

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6075799号
(P6075799)

(45) 発行日 平成29年2月8日 (2017.2.8)

(24) 登録日 平成29年1月20日 (2017.1.20)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)
 GO 1 N 33/543 (2006.01)
 GO 1 N 21/64 (2006.01)
 GO 1 N 21/78 (2006.01)

GO 1 N 33/53 N
 GO 1 N 33/543 5 2 1
 GO 1 N 33/543 5 0 1 D
 GO 1 N 21/64 F
 GO 1 N 21/78 C

請求項の数 14 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2014-514560 (P2014-514560)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月5日 (2012.6.5)
 (65) 公表番号 特表2014-517311 (P2014-517311A)
 (43) 公表日 平成26年7月17日 (2014.7.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/040938
 (87) 国際公開番号 W02012/170435
 (87) 国際公開日 平成24年12月13日 (2012.12.13)
 審査請求日 平成27年6月5日 (2015.6.5)
 (31) 優先権主張番号 61/495,171
 (32) 優先日 平成23年6月9日 (2011.6.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 391008869
 ジェン・プローブ・インコーポレイテッド
 Gen-Probe Incorporated
 アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア
 州サン・ディエゴ、ジェネティック・セン
 ター・ドライブ 10210 番
 (74) 代理人 110001302
 特許業務法人北青山インターナショナル
 (72) 発明者 チャンス、シュゼット
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53
 076、リッチフィールド、ホーリーヒル
 ロード 3207

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板第4因子 (PF4) / ヘパリン抗体を検出する診断デバイス、方法及びシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

流体サンプル中のヒト血小板因子4 (PF4) / ヘパリン抗体の存在を検出するデバイスにおいて、固体サポートに固定した PF4 / ポリアニオン複合体と、非粒子状蛍光染料でラベル化した抗ヒト抗体とを側方流動フォーマットで具え、前記ラベル化した抗ヒト抗体が：

前記固定した PF4 / ポリアニオン複合体；及び

前記流体サンプルを受ける流体サンプルゾーン；

の上流側で前記固体サポートに放出可能に取り付けられていることを特徴とするデバイス。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のデバイスにおいて、前記固体サポートがテストストリップであることを特徴とするデバイス。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のデバイスにおいて、前記ポリアニオンが、ポリビニルスルホン酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアネトールスルホン酸、ポリビニルリン酸塩、ポリビニルホスホン酸塩、ポリビニル硫酸塩、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されることを特徴とするデバイス。

【請求項 4】

請求項 2 に記載のデバイスにおいて、前記テストストリップが：

- a) コンジュゲートパッドであって：
- (i) 抗ヒト抗体を含むコンジュゲートゾーンと；
 - (i i) 前記流体サンプルを受けるように構成され、前記コンジュゲートゾーンの下流側に配置されている前記流体サンプルゾーンと；
 - (i i i) サンプルバッファを受けるように構成され、前記コンジュゲートゾーンと前記サンプルゾーンの間に配置されているサンプルバッファゾーンと；
- を具えるコンジュゲートパッドと；
- b) 前記コンジュゲートパッドの下流側に配置され、当該コンジュゲートパッドと流体連通している多孔膜であって：
- (i) その上に固定化した前記 P F 4 / ポリアニオン複合体を含む検出ゾーンと；
 - (i i) その上に固定化した捕捉試薬を含み、前記ラベル化した抗ヒト抗体に結合するように構成された、前記検出ゾーンの下流側に配置されている制御ゾーンと；
- を具える多孔膜と；
- を具えることを特徴とするデバイス。

10

【請求項 5】

請求項 4 に記載のデバイスにおいて、前記コンジュゲートパッドが更に、コンジュゲートバッファを受けるように構成されたコンジュゲートバッファゾーンを具え、前記コンジュゲートバッファゾーンが前記コンジュゲートゾーンの上流側に配置されていることを特徴とするデバイス。

【請求項 6】

20

請求項 4 に記載のデバイスにおいて、前記テストストリップが更に、コンジュゲートバッファを受けるように構成したコンジュゲートバッファゾーンを含む湿パッドを具え、当該湿パッドが前記コンジュゲートパッドの上流側に、前記コンジュゲートパッドと流体連通して配置されていることを特徴とするデバイス。

【請求項 7】

請求項 4 に記載のデバイスにおいて、前記テストストリップが更に、前記多孔膜と流体連通する芯材パッドを具えており、前記膜が前記コンジュゲートパッドと前記芯材パッドの間に配置されていることを特徴とするデバイス。

【請求項 8】

請求項 4 に記載のデバイスにおいて、前記テストストリップが更に、前記多孔膜と流体連通する芯材パッドを具えており、前記膜が前記コンジュゲートパッドと前記芯材パッドの間に配置されていることを特徴とするデバイス。

30

【請求項 9】

請求項 1 乃至 8 のいずれか一項に記載のデバイスにおいて、前記非粒子状蛍光ラベルがアミン反応性染料であることを特徴とするデバイス。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のデバイスにおいて、前記アミン染料が、D y L i g h t (商標)、A l e x a F l u o r (登録商標)、H i L y t e F l u o r (商標)、C y D y e (商標)、C y (登録商標)、C F (商標)、I R D y e (登録商標)、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されることを特徴とするデバイス。

40

【請求項 11】

流体サンプル中のヒト血小板因子 4 (P F 4) / ヘパリン抗体の存在を検出する方法において：

- a) 請求項 1 乃至 10 のいずれか 1 項に係る側方流動アッセイデバイスを取得するステップと；
- b) P F 4 / ヘパリン抗体を含む又は含むと考えられるサンプルをサンプルゾーンに接触させるステップと；
- c) P F 4 / ヘパリン抗体がサンプル中に存在する場合はこれを検出ゾーンに運んで、固定化した P F 4 / ポリアニオン複合体に結合させ、これによって、前記 P F 4 / ヘパリン抗体を前記検出ゾーンに固定化するステップと；

50

d) ステップ c) に続いて、非粒子状蛍光染料でラベル化した抗ヒト抗体を運んで、固定化した P F 4 / ヘパリン抗体に結合させ、これによって、前記ラベル化した抗ヒト抗体を検出ゾーン中に固定化するステップと；

e) 結合していないラベル化した抗ヒト抗体を制御ゾーンに運んで、固定化した捕捉試薬と結合させ、これによって、ラベル化した抗ヒト抗体を制御ゾーン中に固定化するステップと；

f) 検出ゾーンと制御ゾーン中の非粒子状蛍光ラベルからの蛍光を評価するステップであって、前記両ゾーン中の蛍光の存在が、サンプル中の P F 4 / ヘパリン抗体の存在を表示するステップと；

を具えることを特徴とする方法。

10

【請求項 1 2】

流体サンプル中のヒト血小板因子 4 (P F 4) / ヘパリン抗体の存在を検出する方法において、請求項 1 に記載の側方流動フォーマットを具えるデバイス内でサンドイッチ複合体を形成するステップを具えることを特徴とする方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 1 又は 1 2 に記載の方法において、前記非粒子状蛍光ラベルがアミン反応性染料であることを特徴とする方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載のデバイスにおいて、前記アミン染料が、D y L i g h t (商標)、A l e x a F l u o r (登録商標)、H i L y t e F l u o r (商標)、C y D y e (商標)、C y (登録商標)、C F (商標)、I R D y e (登録商標)、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願とのクロスリファレンス]

本出願は、2011年6月9日付で出願した暫定特許出願第61/495,171号の35 U . S . C § 119 (e) に規定する優先権を請求する。この開示は引用により全体としてここに組み込まれている。

【0002】

30

本発明は、一般的に、免疫診断学の分野に関する。特に、本発明は、血小板第4因子 (P F 4、C - X - C モチーフケモカインリガンド4、又は C X C L 4 と呼ばれる) とヘパリン複合体に対する抗体の検出に関する。これらはヘパリン起因性血小板減少症 (H I T) に関連する。特に、本発明は、流体サンプル中の P F 4 / ヘパリンあるいは P F 4 / ポリアニオン複合体に特異的な抗体を検出する新規な速報流動アッセイ装置、方法及びシステムを提供する。

【背景技術】

【0003】

ヘパリン起因性血小板減少症 (H I T) は、最も頻繁に生じる薬剤起因性免疫介在型血小板減少症 (低血中血小板レベル) であり、ヘパリン治療の重要で、時には生命にかかわる合併症である。ヘパリンは最も広く使用されている静脈内投与抗凝結剤であり、米国で最も広く処方されている薬剤である。毎年約1200万人の患者に1兆以上のユニットが投与されている。静脈内投与ヘパリンは、血栓塞栓性疾患の予防と治療に一般的に使用されており、心臓及び肺のある種の疾患、開胸、バイパス、透析、整形外科手術を含む様々な手順の間又は後といった、その他のアプリケーションにも使用されている。ヘパリンはまた、インターベンショナル・ラジオロジーの診断及び治療手順にも用いられる。H I T は、標準的な治療容量のヘパリン、低用量 (予防的治療) ヘパリン、低分子量ヘパリン、非分画ヘパリン、及び血管内カテーテルを洗い流すだけの少量のヘパリンによってさえも引き起こされることがある。

40

【0004】

50

HITは、I型とII型に分類されており、I型は良性で、II型が重症である。I型は、ヘパリン投与開始後早い段階で生じ、血小板レベルが若干下がるのみで、通常は、ヘパリン治療を続けても正常値に戻る。血栓塞栓性疾患はまれであり、I型HITは、抗体起因性ではない。

【0005】

これに対して、II型HITは、血小板第4因子(PF4)とヘパリンの複合体(PF4/ヘパリン)を結合する血小板活性化抗体によって引き起こされる臨床病理症候群である。(Amiral et al., Thromb. Haemost. 1992, 68: 95 - 961)。ヘパリン投与の5 - 14日以内に生じる血小板減少症は、最も普通の臨床効果である。HITの最も重症の合併症は、静脈と動脈の血栓(HIT関連血栓またはHITT)の発生である。静脈血栓は、肢の壊疽を引き起こし、肢の切断が必要になることがある。II型HITのその他の症状には、単純なアレルギー反応から損傷や壊死に至る皮膚反応が含まれる。

【0006】

HITの基本的な発症は、よく特徴づけられている。外因性ヘパリンへの暴露があると、PF4とヘパリンでできた多分子錯体が形成される。これらの錯体におけるPF4とヘパリンの結合はPF4の構造変化に関連しており、ネオエピトープを露出させる(Reilly, Semin. Dial. 2003, 16: 54 - 60)。本発明者らは、ヘパリン以外の多くのポリアニオン性化合物(例えば、ポリビニルスルホン酸などのポリアニオン類)がPF4との複合体を形成することができ、分子内に同様の構造変化を起こすことを報告している(Visentin et al., J. Lab. Clin. Med. 2001, 138: 22 - 31; 米国特許第5,972,718号、ここに引用により組み込まれている)。このヘパリン依存性ネオエピトープは、患者に免疫反応を引き起こすことがある。抗体反応は、通常、IgG型抗体であり、IgA型及びIgM型も関係がある(Amiral et al., Br. J. Haematol. 1996, 92: 954 - 59)。この抗体は、PF4/ヘパリン複合体に結合し、血小板表面で免疫グロブリン受容体に結合する免疫複合体を形成する(FcRIIA又はCD32)。免疫複合体によるFcRIIA受容体の凝集は、血小板活性化と膜貫通シグナリングによる凝集のトリガとなる。更に、血小板活性化過程において、血小板が細胞膜からのリン脂質微小粒子を放出する。これらの微小粒子が、凝固カスケードの酵素反応を助けてトロンビン形成を起こし、その結果、これらの微小粒子が血流へ放出され血栓ができる。更に、PF4/ヘパリン免疫複合体は、内皮のグリコサミノグリカンに結合して内皮損傷を引き起こす。この内皮の損傷は、この症候群に関連する「血栓ストーム」にも関与している。

