

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5775790号

(P5775790)

(45) 発行日 平成27年9月9日(2015.9.9)

(24) 登録日 平成27年7月10日(2015.7.10)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 F
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 C
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 U
	GO 1 N 33/543	5 8 3
請求項の数 48 (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-229316 (P2011-229316)	(73) 特許権者	507109309
(22) 出願日	平成23年10月19日(2011.10.19)		アケルス バイオサイエンス インコーポ レーテッド
(62) 分割の表示	特願2007-534920 (P2007-534920) の分割		アメリカ合衆国 08086 ニュージャ ージー州 トホロファレ グロベ ロード 201
原出願日	平成17年10月4日(2005.10.4)	(74) 代理人	100097456
(65) 公開番号	特開2012-53052 (P2012-53052A)		弁理士 石川 徹
(43) 公開日	平成24年3月15日(2012.3.15)	(72) 発明者	ダビド ミルニク
審査請求日	平成23年10月19日(2011.10.19)		アメリカ合衆国 08096 ニュージャ ージー州 デプトフォールド ストネイプロ オク 1505
(31) 優先権主張番号	60/615,622		
(32) 優先日	平成16年10月4日(2004.10.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ヘパリン/血小板第4因子抗体の検出法及びキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヘパリン起因性血小板減少症(HIT)を有することが疑われる対象において、HITを診断するための、ヘパリン/血小板第4因子抗体を検出する方法であって：

(a)対象から得られた試料を、粒子と接触し、被験混合物を形成する工程であり、該粒子は、血小板第4因子(PF4)に複合され、この粒子に複合されたPF4は、該PF4分子の立体配座の変化が誘導されてヘパリン/血小板第4因子抗体と特異的に反応し、及び該粒子は、ヘパリン/血小板第4因子抗体との接触時に特異的凝集塊を形成する工程；並びに

(b)微粒子免疫濾過アッセイを用い、被験混合物を分析し、該特異的凝集塊を検出する工程；を含み、

ここで該特異的凝集塊の存在が、対象におけるHITを示し、

該微粒子免疫濾過アッセイが：

(i)被験混合物が、粒子よりも大きいのが、特異的凝集塊よりも小さい孔を含むフィルター手段を通過し、これにより濾液を作製する工程；並びに

(ii)該濾液が、フィルター手段に隣接しかつ流体連通するウィッキング手段を通過する工程であり、該ウィッキング手段は、非特異的に凝集された粒子及び/又は凝集されない粒子を、濾液に残存する特異的凝集塊から分離し、ここで凝集されない粒子は、該特異的凝集塊よりも早い速度で該ウィッキング手段を通り水平に移動する工程；を含み、

ここで濾液中の非特異的に凝集された粒子又は凝集されない粒子の存在は、試料中のヘパリン/血小板第4因子抗体の非存在を示し、及び濾液中の非特異的に凝集された粒子又は

凝集されない粒子の非存在は、試料中のヘパリン/血小板第4因子抗体の存在を示す、前記方法。

【請求項2】

試料中のヘパリン/血小板第4因子抗体の存在を検出する方法であって：

(a) 試料を、血小板第4因子(PF4)に複合された粒子とインキュベーションすることにより、被験混合物を形成する工程であり、この粒子に複合されたPF4は、該PF4分子の立体配座の変化が誘導されてヘパリン/血小板第4因子抗体と特異的に反応し、及び該粒子は、ヘパリン/血小板第4因子抗体との接触時に、特異的凝集塊を形成する工程；

(b) 被験混合物が、粒子よりも大きい、特異的凝集塊よりも小さい孔を含むフィルター手段を通過し、これにより濾液を形成する工程；並びに

(c) 該濾液が、フィルター手段に隣接しかつ流体連通するウィッキング手段を通過し、該ウィッキング手段は、非特異的に凝集された粒子及び/又は凝集されない粒子を、濾液に残存する特異的凝集塊から分離し、ここで凝集されない粒子及び非特異的に凝集された粒子は、該特異的凝集塊よりも早い速度で該ウィッキング手段を通り水平に移動する工程；を含み、

ここで、濾液中の非特異的に凝集された粒子又は凝集されない粒子の存在は、試料中のヘパリン/血小板第4因子抗体の非存在を示し、及び濾液中の非特異的に凝集された粒子又は凝集されない粒子の非存在は、試料中のヘパリン/血小板第4因子抗体の存在を示す、前記方法。

【請求項3】

前記試料が、哺乳類体液を含む、請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

前記試料が、ヒト体液を含む、請求項1又は2記載の方法。

【請求項5】

前記試料が、血液、血清、血漿、尿及び唾液からなる群より選択される、請求項1又は2記載の方法。

【請求項6】

前記粒子が、肉眼で確認することができる、視覚的に認識可能な色を有する、請求項1又は2記載の方法。

【請求項7】

前記粒子が、 $0.1\mu\text{m}$ ~ $10\mu\text{m}$ の平均直径を有する、請求項1又は2記載の方法。

【請求項8】

前記粒子が、 $0.2\mu\text{m}$ ~ $0.6\mu\text{m}$ の平均直径を有する、請求項7記載の方法。

【請求項9】

前記粒子が、ミクロスフェアである、請求項1又は2記載の方法。

【請求項10】

前記粒子が、非球形である、請求項1又は2記載の方法。

【請求項11】

前記粒子が、陰イオン性である、請求項1又は2記載の方法。

【請求項12】

前記粒子が、ポリスチレンを含有する、請求項1又は2記載の方法。

【請求項13】

前記粒子が、ラテックスを含有する、請求項1又は2記載の方法。

【請求項14】

前記粒子が、ラテックスを、濃度 $0.01\text{w/v}\%$ ~ $2\text{w/v}\%$ 含有する、請求項13記載の方法。

【請求項15】

前記粒子が、ラテックスを、濃度 $0.3\text{w/v}\%$ ~ $0.4\text{w/v}\%$ で含有する、請求項14記載の方法。

【請求項16】

10

20

30

40

50

- 前記粒子が、金属コロイドを含有する、請求項1又は2記載の方法。
- 【請求項17】  
前記金属コロイドが、金コロイドである、請求項16記載の方法。
- 【請求項18】  
前記粒子が、乾燥されている、請求項1又は2記載の方法。
- 【請求項19】  
前記粒子が、ガラス製アンプル中に密封されている、請求項1又は2記載の方法。
- 【請求項20】  
前記粒子が、コロイド安定剤により安定化されている、請求項1又は2記載の方法。
- 【請求項21】 10  
前記コロイド安定剤が、トリポリリン酸ナトリウムを含有する、請求項20記載の方法。
- 【請求項22】  
前記トリポリリン酸ナトリウムが、濃度範囲0.001w/v%~0.1w/v%である、請求項21記載の方法。
- 【請求項23】  
前記トリポリリン酸ナトリウムが、濃度範囲0.01w/v%~0.1w/v%である、請求項22記載の方法。
- 【請求項24】  
前記コロイド安定剤が、陰イオン界面活性剤を含有する、請求項20記載の方法。
- 【請求項25】 20  
前記陰イオン界面活性剤が、ドデシル硫酸ナトリウムを含む、請求項24記載の方法。
- 【請求項26】  
前記陰イオン界面活性剤が、ラウリルサルコシナトリウムを含む、請求項24記載の方法。
- 【請求項27】  
前記陰イオン界面活性剤が、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートを含む、請求項24記載の方法。
- 【請求項28】  
ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートが、濃度範囲0.0001w/v%~0.1w/v%である、請求項27記載の方法。
- 【請求項29】 30  
前記ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートが、濃度範囲0.001w/v%~0.01w/v%である、請求項28記載の方法。
- 【請求項30】  
前記コロイド安定剤が、ポリメタリン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムガラス、ピロリン酸ナトリウム又は他のポリリン酸分子を含む、請求項20記載の方法。
- 【請求項31】  
前記コロイド安定剤が、非イオン性界面活性剤を含む、請求項20記載の方法。
- 【請求項32】  
前記コロイド安定剤が、ポリリン酸及び1種又は複数の界面活性剤を含む、請求項20記載の方法。
- 【請求項33】 40  
反応増強液が更に、被験混合物へ添加される、請求項1又は2記載の方法。
- 【請求項34】  
前記反応増強液が、pH7.2を有する、請求項33記載の方法。
- 【請求項35】  
前記反応増強液が、ポリエチレングリコール、塩化ナトリウム、及びグリシンを含有する、請求項33記載の方法。
- 【請求項36】  
前記ポリエチレングリコールが、ポリエチレングリコール8000である、請求項35記載の 50

方法。

【請求項 37】

前記ポリエチレングリコール8000が、5w/v% ~ 15w/v%の範囲である、請求項36記載の方法。

【請求項 38】

前記ポリエチレングリコール8000が、8w/v% ~ 12w/v%の範囲である、請求項37記載の方法。

【請求項 39】

前記塩化ナトリウムが、0.0w/v% ~ 1w/v%の範囲である、請求項35記載の方法。

【請求項 40】

前記塩化ナトリウムが、0.0w/v% ~ 0.1w/v%の範囲である、請求項39記載の方法。

【請求項 41】

前記グリシンが、0.01モル ~ 0.2モルの範囲である、請求項35記載の方法。

【請求項 42】

前記グリシンが、0.02モル ~ 0.1モルの範囲である、請求項41記載の方法。

【請求項 43】

前記フィルター手段が、制御された細孔のポリカーボネートメンブレンを含む、請求項1又は2記載の方法。

【請求項 44】

前記制御された細孔のポリカーボネートメンブレンが、細孔サイズ2 $\mu$ m ~ 12 $\mu$ mを有する、請求項43記載の方法。

【請求項 45】

前記制御された細孔のポリカーボネートメンブレンが、細孔サイズ3 $\mu$ mを有する、請求項44記載の方法。

【請求項 46】

前記ウィッキング手段が、ガラス又は合成ポリマー材料の不織り繊維を含む、請求項1又は2記載の方法。

【請求項 47】

ヘパリン/血小板第4因子抗体の存在が、濾液の色により、視覚的に決定される、請求項1又は2記載の方法。

【請求項 48】

前記微粒子免疫濾過アッセイが、反応セルにおいて行われる、請求項1又は2記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(1. 発明の技術分野)

本発明は、ヘパリン起因性血小板減少症(HIT)を有することが疑われる対象において、HITを検出するのに有用な方法及びキットに関する。特に本発明は、当該技術分野において先行する公知のものよりも、操作がより迅速、より簡便かつより安価である、微粒子免疫濾過アッセイにより試料中のヘパリン/血小板第4因子抗体を検出する方法及びキットに関する。

【背景技術】

【0002】

(2. 発明の背景)

血小板減少症は、血液中の血小板数が異常に低い障害である。薬物起因性の免疫性血小板減少症は、ある種の薬物の使用が、血小板に対する抗体の形成につながる状態である。これらの抗体は、血小板カウントの低下を引き起こし、出血の増加及び凝血能の低下を生じる可能性がある。これらの抗体が妊娠時に形成されると、これらは母親から胎児へと移行することがある。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 3 】

