

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4507879号
(P4507879)

(45) 発行日 平成22年7月21日(2010.7.21)

(24) 登録日 平成22年5月14日(2010.5.14)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 D

CO 7 K 16/18 (2006.01)

GO 1 N 33/53 W

GO 1 N 33/543 (2006.01)

CO 7 K 16/18

GO 1 N 33/547 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 O 1 D

GO 1 N 33/552 (2006.01)

GO 1 N 33/547

請求項の数 36 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-524914 (P2004-524914)
 (86) (22) 出願日 平成15年7月29日(2003.7.29)
 (65) 公表番号 特表2005-534907 (P2005-534907A)
 (43) 公表日 平成17年11月17日(2005.11.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/023483
 (87) 国際公開番号 W02004/011947
 (87) 国際公開日 平成16年2月5日(2004.2.5)
 審査請求日 平成18年5月31日(2006.5.31)
 (31) 優先権主張番号 10/208,560
 (32) 優先日 平成14年7月29日(2002.7.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501354521
 アボット ポイント オブ ケア インコ
 ーポレイテッド
 アメリカ合衆国 08540 ニュージャ
 ーキー州, プリンストン, カレッジ
 ロード イースト 400
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多重ハイブリッドイムノアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも3種の異なる抗体を含む、トロポニンIを検出するためのイムノアッセイ組成物であって、少なくとも3種の異なる抗体がトロポニンI上のアミノ酸25～95の範囲にある少なくとも3種の異なるエピトープと結合可能であり、少なくとも3種の異なる抗体の少なくとも2種は該トロポニンIの派生型(subform)上の少なくとも2種の異なるエピトープと結合可能であり、トロポニンI上の少なくとも3種の異なるエピトープの少なくとも1種は該派生型上の結合に利用不可能であり、該派生型が、タンパク質分解的切断、リン酸化、化学的酸化、化学的還元、アミノ酸残基の切断、及びアミノ酸部分の化学的修飾の少なくとも一つから生じるものである、上記組成物。

【請求項 2】

m種の異なる抗体を含む、トロポニンIを検出するためのイムノアッセイ組成物であって、

(a) m種の異なる抗体の少なくともn種はトロポニンI上のアミノ酸25～95の範囲にあるn種の異なるエピトープに結合可能であり、

(b) 該トロポニンI上のn種の異なるエピトープのn-1種未満は該トロポニンIの派生型上の結合に利用可能なものであり、

ここで、m及びnは3と等しい又はそれ以上であり、mはnと等しい又はそれ以上であり、該派生型が、タンパク質分解的切断、リン酸化、化学的酸化、化学的還元、アミノ酸残基の切断、及びアミノ酸部分の化学的修飾の少なくとも一つから生じるものである、上

10

20

記組成物。

【請求項 3】

少なくとも 3 種の抗体の少なくとも 1 種が、全長抗体、一本鎖抗体、又は抗体フラグメントを含む、請求項 1 記載のイムノアッセイ組成物。

【請求項 4】

抗体フラグメントが Fab フラグメントを含む、請求項 3 記載のイムノアッセイ組成物。

【請求項 5】

少なくとも 3 種の抗体の少なくとも 1 種と複合する共通メンバーをさらに含む、請求項 1 記載のイムノアッセイ組成物。

10

【請求項 6】

少なくとも 3 種の抗体の少なくとも 1 種が共通メンバーと共有結合している、請求項 5 記載のイムノアッセイ組成物。

【請求項 7】

共有結合が架橋剤に由来する架橋リンカーを含む、請求項 6 記載のイムノアッセイ組成物。

【請求項 8】

架橋剤が、スクシンイミジル - 4 - [N - マレイミドメチル] - シクロヘキサン - 1 - カルボキシ [6 - アミドカプロエート]、グルタルアルデヒド、アジピン酸ジヒドラジド、ビス - ジアゾ化ベンジジン、1, 4 - ブタンジグリシジルエーテル、ビス - マレイミドヘキサン、スルホスクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、又は N - ヒドロキシスクシンイミジル 4 - アジドサリチル酸を含む、請求項 7 記載のイムノアッセイ組成物。

20

【請求項 9】

共通メンバーが微粒子である、請求項 5 記載のイムノアッセイ組成物。

【請求項 10】

微粒子が、ラテックスビーズ、ポリスチレンビーズ、ポリスチレン / アクリル酸ビーズ、又はこれらの組み合わせを含む、請求項 9 記載のイムノアッセイ組成物。

【請求項 11】

共通メンバーがシグナル生成エレメントを含む、請求項 5 記載のイムノアッセイ組成物。

30

【請求項 12】

シグナル生成エレメントが、放射性標識、金属粒子、蛍光色素、発色色素、標識化タンパク質、酵素、又はこれらの組み合わせを含む、請求項 11 記載のイムノアッセイ組成物。

【請求項 13】

酵素が、ペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、β - ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、又はこれらの組み合わせを含む、請求項 12 記載のイムノアッセイ組成物。

【請求項 14】

40

シグナル生成エレメントと複合した少なくとも 3 種の抗体の少なくとも 1 種のモル比が 1 : 1 ~ 10 : 1 である、請求項 11 記載のイムノアッセイ組成物。

【請求項 15】

シグナル生成エレメントと複合した少なくとも 3 種の抗体の少なくとも 1 種のモル比が 3 : 1 である、請求項 14 記載のイムノアッセイ組成物。

【請求項 16】

少なくとも 3 種の抗体の少なくとも 2 種がシグナル生成エレメントと複合している、請求項 11 記載のイムノアッセイ組成物。

【請求項 17】

シグナル生成エレメントと複合した少なくとも 3 種の抗体の少なくとも 2 種のモル比が

50

1 : 1 ~ 10 : 1 である、請求項 16 記載のイムノアッセイ組成物。

【請求項 18】

4 種の異なる抗体を含む、トロポニン Iを検出するためのイムノアッセイ組成物であって、4 種の異なる抗体がトロポニン I上のアミノ酸 25 ~ 95 の範囲にある4 種の異なるエピトープと結合可能であり、該トロポニン I上の該 4 種の異なるエピトープの少なくとも 1 種は該トロポニン Iの派生型上の結合に利用不可能であり、4 種の異なる抗体の第 1 抗体及び第 2 抗体は表面に結合され、4 種の異なる抗体の第 3 抗体及び第 4 抗体はそれぞれ酵素と複合され、第 1 抗体及び第 2 抗体の少なくとも 1 つは該トロポニン Iの派生型上のアミノ酸 25 ~ 95 の範囲にある少なくとも 1 種のエピトープと結合可能であり、第 3 抗体及び第 4 抗体の少なくとも 1 つは該派生型上のアミノ酸 25 ~ 95 の範囲にある少なくとも 1 種のエピトープと結合可能であり、該派生型が、タンパク質分解的切断、リン酸化、化学的酸化、化学的還元、アミノ酸残基の切断、及びアミノ酸部分の化学的修飾の少なくとも一つから生じるものである、上記組成物。

10

【請求項 19】

トロポニン Iを検出するためのイムノアッセイ組成物であって、m 種の異なる抗体を含み、

- (a) m 種の異なる抗体の n 種がトロポニン I上のアミノ酸 25 ~ 95 の範囲にあるn 種の異なるエピトープと結合可能であり、
- (b) 該トロポニン I上の n 種の異なるエピトープの n - 1 種未満が該トロポニン Iの派生型上の結合に利用可能であり、
- (c) n 種の異なる抗体の p 種が表面と結合しており、
- (d) n 種の異なる抗体の p 種がそれぞれ抗体と複合しており、
- (e) ステップ (c) における p 種の抗体の少なくとも p - 1 種が該トロポニン Iの派生型上のアミノ酸 25 ~ 95 の範囲にある少なくとも p - 1 種の異なるエピトープと結合可能であり、そして
- (f) ステップ (d) における p 種の抗体の少なくとも p - 1 種が該トロポニン Iの派生型上の p - 1 種の異なるエピトープと結合可能であり、

20

ただし m 及び n は 4 であり、p は 2 であり、該派生型が、タンパク質分解的切断、リン酸化、化学的酸化、化学的還元、アミノ酸残基の切断、及びアミノ酸部分の化学的修飾の少なくとも一つから生じるものである、上記組成物。

30

【請求項 20】

1 以上の感知エレメント、及びトロポニン Iの検出のためにイムノアッセイを行いうる少なくとも 1 つの表面を含むイムノアッセイ装置であって、少なくとも 1 つの表面が少なくとも 2 種の異なる抗体を含み、少なくとも 2 種の異なる抗体がトロポニン I上のアミノ酸 25 ~ 95 の範囲にある少なくとも 2 種の異なるエピトープと結合可能であり、少なくとも 2 種の異なる抗体の少なくとも 1 種は該トロポニン Iの派生型上のアミノ酸 25 ~ 95 の範囲にある少なくとも 1 種のエピトープと結合可能であり、該トロポニン I上の少なくとも 2 種の異なるエピトープの少なくとも 1 種は該派生型上の結合に利用不可能であり、少なくとも 2 種の異なる抗体は少なくとも 1 つの表面に結合し、該派生型が、タンパク質分解的切断、リン酸化、化学的酸化、化学的還元、アミノ酸残基の切断、及びアミノ酸部分の化学的修飾の少なくとも一つから生じるものである、上記イムノアッセイ装置。

40

【請求項 21】

1 以上の感知エレメント、及びトロポニン Iの検出のためにイムノアッセイを行いうる少なくとも 1 つの表面を含むイムノアッセイ装置であって、

- (a) 少なくとも 1 つの表面が m 種の異なる抗体を含み、
- (b) m 種の異なる抗体の少なくとも n 種がトロポニン I上のアミノ酸 25 ~ 95 の範囲にあるn 種の異なるエピトープと結合可能であり、
- (c) 該トロポニン I上の n 種の異なるエピトープの n - 1 種未満が該トロポニン Iの派生型上の結合に利用可能であり、
- (d) m 種の異なる抗体の少なくとも n 種が少なくとも 1 つの表面と結合し、

50

ただし m 及び n は 2 と等しい又はそれ以上であり、 m は n と等しい又はそれ以上であり、該派生型が、タンパク質分解的切断、リン酸化、化学的酸化、化学的還元、アミノ酸残基の切断、及びアミノ酸部分の化学的修飾の少なくとも一つから生じるものである、上記イムノアッセイ装置。

【請求項 2 2】

少なくとも 1 つの表面が、ガラス、半導体、プラスチック、二酸化ケイ素、光形成性 PVA、光形成性ゼラチン、膜形成ラテックス、導電性金属、又はこれらの組み合わせを含む、請求項 1 9 記載のイムノアッセイ装置。

【請求項 2 3】

導電性金属が銀、イリジウム、金、白金又はこれらの組み合わせを含む、請求項 2 2 記載のイムノアッセイ装置。

【請求項 2 4】

少なくとも 2 種の抗体の少なくとも 1 種が少なくとも 1 つの表面に吸収又は吸着されている、請求項 1 9 記載のイムノアッセイ装置。

【請求項 2 5】

少なくとも 2 種の抗体の少なくとも 1 種が少なくとも 1 つの表面と共有結合している、請求項 1 9 記載のイムノアッセイ装置。

【請求項 2 6】

微粒子をさらに含み、ここで少なくとも 2 種の抗体が微粒子と結合し、微粒子が少なくとも 1 つの表面と結合するものである、請求項 1 9 記載のイムノアッセイ装置。

【請求項 2 7】

少なくとも 2 つの微粒子をさらに含み、ここで少なくとも 2 種の抗体の 1 種のみが少なくとも 2 つの微粒子の 1 つと結合し、少なくとも 2 つの微粒子が少なくとも 1 つの表面と結合するものである、請求項 1 9 記載のイムノアッセイ装置。

【請求項 2 8】

トロポニン I 及び該トロポニン I の派生型上のアミノ酸 2 5 ~ 9 5 の範囲にある異なるエピトープと結合する第 3 抗体をさらに含む、請求項 1 9 記載のイムノアッセイ装置。

