

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039044**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.25

(51) Int. Cl. **G01N 33/543** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892164

(22) Дата подачи заявки
2017.03.30

(54) АНТИГЕННЫЙ МАССИВ

(31) **16162859.9**

(32) **2016.03.30**

(33) **EP**

(43) **2019.03.29**

(86) **PCT/EP2017/057481**

(87) **WO 2017/167843 2017.10.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МЭКРОЭРРЭЙ ДИАГНОСТИКС
ГМБХ (АТ)**

(72) Изобретатель:
**Харванегг Кристиан, Миттерер Георг
(АТ)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A1-2004104586
US-A1-2005079592
US-A1-2015177233
US-B1-6268222
US-A1-2002015666

TAIL.W. ET AL.: "An automated microfluidic-based immunoassay cartridge for allergen screening and other multiplexed assays", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC, NEW YORK, vol. 391, no. 2, 15 August 2009 (2009-08-15), pages 98-105, XP026218818, ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/J.AB.2009.05.009 [retrieved on 2009-05-12], the whole document

(57) Изобретение относится к антигенным массивам и способам обнаружения в биологическом образце иммуноглобулинов, специфичных к антигену или антигенам из этого массива. Предлагаемый антигенный массив содержит группы покрытых антигеном гранул, закрепленных на твердом носителе, таком как лист или пластина, где каждая группа включает: (i) гранулы, покрытые одним детектирующим антигеном; или (ii) гранулы, покрытые набором детектирующих антигенов, где детектирующий антиген представляет собой аллерген, маркер инфекции или аутоантиген. Также предлагается способ детектирования иммуноглобулина, специфичного для детектирующего антигена или для набора детектирующих антигенов, где используется антигенный массив изобретения. Данный способ включает инкубацию массива с образцом, затем инкубацию массива с детектирующим реагентом и последующее измерение детектируемого сигнала. Кроме того, в изобретении предложены картриджи, наборы и устройство, содержащие антигенный массив изобретения.

B1

039044

039044

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к антигенным массивам и способам обнаружения в биологическом образце иммуноглобулинов, специфичных для любого из антигенов массива. В частности, изобретение относится к антигенным массивам, содержащим группы покрытых антигеном гранул, закрепленных на твердой подложке. Кроме того, данным документом охватываются картриджи, наборы и устройство, содержащие антигенный массив и способы их применения.

Предшествующий уровень техники

Аллергические заболевания и тесно связанные с ними заболевания, такие как бронхиальная астма, затрагивают четверть населения в промышленно развитых странах. ВОЗ назвала аллергические заболевания серьезной проблемой здравоохранения 21-го века. В настоящее время аллергия I типа затрагивает почти треть населения в промышленно развитых странах. Несмотря на частую безвредность, заболеваемость и тяжесть аллергии возрастают, равно как и прямые и косвенные издержки для общества. Теоретически диагностирование аллергии - простая задача, которая все еще представляет собой проблемы для диагностической отрасли и поставщиков медицинских услуг. Значительный процент пациентов не получает соответствующего диагноза и лечения. Последствиями являются снижение качества жизни, смерти, которые можно было бы предотвратить и, как правило, более высокие затраты на лечение. Чтобы оптимизировать лечение для каждого отдельного пациента, диагноз не может остановиться на идентификации источника аллергена (например, пыльца, животное, пища), но должен углубиться в профиль молекулярной сенсибилизации. Отдельные молекулы аллергенов, вызывающие болезнь, должны быть правильно идентифицированы, поскольку они отвечают за перекрестную реактивность между источниками аллергенов, классификацию рисков (тяжелые реакции или более мягкие формы), тип симптомов (чихание, астма и т.д.), выбор терапии; и прогноз развития болезни. Эта потребность в увеличении диагностического разрешения создает множитель для ряда параметров, которые будут проверяться регулярно, т.е. не соответствуют системам реимбурсации или текущими технологическими возможностями рутинной диагностической диагностики аллергии.

Таким образом, обнаружение специфических иммунных реакций в виде производства специфических антител против определенных биологических или небологических антигенных мишеней является ключом к диагнозу аллергии типа I, но также и для других иммунологических состояний, таких как аутоиммунные заболевания и инфекционные заболевания.

Во всех этих областях лежащее в основе состояние может быть вызвано различными антигенами, вызывающими заболевание, которые могут действовать как маркеры заболевания или антигенами, которые служат суррогатными маркерами для состояния или прогнозирования исходов, как в случае аутоиммунных заболеваний.

Термин "антиген" в общем случае относится к веществу, которое может заставить иммунную систему продуцировать против нее антительный ответ и, возможно, может вызвать биологическую реакцию, когда антитело связывается с ним в соответствующих условиях *in vivo*.

Теоретически, тщательный анамнез на первом этапе позволил бы сузить число тестовых параметров для второй стадии тестирования *in vitro* до достаточно низкого числа. Однако для ряда практических ограничений это не всегда легко достижимо, что делает применение многопараметрического диагностического тестирования для нескольких заболеваний привлекательным. Это справедливо, в частности, когда идентичный класс антител отвечает за иммунный ответ против множества антигенов (например, IgE, IgG, IgA), так что мультиантигенный мониторинг антительных ответов может способствовать улучшению медицинского обслуживания для каждого отдельного пациента. Использование биоинформатики для идентификации антигенных профилей или шаблонов или алгоритмов прогнозирования может значительно облегчить выбор диагноза и лечения и позволить врачу обеспечить более индивидуальный подход к лечению и мониторингу лечения у пациента.

Тесты *in vitro* для определения антигенспецифического иммуноглобулина в основном основаны на принципе ELISA, где антиген иммобилизуют на твердую фазу, которую затем инкубируют с образцом и после отмывания несвязанного образца и неспецифических антител, специфически связанные антитела обнаруживаются с помощью вторичного антитела или аффинного связывающего видов, генерирующих детектируемый сигнал, известный специалистам в данной области (цвет, фотоны и т.д.).

Иммобилизация в этом контексте относится к связыванию антигена либо путем химической связи, либо с помощью других нековалентных способов прикрепления к твердой фазе, например к пластиковой поверхности или к любому другому твердому носителю с подходящими физическими и химическими свойствами для удержания антигена.

Распространенным осложнением при разработке многопараметрического иммунологического теста *in vitro* является гетерогенность антигенов, исходя из того, что в формате тестирования обычно можно применять только идентичные или, по меньшей мере, сходные условия для каждого антигена во время иммобилизации и процедуры анализа. Следовательно, это приводит к компромиссу между количеством антигенов для включения в тест относительно технических характеристик теста в соответствии с измерениями, известными квалифицированному специалисту.

Подавляющее большинство соответствующих антигенов - это белки, будь то из биологических ис-

точников, таких как продукты питания, растения, бактерии или вирусы, или, как в случае аутоиммунитета, белки, произведенные самим организмом человека. Белки - по сравнению, например, с ДНК в генетическом тестировании - чрезвычайно универсальны, но также чрезвычайно неоднородны (заряд, структура, стабильность, свойства поверхности и т.д.), и необходимо учитывать не только физико-химические свойства каждого белка во время обработки и производства теста. Более важно сохранить биологическую активность, например, путем сохранения неизменной вторичной и третичной структуры биомолекул, которые создают фактические эпитопы и сайты связывания антител. В противном случае не может быть проведен функциональный анализ с клинически значимой чувствительностью и специфичностью.

Несколько релевантных антигенов при аллергических, инфекционных или аутоиммунных заболеваниях не являются свободными или растворимыми белками и нуждаются в относительно жестких химических растворителях, чтобы оставаться в растворе, что делает обычное связывание белка или обработку в процессе изготовления тестов *in vitro* трудоемкими. Примерами этого являются запасные белки из орехов или семян или клеточные антигены, которые находятся в клеточных мембранах или в тканях, где они производятся локально.

В области диагностики аллергии *in vitro* еще одно осложнение заключается в том, что биологические источники, которые содержат антигены, вызывающие заболевание, очень гетерогенны между, но также и внутри источников. Как правило, так называемые экстракты аллергенов используются для диагностики *in vivo* и *in vitro*. Экстракт аллергена представляет собой водный сбор белкового содержимого из соответствующего источника, например, пищевых продуктов, животных, растений, пыльцы растений и т.д. В экстрактах аллергенов сложная и трудно стандартизованная смесь аллергенных и неаллергенных составляющих презентуется коже пациента или тестируется против образца крови пациентов, который может содержать специфические IgE-антитела.

Об этой сложной смеси белков, липидов, углеводов и других химических соединений известно, что только относительно небольшое количество белков или семейств белков в каждом источнике аллергена действительно является аллергенным, так что они могут вызвать в иммунной системе продуцирование антительного ответа.

Эта доля фактически релевантного антигена в подавляющем большинстве нерелевантного материала предъявляет высокие требования к способности связывания твердого материала носителя и, как правило, невозможно сделать чувствительный и специфический IgE-анализ для диагностики аллергии на простой гладкой поверхности, такой как планшет для ELISA, без дополнительного обогащения аллергенной фракции и удаления неаллергенных материалов.

В течение последних трех десятилетий многие из так называемых молекулярных антигенов, имеющих отношение к диагнозу аллергии, были идентифицированы и либо очищены из природного источника, либо получены технологией рекомбинантных ДНК. Использование молекулярных антигенов имеет много преимуществ: от стандартизации для лучшего понимания и прогнозирования молекулярной перекрестной реактивности, до классификации рисков пациентов и адаптивного лечения. Тем не менее, большой недостаток для любого рутинного тестирования заключается в том, что, во-первых, требуется гораздо больше опыта от врача в выборе параметра для тестирования. Во-вторых, создается значительно более высокая стоимость на одного пациента, если его тестируют обычными средствами однопараметрического тестирования, которые по-прежнему составляют более 99% коммерческого рынка. Более того, количество крови, которое должно быть взято у пациента, будет линейно расти с каждым обычным однопараметрическим тестом, обычно в диапазоне от 50 до 100 мкл на параметр.

Как следствие, многопараметрические (также называемые мультиплексированными) системы анализа были разработаны и обнародованы несколькими группами, в которых используются различные базовые технологии, начиная от обычных миниатюрных систем для ELISA на основе микротитровальных планшетов (МТП) до массивов или микромассивов с суспензиями гранул в различных исполнениях.

Например, WO 2004/104586 A1 описывает способ и устройство для обнаружения аллергенспецифических антител на основе связывания таких антител с захватывающим реагентом (например, протеином А, протеином G или антителом, которое специфически связывается с иммуноглобулинами), который прикрепляется к биочипу с реактивной поверхностью. Затем связанное аллерген-специфическое антитело контактирует со своим соответствующим аллергеном, который детектируется меченым аллерген-специфическим антителом.

В US 2005/079592 A1 описано устройство для изготовления мультиплексного теста на гранулах, где гранулы с биологическим веществом, таким как белок, закрепленный на их поверхности, выбрасываются в определенные положения на твердофазную основу.

Кроме того, тест для анализа множества аналитов в образце описан в US 6268222 B1. Тест основывается на коровых частицах или носителях, имеющих на своей поверхности множество мелких флуоресцентно меченных полимерных частиц или наночастиц.

В US 2002/0015666 A1 представлена система и способ хранения и дозирования множества отобранных реагентов из устройства хранения большого объема и Tai et al. ((Analytical Biochemistry, vol. 391, no. 2, August 2009, p. 98-105) описывает микрожидкостный картридж и систему для мультиплексированных иммуноанализов.

Хотя чипы на основе суспензии гранул теоретически могут иметь высокую степень мультиплексирования в небольших объемах, практические приложения ограничены типично менее чем 20 параметрами. Внутренняя изменчивость биологической матрицы, такой как сыворотка или плазма, затрудняет ее применение во всех обычных лабораториях, куда часто приходят гемолитические, липемические или иктеричные образцы. Более того, связывающая способность позволяет работать только с чистыми антигенами, а не, например, с сырыми экстрактами аллергенов в чувствительных приложениях, таких как обнаружение IgE. Кроме того, приборы основаны на FACS (сортировка флуоресцентных активированных клеток) или на других дорогих технологиях, требующих нескольких лазерных каналов и точности конфокального лазерного сканирования.

Обычные микромассивы на стеклянных слайдах или внутри микротитровальных пластин могут преодолевать некоторые ограничения суспензионных гранул, жертвуя гибкостью смешивания реагентов по требованию, когда это необходимо для каждого образца пациента, и возможностью принципиальной оптимизации каждого параметра. Фактически, применение плоской и гомогенно активной поверхности для связывания белковых антигенов является значительным ингибирующим фактором для достижения высокой производительности. Кроме того, производство является не только дорогостоящим, но и очень сложным из-за пиколитровых количеств, которое необходимо дозировать или депонировать воспроизводимым образом. У существующих в настоящее время на рынке поставщиков технологий нет реального высокопроизводительного инструментария для производства миллионов высококачественных диагностических микромассивов в год. Размеры партии обычно небольшие (несколько сотен или меньше), а коэффициенты вариабельности (CV) высокие по сравнению с современными автоматизированными иммунологическими анализаторами. Подобно технологии гранул в суспензии микромассивы в основном работают с индикацией флуоресценции или люминесценции и требуют в этом отношении дорогостоящего инструментария. Из-за формата миниатюрного анализа автоматизация не является простой и требует сложного оборудования и/или микрожидкостных конструкций, что опять-таки может быть проблематичным для обычных лабораторных образцов.

Другие многопараметрические тесты, такие как иммунохроматографический анализ на тест-полосках, имеют преимущество относительно низкой стоимости одного параметра, но страдают от недостатка чувствительности, воспроизводимости, редко автоматизированы и не могут иметь более 5-20 параметров на тест-полоску.

Таким образом, в этом сегменте рынка клинической химии в настоящее время нет доступных технологий, которые могут удовлетворить все потребности, в частности: низкую стоимость за тест, высокую степень мультиплексирования (>200), воспроизводимость и отличные технические характеристики (CV, чувствительность, специфичность, диапазон измерения, количественная оценка и т.д.).

Таким образом, целью изобретения является предоставление антигенных массивов с существенным улучшением воспроизводимости и отличными техническими характеристиками, но с сохранением возможности включения множества параметров и эффективного проведения теста.

Сущность изобретения

Задача главным образом решается заявленным объектом изобретения.

Достижения в области молекулярных исследований и мультиплексной технологии иммунотестов объединяются в данном документе для формирования продукта системы "одного окна" для тестирования *in vitro*, а именно антигенного массива, включающего группы покрытых антигеном гранул, иммобилизованных на твердой подложке. Этот новый формат массивов и способы их получения и применения были разработаны на основе преимуществ современных способов из однопараметрических анализов, в основном технических характеристик анализа с возможностью значительного мультиплексирования при оптимизации связывания для каждого отдельного антигена, но без введения существенных компромиссов по сравнению с альтернативными способами, в частности в отношении затрат на тест, масштабируемости производства или требований к сыворотке на параметр. Миниатюрный формат, например при тестировании микромассивами, непригоден для недорогого, но высокопроизводительного тестового формата, поэтому антигенный массив, подробно описанный ниже, может рассматриваться как *in vitro* тест на макро массиве, состоящий из иммобилизованных нано- или микрочастиц, которые образуют дискретные сущности для каждой популяции антигенсвязанных гранул, но имеют значительно большие размеры, чем обычные микромассивы.

Эта новая технология позволяет индивидуально оптимизировать связывание любого антигена (например, детектирующего антигена), такого как аллерген, с твердой фазой, тем самым обеспечивая чувствительный, но надежный дизайн теста, и устраняя компромисс между экономической эффективностью и характеристиками параметров индивидуального теста. Приведенный в данном документе антигенный массив и способы улучшения общей чувствительности, но, в частности, чувствительности при работе с гетерогенным исходным материалом в том, что касается двухфазного подхода связывания - первой с частями, а второй - с твердофазной или пористой и трехмерно структурированной твердой фазой - создает множественную амплификацию поверхности, презентирующей антиген, с которой антитела могут связываться во время стадий инкубации анализа. Современные средства автоматизации и программные решения дополняют реагенты.

С помощью грамотно разработанных панелей антигенов в сочетании с устойчивостью, чувствительностью и специфичностью анализа, а также его легким применением, обеспечивается лучшая клиническая интерпретация результатов и прогнозирование перекрестной реактивности и, следовательно, выбор эффективных способов лечения.

Таким образом, описанный в данном документе массив и способы впервые обеспечивают тест, который может изменить рутину диагностики аллергии, а также другие иммунологические состояния, основанные на специфическом и надежном обнаружении антител, например инфекционное или аутоиммунное заболевание. В частности, в отношении диагностики аллергии в настоящее время тесты *in vitro* проводятся как вторая или третья стадия диагностического процесса, но всесторонние, с высоким разрешением, но чувствительные скрининг-тесты, описанные в данном документе, могут стать инструментом первого уровня, только для сопровождения подтверждающего анамнеза, кожных проб или провокации. Преимущества будут применяться ко всей цепочке создания стоимости, но, самое главное, к пациентам, страдающим иммунологическими заболеваниями.

Приведенное в данном документе в одном аспекте представляет собой антигенный массив, содержащий группы покрытых антигеном гранул, закрепленных на твердом носителе, причем каждая группа включает:

- (i) гранулы, покрытые одним детектирующим антигеном; или
- (ii) гранулы, покрытые набором детектирующих антигенов, предпочтительно, в которых твердый носитель представляет собой лист или пластину, а детектирующий антиген представляет собой аллерген, маркер инфекции или аутоантиген.

В некоторых воплощениях детектирующий антиген представляет собой биомолекулу, состоящую из нуклеиновых кислот и/или аминокислот, предпочтительно белка, пептида, антитела или молекулы ДНК или органического или неорганического химического соединения.

В некоторых воплощениях детектирующий антиген является аллергеном.

В некоторых воплощениях детектирующий антиген является маркером инфекции.

В некоторых воплощениях детектирующий антиген является аутоантигеном.

В некоторых воплощениях детектирующий антиген представляет собой антиген, полученный по технологии рекомбинантной ДНК, или антиген, выделенный и очищенный из биологического материала.

В некоторых воплощениях, где гранулы покрыты набором детектирующих антигенов, указанный набор детектирующих антигенов получают из экстракта или лизата биологического исходного материала, содержащего более одного антигена, или получают из очищенной фракции таких экстрактов или лизатов или очищенной фракции материалов, полученных из культуры клеток.

В некоторых воплощениях детектирующий антиген содержит один эпитоп, одну макромолекулу с несколькими связываемыми антителом эпитопами или смесь различных белков с различными антигенами, содержащими множество эпитопов.

В некоторых воплощениях гранулы представляют собой микро- или наночастицы. В частности, гранулы имеют размер от 5 до 500 нм в диаметре, предпочтительно от 200 до 500 нм в диаметре.

В некоторых воплощениях гранулы представляют собой гранулы из латекса, полимерные пластиковые гранулы, предпочтительно гранулы из полистирола, гранулы из биосовместимых полимеров или стеклянные гранулы, предпочтительно гранулы из двуокиси кремния. В частности, поверхность гранул является пористой или непористой.

В некоторых воплощениях детектирующий антиген связывается ковалентно или нековалентно с гранулами. В частности, детектирующий антиген связывается с гранулами нековалентно пассивной адсорбцией, предпочтительно гидрофобным и/или электростатическим присоединением.

В некоторых воплощениях детектирующий антиген связывается через антигенные спейсеры. В частности, детектирующий антиген связывается таким образом, при котором создается предпочтительная ориентация для презентации эпитопов, представленных на связанном антигене.

В некоторых воплощениях твердый носитель представляет собой лист или пластину пористого или непористого материала, предпочтительно нитроцеллюлозный лист, более предпочтительно ламинированный нитроцеллюлозный лист.

В некоторых воплощениях массив содержит по меньшей мере 25 различных групп. В частности, гранулы в пределах массива или в пределах одной группы имеют одинаковый или разный тип. В некоторых воплощениях группы гранул с антигенным покрытием фиксируются на твердом носителе с использованием контактных способов или бесконтактных способов, предпочтительно с использованием солеидной системы дозирования. В частности, каждая группа фиксируется как имеющий адрес элемент в прямоугольном массиве или в плотноупакованном массиве (*orange-packed array*), предпочтительно при плотностях 1 адресуемый элемент на мм².

В некоторых воплощениях гранулы антигенного массива, описанные в данном документе, принадлежат к одному или разным типам. В частности, гранулы из разных групп гранул могут быть одного типа (например, вся группа гранул антигенного массива содержит гранулы из полистирола диаметром 200-500 нм), или гранулы из разных групп гранул могут быть разных типов (например, группа 1 содержит гранулы из полистирола, а группа 2 содержит стеклянные гранулы). Также гранулы в пределах одной группы

могут быть одного или разных типов.

В одном аспекте, представленное в документе является аллергеном массивом, включающим группы покрытых аллергеном гранул, закрепленных на твердом носителе, причем каждая группа включает:

(i) гранулы, покрытые одним аллергеном; или

(ii) гранулы, покрытые набором аллергенов, предпочтительно аллергеном экстрактом, предпочтительно, где твердый носитель представляет собой лист или пластину.

В следующем аспекте, представленное в данном документе является способами детектирования иммуноглобулина, специфичного для детектирующего антигена, или для набора детектирующих антигенов, предпочтительно, где детектирующий антиген или набор детектирующих антигенов является аллергеном, маркером инфекции или аутоантигеном, причем способы, включают:

(i) обеспечение антигенного массива в соответствии с любым из описанных в данном документе антигенных массивов;

(ii) инкубацию массива с образцом;

(iii) инкубацию массива с детектирующим реагентом;

(iv) необязательно инкубацию массива с реагентом образования сигнала; и

(v) изменение детектируемого сигнала.

В некоторых воплощениях иммуноглобулин представляет собой IgE-антитело, ассоциированное с аллергией.

В некоторых воплощениях иммуноглобулин представляет собой IgG-антитело, ассоциированное с инфекцией или аутоиммунным заболеванием.

Далее в данном документе описаны способы детектирования IgE-антитела, ассоциированного с аллергией, которые включают:

(i) предоставление аллергеном чипа, описанного в данном документе;

(ii) инкубацию массива с образцом;

(iii) инкубацию массива с детектирующим реагентом, предпочтительно IgE-специфическим антителом или IgE-специфическим аптамером;

(iv) необязательно инкубацию массива с реагентом образования сигнала; и

(v) измерение детектируемого сигнала.

В некоторых воплощениях образец представляет собой биологическую жидкость, предпочтительно сыворотку, цельную или обработанную кровь, носовую жидкость или мочу, клеточный лизат или гомогенат ткани из объекта или пула объектов.

В некоторых воплощениях детектирующий реагент представляет собой аффинное связующее вещество, специфичное к иммуноглобулину, предпочтительно антитело (например, анти-IgE или анти-IgG антитело), аптамер (например, IgE-специфичный аптамер или IgG-специфичный аптамер) или аффитело. В частности, детектирующий реагент (i) непосредственно метится, предпочтительно цветным или флуоресцентным соединением или наночастицами золота или окрашенными наночастицами латекса; или (ii) конъюгируется с ферментом (например, анти-IgE или анти-IgG антителом непосредственно с детектируемой меткой или конъюгированное с ферментом).

В некоторых воплощениях способы дополнительно включают инкубацию массива с реагентом образования сигнала в соответствии со стадией (iv) способа, описанного в данном документе, в котором детектирующий реагент конъюгирован с ферментом, и реагент образования сигнала содержит субстрат для указанного фермента.

В некоторых воплощениях способ дополнительно включает инкубацию описанного в данном документе антигенного массива со стоп-раствором после стадии (iv) способов, описанных в данном документе, т.е. добавления стоп-раствора после инкубации антигенного массива с реагентом образования сигнала для прекращения образования сигнала.