ヘパリンは、最も広範に使用される静脈内投与される抗凝固薬であり、米国において最も広く処方される薬物のひとつである。年間1兆単位よりも多くが、約1200万の患者へ投与されている。静脈内投与されるヘパリンは通常、血栓塞栓症、更にはある種の肺及び心臓の障害を含む多くの他の適応症の予防及び治療のために、並びに心臓切開、バイパス、透析又は整形外科の手技を含む様々な手術時又は術後に使用される。ヘパリンは、診断的及び治療的介入の放射線手法のためにも使用される。未分画ヘパリン及び低分子量ヘパリンの広範な使用のために、ヘパリン起因性血小板減少症(HIT)が、最も頻繁な(及び最も壊滅的な可能性がある)薬物起因性血小板減少症であると考えられる(Picker S. M.らの論文、「Pathophysiology, epidemiology, diagnosis and treatment of heparin-induced thrombocytopenia (HIT)」、Eur J Med Res. 2004年4月30日;9(4):180-5, 総説)。

10

## 【 0 0 0 4 】

HITは、I型及びII型に分類され、I型は良性であり、II型は重篤である。I型HITは、ヘパリン開始後早期に発生し、血小板レベルは、わずかにのみ低下し、通常ヘパリン治療が継続される場合であっても正常値に回復する。血栓塞栓症の合併症は稀であり、I型HITは抗体媒介型ではない。

## 【 0 0 0 5 】

対照的に、II型HITは、ヘパリン-血小板第4因子複合体に対する抗体形成により引き起こされる(Harenberg J.らの論文、「Heparin-induced thrombocytopenia: pathophysiology and new treatment options」、Pathophysiol Haemost Thromb. 2002年9-12月;32(5-6):289-94, 総説)。II型HITは典型的には、ヘパリン療法開始後5~14日の間に発症する。II型HITの顕著な症状は、血小板カウントの大幅な低下及び血栓症であり、これは四肢の壊疽(脚切断を要する)につながるか、又は死に至ることさえある。II型HITの他の症状は、単純なアレルギー反応から壊死に至る病巣までの、皮膚反応を含むことがある。

20

## 【 0 0 0 6 】

II型HITは、ヘパリン治療を受けた患者の約1~5%で発生する(Goor Y.らの論文、「Heparin-induced thrombocytopenia with thrombotic sequelae: a review」、Autoimmun Rev. 2002年8月;1(4):183-9, 総説)。より憂うべきことに、心臓手術後の患者の25~50%が、術後5~10日の間にこれらのヘパリン依存性抗体を生じている(Warkentin T.E.らの論文、「Heparin-induced thrombocytopenia and cardiac surgery」、Ann Thorac Surg. 2003年12月;76(6):2121-31, 総説)。II型HITにおける死亡及び脚切断の割合は、各々、30%及び20%と推定されている(Picker S.M.らの論文、前掲)。

30

## 【 0 0 0 7 】

HITの早期診断は、罹患率及び死亡率を低下するために必須である。現在ヘパリン起因性抗体を検出する3種の方法が存在する:(1)14C-セロトニン放出アッセイのような、機能試験(Sheridan D.らの論文、「A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia」、Blood. 1986年1月;67(1):27-30);(2)血小板凝集試験(Chong B.H.らの論文、「The clinical usefulness of the platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia」、Thromb Haemost. 1993年4月1日;69(4):344-50);及び、(3)酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)のような、イムノアッセイ。血小板反応性抗体を検出及び同定するための血清学的アッセイは、感度及び特異性が低いフェーズI試験(例えば、血小板機能のエンドポイントを測定するもの)から、より感度の良いフェーズIIアッセイ(例えば、血小板表面関連免疫グロブリンを検出するもの)へ、更には特異性の高いフェーズIIIアッセイ(例えば、単離された血小板表面糖タンパク質上に位置したアロ抗原に結合した抗体を検出するもの)へと進歩しており、これらの試験は主に、患者において症状が認められた後のHITの確認として使用されており、実行に長い時間がかかる。HITを診断するためのより効率的で感度が良くかつ特異的なアッセイは、依然もたらされていない。

40

## 【 発明の概要 】

## 【 課題を解決するための手段 】

50

## 【0008】

## (3. 発明の概要)

前述の目的を実現するために、本発明者らは、様々な物質中のヘパリン/血小板第4因子抗体を検出する方法及びキットを発明した。これらの方法及びキットは、ヘパリン/血小板第4因子抗体の存在又は非存在を示す色視覚化法に頼っている。好ましくは、この色視覚化は、複雑な計測器又は機器の使用は不要であり、裸眼により全ての色の変化は容易に検出される。

## 【0009】

本発明は、一部、単離された血小板第4因子(PF4)の粒子、好ましくは球形粒子への複合は、PF4分子の立体配座の変化を誘導し、その結果これは患者試料中のヘパリン/血小板第4因子抗体(すなわち、ヘパリンへ複合されたPF4を検出する抗体)と特異的に反応するという、本発明者の驚くべき発見を基にしている。この驚くべき発見は、HITを検出するために、迅速で効率的で感度が良く特異的な微粒子免疫濾過アッセイにおいて、着色された粒子、好ましくは球形粒子又はビーズへ複合された単離されたPF4を含む、方法及びキットの基礎である。

## 【0010】

ある実施態様において、本発明は、液体試料中のヘパリン/血小板第4因子抗体を検出するために、微粒子免疫濾過アッセイ(PIFA(登録商標))(Akers Biosciences, Inc., ニュージャージー州Thorofare)を使用する方法を提供する。本発明の好ましい方法は、試料を、着色した、特に裸眼で色が検出可能な、血小板第4因子(PF4)に複合された粒子(「PF4に複  
20  
合された粒子」と共にインキュベーションする工程を含み、及びその粒子と複合されたPF4は、ヘパリン/血小板第4因子抗体と特異的に反応し、その結果これらの粒子は、ヘパリン/血小板第4因子抗体との接触時に特異的凝集塊を形成する能力を有する。本願明細書において使用される用語「特異的凝集塊」は、この抗体-抗原相互作用のために形成される凝集塊を意味する。その後試料/粒子混合物は、特異的及び/又は非特異的凝集塊を濾液から除去するために、粒子よりも大きい特異的凝集塊よりも小さい孔を有するフィルターを通過する。次に濾液は、凝集されない粒子を、任意の非特異的に凝集された粒子に加え任意の残存する特異的凝集塊から分離するために、フィルターに隣接するウィッキングメンブレンを通過し、この凝集されない粒子は、ウィッキングメンブレンを通り、非特異的に凝集された粒子及び特異的凝集塊の両方よりもより速い速度で水平に移動することができ  
30  
る。その後濾液の色が分析され、ここで色の非存在は、ヘパリン/血小板第4因子抗体の存在を示唆し、及び色の存在は、ヘパリン/血小板第4因子抗体の非存在を示唆している。ひとつの実施態様において、濾液の色は、粒子の既知の濃度に相当する視覚標準と比較することにより分析され、ここでヘパリン/血小板第4因子抗体の存在は、濾液の色が視覚標準の色と実質的に異なる部分で確立され、並びにヘパリン/血小板第4因子抗体の非存在は、濾液の色が視覚標準の色と実質的に類似している部分で確立される。

## 【0011】

好ましい実施態様において、粒子は、球形、好ましくはマイクロスフェアである。別の特定の実施態様において、粒子は非球形である。

ひとつの実施態様において、PF4との複合後、粒子は乾燥され、及び/又はPF4と複合された後ガラス製アンプルに密封される。

別の実施態様において、粒子は、平均直径約0.01  $\mu\text{m}$  ~ 約100  $\mu\text{m}$ 、好ましくは約0.1  $\mu\text{m}$  ~ 約10  $\mu\text{m}$ 、より好ましくは約0.2  $\mu\text{m}$  ~ 約0.6  $\mu\text{m}$ 、最も好ましくは約0.3  $\mu\text{m}$ を有する。

## 【0012】

ひとつの実施態様において、粒子は、陰イオン化合物であり、それらの表面に負電荷を有する。好ましい実施態様において、粒子は、多価陰イオン化合物により形成されるか、又はそれらの表面に多価陰イオン電荷を有する。好ましい実施態様において、粒子はラテックスを含む。特定の実施態様において、粒子は、ラテックスを、濃度約0.01 w/v % ~ 約2 w/v %、好ましくは約0.3 w/v % ~ 約0.4 w/v %で含む。

別の好ましい実施態様において、粒子は、ポリスチレンを含む。特定の実施態様におい

10

20

30

40

50

て、粒子は、ポリスチレン又はスチレン第1級アミノラテックスを含む。

【0013】

別の好ましい実施態様において、粒子は、金属コロイドを含む。特定の実施態様において、粒子は金コロイドを含む。

ある実施態様において、粒子は、コロイド安定剤により安定化される。特定の実施態様において、コロイド安定剤は、トリポリリン酸ナトリウムを、濃度範囲約0.001w/v%～約0.1w/v%、好ましくは約0.01w/v%～約0.1w/v%含有する。

【0014】

別の特定の実施態様において、コロイド安定剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリルサルコシナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリメタリン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムガラス(すなわち、ヘキサメタリン酸ナトリウム)、ピロリン酸ナトリウム又は他のポリリン酸分子からなる群より選択される1種又は複数の陰イオン界面活性剤を含有する。好ましい実施態様において、1種又は複数の陰イオン界面活性剤は、濃度範囲約0.0001w/v%～約0.1w/v%、好ましくは約0.001w/v%～約0.01w/v%である。

更に別の特定の実施態様において、コロイド安定剤は、非イオン性界面活性剤を含有する。

【0015】

特定の実施態様において、粒子に複合されたPF4は、ヘパリン/血小板第4因子抗体と特異的に反応し、その結果これらの粒子は、ヘパリン/血小板第4因子抗体との接触時に凝集塊を形成する能力を有する。粒子は、試料と共に、凝集塊を形成するのに十分な時間、好ましくは約5分間インキュベーションされる。より好ましくは、凝集反応の速度及び感度を最適化するように、反応増強液が、試料/粒子混合物へ添加される。

【0016】

ひとつの実施態様において、反応増強液は、pH7.2を有する。特定の実施態様において、反応増強液は、ポリエチレングリコール、塩化ナトリウム、及びグリシンを含む。より特定の実施態様において、反応増強液は、ポリエチレングリコール8000を、約5w/v%～約15w/v%、好ましくは約8w/v%～約12w/v%の範囲含有する。別のより特定の実施態様において、反応増強液は、塩化ナトリウムを含まない(すなわち、約0.0%)か、又は最大約1w/v%、好ましくは約0.1w/v%含有する。更に別のより特定の実施態様において、反応増強液は、グリシンを約0.01モル～約0.2モル、好ましくは約0.02モル～約0.1モルの範囲で含有する。

【0017】

ひとつの実施態様において、フィルターは、制御された細孔のメンブレンを含む。特定の実施態様において、フィルターは、制御された細孔のポリカーボネートメンブレンを含む。好ましい実施態様において、フィルターは、粒子よりも大きい凝集塊よりも小さい孔を有する。特定の実施態様において、孔は、これらの粒子よりも約5～約15倍大きい。別の特定の実施態様において、孔は、これらの粒子よりも約10～約12倍大きい。

