

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 534682

(P2002 - 534682A)

(43)公表日 平成14年10月15日(2002.10.15)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ド* (参考)
G 0 1 N 33/543	595	G 0 1 N 33/543	595
	593		593
C 1 2 M 1/34		C 1 2 M 1/34	F
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	Q

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 22数)

(21)出願番号 特願2000 - 592635(P2000 - 592635)

(86)(22)出願日 平成12年1月3日(2000.1.3)

(85)翻訳文提出日 平成13年7月6日(2001.7.6)

(86)国際出願番号 PCT/DE00/00001

(87)国際公開番号 W000/40967

(87)国際公開日 平成12年7月13日(2000.7.13)

(31)優先権主張番号 199 00 119.7

(32)優先日 平成11年1月6日(1999.1.6)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(81)指定国 EP ( A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E ) , J P , U S

(71)出願人 メッサー・ホルスト

ドイツ連邦共和国、ロースドルフ、ハムベルクストラッセ、10アー

(71)出願人 ザイラー・ユルゲン

ドイツ連邦共和国、ロースドルフ、ウルメンストラッセ、1

(72)発明者 メッサー・ホルスト

ドイツ連邦共和国、ロースドルフ、シュミューデストラッセ、8

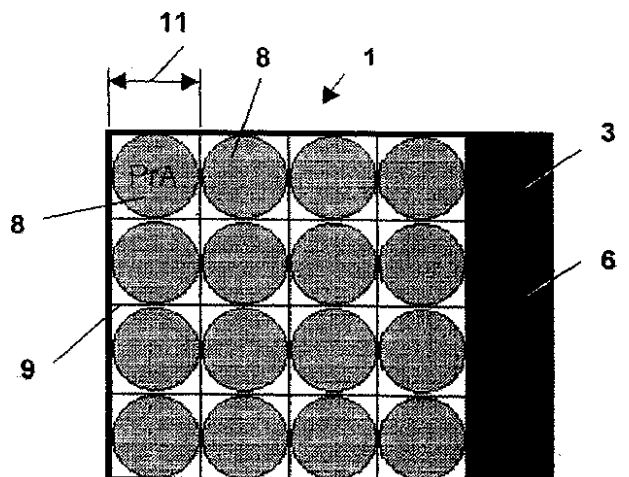
(74)代理人 弁理士 江崎 光史 (外3名)

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB17 CC02 CC08 FA15

(54)【発明の名称】 アレルギー症状を診断する方法と装置

(57)【要約】

結合タンパク質が、基板上に塗布され、診察すべき患者の抗体が、この結合タンパク質上でこの結合タンパク質に結合することによって定着され、引続きアレルギーを引き起こす抗原を含んだ抗原溶液によって暴露される、生体外で免疫反応を検出することによってアレルギー症状を診断する方法。この場合、基板が、反射する固定基板として形成されていて、結合タンパク質が、この基板上の単分子の表面活性層内で塗布される。そしてこの場合、抗体と抗原との間の免疫反応によって引き起こされた抗体層の層厚の増大が、潜伏期間後に楕円偏光法的な測定方法によって測定される。この場合、センサーベースが、反射する固定基板から構成されていて、表面活性的な結合タンパク質から成る1枚の単分子層が、複数のアイランド内で塗布されていて、患者に特有の抗体に結合可能である。



**【特許請求の範囲】**

【請求項01】 結合タンパク質が、基板上に塗布され、診察すべき患者の抗体が、この結合タンパク質上でこの結合タンパク質に結合することによって定着され、引続きアレルギーを引き起こす抗原を含んだ抗原溶液によって暴露される、生体外で免疫反応を検出することによってアレルギー症状を診断する方法において、基板(3)が、反射する固定基板として形成されていて、結合タンパク質(4)が、この基板上の単分子の表面活性層内で塗布されること、及び、抗体(5)と抗原(2)との間の免疫反応によって引き起こされた抗体層の層厚の増大が、潜伏期間後に楕円偏光法的な測定方法によって測定されることを特徴とする方法。

【請求項02】 タンパク質Aが、結合タンパク質(4)として塗布されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項03】 タンパク質Gが、結合タンパク質(4)として塗布されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項04】 結合タンパク質(4)は、ラングミュア-プロットゲット技術を用いて塗布されることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項05】 小さいシリコン板が、基板(3)として使用されることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項06】 基板(3)の少なくとも一部が、結合タンパク質を塗布する前にマスク格子(9)でマスクされることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項07】 マスク格子(9)は、分離された複数のアイランド(8)のこのマスク格子(9)によって結合タンパク質(4)の塗布後に互いに除去されることを特徴とする請求項6に記載の方法。