【請求項 2 9】

感知エレメントが、電極、バイオセンサー、電界効果トランジスタ、弾性表面波装置、導光板、光ファイバー、キュベット、放射能検出器、イムノクロマトグラフィー装置、物理的、原子力的、化学的、生化学的、電気的、若しくは光学的検出を促進する試薬、又はその組み合わせを含む、請求項 1 9 記載のイムノアッセイ装置。

【請求項 3 0】

好適な容器に少なくとも 3 種の異なる抗体を含むイムノアッセイキットであって、少なくとも 3 種の抗体が トロポニン I 上のアミノ酸 2 5 ~ 9 5 の範囲にある少なくとも 3 種の異なるエピトープと結合可能であり、少なくとも 3 種の異なる抗体の少なくとも 2 種は該トロポニン I の派生型上のアミノ酸 2 5 ~ 9 5 の範囲にある少なくとも 2 種の異なるエピトープと結合可能であり、該トロポニン I 上の少なくとも 3 種の異なるエピトープの少なくとも 1 種は該派生型上の結合に利用不可能であり、該派生型が、タンパク質分解的切断、リン酸化、化学的酸化、化学的還元、アミノ酸残基の切断、及びアミノ酸部分の化学的修飾の少なくとも一つから生じるものである、上記イムノアッセイキット。

【請求項 3 1】

好適な容器に m 種の異なる抗体を含むイムノアッセイキットであって、
(a) m 種の異なる抗体の少なくとも n 種が トロポニン I 上のアミノ酸 2 5 ~ 9 5 の範囲にある n 種の異なるエピトープと結合可能であり、
(b) 該トロポニン I 上の n 種の異なるエピトープの $n - 1$ 種未満が該トロポニン I の派生型上の結合に利用可能であり、

ただし m 及び n は 3 と等しい又はそれ以上であり、 m は n と等しい又はそれ以上であり、該派生型が、タンパク質分解的切断、リン酸化、化学的酸化、化学的還元、アミノ酸残基の切断、及びアミノ酸部分の化学的修飾の少なくとも一つから生じるものである、上記

10

20

30

40

50

イムノアッセイキット。

【請求項 3 2】

トロポニンI及び該トロポニンIの派生型を含むサンドイッチイムノアッセイ製品であって、該トロポニンI上のアミノ酸 2 5 ~ 9 5 の範囲にある少なくとも 3 種の異なるエピトープは少なくとも 3 種の異なる抗体による結合に利用可能であり、 3 種の異なる抗体の少なくとも 2 種は該トロポニンI上のアミノ酸 2 5 ~ 9 5 の範囲にある異なるエピトープに結合し、該トロポニンI上の 3 種の異なるエピトープの 2 種は該派生型上の結合に利用可能であり、 3 種の異なる抗体の少なくとも 2 種は該派生型上のアミノ酸 2 5 ~ 9 5 の範囲にある異なるエピトープに結合し、該トロポニンI上の少なくとも 3 種の異なるエピトープの少なくとも 1 種は該派生型上の結合に利用不可能であり、該派生型が、タンパク質分解的切断、リン酸化、化学的酸化、化学的還元、アミノ酸残基の切断、及びアミノ酸部分の化学的修飾の少なくとも一つから生じるものである、上記サンドイッチイムノアッセイ製品。

10

【請求項 3 3】

トロポニンI、該トロポニンIの派生型、及びm種の異なる抗体の少なくとも 2 種を含むサンドイッチイムノアッセイ製品であって、

(a) 該トロポニンIが、それぞれm種の異なる抗体の 1 種と結合可能なアミノ酸 2 5 ~ 9 5 の範囲にある少なくとも n 種の異なるエピトープを含み、

(b) m種の異なる抗体の少なくとも 2 種が、それぞれ該トロポニンI上の異なるエピトープに結合し、

20

(c) 該トロポニンI上の n 種の異なるエピトープの n - 1 種未満が該トロポニンIの派生型上の結合に利用可能であり、

(d) m種の異なる抗体の少なくとも 2 種が、それぞれ該トロポニンIの派生型上のアミノ酸 2 5 ~ 9 5 の範囲にある異なるエピトープと結合し、

ただしm及びnは 3 と等しい又はそれ以上であり、mは n と等しい又はそれ以上であり、該派生型が、タンパク質分解的切断、リン酸化、化学的酸化、化学的還元、アミノ酸残基の切断、及びアミノ酸部分の化学的修飾の少なくとも一つから生じるものである、上記サンドイッチイムノアッセイ製品。

【請求項 3 4】

少なくとも 3 種の抗体の少なくとも 1 種、及び少なくとも 2 種の抗体の少なくとも 1 種がシグナル生成エレメントを含む、請求項 3 2 記載のサンドイッチイムノアッセイ製品。

30

【請求項 3 5】

患者が心筋梗塞に罹患しているか否かを判定する方法であって、

(a) 心筋梗塞の罹患が疑われる患者からのサンプルを、少なくとも 2 種の抗体を結合した表面に適用するステップであって、少なくとも 2 種の抗体が c T n I 上のアミノ酸 2 5 ~ 9 5 の範囲にある少なくとも 2 種の異なるエピトープと結合可能であり、少なくとも 2 種の抗体の少なくとも 1 種が c T n I の派生型上のアミノ酸 2 5 ~ 9 5 の範囲にある少なくとも 1 種の異なるエピトープと結合可能であり、c T n I の少なくとも 1 種のエピトープは該派生型上の結合に利用不可能である、上記ステップ；

(b) c T n I 及び該派生型上のアミノ酸 2 5 ~ 9 5 の範囲にあるまた別のエピトープと結合する第 3 抗体を含む試薬を添加するステップ；並びに

40

(c) 第 3 抗体の結合の程度を測定するステップ、を含み、該派生型が、タンパク質分解的切断、リン酸化、化学的酸化、化学的還元、アミノ酸残基の切断、及びアミノ酸部分の化学的修飾の少なくとも一つから生じるものである、

上記方法。

【請求項 3 6】

患者が心筋梗塞に罹患しているか否かを判定する方法であって、

(a) 心筋梗塞の罹患が疑われる患者からのサンプルを、c T n I 及び c T n I の派生型上のアミノ酸 2 5 ~ 9 5 の範囲にある第 1 エピトープと結合可能な第 1 抗体を結合した表

50

面に適用するステップ；

(b) 少なくとも第2抗体及び第3抗体を別々に又は一緒に添加するステップであって、少なくとも第2抗体及び第3抗体はc T n I上のアミノ酸25～95の範囲にある少なくとも2種の異なるエピトープと結合可能であり、少なくとも第2抗体及び第3抗体は第1エピトープに結合不可能であり、少なくとも第2抗体及び第3抗体の少なくとも1つはそれぞれc T n Iの派生型上のアミノ酸25～95の範囲にある少なくとも1種の異なるエピトープと結合可能であり、c T n Iの少なくとも1種のエピトープは該派生型上の結合に利用不可能である、上記ステップ；並びに

(c) 少なくとも第2抗体及び第3抗体の結合の程度を測定するステップ、
を含み、該派生型が、タンパク質分解的切断、リン酸化、化学的酸化、化学的還元、アミノ酸残基の切断、及びアミノ酸部分の化学的修飾の少なくとも一つから生じるものである

10

上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、疾患及び医学事象、とりわけ心筋梗塞（「M I」）の診断に関する。より具体的には、本発明は、それぞれ臨床マーカーに対して異なる特異性を有する複数の抗体を用いた疾患又は医学事象（特にM I）の臨床マーカーの検出に関する。本発明はまた、疾患及び医学事象、特にM Iの診断に使用される試薬及び装置に関する。

20

【背景技術】

【0002】

急性疾患の診断は、多くの場合イムノアッセイ、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ（「E L I S A」）、すなわち、特に疾患の急性期中に濃度が急速に変化する場合には、生物学的液体中のタンパク質、酵素及びホルモンのような臨床マーカーの異常レベルの検出に基づいている。従って、M Iの発症のような急性疾患の発症を迅速かつ簡便に診断しうるE L I S A系は、著しく重要である。

【0003】

過去において、M Iの発症を診断するための臨床マーカーには乳酸デヒドロゲナーゼ（「L D H」）及びグルタミンオキサロ酢酸トランスアミナーゼ（「G O T」）があるが、これらは非常に特異的なわけではなかった。L D H及びG D Hに関する問題のため、M Iの診断のための臨床マーカーとしてクレアチンキナーゼのM B イソ酵素（「C K - M B」）を使用していた。しかしながら、C K - M Bは骨格筋及び骨格筋傷害後の血液中にも見出すことができる。従って、C K - M Bは心筋に対して完全に特異的ではない。M Iの臨床マーカーとしてのC K - M Bの別の欠点は、骨格筋中のC K - M Bレベルが、骨格筋の再生の程度、M Iの試験を行うとき又はその試験結果を分析するときに多くの場合知ることのできない情報によって変化することである。C K - M Bの試験の別の欠点は、C K - M Bレベルが胸痛発症後に僅か2～3日しか上昇を維持しないことである。その時点後に入院した患者にとって、C K - M B試験の価値は限定されたものであろう。従って、C K - M Bをアッセイする場合の特異性が欠けており、かつそれを診断ツールとして使用するための時間枠が限定されているので、C K - M BはM Iを診断するための理想的な臨床マーカーではない。

30

40

【0004】

心臓トロポニンI（「c T n 1」）は、現在、M I後に極めてすぐに血清中で検出可能であり、かつM I発症後2～3日を超えて存在する正確な心臓特異的生物学的パラメーターとして使用される。トロポニンIは、心臓組織中に3種のサブユニットの複合体として：すなわち、トロポニンT（「T n T」）、トロポミオシン結合サブユニット；トロポニンC（「T n C」）、Ca²⁺結合サブユニット；及びトロポニンI（「T n I」）、アクトミオシンMg²⁺ ATPアーゼを阻害するサブユニットとして存在する。T n Iは、心筋及び横紋筋にカルシウム感受性を与える細いフィラメントの調節タンパク質である。

50

【0005】

ヒトロポニンIは、3種のイソ型、すなわち、2種の骨格筋イソ型（速筋及び遅筋）（MW = 19.8 kDa）、及びN末端上に追加の31残基を有して23 kDaの分子量となる心臓TnIイソ型（「cTnI」）（209アミノ酸）に存在する。心臓TnIは、それがイソ型のみで存在する場合には、独特に心筋中に位置している。心臓TnIは、ヒト血清中にMI後に急速（約4～6時間以内）に出現する。それは18～24時間後にピークレベルに達し、6～10日まで血流中で上昇したレベルを維持する。結果として、心筋から循環中に放出されたcTnIは、心筋障害に極めて特異的である。

【0006】

血中の上昇したcTnIレベルは、MIの診断、並びに他の心臓関連事象及び疾患との識別に使用することができる。ヒトcTnIを正確に検出可能なイムノアッセイ系は、MIの発症を診断するための医学界に役立つであろう。cTnI試験の実用性に関するさらなる情報については、Apple及びWu, Myocardial infarction redefined: Role of cardiac troponin testing. Clinical Chemistry 47, 377-9, (2001)を参照されたい。これは参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0007】

心臓TnIは、タンパク質分解的切断、リン酸化、化学的酸化、化学的還元、アミノ酸残基の切断、及びアミノ酸部分の化学的修飾等の修飾の結果として、血中に複数の派生型（subform）として存在する。例えば、アミノ酸1～25及び150～209は、タンパク質分解の結果として、血清中のcTnI派生型上には一般的に見出されない。血流中を循環するcTnIの多くの異なる派生型は、他のタンパク質との複合体として見出される。Katrukha (1997) 参照。例えば、cTnIは、cTnT及びcTnCと複合体形成していることがある（「cITC」）。

20

【0008】

多くの場合、血流中でのcTnIの化学的修飾及び複合体形成は、cTnIの若干の派生型上に存在するELISA試薬のための結合部位を除去又はブロックし、これによりELISA試薬のエピトープを結合できないようにする。cTnIのエピトープ及びcTnIの不安定性に関するさらなる情報については、Morjanaら, Degradation of Human cardiac troponin I after myocardial infarction: Biotechnol. Appl. Biochem. (1998), 28, 105-111; Gaëlle Ferrerresら, Human cardiac troponin I: precise identification of antigenic epitopes and prediction of secondary structure: Clin. Chem. (1998), 44, 487-493; Katrukhaら, Troponin I is released in bloodstream of patients with a cute myocardial infarction not in free form but as complex: Clin. Chem. (1997), 43, 1379-1385; 及びKatrukhaら, Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection: Clin. Chem. (1998), 44, 2433-244を参照されたい。これらは参照により本明細書に組み入れられる。

