

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4729701号
(P4729701)

(45) 発行日 平成23年7月20日 (2011.7.20)

(24) 登録日 平成23年4月28日 (2011.4.28)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 Z N A G

CO 7 K 16/16 (2006.01)

CO 7 K 16/16

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 19 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-552756 (P2004-552756)
 (86) (22) 出願日 平成15年11月17日 (2003.11.17)
 (65) 公表番号 特表2006-506634 (P2006-506634A)
 (43) 公表日 平成18年2月23日 (2006.2.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/FI2003/000875
 (87) 国際公開番号 W02004/046733
 (87) 国際公開日 平成16年6月3日 (2004.6.3)
 審査請求日 平成18年9月21日 (2006.9.21)
 (31) 優先権主張番号 20022048
 (32) 優先日 平成14年11月18日 (2002.11.18)
 (33) 優先権主張国 フィンランド (FI)

(73) 特許権者 501374390
 テクノロジアン・トゥトキムスケスク・ブ
 イティーティー
 フィンランド共和国、エフイー・O 2 1 5
 O エスポー、プオリミエヘンティエ 5
 (74) 代理人 100091351
 弁理士 河野 哲
 (74) 代理人 100088683
 弁理士 中村 誠
 (74) 代理人 100108855
 弁理士 蔵田 昌俊
 (74) 代理人 100075672
 弁理士 峰 隆司
 (74) 代理人 100109830
 弁理士 福原 淑弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイ法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5 0 0 0 より小さい分子量を有する小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイ法であって、前記分析物を含む試料を、前記分析物と結合する第 1 の結合パートナーと、前記分析物および前記第 1 の結合パートナーの複合体と結合する第 2 の結合パートナーとを含む試薬対と反応させる工程であって、前記第 2 の結合パートナーは、前記分析物および第 1 の結合パートナーの前記複合体と結合する結合パートナーを選択することによって未処置のディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーから得られる工程、第 2 の結合パートナーの結合を決定する工程、こうして試料中の分析物の存在を示す工程を含むアッセイ法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のアッセイ法であって、前記第 1 および第 2 の結合パートナーは、抗体断片 Fab および scFv から選択されるアッセイ法。

【請求項 3】

アッセイ法が均質アッセイ法である、請求項 1 または 2 に記載のアッセイ法。

【請求項 4】

アッセイ法が蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) に基づく、請求項 3 のアッセイ法。

【請求項 5】

前記分析物が乱用薬物である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のアッセイ法。

【請求項 6】

前記分析物が、モルヒネ、テトラヒドロカンナビノール (THC)、またはアンフェタミンである、請求項 5 に記載のアッセイ法。

【請求項 7】

第 2 の結合パートナーは、配列番号 5 を含む K11 scFv のリガンド結合部分を含む、請求項 1 に記載のアッセイ法。

【請求項 8】

第 1 の結合パートナーは、配列番号 1 および配列番号 2 を含む M1 Fab のリガンド結合部分または配列番号 3 および配列番号 4 を含む M2 Fab のリガンド結合部分を含む、請求項 1 に記載のアッセイ法。

【請求項 9】

第 1 の結合パートナーは、配列番号 1 および配列番号 2 を含む M1 Fab のリガンド結合部分を含む、請求項 7 に記載のアッセイ法。

【請求項 10】

5000 より小さい分子量を有する小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイのための試薬対であって、前記分析物と結合する第 1 の結合パートナーと、前記分析物および前記第 1 の結合パートナーの複合体と結合する第 2 の結合パートナーとを含み、前記第 2 の結合パートナーは、分析物および第 1 の結合パートナーの前記複合体と結合する結合パートナーを選択することによって、未処置のディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーから得られ、ここで、第 1 の結合パートナーは、配列番号 1 および配列番号 2 を含む M1 Fab のリガンド結合部分であり、第 2 の結合パートナーは、配列番号 5 を含む K11 scFv のリガンド結合部分を含む、試薬対。

【請求項 11】

第 1 の結合パートナーは、配列番号 1 のアミノ酸番号 3~108 および配列番号 2 のアミノ酸番号 4~123 ; ならびに第 2 の結合パートナーは、配列番号 5 のアミノ酸番号 3~120 および番号 140~246 によって形成される、請求項 10 に記載の試薬対。

【請求項 12】

請求項 10 , 11 のいずれか 1 項に記載の試薬対を含む 5000 より小さい分子量を有する小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイ法のための試験キット。

【請求項 13】

均質アッセイ法のための試薬を含む、請求項 12 に記載の試験キット。

【請求項 14】

蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) に基づいたアッセイ法のための試薬を含む、請求項 13 に記載の試験キット。

【請求項 15】

5000 より小さい分子量を有する小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイ法における、分析物と結合する第 1 の結合パートナーと、前記分析物および前記第 1 の結合パートナーの複合体と結合する第 2 の結合パートナーとを含む試薬対の使用であって、第 2 の結合パートナーは、分析物および第 1 の結合パートナーの前記複合体と結合する結合パートナーを選択することによって未処置ディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーから得られるものである試薬対の使用。

【請求項 16】

5000 より小さい分子量を有する小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイのための試薬対を調製する方法であって、前記分析物と結合する第 1 の結合パートナーと、前記分析物および前記第 1 の結合パートナーの複合体と結合する第 2 の結合パートナーとを提供することを含み、前記第 2 の結合パートナーは、分析物および第 1 の結合パートナーの前記複合体と結合する結合パートナーを選択することによって未処置のディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーを使用して得られる方法。

【請求項 17】

組換え抗体断片が、ファージディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーから調製される、請求項 16 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

最初に、ファージディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーのファージを、固定化された第1の結合パートナーとプレインキュベートして、第1の結合パートナーとそれ自体が第1の結合パートナーに結合したものをソートして除き、その後、結合していないファージを分離して、分析物および固定された第1の結合パートナーの混合物と共にインキュベートし、固定された第1の結合パートナーおよび分析物の間に形成された免疫複合体と結合するが、それ自体が第1の結合パートナーに結合しないファージを選択する、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

前記第1の結合パートナーも、ディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーから得られる、請求項16、17または18のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫アッセイ法に、および特に小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイ法に関する。本発明は、さらにアッセイ法に有用な試薬対および試験キットに、並びに試薬対の使用に、およびこれらの調製のための方法に関する。また、新規の試薬およびこれらの調製のための手段が提供される。

【背景技術】

【0002】

発明の技術的背景

競合的な免疫アッセイ法では、分析物と競合する外部試薬を添加しなければならず、これは非競合的なアッセイ形式の場合には不要である。免疫化学による分析物の検出のための選択の方法は、今日では、2つの抗体が分析物の2つの異なるエピトープと結合し、いわゆるサンドイッチ型のアッセイ法を生じさせる非競合的な免疫アッセイ法である。このようなアッセイ法は、高分子量の分析物によく適しており、これは、速度、感度、および特異性の改善をもたらし、現代の免疫アッセイ法に必要とされている。しかし、低分子量の分子は独立して複数の抗体に同時に結合するほど十分に大きくないために、小さな分析物のための非競合的なアッセイ法を開発することは困難な作業であった。従って、特異性および感度に関する多くの基本的な問題があるにもかかわらず、小さな分析物の検出のためには、競合的な免疫アッセイ形式がほぼ使用されてきただけであった。