Другим аспектом, представленным в данном документе, является картридж, содержащий тестовую камеру для любого из описанных в данном документе антигенных массивов, резервуар для жидких отходов и, необязательно, штрих-код. Картридж может дополнительно включать резервуары или интегрированные флаконы для любого одного или более детектирующих реагентов, реагента образования сигнала, стоп-раствора, одного или нескольких буферов и одного или нескольких контрольных образцов.

Кроме того, представленный в данном документе представляет собой набор, содержащий любой из массивов антигенов, описанных в данном документе, детектирующий реагент, один или несколько буферов, один или несколько контрольных образцов, инструкции для применения набора в любом из способов, описанных в данном документе, и, необязательно, реагент образования сигнала. Набор может дополнительно включать стоп-раствор.

В другом аспекте, представленном в данном документе, предлагается устройство, включающее камеру для одного или нескольких картриджей, описанных в данном документе, пипетку и устройство для обнаружения сигнала.

Чертежи

Фиг. 1А и В - В/В представление 245 аллергенов, специфические измерения IgE и 5 стандартов IgE (верхний правый угол) в возрастающих концентрациях после проведения стандартного анализа с пулом

человеческой сыворотки от аллергических индивидуумов (1A) или с отрицательным контролем (1B) и сканирования изображения с помощью планшетного сканера. Исходные изображения были в 16-битном формате TIFF в оттенках серого;

фиг. 1С - схематическое расположение позиций аллергенов, соответствующих фиг. 1А и В. Каждый аллергенный элемент составляет около 600 мкм в диаметре, расстояние между элементами составляло 1 мм в каждом направлении;

фиг. 2 - оценка теста путем сравнения с эталонным способом;

фиг. 3 - сравнение массива с молекулярными аллергенами, непосредственно иммобилизованными на твердой подложке, и массива с наночастицами в сочетании с теми же молекулярными аллергенами и иммобилизованными на твердом носителе того же типа. Графическое представление результатов из табл. 4;

фиг. 4 - специфические измерения IgE с 8 различными положительными образцами и одним отрицательным по PrU p 3, основному аллергену персика;

фиг. 5 - технические характеристики и сравнение доступных многопараметрических анализов для IgE-специфических измерений. (*) IgE-специфические измерения по определению являются полуколичественными, поскольку нет международного эталона для подготовки индивидуальных аллергенов. (**) Средняя линейная корреляция тестирования > 100 образцов и сравнение компонентов аллергенов и экстрактов аллергенов с помощью ImmunoCAP и ImmunoCAP ISAC;

фиг. 6 - сравнение измерений IgE в образце, испытанном в день 0 и день 330, с использованием того же препарата гранул, покрытых аллергеном.

Подробное описание изобретения

Конкретные термины, используемые в описании, имеют следующее значение.

Используемый в данном документе термин "антиген" относится к веществу, которое может привести к тому, что иммунная система даст антителный ответ против него и, возможно, может вызвать биологическую реакцию, когда антитело связывается с ним в соответствующих условиях *in vivo*. Термин антиген, используемый в данном документе, относится к целой молекуле-мишени или фрагменту такой молекулы, распознаваемых антигенсвязывающим сайтом. В частности, субструктуры антигена, например полипептидной или углеводной структуры, обычно называемые "эпитопами", которые являются иммунологически релевантными, могут быть распознаны таким антигенсвязывающим сайтом.

Термин "антиген детекции", "антиген, который детектируется" или "детектирующий антиген" относится к антигену, определяющему антигенспецифическую реакцию, такую как реакция антитело-антиген. Термин "антиген", "антиген детекции", "антиген, который детектируется" и "детектирующий антиген" используются в данном документе взаимозаменяемо.

Термин "набор детектирующих антигенов" относится к одному или нескольким антигенам, определяющим реакцию, специфичную для состояния. Состоянием может быть заболевание или расстройство или предрасположенность к ним, такое как аллергия или аутоиммунное заболевание; этот термин включает состояния, которые не показывают каких-либо физических и/или клинических симптомов. Реакцией, специфичной для этого состояния, может быть реакция антитело-антиген по меньшей мере с одним антителом, которое характерно для/ассоциировано с указанным состоянием, и это состояние может быть определено такой реакцией; например, антитело IgE, специфичное к аллергену, если состояние является аллергией. Используемый в данном документе термин "набор антигенов" относится к одному или нескольким антигенам, полученным из того же биологического исходного материала, например, полученному из клеточного лизата, клеточного или тканевого гомогената или его очищенной фракции.

Термин "эпитоп" относится к той части антигена, которая определяет ее иммунологическую специфичность. Используемый в данном документе термин "эпитоп", в частности, относится к молекулярной структуре, которая может полностью образовывать специфический партнер связывания или быть частью специфического партнера связывания с участком связывания антитела. Эпитоп может либо состоять из углевода, пептидной структуры, жирной кислоты, органического, биохимического или неорганического вещества или его производных и любых их комбинаций.

Эпитопы могут быть либо линейными, либо конформационными эпитопами. Линейный эпитоп состоит из одного сегмента первичной последовательности полипептидной или углеводной цепи. Линейные эпитопы могут быть смежными или перекрывающимися. Конформационные эпитопы состоят из аминокислот или углеводов, объединенных путем сворачивания полипептида с образованием третичной структуры, и аминокислоты не обязательно смежны друг с другом в линейной последовательности. В частности, в отношении полипептидных антигенов конформационный или прерывистый эпитоп характеризуется наличием двух или более дискретных аминокислотных остатков, разделенных в первичной последовательности, но собирающихся в устойчивую структуру на поверхности молекулы, когда полипептид складывается в нативный белок/антиген.

Обычно эпитопом является полипептид или полисахарид в природном антигене. Как правило, В-клеточный эпитоп будет включать, по меньшей мере, около 5 аминокислот, но может иметь как минимум 3-4 аминокислоты. Эпитопы представляют собой формы, распознаваемые иммунными В- и Т-клетками, а также могут быть представлены неантигенными пептидами, и другими молекулами, которые обладают той же формой эпитопа, которая присутствует в нативном антигене. Примером элемента с формой эпи-

топа является аптамер. Аптамер - это молекула, которая обеспечивает форму, которая может имитировать иммунологический эпитоп. Для представления отдельных эпитопов могут использоваться порции молекул, таких как пептиды или молекулы, представляющие посттрансляционные модификации, углеводы, липиды и другие молекулы.

Термин "массив" относится к набору групп гранул с антигенным покрытием, где каждая группа представляет собой пространственно разделенный адресуемый элемент. Такие элементы или молекулярные объекты могут быть пространственно адресуемыми, например, массивы на основе микротитрационных планшетов, или иммобилизованные на плоских поверхностях, где каждый элемент присутствует в разных координатах X и Y. Для такой пространственной адресации, также известной как кодирование, положение молекулы фиксировано, и это положение коррелирует с идентификацией, что позволяет идентифицировать специфичность антител, содержащихся в образце, для тестирования в массиве. Этот тип пространственного массива обычно синтезируется или наносится пятнами на плоской подложке, создавая большое количество различных элементов, плотно расположенных в небольшой области.

Если не указано иное, термины "частицы", "наночастицы", "сферы", "микросферы" и "гранулы", используемые в данном документе, взаимозаменяемы и относятся к небольшим инертным носителям круглой, овальной или сферической формы, которые могут быть покрыты антигеном (детектирующим антигеном) или набором антигенов (набором детектирующих антигенов).

Используемый в данном документе термин "группа гранул" относится к популяции гранул, связанных или покрытых (используемых в данном документе взаимозаменяемо) специфическим детектирующим антигеном, который может быть идентифицирован с антителом, специфичным для указанного антигена, в реакции антитело-антиген или популяции гранул, покрытых набором детектирующих антигенов, которые могут быть идентифицированы по меньшей мере одним антителом, специфичным для одного из детектирующих антигенов набора.

Термин "тип гранулы" относится к характеристике гранул, определяемых их размером, материалом, молекулярными свойствами поверхностного покрытия, гидрофобностью, электрическим зарядом, поверхностными свойствами (пористыми или непористыми поверхностями), химией связывания или химическим линкером/химией спейсера. Гранулы одного типа имеют одинаковый размер, материал, свойство поверхности, и для соединения антигена используется одна и та же химия. Гранулы другого типа представляют собой гранулы, которые отличаются по меньшей мере одной из этих характеристик.

Используемый в данном документе термин "подложка", "твердая подложка", "носитель", "твердый носитель" или "твердая фаза" относится к любой твердой поверхности, на которую могут быть осаждены и иммобилизованы адресуемые элементы/молекулярные объекты (гранулы с антигенным покрытием) для проведения анализов и реакций.

Термин "иммобилизованный" или "фиксированный" используется в данном документе взаимозаменяемо и означает, что материал или частица, в частности гранулы с антигенным покрытием, либо ковалентно, либо нековалентно связываются с твердой подложкой. Термин относится к материалу или частице, относительно стационарному и не высвобождаемому во время стадий инкубации и или промывки, осушительных с твердой подложкой.

Термин "иммуноглобулин (Ig)" относится к придающей иммунитет части глобулиновых белков сыворотки, и к другим гликопротеинам, которые имеют одинаковые функциональные характеристики. Они обычно содержат четыре полипептидные цепи - две идентичные легкие цепи и две идентичные тяжелые цепи, которые связаны между собой дисульфидными связями.

Термин "IgG" относится к одному из изоформ Ig, обнаруженному в сыворотке, который является основным антителом, возникшим в ответ на антиген и имеющим четыре основных подтипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Термин "IgE" относится к одному из изоформ Ig, обнаруженному в сыворотке, которая плотно связывается с тучной клеткой и базофилами, а также, когда дополнительно связана с антигеном, вызывает высвобождение гистамина и других медиаторов немедленной гиперчувствительности. Этот изоформ Ig играет главную роль в преобладающих аллергических реакциях типа I, таких как сенная лихорадка, астма и анафилаксия.

Используемый в данном документе термин "антитело" относится к полипептидам или белкам, которые состоят из или содержат домены антител, которые понимаются как константные и/или переменные домены тяжелых и/или легких цепей иммуноглобулинов с или без линкерной последовательности. Полипептиды понимаются как домены антител, если они содержат структуру β -бочки, состоящую по меньшей мере из двух β -тяжей структуры домена антитела, связанных петлевой последовательностью. Домены антител могут иметь нативную структуру или модифицированы путем мутагенеза или дериватизации, например, для модификации антигенсвязывающих свойств или любого другого свойства, такого как стабильность или функциональные свойства, такие как связывание с Fc-рецепторами FcRn и/или рецептором Fc γ . Термин "антитело" относится к антителам животного происхождения, включая такие виды млекопитающих, как, например, человек, мышь, кролик, крыса, коза, лама, корова и лошадь, или виды птиц, такие как курица, причем этот термин, в частности, включает рекомбинантные антитела, ко-

торы основаны на последовательностях животного происхождения.

Антитела могут существовать как интактные иммуноглобулины или как модификации в различных формах, включая, например, фрагмент Fv, содержащий только переменные области легкой и тяжелой цепи, фрагмент Fab или (Fab)₂, содержащий переменные области и части константной области, одноцепочечное антитело и тому подобное. Антитело может быть животного (особенно из мыши, козы, кролика или крысы) или человеческого происхождения или может быть химерным. Используемый в данном документе термин "антитело" включает эти различные формы, которые могут быть получены путем модификации целых антител и/или синтезированные de novo с использованием методик рекомбинантных ДНК. "Моноклональные" антитела относятся к отдельным антителам или популяциям отдельных антител, в которых антитела идентичны по специфичности и аффинности, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах.

Используемый в данном документе термин "метка" относится к детектируемому соединению или композиции, которое прямо или косвенно конъюгировано с антителом или фрагментом антитела, так, что образуется "меченое" антитело/фрагмент антитела или "детектирующее антитело". Метка может быть детектирована сама по себе, например радиоизотопные метки, цветные или флуоресцентные метки, наночастицы золота или наночастицы цветного латекса или, в случае ферментативной метки, может катализировать химическое изменение субстратного соединения или композиции, которые могут быть обнаружены.

Используемый в данном документе термин "экстракт" относится к одному или нескольким веществам, обычно в концентрированной форме, полученным путем обработки материала, такого как биологический материал, из которого выделяется экстракт, с помощью растворителя, после чего растворитель удаляется. Термин "экстракт" также будет охватывать одно или несколько веществ, полученных путем воздействия на первичный экстракт последующих процессов очистки, известных специалистам в данной области техники. Как правило, экстракт содержит смесь белков и других молекул.

Экстракт аллергена обычно получают экстракцией аллергена(ов) из биологического исходного материала. Биологический исходный материал обычно представляет собой многоклеточный или неклеточный материал из многоклеточного организма из царств грибов, растений или животных или в некоторых случаях бактериального происхождения. Такой экстракт аллергена может быть получен водной экстракцией водорастворимого материала с использованием механических процедур гомогенизации (например, энергичного смешивания и перемешивания) с последующими стадиями очистки, такими как фильтрация или фракционирование, для получения раствора, т.е. экстракта. Экстракт затем может быть подвергнут дальнейшей очистке и/или обработке, такой как, например, сушка вымораживанием, удаляя, по существу, всю воду. Как правило, экстракт аллергена содержит смесь белков и других молекул.

В настоящем контексте термин "аллерген" относится к любому природному белку, его изоформам, модифицированному белку, рекомбинантному белку, рекомбинантному мутантному белку или любому его фрагменту белка или смесям белков, которые способны индуцировать аллергию, т.е. IgE-опосредованные реакции при их повторном воздействии на человека. Используемый в данном документе термин "набор аллергенов" относится к одному или нескольким аллергенам, полученным из одного и того же биологического исходного материала для аллергенов, например, полученным из аллергенного экстракта биологического исходного материала для аллергена.

Термин "биологический исходный материал" или "биологический материал" относится к любому материалу, происходящему из любого живого организма. В частности, речь идет об отделенных клетках, кусочках ткани, бактериях, вирусах, дрожжах и субфракциях (таких как отделенные ядра или цитоплазма) многих из предыдущих источников (содержащих один или несколько антигенов).

Выражение "биологический исходный материал для аллергенов", используемый в данном документе, относится к любому биологическому материалу, содержащему один или несколько аллергенов. Примерами таких материалов являются РМВ (очищенное тело клеща) или WMC (цельная клеточная культура) акарид, обезжиренная или необезжиренная пыльца, например, трав, злаков, сорняков и деревьев, животная шерсть и перхоть, шкуры, грибные мицелий и споры, тела, яд или слюна насекомых и продукты питания.

Термин "аутоиммунное заболевание" включает любые заболевания, связанные с патогенными аутоантителами, заболевания, которые, скорее всего, опосредуются Т-клетками и заболевания, для которых доказательства патогенного процесса являются только прямыми. Указанные расстройства могут быть, без ограничения указанным, острой идиопатической тромбоцитопенией, аутоиммунными гемолитическими анаемиями, аутоиммунной нейтропенией, аутоиммунной эритробластопенией, миастенией, синдромом Гийена-Барре, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатией, рассеянным склерозом, моноклональными гаммапатиями с антимагневой активностью, аденолеукодистрофией, болезнью Грейвса, системной красной волчанкой, антикардиолипидными антителами и привычным выкидышем, рефрактерным полимиозитом, ювенильным ревматоидным артритом, ревматоидным артритом, синдромом Фелити, язвенным колитом, болезнью Крона, некоторыми гломерулонефритами, ANCA-позитивным системным васкулитом, болезнью Кавасаки, антифактор VII аутоиммунным заболеванием и воспалительной ретинопатией.

Термин "ковалентная связь" или "ковалентное взаимодействие" относится к связям или взаимодействиям, созданным совместным использованием пары электронов между атомами. Ковалентные связи/взаимодействия включают, без ограничения указанным, атомные связи, гомополярные связи, σ - σ -взаимодействия, σ - π -взаимодействия, двухэлектронные связи, одиночные связи, двойные связи, тройные связи, а также комбинации этих взаимодействий/связей. Указанные взаимодействия/связи могут быть полярными или неполярными или могут быть неполярными или неполяризованными.

"Нековалентная" относится к ассоциациям между атомами и молекулами, такими как ионные взаимодействия (например, диполь-дипольные взаимодействия, ионное спаривание и образование соли), водородная связь, неполярные взаимодействия, комплексы включения, клатрирование, ван-дер-ваальсовы взаимодействия (например, пи-пи стэкинг) и их комбинации.

Термин "пассивная адсорбция", "адсорбция" или "абсорбция" относится к адгезии атомов, ионов или молекул из газа, жидкости или растворенного твердого вещества с поверхностью. Механизм адсорбции основан главным образом на гидрофобных (типа Ван-дер-Ваальса, Лондона) сцеплениях между гидрофобными частями адсорбированной молекулы и поверхностью. Большинство гидрофобных молекул прилипают к поверхности пассивной адсорбцией. В случае менее гидрофобных молекул (или более гидрофильных поверхностей, таких как COOH- или NH₂-модифицированные поверхности) может происходить связывание как с ионными взаимодействиями, так и с гидрофобными взаимодействиями.

Используемый в данном документе термин "электростатическое взаимодействие" или "электростатическое присоединение" относится к любому взаимодействию между заряженными компонентами, молекулами или ионами из-за сил притяжения, когда компоненты противоположного электрического заряда притягиваются друг к другу. Примеры включают, без ограничения указанным: ионные взаимодействия, ковалентные взаимодействия, взаимодействия между ионом и диполем (ионная и полярная молекула), взаимодействия между двумя диполями (частичные заряды полярных молекул), водородные связи и лондонские дисперсионные связи (индуцированные диполи поляризуемых молекул).

"Детектируемый сигнал" относится к физическому или химическому сигналу, который может быть измерен визуальными или инструментальными способами и включает колориметрические, флуоресцентные, электрические и хемилюминесцентные сигналы.

"Контрольное значение" или "контрольный сигнал" относится к эталонному значению, с которым можно сравнить сигнал, полученный с образцом объекта или пула объектов. Отрицательный контрольный сигнал может быть получен, например, (i) с образцом, который не содержит иммуноглобулина(ов) (ii) с гранулами, которые не покрыты каким-либо антигеном, т.е. непокрытые гранулы, которые иммобилизованы на твердой подложке (iii) с материалом твердой подложки самим по себе без каких-либо гранул, закрепленных на нем, или (iv) с образцом здорового индивидуума или пула или группы здоровых индивидуумов. "Сигнал положительного контроля" можно получить, например, с помощью коммерческого эталонного образца с указанным количеством анализируемого вещества (т.е. полного иммуноглобулина или определенного иммуноглобулина со специфичностью к конкретному антигену/аллергену), образец, который был подтвержден или испытан положительным в стандартном анализе или с гранулами в сочетании с определенным количеством иммуноглобулина, которое должно быть обнаружено и зафиксировано на твердой подложке.

Термин "образец" относится к практически любому жидкому образцу. Образец может быть получен из любого желаемого источника, такого как физиологическая жидкость, например кровь, слюна, глазная жидкость, мозговая спинномозговая жидкость, пот, моча, молоко, асцитная жидкость, слизистая, синовиальная жидкость, перитонеальная жидкость, амниотическая жидкость или т.п. Жидкий контрольный образец может быть предварительно обработан до применения, например приготовлением сыворотки или плазмы из крови, разбавлением вязких жидкостей или тому подобное; способы обработки также могут включать разделение, фильтрацию, дистилляцию, концентрацию, инактивацию интерферирующих компонентов и добавление реагентов. Кроме того, твердое вещество можно использовать после его модификации с образованием жидкой среды. Этот термин применяется к любой жидкости организма, которая может быть использована в анализе *in vitro*.

Используемый в данном документе термин "объект" или "пациент" относится к теплокровному млекопитающему, в частности человеку или животному, не относящемуся к человеку.

Термин "биомолекула" относится к любой органической молекуле, которая является частью живого организма. Биомолекула включает нуклеотид, полинуклеотид, олигонуклеотид, пептид, белок, углевод, гликозилированную молекулу, липид и другие. Используемый в данном документе термин также относится к органическим молекулам, имитирующим структуру и специфичность связывания биомолекулы, например аптамеру, который таким образом распознается тем же антителом, что и в случае биомолекулы.

"Технология рекомбинантных ДНК" относится к процедурам молекулярной биологии для получения последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано, например, в *Laboratory Manuals*, edited by Weigel and Glazebrook, 2002 Cold Spring Harbor Lab Press; и Sambrook et al, 1989 Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Термин "антигенные спейсеры" относится к химическим линкерам, которые могут быть использо-

ваны для введения промежуточного слоя, создающего определенное расстояние между твердой поверхностью и связанным антигеном, а также к определению химических свойств указанного промежуточного слоя, например, в Bioconjugate Techniques, Greg T. Hermanson, Academic Press, 25.07.2013.

Целью изобретения является создание антигенного массива, содержащей группы гранул с антигенным покрытием, закрепленных на твердом носителе. В некоторых воплощениях гранулы, покрытые антигеном, представляют собой гранулы, покрытые одним детектирующим антигеном (например, антигеном, полученным по технологии рекомбинантной ДНК или выделенным и очищенным антигеном из биологического источника). В некоторых воплощениях гранулы, покрытые антигеном, являются гранулами, покрытыми набором детектирующих антигенов (например, антигенов, полученных из экстракта, такого как экстракт аллергена, антигенов, полученных из лизата, такого как лизат бактериальных клеток, антигенов, полученных из клеточного или тканевого гомогената или их очищенной фракцией).

Например, первая группа гранул связана с определенным (первым) детектирующим антигеном, полученным с помощью технологии рекомбинантной ДНК, вторая группа гранул связана с другим (вторым) детектирующим антигеном, очищенным из биологического материала, третья группа соединена с набором детектирующих антигенов, которые опять отличаются от первого и второго детектирующего антигена, набор детектирующих антигенов получают из клеточного лизата, четвертая группа гранул - с еще одним набором детектирующих антигенов, который получают из экстракта, и так далее. Таким образом, различные группы гранул с антигенным покрытием (популяция гранул) антигенного массива различаются по антигену (например, детектируемому антигену или набору детектирующих антигенов), соединенному с ними.

Такие группы гранул с различными детектирующими антигенами или набором детектирующих антигенов могут быть получены с использованием различных источников (например, лизата, экстракта, рекомбинантного продуцирования) детектирующего антигена, различных типов гранул (гранулы разного размера и/или материала) и/или разных химий связывания (нековалентные или ковалентно связанные антигены).

Антигенный массив, описанный в данном документе, включает по меньшей мере 25 различных групп гранул. В некоторых воплощениях описанный в данном документе антигенный массив содержит по меньшей мере любую из 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 или 250 групп гранул. В некоторых воплощениях антигенный массив содержит вплоть до любого числа из 300, 400, 500 или 1000 групп гранул. В некоторых воплощениях антигенный массив содержит от 200 до 500 групп гранул, предпочтительно от 250 до 350 групп гранул.

В некоторых воплощениях группы гранул в антигенной массиве включают гранулы только одного типа (например, только гранулы из полистирола, только гранулы диаметром 200-500 нм и т.д.). В некоторых воплощениях группы гранул в антигенной массиве включают группы с различными типами гранул (например, гранулы из полистирола диаметром 350 нм, латексные гранулы диаметром 300-500 нм и стеклянные гранулы диаметром 5-500 нм). В некоторых воплощениях группы гранул в антигенной массиве получают с использованием одной и той же химии связывания (например, различные детектируемые антигены/набор детектирующих антигенов связаны с различными группами гранул посредством пассивной адсорбции). В некоторых воплощениях химия связывания отличается между различными группами гранул (например, первый детектирующий антиген/набор детектирующих антигенов соединен с первой группой гранул с использованием пассивной адсорбции, а второй детектирующий антиген/набор детектирующих антигенов связан со второй группой гранул с использованием ковалентного линкера). В частности, антигенный массив может содержать первую группу гранул, содержащих микрогранулы из полистирола диаметром около 200 нм, где первый детектирующий антиген соединяется с поверхностью посредством пассивной адсорбции, вторая группа гранул, содержащих микрогранулы из полистирола с диаметром около 500 нм и поверхностное покрытие NH_2 , где второй детектирующий антиген соединен с поверхностью через сшивающий агент EGS (этиленгликоль-бис-(сукцинимидилсукцинат)), который вводит спейсер с 12 атомами, третья группа гранул, содержащих микрогранулы из полистирола с диаметром около 200 нм и поверхностным покрытием COOH , где третий детектирующий антиген связан с поверхностью с помощью химии связывания посредством карбодиимида с EDC нулевой длины.