【0007】

罹患率と死亡率を低下させるにはHITの早期診断が必須である。HITの診断は、通常、血栓症を伴うあるいは伴わない血小板減少症を含む臨床的異常と、PF4/ヘパリン複合体に対する抗体(PF4/ヘパリン抗体と呼ばれる)の検出に基づいている。ヘパリン依存性抗体の検出には二つのタイプの主要なアッセイがある。機能性アッセイと、PF4依存性抗原免疫アッセイである。機能性アッセイには、セロトニン放出アッセイ(SRA; Sheridan et al., Blood 1986, 67: 27 - 30)、血小板凝集アッセイ(Chong et al., Thromb. Haemost. 1993, 69: 344 - 50)、及びヘパリン-誘導血小板活性(HIPA)アッセイ(Greinacher et al., Thromb. Haemost. 1991, 66: 734 - 36)がある。機能性アッセイは、技術的に実行が難しく、複雑な専門的アッセイであると考えられている。

【0008】

酵素結合免疫アッセイ(ELISAs)は、最も良く使用されているPF4-依存型抗体免疫アッセイである(Greinacher et al., Hematol. 1994, 34: 381 - 85; Visentin et al., J. Clin. Invest. 1994, 93: 81 - 88; また、米国特許出願公開第2010/001546

10

20

30

40

50

7号；国際効果大WO2010/024271号も参照。これらはすべて引用によりここに組み込まれている）。商業的に入手可能なPF4/ヘパリン抗体検出用ELISAsには、PF4 IgG（商標）とPF4 Enhanced（登録商標）（両方とも、Gen-Probe GTI Diagnostics社製、Waukesha, WI）；Asserachrom（登録商標）HPIAとAsserachrom（登録商標）HPIA-IgG（両方とも、Diagnostica Stago社製、Asnieres, France）；Technozym（登録商標）HIT IgG（Technoclone社製、Vienna, Austria）；及び、Zymutest HIA IgGAM（Hyphen Biomed社製、Neuville, France）、がある。ELISAsは、特別な複合体ではないが、通常、ポイントオブケアベースでは入手できない。

10

【0009】

HITは真正な臨床病理症候群であるが、局所的に実験室試験ができない、あるいは十分タイミングよく行えないため、その診断はいまだ主に臨床的根拠に基づいている。HITに関連する血栓症のリスクが高いため、血清学的アッセイが臨床的疑いを確認すると直ちに、代替の抗凝結剤を用いた抗血栓症治療を始めなければならない。PF4/ヘパリン抗体を迅速に検出する免疫アッセイから取得したすぐに入手できる結果と臨床的可能性についての予備テスト診断とを組み合わせ、HITの診断を排除及び/又は確認して、時間的制約のあるHIT臨床管理に医師をアシストできる。

【0010】

20

多くの急速PF4依存性抗原免疫アッセイについての記載がある。たとえば、米国特許出願公開第2006/0172438号及び対応する国際公開番号2006/042089号に記載の粒子免疫濾過アッセイ（PIFA）、並びに米国特許出願公開2010/0255510号及び対応する国際公開番号2009/111254号に開示されている側方流動免疫アッセイ（LFIA）である。これらはすべて本明細書に引用によって組み込まれているいくつかの急速PF4依存性抗原免疫アッセイは、商業的に開発されたものである。ID-PaGIAヘパリン/PF4抗体試験（DiaMed/Bio-Rad, Cressier, Switzerland）は、合成ポリマー粒子の上に被覆したPF4を用いた急速粒子ゲル免疫アッセイである。PIFA（登録商標）ヘパリン/PF4急速アッセイ（Akers Biosciences, Thorofare, NJ）は、精製PF4タンパク質で被覆した染色微小粒子を用いた粒子免疫濾過アッセイである。PF4/ヘパリン抗体の存在下では増強剤がこれらの微小粒子の急速マトリックス形成を促進し、膜濾過システムとこれら微小粒子の相互作用を介して、可視色の結果物が生成される。最終的に、Milenia（登録商標）QuickLine HIT（Milenia Biotec, Gissen, Germany）は、急速側方流動免疫アッセイであり、ニトロセルロース膜に固定されたヤギ抗ヒトIgG抗体が、PF4/ポリアニオン複合体によって事前に捕捉されたヒトIgG抗体に結合する。これは、意図的に色を付けた金のナノ粒子を用いて検出される。

30

【0011】

様々なPF4依存性抗原免疫アッセイが商業的に入手可能であるにもかかわらず、流体サンプル中のPF4/ヘパリン抗体を検出する、簡単で、迅速で、感度が高く、特別な方法が強く求められている。特に、専用の実験室機材に頼ることなく、ポイントオブケア装置で実行できるものが求められている。本発明は、この要求に取り組むものである。

40

【発明の概要】

【0012】

一の態様では、本発明は血液サンプルなどの流体サンプル中のヒト血小板第4因子（PF4）/ヘパリン抗体の存在を検出するデバイスを提供する。このデバイスは、固体サポートに固定化したPF4/ポリアニオン複合体と、非粒子状蛍光染料でラベル化した抗ヒト抗体を具える。いくつかの実施例では、このデバイスが側方流動デバイスであり、個体サポートが試験ストリップである。好ましい実施例では、ラベル化した抗ヒト抗体が、固

50

定化した P F 4 / ポリアニオン複合体の試験ストリップ上流側に解放可能に結合されている。

【 0 0 1 3 】

別の態様では、本発明は、血液サンプルなどの流体サンプル中のヒトヘパリン / 血小板第 4 因子 (P F 4) 抗体の存在を検出する方法を提供する。この方法は、固体サポートに固定化した P F 4 / ポリアニオン複合体と、 P F 4 / ヘパリン抗体と、非粒子状蛍光染料でラベル化した抗ヒト抗体を含むサンドイッチ型錯体を形成するステップを具える。いくつかの実施例では、このサンドイッチ型錯体が側方流動フォーマットに形成され、固体サポートが試験ストリップである。ラベル化した抗ヒト抗体は、好ましくは、 P F 4 / ヘパリン抗体が固定化した P F 4 / ポリアニオン複合体に結合した後にのみ、 P F 4 / ヘパリン抗体に接触する。

10

【 0 0 1 4 】

固定化した P F 4 / ヘパリン複合体に代えて固定化した P F 4 / ポリアニオン複合体を用いて P F 4 / ヘパリン抗体を捕捉することの様々な技術的利点は、米国特許第 5 , 9 7 2 , 7 1 8 号で議論されている。この議論は、引用により本明細書に組み込まれている。更に、ここに記載したデバイスと方法は、非粒子状蛍光ラベルを用いるため優れたアッセイ性能を提供する。このことは、側方流動検出用に粒子状ラベルを使用する通常の方法と対照的である。この設計上の特徴は、固定化した P F 4 / ポリアニオン複合体の強い負電荷プロファイルに対処するものである。開発の途中で、本発明者は、正電荷をもつラテックス粒子が凝集して、負電荷をもつポリアニオンに非特定的に結合する傾向があることを見出した。電荷をもっていない金の粒子は特異性の問題はないが、 P F 4 / ヘパリン抗体の検出目的では、ダイナミックレンジが非常に制限されている。本発明者らは、続いて、非粒子状蛍光ラベル、特に、有意な正電荷を持たないものが、素晴らしいダイナミックレンジを持っており、一方で、 P F 4 / ポリアニオン複合体へは最小の非特異的結合を示すことを見出した。

20

【 0 0 1 5 】

本発明の上記態様では、ポリアニオンが、好ましくは、ポリビニルスルホン酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアネートスルホン酸、ポリビニリン酸塩、ポリビニルホスホン酸塩、ポリビニル硫酸塩、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。特に好ましい実施例では、ポリアニオンがポリビニルスルホン酸 (P V S) である。ラベル化した抗ヒト抗体は、好ましくは、 I g G、 I g A、 I g M、及びこれらの組み合わせに特異的な抗体からなる群から選択される。いくつかの実施例では、ラベル化した抗体が I g G、 I g A 及び I g M に特異的な抗体の混合物を含む。その他の実施例では、ラベル化した抗体が、 I g G のみに特異的な抗体を含む。好ましい実施例では、ラベル化した抗体が、ヤギ抗ヒト抗体である。非粒子状蛍光ラベルは、好ましくは、 D y L i g h t (商標)、 A l e x a F l u o r (登録商標)、 H i L y t e F l u o r (商標)、 C y D y e (商標)、 C y (登録商標)、 C F (商標)、 I R D y e (登録商標)、あるいはこれらの組み合わせといった、アミン反応性染料を含む。

30

【 0 0 1 6 】

更なる態様では、本発明は血液サンプルなどの流体サンプル中のヒト血小板第 4 因子 (P F 4) / ヘパリン抗体の存在を検出する側方流動アッセイデバイスを提供する。このデバイスは、コンジュゲートパッドと、このコンジュゲートパッドの下流側に位置し、当該パッドと流体連通する多孔膜を具える。コンジュゲートパッドは、コンジュゲートゾーンと、サンプルゾーンと、サンプルバッファゾーンを具える。コンジュゲートゾーンは、例えばヤギ抗ヒト免疫グロブリンといった、抗ヒト抗体を含み、これは、コンジュゲートゾーンに放出可能に結合され、例えばアミン反応性染料などの非粒子状蛍光染料でラベル化されている。サンプルゾーンは、コンジュゲートゾーンの下流側に位置しており、全血、血清又は血漿サンプルといった、流体サンプルを受けるように構成して流体サンプルの側方搬送を容易にしている。サンプルバッファゾーンは、コンジュゲートゾーンとサンプルゾーンの間中に位置しており、サンプルバッファを受けるように構成されている。多孔膜

40

50

は、コンジュゲートパッドの下流側に、パッドと流体連通して配置されており、検出ゾーンと制御ゾーンを具える。検出ゾーンは、このゾーンに固定化したPF4ノポリアニオン複合体を含む。コントロールゾーンは、検出ゾーンの下流側に位置しており、例えばゾーンに固定化したマウス抗ヤギ免疫グロブリンなどの捕捉試薬を含むとともに、ラベル化した抗ヒト抗体と結合するように構成されている。

【0017】

本発明のこの態様においては、コンジュゲートパッドが更に、コンジュゲートゾーンの上流側に位置し、ラベル化した抗ヒト抗体を可溶化してその側方移動を容易にするコンジュゲートバッファを受けるように構成された、コンジュゲートバッファゾーンを具えていてもよい。その他の実施例では、コンジュゲートバッファゾーンは、「湿パッド」と呼ばれる別のパッド上にあってもよい。このパッドは、コンジュゲートパッドの上流側に位置し、コンジュゲートパッドと流体連通している。好ましい実施例では、試験ストリップが、多孔膜と流体連通する芯材パッドを具えており、膜がコンジュゲートパッドと芯材パッドの中間に位置するようにしてもよい。芯材パッドの目的は、多孔膜から流体を取り出すことによって、側方移動を強化することである。コンジュゲートパッドは、好ましくは単一の一体的パッドで実施されているが、コンジュゲートパッドが、コンジュゲートゾーンを含む分散したコンジュゲート部分と、サンプルゾーンとサンプルバッファゾーンを含む分散したサンプル部分を具えており、コンジュゲート部分及びサンプル部分が互いに流体連通することも意図されている。