【0018】

ひとつの実施態様において、フィルターは、任意の特異的凝集塊の大半を、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の凝集されない粒子から分離する。特定の実施態様において、フィルターは、約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は全ての特異的凝集塊を、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の凝集されない粒子から分離する。好ましい実施態様において、フィルターは、特異的凝集塊の90%よりも多くを、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の凝集されない粒子から分離する。特異的凝集塊は、例えばサイズ及び/又は重量を基に、非特異的に凝集された粒子及び凝集されない粒子から分離されてもよく、その分離のレベルは、当業者に公知の分離法(例えば、質量分析、クロマトグラフィーなど)により決定及び/又は確認することができる。

【0019】

10

20

30

40

50

ひとつの実施態様において、ウィッキングメンブレンは、ポリマー材料を含有する。特定の実施態様において、ウィッキングメンブレンは、ガラス又は合成ポリマー材料の不織り繊維を含む。好ましい実施態様において、ウィッキングメンブレンはポリエステルを含む。

**【0020】**

ひとつの実施態様において、ウィッキングメンブレンは、任意の凝集されない粒子の大半を、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の凝集塊から分離する。特定の実施態様において、ウィッキングメンブレンは、約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は全ての凝集されない粒子を、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の特異的凝集塊から分離する。好ましい実施態様において、ウィッキングメンブレンは、凝集されない粒子の90%よりも多くを、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の特異的凝集塊から分離する。凝集されない凝集塊は、例えばサイズ及び/又は質量を基に、非特異的に凝集された粒子及び特異的凝集塊から分離されてもよく、その分離のレベルは、当業者に公知の分離法(例えば、質量分析、クロマトグラフィーなど)により決定及び/又は確認することができる。

10

**【0021】**

ひとつの実施態様において、凝集されない粒子は、ウィッキングメンブレンを通り、非特異的に凝集された粒子よりもより早い速度で水平に移動する。特定の実施態様において、凝集されない粒子は、ウィッキングメンブレンを通り、非特異的に凝集された粒子よりも約2~約10倍(すなわち、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10倍)速い速度で、水平に移動する。好ましい実施態様において、凝集されない粒子は、ウィッキングメンブレンを通り、非特異的に凝集された粒子よりも10倍より速い(例えば、10、11、12、13、14、15、20、30、50、100倍などよりも速い)速度で、水平に移動する。

20

**【0022】**

別の実施態様において、凝集されない粒子は、ウィッキングメンブレンを通り、特異的凝集塊よりも速い速度で水平に移動する。特定の実施態様において、凝集されない粒子は、ウィッキングメンブレンを通り、特異的凝集塊よりも約2~約10倍(すなわち、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10倍)速い速度で、水平に移動する。好ましい実施態様において、凝集されない粒子は、ウィッキングメンブレンを通り、特異的凝集塊よりも10倍より速い(例えば、10、11、12、13、14、15、20、30、50、100倍などよりも速い)速度で、水平に移動する。

30

**【0023】**

ある実施態様において、濾液の色は、機械の助けを借りずに視覚的に比較される。ある別の実施態様において、濾液の色は、機械の助けを借りて光学的に比較される。特定の実施態様において、濾液の色は、既知濃度の粒子に相当する標準に対し、視覚的又は光学的に比較される。

**【0024】**

ひとつの実施態様において、ヘパリン/血小板第4因子抗体の存在は、濾液の色が、粒子の色と実質的に異なる(例えば、粒子が凝集し及び保持されるために、濾液は色を欠いている)場合に確立される。別の実施態様において、ヘパリン/血小板第4因子抗体の非存在は、濾液の色が、粒子の色に実質的に類似している場合に確立される。ある実施態様において、濾液の色及び粒子の色は、光学的手段、反射計、又は当業者に周知の他の方法により、定量及び比較される。

40

**【0025】**

ひとつの実施態様において、試料は、対象から得られる液体試料である。特定の実施態様において、試料は、哺乳類体液を含む。好ましい実施態様において、試料は、血液、血清、血漿、又は尿などの、ヒト体液を含む。本願明細書において使用される対象は、好ましくは非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど)又は霊長類(例えば、サル及びヒト)などの哺乳類であり、最も好ましくはヒトである。

**【0026】**

50

本発明は、反応セルを備えるキットも提供する。このキットは、開示された明らかにされた方法の実施に適したアッセイプレートも備えることができる。反応セルは、PF4に複合された粒子も含む。アッセイプレートは、フィルターウェル、及び該フィルターウェルから一定の距離にある観察ウェルを有する上面部材、上面部材に隣接し及びフィルターウェルを超えて伸びているフィルター手段、フィルター手段に隣接かつ流体連通し、並びにフィルターウェル及び観察ウェルの全長に伸びているウィッキング手段、並びにウィッキング手段に隣接する底を備える。

【0027】

ある実施態様において、これらのキットは任意に、2004年8月5日に出願された、代理人整理番号8189-027-888である、その全体が本願明細書に参照により組み入れられている、米国特許出願第60/599,803号に開示された、血液分離装置を含む。

10

【0028】

ある実施態様において、反応セルは、PF4に複合された粒子を含む。ひとつの実施態様において、試料は、反応セルにおいて、PF4に複合された粒子と混合される。ひとつの実施態様において、反応セルは、PF4に複合された粒子を含む破壊可能な槽(vessel)を含む。ひとつの実施態様において、反応セルは更に、試料中の任意の感染性物質を生物学的に不活化する能力を有する死滅溶液を含む。

【0029】

ある実施態様において、アッセイプレートは、上面部材、フィルター手段、ウィッキング手段、及び底部材を備える。特定の実施態様において、上面部材は、フィルターウェル、及び該フィルターウェルから一定の距離にある観察ウェルを備える。特定の実施態様において、フィルター手段は、上面部材に隣接し及び中にあり、並びにフィルターウェルを超えて伸びている。特定の実施態様において、ウィッキング手段は、フィルター手段に隣接かつ流体連通し、フィルターウェル及び観察ウェルの全長に伸びている。特定の実施態様において、底部材は、ウィッキング手段に隣接している。好ましい実施態様において、上面部材、フィルター手段、ウィッキング手段、及び底部材は、適宜塗布された接着剤により、適所に保持される。

20

【0030】

ひとつの実施態様において、上面部材は、人体に関連しているものなどの水溶液に対し実質的に不透過性である材料を含む。好ましい実施態様において、上面部材は、ポリスチレンを含む。ある実施態様において、上面部材は、試料/粒子混合物を受け取る。

30

【0031】

ひとつの実施態様において、フィルター手段は、制御された細孔のメンブレンを備える。特定の実施態様において、フィルター手段は、制御された細孔のポリカーボネートメンブレンを備える。好ましい実施態様において、フィルター手段は、粒子よりも大きい凝集塊よりも小さい孔を有する。特定の実施態様において、孔は、粒子よりも約5倍～約15倍大きい。別の特定の実施態様において、孔は、粒子よりも約10倍～約12倍大きい。更に別の特定の実施態様において、孔は、約2 $\mu\text{m}$ ～約12 $\mu\text{m}$ 、好ましくは約3 $\mu\text{m}$ である。

【0032】

ひとつの実施態様において、フィルター手段は、任意の特異的凝集塊の大半を、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の凝集されない粒子から分離する。特定の実施態様において、フィルター手段は、特異的凝集塊の約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は全てを、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の凝集されない粒子から分離する。好ましい実施態様において、フィルター手段は、特異的凝集塊の90%よりも多くを、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の凝集されない粒子から分離する。特異的凝集塊は、例えばサイズ及び/又は質量を基に、非特異的に凝集された粒子及び凝集されない粒子から分離されてもよく、その分離のレベルは、当業者に公知の分離法(例えば、質量分析、クロマトグラフィーなど)により決定及び/又は確認することができる。

40

【0033】

50

ひとつの実施態様において、ウィッキング手段は、ポリマー材料を含む。特定の実施態様において、ウィッキングメンブレンは、ガラス又は合成ポリマー材料の不織り繊維を含む。好ましい実施態様において、ウィッキングメンブレンは、ポリエステルを含む。好ましい実施態様において、ウィッキング手段は、任意の凝集されない粒子の大半を、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の凝集塊から分離する。特定の実施態様において、ウィッキング手段は、凝集されない粒子の約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は全てを、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の特異的凝集塊から分離する。好ましい実施態様において、ウィッキング手段は、凝集されない粒子の90%よりも多くを、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の特異的凝集塊から分離する。好ましくは、凝集されない粒子は、ウィッキングメンブレンを通り、非特異的に凝集された粒子及び特異的凝集塊よりもより早い速度で水平に移動する。特定の実施態様において、凝集されない粒子は、ウィッキングメンブレンを通り、非特異的に凝集された粒子又は特異的凝集塊よりも約2~約10倍(すなわち、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10倍)より早い速度で、水平に移動する。好ましい実施態様において、凝集されない粒子は、ウィッキングメンブレンを通り、非特異的に凝集された粒子又は特異的凝集塊よりも10倍より早い(例えば、10、11、12、13、14、15、20、30、50、100倍などよりも早い)速度で、水平に移動する。

#### 【0034】

ひとつの実施態様において、底部材は、比較的軟質の材料を含む。特定の実施態様において、底部材はビニルポリマーを含む。

ひとつの実施態様において、アッセイプレートは更に、上面部材とフィルター手段の間に位置し及びフィルターウェルを超えて伸びている基板を備える。好ましい実施態様において、基板は、PF4に複合された粒子、及び凝着(すなわち、凝集)反応を促進する1種又は複数の試薬を含む、ガラス基板である。

#### 【0035】

ひとつの実施態様において、アッセイプレートは更に、ウィッキング手段と底部材の間に配置され及びウィッキング手段と同じ長さである、障壁を備える。好ましい実施態様において、障壁は、ウィッキング手段が、底部材と直接接触することを防ぐ。

#### 【0036】

ひとつの実施態様において、流体試料中のヘパリン/血小板第4因子抗体を検出する装置は、少なくとも1個の脚、ブロックチャネル脚を有するタワー、アンプル及びタワーによるアンプルの圧壊後に試薬がアンプルから流れ込む試薬ウェルを保持するための少なくとも1個のスロットを有するアンプル支持体を備える。この装置は、脚がアンプル支持体中のアンプルを圧壊し、同時にブロックチャネル脚が、流体流れの試薬ウェルへの流れを遮断するように、タワーを受け取る開口部を備えるカバーも備える。従ってタワーが引き抜かれた時点で、ブロックチャネル脚も引き抜かれ、試薬のチャネルを介した試薬ウェルへの流れを可能にする。試験片を保持する底プレートは、試験片上の試薬を受け取るために、試薬ウェルの下側にある。好ましくは、底プレートは、アンプル支持体と連結し、これは次にアンプルを保持し及びカバーにより覆われる。アンプルを圧壊するために、タワーがカバーへ押し下げられた時点で、アンプル中の試薬は放出され、同時にブロックチャネル脚は、チャネルを介した試薬ウェルへの第一の試薬の流れを遮断する。

#### 【0037】

更に別のアンプルは、第二の脚又はブロックチャネル脚上のスプールにより同時に圧壊され、試薬ウェル上へチャネルを介して流れる前に、2種又はそれよりも多い試薬の混合を可能にする。好ましくは、スプールは、ブロックチャネル脚に隣接し、並びにアンプル支持体は、試薬ウェルに接続されたチャネルを備える。

