

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4746810号
(P4746810)

(45) 発行日 平成23年8月10日(2011.8.10)

(24) 登録日 平成23年5月20日(2011.5.20)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 2 5 U

GO 1 N 33/543 5 2 5 G

請求項の数 10 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2001-552089 (P2001-552089)
 (86) (22) 出願日 平成13年1月12日(2001.1.12)
 (65) 公表番号 特表2003-523503 (P2003-523503A)
 (43) 公表日 平成15年8月5日(2003.8.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2001/000095
 (87) 国際公開番号 W02001/051927
 (87) 国際公開日 平成13年7月19日(2001.7.19)
 審査請求日 平成19年11月19日(2007.11.19)
 (31) 優先権主張番号 00/00376
 (32) 優先日 平成12年1月13日(2000.1.13)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 592096719
 ビオーラド・パストゥール
 Bio-Rad Pasteur
 フランス92430マルヌ・ラ・コケット
 、ブルヴァール・レイモン・ボワンカレ
 3番
 (74) 代理人 110000914
 特許業務法人 安富国際特許事務所
 (74) 代理人 100086586
 弁理士 安富 康男
 (72) 発明者 ファビアンヌ ババン
 フランス国 エフ-78180 モンティ
 グニール ブルトンヌー, ルー ド
 ラ グルヌイレット 22

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疎水性固相に親和性試薬を固定する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カルボキシル基で官能化した疎水性固相に親和性試薬を固定する方法であって、前記方法が、前記固相を活性化する段階および前記固相に親和性試薬を結合させる段階を含んで成り、前記固相を活性化する段階が、補助活性剤の存在下に、約4～約6.5のpHを有する酸性媒体中で、カルボジイミドとホスフェート緩衝剤との組合せを使用すること、および結合段階が約7.2～約10.5のpHを有する塩基性媒体中で行われること、を特徴とする方法。

【請求項 2】

使用されるカルボジイミドが、CMC(N-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメチル-p-トルエンスルホネート)およびEDC(1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド)から成る群から選択される化合物であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

使用される補助活性剤が、s-NHS(スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド)、HOBT(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)およびN-ヒドロキシスクシンイミドから成る群から選択される化合物であることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

使用されるカルボジイミドが、CMC(N-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメチル-p-トルエンスルホネート)であり、使用される補助活

10

20

性剤が、s - N H S (スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミド)であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

カルボジイミドが、C O O H 基につき 2 0 ~ 5 0 モル当量の量で使用されることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

補助活性剤が、C O O H 基につき 3 ~ 1 0 モル当量の量で使用されることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

固相を活性化する段階が、約 4 ~ 約 6 . 5 の pH を有する酸性媒体中で、C O O H 基につき 3 ~ 1 0 モル当量のスルホ - N - ヒドロキシスクシンイミド補助活性剤の存在下に、3 0 ~ 2 0 0 m M のホスフェート緩衝剤中の、C O O H 基につき 2 0 ~ 5 0 モル当量の C M C の組合せを使用し、結合が約 7 . 2 ~ 約 1 0 . 5 の pH を有する塩基性媒体中で行われることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 8】

固相を活性化する段階が、p H 6 において、C O O H 基につき 5 モル当量のスルホ - N - ヒドロキシスクシンイミド補助活性剤の存在下に、5 0 m M の K H ₂ P O ₄ ホスフェート緩衝剤中の、C O O H 基につき 3 0 モル当量の C M C の組合せを使用し、結合が、p H 8 . 5 の緩衝剤 1 容量及び前記ホスフェート緩衝剤 1 容量を含有する媒体中で行われることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 9】

親和性試薬が、アミン基を含有するか、またはアミン基を人為的に付与しうることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0】

親和性試薬が、タンパク質、ペプチド、免疫グロブリン、抗原、ハプテン、抗体、酵素、酵素基質、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドから成る群から選択されることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

(技術分野)