【請求項08】 マスク格子(9)は、ワックス状の材料から作られることを特徴とする請求項6又は7に記載の方法。

【請求項09】 免疫グロブリン抗体が、患者に特有の抗体(5)として使用されることを特徴とする請求項1～8のいずれか1項に記載の方法

【請求項10】 免疫グロブリンG抗体(IgG)が、使用されることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項11】 免疫グロブリンG抗体(IgE)が、使用されることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項12】 患者の血清から分離させたアイソトープ的な抗体が、患者に特有の抗体(5)として使用されることを特徴とする請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】 分離させた抗体は、マイクロピペットで移すことによって分離した複数のアイランド(8)内に配置された表面活性的な結合タンパク質(4)上に塗布されることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】 余分の抗体が、アイランド(8)と抗体(5)との結合後に洗浄によってこれらのアイランド8から取除かれることを特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項15】 基板(3)が、個々のアイランド(8)の抗体層の層の厚さの増大を測定するために楕円偏光計の二次元座標の平板上でこの楕円偏光計のレーザービームによってソフトウェア制御で走査されることを特徴とする請求項14に記載の方法。

【請求項16】 走査過程の結果が、評価ソフトウェアによって評価されることを特徴とする請求項15に記載の方法。

【請求項17】 質量分離器が、定量分析的な診断に対して使用され、この質量分離器は、免疫反応を起こすアイランド(8)の物質をその原子の構成要素に分解することを特徴とする請求項7～16のいずれか1項に記載の方法。

。

【請求項18】 得られた分離した単独のフラクションが、既知のタンパク質成分と抗体成分だけ減少し、その結果、残留物質が、見つけ出されたアレルギーを引き起こす要因を明らかにすることを特徴とする請求項17に記載の方法。

【請求項19】 アレルギーを引き起こす要因は、アレルギーのデータバンク中に記憶されたデータと比較されて評価されることを特徴とする請求項18に記載の方法。

【請求項20】 アレルギーのデータベースは、元素構成要素を配置した既知のアレルギーを集めたものであることを特徴とする請求項19に記載の方法。

【請求項21】 アレルギーのデータベースは、アレルギーの生物化学的な構造及び原子の構造要素を有することを特徴とする請求項20に記載の方法。

【請求項22】 残留物質が、アレルギーのデータベースによって更新され、そして比較と絞込みによって同定されることを特徴とする請求項19～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】 センサーベース(1)が、反射する固定基板(3)から構成されていて、表面活性的な結合タンパク質(4)から成る1枚の単分子層が、複数のアイランド(8)内で塗布されていて、患者に特有の抗体(5)に結合可能であり、この単分子層は、抗原溶液(13)中に含まれる抗原(2)と反応可能であることを特徴とする、生体外で免疫反応を検出することによってアレルギー症状を診断する装置。

【請求項24】 反射する基板(3)が、シリコンから形成されていることを特徴とする請求項23に記載の装置。

【請求項25】 結合タンパク質(4)は、タンパク質A(PrA)から成ることを特徴とする請求項23又は24に記載の装置。

【請求項26】 結合タンパク質は、タンパク質G(PrG)から成ることを特徴とする請求項23又は24に記載の装置。

【請求項27】 抗体(5)は、免疫グロブリン抗体であることを特徴とする請求項23～26のいずれか1項に記載の装置。

【請求項28】 抗体(5)は、診察すべき患者の免疫グロブリンG抗体(IgG)であることを特徴とする請求項27に記載の装置。

【請求項29】 抗体(5)は、診察すべき患者の免疫グロブリンE抗体(IgE)であることを特徴とする請求項27に記載の装置。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明は、生体外で免疫反応を検出することによってアレルギー症状を診断する方法に関する。この方法では、結合タンパク質が、基板上に塗布される。診察すべき患者の抗体が、この結合タンパク質上でこの結合タンパク質に結合することによって定着され、引続きアレルギーを引き起こす抗原を含んだ抗原溶液によって暴露される。

**【0002】**

さらに、本発明は、生体外で免疫反応を検出することによってアレルギー症状を診断する装置に関する。

抗原を免疫化学的に特定する方法が、ヨーロッパ特許発明第0629857明細書から公知である。この方法では、結合タンパク質が、基板の表面上に塗布される。一次抗体が、この結合タンパク質上に定着されている。抗原を特定するため、この第一抗体に結合され、こうして同様に定着される。この抗原は、測定を通じてマーキングされた二次抗体によって免疫反応を特定する。

**【0003】**

この方法の欠点は、マーキングした二次抗体が一次抗体のほかに必要であることである。上述した方法ステップで定着した特殊な抗体と化合して錯体を形成する抗原が、この方法ステップに続く潜伏ステップで抗体反応中にこの錯体から再び溶解し、こうして検出反応に進む。そのため、特に感度が著しく制限される。

本発明の課題は、マーキングした二次抗体が省略できる方法を提供することにある。

**【0004】**

この課題は、本発明により、請求項1の上位概念に関連して、基板が、反射する固定基板として形成されていて、結合タンパク質が、この基板上の単分子の表面活性層内で塗布されること、及び、抗体と抗原との間の免疫反応によって引き起こされた抗体層の層厚の増大が、潜伏期間後に楕円偏光法的な測定方法によって測定されることによって解決される。

