

(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2015-511706

(P2015-511706A)

(43) 公表日 平成27年4月20日(2015.4.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 5	4 B 0 2 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Q	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	
	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-561317 (P2014-561317)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月12日 (2013. 3. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年11月6日 (2014. 11. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/000727
 (87) 国際公開番号 W02013/135371
 (87) 国際公開日 平成25年9月19日 (2013. 9. 19)
 (31) 優先権主張番号 12001814.8
 (32) 優先日 平成24年3月16日 (2012. 3. 16)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 514229764
 ダボス ダイアグノスティックス アーゲ
 ー
 スイス国 シーエイチー7270 ダボス
 オーベレ シュトラーセ 22
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
 (72) 発明者 シャヴァラー マンフレート
 スイス国 シーエイチー1785 クレツ
 シエ アンパス ドゥ・ラ・アルタ 6
 (72) 発明者 ライナー クラウディオ
 スイス国 シーエイチー7270 ダボス
 タールシュトラーセ 49

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エバネッセントバイオセンサーを用いたリアルタイム診断アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、エバネッセント場法を用いて水性の生理的液体又は化学的液体中の物質を検出する方法、及び該方法を行う診断デバイスに関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

水性の生理的液体又は化学的液体中の物質を検出する方法であって、

(i) 少なくともリガンド L 1 が結合した表面を準備する工程と、

(i i) 前記表面と、少なくとも検出対象の物質及び少なくとも蛍光標識リガンド L 2 を含有する溶液とを接触させる工程であって、前記検出対象の物質及び前記蛍光標識リガンド L 2 が同じであってもよく、該検出対象の物質、該蛍光標識リガンド L 2 又はその両方が前記表面に結合したリガンド L 1 と相互作用して、少なくともリガンド L 1、該検出対象の物質及び該蛍光標識リガンド L 2 を含む複合体を形成する、工程と、

(i i i) 前記表面に結合した複合体を光源のエバネッセント場によって励起する工程と、

(i v) 放出された蛍光を測定する工程と、

(v) 前記放出された蛍光に基づいて定性的又は定量的な結果を決定する工程と、を含み、前記結果を得るのに 3 つ以上の液体操作工程が必要とされない、方法。

【請求項 2】

工程 (i i) の前記溶液が、蛍光体の吸収域及び / 又は発光域で吸収する少なくとも 1 つの色素を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

任意の洗浄工程を含まない、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

一段階方法である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

液体攪拌を含まない、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (v) で決定される結果が工程 (i i) の開始から 10 分以内に得られる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

リガンド L 1 及び L 2 の一方又は両方が、抗原及び抗体又はそのフラグメントから独立して選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記検出対象の物質がペプチド、タンパク質、脂質、糖脂質、核酸、毒素、ホルモン、ケモカイン、サイトカイン (c y t o k i n s)、免疫グロブリン、抗原又は自己抗原、並びにウイルス、マイコプラズマ (m y c o p l a s m s)、細菌、真菌、酵母及びそれらのフラグメントを含む感染因子からなる群から選択される化学物質又は生体分子物質である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出対象の物質が I g G、I g M、I g E、I g A 及び I g D からなる群から選択される免疫グロブリンである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

単純結合アッセイ、サンドイッチアッセイ、競合アッセイ又は二重抗原アッセイのフォーマットを有する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

患者において特定のアレルゲンに対するアレルギー又は自己免疫疾患を検出する方法であって、

(i) 前記特定のアレルゲンが結合した表面を準備する工程と、

(i i) 前記患者に由来する生理的液体のサンプルと、少なくとも抗ヒト I g E モノクローナル抗体を含有する反応混合物とを混合する工程であって、前記抗体が蛍光体で共有結合標識されている、工程と、

(i i i) 前記表面と、工程 (i i) で得られる溶液とを接触させる工程であって、少なくとも前記アレルゲン、該アレルゲンに特異的な I g E 及び蛍光標識された抗ヒト I g

10

20

30

40

50

Eモノクローナル抗体を含む複合体を形成する、工程と、

(i v) 前記表面に結合した複合体を光源のエバネッセント場によって励起する工程と

、
(v) 放出された蛍光を測定する工程と、

(v i) 前記放出された蛍光に基づいて工程 (i i) の開始から 10 分以内に前記サンプル中の I g E の量を結果として決定する工程と、

を含み、前記結果を得るのに工程 (i i) 及び工程 (i i i) のみを 2 つの液体操作工程として必要とする、方法。

【請求項 1 2】

患者において特定の病原体による感染を検出する方法であって、

(i) 前記病原体の抗原が結合した表面を準備する工程と、

(i i) 前記患者に由来する生理的液体のサンプルと、前記病原体の少なくとも 1 つの抗原を含有する反応混合物とを混合する工程であって、前記抗原が蛍光標識されている、工程と、

(i i i) 前記表面と、工程 (i i) で得られる溶液とを接触させる工程であって、少なくとも前記固定化された抗原、該抗原に特異的な少なくとも 1 つの抗体及び蛍光標識された抗原を含む複合体を形成する、工程と、

(i v) 前記表面に結合した複合体を光源のエバネッセント場によって励起する工程と

、
(v) 放出された蛍光を測定する工程と、

(v i) 前記放出された蛍光に基づいて工程 (i i) の開始から 10 分以内に前記サンプル中の病原体に特異的な免疫グロブリンの量を結果として決定する工程と、

を含み、前記結果を得るのに工程 (i i) 及び工程 (i i i) のみを 2 つの液体操作工程として必要とする、方法。

【請求項 1 3】

溶液中の核酸を検出する方法であって、

(i) 対象の核酸に相補的な核酸が結合した表面を準備する工程と、

(i i) 前記表面と、蛍光標識された前記対象の核酸を含有する可能性がある溶液のサンプルとを接触させる工程であって、少なくとも前記相補的な核酸及び前記蛍光標識された核酸を含む複合体を形成する、工程と、

(i i i) 前記表面に結合した複合体を光源のエバネッセント場によって励起する工程と、

(i v) 放出された蛍光を測定する工程と、

(v) 前記放出された蛍光に基づいて工程 (i i) の開始から 10 分以内に前記サンプル中の対象の核酸の量を結果として決定する工程と、

を含み、前記結果を得るのに工程 (i i) を唯一の液体操作工程として必要とする、方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法を行う診断試験デバイス。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 に記載の診断試験デバイスと、リガンド L 1 が結合した表面を提供する少なくとも 1 つの試験カートリッジと、任意に 1 つ又は複数の反応組成物、希釈剤及び / 又は助剤とを含む診断試験キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エバネッセント場法を用いて水性の生理的液体又は化学的液体中の物質を検出する方法、及び該方法を行う診断デバイスに関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

特定のバイオマーカーについての血液又は血清の検査は、よく用いられている *in vitro* 診断 (IVD) 方法である。血液サンプルを患者から採取し、遠心分離して血漿から細胞を分離する。血漿又は血清を用いて、バイオマーカーの *in vitro* 診断アッセイを行う。血漿がよく使用されるが、例えば尿、唾液、脳脊髄液等の他の体液を *in vitro* 診断によって試験することができる。診断の別の区分では、体液又は他の生物試料、例えば生検材料から得られた血液又は他の細胞に由来する赤血球、白血球及び血小板等の細胞が検査される。

【0003】

感染性疾患、抗体応答、ホルモン状態、代謝異常、腫瘍症候群の指標となるか、又は概して疾患状態をモニタリングするための多数のバイオマーカーが血漿中に見られる。バイオマーカーの性質に応じて、診断アッセイでは生体分子の有無を定性的に測定するか、又は生体分子を定量的に測定する。生体分子は、例えばタンパク質、糖タンパク質、DNA 若しくはRNA、脂質、糖類、又は代謝産物として生じる低分子量化学物質等の多くの化学的又は生化学的なサブグループに属し得る。さらに、細胞、寄生生物、ウイルス、細菌、酵母、真菌又はこれらの生物のフラグメントの検出も診断対象である。

10

【0004】

マーカーはタンパク質、翻訳後に修飾された遺伝子産物、ホルモン、脂質、血液若しくは血漿中で機能を有する小分子、又はミエリン若しくはフェニルケトン等の疾患の指標となる分解産物等の分子であり得る。*in vitro* 診断を用いて測定されるホルモンの例は甲状腺ホルモン又は妊娠試験で検出されるヒト絨毛性ゴナドトロピンである。マーカーの存在及び/又はホルモンの濃度は、医師の診断を支持し、その指針となる有益な情報を提供する。

20

【0005】

マーカーは、通常は血液中に存在しないが、臨床疾患状態において新たに現れる既知の特定の機能を有する分子であってもよい。特定の組織は損傷すると、細胞タンパク質を組織から血流へと放出する場合があります、通常は検出されないタンパク質が患者の血漿中に見られる場合がある。ここでの例は、心臓発作により心筋細胞の損傷が起こった後に血液に見られる心臓トロポニンであり、同時にミオグロビンレベルが正常範囲を越えて上昇する。脳卒中患者については、血流中に現れる神経細胞に特異的なタンパク質、例えばS100又はGFAPがこの事象の後に血流中で観察される。

30

【0006】

バイオマーカーの別の群は、特定のアッセイによって抽出及び測定される感染因子である。*in vitro* 診断試験によって、感染因子自体又はこれらの感染因子に由来するフラグメント及び構成要素が検出及び測定される。感染因子は例えば細菌、ウイルス、寄生生物、真菌、マイコプラズマ (*mycoplasmas*) 又は酵母であり得る。場合によっては、試験は培養又は標的細胞との共培養によって生物学的に行われるが、*in vitro* 診断試験ではタンパク質、DNA、RNA、オリゴ糖、脂質又は糖脂質等の病原体に特異的な生化学的分子が測定されることが多い。

【0007】

免疫グロブリンは、診断を支持するために検査されることが多い更なる分子群である。免疫グロブリンは感染性疾患のマーカーである場合があり、その存在は概して感染又は免疫原との接触の結果としての免疫応答の指標となる。アレルギー、喘息又は自己免疫疾患の場合のように免疫グロブリン自体が悪影響をもたらす可能性もある。

40

【0008】

感染マーカーとしての免疫グロブリン試験の典型例はHIV抗体試験である。HIVウイルスタンパク質と結合する患者の血液中の抗体の存在は、その患者に見られるHIV感染の指標となる。ウイルス自体が患者において検出可能でなくとも、HIVに対する抗体の存在によって患者がHIVに感染していると結論付けることが可能である。主に病原体の抗原に対するIgG又はIgMクラスの免疫グロブリンを検出する多くの異なる試験が存在し、この場合、試験に使用する抗原はタンパク質、オリゴ糖、脂質又は核酸等の病原

