

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-28254
(P2016-28254A)

(43) 公開日 平成28年2月25日(2016.2.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	4 B 0 2 4
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 D	4 B 0 6 4
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577 B	4 H 0 4 5
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18 Z N A	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	

審査請求 有 請求項の数 7 O L 外国語出願 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-209371 (P2015-209371)
 (22) 出願日 平成27年10月23日 (2015.10.23)
 (62) 分割の表示 特願2012-539940 (P2012-539940) の分割
 原出願日 平成22年11月9日 (2010.11.9)
 (31) 優先権主張番号 61/262,488
 (32) 優先日 平成21年11月18日 (2009.11.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 12/941,738
 (32) 優先日 平成22年11月8日 (2010.11.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591099809
 バイオーラッド ラボラトリーズ, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94547, ハーキュルズ, アルフレッド ノーベル ドライブ 1000
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘモグロビン、ヘモグロビンバリエント、及び糖化フォームの多重免疫アッセイ

(57) 【要約】

【課題】本発明は、糖化ヘモグロビンのアッセイの分野に関するものである。

【解決手段】ヘモグロビン、そのバリエント、及びそれらの糖化フォームは、糖化バリエントや試料中のバリエントの混在に関連する他の要素を説明するための、HbA1cの測定されたレベルの補正を可能とする多重アッセイにおいて、個別に決定される。当該多重アッセイに特に適した新規抗体も提供される。

【選択図】 図 1

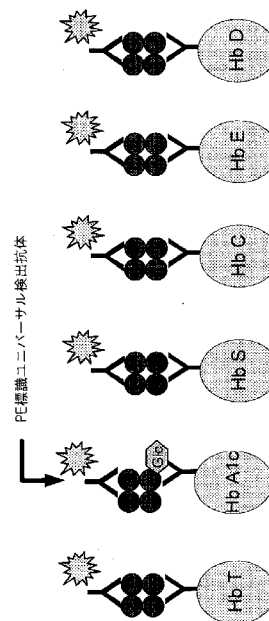


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単一の血液細胞溶解物の試料中の、HbA_{1c}、及び多数のヘモグロビンバリエーションを含む多数のヘモグロビン含有解析物を個別に検出する方法であり、当該方法が：

(a)前記試料をビーズの集団とインキュベーションし、当該集団が均一な混合物(common mixture)中の多数のサブ集団からなり、当該集団の各ビーズに、前記解析物と同数の多数の分類染料(classifier dye)の一つが結合しており、そして当該分類染料は、当該分類染料、ひいては前記サブ集団が、当該分類染料が励起されることで放射される蛍光放射により互いに区別されるように選択され、当該各サブ集団が、更に、前記解析物の1つに選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバーを結合させていることにより、各解析物を、前記サブ集団に結合させられた前記免疫学的結合メンバーを介して、個々のビーズサブ集団と結合させること；

(b)前記サブ集団のビーズに結合した前記解析物を、全ての前記解析物と結合する標識された結合メンバーとインキュベーションすることにより、当該解析物に標識を結合させること；及び

(c)そのように標識された前記結合した解析物について、蛍光放射によりサブ集団の標識を区別しながら、前記結合した解析物に結合した標識を検出することにより、当該解析物を個別に検出すること；

を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記多数のヘモグロビン含有解析物が、全ヘモグロビン、HbA_{1c}、及び前記多数のヘモグロビンバリエーションからなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記HbA_{1c}に選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバーがモノクローナル抗体である、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記多数のヘモグロビンバリエーションが、HbS, HbC, HbE, 又はHbDの1つ以上である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ヘモグロビンバリエーションHbS, HbC, HbE, 又はHbDに選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバーが、当該バリエーション及び糖化バリエーションに選択的に結合するモノクローナル抗体である、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記バリエーションがHbCであり、HbC及び糖化HbCに選択的親和性を有する免疫学的結合メンバーが、HbC最小エピトープ⁴TPKEKSAVT¹²に結合するモノクローナル抗体である、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記バリエーションがHbSであり、HbS及び糖化HbSに選択的親和性を有する免疫学的結合メンバーが、HbS最小エピトープ³LTPVEKSAVT¹²に結合するモノクローナル抗体である、請求項5に記載の方法。

【請求項 8】

前記バリエーションがHbEであり、HbE及び糖化HbEに選択的親和性を有する免疫学的結合メンバーが、HbE最小エピトープ²²EVGGK²⁶又は²¹DEVGGK²⁶に結合するモノクローナル抗体である、請求項5に記載の方法。

【請求項 9】

前記バリエーションがHbDであり、HbD及び糖化HbDに選択的親和性を有する免疫学的結合メンバーが、HbD最小エピトープ¹²¹QFTPP¹²⁵又は¹¹⁹GKQFTPP¹²⁵に結合するモノクローナル抗体である、請求項5に記載の方法。

【請求項 10】

前記多数のビーズサブ集団が、全ヘモグロビンに結合するサブ集団を含まず、そして前

10

20

30

40

50

記方法が、更に、非免疫アッセイ手段により全ヘモグロビンを判定することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記多数のビーズサブ集団が、全ヘモグロビンに結合するサブ集団を含み、全ヘモグロビンに対する選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバーがモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記モノクローナル抗体が、ベータグロビン鎖最小エピトープ⁹SAVTALWGKVV²⁰、⁸KSAVTALWGVV²⁰、又は¹¹VTALW¹⁵に結合する、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記多数のビーズサブ集団が、全ヘモグロビンに結合するサブ集団を含み、全ヘモグロビンに選択的結合親和性を有する前記免疫学的結合メンバーがポリクローナル抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記血液細胞溶解物が変性血液細胞ライゼートである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記試料が糖尿病患者から採取されたものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

血液細胞溶解物の試料中の、全ヘモグロビンに対するHbA_{1c}の比率を決定する方法であり、当該比率は、HbA_{1c}の測定に干渉するヘモグロビンバリエーションが当該溶解物中に存在する可能性を考慮して調整され、当該方法が：

(a)前記試料をビーズの集団とインキュベーションし、当該集団が均一な混合物中の多数のサブ集団からなり、当該集団の各ビーズに、多数の分類染料の一つが結合しており、そして当該分類染料は、当該分類染料、ひいては前記サブ集団が、当該分類染料が励起されることで放射される蛍光放射により互いに区別が可能ないように選択され、当該各サブ集団が、更に、HbA_{1c}及びヘモグロビンバリエーションを含む多数の解析物の1つに選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバーを結合させていることにより、各解析物を、当該免疫学的結合メンバーを介して、個々のビーズサブ集団と結合させること；

(b)前記サブ集団のビーズに結合した前記解析物を、全ての前記解析物と結合する標識された結合メンバーとインキュベーションすることにより、当該解析物に標識を結合させること；

(c)そのように標識された前記結合した解析物について、蛍光放射によりサブ集団の標識を区別しながら、前記結合した解析物に結合した標識を検出することにより、前記試料中の当該解析物の濃度を個別に検出すること；及び

(d)前記濃度から全ヘモグロビンに対するHbA_{1c}の比率を決定し、当該比率が、検出されたヘモグロビンバリエーション濃度とHbA_{1c}の濃度との間の予め決められた関係に実験的に由来する調整係数により、当該ヘモグロビンバリエーションの濃度で調整されること；

を含む、前記方法。

【請求項 1 7】

前記多数の解析物が、更に、全ヘモグロビンを含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記多数のビーズサブ集団が全ヘモグロビンに結合するサブ集団を含まず、更に前記方法が、非免疫アッセイ手法により全ヘモグロビンを決定することを含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記HbA_{1c}に選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバーがモノクローナル抗体である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記多数のビーズサブ集団が全ヘモグロビンに結合するサブ集団を含み、前記全ヘモグロビンに対して選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバーがモノクローナル抗体で

10

20

30

40

50

ある、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

前記モノクローナル抗体が、ベータグロビン最小エピトープ⁹SAVTALWGKVV²⁰、⁸KSAVTALWGKVV²⁰、又は¹¹VTALW¹⁵に結合する、請求項20に記載の方法。

【請求項 22】

前記多数のビーズサブ集団が全ヘモグロビンに結合するサブ集団を含み、前記全ヘモグロビンに対して選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバーがポリクローナル抗体である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 23】

前記血液細胞溶解物が変性血液細胞溶解物である、請求項16に記載の方法。

10

【請求項 24】

前記ヘモグロビンパリアントが、HbC, HbS, HbD, 及びHbEから成る群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 25】

前記ヘモグロビンパリアントHbC, HbS, HbD, 又はHbEに選択的に結合する免疫学的結合メンバーが、当該ヘモグロビンパリアント及び糖化パリアントに結合するモノクローナル抗体である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記ヘモグロビンパリアントがHbCであり、HbCに選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバーが、HbC最小エピトープ⁴TPKESAVT¹²に結合するモノクローナル抗体である、請求項 25 に記載の方法。

20

【請求項 27】

前記ヘモグロビンパリアントがHbSであり、当該パリアントに選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバーが、HbS最小エピトープ³LTPVESAVT¹²に結合するモノクローナル抗体である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記ヘモグロビンパリアントがHbEであり、当該パリアントに選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバーが、HbE最小エピトープ²²EVGGK²⁶又は²¹DEVGGK²⁶に結合するモノクローナル抗体である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 29】

前記ヘモグロビンパリアントがHbDであり、当該パリアントに選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバーが、HbD最小エピトープ¹²¹QFTPP¹²⁵又は¹¹⁹GKQFTPP¹²⁵に結合するモノクローナル抗体である、請求項 25 に記載の方法。

30

【請求項 30】

前記試料が糖尿病患者から採取されたものである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 31】

血液細胞溶解物の試料中の、全ヘモグロビンに対する糖化ヘモグロビンパリアントの比率を決定する方法であり、当該方法が：

(a)前記試料をビーズの集団とインキュベーションし、当該集団が均一な混合物中の多数のサブ集団からなり、当該集団の各ビーズに、多数の分類染料の一つが結合しており、そして当該分類染料は、当該分類染料、ひいては前記サブ集団が、当該分類染料が励起されることで放射される蛍光放射により互いに区別が可能ないように選択され、当該各サブ集団が、更に：

40

第一の免疫学的結合メンバーとして、前記糖化ヘモグロビンパリアント及びHbA_{1c}の両方からなる第一の解析物に選択的結合親和性を有するもの、及び

第二の免疫学的結合メンバーとして、前記ヘモグロビンパリアント及び前記糖化ヘモグロビンパリアントの両方からなる第二の解析物に選択的結合親和性を有するもの

を含む多数の免疫学的結合メンバーの1つを有することにより、当該第一及び第二の解析物を、当該第一及び第二の各免疫学的結合メンバーと結合させること；

(b)結合した前記第一及び第二解析物を、全ての前記解析物と結合する標識された結合メ

50

ンバーとインキュベーションすることにより、当該解析物に標識を結合させること；

(c) そのように標識された前記結合した解析物について、蛍光放射によりサブ集団の標識を区別しながら、前記標識を検出することにより、前記試料中の当該第一及び第二の解析物の濃度を個別に検出すること；及び

(d) 全ヘモグロビンの濃度を決定し、そして前記濃度から全ヘモグロビンに対する前記第一の解析物の比率を決定し、当該比率が、検出されたヘモグロビンバリエーション濃度と全ヘモグロビン濃度との間の予め決められた関係に実験的に由来する調整係数により、全ヘモグロビンに対する当該第二の解析物の濃度で調整されることにより、全ヘモグロビンに対する糖化ヘモグロビンバリエーションの比率を決定すること；

を含む、前記方法。

10

【請求項 3 2】

前記多数の免疫学的結合メンバーが、更に全ヘモグロビンに選択的親和性を有する第三の免疫学的結合メンバーを含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記全ヘモグロビンに選択的結合親和性を有する第三の免疫学的結合メンバーがモノクローナル抗体である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記モノクローナル抗体が、ベータグロビン最小エピトープに結合し、当該モノクローナル抗体が、ベータグロビン最小エピトープ⁹SAVTALWGKVVN²⁰、⁸KSAVTALWGKVVN²⁰、又は¹VTALW¹⁵に結合する、請求項 3 3 に記載の方法。

