

(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2004-521336

(P2004-521336A)

(43) 公表日 平成16年7月15日(2004.7.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00	GO 1 N 33/53	N
A 6 1 P 37/00	GO 1 N 33/53	T
GO 1 N 33/543	A 6 1 K 45/00	
GO 1 N 33/577	A 6 1 P 37/00	
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-566309 (P2002-566309)	(71) 出願人	500116487 ヘスカ コーポレーション アメリカ合衆国 80525 コロラド州 フォート コリンズ プロスペクト パ ークウェイ 1613
(86) (22) 出願日	平成14年1月3日 (2002.1.3)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月26日 (2003.6.26)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/000324	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02002/066602	(72) 発明者	マックコール, キャサリン エイ. アメリカ合衆国 コロラド 80302, ボールダー, プレザント ストリート 709
(87) 国際公開日	平成14年8月29日 (2002.8.29)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/259, 450		
(32) 優先日	平成13年1月3日 (2001.1.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/325, 812		
(32) 優先日	平成13年9月28日 (2001.9.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 アレルゲン特異的 I g E の検出

(57) 【要約】

本発明は、擬似 I g E 媒介性アレルギー疾患を有する動物をスクリーニングするための、ポイント・オブ・ケア・デバイスおよび方法に関する。本発明は、簡単且つ迅速な、予備的な免疫学的検定評価を提供する。この予備的な免疫学的検定評価では、臨床上関連のあるアレルゲンの規定した混合物を用いて、サンプル中に存在するアレルゲン特異的 I g E を捕獲し、続いて二次結合試薬が I g E に選択的に結合する。本発明はさらに、I g E 媒介性疾患を有する動物に免疫療法処置を処方する方法を提供する。本発明の方法を実施するために有用なデバイスおよびキットもまた、提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物から採取されたサンプル中のアレルギー特異的 I g E を検出するためのデバイスであって、該デバイスは、以下：

(a) サンプル受容領域を有する多孔性部材を含む、第 1 の部材；および

(b) 支持部材、

を含み、ここで、該多孔性部材が、アレルギーの少なくとも 1 つの混合物、およびコントロールスポットによりスポットされる、デバイス。

【請求項 2】

前記アレルギーの混合物が、前記多孔性部材の 1 スポット上に置かれる、請求項 1 に記載のデバイス。 10

【請求項 3】

前記アレルギーの混合物が、前記多孔性部材の複数のスポット上に置かれる、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4】

前記アレルギーの混合物が、サンプル受容領域と分離された前記多孔性部材の 1 つの領域に置かれる、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 5】

前記動物が、イヌ、ネコ、ウマ、またはヒトである、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 6】

前記サンプルが動物から採取された体液である、請求項 1 に記載のデバイス。 20

【請求項 7】

前記体液が、全血またはそれらの構成成分、尿、あるいは粘膜の分泌物である、請求項 6 に記載のデバイス。

【請求項 8】

前記体液が、全血、血清、または血漿である、請求項 7 に記載のデバイス。

【請求項 9】

前記デバイスがさらに、多孔性の第 1 部材と毛細管連絡した吸収性部材を含み、ここで、該吸収性部材が、外的手段を使用しないで、第 1 部材中を通る液体の流れを誘導するように選択される、請求項 1 に記載のデバイス。 30

【請求項 10】

前記コントロールスポットが精製された I g E を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 11】

請求項 1 に記載のデバイスであって、ここで、前記アレルギーの混合物が、ネコアレルギー、イヌアレルギー、ノミ唾液タンパク質、チリダニアレルギー、スギ花粉、ブタクサアレルギー、ドクムギアレルギー、メドーフェスキュー、カモガヤ、ギョウギシバ、ヒメスイバ、ハウキギ、ロシアアザミ、イエロードック、オオアワガエリ、コヌカグサ、カバノキおよびイチゴツナギアレルギーからなる群より選択される 1 つ以上の型のアレルギーを含む、デバイス。

【請求項 12】

サンプル中のアレルギー特異的 I g E の存在を検出するための方法であって、該方法は以下の工程を包含する： 40

(a) 請求項 1 に記載のデバイスのサンプル受容領域に該サンプルを加え、これにより、アレルギー特異的 I g E が該サンプル中に存在する場合、多孔性部材上にスポットされる、アレルギーの混合物中の少なくとも 1 つのアレルギーが、アレルギー特異的 I g E に結合する工程；

(b) 該アレルギーの混合物をアレルギー特異的 I g E に選択的に結合する試薬と接触させる工程；および

(c) 結合したアレルギー特異的 I g E が該サンプル中に存在する場合、該結合したアレルギー特異的 I g E を検出する工程。 50

【請求項 13】

前記試薬が標識されている、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記標識された試薬が、抗 I g E 抗体または I g E レセプターである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記標識された試薬が、抗イヌ I g E モノクローナル抗体、抗ネコ I g E モノクローナル抗体、抗ウマ I g E モノクローナル抗体または抗ヒト I g E モノクローナル抗体である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記サンプルが動物から採取された体液である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 17】

前記体液が、全血またはそれらの構成成分、尿、あるいは粘膜の分泌物である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

アレルギー疾患を有する動物に免疫療法処置を処方するための方法であって、該方法は、以下の工程を包含する：

(a) 該動物からサンプルを採取する工程；

(c) 請求項 12 の方法に従ってサンプルを分析して、該サンプル中のアレルギー特異的 I g E の存在を検出する工程であって、ここで、アレルギー特異的 I g E の存在は、陽性サンプルとして該サンプルを同定する、工程；

(c) 陽性サンプルを分析して、該アレルギー疾患の原因である 1 つ以上のアレルギーを同定する工程；および

(d) 該動物のための適切な免疫療法を選択して、該アレルギー疾患を処置する工程。

【請求項 19】

インビトロの免疫アッセイまたは皮内検査が、前記陽性サンプルを分析するために使用される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

請求項 1 に記載のデバイス、および補助試薬を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、アレルギーまたはアトピー性疾患の徴候を示す動物をスクリーニングするためのポイント・オブ・ケア・テスト (point-of-care test) (POCT) デバイスおよび方法に関する。さらに詳細には、本発明の免疫学的デバイスおよび方法は、臨床上関連のあるアレルギーの規定した混合物を使用して、このような動物から採取されたサンプル中のアレルギー特異的 I g E を検出する。

【0002】

(発明の背景)

マスト細胞に結合するアレルギー特異的 I g E のアレルギーへの架橋は、I 型アレルギー疾患 (例えば、アトピー性皮膚炎およびアトピー性喘息) を誘導する。アレルギーおよびアトピーに関連する疾患は、人口のかなりの割合 (ヒトの 20% までを含む) が罹患しており、年々増加している。

【0003】

アレルギー関連疾患はヒトに限定されず、そして獣医業務においても同様に主要な問題であり得る。アレルギー/アトピーに類似した徴候を有する多くの他の疾患が存在し得る。従って、明確な診断は難しい。明確な診断は、詳細な病歴、臨床徴候の慎重な観察、ならびにインビトロおよびインビボの診断テストに依存している。

【0004】

免疫アッセイの手順は、種々のアレルギーの臨床的有意性のインビトロでの検出のための

10

20

30

40

50

感度の良い診断用ツールを提供している。これらの手順はアレルゲンと I g E 特異的検出試薬とを使用して、患者の血清中のアレルゲン特異的抗体を測定する。これらの過程は、特質上、アレルゲンと他の試薬の両方を伴う、インキュベーション時間を必要とする。そして、その結果として、時間がかかり得る。完了に至るまでに 24 時間を必要とするアッセイ手順は珍しくない。さらに、インキュベーション工程および正確に測った試薬での複数回の洗浄の時間を順守する必要性は、大きな病院および照会臨床検査室（ここで、高度な訓練を受けている職員および高性能な設備が、アッセイを実施するために利用可能である）に対し、これらの手順を大いに限定する。さらに、特定の割合のアトピー患者は、照会検査室で使用される標準的なアレルゲンパネル中に存在しないアレルゲンに対するアレルギーがある。これらの場合、詳細な検査は、悪化させているアレルゲンを明らかにすることができず、結果としてこれらの患者に不必要な医療費を負担させる。

10

【0005】

現在、医師または獣医師の職場で使用され得る、アレルゲン特異的 I g E に対する免疫アッセイを行うための単純且つ迅速な手順についての、まだ対処されていない要求が存在する。本発明は、この要求を満たし、そしてさらに関連する利点も提供する。

【0006】

（発明の要旨）

本発明は、動物（ヒト、イヌ、ネコ、およびウマが挙げられるが、これらに限定されない）におけるアレルギーの診断に役に立つ、迅速で簡単な検査を提供する。より詳細には、本発明の装置および方法は、サンプル中のアレルゲン特異的 I g E について、免疫学的な反応を用いてスクリーニングする。このようなサンプルは、I g E を含む動物の体液（例えば、尿、粘膜分泌物、乳、全血または、血漿、血清などを含むそれらの構成成分）から採取され得る。

20

【0007】

本発明のデバイスは、サンプル受容領域を有する、多孔性部材を含む第 1 部材（例えば、メンブレンまたはフィルター）を含む。この多孔性部材は、アレルゲンの少なくとも 1 つの混合物（1 スポットまたは複数のスポットにおいて）および少なくとも 1 つ以上のコントロールスポットによってスポットされ得る。コントロールスポットは、陽性コントロール（例えば、精製された I g E ）および / または手順のコントロール（例えば、ピオチン化されたウシ血清アルブミン（BSA））であり得る。このアレルゲンの混合物は、サンプル受容領域内または多孔性部材の別個の領域中のいずれかにスポットされ得る。

30

【0008】

このデバイスは、外的手段を使用しないで多孔性部材を通る液体の流れを誘導するために、多孔性の第 1 部材と毛細管連絡した吸収性部材を、必要に応じて含み得る。サンプルの静水圧およびそれに続く試薬が多孔性部材通る流れを誘導するのに不十分な場合、この吸収性部材は、多孔性部材を通る液体の流れを誘導するような毛細管の細孔サイズを有するように選択される。

【0009】

このデバイスはまた、第 1 の多孔性部材を支持または収容する支持部材を含む。この吸収性部材はまた、第 1 部材を支持する手段を備え得る。

40

【0010】

サンプル中のアレルゲン特異的 I g E の存在を検出するための方法は、本発明の単純なデバイスを使用し、そして、小容量で長期にわたるインキュベーション工程を必要としない。このような方法は、以下の工程によって達成される：

（a）本発明のデバイスのサンプル受容領域にサンプルを加える工程であって、それによって、アレルゲンがサンプル中に存在する場合、アレルゲンの混合物中の少なくとも 1 つのアレルゲンが、アレルゲン特異的 I g E に結合するデバイスの多孔性部材上にスポットされる；

（b）アレルゲンの混合物を、アレルゲン特異的 I g E に選択的に結合する試薬と接触させる工程；および

50

(c) 結合したアレルギー特異的 I g E をサンプル中に存在する場合に検出する工程。

【0011】

多孔性部材上にスポットするためのアレルギーの有用な混合物としては、以下から選択される1つ以上の型のアレルギーが挙げられ得るが、これらに限定されない：ネコアレルギー、イヌアレルギー、ノミ唾液タンパク質、チリダニ (house dust mite) アレルギー、貯蔵庫ダニ (storage dust mite) アレルギー、スギ花粉、ブタクサアレルギー、ドクムギアレルギー、メドーフェスキュー (meadow fescue)、カモガヤ (orchard grass)、ギョウギシバ (Bermuda grass)、ヒメスイバ、ホウキギ (Kochia)、ロシアアザミ (Russian thistle)、イエロードック (yellow dock)、オオアワガエリ (timothy grass)、コヌカグサ、カバノキおよびイチゴツナギ (blue grass) アレルギー。

【0012】

サンプル中のアレルギー特異的 I g E に選択的に結合する、有用な試薬は、例えば、抗 I g E 抗体または I g E レセプター、あるいはこのような分子のミメトープを含む。検出が可能ないように、このような試薬は検出可能なマーカーにより標識され得るか、または、試薬と結合、または試薬と会合する、検出可能なマーカーが別々に加えられ得る。

【0013】

従って、本発明は、医師または獣医師の職場で簡単且つ迅速に実施し得る、低コストのポイント・オブ・ケア (すなわち、医院または現場において) テストを提供する。本発明の方法およびデバイスにより入手可能な迅速な結果は、医師または獣医師が、さらなる診断作業および/または治療計画の必要性を、素早く判断することを可能にする。さらなる診断作業は、正確なアレルギー (このアレルギーに対して、動物が陽性であり、そして免疫療法が適切である) を決定する検査するための、中央診断検査室へのサンプルの提出も含み得る。

【0014】

従って、本発明はさらに、アレルギー疾患を有する動物の免疫療法処置を処方するための方法を提供する。手短かに言えば、この方法は、以下：

(a) 動物からサンプルを採取する工程；

(b) 本発明の方法に従ってサンプルを分析し、サンプル中のアレルギー特異的 I g E の存在を検出する工程であって、ここでアレルギー特異的 I g E の存在は、陽性コントロールとしてサンプルを同定する、工程；

(c) 陽性サンプルを分析してアレルギー疾患の原因である1つ以上のアレルギー同定する工程；および

(d) 適切な免疫療法を選択して、アレルギー疾患を処置する工程、
によって成し遂げられる。

【0015】

本発明はさらに、免疫アッセイを実施するための、抗 I g E 抗体を含む新規の試薬、デバイスおよび付属の試薬を含むキットを提供する。

【0016】

(発明の詳細な説明)

本発明は、一般にアレルギー特異的 I g E の迅速な検出のための P O C T デバイスおよび免疫アッセイ方法に関する。本発明のこのデバイスと方法は、動物におけるアレルギーの診断において予備的な補助として有用である。

【0017】

本発明の免疫アッセイ方法は、第1の多孔性部材および支持部材を含む P O C T デバイスを使用する。特に適切なデバイスとしては、以下のエレメントを含む：(1) 規定したアレルギーの混合物が1つ以上のスポットにスポットされ得る、多孔性の固体表面；(2) アッセイされるサンプルを加えるための、サンプル受容領域；(3) 多孔性の表面を通過して液体を引き出すための手段；および(4) 結果を表示するための領域。特定の実施形態

において、1つのエレメントは、1つ以上の他のエレメントの機能を果たし得る。例えば、サンプル受容領域は同じ領域、または、規定のアレルゲンの混合物がスポットされた領域とは異なる領域であり得る。

【0018】

この多孔性の第1部材は、アレルゲンの混合物が結合または固定され得る一方で、液体の流れが固定されたアレルゲンの混合物を通過させるのに十分な多孔性であり得る、任意の適切な材料から作製され得る。適切な材料としては、膜、フィルターなどが挙げられる。このような膜およびフィルターは、種々の材料から製造され得る。この種々の材料としては、例えば、プラスチック、ガラス、ゲル、セルロイド、紙、繊維、ポリスチレン、ナイロン、ニトロセルロース、アガロース、綿、およびPVD F (ポリビニリデンフッ化物) が挙げられるが、これらに限定されない。当業者に公知であるか、または以下の実施例で記載されるような任意の手段によって、このアレルゲンの混合物は多孔性部材上にスポット(すなわち、固定)され得る。

10

【0019】

1つ以上のコントロールはまた、免疫アッセイの適切な操作を確実にするために、多孔性部材上にスポットされ得る。好ましくは、このコントロールスポットは、デバイス上の領域にあり、アッセイ試薬と接触し、そして生じたI g E検出試薬の結合を示す役目をする薬剤を含む。陽性コントロールとして有用な薬剤としては、例えば、精製された、ポリクローナルまたはモノクローナルI g E、I g Eレセプター、あるいはそれらの活性フラグメント、抗I g E免疫グロブリン、抗I g G免疫グロブリン、プロテインA、上記分子のいずれかのミメトープ、または、I g E検出試薬の多孔性部材への結合を生じる任意の他の分子が挙げられる。本明細書中で使用される場合、用語「ミメトープ」とは、I g Eに結合する抗I g E抗体の能力を模倣し得る、任意の化合物をいう。ミメトープの1つの例は、分解に対する感受性を減少するが、なおもI g E検出試薬に結合する能力を維持するように改変されたペプチドであり得る。ミメトープの他の例としては、糖質ベースの化合物、脂質ベースの化合物、核酸ベースの化合物、天然の有機化合物、合成的に誘導した有機化合物、抗イディオタイプの抗体、および/または触媒作用抗体、あるいはそれらのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。ミメトープは、例えば、I g E検出試薬に結合し得る化合物に関する合成化合物のライブラリーをスクリーニングすることにより入手し得る。当業者に公知の、手順のコントロール(例えば、ビオチン化B S Aを含む)はまた、多孔性部材上にスポットされ得る。この多孔性の第1部材はさらに、サンプル受容領域も含む。既に記述されているように、このサンプル受容領域は、アレルゲンの混合物が、スポットされるのと同じ領域であり得るか、または、所望の形式に依存する多孔性部材上の異なる位置であり得る。プレフィルターは、必要に応じてサンプルに使用され得る。このプレフィルターは、サンプル受容領域に濾過サンプル(例えば、血清を採取するための全血を含む)を導入する前に好ましく濾過される。このようなサンプルは、プレフィルターデバイス中の本発明のデバイスから別々に濾過され得るか、または、プレフィルターデバイスがサンプル受容領域上に位置付けられ得、そして所望される場合、サンプルが予備濾過された後にプレフィルターが除去または処分され得る。

