

(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2008-541073

(P2008-541073A)

(43) 公表日 平成20年11月20日(2008.11.20)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 2 5 W
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	P
		GO 1 N	33/543	5 2 5 U

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2008-510489 (P2008-510489)	(71) 出願人	507369442
(86) (22) 出願日	平成18年5月9日 (2006.5.9)		マブテック アーバー
(85) 翻訳文提出日	平成19年12月25日 (2007.12.25)		スウェーデン王国 ナッカ ストランド
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/004356		オーガスティンダルスパーゲン 19
(87) 国際公開番号	W02007/057057	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成19年5月24日 (2007.5.24)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	0509422.2	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成17年5月9日 (2005.5.9)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
		(74) 代理人	100129506
			弁理士 小林 智彦
		(74) 代理人	100130845
			弁理士 渡邊 伸一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P V D F 膜

(57) 【要約】

本発明は、(a) 膜をアルコールおよび湿潤剤と接触させる工程、および (b) 該膜を乾燥させる工程を含む、ポリビニルジフルオライド (PVDF) 膜の処理方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 膜をアルコールおよび湿潤剤と接触させる工程、ならびに
- (b) 該膜を乾燥させる工程

を含む、ポリビニルジフルオライド (PVDF) 膜を処理する方法。

【請求項 2】

工程 (a) が、膜をアルコールと湿潤剤との混合物に接触させる工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

工程 (a) が、

- (i) 膜をアルコールと接触させる工程；
- (ii) 該膜を洗浄する工程；および
- (iii) 該膜を湿潤剤と接触させる工程

を含む、請求項1記載の方法。

10

【請求項 4】

アルコールがエタノールおよびメタノールから選択される、請求項1~3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

湿潤剤が、リン酸緩衝生理食塩水、炭酸塩、糖質、タンパク質、およびアミノ酸から選択される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 6】

糖質が、ラクトース、スクロース、グルコース、トレハロース、フルクトース、マンノース、イノシトール、グルコサミン、アラビノース、およびキシロースから選択される、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

タンパク質がアルブミンまたは抗体である、請求項5記載の方法。

【請求項 8】

アミノ酸がグリシンである、請求項5記載の方法。

【請求項 9】

前記請求項のいずれか一項記載の方法により得られるPVDF膜。

30

【請求項 10】

- (a) 膜をタンパク質と接触させる工程；
- (b) 任意で該膜を洗浄する工程；および
- (c) 任意で、安定化剤の存在下で該膜を乾燥させる工程

を含む、請求項9記載のPVDF膜をタンパク質でコーティングする方法。

【請求項 11】

タンパク質が抗体である、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

抗体がサイトカインに対する抗体である、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

免疫アッセイにおける請求項9記載のPVDF膜の使用。

40

【請求項 14】

免疫アッセイがELISAまたはエリスポット (ELISpot) アッセイである、請求項13記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、予備活性化 (preactivation) の必要をなくするためのPVDF膜の処理方法に関する。処理された膜はエリスポット (ELISpot) および他のアッセイにおいて有用である

50

。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

ポリビニルジフルオライド（PVDF）膜は、種々の免疫アッセイにおいて固体支持体として一般に使用されている。タンパク質に結合して保持するその高い能力ゆえに、PVDFは、特に固定化物質の高い局所濃度に依存するエリスポットやマイクロアレイアッセイなどに理想的な膜である。しかしながら、PVDF膜は本来の形態においては非常に疎水性であるという特性を有し、かつ比較的結合活性が乏しいため、その高い結合特性を達成するためにはPVDF膜を活性化する必要がある。活性化は通常、膜をより親水性にして水溶液が膜に浸透することを可能にし、それにより結合に利用できる表面領域を増加させる、エタノール処理またはメタノール処理により達成される。典型的には膜をエタノールで短時間処理し、その後コーティングする物質の添加前に数回洗浄する。疎水性で結合性が低いという特性を取り戻してしまうため、活性化とコーティングとの間に膜を乾燥させないことが必須である。

10

【0003】

「過剰処置」（すなわち過剰量のエタノールまたは過剰に長い処置時間）により悪影響が及ぼされ、最適以下の結果につながることを示されているため、特に膜を細胞アッセイに使用する場合は、厳密に規定された手法で活性化方法を実施する必要がある。

20

【発明の開示】

【0004】

発明の概要

本発明者らは、使用者がコーティング前に予備活性化する必要をなくすように、PVDF膜を改良する方法を開発した。膜の改良により「過剰処理」のリスクが回避される。予め活性化する必要なしに、コーティング物質を直接プレートに添加することができるため、改良された膜の使用はアッセイプレートの調製における大幅な単純化も意味する。従って本発明は、

