

(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2013-541018

(P2013-541018A)

(43) 公表日 平成25年11月7日 (2013.11.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	Z
GO 1 N 33/546 (2006.01)	GO 1 N 33/546	
GO 1 N 33/547 (2006.01)	GO 1 N 33/547	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2013-535509 (P2013-535509)	(71) 出願人	510184449
(86) (22) 出願日	平成23年10月26日 (2011.10.26)		ザ バインディング サイト グループ
(85) 翻訳文提出日	平成25年4月30日 (2013.4.30)		リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/GB2011/052079		イギリス ウェスト ミッドランズ B 1
(87) 国際公開番号	W02012/056233		5 1 Q T バーミンガム エッジバスト
(87) 国際公開日	平成24年5月3日 (2012.5.3)		ン キャルソープ ロード 8
(31) 優先権主張番号	1018096.6	(74) 代理人	100100549
(32) 優先日	平成22年10月27日 (2010.10.27)		弁理士 川口 嘉之
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100126505
			弁理士 佐貫 伸一
		(74) 代理人	100131392
			弁理士 丹羽 武司

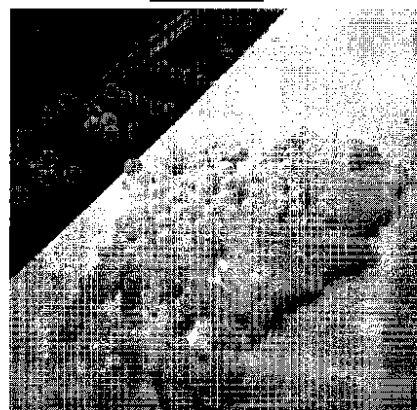
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コーティングされたビーズ

(57) 【要約】

本発明は、(i) 複数のビーズを該生体分子でコーティングすること；(i i) コーティングされたビーズを、液体安定化剤および／またはブロッキング剤と混ぜること；(i i i) 該液体安定化剤および／またはブロッキング剤を含む液相によってまだ実質的に取り囲まれているコーティングされたビーズを、少なくとも部分的に液体透過性である表面に分散すること；(i v) 該表面上の該ビーズを乾燥し、実質的に該液相を除去すること；ならびに(v) 乾燥ビーズを該表面から除去することを含む、ビーズを生体分子でコーティングする方法に関する。

FIGURE 3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ビーズを生体分子でコーティングする方法であって、

(i) 複数のビーズを該生体分子でコーティングすること；

(i i) 該コーティングされたビーズを、液体安定化剤および／またはブロッキング剤と混ぜること；

(i i i) 該液体安定化剤および／またはブロッキング剤を含む液相によってまだ実質的に取り囲まれている該コーティングされたビーズを、少なくとも部分的に液体透過性である表面に分散すること；

(i v) 該表面上の該ビーズを乾燥し、実質的に該液相を除去すること；ならびに

(v) 該乾燥ビーズを該表面から除去することを含む方法。

10

【請求項 2】

前記生体分子が、抗原または抗体に特異的に結合することができる抗体またはその断片である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも部分的に透過性である表面が紙である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記コーティングされたビーズを、前記少なくとも部分的に液体透過性である表面上に分散する前に、過剰な液体安定化剤および／またはブロッキング剤が除去される、請求項 1 ～ 3 いずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記液体安定化剤および／またはブロッキング剤が、糖、多価アルコール、界面活性剤、塩、ポリエチレングリコール (P E G)、ポリマー、金属イオン、タンパク質およびアミノ酸から選択される、1 つ以上の化合物を含む、請求項 1 ～ 4 いずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記安定化剤および／またはブロッキング剤が、スタビルコート (S t a b i l c o a t) (商標)、スタビルガード (S t a b i l g u a r d) (商標)、蔗糖および乳糖から選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記液体安定化剤および／またはブロッキング剤が、ウシ血清アルブミン (B S A) を含む、請求項 1 ～ 6 いずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記ビーズが、直径 0. 5 mm ～ 5 mm であり、特に 1 ～ 3 mm、最も好ましくは、直径 2 mm である、請求項 1 ～ 7 いずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記ビーズが、タンパク質または他のリガンドの受動的吸着用のポリスチレンビーズである、請求項 1 ～ 8 いずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記ビーズが、タンパク質または他のリガンドの共有結合のためのカルボキシル基またはアミノ基などの表面官能基をもつポリスチレンビーズである、請求項 1 ～ 9 いずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記ビーズが、タンパク質または他のリガンドの連結のためのプロテイン G などの結合タンパク質、ストレプトアビジン (s t r e p a v i d i n) またはビオチンをもつポリスチレンビーズである、請求項 1 ～ 10 いずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

