

(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2006-126202

(P2006-126202A)

(43) 公開日 平成18年5月18日(2006.5.18)

| (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 N        | 4 H O 4 5   |
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/53 U        |             |
| CO 7 K 16/18 (2006.01)  | GO 1 N 33/543 5 7 5   |             |
|                         | GO 1 N 33/543 5 4 1 B |             |
|                         | CO 7 K 16/18          |             |

審査請求 有 請求項の数 6 O L 外国語出願 (全 18 頁)

|              |                              |          |                      |
|--------------|------------------------------|----------|----------------------|
| (21) 出願番号    | 特願2005-315078 (P2005-315078) | (71) 出願人 | 591003013            |
| (22) 出願日     | 平成17年10月28日 (2005.10.28)     |          | エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  |
| (31) 優先権主張番号 | 102004052729.6               |          | F. HOFFMANN-LA ROCH  |
| (32) 優先日     | 平成16年10月30日 (2004.10.30)     |          | E AKTIENGESELLSCHAFT |
| (33) 優先権主張国  | ドイツ (DE)                     |          | スイス・シーエイチー4070バーゼル・  |
|              |                              |          | グレンツアーヘルストラツセ124     |
|              |                              | (74) 代理人 | 100091096            |
|              |                              |          | 弁理士 平木 祐輔            |
|              |                              | (74) 代理人 | 100096183            |
|              |                              |          | 弁理士 石井 貞次            |
|              |                              | (74) 代理人 | 100118773            |
|              |                              |          | 弁理士 藤田 節             |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体を検出する際に、アレイ試験方式においてブランク値を低減するための免疫複合体特異的抗体

## (57) 【要約】

【課題】アレイ方式でのイムノアッセイを用いてサンプル中の特定の免疫グロブリンクラスの抗原特異的抗体を測定する方法の提供。

【解決手段】本発明は、アレイ方式でのイムノアッセイを用いてサンプル中の特定の免疫グロブリンクラスの抗原特異的抗体を測定する方法であって、ここで、検出しようとする抗体と特異的に結合することができる種々の抗原をそれぞれについて含む種々の結合パートナー-B<sub>n</sub><sub>x</sub>が支持体上の異なる別個の領域に結合されており、該方法は、該支持体を、該サンプルと、標識を保持する結合パートナー-B<sub>2</sub>とともにインキュベートし、その後、そのそれぞれの別個の領域における標識を検出することによるものであり、かつ、B<sub>2</sub>が、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合するものである方法に、関する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アレイ方式でのイムノアッセイを用いてサンプル中の特定の免疫グロブリンクラスの抗原特異的抗体を測定する方法であって、ここで、検出しようとする抗体と特異的に結合することができる種々の抗原をそれぞれについて含む種々の結合パートナー $B_{n,x}$ が支持体上の異なる別個の領域に結合されており、該方法は、該支持体を、該サンプルと、標識を保持する結合パートナー $B_2$ とともにインキュベートし、その後、そのそれぞれの別個の領域における標識を検出することによるものであり、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合する結合パートナーを $B_2$ として使用するが、その固相に非特異的に結合する免疫グロブリンは検出されないかまたは取るに足らない程度にしか検出されないことを特徴とする、前記方法。 10

## 【請求項 2】

$B_2$ が抗体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

$B_2$ がネオエピトープ特異的抗体である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

$B_2$ が、少なくとも2個、好ましくは少なくとも4個、特に好ましくは10個以上のパラトープを有する低親和性を示す抗体である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

$B_{n,x}$ を固相に結合させるための特異的結合システムとして、ビオチン/ストレプトアビジン、ビオチン/アビジン、ハプテン/抗ハプテン、抗体のFcフラグメント/このFcフラグメントに対する抗体、または糖鎖/レクチンが使用されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。 20

## 【請求項 6】

結合パートナー $B_2$ が、化学発光物質、蛍光物質または放射性物質で標識されている、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

アレイ方式でのイムノアッセイにおいてブランク値を低減する方法であって、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合する結合パートナーを $B_2$ として使用する、前記方法。 30

## 【請求項 8】

標識を保持し、かつ、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合する結合パートナー $B_2$ の、抗原特異的抗体を検出するためのアレイ方式でのイムノアッセイにおいてブランク値を低減するための使用。

## 【請求項 9】

$B_2$ が、ネオエピトープ特異的抗体であるか、または少なくとも2個、好ましくは少なくとも4個、特に好ましくは10個以上のパラトープを有する低親和性の抗体である、請求項 8 に記載の結合パートナー $B_2$ の使用。

## 【請求項 10】

アレイ方式でのイムノアッセイを用いてサンプル中の特定の免疫グロブリンクラスの抗原特異的抗体を測定するための試験キットであって、種々の結合パートナー $B_{n,x}$ を異なる別個の領域に結合させた支持体、個別容器に入った検出試薬、ならびに、標識を保持し、かつ、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合する結合パートナー $B_2$ を含む、試験キット。 40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、アレイ方式でのイムノアッセイを用いてサンプル中の特定の免疫グロブリンクラスの抗原特異的抗体を測定する方法であって、ここで、検出しようとする抗体と特異的に結合することができる種々の抗原をそれぞれについて含む種々の結合パートナー $B_{n,x}$  50

が支持体上の異なる別個の領域に結合されており、該方法は、該支持体を、該サンプルと、標識を保持する結合パートナー $B_2$ とともにインキュベートし、その後、そのそれぞれの別個の領域における標識を検出することによるものであり、かつ、 $B_2$ が、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合する結合パートナーを $B_2$ として使用するが、その固相に非特異的に結合するものである方法に関する。

#### 【0002】

特に、本発明は、抗原特異的抗体を検出するためのアレイ方式でのイムノアッセイにおいて、非特異的に結合した非抗原特異的抗体に起因するブランク値を低減する方法に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

哺乳類生物の免疫系は、異物の導入に対する反応として免疫グロブリンとも呼ばれる抗体を産生する。これらは抗原とも呼ばれる異物に対する防衛のために利用される。これらの免疫グロブリンは5つの異なるクラスに分類することができる。M、G、A、EおよびDクラスの免疫グロブリンに区別される。これらの5つの免疫グロブリンクラスは、それぞれ、 $\mu$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 、または  $\epsilon$  と呼ばれる重鎖の組成において異なっている。

#### 【0004】

各免疫グロブリンクラスは、生物体内で異なる働きをする。Mクラスの免疫グロブリンは、いわゆる一次免疫である抗原との最初の接触時に生じる。しかしながら、この免疫グロブリンの濃度は、感染が進行するにつれて急速に減少する。Gクラスの免疫グロブリンは、まず、一次免疫期間にゆっくりと形成されるが、同じ抗原による2回目の感染が起こったときには大量に生じる。Aクラスの免疫グロブリンは生物の粘膜面に見られ、そこで起こる防御プロセスを担っている。Eクラスの免疫グロブリンは、主として、アレルギー反応を担っている。Dクラスの免疫グロブリンの正確な機能については、現在に至るまで知られていない。

#### 【0005】

個々の免疫グロブリンクラスは血液中に全く異なる濃度で存在している。例えば、Gクラスの免疫グロブリン(IgG)は、ヒト血清中に最も多く存在するクラスであり、約75%の割合で存在し、これは血清含量8~18mg/mlに相当する。2番目に高い頻度で存在する免疫グロブリンがIgAであり、その平均血清濃度は0.9~4.5mg/mlである。Mクラスの免疫グロブリンは0.6~2.8mg/mlの濃度で存在しており、クラスDの免疫グロブリンは0.003~0.4mg/mlの濃度で存在している。IgE抗体は存在する割合が最も低く、血清中0.02~0.05  $\mu$ g/mlの濃度で生じるにとどまる。