(a) 膜をアルコールおよび湿潤剤と接触させる工程、ならびに

(b) 該膜を乾燥させる工程

を含む、ポリビニルジフルオライド（PVDF）膜を処理する方法；

30

本発明の方法によって得られるPVDF膜；

(a) 該膜をタンパク質と接触させる工程、

(b) 任意で該膜を洗浄する工程、および

(c) 任意で該膜を安定化剤の存在下で乾燥させる工程

を含む、本発明のPVDF膜をタンパク質でコーティングする方法；ならびに

免疫アッセイにおける本発明のPVDF膜の使用を提供する。

【0005】

発明の詳細な説明

本発明は、エタノールを用いた活性化後または活性化中に膜をより親水性にする物質（「湿潤剤」）でポリビニルジフルオライド（PVDF）膜を飽和させると、永続的に「活性化」することができるという知見に基づく。こうして膜は、その高い結合特性をなお維持しながら、乾燥および長期保存することができる。本発明の方法は、エリスポットアッセイにおける使用に適した他の疎水性膜に適用することもできる。

40

【0006】

本発明は、

(a) 膜をアルコールおよび湿潤剤と接触させる工程；および

(b) 該膜を乾燥させる工程

を含む、PVDF膜の処理または活性化の方法を提供する。

【0007】

工程(a)は、膜をアルコールと湿潤剤との混合物に接触させる工程を含んでもよい。

50

または、膜を最初にアルコールに接触させ、次に湿潤剤に接触させてもよい。湿潤剤を添加する前に、膜を洗浄してアルコールを除去してもよい。

【0008】

工程(a)において任意の適したアルコールを用いてもよい。アルコールは、好ましくはメタノールまたはエタノールであるが、プロパノールまたはイソプロパノールなどの他のアルコールを使用してもよい。

【0009】

湿潤剤は、PVDF膜をより親水性にする任意の物質である。湿潤剤は親水性化合物、または部分的に親水性の化合物、すなわち親水性および疎水性のいずれでもある化合物である。湿潤剤は好ましくは非毒性である。湿潤剤は、典型的には細胞活性化または細胞の動きに全く影響を及ぼさない。湿潤剤は一般に内毒素を含有しない。適切な湿潤剤には、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、炭酸塩、糖質、タンパク質、およびアミノ酸が含まれる。

10

【0010】

1つの態様において、2種類またはそれ以上、3、4、5、または6種類などの異なる湿潤剤を組み合わせて使用してもよい。例えば、本明細書に記載された2種類またはそれ以上の糖などの2種類またはそれ以上の異なる糖質、2種類またはそれ以上の異なる炭酸塩、2種類またはそれ以上の異なるタンパク質、あるいは2種類またはそれ以上の異なるアミノ酸を湿潤剤として使用してもよい。または、2種類またはそれ以上の異なる種類の湿潤剤を組み合わせて使用してもよい。例えば、糖質とタンパク質、アミノ酸、および/または炭酸塩を任意でPBS中で使用してもよく、タンパク質、アミノ酸、および/または炭酸塩を任意でPBS中で使用してもよく、あるいはアミノ酸および炭酸塩を任意でPBS中で使用してもよい。

20

【0011】

糖質は典型的には糖である。適切な糖の例には、ラクトース、グルコース、スクロース、フルクトース、マンノース、イノシトール、グルコサミン、アラビノース、キシロース、およびトレハロースが含まれる。タンパク質は、それを検出するためにその後膜が使用されるサイトカインのような物質に結合しない、任意のタンパク質であり得る。

【0012】

タンパク質は、例えば膜の目的とされたアッセイにおいて対象となる任意の分子と相互作用しない抗体であってもよい。適したタンパク質は、典型的には5~5000アミノ酸の長さである。タンパク質は典型的には精製された形態である。タンパク質は一般に、プレートの長期保存を可能にするように、時間が経過しても安定なものである。

30

【0013】

任意のアミノ酸、または任意の2種類またはそれ以上のアミノ酸の混合物を湿潤剤として使用してもよい。アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリン、またはこれらの任意の組み合わせであってもよい。グリシンは好ましいアミノ酸である。

