

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6203638号
(P6203638)

(45) 発行日 平成29年9月27日(2017.9.27)

(24) 登録日 平成29年9月8日(2017.9.8)

(51) Int.Cl.

GO1N 33/543 (2006.01)

F1

GO1N 33/543 501L
GO1N 33/543 565G

請求項の数 7 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2013-540013 (P2013-540013)
 (86) (22) 出願日 平成23年11月17日 (2011.11.17)
 (65) 公表番号 特表2013-543981 (P2013-543981A)
 (43) 公表日 平成25年12月9日 (2013.12.9)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2011/061184
 (87) 國際公開番号 WO2012/068372
 (87) 國際公開日 平成24年5月24日 (2012.5.24)
 審査請求日 平成26年11月10日 (2014.11.10)
 (31) 優先権主張番号 61/414,663
 (32) 優先日 平成22年11月17日 (2010.11.17)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 510108434
 オーション バイオシステムズ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 1821, ビレリカ, ファースト フロア
 , 43 マニング ロード
 (74) 代理人 110000659
 特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所
 (72) 発明者 ホンカネン, ピーター
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 1742, コンコード, モニュメント ス
 トリート 1437-5
 (72) 発明者 バーンズ, クリストイン, エー.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2481, ウエルズリー, セイラム ロー
 ド 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ウェル内検量機構を印刷するための方法及びシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数の捕捉抗体機構を試験基板のウェル内に印刷することと、
 検量機構を、前記試験基板の前記ウェル内の1つの前記捕捉抗体機構上に印刷することと、を含む方法であり、

前記検量機構が、前記捕捉抗体機構に結合することができる濃度が既知量の抗原を有し、
 前記試験基板の前記ウェル内の少なくとも1つの捕捉抗体機構が、少なくとも1つの捕捉抗体機構上に印刷された検量機構を有さず、試料中の抗原と結合することができ、

前記試料を前記試験基板の同じ前記ウェルに添加し、

前記検量機構及び抗原はそれぞれ、同じ酵素結合検出抗体と結合することができる、試 10
料中の抗原の存在及び量を検出する方法。

【請求項2】

複数の検量機構を、それぞれの複数の捕捉抗体機構上に印刷することを更に含み、前記複数の検量機構が、前記捕捉抗体機構に結合することができる少なくとも2種の異なる濃度の抗原を含有する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記試料を前記試験基板の同じ前記ウェルに添加するのに先立って、

前記印刷された試験基板をインキュベートすることと、

前記試験基板にブロッキング材料を加えることと、

前記印刷された試験基板を乾燥させることと、

前記印刷された試験基板を、使用又は保存のために処理することと、
を更に含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記方法が、生化学的分析を実行するために使用される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記捕捉抗体機構に結合することができる前記検量機構が抗原である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

酵素結合免疫吸着測定法で実行される、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

検量線を作製するために、前記捕捉抗体機構に結合することができる前記化合物の前記少なくとも2種の異なる濃度からの前記結果を使用することと、

前記検量線を抗原含有試験試料に結合している捕捉抗体機構の信号と比較することと、

前記試験試料における前記抗原の前記存在及び量を決定することと、

を更に含む、請求項6に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2010年11月17日に出願され、「METHOD OF AND SYSTEM FOR PRINTING IN-WELL CALIBRATION FEATURES」と題された米国特許仮出願第61/414663号の35合衆国法典(U.S.C.)§119(e)の下、利益を主張するものである。

【0002】

本発明は、アッセイ基板の調製に関し、より具体的には、ウェル内検量機構をアッセイ基板上に印刷するための方法及びシステムに関する。

【背景技術】

【0003】

関連技術の説明

アッセイ基板は、その上で様々な化学的及び/又は生物学的分析が実施され得る表面である。アッセイ基板の例としては、マイクロアレイプレート、スライドガラス、及びマイクロタイタープレートが挙げられる。マイクロタイタープレートは、その表面に形成された複数の「ウェル」を有する平板面である。各々のウェルは、その中に様々な材料が配置されて、生物学的分析を実施することが可能な小型試験管として使用され得る。マイクロタイタープレートの1つの例示的使用としては、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)が挙げられ、これは、現代の医療的診断試験技術である。