В некоторых воплощениях гранулы в пределах одной группы гранул (т.е. популяция гранул, покрытых одним и тем же детектирующим антигеном или популяция гранул, покрытых одним и тем же набором детектирующих антигенов) содержат гранулы одного и того же типа. В некоторых воплощениях гранулы в пределах одной группы гранул (т.е. популяции гранул, покрытых одним и тем же детектирующим антигеном или популяции гранул, покрытых одним и тем же набором детектирующих антигенов) содержат различные типы гранул. Например, в одной группе гранул некоторые гранулы (первая подгруппа/тип гранул) представляют собой гранулы диаметром около 200 нм, в то время как некоторые другие гранулы (вторая подгруппа/тип гранул) имеют диаметр около 350 нм. В некоторых воплощениях гранулы диаметром около 200 нм предпочтительно связывают с первым детектирующим антигеном путем смешивания экстракта или лизата (т.е. смеси белков и других молекул) с указанными 200 нм гранулами и гранулами диаметром 350 нм предпочтительно связывают со вторым детектирующим антигеном, смешивая их с одним и тем же экстрактом, а затем объединяют два типа гранул в сочетании с двумя раз-

личными детектирующими антигенами, полученными из того же экстракта или лизата, тем самым создавая группу гранул разных типов с покрытием с набором детектирующих антигенов.

В некоторых воплощениях описанный в данном документе антигенный массив представляет собой аллергенный массив, включающий по меньшей мере одну из 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 или 250 групп гранул, связанных с детектирующим аллергеном (например, аллергеном, продуцируемым технологией рекомбинантных ДНК или очищенным природным аллергеном) или набором детектирующих аллергенов (например, гранул в сочетании с экстрактом антигена). В некоторых воплощениях аллергенный массив включает группы гранул в количестве вплоть до любого числа из 300, 400, 500 или 1000. В некоторых воплощениях аллергенный массив включает от 200 до 500 групп гранул, предпочтительнее от 250 до 350 групп гранул.

В некоторых воплощениях аллергенный массив включает одну или несколько групп гранул, покрытых молекулярным/рекомбинантно продуцируемым аллергеном, одну или несколько групп гранул, покрытых экстрактом антигена, и/или одну или несколько групп гранул, покрытых одним или несколькими антигенами, изолированными и очищенными из биологического источника.

В некоторых воплощениях описанный в данном документе массив антигена или антигена включает по меньшей мере 200 групп гранул (например, от 200 до 300 групп гранул), закрепленных на твердой пластине или листе (например, нитроцеллюлозной мембране), где массив содержит: (i) группы гранул (гранулы группы А) каждая группа (из гранул группы А) покрыта другим детектирующим антигеном/аллергеном (например, группа 1, покрытая рекомбинантным первым антигеном/аллергеном, группа 2, покрытая вторым антигеном/аллергеном, очищенным из экстракта или лизата, группа 3, покрытая рекомбинантным продуцируемым третьим антигеном/аллергеном и т.д.); и (ii) группы гранул (гранулы группы В), каждая группа (из гранул группы В), покрытая другим набором детектирующих антигенов/набором аллергенов (например, группа I покрыта первым экстрактом антигена/аллергена, полученного из первого биологического материала, группа II покрыта вторым экстрактом антигена/аллергена, полученного из второго биологического материала) и где группы гранул (гранулы обеих групп А и В) являются гранулами, изготовленными (например, гранулы из полистирола) с диаметром от 200 до 500 нм (например, диаметром около 350 нм), а также детектирующие антигены/аллергены или набор детектирующих антигенов/набор аллергенов соединены с гранулами ковалентно или нековалентно через одни и те же или разные химические связи. В некоторых воплощениях различные детектируемые антигены/аллергены или их наборы соединены с гранулами посредством пассивной адсорбции. В некоторых воплощениях часть детектирующих антигенов/аллергенов или их наборов присоединена посредством пассивной адсорбции, в то время как другие детектирующие антигены/аллергены связаны ковалентно, например, посредством EGS-линкеров или EDC-химии.

В некоторых воплощениях группы гранул расположены на антигенном или аллергенном массиве, описанном в данном документе, в прямоугольной структуре рядов и столбцов или в плотно упакованном паттерне. В некоторых воплощениях описанный в данном документе антигенный или аллергенный массив дополнительно включает положительные и/или отрицательные контрольные пятна в определенных положениях в массиве (например, пятна маркера), которые могут использоваться для обнаружения и идентификации гранул с антигенным покрытием в массиве.

Антигены

Антигены - это вещества, которые могут вызывать в иммунной системе ответ против себя. Антигены обычно представляют собой макромолекулы или молекулы, такие как белки, пептиды, полисахариды, антитела, полинуклеотиды, РНК, ДНК, липиды, гликозилированные молекулы, углеводы, органические или неорганические химические соединения, природные модификации таких молекул, аптамеры), которые являются чуждыми для хозяина. Антигены содержат один или несколько иммунологических эпитопов.

Антигены, описанные в данном документе, являются детектирующими антигенами, т.е. антигенами, определяющими антигенспецифическую реакцию. В некоторых воплощениях детектирующими антигенами являются аллергены, маркеры инфекции и/или аутоантигены.

Аллергены - это антигены, способные стимулировать реакцию гиперчувствительности типа I у atopических индивидуумов через ответы иммуноглобулина E (IgE). Аллергены могут содержаться внутри или могут быть получены из пищевого продукта, такого как, например, молочные продукты (например, коровье молоко), яйцо, сельдерей, кунжут, пшеница, соя, рыба, моллюски, сахара (например, сахара, присутствующие в мясе, такие как α -галактоза), арахис, другие бобовые (например, фасоль, горох, соя и т.д.) и орехи. В ином случае аллерген может содержаться внутри или может быть получен из непродовольственного продукта, такого как продукты животного происхождения, например экскреция пылевых клещей, мех и перхоть, шерсть; пыльца, например пыльца деревьев (таких как пыльца березы, пыльца кедра, пыльца дуба, пыльца ольхи, пыльца граба, пыльца конского каштана, пыльца ивы, пыльца тополя, пыльца платана, пыльца липы, пыльца оливкового дерева, пыльца можжевельника мексиканского и пыльца *Alstonia scholaris*) сорняки (амброзия, подорожник, крапива, полынь обыкновенная, марь белая, шавель) трава (райграс, тимофеевка); яд насекомых (например, яд пчелы, осы, москита, огненного муравья и т.д.), плесень, латекс, металлы (например, никель), бытовые чистящие средства, детергенты, лекарства, косметика (например, парфюмерия и т.д.), лекарственные средства (например пенициллин, сульфо-

намиды, салицилат и т.д.), терапевтические моноклональные антитела (например, цетуксимаб).

В некоторых воплощениях аллерген представляет собой перекрестно-реактивный аллерген. Перекрестно-реактивные аллергены являются аллергенами одного источника (например, березы), которые имеют структурное сходство с аллергенами другого источника (например, яблоко). Если у пациента имеется аллергия на первый источник, у него, вероятно, также разовьется аллергия на второй источник. В некоторых воплощениях аллерген является маркерным аллергеном. Маркерные аллергены преимущественно обнаруживаются в одном конкретном источнике. В некоторых воплощениях аллерген представляет собой пан-аллерген. Пан-аллергены (например, профилин) присутствуют в разных источниках. В некоторых воплощениях аллерген является основным аллергеном, который индуцирует преобладающий Ig-ответ в аллергической популяции, тогда как в другом воплощении аллерген может быть незначительным аллергеном, с которым реагирует только меньшинство аллергических пациентов. В некоторых воплощениях аллерген представляет собой аллерген, который перекрестно не реагирует с любым другим аллергеном.

Таблица 1. Перечень аллергенов

Код	Название	Вид	Распространенное название	Источник	Королевство
2405	Act c [Фрукты]	Actinidia chinensis	Золотой киви	Фрукты	растения
8234	Act c 11	Actinidia chinensis	Золотой киви	Фрукты	растения
10879	Act c Chitinase IV	Actinidia chinensis	Золотой киви	Фрукты	растения
1697	Act d [Фрукты]	Actinidia deliciosa	Зеленый Киви	Фрукты	растения
1	Act d 1	Actinidia deliciosa	Зеленый Киви	Фрукты	растения
5737	Act d 10	Actinidia deliciosa	Зеленый Киви	Фрукты	растения
747	Act d 2	Actinidia deliciosa	Зеленый Киви	Фрукты	растения
2821	Act d 5	Actinidia deliciosa	Зеленый Киви	Фрукты	растения
1279	Aed c	Aedes communis	жалящие насекомые	тело	Животные
1704	All c	Allium cepa	Лук	клубень	растения
1705	All p	Allium porrum	лук-порей	клубень	растения
1706	All s	Allium sativum	Чеснок	клубень	растения
722	Alt a 1	Alternaria alternata	Alternaria alternata	спора	Грибы
3063	Alt a 6.0101	Alternaria alternata	Alternaria alternata	спора	Грибы
6459	Ama cr	Amaranthus cruentus	Амарант багряный	семя	растения
1710	Amb a	Ambrosia	вид, родственник	Пыльца	растения

		artemisiifolia	полыни/абразии		
24	Amb a 1	Ambrosia artemisiifolia	вид, родственный полыни/абразии	Пыльца	растения
694	Ana c 2	Ananas comosus	ананас	фрукты	растения
1714	Ana o [Семя]	Anacardium occidentale	кэшью	семя	растения
1077	Ana o 3	Anacardium occidentale	кэшью	семя	Животные
1033	Ana p [яичный белок]	Anas platyrhynchos	фисташка	Яйцо	растения
10853	Ana p [яичный желток]	Anas platyrhynchos	персик	Яйцо	растения
2918	Ani pe	Anisakis pegreffii	анисакис	личинка	животные
1716	Ani s	Anisakis simplex	анисакис	личинка	животные
35	Ani s 1	Anisakis simplex	анисакис	личинка	животные
37	Ani s 3	Anisakis simplex	анисакис	личинка	животные
8793	Api [стебель]	Apium graveolens	сельдерей	стебель	растения
41	Api g 1.0101	Apium graveolens	сельдерей	корень	растения
1722	Api m [яд]	Apis mellifera	пчела	яд	животные
45	Api m 1	Apis mellifera	пчела	яд	животные
48	Api m 4	Apis mellifera	пчела	яд	животные
11401	Ara h	Arachis hypogaea	арахис	семя	растения
11402	Ara h 1-NT	Arachis hypogaea	арахис	семя	растения
51	Ara h 2	Arachis hypogaea	арахис	семя	растения
52	Ara h 3	Arachis hypogaea	арахис	семя	растения
55	Ara h 6	Arachis hypogaea	арахис	семя	растения
3100	Ara h 8.0101	Arachis hypogaea	арахис	семя	растения
1050	Ara X Аглутинин	Arachis hypogaea	арахис	семя	растения
862	Arm r HRP	Armoracia rusticana	Хрен	лист	растения
1728	Art v	Artemisia vulgaris	полынь	пыльца	растения
753	Art v 1	Artemisia vulgaris	полынь	пыльца	растения
1730	Asp f	Aspergillus fumigatus	Aspergillus	споры	грибы
1732	Asp n	Aspergillus niger	Aspergillus	споры	грибы
3050	Asp r 1	Aspergillus restrictus	Aspergillus	споры	грибы
1734	Aspa o	Asparagus officinalis	Спаржа	стебель	растения
1738	Ber e	Bertholletia excelsa	Бразильский орех	семя	растения
1741	Bet v [Пыльца]	Betula verrucosa	береза	пыльца	растения
90	Bet v 1.0101	Betula verrucosa	береза	пыльца	растения
3136	Ставка v 2.0101	Betula verrucosa	береза	пыльца	растения
2200	Beta v [Лист]	Beta vulgaris	обычная свекла	лист	растения
1742	Bla g	Blattella germanica	прусак	тело	животные
136	Bla g 1	Blattella germanica	прусак	тело	животные
141	Bla g 2	Blattella germanica	прусак	тело	животные
143	Bla g 4	Blattella	прусак	тело	животные

		germanica			
144	Bla g 5	Blattella germanica	прусак	тело	животные
1744	Blo t	Blomia tropicalis	клещ домашней пыли	тело	животные
2019	Bos d [Мясо]	Bos domesticus	корова	мышца	животные
10999	Bos d [Молоко]	Bos domesticus	корова	молоко	животные
163	Bos d 4	Bos domesticus	корова	молоко	животные
164	Bos d 5	Bos domesticus	корова	молоко	животные
165	Bos d 6	Bos domesticus	корова	молоко	животные
167	Bos d 8	Bos domesticus	корова	молоко	животные
10878	Bos d CA	Bos domesticus	корова	мышца	животные
7669	Bos d Желатин	Bos domesticus	корова	кожа	животные
1065	Bos d LF	Bos domesticus	корова	молоко	животные
1755	Bub b [Молоко]	Bubalus bubalis	одомашненный азиатский буйвол	молоко	животные
4043	Cam d [Молоко]	Camelus dromedarius	одногорбый верблюд	молоко	животные
1756	Can f [эпителий]	Canis familiaris	собака	эпителий	животные
174	Can f 1	Canis familiaris	собака	эпителий	животные
175	Can f 2	Canis familiaris	собака	эпителий	животные
176	Can f 3	Canis familiaris	собака	сыворотка	животные
5762	Can f 5	Canis familiaris	клещи	эпителий	животные
1757	Cand a	Candida albicans	кандида	споры	грибы
1760	Cap h [Молоко]	Capra hircus	козел	молоко	животные
709	Car p 1	Carica papaya	папайя	фрукты	растения
1540	Car p Химопапаин	Carica papaya	папайя	фрукты	растения
2025	Cas s [Семя]	Castanea sativa	виды, родственные березе/лесному ореху/дубу	семя	растения
1765	Cav p [Эпителий]	Cavia porcellus	морская свинка	эпителий	животные
10907	Cer si [Семя]	Ceratonia siliqua	рожковое дерево	семя	растения
2223	Che qu	Chenopodium quinoa	лебеда	семя	растения
1771	Cic a	Cicer arietinum	нут	семя	растения
2229	Cit r [Фрукты]	Citrus reticulata	мандарин	фрукты	растения
1775	Cla h	Cladosporium herbarum	грибы	спор	грибы
1778	Cor a [пыльца]	Corylus avellana	лесной орех	пыльца	растения
2028	Cor a [Семя]	Corylus avellana	лесной орех	семя	растения
235	Cor a 1.0103	Corylus avellana	лесной орех	пыльца	растения
5886	Cor a 14	Corylus avellana	клещи	семя	животные
245	Cor 8	Corylus avellana	лесной орех	семя	растения
246	Cor a 9	Corylus avellana	лесной орех	семя	растения
2429	Cot c [Яйцо белый]	Coturnix	золотой киви	яйцо	растения
2430	Cot c [Яичный желток]	Coturnix	золотой киви	яйцо	растения
1782	Cri c	Cricetus	хомяк	эпителий	животные

1784	Cry j	Cryptomeria japonica	кедр	пыльца	растения
1786	Cuc m [мякоть]	Cucumis melo	мускусная дыня	фрукты	растения
1789	Cuc s	Cucumis sativus	огурец	фрукты	растения
256	Cup a 1	Cupressus arizonica	кипарис аризонский	пыльца	растения
1799	Dau c	Daucus carota	морковь	корень	растения
295	Der f 1	Dermatophagoides farinae	кипарис аризонский	тело	растения
302	Der f 2	Dermatophagoides farinae	кипарис аризонский	тело	растения
310	Der p 1	Dermatophagoides pteronyssinus	клещи	тело	животные
311	Der p 10	Dermatophagoides pteronyssinus	клещи	тело	животные
316	Der p 2	Dermatophagoides pteronyssinus	клещи	тело	животные
5748	Der p 23.0101	Dermatophagoides pteronyssinus	клещи	тело	животные
321	Der p 7	Dermatophagoides pteronyssinus	клещи	тело	животные
323	Der p 9	Dermatophagoides pteronyssinus	клещи	тело	животные
3995	Equ as [Молоко]	Equus asinus	осел	молоко	животные
1813	Equ c [Эпителлий]	Equus caballus	лошадь	эпителлий	животные
2032	Equ c [Молоко]	Equus caballus	лошадь	молоко	животные
335	Equ c 3	Equus caballus	лошадь	сыворотка	животные
10877	Equ c Миоглобин	Equus caballus	лошадь	мышца	животные
340	Eur m 2	Euroglyphus maynei	лошадь	тело	животные
1816	Fag e	Fagopyrum esculentum	лошадь	семя	животные
1819	Fel d	Felis domesticus	кошка	эпителлий	животные
345	Fel d 1	Felis domesticus	кошка	эпителлий	животные
346	Fel d 2	Felis domesticus	кошка	сыворотка	животные
2034	Foe v [луковица]	Foeniculum vulgare	укроп	луковица	растения
1826	Fra a [фрукты]	Fragaria ananassa	клубника	фрукты	растения
1831	Gad m [мясо]	Gadus morhua	атлантическая треска	мышца	животные
1832	Gal d [яичный белок]	Gallus domesticus	курица	яйцо	животные
2036	Gal d [яичный желток]	Gallus domesticus	курица	яйцо	животные
2037	Gal d [Мясо]	Gallus domesticus	курица	мышца	животные
359	Gal d 1	Gallus domesticus	курица	яйцо	животные
360	Gal d 2	Gallus domesticus	курица	яйцо	животные
361	Gal d 3	Gallus domesticus	курица	яйцо	животные
362	Gal d 4	Gallus domesticus	курица	яйцо	животные
363	Gal d 5	Gallus domesticus	курица	яйцо	животные

1834	Gly m	Glycine max	soя	семя	растения
368	Gly m 1	Glycine max	soя	семя	растения
1429	Gly m Агглютинин	Glycine max	soя	семя	растения
1144	Gly m II	Glycine max	soя	семя	растения
1840	Hel as	Helix aspersa	коричневая садовая улитка	мышца	животные
378	Hel as 1	Helix aspersa	коричневая садовая улитка	мышца	животные
1841	Hev b	Hevea brasiliensis	латекс	латекс	растения
379	Hev b 1	Hevea brasiliensis	латекс	латекс	растения
380	Hev b 10	Hevea brasiliensis	латекс	латекс	растения
384	Hev b 11	Hevea brasiliensis	латекс	латекс	растения
3314	Hev b 3.0101	Hevea brasiliensis	латекс	латекс	растения
3316	Hev b 5.0101	Hevea brasiliensis	латекс	латекс	растения
392	Hev b 6.02	Hevea brasiliensis	латекс	латекс	растения
396	Hev b 7.02	Hevea brasiliensis	латекс	латекс	растения
397	Hev b 8	Hevea brasiliensis	латекс	латекс	растения
404	Hev b 9	Hevea brasiliensis	латекс	латекс	растения
763	Hom's HSA	Homo sapiens	люди	сыворотка	животные
1384	Hom s LF	Homo sapiens	люди	молоко	животные
2040	Hor v [Семя]	Hordeum vulgare	ячмень	семя	растения
1850	Jug r [Семя]	Juglans regia	грецкий орех	семя	растения
425	Jug r 2	Juglans regia	латекс	семя	растения
426	Jug r 3	Juglans regia	грецкий орех	семя	растения
1856	Lac s	Lactuca sativa	вид, родственный полыни/амброзии	лист	растения
1857	Len c	Lens culinaris	чечевица	семя	растения
905	Lin us	Linum usitatissimum	Linum usitatissimum	семя	растения
1868	Lol p [Пыльца]	Lolium perenne	травы	пыльца	растения
450	Lol p 1	Lolium perenne	Gr	пыльца	растения
940	Lup a [Семя]	Lupinus albus	Lupinus albus	семя	растения
1871	Mal d [Фрукты]	Malus domestica	Malus domestica	фрукты	растения
1454	Mal d 1.0108	Malus domestica	Malus domestica	фрукты	растения
1035	Mel g [яичный белок]	Meleagris gallopavo	индейка	яйцо	животные
10909	Mel g [яичный желток]	Meleagris gallopavo	индейка	яйцо	животные
2049	Мел [Мясо]	Meleagris gallopavo	индейка	мышца	животные
476	Mer a 1	Mercurialis annua	Mercurialis annua	мышца	растения
7643	Mer mr 1	Merluccius	европейский хек	мышца	животные
2051	Mus m [Эпителий]	Mus musculus	мышь	эпителий	животные
478	Mus m 1	Mus musculus	мышь	эпителий	животные
755	Mus m 4	Mus musculus	полынь	сыворотка	растения
1413	Myt e	Mytilus edulis	голубая мидия	мышца	животные
2132	Oct v	Octopus vulgaris	осьминог	мышца	животные
1888	Ole e [Пыльца]	Olea europaea	оливковое дерево	пыльца	растения
482	Ole e 1	Olea europaea	оливковое дерево	пыльца	растения

490	Ole e 2	Olea europaea	оливковое дерево	пыльца	растения
2054	Ory c [Эпителлий]	Oryctolagus cuniculus	мышь	эпителлий	животные
2057	Ory c [Мясо]	Oryctolagus cuniculus	кролик	мышца	животные
759	Ory c 6	Oryctolagus cuniculus	кролик	сыворожка	животные
11394	Ory s [Семя]	Oryza sativa	Oryza sativa	семя	растения
2061	Ovi a [Мясо]	Ovis aries	овца	мышца	животные
1892	Ovi a [Молоко]	Ovis aries	овца	молоко	животные
758	Ovi a 6	Ovis aries	овца	сыворожка	животные
1893	Пан b	Pandalus borealis	ракообразные	мышца	животные
1904	Par j	Parietaria judaica	постенница	пыльца	растения
507	Par j 2	Parietaria judaica	постенница	пыльца	растения
1912	Pen ch	Penicillium chrysogenum	пеницилл	споры	грибы
972	Pen m 1	Penaeus monodon	черная тигровая креветка	мышца	животные
1917	Per a	Periplaneta americana	американский таракан	тело	животные
542	Per a 7	Periplaneta americana	американский таракан	мышца	животные
1920	Pers a	Persea americana	Persea americana	фрукты	растения
1923	Pha v [Семя]	Phaseolus vulgaris	бобовые	семя	растения
1924	Phl p	Phleum pratense	злаки	пыльца	растения
551	Phl p 1.0102	Phleum pratense	злаки	пыльца	растения
3419	Phl p 2.0101	Phleum pratense	злаки	пыльца	растения
559	Phl p 5.0101	Phleum pratense	злаки	пыльца	растения
3420	Phl p 6.0101	Phleum pratense	злаки	пыльца	растения
3422	Phl p 7.0101	Phleum pratense	злаки	пыльца	растения
714	Pin p [Семя]	Pinus pinca	сосна	семя	растения
1008	Pis v [Семя]	Pistacia vera	фисташка	семя	растения
1932	Pla a	Platanus acerifolia	платан кленолистный	пыльца	растения
572	Pla a 1	Platanus acerifolia	платан кленолистный	пыльца	растения
10875	Ple o [спорокарпий]	Pleurotus ostreatus	грибы	спорокарпий	грибы
2322	Pol spp	Polistes spp	перепончатокрылые	яд	животные
1945	Pru ar [Фрукты]	Prunus armeniaca	вишня	фрукты	растения
1948	Pru du [Семя]	Prunus dulcis	миндальное дерево	семя	растения
2070	Pru p [Рец]	Prunus persica	персик	фрукты	растения
2069	Pru p [Целлюлоза]	Prunus persica	персик	фрукты	растения
603	Pru p 3	Prunus persica	персик	фрукты	растения
9147	Pru p 7	Prunus persica	персик	фрукты	растения
1195	Pun g	Punica granatum	гранат	фрукты	растения
2834	Pun g 1	Punica granatum	гранат	фрукты	растения
11786	Pun g 14	Punica granatum	гранат	фрукты	растения
11787	Pun g 5	Punica granatum	гранат	фрукты	растения
11614	Pun g 7	Punica granatum	гранат	фрукты	растения
1955	Que a [Пыльца]	Quercus alba	растения	пыльца	растения

