

(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2005-504988

(P2005-504988A)

(43) 公表日 平成17年2月17日(2005.2.17)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543 5 2 1	
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 D	
	GO 1 N 33/53 N	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2003-534908 (P2003-534908)	(71) 出願人	598053215
(86) (22) 出願日	平成14年10月10日 (2002.10.10)		ランドックス・ラボラトリーズ・リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月9日 (2004.4.9)		RAN DOX LABORATORIES LTD.
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/004593		イギリス、ノーザン・アイルランド、ピーティ29・4キューワイ、カウンティ・アントリム、クラムリン、ダイヤモンド・ロード、アードモア
(87) 国際公開番号	W02003/031976	(74) 代理人	100086405
(87) 国際公開日	平成15年4月17日 (2003.4.17)		弁理士 河宮 治
(31) 優先権主張番号	0124338.5	(74) 代理人	100101454
(32) 優先日	平成13年10月10日 (2001.10.10)		弁理士 山田 卓二
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 較正マイクロアレイ

(57) 【要約】

本発明は、検量システムの正確性を改善するために、内部検量線をマイクロアレイの一部として用いることができるという認識に基づいている。内部検量線により、1つのマイクロアレイ内でアレイを検量すると同時に、サンプル中の標的アナライトの未知の濃度を特定することができる。

本発明の第1の態様によれば、支持材は、離散的な複数の第1の反応領域アレイであって、それぞれが固定化された第1のアナライトまたは第1のアナライトに対する親和性を有する分子を含む第1の反応領域アレイと、異なる既知濃度の第2のアナライトを含む一連の第2の反応領域と、を備える。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

支持材であって、
 離散的な複数の第 1 の反応領域アレイであって、それぞれが固定化された第 1 のアナライ
 トまたは第 1 のアナライトに対する親和性を有するリガンドを含む第 1 の反応領域アレイ
 と、
 支持材に固定化された異なる既知濃度の第 2 のアナライトを含む一連の第 2 の反応領域と
 、を備えたことを特徴とする支持材。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の支持材であって、
 第 1 および第 2 のアナライトは、抗原または抗体であることを特徴とする支持材。

10

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の支持材であって、
 第 2 のアナライトは、共有結合により支持材に固定化されたことを特徴とする支持材。

【請求項 4】

請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 に記載の支持材であって、
 第 2 のアナライトは、たんぱく質または抗体に結合可能なペプチドであることを特徴とす
 る支持材。

【請求項 5】

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 に記載の支持材であって、
 支持材は、約 1 cm^2 であることを特徴とする支持材。

20

【請求項 6】

請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 に記載の支持材であって、
 第 2 のアナライトの濃度は、 $2 \times 10^{-4} \text{ ng}$ から 40 ng であることを特徴とする支持
 材。

【請求項 7】

請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 に記載の支持材であって、
 3 ないし 20 個の第 2 の反応領域があることを特徴とする支持材。

【請求項 8】

請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 に記載の支持材であって、
 5 ないし 15 個の第 2 の反応領域があることを特徴とする支持材。

30

【請求項 9】

請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 に記載の支持材であって、
 7 ないし 10 個の第 2 の反応領域があることを特徴とする支持材。

【請求項 10】

請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 に記載の支持材の上で第 2 の反応領域を内部検量制御とし
 て使用する方法。

【請求項 11】

第 1 のアナライトとマイクロアレイデバイス上に固定化された第 1 のリガンドとの結合の
 検出を改良する方法であって、
 異なる既知濃度の第 2 のアナライトを含むマイクロアレイデバイス上の一連の反応領域を
 用いて、検出を検量するステップを有することを特徴とする方法。

40

【請求項 12】

サンプル中の第 1 のアナライトの量を測定する分析方法であって、
 (i) 第 1 のアナライトに対する親和性を有する第 1 のリガンドを含む 1 つまたはそれ以
 上の反応領域と、異なる既知濃度を有する固定化された第 2 のアナライトを含む一連の第
 2 の反応領域と、を備えたデバイスにサンプルを接触させるステップと、
 (i i) 結合しないすべての第 1 のアナライトを取り除くステップと、
 (i i i) 検出可能に標識され、第 1 のアナライトに対する親和性を有する第 2 のリガン
 ドを含むデバイスと、第 2 のアナライトに対する親和性を有する第 3 のリガンドとを接触

50

させるステップと、

(i v) 結合しない第 2 および第 3 のアナライトを取り除くステップと、

(v) 支持材に結合した第 2 および第 3 のリガンドを測定するステップと、を有し、第 3 のリガンドの測定結果を用いて、検量線を決定し、サンプル中に存在する第 1 のアナライトの量を特定することを特徴とする方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の方法であって、

このデバイスは、請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 に記載の支持材であることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、診断的分析法、とりわけ定量的な免疫学的測定法(イムノアッセイ)で用いられるマイクロアレイの機能を改善する方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

免疫学的測定法とは、リガンド結合分析法であって、アナライトの特定の結合領域に対する抗体の特異的な認識を利用している。免疫学的測定法は、通常、リガンド(抗体、他のたんぱく質、ハプテンなど)を固相(支持材)に固定化させることを含み、これは、特定すべきアナライトにより認識される。特異的に標識された検出剤を用いることにより、水性サンプル中のアナライトを検出し、定量化することができる。サンプル中に存在するアナライト量は、結合した標識検出剤の関数であって、競合アッセイに反比例し、非競合アッセイに正比例する。