20

30

【0020】

本発明のこのデバイスは、必要に応じて、液体が吸収性部材を横切ることを可能にする多孔性部材に接続された毛細管経路を有する吸収性部材を含む。従って、この吸収性部材は、多孔性部材と毛細管連絡しており、そして、外部手段を使用することなく第1の多孔性部材を通る液体の流れを誘導する大きさの毛細管の管孔を有する。この吸収性部材は、アッセイで使用されるサンプルとそれに続く試薬の静水圧がその第一部材を通る流れを誘導するに不十分である場合に、特に有用である。さらに、その吸収性部材はまた、第一部材の支持を提供し得る。

40

【0021】

当業者は、吸収性部材および他の支持部材として有用な、適切な材料を容易に識別し得る。従って、本発明のこのデバイスは、当業者に公知の任意の標準的形式であり得、例えば

50

、ラテラルフローデバイス（米国特許第5,073,484号または米国特許第5,654,162号に記載されている（これらの両方は、本明細書中で参考として援用される））、フロースルーデバイス（米国特許第4,727,019号に記載されている（本明細書中で参考として援用される））、または当業者に容易に認識または決定されるこのようなデバイスの任意の改変物が挙げられる。

【0022】

動物から採取されたサンプル中でのアレルゲン特異的IgEの存在を検出するための本発明の方法は、一般に、上記のデバイスのサンプル受容領域にサンプルを最初に加えることにより達成される。サンプルがテストスポット（ここでアレルゲンの混合物が多孔性部材上にスポットされる）と接触した後、アレルゲン特異的IgEに選択的に結合する試薬が加えられ、そしてテストスポットと接触し得る。次いで、サンプル中に結合したアレルゲン特異的IgEが存在する場合、検出される。

10

【0023】

本明細書中で使用される場合、用語「動物」とは、検出可能な量のアレルゲン特異的IgEの存在により引き起こされるアレルギー疾患を有し得る任意の哺乳動物をいう。このような動物としては、好ましくは、ヒト、イヌ、ネコ、およびウマが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中で使用される場合、ネコは、飼い（domestic）ネコ、野生のネコ、および動物園のネコを含む、ネコのファミリーの任意のメンバーをいう（すなわち、ネコ科（Felidae））。ネコの例としては、飼いネコ、ライオン、トラ、ヒョウ（leopard）、ヒョウ（panther）、クーガー、ボブキャット、オオヤマネコ、ジャガー、チーター、およびサーバルキャットが挙げられるが、これらに限定されない。テストするための好ましいネコは、飼いネコ（家ネコ）である。本明細書中で使用される場合、イヌは、イヌ科（Canidae）のファミリーの任意のメンバーをいい、飼いイヌ、野生のイヌ、キツネ、オオカミ、ジャッカル、およびコヨーテ、ならびにイヌ科のファミリーの他のメンバーが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中で使用される場合、ウマは、ウマ科の動物をいう。ウマ科の動物は有蹄類の哺乳動物であり、家畜の（domestic）ウマおよび野生の馬（例えば、ウマ、ロバ（assess）、ロバ（donkey）、およびシマウマ）が挙げられるが、これらに限定されない。テストするための好ましいウマは、競走馬を含む家畜のウマである。

20

【0024】

アッセイされるサンプルは、このような動物の体液から採取され得る。アレルゲン特異的IgEを含む任意の体液が使用され得、例えば、尿、粘膜の分泌物、乳、全血、またはその構成成分（例えば、血清および血漿）が挙げられる。体液のさらなる例は、米国特許第6,309,832号（本明細書で参考として援用される）中で見出され得る。体液はサンプルとして希釈されずに使用され得るか、またはサンプル受容領域にサンプルをアプラインする前に適切な希釈剤中で所望されるように希釈され得る。当業者は、特定のアッセイに使用されるべき適切なサンプルを容易に決定し得る。

30

【0025】

多孔性部材上に置かれた規定されたアレルゲンの混合物中で選択されるアレルゲンは、最少数のスポット（好ましくは1つのスポット）が、IgE媒介性アレルギー疾患を有する大部分の患者を同定するように、選択される。好ましくは、規定されたアレルゲンの混合物は、IgE媒介性アレルギー疾患を有する患者の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%および100%を同定し得る。当業者は、関連する集団の所望の割合を同定し得る、規定されたアレルゲンの混合物を容易に決定し得る。例えば、所望の標的がIgE媒介性アレルギー疾患を有する全ヒト患者の90%である場合、当業者は、ヒトにおける全IgE媒介性アレルギーの90%を引き起こすことが集合的に公知であるアレルゲンの混合物を選択する。理想としては、アレルゲンの混合物は、最少数のアレルゲンが最大数の患者の同定を可能にするように選択される。本発明の種々の実施形態は、テストされるべき患者集団に基づいてアレルゲンの異なる混合物を有し得る。

40

50

【0026】

アレルギーは、抽出物、抽出物または原料（例えば、ダニもしくは花粉）より精製されたアレルギータンパク質、組換えアレルギー、あるいは上記のそれらの組み合わせの形態であり得る。規定された混合物中における使用に適したアレルギーの非限定的な例として、ネコアレルギー（米国特許第5,328,991号；同第6,019,972号；同第6,048,962号；および同第6,120,769号）；イヌアレルギー（米国特許第5,843,672号）；ノミ唾液タンパク質（米国特許第5,646,115号；同第5,795,862号；および同第5,840,695号）；チリダニアレルギー（米国特許第5,433,948号；同第5,552,142号；同第5,770,202号；同第5,773,002号；同第5,820,862号；同第5,986,526号；同第5,972,352号；同第6,060,057号；同第6,071,522号；同第6,077,518号；同第6,086,897号；同第6,132,734号；および同第6,077,517号）；日本スギ花粉（米国特許第6,090,386号）；ヒメモロコシアレルギー（米国特許第5,480,972号；同第5,691,167号；および同第5,736,149号）；ブタクサアレルギー（米国特許第5,698,204号）；ドクムギアレルギー（米国特許第5,710,126号；同第5,840,316号；および同第5,965,455号）；メドーフェスキュー、カモガヤ、ギョウギシバ、ヒメスイバ、ハウキギ、ロシアアザミ、イエロードック、オオアワガエリ、コヌカグサ、およびイチゴツナギのアレルギーが、挙げられる。さらなるアレルギーを、米国特許第6,309,832号に見出し得る。上記の米国特許は、本明細書によって参考として援用される。

10

20

【0027】

本発明の方法において、全てのアレルギー特異的IgEと混合物中のアレルギーのうちの一つ以上に結合可能にするために、スポットされたアレルギーの混合物にサンプルが接触した後、次いでアレルギー特異的IgEに選択的に結合する試薬を添加し、そしてその試薬を、どの結合したアレルギー特異的IgEに対しても結合可能にする。語句「二次結合試薬」とは、「アレルギー特異的IgEに選択的に結合する試薬」と互換可能に使用される。この二次結合試薬に結合したアレルギー特異的IgEの検出は、サンプル中のアレルギー特異的IgEの存在を示す。

【0028】

本明細書中で使用される場合、語句「アレルギー特異的IgEに選択的に結合する」試薬とは、免疫アッセイの結果に実質的に影響する量では、その二次結合試薬がIgGまたは別クラスの免疫グロブリンに結合しないように、その試薬が、IgGまたは別クラスの免疫グロブリンと比較して優先的にIgEに結合することを意味する。例えば、適切な二次結合剤が、IgGより有意に大きな程度IgEに結合する（IgEに対して実質的により高い親和性を有する）。より好ましい実施形態において、この二次結合剤は、ヒトIgEレセプター鎖タンパク質により提示される特異性と同程度の特異性で、IgEに結合する。別の実施形態において、その二次結合剤は、既知の抗IgE抗体がIgEに結合する条件下では、IgGに結合不可能である。本発明の結合剤による免疫グロブリンの結合は、当業者に公知の手順（例えば、本明細書中に記載されるELISA手順）を使用して測定され得る。特に好ましい実施形態において、その二次結合剤は、ELISAにより測定した場合、300、250、225、200、175、150、125、または100未満の吸光度値でIgGに結合する。適切な結合剤を選択する手引きは、以下の実施例において提供される。

30

40

【0029】

この二次結合試薬は、IgE、Fcレセプター1（FcR1）（本明細書中で参考として援用される、米国特許第5,945,294号に記載される）、IgE結合性アレルギー、またはIgEに選択的に結合する任意の分子に、選択的に結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。そのような抗体の一例は、肥満細胞および好塩基球に結合する抗体のみを認識する抗IgE抗体である。本発明の好ましい抗体は、本

50

明細書中に記載されるように、ヒトFcRI親和性精製されたIgEを使用して生成される、mAbの特徴を有する。

【0030】

好ましい実施形態において、その二次結合試薬は、IgEレセプター結合領域またはIgEレセプター結合ドメインに選択的に結合する、モノクローナル抗体である。そのような抗体の非制限的な例としては、例えば、モノクローナル抗体であるH-219、H-195、H-202、H-203、およびH-207が挙げられる。種特異的抗体および種特異的レセプターは、その種より採取されたサンプル中のアレルゲン特異的IgEを検出するために、特に有用である。例えば、イヌ抗IgE抗体は、イヌより採取したサンプル中のアレルゲン特異的IgEを検出するためのアッセイにおいて、二次結合試薬として有用である。

10

【0031】

好ましい実施形態において、その二次結合試薬は、イヌ(Canine)IgEに選択的に結合するモノクローナル抗体である。そのような抗体の非制限的な例としては、例えば、モノクローナル抗体であるH-219、H-220、H-189、H-190、H-195、H-197、H-200、H-202、H-203、H-206、およびH-207が挙げられる。別の好ましい実施形態において、その二次結合試薬は、ネコ(Feline)IgEに選択的に結合するモノクローナル抗体である。そのような抗体の非制限的な例としては、例えば、モノクローナル抗体であるH-99、H-100、H-101、H-102、H-106が挙げられる。別の好ましい実施形態において、その二次結合試薬は、イヌIgEおよびネコIgE両者に結合するモノクローナル抗体である。そのような抗体の非制限的な例としては、例えば、モノクローナル抗体であるH-201、H-192、H-198、H-199、H-208が挙げられる。別の好ましい実施形態において、その二次結合試薬は、ウマIgEに選択的に結合するモノクローナル抗体である。そのような抗体の非制限的な例としては、例えば、モノクローナル抗体のH-357が挙げられる。

20

【0032】

さらなる好ましい実施形態において、その二次結合試薬はIgEレセプターである。語句「IgEレセプター」とは、全長のレセプター、およびその活性フラグメントが挙げられる。本明細書中で使用される場合、語句「その活性フラグメント」とは、規定された混合物中に含まれるアレルゲンによって捕捉されるアレルゲン特異的IgEに対して結合可能な結合部位を有する、全長のレセプター中のフラグメントを意味する。

30

【0033】

一つの実施形態において、その二次結合試薬は、指示薬剤と直接的に結合され得るか、または指示薬剤で標識され得る。別の実施形態において、その二次結合試薬に結合可能または会合可能な指示薬剤は、別々に添加され得、そして検出され得る。当業者は、本発明における使用に適切な検出手段を、容易に同定し得る。

【0034】

酵素、蛍光分子、放射性標識、または当業者に公知である他の検出可能なマーカのよう、任意の指示試薬または検出試薬が、使用され得る。酵素は、指示薬剤として特に有用である。標識が酵素である場合、結合していないレセプターを除去するための洗浄の後、酵素基質の溶液が添加される。そのデバイスが酵素に結合されたアレルゲン特異的IgEを有する場合、そのIgEは、酵素に結合された、標識されたレセプターの一部を有する。その酵素は、基質を反応させ、そして適切に選択される場合、新規且つ容易に検出可能な酵素反応最終生成物を生じる。特に有用な最終生成物は、可視性の色の変化を生じる発色団である。酵素以外の標識が使用される場合、その手順は変わり得る。蛍光性標識が使用される場合、多孔性部材上の蛍光が、公知の方法により検出され得る。放射性核種標識(例えば、 ^{125}I)が使用される場合、多孔性部材は取り外され得、そして計数され得る。

40

【0035】

50

サンプル、二次結合試薬および所望される任意の洗浄緩衝液の添加の前に、アッセイの感度を増強させるために、サンプル中のアレルゲン特異的 I g E のより広範な結合を可能にするための、短いインキュベーション期間が行われ得る。しかし、本発明の好ましい方法において、そのようなインキュベーション工程は、不必要であるか、または非常に短い（すなわち、概して 60 秒以下程度）。サンプルまたは二次結合試薬を含む溶液の流れは、流れの非存在下において観察されるよりも、実質的に速い結合速度を生じる。従って、試験の実施に要する合計時間は、約 5 分以下であり、好ましくは、約 3 分未満である。

【 0 0 3 6 】

本発明はまた、I g E 媒介性のアレルギー性疾患を有する動物において、免疫治療処置を処方する方法を提供する。そのような方法は、アレルギー性疾患の症状を有する動物よりサンプルを採取する工程、アレルゲン特異的 I g E の存在を検出するために、上記の免疫アッセイ方法に従いそのサンプルを分析する工程を包含する。アレルゲン特異的 I g E がそのサンプル中で検出される場合、その後陽性サンプルがアレルギー性疾患の原因である 1 つ以上のアレルゲンを同定するためにさらに分析され、そして次いで適切な免疫治療がその動物に対して選択される。そのアレルギー性疾患の原因である特定のアレルゲンを同定するための、陽性サンプルのさらなる分析は、当業者に公知の任意の手段（例えば、基準研究機関において実施されるインビトロ免疫アッセイ、または皮内試験（例えば、従来皮膚試験）を含む）により実施され得る。一旦、その特定のアレルゲンが同定されると、当該分野における熟達した診断医は、特定の患者に対して適切な免疫治療法を決定し得る。

10

20

【 0 0 3 7 】

本発明の方法を実施するためのキットもまた提供される。本発明のキットは、本発明のデバイスに加え、本発明の方法において使用される試薬を含む。そのような試薬は、洗浄緩衝液および検出試薬を含む。本発明の好ましい検出試薬としては、イヌ I g E に特異的に結合するモノクローナル抗体、ネコ I g E に特異的に結合するモノクローナル抗体、ウマ I g E に特異的に結合するモノクローナル抗体、およびヒト I g E に特異的に結合するモノクローナル抗体が挙げられる。

【 0 0 3 8 】

以下の実施例は、例示を目的として提供され、そして本発明の範囲を制限することを意図するものではない。

30

【 0 0 3 9 】**（実施例 1）**

本実施例は、スクリーニングのためのアレルゲンを選択する方法、およびそのデバイスを調製した方法を記載する。

【 0 0 4 0 】

本発明の方法は、注意深く規定されたアレルゲン混合物を用意して使用する。その混合物を、最小アレルゲンのパネルを用いて殆どのアレルギー個体を同定するために選択した。

【 0 0 4 1 】

譲渡人の米国診断研究機関からのデータを、多くのイヌがアレルギー性であるアレルゲンを同定するために分析した。ポイント・オブ・ケア・テストを、その診断研究機関で、完全なパネルの中で陽性結果を与える動物の 70% ~ 90% を検出し、一方でそのポイント・オブ・ケア・テストにおいてアレルゲンの総数を少なく保つように、設計した。

40

【 0 0 4 2 】

総数 2000 個を超えるサンプルを、いくつかの異なる組で分析した。そのサンプルを、アレルゲンの完全なパネルの中で試験し、そして約 80% がパネル中の少なくとも 1 つのアレルゲンに対して陽性であると評価を得た。（完全なパネルに対して陰性と評価を得た動物は、パネル中にはないアレルゲンに対してアレルギー性である動物であり得るか、または全くアレルギー性ではないが、むしろアレルギーに類似した症状を有する別の疾患を有し得る）。

【 0 0 4 3 】

50

それら 80%のうち、約 60%は、ノミまたはチリダニのどちらかに陽性である。動物のさらに 15%を加えるために、他の重要なアレルゲンが加えられ得る。候補の追加されるアレルゲンは、メドーフェスキュー、カモガヤ、アカスギ、イエロードック、オオアワガエリ、コヌカグサ、およびイチゴツナギである。異なるアレルゲンの組は、異なる地理的範囲および/もしくは異なる気候において、ならびに/または、異なる動物に対して(上記データはイヌに対してである)、所望され得る。所望されるアレルゲンの組を、標準または基準の研究機関の試験において検出される、アレルゲン特異的 I g E の分析により、再度測定する。

【0044】

他の領域からのデータを、類似の手順で分析した。800個近くのイヌ(dog)血清を、屋内アレルゲンに対する抗体について分析した。チリダニは、最も普通のアレルゲンであり、そして貯蔵庫ダニおよびノミ唾液がそれに続く。チリダニ、貯蔵庫ダニおよびノミ唾液を用いるポイント・オブ・ケア・デバイスは、屋内パネル中で陽性である動物の98%を検出し得た。