2072	Rat n [Эпителий]	Rattus norvegicus	крыса	эпителий	животные
611	Rat n 1	Rattus norvegicus	крыса	эпителий	животные
756	Rat n 4	Rattus norvegicus	крыса	сыворотка	животные
1960	Sac c	Saccharomyces cerevisiae	дрожжи	споры	грибы
3348	Sal k 1	Salsola kali	солянка калийная	пыльца	растения
1962	Sal s [Мясо]	Salmo salar	атлантический лосось	мышца	животные
2363	Sar m	Sardinops melanostictus	рыбы	мышца	животные
1971	Ses i	Sesamum indicum	кунжут	семя	растения
1972	Sin a [Семя]	Sinapis alba	Sinapis alba	семя	растения
2368	Sol so	Solea	морской язык	мышца	животные
1870	Sola l [Фрукты]	Solanum lycopersicum	помидор	фрукты	растения
6131	Sola l [семя]	Solanum lycopersicum	помидор	семя	растения
8215	Sola l 6	Solanum lycopersicum	помидор	фрукты	растения
875	Sola m	Solanum melongena	баклажан	фрукты	растения
1977	Sola t	Solanum tuberosum	картошка	клубень	растения
639	Sola t 1	Solanum tuberosum	картошка	клубень	растения
1980	Spi o	Spinacia oleracea	шпинат	лист	растения
2088	Sus s [Мясо]	Sus scrofa domestica	свинья	мышца	животные
757	Sus s 1	Sus scrofa domestica	свинья	сыворотка	животные
2375	Thu a [Мясо]	Thunnus albacares	рыбы	мышца	животные
11396	Tri a [Семя]	Triticum aestivum	пшеница	семя	растения
8724	Tri a 7k-LTP	Triticum aestivum	пшеница	семя	растения
650	Tri a 18	Triticum aestivum	пшеница	семя	растения
8186	Tri a 28	Triticum aestivum	пшеница	семя	растения
651	Tri a Gliadin	Triticum aestivum	пшеница	семя	растения
2653	Tri me	Trichophyton mentagrophytes	грибы	все тело	грибы
921	Tri tp	Triticum polonicum	злаки	семя	растения
8169	Uro du	Uroteuthis duvauceli	индийский кальмар	мышца	животные
11791	Uro du 1	Uroteuthis duvauceli	индийский кальмар	мышца	животные
6340	Ven ga	Venus gallina	моллюск	мышца	животные
11788	Ven ga 1	Venus gallina	моллюск	мышца	животные
2400	Ves spp	Vespula spp	перепончатокрылые	яд	животные
2012	Vit v [Фрукты]	Vitis vinifera	виноград	фрукты	растения
11392	Zea m [Семя]	Zea mays	кукуруза	семя	растения
684	Zea m 14	Zea mays	кукуруза	семя	растения

Маркеры инфекции представляют собой вещества, композиции или частицы, которые свидетельствуют о наличии инфекционного агента, такого как вирусы, паразиты, бактерии, прионы и грибы.

Маркеры инфекции включают, без ограничения указанным, белки, гликопротеины (например, поверхностные или оболочечные белки бактерий или вирусов), смеси белков (например, лизат бактериальных клеток), другие детектируемые соединения, связанные с инфекционным агентом или частицами (например, вирусоподобные частицы или вирусные оболочки, бактериальные поверхностные антигены и т.д.).

Аутоантигены - это молекулы, созданные организмом, таким как человек, на которые у этого организма есть иммунный ответ, такой как образование антител к аутоантигену, т.е. образование аутоантител. Выработка аутоантител обычно связано с аутоиммунным заболеванием. Примеры аутоантигенов включают как органоспецифические антигены, такие как тиреоглобулин, так и убиквитарные клеточные антигены, такие как ДНК, гистоны и частицы рибонуклеопротеина. Типичные аутоантигены, которые могут быть включены в антигенный массив, описанный в данном документе, приведены в табл. 2.

Таблица 2. Аутоантигены

Белок	Заболевание	Белок	Заболевание
SmB/SmB'	SLE	RuvB-like 1	PM, Der, AH
Sm-D1	SLE	CHD-3	Der
Sm-D2	SLE	CHD-4	Der
Sm-D3	SLE	RCC1	Ray
U1 snRNP A	SLE	PM/Scl-100, PM/Scl-2	PM, SScl
U1 snRNP 70K	SLE	PM/Scl-75, PM/Scl-1	PM, SSCL
U1 snRNP C	SLE	RRP42	PM, SSCL
U2 snRNP A'	SLE	RRP4	PM, SSCL
U2 snRNP B''	SLE	фибрилларин	SScl, у 8% пациентов
Ro52K SS-A1	SLE,SS	UBF-1	SScl, аутоантиген NOR-90
Ro60K SS-A2	C, CC	PA28g	SLE
La SS-B	C, CC	SSNA1	SS
Гистон H1b	SLE	hnRNP A/B	SLE, RA, MCTD
Гистон H2A.1b	SLE	hnRNP A2	SLE, RA, MCTD
Гистон H2B.1a	SLE	ZNF330	RA, ядрышковый аутоантиген 36
Гистон H3.1	SLE	ASF-1 SRp30a	SLE
Гистон H4	SLE	SC35 SRp30b	SLE
ДНК-топоизомераза I	SScl (ретровирусный p30gag)	SRp20	SLE
CENP-A	Ray, Crest (SScl sub)	SRp75	SLE
CENP-B	Ray, Crest (SScl sub)	SRp40	SLE
CENP-C	SS, SScl, аутоантиген	SRp55	SLE
Ku86	SLE	DBP1	SSCL, SLE
Ku70	SLE, Cterm 190 остатков	NUMA1	SS
Аннексин A11	C, CC, P.A.	Eg5 Кинезин-подобный NUMA-2	SS, SLE
RNaseP p38	SScl, 4/4 сыворотка	PCNA (циклин)	Сыворотка SLE содержит PCNA
RNaseP p30	SScl, 2/4 сыворотка	CCP	RA
фибриноген	RA	Ревматоидный фактор	RA, SLE
Ro52	RA	коллаген	RA

Аббревиатуры заболеваний.

SLE - системная красная волчанка;

SS - синдром Шегрена;

SScl - склеродермия (системный склероз);

PM - полимиозит;

Der - дерматомиозит;

Рэй - болезнь Рейно;

RA - ревматоидный артрит;

MCTD - смешанное поражение соединительной ткани.

Антигены, т.е. детектирующие антигены, описанного в данном документе антигенного массива, могут быть антигенами, продуцируемыми с помощью технологии рекомбинантных ДНК, или антигенами, очищенными и выделенными из биологического исходного материала (например, антигенами из биологического материала, по существу, свободного от любых других антигенов, которые могут быть выделены из одного и того же биологического материала способами, известными в данной области (сравните Ian R. Mackay & Noel R. Rose, *The Autoimmune Diseases*, Fifth Edition, Academic Press 2014). В некоторых воплощениях гранулы соединены с рекомбинантно продуцируемым антигеном. В некоторых воплощениях гранулы соединены с выделенным и очищенным детектирующим антигеном из биологического источника.

В некоторых воплощениях антигенный массив содержит группы гранул с набором детектирующих антигенов (например, по меньшей мере один, два или более детектирующего антигена). Например, набор детектирующих антигенов может быть получен из экстракта (например, экстракта аллергена) или лизата (например, бактериального лизата или другого клеточного лизата) биологического источника. В некоторых воплощениях гранулы соединяются с экстрактом или лизатом биологического источника, тем самым получая гранулы с антигенным покрытием с набором детектирующих антигенов.

В некоторых воплощениях гранулы покрывают молекулярным аллергеном, полученным с помощью технологии рекомбинантной ДНК. В некоторых воплощениях гранулы покрывают аллергеном, выделенным или очищенным из биологического источника. В некоторых воплощениях гранулы покрывают экстрактом аллергена (например, набором аллергенов, таких как по меньшей мере один, два или более аллергенов из биологического материала). Экстракт аллергена может содержать сырой экстракт аллергена;

концентрированный экстракт аллергена; или несколько аллергенов, очищенных из экстракта аллергена. Аллергены являются естественными аллергенами. Аллергенный экстракт может, естественно, содержать одну или несколько изоформ одного и того же аллергена. Экстракт аллергена может также состоять из смеси по меньшей мере двух экстрактов аллергенов различных биологических источников, например двух разных, но тесно связанных видов аналогичного основного происхождения, обычно называемых spp.

Связывание антигена с использованием микро- или наночастиц.

Антигенный массив, описанный в данном документе, использует принцип индивидуальной оптимизированной стратегии сочетания гетерогенных и сложных биологических антигенов (т.е. детектирующих антигенов). В мультиплексном анализе обнаружения иммунологических антител это является предварительным условием для достижения оптимальной тестовой эффективности для каждого отдельного параметра.

Связывание антигена происходит в две разных стадии. На первой стадии каждый антиген соединен с взвешенными частицами микрометрового или нанометрового размера, например микрогранулой или наногранулой.

В конкретном воплощении эти частицы являются сферическими частицами, которые могут содержаться в растворе в водных буферах, таких как те, которые обычно используются для хранения белка или, в более общем случае, биомолекулы. Частицами могут быть частицы латекса или полистирола, пластиковые полимерные частицы или частицы, изготовленные из стекла (кремнезем), пористые или непористые поверхностные частицы или даже частицы, сделанные из других биосовместимых полимеров. Размер частиц может составлять от нескольких нанометров до микрон, причем предпочтительный размер частиц составляет от 5 до 500 нм в диаметре, более предпочтительно от 200 до 500 нм, еще более предпочтительно от 200 до 350 нм (например, около 350 нм) в диаметре. В некоторых воплощениях гранулы представляют собой наночастицы полистирола.

Присоединение антигенов (белков, пептидов, антител, ДНК и других биомолекул, полученных из нуклеиновых кислот, аминокислот или органических или неорганических химических соединений, которые могут служить антигенами) может протекать через различные стратегии присоединения.

В простейшем воплощении антигенная молекула или макромолекула будет прикрепляться к частице (грануле) пассивной адсорбцией, например гидрофобным и/или электростатическим присоединением. Присоединение может быть облегчено путем выбора соответствующей буферной системы, которая создает среду для максимального прикрепления, например, путем выбора буферной системы, которая имеет значение pH, близкое к изоэлектрической точке антигена, тем самым нейтрализуя поверхностный заряд в среднем.

В более сложных условиях антиген, подлежащий связыванию, состоит либо из отдельных молекул, несущих один антиген, либо из одной макромолекулы с несколькими связывающими антитела эпитопами или даже с комплексной смесью различных белков с индивидуально различными антигенами, содержащими множество эпитопов (например, экстракт или лизат биологического исходного материала, включающий набор детектирующих антигенов), что может потребовать различных условий адсорбции для достижения оптимальных возможностей биологического связывания (авидность). В этом случае антиген или смесь антигенов может быть разделена на несколько аликвот, и каждая аликвота, связанная в разных условиях, например при различных значениях pH или в буферах с различной ионной силой или с различными буферными добавками, такими как соль, детергенты, буферные вещества и т.д. При каждом условии каждый антиген соединяется в определенной конфигурации, которая может быть предпочтительной для биологической активности, или часть определенных антигенов может соединяться легче, чем другая субпопуляция, или вообще не в выбранных условиях. На следующей стадии различные аликвоты могут быть воссоединены для создания популяции микро- или наночастиц, которые несут разные антигены из исходной комплексной смеси или одного антигена в различных структурных конфигурациях. При достижении этого первоначальный эпитопный репертуар биологического образца может быть связан с частицами без создания смещения таким образом, чтобы сохранялись только выбранные эпитопы или чтобы фактически были связаны только выбранные носители антигенов из сложной смеси.

Выбирая достаточное количество различных условий связывания и оптимизируя смесь дифференциально связанных комбинаций частиц и антигенов, конечный раствор частиц, загруженных антигенами, будет точно формировать эпитопный репертуар исходной смеси, или можно обогатить предпочтительные носители антигена в растворе частиц таким образом, чтобы сохранить при этом полную комплексность эпитопа в целом.

В еще более сложных условиях антигены могут быть соединены путем применения множества способов комбинаторной органической химии связывания, известных специалистам в данной области техники. В соответствии с этой стратегией антигены могут быть ковалентно связаны с частицами и могут выборочно связываться с определенной химической группой, присутствующей на поверхности антигенов, например amino- или карбоксильной группой, сульфгидрильной группой, ароматическим остатком и т.д.

Кроме того, можно использовать подходящие антигенные спейсеры для оптимизации презентации антигена при работе с малыми антигенами, такими как пептиды или химические соединения.

Посредством химической поверхностной инженерии поверхности частиц также возможно оптимизировать сцепление гранул с твердой поверхностью носителя, подавить неспецифическое связывание или усилить связывание антитела.

В некоторых воплощениях детектирующий антиген или набор детектирующего антигена ковалентно связаны с гранулами (например, через линкер EGS с NH_2 -покрытой поверхностью гранул, через линкер EDC с COOH -покрытой поверхностью гранул). В некоторых воплощениях детектирующий антиген или набор детектирующих антигенов нековалентно связаны с гранулами. Например, гранулы могут быть покрыты антигеном или набором детектирующих антигенов пассивной адсорбцией.

Кроме того, можно оптимизировать размер частиц в соответствии с требованиями производственного процесса. Частицы должны быть просты в обращении и оставаться в растворе, и в то же время они должны прикрепляться специфически или неспецифически после осаждения на окончательную твердую подложку. После наполнения частиц антигенами наполненные частицы могут быть отделены от остаточного антигенного раствора, например, среди прочего, путем центрифугирования, магнитного разделения, электрического заряда или эксклюзионного эффекта. Благодаря этому разделению можно сохранять только фракцию предпочтительно связанных антигенов и избавиться от оставшейся, возможно не антигенной фракции исходной смеси антигенов.

Функциональное тестирование антигенсвязанных частиц может быть выполнено, и результаты могут быть сравнены с доступными эталонными тестами, выполненными с помощью эталонного диагностического метода *in vitro*, относительно клинических справочных данных или относительно доступных стандартных препаратов. Поскольку не существует международно признанного лабораторного стандарта для многих антигенспецифических IgE-антител, одной из доступных эталонных систем являются образцы контроля качества Biorad Lymphocheck®, которые были протестированы на IgE против основных аллергенов на трех наиболее широко используемых автоматических инструментах для иммуноанализа (www.bio-rad.com).

Степень связывания антигена может быть проверена различными способами, известными в данной области. Например, надосадочную жидкость из реакции связывания можно использовать для анализа ELISA, с помощью которого можно измерить содержание белка, или можно протестировать на 1D или 2D белковых гелях, в результате чего можно оценить не только общее содержание несвязанных антигенов, но также можно задокументировать природу как несвязанных, так и связанных носителей антигенов (тех, которые больше не присутствуют в геле), глядя на размер/положение белковых пиков или точек. При необходимости надосадочная жидкость может быть дополнительно проанализирована с помощью масс-спектрометрии.

Аналогичный подход может быть применен для проверки стабильности связывания. Например, путем связывания частиц и затем тестирования надосадочной жидкости (раствора, не содержащего частицы) после определенных временных интервалов можно определить, остаются ли антигенные белки неизменно прикрепленными к частицам или диффундируют ли они обратно в раствор через определенный период времени или при определенных условиях хранения, с определенными буферами хранения или детергентами.

Хранение гранул, связанных антигеном, и их обработка при производстве.

Хранение покрытых гранул может протекать в условиях, которые стабилизируют белок, связанный с частицами, в течение, по меньшей мере, нескольких месяцев, предпочтительно нескольких лет после первоначального связывания, с двумя основными целями, во-первых, с целью сохранения белков, присоединенных к частицам, а во-вторых, и что более важно, с целью сохранения биологически активных белков и защиту их от деградациии, например, протеолитическим расщеплением. Кроме того, гранулы должны храниться в растворе и необходимо избегать любых осадков, поскольку это может привести к образованию агрегатов, которые впоследствии не могут быть растворены, что приводит к блокированию и разрушению части эпитопного репертуара, присутствующего в исходном антигенном растворе, без применения более жестких и потенциально антиген-разрушающих способов (нагревание, сдвиговая деформация, обработка ультразвуком, интенсивное перемешивание и т.д.).

Вышеупомянутый подход представляет собой значительное улучшение для любого процесса производства иммунного анализа, поскольку реагенты могут быть стабилизированы в достаточной степени в течение более длительного периода или даже бесконечно при хранении, например, при -80°C . Преимущество наличия стабильных наборов первичных реагентов для последующего производственного процесса в основном заключается в том, что после получения хорошего реагента исходя из того, что он стабилен в течение длительного времени, необходимо прилагать относительно небольшие усилия в процедурах контроля качества. Принимая во внимание, что если соединение должно быть быстро осуществлено сразу перед применением, каждый раз, когда соединение будет завершено, должен быть проведен полный набор мер контроля качества и документирования. Все еще оставалась бы неопределенность в отношении того, возникает ли варьирование процесса связывания или предшествующего ухудшения антигенного раствора, который может быть труднее хранить в течение более длительного времени, чем фактически адсорбированные антигены на поверхности частиц. Специалистам в данной области известно, что белки не могут храниться неограниченно в простом растворе даже при низких температурах,

главным образом потому, что повторное замораживание и оттаивание могут ухудшить качество, а белки имеют тенденцию к осаждению или прикреплению друг к другу. Однако стабильность белков, присоединенных к поверхности, может быть значительно более продолжительной даже при менее благоприятных условиях хранения.

Условия, при которых возможно хранение в течение более длительного периода, также включают выбор наилучшего температурного диапазона, обычно либо -20°C , либо диапазон между $2-8^{\circ}\text{C}$, предпочтительно $2-4^{\circ}\text{C}$.

Буферы, используемые для хранения гранул с антигенным покрытием, описанных в данном документе, включают, без ограничения указанным: простой раствор NaCl, фосфатные буферы, буфер Tris, буфер MES, цитратный буфер, буфер HEPES и т.д.

Условия pH для хранения предпочтительны в физиологическом диапазоне, между pH 7-8, но также могут находиться в диапазоне pH 6-9 или даже pH 2-14.

Добавки для обеспечения более длительного хранения включают, без ограничения указанным: неионные детергенты, такие как Tween-20, SDS, Triton и другие.

Для того чтобы избежать бактериального или грибкового роста в препаратах во время хранения, можно использовать азид натрия, катон или другие консерванты.

Многоатомные спирты, такие как глицерин, поливиниловый спирт и т.д., могут быть использованы для стабилизации как частиц в растворе, так и белков на частицах.

Полисахариды, такие как трегалоза, сахароза и т.д., могут дополнительно стабилизировать белки, в частности, от структурной деградации.

Сахара могут также использоваться для стабилизации белка даже после того, как частицы соединяются с твердой фазой окончательного анализа.

Поверхностное депонирование антигенных заряженных гранул в формате массива.

Перенос гранул из раствора в твердую фазу может быть проведен несколькими способами, известными специалистам в данной области техники. Цель состоит в том, чтобы перенести ряд растворов индивидуальных антигенсодержащих частиц (групп гранул) в упорядоченный массив адресуемых элементов (отдельные молекулярные объекты с определенным положением на массиве), так чтобы после инкубации с антигенсодержащим биологическим образцом, например сывороткой пациента и соответствующим определением события связывания, обнаруженный сигнал мог быть связан с соответствующим антигенным исходным материалом.

Принципиальные способы осаждения жидкостей из раствора на твердый носитель являются контактными или бесконтактными. Для контактных способов, как правило, штамп или штырь какого-либо рода несколько раз опускаются в исходную жидкость, а между погружением в исходную жидкость собранный материал, который поглощается штампом или штырем, осаждается на твердой подложке. Однако этот способ, являющийся более простой альтернативой, имеет существенные недостатки, когда речь идет о масштабируемости и воспроизводимости, поскольку большая часть производительности процесса будет зависеть от природы штампа и исходной жидкости, а также от смачиваемости твердой фазы, вязкости, состав жидкости и т.д.

Поэтому в большинстве современных приложений предпочтительными являются бесконтактные способы. Для описанных в данном документе массивов может использоваться соленоидная система дозирования, при которой шприц создает давление в канале для жидкости, содержащем антигенный исходный раствор, и точно рассчитанное время открытия электромагнитного клапана позволяет образовывать точно однородные капли из керамического наконечника. Капля затем выбрасывается из керамического наконечника и после короткой фазы полета приземляется и присоединяется к твердой фазе. Движение твердой фазы под керамическим наконечником (или наоборот перемещение наконечника с помощью моторизованной оси) позволяет производить отдельные массивы, когда одна за другой упорядоченным образом наносятся разные исходные жидкости. В ином случае осаждение капель может протекать через пьезоуправляемое каплеобразование, в результате чего основное отличие от ранее описанного способа заключается в том, что давление не создается шприцем, а электрическим импульсом к пьезокристаллу, а выдаваемый объем обычно намного меньше, в диапазоне пиколитра, тогда как дозирование соленоидом лучше всего работает в диапазоне нанолитровых капель.

Предпочтительный размер сформированных капель составляет 1 мм в диаметре, что дает круглые элементы (отдельные молекулярные объекты в качестве адресуемых элементов) диаметром около 1 мм на твердой фазе. Используя такие размеры, можно создавать массивы размером примерно 10×10 (100 в целом) различных антигенсвязанных областей на квадратный сантиметр. Количество жидкости, дозированной таким образом на твердой фазе, составляет около 30 нл на каплю, но может составлять от 1 до 200 нл или даже выше. Круглые элементы или блоки, содержащие определенную группу гранул с антигенным покрытием, могут быть идентифицированы по их местоположению/положению (пространственно адресуемому) и могут быть расположены в обычном прямоугольном массиве или в плотноупакованном массиве. Описанные в данном документе массивы содержат от 1 до 9 адресуемых элементов на мм^2 , например любое количество из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 адресуемых элементов на мм^2 .

Важными переменными для качества депонированных пятен (однородность, форма, допуск распо-

ложения и т.д.) и количественная воспроизводимость с точки зрения коэффициента вариации конечного измерения являются: расстояние от мишени, давление в канале; время открытия канавки; объем капли; скорость движения оси; время между дозированием; керамический наконечник в процессе и между процессами очистки и кондиционирования; предварительная подгонка до фактического процесса нанесения пятна; объем аспирации и скорость аспирации; и геометрия микротитровального планшета. Во время процесса осаждения необходимо поддерживать антигенсвязанные частицы в растворе внутри устройства для работы с жидкостью, и избегать любого перекрестного загрязнения между осаждением разных гранул с антигенным покрытием путем достаточной очистки жидких каналов между циклами аспирации и дозирования.