工程 (i v) における前記ビーズが、真空下で乾燥される、請求項 1 ～ 11 いずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

50

前記乾燥工程 (i v) が、 -5°C ～ 37°C で実施される、請求項 1～12 いずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 1～13 いずれか一項に記載の方法によって入手可能なビーズ。

【請求項 15】

生体分子でコーティングされ、安定化剤および／またはブロッキング剤を含む複数のビーズであって、前記ビーズが実質的に凝集しないことを特徴とする複数のビーズ。

【請求項 16】

直径 0.5～5 mm、好ましくは、直径 1～3 mm、最も好ましくは、直径 2 mm である、請求項 15 に記載の複数のビーズ。

【請求項 17】

前記ビーズがポリスチレンビーズである、請求項 15 または 16 に記載の複数のビーズ。

【請求項 18】

前記生体分子が、抗原または抗原に特異的に結合することができる抗体またはその断片である、請求項 14～17 に記載の複数のビーズ。

【請求項 19】

前記液体安定化剤および／またはブロッキング剤が、糖、多価アルコール、界面活性剤、塩、ポリエチレングリコール (P E G)、ポリマー、金属イオン、タンパク質およびアミノ酸から選択される、1 つ以上の化合物を含む、請求項 15～18 に記載の複数のコーティングされたビーズ。

【請求項 20】

前記安定化剤および／またはブロッキング剤が、スタビルコート (S t a b i l c o a t) (商標)、スタビルガード (S t a b i l g u a r d) (商標)、蔗糖および乳糖から選択される、請求項 19 に記載の複数のコーティングされたビーズ。

【請求項 21】

前記液体安定化剤および／またはブロッキング剤が、ウシ血清アルブミン (B S A) を含む、請求項 15～19 に記載の複数のコーティングされたビーズ。

【請求項 22】

請求項 14～19 に記載の前記ビーズまたは複数のビーズを提供することを含む、免疫アッセイを実施する方法。

【請求項 23】

請求項 14～19 に記載の前記ビーズまたは複数のビーズを含む免疫診断用装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ビーズを生体分子でコーティングする方法、および生体分子でコーティングされたビーズに関する。

【背景技術】

【0002】

酵素免疫吸着アッセイ (E L I S A) (非特許文献 1、2) などの診断用免疫アッセイは、研究および産業で広く使用され、多くの診断、臨床、生化学、環境および遺伝学に利用される (非特許文献 3、4) 重要で感度の高い分析手法である。これらのアッセイは、発色、蛍光、放射性、および化学発光分子で標識された検出タンパク質、および／またはエンハンサーもしくはリポーター剤の基質として作用する酵素を含む他の生体分子と結合する検出タンパク質とともに、固体担体上に固定されたタンパク質 (例えば、抗原および抗体) を使用する。

【0003】

2～3 日間／週間を超える長期の保存可能期間をもつ免疫アッセイ固体担体の製造を成功するためには、固定された標的抗原または抗体の物理的な完全性を保持する必要がある

10

20

30

40

50

。これは、湿気、温度、pH、塩、金属イオン、および他の混入物質を含む多くの外的因子によって影響される。例えば、タンパク質は、機能的な三次元構造をもつ、大きく柔軟な分子である（非特許文献5）。触媒部位および／または結合部位領域におけるアミノ酸の空間的配置は、アミノ酸の分子同士および他の周囲の分子との相互作用に依存する（非特許文献6～8）。それは、タンパク質の安定性を決定する局所的な環境状態に従ったタンパク質の固有の構造である。この系における結合および他の分子の特質は、免疫アッセイにおける非特異的な結合の度合いに影響する。よって、この初期レベルにて使用される構成要素はすべて、厳密に評価され、非特異的な結合がないことが確認されなければならない。さらに、試料希釈剤、洗浄緩衝液および結合タンパク質を含む、アッセイ内で使用される他の構成要素が、同様にして評価される必要がある。ある特定のタンパク質および／または界面活性剤の添加は、望ましくない非特異的な結合を著しく減少させることができる。