10

【0045】

500個を超えるイヌ血清を、英国の一般的な花粉について分析した；そのイヌの72%が、カモガヤに対して陽性であった。その次の最も有力な花粉アレルゲンは、ハンの木、ヘラオオパコ、シロザ、およびヒメスイバであった。チリダニ、貯蔵庫ダニ、およびカモガヤまたは近縁の草本に由来するアレルゲンを用いるポイント・オブ・ケア・デバイスは、完全なパネル中で陽性である動物の91%を検出し得た。

20

【0046】

約30個のイヌ血清を、中央ヨーロッパパネルについて分析した；そのイヌの100%がチリダニまたは貯蔵庫ダニに対して陽性であった。チリダニおよび貯蔵庫ダニを用いるポイント・オブ・ケア・デバイスは、完全なパネル中にて、陽性である動物の100%を検出し得た。

【0047】

約56個のイヌ血清を、北部ヨーロッパパネルについて分析した；そのイヌの65%が、チリダニに対して陽性であった。その次の最も有力な花粉アレルゲンは、貯蔵庫ダニであり、コヌカグサおよびシラゲガヤがそれに続いた。チリダニおよび貯蔵庫ダニを用いるポイント・オブ・ケア・デバイスは、完全なパネル中にて、陽性である動物の98%を検出し得た。

30

【0048】

約122個のイヌ血清を、英国拡張花粉について分析した；そのイヌの58%が、メドーフェスキューに対して陽性であった。その次の最も有力な花粉アレルゲンは、アメリカオオモミであった。メドーフェスキューを用いるポイント・オブ・ケア・デバイスは、完全なパネル中にて、陽性である動物の58%を検出し得た。

【0049】

約104個のイヌ血清を、地中海地方パネルについて分析した；そのイヌの59%がチリダニに対して陽性であった。その次の最も有力なアレルゲンは、貯蔵庫ダニおよびノミ唾液であった。チリダニ、貯蔵庫ダニおよびノミ唾液を用いるポイント・オブ・ケア・デバイスは、完全なパネル中にて、陽性である動物の97%を検出し得た。

40

【0050】

本発明のデバイスおよび方法で使用するための正確なアレルゲンを決定するために、そのようなアレルゲンをポイント・オブ・ケア様式にて評価し、単離されたサンプルとしてよりもむしろ混合物としてアレルゲンが存在する場合に、その血清がなお陽性という評価を得ることを決定することもまた必要である。

【0051】

本発明の1つの実施形態において、ポイント・オブ・ケア・デバイスは、メドーフェスキューアレルゲン、チリダニ(dust mite)アレルゲン、およびノミ唾液アレルゲンを含む、1つのアレルゲン混合物を多孔性部材にスポットすることにより調製する。こ

50

れらアレルゲンの各々は、粗抽出物、精製された抽出物、および/または、遺伝子操作され組換え発現された純粋なタンパク質として、存在し得る。そのアレルゲン抽出物または組換えタンパク質を、特定のアレルゲンに依存して、約1,000~500,000 PNU/ml; または10 µg/ml ~ 10 mg/mlで、多孔性部材上にスポットする。試験に必要とされる抽出物の濃度は、実験的に決定されなければならないが、同じアレルゲンまたは同じ抽出物を用いたELISA様式において使用された濃度と同じ濃度で、開始し得る。そのアレルゲンを、BSAを含まないスポット緩衝液 (TRIS 6.05 g/l; NaCl 8.5 g/l; NaN₃ 20 mg/l; およびシヨ糖 10 g/l) を用いて、多孔性部材上にスポットする。

【0052】

10

イヌIgEのスポットを、陽性コントロールとして異なる位置に加える。これを、BSAを含むスポット緩衝液 (TRIS 6.05 g/l; NaCl 8.5 g/l; NaN₃ 20 mg/l; シヨ糖 10 g/l; およびBSA 1 g/l) 中で、1 µg/ml ~ 10 mg/ml、好ましくは約5 ~ 10 µg/mlの濃度でスポットする。

【0053】

本発明の別の実施形態において、イヌIgEのコントロールスポットに加えて、デバイス上に2つの試験スポットが存在し、1つはメドーフェスキューおよびチリダニを含み、そしてもう1つはノミ唾液タンパク質を含む。

【0054】

20

(実施例2)

本実施例は、本質的にKohlerおよびMilstein (KohlerおよびMilstein、(1975)、Nature 256:495-497) (本明細書中で参考として援用される)の方法による、マウス抗イヌIgEモノクローナル抗体 (mAb) の生成を記載する。

【0055】

イヌIgEを、イヌ血清をプールし、硫酸沈殿により分画することにより、調製した。30~55%飽和からの画分を収集し、そしてプロテインGカラムを通過させた。フロースルー画分を、rHuman IgE Receptor Affiprep (Biorad) カラムに適用した。保持されたIgEを高pH溶出液を用いてカラムより回収した。複緩衝液交換カラムは、IgEをさらに精製した。pH5.7~4.95で溶出する画分をプールした。

30

【0056】

二匹のBalb/cマウスを、リン酸緩衝化サリン (PBS) 中に懸濁した30 µgのイヌIgEおよびフロイント完全アジュバントを用いて、足趾に免疫した。14日目に、30 µgのイヌIgEのブーストを、PBS/フロイント不完全アジュバント中で、足趾に投与した。21日目に、抗イヌIgE抗体の存在について、血清を試験した。ELISAによりイヌIgEに対して最も高い力価を示すマウスを、42日目にPBS中の5 µgのイヌIgEを静脈内にブーストした。3日後に脾臓細胞を収集し、そしてPEGを用いて、対数増殖期中期のマウスSP2/0ミエローマ細胞と融合させた。

【0057】

40

細胞を、20%ウシ胎仔血清、10%胸腺馴化培地、2 mM L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウム、および60 µMのβ-メルカプトエタノールを含むRPMI培地中で、培養した。ハイブリッドを、100 µMのヒポキサンチン、10 µMのチミジン、および0.4 µMのアミノプテリンを添加することにより、選択した。ハイブリドーマのコロニーを含むウェルを、ELISAによりイヌIgE、イヌIgG、およびイヌIgMに対する特異的なmAb生産物について試験した。抗原を5 ng/ウェルでコートした。イヌIgEに対して陽性のウェルを増殖させ、そして安定なmAb分泌細胞が同定されるまで、限界希釈により希釈クローン化した。

【0058】

モノクローナル抗体は、組織培養物上清、腹水、またはバイオリアクター上清のいずれか

50

として、粗製形態で提供される。特異的 m A b を、これらの液体型のいずれかから、親和性クロマトグラフィーまたはイオン交換クロマトグラフィーを使用して精製し得る。

【0059】

E L I S A により、イヌ I g E 鎖に反応性の 20 種の抗体を、作製した。全ての m A b は、E L I S A によって、イヌ I g E を認識し、そしてイヌ I g G も I g M も認識しない。これらのうち、3 種 (H - 198、H - 199 および H - 206) を除いた 15 種が、ウエスタンブロットにより、71 k D a の鎖を認識する。そして 2 種 (H - 192 および H - 204) が、さらに試験されるべきである。イヌ I g E を探索するためにこれらの m A b を使用して、3 種のウエスタンブロットのパターンが見られた；1 つの m A b の組 (H - 195、H - 197、および H - 208) は、イヌ I g E の 71 k D a 鎖のみを認識する；第 2 の m A b の組 (H - 189、H - 190、H - 191、H - 193、H - 203、H - 207、H - 219、および H - 220) は、イヌ I g E の 71 k D a 鎖、および色素の先端のちょうど上に泳動するバンド (約 6 k D a に) を認識する；第 3 の m A b の組 (H - 200、H - 201、H - 202、および H - 205) は、イヌ I g E の 71 k D a 鎖、および 55 k D a にある広く拡散したバンドを認識する。この第 3 の m A b の組は、イヌ I g G 鎖を認識せず、このことは、余分なバンドがイヌ I g G の混入物ではないことを示唆する。この興味深い結合ドメインは、イヌ I g E 鎖といくらか関係を有するようである。1 つの m A b (H - 204) を除いた全てを評価した。そしてこれら m A b のうち 5 つ (H - 191、H - 192、H - 198、H - 199、および H - 208) が、E L I S A によって、イヌ I g E よりもずっとよくネコ I g E を認識し、そしていくつかの場合では、イヌ I g E との反応性が全く検出できなかった。1 つの m A b (H - 201) は、イヌ I g E と同程度によくネコ I g E を認識した。

10

20

【0060】

抗体を、E L I S A の反応性パターンに基づいて、9 つのカテゴリーにグループ化した。各々のグループ由来の最も高い力価の m A b を精製し、そしてイヌ I g E 検出 P O C T 候補 (H - 189、H - 199、H - 200、H - 201、H - 204、H - 205、H - 206、H - 207、および H - 208) としてスクリーニングした。これらの m A b より、H - 200、H - 201 および H - 207 を選択した。これら 3 つの m A b を用いたさらなる試験は、H - 207 が、P O C T において利用されるために好ましい m A b であることを示した。

30

【0061】

上に述べた抗体を、イヌ血清、P B M C または血液でさえ有り得るような、複雑なサンプル中にて存在するイヌ I g E の様々なレベルを検出するために、様々なアッセイ形態にて利用し得る。これらの抗体は、総血清 I g E を計算するために、ヒト F c R I と組み合わせうまく機能する。適切な標準物を用いて、イヌ I g E レベルを容易に測定し得、そして免疫刺激、アレルゲン曝露などの様々な場に対して、比較し得る。抗イヌ I g E m A b のさらなる用途として、親和性クロマトグラフィー方法によるイヌ I g E の精製および / またはイヌ I g E 免疫複合体の精製を簡略化する用途が挙げられる。鎖特異的な m A b の使用は、従来クロマトグラフィー方法と比較した場合、血清のようなサンプル供給源からイヌ I g E を簡単に、そしてより直ちに除去する。他の使用としては、精製工程中のインタクトなイヌ I g E 鎖の分離をモニターすることが挙げられる。細胞表面 I g E を位置付け、精製プロセスの間にインタクトなイヌ I g E 鎖を確認するためにこれらの抗体を使用することにより、フローサイトメトリー研究を実施し得る。細胞表面の I g E を位置付けて、そして F c R I ベースの結果の妥当性を確認するために、これら抗体を使用して、フローサイトメトリー研究を実施し得る。さらに、抗イヌ鎖 m A b を、アレルギー性イヌに対する免疫治療のために使用し得る。

40

【0062】

マウス抗ネコ I g E m A b、マウス抗ウマ I g E m A b、およびマウス抗ヒト I g E m A b とは、上記と同じ方法にて作製する。その m A b をまた、上に記載した使用のためのモノクローナル抗体を調製するための標準的な方法によって、マウス以外の動物で調製し得

50

る。

【0063】

(実施例3)

本実施例は、抗イヌIgEモノクローナル抗体が、以下のプロトコールを使用して固相ELISAによって測定されるように、抗原特異的なイヌIgEまたはネコIgEに結合する能力を開示する：

マイクロタイタープレートのウェルを、CBC緩衝液(50mM炭酸、pH9.6)に希釈した、Der Fタンパク質(30タンパク質室素単位(PNU/ウェル))(Center Labs, Port Washington, N.Y.)、ノミ唾液抗原(FSA)(100ng/ウェル)(米国特許第5,646,115号に記載されるように調製した)またはイヌIgG(1μg/ウェル)(Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA)のいずれかでコートし、そのプレートを、4で、一晚保存し、カバーした(IgGでコートされたウェルは、非特異的イムノグロブリン結合のレベルを測定するために供する)。次の日、過剰の流体を、ウェルから除去し、そのウェルを水気をとって乾燥し、そして200μlのアッセイ緩衝液(0.05%のTween-20を含むPBS中の4%ウシ胎仔血清)を各々のウェルに添加した。室温(RT)での60分のインキュベーションの後、そのウェルを、洗浄緩衝液(0.05%のTween-20を含むPBS)を用いて4回洗浄し、そして各々のウェルに100μlのイヌ血清またはネコ血清(アッセイ緩衝液に1:20に希釈した)を添加した。いくつかのウェルに、使用前に56で1時間加熱した血清(標識された「加熱血清」)を供した(この手順は、IgE-Fcレセプター結合領域を変性させ、実施者に、この領域内またはこの領域の近くで、どの抗体がIgEに結合するかを決定させ得ることが知られている)。そのプレートを4で一晚インキュベートし、その後ウェルを、洗浄緩衝液を用いて4回洗浄し、そして示されるようにアッセイ緩衝液に希釈した、抗イヌIgEハイブリドーマ細胞(実施例2に記載されるように調製した)由来の100μlの上清を、各々のウェルに添加した。そのプレートを、室温で2時間インキュベートし、その後、そのウェルを、洗浄緩衝液を用いて4回洗浄し、そしてアッセイ緩衝液中に1:2000で希釈した、100μlのHRP結合体化口バ抗マウスIgG(Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA)を、各々のウェルに添加した。室温での1時間のインキュベーションの後、そのウェルを、洗浄緩衝液を用いて4回洗浄し、そして100μlのTMB Peroxidase Substrate System(KPL Labs, Gaithersburg, MD)を、各々のウェルに添加した。このプレートを、ウェル中に色が発生するまで(約10分間)、室温でインキュベートし、その時点で、各々のウェルに、100μlの1.0Mリン酸を添加することによって、反応を停止させた。非特異的結合のバックグラウンドレベルを、イヌ(Canine)血清またはネコ血清を添加しなかったこと以外は、上記のようにウェルを調製することによって測定した。ELISAプレートリーダーを用いて、各々のウェルの最適な密度を、450nmで測定し、その結果を、表1に示した。吸光度のバックグラウンドレベルを、表1に示された全ての値から引いた。100より高い値を、陽性とみなす。

【0064】

【表1】

10

20

30

40

表 1.

mAb ID	MAb 希釈	イヌ血清			ネコ血清			イヌ IgG 血清
		DerF			ノミ唾液 Ag			
		血清	加熱した 血清	血清 (-)	血清	加熱した 血清	血清 (-)	
H-219	1:250	3249	479	40	5	22	5	455
	1:500	3028	369		4	4		
	1:1000	2819	270		10	10		
H-220	1:250	49	1533	0	7	6	4	316
	1:500	42	1234		8	4		
	1:1000	60	870		7	6		
H189	1:250	39	1838	2	7	6	8	473

表 1 の続き

	1:500	37	1714		3	1		
	1:1000	42	1465		2	3		
H-190	1:250	2783	2970	0	65	21	12	1192
	1:500	2227	2798		34	10		
	1:1000	1578	2426		24	7		
H-191	1:250	35	57	0	3630	2636	0	22
	1:500	46	55		3517	2351		
	1:1000	44	60		3245	1714		
H-192	1:250	55	62	8	3418	2926	35	64
	1:500	44	52		3071	2273		
	1:1000	48	71		2595	1808		
H-193	1:250	72	1572	0	13	7	9	368
	1:500	61	1306		11	14		
	1:1000	71	972		8	13		
H-195	1:250	3752	2027	0	26	30	22	1260
	1:500	3604	1477		18	21		
	1:1000	3424	974		21	27		
H-197	1:250	1953	2882	0	28	12	6	902
	1:500	1294	2415		17	11		
	1:1000	739	1779		14	16		
H-198	1:250	120	60	0	3818	2923	1	14
	1:500	81	44		3803	2841		
	1:1000	79	45		3714	2779		
H-199	1:250	60	50	1	3108	2502	0	85
	1:500	44	47		2977	2242		
	1:1000	43	47		2736	1959		
H-200	1:250	3781	2420	4	29	33	28	1355
	1:500	3744	1897		15	17		
	1:1000	3532	1436		11	11		
H-201	1:250	3606	2538	1	3695	3061	26	1782
	1:500	3473	2195		3557	2480		
	1:1000	3223	1904		3446	2705		
H-202	1:250	3697	1892	0	20	17	19	1170
	1:500	3826	1744		15	11		
	1:1000	3620	1343		22	9		
H-203	1:250	3803	2425	0	69	69	68	1986
	1:500	3603	2024		39	42		
	1:1000	3424	1478		32	30		
H-205	1:250	67	3483	0	12	6	9	472
	1:500	66	1245		6	3		
	1:1000	68	752		8	10		
H-206	1:250	1972	1446	0	3	18	8	472
	1:500	1615	1284		4	3		
	1:1000	1156	972		9	11		
H-207	1:250	3393	720	4	12	11	12	663
	1:500	3085	546		8	6		
	1:1000	2617	353		11	10		
H-208	1:250	105	51	1	3053	2939	5	22
	1:500	101	67		2672	2797		
	1:1000	122	59		2184	2488		

10

20

30

40

(実施例 4)

抗イヌ IgE モノクローナル抗体が、固定化されたヒト Fc - レセプター I - 鎖によって結合されているイヌ IgE または ネコ IgE に結合する能力を、以下の捕捉アッセイ プロトコルを用いて試験した。