30

40

【0009】

大部分の市販の重要な臨床マーカー分析物に関しては、分析物の特定のエピトープと結合する多くの有効なモノクローナル抗体が開発されている。抗体間の相違は、分析物と結合する特異的な位置、分析物との親和性、及びサンプル中の他の潜在的な干渉物との交差反応性である。ELISAアッセイは、伝統的には、捕捉試薬又はシグナル試薬として使用するために利用可能な抗体を対で試験することにより開発されてきた。

【0010】

50

c T n I のための E L I S A アッセイの開発において、使用する抗体及び酵素試薬の最適化に多くの努力が費やされた。しかしながら、エピトープが、血清中に存在する c T n I の多くの派生型上の結合及び他のタンパク質との複合体形成に利用不可能であるという可能性は、c T n I の検出を著しく困難にし、現在の E L I S A 試薬がサンプル中の実際の c T n I レベルを過少評価する原因となる。さらに、結合に利用可能な異なるエピトープを有する c T n I の多くの異なる派生型は、現在の E L I S A アッセイがサンプルからサンプルへの、試薬セットから試薬セットへの、そして時間の関数としての著しく異なる結果を与える原因となる。

【 0 0 1 1 】

従って、急性疾患事象、特に M I を診断するために、臨床マーカー及びその派生型、特に c T n I を検出する方法を開発する必要がある。本発明はこの必要を満たすものであり、かつ臨床マーカー及びその派生型、特に c T n I を検出するための試薬、キット及び装置を提供する。

【 発明の開示 】

【 0 0 1 2 】

本発明は、目的的分析物の検出に関する。目的的分析物は c T n I でありうる。本発明の例示的な実施形態において、目的的分析物の検出のためのイムノアッセイ組成物は、3 種以上の抗体を含むことができるが、各抗体は分析物上の異なるエピトープと結合可能なものである。分析物と結合する 3 種の異なる抗体の少なくとも 2 種は、分析物の派生型上の少なくとも 2 種の異なるエピトープにも結合可能である。目的的分析物上のエピトープの少なくとも 1 種は、派生型上の結合に利用不可能である。

【 0 0 1 3 】

本発明の別の例示的な実施形態において、目的的分析物を検出するためのイムノアッセイ装置は、2 種以上の抗体を含むことができ、各抗体は該分析物上の異なる抗体と結合するものであり、そして該 2 種以上の抗体は少なくとも 1 つの表面と結合しているものである。分析物と結合する 2 種の異なる抗体の少なくとも 1 種はまた、該分析物の派生型上の少なくとも 1 種の異なるエピトープとも結合可能である。目的的分析物上のエピトープの少なくとも 1 種は、派生型上の結合に利用不可能である。

【 0 0 1 4 】

本発明の別の例示的な実施形態において、目的的分析物を検出するためのイムノアッセイキットは、3 種以上の抗体を含むことができ、各抗体は該分析物上の異なる抗体と結合可能であるものである。分析物と結合する 3 種の異なる抗体の少なくとも 2 種は、該分析物の派生型上の少なくとも 2 種の異なるエピトープとも結合可能である。目的的分析物上のエピトープの少なくとも 1 種は、派生型上の結合に利用不可能である。

【 0 0 1 5 】

本発明の別の例示的な実施形態において、サンドイッチイムノアッセイ製品は、目的的分析物及び該分析物の派生型を含むことができる。分析物上の少なくとも 3 種の異なるエピトープは、少なくとも 3 種の異なる抗体との結合に利用可能である。少なくとも 3 種の異なる抗体は、分析物上の異なるエピトープと結合している。分析物上の 3 種のエピトープの少なくとも 2 種は、派生型上の結合に利用可能である。少なくとも 3 種の抗体の少なくとも 2 種は、派生型上の異なるエピトープと結合している。目的的分析物上のエピトープの少なくとも 1 種は、派生型上の結合に利用不可能である。

【 0 0 1 6 】

本発明の別の例示的な実施形態において、患者のサンプルを、c T n I 上の異なるエピトープと結合する少なくとも 2 種の抗体を含む表面に適用することにより、患者を心筋梗塞のような急性疾患の発症について診断することができる。ここで、2 種の抗体の少なくとも 1 種は、c T n I の派生型上の異なるエピトープと結合可能であり、少なくとも 2 種の抗体の少なくとも 1 種のエピトープは、派生型上の結合に利用不可能である。次いで、第 3 抗体を添加し、これは c T n I 及び派生型上の別のエピトープと結合する。次いで、c T n I 及び派生型への第 3 抗体の結合の程度を測定する。

【 0 0 1 7 】

図面の簡単な説明

図 1 は、目的の分析物の検出のための標準サンドイッチアッセイを示し、捕捉抗体 ($A b_1$) 及びシグナル抗体 ($A b_2$) は、目的の分析物 ($A n$) のそれぞれ第 1 及び第 2 エピトープ (e_1 及び e_2) に対するものである。シグナル抗体は、基質 (S) から生成物 (P) への変換によるシグナル生成のために使用される酵素 ($E n z$) で標識される。

【 0 0 1 8 】

図 2 は、3 種のエピトープ (e_1 、 e_2 及び e_3) を有する目的の分析物 ($A n$) の説明である。分析物が修飾されるか、複合体を形成するか、又は別の立体配座をとると、抗体による結合に利用不可能である 1 種以上のエピトープを有する派生型が生成する。結合に利用不可能である各エピトープは円で示されており、その一方で結合に利用可能であるエピトープは円なしで示されている。各派生型は、追加のエピトープが抗体による結合に利用不可能であるようにさらに修飾されていてもよい。

10

【 0 0 1 9 】

図 3 は、1 種の捕捉抗体 ($A b_1$) 及び 2 種以上のシグナル抗体 ($A b_2$ 及び $A b_3$) を用いる、目的の分析物 ($A n$) 及びその派生型を検出するための改変サンドイッチアッセイを示す。このアッセイは、該分析物、並びに捕捉抗体のための少なくとも 1 種のエピトープ (e_1) 及びシグナル抗体のための少なくとも 1 種のエピトープ (e_2 又は e_3) を有する該分析物の全ての派生型の存在を検出することができる。結合のための全てのエピトープは、抗体と結合したものとして示されている。しかしながら、分析物及びその派生型は、1 種だけの捕捉抗体及び検出対象の 1 種のシグナル抗体と結合することが必要である。

20

【 0 0 2 0 】

図 4 は、2 種以上の捕捉抗体 ($A b_1$ 及び $A b_2$) 及び 1 種のシグナル抗体 ($A b_3$) を用いる、目的の分析物 ($A n$) 及びその派生型を検出するための改変サンドイッチアッセイを示す。このアッセイは、該分析物、並びにシグナル抗体のための少なくとも 1 種のエピトープ (e_3) 及び捕捉抗体のための少なくとも 1 種のエピトープ (e_1 又は e_2) を有する該分析物の全ての派生型の存在を検出することができる。結合のための全てのエピトープは、抗体と結合したものとして示されている。しかしながら、分析物及びその派生型は、1 種だけの捕捉抗体及び検出対象の 1 種のシグナル抗体と結合することが必要である。

30

【 0 0 2 1 】

図 5 は、2 種以上の捕捉抗体 ($A b_1$ 及び $A b_2$) 及び 2 種以上のシグナル抗体 ($A b_3$ 及び $A b_4$) を用いる、目的の分析物 ($A n$) を検出するための改変サンドイッチアッセイを示す。このアッセイは、該分析物、並びに捕捉抗体のための少なくとも 1 種のエピトープ (e_1 又は e_2) 及びシグナル抗体のための少なくとも 1 種のエピトープ (e_3 又は e_4) を有する該分析物の全ての派生型の存在を検出することができる。結合のための全てのエピトープは、抗体と結合したものとして示されている。しかしながら、分析物及びその派生型は、1 種だけの捕捉抗体及び検出対象の 1 種のシグナル抗体と結合することが必要である。

40

【 0 0 2 2 】

図 6 は、目的の分析物 ($A n$) 上の異なるエピトープ (e_1 又は e_2) と結合性であり、かつ共通メンバーと複合した 1 種の抗体 ($A b_1$) 又は 2 種以上の抗体 ($A b_1$ 及び $A b_2$) を示すが、該共通メンバーは表面 (図 6 A)、微粒子 (図 6 B)、及び酵素のようなポリペプチド (図 6 C) であるものである。

【 0 0 2 3 】

図 7 は、異なる抗体 ($A b_1$ 又は $A b_2$) と個々に複合した共通メンバーの混合物を示し、目的の分析物 ($A n$) 上の異なるエピトープ (e_1 又は e_2) と結合する各抗体がアッセイされるが、該共通メンバーは微粒子 (図 7 A) 又は酵素のようなポリペプチド (図 7 B) であるものである。

50

【0024】

図8は、2種以上の抗体（ Ab_1 及び Ab_2 ）と複合した共通メンバー（微粒子など）を示し、これは表面のような別の共通メンバーと複合しているが、2種以上の捕捉抗体は、（i）異なる微粒子と個々に複合している（図8A）か、又は（ii）微粒子上で一緒に複合している（図8B）ものである。

【0025】

図9は、アミノ酸1～25及び150～209を除いた心臓トロポニンI（cTnI）の派生型の一次構造を表し、またcTnI抗体のエピトープのための位置を示す。

【0026】

図10は、遊離cTnI及び2つのレベルのcITCを添加した全血サンプルに対する第1捕捉抗体（CB1）、第2捕捉抗体（CB2）、又は第1及び第2捕捉抗体の混合物（CB12）を用いて調製した、種々の単一使用アッセイに由来する電流シグナルを示す。

10

【0027】

図11は、6.0 ng/mLのcITC複合体でスパイクした全血サンプルから、調製直後及び室温で1日後に、CB1又はCB2で被覆したセンサー、並びに第1抗体と複合したシグナル生成酵素（EC1）、第2抗体と複合したシグナル生成酵素（EC2）、又はEC1及びEC2の混合物（EC12）を用いて調製したカートリッジを使用して得られた電流シグナルを示す。

【0028】

20

図12は、ALPとFabとの異なる比を有するFab-ALP複合物に関する溶出プロファイルを示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

詳細な説明1. 定義

本発明の理解を助けるために、幾つかの用語を以下に定義する。

【0030】

「分析物」は、少なくとも3種の異なる抗体が結合可能である生物学的又は化学的物質を意味し、そして少なくとも3種の異なる抗体が結合することが可能な、該分析物の派生型を包含する。

30

【0031】

「抗体」は、目的の分析物又はその派生型上のエピトープと特異的に結合するポリペプチド又はその誘導体を意味する。

【0032】

「捕捉抗体」又は「捕捉試薬」は、目的の分析物又はその派生型と特異的に結合する抗体を意味するが、該抗体は、該分析物又はその派生型と結合する（i）前、（ii）その後、又はその間（iii）に、表面上に固定化されているものである。

【0033】

シグナル生成エレメントのシグナルを説明するために使用する場合の「検出する」、「検出された」又は「検出可能な」は、バックグラウンドから識別可能であるシグナルを意味する。

40

【0034】

「エピトープ」は、目的の分析物又はその派生型上の抗体又は他の結合メンバーのための結合部位を意味する。エピトープは、抗体による結合のためにそのエピトープが存在しないか又は接近不可能であるならば、「結合に利用不可能」である。

【0035】

「イムノアッセイ」又は「サンドイッチイムノアッセイ」は、同時サンドイッチ、フォワードサンドイッチ及びリバースサンドイッチイムノアッセイを意味し、かつその競合イムノアッセイを包含し、それら全ては当業者が十分に理解しているものである。

50

【0036】

分析物を説明するために使用する場合の「派生型(subform)」は、化学反応の生成物、少なくとも2種の異なる抗体が結合可能である他の生物学的若しくは化学的物質、その別の立体配座、又はそれらの組み合わせとの複合体のメンバーを意味する。