Чтобы добиться процесса осаждения с нулевым дефектом, важно обнаружить каждое событие одиночного дефекта дозирования, например, путем добавления непостоянного красителя к раствору частиц, который позволяет обнаружить успешное осаждение жидкости на твердую фазу, но будет смываться во время фактической процедуры тестирования. Таким образом, отсутствующая капля может быть обнаружена и ретроспективно добавлена после первого раунда дозирования, что приведет к 100% полным партиям в 100% случаев.

Твердая подложка.

Процесс осаждения обычно проводят на больших листах или пластинах твердого материала носителя, причем каждая партия обычно состоит от нескольких сотен до нескольких тысяч идентичных массивов. Непрерывный процесс может быть реализован путем выравнивания необходимого количества каналов дозирования и перемещения подложки на пластинах или даже катушечной системы под наконечниками для дозирования и определения времени позиционирования и дозирования так, чтобы на твердой подложке были созданы упорядоченные массивы пятен частиц.

После стадии дозирования твердую подложку разрезают на куски соответствующего размера для дальнейшей сборки или хранения. В ином случае, твердую подложку можно разрезать до подходящих размеров еще до осаждения гранул с антигенным покрытием, где размер кусков соответствует количеству депонированных групп частиц и плотности отдельных групп. В предпочтительном воплощении отдельные куски твердой подложки являются прямоугольными и от 5×5 до 200×200 мм или более, еще более предпочтительно от 10×10 до 20×30 мм.

Твердая подложка может состоять из нитроцеллюлозы, ламинированной нитроцеллюлозы или диазобумаги или органических полимеров, таких как полистирол, полиэтилен, полипропилен, полифторэтилен, полиэтиленокси, поливинилидендифторид (PVDF), полиакриламид, поликарбонат, полиаломер, поливинил, нейлон, полимеры и их трансплантаты или другие функционализированные пластмассы. Твердая подложка также может быть неорганической, такой как стекло, диоксид кремния, стекло с контролируемым размером пор (CPG) или диоксид кремния с обращенной фазой. Конфигурация твердого носителя может быть в форме мембраны или поверхности и может быть плоской, по существу плоской или неплоской. Твердые опоры могут быть пористыми или непористыми и могут иметь характеристики разбухания или неразбухания.

По своей природе твердая подложка может быть пористым или непористым материалом, обладающим способностью удерживать частицы, загруженные белковыми антигенами. Например, нитроцеллюлозные листы или слоистые нитроцеллюлозные листы могут быть использованы в качестве твердой фазы, при этом размер пор и точный состав нитроцеллюлозы могут оказать значительное влияние на результаты теста. Так же химическая активация нитроцеллюлозы с целью ковалентного связывания биомолекул может оказать благотворное влияние на результаты испытаний. В качестве твердой подложки доступны различные типы нитроцеллюлозных мембран, такие нитроцеллюлозные мембраны различаются по размеру пор, скорости потока или исходному материалу. Предпочтительно размер пор должен находиться в диапазоне размеров частиц, так чтобы частицы удерживались порами на поверхности, но в то же время не проваливались в структуру твердой подложки, что затруднило бы связывание антитела с поверхностью частиц.

Твердая фаза должна быть долговечной и совместимой с обычной процедурой ELISA, которая требует нескольких часов инкубации и промывки в водных растворах. Неспецифическое связывание с поверхностью должно быть либо по существу низким, либо должна быть возможность блокирования любого неспецифического связывания с твердой фазой, чтобы достичь требуемого отношения сигнал/шум (сигнал делится на стандартное отклонение шума).

Хранение тестов и сборка в картридж.

Чтобы стабилизировать частицы после осаждения на твердую подложку, твердую подложку можно хранить при соответствующей температуре, предпочтительно 2-8°C. Кроме того, сахар или другие стабилизирующие вещества могут быть добавлены распылением после нанесения частиц. Требование к стабильности составляет не менее одного года после изготовления, предпочтительно по меньшей мере 30 месяцев после изготовления, что может оставить 6 месяцев для доставки конечным пользователям после изготовления и оставшегося срока хранения 24 месяца у конечного пользователя.

Для практической обработки, хранения и транспортировки, а также для упаковки в комплекте, раз-

резанные полосы твердой подложки будут собраны в картридж, который более подробно описан ниже. Картридж не только обеспечивает физическую защиту твердых подложек макро массивов, но также обеспечивает очень сложный и функциональный контейнер, который значительно облегчает автоматическую обработку тестов, обработку жидкости и удаление потенциально загрязненных материалов.

Процедура анализа.

Далее в данном документе описаны способы *in vitro* детекции специфического иммуноглобулина для детектирующего антигена или для набора детектирующих антигенов с использованием описанного в данном документе антигенного массива. В частности, способ включает:

- (i) обеспечение антигенного массива, описанного в данном документе;
- (ii) инкубацию массива с образцом;
- (iii) инкубацию массива с детектирующим реагентом;
- (iv) необязательно, инкубацию массива с реагентом образования сигнала; и
- (v) измерение детектируемого сигнала.

Повышенный детектируемый сигнал по сравнению с сигналом отрицательного контроля указывает на присутствие иммуноглобулина в образце, в то время как отсутствие увеличения сигнала указывает на отсутствие иммуноглобулина в образце.

В некоторых воплощениях детектируемый сигнал является колориметрическим, флуоресцентным, электрическим или хемилюминесцентным сигналом.

Биологический анализ, как описано в данном документе, имеет целью детектировать специфические иммуноглобулины против множества антигенов в одной аналитической процедуре, которая основана на принципе ELISA и обычно состоит из следующих основных стадий:

- 1) предварительная промывка;
- 2) блокирование;
- 3) инкубация с образцом;
- 4) промывка;
- 5) инкубация с детектирующим реагентом;
- 6) промывка;
- 7) дополнительно: инкубация с образованием сигнала;
- 8) необязательно: остановка образования сигнала;
- 9) детекция и измерение результата.

В некоторых воплощениях способы детекции иммуноглобулина, специфичного для детектирующего антигена или набора детектирующих антигенов (например, аллергена или набора аллергенов) с использованием описанного в данном документе антигенного массива, включают:

- (i) обеспечение антигенного массива (например, аллергенного массива), описанного в данном документе;
- (ii) инкубацию массива с образцом (например, с сывороткой или цельной или обработанной кровью);
- (iii) инкубацию массива с детектирующим реагентом (например, анти-IgE антителом или анти-IgG антителом или IgE-специфическим или IgG-специфическим аптамером, непосредственно меченным детектируемым сигналом, анти-IgE антителом или анти-IgG антителом или IgE-специфическим или IgG-специфическим аптамером, конъюгированным с ферментом);
- (iv) необязательно, инкубацию массива с реагентом для образования сигнала (например, субстратом для ферментативной реакции);
- (v) необязательно, добавление стоп-раствора для завершения образования сигнала; и
- (vi) измерение регистрируемого сигнала.

Образец в этом смысле может быть сывороткой пациента, цельной или обработанной кровью, жидкостью из носа, мочой, другими физиологическими жидкостями или клеточными лизатами или гомогенатами из тканей и т.д. Образец может быть от одного объекта или из пула объектов (например, пула сыворотки 10, 20, 30 объектов при скрининге большого количества испытуемых). В некоторых воплощениях образец представляет собой образец крови (например, образец сыворотки). В некоторых воплощениях размер выборки составляет любое из 1-2000 мкл, например любое из 1-10 мкл, от 10 до 50 мкл, от 50 до 100 мкл, от 100 до 500 мкл, от 500 до 2000 мкл. В некоторых воплощениях размер выборки составляет любое из 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 250, 500, или 1000, или 2000 мкл. В некоторых воплощениях образец не разбавлен. В некоторых воплощениях образец разбавлен. В некоторых воплощениях разбавление образца составляет от 1:1 до 1:10, от 1:10 до 1:100, от 1:100 до 1:1000 или от 1:1000 до 1:10000. В некоторых воплощениях разбавление образца представляет собой любое значение из 1:10, 1:100, 1:1000 или 1:10000. Фактическое количество необходимого образца может зависеть от разбавления образца, используемого для реакции инкубации.

Исполнение теста не должно существенно влиять на биологический образец, даже если образец не находится в идеальном состоянии, что часто происходит во время обычного взятия крови. Типичными проблемами могут быть липемические, гемолитические или иктеричные жидкости для образцов, образцы с высоким содержанием белка или даже с высоким содержанием антител (IgG, IgE, другие).

Детектирующий реагент представляет собой аффинное связующее вещество биологического происхождения, предпочтительно антитело (например, детектирующее антитело), полученное либо иммунизацией, либо искусственным отбором с помощью случайной библиотеки. Другие аффинные связующие агенты могут быть искусственно подобранными связующими агентами на основе белков или нуклеиновых кислот, таких как аптамеры или аффитела.

Начальная стадия промывки предназначена для удаления любых твердых частиц, не связанных с твердой фазой, которые в противном случае конкурировали бы за связывание связывающегося с твердой фазой антигена и свободного растворимого антигена на стадии инкубации образца.

В общих чертах, стадия промывки не является одной стадией, но обычно выполняется многократно, чтобы добиться окончательного удаления любого нежелательного реагента ниже предела обнаружения. В частности, применение стадий промывки можно повторить 3-5 раз, в результате чего разбавление объема предполагается путем наклона картриджа и добавления свежего промывочного раствора, по меньшей мере, в 30 раз, так что после 3 раундов промывки разбавление составляет около 1 к 27000, любая дополнительная стадия промывки еще больше увеличит разбавление в 30 раз.

Стадия блокирования предназначена для блокирования любой возможности неспецифического связывания любых составляющих образца, таких как детектируемое антитело, которое не специфично по отношению к иммобилизованному антигену, а также неспецифического связывания детектирующего реагента.

Блокирование может быть выполнено один раз до инкубации с образцом или может быть проведено несколько раз перед каждой стадией анализа или может быть добавлен блокирующий реагент для разбавления измеряемого образца, или даже детектирующий реагент (например, детектирующее антитело, аптамер или аффитела) могут содержаться в блокирующем реагенте.

Блокирующий реагент в этом отношении относится к любому веществу биологического или другого происхождения, которое может смягчать непреднамеренные или неспецифические реакции связывания, которые обычно происходят между сложными биологическими образцами, такими как кровь или сыворотка, и множеством антигенов на твердой фазе. Блокирование предпочтительно не включает потенциально антигенного белка, который в противном случае мог бы вызвать еще большее неспецифическое связывание и снижение образования сигнала относительно шума.

Например, бычий сывороточный альбумин (BSA), который часто используется для простых процедур ELISA в качестве стабилизирующего или блокирующего агента, обычно непригоден, когда участвует человеческое IgE или IgG, так как BSA является потенциальным пищевым аллергеном и частым индуктором нерелевантного IgG у людей, которые часто потребляют молочные или мясные продукты из говядины. Таким образом, любые сайты связывания, заблокированные BSA, могут дать еще больше проблем с неспецифическим фоном, чем в противном случае, если образцы содержат соответствующие анти-BSA-антитела детектируемого подкласса. Подобные обстоятельства делают невозможным применение многих дешевых и легкодоступных блокирующих реагентов, которые часто используются в других областях.

Соответственно, если применяются блокаторы белка, они не должны быть иммуногенными для человека, такие как человеческий сывороточный альбумин, который обычно не связывает какие-либо человеческие антитела.

Альтернативные способы блокирования включают детергенты, сахара, полиспирты или другие соединения, которые могут дестабилизировать слабое связывание между партнерами взаимодействия, которые не так сильны и специфичны, как комплекс связывания антиген-антитело (как правило, с константами аффинности 10^{-9} М или менее).

Стадии инкубации с образцом или детектирующим реагентом (например, детектирующим антителом) обычно принимают пропорционально самому длинному периоду времени общей процедуры с временем инкубации в диапазоне от минут до нескольких часов. Предпочтительно инкубация образца занимает менее 2 ч, а инкубация с детектирующим реагентом занимает менее 30 мин. В случае, когда детектирующий реагент уже имеет детектируемую метку, стадию инкубации для образования сигнала можно опустить. В противном случае, в частности, при использовании генерации ферментативного сигнала, типичное время инкубации с реагентом для образования сигнала предпочтительно составляет менее 5 мин.

Во время инкубации настоящая конструкция картриджа позволяет перемешивать жидкость, тем самым смешивая образец и увеличивая массовый перенос аффинных связующих веществ к соответствующим антигенам. Предпочтительно перемешивание следует за движением вдоль длинной стороны картриджа, который является достаточно мягким, чтобы жидкость не переполняла сосуды, но является достаточно жестким, чтобы увеличить кинетику реакции достаточно по сравнению с инкубацией без смешивания.

В ином случае, кинетику анализа можно увеличить или контролировать с помощью температуры или электромагнитных волн, предназначенных для более эффективного смешивания жидкости.

Детекция и измерение.

Для создания детектируемого сигнала существует несколько возможностей, известных специалистам в данной области техники. В простейшей форме детектирующий реагент, который связывается с сайтами антигена, загружается специфическим иммунным глобулином, непосредственно маркируется

либо красителем, либо возбуждаемым соединением, таким как флуоресцентный краситель или наночастицы золота или наночастицы цветного латекса или аналогичные. В этом случае детекция не требует дополнительных стадий образования сигнала, и сигнал может считываться непосредственно после вымывания несвязанного детектирующего реагента.

В предпочтительном воплощении генерация ферментативного сигнала применяется при использовании детектирующих реагентов, которые конъюгированы с ферментом, который преобразует субстрат, содержащийся в реактиве для образования сигнала, в детектируемый сигнал.

Ферменты, конъюгированные с детектирующим реагентом, включают, без ограничения указанным, щелочную фосфатазу (AP), пероксидазу хрена (HRP) или β -галактозидазу (GAL). Эти ферменты могут создавать цветной осадок из субстрата (например, NCIB/NBT) или могут создавать фотоны из преобразования люминофора (например, Lumigen APS-5) или могут преобразовывать субстрат для изменения коэффициента экстинкции на определенной длине волны, например о-нитрофенил- β -D-галактопиранозидазу, соответственно.

Если необходимо, ферментативную реакцию можно немедленно остановить, добавив вещество, которое сильно мешает конверсии субстрата ферментом, так называемый стоп-раствор (например, дистиллированная вода, EDTA, NaOH, HCl и т.д.).

В некоторых воплощениях детектирующий реагент представляет собой антитело против человеческого IgE, непосредственно меченное цветным соединением, наночастицами золота или цветными латексными наночастицами или с возбуждаемым соединением. В некоторых воплощениях детектирующим реагентом является антитело против человеческого IgG, непосредственно помеченное красителем, наночастицами золота, цветными латексными наночастицами или возбуждаемым соединением. В некоторых воплощениях детектирующий реагент представляет собой аптамер или аффитело, специфически распознающие антитела IgE или IgG человека, где аптамер или аффитело непосредственно помечены красителем, наночастицами золота, цветными латексными наночастицами или возбуждаемым соединением. В некоторых воплощениях детектирующий реагент представляет собой антитело против человеческого IgE или IgG, конъюгированное с ферментом (например, AP, HRP или GAL), и способ включает инкубацию массива с реагентом образования сигнала (например, субстратом для ферментативной реакции) в соответствии со стадией (iv) описанного в данном документе способа и необязательно дополнительно добавление стоп-раствора (например, ddH₂O, EDTA, NaOH, соляной кислоты, серной кислоты или любого реагента, который может влиять на ферментативную реакцию, либо делая реакцию невозможной из-за требований к значению pH для каталитической реакции, путем уничтожения или изменения субстрата химически, путем блокирования активного центра фермента или замедления реакции до незначительного уровня и т.д.), согласно стадии (iv).

В некоторых воплощениях детектирующий реагент содержит два компонента: (i) первый компонент, содержащий анти-IgE или анти-IgG антитело; и (ii) второй компонент, содержащий реагент, распознающий анти-IgE или анти-IgG антитело, причем второй реагент либо непосредственно помечен красителем или возбуждаемым соединением, либо конъюгирован с ферментом и где антигенный массив инкубируется с (i) и затем (ii) в соответствии со стадией (iii), описанных в данном документе способов (со стадией промывки между ними). Например, первый компонент может представлять собой анти-IgE или анти-IgG-антитело определенного типа, такое как антитело, полученное из организма, такого как крыса, мышь, кролик и т.д., а второй компонент может быть антителом, связывающим указанный тип антител, например антитело против крысиного антитела, против мышинного антитела, против кроличьего антитела и т.д.

В частности, в данном документе представлен способ *in vitro* для обнаружения IgE-антител, связанных с аллергией, включающий:

(i) предоставление аллергенного массива, описанного в данном документе;

(ii) инкубацию массива с образцом (например, сывороткой или цельной или обработанной кровью);

(iii) инкубацию массива с анти-IgE-антителом или анти-IgE-аптамером, непосредственно помеченным детектируемым сигналом или анти-IgE или анти-IgE-аптамером, конъюгированным с ферментом (например, конъюгированным с AP, HRP или GAL);

(iv) необязательно, инкубацию массива с реагентом образования сигнала (например, субстратом для ферментативной реакции);

(v) необязательно добавление стоп-раствора для завершения образования сигнала (например, ddH₂O, EDTA, NaOH, соляной кислоты, серной кислоты или любого реагента, которые могут влиять на ферментативную реакцию; и

(vi) измерение регистрируемого сигнала. Обнаружение цветного сигнала может осуществляться через простую CCD-камеру, CMOS-камеру, лазерный сканер, такой как обычный планшетный сканер, или любое другое устройство, способное измерять разность интенсивностей между обычно белым или прозрачным фоном твердой подложки и окрашенными участками реакции, где была обнаружена реакция связывания. В случае фотонного измерения для измерения сигналов индивидуально необходимо использовать камеру с достаточной чувствительностью или фотоумножитель.

Для количественной оценки требуется сначала определить области, в которых отдельные антигены

были иммобилизованы. Этому может способствовать паттерн пятен положительного контроля, которые всегда дают обнаруживаемый и сильный сигнал, так называемые маркерные пятна. Например, пятном положительного контроля может быть группа гранул, соединенных с очищенным человеческим IgE-антителом. Из положения и ориентации пятен маркера известно относительное положение всех других сайтов, а также их размер, и они могут быть обнаружены внутри полученного изображения или массива точек данных.

Для каждой типично круглой области иммобилизованных заряженных частиц антигена интеграция сигнала может быть рассчитана путем добавления каждого пикселя, который находится в ожидаемом сигнале к общему сигналу, и каждый пиксель, который находится снаружи, может быть добавлен к фону. Кроме того, среднее, медиана и стандартное отклонение можно рассчитать как для сигналов, так и для фона. Все вычисления будут обрабатываться программным инструментом анализа изображения, например, известным специалисту, например ImageJ от NIH.

В описанных в данном документе способах предпочтительным является расчет локального фона, который получают путем суммирования всех пикселей, которые находятся в трехкратном диаметре площади пятна, но не внутри любого из сайтов антигенов в совокупности.

Кроме того, статистические меры контроля могут использоваться для оценки качества или надежности сигнала, такого как среднее значение для медианного варьирования, изменения сигнала, изменения шума и обнаружения выскакивающих наблюдений.

Порог либо с точки зрения суммарного измеряемого сигнала - фона, либо с точки зрения отношения сигнал/шум применяется для фильтрации необработанных данных измерений. Предпочтительно только сигналы, которые по меньшей мере в 2 раза выше, чем изменение фонового шума, рассматриваются как положительные сигналы (например, детектируемый сигнал).

Нормализация и калибровка результатов.

После получения необработанных данных измерений необходимо выполнить две стадии, которые требуются для того, чтобы получить из необработанных аналитических данных до клинически значимых единиц ответа.

В описанных в данном документе способах используются два разных способа достижения первой нормализации и второй калибровки результатов.

Нормализацией в этом отношении является способ нормализации вариаций общих уровней сигнала между измерениями, днями, партиями или операторами, до идентичного уровня в среднем. Таким образом, вариации в точном времени инкубации, различия из-за изменений температуры окружающей среды, изменения, вызванные матрицей образцов и т.д., могут быть в некоторой степени компенсированы.

В случае настоящей заявки для достижения этой нормализации используется стандартная кривая подкласса конкретного антитела, который должен быть измерен в анализе. Очищенное антитело, например IgE человека, иммобилизуют в возрастающих концентрациях в отдельных сайтах формата макромассива. Согласно этому подходу наивысшая концентрация на стандартной кривой будет считаться 100%-ным сигналом, тогда как каждому известному разбавлению стандартной кривой присваивается соответствующее уменьшение концентрации. Из всех точек кривой вычисляется соответствие кривой и используется для преобразования произвольных единиц интенсивности в относительные единицы сигнала путем применения уравнения кривой к каждому исходному измеренному значению.

Этот способ позволяет нормализовать средние интенсивности сигналов между измерениями, однако не может компенсировать индивидуальные колебания для каждого отдельного параметра в соответствующей партии. Как правило, в каждом производимом лоте существует определенная степень вариации производства, и часто эти вариации являются систематическими в том смысле, что, например, параметр 1 может быть на 10% выше долговременного среднего, а параметр 2 может быть на 5% ниже долговременного среднего, а параметр 3 может быть в пределах спецификаций. Для того чтобы устранить такие различия до необходимого минимума, можно обнаружить любые систематические вариации долговременного среднего с помощью хорошо определенных контрольных образцов уже на участке контроля качества производителя. Как только это систематическое изменение идентифицируется, появляется возможность передавать эти различия конечному пользователю в виде листа данных или предпочтительно в формате автоматического кодирования, таком как 2D-штрих-код, напечатанный на каждой партии. Читая и интерпретируя этот штрих-код, конечный пользователь может - с помощью программных средств - автоматически корректировать значения измерений в соответствии с идентифицированными вариациями во время процедуры контроля качества на сайте производителя, а в приведенном выше Примере затем корректировать измерения параметра 1, уменьшая их на 10%, регулируя параметр 2, увеличивая их на 5% и оставляя параметр 3 неизменным. Следовательно, должна быть возможность уменьшения общей вариации иммунологического анализа до более низкого уровня, чем без этой настраиваемой и статистически обоснованной корректировки данных.

На последней стадии должна быть достигнута фактическая калибровка результатов. Калибровка в этом отношении представляет собой процесс преобразования скорректированных единиц относительно ответа в определенной форме абсолютных единиц. Абсолютные единицы должны служить значением, которое позволяет сравнивать результаты с системами других производителей, между лабораториями

или между временными точками, даже когда были сделаны значительные изменения в системе.

Калибровка может быть осуществлена относительно международно признанного эталонного препарата, если таковой имеется. Для многих областей заболеваний для калибровки могут быть приобретены и использованы количественные эталонные стандарты. Обычный процесс калибровки, однако, нецелесообразен для применения в форматах многопараметрического анализа просто потому, что для калибровки системы потребуется значительно больше усилий и затрат, чем для фактических измерений.

Стандартный подход для калибровки в однопараметрических анализах - это гомологичная калибровка, в результате чего измеряется результат измерения для конкретного взаимодействия антиген - антитело, которое должно быть измерено в образце с неизвестной концентрацией последнего, и сравнивается с результатами измерений определенных образцов с определенных концентраций иммуноглобулинов против соответствующего антигена и с использованием этой контрольной кривой для преобразования необработанного измерения в абсолютные количественные результаты измерений.

Это легко достигается при измерении относительно небольшого количества стандартных препаратов для калибровки по сравнению с относительно большим количеством неизвестных образцов.