20

【請求項 3 5】

前記全ヘモグロビンに選択的親和性を有する第三の免疫学的結合メンバーがポリクローナル抗体である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記多数の免疫学的結合メンバーが、全ヘモグロビンに対する選択的親和性を有する免疫学的結合メンバーを含まず、前記工程(d)における全ヘモグロビンの濃度が、非免疫アッセイ手段により決定される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記第一の解析物に選択的結合親和性を有する第一の免疫学的結合メンバーがモノクローナル抗体である、請求項 3 1 に記載の方法。

30

【請求項 3 8】

前記第二の解析物に選択的結合親和性を有する第二の免疫学的結合メンバーがモノクローナル抗体である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記第二の解析物が、HbC、HbS、HbD、及びHbEからなる群から選択される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記第二の解析物がHbCであり、前記第二の免疫学的結合メンバーが、HbC最小エピトープ⁴TPKEKSAVT¹²に結合するモノクローナル抗体である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記前記第二の解析物がHbSであり、前記第二の免疫学的結合メンバーが、HbS最小エピトープ³LTPVEKSAVT¹²に結合するモノクローナル抗体である、請求項 3 9 に記載の方法。

40

【請求項 4 2】

前記前記第二の解析物がHbEであり、前記第二の免疫学的結合メンバーが、HbE最小エピトープ²²EVGGK²⁶又は²¹DEVGGK²⁶に結合するモノクローナル抗体である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記前記第二の解析物がHbDであり、前記第二の免疫学的結合メンバーが、HbD最小エピトープ¹²¹QFTPP¹²⁵又は¹¹⁹GKQFTPP¹²⁵に結合するモノクローナル抗体である、請求項 3 9 に記載の方法。

50

【請求項 4 4】

前記試料が糖尿病患者から採取されたものである、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

HbC 最小エピトープ⁴TPEKSAVT¹²に結合する、ヘモグロビンバリエントHbC及び糖化HbCに選択的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 4 6】

HbS 最小エピトープ³LTPVEKSAVT¹²に結合する、ヘモグロビンバリエントHbS及び糖化HbSに選択的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 4 7】

HbE 最小エピトープ²²EVGGK²⁶又は²¹DEVGGK²⁶に結合する、ヘモグロビンバリエントHbE及び糖化HbEに選択的に結合するモノクローナル抗体。

10

【請求項 4 8】

HbD 最小エピトープ¹²¹QFTPP¹²⁵又は¹¹⁹GKQFTPP¹²⁵に結合する、ヘモグロビンバリエントHbD及び糖化HbDに選択的に結合するモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2009年11月18日に出願されたUnited States Provisional Patent Application No. 61/262,488の利益を主張し、当該文献の内容は、本明細書中に参照により援用される。

20

【背景技術】

【0002】

1. 発明の分野

本発明は、糖化ヘモグロビンのアッセイの分野に関するものである。

【0003】

2. 先行技術の記載

1又は2型糖尿病に罹患した個体において、血糖管理(glycemic control)の維持は最も重要であり、そのような維持には、これらの個体の血液中のヘモグロビンA_{1c}のレベルの決定が必要である。糖尿病の世界での蔓延率の増大を考慮すると、正確かつ再現可能なHbA_{1c}アッセイが必要である。また、HbA_{1c}アッセイは、糖尿病患者のスクリーニングにも使用される。

30

【0004】

患者のモニタリング及びスクリーニングの両方のためのHbA_{1c}測定は、赤血球の生存時間中の平均として計算される。この平均は、患者の血液中のヘモグロビンバリエントやサラセミア(thalassemia)の存在時の顕著な幾つかの生理的条件により低下する。ヘモグロビンバリエントは、特定の民族集団中で、そして幾つかの地理的領域において流行している。世界で知られている800以上のバリエントの中で、最も一般的なものは、HbS、HbC、HbD、及びHbEである。HbSはアフリカ系の個体で最も優勢で、HbDはパンジャブインド系で、そしてHbEは東南アジアで優勢である。他の公知のヘモグロビンの型として、HbF(胎児ヘモグロビン)及びHbA₂があり、それらはいずれも、ヘモグロビンアルファ及びベータサブ

40

【0005】

典型的には、バリエントが実際に存在することが知られているか否かに関わらず、HbA_{1c}の決定から分離して、ヘモグロビンバリエントの決定が行われる。特定のバリエントに

50

対する抗体がこの目的で開発されており、そのような抗体の報告の例を以下に示す。

【 0 0 0 6 】

HbS: Jensen, R.H., et al, "Monoclonal antibodies specific for sickle cell hemoglobin," Hemoglobin 9(4), 349-362 (1985)

【 0 0 0 7 】

HbS: Epstein, N., et al, "Monoclonal antibody-based methods for quantitation of hemoglobins: application to evaluating patients with sickle cell anemia treated with hydroxyurea," Eur. J. Haematol. 57(1), 17-24 (1996)

【 0 0 0 8 】

HbA: Rosenthal, M.A., et al, "Binding specificity of a monoclonal antibody to human HbA," Hemoglobin 19(3-4), 191 -196 (1995)

10

【 0 0 0 9 】

HbS及びHbC: Garver, E.A., et al, "Screening for hemoglobins S and C in newborn and adult blood with a monoclonal antibody in an ELISA procedure," Annals of Hematology 60(6), 334-338 (1990)

【 0 0 1 0 】

ーアミノ酸置換を有するHb: Stanker, L.H., et al, "Monoclonal antibodies recognizing single amino acid substitutions in hemoglobin," J. Immunol. 136 (11), 4174-4180 (1986)

【 0 0 1 1 】

Hbバリエーション: Moscoso. H., et al, "Enzyme immunoassay for the identification of hemoglobin variants," Hemoglobin 14(4), 389-98 (1990)

20

【 0 0 1 2 】

Hbバリエーション: Schultz, J.C., "Utilization of monoclonal antibody-based assay HemoCard in screening for and differentiating between genotypes of sickle cell disease and other hemoglobinopathies," J. Clin. Lab. Anal. 9(6), 366-374 (1995)

【 0 0 1 3 】

これら及び他の報告にかかわらず、バリエーションの決定は、現在は、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)又は電気泳動のいずれかにより行われる。HPLCは、HbA_{1c}レベルを取得する迅速な手段であり得るが、バリエーションやサラセミアを検出及び定量するためには、広範なHPLCグラディエントが必要となる。なぜなら、HPLCにおいて、当該バリエーションと共に不純物が溶出し、様々なバリエーションが互いに一緒に溶出する傾向があるからである。実際に、幾つかのバリエーションは、最適化されたHPLCグラディエントを用いても、HPLCにより分離することが出来ない。典型的には、迅速なA_{1c}測定のためのものと、バリエーション及びサラセミアの試験のためのものと、別個のHPLC手段が使用されるので、レベルを決定するHPLCと、迅速性で格段に劣るバリエーション又はサラセミア状態を判定するHPLCを同時に行うことは不可能である。

30

【 0 0 1 4 】

複数の解析物の同時検出を提供するアッセイは、「多重」アッセイと呼ばれ、ビーズ表面でのアフィニティー型結合反応を使用し、フローサイトメトリーにより検出を行う多重アッセイの開示は、以下の特許に開示されている。

40

【 0 0 1 5 】

Watkins, M.I., et al, "Magnetic particles as solid phase for multiplex flow assays," US 6,280,618 B2, issued August 28, 2001

【 0 0 1 6 】

Watkins, M.I., et al, "Magnetic particles as solid phase for multiplex flow assays," US 6,872,578 B2, issued March 29, 2005

【 0 0 1 7 】

Thomas, N., "Multiple assay method," US 6,913,935 B1, issued July 5, 2005

【 0 0 1 8 】

50

Hechinger, M., "Platelet immunoglobulin bead suspension and flow cytometry," U S 6,933, 106 B 1 , issued August 23, 2005

【 0 0 1 9 】

Hechinger, M., "Anti-platelet immunoglobulin bead positive control," US 6,951 ,716 B 1 , issued October 4, 2005

【 0 0 2 0 】

Watkins, M.L., et al , "Multi-analyte diagnostic test for thyroid disorders," US7,271 ,009 B 1 , issued September 8, 2007

【 0 0 2 1 】

Bell, M.L., "Assay procedures and apparatus," US 7,326,573 B2, issued February 5, 2008 10

【 0 0 2 2 】

Song, Y., et al., "Multiplex protein interaction determinations using glutathione- GST binding," US 2002/01 151 16 A 1 , published August 22, 2002

【 0 0 2 3 】

解析物の幾つかの組合せについての多重アッセイの成功は、しかしながら、高レベルの予測性があったとしても、類似の成功が全ての解析物の組合せにおいて、特に解析物間の類似性が高い組合せにおいて確実性を提供するものではない。ヘモグロビン並びにそのバリエーション及び糖化フォームは、そのような組合せの一つである。多重アッセイは、通常の反応培地中で完全に混和した複数の異なる免疫応答を含み、異なる解析物における複数の免疫反応物の間で競合が生じ、その競合は、免疫反応物が単一の場合よりも著しいので、複数の方向に交差反応を生じる。また、ビーズのセット自体も、免疫アッセイが実施されるのと同時に区別(differentiate)されなければならない。この区別は、別のビーズセットに別の色素を使用して行うか、各ビーズセットにおいてサイズを変えるか、または他の公知の区別因子を採用するかにより、更なるレベルの複雑性と更なるクロストークの可能性を加えることになる。 20

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 2 4 】

本発明は、ヘモグロビンバリエーションが、互いに、そしてHbA_{1c}から、そして全ヘモグロビンから区別され、そしてそれぞれのレベルが多重免疫アッセイにおいて測定されるという発見に根差している。当該アッセイは、例えば、HbA_{1c}に加えて1つのバリエーション及び全ヘモグロビン、又は2つ以上のバリエーション及び全ヘモグロビンを検出できる。2つ以上のバリエーションを検出するとき、様々なバリエーションが選択されるが、好ましくは、当該アッセイは、最もありふれたバリエーションであるHbS, HbC, HbE, 及びHbDの4つを含む。また、当該アッセイは、HbA₂及びHbFの測定を含んでもよい。故に、本発明は、患者の血液中のヘモグロビンバリエーションの存在を検出及び同定する方法に根差す。また、本発明は、全ヘモグロビンに相対的なHbA_{1c}のレベルを測定する方法に根差すが、この結果は、一緒に存在しているであろうバリエーションの存在により補正される。そして、当該補正は、個々のバリエーションについて、又は複数のバリエーションの組合せについて行われ得る。また、本発明は、補正を行わずにA_{1c}とヘモグロビンバリエーションを同時に検出する方法に根差し、当該検出は、幾つかのケースにおいて有用である。本発明の尚も更なる側面は、糖化フォームの特定のバリエーションのレベルの測定である。バリエーションが存在することが知られている場合、当該バリエーションの糖化したものは、測定され、HbA_{1c}のレベルに加えられて、全糖化ヘモグロビンの正確な表示が取得される。 30 40

【 0 0 2 5 】

更なる態様において、本発明は、本発明の方法に使用出来るヘモグロビンバリエーションに選択的な結合親和性を有する抗体を提供する。幾つかの態様において、本発明は、HbC及び糖化HbCに選択的な結合親和性を有するモノクローナル抗体を提供し、当該抗体は、HbC最小エピトープ⁴TPKEKSAVT¹²に、又はアミノ酸配列TX₁KE又はLTX₁KEを含むHbC最小エピトープ 50