【0003】

しかし、小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイ法の開発を報告している刊行物がわずかに存在する。これらの論文では、分析物に結合している一次抗分析物抗体と結合するが、単独で一次抗体または分析物と結合しない二次抗免疫複合体（抗IC）抗を開発しているUllman et al., 1993; Self et al., 1994; Towbin et al., 1995)。Ullman et al., 1993は、テトラヒドロカンナビノール（THC）に対する抗体の免疫複合体を認識する抗体を記載している。抗IC抗体は、免疫原として親和性ラベルした抗THC抗体を使用して、 Δ^9 THCが存在下することによって結合が増強される抗IC抗体を選択することによって得た。Self et al. (1994) は、ジゴキシンを決定するための抗IC抗体を調製する際と同じ原理を使用した。Towbin et al. (1995) は、ハプテン・アンジオテンシンIIのためのサンドイッチ免疫アッセイ法であって、免疫化では、抗IC抗体を得るために抗免疫複合体で免疫化する前に、複合体を形成していない一次抗体で寛容化することを含むアッセイ法を報告している。小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイに使用する抗IC抗体は、今までは、免疫化によって得られた従来のポリクローナルまたはモノクローナル抗体であったが、本明細書に記載されているアッセイ法は、一次抗体のラベリングおよび二次抗体の固定化、またはその逆を含む。

【0004】

小さな分析物のためのいわゆる「独自測定基準」の非競合的な免疫アッセイ法は、Mares et al. (1995) によって開発された。彼らは、エストラジオール（oestradiol）特異

10

20

30

40

50

的な一次抗体の高頻度可変領域内の異なるエピトープを認識する2つのタイプの抗イディオタイプ抗体を使用した。第1の抗イディオタイプ抗体（ベータタイプ）は、一次抗体の結合部位にエピトープのための分析物と競合する能力を有する。第2の抗イディオタイプ（アルファタイプ）は、一次抗体の可変領域内のエピトープを認識し、かつ結合は分析物の存在に感受性でない。しかし、アルファタイプは、ベータタイプの存在下において一次抗体が結合することを立体的に邪魔する。これらの3つのタイプの抗体により、小さな分析物のための非競合的なアッセイ法の開発を可能になる。

【0005】

いわゆる開放型サンドイッチ免疫アッセイ法は、ハプテンの検出のために開発された（Suzuki et al., 2000; Suzuki et al., 1999; Yokozeki et al., 2002）。これらは、いくつ

10

【0006】

非競合的な免疫アッセイ形式の有意な利益にもかかわらず、このような小さな分析物のためのアッセイ法は、ほんのわずかの例しか報告されていない。その理由は、おそらく、動物を免疫することによって二次（抗免疫複合体または抗イディオタイプ）抗体を産生することが困難なことにある。たとえば、ハイブリドーマ技術（Kohler、およびMilstein、1975）によって開発された抗ハプテン・モノクローナル抗体は、マウスの自己抗原であり、これらに対する免疫応答を生じさせることは、困難である（Maruyama et al., 2002; Ullman et al., 1993; Kobayashi et al., 2000）。さらなる問題は、免疫化に使用される免疫複合体が、免疫複合体に対する応答が得られる前に、破壊される傾向があるということである（Ullman et al., 1993; Kobayashi et al., 2000）。

20

【0007】

本発明は、ここで、小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイ・プロトコルであって、抗IC抗体が開発されたときに、今までに最も困難な作業であった免疫複合体で動物を免疫化することを回避する免疫アッセイ・プロトコルを提供する。また、本発明は、さらにアッセイの速度、感度、および単純さを改善する同種の免疫アッセイを容易にする。

【発明の開示】

【0008】

発明の概要

30

小さな分析物のための免疫アッセイ法に使用するための抗IC抗体を生じさせることに付随する問題点は、今回、免疫した動物からの代わりに、ディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーから必要な抗IC抗体を供給することによって回避することができる。ファージディスプレイ抗体ライブラリーは、莫大な数のクローンを含み、抗体断片などの所望の結合をコードするものから構築されていてもよく、一連のパニングによって濃縮および選択することができる。このプロトコルにより、費用効果があり、かつ実行可能な方法で、小さな分析物のための迅速で、信頼でき、また単純な免疫アッセイ法の開発のための新たな可能性が開ける。

【0009】

従って、本発明の1つの目的は、小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイ法であって、前記分析物を含む試料を、前記分析物と結合する第1の結合パートナーと、前記分析物および前記第1の結合パートナーの複合体と結合する第2の結合パートナーとを含む試薬対と反応させることを含む小さなアッセイ法である。本免疫アッセイ法は、第2の結合パートナーが、前記分析物および第1の結合パートナーの前記複合体と結合する結合パートナーを選択することと、第2の結合パートナーの結合を決定することとによってディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーから得られ、こうして試料中に分析物が存在することを示す点を特徴とする。

40

【0010】

もう一つの本発明の目的は、小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイ法のための試薬対であって、前記分析物と結合する第1の結合パートナーと、前記分析物および前記

50

第1の結合パートナーの複合体と結合する第2の結合パートナーとを含み、前記第2の結合パートナーは、分析物および第1の結合パートナーの前記複合体と結合する結合パートナーを選択することによって、ディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーから得られるという点を特徴とする試薬対である。

【0011】

さらにもう一つの本発明の目的は、小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイ法のための試験キットであって、前記キットは、前記分析物と結合する第1の結合パートナーと、前記分析物および前記第1の結合パートナーの複合体と結合する第2の結合パートナーを含む試薬対を含み、前記第2の結合パートナーは、分析物および第1の結合パートナーの前記複合体と結合する結合パートナーを選択することによって、ディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーから得られることを特徴とするキットである。

10

【0012】

また、本発明は、小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイ法において、分析物と結合する第1の結合パートナーと、前記分析物および前記第1の結合パートナーの複合体と結合する第2の結合パートナーを含む試薬対の使用であって、第2の結合パートナーは、分析物および第1の結合パートナーの前記複合体と結合する結合パートナーを選択することによってディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーから得られる使用に向けられる。

【0013】

なおさらなる本発明の目的は、小さな分析物のための非競合的な免疫アッセイのための試薬対を調製する方法であって、前記分析物と結合する第1の結合パートナーと、前記分析物および前記第1の結合パートナーの複合体と結合する第2の結合パートナーとを提供することを含み、前記第2の結合パートナーは、分析物および第1の結合パートナーの前記複合体と結合する結合パートナーを選択することによってディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーから得られることを特徴とする方法である。

20

【0014】

また、本発明は、新規の組換え結合タンパク質であって、これらが配列番号1および配列番号2を含むM1 Fabのリガンド結合部分；配列番号3および配列番号4を含むM2 Fab；または配列番号5を含むK11 scFvを含むという点を特徴とするタンパク質を提供する。

【0015】

新規の結合タンパク質をコードするDNA、並びにこれらを発現する宿主細胞も、本発明に含まれる。

30

【0016】

本発明の有利な態様は、従属請求項に記載されている。

【0017】

本発明のその他の目的、詳細、および利点は、以下の図面、詳細な説明、および実施例から明らかになるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

発明の詳細な説明

40

本発明の非競合的な免疫アッセイのための試薬対は、第1の結合パートナーおよび第2の結合パートナーを含む。第1の結合パートナーは、分析物に結合して、第1の結合パートナーと分析物の間の複合体を形成する。第2の結合パートナーは、第1の結合パートナーおよび分析物によって形成される複合体と結合する。結合パートナーは、通常、所望の結合性質を有する抗体断片を含む抗体などのタンパク質である。抗体は、免疫グロブリン分子であり、これは、IgG、IgM、IgE、IgA、またはIgDのクラスに属する可能性があり；IgGおよびIgMが最も多用されている。好ましくは、結合パートナーは、FabまたはscFv断片などのリガンド-結合部位を含む抗体断片である。Fab断片（断片抗原結合）として知られる断片は、免疫グロブリン重鎖の可変ドメインおよび第1の定常ドメインにジスルフィド架橋によって共有結合性に付着された免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインおよび定常ドメインか