Однако в приложении с несколькими сотнями индивидуальных параметров, измеренных в каждой реакции, и каждым параметром, представляющим связывание идентичного подкласса антител, но с другим антигеном, гомологичная калибровочная кривая для каждого индивидуального параметра не представляется целесообразной и, скорее всего, приведет к значительной дополнительной вариации. Поэтому используется так называемый метод гетерологичной калибровки. Калибровочная кривая создается не для одного измерения антиген-антитело с различными концентрациями соответствующего антитела, измеренного в отдельных образцах, а с одним образцом, который представляет диапазон конкретных концентраций антител против ряда различных иммобилизованных антигенов. Способ основан на том факте, что, когда один и тот же иммуноглобулин детектируется при связывании различных антигенов, абсолютным требованием является не калибровка антительного ответа для каждого антигена-мишени индивидуально, а сохранение одной и той же калибровочной кривой только для каждого обнаруженного класса иммуноглобулинов.

Интерпретация результатов, поддерживаемых программными инструментами.

Описанное применение многопараметрических иммунологических измерений приведет к значительно большему количеству результатов теста, чем обычная однопараметрическая клиническая работа по профилю сенсибилизации пациента.

Следовательно, применение инструментов биоинформатики должно облегчать интерпретацию и визуализацию результатов в формате, который позволит врачу легче просмотреть данные и получить по возможности лучший диагностический вывод. Следующие факторы должны считаться актуальными для облегченного представления программного обеспечения или руководства:

- 1) общая классификация состояния здоровья, например, на основании профиля о том, что есть вероятность, что пациент страдает от предполагаемого заболевания, для которого был заказан тест;
- 2) детальная классификация заболевания, например соответствующие параметры или паттерны параметров, которые указывают на состояние заболевания или причину заболевания;
- 3) классификация риска пациента, например, путем различения пациентов по уровню антительного ответа против определенных мишеней или паттернов антительных ответов против комбинации мишеней или отсутствия защитных антител против определенных мишеней или отношения различных подклассов антител против различных антигенных мишеней;
- 4) последствия лечения пациента, например, путем выбора соответствующих лекарств, предоставления правильных рекомендаций для предотвращения или даже предотвращения применения наиболее вероятных неэффективных лекарств.

Полные панели для клинической интерпретации.

Основным преимуществом мультиплексированного иммуноанализа является возможность включения всех соответствующих клинических параметров в один тест, что уменьшает нагрузку на врача для предварительного выбора тестов для каждого отдельного пациента и всегда позволяет получить полное клиническое обследование на одной аналитической стадии.

Конструкция картриджей и преимущества в отношении автоматизации.

Кроме того, в данном документе представлены картриджи, содержащие тестовую камеру для любого из описанных в данном документе антигенных массивов, резервуар для жидких отходов и, необязательно, штрих-код для идентификации и калибровки. Картридж может дополнительно содержать резервуары или интегрированные флаконы для любого одного или нескольких детектирующих реагентов (например, меченого антитела, меченого аптамера или меченого аффитела), реагента для образования сигнала (например, ферментного субстрата) и стоп-раствора (например, дистиллированная вода, EDTA, NaOH, HCl и т.д.). В некоторых воплощениях картридж дополнительно содержит резервуар или интегрированный флакон для одного или более контрольных образцов (например, положительных и/или отрицательных контролей) и/или одного или нескольких буферов, используемых во время процедуры анализа (например, буферов для промывки, блокирующих буферов, буферов для разбавления). В некоторых воплощениях положительный контрольный образец представляет собой коммерчески доступный стан-

дартизованный образец с определенным количеством иммуноглобулина (например, общий IgG или IgE и/или определенный IgG или IgE, специфичный для конкретного антигена/аллергена). В некоторых воплощениях положительный контрольный образец представляет собой образец, который был проверен или испытан положительным в стандартном анализе соответствующего иммуноглобулина. В некоторых воплощениях отрицательный контрольный образец представляет собой коммерчески доступный образец, который не содержит никаких иммуноглобулинов или образец, который был проверен или испытан отрицательным в стандартном анализе для соответствующего иммуноглобулина. Картридж может дополнительно обеспечивать средство для мягкого перемещения антигенного массива в тестовой камере или тестовой камеры в целом с размещенной в ней антигенным массивом, чтобы обеспечить равномерное распределение образца и буферов на массиве во время периодов инкубации, а также тщательную промывку массива. Размер картриджа будет зависеть от размера массива и типа и количества используемых реагентов. Предпочтительно размер будет находиться в диапазоне от 1 см×1 см×5 см до 2 см×5 см×15 см.

Фиксация антигенных массивов в картридже может осуществляться одним из нескольких способов, включая механическую фиксацию путем резки до точного размера окружающего пространства, с использованием механических фиксаций на краях полос или с использованием биосовместимых адгезивов, которые также выдерживают стадии промывки и инкубации во время процедуры ELISA. Важным аспектом фиксации является отсутствие создания зазоров, областей или отверстий в картридже или между картриджем и твердофазной тест-полоской, где может происходить неспецифическое связывание во время стадий инкубации, что может не поддаваться эффективной промывке, поскольку значительно увеличится образование общего неспецифического сигнала на стадии детекции, что, следовательно, приведет к уменьшению пикового сигнала до уровня шума анализа и общей эффективности анализа.

Схожее значение имеет фактор отсутствия позиционных эффектов инкубации и обнаружения сигнала, хорошо известных специалистам в данной области техники. Типичной систематической ошибкой является так называемый краевой эффект, при котором результаты участков реакции (пятен), находящихся близко к границе массива, и прилегающим стенкам или флаконам картриджа, либо значительно, либо воспроизводимо выше или ниже, чем в середине массивов. Различия могут быть вызваны поведением жидкости при встряхивании или перемешивании, накоплением связующих в выбранных местах или поверхностным натяжением или кинетическими различиями в реакционных участках, окруженных более фиксированными границами и, следовательно, более ограниченной свободной диффузией, чем те, которые являются более центральными и менее ингибированными краями или стенками. Даже различия в пространственной температуре могут играть роль в наблюдаемых различиях, а также систематической ошибке в событии детекции, вызванном геометрией сосуда. Например, в случае микромассивов, депонированных в круглых микролуночных планшетах, пятна в центре обычно значительно отличаются по поведению, чем пятна, расположенные ближе к границе планшетов. Хотя некоторые производители преодолевают это ограничение, печатая "круглые массивы" или паттерны, это конечно значительно уменьшает полезную площадь и количество признаков в каждой области, что не подходит для реального многопараметрического анализа с несколькими сотнями различных анализов в реакции.

Конструкция картриджа в представленном изобретении предлагает дополнительное преимущество. Картридж можно считать самим комплектом, он может содержать все жидкости и реагенты, необходимые для проведения испытаний в специально разработанных сосудах. Картридж может содержать штрих-код для идентификации партии и даже корректирующие факторы для калибровки и т.д., которые могут храниться в таком штрих-коде.

Аналогично, набор одноразовых пластиковых наконечников может находиться на борту в картридже, откуда пипетка может захватывать их для процесса и повторно вводить в картридж после применения. Таким образом, окружающие части системы не подвергаются (например, при обработке жидкостью) контакту с жидкостями, которые потенциально биологически опасны или инфекционны, поскольку все жидкости собираются в самом картридже с помощью разработанной емкости для отходов. Поэтому нет необходимости в каких-либо специальных процедурах очистки или дезинфекции инструмента.

Поскольку картридж может захватывать или даже содержать все необходимые жидкости для процедуры теста, на основе такой конструкции можно спроектировать автоматизацию анализа таким образом, чтобы единственной частью обработки жидкостью могла быть поршневая пипетка, которую из-за одноразовых наконечников не требуется обслуживать или заменять клапаны или трубки в течение нормального ожидаемого срока службы прибора. Общая стоимость разработки, а также стоимость владения таким инструментом практически без технического обслуживания намного ниже, чем стоимость типичного автоматического анализатора иммунитета, который содержит много подвижных частей, клапанов и трубок, которые необходимо систематически заменять.

Во время стадий промывки картридж просто наклоняется в одну сторону, так что содержащаяся жидкость проходит в резервуар внутри картриджа, где она захватывается и, наконец, удаляется.

Кроме того, в данном документе представлены комплекты, содержащие антигенную массив или картридж, описанные в данном документе, детектирующий реагент, контрольные образцы (например, положительный или отрицательный контроль), буферы, используемые во время анализа и инструкции для применения. Набор может дополнительно включать реагент образования сигнала (например, суб-

страт для фермента) и, возможно, стоп-раствор (например, дистиллированную воду, EDTA, NaOH, HCl и т.д.). В некоторых воплощениях набор содержит антигенную массив (например, аллергенный массив), детектирующий реагент, специфичный для IgE или IgG (например, анти-IgE или анти-IgG антитело, аптамер или аффитело, специфичные для IgE или IgG, либо напрямую помеченные или конъюгированные с ферментом), буферные растворы (например, буферы для промывки, блокирующие буферы, буферы для разбавления) и, необязательно, реагент образования сигнала (например, ферментный субстрат). В некоторых воплощениях комплект дополнительно включает стоп-раствор (например, дистиллированную воду, EDTA, NaOH, HCl и т.д.).

Кроме того, в данном документе предусмотрено устройство, содержащее камеру для одного или нескольких картриджей, как описано в данном документе, пипетку и устройство для обнаружения сигнала (например, ПЗС-камера, CMOS-камера, лазерный сканер).

Кроме того, изобретение включает следующие разделы.

1) Антигенный массив, содержащий группы покрытых антигеном гранул, закрепленных на твердом носителе, где каждая группа включает:

(i) гранулы, покрытые одним детектирующим антигеном; или

(ii) гранулы, покрытые набором детектирующих антигенов, предпочтительно, где твердый носитель представляет собой лист или пластину и где детектирующий антиген представляет собой аллерген, маркер инфекции или аутоантиген.

2) Антигенный массив по разделу 1, в котором детектирующий антиген представляет собой биомолекулу, состоящую из нуклеиновых кислот и/или аминокислот, предпочтительно белка, пептида, антитела или молекулы ДНК или органического или неорганического химического соединения.

3) Антигенный массив по любому из разделов 1 или 2, где детектирующий антиген является аллергеном.

4) Антигенный массив по любому из разделов 1-3, где детектирующий антиген является маркером инфекции.

5) Антигенный массив по любому из разделов 1-4, где детектирующий антиген является аутоантигеном.

6) Антигенный массив по любому из разделов 1-5, где детектирующий антиген представляет собой антиген, полученный с помощью технологии рекомбинантной ДНК, или антиген, выделенный и очищенный из биологического материала.

7) Антигенный массив по любому из разделов 1-6, где набор детектирующих антигенов получают из экстракта или лизата биологического исходного материала, содержащего более одного антигена.

8) Антигенный массив по любому из разделов 1-7, где детектирующий антиген содержит единственный эпитоп, одну макромолекулу с несколькими антителосвязывающими эпитопами или смесь различных белков с различными антигенами, содержащими множество эпитопов.

9) Антигенный массив по любому из разделов 1-8, где гранулы представляют собой микро- или наночастицы.

10) Антигенный массив по любому из разделов 1-9, где гранулы имеют размер от 5 до 500 нм в диаметре, предпочтительно от 200 до 500 нм в диаметре.

11) Антигенный массив по любому из разделов 1-10, в которой гранулы представляют собой латексные гранулы, полимерные пластиковые гранулы, предпочтительно гранулы полистирола, гранулы, изготовленные из биосовместимых полимеров, или стеклянные гранулы, предпочтительно кремниевые гранулы.

12) Антигенный массив по любому из разделов 1-11, где поверхность гранул является пористой или непористой.

13) Антигенный массив по любому из разделов 1-12, где детектирующий антиген связывается ковалентно или нековалентно.

14) Антигенный массив по любому из разделов 1 или 13, где детектирующий антиген связан с гранулами нековалентно пассивной адсорбцией, предпочтительно гидрофобным и/или электростатическим присоединением.

15) Антигенный массив по любому из разделов 1-14, где детектирующий антиген связывается через антигенные спейсеры.

16) Антигенный массив по любому из разделов 1-15, где детектирующий антиген связан таким образом, при котором создается предпочтительная ориентация для презентации эпитопов, представленных на связанном антигене.

17) Антигенный массив по любому из разделов 1-16, где твердый носитель представляет собой лист или пластину из пористого или непористого материала, предпочтительно нитроцеллюлозного листа, более предпочтительно ламинированного нитроцеллюлозного листа.

18) Антигенный массив по любому из разделов 1-17, включающий гранулы того же или другого типа.

19) Антигенный массив по любому из разделов 1-18, где массив включает по меньшей мере 25 различных групп.

20) Антигенный массив по любому из разделов 1-19, где группы гранул с антигенным покрытием

закреплены на твердом носителе с использованием контактных способов или бесконтактных способов, предпочтительно с использованием соленоидной системы дозирования.

21) Антигенный массив по любому из разделов 1-20, где каждая группа фиксируется как адресуемый элемент в прямоугольном массиве или в плотноупакованном массиве, предпочтительно при плотности 1 адресуемый элемент на мм².

22) Антигенный массив по любому из разделов 1-3 и 6-21, в котором гранулы, покрытые антигеном, представляют собой покрытые аллергеном гранулы, закрепленные на твердом носителе, предпочтительно твердый носитель представляет собой лист или пластину, причем каждая группа включает:

- (i) гранулы, покрытых одним аллергеном; или
- (ii) гранулы, покрытые набором аллергенов, предпочтительно экстрактом аллергена.

23) Способ детекции иммуноглобулина, специфичного к детектирующему антигену, или к набору детектирующих антигенов, включающий:

- (i) обеспечение антигенного массива по любому из разделов 1-22;
- (ii) инкубацию массива с образцом;
- (iii) инкубацию массива с детектирующим реагентом;
- (iv) необязательно инкубацию массива с реагентом образования сигнала; и
- (v) измерение детектируемого сигнала.

24) Способ раздела 23, где иммуноглобулин представляет собой IgE-антитело, ассоциированное с аллергией.

25) Способ раздела 23, где иммуноглобулин представляет собой IgG-антитело, связанное с инфекцией или аутоиммунной реакцией.

26) Способ по любому из разделов 23-25, где образец представляет собой биологическую жидкость, предпочтительно сыворотку, целую или обработанную кровь, носовую жидкость или мочу, клеточный лизат или гомогенат ткани из объекта или пула объектов.

27) Способ по любому из разделов 23-26, где детектирующий реагент представляет собой аффинное связующее вещество, специфичное к иммуноглобулину, предпочтительно антитело, аптамер или аффитело.

28) Способ по любому из разделов 23-27, где детектирующий реагент представляет собой анти-IgE антитело, IgE-специфичный аптамер, IgE-специфичное аффитело, анти-IgG антитело, IgG-специфичный аптамер или IgG-специфичное аффитело. Способ по любому из разделов 23-27, в котором детектирующий реагент (i) помечен напрямую, предпочтительно цветным или флуоресцентным соединением или наночастицами золота или цветными латексными наночастицами; или (ii) конъюгирован с ферментом.

29) Способ по любому из разделов 23-28, дополнительно включающий инкубацию массива с реагентом образования сигнала в соответствии со стадией (iv) п.23, где детектирующий реагент конъюгирован с ферментом, а реагент образования сигнала включает субстрат для упомянутого фермента.

30) Способ по разделу 30, дополнительно включающий массив со стоп-раствором после стадии (iv).

31) Способ по любому из разделов 23-30 для обнаружения IgE-антитела, связанного с аллергией, включающий:

- (i) обеспечение матрицы антигенов согласно разделу 22;
- (ii) инкубацию массива с образцом;
- (iii) инкубацию массива с помощью детектирующего реагента (например, анти-IgE антитела или IgE-специфического аптамера или IgE-специфического аффитела);
- (iv) необязательно инкубацию массива с реагентом образования сигнала; и
- (v) измерение детектируемого сигнала.

32) Картридж, включающий тестовую камеру для антигенного массива по любому из разделов 1-22, резервуар для жидких отходов и, необязательно, штрих-код.

33) Набор, включающий антигенный массив по любому из разделов 1-22, детектирующий реагент, один или несколько буферов, один или несколько контрольных образцов и инструкции для применения набора в способе согласно любому из элементов 23-31 и необязательно реагент образования сигнала.

34) Устройство, включающее камеру для одного или нескольких картриджей по элементу 32, пипетку и устройство для обнаружения сигнала.

Примеры

Примеры, описанные в данном документе, являются иллюстрацией изобретения и не предназначены для его ограничения. Различные воплощения изобретения описаны в соответствии с настоящим изобретением. Многочисленные модификации и вариации методов, описанных и проиллюстрированных в данном документе, могут быть внесены без отхода от сущности и объема изобретения.

Пример 1.

Материалы и методы.

Аллергенный исходный материал.

Аллергены были приобретены у различных внешних поставщиков или произведены самостоятельно. Аллергены были либо аллергенными экстрактами, либо очищенными природными аллергенами, либо рекомбинантными аллергенами. Аллергены обрабатывались в соответствии с рекомендациями постав-

щиков или в соответствии с нашим собственным опытом в отношении буферов и условий хранения. Повторное замораживание/оттаивание избегалось. Для аллергенов, которые были доставлены в лиофилизированной форме, восстановление проводилось в соответствии с инструкциями производителя.

Связывание аллергенов с наночастицами.

Полистирольные наночастицы были приобретены у Polysciences Europe GmbH. Связывание материалов с аллергенами с частицами проводилось в соответствии с рекомендациями производителя, но в конечном итоге их необходимо было оптимизировать для каждого препарата аллергенов. Для получения оптимальной эффективности связывания и биологической активности были применены различные подходы. Некоторые аллергены могут быть связаны пассивной адсорбцией с удовлетворительными результатами, в то время как многие аллергены требуют особых условий связывания или стратегий образования ковалентных связей. Для этой цели использовались частицы полистирола с модификациями поверхности NH_2 или COOH , а также гомо- или гетеробифункциональные сшивающие агенты. Несколько препаратов аллергенов были обработаны таким образом, что сначала их разделили на несколько аликвот, затем соединили в разных условиях и, наконец, снова объединили для представления полного репертуара эпитопов аллергенов во время функционального тестирования.

Связывание пассивной адсорбцией (стандартный протокол).

Наночастицы были приготовлены в соответствии с инструкциями производителей. Аллергены или экстракты аллергенов разбавляли до соответствующей концентрации соединения, обычно менее 0,5 мг/мл, в буферах, соответствующих изоэлектрической точке аллергенов. Частицы (1% твердых веществ) и аллергены инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Инкубацию продолжали без смешивания в течение ночи при 2-8°C. Наконец, частицы осаждали путем центрифугирования при 10000 об/мин, 4°C в течение 15 мин, собирали надосадочную жидкость и суспендировали гранулы в соответствующих буферах и консервантах для длительного хранения.

Связывание пассивной адсорбцией (расширенный протокол).

Подобно вышеуказанному стандартному протоколу за исключением того, что, по меньшей мере, использовали отдельно 3 разных диапазона pH, как правило, в нейтральном, кислотном и основном диапазоне. После выполнения протокола связывания частицы объединяли вместе при нейтральном pH.

Химическое связывание с частицами, поверхность которых покрыта COOH .

Наночастицы разбавляли до соответствующих концентраций, обычно 1% твердых веществ, затем промывали 3 раза в активирующем буфере (например, MES-буфер с pH от 5 до 7,5), гранулировали и суспендировали между стадиями промывки. Для активации частицы, содержащие поверхностные COOH -группы, активировали водорастворимым карбодиимидом, например 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимидом в течение 15-30 мин. После активации частицы два раза промывали в активирующем буфере. Белок разбавляли в буфере для связывания, не содержащем свободных NH_2 -групп, до концентрации, которую обычно оптимизировали с помощью экспериментов по титрованию. Активированные частицы и белковый раствор инкубировали в течение не менее 3 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 2-8°C. Наконец, частицы осаждали путем центрифугирования, как описано выше, и суспендировали в буферах хранения, содержащих консерванты, до дальнейшего применения.

Химическое связывание с частицами, поверхность которых покрыта NH_2 .

Использовали протокол, очень похожий на описанный выше, с тем отличием, что для активации NH_2 -групп на наночастицах использовали реактивный реагент, например глутаральдегидную или сукцинимидную химию, такую как EGS-сшивающие агенты. Соответственно, буферы и значения pH должны были быть скорректированы для оптимизации эффективности связывания в случае каждой применяемой химии. Не во всех случаях теоретически оптимальное значение pH давало желаемую оптимальную эффективность связи, а скорее значение pH, которое не было бы выбрано путем изучения теоретических свойств белка.

Оценка эффективности связывания.

Эффективность связывания измерялась с использованием как прямых, так и косвенных способов. До и после связывания измеряли концентрацию белка в растворе. Степень истощения белка из раствора после связывания была хорошим показателем связывания белка, но не биологической активности. Кроме того, связанные гранулы удаляли из белка с использованием способов, описанных поставщиком для получения белка из гранул. Эти обезжиренные белковые препараты также характеризовали с помощью измерения концентрации, а также денатурирующим электрофорезом в SDS-геле и окрашиванием кумасси синим.

Для окончательной оценки биологической активности связанных аллергенов проводили функциональное измерение с использованием стандартной процедуры проверки и анализа (см. ниже), для тестирования конкретных положительных сывороток для каждого препарата аллергенов. Параметрами, используемыми для тестирования, были: 15-минутное блокирование, 2-часовая инкубация сыворотки с разведенными 1:5 образцами сыворотки, инкубация с детектирующими антителами в течение 30 мин.

Дозированная подача частиц аллергена на твердую фазу.

Нитроцеллюлозные мембраны приобретали у GE Healthcare и Pall Europe. Проверяли различные типы мембран с различными свойствами по размеру пор, скорости потока или материалу основы.

Дозированное нанесение осуществлялось с помощью прибора Biodot AD1520 с использованием оптимизированных настроек для циклов движения, аспирации, дозированного нанесения и промывки. Каждый препарат аллергена осаждали на твердой фазе в объеме, составляющем по меньшей мере 20 нл, с шагом между центрами 1 мм. Окончательные массивы имели геометрию, как правило, 10 столбцов и 25 строк.

После выдачи NC-листы герметизировали и хранили при 2-8°C до дальнейшей обработки. Перед анализом листы NC разрезали до соответствующих размеров, и небольшие виньетки, содержащие контрольную матрицу, помещали в кассеты для анализа.

Стандартная процедура анализа.

Был создан тестовый массив, содержащий 250 различных элементов, которые первоначально были заблокированы от неспецифического связывания в буфере, содержащем высокие концентрации неаллергенного белка, при осторожном покачивании контейнерной кассеты с массивом.

Промывку между стадиями процесса проводили с использованием трис-буферного солевого раствора с pH 7,4 и 0,2% Tween-20 в качестве детергента (TBS-T).

После блокировки массивы инкубировали с сывороткой или плазмой пациента при постоянном осторожном покачивании в течение как минимум 15 мин. Сыворотку отбрасывали и массивы промывали несколько раз TBS-T при осторожном перемешивании.

После циклов промывки массивы инкубировали с разведенным анти-IgE человека антителом, которое было помечено щелочной фосфатазой (AP). Затем антитело отбрасывали и оставшиеся несвязанные антитела несколько раз промывали TBS-T.

Наконец, массивы инкубировали с субстратом формирования цвета BCIP/NBT (5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат/нитросиний тетразолий) в течение нескольких минут до достижения достаточной чувствительности, затем реакцию останавливали и оставшийся субстрат смывали.

Массивы высушивали перед сканированием или визуализацией. Изображения получали как 24-битные цветные изображения и преобразовывали в 16-битные данные в оттенках серого.

Анализ.

Каждый круглый элемент был количественно оценен путем вычисления средней интенсивности и вычитания локального фона из значения элемента. Отношение сигнал-шум > 2 рассматривалось как положительный сигнал.

Массивы были нормализованы по стандартной кривой иммобилизованного очищенного IgE человека, который был нанесен в виде пятен вместе с аллергенными препаратами. Кроме того, нормированные значения были откалиброваны с использованием гетерологичной калибровки по сравнению с эталонным образцом с несколькими положительными результатами теста.