【0037】

「感知エレメント」は、シグナルを検出できる任意の手段又は装置を意味する。

【0038】

「シグナル抗体」又は「シグナル試薬」は、目的の分析物又はその派生型と特異的に結合する抗体を意味するが、該抗体は、シグナル生成エレメントと共有結合、疎水性相互作用、親水性相互作用、イオン性相互作用、ファン・デル・ワールス力、又はその組み合わせにより結合するものである。

10

【0039】

「シグナル生成エレメント」は、(i)検出可能なシグナルを直接若しくは間接的に生成するか、又は(ii)それ自体が検出可能である、生物学的、化学的又は放射性物質を意味する。

【0040】

「表面」は、溶液から分離できる支持体を意味する。

【0041】

2. 分析物

本発明は、分析物又はその派生型の検出に関する。分析物は、急性疾患事象に罹患したと考えられる患者に由来する疾患状態の臨床マーカーであってよいが、該臨床マーカーは1種以上の派生型にも存在するものである。本発明により分析することのできる急性疾患状態において、目的の急性疾患事象の時点で、その後で、又はその前に、有意な量で放出される、一過性に上昇した血中物質でありうる。臨床マーカー分析物の一過性に上昇した濃度は、内因性変換因子が臨床マーカーに作用して分析物の派生型を生成すると、低下する。臨床マーカーに由来する派生型は、最初にそれぞれが生成され、次いで内因性変換因子により代謝されるので、連続的に一過性に上昇することがある。一過性上昇の期間は、短くて2～3時間ないし長くて数週間であってよい。

20

【0042】

分析物は、心臓発作、卒中のような急性疾患事象の場合、又は骨折若しくは血腫のような外傷の場合に、少量で放出される生物学的物質(例えばタンパク質、糖タンパク質、酵素など)であってよい。分析物は、通常はこのような増加量で存在することがなく、内因性変換因子により経時的に1種以上の派生型に変換されうる。内因性変換因子は、限定されるものではないが、タンパク質分解切断、リン酸化、化学的酸化、化学的還元、アミノ酸残基の切断、及びアミノ酸部分の修飾がある。分析物は、TnI、TnT、CK-M、CK-B、ミオグロビン、hCG、TSH、FSH、肺炎球菌性PCA、アポリポタンパク質、C-反応性タンパク質(CRP)、脳ナトリウム排泄性タンパク質(BNP)及びそのプロ形態であるpro-BNP、ヒト白血球抗原及びヒトアポリポタンパク質を包含するが、これらに限定されるものではない。好ましい分析物はcTnIである。

30

【0043】

分析物は、抗体による結合に利用可能である少なくとも3種の異なるエピトープを有する(図2)。分析物の派生型は、抗体による結合に利用可能である少なくとも2種の異なるエピトープを有し、そして派生型のエピトープは分析物にも存在する(図2)。分析物の少なくとも1種のエピトープは、派生型上の結合に利用不可能である。派生型上の結合に利用不可能である分析物のエピトープは、複合体形成又は別の立体配座、並びに上記内因性変換因子の結果としてのものであってよい。

40

【0044】

分析物は未変性又は天然形態のものでありうる。分析物はまた、未変性又は天然形態の誘導体であってよい。例えば、cTnIの場合には、分析物は全長cTnIモノマー、又は遊離しているか若しくはcITC複合体の一部である、該モノマーの誘導体であって

50

よい。加えて、分析物はM Iに関連して血清中に放出されるc T n Iの任意の形態であってよい。分析物はまた、血清中に存在するc T n I（図9に示すc T n Iを含むが、これに限定されるものではない）の任意の修飾形態であってもよい。分析物はまた、該分析物の任意の前駆体上の結合に利用不可能である1種以上のエピトープを有するc T n Iの任意の修飾形態であってもよい。分析物であるためには、唯一の必要条件は、c T n Iの修飾形態又は誘導体形態が、3種の異なる抗体による結合に利用可能な少なくとも3種のエピトープを有する必要があることである。

【0045】

本発明はまた、高感度が要求される場合には、低濃度で存在する分析物及びその派生型の検出に使用することができる。

【0046】

3. イムノアッセイ

分析物は、図1に示すサンドイッチアッセイに基づく系を用いて典型的に検出されているが、捕捉のための第1モノクローナル又はポリクローナル抗体は表面と結合されており、そして第2モノクローナル又はポリクローナル抗体はシグナル生成エレメント（例えば、酵素）で標識されている。市販のイムノアッセイ製品及びそれらの基礎となる技術に関するさらなる情報については、Wild（編），The Immunoassay Handbook，Stockton Press NY，1994を参照されたい。これは参照により本明細書に組み入れられる。しかしながら、典型的サンドイッチアッセイは、捕捉抗体、シグナル抗体又は両者のためのエピトープを結合に利用不可能にする複合体形成、別の立体配座又は修飾を受けた分析物を十分に検出することができない。

【0047】

本発明は、分析物及びその1種以上の派生型を検出するためのサンドイッチアッセイの使用に関する（図2）。分析物の派生型は、変異、複合体形成、化学修飾、タンパク質分解又は再編成を含む原因によるものでありうる。本発明はまた、1種以上の関連する分析物、例えば活性タンパク質及びその不活性前駆体、又は単一検出アッセイが開発されている類似の分析物クラスを検出するためにも使用することができる。

【0048】

目的の分析物又はその1種以上の派生型は、分析物上の2種以上のエピトープに特異的な抗体を用いて、（i）サンドイッチの捕捉側（図4）、（ii）サンドイッチのシグナル側（図3）、又は（iii）両方（図5）でイムノアッセイを行うことにより検出することができる。目的の分析物上の少なくとも3種のエピトープを全体として標的とすることにより、本発明の多重サンドイッチアッセイは、一定のエピトープが派生型上の結合に利用不可能であっても、捕捉抗体が結合可能である少なくとも1種のエピトープ及びシグナル抗体による結合に利用可能である少なくとも1種のエピトープがある限り、分析物及びその派生型の存在を検出することができる。従って、本発明は、サンプル内に出現する分析物及びその複数の派生型を検出することが可能である。

【0049】

当業者は、本明細書に記載した本発明が、目的の分析物上のエピトープと特異的に結合可能である任意の結合メンバーの使用により、目的の分析物を検出できることを理解するであろう。結合メンバーは、細胞外又は細胞内受容体、ポリヌクレオチド、ペプチド核酸、及びその誘導体を包含するが、これらに限定されるものではない。

【0050】

本発明の実施における複数の抗体の使用は、典型的なサンドイッチアッセイにおけるポリクローナル抗体の使用とは対照的である。加えて、本発明のほうが優れている。ポリクローナル調製物において、認識される特定のエピトープ及び調製物中の種々の抗体の割合は、一般的に未知である。さらに、認識されるエピトープ及び種々の抗体の割合は、ポリクローナル調製物間で変化する。ポリクローナル手法における別の欠点は、ポリクローナル調製物内の個々の抗体の結合が多様な結合親和性を有することである。結果として、ポリクローナル調製物の大部分が、標準以下の分析性能を有するか、又は調製物中の他の抗

10

20

30

40

50

体と競合するエピトープと結合する抗体である。これに対し、本発明は、より効果的なアッセイ特性を有する制御された多重エピトープ試薬の調製を可能にする。なぜならば、結合親和性がより良好であり、かつ所定のアッセイシグナルに必要な試薬がより少ないからである。

【0051】

本発明の一つの例示的な実施形態において、イムノアッセイは、表面と結合した第1抗体（すなわち、「捕捉抗体」又は「捕捉試薬」）、並びに少なくとも第2抗体及び第3抗体に基づくが、各抗体は分析物上の異なるエピトープと結合するものである。表面と結合していない抗体は、シグナル生成エレメント（すなわち、「シグナル抗体」又は「シグナル試薬」）で標識される。図3参照。

10

【0052】

本発明の別の例示的な実施形態において、イムノアッセイは、少なくとも第1及び第2捕捉抗体、並びに第3抗体に基づく。表面と結合していない抗体は、シグナル抗体という。図4参照。

【0053】

本発明の別の例示的な実施形態において、イムノアッセイは、少なくとも第1及び第2捕捉抗体、並びに第3及び第4抗体に基づく。表面と結合していない抗体は、シグナル抗体という。図5参照。

【0054】

4. 抗体

20

本発明の抗体は、目的の分析物又はその派生型上の結合に利用可能なエピトープと特異的に結合する任意の抗体であってよい。本発明の抗体は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgEのクラス、並びにFab、F(ab')₂及び一本鎖抗体を含むそのフラグメント及び誘導体を包含する。本発明の抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、アフィニティー精製抗体、又はその混合物であって分析物又はその派生型のエピトープに十分な結合特異性を示すものを包含する。モノクローナル抗体並びにそのフラグメント及び誘導体が本発明の実施において好ましい。本発明の抗体は、相互に十分に分離された分析物のエピトープに、該抗体が分析物又はその派生型との結合を互いに干渉しないように結合することが好ましい。目的の分析物のために適切な抗体は、当技術分野で公知の方法を用いて、該分析物上の既知のエピトープ部位への利用可能な抗体のマッピング組み合わせにより選択することができる。

30

【0055】

抗体フラグメントの調製には、ペプシン、パパイン、フィシン及びトリプシンのような普通の酵素の使用を含む多くの方法が存在する。抗体の調製及び抗体のフラグメント作製に関するさらなる情報については、Harlow及びLane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1988を参照されたい。これは参照により本明細書に組み入れられる。

【0056】

本発明の抗体は、ヒトcTnIに特異的であってよい。抗体は、図9に示すように、cTnIの一次配列上に位置するエピトープを特異的に認識することができる。抗体は、図9に示した抗体から選択することもできる。

40

【0057】

5. 捕捉

本発明の捕捉抗体は、1種以上の抗体を表面と結合させることにより固定化することができる。例えば、図6A及び図6B参照。多種多様な化合物を表面として採用することができ、主な考慮事項は、表面への抗体の結合、シグナル生成エレメントとの干渉がないこと、及び標識の検査との干渉がないことである。特に、蛍光又は色素原スペクトルを測定する場合には、表面は干渉を与えてはならない。

【0058】

50

天然及び合成両方の有機及び無機ポリマーを表面として採用することができる。好適なポリマーの例は、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリ(4-メチルブチレン)、ブチルゴム及び他の合成ゴム、シリコンゴム及び、シラスティックポリマー、ポリエステル、ポリイミド、セルロース及びセルロース誘導体(例えば、酢酸セルロース、ニトロセルロースなど)、アクリレート、メタクリレート、ビニルポリマー(例えば、ポリ酢酸ビニル、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリフッ化ビニルなど)、ポリスチレン及びスチレングラフトポリマー、スチレン-アクリロニトリルコポリマー、レーヨン、ナイロン、ポリ酪酸ビニル、ポリホルムアルデヒドなどを包含する。表面として採用できる他の材料は、シリカゲル、シリコンウエハー、ガラス、紙、不溶性タンパク質、金属、メタロイド、金属酸化物、磁性材料、半導体材料、セメントなどである。加えて、ゲルを形成する物質、すなわち、ゼラチンのようなタンパク質、リボ多糖、シリケート、アガロース、ポリアクリルアミド又はデキストランのような数種の水相を形成するポリマー、ポリアルキレングリコール(例えば、アルキレンは2~3個の炭素原子を有する)、又は界面活性剤、例えばリン脂質のような両染色化合物、長鎖(12~24個の炭素原子)アルキルアンモニウム塩などが包含される。

【0059】

表面は、ポリスチレン、スチレン-(ビニルモノマー)コポリマー(スチレン-アクリロニトリルコポリマーなど)を包含するスチレンコポリマー、ポリオレフィン(ポリエチレン及びポリプロピレンなど)、並びにアクリレート及びメタクリレートのポリマー及びコポリマー、並びにそれらの混合物を含むことができる。