30

本発明は、アナライト検出のためのバイオアッセイに使用しうる疎水性固相に親和性試薬を固定する方法、この方法によって得られる反応性複合体、およびバイオアッセイキットにおける前述の複合体の使用に関する。

【0 0 0 2】

(背景技術)

相互親和性を有する試薬を使用する生物学的分析アッセイは、長年にわたって知られている。前述の試薬は、以下に「親和性試薬」または「親和性対試薬」と称する。従って、親和性対の一方を、他方を使用することによって探し、検出する方法が知られている。親和性試薬間の親和性反応を利用するバイオアッセイ、または「アフィニティアッセイ」は、例えば酵素およびその基質を使用する酵素分析、B e r s o n および Y a l o w (1 9 5 9) の先駆的研究によって開始され、抗体と、対応する抗原またはハプテンとの反応を含む定性または定量イムノアッセイ、最近では、標的オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと、それと特異的に交雑しうる相補的ヌクレオチドプローブを使用する核酸交雑アッセイを包含する。

40

【0 0 0 3】

1 9 6 0 年代以来、得られた遊離複合体と結合複合体との分離を必要とするアフィニティアッセイにおいて、この分離工程を単純化するために、反応性固相(または固体支持体)を使用しようとする努力がなされている。

親和性試薬は、例えばグルタルアルデヒドの補助によって、共有結合によって固相に固定することができる。1 9 6 7 年の C a t t および T r e g e a r の研究以来、簡単な受動

50

吸着によって固相に親和性試薬を固定することも知られている。

受動吸着による固定は簡単であるという長所を有するが、不適切に固定された試薬を液体媒体に放出する。

【0004】

固相共有結合は一般に、より高い安定性を有する最終試薬を生成するという長所を有するだけでなく、より高い親和性の試薬を固体支持体に固定させることもできる。現在使用している多くの固相共有結合の方法および薬剤が存在する：言及されうる非制限的な例は、例えば、DMA P (ジメチルアミノピリジン)、HOB t (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)、N-ヒドロキシスクシンイミドまたはs-NHS (スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド)といった補助活性剤の存在または非存在下での、グルタルアルデヒド、臭化シアンおよびカルボジイミドとの結合であり、これらは当業者によく知られている。

10

【0005】

共有結合によって固相に親和性試薬を固定する種々のプロトコルは、1、2または3段階で行われる。1段階結合においては、全ての成分を相互に接触させる。2段階結合は一般に、固体支持体をいわゆる「活性剤」によって活性化し、次に、洗浄して過剰の未反応活性剤を除去し、最後に親和性触媒に接触させる第一段階を含み、第二段階において実際の結合を実施する。

【0006】

多くの固相または固体支持体が知られており、使用されている：親水性固相（例えば、Pharmaciaによって市販されているSephadex（登録商標））および疎水性固相（例えば、ポリプロピレン、ポリスチレン、ラテックス等）。後者は一般に、例えば、アミン、カルボキシル、トシル、アルデヒド、ヒドロキシル、チオール、クロロメチル、ヒドラジドおよびその他の基といった予めグラフトされた官能基を介する反応を提供する。

20

【0007】

カルボキシル基によって官能化された疎水性固相に親和性試薬を共有結合させる種々の方法が提示されている：MES (2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸)とカルボジイミドの組合せのような、緩衝剤と活性剤の種々の組合せを使用する。言及されうる例は、D. Bastos-Gonzalezら、J. of Colloid and Interface Science, 176, 232-239 (1995)、またはC. Bieniarzら、Bioconjugate Chem., 1996, 7, 88-95に記載されている、MESおよびEDC (1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド)の存在下における抗体とカルボキシル化合物ラテックスとの共有結合である。

