセイの特異性をモニタリングするための対照、およびアレイ中の各スポットにおけるシグナル強度の決定のために試料処理の後にアレイのグリッドを形成するための基準点マーカを含む。表6は、抗原アレイをプリントし処理するために使用され得る試薬を要約している。

【 0 1 4 6 】

(表6) 抗原アレイ試薬

試薬	機能	例	注釈
色素生産性色素を有するタンパク質または抗体	グリッド形成ソフトウェアが、アレイの各スポットの位置を特定し、そこにグリッドを設置することを可能にする基準点マーカ	BlueRanger色素とコンジュゲートしたタンパク質マーカ	
プリントバッファー	アレイ中のバックグラウンドシグナルを決定するための陰性対照		
抗IgM抗体	試料の添加を証明するための対照 (アッセイ性能 (1))	抗ヒトIgM	血清の添加は血清IgMのこのスポットとの結合をもたらすであろう; 非ヒト試料が試験される場合には、抗体は試験される種に由来するIgGの捕捉のために適切なものに交換されるであろう
ハプテン結合タンパク質-酵素コンジュゲート	酵素基質の性能をモニタリングするための陽性比色定量対照	ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ	
抗IgG抗体	試料の添加を証明するための対照 (アッセイ性能 (1))		血清の添加は血清IgGのこのスポットとの結合をもたらすであろう; 非ヒト試料が試験される場合には、抗体は試験される種に由来するIgGの捕捉のために適切なものに交換されるであろう
IgG	二次検出抗体の添加を証明するための対照 (アッセイ性能 (2))	ヒトIgG	二次抗体がIgGと結合するであろう; 非ヒト試料が試験される場合には、抗体は試験される種に由来するIgGの捕捉のために適切なものに交換されるであろう
非特異抗体	抗原捕捉特異性 (アッセイ特異性) を決定するための陰性対照	ハムスターIgG	アレイパネルおよび検出試薬に提示されていない種に由来するIgG
抗体の捕捉のための試験抗原またはリガンドのパネル	疾患または健康のマーカに関する診断試験 (捕捉要素)	インフルエンザA抗原	各試験抗原は二つ組でまたは単一のスポットとしてプリントされ得る (16の試験のパネルの場合)

10

20

30

40

【 0 1 4 7 】

アレイを、下記表7に記載される5×5グリッドでプリントする。対照抗体を、対照抗体から得られたシグナルに依り、0.1mg/ml ~ 1mg/mlの範囲の濃度でプリントする。試験抗原

50

またはリガンドを、陽性対照の生物学的試料からの試験抗体に対する抗原の親和性に依り、0.05mg/ml～1mg/mlの範囲の濃度でプリントする。

【0148】

(表7) 抗体検出のための抗原アレイの設計

基準点マーカー	試験抗原1	試験抗原1	試験抗原2	試験抗原2
プリントバッファー (陰性対照)	試験抗原3	試験抗原3	試験抗原4	試験抗原4
抗IgM抗体 (アッセイ性能(1))	試験抗原5	試験抗原5	試験抗原6	試験抗原6
プリントバッファー (陰性対照)	試験抗原7	試験抗原7	試験抗原8	試験抗原8
HRPとコンジュゲート したタンパク質 (比色定量対照)	抗IgG抗体 (アッセイ性能(1))	IgG (アッセイ性能(2))	非交差反応性種 由来の抗体 (アッセイ特異性)	基準点マーカー

10

20

【0149】

プリントされたアレイを、まず、37℃で60分間ブロッカーと共にインキュベートすることにより、抗体の存在を測定するために使用する。

30

【0150】

血清、血漿、またはその他の任意の生物学的材料のような、最大96の異なる被験試料を、自己のウェルに添加する。試料を、希釈せずに添加してもよいし、または、試験用のウェルへの添加前にブロッカーで希釈してもよい。膜を37℃で60分間インキュベートし、結合しなかった物質をPBS-Tで洗浄除去する。

【0151】

アレイされた抗原に結合した抗体を、酵素コンジュゲート二次抗体またはコロイド金のような有色分子とコンジュゲートした二次抗体とのインキュベーションにより検出する。次いで、各スポットにおける酵素の量を、スポットに有色沈殿物を沈着させる基質を使用することにより測定する。

40

【0152】

陽性対照を以下のように検出する。比色定量対照を、酵素基質の添加により検出した。アッセイ性能(1)対照は、血清試料中のIgGに結合すると考えられ、二次抗体-酵素コンジュゲートおよび酵素基質の添加により検出される。アッセイ性能(2)対照は、二次抗体-酵素コンジュゲートに結合すると考えられ、酵素基質の添加により検出される。アッセイ性能(1)対照は、血清試料中のIgMに結合すると考えられ、二次抗体-酵素コンジュゲートおよび酵素基質の添加により検出される。

【0153】

実施例5

50

血清サイトカインの検出のための抗体アレイ

表8に挙げられた試薬を、サイトカインアレイの製造および処理のために使用した。

【0154】

(表8) サイトカインアレイ試薬

試薬	供給元	カタログ番号	機能
マウス抗ヒトIFN γ 抗体	BioLegend	507501	捕捉要素
マウス抗ヒトTNF α 抗体	BioLegend	502801	
マウス抗ヒトIL4抗体	BioLegend	500701	
ヤギ抗ヒトIgG抗体	Pierce	31119	試料添加を検出する (アッセイ性能(1))
マウス抗ヒトIgM抗体	BioLegend	314501	
ビオチン抗ヒトIFN γ 抗体	BioLegend	502503	二次抗体
ビオチン抗ヒトTNF α 抗体	BioLegend	502903	
ビオチン抗ヒトIL4抗体	BioLegend	500803	
ビオチン抗ヒトIgG抗体	Pierce	31774	IgGおよびIgMのアッセイ 性能(1) 対照との結合を 検出する
ビオチン抗ヒトIgM抗体	BioLegend	314503	
ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ	Pierce	21126	発色反応
ヤギ抗ヒトIgG西洋ワサビペルオキシダーゼ	Pierce	31412	基準点マーカーおよび 発色反応
ヒトIgG	Pierce	31154	アッセイ特異性
ヒトIgM	Pierce	31146	