50

ら成る。Fv (可変ドメイン) は、リガンド結合を担う免疫グロブリン分子の可変領域を意味する。ScFv (単鎖Fv) は、抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメインがペプチドによって連結されて、単一のmRNA分子から合成された単一のポリペプチド鎖を形態する分子を意味する。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の可変領域は、共にリガンド結合を担当する。リガンドは、結合パートナーが結合する物質であり、抗体に関しては、これは抗原またはハプテンである。

【0019】

第1の結合パートナーは、従来のポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、またはこれらの断片あってもよいが、好ましくは、これは組換えのものであり、第2の結合パートナーも同様である。第1の結合パートナーを選択したときに、これは、そのリガンドと複合体を形成して、この複合体を、組換えライブラリーから第2の結合パートナーを選択するために使用する。リガンドを伴わない1の結合パートナーは、逆淘汰として使用する。第2の結合パートナーは、複合体のみを認識し、任意の有意な程度で遊離の第1の結合パートナーまたは遊離の抗原を認識しない。

【0020】

組換え結合パートナー・ライブラリーは、好都合なことには、発現ライブラリーであり、これは典型的にはディスプレイ・ライブラリーである。ディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーの一般的な原理は、これらが融合タンパク質として結合パートナー表面に存在することである (酵母もしくは細菌細胞などの微生物細胞、またはファージの表面にあってもよい)。また、ディスプレイ組換え結合パートナー・ライブラリーは、新生タンパク質およびmRNAの安定な複合体が、インビトロでの発現系において産生されるディスプレイ・ライブラリーであることができる。ファージディスプレイ・ライブラリーは、最も多用される。抗体ファージディスプレイ技術およびその適用は、たとえばHoogenboom et al., 1998に記載されている。

【0021】

ファージディスプレイ抗体ライブラリーは、適切なファージディスプレイ・ベクター内に免疫グロブリンドメインをコードするcDNAをクローン化することによって構築してもよい。何百万もの抗体断片の変種をコードするDNAをファージ・コートタンパク質の一部としてベクターにバッチクローン化する。細菌内にベクターを形質転換することによって、異なる特異性を有する何百万もの抗体断片を含む大規模なライブラリーを得ることができる。細菌の培養により、これらの表面上に抗体断片を示すファージを発現することとなる。示される抗体の遺伝子は、ファージゲノム内に保有され、したがって、表現型と遺伝子型が結びついている。示されるタンパク質とそのDNAの間の物理的な結びつきにより、パニングと呼ばれる単純なインビトロでの選択手法によって莫大な数のタンパク質の変種 (それぞれが、その対応するDNAに結びついている) のスクリーニングが可能となる。最も簡単な形態では、パニングは、キャリア上に固定された関心対象のリガンドと共にファージに示された変種のプールをインキュベートすること、結合していないファージを洗い流すこと、リガンドに対する結合を破壊することによって特異的に結合したファージを溶出することによって行われる。次いで、溶出されたファージをインピボで増幅させる。本方法を数回繰り返して、最もしっかりと結合する配列を採用してファージ・プールを段階的に濃縮する。約3~6ラウンドの選択および増幅の後、最適なクローンをシーケンスし、さらなる発現のために宿主細胞に形質転換する。宿主細胞は、真核細胞または原核細胞、たとえば、酵母、動物、植物、もしくは昆虫の細胞、または細菌細胞であってもよい。ハイブリドーマ細胞であってもよく、これは、形質転換後に組換えモノクローナル抗体を産生する。また、組換え結合パートナーまたは少なくともその一部を合成で製造してもよい。

【0022】

組換え抗体ライブラリーを使用するという概念により、小さな分析物のための非競合的なサンドイッチ・アッセイ法が可能になる。サンドイッチは、全ての標準的な免疫アッセイ法によって検出することができる。通常、1つのパートナーは、マイクロタイターウェルまたはビーズなどのキャリア上に固定されている。サンドイッチは、分析物およびその

10

20

30

40

50

他の結合パートナーの存在下で形成される。サンドイッチは、たとえば二次抗体を使用することによって、または結合パートナーの少なくとも1つにラベリングすることによって検出してもよい。ラベルは、放射性ラベル、酵素、または蛍光化合物などの従来のいずれのラベルであることもできる。アッセイ法は、たとえば、ELISAまたはFIAであることができる。

【0023】

本発明の試薬対の大きな利点は、同種の(homogenous)非競合的な免疫アッセイ法、すなわち溶液中で行う免疫アッセイ法が可能になるということである。固定および洗浄の工程を回避することにより、極めて単純なアッセイ法となる。また、このような試験は、現場で、すなわち研究室以外の場所で試験するために適している。

10

【0024】

好ましい同種の免疫アッセイ法は、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)に基づくものであり、総説については、Szilsi et al. (1998)を参照されたい。FRETでは、分子フルオロフォア(ドナー)からのエネルギーによって高エネルギー状態を生じ、分子間の双極子-双極子カップリングを経て、もう一つのフルオロフォア(アクセプター)へ移される。これは、ドナーとアクセプターの間の距離が短く(10~100 Å)、ドナーのスペクトルとアクセプターの吸収スペクトルが部分的に重複する蛍光である場合にのみ可能となる。次いで、エネルギー転移は、蛍光の変化として検出される。時間分解蛍光が利用されることが多い(Hemmil et al., 1988)。

【0025】

20

FRETは、2つの結合パートナー(これらは、好ましくはFRETドナー アクセプター対を形成するフルオロフォアを有する抗体断片である)をラベリングすることによって本発明に適用される。結合パートナーおよび分析物が小さなきは、フルオロフォアは、非常に近くに入り、測定可能なFRETシグナルが得られる。

【0026】

本発明は、治療薬および濫用薬物、ステロイド、ホルモン類、代謝産物、並びに環境の汚染物質および毒素などの低分子量の分析物のための便利かつ迅速な解析ツールを提供する。これらの小さな分析物の一般的な特徴は、抗原の異なるエピトープを認識する2つの抗体を使用する従来のサンドイッチ・アッセイ法のためにはこれらがあまりに小さすぎるということである。これらの小さな分析物の分子量は、通常5000よりも小さいが、限界は絶対的ではない。

30

【0027】

免疫アッセイ法は、環境ハザード、食品および飼料中の毒性化合物、進行中のプロセス、たとえば微生物プロセスを表す化学薬品、生体系の代謝プロセスを検出する際に、並びに臨床試験、薬物モニタリング、および薬理学的研究などの際に、各種の調査に使用してもよい。本アッセイ法は、アヘン剤(たとえば、モルヒネ)、アンフェタミン、カンナビノイド(たとえば、テトラヒドロカンナビノール(THC))、バルビツール剤、ベンゾジアゼピン、コカイン、LSD、メサドン、メタカロン、フェンシクリジン、プロボキシフェン、三環系抗うつ薬などの乱用薬物を検出するために極めて適している。同種のアッセイ法は、現場での試験のための、警察が運転手を手入れする際に使用するために優れた便利なツールを提供する。薬物および濫用薬物についての解析をする試料は、たとえば血液、血清、尿、または唾液などのいずれの体液試料であってもよい。