【0065】

マイクロタイタープレートのウェルを、CBC 緩衝液中のヒト Fc - レセプター I - 鎖タンパク質の細胞外ドメイン (huFcRI) (米国特許第 5,945,294 号に記載されるように調製した) (42.5 ng / ウェル) でコートし、そしてそのプレートをインキュベートし、カバーし、4 で一晩インキュベートした。さらに、複数のウェ

50

ルも、熱処理したイヌIgG (Jackson ImmunoResearch Labs, west Grove, PA) (1 μ g / ウェル) でコートし、非特異的イムノグロブリン結合のバックグラウンドレベルを測定した。熱処理は、汚染IgEの活性を特異的に破壊すると考えられている。

【 0 0 6 6 】

次の日、過剰の流体を、ウェルから除去し、200 μ lのアッセイ緩衝液を各々のウェルに添加し、そしてそのプレートを室温で1時間インキュベートした。そのウェルを、洗浄緩衝液を用いて4回洗浄し、そして各々のウェルに精製したイヌIgEまたはネコIgE (実施例2に記載されるように調製した) を添加した (100 μ lのアッセイ緩衝液中の50 ng / ウェル) 。室温での2時間のインキュベーションの後、そのウェルを、洗浄緩衝液を用いて4回洗浄し、そして記載されるようにアッセイ緩衝液中に希釈した、100 μ lの抗イヌIgEハイブリドーマ細胞上清 (実施例2に記載されるように調製した) を、各々のウェルに添加した。そのプレートを、室温で1時間インキュベートし、そのウェルを、洗浄緩衝液を用いて4回洗浄し、そしてアッセイ緩衝液中に1 : 2000に希釈した100 μ lのHRP結合体化ロバ抗マウスIgGを、各々のウェルに添加した。そのプレートを、室温で1時間インキュベートし、その後、そのウェルを、洗浄緩衝液を用いて4回洗浄し、そして100 μ lのTMB Peroxidase Substrate System (KPL Labs, Gaithersburg, MD) を、各々のウェルに添加した。そのプレートを、ウェル中に色が発生するまで (約15分間) 、室温でインキュベートし、その時点で各々のウェルに、100 μ lの1.0 Mリン酸を添加することによって反応を停止させた。各々のウェルの最適な密度を、450 nMでELISAプレートリーダーを用いて測定し、その結果を、表2に示した。バックグラウンドの吸光度を、いずれのmAbも添加せずに、上記のようにいくつかのウェルを調製することによって測定し、バックグラウンドレベルを、表1に列挙される全ての値から引いた。100より高い値を、陽性とみなす。

10

20

【 0 0 6 7 】

【 表 2 】

表 2.

mAb 希釈	H-219			H-220			H-189		
	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG
1:100	2897	11	77	26	5	1	30	4	2
1:300	2960	6	38	11	5	0	22	0	0
1:1000	2679	5	17	8	0	0	17	4	0
mAb 希釈	H-190			H-191			H-192		
	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG
1:100	3985	152	108	15	576	0	2726	4200	0
1:300	3062	53	67	10	353	0	1199	4200	10
1:1000	2444	17	22	3	137	0	759	3713	6
mAb 希釈	H-193			H-195			H-197		
	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG
1:100	24	5	4	4000	16	127	2570	78	67
1:300	16	5	0	2851	11	75	3132	32	35
1:1000	9	2	0	2069	5	25	2789	14	14
mAb 希釈	H-198			H-199			H-200		
	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG
1:100	2871	4200	3	1240	3181	0	3371	35	137
1:300	1510	4200	71	1091	3344	1	2434	19	120
1:1000	1187	3865	0	993	3068	0	2857	6	41
mAb 希釈	H-201			H-202			H-203		
	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG
1:100	2750	3423	82	3523	68	107	2926	15	177
1:300	3197	3732	88	2938	5	85	3509	22	197
1:1000	3387	3627	71	2000	3	33	3704	13	168
mAb 希釈	H-205			H-206			H-207		
	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG
1:100	27	0	0	2153	5	19	2690	6	35
1:300	6	3	2	2011	6	14	1925	10	16
1:1000	5	0	0	1553	3	4	1414	0	4
mAb 希釈	H-208								
	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgG						
1:100	131	1880	0						
1:300	219	2099	0						
1:1000	151	1617	64						

(実施例 5)

本実施例は、抗ネコ IgE モノクローナル抗体が抗原特異的なイヌ IgE またはネコ IgE に結合する能力を開示する。抗ネコ IgE を産生するハイブリドーマ細胞株を、マウスをイヌ IgE のかわりにネコ IgE を用いて免疫することを除いて、実施例 2 に記載される手順を用いて産生した。ELISA を、実施例 3 に概説される固相 ELISA プロトコールを用いて実施し、そして抗イヌ IgE ハイブリドーマの上清に代わり、抗ネコ IgE ハイブリドーマの上清を使用した。さらに、非特異的イムノ(免疫)グロブリン結合のバックグラウンドレベルを測定するために、イヌ IgG の代わりにネコ IgG を用いて、いくつかのウェルをコートした。これらの ELISA の結果を表 3 に示す。吸光度のバックグラウンドレベルを表に示される全ての値から引いた。100 より高い値を、陽性とみなす。

【0068】

【表 3】

10

20

30

40

表 3.

		イヌ血清				ネコ血清				
		DerF		ノミ唾液		DerF		ノミ唾液		純粋な ネコ IgG
		血清	加熱した 血清	血清	加熱した 血清	血清	加熱した 血清	血清	加熱した 血清	
H-100	1:250	27	43	40	38	2473	2794	2925	2371	41
	1:500	30	46	39	41	1932	2269	2605	2083	72
	1:1000	39	50	39	42	1287	1582	2001	1479	17
H-101	1:250	56	67	46	45	3577	3464	3741	3287	59
	1:500	41	63	38	47	3144	3042	3392	2966	84
	1:1000	74	61	39	45	2474	2465	2921	2416	21
H-102	1:250	60	54	32	43	3586	3444	3628	3239	33
	1:500	34	46	27	36	3188	3052	3383	2984	53
	1:1000	30	47	29	39	2607	2501	2935	2424	28
H-103	1:250	83	64	43	44	30	35	6	25	0
	1:500	79	72	53	42	3	68	0	5	0
	1:1000	48	54	41	48	7	14	1	7	0
H-106	1:250	53	59	43	43	1268	1443	1580	1002	0
	1:500	42	74	38	50	861	1008	1257	713	5
	1:1000	58	52	45	63	450	537	705	433	0
H-99	1:250	110	205	215	261	3567	4097	3632	3522	4200
	1:500	90	113	130	152	3363	3962	3277	3315	4200
	1:1000	74	107	111	125	3016	3814	3305	2978	4089
H-104	1:250	4200	4200	4200	4200	4200	4200	3895	3929	4200
	1:500	4200	4200	4200	4200	4121	4200	3755	3883	4200
	1:1000	4200	4200	4067	4093	3932	3919	3717	3746	3892
H-107	1:250	49	51	30	42	1418	2226	217	587	3975
	1:500	45	62	15	47	1225	1960	172	504	3808
	1:1000	37	76	40	44	879	1509	143	420	3140

10

20

本実施例は、これらの全てのmAbがネコIgEを認識することを示す。8種類のmAbのうち5種類は、ネコIgEに特異的であるが、一方、2種類のmAbはネコIgEおよびネコIgGの両方を認識し、そして1種類のmAbは、ネコIgE、ネコIgG、およびイヌIgEに結合する。

【0069】

(実施例6)

本実施例は、抗ネコIgEモノクローナル抗体がhuFcRI固定化された、イヌIgEまたはネコIgEに結合する能力を開示する。本実施例は、抗イヌIgEハイブリドーマ細胞上清の代わりに抗ネコIgEハイブリドーマ細胞上清を用いることを除いて、実施例4に記載される捕捉アッセイプロトコルを用いる。このアッセイの結果を、以下の表4に示す。

【0070】

【表4】

30

表 4.

mAb 希釈	H-99		H-100		H-101	
	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgE	ネコ IgE
1:00	0	206	24	2496	8	2443
1:300	0	186	11	1591	0	1381
1:1000	0	60	11	846	0	1111
mAb 希釈	H-102		H-103		H-104	
	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgE	ネコ IgE
1:00	3	2325	0	0	333	476
1:300	0	1002	0	0	229	352
1:1000	6	1087	0	0	287	169
mAb 希釈	H-106		H-107			
	イヌ IgE	ネコ IgE	イヌ IgE	ネコ IgE		
1:00	9	1238	0	37		
1:300	0	491	0	33		
1:1000	5	245	2	37		

10

20

30

40

50

(実施例 7)

本実施例は、組換え産生されたウマFcRI (EqFcRI) の精製のための方法を開示する。組換えEqFcRIを発現する培養物を米国特許第6,057,127号に記載されるように産生し、そしてその上清を収集し、そして2.2mVの導電率および6.0のpHに調整した。そのサンプルを、緩衝液A(20mMのNa-PO₄、pH 6.0)を用いて事前に平衡化したSP-Sepharose Hi-Trapカラム(Pharmacia、Peapack、NJ)にアプライした。サンプルのアプライの後に、そのカラムを緩衝液Aを用いて洗浄し、そして結合されているタンパク質を、緩衝液A中の0.1M NaCl、0.15M NaCl、0.2M NaCl、0.3M NaCl、0.4M NaCl、0.5M NaCl、および1.0M NaClの段階勾配を用いて、溶出した。0.2Mで溶出した、EqFcRIを含む画分を、プールし、濃縮し、そしてPBSで平衡化されているSuperdex 75 10/30カラムにアプライした。0.5mlの画分を収集し、そして製造者の指示に従って、Novex 14% SDS-PAGEゲル(Invitrogen、Carlsbad、CA)を用いて分析し、EqFcRIを含む画分をプールした。

【0071】

(実施例 8)

本実施例は、固相ELISAを用いて、抗ウマIgEモノクローナル抗体H357が抗原結合ウマIgEを認識する能力を開示する。マウスをイヌIgEの代わりにウマIgEで免疫することを除いて、mAb H-357を、実施例2に概説される手順を用いて産生した。その後、H-357は、ウマIgEに特異的であることが示された。ELISAを、以下のプロトコルを用いて実施した：マイクロタイタープレートのウェルを、示されたアレルゲンでコートし、そのプレートを、4で、一晚インキュベートした(D. farinae(Center Labsより得、そして30アレルギー単位(AU)/ウェルでコートした)を除いて、全てのアレルゲンを、Greer Labs、Lenoir、N.C.から得、30PNU/ウェルでコートした)。次の日、過剰の流体を除去し、各々のウェルに200μlのアッセイ緩衝液を添加し、そしてそのプレートを、室温(RT)で1時間インキュベートした。そのプレートを、洗浄緩衝液を用いて4回洗浄し、

そして各々のウェルに100 μ lのウマ血清(アッセイ緩衝液中に1:20で希釈した)を添加し、そのプレートを、4で、一晚インキュベートした。次の日、そのプレートを洗浄緩衝液を用いて4回洗浄し、そしてそのウェルに、ビオチン化抗ウマIgE mAb H357(10ng)、ビオチン化組換えヒトFcレセプターI鎖(huFcRI)(13ng)(米国特許第5,945,294号に記載されるように調製した)またはビオチン化組換えウマFcレセプター(EqFcRI)(13ng)(実施例7に記載されるように調製した)のいずれかを添加した(全ての分子を、ビオチン-LC-ヒドラジンをを用いる標準的な手順に従いビオチン化した)。そのプレートを、室温で2時間インキュベートし、次いで洗浄緩衝液を用いて4回洗浄した。アルカリホスファターゼ(AP)結合体化ストレプトアビジン(50ng/ウェル)(KPL Labs)を各々のウェルに添加し、そしてこのプレートを室温で1時間インキュベートした。コントロールウェルを、抗ウマIgE mAbもIgEレセプターも用いなかったこと以外は、上記のように調製した。そのプレートを、洗浄緩衝液を用いて洗浄し、各々のウェルに100 μ lのp-ニトロフェニルホスフェート(Moss, Inc., Pasadena, MD)を添加し、そしてこのプレートを室温で1時間インキュベートした。呈色反応を、各々のウェルに、50 μ lの20mM L-システインを添加することによって停止し、そしてELISAプレートリーダーを用いて、405nmで吸光度を測定した。バックグラウンド値を引いた、その結果を、表5に示す。

【0072】

【表5】

表5.

ウマ #1			
アレルゲン	H-357	HuFcRI α	EqFcRI α
ブユ	970	531	575
アブ	1600	695	1134
D. farinae	4035	3807	3942
ウマ #2			
アレルゲン	H-357	HuFcRI α	EqFcRI α
アルファルファ	691	448	526
クロアリ	2377	1418	1539
アブ	1484	732	1067
ウマ #3			
アレルゲン	H-357	HuFcRI α	EqFcRI α
クロアリ	2138	1719	1972
アブ	450	723	913
ウマ #4			
アレルゲン	H-357	HuFcRI α	EqFcRI α
D. farinae	732	414	405
ウマ #5			
アレルゲン	H-357	HuFcRI α	EqFcRI α
ブナ	364	388	351
ウマ #6			
アレルゲン	H-357	HuFcRI α	EqFcRI α
ブナ	143	140	108
ウマ #7			
アレルゲン	H-357	HuFcRI α	EqFcRI α
ブナ	305	345	266

このデータは、IgEを検出するためにH-357が用いられた場合に得られた吸光度が、ヒトFcRIまたはウマFcRIのいずれかが用いられた場合に観察された吸光度と類似することを示す。

【0073】

(実施例9)

本実施例は、ウマIgEに対する抗ウマIgEモノクローナル抗体H-357の特異性を開示する。マイクロタイタープレートのウェルを、CBC緩衝液中のウマIgE、イヌIgE、ネコIgEまたはヒトIgEを50ng/ウェルで用いてコートし、そしてこのプレートを、4で一晚インキュベートした。過剰の流体を、除去し、各々のウェルに200 μ lのアッセイ緩衝液を添加し、そしてこのプレートを、室温(RT)で1時間インキュベートした。このプレートを、洗浄緩衝液を用いて4回洗浄し、そして各々のウェルに、50 μ lの連続希釈した(アッセイ緩衝液中に、400~3.1ng/ml)ビオチン化抗ウマIgE mAb(ビオチン-LC-ヒドラジンをを用いる標準的手順によってビオチン化した)を添加した。このプレートを、室温で、2時間インキュベートし、次いで洗浄緩衝液を用いて、4回洗浄した。各々のウェルに、HRP結合体化ストレプトアビジン(KPL Labs)を添加し(10ng/ウェル)、そしてこのプレートを、室温で1時間インキュベートした。コントロールウェルを、抗ウマIgE mAbの添加しなかったこと以外は、上記のように調製した。このプレートを、洗浄緩衝液を用いて洗浄し、各々のウェルに100 μ lのTMB Substrate Systemを添加し、そしてこのプレートを室温で、5分間インキュベートした。この呈色反応を、各々のウェルへの100 μ lの1M H₃PO₄の添加によって停止し、そしてその吸光度を、ELISAプレートリーダーを用いて450nmで読み取った。その結果を、表6に示す。バックグラウンドレベルを、示した値から引き、100より高い全ての値を、陽性とみなす。

10

【0074】

【表6】

表6.

20

mAb H-357 (ng/ウェル)	コートするイムノグロブリン			
	ウマ IgE	イヌ IgE	ネコ IgE	ヒト IgE
20	2639	208	3	4
10	2567	180	6	0
5	2496	161	0	0
2.5	2077	134	0	0
1.25	1419	98	0	0
.63	848	61	0	0
.31	484	35	3	2
.16	278	15	1	1

30

本実施例は、mAb H-357がイヌIgE、ネコIgEまたはヒトIgEよりも、ウマIgEに対して非常に高い特異性を有することを示す。

【0075】

(実施例10)

本実施例は、huFc RI が種々の種由来の表面結合IgEに結合する能力を開示する。このアッセイを、表面結合IgEを検出するために、抗ウマIgE mAbの代わりにビオチン化huFc RI を用いることを除いて、実施例9に概説される基本的なプロトコルを用いて実施した。さらに、各々のウェルを、50ngのIgEの代わりに100ngのIgEを用いてコートし、レセプターの濃度を、変化させ、そしてhuFc RI を伴うインキュベーション時間を、1時間に短縮した。バックグラウンドレベルを、huFc RI を除く全ての試薬を用いてコントロールウェルを調製することによって測定した。このアッセイの結果を、表7に示す。バックグラウンド値を、表に示される値から引いた。

40

【0076】

【表7】

表 7.