#### 【0038】

好ましくは、底プレート、試験片(test trip)、アンプル支持体、及びカバーは嵌合され、タワーの押し下げ及び引き抜きにより操作可能な試験装置を形成する。

本発明の多くの利点及び詳細は、以下の略図及び詳細な説明により更に説明される。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0039】

## (5. 発明の詳細な説明)

II型HITは、PF4がヘパリンへ複合される際に生じる「血小板第4因子」(PF4)と称される血小板タンパク質上のエピトープを認識する抗体により媒介される(Horsewood P.らの論文、「The epitope specificity of heparin-induced thrombocytopenia」、Br J Haematol. 1996年10月; 95(1):161-7)。ヘパリンがPF4へ結合した場合、PF4分子の立体配座変化が生じ、結果的に、免疫原として作用する新たなエピトープが露出する(Reilly R.F.の論文、「The pathophysiology of immune-mediated heparin-induced thrombocytopenia」、Semin Dial. 2003年1-2月; 16(1):54-60, 総説)。ヘパリン以外の多くの多価陰イオン化合物は、PF4との複合体を形成し、分子内で同様の立体配座変化を生じることができ(Visentin G.P.らの論文、「Heparin is not required for detection of antibodies associated with heparin-induced thrombocytopenia/ thrombosis」、J Lab Clin Med. 2001年7月; 138(1):22-31)。

10

## 【0040】

本発明は、一部、単離された血小板第4因子(PF4)の、粒子、好ましくは球形粒子、より好ましくは多価陰イオン粒子(例えば、ポリスチレン)への複合は、PF4分子の立体配座の変化を誘導し、その結果これは患者試料中のヘパリン/血小板第4因子抗体と特異的に反応するという、本発明者らの驚くべき発見を基にしている。この驚くべき発見は、HITを検出するのに、迅速で効率的で感度が良く特異的な微粒子免疫濾過アッセイにおいて、着色された粒子、好ましくは球形粒子又はビーズへ複合された単離されたPF4を含む、方法及びキットの基礎となる。

20

## 【0041】

本発明の方法は、試料を、血小板第4因子(PF4)に複合された粒子(「PF4に複合された粒子」と共にインキュベーションする工程、試料/粒子混合物をフィルターに通過させる工程、及び濾液の色を分析する工程を含む。本発明のキットは、PF4に複合された粒子を試料と混合及び/又はインキュベーションするための反応セルを備える。これらのキットは、試料/粒子混合物を濾過及び分析するためのアッセイプレートも含む。

## 【0042】

本発明は更に、ヘパリン起因性血小板減少症(HIT)を有することが疑われる対象においてHITを検出するための前述の方法及びキットの使用を包含している。これらの方法及びキットは、様々な状況、例えば病院、診療所、医師のオフィス、臨床検査室などで使用することができる。

30

開示を明確にするために、本発明の詳細な説明を以下の小項目に分けるが、これらは限定するものではない。

## 【0043】

## (5.1 微粒子免疫濾過アッセイ)

微粒子免疫濾過アッセイ(PIFA(登録商標))(Akers Biosciences, Inc., ニュージャージー州Thorofare)は、精度、使用の容易さ、及び結果の迅速性に関して著しい利点をもたらすシステムである。その原理は、抗体/抗原結合に反応する粒子の選択的濾過を基にしている。抗原又は抗体でコートされた染色粒子は、アッセイの結果について視覚的シグナルを提供し：被験試料中の対応する抗体又は抗原の存在は、凝集された粒子のマトリックスの形成を生じるであろう。マトリックス形成された(凝集された)又はマトリックス形成されない(凝集されない)粒子のフィルター媒体を通して移動する能力は、被験試料の陽性又は陰性の反応性の測定である。

40

## 【0044】

実際に、この技術は、被験試料(例えば、血液、血清、血漿、尿、又は唾液)の、抗原又は抗体によりコートされた粒子からなる試薬との組合せを伴う。インキュベーション期間に、この試薬は、被験試料と反応することができる。対応する抗原又は抗体を含有する被験試料(陽性試料)は、粒子に、マトリックス(すなわち、凝集塊)形成を引き起こし；これ

50

らの物質を伴わない被験試料(陰性試料)は、凝集されない粒子を残すであろう。一旦試薬が試料と反応された場合は、この混合物は、非特異的に凝集された粒子(すなわち、互いに、又は他の物質とはマトリックスを形成するが、対応する抗原又は抗体とは形成しないそのような粒子)及び/又は凝集されない粒子から、凝集された粒子を分離するようにデザインされた装置へ誘導される。この装置は、制御された細孔及び液体流れの動的特性を組み合わせている、積層されたいくつかのメンブレンの複合材料である。細孔サイズ及び密度、並びに繊維網目を通る液体流れの注意深い制御により、凝集された粒子は、効率的に濾過され、残りの反応混合物から分離され、装置の内層への侵入を防止することができる。反対に凝集されない粒子は、制御された細孔のメンブレンを透過し、内側メンブレン層へ移動する。

10

**【0045】**

従って陽性試料は、制御された細孔のメンブレンにより濾過される凝集された粒子を生成し；粒子、従って色は、次のメンブレン層へ移動することができない。この場合、色は、装置の第一の目視ウィンドウ(例えば、図1の(14)参照)においてのみ視認可能である。反対に負の試料は、凝集された粒子を生じず；染色された凝集されない粒子は、制御された細孔のメンブレンを通り、次のメンブレン層へと通過し、そこで装置の第二の観察ウィンドウを通して視認可能となる。

**【0046】**

PIFA(登録商標)技術及び関連するキットの具体的な実施態様は、米国特許第5,231,035号；第5,565,366号；及び第5,827,749号において、より完全に詳細に説明されており、これらの特許は全てそれらの全体が本願明細書に参照により組入れられている。

20

**【0047】**

具体的に、本発明は、様々な物質中のヘパリン/血小板第4因子抗体を検出するための、PIFA(登録商標)技術の使用を包含している。この物質は、生物学的給源又は生物学的材料に露出された非生物学的給源であることができる。本発明の好ましい方法は、試料を、血小板第4因子と複合される粒子(「PF4に複合された粒子」と共にインキュベーションすることを含む。一旦粒子と複合されると、PF4は、ヘパリン/血小板第4因子抗体と、特異的に反応し、その結果PF4に複合された粒子は、ヘパリン/血小板第4因子抗体との接触時に特異的凝集塊を形成する能力を有する。次に試料/粒子混合物は、任意の特異的凝集塊を濾液から除去するために、粒子よりも大きいとその特異的凝集塊よりも小さい孔を有するフィルターを通過する。その後濾液は、任意の凝集されない粒子を任意の非特異的に凝集された粒子並びに任意の残存する特異的凝集塊から分離するために、フィルターに隣接するウィッキングメンブレンを通過する。凝集されない粒子は、非特異的に凝集された粒子及び特異的凝集塊の両方よりもより速い速度で、ウィッキングメンブレンを通り水平に移動する。

30

**【0048】**

フィルター及びウィッキングメンブレンを通じた濾過後、フィルターは、色の変化について、好ましくは既知濃度の粒子に対応する視覚標準との比較により、分析される。ヘパリン/血小板第4因子抗体の存在は、濾液の色が粒子の色と実質的に異なる場合に、確立され；ヘパリン/血小板第4因子抗体の非存在は、濾液の色が粒子の色に実質的に類似している場合に、確立される。

40

**【0049】**

これらの粒子は、スチレン又はその誘導體類、例えばメチルスチレン、エチルスチレン、及びクロロスチレンなど、オレフィン類、例えばエチレン及びプロピレン、アクリル酸又はそのエステル類、例えばメチルアクリレート及びエチルアクリレートなど、メタクリル酸又はその誘導體類、例えばエチルメタクリレート、アクリロニトリル、及びアクリルアミドなど、ジエン類、例えばブタジエン、クロロプレン及びイソプレンなど、塩化ビニル、塩化ビニリジン、及び酢酸ビニルから生成されたホモポリマー及びコポリマーにより例証されるような、ラテックス凝着に利用可能であることがわかっているか又は利用可能であると考えられる任意の結晶格子であることができる。スチレン、クロロスチレン、ア

50

クリル酸、ビニルトルエン、メチルメタクリレートから生成されたホモポリマー又はコポリマーの結晶格子は、有利に使用される。

【0050】

好ましくは、これらの粒子は、多価陰イオン化合物で作製される。特定の実施態様において、これらの粒子は、多価陰イオン化合物を、濃度約0.001w/v%、約0.005w/v%、約0.01w/v%、約0.05w/v%、約0.1w/v%、約0.2w/v%、約0.3w/v%、約0.4w/v%、約0.5w/v%、約0.6w/v%、約0.7w/v%、約0.8w/v%、約0.9w/v%、約1.0w/v%、約1.1w/v%、約1.2w/v%、約1.3w/v%、約1.4w/v%、約1.5w/v%、約1.6w/v%、約1.7w/v%、約1.8w/v%、約1.9w/v%、約2.0w/v%、約2.1w/v%、約2.2w/v%、約2.3w/v%、約2.4w/v%、約2.5w/v%、約2.6w/v%、約2.7w/v%、約2.8w/v%、約2.9w/v%、約3.0w/v%、約5.0w/v%、約10w/v%又はそれ以上で含有する。好ましくは、これらの粒子は、多価陰イオン化合物を、濃度約0.01w/v%～約2w/v%、より好ましくは約0.3w/v%～約0.4w/v%で含有する。

10

【0051】

好ましい実施態様において、これらの粒子は、ラテックスを含有する。他の有用な粒子は、アミノ基、チオール基、カルボキシル基又は他の反応基などの、レセプターとの反応を促進する反応基を持つか又は持たない、ポリスチレン、好ましくはカルボキシル化されたポリスチレンを含む。カルボキシル化されたスチレンブタジエン又はアクリロニトリルブタジエンスチレンなどのブタジエン/スチレンコポリマーも、有用である。別の好ましい実施態様において、粒子は、ポリスチレン又はスチレン第1級アミノラテックスを含む。

20

【0052】

ヘパリン/血小板第4因子抗体がその上で複合され得る無機粒子、例えばシリカ、クレイ、活性炭のような炭素、及び他の物質を、本発明において使用することができる。

別の好ましい実施態様において、これらの粒子は、金コロイドなどの金属コロイドを含有する。特定の実施態様において、金属コロイドは帯電されている。

【0053】

ある実施態様において、これらの粒子は、コロイド安定剤により安定化されている。特定の実施態様において、コロイド安定剤は、トリポリリン酸ナトリウムを、濃度約0.001w/v%、約0.005w/v%、約0.01w/v%、約0.05w/v%、約0.1w/v%、約0.2w/v%、約0.3w/v%、約0.4w/v%、約0.5w/v%、約0.6w/v%、約0.7w/v%、約0.8w/v%、約0.9w/v%、約1.0w/v%、約1.1w/v%、約1.2w/v%、約1.3w/v%、約1.4w/v%、約1.5w/v%、約1.6w/v%、約1.7w/v%、約1.8w/v%、約1.9w/v%、約2.0w/v%、約2.1w/v%、約2.2w/v%、約2.3w/v%、約2.4w/v%、約2.5w/v%、約2.6w/v%、約2.7w/v%、約2.8w/v%、約2.9w/v%、約3.0w/v%、約5.0w/v%、約10w/v%又はより多く含有する。好ましくは、コロイド安定剤は、トリポリリン酸ナトリウムを、濃度約0.001w/v%～約0.1w/v%、より好ましくは約0.01w/v%～約0.1w/v%含有する。