40

【0028】

本発明の試薬対は、試験キットに含まれていてもよい。この試験キットは、反応溶液、緩衝液、洗浄溶液、並びにラベルおよび選択的に蛍光光度計などの検出手段などの、アッセイ法に必要なとされるその他の何らかの試薬をさらに含んでもよい。好ましくは、試験キットは、互いに物理的に分離された、たとえば多くはマイクロアレイの形態の複数の試薬対を含み、これにより、たとえば単一のだ液試料から同時に多くの異なる乱用薬物を試験してもよい。

【0029】

50

本発明の特別な態様において、モルヒネを検出するための試薬対が製造され、前記物質についての同種の免疫アッセイ法に使用される。第1の結合パートナーは、免役キャリアBSAに結合したモルヒネで免疫したマウスからのcDNAから産生されるファージディスプレイ抗体ライブラリーから得られるFab断片である。モルヒネ特異的な抗体ファージを、BSAに結合したモルヒネに対して結合するものを選択し、BSA単独に結合するものをソートして除くことによって濃縮した。数回のパニングラウンドの後、2つの高度に結合するクローンをシーケンスし、発現させる。発現されたFab断片には、M1 FabおよびM2 Fabという名前をつけた。

【0030】

第2の結合パートナーは、モルヒネおよびM1 Fabの複合体と結合する抗体を選択することによって、未処置のscFv抗体断片ファージディスプレイ・ライブラリーから得られる。最初に、ファージをプレインキュベートして、M1 Fabに結合させ、それ自体がM1 Fabに結合したものをソートして除く。結合していないファージを分離して、モルヒネおよび固定されたM1 Fabの混合物と共にインキュベートし、固定されたM1 Fabおよびモルヒネの間に形成された免疫複合体と結合するファージを選択する。結合していないファージを分離して洗浄し、次いで複合体に結合したものを溶出する。バックグラウンドは、モルヒネの不存在下におけるM1 Fabに対する結合を点検することによってモニターする。いくつかのパニングラウンドの後、多くのクローンを拾い、シーケンスし、発現させてscFv断片K11を生じる。

【0031】

蛍光に基づいた免疫アッセイ法は、第1の結合パートナーとしてユーロピウムでラベルしたM1 Fabを、および第2の結合パートナーとしてCy5でラベルしたscFv断片K11を使用しに行く。結合パートナーを、モルヒネを含む唾液または尿試料と共にインキュベートし、次いで所定の時間後に蛍光を測定する。本アッセイ法は、完全に均質であり、シグナルは、約5分で読み込み可能である。尿および唾液に対する感度は、本発明者らのモデル分析物であるモルヒネの場合に当局によって要求されるものよりも明らかに高い。試験の実行は、試薬をマイクロタイタープレートのウェルにあり、唾液または尿のいずれかの段階希釈を添加するようになされる。たとえば警察分野での使用に好適な態様において、試薬は、容器中で乾燥形態のものである。唾液を添加し、これにより試薬が溶解して、さらなる工程を伴わずに読み込むことができる。

【0032】

本発明によって提供される新規の組換え結合タンパク質は、M1 Fab、M2 Fab、またはK11 scFvのいずれかのリガンド結合部分を含む。「リガンド結合部分」は、結合を担う分子の部分の意味する。本明細書および特許請求の範囲に記載された配列の軽微なバリエーションまたは修飾は、これらがタンパク質の結合活性に影響を及ぼさないことを条件として、なお本発明の範囲内である。

【0033】

本発明は、以下の非限定の実施例によって図示される。しかし、上記明細書に、および実施例において与えられる態様は、例示の目的のみのためであることが理解されるべきであり、その種々の改変と変更態様は、本発明の範囲内であり得る。

【実施例】

【0034】

実施例1

抗モルヒネ抗体の開発

マウスの免疫化

46週間目の雌Balb/cマウスには、フロイントアジュバント中のBSAに結合したモルヒネ(Fitzgerald)を3週間隔で免疫した。血清試料を2回目の追加抗原注射の後に試験して、直接的なELISAにおいて抗原に対して最高の反応を示すマウスを抗体ファージディスプレイ・ライブラリーの供与源とするために選択した。

【0035】

抗体ファージディスプレイ・ライブラリーの構築

全ての基本的な組換えDNA法は、本質的に (Sambrook et al. 1990) に記載されたとおりに行った。モルヒネBSA抱合体に対して最高の抗体反応を有するマウスを屠殺し、総RNAをRNagents (登録商標) Total RNA Isolation System (Promega Co., WI, USA) を使用して脾細胞から単離した。総RNAのmRNAプールをOligotex mRNAキット (QIAGEN Inc., Germany) で単離した。cDNAは、オリゴdTプライミングでmRNAから合成した。抗体Fab断片をコードする遺伝子は、抗体カッパー軽鎖および重鎖の可変領域および定常領域特異的なプライマーを使用してPCRによって増幅した。抗体軽鎖PCR産物をプールし、NheIおよびAscI制限酵素によって消化して、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Germany) と組み合わせて調製用のアガロースゲルで精製した。アガロースゲル精製した抗体軽鎖DNAをpComb3 (Barbas et al., 1991) に由来するFabファージミド・ベクターphagemid9にライゲーションし、電気穿孔法によって大腸菌XL1-Blue株 (Stratagene) に形質転換した。プラスミドDNAは、オーバーナイト培養物からQIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN Inc., Germany) によって単離した。重鎖のFd領域 (可変領域および第1の定常領域) をコードするPCR産物をプールし、SfiIおよびNotI制限酵素によって消化して、調製用のアガロースゲル単離によって精製し、軽鎖DNAを含むファージミド・ベクターに結合した。Fab断片の両方の重鎖および軽鎖をコードするファージミド・ベクターを電気穿孔法によって大腸菌TOP10F細菌 (Invitrogen Inc., CA, USA) に形質転換した。形質転換された細菌をシェーカーで+37 °Cにおいて一晩インキュベートし、プラスミドDNAをQIAGEN Plasmid Midi Kitによって単離した。抗体ライブラリーの多様性は、個々のクローンの部分的なV_L-またはV_H-遺伝子領域をシーケンスすることによって確認した。

【0036】

ファージディスプレイ抗体ライブラリーは、以下の通りに作製した：4 µgの抗体ライブラリープラスミドDNAを、2つの平行した形質転換で電気穿孔法によって大腸菌TOP10Fに形質転換した。形質転換後、細胞を2.8 mlのSOC培地に懸濁し、シェーカーで+35 °Cにおいて1時間インキュベートした。7mlの予熱した (+37 °C) SB培地、20 µg/mlのカルベニシリン、および10 µg/mlのテトラサイクリンを添加した。シェーカーで+35 °Cにおいて1時間インキュベーション後、30 µg/mlのカルベニシリンを添加し、インキュベーションを1時間続け、その後に1ml (～10¹¹ pfu) のヘルパーファージVCS-M13 (Stratagene) を添加して、ゆっくりと振盪させながら+35 °Cで20分間、ファージを細菌に感染させた。平行した形質転換を共に合わせて、50 µg/mlのカルベニシリンおよび10 µg/mlのテトラサイクリンを有する80mlの予熱された (+37 °C) SB培地を添加した。シェーカーで+35 °Cにおいて2時間インキュベーション後、70 µg/mlのカナマイシンを添加し、インキュベーション一晩続けた。

【0037】

細胞を+4 °Cで4000gで15分間遠心した。20mlの20%のPEG、2.5MのNaCl (PEG/NaCl) を上清に添加し、これを氷上で30分間インキュベートした。PEG沈殿したファージを+4 °Cで13000gで20分間遠心した。ペレットを2mlのPBSに懸濁し、1mlを2つのエプENDORフチューブに移した。+4 °Cで5分間遠心分離後、200 µlのPEG/NaClを上清に添加することによってファージを沈殿させた。溶液を混合し、+4 °Cで5分間遠心した。ペレットを1mlのPBSまたはPBS+1% BSAに懸濁した。1 µlの20%のNa-アジ化物を保存剤として添加した。ファージディスプレイ抗体ライブラリーは、+4 °Cで貯蔵した。