FceRIa (ng/ml)	コートするイムノグロブリン			
	ヒト IgE	イヌ IgE	ネコ IgE	ウマ IgE
1300	1482	2286	2973	2123
650	2109	2409	3038	2108
325	1933	2327	3007	2128
162.5	1896	2321	2930	2058
81.3	2128	2307	2741	1867
40.6	1054	2100	2732	1698
20.3	1039	1964	2462	1344
10.2	1462	1911	2443	1132
5.1	1276	1509	2147	881
2.5	783	1050	1447	556
1.3	574	710	891	330

10

このデータは、huFcRI がヒト由来IgE、イヌ由来IgE、ネコ由来IgE、およびウマ由来IgEを等しい親和性で認識し得ることを示した。

【0077】

(実施例11)

本実施例は、本発明の種々のモノクローナル抗体のアイソタイプを開示する。アイソタイプを、製造者の指示に従い、IsoStrip Kit (マウスモノクローナル抗体アイソタイプ決定キット) (Roche Diagnostics Corporation、Indianapolis、IN) を用いて決定した。これらの試験の結果を、以下の表8に示す。

20

【0078】

【表8】

表 8

mAb 名称	アイソタイプ
H99	IgG ₁ , k
H100	IgG ₁ , k
H101	IgG ₁ , k
H102	IgG ₁ , k
H103	IgM, k
H104	IgG ₁ , k
H106	IgG ₁ , k
H107	IgG ₁ , k
H189	IgG _{2a} , k
H190	IgG ₁ , k
H191	IgG ₁ , k
H192	IgG ₁ , k
H193	IgG _{2a} , k
H195	IgG ₁ , k
H197	IgG ₁ , k
H198	IgG ₁ , k
H199	IgG _{2b} , k
H200	IgG ₁ , k
H201	IgG ₁ , k
H202	IgG ₁ , k
H203	IgG ₁ , k
H204	IgG ₁ , λ
H205	IgG _{2b} , k
H206	IgG _{2a} , k
H207	IgG ₁ , k
H208	IgG _{2b} , k
H219 (H187)	IgG ₁ , k
H220 (H188)	IgG _{2a} , k

10

20

30

40

(実施例 12)

本実施例は、E q F c R I が、種々の種由来の表面結合 I g E に結合する能力を開示する。このアッセイを、表面結合 I g E を検出するために、抗ウマ I g E m A b の代わりにビオチン化 E q F c R I を用いることを除いて、実施例 9 に概説される基本的なプロトコルを用いて実施した。さらに、各々のウェルを、50 ng の I g E の代わりに 100 ng の I g E を用いてコートし、レセプターの濃度を、変化させ、そして E q F c R I を伴うインキュベーション時間を、1 時間に短縮した。バックグラウンドレベルを、E q F c R I を除く全ての試薬を用いてコントロールウェルを調製することによって測定した。このアッセイの結果を、表 8 に示す。バックグラウンド値を、表 9 に示される値から引いた。

【0079】

【表 9】

表 9.

FceRIα (ng/ml)	コートするイムノグロブリン			
	ヒト IgE	イヌ IgE	ネコ IgE	ウマ IgE
1300	142	1805	2612	1838
650	173	1706	2663	1777
325	214	1733	2807	1834
162.5	112	1562	2669	1879
81.3	79	1657	2567	1813
40.6	34	1464	2615	1706
20.3	34	1115	2328	1322
10.2	41	903	2129	1151
5.1	36	599	1653	957
2.5	44	367	1053	684
1.3	7	222	508	385

10

このデータは、E q F c R I が、イヌ I g E、ネコ I g E、およびウマ I g E と高い親和性で結合するが、ヒト I g E に対しては、非常に低い親和性を有することを示す。

【 0 0 8 0 】

(実施例 1 3)

本実施例は、本発明のイムノアッセイを実施するための一般的なプロトコールを提供する。

【 0 0 8 1 】

使用の直前に、そのデバイスを、2滴の洗浄緩衝液 (T R I S 6 . 0 5 g / l ; N a C l 8 . 5 g / l ; N a N ₃ 2 0 m g / l ; ウシ血清アルブミン (B S A) 2 . 5 g / l ; T w e e n 2 0 5 . 0 m l / l ; そして濃 H C l で 7 . 5 ± 0 . 1 に p H 調整した) で湿潤させる。その2滴を、連続的に添加し、そしてその滴下は、次の工程に移る (p r o c e e d) 前に吸収され得る。

【 0 0 8 2 】

次いで2滴のサンプル (未希釈) を、続けて添加し、そしてその滴下は、次の工程に移る前に吸収され得る。次いで、2滴の洗浄緩衝液を一度に添加し、そしてその滴下は、実施前に吸収され得る。

【 0 0 8 3 】

次いで、2滴のビオチン化マウス抗イヌ I g E を続けて添加し、そしてその滴下は、次の工程に移る前に吸収され得る。次いで2滴の洗浄緩衝液を、一度に添加し、その滴下は、次の工程に移る前に吸収され得る。

【 0 0 8 4 】

次いで2滴のストレプトアビジン - アルカリホスフェートを続けて添加し、そしてその滴下は、次の工程に移る前に吸収され得る。次いで2滴の洗浄緩衝液を一度に添加し、そしてその滴下は、次の工程に移る前に吸収され得る。

【 0 0 8 5 】

次いで、2滴の酵素基質を続けて添加し、そしてその滴下は、次の工程に移る前に吸収され得る。最短で30秒待機し、次いで、4滴の洗浄緩衝液を続けて添加する。結果は、すぐに読み取ることができ、そして2時間安定である。

【 0 0 8 6 】

本発明の代替的な実施形態において、その検出試薬は、イムノゴールド、または蛍光化合物もしくは放射性化合物のような別の指示試薬であり、そしてその結果を読み取る方法は、適切に変化する。

【 0 0 8 7 】

本発明は、現在の好ましい実施形態に関連して記載されたが、種々の改変が、本発明の精神から逸脱することなくなされ得ることは、当業者に理解され得る。従って、本発明は、上記の特許請求の範囲によってのみ限定される。

40

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/066602 A2

- (51) International Patent Classification: C12N
- (21) International Application Number: PCT/US02/00324
- (22) International Filing Date: 3 January 2002 (03.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/259,450 3 January 2001 (03.01.2001) US
60/325,812 28 September 2001 (28.09.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
US 60/325,812 (CON)
Filed on 28 September 2001 (28.09.2001)
US 60/259,450 (CON)
Filed on 3 January 2001 (03.01.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): HESKA CORPORATION [US/US]; 1613 Prospect Parkway, Fort Collins, CO 80525 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MCCALL, Catherine, A. [GB/US]; 709 Pleasant Street, Boulder, CO 80302 (US); BABU, Uma, Mahesh [US/US]; 5627 Weeping Way, Fort Collins, CO 80528 (US); RADECKI, Steven, V. [US/US]; 150 North County Road 3, Fort Collins, CO 80524 (US).
- (74) Agents: VERSER, Carol, Talkington et al.; Heska Corporation, 1613 Prospect Parkway, Fort Collins, CO 80525 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/066602 A2

(54) Title: DETECTION OF ALLERGEN-SPECIFIC IGE

(57) Abstract: This invention relates to point-of-care devices and methods to screen animals with suspected IgE-mediated allergic disease. The present invention provides a simple and rapid preliminary immunoassay screen, in which a defined mixture of clinically relevant allergens is used to capture allergen-specific IgE present in a sample, followed by a second binding reagent that selectively binds IgE. The present invention further provides methods for prescribing immunotherapy treatment in animals having IgE-mediated diseases. Devices and kits useful for carrying out the methods of the invention are also provided.

DETECTION OF ALLERGEN-SPECIFIC IgE

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to point-of-care test (POCT) devices and methods to
5 screen animals showing signs of allergy or atopic disease. More particularly, the
immunological devices and methods of the invention use a defined mixture of
clinically relevant allergens to detect allergen-specific IgE in samples obtained from
such animals.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

The cross-linking of mast cell-bound allergen-specific IgE to allergens induces
Type I allergic diseases such as atopic dermatitis and atopic asthma. Diseases related
to allergy and atopy affect a significant percentage of the population, including up to
20% of humans, and are increasing every year.

15

Allergy-related illness is not restricted to humans, and can be a major problem
in veterinary practice as well. A number of other diseases may present with
symptoms similar to those of allergy/atopy, thus a definitive diagnosis may be
difficult. A definitive diagnosis relies upon a thorough history, careful review of
clinical signs, and *in vitro* and *in vivo* diagnostic tests.

20

Immunoassay procedures have provided sensitive diagnostic tools for the *in*
vitro detection of a variety of allergens of clinical significance. These procedures use
allergens and IgE specific detection reagents to measure allergen-specific antibodies
in the serum of the patient. These processes characteristically require an incubation
period with both the allergens and other reagents and, as a result, may be time
25 consuming. It is not unusual for an assay procedure to require up to 24 hours to
complete. Furthermore, the need to adhere to time incubation steps and multiple
washings with measured reagents has largely limited these procedures to large

hospital and reference clinical laboratories where highly trained personnel and sophisticated equipment are available to perform the assays. Additionally, a certain percentage of atopic patients are allergic to allergens not present in the standard allergen-panels used by reference labs. In these cases, detailed testing fails to reveal
5 the aggravating allergen(s) resulting in these patients incurring unnecessary medical expenses.

Presently there is an unmet need for a simple and rapid procedure for conducting immunoassays for allergen specific IgE which can be used in the physician's or veterinarian's office. The present invention satisfies this need and
10 provides related advantages as well.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides rapid and simple tests to aid in the diagnosis of allergy in animals, including, but not limited to, humans, dogs, cats and horses. More
15 particularly, the devices and methods of the invention screen for allergen-specific IgE in a sample using immunological reactions. Such samples can be obtained from animal bodily fluids that contain IgE, such as, for example, urine, mucosal secretions, milk, whole blood or components thereof including plasma, serum and the like.

The devices of the present invention include a first member containing a
20 porous member, such as a membrane or filter, having a sample receiving area. The porous member can be spotted with at least one mixture of allergens (in one spot or multiple spots) and at least one control spot. The control spot or spots can be a positive control, such as purified IgE, and/or a procedural control, such as biotinylated bovine serum albumin (BSA), for example. The mixture of allergens can be spotted
25 either within the sample receiving area or in a separate area of the porous member.

The device can optionally contain an absorbent member in capillary communication with the porous first member to induce the flow of a liquid through the porous member without the use of external means. The absorbent member is selected to have a capillary pore size to induce flow of liquids through the porous
30 member when the hydrostatic pressure of the sample and subsequent reagents are insufficient to induce flow through the porous member.

WO 02/066602

3

PCT/US02/00324

The device also includes a support member to support or house the first porous member. The absorbent member can also provide the means to support the first member.

5 Methods for detecting the presence of allergen-specific IgE in a sample use simple devices of the present invention, small volumes, and do not require lengthy incubation steps. Such methods are accomplished by:

- (a) adding the sample to the sample receiving area of a device of the present invention, whereby at least one allergen in the mixture of allergens spotted on the porous member of the device binds to allergen-specific IgE if present in the
10 sample;
- (b) contacting the mixture of allergens with a reagent that selectively binds the allergen-specific IgE; and
- (c) detecting bound allergen-specific IgE if present in the sample.

Useful mixtures of allergens for spotting onto the porous member can contain,
15 but are not limited to, one or more types of allergens selected from the following: cat allergens, dog allergens, flea saliva proteins, house dust mite allergens, storage dust mite allergens, Japanese Cedar pollen, ragweed allergens, ryegrass allergens, meadow fescue, orchard grass, Bermuda grass, sheep sorrel, Kochia, Russian thistle, yellow dock, timothy grass, redtop, birch and blue grass allergens.

20 Useful reagents that selectively bind the allergen-specific IgE in a sample include, for example, anti-IgE antibodies or IgE receptors or mimetopes of such molecules. Such reagents can be labeled with a detectable marker or a detectable marker can be separately added that binds or otherwise associates with the reagent such that detection is possible.

25 The present invention accordingly provides low cost point-of-care (i.e., in clinic or field) tests that can be performed simply and quickly in the physician's or veterinarian's office. The rapid results available with the methods and devices of the present invention permit the physician or veterinarian to quickly assess the need for further diagnostic work and/or treatment plans. Further diagnostic work may include
30 submission of a sample to a central diagnostic laboratory for testing to determine the exact allergens for which the animal is positive, and for which immunotherapy would be appropriate.

WO 02/066602

PCT/US02/00324

4

Thus, the present invention further provides methods for prescribing immunotherapy treatment of an animal having an allergic disease. Briefly, the methods are accomplished by:

- (a) obtaining a sample from the animal;
- 5 (b) analyzing the sample according to the methods of the present invention to detect the presence of allergen-specific IgE in the sample, wherein the presence of allergen-specific IgE identifies the sample as a positive sample;
- (c) analyzing the positive sample to identify one or more allergens responsible for an allergic disease; and
- 10 (d) selecting an appropriate immunotherapy to treat the allergic disease.

The present invention further provides novel reagents, including anti-IgE antibodies, and kits containing devices and ancillary reagents for conducting the immunoassays.

15

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is generally directed to POCT devices and immunoassay methods for the rapid detection of allergen-specific IgE. The devices and methods of the present invention are useful as preliminary aids in the diagnosis of allergy in

20 animals.

The immunoassay methods of the present invention use POCT devices that include a first porous member and a support member. Particularly suitable devices include the following elements: (1) a porous solid surface to which a defined mixture of allergens can be spotted in one or more spots; (2) a sample receiving area for

25

adding the sample to be assayed; (3) a means for drawing liquids through the porous surface; and (4) an area for displaying the results. In certain embodiments, one element may perform the functions of one or more of the other elements. For

example, the sample receiving area may be the same area or a different area from where the defined mixture of allergens have been spotted.

The porous first member can be made of any suitable material to which the mixture of allergens can be bound or affixed, while sufficiently porous to allow the flow of liquids to pass through or by the affixed mixture of allergens. Suitable materials include membranes, filters and the like. Such membranes and filters can be made from a variety of materials, which include but are not limited to, for example, plastic, glass, gel, celluloid, paper, fabric, polystyrene, nylon, nitrocellulose, agarose, cotton, and PVDF (poly-vinylidene-fluoride). The mixture of allergens can be spotted (i.e. affixed) on the porous member by any means known to those skilled in the art or as described in the Examples below.

One or more controls can also be spotted on the porous member to ensure the proper operation of the immunoassay. Preferably, the control spot is an area on the device, which comes into contact with the assay reagents and which contains an agent which serves to indicate binding of IgE-detecting reagent has occurred. Agents useful as positive controls include, for example, purified polyclonal or monoclonal IgE, IgE receptors or active fragments thereof, anti-IgE immunoglobulin, anti-IgG immunoglobulin, protein A, mimetopes of any of the above molecules or any other molecule resulting in binding of the IgE-detecting reagent to the porous member. As used herein, the term "mimotope" refers to any compound able to mimic the ability of anti-IgE antibody to bind to IgE. An example of a mimotope can be a peptide that has been modified to decrease its susceptibility to degradation but which still retains the ability to bind the IgE-detecting reagent. Other examples of mimetopes include, but are not limited to, carbohydrate-based compounds, lipid-based compounds, nucleic acid-based compounds, natural organic compounds, synthetically derived organic compounds, anti-idiotypic antibodies and/or catalytic antibodies, or fragments thereof. A mimotope can be obtained by, for example, screening libraries of synthetic

WO 02/066602

6

PCT/US02/00324

compounds for compounds capable of binding to the IgE-detecting reagent.

Procedural controls known to those skilled in the art can also be spotted on the porous member, including, for example, biotinylated BSA. The porous first member further contains a sample receiving area. As noted previously, the sample receiving area can
5 be the same area where the mixture of allergens are spotted or can be in a different location on the porous member depending on the desired format. A pre-filter can optionally be used for samples that are preferably filtered prior to introducing the filtered sample to the sample receiving area, including, for example, whole blood to obtain serum. Such samples can be filtered separately from the device of the present
10 invention in a pre-filter device or the pre-filter device can be seated above the sample receiving area and, if desired, the pre-filter can be removed and disposed after the sample has been pre-filtered.

The devices of the present invention optionally contain an absorbent member having capillary pathways connected to the porous member to permit a liquid to
15 traverse the absorbent member. Accordingly, the absorbent member is in capillary communication with the porous member and has capillary pores sized to induce the flow of liquid through the first porous member without the use of external means. The absorbent member is particularly useful when the hydrostatic pressure of the sample and subsequent reagents used in the assay are insufficient to induce flow
20 through the first member. In addition, the absorbent member can also provide support for the first member.

Those skilled in the art can readily identify suitable materials useful as absorbent members and other support members. Thus, the devices of the present invention can be of any standard format known to those skilled in the art, including,
25 for example, a lateral flow device (as described in U.S. Patent 5,073,484 or U.S. Patent 5,654,162, both incorporated herein by reference), a flow-through device (as described in U.S. Patent 4,727,019, incorporated herein by reference), or any

modifications of such devices readily known or determined by those skilled in the art.

The methods of the present invention for detecting the presence of allergen-specific IgE in a sample obtained from an animal are generally accomplished by first adding a sample to the sample receiving area of a device as described above. After the sample has come in contact with the test spot where the mixture of allergens has been spotted on the porous member, a reagent that selectively binds allergen-specific IgE is added and allowed to come in contact with the test spot. If present in the sample, the bound allergen-specific IgE is then detected.