免疫反応によって引き起こされた抗体層の層厚の増大を楕円偏光的に - すなわ

ち光学的に、ひいては非破壊的に - 測定することが、反射する固定基板を使用することによって可能である。二次抗体が、この楕円偏光的な測定によって完全に省略できる。

#### 【0005】

タンパク質Aが、結合として公知のラングミュア - プロットゲット技術を用いて本発明の好適な実施形にしたがって塗布される。しかし、例えばタンパク質Gやその他の適した結合タンパク質として使用し、同様な技術を用いて塗布することも可能である。

結合タンパク質を所望の単分子の表面活性層内で塗布することが、ラングミュア - プロットゲット技術を使用することによって可能である。この単分子層は、最少の物質が使用され得、かつ検出され得ることを保証する。

#### 【0006】

本発明のその他の好適な実施形によれば、小さいシリコン板が、基板として使用される。

シリコンの屈折率が大きいために、それに応じた高い分解能が、基板の材料としてシリコンを使用することによって層の厚さの楕円偏光的な測定に対して得られる。

本発明のもう1つの好適な実施形によれば、基板の少なくとも一部が、結合タンパク質を塗布する前に格子状にマスクされる。マスク格子が、分離された複数のアイランドのこのマスク格子によってこの結合タンパク質の塗布後に互いに除去される。

#### 【0007】

複数の結合タンパク質のアイランドの特定の構造が、マスク格子を使用することによって簡単に得られる。このとき、試験又は診断に必要な特殊な抗体が、これらの結合タンパク質のアイランド又はタンパク質Aのアイランド上に定着され得る。

免疫グロブリン抗体が、本発明の1つの好適な実施形にしたがって使用される。  
すなわち、例えば、免疫系内で最も多く存在する免疫グロブリンG ( I g G ) が

使用される。しかし、例えば、免疫グロブリンE抗体(IgE)を使用することも可能である。この抗体(IgG)は、-文字「Y」-のように3つの領域から成る。腕に相当するFab領域は、特殊な反応性に対して責任がある。その一方で、足のかかるとに相当するFc領域は、普通に反応する。このIgGは、このFc領域を介して結合タンパク質、例えばタンパク質Aに結合されている。

#### 【0008】

本発明のもう1つ別の好適な実施形によれば、患者の血清から分離させたアイソトープ的な抗体が使用される。しかしながら、基本的には、アイソトープ的な抗体は、血液や尿やその他の抗体液から分離できる。

これらの分離させた抗体は、マイクロピペットで移すことによって分離した複数のアイランド内に配置された結合タンパク質上に塗布される。すなわち、結合タンパク質のアイランドが、マイクロピペットを連続的に移すことによってか、又はマイクロピペットをアイランドマトリックスに応じてラスタ同期式に完全に移すことによって装着され得る。

#### 【0009】

本発明のもう1つ別の好適な実施形によれば、個々のアイランドの抗体層の層の厚さの増大を測定するため、基板が、楕円偏光計の二次元座標の平板上でこの楕円偏光計のレーザービームによってソフトウェア制御で走査される。このとき、走査過程の結果が、評価ソフトウェアによって評価される。

層の厚さの増大のソフトウェア制御された楕円偏光的な測定によって、層の厚さが、ほとんど自動的にかつ誤差なしに楕円偏光的に時間を節約して測定され得る。

本発明のもう1つ別の好適な実施形によれば、質量分離器が、定量分析的な診断に対して使用される。この質量分離器は、免疫反応を起こすアイランドの物質をその原子の構成要素に分解する。得られた分離した単独のフラクションは、既知のタンパク質成分と抗体成分だけ減少する。その結果、残留物質が、見つけ出されたアレルギーを引き起こす要因を明らかにする。このアレルギーを引き起こす要因は、アレルギーのデータベース中に記憶されたデータと比較されて評価される。

## 【0010】

この方法に組み込まれた処理プログラムによって、アレルギーのデータバンク - ソフトウェアライブラリ - によって、質量分離器の結果が、更新され、そして比較と絞込みによって同定される。

したがって、本発明の方法は、既に公知の方法よりも定量分析的に著しく精確である。

さらに、本発明の方法を一般的に使用可能な方法に拡張することができる。

ヨーロッパ特許発明第 0 629 857 明細書から公知の装置は、説明した欠点を有し、楕円偏光計での光学的な測定に適さない。

## 【0011】

それ故に、本発明のさらなる課題は、生体外で免疫反応を検出することによってアレルギー症状を診断する装置を提供することにある。この装置は、マーキングした二次抗体なしに実現でき、非破壊的な光学測定に適する。

