

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 40024

(P2002 - 40024A)

(43)公開日 平成14年2月6日(2002.2.6)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	X 4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/543	511 D 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/543	511	33/577	B
33/577		C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 39数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 101361(P2001 - 101361)

(22)出願日 平成13年3月30日(2001.3.30)

(31)優先権主張番号 193951

(32)優先日 平成12年3月31日(2000.3.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 501131014

オーソ・クリニカル・ダイアグノスティック
クス・インコーポレイテッド
ORTHO - CLINICAL DIA
GNOSTICS , INC .
アメリカ合衆国、14626 - 5101 ニューヨー
ク州、ロチェスター、インディゴ・クリー
ク・ドライブ 100

(74)代理人 100066474

弁理士 田澤 博昭 (外 1 名)

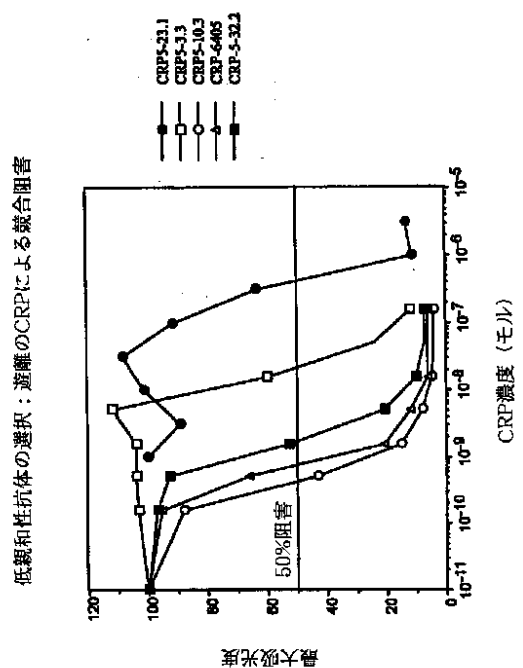
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C 反応性蛋白についての免疫測定

(57)【要約】

【課題】 新規な C R P 免疫測定用の組成物を提供する。

【解決手段】 本発明の組成物は低親和性の抗ヒト C R P 単クローン抗体および当該 C R P 抗体に対して培養された抗イディオタイプ抗体を含有している。本発明はさらに高濃度で高分子量の目的の抗原に対して特異的な抗体に関連する抗イディオタイプ単クローン抗体の母集団を得るための方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 C 反応性蛋白を検出するための競合的免疫測定を実行するための方法において、

(i) 固定した低親和性の抗ヒト C 反応性蛋白抗体およびラベル化した抗イディオタイプ抗体にサンプルを接触させる工程と、

(i i) 前記ラベルを検出する工程と、

(i i i) 前記ラベルの検出結果をサンプル内の C 反応性蛋白の量に対して相関付ける工程とを備えた方法。

【請求項 2】 C 反応性蛋白を検出するための競合的免疫測定を実行するための方法において、

(i) 固定した抗イディオタイプ抗体およびラベル化した低親和性の抗ヒト C 反応性蛋白抗体にサンプルを接触させる工程と、

(i i) 前記ラベルを検出する工程と、

(i i i) 前記ラベルの検出結果をサンプル内の C 反応性蛋白の量に対して相関付ける工程とを備えた方法。

【請求項 3】 競合的免疫測定のための一式の装置において、低親和性の抗ヒト C 反応性蛋白抗体である第 1 の抗体と、当該第 1 の抗体に結合可能な抗イディオタイプ抗体である第 2 の抗体とを含む装置。

【請求項 4】 低親和性の抗ヒト C 反応性蛋白抗体を生成できる C R P 5 - 2 3 として同定されるハイブリドーマ細胞系。

【請求項 5】 請求項 4 に記載のハイブリドーマにより生成した抗体。

【請求項 6】 低親和性の抗ヒト C 反応性蛋白抗体に対して培養された抗イディオタイプ抗体。

【請求項 7】 抗イディオタイプ抗体を生成できる C 2 3 i d 2 - 6 . 3 として同定されるハイブリドーマ細胞系。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は C 反応性蛋白 (C R P) を検出するためのインビトロ診断用免疫測定に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】高濃度および高分子量の分析物の場合の最近の免疫測定は比色定量的または化学発光的な検出システムを使用する臨床化学的な分析器 (analyzers) を多様に用いて行うことが困難である。

【 0 0 0 3 】一般に、市場における高濃度および高分子量の分析物の場合の免疫測定は分析物の多面的な特性に基づいて断定されている。最終的に、分析物は (混濁または比濁測定における) 凝集、析出 (放射状免疫拡散)、またはサンドイッチ式免疫測定のいずれかによるある種の架橋反応により検出される。これらの種類の免疫測定はそれぞれ自動化システムに翻訳するという相当な手間を要する。すなわち、放射状免疫拡散測定は極めて時間がかかり (数時間乃至数日)、慎重に選択した相

当量の抗血清を必要とする。また、凝集反応に基づく測定は初期的な希釈処理および相当量の免疫材料が必要である。さらに、上記の各方法は現在の臨床分析器において通常的に存在していない特別な光学システムを必要とする。加えて、サンドイッチ式または 2 部位式 (two-site) 免疫測定は大量の初期的な希釈処理または高価な免疫材料の不希望に大量の濃縮処理のいずれかを必要とする。

【 0 0 0 4 】

【発明が解決しようとする課題】競合的な免疫測定に関するフォーマットの現状での可能性が多くの治療薬または薬物の乱用のような場合における高濃度で低分子量の分析物に対して最も好適に適用されている。これまで、上記のような競合的な免疫測定は遊離の薬物と薬物誘導したハプテンおよびホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (H R P) の化学的結合により調製される酵素ラベルとの間の有限数の薬物特定結合部位 (固定化抗体分子) についての競合に基づいて断定されている。一般に、上記の診断検査における試薬の選択基準は、第 1 に、薬物 - 抗体複合物の解離定数 (K d) が血清サンプル中の薬物濃度に (1 0 の係数以内で) 一致する必要があること、第 2 に、ラベル - 抗体複合物の解離定数が同一条件下における薬物 - 抗体複合物の解離定数よりも相対的に (分析物の絶対濃度に基づいて 1 倍乃至数倍の程度で) 低いことを含む。しかしながら、必要な親和性の諸条件を有する抗体およびラベルを作成する場合の困難さにおいて不都合が存在する。

【 0 0 0 5 】高濃度で高分子量の分析物の場合に上記の諸条件を満足することは困難である。特に、上記の第 2 の条件 (ラベル化した分析物における比較的高い親和性) を達成することが困難である。一方、薬物のような比較的小さな分子の場合は、ラベルに対する抗体の親和性を、「リンカー作用 (linker effect)」(抗体とリンカーとの間の相互作用による付加的な結合エネルギー)、ラベルのハプテンに対する多数部位置換 (multisubstitution)、および、可能な場合における、ラベル表面上における薬物の好適な配向を含む幾つかの作用により高めることができる。しかしながら、高分子の分析物の場合には、分析物との間の相互作用におけるエプーブおよび分析物 - 酵素結合が同一であって分析物上の全体に存在しているために、同等の作用は期待できない。別の見方をすれば、このような分析物は溶液中に遊離している状態または H R P 分子に結合している状態のいずれであっても抗体と同様の作用を示すと考えられる。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】本発明者は目的の分析物が高濃度で高分子量である場合に高濃度で低分子量の分析物を検出するための従来手法を採用することにおける欠陥を解消した。従って、本発明の目的は高濃度で高分

子量の目的の抗原に対して特異的な抗体に関連する抗イディオタイプ単クローン抗体母集団を得るための方法を提供することであり、当該方法において、上記の抗イディオタイプの抗体母集団が上記の目的の抗原に対して特異的な選択された抗体に対する広範囲な結合親和性を有しており、上記の抗イディオタイプの抗体母集団の一部分が特定用途に対して必要な親和性を有するように選択できる。好ましい実施形態において、上記の抗イディオタイプの抗体母集団は上記の抗体に対応する目的の抗原の親和性よりも相当に高い目的の抗原に関連する抗体に対する親和性を示すように選択される。さらに、本発明者は上記の目的の抗原に対して低い親和性の抗体を得るための手段を開示する。

【0007】別の態様において、本発明は新規なCRP免疫測定組成物に関する。この組成物は低親和性 (K_D

$10^{-7}M$) の抗ヒトCRP単クローン抗体 (CRP 5 - 23) および当該CRP 5 - 23に対して培養した抗イディオタイプ抗体を含んでいる。本発明者はCRPに対して効果的に結合するCRP 5 - 23がイオン化したカルシウムに対して反応しないことを発見した。この抗体用のハイブリドーマはPTA - 1354の名称でATCCにより寄託されている。

【0008】さらに別の態様において、本発明は一般に競合的免疫測定法、ドライ・フィルムおよび溶液を基材とする構成要素およびキットに関し、特に、CRPについての免疫測定に関する。

【0009】目的の分析物 (抗分析物性抗体 (antianalyte antibody)) に対して適当な親和性を有する抗体を用いて開始することにより、抗イディオタイプ抗体を、(i) 抗分析物性抗体に対する高い親和性を有している