As used herein, the term "animal" refers to any mammal that is capable of having an allergic disease caused by the presence of deleterious amounts of allergen-specific IgE. Such animals preferably include, but are not limited to, humans, dogs, cats and horses. As used herein, a cat refers to any member of the cat family (i.e., Felidae), including domestic cats, wild cats and zoo cats. Examples of cats include, but are not limited to, domestic cats, lions, tigers, leopards, panthers, cougars, bobcats, lynx, jaguars, cheetahs, and servals. A preferred cat to test is a domestic cat. As used herein, a dog refers to any member of the family Canidae, including, but not limited to, domestic dogs, wild dogs, foxes, wolves, jackals, and coyotes and other members of the family Canidae. As used herein, a horse refers to an equid. An equid is a hoofed mammal and includes, but is not limited to, domestic horses and wild horses, such as, horses, asses, donkeys, and zebras. Preferred horses to test include domestic horses, including race horses.

Samples to be assayed can be obtained from bodily fluids of such animals. Any bodily fluid that contains allergen-specific IgE can be used, including, for example, urine, mucosal secretions, milk, whole blood and components thereof, such as serum and plasma. Further examples of bodily fluids may be found in U.S. Patent 6,309,832 which is hereby incorporated by reference. A bodily fluid can be used undiluted as the sample or can be diluted as desired in a suitable diluent before

applying the sample to the sample receiving area. Those skilled in the art can readily determine the appropriate sample to be used in a particular assay.

The allergens that are selected in the defined mixture of allergens that is deposited on the porous member are selected such that a minimum number of spots, preferably one spot, will identify a great majority of patients with IgE-mediated allergic disease. Preferably, the defined mixture of allergens will be capable of identifying at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% and 100% of patients with IgE-mediated allergic disease. Those skilled in the art can readily determine a defined mixture of allergens capable of identifying a desired percent of the relevant population. For example, if the desired target is 90% of all human patients with IgE-mediated allergic disease, those skilled in the art would select a mixture of allergens that are collectively known to cause 90% of all IgE-mediated allergies in humans. Ideally, the mixture of allergens is chosen such that the minimum number of allergens allows the identification of the maximum number of patients. Various embodiments of the present invention may have different mixtures of allergens based on the patient population to be tested.

The allergens may be in the form of extracts, purified allergenic proteins from extracts or from raw materials such as mites or pollens, recombinant allergens, or combinations of the above. Suitable allergens for use in the defined mixture include, but are not limited to, cat allergens (U.S. Patent 5,328,991; 6,019,972; 6,048,962; and 6,120,769); dog allergens (U.S. Patent 5,843,672); flea saliva proteins (U.S. Patent 5,646,115; 5,795,862; and 5,840,695); house dust mite allergens (U.S. Patent 5,433,948; 5,552,142; 5,770,202; 5,773,002; 5,820,862; 5,986,526; 5,972,352; 6,060,057; 6,071,522; 6,077,518; 6,086,897; 6,132,734; and 6,077,517); Japanese Cedar pollen (U.S. Patent 6,090,386); Johnson grass allergens (U.S. Patent 5,480,972; 5,691,167; and 5,736,149); ragweed allergens (U.S. Patent 5,698,204); ryegrass allergens (U.S. Patent 5,710,126; 5,840,316; and 5,965,455); meadow fescue, orchard

grass, Bermuda grass, sheep sorrel, Kochia, Russian thistle, yellow dock, timothy grass, redtop, and blue grass allergens. Additional allergens may be found in U.S. Patent 6, 309, 832. The above U.S. patents are hereby incorporated by reference.

In the methods of the present invention, after the sample comes in contact with
5 the spotted mixture of allergens in order to allow any allergen-specific IgE to bind to one or more of the allergens in the mixture, a reagent that selectively binds allergen-specific IgE is then added and allowed to bind to any bound allergen-specific IgE. The term "second binding reagent" is used interchangeably with "reagent that selectively binds allergen-specific IgE." The detection of allergen-specific IgE bound
10 to the second binding reagent is indicative of the presence of allergen-specific IgE in the sample.

As used herein, a reagent that "selectively binds allergen-specific IgE" means that it preferentially binds IgE as compared to IgG or another class of immunoglobulin such that the second binding reagent does not bind to IgG or another
15 class of immunoglobulin in an amount that substantially affects the results of the immunoassay. For example, a suitable second binding agent binds IgE to a significantly greater extent (has a substantially higher affinity for IgE) than IgG. In a preferred embodiment, the second binding agent binds IgE with a specificity similar to that exhibited by the human IgE receptor alpha chain protein. In another
20 embodiment, the second binding agent fails to bind IgG under conditions in which known anti-IgE antibodies bind IgE. Binding of immunoglobulin by binding agents of the present invention can be measured using procedures known to those skilled in the art, for example, the ELISA procedures described herein. In a particularly preferred embodiment, the second binding agent binds IgG with an absorbance value,
25 as determined by ELISA, of less than 300, 250, 225, 200, 175, 150, 125 or 100. Guidance for selecting suitable binding agents is provided in the Examples below.

The second binding reagent may be a polyclonal or monoclonal antibody that selectively binds IgE, the Fcε receptor 1 (FcεR1) (as described in U.S. Patent 5,945,294, which is incorporated herein by reference), IgE-binding allergens or any molecule which selectively binds to IgE. One example of such an antibody is an anti-IgE antibody that only recognizes antibodies which bind to mast cells and basophils. Preferred antibodies of the present invention have the characteristics of a mAb produced using human FcεRIα-affinity purified IgE as described herein.

In a preferred embodiment, the second binding reagent is a monoclonal antibody that selectively binds to an IgE receptor-binding region or domain. Examples of such antibodies include, but are not limited to, for example, monoclonal antibodies H-219, H-195, H-202, H-203 and H-207. Species-specific antibodies and receptors are particularly useful for detecting allergen-specific IgE in samples obtained from that species. For example, canine anti-IgE antibodies are useful as the second binding reagent in assays for detecting allergen-specific IgE in sample obtained from a dog

In a preferred embodiment, the second binding reagent is monoclonal antibody that selectively binds to canine IgE. Examples of such antibodies include, but are not limited to, for example, monoclonal antibodies H-219, H-220, H-189, H-190, H-195, H-197, H-200, H-202, H-203, H-206 and H-207. In another preferred embodiment, the second binding reagent is monoclonal antibody that selectively binds to feline IgE. Examples of such antibodies include, but are not limited to, for example, monoclonal antibodies H-99, H-100, H-101, H-102, H-106. In another preferred embodiment, the second binding reagent is monoclonal antibody that binds to both canine and feline IgE. Examples of such antibodies include, but are not limited to, for example, monoclonal antibodies H-201, H-192, H-198, H-199, H-208. In another preferred embodiment, the second binding reagent is monoclonal antibody that selectively binds to equine IgE. Examples of such antibodies include, but are not limited to, for example, monoclonal antibody H-357.

In a further preferred embodiment, the second binding reagent is an IgE receptor. The term "IgE receptor" includes the full length receptor and active fragment thereof. As used herein, the term "active fragment thereof" means fragments of the full length receptor having binding sites that are capable of binding to the allergen-specific IgE captured by the allergen(s) contained in the defined mixture.

In one embodiment, the second binding reagent can be directly conjugated to, or labeled with, an indicator agent. In an alternative embodiment, an indicator agent capable of binding to or associating with the second binding reagent can be separately added and detected. Those skilled in the art can readily identify suitable detection means for use in the present methods.

Any indicator or detection reagent such as enzymes, fluorescent molecules, radiolabels, or other detectable marker known to those skilled in the art can be used. Enzymes are particularly useful as indicator agents. If the label is an enzyme, after washing to remove unbound receptor, a solution of the enzyme substrate is added. If the device has bound to it the allergen specific IgE, then the IgE will have bound to it a portion of labeled receptor. The enzyme will cause the substrate to react and generate, if properly selected, a new, and easily detectable enzymatic-reaction end product. A particularly useful end product is a chromophore which results in a visual color change. If a label other than an enzyme is used, the procedure can be varied. Fluorescence on the porous member can be measured by known methods if a fluorescing label is used. If a radionuclide label, such as ^{125}I is used, the porous member can be removed and counted.

The addition of the sample, second binding reagent and any desired washing buffers can be preceded by brief incubation periods to permit more extensive binding of the allergen-specific IgE in the sample to increase the sensitivity of the assay. However, in the preferred methods of the present invention, such incubation steps are

WO 02/066602

12

PCT/US02/00324

either unnecessary or are very brief, i.e., generally on the order of 60 seconds or less. The flow of solutions containing the sample or second binding reagent results in a substantially faster rate of binding than is observed in the absence of flow.

Accordingly, the total time required for performing the test is about 5 minutes or less, and preferably less than about 3 minutes.

The present invention also provides methods of prescribing immunotherapy treatment in animals having IgE-mediated allergic disease. Such methods include obtaining a sample from an animal having symptoms of allergic disease, analyzing the sample according to the immunoassays methods described above to detect the presence of allergen-specific IgE. If allergen-specific IgE is detected in the sample, the positive sample is then further analyzed to identify one or more allergens responsible for the allergic disease and an appropriate immunotherapy is then selected for the animal. Further analysis of a positive sample to identify the specific allergen or allergens responsible for the allergic disease can be accomplished by any means known to those skilled in the art, including, for example, by *in vitro* immunoassays conducted for example in a reference laboratory or by intradermal tests (e.g. conventional skin tests). Once the specific allergen or allergens have been identified, clinicians skilled in the art can determine the appropriate immunotherapy for the particular patient.

Kits for performing the methods of the present invention are also provided. In addition to the devices of the present invention, the kits of the present invention include reagents used in the methods of the present invention. Such reagents include wash buffers and detection reagents. Preferred detection reagents of the invention include monoclonal antibodies that specifically bind canine, feline, equine, and human IgE.

The following examples are provided for the purposes of illustration, and are not intended to limit the scope of the present invention.

Example 1

This example describes how the allergens for the screens are selected, and how the devices are prepared.

5 The methods of the present invention use carefully defined mixtures of allergens. The mixtures are selected to identify most allergic individuals with a minimum allergen panel.

Data from the assignee's US diagnostic laboratories was analyzed to identify allergens to which many dogs were allergic. The point of care test was designed to
10 detect 70 to 90% of animals that give positive results in the complete panel at the diagnostic laboratories, while keeping the total number of allergens in the point of care test small.

A total of more than two thousand samples was analyzed in several different sets. The samples were tested in the full panel of allergens and approximately 80%
15 tested positive to at least one allergen in the panel. (An animal that tests negative to the complete panel may be an animal that is allergic to an allergen not in the panel, or may not be allergic at all, but rather have another disease with symptoms that resemble allergy).

Of those 80%, approximately 60% are positive to either flea or dust mites. To
20 add an additional 15% of animals, other important allergens may be added. Candidate additional allergens would be Meadow Fescue, Orchard Grass, red Cedar, yellow dock, timothy grass, redtop, and blue grass. A different set of allergens may be desired in different geographic regions and/or climates, and/or for different animals (the above data is for dogs). The desired set of allergens is again determined by
25 analysis of allergen specific IgE detected in a standard or reference laboratory tests.

Data from other regions was analyzed in a similar manner. Nearly 800 dog sera were analyzed for antibodies to indoor allergens. House dust mite was the most
common allergen, followed by storage mites and flea saliva. A point of care device with house dust mite, storage mite, and flea saliva could detect 98% of the animals
30 that are positive in the indoor panel.

More than 500 dog sera were analyzed for United Kingdom general pollens; 72% of the dogs were positive to cocksfoot. The next most prevalent pollen allergens

WO 02/066602

14

PCT/US02/00324

were alder, English Plantain, Lamb's quarters, and Sheep Sorrel. A point of care device with allergens from house dust mite, storage mite, and cocksfoot or highly related grasses, could detect 91% of the animals that are positive in the complete panel.

5 Approximately 30 dog sera were analyzed for Central Europe panel; 100 % of the dogs were positive to house dust mite or storage mites. A point of care device with house dust mite and storage mite could detect 100% of the animals that are positive in the complete panel.

10 Approximately 56 dog sera were analyzed for Northern Europe panel; 65 % of the dogs were positive to house dust mite. The next most prevalent allergens were storage mites, followed by red top and velvet grass. A point of care device with house dust mite and storage mite could detect 98% of the animals that are positive in the complete panel.

15 Approximately 122 dog sera were analyzed for United Kingdom extended pollens; 58 % of the dogs were positive to Meadow fescue. The next most prevalent allergen was Grand fir. A point of care device with Meadow fescue could detect 58% of the animals that are positive in the complete panel.

20 Approximately 104 dog sera were analyzed for Mediterranean panel; 59 % of the dogs were positive to house dust mite. The next most prevalent allergens were storage mites and flea saliva. A point of care device with house dust mite, storage mite, and flea saliva could detect 97% of the animals that are positive in the complete panel.

25 To determine the correct allergens to use in the devices and methods of the invention it is also necessary to assess such allergens in a point of care format, to determine that the sera will still test positive when the allergens are present as a mixture, rather than as an isolated sample.

30 In one embodiment of the present invention, the point of care device is prepared by spotting the porous member with one mixture of allergens comprising meadow fescue, dust mite, and flea saliva allergens. Each of these allergens may be present as crude extract, purified extract, and/or genetically engineered and recombinantly expressed pure proteins. The allergens extracts or recombinant proteins are spotted onto the porous member at approximately 1,000 to 500,000

WO 02/066602

15

PCT/US02/00324

PNU/ml; or 10 µg/ml to 10 mg/ml, depending upon the particular allergen. The exact concentration required for a test must be determined experimentally, but one can begin with a concentration similar to that used in an ELISA format with the same allergen or extract. The allergens are spotted onto the porous member with spotting
5 buffer without BSA (TRIS 6.05 g/l; NaCl 8.5 g/l; NaN₃ 20 mg/l; and sucrose 10 g/l).

A spot of canine IgE is added at a different location as positive control. This is spotted at 1 µg/ml to 10 mg/ml, preferably about 5-10 µg/ml in spotting buffer with BSA (TRIS 6.05 g/l; NaCl 8.5 g/l, NaN₃ 20 mg/l, sucrose 10 g/l, and BSA 1g/l).

In another embodiment of the invention, there are two test spots on the device,
10 one with meadow fescue and house dust mite, and the other with flea saliva proteins, in addition to the control spot of canine IgE.

Example 2

This example describes the production of mouse anti-canine IgE monoclonal
15 antibodies (mAb) essentially by the method of Kohler and Milstein (Kohler and Milstein, (1975), Nature 256:495-497), which is herein incorporated by reference.

Canine IgE was prepared by pooling canine serum and fractionating by ammonium sulfate precipitation. The fraction from 30-55% saturation was collected and passed through a Protein G column. The flow through fraction was applied to a
20 rHuman IgE Receptor Affiprep (Biorad) column. Retained IgE was recovered from the column with high pH elution. A polybuffer Exchanger column further purified IgE. Fractions eluting at pH5.7 to 4.95 were pooled.

Two Balb/c mice were immunized in the footpad with 30 µg canine IgE suspended in phosphate buffered saline (PBS) and Freund's complete adjuvant. A
25 boost of 30 µg canine IgE was given in PBS/Freund's incomplete adjuvant in the footpad on day 14. Sera was tested for presence of anti-canine IgE antibodies at day 21. The mouse exhibiting the highest titer against canine IgE by ELISA was boosted with 5 µg canine IgE in PBS, intravenously on day 42. Spleenocytes were harvested three days later, and fused with mouse SP2/0 myeloma cells at mid-log growth phase
30 using PEG.

Cells were cultured in RPMI medium containing 20% fetal bovine serum, 10% thymocyte conditioned media, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 60

WO 02/066602

16

PCT/US02/00324

μM β -mercaptoethanol. Hybrids were selected by adding 100 μM hypoxanthine, 10 μM thymidine and 0.4 μM aminopterin. Wells containing hybridoma colonies were tested for specific mAb production against canine IgE, IgG, and IgM by ELISA. Antigenes were coated at 5 ng/well. Wells positive to canine IgE were expanded and
5 dilution cloned by limiting dilution until stable mAb secreting cell lines were identified.

Monoclonal antibody is either supplied in a crude form as tissue culture supernatant, ascites or bioreactor supernatant. Specific mAb can be purified using affinity chromatography or ion exchange chromatography from any of these fluid
10 types.

Twenty antibodies reactive to canine IgE epsilon chain by ELISA were generated. All mAbs recognize canine IgE and not canine IgG or IgM by ELISA. Of these, fifteen recognize the 71 kDa epsilon chain by Western blots except three (H-198, 199, and 206) and two are yet to be tested (H-192 and 204). Three Western blots
15 patterns emerged using these mAbs to probe canine IgE; one set of mAbs (H-195, 197, and 208) recognize the 71 kDa epsilon chain of canine IgE only; a second set of mAbs (H-189, 190, 191, 193, 203, 207, 219 and 220) recognize the 71 kDa epsilon chain of canine IgE and a band running right above the dye front (at about 6 kDa); and the third set of mAbs (H-200, 201, 202, and 205) recognize the 71 kDa epsilon
20 chain of canine IgE and a broad diffuse band at 55 kDa. This third set of mAbs do not recognize canine IgG gamma chain, suggesting that the extra band is not a contaminant of dog IgG. This interesting binding domain appears to have some relationship with the canine IgE epsilon chain. All but one mAb (H-204) were evaluated, and five of these mAbs (H-191, 192, 198, 199, and 208) recognized feline
25 IgE by ELISA even better than canine IgE, and in some cases reactivity with canine IgE was not even detectable. One mAb (H-201) recognized feline IgE equally well as canine IgE.