【0060】

表面は、粒子形態の磁化性材料を含むこともできる。このような磁化性材料による典型的な干渉は、反応ステップのそれぞれに磁化性粒子を添加することにより最小限にできる。各ステップで生じる磁性干渉をほぼ等しくすることができ、従ってかかる干渉は効果的に解消される。磁化性粒子は、磁場を印加して該粒子を濃縮することにより血清又は他の溶液から容易に分離することができる。

【0061】

捕捉抗体は、抗体結合部位を著しく減少させることがなく、かつ表面から該抗体が脱離することなく液体及び洗浄液から表面の分離を可能とする程度に十分に結合する結合方法により、表面と結合させることができる。非共役結合は、吸着、イオン結合、ファン・デル・ワールス吸着、静電氣的結合、及び他の非共役結合により達成することができる。抗体は共役結合により表面と結合させることもできる。

【0062】

抗体を表面に共役結合で付着させるための手法は、I. Chibataにより IMMobilized Enzymes, Halsted Press, New York, 1978、及びA. Cuatrecasas, J. Bio. Chem. 245:3059 (1970)に記載されており、これらの内容の全体が参照により本明細書に組み入れられる。表面をタンパク質で被覆し、そして米国特許第4,210,418号に記載の手法を用い、例えばカップリング剤としてグルタルアルデヒドを用いてカップリングさせることができる。別の手法において、ポリエーテルイソシアネートのような遊離イソシアネート基を有する層で被覆することができる。そえに対して水溶液中の抗体をアプライすることは、必要条件である結合をもたらす。別の手法において、米国特許第3,720,760号に記載されたように、抗体を臭化シアンによりヒドロキシ化材料にカップリングさせることができる。さらに他の手法において、ブドウ球菌プロテインAを表面と結合させることができ、そして抗体のFc鎖を該プロテインAと複合させることができる。

【0063】

捕捉抗体を付着により表面と結合させたのち、化学的に架橋させることができる。使用できる架橋剤は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDC)、グルタルアルデヒド、アジピン酸ジヒドラジド、ビス-ジアゾ化ベンジジン、1,4-ブタンジグリシジルエーテル、ビス-マレイミドヘキサン、スルホスクシンイミ

ジル 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、及び N - ヒドロキシスクシンイミジル 4 - アジドサリチル酸を包含するが、これらに限定されるものではない。EDC は遊離カルボキシル基を有する任意の表面に使用することができる。これら試薬及び多くの他の類似の試薬は当技術分野で周知である。

【 0 0 6 4 】

6 . 共通メンバーへの抗体の複合

別の例示的な実施形態において、上記の任意の結合（複合）方法を用いて、同一又は異なる抗体を共通メンバーと複合することができる。共通メンバーは、上記のように粒子、微粒子（図 6 B）、ポリペプチド（図 6 C）、化学リンカー、又は表面（図 6 A）を包含するが、これらに限定されるものではない。

10

【 0 0 6 5 】

共通メンバーは 2 種以上の抗体と複合させることができ、各抗体はアッセイされる分析物上の異なるエピトープと結合するものである。図 6 参照。例えば複合反応の化学量論が制御される方法を用いて、複数の抗体を共通メンバーと制御したモル比で複合させることができる。

【 0 0 6 6 】

加えて、複数の共通メンバーを異なる抗体と個々に複合させることができ、各抗体はアッセイされる分析物上の異なるエピトープと結合するものである。図 7 参照。異なる抗体のモル比は、複数の共通メンバーと複合した抗体とを混合するなどの方法を用いて制御することができる。

20

【 0 0 6 7 】

a . 微粒子

抗体は、上記の任意の複合方法を用いて微粒子と結合させることができる。カップリング方法の選択に際して種々の因子を考慮することができ、それらは粒子の種類及び大きさ、カップリング剤、反応物の濃度、一段階又は多段階反応、反応の緩衝液及び pH、保存緩衝液、及びブロッキング剤を包含するが、これらに限定されるものではない。微粒子の使用に関するさらなる詳細については、Bangs TechNote # 201 “Working with Microspheres” ; Bangs TechNote # 204 “Adsorption to Microspheres” ; Bangs TechNote # 205 “Covalent Coupling” ; Seradyn Technical Method Bulletin “Recommended Adsorption and Covalent Coupling Procedure” (1999) ; Hager , H . J . “Latex Polymer Reagents for Diagnostic Tests” ; 米国特許第 3 , 857 , 931 号 ; 及び Wong , Chemistry of Protein Conjugation and Cross - Linking , 1991 , CRC Press , Boca Raton , FL を参照されたい。これらは参照により本明細書に組み入れられる。

30

【 0 0 6 8 】

7 . シグナル

シグナル試薬は、多数の任意の一般的方法により、抗体をシグナル生成エレメントと複合させることにより調製することができる。複合物は、例えば、遊離スルフヒドリル基を利用し、利用可能なジスルフィド結合からスルフヒドリル基を生成するか、又は追加のスルフヒドリルを抗体上に導入することにより調製することができる。次いで、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (SMC C) のような結合剤を用いて、活性化抗体をシグナル生成エレメントと複合させることができる。抗体複合物の調製に関するさらなる情報については、Pierce Instructions “ImmunoPure IgG1 Fab and F (ab ') 2 Preparation Kit” # 44880 ; Pierce Instructions “SMCC , Sulfo - SMCC” # 22360 , # 22322 ; Pierce Instructions “EZ - Link Maleimide Activated

40

50

Phosphatase Kit" # 31493; Beale, D. (1987) Molecular fragmentation: Some applications in immunology, Exp Comp Immunology 11, 287-296; Lamoyi, E. (1986) Preparation of (Fab')₂ fragments from mouse IgG of various subclasses, Meth Enz 121, 652-663; King, TP, Kochoumian, L. (1979), A comparison of different enzyme-antibody conjugates for enzyme-linked immunosorbent assay, J Immun Meth 28, 201-210; Brinklay, MA (1992), A survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and crosslinking reagents, Bioconj Chem 3, 2-13; 及び Tech Note #204, "Adsorption to Microspheres", Bangs Laboratories Inc Rev. #001 8/4/99を参照されたい。これらは参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0069】

本発明のシグナル生成エレメントは、放射性標識、金属粒子、色素原、蛍光色素、標識化タンパク質及び酵素を包含するが、これらに限定されるものではない。シグナル生成エレメントが酵素である場合には、該酵素は、基質の除去又は生成物の生成を検出することができる反応を触媒する。例示的な酵素は、アミラーゼ、ポリヌクレオチダーゼ、アルギナーゼ、アデナーゼ、アミノポリペプチダーゼ、ペプシン、リパーゼ、カタラーゼ、チロシナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼ、ジアホラーゼ、グリオキサラーゼ、アルドラーゼ、グルコースオキシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリラーゼ及びヘキソキナーゼを包含するが、これらに限定されるものではない。例示的な酵素は、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ及びフェノールオキシダーゼをも包含する。基質から生成物への酵素的変換は、光学的又は電子化学的手段により測定することができる。

20

【0070】

30

a. シグナル生成エレメントと複合した複数の抗体

サンドイッチアッセイの感度は、分析装置の検出領域内での捕捉試薬及び表面へのシグナル試薬の非特異的吸着のレベルにより大部分が制限される。このような表面はキュベット、吸い上げエレメント、電極などの壁を包含する。サンプル中の分析物のレベルが低い場合には、測定されたシグナルの著しい量がバックグラウンドであり、従ってサンプル中の分析物の濃度に関連しない。シグナル試薬が分析装置内の表面に非特異的に吸着する傾向は、シグナル抗体の形成に使用される抗体及びシグナル生成エレメント、並びに架橋剤の固有特性の関数である。加えて、分析装置に用いられる材料（例えば、プラスチックの種類）並びに洗浄及び基質含有溶液の組成は、このような非特異的タンパク質吸着を最小限にするように一般的に最適化される。特に、種々の界面活性剤、例えば Tween 20、Brij 35、Triton X100は、アッセイ装置内でのシグナル試薬と他の成分との望ましくない相互作用を最小限にするためにサンドイッチアッセイにおいては殆ど必ず用いられる。血清アルブミンのような非酵素タンパク質、ゼラチンのような変性タンパク質、及び不活化酵素を、シグナル試薬の非特異的吸着レベルを低下するために、表面ブロッキング剤として加えることもできる。アッセイの全成分を最適化した場合でさえも、検出可能な非特異的シグナル試薬吸着レベルが依然として存在する。この非特異的吸着は、アッセイに用いられるシグナル試薬の量に比例する。従って、より少ないシグナル試薬の使用及び同じモル量の低分子量シグナル試薬の使用は、アッセイにおいてより低いバックグラウンドシグナルを生じるだろう。

40

【0071】

50

シグナル試薬は、バックグラウンドシグナルレベルの低下に寄与する可能性のある抗体のフラグメント、例えばF a bフラグメントを含むことができる。シグナル試薬の分子量の低下により、拡散が考慮されるため、結合段階に必要な時間を短縮することができる。シグナル試薬は2種以上の抗体を含むこともできるが、該抗体は、シグナル試薬の全体的大きさを最小限にすることによりバックグラウンドシグナルレベルを低下することもできる一方で、目的的分析物の存在に応答してシグナルを生成するその能力を最大にするものである。シグナル試薬の2種以上の抗体は、分析物の2種以上の異なるエピトープと結合することができ、該エピトープは、該分析物の2種以上のエピトープが該シグナル試薬の2種以上の抗体と結合した場合に、シグナル抗体 - 分析物複合体の安定化に導くことが可能なものである。

10

【0072】

シグナル試薬が2種以上の抗体を含む場合には、該抗体は1種以上の異なるエピトープと結合することができる。

【0073】

シグナル生成エレメントを2種以上の抗体と複合させることができ、各抗体は目的的分析物上の異なるエピトープと結合する。図6C参照。複合した抗体とシグナル生成エレメントとのモル比は、反応条件及び複合反応のための化学量論の選択により制御することができる。

【0074】

それぞれ1:1より大きいモル比で、第1抗体を第1シグナル生成エレメントと複合させることができ、そして第2抗体を第2シグナル生成エレメントと複合させることができ、次いで混合するが、第1及び第2抗体は、それぞれ目的的分析物上の異なるエピトープと結合するものである。図7B参照。第1及び第2抗体のモル比も制御することができる。

20

【0075】

シグナル生成エレメントは、単一抗体と、又は同一分析物上の異なるエピトープに対する2種以上の抗体と複合させることができるが、該シグナル抗体は約1:100~約1:1,001のシグナル生成エレメントと抗体集団との比を含む。シグナル生成エレメントは抗体集団と、約1:90~約1:1,001の比で複合させることもできる。シグナル生成エレメントは抗体集団と、約1:80~約1:1,001の比で複合させることもできる。シグナル生成エレメントは抗体集団と、約1:70~約1:1,001の比で複合させることもできる。シグナル生成エレメントは抗体集団と、約1:60~約1:1,001の比で複合させることもできる。シグナル生成エレメントは抗体集団と、約1:50~約1:1,001の比で複合させることもできる。シグナル生成エレメントは抗体集団と、約1:40~約1:1,001の比で複合させることもできる。シグナル生成エレメントは抗体集団と、約1:30~約1:1,001の比で複合させることもできる。シグナル生成エレメントは抗体集団と、約1:20~約1:1,001の比で複合させることもできる。シグナル生成エレメントは抗体集団と、約1:10~約1:1,001、約1:20~約1:10、約1:30~約1:20、約1:40~約1:30、約1:50~約1:40、約1:60~約1:50、約1:70~約1:60、約1:80~約1:70、約1:90~約1:80、及び約1:100~約1:90の比で複合させることもできる。シグナル生成エレメントは抗体集団と、約1:5~約1:1,001、約1:10~約1:5、約1:15~約1:10、約1:20~約1:15、約1:25~約1:20、約1:30~約1:25、約1:35~約1:30、約1:40~約1:35、約1:45~約1:40、及び約1:50~約1:45の比で複合させることもできる。シグナル生成エレメントは抗体集団と、約1:3.3の比で複合させることもできる。

30

40

【0076】

シグナル生成エレメントは、分析物又はその派生型上の異なるエピトープとそれぞれ結合可能である第1及び第2抗体と複合させることができるが、第1抗体と第2抗体との比は、約1:50~約50:1である。第1抗体と第2抗体との比は、約1:10~約10

