

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 520963

(P2003 - 520963A)

(43)公表日 平成15年7月8日(2003.7.8)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ド* (参考)
G 0 1 N 33/92		G 0 1 N 33/92	Z 2 G 0 4 3
21/64		21/64	B 2 G 0 4 5
			F 2 G 0 5 4
21/76		21/76	
21/78		21/78	C

審査請求 有 予備審査請求 (全 28数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 554066(P2001 - 554066)

(86) (22)出願日 平成13年1月17日(2001.1.17)

(85)翻訳文提出日 平成14年7月16日(2002.7.16)

(86)国際出願番号 PCT/GB01/00167

(87)国際公開番号 W001/053829

(87)国際公開日 平成13年7月26日(2001.7.26)

(31)優先権主張番号 0001089.2

(32)優先日 平成12年1月18日(2000.1.18)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 カウンシル・フォー・ザ・セントラル・ラボラトリー・オブ・ザ・リサーチ・カウンスルズ

COUNCIL FOR THE CENTRAL LABORATORY OF THE RESEARCH COUNCILS

イギリス、ダブリューエイ4・4エイディ、チェシャー、ウォーリントン、デアーズベリー、デアーズベリー・ラボラトリー

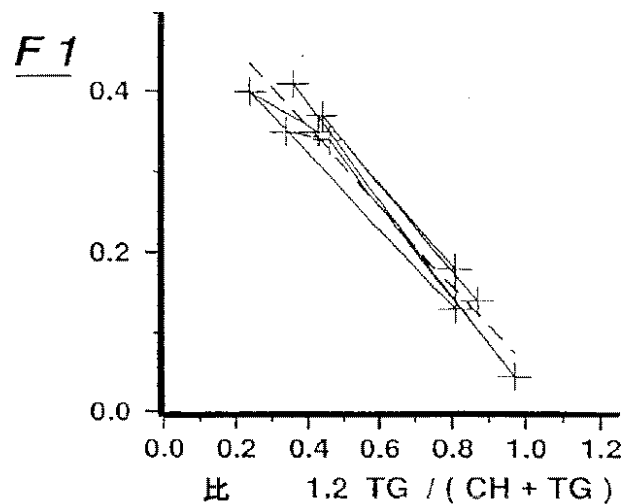
(74)代理人 弁理士 青山 稔 (外 2 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リポタンパク質のアッセイ方法

(57)【要約】

多数の異なる標的分子タイプのうちの特定の1つの試料溶液中の同一性および/または濃度または相対的濃度を決定するためのアッセイ方法であって、i) そのまたは各々の標的分子タイプに結合し、そのように結合する場合、適当な励起下にて蛍光するプローブ物質を該試料に添加し、ii) 試料に対して時間分解蛍光測定を行ない；次いで、iii) 該時間分解蛍光測定から得られた時間減衰データの分析から該決定を行う工程を含むことを特徴とする該方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 多数の異なる標的分子タイプのうちの特定の1つの試料溶液中の同一性および/または濃度または相対的濃度を決定するためのアッセイ方法であって、

i) そのまたは各々の標的分子タイプに結合し、そのように結合する場合、適当な励起下にて蛍光するプローブ物質を該試料に添加し、

ii) 試料に対して時間分解蛍光測定を行ない; 次いで、

iii) 該時間分解蛍光測定から得られた時間減衰データの分析から該決定を行う工程を含むことを特徴とする該方法。

【請求項2】 該標的分子タイプの各々につき時間の関数として異なる特徴的蛍光強度の減衰を有するように該プローブ物質を選択することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 工程(iii)の該決定が、減衰速度を表す時間分解強度減衰パラメーターからなされることを特徴とする請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 工程(iii)の該分析が、減衰時間定数を決定するための時間分解蛍光測定データの多重指数関数分析を含み、該決定が該時間定数の関数としてなされることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項5】 該多重指数関数分析が、振幅を減少させる一連の指数関数として時間分解蛍光減衰を表わし、該時間定数が指数関数の最も重要な時間定数であることを特徴とする請求項4記載の方法。

【請求項6】 該試料が、2以上の該標的分子タイプの混合物を含有し、工程(iii)の該決定が、該試料中に存在する全標的分子タイプの総濃度に対する第1の標的分子タイプの濃度を決定することを含むことを特徴とする請求項1ないし5のいずれか1記載の方法。

【請求項7】 該試料が、2以上の該標的分子タイプの混合物を含有し、工程(iii)の該決定が、該時間分解減衰測定データおよび試料中に存在する全標的分子タイプの総濃度の別々の測定値の組合せから第1の標的分子タイプの濃度を決定することを含むことを特徴とする請求項1ないし5のいずれか1記載の方法。

【請求項8】 該試料が、該標的分子タイプのうちの1つだけを含むし、工程(iii)の該決定が時間分解蛍光測定データに対する参照によって、存在する該タイプの標的分子を同定することを特徴とする請求項1ないし5のいずれか1記載の方法。

【請求項9】 該標的分子タイプが、異なるタイプの蛋白質であることを特徴とする請求項1ないし8のいずれか1記載の方法。

【請求項10】 該標的分子タイプが、異なる密度のリポタンパク質であることを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項11】 該リポタンパク質が、HDL、LDLおよびVLDLであることを特徴とする請求項10記載の方法。