【0003】

さまざまな免疫学的測定法が報告されており、このときリガンドを含む固相は、プラスチックチューブ(米国特許第 3,646,346号)、ディスク(J. Lab. および Clin. Med 70: 820,1967)、多孔質支持材(米国特許第 4,708,932号および米国特許第 4,459,360号)、およびビーズ(Clin Chem. 37: 1521, 1991)である。これらのシステムにおけるアナライトの定量化は、個々の外部の検量線、すなわち個々の固相ユニット中にある各アナライトの濃度を決定することにより実現される。特定のアナライトを測定する必要がある場合に、サンプルの実験を制御するために、検量線が記録され、利用される。

【0004】

マイクロアレイに基づいた技術により、複数のアナライトを特定することの意義について、現在広く認識されつつある。これらのシステムによれば、より柔軟性に富み、汎用性が高く、収量および感度が良好である。複数のリガンドを支持材の表面上に配設することができ、それぞれは一定少量(p1またはn1)の個別の離散的なテスト領域(DTR)を構成し、1つのサンプルにおける複数のアナライトの同時の複合的な検出および定量化を実現することができる。分析に必要なサンプルの量は、同様に、実質的に低減させることができる。

【0005】

英国特許公開公報第 2 3 2 4 8 6 6 号は、免疫学的測定法で用いられる好適なマイクロアレイを開示している。

【0006】

(発明の要約)

本発明は、検量システムの正確性を改善するために、内部検量線をマイクロアレイの一部として用いることができるという認識に基づいている。内部検量線により、1つのマイクロアレイ内でアレイを検量すると同時に、サンプル中の標的アナライトの未知の濃度を特定することができる。

【0007】

10

20

30

40

50

本発明の第1の態様によれば、支持材は、離散的な複数の第1の反応領域アレイであって、それぞれが固定化された第1のアナライトまたは第1のアナライトに対する親和性を有する分子を含む第1の反応領域アレイと、異なる既知濃度の第2のアナライトを含む一連の第2の反応領域と、を備える。

【0008】

異なる既知濃度の第2のアナライトを含む一連の第2の反応領域により、検量線を確立することができる。これを用いて、第1の反応領域上で起こる反応を定量化することができる。

【0009】

本発明の第2の態様によれば、サンプル中の第1のアナライトの量を測定する分析方法は

(i) 第1のアナライトに対する親和性を有する第1のリガンドを含む1つまたはそれ以上の反応領域と、異なる既知濃度を有する固定化された第2のアナライトを含む一連の第2の反応領域と、を備えたデバイスにサンプルを接触させるステップと、

(ii) 結合しないすべての第1のアナライトを取り除くステップと、

(iii) 検出可能に標識され、第1のアナライトに対する親和性を有する第2のリガンドを含むデバイスと、第2のアナライトに対する親和性を有する第3のリガンドとを接触させるステップと、

(iv) 結合しない第2および第3のアナライトを取り除くステップと、

(v) 支持材に結合した第2および第3のリガンドを測定するステップと、を有し、第3のリガンドの測定結果を用いて、検量線を決定し、サンプル中に存在する第1のアナライトの量を特定する。第1および第2のアナライトは、同じであってもよいし、異なってもよい。

【0010】

本発明の第3の態様によれば、第1のアナライトとマイクロアレイデバイス上に固定化された第1のリガンドとの結合の検出を改良する方法は、異なる既知濃度の第2のアナライトを含むマイクロアレイデバイス上の一連の反応領域を用いて、検出を検量するステップを有する。

【0011】

本発明の第4の態様によれば、一連の反応領域が支持材上に配設され、反応領域は、アナライトの異なる既知濃度を含み、これを用いて、結合アッセイ中の内部検量が制御される。

【0012】

本発明によれば、簡易的で、便利で、有効な手法で、結合アッセイの検量を制御することができる。生物学的サンプル中の標的アナライトの存在を検出するために用いられる支持材と同じ支持材上に、検量制御反応を配置することにより、個別の支持材に対する必要性を低減し、すべての反応を同時に開始することができる。

【0013】

(発明の説明)

図面を参照しながら本発明を説明する。

本発明は、従来式のマイクロアレイデバイスを利用する。これらは、通常、シリコン、プラスチック、セラミック、またはガラスなどの適当な支持材料を有し、その上に個別の反応領域が設けられ、各領域は固定化アナライト(検体、被分析物)を含む。適当なデバイスが英国特許公開公報第2324866号に開示されており、その内容が参考としてここに一体に統合される。

【0014】

本発明で用いられる支持材料は、任意の適当な寸法または形状を有し、好適には 2 cm^2 未満で、より好適には約 1 cm^2 未満である。個々の反応領域を従来式の手法で配置してもよい。反応領域は、 $200\text{ }\mu\text{m}$ 未満、より好適には $100\text{ }\mu\text{m}$ 未満、最も好適には $10\text{ }\mu\text{m}$ ～ $15\text{ }\mu\text{m}$ だけ離間している。支持材料は、好適には、平坦な平面表面を有し、その上に

アナライトが固定化される。

【0015】

アナライトは、従来式の手段を用いて、材料表面上に固定化してもよい。共有結合的な固定化が好ましい。同様に、受動的な吸着作用を用いてもよいが、この形態による固定化は、pH、温度、およびイオン強度の変化に対して影響を受けやすく、いくつかの例において、結合力の弱い分子が培養および洗浄ステップ中に放出されることがあり、再現性に劣ることがある。固定化処理された後は、当然に、分子は最大の活性を有することが好ましい。

【0016】

一般に、所定の条件下で活性化できる化学反応するリンカ分子を用いるなど、従来式の手法を用いて、共有結合的な固定化を実現することができる。好適なリンカ分子の具体例は、英国特許公開公報第2324866号に開示されている。

