

(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2015-522825  
(P2015-522825A)

(43) 公表日 平成27年8月6日(2015. 8. 6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006. 01)</b>	GO 1 N 33/53 N	2GO54
<b>GO 1 N 33/543 (2006. 01)</b>	GO 1 N 33/543 581W	
<b>GO 1 N 33/569 (2006. 01)</b>	GO 1 N 33/543 581H	
<b>GO 1 N 33/556 (2006. 01)</b>	GO 1 N 33/569 L	
<b>GO 1 N 21/82 (2006. 01)</b>	GO 1 N 33/556	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-523269 (P2015-523269)  
 (86) (22) 出願日 平成25年7月18日 (2013. 7. 18)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年2月6日 (2015. 2. 6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/051165  
 (87) 国際公開番号 W02014/015194  
 (87) 国際公開日 平成26年1月23日 (2014. 1. 23)  
 (31) 優先権主張番号 61/673, 215  
 (32) 優先日 平成24年7月18日 (2012. 7. 18)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510089007  
 セラノス, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 943  
 04, パロアルト, ページミル  
 ロード 1701  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔  
 (74) 代理人 230113332  
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 凝集の検出および測定のための方法

(57) 【要約】

凝集検定を遂行および分析するための方法、組成物、システム、および機器が提供される。一態様では、凝集検定の画像分析のための方法が提供される。別の態様では、凝集検定を遂行するための方法が提供される。一態様では、前記方法は、ウイルスまたはウイルスに対する抗体を含む、様々な分子の検出のために用いられ得る。別の態様では、前記方法は、被験者の有効な免疫化を決定するために用いられ得る。本明細書で提供される開示中の、被験者からの生物学的サンプルを含む、混合物中の粒子凝集の検定方法を含む実施形態では、この方法は、サンプル中のウイルスまたは抗体の量の決定を許容する。

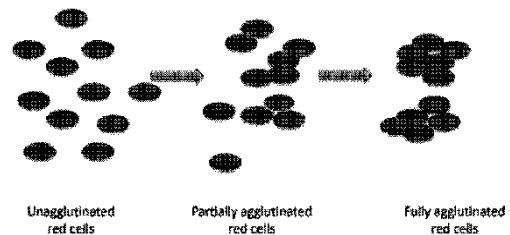


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生物学的サンプル中の抗体の存在を決定するための方法であって前記抗体は選択的にウイルス粒子に結合し、前記方法は：

( a ) 赤血球、ウイルス粒子、および前記抗体を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、前記ウイルス粒子との相互作用を介する赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および

( b ) 混合物中で凝集が起きるかを検出することを含み、この凝集の不在は前記抗体の存在を示し、

前記ステップ ( a ) ~ ( b ) は 1 時間未満で生じる方法。

10

## 【請求項 2】

前記赤血球があらかじめ固定された、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記赤血球が、グルタルアルデヒドによる処理によりあらかじめ固定された、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記赤血球が、シチメンチョウ赤血球細胞を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 5】

前記ウイルス粒子がインフルエンザウイルスを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記生物学的サンプルが、血漿または血清を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7】

前記血漿または血清が、ウイルス粒子に対するワクチンを投与された被験者からのものである、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記生物学的サンプルが、ノイラミニダーゼにより前処理された、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

30

## 【請求項 9】

前記処理が、生物学的サンプルをノイラミニダーゼと共にインキュベートすることにより遂行され、および前記混合物中のノイラミニダーゼ最終的な濃度が 0 . 1 ~ 1 . 5 U / L である、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記が、前記サンプルを活性化ノイラミニダーゼと 30 分未満インキュベートすることにより遂行される、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記生物学的サンプルがステップ ( a ) に先立って、連続的に希釈される、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

40

## 【請求項 12】

前記ステップ ( a ) ~ ( b ) が約 30 ~ 60 分で生じる、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 13】

前記前記凝集の存在が、赤血球 - ウイルス粒子クラスターの形成により証明され、および前記クラスターは、光学的機器の画像化領域において捕捉され、および前記検出ステップは：

( i ) 前記光学的機器により、前記クラスターの複数の画像を、前記画像化領域の異なる位置において捕捉すること；および

( i i ) 凝集の発生を前記画像の分析に基づいて検出することを含む、請求項 1 ~ 12

50

のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記光学的機器がカメラを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記光学的機器が顕微鏡を含む、請求項 13 または 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

前記画像化領域が、マイクロ流体性チャネルの中に存在する、請求項 13 ~ 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

前記分析が、前記画像のそれぞれにおいて捕捉された個々の赤血球の中心から中心への距離に基づいて、前記クラスターのサイズを計算することを含む、請求項 13 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 18】

前記ステップ (a) が、前記ウイルス粒子および前記生物学的サンプルの混合物を、赤血球を添加する前にインキュベートすることを含む、請求項 13 ~ 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

生物学的サンプル中の抗体の存在を決定するための方法であって前記抗体は選択的にウイルス粒子に結合し、前記方法は：

20

(a) 赤血球、ウイルス粒子、および前記抗体を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、前記ウイルス粒子との相互作用を介する赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および

(b) 光学的機器の支援により、混合物の画像を捕捉することを含み、画像中の赤血球 - ウイルスの粒子クラスターの存在が、凝集の発生および検出可能な量の抗体の欠如を示し、およびクラスターの不在は、凝集の欠如および検出可能な量の抗体の存在を示す方法。

【請求項 20】

前記赤血球 - ウイルス粒子クラスターの形成が、前記画像に捕捉された、赤血球の中心から中心への距離を評価することにより決定される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

30

前記ステップ (a) が、前記ウイルス粒子および前記生物学的サンプルの混合物を、赤血球を添加する前にインキュベートすることを含む、請求項 19 または 20 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

生物学的サンプル中の抗体の存在を決定するための方法であって、前記抗体は選択的にウイルス粒子に結合し、前記方法は：

(a) 赤血球、およびウイルス粒子を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、前記ウイルス粒子との相互作用を介する赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および

(b) 前記混合物中で、凝集が発生するかを検出することを含み、前記凝集の存在が、前記ウイルス粒子の存在を示し、

40

ステップ (a) ~ (b) は 1 時間未満で生じる方法。

【請求項 23】

生物学的サンプル中のウイルス粒子の存在を決定するための方法であって：

(a) 赤血球およびウイルスの粒子を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、ウイルスの粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および

(b) 光学的機器の支援により、混合物の画像を捕捉することを含み、画像中の赤血球 - ウイルスの粒子のクラスターの存在が、凝集の発生および検出可能な量のウイルスの粒子の欠如を示し、およびクラスターの不在は、凝集の欠如および検出可能な量のウイルス

50

の粒子の欠如を示す方法。

【請求項 2 4】

被験者の有効な免疫化を決定するための方法であって、前記方法は：

( a ) ウイルス粒子に対する第一のワクチンの第一の用量で免疫化された被験者からの生物学的サンプルを得ること

( b ) 赤血球、ウイルスの粒子および抗体を含む生物学的サンプルの混合物を、ウイルスの粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および

( c ) サンプル中のウイルスに対する抗体の濃度を、赤血球の凝集により形成されたクラスターに基づき決定することを含み、

および前記ステップ ( b ) ~ ( c ) は 1 時間未満で生じる方法。

【請求項 2 5】

被験者の有効な免疫化を決定するための方法であって、前記方法は：

a ) ウイルス粒子に対する第一のワクチンの第一の用量で免疫化された被験者からの生物学的サンプルを得ること；

( b ) 赤血球、ウイルス粒子、および生物学的サンプルの混合物を、ウイルス粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；

( c ) 光学的機器の支援により、混合物の画像を捕捉すること；および

( d ) サンプル中のウイルスに対する抗体の濃度を、赤血球の凝集により形成されたクラスターに基づき決定することを含み、

画像中の赤血球 - ウイルス粒子クラスターの存在が、凝集の発生および検出可能な量の抗体の欠如を示し、およびクラスターの不在が、凝集の欠如および検出可能な量の抗体の存在を示す方法。

【請求項 2 6】

前記抗体の濃度が、所定のレベルよりも低い場合に、前記ウイルス粒子に対する第一のワクチンの第二の用量を前記被験者に投与することを更に含む、請求項 2 3 または 2 4 び記載の方法。

【請求項 2 7】

前記抗体の濃度が、所定のレベルよりも低い場合に、前記ウイルス粒子に対する第一のワクチンの第二のワクチンを前記被験者に投与することを更に含む、請求項 2 3 または 2 4 び記載の方法。

【請求項 2 8】

キットであって：あらかじめ固定された赤血球、ウイルス粒子、および前記キットを抗体またはウイルスの検出に使用するための使用説明書を含むキット。

【請求項 2 9】

前記画像が顕微鏡的な画像である、請求項 1 9、2 3 または 2 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 0】

生物学的サンプル中の抗体の存在を決定するための方法であって、前記抗体は選択的にウイルス粒子に結合し、前記方法は：

( a ) 赤血球、ウイルス粒子、および前記抗体を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、前記ウイルス粒子との相互作用を介する赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および

( b ) ( a ) と同時に、または後続して、前記混合物を、その頂部に開口部を有する容器であって、内部は底部まで円錐形の容器の中に提供すること；

( c ) 少なくとも前記混合物の一部が前記容器の頂部における開口部に、傾斜の前よりは近づくことができるように、および少なくともサンプルの一部が前記容器の中に傾斜の後よりは残存するように前記容器を傾斜すること；および

( d ) 光学的機器の支援により、前記混合物の画像を捕捉することを含み、前記傾斜された容器内の赤血球の位置は、サンプル中の前記抗体の存在または量を決定するために用

10

20

30

40

50

いられ得る方法。

【請求項 3 1】

生物学的サンプル中のウイルス粒子の存在を決定するための方法であって、前記ウイルス粒子は選択的に抗体に結合され、前記方法は：

(a) 赤血球、前記抗体、および前記ウイルス粒子を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、前記ウイルス粒子との相互作用を介する赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；

(b) (a) と同時に、または後続して、前記混合物を、その頂部に開口部を有する容器であって、内部は底部まで円錐形の容器の中に提供すること；

(c) 少なくとも前記混合物の一部が前記容器の頂部における開口部に、傾斜の前よりは近づくことができるように、および少なくともサンプルの一部が前記容器の中に傾斜の後よりは残存するように前記容器を傾斜すること；および

(d) 光学的機器の支援により、前記混合物の画像を捕捉することを含み、前記傾斜された容器内の赤血球の位置は、サンプル中の前記ウイルス粒子の存在または量を決定するために用いられ得る方法。

【請求項 3 2】

前記容器内に、分析のための 1 つ以上のゾーンが存在するかまたは確立され、および光学的信号が、それぞれのゾーンの上で測定される、請求項 3 0 または 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記 1 つ以上のゾーンの上で測定された光学的信号が、サンプル中の凝集したまたは凝集していない赤血球の量の決定に用いられ得る、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記容器内に、分析のための軸が、存在するか、または確立され、および光学的信号が、前記軸に沿って測定される、請求項 3 0 または 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記軸は、ボタン部分の中心を貫通し、および存在する場合には、充填された赤血球の液滴部分は、前記容器の底部に存在する、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記軸に沿って測定された光学的信号が、サンプル中の凝集した、または凝集していない赤血球の量を測定するために用いられる得る、請求項 3 4 または 3 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 7】

前記容器の底に充填された赤血球が特定され、および前記充填された赤血球の面積または周囲の長さが測定される、請求項 3 0 または 3 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 8】

前記方法が、前記充填された赤血球のボタン、および随意的に、液滴領域の特定のために、パターン認識方法を用いることを更に含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記充填された赤血球の面積または周囲の長さが、前記サンプル中の凝集した、または凝集していない赤血球の量を決定するために用いられ得る、請求項 3 7 または 3 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 0】

生物学的サンプル中の抗体の存在を決定するための方法であって、前記抗体は選択的に凝集粒子に結合し、前記方法は：

(a) 可視化粒子、前記凝集粒子、および前記抗体を含むことが疑われる生物学的サンプル混合物を、前記凝集粒子との相互作用を介する可視化粒子の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および

(b) 前記混合物中で凝集が生じるかを検出することを含み、前記凝集の不在は前記抗体の存在を示し、

前記ステップ (a) ~ (b) は 1 時間未満で生じる方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 4 1】  
前記可視化粒子がマイクロスフェアである、請求項 4 0 に記載の方法。
- 【請求項 4 2】  
前記凝集粒子がウイルス、プリオン、またはバクテリアを含む、請求項 4 0 または 4 1 のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 4 3】  
前記生物学的サンプルが血漿または血清を含む、請求項 4 0 ~ 4 2 のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 4 4】  
前記血漿または血清が、前記凝集粒子に対するワクチンを投与された被験者からのものである、請求項 4 3 に記載の方法。 10
- 【請求項 4 5】  
前記生物学的サンプルがノイラミニダーゼにより前処理された、請求項 4 0 ~ 4 4 のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 4 6】  
前記処理が、前記生物学的サンプルをノイラミニダーゼとインキュベートすることにより遂行され、および前記ノイラミニダーゼの前記混合物中の最終的な濃度が 0 . 1 ~ 1 . 5 U / L である、請求項 4 5 に記載の方法。
- 【請求項 4 7】  
前記処理が、前記サンプルを活性なノイラミニダーゼと 30 分未満インキュベートすることにより遂行される、請求項 4 6 に記載の方法。 20
- 【請求項 4 8】  
前記生物学的サンプルがステップ ( a ) に先立って連続的に希釈される、請求項 4 0 ~ 4 7 のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 4 9】  
前記ステップ ( a ) ~ ( b ) が約 3 0 ~ 6 0 分で生じる、請求項 4 0 ~ 4 8 のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 5 0】  
前記凝集の存在が、可視化粒子 - 凝集粒子クラスターの形成により証明され、および前記クラスターが、光学的機器の画像化領域により捕捉され、および前記検出ステップは： 30  
 ( i ) 前記クラスターの複数の画像を、前記画像化領域の異なる位置において、前記光学的機器により捕捉すること；および  
 ( i i ) 前記凝集の発生を、前記画像の分析に基づいて検出することを含む、請求項 4 0 ~ 4 9 のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 5 1】  
前記光学的機器がカメラを含む、請求項 5 0 に記載の方法。
- 【請求項 5 2】  
前記光学的機器が、顕微鏡を含む、請求項 5 0 に記載の方法。
- 【請求項 5 3】  
前記画像化領域が、マイクロ流体性チャネルの中に存在する、請求項 5 0 ~ 5 2 のいずれかに記載の方法。 40
- 【請求項 5 4】  
前記分析が、前記クラスターのサイズを、前記画像のそれぞれに捕捉された、個々の赤血球の中心から中心への距離に基づいて計算することを含む、請求項 5 0 ~ 5 3 のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 5 5】  
前記ステップ ( a ) が、赤血球を加える前に、前記ウイルス粒子および前記生物学的サンプルの混合物をインキュベートすることを含む、請求項 4 0 ~ 5 4 のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 5 6】 50

生物学的サンプル中の抗体の存在を決定するための方法であって、前記抗体は選択的に凝集粒子に結合し、前記方法は：

(a) 可視化粒子、前記凝集粒子、および前記抗体を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、前記凝集粒子との相互作用を介する可視化粒子の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および

(b) 光学的機器の支援により、前記混合物の画像を捕捉することを含み、前記画像中の可視化粒子 - 凝集粒子クラスターの存在が前記凝集の発生、および検出可能な量の前記抗体の欠如を示し、および前記クラスターの不在が、前記凝集の欠如および前記検出可能な量の前記抗体の存在を示す方法。

【請求項 57】

前記可視化粒子 - 凝集粒子クラスターの形成が、前記画像中に捕捉された、個々の可視化粒子の中心から中心への距離を評価することにより決定される、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記ステップ (a) が、前記可視化粒子を加える前に、前記凝集粒子および前記生物学的サンプルの混合物をインキュベートすることを含み、請求項 56 または 57 のいずれかに記載の方法。

【請求項 59】

生物学的サンプルの凝集粒子の存在を決定するための方法であって：

(a) 可視化粒子、および前記凝集粒子を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、前記凝集粒子との相互作用を介する可視化粒子の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および

(b) 前記混合物中で、凝集が生じるかを検出することを含み、前記凝集の存在は前記凝集粒子の存在を示し、

およびステップ (a) ~ (b) は 1 時間未満で生じる方法。

【請求項 60】

生物学的サンプルの凝集粒子の存在を決定するための方法であって：

(a) 可視化粒子、および前記凝集粒子を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、前記凝集粒子との相互作用を介する可視化粒子の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および

(b) 光学的機器の支援により、前記混合物の画像を捕捉することを含み、前記画像中の可視化粒子 - 凝集粒子クラスターの存在が前記凝集の発生、および検出可能な量の前記凝集粒子の存在を示し、および前記クラスターの不在が、前記凝集の欠如および前記検出可能な量の前記凝集粒子の欠如を示す方法。

【請求項 61】

被験者の有効な免疫化を決定するための方法であって：

(a) ウイルス粒子に対する第一のワクチンの第一の用量で免疫化された被験者からの生物学的サンプルを取得すること；

(b) 可視化粒子、前記凝集粒子、および前記生物学的サンプルの混合物を、前記凝集粒子との相互作用による前記可視化粒子の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および

(c) 前記サンプル中の前記凝集粒子に対する抗体の濃度を、前記可視化粒子の凝集により形成されたクラスターに基づき決定することを含み、

および前記ステップ (b) ~ (c) は 1 時間未満で生じる。

【請求項 62】

被験者の有効な免疫化を決定するための方法であって：

(a) ウイルス粒子に対する第一のワクチンの第一の用量で免疫化された被験者からの生物学的サンプルを取得すること；

(b) 可視化粒子、前記凝集粒子、および前記生物学的サンプルの混合物を、前記凝集粒子との相互作用による前記可視化粒子の凝集を許容する条件下でインキュベートするこ

10

20

30

40

50

と；

(c) 光学的機器の支援により前記混合物の画像を捕捉すること；および

(d) 前記サンプル中の前記凝集粒子に対する抗体の濃度を、前記可視化粒子の凝集により形成されたクラスターに基づき決定することを含み、

前記画像中の可視化粒子 - 凝集粒子クラスターの存在が、前記凝集の発生および検出可能な量の前記抗体の欠如を示し、および前記クラスターの不在が、前記凝集の欠如および検出可能な量の前記抗体の存在を示す方法。

【請求項 63】

前記抗体濃度が所定のレベルより低い場合に前記凝集粒子に対する前記第一のワクチンの第二の用量を、前記被験者に投与することを更に含む、請求項 61 または 62 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 64】

前記抗体濃度が所定のレベルより低い場合に前記凝集粒子に対する第二のワクチンを、前記被験者に投与することを更に含む、請求項 61 または 62 のいずれかに記載の方法。

【請求項 65】

キットであって：可視化粒子、凝集粒子、および抗体または凝集粒子検出のために前記キットを使用するためのユーザーへの使用説明書を含むキット。

【請求項 66】

前記可視化粒子がマイクロスフェアである、請求項 65 に記載のキット。

【請求項 67】

前記画像が顕微鏡的な画像である、請求項 19、23、25、56、60、または 62 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 68】

生物学的サンプル中の抗体の存在を決定するための方法であって、前記抗体は選択的に凝集粒子に結合し、前記方法は：

(a) 可視化粒子、前記凝集粒子、および前記抗体を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、前記凝集粒子との相互作用を介する可視化粒子の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；

(b) (a) と同時に、または後続して、前記混合物を、その頂部に開口部を有する容器であって、内部は底部まで円錐形の容器の中に提供すること；

30

(c) 少なくとも前記混合物の一部が前記容器の頂部における開口部に、傾斜の前よりは近づくことができるように、および少なくともサンプルの一部が前記容器の中に傾斜の後よりは残存するように前記容器を傾斜すること；および

(d) 光学的機器の支援により、前記混合物の画像を捕捉することを含み、前記傾斜された容器内の赤血球の位置は、サンプル中の前記抗体の存在または量を決定するために用いられ得る方法。

【請求項 69】

生物学的サンプルの凝集粒子の存在を決定するための方法であって、前記凝集粒子は抗体に選択的に結合し、前記方法は：

(a) 可視化粒子、前記抗体、および前記凝集粒子を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、前記凝集粒子との相互作用を介する可視化粒子の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；

40

(b) (a) と同時に、または後続して、前記混合物を、その頂部に開口部を有する容器であって、内部は底部まで円錐形の容器の中に提供すること；

(c) 少なくとも前記混合物の一部が前記容器の頂部における開口部に、傾斜の前よりは近づくことができるように、および少なくともサンプルの一部が前記容器の中に傾斜の後よりは残存するように前記容器を傾斜すること；および

(d) 光学的機器の支援により、前記混合物の画像を捕捉することを含み、前記傾斜された容器内の赤血球の位置は、サンプル中の前記凝集粒子の存在または量を決定するために用いられ得る方法。

50



## 【請求項 70】

前記容器内に、分析のための1つ以上のゾーンが存在するかまたは確立され、および光学的信号が、それぞれのゾーンの上で測定される、請求項68または69に記載の方法。

## 【請求項 71】

前記1つ以上のゾーンの上で測定された光学的信号が、サンプル中の凝集したまたは凝集していない可視化粒子の量を測定するために用いられる得る、請求項70に記載の方法。

## 【請求項 72】

前記容器内に、分析のための軸が、存在するか、または確立され、および光学的信号が、前記軸に沿って測定される、請求項68または69に記載の方法。

## 【請求項 73】

前記軸は、ボタン部分の中心を貫通し、および存在する場合には、充填された赤血球の涙滴部分は、前記容器の底部に存在する、請求項72に記載の方法。

## 【請求項 74】

前記軸に沿って測定された光学的信号が、サンプル中の凝集した、または凝集していない可視化粒子の量を測定するために用いられる得る、請求項72または73のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 75】

前記容器の底に充填された可視化粒子が特定され、および前記充填された可視化粒子の面積または周囲の長さが測定される、請求項68または69のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 76】

前記方法が、前記充填された可視化粒子のボタン、および随意的に、涙滴領域の特定のために、パターン認識方法を用いることを更に含む、請求項75に記載の方法。

## 【請求項 77】

前記充填された可視化粒子の面積または周囲の長さが、前記サンプル中の凝集した、または凝集していない可視化粒子の量を決定するために用いられ得る、請求項75または76のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 78】

複数の画像が収集され、および前記複数の画像がビデオにより収集される、請求項19、23、25、30、31、56、60、62、68、または69のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 79】

前記方法が、ポイント・オブ・サービスの位置で遂行される、請求項1～27、29～64、または67～78のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 80】

混合物中の可視化粒子の凝集の検定方法であって：

A) 凝集粒子との相互作用を介して、前記可視化粒子の凝集を許容する条件下で、前記可視化粒子および前記凝集粒子を含む混合物を生成すること；

B) 少なくとも1つの前記混合物の画像を取得すること；および

C) 前記混合物中の前記可視化粒子の凝集の測定を得るために、前記画像を分析すること

を含む方法。

## 【請求項 81】

前記可視化粒子がRBCまたはマイクロスフェアである、請求項80に記載の方法。

## 【請求項 82】

前記凝集粒子がウイルス粒子または抗体である、請求項80または81のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 83】

前記画像がCCDまたはCMOS画像センサーにより取得される、請求項80～82のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 84】

10

20

30

40

50

前記画像が光学的機器により取得される、請求項 80 ~ 83 のいずれかに記載の方法。

【請求項 85】

前記凝集粒子が被験者からの生物学的サンプル中に提供される、請求項 80 ~ 84 のいずれかに記載の方法。

【請求項 86】

前記生物学的サンプルが血漿または血清を含む、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 87】

前記凝集粒子がウイルス粒子である、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 88】

前記凝集粒子が抗体である、請求項 85 に記載の方法。

10

【請求項 89】

サンプル中のウイルス粒子または抗体の量を決定することを更に含む、請求項 85 ~ 88 のいずれかに記載の方法。

【請求項 90】

前記凝集粒子の少なくとも 1 つの凝集粒子に特異的に結合する抗体を更に含み、および前記可視化粒子の可視化粒子と前記凝集粒子の相互作用を阻害する、請求項 80 ~ 89 のいずれかに記載の方法。

【請求項 91】

前記被験者からの生物学的サンプル中の混合物に前記抗体が提供される、請求項 90 に記載の方法。

20

【請求項 92】

前記生物学的サンプルが、血漿または血清を含む、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

前記サンプル中の前記抗体の量を決定することを更に含む、請求項 91 または 92 に記載の方法。

【請求項 94】

前記混合物の画像が、前記混合物の生成から 1 時間以内で取得される、請求項 80 ~ 93 のいずれかに記載の方法。

【請求項 95】

画像を分析することが、画像中の目的の領域 (ROI) を特定することを含む、請求項 80 ~ 94 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 96】

前記 ROI が、前記混合物の撮像された情報を含み、前記混合物が可視化粒子および凝集粒子を含む、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

前記混合物中の前記可視化粒子の凝集の測定が、前記可視化粒子の凝集または非凝集の定性的測定である、請求項 80 ~ 96 のいずれかに記載の方法。

【請求項 98】

前記混合物中の前記可視化粒子の凝集の測定が、前記可視化粒子の凝集の程度の定量的測定である、請求項 80 ~ 96 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 99】

前記混合物 2 つ以上の画像が取得される、請求項 80 ~ 98 のいずれかに記載の方法。

【請求項 100】

前記凝集が、可視化粒子および凝集粒子を含むクラスターの形成により証明され、および前記画像を分析するステップが、画像中のクラスターを特定することを含む、請求項 80 ~ 99 のいずれかに記載の方法。

【請求項 101】

画像中のクラスターのサイズまたは数を決定することを更に含む、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 102】

50

画像中のクラスターを特定する前記ステップが、画像中の可視化粒子の間の距離を決定することを含む、請求項100に記載の方法。

【請求項103】

前記画像中の可視化粒子の間の距離を決定するステップが、画像中の可視化粒子の中心から中心への距離を決定することを含む、請求項102に記載の方法。

【請求項104】

前記画像を分析するステップが、画像中の第一の可視化粒子および第二の可視化粒子の中心から中心への間の距離を決定することを含む、請求項80～103に記載の方法。

【請求項105】

画像中の前記第一の可視化粒子および第二の可視化粒子の位置を決定することをも更に含む、請求項104に記載の方法。

10

【請求項106】

前記クラスターを特定するステップが、第一の可視化粒子および第二の可視化粒子を特定することを含み、前記第一の可視化粒子および第二の可視化粒子の中心から中心の間の距離が、第一または第二の可視化粒子のいずれかの直径の1.5倍を超えない、請求項100～105に記載の方法。

【請求項107】

前記クラスターを特定するステップが、第一の可視化粒子および第二の可視化粒子を特定することを含み、前記第一の可視化粒子および第二の可視化粒子の中心から中心の間の距離が、 $1.2\mu\text{m}$ を超えない、請求項100～106に記載の方法。

20

【請求項108】

前記クラスターを特定するステップが、少なくとも3つの可視化粒子を特定することを含み、前記3つの可視化粒子のそれぞれが、前記可視化粒子の中心が、前記他の2つの可視化粒子の中心から $1.5\mu\text{m}$ を超えない位置にあるように位置づけられる、請求項100～105に記載の方法。

【請求項109】

前記クラスターを特定するステップが、カットオフ値の距離を選択することを含み、前記カットオフ値の距離未満の距離に互いに存在する可視化粒子は、互いに会合していると見なされる、請求項100～108に記載の方法。

【請求項110】

前記カットオフ値の距離を選択するステップが2つ以上の画像中の可視化粒子についての動径分布関数を計算することを含む、請求項109に記載の方法。

30

【請求項111】

前記画像を分析するステップが、前記混合物の画像の領域から特徴を抽出することを含む、請求項80～110のいずれかに記載の方法。

【請求項112】

前記特徴を抽出するステップが、前記混合物のテクスチャーを分析することを含む、請求項111に記載の方法。

【請求項113】

前記混合物のテクスチャーを分析するステップが、ローカル・バイナリー・パターン演算子により画像を分析することを含む、請求項112に記載の方法。

40

【請求項114】

前記特徴を抽出することが、前記画像の領域中の1つ以上の色チャンネルにおける信号強度を分析することを含む、請求項112または113に記載の方法。

【請求項115】

前記混合物のテクスチャーを分析するステップが、前記ローカル・バイナリー・パターン演算子から得られた情報を、既知の凝集状態の混合物の1つ以上の画像からのローカル・バイナリー・パターン情報により、前もって訓練されたアルゴリズムに入力することを含む、請求項113に記載の方法。

【請求項116】

50

前記画像を分析するステップが、前記混合物の画像からの特徴抽出情報を、既知の凝集状態の対照混合物の画像からの特徴抽出情報と比較することを含み、前記対照混合物は、可視化粒子および凝集粒子を含む、請求項 80 ~ 115 のいずれかに記載の方法。

【請求項 117】

ステップ A) ~ C) が 1 時間以下で遂行される、請求項 80 ~ 116 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[発明の相互参照]

本出願は、2012年7月18日に出願された米国特許予備出願第61/673,215号による優先権を主張し、この出願はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

凝集または分子または細胞の凝集は、様々な有用な生物学的検定の基礎を形成する。赤血球凝集反応 (hemagglutination または haemagglutination) は、赤血球細胞 (RBC) を含む凝集の特異的な形態である。この現象は、臨床検査室では、血液型、血液中のウイルスの存在および / もしくは量ならびに / または特定の抗感染薬抗体を決定するために用いられる。赤血球凝集反応は、RBC が中程度の攪拌に対して安定な、巨視的な格子構造を形成することを引き起こす。これらの構造は、凝集していない RBC から、目視による観察で区別され得る、このことは様々な従来の検定方法の基礎を形成している。

【0003】

赤血球凝集反応は、ウイルス、バクテリア、抗体、および他の因子 (例えば、レクチン) により引き起こされ得る。例えば、A 型抗原に結合する抗体は、A または AB 型の RBC を含むサンプル中で赤血球凝集反応を誘導する。同様に、ウイルスおよび細胞表面分子に結合するウイルスの抗原は赤血球凝集反応を誘導し得る。ウイルスは、宿主細胞上の分子に結合する、タンパク質 “ヘマグルチニン” を含み得る。例えば、ヘマグルチニン・タンパク質は、RBC などの宿主細胞の膜上のシアル酸に結合し得る。ウイルスを含むサンプルの様々な希釈において、赤血球凝集反応を観察することにより、ウイルスの力価が概算される。これらの方法によりバクテリアが検出されおよび定量される。

【0004】

赤血球凝集反応検定の高度に有用な応用に関わらず、現行の方法は、比較的遅く、主観的であり、およびいくつかの目的にとっては信頼性がない。従来の前処理プロトコルは、12 ~ 24 時間かかり、および目視による検査は定量的決定を行うためには着実な方法ではない。赤血球凝集反応検定は、しばしば時間が必須的である設定で遂行される (例えば、ウイルスの発生の拡散防止のため、または緊急輸血の間)。従って、当技術分野では、凝集の検出および測定、のための改良された方法に対する大きな要求がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

改良された凝集検定のための、方法、組成物、システムおよび機器が提供される。一態様では、凝集反応の分析のための改良された画像化技法が提供される。別の態様では、時間を減少させおよび / または凝集反応の正確性を増加するための方法が提供される。別の態様では、凝集反応のための改良された試薬が提供される。別の態様では、凝集反応を遂行または分析するための改良された機器が提供される。追加的な改良も提供され、および本開示は、追加的な態様を含む。本明細書において開示される複数の改良も共に用いられ得る。

【0006】

一態様では、生物学的サンプル中の抗体の存在を決定するための方法が提供され、前記

10

20

30

40

50

抗体は、選択的にウイルスの粒子に結合し、およびこの方法は以下のステップを含む：（ a ）赤血球、ウイルスの粒子および抗体を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、ウイルスの粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および（ b ）混合物中で凝集が起きるかを検出することであって、凝集の不在は抗体の存在を示し、および前記ステップ（ a ）～（ b ）は1時間未満で生じる。別の関連するが個別の態様では、この方法は（ a ）赤血球、ウイルスの粒子、および抗体を含むことが疑われる生物学的サンプルを、ウイルスの粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および（ b ）光学的機器の支援により、混合物の画像を捕捉することを含み、画像中の赤血球 - ウイルスの粒子クラスターの存在が、凝集の発生および検出可能な量の抗体の欠如を示し、およびクラスターの不在は、凝集の欠如および検出可能な量の抗体の存在を示す。いくつかの実施形態では、顕微鏡的な混合物の画像が得られる。

10

**【 0 0 0 7 】**

別の態様では、生物学的サンプル中のウイルス粒子の存在を決定するための方法が提供され、この方法は：（ a ）赤血球または修飾された赤血球細胞、ウイルスの粒子、および抗体を含むことが疑われる生物学的サンプルを、ウイルスの粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および（ b ）混合物中で凝集が起きるかを検出することを含み、凝集の存在はウイルスの粒子の存在を示し、および前記ステップ（ a ）～（ b ）は1時間未満で生じる。関係するが個別の態様では、生物学的サンプル中のウイルス粒子の存在を決定する方法は：（ a ）赤血球およびウイルスの粒子を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、ウイルスの粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および（ b ）光学的機器の支援により、混合物の画像を捕捉することを含み、画像中の赤血球 - ウイルスの粒子のクラスターの存在が、凝集の発生および検出可能な量のウイルスの粒子の存在を示し、およびクラスターの不在は、凝集の欠如および検出可能な量のウイルスの粒子の欠如を示す。いくつかの実施形態では、顕微鏡的な混合物の画像が得られる。

20

**【 0 0 0 8 】**

別の態様では、被験者の有効な免疫化を決定するための：（ a ）ウイルス粒子に対する第一のワクチンの第一の用量で免疫化された被験者からの生物学的サンプルを得ること（ b ）赤血球、ウイルスの粒子および抗体を含む生物学的サンプルの混合物を、ウイルスの粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および（ c ）サンプル中のウイルスに対する抗体の濃度を、赤血球の凝集により形成されたクラスターに基づき決定することを含む方法が提供され、および前記ステップ（ b ）～（ c ）は1時間未満で生じる。関係するが個別の態様では、この方法は（ a ）ウイルス粒子に対する第一のワクチンの第一の用量で免疫化された被験者からの生物学的サンプルを得ること；（ b ）赤血球、ウイルス粒子、および生物学的サンプルの混合物を、ウイルス粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；（ c ）光学的機器の支援により、混合物の画像を捕捉すること；および（ d ）サンプル中のウイルスに対する抗体の濃度を、赤血球の凝集により形成されたクラスターに基づき決定することを含み、画像中の赤血球 - ウイルス粒子クラスターの存在が、凝集の発生および検出可能な量の抗体の欠如を示し、およびクラスターの不在が、凝集の欠如および検出可能な量の抗体の存在を示す。いくつかの実施形態では、顕微鏡的な混合物の画像が得られる。

30

40

**【 0 0 0 9 】**

実施形態では、赤血球は、例えば、グルタルアルデヒドによる処理によりあらかじめ固定化され得る。所望の場合には、赤血球はシチメンメンチョウ赤血球細胞または他のヒト以外の R B C を含み得る。

**【 0 0 1 0 】**

主題の方法のいずれかにより検出されたウイルス粒子は、任意のタイプの凝集ウイルスを含み得る。例えばおよび制限なしに、B型肝炎ウイルス（ H B V ）、C型肝炎ウイルス（ H C V ）、およびインフルエンザウイルスのいずれの株も本明細書において開示される

50

方法により検出され得る。いくつかの態様では、本明細書において開示されるいずれかの方法により検出された抗体は、凝集ウイルスなどの任意の凝集粒子に対するものであり得る。例えばおよび制限なしに、HBV、HCVおよびインフルエンザウイルスのいずれの株に対する抗体も検出され得る。

【0011】

本明細書において開示される方法のいずれかにおいて利用される生物学的サンプルは、限定はされないが、新鮮なまたは抗凝固処理された全血、血漿および血清を含む、処理されたまたは未処理の適切な体液であることができる。いくつかの例では、血漿または血清は、ウイルス粒子に対するワクチンを投与された被験者からのものである。所望の場合には、生物学的サンプルは、例えば、前記生物学的サンプルをノイラミニダーゼと、2時間、1時間、30分、20分、10分、5分未満または更に短い時間などの適切な時間の間、インキュベートすることにより、ノイラミニダーゼにより、前処理され得る。

