

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-524820

(P2006-524820A)

(43) 公表日 平成18年11月2日(2006.11.2)

(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	2 G O 5 4
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18	4 H O 4 5
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 A	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

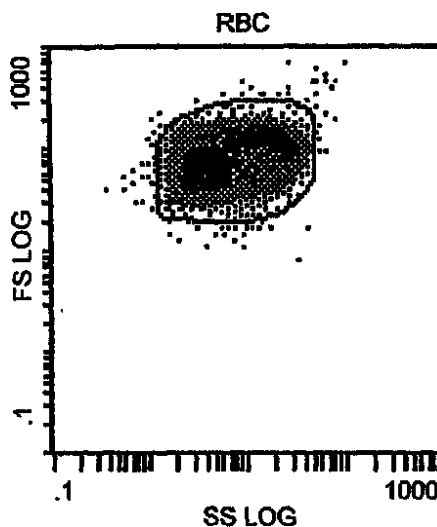
(21) 出願番号	特願2006-509756 (P2006-509756)	(71) 出願人	505275295
(86) (22) 出願日	平成16年4月7日 (2004. 4. 7)		ベックマン コールター, インコーポレイ
(85) 翻訳文提出日	平成17年12月20日 (2005. 12. 20)		テイド
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/010633		アメリカ合衆国, カリフォルニア 928
(87) 国際公開番号	W02004/096009		34, フラートン, ノース ハーバー ブ
(87) 国際公開日	平成16年11月11日 (2004. 11. 11)		ールバード 4300, メール コード
(31) 優先権主張番号	10/423, 544		エー-42-シー
(32) 優先日	平成15年4月25日 (2003. 4. 25)	(74) 代理人	100099759
(33) 優先権主張国	米国 (US)		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】 ヘモグロビンのデファレンシャル測定

(57) 【要約】

本発明は、検出可能マーカーに対して結合したpan-ヘモグロビン抗体並びにヘモグロビン型及び/又は変異体に対して特異的に結合する検出可能マーカーに対して結合した1又は複数の親和性試薬を使用することで試料中のヘモグロビンを分析するための試薬に関連する。本発明は更に、当該試薬を使用するフローサイトメトリー法に関連する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試験試料中のあるヘモグロビン型又は変異体を分析する方法であって、当該方法は：

a)患者に由来する試験試料と、第1標識に対して結合しているpan-ヘモグロビン抗体及び第2標識に対して結合しているヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬を混合し；そして

b)当該試験試料を測定してpan-ヘモグロビン抗体上の第1標識から生じたシグナル及びヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬上の第2標識から生じたシグナルを測定し；そして

c)前記pan-ヘモグロビン抗体からのシグナルと前記ヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬からのシグナルを比較すること、を含んで成る方法。 10

【請求項 2】

前記pan-ヘモグロビン抗体からのシグナルと前記ヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬からのシグナルの比較することが、当該ヘモグロビン型又は変異体を含む赤血球の%を測定することを含んで成る、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記pan-ヘモグロビン抗体に由来するシグナルと前記ヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬からのシグナルを比較することが、当該ヘモグロビン型又は変異体の%濃度を測定することを含んで成る、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記pan-ヘモグロビン抗体に由来するシグナルと前記ヘモグロビン型又は変異体に特異的な試薬からのシグナルを比較することが、当該ヘモグロビン型又は変異体を含む血液体積あたりの平均赤血球数を測定することを含んで成る、請求項1に記載の方法。 20

【請求項 5】

前記試験試料と、第3の標識が結合されている更なるヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬を混合し、そしてヘモグロビン型又は変異体抗体の第3の標識から生じたシグナルを測定することを含んで成る、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記pan-ヘモグロビン抗体及び前記ヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬のシグナルを参照値と比較することを更に含んで成る、請求項1に記載の方法。 30

【請求項 7】

前記参照値が、正常な患者集団におけるpan-ヘモグロビン抗体からのシグナルとヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬からのシグナルを比較することからの値を含んで成る、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記参照値が、同患者に由来する前記pan-ヘモグロビン抗体からのシグナルと前記ヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬からのシグナルを予め比較することを含んで成る、請求項6に記載の方法。

【請求項 9】

前記ヘモグロビン型又は変異体がヘモグロビンA_{1c}を含んで成る、請求項1に記載の方法 40

【請求項 10】

前記pan-ヘモグロビン抗体及びヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬のシグナルを参照値と比較することにより糖尿病の患者の症状の分析を可能にする請求項6に記載の方法。

【請求項 11】

前記pan-ヘモグロビン抗体及び前記ヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬のシグナルを参照値と比較することにより異常血色素症の患者の症状の分析を可能にする、請求項6に記載の方法。

【請求項 12】

前記ヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬がフルオロクロームに結合した抗体を含んで成る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

検出可能標識に結合した pan-ヘモグロビン抗体を含んで成る結合抗体製品。

【請求項 1 4】

前記検出可能標識がフルオロフォアである、請求項 1 3 に記載の結合抗体製品。

【請求項 1 5】

前記抗体がヘモグロビン鎖上の共通する抗原決定基に対して結合する、請求項 1 3 に記載の結合抗体製品。

【請求項 1 6】

1以上の更なるヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬であって、異なる検出可能標識に結合している親和性試薬を更に含んで成る、請求項 1 3 に記載の結合抗体製品。

10

【請求項 1 7】

赤血球に特異的な親和性試薬であって、異なる検出可能標識に結合している親和性試薬を含んで成る、請求項 1 3 に記載の結合抗体製品。

【請求項 1 8】

白血球に特異的な親和性試薬であって、異なる検出可能標識に結合した親和性試薬を更に含んで成る、請求項 1 3 に記載の結合抗体製品。

【請求項 1 9】

前記製品が凍結乾燥製品を含んで成る、請求項 1 3 に記載の結合抗体製品。

20

【請求項 2 0】

前記製品が 1 種以上の防腐剤を含む液体製品を含んで成る、請求項 1 3 に記載の結合抗体製品。

【請求項 2 1】

既知量の 1 種類以上のヘモグロビン型又は変異体を更に含んで成る、請求項 1 3 に記載の結合抗体製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

30

発明の分野

本発明は、ヘモグロビン型又は変異体を分析するための試薬に関連する。加えて、本発明は、当該試薬を使用するフローサイトメトリー法に関連する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

正常な成人ヘモグロビンA(HbA)は2つの (アルファ)及び2つの (ベータ)鎖($\alpha_2 \beta_2$)からなる。次に正常な成人ヘモグロビンA₂(HbA₂)は2つの (アルファ)及び2つの (デルタ)鎖($\alpha_2 \delta_2$)鎖からなる。正常な成人の血液は、主要なヘモグロビン物質としてHbA及び少数ヘモグロビン物質としてHbA₂を含む。ヒト胎児及び新生児は主に胎児性ヘモグロビンF(HbF)を生産し、それは、2つの (アルファ)鎖及び2つの (ガンマ)鎖からなる。更に、(シータ)鎖、(ゼータ)鎖及び(エプシロン)鎖は早期ヒト胎児において確認されている。

40

【0 0 0 3】

最初に発見された異常ヘモグロビンは、ヘモグロビンS(HbS)であり、それは鎌状赤血球貧血症の原因である。HbSは、通常 (ベータ)鎖の6位において発見されるバリン残基がグルタミン残基に置換された結果生じる。他の比較的共通する異常なヘモグロビンはヘモグロビンC(HbC)である。

【0 0 0 4】

加えて、合計約90%のヘモグロビンがグリコシル化されていない。グリコシル化されていないヘモグロビンの主要な画分は、HbA₀とよばれる、非グリコシル化HbAである。グリ

50

コシル化されたヘモグロビン(GHb)は、様々な糖がヘモグロビン分子に対して結合することにより形成されている少数のヘモグロビン成分を意味する。ヒト赤血球はグルコースを自由に透過できる。各赤血球において、GHbは、周囲グルコース濃度に比例した速度で形成される。グルコースとヘモグロビンの反応は、酵素にはよらず、不可逆的且つ緩慢で、従ってヘモグロビン全体の一部のみが、赤血球の寿命(120日)の間に糖化される。結果として、GHbを測定することにより、長期グルコースレベルをモニタリングするために使用され、先の2~3月に渡る平均血液グルコース濃度の正確な指標を提供する、血液グルコースレベルの、重み付けがされた「移動」平均を提供する。