【0017】

検量システムにおいて用いられるアナライトは、アッセイ中のテストサンプルから特定すべきものと同じものであってもよいし、異なってもよい。アナライトは、特定のリガンドに対して親和性を有する任意の分子であってもよい。アナライトは、例えば、DNA、RNA、または機能的類似体などのポリヌクレオチドであってもよい。択一的には、例えば、酵素、抗体、受容体、またはホルモンなどのたんぱく質やペプチドを用いてもよい。また、この分子は、ウィルスまたは有機化合物であってもよい。

【0018】

このデバイスは、好適には、抗体または抗原がアナライトである場合の免疫学的測定法（イムノアッセイ）において用いられる。免疫学的測定技術は、当業者により広く用いられ、これらを実現する方法は、明らかである。この文脈において、マイクロアレイは、検量システムを形成する既知濃度のアナライトを含む一連の（第2の）反応領域と、標的サンプル中に存在するアナライトに対して親和性を有する固定化リガンドを含む一連の（第1の）反応領域と、を有する。

【0019】

固定化されたリガンドは、例えば、特定の抗体、抗原、またはテストサンプル中のアナライトにより標的とされた特定の酵素であってもよい。これらのすべては、従来式の技術に基づいて、当業者にとって自明である。

【0020】

テストサンプル中のアナライトの検出、および/または検量システムの検出は、検出可能に標識され、アナライトに対する親和性を有する別のリガンドを追加することにより、実現される。例えば、アナライトが抗体IgEで、検出リガンドが蛍光ラベルで標識された抗-IgEであってもよい。この検出形態は、従来式の免疫学的測定法で用いられたものと同じものであり、そのステップを実現する手法は当業者にとって明らかである。

【0021】

好適な標識は、従来式の検出システムに基づいて、当業者に明らかなものである。例えば、ラベルは、蛍光、化学ルミネセンス、比色定量分析、または生物発光ルミネセンスであってもよい。

【0022】

それぞれのデバイスは、既知量の異なるアナライトを含む一連の個別の反応領域を有する。これを用いて、内部検量線が得られる。

【0023】

この文脈において、本発明で用いる上で必要な反応領域毎のアナライト濃度は、アナライトなどの特性に依存して、当業者により決定され得る。疑義を払拭するために、検量システムを構成する各反応領域は、同一の支持体上において、同一の流体サンプルと接触しないようにする壁または障壁により分離されない。

【0024】

検量の制御のために用いられるアナライトの濃度範囲は当業者にとって明らかである。濃

10

20

30

40

50

度範囲は、通常、アッセイ中に用いられる固定化アナライトの最大濃度を含む。好適な実施形態において、濃度は、 2×10^{-4} ngないし40 ngの範囲にある。

【0025】

必要な数の反応領域を有するマイクロアレイデバイス上で内部検量を調整することができる。通常、3ないし20個の反応領域が用いられる。好適には4ないし15個、最も好適には4ないし10個の反応領域が用いられる。

【0026】

一連の検量反応領域は、マイクロアレイデバイスの所定位置、通常、特定が容易な1つの角部に配置される。

【0027】

以下の実施例により、本発明を説明する。

【0028】

(実施例1)

<1つのバイオチップ(マイクロアレイ)におけるヒトIgMの上昇濃度の検出>
この実験において、精製ヒトIgMの上昇濃度を含む個別テスト領域(Discrete Test Region DTR)毎に20 n l容量が、pH 9.5で0.5 MのNaClを含む50 mMのカーボネイト緩衝液中のバイオチップに直接的に適用された。適用された濃度範囲は、DTR毎に、0、0.07、0.15、0.30、0.60、1.25、2.5、5、10、20、40 ngが適用された。その後、検定剤、抗ヒトIgMペルオキシダーゼ標識抗体が添加された。トリス緩衝剤、トゥイーン20(Tween20)洗浄剤を含む生理食塩水、および化学ルミネセンス現像液を用いて洗浄するステップの後、ヒトIgMの検量線がバイオチップ上で検出される。図1は、実施例1を示す。グラフ表示(a, b)および視覚的描写(a', b')は、バイオチップ上の精製ヒトIgMの(標準)検量線を示す。a, a'で指定されたものは、GOPS活性化表面を示し、b, b'で指定されたものは、ICPTES活性化表面を示す(英国特許公開出願第2324866号)。相対発光量を縦軸に、DTR毎のng単位の精製ヒトIgM量を横軸にプロットして、このグラフを得た。

【0029】

(実施例2)

<1つのバイオチップにおけるヒトIgMの上昇濃度の検出>
この実験においては、精製ヒトIgMの増大濃度を含む、DTR毎に10 n lの容量が、pH 9.5で0.5 MのNaClを含む50 mMのカーボネイト緩衝液中のバイオチップに直接的に適用された。適用された濃度範囲は、DTR毎に、0、0.042、0.085、0.17、0.34、0.68、1.36、5.46、10.92、21.85 ngが適用された。TBSTおよび化学ルミネセンス現像液による洗浄ステップの後、検定剤、抗ヒトIgGペルオキシダーゼ標識抗体を添加して、バイオチップ上のヒトIgGの検量線を得た。

【0030】

図2は、実施例2の結果を示す。

グラフ表示(a)および視覚的描写(a')は、1つのバイオチップ上のGOPS活性化表面における精製ヒトIgGに対する(標準)検量線を示す。

【0031】

(実施例3)

<1つのバイオチップにおけるヒトFSHの上昇濃度の検出>
この実験においては、ヒトFSHの増大濃度を含む、DTR毎に20 n lの容量が、pH 9.5で0.5 MのNaClを含む50 mMのカーボネイト緩衝液中のバイオチップに直接的に適用された。濃度は、0、0.32、0.64、1.28、2.6 mIU/DTRであった。TBSTおよび化学ルミネセンス現像液による洗浄ステップの後、検定剤および抗ヒトFSHペルオキシダーゼ標識抗体を添加すると、ヒトFSHの4つの上昇濃度がバイオチップ上で同時に検出された。図3は、実施例3の結果を示す。