この課題は、請求項 2 3 の上位概念に記載の本発明により、センサーベースが、反射する固定基板から構成されていて、表面活性的な結合タンパク質から成る 1 枚の単分子層が、複数のアイランド内で塗布されていて、患者に特有の抗体に結合可能であり、この単分子層は、抗原溶液中に含まれる抗原と反応可能であること、及び、免疫反応が、楕円偏光計で測定可能であることによって解決される。

## 【0012】

センサーベースが 1 枚の反射する基板から構成されていて、表面活性的な結合タンパク質の複数のアイランドが、この基板上で溶液中に含まれる抗原と反応しうる患者に特有の抗体に結合可能であることによって、この装置又はこの基板を楕円偏光計で評価することが可能である。その結果、免疫反応が、楕円偏光計で測定可能である。

本発明の 1 つの好適な実施形によれば、反射する基板は、シリコンから形成されている。

シリコンの屈折率が大きいために、高い分解能が、シリコンを使用することによって層の厚さの楕円偏光的な測定に対して得られる。

## 【0013】

本発明のもう1つ別の好適な実施形によれば、タンパク質A (PrA) が、結合タンパク質として使用される。診察すべき患者の免疫グロブリンG抗体 (IgG) が、抗体として使用される。このIgGは、タンパク質AのFcリセプタを通じてこのIgGのFc領域によってこのタンパク質Aに結合される。

以下に、本発明を構成的な記述と添付した図面に基づいてさらに詳しく説明する。本発明の好適な実施形が、これらの中でたとえば具体的に説明されている。

アレルギー症状を診断する装置は、主に患者に特有の抗原2に結合可能であるセンサーベース1から構成される。

このセンサーベース1は、主に基板3、結合タンパク質4及び患者に特有の抗体5から構成される。

## 【0014】

基板3は、長方形の小さいシリコン板として形成されている。(特殊な浸漬法によって表面活性的な材料から成る単分子の薄膜を被覆する)ラングミュア-ブロットゲット技術によって、結合タンパク質4の単分子層が、この基板3上に配置されている。タンパク質A (PrA) が、結合タンパク質4として使用される。例えば、タンパク質Gを結合タンパク質として使用することも可能である。この結合タンパク質4は、この小さいシリコン板上でアイランド8の形態で配置されている。この場合、基板4は、マスクされない縁部6を有する。このマスクされない縁部6は、一方では保持用のグリップ面として使用され、他方では場合によっては基板3の屈折率を算出するための基準面として使用される。これらのアイランド8は、患者に特有の抗体5を有する。この場合、相違するアイランド8が、それぞれ異なる特性から成る抗体5を有する。患者の血清から分離させたアイソトープ的な免疫グロブリンG抗体 (IgG) が、抗体5として使用される。例えば、免疫グロブリンE抗体 (IgE) を使用することも可能である。

## 【0015】

ワックス状の材料から成るマスク格子9が、基板3又は小さいシリコン板上にマスクされる。ラングミュア-ブロットゲット技術を使用することによって、マスク格子9によってマスクされない中間空間が、浸漬によってタンパク質Aで単

分子的に被覆される。その結果、PrAから成る互いに分離された複数のアイランド8が、マスク格子9によって形成される。患者の血清から分離させた抗体(IgG)5が、一列に配置された複数のマイクロピペット10を使用することによってこれらのアイランド8上に塗布される。マイクロピペット10に対する(基板のラスタ内列、例えば4つのアイランド8に相当する)複数のラスタの列がそれぞれ、センサーベース1に形成される。この場合、これらのマイクロピペット10が、このセンサーベース1又は基板3の上を連続的に移動する。その一方で、基板3は、マトリックスの幅7ごとにさらに移動する。例えば4つのアイランド8が一列に配置されている場合、マトリックスの幅7は、4倍のアイランドの幅11に相当する。

#### 【0016】

その他の実施形によれば、基板のラスタに相当するマイクロピペットのラスタが形成される。このことは、例えば結晶構造を利用して小さいシリコン板をその厚さに応じてマイクロエッチングすることによって可能である。ラスタ同期式の完全な装着が、マイクロピペットのラスタを使用することによって可能になる。

(PrA-)アイランド8と抗体5との結合を可能にする確実な作用時間の経過後に、余分の抗体が洗浄によってこれらのアイランド8から取除かれる。引き続き、マスク格子9が、基板から除去される。

#### 【0017】

アレルギー症状を診断するため、バイオセンサーとして作用するセンサーベース1が、アンチゲン溶液又は抗原溶液の浴槽12内で患者に特有のアンチゲン又は抗原2によって暴露される。このとき、アンチゲン又は抗原2が抗体5に結合(免疫反応)する際に期待される層の厚さの増大は、図示しなかった楕円偏光計によって検出される。個々のアイランド8の抗体層の厚さの増大を測定するため、基板3が、楕円偏光計の二次元座標の平板上でこの楕円偏光計のレーザービームによってソフトウェア制御で走査される。このとき、走査過程の結果が、評価ソフトウェアによって評価される。図示しなかった質量分離器を使用することによって、免疫反応を起こすアイランド8の物質が、その原子の構成要素に分