【0018】

固定PF4ノポリアニオン複合体と組み合わせた非特定蛍光ラベルの使用に加えて、ここに記載した側方フローアッセイ構造は、素晴らしいアッセイパフォーマンスを提供する更なる利点のある設計特徴を有する。すなわち、ラベル化した抗ヒト抗体を含むコンジュゲートゾーンは、サンプルゾーンとサンプルバッファゾーンの上流に配置されている。これは、コンジュゲートゾーンがサンプルゾーン及び/又はサンプルバッファゾーンの下流に配置されて、検出ラベルを可溶化し、検体がコンジュゲートゾーンを通過するときに対象となる検体に結合する通常の側方流動アッセイ構成とは逆である。

【0019】

この設計特徴は、試験を行う典型的なサンプルが、ほとんどがPF4ノヘパリンに特定でない免疫グロブリンの混合物を含む血液、血漿又は血清であるという事実によって生じる問題に取り組むものである。このアッセイで使用するコンジュゲートが、たとえば、ヤギ抗ヒトイムノグロビンなどの真正抗ヒト抗体を含む場合は、このコンジュゲートとサンプル中のPF4ノヘパリン抗体との間で特異的に結合しない可能性が大であり、その結果サンプル中のPF4ノヘパリン抗体の結合に使用できる枯渇が生じる。したがって、サンプルが検出ゾーンを通過するまでコンジュゲートがサンプルに接触しないこと及びサンプル中のPF4ノヘパリン抗体が固定化PF4ノポリアニオン複合体に結合することは極めて重大である。ここに開示したデバイス構成は、サンプルゾーンとコンジュゲートゾーンの従来の位置を逆にすることによって、この要求を満たすものであり、これによって、ラベル化した抗ヒト抗体の移動をサンプルの移動から完全に切り離している。

【0020】

好ましい実施例では、試験ストリップを硬い裏張りに張り付けて、例えばプラスチックカセットなどのカセットに封入する。通常、このカセットは、サンプルゾーンを露出させるように構成した第1の開口と、検出ゾーンと制御ゾーンを露出させるように構成した第2の開口を具える。流体サンプルをアッセイデバイスにつけるためにはサンプルゾーンへのアクセスが必要であることは明らかである。また、蛍光信号を検出するために、検出および制御ゾーンへのアクセスが必要なことも明らかである。いくつかの実施例では、カセットが、サンプルバッファゾーンを露出させるように構成した第3の開口と及び/又はコンジュゲートバッファゾーンを露出させるように構成した第4の開口を具えている。これらの実施例では、サンプル及びコンジュゲートバッファへサンプルとコンジュゲートバッファをそれぞれ付けるためには、サンプルバッファ及びコンジュゲートバッファゾーンへ

のアクセスが望ましい。

【 0 0 2 1 】

所定の代替実施例では、アッセイデバイスが更に、サンプルバッファをサンプルバッファゾーンへ提供するように構成した第1バッファポートと、及び/又は、コンジュゲートバッファをコンジュゲートバッファゾーンへ提供するように構成したコンジュゲートバッファポートを具えていてもよい。これらの実施例において、好ましくはデバイスがサンプルバッファポート及び/又はコンジュゲートバッファポートに正圧がかかったときにサンプルバッファ及び/又はコンジュゲートバッファを放出する手段を具えている。この放出手段は、通常、柔軟材料でできておりサンプルバッファポートとコンジュゲートバッファポートを覆うブリスタを具え、選択的に、正圧がブリスタにかかるとサンプルバッファポ

10

ーチ及び/又はコンジュゲートバッファポートを破るように構成されたピン又はタックなどの穴あけ部材を更に具えている。いくつかの実施例では、ここに述べたアッセイデバイスは更に、一またはそれ以上のアッセイパラメータ及び/又はロット情報(例えば、製品名、ロット番号、有効期限など)を含む無線自動識別(RFID)チップを具えている。

【 0 0 2 2 】

コンジュゲートパッドは、ポリエステルでできていてもよく、多孔膜はニトロセルロースでできていてもよい。いくつかの実施例では、ウエットパッドはポリエステルでできており、芯材パッドは、十分に強い毛管現象を有するセルロース材料でできている。ポリアニオンは、好ましくは、ポリビニルスルホン酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアネートルスルホン酸、ポリビニルリン酸塩、ポリビニルホスホン酸塩、ポリビニル硫酸塩、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。特に好ましい実施例では、ポリアニオンがポリビニルスルホン酸(PVS)である。ラベル化した抗ヒト抗体は、好ましくは、IgG、IgA、IgM、及びこれらの組み合わせに特異的な抗体からなる群から選択される。いくつかの実施例では、ラベル化した抗体がIgG、IgA及びIgMに特異的な抗体の混合物を含む。その他の実施例では、ラベル化した抗体が、IgGのみに特異的な抗体を含む。好ましい実施例では、ラベル化した抗体が、ヤギ抗ヒト抗体である。非粒子状蛍光ラベルは、好ましくは、DyLight(商標)、Alexa Fluor(登録商標)、HiLyte Fluor(商標)、CyDye(商標)、Cy(登録商標)、CF(商標)、IRDye(登録商標)、あるいはこれらの組み合わせといった、アミン反応性染料を含む。捕捉試薬は、好ましくは、コンジュゲート用抗ヒト抗体を作るのに使用した哺乳類種

20

30

からの免疫グロブリンに結合する。例えば、抗ヒト抗体がヤギで育つものであれば、捕捉試薬は、マウス抗ヤギ抗体といった、抗ヤギ抗体を含む。

【 0 0 2 3 】

別の態様では、本発明は、血液サンプルなどの流体サンプル中のヒトPF4/ヘパリン抗体の存在を検出する方法を提供する。この方法は：a)本発明に係る側方流動アッセイを取得するステップと；b)PF4/ヘパリン抗体を含むあるいは含むと思われるサンプルをサンプルゾーンに接触させるステップと；c)PF4/ヘパリン抗体がサンプル中に存在する場合は、それを検出ゾーンへ運んで、固定したPF4/ポリアニオン複合体に結合させて、PF4/ヘパリン抗体を検出ゾーンに固定するステップと；d)ステップc)に続いて、非粒子状蛍光染料でラベル化した抗ヒト抗体を検出ゾーンに運んで、固定化したPF4/ヘパリン抗体と結合させ、これによって、ラベル化した抗ヒト抗体を検出ゾーンに固定化するステップと；e)結合しなかったラベル化した抗ヒト抗体を制御ゾーンに運んで、固定化捕捉試薬に結合させ、これによって、制御ゾーン中のラベル化した抗ヒト抗体を固定化するステップと；およびf)検出及び制御ゾーン中の非粒子状蛍光ラベルからの蛍光を評価し、前記両ゾーンにおける蛍光の存在が、サンプル中のPF4/ヘパリン抗体の存在を示すことと；を特徴とする。

40

【 0 0 2 4 】

本発明のこの態様では、PF4/ヘパリン抗体を検出ゾーンへ運ぶステップが、サンプルバッファをサンプルバッファゾーンへ付けて側方移動を容易にするステップを具える。好ましい実施例では、サンプルバッファが1倍のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、ウシ

50

血清アルブミン (B S A) 及びポリソルベート 2 0 (T w e e n 2 0 (商 標)) を含む。 B S A 濃度は、好ましくは約 1 % であり、 T w e e n 2 0 (商 標) の濃度は好ましくは約 0 . 1 % である。サンプルバッファの p H は、好ましくは約 7 . 4 に調整されている。

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施例では、非粒子蛍光染料でラベル化した抗ヒト抗体を検出ゾーンに運ぶステップが、コンジュゲートバッファをコンジュゲートバッファゾーンへ付けて、ラベル化した抗ヒト抗体を可溶化し、その側方への移動を容易にするステップを具える。コンジュゲートバッファの成分は、サンプルバッファの成分と同じでもよく、異なってもよい。好ましい実施例では、コンジュゲートバッファは、1 倍の P B S と、 B S A 及び T w e e n 2 0 (商 標) を含む。 B S A の濃度は好ましくは約 1 % であり、 T w e e n 2 0 (商 標) の濃度は好ましくは約 0 . 1 % である。コンジュゲートバッファの p H は好ましくは約 7 . 4 に調整されている。

10

【 0 0 2 6 】

上述した通り、ポリアニオンは好ましくは、ポリビニルスルホン酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアネートスルホン酸、ポリビニリン酸塩、ポリビニルホスホン酸塩、ポリビニル硫酸塩、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。特に好ましい実施例では、ポリアニオンがポリビニルスルホン酸 (P V S) である。ラベル化した抗ヒト抗体は、好ましくは、 I g G、 I g A、 I g M 及びこれらの組み合わせに特異的な抗体からなる群から選択される。いくつかの実施例では、ラベル化した抗体は、 I g G、 I g A、及び I g M に特異的な抗体の混合物を含む。別の実施例では、ラベル化した抗体が、 I g G のみに特異的な抗体を含む。好ましい実施例では、ラベル化した抗体が、ヤギ抗ヒト抗体である。非粒子状得気孔ラベルは、好ましくは、 D y L i g h t (商 標)、 A l e x a F l u o r (登 録 商 標)、 H i L y t e F l u o r (商 標)、 C y D y e (商 標)、 C y (登 録 商 標)、 C F (商 標)、 I R D y e (登 録 商 標)、あるいはこれらの組み合わせといった、アミン反応性染料を含む。固定化した捕捉試薬は、好ましくは、コンジュゲート用抗ヒト抗体を作るのに使用した哺乳類種から得た免疫グロブリンに結合する抗体である。たとえば、抗ヒト抗体がヤギで育つものであれば、捕捉試薬は、マウス抗ヤギ抗体といった、抗ヤギ抗体を含む。

20

【 0 0 2 7 】

所定の実施例では、本明細書に記載した方法が更に、無線自動識別 (R F I D) チップを用いて少なくとも一のアッセイパラメータ、及び / 又は、ロット情報 (例えば、製品名、ロット番号、有効期限、等) を送信するステップを具える。いくつかの特定の好ましい実施例では、評価ステップが、フルオロメータを用いて、検出および制御ゾーンにおける蛍光を測定するステップを具える。

30

【 0 0 2 8 】

更なる態様では、本発明は、患者の体液中の P F 4 / ヘパリン複合体に起因する免疫グロブリン抗体の存在及び / 又は量を測定する、ポイントオブケア側方流動免疫アッセイシステムを提供する。このシステムは、毛細現象による液体の動きをサポートできる不活性の、繊維状材料でできたリニア膜であって、裏打ちによって支持されているリニア膜と；光吸収ラベルを、コンジュゲート / サンプルパッドを通過する体液のサンプル中に存在する P F 4 / ヘパリン複合体に起因する免疫グロブリン抗体に結合する手段と；検出ゾーン中の膜の上に P F 4 / ポリアニオン複合体を固定化する手段と；を具える。リニア膜は、近位端から遠位端にかけてコンジュゲートゾーン、サンプルパッド、検出ゾーン、制御ゾーン、及び芯材パッドに区分けされており、これらは各々、選択的に、流動ゾーンによって隣接するゾーンから分離されている。 P F 4 / ポリアニオン複合体は、共役的に、検出ゾーンを通過する光吸収ラベルに結合した P F 4 / ヘパリン複合体に起因する免疫グロブリン抗体と結合することができる。ここで、光吸収ラベルは、検出ゾーンに固定化された P F 4 / ポリアニオン複合体に結合された抗体の可視化を容易にする。