て、(ii) 抗分析物性抗体に対する結合において相互に排他的な様式で目的の抗原に対して競合するように調製して選択できる。

【0010】本発明者は本明細書において抗CRP性抗体に対応するCRPよりも高い親和性を有する抗イディオタイプ抗体の使用に基づくヒトCRP (C反応性蛋白) についての競合的酵素免疫測定の開発について記載している。本発明は2種類の新規な免疫材料を具体化している。すなわち、第1の免疫材料は比較的低親和性の抗ヒトCRP単クローン抗体であるCRP 5 - 23であり、この材料はCRPとの相互作用がイオン化したカルシウムに対して無反応性である ($[Ca^{++}]$ が0 mM乃至1 mMの範囲内で変化する時に K_D が2の係数よりも小さい範囲で変化する) という極めて有用な付加的特性を有している。このCRPの構造がカルシウムによって決まり、抗体およびCRPの結合がカルシウムに依存していないという事実が有用であり、実際に有利な点である。抗原であるCRPを含有する生物学的な各サンプルにおいてカルシウムの量が変化するので、上記の結合無反応性がCRPについての免疫測定において有効で

ある。

【0011】第2の免疫材料はCRP 5 - 23に対して培養された抗イディオタイプ抗体であり、CRP 5 - 23に対してヒトCRPと競合してCRPおよびこの抗イディオタイプ抗体のCRP 5 - 23に対する結合が相互に排他的になるような機能について選択される。このような抗イディオタイプ抗体を生成することのできるハイブリドーマはPTA - 1353の名称でATCCにより寄託されている。

【0012】1989年5月9日に発行された米国特許第4,828,981号、および1993年6月15日に発行された米国特許第5,219,730号のような既に発行された少なくとも2件の米国特許が抗イディオタイプ抗体を使用する免疫測定を記載している。

【0013】

【発明の実施の形態】本明細書において使用する「抗イディオタイプ抗体」は、その定義において、同類の (cognate) 抗体、この場合においてCRP 5 - 23の V_H および/または V_L ドメインに結合する抗体である。この場合において、抗イディオタイプ抗体はその同類の抗体に対する結合が分析物CRPの結合により相互に排他的になるという付加的特性を有している。

【0014】本明細書において使用する「サンプル」とは、関与する分析物を含有し得るあらゆる基質を意味する。このサンプルは全血、または赤血球、白血球、血小板、血清およびプラズマ、腹水、尿、脳脊髄流体、および関与する分析物を含有し得るその他の成分を含む全血成分のような生物学的流体とすることができる。必要に応じて、このサンプルは水、土、草木から得ることができる。

【0015】また、「競合的免疫測定 (competitive immunoassay)」とは、有限数の相互に排他的な結合部位に対して測定する分析物およびラベル化した検出器分子が競合するように構成されている免疫測定を意味する。このような種類の免疫測定においては、分析物が多量にあることが検出器分子の結合と相反的な関係を有する。

【0016】この測定は検出器分子に付着してラベル化した検出器分子を形成することのできる任意の酵素ラベルにより行うことができる。例えばグルコース・オキシダーゼ等のオキシダーゼ、例えばホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ等のペルオキシダーゼ、アルカリ・ホスファターゼおよびガラクトシダーゼのような酵素が好ましいラベルである。

【0017】さらに、任意のラベルに対する適当な基質を決定することは、例えば、臨床化学分野における作業者等の、通常の熟練者が有する技術の範囲内である。この基質は酵素ラベルにより直接的に作用を受ける材料であるか、ラベルの酵素的反応に関連する一連の反応に関係する材料とすることができる。

【0018】本発明において効果的に使用できるその他

のラベルは例えばフルオレセイン、ダンシル等の蛍光ラベル、化学発光ラベル、および例えば¹²⁵Iまたは¹⁴Cを含む放射性ラベルである。

【0019】本発明の効果および利点を以下の各実施例によりさらに説明する。これらの実施例は本発明の趣旨および範囲を説明するためのものであり、本発明の趣旨および範囲を制限するためのものではない。

【0020】実施例 1：低親和性抗 CRP 単クローン抗体の調製

ヒト血清中に見られる C 反応性蛋白 (CRP) の濃度範囲は 5 mg / L (40 nM) よりも小さい正常値から 300 mg / L (2.6 μM) よりも大きな値までに及ぶ。CRP についての適当な競合的免疫測定を構成するためには、同一濃度範囲内、すなわち、40 nM 乃至 2.6 μM の範囲内の CRP に対応する解離定数 (Kd) を有する単クローンの抗体が必要である。そこで、CRP に対する単クローン抗体を CRP - リムルス・ヘモシアニン結合体による CAF1 マウスの免疫処置に続いて発生させ、ELISA により CRP に対する結合についてスクリーニングした。得られた CRP 反応性培養体をクローン化し、これらが分泌した抗体を競合的 ELISA 技法により CRP に対する親和性について測定した。まず、この抗体の培養体を CRP・ELISA プレート上において滴定して最大の吸光度の値が一定のプラトーに到達する濃度を決定した。このプラトーにおける最大の吸光作用が生じる最小の濃度を競合的 ELISA 技法に用いて抗体濃度が制限されていることを確認した。種々の濃度における可溶性 CRP をサンプルの抗体と共に混合した後に、ELISA プレートに供給して阻害プロファイルを作成した。この場合の最大吸光度の値の 50% の減少を生じる濃度が抗体 - CRP の相互作用の解離定数に概ね相当する。図 1 はそれぞれの阻害プロファイルから導いた幾つかの抗体の親和性測定値を示している図である。抗体の CRP5 - 23 (IgG1,) は 0.4 μM の解離定数を示し、この値は CRP についての競合的免疫測定を構成するための第 1 の必須基準 (分析物に対する比較的低い親和性) を満たしている。

【0021】実施例 2：CRP5 - 23 に対する抗イディオタイプ抗体の調製

CAF1 マウスをリムルス・ヘモシアニンに対して結合した CRP5 - 23 抗体により免疫処置した。これらのマウスを殺して、この免疫処置したマウスから得た脾臓細胞を SP2 / 0 - Ag14 骨髓腫細胞と共に融合した。まず、得られたハイブリドーマを CRP5 - 23 により調製した固定 Fab フラグメントに対して結合した抗体の分泌について従来の ELISA 技法によりスクリーニングした。このスクリーニングにより CRP5 - 23 の Fab フラグメントに対する公称の反応性を有する母集団を定めることができる。

【0022】さらに、選別を行って競合的免疫測定において重要な特性を有する抗体を識別した。適当な抗イディオタイプ抗体を選別するために採用した基準は、

1. 比較的高い親和性 ($K_d < 10^{-8} M$) で CRP5 - 23 に結合する必要があること、および、
2. その CRP5 - 23 に対する結合が分析物である CRP の結合により相互に排他的であることが必要であることである。

【0023】Biacore 装置を使用する表面プラズモン共鳴により陽性クローンを再スクリーニングして (脱離速度 (off-rate) において反映される場合の) CRP5 - 23 に対する抗イディオタイプ抗体の親和性および結合の相互排他性を測定した。ラビットの抗マウス IgG (Fc) をバイオセンサーの表面上に固定して、ハイブリドーマ培養体の上澄み液から抗イディオタイプ抗体を捕捉するために用いた。0.2 nM における CRP5 - 23 の Fab フラグメントの単独物および 0.9 nM の CRP が存在している物を固定化した抗イディオタイプ抗体の表面上に注射して相対質量の累積を比較した。その結果、抗イディオタイプ抗体の 1 種である C23ID2 - 6.3 (IgG1,) は抗イディオタイプ抗体についての本発明者の基準を満たした。すなわち、この抗イディオタイプ抗体はバイオセンサーの表面からの脱離速度が極めて遅いことにより示される見かけ上において高い親和性で CRP5 - 23 の Fab フラグメントに結合し、その結合が競合体 (competitor) として使用した比較的低濃度の CRP の存在下において約 33% 阻害された。

【0024】実施例 3：従来の ELISA 技法における抗イディオタイプ抗体による競合的免疫測定の調製

抗 CRP 抗体である CRP5 - 23 およびその抗イディオタイプ抗体である C23ID2 - 6.3 をこれらの HRP 結合した各相当物と共に用いて 2 種類の ELISA 技法に基づく競合的免疫測定を開発した。これらの 2 種類の ELISA フォーマットを図 2 に示し、CRP に対するそれぞれの対応する投与応答曲線を図 3 に示す。これらの図に示すように、フォーマット 1 はプレート表面上に固定した抗イディオタイプ抗体により構成されており、HRP ラベル化した抗 CRP 抗体が固定した抗イディオタイプ抗体上の部位において可溶性の CRP と共に競合する。フォーマット 2 は各試薬の逆の配向を採用しており、この方式においては、抗 CRP 抗体が固定されており、溶液内の HRP ラベル化した抗イディオタイプ抗体および CRP がプレート上の抗 CRP 抗体の部位において競合する。標準的な FLISA 技法を行って抗体を固定し、非特異的部位をブロックし、ラベルを滴定して、信号の発生および検出を行った。この結果、図示のように、CRP 濃度の増加に伴う投与応答曲線の減少または降下が両方のフォーマットの使用において見られた。

【0025】実施例4：可溶性ラベルを含有するドライ・フィルム・フォーマット内の抗イディオタイプ抗体によるCRPに対する投与応答曲線の作成

上記の免疫材料の作用はELISAフォーマット内において明瞭に示されたので、本発明者はこれらの材料のドライ・フィルム・フォーマットにおける有用性を次に調べた。免疫・速度測定用のコーティング材料を各フォーマットに対して作成した。フォーマット1のコーティング材料はビーズ上に固定されて受容体または散布層のいずれかの形態においてコーティングされた抗イディオタイプ抗体C23ID2-6.3により構成されている。その後、可溶性のHRPラベル化した抗CRP抗体のCRP5-23を血清サンプルに添加して標準的な免疫速度測定方法に従ってVITROS（登録商標）250分析器により処理して各コーティング材料を評価した。フォーマット2のコーティング材料は、これらのコーティング材料がビーズ上に固定した抗CRP抗体のCRP5-23により構成されていて、HRPラベル化した抗イディオタイプ抗体を各サンプルに加えたことを除いて、上記と同様に製造して評価した。図4はCRPに対する投与応答曲線の各フォーマットについての実施例を示している図である。これらの両方のフォーマットはCRP濃度の増加に伴って下降する投与応答曲線を示しており、これらの曲線はCRP濃度の臨床的に関連する濃度の範囲内において下降している。