50

体に由来する全抗原又は分子的に定義された抗原としての病原体であり得る。抗原は糖脂質、グリコシル化タンパク質又は脂質タンパク質複合体等のこれらの化学物質の組合せであつてもよい。

【0009】

アレルギーの場合、アレルギー特異的な免疫グロブリンE (I g E) の検出は、アレルギーの臨床診断の感度の高い指標である。ここで、I g E 自体が疾患の病態生理の中心的存在の1つである。アレルギー試験では、患者の血液を有害なアレルギーを特異的に認識するI g E 分子について検査する。この場合、試験の目的は患者のサンプルのI g E レベルが概して上昇しているか否か、及び/又はサンプルが特定のアレルギーと反応するI g E を含有するか否かを決定することである。アレルギーの典型例は落花生、セロリ、イエダニ又はカバノキ花粉に由来するタンパク質である。自己免疫疾患の場合、患者の血液は患者自体に由来する(f o r m) 抗原と反応する免疫グロブリンを含有する。自己免疫疾患の典型例は、血小板糖タンパク質に対する自己抗体による輸血後紫斑病、関節リウマチ又は紅斑性狼瘡である。上記の例により、疾患の場合の抗体の存在が実証されるが、免疫グロブリンの欠如は、例えば非常に有用な診断試験として血漿I g A の欠乏等の疾患状態も示し得る。

10

【0010】

全血、血清、血漿、血液細胞又はその一部が診断試験の試験材料の供給源である。さらに、尿、精液、塗抹、脳脊髄液又は唾液等の他の体液が、i n v i t r o 診断試験(I V D) に使用される好適な材料の供給源となり得る。

20

【0011】

がんバイオマーカーは、遺伝的修飾によって得られる過剰発現又は修飾される自己抗原の群に属する。その典型例は、多くのタイプのがんで増加するがん胎児性抗原(c a n c e r o e m b r y o t i c a n t i g e n) (C E A) 、及び前立腺関連抗原(P S A) である。

【0012】

サイトカイン及びケモカインは低分子タンパク質群に属し、基本的に全ての炎症性疾患において又は特定の免疫療法後に過剰発現される。典型例は、有害微生物が増殖し得るよりはるか以前に炎症誘発性サイトカインが過剰発現される敗血症、又は侵襲性真菌症におけるガラクトマンナン(g a l a c t o m m a n n a n s) 及び真菌代謝の他の産物の検出である。これらの致命的な疾患においては、救命のために迅速かつ信頼性のある診断が必要とされる。これらの疾患の現行の診断方法には時間がかかり過ぎ、患者の診断が遅滞する場合が多い。

30

【0013】

バイオマーカーアッセイを行う多くの異なる市販のアッセイが存在する。これらのアッセイ技術は各々、特定の用途及び分析物で選ばれる。したがって、特定のバイオマーカーを検出及び定量化するのに生化学用試薬が適している。バイオマーカーを測定する多くの方法の中でも、I V D 検査を行うのに一般に用いられる技術は酵素結合免疫吸着法(E L I S A) である。E L I S A は、固相に結合したリガンド及びそれと相互作用する液相を用いる不均一アッセイフォーマットである。全てのE L I S A の別の一般的な態様は、患者のサンプルの診断バイオマーカーアッセイが行われる1 m l 未満の容量、典型的には300 μ l の容量のウェルと呼ばれる窪み(p o t) の形態の固体基板の使用である。E L I S A ウェルは、典型的には12ウェルで8列の配置を有し、96個の個別ウェルを有するE L I S A プレート又はマイクロタイタープレートとして知られる。E L I S A プレートは射出成形によって有機ポリマーで作製され、典型的な材料はポリスチレンであるが、P V C のような他の有機ポリマーも使用される。

40

【0014】

全てのE L I S A は、液相中に存在する少なくとも1つのリガンド及び固体表面に結合した少なくとも1つの分析物による共通の測定原理を有する。溶液中のリガンドは酵素と連結する。溶液中の酵素で標識されたリガンドはウェルの表面に拡散し、表面に結合した

50

分析物に非共有結合的に結合する。典型的には、この結合反応には約30分～120分かかる。続いて、過剰な結合していない液体リガンドを、洗浄溶液をウェルに添加し、除去することによる複数回の洗浄工程で除去する。一段階ELISAでは、結合したリガンド-酵素複合体の発見は着色基質を添加し、発色を測定することによって行われる。二段階ELISAでは二次検出試薬を添加し、1回目のインキュベーション及び基質の添加後に30分～120分の更なるインキュベーション、続いて記載のような2回目の洗浄サイクルが必要とされる。一部のELISAは3回目のリガンド結合工程、例えば増幅又は増強工程を更に含むように設計されており、一例は基質反応を行う前のビオチン-アビジン系によるシグナル増幅である。次いで、好適な酵素基質を添加することによって結合したリガンドを検出する。これらの酵素基質は化学物質の無色の溶液であり、固定化された酵素の結合により無色の基質が着色生成物へと変換される。発色量は酵素濃度に依存し、固定化された分析物に結合する酵素の量に正比例する。ここで、着色生成物の量及び濃度は好適な光学機器によって定量的に読み取ることができ、結合した酵素検出リガンドコンジュゲートの量及び分析物濃度の定量的測定値自体に比例する。測定可能な発光シグナル又はリン光シグナルを生成する他の酵素基質も、アウトプットの定量化に必要とされる特定の設備と組み合わせて使用される。

10

20

30

40

50

【0015】

IVDに使用される他の試験システムは、原則としてビーズに固定化した分析物によるELISA試験フォーマットであるビーズベースのシステムである。この場合、検出方法は酵素によるか、又は蛍光検出若しくは代替的には電気化学発光によるものである。これらのアッセイの多くは、アッセイを行うための手動操作工程を減らした、完全に自動化された設備を用いて行われる。

【0016】

凝集を用いた均一アッセイフォーマット又は蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づく均一アッセイが、*in vitro*診断のための他の既知のアッセイ技術である。

【0017】

使用されている試験システムの大半が、過剰な試薬保有酵素又は蛍光標識を除去するのに複数のピペット操作工程及び洗浄工程を必要とするELISA構成の基本原理を利用するものである。大抵の方法は長いインキュベーション時間を必要とし、時間のかかる多数の液体移動操作及び洗浄工程を含み、診断研究所における自動解法を要求する。

【0018】

生化学分析物及び臨床分析物を測定するELISA及び他の免疫アッセイ技術と比べてより最近のシステムでは、バイオセンサーが使用される。市販のバイオセンサーについて幾つかの技術的解決策が存在する。

【0019】

生体分子を分析する新たな技術は、結合した蛍光体のエバネッセント場励起であり、特許文献1、特許文献2、特許文献3に記載のように結合事象をリアルタイムに直接測定するものである。このエバネッセント場バイオセンサーの機能原理は、非共有結合性相互作用による表面に結合した分析物と溶液中のリガンドとの相互作用である。溶液中のリガンドは蛍光性分子に共有結合的に付着する。蛍光体分子の好ましい励起は、例えばレーザーダイオードによって生じるようなコヒーレント光によるものであり、次いで放出された光子を検出する。これに好適な蛍光体(fluorophors)は例えばCy5、Alexa色素又は集光性タンパク質アロフィコシアニン(Allo-phyco cyanine)(APC)である。

【0020】

この生化学反応は、付加的な光学的物質を底部に有するELISAウェルと同様の形態及び寸法の小さなウェルにおいて行われる。ELISAと同様、バイオセンサーウェル及びその光学底部は、例えばポリスチレンのような熱可塑性材料の射出成形によって作製される。ELISA法とエバネッセントバイオセンサー法との間の大きな違いは、溶液中のリガンドの標識である。ELISAでは標識は酵素であり、エバネッセント技術ではリガ

ンドは蛍光性分子で標識される。結合した蛍光体、すなわちエバネッセント表面に固定化された分析物に結合する溶液中の蛍光リガンドの測定は、エバネッセント場励起原理を用いた結合した蛍光標識リガンドの特異的な励起によって達成される。結合した蛍光体の選択的な励起は、ウェルの底部に位置するおよそ200nm厚の液体層の特異的な励起をもたらす。結合表面の上方の溶液中に過剰に存在する蛍光標識リガンドを励起しない光学的構造を用いたエバネッセント場の光によって起こる。エバネッセント場に存在する蛍光標識リガンドのみが励起し、光子を放出する。この方法により、可溶性リガンドと固定化リガンドとの結合反応のリアルタイムでの観察が可能になる。

【0021】

I V D 試験に用いられる大抵の免疫アッセイは、バイオマーカーの結果を得るためにインキュベーション時間、洗浄、二次試薬若しくは三次試薬又は溶液の添加を含む長時間の単調な手順を有するが、エバネッセントバイオセンサーは *in vitro* 診断アッセイを短時間で行うことを可能にする。E L I S A 自動化又はビーズベースの免疫アッセイの複雑かつ高コストの設備は、エバネッセントバイオセンサーを診断用途に使用する場合、必要でも必須でもない。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0022】

【特許文献1】欧州特許第1079226号明細書

【特許文献2】欧州特許第1204856号明細書

20

【特許文献3】欧州特許第1371967号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0023】

しかしながら、試験時間及び取扱いの容易さの点でE L I S A よりも優れていると同時に、E L I S A ベースの方法で知られるのと同等の柔軟性及び特異性をもたらす免疫ベースのアッセイは現在知られていない。

【0024】

したがって、高度に特異的で高感度であり、迅速に定性的結果及び定量的結果をもたらす、使用が容易な、患者から得られる生理的液体等の様々な液体中の物質を検出する方法を確立することが非常に望ましい。

30

【0025】

したがって、本発明の根底にある問題は、例えばE L I S A システムに利用され、同時に長い試験時間及び複数回の及び/又は複雑な操作工程をオペレーターが行う必要性等の上述の欠点を回避する、正確かつ非常に万能な免疫反応を用いる新規の方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0026】

したがって、本発明の一態様として、水性の生理的液体又は化学的液体中の物質を検出する方法であって、(i)少なくともリガンドL1が結合した表面を準備する工程と、(ii)前記表面と、少なくとも検出対象の物質及び少なくとも蛍光標識リガンドL2を含む溶液とを接触させる工程であって、前記検出対象の物質及び前記蛍光標識リガンドL2が同じであってもよく、該検出対象の物質、該蛍光標識リガンドL2又はその両方が表面に結合したりリガンドL1と相互作用して、少なくともリガンドL1、該検出対象の物質及び該蛍光標識リガンドL2を含む複合体を形成する、工程と、(iii)前記表面に結合した複合体を光源のエバネッセント場によって励起する工程と、(iv)放出された蛍光を測定する工程と、(v)前記放出された蛍光に基づいて定性的又は定量的な結果を決定する工程と、を含み、前記結果を得るのに3つ以上の液体操作工程が必要とされない、方法が提供される。