10

【0004】

ある特定の条件下では、タンパク質は、機能しない形に折り畳みがほどける（unfold）ようになる。ある限界を超える温度に曝すことは、熱的に不安定なタンパク質が、折り畳みがほどけ、変性することを引き起こす。高濃度の溶質、極端なpH、機械的な力および他の化学薬剤の存在が、潜在的な不活性化要因である。完全に変性したタンパク質は、三次構造および二次構造の両方を欠き、結果として、その結合能、または免疫アッセイ内の対応する反応物質に結合される能力を喪失または減少する。

【0005】

タンパク質一次構造は、特定のアミノ酸の直鎖状配列からなる。ポリペプチド鎖が形成されて相互に作用しながら、二次、三次および最終的には四次構造を形成するように折り畳むことによって、複雑な構造が生み出される（非特許文献9）。アミノ酸構成要素は、親水性および疎水性であることができ、より疎水性のアミノ酸は、球状分子の内側に集まる一方で、親水性または極性アミノ酸は外側に集中し、この配置は結果として自発的な折り畳みをもたらす（非特許文献10、11）。さらに、静電相互作用、水素結合、およびファン・デル・ワールス力のすべてが、この折り畳みプロセスに関与する。正しい折り畳みは、タンパク質の生物学的活性を確実に適切にし、その天然の状態にあるタンパク質が、最も安定している（非特許文献12、13）。

20

【0006】

従って、天然の構造を安定化および保持する環境において保存および使用されたタンパク質が、その機能および活性を保持することになるのは論理的に当然である。一般に、水和状態における周囲の分子との、連続した相互作用により、溶液中に保存されたタンパク質は、乾燥された形と比べて短い保存可能期間を有する。的確な安定化条件が利用された場合、乾燥および凍結することは、この相互作用を最小限にするか、または停止するが、そうでなければ変性（denaturation）がさらに起こることになる。一般に、溶液中においてタンパク質は、高濃度および低温で、より安定である。低温にて、タンパク質相互作用は、より少ない運動エネルギーを有する。より高いタンパク質濃度では、容器表面への吸着、ならびに酵素の作用および他の低レベルの混入物質による不活化のために、喪失されるタンパク質活性がより少ない。典型的には、タンパク源に存在するタンパク質分解酵素（例えば、加水分解酵素および酸化酵素）はいずれも除去されるので、コーティングに使用される水および安定化溶液は、通常、高品質であるはずである。

30

40

【0007】

このタイプの免疫アッセイを製造する会社の多くは、独占所有権のあるコーティング法および固体担体安定化法を有している。予期されるように幾つかのものは、他と比べて良好に機能し、一般的なELISA原理および応用について出版された書籍に一般的なガイドダンスが記載されている（非特許文献1、2）。抗体および抗原が典型的にはマイクロウェルプレートのウェルの内側に結合し、約12時間、室温または4℃でインキュベーションされ、その段階に過剰な非結合の結合しない物質が吸引され、ブロック／安定化剤が添加される。結合は、限定はされないが典型的には静電気力による結合である。必要に応じ

50

て、洗浄工程を途中に入れることができる。ブロック／安定化剤を、わずかばかり30分間、室温でインキュベーションすると、反応物質が固体担体上のあらゆる非結合部位に結合することも、結合している抗体または抗原と合体することも可能になる。次の工程では、試薬の物理的な膜が結合タンパク質を覆うほどに過剰なブロック／安定化剤が除去される。次の工程は、その完全性を維持しながら、固体担体上の反応物質を乾燥するために設計されている。典型的には、これを達成するために使用される方法が2つあり、第1は、従来の実験室インキュベーターで37℃にて12～24時間インキュベーションすること、また別の方法としては、材料の容積に応じて1～24時間真空乾燥して乾燥することである。我々の経験では、後者の方法は活性の初期喪失が最小限となり、より長期的な安定性を得られるという著しい利点を持つ。