【0004】

一般的に、ELISAにおいては、捕捉抗体がマイクロタイタープレート内のウェルの底部に印刷される。捕捉抗体は、それに対するアッセイが実施される特定の抗原に関して特異性を有する。分析される試料が、この捕捉抗体を含有するウェルに添加され、捕捉抗体が、試料中に含有される抗原を「捕捉」又は固定化する。次いで検出抗体がウェルに添加され、これがまた抗原に結合し及び/又は抗原と複合体を形成する。次いで更なる材料がウェルに添加され、これが検出抗体によって検出可能な信号を発生させる。例えば、特定の波長の光がウェル上に照射される場合、抗原/抗体複合体は蛍光を発するだろう。試料中の抗原の量は、蛍光の大きさに基づいて推測され得る。別の例において、検出抗体に所定の波長(例えば、400~500nm)内で光を放射させる化合物がウェルに添加され得る。この光は、電荷結合素子(CCD)カメラによって読み取られ、放射された光の光学的輝度を測定することができる。

【0005】

10

20

30

40

50

E L I S A の過程中には、ウェルの吸光度、蛍光、又は電気化学的信号が測定され得、試料抗原の存在及び量をより正確に決定するために、標準と比較され得る。例えば、抗原の既知の濃度を有する検量機構が、抗原含有の患者試料を受容するウェルとは離れたウェルに配置されることが可能である。しかしながら、異なるウェルにおける蛍光の可変性などの信号の可変性が、個々のウェルからの結果を比較する上での精度を低減させる可能性がある。

【 0 0 0 6 】

したがって、医療的診断試験技術及び他の生化学的分析における精度及び信頼性を提供しあつ改善するための方法及びシステムへの要求が存在する。

【図面の簡単な説明】

10

【 0 0 0 7 】

【図 1 A - 1 B】マイクロタイタープレート内の 2 つのウェルの断面図及び上面図をそれぞれ示す。

【図 2 A - 2 C】E L I S A を実行する既知の方法の過程中的マイクロタイタープレート内の 1 つのウェルの一連の断面図を示す。

【図 3】いくつかの実施形態によるウェル内検量機構を調製するための方法を示す。

【図 4 A - 4 C】いくつかの実施形態による E L I S A を実行する方法の過程中的マイクロタイタープレート内の 1 つのウェルの一連の断面図を示す。

【図 5】いくつかの実施形態による多くの印刷された機構を有するマイクロタイタープレート内の 1 つのウェルの断面図を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【 0 0 0 8 】

図 1 A は、マイクロタイタープレート 1 0 0 内の 2 つのウェルの断面図の図説を示す。1 つの例示的実装において、ウェル基板は、ポリスチレン基部 1 0 5 から形成される。他の可能性がある基板材料としては、ニトロセルロース、ガラス、及び他の可塑性材料が挙げられるが、これらに限定されない。図 1 B は、マイクロタイタープレート 1 0 0 内の 2 つのウェルの上面図の図説である。生化学的分析における使用のためのマイクロタイタープレートの調製中に、多くの異なる捕捉抗体「機構」1 1 0 が、ウェル内に印刷され、ポリスチレン基部 1 0 5 に付着する。本明細書で使用する場合、「機構」は、異なる形状、例えば丸形形状などを有することができる。このアッセイ基板は、例えば、9 6 - ウェルのマイクロタイタープレートであることができる。この機構は、例えば、直径で約 3 0 0 μm ~ 約 5 0 0 μm であり得る。