50

: 1、約 1 : 5 ~ 約 5 : 1、約 1 : 3 ~ 約 3 : 1、及び約 1 : 2 ~ 約 2 : 1 であってもよい。

【 0 0 7 7 】

8 . シグナル及び検出

シグナルは、放射線、光学的、電気化学的方法など（これらに限定されるものではない）を用いて感知エレメントにより、又は当技術分野で公知のいくつかの他の変換手段により測定することが可能であり、シグナル生成エレメントにより生成させることができる。感知エレメントは、電極、バイオセンサー、電界効果トランジスタ、弾性表面波装置、導光板、光ファイバー、キュベット、放射能検出器、物理的、原子力的、化学的、生化学的、電気的、若しくは光学的検出を促進する試薬、又はその組み合わせであってよい。

10

【 0 0 7 8 】

9 . イムノアッセイ装置

目的の分析物のイムノアッセイは、1つ以上の感知エレメント及び上記のように改変サンドイッチイムノアッセイが行われる表面を含むイムノアッセイ装置で行うことができる。装置表面は、分析物上の異なるエピトープとそれぞれ結合可能である2種以上の抗体を含むことができる。2種の抗体の少なくとも1種はまた、分析物の派生型上の同一エピトープと結合可能である。分析物上のエピトープの少なくとも1種は、派生型上の結合に利用不可能である。

【 0 0 7 9 】

本発明の装置は、カートリッジ、カラム、シリンジ、キュベット、又は当技術分野で公知の他の分析装置若しくは系を含む。カートリッジは、米国特許第 5 , 0 9 6 , 6 6 9 号に記載されたような型のものであってよい。他のカートリッジ形状の例は、米国特許第 5 , 4 1 6 , 0 2 6 号、第 5 , 5 9 3 , 6 3 8 号、第 5 , 4 4 7 , 4 4 0 号、第 5 , 6 2 8 , 9 6 1 号、第 5 , 5 1 4 , 2 5 3 号、第 5 , 6 0 9 , 8 2 4 号、第 5 , 6 0 5 , 6 6 4 号、第 5 , 6 1 4 , 4 1 6 号、第 5 , 7 8 9 , 2 5 3 号、第 6 , 0 3 0 , 8 2 7 号、及び第 6 , 3 7 9 , 8 8 3 号に見出される。さらに他のカートリッジ形状は、P C T / U S 0 0 / 3 1 1 5 8 号、P C T / U S 0 1 / 0 4 3 4 5 号及び同時継続中の米国特許出願第 1 0 / 0 8 7 , 7 3 0 号に記載されている。上記の開示は参照により本明細書に組み入れられる。

20

【 0 0 8 0 】

イムノアッセイ装置の表面は、当業者に公知の任意の適切な表面であってよく、ガラス、半導体、プラスチック、二酸化ケイ素、光成形性 P V A、光成形性ゼラチン、膜形成ラテックス、及び導電性金属を包含するが、これらに限定されるものではない。導電性金属表面は、銀、イリジウム、金、白金、及びその合金であってよい。

30

【 0 0 8 1 】

抗体は、イムノアッセイ装置の表面に吸収、吸着又は共有結合させることができる。抗体は、P V A、ゼラチン及びラテックス層に吸収させるか、又はそれらの表面に吸着させることができる。抗体は、ガラス、金属、半導体、プラスチック、二酸化ケイ素、光成形性 P V A、及び導電性金属に吸着させることができる。2種以上の抗体を上記のように微粒子に結合させることができるが、微粒子は上記のように表面に結合する。イムノアッセイ装置は、分析物上の異なるエピトープと結合する第3抗体を含むこともできる。

40

【 0 0 8 2 】

イムノアッセイ装置の感知エレメントは、当技術分野で公知の任意の型のものであってよく、電極、バイオセンサー、電界効果トランジスタ、弾性表面波装置、導光板、光ファイバー、キュベット、放射能検出器、イムノクロマトグラフィー装置、物理的、原子力的、化学的、生化学的、電気的、若しくは光学的検出を促進する試薬、又はその組み合わせを包含するが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 8 3 】

1 0 . イムノアッセイキット

イムノアッセイキットは、上記のように改変サンドイッチイムノアッセイにおいて目的

50

の分析物及びその派生型を検出するために使用することができる。キットは分析物上の異なるエピトープとそれぞれ結合可能である3種又はそれ以上の抗体を含むことができる。3種の抗体の少なくとも2種はまた、分析物の派生型上の同一エピトープと結合可能である。分析物上のエピトープの少なくとも1種は、派生型上の結合に利用不可能である。

【0084】

11. サンドイッチイムノアッセイ製品

サンドイッチイムノアッセイ製品は、目的の分析物及びその派生型を含むことができる。分析物上の少なくとも3種のエピトープは、少なくとも3種の異なる抗体による結合に利用可能である。分析物は、少なくとも3種の異なる抗体と結合してよく、各抗体は分析物上の異なるエピトープと結合する。分析物上の3種のエピトープの少なくとも2種は、少なくとも3種の異なる抗体の少なくとも2種による派生型上の結合に利用可能である。派生型は、分析物と結合する3種の異なる抗体の少なくとも2種と結合することができ、各抗体は派生型上の異なるエピトープと結合する。分析物の少なくとも1種のエピトープは、派生型上の結合に利用不可能である。分析物及び分析物の派生型と結合した抗体の少なくとも1種は、シグナル抗体であってよい。

【0085】

12. 分析物についてのアッセイ方法

サンプルは、上記のようにサンドイッチイムノアッセイを行うことにより分析物及びその派生型の存在についてイムノアッセイすることができる。少なくとも3種の異なる抗体が用いられるが、各抗体は分析物上の異なるエピトープと結合可能であるものである。分析物と結合可能である抗体の少なくとも2種は、捕捉抗体若しくはシグナル抗体、又はその組み合わせである。分析物上のエピトープの少なくとも1種は、派生型上の結合に利用不可能である。

【0086】

イムノアッセイ対象のサンプルを、1種以上の捕捉抗体を含む表面に加える。次いで、1種以上のシグナル抗体を加える。別法として、1種以上の捕捉抗体を含む表面にサンプルを適用する前又はその間に、1種以上のシグナル抗体をサンプルに加え得る。未結合シグナル抗体を除去したのち、1種以上のシグナル抗体の結合の程度を上記のように測定する。シグナルは、存在するか又は捕捉抗体が結合可能である少なくとも1種のエピトープ、及び存在するか又はシグナル抗体が結合可能である少なくとも1種の第2エピトープを有する分析物並びに分析物の全ての派生型により生成されるだろう。

【0087】

13. 急性疾患の診断方法

目的の分析物及びその派生型は、患者が急性医学事象に罹患したかどうかを判定するためにイムノアッセイすることができる。サンプルを患者から採取し、上記アッセイ方法を用いて目的の分析物及びその派生型の存在についてイムノアッセイすることができる。シグナル抗体により生じたシグナルを対照値と比較することができる。対照を超えて検出されるシグナル、又は数時間若しくは数日にわたる一連のアッセイに由来するシグナルの連続は、患者が急性医学事象に罹患したことを示すものである。

【0088】

急性医学事象は、臨床マーカーに関連する任意の疾患状態であってよいが、該臨床マーカーは、本明細書に記載した改変イムノアッセイにおける分析物となるものである。医学事象は、例えば心筋梗塞であってよい。目的の分析物は、例えばTnI、TnT、TnC、CK-M、CK-B、CK-MB、ミオグロビン、TSH、FSH、CRP、BNP、pro-BNP、PSA、PCA、アポリポプロテイン、及びその組み合わせであってよい。

【0089】

14. 急性疾患の発症時間の診断方法

目的の分析物及びその派生型は、患者が急性医学事象に罹患した時を判定するためにイムノアッセイすることができる。サンプル、又は異なる時点で得られるサンプルのセット

10

20

30

40

50

を患者から採取し、上記アッセイ方法を用いて目的の分析物及びその派生型の存在についてイムノアッセイすることができる。患者が急性医学事象に罹患した時を測定するために、シグナル抗体により生成されたシグナルの量を、時間に対する分析物の量の標準曲線と相関させることができる。当業者であれば本明細書に記載した方法を用いて標準曲線を作成することができる。

【0090】

15. 急性疾患の重症度の診断方法

目的の分析物及びその派生型は、患者が罹患した急性医学事象の重症度を測定するためにイムノアッセイすることができる。サンプル、又は異なる時点で得られるサンプルのセットを患者から採取し、上記アッセイ方法を用いて目的の分析物及びその派生型の存在についてイムノアッセイすることができる。シグナル抗体により生成されたシグナルの量を、患者が罹患した医学事象の重症度と相関させることができる。

10

【0091】

本発明を全般的に説明してきたが、下記の実施例は本発明をより十分に説明するために提供されるものである。これらの実施例は例示のみを目的とするものであって、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例1】

【0092】

粒子へのcTnI捕捉抗体の結合

ポリスチレン/アクリル酸ラテックスの直径0.2 μ mのスフェア(Seradyn)を最初にpH6.2の0.05M 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES、Sigma Aldrich)緩衝液中で交換することにより、cTnIに特異的な抗体と結合したビーズ粒子を調製した。このラテックススフェアの2%w/w溶液に、cTnI抗体(同じ0.05M MES緩衝液中で交換した緩衝液)を、ラテックススフェアの質量に対して制御した質量比で加えた。この溶液を4で15分間攪拌し、抗体で被覆されたビーズを制御した遠心により分離した。典型的に十分な抗体を加えてラテックスビーズ表面を十分に飽和した(ラテックス粒子の質量の8%~15%)。次いで、この微粒子の遠心ペレットをMES緩衝液中に1%w/vの密度で再懸濁し、1~10mMのEDCを加えて、吸着抗体をラテックススフェアに共有結合で架橋した。この懸濁液を4~12時間反応させ、この時点でラテックス粒子を遠心により分離し、MES緩衝液中に1%で再懸濁し、EDCの添加を繰り返した。上記方法を用いて、CB1(19C7、Hytest Inc.)又はCB2(34503228P、Biospecific Inc.)を含む微粒子捕捉試薬を調製した。CB1及びCB2両方を含むCB12微粒子は、上記方法を用い、2種の捕捉抗体の混合物を加えることにより調製した。

20

30

【実施例2】

【0093】

シグナル抗体の調製

下記方法を用いて、シグナル試薬として使用するアルカリホスファターゼ(ALP)標識化Fab複合物を調製した。アルカリホスファターゼ(Biozyme)をリン酸緩衝食塩水(PBS)に緩衝液交換した。ALPの1mg/ml~15mg/mlを25重量%(溶液中のALP重量に対して)のヘテロ2機能性架橋剤スクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]-シクロヘキサン-1-カルボキシ[6-アミドカプロエート](LCSMCC、Pierce)と反応させた。架橋剤はジメチルスルホキシド(DMSO、Sigma)中の溶液として加えた。この溶液を室温で45分間反応させ、その後遠心して沈殿を除去した。この活性化ALPをSephadex G50脱塩カラム(Sigma Aldrich)により未反応LCSMCCから分離した。

40

【0094】

シグナル試薬中に導入する抗体のFabフラグメントを全抗体のペプシン(Sigma)消化により生成し、S200 Sephacrylサイズ排除カラム(Amersham Pharmacia)を用いて分離した。得られたF(ab)₂フラグメントを60mMメルカプトエチルア

50

ミン (M E A、Sigma Aldrich) 中で 4 5 分間 3 7 で化学的に還元して 2 種の F a b フラグメントを生成し、これらを S e p h a d e x G 5 0 脱塩カラムを用いて脱塩することにより過剰の M E A から分離した。次いで、F a b フラグメントを活性化 A L P に加え、4 で 2 ~ 1 2 時間反応させた。等体積の 0 . 1 M グリシン (Sigma)、0 . 0 1 M システイン (Pierce) (P B S p H 7 . 4 中) で反応を停止した。次いで、反応生成物を S e p h a c r y l S 2 0 0 カラムを用いて分画して F a b フラグメントを含むシグナル試薬を得た。F a b フラグメントと A L P との特定モル比を有するシグナル試薬は、上記反応において F a b₂ フラグメントと A L P との比を変えることにより得た。図 1 2 は、1 ; 1、1 : 3、1 : 6 及び 1 : 1 0 の A L P : F a b 比を有する A L P - F a b シグナル試薬に関する溶出プロフィールを示す。