10

20

【0155】

アレイを、下記表6に記載する5×5グリッドでプリントした。抗サイトカイン抗体を0.2 mg/mlでプリントし、対照抗体を表9に示した濃度でプリントした。二次抗体のためのアッセイ性能対照は使用しなかった。

【0156】

(表9) サイトカイン検出のための抗体アレイの検出

抗ヒトIgG- ペルオキシダーゼ (基準点マーカー)	抗ヒトIgG抗体 (アッセイ性能(1)) (200 μ g/ml)	抗ヒトIgG抗体 (アッセイ性能(1)) (200 μ g/ml)	抗ヒトIgM抗体 (アッセイ性能(1)) (200 μ g/ml)	抗ヒトIgM抗体 (アッセイ性能(1)) (200 μ g/ml)
プリントバッファー (陰性対照)	抗ヒトIFN γ 抗体 (捕捉要素) (200 μ g/ml)	抗ヒトIFN γ 抗体 (捕捉要素) (200 μ g/ml)	抗ヒトTNF α 抗体 (捕捉要素) (200 μ g/ml)	抗ヒトTNF α 抗体 (捕捉要素) (200 μ g/ml)
ビオチン化抗 ヒトIgG (アッセイ性能(3)) 50 μ g/ml	抗ヒトIL4抗体 (捕捉要素) (200 μ g/ml)	抗ヒトIL4抗体 (捕捉要素) (200 μ g/ml)	プリントバッファー (陰性対照)	プリントバッファー (陰性対照)
プリントバッファー (陰性対照)	プリントバッファー (陰性対照)	プリントバッファー (陰性対照)	プリントバッファー (陰性対照)	プリントバッファー (陰性対照)
ストレプト アビジン- ペルオキシダーゼ (比色定量対照) (400 μ g/ml)	ヒトIgG (50 μ g/ml) (アッセイ性能(2))	ヒトIgG (50 μ g/ml) (アッセイ性能(2))	ヒトIgG (50 μ g/ml) (アッセイ性能(2))	抗ヒトIgG- ペルオキシダーゼ (50 μ g/ml) (基準点マーカー)

30

40

50

【0157】

プリントされたアレイは、まず、37 で60分間ブロッカーと共にインキュベートすることにより、サイトカインの量を測定するために使用した。

【0158】

既知量のサイトカインを加えた (spiked) ヒト血清を、膜プレート上の96アレイの各々に添加した。膜を37 で60分間インキュベートし、結合しなかった物質をPBS-Tで洗浄除去した。

【0159】

アレイされた抗体に結合したサイトカインを、ビオチン化抗サイトカイン抗体およびストレプトアビジンにコンジュゲートした西洋ワサビペルオキシダーゼとの逐次インキュベーションにより検出した。ビオチン化された、抗ヒトIgG抗体および抗ヒトIgM抗体と共にインキュベートした後に、ストレプトアビジン-HRPを添加することにより、陽性対照を検出した。次いで、各スポットにおけるペルオキシダーゼの量を、金属増感型ジアミノベンジジンを使用することにより測定した。

10

【0160】

この実験において、アレイ上のアッセイ性能(2)抗体は、実施例3において好ましい、ビオチン化抗ヒトサイトカイン抗体を検出した抗体であるのではなく、アッセイ性能(1)対照(即ち、ビオチン化された、抗ヒトIgG抗体および抗ヒトIgM抗体)を解明するための二次抗体を検出した。

【0161】

20

1.25 µg/mlのTNF および0.32ng/mlのIFN を加えた (spiked) ヒト血清試料の処理から得られた結果の代表的な例を、図3に示す。破線は、それより上であれば結果が陽性であると見なされるシグナルの閾値を表す。閾値は、陰性対照スポットのシグナル強度に基づいており、そのシグナルの2倍である。試験された試料についてのデータを表10にも示す。

【0162】

(表10) 実施例5の結果

試料番号	試験	結果	注釈
1	IgG	陽性	試料は血清であった
	IgM	陽性	試料は血清であった
	IFN γ	陽性	存在するサイトカイン
	TNF α	陽性	存在するサイトカイン
	IL4	陰性	存在しない

30

【0163】

実施例6

感染性疾患抗原に反応性である試料中の抗体の検出のための抗原アレイ

表11に挙げられた試薬を、抗原アレイの製造および処理のために使用した。

【0164】

(表11) 抗体検出アッセイ試薬

40

試薬	供給元	カタログ番号	機能
抗マウス抗体ペルオキシダーゼ	Pierce	31430	発色反応
組換えB型肝炎コア抗原	BiosPacific	J44400352	捕捉要素
組換えB型肝炎表面抗原 ad	BiosPacific	J44050228	
組換えB型肝炎表面抗原 ay	BiosPacific	J44030228	
adおよびayサブタイプと反応性のマウス抗B型肝炎抗体	BiosPacific	A34060259P	
CMV E1A IgG抗原	BiosPacific	J43010230	
CMV E1A IgM抗原	BiosPacific	J43020230	
インフルエンザA抗原	BiosPacific	J43610149	
インフルエンザB抗原	BiosPacific	J43620149	
ヤギ抗ヒトIgG 西洋ワサビペルオキシダーゼ	Pierce	31412	基準点マーカーおよび発色反応
ヤギ抗ヒトIgM 西洋ワサビペルオキシダーゼ	Pierce	31415	発色反応
ヤギ抗ヒトIgG抗体	Pierce	31119	試料添加を検出する (アッセイ性能(1)) IgGおよびIgMのアッセイ性能(1) 対照との結合を検出する
マウス抗ヒトIgM抗体	BioLegend	314501	
ヒトIgG	Pierce	31154	抗体添加の検出を検出する (アッセイ性能(1))
ヤギIgG	Pierce	31212	アッセイ特異性