#### 【0006】

多くの疾患の示差的診断では、特定の抗原に対して特異的な、1以上のまさに特定の免疫グロブリンクラスの抗体を検出することが重要である。ウイルス、細菌および寄生虫感染の場合では、クラス特異的な抗体検出によって、または特定の免疫グロブリンクラスの存在を除外することによって(例えば、IgGおよびIgA抗体を検出するが、IgM抗体は検出しない)、満足のいく診断が初めて保証される。新たなまたは急性の感染と以前からある感染とを識別するためにも、また、感染の経過を臨床的にモニターするためにも、これはとりわけ重要である。抗体のクラス特異的な検出は、HIV、A型肝炎、B型肝炎、トキソプラズマ症、風疹およびクラミジア感染症にとって特に重要である。特定の抗原に対して特異的な抗体のクラス特異的検出は、防御抗体の力価を測定する際にも、また免疫化が成功したかどうかを確かめるためにも必要である。

#### 【0007】

ある抗原に対して特異的な特定のクラスの抗体を検出するための種々の方法が、従来技術において記載されている。すなわち、特定のクラスの抗原特異的抗体は、その特異的抗体を、特異的抗原でコーティングされた固相と結合させることによってしばしば検出される。抗原に対して特異的であり、かつ、今や固相に結合されている免疫グロブリン(Ig)は、特定のクラスのヒトIgに対して特異的に向けられる抗体を、検出しようとするIg分子と

10

20

30

40

50

結合させることによって、検出される。ヒトIgに対して向けられた抗体は、検出に利用される標識を伴って提供される。しかしながら、このような試験手順は、ヒトIgに対して向けられたクラス特異的標識抗体との反応の前の洗浄によって、結合していない非特異的なIgが全て除去される場合にのみ有効である。よって、例えば、サンプル中の特異的なIgG分子を検出する場合、異なる程度でサンプル特異的に吸収し、かつ固相と非特異的に結合することができる比較的多量(4~20mg/ml)の非特異的なIgGが存在する。IgGに対する検出抗体を使用すると、これらの非特異的に結合した免疫グロブリンも認識され、結合される。このことにより、バックグラウンドシグナルは上昇し、感度は低下することとなる。

#### 【0008】

これらのバックグラウンドシグナルを低減する1つの方法が、免疫グロブリンの非特異的結合を回避するために固相を修飾すること、そして、免疫グロブリンが固相と結合しないようにすることも意図した特殊なバッファー添加剤(例:ヒドロゲル(商標)固相(Perkin Elmer)、Fast(商標)スライドガラス(Schleicher & Schuell)、界面活性剤、カオトロピック塩)を使用することである。固相の修飾は労力を要し、また、費用もかかる。さらに、バッファー添加剤が一部の抗体の反応性を低下させ、その結果として、シグナルを低減する可能性があることが明らかになってきた。特に、場合により反応槽における異なる試験方式での複数の特定の試験を含むアレイ方式でのイムノアッセイのような小型試験系の場合においては、非特異的に結合した免疫グロブリンによって生じるバックグラウンドシグナルがブランク値を上昇させ、それにより特定の免疫グロブリンクラスの特異的抗体を検出することがさらに困難になる。そのため、例えば、ある種の界面活性剤を添加することで抗体の非特異的結合を抑制することはできるが、その同じ界面活性剤が同じアレイ系での別の試験においては効果がないか、場合によっては逆効果である可能性がある。

#### 【0009】

イムノアッセイにおけるバックグラウンドシグナルを低減するさらなる可能性としては、補体第1成分のサブユニットである凝固因子C1qの使用が、EP0222146B1で開示されている。この場合においては、支持体に結合されたそのタンパク質C1qを用い、タンパク質C1qと結合した免疫複合体が固相を分離することにより体液から分離されるという体外免疫吸着を用いることによって、*in vivo*で血液から循環免疫複合体を選択的に除去する。US5698449A1では、血液から免疫複合体を選択的に除去し、かつ、免疫複合体を検出し、定量するためのC1qの断片が開示されている。さらに、US4062935A1では、リウマチ因子またはC1qをサンプルへ添加し、そして生じた免疫複合体と結合させ定量することが記載されている。しかしながら、ここに記載する従来技術は、アレイ方式でのイムノアッセイへの適用は何ら示していない。

#### 【0010】

アレイ方式でのイムノアッセイの固有の特徴は固相である。このような方法では、固相の規定された別個の領域を含む局在試験領域であって、好ましくは、不活性領域により他の試験領域と空間的に分離された局在試験領域から、固相が構成されていることが好ましい。スポットとして規定されるこれらの局在試験領域は、好ましくは、直径10 $\mu$ m~1cm、特に好ましくは、直径100~200 $\mu$ mを有する。アレイシステムとも呼ばれるいくつかの試験領域を有する固相が好ましい。このようなアレイシステムは、例えば、EkinsおよびChu(Clin. Chem. 37 (1995), 1955-1967)、ならびに、米国特許第5,432,099号、第5,516,635号および第5,126,276号に記載されている。アレイシステムには、1つのサンプルからの複数の分析物の測定を同時に行うことができるという利点がある。従って、試験領域に抗原特異的抗体のような結合パートナーを複数適用することが可能である。これらのアレイシステムの固相は、EP0939319(Hornauerら)に開示されているように、ストレプトアビジンまたはアビジンでコーティングすることが好ましい。サンプル成分、特に、非特異的IgGは、このような固相全てと結合する。この場合、バックグラウンドシグナルを低減するためのユニバーサルバッファー添加剤を使用することはできず、個々の結合パートナーそれぞれにまさに特定のバッファー添加剤が必要となるため、多大な労力を払わない限り不可能である。ある結合パートナーの場合において好ましい効果があるバッファー添加剤も、

他の結合パートナーに対しては悪影響を与えるかもしれない。数多くの異なる結合パートナーに対して固相を修飾することも非常に難しい。そのため、アレイ固相上で数個～多数の異なる試験を組み合わせる場合、ブランク値を最適化するために、上記の方法を実行可能な労力を持って利用することはできない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

よって、抗原特異的抗体を検出するためのイムノアッセイをアレイ方式で実施するための、従来技術の不利益を大幅に回避し、特に、非特異的に結合した免疫グロブリンに起因するバックグラウンドシグナルを低減する方法を開発することが本発明の目的であった。

10

【課題を解決するための手段】

【0012】

この目的は、アレイ方式でのイムノアッセイを用いてサンプル中の特定の免疫グロブリンクラスの抗原特異的抗体を測定するための方法であって、ここで、検出しようとする抗体と特異的に結合することができる種々の抗原をそれぞれについて含む種々の結合パートナー $B_{n_x}$ が支持体上の異なる別個の領域に結合されており、該方法が、該支持体を、該サンプルと、標識を保持する結合パートナー $B_2$ とともにインキュベートし、その後、そのそれぞれの別個の領域における標識を検出することによるものであり、その $B_2$ が、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合するものである本発明の方法により、達成される。