10

【 0 0 9 5 】

上記方法を用いて、E C 1 (G 1 2 9 C、Biospecific Inc.) 又は E C 2 (G 1 3 0、Biospecific Inc.) を含む A L P - 標識化シグナル試薬を調製した。E C 1 及び E C 2 両方を含む E C 1 2 シグナル試薬は、上記方法を用いて 2 種の F a b フラグメントを 1 : 1 のモル比で混合したのち、この混合物を活性化 A L P に加えることにより調製した。

【 実施例 3 】

【 0 0 9 6 】

c T n I 捕捉抗体を用いた E L I S A センサーの調製

下記方法を用いて、E L I S A センサー上に抗体標識化粒子の固定化層を含む分析物検出器を作製した。簡単に述べると、酸化ケイ素ウエハーについての慣用の半導体薄層技術を用いて、分析物検出器に用いる電流センサーを製造する。米国特許第 5 , 5 5 4 , 3 3 9 号に記載の方法を用いて、実施例 1 に記載した捕捉抗体の溶液を微細分散することにより、c T n I 捕捉領域を生成する。この粒子含有懸濁液の液滴を乾燥させて、該センサー表面上に c T n I 捕捉領域を形成する。これらのセンサーチップを別個の電子化学的接地用チップと共に、レーザー切断してセンサー、接地用チップ及び液体チャンネルのための開口部を有する、両面テープガasketで覆われたプラスチック底板に取り付ける。この底板アセンブリーにプラスチックカバーを加えて液体用導管を形成する。実施例 2 の酵素標識化シグナル試薬を、捕捉抗体として同一 E L I S A センサー上に印刷する。P B S 及び保存剤を含む 1 % ~ 5 0 % 糖溶液中でシグナル試薬を製剤化する。この組成物は、血液サンプル中へのシグナル試薬の速やかな溶解をもたらすことが認められた。組み立てたカートリッジを成形して、携帯用電子化学的分析器に使用できる使い捨てカートリッジを得る。

20

30

【 実施例 4 】

【 0 0 9 7 】

単一又は複数の捕捉抗体を用いる c T n I の検出の比較

米国特許第 5 , 0 9 6 , 6 6 9 号 (これは参照により本明細書に組み入れられる) に記載された一般型の c T n I 測定用分析系を用いた。簡単に述べると、C B 1、C B 2 及び C B 1 2 捕捉抗体を含むラテックスミクロスフェアで被覆したセンサーを用いて、実施例 3 に記載したように c T n I アッセイ用カートリッジを作製した。遊離 c T n I (Scripps Laboratories) 又は I T C 複合体 (Hytest Ltd) を加えた 3 種の全血サンプル中で c T n I をアッセイした。実施例 2 に記載したシグナル試薬 E C 1 2 を用いて、A L P による基質の脱リン酸から電気活性生成物が生成されることに基づいて電流シグナルを生成させた。電気活性生成物の量は、検出可能な c T n I の量に比例する。

40

【 0 0 9 8 】

図 1 0 は、C B 1 捕捉試薬を含むカートリッジのシグナルレベルが遊離 c T n I (菱形の点) 及び 2 種の I T C 複合体のレベル (四角及び三角の点) の両方に対して高いことを示す。これとは対照的に、C B 2 捕捉試薬を含むカートリッジは、特に I T C 複合体に対して、より低いシグナルを与える。C B 1 2 ハイブリッド捕捉試薬を用いたカートリッジは、c T n I の両方の形態に対して C B 1 又は C B 2 捕捉試薬と比較して改善されたシグナル生成を示す。C B 1 2 捕捉試薬の改善された性能は驚くべきである。なぜならば、こ

50

のハイブリッド試薬は、単独ではC B 1 抗体よりも著しく低い性能を有するC B 2 抗体を含むからである。

【実施例 5】

【0099】

単一又は複数のシグナル抗体を用いる c T n I の検出の比較

6 . 0 n g / m L c I T C 複合体を添加した全血サンプル中で、c T n I を調製直後及び室温で1日のインキュベーション後に、実施例3に記載したC B 1 及びC B 1 2 捕捉試薬、並びに実施例2に記載したE C 1、C E 2 又はE C 1 2 シグナル試薬を含むラテックスミクロスフェアで被覆したセンサーを有するカートリッジを用いてアッセイした。図11は、E C 1 シグナル試薬がE C 2 シグナル試薬よりも高いシグナル生成を示すことを実証する。c T n I の老化（例えば、タンパク質分解変性）を刺激するために1日のインキュベーション後に、E C 1 シグナル試薬に関するシグナルレベルは著しく低下する。対照的に、E C 2 試薬のシグナルレベルは中程度の低下しか示さない。ハイブリッドシグナル試薬E C 1 2 のシグナル生成は、サンプルを1日インキュベートした後は特に、2種の単一抗体シグナル試薬のそれぞれよりも驚くほど優れている。

10

【実施例 6】

【0100】

心筋梗塞の診断としての血清中の c T n I の検出

心筋梗塞の罹患が疑われる患者、並びに対照個体から全血サンプルを採取する。全血サンプル中でc T n I を、実施例3に記載したC B 1 2 捕捉試薬、及び実施例2に記載したE C 1 2 シグナル試薬を含むラテックスミクロスフェアで被覆したセンサーを有するカートリッジを用いてアッセイする。M I の罹患が疑われる患者に由来するサンプルにおけるシグナル生成を、対照に由来するシグナルのレベルと比較する。対照より大きいシグナルレベルは、該患者がM I に罹患したことを示す。

20

【図面の簡単な説明】

【0101】

【図1】目的の分析物の検出のための標準サンドイッチアッセイを示し、捕捉抗体（A b₁）及びシグナル抗体（A b₂）は、目的の分析物（A n）のそれぞれ第1及び第2エピトープ（e₁及びe₂）に対するものである。

【図2】3種のエピトープ（e₁、e₂及びe₃）を有する目的の分析物（A n）の説明である。

30

【図3】1種の捕捉抗体（A b₁）及び2種以上のシグナル抗体（A b₂及びA b₃）を用いる、目的の分析物（A n）及びその派生型を検出するための改変サンドイッチアッセイを示す。

【図4】2種以上の捕捉抗体（A b₁及びA b₂）及び1種のシグナル抗体（A b₃）を用いる、目的の分析物（A n）及びその派生型を検出するための改変サンドイッチアッセイを示す。

【図5 A - E】2種以上の捕捉抗体（A b₁及びA b₂）及び2種以上のシグナル抗体（A b₃及びA b₄）を用いる、目的の分析物（A n）を検出するための改変サンドイッチアッセイを示す。

40

【図5 F - I】2種以上の捕捉抗体（A b₁及びA b₂）及び2種以上のシグナル抗体（A b₃及びA b₄）を用いる、目的の分析物（A n）を検出するための改変サンドイッチアッセイを示す。

【図6】目的の分析物（A n）上の異なるエピトープ（e₁又はe₂）と結合性であり、かつ共通メンバーと複合した1種の抗体（A b₁）又は2種以上の抗体（A b₁及びA b₂）を示すが、該共通メンバーは表面（図6 A）、微粒子（図6 B）、及び酵素のようなポリペプチド（図6 C）であるものである。

【図7】異なる抗体（A b₁又はA b₂）と個々に複合した共通メンバーの混合物を示し、目的の分析物（A n）上の異なるエピトープ（e₁又はe₂）と結合する各抗体がアッセイされるが、該共通メンバーは微粒子（図7 A）又は酵素のようなポリペプチド（図7

50

B)であるものである。

【図8】2種以上の抗体 (Ab_1 及び Ab_2) と複合した共通メンバー (微粒子など) を示し、これは表面のような別の共通メンバーと複合しているが、2種以上の捕捉抗体は、(i)異なる微粒子と個々に複合している (図8A) か、又は (ii) 微粒子上で一緒に複合している (図8B) ものである。

【図9】アミノ酸 1 ~ 25 及び 150 ~ 209 を除いた心臓トロポニン I (cTnI) の派生型の一次構造を表し、また cTnI 抗体のエピトープのための位置を示す。

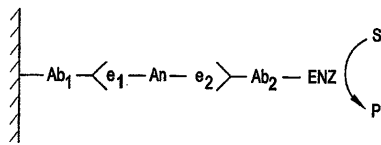
【図10】遊離 cTnI 及び 2つのレベルの cITC を添加した全血サンプルに対する第1捕捉抗体 (CB1)、第2捕捉抗体 (CB2)、又は第1及び第2捕捉抗体の混合物 (CB12) を用いて調製した、種々の単一使用アッセイに由来する電流シグナルを示す。

10

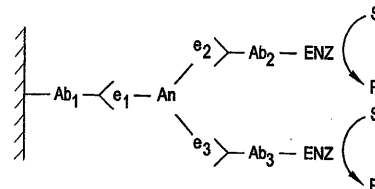
【図11】6.0 ng/mL の cITC 複合体でスパイクした全血サンプルから、調製直後及び室温で1日後に、CB1又はCB2で被覆したセンサー、並びに第1抗体と複合したシグナル生成酵素 (EC1)、第2抗体と複合したシグナル生成酵素 (EC2)、又は EC1 及び EC2 の混合物 (EC12) を用いて調製したカートリッジを使用して得られた電流シグナルを示す。

【図12】ALPとFabとの異なる比を有する Fab-ALP 複合物に関する溶出プロフィールを示す。

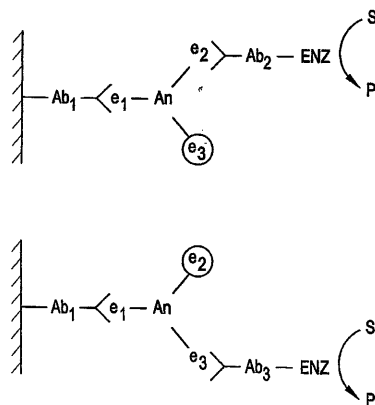
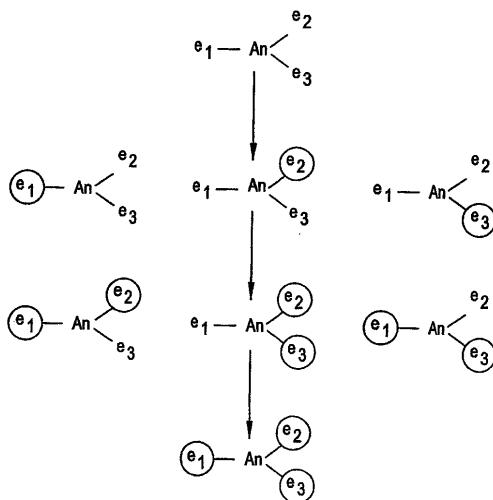
【図1】