解される。得られた分離した単独のフラクションは、既知のタンパク質成分と抗体成分だけ減少する。その残留物質が、見つけ出されたアレルギーを引き起こす要因である。この要因は、抗原のデータバンク又はソフトウェアライブラリ中で評価される。この抗原のデータバンクは、元素構成要素と生物化学的な構造と原子構造要素と評価に必要な全ての条件とを配置した全ての既知の抗原を集めたものである。この方法に組込まれた処理プログラムによって、アレルギーのデータバンクによって、質量分離器の結果が、更新され、そして比較と絞込みによって同定される。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 拡大して示した基板の概略的な正面図である。

【図2】 一列に配置された複数のマイクロピペットを概略的に示した図1の基板の正面図である。

【図3】 縮尺を合わせないで原理的に示した基板の側面図である。

【図4】 浴槽内へ入れられた基板の概略的な側面図である。

【図5】 抗原を検出する方法の簡略化したフローチャートである。

#### 【符号の説明】

- 1 センサーベース
- 2 患者に特有の抗原
- 3 基板
- 4 結合タンパク質
- 5 患者に特有の抗体
- 6 マスクされない縁部
- 7 マトリックスの幅
- 8 アイランド
- 9 マスク格子
- 10 マイクロピペット
- 11 アイランドの幅
- 12 浴槽
- 13 抗原溶液

【図1】

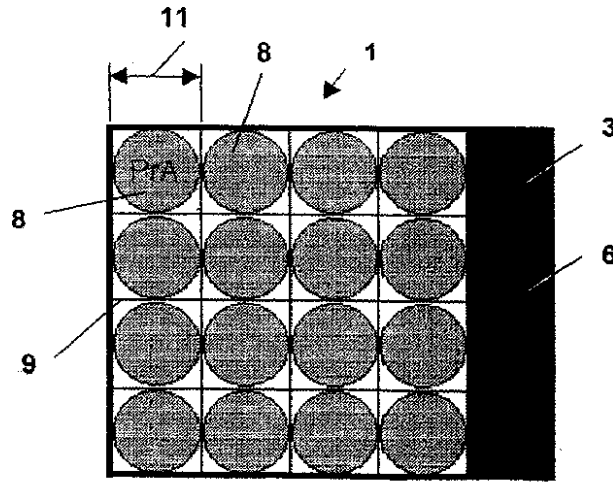


Figure 1

【図2】

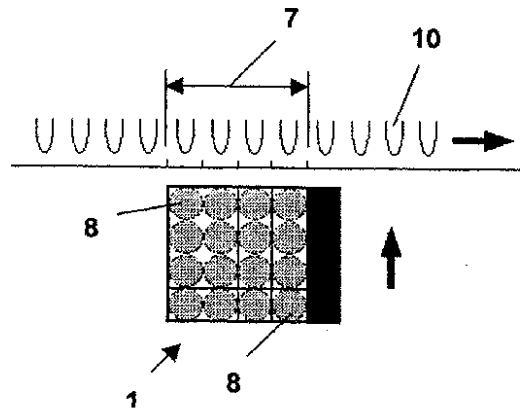


Figure 2

【図3】

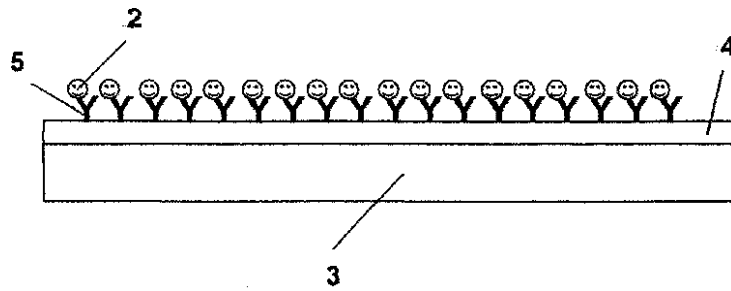
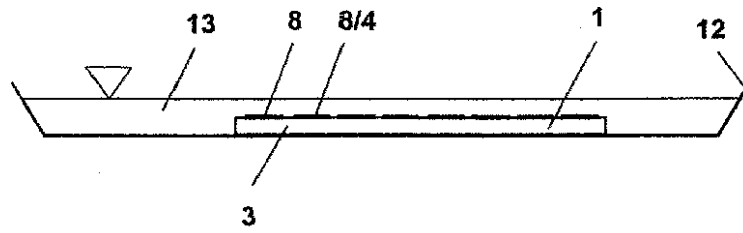