【0026】実施例5：コーティングしたラベルを含有するドライ・フィルム・フォーマット内の抗イディオタイプ抗体によるCRPに対する投与応答曲線の作成

これらの免疫材料のドライ・フィルム中における有用性を示すために、HRPラベルをインクジェット印刷処理により両方のフォーマットのコーティング材料の中に混入させた。フォーマット1の場合は、HRP結合したCRP5-23を、固定したC23ID2-6.3を含有するドライ・フィルム・コーティング材料上に供給した。10μLの血清サンプルによる再塗布処理後の公称濃度は2.5nM・IgGであった。同様に、HRP結合したC23ID2-6.3を10μLの血清サンプルの再塗布時における最終濃度が約0.5nM・IgGになるように固定化したCRP5-23を含有するドライ・フィルム・コーティング上に供給した。これらのインクジェット印刷処理したコーティング材料を自然乾燥させた後に、種々のCRP濃度における血清サンプルをVITROS（登録商標）250分析器における免疫速度アッセイとして評価した。この結果、図5に示すように、両方のフォーマットがCRP濃度の増加に伴って下降する投与応答曲線を示した。

【0027】実施例6：完全に製造した免疫速度測定用ドライ・スライド・フィルム・フォーマットにおけるCRPに対する投与応答曲線の作成

このドライ・フィルムの製造方法を説明する。完全な免

疫速度測定用コーティング材料を既にフォーマット1について説明したように調製した。その後、抗CRP性HRPラベルを免疫速度測定用グラビア・シリンダー印刷処理によりドライ・フィルム内に混入させた。この完全な機械的に製造したコーティング材料を切断し、VITROS（登録商標）250分析器に取り付けて異なるCRP濃度の血清を基材とする各サンプルと共に測定した。結果として得られたCRP濃度の増加に伴って下降する投与応答曲線は希釈または予備処理を行うことなくCRPに対応する分析物の範囲内で未知のサンプルのCRP値を測定するために使用できる（図6を参照されたい）。

【0028】実施例7：VITROS（登録商標）ECi自動化免疫測定用分析器における抗イディオタイプ抗体によるCRPに対する投与応答曲線の作成

フォーマット1の場合において、従来法により、CRP5-23をHRPに結合させ、C23ID-6.3をビオチンに結合させた。図7（A）に示すように、0.1mg/L乃至1000mg/Lの範囲で変化するCRP濃度を有する各サンプルを用いて投与応答曲線を作成した。さらに、フォーマット2についての同様のデータを図7（B）に示す。

【0029】以上の結果から、本発明の免疫材料により構成した免疫測定法において以下のような幾つかの利点が見られた。

- 1．種々のフォーマットに対して容易に適応できる競合的免疫測定。
 - 2．分析範囲：分析範囲は幅において約2倍程度であり、ヒト血清における既知のCRP濃度の有用な範囲内である。この分析範囲は各主成分の濃度およびいずれの成分が固定または移動可能であるかの選択により適宜変更できる。
 - 3．多様性：本発明の測定方法（アッセイ）は2種類以上の方法で構成できる。本発明において具体化した構成の例は、（i）CRP5-23が固定されており、抗イディオタイプ抗体のHRP結合物が移動可能である構成、および、（ii）抗イディオタイプ抗体が固定されており、CRP5-23のHRP結合物が移動可能である構成である。
 - 4．希釈：無希釈が必要であるが、別の理由で希釈が必要である場合は、類似の免疫材料が分析物の濃度減少に適合するために選択できる。
 - 5．少量の材料の必要性：特定の交換可能な方法が実質的な希釈または不所望に多量の免疫材料を必要とする場合に、これらのフォーマットは1nM乃至10nMの各材料（1回の測定当たり数μg程度の量）を必要とするだけである。
 - 6．患者サンプルにおける異好性作用に対する感受性の低下：抗CRP抗体および抗イディオタイプ抗体は異なる重鎖鎖網となるように選択または修飾できる。
- 【0030】以上、本発明をその好ましい実施形態に基

づいて説明したが、上記の実施形態の多数の変更および変形が本発明の範囲および趣旨に逸脱することなく行うことができることを理解するべきである。

【0031】本発明の実施態様は以下の通りである。

(1) 前記低親和性の抗ヒトC反応性蛋白抗体がCRP 5 - 23である請求項1または請求項2に記載の方法。
(2) 前記抗イディオタイプ抗体がCRP 5 - 23に結合可能な抗体である請求項1または請求項2に記載の方法。

(3) 前記抗体がイオン化したカルシウムに対して無反応性である請求項5に記載の抗体。

【0032】

【発明の効果】従って、本発明によれば、従来に比して優れた有用性を示す新規な免疫測定用の組成物が提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】ELISAにおける抗CRP抗体および可溶性CRPの競合プロファイルによる親和性定数の評価を示すグラフである。5種類の抗体による競合プロファイルが示されており、これらは最大吸光度の50%の減少を生じるCRP濃度により決定される親和性の範囲を示している。ヒト血清におけるCRPの正常な範囲が縦軸(y軸)により示されている。また、CRP 5 - 10 (0.4 nM) およびCRP 5 - 23 (0.4 μM) に対する正常な親和性がx軸上に突き出した矢印により示されている。

【図2】低親和性の抗CRP抗体およびこれに対応する抗イディオタイプ抗体により構成可能な2種類のフォーマットを示す図である。フォーマット1(図2(A))において、CRPの代理として作用する抗イディオタイプ抗体C23ID2 - 6.3はプラスチック微量滴定用プレートの表面上に固定されている。HRP結合した抗CRP単クローン抗体のCRP 5 - 23がCRPを含有するサンプルと共にこのウェルに添加される。このCRPの量が固定された抗イディオタイプ抗体に結合するHRP - CRP 5 - 23の量に最終的に反映する。フォーマット2(図2(B))においては、CRP 5 - 23の単クローン抗体が固定されて、HRP結合した抗イディオタイプ抗体がCRP 5 - 23結合部位においてサンプル内のCRPに対して競合する。

【図3】従来の微量滴定用プレートにおける各フォーマットの場合のCRP投与応答曲線を示す図である。両方のフォーマットはCRP濃度の増加と共に下降する投与曲線を示しており、各投与曲線は臨床的に関連する範囲内に存在している。フォーマット1は図において左側のグラフ(A)に示されており、フォーマット2は右側のグラフ(B)に示されている。414 nmにおける吸光度は検出可能なHRPの活性の量を反映する。グラフ(A)において、ダイヤモンド形の点で示した曲線は固定したC23ID2 - 6.3およびHRPラベル化した

CRP 5 - 23により得られた投与応答曲線を示しており、正方形の点で示した曲線はCRP 5 - 23をC23ID2 - 6.3に置換した場合の対照としての投与応答曲線を示している。一方、グラフ(B)においては、正方形の点で示した曲線は固定したCRP 5 - 23およびHRPラベル化したC23ID2 - 6.3により得られた投与応答曲線を示しており、ダイヤモンド形の点で示した曲線はC23ID - 6.3をCRP 5 - 23に置換した場合の対照としての投与応答曲線を示している。各エラー・バー(誤差範囲)は再現実験における平均値および標準偏差を示している。

【図4】スポット状ラベルによる薄膜免疫測定におけるフォーマット1およびフォーマット2のCRP投与応答曲線を示す図である。各フォーマットにおいて、固定した抗体は当該技術分野において周知のコーティング法により薄いドライ・フィルム内に混入されている。また、HRPラベル化した試薬はCRPを含有するサンプルと共に混合されて、この混合物を薄膜の中心部に載置した。5分間の培養処理の後に、洗浄流体を調節して加えながらこの薄膜を洗浄して未結合の要素を培養領域の周辺部に移動させた。この際に、結合部分(HRP活性)を過酸化物の同時添加により測定し、この過酸化物は薄膜内に予め混入されている色素による色の展開を開始する。色の展開の最大速度(V_{max})を[CRP](CRP濃度)の関数としてプロットした。フォーマット1の場合を正方形の点により表現し、フォーマット2の場合を円形の点により示した。

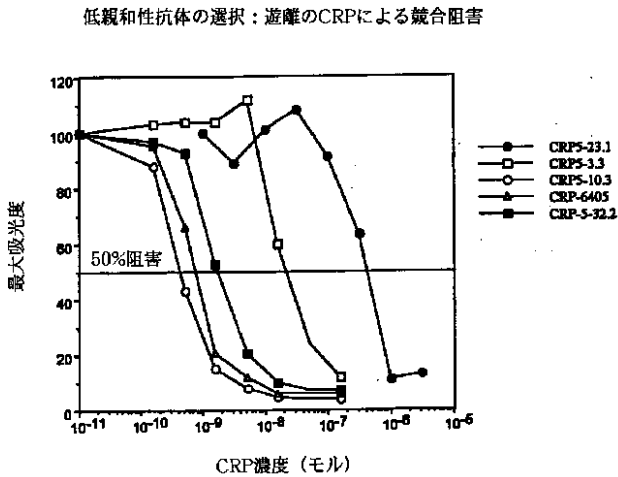
【図5】インクジェット印刷により混入したラベルによるCRP投与応答曲線を示す図である。フォーマット1の曲線を正方形の点で示し、フォーマット2の曲線をダイヤモンド形の点で示した。