40

【 0 0 2 9 】

本発明のこの態様では、体液が血液、あるいは例えば血漿又は血清などの血液の免疫グ

50

ロブリン含有成分であってもよい。ポリアニオンは、好ましくは、ポリビニルスルホン酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアネトールスルホン酸、ポリビニルリン酸塩、ポリビニルホスホン酸塩、ポリビニル硫酸塩、及びこれらの組み合わせである。特に好ましい実施例では、ポリアニオンがポリビニルスルホン酸（PVS）である。いくつかの実施例では、PF4／ヘパリン複合体誘導免疫グロブリン抗体が、IgG、IgA、IgE、IgM及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの好ましい実施例では、光吸収ラベルが、蛍光ラベルであり、例えばフルオロメータなどの電気光学式読取デバイスによって抗体の可視化が容易になる。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】図1A及び1Bは、本発明にかかるアッセイデバイスの一般的なレイアウトを示す図である。図1Aは、検体検出の原理を示し、図1Bは、例示的アッセイデバイスの斜視図である。

【図2】図2A乃至2Cは、本発明によるアッセイデバイスの更なる一般的なレイアウトを示す図である。図2Aは、基本構造の平面及び側面図であり、ここでは、テストストリップが一体になったコンジュゲート／サンプルパッドと、多孔膜、及び芯材パッドを具える。図2Bは、変形した構成の平面及び側面図であり、ここでは、テストストリップが、分散ウエットパッドと、一体になったコンジュゲート／サンプルパッドと、多孔膜と、芯材パッドを具える。図2Cは、ある構造の平面及び側面図であり、ここでは、テストストリップが、分散したコンジュゲートパッドとサンプルパッド、多孔膜、及び芯材パッドを具える。

【図3】図3A及び3Bは、本発明に係るアッセイデバイスの代替の実施例を示す図である。図3Aは、デバイスの側面図であり、ここでは、サンプルバッファとコンジュゲートバッファが、プリスタ／ポーチに含まれているとともに、プリスタ／ポーチが圧縮されるとテストストリップに放出される。図3Bは、図3Aに示すデバイスの断面図である。

【図4】図4A及び4Bは、図3A及び3Bに示すデバイスの実施例に用いることができる穴あけ機構の例を示す図であり、プリスタ／ポーチを破って、ここに含まれているサンプルとコンジュゲートバッファをテストストリップに送達する。

【図5】図5A乃至5Cは、図3A及び3Bに示すデバイスの変形例を示す図である。このデバイスは、アッセイカセットの周りに摺動可能に配置した表示器スライドを具えており、このスライドがカセットに対して移動すると、サンプル及びコンジュゲートバッファを含むプリスタ／ポーチを圧縮する形状をしたリーディングエッジを有している。

【図6】図6は、本発明に係るPF4／ヘパリン側方流動アッセイの性能に関する、ヘモグロビン、ビリルビン、及びトリグリセライドの効果を示す図である。

【発明の詳細な説明】

【0031】

開示を明確にするために、限定ではなく、本発明の詳細な説明を以下のサブセクションに分ける。

【0032】

A．定義

特に定義がなされていない限り、ここで用いられているすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって共通に理解されているものと同じ意味を持つ。本明細書に引用されているすべての特許、特許出願、公開された出願、及びその他の刊行物は、その全体が引用によって組み込まれている。このセクションに記載されている定義が、ここに引用によって組み込まれているこれらの特許、特許出願、公開された出願、及びその他の刊行物に記載されている定義と異なるあるいは一致していない場合、このセクションに記載されている定義が、引用によりここに組み込まれている定義に優先する。

【0033】

ここに使用されている、「一つの」は、「少なくとも一の」又は「一またはそれ以上の」の意味である。

【0034】

明細書及び特許請求の範囲を通じてここで使用されている近似の用語は、関連する基本機能を変更することなく緩く変化する量的あるいは質的表現を修正するのに適用される。したがって、「約」といった用語で修正された値は、特定の精密な値に限定されるものではなく、特定した値と異なる値を含むことができる。

【0035】

ここに使用されている、「血小板第4因子」あるいは「PF4」の用語は、顆粒血小板に見られ、血小板が活性化して血清に放出された分子量約32,000ダルトンの正電荷を多く持つ四量体タンパク質を意味する。PF4は、CXCL4としても知られており、これは更に、Poncz et al., Blood 1987, 69:219-23に10記載された成熟タンパク質に実質的に該当し、免疫賦活作用、遊走能、及びヘパリン中和作用といったPF4に関連するいずれかの生物作用を有する70のアミノ酸タンパク質を意味する。本発明で用いられているPF4は、ヒト血小板由来のPF4、遺伝子組み換えヒトPF4、あるいは標準的なペプチド合成によって製造したヒトPF4であってもよい。

【0036】

用語「ヘパリン」は、一般的には、反復構造のグルコサミンとグルクロン酸糖残基によって一般的に特徴づけられる構造的に複雑な硫酸化グリコサミノグリカン族の員である(Casu, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1985, 47:578-83)。最も広く知られているヘパリンは、牛の肺又は豚の腸から作成した「非分画」又は「商用」ヘパリンであり、これは、約8,000乃至20,000ダルトンの分子量のヘパリン分子の異種混合物に及ぶ(Wolinsky et al., J. Am. Coll. Cardiol. 1990, 15:475-81)。しかしながら、用語「ヘパリン」は、広い範囲のより均質なヘパリン製剤、並びにヘパリン状分子に及び、ヘパリン硫酸と、トリドデシルメチルアンモニウムやベンザルコニウムといった疎水性カウンターイオンを有するヘパリンを含む。また、本発明を説明する目的のヘパリンの定義には、従来の化学合成技術、化学修飾技術、化学分解技術を用いて製造した様々な合成ヘパリンやヘパリン誘導体が含まれる(ここに引用により組み込まれているRodén, L. THE BIOCHEMISTRY OF GLYCOPROTEINS AND PROTEOGLYCANS (Lennarz, W. J., ed.) 267-371, Plenum Publishing Corp., New York, 1980)。変化型には、ヘパリンナトリウム(例えば、ヘプサル(hepsal)や、プラリン(pularin))、ヘパリンカリウム(例えば、クラリン(clarin))、ヘパリンリチウム、ヘパリンカルシウム(例えば、カルシパリン(calciparine))、ヘパリンマグネシウム(例えば、クテパリン(cutheparine))、分子量約4,000乃至約5,000ダルトンの低分子量ヘパリン(例えば、アルデパリンナトリウム(ardeparin sodium))、高親和性ヘパリン、といったヘパリンのアルカリ金属あるいはアルカリ土類金属塩が含まれる(Scully et al., Biochem. J. 1989, 262:651-58)。

【0037】

ここで用いられている、「PF4/ヘパリン複合体」は、ヘパリンがPF4に結合して、タンパク質の構造変化を生じさせて潜在性エпитープ(cryptic epitope)が露出する時に形成される複合体を意味する。この複合体は、「外来」抗原として認識され、血小板Fc-レセプタの連続クラスタ化によってPF4/ヘパリン複合体に結合する免疫グロブリンの放出によって特徴づけられる免疫反応をトリガする。

【0038】

ここで用いられている、用語「流体」は、自由に動くことができる組成物を意味する。したがって、流体は、半固体、ペースト、溶液、水性混合物、及びその他このような組成物の形態の組成物に及ぶ。

【0039】

用語「サンプル」は、一般的に分析を必要とする検体、特に P F 4 / ヘパリン複合体に対する抗体を含むものを意味する。このサンプルは、生体液又は生物組織といった生物学的サンプルである。生体液の例には、血液、血漿、血清、唾液、痰、尿、脳脊髄液、涙、粘液、羊水、精液、糞便、その他がある。生物組織は、通常その細胞間物質と共にある特殊な細胞集合体であり、結合組織、上皮組織、筋肉組織及び神経組織を含む人体の構造材料の一つを形成している。生物組織の例には、器官、腫瘍、リンパ節、動脈及び個々の細胞も含まれる。

【 0 0 4 0 】

ここに用いられている、「血液サンプル」は、全血サンプル、又は全血から抽出した血漿又は血清分画を意味する。好ましくは、血液サンプルは、全血又は全血から抽出した血漿又は血清分画などのヒトの血液サンプルを意味する。用語「血漿」は、流体であって、全血の非細胞成分を意味する。使用する分離方法によって、血漿は完全に細胞成分を含まないか、あるいは、様々な量の血小板及び / 又は少量のその他の細胞成分を含むものでもよい。血漿は、フィブリノゲンなどの様々な血栓要因を含むため、用語「血漿」は、全ヒト血清などの全哺乳類血清を意味する「血清」とは区別される。更に、ここに使用されている、「血清」とは血栓要因を取り除いた血液プラズマを意味する。

【 0 0 4 1 】

ここに用いられている、用語「対象」又は「患者」は、好ましくはヒトである。

【 0 0 4 2 】

用語「ポリアニオン」は一般的に、一以上の負に荷電された陰性基を有する巨大分子を意味する。ここで用いられている、用語「陰性」は、リニアで、負に荷電されており、分子量が 2 0 0 0 乃至 6 0 0 0 ダルトン（平均 5 0 0 0 ダルトン）の非グリコサミノグリカン（すなわち、非ヘパリン）ポリマを意味する。ここで使用されている、ポリアニオンは、好ましくは、ポリビニルスルホン酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアネートルスルホン酸、ポリビニルリン酸塩、ポリビニルホスホン酸塩、ポリビニル硫酸塩、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。特に好ましい実施例では、ポリアニオンがポリビニルスルホン酸（ P V S ）である。

【 0 0 4 3 】

ここで用いられている、「 P F 4 / ポリアニオン複合体」は、ここで規定されているポリアニオンが P F 4 に結合し、タンパク質に構造変化を起こして潜在的エピトープが露出するときに形成される複合体を意味する。 P F 4 / ポリアニオン複合体は、好ましくは P F 4 / ポリビニルスルホン酸、 P F 4 / ポリスチレンスルホン酸、 P F 4 / ポリアネートルスルホン酸、 P F 4 / ポリビニルリン酸塩、 P F 4 / ポリビニルホスホン酸塩、及び P F 4 / ポリビニル硫酸塩から選択される。特に好ましい実施例では、 P F 4 / ポリアニオン複合体が P F 4 / P V S である。

【 0 0 4 4 】

ここで用いられている、用語「ポリビニルスルホン酸」又は「 P V S 」は、式 - [C H₂ - C H - (S O₃ N a) -]_n - の分子を意味する。ここで、 n は、好ましくは 2 0 乃至 6 0 であり、カリウム及びその他のカチオンの塩を含む。以下の実施例では、ポリビニルスルホン酸が約 5 , 0 0 0 ダルトン（約 3 5 - 4 0 のサブユニット）を有する。