10

【0008】

真空乾燥は、真空乾燥機において急速乾燥に必要な熱の量を減らして、材料を減圧環境で乾燥するプロセスであり、温度が上がらず、乾燥がより速い。この技術により、我々は非常に高いレベルの乾燥を達成でき、高温（37℃）で2年を超える固体担体安定性を可能にする。我々が採用する真空乾燥と安定化試薬の組み合わせは、熱によってダメージを与えることなくタンパク質の完全性を保持する。

【0009】

SurModics社を含む市場には、独占所有権を持つ、すぐに使えるブロッキングおよび安定化溶液の製品が多くあり、また、これらは固体担体を効果的に安定化するとされている。Stabil Coat（登録商標）およびStabil Guard（登録商標）（非特許文献14）ならびにウシ血清アルブミン（BSA）有りの蔗糖および／または乳糖、ならびにウシ血清アルブミン（BSA）無しの蔗糖および／または乳糖、さらにゼラチンおよび0.1～3%w/vのもどした脱脂粉乳を含む他のタンパク質ブロッキング剤が、一般的に使用される。

20

【0010】

近年、ポリスチレンビーズ（2mm）などの大きなビーズからなる代替的な固相担体が利用可能になってきており、直径範囲は、より広範な0.5～5mmでありうる。これらのビーズは、抗体または抗原でコーティングされ、ブロッキング、安定化、乾燥され、生物学的に不活性なプラスチック、例えばポリプロピレンからなるマイクロプレートウェルに入れられ、非特異的な結合に対する、この構成要素のさらなるブロッキングを必要としない。一般に知られている方法の最初の適用により、乾燥したビーズの塊を生じ、この方法では、均一にコーティングされ、固形の塊を形成せず、自由に流動するビーズを得ることが極めて重要である。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】David Geoffrey Wild, The Immunoassay Handbook published by Elsevier ISBN: 0-08-044526-8 (2008)

【非特許文献2】John R. Crowther, The ELISA Theory and Practice. Humana Press ISBN:0-89603-279-5 (1995)

40

【非特許文献3】Park, J-W et al, Sensors and Actuators B, 91 : 158-162 (2003)

【非特許文献4】Engvall, E. And P. Perlmann, Immunochemistry, 8:871-873 (1971).

【非特許文献5】Sali, A. et al, Nature, 369:248-251 (1994)

【非特許文献6】Klotz, I., Archives Biochemistry & Biophysics, 116:92-96 (1966)

【非特許文献7】Asakura, T. et al, J. Bio Chem., 253:6423-6425 (1978)

【非特許文献8】Torchilin, V., Enzyme and Microbiological Technology, 1 :74-82 (1979)

【非特許文献9】Maish, M., <http://www.sparknotes.com/health/aminoacids> (2005)

【非特許文献10】anehisa, M. and T. Tsong, Biopolymers, 19:1617-1628 (1980)

【非特許文献11】Burley, S. and G. Petsko, Science, 229:23-28 (1985)

50

【非特許文献 1 2】Wang, W., Intl. Jour, of Pharmaceutics, 185: 129-188 (1999)

【非特許文献 1 3】Wang, W., Intl. Jour, of Pharmaceutics, 289: 1-30 (2005)

【非特許文献 1 4】Lueng, W. et al, Jour, of Immunological Methods, 281 : 109-118 (2003).