30

【0054】

別の特定の実施態様において、コロイド安定剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリルサルコシナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリメタリン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムガラス(すなわち、ヘキサメタリン酸ナトリウム)、ピロリン酸ナトリウム、及び他のポリリン酸分子からなる群より選択される1種又は複数の陰イオン界面活性剤を含有する。特定の実施態様において、コロイド安定剤は、陰イオン界面活性剤を、濃度約0.0001w/v%、約0.001w/v%、約0.005w/v%、約0.01w/v%、約0.05w/v%、約0.1w/v%、約0.2w/v%、約0.3w/v%、約0.4w/v%、約0.5w/v%、約0.6w/v%、約0.7w/v%、約0.8w/v%、約0.9w/v%、約1.0w/v%、約1.1w/v%、約1.2w/v%、約1.3w/v%、約1.4w/v%、約1.5w/v%、約1.6w/v%、約1.7w/v%、約1.8w/v%、約1.9w/v%、約2.0w/v%、約2.1w/v%、約2.2w/v%、約2.3w/v%、約2.4w/v%、約2.5w/v%、約2.6w/v%、約2.7w/v%、約2.8

40

50

w/v %、約2.9w/v %、約3.0w/v %、約5.0w/v %、約10w/v %又はそれよりも多く含有する。好ましくはコロイド安定剤は、陰イオン界面活性剤を、濃度約0.0001w/v % ~ 約0.1w/v %、より好ましくは約0.001w/v % ~ 約0.01w/v %含有する。

**【0055】**

ある別の実施態様において、コロイド安定剤は、非イオン性界面活性剤を含有する。非イオン性界面活性剤の例は、Triton(登録商標)X-100(アルキルアリアルポリエーテルアルコール又はオクチルフェノールエトキシレート)、Triton(登録商標)X-114(オクチルフェノール-ポリエチレングリコールエーテル)、オクチルチオグルコシド、Nonidet(登録商標)P-40([オクチルフェノキシ]ポリエトキシエタノール)、及びN-オクチル-BD-グルコピラノシドを含むが、これらに限定されるものではない。

10

**【0056】**

ひとつの具体的な好ましい実施態様において、これらの粒子は、球形、好ましくはミクロスフェアである。別の特定の実施態様において、粒子は、非球形である。

これらの粒子は、同じサイズのフィルター孔を容易に通過するように、ほぼ同じ直径であることは重要である。特定の実施態様において、粒子は、平均直径約0.0001 $\mu\text{m}$ 、約0.01 $\mu\text{m}$ 、約0.05 $\mu\text{m}$ 、約0.1 $\mu\text{m}$ 、約0.2 $\mu\text{m}$ 、約0.3 $\mu\text{m}$ 、約0.4 $\mu\text{m}$ 、約0.5 $\mu\text{m}$ 、約0.6 $\mu\text{m}$ 、約0.7 $\mu\text{m}$ 、約0.8 $\mu\text{m}$ 、約0.9 $\mu\text{m}$ 、約1.0 $\mu\text{m}$ 、約2.0 $\mu\text{m}$ 、約3.0 $\mu\text{m}$ 、約4.0 $\mu\text{m}$ 、約5.0 $\mu\text{m}$ 、約10 $\mu\text{m}$ 、約20 $\mu\text{m}$ 、約30 $\mu\text{m}$ 、約40 $\mu\text{m}$ 、約50 $\mu\text{m}$ 、約100 $\mu\text{m}$ 、約200 $\mu\text{m}$ 、約300 $\mu\text{m}$ 、約400 $\mu\text{m}$ 、約500 $\mu\text{m}$ 、約1,000 $\mu\text{m}$ 又はそれよりも大きいものを有する。

**【0057】**

20

好ましい実施態様において、粒子は、平均直径約0.01 $\mu\text{m}$  ~ 約100 $\mu\text{m}$ 、好ましくは約0.01 $\mu\text{m}$  ~ 約10 $\mu\text{m}$ 、より好ましくは約0.2 $\mu\text{m}$  ~ 約0.6 $\mu\text{m}$ を有する。最も好ましくは、粒子の平均直径は約0.3 $\mu\text{m}$ であり、粒子の直径は、平均から、30%を超えて、好ましくは15%、10%、又は5%を超えて変動しない。

**【0058】**

これらの粒子は好ましくは、染料、顔料又はコーティングの添加により生じた視覚的に認識可能な色を有する。例えば染色されたポリアクリルアミド粒子の調製は、本願明細書に参照により組入れられている、Wegfahrtらの名の米国特許第4,108,974号に開示されている。色は、比較的暗いことが好ましく、黒色又は暗青色が好ましい。

好ましい粒子は、Bangs Laboratories(インディアナ州Carmel)及びSeradyn, Inc.(インディアナ州インディアナポリス)から様々な直径で入手可能な、小型で、均一な直径の着色されたポリスチレンラテックス球である。

30

**【0059】**

ヘパリン/血小板第4因子抗体と特異的に反応するネオエピトープを露出するための粒子の血小板第4因子との複合は、タンパク質の粒子への複合に関する技術分野におけるいずれか公知の方法により実行され得る。その処理条件は、当然のことながら選択された粒子の物理化学特性に応じてある程度変動するであろう。特定の実施態様において、PF4は、PF4と粒子表面の間の疎水性及びイオン性相互作用により媒介される方法である吸着により、粒子へ結合することができる。好ましい実施態様に従い、PF4は、これらの粒子へ共有結合される。特定の実施態様において、PF4は、例えば水溶性カルボジイミドである1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDAC)の存在下において、カルボキシル化修飾された粒子へ共有結合することができる。

40

**【0060】**

PF4は、粒子へ化学的に結合することができるが、コーティングがPF4とヘパリン/血小板第4因子抗体の間の結合を妨害しない限りは、粒子は代わりに、PF4が接着する物質でコートされてもよい。固定されたPF4及び粒子の量は、好ましくはPF4に複合された粒子の各々が、1種又は複数のヘパリン/血小板第4因子抗体と妥当な時間一緒に混合された場合に凝集するように調節される。

**【0061】**

特定の実施態様において、粒子へ複合されたPF4は、ヘパリン/血小板第4因子抗体と特

50

異的に反応し、その結果これらの粒子は、ヘパリン/血小板第4因子抗体の接触時に凝集塊を形成する能力を有する。PF4に複合された粒子は、凝集塊が形成されるのに十分な時間、試料と共にインキュベーションされる。ある実施態様において、PF4に複合された粒子は、凝集塊が形成されるために、試料と少なくとも30秒間、少なくとも1分間、少なくとも2分間、少なくとも3分間、少なくとも4分間、少なくとも5分間、少なくとも10分間、少なくとも15分間、少なくとも20分間、少なくとも30分間又はそれよりも長くインキュベーションされる。ある実施態様において、PF4に複合された粒子は、凝集塊が形成されるために、試料と、30分間を超えず、20分間を超えず、15分間を超えず、10分間を超えず、5分間を超えず、4分間を超えず、3分間を超えず、2分間を超えず、1分間を超えず、30秒間を超えないか又はそれよりも短くインキュベーションされる。好ましい実施態様において、PF4に複合された粒子は、試料と、約30秒～約5分間インキュベーションされる。より好ましくは、凝集反応の速度及び感度を最適化するために、反応増強液が試料/粒子混合物へ添加される。ひとつの実施態様において、PF4へ複合された後、粒子は乾燥され、及び/又はガラス製アンプル中で密封される。

10

**【0062】**

ひとつの実施態様において、試料は、対象から得られる液体試料である。本願明細書において使用される対象は好ましくは、非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど)又は霊長類(例えば、サル及びヒト)などの哺乳類であり、最も好ましくはヒトである。特定の実施態様において、試料は、哺乳類の体液を含む。好ましくは試料は、血液、血清、血漿、又は尿などのヒト体液を含む。

20

**【0063】**

興味深い試料とPF4に複合された粒子は、多くの方法で接触することができる。好ましい方法において、試料は、PF4に複合された粒子及び凝集反応を促進することを補助する他の試薬を含有する溶液と混合され、被験混合物を形成する。凝集を発生するのに又は別の形に凝集するのに十分な時間間隔をかけることが許される。あるいは、試料は、粒子及び凝集反応を促進することを補助する他の試薬(例えば、ポリエチレングリコール8000及びデキストラン10,000MW)を含有するガラスメンブレンのような基板を通過することができる。試料がリガンドを含む場合、凝集塊及び他の部分は、基板から放出されるであろう。放出された凝集塊及び他の部分も、本発明の被験混合物を構成する。

**【0064】**

30

ある実施態様において、反応増強液が、凝集反応を促進するために試料/粒子混合物へ添加される。ひとつの実施態様において、この反応増強液は、pH7.2を有する。特定の実施態様において、反応増強液は、ポリエチレングリコール、塩化ナトリウム、及びグリシンを含む。より特定の実施態様において、反応増強液は、ポリエチレングリコール8000を、約5w/v%～約15w/v%、好ましくは約8w/v%～約12w/v%の範囲含む。別のより特定の実施態様において、反応増強液は、塩化ナトリウムを含まないか(すなわち約0.0%)、又は最大約1w/v%、好ましくは約0.1w/v%含む。更に別のより特定の実施態様において、反応増強液は、グリシンを、約0.01モル～約0.2モル、好ましくは約0.02モル～約0.1モル含有する。

**【0065】**

40

その後被験混合物は、粒子よりも大きいが一様に形成され得るリガンド/粒子凝集塊の集団(clump)よりも小さい孔を有するフィルターに曝される。ひとつの実施態様において、フィルターは、制御された細孔のメンブレンを含む。特定の実施態様において、フィルターは、制御された細孔のポリカーボネートメンブレンを含む。

**【0066】**

このフィルターは、ラテックス粒子直径よりも約5～約15倍大きい、好ましくは約10～約12倍大きい、より好ましくは直径約3 $\mu$ mである、規定された細孔サイズを有さなければならない。これらの細孔の直径にはある程度の小さい変動が存在することは理解されるであろう。好ましくは、細孔直径は、公称直径から30%よりも多く、好ましくは15%、10%、又は5%よりも多く変動しない。

50

## 【 0 0 6 7 】

フィルターの細孔サイズは、ヘパリン/血小板第4因子抗体/粒子凝集塊を保持するが、非特異的凝集により形成されることがある任意の比較的小さい凝集塊の通過は可能であるように選択される。非特異的凝集は、ヘパリン/血小板第4因子抗体の非存在下での粒子の凝集であることは理解されるであろう。アッセイ感度は、直径がおおまかに10~15粒子の、細孔サイズより大きい凝集塊を生成するように調節されなければならない。好ましくはフィルターは、制御された直径の細孔を有する完全な(absolute)チャンネルメンブレンであろう。

## 【 0 0 6 8 】

このフィルターは、任意の特異的凝集塊の大半を、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の凝集されない粒子から分離する。ある実施態様において、フィルターは、特異的凝集塊を約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は全て、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の凝集されない粒子から分離する。好ましい実施態様において、フィルターは、特異的凝集塊の90%よりも多くを、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の凝集されない粒子から分離する。特異的凝集塊は、非特異的に凝集された粒子及び凝集されない粒子から、例えばサイズ及び/又は質量を基に分離され、並びに分離のレベルは、当業者に公知の分離法(例えば、質量分析、クロマトグラフィーなど)により決定及び/又は確認される。