30

【0008】

しかし、ホスフェート緩衝剤とカルボジイミド（活性剤として）の組合せは、カルボジイミドがホスフェートも活性化し、従って、それらの活性の大部分を失うという短所を有する故に、避けるべきであることが以前から知られている。これは、同時に、不十分な有効性の共有結合、高い割合の受動吸着、および、その結果として得られた生成物の不安定性を生じる (Wong, S, 「Chemistry of protein conjugation and crosslinking」、第6章、p. 196 (1991)、およびM. A. Gillesら、Analytical Biochemistry, 184, 244-248 (1990))。

40

【0009】

Bangs (Bangs Laboratories Inc., Tech. Note # 13c, Covalent coupling protocols, p. 3)は、水性溶液中でカルボジイミドEDCの補助とともにカルボキシル基によって官能化された疎水性固相を活性化するプロトコルを提示しているが、得られる結果は、結合有効性の見地から、決して満足できるものではない。実際に、結合は量的ではなく、共有結合と比較して受動吸着の割合が高い (下記実施例1参照)。

50

【0010】

一般に、カルボキシル基によって官能化された疎水性固相に親和性試薬を固定するために共有結合を使用する全ての先行技術法において、親和性試薬と固相との実際の共有結合は、前述の固相への前述の親和性試薬の受動吸着によるかなりの程度の固定が共存するという好ましくない観察がなされる。言い換えれば、これらの方法は、所望される最大程度の共有結合を得ることができないという短所を有する。受動吸着は、共有結合に有利になるように調節することができないので、これらの方法は、親和性試薬の共有結合固定を最適化することができないか、または再現性のある共有結合を得ることができない。従って、それらは、時間の経過とともに不安定な生成物を生じる。

従って、結合の共有結合性を再現可能に調節し、最適化し、それと共に、同時受動吸着の可能性を最小限にする、カルボキシル基によって官能化された疎水性固相に親和性試薬を固定する方法が求められている。

10

【0011】

驚くことに、活性剤としてのカルボジイミドとホスフェート緩衝剤との組合せの補助によって、カルボキシル基で官能化された疎水性固相に親和性試薬を固定する反応の共有結合性を再現可能に調節し、最適化しうることが見い出された。

従って、本発明は、カルボキシル基によって官能化された疎水性固相に親和性試薬を固定する方法に関し、前述の方法が、前述の固相を活性化する段階および固相に親和性試薬を結合させる段階を含んで成り、前述の固相を活性化する段階が、補助活性剤の存在下において、酸性媒体中でカルボジイミドとホスフェート緩衝剤との組合せを使用し、親和性試薬の結合の段階が塩基性媒体中で行われることを特徴とする。

20

【0012】

この分野において、およびペプチド合成の分野において、カルボキシル基活性剤として使用されるあらゆるカルボジイミドを、本発明の目的に使用することができる。

カルボジイミドの例は、特に、Lundblad, R. L. による、*Chemical Reagents for Protein Modification*、第2巻、第4章、CRC Press; Boca Raton, F. L. および Marion Mikolajczyk による、*Tetrahedron*、第37巻、p. 233-284 (1981) に記載されている。

30

【0013】

本発明の活性剤として使用することができるカルボジイミドの例として特にCMC (N-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメチル-p-トルエンスルホネート) およびEDC (1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド) を挙げることができ、CMC が特に好ましい。

【0014】

カルボジイミドは、COOH基に対して過剰で使用しなければならない。使用される量は、COOH基につき20~50モル当量であるのが好ましい。

「ホスフェート緩衝剤」は、本発明において、一般に30~200mMの濃度で使用される通常のホスフェート緩衝剤(ナトリウムおよび/またはカリウム)を意味すると理解されるものとし、50mMのホスフェート緩衝剤が特に好ましい。

40

【0015】

この分野で使用されるあらゆる補助活性剤を使用することができる。補助活性剤の例は、特に、Staros, J. V. による、*Biochemistry*、21, 3950-3955 (1982); O'Sullivan, M. J. による、*Anal. Biochem.*、100, 100-108 (1979); Abdella, P. M. による、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*、87, 734-742 (1979) に記載されている。