【0005】

ヘモグロビンA_{1c}(HbA_{1c})は、糖化されたヘモグロビンの1つの特異的な型でありそして糖尿病に関して最も重要なヘモグロビン物質である。HbA_{1c}は、不安定なアルジミンを提供する、鎖における末端アミン基とグルコースのアルデヒド基との反応により生じる。アルジミンの再配置によりHbA_{1c}が与えられ、それは、バリンアミン基に対して結合した-ケトグリコシドを特徴とする。HbA_{1c}であるヘモグロビンの総量は、非糖尿病において約3~6%であり、そして制御されるに乏しい糖尿病においては20%以上である。Goldsteinら, Clin. Chem. vol.32 : B64-B70 (1986). The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Groupは、GHb(% HbA_{1c})の1%の変化が、先の120日に渡る血液グルコースレベルにおいて300mg/Lの平均変化を示すことを報じている。従って、HbA_{1c}の濃度の測定は、糖尿病の診断及びモニタリングにおいて有用である。

10

【0006】

ヘモグロビンを同定及び特性決定するために様々な方法が使用されてきた。伝統的に、これらの方法には、電気泳動、等電点電気泳動、HPLC及びマクロ-クロマトグラフィーが含まれる。加えて、フローサイトメトリーも、特定のヘモグロビン型及び/又は変異体を分析するために使用されてきた。

20

【0007】

フローサイトメトリーは、一種類の赤血球が分析される血液試料の分析をするための迅速且つ効率的な方法を供する。フローサイトメトリーが特異的なヘモグロビン型及び/又は変異体を分析するために使用されている場合、特定の注目のヘモグロビンに対して特異的なモノクローナル抗体がヘモグロビン型及び/又は変異体の集団を測定するために使用され、そして総ヘモグロビン集団が、総赤血球集団を同定するために光散乱を使用することによって又はHbAに対して特異的なモノクローナル抗体を使用することのいずれかによって測定されているDoverら, Blood vol.61 :No.4 pp.1109~1113 (1987) ; Jensenら, ヘモグロビン vol.9 (No.4) pp.349-362 (1985)。第三の方法として、総ヘモグロビンは、赤血球上のグリコフォリンAを標識することにより総赤血球細胞を同定することによって測定されている。

30

【0008】

しかし、これらの方法はどれも、総ヘモグロビン集団を正確に特定することができない。サイズに基づいて赤血球集団を同定するために光散乱を使用することは、総ヘモグロビン集団を誤って多く測定する。その理由は、光散乱窓(light scatter window)において偽のポジティブを与える赤血球ではない細胞粒子による。加えて、グリコフォリンAを標識化する際に総ヘモグロビンを基準とすることで、人工的な高い値がもたらされるだろうし、その理由は、全赤血球の系統、即ち、有核赤血球、網状赤血球及び成熟赤血球がグリコフォリンAタンパク質を発現するが、全ての赤血球の細胞がヘモグロビンを含んでいるわけではないことである。有核赤血球及び網状赤血球は、僅か少数又は少量のヘモグロビンを含みうる。HbAに対する抗体を使用することで、総ヘモグロビンについて誤って低い数値がもたらされ、その理由は、正常な対象者におけるヘモグロビンの90~95%のみがA形態にあり、そして異常な患者においては少なくさえもあるからだ。

40

【0009】

ヘモグロビンを分析するためにフローサイトメトリーを使用することに伴う更なる限定は、正確な測定をするために必要な色補正試薬を欠くことからもたらされる。一つの試料

50

のフローサイトメトリー分析において1種類以上の蛍光試薬(例えば、フルオレセイン及びローダミン)が使用された場合、一つの蛍光スペクトルが他のスペクトルへと滲んで重なることが理由で、試薬の蛍光スペクトルがオーバーラップすることにより各集団の不正確な測定がもたらされるからである。スペクトルのオーバーラップすることにより生じた分析におけるエラーを補正するために、試薬が必要となるがその試薬は、装置に、蛍光が滲むことによって生じた人工的なポジティブシグナルを除去する設定を可能にする。フローサイトメーター上での色補正を確立するために、細胞に対して直接結合する一組の関連する蛍光色素試薬が必要とされている。減算補正法において、各試薬は異なるフルオロフォアに対して結合されており、そしてスペクトルのオーバーラップが差し引かれる。フルマトリクス補正方法において、使用された各異なるフルオロフォアに対して結合した試薬が必要とされているBagwell, CBら、Ann N Y Acad Sci. vol.20 : No.67 pp.167- 84 (1993)。しかし、現在は赤血球に対する色補正試薬システムは存在しない。結果として、赤血球の多色フローサイトメトリー分析は不正確でありうる。

10

【0010】

これらの理由のため、免疫蛍光によってヘモグロビンの正確な測定を達成するようにフローサイトメトリーを使用することは可能ではない。上で論じたように、例えば、特定のヘモグロビン集団で1%の変化があれば、病理学的状態の現れであり、フローサイトメトリーを使用することで、試料中のヘモグロビンの迅速な分析のために正確な感受性方法が必要とされている。

【0011】

本発明は、これらの欠点を解消しそして試料中のヘモグロビンを分析するためにフローサイトメトリーを使用する正確な方法を提供する。本発明は、更に、赤血球及び赤血球成分の例えば、ヘモグロビン型及び/又は変異体を、多色フローサイトメトリー分析を使用することで正確に測定可能にする色補正システムを提供する。

20

【発明の開示】

【0012】

発明の概要

本発明は、試料中の1又は複数のヘモグロビン型及び/又は変異体を分析する方法に関し、当該方法は、患者に由来する試験試料とpan-ヘモグロビン抗体(第1標識に対して結合している)及びヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬(第2標識に対して結合している)を混合し;当該試験サンプルを測定してpan-ヘモグロビン抗体上の第1標識から生じたシグナル及びヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬上の第2標識から生じたシグナルを測定し;当該pan-ヘモグロビン抗体からのシグナルと当該ヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬から生じたシグナルを比較し;そしてその比較の結果を報告することを含んで成る方法である。

30

【0013】

本発明は、検出可能標識に対して結合したpan-ヘモグロビン抗体を含んで成る結合抗体製品を更に含んで成る。本発明の更なる観点は、コントロール製品として使用されて良い結合抗体製品に関連する。加えて、当該コントロール製品は、既知量の1又は複数のヘモグロビン型及び/又は変異体を含んで良い。本発明の他の観点は、全血アッセイのために白血球及び白血球成分に対する1又は複数の抗体を更に含んで成る結合抗体製品を包含する。

40

【0014】

本発明の更なる実施態様において、結合抗体製品は、それぞれが異なる蛍光標識に対して結合しているpan-ヘモグロビン抗体を含んで成ることができる。加えて、色補正キットは、検出可能標識に対して結合したpan-ヘモグロビン抗体並びに他の検出可能標識に対して結合した1以上の更なるヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬を含んで成って良く、ここで当該抗体及び各更なるヘモグロビン型又は変異体に特異的な親和性試薬は、互いに異なる検出可能標識を有する。かかる実施態様の例は、第1検出抗体に対して結合したpan-ヘモグロビン抗体並びに第2の検出標識を有するグリコフォリンAに対し

50

て特異的に結合する抗体を含んで成って良い。

【0015】

本発明は、糖尿病の診断及び予後方法をも包含し、当該方法は、患者試料とHbA_{1c}に対する抗体（ここで当該抗体は第1検出可能標識に対して結合している）とpan-ヘモグロビン抗体（第2検出可能標識に対して結合している）とを反応させ；試験試料を測定してpan-ヘモグロビン抗体上の第1標識から生じたシグナル及びHbA_{1c}。特異的親和性試薬上の第2標識から生じたシグナルを測定し；そして当該pan-ヘモグロビン抗体と当該HbA_{1c}。特異的親和性試薬に由来するシグナルを比較することを含んで成る。