10

【0012】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示される方法において使用される様々なステップは、約2時間、60分、45分、30分以下以内、または約30～約60分の間で完了し得る。

【0013】

一態様では、本明細書において提供されるものは、画像分析に基づく、凝集を分析する方法である。一実施形態では、画像分析方法が、RBCの容積の運動の分析または円錐形のウエルまたは管の中の凝集検定中の粒子の可視化のために用いられる。別の実施形態では、画像分析方法が、RBCの微細構造の監視または粒子懸濁物の可視化のために、顕微鏡的なRBCの画像の分析、または凝集検定中の懸濁物中の粒子の可視化のために用いられる。

20

【0014】

一態様では、本明細書において提供されるものは方法RBCの容積の運動および粒子の可視化のための画像分析のための方法である。一実施形態では、反応容器（例えば、反応管またはウエル）中の指定された場所を用いる凝集反応の画像分析のための方法が提供される。一実施形態では、凝集反応の充填された細胞の走査を用いる、凝集反応の画像分析のための方法が提供される。一実施形態では、面積および/または凝集反応の充填された細胞の周囲の長さの決定を用いる、凝集反応の画像分析のための、方法が提供される。いくつかの態様では、充填された細胞は、ボタンおよび/または涙滴領域を含む。

30

【0015】

いくつかの実施形態では、凝集の存在は、赤血球 - ウイルス粒子クラスターの形成により証明され、および前記クラスターは、光学的機器の画像化領域中に捕捉される。光学的機器は、制限なしにカメラ、顕微鏡、光学的スキャナー、センサー、検出器、または任意の他の適切な画像化機器を含み得る。所望の場合には、凝集反応の分析は、前記画像のそれぞれに捕捉された個々の赤血球の中心から中心への距離に基づく前記クラスターのサイズを計算することにより遂行され得る。

【0016】

いくつかの実施形態では、被験者の有効な免疫化を決定するための方法は、生物学的サンプル中の抗体濃度が、所定のレベルよりも低い場合に、第一のウイルス粒子に対する、ワクチンの第二の用量を被験者に投与するステップを更に含むことができる。

40

【0017】

更に提供されるものは以下を含むキットである：あらかじめ固定された赤血球、ウイルス粒子、および抗体またはウイルスの検出のためのキットを使用するユーザーに対する使用説明書。そのような使用説明書は無線的に送信されおよび自動化されたシステムにおいて遂行され得る。

【0018】

実施形態では、本明細書において提供されるものは、混合物中の粒子の凝集の検定方法であり、この方法は：凝集粒子との相互作用を介して、可視化粒子の凝集を許容する条件

50

下で、可視化粒子および凝集粒子を含む混合物を生成すること；少なくとも1つの混合物の画像を取得すること；および混合物中の粒子の凝集の測定を得るために、画像を分析することを含む。

【0019】

本明細書で提供される開示中の可視化粒子を含む実施形態では、この可視化粒子はRBCまたはマイクロスフェアである。

【0020】

本明細書で提供される開示中の凝集粒子を含む実施形態では、この凝集粒子は、ウイルス、ウイルス粒子、または抗体である。

【0021】

本明細書で提供される開示中の画像を取得することを含む実施形態では、この画像はCCDまたはCMOS画像センサーにより得られる。

【0022】

本明細書で提供される開示中の画像を取得することを含む実施形態では、この画像は光学的機器により得られる。

【0023】

本明細書で提供される開示中の凝集粒子を含む実施形態では、この凝集粒子は被験者からの生物学的サンプル中に提供される。

【0024】

本明細書で提供される開示中の生物学的サンプルを含む実施形態では、この生物学的サンプルは血漿または血清を含む。

【0025】

本明細書で提供される開示中の凝集粒子を含む実施形態では、この凝集粒子はウイルスである。

【0026】

本明細書で提供される開示中の凝集粒子を含む実施形態では、この凝集粒子は抗体である。

【0027】

本明細書で提供される開示中の、被験者からの生物学的サンプルを含む、混合物中の粒子凝集の検定方法を含む実施形態では、この方法は、サンプル中のウイルスまたは抗体の量の決定を許容する。

【0028】

本明細書で提供される開示中の、凝集粒子および可視化粒子を含む、混合物中の粒子凝集の検定方法を含む実施形態では、混合物は、凝集粒子に特異的に結合し、および凝集粒子と可視化粒子との相互作用を阻害する抗体更に含む。実施形態では、抗体が被験者からの生物学的サンプル中の混合物に提供される。実施形態では、この生物学的サンプル血漿または血清を含む。実施形態では、この方法は、サンプル中の抗体の量の決定を許容する。

【0029】

本明細書で提供される開示中の、凝集粒子および可視化粒子を含む混合物および混合物の画像を取得することを含む実施形態では、この画像は、混合物を生成してから、それぞれ10秒、30秒、1分、2分、5分、10分、15分20分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、または8時間以内で得られる。

【0030】

本明細書で提供される開示中の、混合物中の粒子の凝集を得るために、凝集粒子および可視化粒子を含む混合物の画像を分析することを含む実施形態では、この画像を分析することは画像中の目的の領域(ROI)を特定することを含む。

【0031】

本明細書で提供される開示中のROIを含む実施形態では、このROIは可視化粒子および凝集粒子を含む混合物の撮像された情報を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 2 】

本明細書で提供される開示中の、凝集粒子および可視化粒子を含む混合物中の粒子の凝集の測定を含む実施形態では、この混合物中の粒子の凝集の測定は、凝集または非凝集の定性的測定である。

## 【 0 0 3 3 】

本明細書で提供される開示中の、凝集粒子および可視化粒子を含む混合物中の粒子の凝集の測定を含む実施形態では、この混合物中の粒子の凝集の測定は、凝集程度の定量的測定である。

## 【 0 0 3 4 】

本明細書で提供される開示中の、凝集粒子および可視化粒子を含む混合物の画像を取得することを含ま実施形態では、2つ以上の混合物の画像が得られる。

10

## 【 0 0 3 5 】

本明細書で提供される開示中の、凝集粒子および可視化粒子を含む混合物の少なくとも1つの画像を取得すること、および混合物中の粒子の凝集の測定のために画像を分析することを含ま実施形態では、この画像を分析することは、画像中のクラスターの同定を含む。

## 【 0 0 3 6 】

本明細書で提供される開示中の、画像中のクラスターの同定を含む方法を含む実施形態では、この方法は、画像中のクラスターのサイズまたは数を決定することを更に含む。

## 【 0 0 3 7 】

本明細書で提供される開示中の、画像中のクラスターの同定を含む実施形態では、この画像中のクラスターの同定は、画像中の可視化粒子の間の距離を決定することを含む。

20

## 【 0 0 3 8 】

本明細書で提供される開示中の～画像中の可視化粒子の間の距離を決定することを含ま実施形態では、この可視化粒子の間の距離を決定することは、画像中の可視化粒子の間の中心から中心への距離を決定することを含む。

## 【 0 0 3 9 】

本明細書で提供される開示中の、凝集粒子および可視化粒子を含む混合物の少なくとも1つの画像を取得すること、および混合物中の粒子の凝集の測定を得るために画像を分析することを含ま実施形態では、この画像を分析することは、画像中の第一の可視化粒子および第二の可視化粒子の間の中心から中心への距離を決定することを更に含む。実施形態では、この画像を分析することは、画像中の第一の可視化粒子および第二の可視化粒子の位置を決定することを更に含む。

30

## 【 0 0 4 0 】

本明細書で提供される開示中の、画像中の可視化粒子および凝集粒子を含むクラスターの同定を含む方法を含む実施形態では、この可視化粒子および凝集粒子を含むクラスターの同定は、第一の可視化粒子および第二の可視化粒子を同定することを含み、可視化粒子および第二の可視化粒子の間の中心から中心への距離は、第一または第二の可視化粒子のいずれかの直径よりも、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、2.5、3、または5倍より大きい。

40

## 【 0 0 4 1 】

本明細書で提供される開示中の、画像中の可視化粒子および凝集粒子を含むクラスターの同定を含む方法を含む実施形態では、この可視化粒子および凝集粒子を含むクラスターの同定は、第一の可視化粒子および第二の可視化粒子を同定することを含み、可視化粒子および第二の可視化粒子の間の中心から中心への距離は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、または50  $\mu\text{m}$  よりも大きい。

## 【 0 0 4 2 】

本明細書で提供される開示中の、画像中の可視化粒子および凝集粒子を含むクラスターの同定を含む方法を含む実施形態では、この可視化粒子および凝集粒子を含むクラスター

50



の同定は、少なくとも3つの可視化粒子のクラスターを同定することを含み、可視化粒子のそれぞれは、その粒子の中心が、クラスター中の他の2つの可視化粒子のそれぞれの中心から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、または50 μm以内にあるように位置づけられる。

【0043】

本明細書で提供される開示中の、画像中の可視化粒子および凝集粒子を含むクラスターの同定を含む方法を含む実施形態では、この画像中のクラスターの同定は、カットオフ値距離を選択することを含み、互いにカットオフ値の距離よりも小さい距離に存在する粒子は、たがいに付随し合うと見なされる。

【0044】

本明細書で提供される開示中の～カットオフ値の距離を選択することを含む実施形態では、このカットオフ値の距離を選択することは、画像中の2つ以上の粒子についての動径分布関数を計算することを含む。

【0045】

本明細書で提供される開示中の、混合物中の粒子の凝集の測定を取得するために、凝集粒子および可視化粒子を含む混合物の少なくとも1つの画像を取得することならびに画像を分析することを含む実施形態では、この画像を分析することは、可視化粒子および凝集粒子を含む混合物の、撮像された情報を含む画像の領域からの特徴抽出を含む。

【0046】

本明細書で提供される開示中の、画像からの特徴抽出を含む実施形態では、この特徴抽出は、可視化粒子および凝集粒子を含む混合物のテクスチャーを分析することを含む。

【0047】

本明細書で提供される開示中の、可視化粒子および凝集粒子を含む混合物の撮像された情報を含む画像のテクスチャーを分析することを含む実施形態では、この混合物のテクスチャーを分析することは、撮像された情報をローカル・バイナリー・パターン演算子(ローカル・バイナリー・パターン演算子)で分析することを含む。

【0048】

本明細書で提供される開示中の、画像からの特徴抽出を含み、特徴抽出が可視化粒子および凝集粒子の混合物のテクスチャーを分析することを含む実施形態では、この特徴抽出は、可視化粒子および凝集粒子を含む混合物の撮像された情報を含む、画像の領域の1つ以上のカラー・チャンネルでの信号の強度を解析することを更に含む。

【0049】

本明細書で提供される開示中の、可視化粒子および凝集粒子を含む混合物のテクスチャーを分析することを含む実施形態では、混合物の構造を分析することは、ローカル・バイナリー・パターン演算子から得られた情報を、可視化粒子および凝集粒子の混合物を含む既知の凝集状態の1つ以上の画像からのローカル・バイナリー・パターン情報であらかじめ訓練されている、アルゴリズムに入力することを含む。

【0050】

本明細書で提供される開示中の、混合物中の粒子の凝集の測定を取得するために、凝集粒子および可視化粒子を含む混合物の、少なくとも1つの画像を取得することならびに画像を分析することを含む実施形態では、この画像を分析することは、混合物の画像からの特徴抽出情報を、可視化粒子および凝集粒子を含む、既知の凝集状態の参照混合物の画像からの特徴抽出情報と比較することを含む。

【0051】

本明細書の他の場所に記載されるように、凝集検定および凝集阻害検定は異なるが、しかし関連する検定である。従って、実施形態では、本明細書のシステム、試薬、“凝集検定”のための方法などの記述は、文脈が明確に他のことを支持しない限り、凝集検定および凝集阻害検定の両方に適用され得る。同様に、実施形態では、本明細書のシステム、試薬、“凝集検定”のための方法などの記述は、文脈が明確に他のことを支持しない限り、

10

20

30

40

50

凝集検定および凝集阻害検定の両方に適用され得る。例えば、凝集および凝集阻害検定の両方が、検定における可視化粒子凝集の程度を分析することを含むことができ、および従って、可視化粒子の凝集の程度を分析するために本明細書で提供されるシステム、試薬および方法は、凝集検定および凝集阻害検定の両方に適用され得る。

【0052】

この要旨は、以下の発明の詳細な説明で更に記載される概念の単純化された形態における選択を紹介するために提供される。この要旨は、主張される主題の主要な特徴または本質的な特性を特定することを意図しておらず、主張される主題の範囲を限定するために用いられることを意図していない。

[参照による組み込み]

10

【0053】

本明細書において言及される、全ての刊行物、特許及び特許出願は、個々の刊行物、特許及び特許出願のそれぞれが、参照により組み込まれるために、あたかも明確に、及び個々に参照により示されるのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0054】

図面において、

【0055】

【図1】図1は、赤血球細胞の凝集を描いている。

【0056】

20

【図2】図2は、それにより、凝集した、および凝集していないサンプルが区別され得る従来のペレット検定を図示している。

【0057】

【図3】図3は、それにより、凝集した、および凝集していないサンプルが、円錐型管中で区別され得る従来のペレット検定を図示している。

【0058】

【図4】図4は、A) ウイルスに媒介された細胞の凝集およびB) 抗体に媒介された細胞の凝集を描いている。

【0059】

【図5】図5は、ウイルスに媒介された細胞の凝集の抗体に媒介された阻害を描いている。

30

【0060】

【図6】図6は、容器中の指定された場所での、画像分析による可視化粒子の全体の動きの分析に関連する概略図を描いている。パネルAは、凝集していない、部分的に凝集した、および凝集したサンプル中のゾーンの全域にわたる可視化粒子の動きを描いている。パネルBは、可視化粒子の面積よりも小さなゾーンを描いている。

【0061】

【図7】図7は、信号強度対図6に描かれたサンプルのゾーン番号の、サンプルのグラフを示す。

【0062】

40

【図8】図8は、スキャニングを用いる画像分析による可視化粒子の全体の動きの分析のために用いられ得る、容器の底の充填された細胞のボタンおよび涙滴領域を貫く軸を描いている。

【0063】

【図9】図9は、信号強度対凝集していない、凝集した、および部分的に凝集したサンプルについての図8に描かれた軸に沿った位置番号の、サンプルのグラフを示している。三角形でマークされた線は、凝集したサンプル、正方形でマークされた線は、部分的に凝集したサンプル、および菱形でマークされた線は凝集したサンプルである。

【0064】

【図10】図10は、面積または周辺の長さの画像分析による、可視化粒子の全体の動き

50

の分析に用いられ得る、充填された可視化粒子のボタン（面積 A / 1005）領域および液滴（面積 B / 1010）領域の周辺の長さの特定を示す概略図である。

【0065】

【図11】図11は、図10中の分析を示す、サンプルのグラフであり、面積 A（1005）および面積 B（1010）の%面積の間の関係、凝集の程度、および面積 B の面積 A に対する比を描いている。菱形でマークされた線が面積 A、正方形でマークされた線が面積 B、および三角形でマークされた線が面積 B / 面積 A の比である。

【0066】

【図12】図12は、非凝集サンプル A ) および凝集サンプル B ) についての代表的な顕微鏡画像を示す。

10

【0067】

【図13】図13は、6つのサンプル、サンプル1~5および参照のクラスターのサイズの分布（左側のグラフ）、および6つのサンプルのそれぞれについて計算された会合因子（右側のグラフ）を示す。右側のグラフの差し込み図は、充填された赤血球の流動率（flow characteristics）を、プレートチルト（plate tilting）法および目視による観察を用いて測定された、同じサンプルの巨視的な画像である。差し込み図の左の列は、プレートチルト前のウエルの画像、および差し込み図の右の列は、プレートチルト後のウエルの画像である。

【0068】

【図14-1】図14は、A) 会合因子の顕微鏡的な分析、B) ペレット検定の巨視的な目視画像、C) 閾値デジタル化に付された、ペレット検定の巨視的な走査画像、およびD) ペレット検定の巨視的な走査画像の分析の間の比較を示す。B) およびC) は、それぞれ、A) およびD) において分析されたサンプルの画像を含む。B) およびC) は、充填された赤血球の流動率を、プレートチルト法および目視による観察を用いて測定された、ペレット検定の画像を示す。パネルB) およびC) において、ウエルは、底部から頂部に向かい1~6と番号付けされ、および右の行および左の行のそれぞれのウエルは、同じ検定条件での反復である。D) において、菱形でマークされた線はC) の右列の細胞の面積であり、三角形でマークされた線は、C) の左列の細胞の面積であり正方形でマークされた線は、C) の右列の細胞の周辺長であり、およびX印でマークされた線は、C) の左列の細胞の周辺長である。

20

30

【図14-2】図14は、A) 会合因子の顕微鏡的な分析、B) ペレット検定の巨視的な目視画像、C) 閾値デジタル化に付された、ペレット検定の巨視的な走査画像、およびD) ペレット検定の巨視的な走査画像の分析の間の比較を示す。B) およびC) は、それぞれ、A) およびD) において分析されたサンプルの画像を含む。B) およびC) は、充填された赤血球の流動率を、プレートチルト法および目視による観察を用いて測定された、ペレット検定の画像を示す。パネルB) およびC) において、ウエルは、底部から頂部に向かい1~6と番号付けされ、および右の行および左の行のそれぞれのウエルは、同じ検定条件での反復である。D) において、菱形でマークされた線はC) の右列の細胞の面積であり、三角形でマークされた線は、C) の左列の細胞の面積であり正方形でマークされた線は、C) の右列の細胞の周辺長であり、およびX印でマークされた線は、C) の左列の細胞の周辺長である。

40

【図14-3】図14は、A) 会合因子の顕微鏡的な分析、B) ペレット検定の巨視的な目視画像、C) 閾値デジタル化に付された、ペレット検定の巨視的な走査画像、およびD) ペレット検定の巨視的な走査画像の分析の間の比較を示す。B) およびC) は、それぞれ、A) およびD) において分析されたサンプルの画像を含む。B) およびC) は、充填された赤血球の流動率を、プレートチルト法および目視による観察を用いて測定された、ペレット検定の画像を示す。パネルB) およびC) において、ウエルは、底部から頂部に向かい1~6と番号付けされ、および右の行および左の行のそれぞれのウエルは、同じ検定条件での反復である。D) において、菱形でマークされた線はC) の右列の細胞の面積であり、三角形でマークされた線は、C) の左列の細胞の面積であり正方形でマークされ

50

た線は、C)の右列の細胞の周辺長であり、およびX印でマークされた線は、C)の左列の細胞の周辺長である。

【0069】

【図15】図15は、従来の受容体破壊酵素(RDE)法で前処理されたもの(斜線で満たされたもの)および本明細書で提供されるノイラミニダーゼを使用する方法で前処理されたもの(黒で満たされたもの)の間の比較を示す。

【0070】

【図16】図16は、示されるようにRDE法による、および本明細書で提供されるノイラミニダーゼ法による血漿サンプルの前処理と参照との比較を示す。

【0071】

【図17】図17は、従来のHAI(赤血球凝集反応阻害検定)方法に起因する抗体力価に対してプロットされた、本開示のHAI方法に起因する抗体力価を示す。

【0072】

【図18】図18は、3つの異なるウイルスの抗原である、H1N1、H3N2、およびインフルエンザBの従来のHAI方法による抗体力価に対してプロットされた、本開示のHAI方法による結果を示す。

【0073】

【図19】図19は、凝集検定中の粒子の例示的なX-軸上の距離 $r$ (ピクセルでの)およびY-軸上の $g(r)$ を有する、動径分布関数のプロットを示す。

【0074】

【図20】図20は、本明細書で提供される方法の実施形態によるサンプルの凝集を評価するための例示的なステップを提供するフローチャートである。

【0075】

【図21-1】図21は、凝集の検定を含む例示的なチップの画像を示し;図21A、21B、および21Cは、異なる被験者からのサンプルによる検定を示す。

【図21-2】図21は、凝集の検定を含む例示的なチップの画像を示し;図21A、21B、および21Cは、異なる被験者からのサンプルによる検定を示す。

【発明を実施するための形態】

【0076】

本明細書において提供されるものは、赤血球またはマイクロスフェアなどの選択的に凝集し得る他の粒子の凝集の発生を検出することによる、サンプル中のウイルス粒子、凝集粒子、抗原または抗原に対する抗体についての検定に関係する、組成物、システム、機器、および方法である。

## I. 総論

### A. 定義

【0077】

冠詞“a”、“an”および“the”は非制限的である。例えば、“themethod”は、フレーズの意味の最も広い定義を含み、1つより多い方法であることができる。

【0078】

「被験者」は、ヒトまたは動物であってよい。この被験者は生きていても、または死んでいてもよい。この被験者は、患者、臨床試験の被検者、または前臨床試験の被験者であってよい。被験者は、診断、治療、および/または疾患予防を受けることができる。この被験者は、医療専門家のケアの下にあっても、またはなくてもよい。

【0079】

「血液サンプル」は、血液または任意の血液の分画、血液誘導体などのサンプルである。血漿は、血液分画の一例である。この血液サンプルは、任意の適切な容積を有することができ、任意の適切な方法により得られることができ、任意の時間に被験者の任意の部位から採取されることができ、および任意の適切な容器に採取されることなどができる。血液は、栄養素および酸素などの必要な物質を細胞に送達し、および代謝的な廃棄産物を

10

20

30

40

50

同じ細胞から運び去る、特殊化した動物（ヒトを含む）内の体液 である。血液サンプルは、任意の適切な添加物、随意的に1つ以上の抗凝固剤を有することができる。「血液サンプル」は、希釈された血液サンプルも含む。

【0080】

「血漿」は、全血中の血液細胞がその中に通常は懸濁する血液の液体構成成分 である。それは、細胞外流体（細胞の外側の全ての体液）の血管内の流体部分である。それはほとんど水であり（容積により約93%）および溶解したタンパク質、グルコース、凝固因子、無機イオン、ホルモンおよび二酸化炭素（血漿は、排せつ産物の輸送の主な媒体である）。血液血漿は抗凝固剤を含む血液の管を、血液細胞が管の底に沈降するまで遠心分離機内で回転する（遠心分離する）ことにより調製されることができる。この血液血漿は次いで吸引されるか、または抜き取られる。

10

【0081】

「血液血清」はフィブリン、フィブリノーゲンまたは他の凝固因子のない血液血漿である（すなわち、全血マイナス両方の細胞および凝固因子）。

【0082】

血液サンプルは、「非静脈ルート」、すなわち、血液が静脈および動脈から針により採血されない、により得られ得る。非静脈ルートは、血液サンプルが、静脈血（脱酸素された血液）または動脈血（酸素化された血液）のいずれかであるかは、限定しない。静脈血および動脈血の両方が適切である。身体の毛細血管から血液を得ることは、非静脈ルートの一例である。

20

【0083】

「指先の突き刺し」、「指先穿刺」、または同様のものは、血液サンプルを非静脈ルートにより得るために適切な方法の一例である。ここで、鋭い先端または刃が、指（または身体の任意の他の部分）の皮膚を貫通するために用いられることができ、血液が身体から発することを引き起こす。指先穿刺は、かかと、随意的に、例えば乳児のかかに行うことができる。血液は、毛細管、ピペット、拭い綿、滴下、または当技術分野で周知の任意の他の機構を用いて採取し得る。

【0084】

本明細書で、「凝集」（“agglutination”または“aggregation”）、もしくはその文法的な等価物は、それにより分子または細胞などの粒子が、空間中で経時的にクラスターを形成するプロセスを意味する。結果として生成する凝集物は、凝集していない個別の粒子とは、少なくともいくつかの異なる性質を有し、およびこれらの凝集物の検出または測定の実定は有用な情報を提供する。

30

【0085】

用語「ウイルス粒子」は、ウイルスまたはウイルスの構成要素を含む、任意の分子または物質を含む。この用語は全ウイルス、と同時にウイルスの一部を含む。ウイルス粒子は、ウイルスの抗原を含む。ウイルス抗原は、制限なしに、ウイルスのポリペプチド、核酸、および炭水化物を含む。

【0086】

用語「赤血球」は、いかなる生命体からの、いかなる形態の赤血球細胞をも含む。従って、この用語は、新鮮な、変更されていない、赤血球細胞と同時に、化学的または他の処理に付された赤血球細胞も含む。この用語は哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、無脊椎動物、または任意の他のタイプの生命体からの赤血球細胞を含む。

40

【0087】

「画像」は、特定の物理的な対象と同様の見かけを有する、任意の人工物、例えば二次元の写真、写真の一組、またはビデオである。画像は、カメラによる光の捕捉を含み得る。

【0088】

画像は「画素化され」得る、つまり画像はピクセルを含むことを意味する。

【0089】

50

本明細書において使用される、「ポイント・オブ・サービス」の位置は、被験者がサービス（例えば検査、監視、治療、診断、ガイダンス、サンプル収集、ID確認、医療サービス、非医療サービス等）を受けることのできる場所を含むことができ、および、制限なく、被験者の自宅、被験者の勤務先、ヘルスケア提供者（例えば、医師）の場所、病院、緊急治療室、手術室、診療所、ヘルスケア専門家の執務室、臨床検査室、小売店〔例えば薬局（例えば、小売り薬局、臨床薬局、病院薬局）、ドラッグストア、スーパーマーケット、食品雑貨店、等〕、運搬用車両（例えば自家用車、ボート、トラック、バス、航空機、バイク、救急自動車、移動ユニット、消防車/トラック、救命救急車、司法遂行車両、警察車両、又は前記被験者を一点から他へ移動するように設定されている車両等）、移動医療ケアユニット、可動ユニット、学校、デイケアセンター、手荷物検査場、戦場、健康支援生活住居、政府のオフィス、オフィスビルディング、テント、体液サンプル取得施設（例えば血液収集センター）、被験者がアクセスを望み得る位置の入り口の場所またはその近くの場所、被験者がアクセスを望み得る機器上またはその近くの場所、被験者がアクセスを望み得る場所またはその近くの場所（例えば、被験者がコンピュータにアクセスしたい場合には、そのコンピュータの位置）、サンプル処理機器がサンプルを受け取る位置、または本明細書の別の場所に記載される任意の他のポイント・オブ・サービス位置を含み得る。いくつかの実施形態では、ポイント・オブ・サービスはポイント・オブ・ケアである。本明細書において使用される、「ポイント・オブ・ケア」は、被験者が医療関連サービス（例えば、治療、試験、監視、診断、カウンセリング、サンプル採取など）を受けることのできる、被験者または被験者の近傍の任意の位置（例えば、被験者の自宅または勤務先、グロサリー・ストア、ドラッグ・ストア、医療クリニック、病院、学校など）を指す。

#### 【0090】

「ビデオ」画像は、経時的に順次収集された一連の画像である。ビデオ画像は、例えば、少なくとも1フレーム/分、少なくとも1フレーム/10秒、少なくとも1フレーム/秒、少なくとも10フレーム/秒、少なくとも20フレーム/秒、少なくとも30フレーム/秒、少なくとも40フレーム/秒、少なくとも50フレーム/秒、少なくとも100フレーム/秒、または少なくとも200フレーム/秒を含む、任意の速度で収集され得る。

#### B. 一般的考察

##### 【0091】

赤血球凝集反応検定は、複雑および遅いプロトコルにより多年にわたって用いられている。凝集反応の特徴は、大きな構造が共に、比較的弱い力により保持されることである（非共有結合タンパク質-タンパク質相互作用）。そのようなプロセスは、細胞懸濁物の攪拌および混合のような機械的な力に反応する。凝集の特徴は、反応物のみではなく、その反応が生じる容器の形状にも依存することである。温度、溶媒組成物、タンパク質、炭水化物（例えば、デキストラン）および他の（例えば、ポリエチレングリコール）ポリマーなどのポリマーの存在は、すべて反応への効果を有する。一般的な凝集反応の概略図が図1に示される。

##### 【0092】

凝集反応を読むために、いくつかの光学的方法が現在用いられている。

##### 【0093】

図2に示される最初の方法では、反応容器はまっすぐな側面を持つ円形の管である。凝集した赤血球は、凝集していない細胞よりも早く沈降する。十分な時間の経過後に、凝集した細胞反応生成物は、凝集した細胞のペレットと共に透明な上澄みを示す一方、凝集していない細胞反応は、凝集していない細胞が懸濁物、中に残ったままで、混濁したままである。

##### 【0094】

第二の方法は、図3に図示される。円錐形の管を用いることは、いくらかの凝集した赤血球細胞が、管の底部に分散された格子/マットの形成を引き起こす一方で、いくらかの

凝集した赤血球細胞は、溶液中に懸濁されたままであることが見出されている。対照的に、凝集していない細胞のほとんどが、管の側面を転がり落ちて管の狭い底部チップで「ボタン」を形成するが、このボタンは緩やかに充填される。凝集検定の後で、円錐形の管中の細胞が、凝集しているか、または凝集していないかを特定することを助けるために、細胞が検定において沈降するための十分な時間を与えられた後に、円錐形の管は傾けられることができる。図3におけるように、そのような管がある角度で傾けられたとき、凝集していない細胞のボタンは、流れて「涙滴」の形をした塊を形成する一方、凝集した細胞は大幅に少ない流れを示す。

【0095】

本明細書で提供される、凝集検定のための、方法、組成物、システムおよび機器は、既存の技術に対して複数の利点を有する。

10

【0096】

一態様では、結合検定を用いる、ウイルス粒子の存在を決定する方法が提供される。本明細書でより詳細が提供されるように、一態様では、この検定では、ウイルス粒子が存在する場合、赤血球に結合しおよび赤血球-ウイルス粒子クラスターを形成し、ならびに従って凝集を引き起こす。これは赤血球凝集反応検定(HA)と称される。図4、パネルAを参照されたい。

【0097】

更なる態様では、結合検定を用いる、抗体の存在を決定する方法が提供される。本明細書でより詳細が提供されるように、一態様では、この検定では、抗体が存在する場合、赤血球に結合しおよび赤血球-ウイルス粒子クラスターを形成し、ならびに従って凝集を引き起こす。これは赤血球凝集反応検定(HA)と称される。図4、パネルBを参照されたい。

20

【0098】

一態様では、競争検定を用いる、抗体の存在を決定する方法が提供される。本明細書でより詳細が提供されるように、一態様では、この検定では、抗体が存在する場合、ウイルス粒子の表面に結合し、従ってウイルス粒子が赤血球に結合し、および赤血球-ウイルス粒子クラスターを形成することを防止する。従って、ウイルス粒子に対する抗体が、凝集の不在または阻害をもたらす。赤血球凝集反応検定阻害(HAI)と称される。図5を参照されたい。

30

【0099】

一態様では、本明細書で提供される方法は、凝集検定のためのサンプル前処理時間を30分以下の短さに減少させる。一態様では、このことは、サンプル前処理の間にノイラミニダーゼを使用することにより達成され得る。

【0100】

別の態様では、本明細書で提供される方法は、赤血球凝集反応検定試薬セットを単純化させ得る。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、全ての赤血球凝集反応検定に対して、単純で安定なタイプの赤血球細胞調製(またはマイクロスフェアなどの、その等価物)を用いる。安定なタイプの赤血球調製の例は、グルタルアルデヒドによる固定化により安定化されたシチメンチョウ赤血球である。そのような固定化された細胞は、本質的には無期限に安定である(対照的に新鮮な赤血球は、毎日調製されなければならず日ごとに変動する)。固定化は、ウイルスのヘマグルチニンまたは他の凝集粒子が結合する細胞表面受容体を不活性化しない。異なる動物種からの新鮮な赤血球および細胞も開示された方法において用いられ得る。

40

【0101】

いくつかの態様では、本開示の方法は、検定ステップの組み合わせを含む。従来のHAI方法は、少なくとも2つの別個のインキュベーション(処理された抗体を含むサンプルとウイルスの抗原との反応が1つ、プラス赤血球との反応が1つ、合計で約60分)を用いる一方で、本明細書で提供される方法は単一のインキュベーションを用い得る。そのようなインキュベーションは、約45分以下、約30分以下、約25分以下、約20分以下

50

、約15分以下、約10分以下、約5分以下、約4分以下、約3分以下、約2分以下、または約1分以下かかるなど、従来の方法におけるよりも大幅に短くあることができる。特定の実施形態では、2ステップも用いられ得る。

【0102】

いくつかの態様では、本開示の方法は、凝集反応を加速する。凝集反応は、検定媒質の組成物に対して感受性である。例えば、ポリマー（タンパク質、デキストランなどの炭水化物ポリマー）との電荷-電荷相互作用および弱い相互作用などの全てが凝集速度および終点に対して広範囲の効果を有する。グルタルアルデヒドで固定化されたシチメンチョウ赤血球のいくつかの実施形態では、アルブミンが凝集反応を約4倍に加速できる。

【0103】

本開示の方法は、凝集終点の客観分析を更に提供する。画像分析は、赤血球凝集反応検定を客観的および定量的に、サンプルの滴定の必要性なしに読み取るために用いられることができる。画像分析のための特定の方法は、2011年1月21日に出願された米国特許仮出願第61/435,250号において提供され、この出願は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0104】

一実施形態では、円錐形の管の反応容器中の凝集検定のデジタル画像が採集される。この画像は、「涙滴」形成（赤血球柱の長さ）の程度を測定するために、解釈され得る。別の実施形態では、可視化粒子の「クラスター分析」は、以下に詳細が記されるように遂行され得る。この方法は、非常に短い時間の後で、凝集反応が読み取られることを可能にする。

20

【0105】

更に、本明細書で提供される方法は、合計の凝集検定時間を減少させ得る。表1は、従来の方法および本明細書で例示的な提供される凝集阻害検定方法の実施形態との比較を提供する。以下の表1に示されるように、本明細書で提供される方法は検定時間の20分の1より大きい減少、および凝集検定プロトコルの複雑性の大幅な減少をもたらし得る。



【表 1】

表 1

ステップ	時間 (時間)	
	従来の方法	本発明の方法 の例示的な実 施形態
赤血球の試薬調製	4	該当せず
サンプルの前処理	1 8	0. 5
前処理用試薬のインキュベ ーション	0. 5	0. 1
ウイルスの抗原とのインキュベ ーション	0. 5	0. 3
赤血球の試薬とのインキュベ ーション	0. 8	
合計の時間	2 4	0. 9
ステップ	6	4

10

20

30

40

50

## 【 0 1 0 6 】

本明細書において開示される方法は、客観的で、動的な読み取りの使用により、更に試薬の連続的な希釈の必要性を除去できる。

## 【 0 1 0 7 】

本方法の1つ以上のステップは、ポイント・オブ・サービスの位置またはポイント・オブ・ケアの位置において遂行され得る。本明細書において開示される方法の実施においては、ポイント・オブ・ケアの位置は、医療従事者が、特定の被験者に関する検定データに基づいて、迅速に被験者のための治療を決定することを可能にする。

## I I . 検定

## A . 赤血球凝集反応検定 ( H A 検定 )

## 【 0 1 0 8 】

一態様では、本明細書において提供されるものは赤血球凝集反応検定 ( H A ) に関する、方法、組成物、機器、およびシステムである。赤血球凝集反応検定は、赤血球凝集反応による、ウイルス、バクテリア、抗体または他の赤血球凝集粒子検出の方法の方法として使用され得る。

## 【 0 1 0 9 】

赤血球の凝集は、赤血球凝集反応と称されることができる。

## 【 0 1 1 0 】

本明細書において使用される、用語「可視化粒子」は、凝集し、および巨視的にまたは顕微鏡的に検出される任意の細胞または粒子を指す。「可視化粒子」は、制限なしに、赤血球、他の細胞、およびマイクロスフェアを含む。

## 【 0 1 1 1 】

本明細書において使用される、用語「凝集粒子」は、細胞に結合し、および凝集を引き起こすか、または粒子の可視化を引き起こす、任意の分子または生命体を指す。「凝集粒子」は、制限なしに、ウイルス、ウイルス粒子、および抗体を含む。