20

【0013】

驚くべきことに、本発明の $B_2$ を使用することにより、アレイ方式でのイムノアッセイのスポットにおいて、特定の免疫グロブリンクラスの抗原特異的抗体に対する高い感度が得られることが分かった。 $B_2$ の本発明の使用により、主として、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体の特異的結合が起こる。これに関して、 $B_2$ は、好ましくは、スポット上でより密に結合した、アレイ方式でのイムノアッセイの抗原特異的抗体を認識するが、固相と非特異的に結合した免疫グロブリンは検出されないか、ごくわずかな程度しか検出されない。

【0014】

本発明の方法は、以下の工程を含む：

30

- その各々が検出しようとする抗体と特異的に結合することができる種々の抗原 $B_{n_x}$ を含む種々の別個の領域上のコーティングされた試験領域を有するアレイ試験支持体を提供する工程、
- 該試験領域を、好ましくは抗原特異的抗体である検出しようとする分析物を含むサンプルとともにインキュベートする工程、
- 過剰の免疫グロブリンを除去する工程、
- 標識を保持し、かつ、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体とだけ特異的に結合する結合パートナー $B_2$ とともに、インキュベーションする工程、および
- 検出しようとする分析物と結合している結合パートナー $B_2$ を検出する工程。

【0015】

40

本発明のもう1つの主題は、抗原特異的抗体を検出するためのアレイ方式でのイムノアッセイにおいてブランク値を低減するための、標識を保持し、かつ、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合する結合パートナー $B_2$ の使用である。

【0016】

本発明の方法においては、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合する抗体を、結合パートナー $B_2$ として使用することが好ましい。その抗体は、測定しようとする抗原特異的抗体に対して1個、好ましくは数個の結合部位（パラトープ、抗原決定基、または結合部位とも呼ばれる）、すなわち、測定しようとするIgG抗体と免疫学的に特異的に反応する構造物を、含有する。 $B_2$ は、好ましくは、アレイ方式での

50

イムノアッセイのスポットに高密度で存在している、特異的に結合した、凝集および/またはオリゴマー化した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と結合する。主として単独で存在し、まばらに分布する、非特異的に固相と結合した抗体は、 $B_2$ によって検出されないか、または取るに足らない程度しか検出されない。

#### 【0017】

免疫グロブリンを検出するための免疫複合体特異的抗体の使用は、従来技術において何度も記載されている。免疫複合体特異的抗体は、好ましくは、単独の免疫グロブリンとは結合しないが、凝集またはオリゴマー化した免疫グロブリンと結合するリウマチ因子様抗体である。EP1098198(Bertiら)は、酵素イムノアッセイにおいてヒトIgG抗体を定性的および定量的に測定するための方法に関する。この場合には、特定の抗原が結合したヒトIgG抗体と特異的に結合するモノクローナル抗体が使用されている。抗原が特異的抗体と結合すると、新たなエピトープまたは結合部位(ネオエピトープと呼ばれる)が形成される。しかしながら、この文献に記載の方法においては、IgG分子との選択的な結合がシグナルの消失と関係していることに留意されたい。さらに、自動化システム、例えば、特に、アレイ方式でのイムノアッセイに必要な自動化システムへの適用は示されていない。この方法においては、固相と非特異的に結合した抗体に起因するバックグラウンドシグナルの低減については記載されていない。

10

#### 【0018】

本発明の方法においては、抗原特異的抗体との結合に対して低い親和性を有する抗体を $B_2$ に使用することが好ましい。エピトープに対する抗体の親和性は、抗体の各抗原結合部位と各エピトープとの間の非共有結合的相互作用全体の強度として定義される。低親和性を有する抗体は弱く結合し、急速に解離するが、一方、高親和性抗体はより強く結合し、長期間にわたり結合し続ける。例えば、多数の反復した抗原決定基を有する複合抗原と数個の結合部位を有する相補的抗体との場合のように、結合部位における親和性が、抗原抗体相互作用の真の強度を常に反映するわけではない。ある部位での抗原と抗体の抗原結合部位(またはエピトープ)との間の相互作用が、同じ抗体の第2の抗原結合部位において、相互作用パートナーの架橋を引き起こし得る反応の可能性を高める。多価抗体と抗原との間のこのような多重相互作用の強度はアビディティと呼ばれる。例えば、五量体の免疫グロブリンIgMの場合、高いアビディティが低親和性を補う。本発明の方法においては、相互に架橋している免疫グロブリンIgMまたはIgG免疫グロブリンのような、複数のパラトープ、すなわち、少なくとも2個、好ましくは少なくとも4個、特に好ましくは10個以上のパラトープを有する、抗原特異的抗体に対して低親和性を有する抗体を使用することが好ましい。この例としては、通常IgM分子から構成されており、まれにはIgG、IgAおよびIgE分子からも構成されているリウマチ因子がある。リウマチ因子は抗体のFc部分と反応する。

20

30

#### 【0019】

平均的な当業者であれば、結合パートナー、好ましくは抗体の、親和性の値は、Langmuirのモデルによって定義される親和性係数によって決定できることは分かるであろう。非常に高い親和性の親和性係数は約 $10^{-9} \sim 10^{-11}$ であり、中程度の親和性では約 $10^{-8}$ であり、低い親和性では約 $10^{-7}$ であり、非常に低い親和性では約 $10^{-6}$ である。本発明の結合パートナー $B_2$ は、低い親和性を有し、その親和性係数は約 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ であるが、この範囲は分析試験において反応により決定されたものである。

40

#### 【0020】

結合パートナー $B_2$ であるこのような低親和性抗体を使用した場合には、 $B_2$ はスポット上で密に結合したアレイ方式でのイムノアッセイの抗原特異的抗体だけを認識する。まばらに不均一分布する、固相と非特異的に結合された免疫グロブリンは、検出されないか、取るに足らない程度にしか検出されない。

#### 【0021】

例えばサンプルが非常に低濃度であるために、検出しようとする特異的に結合した抗体がスポットに特定の密度で存在していない場合は、抗原が特異的に結合した抗体と特異的

50

に結合する抗体を、 $B_2$ に使用することができる。抗原が特異的抗体と結合すると、新たなエピトープまたは結合部位（ネオエピトープと呼ばれる）が明らかに形成される。抗原が結合した抗体に対するこのような抗体は、例えば、EP1098198で開示されている。本発明の場合は、 $B_2$ が、抗原特異的に結合した抗体と結合することにより、ネオエピトープが見出される。固相と非特異的に結合する抗体の場合にはネオエピトープ特異的な結合は形成されず、アレイ方式でのイムノアッセイのスポットに結合する抗原特異的抗体の場合にのみ、それが形成される。

#### 【0022】

本発明の方法においては、好ましくは、抗原特異的抗体と結合させるために、 $B_2$ として抗体フラグメントを使用することもできる。抗体のフラグメント化は、当業者に公知であり、従来法により実施される。これらの抗体フラグメントのそれらの有用性による選択は、完全抗体について記載されている方法と同様に行われる。抗体フラグメントは、特定のタンパク質と選択的に反応することができる、タンパク質分解性切断および/または組換え生成した、抗体分子の構成要素からなる。タンパク質分解性切断したフラグメントおよび/または組換え生成したフラグメントの例としては、Fab、 $F(ab')_2$ 、Fab'、FvならびにペプチドリンカーとV[L]および/またはV[H]ドメインを含有する一本鎖抗体(scFv)がある。ScFvは共有結合または非共有結合して、2個以上の結合部位を有する抗体を生じ得る。本発明はまた、ポリクローナルもしくはモノクローナル抗体、または抗体の他の精製調製物および組換え生成抗体も包含する。