【発明の概要】

【0012】

出願人は、固形の塊を形成せず、自由に流動する均一にコーティングされたビーズを作り出す方法を見出した。

【0013】

すなわち、該方法は、次を提供する：

【0014】

ビーズを生体分子でコーティングする方法であって、

(i) 複数のビーズを該生体分子でコーティングすること；

(i i) 該コーティングされたビーズを、液体安定化剤および／またはブロッキング剤と混ぜること、

(i i i) 該液体安定化剤および／またはブロッキング剤を含む液相によってまだ実質的に取り囲まれた該コーティングされたビーズを、少なくとも部分的に液体透過性である表面に分散すること；

(i v) 該表面上の該ビーズを乾燥し、実質的に該液相を除去すること；ならびに、随意に、該乾燥ビーズを該表面から除去することを含む方法。

【発明を実施するための形態】

【0015】

生体分子は、例えば、核酸（DNAまたはRNAなど）、リポ多糖類（lipopolysaccharide）、多糖類、タンパク質またはペプチドでありうる。典型的には、生体分子は、タンパク質またはペプチドである。

【0016】

好ましくは、生体分子は、抗原または抗体に特異的に結合することができる抗体またはその断片である。抗原は、タンパク質またはペプチド、核酸、リポ多糖類または単糖類などの生体分子でありうる。

【0017】

コーティングされたビーズと混合するとき、安定化剤および／またはブロッキング剤は液体である。典型的には、過剰な液体安定化剤および／またはブロッキング剤が除去される。コーティングされたビーズは、液体安定化剤および／またはブロッキング剤を含む液相によってまだ実質的に取り囲まれている。コーティングされたビーズを取り囲んでいる保持液体の量は、典型的には、液体安定化剤および／またはブロッキング剤の最初の量の約 2～5 % である。これは以下を形成する：

(a) 結合した生物学的物質（抗原または抗体など）の表面に保護シェルを形成する安定化剤の物理的な層；および

(b) ビーズの周りの余った液体と、部分的に液体透過性である表面との間に確実にウィック効果（wick effect）を生じる液相。

【0018】

典型的には、少なくとも部分的に液体透過性である表面により、液体が引き込まれるか、逃がされることが可能になる。存在する液体が不十分な場合、過剰な液体が逃がされず、隣接するビーズの周りの残留液体が乾燥するにつれて、塊の中で付着し合うことが観察されている。

【0019】

典型的には、少なくとも部分的に液体透過性である表面は、紙または他の繊維タイプの表面である。典型的には、紙は、液体を吸収するその容量を許容する大きさである。

【0020】

典型的には、紙は、Macherey-Nagel 社（Macherey-Nagel）

10

20

30

40

50

e l G m b H a n d C o) 製の C o d e M N 2 1 5 などのろ紙である。そのような紙は、比較的高い流量 (8 5 m m / 1 0 分) および比較的なめらかな表面を有する。

【 0 0 2 1 】

典型的には、そのような材料は、免疫アッセイを妨げうる残留化学物質、特に、タンパク質分解酵素またはエンドヌクレアーゼ、エンドトキシン、界面活性剤、およびアジドなどの微量金属イオン、酵素を含有しない。

【 0 0 2 2 】

液体透過性表面の典型的な流量は、2 0 m m / 1 0 分 ~ 1 0 0 m m / 1 0 分である。表面のウィッキング効果 (w i c k i n g e f f e c t) は液体を引き離すので、濃縮または乾燥したときに、安定化化学物質が、隣接するビーズを互いに付着しない。

10

【 0 0 2 3 】

紙の代わりに、他の材料が使用されうる。

【 0 0 2 4 】

典型的には、紙は、木材パルプなどのセルロースから作られる。

【 0 0 2 5 】

典型的には、ビーズは表面上で、例えば、真空下で乾燥される。利用温度は、例えば、- 5 ° C ~ 3 7 ° C、例えば、- 5 ° C ~ 3 0 ° C、および典型的には、0 ° C ~ 室温でありうる。

【 0 0 2 6 】

出願人は、乾燥は真空下である必要はないことを見出している。乾燥は、周囲圧力下で、例えば室温 (2 0 ° C) ~ 3 7 ° C で行われうる。

20

【 0 0 2 7 】

乾燥したビーズは、表面から除去されうる。次に、例えば、- 4 0 ° C または 4 ° C で保全されうる。それらは、例えば、周囲の空気から湿気を除去し、安定性を維持するように、理想的には、密閉された容器にシリカゲル乾燥剤とともに保存されうる。