ブに結合するモノクローナル抗体であり、ここで、 X_1 は、天然に存在する20個のありふれたアミノ酸のいずれか1つである。幾つかの態様において、本発明は、HbS及び糖化HbSに選択的結合親和性を有するモノクローナル抗体を提供し、当該抗体は、HbS最小エピトープ³LTPVEKS¹²に、又はアミノ酸配列PVEX₂X₃A又はLTPVEX₂X₃Aを有するHbS最小エピトープに結合し、ここで、 X_2 及び X_3 は、独立して、天然に存在する20個のありふれたアミノ酸のいずれか1つから選択される。幾つかの態様において、本発明は、HbE及び糖化HbEに選択的結合親和性を有するモノクローナル抗体を提供し、当該抗体は、HbE最小エピトープ²EVGGK²⁶に、又はアミノ酸配列DEVGGK又はEVX₄X₅Kを有するHbE最小エピトープに結合し、ここで、 X_4 及び X_5 は、独立して、天然に存在する20個のありふれたアミノ酸のいずれか1つから選択される。幾つかの態様において、本発明は、HbE \neq D及び糖化HbDに選択的結合親和性を有するモノクローナル抗体を提供し、当該抗体は、HbD最小エピトープ¹²¹QFTPP¹²⁵に、又はアミノ酸配列GX₆QFX₇PP又はQFX₇PPを有するHbD最小エピトープに結合し、ここで、 X_6 及び X_7 は、独立して、天然に存在する20個のありふれたアミノ酸のいずれか1つから選択される。

10

20

30

40

50

【0026】

また、本発明は、全ヘモグロビンに選択的に結合する(非ヘモグロビンポリペプチドと比較して)、ポリクローナル又はモノクローナルのいずれかの抗体を採用する場合もある。幾つかの態様において、本発明で使用される全反応性(pan-reactive)ポリクローナル抗体は、アルファグロビン及びベータグロビンの以下の領域に存在する1つ以上のエピトープに結合する。⁴⁹SHGSAQVGHGKVADALTNAVAHVDDMPNALSALSDHLHAHKLRRVDPV⁹⁶、ベータグロビン¹⁵WGKVN²⁰DEVGG³⁰ALG³⁰、⁴⁵FGDLSTP⁵¹、及び⁷⁶AHLDNLKGT⁸⁷FAT⁸⁷。幾つかの態様において、全反応性抗体は、エピトープ⁹SAVTALWGK²⁰VNV²⁰(ベータグロビン)又は⁸KSAVTALWGK²⁰VNV²⁰又は¹¹VTALW¹⁵に、又は配列ALWG又はVTX₉LWを有するベータグロビン最小エピトープに結合するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であり、ここで、 X_9 は、天然に存在する20個のありふれたアミノ酸のいずれか1つである。本発明で使用される抗体は、⁸KSAVTALWGK²⁰VNV²⁰、⁵⁸PKVAHGK⁷¹VLGAF⁷¹又は⁸⁷TLSELHCDKLHVDPENFR¹⁰⁴(ベータグロビン)等の、ベータグロビン上のエピトープに結合してもよい。

【0027】

更に、本発明は、通常の及びバリエーションのヘモグロビンに結合するが非糖化フォームのヘモグロビンに結合しない、糖化フォームのヘモグロビンに選択的に結合するモノクローナル抗体を提供する。糖化残基V及び残基Hは、典型的には、そのような抗体が結合するのに重要である。

【0028】

本発明の方法は、他のヘモグロビンバリエーションに選択的に結合するモノクローナル抗体等の抗体を使用して、他のヘモグロビンバリエーションを検出する工程を追加で含んでもよい。

【0029】

典型的な態様において、本発明に使用される抗体は、 K_D が約 10^{-6} M~約 10^{-12} Mの範囲内である。幾つかの態様において、当該抗体は、 K_D が約 10^{-7} M~約 10^{-11} Mの範囲内である。他の態様において、当該抗体は、 K_D が約 10^{-8} M~約 10^{-10} Mの範囲内である。典型的には、 K_D はnMの範囲で、例えば約 10^{-9} M~約 10^{-10} Mの範囲内である。

【0030】

本発明のこれら及び他の特徴、目的及び長所は、下記の記載により更によく理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、糖化ヘモグロビン及びヘモグロビンバリエーションを測定するサンドイッチ免疫アッセイの例の模式図を提供する。

【0032】

【図2】図2は、本発明に係る一連の多重アッセイと、一連のHPLCアッセイの間のデータ

を比較するプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0033】

発明の詳細な説明及び好ましい態様

本発明により検出されるべきヘモグロビンバリエントは、文献で報告された公知のいずれかのバリエント、又は他のヘモグロビン、糖化ヘモグロビン及び糖尿病の技術分野の医師及び研究者に知られているバリエントである。上記のように、最もありふれたヘモグロビンバリエントはHbS, HbC, HbE, 及びHbDの4つであるが、これら4つに加えて、又はこれらの幾つかに代わり、他のバリエントが検出される場合もある。例えば、ベータサラセミアで増大するバリエントは、HbF及びHbA₂の2つである。多重アッセイにおけるこれらの各バリエントに使用される結合メンバーは、一般にモノクローナル抗体であり、好ましくは、多重アッセイ専用に関連されたものである。当該抗体は、好ましくは、交差活性を最小にするように他のバリエントから各バリエントを区別する、及び最も重要なことだが野生型ヘモグロビンA0からバリエントを区別する、バリエント上のエピトープに結合する。試料中の全ヘモグロビンの濃度の数値の使用を必要とする本発明の幾つかの態様において、濃度は、免疫アッセイ手段又は非免疫アッセイ手段のいずれかにより決定できる。非免疫アッセイ手法の一例は、光学密度の決定である。他の例は、ヘモグロビンの分野の当業者にとって明白であろう。免疫アッセイにより全ヘモグロビン濃度が決定される態様において、当該決定は、多重アッセイの一部として実施され得る。多重アッセイにおける全ヘモグロビンに対する抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであってもよく、また、HbA_{1c}の抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであってもよく、好ましくはモノクローナル抗体である。

10

20

【0034】

抗体

本明細書中で使用されるとき「抗体」は、結合タンパク質として機能的に規定され、そして抗体を産生する動物の免疫グロブリンをコードする遺伝子のフレームワーク領域由来であると当業者に認識されるアミノ酸配列を有するものとして構造的に規定される、タンパク質を指す。抗体は、免疫グロブリン遺伝子又は免疫グロブリン遺伝子の断片に実質的にコードされる1つ以上のポリペプチドからなり得る。認識された免疫グロブリン遺伝子として、カッパー、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン及びミュー定常領域遺伝子が挙げられ、また、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。軽鎖は、カッパー又はラムダのいずれかとして分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ又はイプシロンとして分類され、これらはそれぞれ免疫グロブリンのクラスIgG, IgM, IgA, IgD及びIgEとして規定される。

30

【0035】

典型的な免疫グロブリン(抗体)構造単位は、テトラマーを有することが知られている。各テトラマーは、同一のポリペプチド鎖を有する2つのペアで構成され、各ペアは、1つの「軽鎖」(約25kD)及び1つの「重鎖」(約50kD)を有する。各鎖のN末端は、抗原認識に最も重要な約100~110個又はそれ以上のアミノ酸の可変領域を規定する。可変軽鎖(V_L)及び可変重鎖(V_H)という用語は、それぞれこれらの軽鎖及び重鎖をさす。

40

【0036】

本明細書中で使用されるとき、抗体という用語は、結合特異性を保持する抗体断片を含む。例えば、多数の同定された抗体断片が存在する。故に、例えば、ペプシンは、抗体のヒンジ領域におけるジスルフィド結合のC末端側を切断して、ジスルフィド結合によりVH-CH1(Fd)と軽鎖が連結したものであるFabのダイマーであるF(ab)'₂を生じる。当該F(ab)'₂は、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合を破壊し、Fab'モノマーに変換される穏和な条件下で減少し得る。当該Fab'モノマーは、本質的には、ヒンジ領域の全部又は一部を有するFabである(他の抗体断片のより詳細な説明として、Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993)を参照されたい)。無傷の抗体の消化により様々な抗体断片が規定されるが、当業者は、当該断片が、化学的に、又は組換えDNA手段の利用に

50

より新たに合成できることを認識する。故に、「抗体」という用語は、全形の抗体の改変により、又は組換えDNA手段を使用して生産される、抗体断片も含む。抗体は、 V_H - V_L ダイマー、 V_H ダイマー又は V_L ダイマー等のダイマーを含み、単一の鎖の抗体をも含む。あるいは、当該抗体は他の断片であってもよく、例えばジスルフィド安定化Fv(dsFv)である。また、組換え技術等の公知の技術を使用して、他の断片を作製することも出来る。幾つかの態様において、抗体は、鎖がscFv, Fv, Fab, (Fab')₂等の可溶性タンパク質として分泌される場合、ファージ上にディスプレイされたもの又はベクターを使用した組換え技術により作製されたものを含み、又は、鎖が可溶性タンパク質として分泌される場合、ベクターを使用した組換え技術により作製されたものを含む。

【0037】

本明細書中で使用されるとき、ヘモグロビンパリアント等の抗原に対する「選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバー」は、典型的には抗体である。幾つかの態様において、抗原に選択的結合親和性を有する結合メンバーは、例えば、当該抗原と選択的結合親和性を有するものとしてペプチドライブラリーをスクリーニングして同定されたペプチドであってもよい。

【0038】

一つの側面において、本発明は、 HbA_{1c} に結合するモノクローナル抗体並びにヘモグロビンパリアントHbS, HbC, HbE, 及びHbDに特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。ヘモグロビンベータ鎖の配列を以下に示す。

VHLTPEEKSAVTALWGKVNVDVEVGGGEALGRLLVYPTQRFESFGDLSTPDAVMGNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHL DNL
KGT FATLSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLCVLAHFFGKEFTPPVQAAAYQKVVAGVANALAHKYH

本明細書中に記載のヘモグロビンベータ鎖中のアミノ酸残基の配置は、他に特段の言及が無い限り、このアミノ酸配列に準拠する。

【0039】

HbA_{1c} は、N末端のバリンが糖化している。最も一般的なベータ鎖の点突然変異は、HbS (Glu 6 Val); HbC (Glu 6 Lys); HbE (Glu 26 Lys)及びHbD (Glu 121 Gin)である。ベータ鎖配列中のGlu 6、Glu 26及びGlu 121の位置を下線で示す。

【0040】

HbA_2 及びHbFも、本発明のアッセイにおいて決定され得る。ヘモグロビン A_2 は2つのアルファ鎖と2つのベータ鎖を有し、ヘモグロビンFは、2つのアルファ鎖及び2つのガンマ鎖を有する。

【0041】

本発明の文脈において、「特異的に結合する」又は「特異的に(又は選択的に)免疫応答する」又は「選択的親和性を有する」という用語は、その抗体が関心のある抗原と結合する場合の結合反応を指す。この発明の文脈において、前記抗体は、関心のある抗原、例えばHbSの糖化フォームを含むHbS等と、他の抗原、例えば HbA_0 やHbC等の他のヘモグロビンパリアントの親和性の100倍以上の親和性で結合する。

【0042】

本明細書中で使用するとき、「反応性」という用語は、ある抗体に特異的に結合する抗原と、他の抗原、例えば他のヘモグロビンパリアント又は野生型 HbA_0 等との間の、当該抗体との反応性の相対的な結合シグナルを指す。反応性は、抗原と抗体の結合を可能とする適切な緩衝液を使用して評価される。反応性は、例えば、直接又はサンドイッチELISAアッセイを使用して判定できる。例えば、野生型ヘモグロビン及び/又はヘモグロビンパリアントに対する反応性を決定するための直接式のアッセイにおいて、抗原をELISAプレートに直接吸着させ、様々な抗体を添加してそれらのいずれが結合するかを観察し、その後、フィコエリスリン標識抗体等の標識抗マウス抗体を使用して調査が行われる。サンドイッチ法において、ビーズにモノクローナル抗体を結合させ、その後、抗原を添加し、そして、全てのヘモグロビン種に結合するフィコエリスリン標識ユニバーサル検出抗体等で調査が行われる。故に、サンドイッチ法を使用する場合、反応性は、HbSヘモグロビンパリアント等の特異的抗原と結合したときに生じる蛍光シグナルと、他の抗原、例えば野生型

10

20

30

40

50

ヘモグロビンと結合したときに生じる蛍光シグナルとの相対値として規定され得る。抗体は、それが、参照抗原と比較して、試験されるもう一つの抗原が、2倍、典型的には3~4倍の反応性を呈するとき、当該もう一つの抗原に特異的と見なされる。