#### 【0023】

本発明の方法においては、モノクローナルヒト抗体<H-Agg.-IgG>M3.022.5-IgM-Digを $B_2$ として使用することが好ましい。IgM免疫グロブリンクラスのこの抗体は、リウマチ抗体の一般的な種類の特性を有している。すなわち、この抗体は、アレイ方式でのイムノアッセイのスポット上の高密度に集中した抗原特異的抗体しか認識しないため、抗原特異的に結合した免疫グロブリンクラスIgGの抗体と、好ましくは、強く結合する。抗体<H-Agg.-IgG>M3.022.5-IgM-Digの固有の特徴は、その抗原に対して特異的ではないアレイの固相に非特異的に結合する、ブランク値を生じる免疫グロブリンを認識しないか、ごくわずかにしか認識しないことである。<H-Agg.-IgG>M3.022.5-IgM-Digを使用することにより、アレイ上のバックグラウンドシグナルを大幅に低減し、あらゆるサンプルにおいてそれを一定水準に合わせられる。

#### 【0024】

さらに、マウス、ヒツジまたは他の種に由来する免疫グロブリンクラスIgMまたはIgGのモノクローナル抗体(MAB)も $B_2$ として使用することができる。これらは、当業者には公知である。いかなる場合であれ、抗原特異的に結合した抗体だけを認識し、一方、固相と非特異的に結合している抗体を認識しない限りは、種々の種由来のポリクローナル抗体(PAB)も使用することができる。

#### 【0025】

よって、本発明のもう1つの主題は、アレイ方式でのイムノアッセイにおいてブランク値を低減する方法であって、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合する結合パートナーを $B_2$ として使用することを特徴とする方法である。

#### 【0026】

抗体 $B_2$ の普遍的な使用により、アレイ固相上で数個～多数の異なる試験を組み合わせることが可能になる。これに関しての重要な利点は、簡単で普遍的なバッファー組成しか必要でないという点である。本発明の実施例2では、間接試験方式の2つの試験を高感度サンドイッチアッセイであるTSH試験と組み合わせている。TSH(甲状腺刺激ホルモン)は、甲状腺機能の調節に関与するホルモンである。サンドイッチ方式でTSHを検出する場合には、この抗原に対して向けられた標識抗体を使用する。

#### 【0027】

TSH試験は、感度が強く要求される試験である。第三世代の試験では最大10～14Mの濃度を検出することができる。この高い感度はバックグラウンドシグナルによって大きく影響

10

20

30

40

50

を受けるので、バックグラウンドシグナルは可能な限り低く、好ましくは、0である必要がある。バックグラウンドシグナルが上昇すると、低濃度のものとバックグラウンドとをモはや区別できなくなり、感度が失われる。よって、TSH試験は、ブランク値を最適化するための理想的な量測定法である。

**【0028】**

試験手順においては、モノクローナル抗体<H-IgG PAN>M-R10Z8E9-IgG-DigのようなIgGに対する抗体が、結合パートナー $B_2$ として使用される。TSH試験において、ならびにスポットを載せなかったポリスチレン支持体の対照部位において、この抗体を用いて高いバックグラウンドシグナルが測定された。さらに、陰性対照および負の干渉サンプルでは、2つの間接試験方式Jo-1およびSc170においてこの抗体によりさらに高いバックグラウンドシグナルが生じた。

10

**【0029】**

抗体<H-IgG PAN>M-R10Z8E9-IgG-Digは、種々の会社から入手できる市販の抗ヒトIgG抗体の一例である。例えば、パーミンガム大学からのMAB R10Z8E9はあらゆるサブクラスの抗ヒトIgGを認識する。さらに、マウス由来のあらゆるサブクラスに対して特異的に向けられたMAB<h-IgG>はPierce社から製品番号37300ZZで入手することができ、マウス由来のサブクラスIgG1、2および3を認識するMAB<h-IgG>はCalbiochem社から製品番号411128で入手することができる。

**【0030】**

驚くべきことに、結合パートナー $B_2$ 、例えば、本発明の抗体である凝集したIgGに対する<H-Agg.-IgG>M3.022.5-IgM-Digを使用することにより、高感度TSHサンドイッチアッセイにおいても、間接試験方式においても、バックグラウンドシグナルが十分な程度まで低減される程度に非特異的結合を減少させることができることが分かった。対照群の「バックグラウンド全域」、陰性対照、および負の干渉サンプルにおいてさえも、この結合パートナー $B_2$ によるバックグラウンドシグナルは、大幅に低減され、またはもはや存在しなかった。

20

**【0031】**

本発明の方法では、複数の結合パートナー( $B_{n_x}$ )を、アレイ方式でのイムノアッセイに適用するが、ここで、 $B_{n_x}$ は各場合について、検出しようとする抗体と特異的に結合することができる異なる抗原を含む。この方法は間接試験方式または抗原ダウン方式とも呼ばれる。本発明の方法では、アレイは、好ましくは、金属、ガラス、プラスチックまたはポリスチレン製の支持体からなる。本発明の方法においては、当業者には公知であり、例えば、EP0939319(Hornauerら)に記載されているポリスチレン支持体を使用することが好ましい。

30

**【0032】**

結合パートナーは、互いに空間的に分離されている試験領域として定められる支持体の別個の領域上に、固定される。同じ結合パートナー $B_{n_x}$ を含有する1以上のスポットを含んでなる試験領域が、その支持体上に存在することが好ましく、例えば、数個の同一スポットからなる列が形成されうる。結合パートナー $B_{n_x}$ を固定する方法は当業者にはよく知られており、例えば、EP0939319(Hornauerら)に開示されている。本明細書に記載の方法は、結合アッセイのために空間的に明確に定義された試験領域を提供する方法に関するものである。分析物を、定性的および定量的に高い信頼性をもって測定するためには、再現性ある方法により、正確に規定された量の受容体分子を利用して、結合アッセイの試験領域を設けることができる必要がある。EP0939319(Hornauerら)では、重層コーティングを適用することにより、結合アッセイ用の空間的に明確に定義された試験領域が得られることを記載している。コーティングには、固相支持体の試薬フィールドにプレコーティングを施すこと、プレコーティングした支持体を洗浄すること、およびプレコーティングと結合可能な受容体分子を含んでなる第2のコーティングを施すことが含まれる。プレコーティングには、高親和性結合対の第1のパートナー、例えば、ストレプトアビジン、アビジンもしくはビオチン、ならびに上記物質の類似体、誘導体および複合体、または抗

40

50

マウス抗体のような抗体が含まれることが好ましい。しかしながら、第2のコーティング、例えば、アミン、スルフィドまたはシリル基を有する分子と共有結合することを意図した分子をプレコーティングとして塗布することもできる。さらに、EP0939319(Hornauerら)では、プレコーティングした支持体を低イオン強度のバッファーで洗浄することによって、再現性ある均一な試験スポットが得られることが示されている。試薬フィールドの空間的に定義された領域の形態において、洗浄したプレコーティングに、プレコーティングと結合可能な受容体分子を含む第2のコーティングを施す。受容体分子は、高親和性相互作用、例えば、免疫反応、ストレプトアビジン/アビジン相互作用など、または、同様に、プレコーティングとして施された結合対の第1のパートナーとの共有結合を受ける可能性がある結合対の第2のパートナーを、含むことが好ましい。よって、例えば、プレコーティングとしてストレプトアビジンまたはアビジンを塗布し、受容体分子がビオチン成分を有してもよい。