【図6】グラビア印刷により混入したラベルによる薄膜免疫測定におけるCRP投与応答曲線を示す図である。固定した相補的抗体を含有する免疫速度測定用の薄膜コーティング上へのグラビア印刷によりHRP結合物を混入した。その後、種々の濃度でCRPを含有する血清サンプルを各フォーマットにおいて調製したコーティング上にスポットした。5分間の培養処理後に、洗浄流体を調節して加えながらこの薄膜を洗浄して未結合の要素を培養領域の周辺部に移動させた。この際に、結合部分(HRP活性)を過酸化物の同時添加により測定し、この過酸化物は薄膜内に予め混入されている色素による色の展開を開始する。色の展開の最大速度(V_{max})を[CRP](CRP濃度)の関数としてプロットした。フォーマット1の場合を円形の点により表現し、フォーマット2の場合を正方形の点により示した。

【図7】VITROS(登録商標)ECi自動化免疫測定分析器システムに対応して構成された免疫測定によるCRP投与応答曲線を示す図である。これらの変更様式においては、固定された成分がビオチンに結合して初期的に可溶

性の成分として存在している。50 μ Lのビオチン処理した試薬を40 μ LのCRP含有サンプルの添加後で50 μ LのHRP結合試薬の添加前にストレプトアビジン・コーティング処理したウエルに加えた。8分間の培養*

【図1】

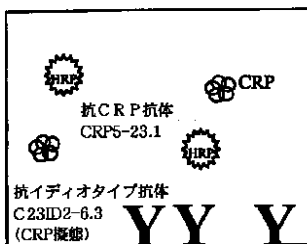


【図2】

アッセイ・フォーマット

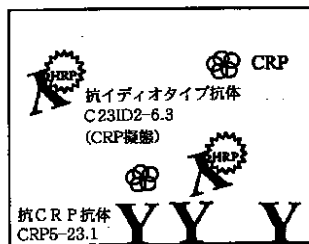
(A)

CRP5-23.1・HRP



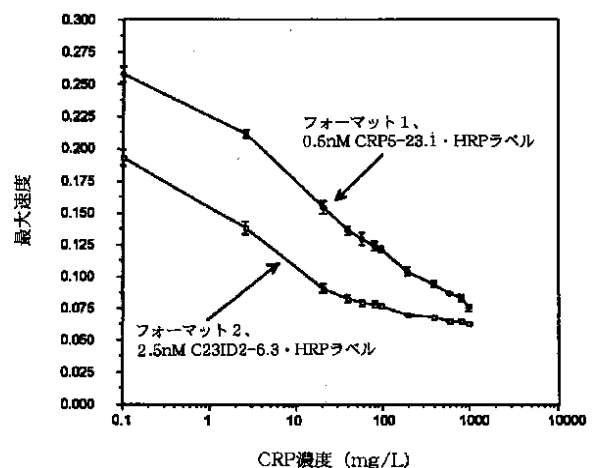
(B)

C23ID2-6.3・HRP



【図5】

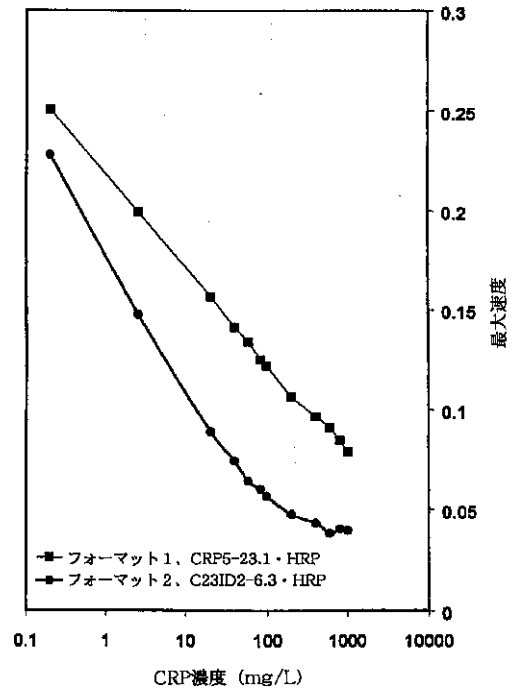
インクジェット印刷により供給したラベルによる
薄膜における投与応答曲線



*処理後に、ウエルをよく洗浄して、このウエルに付随するHRP活性を化学発光性基質により検出した。フォーマット1の場合の結果をグラフ(A)に示し、フォーマット2の場合の結果をグラフ(B)に示した。

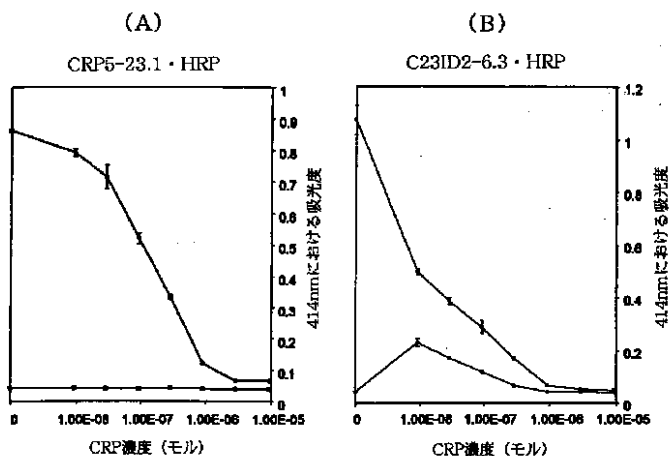
【図4】

スポット状のHRPラベルによる薄膜における
投与応答曲線

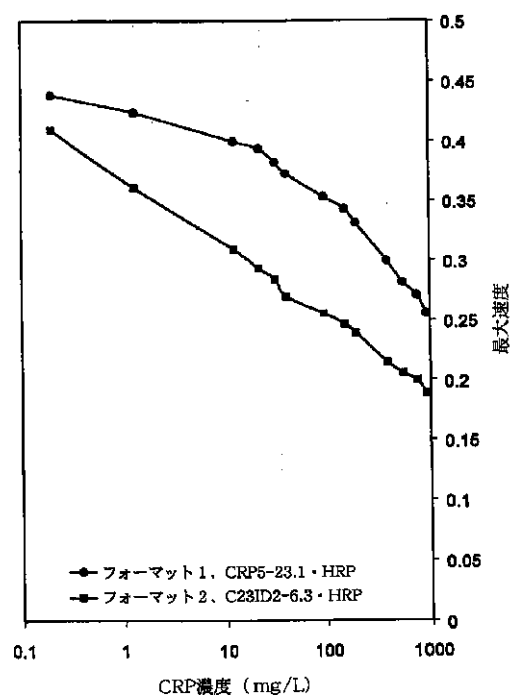


【図3】

ELISAフォーマット

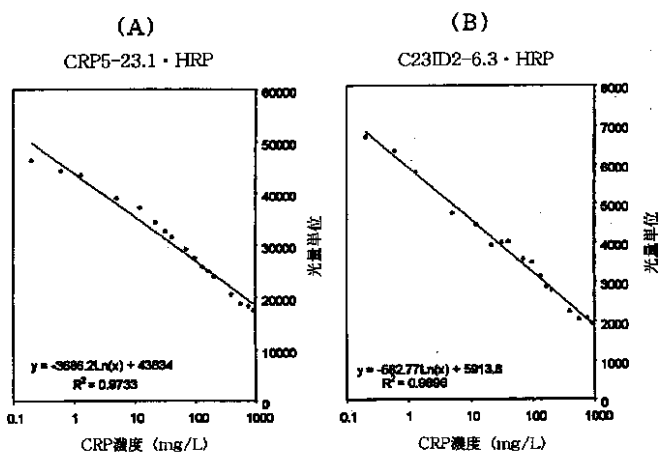


【図6】

コーティングしたHRPラベルによる
薄膜における投与応答曲線

【図7】

ECIフォーマット



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

// C 1 2 P 21/08

識別記号

F I

C 1 2 N 5/00

テマコード^{*}(参考)

B

(71)出願人 501131014

100 Indigo Creek Drive,
Rochester, NY
14626 - 5101, U. S. A.

(72)発明者 ジョン・エル・ダイス

アメリカ合衆国、14620 ニューヨーク州、
ロチェスター、マルベリー・ストリート
299

(72)発明者 エドワード・アール・スカリス

アメリカ合衆国、14526 ニューヨーク州、
ベンフィールド、コブルストーン・クロッ
シング 30

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA90X AA93Y AB04 AC14
BA08 CA25 CA46
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76
EA50 FA72

【外国語明細書】

1. Title of Invention

IMMUNOASSAY FOR C-REACTIVE PROTEIN

2. Claims

1. A method for performing a competitive immunoassay for detecting C-reactive protein comprising:
 - i. contacting a sample with an immobilized a low affinity anti-human C-reactive protein antibody and a labeled antiidiotypic antibody,
 - ii. detecting the label, and
 - iii. correlating the detection of the label with the amount of C-reactive protein in the sample.
2. A method for performing a competitive immunoassay for detecting c-reactive protein comprising:
 - i. contacting a sample with an immobilized antiidiotypic antibody and a labeled low affinity anti-human C-reactive protein antibody,
 - ii. detecting the label, and
 - iii. correlating the detection of the label with the amount of C-reactive protein in the sample.
3. A kit for a competitive immunoassay comprising: a first antibody wherein said first antibody is a low affinity anti-human C-reactive protein antibody and a second antibody where said second antibody is an antiidiotypic antibody capable of binding said first antibody.