40

【0027】

50

本発明によると、検出対象の物質及びリガンドL2は概して互いに異なるが、例外的に同じであってもよい。そのような場合、溶液は少なくとも検出対象の蛍光標識物質を検出対象の物質及び蛍光標識リガンドL2の両方として含有する。

【0028】

本明細書で「検出」という用語は具体的に限定されず、対象の物質の定性的測定を含むだけでなく、その定量的決定も明示的に含む。これに関連して、本明細書で使用される「定性的」は特定のサンプルにおける物質の有無の決定を意味し、本明細書で使用される「定量的」という用語は特定のサンプルにおける検出対象の物質の含量又は量の測定を意味する。

【0029】

加えて、「物質」という用語は本明細書で具体的に限定されず、対象とされ得る任意の化学物質又は生化学物質を含む。該物質の例としては、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、DNA及びRNA等の核酸、脂質、糖類、ホルモン、遺伝子産物及び組織の分解産物等の生体分子、並びに細胞、細菌、真菌、マイコプラズマ、ウイルス、酵母及び寄生生物等の感染因子/生物が挙げられる。

【0030】

さらに、本明細書で使用される「水性の生理的液体又は化学的液体」という表現は具体的に限定されず、本発明の方法において使用可能である限り、開示されないあらゆる種類の液体を含む。例えば、液体は対象の物質の水溶液であってもよく、又は全血、血漿、血清、滑液、尿、唾液若しくは脳脊髄液等の患者から得られる又はそれに由来する生理的液体であってもよい。上記の「生理的液体」という表現は、例えば生検によって得られる1つ又は複数の患者の組織に由来する液体を更に含み、様々なタイプの全細胞又は細胞溶解物を更に含む。本発明による「化学的液体」はアルコール、エステル、芳香族溶媒、アミン等の水とは異なる少なくとも1つの溶媒を含む液体である。

【0031】

本発明によると、上記で規定した方法の工程(i)において、少なくとも1つのリガンドL1が結合した、すなわち固定化された表面を準備する。本明細書で「結合した」という用語は、好ましくはリガンドL1が吸収(直接吸収)によって表面に付着していることを意味する。しかしながら、リガンドL1は架橋要素、例えば抗体又は抗原等のタンパク質を介して表面に結合していてもよい。リガンドL1は共有結合によって表面に結合していてもよい。これは例えば、アクリレート表面を用いて、例えばカルボジイミドによる変換によってもたすことができる。本発明における「結合した」という用語は表面又は別のリガンドへの付着を含み、共有結合性及び非共有結合性の両方の相互作用、例えばイオン性、極性又は非極性の相互作用に基づく相互作用を含む。

【0032】

本明細書で、リガンドL1は一般的な方法によって表面上に配置することができる。例えば、リガンドL1として働くタンパク質を表面上にコーティングしてもよい。リガンドL1は、好ましくは吸収又は共有結合によって表面に結合することができる。この工程の後、表面を好ましくは別の溶液で処理し、リガンドL1に付着していない表面上の部位を、例えば基本的に溶液に含まれる構成要素と反応しない別のタンパク質と接触させることによってブロッキングする。上記の表面は例えば、凹形の容器、例えばキュベット、又はマイクロタイタープレート若しくは試験カートリッジのウェルの内側である。

【0033】

本発明によると、表面に結合したリガンドL1は、該リガンドL1に加えて、少なくとも蛍光標識リガンドL2及び検出対象の物質を含む複合体を形成し得る。表面に結合したリガンドL1により、検出対象の物質との複合体が表面に「定着し」、すなわち固定され、同時に蛍光体を含有する化合物で標識することによって検出することができる。

【0034】

本発明によると、「複合体」は、2つ以上の好ましくは化学物質又は生化学物質間の分子カップリング又は分子結合と理解される。複合体は好ましくは選択的及び/又は特異的

10

20

30

40

50

な変換を用いて、とりわけ好ましくは抗原 - 抗体反応によって形成される。本発明によると、「変換」という用語は、2つ以上の反応相手の共有結合性及び非共有結合性の両方の相互作用を含み、両タイプの相互作用が上記複合体内で続いて生じ得る。非共有結合性の相互作用は、例えば反応相手のファンデルワールス (Van der Waals) 相互作用、極性及び / 又はイオン性の相互作用を意味し得る。「反応相手」という用語は、本発明において別の物質に対する親和性を有する化合物を意味する。

【0035】

本発明によると、複合体形成の一般的な様式は具体的に限定されず、とりわけ以下の例が含まれる：

(1) 検出対象の物質は蛍光標識リガンドL2に対する親和性又は結合部位を有する。したがって、蛍光標識リガンドL2は検出対象の物質がリガンドL1に結合する前、後又はそれと同時に検出対象の物質に共有結合的又は非共有結合的に結合して、複合体を形成することができる。

(2) 検出対象の物質はリガンドL2である。このような場合には、検出対象の物質自体が蛍光標識され、表面に結合したリガンドL1と複合体を形成することが可能である。蛍光標識された検出対象の物質がリガンドL2の機能を担う場合には、検出対象の物質自体が蛍光体を保有することから、該リガンドL2は必要とされない。

(3) 検出対象の物質が蛍光標識リガンドL2を含有する、すなわちリガンドL2が検出対象の物質の構造の一部である。

(4) 別の化合物が蛍光標識リガンドL2を含有するか、又は該蛍光標識リガンドL2に対して親和性を有し、他の化合物が検出対象の物質に対する少なくとも1つの結合部位を更に含有する。この場合、他の化合物、検出対象の物質及びリガンドL2が(全体として又は個別に)コンジュゲート又は複合体として溶液中に存在し得るか、又はコンジュゲートが溶液中に形成される。

【0036】

さらに、本明細書で使用される「液体操作工程」という表現は概して、液体を作用部位から及び / 又は作用部位へと移動、除去又は添加する任意の工程を含む。例えば、本発明による液体操作工程は、液体をキュベット、マイクロタイタープレート又は試験カートリッジのウェルへと例えばピペット操作によって添加すること、又は液体をかかるとして除去することを含む。

【0037】

本明細書で、「光源」という用語は具体的に限定されず、エバネッセント場を生じ、リガンドL2又は検出対象の物質に結合した蛍光体を励起するのに適した任意の光源を含む。例えば、単色光を光源として使用することができる。好ましくは蛍光体の発光を妨げず、好ましくは色素の吸収バンドと交わる波長を有する光を使用するものとする。光が少なくとも635nmの波長を放出するレーザーが光源としてとりわけ好ましい。特に、上清溶液が血清である場合、血清の固有の蛍光がおよそ580nmであることから、600nm ~ 700nmの波長を放出するレーザーが好ましい。

【0038】

本発明の更なる実施の形態によると、上記で規定した方法において、工程(i i)の溶液は、蛍光体の吸収域及び / 又は発光域で吸収する少なくとも1つの色素を更に含む。

【0039】

本発明によると、容量中の蛍光体、すなわち表面に結合した複合体の一部でない蛍光体の励起は、表面と接触して配置された溶液に蛍光体の吸収域及び / 又は発光域で吸収する少なくとも1つの色素が添加されている場合に抑制することができる。

【0040】

容量に添加された色素の吸収は、本発明における蛍光体の吸収域及び / 又は発光域と整合する。単一の色素又は色素混合物を使用することができる。蛍光体の吸収域は概して、使用する光源の波長と一致する。色素がこの特別な範囲内に吸収極大を有する必要はなく、吸収スペクトルのショルダーで十分であり得る。例えば、APC又はCy5のような蛍

10

20

30

40

50

光体を使用する場合、使用する色素は例えばブリリアントブルーFCFのように600nm~700nmに吸収を有し得る。添加する色素の濃度は、溶液中の各色素の吸収係数及び放射される光の周波数の両方に応じて異なる。色素の濃度は、透過する光が基本的に表面上1mm以内で吸収され得るように色素に応じて調整することができる。

【0041】

好ましい実施の形態によると、上記で規定した方法は任意の洗浄工程を含まない。

【0042】

特に、本発明の方法は、好ましくは蛍光標識リガンドL2等の過剰な反応物を含有する容量を除去し、及び/又はリガンドL1及び/又は測定対象の複合体が結合している表面を洗浄する任意の工程を必要としない。これにより、本発明の方法が有利に加速し、所望の測定結果が迅速に得られ、方法を行う際の廃液の蓄積及び誤操作が回避される。

10

【0043】

本発明の更なる実施の形態では、上記で規定した方法は一段階方法である。本発明によると、「一段階」方法は1回の複合体形成反応しか行わないことを意味し、概してオペレーターは所望の測定結果を得るのに1回のみ又は多くとも2回の液体操作工程しか行う必要がない。このため、初回の複合体形成後のより多くの試薬の添加等の更なる反応工程が有利に回避される。

【0044】

さらに、本発明の更なる実施の形態は、液体攪拌を含まない上記で規定した方法に関する。

20

【0045】

本発明において、「液体攪拌」という表現は具体的に限定されず、自然拡散を除く液体中で行われる任意のタイプの攪拌を含む。例えば、本発明における液体攪拌は振盪、かき混ぜ、超音波攪拌等を含む。自然に起こる拡散を除く任意の液体攪拌を回避することによって、方法を単純かつ効果的な形で行うことができ、それによりそれぞれの攪拌デバイスを含む複雑な技術的設定が回避される。

【0046】

上記で規定した方法の更なる実施の形態によると、工程(v)で決定される結果が工程(ii)の開始から10分以内に得られる。

【0047】

本発明によると、定性的又は定量的な結果は、少なくとも検出対象の物質及び蛍光標識リガンドL2を含有する溶液を、リガンドL1が結合した表面と接触させてから10分以内に得られる。結果は9分以内、8分以内又は7分以内に得られるのが好ましい。更なる例としては、6分以内、5分以内又は4分以内の期間が挙げられる。

30

【0048】

更なる実施の形態によると、本発明はリガンドL1及びL2の一方又は両方が抗原、抗体又はそのフラグメントから独立して選択される上記で規定した方法に関する。

【0049】

本発明の更なる実施の形態は、前記検出対象の物質がペプチド、タンパク質、脂質、糖脂質、核酸、毒素、ホルモン、ケモカイン、サイトカイン(cytokins)、免疫グロブリン、抗原又は自己抗原、並びにウイルス、マイコプラズマ(mycoplasmas)、細菌、真菌及び酵母、及びそれらのフラグメントを含む感染因子からなる群から選択される化学物質又は生体分子物質である上記で規定した方法に関する。