【0016】

本発明の更なる観点は、糖尿病の患者の治療コンプライアンスをモニタリングするために方法に関連し、当該方法は、患者の試料とHbA_{1c}及び/又はグリコシル化されたヘモグロビンに対する抗体（ここで当該抗体は第1検出可能標識に対して結合している）とpan-ヘモグロビン抗体（第2検出可能標識に対して結合している）を反応させ；試験試料を測定してpan-ヘモグロビン抗体上の第1標識から生じたシグナル及びHbA_{1c}及び/又はグリコシル化ヘモグロビン上の抗体上の第2標識から生じたシグナルを特定し；そして当該pan-ヘモグロビン抗体及び当該HbA_{1c}及び/又はグリコシル化されたヘモグロビン抗体からのシグナルを参照値に対して比較することを含んで成る。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

発明の詳細な説明

本発明は、試料中のヘモグロビンを分析する正確な定量方法を供する。好適な方法は、測定領域を通過する個々の細胞を分析するフローサイトメトリーを使用する。当業者には理解されるように、本発明は蛍光顕微鏡により行われて良いが、試料を分析する時間が実質上増加するだろう。本発明は、更に、赤血球並びにヘモグロビン型及び/又は変異体などの赤血球成分を正確に分析するための多色フローサイトメトリーの使用を可能にする色補正試薬システムを提供する。

20

【0018】

「pan-ヘモグロビン」抗体とは、ヘモグロビン鎖上で共通する抗原決定基に対して結合し、総ヘモグロビン集団の標識化をもたらす抗体である。例えば、pan-ヘモグロビン抗体は、全てのヘモグロビン型及び変異体に共通するヘモグロビン鎖に対して少なくとも結合するだろう。更に、pan-ヘモグロビン抗体は、（アルファ）及び（デルタ）ヘモグロビン鎖に対して結合することができ総ヘモグロビン集団の標識化をももたらすだろう。好適に、pan-ヘモグロビン抗体は、モノクローナル抗体である。しかし、本発明は、総ヘモグロビン集団の標識化をもたらすなら、pan-ポリクローナル抗体が使用されて良いことも熟考する。様々なpan-ヘモグロビン抗体が未結合形態において商業的に入手可能である。pan-ヘモグロビン抗体の例は、次のような製造者から入手可能である：a)モノクローナル抗体はCortex Biochem, Inc., San Leandro, CA, Product ID CR8001M, 名称：ヘモグロビン（チェーン）、銘柄：アンチ-ヘモグロビン（ ）；Biodesign International, Kennebunk, ME, カタログNo. H67696M, 名称：ヒトヘモグロビン チェーン、銘柄：モノクローナルアンチヘモグロビン（チェーン）；Fitzgerald International, Inc., Concord, MA, カタログ：10-H03、名称：ヘモグロビン全体分子（ヒト）から入手可能であり；そしてb)ポリクローナル抗体はAccurate Antibodies, Westbury, NY, Product ID：IMS-02-068-02、名称：ヘモグロビンチキンアンチヒト；及び製品ID：BMD-J16、名称：ヘモグロビンヒツジアンチヒト；及び製品ID:BYA-1006-1、名称：ヘモグロビンウサギアンチヒト；から入手可能である。しかしpan-ヘモグロビン抗体はフローサイトメトリーにおいては使用されていない又は検出可能標識に対して結合されていない。加えて、特定のヘモグロビン型及び/又は変異体に対して特異的ないくつかの予め結合されているヘモグロビン抗体が様々な商業的ソースから入手可能である。

30

40

【0019】

本発明の日より前に、ヘモグロビンAに対して特異的なモノクローナル抗体が、試料中

50

の総ヘモグロビンを測定するために使用されてきたCampbell,らCytometry vol.35 : pp.242-248 (1999)。しかし、pan-ヘモグロビン抗体とは違い、ヘモグロビンAに対するモノクローナル抗体は、総ヘモグロビン集団のたった90~95%としか反応しない。本発明者は、最初に、pan-ヘモグロビン抗体を検出可能標識に対して結合させている。従って、本発明の1つの観点は、フローサイトメトリー試薬として使用するために適切である検出可能標識に対して結合しているpan-ヘモグロビン抗体に関連する。

【0020】

試料中の総ヘモグロビンを検出するためのpan-ヘモグロビン抗体の使用は、特徴あるヘモグロビン型及び/又は抗体に対して特異的である抗体など、親和性試薬との組み合わせにおいて使用される場合、試料中に存在する型及び/又は変異体の量を分析するために、好適にはフローサイトメトリーによる正確な方法を供する。ヘモグロビン型としては、限定ではないが、HbA_{1c}、HbA、HbA₂、胚性Hb、HbS、HbF、HbC、HbD、HbE及びグリコシル化されたHbが挙げられる。加えて、ヘモグロビン変異体としては、ヘモグロビン型の多くのヘモグロビン誘導体が挙げられる。ヘモグロビン変異体は、往々にしてヘモグロビン型のアミノ酸配列の単一の操作の結果により生じる。本発明を使用することで、全てのヘモグロビンが検出されて良く、好適にはフローサイトメトリーによって検出されて良く、そのためには、検出可能標識に対して結合できうる抗体などの特異的親和性試薬がある。更に、細胞内分子又は抗原及び表層膜分子又は抗原に対して結合する抗体は、細胞に関する更なる情報を提供するためにpan-Hbと組み合わせられて良い。

10

【0021】

pan-ヘモグロビン抗体並びにヘモグロビン型及び/又は変異体親和性試薬上の検出可能抗体は、好適にはフローサイトメトリーを使用することで検出可能である任意の標識の例えば、フルオロフォアであって良い。フルオロフォアには、蛍光状態において存在する蛍光標識及び励起により蛍光を発するフルオロクロームの両方が含まれる。本発明に適した様々なフルオロフォアは、Molecular Probes, Inc., Eugene, ORなどいくつかの会社から商業上入手可能である。

20

【0022】

適切なフルオロフォアの例としては、限定ではないが、Alexa Fluor色素シリーズの例えば、Alexa 350、Alexa 430、Alexa 488、Alexa 532、Alexa 546、Alexa 555、Alexa 568、Alexa 594、Alexa 633、Alexa 647、Alexa 660、Alexa 700及びAlexa 750、BODIPY色素、フルオレセイン、オレゴングリーン、ローダミングリーン、テトラメチルローダミン、リサミンローダミンB(lissamine rhodamine B) ローダミンRed-X、A-ローダミン、X-ローダミン、テキサスレッド、テキサスレッド-X、ナフトフルオロセイン、レーザーPro IR 790、カルボキシローダミン6G、QSY色素、NANOGOLDスルホスクシニミジルエステル、カスケードブルー、クマリン誘導体、ナフタレン、ピレン、ピリジルオキサゾール誘導体、カスケードイエロー、ダポキシル色素、エオシン誘導体、ピリジルオキサオール誘導体、ベンゾオキサゾール誘導体、ルシファーイエロー、AMCA、マリーナブルー、パシフィックブルー、フィコエリトリン(PE)、PEベースタンデム蛍光物質(PE-Tx Red、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7)、Cy3、Cy3.5、アロフィコシアニン(APC)、APCベースタンデム蛍光物質(APCCy7、APCCy5.5、Cy5.5、Cy7)及びクロマトグラフィーマレイミドが挙げられる。

30

40

【0023】

本発明において使用されたフルオロフォアの抗体に対する結合は、常用且つ周知の方法を使用することで行われて良い。結合Pan-Hgb製品は、パッケージングされて凍結乾燥製品として又は液体産物において販売されて良い。凍結乾燥した製品は、液体製品よりも長い棚寿命を有するだろう。液体製品は、適切なバッファの例えば、リン酸緩衝溶液(PBS)及び1種類以上の防腐剤を含むだろう。