## 【 0 1 1 2 】

いくつかの態様では、「赤血球凝集反応検定」または「赤血球凝集反応阻害検定」として本明細書に記載される検定は、H A または H A I 検定において、適切な対応する凝集粒子とともに、R B C の役割で機能する赤血球細胞ではない可視化粒子（例えば、ミクロスフェア、バクテリア）によっても遂行され得る。更に、H A I 検定は、可視化粒子の凝集を凝集粒子により阻害するために、任意の凝集粒子と結合し得る、任意の抗体について検定するために遂行されることができ得る。

10

## 【 0 1 1 3 】

一態様では、本明細書において提供されるものは赤血球凝集反応の改良された検出の方法および測定と同様に、赤血球凝集反応の阻害の改良された検出および測定の方法である。赤血球凝集反応の検出または測定のための検定はH A 検定と称される。赤血球凝集反応の阻害の検出または測定のための検定は、H A I 検定と称される。図 4 は、A ) ウイルスおよび B ) 抗体により誘起される赤血球凝集反応のプロセスを図示している。ウイルスにより誘導された赤血球凝集反応は、例えば、ウイルスまたはウイルス粒子の存在の検出またはウイルスの力価としても知られる、その量の定量のために用いられ得る。抗体により誘導された凝集は、例えば、サンプル中の赤血球の血液型を決定するために用いられ得る。

20

## 【 0 1 1 4 】

一実施形態では、本明細書で提供されるものは、以下のものを含む生物学的サンプル中のウイルス粒子の存在を決定するための方法である：( a ) 赤血球およびウイルス粒子を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、ウイルス粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および( b ) 混合物中で凝集が起きるかを検出することであって、凝集の存在はウイルス粒子の存在を示し、およびステップ( a ) ~ ( b ) は 1 時間未満で生じる。凝集の検出および分析は、本明細書で提供されるように遂行される。

## 【 0 1 1 5 】

別の態様では、本明細書で提供されるものは、以下のものを含む生物学的サンプル中の凝集粒子の存在を決定するための方法である：( a ) 可視化粒子および a 凝集粒子を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、凝集粒子との相互作用を介する、可視化粒子の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および( b ) 前記混合物中で前記凝集が生じるかを検出することであって、前記凝集の存在が、前記凝集粒子の存在を示し、およびステップ( a ) ~ ( b ) は 1 時間未満で生じる。凝集の検出および分析は、本明細書で提供されるように遂行される。

30

## 【 0 1 1 6 】

凝集の検出は、一般的に顕微鏡と連結され得る、スキャナー、カメラ、検出器、またはセンサーなどの画像化機器を用いて凝集の画像を撮影することを含む。

40

## 【 0 1 1 7 】

一般に、検定は、96 - 穴マイクロタイタープレートまたはその等価物などの反応を保持する能力を持つ機器を用いて遂行される。前処理された、検出されるべきウイルス粒子または凝集粒子を含む生物学的サンプルは、希釈剤の緩衝液（例えば、B S A を含む P B S ）により連続的に希釈される。次いで、懸濁物中のあらかじめ固定された R B C または可視化粒子が加えられることができ、次いで穏やかに混合される。この反応は適切な時間の期間、例えば、合計約 15 分インキュベートされる。しかしながら、約 10 または 5 分またはそれより短い、または 20、25、30、35、40、50、60 分、またはそれより長いなどの、15 分より短いか、または長い合計のインキュベーションが用いられ得る。インキュベーションは室温（すなわち、25 °C）、または約 4、8、12

50

、14、16、20、30、35、40、45、50、55、60、65、または70  
なその、室温よりも低いか、または高い温度で行われ得る。インキュベーションの温度及び持続時間は、検定の速度および正確性の両方を達成するために、最適化され得る。前記プレートはスキャナー上で読み取られることができ、およびプレートの最終的な終点の画像が、好適にはプレートが、約20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、または75°などの、20~75°の角度で傾けられた時に撮影され得る。

#### 【0118】

いくつかの実施形態では、凝集検定の画像が、顕微鏡を含む光学的機器により捕捉される。これらの実施形態では、検定は、あらかじめ固定されたRBCまたは可視化粒子が反応に加えられた後に、ウエル（または反応を保持する他の構造）からの少量のサンプル（例えば、1~2μL）が、キュベットまたはチップ中に直接移送され、および顕微鏡を含む光学的機器下に撮像される以外は一般に上述のように遂行される。本明細書においてより詳細に記載されるように会合因子を計算するために、画像が、収集されおよび分析され得る。

10

#### 【0119】

凝集検定を行う持続時間は、一般に検定の速度および正確性の両方を達成するために最適化される。いくつかの実施形態では、検定および検出凝集の遂行は約10分以下、15分以下、20分以下、30分以下、40分以下、50分以下、または60分以下などの1時間未満時間で生じる。いくつかの実施形態では、検定および検出凝集の遂行は1時間を超えるが、しかし2、3、4、5、6、7、または8時間未満で生じる。

20

#### 【0120】

いくつかの実施形態では、凝集ウイルスを含まないことが知られるサンプルを用いて、観察された凝集が、凝集ウイルスまたは凝集粒子に起因することを確実にするためにHA検定が遂行される（すなわち陰性対照）。いくつかの実施形態では、凝集ウイルスを含むことが知られるサンプルを用いて、検定に用いられた赤血球または可視化粒子が、凝集を受け能力があるかを確実にするためにHA検定が遂行される（すなわち陽性対照）。

B. 赤血球凝集反応阻害検定（HAI検定）

#### 【0121】

一態様では、本明細書において提供されるものは、赤血球凝集反応阻害検定（HAI）に関する方法、組成物、機器、およびシステムである。赤血球凝集反応阻害検定は、赤血球凝集反応を阻害するサンプルの能力を測定する。HAI検定は、例えば、凝集ウイルスまたは凝集粒子に結合し、および凝集させるための能力を阻害する能力を有する抗体の存在の検出または測定のために有用である。そのような結合の存在は、ウイルスまたは凝集粒子に対する抗体の存在の有用な指標である。

30

#### 【0122】

図5を参照して、赤血球凝集反応の阻害の概略的な略図が描かれている。いくつかの実施形態では、ウイルスを含む試薬が、選択的にウイルスに結合する抗体を含み得るサンプルとインキュベートされる。ウイルス粒子に結合し得る抗体は、ウイルス粒子の赤血球凝集反応を誘導する能力に干渉し得る。赤血球凝集反応の阻害は、従って抗体の存在を指示するために役立つ。このように、HAI検定は、生物学的サンプル中の抗体を検出または測定するために用いられ得る。

40

#### 【0123】

従来のアプローチにおいては、HAI検定は少なくとも3つのステップで遂行される：  
（1）抗体を含むことが疑われるサンプルの前処理；（2）最大24時間までの、前処理された、抗体を含むことが疑われるサンプルのウイルスとのインキュベーション（ウイルスへの抗体は、ウイルス粒子上のヘマグルチニンに結合し、ヘマグルチニンの不活性化状態にする）；および（3）ステップ（2）からの物質の不活性化、および次いで赤血球の調製（新鮮に作成された）が加えられ、およびその混合物は合計約2時間インキュベートされる。

50

## 【 0 1 2 4 】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、3つの別個のステップの必要性を除去することにより従来の方法を改善する。いくつかの実施形態では、赤血球細胞およびウイルスの抗原試薬は単一の試薬に組み合わせられる。いくつかの実施形態では、凝集粒子および可視化粒子は、単一の試薬に組み合わせられる。

B 1 . 抗体の検出

## 【 0 1 2 5 】

一態様では、生物学的サンプル中の抗体の存在を決定するための方法が提供され、この抗体は、選択的にウイルス粒子に結合し、およびこの方法は以下を含む：(a) 赤血球、ウイルス粒子、および前記抗体を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、前記ウイルス粒子との相互作用を介する赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および(b) 混合物中で凝集が起きるかを検出することであって、この凝集の不在は前記抗体の存在を示し、および前記ステップ(a) ~ (b) は1時間未満で生じる。この凝集の検出および分析は、本明細書で提供されるように遂行される。

10

## 【 0 1 2 6 】

一態様では、生物学的サンプル中の抗体の存在を決定するための方法が提供され、この抗体は、選択的に凝集粒子に結合し、およびこの方法は以下を含む：(a) 可視化粒子、凝集粒子、および抗体を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、凝集粒子との相互作用を介する可視化粒子の凝集を許容する条件下においてインキュベートすること；および(b) 混合物中で凝集が起きるかを検出することであって、凝集の不在が抗体の存在を示し、およびステップ(a) ~ (b) は1時間未満で生じる。この凝集の検出および分析は、本明細書で提供されるように遂行される。

20

## 【 0 1 2 7 】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子および生物学的サンプルは、赤血球が加えられる前に、共にインキュベートされる。いくつかの実施形態では、凝集粒子および生物学的サンプルは、可視化粒子が加えられる前に共にインキュベートされる。

B 2 . ウイルス粒子または赤血球凝集粒子の検出

## 【 0 1 2 8 】

別の態様では、H A I 検定は、特定のウイルス粒子または凝集粒子を検出または測定するために用いられる。特定のウイルス粒子または凝集粒子を含むことが疑われるサンプルが、凝集について、選択的に特定のウイルス粒子または凝集粒子に結合することが知られる、(試薬) 抗体の固定された量の既知の量の存在または不在で検定される。もしサンプルが、抗体の存在下にそれでも凝集を誘導すると、このサンプルは、目的の特定のウイルス粒子または凝集粒子を含まない(または単に低い量で含む)(しかし、異なるウイルスまたは凝集粒子を含む可能性がある)。一方もし、特定の抗体の存在下で、凝集が阻害されることが観察されると、次いでこのサンプル中のウイルス粒子または凝集粒子は、目的の特定のウイルスまたはウイルス粒子に似つかわしい。

30

## 【 0 1 2 9 】

いくつかの実施形態では、H A I 検定は、未知の量のウイルスまたは抗体の滴定なしで遂行される。本明細書での、この方法の客観的分析は、R B C の凝集の状態でのわずかな変化に対してさえも、高度の感受性を提供する。この高い分解能は、凝集/非凝集の間の厳密な転移点を決定することにおける曖昧さを低下させる。このことは滴定の必要性を除去することができ、検定プロトコルを大幅に単純化させる。

40

## 【 0 1 3 0 】

いくつかの実施形態では、凝集ウイルスまたは凝集粒子を含まないことが知られるサンプルを用いて、観察された凝集が、凝集ウイルスまたは凝集粒子に起因することを確実にするためにH A 検定が遂行される(すなわち陰性対照)。いくつかの実施形態では、H A I 検定が、凝集ウイルスまたは凝集粒子を含むが、抗体を欠如することが知られるサンプルを用いて、検定に用いられる赤血球または可視化粒子が凝集を受ける能力を有することを確実にするために遂行される(すなわち陽性対照)。この対照は、それから抗体により

50

誘導される阻害が決定され得る、凝集に対するベースラインの測定を設定することを支援し得る。

#### C. 生物学的サンプル

##### 【0131】

一態様では、本明細書において提供されるものは生物学的サンプル中の抗体の存在、ウイルス粒子、抗原、または凝集粒子の存在を決定するための方法である。

##### 【0132】

本明細書での「生物学的サンプル」は、生物学的ソースから導出されるサンプルを意味する。生物学的サンプルの例は、限定はされないが、血液、血清、唾液、尿、胃液および消化液、涙液、糞便、精液、腔液、腫瘍組織から導出された間質液、眼液、体組織、または脊髄液を含む。被験者の組織サンプルの例は、限定はされないが、結合組織、筋肉組織、神経組織、上皮組織、軟骨、または骨を含む。これらのサンプルは、ヒトまたは動物から提供され得る。これらのサンプルは、生きているまたは死んでいる被験者から採集され得る。これらのサンプルは、被験者から新鮮に採取され得るか、または何らかの前処理、貯蔵。または輸送を受けることができる。

10

##### 【0133】

いくつかの実施形態では、前記生物学的サンプルは、血液から導出された血漿または血清を含む。

##### 【0134】

いくつかの実施形態では、血液、血漿または血清は、抗原に対するワクチンを投与された被験者（例えば、ヒト）から導出され得る。この抗原は、例えば、ウイルス粒子または凝集粒子であり得る。

20

##### 【0135】

被験者は、サンプルを提供することができ、および/またはサンプルは、被験者から採取されることができる。被験者はヒトまたは動物であってよい。この被験者は生きていても、または死んでいてもよい。この被験者は患者、臨床試験の被験者、または前臨床試験の被験者であってよい。被験者は、診断、治療、監視および/または疾患予防を受けることができる。この被験者は、医療専門家のケアの下にあっても、またはなくてもよい。この被験者は、任意の年齢の、幼児、小児、成人または老人であってよい。

##### 【0136】

任意のサンプルの容積が被験者から提供され得る。容積の例は、限定はされないが、約 10 mL 以下、5 mL 以下、3 mL 以下、1 mL 以下、500  $\mu$ L 以下、400  $\mu$ L 以下、300  $\mu$ L 以下、250  $\mu$ L 以下、200  $\mu$ L 以下、170  $\mu$ L 以下、150  $\mu$ L 以下、125  $\mu$ L 以下、100  $\mu$ L 以下、75  $\mu$ L 以下、50  $\mu$ L 以下、25  $\mu$ L 以下、20  $\mu$ L 以下、15  $\mu$ L 以下、10  $\mu$ L 以下、9  $\mu$ L 以下、8  $\mu$ L 以下、7  $\mu$ L 以下、6  $\mu$ L 以下、5  $\mu$ L 以下、4  $\mu$ L 以下、3  $\mu$ L 以下、2  $\mu$ L 以下、1  $\mu$ L 以下、750 nL 以下、500 nL 以下、250 nL 以下、100 nL 以下、50 nL 以下、20 nL 以下、10 nL 以下、5 nL 以下、1 nL 以下、500 pL 以下、100 pL 以下、50 pL 以下、または 1 pL 以下を含み得る。サンプルの量は、約一滴のサンプルであってよい。サンプルの量は、非静脈的ルートから採取された量であってよい。サンプルの量は、指先の突き刺し。または指先穿刺から採取される量であってよい。本明細書において記載されるものを含む、任意の容積、が、本明細書において開示される方法において用いられ得る。

30

40

#### C1. 生物学的サンプルの前処理

##### 【0137】

いくつかの実施形態では、非特異的なバックグラウンドを低下させるために、生物学的サンプルが前処理される。

##### 【0138】

前処理は、一般に、生物学的サンプルに付随するバックグラウンドまたは偽陽性の測定を低減するための処理を含む。血液血清および血漿は、しばしばウイルスのヘマグルチニンに結合しおよび凝集反応の阻害を引き起こす因子 [特にウイルスに対する抗体ではない

50

糖タンパク質]を含む。そのような糖タンパク質の主要なクラスは、タンパク質に共有結合的に連結したポリシアル酸鎖を有する。そのようなタンパク質の存在は、HAI検定において測定された抗体力価を偽って上昇させ、およびHA検定において、測定されたウイルス粒子力価を偽って低下させる。この問題を除外するために、HAまたはHAI検定を行う前に、干渉因子を除去するために、サンプルは前処理されることができる。

#### 【0139】

2つの酵素が、一般に凝集反応において、バックグラウンドを減少させるためのサンプル前処理のために用いられる：(1)糖タンパク質または糖脂質に結合したシアル酸を開裂させる受容体破壊酵素(“RDE”) (例えば、コレラ毒液；例えば、Sigma-Aldrich、製品番号C8772、および(2)エキソまたはエンドポリシアル酸を開裂するノイラミニダーゼ(例えば、VibriocholeraからのタイプIII、1-5ユニット/mgタンパク質；例えば、Sigma-Aldrich、製品番号N7885)。従来の前処理方法は、RDEを約20時間の使用する。

10

#### 【0140】

いくつかの実施形態では、生物学的サンプルは、ノイラミニダーゼにより前処理される。ノイラミニダーゼは、ノイラミンさんのグリコシド結合を開裂するリコシド加水分解酵素の酵素のクラスを称する。ノイラミニダーゼ酵素はウイルスを含む一連の生命体に見出される酵素の大きなファミリーである。ノイラミニダーゼは、受容体などのタンパク質からその末端シアル酸残基の加水分解を触媒する能力により、シアリダーゼとも呼ばれる。ノイラミニダーゼの主要なクラスは、ウイルスのノイラミニダーゼ、バクテリアのノイラミニダーゼ、哺乳類のノイラミニダーゼ、リソソームのシアリダーゼ、細胞質のシアリダーゼ、および膜シアリダーゼを含む。

20

#### 【0141】

いくつかの実施形態では、生物学的サンプルノイラミニダーゼによる前処理は、反応速度における利点を提供する。いくつかの実施形態では、サンプル前処理は、サンプルをノイラミニダーゼと30分未満インキュベートすることにより遂行される。

#### 【0142】

実施例 of ノイラミニダーゼ処理の例が、本明細書において提供される。一般に、適正な量のノイラミニダーゼが、血清または血漿に加えられ、および反応に適切な温度(例えば、約4、8、10、15、20、25、30、35、37、40、45、50、55、60、65、または70 で)で、適切な時間の期間インキュベートされる。反応に加えられるノイラミニダーゼの量は、酵素の活性および血清の性質に依存する。いくつかの反応では、約0.01、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.2、1.4、1.6、1.8、2、2.2、2.4、2.6、2.8、3、4、5、6、7、8、9または10ユニット(U)ノイラミニダーゼ/リットルが前処理ステップにおいて用いられる。ノイラミニダーゼは、適切な緩衝溶液(例えば、100mM酢酸ナトリウム、pH5.5、0.15MNaCl、4mM $CaCl_2$ )において調製される。いくつかの実施形態では、処理は、生物学的サンプルを、ノイラミニダーゼと、約10、15、20、25、30、40、50、60、90、または120分未満インキュベートすることにより遂行される。ノイラミニダーゼ反応は、ノイラミニダーゼ酵素を不活性するために用いられるが、サンプルに対しては全くか、または最小の損傷しか与えない溶液である「停止溶液」により停止され得る。一実施例では、停止溶液はpH8.2のリン酸ナトリウム溶液中の1.5%クエン酸ナトリウムである。一実施例では、停止溶液を用いる停止反応は、5倍容積のpH8.2のリン酸ナトリウム溶液中の1.5%クエン酸ナトリウムをノイラミニダーゼ反応に加えて、およびその混合物を56 で5分間インキュベートすることにより行われる。

30

40

#### 【0143】

いくつかの実施形態では前記前処理は、生物学的サンプルをノイラミニダーゼとインキュベートすることにより遂行され、および混合物中のノイラミニダーゼの最終濃度は、約0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.2、1.4、1.6、1.8、または2U/

50

リットル、またはそれより大きいか、または小さい。

【0144】

不活性化の後、前記反応は、室温まで放冷される。いくつかの実施形態では、処理されたサンプルは本明細書において提供される検定に使用されるに先立ち希釈（例えば、1：2、1：3、1：4、1：5、または1：10希釈）される。

【0145】

検定は、生物学的サンプル、抗原、赤血球、ウイルス粒子、凝集粒子、可視化粒子、抗体、またはそれらの任意の組み合わせの連続的希釈により遂行され得る。しかしながら、いくつかの実施形態では、連続的希釈の必要性は、迅速な凝集の検定分析について、本明細書において記載される方法の使用により、減少されるかまたは除去される。

10

D．標的の分析

【0146】

本明細書において提供される方法は、生物学的サンプル中の標的の検体を検出するために用いられる。標的の検体は、制限なしに、抗体、抗原、ウイルス粒子、バクテリア粒子、または凝集粒子であることができる。

D1．抗体標的検体

【0147】

一態様では、生物学的サンプル中の抗体の検出および測定方法が提供される。いくつかの実施形態では、検出可能な抗体は選択的にウイルス粒子に結合する。いくつかの実施形態では、検出可能な抗体は選択的に凝集粒子に結合する。

20

【0148】

いくつかの実施形態では、サンプルは赤血球を凝集させる能力を有するウイルス粒子上の1つ以上のエピトープに結合する抗体を含む任意の抗血清であるか、または赤血球を凝集させる能力を有することが疑われる任意の抗血清であってよい。代替的にまたは追加的に、前記抗血清は、ヘマグルチニンタンパク質上の1つ以上のエピトープに結合する抗体を含む任意の抗血清であるか、またはヘマグルチニンタンパク質の1つ以上のエピトープに結合する能力を有する抗体を含むことが疑われる任意の抗血清であってよい。代替的にまたは追加的に、前記抗血清は、凝集粒子上に存在する1つ以上のエピトープに結合する抗体を含む抗血清であってよい。前記抗血清は、ヒト、トリ、ウマ、ウサギ、マウス、ヤギ、ブタ、モルモットまたはラットなどの任意の生存しているソースから得られる血清であってよい。抗血清の生存しているソースは、特定の抗原により免疫化されることができ、この生存しているソースは、特に抗原に曝露される必要はない。前記抗血清は、ウイルス、ヘマグルチニンタンパク質、または凝集粒子に結合する抗体を含むように、生体外で生成された血清であってよい。前記抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであってよい。更に、前記抗体は完全な長さであるか、またはFab、F(ab)<sub>2</sub>、またはFvフラグメントなどの抗原結合フラグメント、および単鎖抗体であってよい。前記抗体は、天然に発生する抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体であってよい。そのソースには関わらず、凝集ウイルス、ヘマグルチニンタンパク質、または凝集粒子に結合するいかなる抗体も検定において用い得る。ヘマグルチニンまたは凝集粒子に特異的に結合し、および凝集を妨げるかまたは阻害する他のタイプの試薬も用い得る。そのような結合剤の例は、制限なしに、アプタマーおよびレクチンを含む。

30

40

【0149】

いくつかの実施形態では、血漿、血清、または抗血清サンプルは、凝集ウイルスまたは凝集粒子に対するワクチンを投与された被験者から得られる。従って、本明細書において提供されるものは、被験者からのサンプル中の凝集ウイルスまたは凝集粒子に対する抗体の存在を、本開示のHAI検定を用いて、検出および/または測定することにより評価される、被験者の有効な免疫化を決定するための方法でもある。

【0150】

当業者は、特定の検定において用いられる抗血清または抗体の濃度が、抗血清のソース、抗血清中の抗体のタイプ、抗血清中の抗体の親和性、抗血清の非抗体構成要素の濃度、

50

サンプル容積、および検定で用いられる他の構成要素のソースおよび濃度などの一連の異なる因子に依存することを理解するであろう。更に、検定で用いられる前記抗血清の濃度は、いくつかの場合には、抗血清中の抗体が従来のHAI検定において赤血球凝集反応が生じることを妨げ得る、抗血清の最も低い希釈の既知の値に基づき得る。より高いおよびより低い抗血清の濃度が、この希釈に基づいて、本明細書で提供される検定の開始点として用いられ得る。例えば、もし1:128希釈が従来のHAI検定において、赤血球凝集反応が妨げられる、この抗血清の最も低い希釈である場合、実施形態では、1:64、1:128、1:512、1:1024、1:2048、1:4096および1:8192の希釈が本明細書で提供される方法において用いられ得る。当業者は、2またはいくつかの他の数の倍数に基づいて、抗血清の任意の希釈、または任意の一連の希釈が用いられ得ることを理解するであろう。一態様では、検定の最終的混合物中の抗体の濃度は、約、例えば、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10、20、30、40、または50 nMであり得る。別の態様では、検定の最終的混合物中の抗体の濃度は、約、例えば、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、2・g/mL、4・g/mL、6・g/mL、8・g/mL、10・g/mL、または20・g/mLであり得る。そのような態様においては、ウイルスのエピトープに対する抗血清中の抗体の解離定数( $K_D$ )は、約0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40または50 nMであり得る。一態様では、最終検定混合物中のウイルスの濃度は、約5、10、15、または20赤血球凝集反応単位/mL。赤血球凝集反応単位(HA単位)は、赤血球凝集反応が従来のHA検定において生じるウイルスの最も低い希釈である。

10

20

#### 【0151】

本開示の方法は、サンプル中の抗体の検出および/または測定のための改良を提供し、およびいくつかの実施形態では、この方法を遂行する合計の時間の量は、500、400、300、200、180、160、140、120、100、90、75、60、45、40、30、25、50、15、10、または5分未満である。いくつかの実施形態では、この方法を遂行する合計の時間の量は、約30~60分である。

#### 【0152】

実施形態では、目的のサンプルの抗体の量を決定するためのHAI検定において、既知の量のウイルスまたは他の凝集粒子および/または既知の量の可視化粒子が未知の量の目的の抗体を含むサンプルと共に用いられる。目的の抗体は、既知の量のウイルスまたは他の凝集粒子に特異的に結合し得る。実施形態では、目的の抗体を含むサンプルの、既知の量のウイルスまたは他の凝集粒子が可視化粒子を凝集させる能力に対する影響の測定は、サンプル中の目的の抗体の量の決定を可能にし得る。目的の抗体のウイルスまたは他の凝集粒子への結合は、前記粒子が可視化粒子を凝集させることを阻害し得る。これらの検定では、サンプル中の、ウイルスまたは他の凝集粒子に対する抗体の存在は、粒子の凝集性を低下または除去し得る。

30

#### D2. ウイルス粒子検体

#### 【0153】

別の態様では、本明細書において提供されるものは、生物学的サンプル中のウイルス粒子の存在を決定するための方法である。

40

#### 【0154】

多くのウイルスが、RBCの表面上に存在する分子に結合する。このことの帰結は、特定の濃度において、ウイルスの懸濁物は表面受容体に結合するか、またはN-アセチルノイラミン酸を含む受容体の修飾により、RBCを凝集させることである。複数のRBCの単一のウイルス粒子またはバクテリアへの結合は、RBCの凝集(赤血球凝集反応)をもたらす。このように凝集を促進するウイルスは、凝集ウイルスと称される。いくつかの実施形態では、本開示の方法は凝集ウイルスを検出または測定するために用いられる。他の実施形態では、本開示の方法は、凝集ウイルスへの抗体を検出または測定するために用い

50



られる。

【0155】

凝集ウイルスは、限定はされないが、ピコルナウイルス、コロナウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、オルトミクソウイルス、ブニヤウイルス、アレナウイルス、レオウイルス、レトロウイルス、パピロマウイルス、パルボウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、肝炎ウイルス、および海綿状ウイルスを含む多くの異なるタイプのウイルスを含む。他の凝集ウイルスは、インフルエンザ、単純ヘルペスウイルス1および2、はしか、デング、疱瘡、ポリオ、HIV、H1N1ソロモン諸島型、H3N2ウイスコンシン型ウイルス、トリH5N1ベトナム型ウイルス、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、およびインフルエンザウイルスの任意の株を含み得る。

10

【0156】

更なる凝集ウイルスは、ヒト以外の霊長類のウイルスを含み、その限定しない例は、オランウータンヘルペスウイルス1、オランウータンヘルペスウイルス3、オナガザルヘルペスウイルス1(Bウイルス、HV *simiae*)、オナガザルヘルペスウイルス2(SA8)、オナガザルヘルペスウイルス3(SA6)、オナガザルヘルペスウイルス4(SA15)、オナガザルヘルペスウイルス5(アフリカミドリザルサイトメガロウイルス)、オナガザルヘルペスウイルス6(リパプールバーベットモンキー(Liverpool vervet monkey)ウイルス)、オナガザルヘルペスウイルス7(パタスマンキー(Patas monkey)HV; MMVまたはPHV *delta* HV)、オナガザルヘルペスウイルス8(アカゲザル(Rhesus monkey)サイトメガロウイルス)、オナガザルヘルペスウイルス9(メディカル・レーク(Medical Lake)・マカクLVサル水痘帯状疱疹HV(Medical Lake macaque LV simian varicella HV))、オナガザルヘルペスウイルス10(アカゲザル白血球随伴LVIT株(Rhesus leukocyte assoc. LV strain IT))、オナガザルヘルペスウイルス12(LVヒヒ属(LV *papio*)、ヒヒLV(*baboon* LV))、オナガザルヘルペスウイルス13(ヘルペスウイルスシクロピス(*cyclopiis*))、オナガザルヘルペスウイルス14(アフリカミドリザルEBV様ウイルス)、オナガザルヘルペスウイルス15(アカゲザルEBV様HV(Rhesus EBV-like HV))、クモザルヘルペスウイルス1(クモザルHV)、クモザル亜科ヘルペスウイルス2(HV *ateleles*)、マーモセット科ヘルペスウイルス(HVサギナス(*saguinus*))、マーモセットヘルペスウイルス(SSG、マーモセットサイトメガロウイルス)、オマキザルヘルペスウイルス1(カプチン(*Capuchin*) HV)、オマキザル科ヘルペスウイルス2(カプチン(*Capuchin*) HV)、オランウータンヘルペスウイルス1(チンパンジーHV; *pan* HV)、オランウータンヘルペスウイルス2(オランウータンHV)、オランウータンヘルペスウイルス3(ゴリラHV)、リスザルヘルペスウイルス1(マーモセットHV、ヘルペスT、HV)、タマリナス(*tamarinus*)、HV広鼻猿類(*platyrrhinae*)、(タイプリスザルヘルペスウイルス2)リスザルHV、およびHVリスザル(*saimiri*)。

20

30

40

【0157】

凝集ウイルスは、限定はされないが、以下を含む哺乳類のウイルスを称することができる：ウシヘルペスウイルス1-5、ヒツジヘルペスウイルス1-2、アルセラフィンヘルペスウイルス1、パルボウイルス(マウス微小ウイルス、アリューシャンミンク秒、ウシパルボウイルス、イヌパルボウイルス、ニワトリパルボウイルス、ネコ汎白血球減少症、ネコパルボウイルス、ガチョウパルボウイルス、HBパルボウイルス、H-1パルボウイルス、キルハム(Kilham)ラットラピーヌ(*lapine*)パルボウイルス、ミンク腸炎を含む)エリスロウイルス(アデノ随伴タイプ1-5、ウシアデノ随伴、イヌアデノ随伴、ウマアデノ随伴、ヒツジアデノ随伴を含む)。

【0158】

50

凝集ウイルスの更なる非制限的な例は以下を含み得る：カリフラワー・モザイク、バドナウイルス、ジェミニウイルス、植物レトロウイルス、クリプトウイルス、ラブドウイルス科、トマト軟化えそ (Tomato Spotted mosaic)、テヌイウイルス、ジャガイモウイルス、ポチウイルス科、クロステロウイルス、ターニップイエローモザイク (Turnip Yellow mosaic)、トマトブッシイモザイク (Tomato Bushy mosaic)、ルテオウイルス、セキウイルス科、タバコモザイク、ササゲモザイク、ダイコンひだ葉モザイク (Pea Enation mosaic)、アカクローバー葉脈モザイク (Red Clover vein mosaic)、プロムモザイク (Brome mosaic)、キュウリモザイク、アルファルファモザイク、オオムギ縞萎縮 (Barley yellow mosaic)、テンサイそ

10

#### 【0159】

以下の科からのウイルスも本開示の方法における使用に含まれる：バキュロウイルス科およびヌディウイルス科、ポリドナウイルス科、アスコウイルス科、ノダウイルス科、テトラウイルス科、テトラウイルス科、トンパスウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、トガウイルス科、プロモウイルス科、バマウイルス科、トチウイルス科、バルティティウイルス科、ハイポウイルス科、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科、フィロウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、アレナウイルス科、レピウイルス科、ピコルナウイルス科、セキウイルス科、コモウイルス科、ポチウイルス科、カリシウイルス科、アストロウイルス科、ノダウイルス科、イノウイルス科、ミクロウイルス科、ジェミニウイルス科、サーコウイルス科、バルボウイルス科、ヘパドナウイルス科、レトロウイルス科、シストウイルス科、レオウイルス科、ビルナウイルス科、ミオウイルス科、サイフォウイルス科、ポドウイルス科、テクティウイルス科、コルチコウイルス科、プラズマウイルス科、リポリクスウイルス科、フセロウイルス科、ボックスウイルス科、アフリカブタコレラ様ウイルス、イリドウイルス科、フィコドナウイルス科、バキュロウイルス科、ヘルペスウイルス科、アデノウイルス科、パポヴァウイルス科、ポリドナウイルス科、ピコルナウイルス科、カリシウイルス科、アストロウイルス科、トガウイルス科、フラビウイルス科、コロナウイルス科、アルテリウイルス科、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科、フィロウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、アレナウイルス科、レオウイルス科、ピマウイルス科、レトロウイルス科、肝炎ウイルス科、サーコウイルス科、バルボウイルス科、パポバウイルス科、アデノウイルス科、ヘルペスウイルス科、ボックスウイルス科、およびイリドウイルス科。

20

30

40

#### 【0160】

当業者は、特定の検定において用いられるウイルスの濃度が、ウイルスの正体、サンプル容積、および検定で用いられる他の構成要素のソースおよび濃度などの一連の異なる因子に依存することを理解するであろう。更に、検定で用いられる前記ウイルスの濃度は一般に、赤血球凝集反応が従来のHA検定で生じる、ウイルスの最も低い希釈の既知の値に基づく。この希釈は1赤血球凝集反応単位 (“HA単位”または“HAU”) とみなされる。1HAUに基づく、より高いおよびより低いウイルスの濃度が、検定の出発点として用いられ得る。例えば、例えば、もし1:128希釈が従来のHAI検定において、赤血球凝集反応が生じる、最も低いウイルスの希釈である場合、実施形態では、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024、1:2048、1:4096および1:8192の希釈が本明細書で提供される方法と用いられ得る。当業者は、2またはいくつかの他の数の倍数に基づいて、ウイルスの任意の希釈、または任意の一連の希釈が用いられ得ることを理解するであろう。

#### D3. バクテリアの検体

#### 【0161】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、RBCの細胞表面の分子または可視化粒子に結合し得る能力を有し、および凝集を誘導し得るバクテリアの検出に用いられ得る。

50

#### D 4 . 凝集粒子検体

##### 【 0 1 6 2 】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、細胞またはミクロスフェアに結合し、および細胞またはミクロスフェアの凝集を引き起こし得る任意の粒子を検出するために用いられ得る。そのような粒子は、本明細書において「凝集粒子」と称される。凝集粒子は、制限なしに、ウイルス、バクテリア、ウイルス粒子、アレルゲン、および抗体を含み得る。他の例では、凝集粒子は、タンパク質および炭水化物 R B C の表面または他の細胞（例えば、レクチン）に対する結合特異性を有する。更に、ミクロスフェア（ミクロスフェアは、以下に議論されるように、それらの表面に広範囲の様々な分子を持つように調製される）の文脈において、ミクロスフェア表面の分子に結合し得る全ての分子が凝集粒子として機能し得る。

10

#### E . 赤血球

##### 【 0 1 6 3 】

一態様では、本開示は、「赤血球」と互換可能に用いられる、赤血球細胞（“ R B C ”）の凝集の検出および測定のための方法を提供する。

##### 【 0 1 6 4 】

赤血球は、鉄を含む生体分子であり、酸素と結合し、および血液の赤い色の原因であるヘモグロビンを含む、酸素を送達する細胞である。ウイルスなどの凝集粒子の存在下においてその細胞が凝集する潜在的な能力を備えている限り、様々な生命体からの赤血球が、本明細書において開示される方法において用いられ得る。適切な赤血球としては、制限なしに、ガチョウ、ニワトリ、カモ、およびシチメンチョウ赤血球細胞などの鳥類の赤血球、およびヒト赤血球、モルモット赤血球、マウス赤血球、ラット赤血球、ウシ赤血球、ウマ赤血球、ヤギ赤血球およびヒツジ赤血球などの哺乳類の赤血球を挙げることができる。ヒト赤血球は、A型赤血球、B型赤血球、AB型赤血球、およびO型赤血球などのいかなる血液型のドナーからのものでもあり得る。

20

##### 【 0 1 6 5 】

いくつかの実施形態では、赤血球は凝集について検定され、および赤血球の濃度が約 0 . 0 1 %ヘマトクリット未満、約 0 . 0 5 %ヘマトクリット未満、約 0 . 1 %ヘマトクリット未満、約 0 . 1 5 %ヘマトクリット未満、約 0 . 2 %ヘマトクリット未満、約 0 . 5 %ヘマトクリット未満、約 1 %ヘマトクリット未満、約 5 %ヘマトクリット未満、約 1 0 %ヘマトクリット未満、約 1 5 %ヘマトクリット未満、約 2 0 %ヘマトクリット未満、約 3 0 %ヘマトクリット未満、約 4 0 %ヘマトクリット未満、または約 5 0 %ヘマトクリット未満の濃度で存在するように選ばれることができる。