10

20

【0165】

アレイを5×5グリッドでプリントした。対照抗体および組換え抗原または精製された抗原を、表12に記載する様々な濃度でプリントした。

【0166】

(表12) 抗体検出のための抗原アッセイの設計

抗ヒトIgG- ペルオキシダーゼ 50 µg/ml	CMV E1A IgG Ag 0.5 mg/ml	CMV E1A IgG Ag 0.5 mg/ml	CMV E1A IgM Ag 0.5 mg/ml	CMV E1A IgM Ag 0.5 mg/ml
プリントバッファー	B型肝炎表面Ag ad 0.25 mg/ml	B型肝炎表面Ag ad 0.25 mg/ml	B型肝炎表面Ag ay 0.25 mg/ml	B型肝炎表面Ag ay 0.25 mg/ml
抗ヒトIgM抗体	インフルエンザA Ag 0.25 mg/ml	インフルエンザA Ag 0.25 mg/ml	インフルエンザB Ag 0.25 mg/ml	インフルエンザB Ag 0.25 mg/ml
プリントバッファー	B型肝炎コアAg 0.25 mg/ml	B型肝炎コアAg 0.25 mg/ml	プリントバッファー	プリントバッファー
抗ヒトIgG- ペルオキシダーゼ 50 µg/ml	抗ヒトIgG抗体 0.2 mg/ml	ヒトIgG 0.01 mg/ml	ヤギIgG 0.2 mg/ml	抗ヒトIgG- ペルオキシダーゼ 50 µg/ml

30

40

【0167】

プリントされたアレイを、まず、37 °Cで60分間ブロッカーと共にインキュベートした。

【0168】

adおよびayサブタイプに反応性である10 µg/mlの抗B型肝炎抗体を加えた(spiked)ヒト血清を、アレイを含有しているプレートの行Aに添加し、行AからGまでブロッカーで2倍希釈された。行Hはブロッカー溶液のみを含有していた。膜を37 °Cで60分間インキュベ-

50

トし、結合していない抗体をPBS-Tで洗浄除去した。

【0169】

アレイされた抗原に結合した抗体を、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート抗マウスIgG抗体、ならびに抗ヒトIgG抗体およびIgM抗体の混合物とのインキュベーションにより検出した。次いで、各スポットにおけるペルオキシダーゼの量を、金属増感型ジアミノベンジジンを使用することにより測定した。

【0170】

図4に示されるように、アッセイは、adおよびayサブタイプに反応性の抗B型肝炎抗体の存在に関する陽性シグナルを返した。その他の抗原からのシグナルは、陽性の試験結果についての閾値未満であり、このことから、アレイの特異性が強調された。

10

【0171】

実施例7

基準点マーカーのプリント濃度の最適化

50 μ lのプリントバッファーを、凍結乾燥BlueRanger Prestained Protein Molecular Weight Marker (Pierce, カタログ番号 26681) の3本のチューブの各々に添加した。3つのタンパク質溶液をプールし、チューブ1と名称を付けたマイクロチューブに移した。他の4本のマイクロチューブに2~5と名称を付け、62 μ lのプリントバッファーを各チューブに添加した。

【0172】

着色済みタンパク質を、チューブ1から5まで2倍希釈して、アレイをプリントするために使用した。アレイ構成を表13に示す。

20

【0173】

(表13)アレイ構成

未希釈着色済みタンパク質	未希釈着色済みタンパク質
2分の1希釈のタンパク質	2分の1希釈のタンパク質
4分の1希釈のタンパク質	4分の1希釈のタンパク質
8分の1希釈のタンパク質	8分の1希釈のタンパク質
16分の1希釈のタンパク質	16分の1希釈のタンパク質

【0174】

アレイを走査し分析した。その結果は図5に示す。図中、X軸の単位はチューブを示し、従って、希釈率を示す。

30

【0175】

実施例8

抗IgE抗体検出のためのアレルゲンアレイ

組換え法により入手されたアレルゲン、または、例えば、チリダニ、草、および木の花粉、動物のフケ、カビ、昆虫毒、ならびにダイズタンパク質、乳タンパク質、様々な木の実、穀類、および豆科植物に由来するタンパク質、エビ、アワビ、およびロブスターのような魚介類に由来するタンパク質のような食品等に由来するアレルゲンのような関心対象のアレルゲンに対するIgE抗体の検出のためのアレイを、IgE抗体の特異的な捕捉のための捕捉要素としてアレルゲンのパネルをプリントすることにより作出する。一連の対照抗体および対照タンパク質もプリントする。これらの対照は多様な機能を果たし、個々の試薬の性能を含むアッセイ性能をモニタリングするための対照、アッセイの特異性をモニタリングするための対照、およびアレイ中の各スポットにおけるシグナル強度の決定のために試料処理の後にアレイのグリッドを形成するための基準点マーカーを含む。表14は、アレルゲンアレイをプリントし処理するために使用され得る例示的な試薬を要約している。