【0014】

膜をアルコールおよび湿潤剤と接触させる時間は重要ではない。典型的には膜をアルコールと湿潤剤との混合物に約30秒間~約10分間接触させる。実際面では、アルコールと湿潤剤との混合物を膜に添加した直後に膜を乾燥に供してもよい。または、典型的には膜を約30秒間~約10分間アルコールと接触させ、次に膜を約30秒間~約10分間湿潤剤と接触させる。湿潤剤をアルコールの直後に添加してもよい。湿潤剤を添加した直後に膜を乾燥に供してもよい。

40

【0015】

一般に、70%アルコール、例えば70%エタノールまたは70%メタノールが本発明の方法に使用される。アルコールを他の濃度、例えば30%~90%で使用することもできる。

【0016】

50

種々の湿潤剤の適切な濃度は以下の通りである。糖質は約0.05%～約5%の濃度、例えば約0.1%～約4%または約0.2%～約3%で使用してもよい。糖質はPBS中に存在してもよい。グリセロールは約0.1%～約10%の濃度、例えば約1%、2%、または5%で使用してもよい。

【0017】

PBSは、例えば標準希釈または標準希釈の2倍のような、標準希釈の約0.5～約10倍などの様々な異なる希釈で使用することができる。標準希釈のPBSは、20mMリン酸および50mM NaClである。

【0018】

アミノ酸、またはアミノ酸の組み合わせを約0.05%～5%の濃度、例えば0.5%、1%、または2%で使用してもよい。

10

【0019】

抗体などのタンパク質を、約 $1\mu\text{gml}^{-1}$ 、 $2\mu\text{gml}^{-1}$ 、または $5\mu\text{gml}^{-1}$ などの、約 $0.1\mu\text{gml}^{-1}$ ～約 $10\mu\text{gml}^{-1}$ の濃度で使用してもよい。

【0020】

膜は典型的には湿潤剤の存在下、および任意でアルコール存在下で無菌条件下で乾燥される。例えば膜を、乾燥した環境の空間で無菌の流れの下で乾燥してもよい。無菌条件はプレートをUV光下に維持することによって適用することができる。または、乾燥を無菌でない条件で行ってもよく、乾燥後に照射によってプレートを滅菌してもよい。真空下で乾燥を行ってもよい。乾燥工程を助けるためにプレートを加熱してもよい。乾燥時間は重要ではなく、添加したエタノール/湿潤剤の量および乾燥条件に依存する。

20

【0021】

典型的には乾燥工程は、湿潤剤がタンパク質である場合には特に、安定化剤の非存在下で行われる。

【0022】

PVDF膜は任意の様式であり得る。例えば、PVDFのシートを本発明の方法で処理することができる。または、PVDF膜は特定のアッセイに適した様式であってもよい。例えば、PVDF膜は96ウェルのエリスロットプレート中であってもよい。96ウェルのエリスロットプレートでは、PVDF膜は全てのウェル、ウェルのストリップ、または単一のウェル内に存在してもよい。

30

【0023】

本発明はまた、

- (a) 乾燥した膜をタンパク質と接触させる工程；
- (b) 任意で該膜を洗浄する工程；および
- (c) 任意で、安定化剤の存在下で該膜を乾燥させる工程

をさらに含む、PVDF膜の処理方法も提供する。

【0024】

タンパク質は、アッセイで検出される物質に特異的に結合可能な、任意のタンパク質であり得る。タンパク質は、例えば抗体またはその断片であってもよい。

【0025】

抗体は、イムノアッセイに有用な任意の抗体または結合タンパク質であってもよい。例えば、抗体はIFN- γ 、IL-10、IL-12、またはIL-13などのサイトカインに特異的な抗体であってもよい。

40

【0026】

本発明は、本発明の方法によって得られるPVDF膜も提供する。PVDF膜は典型的には乾燥された形態で提供される。本発明の膜は、その膜のその後の使用、すなわち結合タンパク質での膜のコーティングの前に、活性化を必要としない。本発明の膜は、溶液中で抗体または他の結合タンパク質と直接接触させることによりコーティングすることができる。