30

##### 【 0 1 6 6 】

ヘマトクリット（H tまたはH C T）または血中血球容積（P C V）または赤血球容積分率（E V F）は、赤血球細胞により占有される血液容積のパーセンテージである。

#### E 1 . 赤血球の固定化

##### 【 0 1 6 7 】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される方法を用いて検定される赤血球は前処理される。

40

##### 【 0 1 6 8 】

従来の赤血球凝集反応法で用いられる赤血球細胞試薬は、複雑な洗浄手順を用いて新鮮に調製されなければならない。従来の手順は労働集約的であり、不便であり、および時間のかかるものである。対照的に、いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は単一の安定な固定された赤血球調製物を用いるので、試薬調製は検定を行うときに必要とされる。

##### 【 0 1 6 9 】

前処理は、あらかじめ固定された赤血球を生成するための赤血球の事前固定化（p r e - f i x a t i o n）を含む。赤血球の事前固定化は、血液サンプルから新鮮に赤血球を調製する必要性の除去に起因する検定時間の削減、および均一な事前に固定された赤血球

50

サンプルの使用による、凝集検定の再現性を含む膨大な利点を提供し得る。当技術分野では赤血球の固定化方法は既知であり、および米国特許第 5, 994, 139 号に記載されるものを含む。

【0170】

いくつかの実施形態では、赤血球は、ホルムアルデヒドなどのモノアルデヒド、グルタルアルデヒドなどのアルデヒド、およびホルムアルデヒドと等価であるパラホルムアルデヒドなどのポリマー性の形態を含む有機アルデヒドとの処理によりあらかじめ固定される。いくつかの実施形態では、赤血球はグルタルアルデヒドとの処理によりあらかじめ固定される。この固定された細胞は、本質的に無期限に安定である（対照的に、新鮮な赤血球は毎日調製されなければならない、および日ごとに変動する）。固定化は、ウイルスのヘマグルチニンまたは他の凝集粒子が結合する細胞表面受容体を不活性化しない。

10

【0171】

いくつかの実施形態では、動物の赤血球細胞が、新鮮に洗浄された動物の RBC をグルタルアルデヒド緩衝溶液に短時間曝露し、および生理食塩水により完全に洗浄することにより調製される。この処理は、赤血球の自然の抗原性を大部分保存する一方、細胞を一般的に浸透圧性ショック、冷凍・解凍または免疫溶血反応による溶解に対して抵抗性にする。これらの試薬は、赤血球凝集反応手順において直接用いられ得るか、または赤血球凝集反応検査のための様々なタンパク質と連結され得る。グルタルアルデヒドにより安定化された RBC は、一般的に 0.1% アジ化ナトリウムを含む生理食塩水中の細胞懸濁物として保存される。

20

【0172】

グルタルアルデヒド固定化により安定化された赤血球細胞は、ウシ、ネコ、ニワトリ、イヌ、ヤギ、モルモット、ハムスター、ウマ、サル、マウス、ブタ、ラット、ヒツジ、シチメンチョウおよびウサギからのグルタルアルデヒドにより安定化された動物の赤血球細胞を提供する、Fitzgerald Industries (マサチューセッツ州アクトン (Acton)) などの商業的なソースから入手可能であり、これらの全てが本明細書で提供される方法において使用され得る。

【0173】

いくつかの実施形態では、前記赤血球は、グルタルアルデヒド固定化により安定化されたシチメンチョウ赤血球である。いくつかの実施形態では、異なる動物種からの新鮮な赤血球および細胞も用いられ得る。

30

F. 他のタイプの細胞

【0174】

いくつかの実施形態では、赤血球細胞以外の細胞が、これらの細胞がウイルス粒子、抗体、または他の凝集粒子の存在下で凝集する限り、本明細書で提供される方法のために使用され得る。

G. ミクロスフェア

【0175】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、その凝集物が顕微鏡的に検出されるために十分大きいという条件で、任意の非細胞分子または粒子の凝集を測定するために用いられる。そのような粒子は本明細書において「ミクロスフェア」と称される。従って、本明細書において提供される検定において、RBC はミクロスフェアで置換されることができ、その表面は、ウイルス粒子、抗体、または他の凝集粒子または検出されるべき物質と線性的に結合する、抗原または抗体と連結される。

40

【0176】

適切なミクロスフェアの例は、ウイルス粒子、抗体、タンパク質、炭水化物、または抗原に容易に結合し、および凝集することができるラテックスミクロスフェアおよび他のミクロスフェアを含む。一実施形態では、前記ミクロスフェアは、ビーズである。いくつかの実施形態では、ミクロスフェアは、ラテックス、金、ガラス、またはシリカを含む。一実施形態では、前記ミクロスフェアは、ウイルス粒子に結合する受容体により被覆された

50

ラテックスマイクロスフェアである。一実施形態では、マイクロスフェアは、ヘマグルチニンタンパク質、または血液型抗原（例えば、抗原 A、B、D、など）により被覆される。

【0177】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、凝集試験のために抗原により被覆されたマイクロスフェアを用いる。その名前に関わらず、マイクロスフェアは、制限なしに、球状、直方体、円筒状、および不規則を含む任意の形状であってよい。それらは、抗原に結合しおよび凝集検定での使用に適切な任意の物質を含み得る。

【0178】

抗原はマイクロスフェアに連結され得る。抗原のマイクロスフェアピースへの結合のための方法は、当技術分野で周知である。連結は、マイクロスフェアの表面、または外表面から接近できる内表面に対するものであることができる。抗原は、Luminex Corporation（テキサス州オースチン（Austin））より提供されているようなピースと、製造者の推奨に従った2ステップのカルボジイミド処理により連結され得る。いくつかの実施形態では、前記抗原は、前記マイクロスフェアに吸着されるか、または共有結合的に結合される。

10

【0179】

いくつかの実施形態では、複数の抗原が用いられることができ、それぞれが別個のまたは同じマイクロスフェアに結合される。マイクロスフェアとの連結に用いられる抗原は、本明細書で提供される方法を用いる抗体または凝集粒子により認識され得る、ウイルスの抗原性部分を含む。ウイルスの抗原性部分は、限定はされないが、ウイルスの膜タンパク質および非構造タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、それぞれが異なる抗原または抗体に連結されるマイクロスフェアの混合物が用いられ得る

20

H. 非特異的タンパク質および他の分子

【0180】

いくつかの実施形態では、凝集反応を加速するために非特異的なタンパク質が凝集検定に加えられる。非特異的なタンパク質の添加は、反応を約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、10倍、20倍、または30倍を超えて加速できる。適切な非特異的タンパク質は、限定はされないが、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリおよびヒトなどの様々な動物からのアルブミンを含む、アルブミンを含む。アルブミンの他の非制限的な例は、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、ニワトリ卵白由来アルブミン、ウシラクトアルブミンおよびヒトラクトアルブミン。

30

【0181】

加えて、合成ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリエチレンオキシド（PEO））、糖ポリマー（例えば、デキストラン）、デキストラン硫酸、ジエチルアミノエチル-デキストラン（DEAE-デキストラン）およびポリビニルピロリドンなどの他の巨大分子種も、凝集を加速するために用いられ得る。

【0182】

前記検定に加えられる非特異的な添加物の量は変化することができ、および一般的には約0.1~50mg/mlの間の任意の量であり得る。特定の方法では、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、または50mg/mlの非特異的な添加物が前記検定に加えられる。いくつかの実施形態では、たかだか0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、または50mg/mlの非特異的なが前記検定に加えられる。

40

【0183】

非特異的な添加物は、前記検定で用いられる、希釈剤緩衝液または他の緩衝液/試薬に加えられ得る。

I. 提供される凝集検定の特定の利点

【0184】

本明細書において記載される組成物、方法、システム、および機器は、従来の凝集検定を上回る複数の異なる利点を凝集検定に対して提供する。

50

## I 1 . 増大された感度

### 【 0 1 8 5 】

実施形態では、本明細書で提供される方法は、従来の凝集検定を上回る凝集検出の増大された感度を有し得る。

### I 1 a . 増大された感度 - 画像分析

#### 【 0 1 8 6 】

一実施形態では、凝集検定感度は、凝集反応（以下で更に議論される）を分析するための画像分析の使用により増大される。画像分析の使用は、検定感度を従来の凝集検定の約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、または100倍に増大させ得る。

10

### I 1 b . 増大された感度 - 濃度 / 希釈ステップ

#### 【 0 1 8 7 】

別の実施形態では、凝集検定感度は、凝集粒子（例えば、ウイルス粒子）および可視化粒子（例えば、RBCまたはミクロスフェア）を含む反応混合物を濃縮することに次いで、濃縮された物質の希釈、および凝集の後続する分析により増大され得る。この方法において、濃縮ステップにおいて、前記凝集粒子および可視化粒子は、密接な近接にもたらされ、凝集粒子の可視化粒子への結合が促進される。次いで、濃縮された物質を希釈するステップでは、特異的に凝集した可視化粒子だけが、凝集したままで残る（すなわち濃縮ステップの間に非特異的に凝集した可視化粒子は、希釈ステップの間には、凝集したままで残らない）。この方法を用い、検出可能な凝集を生成するために、より少ない凝集粒子が検定で用いられることができる。それに応じて、HAI検定では、より少ないサンプル中の抗体が、凝集阻害を引き起こすために必要となる。従って、より少ない凝集粒子および/より少ない抗体が、凝集または凝集阻害を引き起こすために必要なので、この方法は、凝集検定の感度を増大させ得る。

20

#### 【 0 1 8 8 】

一実施形態では、凝集検定の感度は、以下のステップを含む方法により凝集検定を遂行することにより増大され得る。第一に、目的の生物学的抗体を含むことが疑われるサンプルが、凝集粒子および可視化粒子と混合されおよびインキュベートされる。いくつかの態様では、前記生物学的サンプルは、可視化粒子の添加の前に凝集粒子とインキュベートされ得る。第二に、凝集粒子、可視化粒子、および目的の抗体を含むことが疑われるサンプルを含む反応は、ペレットを生成するために遠心分離される。典型的には、この方法による遠心分離は、再懸濁が困難な複合体を生成させないために、穏やか（数分間にわたり数百から低い数千×g）である。第三に、上澄みが除去され、および前記ペレットが凝集した粒子または可視化粒子に干渉しない、緩衝液により1~2回洗浄される。第四に、この洗浄されたペレットが緩衝液に再懸濁される。第五に、この再懸濁された反応混合物が凝集について分析される。

30

#### 【 0 1 8 9 】

別の実施形態では、抗体を凝集粒子として用いる凝集検定では、洗浄された凝集反応に目的の抗体のタイプに対する抗体を加えることにより、更に検定の感度が増大され得る。一実施形態では、上記に記載される濃度 / 希釈ステップを含む凝集反応において、目的の抗体がヒトのものである場合、洗浄されたペレットが再懸濁されるときに、抗ヒトグロブリン（クームス（Coombs）試薬）も、再懸濁されたペレットに加えられる。再懸濁されたペレットを抗 - ヒトグロブリンとインキュベートした後に、再懸濁された反応が凝集について分析される。この方法では、抗ヒトグロブリンは可視化粒子に結合し得る目的の抗体に結合する。抗 - ヒトグロブリン目的の抗体の複数の抗体を寄せ集めることができ、およびこれらの抗体のそれぞれが、1つ以上の可視化粒子に結合できるために、抗ヒトグロブリンの添加は凝集検定の感度を増大させ得る。特定の抗体のタイプを同定するために、この方法の特異性は抗ヒトグロブリンよりはむしろ、抗ヒトIgM、IgG、またはIgAを用いることにより更に増大されることができる。

40

## I 2 . 増大された速度

50

## 【 0 1 9 0 】

一態様では、本明細書で提供される検定は、速度に関する利点を提供し得る。従来の凝集検定は、少なくとも12～18時間のインキュベーションを伴う前処理ステップを必要とする。本開示のいくつかの方法では、前処理ステップは、15分未満、30分未満、1時間未満、2時間未満で遂行される。更に、本開示の方法は、従来の手順を用いて4時間かかり得るプロセスである、赤血球の新鮮な調製の必要性を除去する。従来のHAI検定方法では、目的の抗体を含み得るサンプルとウイルスの抗原および赤血球とのインキュベーションは、2つの別個のステップとして行われるが、本明細書において開示される、いくつかの実施形態では、ウイルスの抗原および赤血球が共に目的の抗体を含み得るサンプルに、単一のステップで加えられる。実施形態では、本開示のHA検定またはHAI検定は、1時間未満、1.5時間未満、2時間未満、2.5時間未満、3時間未満で遂行される。

10

## 【 0 1 9 1 】

本開示の方法は、サンプル中のウイルスの検出および/または測定についての改良を提供し、およびいくつかの実施形態では、方法を遂行するための合計の時間の量は、500、400、300、200、180、160、140、120、100、90、75、60、45、30、15、10、5分未満である。いくつかの実施形態では、方法を遂行するための合計の時間の量は、30～60分である。

I 2 a . 増大された速度 - 画像分析

## 【 0 1 9 2 】

一実施形態では、凝集検定の速度は、凝集反応を分析するための画像分析の使用により増大され得る（以下で更に議論される）。

20

I 2 b . 増大される速度 - 試薬および検定 ステップ

## 【 0 1 9 3 】

他の実施形態では、凝集 検定の速度は、凝集 反応の性能および/または分析を加速するための改良された試薬および/または検定 ステップの使用により増大され得る。例えば、本明細書の他の場所に記載されるように、サンプル前処理の任意の1つ以上の改良（例えば、ノイラミニダーゼの使用による）、あらかじめ固定されたRBCまたはマイクロスフェアの使用、use of 組み合わせられた 検定 ステップの使用（例えば、可視化 粒子の添加の前に第一に凝集 粒子および抗体を含むサンプルをインキュベートすることよりも、むしろ凝集 粒子、可視化 粒子、および抗体を含むサンプルの、単一のインキュベーション ステップでの混合による）、および検定媒質組成物における改良は、正確な凝集 検定結果を得るために必要な時間を減少させ得る。

30

I 3 . 減少された容積

## 【 0 1 9 4 】

一態様では、本明細書で提供される方法は、反応容積に関して利点を提供し得る。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される凝集検定方法は、約50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1マイクロリットル以下の反応容積において遂行され得る。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される凝集検定は、約50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1マイクロリットル以下の血液サンプルを用いて遂行され得る。

40

J . 一般 - 凝集検定

## 【 0 1 9 5 】

凝集の検出は、一般的にスキャナー、カメラ、検出器、またはセンサーなどの画像化機器を用いて凝集反応生成物の画像を撮影することを含む。いくつかの実施形態では、画像化機器は顕微鏡に連結される。

## 【 0 1 9 6 】

一般に、検定は、マイクロタイタープレート（96孔、または他の形式）、試験管、マイクロチューブ（microfuge tube）、毛細管、ピペットチップまたは他の容器などの反応を保持する能力を持つ機器を用いて遂行される。前処理された検出されるべ

50

き抗体を含む生物学的サンプルは、希釈剤緩衝液（例えば、BSAを含むPBS）により、随意的に連続的に希釈される。次に、ウイルス粒子が、容器に加えられることができ、および各容器の内容物が穏やかに混合される。次いで、あらかじめ固定されたRBC懸濁物が加えられることができ、続いて穏やかに攪拌される。この反応は、適切な時間の間、例えば合計約15分、インキュベートされる。しかしながら、約5、10、20、25、30、35、40、50、60分、またはそれより短いか、もしくは長いなどの、15分より短いか、または長い合計のインキュベーションも用いられることができる。このインキュベーションは、室温（すなわち、25℃）、または約4、8、12、14、16、20、30、35、40、45、50、55、60、65、または70℃なその、室温よりも低いか、または高い温度で行われ得る。インキュベーションの温度及び持続時間は、検定の速度および正確性の両方を達成するために、最適化され得る。前記プレートはスキャナー上で読み取られることができ、およびプレートの最終的な終点の画像が、好適にはプレートが、水平に対して約20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、または75°などの、20～75°の角度で傾けられた時に撮影され得る。

10

20

30

40

50

#### 【0197】

いくつかの実施形態では、凝集検定の画像が、顕微鏡を含む光学的機器により捕捉される。これらの実施形態では、前記検定は、あらかじめ固定されたRBCまたは可視化粒子が反応に加えられた後に、ウェル（または反応を保持する他の構造）からの少量のサンプル（例えば、1～2μL）が、キュベットまたはチップ中に直接移送され、および顕微鏡を含む光学的機器下に撮像される以外は一般に上述のように遂行される。本明細書においてより詳細に記載されるように会合因子を計算するために、画像が、収集されおよび分析され得る。

#### 【0198】

凝集検定を行う持続時間は、一般に検定の速度および正確性の両方を達成するために最適化される。いくつかの実施形態では、検定および検出凝集の遂行は約10分以下、15分以下、20分以下、30分以下、40分以下、50分以下、または60分以下などの1時間未満時間で生じる。いくつかの実施形態では、検定および検出凝集の遂行は1時間を超えるが、しかし2、3、4、5、6、7、または8時間未満で生じる。

#### 【0199】

いくつかの実施形態では、凝集検定は、クラウド・コンピューティング・インフラストラクチャーを介して、凝集検定の1つ以上のステップが自動化されおよび/または制御される、システムまたは機器上で遂行され得る。例えば、本明細書において記載される凝集検定は、米国特許出願第13/244,947号または米国特許出願第No. 13/355,458号に記載されたシステムまたは機器上で遂行されることができ、これらは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0200】

一実施形態では、機器は、凝集に適切な（およびそれにより凝集検定を開始する）条件下で、凝集粒子をサンプルに加える能力を有する構成要素を含み；構成要素は、凝集検定の一組の画像を取得する能力を有し；および構成要素はサンプルの凝集を測定するために、一組の画像を分析する能力を有する。サンプルの凝集を測定するために、一組の画像を分析する能力を有する前記構成要素は、機器内の、凝集検定の2つ以上の画像を得るために構成された構成要素と、同じ装置の一部であることができる。サンプルの凝集を測定するために、一組の画像を分析する能力を有する前記構成要素は、前記機器に埋め込まれ得る。サンプルの凝集を測定するために、一組の画像を分析する能力を有する前記構成要素は、複数のタイプの分析を遂行するために構成されることができ、および/またはそれは、機器内で複数の応用のために用いられ得る。サンプルの凝集を測定するために、一組の画像を分析する能力を有する前記構成要素は、機器から遠隔に配置され得る。サンプルの凝集を測定するために、一組の画像を分析する能力を有する前記構成要素は、クラウド・コンピューティング・インフラストラクチャー（例えば、クラウド・コンピューティング）中に配置され得る。サンプルの凝集を測定するために、一組の画像を分析する能力を有



する前記構成要素は、クラウド中に配置されることができ、および前記機器は、このクラウドから動的に制御されるために構成され得る。いくつかの実施形態では、前記機器は、凝集検定分析の結果に基づき二次的手順に影響を及ぼすために構成される。いくつかの実施形態では、本明細書において記載される凝集検定を遂行する能力のある機器は、例えば、米国特許出願第 13 / 244 , 947 号に記載される機器として構成されることができ、この出願は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0201】

一実施形態では、本明細書において開示されるシステムは、凝集に適切な条件下で、およびそれにより凝集検定を開始する、凝集粒子をサンプルに加える能力を有する構成要素；一組の凝集検定の画像を取得する能力のあるカメラ；および前記一組の画像サンプルの凝集を測定するために分析する能力のあるコンピュータを含み得る。サンプルの凝集を測定するために一組の画像の画像を分析するために構成された前記コンピュータは、一組の2つ以上の凝集検定の画像を取得するために構成されたカメラとシステム内の同じの装置の一部であってよい。サンプルの凝集を測定するために一組の画像の画像を分析するために構成された前記コンピュータは、前記システム内に埋め込まれ得る。サンプルの凝集を測定するために一組の画像の画像を分析するために構成された前記コンピュータは、複数のタイプの分析を遂行するために構成されることが出液、および/またはそれは前記システム内の複数の応用のために用いられる。サンプルの凝集を測定するために一組の画像の画像を分析するために構成された前記コンピュータは、一組の2つ以上の凝集検定の画像を取得するために構成されたカメラから遠隔に配置され得る。サンプルの凝集を測定するために一組の画像の画像を分析するために構成された前記コンピュータは、クラウド中に配置されることができ、および前記システムは、前記クラウドから動的に制御されるために構成され得る。前記システムは、凝集検定分析の結果に基づき二次的手順に影響を及ぼすために構成され得る。いくつかの実施形態では、本明細書において記載される凝集検定を遂行する能力のあるシステムは、例えば、米国特許出願第 13 / 244 , 947 号に記載されるシステムとして構成されることができ、この出願は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### III . 検出および画像分析

#### 【0202】

一態様では、本開示は、画像分析に基づく凝集、または赤血球凝集反応を分析する有利な客観的な方法を提供する。

#### 【0203】

円錐形の管またはウエル（タイタープレート中の）における従来の凝集検定では、凝集は、ウエル底部の RBC の低下された移動性（凝集の場合）、またはタイタープレートが傾けられた時の重力下で充填された RBC の制限された流れ（凝集の欠如の場合）のいずれかの目視による観察によって決定される。凝集の場合の RBC の低下された移動性は、RBC および凝集粒子の間の引力に起因する。

#### 【0204】

凝集反応を読み取るために、いくつかの光学的（可視的な）方法が用いられている。しかしながら、これらの既存の方法は、RBC の互いの結合を、懸濁物のバルクの物質特性を単純な目視による検査により観察することにより検出する。

#### 【0205】

一態様では、本明細書において提供されるものは画像分析に基づく凝集を分析する方法である。一実施形態では、画像分析方法は、円錐形のウエルまたは管中の凝集検定中の、RBC または可視化粒子の全体の動きを分析するために用いられる。別の実施形態では、画像分析方法は、RBC または可視化粒子懸濁物の微細構造を調べるために、RBC または可視化粒子凝集検定中の懸濁物中の、顕微鏡的な画像を分析するために用いられる。

#### A . RBC / 可視化粒子の全体の動きの画像分析

#### 【0206】

一態様では、本明細書において提供されるものはRBCおよび可視化粒子の全体の動きの画像分析のための方法である。上記および図3中に記載されるように、円錐形の(V字型の)反応容器(例えば、管または反応ウエル)中では、凝集していない細胞は、一般的に容器の底のゆるやかに充填された「ボタン」内に沈降する一方、凝集した細胞は、一般的に他の細胞により緊密に接着する。従って、もし凝集した細胞を含む円錐形の反応容器が傾けられると、この細胞は、細胞が互いに比較的緊密に接着しているために、一般に容器の底を離れない。対照的に、もし凝集していない細胞を含む反応容器が傾けられると、いくつかの細胞は、一般に重力下にウエルの底部から離れ、「涙滴」型を含む細胞ペレットの形成を導く。上記の事象に関連する、凝集検定の画像分析のための複数の方法が、本明細書において提供される。

10

#### A 1 . 全体の動き - 反応容器中の指定された場所での画像分析

##### 【0207】

一実施形態では、反応容器(例えば、反応管またはウエル)中の、指定された場所での凝集反応の画像分析のための方法が提供される。図6はこの方法に関する概略図を示す。この方法では、ゾーン610が反応容器600の底部の中に含まれ、および/またはその隣にある。反応容器600の底部は、細胞605のペレットを含み得る。反応容器の画像が、反応容器を傾げる前、その間、および/またはその後に撮影され得る。細胞の位置は、サンプルの凝集のレベルを決定するため、および/または関連する計算を遂行するために用いられ得る反応容器中の指定されたゾーンへの参照により決定され得る。場合によっては、反応容器を傾けた際に、細胞615の「涙滴」を生じ得る。凝集していない細胞は、涙滴形状を生じる一方、凝集した細胞は涙滴形状を生じない。凝集した細胞は、ペレット化されたままであるか、または「ボタン」形状のままである。場合によっては、検定は細胞の部分的な凝集をもたらし得る。前記ゾーン610は、ボタン細胞および/または涙滴細胞およびバックグラウンドのいくらかの部分を含む領域を包含するアウトラインを有し得るか(図6A)、またはこのゾーンは、ボタンまたは涙滴細胞を含み得る領域のみを占有するより小さなアウトラインを有し得る(図6B)。

20

##### 【0208】

一実施形態では、反応容器中の指定されたゾーンを用いる凝集反応の画像分析は以下のステップの1つ以上を含み得る：

##### 【0209】

第一に、反応混合物を含むウエルのデジタル画像が撮影される。

30

##### 【0210】

第二に、この画像が、検定ウエル上の基準マークの参照、またはボタンまたは涙滴の認識のいずれかによる、パターン認識技法を用いて配向される。

##### 【0211】

第三に、この画像が、反応容器中のゾーンに対して配向される。光学的信号が、それぞれのゾーンの一面でピクセルxピクセルで測定され得る。例えば、白色照明を用いて測定された信号は：a) %透過光(T)(画像が背面照明で得られた場合にはグレー・スケール)、またはb) %反射光(R)(画像が正面照射で得られた場合にはグレー・スケール)であり得る。パーセント光透過は、光路中に細胞が存在する場合対細胞が存在しない場合の透過光の比を取ることにより決定され得る；パーセント反射率(reflectance)も類似の様式で決定され得る。%Tおよび%Rのそれぞれの測定は、照明源および検出器を含む。透過の場合、サンプルは、照準線内の、および照明源と検出器の間の、光学的に透明な容器中に配置され得る。照明源から来る光が強度 $I_0$ を有し、および検出器に到達する光(サンプルを通過した後に)が強度 $I$ を有する場合、透過率は $T = I / I_0$ を用いて計算される。

40

##### 【0212】

第四に、等価率(%T)または反射率(%R)は： $(A = -\text{LOG}[\%T])$ (ビアー(Beer)の法則)または $K/S$ (式中 $K$ =吸光度および $S$ は散乱)(クベルカ-ムンク関数(Kubelka-Munk function))の式により、吸光度(A)に

50

それぞれ変換され得る。ビアーの法則は、測定された吸光度および検体濃度の間の関係である。

【0213】

A および  $K/S$  は、直接光吸収種の濃度にそれぞれ以下のように関係する： $A = \text{濃度} \cdot M \cdot l \cdot C$ （式中、 $M$  モル吸光計数であり、 $l$  はサンプルの経路長であり、および  $C$  は光吸収種である目的の検体の濃度である）； $K/S = (1 - (0.01R)^2) / (2 \cdot 0.01R)$ 。散乱については、前記照明源は、検出器に対しておおむね  $90^\circ$  の角度である。この散乱強度は、サンプルにより散乱された光（前記照明源からの）の強度（前記検出器により収集された）である。

【0214】

図7に示されるように、信号強度（%T または %R）が、ゾーンナンバー（図6Aの概略図の）に対してプロットされる場合、応答対凝集の程度（任意の尺度）を示す関係が得られる。

【0215】

上記の等式は単一の波長には適用されるが、白色光が用いられる場合、前記A または  $K/S$  の値は、波長の範囲にわたる平均を表す。これらは、それでも凝集分析についての許容できる結果を提供する。

【0216】

いくつかの実施形態では、吸光度または  $K/S$  を測定された信号として用いて、バックグラウンドより大きな信号が各ゾーン内で平均される。更に、吸光度または  $K/S$  が、任意の閾値より大きい場合には、この信号は1に、または分析についてのカットオフより少ない場合には、この信号はゼロに設定され得る。

A2. 全体の動き - スキャニングを用いる画像分析

【0217】

一実施形態では、凝集反応の充填された細胞のスキャニングを用いる画像分析のための方法が提供される。この充填された細胞は、ボタンおよび/または涙滴領域を含み得る。図8は、この方法に関する概略図を示す。この方法では、凝集反応は円錐形の容器中で遂行され、およびこの反応容器が次いで傾斜される。次に、ボタンおよび/または涙滴の長軸に沿ってスキャン・ゾーンが確立され得る。分析のためのこの軸は、ボタン、涙滴、またはそれらの組み合わせより短くてもまたは長くてもよい。ボタンの外側の、軸の開始が位置0、および涙滴の外側の位置20が軸の終点であるなど、軸に沿った位置が指定されることができる。速度および正確性の最良の組み合わせに基づいて、位置の数は任意的に選択されることができる。%T または %R などの光学的信号のために、軸の長さが必要とされる。前記信号が軸に沿った位置に対してプロットされる。図9は、光学的信号強度対複数のタイプのサンプル（凝集した（三角形）、部分的に凝集した（正方形）、および凝集していない（菱形））についての図8に示される軸に沿った位置の代表的なグラフである。ボタンおよび/または涙滴の長さに沿った前記光学的信号は、サンプル中の凝集のレベルを決定するために、および/または関連する計算を遂行するために用いられ得る。

【0218】

一実施形態では、ボタンおよび/または涙滴の凝集反応のスキャニングを用いる画像分析は、以下のステップの1つ以上を含む：

【0219】

第一に、反応混合物を含むウエルのデジタル画像が撮影される。

【0220】

第二に、この画像が、検定ウエル上の基準マークの参照、またはボタンまたは涙滴の認識のいずれかによる、パターン認識技法を用いて配向される。

【0221】

第三に、涙滴および/またはボタンの長軸に沿ったスキャン。ゾーンが、 $i_s$  %T または %R について調べられる。

【0222】

10

20

30

40

50

第四に、光学的信号（上記の「全体の動き - 反応容器中の指定された場所での画像分析」において定義されるもの）が、軸にそって、ピクセル×ピクセルで測定される。

【0223】

第五に、バックグラウンドより大きな信号が、下方および軸に直角ないくつかのピクセルにわたって平均される。

【0224】

第六に、信号が軸に沿った位置に対してプロットされる。

### A3. 全体の動き - 面積または周囲の長さの画像分析

【0225】

一実施形態では、凝集反応の充填された細胞の面積および/または周囲の長さの決定を用いる凝集反応の画像分析のための方法が提供される。充填された細胞は、ボタンおよび/または涙滴領域を含み得る。いくつかの実施形態では、前記充填された細胞のボタンおよび/または涙滴領域の面積および/または周囲の長さが決定され得る。図10はこの方法に関する概略図を示す。この方法では、凝集反応が円錐形の容器中で遂行され、および反応容器が次いで傾斜される。次に、傾斜されたサンプル1000全体の画像が取得され得る。光学的信号が、次いで画像上で得られることができる。次いで、パターン認識方法が、サンプルのボタンおよび/または涙滴領域（ある場合には）を特定するために用いられ得る。図10では、サンプルは、ボタン領域1005（領域A）および涙滴領域1010（領域B）を有する。このボタンおよび/または涙滴の面積および/または周囲の長さが、次いで測定され得る。この情報は、サンプル中の凝集のレベルを決定するために、および/または関連する計算を遂行するために用いられ得る。

10

20

【0226】

一実施形態では、および/または涙滴の面積および/または周囲の長さの分析を用いる凝集反応の画像分析は、以下のステップの1つ以上を含み得る：

【0227】

第一に、反応混合物を含むウエルのデジタル画像が撮影される。

【0228】

第二に、この画像が、検定ウエル上の基準マークの参照、またはボタンまたは涙滴の認識のいずれかによる、パターン認識技法を用いて配向される。

【0229】

第三に、上記の「全体の動き - 反応容器中の指定された場所での画像分析」において定義されたゾーンに対して画像が配向される。

30

【0230】

第四に、光学的信号（上記の「全体の動き - 反応容器中の指定された場所での画像分析」において定義されるもの）が、画像全体の上で、ピクセル×ピクセルで測定される。

【0231】

第五に、パターン認識方法が、ボタン、および存在する場合には涙滴に対応する面積を特定するために用いられる。これらの面積は、バックグラウンドよりも大幅に大きな吸光度を有する。前記ボタンおよび/または涙滴の面積および/または周囲の長さが測定される。いくつかの実施形態では、それぞれの既知の管の位置について、画像のセグメント化が管の中央で開始され得る。赤血球または可視化粒子により形成された暗い領域は、領域拡張法（region growing method）または適応閾値化によりセグメント化されることができ、細胞の存在に対応する領域を含む二値画像を生成する。セグメント化された領域の形状は、分布の固有値、または代替的に楕円などのパレメトリック形状を適合させるか、もしくは領域の慣性の離心率またはモーメントなどの他の形状パラメータを計算することにより、分析され得る。更に、このセグメント化された領域は、オリジナルの画像パッチに重ねあわされることができ、およびその領域の強度分布および他の強度統計が計算され得る。

40

【0232】

第六に、ボタンおよび涙滴領域のそれぞれの面積の合計の%（面積A / （面積A + 面積

50

B) および面積  $B / (面積 A + 面積 B)$  ; 図 1 1、それぞれ、菱形でマークされた線および正方形でマークされた線) が凝集の程度に対してプロットされる場合、明確な校正可能な応答が得られる。面積の比 ( $B / A$ ) (図 1 1、三角形でマークされた線) は、凝集に対してより感度の高い応答を与え得る。代替的に、閾値を超える合計の面積が凝集の測定に用いられ得る。凝集の測定は、形状および強度情報を組み合わせることによっても得られ得る。

#### A 4 . 一般的考察 - R B C / 可視化粒子の全体の動きの画像分析

##### 【 0 2 3 3 】

R B C または可視化粒子の全体の動きを分析するための、本明細書で提供される方法を使用することにより、人間の観察者による同じ反応の目視分析に比べて、より早期のおよび / またはより正確な凝集の検出が達成され得る。

10

##### 【 0 2 3 4 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法の任意のものについて、光源が全体の動きの画像を収集するために用いられ得る。正面または背面照射が用いられ得る。光源は、例えば、白色光または L E D ( 単一色 ) であり得る。検出器は任意の画像化タイプ、例えば C C D または C M O S であってよい。画像は単一の時間に撮影され得るか、またはビデオ画像シリーズが様々な間隔で画像を撮影することで作成され得る。ビデオでは、15 / 秒、10 / 秒、5 / 秒、1 / 秒、0.5 / 秒、または 0.1 / 秒を含む任意の間隔で画像が撮影され得る。上記に記載される分析の方法は、一度に単一の画像が分析される場合についてである。いくつかの態様では、凝集検定のビデオ記録が作成される場合、様々な信号パラメータ経時的な変化の速度 ( $d S / d T$ ) に変換され得る。

20

##### 【 0 2 3 5 】

本明細書で提供される方法のいずれにおいても、多くのピクセルにわたる平均が、不規則雑音を低下させるために用いられる。ピクセルは  $x$  および  $y$  の両方向において平均され、ここで  $x$  は重力の方向である。いくつかの態様では、少なくとも 5 つの隣接したピクセルの行または列、または少なくとも 5 ピクセルの片を持つ正方形または四角形のゾー ( 正方形ゾーンに対しては 25 ピクセル ) が平均される。本明細書において提供されるいくつかの例の画像では、各次元に数百のピクセルがあるので、平均はそれでも良好な空間的解像度を提供する。

#### B . R B C / 可視化粒子の顕微鏡的な画像の画像分析

30

##### 【 0 2 3 6 】

一態様では、本明細書において提供されるものは、懸濁物中の細胞または粒子の微細構造、または懸濁物のテクスチャーを調べるための、凝集検定中の懸濁物中の R B C または可視化粒子の顕微鏡的な画像を分析するための画像分析方法である。これらの画像の分析は、懸濁物中の細胞の凝集または粒子に関する情報を提供し得る。いくつかの態様では、これらの方法は、細胞または粒子の全体の動きの分析により検出され得るよりも早期に、反応における凝集の検出を可能にする。これらの方法は、目視による検査に依存する従来の方法よりも、より信頼性があり、および自動化に対してより適応可能であり得る。