【0038】

抗モルヒネ・ライブラリーの選択

モルヒネ特異的抗体は、以下の選択手法によってファージディスプレイ抗体ライブラリーから選択した：マイクロタイターウェルを、1 µgのBSAに結合したモルヒネ (モルヒネBSA; Fitzgerald Industries International, Inc., MA, USA) の100 µlの100mMのNa-炭酸水素塩緩衝液、pH 9.8溶液で+4 °Cにおいて一晩被覆した。ウェルをPBSで2回洗浄し、1%のBSAのPBS溶液で、+37 °Cで1時間ブロックした。100 µlのファージ・ライブラリーを振盪しながらRTで1時間ウェル中でインキュベートし、その後に結合していないファージを除去

してウェルをPBSで22回洗浄した。結合したファージを100 μ lの100mMのHCl (pH 2.2) で15分管溶出した。溶出したファージをウェルから除去して、1Mのトリスで中和した。10 μ g/mlのテトラサイクリンを補ったSB中で培養した3mlの新しい大腸菌XL1-Blue細胞 (OD₆₀₀ ~ 1) を、溶出されたファージに+35 で15分間感染させた。20 μ g/mlのカルベニシリンおよび10 μ g/mlのテトラサイクリンを有する7mlの予熱されたSB (+37) を添加し、培養液をシェーカーで+35 で1時間インキュベートした。30 μ g/mlのカルベニシリンを添加し、インキュベーションを1時間続けた。1mlのヘルパーファージ・VCS-M13を培養液に添加し、ゆっくりと振盪しながら15分間、+35 でインキュベートした。培養液を50 μ g/mlのカルベニシリンおよび10 μ g/mlのテトラサイクリンを有する90mlの予熱された (+37) SBで希釈した。シェーカーで+35 において2時間インキュベーション後、70 μ g/mlのカナマイシンを添加し、インキュベーションを一晩続けた。増幅されたファージの精製は、上記の通りにPEG沈殿によって行った。

10

【0039】

精製したファージをさらなる濃縮ラウンドに使用した。4回の選択ラウンドの後、モルヒネ特異的抗体ファージは、バックグランドと比較したときに1000倍以上濃縮されていた。ファージのバックグランド結合は、BSA被覆マイクロタイターウェル中でファージ・ライブラリーをインキュベートすることによって、それぞれの選択ラウンドにおいて平行してモニターした。ウェルを洗浄し、ファージをモルヒネ-BSA被覆ウェルに溶出した。モルヒネ特異的なファージの濃縮は、バックグランドウェルから溶出されたファージの量に対してモルヒネ-BSA被覆ウェルから溶出されたファージの量を比較することによってモニターした。

20

【0040】

個々のクローンの特徴づけ

4回目のパニング・ラウンドの後、ファージミドDNAをQIAGEN Plasmid Midi Kitによって単離した。Fab遺伝子断片を単離するために、プラスミドをNheIおよびNotI制限酵素で消化した。アガロースゲル単離したDNAを発現ベクター-pKktacにライゲーションした。ライゲーション反応物を大腸菌XL1-Blue細胞に形質転換した。

【0041】

個々のクローンを選択し、ミニプレップDNAをQIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN Inc., Germany) で抽出した。ミニプレップの配列決定に従って、2つの異なるFabがクローンが見いだされた。これらのクローンをM1およびM2と呼んだ。M1 Fab断片のアミノ酸配列は、配列番号1 (軽鎖) および配列番号2 (重鎖) であった。アミノ酸番号3~108は、可変領域を示し、番号109~215は、M1軽鎖 (配列番号1) の中で定常領域を示す。アミノ酸番号4~123は、可変領域を示し、番号124~226は、M1重鎖 (配列番号2) の定常領域を示す。M2 Fab断片のアミノ酸配列は、配列番号3 (軽鎖) および配列番号4 (重鎖) であった。アミノ酸番号3~108は、可変領域を示し、番号 109~215は、M2軽鎖 (配列番号3) の定常領域を示す。アミノ酸番号4~123は、可変領域を示し、番号124~226は、M2重鎖 (配列番号4) の定常領域を示す。残りのアミノ酸は、クローン技術に由来するものであり、いくつかのC末端のアミノ酸は、タンパク質の単離および精製を容易にする。また、小規模 (3ml) のFab発現培養液を作製した。細胞の周辺質画分をPBS中で3回、細胞を凍結および解凍することによって単離した。

30

40

【0042】

モルヒネに対する個々のFabクローンの結合は、モルヒネBSA被覆マイクロタイターウェル内でのELISAによって試験した：マイクロタイターウェルを200ngのモルヒネ-BSAの0.1MのNa-炭酸水素塩緩衝液、pH 9.8溶液で+4 において一晩コーティングした。対照ウェルは、緩衝液のみで満たした。コーティング後、ウェルをPBSで3回洗浄し、RTで1時間0.5%のBSAのPBS溶液 (BSA/PBS) でブロックした。ウェルをPBSで3回洗浄し、周辺質画分の1:10希釈をウェル内のBSA/PBSの100 μ lに添加した。シェーカーでRTにおいて1時間インキュベーション後、ウェルをPBSで3回洗浄し、1:2000希釈したアルカリホスファターゼ結合抗マウスFab特異的抗体 (Sigma、A-1293) を100 μ lのBSA/PBSに添加した。ウェルをシ

50

シェーカーでRTにおいて1時間インキュベートし、PBSで3回を洗浄した。100 μ lのアルカリホスファターゼ基質溶液（2mg/mlのp-ニトロフェニルホスフェートジ-Na-塩のジエタノールアミン-MgCl₂-緩衝液溶液）をウェルに添加し、吸光度を測定した。予備結果に従って、M1 Fabは、本アッセイ法においてより良好な性能を示し、従って、継続のために選択した。

【0043】

発酵および精製

発現ベクターpKktac中の抗モルヒネFab断片M1を大腸菌発現株RV308に形質転換した。FabをBio-Flow IV発酵槽（New Brunswick）内の流加回分発酵によって発現させて、セファロースSPイオン交換およびタンパク質Gクロマトグラフィー（Pharmacia）によって精製した。

【0044】

競合的な免疫アッセイ法における一次抗体の性能

M1抗モルヒネFab断片の性能を、商業的な尿毒物対照S1およびS3（Bio-Rad）を用いた競合的なELISAアッセイ法で試験した。S1尿毒物対照は、米国質濫用および精神衛生サービス局（Substance Abuse and Mental Health Services Administration：SAMSHA）によって推奨される免疫アッセイ・カットオフ・レベル以下の濃度20～25%の薬物および薬物代謝産物（モルヒネを含む）を含む。S3尿毒物対照は、約3倍の免疫アッセイ・カットオフ・レベルの濃度の薬物および薬物代謝産物を含む。マイクロタイターウェルは、500ngのモルヒネBSAの100 μ lのNab carbonate緩衝液、pH 9.8溶液で、+4において一晩コートした。ウェルをPBSで3回洗浄し、RTで1時間BSA/PBSでブロックした。PBSで3回洗浄したあと、S1、S3（Bio-Rad）、ポジティブ対照、またはネガティブ対照の尿希釈をウェルの100 μ lのBSA/PBS溶液に添加し、1ngのM1 Fabでスパイクした。ウェルをシェーカーでRTにおいて2時間インキュベートし、PBSで3回を洗浄した。1：2000希釈したアルカリホスファターゼ結合抗Fab抗体（Sigma、A-1293）をウェルの100 μ lのBSA/PBS溶液に添加し、シェーカーでRTにおいて1時間インキュベートした。ウェルをPBSで3回洗浄し、10 μ lのアルカリホスファターゼ基質溶液を添加して、A₄₀₅を測定した。結果は、図1に示してある。ポジティブ結果は、試料の1：64希釈によって達成することができる。