【請求項12】 該試料が、血清または血漿から得られることを特徴とする請求項9ないし11のいずれか1記載の方法。

【請求項13】 全標的分子タイプの総濃度の該別々の測定値が生化学的に得られることを特徴とする請求項7に従属する場合の請求項9ないし12のいずれか1記載の方法。

【請求項14】 該プローブ物質が、(本明細書に記載された)K-37であることを特徴とする請求項1ないし13のいずれか1記載の方法。

【請求項15】 実質的に本明細書に記載される血清または血漿中に存在するリポタンパク質間を区別することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、多数の異なる標的分子タイプのうちの特定の1つの試料溶液中の同一性、および/または濃度または相対的濃度を決定するためのアッセイ方法に関する。

【0002】

特に、専らではないが、本発明は、蛋白質混合物中の特定のリポタンパク質の同一性を決定するための、および血漿または血清のごとき蛋白質混合物中の異なるクラスのリポタンパク質を区別するためのアッセイに関する。

【0003】

脂質、コレステロールおよびトリグリセリドの担体であるリポタンパク質は、血漿または血清の主成分中にある（簡潔には、後記では、「血漿」なる用語を用いるが、「血漿」への引用は、血漿または血清への引用として解釈されるべきである）。血漿中に見出されたりポタンパク質は、3つの主要分類：高密度リポ蛋白質（HDL）、低密度リポ蛋白質（LDL）および超低密度リポ蛋白質（VLDL）に分類される。血漿中リポタンパク質濃度とアテローム性動脈硬化症（すなわち、心血管疾患発生）の危険性との間に強い関連性があることはよく知られている。また、異なるクラスのリポタンパク質が各々、アテローム性動脈硬化症において異なる役割を果たすことも知られている。例えば、HDLは抗アテローム発生物質とみなされるが、LDLは高度のアテローム発生物質である（そのコレステロールはアテローム性動脈硬化症発生と緊密に関連して運搬する）ことが知られている。VLDLは、わずかにアテローム発生物質であり、女性においてより重要であると考えられている。

【0004】

血漿は様々な蛋白質の複合混合物であり、分離し、次いで異なるクラスのリポタンパク質の濃度を直接的に測定する方法は知られているが、かかる方法は複雑でかつ高価である。従って、臨床検査室において広く用いられるリポタンパク質アッセイの通常の方法は間接的方法であり、ここに、重要なLDL濃度は、Friedewaldの式：

$$(CH - LDL) = CH - (CH - HDL) - TG / 5$$

[式中、CHは総コレステロール濃度、(CH - LDL)はコレステロールLDL濃度であり、(CH - HDL)はHDL濃度であって、TGは(遊離グリセロールを含めた)トリグリセリド濃度である]

を用いて、総コレステロール濃度、トリグリセリド濃度およびHDL濃度の測定値から計算される。

【0005】

HDL、CHおよびTG濃度は、LDL濃度の計算前に測定しなければならず、HDL、CHおよびTG濃度の測定におけるいずれの誤差もLDL濃度の計算において形成されると認められるであろう。加えて、TG濃度の通常の測定は、トリグリセリドおよび遊離グリセロールの濃度間を区別せず、それは変動し、LDL濃度の計算にさらなる誤差を誘導し得る。かくして、LDL濃度の計算は、特に高トリグリセリドレベルにて非常に大きくなり得る誤差を含む。かかる誤差は、例えば、広範囲に用いられる(ダイエット、薬剤等のごとき)LDL低下処置の進行をモニタリングすることにおける特別な問題であり、ここに、トリグリセリドレベルは劇的に変化し得るが、LDL濃度における(典型的には、数パーセントのオーダーの)比較的小さな減少を正確にモニターすることが必要である。

【0006】

前記の通常のアッセイ手法のさらなる欠点は、総CHおよびTGアッセイが全血漿試料に行う簡単な手法を含むが、HDL濃度の測定は、予備的分離プロセスを必要とし、ここに、LDLおよびVLDL成分は(LDL + VLDLを凝固させ、それらを遠心によって除去することによって)除去される。

【0007】

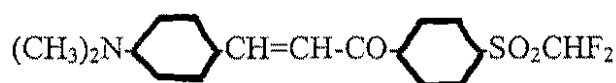
前記の方法のさらにさらなる欠点は、それがVLDL濃度の測定を提供せず、従って、例えば、酵素学的に推定された血漿中トリグリセリドおよび遊離グリセロール含量に基づきVLDL濃度を計算することによりいくらかの異なる方法またはプロセスから決定しなければならないことである。

【0008】

主としてLDL + VLDLの合計である血漿の総リポタンパク質濃度をアッセイするための別法の方法は、2つのロシア特許第SU1457386号および第SU1476384号に開示されている。これらは、蛍光プローブとして、特定の有機発光団、4 - ジメチルアミノ - 4' - ジフルオロメチル - スルホニル - ベンジリデン - アセトフェノン (DMSBA) の使用に関する。K - 37と識別される該プローブの式は、後記に与えられる：

【0009】

【化1】



【0010】

該プローブK - 37は、水中にて発光しないが、血漿のごとき蛋白質水溶液中では高度に発光する。特に、蛍光強度は、血漿のリポタンパク質含量に高度に依存し、かくして、K - 37をプローブとして用いて、リポタンパク質濃度と、存在できる他の蛋白質の濃度を区別できる。