Antibodies were grouped into 9 categories based on ELISA reactivity patterns. The highest titered mAb from each group was purified and screened as a canine IgE
30 detection POCT candidate (H-189, 199, 200, 201, 204, 205, 206, 207, and 208). From these mAbs, H-200, 201, and 207 were chosen. Further testing with these three mAbs indicated that H-207 was the preferred mAb to be utilized in the POCT.

The antibodies mentioned above can be utilized in various assay configurations to detect various levels of canine IgE present in complex samples such as dog sera, PBMCs or possibly even blood. They work well in combination with the human FcεRIα to calculate total serum IgE. With appropriate standards, dog IgE levels could easily be measured and compared to various stages of immune stimulation, allergen exposure, etc. Additional applications of anti-canine IgE mAbs include application to simplifying purification of canine IgE and/or canine IgE immune complexes by affinity chromatography methods. Use of mAbs specific to epsilon chain would easily and more readily remove dog IgE from sample sources such as serum as compared to conventional chromatography methods. Other uses include monitoring separation of intact canine IgE, epsilon chain during purification processes. Flow cytometry studies could be performed by using these antibodies to map cell surface IgE and to check intact canine IgE, epsilon chain during purification processes. Flow cytometry studies could be performed by using these antibodies to map cell surface IgE and to check the validity of FcεRIα based results. In addition, the anti-canine epsilon chain mAbs may be used for immunotherapy for allergic dogs.

Mouse anti-feline IgE mAbs, mouse anti-equine IgE mAbs, and mouse anti-human IgE mAbs are made in the same manner as above. The mAbs may also be prepared in animals other than mouse by standard techniques for preparation of monoclonal antibodies for the above cited uses.

Example 3

This Example discloses the ability of the anti-canine IgE monoclonal antibodies to bind antigen-specific, canine or feline IgE, as measured by solid phase ELISA, using the following protocol:

The wells of a microtiter plate were coated with either Der F protein (30 Protein Nitrogen Units (PNU)/well) (Center Labs, Port Washington, N.Y.), flea saliva antigen (FSA) (100 ng/well) (prepared as described in U.S. Patent 5,646,115) or canine IgG (1μg/well)(Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA), diluted in CBC buffer (50 mM carbonate, pH 9.6) and the plate stored, covered, overnight at 4°C. (Wells coated with IgG serve to measure the level of non-specific immunoglobulin binding.) The following day, excess fluid was removed from the wells, the plates blotted dry, and 200 μl of Assay buffer (4% fetal calf serum in PBS

WO 02/066602

18

PCT/US02/00324

containing 0.05% Tween-20) were added to each well. Following a 60 minute incubation at room temperature (RT), the wells were washed four times using Wash buffer (PBS containing 0.05% Tween-20), and 100 μ l of canine or feline serum (diluted 1:20 in Assay buffer) were added to each well. Some wells (labeled 'Heated Serum') received serum which had been heated at 56°C for one hour prior to use. (This procedure is known to denature the IgE-Fc receptor binding region which allows one to determine which antibodies bind IgE in or near this region) The plates were incubated overnight at 4°C, after which the wells were washed four times using Wash buffer, and 100 μ l of supernatant from anti-canine IgE hybridoma cells (prepared as described in Example 2), diluted in Assay buffer as indicated, were added to each well. The plates were incubated for 2 hours at room temperature after which, the wells were washed four times using Wash buffer and 100 μ l of HRP-conjugated, donkey, anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA), diluted 1:2000 in Assay buffer, were added to each well. After incubating at RT for one hour, the wells were washed four times using Wash buffer and 100 μ l of TMB Peroxidase Substrate System (KPL Labs, Gaithersburg, MD) were added to each well. The plates were incubated at RT until color developed within the wells (approximately ten minutes), at which time the reaction was stopped by adding 100 μ l of 1.0M phosphoric acid to each well. Background levels of non-specific binding were measured by preparing wells as described above but without adding canine or feline serum. Using an ELISA plate reader, the optical density of each well was measured at 450 nm, the results of which are shown in Table 1. The background level of absorbance was subtracted from all of the values shown in Table 1. Values over 100 are considered to be positive.

25 Table 1.

mAb ID	MAb Dilution	Dog Serum			Cat Serum			Dog IgG Serum
		DerF			Flea Saliva Ag			
		Serum	Heated Serum	Serum (-)	Serum	Heated Serum	Serum (-)	
H-219	1:250	3249	479	40	5	22	5	455
	1:500	3028	369		4	4		
	1:1000	2819	270		10	10		
H-220	1:250	49	1533	0	7	6	4	316
	1:500	42	1234		8	4		
	1:1000	60	870		7	6		
H189	1:250	39	1838	2	7	6	8	473

WO 02/066602

19

PCT/US02/00324

	1:500	37	1714		3	1		
	1:1000	42	1465		2	3		
H-190	1:250	2783	2970	0	65	21	12	1192
	1:500	2227	2798		34	10		
	1:1000	1578	2426		24	7		
H-191	1:250	35	57	0	3630	2636	0	22
	1:500	46	55		3517	2351		
	1:1000	44	60		3245	1714		
H-192	1:250	55	62	8	3418	2926	35	64
	1:500	44	52		3071	2273		
	1:1000	48	71		2595	1808		
H-193	1:250	72	1572	0	13	7	9	368
	1:500	61	1306		11	14		
	1:1000	71	972		8	13		
H-195	1:250	3752	2027	0	26	30	22	1260
	1:500	3604	1477		18	21		
	1:1000	3424	974		21	27		
H-197	1:250	1953	2882	0	28	12	6	902
	1:500	1294	2415		17	11		
	1:1000	739	1779		14	16		
H-198	1:250	120	60	0	3818	2923	1	14
	1:500	81	44		3803	2841		
	1:1000	79	45		3714	2779		
H-199	1:250	60	50	1	3108	2502	0	85
	1:500	44	47		2977	2242		
	1:1000	43	47		2736	1959		
H-200	1:250	3781	2420	4	29	33	28	1355
	1:500	3744	1897		15	17		
	1:1000	3532	1436		11	11		
H-201	1:250	3606	2538	1	3695	3061	26	1782
	1:500	3473	2195		3557	2480		
	1:1000	3223	1904		3446	2705		
H-202	1:250	3697	1892	0	20	17	19	1170
	1:500	3826	1744		15	11		
	1:1000	3620	1343		22	9		
H-203	1:250	3803	2425	0	69	69	68	1986
	1:500	3603	2024		39	42		
	1:1000	3424	1478		32	30		
H-205	1:250	67	3483	0	12	6	9	472
	1:500	66	1245		6	3		
	1:1000	68	752		8	10		
H-206	1:250	1972	1446	0	3	18	8	472
	1:500	1615	1284		4	3		
	1:1000	1156	972		9	11		
H-207	1:250	3393	720	4	12	11	12	663
	1:500	3085	546		8	6		
	1:1000	2617	353		11	10		
H-208	1:250	105	51	1	3053	2939	5	22
	1:500	101	67		2672	2797		
	1:1000	122	59		2184	2488		

Example 4

WO 02/066602

21

PCT/US02/00324

i:100	2897	11	77	26	5	i	30	4	2
1:300	2960	6	38	11	5	0	22	0	0
1:1000	2679	5	17	8	0	0	17	4	0
	H-190			H-191			H-192		
mAb	Dog	Cat	Dog	Dog	Cat	Dog	Dog	Cat	Dog
Dilution	IgE	IgE	IgG	IgE	IgE	IgG	IgE	IgE	IgG
1:100	3985	152	108	15	576	0	2726	4200	0
1:300	3062	53	67	10	353	0	1199	4200	10
1:1000	2444	17	22	3	137	0	759	3713	6
	H-193			H-195			H-197		
mAb	Dog	Cat	Dog	Dog	Cat	Dog	Dog	Cat	Dog
Dilution	IgE	IgE	IgG	IgE	IgE	IgG	IgE	IgE	IgG
1:100	24	5	4	4000	16	127	2570	78	67
1:300	16	5	0	2851	11	75	3132	32	35
1:1000	9	2	0	2069	5	25	2789	14	14
	H-198			H-199			H-200		
mAb	Dog	Cat	Dog	Dog	Cat	Dog	Dog	Cat	Dog
Dilution	IgE	IgE	IgG	IgE	IgE	IgG	IgE	IgE	IgG
1:100	2871	4200	3	1240	3181	0	3371	35	137
1:300	1510	4200	71	1091	3344	1	2434	19	120
1:1000	1187	3865	0	993	3068	0	2857	6	41
	H-201			H-202			H-203		
mAb	Dog	Cat	Dog	Dog	Cat	Dog	Dog	Cat	Dog
Dilution	IgE	IgE	IgG	IgE	IgE	IgG	IgE	IgE	IgG
1:100	2750	3423	82	3523	68	107	2926	15	177
1:300	3197	3732	88	2938	5	85	3509	22	197
1:1000	3387	3627	71	2000	3	33	3704	13	168
	H-205			H-206			H-207		
mAb	Dog	Cat	Dog	Dog	Cat	Dog	Dog	Cat	Dog
Dilution	IgE	IgE	IgG	IgE	IgE	IgG	IgE	IgE	IgG
1:100	27	0	0	2153	5	19	2690	6	35
1:300	6	3	2	2011	6	14	1925	10	16
1:1000	5	0	0	1553	3	4	1414	0	4
	H-208								
mAb	Dog	Cat	Dog						
Dilution	IgE	IgE	IgG						
1:100	131	1880	0						
1:300	219	2099	0						
1:1000	151	1617	64						

Example 5

This example discloses the ability of anti-feline IgE monoclonal antibodies to bind antigen-specific canine or feline IgE. Hybridoma cell lines producing anti-feline IgE were generated using the procedure described in Example 2, with the exception the mice were immunized with feline IgE instead of canine IgE. The ELISA's were performed using the solid phase ELISA protocol outlined in Example 3 and substituting the anti-feline IgE hybridoma supernatants for anti-canine IgE hybridoma supernatants. Additionally, to measure the background level of non-specific

WO 02/066602

22

PCT/US02/00324

immunoglobulin binding, some wells were coated with feline IgG instead of canine IgG. The results of these ELISA's are shown in Table 3. Background levels of absorbance have been subtracted from all values shown in the table. Values greater than 100 are considered positive.

5 Table 3.

		Dog Serum				Cat Serum				Pure Cat IgG Serum
		DerF		Flea Saliva		DerF		Flea Saliva		
		Serum	Heated Serum	Serum	Heated Serum	Serum	Heated Serum	Serum	Heated Serum	
H-100	1:250	27	43	40	38	2473	2794	2925	2371	41
	1:500	30	46	39	41	1932	2269	2605	2083	72
	1:1000	39	50	39	42	1287	1582	2001	1479	17
H-101	1:250	56	67	46	45	3577	3464	3741	3287	59
	1:500	41	63	38	47	3144	3042	3392	2966	84
	1:1000	74	61	39	45	2474	2465	2921	2416	21
H-102	1:250	60	54	32	43	3586	3444	3628	3239	33
	1:500	34	46	27	36	3188	3052	3383	2984	53
	1:1000	30	47	29	39	2607	2501	2935	2424	28
H-103	1:250	83	64	43	44	30	35	6	25	0
	1:500	79	72	53	42	3	68	0	5	0
	1:1000	48	54	41	48	7	14	1	7	0
H-106	1:250	53	59	43	43	1268	1443	1580	1002	0
	1:500	42	74	38	50	861	1008	1257	713	5
	1:1000	58	52	45	63	450	537	705	433	0
H-99	1:250	110	205	215	261	3567	4097	3632	3522	4200
	1:500	90	113	130	152	3363	3962	3277	3315	4200
	1:1000	74	107	111	125	3016	3814	3305	2978	4089
H-104	1:250	4200	4200	4200	4200	4200	4200	3895	3929	4200
	1:500	4200	4200	4200	4200	4121	4200	3755	3883	4200
	1:1000	4200	4200	4067	4093	3932	3919	3717	3746	3892
H-107	1:250	49	51	30	42	1418	2226	217	587	3975
	1:500	45	62	15	47	1225	1960	172	504	3808
	1:1000	37	76	40	44	879	1509	143	420	3140

This example demonstrates that all of these mAbs recognize feline IgE. Five out of the eight mAbs are specific for feline IgE whereas two mAb recognizes both feline IgE and IgG and one mAb binds feline IgE, IgG and canine IgE.

Example 6

This example discloses the ability of the anti-feline IgE monoclonal antibodies to bind hFcεRIα-immobilized, canine or feline IgE. This example uses the capture-assay protocol described in Example 4 with the exception that anti-feline IgE

WO 02/066602

23

PCT/US02/00324

hybridoma cell supernatants were used in place of anti-canine IgE hybridoma cell supernatants. The results of this assay are shown below in Table 4.

Table 4.

mAb Dilution	H-99		H-100		H-101	
	Canine IgE	Feline IgE	Canine IgE	Feline IgE	Canine IgE	Feline IgE
1:00	0	206	24	2496	8	2443
1:300	0	186	11	1591	0	1381
1:1000	0	60	11	846	0	1111
mAb Dilution	H-102		H-103		H-104	
	Canine IgE	Feline IgE	Canine IgE	Feline IgE	Canine IgE	Feline IgE
1:00	3	2325	0	0	333	476
1:300	0	1002	0	0	229	352
1:1000	6	1087	0	0	287	169
mAb Dilution	H-106		H-107			
	Canine IgE	Feline IgE	Canine IgE	Feline IgE		
1:00	9	1238	0	37		
1:300	0	491	0	33		
1:1000	5	245	2	37		

5

Example 7

This example discloses a method for the purification of recombinantly produced equine FcReRI α (EqFcReRI α). Cultures expressing recombinant EqFcReRI α were produced as described in US Patent 6,057,127, and the supernatants collected and adjusted to a conductivity of 2.2 mv and a pH of 6.0. The sample was applied to a SP-Sepharose Hi-Trap column (Pharmacia, Peapack, NJ) which had been pre-equilibrated with Buffer A (20 mM Na-PO₄, pH 6.0). Following application of the sample, the column was washed with Buffer A and the bound proteins eluted using a step-gradient of 0.1M, 0.15M, 0.2M, 0.3M, 0.4M, 0.5M and 1.0M NaCl in Buffer A. Fractions containing EqFcReRI α , which eluted at 0.2M, were pooled, concentrated, and applied to a Superdex 75 10/30 column which had been equilibrated in PBS. 0.5 ml

fractions were collected and analyzed using a Novex 14% SDS-PAGE gel (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to manufacturers instructions and fractions containing EqFccRI α were pooled.

Example 8

5 This example discloses the ability of anti-equine IgE monoclonal antibody H-357 to recognize antigen-bound equine IgE using a solid-phase ELISA. mAb H-357 was produced using the procedure outlined in Example 2 with the exception the mice were immunized with equine IgE instead of canine IgE. H-357 was subsequently
10 shown to be specific for equine IgE. The ELISA's were performed using the following protocol:

The wells of a microtiter plate were coated with the indicated allergen and the plate incubated overnight at 4°C. (All allergens were obtained from Greer Labs, Lenoir, N.C. and coated at 30 PNU/well with the exception of D. farinae which was
15 obtained from Center Labs and coated at 30 allergy units (AU)/well). The following day, excess fluid was removed, 200 μ l of Assay buffer added to each well and the plate incubated at room temperature (RT) for one hour. The plate was washed four times using Wash buffer, and 100 μ l of equine sera (diluted 1:20 in Assay buffer) added to each well and the plate incubated ON at 4°C. The following day, the plate
20 was washed four times using Wash buffer and either biotinylated anti-equine IgE mAb H357 (10 ng), biotinylated, recombinant human Fc epsilon receptor I alpha chain (huFccRI α) (13 ng) (prepared as described in US Patent 5,945,294) or biotinylated recombinant equine Fc epsilon receptor alpha (EqFccRI α) (13 ng) (prepared as described in Example 7) was added to the wells. (All molecules were
25 biotinylated following standard procedures using biotin-LC-hydrazide). The plate was incubated at RT for two hours and then washed four times using Wash buffer. Alkaline phosphatase (AP)-conjugated streptavidin (50 ng/well) (KPL Labs) was added to each well and the plate incubated at RT for one hour. Control wells were prepared as described above but without the addition of anti-equine IgE mAb or IgE
30 receptors. The plate was washed using Wash buffer, 100 μ l of p-nitrophenyl phosphate (Moss, Inc., Pasadena, MD) added to each well and the plate incubated at RT for one hour. The color reaction was stopped by the addition of 50 μ l of 20 mM

L-cysteine to each well and the absorbance was read at 405 nM using an ELISA plate reader. The results, with the background values subtracted, are shown in Table 5.

Table 5.