40

【0176】

(表14)アレルゲンアッセイ試薬

試薬	機能	例	注釈
色素生産性色素または酵素とコンジュゲートしたタンパク質または抗体	グリッド形成ソフトウェアが、アレイの各スポットの位置を特定し、そこにグリッドを設置することを可能にする基準点マーカー	BlueRanger色素とコンジュゲートしたタンパク質マーカーまたは抗体-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート	
プリントバッファー	アレイ中のバックグラウンドシグナルを決定するための陰性対照		
抗IgE抗体 (アッセイ性能対照1)	試料中の総IgGの存在を決定する	マウス抗ヒトIgE抗体	血清中のIgEの存在はIgEのこのスポットとの結合をもたらすであろう; 非ヒト試料が試験される場合には、抗体は試験される種に由来するIgEの捕捉のために適切なものに交換されるであろう
ハプテン結合 タンパク質-酵素 コンジュゲート	酵素基質の性能をモニタリングするための陽性比色定量対照	ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ	
抗ヒトIgG抗体 (アッセイ性能対照1)	試料の添加を証明するための対照		血清の添加は血清IgGのこのスポットとの結合をもたらすであろう; 非ヒト試料が試験される場合には、抗体は試験される種に由来するIgGの捕捉のために適切なものに交換されるであろう
IgE (アッセイ性能対照2)	二次検出抗体の添加を証明するための対照	ヒトIgE	二次抗体がIgGと結合するであろう; 非ヒト試料が試験される場合には、抗体は試験される種に由来する抗IgEの捕捉のために適切なものに交換されるであろう
非特異抗体	抗原捕捉特異性(アッセイ特異性)を決定するための陰性対照	ハムスターIgG	アレイパネルおよび検出試薬に提示されていない種に由来するIgG
抗体の捕捉のための試験アレルゲンのパネル	患者IgEのアレルゲン(捕捉要素)に対する特異性を決定するための診断試験	チリダニ抽出物	試験アレルゲンの各々は二つ組でまたは単一のスポットとしてプリントされ得る(16の試験のパネルの場合)

10

20

30

40

【0177】

アレイを、表15に記載する5×5グリッドでプリントする。対照抗体を、対照抗体から得られたシグナルに依り、0.1mg/ml～1.0mg/mlの範囲の濃度でプリントする。試験アレルゲンを、陽性対照の生物学的試料からの試験抗体に対する抗原の親和性に依り、0.05mg/ml～1.0mg/mlの範囲の濃度でプリントする。

【0178】

(表15) IgE抗体検出のためのアレルゲンアレイの設計

50

基準点マーカー	試験アレルゲン 1	試験アレルゲン 1	試験アレルゲン 2	試験アレルゲン 2
プリントバッファー (陰性対照)	試験アレルゲン 3	試験アレルゲン 3	試験アレルゲン 4	試験アレルゲン 4
抗IgE抗体 (アッセイ性能(1))	試験アレルゲン 5	試験アレルゲン 5	試験アレルゲン 6	試験アレルゲン 6
プリントバッファー (陰性対照)	試験アレルゲン 7	試験アレルゲン 7	試験アレルゲン 8	試験アレルゲン 8
HRPと コンジュゲートした タンパク質 (比色定量対照)	抗ヒトIgG抗体 (アッセイ性能(1))	IgE (アッセイ性能(2))	非交差反応性種 由来の抗体 (アッセイ特異性)	基準点マーカー

10

20

【0179】

プリントされたアレイを、まず、37℃で60分間ブロッカーと共にインキュベートすることにより、抗体の存在を測定するために使用する。

【0180】

最大96の異なる試験される試料(例えば、血清または血漿)を、個々のウェルに添加してもよい。試料を希釈せずに添加してもよいし、または試験ウェルへの添加前にブロッカーで希釈してもよい。膜を37℃で60分間インキュベートし、結合していない物質をPBS-Tで洗浄除去する。

30

【0181】

アレイされた抗原に結合した抗体を、酵素コンジュゲート二次抗体またはコロイド金のような有色分子とコンジュゲートした二次抗体とのインキュベーションにより検出する。次いで、各スポットにおける酵素の量を、スポットに有色沈殿物を沈着させる基質を使用することにより測定する。陽性対照を以下のように検出する：比色定量対照は、酵素基質の添加により検出した。アッセイ性能対照(1)は、血清試料中のIgGに結合すると考えられ、二次抗体-酵素コンジュゲートおよび酵素基質の添加により検出される。アッセイ性能(2)対照は、二次抗体-酵素コンジュゲートに結合すると考えられ、酵素基質の添加により検出される。アッセイ性能(1)対照は、血清試料中のIgEに結合すると考えられ、二次抗体-酵素コンジュゲートおよび酵素基質の添加により検出される。

40

【0182】

実施例9

抗体と抗原の混成アレイ

血清中のサイトカインおよびその他のタンパク質バイオマーカーのような抗体および抗原の存在を同時に検出するためのアレイを、分析物の特異的な捕捉のための捕捉要素として対応する同族の抗原および抗体のパネルをプリントすることにより作出する。一連の対照抗体および対照タンパク質もプリントする。これらの対照は、個々の試薬の性能を含む

50

アッセイ性能のモニタリング、アッセイの特異性のモニタリング、およびアレイ中の各スポットにおけるシグナル強度の決定のために試料処理の後にアレイをグリッド形成するための基準点マーカーなどの、多様な機能を果たす。表16は、これらの混成アレイをプリントし処理するために使用され得る例示的な試薬を要約している。