【0011】

ロシア特許第SU1457386号は、K - 37を合成する方法を記載し、ロシア特許第SU1476384号は、(標準試料の測定された蛍光および既知濃度に参照して) 血漿試料およびK - 37の混合物の定常状態蛍光の測定値から総CHおよびTG含量を計算する方法を記載している。アッセイされるべき血液試料は、緩衝液(pH7.4、10mNトリスHClおよび2mN EDTAを含有)を用いて希釈し、次いで、遠心して、赤血球および他の形成された成分を除去する。次いで、少量(10μl)のK - 37の1mN標準溶液を1mlの上澄み溶液に添加し、得られた蛍光強度を、各々、440nmおよび550nmの励起波長および観察波長にて、蛍光分光光度計を用いて測定する。式は、アッセイされるべき試料の測定された蛍光、および既知希釈の既知のCHおよびTG濃度で、血漿の標準試料中のK - 37の測定された蛍光からCHおよびTGの全濃度を計算するために開示されている。50倍ないし500倍希釈にてアッセイされるべき多数の異なる希釈の試料についてのプロセスの繰返しについての結果は、C

HおよびTGの総濃度の測定が、血液希釈に大きく独立することを確立する。

【0012】

かくして、蛍光プローブとしてのK-37の使用は、非常に少ない血漿試料だけが必要とされるので、非常に敏感なアッセイ手法を提供し、それは、タンパク質成分の分離を必要とせずに行うために比較的簡単である。次いで、このように測定されたCHおよびTGの濃度は、計算された結果を正常値と比較することによって高脂血症の直接的な指標として用いることができる。

【0013】

前記方法の1つの欠点は、それが異なる分類のリポタンパク質間を区別せず、かくして、例えば、それをを用いてLDL濃度における小さな変化をモニターできないことである。

【0014】

前記の欠点を除去または緩和することが本発明の目的である。

【0015】

本発明により、多数の異なる標的分子タイプのうちの特定の1つの試料溶液中の同一性および/または濃度または相対的濃度を決定するためのアッセイ方法であって、

i) そのまたは各々の標的分子タイプに結合し、そのように結合する場合、適当な励起下にて蛍光するプローブ物質を該試料に添加し、

ii) 試料に対して時間分解蛍光測定を行ない；次いで、

iii) 該時間分解蛍光測定から得られた時間減衰データの分析から該決定を行う工程を含むことを特徴とする該方法が提供される。

【0016】

本発明は、標的分子タイプの範囲の各々のものに結合する単一プローブが蛍光減衰寿命に参照して、該試料溶液中に存在する特定の標的分子タイプの同一性および/または濃度（または相対的濃度）に対して情報を与えることができるという認識に基づいている。

【0017】

好ましくは、該標的分子タイプの各々につき時間の関数として異なる特徴的蛍

光強度の減衰を有するように該プローブ物質を選択する。

【0018】

本発明は、例えば、典型的には、電子時間窓を開けさせて、サブナノ秒およびナノ秒時間スケールでの時間における2点間の蛍光寿命事象を受容する時間ゲート(time-gated)測定系から区別されるごとき真の蛍光寿命測定を含む。時間ゲート測定方法それ自体は、寿命を直接的には測定しない。本発明に用いることができる公知の蛍光寿命測定方法の例は、パルス一致(pulse coincidence)、位相推移(phase shift)または位相変調の方法(後者の2つは、いずれも単一または複数の周波励起による)である。

【0019】

時間分解蛍光測定から得られたデータの分析は、多数の方法にて行うことができた。好ましい方法は、減衰時間を表すパラメーターを同定することであり、それは、うまく、該時間分解蛍光測定データに関して行われた多重指数関数分析(multi-exponential analysis)の結果として誘導された指数時間定数であり得る。

【0020】

単一成分試料溶液、すなわち、プローブ物質が結合する標的分子タイプの範囲のうちの1つだけを含有する試料において、存在する特定の標的分子タイプを、時間分解蛍光測定データから直ちに同定できる。この同定は、いずれのさらなる測定も必要とすることなくなされ得る。

【0021】

該試料溶液が2以上の該標的分子タイプを含有する場合、本発明を用いて、存在する全標的分子タイプの画分として特に選択されたものの濃度を決定できる。再度、さらなる測定はこの情報を得るのに必要ではない。

【0022】

本発明は、血清または血漿のごとき蛋白質混合物中に存在する特定のクラスのリポタンパク質の濃度を決定するのに特に適当である。この場合には、プローブ物質は、好ましくは、前記のK-37である。

【0023】

本発明の操作の例は、今や、添付図面を参照して記載され、ここに：

図1は、後記の実施例2に関して引用されたプロットであり；および

図2および3は、後記の実施例3に関して引用されたプロットである。

【0024】

前記のごとく、本発明は、リポタンパク質の脂質に結合し、適当な放射波長にて励起される場合に蛍光する蛍光プローブ(K-37)を用いる時間分解蛍光測定に基づいている。時間分解蛍光測定の基本原理はよく知られており、特定の波長にて(または特定の範囲の波長にわたって)周期的な短いパルスの放射で試料を蛍光させ、次いで、各パルスに続く時間にわたって蛍光強度における減衰を測定することを含む。後記の実験において、シンクロトロン源を用いて、試料を励起し、次いで、単一光子計数法を用いて、時間減衰データを誘導した。Munro I. H., (1980)、「蛍光寿命測定法および時間分解分光法用の変調された源としてのシンクロトロン放射」；Synchrotron Radiation Research 編, Winick H, Doniachs, Plenum Press New Yorkの第8章；Munro I. H., Schwenter N (1983)「シンクロトロン放射を用いる時間分解分光法に関して」Nuclear Instruments and Methods, 208, 819；およびO'Connor, D. V. Philips Hillips, D (1984) Time-Related Single-Photon-Counting, Academic Press. London. しかしながら、蛍光寿命の測定に適当ないずれの手法も用いることができる理解されるであろう。