Пример 2.

Антигенный массив, содержащий 245 групп гранул с антигенным покрытием, получали с использованием материалов и способов, описанных в примере 1. Для данных, показанных в данном документе, наносили пятна только пассивно адсорбируемых аллергенов. IgE-специфические измерения для 245 аллергенов и 5 стандартов IgE с использованием пула человеческих образцов из нескольких аллергических объектов показаны на фиг. 1A. Соответствующий отрицательный образец без значительного уровня специфического IgE показан на фиг. 1B. Схема групп антигенов показана на фиг. 1C. Расстояние между группами антигенов составляло 1 мм в направлении x и y.

Пример 3a. Тестовая оценка по сравнению с эталонным способом.

В общей сложности до 137 образцов пациентов (количество пациентов, перечисленных как n в табл. 3) испытывали с помощью представленного способа, описанного в примере 1. Образцы пациентов разводили 1:5 для тестирования и применяли стандартную процедуру анализа. Для сравнения данных, полученные результаты сравнивались с имеющимися справочными данными, которые были получены с использованием другой версии теста ImmunoCAP ISAC (Thermo Fisher, Уппсала, Швеция). Образцы пациентов, выявленные положительными или отрицательными в контрольном анализе, показаны в табл. 3 как "пол" или "отр" соответственно. Для сравнения для создания статистики ROC (Curve Operator Curve) использовали данные Medcal Version 16.1. С этой целью любые антигенспецифические результаты выше, чем порог производителей в тесте ImmunoCAP ISAC, считались истинно положительными (=1), в противном случае - как отрицательные (= 0). Результатом статистической оценки было: площадь под кривой AUC (идеальная корреляция = 1, отсутствие корреляции = 0), аналитическая чувствительность, аналитическая специфика. Всего было учтено 3619 результатов измерений, из которых 692 положительных результата и 2927 отрицательных результатов. Результаты приведены в табл. 3 ниже. Также показана средняя чувствительность и специфичность, которые составляли соответственно 99 и 95%, в результате чего сниженная специфичность объяснялась более высокой чувствительностью нового способа, который будет генерировать более положительные результаты измерения, чем эталон.

Таблица 3. Анализ ROC с эталонными данными из ImmunoCAP ISAC

Параметр	Эталонный тест	n	пол	отр	AUC	Чувств	Специф
Alt a 1	Alt a 1	137	9	128	0,99	100	95
Ani s 3	Ani s 3	81	4	77	1,00	100	100
Art v	Art v 1	81	4	77	0,96	100	94
Art v 1	Art v 1	137	8	129	1,00	100	99
Bet v 1.0101	Bet v 1	81	10	71	0,93	100	79
Bet v 2.0101	Bet v 2	81	10	71	0,99	100	99
Bos d 4	Bos d 4	81	4	77	1,00	100	100
Bos d 5	Bos d 5 (2x)	81	4	77	0,99	100	99
Bos d 8	Bos d 8	81	5	76	1,00	100	99
Bos d LF	Bos d LF	81	2	79	0,90	100	84
Can f 1	Can f 1	81	6	75	1,00	100	99
Can f 3	Can f 3	81	3	78	1,00	100	100
Cup a 1	Cup a 1	56	26	30	0,98	100	97
Der p 1	Der p 1	137	47	90	0,99	97	98
Der p 10	Der p 10	81	3	78	1,00	100	100
Fel d 1	Fel d 1	81	29	52	0,98	97	94
Gal d 1	Gal d 1	81	4	77	1,00	100	100
Gal d Egg White	Gal d 1,2,3,4	81	6	75	0,92	100	77
Hel as	Hel as 1	81	3	78	0,75	100	63
Hel as 1	Hel as 1	81	3	78	1,00	100	99
Hev b 6.02	Hev b 6	81	5	76	1,00	100	100
Hev b 8	Hev b 8	81	12	69	0,95	92	96
Lol p 1	Lol p 1	137	74	63	0,99	98	93
Mer a 1	Mer a 1	81	13	68	0,98	92	93
Ole e 1	Ole e 1	137	42	95	0,98	96	94
Ole e 2	Ole e 2	137	25	112	1,00	100	100
Par j 2	Par j 2	137	44	93	0,99	97	94
Pen m 1	Pen m 1	81	4	77	1,00	100	100
Per a 7	Per a 7	81	4	77	0,98	100	92
Phl p 1	Phl p 1	137	87	50	1,00	100	100
Phl p 2	Phl p 2	137	44	93	0,95	100	91
Phl p 5	Phl p 5	137	61	76	1,00	100	100
Phl p 6	Phl p 6	137	40	97	0,99	100	98
Phl p 7	Phl p 7	81	3	78	1,00	100	100
Phl p Pollen	Phl p 1,2,5,6,7	56	31	25	0,98	97	92
Pla a 1	Pla a 1	81	2	79	1,00	100	100
Pla a Pollen	Pla a 1,2	81	6	75	0,94	100	91
Pru p 3	Pru p 3	56	5	51	0,98	100	90
		сумма	сумма	сумма		среднее	среднее
Статистика.		3619	692	2927		99	95

Пример 3в. Оценка теста по сравнению с эталонным способом.

220 образцов пациентов испытывали с помощью раскрытого способа, как описано в примере 1. Аллергены были либо пассивно адсорбированы, либо химически связаны, например, с использованием различных химических линкеров. Образцы пациентов разводили 1:5 для тестирования и применяли стандартную процедуру анализа. Для сравнения данных полученные результаты сравнивались с имеющимися справочными данными, которые были получены с использованием другой версии теста ImmunoCAP ISAC (Thermo Fisher, Уппсала, Швеция). Чувствительность, специфичность и корреляция r^2 для выбранных аллергенов показаны на фиг. 2. Чувствительность и специфичность оценивали с использованием MedCalc по сравнению с эталонными данными с использованием протоколов производителей для тестирования и порога 0,3 ISU. Линейный регрессионный анализ результатов измерений был выполнен с помощью Microsoft Excel. Всего было учтено 779 положительных результатов и 2772 отрицательных результата.

Пример 4. Усиление сигнала.

12 экстрактов аллергена или молекулярных аллергенов из молока и яйца иммобилизовали в двух разных условиях на твердофазном материале-носителе (нитроцеллюлоза Protran, 0,2 мкм, GE Healthcare). Первое условие непосредственно связывало аллергенные белки с твердой фазой, как описано изготовителем для процедур вестерн-блоттинга. Во-вторых, 12 аллергенов сначала связывали с полистирольными наночастицами размером 350 нм с помощью пассивной адсорбции в нейтральных условиях pH без дополнительной оптимизации условий взаимодействия, как описано в материалах и методах примера 1.

Затем 20 сывороток крови с аллергией на молоко и яйца тестировали на специфический IgE против 12 белков. Полученные аллерген-специфические сигналы от каждого непосредственно иммобилизованного белкового препарата или каждого иммобилизованного связанного с частицами антигена (исходные данные для всех 20 сывороток, показанных в табл. 5) были усреднены по всем 20 сывороткам, два сум-

марных значения на каждый аллерген были сопоставлены и фактор был рассчитан между этими значениями. Результаты представлены в табл. 4 и на фиг. 3.

Таблица 4. Сводные результаты для 12 аллергенов либо иммобилизованных напрямую, либо иммобилизованных в виде препаратов, связанных с частицами

Аллерген	прямое соединение	соединение с частицами	кратность (x)
Bos d [Молоко]	226308	685342	3,03
Bos d 4	29706	98222	3,31
Bos d 5	50009	278392	5,57
Bos d 6	7291	127222	17,45
Bos d 8	151474	606300	4,00
Bos d LF	80338	342786	4,27
Gal d [яичный белок]	40472	77736	1,92
Gal d [яичный желток]	29165	75288	2,58
Gal d 1	14947	179650	12,02
Gal d 2	2702	28958	10,72
Gal d 3	5169	82668	15,99
Gal d 4	5533	61884	11,18

Показаны исходные данные измерения интенсивности, некалиброванные. Средняя амплификация сигнала была почти 8-кратной в случае с аллергенами, связанными с частицами, по сравнению с аллергенами, не связанными с частицами, в пределах от почти 2 до 17. Результаты представлены графически на фиг. 3.

Таблица 5. Подробные исходные данные измерения из примера усиления сигнала

	Сыворотка 1	Сыворотка 2	Сыворотка 3	Сыворотка 4	Сыворотка 5	Сыворотка 6	Сыворотка 7	Сыворотка 8	Сыворотка 9	Сыворотка 10
Непосредственно иммобилизованный										
Bos d [Молоко]	0	3906	5274	8670	6891	13878	36391	1062	1219	2141
Bosd4	0	439	251	760	856	868	10352	0	220	396
Bosd5	0	903	211	224	0	0	7903	0	522	788
Bosd6	0	0	0	0	0	0	1205	0	758	0
Bosd8	0	2824	2836	5907	931	1098	32502	610	1054	1813
Bos d LF	0	1417	766	213	233	215	2340	0	0	2467
Gal d [яичный белок]	0	0	2369	0	0	0	1434	0	0	690
Gal d [яичный желток]	0	1142	7272	947	0	0	0	0	0	0
Gald1	0	772	384	385	133	0	3502	0	574	0
Gald2	0	0	0	0	0	0	2702	0	0	0
Gald3	0	0	0	0	0	0	1572	0	0	0
Gald4	n	751	n	1R4	n	n	1053	163	n	n
Белок, связанный с частицами										
Бос [Молоко]	0	24132	22258	15548	9922	16500	78268	7626	10772	20808
Bosd4	0	1896	936	522	0	0	5976	0	428	2178
Bosd5	0	6174	3316	2018	1046	1030	37328	3970	5512	6592
Bosd6	0	4846	2054	3386	1916	2192	5196	2038	13192	4702
Bosd8	366	28778	18830	12498	4772	1844	74110	9668	6742	13908
Bos d LF	0	32520	4386	11362	7206	7902	8260	2330	1504	15356
Gal d [яичный белок]	0	0	17398	0	0	0	4956	0	530	0
Gal d [яичный желток]	0	2696	18090	1914	384	0	0	1128	0	0
Gald1	0	27028	6558	6118	2630	406	13438	6482	4488	476
Gald2	0	1538	252	394	0	418	7826	2264	400	810
Gald3	0	12624	2868	3170	558	0	4392	2072	0	0
Gald4	0	10240	1414	3690	1248	0	3244	2212	0	0

	Сыворотка 11	Сыворотка 12	Сыворотка 13	Сыворотка 14	Сыворотка 15	Сыворотка 16	Сыворотка 17	Сыворотка 18	Сыворотка 19	Сыворотка 20
Непосредственно иммобилизованный										
Bosd [Молю-ко]	3231	0	38058	39992	1211	1728	2446	5507	49671	5032
Bosd 4	0	0	3430	672	0	0	0	925	10537	0
Bosd 5	727	0	0	421	0	0	0	3941	33137	1232
Bosd 6	0	0	622	0	4706	0	0	0	0	0
Bosd 8	1124	0	2842	41253	0	0	167	4797	46058	5658
Bosd LF	10893	0	224	0	153	0	194	6197	46932	8094
Gal d [яичный белок]	1455	0	0	566	6034	3040	0	580	21523	2781
Gal d [яичный желток]	194	123	0	0	15901	0	421	0	3165	0
Gald1	1916	0	2690	0	0	1081	564	0	2946	0
Gald2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gald3	873	0	2724	0	0	0	0	0	0	0
Gald4	876	0	1728	0	0	261	0	0	1017	0
Белок, связанный с частицами										
Bos [Молю-ко]	11538	4458	42316	132424	8942	4634	4816	28064	172130	70186
Bosd 4	0	0	0	2618	0	0	0	3458	79354	856
Bosd 5	4868	1454	1346	6250	3056	1132	1246	32904	146902	12248
Bosd 6	2234	1332	5950	476	48884	5156	2518	3342	16388	1420
Bosd 8	9590	3548	5746	137612	7302	2234	3398	29196	173092	63066
Bosd LF	23502	1740	2554	3092	1738	6904	5704	11668	152712	42346
Gal d [яичный белок]	0	0	0	0	43004	11558	0	290	0	0
Gal d [яичный желток]	1110	0	1026	0	41200	1080	1750	1748	3162	0
Gald1	22762	2492	48790	1700	7604	6796	5254	5522	11106	0
Gald2	1890	0	2942	0	558	750	1100	1382	6434	0
Gald3	16954	0	35786	0	3890	0	0	354	0	0
Gald4	8720	0	28012	0	2148	514	0	442	0	0

Пример 5. Влияние различных условий связывания на специфический IgE-ответ в функциональном анализе.

Были проведены специфические измерения IgE с 8 различными образцами, положительными против Pru p 3, основного аллергена персика (фиг. 4). Один отрицательный образец был протестирован как контроль. Pru p 3 связывали с использованием нескольких различных способов, включая три разных способа ковалентного связывания (условие 1-3). Пассивная адсорбция белка вообще не работала, и белок почти не мог быть связан с наночастицами только пассивной адсорбцией (результаты не показаны). Согласно анализу эффективности связывания между различными подходами образования ковалентной связи большой разницы не наблюдалось. Однако функциональный анализ выявил существенное различие в биологической активности связанных аллергенов при тестировании ряда сывороток и сравнении результатов с эталонным способом ImmunoCAP 100 от ThermoFisher, Уппсала, Швеция).

В зависимости от тестируемой сыворотки наблюдаются значительные различия между результатами различных способов и подходами связывания. Основопологающим объяснением является то, что в зависимости от того, против каких эпитопов сыворотка имеет специфический IgE, определенный способ связывания или способ анализа представляют более или менее соответствующий эпитоп в активной конформации.

Значения непосредственно несопоставимы, поскольку каждый способ дает результаты в разных единицах, которые, однако, откалиброваны по внутреннему стандарту, чтобы быть похожими.

Пример 6. Клиническое наблюдение пациента, выявившее дополнительную сенсibilизацию.

Пациент посетил местную аллергологическую клинику после двух приступов астмы в ночное время, когда он оставался ночевать в доме друга с котом. Аллергия на траву и березу была известна раньше, но ранее не возникало проблем с дыханием. Результаты, полученные в клинике аллергии с использова-

нием метода Immuno CAP, показаны в табл. 6 ниже (Reference IC) и сравниваются с описанным в данном документе способом (упоминаемый как "FABER" в табл. 6). В табл. 6 далее указаны результаты тестов на кожные заболевания (SPT) и наблюдаемые симптомы у пациента для выбранных аллергенов.

Качественная корреляция (положительная или отрицательная) результатов *in vitro* между описанным в данном документе способом и эталонным способом ImmunoCAP обычно высока. Можно предположить, что некоторые из коммерчески полученных аллергенных экстрактов (например, Bet v, Amb a) не содержат достаточного количества аллергенов, так как полученные значения были первоначально ниже эталонного способа. Однако при обобщении результатов молекулярного тестирования можно получить очень похожий результат между нашим способом (Bet v 1.0101 + Bet v 2.0101) и ImmunoCAP.

Скарификационная проба (Skin prick test, SPT) у пациента была отрицательной на кошку. Кожный тест, а также тест IVD на системе ImmunoCAP проводили с экстрактами кожных аллергенов. Оба теста сработали плохо, дав отрицательный тест в SPT и умеренный положительный результат в тесте ImmunoCAP. Общая проблема с аллергенными экстрактами заключается в том, что точная природа аллергенов, присутствующих в смеси, неясна, а также в деградации аллергенов, которая может происходить при экстракции или хранении. Наш тестовый формат показал сравнительно низкий результат на коммерческом кошачьем экстракте, но очень высокий положительный результат на рекомбинантном чистом кошачьем аллергене Fel d 1. Очень маловероятно, что такой высокий положительный результат *in vitro* был бы так же легко проигнорирован клиническим врачом на основании отрицательного результата теста SPT.

Были обнаружены дополнительные сенсibilизации, некоторые из которых не могут быть объяснены перекрестной реактивностью аллергена и поэтому могут считаться потенциально релевантными, например, против креветок и тараканов. Например, высокий уровень аллергенов типа PR10 (гомология Bet v 1) оказался положительным: Bet v 1.0101, Mal d 1.0108, Cor a 1.0103; Профилины, которые также высококонсервированы между видами, найденными положительными, представляли собой: Ara h 8.0101, Bet v 2.0101, Nev b 8, Mer a 1; Также эпителий множества животных или белки молока и мяса животных можно объяснить перекрестной реактивностью между видами животных.

С другой стороны, аллергены, такие как Bla g 1 тараканов или Pen m 1 креветок, не были найдены никакими эталонными тестами и могут рассматриваться как настоящие сенсibilизации, которые не могут быть объяснены перекрестной реактивностью с другими положительными результатами теста. Таким образом, эти белки могли быть исследованы далее по клинической значимости.

Таблица 6. "Пациент А" в диагностической системе FABER

аллерген	Название	Пациент А	Эталон IC	SPT	Симптомы
Alt a 1	альтернариоз	6,66	1,97	POS	
Amb a [Пыльца]	амброзия	0	3,58	NEG	
Ana c 2	маркер scd	1,32			
Ara h 8.0101	профиллин, арахис	2,9			
Arm r HRP	маркер scd	1,08			
Art v [Пыльца]	артемизия	0	4,03	NEG	
Bet v [Пыльца]	береза	1,04	60	POS	POS
Bet. v 1.0101	береза	17,09			
Bet. v 2.0101	береза	18,85			
Bla g 1	таракан	1,24			?
Bos d [Молоко]	молоко, коровье	1,64			
Can f [эпителий]	собака	3,37	0,38	NEG	?
Cor a 1.0103	лесной орех	10,06	NA	+	?
Cri c	кролик	2,95		NEG	
Cry j	кедр	1,39			
Derf2	клещи	1,08	0,02	NEG	?
Equ as [Молоко]	молоко, ослиное	3,23			
Eeld	кошка	1,89	3,34	NEG	POS
Eeldl	кошка	40,88			
Неуб8	профиллин, латекс	7,05			
Loi p [Пыльца]	трава	62,06			
Lol p 1	трава	46,21			
Mald 1.0108	яблоко	7,32			
Ваал	профиллин, подсолнечник	9,52			
Musm [Эпителий]	мышь	3,11			
Olee2	оливка	5,3			
Ory c [Эпителий]	хомяк	3,94			
Ovi a [Мясо]	мясо, овечье	2,34			

Ovi a [Молоко]	молоко, овечье	1,07			
Ovi a 6	трава	1,4			
Phl p	трава	51,77	76,1	POS	POS
Phl p 1-0102	трава	50,38			
Phl p 5.0101	трава	53,09			
Phl p 6.0101	трава	10,16			
Pla.a	платан	1,81			
Крыса n [Эпителлий]	крыса	4,15			
Pen m l	креветка	0,38			

Пример 7. Сравнение тестов с эталонным способом 83 образца тестировали с использованием описанного в данном документе антигенного массива (см. примеры 1 и 2), а также использовали тест ImmunoCAP ISAC (Thermo Fisher Уппсала, Швеция) в качестве эталонного способа. Технические характеристики двух тестов сравниваются на фиг. 5.

Всего было протестировано 245 аллергенов в антигенном массиве, описанном в примерах 1 и 2, и 112 аллергенов в эталонном способе, при этом 70 аллергенов перекрывались между двумя тестами. Результаты этих аллергенов, которые были непосредственно сопоставимы (идентичны) между двумя тестами, хорошо коррелировали, демонстрируя корреляцию Пирсона 76%. Для этих перекрывающихся аллергенов в эталонном способе были получены 1057 положительных результатов, а с помощью способа, описанного в данном документе, были получены 1159 положительных результатов, что соответствует увеличению примерно на 10% (9,65%) и указывает на повышенную чувствительность настоящего способа.

Кроме того, с помощью эталонного способа были получены в общей сложности 2508 положительных результатов теста, тогда как с текущим способом в то же время было получено 4740 положительных результатов. Таким образом, описанный в данном документе антигенный массив идентифицировал гораздо больше сенсбилизаций, т.е. увеличение на 89%, что дополнительно указывает на более высокую чувствительность массива/способа антигена по сравнению с эталонным массивем/способом. Результаты обобщены в табл. 7.

Таблица 7. Сводное сравнение тестов

Сводное сравнение с эталонным способом	
# тестируемых образцов	83
Эталонный способ	ImmunoCAP ISAC 112 sIgE
# эталонных аллергенов	112
# протестированных аллергенов	245
# перекрывающиеся (идентичных) аллергенов	70
# прямо сопоставимых результатов	5810
# положительных результатов теста, полученные с использованием эталонного способа	2508
# положительных результатов теста, полученных с помощью нового способа	4740
# положительных результатов эталона, перекрывающиеся аллергены	1057
# положительных результатов нового способа, перекрывающиеся аллергены	1159
% дополнительной сенсбилизации, детектируемой новым способом	89,00%
% дополнительных сенсбилизаций, детектируемых новым способом, перекрывающиеся аллергены	9,65%
Среднее значение корреляция Пирсона новый способ vs. эталонный способ	0,76
Макс. Корреляция Пирсона новый способ vs. эталонный способ	0,99

Пример 8. Стабильность антигенсвязанных гранул.

Гранулы, связанные с аллергеном, готовили, как описано в примере 1, и аллергенный массив получали в день 0. Несколько дополнительных антигенных массивов (около 40) получали в течение 330 дней с использованием тех же препаратов гранул, связанных с аллергенами. Антиген-связанные гранулы хранились в течение этого периода времени при 2-8°C за исключением случаев, когда они использовались для получения антигенных массивов, для которой они выдерживались при комнатной температуре в течение примерно 30 мин.

Тот же образец был испытан в день 0 в антигенном массиве, изготовленном в день 0, а затем снова в день 330 в антигенном массиве, изготовленном в день 330. Результаты двух тестов и вариационного коэффициента (CV) приведены в табл. 8. На фиг. 5 показан график результатов в день 0 и день 330.

Эти данные показывают чрезвычайно высокую стабильность покрытых аллергеном гранул и воспроизводимость способа.

Таблица 8. Сравнение результатов тестов в день 0 и день 330

Аллерген	День 0	День 330	CV (%)
Act d [Фрукты]	1,97	2,34	8,51
All p	5,05	5,54	4,63
All s	4,54	5,21	6,84
Alt a 1	11,53	12,36	3,49
Ana p [яичный желток]	1,32	1,32	0,34
Ara h	2,94	3,28	5,37
Ara h 1-NT	1,77	1,94	4,69
Ara h 8.0101	1,20	1,43	8,62
Art v	2,21	2,60	8,12
Blo t	1,44	1,61	5,47
Bos d [Молоко]	10,61	11,14	2,45
Bos d 8	9,60	10,01	2,08
Bub b [Молоко]	9,55	10,31	3,83
Cam d [Молоко]	2,28	2,47	4,12
Can f [эпителий]	11,78	12,00	0,93
Can f 3	27,57	32,16	7,69
Cap h [Молоко]	7,16	6,58	4,18
Cot c [яичный белок]	1,18	1,35	6,87
Cot c [яичный желток]	2,11	2,57	9,76
Cri c	2,67	2,91	4,28
Der f 2	1,89	2,21	7,92
Der p 10	2,31	2,49	3,84
Der p 23.0101	2,29	2,30	0,18
Equ c 3	1,42	1,66	7,82
Fag e	1,50	1,66	4,88
Fel d	1,97	1,80	4,66
Fel d 2	12,50	13,53	3,96
Gal d [яичный желток]	1,34	1,22	4,82
Gal d 5	2,05	1,91	3,46
Hel as 1	1,27	1,49	8,18
Jug r [Семя]	2,13	2,12	0,27
Lup a [Семя]	1,24	1,28	1,49
Mal d 1.0108	2,54	2,98	7,95
Mel g [яичный желток]	1,43	1,35	2,81
Ogy c [Эпителий]	1,94	1,68	6,99
Ogy c 6	2,76	2,75	0,23
Ovi a [Молоко]	10,90	9,59	6,38
Par j	5,78	6,18	3,33
Phl p 1.0102	5,06	6,23	10,38
Phl p 7.0101	3,46	3,29	2,49
Pis v [Семя]	3,81	4,00	2,51
Pla a	9,46	10,72	6,24
Pru ar [Фрукты]	5,62	5,29	3,08
Pru du [Семя]	2,05	1,77	7,30
Pru p [Целлюлоза]	4,82	5,25	4,33
Que a [Пыльца]	4,59	4,41	2,00
Соль	2,26	1,92	8,14
Sola l [Фрукты]	2,86	2,95	1,43
Sola l [Семя]	3,01	3,03	0,34
Sola m	2,55	2,91	6,46
Tri a [Семя]	4,45	3,95	5,92
Ven ga	2,50	2,22	5,77
Zea m [Семя]	1,33	1,57	8,22

Пример 9. Оптимизация экстракта для приготовления гранул, покрытых аллергенами.