40

【0050】

更なる実施の形態では、前記検出対象の物質がIgG、IgM、IgE、IgA及びIgDからなる群から選択される免疫グロブリンである。

【0051】

本明細書で、「免疫グロブリン」並びにサブタイプ「IgG」、「IgM」、「IgE」、「IgA」及び「IgD」という用語は、それぞれの免疫グロブリン又はサブタイプ自体を指すだけでなく、それぞれの免疫グロブリン又はサブタイプと比較して同じ化合物

50

ノ構造と少なくとも部分的に相互作用する限り、そのフラグメント及び誘導体も含む。

【0052】

更なる実施の形態は、単純結合アッセイ、サンドイッチアッセイ、競合アッセイ又は二重抗原アッセイのフォーマットを有する上記で規定した方法に関する。これらのフォーマットは図1及び実施例に更に説明される。

【0053】

本発明の方法に関して上に提示される全ての定義は、特に指定のない限り以下の本発明の態様にも適用される。

【0054】

本発明の更なる態様は、患者において特定のアレルゲンに対するアレルギー又は自己免疫疾患を検出する方法であって、(i)前記特定のアレルゲンが結合した表面を準備する工程と、(ii)前記患者に由来する生理的液体のサンプルと、少なくとも抗ヒトIgEモノクローナル抗体を含有する反応混合物とを混合する工程であって、前記抗体が蛍光体で共有結合標識されている、工程と、(iii)前記表面と、工程(ii)で得られる溶液とを接触させる工程であって、少なくとも前記アレルゲン、該アレルゲンに特異的なIgE及び蛍光標識された抗ヒトIgEモノクローナル抗体を含む複合体を形成する、工程と、(iv)表面に結合した複合体を光源のエバネッセント場によって励起する工程と、(v)放出された蛍光を測定する工程と、(vi)前記放出された蛍光に基づいて工程(ii)の開始から10分以内に前記サンプル中のIgEの量を結果として決定する工程と、を含み、前記結果を得るのに工程(ii)及び工程(iii)のみを2つの液体操作工程として必要とする、方法に関する。

10

20

【0055】

本発明の別の態様は、患者において特定の病原体による感染を検出する方法であって、(i)前記病原体の抗原が結合した表面を準備する工程と、(ii)前記患者に由来する生理的液体のサンプルと、前記病原体の少なくとも1つの抗原を含有する反応混合物とを混合する工程であって、前記抗原が蛍光標識されている、工程と、(iii)前記表面と、工程(ii)で得られる溶液とを接触させる工程であって、少なくとも固定化された抗原、該抗原に特異的な少なくとも1つの抗体及び蛍光標識された抗原を含む複合体を形成する、工程と、(iv)前記表面に結合した複合体を光源のエバネッセント場によって励起する工程と、(v)放出された蛍光を測定する工程と、(vi)前記放出された蛍光に基づいて工程(ii)の開始から10分以内に前記サンプル中の病原体に特異的な免疫グロブリンの量を結果として決定する工程と、を含み、前記結果を得るのに工程(ii)及び工程(iii)のみを2つの液体操作工程として必要とする、方法に関する。

30

【0056】

本発明によると、上記で規定した方法の工程(ii)で得られる溶液中に存在する蛍光標識された抗原は、表面に結合したものと同一抗原であってもよく、又は検出対象の免疫グロブリンと結合することが可能である限り異なる抗原であってもよい。

【0057】

本発明の更なる態様は、溶液中の核酸を検出する方法であって、(i)前記対象の核酸に相補的な核酸が結合した表面を準備する工程と、(ii)前記表面と、蛍光標識された前記対象の核酸を含有する可能性がある溶液のサンプルとを接触させる工程であって、少なくとも相補的な核酸及び前記蛍光標識された核酸を含む複合体を形成する、工程と、(iii)前記表面に結合した複合体を光源のエバネッセント場によって励起する工程と、(iv)放出された蛍光を測定する工程と、(v)前記放出された蛍光に基づいて工程(ii)の開始から10分以内に前記サンプル中の対象の核酸の量を結果として決定する工程と、を含み、前記結果を得るのに工程(ii)を唯一の液体操作工程として必要とする、方法に関する。

40

【0058】

本発明の更なる態様は、上記で規定した方法を行う診断試験デバイスに関する。

【0059】

50

本発明によると、診断試験デバイスは特に限定されず、例えばサンプルを励起する照射手段と、該励起によって得られる蛍光を検出することが可能な検出手段と、結果をオペレーターに対して表示する表示手段とを備える任意の試験デバイスを含む。診断試験デバイスはキュベット、マイクロタイタープレート又は試験カートリッジ等のサンプル担体が挿入されたレセプタクルを有するのが好ましい。

【0060】

キュベット、マイクロタイタープレート又は試験カートリッジは、ガラス又はプラスチック、とりわけ好ましくはポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリシクロオレフィン、ポリアクリロニトリル (polyacrylonitrile)、ポリメチルメタクリレート等のプラスチック及び/又はこれらのプラスチックの混合物及びブレンドを含有するのが好ましい。原則として、基本的に可視範囲の光を吸収しない任意のプラスチックが好適である。一実施の形態では、プラスチックは例えば、散乱光に起因する発光を除去するために薄青色に染色されていてもよい。プラスチックのキュベット、マイクロタイタープレート及び試験カートリッジは射出成形によって安価に得ることができ、好ましくは $1\mu\text{l}$ ~ $400\mu\text{l}$ 、とりわけ好ましくは $5\mu\text{l}$ ~ $200\mu\text{l}$ の反応容量を有する。本発明のキュベット、マイクロタイタープレート又は試験カートリッジは一体形で作製されるのが好ましい。

10

【0061】

本発明の更なる態様は、上記で規定した診断試験デバイスと、リガンドL1が結合した表面を提供する少なくとも1つの試験カートリッジと、任意に1つ又は複数の反応組成物、希釈剤及び/又は助剤とを含む診断試験キットに関する。

20

【0062】

本明細書で「試験カートリッジ」という表現は具体的に限定されず、リガンドL1が結合し、それぞれの溶液又は反応物と接触し得る表面を提供するために用いることができる任意の物体を含む。例えば、試験カートリッジは、特定の測定要件に対して事前調整される、複数の完全に分離した測定ウェルを有する使い捨ての測定カートリッジであってもよい。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】本発明の方法を用いて行うことができるアッセイフォーマットの例を示す図である。図1.1は単純結合アッセイを示す。1つのリガンド(a)をセンサー表面にコーティングし、蛍光リガンド(b)が時間に依存して固定化リガンド(a)に結合する。これは、コーティングしたアビジン及び検出試薬としてビオチン化APCを用いた実施例1で更に実証される。図1.2は、抗体(a)をセンサー表面にコーティングし、溶液中の蛍光標識された第2の抗体(c)を溶液中加入ることによって達成されるサンドイッチアッセイを示し、リガンド(a)及び(c)の両方が独立して同時に分析物(b)と反応する。これは、分析物タンパク質IgEを2つのモノクローナル抗体で検出する実施例5、又は2つのモノクローナル抗体を用いた分析物HCGについてのサンドイッチアッセイである実施例11で更に実証される。図1.3は、固定化リガンド(a)及び溶液中の蛍光標識リガンド(c)を用いた単純結合アッセイに関連した競合アッセイを示す。競合相手(b)が溶液中のリガンド(c)に結合する。実施例2において、ビタミンHとしても知られるビオチンの競合アッセイを説明する。図1.4は免疫グロブリンの検出のためのサンドイッチアッセイスキームを示す。固定化リガンド(a)が免疫グロブリン(b)と反応し、第2のリガンド(c)が免疫グロブリン(b)と反応する。この場合、リガンド(c)は溶液中の蛍光標識リガンドL2である。実施例3において、ヒト血清中のrAspf1特異的IgEを検出するサンドイッチ試験を説明する。図1.5は、固定化抗原リガンド(a)及び蛍光標識抗原リガンド(c)を含む二重抗原サンドイッチ抗体アッセイスキームを示す。免疫グロブリン(b)がサンプル中の分析物である。IgG等の免疫グロブリンは二官能性分子であり、抗原に対する少なくとも2つの結合部位を有する。IgM等の免疫グロブリンは10種の抗原分子と反応することができる。これにより、全クラ

30

40

50

スの二官能性免疫グロブリンを検出する、二重抗原架橋アッセイとも呼ばれる二重抗原サンドイッチアッセイの確立が可能となる。実施例 6 及び実施例 7 では、ヒト抗トキソプラズマ抗体及びマウス抗オボアルブミン I g G 抗体の試験を説明する。図 1 . 6 は、アビジン等の固定化リガンド (a)、固定化リガンドのアビジン (a) に結合するビオチン化オリゴヌクレオチド (b)、及び蛍光標識オリゴヌクレオチド (c) による D N A を検出するアッセイを単純なスキームで示し、標識は C y 5 分子である。D N A 検出試験は実施例 1 0 及び実施例 1 1 に詳細に説明する。

【図 2】アビジン / ビオチン化 A P C 結合アッセイを示す図である。

【図 3】ビオチンの競合アッセイを示す図である。

【図 4】r A s p f 1 に結合するヒト I g E についてのアッセイを示す図である。

10

【図 5】全ヒト I g E を検出するサンドイッチアッセイを示す図である。

【図 6】トキソプラズマ抗体の一段階二重抗原抗体サンドイッチアッセイを示す図である。

【図 7】ネズミオボアルブミン特異的 I g G の一段階二重抗原抗体サンドイッチアッセイを示す図である。

【図 8】核酸オリゴヌクレオチド検出アッセイを示す図である。

【図 9】結合 D N A フラグメントによる核酸 D N A 検出アッセイを示す図である。

【図 1 0】H C G のサンドイッチアッセイを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 6 4】

20

本発明の水性の生理的液体又は化学的液体中の物質を検出する方法は、免疫ベースの E L I S A 技術又は他の免疫ベースの技術と簡便な迅速かつ信頼性のあるエバネッセント場検出システムとを有利に組み合わせたものである。結果として、非常に万能であり、様々な液体中の対象の物質の分析について特異的かつ正確であり、同時に例えば E L I S A に必要とされる多数の操作工程 (例えば洗浄、ブロック等) が回避されるアッセイ方法が得られる。さらに、有利には、本発明の方法では長いインキュベーション時間は必要とされず、そのため定性的結果及び定量的結果が 1 0 分以内に迅速に得られる。

【 0 0 6 5】

本発明を下記の実施例を参照して更に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

【実施例】

30

【 0 0 6 6】

以下で、E L I S A システムにおいて通常行われる免疫アッセイ及び生化学的結合アッセイをどのようにエバネッセントバイオセンサーアッセイへと転換するかを実証する。E L I S A 又はビーズベースの免疫測定法の生物学的要素及び反応物の適合は、種々のアッセイ及びアッセイフォーマットで達成され、正確、急速かつ定量的に分子を高感度で検出及び測定することができる。