10

#### 【0033】

本発明のこの方法では、試験領域全体の検出しようとする結合パートナーまたは抗原の総和は、 $B_{n_x}$  ( $B_{n_x}=B_{n_1}+B_{n_2}+B_{n_3}\dots$  など)として定義される。従って、各試験領域は特定のタイプの $B_{n_x}$ を含み、例えば、試験領域1は、結合パートナーまたは抗原 $B_{n_1}$ を含み、試験領域2は結合パートナーまたは抗原 $B_{n_2}$ を含み、試験領域3は結合パートナーまたは抗原 $B_{n_3}$ を含むなどである。このように、各試験領域は、異なる抗原 $B_{n_x}$ の混合物ではなく、特定のタイプの結合パートナーを含む。特異的結合パートナーは、同一スポットが数個存在するように、例えば1列に並んだ、数個の試験領域中に存在してもよい。所望であれば、混合スポットを使用することもでき、すなわち、異なる抗原を1つの試験領域内に含めてもよい。従って、本発明の方法は、複数の結合パートナー( $B_{n_x}$ )と特異的に結合することができる抗原特異的抗体をたった1つの結合パートナー $B_2$ を用いて検出することができることから、普遍的検出方法を提供する。

20

#### 【0034】

本発明の実施例では、例えば、抗核抗原Jo-1およびSc170に対する自己抗体が検出される。Jo-1に対する抗体はヒスチジル-tRNAシンセターゼ酵素に対するものであり、一方Sc170は強皮症のマーカーである。

#### 【0035】

抗核抗体(ANA)は、例えば、全身性エリテマトーデスにおけるいわゆるLE因子などの種々の細胞成分に対して向けられた自己抗体である。これらの抗核因子(ANF)の特異性は極めて多様である。現在、ANFと反応する30種を超える抗原が知られている。これらは当業者にはよく知られており、例えば、Biotest(免疫学辞典)の145頁に記載されている。また、本発明の方法は自己抗体、すなわち、典型的な自己免疫抗体、および、さらに抗甲状腺抗原、抗膵島細胞抗原等の検出にも使用できる。さらに、この方法により、トキソプラズマ症、風疹およびクラミジア感染症のような特定の病原体に対する抗体の検出も可能になる。

30

#### 【0036】

本発明の方法において、結合パートナー $B_2$ は、当業者に公知の方法により検出される。この目的では、結合パートナー $B_2$ に標識を結合させる。スポットの部位特異的標識を可能にする、当業者によく知られた全ての標識が、使用できる。標識としては、化学発光物質、蛍光物質もしくは放射性物質、あるいは金属ゾル、ラテックスまたは金粒子のような直接検出できる物質を使用することが好ましい。結合パートナー $B_2$ を標識化する方法は当業者にはよく知られており、本明細書でさらに説明する必要はない。標識は、化学発光物質、蛍光物質もしくは放射性物質、あるいは金属ゾル、ラテックスまたは金粒子を測定することによる公知の方法により直接検出され、そのような方法については、US0017616(Karlら)、0304202B1、EP0736176 B1、EP0608370 B1(Ekinsら)、EP0939319(Hornauerら)で記載されている。

40

#### 【0037】

また、標識を間接的に検出することもできる。この場合には、それ自体が次にシグナル

50

発生基と結合する別の結合パートナーが、 $B_2$ の標識、例えば、ジゴキシゲニンのようなハプテンと特異的に結合する。そのシグナル発生基、例えば、化学発光物質、蛍光物質もしくは放射性物質、あるいは酵素または金粒子は、当業者にはよく知られた方法により検出される。 $B_2$ の標識と特異的に結合する抗体または抗体フラグメント、例えば、ジゴキシゲニンに対して向けられた抗体またはハプテンに対して向けられた抗体を、例えばさらなる結合パートナーとして使用してもよい。

#### 【0038】

本発明の方法においては、結合パートナー $B_{n_x}$ が固相と結合されている。この場合、 $B_{n_x}$ は固相に直接結合されてもよい。 $B_{n_x}$ は当業者に公知の方法により固相に直接結合される。また、 $B_{n_x}$ は特異的結合システムを用いて固相に間接的に結合されることもある。この場合、 $B_{n_x}$ は、抗原と特異的結合システムの反応パートナーとを含有する複合体である。この場合における特異的結合システムとは、相互に特異的に反応し得る2つのパートナー同士として理解される。その結合能は、この場合、免疫学的反応または別の特異的反応に基づいたものである。このような反応パートナー、および特異的抗原または抗体で試験支持体をコーティングするためのイムノアッセイにおけるそれらの使用については、当業者には公知である。特異的結合システムとして、ビオチンとアビジンまたはビオチンとストレプトアビジンの組合せを使用することが好ましい。他の好ましい組合せとしては、ビオチンと抗ビオチン、ハプテンと抗ハプテン、抗体のFcフラグメントとこのFcフラグメントに対する抗体、または糖鎖とレクチンがある。よって、この特異的結合対の反応パートナーの一方は、結合パートナー $B_{n_x}$ を形成する複合体の一部である。特異的結合システムの他方の反応パートナーは支持体と結合される。特異的結合システムの他方の反応パートナーと支持体材料との結合は、当業者に公知の一般的な方法を利用して行うことができる。この場合には、共有結合および吸着結合が好適である。

#### 【0039】

当業者に公知のあらゆる生体液をサンプルとして使用することができる。サンプルとしては、全血、血清、血漿、尿、唾液、液等のような体液を使用することが好ましい。

#### 【0040】

試験混合物には、サンプル、固相および上記受容体に加えて、その用途に必要な添加剤、例えば、バッファー、塩、界面活性剤、BSAのようなタンパク質添加剤が含まれてもよい。必要な添加剤については、当業者には公知であり、当業者によって簡単に見極めることができる。

#### 【0041】

さらに、本発明は、アレイ方式でのイムノアッセイを用いてサンプル中の特定の免疫グロブリンクラスの抗原特異的抗体を測定するための試験キットであって、種々の結合パートナー $B_{n_x}$ を異なる別個の領域に結合させた支持体、個別容器に入った検出試薬、ならびに、標識を保持し、かつ、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合する結合パートナー $B_2$ を含む試験キットに関する。その試験キットには、対照品および標準品、ならびに、当業者に公知の、バッファー、塩、界面活性剤などのような一般的な試験添加剤を含む1種以上の溶液中の試薬も、含まれる。

#### 【0042】

以下の実施例によって、本発明をさらに説明する。

#### 【実施例】

#### 【0043】

##### 実施例1

##### リウマチ因子様特異性を有するモノクローナルマウスIgM抗体の製造

##### 免疫原：H-IgG重合体

10mgのヒトIgG1(Sigma Company)を0.6mlの25mM重炭酸バッファー(pH9.5)に溶かす。3.5  $\mu$ lの12.5%グルタルジアルデヒド溶液を添加した後、それを室温にて2時間インキュベートする。続いて、それを氷浴中で冷却し、50mMトリエタノールアミン溶液(pH8.0)を用いてpH8.3に調整し、0.15mlの新たに調製した水素化ホウ素ナトリウム溶液(8mg水素化ホウ