【0027】

従って本発明は、

50

- (a) 膜をタンパク質と接触させる工程；
- (b) 任意で該膜を洗浄する工程；および
- (c) 任意で、安定化剤の存在下で該膜を乾燥させる工程

を含む、本発明のPVDF膜をタンパク質でコーティングする方法も提供する。

【0028】

PVDF膜を乾燥させることは必須ではない。膜をタンパク質と接触させた後、膜を直ちにアッセイ法に使用することができる。

【0029】

本発明は免疫アッセイにおける本発明のPVDF膜の使用を提供する。免疫アッセイの例にはエリスポットおよびELISAアッセイが含まれる。

10

【0030】

本発明のPVDF膜は、抗体などのタンパク質で膜をコーティングするための説明書、および/または免疫アッセイを行うための説明書とともに提供してもよい。膜を、抗体などの免疫アッセイの任意の構成成分とともに提供してもよい。従って、本発明はまた、1つまたは複数の抗体、緩衝剤、細胞培養培地、酵素結合抗体、ストレプトアビジン-酵素複合体、酵素基質、および/またはアッセイの説明書とともに本発明の膜を含む、イムノアッセイキットも提供する。抗体は、捕捉抗体として膜に結合するための抗体でも、または捕捉された反応物を検出するための抗体であってもよい。検出抗体はビオチン化されていてもよい。キットがビオチン化検出抗体を含む場合、典型的にはキットはストレプトアビジン-酵素複合体も含む。

20

【0031】

以下の実施例により本発明を説明する。

【0032】

実施例

比較例1

PVDFエリスポットプレートのエタノールでの処理および過剰処理の影響を実証するために、種々の従来のコーティング法を用いてIFN- γ エリスポットアッセイを行った。

【0033】

市販のプレコートエリスポットプレート(Mabtech社、ストックホルム、スウェーデン)をプレコート対照プレートとして使用した。これらのプレートでは、IFN- γ 抗体をエタノールで活性化した膜上へコーティングし、次に安定化剤の存在下で乾燥させた。この方法は、様々な条件下で長期保存した場合に、任意で感度が良くかつ高度に安定なプレートを生成するためにすでに示されている。また、膜はエタノールで活性化されるが、処理条件はエタノール処理による負の影響が見られないように選択される。

30

【0034】

過剰処理の影響を実証するために、1ウェルあたり1.5 μ gの抗IFN- γ 抗体(1D1K)でのコーティングの前に、PVDFエリスポットプレートを100 μ l/ウェルの70%エタノールで2分間予め湿潤させた。

【0035】

1ウェルあたり1.5 μ gの抗IFN- γ 抗体(1D1K)でコーティングした非処理プレートもこの実施例に使用した。

40

【0036】

エリスポットプレートを 10×10^4 /ウェルの末梢血単核細胞(PBMC)とともに、抗原性ペプチド(CEFペプチドプール)の存在下で一晩インキュベートした。細胞を除去して、IFN- γ に対する酵素結合二次抗体(7-B6-1)を添加し、続いてストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ複合体(SA-ALP)、およびその後基質(BC1P/NBT)で発色させた。ドイツのAID社の自動化エリスポットリーダーを用いてスポットを計数した。

【0037】

図1は、適正に活性化されたウェル(A)と「過剰処理された」ウェル(B)のエリスポットの典型的な結果を示す。示されるように、過剰処理によってスポット数は有意に減少

50

し、さらにそれらのスポットは明瞭さも比較的 low、そのため、計測がより困難である。影響はプレート内の別々のウェル間で大きく変化し、その結果、乏しい再現性および概して信頼性が低い結果をもたらす。過剰処理の問題を回避するために、エリスロット利用者のなかには予め活性化をせずに膜をコーティングすることを選択する人もいる。これは通常より良好な再現性を与えるが、感度が減少し、スポットの質は低下する(C)。

【0038】

エタノール処理による悪影響を制御するために、主要なエリスロットプレート製造業者であるミリポアから現在提供されているプロトコルでは、少量のエタノールまたはメタノール(96ウェルプレートで15µl/ウェル)を用いた非常に短い処理(1分未満)が必要となる。しかしながら、これらの条件は実際には採用が必ずしも容易ではなく、負の影響を回避するのに十分でないことがある。

10

【0039】

実施例1: 2工程および1工程の方法を用いた、エタノールおよび湿潤剤でのPVDF膜の処理
以下の実験において、2工程または1工程の方法のいずれかにより、エタノールおよび湿潤剤で96ウェルエリスロットプレートを処理した。

【0040】

2工程法では、70%エタノール(50µl/ウェルで2分間)を用いた従来の方法でプレートを活性化し、次に蒸留水で洗浄した。その後25~50µl/ウェルの湿潤剤を添加して、滅菌条件下でプレートを乾燥させた。

【0041】

1工程法では、プレートをエタノールと湿潤剤(0.2%トレハロース)との混合物に供した。50µlまたはそれ以上のこの混合物を各ウェルに添加し、その後滅菌条件下で乾燥させた。