10

20

30

40

50

【0032】

(実施例4)

<バイオチップ上の1列のサンプルに含まれる高精製ヒトIgE検量用試料、総IgE、および特異的IgEの同時検出>

この実験においては、10nLの反応領域の2列がDTRを構成する。第1列は、3つのDTRからなり、特に対象となるアナライト、すなわちピーナッツおよび草木花粉混合物に対する総IgE、および特異的IgEと結合するリガンドを含む。第2列の反応領域は、骨髄腫ヒトIgE検量用試料から精製され、DTR毎に、0、50、200、700、1000、2000IgEkU/Lの増大濃度を有する6つのDTRにより構成される。このリガンドおよびIgE検量用試料は、pH9.5で50mMのカーボネイト緩衝液中のバイオチップに適用された。

10

【0033】

患者のサンプルを培養し、トリス緩衝生理食塩水-トゥイーン20を用いて洗浄した後、検定剤、抗ヒトIgEペルオキシダーゼ標識抗体を添加した。免疫反応が完了した後、非結合反応物を除去するために、他の洗浄ステップを行った。化学ルミネセンス現像液を用いると、マイクロアレイ化されたバイオチップ上において、同時の検定、視覚化(表象化)、検量、および総IgEと特異的IgEの測定することができた。

【0034】

アレルギー患者から総IgEと特異的IgEに対する結果が、この装置を用いて、同時に定量化された。

20

サンプル1：草木花粉およびピーナッツ陽性サンプル：

総IgE：968kU/L

草木花粉IgE：88kU_A/L

ピーナッツIgE：62kU_A/L

サンプル2：ピーナッツ陽性サンプル：

総IgE：717.5kU/L

草木花粉IgE：0kU_A/L

ピーナッツIgE：99.5kU_A/L

サンプル3：草木花粉陽性サンプル：

総IgE：883kU/L

草木花粉IgE：128kU_A/L

ピーナッツIgE：0kU_A/L

サンプル4：樹木花粉陽性サンプル：

総IgE：415kU/L

草木花粉IgE：0kU_A/L

ピーナッツIgE：0kU_A/L

図4は、実施例4の結果を示す。

30

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、マイクロアレイ上に存在するIgMの測定結果を示すグラフである。

40

【図2】図2は、マイクロアレイ上に存在するIgGの測定結果を示すグラフである。

【図3】図3は、マイクロアレイ上に存在する卵胞刺激ホルモンの測定結果を示すグラフである。

【図4】図4は、草木花粉およびピーナッツ(a/a')、ピーナッツ(b/b')、草木花粉(c/c')および樹木花粉(d/d')に関するIgEの測定結果を示すグラフであって、水平軸がDTR毎のkU/L単位のIgE濃度を示し、垂直軸が相対発光量(RLU)を示す。

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 April 2003 (17.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/031976 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/543 (74) Agent: GILL JENNINGS & EVERY; Broadgate House, 7 Fildon Street, London EC2M 7LH (GB).
- (21) International Application Number: PCT/GB02/04593
- (22) International Filing Date: 10 October 2002 (10.10.2002) (81) Designated States (national): AU, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0124358.5 10 October 2001 (10.10.2001) GB (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GR, GB, GR, IB, IT, LI, MC, NI, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (for all designated States except US): RAN-DOX LABORATORIES LTD, [GB/GB]; Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim BT29 4QY (IE).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): LAMONT, John, Victor [GB/GB]; Randox Laboratories Ltd., Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim BT29 4QY (IE); MCCONNELL, Robert, Ivan [GB/GB]; Randox Laboratories Ltd., Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim BT29 4QY (IE); FITZGERALD, Stephen, Peter [GB/GB]; Randox Laboratories Ltd., Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim BT29 4QY (IE); RODRIGUEZ, Maria, Luz [ES/GB]; Randox Laboratories Ltd., Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim BT29 4QY (IE).
- Published:**
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 03/031976 A2

(54) Title: CALIBRATING MICROARRAYS

(57) Abstract: An assay for measuring the amount of a first analyte in a sample, comprises the steps of: (i) contacting the sample with a device that comprises one or more first reaction sites which comprise a first ligand having affinity for the first analyte, and a series of second reaction sites each comprising different known concentrations of an immobilised second analyte; (ii) removing any unbound first analyte; (iii) contacting the device with a second ligand that is detectably labelled and which has affinity for the first analyte, and a third ligand that is detectably labelled and which has affinity for the second analyte; (iv) removing any unbound second and third ligands; and (v) measuring the amount of second and third ligands, wherein measurement of the third ligand is used to establish a calibration curve, used to determine the amount of first analyte present in sample.

WO 03/031976

PCT/GB02/04593

1

CALIBRATING MICROARRAYSField of the Invention

The present invention relates to improving the performance of microarrays in diagnostic assays, in particular for microarrays used in quantitative immunoassays.

5 Background of the Invention

Immunoassays are ligand binding assays where the specific recognition of an antibody to the specific binding site of an analyte is exploited. The immunoassays usually involve the immobilisation of a ligand (antibody, other protein, hapten etc.) to a solid phase (support material) that will, in turn, be recognised by the analyte to be
10 determined. The use of specific labelled detecting agents allows the subsequent detection and quantitation of the analyte in an aqueous sample. The amount of analyte present in the sample is a function of the bound labelled detecting agent: inversely proportional in competitive assays and directly proportional in noncompetitive assays.