30

【 0 0 0 9 】

図 2 A ~ C は、E L I S A を実行する既知の方法の過程中的ウェル 2 0 5 の一連の断面図 2 0 0 を示す。捕捉抗体機構 2 1 0 がウェル 2 0 5 の底部に印刷された後に、プレート 2 0 0 上に残留するプレート結合部位 2 1 5 を遮断するために、プロッキング材料が添加される。これが、誤った読み取りをもたらす可能性がある、E L I S A 中での試料抗原のウェルの基部への非選択的結合を抑制する。第 2 に、抗原含有試料がウェルに添加される。図 2 B は、捕捉抗体機構 2 1 0 に結合する抗原 2 2 0 を示す。第 3 に、このウェルが、未結合抗体が除去されるように、洗浄される。第 4 に、酵素結合検出抗体が添加される。図 2 C は、抗原 2 2 0 に結合している酵素結合検出抗体 2 3 0 を示す。次いで、このウェルが、未結合抗体 - 酵素複合体が除去されるよう洗浄される。次に、酵素を、色、蛍光、又は電気化学的信号などの検出可能な信号に変換する物質が加えられる。最後に、ウェルの吸光度、蛍光、又は電気化学的信号が測定され、標準と比較され、試料抗原の存在及び量を決定する。標準は、患者試料を受容するウェルから離れているウェル内に抗原の既知濃度を有する検量機構を印刷することによって生成され得る。

40

【 0 0 1 0 】

このようなアプローチは、標準結果と、異なるウェルからの試料結果を比較することを伴う。蛍光可変性などの信号可変性並びに別個のウェルにおけるウェル間の可変性は、試験結果の精度及び信頼性を低減させる可能性がある。

50

【0011】

1つの例示的実施形態では、図4Aは2つの捕捉抗体機構410及び420並びに捕捉抗体機構420の上部に印刷された検量機構430を備える1つのプレートウェルの断面図を示す。この検量機構430は、抗原含有試料に結合する捕捉抗体機構410と同一のウェル内にある。図3は、いくつかの実施形態によるマイクロタイプレート上にウェル内検量機構を印刷する方法300を示す。方法300は、抗原の既知量を備える検量機構を抗原含有試料に結合する捕捉抗体機構と同一のウェル内に印刷することによって、信号可変性及びウェル間の可変性から生じ得る不正確さを低減又は排除する。方法300はアッセイ結果の変動を低減するだけではなく、プレートの全てのウェルが患者試料を分析するよう使用され得るので、処理能力も増加させる。

10

【0012】

好適な試料としては、例えば、細胞溶解液、細胞上清液、血漿、血清、又は他の生物学的体液などのプロテオミクス試料が挙げられる。本明細書で使用する場合、「ターゲットプレート」とは、分析の特定のセットのために調製される（例えば、印刷され、遮断され、及び後の使用のために処理される）プレートである。「ソースプレート」とは、ターゲットプレート上に印刷される材料の供給源を有するプレートである。例えば、ソースプレートのウェルは、ターゲットプレート上に印刷される種々のタイプの抗体で充填され得る。方法300によると、ソースプレートは、印刷プロセスのために調製される（工程310）。これは、ソースプレートのウェルを、ターゲットプレート上に印刷される所望の材料で充填することを含むことができる。次に、ターゲットプレートが印刷用に調製される（工程320）。これは、印刷される材料がプレートウェルの底部表面に適切に付着することを可能にすることを含むことができる。

20

【0013】

次いでソース及びターゲットプレートが印刷装置（例えば、Billerica, MAのAuson Biosystems, Inc.から入手可能な2470 Arrayer）内に固定される（工程330）。捕捉抗体機構が、ターゲットプレートのウェル内で印刷される（工程340）。次に、抗原の既知濃度を備える検量機構が、捕捉抗体機構上に正確に印刷される（工程350）。抗原の既知濃度は、ミリリットル当たりフェムトグラム（10 - 15 g）のオーダーからミリリットル当たりミリグラム（10 - 3 g）の範囲である。2470 Arrayerを使用する実装は、アレイヤーのピンサイズとは無関係に、捕捉抗体機構上への検量機構の正確な印刷を達成できることによって、検量機構の外側縁部と捕捉抗体機構の外側縁部との間の位置合わせ不良は4 μm以下である。本発明の他の実装は、機構の寸法に応じて、約4 μmを超える検量機構の外側縁部と捕捉抗体機構の外側縁部との間の位置合わせ不良を容認する。例えば、印刷機能が、直径で約120 μm ~ 約240 μmの範囲である場合、約10 μmの検量機構の外側縁部と捕捉抗体機構の外側縁部との間の位置合わせ不良が容認され得る。