20

【0042】

いくつかの異なる化合物を試験して所望の湿潤効果を達成した。これらはPBS(リン酸緩衝生理食塩水)および炭酸塩などの塩、ラクトース、グルコース、およびトレハロースなどの糖、ならびにタンパク質、グリセロール、およびアミノ酸のグリシンを含む。

【0043】

乾燥後、プレートを乾パックとともに容器に入れ、使用するまで室温で保存する。

【0044】

実験において対照として使用されるプレートは、市販のプレコートエリスロットプレート(Mabtech社、ストックホルム、スウェーデン)であり、本明細書中ではプレコート対照と呼ぶ。

30

【0045】

IFN- エリスロットアレイは、様々に処理された以下のプレート上で実施した。

【0046】

IFN- 試験エリスロットアッセイにおいて、2工程法は2%グリセロール(図2B)または2µgの無関係な抗体(図2C)を用いて行い、ならびに1工程法は50µlの70%エタノールと0.2%のトレハロースとの混合物を用いて行った。

【0047】

IFN- エリスロットアッセイ試験において、PBMC(10×10⁴/ウェル)をIFN- でコーティングされたプレートとともに、刺激抗原性ペプチド(CEFペプチドプール)の存在下でインキュベートした。インキュベーション後、細胞を除去し、上記のようにプレートを発色させて解析した。典型的な結果を図2に示す。

40

【0048】

図2Bおよび図2Cに例証されるように、2工程法を用いたいくつかのコーティングプロトコルでは、スポットの数および質の両方に関してプレコート対照(図2A)と同等の結果を生じた。例えば、グリセロールは明瞭なスポットを与え(図2B)、同様に無関係な抗体としてのタンパク質は良好な湿潤剤として機能した(図2C)。

【0049】

50

湿潤剤を70%エタノールをともに添加した場合、1工程法を用いても良好な結果が得られた。PBS中でエタノールとトレハロースとの混合物で処理したプレート（図2D）は、プレコートプレート（図2A）およびエタノールと予備湿潤剤を順次添加した場合のプレート（図2B）の両方を使用したものと非常に似た結果を示した。その良好な性能およびより簡便な方法のために、いくつかの実験において、様々なサイトカインを用いて1工程のプロトコルをさらに評価した。

【0050】

実施例2：1工程法を用いて処理したPVDF膜を用いたIL-10、IL-12、およびIL-13エリスポットアッセイ

非処理プレート（抗体コーティングの前に予め湿潤させない）、従来法によりエタノールで処理したプレート（抗体でのコーティング前に100 μ l/ウェルの70%のエタノールで2分間新たに予め湿潤させた）、および、モノクローナル抗体である抗IL-10（9D7）、抗IL-12（IL-12-1）、および抗IL-13（IL-13-1）15 μ g/ml⁻¹でそれぞれコーティングする前に、実施例1に記載の1工程法に従ってエタノールとトレハロースとの混合物で処理したプレートを用いてIL-10、IL-12、およびIL-13エリスポット試験アッセイを行った。

【0051】

IL-10、IL-12、およびIL-13アッセイにおいて、特異的刺激用のCEFペプチドプール0.1 μ g/ml、特異的刺激用のPPD（purified protein derivative）1 μ g/ml、またはポリクローン活性化用のPHA（フィトヘムアグルチニン）1 μ g/mlで刺激していない、もしくは刺激したプレート内でPBMC（125 \times 10³/ウェル）を一晩培養した。一晩のインキュベーション後、細胞を除去し、プレートをビオチン化二次抗体（12G8-ビオチン、IL-12-11-ビオチン、またはIL-13-11ビオチン）、その後SA-ALPで発色させた。ALP基質（BCIP/NBT）を10分間載せた。プレートを上記の通りに解析した。

【0052】

IL-10アッセイの結果を図3に示し、IL-12アッセイの結果を図4に示し、およびIL-13アッセイの結果を図5に示した。

【0053】

図3および図4に示されるように、様々な種類の活性化後にエリスポットでIL-10およびIL-12の生成を解析した場合、良好な結果が得られた。上述のとおり、エタノールでのプレートの過剰処理は一貫して不良な結果をもたらす（中央列）、前もっての活性化を行わない同様のコーティングでは、最適以下のスポット数、およびより拡散したスポットがもたらされた（最上列）。