【 0 0 2 8 】

また、ビーズは、熱を加えることによって、または低湿度環境における室温で乾燥されうる。

【 0 0 2 9 】

液体安定化剤および／またはブロッキング剤は、糖、多価アルコール、界面活性剤、塩、ポリエチレングリコール (P E G)、ポリマー、金属イオン、タンパク質およびアミノ酸から選択される、1 つ以上の化合物でありうる。そのような化合物は、一般に W a n g , W による論文に記載されている^{1 2}, ^{1 3}。タンパク質が、最も典型的に使用される。

30

【 0 0 3 0 】

他のブロッキング材料としては、B l o c k A c e (商標)、精製牛乳タンパク質 (雪印乳業株式会社、日本)、グリセリン、L i p i d u r e (商標)、日本油脂 (日本) より入手可能な 2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンの水溶性ポリマー (P a r k , J - W³ を参照されたい) が挙げられる。さらに、他の安定化剤および／またはブロッキング剤としては、マンニトール、蔗糖、トレハロース、デキストロース、ソルビトール、サイクロデキストリン、ヒドロキシアルキルセルロースおよび乳糖が挙げられる。好ましくは、安定化剤および／またはブロッキング剤は、スタビルコート (S t a b i l c o a t) (商標) (典型的には、生理食塩水に希釈されたウシタンパク質含有組成物) およびスタビルガード (S t a b i l g u a r d) (商標) (典型的には、生理食塩水に希釈された無タンパク質材料) から選択され、ともに S u r M o d i c s 社 (S u r M o d i c s I n c) (E d e n P r a i r i e , アメリカ合衆国) より入手可能である。また、蔗糖および乳糖も利用されうる。

40

【 0 0 3 1 】

典型的には、スタビルコート (S t a b i l c o a t) (商標) またはスタビルガード (S t a b i l g u a r d) (商標) の 5 0 % v / v 溶液が使用される。

【 0 0 3 2 】

典型的には、液体安定化剤および／またはブロッキング剤は、B S A を含む。

50

【0033】

ビーズは、ポリマーであっても、非ポリマーであってもよい。例えば、ビーズはシリカまたは最も好ましくはポリスチレンビーズであり、受動吸収のために誘導体化されておらず、または共有結合のための特定の官能基もしくは所望のリガンドに結合するように特定のリンカータンパク質を含有しうる。一般に、そのような誘導体化法は当該技術分野において公知である。典型的には、ビーズは、直径0.5 mm～5 mm、1～3 mm、最も典型的には、直径2 mmである。

【0034】

ビーズは、タンパク質または他のリガンドの共有結合のためのカルボキシル基またはアミノ基などの表面官能基をもつポリスチレンビーズでありうる。

10

【0035】

ビーズが、タンパク質または他のリガンドの連結のためのプロテインGなどの結合タンパク質、ストレプトアビジン (streptavidin) またはビオチンをもつポリスチレンビーズでありうる。

【0036】

また、本発明は、本発明の方法によって入手可能なビーズを提供する。

【0037】

本発明のさらなる態様は、生体材料でコーティングされた複数のビーズを提供し、それらビーズは安定化剤および／またはブロッキング剤を含み、ビーズが実質的に凝集しないことを特徴とする。すなわち、ビーズは、実質的に自由流動であり、他のビーズに実質的に付着しない。