【 0 0 6 7】

免疫グロブリン等のタンパク質又はタンパク質の検出については、単純な一段階サンドイッチアッセイフォーマットが可能である。最大で 2 回のピペット操作工程を含む非常に単純な一段階アッセイ手順が、エンドユーザーにとって本質的に新しい。さらに、アッセイをポイントオブケア (P O C) 検査又はベッドサイド検査での使用に適合させるために、主な態様は希釈物等の生体サンプルの任意の前処理工程を省き、血漿、血清、尿又は唾液のサンプルを不希釈状態で使用することであった。現在、患者の血漿及び血清中のタンパク質抗原及び免疫グロブリンを検出するために用いられるサンドイッチアッセイの大半は二段階アッセイである。

40

【 0 0 6 8】

例として、タンパク質等の中間分子量から高分子量の分析物を分析及び定量化する抗体サンドイッチアッセイへのエバネッセントバイオセンサー技術の使用を示す。他の例では、二重抗原サンドイッチアッセイによる抗体の検出を実証する。抗体は、疾患を引き起こす抗原、アレルゲン、又は微生物等の感染因子に対するものである。驚くべきことに、ア

50

ッセイは、3桁の濃度以上の広い抗体の濃度範囲にわたって高い感度及び有用性を示す一段階アッセイとして働く。これにより、抗原特異的IgG、IgM、IgA、IgE及びIgD等の他の免疫グロブリンを単純な高速一段階アッセイにおいて高い感度、特異性で、1ml当たり数十ナノグラムのIgGから(form)1ml当たり数百マイクログラムのIgGという広範囲の濃度にわたって検出する方法の性能が実証される。重要なことには、アッセイを任意の洗浄工程なしに行うことにより、試験を行うための仕事量が減少する。付加的な利点は、高親和性抗体及び低親和性抗体を検出することができることである。低親和性抗体の検出は、これらの抗体がELISA等の大抵の免疫アッセイ及び結合アッセイの二次インキュベーション工程及び洗浄手順中に固定化抗原から洗い流される場合があることから非常に重要である。これは例えば脂質、糖又は糖脂質の抗原、及び場合によっては結合親和性が低い小ペプチドに対する免疫応答を測定する場合に診断的に非常に適切である。依然として、これらの低親和性免疫応答は宿主防御において、又は初期免疫応答に医学的興味を持たれる場合に重要である。糖及び糖誘導体に対する低親和性抗体による非常に顕著な免疫応答は血液型A抗原及びB抗原である。IgG及びIgMサブクラスの天然の抗体は糖類に対するものであり、洗浄工程によってこれらの低親和性抗体が除去され、in vitroアッセイにおいて偽陰性結果をもたらす場合がある。

10

20

30

40

50

【0069】

抗原及び抗体のサンドイッチアッセイは現在、心臓発作及び脳卒中の事象を診断するための心臓タンパク質(トロポニン、ミオグロビン)及び脳タンパク質(S100)等のタンパク質の検出に用いられることが多い。更なる有用な診断用途は、生殖ホルモン検査(HCG、LH、FSH等)、並びに一般的なタンパク質及びペプチドホルモン検査(TSH、インスリン、サイトカイン、インターフェロン、PCT、BNP、ANP等)である。感染性疾患を診断する抗体試験は、ウイルス、細菌又は他の起源の実質的に全ての関連感染性病原体(HIV、HBV、HCV、インフルエンザ、トキソプラズマ、アスペルギルス、プラスモジウム、ストレプトコッカス、大腸菌(E. coli)等)について市販されている。診断において日常的に行われる他の既知の抗体試験は、全IgE及び特異的なIgEを定量的に検出するアレルギー関連診断アッセイ、並びに自己抗原に結合する自己抗体を検出する自己免疫関連アッセイである。

【0070】

サンドイッチフォーマットが技術的に実現可能でない場合に低分子量化合物のin vitro診断試験に一般に用いられ、小ペプチド及び場合によっては血漿中に高濃度で生じるタンパク質についても用いられる第2のアッセイフォーマットは、競合的免疫アッセイフォーマットである。競合アッセイは低分子代謝産物及び薬物の検査、すなわち依存性薬物(とりわけテトラヒドロカナビノール、コカイン、アヘン剤、エクスタシー等のアンフェタミン、メタドン、LSD及びベンゾジアゼピン)、ステロイドホルモン、ヒスタミン又はトリプトファン等の代謝産物、及びビタミンの検査に適用される。このフォーマットの更なる試験は抗生物質及び農薬の試験であり、これらの分析物についての食品及び食品成分の検査が関連アッセイである。例えばバソプレッシン又はサブスタンスP等のペプチドホルモンも競合アッセイフォーマットで試験される。C反応性タンパク質(CRP)のような一部の豊富な分析物については、正常ヒト血漿での高い濃度(mg/ml)がサンドイッチフォーマットで確実に測定するには問題である。サンドイッチアッセイにおける分析物の高い濃度の問題及び高用量フック問題、すなわちプロゾーン効果を克服する解決策は患者のサンプルの事前希釈である場合があり、又は別の解決策は分析物を競合アッセイで測定することである。

【0071】

診断に関連する第3の大きな分析物の群は、核酸DNA及びRNAの検査である。これは、分子生物学的増幅技術(PCR)を用いてDNA又はRNAを増幅することによって日常的に行われる。増幅工程なしに得られる天然の供給源に由来する増幅したDNA又はRNAの検出は、エバネッセントバイオセンサーによって実証される。ここで、エバネッセントベースのバイオセンサーは、検出工程の前に導入される好適な核酸修飾によって標

識された核酸の迅速かつ単純な検出を可能にする。基本原理は、分析対象の核酸を蛍光部分で特異的に標識することである。これはその後エバネッセントバイオセンサーを用いて検出及び定量化することができる。高感度かつ高度に特異的な核酸の検出は、E L I S A フォーマットと同様の単純な手法を用いて達成され、典型的には10分又は更にそれ未満で定量的結果をもたらす。DNA及びRNAの分子生物学的操作については、強力な変性界面活性剤、カオトロピック剤又は熱等の変性条件が技術に使用されることが多く、核酸の検出への酵素/基質の組合せの使用は問題がある。ここで、エバネッセントバイオセンサーは不安定な酵素を検出標識として使用せず、代わりに熱及び他の変性条件に安定な化学的蛍光体に頼るため、大抵の分子生物学的な方法と適合する技術である。これにより、熱及び化学的に不安定な酵素を用いたE L I S A フォーマットでは不可能であった、DNAの高感度検出を低ピコモル濃度で5分～10分以内に可能にする新たなアッセイフォーマット及び分子生物学への適用が可能となる。この高感度かつ高速の核酸検出は酵素増幅に基づく増幅がなくとも行うことができ、病原体の同定及び定量化の有用な診断ツールをもたらす。アッセイの更に別の可能性は、固定化DNAを蛍光体で標識されたDNA結合タンパク質で精査するDNAタンパク質結合アッセイ、例えばプロモーター免疫アッセイである。要約すると、全てのE L I S A アッセイをエバネッセントバイオセンサーアッセイへと転換することができる。

10

【0072】

実施例1：アビジン/ビオチン-A P Cアッセイ

エバネッセントバイオセンサーシステムを用いる単純結合アッセイを、アビジンでコーティングした表面と様々な量のビオチン化アロフィコシアニン(b i o - A P C)とを反応させることによって行う。エバネッセントバイオセンサーチップを、ニュートラアビジンのP B S溶液でコーティングした。コーティングは、ニュートラアビジン原液をP B Sで10 μ g/ml溶液へと希釈し、この溶液30 μ lを各ウェルに添加し、室温で2時間インキュベートすることによって行う。コーティング溶液を除去し、ウェルをP B Sで3回洗浄し、最後に50 μ lのブロッキング溶液でウェルを満たす。ブロッキング溶液は1% B S AのP B S溶液であり、0.25% T w e e n 20を含有する。ブロッキングは室温でおよそ1時間行い、ブロッキング溶液を除去し、測定対象のサンプル溶液を添加することによって終了する。試験対象のサンプルは1% B S A、0.05% T w e e n 20及び0.04% B r i l l i a n t B l a c k B Nを添加したP B Sバッファー中で様々な濃度のb i o - A P Cとした。各々のウェルを或る特定の濃度のb i o - A P Cと反応させる。

20

30

【0073】

エバネッセントバイオセンサー機器及び特許文献1、特許文献2、特許文献3に記載のデバイスを用いて、蛍光を10分間にわたってリアルタイムで測定する。測定される光子の増加は整数で与えられ、或る特定のウェルについて反応の最初の10分以内にカウントされる光子の増加である。1つのウェルで測定される光子の増加は、測定単位カウント毎秒(又は「c p s」と省略される)による「デルタカウント」(d c)としての0秒時点から600秒時点までの光子の変化として与えられる。或る特定のウェルから(f o r m)放出される光子は、生化学反応中に各測定が1秒間という時間間隔で測定されるが、測定点当たり10ミリ秒～(o r)20秒の任意の値を使用してもよい。測定された光子をグラフのY軸にX軸の時間に対してプロットし、この手順を各ウェルについて個別に行う。次いで、線形回帰曲線をリーダー機器のソフトウェアによって生成し、10分間の観察時間当たりの光子の平均増加を自動的に算出する。1532カウント毎秒(c p s、1秒間に測定される光子)のd cは、この特定のウェルについて測定される光子数が10分間の測定で1532 c p s増加することを意味する。

40

【0074】

ここで、経時的な光子の増加d c(c p s)はサンプル中の分析物の量の尺度である。図2に示す結果は、X軸に試験に使用するビオチンA P Cの濃度(μ g/ml)、Y軸に測定の最初の10分での光子の増加である対応するd cをプロットすることによって得ら

50

れる。試験に使用する *bio*-APC の量と、エバネッセントバイオセンサーを用いて観察されるシグナルとの間に線形に近い関係が観察される。*bio*-APC の検出限界は 10 ng/ml 未満である。

【0075】

実施例 2：アビジン/ビオチン - APC 競合アッセイ

エバネッセントバイオセンサーシステムを用いてビオチンを決定する単純アッセイを、初めに実施例 1 に記載のように準備したアビジンでコーティングしたバイオセンサー表面と、1% BSA、PBS、0.05% Tween 20 のバッファー中の様々な量でビオチンを含有する溶液との室温で 1 時間の反応によって行う。その後、ウェルを PBS で 3 回洗浄することによってビオチン溶液を除去する。続いて、遊離ビオチン結合部位を *bio*-APC によって検出する。