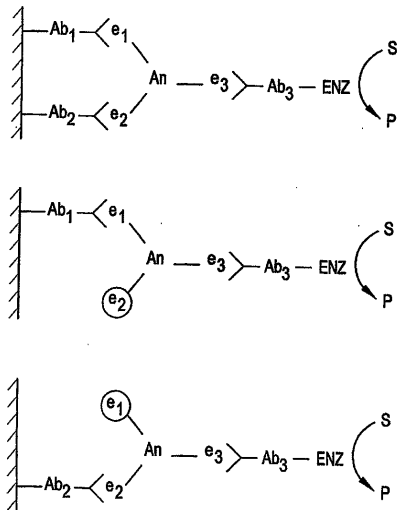
【図3】



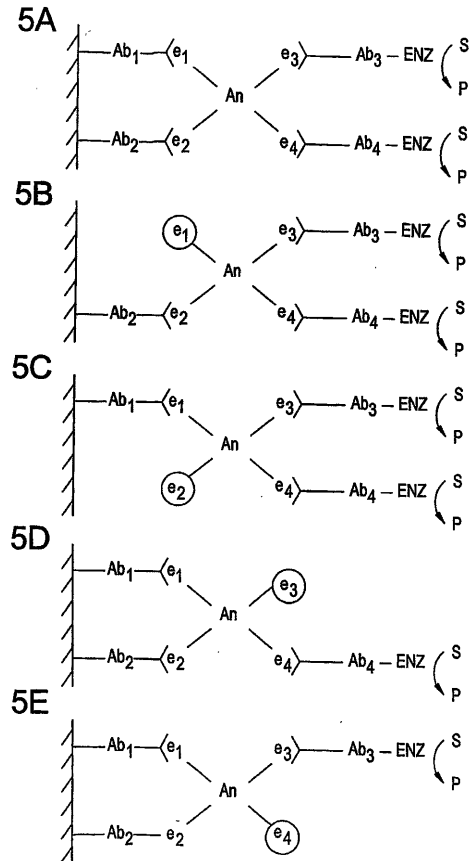
【図2】



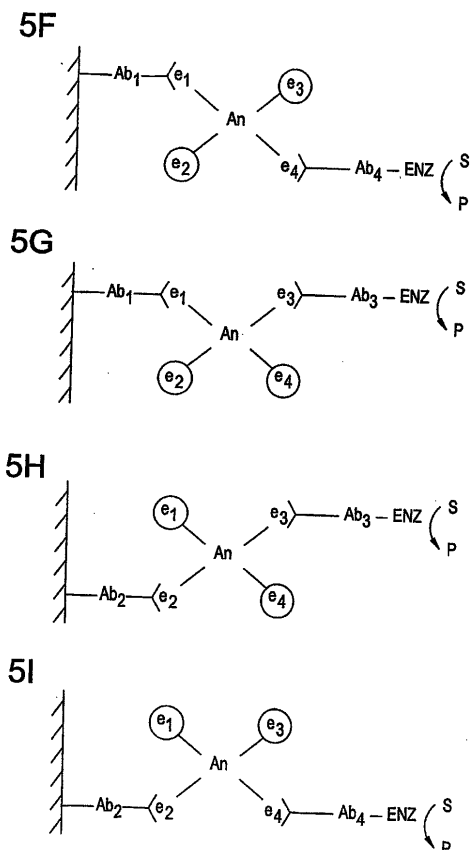
【 図 4 】



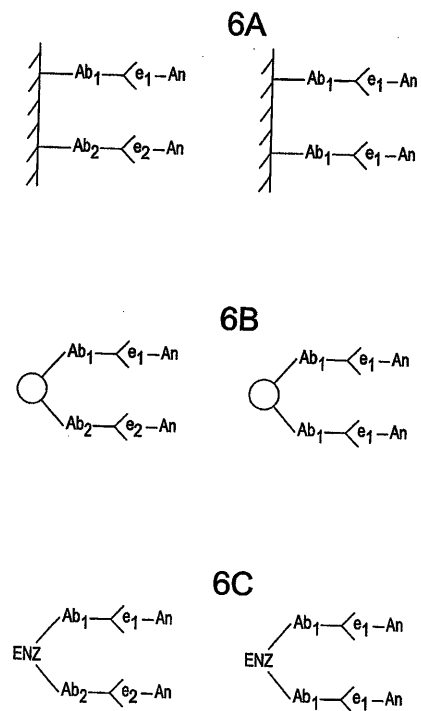
【 図 5 A - E 】



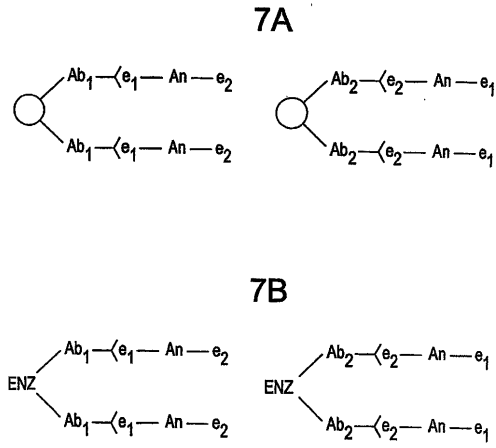
【 図 5 F - I 】



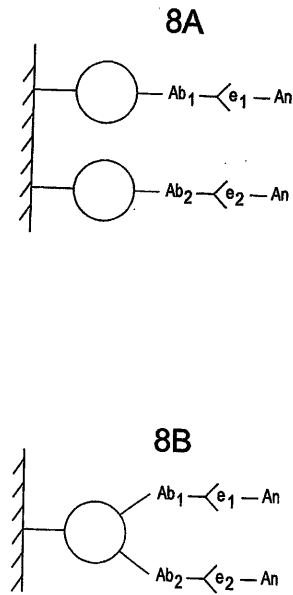
【 図 6 】



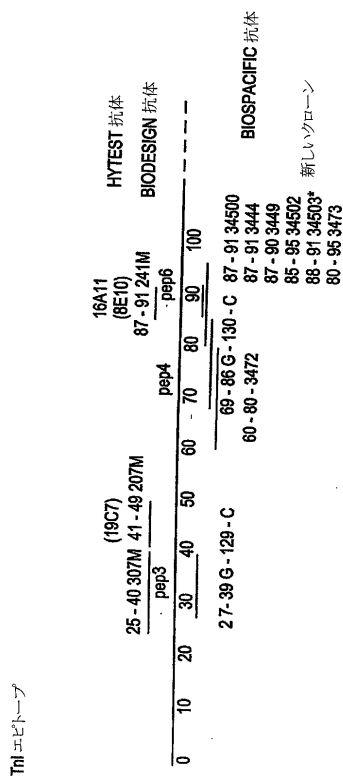
【 図 7 】



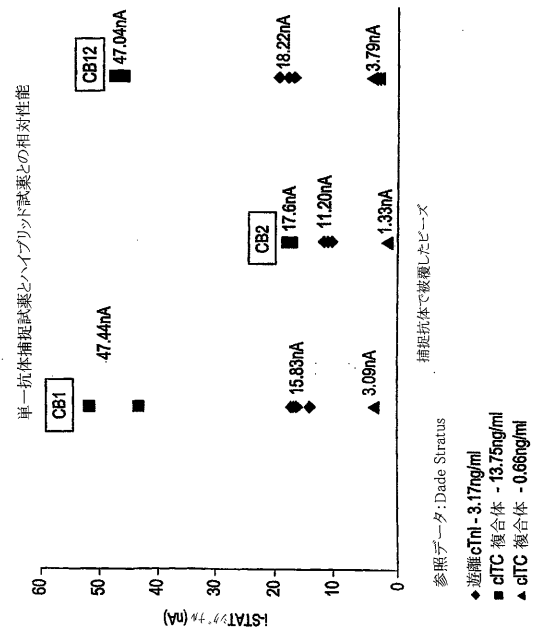
【 図 8 】



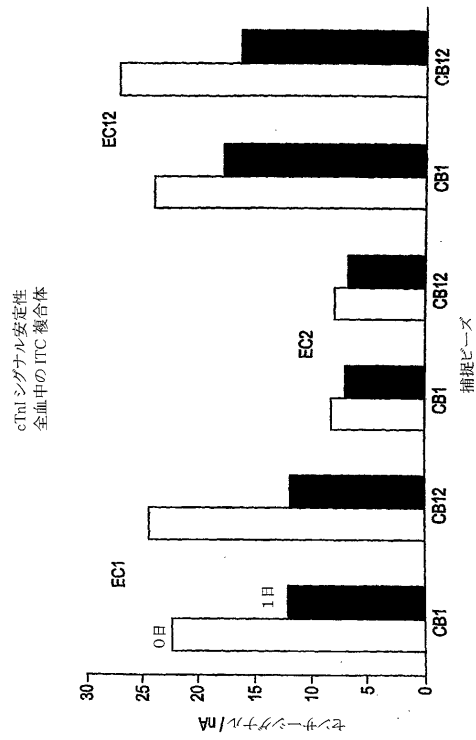
【 図 9 】



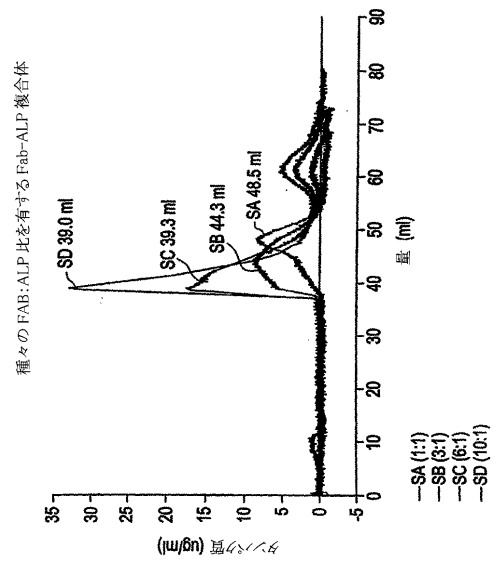
【 図 1 0 】



【図 1 1】



【図 1 2】



フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/553 (2006.01) G 0 1 N 33/552
 G 0 1 N 33/553
- (72)発明者 キャンベル, ジョン, ルイス, エマーソン
 カナダ国 ケイ 0 エイ 3 エム 0 オンタリオ, ウッドローン, チャーモント ウェイ 1 4 5
- (72)発明者 フランク, パメラ, アン
 カナダ国 ケイ 2 ジェイ 2 イー 3 オンタリオ, ネピーン, ティーブンス ドライブ 7
- (72)発明者 ホークス, メグハム, エリザベス
 カナダ国 ケイアイエス 4 ダブリュ 3 オンタリオ, オタワ, ロスリン アベニュー 3 0
- (72)発明者 ロビン, シャノン, レイシュマ
 カナダ国 ケイ 0 エイ 3 エム 0 オンタリオ, ウッドローン, ストーンクレスト ロード 4 7
 2 4
- (72)発明者 ミラー, キャリー, ジェイムス
 カナダ国 ケイ 2 エム 1 エヌ 2 オンタリオ, オタワ, チックソー クレセント 8 3
- (72)発明者 ヤン, ツェン
 カナダ国 ケイ 2 エム 2 アール 6 オンタリオ, カナタ, グラシー ブレインズ ドライブ 1
 4 7

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 特開平 0 2 - 5 0 0 9 4 9 (J P , A)
 Filatov VL et al., Epitope mapping of anti-troponin I monoclonal antibodies., Biochemistry and Molecular Biology International, 1 9 9 8 年 9 月, 45(6), 1179-87
 Nikulina VA et al., Synergistic effects in antigen capture ELISA using three monoclonal antibodies directed at different epitopes of the same antigen., Clinica Chimica Acta, 2 0 0 0 年 9 月, 299(1-2), 25-44

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
 G01N 33/53-33/551
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	多重杂交免疫分析		
公开(公告)号	JP4507879B2	公开(公告)日	2010-07-21
申请号	JP2004524914	申请日	2003-07-29
申请(专利权)人(译)	艾 - Stat的公司		
当前申请(专利权)人(译)	保健公司雅培点		
[标]发明人	キャンプベルジョンルイスエマーソン フランクパメラアン ホークスメグハムエリザベス ロビンシャノンレイシュマ ミラーキャリージェイムス ヤンツェン		
发明人	キャンプベル,ジョン,ルイス,エマーソン フランク,パメラ,アン ホークス,メグハム,エリザベス ロビン,シャノン,レイシュマ ミラー,キャリー,ジェイムス ヤン,ツェン		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 G01N33/543 G01N33/547 G01N33/552 G01N33/553 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/6887 G01N2333/4712 B01L3/502 B01L3/50273 B01L2400/0683 G01N33/53 G01N33/5302 G01N33/54313 G01N33/54353 G01N33/54386 G01N33/545 G01N33/6893 G01N2333 /47 G01N2800/324		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.W C07K16/18 G01N33/543.501.D G01N33/547 G01N33/552 G01N33/553		
优先权	10/208560 2002-07-29 US		
其他公开文献	JP2005534907A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于目标分析物的免疫测定的组合物和方法。使用三种或更多种抗体在免疫测定中检测分析物，但每种抗体特异性结合分析物上的不同表位。如果感兴趣的分析物是急性疾病的临床标志物，则通过免疫测定法检测所述分析物将是所述疾病发作的诊断。