【0045】

M1 Fabおよびモルヒネの免疫複合体に特異的な抗免疫複合体抗体の開発

未処置のヒトscFvファージディスプレイ・ライブラリーからの免疫複合体特異抗体の選択

M1 Fab断片をImmunoPure Sulfo-NHS-LC Biotinキット（Pierce）でビオチン化した。ビオチン化された抗体を精製し、緩衝液をEcono-Pac 10DG Columns（Bio-Rad、CA、USA）でPBSに変えた。200 μ lの未処置のヒトscFvファージディスプレイ・ライブラリー（カッパーまたはラムダ軽鎖）のBSA/PBS溶液を10 μ lのストレプトアビジン被覆磁気ビーズ（Dynal、M280）および0.5 μ gのビオチン化されたM1 Fabと共に+4で一晩ブレインキュベートした。未処置のヒトscFvファージディスプレイ・ライブラリーは、50人の健康な個体のプールされたリンパ球から構築した。ライブラリーのサイズは、 1×10^8 クローンであると推定された。未処置のヒトscFvファージディスプレイ・ライブラリーは、カッパーまたはラムダ特異的なVL-遺伝子のいずれかと結合されたIgM特異的なVH-遺伝子を含む。結合していないファージをビーズから分離し、これらの100 μ lを100ngのモルヒネ、500ngのビオチン化されたM1 Fab、および5 μ lのストレプトアビジン被覆磁気ビーズと共にシェーカーでRTにおいて1時間インキュベートした。選択手順のためのバックグラウンドは、同様の方法で行ったが、結合反応からモルヒネを抜いた。磁気ビーズを0.5mlのPBSで5回洗浄し、結合したファージを100 μ lのHCl（pH 2.2）で30分間溶出した。溶出されたファージを1Mのトリスで中和し、大腸菌XL1Blue細胞に感染させた。細胞を培養し、以前に記載したとおりにファージを精製した。5回のパニング・ラウンドの後、溶出されたファージの量をバックグラウンド対照ウェルから溶出されたファージの量と比較したときに、カッパー軽鎖を有するscFvライブラリーで濃縮が見られた。また、選択ラウンドから溶出されたファージのプールを試験したときに、M1 Fabおよびモルヒネによって形成される免疫複合体に特異

的な結合剤の濃縮がファージELISAにおいて明らかにみられた。

【 0 0 4 6 】

個体クローンの特徴づけ

個々のファージ・クローンを採集し、これらをシーケンスした。クローンの全ては、同じ配列（配列番号5）を有した。抗M1 +モルヒネ免疫複合体scFv断片のアミノ酸配列には、K11 scFvという名前をつけた。アミノ酸番号3～120は、重鎖可変領域を表し、番号140～246は、軽鎖可変領域を表し、番号121～139は、K11 scFv（配列番号5）のリンカーを表す。残りのアミノ酸は、クローン技術に由来するものであり、いくつかのC末端のアミノ酸はタンパク質の単離および精製を容易にする。

【 0 0 4 7 】

発現および精製

scFv断片K 11をコードする遺伝子を発現ベクターpKktacに挿入し、大腸菌RV308株に形質転換した。細胞を100 μ g/mlのアンピシリンを有する20mlのLBに接種し、シェーカで+37 において一晚インキュベートした。オーバーナイト培養物から、10mlの接種を、100 μ g/mlのアンピシリンを有する500mlのLBを含む2つの三角フラスコに添加した。細胞を、 D_{600} が1になるまでシェーカで+30 においてインキュベーションし、その後に0.5mlの1MのIPTGおよび100 μ g/mlアンピシリンを培養液に添加して、一晚シェーカで+37 においてインキュベーションを続けた。培地の上清および細胞の周辺質画分をK11 scFvの精製のために使用した。細胞を15分間4000gで遠心し、上清をきれいなフラスコに入れた。細胞を20mlのPBSに再懸濁した。細胞の周辺質画分は、細胞を凍結する（-70 ）および解凍する（+37 ）を3回によって単離した。30分間12000gで遠心分離後、透明な周辺質の上清をとった。残留する染色体DNAを除去するために、培地および周辺質画分を+37 で2時間の2 mg/mlのDNaseIで処理した。発現されたK11 scFvは、そのC末端に6 $\times$ His-タグを有するので、これは固定化した金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）によって精製することができる。K11 scFvは、マトリックスとしてSTREAMLINE Cheating（Amershampharmacia biotech）を、および金属キレートとして銅を使用して、拡張ベッドクロマトグラフィー（expanded bed chromatography）によって精製した。K11 scFvの純度は、SDS-PAGEでチェックした。

【 0 0 4 8 】

モルヒネのための非競合的な免疫アッセイ法の開発

ユーロピウムでの抗免疫複合体抗体K11 scFvのラベリング

精製した抗M1およびモルヒネ免疫複合体scFv断片K11は、製造業者による記載に従って、DELFLIA Eu-Labelingキット（Wallac）によってユーロピウム・キレートでラベルした。ラベルされたK11 scFvの緩衝液を50mMのトリスpH 7.8（0.9%のNaCl）に変えた。ラベリング収率は、0.4Eu / scFvであった。

【 0 0 4 9 】

モルヒネのための非競合的な免疫アッセイ

K11 scFvの感受性および交差反応性を非競合的な免疫アッセイによって研究した。Transparent Streptawell（Roche）ストレプトアビジン被覆マイクロタイターウェルをPBSで3回を洗浄した。500ngのビオチン化された抗モルヒネM1 Fabをウェルの100 μ lのBSA / PBS溶液に添加し、ウェルをシェーカでRTにおいて30分間インキュベートした。3回のPBSでの洗浄後、モルヒネ、アンフェタミン、テトラヒドロカンナビノール（THC）またはS1尿対照でスパイクした希釈試料をウェル内の50 μ lのBSA / PBS溶液に添加した。1 : 100希釈したユーロピウムラベルしたK11 scFvをウェル内の50 μ lのBSA / PBS溶液に添加し、インキュベーションを1時間続けた。ウェルをPBSで3回洗浄し、100 μ lの増強溶液（Wallac）をウェルに添加した。RTで15分の振盪の後、蛍光は、VictorV蛍光光度計（Wallac）によって検出した。結果は、図2に示してある。一次抗体断片M1に対するK11 scFvの結合と、M1およびモルヒネ免疫複合体に対する結合の間の親和性には、有意差がある。これにより、試料中の1ng / mlのモルヒネを検出することができる。アンフェタミンまたはTHCとの交差反応性は検出されなかった。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

同種の時間分解蛍光共鳴エネルギー転移 (TR-FRET)

抗モルヒネFab断片M1を、LANCE Eu-W1024 ITCキレート・キット (Wallac) によってユーロピウムでラベルした。ラベルされたM1の緩衝液を50mMのトリス、pH 7.8、0.9%のNaClに変えた。ラベリング収率は、1.1Eu / Fabであった。抗M1 +モルヒネ免疫複合体scFv断片K11 scFvを、FluoroLink Ab Cy5ラベリング・キット (Amershampharmacia biotech) によってCy5でラベルした。ラベリング収率は、2 Cy5 / scFvであった。