【0076】

ここで、経時的な光子カウントの増加 dc (cps) はサンプル中の遊離ビオチンの量の尺度である。図 3 に示す結果は、X 軸に試験に使用する遊離ビオチンの濃度 (nmol/ml)、Y 軸に測定の最初の 10 分での対応する累積光子カウントの増加をプロットすることによって得られる。

【0077】

遊離ビオチン量の増加が用量依存的にシグナルの低下をもたらす典型的な競合曲線が観察される。このアッセイを用いて、検出可能な最低濃度である 1 ml 当たり 50 pmol のビオチンから始めて遊離ビオチンを検出することができる。アッセイは、ビオチン溶液と *bio*-APC とをウェルの外で混合し、得られる混合物をアビジンバイオセンサーチップを用いて分析することによって一段階アッセイとして行うこともできる。競合アッセイはステロイド、抗生物質、依存性薬物、医薬品、代謝産物又はビタミン等の化学的及び生化学的な小分子の測定に有用である。ビタミン H としても知られるビオチンの測定は多くの様々な可能性の一例である。

【0078】

実施例 3：rAsp f1 特異的 IgE アッセイ

rAsp f1 に特異的なヒト IgE を測定する課題は、以下の実験的設計によって解決される。rAsp f1 はアスペルギルス・フミガータス (*Aspergillus fumigatus*) の関連主要アレルゲンの 1 つであり、記載される何千ものアレルゲンの 1 つである。バイオセンサーチップを、実施例 1 に記載の方法に従って PBS 中 $10 \mu\text{g/ml}$ の組み換え rAsp f1 でコーティングする。rAsp f1 を大腸菌で発現させ、標準クロマトグラフ法を用いて精製する。rAsp f1 に対する血清中のヒト IgE 抗体の測定については、4 容量部のヒト血清を 1 部の 5 倍濃縮反応混合物と混合する。5 倍濃縮混合物は 5 mg/ml のウシ IgG、5% BSA、0.2% Brilliant Black BN、0.5% ポリビニルピロリドン (polyvinyl-pyrrolidone) K70、1% スクロース、0.25% Tween 20、0.125% アスコルビン酸、PBS 中の 10 mM HEPES (pH 7.4)、及び APC 蛍光体で共有結合標識された $50 \mu\text{g/ml}$ のマウス抗ヒト IgE モノクローナル抗体を含有する。20 μl の混合物を rAsp f1 でコーティングしたバイオセンサーウェルにピペットで移し、即座にエバネッセントバイオセンサー機器で測定する。

【0079】

ここで、経時的な光子の増加 dc (cps) はヒト血清サンプル中に存在する抗 rAsp f1 特異的 IgE の量の尺度である。図 4 に示す結果は、X 軸に CAP 単位 KU/L で与えられる種々の血清サンプル中に存在する異なる既知の濃度の抗 rAsp f1 特異的ヒト IgE、Y 軸に測定の最初の 10 分での対応する光子の増加をプロットすることによって得られる。血清サンプル中の rAsp f1 特異的 IgE の量と、バイオセンサーシステムを用いたシグナル dc (cps) との間に線形関係が観察される。Phadia の rAsp f1 試験及びエバネッセントバイオセンサーシステムによって求めた CAP 単位間の相関は 0.98 であり、 dc は 1 KU/L の IgE 当たり 1738 cps である。

10

20

30

40

50

エバネッセントバイオセンサー試験の検出限界は1 k U / L未満である。エバネッセントバイオセンサーは、洗浄を行わない僅か2回のピペット操作工程での全ヒト血清中のアレルゲン特異的I g Eの10分間の単純な一段階測定を可能にする。

【0080】

示した例は、何千もの異なる抗原又はアレルゲンから選ぶことができる、コーティングする抗原を変化させることによって行うことができる多くの試験のうちの1つである。さらに、このフォーマットを用いて、他のサブクラス他の免疫グロブリン、例えばアイソタイプI g G、I g A、I g D又はI g Mの免疫グロブリン及びその対応するサブタイプを検出することもできる。

【0081】

実施例4：全I g Eアッセイ

血清中の全I g Eの濃度の測定は、日常的な臨床診断でよく必要とされる別の試験である。I g Eをエバネッセントバイオセンサーシステムで測定するには、試験設計は一段階サンドイッチアッセイとする。バイオセンサーチップを10 μ g / m lの抗ヒトI g Eモノクローナル抗体クローン7.3でコーティングし、ヒトI g E検出ミックスを上記のように調製する。この実験では、ミックスは1.5 m g / m lのウシI g G、3% B S A、0.12% Brilliant black BN、0.15%ポリビニルピロリドン (polyvinyl-pyrrolidone) K70、0.3%スクロース、0.15% Tween 20、0.125%アスコルビン酸、PBS中の10 m M H E P E S (p H 7.4)、及びA P Cで共有結合標識された30 μ g / m lのマウス抗ヒトI g Eモノクローナル抗体を含む3倍濃縮ミックスとして調製する。種々の量のI g Eを含有するヒト血清を、1部のヒト血清と19部のP B Sとを混合することによってP B Sで希釈する。この混合物20 μ lと3倍濃縮検出ミックス10 μ lとを混合し、得られる溶液20 μ lをコーティングバイオセンサーウェルにピペットで移し、バイオセンサーをエバネッセントバイオセンサー機器で直接測定する。結果を図5に示す。

【0082】

ここで、経時的な光子の増加d c (c p s)はヒト血清サンプル中に存在する全I g Eの量の尺度である。図5に示す結果は、X軸にC A P単位k U / Lで与えられる種々の血清サンプル中に存在する異なる濃度の全ヒトI g E、Y軸に測定の最初の10分での対応する光子の増加をプロットすることによって得られる。血清サンプル中のI g Eと、バイオセンサーシステムを用いたシグナルd c (c p s)との間に線形関係が観察される。P h a d i aの全I g E測定及びエバネッセントバイオセンサーシステムによって求めたC A P単位間の相関は0.89である。エバネッセントバイオセンサーは、僅か2回のピペット操作工程で洗浄工程なしに全ヒト血清中の全I g Eの10分間の単純な一段階測定を可能にする。この方法により、他のサブタイプの免疫グロブリンの検出も同様に可能である。

【0083】

実施例5：トキソプラズマ抗体アッセイ

i n v i t r o診断で行われる一般的な試験は、患者が病原体に感染しているか否かを、患者の血清又は血漿を病原体と反応する抗体について試験することによって検出することである。病原体は細菌、ウイルス、酵母、寄生生物又は任意の他の微生物病原体であり得る。陽性抗微生物抗体試験は多くの場合、既存の感染又は以前の感染の指標となる。これは、全てのドナーをH I V、H B V及びH C Vについての抗体試験によって血清学的にスクリーニングする血液バンクにおいて日常的に行われる。更なる日常的なスクリーニング試験は、血清試験によって検出される4つの個別の病原体による病原体のT o R C Hパネルである。これらの病原体はトキソプラズマ、風疹、C M V及びH S Vである。

【0084】

トキソプラズマ抗体試験は、二重抗原抗体アッセイのような非常に単純かつ迅速な一段階アッセイにおいてエバネッセントバイオセンサーによって行うことができる。二重抗原抗体アッセイでは、病原体と反応する免疫グロブリンを検出する。アッセイはサブクラス

10

20

30

40

50

に特異的でないが、代わりに全ての二官能性免疫グロブリンが陽性反応を生じる。このアッセイフォーマットの利点は、免疫サブクラスに関わらず病原体に対する全ての免疫グロブリンを検出することができることであり、これによりこの設定がスクリーニング試験として適するものとなる。感染の初期では主要な免疫応答はI g Mサブタイプの抗体であり、感染の後期にのみI g G 応答が生じ、免疫グロブリンアイソタイプスペクトルの中心となる。二重抗原アッセイはI g G 応答及びI g M 応答の同時検出を可能にし、高い診断感度を有する。さらに、エバネッセントバイオセンサーアッセイはアッセイ手順に洗浄工程を含まず、不希釈血清を使用するため、E L I S Aでの検出が困難な低い親和性しか有しない抗体を含む抗体を検出することができる。低親和性抗体は、E L I S A手順では洗浄工程及び通常のインキュベーション期間、例えば二次抗体酵素コンジュゲートとのインキュベーション期間の間に洗い流される。低親和性抗体の例は感染の極めて初期の抗体、又は糖類等の低分子量の小抗原、並びに細菌及び他の病原体の脂質抗原に対する抗体であり、抗体はその低親和性のために、従来E L I S A法を用いる場合に感染した動物及びヒトの血清における検出が困難な場合がある。バイオセンサー技術を有利に用いることができる他の糖抗原は、血液型A抗原及びB抗原並びにこれらの血液型抗原に対する低親和性抗体である。

10

【0085】

トキソプラズマ抗原を組織培養上清から粒状物質として調製し、標準手順に従って精製する。この抗原の1アリコート、基本的にはアビジンについて記載されるように吸収によってバイオセンサーチップにコーティングする。別のアリコートをA P Cで蛍光標識する。一段階二重抗原試験を20 μ lの抗トキソプラズマI g G標準と、T r i s緩衝1%カゼイン、2% B S A、本質的に中性p Hの0.3% T w e e n 20からなり、60 μ g / m lのトキソプラズマ抗原A P Cコンジュゲートを含有する3倍濃縮反応ミックス10 μ lとを混合することによって行う。混合の直後に、得られる溶液20 μ lをトキソプラズマ抗原でコーティングしたバイオセンサーウェルに移し、バイオセンサーデバイスを即座にエバネッセントバイオセンサー機器で測定する。ここで、経時的な光子の増加d c (c p s)は抗トキソプラズマ特異的な免疫グロブリンの量の尺度である。

20

【0086】

X軸にI U / m lで与えられる種々の異なる濃度の抗トキソプラズマ(a n t i - T o x p l a s m o s e)標準、Y軸に測定の最初の10分での対応する光子の増加をプロットすることによる結果を図6に示す。試験したサンプル中の抗トキソプラズマ(a n t i - T o x p l a s m o s e)標準の量と、エバネッセントバイオセンサーシグナルとの関係が観察される。曲線適合後の標準中の所与の単位に対するシグナルの相関は0.98であり、検出限界は標準調製物10 I U / m l未満であり、アッセイはE L I S Aと同等又はより良好な性能を有する。

30

【0087】

実施例6：オボアルブミン抗体アッセイ

アレルギー研究では、マウスを微量のオボアルブミンで免疫化し、抗オボアルブミンI g E 応答をi n v i v oで生成する。オボアルブミン免疫化は実験動物でも強い抗オボアルブミンI g G 応答をもたらし、これを測定することができる。免疫化マウスのI g G画分は精製プロテインGであり、抗オボアルブミンI g G濃度をE L I S Aによって決定した。このマウスI g G抗オボアルブミン調製物を、続いて一段階エバネッセントバイオセンサーアッセイで試験した。