4. A hybridoma cell line, identified as CRP5-23, capable of producing a low affinity anti-human C-reactive protein antibody.
5. An antiidiotypic antibody raised against a low affinity anti-human C-reactive protein antibody.
6. A hybridoma cell line, identified as C23id2-6.3, capable of producing an antiidiotypic antibody.

3. Detailed Description of Invention

Field of Invention

The present invention relates an in vitro diagnostic immunoassay for detecting C-reactive protein (CRP).

Background of the Invention

Most current immunoassays for high concentration, high molecular weight analytes are difficult to run on widely used clinical chemistry analyzers that use colorimetric or chemiluminescent detection systems.

Typically, immunoassays for high concentration, high molecular weight analytes in the marketplace are predicated on the multivalence of the analyte. Ultimately, the analyte is detected by some sort of cross-linking, either by agglutination (in turbidimetric or nephelometric assays), precipitation (radial immunodiffusion), or sandwich immunoassays. These types of immunoassays each have significant handicaps in translation into automated systems. Radial immunodiffusion assays are extremely slow (hours to days) and require substantial quantities of carefully selected antisera. Agglutination-based assays require both initial dilution and substantial quantities of immunomaterials. In addition, each of these methods requires specialized optical systems not ordinarily present on contemporary clinical analyzers. Sandwich or

two-site immunoassays require either large initial dilutions or undesirably large concentrations of expensive immunomaterials.

The current capability of the formats directed to competitive immunoassays is best applied to high concentration, low molecular weight analytes like many therapeutic drugs or drugs of abuse. Traditionally, these competitive immunoassays are predicated on competition for a limited number of drug specific binding sites (immobilized antibody molecules) between free drug and an enzyme label prepared by chemical conjugation of a drug-derived hapten and horseradish peroxidase (HRP). Typically, selection criteria for the reagents for these diagnostic tests might include: first, the K_d (dissociation constant) of the drug:antibody complex must be similar to (within a factor of 10) the concentration of drug in the serum sample; and second, the K_d of the label:antibody complex must be substantially lower (one to several orders of magnitude depending on the absolute concentration of the analyte) than that of the drug:antibody complex under the same conditions. A problem encountered lies in the difficulty in making antibodies and labels with the necessary affinity requirements.

Satisfying the above conditions for high concentration, high molecular weight analytes is difficult. In

particular the second condition (higher affinity for the labeled analyte), listed above is difficult to achieve. For small molecules, like drugs, the affinity of the antibody for the label can be enhanced by several effects including the "linker effect" (additional bonding energy due to interaction of the antibody with the linker), multisubstitution of the label with the hapten, and, possibly, favorable orientation of the drug on the label surface. Equivalent effects for macromolecular analytes are unlikely because the epitope for interaction with the analyte and the analyte:enzyme conjugate are identical and reside entirely on the analyte. Put another way, the analyte looks the same to the antibody whether it is free in solution or conjugated to an HRP molecule.

Summary of the Invention

We have overcome the deficiencies of using the conventional approaches for detecting high concentration, low molecular weight analytes in a situation where the target analyte is high concentration, high molecular weight. Therefore, it is an object of the present invention to provide a method for obtaining antiidiotypic monoclonal antibody populations directed to an antibody that is specific for a high concentration, high molecular weight target antigen wherein said antiidiotypic antibody populations have a wide range of binding affinities for the selected

antibody specific to said target antigen and wherein a subset of said antiidiotypic antibody populations can be selected having the required affinity for a particular application. In a preferred embodiment antiidiotypic antibody populations are selected which express an affinity for the antibody directed to the target antigen which is substantially greater than that of the target antigen for the antibody. Additionally, we describe a means for obtaining a low affinity antibody for the target antigen.

In another aspect, this invention relates to new CRP immunoassay compositions. Said compositions comprise the low affinity ($K_D \sim 10^{-7}$ M) anti-human CRP monoclonal antibody (CRP5-23), and an antiidiotypic antibody raised against CRP5-23. We found that CRP5-23 binding to CRP, advantageously, is insensitive to ionized calcium. The hybridoma for this antibody has been deposited with the ATCC with a designation of PTA-1354.

In yet another aspect, our invention relates generally to competitive immunoassay methods, dry-film and solution based elements and kits and specifically to an immunoassay for CRP.

Starting with an antibody having the appropriate affinity for the target analyte (antianalyte antibody) an antiidiotypic antibody can be prepared and selected

having i) high affinity for the antianalyte antibody, and ii) which competes with target antigen in a mutually exclusive manner for binding to the antianalyte antibody.

We describe herein the development of a competitive enzyme immunoassay for human C-reactive protein based on the use of antiidiotypic antibodies which have a higher affinity than CRP for an anti-CRP antibody. The invention embodies two novel immunomaterials. The first is a relatively low affinity anti-human CRP monoclonal antibody, CRP5-23, which has the additional very useful property that its interaction with CRP is insensitive (K_D differs by less than a factor of two when $[Ca^{++}]$ is varied from 0 to 1 mM) to ionized calcium. The conformation of CRP is dependent upon calcium, and the fact that the binding of antibody and CRP is not so dependent is useful and in fact advantageous. As biological samples containing the antigen, CRP, may have varying calcium levels, the binding insensitivity is beneficial in an immunoassay for CRP.

The second immunomaterial is an antiidiotypic antibody raised against CRP5-23 and selected for its ability to compete with human CRP for binding to CRP5-23, such that binding of CRP and the antiidiotypic antibody to CRP5-23 are mutually exclusive. A hybridoma capable of producing

such an antiidiotypic antibody has been deposited with the ATCC and given the designation PTA-1353.

At least two previously issued US Patents describe immunoassays that use antiidiotypic antibodies: US Patent No. 4,828,981, issued May 9, 1989, and US Patent No. 5,219,730, issued June 15, 1993.

Detailed Description

Antiidiotypic antibody as used herein, is, by definition, an antibody which binds to the V_H and/or V_L domain of the cognate antibody, in this case CRP5-23. In this instance, the antiidiotypic has the additional

property that its binding to its cognate antibody is mutually exclusive with the binding of the analyte CRP.

A "sample" as used herein, refers to any substance which may contain the analyte of interest. A sample can be biological fluid, such as whole blood or whole blood components including red blood cells, white blood cells, platelets, serum and plasma, ascites, urine, cerebrospinal fluid, and other constituents of the body which may contain the analyte of interest. Optionally, samples may be obtained from water, soil, and vegetation.

A competitive immunoassay refers to an immunoassay that is designed so that the analyte to be measured and a labeled detector molecule compete for a limited number of mutually exclusive binding sites. In these types of immunoassays the abundance of the analyte is inversely related to the binding of the detector molecule.

The assay can be carried out using any enzyme label that can be attached to the detector molecule to form a labeled detector molecule. Enzymes such as oxidases, e.g., glucose oxidase, peroxidases, e.g., horseradish peroxidase (HRP), alkaline phosphatase and galactosidases are preferred labels.

It is within the skill of the ordinary artisan, for example a worker in clinical chemistry to determine a

suitable substrate for a given label. The substrate can be a material which is directly acted upon by the enzyme label or a material that is involved in a series of reactions which involve enzymatic reaction of the label.

Other labels that can be effectively used in the invention are: fluorescent labels, e.g., fluorescein, dansyl; chemiluminescent labels and radioactive labels including, e.g., ^{125}I or ^{14}C .

The effectiveness and advantages of the invention are further illustrated by the following examples. The examples are meant to illustrate, but not to limit, the scope and spirit of the invention.

Example 1 Preparation of a low affinity antiCRP monoclonal antibody.

The concentration range of C-reactive protein found in human serum runs from a normal value of less than 5 mg/L (40 nM) to greater than 300 mg/L (2.6 μM). To devise a suitable competitive immunoassay for CRP required a monoclonal antibody having a K_d for CRP within the same concentration range, that is, between 40 nM and 2.6 μM . Monoclonal antibodies to CRP were generated following immunization of CAF1 mice with CRP-Limulus Hemocyanin conjugates and screened for binding to CRP by ELISA. Resulting CRP reactive cultures were cloned and their

secreted antibodies measured for affinity to CRP using a competitive ELISA technique. The antibody cultures were initially titered on a CRP ELISA plate to determine the concentration at which the maximal absorbance value reaches a plateau. The minimal concentration at which the plateau maximal absorbance occurs was used in a competitive ELISA to assure that the antibody concentration is limiting. Soluble CRP at various concentrations was mixed with sample antibody then applied to the ELISA plate to generate an inhibition profile. The concentration that yielded 50% reduction of the maximal absorbance value approximates the K_d of the antibody:CRP interaction. Figure 1 illustrates the affinity measurements of several antibodies derived from their inhibition profiles. Antibody CRP5-23 (IgG1, κ) exhibited a K_d of 0.4 μM which met the first essential criterion (relatively low affinity for the analyte) for devising a competitive immunoassay for CRP.

Example 2

Preparation of an antiidiotypic antibody to CRP5-23.

CAFl mice were immunized with CRP5-23 antibody conjugated to Limulus hemocyanin. The mice were sacrificed and splenocytes obtained from the immunized mice were fused with SP2/0-Ag14 myeloma cells. The resulting hybridomas were initially screened by conventional ELISA for the secretion of antibody that

bound to immobilized Fab fragments prepared from CRP5-23. This screen defined a population of antibodies with nominal reactivity for the CRP5-23 Fab fragment.

Further selection was performed to identify those antibodies with properties essential for competitive immunoassay. The criteria used for selecting a suitable antiidiotypic antibody were:

1. it should bind to CRP5-23 with relatively high affinity ($K_d < 10^{-8}$ M), and
2. its binding to CRP5-23 should be mutually exclusive with binding of the analyte, CRP.