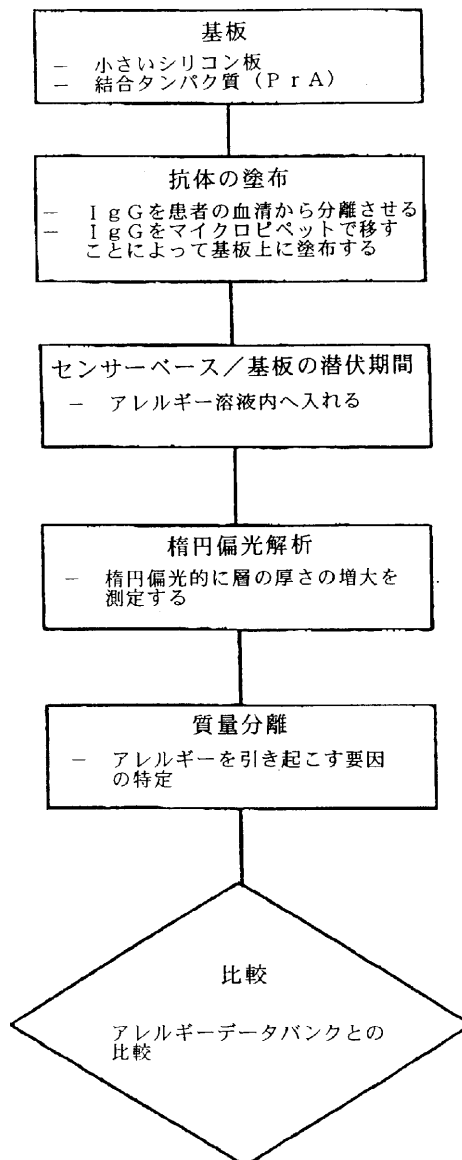
Figure 3

【図4】



Figur 4

【図5】



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年2月8日(2001.2.8)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【請求項01】 結合タンパク質が、反射する固定基板上に塗布され、診察すべき患者の抗体が、この結合タンパク質上でこの結合タンパク質に結合することによって定着され、引続きアレルギーを引き起こす抗原を含んだ抗原溶液によって暴露され、この場合、抗体(5)と抗原(2)との間の免疫反応によって引き起こされたタンパク質-抗体層の層の厚さの増大が、潜伏期間後に楕円偏光的な測定方法によって同定される、生体外で免疫反応を検出することによってアレルギー症状を診断する方法において、結合タンパク質(4)は、ラングミュア-ブロットゲット技術を用いることによって基板(3)上の単分子の表面活性層内で塗布されることを特徴とする方法。

【請求項02】 タンパク質Aが、結合タンパク質(4)として塗布されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項03】 タンパク質Gが、結合タンパク質(4)として塗布されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項04】 小さいシリコン板が、基板(3)として使用されることを特徴とする請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項05】 基板(3)の少なくとも一部が、結合タンパク質を塗布する前にマスク格子(9)でマスクされることを特徴とする請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項06】 マスク格子(9)は、分離された複数のアイランド(8)のこのマスク格子(9)によって結合タンパク質(4)の塗布後に互いに除去されることを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項07】 マスク格子(9)は、ワックス状の材料から作られることを特徴とする請求項5又は6に記載の方法。

【請求項08】 免疫グロブリン抗体が、患者に特有の抗体(5)として使用されることを特徴とする請求項1~7のいずれか1項に記載の方法

【請求項09】 免疫グロブリンG抗体(IgG)が、使用されることを特徴とする請求項8に記載の方法。

【請求項10】 免疫グロブリンG抗体(IgE)が、使用されることを特徴とする請求項8に記載の方法。

【請求項11】 患者の血清から分離させたアイソトープ的な抗体が、患者に特有の抗体(5)として使用されることを特徴とする請求項1~10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】 分離させた抗体は、マイクロピペットで移すことによって分離した複数のアイランド(8)内に配置された表面活性的な結合タンパク質(4)上に塗布されることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項13】 余分の抗体が、アイランド(8)と抗体(5)との結合後に洗浄によってこれらのアイランド8から取除かれることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】 基板(3)が、個々のアイランド(8)の抗体層の層の厚さの増大を測定するために楕円偏光計の二次元座標の平板上でこの楕円偏光計のレーザービームによってソフトウェア制御で走査されることを特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項15】 走査過程の結果が、評価ソフトウェアによって評価されることを特徴とする請求項14に記載の方法。

【請求項16】 質量分離器が、定量分析的な診断に対して使用され、この質量分離器は、免疫反応を起こすアイランド(8)の物質をその原子の構成要素に分解することを特徴とする請求項7~15のいずれか1項に記載の方法。

。

【請求項17】 得られた分離した単独のフラクションが、既知のタンパク質成分と抗体成分だけ減少し、その結果、残留物質が、見つけ出されたアレルギー

一を引き起こす要因を明らかにすることを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項18】 アレルギーを引き起こす要因は、アレルギーのデータバンク中に記憶されたデータと比較されて評価されることを特徴とする請求項17に記載の方法。