【 0 0 5 1 】

唾液はを種々の希釈のモルヒネでスパイクし、これらの試料を黒いマイクロタイターウェル (Nunc) に添加する前に脱脂綿を通してろ過した。1 μ gのユーロピウムでラベルしたM1 Fabおよび1 μ gのCy5ラベルしたK11 scFvをウェル内の50 μ lのBSA / PBSに添加した。TR-FRETは、VictorV蛍光光度計 (Wallac) によって、RTで5、15、30、または60分間インキュベーションした後に読み込んだ。結果は、図3に示してある。5分のインキュベーションの後、唾液中の1ng / mlのモルヒネが検出された。

10

【 0 0 5 2 】

本発明の試薬およびアッセイ法を提供するための1つのストラテジーを記載したが、多数のバリエーションおよび修飾は、当業者に明らかであろう。

【 0 0 5 3 】

実施例2

コデイン、ヘロイン、ノスカピン、およびパパベリンとのM1 Fab断片の交差反応性

20

コデイン、ヘロイン、ノスカピン、およびパパベリンとのM1抗モルヒネFab断片の交差反応性を競合的なELISAで試験した。マイクロタイタープレート・ウェルを、500ngのモルヒネ-BSAの100 μ lのNa-炭酸水素塩緩衝液、pH 9.8溶液で、+4 においてo / nコートした。ウェルをPBSで3回洗浄し、RTで1時間0.5%のBSA / PBSによってブロックし、再びPBSで3回洗浄した。2つの平行した、モルヒネコデイン、ヘロイン、ノスカピン。またはパパベリン (39,78、156,313、625,1250、2500、または5000ng / ml) のPBS溶液を5ngの精製したM1 Fabと共に含む100 μ lの試料をウェルに添加し、シェーカーでRTにおいて30分間インキュベートし、PBSで3回を洗浄した。1 : 2000の希釈したアルカリホスファターゼ結合抗Fab抗体 (Sigma、A-1293) をウェル内の100 μ lの0.5%のBSA / PBSに添加し、シェーカーでRTにおいて30分間インキュベートした。ウェルをPBSで3回洗浄し、100 μ lのアルカリホスファターゼ基質溶液を添加し、A405を測定した。結果は、図4に示してある。競合的なELISA結果に従って、M1抗体は、モルヒネと構造的に非常に類似するコデインおよびヘロインに対して高い交差反応性を有する。

30

【 0 0 5 4 】

モルヒネのための同種の時間分解蛍光共鳴エネルギー転移 (TRFRET) 免疫アッセイ法

抗モルヒネFab断片M1をLANCE Eu-W1024 ITCキレート・キット (Wallac) によって、ユーロピウムでラベルした。ラベルされたM1緩衝液を50mMのトリス、pH 7.8、0.9%のNaClに変えた。ラベリング収率は、1.1Eu / Fabであった。抗M1+モルヒネ免疫複合体scFv断片K11は、Fluoro Link-Ab Cy5ラベリング・キット (Amersham Pharmacia Biotech) によって、Cy5でラベルした。ラベリング収率は、2 Cy5 / scFvであった。

40

【 0 0 5 5 】

唾液を高濃度 (10 μ g/ml) の以下の薬物でスパイクした：モルヒネ、ヘロイン、コデイン、パパベリン、およびノスカピン。試料を黒いマイクロタイタのウェル (Nunc) に加える前に脱脂綿を通してろ過した。1 μ gのユーロピウムラベルしたM1 Fabおよび1 μ gのCy5でラベルしたK11scFvをウェル内の50 μ lのBSA / PBSに添加した。対照として、いずれの薬物も添加していないM1およびK11抗体対からのバックグラウンド蛍光を測定した。TR-FRETは、VictorV蛍光光度計 (Wallac) によって、RTで5分のインキュベーション後に読み込んだ。結果は、図5に示してある。

【 0 0 5 6 】

モルヒネでスパイクしたただ液試料では、高い蛍光値を与えるが、その他の薬物では、対

50

照（いずれの薬物も添加していないラベルされたM1およびK11 scFv断片）から検出されるバックグラウンド蛍光と同様の蛍光値を与える。K11 scFvは、M1とモルヒネの間で形成される免疫複合体に極めて高い特異性で結合する。K11は、M1およびモルヒネ免疫複合体を、M1とヘロインまたはM1とコデインの間の免疫複合体と完全に区別することができ、バックグラウンドレベルに対応する蛍光値を与えた。

【 0 0 5 7 】

参考文献

- Barbas, C. F. III, Kang, A. S. , Lerner, R. A. , Benkovic, S. J. (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7978-7982. 10
- Hemmila, I., Malminen, O., Mikola, H. , Lovgren, T. (1988) Homogeneous time- resolved fluoroimmunoassay of thyroxine in serum. *Clin. Chem.* 34: 2320- 2322.
- Hoogenboom H. R. , de Bruine, A. P. , Hufton, S. E. , Hoet, R. M. , Arends, J.-W. , and Roovers, R. C. (1998) Review article : Antibody phage display tech- nology and its applications. *Immunotechnology* 4, 1-20.
- Kobayashi, N. , Oiwa, H. , Kubota, K. , Sakoda, S. , Goto, J. (2000) Monoclonal antibodies generated against an affinity-labeled immune complex of an anti-bile acid metabolite antibody: an approach to noncompetitive hap- ten immunoassays based on anti-idiotypic or anti-metatype antibodies. *J Immunol Methods*, 245,95-108. 20
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256,495-7.
- Mares, A., De Boever, J. , Osher, J. , Quiroga, S. , Barnard, G. and Kohen, F. (1995) A direct non-competitive idiometric enzyme immunoassay for se- rum oestradiol. *J Immunol Methods*, 181,83-90.
- Maruyama, H., Sperlagh, M. , Zaloudik, J. , Liang, S. , Mizuki, K., Molthoff, C. and Herlyn, D. (2002) Immunization procedures for anti-idiotypic anti- body induction in mice and rats. *J Immunol Methods*, 264,121.
- Sambrook, J. , Fritsch, E. F. , and Maniatis, T. (1990) *Molecular Cloning : A laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 30
- Self, C. H. , Dessi, J. L. and Winger, L. A. (1994) High-performance assays of small molecules : enhanced sensitivity, rapidity, and convenience demonstrated with a noncompetitive immunometric anti-immune complex assay system for digoxin. *Clin Chem*, 40,2035-41.
- Suzuki, C. , Ueda, H. , Mahoney, W. and Nagamune, T. (2000) Open sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitation of small hap- tens. *Anal Biochem*, 286,238-46.
- Suzuki, C. , Ueda, H. , Tsumoto, K. , Mahoney, W. C. , Kumagai, I. and Nagamune, T. (1999) Open sandwich ELISA with V (H)-N (L)-alkaline phosphatase fusion proteins. *J Immunol Methods*, 224,171-84. 40
- Szollósi, J. , Damjanovich, S., Matyus, L. (1998) Application of Fluorescence Resonance Energy Transfer in the Clinical Laboratory: Routine and Research. *Communications in Clinical Cytometry*, 34: 159-179.
- Towbin, H. , Motz, J., Oroszlan, P. and Zingel, O. (1995) Sandwich immunoassay for the hapten angiotensin 11. A novel assay principle based on antibodies against immune complexes. *J Immunol Methods*, 181,167-76.
- Ueda, H. , Tsumoto, K. , Kubota, K. , Suzuki, E. , Nagamune, T. , Nishimura, H., Schueler, P. A. , Winter, G. , Kumagai, I. and Mahoney, W. C. (1996) Open sandwich ELISA : a novel immunoassay based on the interchain interaction of 50

antibody variable region. Nat Biotechnol, 14,1714-8.