Positive clones were rescreened using surface plasmon resonance using a Biacore instrument to measure the affinity of the antiidiotypic antibody for CRP5-23 (as reflected in its off-rate) and the mutual exclusivity of binding. Rabbit anti-mouse IgG(Fc) was immobilized onto the biosensor surface and used to capture antiidiotypic antibodies from hybridoma culture supernates. CRP5-23 Fab fragments at 0.2 nM alone and in the presence of 0.9 nM CRP were injected over the surface of the immobilized antiidiotypic antibody and the relative mass accumulation compared. One antiidiotype antibody, C23id2-6.3 (IgG1, κ), met our criteria for an antiidiotypic antibody. It bound the Fab fragment of

CRP5-23 with seemingly high affinity as indicated by its very slow off rate from the biosensor surface and its binding was inhibited by about ~33% in the presence of the relatively low concentration of CRP used as competitor.

Example 3

Preparation of a competitive immunoassay using antiidiotypic antibodies in conventional ELISA.

Two versions of ELISA format based competitive immunoassays were developed using the anti-CRP antibody CRP5-23 and its antiidiotype C23id2-6.3 along with their HRP conjugated partners. The two ELISA formats are illustrated in Figure 2 and the corresponding dose-response curves for CRP are presented in Figure 3. As depicted in the figure, format 1 consists of the antiidiotypic antibody immobilized onto the plate surface and the HRP-labeled anti-CRP antibody competes with soluble CRP for sites on the immobilized antiidiotypic antibody. Format 2 uses the opposite orientation of reagents wherein the anti-CRP antibody is immobilized while the HRP-labeled antiidiotypic antibody and CRP in solution compete for antiCRP sites on the plate. Standard ELISA procedures were followed to immobilize antibody, block non-specific sites, titer labels, and for signal generation and detection. Decreasing dose-response curves with increasing CRP

concentrations were observed using both formats, as illustrated.

Example 4

Generation of dose-response curves for CRP using antiidiotypic antibodies in dry-film formats with soluble labels.

Having demonstrated that these immunomaterials work well in ELISA formats, we examined their utility in dry-film format. immuno-rate coatings were made for each format.

Format 1 coatings consisted of antiidiotypic antibody C23id2-6.3 immobilized onto beads and coated in either the receptor or spreading layers. Coatings were then evaluated by adding soluble HRP-labeled anti-CRP antibody CRP5-23 to serum samples and run on VITROS® 250 analyzer using standard immuno-rate procedures. Format 2 coatings were manufactured and evaluated similarly except that they consisted of anti-CRP antibody CRP5-23 immobilized onto beads and HRP labeled antiidiotypic antibody was added to each sample. Figure 4 illustrates one example for each format of a dose-response curve for CRP. Both formats exhibit descending dose-response curves with increasing CRP concentrations and the curves decline throughout the clinically relevant range for CRP.

Example 5

Generation of a dose-response curve for CRP using antiidiotypic antibodies in dry-film formats using coated labels.

To demonstrate utility of these immunomaterials in dry-film, the HRP labels were incorporated into both format coatings using an inkjet printing process. For Format 1 HRP-conjugated CRP5-23 was applied onto a dry film coating containing immobilized C23id2-6.3. Its nominal concentration after rewetting by 10 μ L of a serum sample was 2.5 nM IgG. Similarly, HRP-conjugated C23id2-6.3 was applied onto dry-film coating containing immobilized CRP5-23 to approximate a final concentration upon rewetting with 10 μ L of a serum sample of 0.5 nM IgG. The inkjet-printed coatings were allowed to dry, then serum samples at various CRP concentrations were evaluated as immuno-rate assays on the VITROS®-250 analyzer. Both formats yielded descending dose-response curves with increasing CRP concentrations as shown in Figure 5.

Example 6

Generation of a Dose-Response curve for CRP in fully manufactured immuno-rate dry slide film format.

A process for manufacturing of this dry film is described. A complete immuno-rate coating was prepared

as described for Format 1 previously. The anti-CRP HRP label was then incorporated into the dry film using the immuno-rate gravure cylinder printing process. The complete machine manufactured coating was slit, mounted and tested on an VITROS® 250 analyzer with serum based samples of varying CRP concentrations. The resulting descending dose response curve with increasing CRP concentration can be used to measure CRP values of unknown samples within the analyte range for CRP without dilution or pretreatment (see Figure 6).

Example 7

Generation of dose-response curves for CRP using antiidiotypic antibodies on the VITROS® ECI automated immunoassay analyzer.

For Format 1, CRP5-23.1 was conjugated with HRP and C23id2-6.3 was conjugated with biotin by conventional methods. Depicted in Fig. 7A, a dose-response curve was generated using samples with CRP concentrations varying from 0.1 to 1000 mg/L. Similar data for Format 2 is presented in Fig. 7B.

Some advantages that were seen in immunoassays constructed with immunomaterials of the present invention are:

1. competitive immunoassays readily adapted to a variety of formats;

2. Analytic range: the analytic range is about two orders of magnitude wide, and is within the known useful range of CRP concentrations in human sera. The analytic range can be subtly repositioned by the concentrations of the primary components and the selection of which component is immobilized and which is mobile;
3. Versatility: These assays can be configured in more than one way. Two examples of configurations contemplated in the present invention are:
 - i. with CRP5-23 immobilized and the HRP conjugate of the antiidiotypic antibody mobile, and
 - ii. the antiidiotypic antibody immobilized and the HRP conjugate of CRP5-23 mobile;
4. Dilution: No dilution is required; however, should dilution be desirable for other reasons similar immunomaterials can be selected to accommodate the reduction in concentration of analyte;
5. Small materials requirements: where certain of the alternative methods require substantial dilution or undesirably large quantities of immunomaterials, these formats require only 1-10 nM of each (on the order of micrograms per assay); and
6. Reduction of susceptibility to heterophile activity in patient samples: antiCRP and antiidiotypic antibodies can be selected or modified so that they are of different heavy chain subclasses.

It is to be understood that numerous changes and modifications may be made therein without departing from the scope and intent of the invention.

4. Preferred aspects are provided as stated in the followings

- (1) The method of aspect(4) wherein the low affinity anti-human C-reactive protein antibody is CRP5-23.
- (2) The method of claim 5 wherein the antiidiotypic antibody is antibody is capable of binding CRP5-23.
- (3) An antibody produced by the hybridoma of claim 4.
- (4) The antibody of aspect(3) wherein said antibody is insensitive to ionized calcium.

5. Brief Description of the Drawings

Figure 1: shows a graph depicting the estimation of affinity constants from competition profiles of antiCRP antibodies and soluble CRP in ELISA. Competition profiles from five antibodies to CRP are shown which exhibit a range of affinities as determined by the concentration of CRP that yields a 50% reduction of the maximal absorbence. The normal range for CRP in human sera is indicated by vertical lines. The nominal affinities values for CRP5-10 (0.4 nM) and CRP5-23 (0.4 μ M) are indicated by arrows projected onto the x-axis.

Figure 2: depicts the two formats in which competitive immunoassays can be configured using a low affinity antiCRP antibody and its corresponding antiidiotypic antibody. In Format 1 (Fig. 2A), the antiidiotypic antibody C23id2-6.3, which serves as a CRP surrogate, is immobilized on the surface of a plastic microtiter plate. HRP-conjugated antiCRP monoclonal antibody CRP5-23 is added to the well along with sample containing

CRP. The amount of CRP is ultimately reflected in the amount of HRP-CRP5-23 that binds to the immobilized antiidiotypic antibody. In Format 2 (Fig.2B), the CRP5-23 monoclonal antibody is immobilized and the HRP-conjugated antiidiotypic antibody competes with CRP in the sample for the CRP5-23 binding sites.

Figure 3: CRP dose response curves for each format in conventional microtiter plates. Both formats exhibit descending dose response curves with increasing CRP concentrations and the dose-response curve is positioned in the clinically relevant range for each assay. Format 1 is depicted in (A); Format 2 in (B). The absorbency at 414 nm reflects the amount of detectable HRP activity. In (A), the closed diamonds define the dose-response curve obtained with the immobilized C23id2-6.3 and HRP-labeled CRP5-23; the closed squares define the response when CRP5-23 was substituted for the C23id2-6.3, as a control. In (B), the closed squares define the dose-response curve obtained with immobilized CRP5-23 and HRP-labeled C23id2-6.3; the closed diamonds define the dose response curve when C23id2-6.3 was substituted for CRP5-23, as a control. Error bars indicate the average and standard deviation of duplicates.

Figure 4: CRP dose-response curves of Formats 1 and 2 in thin film immunoassays using spotted labels. In each

format the immobilized antibody was incorporated into a thin dry film by coating methods well known in the art. The HRP-labeled reagent was mixed with the CRP-containing sample and the mixture spotted onto the center of the thin film. After a five minute incubation, the thin film was washed by the controlled addition of wash fluid to drive the unbound elements to the margins of the incubation zone. The bound fraction (HRP activity) was measured by the simultaneous addition of peroxide which initiated color development from a dye previously incorporated into the thin film. Maximum rate of color development (V_{max}) is plotted as a function of [CRP]. Format 1 is presented in closed squares; Format 2 in closed circles.