Different immunoassays have been reported in which the solid phase that
15 contains the ligands are plastic tubes (US 3,646,346), discs (J. Lab. and Clin. Med., 70: 820, 1967), porous supports (US 4,708, 932, US 4,459,360) and beads (Clin Chem. 37: 1521, 1991). The quantitation of analyte in these systems is carried out by the construction of individual external calibration curves; the concentration of each analyte being in a separate solid phase unit. These calibration curves may be stored and
20 used to control runs of samples in which a particular analyte has to be measured.

There is now a growing awareness of the advantages of carrying out
multianalyte determination on microarray-based technologies. These systems present greater flexibility and versatility with high throughput and sensitivity. Multiple ligands can be disposed on the surface of the support, each one defining individual discrete test
25 regions (DTRs) of defined small volumes (pl or nl), permitting the simultaneous multiplexed detection and quantitation of multiple analytes in one sample. The amount of sample required per assay is also greatly reduced.

GB-A-2324866 discloses suitable microarrays that may be used in an immunoassay.

WO 03/031976

PCT/GB02/04593

2

Summary of the Invention

The present invention is based on the realisation that an internal calibration system can be used as part of a microarray to improve the accuracy of the detection system. The internal calibration system enables the calibration of an assay to be performed within one microarray while at the same time determining the unknown concentration of a target analyte in a sample.

According to a first aspect of the invention, a support material comprises an array of discrete first reaction sites, each reaction site comprising an immobilised first analyte, or a molecule that has affinity for the first analyte, and a series of second reaction sites with different known concentrations of a second analyte.

The series of reaction sites of different known concentrations allows a calibration curve to be established, which can be used to quantify the reaction occurring on the first reaction sites.

According to a second aspect of the invention, an assay for measuring the amount of a first analyte in a sample comprises the steps of:

- (i) contacting the sample with a device that comprises one or more first reaction sites which comprise a first ligand having affinity for the first analyte, and a series of second reaction sites each comprising different known concentrations of an immobilised second analyte;
- (ii) removing any unbound first analyte;
- (iii) contacting the device with a second ligand that is detectably labelled and which has affinity for the first analyte, and a third ligand that is detectably labelled and which has affinity for the second analyte;
- (iv) removing any unbound second and third ligands; and
- (v) measuring the amount of second and third ligands bound onto the support, wherein

measurement of the third ligand is used to establish a calibration curve, used to determine the amount of first analyte present in the sample. The first and second analytes may be the same or different.

According to a third aspect of the invention, a method for improving the detection of the binding of a first analyte to a first ligand immobilised on a microarray device,

WO 03/031976

PCT/GB02/04593

3

comprises calibrating the detection by means of a series of reaction sites on the microarray device comprising different known concentrations of a second analyte.

According to a fourth aspect of the invention, a series of reaction sites are provided on a support material, the reaction sites comprising different known concentrations of an analyte, and which are used to provide internal calibration control in a binding assay.

The present invention permits a calibration control to be established for a binding assay in a simple, convenient and efficient manner. Placing the calibration control reaction on the same support as used to detect the presence of a target analyte in a biological sample, reduces the need for separate supports and allows all reactions to be initiated together.

Description of the Drawings

The invention is described with reference to the accompanying drawings, where:

Figure 1 is a graphic representation of the measurement of IgM present on a microarray;

Figure 2 is a graphic representation of the measurement of IgG present on a microarray;

Figure 3 is a graphic representation of the measurement of follicle stimulating hormone (FSH) present on a microarray; and

Figure 4 shows graphic representations of the measurement of IgE for each of: grass pollen and peanut (a/a'), peanut (b/b'), grass pollen (c/c) and tree pollen (d/d'), the horizontal axis representing the concentration of IgE in kU/L per DTR, and the vertical axis representing relative light units (RLU).

Description of the Invention

The present invention makes use of conventional microarray devices. These comprise typically a suitable support material, such as silicon, plastics, ceramics or glass, onto which discrete reaction sites are positioned, each comprising an immobilised analyte. Suitable devices are disclosed in GB-A-2324866, the content of which is incorporated herein by reference.

The support material used in the invention may be any suitable size or shape, preferably less than 2cm², more preferably about or less than 1cm². The discrete

WO 03/031976

PCT/GB02/04593

4

reaction sites may be positioned in any conventional way. Preferably, the reaction sites are separated by less than 200 μm , more preferably less than 100 μm , and most preferably 10-15 μm . The support material has preferably a flat, planar surface onto which the analytes are to be immobilised.

5 The analytes may be immobilised on the surface of the material using conventional means. Covalent immobilisation is preferred. Passive adsorption may also be used, but this form of immobilisation is susceptible to changes in pH, temperature and ionic strength, and may in some instances result in release of weakly-bound molecules during incubation and washing steps, thus contributing to poor
10 reproducibility. It is of course desirable that the molecules retain maximum activity, after the immobilisation procedure.

Covalent immobilisation may be carried out using conventional techniques, typically using a chemically-reactive linker molecule, which can be activated under defined conditions. Examples of suitable linker molecules are described in
15 GB-A-2324866.

The analyte that is to be used in the calibration system can be the same or different from that to be determined from a test sample in the assay. The analyte may be any molecule which has affinity for a particular ligand. For example, the analytes may be polynucleotides, e.g. DNA, RNA, or functional analogues thereof.
20 Alternatively, proteins and peptides may be used, e.g. enzymes, antibodies, receptors or hormones. The molecules may also be viruses or organic compounds.

The preferred use of the devices is in immunoassays, where an antibody or antigen is the analyte. Immunoassay techniques are used widely in the art, and methods for carrying them out are apparent. In this context, the microarray will comprise a
25 series of (second) reaction sites with known concentrations of the analyte that forms the calibration system, and a series of (first) reaction sites each comprising an immobilised ligand that has affinity for the analyte present in the target sample.

The immobilised ligand may be, for example, a particular antibody, an allergen or a specific enzyme which is targeted by the analyte in the test sample. All this will
30 be evident to the skilled person based on conventional techniques.