30

【0014】

上述されたように、図4Aは、2つの捕捉抗体機構410及び420と捕捉抗体機構420上に印刷された1つの検量機構430とを有する1つのプレートウェルの断面図を示す。この検量機構430は、抗原含有試料に結合する捕捉抗体機構410と同一のウェル内にある。

40

【0015】

印刷されたターゲットプレートが、所定の時間インキュベートされ（工程360）、捕捉抗体と反応しないプロッキング材料が、既知の方法を用いて、ターゲットプレートに加えられる（工程370）。このプロッキング材料は、プレートの残りの結合表面に吸着し、非特異的相互作用の抗原に結合することによって、バックグラウンド信号を減らす。次いで、印刷されたターゲットプレートが乾燥される（工程380）。1つの例示的実装において、2010年8月11日に出願され、「Method of and System for Applying Blocking Material to Assa

50

y Substrates」と題された米国特許出願第61/372,552号（その内容が、参照によりその全体を本明細書に組み込まれる）に記載されるようにプロッキング材料溶液が、噴霧プロセスを介して、マイクロタイタープレート内の複数のウェルの底部の表面に加えられる。

【0016】

噴霧工程中に、エアーブラシ（例えば、Paasche Talon モデル TG0210）を使用して、プロッキング材料をプレートのウェルの底部表面に加える。噴霧工程中に、約10mlのプロッキング材料溶液が、プレートの表面全体に噴霧される。プロッキング材料は、圧縮空気源、例えば、約138kPa（20psig）の圧力で、清浄かつ乾燥した空気を供給する標準空気圧縮機などの圧縮された空気源によって推進される。エアーブラシの流速は、約10ml/分にセットされる。プロッキング材料の適用は、プロッキング材料のマイクロタイターウェルへの添加中の機構の形態異常及び／又はトッピングを低減又は排除する。本明細書に説明される噴霧プロセスにより調製されたプレートは、優れた機構均一性を有する。

【0017】

いくつかの実施形態において、エアーブラシのノズルは、プレートの表面から約15cm（6インチ）で配置され、ノズルをプレートの表面に対して垂直に維持しながら、エアーブラシがプレートの表面全体にわたって掃引される。言い換えれば、スプレーパターンの中心が、プレートの表面に対して本質的に垂直である。噴霧は、少なくともウェル内のプロッキング材料のレベルが印刷された機構530を覆うまで継続される。プロッキング材料のレベルが達成された後に、噴霧プロセスを継続することによって、追加のプロッキング材料が添加されることも可能であり、又は必要に応じて、本明細書に記載されるように、マイクロピペットを介してプロッキング材料が添加されることも可能である。

【0018】

本明細書に記載されるようなプロッキング材料の適用は、手によって加えられることができる。いくつかの実装では、プロッキング材料は自動化された機械によって加えられ得る。例えば、印刷し、インキュベートし、及び乾燥させた後に、プレートが、その上部に1つ以上のスプレーノズルが装備されているコンベヤー上に配置されることができる。コンベヤーの速度は、1つ以上のノズルのスプレーパターン内のプレートの適切な滞留時間を確保するよう制御され得る。例えば、全てのノズルの総流速が約10ml/分であれば、コンベヤー速度は、プレートの表面の少なくとも一部が1分の間スプレー下にあることをもたらすよう制御され得る。別の例示的実装において、プレートは固定位置に保持されることができ、自動アームが1つ以上のスプレーノズルをプレートの表面の上部に向けることができる。

【0019】

本明細書で提供される特定の操作パラメータは、単に例示的なものであり、他の数値も本発明の範囲内に含まれる。例えば、プロッキング材料の流速は、5～20ml/分の間で変化することが可能であり、エアーブラシフローノズルとプレートの表面との間の距離は、2～41cm（1～16インチ）の間で変化すること可能であり、並びに空気圧は34～207kPa（5～30psig）の間で変化することが可能である。これら範囲は単に例示的なものであり、限定することを意図するものではないことを理解されたい。