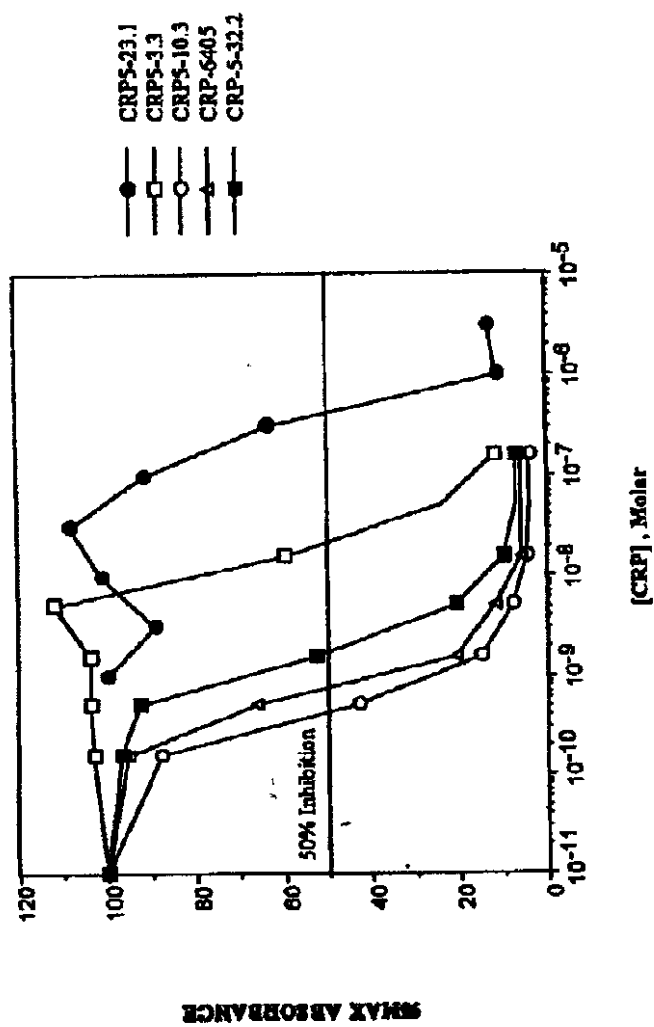
Figure 5: CRP dose-response curves in thin film immunoassays using labels incorporated by inkjet printing. Format 1 is shown in closed squares; Format 2 in closed diamonds.

Figure 6: CRP dose-response curves in thin-film immunoassays using labels incorporated by gravure printing. HRP-conjugates were incorporated by gravure printing onto immuno-rate thin-film coatings containing the immobilized complementary antibody. Serum samples containing CRP at various concentrations were spotted onto coatings prepared in each format. After a five minute incubation, the thin film was washed by the

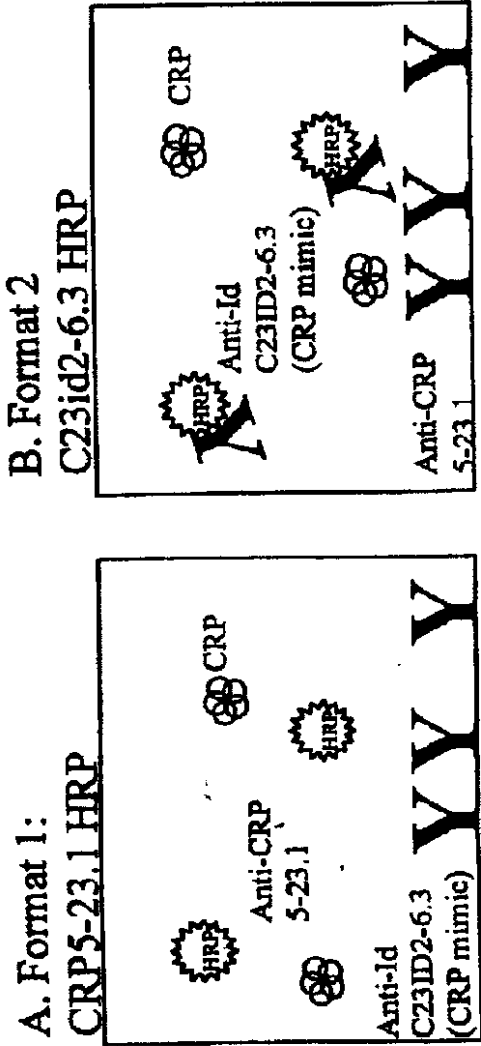
controlled addition of wash fluid to drive the unbound elements to the margins of the incubation zone. The bound fraction (HRP activity) was measured by the simultaneous addition of peroxide which initiated color development from a dye previously incorporated into the thin film. Maximum rate of color development (V_{\max}) is plotted as a function of [CRP]. Format 1 is presented in closed circles; Format 2 in closed squares.

Figure 7: CRP dose-response curve from immunoassays configured for the VITROS® ECI automated immunoassay analyzer system. In these variations the immobilized component is conjugated with biotin and present initially as a soluble component. 50 μ L of the biotinylated reagent was added to streptavidin-coated well after the addition of 40 μ L of CRP-containing sample and before the addition of 50 μ L of the HRP-conjugated reagent. After an incubation of 8 minutes, the well was exhaustively washed and the well-associated HRP activity was detected by means of a chemiluminescent substrate. Format 1 is depicted in (A); Format 2 in (B).