【0024】

本発明の方法は、患者試料中のヘモグロビンを分析するために使用されて良い。本発明の方法を使用することで、ヘモグロビンの特定の型及び/又は変異体を含む赤血球の%が特定されて良い。一層詳細に、Pan-Hb結合体を使用することで、赤血球及び所定の型の数

50

の特定が可能になりそして/又は変異型Hb結合体を使用することで、所定の型及び/又は変異体を含む赤血球の数の特定が可能になり、従って、所定の型/変異体Hbを含む赤血球の%が特定されて良い。他の実施態様において、総ヘモグロビン含量に対する特定のヘモグロビン型及び/又は変異体の%の濃度は、最初に、試料中のヘモグロビンの総濃度を、標識したpan-ヘモグロビン抗体及び既知量のヘモグロビンの参照標準からのシグナルの強度を使用することで測定し、そして標識した型及び/又は変異体ヘモグロビン抗体並びに既知量の型及び/又は変異体ヘモグロビンの参照標準からのシグナル強度を使用することによって所定の型及び/又は変異体の濃度を特定することによって特定されて良い。更なる実施態様において、総ヘモグロビン含量に対する特定のヘモグロビン型及び/又は変異体の%濃度は、最初に、他の適当な手段の例えば、吸光度又は光散乱を使用することで試料中のヘモグロビンの総濃度を測定することにより特定されて良く、そして所定の型及び/又は変異体の濃度は、標識された型及び/又は変異体ヘモグロビン抗体によって同定された細胞中に含まれた所定の型及び/又は変異体の平均濃度の相関表によって特定されて良い。米国特許第5,686,309号は、本明細書中その全体を参照によって組み込まれている。なおさらに、本発明を試験試料中、特定のヘモグロビン型及び/又は変異体の例えば、ヘモグロビンA_{1c}及び/又はグリコシル化されたヘモグロビンを含む血液体積あたりの赤血球の平均数を特定するために使用することも本願が熟考した範囲内である。

10

20

30

40

50

【0025】

本発明は、診断及び予後用途の両方を有しうる。診断用途に関して、特定のヘモグロビン型及び/もしくは変異体の存在及び/もしくは量により複数の病理状態の存在及び程度を診断できる。一層詳細に、本発明は、異常血色素症及び糖尿病に関連した価値ある診断及び予後情報を提供することができる。

【0026】

異常血色素症は、HbA₀及びHbFではないヘモグロビン型及び/又は変異体の存在を特徴とする疾患の不均質な集団を示す。例えば、HbA₂は、 α -サラセミアのいくつかの形態に関連し、HbA_{1c}及びグリコシル化されたHbは糖尿病及びコラーゲン疾患に関連する。HbSは鎌状赤血球病に関連している。HbC及びHbDは、HbC及びHbD疾患にそれぞれ関連し、そしてHbEはHbE疾患及び β -サラセミアに関連する。更に、HbFは正常な胎児及び新生児において発現しており、それは鎌状赤血球病にも関連する。

【0027】

特に重要なものは、ヘモグロビンHbA_{1c}である。HbA_{1c}であるヘモグロビンの総量は、糖尿病でない場合約3~6%であり、そして調節が乏しい糖尿病において約20%以上である(Goldstein, DE, ら, Clin. Chem. vol.32 : B64-B70 (1986)). The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Groupは、GHb(%HbAc_{1c})における1%の変化は、先行する120日に渡る血液グルコースレベルにおいて300 mg/Lの平均変化を示すと報じている。加えて、ヘモグロビンA_{1c}モニタリングを、糖尿病前検診として使用できうることを示しており、何故なら患者は、それらが異常なグルコース寛容検診を有する前に、ヘモグロビンA_{1c}のレベルの上昇を示しうるからである。従って、患者の試験試料中のヘモグロビンの濃度を特定することは、糖尿病を診断することにおいて及び当該疾患の治療をモニタリングすることにおいての両方で有用である。

【0028】

Professional Practice Committee of the American Diabetes Associationにより承認された最近刊行されたガイドラインは、ヘモグロビンA_{1c}及び/又はグリコシル化されたヘモグロビンは、糖尿病患者において、血糖コントロール及び治療計画のコンプライアンスをモニタリングするために日常的に測定されるべきであることを推奨したSacks, ら, Clin. Chem. vol.48 : pp.436~472 (2002)。同時に、当該ガイドラインは、ヘモグロビンA_{1c}及びグリコシル化されたヘモグロビンをモニタリングするために一貫性及び正確さが無いアッセイが現在様々な研究室で使用されていることを記している。

【0029】

本発明は、患者試料においてヘモグロビンA_{1c}及びグリコシル化されたヘモグロビンを

分析する正確且つ一貫した手段を提供する。本発明の方法を使用することで、ヘモグロビン A_{1c} 及び/又はグリコシル化ヘモグロビンを含有する細胞の%は、標識されたpan-ヘモグロビン抗体からのシグナルを使用することでヘモグロビンを含有する細胞の総数を測定し、そしてヘモグロビン A_{1c} 及び/又はグリコシル化されたヘモグロビンに対して特異的な標識された抗体からのシグナルを使用することでこれらのヘモグロビンを含む細胞の総数を測定することにより測定されて良い。代わりに、ヘモグロビン A_{1c} 及び/又はグリコシル化されたヘモグロビンの濃度は、標識されたpan-ヘモグロビン抗体及び既知量のヘモグロビンの標準参照からのシグナルを使用することで試料中のヘモグロビンの総濃度を特定し、次いで、標識されたヘモグロビン A_{1c} 及び/又は既知量のヘモグロビン A_{1c} 及び/もしくはグリコシル化されたヘモグロビンに関する標準参照からのシグナルを使用することで試料中のヘモグロビン A_{1c} 及び/又はグリコシル化されたヘモグロビンの総濃度を測定することによって特定されて良い。

10

【0030】

本発明は、患者の試験試料を検出可能標識が結合されているヘモグロビン A_{1c} に対する抗体とそして第2の検出可能標識が結合されているpan-ヘモグロビン抗体と反応させることによって糖尿病を検診する方法に関連する。好適に、当該方法は、フローサイトメーターを使用する。試料中に存在するヘモグロビン A_{1c} の量は測定されて良く、そしてその結果は、比較可能な正常な患者集団において発見されるヘモグロビン A_{1c} の参照と比較されて良い。

【0031】

本発明は、スクリーニング用途に加えて、診断用途をも有する。例えば、糖尿病患者の A_{1c} レベルの変化が僅か(最大で1%)であってさえも、糖尿病に関連した長期合併症の35%の増加に相関関係がある。本発明の方法は、ヘモグロビン型及び/又は変異体のレベルのかかる僅かな変化を正確に測定するために感度を有する。

20

【0032】

加えて、本発明は、本明細書中先に記載した試薬及び方法を使用することによって糖尿病患者における治療コンプライアンスをモニタリングする迅速且つ効率的な手段として使用されて良い。

【0033】

本発明は、更に、検出可能標識に対して結合した結合pan-ヘモグロビン抗体を1種類以上及び既知量の1又は複数のヘモグロビン型及び/又は変異体を含むコントロール製品に関連する。例えば、コントロール製品は、標識されたpan-ヘモグロビン抗体及び既知量の1又は複数のヘモグロビン型又は変異体の例えば、 HbA_0 、 HbF 、及び HbS を含むことができる。本発明のコントロール製品は、フローサイトメーターのために使用されて良い。コントロール製品は、特異的親和性試薬の例えば、1又は複数のヘモグロビン型及び/又は変異体に対する抗体(検出可能標識の例えば、FITC、PE、PE-Tex Red又はPE-Cy5に対して結合している)をも含んで良い。