【0016】

本発明によって使用しうる補助活性剤のうち、特にs-NHS (スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド)、HOBt (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール) およびN-ヒドロキ

50

シスクシンイミドが使用され、s - N H S (スルホ - N - ヒドロキシシスクシンイミド) が特に好ましい。

カルボジイミドと同様に、補助活性剤は、C O O H 基に対して過剰で使用しなければならない。使用される量は、C O O H 基につき 3 ~ 10 モル当量であるのが好ましい。

【 0 0 1 7 】

本発明の方法の活性化段階における「酸性媒体」は、約 4 ~ 約 6 . 5 の p H を有する媒体を意味すると理解されるものとし、p H 6 が特に好ましく、前述の媒体の酸性性質はホスフェート緩衝剤によって付与される。

本発明の方法の結合段階における「塩基性媒体」は、約 7 . 2 ~ 約 10 . 5 の p H を有する媒体を意味すると理解されるものとし、p H 8 . 5 の緩衝剤 50 % を含有する媒体が特に好ましい。

10

【 0 0 1 8 】

媒体の塩基性性質は、適切な一般的な緩衝剤、例えば、ボレート緩衝剤またはホスフェート緩衝剤 / ボレート緩衝剤混合物を使用することによって得られる。

従って、本発明の好ましい実施形態において、固相の活性化段階は、約 4 ~ 約 6 . 5 の p H を有する酸性媒体中で、C O O H 基につき 3 ~ 10 モル当量のスルホ - N - ヒドロキシシスクシンイミド補助活性剤の存在下に、30 ~ 200 m M のホスフェート緩衝剤中の、C O O H 基につき 20 ~ 50 モル当量の C M C の組合せを使用し、結合は約 7 . 2 ~ 約 10 . 5 の p H を有する塩基性媒体中で行う。

【 0 0 1 9 】

20

本発明の特に好ましい実施形態において、固相の活性化段階は、p H 6 で、C O O H 基につき 5 モル当量のスルホ - N - ヒドロキシシスクシンイミド補助活性剤の存在下において、50 m M の K H ₂ P O ₄ ホスフェート緩衝剤中において、C O O H 基につき 30 モル当量の C M C の組合せを使用し、結合は p H 8 . 5 のボレート緩衝剤 50 % を含有する媒体中で行う。

上述の結合条件に関連する活性化パラメーター (カルボジイミド、ホスフェート緩衝剤、補助活性剤および酸性 p H) の適切な組合せは、本発明の方法の実施に重要である。

【 0 0 2 0 】

本発明によって固定しうる親和性試薬は、アミン基を有するか、または人為的にアミン基を付与しうる化合物である。言及されうるそのような親和性試薬の例は、タンパク質、ペプチド、免疫グロブリン、抗原、ハプテン、抗体、酵素、酵素基質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド等、ならびに当業者に知られている他の生物試薬である。

30

「疎水性固相」は、本発明の開示において、当分野で一般に使用される疎水性ポリマー、例えば、ポリプロピレンおよびポリスチレンのようなビニル芳香族ポリマー、特にこれらのポリマーのラテックスから成る固相を意味すると理解されるものとする。これらの固相は、当業者によく知られている方法を使用してカルボキシル基によって官能化される。これに関して、例えば、O t t e w i l l R . H . ら、K o l l o i d Z u Z . P o l y m e r e , 2 1 5 , 1 6 1 - 1 6 6 (1 9 6 7) の論文を参照することができる。

【 0 0 2 1 】

本発明に使用しうる、カルボキシル基で官能化された疎水性固相の例は、ラテックス粒子、例えば、E s t a p o r (登録商標) (P r o l a b o , フランス) の商品名で知られているラテックス粒子、D y n a l からの D y n a b e a d s (登録商標) 磁性粒子、P o l y s c i e n c e s , I n c . からの P o l y b e a d (登録商標) 微小球、およびそれらの相当物等である。