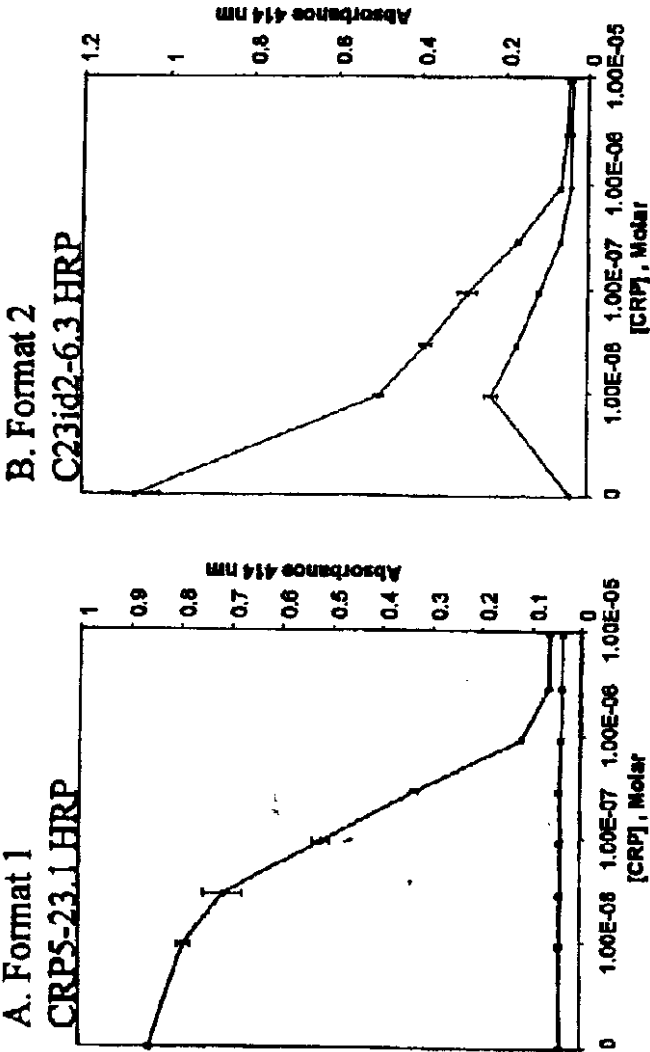
【図 1】



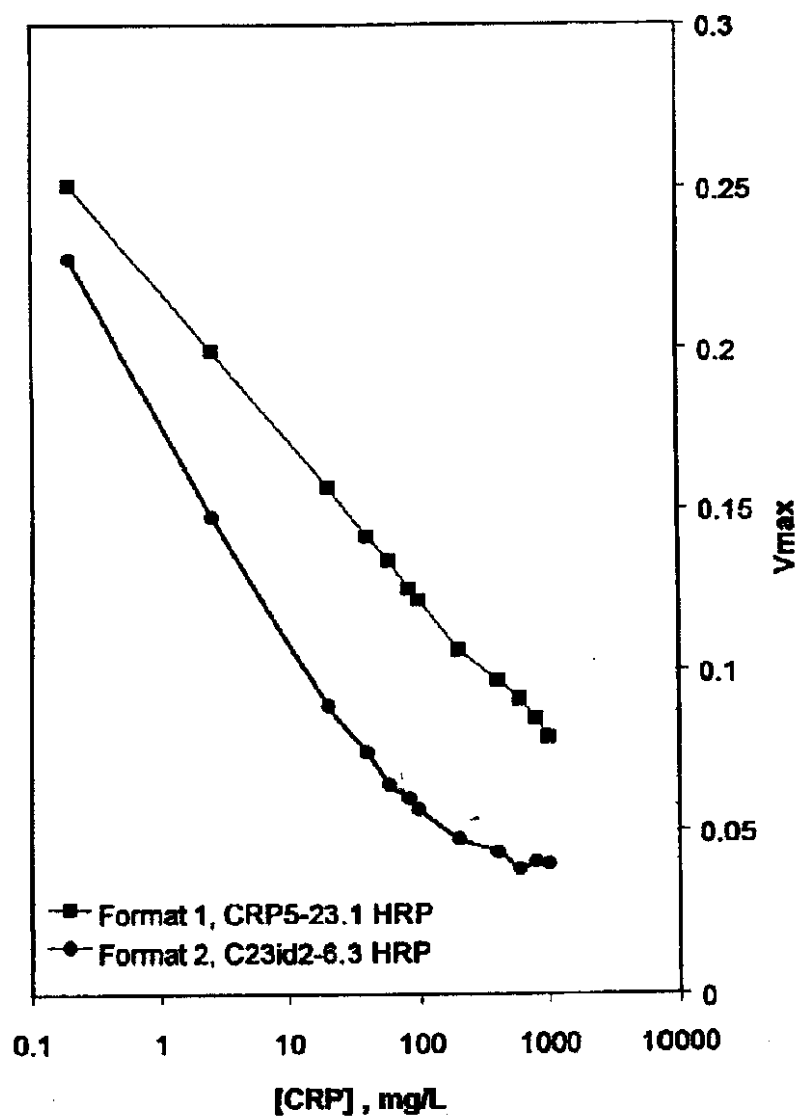
【図2】



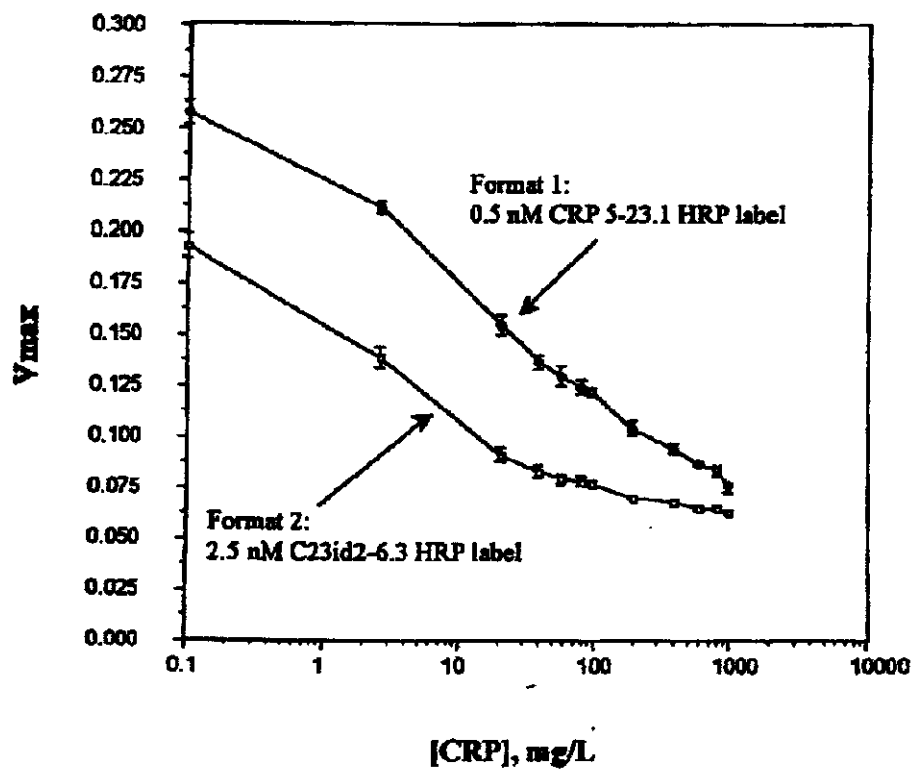
[図 3]



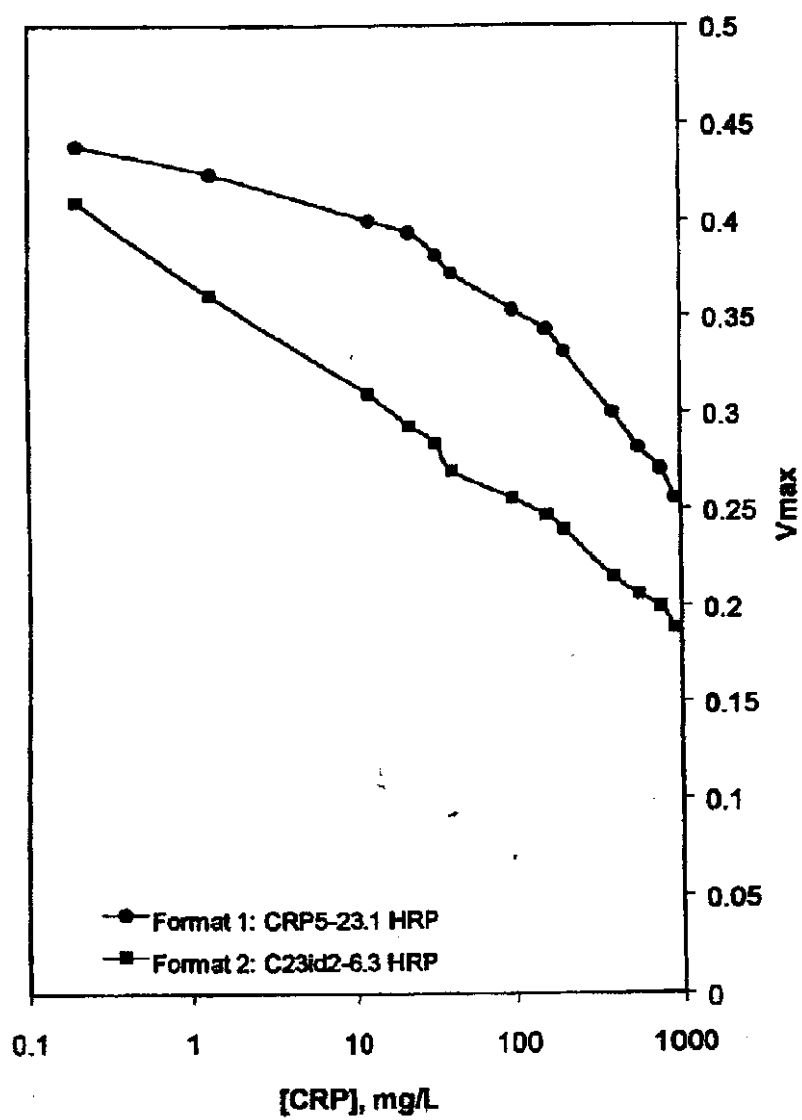
【図 4】



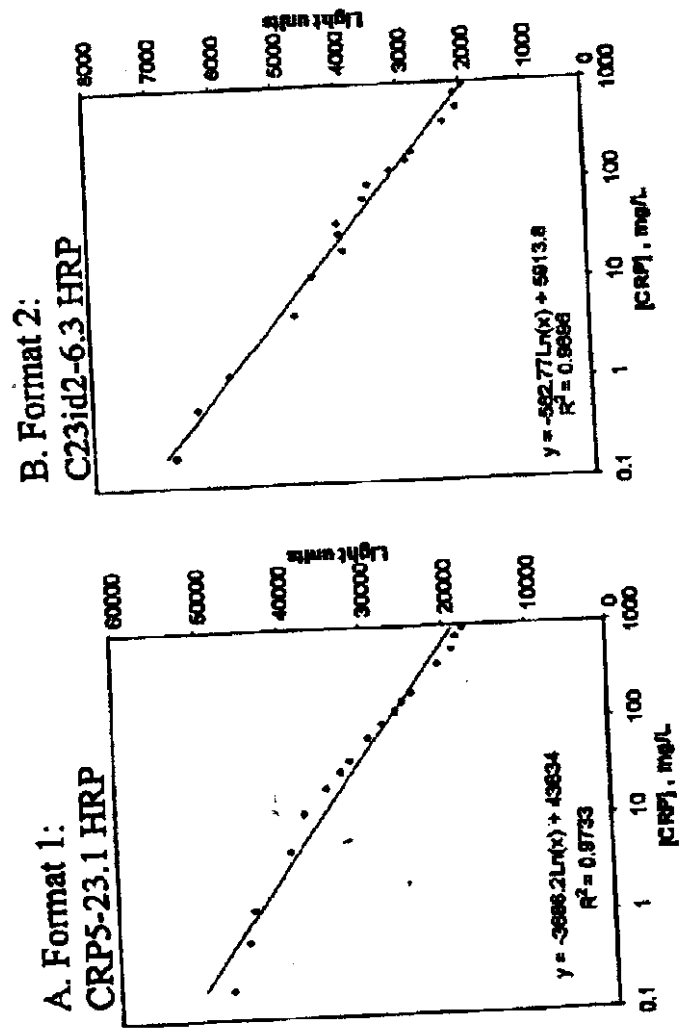
【図5】



【図6】



【図 7】



1. Abstract

The present invention relates to new CRP immunoassay compositions. The compositions include a low affinity anti-human CRP monoclonal antibody, and an antiidiotypic antibody raised against it. The invention further provides a method for obtaining antiidiotypic monoclonal antibody populations directed to an antibody that is specific for a high concentration, high molecular weight target antigen.

2. Selected Drawings

Fig.1

专利名称(译)	C反应蛋白的免疫分析		
公开(公告)号	JP2002040024A	公开(公告)日	2002-02-06
申请号	JP2001101361	申请日	2001-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥索 - 临床诊断公司		
[标]发明人	エドワード・アール・スカリス ジョン・エル・ダイス		
发明人	エドワード・アール・スカリス ジョン・エル・ダイス		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C07K16/42 C12N5/10 C12N5/20 C12P21/08 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/686 C07K16/18 C07K16/4241 G01N33/68 G01N2333/4737 Y10S435/965 Y10S435/975		
FI分类号	G01N33/53.X C07K16/18 G01N33/543.511.D G01N33/577.B C12P21/08 C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/16		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/ /AB04 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
优先权	09/193951 2000-03-31 US		
其他公开文献	JP5031148B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种用于CRP免疫测定的新型组合物。本发明的组合物包含低亲和力的抗人CRP单克隆抗体和针对该CRP抗体培养的抗独特型抗体。本发明进一步提供了用于获得抗独特型单克隆抗体群体的方法，所述抗独特型单克隆抗体与以高浓度和高分子量对目标抗原具有特异性的抗体相关。