20

【0038】

生体分子、安定化剤および／またはブロッキング剤、ならびにビーズは、典型的には、上で定義された通りである。

【0039】

本発明のさらなる態様は、本発明にかかる1つのビーズまたは複数のビーズを提供することを含む免疫アッセイを実施する方法を提供する。

【0040】

また、本発明にかかる1つのビーズまたは複数のビーズを含む免疫診断用装置も提供される。

30

【図面の簡単な説明】

【0041】

本発明を、実施例を単なる例示として、以下の図を参照して説明する。

【図1】図1は、ポリスチレンディッシュ中で乾燥したビーズを示し、これらビーズは塊になり、ディッシュや隣接するビーズに付着するのが観察された。

【図2】図2は、シリコン処理をした紙上で乾燥したビーズを示し、ビーズは塊になり、紙や隣接するビーズに付着した。

【図3】図3は、ろ紙上で乾燥したビーズを示し、ビーズは自由で流動的である。

【実施例】

【0042】

40

ビーズのコーティングは、従来のもので、当該技術分野において一般に公知である。すなわち、所要の抗原または抗体を、(タンパク質に応じて) 0.5～20 μg/mLの典型的な濃度で含有する、pH 7.2のリン酸緩衝生理食塩水またはpH 9.6の炭酸塩などの適切な緩衝液を用いて、ポリスチレンビーズなどのビーズをコーティングし、8～12時間、室温で静かに混ぜた。バッファの容積は、5 μL/ビーズであり、100,000ビーズに対して、容量は5000 mLである。典型的には次に、過剰なコート溶液 (coat solution) を吸引する。そして、ここでもやはり50 μL/ビーズを使用して、典型的に50%スタビルコート (Stabilcoat) (商標) またはスタビルガード (Stabilguard) (商標) を含有するブロッキング/安定化バッファを加え、室温にて30分間混ぜた。次に、大部分の残留ブロッキング/安定化バッ

50

ァーを捨てた。しかし、典型的には、液体のごく一部、例えば、2～5%が保持された。これは、安定化剤の層が、結合した抗原／抗体一面に保護シェルを形成可能にするのに必要であることがわかった。残留液と共にビーズを表面上に広げ、次に浅くてふたの無い（open）トレイに入れ、そこで典型的には室温で真空乾燥した。表面がポリスチレンディッシュであった場合、ビーズは塊になり、ディッシュや隣接するビーズに付着するのが観察された（図1）。水分をはじくようにシリコンコーティングが施された、シリコン処理された紙上で乾燥したビーズが、紙や隣接するビーズに付着するのが観察された（図2）。しかし、ろ紙上で乾燥したビーズは、吸収性をいくらか有し、液体をビーズから逃がすことができ、自由に流動的であることが見出された（図3）。

【0043】

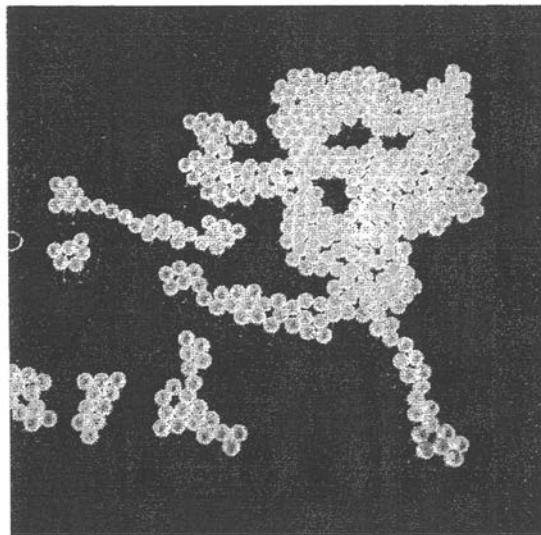
10

典型的には、ビーズを、バッチサイズに応じて4～18時間真空乾燥した。次に、乾燥したビーズを、即時使用のために、好適なサイズの容器に注ぐか、でなければ、例えば、マイクロプレートに入れる前に-40℃もしくは4℃で保存し、シリカゲル乾燥剤の小袋ともにホイルポーチ（foil pouch）に密封して、水分侵入を最小限にし、安定性を維持した。