40

【0088】

アッセイフォーマットは二重抗原サンドイッチ抗体アッセイであり、10 μ g / m lのオボアルブミンのP B S溶液をウェル内で一晚インキュベートすることによってオボアルブミンをセンサー表面に固定化し、続いて実施例1に記載のように洗浄工程及びブロッキング工程を行うことを行った。検出のために、規定量の抗オボアルブミンマウスI g Gを含有する溶液20 μ lを、3% B S A、0.12% B r i l l i a n t B l a c k B N、0.3% ポリビニルピロリドン(p o l y v i n y l - p y r o l i d o n) K 9 0

50

、0.15% Tween 20、0.075% アスコルビン酸、6 mM HEPES (pH 7.4)、2 mM PO₄ (pH 7.4) 及び30 mM NaClのバッファー中60 µg/mlのAPCで標識したオボアルブミンを含有する溶液10 µlと混合した。この混合物20 µlを、オボアルブミンでコーティングしたバイオセンサーチップ及びバイオセンサーリーダーで余計に遅らせることなく即座に分析した。

【0089】

ここで、経時的な光子の増加 dc (cps) は元のサンプル中のマウス抗オボアルブミン IgG の量の尺度である。図7に示す結果は、X軸に単位 µg/ml で与えられる異なる濃度の抗オボアルブミン IgG、Y軸に測定の最初の10分での対応する光子の増加をプロットすることによって得られる。1 ml 当たり30 ng から1 ml 当たり10 µg の IgG という範囲での試験における抗オボアルブミン IgG 量の関係が観察される。30 µg/ml を超える抗原特異的 IgG という生理学的に不適切な濃度での IgG 量の増加は、測定シグナルの低下をもたらす。期待される形である線形性を下回る。これは、測定シグナルを低下させる高用量フック (プロゾーン) 効果に起因する。それにもかかわらず、1 ml (milliliter) 当たり30 ng から1 ml 当たり100 µg の IgG までの全てのサンプルが陽性シグナルを生じる。これにより、一段階二重抗原サンドイッチ抗体アッセイの病原体検出における IgG 及び他の免疫グロブリンを検出する診断ツールとしての使用が実証される。サンドイッチ抗原アッセイを用いて病原体抗原、例えば HIV p24 又は HBV S 抗原又は HBS c 抗原又はマラリア抗原の検出を行うことが可能であることも明らかである。

10

20

【0090】

実施例7：核酸オリゴヌクレオチド検出アッセイ

DNA 又は RNA 等の核酸の検出は診断及び R & D の別の共通の課題である。DNA の単純アッセイを、実施例1に記載のようにエバネッセントバイオセンサーチップをアビジンでコーティングすることによって行う。コーティング及びブロッキングの後、チップを PBS で3回、1% スクロース溶液で3回洗浄した後、バイオセンサーデバイスを乾いたペーパータオル上でタッピングして全ての液体を除去した。得られるチップを常温で2時間放置して乾燥させた。この洗浄手順によって準備したバイオセンサーは、非乾燥フォーマットのバイオセンサーチップと同一の性能を有する。試験のために、4倍濃縮 SSC、0.1% SDS 及び0.04% Brilliant Black BN からなるバッファー中の40 pmol/ml の3' ビオチン化オリゴヌクレオチド 5' - ACT GGC GAA CTA CTT ACT CT - 3' - BIO を含有する溶液と、様々な量の相補的な5' Cy5 標識相補的分析物オリゴヌクレオチド Cy5 - 5' - AGA GTA AGT AGT TCG CCA GT - 3' とを室温で混合し、混合後即座に20 µl の混合物をアビジンコーティングウェルに添加することによって分析し、エバネッセントリーダー機器で5分間読み取った。Cy5 標識オリゴヌクレオチド濃度は0 pmol/ml ~ 1000 pmol/ml の範囲にわたって変化させた。

30

【0091】

ここで、経時的な光子の増加 dc (cps) は Cy5 標識オリゴヌクレオチドの量の尺度である。図8に示す結果は、X軸に異なる濃度 (pmol/ml) の Cy5 オリゴヌクレオチド、Y軸に試験における Cy5 オリゴ濃度に対する分析物 Cy5 オリゴヌクレオチドの量を1 ml 当たり0 pmol から100 pmol まで増加させることによる測定の最初の5分での光子の用量依存的な増加をプロットすることによって得られる。分析感度は、5分間のアッセイにおける DNA の定量的検出について0.1 pmol/ml 未満である。

40

【0092】

実施例8：結合 DNA フラグメントによる核酸 DNA 検出アッセイ

DNA 又は RNA 等の核酸を検出する別のアッセイフォーマットは、オリゴヌクレオチドをセンサー表面に固定化し、可溶性の相補的 Cy5 標識 DNA フラグメントをハイブリダイズさせ、反応をエバネッセントバイオセンサーで時間分解的に観察することによるも

50

のである。DNAの単純アッセイを、実施例1又は実施例7に記載のようにエバネッセントバイオセンサーチップをアビジンでコーティングすることによって行う。ブロッキング工程の後、バイオセンサーを4倍濃縮SSC、0.1%SDS及び0.04%Brilliant Black BNからなるバッファー中の40 pmol/mlの3'ピオチン化オリゴヌクレオチド5'-ACT GGC GAA CTA CTT ACT CT-3'-BIOを含有する溶液と室温で2時間インキュベートする。過剰な非反応ピオチン化オリゴヌクレオチドを、試験前に複数回の洗浄によって洗い流す。

【0093】

試験のために、様々な量の5'Cy5標識分析物オリゴヌクレオチドCy5-5'-AGA GTA AGT AGT TCG CCA GT-3'を、4倍濃縮SSC、0.1%SDS及び0.04%Brilliant Black BNからなるバッファー中で調製した。この溶液20 µlをエバネッセントバイオセンサーウェルに添加し、即座にエバネッセントリーダー機器で5分間読み取った。Cy5標識オリゴヌクレオチド濃度は0 pmol/ml ~ 100 pmol/mlの範囲にわたって変化させた。

10

【0094】

ここで、経時的な光子の増加dc(cps)はCy5標識オリゴヌクレオチドの量の尺度である。図9に示す結果は、X軸に異なる濃度(pmol/ml)のCy5オリゴヌクレオチド、Y軸に測定の最初の5分での対応する光子の増加をプロットすることによって得られる。1ml当たり0.2 pmolから(form)100 pmolまでの試験におけるCy5オリゴの関係が観察される。分析感度は、定量的に5分間のアッセイにおけるDNAの検出について0.3 pmol/ml以下である。

20

【0095】

実施例9： HCGを検出するサンドイッチアッセイ

別の一般的なアッセイフォーマットは、タンパク質分子の検出のためのサンドイッチアッセイである。サンドイッチアッセイの典型例は、妊娠ホルモンであるヒト絨毛性ゴナドトロピンの試験である。試験は、10 µg/mlの抗HCGモノクローナル抗体Medix 5016のPBS溶液を一晩インキュベートし、続いて実施例1に概説するように洗浄工程及びブロッキング工程を行うことによって、HCGに対する抗体をエバネッセントバイオセンサー表面に固定化することで行う。検出のために、規定量のHCG、Sigma C0434を含有する溶液20 µlを、3 mg/mlのウシIgG、3%BSA、0.12%Brilliant Black BN、0.3%ポリビニルピロリドン(polyvinyl-pyrrolidone) K90、0.6%スクロース、0.15%Tween 20、0.075%アスコルビン酸、6 mM HEPES (pH 7.4)、2 mM PO4 (pH 7.4)及び30 mM NaClのバッファー中30 µg/mlのAPCで共有結合標識したHCGに対する別のモノクローナル抗体Medix 5501を含有する溶液10 µlと混合した。この混合物20 µlを、バイオセンサーリーダーを用いてコーティングした乾燥バイオセンサーチップで余計に遅らせることなく即座に分析した。

30

【0096】

ここで、経時的な光子の増加dc(cps)はサンプル中のHCGの量の尺度である。図10に示す結果は、X軸に1l当たりの国際単位で与えられる異なる濃度のHCG、Y軸に測定の最初の10分での対応する光子の増加をプロットすることによって得られる。10 U/L ~ 30000 U/Lの範囲の試験におけるHCGの希釈量の線形関係が観察される。分析物量の増加は、期待される形である線形性を下回る測定シグナルの低下をもたらす。これは、測定シグナルを低下させる高用量フック効果、すなわちプロゾン効果に起因する。それにもかかわらず、5 U/L ~ 30000 U/LのHCGの全てのサンプルが定量的に測定され、観察される曲線は免疫アッセイの理論に応じてS字形である。これにより、サンドイッチアッセイにおいて生化学的分析物を高感度かつ高特異性でELISA、ビーズ技術、又は他の免疫アッセイフォーマット若しくは結合アッセイフォーマット等の他の一般に用いられる免疫測定法と同等の品質で測定するエバネッセントバイ