【 0 0 4 5 】

用語「固定化」は、一般的に静止又は動くことができないことを意味する。ここで用いられているように、「固定化」とは、少なくとも部分的に、及び好ましくは実質的に、分子レベルで共有結合又は非共有結合又は相互作用によって基板に付いていることを意味する。当業者には、本発明が特定の固定化モードに限定されないことは自明である。

【 0 0 4 6 】

用語「結合」は、一般的に蛍光色素分子に化学的に結合した抗体であって、抗体を視覚的に検出できるようにすることを意味する。ここで用いられている、「結合」は、非特定蛍光染料でラベル化した抗ヒト抗体（例えばヤギ抗ヒト I g G、I g A、I g M、又はこれらの組み合わせ）を意味する。その他の免疫グロブリン（例えば、ロバ、ウマ、ヒツジ

10

20

30

40

50

、ウサギ、マウス、ラット、ラマ、モルモット、ハムスタ、及びニワトリ)を、抗ヒト抗体として使用して、本発明での使用を検討することもできる。

【0047】

ここで用いられているように、用語「抗体」は、最も広い意味で使用される。したがって、「抗体」は、天然のものであってもよく、従来のハイブリドーマ技術で製造したモノクローナル抗体のような人工の抗体、及び/又はこれらの機能性断片であってもよい。本発明の抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、並びに抗原結合ドメイン及び/又は一またはそれ以上の相補性決定領域を含むこれらの抗体の断片(Fab、Fab'、F(ab')₂、Fvなど)を含む。

【0048】

用語「非粒子状」は、一般的に、粉状又は粒子状でない物質、すなわち、粉状、断片状、顆粒、粒状、粒子状でない物質を意味する。ここで用いられているように、「非粒子状」は、好ましくは相当量のバラバラの粒子を含まない液状媒体を意味し、これは、この媒体に含まれる少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%の物質が完全に溶解していることを意味する。ここで用いられている、用語「蛍光染料」、又は「蛍光ラベル」は、ある波長の放射エネルギーを受けて、第2の波長の放射エネルギーを発する少なくとも一の蛍光色素分子を含む化合物を意味する。

【0049】

用語「アミン反応性」は、一般的に、ある化合物の第2の化合物上でアミンと反応する化合物の特徴又は官能基を意味する。ここで用いられている、用語「アミン反応性染料」は、DyLight(商標)、Alexa Fluor(登録商標)、HiLyte Fluor(商標)、CyDye(商標)、Cy(登録商標)、CF(商標)、IRDye(登録商標)、及びこれらの組み合わせから選択された水溶性蛍光染料を意味する。特に好ましい実施例において、アミン反応性蛍光染料はDyLight(商標)である。

【0050】

ここで用いられている、用語「放出可能に付けた」とは、ラベル化した結合がテストストリップ上で可逆的な状態で乾燥している、すなわち放出可能に付けた結合は、適当な動くバッファの存在下で再度可溶化するとき、試験ストリップに沿って移動できる。

【0051】

用語「捕獲試薬」は、一般的に、適当な条件下で捕獲試薬-ターゲット分子複合体が残りのサンプルから分離できるように、サンプル中のターゲット分子に結合して捕獲できる試薬を意味する。サンドイッチ免疫アッセイでは、捕獲試薬が好ましくは、ターゲット抗原に対して固定化した抗体であるかあるいは様々な抗体の混合物である。ここで用いられているように、捕獲試薬は好ましくは、コントロールゾーンに固定されて、非結合ラベル化結合体を捕捉する。したがって、好ましい実施例では、捕獲試薬が、検出用の抗ヒト免疫グロブリンと結合できる抗体を含む。たとえば、ヤギ抗ヒトIgGがラベル化した結合体に用いられている場合、マウス抗ヤギ抗体を捕獲試薬としてもちいることができる。その他の免疫グロブリン(例えば、抗ヒト抗体と同じ種からのものでない限り、ロバ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ラット、ラマ、モルモット、ハムスタ、及びニワトリ)を捕捉試薬として使用することができ、本発明における使用が意図されている。

【0052】

ここで用いられているように、用語「側方流動」は、吸収材又は非吸収材を含むテストストリップ上にヒトPF4/ヘパリン抗体を含むと思われる体液サンプルを配置することを意味し、ここで流体サンプル中の検体はテストストリップを介してストリップ中の様々な試薬と共に毛細管現象によって横方向に流れる。

【0053】

用語「テストストリップ」は、一般的にクロマトグラフィのような媒体を意味し、その上で本発明のアッセイが好ましく実行される。ここで用いられている、テストストリップは、順番に、近位端近傍に位置しており、ヒト免疫グロブリンに結合して検出可能な複合体を作る抗ヒト抗体に結合された非粒子状蛍光ラベルを含む「結合ゾーン」と、「結合ゾ

10

20

30

40

50

ーン」の下流に位置する流体サンプルを適合させる「サンプルゾーン」と、流体サンプル中でPF4/ヘパリン抗体を捕捉しそれを維持する固定化されたPF4/ポリアニオン複合体を含む「検出ゾーン」と、ラベル化したコンジュゲートを捕捉して維持する固定化した捕捉試薬を含む「制御ゾーン」と、遠位端あるいはその近傍に配置されてテストストリップを介して流体サンプルの吸引を補助する「芯材パッド」とを具える。

【0054】

ここで用いられているように、用語「上流」及び「近位」は、一般的に検出システムの端部から離れてサンプル適用部位に向かう流体の流れの方向を意味する。逆に、用語「下流」及び「遠位」は、一般的に、サンプル適用部位から離れて検出システムの端部に向かう流体の流れの方向を意味する。

10

【0055】

構造に関してここで用いられている用語「流体連通」は、その構造が、一の構造を流れる流体が、その他の構造に直接的又は間接的に流れるように連結されていることを意味する。デバイスの一要素に関連してここで用いられている用語「流体連通」は、デバイスが、流体サンプルで濡れた後、流体サンプル又は流体サンプルの成分の当該要素の一またはそれ以上の部分を通るあるいはその中へ流れる又は放散させる状態を意味する。この用語は更に、2又はそれ以上の特定の要素が流体サンプルによって濡れた状態も意味する。

【0056】

用語「結合パッド」は、一般的に、ラベル化したコンジュゲートを具える膜材またはその他のタイプの材料を意味する。ここで用いられているように、「結合パッド」は、更に、結合ゾーンの下流に位置するサンプルゾーンを具えていてもよい。結合パッドは、セルロースアセテート、セルロースナイトレート、ポリアミド、グラスファイバ、膜、ポリエーテルスルホン、再生セルロース(RC)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、ポリエステル(例えば、ポリエチレンテレフタレート)、ポリカーボネート(例えば、4,4'-ヒドロキシジフェニル-2,2'-プロパン)、酸化アルミニウム、混合セルロースエステル(例えば、セルロースアセテートとセルロースナイトレートの混合物)、ナイロン(例えば、ポリアミド、ヘキサメチレンジアミン、及びナイロン66)、ポリプロピレン、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)、高密度ポリエチレン(HDPE)、及びHDPE+核形成剤である「アルミニウムジベンゾアート」(DBS)でできていてもよい。結合パッドのその他の例には、Cyclo pore(登録商標)ポリエチレンテレフタレート、Nucleo pore(登録商標)ポリエチレンテレフタレート、Membrana-Fil(登録商標)セルロースアセテートとセルロースナイトレート、Whatman(登録商標)セルロースアセテートとセルロースナイトレート、Whatman(登録商標)#12-Sレーヨン、Anopore(登録商標)酸化アルミニウム、Anodisc(登録商標)酸化アルミニウム、Sartoriusセルロースアセテート、例えば5µm、及びWhatman(登録商標)標準17パウンドガラスがある。

20

30

【0057】

用語「サンプルパッド」は、一般的に、親水性膜などの親水性エレメントを意味し、血液、血清又は血漿などのサンプルを受けるのに使用することができる。ここで用いられているように、サンプルパッドは、コンジュゲートパッド。又はコンジュゲートパッドの下流側に、コンジュゲートパッドと流体連通して配置された分散パッドであってもよい。サンプルパッドは、好ましくは、コンジュゲートパッドと同じ材料でできている。

40

【0058】

ここで用いられているように、用語「多孔膜」は、一般的に多数の孔又はホールを有し、ある距離を毛細管力で液体を運ぶことができる膜を意味する。この膜は、好ましくは検出ゾーンにおいて、及び選択的に、対象となるその他の領域において、共有結合、非共有結合、あるいは物理的結合のいずれかによって反応物質を結合できる。本発明に用いられる好適な多孔膜材料には、天然繊維、あるいはナイロン、ポリエステル、セルロースベースのポリマー物質、ガラスなどの粒子状材料からなる焼成構造、又は様々な熱プラスチックポリマといった合成繊維、又は多くの場合、ニトロセルロース、ナイロン、ポリスルホ

50

ン、などの合成物質である成形膜フィルムがある。多孔膜の好ましい厚さと中くらいのポアサイズは、一部、膜に適用するサンプルの性質と、多孔媒体を通る所望の流速と、試験時間、及び試験感度によって異なる。特定のアプリケーションに対する最も好ましい孔径は、当業者の知識の範囲である。一般的な問題として、孔径 $3\ \mu\text{m}$ 乃至 $12\ \mu\text{m}$ が好ましい。本発明の特に好ましい実施例では、多孔膜がニトロセルロースでできている。

【0059】

ここで用いられているように、用語「湿パッド」は、アッセイデバイスの上流側端部に配置され、コンジュゲートパッドと流体連通する選択的な試験ストリップを意味する。使用時に、「湿パッド」は、乾燥したコンジュゲートを可溶化するとともに、検出ゾーンへ送るコンジュゲートバッファを受けるように作用する。湿パッドは、好ましくはコンジュゲートパッドと同じ材料でできている。その名前にかかわらず、用語「湿パッド」は、構造的エレメントが本来的に常に湿っていることを暗示するものではない。

10

【0060】

ここで用いられているように、用語「芯材パッド」は、アッセイデバイスの下流側端部にあるサンプルゾーンから多孔膜の反対側端部と流体連通している試験ストリップエレメントを意味する。芯材パッドは、多孔膜を通して流体を「引っ張る」又は「駆動する」ことで、多孔膜中の毛細管流動を強化する。本発明で用いる芯材パッドは、試験ストリップから液体を急速に吸収できる材料でできている。コンジュゲート/サンプルパッドからの検体とその他の物質が検出ゾーンと制御ゾーンを通るようにするために、所定の試験に用いる吸収材は、毛細管力で試験ストリップから引き込まれる液体と少なくとも同じ量を吸収するのに十分な容積がある。好適な物質には、純セルロース、ニトロセルロース、あるいはフィルタ紙など、様々な公知の紙又はセルロースベースの材料がある。

20

【0061】

ここで用いられている、「接触する」とは、二つまたはそれ以上の構成要素が互いに接合することを意味する。「接触」は、流体又は半流体混合物中のすべての成分を混合することによって達成される。「接触」は、また、一またはそれ以上の成分が、固体組織部分又は基板など、固体表面上の一またはそれ以上のその他の成分に接触するときにも達成される。

【0062】

ここで用いられている、用語「評価」又は「測定」は、反応システム中に存在する検体の量又は濃度の絶対値を得る、及び反応システム中の検体のレベルを示すインデックス、率、パーセンテージ、視覚的あるいはその他の値を得るという意味で、定量的決定と定性的決定の双方を含むことを意図している。