WO 03/031976

PCT/GB02/04593

5

The detection of the analyte in the test sample and/or that of the calibration system is carried out by the separate addition of a further ligand that is detectably labelled and which has affinity for the analyte. For example, the analyte can be the antibody IgE, and the detecting ligand can be an anti-IgE antibody that is labelled with a fluorescent label. This form of detection is the same as that used in conventional immunoassays, and so it will be apparent to the skilled person how to carry these steps out.

Suitable labels will be apparent to the skilled person, based on conventional detection systems. For example, the label may be fluorescent, chemiluminescent, colourimetric or bioluminescent.

Each device will comprise a series of discrete reaction sites that comprise different known amounts of an analyte. This is used to produce an internal calibration curve.

In this context, the concentration of analyte per reaction site necessary for use in the invention can be determined by the skilled person, depending on the nature of the analyte, etc. For the avoidance of doubt, each of the reaction sites that make up the calibration system are on the same support, and are not separated by walls or barriers that prevent the sites being in contact with the same fluid sample.

It will be apparent to the skilled person what range of analyte concentrations should be used for the calibration control. The concentration range will include typically the maximum concentration of immobilised analyte to be used in the assay. In a preferred embodiment, the concentration ranges from 2×10^{-4} ng to 40 ng.

The internal calibration can be set up on the microarray device with as many reaction sites as required. Usually, there will be from 3 to 20 reaction sites that are utilised. Preferably, there will be from 4 to 15, and most preferably from 4 to 10.

The series of calibration reaction sites will be located at a known position on the microarray device, usually in one corner to allow easy identification.

The following Examples illustrate the invention.

Example I

Detection in one biochip (microarray) of ascending concentrations of human IgM.

In this experiment, volumes of 20 nl per Discrete Test Region DTRs containing ascending concentrations of purified human IgM were applied directly to a biochip in 50mM carbonate buffer, pH 9.5, containing 0.5M NaCl. The range of concentrations

WO 03/031976

PCT/GB02/04593

6

applied was 0, 0.07, 0.15, 0.30, 0.60, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 ng per DTR. The detecting agent, antihuman IgM peroxidase-labelled antibody was then added. Following a washing step with Tris buffer, Saline containing Tween 20 detergent, and chemiluminescent development, a calibration curve of human IgM was detected on the biochip. Figure 1 illustrates Example 1. Graphical representation (a,b) and visual depiction (a',b') show the calibration (standard) curves for purified human IgM on one biochip. The designations a, a', represent a GOPS activated surface; and designations b, b', represent an ICPTES activated surface (GB-A-2324866). The graphs were obtained by plotting Relative Light Units (RLU) along the ordinate against the amount of purified IgM in ng per DTR.

10 Example 2

Detection in one biochip of ascending concentrations of human IgG.

In this experiment volumes of 10 nl per DTR containing increasing concentrations of purified human IgG were applied directly to the biochip in 50mM carbonate buffer, pH 9.5, containing 0.5M NaCl. The range of concentrations applied was 0, 0.042, 0.085, 15 0.17, 0.34, 0.68, 1.36, 5.46, 10.92, 21.85 ng per DTR. Addition of the detecting agent, antihuman IgG peroxidase-labelled antibody, followed by a washing step with TBST and chemiluminescent development resulted in a calibration curve for human IgG on the biochip.

Figure 2 illustrates the results of Example 2. Graphical depiction (a) and visual depiction (a') show a calibration (standard) curve for purified human IgG on one biochip in a GOPS-activated surface.

Example 3

Detection in one biochip of ascending concentrations of human FSH

In this experiment volumes of 20 nl per DTR containing increasing concentrations of human FSH were applied directly to the biochip surface in 50mM carbonate buffer, pH 25 9.5, containing 0.5M NaCl. The concentration ranged from 0, 0.32, 0.64, 1.28, 2.6 mIU/DTR. After the addition of the detecting agent, antihuman FSH peroxidase-labelled antibody was added, followed by washing with TBST and chemiluminescent development; the four ascending concentrations of the human FSH were detected simultaneously on the biochip. Figure 3 illustrates the results of Example 3.

30 Example 4

WO 03/031976

PCT/GB02/04593

7

Simultaneous detection in samples of a series of highly purified human IgE calibrators, total IgEs, and specific IgEs on biochips.

In this experiment two series of reaction sites of 10nl define the DTRs. The first series is represented by three DTRs and contains the ligands which bind specifically the analytes of interest: total IgE and specific IgEs to peanuts and a mixture of grass pollens. The second series of reaction sites is defined by six DTRs with increasing concentrations of highly purified from myeloma human IgE calibrators: 0, 50, 200, 700, 1000, 2000 IgE kU/L per DTR. The ligands and the IgE calibrators were applied onto biochips in 50 mM carbonate buffer, pH 9.5.

After incubation with patient samples and washing with Tris buffer saline -Tween 20 (TBST), the detecting agent, antihuman IgE peroxidase-labelled antibody was added. After completion of the immune reaction, other washing steps were performed to remove non-bound reactants.

Chemiluminescent development allowed the simultaneous detection, visualisation, calibration and measurement of total and specific IgEs on microarrayed biochips.

Results for total IgE and specific IgEs from allergic patients were simultaneously quantified with the present device:

Sample 1: grass pollen and peanuts positive sample: total IgE: 968 kU/L, grass pollen IgE: 88 kU_A/L, peanut IgE: 62 kU_A/L.

Sample 2: peanut positive sample : total IgE: 717.5 kU/L, grass pollen IgE: 0, peanut IgE: 99.5 kU_A/L

Sample 3: grass pollen positive sample: total IgE: 883 kU/L, grass pollen IgE: 128 kU_A/L, peanut IgE :0.