【0054】

このことは、最適な結果を得るのに（他の多くのサイトカインのように1日間ではなく）2日間の刺激および細胞培養を要する、より低速の反応速度を有するサイトカインIL-13においてさらにより明らかであった。スポット数およびスポット強度の両方に関しては最適以下であったが、本方法で処理したプレートを使用した場合、PHA刺激を受けた培養では一晩のインキュベーション後にも明瞭な（IL-13の）反応が検出された（図5、列3）。しかしながらこれらのスポットは、その他の2つのプレートでは検出不可能か、またはかろうじて検出できるのみであった（図5、列1および2）。

【0055】

実施例3：処理表面上の抗体取り込み

無処理プレート、記載された方法で処理したプレート、および新たにエタノールで活性化したプレートとの間でのタンパク質の吸収能の変化を実証するために、15 μ g/mlの濃度のモノクローナル抗体1D1Kを用いて室温で3時間コーティングした。表1に示すように、従来の方から従ってコーティングしたウェルで最も結合が強く、これらのウェルにおいて得られる不良なエリスポットの結果（図1B）は、コーティングされた抗体の量の不足が原因でないことを示している。記載される方法に従って処理したウェルは、従来のコーティングを用いた場合と同等またはわずかに少ない量の抗体が結合したのに対し、非活性化膜への結合は実質的により少なかった。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 6 】

(表1) 予備活性化を行ったおよび予備活性化を行わないPVDF膜への抗体の結合 ELISAにおける非結合抗体の濃度分析により、結合抗体の量を間接的に測定した。もとの抗体溶液と比較することにより、結合割合を推定した。

エタノールで湿潤させたプレートに結合:	31.3 %
無処理プレートに結合:	11.1 %
本方法で処理したプレートに結合:	26.3 %

【 図面の簡単な説明 】

10

【 0 0 5 7 】

【図1】種々の従来のコーティング法を用いた、典型的なIFN- γ エリスポットの結果を示す。(A) 前処理した対照プレート、(B) 「過剰処理した」プレート、および(C) 非処理プレート。

【図2】種々のコーティング法を用いた、典型的なIFN- γ エリスポットの結果を示す。(A) プレコート対照プレート、(B) エタノールで湿潤させ、グリセロールとともに乾燥させたプレート、(C) エタノールで湿潤させ、タンパク質(2 μ gの無関係な抗体)とともに乾燥させたプレート、ならびに(D) エタノールとトレハロースとの混合物で処理し、乾燥させたプレート。抗原なしの対照ウェルにおいて、スポットの数は常に5未満であった。

20

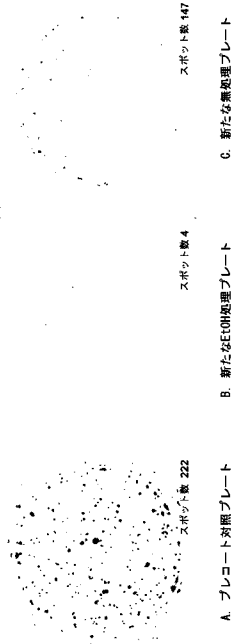
【図3】種々のコーティング法を用いた、典型的なIL-10エリスポットの結果を示す。(列1) 非処理プレート、(列2) エタノールで新たに予め湿潤させたプレート、および(列3) エタノールとトレハロースとの混合物で処理し乾燥させたプレート。抗原なしの対照ウェルにおけるスポット数は、各プレートにおいて5未満であった。各プレートにおけるスポット数は各図で示される(n=4)。

【図4】図4は、種々のコーティング法を用いたIL-12エリスポットの結果を示す。(列1) 非処理プレート、(列2) エタノールで新たに予め湿潤させたプレート、および(列3) エタノールとトレハロースとの混合物で処理し乾燥させたプレート。抗原なしの対照ウェルにおけるスポット数は、全てのプレートにおいて5未満であった。各プレートにおけるスポット数は各図で示される(n=4)。

30

【図5】図5は、種々のコーティング法を用いたIL-13エリスポットの結果を示す。(列1) 無処理プレート、(列2) エタノールで新たに予め湿潤させたプレート、および(列3) エタノールとトレハロースとの混合物で処理し乾燥させたプレート。各プレートにおけるスポット数は各図で示される(n=4)。