Ullman, E. F., Milburn, G., Jelesko, J., Radika, K., Pirio, M., Kempe, T. and Skold, C. (1993) Anti-immune complex antibodies enhance affinity and specificity of primary antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A, 90,1184-9.

Yokozeki, T., Ueda, H., Arai, R., Mahoney, W. and Nagamune, T. (2002) A homogeneous noncompetitive immunoassay for the detection of small haptens. Anal Chem, 74,2500-4.

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 8 】

【図 1】 M1 Fabを使用する競合的なELISA。尿+は、1 μ g/mlのモルヒネでスパイクした尿である。

10

【図 2 a】 Euラベルした抗M1+モルヒネ免疫複合体scFv断片K11での、非競合的な時間分解蛍光免疫法 (TR-FIA)。a) 本アッセイ法の交差反応性および感度。

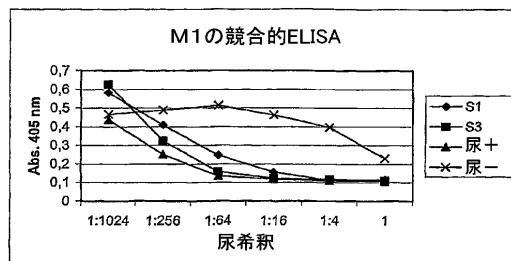
【図 2 b】 Euラベルした抗M1+モルヒネ免疫複合体scFv断片K11での、非競合的な時間分解蛍光免疫法 (TR-FIA)。b) 試料としてS1尿対照希釈での本アッセイ法の感度。

【図 3】 モルヒネの同種TR-FRET免疫アッセイ。

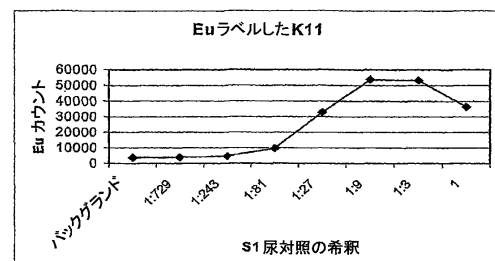
【図 4】 競合的なELISAによるコデイン、ヘロイン、ノスカピン、およびパパベリンでのM1抗モルヒネFab断片の交差反応性の解析。

【図 5】 モルヒネについての比較TR-FRETに基づいた均一免疫アッセイ法。

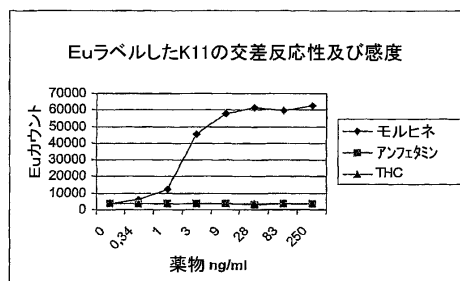
【図 1】



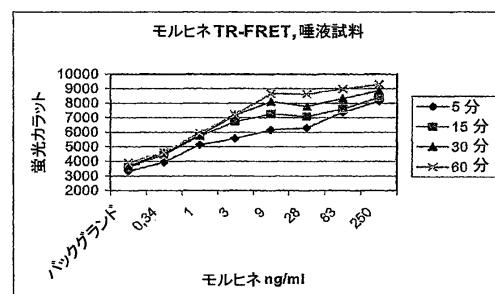
【図 2 b】



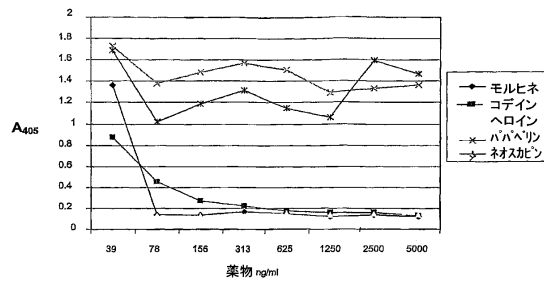
【図 2 a】



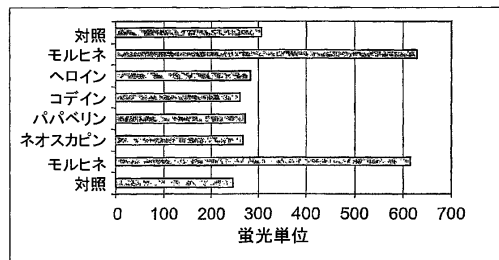
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

[0004729701000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	A
G 0 1 N 21/78 (2006.01)		G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 33/542 (2006.01)		G 0 1 N 33/542	A

(74)代理人 100095441
弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100103034
弁理士 野河 信久

(74)代理人 100092196
弁理士 橋本 良郎

(74)代理人 100100952
弁理士 風間 鉄也

(72)発明者 プリ、ティモ
フィンランド国、エフアイ - 0 0 6 5 0 ヘルシンキ、マイリーペロンボルク 3 ビー 2 8

(72)発明者 ホイツヤ、マッティ
フィンランド国、エフアイ - 0 0 1 0 0 ヘルシンキ、カロニウクセンカツ 9 シー 5 4

(72)発明者 タッキネン、クリスティーナ
フィンランド国、エフアイ - 0 2 2 0 0 エスポー、ハルティランティエ 1 2 エーエス 1

(72)発明者 ソダーlund、ハンス
フィンランド国、エフアイ - 0 2 9 4 0 エスポー、サロンキティエ 1 9

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特開昭 6 3 - 1 1 2 5 9 9 (J P , A)
特開平 0 9 - 1 5 4 5 8 3 (J P , A)
特表平 1 0 - 5 0 7 3 4 1 (J P , A)
LITTLE,M. et al , Generation of a large complex antibody library from multiple donors ,
J Immunol Methods , 1 9 9 9 年 , Vol.231, No.1-2 , p.3-9

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/48 - G01N 33/98
C07K 16/16
C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 15/09
G01N 21/78

专利名称(译)	小分析物的非竞争性免疫分析		
公开(公告)号	JP4729701B2	公开(公告)日	2011-07-20
申请号	JP2004552756	申请日	2003-11-17
申请(专利权)人(译)	瓦尔化Tekunirinen steups金计划扫描箱		
当前申请(专利权)人(译)	技术安妮政党员金规模磁盘浮标茶		
[标]发明人	プリティモ ホイツヤマッティ タッキネンクリスティーナ ソダールンドハンス		
发明人	プリ、ティモ ホイツヤ、マッティ タッキネン、クリスティーナ ソダールンド、ハンス		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/16 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/09 G01N21/78 G01N33/542 C07K16/44 G01N33/68 G01N33/94		
CPC分类号	C07K16/44 C07K2317/622 G01N33/542 G01N33/6857 G01N33/946 G01N33/948 G01N33/9486		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.G C07K16/16 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/00.A G01N21/78.C G01N33/542.A		
代理人(译)	河野 哲 中村 诚		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	2002002048 2002-11-18 FI		
其他公开文献	JP2006506634A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于小分析物的非竞争性免疫测定法，其中分析物与两种结合配偶体反应。第一个结合配偶体与分析物结合，在第一个结合配偶体和分析物之间形成复合物，第二个结合配偶体由第一个结合配偶体和分析物形成与复杂的结合。检测在分析物和结合配偶体之间形成的所得复合物。结合配偶体是蛋白质，例如包含抗体片段的抗体。本发明还涉及可用于测定方法的试剂对和测试试剂盒，以及试剂对的使用和它们的制备方法。还提供了新的试剂和它们的制备方法。

図 3】