##### 【 0 2 3 7 】

いくつかの実施形態では、画像分析は、画像のそれぞれに捕捉された、個々の赤血球の中心から中心への距離に基づいて、赤血球 - 凝集粒子クラスターのサイズを計算することを含む。この個々の赤血球の中心から中心への距離は、例えば、赤血球細胞または可視化粒子のサイズを参照する画像の内部校正に基づいて得られ得る。別の例では、それは光学的システムの絶対的な校正に基づいて得られ得る。顕微鏡下で、赤血球は、明るい固形の円形のスポットまたは明るい環のように見られ得る ( 照明の配置に依存して ) 。どちらの場合においても、それぞれの赤血球の中心は、その円の質量中心を計算することにより決定され得る。いったんそれぞれの円の、質量中心が決定されると、中心から中心への距離が計算されることができ。

40

##### 【 0 2 3 8 】

R B C の中心の情報は、互いに引きつけ合う細胞を特定するために「カットオフ」距離

50

と連結して用いられることができる。「カットオフ」距離は、2つの細胞の中心から中心の間の距離に基づいて、適用され得る。代替的に、「カットオフ」距離は、2つの細胞の間の距離（例えば、2つの細胞の最も近い距離の外部境界の間の距離）に関する別の測定可能なパラメータに基づいて適用され得る。「カットオフ距離」は、典型的には細胞直径の1つから2つ分の距離であるが、それは変化し得る。いくつかの実施形態では、「カットオフ距離」は、細胞直径の距離である（例えば、「カットオフ」距離は、凝集の際に可視化粒子が互いに緊密に充填される、検定における可視化粒子の直径であり得る；緊密に充填された可視化粒子は、第一に充填された粒子が、第二に充填された粒子と直接接触するように直ちに互いに隣接することができ、および第一の粒子および第二の粒子の中心間の距離は、可視化粒子の直径に等しい）。いくつかの実施形態では、「カットオフ」距離は、RBCの直径の0.5倍以下、RBCの直径の1倍以下、RBCの直径の2倍以下、またはRBCの直径の2.5倍以下である。このカットオフ距離は、校正からまたは検定においてRBCが引力を受ける距離を越える距離の推算から決定され得る。

10

## 【0239】

実施形態では、カットオフ距離は、画像中の可視化粒子の群について、動径分布関数（対相関関数）を計算することにより決定され得る。実施形態では、動径分布関数  $g(r)$  は、参照粒子から距離  $r$  で可視化粒子を発見する確立を定量化する。動径分布関数は、例えば、K. Younger, American Journal of Physics, 72巻(9) ページ1247 (2004)に記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。実施形態では、 $g(r)$  画像中の全ての粒子にわたる、および検定サンプルの複数の画像にわたる平均として計算される。 $g(r)$  対距離  $r$  が、例えば、図19のようにプロットされることができる。実施形態では、カットオフ距離は、最も高い  $g(r)$  ピークの  $r$  値として選ばれる。実施形態では、最も高い  $g(r)$  ピークは  $g_{max}$  ピークと称される。凝集検定では、典型的には、最も高い  $g(r)$  ピークの  $r$  値は、互いに引力を及ぼし合う2つの可視化粒子の間の距離に対応する。従って、距離  $r$ （または距離  $r$  に近い値）は、会合している可視化粒子の特定のために効果的なカットオフ距離として機能する。実施形態では、このカットオフ距離は0.5・m以下、1・m以下、2・m以下、3・m以下、4・m以下、5・m以下、6・m以下、7・m以下、8・m以下、9・m以下、10・m以下、11・m以下、12・m以下、13・m以下、14・m以下、15・m以下、20・m以下、25・m以下、30・m以下、35・m以下、40・m以下、または50・m以下であり得る。

20

30

## 【0240】

カットオフ距離および細胞の位置についての情報を用いて、RBCクラスターが特定され得る。本明細書において「クラスター」は、決定されたカットオフ距離に基づき、互いに関係しあう、接触している2つ以上の細胞の分布を意味する。本明細書において開示される検定を用いて検出され得るクラスターのサイズは、検定に用いられる、赤血球のソース、および抗血清およびウイルスの正体 (identity) を含む構成要素に基づいて変動し得るが、わずか2つの赤血球のクラスターでもこの検定を用いて検出され得る。特定の態様では、約3、4、5、6、7、8、9、10、20、25、30、50、75、または100未満の赤血球のクラスターが、本明細書において提供される検定を用いて検出され得る。実施形態では、可視化粒子のクラスターは、一対 (pair-wise) 分析を含む方法により同定され得る。一対分析方法は、例えば粒子間の中心から中心への距離が、選択されたカットオフ距離であるか、またはそれより小さいことができるように、任意の2つの可視化粒子が位置づけられているかどうかを観察することができる。もしそうであれば、その2つの可視化粒子は、同一のクラスターの一部として分類される。このプロセスは、画像中または画像の一領域中の全ての可視化粒子にわたって行われることができ、およびそれにより、クラスターが同定される。例えば、もし2つの可視化粒子のクラスターが特定されると、同定されたクラスター中の可視化粒子のそれぞれは、その可視化粒子が、選択されたカットオフ距離内で、いずれかの他の可視化粒子の近傍にあるかどうかを特定するために調べられ得る。もしそうであれば、他の可視化粒子は、最初の2

40

50

つの粒子と同じクラスターの一部であると特定され得る。クラスターの1つ以上の完全な寸法（例えば、クラスター中の可視化粒子の数、クラスターの面積など）が決定されるまでこのプロセスが繰り返されることことができる。実施形態では、可視化粒子のクラスターは、3つ以上の可視化粒子の間の関係の決定を含む方法により特定され得る。例えば、いくつかの実施形態では、所定の可視化粒子が、所定のクラスター中の、少なくとも2つの他の可視化粒子の選択されたカットオフ距離内にある場合に、その所定の粒子は所定の同じクラスター内に存在するとして分類され得る。実施形態では、クラスターは、クラスターが単一のステップにより特定されることができるよう、画像中の複数の可視化粒子の間の距離の同時的評価により特定され得る。他の実施形態では、クラスターは、クラスターが複数のステップのプロセスにより特定されることができるよう、画像中の異なる可視化粒子の間の距離の順次的な評価により特定され得る。

10

## 【0241】

いくつかの実施形態では、クラスター中の粒子は、そのクラスターが一定の長さまたは幅を持たないように、無秩序または半分無秩序な配向に配置され得る。他の実施形態では、クラスター中の粒子は、秩序ある配向に配列されることができ、そのクラスターが一定の長さおよび/または幅（例えば、クラスターは、鎖状に連結された粒子を含むことができ、例えば、この鎖は単一粒子の幅、および2~5、10、20、50、100、またはより多くの粒子のいずれかからの長さを有する）を有する。

## 【0242】

いくつかの実施形態では、規定のサンプルについて、2つ以上の粒子のクラスターの数  
が計数されることができ、およびクラスターのサイズのヒストグラムが計算される。クラ  
スターのサイズのヒストグラムを計算するために、同じサンプルの複数の画像がクラス  
ターについて分析されることができ、およびこのヒストグラムは、複数の画像から得られ  
たか、または平均されたクラスター値（例えば、同じサンプルの、2、3、4、5、6、7  
、8、9、10またはより多い画像からのクラスターサイズ値）を含み得る。クラスター  
のサイズのヒストグラムから、平均のクラスターのサイズ（ $S_{mean}$ ）が、

20

## 【数1】

$$S_{mean} = \frac{\sum_i i^2 N_i}{\sum_i i N_i}$$

30

を用いて計算され、式中、 $N_i$  はサイズ  $i$  のクラスターの数であり、 $i$  はクラスター中の  
粒子の数である。

## 【0243】

クラスターのサイズを表すための、より便利な方法は、

## 【数2】

$$AF = \frac{S_{mean}}{\min(S_{mean})}$$

40

で定義される、いわゆる「会合因子」( Association Factor ) を用いる  
ことであり、例えば、対照サンプルに対応する、最小値に対して正規化が行われる。既定  
のサンプルの様々な希釈を含む検定において、力価を得るために、平均のクラスターのサ  
イズが、全てのサンプルの希釈因子に対してプロットされ得る。

## 【0244】

代表的なクラスターのサイズのヒストグラムのプロット、および凝集ウイルスを含むサ  
ンプルについてのHA検定についての会合因子が、図13に示される。パネルA中のプロ  
ットは、サンプルの5つの希釈および対照についてのクラスターのサイズの分布を示す。  
サンプル希釈1は、最も高いサンプル濃度を有し；後続する希釈番号は、それぞれ、その  
前の希釈の半分のサンプルを有する。対照反応はサンプルをまったく含まない。全てのサ

50

ンプル希釈についての、会合因子が図 1 3 B に示される。高いウイルス濃度を持つサンプル希釈（低いサンプル希釈、サンプル 1 ~ 2 に対応する）が、会合因子の高い値を示す一方、サンプル 4、5、および対照（高いサンプル希釈 / サンプルがまったく無いものに対応する）が、会合因子について減少した値を示すことが明確にみられる。サンプル 2 およびサンプル 4 の間の遷移も非常に明白である。図 1 3 B の差し込み図は、典型的なマイクロタイターに基づく同じサンプル希釈での H A 検定の結果を示し、第一の列（左）は、影響を受けないタイタープレートからの画像、および第二の列（右）は、傾けられたタイタープレートからの画像である。サンプル 1 ~ 3 がいくらかの凝集を示す一方、他の 3 つのサンプルは R B C の流れを表し、それにより非凝集を示唆する。これらの画像から、凝集から非凝集への遷移はサンプル # 3 であり、これは会合因子のプロットにおける変曲点に非常に近いことが結論される。これは、本明細書で提供される方法と既存の凝集方法との結果の一致を実証する。

10

**【 0 2 4 5 】**

従って、本開示の方法を用いる画像分析は、画像中の赤血球中心から中心への距離に基づいて、クラスターのサイズを計算することを含み、およびウイルス粒子またはサンプル中の抗体の存在は、前記クラスターのサイズから導出された会合因子に基づいて決定され得る。

**【 0 2 4 6 】**

ウイルス粒子または抗体濃度の定量化は、試験される生物学的サンプルおよび既知の濃度または力価（校正標準）を持つウイルス粒子または抗体を用いる平行検定を行うことにより遂行され得る。その結果は、校正標準としてプロットされ、および校正曲線を提供し得る。

20

**【 0 2 4 7 】**

実施形態では、画像または光に基づく凝集反応の分析は、以下のステップの 1 つ以上を含み得る。可視化粒子および凝集粒子を含む凝集検定サンプルが、検定サンプルの画像が、そこを通過して得られる光学的に透明なピペットチップ、毛細管、顕微鏡スライド、または他の容器もしくは表面などの構造中に提供されることができる。いくつかの実施形態では、2 つ以上の異なる検定サンプルが分析のために同じ容器に導入されることができるように、容器は、2 つ以上の流体的に別個の空洞を含むことができる。例えば、容器は、透明なプラスチックおよび 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、またはより多い別個の凝集検定を指示するために十分な、垂直なウエルを含む、キュベットであってよい。実施形態では、検定サンプルが、少量の検定サンプルから画像が得られることができるような容器または表面のマイクロチャネルまたは他の狭い構造の中に導入される。例えば、この検定サンプルは、50・1 以下、40・1 以下、30・1 以下、25・1 以下、20・1 以下、15・1 以下、10・1 以下、9・1 以下、8・1 以下、7・1 以下、6・1 以下、5・1 以下、4・1 以下、3・1 以下、2・1 以下、1・1 以下、0.5・1 以下、または 0.1・1 以下の検定サンプルから画像が得られるような構造の中に導入される。凝集検定サンプルを指示する構造は、可視化粒子が、顕微鏡の焦点に組み込まれるために、顕微鏡対物レンズの近くに配置され得る。前記構造を顕微鏡対物レンズの近くに位置付けるために、前記構造が移動され得るか、顕微鏡対物レンズが移動され得るか、または前記構造および顕微鏡対物レンズの両方が移動され得る。同様に、対物レンズの焦点を合わせのために、または対物レンズ内の視野を変化させるために、前記構造が移動され得るか、顕微鏡対物レンズが移動され得るか、または前記構造および顕微鏡対物レンズの両方が移動され得る。検定サンプルの 1 つ以上の画像が、得られ得る。実施形態では、検定サンプルの画像は、顕微鏡中の、または顕微鏡と光学的に連通している C C D、C M O S または他の画像センサーにより取得され得る。実施形態では、単一のサンプルの、複数の異なる視野の画像が取得され得る。例えば、単一の検定サンプルの、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上、15 以上、20 以上、25 以上、50 以上、100 以上、500 以上、または 1000 以上の視野の画像が取得され得る。画像は、画像中の可視化粒子（例えば、R B C）の位置

30

40

50



を決定するために分析され得る。実施形態では、前記画像は、画像中、または画像の目的の領域中の可視化粒子の全ての位置を決定するために分析される。それぞれの特定された可視化粒子について、可視化粒子の中心が決定される。前記画像は、可視化粒子のクラスターを特定するために分析され得る。実施形態では、クラスターは、「カットオフ距離」値を計算の一部に含む計算方法を用いて特定されることができ、「カットオフ距離」は、閾値 ( *delineating point* ) として機能する値であり、例えば、「カットオフ距離」未満の距離により分離されている2つの可視化粒子が、互いに会合して、同じクラスターの一部であると見なされることができ、および、例えば「カットオフ距離」を越える距離により分離されている2つの可視化粒子が、互いに会合していないと見なされ、および必ずしも同じクラスターの一部ではないと見なされる。カットオフ距離は、本明細書の別の部分に記載される任意の方法に基づいて、決定または選択され得る。カットオフ距離の選択の後で、1つ以上のサンプルの画像中のクラスターが、本明細書の別の部分に記載されるクラスター特定のための方法に従って、特定され得る。実施形態では、様々な数の可視化粒子を含むクラスターの数決定され得る (例えば、画像中の、それぞれ10個の可視化粒子を含む7つのクラスターがあり、それぞれ15個の可視化粒子を含む3つのクラスターがあるなど)。実施形態では、サンプル中のクラスターのサイズのヒストグラムが決定され得る。実施形態では、サンプル中のクラスターの平均のクラスターサイズが決定され得る。更なる実施形態では、本明細書の他の場所に記載されるように、サンプル中のクラスターの平均のクラスターのサイズが、会合因子に変換される。実施形態では、異なるサンプルのクラスターのサイズのヒストグラム、異なるサンプルのクラスターの平均のクラスターのサイズ、または異なるサンプルの会合因子が、異なるサンプルの凝集レベルの決定に用いられ得る。実施形態では、サンプルの異なる希釈の凝集レベル、または凝集検定の既定の時間の後の、サンプルの凝集レベルに基づいて、サンプル中の目的の抗体、ウイルス粒子、または他の粒子が決定され得る。

10

20

30

40

50

#### 【0248】

本明細書で提供される方法は、サンプル中の凝集粒子または凝集粒子を阻害する粒子 (例えば、凝集粒子に対する抗体) の力価を決定するために用いられ得る。例えば、目的のサンプルの複数の異なる希釈が調製されることができ、および異なるサンプルの希釈が、可視化粒子の凝集を阻害または引き起こす能力について検定され得る。検定情報とサンプルの希釈に関する情報に基づいて、サンプル中の凝集粒子または凝集粒子を阻害する粒子の力価が決定され得る。

#### 【0249】

本明細書で提供される動径分布関数  $g(r)$  が目的のサンプルについて決定される方法の、いくつかの実施形態では、 $g(r)$  値の強度/レベルは、サンプルの凝集レベルを決定するために用いられ得る。例えば、 $g(r)$  対距離  $r$  のプロットにおいて、その最も高いピーク (第一のサンプル  $g_{max}$ ) において、特定の比較的高い  $g(r)$  値を有する第一のサンプルは、凝集していると思われ得る一方で、その  $g(r)$  対距離  $r$  のプロットにおいて、その最も高いピーク (第二のサンプル  $g_{max}$ ) において、比較的低い  $g(r)$  値を有する第二のサンプルは、凝集していないと思われ得る。この決定は、例えば、第一のサンプルにおいて、第二のサンプルよりも、より多数の粒子が互いに特定の距離  $r$  内にあると (および従って第一のサンプルについての、 $g(r)$  対距離  $r$  のプロットにおける  $g_{max}$  における  $g(r)$  値が、第二のサンプルについての  $g(r)$  対距離  $r$  におけるものよりも高いことをもたらす)、第一のサンプルは、第二のサンプル中の粒子よりも、より凝集した粒子を含み得るという概念に基づいている。

#### 【0250】

いくつかの実施形態では、画像分析は、凝集検定の画像中の懸濁物中の RBC または可視化粒子のテクスチャーを分析することを含み得る。懸濁物中の粒子のテクスチャーは、懸濁物中の粒子の凝集に関する情報を提供し得る。一般的に、懸濁物中の可視化粒子の凝集は、凝集していない粒子を含む対応する懸濁物よりも、より塊状のより粗いテクスチャーの見かけを有する懸濁物をもたらす。懸濁物のテクスチャーは、懸濁物中の粒子の凝集

に関する情報を得るために、様々なやり方で分析され得る。

【0251】

懸濁物中の粒子を含む凝集 検定の開始中または開始後に、この懸濁物 は、そこを通過して、懸濁物の画像または懸濁物からの光が取得され得る、容器中または表面 に移転される。例えば、凝集 検定は、ピペット チップ、毛細管、または顕微鏡スライド中に移転され得る。本明細書の他の場所に記載される任意の光学的 設定を介して、この検定の1つ以上の画像 が取得され得る。実施形態では、凝集検定の画像は顕微鏡の支援により取得され得る。実施例では、画像 はCCDまたはCMOS 画像 センサーにより取得され得る。画像 認識アルゴリズム（例えば、テンプレート・マッチング・プロトコル） が凝集 検定 物質を含む視野内または画像内の領域（例えば、容器の内部）、および凝集 検定 物質を含まない視野内または画像内の領域（例えば、検定を指示する容器 の壁）を特定することができる。

10

【0252】

懸濁物中の粒子を含む1つ以上の凝集検定の画像を捕捉するとすぐに、その画像は、画像またはその領域のテクスチャー分析に付される。画像のテクスチャーを分析するための適切な方法が本明細書で提供される方法と共に用いられ得る。例えば、画像が、ローカル・バイナリー・パターン（local binary pattern：LBP）演算子、グレーレベルの同時生起行列（gray-level co-occurrence matrix：GLCM）演算子、ガボールの外観特定（Gabor features identification）、またはタムラのテクスチャー特徴特定に付される。画像のテクスチャー分析のための方法は、例えば、T. Ojalaら、Pattern Recognition, 第29巻, pp. 51~59, M. Heikkiläら、Pattern 認識第42巻(3): 425~436, P. HowarthおよびS. Ruger, Evaluation of Texture Features for Content-Based Image Retrieval. In: Third International Conference, CIVR 2004, pp. 326~334 (2004), および. HowarthおよびS. Ruger, Robust Texture Features for Still-Image Retrieval. Vision, Image, and Signal Processing, IEEE Proceedings, 第152巻, 6号に記載されており、これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。実施形態では、画像分析方法は、MPEG-7記述子、記述スキーム、記述子定義言語、またはシステムツールなどのMPEG-7要素を含む。

20

30

【0253】

実施形態では、ローカル・バイナリー・パターン演算子は、画像のテクスチャーの分析に用いられる。典型的には、ローカル・バイナリー・パターン演算子は、画像の目的の領域の選択を含む。前記目的の領域は画像またはその1つ以上の部分であり得る。随意的に、目的の領域は、選択されたピクセル数の2つ以上のセルに分割されることができる（例えば、10×10、12×12、16×16、18×18、25×25、30×50ピクセルなど）。目的の領域またはセル内で、ピクセルのいくつか、または全ては、そのそれぞれが、その調べられるピクセルを囲むピクセルとの関係において、強度について調べられる。例えば、既定のピクセルについて、そのピクセルの強度は、その一番近い隣にある8つのそれぞれの強度と比較される（例えば、既定のピクセルが3×3のピクセル格子の中心にあると、およびその既定のピクセルは、同じ3×3の格子の残りのピクセルのそれぞれと比較される）。既定のピクセル強度を強度を既定のピクセルの隣と比較するとき、既定のピクセルの隣は、既定のピクセルの周りを時計回りに、または反時計回りなど、順序づけられた方向において評価され得る。既定のピクセルおよびその隣のピクセルの比較は、二値コードに変換され得る。例えば、既定のピクセルが隣のピクセルと比較される場合、もし既定のピクセルが隣のピクセルより大きい強度を持っていると、それには数“1”が指定され得る。対照的に、既定のピクセルが、隣のピクセルよりも弱い強度を持って

40

50

いると、それには数“0”が指定され得る。従って、既定のピクセルが複数の隣のものと比較される場合、既定のピクセルには複数の桁の二値数が指定されることができ、その二値数のそれぞれの桁が既定のピクセルおよび隣のピクセルの1つとの比較を表している。例えば、3×3ピクセル格子の中心にある既定のピクセルの場合、この既定のピクセルには、中心の既定のピクセルと同じ3×3格子中の隣接した隣のもののそれぞれとの順次の比較に基づく、8桁の二値数が指定され得る。随意的に、既定のピクセルに割り当てられたこの二値数が、10進法に変換され得る。胸痛領域の複数のピクセル（例えば、目的の領域、セル）について、強度値が決定されると（例えば、二値数または10進）、共通の領域についてのヒストグラムが決定され得る。このヒストグラムは、様々なピクセルの相対的強度に関する情報を含み得る。実施形態では、このヒストグラムは正規化され得る。実施形態では、複数のセルからの、ヒストグラムが連結させられ得る。目的の領域の複数のセルからのヒストグラムの連結は、目的の領域についての特徴ベクトルを提供し得る。この特徴ベクトルは、画像をその決定されたテクスチャーに基づいて分類するために、サポートベクター機械などの、機械学習アルゴリズムにより処理され得る。

10

20

30

40

50

#### 【0254】

典型的には、本明細書で提供される、凝集検定のテクスチャーの画像分析に基づく凝集の検定を含む方法は、目的の検定のテクスチャー情報を、既知の凝集状態（例えば、凝集または非凝集）のサンプルから生成されたテクスチャー情報と比較することを含む。従って、本明細書で提供される方法は、懸濁物中の粒子を含む既知の凝集状態のサンプルの画像を取得すること、およびこれらのサンプルテクスチャーを分析することを含む。目的のサンプルの凝集状態の分類を手伝うために、この情報は、機械学習アルゴリズムに含まれ得るか、またはそれとともに用いられ得る。実施形態では、既知の凝集状態のサンプルの画像は、未知の凝集状態のサンプルの画像の分類を助けるために用いられる「トレーニング・セット」として、本明細書で提供される方法およびアルゴリズムと共に用いられ得る。

#### 【0255】

本明細書で提供される方法は、サンプルの凝集状態の定性的および定量的評価の両方のために用いられ得る。例えば、実施形態では、本明細書で提供される方法は、目的のサンプルを凝集したか、または凝集していないかのどちらかとして、定性的に分類するために用いられ得る。他の実施形態では、本明細書で提供される方法は、サンプルの凝集の程度を評価することなどにより、目的のサンプルを定量的に分類するために用いられ得る。サンプルの凝集レベルの定量的評価を支援するために、凝集の異なる程度を含むサンプルを含む、トレーニング・セット（例えば、弱く凝集した、中程度に凝集した、強く凝集した、10%凝集した、20%凝集したなど）が提供され得る。実施形態では、サンプルの凝集検定の凝集レベルの定量的評価は、サンプルの、目的のウイルス、抗体または他の粒子の力価が、凝集検定が定性的に凝集または非凝集についてのみ評価される場合に、サンプルの力価が決定されるために必要なものより、より少ないサンプルの希釈、またはより短い時間の間で決定されることを可能にする。

#### 【0256】

いくつかの実施形態では、画像のテクスチャー分析は、画像の1つ以上の他の特徴の分析と連結して用いられ得る。例えば、テクスチャーについての分析に用いられる画像は、画像目的の領域全域にわたる1つ以上の波長または色チャンネルにおける強度についても分析され得る。加えて、波長または色チャンネルにおける平均強度または強度の標準偏差が、画像またはその一部分の全域にわたって決定され得る。目的の領域の全域にわたる色チャンネルにおける信号の強度の測定は、例えば、撮像された検定中の懸濁物中の粒子における相対的量などの情報を提供し得る。例えば、もし多くの赤血球細胞が検定サンプル中の懸濁物中にある場合（例えば、凝集していない赤血球細胞の場合）、検定の画像は、画像の全域にわたる赤チャンネル中で比較的高い信号を有し得る。対照的に、もし比較的小さい赤血球細胞が検定サンプル中の懸濁物中にある場合（例えば、共に塊を形成しおよび懸濁物から落下する傾向にある凝集した赤血球細胞の場合）、検定の画像は、画像の全域にわた

る赤チャネル中で比較的低い信号を有し得る。画像全域にわたる、色チャネルの強度の標準偏差の測定も、検定物質の凝集状態に関係する情報を提供し得る。例えば、検定物質が凝集している場合、凝集していない物質よりも、凝集した物質は、より塊状であり、均一な稠度が少ないために、ROI全域にわたり、凝集していない検定物質よりも色チャネルにおいて、より高い標準偏差を有することができる。別の例では、凝集検定のテクスチャーについて分析される画像は、検定の懸濁物から沈降して出た粒子の量を決定するためにも分析され得る。例えば、検定物質を支持する容器（例えば、チップ）の底部にこれらの粒子は蓄積できる。例えば、沈降した粒子を含む目的の領域を特定すること、およびこれらの領域のサイズおよび/または強度を決定することにより、容器の底部内の粒子の量が、決定され得る。

10

#### 【0257】

図20は、本明細書で提供される方法の実施形態による、サンプルの凝集を評価するための例示的なステップを提供するフローチャートである。図20を参照し、支持容器または表面中の懸濁物中の粒子を含む1つ以上の凝集検定の画像を取得し得る2005。この画像は、凝集検定物質の画像を含むか、または含まない画像の部分特定のために、テンプレート・マッチングのプロトコル2015または他の画像認識アルゴリズムに付される。例えば画像は、画像のどの部分が、支持容器に相当するか、およびどの部分が検定物質に対応するかを特定するために処理され得る。この画像は、分析画像中の目的の領域（ROI）2025を特定するために、更に処理され得る。典型的にはこの目的の領域は、凝集検定物質の画像を含む画像の部分の中にある。画像中のROIを特定した後に、このROIは、検定物質の画像の特徴を決定するために分析され得る。このプロセスは、「特徴抽出」2035と称され得る。実施形態では、特徴抽出の間、検定物質の画像のテクスチャーまたは検定物質の他の特徴が分析され得る。本明細書において開示されるテクスチャー分析のための任意の方法が、画像のテクスチャーを分析するために、用いられ得る。いくつかの実施形態では、ローカル・バイナリー・パターン（LBP）演算子が、画像のテクスチャーを分析するために用いられる。加えて、目的の領域全域にわたる選択された色チャネルにおける信号の強度などの、テクスチャー以外の特徴が画像から抽出され得る。次に、画像のテクスチャーまたは他の特徴に関して得られた情報が、2つ以上の異なる方法の内の少なくとも1つにおいて用いられ得る。第一に、もし凝集検定が既知の凝集状態の検定として提供されたのであれば、サポートベクターマシン（SVM）分類子モデル2045を開発するために、検定の画像から分析されたテクスチャー情報が、トレーニング・セットの一部として用いられ得る。第二に、もし凝集検定が未知の凝集状態を持っていて、および凝集状態の決定のために提供された場合は、検定の画像から分析されたテクスチャー情報は、SVM分類子予測2055を産生するために、SVM分類子モデルに提供されるテスト・セットの一部として用いられ得る。このSVM予測は、サンプルの凝集状態についての情報を、検定の画像のテクスチャーに基づいて提供し得る。実施形態では、このSVM予測は、画像分析の結果から導出され得る、更なる出力情報2065を産生するために、更に処理され得る。例えば、凝集に基づく血液型を決定するための検定において、この凝集結果は、凝集検定において用いられた血液の血液型の出力を産生するために処理され得る。

20

30

40

#### 【0258】

実施形態では、本明細書において、検定画像の「テクスチャー」などの分析についての言及は、文脈が明確に他のものを指示しない限り、検定の「テクスチャー」などの分析への言及と、互換可能に用いられ得る。更に、実施形態では、本明細書において記載される画像は、1つ以上の特徴について「撮像された情報」を含むものとして記載され得る。このフレーズが、より大きい画像の要素/構成要素を指すことが理解されるであろう。従って、実施形態では、例えば、可視化粒子に関する「撮像された情報」を含む画像は、その視野の中に可視化粒子を含む、視野について撮影された画像であることが理解されるであろう。

50

## 【0259】

顕微鏡法は、当分野ではよく周知されており、および米国特許出願公開第2009/0214114A1号、2011/0013821A1号、2008/0212865A1号、および2010/0183216A1号に記載されており、これらの全ては参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0260】

本開示の方法と共に使用するために適切な顕微鏡法も、2011年1月21日に出願された米国特許予備出願第61/435,250号に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0261】

本明細書で提供される方法の1つの利点は少量のサンプルの容積を使うことが可能であることである。いくつかの実施形態では約1~1.5 $\mu$ Lのサンプルが分析のために用いられる。いくつかの実施形態では、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45または50 $\mu$ L未満のサンプルが分析のために用いられる。

## 【0262】

いくつかの実施形態では、前記光学的機器は、カメラ、センサー、または検出器を含む。いくつかの実施形態では、前記光学的機器は、顕微鏡または顕微鏡に光学的に連結されたセンサー、検出器、またはカメラを含む前記光学的機器と光学的に連結される。

## 【0263】

いくつかの実施形態では、前記画像は、CCDカメラを用いて捕捉される。前記CCDカメラは、USBCCDカメラであり得る。いくつかの実施形態では、前記画像はCMOSカメラを用いて捕捉される。前記顕微鏡のステージは、反応容器またはその中のチャンネルに沿った異なる視野を撮像するために移動され、および撮像され得る。

## 【0264】

いくつかの実施形態では、サンプルの分析およびその検定反応生成物はデジタル画像化を用いて遂行される。前記検定反応容器は、単一の操作において、測定のために整列されることができ、および走査または撮像される。いくつかの実施形態では、このことは機械的構成要素により自動的に達成される。検定反応容器は、カートリッジ、機器、またはシステム中の定義された場所に配置されることができ、および画像化および/または分析のために、スキャナー/カメラに対して移動される。いくつかの実施形態では、前記反応容器がスキャナー/カメラに移動する間も、前記反応容器の配向は保たれる。いくつかの実施形態では、スキャナー/カメラが反応容器へ移動する。

## 【0265】

いくつかの実施形態では、前記画像化領域は、チャンネル中のマイクロ流体中に存在する。いくつかの実施形態では、サンプルが搬送され、およびマイクロ・チャンネル(本明細書では、マイクロ流体性チャンネルとも称される)を含む顕微鏡キュベット中に導入される。いくつかの実施形態では、前記マイクロ・チャンネルは、約125 $\mu$ m $\times$ 1000 $\mu$ mおよび約7mmの長さの断面を有し得る。しかしながら、他の寸法のマイクロ・チャンネルも本明細書で提供される方法において用いられ得る。前記チャンネルは、広帯域光源および対物レンズ(例えば、10 $\times$ 対物レンズ)を備えた標準的明視野顕微鏡の上に装填され得る。前記顕微鏡は、前記視野が前記チャンネルの側壁から離れて、および前記画像が、個々のRBCまたは可視化粒子を明確に観察するために焦点中にあるように調整され得る。

## 【0266】

サンプルの分析に続き、追加的なサンプル(例えば、異なるウイルス/抗体濃度を持った)が搬送されおよび新しいキュベットに装填され、および画像取得が繰り返される。いくつかの実施形態では、約10画像が収集される。いくつかの実施形態では、サンプルごとに、サンプル当たり少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、50、または100画像など、10未満、または10より多い画像が取得される。前記収集された画像は、次いで、例えば、全ての画像が

10

20

30

40

50

ら R B C の中心が検出されることを伴って、正確に R B C の位置を決定するために、処理され得る。

【 0 2 6 7 】

スキニングまたは画像化から得られた画像は、各ピクセルが区別できる検出スペクトル領域に対応する複数の強度値を含む、ピクセルの二次元的なアレイであることができる。

【 0 2 6 8 】

前記照明されたバックグラウンドは、その全表面にわたって等しい強度の白色光を放出し得る。前記光の放出は、いくらか変動し、前記撮像装置 / センサーにより検出される、ピクセル強度の正規分布を生成する。露出時間は、値が読みだされる前に、前記センサーのピクセルが、光子を収集することが可能である時間の量であることができる。前記露出時間が延長されたときには、既定の光量に対して、前記読み出し値はより大きくあってよい。この制御は、前記応用に対する「粗い」制御であることができる。増幅率 ( g a i n ) は、前記センサー信号に加えられる前記増幅の量を調整する制御であり得る。増幅率を増加することは、センサーからの信号の値を増加させる。増幅率は「精密な」制御であり得る。

10

【 0 2 6 9 】

分析は、光学的設定を用いて遂行され得る。前記光学的設定は、光源、開口部、およびセンサーまたは検出器を含み得る。いくつかの実施形態では前記設定はカメラを含むことができこのカメラは、ウェブカメラであることができ、このカメラセンサーは C C D チップであることができ、このレンズは、5 ~ 1 0 0 m m の間の任意の距離であるレンズから対象までの距離を持つガラスであることができ、および前記光源は、白色光源であり得る。

20

【 0 2 7 0 】

一実施形態では、本明細書において開示されるものは、凝集検定および随意的に、他の検定のタイプの検出のための、センサーまたは検出器を含む検出組立品を収容する読み取り機の組立品である。前記検出組立品は、例えば、遂行される検定のタイプおよび使用される検出機構に基づいて、反応容器の上または前記反応容器に関して異なる配向にあり得る。前記検出組立品は、前記反応容器と連通するために移動されることができ、または前記反応容器が前記検出組立品と連通するために移動され得る。

30

【 0 2 7 1 】

前記光学的検出器 / センサーは、C C D など任意のタイプの画像化センサーであってよい。いくつかの実施形態では、検出組立品は、C C D 検出器にバンドルとして結合される複数の光ファイバーケーブルを含み得る。前記光ファイバーのバンドルは、個別のファイバーから、または固いバンドルを形成するために共に融合された多くの小さなファイバーから構築され得る。そのような堅いバンドルは、商品として入手可能であり、および C C D 検出器と容易に連結され得る。

【 0 2 7 2 】

検出器 / センサーは、電球または光放出ダイオード ( L E D ) などの光源も含み得る。前記光源は、結果を検出するために、検定を照明し得る。前記照明源は、レーザー、単色 L E D 、蛍光ランプまたは L E D からの広周波数の光、L E D アレイ、赤、緑、および青色光源の混合物、L E D により活性化されたリン、蛍光管、白熱ランプ、およびフラッシュ管などのアーク源であり得る。前記検出器は、前記光源を前記検定に送達するための、レンズまたは光ファイバーなどの光学系も含み得る。

40

【 0 2 7 3 】

前記キュベットまたは反応容器の画像化領域は、目的の応用のために十分な数の細胞を提供するように設計され得る。例えば、大量の R B C の計数は、1 0 0 0 ~ 2 0 0 0 の細胞のみの計数を必要とし、およびそれゆえに希釈されたサンプル、および前記キュベット中の小さな画像化領域のみを必要とする。

【 0 2 7 4 】

50

キュベットの前記画像化プラットフォームへの移動を可能にするために、キュベットの、自動化された様式での標準的ピペッティング機構により、拾い上げられるために設計され得る。前記ピペッティング機構の、チップ排出装置は、前記ピペッティング機構から、前記キュベットを前記画像化プラットフォーム上に排出できる。キュベットの画像化プラットフォームへの位置合わせ ( r e g i s t r a t i o n ) は、2つのステップで生じ得る。前記キュベットが前記画像化プラットフォームへ移転されると、前記キュベットを前記画像化プラットフォームの光学的軸 ( X、Y位置合わせ ) に平行に整列させるために、前記キュベット上の固定された位置合わせ特徴が、前記画像化プラットフォーム上の嵌合特徴と連結する。位置合わせは、次いで前記画像化プラットフォームの上に配置された機構により完了される。この機構は、前記キュベットを、前記画像化プラットフォームの光学的軸に垂直な平面状表面に対して付勢し ( Z位置合わせ )、それにより、サンプルを画像化プラットフォームの焦点範囲に拘束する。