【請求項19】 アレルギーのデータバンクは、元素構成要素を配置した既知のアレルギーを集めたものであることを特徴とする請求項18に記載の方法。

【請求項20】 アレルギーのデータバンクは、アレルギーの生物化学的な構造及び原子の構造要素を有することを特徴とする請求項19に記載の方法。

【請求項21】 残留物質が、アレルギーのデータバンクによって更新され、そして比較と絞込みによって同定されることを特徴とする請求項18～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】 センサーベース(1)が、反射する固定基板(3)から構成されていて、表面活性的な結合タンパク質(4)から成る1枚の単分子層が、複数のアイランド(8)内で塗布されていて、患者に特有の抗体(5)に結合可能であり、この単分子層は、抗原溶液(13)中に含まれる抗原(2)と反応可能であることを特徴とする、生体外で免疫反応を検出することによってアレルギー症状を診断する装置。

【請求項23】 反射する基板(3)が、シリコンから形成されていることを特徴とする請求項22に記載の装置。

【請求項24】 結合タンパク質(4)は、タンパク質A(PrA)から成ることを特徴とする請求項22又は23に記載の装置。

【請求項25】 結合タンパク質は、タンパク質G(PrG)から成ることを特徴とする請求項22又は23に記載の装置。

【請求項26】 抗体(5)は、免疫グロブリン抗体であることを特徴とする請求項22～25のいずれか1項に記載の装置。

【請求項27】 抗体(5)は、診察すべき患者の免疫グロブリンG抗体(IgG)であることを特徴とする請求項26に記載の装置。

【請求項28】 抗体(5)は、診察すべき患者の免疫グロブリンE抗体(IgE)であることを特徴とする請求項26に記載の装置。

**【手続補正2】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0001**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0001】**

本発明は、生体外で免疫反応を検出することによってアレルギー症状を診断する方法に関する。この方法では、結合タンパク質が、基板上に塗布される。診察すべき患者の抗体が、この結合タンパク質上でこの結合タンパク質に結合することによって定着され、引続きアレルギーを引き起こす抗原を含んだ抗原溶液によって暴露される。この場合、抗体と抗原との間の免疫反応によって引き起こされたタンパク質 - 抗体層の層の厚さの増大が、潜伏期間後に楕円偏光的な測定方法によって同定される。

**【手続補正3】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0002**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0002】**

さらに、本発明は、生体外で免疫反応を検出することによってアレルギー症状を診断する装置に関する。

米国特許発明第552272号明細書から公知のアレルギー症状を診断する方法が、アレルギースクリーン法用の方法と装置を開示する。この装置は、反射する固定基板を有する。この基板は、結合層と蛍光マーカを含む。免疫に関する短い論文が発刊されている。この論文では、抗体が、レセプター材料として一定の厚さの層の形態で基板の結合層上で結合される。次いで、抗原が、解析対象物としてこの抗体によって結合される。この結合層上のこの解析対象物の定着が、層の厚さを変化させ、かつ屈折率を変化させる。そして、蛍光発光の変化を通じて楕円偏光解析を使用することによって測定することができる。

一方では比較的高い経費が必要である点、及び、他方では蛍光でマーキングすることが分解能を悪く点が、この公知の方法における欠点である。

抗原を免疫化学的に特定する方法が、ヨーロッパ特許発明第 0 629 857明細書から公知である。この方法では、結合タンパク質が、基板の表面上に塗布される。一次抗体が、この結合タンパク質上に定着されている。抗原を特定するため、この第一抗体に結合され、こうして同様に定着される。この抗原は、測定を通じてマーキングされた二次抗体によって免疫反応を特定する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0003

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0003】

この方法の欠点は、マーキングした二次抗体が一次抗体のほかに必要であることである。上述した方法ステップで定着した特殊な抗体と化合して錯体を形成する抗原が、この方法ステップに続く潜伏ステップで抗体反応中にこの錯体から再び溶解し、こうして検出反応に進む。そのため、特に感度が著しく制限される。

さらに、生物分子の特殊な検出と同定に対する方法と光学センサが、ヨーロッパ特許発明第 0 886 141号明細書から公知である。生物分子、例えば抗体が、光学センサの基板上で結合され、引続きアレルギーを引き起こす抗原を含んだ抗原溶液に暴露される。

極めて経費がかかり、より高価である点が、この方法の欠点である。確かに濃度測定がこの方法で可能であるものの、層の厚さが測定不可能であり、かつ、分子の大きさが表示不可能である。何故なら、ここでは溶液中の錯体の測定に意義があるからである。

本発明の課題は、蛍光マーカ―又はマーキングした二次抗体が省略できる方法を提供することにある。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0004】

この課題は、本発明により、請求項1の上位概念に関連して、結合タンパク質が、ラングミュア-ブロットゲット技術を用いることによって基板上の単分子の表面活性層内で塗布されることによって解決される。