【 0 1 8 3 】

(表 1 6) 抗体と抗原の混成アレイ試薬

試薬	機能	例	注釈
色素生産性色素または酵素とコンジュゲートしたタンパク質または抗体	グリッド形成ソフトウェアが、アレイの各スポットの位置を特定し、そこにグリッドを設置することを可能にする基準点マーカー	BlueRanger色素とコンジュゲートしたタンパク質マーカーまたは抗体-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート	
プリントバッファー	アレイ中のバックグラウンドシグナルを決定するための陰性対照		
抗二次抗体IgG (アッセイ性能対照3)	二次検出抗体の性能をモニタリングする	マウスIgG抗体	二次抗体の添加はIgGのこのスポットとの結合をもたらすであろう; スポットされる抗体は二次抗体カクテルの内容に依って変動するであろう
ハプテン結合タンパク質-酵素コンジュゲート	酵素基質の性能をモニタリングするための陽性比色定量対照	ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ	
抗IgG抗体 (アッセイ性能対照1)	試料の添加を証明するための対照		血清の添加は血清IgGのこのスポットとの結合をもたらすであろう; 非ヒト試料が試験される場合には、抗体は試験される種に由来するIgGの捕捉のために適切なものに交換されるであろう
IgG (アッセイ性能対照2)	二次検出抗体の添加を証明するための対照	ヒトIgG	二次抗体がIgGと結合するであろう; 非ヒト試料が試験される場合には、抗体は試験される種に由来するIgGの捕捉のために適切なものに交換されるであろう
非特異抗体	抗原捕捉特異性 (アッセイ特異性) を決定するための陰性対照	ハムスターIgG	アレイパネルおよび検出試薬に提示されていない種に由来するIgG
抗体の捕捉のための試験抗原のパネル	患者のIgGまたはIgMの抗原に対する特異性を決定するための診断試験 (捕捉要素)	抗核抗原 (ANA)	試験抗原の各々は二つ組でまたは単一のスポットとしてプリントされ得る (16テストのパネルの場合)
抗原との結合のための試験抗体のパネル	患者試料中の抗原の存在を決定するための診断試験 (捕捉要素)	C反応性タンパク質	試験抗体の各々は二つ組でまたは単一のスポットとしてプリントされ得る (16の試験のパネルの場合)

10

20

30

40

【 0 1 8 4 】

アレイを、表17に記載する5×5グリッドでプリントする。対照抗体を、対照抗体から得

50

られたシグナルに依り、0.1mg/ml ~ 1.0mg/mlの範囲の濃度でプリントする。試験抗原および試験抗体は、陽性対照の生物学的試料からの試験抗体に対する抗原の親和性に依り、0.05mg/ml ~ 1.0mg/mlの範囲の濃度でプリントする。

【 0 1 8 5 】

(表 1 7) 抗体と抗原の混成アレイ

基準点マーカー	試験抗原1	試験抗原1	試験抗原2	試験抗原2
プリントバッファー (陰性対照)	試験抗原3	試験抗原3	試験抗原4	試験抗原4
抗二次抗体 IgG抗体 (アッセイ性能 (3))	試験抗体1	試験抗体1	試験抗体2	試験抗体2
プリントバッファー (陰性対照)	試験抗体3	試験抗体3	試験抗体4	試験抗体4
HRPと コンジュゲートした タンパク質 (比色定量対照)	抗ヒトIgG抗体 (アッセイ性能 (1))	IgG (アッセイ性能 (2))	非交差反応性種 由来の抗体 (アッセイ特異性)	基準点マーカー

【 0 1 8 6 】

プリントされたアレイを、まず、37 °Cで60分間ブロッカーと共にインキュベートすることにより、抗原および抗体の存在を測定するために使用する。

【 0 1 8 7 】

最大96の異なる被験試料、例えば血清または血漿を、個々のウェルに添加する。試料を希釈せずに添加してもよいし、または試験ウェルへの添加前にブロッカーで希釈してもよい。膜を37 °Cで60分間インキュベートし、結合していない物質をPBS-Tで洗浄する。

【 0 1 8 8 】

アレイされた試薬に結合した抗原および抗体を、酵素コンジュゲート二次抗体またはコロイド金のような有色分子とコンジュゲートした二次抗体とのインキュベーションにより検出する。次いで、各スポットにおける酵素の量を、スポットに有色沈殿物を沈着させる基質の使用により測定する。陽性対照を以下のように検出する。比色定量対照は、酵素基質の添加により検出した。アッセイ性能対照 (1) は、血清試料中のIgGに結合すると考えられ、二次抗体-酵素コンジュゲートおよび酵素基質の添加により検出される。アッセイ性能 (2) 対照は、二次抗体-酵素コンジュゲートに結合すると考えられ、酵素基質の添加により検出される。アッセイ性能 (3) 対照は、二次IgG (検出抗体) に結合すると考えられ、検出抗体-酵素コンジュゲートおよび酵素基質の添加により検出される。