10

**【 0 2 7 5 】**

本開示の方法は、様々な照明配列を提供する：暗視野および明視野である。前記設定のモジュール的な性質は、位相差および微分干渉コントラスト ( D I C ) の統合も可能にする。

**【 0 2 7 6 】**

明視野照明は、ケーラー ( K o e h l e r ) 照明を生成させるための、白色光源とステージ集光装置の使用により達成され得る。顕微鏡のステージは、前記 X および Y 方向 ( 例えば、水平方向 ) における移動を可能にするために、コンピュータ制御されたステップング・モーターに接続され得る。全ての位置で、画像の所望の数が捕捉されることができ、および前記ステージは次の X Y 位置に移動され得る。

20

**【 0 2 7 7 】**

いくつかの実施形態では、本明細書において提供されるものは抗体、ウイルス粒子、または凝集粒子の存在を決定するための、凝集の画像の捕捉を含む方法である。

**【 0 2 7 8 】**

一実施形態では、生物学的サンプル中の抗体の存在を決定するための方法が提供され、その中では前記抗体は選択的にウイルス粒子に結合し、前記方法は以下のことを含む： ( a ) 赤血球、ウイルス粒子、および抗体を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、ウイルス粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および ( b ) 混合物中で凝集が起きるかを検出することであって、凝集の不在が前記抗体の存在を示し、およびステップ ( a ) ~ ( b ) は1時間未満で生じる。前記凝集の存在は、赤血球 - ウイルス粒子クラスターの形成により証明され、前記クラスターは画像化領域 ( 非常に小さな容積に相当する ) 中に存在し、および前記検出ステップは： ( i ) 前記画像化領域の異なる位置でのクラスターの複数の画像を光学的機器で補足すること；および ( i i ) 前記画像の分析に基づいて凝集の発生を検出することを含む。いくつかの実施形態では、ステップ ( a ) は、前記ウイルス粒子および前記生物学的サンプルの混合物を前記赤血球を添加する前にインキュベートすることを含む。

30

**【 0 2 7 9 】**

別の態様では、本明細書で提供されるものは、生物学的サンプル中の抗体の存在を決定するための方法であって、前記抗体は選択的にウイルス粒子に結合し、および前記方法は以下のことを含む： ( a ) 赤血球、ウイルス粒子、および抗体を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、ウイルス粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および ( b ) 光学的機器の支援により前記混合物の画像 ( または経時的に撮影される一連の画像 ) を捕捉することであって、前記画像中の赤血球 - ウイルス粒子クラスターの存在は、凝集の発生および検出可能な量の抗体の欠如を示し、およびクラスターの不在は、凝集の欠如および検出可能な量の抗体の存在を示す。いくつかの実施形態では、ステップ ( a ) は、前記ウイルス粒子および前記生物学的サンプルの混合物を前記赤血球を添加する前にインキュベートすることを含む。

40

**【 0 2 8 0 】**

50

別の実施形態では、本明細書で提供されるものは、以下のことを含む、生物学的サンプル中の、前記ウイルス粒子の存在を決定するための方法である：(a) 赤血球、およびウイルス粒子を含むことが疑われる生物学的サンプルの混合物を、ウイルス粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下でインキュベートすること；および(b) 光学的機器の支援により混合物の画像を捕捉することであって、前記画像中の赤血球 - ウイルス粒子クラスターの存在は、凝集の発生および検出可能な量の前記ウイルス粒子の存在を示し、およびクラスターの不在は、凝集の欠如および検出可能な量の前記ウイルス粒子の不在を示す。

#### 【0281】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、サンプルにより、透過された、反射された、または散乱された光の検出を含むことができる。サンプルからの光は例えば、CCDもしくはCMOSセンサーなどの画像センサー、または光電子増倍管(PMT)もしくは光ダイオードなどの光検出器を含む光学的機器により、検出されることができる。

#### 【0282】

上記で提供されるいかなる方法においても、前記方法は、可視化粒子が赤血球の代わりに、および/または凝集粒子がウイルス粒子の代わりに用いられる場合にも、実施され得る。

### D. 検定からの光の検出による凝集検定の分析

#### 【0283】

いくつかの実施形態では、凝集検定および凝集阻害検定は、検定を通過したまたは検定からの光の動きを測定することにより評価され得る。例えば、光源からの光は凝集検定に到達することができ、および検定により反射された、透過された、または散乱された光が測定され得る。実施形態では、懸濁物中の粒子が凝集するとき、それらは、凝集していない粒子よりも、より迅速に懸濁物から沈降する。従って、粒子の凝集が起きている検定からの光、またはそれを通過する光は、粒子の凝集が生じていない検定とは、異なった移動をし得る。例えば、凝集した粒子は、凝集していない粒子よりも、より迅速に懸濁物から沈降し得る。従って、経時的には、その中で粒子が凝集している検定物質の上部領域は、その中で粒子が凝集していない検定物質の上部領域よりも、より迅速に透明になり得る。前記より透明な検定物質は、その中で粒子が凝集せずに、および沈降していない、対応する検定物質よりも、より多くの光を透過させ得るか、またはより少ない光を散乱し得る。同様に、その中で粒子が凝集している検定物質の下部領域は、その中で粒子が凝集していない検定物質の下部領域よりも、より迅速に光学的に密度が高くなる。前記より密度の高い検定物質は、その中で粒子が凝集せず、及び沈降していない対応する検定物質よりも、より少ない光を透過し得るか、またはより多い光を散乱し得る。検定からの光は、例えばPMTまたは光ダイオードなどの光検出器により検出されることができる。本明細書の他の場所に記載される任意の光源、光検出器、または光学的機器が、検定からの光、または検定を通過する光の移動の測定に用いられ得る。実施形態では、検定からの光、または検定を通過する光の移動は、前記検定がピペットチップまたは多孔キュベットなどの容器中に支持されている場合に、測定され得る。

### IV. 応用

#### 【0284】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される赤血球凝集反応および赤血球凝集反応阻害検定は、ウイルスの抗原および抗ウイルス抗体の測定に用いられ得る。標準的WHO赤血球凝集反応阻害方法は、過度に遅くおよび可視的に妨害される。一態様では、本明細書において提供されるものは、危険に晒されている患者集団および彼らの治療法を管理するために、緊急の行動をとることができるために、迅速な、客観的に読み取れる、および良好に標準化された、迅速な凝集検定結果を得るために用いられ得る検定である。

感染が疑われる個人の特定

#### 【0285】

10

20

30

40

50



一態様では、感染が拡大しないように被験者および/または彼らの接触者を隔離することができるように、病原体に感染した被験者および/または彼らの接触者を特定するための方法が提供される。

【0286】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子などの病原体と接触したことが疑われる被験者が、前記ウイルス粒子の存在、または彼らが選択的に前記ウイルス粒子に結合する抗体を持っているかを決定するために、前記本明細書で提供される方法を用いて試験される。血清または血漿などの生物学的サンプル、が前記被験者から取得されることができ、および検査のために用いられ得る。

被験者および免疫化プログラムの評価

10

【0287】

本開示の方法を用いる抗体の検出および/または測定は、被験者の有効な免疫化を決定するために有用である。本明細書において使用される用語「有効な免疫化」は、被験者に保護的な免疫応答を誘導するために十分な状態を意味する。被験者は、前記被験者から導出された生物学的サンプル中の、既定のウイルスまたはウイルス抗原に対する抗体の検出により、効果的に免疫化されていると判断される。有効な免疫化の評価は、前記被験者から導出された生物学的サンプル中の、既定のウイルスまたはウイルス抗原に対する抗体の特定のレベルの測定により行われ得る。

【0288】

本明細書で提供される方法は、被験者の集団または群の免疫化における有効性について、免疫化プログラムを評価するために用いられ得る。いくつかの態様では、本明細書で提供される方法は、学校、職場、または被験者の自宅などのポイント・オブ・サービスの試験の設定における被験者の集団または群の免疫化を評価するために用いられ得る。

20

【0289】

一態様では、本明細書で提供されるものは、以下のことを含む、被験者の有効な免疫化を決定するための方法である：(a) ウイルス粒子に対する第一のワクチンの第一の用量で免疫化された被験者からの生物学的サンプルを取得すること(b) ウイルス粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下で、赤血球、前記ウイルス粒子、および前記生物学的サンプルの混合物をインキュベートすること；および(c) サンプル中のウイルスに対する抗体の濃度を、前記赤血球の凝集により形成されるクラスターに基づいて決定すること、およびステップ(b) ~ (c) は約1時間未満で生じること。

30

【0290】

一態様では、本明細書で提供されるものは、以下のことを含む、被験者の有効な免疫化を決定するための方法である：(a) ウイルス粒子に対する第一のワクチンの第一の用量で免疫化された被験者からの生物学的サンプルを取得すること；(b) ウイルス粒子との相互作用による赤血球の凝集を許容する条件下で、赤血球、前記ウイルス粒子、および前記生物学的サンプルの混合物をインキュベートすること；(c) 光学的機器の支援により混合物の画像を捕捉すること；および(d) 前記生物学的サンプル中の前記ウイルス粒子に対する抗体濃度を、前記赤血球の凝集により形成されるクラスターに基づいて決定することであって、前記画像中の赤血球 - ウイルス粒子クラスターの存在が、凝集の発生および検出可能な量の抗体の欠如を示し、および前記クラスターの不在が凝集の欠如および検出可能な量の抗体の存在を示す。

40

【0291】

上記または本明細書の他の場所で提供されるいかなる方法においても、前記方法は、可視化粒子が赤血球の代わりに、および/または凝集粒子がウイルス粒子の代わりに用いられる場合にも、実施され得る。同様に、本明細書における「細胞」または「赤血球」への言及は、文脈が明確に指示しない限りは、可視化粒子をも含み得る。同様に、本明細書における「ウイルス粒子」への言及は、文脈が明確に指示しない限りは、凝集粒子をも含み得る。

【0292】

50

従って、本明細書で提供される方法は、ワクチン接種の有効性をリアルタイムで、および/または現場で測定するために用いられることができ、および前記ワクチン接種の用量はそれに従って調節される。更に、もし利用可能であれば、代替的なワクチンが、試験においてワクチンに応答しない被験者のために用いられ得る。従って、ワクチン供給者は免疫化のスケジュールおよび用量を最適化できる。

血液型の決定のための方法

【0293】

本開示の方法は、赤血球を含むサンプルの血液型を決定することについても有用であり得る。いくつかの実施形態では、様々な血液型の抗原に対する抗体が、赤血球を含むサンプル中の赤血球凝集反応を誘導する能力について試験されることができ、それにより前記赤血球の血液型を決定する。

10

【0294】

いくつかの実施形態では、血液を含むサンプルの血液型の決定のための方法が提供される。血液型は、A、BおよびRh抗原に対する標準的抗体および全血サンプルの添加を用いて決定されることができ、前記A、BおよびRh抗原に対する特定の抗体は、よく知られており、および血液検査において日常的に用いられている。例えば、もしAの血液型に結合する抗体が加えられておよび凝集が生じると、前記血液はA型またはAB型のいずれかである。A型またはAB型のいずれかを決定するために、前記B型に結合する抗体が別個の検定において加えられ、およびもし凝集が起きなければ、前記血液はA型である。本開示の方法は、ドナー-受容者の間の輸血の適合性の評価のための交差適合試験にも用いられることができる。交差適合では、凝集ドナーの赤血球細胞および受容者の血清または血漿が、共にインキュベートされるときに、凝集が生じることは、前記ドナーの血液が、その特定の受容者には不適合であることを示す。

20

【0295】

本開示の方法は、サンプル中の血液型の決定のための改良を提供し、およびいくつかの実施形態では、前記方法を遂行するための合計の時間の量は、500、400、300、200、180、160、140、120、100、90、75、60、45、30、15、10、5、2、または1分、または30、20、10、5、3、または1秒未満である。いくつかの実施形態では、前記方法を遂行するための合計の時間の量は、0.5~5分である。

30

【0296】

実施形態では、本明細書で提供される方法および試薬は、ストレプトザイム(streptozyme)(抗ストレプトコッカス抗体-特にストレプトコッカスNADアーゼ、DNアーゼ、ストレプトキナーゼ、ストレプトリシンO、およびヒアルロニダーゼに対する抗体)または抗赤血球細胞抗体に対する凝集検定において用いられ得る。

V. キット

【0297】

いくつかの実施形態では、本開示はあらかじめ固定された赤血球およびウイルス粒子を含むキットも提供する。HAおよびHAI検定に用いられる赤血球は不安定であり得て、および検定の再現性における誤差にも寄与する、時間および労力のかかる新鮮な調製を要求する。一実施形態では、本開示のキットは、赤血球の新鮮な調製の必要のない、ウイルスに対する抗体の検出または測定に対して適切なあらかじめ固定された赤血球およびウイルス粒子を提供する。別の実施形態では、本開示のキットは、ウイルスに対する抗体の検出または測定に対して適切な、マイクロスフェアおよびウイルス粒子を提供する。別の実施形態では、本開示のキットは、前記凝集粒子に対する抗体の検出または測定に適切な、可視化粒子および凝集粒子を提供する。本明細書において開示されるキットは、は、検定の再現性、および標準化された試薬の使用による利点も提供し得る。

40

【0298】

前記キットと共に、様々な緩衝液および酵素、BSA、および例えば、既知の力価を有するウイルス粒子および/または抗体であり得る参照(陰性および陽性)などの、他の試

50

薬も提供され得る。更に、前記検定を遂行するための使用説明書も前記キットと共に提供され得る。

【実施例】

【0299】

実施例 1

前処理方法

材料：ノイラミニダーゼ 1 U (Sigma N7885 - 1 UN、3.78 U/mg タンパク質)；緩衝液 A：100 mM 酢酸ナトリウム pH 5.5、0.15 M NaCl、および 4 mM CaCl<sub>2</sub>；緩衝液 B：100 mM リン酸ナトリウム pH 8.2、1.5% クエン酸ナトリウム；ノイラミニダーゼ酵素溶液 [0.8 mU/mL の最終濃度に対して 5 mL の緩衝液 A 中に 4 ミリ単位 (mU) のノイラミニダーゼ酵素]。

10

【0300】

方法：

1. 4 容積のノイラミニダーゼ酵素溶液が 1 容積の血清に加えられる (0.2 mL ノイラミニダーゼ + 0.05 mL 血清)
2. 前記混合物が、 $37 \pm 2$  で 25 分間インキュベートされた
3. 5 容積の緩衝液 B が前記混合物に加えられた
4. 前記混合物が、ノイラミニダーゼを不活性化するために、 $56 \pm 2$  で 5 分間インキュベートされた
5. 前記血清が室温まで放冷された。前記血清の最終希釈は 1 : 10 であった (抗体力価決定のための連続的希釈シリーズにおける開始の希釈)。

20

実施例 2

赤血球凝集反応阻害検定 - 画像分析方法の比較

【0301】

材料：インフルエンザ A H3N2 / ブリスベーン (Brisbane) / 10 / 07 (4 HAU / 50  $\mu$ L) 希釈剤緩衝液中のウイルス粒子；希釈剤緩衝液 [0.05% アジ化ナトリウムおよび 0.05% ウシ血清アルブミンを含む、リン酸により緩衝化された生理食塩水 pH 7.2；(PBS / A / BSA)]；インフルエンザ B に対する抗体を含むヒト血漿；および希釈剤緩衝液中のグルタルアルデヒドで固定化されたシチメンチョウ - RBC (0.6% v/v)。

30

【0302】

方法：

- 1) マイクロタイタープレートの RBC 対照ウエルおよび処理された抗体を含むサンプルの連続的希釈のための第一のウエルを除く全てのウエルに、25  $\mu$ L の PBS / A / BSA が加えられた。
- 2) 前記第一のウエルに、50  $\mu$ L の処理された抗体 (処理緩衝液中に 1 / 10 に希釈された) を含むサンプル (血清または血漿) が加えられた。
- 3) サンプルは、25  $\mu$ L のサンプルを前記第一のウエルから 25  $\mu$ L PBS / A / BSA を含む隣のウエルに移動させることにより連続的に希釈された。前記ステップは、シリーズの最後のウエルまで繰り返された。このステップは随意的であり、および単一の希釈レベルにより置換され得る。
- 4) 処理されたサンプルを含む全てのウエルに、25  $\mu$ L の PBS / A / BSA に希釈されたインフルエンザ B / フロリダ (Florida) / 04 / 06 ウイルス (4 HAU / 50  $\mu$ L) が加えられた。
- 5) 50  $\mu$ L PBS / A / BSA が前記参照 RBC ウエルに加えられた。
- 6) 前記ウエルの内容物が、マイクロタイタープレートの側壁を穏やかに軽くたたくことにより混合された。
- 7) PBS / A / BSA 中で調製された、50  $\mu$ L のグルタルアルデヒドで固定化されたシチメンチョウ - RBC 懸濁物 (0.6%) が、全てのウエルに加えられた。

40

50

【0303】

前記反応の全体の動きの分析において、以下のステップ（８～１１）も遂行された：

８）前記ウエルの内容物が、マイクロタイタープレートの側壁を穏やかに軽くたたくことにより混合された。

９）前記プレートは覆われ、および室温で合計約１５分インキュベートされた。

１０）１５分目に、前記プレートは、前記スキャナー上で読み取られ、および最終的な終点の画像（図１４Ｂ）が、４５～６０°に傾けられた前記プレートで撮影された。

１１）前記画像がスキャンされ（図１４Ｃ）、ならびに充填された赤血球に対応する暗い領域の面積および周辺の高さが計算された。

#### 【０３０４】

顕微鏡的な画像の画像分析において、以下のステップがステップ７）の後に遂行された：

１２）前記ウエルからの少量のサンプル（～１または２μＬ）がキュベット中に直接ピペットで移動され、および顕微鏡下で撮像された。

１３）画像が収集され、および本明細書の他の場所に記載されるように、ＲＢＣの会合因子を計算するために分析された。

#### 【０３０５】

顕微鏡的な画像の画像分析を用いた、異なるサンプルについての会合因子のプロットが図１４Ａに示される。全体の動きの画像分析を用いて、 $f_{or}$ 異なるサンプルの充填された細胞についての面積または周辺の高さが図１４Ｄに示される。サンプルには１～６の番号が付けられ、および重複している。図１４Ｂは、傾けた後の、前記ペレット検定のウエルの巨視的な可視的画像を示す。図１４Ｃは、閾値デジタル化に付された図１４Ｂのスキャンされた画像を示す。前記ウエルは、図の底部から始まって、１～６と番号を付けられ、および右および左の列はサンプルの希釈の同じレベルを持つ検定の重複である。図１４Ａに示されるように、高い抗体濃度（低い希釈、サンプル１～３）を持つサンプルは、会合因子について低い値を示す一方で、サンプル４、５、および６（低い抗体濃度は高い値の会合因子を示す。サンプル３およびサンプル４の間の遷移は極めて明白である。図１４Ｄに示されるように、高い抗体濃度を持つサンプル（低い希釈、サンプル１～３）は、充填された細胞の周囲の高さおよび面積について高い値を示す（すなわち前記涙滴中の多くの細胞）一方、サンプル４～６（低い抗体濃度）は、充填された細胞の周囲の高さおよび面積についてより低い値を示す（すなわち前記涙滴中の少ない細胞）。サンプル３およびサンプル４の間の遷移も明白である。ペレット検定の巨視的な可視的画像（図１４Ｂ）では、サンプル４～６が凝集を示す一方、サンプル１～３はＲＢＣの流動を示し、それにより非凝集を示唆することが見られ得る。上記の方法のそれぞれから、凝集から非凝集への遷移はサンプル＃３および＃４の間にあることが結論され得る。従って、このデータは、本明細書において提供される画像分析についての方法（顕微鏡的な画像の画像分析（図１４Ａ）および従来による分析による、凝集検定ウエルの目視による検査（図１４Ｂ）に基づく全体の動きの画像分析（図１４Ｄ）との一致を実証する。

#### 実施例 3

#### ＲＢＣ凝集検出のための顕微鏡に基づく方法

#### 【０３０６】

目的のウイルスに対する抗体を含む生物学的サンプルが、５分以下の特定の時間の間、前記ウイルスと、インキュベートされる。インキュベーションの後で、赤血球細胞がサンプルに加えられおよび混合される。サンプルの一部（約１～１．５μＬ）が、取り出されおよびマイクロチャンネルを含む顕微鏡キュベットに導入される。前記マイクロチャンネルは、 $125\mu\text{m} \times 1000\mu\text{m}$ および約７mmの長さの断面積を有する。前記チャンネルは、広帯域光源および１０×対物レンズを備えた標準的明視野顕微鏡に装填される。それぞれの視野は $\sim 700\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ の面積に相当する。前記顕微鏡は、その視野が、前記チャンネルの側壁から離れ、および個々のＲＢＣを明確に観察できるように、前記画像が焦点内にあることができるように調節される。前記画像はＵＳＢＣＣＤカメラを用いて捕捉される。前記顕微鏡のステージは、前記チャンネルに沿って異なる視野を撮像するために、前

記チャンネルの軸に沿って移動され、および撮像される。約10の視野が捕捉される。サンプル画像は図12に示される。

【0307】

収集された画像は、RBCの位置を正確に決めるために処理された。全ての画像から、RBCの中心が検出された。図12は、2つのサンプルについての代表的な画像；対照サンプル（左、パネルA）、（凝集していないサンプルを表す）、および凝集したサンプル（右、パネルB）を示す。前記画像の裸眼での検査でに基づいては、前記2つのサンプルを区別することは困難であるが、RBCの中心の情報が「カットオフ」距離と連動して用いられる場合、互いに結合した細胞を特定することが可能である。

実施例4

従来の前処理および本開示の前処理方法の比較

A. 前処理従来の方法

【0308】

受容体破壊酵素（RDE）のソースは、Sigma C8772コレラ菌（Vibrio Cholerae）からのコレラろ過物の粗抽出物であった。

【0309】

0.1単位RDEが、5mLの無菌蒸留水で再構築された。1mLの再構築されたRDEが、20mLのカルシウム生理食塩溶液、pH7.2で希釈された。4容積の希釈されたRDEが、1容積のEDTAで抗凝血化されたヒト血漿（0.4mLRDE+0.1mL血漿）に加えられた。サンプルは4つの別個のサンプルについて重複して調製された。対照の（処理されていない）検定については、4容積の生理食塩水溶液が1容積の血漿（0.4mLカルシウム生理食塩水溶液+0.1mL血漿）。

【0310】

前記混合物は、30、60、360分および一晚（>16時間）37°Cでインキュベートされた。前記対照は一晚（>16時間）37°Cでインキュベートされた。

【0311】

5容積の1.5%クエン酸ナトリウム（0.5mL）が各サンプルに加えられた。これらのサンプルは、56°Cで、30分間、前記RDEを不活性化するためにインキュベートされた。前記血清は室温まで放冷された。前記処理された血清の最終的な希釈は1:10であった（抗体力価決定のための前記連続的希釈シリーズにおける開始希釈として用いられた）。

B. 本開示の前処理方法

【0312】

ノイラミニダーゼのソースはSigmaからの3.78U/mgタンパク質であった。ノイラミニダーゼ酵素溶液は、4mUノイラミニダーゼ酵素の5mLの緩衝液A溶液であった：100mM酢酸ナトリウムpH5.5、0.15MNaCl、および4mMCaCl<sub>2</sub>（0.8mU/mL最終的な濃度）。

【0313】

4容積のノイラミニダーゼ酵素溶液が、1容積の血漿（0.2mLノイラミニダーゼ+0.05mL血漿）に加えられ、および前記混合物が37°Cで25分間インキュベートされた。5容積の緩衝液B（リン酸ナトリウム中の1.5%クエン酸ナトリウムpH8.2）（0.25mL）が次いで加えられ、および前記ノイラミニダーゼを不活性化するために、前記混合物が56°Cで5分間インキュベートされた。前記血漿が室温まで放冷された。前記処理された血漿の最終的な希釈は1:10であった（抗体力価決定のための前記連続的希釈シリーズにおける開始希釈）。

C. 比較

【0314】

比較分析の結果が図15に示されている。見られるように、前記非特異的な反応は両方の方法により除外されたが、本開示のノイラミニダーゼの方法（中身の詰まったバー）は、従来の方法（斜線で満たされたバー）よりもはるかに速かった。図16は、上記に記載

10

20

30

40

50

され、および示された様々な前処理方法に続く H A I 検定の結果を示す。サンプルは、対照（中身の詰まった黒いバー）、R D E により一晚処理（逆の斜線のバー）、またはノイラミニダーゼにより 25 分間処理されたもの（順方向の斜線のバー）である。3 つの血漿および血清サンプル（それぞれが単一の血液サンプルから）が試験された。サンプル 1 および 3 はウイルスの抗体について陰性であったが、サンプル 2 は陽性であった。両方のサンプルの前処理方法は、偽陽性反応を除外した一方、真の陽性反応を保持した。見られるように、本開示の方法は、偽陽性反応の除去および真の陽性反応の保持に対して同等に有効であり、および本開示の方法ははるかに速い。

#### 実施例 5

#### 本開示の方法と従来の H A I 方法の比較

##### 【0315】

この実験では、H A I 検定を遂行するための特定の本開示の方法が、H A I 検定を遂行するための従来の方法と比較された。

#### 単一ウイルス株抗原による H A I 検定

##### 【0316】

1 つの実験では、H A I 検定は、インフルエンザ A H 1 N 1 / カリフォルニア ( C a l i f o r n i a ) / 0 4 / 2 0 0 9 をウイルス粒子として用い、および H 1 N 1 ウイルスに対して免疫化された被験者からの生物学的サンプルを用いて遂行された。

##### 【0317】

前記検定は以下のように遂行された：

#### 前処理ステップ

##### 【0318】

従来の方法のサンプルについては、H 1 N 1 に対して免疫化された被験者からの血漿サンプルの前処理は、実施例 4、パート A に提供されるように遂行された。

##### 【0319】

本開示の方法のサンプルについては、H 1 N 1 に対して免疫化された被験者からの血漿サンプルの前処理は、実施例 4、パート B に提供されるように遂行された。

#### H A I 検定ステップ

##### 【0320】

従来の方法のサンプルについては、前記 H A I 検定は、実施例 2 のステップ 1 ~ 1 0 に提供されているように遂行された。前記検定の結果は、傾けられたウエルの裸眼（可視）による検査により決定された。

##### 【0321】

本開示の方法のサンプルについては、前記 H A I 検定は、実施例 2 のステップ 1 ~ 7 プラス 1 2 ~ 1 3 に提供されるように遂行された。前記検定の結果は、前記凝集反応の顕微鏡的な画像の画像分析に基づくサンプルの会合因子の計算により決定された。

##### 【0322】

これらの方法からの情報に基づき、各サンプルの力価が決定された。

#### 分析

##### 【0323】

本開示の方法のサンプルについての抗体力価の L O G が、従来の方法のサンプルの力価の L O G に対してプロットされた。図 1 7 に見られるように、優良な相関が得られ、および回帰直線の勾配及び切片は、2 つの方法の結果の一致を示した。前記相関線の  $R^2$  値は 0 . 8 9、および H 1 N 1 に対して免疫化された被験者からの血漿サンプルの  $N = 1 0$  であった。

#### 複数のウイルス株抗原による H A I 検定

##### 【0324】

別の実験では、検定は、前記ウイルス粒子として、インフルエンザ A H 1 N 1 / カリフォルニア ( C a l i f o r n i a ) / 0 4 / 2 0 0 9 による検定に加えて、インフルエンザ B ( インフルエンザ B / フロリダ ( F l o r i d a ) / 0 4 / 0 6 ) およびインフルエ

10

20

30

40

50

ンザ A (インフルエンザ A / H 3 N 2 / ブリスベーン ( B r i s b a n e ) / 1 0 / 0 7 ) に対する検定を行った以外は、上記の単一ウイルス株抗原での H A I 検定と同様に遂行された。前記血漿サンプルは、前記季節性ウイルスインフルエンザ B および H 3 N 2 ウイルスに、以前に曝露された可能性のある個人であって、H 1 N 1 ( 2 0 0 9 ) 流行型ウイルスに対して免疫化された個人からのものである。上記のように、従来の方法および本開示の方法の両方が、前処理および H A I 検定ステップの両方に用いられた。

【 0 3 2 5 】

図 1 8 を参照し、3 つのウイルス株抗原についての検定が、前記対応する抗体についての検定に用いられた。3 つの全ての株について、結果は個々に、および次いで凝集したデータのセットとしてプロットされた。全ての場合に、前記回帰統計は前記 2 つの方法の等価性を示した。前記従来の方法からの 2 x を超える希釈 ( 前記参照方法の分解能の限界 ) の結果を与えたサンプル ( 3 1 の内 ) はなかった。この実験は、両方の方法が正確であり、平均の不正確性が 2 x を超える希釈よりもはるかに小さいことを示した。比較の統計は以下の表 2 中に与えている。

10

【表 2】

表 2

サンプル数	3 1	
LOG 最大力価	2. 8 1	20
LOG 最小力価	1. 0 0	
平均 LOG 力価	1. 9 8	
範囲、倍 (線形、非 LOG)	6 5	
平均 l o g 差異	0. 1 6	
前記 LOG 推算値 / LOG 平均の標準誤差	8. 2 %	30
(同等である、倍)	1. 4 6	

実施例 6

画像特徴抽出による血液型分類

【 0 3 2 6 】

この実験では、本明細書で提供されるテクスチャー分析を含む画像特徴抽出分析方法に従い、血液が、A、B、AB、または O 型および Rh + または - に分類された。

【 0 3 2 7 】

E D T A により処理された血液の 3 つのサンプルが、3 人の異なる被験者から得られた。それぞれの血液サンプルは混合され、および赤血球細胞 ( R B C ) をペレット化するために、1 0 , 0 0 0 r p m で遠心分離された。2 0 マイクロリットルの各被験者からの充填された R B C のそれぞれは、1 0 容積 % の R B C 懸濁物を生成するために、1 8 0 マイクロリットルの生理食塩水溶液により希釈された。それぞれの R B C 懸濁物について、4 つの管 / 検定が準備された：1 ) 抗血液型 A 抗体；2 ) 抗血液型 B 抗体；3 ) 抗血液型 D ( R h 因子 ) ；および 4 ) 参照。2 4 マイクロリットルの希釈剤 ( P B S + 0 . 1 % B S A + 0 . 1 % ポリソルベート 2 0 ) が、管 # 1 ~ 3 のそれぞれに加えられ、および 3 0 マイクロリットルの希釈剤が管 # 4 に加えられた。6 マイクロリットルのそれぞれの前記抗体が、管 # 1 ~ 3 のそれぞれに加えられた。ピペットにより、2 0 マイクロリットルの 1 0 % R B C 懸濁物が管 # 1 ~ 4 のそれぞれに加えられ、および前記試薬が、それぞれの管

40

50

の中で凝集検定を生成するために加えられた。それぞれのRBC懸濁物のそれぞれ10マイクロリットルの検体が、ピペットチップ中に吸引された。前記ピペットチップは白色光源およびCCDカメラを含む分析器中に位置付けられ、および前記チップの画像が、それぞれの凝集検定の開始後の5分および10分で取得された。5分間のインキュベーション後のチップの画像は、前記3つのそれぞれ異なるサンプル(サンプル“I”、“II”および“III”)についての、それぞれの凝集検定(検定“1”、“2”、“3”、および“4”)が図21に示される(図21Aは、サンプルI、図21BはサンプルII、および図21CがサンプルIIIを示す)。各チップの画像は、本明細書の他の場所に記載される画像テクスチャー分析方法により分析された。簡潔に、テンプレート・マッチング・アルゴリズムを用いて、前記ピペットチップ端末2105および検定物質のメニスカス2110が特定された。前記ピペットチップ端末の位置および検定物質のメニスカスに基づき、前記画像の検定物質を含む目的領域(ROI)2115が決定された。目的領域2115は、前記メニスカスの下の、前記ピペットチップ端末の上の、前記ピペットチップの側壁の間の四角形の形として定義された。前記チップ内の例示的なROI2115が、サンプルIの検定1について、図21A中に示される。次に、特徴抽出が、前記ROIで遂行される。特徴抽出はi)前記ROI中の赤チャンネルの強度の平均および標準偏差の決定、およびii)ローカル・バイナリー・パターン(LBP)の決定を含んだ。前記LBPオペレーターは、局所の分布パターン(local spatial pattern)およびグレー・スケールのコントラストを捕捉する。前記画像から抽出された特徴はサポートベクターマシン分類子に提供された。前記サポートベクターマシン分類子は、既知の凝集状態(凝集したまたは非凝集)の検定の画像情報により前もって訓練されていた。前記画像から抽出された特徴を用い、前記サポートベクターマシンは、凝集した、または凝集していない、検定物質を含むものとして各ROIを分類した(二値分類として)。最終的に、前記サンプルの各ROIの分類情報は、サンプルの血液型を特定するために用いられた。一般に、サンプルが既定の抗原(A、B、またはD)に対する抗体により凝集すると、この検定は、サンプルが対応する抗原について陽性であることを示す。従って、サンプルIは、BRh-陽性(“B陽性”)血液であると特定される(図21Aのチップ2および3は、凝集した物質を含み、および従ってこの血液は、抗血液型B抗体および抗血液型D(Rh)抗体により認識される抗原を含む)、サンプルIIは、ARh-陽性血液(図21Bのチップ1および3は凝集した物質を含む)、およびサンプルIIIはO陽性血液(図21Cのチップ3は凝集した物質を含む)。前記サンプルI、II、およびIIIの血液型は、従来血液分類方法(Elدونカード)を用いても分析され得る。本明細書で提供される実験の結果は、従来血液分類方法からの結果と一致し、従って本明細書で提供される方法の正確性を確定する。

#### 【0328】

上述のことは、本発明の好適な実施例の完全な記載であるが、様々な代替物、修正および等価物を使用することが可能である。従って、現在の発明の範囲は、上記の記載を参照して決定されるべきではなく、添付の特許請求の範囲、およびそれらのなど価物の完全な範囲を参照して決定されるべきである。好適であるか、またはないかに関わらず、任意の特徴が、好適であるか、またはないかに関わらず、他の特徴と組み合わせられ得る。「means for(ための手段)」の語句を使用して、所定の請求項が明確に言明されていない限り、添付された請求項は、手段プラス機能の限定を含むものとは解釈されない。本明細書の記載、以下の特許請求範囲の全体を通して用いられるように、「a(1つ)」「an(1つ)」「the(前記の)」は、文脈において明白に示さない限り、複数の意味を含むことを理解されたい。更に、本明細書の記載、および以下の特許請求の範囲の全体を通して用いられる、「in(～の中に)」の意味は、文脈で明白に示されない限り、「in(～の中に)」、および「on(～の上に)」を含む。最後に、更に、本明細書の記載、および以下の特許請求の範囲の全体を通して用いられる、「および(および)」、「or(または)」の意味は、文脈で明白に示されない限り、接続詞および離接的接続詞を含み、交換可能に使用され得る。従って、文脈で明白に指示しない限り、文脈の中で「お

10

20

30

40

50



よび（および）」、または「or（または）」という用語が使用される場合、そのような接続の使用法は「および / or（および / または）」を除外しない。

【 図 4 】

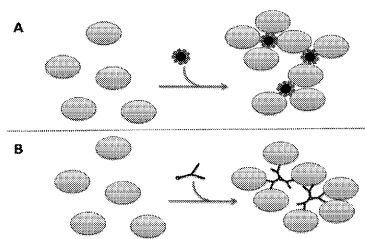


FIG. 4

【 図 5 】

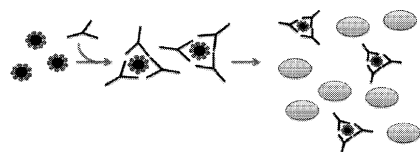


FIG. 5

【 図 10 】

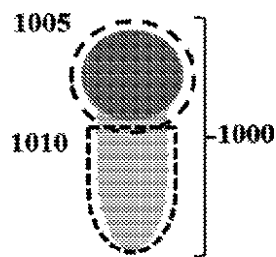
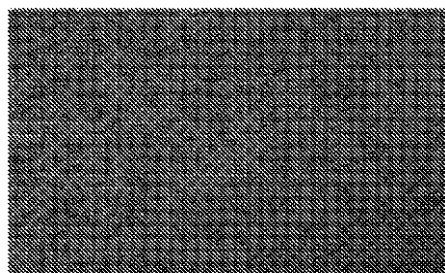