Sample 4 : tree pollen positive sample: total IgE: 415 kU/L, grass pollen IgE: 0, peanut IgE: 0.

Figure 4 illustrates the results of Example 4.

WO 03/031976

PCT/GB02/04593

8

CLAIMS

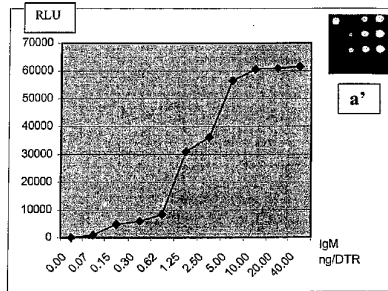
1. A support material comprising an array of discrete first reaction sites, each reaction site comprising an immobilised first analyte or a ligand having affinity for the first analyte, and a series of second reaction sites comprising different known concentrations of a second analyte immobilised on the support.
2. A support according to claim 1, wherein the first or second analyte is an antigen or antibody.
3. A support according to claim 1 or claim 2, wherein the second analyte is immobilised via a covalent linkage to the support.
4. A support according to any preceding claim, wherein the second analyte is a protein or peptide capable of binding to an antibody.
5. A support according to any preceding claim, wherein the support is about 1cm².
6. A support according to any preceding claim, wherein the concentration of the second analyte is from 2 x 10⁻⁴ng to 40ng.
7. A support according to any preceding claim, wherein there are from 3 to 20 second reaction sites.
8. A support according to any preceding claim, wherein there are from 5 to 15 second reaction sites.
9. A support according to any preceding claim, wherein there are from 7 to 10 second reaction sites.
10. Use of the second reaction sites on a support according to any preceding claim, as an internal calibration control.
11. A method for improving the detection of the binding of a first analyte to a first ligand immobilised on a microarray device, comprising calibrating the detection by means of a series of reaction sites on the microarray device, the reaction sites comprising different known concentrations of a second analyte.
12. An assay for measuring the amount of a first analyte in a sample, comprising the steps of:
 - (i) contacting the sample with a device that comprises one or more first reaction sites which comprise a first ligand having affinity for the first analyte, and a series of second reaction sites each comprising different known concentrations of an immobilised second analyte;

WO 03/031976

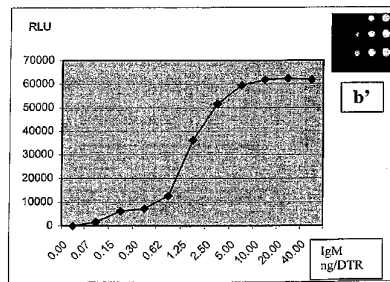
PCT/GB02/04593

9

- (ii) removing any unbound first analyte;
 - (iii) contacting the device with a second ligand that is detectably labelled and which has affinity for the first analyte, and a third ligand that is detectably labelled and which has affinity for the second analyte;
 - 5 (iv) removing any unbound second and third ligands; and
 - (v) measuring the amount of second and third ligands bound to the support, wherein measurement of the third ligand is used to establish a calibration curve, used to determine the amount of first analyte present in the sample.
13. An assay according to claim 12, wherein the device is a support as defined in any
- 10 of claims 1 to 9.