【0025】

実施例1：単一成分溶液中のリポタンパク質の区別およびリポタンパク質タイプの同定。

【0026】

ヒト血清リポ蛋白質のVLDLおよびLDLはよく確立された慣用的な方法を用いて、超遠心分離のプロセスによって供与体血清から得た。次いで、各試料の各々の水溶液を調製し、各リポタンパク質は、pH7.3の0.14M NaCl、0.01M トリス-HCl中の1g/Lの濃度を有する。次いで、プローブK-37を各試料溶液に攪拌下にて、ゆっくり添加した。

【0027】

次いで、各試料を440nmの励起波長にて、Daresbury Laboratory (Daresbury, Warrington, Cheshire, England) のシンクロトロン源を用いて、本発明に従って時間分解蛍光測定に付した。次いで、単光子計数法を用いて、550nmの検出波長に対してエネルギーにおいて等価な光子の時間分解減衰データを集めた。次いで、該結果の多重指数分析を非線形最小二乗法を用いて行ない、振幅を減少させる一連の指数関数、すなわち：

【0028】

【数1】

$$F(t)=A_1 \times \exp(-t/\tau_1) + A_2 \times \exp(-t/\tau_2) + \dots$$

【0029】

[式中、 A_1 、 A_2 ・・・ A_n は振幅であって、 τ_1 、 τ_2 ・・・ τ_n は例示的減衰時間定数である] として強度減衰の時間依存性を表した。

【0030】

前記の数学的分析は、VLDL溶液につき $\tau_1 = 3.1$ ナノ秒およびLDL溶液につき $\tau_1 = 4.1$ ナノ秒を明らかとする。これらの数値計算における誤差は、0.2ナノ秒のオーダーにすぎないが、2つの数値間の差は明確に大きい。従って、LDLまたはVLDLのいずれかを含有するいずれの特定の単一成分溶液についての τ_1 の測定値も、リポタンパク質が存在することを明らかとするであろう。換言すれば、K-37プローブを用いる本発明による時間分解蛍光測定法の実行は、VLDLおよびLDLを区別し、 τ_1 の測定値は、各々の溶液中のVLDLまたはLDLの同定用のパラメーターとして推定できる。

【0031】

本実施例は、リポタンパク質の時間分解蛍光減衰がリポタンパク質の密度に高度に依存することを示す。LDLおよびVLDL溶液だけを用いたが、本実施例は、HDLのごとき他のリポタンパク質のクラスで繰返して、それらの特定の特徴的減衰時間定数を確立できる。

【0032】

実施例2：リポタンパク質混合物（血清）中のVLDL画分の決定。

異なるリポタンパク質がK - 37を用いて測定されるごとき異なる蛍光減衰時間定数を有するならば、本実施例は、リポタンパク質混合物の時間分解蛍光減衰の測定を用いて、その混合物中に存在する異なるリポタンパク質の相対的濃度に関する直接的な情報を与える方法を示す。

【0033】

10個の血清試料をコレステロール(CH)およびトリグリセリド(TG)含量における広範囲の変動を有するように選択された異なる供与体から得て、次いで、脂質濃度の決定を臨床自動分析器における日常的な酵素分析を用いて各試料の一部分に行った。かかる手法は慣用的である。これは、各試料の3つの数値、すなわち、総CH濃度、総TG濃度、HDLコレステロール(CH-HDL)濃度を与えた。生化学的に測定された数値を後記の表1に与える。

【0034】

【表1】

表1

血清 番号	総CH mg/dL	総CH mg/dL	CH-HDL mg/dL
1	197	513	27
2	410	239	63
3	271	566	41
4	201	416	27
5	499	124	49
6	252	142	51
7	178	71	64
8	244	150	31
9	201	867	22
10	623	266	45

【0035】

該CHおよびTGのレベルは、各々、623mg/dLおよび867mg/dLの非常に高値まで全試料にわたって非常に広範囲に変動することが、表1から分かるであろう。さらに、CH: TG比は、0.23 - 対 - 4.0、すなわち、17倍変動する。これらの変動の範囲には、典型的なヨーロッパ人集団において見出されると期待できる数値の98%を超えて含まれる。

【0036】

次いで、時間分解減衰測定を、実施例1に関連して前記のごとく、該試料を調製して、蛍光測定を行い、各試料に行った。減衰時間 τ_1 の測定値を以下の表2に与える。

【0037】

【表2】

表2

血清	減衰時間
番号	T_1 ナノ秒
1	3,17
2	3,71
3	3,25
4	3,15
5	3,8
6	3,66
7	3,67
8	3,65
9	2,98
10	3,85

【0038】、

ヒト血清中トリグリセリドが主としてVLDLから生じ、総CHが全てのリポタンパク質から生じ、VLDLコレステロール濃度がVLDLトリグリセリド濃度の約0.2であることはよく知られているので、VLDL：総リポタンパク質濃度の比は以下の式によって表すことができる：

$$(CH - VLDL + \text{総TG}) / (\text{総CH} + \text{総TG}) = 1.2 (\text{総TG}) / (\text{総CH} + \text{総TG})$$