10

20

30

40

50

素/1ml水)をそこに添加する。0にて2.5時間経過後、沈殿物を10mMリン酸カリウムバッファー/0.2M NaCl(pH7.5)に対して4にて16時間透析する。IgG重合体を含有する透析物は分割して-80にて保存するか、または免疫化およびハイブリドーマ細胞の培養上清における特異性試験に使用する。

【0044】

H-IgG3重合体は、ヒトIgG3(Sigma Company)から出発して同様にして製造される。

【0045】

マウスの免疫化

12週齢の雌Balb/cマウスに、まず、100 $\mu$ gのH-IgG1またはIgG3重合体をアジュバントCFA(完全フロイントアジュバント)とともに用いて腹膜内免疫処置する。8日後、CFA中100 $\mu$ gの各IgG重合体を用いてさらに免疫処置を行う。最初の免疫処置から13日後、200 $\mu$ gの各重合体をアジュバントなしで腹膜内投与し、最初の免疫処置から14日および15日後、いずれの場合についても、100 $\mu$ gを腹膜内および静脈内投与した。融合は16日後に行う。

【0046】

ハイブリドーマクロンの製造

融合およびクローニング

免疫したマウスの脾臓細胞をGalfr aの方法(Methods in Enzymology 73, 1981, 3)に従って骨髓腫細胞と融合させる。免疫したマウスの約 $1 \times 10^8$ 脾臓細胞を $2 \times 10^7$ 骨髓腫細胞(P3X63-Ag8-653、ATCC CRL 1580)と混合し、遠心分離する(300gおよび4 $^\circ$ Cにて10分)。次いで、これらの細胞をウシ胎児血清(FCS)不含のRPMI-1640培地で1回洗浄し、50 ml円錐管に入れて再度400gにて遠心分離する。1mlのPEG(ポリエチレングリコール)(分子量4000、Merck, Darmstadt)を添加し、ピペティングにより混合する。37 $^\circ$ の水浴中1分経過後、5 mlのFCS不含RPMI 1640を滴下して加え、混合し、培地(RPMI 1640+10%FCS)を加えて50 mlとし、その後、遠心分離する。沈降した細胞を10%FCS含有RPMI 1640培地に取り、それをヒポキサンチン-アザセリン選択培地(100mmol/lヒポキサンチン、1 $\mu$ g/mlアザセリンを含むRPMI 1640+10%FCS)に播種する。培地に増殖因子としてインターロイキン6(100U/ml)を添加する。およそ10日後に、初代培養物を特異的抗体合成について調べた。凝集したヒトIgG1との陽性反応を示すが、単量体IgGとの交差反応を示さない初代培養物を、96ウェル細胞培養プレートにおいて蛍光活性化細胞選別装置を用いてクローン化する。培地に増殖添加剤としてインターロイキン6(100U/ml)を添加する。

【0047】

この方法により、次のハイブリドーマクロンを得た：

【表1】

| MAB名                         | 免疫原           | サブクラス特異性            |
|------------------------------|---------------|---------------------|
| MAB<H-Agg.-IgG>M-3.022.5-IgM | H-IgG1<br>重合体 | IgG1>IgG3>IgG4>IgG2 |
| MAB<H-Agg.-IgG>M-1.010.2-IgM | H-IgG1<br>重合体 | IgG1>IgG3>IgG4>IgG2 |
| MAB<H-Agg.-IgG>M-1.1.7-IgM   | H-IgG3<br>重合体 | IgG1>IgG3>IgG2>IgG4 |

【0048】

凝集したヒトIgGに対して特異性を有するモノクローナル抗体についてのスクリーニング試験

ストレプトアビジンでコーティングされたMTPをビオチン化ヒトIgG1またはIgG3でコーティングする。その後、それらを細胞培養上清中のモノクローナル抗体とともにインキュベートする。続いて、抗マウス-IgM-PODを用いる通常の方法でPOD基質と反応させることにより、結合した抗体を検出する。

【0049】

10

20

30

40

50

固相结合したヒトIgGを用いたサブクラス特異性の決定

ハイブリドーマ細胞の培養上清中の抗体の特異性を決定するため、組換えストレプトアビジンでコーティングされたMTP (MicroCoat Company、製品番号12-K 96 N) をインキュベーションバッファー中1 $\mu$ g/mlのサブクラス1または2または3または4のビオチン化h-IgG (=H-IgG-Bi)でコーティングする。ビオチンを介して固相と結合したIgGは凝集した重合体IgGのように振盪するため、サブクラス特異性を決定するためにこの試験法を使用することができる。この目的では、各ウェルにつき100 $\mu$ lのH-IgG-Bi溶液を振盪しながら室温にて60分間インキュベートし、その後、0.9%NaCl/0.05%Tween 20で3回洗浄する。

## 【0050】

次の工程では、調べようとする抗体溶液(培養上清)100 $\mu$ lを、コーティングしたウェルに添加し、振盪しながら室温にて1時間インキュベートする。0.9%塩化ナトリウム/0.05% Tween 20で3回洗浄した後、サンプル由来の結合した抗体を検出するために、各場合について、マウスIgMに対するヤギ由来ポリクローナル抗体(Dianova Company、製品番号115-036-075、濃度は0.16 $\mu$ g/mlインキュベーションバッファーで使用)のPOD標識した(Fab')<sub>2</sub>フラグメント100 $\mu$ lを添加し、振盪しながら室温にて1時間インキュベートし、その後、0.9%塩化ナトリウム/0.05%Tween(登録商標)20で3回洗浄する。

## 【0051】

最後に、100 $\mu$ l/ウェルのABTS(登録商標)基質(Roche Diagnostics GmbH、製品番号1684 302)を添加し、室温にて30分経過した後、Dynatech Company社製MR700 マイクロプレートリーダーにより405/492nmでの吸光度を測定する。

## 【0052】

インキュベーションバッファー： 40mMリン酸ナトリウム(pH7.4)  
200mM酒石酸ナトリウム  
0.1%Tween 20  
0.2%ウシ血清アルブミン

単量体ヒトIgG1との反応性/交差反応の判定

単量体の非凝集H-IgG1との反応性/交差反応を判定するため、調べようとするモノクローナル抗体を、上記試験において、漸増濃度または過剰の単量体の非凝集IgG1とともにプレインキュベートする。測定シグナルが高い水準のまま変化しない場合には、交差反応は起こっていない。測定シグナルが低下する場合には、交差反応が起こったことになる。

## 【0053】

このために、組換えストレプトアビジンでコーティングされたマイクロタイタープレート(MTP)(MicroCoat Company、製品番号12-K 96 N)をインキュベーションバッファー中1 $\mu$ g/mlのビオチン化H-IgG1(=H-IgG1-Bi)でコーティングする。各ウェルにつき100 $\mu$ lのH-IgG1-Bi溶液を使用し、振盪しながら室温にて60分間インキュベートし、その後、0.9%NaCl/0.05%Tween 20で3回洗浄する。

## 【0054】

交差反応について試験しようとするモノクローナル抗体を最大1 $\mu$ g/mlの順次濃度の単量体の非凝集IgG1とともにプレインキュベートする。プレインキュベーションは、コーティングしていない96ウェルMTP中、振盪しながら室温にて1時間行う。