【 0 1 8 9 】

実施例10

血清試料中の抗体の検出のための上気道ウイルス病原体アレイ

表18に挙げられた試薬を、抗原アレイの製造および処理のために使用した。

【 0 1 9 0 】

(表 1 8) 抗体検出アッセイ試薬

試薬	供給元	カタログ番号	機能
抗マウス抗体ペルオキシダーゼ	Pierce	31430	発色反応
アデノウイルス抗原	Virion	1121	捕捉要素
サイトメガロウイルスCF抗原	Virion	1130	
インフルエンザA抗原	Microbix	EL-13-02	
インフルエンザB抗原	Microbix	EL-14-02	
パラインフルエンザ3抗原	Microbix	EL-10-02	
呼吸器合胞体ウイルス抗原	Virion	1124	
サイトメガロウイルスIgG抗原	BiosPacific	J43010230	
インフルエンザA抗原	BiosPacific	J43610149	
ヤギ抗ヒトIgG西洋ワサビペルオキシダーゼ	Pierce	31412	基準点マーカーおよび発色反応
ヤギ抗ヒトIgG抗体	Pierce	31119	試料添加を検出する (アッセイ性能 (1)) IgGおよびIgMの アッセイ性能 (1) 対照 との結合を検出する
マウス抗ヒトIgM抗体	BioLegend	314501	
ヒトIgG	Pierce	31154	検出抗体添加を検出する (アッセイ性能 (2))
マウスIgG	Pierce	31202	アッセイ特異性
ヤギ抗マウスIgG	Pierce	31164	アッセイ特異性

10

20

【 0 1 9 1 】

アレイを5×5グリッドでプリントした。対照抗体および組換え抗原または精製された抗原を、表19に記載する様々な濃度でプリントした。

【 0 1 9 2 】

(表 1 9) 抗体検出のための上気道ウイルス病原体アッセイの設計

抗マウスIgG- ペルオキシダーゼ 0.1 mg/ml	アデノウイルスAg 2倍希釈	アデノウイルスAg 2倍希釈	CMV CF Ag 2倍希釈	CMV CF Ag 2倍希釈
プリント バッファー	インフルエンザA Ag (Microbix) 0.50 mg/ml	インフルエンザA Ag (Microbix) 0.50 mg/ml	インフルエンザB Ag 0.40 mg/ml	インフルエンザB Ag 0.40 mg/ml
抗マウスIgG抗体 0.05 mg/ml	パラインフルエンザ3 Ag 1.0 mg/ml	パラインフルエンザ3 Ag 1.0 mg/ml	RSV Ag 2倍希釈	RSV Ag 2倍希釈
プリント バッファー	CMV E1A IgG Ag 0.40 mg/ml	CMV E1A IgG Ag 0.40 mg/ml	インフルエンザA Ag (Biospacific) 0.40 mg/ml	インフルエンザA Ag (Biospacific) 0.40 mg/ml
ヒトIgG 0.01 mg/ml	マウスIgG 0.01 mg/ml	抗ヒトIgG 0.025 mg/ml	抗ヒトIgM 0.1 mg/ml	抗マウスIgG- ペルオキシダーゼ 0.1 mg/ml

30

40

【 0 1 9 3 】

プリントされたアレイを、まず、37℃で60分間ブロッカーと共にインキュベートした。ヒト血清試料を、アレイを含有しているプレートの行Aに100分の1の希釈率で添加し、行AからGまでブロッカーで2倍希釈した。行Hはブロッカー溶液のみを含有していた。膜を37℃で60分間インキュベートし、結合していない抗体をPBS-Tで洗浄除去した。

【 0 1 9 4 】

アレイされた抗原に結合した抗体を、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート抗マ

50

ウスIgG抗体とのインキュベーションにより検出した。次いで、各スポットにおけるペルオキシダーゼの量を、金属増感型ジアミノベンジジンを使用することにより測定した。

【0195】

図6は、アレイ上の6種のウイルス抗原の各々に対する抗体の存在に関する、800分の1の希釈率の6個のヒト血清試料の結果を示す。100000というシグナル強度閾値を、陽性試験のために設定した。アッセイは、アレイ上の抗原のいくつかに関して陽性シグナルを返した。その他の抗原からのシグナルは、陽性の試験結果についての閾値未満であり、このことから、アレイされた抗原に対する血清抗体の存在を決定するアレイの能力が強調された。この閾値に基づき、表20に示される結果を得た。

【0196】

【表20】

試料	アデノ	CMV	Flu A	Flu B	Para3	RSV
1	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性
2	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
3	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性
4	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陽性
5	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
12	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性

【0197】

実施例11

血清試料中の抗B型肝炎抗体の検出のためのB型肝炎抗原アレイ

表21に挙げられた試薬を、抗原アレイの製造および処理のために使用した。

【0198】

(表21) 抗B型肝炎抗体の検出アッセイ試薬

試薬	供給元	カタログ番号	機能
抗マウス抗体ペルオキシダーゼ	Pierce	31430	発色反応
B型肝炎表面抗原「ad」	BiosPacific	J44010031	捕捉要素
B型肝炎表面抗原「ay」	BiosPacific	J44020031	
B型肝炎「E」抗原	BiosPacific	J44200352	
B型肝炎コア抗原	BiosPacific	J44400352	
ヤギ抗ヒトIgG西洋ワサビペルオキシダーゼ	Pierce	31412	基準点マーカーおよび発色反応
ヤギ抗ヒトIgG抗体	Pierce	31119	試料添加を検出する (アッセイ性能(1)) IgGおよびIgMの アッセイ性能(1) 対照との 結合を検出する
ヒトIgG	Pierce	31154	検出抗体添加を検出する (アッセイ性能(2))
ヤギ抗マウスIgG	Pierce	31164	アッセイ特異性

【0199】

アレイを5×3グリッドでプリントした。対照抗体および組換え抗原または精製された抗原を、表22に記載する様々な濃度でプリントした。

【0200】

(表22) 抗B型肝炎抗体検出のための抗原アッセイの設計

10

20

30

40

抗マウスIgG- ペルオキシダーゼ 0.1 mg/ml	B型肝炎表面抗原 「ad」 0.2 mg/ ml	B型肝炎表面抗原 「ad」 0.2 mg/ ml
プリントバッファー	B型肝炎表面抗原 「ay」 0.2 mg/ ml	B型肝炎表面抗原 「ay」 0.2 mg/ ml
抗マウスIgG抗体 0.2 mg/ml	B型肝炎「E」抗原 0.2 mg/ ml	B型肝炎「E」抗原 0.2 mg/ ml
プリントバッファー	B型肝炎コア抗原 0.2 mg/ ml	B型肝炎コア抗原 0.2 mg/ ml
抗ヒトIgG抗体 0.2 mg/ml	ヒトIgG 0.05 mg/ml	抗マウスIgG- ペルオキシダーゼ 0.1 mg/ml