## 【 0 0 6 9 】

好ましい制御された細孔のメンブレンは、Poretics Corporation(カリフォルニア州Livermore)から市販されているもののような、ポリカーボネートを含むメンブレンである。

濾液は、フィルターを通過後、更なる分離のためにウィッキングメンブレンを通過する。ひとつの実施態様において、ウィッキングメンブレンは、ポリマー材料を含む。特定の実施態様において、ウィッキングメンブレンは、ガラス又は合成ポリマー材料の不織り繊維を含む。好ましい実施態様において、ウィッキングメンブレンは、ポリエステルを含む。

## 【 0 0 7 0 】

ウィッキングメンブレンは、大半の任意の凝集されない粒子を、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の特異的凝集塊から分離する。ある実施態様において、ウィッキングメンブレンは、凝集されない粒子の約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は全てを、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の特異的凝集塊から分離する。特定の実施態様において、ウィッキングメンブレンは、凝集されない粒子の90%よりも多くを、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の特異的凝集塊から分離する。凝集されない凝集塊は、非特異的に凝集された粒子及び特異的凝集塊から、例えばサイズ及び/又は質量を基に分離され、並びに分離のレベルは、当業者に公知の分離法(例えば、質量分析、クロマトグラフィーなど)により決定及び/又は確認される。

## 【 0 0 7 1 】

凝集されない粒子は、ウィッキングメンブレンを通り非特異的に凝集された粒子よりもより迅速に移動し、及び非特異的に凝集された粒子は、ウィッキングメンブレンを通り特異的凝集塊よりもより迅速に移動する。ひとつの実施態様において、凝集されない粒子は、ウィッキングメンブレンを通り特異的凝集塊よりもより迅速に水平に移動する。特定の実施態様において、凝集されない粒子は、ウィッキングメンブレンを通り、非特異的に凝集された粒子よりも1,000倍、500倍、100倍、50倍、30倍、20倍、15倍、10倍、5倍、4倍、3倍、2倍より速い速度で水平に移動する。別の特定の実施態様において、凝集されない粒子は、ウィッキングメンブレンを通り、特異的凝集塊よりも1,000倍、500倍、100倍、50倍、30倍、20倍、15倍、10倍、5倍、4倍、3倍、2倍より速い速度で水平に移動する。更に別の特定の実施態様において、非特異的に凝集された粒子は、ウィッキングメンブレンを通り、特異的凝集塊よりも1,000倍、500倍、100倍、50倍、30倍、20倍、15倍、10倍、5

10

20

30

40

50

倍、4倍、3倍、2倍より速い速度で水平に移動する。

【0072】

一旦混合物が濾過されたならば、これにより生成された濾液は、凝集されない粒子の存在について分析される。そのような分析は、遠心又は粒子計測のような、当該技術分野において公知の適当な物理的及び/又は化学的方法のいずれかにより行うことができること理解されるが、好ましくは、濾液の分析は、その中の粒子に対応する認知可能な色の存在を決定するための、濾液の目視による検査により行われる。従って粒子及びヘパリン/血小板第4因子抗体の割合が慎重に選択される場合、定量的システムは、粒子に対応する色の濾液中の存在は、試料中のヘパリン/血小板第4因子抗体の非存在を示し、並びに濾液中のそのような色の非存在は、試料中のヘパリン/血小板第4因子抗体の存在を示していることが確立されている。当然、本発明により試料中に存在するヘパリン/血小板第4因子抗体の量を決定することも可能である。適当な定量的システムは、濾液を、濾液中の既知濃度の着色した粒子に対応する1種又は複数の視覚標準と比較することにより確立され得る。このような視覚標準は、既知濃度のヘパリン/血小板第4因子抗体を有する試料から調製されるであろう。

10

ある別の実施態様において、濾液の色は、光学的に比較され、及び濾液中のヘパリン/血小板第4因子抗体の量は、当業者に公知の機器により決定される。

【0073】

(5.2 キット)

本発明は更に、説明された方法の実行に適したキットを提供する。一般にこのようなキットは、粒子又はビーズに複合された単離されたPF4を含む反応セルを備える。加えてキットは、前述のフィルター法及び分析法の実行に適したアッセイプレートなどの、構成部品を含む。

20

【0074】

好ましい実施態様において、キットは、ふたつの構成部品、試薬を含むプラスチック製ピペットのような、容器を含む。これらの試薬は、ピペットの内側に密封された圧壊可能なアンプル中に含まれており、並びにPF4でコートされた粒子及び迅速な抗原/抗体結合を促進するための助けとなる他の物質を含む。

【0075】

ひとつの実施態様において、反応セルは、PF4に複合された粒子を含む破壊可能な槽を備える。任意に反応セルは、凝集反応を増強する溶液を含む。任意に反応セルは、試料中の任意の感染性物質を生物学的に不活化する溶液を含む。

30

反応セルは、試料のPF4に複合された粒子との混合及び/又はインキュベーションに使用することができる。

【0076】

本発明のアッセイプレートは、上面部材、フィルター手段、ウィッキング手段、及び底部材を備える。特定の実施態様において、上面部材は、フィルターウェル及び該フィルターウェルから一定の距離にある観察ウェルを備える。特定の実施態様において、フィルター手段は、上面部材に隣接し、及びフィルターウェルを超えて伸びている。特定の実施態様において、ウィッキング手段は、フィルター手段に隣接かつ流体連通し、並びにフィルターウェル及び観察ウェルの全長に伸びている。特定の実施態様において、底部材は、ウィッキング手段に隣接している。好ましい実施態様において、上面部材、フィルター手段、ウィッキング手段、及び底部材は、適宜塗布された接着剤により適所に保持されている。

40

【0077】

ひとつの実施態様において、上面部材は、人体に関連しているもののような水溶液に対し実質的に不透過性の材料を含有する。好ましい実施態様において、上面部材は、ポリスチレンを含有する。ある実施態様において、上面部材は、試料/粒子混合物を受け取る。

【0078】

ひとつの実施態様において、フィルター手段は、制御された細孔のメンブレンを含む。

50

特定の実施態様において、フィルター手段は、制御された細孔のポリカーボネートメンブレンを含む。好ましい実施態様において、フィルター手段は、粒子よりも大きい凝集塊よりも小さい孔を有する。

【0079】

ある実施態様において、フィルター手段は、粒子よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、20倍、30倍、50倍、100倍又はそれ以上大きい、凝集塊よりも小さい孔を有する。特定の実施態様において、孔は、粒子よりも約5～約15より大きい。別の特定の実施態様において、孔は、粒子よりも約10～約12より大きい。更に別の特定の実施態様において、孔は、約2 $\mu\text{m}$ ～約12 $\mu\text{m}$ 、好ましくは約3 $\mu\text{m}$ である。

10

【0080】

フィルター手段は、任意の特異的凝集塊の大半を、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の凝集されない粒子から分離することが可能である。ある実施態様において、フィルター手段は、特異的凝集塊の約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は全てを、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の凝集されない粒子から分離する。より好ましい実施態様において、フィルター手段は、特異的凝集塊の90%よりも多くを、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の凝集されない粒子から分離する。

【0081】

ひとつの実施態様において、ウィッキング手段は、ポリマー材料を含む。特定の実施態様において、ウィッキングメンブレンは、ガラス又は合成ポリマー材料の不織り繊維を含む。好ましい実施態様において、ウィッキングメンブレンは、ポリエステルを含有する。好ましい実施態様において、ウィッキング手段は、任意の凝集されない粒子の大半を、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の特異的凝集塊から分離する。特定の実施態様において、ウィッキング手段は、任意の凝集されない粒子の90%よりも多くを、任意の非特異的に凝集された粒子及び/又は任意の特異的凝集塊から分離する。

20

【0082】

ひとつの実施態様において、底部材は、比較的軟質の材料を含む。特定の実施態様において、底部材は、ビニルポリマーを含む。

ひとつの実施態様において、アッセイプレートは更に、上面部材とフィルター手段の間に位置し、及びフィルターウェルを超えて伸びている基板を備える。好ましい実施態様において、基板は、PF4に複合された粒子及び凝集反応を促進する1種又は複数の試薬を含むガラス基板である。

30

【0083】

ひとつの実施態様において、アッセイプレートは更に、ウィッキング手段と底部材の間に位置し、及びウィッキング手段と同じ長さである障壁を備える。好ましい実施態様において、障壁は、ウィッキング手段が底部材と直接接触することを防ぐ。

【0084】

本発明のキットにおいて使用することができる好ましいアッセイプレート(1)の例が、図1～7に示されており、これらはその全体が本願明細書に参照により組み入れられている米国特許第5,565,366号から採用されている。本発明の方法及びキットに有用なアッセイプレートは一般に：フィルターウェル(12)及び観察ウェル(14)を有する、予め決定された寸法の実質的に平坦な上面部材(10)；上面部材に隣接し及びフィルターウェルを超えて伸びている、フィルター手段(20)；フィルター手段に隣接し、並びにフィルターウェル及び観察ウェルの全長及び幅を超えて伸びている、ウィッキング手段(30)；並びに、上面部材と近似した寸法を有し、ウィッキング手段に隣接した、実質的に平坦な底部材(50)；を備える。分析手段は、フィルター手段以外のアッセイプレートの要素を含むことは理解されるであろう。

40

【0085】

上面部材は好ましくは、人体に関連しているもののような水溶液に対し実質的に不透過

50

性の材料を含む。上面部材は好ましくは、剛性材料から切断又は打抜きされ、その結果アッセイプレートへある程度の支持を与えることができる。上面部材は、ポリスチレンを含み、並びに全長約100mm、幅約20mm、及び厚さ約1.0mmを有することは、好ましい。

#### 【0086】

上面部材は、上面部材の全厚を通じて伸びるフィルターウェル(12)及び観察ウェル(14)を有するように、切断されるか、打抜きされるか、そうでなければ二次加工される。好ましくは、フィルターウェル及び観察ウェルは円形であるが、他の形状も可能である。フィルターウェル及び観察ウェルは、互いに予め決定された距離(X)にあることも好ましい。一部の凝集塊は、フィルターにより保持されるのに十分な直径の集団を形成しない可能性が存在するので、予め決定された距離(X)は、フィルターを通過する任意の凝集塊が、観察ウィンドウに到達しないように選択される。従って予め決定された距離(X)は、使用される具体的な粒子及びウィッキング手段により変動するであろう。一般に、距離(X)は、凝集塊を保持するウィッキング手段の能力と反比例で変動するであろう。

10

#### 【0087】

フィルター手段(20)は好ましくは、粒子よりも大きいが一般に凝集塊の集団よりも小さい孔(22)を有する、先に説明されたようなフィルターである。フィルター手段は、制御された細孔のポリカーボネートメンブレンであることが、好ましい。フィルター手段が制御された細孔のポリカーボネートメンブレンである場合のように、フィルター手段が透明であるか又はほぼ透明である場合、フィルター手段は、フィルターウェルを超えて伸びることのみが必要とされるが、フィルター手段は、図3のように、観察ウェルを超えて伸びることが好ましい。