【0043】

「エピトープ」又は「抗原決定基」は、抗体が結合する抗原上の部位を示す。エピトープは、隣接するアミノ酸群、又はタンパク質の三次フォールディング(tertiary folding)により近接する隣接していないアミノ酸群のいずれも形成し得る。隣接するアミノ酸群から形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒に曝露しても維持されるが、三次フォールディングにより形成されるエピトープは、変性溶媒による処理で機能を失う。エピトープは、典型的には、特有の空間的構造中に、3つ以上、より一般的には5つ以上、又は8~10個のアミノ酸を有する。エピトープをマッピングする方法は、当該技術分野で周知である(例えばEpitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996))。本発明における「最小(minimal)」エピトープは、典型的には、ベータ又はアルファグロビンの全アミノ酸配列をカバーする重複したペプチド群に対する抗体の結合を測定し、結合した全てのペプチドに共通するアミノ酸配列を同定することにより決定される。「最小」エピトープ中の重要なアミノ酸は、典型的には、アラニンスキニングにより同定される。

10

【0044】

当該技術分野において理解されるように、「最小」エピトープは、アラニンスキニング等により決定された結合に重要でない部位等を置換したものも含み得る。そのような置換は、アミノ酸を化学的に類似のアミノ酸で置換する保存的置換を含む。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換の表は、当該技術分野で周知である。以下は、天然に存在する20種類の通常のアミノ酸の中で、互いに置換され得るアミノ酸の例である。アラニン及びグリシン；アスパラギン酸及びグルタミン酸；アスパラギン及びグルタミン；アルギニン及びリシン；セリン及びスレオニン。他の保存的置換として、以下の群のアミノ酸を当該群の他のアミノ酸と置換することが挙げられる。イソロイシン、ロイシン、メチオニン及びバリン。フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンも、互いに置換され得るアミノ酸の群の例である。

20

【0045】

表1は、ヘモグロビン及びヘモグロビンパリアントに対する特異的モノクローナル抗体の生産に利用される免疫原の例を提供する。

30

【表 1】

表 1

ペプチド免疫原の例

ヘモグロビン標的	ペプチド名	配列	
ヘモグロビンバリエント	H1	H2N-VHLTPEEKSAVTALW-C-CONH2	10
	H2	H2N-VHLTPEEASASTASW-C-CONH2	
	H2bis	H2N-VHLTPEEKSASTASW-C-CONH2	
HbS	H3	H2N-VHLTPVEKSAVTALW-C-CONH2	
HbC	H4	H2N-VHLTPKEKSAVTALW-C-CONH2	
HbE	H5	H2N-CYG-NVDEVGGKALGRLLV-CONH2	20
	H5bis	H2N-CYG-VTALWGKVNDEVGGK-CONH2	
	H10	H2N-C-Hx-EVGGKALG-CONH2	
	H10bis	H2N-EVGGKALG-Hx-C-CONH2	
HbD	H6	H2N-CYG-VLAHHFGKQFTPPVQAA-CONH2	
	H6bis	H2N-QFTPPVQAAYQKV VAGV-GYC-CONH2	
	H9	H2N-GKQFTGKQFTGKQFT-GYC-CONH2	
	H11	H2N-C-Hx-HFGKQFTP-CONH2	
	H11bis	H2N-HFGKQFTP-Hx-C-CONH2	
HbA1c	GP1	グルコース-HN-VHLTPEE-Hx-C-CONH2	30
	GP3	1-デオキシフルクトシラシル-HN-VHLTPEE-Hx-C-CONH2	
	糖化 H2	グルコース-HN-VHLTPEEASASTASW-C-CONH2	

【0046】

表 2 は、ヘモグロビン及びヘモグロビンバリエントに対する特異的モノクローナル抗体の生産に利用される免疫化計画 (immunization regimen) の例を提供する。

【表 2】

表 2
免疫化計画の例

注射の順序	HbS	HbC	HbE	HbD	HbA1c	HbA 及び A' リアット
1	原型 HbS 抗原	H4-KLH	H5bis-KLH	変性 HbD + H6-KLH	GP3-KLH	原型 HbA0
2	H3-KLH	H4-KLH	H5bis-KLH	変性 HbD + H6-KLH	GP3-KLH	H1-KLH
3	H3-KLH	H4-KLH	H5bis-KLH	変性 HbD + H6-KLH	GP3-KLH	原型 HbA0
4	変性 HbS + H3-KLH	変性 HbC	H5bis-KLH	変性 HbD + H6-KLH	GP3-KLH	H1-KLH
5	変性 HbS + H3-KLH	H4-KLH	変性 HbE	変性 HbD + H6-KLH		
6	変性 HbS + H3-KLH	H4-KLH	変性 HbE	変性 HbD		
7			変性 HbE	変性 HbD + H6-KLH		
8			H5bis-KLH	変性 HbD + H6-KLH		
9			H5bis-KLH	変性 HbD + H6-KLH		
10			変性 HbE + H5bis-KLH	変性 HbD + H6-KLH		
11			変性 HbE + H5bis-KLH			
12	皮下 及び 腹腔内	皮下 及び 腹腔内	変性 HbE + H5bis-KLH 皮下 及び 腹腔内	皮下 及び 腹腔内	腹腔内	皮下 及び 腹腔内

10

20

30

【 0 0 4 7 】

抗HbS抗体

ヘモグロビンバリエーションHbSは、ヘモグロビンベータ鎖の6位にあるグルタミン酸がバリンに置換された点突然変異を有する。

【 0 0 4 8 】

HbSに選択的な本発明の抗HbS抗体は、HbC及びHbA0の親和性よりも少なくとも100倍以上低い（即ち良好な）親和性でHbSと結合するという結合特性を有する。幾つかの態様において、前記抗体は、最小HbSエピトープ⁵PVEKSAVT¹²と結合する。そのような抗体は、反応性が、6位のバリンがイソロイシンに置換されても同程度の反応性を有し得るが、当該位置がそれ以外のアミノ酸で置換されると、反応性が2倍、又は3倍以上低下する。幾つかの態様において、³LTP⁵、⁷E及び¹⁰Aも、結合に重要である。

40

【 0 0 4 9 】

幾つかの態様において、前記抗体は、最小エピトープ³LTPVEKSAVT¹²と結合する。幾つかの態様において、当該抗体は、6位のバリンがイソロイシン又はアラニンで置換されても反応性を有するが、当該位置がそれら以外のアミノ酸で置換された場合、反応性は、2倍、しばしば3倍以上低下する。幾つかの態様において、²HLTPVEK⁸及び¹⁰Aも、結合にとって重要である。

【 0 0 5 0 】

50

幾つかの態様において、⁵PVEKSAVT¹²等のHbS最小エピトープに結合する抗体は、6位にバリンを有するHbS最小エピトープのバリエーションに結合してもよい。そのような最小エピトープの例として、⁵PVEX₂X₃A¹⁰が挙げられ、ここで、X₂及びX₃は、独立して通常天然に存在するアミノ酸から選択され得て、例えばそれぞれK及びSの保存的置換である。

【0051】

典型的には、前記抗体はIgGであり、たとえば、当該抗体は、IgG₁、IgG₂、又はIgG₃を有し得る。いくつかの態様において、軽鎖定常領域は銅鎖である。他の態様において、軽鎖定常領域は、ラムダ鎖であってもよい。

【0052】

一つの態様において、本発明のHbS抗体は、免疫原HbS及びH3-KLH : H₂N-VHLTPVESAVTALW-C-CONH₂に対して形成される。他の態様において、当該免疫原は、H3-KLH : H₂N-VHLTPVEKSAVTALW-C-CONH₂及び精製された原型(native)及び/又は変性HbSタンパク質の組合わせ、又は上記免疫原の個々の構成を使用した連続的免疫化である。KLH以外の担体タンパク質を使用することも出来る。例えばアルブミン又はオボアルブミンであり、他の例も当業者にとって明らかである。

【0053】

当該技術分野で理解され、上記表1で例示されるように、様々な免疫原が、所望の抗体を取得するのに使用され得る。例えば、ペプチド免疫原KLH : H₂N-VHLTPVEKSAVTALW-C-CONH₂は、C-末端カルボキサミドではなくC-末端カルボキシレートをも有してもよい。幾つかの態様において、システインリンカー部分は、6-アミノヘキサノ酸のHx残基をスペーサーとし、又はスペーサー配列等のスペーサーが採用されてもよい。更に、ペプチド配列は様々なものであってもよい。

【0054】

抗HbS抗体は、典型的には、HbSの糖化及び非糖化フォームとも同様の親和性で結合し得る。例えば、抗HbS抗体は、典型的には、HbSの糖化及び非糖化フォームとも、糖化HbSと非糖化HbSとの間の結合の親和性の差が3倍未満、典型的には2倍未満で結合し得る。

【0055】

抗HbC抗体

ヘモグロビンバリエーションHbCは、ヘモグロビンベータ鎖の6位でグルタミン酸と置換されたリシスを有する。本発明に使用される抗HbCモノクローナル抗体は、典型的には、HbS及びHbA0に対する親和性の100倍以上の親和性でHbCと結合する。幾つかの態様において、前記モノクローナル抗体は、最小エピトープ⁴TPKEKSAVT¹²と結合する。幾つかの態様において、前記抗体は、結合に重要な残基が残基³LT⁴及び⁶Kであるように、結合親和性を有する。幾つかの態様において、結合に重要な残基は、³LT⁴及び⁶KE⁷であってもよい。また、前記結合特異性は、6位でリシンをアルギニン又はヒスチジンで置換することを許容するが、他のアミノ酸の置換は、反応性を、少なくとも2倍、典型的には3倍以上の損失を引き起こす。他の態様において、HbC抗体の反応性は、6位のリシンがアルギニン、チロシン、アスパラギン、グルタミン又はグリシンで置換されることを許容するが、他のアミノ酸残基による置換は、反応性の損失を引き起こす。

【0056】

幾つかの態様において、⁴TPKEKSAVT¹²等のHbC最小エピトープと結合する抗体は、⁴TX₁KE⁷又は³LTX₁KE⁷を有する最小エピトープ等の、6位でKを有するHbC最小エピトープのバリエーションと結合する。ここで、X₁は、天然に存在する20種類のアミノ酸の1つであり得る。

【0057】

典型的には、前記抗体はIgGであり、たとえば、当該抗体は、IgG₁、IgG₂、又はIgG₃アイソタイプを有し得る。いくつかの態様において、軽鎖定常領域は銅鎖である。他の態様において、軽鎖定常領域は、ラムダ鎖であってもよい。

【0058】

本発明の抗体は、免疫原H4-KLH : H₂N-VHLTPKESAVTALW-C-CONH₂に対して生産され得る。他のペプチド免疫原の例は表1に列挙され、KLHの位置に他の通常担体タンパク質が

使用されてもよい。幾つかの態様において、前記免疫化は、前記ペプチド及び精製された原型及び/又は変性HbCタンパク質の組み合わせを使用して実施される。幾つかの態様において、上記免疫原の個々の構成を使用して、連続的な免疫化が実施される。免疫化のプロトコルの一例は、表2に記載される。上記の抗HbS抗体の項で説明したように、当業者は、容易に他の免疫原ペプチドを設計して、所望のHbC結合特異性を有する抗体を取得することが出来る。

【0059】

抗HbC抗体は、典型的には、HbCの糖化及び非糖化フォームとも同様の親和性で結合し得る。例えば、抗HbC抗体は、典型的には、HbCの糖化及び非糖化フォームとも、糖化HbCと非糖化HbCとの間の結合の親和性の差が3倍未満、典型的には2倍未満で結合し得る。

10

【0060】

抗HbE抗体

HbEは、ヘモグロビンベータ鎖の26位でグルタミン酸がリシンに置換されている。本発明の抗HbEモノクローナル抗体は、HbEに対して、HbAと比較して、典型的には4倍又は5倍以上、しばしば10倍以上の反応性で結合する。幾つかの態様において、前記モノクローナル抗体は、最小エピトープ²²EVGGK²⁶に結合する。幾つかの態様において、そのような抗HbE抗体は、²²EVGGK²⁶に対する結合特異性を有し、²²Eに依存し、²¹D、²³V及び²⁶Kは結合に重要である。幾つかの態様において、前記抗体は、26位のKのS、T、A、R、Q又はGへの置換が結合活性を少なくとも50%、典型的には70%又はそれ以上保持するように、結合特異性を有する。幾つかの態様において、26位のKのS、T、A、R、又はVへの置換が結合活性を少なくとも50%、典型的には70%又はそれ以上保持するように、結合特異性を有する。