10

【0201】

プリントされたアレイを、まず、37 で60分間ブロッカーと共にインキュベートした。ヒト血清試料を、アレイを含有しているプレートの行Aに100分の1の希釈率で添加し、行AからGまでブロッカーで2倍希釈した。行Hはブロッカー溶液のみを含有していた。膜を37 で60分間インキュベートし、結合していない抗体をPBS-Tで洗浄除去した。

20

【0202】

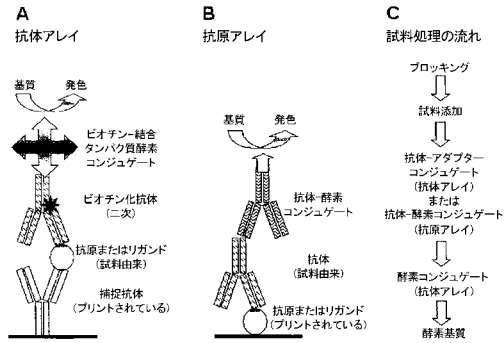
アレイされた抗原に結合した抗体を、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート抗ヒトIgG抗体とのインキュベーションにより検出した。次いで、各スポットにおけるペルオキシダーゼの量を、金属増感型ジアミノベンジジンを使用することにより測定した。図7は、アレイ上の4種のB型肝炎抗原の各々に対する抗体の存在に関する、4000分の1の希釈率で試験された10個のヒト血清試料の結果を示す。

【0203】

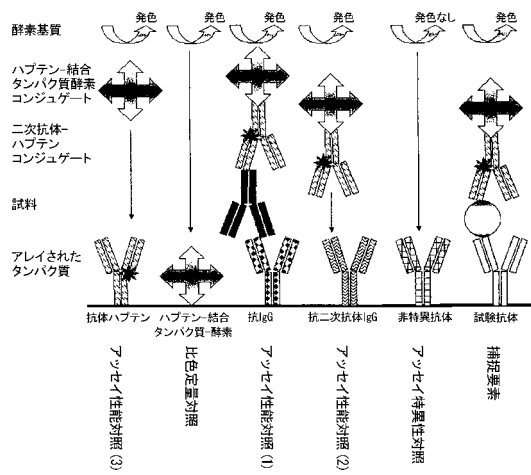
本発明が上記の実施例に関連して記載されたが、変更および変動が本発明の本旨および範囲内に包含されることが理解されるであろう。従って、本発明は以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。