20

#### 【0088】

フィルター手段は、ウィッキング手段(30)に隣接している。ウィッキング手段は好ましくは、フィルター手段と密に物理的接触するように配置されており、その結果濾液は、ウィッキング手段へ垂直に流れ、及びフィルターウェルの下側位置から観察ウェルの下側位置へ水平に移動する。フィルター手段は、フィルターウェル及び観察ウェルの全長に伸びることのみ必要とされるが、ウィッキング手段は、図3のように、若干より長いことが好ましい。フィルター手段及びウィッキング手段は好ましくは、Research Company(ペンシルバニア州Glen Rock)から商標名ARcare Porousで入手可能な接着剤のような、多孔質接着剤により、互いに付着されている。ウィッキング手段は、ガラス又は天然もしくは合成ポリマー材料、好ましくはポリエステルの不織り繊維を含むことが、好ましい。ウィッキング手段中の繊維の組成及び配置は、凝集塊及び粒子が、異なる速度でその上を移動するように選択される。粒子が、より迅速に移動することが好ましい。ウィッキング手段は、観察ウェルで色の視覚的検出を促進するために、エンボス加工又はそれ以外で形成された視覚的に認識可能なパターン、例えば斜交平行パターン(32)を有することも好ましい。

30

#### 【0089】

底部材(50)は、ウィッキング手段に隣接し、好ましくは水溶液に実質的に不透過性の材料を含有する。底部材は好ましくは、上面部材の適当な幅及び全長を有するように、切断又は打抜きされる。上面部材及び/又は底部材は、アッセイプレートを支持するのに役立つなければならない。従って、上面部材が、適切な支持体を提供する場合、底部材は、ピニルポリマーのような、比較的軟質の材料を含むことができる。底部材は好ましくは、接着剤により、アッセイプレートの他の構成部品に物理的に付着される。多くの適当な接着剤は、ウィッキング手段のウィッキング特性を損なうので、好ましいアッセイプレートは、少なくともウィッキング手段と同じ長さであり、及びウィッキング手段と接着剤のついた底部材の間に配置された薄いポリエチレンフィルムのような、障壁(40)を有する。

40

#### 【0090】

本発明の方法及びキットに有用なアッセイプレートは任意に、PF4に複合された粒子及び凝集反応の促進に必要な他の試薬を含む、ガラスメンブレンのような、基板(60)も備える。このような基板は、試料が、レセプターを有する粒子を含有する溶液と前混合されるよりもむしろ、直接フィルターウェルへ塗布される場合に使用される。基板は、図4に示

50

されたように、上面部材とフィルター手段の間に配置されねばならず、及びフィルターウェルを超えて伸びていなければならない。

【0091】

好ましい種類の反応セル(70)を、図5に示している。本発明の反応セルのひとつの要素は、その中でPF4に複合された粒子が、リガンドを含むと疑われる試料と接触される容器(80)である。このような容器は、様々な形状を有することができる。しかし好ましい形状の容器は、図5に示されたような、ピペットである。開放端を有する容器は、更に試料及びPF4に複合された粒子を含有するためのキャップ(72)を備えることが好ましいことは理解されるであろう。好ましい容器は、使い捨てであり、比較的安価な、当該技術分野において公知の実質的に透明な合成ポリマーのいずれかを含む。適当な透明なピペット型容器は、Franklin, Inc.(ニュージャージー州フランクリン)から入手可能である。

10

【0092】

好ましい反応セル内には、レセプター含有粒子(92)を含む破壊可能な槽(90)が存在する。槽が、加えられた力により破壊又は破裂された時、粒子が試料と接触するまで、使用される材料が、しっかりと粒子を含むのに十分な構造上の完全性を有する限りは、破壊可能な槽は、ガラス又はいくつかの合成ポリマーを含有することができる。反応セルが破壊可能な槽を含む場合、容器は、それを通して破裂力が破壊可能な槽に加えられるよう、比較的柔軟な材料を含むことが必要である。

【0093】

好ましい反応セルは更に、死滅溶液を含有する。用語「死滅溶液」は、アッセイを実行するために使用される患者試料中の任意の感染性物質を生物学的に不活化する能力を有する任意の溶液を意味することが意図されている。エタノール、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、ヨードフォア、又は酸化漂白剤を含有する溶液は、本発明に従った死滅溶液の例を提供する。死滅溶液は、次亜塩素酸ナトリウムのような、酸化漂白剤を含有することが好ましい。死滅溶液は、容器の片端にあり、及び破裂可能なメンブレン(102)によりそれらから分離されているコンパートメント(100)内に含まれることが好ましい。あるいは、死滅溶液は、容器内に配置された、破壊可能な槽(110)内に含まれる。これらのメンブレン又は槽は、加えられた力により破壊又は破裂されるまではしっかりと死滅溶液を含むのに十分な構造上の完全性を有する材料を含む。その後死滅溶液は放出され、通常アッセイの完了時に、容器内又はアッセイプレート上に位置した任意の生物学的活性物質と

20

30

【0094】

流体試料中のヘパリン/血小板第4因子抗体を検出する器具の好ましい実施態様は、図8及び9に分解図で示されている。器具800は、前面870、並びに試料ウェル803、両側のラッチ807、脚810、及びブロックチャネル脚815を備えるタワー805を含む。タワー805は、カバー825の開口部820へ嵌合されており、その結果脚810は、アンブル支持体835中のスロット840内に配置されたアンブル830を圧壊する。図8及び9は、2個のアンブル830を含むためのスペースを伴うスロット840のみを示しているが、2個よりも多くのアンブルをこの器具800において使用することができ、並びに追加の脚を、タワー805に備えることができる。カバー825も、内側にラッチ808を有し、タワー805が押し下げられた場合、タワー805のラッチ807は、カバー825のラッチ808と嵌合し、その結果タワー805は、わずかに位置809の分上昇することができる。タワー805のブロックチャネル脚815は、アンブル支持体835中の試薬ウェル845への流体の流れを遮断し、その後タワー805がカバー825の開口部820へ嵌合され及び押しつけられた時点で、タワー805の脚810によりアンブル830を圧壊する。カバー825は、アンブル支持体835上に配置される。

40

【0095】

好ましくは、カバー825及びアンブル支持体835は、適所に試験片855を保持する底プレート850へ互いにスナップ嵌めすることができる。先に説明されたような微粒子免疫濾過アッセイを含む試験片855は、試験ウィンドウ847及び対照ウィンドウ848を有し、窪み865により適所に保持されている。別の実施態様においては、試験片855を保持し及び方向付

50

けるために、異なる構造が使用されてもよい。典型的には、タワー805が押し下げられ、その後タワー805のブロックチャネル脚815により遮断されたチャネル875を解除するように位置809へ引き抜かれることにより、試薬がアンプル830から放出される時に、試験片85は、試薬ウェル845から、チャネル875を介して1種又は複数の試薬を受け取る。好ましくは、試薬は、血小板第4因子(PF4)へ複合された粒子を含む。タワー805は更に、2種(又はそれよりも多い)試薬の試薬ウェル845へ流れる前の混合を可能にするために、別のアンプルを圧壊するためのスプール817を備える。別の実施態様において、スプール817は、ブロックチャネル脚815に隣接しなくてもよい。

【0096】

図9は、試薬ウェル下面846及びチャネル下面876を示している。図8及び9に示されるように、その窪みは、異なる部品を誘導し及び好ましくは嵌合し、その結果底プレート860、試験片855、アンプル支持体835、及びカバー825は、嵌合され、タワー805の押し下げ及び引き抜きにより操作可能な試験器具800を形成する。

10

【0097】

ひとつの実施態様において、器具800は、以下の様式で使用される：

最初に、タワー805は、カバー825内の開口部820へ嵌合するような方法で下側へ全て押される。第二に、患者試料は、タワー805の試料ウェル803へ注入される。第三に、器具800は、試験片855の長軸に沿って左右に5秒間振盪される。第四に、患者試料及びアンプル(複数)中の試薬(複数)が、チャネル875内で混合物を形成する時点で、器具800は、1分間平面上に静置される。好ましくは、試薬は、血小板第4因子(PF4)に複合された粒子を含有する。第五に、タワー805は、停止位置809まで引き上げられ、この器具800は、角度45度まで前方へ傾けられ、前側870の反対側を軽く叩き、その結果この混合物は、試薬ウェル845へ流れ、そこでこれは先に説明されたような微粒子免疫濾過アッセイの反応を受ける。最後に、器具800は、再度平らにし、10分間、又は色が対照ウィンドウ848に認められるまで、静置する。

20

【0098】

ある別の実施態様において、キットは、試薬を含有するプラスチック製ピペットのような容器の、2個の構成部品を含む。これらの試薬は、ピペットの内側に密封された圧壊可能なアンプル中に含まれ、並びに迅速な抗原/抗体結合を促進することを助けるPF4でコートされた粒子及び他の物質を含有する。

30

【0099】

ひとつの実施態様において、反応セルは、PF4に複合された粒子を含む、破壊可能な槽を含む。任意に、反応セルは、凝集反応を増強する溶液を含む。任意に反応セルは、試料中の任意の感染性物質を生物学的に不活化する溶液を含む。

【0100】

反応セルを、試料をPF4に複合された粒子と混合及び/又はインキュベーションのために使用することができる。

本発明の追加の目的、利点、及び新規特徴は、限定を意図しない、下記実施例の審査時に、当業者には明らかになり、ここで部(parts)及びパーセントは、特に記さない限りは、重量対容積である。

40

【実施例】

【0101】

(6. 実施例)

(6.1 HealthTEST(商標)ヘパリン/血小板第4因子抗体アッセイ)

HealthTEST(商標)ヘパリン/血小板第4因子抗体アッセイ(Akers Biosciences, Inc.)は、ヘパリン/血小板第4因子抗体の検出のためにデザインされた、PIFA(登録商標)技術を基にした定量的インピトロ診断装置である。この装置は、メンブレン濾過システム及び結果ウィンドウを含むMiniReactor装置、並びに微粒子ベースの反応試薬を含む押しボタン式試薬分配システムを含むキットにおいて供給される。

【0102】

50

MiniReactorは、試料が試薬と反応することを可能にする反応ウェルを含む。試料は、反応ウェル(wall)へ添加され、その後試薬分配器中に含まれた試薬が添加される。試薬は、単離又は精製されたPF4タンパク質でコートされた微粒子に加え、被験試料中の特異的抗体の存在下で粒子の迅速な凝集塊形成を促進するようにデザインされた追加の増強物質(例えば、ポリエチレングリコール8000及びデキストラン10,000MW)を含む。

【0103】

一旦これらの試薬が、反応ウェルにおいて試料と反応したならば、反応混合物はメンブレン濾過システム上に自動的に集まる。このシステムは、凝集された粒子を濾過するように作用するが、同時に凝集されない粒子は通過させる。従って凝集された反応性試料は、メンブレン内に捕獲される。染色された粒子は、このフィルター上に捕獲され、粒子及びその結果としての色は、結果ウィンドウの陽性/陰性ラインを通過するように移動することができない。逆に凝集されない非反応性試料は、メンブレンフィルターを通過し、ウィッキング層へ侵入し、色は、陽性/陰性ラインを通過するように移動する。