FIG. 10

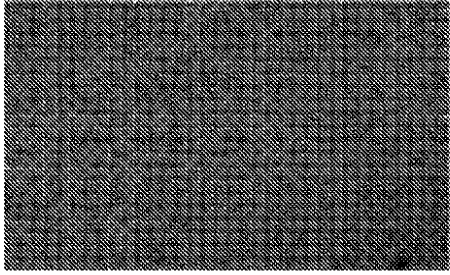
【 図 12 A 】

A



【図 1 2 B】

**B**



【図 1】

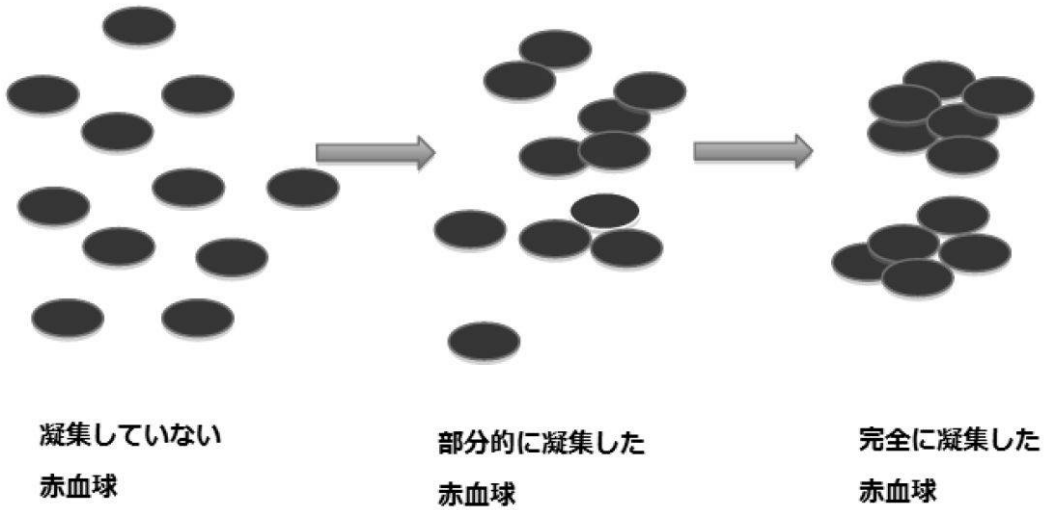


図 1

【 図 2 】

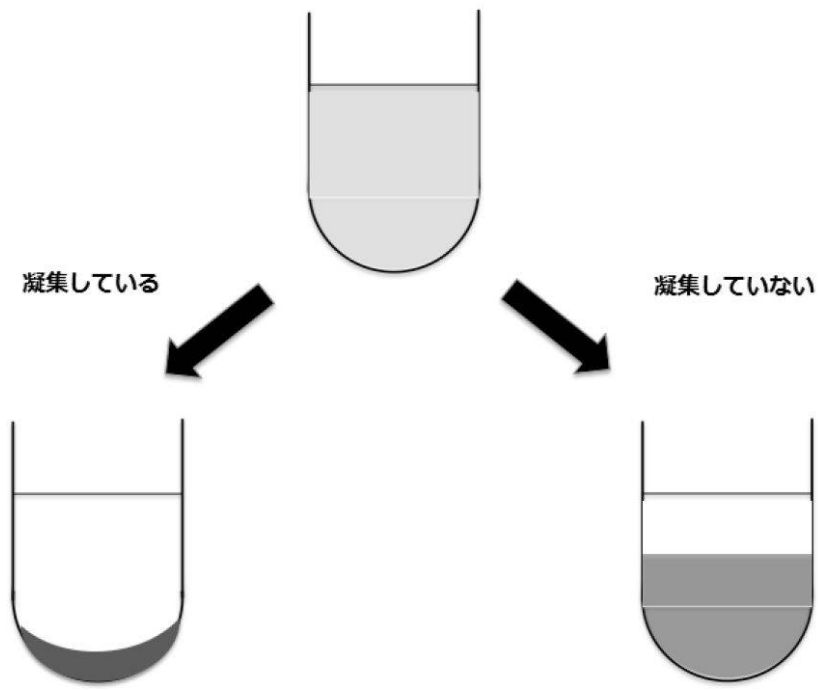


図 2

【 図 3 】

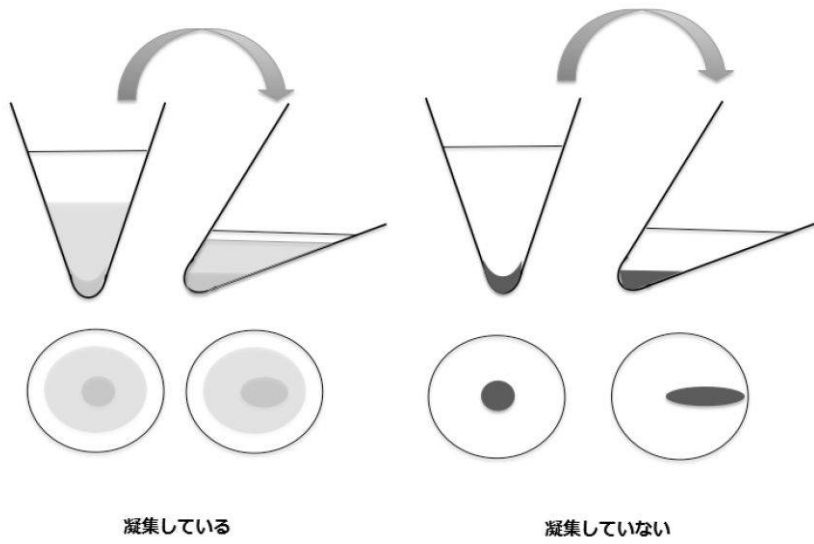


図 3

【図6】

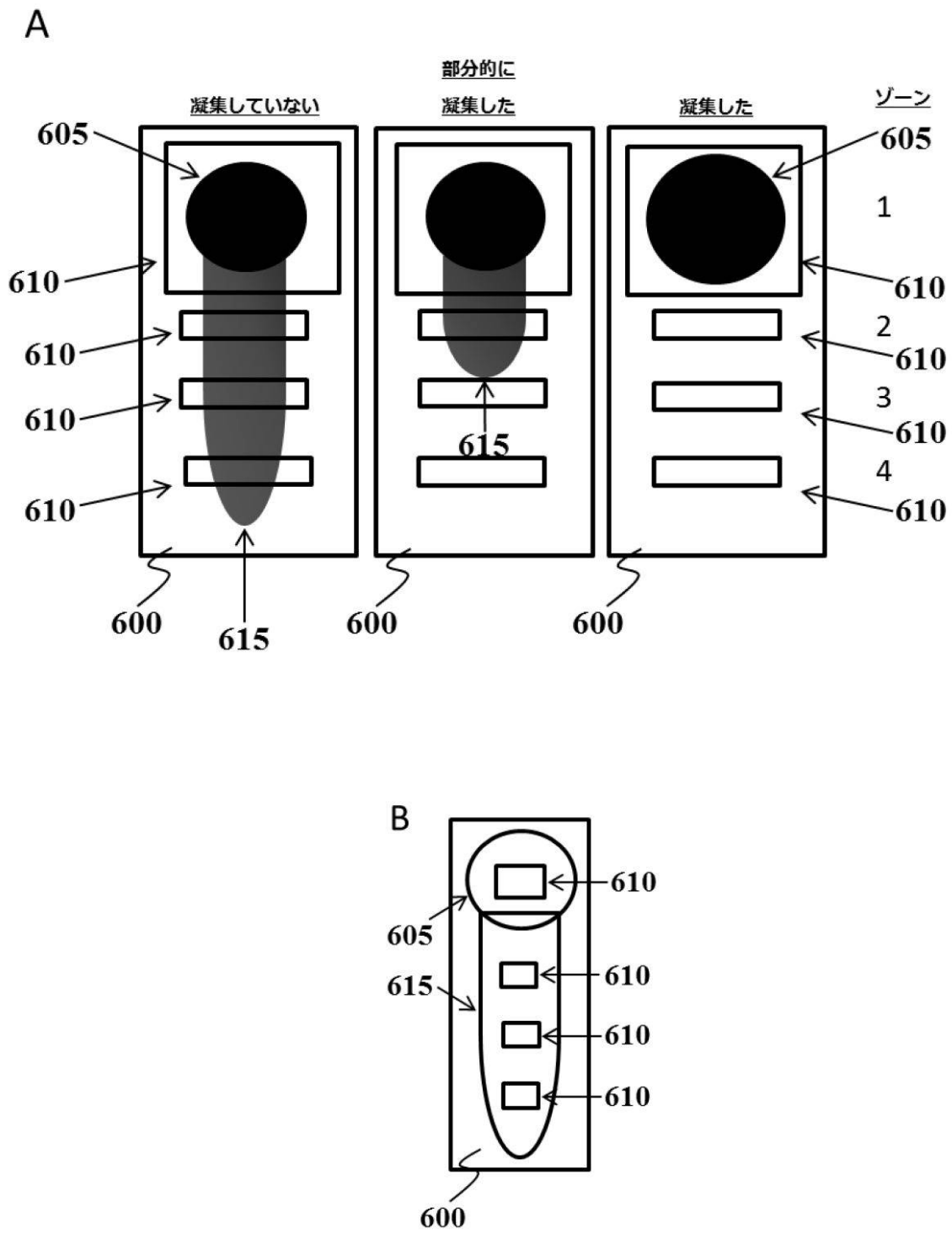


図6

【 図 7 】

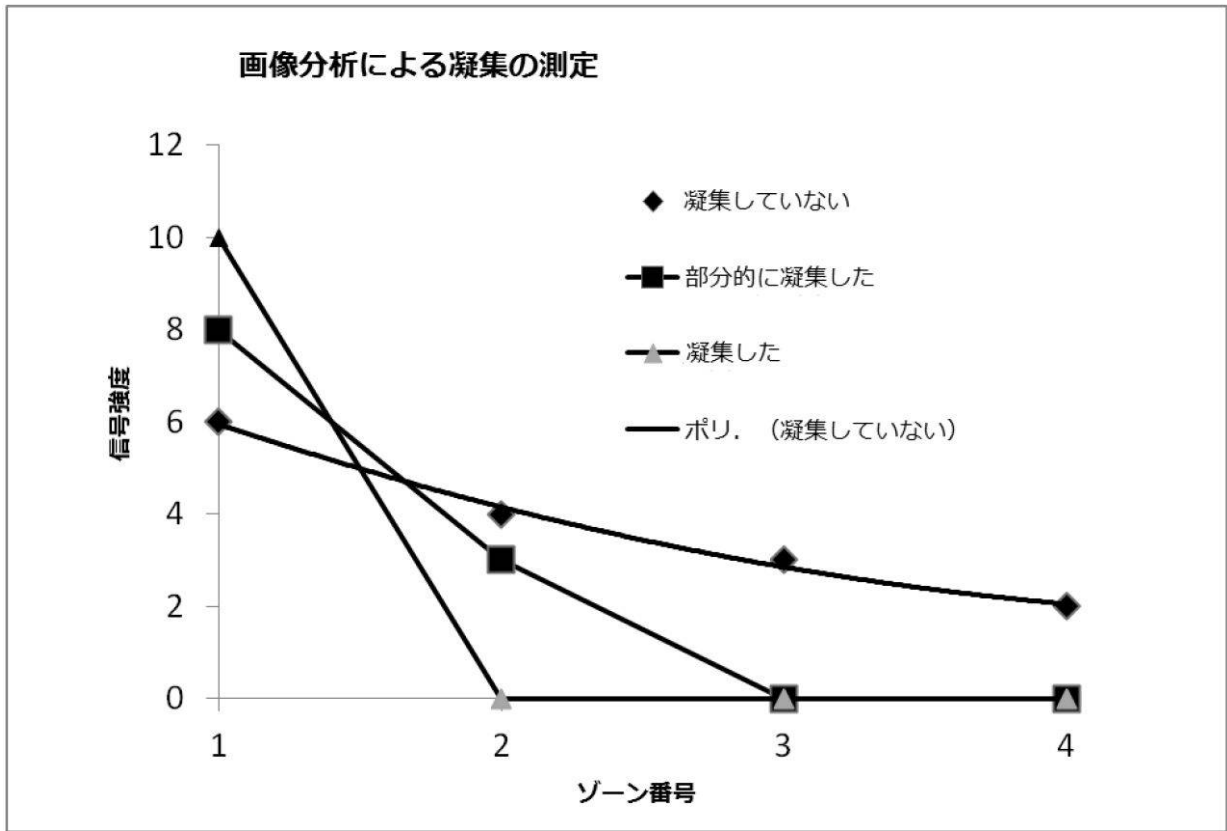


図 7

【 図 8 】

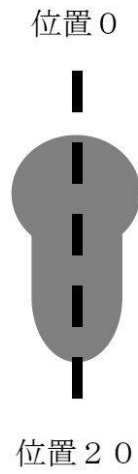


図 8

【 図 9 】

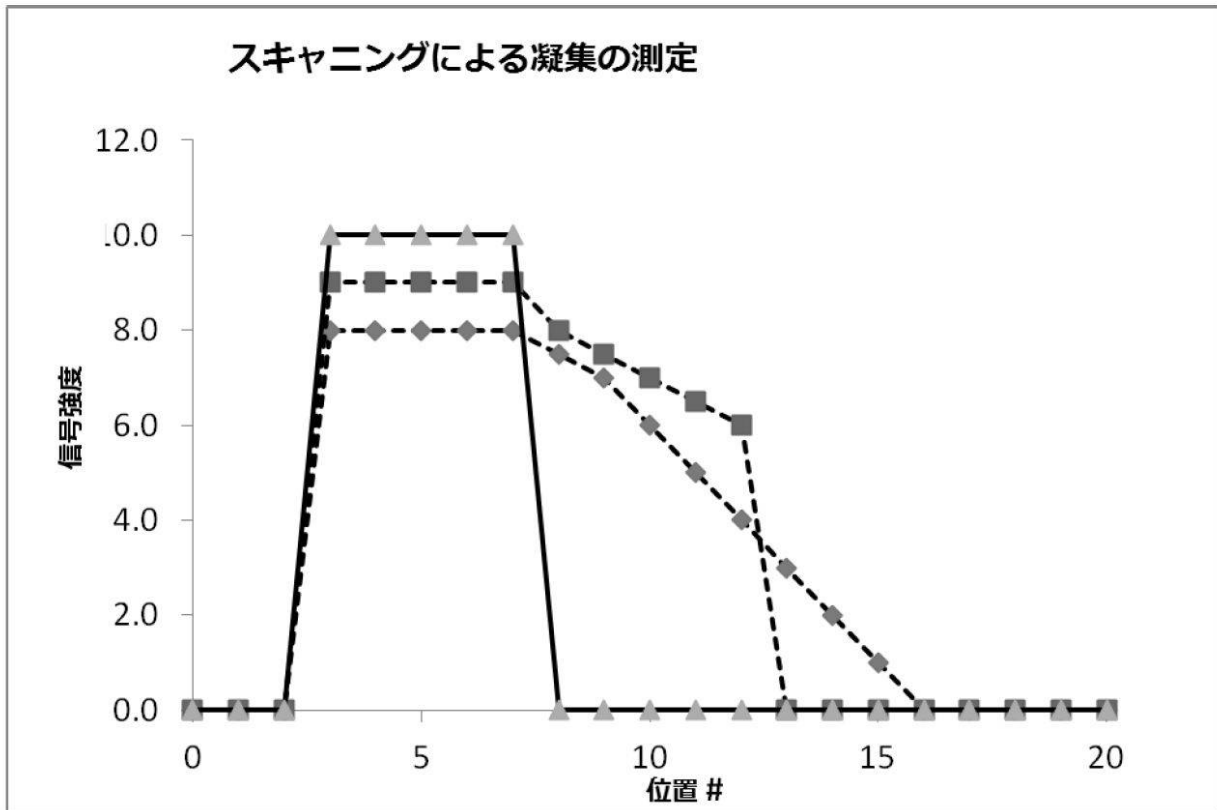


図 9

【 図 1 1 】

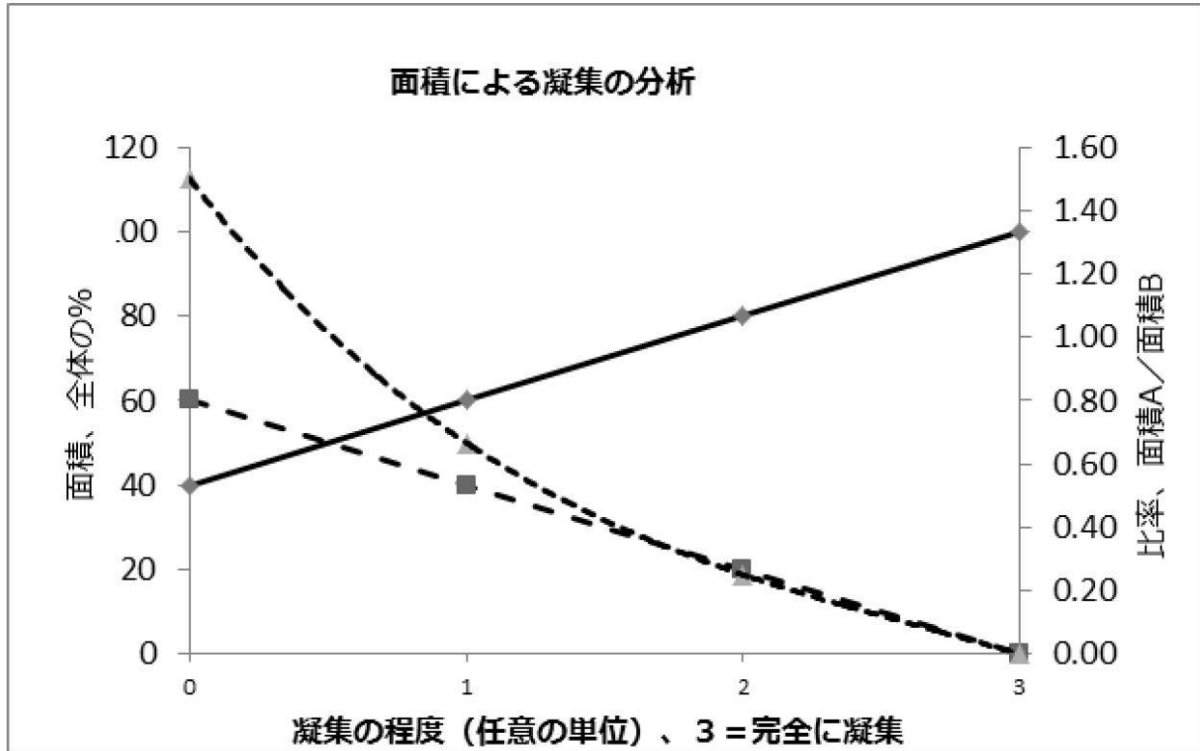


図 11

【 図 1 3 】

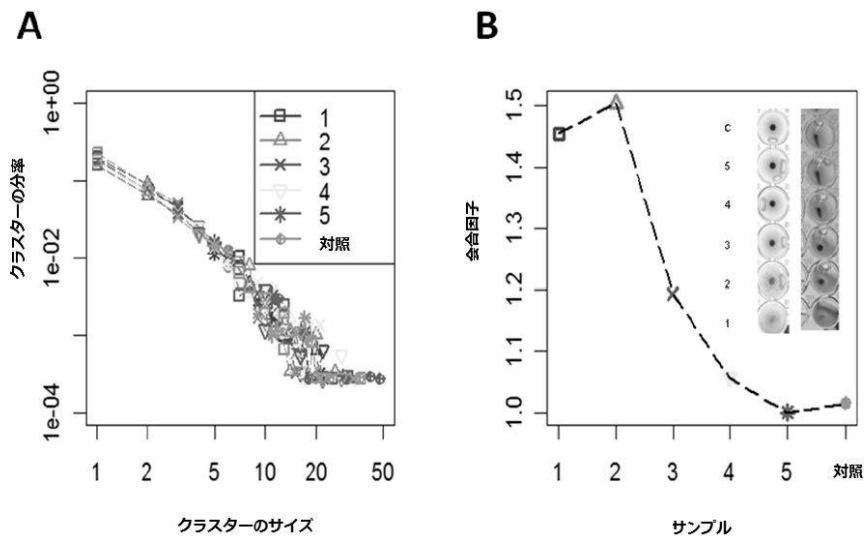
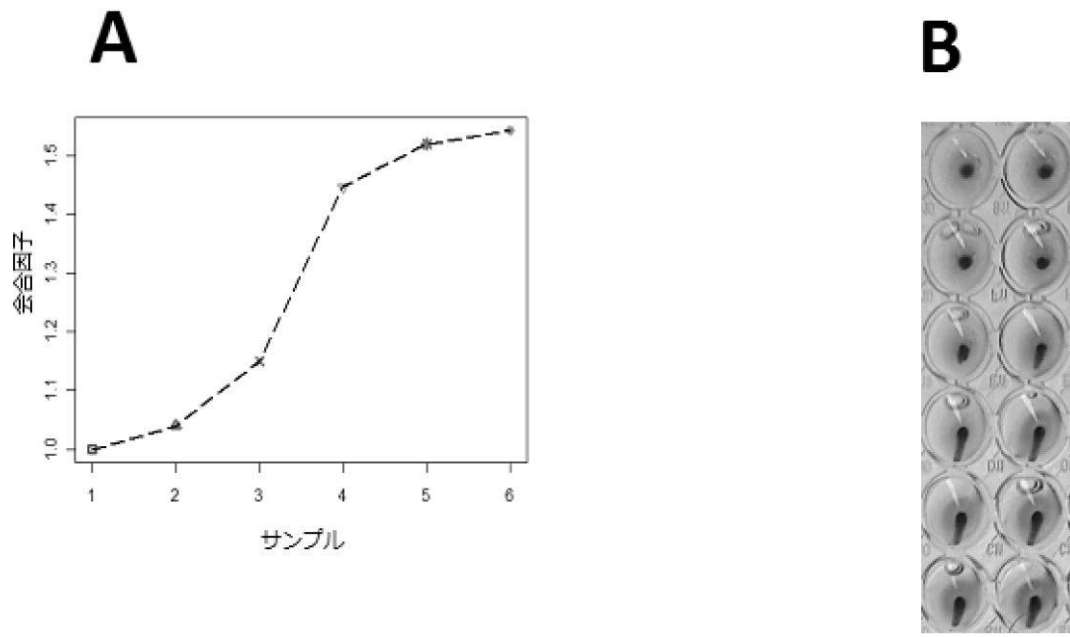