【0039】

生化学的に決定されたデータへの参照により測定された減衰時間の分析は、混合物の τ_1 がその混合物内に存在するリポタンパク質の相対的濃度に密接に関連することを確立する。該試料の総リポタンパク質濃度のVLDL画分と、測定された時間定数 τ_1 との間の密接な相関性は、以下の蛍光パラメーターF1：

$$F1 = 2.0 - (6.2 / \tau_1)$$

を用いて示すことができる。

(表2に与えられた測定値 λ_1 から計算された)蛍光パラメーターF1に対する(前記のごときおよび表1の生化学的に誘導されたデータを用いて計算された)VLDL画分のプロットを図1として示す。これは、その2つの間に非常に強固な線形相関が存在することを示す。線形相関係数は、 $r = -0.98$ である(すなわち、1に非常に近い)。

【0040】

かくして、前記の確立された λ_1 およびVLDL画分間の相関性を知れば、いずれの血清試料の総コレステロール含量のVLDL画分も、単一測定、すなわち、時間定数 λ_1 に基づいて本発明を用いて誘導できる。血清コレステロール成分の他の測定および先の分離は必要とされない。

【0041】

前記の実施例が、 λ_1 およびVLDL画分間の関係を確立するが、同様の関係は、VLDLおよびHDLを含めた他のリポタンパク質の λ_1 および画分濃度の間で確立できる。

【0042】

実施例3：血清中のLDL濃度の決定：

総リポタンパク質濃度に対するいずれの特定のクラスのリポタンパク質の画分濃度も、(前記の実施例2によって確立されたごとき) λ_1 から見出すことができるので、絶対濃度は、総CH+TG濃度の別々の測定から計算できることに続く。

【0043】

本明細書の導入部分に言及されるごとく、血清中のLDL濃度を正確に測定できることは非常に重要である。本実施例は、本発明を用いて、LDL濃度の測定を非常に単純化できる方法を説明する。

【0044】

表1の生化学的データおよび表2の関連した時間減衰測定を用いて、図2は、後記の蛍光パラメーターF2：

$$F2 = (CH + TG) \times [1.8 - (5.6 / \lambda_1)]$$

に対するLDLコレステロール(CH-LDL)のプロットである。

【0045】

図2は、蛍光パラメーターF2(かくして、 λ_1)およびLDL濃度との間に、用いられた試料によって示された非常に広範囲の濃度にわたり非常に密接な相関性が存在することを示す。線形相関係数は、 $r = 0.96$ である。かくして、本発明は、血清中のLDL濃度を決定する方法を提供し、わずか2つの測定値、すなわち、 λ_1 、およびよく知られ相対的に単純な臨床的手法を用いて容易に得ることができる総CH+TGを必要とする。従って、本発明によるLDL決定は、先行技術のものより、行うのに非常に単純でかつ直接的である。

【0046】

パラメーターF2およびVDL濃度間の相関性は、パラメーターF2の計算における生化学的に誘導されたデータ、すなわち、CH+TGの使用に起因し得ないことに注目すべきであろう。数値CH+TGは、事実、他方に対して一方をプロットする図3に示されるごときCH-LDL濃度と何ら相関性を有しない。図3の場合において、線形相関係数は、ゼロに非常に接近している($r = 0.06$)。

【0047】

本方法から得られた結果は、有意な確率的誤差(random error)を示さない。さらに、いずれの小さな誤差も特性において系統的であり、試料が取られた特定の患者等に依存し、従って、その小さな誤差は、その患者に対する全てのテストにおいて存在し、かくして、例えば、経時的なLDLレベルにおける小さな変化を正確にモニターする能力に対して効果を有さないであろうと推定できる。

【0048】

本明細書の導入部分に言及されたごとく、K-37の蛍光強度は、血清の希釈の程度に依存しないようであり、かくして、本発明は大きな感度を有し、患者等から採取されるべきほんの少量の試料を必要とする。加えて、得られた結果は一貫し、長期の治療サイクルにわたる変化を測定するのに特に重要である再現性がある。

【0049】

時間分解蛍光データの獲得は単一工程操作であり、血清中リポタンパク質の先の分離を必要としないことが認められるであろう。加えて、蛍光寿命結果は、プローブK-37の添加の1分間以内に得ることができる。

【0050】

本発明を行い、血清および血漿以外の蛋白質混合物のリポタンパク質含量を同定できることが認められるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、実施例2に関して引用されたプロットであり、蛍光パラメーターF1とVLDL画分との非常に強固な線形相関を示す。