30

【0034】

コントロール製品の要素は、単一ユニットとしてパッケージングされて良い。単一パッケージ内で、個々の試薬の例えば、結合したpan-ヘモグロビン抗体;既知の型又は量のヘモグロビン型及び/又は変異体親和性試薬は、個別の容器の例えば、バイアル中に含まれて良いかあるいは、予め一緒に混合されていて良い。コントロール製品中の試薬は、再生形態又はエンドユーザーによって適切に再生されるために凍結乾燥形態において提供されていて良い。パッケージングされたコントロール産物は、使用するためそして試薬を保存するための適切な説明書を含んでいて良い。

40

【0035】

本発明の更なる観点は、フローサイトメーターによる赤血球の多色分析のための色補正を確立する試薬及び方法を含む色補正キットを提供する。1超の蛍光試薬(例えば、フルオレセイン及びPE)がフローサイトメーター分析の試料分析において使用される場合、試薬の蛍光スペクトルのオーバーラップにより各々の集団の不正確な測定がもたらされうる

50

。何故なら、試料分析に由来する1つの蛍光スペクトルからの蛍光シグナルが他の蛍光スペクトルに滲んで重なることによる。スペクトルのオーバーラップにより生じた分析のエラーを補正するために、機器を、蛍光シグナルが滲んで重なることによって生じた人工的なポジティブシグナルを除去することが可能な設定にする試薬が使用される。

【0036】

フローサイトメーター上での補正を確立するために、同じ細胞集団に対して直接結合する2以上の試薬が必要とされている。各試薬は、異なるフルオロフォアに対して結合している。本発明の色補正試薬により、グリコフォリンAは第一のフルオロフォアで標識されている。グリコフォリンAはシアロ糖タンパク質であり、それは赤血球系統細胞に対して特異的でありそしてヒト赤血球前駆体細胞～成熟赤血球細胞上に存在する。加えて、赤血球は第二フルオロフォアに対して結合したpan-ヘモグロビン抗体で標識されている。従って、本発明の色補正システムにより、赤血球は2つの異なる赤血球特異的標識、即ち、グリコフォリンAに対して特異的に結合する抗体及びpan-ヘモグロビン抗体で標識されている。これらの試薬を使用することで、赤血球による正確な多色フローサイトメトリーが行われて良い。

10

【0037】

今日のフローサイトメトリーの大部分は、多色システムの分析をできる。加えて、機器及びソフトウェアは5色を越える色分析に使用可能である。これらのシステムにおける色補正は、使用される様々なフルオロクロームに対して個別に結合した試薬を使用することでフルマトリクス補正によって達成されて良い。次いで、ソフトウェアプログラムが各フルオロクロームに関する色補正を確立する。本発明の色補正システムにより、グリコフォリンAに対するモノクローナル抗体は3つの異なる蛍光標識の例えば、FITC、PE、及びPE-Tx Redに対して個別に結合させられている。加えて、pan-ヘモグロビン抗体は、3つの異なる蛍光標識の例えば、PE、PE-Tx Red及びPE-Cy5に対して結合させられている。次いで、赤血球は、選定の結合した抗体により標識されている。例えば、マトリクス色補正を達成するために、次のような、抗体結合体で標識された赤血球が調製されて良い：

20

- 1)グリコフォリンA-FITC + pan-Hb-PE
- 2)グリコフォリンA-PE +pan-Hb-PE-Tx Red
- 3)グリコフォリンA-PE+pan-Hb-PE-Cy5
- 4)グリコフォリンA-PE-Tx Red +pan-Hb-PE-Cy5

30

【0038】

グリコフォリンA抗体及びpan-ヘモグロビン抗体の様々な標識をされたペアを各々含む赤血球の4つの試料は、フローサイトメーターにランして通されそして色補正が測定されて良い。赤血球のための色補正システムは5色以上の分析を伴う使用のために適合されて良い。

【0039】

本発明は、フローサイトメトリーを使用する赤血球の多色分析のための色補正キットも含む。色補正キットと共に、上記色補正試薬がユニットとしてパッケージングされるだろう。ユニット内で、グリコフォリンA標識及びpan-ヘモグロビン抗体は、同じバイアル又は別個のバイアル中に含まれていて良い。キット中の試薬は、再生形態において又はエンドユーザーによる適切な再生のために凍結乾燥されていて良い。そしてまた、キット内には、色補正試薬の使用と保存に関する適切な説明書及び/又はソフトウェアが含まれていて良い。

40

【実施例】

【0040】

本発明の例示となる実施態様

実施例1 - RBC調製

A.RBCの架橋 - 200µLの血液試料を試験管中へとピペティングした。この血液試料に対して、3.0mlの2倍希釈した試薬#1を加えて、この試料を5秒に渡りボルテックスに掛け、そしてローラーミキサーにより35分に渡り血液全体を混合した。この試料を次いで5分

50

に渡り200g、1100rpmで遠心して上清を除去した。

【0041】

B. 架橋したRBCの透過化 - 赤血球を、公知の技術及び試薬を使用することで透過化させることができる。その技術及び試薬は例えば、Van Agthovenらの米国特許第6,534,279(その全体は本明細書中参照によって組み込まれている)に開示されているものである。遠心して上清を取り除いた後、ペレットを3.0mlの10倍希釈試薬#2で再懸濁させ、そして分散させるために10秒に渡り超音波処理し、ボルテックスに掛けてローラーミキサー上で5分に渡り混合した。次いで、試料を5分に渡り200g、1100rpmで遠心して上清を除去した。この点で、試料を最大2週間に渡り冷蔵又は0.5mlのPBS中で再懸濁させたペレットで保存できる。

10

【0042】

C. ブロッキング、安定化及び保存 - もし試料を保存するなら、ペレットを3.0mlの10倍希釈試薬#3中で再懸濁させ、5秒に渡りボルテックスに掛け、そしてローラーミキサー上で1時間以上に渡り(最大で3時間)に渡り混合できうる。次いで、この試料を最大2週に渡り保存しできうる。保存後、遠心により試料を各回3mlのPBSで2回洗浄し、そして10分に渡り、200g、1100rpmで遠心する。遠心後、抗体を結合させるために上清を除去してペレットを0.5mlへとPBSにより懸濁させた。

【0043】

試薬#1 (500ml)

37%ホルムアルデヒド溶液、270ml

500,000MWの硫酸デキストラン、0.5g

20×PBS、25ml

D(+)トレハロース、150g

蒸留水、500 mlにする

pHをHClで5.5にする

20

【0044】

試薬#2(500ml)

クエン酸、10.5 g

10%SDS溶液、15.5ml

D(+)トレハロース、150g

蒸留水、500mlにする

30

【0045】

試薬#3(500 ml)

Tween 20、100ml

D(+)トレハロース、100g

Trizma塩基、3.03g

NaCl、2.90g

蒸留水、500mlにする

HClでpH7.4にする

40

【0046】

実施例2 - マウスIgGイソ型コントロール及び色補正コントロール

この例において、3つのチューブを以下のようにして調製した：

チューブ1: マウスイソ型コントロールチューブを、20µlの調製したRBCと10µlのマウスIgG1-FITC/マウスIgG1-PE(1.1µg:1.1µg)をインキュベートすることによって調製した。図1A~Cは、コントロール製品に関連する1つの散布図及び2つのヒストグラムを含んで成る。図1Aは、側方角(side angle)光散乱に対する前方にゲートをされた赤血球分布を示すドットプロット(logスケール)である。図1Bは、MsIgG1-FITCイソ型コントロールによって測定した際のFL1に関するバックグランド蛍光染色シグナルを描くヒストグラム(logスケール)である。図1Cは、MsIgG1-PEイソ型コントロールによって測定した際のFL2に関するバックグランド蛍光シグナルを描くヒストグラムである(logスケール)。図1B及び1C