40

50

オセンサーの有用性が実証される。

【 図 1 . 1 】

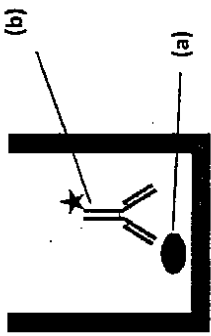


Fig 1.1

【 図 1 . 2 】

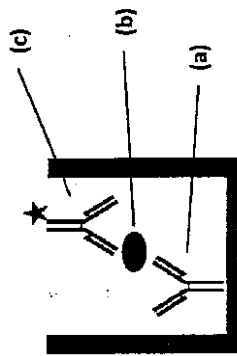


Fig 1.2

【 図 1 . 3 】

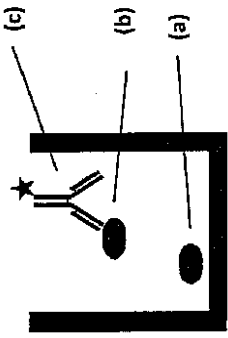


Fig.1.3

【 図 1 . 4 】

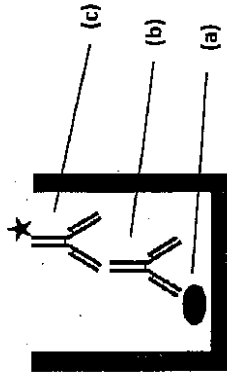


Fig.1.4

【 図 1 . 5 】

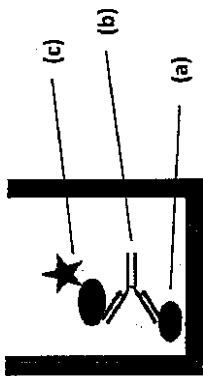


Fig.1.5

【 図 1 . 6 】

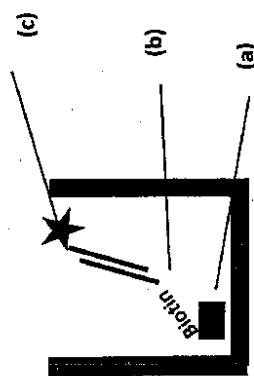


Fig.1.6

【 図 2 】

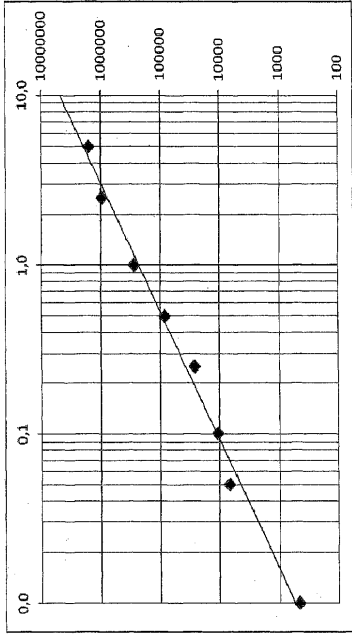


Figure 2

【 図 3 】

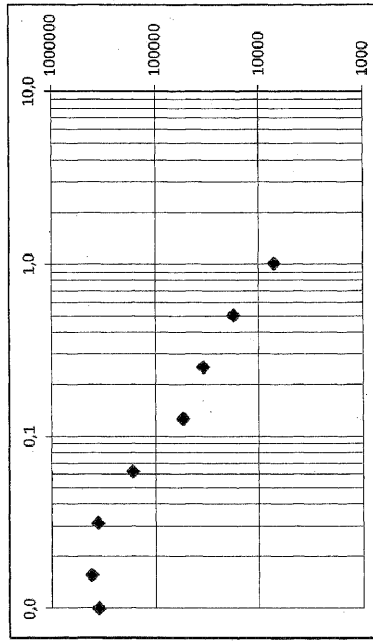


Figure 3

【 図 4 】

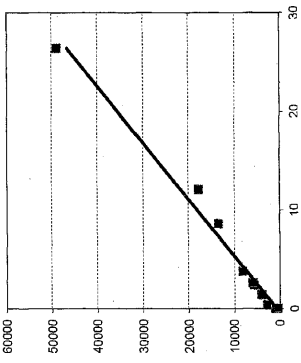


Figure 4

【 図 6 】

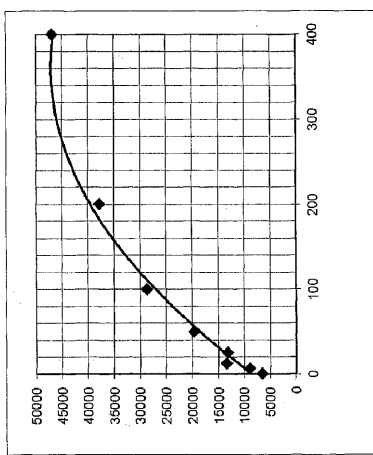


Figure 6

【 図 5 】

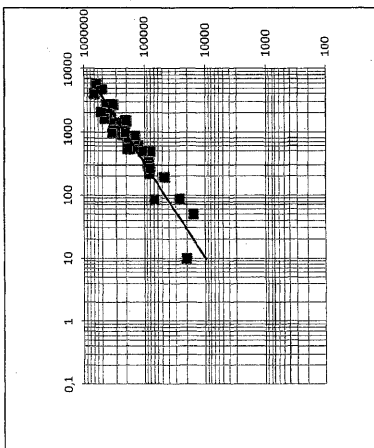


Figure 5

【 図 7 】

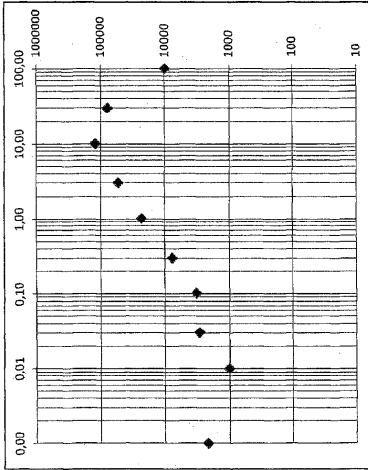


Figure 7

【 図 8 】

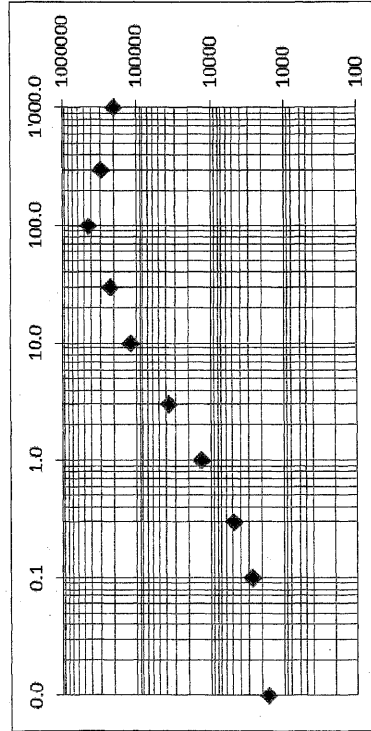


Figure 8

【 図 9 】

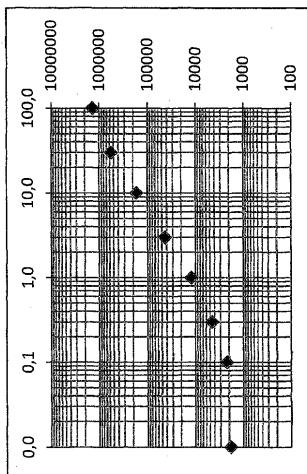


Figure 9

【 図 10 】

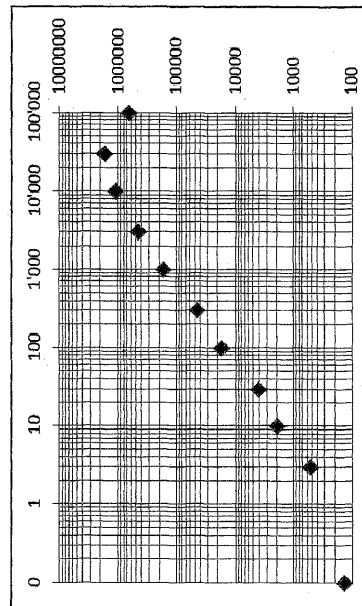


Figure 10

【配列表】

2015511706000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/000727

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/08762 A1 (THAUMDX LLC [US]; BOREN ARTHUR D [US]; ANDERSON ALAN C [US]; PAWLAK JA) 31 January 2002 (2002-01-31) page 8, line 13 - line 36; claims 1-45 page 21, line 20 - line 24 page 23, line 5 - line 27 -----	1-15
A	WO 2004/033720 A2 (HOPITAUX UNIVERSITAIRES DE GEN [CH]; SCHRENZEL JACQUES [CH]; FRANCOIS) 22 April 2004 (2004-04-22) claims 42-77; example 1 -----	1-15
X	EP 1 371 967 A1 (DIAGNOSTISCHE FORSCH STIFTUNG [CH]; LEUZE ELECTRONIC GMBH & CO [DE] DI) 17 December 2003 (2003-12-17) cited in the application page 10, line 39 - page 15, line 17 ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 10 June 2013		Date of mailing of the international search report 25/06/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreno de Vega, C

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/000727

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 6 929 943 B1 (QUAPIL GERALD [DE] ET AL) 16 August 2005 (2005-08-16) cited in the application the whole document	1-10
X	----- US 2006/019244 A1 (MARTINEZ JENNIFER S [US] ET AL) 26 January 2006 (2006-01-26) paragraphs [0016], [0029], [0031], [0037] -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/000727

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0208762	A1	AU 7193701 A WO 0208762 A1	05-02-2002 31-01-2002
WO 2004033720	A2	AU 2003271637 A1 EP 1556507 A2 US 2007015151 A1 WO 2004033720 A2	04-05-2004 27-07-2005 18-01-2007 22-04-2004
EP 1371967	A1	NONE	
US 6929943	B1	AT 264501 T DE 59909185 D1 DK 1079226 T3 EP 1079226 A1 ES 2219962 T3 PT 1079226 E US 6929943 B1	15-04-2004 19-05-2004 10-05-2004 28-02-2001 01-12-2004 30-07-2004 16-08-2005
US 2006019244	A1	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/00 A

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

(72)発明者 アクディス チェツミ
スイス国 シーエイチ - 7 2 6 5 ダボス プレティガウアーシュトラッセ 2 4 ベー

(72)発明者 ヴィキ マックス
スイス国 シーエイチ - 1 1 1 0 モルジュ アヴェニュー ユゴネ 5

(72)発明者 クラメリ レト
スイス国 シーエイチ - 7 2 7 0 ダボス エーデンシュトラッセ 1 3

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA09 HA12
4B063 QA01 QA19 QQ42 QQ52 QR32 QR56 QR62 QR82 QS25 QS34
QX02

专利名称(译)	使用消逝生物传感器的实时诊断测定		
公开(公告)号	JP2015511706A	公开(公告)日	2015-04-20
申请号	JP2014561317	申请日	2013-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	达沃斯诊断AG		
申请(专利权)人(译)	达沃斯诊断AG		
[标]发明人	シャヴァラーマンフレート ライナークラウディオ アクディスチェツミ ヴィキマックス クラメリレト		
发明人	シャヴァラー マンフレート ライナー クラウディオ アクディス チェツミ ヴィキ マックス クラメリレト		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 C12Q1/68 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N21/648 G01N33/521 G01N33/5308 G01N33/54373 G01N33/569 G01N33/56911 G01N33/56961 G01N33/56983		
FI分类号	G01N33/543.595 G01N33/53.Q G01N33/53.N G01N33/53.M C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/ /QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
优先权	2012001814 2012-03-16 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用消逝场方法检测含水生理或化学流体中的物质的方法和用于实施该方法的诊断装置。【选择图表】无

【 1 . 2 】

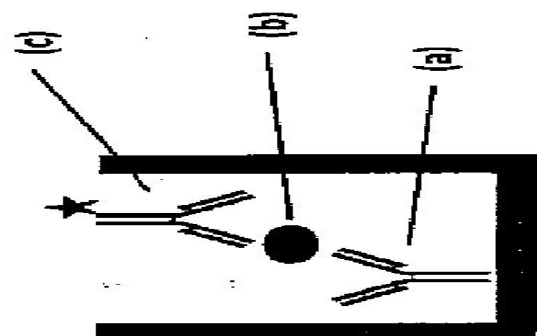


Fig. 1.2