20

【0061】

幾つかの態様において、²²EVGGK²⁶等のHbE最小エピトープに結合する抗体は、²¹DEVGGK²⁶又は²²EVX₄X₅K²⁶を有する最小エピトープ等の、26位にKを有するHbE最小エピトープのバリエーションと結合し得る。ここでX₄及びX₅は、Gの保存的置換等の、天然に存在する20種類のアミノ酸から独立して選択され得る。

【0062】

典型的には、前記抗体はIgGであり、たとえば、当該抗体は、IgG₁、IgG₂、又はIgG₃アイソタイプを有し得る。いくつかの態様において、軽鎖定常領域はカップー鎖である。他の態様において、軽鎖定常領域は、ラムダ鎖であってもよい。

30

【0063】

本発明の抗HbE抗体は、例えば免疫原H5bis-KLH : H₂N-CYG-VTALWGKVNVEVGGK-CONH₂を使用して取得できる。幾つかの態様において、前記抗体は、免疫原と、ペプチド、原型HbE抗原及びHbE変性抗原との混合物、又は連続注射により作成される。ペプチド免疫原の例は、表1に提供される。ペプチド免疫原は、他の変性又は原型HbEを用いて、又は用いずに使用できる。免疫化プロトコルの一例は、表2に提供される。抗HbS抗体に関する上記項で説明したように、当業者は、他の免疫原ペプチドを設計して、容易に所望のHbE結合特異性を有する抗体を取得することが出来る。読者は、他のペプチド抗原の例として、表1を再び参照できる。

【0064】

抗HbE抗体は、典型的には、HbEの糖化及び非糖化フォームとも同様の親和性で結合し得る。例えば、抗HbE抗体は、典型的には、HbEの糖化及び非糖化フォームとも、糖化HbEと非糖化HbEとの間の結合の親和性の差が3倍未満、典型的には2倍未満で結合し得る。

40

【0065】

抗HbD抗体

HbDは、ヘモグロビンベータ鎖の121位のグルタミン酸がグルタミンで置換されたものである。本発明の抗HbDモノクローナル抗体のHbDへの反応性は、HbAへの反応性と比べて、典型的には少なくとも3倍又はそれ以上である。幾つかの態様において、前記抗体は、最小エピトープ¹²¹QFTPP¹²⁵と結合する。幾つかの態様において、前記抗体の結合特異性において、¹¹⁹G、¹²¹QF¹²²、及び¹²⁴pp¹²⁵が重要である。

50

【0066】

幾つかの態様において、¹²¹QFTPP¹²⁵等のHbD最小エピトープに結合する抗体は、¹¹⁹GX₆QFX₇PP¹²⁵又は¹²¹QFX₇PP¹²⁵を有する最小エピトープ等、121位にQを有するHbE最小エピトープのパリアントに結合し得る。ここで、X₆及びX₇は、それぞれK及びTの保存的置換等の、天然に存在する20種類のアミノ酸から独立して選択され得る。

【0067】

典型的には、前記抗体はIgGであり、たとえば、当該抗体は、IgG₁、IgG₂、又はIgG₃アイソタイプを有し得る。いくつかの態様において、軽鎖定常領域はカップー鎖である。他の態様において、軽鎖定常領域は、ラムダ鎖であってもよい。

【0068】

本発明の抗HbD抗体は、例えば免疫H6-KLH : H₂N-CYGVLAHHFGKQFTPPVQAA-CONH₂を使用して、又は原型及び/又は変性HbD及びH6-KLH : H₂N-CYGVLAHHFGKQFTPPVQAA-CONH₂を使用して、又は様々な免疫原の組み合わせ又は連続注射により取得できる。所望のHbD結合特異性を有する抗体の取得に利用できる他の免疫原ペプチドは、当業者にとって容易に明らかになり得る。

【0069】

抗HbD抗体は、典型的には、HbDの糖化及び非糖化フォームとも同様の親和性で結合し得る。例えば、抗HbD抗体は、典型的には、HbDの糖化及び非糖化フォームとも、糖化HbDと非糖化HbDとの間の結合の親和性の差が3倍未満、典型的には2倍未満で選択的に結合し得る。

【0070】

全反応性(Pan-reactive)抗体

本発明は、本発明において使用される全反応性抗体をも提供する。そのような抗体は、様々なフォームのヘモグロビンと結合し得る。全反応性抗体は、H5bis-KLH : H₂N- CYGVTALWGWKVNVDVGGK-CONH₂又は H1-KLH : H₂N-VHLTPEEKSAVTALW-C-CONH₂を含む、多数の異なる免疫原を使用して生産できる。そのようなペプチド免疫原は、原型又は変性HbA0と混合して、又は原型及び/又は変性HbA0と連続して注射され得る。当該技術分野で理解されるように、Hbパリアントに加えてHbA0に選択的に結合するHb抗体を取得するために、任意の数のHb抗原が使用され得る。全反応性抗体は、モノクローナル又はポリクローナル抗体であってもよい。全反応性抗体は、ペプチド免疫原を使用せずに、原型又は変性ヘモグロビンをを用いた免疫化により取得することも出来る。

【0071】

幾つかの態様において、本発明において使用される全反応性ポリクローナル抗体は、以下のアルファグロビン及びベータグロビンの領域：アルファグロビン⁴⁹SHGSAQVKGHGKVKVADALTNAVAHVDDMPNALSALSDDLHAKLRRVDPV⁹⁶、ベータグロビン¹⁵WGKV VDE VGGEALG²⁹、⁴⁵F GDLSTP⁵¹、及び⁷⁶AHLNLIKGT⁸⁷中に存在する一つ以上のエピトープに結合する。

【0072】

一つの態様において、全反応性抗体は、ベータグロビンエピトープ⁹SAVTALWGWKVN²⁰に結合する。幾つかの態様において、前記抗体は、ベータグロビンエピトープ¹¹VTALW¹⁵に結合する。幾つかの態様において、¹¹VT¹²及び¹⁴LW¹⁵は、結合にとって重要である。

【0073】

幾つかの態様において、全反応性抗体は、以下の配列：ベータグロビン最小エピトープ⁸KSAVTALWGWKVN²⁰、ベータグロビン最小エピトープ⁵⁸PK VK AHGKK VLG AF⁷¹、及びベータグロビン⁸⁷TLSELHCDKLH VDPENFR¹⁰⁴最小エピトープを有するベータ及びアルファグロビンエピトープに結合する。幾つかの態様において、残基¹³ALWG¹⁶は結合に重要である。

【0074】

典型的には、前記抗体はIgGであり、たとえば、当該抗体は、IgG₁、IgG₂、又はIgG₃アイソタイプを有し得る。いくつかの態様において、軽鎖定常領域はカップー鎖である。他の態様において、軽鎖定常領域は、ラムダ鎖であってもよい。

【0075】

10

20

30

40

50

本発明に使用される全反応性抗体は、ヘモグロビンに対して広く反応性を有し、ヘモグロビンA及びHbS、HbC、HbD及びHbE等のバリエーションの糖化及び非糖化フォームのいずれにも結合し得る。

【0076】

本発明の幾つかの態様において、様々なフォームのヘモグロビンに結合する全反応性抗体は、全ての解析物に結合する標識された結合メンバーとして使用されることにより、結合された解析物を標識する。故に、例えば、エピトープ：アルファグロビン⁴⁹SHGSAQVKHGKGVADALTNAVAHVDDMPNALSALSDDLHAHKLRRVDPV⁹⁶、ベータグロビン¹⁶GKV VDEVGGEALG²⁹、⁴⁶GDLSTP⁵¹、及び⁷⁸LDNLKGTFFAT⁸⁷に結合する標識された全反応性ポリクローナル抗体が、アッセイされる解析物(ヘモグロビンの様々なフォーム)の全てに結合する抗体を検出するユニバーサル検出抗体として使用されることにより、結合された解析物を標識する。

10

【0077】

抗HbA_{1c}抗体

本発明は、追加で、糖化ヘモグロビンに結合特異性を有する抗HbA_{1c}抗体を提供する。そのような抗体は、GP3-KLH：1-デオキシフルクトピラノシル-HN-VHLTPEE-Hx-C-CONH₂等の免疫原を使用して生産され得る。前記抗体はIgGであり、たとえば、当該抗体は、IgG₁、IgG₂、又はIgG₃アイソタイプを有し得る。いくつかの態様において、軽鎖定常領域はカッパー鎖である。他の態様において、軽鎖定常領域は、ラムダ鎖であってもよい。

【0078】

本発明の抗HbA_{1c}抗体は、HbA_{1c}、HbS_{1c}、HbD_{1c}、HbE_{1c}、及びHbC_{1c}を含む、糖化ヘモグロビンに高度に特異的であり、非糖化フォームのヘモグロビンを認識しない(即ちHbA_{1c}、HbS_{1c}、HbD_{1c}、HbE_{1c}、及びHbC_{1c}が非糖化フォームと比較して少なくとも100倍を超える親和性を有する)。そのような抗体は、典型的には、糖化N末端ペプチドにおいて結合親和性を有し、ここで、糖化パリン1及びヒスチジン2のいずれも結合にとって重要な残基である。

20

【0079】

A_{1c}モノクローナル抗体は、糖化ペプチドGP3(1-デオキシフルクトピラノシル-HN-VHLTPEE-Hx-C-CONH₂)が原型Hb A_{1c}と結合を競合するが、非糖化ペプチド、例えばRW1a(VHLTPEE-CONH)とは競合しないように、競合的結合実験における結合特異性を有する。

【0080】

HbF及びHbA₂抗体

HbF及びHbA₂も、本発明の方法を使用してアッセイされ得る。HbA₀又は他のタンパク質と比較してHbFに、又はHbA₀又は他のタンパク質と比較してHbA₂抗体に選択的に結合する抗体は、A₀ベータ鎖と比較してデルタ及びガンマ鎖において複数の差異があるため、HbFに特異的な、又はHbA₂に特異的なペプチド配列を有する免疫原を使用して取得できる。

30

【0081】

抗体の生産

本発明の抗ヘモグロビン抗体は、ヘモグロビンタンパク質又はその断片を用いて作製され、又は組換え生産され得る。抗体の結合特異性を決定するために、当該技術分野で周知の様々な技術が使用され得る。抗体の特異的免疫反応性を決定するのに使用され得る免疫アッセイの設定及び条件の記載として、例えばHarlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988)を参照されたい。

40

【0082】

幾つかの態様において、本発明に使用される抗体、例えばヘモグロビンの様々なフォームに結合するヘモグロビン抗体、バリエーションに特異的なヘモグロビン抗体、又は糖化ヘモグロビンに特異的なヘモグロビン抗体は、ポリクローナル抗体である。例えば、ヘモグロビンバリエーションに特異的な抗体は、アフィニティー精製単一特異性(monospecific)ポリクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体を調製する方法は、当業者に知られている(例えばHarlow & Lane, Antibodies, A Laboratory manual (1988); Methods in Immunology)。ポリクローナル抗体は、哺乳類中で、1つ以上の免疫化剤及び必要な場合アジ

50

ュバントを用いて作製される。

【0083】

幾つかの態様において、本発明において使用される抗体、例えば様々なフォームのヘモグロビンに結合する抗体、1つのヘモグロビンバリエーション(及び糖化ヘモグロビンバリエーション)に特異的な抗体、又は糖化ヘモグロビンに特異的な抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、Kohler & Milstein, Nature 256:495 (1975)に記載されるような、ハイブリドーマ法を使用して調製され得る。ハイブリドーマ法において、典型的には、マウス、ウサギ又は他の適切な宿主動物が、免疫化剤に特異的に結合し得る抗体を生産し、又は生産することが出来るリンパ球を引き出すための免疫化剤を用いて免疫化される。あるいは、リンパ球はインビトロで免疫化されてもよい。