10

【0104】

この試験は、迅速な手動アッセイであり、直ぐに結果が必要である場合に、容易に実行することができる。この試験は、使い捨て試験装置において色の視覚的決定により血清又は血漿中のヘパリン/血小板第4因子抗体の存在を決定する。このアッセイの最低数の工程を実行するのに要する時間は、5分未満である。

【0105】

染色されたヘパリン/血小板第4因子抗原でコートされた微粒子は、アッセイの結果について、視覚的シグナルを提供する。凝集された又は凝集されない粒子をフィルター媒体を通じて移動する能力は、被験試料の反応性/非反応性の測定である。

20

【0106】

(6.1.1 材料及び方法)

2種の調査を行い、HealthTEST(商標)ヘパリン/血小板第4因子抗体アッセイの性能を、現場給源(field source)から得られた新鮮な試料を使用する市販の標準臨床検査法と比べ、評価した。

これらの調査は、試験の特異性及び感度を測定した。比較調査の結果を、6.1.2.項にまとめた。

【0107】

(6.1.2 結果)

30

## 【表1】

## 特異性及び感度

## 試験#1 血漿

HealthTEST(商標)		ELISA		10
		陽性	陰性	
	陽性	21	15	
	陰性	2	137	
		23	152	

特異性=90.1%(又は、137/152)

感度=91.3%(又は、21/23)

全体の一致度=90.3%(又は、158/173)

## 試験# 2 血清

HealthTEST(商標)		ELISA		20
		陽性	陰性	
	陽性	21	3	
	陰性	2	153	
		23	156	

特異性=98.1%(又は、153/156)

感度=91.3%(又は、21/23)

全体の一致度=97.2%(又は、174/179)

30

## 【0108】

## 再現性

本試験の再現性を測定する試験は、4連続日毎日、HealthTEST(商標)ヘパリン/血小板第4因子抗体アッセイにより試験した、陽性及び陰性の各患者対照の5つ組を用いて行った。

これらの結果は、本試験は、血清及び血漿の両方について、100%再現性があることを示している。

## 【0109】

## (6.1.3 考察)

HealthTEST(商標)ヘパリン/血小板第4因子抗体アッセイは、抗凝固薬ヘパリンの使用を伴う重度のアレルギー様副作用であるヘパリン起因性血小板減少症(HIT)を発症するリスクのある患者を同定するためにデザインされた。ヘパリン/血小板第4因子抗体の存在は、HITに関するリスクのある患者に付随し、急激に血液学及び心臓学の治療標準となってきた。従ってヘパリン/血小板第4因子抗体存在の決定は、血管アクセス血栓症のリスク評価に大いに寄与するであろう。本試験は、好ましくはヘパリンが手術及び他の医療手技の間に投与される、病院のような、保健施設における使用が意図されている。本試験は、包括的試験において性能特徴について評価された。これらの試験は、本試験が意図された用途について安全かつ有効であることを明らかにしている。

40

## 【0110】

同じく、これらの試験は、HealthTEST(商標)ヘパリン/血小板第4因子抗体アッセイは、酵素イムノアッセイ(ELISA)のような、現在の臨床検査手法と同じように感度がありかつ

50

特異的であるが、計測装置を必要とせず、及びわずかに5分間で行うことができることを示している。これらの利点は、市場要因及び代替サイトの保健産業(alternate-site health-care industry)を形作る傾向を利用し、迅速な診断アッセイシステムを可能にするであろう。

【0111】

(7. 同等物)

本発明は、説明された特定の実施態様による範囲に限定されず、これらは単に本発明の個別の態様の例証を意図しており、並びに機能的に同等の方法及び構成部品は、本発明の範囲内である。実際、本願明細書において示され及び説明されたものに加え、慣習的実験を超えないものを使用し、先の説明及び添付図面から、様々な本発明の変更が当業者には明らかになるであろう。そのような変更及び同等物は、添付された「特許請求の範囲」に収まることが意図されている。

10

【0112】

本願明細書において言及された全ての刊行物、特許及び特許出願は、各々が個別の刊行物、特許及び特許出願が、個別に本願明細書に参照により組入れられていることが具体的かつ個別に示されているのと同程度に、本願明細書に参照により組入れられている。

本願明細書の参考文献の引用又は考察は、それらが本発明に先行することを認めるものとして理解されてはならない。

【図面の簡単な説明】

【0113】

20

(4. 図面)

図1-7は、その全体が本願明細書に参照により組入れられている、米国特許第5,565,366号から得ている。

【図1】図1は、本発明の好ましい方法及びキットに従い有用なアッセイプレートの平面図である。

【図2】図2は、本発明の好ましい方法及びキットに従い有用なアッセイプレートの拡大断面図である。

【図3】図3は、ウィッキング手段と底部材の間に障壁を有する、本発明の好ましい方法及びキットに従い有用な好ましいアッセイプレートの拡大断面図である。

【図4】図4は、フィルターウェルの下側に基板を有する、本発明の好ましい方法及びキットに従い有用なアッセイプレートの拡大断面図である。

30

【図5】図5は、本発明の好ましいキットに従い有用な反応セルの斜視図である。

【図6】図6は、コンパートメント中に「死滅」溶液を含む、本発明の好ましいキットに従い有用な反応セルの斜視図である。

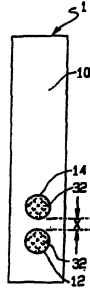
【図7】図7は、破壊可能な槽中に「死滅」溶液を含む、本発明の好ましいキットに従い有用な反応セルの斜視図である。

【図8】図8は、本発明に基づくアッセイを実行するために適した集成体の分解図である。

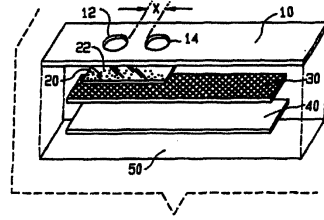
【図9】図9は、本発明に基づくアッセイを実行するために適した集成体の第二の分解図である。

40

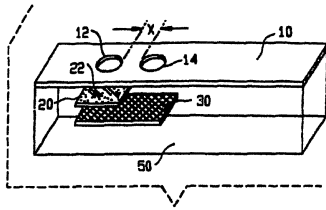
【図1】



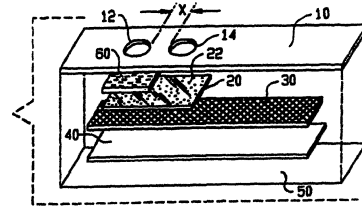
【図3】



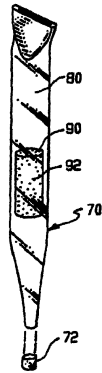
【図2】



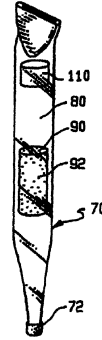
【図4】



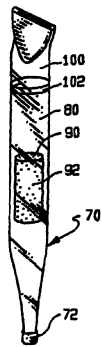
【図5】



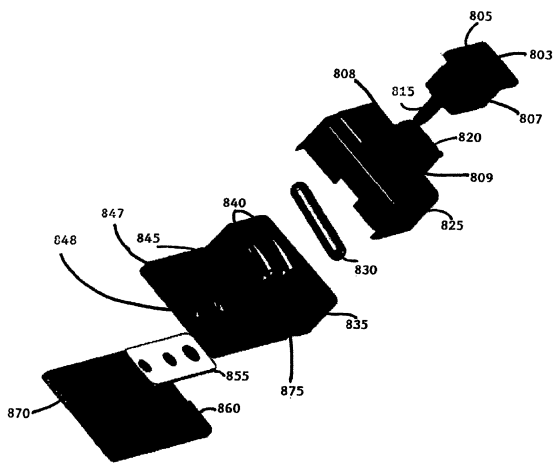
【図7】



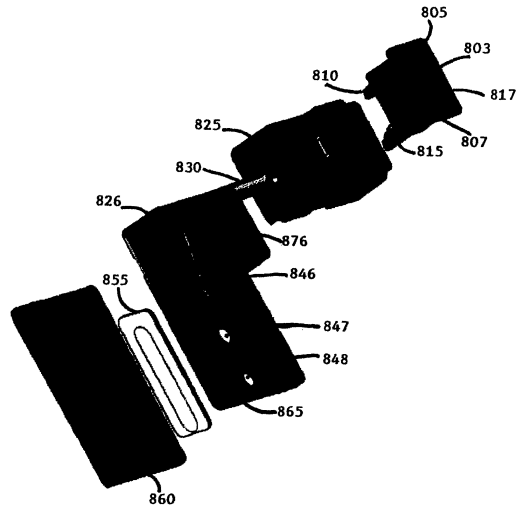
【図6】



【図8】



【図9】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 33/545 B  
G 0 1 N 33/553

(72)発明者 スサン アンドレルクジク  
アメリカ合衆国 0 8 0 9 6 ニュージャージー州 ウェスト デプトフォールド バルンスダレ  
ロード 1 1 0 3

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 国際公開第97/032211(WO, A1)  
特表平05-506311(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / P u b M e d ( S T N )

专利名称(译)	肝素/血小板因子4抗体检测方法和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP5775790B2</a>	公开(公告)日	2015-09-09
申请号	JP2011229316	申请日	2011-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	打开扫描BioScience公司		
申请(专利权)人(译)	アケルス生物科学インコーポレーテッド		
当前申请(专利权)人(译)	アケルス生物科学インコーポレーテッド		
[标]发明人	ダビドミルニク スサンアンドレルクジク		
发明人	ダビド ミルニク スサン アンドレルクジク		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/545 G01N33/553		
CPC分类号	G01N33/6863 B01L3/5023 B01L2200/16 B01L2300/0681 B01L2400/0683 G01N33/54313 G01N33/564 G01N33/6893 G01N33/86 G01N2333/522 G01N2400/40 G01N2800/222		
FI分类号	G01N33/543.581.F G01N33/53.N G01N33/543.581.C G01N33/543.581.U G01N33/543.583 G01N33/545.B G01N33/553		
代理人(译)	石川 彻		
优先权	60/615622 2004-10-04 US		
其他公开文献	JP2012053052A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法，用于检测怀疑患有HIT的物体中的肝素诱导的血小板减少症（HIT）。解决方案：使样品与血小板因子4（PF4）复合的颗粒接触，PF4与颗粒复合，特异性地与肝素/血小板因子4抗体反应，样品/颗粒混合物通过过滤器，然后分析滤液的颜色。当滤液的颜色与含有受体的颗粒的颜色显著不同时，建立样品中肝素/血小板因子4抗体的存在。

(21) 出願番号	特願2011-229316 (P2011-229316)	(73) 特許権者	507109309
(22) 出願日	平成23年10月19日 (2011.10.19)		
(62) 分割の表示	特願2007-534920 (P2007-534920)の分割		
原出願日	平成17年10月4日 (2005.10.4)		
(65) 公開番号	特願2012-53052 (P2012-53052A)		
(43) 公開日	平成24年3月15日 (2012.3.15)	(74) 代理人	100097456
審査請求日	平成23年10月19日 (2011.10.19)		弁理士 石川 徹
(31) 優先権主張番号	60/615,622	(72) 発明者	ダビド ミルニク
(32) 優先日	平成16年10月4日 (2004.10.4)		アメリカ合衆国 08096 ニュージャージー州 デプトフォールド ストネイブロ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		オク 1505