30

【0063】

ここで用いられている、用語「ポイントオブケア」は、治療を受けている患者のすぐ近くで使用するように特に構成された医療診断手順を意味する。

【0064】

B. PF4/ヘパリン抗体検出用アッセイデバイス

ここに記載した側方流動アッセイは、PF4/ヘパリン抗体と呼ばれる、ヘパリン起因性血小板減少症に關与する抗体の検査に使用できるヘパリン起因性抗体用の定性的及び半定性的ポイントオブケアイムノアッセイである。インビボ抗体は、PF4とヘパリン複合体に対して形成されるが、インビトロではこれらの抗体は、ポリビニルスルホン酸(PVS)などのその他のポリアニオンと複合するときに、PF4と反応する。PF4/ヘパリン抗体と様々なPF4/ポリアニオン複合体との交差反応性についての詳細な記載は、米国特許第5,972,718号にあり、この特許はここに全体が引用により組み込まれている。

40

【0065】

これは、ポリアニオンと、抗ヒトIgG、又は抗ヒトIgA、IgG、及びIgM、非粒子状蛍光ラベル、好ましくはアミン-反応性蛍光染料と結合した抗体と複合されたヒトPF4を用いた、即時免疫クロマトグラフィックサンドイッチアッセイである。PF4/

50

ポリアニオン複合体は、アッセイデバイスの試験ライン（検出ゾーン）に固定されており、非粒子状蛍光染料でラベル化した抗ヒト抗体（コンジュゲート）は、試験ラインの上流のコンジュゲートパッドに放出可能に付けられている。上述したように、ラベル化した抗体もサンプル適用部位（サンプルゾーン）の上流に配置されており、ヒト抗体とコンジュゲートが試験ラインで相互作用する前に相互作用することを防止している。試験は、検体と、PF4/ヘパリン複合体に対するヒト抗体の相互作用の度合いを、例えばフルオロメータなどの蛍光信号に基づいて測定することができる電子光学読取デバイスを用いて分析される。試験パフォーマンスは、コンジュゲートに含まれる、たとえば、コンジュゲートがヤギ抗ヒト抗体を含む場合はマウス抗ヤギIgGといった、抗ヒト抗体に結合する、固定捕捉試薬を含む基準ライン（制御ゾーン）によって評価される。

10

【0066】

好ましい実施例では、本発明の側方流動PF4/ヘパリンアッセイは、カセットに封入された試験ストリップを具える。図2A乃至2Cは、試験デバイスの例示的实施例の様々な構成要素と構造を示す。膜及び/又はパッドの各連結点に、パッド及び/又は膜が互いに流体連通するように、膜及び/又はパッド材が重なる部分がある。図2Cに示すいくつかの実施例では、試験ストリップは上流から下流にかけて、（1）コンジュゲートゾーンを含むコンジュゲートパッド；（2）サンプルゾーンを含むサンプルパッド；（3）検出ゾーンと制御ゾーンを含む多孔膜、及び（4）芯材パッド；の4つの構成要素を有する。好ましい実施例では、図2A及び2Bに示すように、コンジュゲートパッドとサンプルパッドを組み合わせて一つの一体型パッドとなっており、パッドの最も遠位部分にコンジュゲートが乾燥して設けられており、サンプルは、最も近位側部分に付けられている。試験ストリップは更に、サンプルゾーンとコンジュゲートゾーン間に位置するサンプルバッファゾーンと、コンジュゲートゾーンの上流に位置するコンジュゲートバッファゾーンを具えることが好ましい。いくつかの実施例では、図2Bに示すように、試験ストリップが更に、コンジュゲートパッドの上流に分散型湿パッドを具える。これらの実施例では、コンジュゲートバッファゾーンが、コンジュゲートパッドに代えて湿パッド内に位置している。

20

【0067】

コンジュゲートパッドは、好ましくはポリエステルでできており、PF4/ヘパリン複合体に放出可能に付けた、非粒子状蛍光染料でラベル化した抗ヒトIgG抗体、あるいは検体ヒト抗体に結合するであろう抗ヒトIgG、IgM、及びIgA抗体の混合物を含む。好ましい実施例では、このラベル化された抗体がヤギ抗ヒトIgGである。非粒子状蛍光ラベルは、好ましくは、DyLight（商標）、Alexa Fluor（登録商標）、HiLyte Fluor（商標）、CyDye（商標）、Cy（登録商標）、CF（商標）IRDye（登録商標）、又はこれらの組み合わせといった、アミン反応性染料を含む。アミン反応性蛍光染料ラベルは水溶液に溶解、粒子又は粒子状ラベルではない。（例えば、Thermo Fisher Scientific Inc., Instructions for DyLight™ Microscale Antibody Labeling Kits, stating that “the water solubility of the DyLight Reagents allows a high fluor-to-protein ratio without precipitation during conjugation.” 参照）。アミン反応性蛍光染料ラベルは、好ましくは、ヤギ抗ヒトIgG、又はヤギ抗ヒトIgG、IgM及びIgAの混合物などの抗ヒト抗体に直接結合する。

30

40

【0068】

多孔膜は、好ましくはニトロセルロースでできている。検出ゾーンは好ましくは、検体であるヒトPF4/ヘパリン抗体が結合している固定化PF4/ポリアニオン複合体を含む。制御ゾーンは、好ましくは、検出ゾーンを通過する非結合ラベル化抗体に結合する固定された捕捉試薬を含む。固定された捕捉試薬は、好ましくは、コンジュゲートように抗ヒト抗体を生成するのに使用した哺乳動物種から得た免疫グロブリンに結合する抗体であ

50

る。たとえば、この抗ヒト抗体がヤギで育成された場合は、捕捉試薬はマウス抗ヤギ Ig G などの抗ヤギ抗体を含む。

【0069】

図2A乃至2Cを再度参照すると、試験ストリップがカセットに封入されている。ポート1は、サンプルゾーンを露出させてサンプル、好ましくは血清又は血漿をコンジュゲートパッドに（分散型サンプルパッドが使用されている場合はサンプルパッド）に付けるように構成されている。ポート2は、サンプルバッファゾーンを露出させて、サンプルバッファをコンジュゲートパッドに（分散型サンプルパッドが使用されている場合はサンプルパッド）に付けるように構成されている。最後に、ポート3は、コンジュゲートバッファゾーンを露出させて、コンジュゲートバッファをコンジュゲートパッドに（又は、分散型湿パッドが使用されている場合は、湿パッド）に付けるように構成されている。いくつかの実施例では、ポート2と3が各々、ポーチで覆われており、このポーチがサンプルバッファとコンジュゲートバッファをそれぞれ含んでいる。サンプルバッファとコンジュゲートバッファは同じ成分又は異なる成分を有していてもよい。好ましい実施例では、サンプルバッファとコンジュゲートバッファが、1×PBS、1%BSA、及び0.1%ポリソルベート20（Tween 20（商標））、を含み、pH7.4に中和されている、同じ成分を持つ。

【0070】

いくつかの実施例では、好ましくはカセットの右側に無線自動識別（RFID）チップが収納されており、このチップにアッセイパラメータや、ロット情報（製品名、ロット番号、使用期限）が入っている。カセットの左側には、たとえば、フルオロメータなどの、アッセイ信号を読み取るための電子光学読取機が挿入されている。

【0071】

代替の実施例では、図3A及び3Bに示すアッセイデバイスを使用している。これらの実施例では、ポート2及び3の上に直接配置したポーチに、それぞれ、予めサンプルとコンジュゲートバッファが入っている。これらのポーチは、好ましくは、たとえば、ゴム、ラテックス、プラスチックなどの柔軟材でできたプリスタで覆われており、オペレータがプリスタに正圧をかけたときにこれらのポーチが破れるようになっている。図4A乃至4Bは、ポーチを破ってその中に含まれているバッファを放出させるのに使用できる貫通機構の例を示すものである。これらの例が非限定的なものであり、代替手段を使用してバッファを放出できることは自明である。

【0072】

別の代替実施例では、図5A乃至5Cに示すアッセイデバイスを使用することができる。この実施例は、図3A及び3Bに示す実施例と概念的に似ているが、重要な変形がある。この実施例のデバイスは、バッファを含んでいるプリスタ及び/又はポーチを圧縮する形状の立ち上がりエッジを有する表示スライドを具えている。したがって、この表示スライドをアッセイカセットに対して横方向に移動させることで、バッファの放出を容易かつ簡単に行うことができる。

【0073】

C. PF4 / ヘパリン抗体の検出方法

本明細書に記載したPF4 / ヘパリン抗体アッセイは、以下の3つの基本ステップで動作する：（1）サンプルを加える、（2）サンプルバッファを加える、及びコンジュゲートを流す。一の実施例では、サンプルをポート1にまず加えて、コンジュゲートパッド又はサンプルパッドのサンプルゾーンと接触させる。次いで、好ましくは、1×PBS、1%BSA、及び0.1%のTween 20（商標）、を含み、pH7.4に調整されたサンプルバッファをすぐにポート2に付けて、検出ゾーンにサンプルを「押し」、そこでPF4 / ヘパリン抗体がサンプル中に存在していれば、固定化したPF4 / ポリアニオン複合体に結合する。滞留時間経過後、コンジュゲートバッファをポート3に塗布する。滞留時間は、1秒ほどの短い時間でもよいが、サンプルバッファを加えた後少なくとも約3分であることが好ましい。コンジュゲートバッファは、好ましくはサンプルバッファと同

じものであり、乾燥したコンジュゲートを水和させ、可溶化させて、ラベル化した抗ヒト抗体が検出ゾーンと制御ゾーンに流れて、そこで、P F 4 / ポリアニオン複合体及び捕捉試薬とそれぞれ結合された固定化P F 4 / ヘパリン抗体と結合する。

【 0 0 7 4 】

図 3 A 及び 3 B に示す代替アッセイの実施例では、まずサンプルをポート 1 に加える。次いでサンプルを加えた後ポート 2 上のポーチを破り、サンプルバッファを放出する。サンプルバッファが、サンプルを検出ゾーンに押して、ここで、サンプル中に P F 4 / ヘパリン抗体が存在すれば、固定化P F 4 / ポリアニオン複合体に結合する。滞留時間経過後にポート 3 上のポーチが破れる。滞留時間は、1 秒ほどの短い時間でもよいが、ポート 2 上のポーチが破れた後少なくとも約 3 分であることが好ましい。ポート 3 に分注されたコンジュゲートバッファは、好ましくはサンプルバッファと同じものであり、乾燥したコンジュゲートを水和させ、可溶化させて、ラベル化した抗ヒト抗体が検出ゾーンと制御ゾーンに流れて、そこで、P F 4 / ポリアニオン複合体、及び捕捉試薬とそれぞれ結合した固定化P F 4 / ヘパリン抗体と結合する。