50

の両方において、線形解析領域をヒストグラム中に割り当てている。

【0047】

チューブ2及びチューブ3:色補正コントロールチューブを全てのアッセイ型について類似するように調製した。20 μ Lの調製したRBCを個別のチューブにピペティングして入れた。1つのチューブに対してフルオロクロム結合抗体試薬、即ち、pan-HbFITC10 μ lを加え(チューブ2)を加え、そして他のチューブには第2フルオロクロム結合抗体試薬、即ち、グリコフォリンA-PE10 μ lを入れて加えた(チューブ3)。各チューブを5秒に渡りボルテックスに掛け、そして室温で10~15分に渡り攪拌した。各チューブを遠心において3mlのPBSで3回洗浄し、そして各チューブの内容物をPBSにより0.5mlに懸濁した。両チューブの内容物を、色補正試料チューブについて一緒にプールして1.0mlにした。図2Aは、個別に染色してプールした標本に由来する1.1 μ gのPan-HbFITCモノクローナル抗体(FL1)(チューブ2)及び0.1 μ gのグリコフォリン-A-PE抗体(FL2)(チューブ3)で染色した赤血球の分布を示す色補正に関する2色ドットプロットを描く。図2Bは、ヒストグラムの第2ピークを伴う、pan-HbFITCの特異的染色(チューブ2)を描く。図2Cはヒストグラムの第2ピークを伴うグリコフォリン-A-PE(チューブ3)の特異的染色を描く。図2B及び2Cにおいて、線形解析領域は、ヒストグラム中ネガティブ(第1)及びポジティブ(第2)ピークの両方に関して与えている。

10

【0048】

実施例3 - RBC抗体染色

モノクローナル抗体調製物による染色を、例1により調製した20 μ lのRBCと例3A~Dに示す抗体試薬調製物をインキュベートすることによって行った。細胞を3秒に渡りボルテックスに掛け、そして室温で10分に渡りインキュベートした。細胞を遠心により2回洗浄して1mlのPBS中で再懸濁させた。

20

【0049】

実施例3 A - HbA_{1c}RBC(HbA_{1c}/Pan Hb)の検出

全血からRBCを例1に従い調製し、そして10 μ l(1.1 μ g)のpan-Hb-PE及び10 μ l(2.0 μ g)のHbA_{1c}-FITCで染色した。図3AはHbA_{1c}及びpan-Hbを含む(第2象限)並びにpan-Hbのみを含む(第1象限)を含む赤血球の相対分布(%)を伴うドットプロットである。図3Bは、ヒストグラムの正確なピークを伴うpan-HbFITCに関する特異的染色を描く。図3Cは、ヒストグラムの正確なピークを伴うHbA_{1c}の特異的染色を描く。図3B及び3Cにおいて、線形解析領域をネガティブ(第1)及びポジティブ(第2)ピークの両方についてヒストグラム中に与えられてある。

30

【0050】

実施例3B - HbS RBC (HbS/pan-Hb)の検出

鎌型細胞患者に由来する既知数のRBCで「汚染した」正常な全血に由来するImmuno-Trol(登録商標)コントロール製品試料調製物を、上記のように、10 μ l(1.1 μ g)のpan-Hb-PE及び30 μ l(2 μ g)のHbS-FITCを使用することで染色した。図4AはImmuno-Trol(登録商標)細胞についてバックグランド電圧を設定するためにMsIgG-FITC/MsIgG-PEを使用することでイソ型コントロールに関する2色ドットプロットを描く。図4Bは、0.1 μ gのグリコフォリンA-FITCモノクローナル抗体(FL1)及び1.1 μ gのpan-Hb-PEモノクローナル抗体(FL2)で染色した赤血球の分布を示す2色補正に関する2色ドットプロットを描く。図4Cは、2 μ gの抗HbS-FITC及び1.1 μ gのpan-Hb-PE蛍光試薬で染色した赤血球の相対分布(%)によるドットプロットを描く。第2象限における細胞はHbS及びPan Hbを含み、一方で第4象限における細胞はpan-Hbのみを含む。

40

【0051】

実施例3C - Immuno-Trol(登録商標)コントロール製品及び血液RBCにおけるi抗原の検出(i-抗原/HbF)

RBC中のi抗原を既知数の脊髄血液RBCを含む細胞調製物中のHbFを検出することによって評価した。2種類の調製物を、Immuno-Trol(登録商標)コントロール製品及び健全なドナーに由来する抹消血液にそれぞれ1.5%及び0.5%のi抗原含有細胞を含む脊髄血液を注射す

50

ることによって生じさせた。染色を上記のとおり行った。

【0052】

図5A~Cは、コントロール製品に関連する1つの散布図及び2つのヒストグラムを含んで成る。図5Aは、側方角光散乱に対する前にゲートされたImmuno-Trol(登録商標)細胞を示す代表的なドットプロットを示す(logスケール)。図5Bは、MslgG1-FITCイソ型コントロールによって測定した際のFL1に関するバックグランド蛍光を示す(logスケール)。図5Cは、MslgG1-PEイソ型コントロールによって測定した際のFL2に関するバックグランド蛍光を示す(logスケール)。線形分析領域を、図5B及び5Cの両ヒストグラムにおいて与えている。

【0053】

図6A~Bは、2つのヒストグラムを含んで成り、それらはImmuno-Trol(登録商標)細胞における、1.1 μ gのPan-Hb-FITCモノクローナル抗体(FL1)及び0.1 μ gのグリコフォリンA-PEモノクローナル抗体(FL2)で染色したImmuno-Trol(登録商標)細胞の分布を図6A及びBでそれぞれ示す、色補正に関する単一色ヒストグラムを使用する色補正に関連する。線形解析領域を図6A及び6Bの両ヒストグラムにおいて与えている。

【0054】

図7A~Bは、ヘモグロビンの試験アッセイに関連する1の散布図及び1つのヒストグラムを含んで成る。図7Aは、i抗原(FL2)及びHbF(FL1)を含む(第2象限)及びHbFのみを含む(第1象限)細胞の相対分布(%)によるドットプロットを描く。図7Bは、i抗原(第2ピーク)に関する特異的な染色を描く。線形解析領域を、図7Bのヒストグラム中に与えている。

【0055】

実施例3D - 試験試料分析

全血からRBCを実施例1に従って調製して脊髄血液に注射した。血液の試験試料をpan-ヘモグロビン抗体結合体及びi-抗原抗体と反応させた。

【0056】

図8A~Cはコントロール製品に関連する1つの散布図及び2つのヒストグラムを含んで成る。図8Aは、側方角光散乱に対する前方ゲートされたRBC調製物の分布を示す代表的なドットプロットを示す(logスケール)。図8Bは、MslgG1-FITCイソ型コントロールによって測定されたFL1に関するバックグランド蛍光を示す(logスケール)。図8Cは、MslgG1-PEイソ型コントロールによって測定した際のFL2に関するバックグランド蛍光を示す(logスケール)。線形分析領域は、図8B及び8Cのヒストグラム中に与えている。

【0057】

図9A~Cは、色補正及び試験アッセイに関連する3つのヒストグラムを含んで成る。図9Aは、脊髄赤血球を注射され且つ1.1 μ gのpan-Hb-FITCモノクローナル抗体(FL1)で染色された正常な赤血球の分布を示すヒストグラムを描く。図9Bは、0.1 μ gのグリコフォリンA-PEモノクローナル抗体(FL2)で染色した赤血球の分布を示すヒストグラムを描く。図9Cはi抗原で染色した赤血球を示すヒストグラムを描く。小さなホジティブピーク(Pカーソル)は、i抗原について特異的に染色された細胞を示す。線形解析領域を全てのヒストグラムについて与えている。

【0058】

実施例4フローサイトメーター上での分析

本研究を単一のレーザー-Beckman Coulter XLフローサイトメーターを使用することで行っている一方で、それらを他のフローサイトメーターを使用することで行うこともできる。適切な機器性能を確保するために適切な量の産物をランした後、当該フローサイトメーターの電圧をセットするために例2に従い調製したチューブ1をバックグランド蛍光及び非特異的結合について分析した。また例2に従い調製した、チューブ2及び3の組合せを色補正コントロールとして使用した。チューブ4を、例1に従い調製しそして例3に供した一般的な手順に従い抗体結合体で染色したRBCを使用することで調製した。チューブ4を注目のHbを有するRBCの%ホジティブを測定するために2色試料として使用した。この試料のフローサイトメーター分析の結果を図8A~9Cにプロットし、それらはpan-ヘモグロビ