40

【 0 0 2 2 】

本発明はさらに、本発明の方法によって得られる反応性固体複合体、例えば、イムノアッセイに使用しうる固相 / 抗原複合体、固相 / ハプテン複合体、固相 / 抗体複合体等、核酸交雑アッセイ、増幅アッセイ等に使用しうる固相 / オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド複合体、固相 / 酵素複合体または固相 / 酵素基質複合体等にも関する。

【 0 0 2 3 】

50

本発明はさらに、バイオアッセイ用のキットにおけるこれらの複合体の使用にも関し、非制限的な例は、当業者に知られている定性的または定量的なイムノアッセイ、核酸交雑アッセイ、核酸増幅アッセイ、酵素アッセイ等である。

例示するものにすぎず、どのような方法においても本発明の範囲を限定するものではないと理解すべき下記の実施例によって、本発明がより明確に理解される。

【0024】

(実施例)

実施例 1

カルボキシルビーズへのペプチドの結合

a) 試薬

10

a 1) カルボキシルビーズ

フランスの Prolabo によって製造された磁性カルボンキシルラテックスビーズ (参考 Estapor M1-070/60) を、カルボキシル基を有する疎水性固相として使用した。それらは、COOH 基によって官能化されたポリスチレンおよび酸化鉄の多分散粒子から成る。使用される固相は、下記の特性を有する：平均径 (0.8 μm)、鉄のパーセント (62%)、官能化度 (150 μeq COOH/g)。それは 0.1 g/mL の水性懸濁液の形態である。

全てのビーズ洗浄工程は下記のように行われる：

各実験において、試験管に存在する磁性ビーズを、磁化支持体を使用して溶液から分離する。上澄みをピペットで除去し、磁性ビーズを、磁化支持体によって各試験管に保持する。新しい溶液または新しい緩衝剤の各添加後に、ビーズを、約 10 秒間かき混ぜることによって再懸濁させる。

20

洗浄は、洗浄溶液の添加、ビーズの再懸濁、および磁化によるこの溶液の除去を含んで成る。

【0025】

a 2) ペプチド

下記配列を有する 17 個のアミノ酸のペプチドを、この実施例において使用した：KGSYSVDHFRWGRPVSG-NH₂。

このペプチドは、E. Atherton および R. L. Sheppard、*「Solid phase peptide synthesis, a practical approach」*、IRL PRESS (1989)、Oxford University Press、pp. 25-34 に記載されている方法によって製造した。

30

使用したホスフェート緩衝液は、pH 6 の KH₂PO₄ 50 mM 水溶液であった。

全ての操作を、室温、即ち 19~24 °C で行った。

【0026】

b) カルボキシルビーズへのペプチドの固定

b 1) カルボキシルビーズへのペプチドの共有結合

ステップ 1：カルボキシルビーズの洗浄

試験管中の 50 μL の磁性カルボキシルラテックスビーズを、pH 9 の 0.1 mM、NaOH 750 μL で 2 回、二重蒸留水 750 μL で 1 回、最後にホスフェート緩衝液 750 μL で 1 回、洗浄する。

40

ステップ 2：カルボキシルビーズの活性化

250 μL のホスフェート緩衝液、200 μL (30 eq / COOH 基) の CMC (N-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメチル-p-トルエンスルホネート) (Fluka) の水溶液、および 50 μL (5 eq / COOH) の s-NHS (スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド) (Pierce) の水溶液を、ステップ 1 で得た洗浄ビーズの残留物に添加する。

反応混合物を、振とうしながら室温で 1 時間インキュベーションする。次に、ビーズを 500 μL のホスフェート緩衝液で洗浄する。

ステップ 3：ビーズへのペプチドの結合

50

0.25 eq (COOH基に基づく)のセクションa2)に記載したペプチドを含有する、250 μLのホスフェート緩衝液、およびpH 8.5の250 μLの37.5 mMボレート/50 mM NaCl緩衝液を、ステップ2で得た活性化ビーズの残留物に添加する。反応混合物を、振とうしながら室温で1時間インキュベーションする。ビーズを磁化によって分離し、上澄みをHPLCによる測定(下記セクションc)参照)のために保持する。洗浄後、ビーズをpH 7.4のPBSか、または他の好適な同等の緩衝液中に維持する。