図 13

【 図 1 4 - 1 】





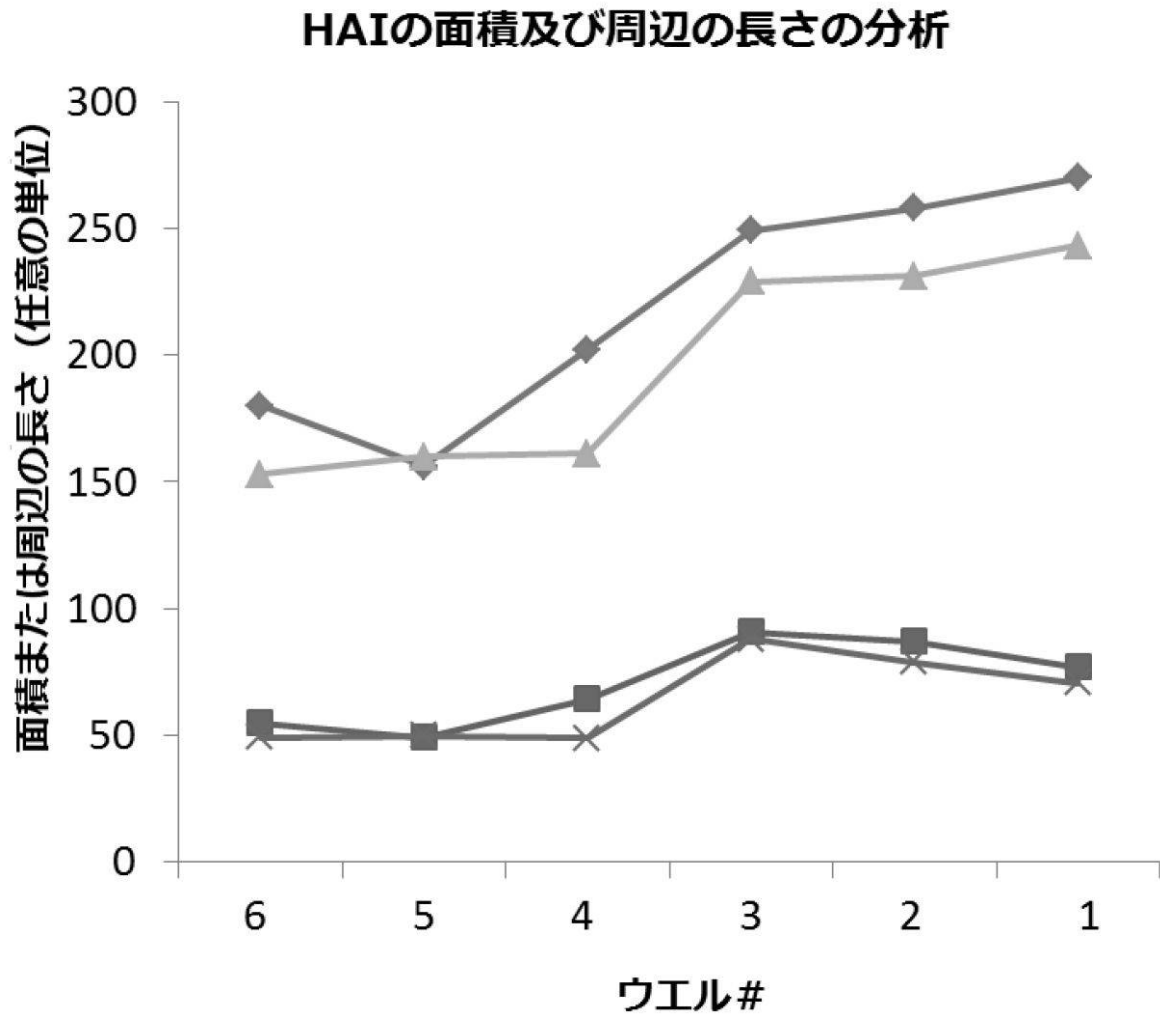
【 図 1 4 - 2 】



-

【図 1 4 - 3】

D



【 図 1 5 】

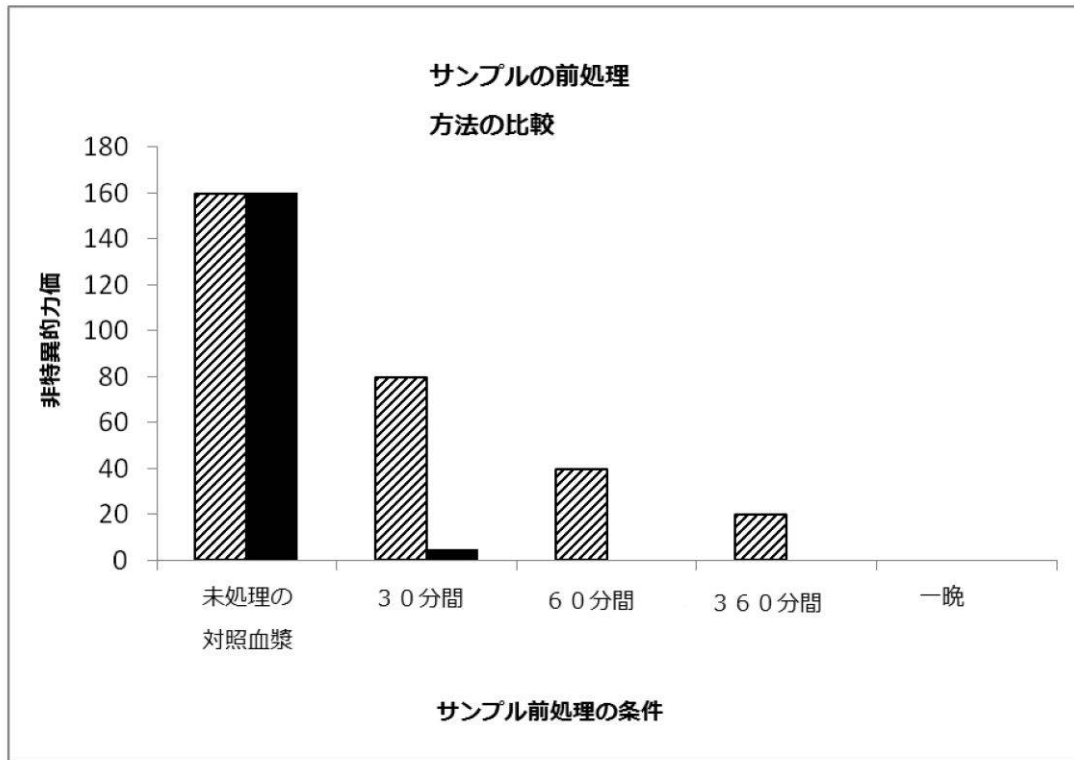


図 15

【 図 1 6 】

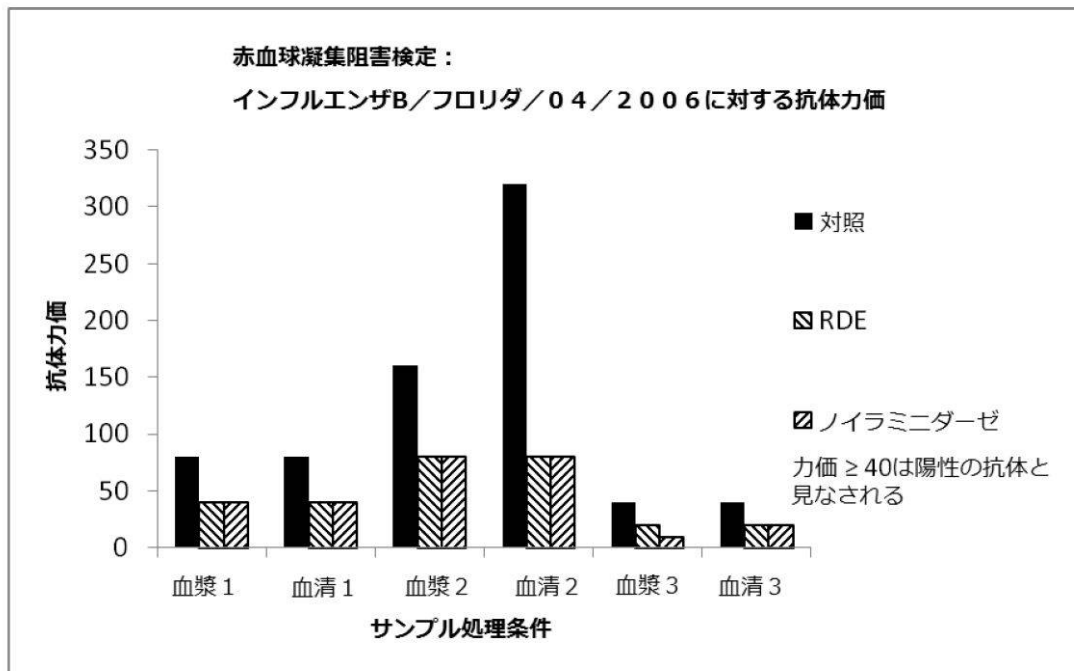


図 16

【 図 1 7 】

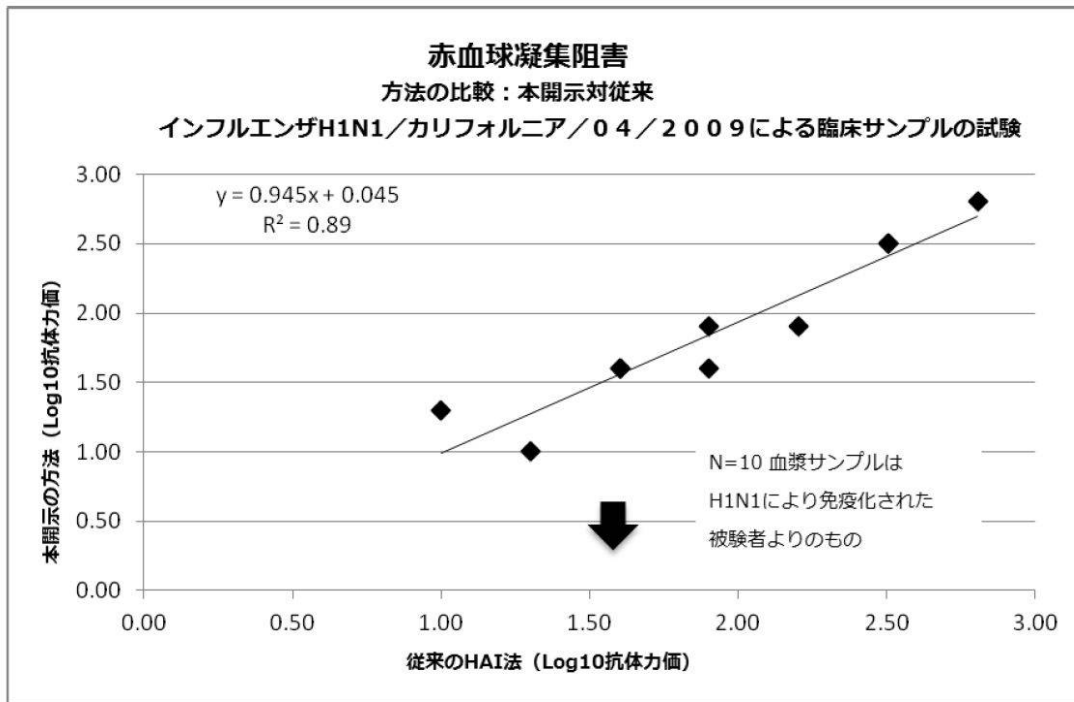


図 17

【 図 1 8 】

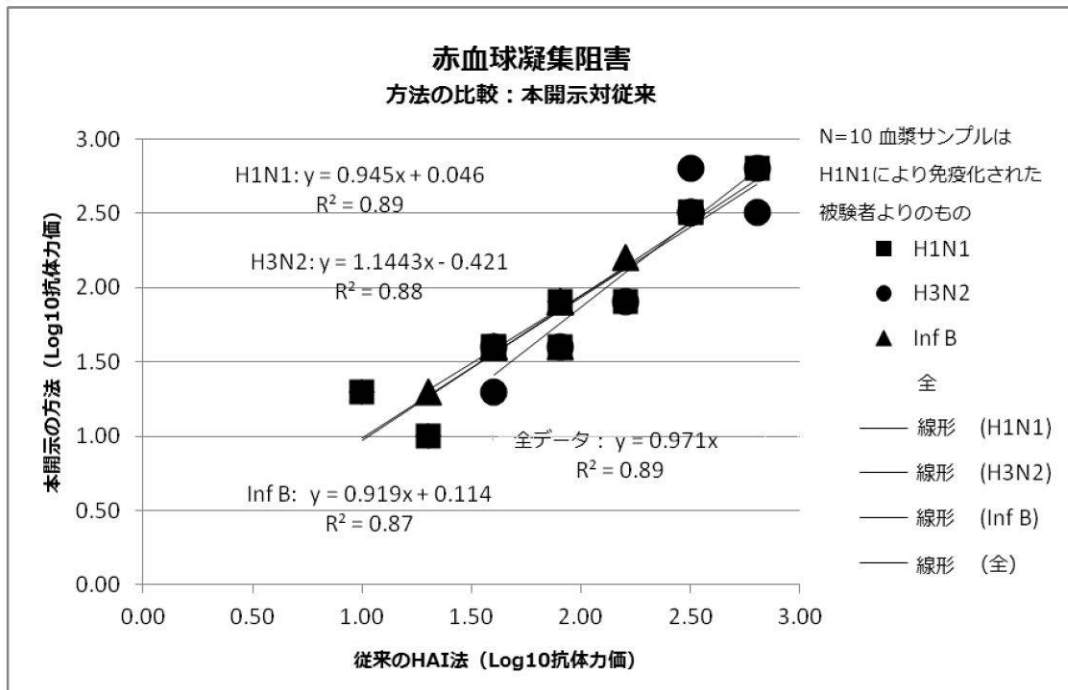


図 18

【 図 19 】

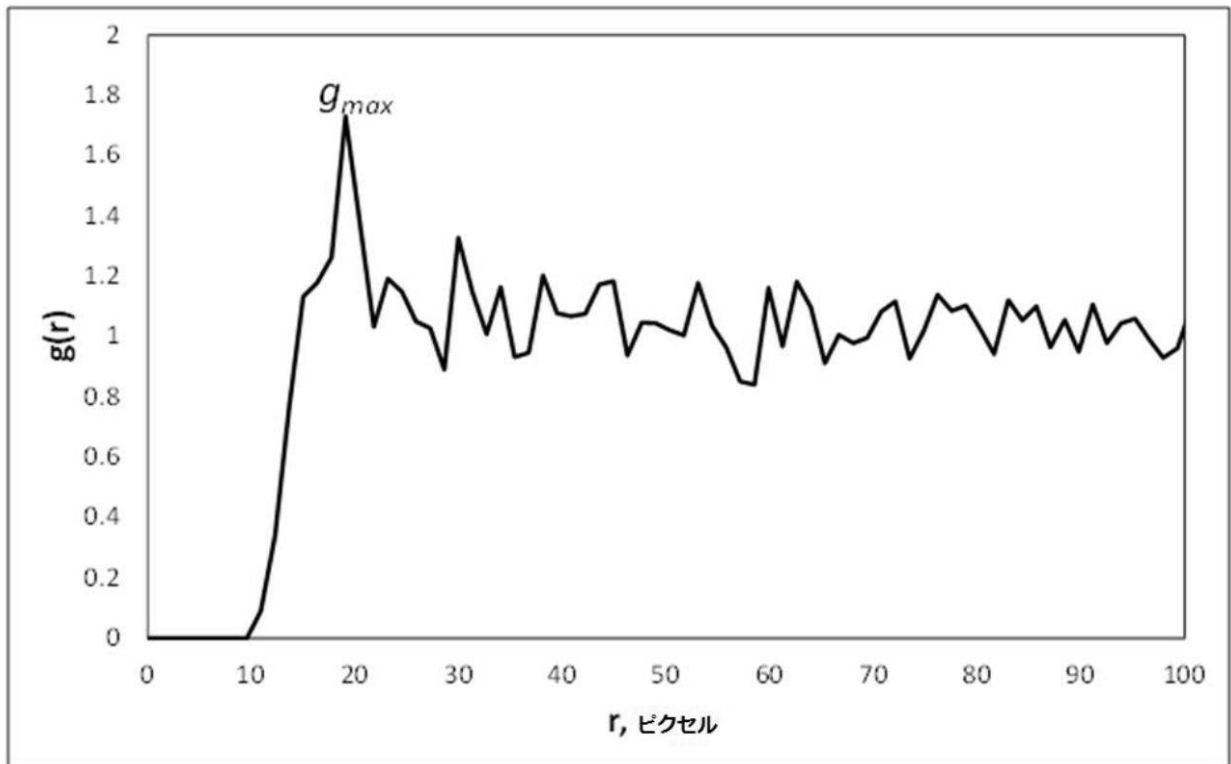


図 19

【 図 20 】

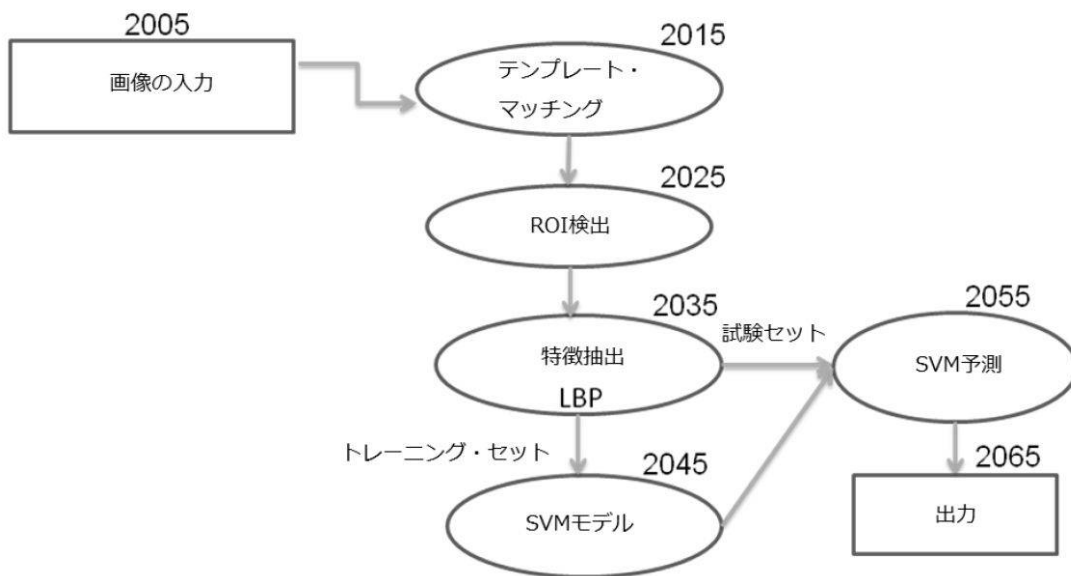


図 20

【 図 2 1 - 1 】

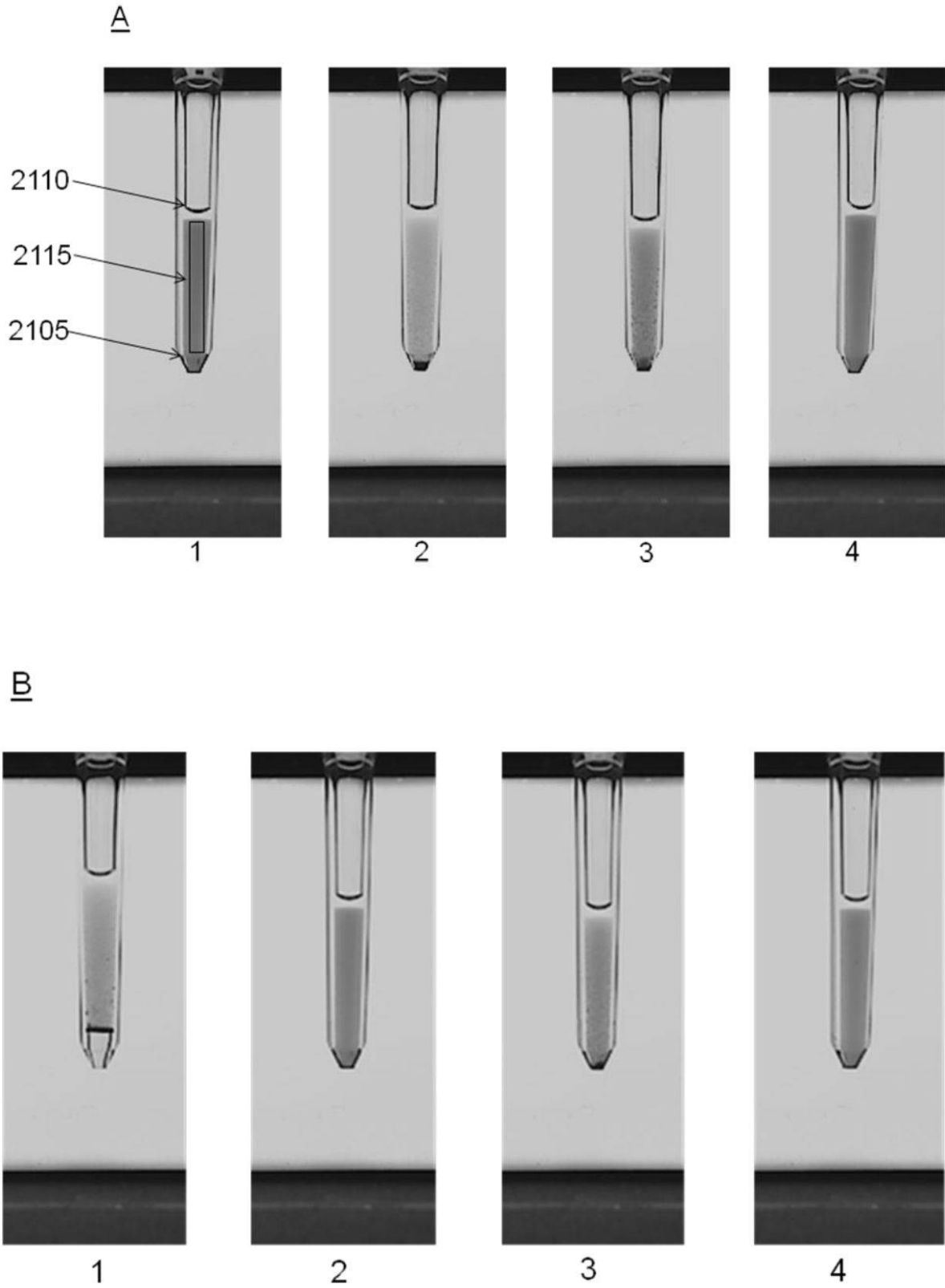


図 21 (以下に続く)

【図 21 - 2】

C

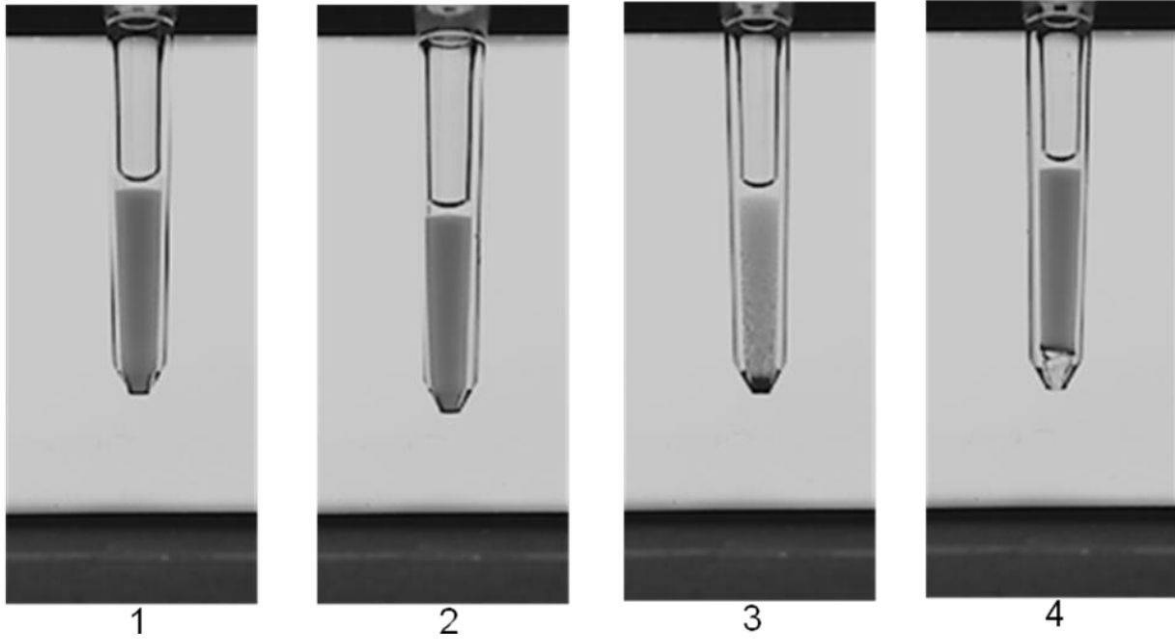


図 21 (上から続く)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2013/051165 13.03.2014

International application No.

PCT/US13/51165

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - G01N 33/53, 33/556 (2014.01) USPC - 435/5, 7.25; 436/521, 539, 164; 422/73 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): G01N 33/53, 33/563, 33/556, 33/555, 33/554, 33/536; A61K 35/12, 35/14, 35/18, 35/76, 39/00, 39/395, 39/12, 38/36 (2014.01) USPC: 435/7.2, 7.1, 4, 5, 7.21, 7.25, 7.8, 40.5, 40.51; 436/512, 521, 522, 539, 540, 8, 17, 63, 164, 166, 174; 422/73 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google/Google Scholar; ProQuest; ScienceDirect; agglutination, hemagglutination, red blood cells, RBCs, erythrocytes, glutaraldehyde, pentanedial, glutardialdehyde, glutaric acid dialdehyde, glutaric aldehyde, glutaric dialdehyde, '1,5-pentanedial', 'pentane-1,5-dial, detect, distinguish, presence, test		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 4298346 A (ITO, H) November 3, 1981; abstract; column 1, line 32-62; column 1, line 66-column 2, line 17; column 3, line 22-48; column 6, lines 24-35	1-3, 4/1-4/3 -- 19, 20, 21/19, 21/20, 29/19, 58/56, 58/57, 67/19, 78/19
X -- Y	EP 0435246 B1 (KANO, T et al.) August 9, 1995; abstract; column 3, lines 13-21; column 4, line 54-column 5, line 2; column 6, line 44-column 7, line 5; column 8, lines 24-39, column 9, lines 17-43; figures 2, 5c, 11	23, 29/23, 56, 57, 59, 60, 67/23, 67/56, 67/60, 68, 69, 70/68, 70/69, 71/70/68, 71/70/69, 72/68, 72/69, 73/72/68, 73/72/69, 75/68, 75/69, 76/75/68, 76/75/69 -- 19, 20, 21/19, 21/20, 26/23, 27/23, 29/19, 29/25, 30, 31, 32/30, 32/31, 33/32/30, 33/32/31, 34/30, 34/31, 35/34/30, 35/34/31, 37/30, 37/31, 38/37/30, 38/37/31, 58/56, 58/57, 67/19, 67/25, 67/62, 78/19, 78/23, 78/30, 78/31, 78/56, 78/60, 78/68, 78/69
<input checked="" 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 20 February 2104 (20.02.2014)		Date of mailing of the international search report <b>13 MAR 2014</b>
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: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774



INTERNATIONAL SEARCH REPORT **PCT/US2013/051165 13.03.2014**

International application No.

PCT/US13/51165

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2009/0325148 A1 (KACHURIN, A et al.) December 31, 2009; abstract; paragraphs [0003], [0005]-[0009], [0013], [0028], [0044], [0045]	24, 25, 61, 62 — 26/24, 27/24, 29/25, 63/61, 63/62, 64/61, 64/62, 67/25, 67/62, 78/25, 78/62
X — Y	US 4829011 A (GIBBONS, I) May 9, 1989; abstract; column 12, lines 39-67; column 4, line 64-column 5, line 19; column 11, lines 16-24	28, 65 ----- 66
X — Y	US 4176174 A (RUSSELL, SR et al.) November 27, 1979; abstract; column 1, line 51-column 2, line 2; column 6, lines 53-60	40, 42/40 ----- 41, 42/41
X	US 4403037 A (COATES, SR) September 6, 1983; abstract; column 1, lines 47-63; column 2, lines 10-23; Claim 7	22
Y	US 2011/0229914 A1 (LEE, FE et al.) September 22, 2011; abstract; paragraphs [0006], [0029]	26/23, 28/24, 27/23, 27/24, 63/61, 63/62, 64/61, 64/62
Y	US 8007999 B2 (HOLMES, EA et al.) August 30, 2011; abstract; column 2, lines 25-67; column 4, lines 20-36; column 5, lines 34-64; column 8, lines 4-15	30, 31, 32/30, 32/31, 33/32/30, 33/32/31, 34/30, 34/31, 35/34/30, 35/34/31, 37/30, 37/31, 38/37/30, 38/37/31, 78/30, 78/31
Y	McHUGH, TM et al. Simultaneous Detection Of Antibodies To Cytomegalovirus And Herpes Simplex Virus By Using Flow Cytometry And A Microsphere-Based Fluorescence Immunoassay. October 1988. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 26, No. 10, pp. 1957-1961; abstract; page 1957, left column, second paragraph. DOI: 0095-1137/88/101957-05\$02.00/0	41, 42/41, 66
Y	US 2001/0034068 A1 (SPIVEY, RJ et al.) October 25, 2001; abstract; figure 3; paragraph [0047]	78/19, 78/23, 78/25, 78/30, 78/31, 78/56, 78/60, 78/62, 78/68, 78/69

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2013/051165-13-03-2014

International application No.

PCT/US13/51165

<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 5-18, 36, 39, 43-55, 74, 77, 79, 83-117 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
-***-Please See Supplemental Page-***-	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Group I: Claims 1-4, 19-35, 37, 38, 40-42, 56-73, 75, 76, 78
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2013/051165 13.03.2014

International application No.

PCT/US13/51165

---Continuation of Box No. III - Observations where unity of invention is lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-4, 19-35, 37, 38, 40-42, 56-73, 75, 76 and 78 are directed towards a method for determining the presence of an antibody in a biological sample, wherein said antibody binds selectively to a viral particle, the method comprising: (a) incubating a mixture of erythrocytes, the viral particle, and the biological sample suspected of containing said antibody, under conditions permitting agglutination of the erythrocytes via interaction with said viral particle; and (b) detecting whether said agglutination occurs in said mixture, wherein the absence of said agglutination indicates the presence of said antibody, wherein said steps (a)- (b) take place in less than one hour; a method for determining the presence of an antibody in a biological sample, where said antibody binds selectively to a viral particle, the method comprising: (a) incubating a mixture of erythrocytes, the viral particle, and the biological sample suspected of containing said antibody, under conditions permitting agglutination of the erythrocytes via interaction with said viral particle; and (b) capturing with the aid of an optical device an image of said mixture, wherein the presence of an erythrocyte-viral particle cluster in said image indicates the occurrence of said agglutination and lack of detectable amount of said antibody, and wherein the absence of said cluster indicates the lack of said agglutination and the presence of detectable amount of said antibody; a method for determining the presence of a viral particle in a biological sample, comprising: (a) incubating a mixture of erythrocytes and a biological sample suspected of containing said viral particle, under conditions permitting agglutination of the erythrocytes via interaction with said viral particle; and (b) detecting whether said agglutination occurs in said mixture, wherein the presence of said agglutination indicates the presence of said viral particle, and wherein steps (a)-(b) take place in less than one hour; a method for determining the presence of a viral particle in a biological sample, comprising: (a) incubating a mixture of erythrocytes and a biological sample suspected of containing said viral particle, under conditions permitting agglutination of the erythrocytes via interaction with said viral particle; and (b) capturing with the aid of an optical device an image of said mixture, wherein the presence of an erythrocyte-viral particle cluster in said image indicates the occurrence of said agglutination and the presence of detectable amount of said viral particle, and wherein the absence of said cluster indicates the lack of said agglutination and the lack of detectable amount of said viral particle; a method for determining the effective immunization of a subject, comprising: (a) obtaining a biological sample from a subject that has been immunized with a first dosage of a first vaccine against a viral particle; (b) incubating a mixture of erythrocytes, the viral particle, and said biological sample, under conditions permitting agglutination of the erythrocytes via interaction with said viral particle; and (c) determining the concentration of an antibody against said virus in said sample based on the clusters formed by the agglutination of the erythrocytes, and wherein said steps (b) - (c) take place in less than one hour; a method for determining the effective immunization of a subject, comprising: (a) obtaining a biological sample from a subject that has been immunized with a first dosage of a first vaccine against a viral particle; (b) incubating a mixture of erythrocytes, said viral particle, and said biological sample, under conditions permitting agglutination of the erythrocytes via interaction with said viral particle; (c) capturing with the aid of an optical device an image of said mixture; and (d) determining the concentration of an antibody against said viral in said biological sample based on the clusters formed by the agglutination of the erythrocytes, wherein the presence of an erythrocyte-viral particle cluster in said image indicates the occurrence of said agglutination and lack of detectable amount of said antibody, and wherein the absence of said cluster indicates the lack of said agglutination and the presence of detectable amount of said antibody; a kit, comprising: pre-fixed erythrocytes, a viral particle, and instructions for a user to use said kit for antibody or viral detection; a method for determining the presence of an antibody in a biological sample, wherein said antibody binds selectively to a viral particle, the method comprising: (a) incubating a mixture of erythrocytes, the viral particle, and the biological sample suspected of containing said antibody, under conditions permitting agglutination of the erythrocytes via interaction with said viral particle; (b) concurrent with or subsequent to (a), providing the mixture in a vessel having an opening at the top of the vessel and interior conical shape at the bottom of the vessel; (c) tilting the vessel such that after tilting, at least a portion of the mixture is closer to the opening at the top of the vessel than prior to the tilting, and wherein at least a portion of the sample remains in the vessel after the tilting; and (d) capturing with the aid of an optical device an image of said mixture, wherein the position of erythrocytes within the tilted vessel may be used to determine the presence or amount of said antibody in the sample; a method for determining the presence of a viral particle in a biological sample, wherein said viral particle may be selectively bound by an antibody, the method comprising: (a) incubating a mixture of erythrocytes, the antibody, and the biological sample suspected of containing said viral particle, under conditions permitting agglutination of the erythrocytes via interaction with said viral particle; (b) concurrent with or subsequent to (a), providing the mixture in a vessel having an opening at the top of the vessel and interior conical shape at the bottom of the vessel; (c) tilting the vessel such that after tilting, at least a portion of the mixture is closer to the opening at the top of the vessel than prior to the tilting, and wherein at least a portion of the sample remains in the vessel after the tilting; and (d) capturing with the aid of an optical device an image of said mixture, wherein the position of erythrocytes within the tilted vessel may be used to determine the presence or amount of said viral particle in the sample; a method for determining the presence of an antibody in a biological sample, wherein said antibody binds selectively to an agglutinating particle, the method comprising: (a) incubating a mixture of visualization particles, the agglutinating particle, and the biological sample suspected of containing said antibody, under conditions permitting agglutination of the visualization particle via interaction with said agglutinating particle; and (b) detecting whether said agglutination occurs in said mixture, wherein the absence of said agglutination indicates the presence of said antibody, wherein said steps (a)- (b) take place in less than one hour; a method for determining the presence of an antibody in a biological sample, where said antibody binds selectively to an agglutinating particle, the method comprising: (a) incubating a mixture of visualization particles, the agglutinating particle, and the biological sample suspected of containing said antibody, under conditions permitting agglutination of the visualization particle via interaction with said agglutinating particle; and (b) capturing with the aid of an optical device an image of said mixture, wherein the presence of a visualization particle-agglutinating particle cluster in said image indicates the occurrence of said agglutination and lack of detectable amount of said antibody, and wherein the absence of said cluster indicates the lack of said agglutination and the presence of detectable amount of said antibody; a method for determining the presence of an agglutinating particle in a biological sample, comprising: (a) incubating a mixture of visualization particles and a biological sample suspected of containing said agglutinating particle, under conditions permitting agglutination of the visualization particle via interaction with said agglutinating particle; and (b) detecting whether said agglutination occurs in said mixture, wherein the presence of said agglutination indicates the presence of said agglutinating particle, and wherein steps (a)- (b) take place in less than one hour; a method for determining the presence of an agglutinating particle in a biological sample, comprising: (a) incubating a mixture of visualization particles and a biological sample suspected of containing said agglutinating particle, under conditions permitting agglutination of the visualization particle via interaction with said agglutinating particle; ... Continued on Next Supplemental Page ...

---Continued Within the Next Supplemental Box---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2013/051165 13.03.2014

International Application No.

PCT/US13/51165

-\*\*\*-Continued from Previous Supplemental Box-\*\*\*-

... Continued from Previous Supplemental Page ... and (b) capturing with the aid of an optical device an image of said mixture, wherein the presence of an visualization particle -agglutinating particle cluster in said image indicates the occurrence of said agglutination and the presence of detectable amount of said agglutinating particle, and wherein the absence of said cluster indicates the lack of said agglutination and the lack of detectable amount of said agglutinating particle; a method for determining the effective immunization of a subject, comprising: (a) obtaining a biological sample from a subject that has been immunized with a first dosage of a first vaccine against an agglutinating particle; (b) incubating a mixture of visualization particles, the agglutinating particle, and said biological sample, under conditions permitting agglutination of the visualization particles via interaction with said agglutinating particles; and (c) determining the concentration of an antibody against said agglutinating particle in said sample based on the clusters formed by the agglutination of the visualization particles, and wherein said steps (b) - (c) take place in less than one hour; a method for determining the effective immunization of a subject, comprising: (a) obtaining a biological sample from a subject that has been immunized with a first dosage of a first vaccine against an agglutinating particle; (b) incubating a mixture of visualization particles, said agglutinating particle, and said biological sample, under conditions permitting agglutination of the visualization particles via interaction with said agglutinating particle; (c) capturing with the aid of an optical device an image of said mixture; and (d) determining the concentration of an antibody against said agglutinating particle in said biological sample based on the clusters formed by the agglutination of the visualization particles, wherein the presence of a visualization particle -agglutinating particle cluster in said image indicates the occurrence of said agglutination and lack of detectable amount of said antibody, and wherein the absence of said cluster indicates the lack of said agglutination and the presence of detectable amount of said antibody; a kit, comprising: visualization particles, an agglutinating particle, and instructions for a user to use said kit for antibody or agglutinating particle detection; a method for determining the presence of an antibody in a biological sample, wherein said antibody binds selectively to an agglutinating particle, the method comprising: (a) incubating a mixture of visualization particles, the agglutinating particle, and the biological sample suspected of containing said antibody, under conditions permitting agglutination of the visualization particle via interaction with said agglutinating particle; (b) concurrent with or subsequent to (a), providing the mixture in a vessel having an opening at the top of the vessel and interior conical shape at the bottom of the vessel; (c) tilting the vessel such that after tilting, at least a portion of the mixture is closer to the opening at the top of the vessel than prior to the tilting, and wherein at least a portion of the sample remains in the vessel after the tilting; and (d) capturing with the aid of an optical device an image of said mixture, wherein the position of visualization particles within the tilted vessel may be used to determine the presence or amount of said agglutinating particle in the sample; and a method for determining the presence of an agglutinating particle in a biological sample, wherein the agglutinating particle may be selectively bound by an antibody, the method comprising: (a) incubating a mixture of visualization particle, the antibody, and the biological sample suspected of containing said agglutinating particle, under conditions permitting agglutination of the visualization particles via interaction with said agglutinating particle; (b) concurrent with or subsequent to (a), providing the mixture in a vessel having an opening at the top of the vessel and interior conical shape at the bottom of the vessel; (c) tilting the vessel such that after tilting, at least a portion of the mixture is closer to the opening at the top of the vessel than prior to the tilting, and wherein at least a portion of the sample remains in the vessel after the tilting; and (d) capturing with the aid of an optical device an image of said mixture, wherein the position of visualization particles within the tilted vessel may be used to determine the presence or amount of said agglutinating particle in the sample.

Group II: Claims 80-82 are directed toward a method of assaying for the agglutination of visualization particles in a mixture, comprising: a) generating a mixture comprising the visualization particles and agglutinating particles under conditions permitting agglutination of the visualization particles via interaction with the agglutinating particles; b) obtaining at least one image of the mixture; and c) analyzing the image to obtain a measurement of the agglutination of the visualization particles in the mixture.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include a method for determining the presence of an antibody in a biological sample, wherein said antibody binds selectively to a viral particle, wherein the absence of agglutination indicates the presence of said antibody, wherein said steps (a)-(b) take place in less than one hour; a method for determining the presence of an antibody in a biological sample, where said antibody binds selectively to a viral particle, wherein the absence of a cluster indicates the lack of agglutination and the presence of detectable amount of said antibody; a method for determining the presence of a viral particle in a biological sample, wherein steps (a)-(b) take place in less than one hour; a method for determining the presence of a viral particle in a biological sample, wherein the absence of a cluster indicates the lack of agglutination and the lack of detectable amount of said viral particle; a method for determining the effective immunization of a subject, comprising: (a) obtaining a biological sample from a subject that has been immunized with a first dosage of a first vaccine against a viral particle; determining the concentration of an antibody against said virus in said sample based on the clusters formed by the agglutination of the erythrocytes, and wherein said steps (b) - (c) take place in less than one hour; a method for determining the effective immunization of a subject, comprising: (a) obtaining a biological sample from a subject that has been immunized with a first dosage of a first vaccine against a viral particle; and (d) determining the concentration of an antibody against said viral in said biological sample based on the clusters formed by the agglutination of the erythrocytes, wherein the absence of a cluster indicates the lack of said agglutination and the presence of detectable amount of said antibody; a kit, comprising: pre-fixed erythrocytes, a viral particle, and instructions for a user to use said kit for antibody or viral detection; a method for determining the presence of an antibody in a biological sample, wherein said antibody binds selectively to a viral particle, the method comprising: providing a mixture in a vessel having an opening at the top of the vessel and interior conical shape at the bottom of the vessel; (c) tilting the vessel such that after tilting, at least a portion of the mixture is closer to the opening at the top of the vessel than prior to the tilting, and wherein at least a portion of the sample remains in the vessel after the tilting; wherein the position of erythrocytes within the tilted vessel may be used to determine the presence or amount of said antibody in the sample; a method for determining the presence of a viral particle in a biological sample, wherein said viral particle may be selectively bound by an antibody, the method comprising: providing a mixture in a vessel having an opening at the top of the vessel and interior conical shape at the bottom of the vessel; (c) tilting the vessel such that after tilting, at least a portion of the mixture is closer to the opening at the top of the vessel than prior to the tilting, and wherein at least a portion of the sample remains in the vessel after the tilting; wherein the position of erythrocytes within the tilted vessel may be used to determine the presence or amount of said viral particle in the sample;... Continued on Next Supplemental Page ...

-\*\*\*-Continued Within the Next Supplemental Box-\*\*\*-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2013/051165 13.03.2014

International application No.

PCT/US13/51165

-\*\*\*Continued from Previous Supplemental Box-\*\*\*-

... Continued from Previous Supplemental Page ... a method for determining the presence of an antibody in a biological sample, wherein said antibody binds selectively to an agglutinating particle, wherein said steps (a)-(b) take place in less than one hour; a method for determining the presence of an antibody in a biological sample, wherein the lack of detectable amount of said antibody, and wherein the absence of a cluster indicates the lack of agglutination and the presence of detectable amount of said antibody; a method for determining the presence of an agglutinating particle in a biological sample, wherein the presence of agglutination indicates the presence of said agglutinating particle, and wherein steps (a)-(b) take place in less than one hour; a method for determining the presence of an agglutinating particle in a biological sample, wherein the absence of a cluster indicates the lack of agglutination and the lack of detectable amount of said agglutinating particle; a method for determining the effective immunization of a subject, comprising: (a) obtaining a biological sample from a subject that has been immunized with a first dosage of a first vaccine against an agglutinating particle; wherein said steps (b) - (c) take place in less than one hour; a method for determining the effective immunization of a subject, comprising: (a) obtaining a biological sample from a subject that has been immunized with a first dosage of a first vaccine against an agglutinating particle; wherein the absence of a cluster indicates the lack of said agglutination and the presence of detectable amount of said antibody; a kit, comprising: visualization particles, an agglutinating particle, and instructions for a user to use said kit for antibody or agglutinating particle detection; a method for determining the presence of an antibody in a biological sample, wherein said antibody binds selectively to an agglutinating particle; the method comprising: providing a mixture in a vessel having an opening at the top of the vessel and interior conical shape at the bottom of the vessel; (c) tilting the vessel such that after tilting, at least a portion of the mixture is closer to the opening at the top of the vessel than prior to the tilting, and wherein at least a portion of the sample remains in the vessel after the tilting; wherein the position of visualization particles within the tilted vessel may be used to determine the presence or amount of said antibody in the sample; and a method for determining the presence of an agglutinating particle in a biological sample, wherein the agglutinating particle may be selectively bound by an antibody, the method comprising: providing the mixture in a vessel having an opening at the top of the vessel and interior conical shape at the bottom of the vessel; (c) tilting the vessel such that after tilting, at least a portion of the mixture is closer to the opening at the top of the vessel than prior to the tilting, and wherein at least a portion of the sample remains in the vessel after the tilting; wherein the position of visualization particles within the tilted vessel may be used to determine the presence or amount of said agglutinating particle in the sample, which are not present in Group II, the special technical features of Group II including a method of assaying for the agglutination of visualization particles in a mixture, and analyzing the image to obtain a measurement of the agglutination of the visualization particles in the mixture.

Groups I-II share the technical features including a method comprising: a) generating a mixture comprising visualization particles and agglutinating particles under conditions permitting agglutination of the visualization particles via interaction with the agglutinating particles; b) obtaining at least one image of the mixture.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 4,829,011 A (GIBBONS) in view of US 4,556,641 to Kano, et al. (hereinafter "Kano"). Gibbons discloses a method comprising (a method comprising: column 2, lines 15-18): a) generating a mixture (forming a reaction medium (generating a mixture); column 2, lines 17-19) comprising visualization particles (comprising a plurality of particles having a binding pair member (comprising visualization particles); column 2, lines 19-20) and agglutinating particles (and a polyvalent receptor (agglutinating particles); column 2, lines 24-28) under conditions permitting agglutination of the visualization particles via interaction with the agglutinating particles (under conditions permitting agglutination of the visualization particles via interaction with the agglutinating particles; column 2, lines 23-37). Gibbons does not disclose obtaining at least one image of the mixture. Kano discloses obtaining at least one image of a mixture of an agglutination reaction (obtaining at least one image of a mixture of an agglutination reaction; column 3, lines 52-60). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the method of Gibbons regarding the agglutination of particles enabling visualization and agglutinating particles, in combination with the Imaging method of Kano, for enabling the real-time image tracking of the agglutination process, whereby a rapid and reliable determination of the results of the agglutination reaction would have been possible using the various images previously disclosed by the method of Kano, without undue experimentation or testing.

Since none of the special technical features of the Groups I-II inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Gibbons and Kano references, unity of invention is lacking.

## 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 21/82

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

(72)発明者 パテル, ポール

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 4 , パロ アルト, ページ ミル ロード 1 7  
0 1

(72)発明者 アネカル, サマルサ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 4 , パロ アルト, ページ ミル ロード 1 7  
0 1

(72)発明者 ギボンズ, イアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 4 , パロ アルト, ページ ミル ロード 1 7  
0 1

(72)発明者 ホームズ, エリザベス エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 4 , パロ アルト, ページ ミル ロード 1 7  
0 1

(72)発明者 ジョシ, スワプナ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 4 , パロ アルト, ページ ミル ロード 1 7  
0 1

Fターム(参考) 2G054 AA07 AB04 BA02 BB10 BB13 CA23 CB03 CD01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015522825A5</a>	公开(公告)日	2016-09-01
申请号	JP2015523269	申请日	2013-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	赛拉诺斯股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	塞拉诺斯公司		
[标]发明人	パテルポール アネカルサマルサ ギボンズイアン ホームズエリザベスエー ジョシスワプナ		
发明人	パテル, ポール アネカル, サマルサ ギボンズ, イアン ホームズ, エリザベス エー. ジョシ, スワプナ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/556 G01N21/82		
CPC分类号	B01L3/5021 G01N33/54313 G01N33/556 G01N33/56983 G01N33/6854 A61B5/08 G01N33/86		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.581.W G01N33/543.581.H G01N33/569.L G01N33/556 G01N21/82		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/AB04 2G054/BA02 2G054/BB10 2G054/BB13 2G054/CA23 2G054/CB03 2G054/CD01		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/673215 2012-07-18 US		
其他公开文献	JP2015522825A		

#### 摘要(译)

提供了用于进行和分析凝集测定的方法，组合物，系统和装置。在一个方面，提供了用于凝集测定的图像分析的方法。在另一方面，提供了用于进行凝集测定的方法。在一个方面，该方法可用于检测各种分子，包括病毒或针对病毒的抗体。在另一方面，该方法可用于确定受试者的有效免疫。