【 0 0 7 5 】

図 5 A 乃至 5 C に示す代替アッセイの実施例では、最初に、サンプルウエル上に表示スライドが配置される。これは、図 2 A 乃至 2 C のポート 1 に対応する（図 5 A 参照）。カセットの戻り止めを用いて正確なアラインメントを表示する。まず、サンプルをサンプルウエルに加える。サンプルを加えた後、表示スライドが第 2 の位置に移動して、第 1 の（小）プリスタからサンプルバッファを放出する（図 5 B 参照）。サンプルバッファが、サンプルを検出ゾーンに押して、ここで、サンプル中に存在すれば、P F 4 / ヘパリン抗体が固定化P F 4 / ポリアニオン複合体に結合する。滞留時間経過後に表示スライドが第 3 の位置に移動して、第 2 の（大）プリスタからコンジュゲートバッファを放出する（図 5 C 参照）。滞留時間は、1 秒ほどの短い時間でもよいが、第 1 のプリスタからバッファが放出した後少なくとも約 3 分であることが好ましい。第 2 プリスタから放出されたコンジュゲートバッファは、好ましくはサンプルバッファと同じものであり、乾燥したコンジュゲートを水和させ、可溶化させて、ラベル化した抗ヒト抗体が検出ゾーンと制御ゾーンに流れて、そこで、P F 4 / ポリアニオン複合体、及び捕捉試薬とそれぞれ結合された固定化P F 4 / ヘパリン抗体と結合する。

【 0 0 7 6 】

上述したように、テストサンプルがP F 4 / ヘパリンに対する検出可能なレベルのヒト抗体を含む場合は、検出ゾーンがラベル化抗ヒト抗体 - P F 4 / ヘパリン抗体 - P F 4 / ポリアニオンサンドイッチ複合体を含むことになる。アッセイが正しく行われたら、テストサンプルが検出可能なレベルのヒトP F 4 / ヘパリン抗体を含んでいるかいないかにかかわらず、制御ゾーンがラベル化抗ヒト抗体 - 捕捉試薬複合体を含むことになる。サンプルを本明細書に記載した側方流動P F 4 / ヘパリンアッセイデバイスに好ましくは15 分間付けた後、検出ゾーンと制御ゾーンの蛍光信号が、フルオロメータなどの電子光学読取器によって定量化され、テストサンプル中にヒトP F 4 / ヘパリン抗体の存在と相対的な可能性を示す。制御ラインで測定された値は、コンジュゲート及び流動距離制御として作用するが、更に、試験ラインにおける結果の検出に利用することができる。いくつかの実施例では、標準値がユーザに提供されており、定量化試験の一部として標準曲線が生成される。すなわち、サンプル中のヒトP F 4 / ヘパリン抗体の量を正確に決定または測定することができる。

【 0 0 7 7 】

D . P F 4 / ヘパリン抗体を検出するアッセイシステム

上述した通り、本発明は、患者の体液中のP F 4 / ヘパリン複合体に起因する免疫グロブリン抗体の存在及び/又は量を検出するポイントオブケア側方流動免疫アッセイシステムも提供している。このシステムは、毛細管現象によって液体の移動を支持することができる不活性繊維材料でできており、裏打ちによって支持されているリニア膜と；コンジュゲートゾーンを通過する体液サンプル中に存在するP F 4 / ヘパリン複合体に起因する免

疫グロブリン抗体に、光吸収ラベルを結合させる手段と；検出ゾーン中の膜の上に P F 4 / ポリアニオン複合体を固定化する手段と；を具える。リニア膜は、近位端から遠位端にかけて、コンジュゲートゾーン、サンプルパッド、検出ゾーン、制御ゾーン、及び芯材パッドに区画されている。P F 4 / ポリアニオン複合体は、P F 4 / ヘパリン複合体で誘発され検出ゾーン内に流れる光吸収ラベルに結合された免疫グロブリン抗体に共役的に結合することができる。この検出ゾーン中で、光吸収ラベルが、検出ゾーンに固定化された P F 4 / ポリアニオン複合体に結合された抗体の可視化を容易にする。

【 0 0 7 8 】

上述した通り、体液は血液、又は、血漿又は血清など、血液の免疫グロブリン含有成分であってもよい。ポリアニオンは、好ましくは、ポリビニルスルホン酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアネートスルホン酸、ポリビニルリン酸塩、ポリビニルホスホン酸塩、ポリビニル硫酸塩、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。特に好ましい実施例では、ポリアニオンがポリビニルスルホン酸 (P V S) である。いくつかの実施例では、P F 4 / ヘパリン複合体起因性免疫グロブリン抗体が、I g G、I g A、I g E、I g M、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。好ましい実施例では、光吸収ラベルが蛍光ラベルであり、フルオロメータなどの電子光学読取器によって抗体の可視化を容易にする。

【 0 0 7 9 】

[実施例]

実施例 1

P F 4 / ヘパリン側方流動アッセイデバイスの作成

ポリエステルコンジュゲートパッドを、10 mM のホウ酸塩と、3 % のウシ血清アルブミン (B S A) と、1 % のポリビニルピロリドン (M W 4 0 , 0 0 0 , P V P - 4 0) と、0 . 2 5 % のトリトン X - 1 0 0 (オクチルヘノールエチレンオキシド) と、0 . 0 5 % の 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンと 5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン (P r o C l i n e (登録商標)) とを含む、p H 8 . 0 のブロッキングバッファでブロックした。アミン反応性蛍光染料ラベル (D y L i g h t (商標) N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) エステル、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c I n c . , R o c k f o r d , I L) を、ヤギ抗ヒト I g A、I g G 及び I g M 抗体の混合物とを、製造者の指示書 (D y L i g h t (商標) M i c r o s c a l e A n t i b o d y L a b e l i n g K i t s , T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c I n c . , R o c k f o r d , I L 用指示書) に従って直接結合させた。アミン反応性蛍光染料でラベル化したヤギ抗ヒト I g G 抗体コンジュゲートを、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) と、0 . 0 5 % の P r o C l i n (登録商標)、7 % のスクロース、及び 3 % のトレハロースを含むバッファ中に溶かし、コンジュゲートパッドに付けて乾燥させた。

【 0 0 8 0 】

ニトロセルロース膜を、10 mM のリン酸ナトリウムと、1 % のスクロースと、0 . 2 5 % の P V P - 4 0 と、0 . 8 % の魚肉ゲルとを含む、p H 7 . 6 のブロッキングバッファでブロックした。上述の米国特許第 5 , 9 7 2 , 7 1 8 号に記載されているように、P F 4 / P V S 複合体を作り、2 . 8 mM の $K H _ 2 P O _ 4$ と、7 . 2 mM の $N a _ 2 H P O _ 4$ と、1 2 8 . 3 mM の $N a C l$ と、0 . 1 % の $N a N _ 3$ とを含むバッファに溶かし、ニトロセルロース膜の検出ゾーンに塗布して乾燥させた。マウス抗ヤギ I g G 抗体を、P B S と、0 . 0 5 % の $N a N _ 3$ を含むバッファに溶かし、ニトロセルロース膜の制御ゾーンに付けて乾燥させた。ブロッキングステップを除いて、コンジュゲートパッドとニトロセルロース膜に、その他の化学処理を行っていない。

【 0 0 8 1 】

コンジュゲートパッドと、ニトロセルロース膜と、セルロースベースの芯材パッドを、硬い裏打ちの上で組み立てて、両方のパッドが膜と重なるようにして、アセンブリ全体を無線自動識別 (R F I D) チップと共にプラスチックカセット中に封入した。

【 0 0 8 2 】

実施例 2

P F 4 / ヘパリン側方流動アッセイプロトコル

側方流動アッセイプロトコルは以下の通りであった。5 μ l の血清サンプルを図 1 A 乃至 1 C のポート 1 に示すようなサンプルポートに付け、直ちに 15 μ l のサンプルバッファ (1 \times P B S 、 1 % の B S A 、 及び 0 . 1 % のポリソルベート 20 (T w e e n 20 (商 標)) 、 p H 7 . 4) を直ちに、図 2 A 乃至 2 C のポート 2 に示すようにサンプルバッファゾーンに付けた。約 3 分後に、90 μ l のコンジュゲートバッファ (1 \times P B S 、 1 % の B S A 、 及び 0 . 1 % のポリソルベート 20 (T w e e n 20 (商 標)) 、 p H 7 . 4) を、図 2 A 乃至 2 C のポート 3 に示すようなコンジュゲートバッファゾーンに付けた。約 12 分後に、アッセイカセットを蛍光読取器に配置して、検出ゾーン及び制御ゾーンにおいてアミン反応性蛍光ラベルからの蛍光信号を測定した。4 回の反復を用いて、P F 4 / ヘパリン側方流動中で各サンプルを試験した。

10

【 0 0 8 3 】

実施例 3

P F 4 / ヘパリン側方流動アッセイの比較成績

P F 4 / ヘパリン側方流動アッセイと基準 P F 4 / ヘパリン酵素免疫アッセイの相対的パフォーマンスを比較するために、ヘパリン治療を受けている患者からの 83 の血清サンプルセットを、本発明による P F 4 / ヘパリン側方流動アッセイと、米国特許第 5 , 972 , 718 号に詳細に記載されている通常使用されている E L I S A 試験に従って、P F 4 / ヘパリン側方流動アッセイで試験した。E L I S A では、マイクロウエルに固定化した P F 4 / P V S 複合体が、それに続くアルカリホスファターゼコンジュゲート (P F 4 E n h a n c e d (登 録 商 標) 、 G e n - P r o b e G T I D i a g n o s t i c s , I n c . W a u k e s h a , W I) を介した検出によって、患者サンプルからの P F 4 / ヘパリン抗体と反応する。両方のアッセイで、I g G 、I g A 及び I g M 抗体を検出する。P F 4 / ヘパリン側方流動アッセイを、ラベル化した抗ヒト抗体コンジュゲートを、サンプルバッファをサンプルバッファゾーン付けた直後に、コンジュゲートパッドに液状で塗布した点を除いて、上述した実施例 1 及び 2 のように実行した。ラベル化したコンジュゲートは、コンジュゲートパッドに付けた時はすでに溶けているため、コンジュゲートバッファを使用してコンジュゲートを押すことができない。更に、プラスチック製ハウジング / カセットは、この実験では使用しなかった。

20

30

【 0 0 8 4 】

定性的結果を、2 \times 2 分割表を用いて分析した。最も高い相対蛍光単位を示す臨床的陰性サンプルに基づく予めのカットオフを割り当てることによって、P F 4 / ヘパリン側方流動アッセイについての陽性及び陰性結果がわかる。この結果が表 1 にまとめられている。側方流動アッセイに偽陰性はなかった。3 つのサンプルが、側方流動アッセイで陽性反応を示したが、比較 E L I S A アッセイでは陰性であった。これらのサンプルは、E L I S A の感度カットオフの若干下のポイントに希釈された公知の陽性サンプルであった。全体として、P F 4 / ヘパリン側方流アッセイは 100 % の感度 (95 % 信頼区間 (C I) = 90 . 4 % - 100 . 0 %) 、 93 . 6 % の特異性 (95 % C I = 82 . 8 % - 97 . 8 %) 、 96 . 4 % の基準の酵素免疫アッセイとの同一性 (95 % C I = 89 . 9 % - 98 . 8 %) を示した。

40

【 0 0 8 5 】

表 1 : E L I S A と比較した P F 4 / ヘパリン側方流アッセイの相対的パフォーマンス

PF4/ヘパリン 側方流動アッセイ	PF4 Enhanced [®] ELISA			
		陽性	陰性	合計
	陽性	36	3	39
	陰性	0	44	44
	合計	36	47	83