10

20

30

40

50

ン抗体及び抗*i*-抗体で標識された脊髄赤血球を注射した正常な血液試料の2色フローサイトメトリー分析の散布図及びヒストグラムである。

【0059】

図8A~Cは、コントロール製品に関連する1つの散布図及び2つのヒストグラムを含んで成る。図8Aは、側方角光散乱に対する前方にゲートされたRBC調製物の分布を示す代表的なドットプロットを描く(logスケール)。図8Bは、MslgG1-FITCイソ型コントロールによって測定した際のFL1に関するバックグランド蛍光を描く(logスケール)。図8Cは、MslgG1-PEイソ型コントロールによって測定した際のFL2に関するバックグランド蛍光を描く(logスケール)。線形解析領域を、図8B及び8Cのヒストグラムに与えている。

【0060】

図9A~Cは、色補正及び試験アッセイに関連する3つのヒストグラムを含んで成る。図9Aは、脊髄赤血球を注射され且つ1.1µgのpan-Hb-FITCモノクローナル抗体(FL1)で染色した正常細胞の分布を示すヒストグラムを描く。図9Bは、0.1µgのグリコフォリンA-PEモノクローナル抗体(FL2)で染色した赤血球の分布を示す。図9Cは、*i*抗原で染色した赤血球を示すヒストグラムを描く。小さなホジティブピーク(Pカーソル)は、*i*抗原について特異的に染色した細胞を示す。線形解析領域を全てのヒストグラムに与えている。

【0061】

本明細書は、本明細書中に引用された引用文献から理解され、当該引用文献は、その全体を参照によって組み込まれている。本明細書内の実施態様は本発明の実施態様の例を提供し且つ本発明を限定するものではない。当業者は、多くのほかの実施態様は本発明によって包含され、そして説明及び例としてのみ捉えられ、本発明の真の範囲及び精神は特許請求の範囲によって示されることを理解するだろう。

【図面の簡単な説明】

【0062】

図1A~3Cは、pan-ヘモグロビン抗体及び抗-HbA_{1c}抗体で標識した赤血球の2色フローサイトメトリー分析によるドットプロット及びヒストグラムを描く。

【図1】A~Cは、コントロール産物に関連する1つの散布図及び2つヒストグラムを含んで成る。

【図2】A~Cは、色補正のための本発明の試薬を使用することに関連する1つの散布図及び2つのヒストグラムに関連する。

【図3】A~Cは、pan-Hb-FITC(FL1)及び抗HbA_{1c}-PE(FL2)蛍光試薬により染色された非服従糖尿病患者(non-compliant diabetic patient)(1型)に由来する赤血球に関連する1つの散布図及び2つのヒストグラムを含んで成る。

【図4】図A~Cは、pan-ヘモグロビン抗体及び抗-Sヘモグロビン抗体で標識した鎌状赤血球患者に由来するRBCを含む細胞調製物(Immuno-Trol(登録商標)フローサイトメトリーコントロール製品、Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA)のフローサイトメトリー分析に関連する3つの散布図を含んで成る。図5A~7Bは、2つの細胞調製物の2色フローサイトメトリー分析のドットプロット及びヒストグラムである。第1の細胞調製物は、脊髄赤血球を注射されそしてpan-ヘモグロビン抗体で標識されそして肺性赤血球によって発現される*i*抗原に対して結合する抗体(抗*i*抗原抗体)で標識されているImmuno-Trol(登録商標)コントロール製品(Beckman Coulter, Inc.)であり、そして第2の細胞調製物は、脊髄赤血球を注射されており且つpan-ヘモグロビン抗体及び抗*i*抗原抗体で標識されている正常赤血球である。

【図5】A~Cは、コントロール製品に関連する1つの散布図及び2つのコントロール産物に関連する。

【図6】A~Bは、1.1µgのpan-Hb-FITCモノクローナル抗体(FL1)及び0.1µgのグリコフォリンA-PEモノクローナル抗体(FL2)で染色したImmuno-Trol(登録商標)細胞の分布を示す色補正に関する単色ヒストグラムを使用する色補正に関連する。

【図7】A~Bは、ヘモグロビンの試験アッセイに関連する1つの散布図及びヒストグラムを含んで成る。図8A~9Cは、pan-ヘモグロビン抗体及び抗*i*抗原抗体で標識した脊髄赤

10

20

30

40

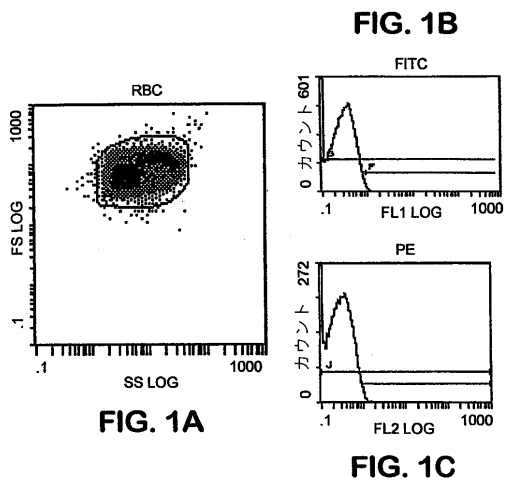
50

血球を注射した正常血液試料の2色フローサイトメトリー分析の散布図及びヒストグラムである。

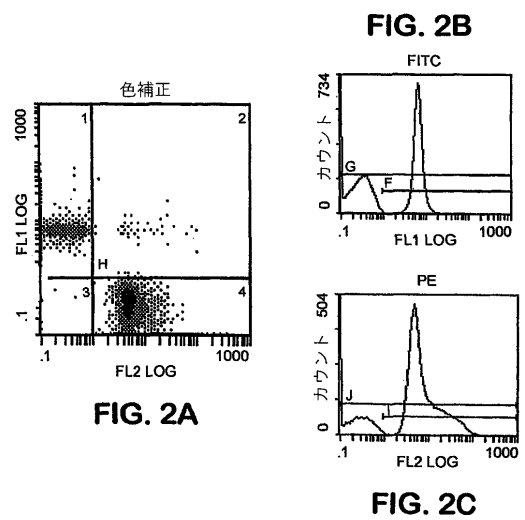
【図8】A~Cは、コントロール産物に関連する1つの散布図及び2つのヒストグラムを含んで成る。