## 【0055】

次の工程では、この溶液(抗体+過剰の凝集していない単量体IgG1)100 $\mu$ lをコーティングしたウェルに添加し、振盪しながら室温にて1時間インキュベートする。0.9%塩化ナトリウム/0.05% Tween 20で3回洗浄した後、各場合について、サンプル由来の結合した抗体を検出するためにマウスIgMに対するヤギ由来ポリクローナル抗体(Dianova Company、製品番号115-036-075、濃度は0.16 $\mu$ g/mlインキュベーションバッファーを使用)のPOD標識した(Fab')<sub>2</sub>フラグメント100 $\mu$ lを添加し、振盪しながら室温にて1時間インキュベートし、その後、0.9%塩化ナトリウム/0.05%Tween(登録商標)20で3回洗浄する。

## 【0056】

最後に、100 $\mu$ l/ウェルのABTS(登録商標)基質(Roche Diagnostics GmbH、製品番号1

684 302) を添加し、室温にて30分経過した後、Dynatech Company社製MR700 マイクロプレートリーダーにより405/492nmでの吸光度を測定する。

【0057】

本発明において好適なモノクローナルリウマチ因子様結合性を有する抗体は、あらゆるヒトIgGサブクラスを認識し、競合試験において単量体H-IgGと10%未満の交差反応を示す。反応性の判定にH-IgG1重合体を使用した場合、測定シグナルは大幅に低下する。表1では、判明したモノクローナル抗体の主たる特性を示している。

【0058】

モノクローナル抗体を単離するためのハイブリドーマクローンの発酵

得られたハイブリドーマ細胞を10%FCS含有RPMI 1640培地に $1 \times 10^5$ 細胞/mlの密度にて播種し、発酵槽(Thermodux Company、Wertheim/Main、MCS-104XL型、製品番号144-050)中で7日間増殖させる。培養上清において、1ml当たり100 $\mu$ gモノクローナル抗体の平均濃度に達する。

【0059】

モノクローナル抗体MAB<H-Agg.-IgG>M-3.022.5.-IgMの単離

ポリエチレングリコール6000(Merck Company)の微細粉70gを50 $\mu$ g/mlを超える発酵モノクローナルIgMを含有する培養上清1リットルに室温にて添加する。45分後に沈殿するIgMを遠心分離により沈降させ、50ml TRISバッファー(20mM TRIS/0.2M NaCl/25mMグリシン/2%スクロース、pH8)中に溶かす。6.5%ポリエチレングリコール6000を用いてこの溶液から2回目のIgM沈殿を行い、遠心分離により沈降させる。この沈降物を5ml TRISバッファーに溶かし、同じバッファーに対して透析する。

【0060】

この透析物を透明になるまで遠心分離し、ベット容量350mlのSuperose 6カラム(Amersham Biosciences Company)上のクロマトグラフィーにかける。使用バッファーは75mM HEPE S/0.25M NaCl/3%スクロース(pH7.5)とする。分子量900,000のIgMピーク画分をプールし、限外濾過により5mg/mlまで濃縮する。IgM溶液を分割して-80にて保存する。

【0061】

ビオチン化H-IgG(=H-IgG-Bi)の調製

2mlの0.1Mリン酸ナトリウムバッファー(pH8.3)に溶かしたサブクラス1または2または3または4のH-IgG(Sigma Company)5mgを、2.67mM溶液のビオチニルアミノ-3,6-ジオキサオクタニルアミノカルボニルヘプタン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル含有ジメチルスルホキシド50 $\mu$ lと混合し、25にて60分間攪拌する。IgG対活性化ビオチンの比は1:4である。生成したIgG-Biを、20mMリン酸カリウムバッファー/0.1M NaCl/3%スクロース(pH7.5)に対して4にて透析する。透析したIgG-Biを分割して-80にて保存する。

【0062】

MAB<H-Agg.-IgG>M-3.022.5-IgM-ジゴキシゲニン(IgM-Dig)の調製

5mgのMAB<H-Agg.-IgG>M-3.022.5-IgMを0.1Mリン酸ナトリウムバッファー(pH8.6)で全量2mlに調整する。この溶液に、1.11mM溶液のジゴキシゲニン-3-0-メチル-カルボニル-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル含有ジメチルスルホキシド50 $\mu$ lを添加し、続いて、25にて60分間攪拌する。IgM対活性化ジゴキシゲニンの比は1:10である。生成したIgM-ジゴキシゲニンを20mMリン酸カリウムバッファー/0.1M NaCl/3%スクロース(pH7.5)に対して透析する。透析したIgM-Digを分割して-80にて保存する。

【0063】

実施例2

黒色に染色したポリスチレン支持体上の約2.5 $\times$ 6mmの試験領域全域にわたってストレプトアビジンコーティングを施す。インクジェット方式により試験領域にビオチン化抗原からなる、1列につき約20個の同一スポットの列を作製する。その各スポットの直径は約150 $\mu$ mとする。続いて、サンプルをサンプル希釈バッファーで1:10の割合に希釈し、40 $\mu$ lの希釈サンプルをアレイのそれぞれの試験領域に手でピペット注入する。残りのアッセイ処理は、実験室用ブレッドボードウォッシャー-インキュベーターで実施した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 4 】

次の試験特異的試薬を使用した：

サンプル希釈バッファー：50mM Tris、pH7.6；150mM NaCl；0.1%界面活性剤（ポリドカノール）；

0.6%BSA；0.2%保存剤（オキシピリオン (oxypyrrion) および塩酸メチルイソチアゾロン (MIT)）

洗浄バッファー：10mM Tris、0.01%ポリドカノール、0.001%オキシピリオン、0.001%MIT

サンプル：ヒト血清、陽性サンプルは市販品、陰性サンプルは内部提供者のものである。

10

## 【 0 0 6 5 】

ビオチン化抗原としてネイティブJo1およびネイティブSc170を使用した。これらの抗核抗原に対する自己抗体を間接試験方式で検出した。各スポット溶液には100 $\mu$ g/mlのそれぞれのビオチン化抗原を使用した。さらに、本発明の利点を確認するため、この実施例でTSH試験も実施した。TSH試験ではアッセイ系の感度が最も強く要求され、それ故、ブランク値を最適化するための理想的なパラメーターとなる。

## 【 0 0 6 6 】

試験手順の説明：

サンプルを37 にて6分間インキュベートした。サンプルを吸引し、洗浄バッファーで試験領域を洗浄した後、それらを結合パートナーB<sub>2</sub>、ジゴキシンで標識した抗体とともに37 にて3分間インキュベートし、その後、洗浄工程を行った。蛍光標識<Dig>抗体とともに37 にて3分間インキュベートし、その後、試験領域を洗浄し、真空乾燥させた後、シグナルをCCDカメラで検出した。測定用にサンプルをサンプル希釈バッファーで1:10希釈した。

20

## 【 0 0 6 7 】

表2：モノクローナルヒト抗体<H-IgG PAN>M-R10Z8E9-IgG-Digを使用したときの試験結果：

【表 2】

| スポットアッセイ形式    | MAB<TSH><br>サンドイッチ | Jo-1<br>間接 | Sc170<br>間接 | バックグラウンド<br>全域 |
|---------------|--------------------|------------|-------------|----------------|
| 陰性対照          | 406                | 2123       | 25          | 226            |
| 負の干渉サンプル      | 293                | 3107       | 59          | 660            |
| Jo-1 陽性 9501  | 763                | 26551      | 0           | 272            |
| Sc170 陽性 5510 | 161                | 716        | 10654       | 401            |