【 図 1 】

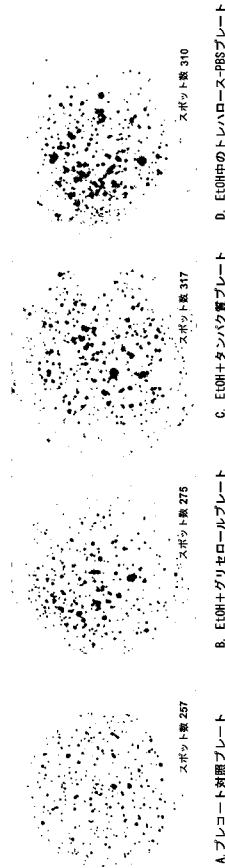


A. プレコート対照プレート
 スポット番号 222

B. 新たなE10H処理プレート
 スポット番号 4

C. 新たなE10H処理プレート
 スポット番号 147

【 図 2 】



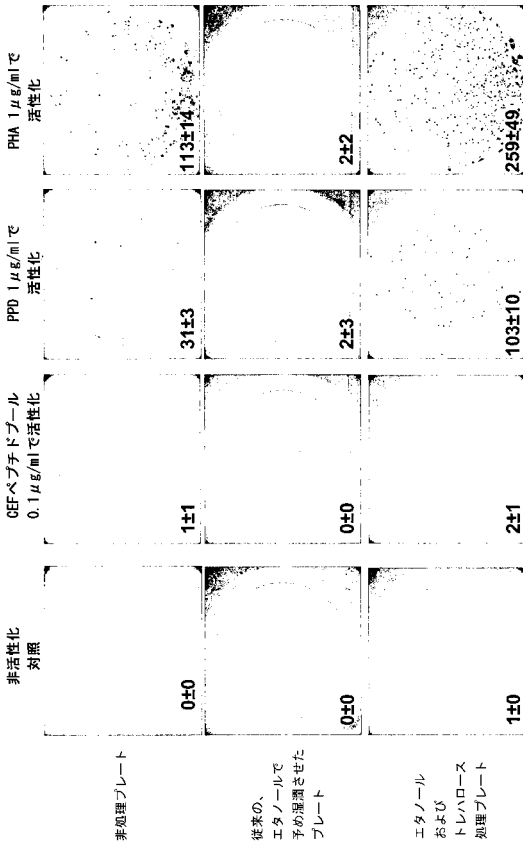
A. プレコート対照プレート
 スポット番号 257

B. E10H+グリセロールプレート
 スポット番号 275

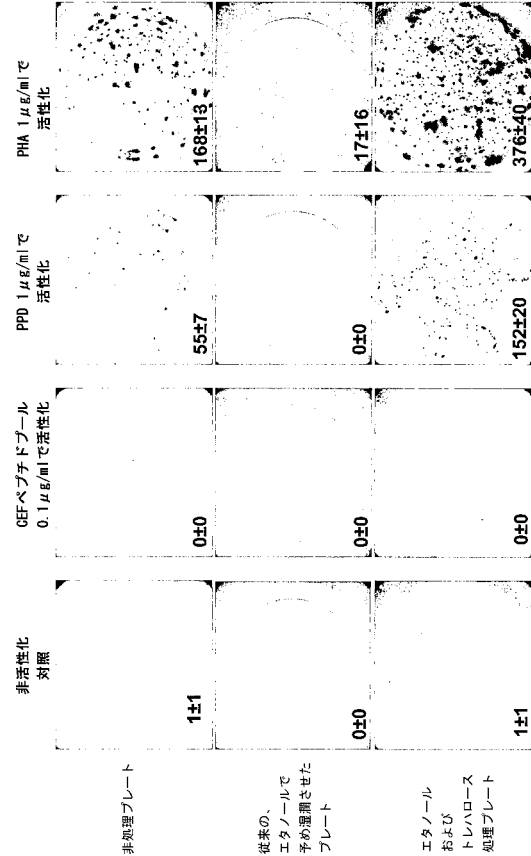
C. E10H+タンパク質プレート
 スポット番号 317

D. E10H中のトレハロース-PBSプレート
 スポット番号 310

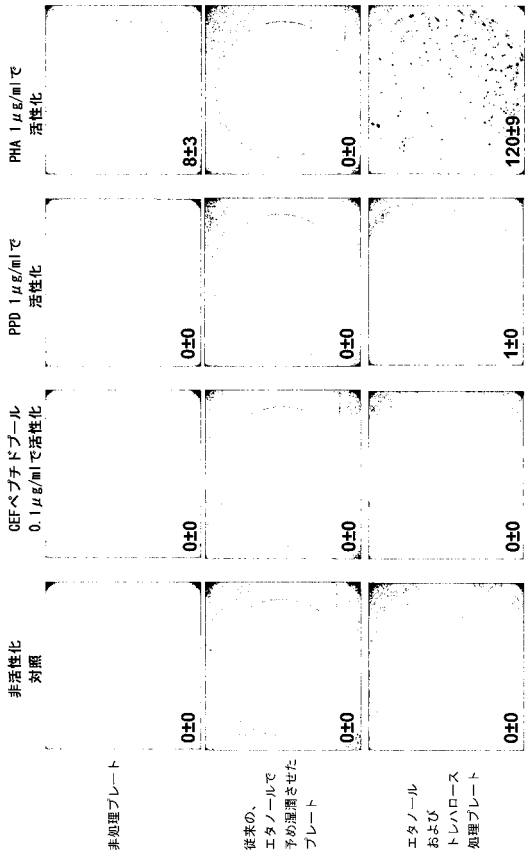
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/004356