a



b

Figure 1

WO 03/031976

PCT/GB02/04593

2/4

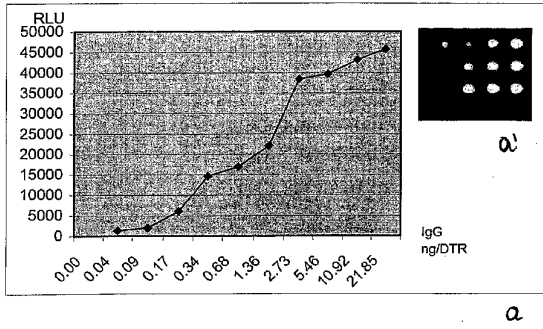


Figure 2

WO 03/031976

PCT/GB02/04593

3/4

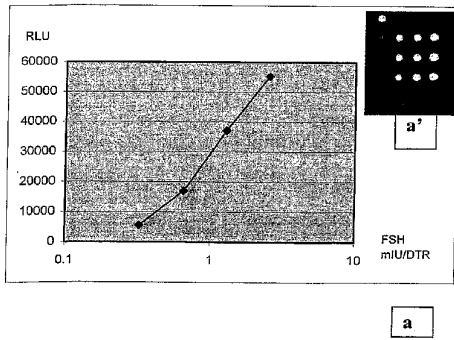


Figure 3

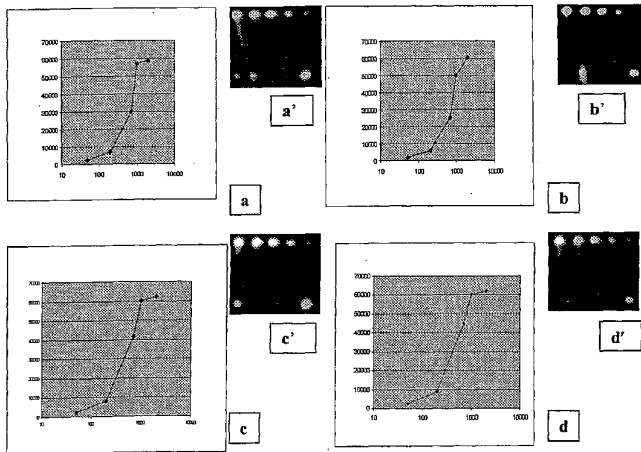


Figure 4

【 国際公開パンフレット (コレクション) 】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 April 2003 (17.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/031976 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/543 (74) Agent: GILL JENNINGS & EVERY; Broadgate House, 7 Fildon Street, London EC2M 7LH (GB).
- (21) International Application Number: PCT/GB02/04593
- (22) International Filing Date: 10 October 2002 (10.10.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0124338.5 10 October 2001 (10.10.2001) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): RAN-
DOX LABORATORIES LTD. [GB/GB]; Ardmore, Dia-
mond Road, Crumlin, Co. Antrim BT29 4QY (IE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): LAMONT, John,
Victor [GB/GB]; Radox Laboratories Ltd., Ardmore,
Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim BT29 4QY (IE);
MCCONNELL, Robert, Ivan [GB/GB]; Radox Lab-
oratories Ltd., Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co.
Antrim BT29 4QY (IE). FITZGERALD, Stephen,
Peter [GB/GB]; Radox Laboratories Ltd., Ardmore,
Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim BT29 4QY (IE);
RODRIGUEZ, Maria, Luz [ES/GB]; Radox Labora-
tories Ltd., Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim
BT29 4QY (IE).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
27 November 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/031976 A3

(54) Title: CALIBRATING MICROARRAYS

(57) Abstract: An assay for measuring the amount of a first analyte in a sample, comprises the steps of: (i) contacting the sample with a device that comprises one or more first reaction sites which comprise a first ligand having affinity for the first analyte, and a series of second reaction sites each comprising different known concentrations of an immobilised second analyte; (ii) removing any unbound first analyte; (iii) contacting the device with a second ligand that is detectably labelled and which has affinity for the first analyte, and a third ligand that is detectably labelled and which has affinity for the second analyte; (iv) removing any unbound second and third ligands; and (v) measuring the amount of second and third ligands, wherein measurement of the third ligand is used to establish a calibration curve, used to determine the amount of first analyte present in sample.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/04593
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 2 324 866 A (RANDOX LAB LTD) 4 November 1998 (1998-11-04) abstract page 12, paragraph 4 examples 1,2 claims 1,19,20	1,10-12
X	WO 01 09607 A (LARGE SCALE PROTEOMICS CORP) 8 February 2001 (2001-02-08) abstract page 41, paragraph 2 claims 1,8-10	1,10-12
A	WO 01 20330 A (TEXAS A & M UNIVERSITY SYST ; CREMER PAUL S (US); YANG TINGLU (US);) 22 March 2001 (2001-03-22) the whole document	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims) 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 July 2003		Date of mailing of the international search report 14/07/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer: Weijland, A

Form PCT/ISA/E10 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No. PCT/GB 02/04593	
Patent document class in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
GB 2324866	A	04-11-1998	AU	713388 B2	02-12-1999
			AU	6198898 A	22-10-1998
			BR	9800655 A	10-08-1999
			CA	2235183 A1	21-10-1998
			CN	1215167 A	28-04-1999
			CZ	9801169 A3	11-11-1998
			EG	22471 A	26-02-2003
			EP	0874242 A1	28-10-1998
			HK	1012202 A1	17-05-2002
			HR	980215 A1	28-02-1999
			HU	9800920 A1	28-10-1998
			JP	10319011 A	04-12-1998
			NO	981766 A	22-10-1998
			NZ	330227 A	28-10-1999
			PL	325914 A1	26-10-1998
			RU	2168174 C2	27-05-2001
			SG	87765 A1	16-04-2002
			SK	51098 A3	04-11-1998
			TR	9800737 A1	23-11-1998
			US	6498010 B1	24-12-2002
ZA	9803345 A	21-04-1999			
WO 0109607	A	08-02-2001	AU	6750200 A	19-02-2001
			CA	2376489 A1	08-02-2001
			EP	1204867 A1	15-05-2002
			JP	2003014750 A	15-01-2003
			JP	2003014751 A	15-01-2003
			JP	2003014752 A	15-01-2003
			JP	2003028868 A	29-01-2003
			JP	2003028879 A	29-01-2003
			JP	2003004738 A	08-01-2003
			JP	2003028869 A	29-01-2003
			JP	2003014753 A	15-01-2003
			JP	2003014754 A	15-01-2003
			JP	2003014755 A	15-01-2003
			JP	2003014756 A	15-01-2003
			JP	2003014757 A	15-01-2003
			JP	2003014758 A	15-01-2003
			JP	2003014759 A	15-01-2003
			JP	2003028870 A	29-01-2003
			WO	0109607 A1	08-02-2001
			US	2003044855 A1	06-03-2003
US	2001012537 A1	09-08-2001			
US	2002015952 A1	07-02-2002			
US	2001041339 A1	15-11-2001			
WO 0120330	A	22-03-2001	AU	3883301 A	17-04-2001
			CA	2385807 A1	22-03-2001
			EP	1218745 A1	03-07-2002
			WO	0120330 A1	22-03-2001

 フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ジョン・ビクター・ラモント

イギリス、ビーティ 29・4 キューワイ、カウンティ・アントリム、クラムリン、ダイヤモンド・ロード、アードモア、ランドックス・ラボラトリーズ・リミテッド

(72) 発明者 ロバート・アイバン・マッコネル

イギリス、ビーティ 29・4 キューワイ、カウンティ・アントリム、クラムリン、ダイヤモンド・ロード、アードモア、ランドックス・ラボラトリーズ・リミテッド

(72) 発明者 スティーブン・ピーター・フィッツジェラルド

イギリス、ビーティ 29・4 キューワイ、カウンティ・アントリム、クラムリン、ダイヤモンド・ロード、アードモア、ランドックス・ラボラトリーズ・リミテッド

(72) 発明者 マリア・ルス・ロドリゲス

イギリス、ビーティ 29・4 キューワイ、カウンティ・アントリム、クラムリン、ダイヤモンド・ロード、アードモア、ランドックス・ラボラトリーズ・リミテッド