30

## 【 0 0 6 8 】

モノクローナル抗体<H-IgG PAN>M-R10Z8R9-IgG-Digを使用して、表2に示すシグナルを得た。この抗体を使用した場合、TSH試験、さらに、スポットを載せていないポリスチレン支持体の部位において（「バックグラウンド全域」、表2の右欄）極めて高いバックグラウンドシグナルが認められた。陰性対照および負の干渉サンプルは、2つの間接試験方式Jo-1およびSc170でこの抗体を用いてさらに高いバックグラウンドシグナルを示した。これらのようにバックグラウンドシグナルが非常に高いと、その結果、弱陽性サンプルの低いシグナルはバックグラウンドシグナルによって過度な負荷を受けるため、低濃度の分析物を測定することができない。この試験の感度の結果からは、抗体<H-IgG PAN>M-R10Z8R9-IgG-Digの使用は、慣用的な実験室の診断用途には適切でない。

40

## 【 0 0 6 9 】

表3：モノクローナルヒト抗体<H-Agg.-IgG>M3.022.5-IgMを使用した試験結果

【表 3】

| スポットアッセイ形式    | MAB<TSH><br>サンドイッチ | Jo-1<br>間接 | Sc170<br>間接 | バックグラウンド<br>全域 |
|---------------|--------------------|------------|-------------|----------------|
| 陰性対照          | 29                 | 364        | 7           | 38             |
| 負の干渉サンプル      | 4                  | 449        | 21          | 41             |
| Jo-1 陽性 9501  | 0                  | 28487      | 0           | 74             |
| Sc170 陽性 5510 | 0                  | 41         | 9623        | 54             |

10

## 【 0 0 7 0 】

抗体 Mab<H-Agg.-IgG>M3.022.5-IgM を使用して、表3に示すシグナルを得た。この試験では、バックグラウンドシグナルが実質的に低減し、あらゆるサンプルにおいてそれは一定水準となり、その感度が所望の限界に達した。サンドイッチアッセイ (TSH) および間接試験 (Jo-1 および Sc170) では、陰性対照および負の干渉サンプルにおいて非特異的結合はもはや検出されないか、取るに足らない程度しか検出されない。また、バックグラウンドシグナルである「バックグラウンド全域」もこの抗体によって大幅に低減した。

## 【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平成 17 年 11 月 10 日 (2005.11.10)

## 【 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 】

アレイ方式でのイムノアッセイを用いてサンプル中の特定の免疫グロブリンクラスの抗原特異的抗体を測定する方法であって、ここで、検出しようとする抗体と特異的に結合することができる種々の抗原をそれぞれについて含む種々の結合パートナー  $B_{nx}$  が支持体上の異なる別個の領域に結合されており、該方法は、該支持体を、該サンプルと、標識を保持する結合パートナー  $B_2$  とともにインキュベートし、その後、そのそれぞれの別個の領域における標識を検出することによるものであり、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合する結合パートナーを  $B_2$  として使用するが、その固相に非特異的に結合する免疫グロブリンは検出されないかまたは取るに足らない程度にしか検出されないことを特徴とする、前記方法。

## 【 請 求 項 2 】

$B_2$  が抗体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【 請 求 項 3 】

$B_2$  がネオエピトープ特異的抗体である、請求項 2 に記載の方法。

## 【 請 求 項 4 】

アレイ方式でのイムノアッセイにおいてブランク値を低減する方法であって、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合する結合パートナーを  $B_2$  として使用する、前記方法。

## 【 請 求 項 5 】

標識を保持し、かつ、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合する結合パートナー  $B_2$  の、抗原特異的抗体を検出するためのアレイ方式でのイムノアッセイにおいてブランク値を低減するための使用。

## 【 請 求 項 6 】

アレイ方式でのイムノアッセイを用いてサンプル中の特定の免疫グロブリンクラスの抗原特異的抗体を測定するための試験キットであって、種々の結合パートナー  $B_{nx}$  を異なる

別個の領域に結合させた支持体、個別容器に入った検出試薬、ならびに、標識を保持し、かつ、抗原特異的に結合した特定の免疫グロブリンクラスの抗体と特異的に結合する結合パートナー $B_2$ を含む、試験キット。

---

フロントページの続き

- (72)発明者 ウルスラ クラウス  
ドイツ連邦共和国 デー - 8 2 3 8 0 ペイシェンバーグ, アーツェバーグシュトラッセ 8
- (72)発明者 ヘルムート レンツ  
ドイツ連邦共和国 デー - 8 2 3 2 7 トゥツィング, フォン - ケールマン - シュトラッセ 1  
4
- (72)発明者 クリスティン マルカート - ハーン  
ドイツ連邦共和国 デー - 8 2 3 7 7 ペンツバーグ, サエルヴェイハーシュトラッセ 5 4
- Fターム(参考) 4H045 AA30 CA40 DA75 EA50 FA72

【外国語明細書】

2006126202000001.pdf

|             |   |         |            |
|-------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)     | 当特异性检测特异性免疫球蛋白类抗体结合抗原时，阵列测试方法中用于降低空白值的免疫缀合物特异性抗体                  |         |            |
| 公开(公告)号     | <a href="#">JP2006126202A</a>                                     | 公开(公告)日 | 2006-05-18 |
| 申请号         | JP2005315078  | 申请日     | 2005-10-28 |
| 申请(专利权)人(译) | F.霍夫曼 - 罗氏公司  |         |            |
| [标]发明人      | ウルスラ クラウス<br>ヘルムート レンツ<br>クリスティン マルカート-ハーン                        |         |            |
| 发明人         | ウルスラ クラウス<br>ヘルムート レンツ<br>クリスティン マルカート-ハーン                        |         |            |
| IPC分类号      | G01N33/53 G01N33/543 C07K16/18                                    |         |            |
| CPC分类号      | G01N33/543 G01N33/6854  |         |            |
| FI分类号       | G01N33/53.N G01N33/53.U G01N33/543.575 G01N33/543.541.B C07K16/18 |         |            |
| F-TERM分类号   | 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA72            |         |            |
| 优先权         | 102004052729 2004-10-30 DE  |         |            |
| 外部链接        | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过阵列测试方法中的免疫测定来测量特定免疫球蛋白类别的抗原特异性抗体的方法。ZSOLUTION：该方法用于通过阵列测试方法中的免疫测定法测量样品中特定免疫球蛋白类的抗原特异性抗体。在分别含有可以与待检测的抗体特异性组合的各种抗原的各种偶联配偶体B SB nx &lt;/ SB>与支持物上的不同个体区域组合。在该方法中，将支持物与样品和偶联的配偶体B SB2保持指示物一起孵育，然后检测不同个体区域中的每个指示物；而B SB2特异性地与特定免疫球蛋白类的给定抗原特异性组合抗体组合。Z

| MAB名                            | 免疫原           | サブクラス特異性            |
|---------------------------------|---------------|---------------------|
| MAB<H-Agg. -IgG>M-3. 022. 5-IgM | H-IgG1<br>重合体 | IgG1>IgG3>IgG4>IgG2 |
| MAB<H-Agg. -IgG>M-1. 010. 2-IgM | H-IgG1<br>重合体 | IgG1>IgG3>IgG4>IgG2 |
| MAB<H-Agg. -IgG>M-1. 1. 7-IgM   | H-IgG3<br>重合体 | IgG1>IgG3>IgG2>IgG4 |