【0027】

b2)カルボキシルビーズへのペプチドの受動吸着

「受動」型の結合(「受動吸着」とも呼ばれる)を活性剤およびカップリング剤、CMCおよびs-NHSを除いた上記と全く同じ試薬を使用して行う。「受動」型の結合後、ビーズを磁化によって分離し、上澄みをHPLCによる測定(セクションc)参照)のために保持する。

10

【0028】

c)HPLCによる共有結合収率の計算および受動結合の測定

結合の後、無極性固定相(C18)および極性移動相(勾配:アセトニトリル/0.08% TFA水溶液~0.1% TFA)を有する装置(例えば、Waters)での逆相高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)を行う。

各結合(共有または受動)の終了時に、セクションb1)またはb2)で得た30 μLの上澄みをHPLC装置に入れる。

20

【0029】

同量の「対照溶液」(即ち、結合に使用したのと同じであるが、磁性ビーズに結合していないペプチド溶液(pH 8.5の250 μL、37.5 mMボレート/50 mM NaCl緩衝液、および250 μLのホスフェート緩衝液中))もHPLC装置に入れる。

分で表される時間Tの関数としての、214 nmでの吸収を測定することによって得たHPLCクロマトグラムを、図1~3に示す。図1のクロマトグラムは、T₀における対照溶液(磁性ビーズに結合していないアッセイ)を使用して得たピークを示し、前述の溶液は、導入された全量のペプチドを示すことによって基準となる。

【0030】

図2のクロマトグラムは、セクションb1)に記載した共有結合の終了時にT₀+1時で採取した上澄みを使用して得たピークを示す。

30

図3のクロマトグラムは、セクションb2)に記載した受動結合の終了時にT₀+1時で採取した上澄みを使用して得たピークを示す。

【0031】

各クロマトグラムについて、ピーク領域をソフトウェアプログラム(例えば、Millenniumソフトウェア)によって集約する。これは、対照溶液に関する領域A0、共有結合に関する領域A1、および「受動型」結合に関する領域A2を測定する。

従って、結合収率は、下記式を使用して、当業者に既知の逆測定(back determination)によって求められる:

$$\% \text{共有結合} = [(A0 - A1) / A0] \times 100$$

40

$$\% \text{「受動型」結合} = [(A0 - A2) / A0] \times 100$$

【0032】

d)本発明の結合と先行技術の結合との比較

この試験は、先行技術の3つのプロトコルおよび本発明のプロトコルで行った。カップリング剤および活性剤を使用しない「受動」条件下の結合は、全プロトコルについて平行して行った。共有結合および受動結合の収率を、c)に記載した方法で求めた。

【0033】

先行技術のプロトコル:

- 「Bangs」プロトコル、Bangs Laboratories Inc., Tech, note #13c、Covalent coupling protocols

50

, p . 3 .

【 0 0 3 4 】

ビーズを予備賦活緩衝液 (p H 4 . 5 の 5 0 m M ホスフェート緩衝液) で洗浄し、次に、少ないパーセント (2 0 %) の予備賦活緩衝液の存在下に E D C の水溶液で活性化した。結合を、 p H 8 . 5 の 0 . 2 M ボレート緩衝液中で行った。結合後、未反応カルボキシル基をエタノールアミン溶液でブロックした。ビーズを、 B S A 、グリシン、 Tween (登録商標) 洗浄剤およびアジ化ナトリウムを含有する緩衝液中に維持した。

【 0 0 3 5 】

- J . S a c k r i s o n プロトコル、ラテックス粒子への共有結合および微小球を使用する診断開発、ラテックスコース、 1 9 9 7 .