10

【0084】

上記のように、本発明の抗体は、任意の数の免疫原及び免疫化プロトコルを使用して生産され得る。幾つかの態様において、当該免疫原は、原型又は変性ヘモグロビタンパク質と組み合わせて投与されるペプチドである。当該技術分野で理解されるように、免疫原は複数回投与され得る。組み合わせが採用される態様において、当該抗原の組み合わせは、同時に、又は任意の順番で連続して投与されてもよい。幾つかの態様において、ペプチド免疫原はLHコンジュゲートであるが、KLH以外の担体タンパク質が使用されてもよく、例えばBSAコンジュゲートが使用されてもよい。

【0085】

抗体を使用したアッセイの条件

20

本発明の実施において、ヘモグロビンA_{1c}、ヘモグロビンバリエーション、及び全ヘモグロビンが、様々な免疫アッセイの様式を経て測定され得る。一例としてサンドイッチ法が挙げられ、当該手法において、解析物に対する特異的な抗体が固相ビーズに固定され、検出は、ヘモグロビン種に対する1つ以上の抗体を有するビーズを探索することにより達成される。全てのヘモグロビン種に結合するユニバーサル抗体が当該探索に使用され得るが、2つ以上の検出抗体が使用される場合もある。一例として図1に示すように、ヘモグロビンHbA_{1c}及び最もありふれた4つのヘモグロビンバリエーション種HbS、HbC、HbE、及びHbDの全ヘモグロビンに特異的な個々の抗体が、それぞれビーズの個別のサブ集団に結合させられるが、全てのヘモグロビン種に結合し、標識としてフィコエリスリン(PE)を担持するユニバーサル抗体が、使用される。サンドイッチアッセイ法において、各アッセイの抗体の量は、解析物(当該アッセイに指向される特定のフォームのヘモグロビン)が過剰になるように選択されるので、当該抗体は、結合反応における限定試薬である。そうすることにより全ヘモグロビンに対する抗体と例えば個々のヘモグロビンに対する抗体との間の競合が最小化される。しかしながら、当該技術分野の手法に属するアッセイパラメータの調整及び適切な抗体の選択により、競合アッセイ法は、ヘモグロビン種の多重検出に利用することもできる。

30

【0086】

前記多重アッセイは一般に哺乳類の血液試料を用いて行われるが、当該アッセイは、ヒトの血液試料において特に価値がある。血液試料は、細胞を溶解し、そして免疫アッセイに適した濃度まで当該溶解物を希釈することにより調製され得る。これらの各工程は、当該技術分野に公知の方法により実施される。希釈は、水、サポニンを含む溶液、又はヘモグロビンや免疫学的活動に影響しない他の任意の希釈剤で行われ、希釈の程度は様々である。大半の場合、希釈は、約1:25~約1:3000である。溶解物中のヘモグロビンは溶解物の希釈の前又は後に変性されたものが前記アッセイに使用され得るが、あるいは当該溶解物は、ヘモグロビンの変性をせずに使用される場合もある。大半の場合、当該技術分野で公知の方法により変性が実施される。

40

【0087】

HbA_{1c}及びその各バリエーションのレベルは、好ましくは、前記試料中の全ヘモグロビンに対するパーセンテージとしてそれぞれ表現される。ヘモグロビンバリエーションの存在下の糖化の程度の判定のため、本発明は3つの選択肢を有する。現在許容される方法に適合する

50

一つ目の選択肢は、HbA_{1c} ビーズのみの結果を全ヘモグロビンで補正することによる、HbA_{1c} レベルの決定である。二つ目の選択肢は、バリエーションの糖化フォームのパーセントをHbA_{1c} のパーセントに加えることによる、全ヘモグロビン糖化の決定である。バリエーションの検出されたレベルの関数である補正率により測定されたHbA_{1c} パーセントを調整する第三の選択肢は、HbA_{1c} の決定がバリエーションの存在により不都合な影響を受ける場合に有用である。当該関数は、非多重アッセイを含む別個のアッセイにより独立して決定され得る関連性により実験的に決定され得る。前記補正率は、HbA_{1c} 濃度が、全ヘモグロビンに関連して補正された後のHbA_{1c} 濃度、又は補正前のHbA_{1c} 濃度のいずれかに適用されるものであってもよい。

【 0 0 8 8 】

10

HbA_{1c} 値の補正を例示するために、本発明に関するビーズベースアッセイ(BioPlex 2200, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA)及びHPLCアッセイ(Variant (商標) II, Bio-Rad Laboratories, Inc.)の両方を使用してアッセイが行われ、いずれのアッセイも、HbCのパーセンテージの増大の関数としてHbA_{1c} パーセントを決定する。結果は表3及び図2に示す。「差比(Difference Ratio)」= $(\%A_{1c} \text{ Variant II} - \%A_{1c} \text{ BioPlex 2200}) / (\%A_{1c} \text{ Variant II})$ 。

【 表 3 】

表 3

20

患者 ID	% HbC	-----% A _{1c} -----		差比	調整した BioPlex 値	標的との差	
		BioPlex 2200	Variant II (標的)			調整	未調整
PT 200	31.8	6.06	5.9	-0.03	5.73	0.17	-0.16
PT 219	32.1	6.30	5.8	-0.09	5.98	-0.18	-0.50
PT 265	33.7	5.71	5.4	-0.06	5.37	0.03	-0.31
PT 622	34.1	6.20	5.9	-0.05	5.87	0.03	-0.30
PT 658	33.9	5.92	5.9	0.00	5.59	0.31	-0.02
PT 667	33.5	6.00	5.8	-0.03	5.67	0.13	-0.20
PT m832	32.1	6.14	6.1	-0.01	5.81	0.29	-0.04
PT m837	37.6	5.80	5.5	-0.05	5.47	0.03	-0.30
PT m908	39.2	5.37	4.6	-0.17	5.03	-0.43	-0.77
PT m923	41.1	5.53	4.8	-0.15	5.19	-0.39	-0.73
平均の差 →						0.00	-0.33

30

40

【 0 0 8 9 】

ヘモグロビンC(又はいずれかのヘモグロビンバリエーション)のパーセントとHbA_{1c} パーセントの差との関連性を定量するために様々な数理モデルが使用され得るが、この例において使用される数理モデルは、単純な線形回帰モデルである。このモデルを使用して、BioPlex 2200免疫アッセイから得られた数値を補正して、参照の手法と比較できる結果を得るこ

50

とができる。これは、調整されたBioPlex 2200パーセントHbA_{1c}値と、参照のVariant II法により決定した標的パーセントHbA_{1c}値の平均の差により実証される。前記表中に示された補正されたHbA_{1c}値は、個体の血糖インデックスのより良好な推定を提供する。

【0090】

表3及び図2に記載のデータを取得するのに使用されるBioPlex 2200ビーズベース免疫アッセイは、HbA_{1c}及びHbS, HbC, HbD, 及びHbEを含む全てのヘモグロビンバリエーションに結合する抗体を利用する。全ての糖化バリエーション及びHbA₀は、当該抗体と、概ね同程度の親和性(affinity and avidity)で結合する。故に、当該免疫アッセイの結果は、全糖化ヘモグロビンを表し、ヘテロ接合ヘモグロビンASの場合、HbA_{1c}及びHbS_{1c}種の両方を含む組合せの数値である。あるヘモグロビンバリエーションの形質を呈する個体において、当該バリエーションに対応する糖化ヘモグロビンの割合は、血糖状態の測定の改善を提供する。試料中のHbS_{1c}のパーセントは、HbA_{1c}及びHbS_{1c}のパーセントの合計に当該試料中のHbSの割合を掛けることにより取得される。例えば、全糖化ヘモグロビンの値が5.54%である患者の試料(HbA_{1c}及びHbS_{1c}で構成される)において、この値に当該試料中のHbSの割合である38.8%を掛けると、HbS_{1c}の値として2.14%が得られる。これは一つの数理モデルであるが；必要に応じてより繊細な数理モデルを用いてより正確な結果を提供することも出来る。

10

【0091】

本発明の実施に係る結合反応が起こる表面を提供するビーズは、アッセイ材料に対して、及び試料自体に対して不活性な任意の材料で形成されてもよく、固体であって当該試料及び本アッセイに使用される他の任意の溶媒又は担体に不溶性である。ポリマーが好ましく、当該ビーズは、好ましくは微小球である。ポリマーは、微小球に形成可能で、前記抗体の抗原結合領域に干渉しない抗体の領域で抗体と会合できる任意の材料であってもよい。蛍光標識が使用される態様において、自己蛍光が最小限のものも好ましいポリマーである。適切なポリマーの例として、ポリエステル、ポリエーテル、ポリオレフィン、ポリアルキレンオキシド、ポリアミド、ポリウレタン、多糖類、セルロース、及びポリイソブレンが挙げられる。前記微小粒子に構造的完全性及び合成をもたらすために、多くのポリマーにおいて架橋が有用である。磁性ビーズが使用されてもよい。

20

【0092】

抗体のビーズ表面への結合は、アフィニティー相互作用、疎水性相互作用、又は共有結合により達成され得る。共有結合が好ましい。共有結合における官能基は、公知の手段、例えば官能基を含有するモノマーの単独モノマー又はコモノマーとしての使用等において、ポリマー構造内に埋め込まれる。適切な官能基の例として、アミン基(-NH₂)、アンモニウム基(-H₃⁺ or -NR₃⁺)、水酸基(-OH)、カルボン酸基(-COOH)、及びイソシアヌ酸基(-NCO)が挙げられる。ポリオレフィンにカルボン酸基を導入するのに有用なモノマーは、アクリル酸及びメタクリル酸である。固相表面の抗体の密度を高め、そして前記アッセイの範囲及び感度を増大させるために立体障害を低下させるため、連結基が使用される場合もある。適切な有用な連結基の例として、ポリリシン、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸及びポリアルギニンが挙げられる。

30

【0093】

前記ビーズのサイズ範囲は、本発明に問題が生じない程度の粒子サイズの範囲で様々である。多くの場合、集中するビーズのサイズ範囲は、直径約0.3マイクロメートル~約100マイクロメートルで、好ましくは約0.5マイクロメートル~約40マイクロメートルである。

40

【0094】

本発明に係るビーズの多重使用は、前記ビーズに2つ以上の群(本明細書中、ビーズセット又はサブ集団とも表記される)を割り当てることにより達成される。各群は、1つのヘモグロビンバリエーション、糖化バリエーション、HbA_{1c}、又は全ヘモグロビンを選択する抗体を有し、分離が可能であり、又は少なくとも「区別パラメーター」により他の群から区別することが出来る。当該「区別パラメーター」は、他の群のアッセイ結果から1つの群のアッセイ結果を分離して検出することを可能とする任意の区別可能な特性である。区別パラメ

50

ーターの一例は粒子サイズであり、各群のサイズ範囲は、他の群のサイズ範囲と重複しない。サイズ範囲の広さと異なるサイズ範囲の平均直径間のスペースは、サイズによるフローサイトメトリーによる群の区別を可能とするように選択され、フローサイトメトリーの使用及び計装(instrumentation)の当業者にとって容易に明確となる。本明細書中、「平均直径」という用語は、数平均直径を意味する。多くの場合、好ましいサイズ範囲の広さは、平均直径の約 $\pm 5\%$ のCVを有するものであり、ここでCVは変動係数であり、粒子の平均直径の標準偏差を平均粒子直径で割ったものを100倍したパーセントとして定義される。様々なサイズ範囲の間の平均直径間の最小のスペースは、サイズ分布、異なる抗体を結合するためのサイズによるビーズの分離の容易さ、並びにフローサイトメトリー装置の種類及び感度に依存する。多くの場合、異なるサイズ範囲の平均直径が、少なくとも1つのサイズ範囲の平均直径の約6%、好ましくは少なくとも1つのサイズ範囲の平均直径の約8%、そして最も好ましくは少なくとも1つのサイズ範囲の平均直径の約10%離れているとき、最良の結果が達成され得る。他の好ましいサイズ範囲の広さの関連は、各サイズ範囲内の粒子の直径の標準偏差が、隣接するサイズ範囲の平均直径の分離の3分の1未満であることである。

10

【0095】

様々な群のビーズの間を区別するのに使用できる区別パラメーターの他の例は、蛍光である。蛍光による区別は、ビーズ内に蛍光材料を埋め込むことにより達成され、当該材料が各ビーズ群で異なる蛍光放射スペクトル有することにより区別が可能である。