10

【 0 0 8 6 】

実施例 4

P F 4 / ヘパリン側方流動アッセイの干渉試験

通常、血液サンプル中にビリルビン、ヘモグロビン、及びトリグリセリドが存在し、アッセイ性能を妨げる。これらの物質の干渉試験を、「スパイク」実験によって行った。トリグリセリド干渉を、イントラリピッド（20%の脂肪乳剤）を用いて評価した。試験を行った血清サンプルは、E L I S Aで測定した場合と同様に、陰性、低陽性、中程度陽性のP F 4 / ヘパリン反応レベルを示した。試験を行った対応する物質について同量の希釈剤（ヘモグロビンとトリグリセリドについては水；ビリルビンについては0.1Nの水酸化ナトリウム）用いて用意した血清を、対照として使用した。全てのサンプルを3回試験した。下記の表2は、試験を行った干渉をまとめたものである。

20

【 0 0 8 7 】

表2. P F 4 / ヘパリン側方流動アッセイで試験した干渉物質のまとめ

物質	濃度試験(mg/dL)
ビリルビン	20
ヘモグロビン	500
トリグリセリド(イントラリピッド)	500

30

【 0 0 8 8 】

この実験の結果を図6にまとめてある。3つの各物質で試験した各サンプルについて、計算結果は希釈対照に比較してほぼ同じであった。図6は、試験血清の平均R F U値が、対応する対照の条件と著しく異なるものではなかったことを示している。試験を行った濃度において、ビリルビン、ヘモグロビン、及びトリグリセリドは、P F 4 / ヘパリン側方流動アッセイと有意に干渉を起こすようには見えなかった。

40

【 0 0 8 9 】

実施例 5

P F 4 / ヘパリン側方流動アッセイの交差反応性試験

実施例2で述べたアッセイプロトコルに従って、交差反応性試験を3度行った。表示した抗原に対する抗体を含む血清を、P F 4 / ヘパリン抗体が存在しない状態で試験した。ヒト血小板抗原（H P A）、血小板グリコプロテインI V（G P I V又はC D 3 6）、リン脂質、又は血液型抗原（A、B又はA B）についてアッセイ中に交差反応は観察されなかった。

50

【 0 0 9 0 】

上記に基づいて、本明細書に記載した側方流動アッセイを、PF4/ヘパリン複合体に特異的な抗体の検出に用いることができる。これは、ヘパリン起因性血小板減少症（HIT）に関連するPF4/ヘパリン抗体のスクリーニングに使用することができる。このアッセイフォーマットは、個々のサンプルのポイントオブケア試験に使用することができる。PF4/ヘパリン複合体に対する抗体の即時検出（約15分）に容易に入手できる免疫アッセイによって、HITの臨床診断を迅速に確認することができ、したがって、時間的制約があるHITの臨床管理に役立つ。

【 0 0 9 1 】

上述の実施例は、説明の目的のものであり、発明の範囲を限定することを意図するものではない。上述した実施例の多くの変形が可能である。上述の実施例の変形及び変更は当業者には自明であるので、本発明は特許請求の範囲によってのみ制限を受ける。

10

【 図 1 A 】

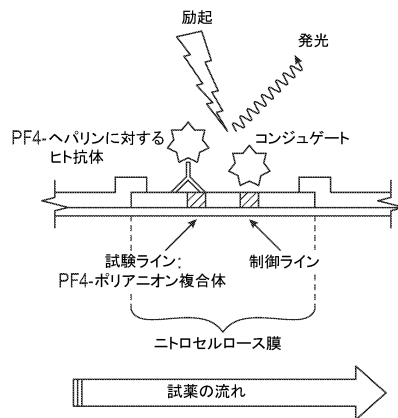


FIG. 1A

【 図 2 A 】

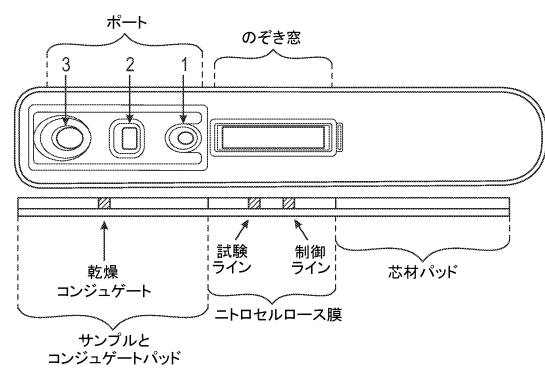


FIG. 2A

【 図 1 B 】

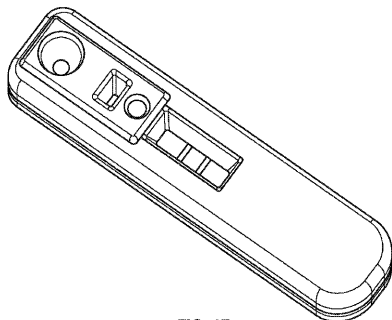


FIG. 1B

【図 2 B】

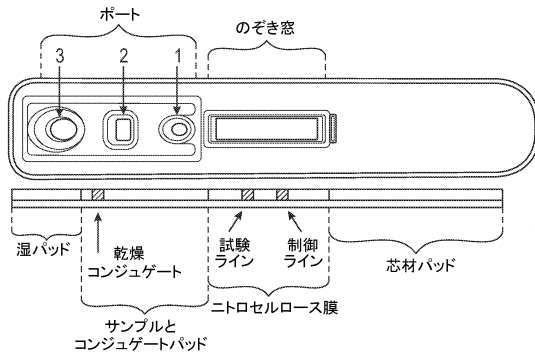


FIG. 2B

【図 2 C】

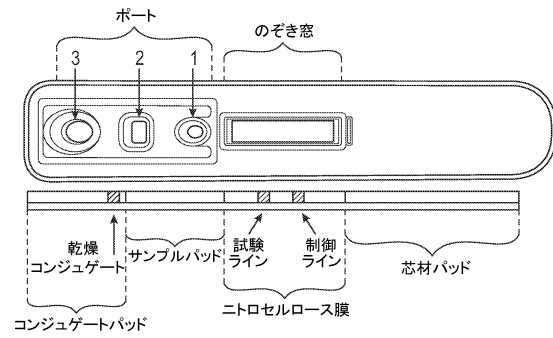


FIG. 2C

【図 3 A】

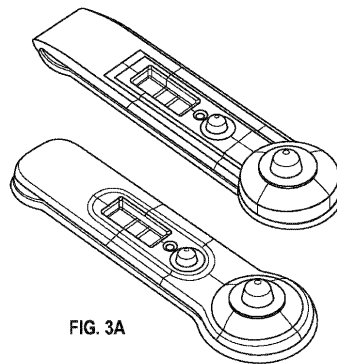


FIG. 3A

【図 3 B】

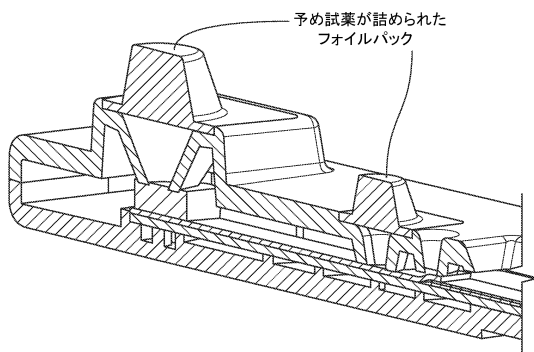


FIG. 3B

【図 4 B】

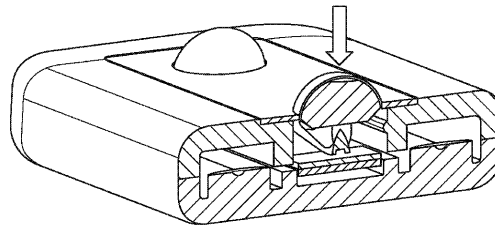


FIG. 4B

【図 4 A】

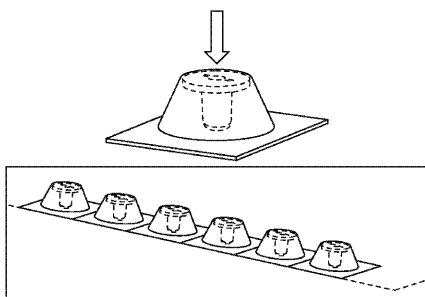
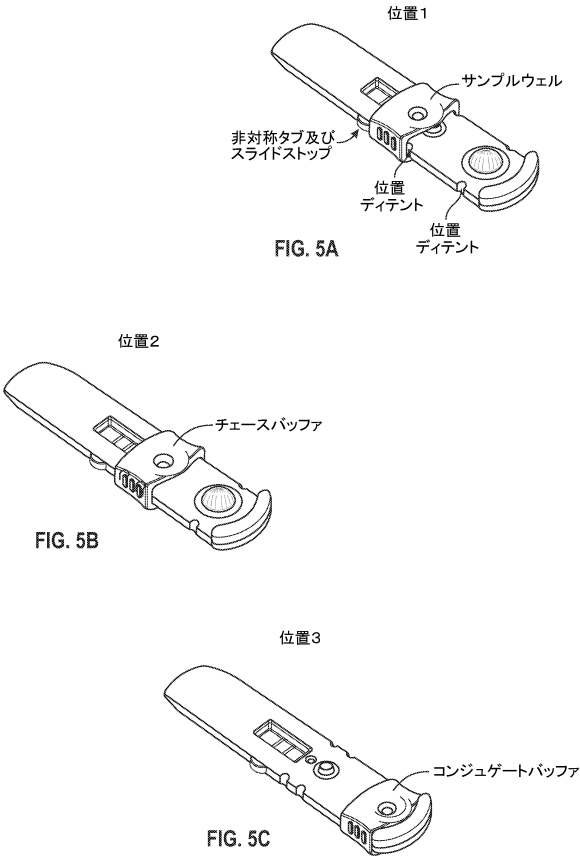
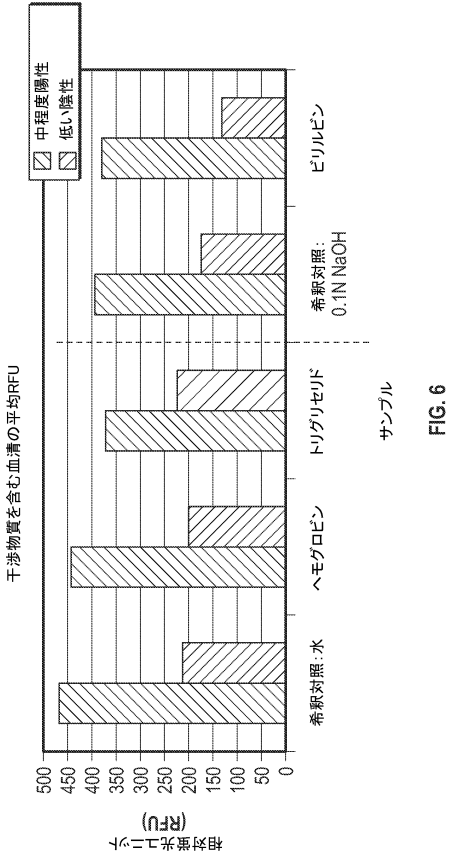


FIG. 4A

【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(72)発明者 ヴィセンティン, ギアン パオロ
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53189, ウォーキシャ, イーストサンセットドライブ
1623, アpartment 205

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 国際公開第2009/111254(WO, A2)
国際公開第97/032211(WO, A1)
特開2010-014714(JP, A)
国際公開第2010/024271(WO, A1)
特開2009-162557(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98