【図2】

図2は、実施例3に関して引用されたプロットであり、蛍光パラメーターF2とLDL濃度との相関性を示す。

【図3】

図3は、実施例3に関して引用されたプロットであり、CH+TG濃度とCH-LDL濃度とが相関性を有しないことを示す。

【図1】

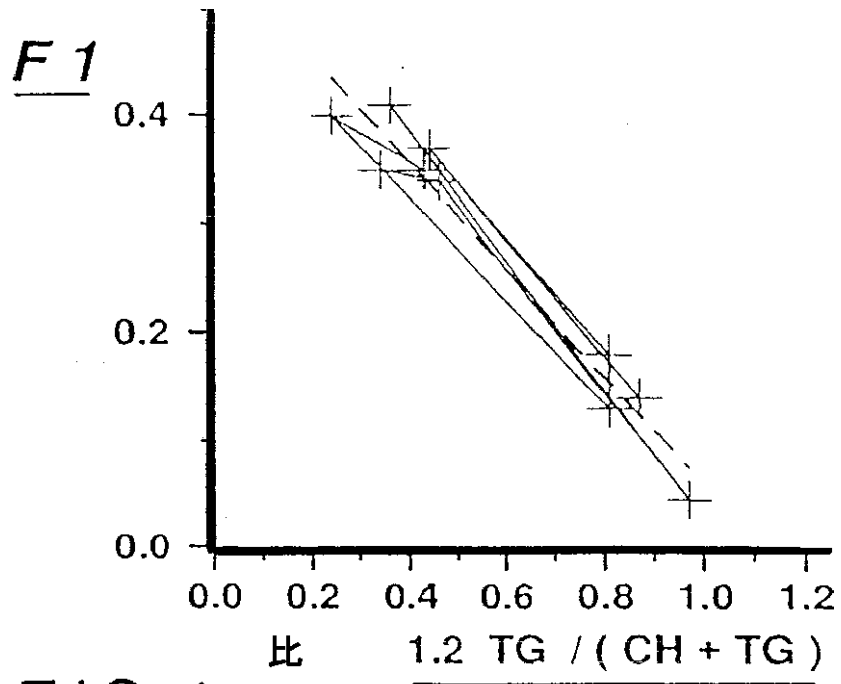


FIG.1

【図2】

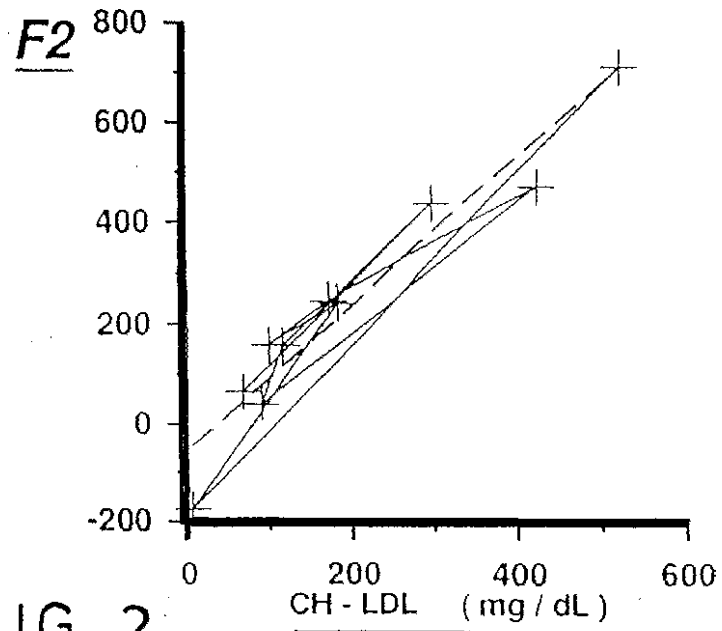


FIG.2

【 3】

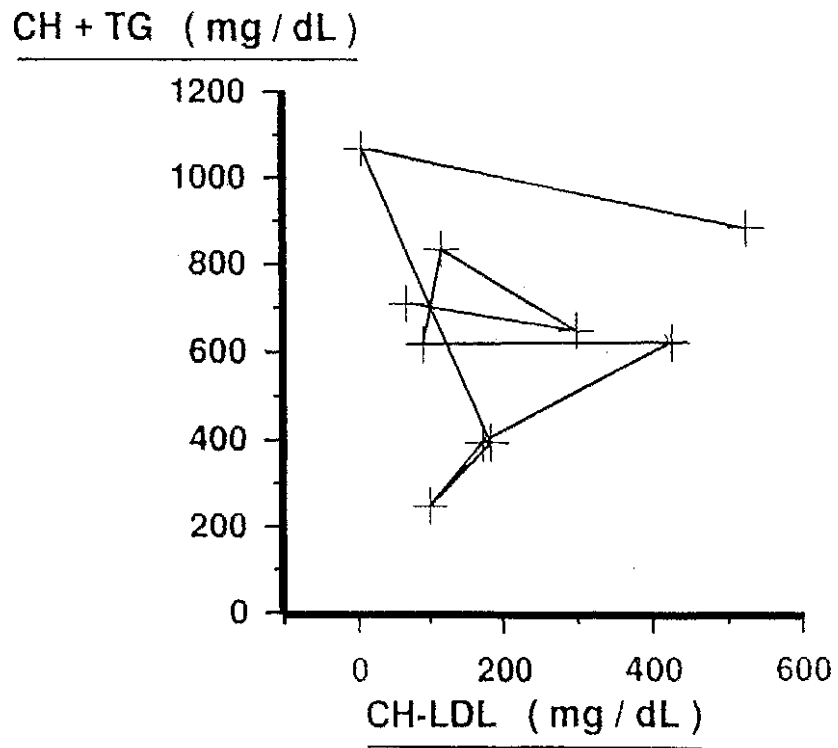


FIG. 3

【手続補正書】**【提出日】**平成14年7月29日(2002.7.29)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**特許請求の範囲**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】**

【請求項1】 少なくとも2つの標的分子タイプの混合物を含有する試料溶液中の多数の異なる標的分子タイプのうちの特定の1つの濃度または相対的濃度を決定するためのアッセイ方法であって、

i) 各々の標的分子タイプに結合し、そのように結合する場合、適当な励起下にて蛍光するプローブ物質を該試料に添加し、

ii) 試料に対して時間分解蛍光測定を行ない；次いで、

iii) 該時間分解蛍光測定から得られた時間減衰データの分析から該決定を行う工程を含むことを特徴とする該方法。

【請求項2】 該標的分子タイプの各々につき時間の関数として異なる特徴的蛍光強度の減衰を有するように該プローブ物質を選択することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 工程(iii)の該決定が、減衰速度を表す時間分解強度減衰パラメーターからなされることを特徴とする請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 工程(iii)の該分析が、減衰時間定数を決定するための時間分解蛍光測定データの多重指数関数分析を含み、該決定が該時間定数の関数としてなされることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項5】 該多重指数関数分析が、振幅を減少させる一連の指数関数として時間分解蛍光減衰を表わし、該時間定数が指数関数の最も重要な時間定数であることを特徴とする請求項4記載の方法。