【0020】

次いで、ターゲットプレートが、既知の方法を使用して、使用または保存のために処理される（工程390）。例えば、ターゲットプレートは、約4で一晩インキュベートされ得る。あるいは、過剰のプロッキング材料（例えば、ウェルの底部に結合されなかったプロッキング材料）がターゲットプレートから除去され、このプレートが次いで乾燥され、次いで、このプレートが保存用に防湿包装内に配置され得る。開示されたウェル内検量機構を印刷する方法は、抗原含有試料に結合する捕捉抗体機構からは別個のウェルで印刷された検量機構を有することから生じる得る不正確さを低減又は排除する。開示された方法はまた、プレートの全てのウェルが患者の試料を分析するよう使用され得るので、処理

10

20

30

40

50

能力も増加させる。

【0021】

次いで、ウェル内検量機構を有するプレートは、ELISAなどの化学的及び／又は生物学的分析を実行するよう使用されることができる。図4Bは、抗原含有試料が添加された後、並びに患者の抗原440が捕捉抗体410に結合する際のウェルの断面図を示す。次に、酵素結合検出抗体がウェルに添加される。図4Cは、抗原440に結合している酵素結合検出抗体450と、検量機構430とを示す。化学発光基質溶液などの物質が加えられ、酵素を検出可能な信号に変換する。最後に、信号が測定され、当該技術分野で既知の方法を使用して、試料抗原の存在及び量が決定される。

【0022】

別の例示的実施形態において、2つ又はそれ以上の捕捉抗体機構がそれぞれのウェルに印刷されることが可能であり、変化する抗原の濃度の1つ以上の検量機構がそれぞれのウェルに印刷されることが可能である。図5は、ウェル505の底部で印刷された捕捉抗体機構510及び520を備える1つのプレートの断面図を示す。変化する抗原の濃度を有する5つの検量機構530が、捕捉抗体機構520の上部に正確に印刷される。変化する抗原の濃度を有する一連の検量機構は、標準曲線を作製するために使用され得る。検量機構の変化する濃度が既知であることで、この機構は既知の濃度に関して強度が変化する検出可能な信号を生成する。標準曲線は、抗原含有試験試料に結合する捕捉抗体機構の信号と比較されて、試料抗原の存在及び量を決定することができる。開示された方法は、抗原含有試験試料に結合する捕捉抗体機構からは別個のウェル内で印刷された一連の検量機構を有するものから生じ得る不正確さを低減又は排除する。これはまた、増大した処理能力並びにアッセイ及び他の分析の効率ももたらす。

【0023】

上記で提供された特定の操作パラメータは単に例示的なものであり、他の数値は本発明の範囲内に含まれる。

【0024】

アッセイの結果を読み取るための環境指示薬又はソフトウェアなどの関連する器具又は試薬の任意の組み合わせと共に上記装置を組み込むキットが作製され得る。

【0025】

上記の実施形態は、自己免疫疾患を有する患者などの患者における抗原及びタンパク質の存在、ウィルス性疾患に対する抗体、細菌性疾患に対する抗体、アレルギー反応に対する抗体、又は癌に対する抗体の存在を検出するよう使用され得る。

【0026】

本明細書で使用される用語及び表現は、説明のための用語であり、限定するものではない。このような用語及び表現の使用においては、表示され又は説明された特徴の等価物、又はその一部分を除外することを意図しておらず、様々な変更が、請求されている本発明の範囲内で可能であることが認識されるべきである。

【図 1 A】

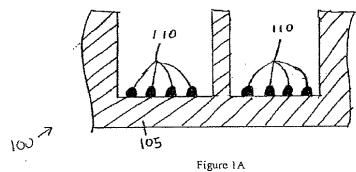


Figure 1A

【図 1 B】

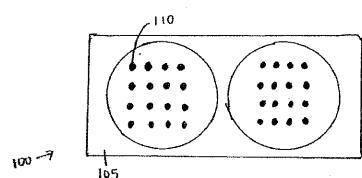
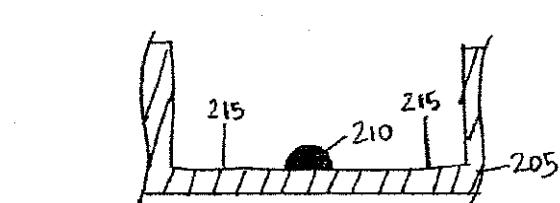