Березовая пыльца была приобретена у коммерческого поставщика, а экстракт аллергена был приготовлен способами, известными специалистам в данной области, в основном перемешиванием в определенных условиях и в течение определенных периодов времени в физиологическом буфере. Экстракт берёзовой пыльцы соединяли с наночастицей пассивным связыванием с использованием 4 различных условий pH и солей. Как показывают данные (табл. 9), на основе молекулярного профиля пациента (например, какие молекулярные аллергены у пациента имеют специфические антитела в сыворотке), разные значения pH дают различную количественную оценку sIgE. Это указывает на то, что объединение разных условий pH сохраняет репертуар молекулярного эпитопа экстракта и приводит к более точному и более чувствительному измерению.

Кроме того, экстракт березы дополнительно обрабатывали методом эксклюзионной хроматографии (SEC). Отдельные фракции, представляющие определенный диапазон молекулярной массы исходного экстракта, собирали и связывали с наночастицами с использованием одного условия. Как и ожидалось, в зависимости от модели молекулярного распознавания получается еще более выдающийся результат измерения в соответствии с паттерном молекулярной сенсибилизации пациентов. Например, образец 1 показал сопоставимые уровни специфического IgE во всех фракциях, тогда как образец 2 показал низкие уровни sIgE против фракции 1, но высокий против фракции 3, тогда как образец 3 имел самые высокие уровни sIgE против фракции 1. Объединение отдельных фракций и дальнейшая оптимизация условий связывания pH для каждой фракции приведут к более высокой аналитической чувствительности, чем у эталонного способа.

Таблица 9

Единицы: специфический IgE, в kUA/L (= 2,4 нг/мл)	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4	Образец 5	Образец 6	Образец 7
Экстракт березы, pH Условие 1	24,15	29,06	9,22	0	0	0	0
Экстракт березы, pH Условие 2	21,3	22,28	9,51	0	0	0	0
Экстракт березы, pH Условие 3	26,25	28,68	18,79	0	0	0	0
Экстракты березы, pH Условие 4	20,24	22,95	10,46	0	0	0	0
Экстракт березы, Смешивание pH-условий 1-4	35,18	36,22	28,75	0	0,2	0	0
Экстракт березы, фракция 1 (SEC)	39,21	1,1	37,41	0	0,29	0	0
Экстракт березы, фракция 2 (SEC)	26,57	8	24,79	0	0	0	0
Экстракт березы, фракция 3 (SEC)	35,29	40,15	13,25	0	0,39	0	0
Сумма фракций SEC 1-3	74,5	41,25	50,66	0	0,68	0	0
Эталонный способ (ImmunoCAP)	29,6	77	6,04	0	0,34	0	0
Молекулярный аллерген Bet v 1	+	+	+	-	+	-	-
Молекулярный аллерген Bet v 2	+	+	+	-	+	-	-
Молекулярный аллерген Bet v 4	-	-	+	-	-	-	-

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенный массив для обнаружения иммуноглобулинов, специфичных к одному или нескольким антигенам из массива, в биологическом образце, включающий группы покрытых антигеном гранул, закрепленных на твердом носителе, где каждая группа включает:

(i) гранулы, покрытые одним детектирующим антигеном; или

(ii) гранулы, покрытые набором детектирующих антигенов,

и где твердый носитель представляет собой лист или пластину, а детектирующий антиген представляет собой аллерген, маркер инфекции или аутоантиген.

2. Антигенный массив по п.1, отличающийся тем, что детектирующий антиген представляет собой биомолекулу, состоящую из нуклеиновых кислот и/или аминокислот, предпочтительно белка, пептида, антитела или молекулы ДНК или органического или неорганического химического соединения.

3. Антигенный массив по любому из пп.1 или 2, отличающийся тем, что детектирующий антиген представляет собой антиген, полученный по технологии рекомбинантных ДНК, или антиген, выделенный и очищенный из биологического материала.

4. Антигенный массив по любому из пп.1 или 2, отличающийся тем, что набор детектирующих антигенов получают из экстракта или лизата биологического исходного материала, содержащего более одного антигена.

5. Антигенный массив по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что гранулы представляют собой микро- или наночастицы, предпочтительно, когда гранулы имеют размер от 5 до 500 нм в диаметре, предпочтительно от 200 до 500 нм в диаметре.

6. Антигенный массив по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что гранулы представляют собой латексные гранулы, полимерные пластиковые гранулы, предпочтительно гранулы из полистирола, гранулы, изготовленные из биосовместимых полимеров, или стеклянные гранулы, предпочтительно гранулы,

лы из двуокиси кремния.

7. Антигенный массив по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что детектирующий антиген связывается ковалентно или нековалентно, предпочтительно пассивной адсорбцией.

8. Антигенный массив по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что твердый носитель представляет собой лист или пластину из пористого или непористого материала.

9. Антигенный массив по п.8, где твердый носитель представляет собой лист или пластину из нитроцеллюлозного листа, такого как ламинированный нитроцеллюлозный лист.

10. Антигенный массив по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что массив содержит по меньшей мере 25 различных групп, предпочтительно, где каждая группа фиксируется как адресуемый элемент в прямоугольном массиве или в плотноупакованном массиве, необязательно при плотности 1 адресуемый элемент на мм².

11. Антигенный массив по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что гранулы относятся к одинаковому или различным типам.

12. Антигенный массив по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что гранулы, покрытые антигеном, являются гранулами, покрытыми аллергеном, и каждая группа гранул, покрытых аллергеном, включает:

- (i) гранулы, покрытые одним аллергеном; или
- (ii) гранулы, покрытые набором аллергенов, предпочтительно экстрактом аллергена.

13. Способ детектирования иммуноглобулина, специфичного для детектирующего антигена, или для набора детектирующих антигенов, включающий:

- (i) обеспечение антигенного массива по любому из пп.1-12;
- (ii) инкубацию массива с образцом;
- (iii) инкубацию массива с детектирующим реагентом; и
- (v) измерение детектируемого сигнала.

14. Способ по п.13 дополнительно включающий стадию (iv) инкубации массива с реагентом образования сигнала.

15. Способ по п.13 или 14, отличающийся тем, что иммуноглобулин представляет собой IgE-антитело, ассоциированное с аллергией, или IgE-антитело, ассоциированное с инфекцией или аутоиммунным заболеванием.

16. Способ по любому из пп.13-15, отличающийся тем, что образец представляет собой биологическую жидкость, предпочтительно сыворотку, целую или обработанную кровь, носовую жидкость или мочу, клеточный лизат или гомогенат ткани от объекта или пула объектов.

17. Способ по любому из пп.13-16, отличающийся тем, что реагент для детекции представляет собой аффинный связывающий агент, специфичный для иммуноглобулина.

18. Способ по п.17, отличающийся тем, что аффинный связывающий агент, специфичный для иммуноглобулина, представляет собой антитело, аптамер или аффитело.

19. Способ по п.17 или 18, отличающийся тем, что детектирующий реагент:

(i) непосредственно помечен, предпочтительно окрашенным или флуоресцентным соединением, или наночастицами золота, или цветными латексными наночастицами; или

(ii) конъюгирован с ферментом.

20. Способ по любому из пп.14-19, дополнительно включающий инкубацию антигенного массива с реагентом образования сигнала в соответствии со стадией (iv) по п.14, где детектирующий реагент конъюгирован с ферментом и реагент образования сигнала содержит субстрат для указанного фермента.

21. Способ по любому из пп.14-20, дополнительно включающий инкубацию антигенного массива со стоп-раствором после стадии (iv) по п.14.

22. Способ по любому из пп.13-21, отличающийся тем, что иммуноглобулин представляет собой IgE-антитело, ассоциированное с аллергией, причем способ включает:

(i) обеспечение антигенного массива по п.12;

(ii) инкубацию массива с образцом;

(iii) инкубацию массива с детектирующим реагентом, предпочтительно IgE-специфическим антителом или IgE-специфическим аптамером;

(v) измерение детектируемого сигнала.

23. Способ по п.22 дополнительно включающий стадию (iv) инкубации массива с реагентом образования сигнала.

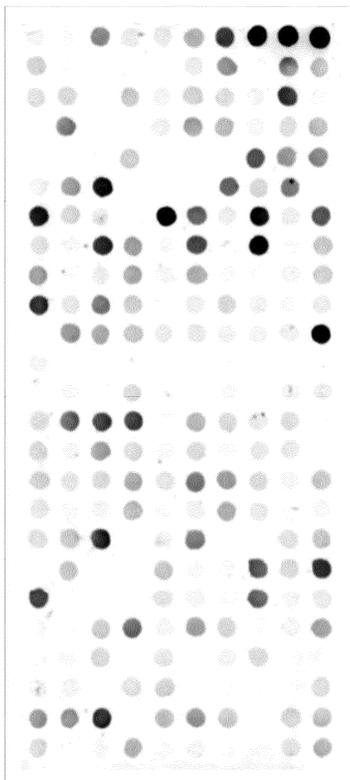
24. Картридж, содержащий тестовую камеру, содержащую антигенный массив по любому из пп.1-12, и резервуар для жидких отходов.

25. Картридж по п.24, дополнительно включающий штрих-код.

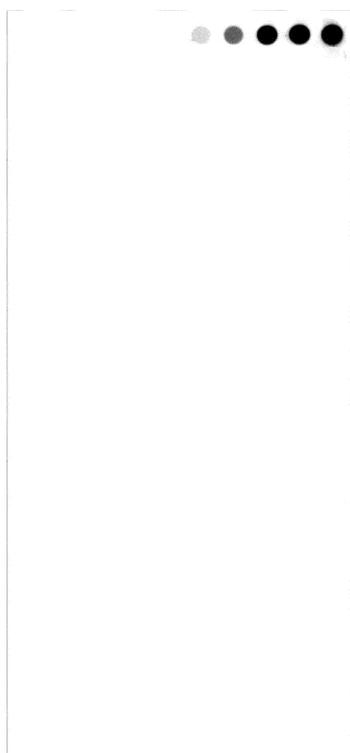
26. Набор для детектирования иммуноглобулина, специфичного для детектирующего антигена, или для набора детектирующих антигенов, содержащий антигенный массив по любому из пп.1-12, детектирующий реагент, один или несколько буферов, один или несколько контрольных образцов и инструкции для применения набора в способе по любому из пп.13-23.

27. Набор по п.26 дополнительно содержащий реагент образования сигнала.

28. Устройство для детектирования иммуноглобулина, специфичного для детектирующего антигена или для набора детектирующих антигенов, содержащее камеру, содержащую один или несколько картриджей по п.24 или 25, пипетку и устройство для обнаружения сигнала.



Фиг. 1А



Фиг. 1В

Ven ga 1	Ves spp	Vit v [фрукт]	Zea m [семя]	Zea m 14	IgE Std. 1	IgE Std. 2	IgE Std. 3	IgE Std. 4	IgE Std. 5
Tri a [семя]	Tri a 18	Tri a 28	Tri a 7k-	буфер	Tri me	Tri tp	Uro du	Uro du 1	Ven ga
Sola l [фрукт]	Sola l [семя]	Sola l 6	Sola m	Sola t	Sola t 1	Spi o	Sus s [мясо]	Sus s 1	Thu a [мясо]
Rat n 1	Rat n 4	Sac c	Sal k 1	Sal s [мясо]	Sar m	Sec s [семя]	Ses i [семя]	Sin a [семя]	Sol so
Pru p 3 A	Pru p 7	Pun g	Pun g 1	Pun g 14	Pun g 5	Pun g 7	Que a [пыльца]	Que i [пыльца]	Rat n [эпит.]
Pin p [семя]	Pis v [семя]	Pla a [пыльца]	Pla a 1	Ple o [спора]	Pol spp	Pru ar [фрукт]	Pru du	Pru p [пыльца]	Pru p 3 B
Per a	Per a 7	Pers a	Pha v [семя]	Phl p	Phl p 1.010	Phl p 2.010	Phl p 5.010	Phl p 6.010	Phl p 7.010
Ory s [семя]	Ovi a [мясо]	Ovi a [молоко]	Ovi a 6	Pan b	Par j	Par j 2	Pas n	Pen ch	Pen m 1
Mus m	Mus m 1	Myt e	Nep n	Oct v	Ole e [пыльца]	Ole e 1	Ole e 2	Ory c [мясо]	Ory c 6
Loi p 1	Lup a [семя]	Mal d [фрукт]	Mal d 1.010	Mal a p	Mel g [яйцо]	Mel g [яйцо]	Mel g [мясо]	Mer a 1	Mer m 1
Hom s HSA	Hom s LF	Hor v [семя]	Jug r [семя]	Jug r 3	Lac s	Len c	Lep d	Lin us	Loi p [пыльца]
Hev b 1	Hev b 10	Hev b 11	Hev b 3.010	Hev b 5.010	Hev b 6.02	Hev b 7.02	Hev b 8	Hev b 9	Hev b 9
Gal d 2	Gal d 3	Gal d 4	Gal d 5	Gly m	Gly m 1	Gly m [аэро-типп]	Gly m TI	Hel as	Hel as 1
Fel d	Fel d 1	Fel d 2	Foe v [луковица]	Fra a	Fra a [ache]	Gad m	Gal d [яйцо]	Gal d [яйцо]	Gal d 1
Der p 10	Der p 2	Der p 23.01	Der p 7	Der p 9	Equ as [молоко]	Equ c [эпит.]	Equ c [молоко]	Equ c 3	Equ c [молоко-бин]
Cri c [эпит.]	Cry j	Cuc m [пыльца]	Cuc s	Cup a 1	Cyn d [пыльца]	Dau c	Der f	Der p	Der p 1
Cer si [семя]	Che qu	Cic a	Cit r [фрукт]	Cla h	Coc n [семя]	Cor a [пыльца]	Cor a [семя]	Cor a 1.010	Cor a 9
Can f 1	Can f 2	Can f 3	Cor a 8	Cand a	Car h [молоко]	Car p 1	Car p [химопла-гид]	Cas s [семя]	Cav p [эпит.]
Bos d 6	Bos d 8	Bos d CA	Bos d [железин]	Bos d LF	Bos d TG	Bot fu	Bub b [молоко]	Sam d [молоко]	Can f [эпит.]
Bla g 1	Bla g 2	Bla g 4	Bla g 5	Blo t	Bos d [эпит.]	Bos d [мясо]	Bos d [молоко]	Bos d 4	Bos d 5
Asp n	Asp r 1	Aspa o	Ave s [семя]	Ver e [семя]	Bet v [пыльца]	Bet v 1.010	Bet v 2.010	Beta v лист	Bla g
Ara h 1-NT	Ara h 2	Ara h 3	Ara h 6	Ara h 8.010	Ara h [аэро-типп]	Arm r HRP	Art v	Art v 1	Asp f
Ani pe	Ani s	Ani s 1	Ani s 3	Ari g [стебель]	Ari g 1.010	Ari m [яд]	Ari m 1	Ari m 4	Ara h
All p	All s	Alt a 1	Alt a 6.010	Ama cr	Amb a	Amb a 1	Ana c	Ana c 2	Ana o [семя]
Act c [фрукт]	Act c 11	Act c [хитин]	Act d [фрукт]	Act d 1	Act d 10	Act d 2	Act d 5	Aed c	All c

Фиг. 1С

Сравнительная оценка теста:

220 предварительно выбранных сенсibilизированных образцов, доступны результаты испытаний ImmuloCAP ISAC 30 аллергических компонентов показали, по меньшей мере, 5 положительных значений 779 положительных результатов и 2772 отрицательных результата были проанализированы для приведенной ниже таблицы

	Аллерген	Чувствительность (*)	Специфичность (*)	r2 корреляция (**)
Клещи	Der p 1	97	98	0,80
	Der p 2	78	90	0,65
	Der p 10	100	100	0,99
Кошка	Fel d 1	98	100	0,61
Собака	Can f 1	100	99	0,75
	Can f 3	100	100	0,99
Молоко	Bos d 4	100	100	0,96
	Bos d 5	100	99	0,96
	Bos d 6	75	89	0,85
	Bos d 8	100	99	0,77
Яйцо	Gal d 1	100	100	0,97
	Gal d 2	75	100	0,97
оливка	Ole e 1	100	100	0,89
	Ole e 2	100	100	0,85
альтернариоз	Alt a 1	100	95	0,85
трава	Phl p 1	100	100	0,82
	Phl p 2	100	91	0,86
	Phl p 5	100	97	0,77
	Phl p 6	100	98	0,80
	Phl p 7	100	100	0,93
	Lol p 1	100	79	0,79
	береза	Bet v 1	100	79
Bet v 2		100	99	0,93
полынь	Art v 1	100	99	0,56
кипарис	Cup a 1	100	97	0,87
оливка	Ole e 1	100	93	0,89
	Ole e 2	100	98	0,85
латекс	Hev b 6.02	100	100	0,95
	Hev b 8	92	96	0,85
Постенница	Par j 2	95	97	0,84
	Среднее	97	96	0,85

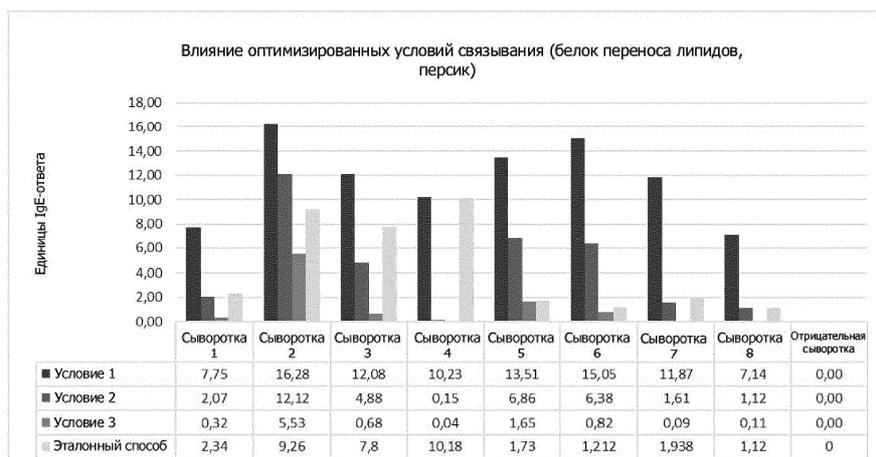
(*) Чувствительность и специфичность оценивали с использованием MedCalc по сравнению с исходными данными ImmuloCAP ISAC с использованием протоколов производителей для тестирования и порог 0,3 ISU

(**) Линейный регрессионный анализ результатов измерений выполнялся с помощью Microsoft Excel

Фиг. 2



Фиг. 3

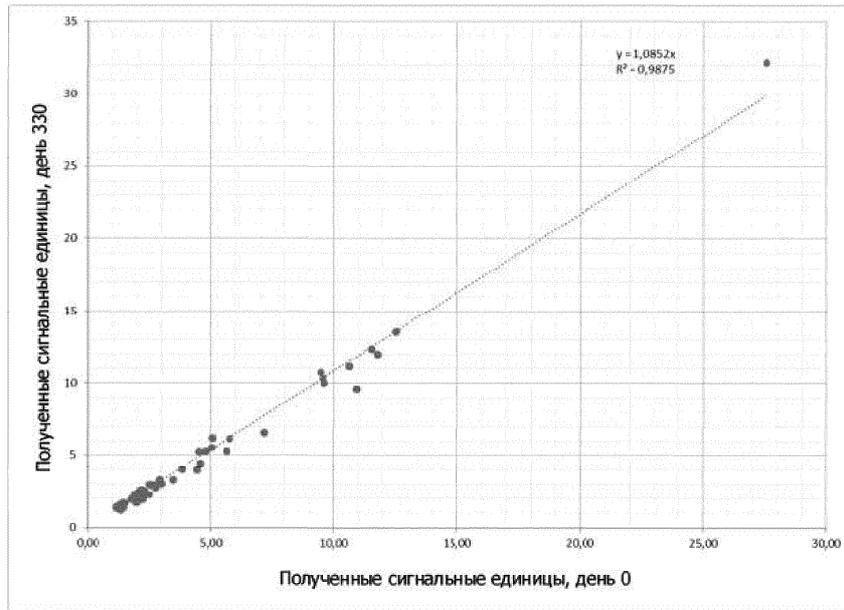


Фиг. 4

Технические характеристики и сравнение доступных многопараметрических анализов для измерений специфического IgE

	FABER MacroArray Diagnostics	ImmunoCAP ISAC Thermo Fisher Scientific
Производитель	MacroArray Diagnostics	Thermo Fisher Scientific
Аллергенные компоненты (#)	123	112
Экстракты аллергенов (полные аллергены) (#)	122	0
Объем сыворотки	100 мкл	35 мкл
Объем сыворотки за отчетный результат	0,4 мкл	0,3 мкл
Длительность теста	4 часа	4 часа
Образование сигнала	колориметрическое, ферментативное усиление	Флуоресценция, без усиления
Предел обнаружения	> = 0,1 кUA/л для аллергенных компонентов > = 0,5 кUA/л для экстрактов аллергенов	> = 0,3 KUATL недоступно
Линейный диапазон	0,1 - 50 единиц (2,5 log) измерение конечной точки 0,1 -100 единиц (3 log) кинетическое измерение	0,3-100 единиц (2,35 log)
Считывание данных	Сканер или камера CCD/CMOS	Конфокальный лазерный сканер
Стоимость сканера	<200 евро	> 15000 Евро
Продолжительность сканирования/операция	<30 секунд для 40 тестов, ручная процедура	2 минуты на 4 теста, ручная процедура
Результаты, анализ и длительность	Полностью автоматический, <5 с на образец	Необходимые стадии вручную, зависит от оператора
Минимум образцов за один проход	1	4
Максимум образцов за один прогон (1 оператор, 1 день)	<100	<100
Калибровка	Онлайн (стандартная кривая IgE)	Дополнительный тестовый образец 8, гетерологичный
Коррекция по аллергену или партии	на основе штрих-кода DataMatrix, партия и аллерген	нет
Автоматизация	Ручная или полупавтоматическая	Ручная
Хранение обработанного теста перед считыванием	бесконечно	Дни (с защитой от света)
Результаты теста	Произвольные единицы; полуколичественные (*)	Произвольные единицы; полуколичественные (*)
Точность (CV, общая)	<15%	25 % > 1 ISU, >> 25 % < 1 ISU
Стабильность/хранение	> 1 год, нет доступных данных в реальном времени	Нет данных
Тип образца	Сыворотка, плазма	Сыворотка, плазма
Гемолитическая интерференция образца	нет	Нет данных
Интерференция общего IgE	Невозможно измерить <5000 кUA/л tIgE	Данные недоступны

Фиг. 5



Фиг. 6