Horse #1			
Allergen	H-357	HuFceR1 α	EqFceR1 α
Black Fly	970	531	575
Horse Fly	1600	695	1134
D. farinae	4035	3807	3942
Horse #2			
Allergen	H-357	HuFceR1 α	EqFceR1 α
Alfalfa	691	448	526
Black Ant	2377	1418	1539
Horse Fly	1484	732	1067
Horse #3			
Allergen	H-357	HuFceR1 α	EqFceR1 α
Black Ant	2138	1719	1972
Horse Fly	450	723	913
Horse #4			
Allergen	H-357	HuFceR1 α	EqFceR1 α
D. farinae	732	414	405
Horse #5			
Allergen	H-357	HuFceR1 α	EqFceR1 α
Beech	364	388	351
Horse #6			
Allergen	H-357	HuFceR1 α	EqFceR1 α
Beech	143	140	108
Horse #7			
Allergen	H-357	HuFceR1 α	EqFceR1 α
Beech	305	345	266

5

The data demonstrates the absorbance obtained when H-357 is used to detect IgE is similar to that observed when either human or equine FceR1 α is used.

10 Example 9

This example discloses the specificity of anti-equine IgE monoclonal antibody H-357 for horse IgE. The wells of a microtiter plate were coated, at 50ng/well, with either equine IgE, canine IgE, feline IgE or human IgE in CBC buffer and the plate incubated overnight at 4°C. Excess fluid was removed, 200 μ l of Assay buffer added to each well and the plate incubated at room temperature (RT) for one hour. The plate was washed four times using Wash buffer and 50 μ l of serially diluted (from 400 to 3.1 ng/ml in Assay buffer) biotinylated anti-equine IgE mAb (biotinylated by standard

15

WO 02/066602

26

PCT/US02/00324

procedures using biotin-LC-hydrazide) were added to each well. The plate was incubated at RT for two hours and then washed four times using Wash buffer. HRP-conjugated streptavidin (KPL Labs) was added to each well (10 ng/well) and the plate incubated at RT for one hour. Control wells were prepared as described above but without the addition of anti-equine IgE mAb. The plate was washed using Wash buffer, 100 μ l of TMB Substrate System added to each well and the plate incubated at RT for 5 minutes. The color reaction was stopped by the addition of 100 μ l 1M H₃PO₄ to each well and the absorbance was read at 450 nM using an ELISA plate reader and the results are shown in Table 6. Background levels have been subtracted from the values shown and all values over 100 are considered positive.

Table 6.

mAb H-357 (ng/well)	Coating Immunoglobulin			
	Equine IgE	Canine IgE	Feline IgE	Human IgE
20	2639	208	3	4
10	2567	180	6	0
5	2496	161	0	0
2.5	2077	134	0	0
1.25	1419	98	0	0
.63	848	61	0	0
.31	484	35	3	2
.16	278	15	1	1

This example demonstrates mAb H-357 has a much greater specificity for equine IgE than for canine, feline or human IgE.

Example 10

This example discloses the ability of huFceRI α to bind surface-bound IgE from various species. This assay was performed using the basic protocol outlined in Example 9 with the exception that biotinylated-huFceRI α , instead of anti-equine IgE mAb, was used to detect surface-bound IgE. In addition, each well was coated with 100 ng of IgE instead of 50ng IgE, concentrations of receptor were changed and the incubation time with the huFceRI α shortened to one hour. Background levels were measured by preparing control wells with all reagents except huFceRI α . The results of this assay are shown in Table 7. Background values have been subtracted from those shown in the Table.

Table 7.

FcεRIα (ng/ml)	Coating Immunoglobulin			
	Human IgE	Canine IgE	Feline IgE	Equine IgE
1300	1482	2286	2973	2123
650	2109	2409	3038	2108
325	1933	2327	3007	2128
162.5	1896	2321	2930	2058
81.3	2128	2307	2741	1867
40.6	1054	2100	2732	1698
20.3	1039	1964	2462	1344
10.2	1462	1911	2443	1132
5.1	1276	1509	2147	881
2.5	783	1050	1447	556
1.3	574	710	891	330

The data demonstrates huFcεRIα is capable of recognizing IgE from humans, canines, felines and equines with equal affinity.

5

Example 11

This example discloses the isotypes of the various monoclonal antibodies of the present invention. Isotypes were determined using the IsoStrip Kit (mouse monoclonal antibody isotyping kit) (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)

10 according to the manufacturer's instructions. The results of these tests are shown below in Table 8.

Table 8

mAb Designation	Isotype
H99	IgG ₁ , k
H100	IgG ₁ , k
H101	IgG ₁ , k
H102	IgG ₁ , k
H103	IgM, k
H104	IgG ₁ , k
H106	IgG ₁ , k
H107	IgG ₁ , k
H189	IgG _{2b} , k
H190	IgG ₁ , k
H191	IgG ₁ , k
H192	IgG ₁ , k
H193	IgG _{2c} , k
H195	IgG ₁ , k

H197	IgG ₁ k
H198	IgG ₁ k
H199	IgG _{2b} k
H200	IgG ₁ k
H201	IgG ₁ k
H202	IgG ₁ k
H203	IgG ₁ k
H204	IgG ₁ λ
H205	IgG _{2b} k
H206	IgG _{2a} k
H207	IgG ₁ k
H208	IgG _{2b} k
H219 (H187)	IgG ₁ k
H220 (H188)	IgG _{2a} k

Example 12

This example discloses the ability of EqFccRIα to bind surface-bound IgE from various species. This assay was performed using the basic protocol outlined in Example 9 with the exception that biotinylated-EqFccRIα, instead of anti-equine IgE mAb, was used to detect surface-bound IgE. In addition, each well was coated with 100 ng of IgE instead of 50ng IgE, the concentrations of receptor were changed and the incubation time with the EqFccRIα shortened to one hour. Background levels were measured by preparing control wells with all reagents except EqFccRIα. The results of this assay are shown in Table 8. Background values have been subtracted from those shown in the Table 9.

Table 9.

FccRIα (ng/ml)	Coating Immunoglobulin			
	Human IgE	Canine IgE	Feline IgE	Equine IgE
1300	142	1805	2612	1838
650	173	1706	2663	1777
325	214	1733	2807	1834
162.5	112	1562	2669	1879
81.3	79	1657	2567	1813
40.6	34	1464	2615	1706
20.3	34	1115	2328	1322
10.2	41	903	2129	1151
5.1	36	599	1653	957

WO 02/066602

29

PCT/US02/00324

2.5	44	367	1053	684
1.3	7	222	508	385

The data demonstrates E_qFcεRIα binds canine, feline and equine IgE with high affinity but has a much lower affinity for human IgE.

Example 13

5 This example provides the general protocol for performing the immunoassays of the present invention.

Immediately prior to use, the device is wetted with two drops of wash buffer (TRIS 6.05 g/l; NaCl 8.5 g/l; NaN₃ 20 mg/l; Bovine Serum Albumin (BSA) 2.5 g/l; Tween 20 5.0 ml/l; and pH adjusted with concentrated HCl to 7.5 ± 0.1). The two
10 drops are added one right after the other, and the drops are allowed to absorb before proceeding.

Two drops of sample (undiluted) are then added, one immediately after the other, and the drops are allowed to absorb before proceeding. Two drops of wash buffer are then added, one at a time, and the drops are allowed to absorb before
15 proceeding.

Two drops of biotinylated mouse anti-canine IgE are then added, one immediately after the other, and the drops are allowed to absorb before proceeding. Two drops of wash buffer are then added, one at a time, and the drops are allowed to absorb before proceeding.

20 Two drops of streptavidin-alkaline phosphatase are then added, one immediately after the other, and the drops are allowed to absorb before proceeding. Two drops of wash buffer are then added, one at a time, and the drops are allowed to absorb before proceeding.

25 Two drops of enzyme substrate are then added, one immediately after the other, and the drops are allowed to absorb before proceeding. Wait a minimum of 30

WO 02/066602

30

PCT/US02/00324

seconds, and add four drops of wash buffer are then added, one immediately after the other. Results can be read immediately and are stable for two hours.

In an alternative embodiment of the invention, the detector reagent is another indicator reagent such as immunogold, or a fluorescent or radioactive compound, and
5 the method of reading the results will change appropriately.

Although the invention has been described with reference to the presently preferred embodiments, it should be understood to those skilled in the art that various modifications can be made without departing from the spirit of the invention.

Accordingly, the invention is limited only by the following claims.

What is claimed is:

1. A device for detecting allergen-specific IgE in a sample obtained from an animal, said device comprising:
 - (a) a first member comprising a porous member having a sample
5 receiving area, wherein said porous member is spotted with at least one mixture of allergens and a control spot; and
 - (b) a support member.
2. The device of Claim 1, wherein the mixture of allergens is deposited on one spot of the porous member.
- 10 3. The device of Claim 1, wherein mixtures of allergens are deposited on multiple spots of the porous member.
4. The device of Claim 1, wherein the mixture of allergens is deposited on an area of the porous member separate from the sample receiving area.
5. The device of Claim 1, wherein the animal is a dog, cat, horse or
15 human.
6. The device of Claim 1, wherein the sample is a bodily fluid obtained from the animal.
7. The device of Claim 6, wherein the bodily fluid is whole blood or a component thereof, urine or a mucosal secretion.
- 20 8. The device of Claim 7, wherein the bodily fluid is whole blood, serum or plasma.
9. The device of Claim 1, wherein said device further comprises an absorbent member in capillary communication with the porous first member, wherein

WO 02/066602

32

PCT/US02/00324

said absorbent member is selected to induce flow of liquid through the first member without the use of external means.

10. The device of Claim 1, wherein the control spot contains purified IgE.

11. The device of Claim 1, wherein said mixture of allergens comprise one
5 or more types of allergens selected from the group consisting of cat allergens, dog allergens, flea saliva proteins, house dust mite allergens, Japanese Cedar pollen, ragweed allergens, ryegrass allergens, meadow fescue, orchard grass, Bermuda grass, sheep sorrel, Kochia, Russian thistle, yellow dock, timothy grass, redtop, birch and blue grass allergens.

12. A method for detecting the presence of allergen-specific IgE in a
10 sample, said method comprising the steps of:

(a) adding the sample to the sample receiving area of the device of Claim 1, whereby at least one allergen in the mixture of allergens spotted on the porous member binds to allergen-specific IgE if present in the sample;

15 (b) contacting the mixture of allergens with a reagent that selectively binds to allergen-specific IgE; and

(c) detecting bound allergen-specific IgE if present in the sample.

13. The method of claim 12, wherein the reagent is labeled.

14. The method of claim 13, wherein the labeled reagent is an anti-IgE
20 antibody or an IgE receptor.

15. The method of claim 14, wherein the labeled reagent is an anti-canine IgE, anti-feline IgE, anti-equine IgE or anti-human IgE monoclonal antibody.

WO 02/066602

33

PCT/US02/00324

16. The method of claim 12, wherein the sample is a bodily fluid obtained from an animal.
17. The method of claim 16, wherein said bodily fluid is whole blood or a component thereof, urine or a mucosal secretion.
- 5 18. A method for prescribing immunotherapy treatment of an animal having an allergic disease, said method comprising the steps of:
- (a) obtaining a sample from the animal;
 - (c) analyzing the sample according to the method of Claim 12 to detect the presence of allergen-specific IgE in said sample, wherein the presence of
10 allergen-specific IgE identifies the sample as a positive sample;
 - (c) analyzing the positive sample to identify one or more allergens responsible for said allergic disease; and
 - (d) selecting an appropriate immunotherapy for said animal to treat the allergic disease.
- 15 19. The method of Claim 18, wherein an *in vitro* immunoassay or an intradermal test is used to analyze the positive sample.
20. A kit comprising the device of Claim 1 and ancillary reagents.

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/066602 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/558, 33/68 (74) Agents: **VERSER, Carol, Talkington** et al.; Heska Corporation, 1613 Prospect Parkway, Fort Collins, CO 80525 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/00324 (81) Designated States (*national*): AT, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 3 January 2002 (03.01.2002) (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, UY), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/259,450 3 January 2001 (03.01.2001) US
60/325,812 28 September 2001 (28.09.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
US 60/325,812 (CON)
Filed on 28 September 2001 (28.09.2001)
US 60/259,450 (CON)
Filed on 3 January 2001 (03.01.2001)
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): **HESKA CORPORATION** [US/US]; 1613 Prospect Parkway, Fort Collins, CO 80525 (US).
Published:
with international search report
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **MCCALL, Catherine, A.** [GB/US]; 709 Pleasant Street, Boulder, CO 80302 (US). **BABU, Uma, Mahesh** [US/US]; 5627 Weeping Way, Fort Collins, CO 80528 (US). **RADECKI, Steven, V.** [US/US]; 150 North County Road 3, Fort Collins, CO 80534 (US).
(88) Date of publication of the international search report:
27 February 2003
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/066602 A3

(54) Title: DETECTION OF ALLERGEN-SPECIFIC IGE

(57) Abstract: This invention relates to point-of-care devices and methods to screen animals with suspected IgE-mediated allergic disease. The present invention provides a simple and rapid preliminary immunassay screen, in which a defined mixture of clinically relevant allergens is used to capture allergen-specific IgE present in a sample, followed by a second binding reagent that selectively binds IgE. The present invention further provides methods for prescribing immunotherapy treatment in animals having IgE-mediated diseases. Devices and kits useful for carrying out the methods of the invention are also provided.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 02/00324
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/558 G01N33/68		
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) IPC 7 G01N		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 556 745 A (ABBOTT LAB) 25 August 1993 (1993-08-25) abstract page 5, line 1 - line 50; figures 1,2; examples 1,14,16 ---	1-20
X	DE 197 21 151 A (MERCK PATENT GMBH) 26 November 1998 (1998-11-26) abstract; claims; examples 1,2 ---	1-20
X	WO 97 20859 A (IDEXX LAB INC) 12 June 1997 (1997-06-12) page 6, line 15 -page 8, line 30 page 15, line 1 -page 17, line 15 page 31, line 26 -page 36, line 9 --- -/--	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 *I* 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. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 October 2002		Date of mailing of the international search report 06/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Luis Alves, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor's Name	Application No
	PCT/US 02/00324

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 29696 A (QUIDEL CORP) 22 December 1994 (1994-12-22) abstract page 20, line 1 -page 22, line 35; figure 3; example 1 ---	1-11,20
A	DE 38 20 556 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 21 December 1989 (1989-12-21) abstract; examples 1,2 ---	1-20
A	WILTSHIRE STEVE ET AL: "Detection of multiple allergen-specific IgEs on microarrays by immunoassay with rolling circle amplification" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WINSTON, US, vol. 46, no. 12, December 2000 (2000-12), pages 1990-1993, XPO02207139 ISSN: 0009-9147 the whole document -----	1-20

1

Form PCT/ISA(210) (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 02/00324

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0556745	A	25-08-1993	EP 0556745 A1 25-08-1993
DE 19721151	A	26-11-1998	DE 19721151 A1 26-11-1998 WO 9853321 A1 26-11-1998 EP 1019730 A1 19-07-2000 HU 0003843 A2 28-03-2001 JP 2002514306 T 14-05-2002 PL 336978 A1 31-07-2000 TR 9902855 T2 21-02-2000
WO 9720859	A	12-06-1997	AU 1146897 A 27-06-1997 WO 9720859 A1 12-06-1997
WO 9429696	A	22-12-1994	EP 0705426 A1 10-04-1996 JP 8511621 T 03-12-1996 WO 9429696 A1 22-12-1994
DE 3820556	A	21-12-1989	DE 3820556 A1 21-12-1989

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/68	G 0 1 N 33/543 5 2 1	
	G 0 1 N 33/577 B	
	G 0 1 N 33/68	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 バブ, ウマ マヘッシュ
 アメリカ合衆国 コロラド 8 0 5 2 8, フォート コリンズ, ウィーピング ウェイ 5 6
 2 7

(72) 発明者 ラデッキ, スティーブン ブイ.
 アメリカ合衆国 コロラド 8 0 5 2 4, フォート コリンズ, ノース カントリー ロード
 3 1 5 0

Fターム(参考) 4C084 AA17 NA14 ZB072 ZB132

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004521336A5	公开(公告)日	2005-07-07
申请号	JP2002566309	申请日	2002-01-03
[标]申请(专利权)人(译)	六斯卡公司		
申请(专利权)人(译)	Hesuka公司		
[标]发明人	マックコールキャサリンエイ バブウママハッシュ ラデッキステイーブンブイ		
发明人	マックコール, キャサリン エイ. バブ, ウマ マハッシュ ラデッキ, ステイーブン ブイ.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K45/00 A61P37/00 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	A61P37/00 G01N33/558 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.Q G01N33/53.N G01N33/53.T A61K45/00 A61P37/00 G01N33/543.521 G01N33/577.B G01N33/68		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB072 4C084/ZB132		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/259450 2001-01-03 US 60/325812 2001-09-28 US		
其他公开文献	JP2004521336A		

摘要(译)

本发明涉及用于筛选患有疑似IgE介导的过敏性疾病的动物的即时医疗设备和方法。本发明提供了一种简单而快速的初步免疫测定筛选，其中使用临床相关变应原的确定混合物捕获样品中存在的变应原特异性IgE，然后是选择性结合IgE的第二结合试剂。本发明进一步提供了在患有IgE介导的疾病的动物中规定免疫疗法治疗的方法。还提供了可用于实施本发明方法的装置和试剂盒。