Figure 1B

【図 2 A】



200

Figure 2A

【図 2 B】

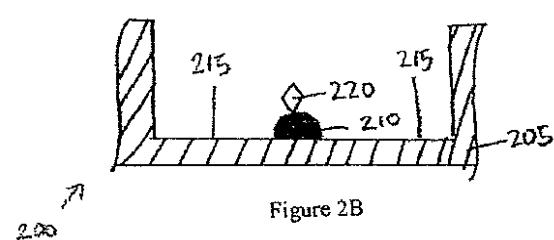


Figure 2B

【図 2 C】

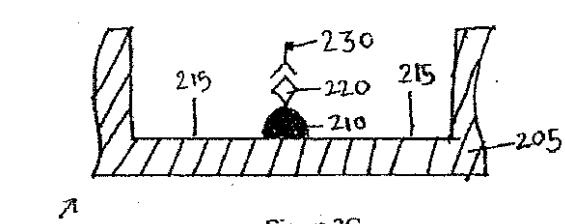


Figure 2C

【図 3】

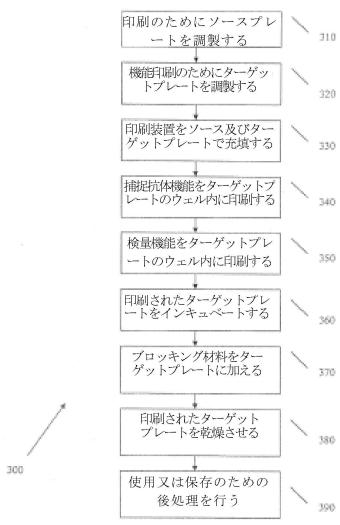


図 3

【図 4 B】

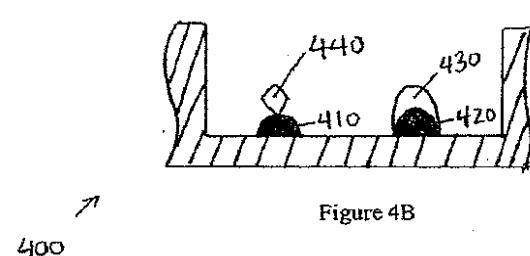


Figure 4B

【図 4 C】

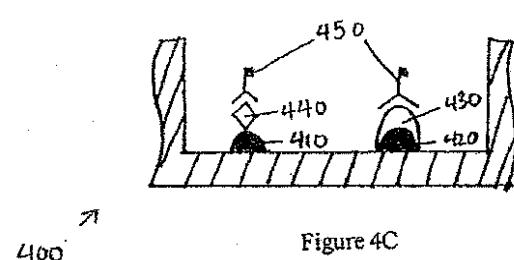


Figure 4C

【図 4 A】

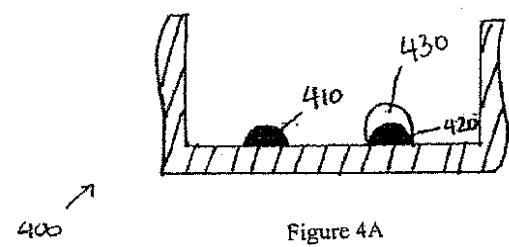
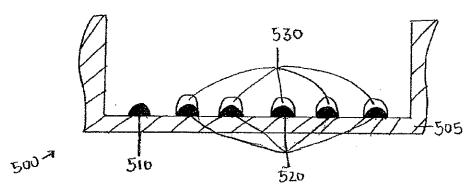


Figure 4A

【図5】



フロントページの続き

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 国際公開第2010/075632 (WO, A1)

特表2007-505326 (JP, A)

米国特許出願公開第2004/0265923 (US, A1)

特表2008-527333 (JP, A)

特表2009-519450 (JP, A)

特表2012-514184 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98