結合タンパク質が単分子の表面活性層内で塗布されることによって、ほぼ単分子の抗体の層が、結合タンパク質のFcに特有の結合性によって形成される。これらの抗体は、この結合タンパク質に結合されている。2層の錯体が、特定の方向に指向された、すなわち構成された抗体の結合によって生成される。抗体と抗原との間の免疫反応の結果、この2層の錯体の層の厚さの増大が、一義的に物理的に直接測定するいわゆる零楕円偏光計による楕円偏光的な測定方法によって直に、すなわちマーキングなしに同定され得る。ラングミュア-ブロットゲット技術を使用することによって、結合タンパク質を所望の単分子の表面活性的に構成された層内で塗布することが可能である。しかも、この単分子の層は、最小限の物質が使用され得、かつ検出され得ることを保証する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0005】

タンパク質Aが、結合として公知のラングミュア-ブロットゲット技術を用いて本発明の好適な実施形にしたがって塗布される。しかし、例えばタンパク質Gやその他の適した結合タンパク質として使用し、同様な技術を用いて塗布することも可能である。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/DE 00/00001
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 GOIN33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 GOIN		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 16286 A (GOETEBORGS ANALYSLAB) 1 October 1992 (1992-10-01) abstract page 18, paragraph 3 page 20, paragraph 5 -page 21, paragraph 1 page 23, paragraph 4 example 2	1-29
X	EP 0 886 141 A (SUISSE ELECTRONIQUE MICROTECH ;PRIONICS AG (CH)) 23 December 1998 (1998-12-23) column 1, paragraph 1 column 8, paragraph 3 claims	1-29
---		
-/--		
<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 doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 June 2000		Date of mailing of the international search report 14/07/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pellegrini, P

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/DE 00/00001
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 633 724 A (KING DAVID A ET AL) 27 May 1997 (1997-05-27) abstract claims ---	1-29
X	US 5 812 272 A (KING DAVID A ET AL) 22 September 1998 (1998-09-22) abstract claims ---	1-29
X	US 5 552 272 A (BOGART GREGORY R) 3 September 1996 (1996-09-03) abstract claims ---	1-29
X	LIN V S -Y ET AL: "A POROUS SILICON-BASED OPTICAL INTERFEROMETRIC BIOSENSOR" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 278, no. 5339, 31 October 1997 (1997-10-31), pages 840-843, XP000876896 ISSN: 0036-8075 the whole document ---	1-29
X	SILZEL J.W. ET AL.: "Mass-sensing, multianalyte microarray immunoassay with imaging detection" CLIN. CHEM., vol. 44, no. 9, 1998, pages 2036-2043, XP002140864 the whole document ---	1-29
P,X	OSTROFF R.M. ET AL.: "Thin film biosensor for rapid visual detection of nucleic acid targets" CLIN. CHEM., vol. 45, no. 9, 1999, pages 1659-1664, XP002140865 the whole document -----	1-29

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No.

PCT/DE 00/00001

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9216286 A	01-10-1992	SE 468157 B SE 9100871 A	16-11-1992 23-09-1992
EP 0886141 A	23-12-1998	EP 0887645 A	30-12-1998
US 5633724 A	27-05-1997	DE 19615380 A	06-03-1997
US 5812272 A	22-09-1998	DE 19731479 A JP 11044647 A	06-08-1998 16-02-1999
US 5552272 A	03-09-1996	NONE	

专利名称(译)	用于诊断过敏症状的方法和设备		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002534682A</a>	公开(公告)日	2002-10-15
申请号	JP2000592635	申请日	2000-01-03
[标]申请(专利权)人(译)	霍斯特·梅塞尔 塞勒尤尔根		
申请(专利权)人(译)	梅塞尔霍尔斯特 塞勒 - 尤尔根		
[标]发明人	メッサーホルスト		
发明人	メッサー・ホルスト		
IPC分类号	C12M1/34 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/54373 B01J2219/00605 B01J2219/00612 B01J2219/00617 B01J2219/0063 B01J2219/00637 B01J2219/00659 B01J2219/0072 G01N33/54386		
FI分类号	G01N33/543.595 G01N33/543.593 C12M1/34.F G01N33/53.Q		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB17 4B029/CC02 4B029/CC08 4B029/FA15		
优先权	19900119 1999-01-06 DE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

将结合蛋白施加于底物，通过结合至结合蛋白上的结合蛋白来建立待检查的患者抗体，然后将其暴露于含有变应原性抗原的抗原溶液中。通过检测外部的免疫反应来诊断过敏症状的方法。在这种情况下，将底物设计为反射固定底物，并将结合蛋白施加在该底物上的单分子表面活性层中。然后，在这种情况下，在孵育期之后，通过椭圆偏振法测量由抗体和抗原之间的免疫反应引起的抗体层的层厚度的增加。在这种情况下，传感器底座由反射的固定基底组成，并且在多个岛中应用了单层表面活性结合蛋白，以结合患者特异性抗体。有可能