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. GOIN33/543 B01D71/34 B01D67/00		
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) GOIN B01D		
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, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 827 650 A (BRONSTEIN ET AL) 27 October 1998 (1998-10-27) the whole document in particular col. 7, line 55 - col. 8, line 2; Examples	1,2,4, 9-11,13
X	WO 01/05492 A (BAXTER INTERNATIONAL INC) 25 January 2001 (2001-01-25) abstract page 3, line 2 - line 32 page 9, line 9 - page 10, line 8 page 11, line 3 - line 6	1,2,4,9
X	US 4 340 482 A (STERNBERG ET AL) 20 July 1982 (1982-07-20) abstract example 2	1,3-5,8
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the International filing date</p> <p>*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)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>*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</p> <p>*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</p> <p>*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.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the International search 31 July 2006		Date of mailing of the International search report 04/09/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Thumb, W

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/004356

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 353 460 A (MILLIPORE CORPORATION) 7 February 1990 (1990-02-07) abstract example 1	1,3,4,9, 10
X	CHABRAOUI F ET AL: "DOT-BLOT IMMUNODETECTION OF ANTIBODIES AGAINST G MI AND OTHER GANGLIOSIDES ON PVDF-P MEMBRANES" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 165, no. 2, 1993, pages 225-230, XPO02065880 ISSN: 0022-1759 page 226, column 2, line 6 - line 38	1,3-5, 9-11,13, 14
Y	DE 102 25 501 A1 (EPPENDORF AG) 24 December 2003 (2003-12-24) the whole document in particular paragraphs 8-13, 33, 34	6
Y	LIN YING ET AL: "Detection of multiple cytokines by protein arrays from cell lysate and tissue lysate." CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE, vol. 41, no. 2, February 2003 (2003-02), pages 139-145, XPO09070355 ISSN: 1434-6621 abstract page 140, column 1, paragraphs 2,3	1-14
Y	US 2004/214180 A1 (KOBAYASHI HIRONORI ET AL) 28 October 2004 (2004-10-28) paragraphs [0023] - [0026], [0041], [0042], [0071] - [0076], [0107], [0108]	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2006/004356

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5827650	A	27-10-1998	NONE
WO 0105492	A	25-01-2001	AU 5613700 A 05-02-2001 CN 1317987 A 17-10-2001 EP 1140334 A1 10-10-2001 JP 2003504190 T 04-02-2003
US 4340482	A	20-07-1982	NONE
EP 0353460	A	07-02-1990	JP 2045537 A 15-02-1990 JP 2796599 B2 10-09-1998 US 5011861 A 30-04-1991
DE 10225501	A1	24-12-2003	WO 03104809 A1 18-12-2003 EP 1512011 A1 09-03-2005 US 2006099642 A1 11-05-2006
US 2004214180	A1	28-10-2004	NONE

フロントページの続き

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

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(72)発明者 ブランシュ アンデルセン ステン

スウェーデン王国 ナッカ ストランド ボックス 1 2 3 3

专利名称(译)	PVDF膜		
公开(公告)号	JP2008541073A	公开(公告)日	2008-11-20
申请号	JP2008510489	申请日	2006-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	基于阿单抗技术		
申请(专利权)人(译)	安倍晋三Mabtech		
[标]发明人	ブランシュアンデルセンステン		
发明人	ブランシュ-アンデルセン ステン		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	B01D69/02 B01D67/0088 B01D71/34 B01D2323/02 B01D2325/36 G01N33/54393 Y10T428/3154		
FI分类号	G01N33/543.525.W G01N33/53.P G01N33/543.525.U		
代理人(译)	清水初衷 小林智彦 渡边真一 井上隆一		
优先权	2005009422 2005-05-09 GB		
其他公开文献	JP5199069B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供一种处理聚二氟乙烯 (PVDF) 膜的方法, 包括 (a) 使膜与醇和润湿剂接触, 和 (b) 干燥该膜。

【 図 3 】