【0096】

よって、蛍光は、区別パラメーター及びアッセイにおいてビーズ上に結合が起こったことを検出する手段の両方として使用され得る。後者は、アッセイレポーターと見なされる蛍光ラベルにより達成されうる。故に、個々の群は異なる放射スペクトルの放射により区別でき、そして群の区別に使用される放射スペクトルは、それ自体アッセイレポーターの放射スペクトルと異なってもよい。区別パラメーターとして使用できる蛍光基質の例はフルオレセインであり、そしてアッセイ検出に使用できる基質の例は、フィコエリスリンである。異なる濃度のフルオレセインを用いて染色されることにより、異なるビーズの群は互いに区別することができる。異なる蛍光強度を有する、又は異なる波長で蛍光を放射する蛍光材料を使用することにより、区別することが出来る。また、前記染料は、様々な波長で複数の蛍光放射を生じるように組み合わせ使用されてもよく、波長の差異は、区別パラメーターとして、かつアッセイレポーターから区別パラメーターを区別する手段として使用される。

20

30

【0097】

有用な区別パラメーターの尚も他の例として、光散乱、光放射又は光散乱及び光放射の組合せが挙げられる。側方(Side-angle)光散乱は、粒子サイズ、粒度(granularity)、吸光度及び表面粗度により異なるが、前方(forward-angle)光散乱は、主にサイズ及び屈折率に影響される。これらの性質のいずれも、区別パラメーターとして使用できる。

【0098】

一つの区別手段において、前記ビーズは、2つ以上の蛍光色素が埋め込まれており、アレイ内の各ビーズが、それに関連する3つ以上の区別可能なパラメーター、即ち、2つの個別の波長での蛍光放射と側方散乱を有する。故に、Cy5等の赤色の蛍光色素は、Cy5.5等の橙色の蛍光色素と共に使用され得る。更に、追加の蛍光色素が、当該系を拡張するために使用され得る。よって、各ビーズは、様々な波長の複数の蛍光染料を含有し得る。

40

【0099】

複数のビーズの群を区別するのに使用できる尚も更なる区別パラメーターの例は、吸光度である。光がビーズに照射されるとき、ビーズによる当該光の吸収は、側方散乱光の強度で専ら求められるが、前方散乱光は相対的に影響を受けない。従って、ビーズに含まれる様々な色の色素の間の旧高度の違いは、側方散乱光の強度の違いを観察することにより決定される。

【0100】

50

複数のビーズの群を区別するのに使用できる尚も更なる区別パラメーターの例は、各群におけるビーズの数である。アッセイにおける各群のビーズの数は公知の手段において変化させられ、そして異なるアッセイの応答を有するビーズのカウントが決定される。当該異なる応答は、各応答を有するビーズの数により、特定のアッセイと関連付けられる。

【0101】

上記例に記載したように、様々なパラメーターや特性が、1つのビーズ群を他の群と区別するための区別パラメーターとして使用できる。区別パラメーターは、サイズ、組成、光散乱に影響する物理的性質、ビーズに異なる放射スペクトル及び/又は散乱特性を与える励起可能な蛍光若しくは色素染料、又は1つ以上の蛍光染料の濃度の違いから生じる。区別パラメーターが蛍光染料又は色素であるとき、それはビーズの表面を被覆し、ビーズに埋め込まれ、又はビーズ材料の分子に結合する場合もある。故に、蛍光ビーズがポリマー材料と蛍光染料を組み合わせることにより、又はビーズを色素に浸漬することにより生産され得る。既に染料を含有しているビーズも本発明における使用に適しており、これらはSpherotech, Inc. (Libertyville, Illinois, USA)及びMolecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon, USA)等により市販されている。フローサイトメトリー製品の供給元はインターネットで見つけれられ、例えばworld wide web molbio.princeton.edu/facs/FCMsites.html等が挙げられる。

10

【0102】

本発明に係る検出及び区別は、フローサイトメトリーにより実施される。フローサイトメトリーの方法及び装置は当該技術分野で公知であり、本発明の実施においてそれらを利用することが出来る。一般に、フローサイトメトリーは、ビーム光及び電気光学センサーを通過する流れとしてビーズ又は微小球の懸濁液の通過にあり、そのような方法において当該領域を一度に1つの粒子のみ通過する。この領域を各粒子が通過するとき、ビーム光が粒子の存在により乱され(perturbed)、そしてその結果、散乱及び蛍光が検出される。前記光学シグナルは、個々のアッセイの結果が達成されるように、ラベルの存在及び量に関して各粒子がどのサブグループに属するかを同定するための装置により使用される。装置の説明及びフローサイトメトリーの方法は公知文献に見られる。例えば、以下の文献が挙げられる。McHugh, "Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes," *Methods in Cell Biology* 42, Part B (Academic Press, 1994); McHugh et al, "Microsphere-Based Fluorescence Immunoassays Using Flow Cytometry Instrumentation," *Clinical Flow Cytometry*, Bauer, K.D., et al., eds. (Baltimore, Maryland, USA: Williams and Williams, 1993), pp. 535-544; Lindmo et al, "Immunoassay Using Mixtures of Two Particle Types of Different Affinity," *J. Immunol. Meth.* 126: 183-189 (1990); McHugh, "Flow Cytometry and the Application of Microsphere-Based Fluorescence Immunoassays," *Immunochemica* 5: 116 (1991); Horan et al, "Fluid Phase Particle Fluorescence Analysis: Rheumatoid Factor Specificity Evaluated by Laser Flow Cytometry," *Immunoassays in the Clinical Laboratory*, 185-189 (Liss 1979); Wilson et al, "A New Microsphere-Based Immunofluorescence Assay Using Flow Cytometry," *J. Immunol. Meth.* 107: 225-230 (1988); Fulwyler et al, "Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes," *Meth. Cell Biol.* 33: 613-629 (1990); Coulter Electronics Inc., United Kingdom Patent No. 1,561,042 (published February 13, 1980);及び Steinkamp et al, *Review of Scientific Instruments* 44(9): 1301-1310 (1973)。

20

30

40

【実施例】

【0103】

実施例 1

本実施例は、本発明の実施において使用される6つのヘモグロビン候補抗体の結合活性を表す。当該6つの抗体を以下に示す。

19E10-E7 (HbS特異的) 7B3-2C3-1G10 (HbD特異的)

50

12C8-A11 (HbC特異的) 13G7-E8-3H3 (HbA_{1c}特異的)
 4A10-2D6-2G8 (HbE特異的) 3E5-DLE10-3A3 (全反応性)

【 0 1 0 4 】

19E10-E7は、ベータグロビン最小エピトープ⁵PVEKSAVT¹²に結合する。⁵PVE⁷及びA¹⁰は、結合に重要である。L³及びT⁴も、結合活性に貢献する。追加のエピトープマッピング実験は、V⁶が、結合活性の損失無く、Iに置換され得ることを示した。

【 0 1 0 5 】

12C8-A11は、ベータグロビン最小エピトープ⁴TPKEKSAVT¹²に結合する。T⁴及びK⁶は、結合に重要である。L³も、結合に貢献する。追加のエピトープマッピング実験は、K⁶が、結合活性の損失無く、Rに置換され得ることを示した。

10

【 0 1 0 6 】

4A10-2D6-2G8は、ベータグロビン最小エピトープ²²EVGGK²⁶に結合する。²²EV²³及びK²⁶は、結合に重要である。D²¹も、結合に貢献する。追加のエピトープマッピング実験は、K²⁶が、結合活性の損失無く、S又はTに置換され得ることを示した。

【 0 1 0 7 】

7B3-2C3-1G10は、ベータグロビン最小エピトープ¹²¹QFTPP¹²⁵に結合する。G¹¹⁹も、結合に貢献する。

【 0 1 0 8 】

抗体結合の動態は、タンパク質-タンパク質相互作用用のProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.)を使用して解析された。異なる抗体(それぞれ10 µg)は、チャンネルあたり1つの抗体が不動化されるように、センサーチップにアミンカップリングされた。抗原は、200~13nMの範囲で採用された。動態解析の結果は、下記表4に要約した。

20

【 0 1 0 9 】

各抗体は、特異的なヘモグロビンに高い親和性を有していた。全反応性抗体も、様々な抗原に対して良好な親和性定数を有していたが、特定のバリエーションの抗体がそれぞれの抗体に結合する場合の親和性定数よりは低かった。19E10-E7を除いて全てのバリエーション抗体はHbA0に結合せず、前記親和性定数は、本質的には0であった。19E10-E7抗HbS抗体において、HbA0に対する低いレベルの結合が観察され、親和性定数は 6.5×10^{-7} Mで、HbSの親和性定数と比較して2ログ以上少ない。

【表 4】

表 4

ヘモグロビン及びヘモグロビンバリエーションに対する6つの特異的モノクローナル抗体の動態解析

	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)	
19E10-E7				
HbS	$7.6 \cdot 10^4$	$6.3 \cdot 10^{-4}$	$8.3 \cdot 10^{-9}$	10
12C8-A11				
HbC	$7.3 \cdot 10^4$	$4.5 \cdot 10^{-4}$	$6.1 \cdot 10^{-9}$	
4A10-2D6				
HbE	$7.1 \cdot 10^4$	$6.2 \cdot 10^{-5}$	$8.7 \cdot 10^{-10}$	
7B3-2C3				
HbD	$1.4 \cdot 10^5$	$1.1 \cdot 10^{-3}$	$7.4 \cdot 10^{-9}$	20
13G7-E8				
HbA _{1c}	$1.2 \cdot 10^4$	$2.3 \cdot 10^{-5}$	$1.9 \cdot 10^{-9}$	
3E5-DLE10				
HbS	$3.9 \cdot 10^4$	$7.9 \cdot 10^{-4}$	$2.0 \cdot 10^{-8}$	
HbE	$2.9 \cdot 10^4$	$4.4 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-8}$	
HbD	$3.4 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$3.0 \cdot 10^{-8}$	
HbA _{1c}	$3.7 \cdot 10^4$	$9.4 \cdot 10^{-4}$	$2.5 \cdot 10^{-8}$	30
HbC	$4.5 \cdot 10^4$	$7.4 \cdot 10^{-4}$	$1.6 \cdot 10^{-8}$	
HbA ₀	$1.4 \cdot 10^4$	$3.4 \cdot 10^{-3}$	$2.4 \cdot 10^{-7}$	

【0110】

実施例 2

本実施例は、本発明に係るサンドイッチ免疫アッセイを用いた、全ヘモグロビンに対するヘモグロビン及びヘモグロビンバリエーションタンパク質のパーセンテージの測定を示す。固相捕捉ビーズ免疫試薬が、実施例1に記載のHbA₀、HbA_{1c}、HbS、HbC、HbE及びHbDに特異的な6つのモノクローナル抗体を用いて開発された。

【0111】

前記6つの標的抗原に対する抗体は、常磁性ビーズに共有結合された。各ビーズは各抗体に特有の特異的蛍光シグナルを有するように染色され、その後のフローサイトメトリー検出器中で区別できるようにした。6つの抗体が結合したビーズを混合して、多重ビーズ試薬を作製した。検出抗体試薬は、全てのヘモグロビン種に反応性を有するフィコエリスリン標識ポリクローナル抗体を用いて調製された。アッセイにおいて結合する様々なビーズ及び種の模式図を図1に示す。

【0112】

10

20

30

40

50

前記アッセイは、全血及びキャリブレーター(5 μ L)を緩衝変性剤の溶液(10 μ L)に加えることにより、試料中に存在するヘモグロビン種のエピトープの全てを露出させて、それらが固相抗体に結合できるようにした。37 $^{\circ}$ Cで10分間変性させた後、ビーズ試薬(250 μ L)を試料に添加し、その後、追加で37 $^{\circ}$ C、20分のインキュベーションを行った。当該反応混合物を0.1%Tween-20界面活性剤を含有するリン酸緩衝生理食塩水(PBST、各100 μ L)で4回洗浄して、試料から未結合のタンパク質を全て除去し、ビーズと結合したヘモグロビン標的のみを残した。当該ビーズをフィコエリスリン標識抗体試薬を含有するPBST(25 μ L)で再懸濁し、これを37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベーションした。