【請求項6】 工程(iii)の該決定が、該試料中に存在する全標的分子タイプの総濃度に対する第1の標的分子タイプの濃度を決定することを含むこと

を特徴とする請求項1ないし5のいずれか1記載の方法。

【請求項7】 工程(iii)の該決定が、該時間分解減衰測定データおよび試料中に存在する全標的分子タイプの総濃度の別々の測定値の組合せから第1の標的分子タイプの濃度を決定することを含むことを特徴とする請求項1ないし5のいずれか1記載の方法。

【請求項8】 該標的分子タイプが、異なるタイプの蛋白質であることを特徴とする請求項1ないし7のいずれか1記載の方法。

【請求項9】 該標的分子タイプが、異なる密度のリポタンパク質であることを特徴とする請求項8記載の方法。

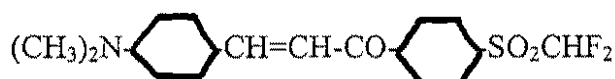
【請求項10】 該リポタンパク質が、HDL、LDLおよびVLDLであることを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項11】 該試料が、血清または血漿から得られることを特徴とする請求項8ないし10のいずれか1記載の方法。

【請求項12】 全標的分子タイプの総濃度の該別々の測定値が生化学的に得られることを特徴とする請求項7に従属する場合の請求項8ないし11のいずれか1記載の方法。

【請求項13】 該プローブ物質が、化学式：

【化1】



により表されることを特徴とする請求項1ないし12のいずれか1記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern: Application No PCT/GB 01/00167
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/557 G01N33/533		
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) IPC 7 G01N		
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 practical, search terms used) WPI Data, EPO-Internal, INSPEC, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199323 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1993-186834 XP002165393 & SU 1 545 527 A (KRASOVITSKII B M), 23 July 1992 (1992-07-23) abstract	1-14
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199339 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1993-309983 XP002165394 & SU 1 457 386 A (KRASOVITSKII B M), 30 October 1992 (1992-10-30) cited in the application abstract	1-14
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" 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 "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 "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. "8" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 17 April 2001		Date of mailing of the international search report 18.05.01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer GONCALVES M L F C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat	Application No
	PCT/GB 01/00167

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 198235 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1982-74280E XP002165395 & SU 877 437 A (MOSC MED INST), 30 October 1981 (1981-10-30) abstract</p>	1-14
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199228 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B02, AN 1992-232285 XP002165396 & SU 1 681 266 A (PHYS CHEM MEDICINE RES INST), 30 September 1991 (1991-09-30) abstract</p>	1-14
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199306 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1993-052004 XP002165397 & SU I 720 004 A (HEALTH MIN PHYS CHEM RES INST), 15 March 1992 (1992-03-15) abstract</p>	1-14
X	<p>GRYZUNOV YU A ET AL: "Serum albumin binding sites properties in donors and in schizophrenia patients: the study of fluorescence decay of the probe K-35 using S-60 synchrotron pulse excitation" 12TH NATIONAL SYNCHROTRON RADIATION CONFERENCE, NOVOSIBIRSK, RUSSIA, 14-18 JULY 1998, vol. 448, no. 1-2, - July 1998 (1998-07) pages 478-482, XP004206580 Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section A (Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment), 21 June 2000, Elsevier, Netherlands ISSN: 0168-9002 page 478</p>	1-14

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern. Application No
 PCT/GB 01/00167

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DOBRETsov G E ET AL: "Time-resolved spectroscopy of the probe fluorescence in the study of human blood protein dynamic structure on SR beam" 12TH NATIONAL SYNCHROTRON RADIATION CONFERENCE, NOVOSIBIRSK, RUSSIA, 14-18 JULY 1998, vol. 448, no. 1-2, - July 1998 (1998-07) pages 471-477, XP004206579 Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section A (Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment), 21 June 2000, Elsevier, Netherlands ISSN: 0168-9002 page 471	1-14
X	DEM'YANOV G V ET AL: "Observation of fluorescence anisotropy decay for a lipid probe in artificial membranes" KRATKIE SOOBShCHENIYA PO FIZIKE, 1995, ALLERTON PRESS, RUSSIA, no. 11-12, - 1995 pages 15-19, XP000995214 page 16	1-14
X	DEMYANOV G V ET AL: "Characteristics of molecular fluorescence of a lipid probe in human blood lipoproteins exposed to synchrotron radiation" 10TH NATIONAL SYNCHROTRON RADIATION CONFERENCE (SR'94), NOVOSIBIRSK, RUSSIA, 11-15 JULY 1994, vol. 359, no. 1-2, 11 - 15 July 1994, pages 342-344, XP000995488 Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section A (Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment), 1 May 1995, Netherlands ISSN: 0168-9002 page 342	1-14

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern	Application No
	PCT/GB 01/00167