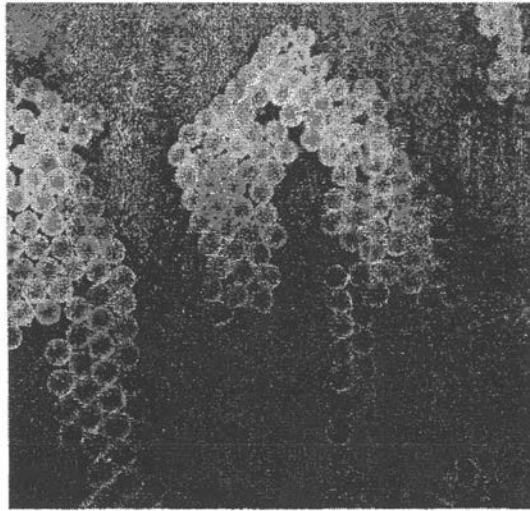
【0044】

また、熱または低湿度環境における室温などの代替的な乾燥方法もうまく機能するが、乾燥時間が長くなる。

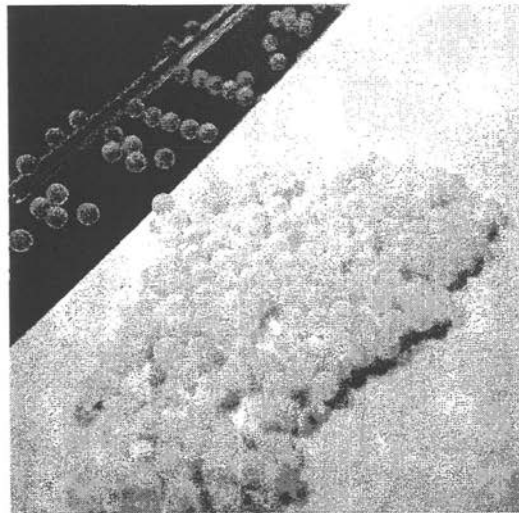
【図1】



【図 2】



【図 3】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2011/052079

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/53 G01N33/543 A61K9/20
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/066906 A2 (EASTERN VIRGINIA MED SCHOOL [US]) 14 August 2003 (2003-08-14) paragraph [0074] - paragraph [0078] paragraph [0024] -----	1-23
A	US 2003/148362 A1 (LUKA JANOS [US]) 7 August 2003 (2003-08-07) paragraph [0024] -----	1-23
A	WO 03/057852 A2 (HILDEBRAND WILLIAM H [US]; BUCHLI RICO [US]) 17 July 2003 (2003-07-17) page 66 - page 68 -----	1-23

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 January 2012

Date of mailing of the international search report

06/02/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Routledge, Brian

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2011/052079

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03066906	A2	14-08-2003	AU 2003217306 A1	02-09-2003
			CA 2474530 A1	14-08-2003
			WO 03066906 A2	14-08-2003

US 2003148362	A1	07-08-2003	NONE	

WO 03057852	A2	17-07-2003	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, 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, VN

(72)発明者 バッド, ロジャー
イギリス ウェスト ミッドランズ B15 1QT バーミンガム エッジバーストン キャルソ
ープ ロード 8 ザ バインディング サイト グループ リミテッド内

(72)発明者 テイラー, デビッド
イギリス ウェスト ミッドランズ B15 1QT バーミンガム エッジバーストン キャルソ
ープ ロード 8 ザ バインディング サイト グループ リミテッド内

专利名称(译)	涂层珠		
公开(公告)号	JP2013541018A	公开(公告)日	2013-11-07
申请号	JP2013535509	申请日	2011-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	结合点集团有限公司		
申请(专利权)人(译)	结合部位集团有限公司		
[标]发明人	バッドロジャー テイラーデビッド		
发明人	バッド,ロジャー テイラー,デビッド		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/546 G01N33/547		
CPC分类号	A61K9/5078 G01N33/5306 G01N33/54393 G01N33/54313		
FI分类号	G01N33/531.Z G01N33/546 G01N33/547		
代理人(译)	川口义行		
优先权	2010018096 2010-10-27 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用生物分子包被珠子，该方法包括：(i) 用生物分子包被多个珠子；(ii) 将涂覆的珠粒与液体稳定剂和/或封闭剂混合 (iii) 将涂覆的珠粒基本上分散，所述涂覆的珠粒基本上被包含液体稳定剂和/或封闭剂的液相包围在至少部分液体可渗透的表面上；(iv) 干燥表面上的珠子以基本上除去液相；(v) 从表面除去干燥的珠粒。

FIGURE 3