【0113】

PBST(各100 μ L)で4回洗浄した後、当該ビーズをPBSTに再懸濁し、Luminexフローサイトメトリー検出器で処理して、試料中に存在する個々のヘモグロビン種に結合したビーズを探索した。例えば、ホモ接合ヘモグロビンAAの個体から採取した試料は、HbA_{1c}及びHbA₀ビーズからのシグナルを呈し、そしてヘテロ接合ヘモグロビンバリエーションの個体から採取した試料は、HbA₀、HbA_{1c}及び特異的ヘモグロビンバリエーションビーズからのシグナルを呈した。各ビーズのフィコエリスリン由来の蛍光シグナルは、試料及びキャリブレーターにおいて測定された。ビーズ及び公知の用量の各キャリブレーターを使用して、各ヘモグロビン解析物について校正曲線を作成した。各試料中のヘモグロビン解析物の濃度は、それらの蛍光シグナル及び確立した校正曲線の用量応答から決定された。HbA_{1c}のパーセント及びヘモグロビンバリエーションのパーセントは、試料中に存在する場合、ヘモグロビンHbA_{1c}又はバリエーションヘモグロビンタンパク質の濃度を、各ビーズ由来のHbA₀の濃度で割ることにより決定された。ヘテロ接合ヘモグロビンバリエーションを含有する試料(例えばHbAS等)の場合、A_{1c}とHbA₀の濃度の比に由来するパーセントA_{1c}値が、試料中のヘモグロビンバリエーションの濃度の使用を要するときは、個体の真の血糖インデックスを最もよく反映する数値を提供するために調整される。

【0114】

本明細書に添付した特許請求の範囲において、「一つの」は、「二つ以上」をも意味することを意図する。「含む」及びその変形は、その前の工程又は要素の言及が、任意で更なる工程又は要素を追加し得て、限定的でないことを意味する。本明細書に引用される全ての特許、特許出願、及び他の刊行物は、それらの開示の全てが本明細書中に参照により援用される。本明細書に引用されるいずれの参照材料又は一般的な公知技術と、本明細書の明確な教示との間に相異があった場合、本明細書中の教示に寄って解釈されることが意図される。これは、同一の用語について、当該技術分野で理解される用語又は語句の定義と本明細書中に明示に提供された定義が相異なる場合も同様である。

10

20

30

【 図 1 】

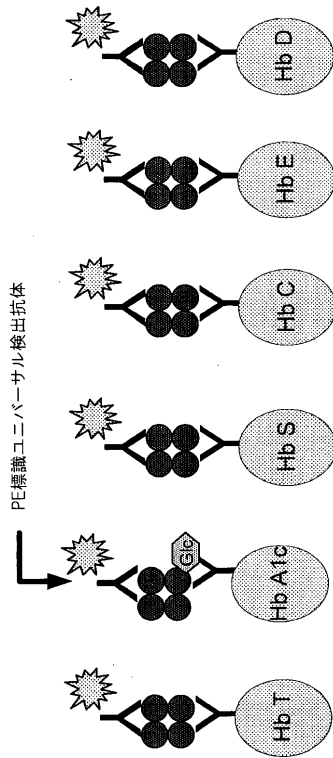


FIG. 1

【 図 2 】

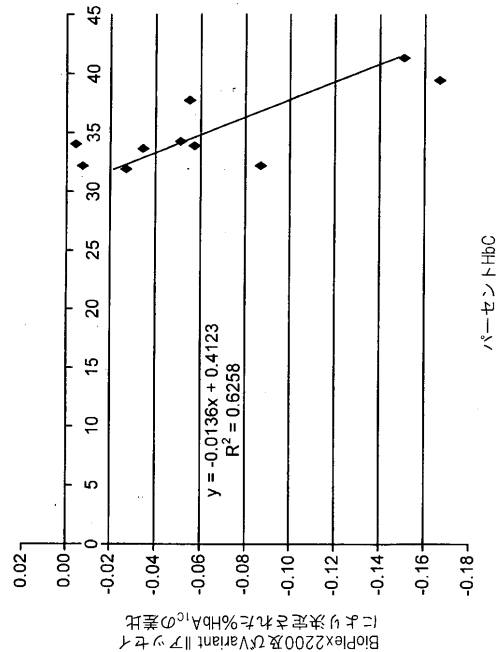


FIG. 2

【 配列表 】

2016028254000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成27年11月18日 (2015.11.18)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

単一の血液細胞溶解物の試料中の、HbA_{1c}、及び多数のヘモグロビンバリエーションを含む多数のヘモグロビン含有解析物を個別に検出する方法であり、当該方法が：

- (a) 前記試料をビーズの集団とインキュベーションし、当該集団が均一な混合物 (common mixture) 中の多数のサブ集団からなり、当該集団の各ビーズに、前記解析物と同数の多数の分類染料 (classifier dye) の一つが結合しており、そして当該分類染料は、当該分類染料、ひいては前記サブ集団が、当該分類染料が励起されることで放射される蛍光放射により互いに区別されるように選択され、当該各サブ集団が、更に、前記解析物の1つに選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバーを結合させていることにより、各解析物を、前記サブ集団に結合させられた前記免疫学的結合メンバーを介して、個々のビーズサブ集団と結合させること；
- (b) 前記サブ集団のビーズに結合した前記解析物を、全ての前記解析物と結合する標識された結合メンバーとインキュベーションすることにより、当該解析物に標識を結合させること；及び
- (c) そのように標識された前記結合した解析物について、蛍光放射によりサブ集団の標識

を区別しながら、前記結合した解析物に結合した標識を検出することにより、当該解析物を個別に検出すること；

を含む、前記方法。

【請求項2】

血液細胞溶解物の試料中の、全ヘモグロビンに対するHbA_{1c}の比率を決定する方法であり、当該比率は、HbA_{1c}の測定に干渉するヘモグロビンバリエーションが当該溶解物中に存在する可能性を考慮して調整され、当該方法が：

(a)前記試料をビーズの集団とインキュベーションし、当該集団が均一な混合物中の多数のサブ集団からなり、当該集団の各ビーズに、多数の分類染料の一つが結合しており、そして当該分類染料は、当該分類染料、ひいては前記サブ集団が、当該分類染料が励起されることで放射される蛍光放射により互いに区別が可能ないように選択され、当該各サブ集団が、更に、HbA_{1c}及びヘモグロビンバリエーションを含む多数の解析物の1つに選択的結合親和性を有する免疫学的結合メンバーを結合させていることにより、各解析物を、当該免疫学的結合メンバーを介して、個々のビーズサブ集団と結合させること；

(b)前記サブ集団のビーズに結合した前記解析物を、全ての前記解析物と結合する標識された結合メンバーとインキュベーションすることにより、当該解析物に標識を結合させること；

(c)そのように標識された前記結合した解析物について、蛍光放射によりサブ集団の標識を区別しながら、前記結合した解析物に結合した標識を検出することにより、前記試料中の当該解析物の濃度を個別に検出すること；及び

(d)前記濃度から全ヘモグロビンに対するHbA_{1c}の比率を決定し、当該比率が、検出されたヘモグロビンバリエーション濃度とHbA_{1c}の濃度との間の予め決められた関係に実験的に由来する調整係数により、当該ヘモグロビンバリエーションの濃度で調整されること；

を含む、前記方法。

【請求項3】

血液細胞溶解物の試料中の、全ヘモグロビンに対する糖化ヘモグロビンバリエーションの比率を決定する方法であり、当該方法が：

(a)前記試料をビーズの集団とインキュベーションし、当該集団が均一な混合物中の多数のサブ集団からなり、当該集団の各ビーズに、多数の分類染料の一つが結合しており、そして当該分類染料は、当該分類染料、ひいては前記サブ集団が、当該分類染料が励起されることで放射される蛍光放射により互いに区別が可能ないように選択され、当該各サブ集団が、更に：

第一の免疫学的結合メンバーとして、前記糖化ヘモグロビンバリエーション及びHbA_{1c}の両方からなる第一の解析物に選択的結合親和性を有するもの、及び

第二の免疫学的結合メンバーとして、前記ヘモグロビンバリエーション及び前記糖化ヘモグロビンバリエーションの両方からなる第二の解析物に選択的結合親和性を有するもの

を含む多数の免疫学的結合メンバーの1つを有することにより、当該第一及び第二の解析物を、当該第一及び第二の各免疫学的結合メンバーと結合させること；

(b)結合した前記第一及び第二解析物を、全ての前記解析物と結合する標識された結合メンバーとインキュベーションすることにより、当該解析物に標識を結合させること；

(c)そのように標識された前記結合した解析物について、蛍光放射によりサブ集団の標識を区別しながら、前記標識を検出することにより、前記試料中の当該第一及び第二の解析物の濃度を個別に検出すること；及び

(d)全ヘモグロビンの濃度を決定し、そして前記濃度から全ヘモグロビンに対する前記第一の解析物の比率を決定し、当該比率が、検出されたヘモグロビンバリエーション濃度と全ヘモグロビン濃度との間の予め決められた関係に実験的に由来する調整係数により、全ヘモグロビンに対する当該第二の解析物の濃度で調整されることにより、全ヘモグロビンに対する糖化ヘモグロビンバリエーションの比率を決定すること；

を含む、前記方法。

【請求項4】

HbC最小エピトープ⁴TPEKSAVT¹²に結合する、ヘモグロビンバリエーションHbC及び糖化HbCに選択的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項5】

HbS最小エピトープ³LTPVEKSAVT¹²に結合する、ヘモグロビンバリエーションHbS及び糖化HbSに選択的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項6】

HbE最小エピトープ²²EVGGK²⁶又は²¹DEVGGK²⁶に結合する、ヘモグロビンバリエーションHbE及び糖化HbEに選択的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項7】

HbD最小エピトープ¹²¹QFTPP¹²⁵又は¹¹⁹GKQFTPP¹²⁵に結合する、ヘモグロビンバリエーションHbD及び糖化HbDに選択的に結合するモノクローナル抗体。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 ロジャー ウォーカー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 1 0 , ベニシア, カーニー ストリート 6 8 8

(72)発明者 ベネディクト ジャルダン

フランス国, エフ - 3 4 9 8 0 サンクレマン ドゥ リビエール, リュ ドゥ ラ マリー 4
, ピラ 2

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA44 HA15

4B064 AG27 CA20 CC24 DA13

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50 FA71

【外国語明細書】

2016028254000001.pdf

专利名称(译)	血红蛋白，血红蛋白变体和糖基化形式的多重免疫分析		
公开(公告)号	JP2016028254A	公开(公告)日	2016-02-25
申请号	JP2015209371	申请日	2015-10-23
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-雷德实验室股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物 - Rad实验室，Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	ロジャーウォーカー ベネディクトジャルダン		
发明人	ロジャー ウォーカー ベネディクト ジャルダン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577 C07K16/18 C12N15/02 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/34 G01N33/582 G01N33/721 G01N33/723 Y10T436/101666 Y10T436/25125 C07K2317/92 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/543.501.D G01N33/577.B C07K16/18.ZNA C12N15/00.C C12P21/08 C12N15/13		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎		
优先权	61/262488 2009-11-18 US 12/941738 2010-11-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(21) 出願番号	特願2015-209371 (P2015-209371)	(71) 出願人	591099809
	(22) 出願日	平成27年10月23日 (2015.10.23)		バイオラッド ラボラトリーズ, インコーポレイテッド
要解决的问题：提供糖化血红蛋白的测定。溶解：血红蛋白，其变体和糖基化形式在多重测定中单独测定，该测定允许校正测量的HbA1c水平以解释糖基化变体和与a相关的其他因子。样品中变体的混合物。还提供了特别适用于多重测定的新抗体。附图：图1	(62) 分割の表示	特願2012-539940 (P2012-539940)の分割		アメリカ合衆国, カリフォルニア 94547, ハーキュルス, アルフレッド ノーベル ドライブ 1000
	原出願日	平成22年11月9日 (2010.11.9)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
	(31) 優先権主張番号	61/262,488	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
	(32) 優先日	平成21年11月18日 (2009.11.18)	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 慎
	(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
	(31) 優先権主張番号	12/941,738		
	(32) 優先日	平成22年11月8日 (2010.11.8)		
	(33) 優先権主張国	米国 (US)		