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DEMYANOV G V ET AL: "Protein fluorescence decay of human serum with a very low density of lipoproteins exposed to synchrotron radiation"</p> <p>NINTH USSR NATIONAL CONFERENCE ON SYNCHROTRON RADIATION UTILIZATION, MOSCOW, USSR, 26-29 JUNE 1990, vol. A308, no. 1-2, pages 215-218, XP000995480</p> <p>Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section A (Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment), 10 Oct. 1991, Netherlands ISSN: 0168-9002 page 215</p> <p>---</p>	1-14
Y	<p>KUREK N K ET AL: "The use of synchrotron radiation to investigate the localization of fluorescent probes in model lipoproteins"</p> <p>EIGHTH USSR NATIONAL CONFERENCE ON SYNCHROTRON RADIATION UTILIZATION, NOVOSIBIRSK, USSR, 18-22 AUG. 1988, vol. A282, no. 2-3, pages 490-492, XP000995208</p> <p>Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section A (Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment), 10 Oct. 1989, Netherlands ISSN: 0168-9002 page 490</p> <p>---</p>	1-14
Y	<p>YOU WENDY W ET AL:</p> <p>"3-(4-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde, a reagent with broad dynamic range for the assay of proteins and lipoproteins in solution."</p> <p>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 244, no. 2, 1997, pages 277-282, XP000985955</p> <p>ISSN: 0003-2697 page 277</p> <p>-----</p>	1-14

Form PCT/SA21D (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/GB 01/00167
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 15
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 15

Present claim 15 relate to an extremely large number of possible methods. Support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the methods claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the methods of claims 1-14.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No
PCT/GB 01/00167

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
SU 1545527 A	23-07-1992	NONE	
SU 1457386 A	30-10-1992	NONE	
SU 877437 A	30-10-1981	NONE	
SU 1681266 A	30-09-1991	NONE	
SU 1720004 A	15-03-1992	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト [*] (参考)
// G 0 1 N 33/533		G 0 1 N 33/533	
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	ゲナディ・エフゲニーエビッチ・ドブレツ オフ ロシア119828モスクワ、リサーチ・インスティテュート・フォー・フィジカル・ケミカル・メディシン		
(72)発明者	タチアナ・イワノーブナ・シレジシュチコ ワ ロシア、モスクワ、レベデフ・フィジカル・インスティテュート		
(72)発明者	ニコライ・コンスタンティノビッチ・クレク ク ロシア119828モスクワ、リサーチ・インスティテュート・フォー・フィジカル・ケミカル・メディシン		
(72)発明者	デイビッド・クラーク イギリス、ダブリューエイ4・4エイディ、ウォーリントン、デアーズベリー・ラボラトリー		
(72)発明者	ギャレス・ジョーンズ イギリス、ダブリューエイ4・4エイディ、ウォーリントン、デアーズベリー・ラボラトリー		
(72)発明者	ミハイル・ニコラエビッチ・ヤキメンコ ロシア、モスクワ、レベデフ・フィジカル・インスティテュート		

(72)発明者 ボリス・モルドゥホビッチ・クラソビツキ
—

ウクライナ310001ハリコフ、インスティテ
ュート・オブ・シングルクリスタルズ

F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 DA02 EA01 FA03
GA25 GB18 GB28 KA02 KA05
KA08 NA01
2G045 AA13 AA25 CA25 CA26 DA62
FB13 GC15
2G054 AA07 CA21 CE02 EA01

专利名称(译)	测定脂蛋白的方法		
公开(公告)号	JP2003520963A	公开(公告)日	2003-07-08
申请号	JP2001554066	申请日	2001-01-17
[标]申请(专利权)人(译)	COUNCIL FOR THE RES议会的CENT LAB		
申请(专利权)人(译)	委员会的研究委员会中心实验室		
[标]发明人	ゲナディエフゲニーエビッチドブレツォフ タチアナイワノーブナシレジシュチコワ ニコライコンスタンティノビッチクレク デイビッドクラーク ギャレスジョーンズ ミハイルニコラエビッチヤキメンコ ボリスモルドゥホビッチクラソビツキー		
发明人	ゲナディ・エフゲニーエビッチ・ドブレツォフ タチアナ・イワノーブナ・シレジシュチコワ ニコライ・コンスタンティノビッチ・クレク デイビッド・クラーク ギャレス・ジョーンズ ミハイル・ニコラエビッチ・ヤキメンコ ボリス・モルドゥホビッチ・クラソビツキー		
IPC分类号	G01N21/64 G01N21/76 G01N21/78 G01N33/533 G01N33/557 G01N33/92		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/557 G01N33/92 G01N2800/044 Y10S435/973 Y10S436/80		
FI分类号	G01N33/92.Z G01N21/64.B G01N21/64.F G01N21/76 G01N21/78.C G01N33/533		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/FA03 2G043/GA25 2G043/GB18 2G043/GB28 2G043/KA02 2G043/KA05 2G043/KA08 2G043/NA01 2G045/AA13 2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA62 2G045/FB13 2G045/GC15 2G054/AA07 2G054/CA21 2G054/CE02 2G054/EA01		
优先权	2000001089 2000-01-18 GB		
其他公开文献	JP3647810B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种测定方法，用于确定样品溶液中多种不同靶分子类型中特定一种的身份和/或浓度或相对浓度，包括：i) 与该靶分子或每种靶分子类型结合。当如此结合时，将在适当的激发下发荧光的探针物质加入样品中，并且ii) 对样品进行时间分辨荧光测量；以及iii) 从时间分辨荧光测量获得。该方法包括从对时间衰减数据的分析中进行确定的步骤。