【図9】A~Cは、色補正及び試験アッセイに関連する3つヒストグラムを含んで成る。

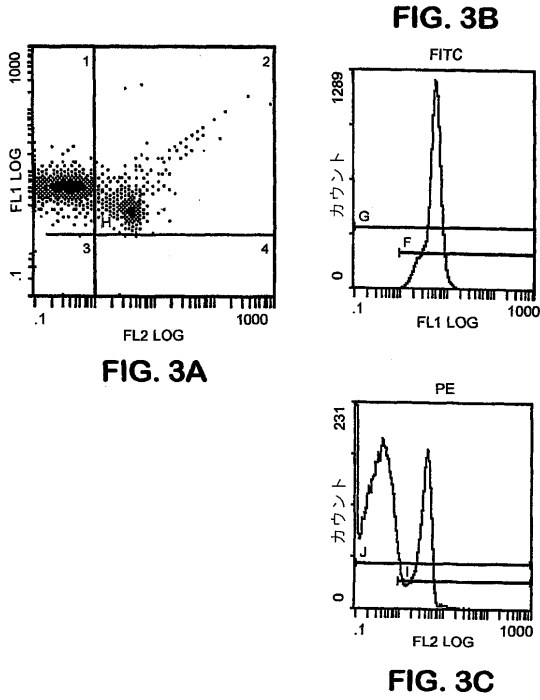
【図1】



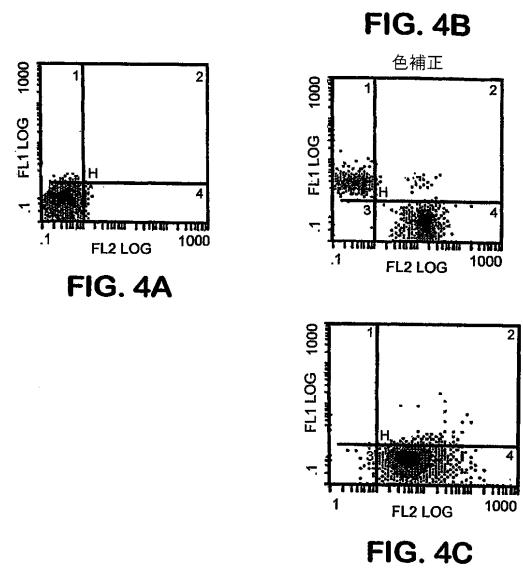
【図2】



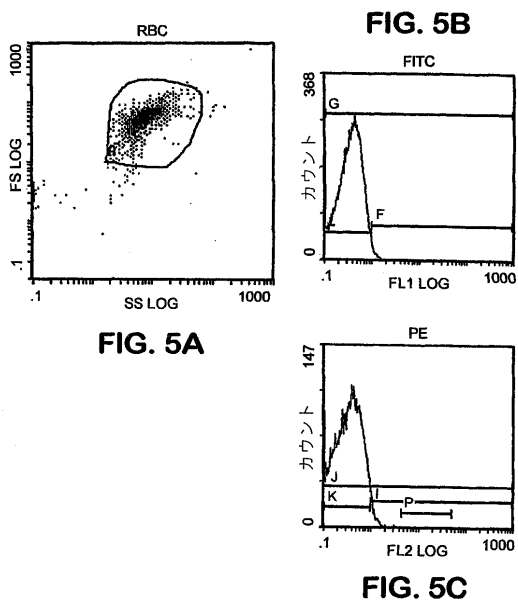
【 図 3 】



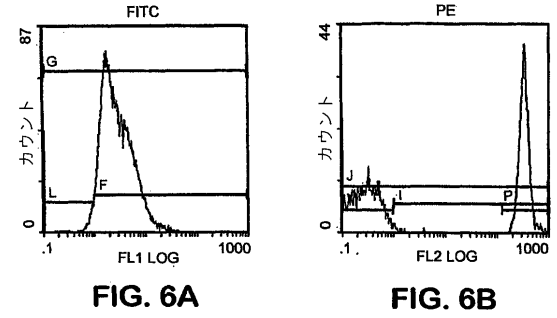
【 図 4 】



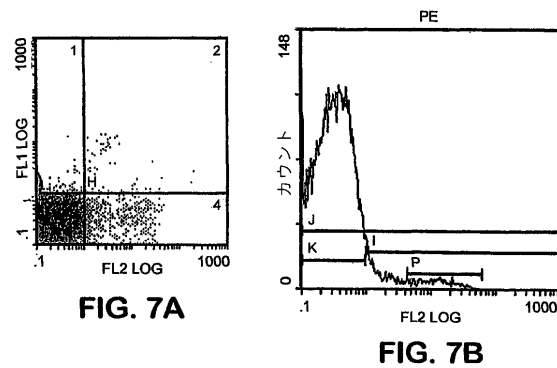
【 図 5 】



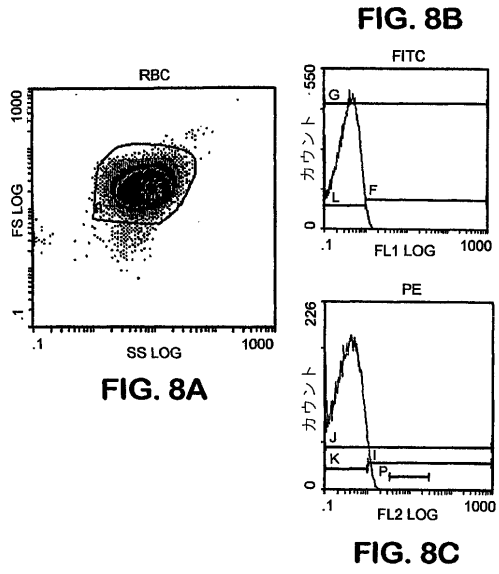
【 図 6 】



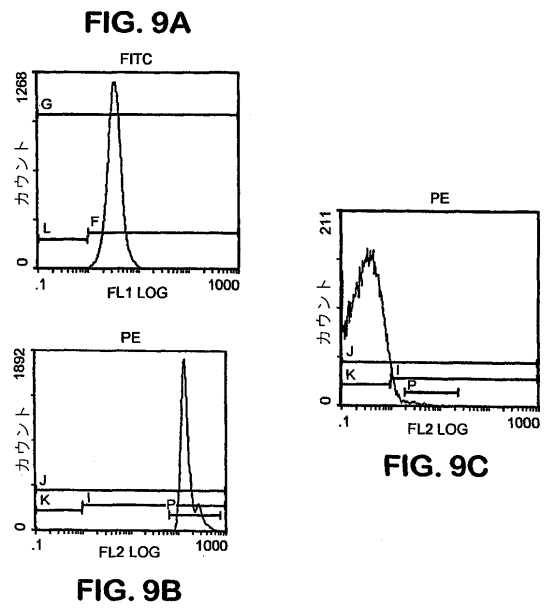
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/10633
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/53, 33/543 US CL : 436/ 501, 514, 518; 435/7.1, 7.93, 7.94, 7.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/ 501, 514, 518; 435/7.1, 7.93, 7.94, 7.5 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,759,866 A (MACHIDA et al.) 02 June 1998 (02.06.1998), see entire document.	1-16
X	STOELLNER D. Membrane-immobilized haptoglobin as affinity matrix for a hemoglobin A1C immunosensor. Analytica Chimica Acta. 16 October 2002, Vol. 470, No. 2, pages 111-119, see entire document.	1-11, 13, 15, and 16
---		-----
Y		12 and 14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 16 May 2005 (16.05.2005)		Date of mailing of the international search report 25 MAY 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Gailene R. Gabel <i>Gailene R. Gabel</i> Telephone No. (571) 272-1600 <i>628</i>

 フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74) 代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72) 発明者 パーシュテイン, アレクサンダー

アメリカ合衆国, フロリダ 33024, ペンブローク パインズ, ノースウエスト トゥウェン
ティーファースト コート 7473

(72) 発明者 バン アグトベン, アンドレア

フランス国, エフ - 13009 マルセイユ, アブニユ ジョセフ クロベット 15

(72) 発明者 ルーカス, フランク ジェイ.

アメリカ合衆国, フロリダ 33432, ボカ ラトン, ベスル ブールバード 2143

(72) 発明者 ラベリーノ, エンリケ

アメリカ合衆国, フロリダ 33126, マイアミ, ノースウエスト セブンス ストリート 8
045, # 411

F ターム(参考) 2G054 AA07 AB05 EA03 GB02

4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 EA50 FA74

专利名称(译)	血红蛋白的差异测量		
公开(公告)号	JP2006524820A	公开(公告)日	2006-11-02
申请号	JP2006509756	申请日	2004-04-07
[标]申请(专利权)人(译)	贝克曼团雷开球德		
申请(专利权)人(译)	Beckman Coulter公司, 股份有限公司雷开球德		
[标]发明人	バーシュテインアレクサンダー バンアグトベンアンドレア ルーカスフランクジェイ ラベリーノエンリケ		
发明人	バーシュテイン,アレクサンダー バン アグトベン,アンドレア ルーカス,フランク ジェイ. ラベリーノ,エンリケ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 G01N33/531 G01N21/78 G01N33/555 G01N33/72		
CPC分类号	G01N33/721 G01N33/555		
FI分类号	G01N33/53.K C07K16/18 G01N33/531.A G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/AB05 2G054/EA03 2G054/GB02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 西山雅也		
优先权	10/423544 2003-04-25 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明使用与可检测标记物结合的泛血红蛋白抗体和与特异性结合血红蛋白类型和/或变体的可检测标记物连接的一种或多种亲和试剂。与用于分析样品中的血红蛋白的试剂有关。本发明还涉及使用所述试剂的流式细胞术方法。