30

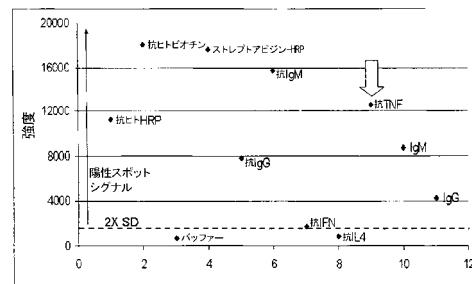
【 図 1 】



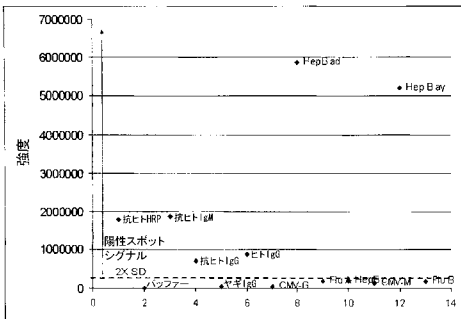
【 図 2 】



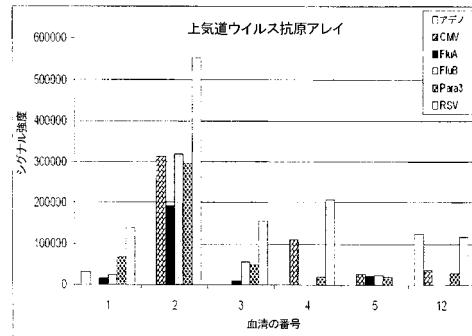
【 図 3 】



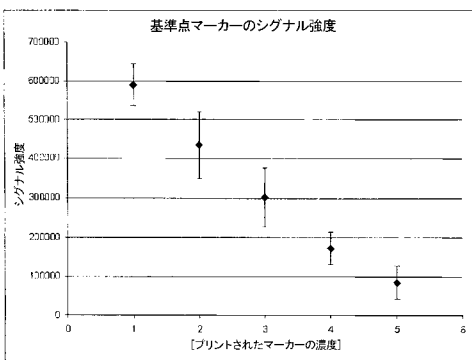
【 図 4 】



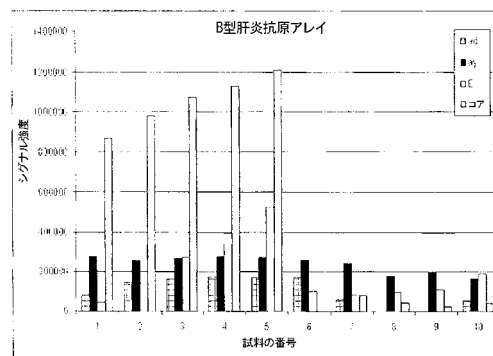
【 図 6 】



【 図 5 】



【 図 7 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 07/82732
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/53 (2008.04) USPC - 435/4, 435/7.1, 436/510 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) USPC - 435/4, 435/7.1, 436/510 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/7.9, 436/501 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); PubMed; Google Scholar Search Terms Used: Detect, target, analyte, Cytokine, TNF, pair, two, repeat, capture, progesterone, growth hormone, serum cortisol, testosterone, microporous, membrane		
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 2005/0153381 A1 (MARUSICH et al.) 14 July 2005 (14.07.2005) entire document, especially para[0045], [0050], [0135], [0141], [0145], [0164], [0171], [0363], [0518], [0519]	1-3, 11-18 <hr/> 4-10
Y	US 2005/0003398 A1 (TAO et al.) 06 January 2005 (06.01.2005) entire document, especially para [0012], [0057]	7-10
Y	US 2005/0211559 A1 (KAYYEM.) 29 September 2005 (29.09.2005) entire document, especially para [0019]	4-6, 8-10
<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 06 May 2008 (06.05.2008)		Date of mailing of the international search report 20 MAY 2008
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. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

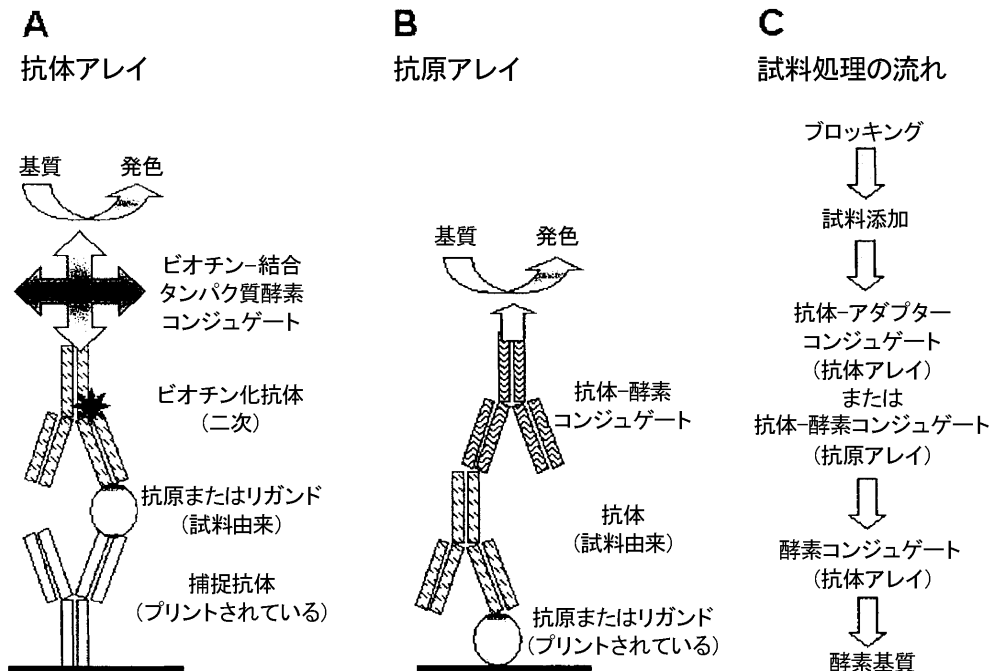
フロントページの続き

(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, MT, 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, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, 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

- (74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74) 代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
- (74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 クンブル サリタ
ニュージーランド オークランド グレンドウィー マウント テイラー ドライブ 63

【要約の続き】



专利名称(译)	分析膜和使用方法		
公开(公告)号	JP2010511177A	公开(公告)日	2010-04-08
申请号	JP2009539389	申请日	2007-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	图片之三有限公司		
申请(专利权)人(译)	Pikuta有限公司		
[标]发明人	クンブルサリタ		
发明人	クンブル サリタ		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N2800/52 B01L3/5025 B01L3/5085 B01L3/50855 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/543.525.C G01N33/543.525.U G01N33/531.B		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关		
优先权	60/861771 2006-11-28 US		
其他公开文献	JP5240945B2 JP2010511177A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测样品中至少一种目标分析物的微孔膜。所述膜包括阵列，所述阵列包括至少一个捕获元件和印刷在膜表面上的至少一个控制元件，所述至少一个捕获元件对应于并且能够结合目标分析物，所述多个控制元件，当存在时包括：i) 至少一个基准标记，ii) 至少一个阴性对照以监测背景信号，iii) 至少一个阴性对照以监测测定特异性，iv) 至少一个阳性比色对照，v) 至少一个阳性对照监测分析性能或其任何组合。

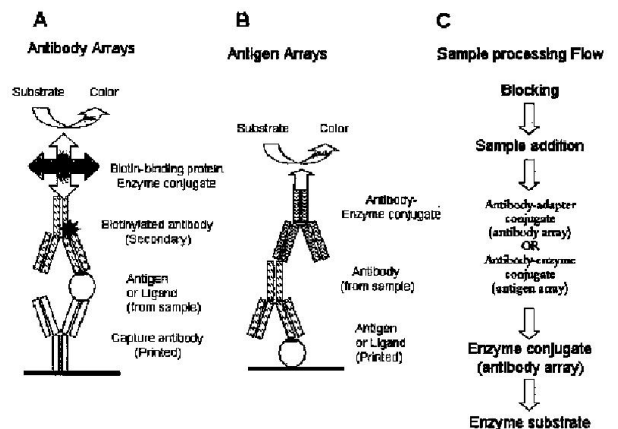


FIG. 1