p H 8 . 5 の 1 0 m M ボレート緩衝液、 p H 5 . 0 の 1 0 m M 酢酸ナトリウム溶液、および p H 1 0 . 2 の 5 0 m M ジエタノールアミン溶液を使用してビーズを数回洗浄し、次に、 p H 1 0 . 2 の 5 0 m M ジエタノールアミン緩衝液中の C M C の溶液で活性化した。カップリングを、 p H 7 . 4 の 1 0 0 m M ホスフェート / 1 5 0 m M N a C l 緩衝液中で行った。

【 0 0 3 6 】

- D . B a s t o s - G o n z a l e z ら、 J . o f C o l l o i d a n d I n t e r f a c e S c i e n c e , 1 7 6 , 2 3 2 - 2 3 9 , 1 9 9 5 に記載のプロトコル 1 .

ラテックスビーズを p H 5 . 6 の緩衝液 (M E S) に添加した。カップリングを、弱酸性媒体 (p H 5 . 6 の M E S 緩衝液) 中に行った。 E D C の水溶液を添加し、次に、試料を室温でインキュベーションした。結合後、過剰のカルボキシル基を、エタノールアミンで処理することによってブロックした。

H P L C 測定によって得た結果を、表 I において、結合収率 (%) 、および共有結合と受動結合の差 () で示す。

【 0 0 3 7 】

【表 1】

表 I

| プロトコル | 受動結合 ペプチドの% | 共有結合 ペプチドの% | Δ (共有-受動) |
|--|----------------|----------------|--------------|
| Bangs | 47 | 57 | 10 |
| ラテックスコース (J. Sackrison) | 80 | 82 | 2 |
| プロトコル 1 (D. Bastos-Gonzalez et al.) | 8 | 13 | 5 |
| 本発明のプロトコル | 54 | 100 | 46 |

【 0 0 3 8 】

先行技術のプロトコルを使用して得た結果と比較して、本発明の結合プロトコルを使用した場合に最良の性能特性が得られる：したがって、本発明の結合プロトコルを使用した場合、共有結合収率は量的 (1 0 0 %) であり、共有結合と受動結合の差は、 2 つの形態の結合の差が相対的に小さい先行技術のプロトコルと比較して、かなり大きい。

【 0 0 3 9 】

e) 本発明の結合法の再現性

本発明の結合法の再現性を、一方で、全く同一のバッチのビーズへの 3 つの結合を行い、他方で、異なるバッチのビーズへの結合を行うことによって試験した。セクション b 1) (上記) に記載したプロトコルによる共有結合、およびセクション b 2) (上記) に記載したプロトコルによる「受動」型結合を、各実験において平行して行った。結合収率の計

算、および受動結合の測定は、上記プロトコルc)によって行った。

HPLC測定によって得た結果を、表IIに、結合収率(%)、および共有結合と受動結合の差()で示す。

【0040】

【表2】

表 II

| ビーズのバッチ | 受動結合 ペプチドの% | 共有結合 ペプチドの% | Δ (共有-受動) |
|---------|----------------|----------------|--------------|
| 477 | 52 | 98 | 46 |
| 477 | 54 | 100 | 46 |
| 477 | 58 | 100 | 42 |
| 583 | 56 | 93 | 37 |

10

【0041】

これらの結果は、全く同一のバッチ(バッチ477)を使用した場合に再現性が優れていることを示す。異なるバッチ(バッチ583)を使用した場合、結合収率は完全に許容されるものであり、第一バッチで得た収率に比較しうるものである。

【0042】

20

実施例2

a) 磁性カルボキシルビーズへのウシ血清アルブミン(BSA)の結合

175 μgのBSA(Pantex)を、実施例1のセクションb1)に記載した条件下に結合させる。実際の結合反応は、室温において22時間(1時間の代わりに)行う。受動吸着は、同じ条件であるが、カップリング剤、CMC、および補助活性剤s-NHSを使用せずに行う。結合後、ビーズを磁化によって分離し、上澄みはHPLCによる測定のために保持する。

【0043】

b) 本発明のBSA結合と先行技術の結合との比較

本発明のプロトコルを、先行技術の2つのプロトコル、即ち、「Bangs」プロトコルおよび「ラテックスコース」プロトコル(J. Sackrison)と比較した。3つのプロトコルを使用した共有結合および受動吸着の収率を、実施例1のセクションc)に記載した方法で求めた。

30

HPLC測定によって得た結果を、表IIIにおいて、結合収率(%)、および共有結合と受動吸着との差()で示す。

【0044】

【表3】

表 III

| プロトコル | 受動結合 BSAの% | 共有結合 BSAの% | Δ (共有-受動) |
|----------------------------|---------------|---------------|--------------|
| Bangs | 13 | 17 | 4 |
| ラテックスコース (J. Sackrison) | 31 | 34 | 3 |
| 本発明のプロトコル | 25 | 65 | 40 |

40

【0045】

結果は、本発明のプロトコルがより高い結合(共有-受動)を与える故に、先行技術のプロトコルと比較してより優れていることを示す。

50

【0046】

実施例3

抗HIV抗体の検出のための診断試験への適用

下記に示すように、磁性ビーズに固定した捕獲抗原と酵素で標識した抗原の間に抗HIV-2特異性抗体を挟む既知のELISA試験、即ち、Bio-Rad Laboratories, Marnes la Coquette, フランスからカタログ番号34020で入手可能なAccess (登録商標) HIV 1-2 New試験において、本発明の方法によって得たビーズを抗HIV抗体の検出に使用した。信号の暴露および測定は、化学発光酵素基質を添加し、生じた発光を読み取ることによって行う。

【0047】

a) 材料および方法

a1) 捕獲抗原(ペプチド)

必須免疫優性エピトープ(essential immunodominant epitope)を含有する27AAのペプチド、即ち、HIV-2のgp36のヘプタペプチドCAFRQVCを、上述のE. AthertonおよびR. L. Sheppardの方法によって合成し、次に、ホモ二官能価試薬ビス(スルホスクシニミル)スベレートの補助によって、共有結合によってBSAに結合させた。得られたBSA/HIV-2ペプチド結合体を以下に「BSA/HIV-2」と称する。

【0048】

a2) 捕獲抗原の固定

次に、上記BSA/HIV-2結合体を、本発明の共有結合プロトコルおよび先行技術のプロトコルによって、磁性カルボキシルラテックスビーズ(Estapor)に結合させた。

・12 μgのBSA/HIV-2結合体を、実施例1b)に記載した方法によって100 μLのビーズに結合させた。

・12 μgのBSA/HIV-2結合体を、先行技術の方法(Bastos-Gonzalezのプロトコル1、実施例1d)参照)によって100 μLのビーズに結合させた。BSA/HIV-2ペプチドを有する得られた磁性ビーズを以下に「BSA/HIV-2ビーズ」と称する。

【0049】

a3) 暴露抗原

上記a1)で使用したのと同じ、必須免疫優性エピトープを含有する27AAのペプチド、即ち、HIV-2のgp36のヘプタペプチドCAFRQVCを、ホモ二官能価試薬ビス(スルホスクシニミル)スベレートの補助によって、共有結合によってBiozymeからのアルカリ性ホスファターゼ(以下に「ALP」と称する)に結合させた。得られたHIV-2ペプチド/ALP結合体を以下に「ペプチド/ALP」と称する。

【0050】

a4) 信号の検出

アルカリ性ホスファターゼに特異的なジオキセタンに基づく基質を使用して暴露を得る。信号は、フランスのBio-Rad Laboratoriesから入手可能なAccess (登録商標)光度計で読み取る。信号は、RLU(相対発光単位)で表される。

【0051】

a5) 試料

陰性ヒト血清で稀釈した抗HIV-2抗体に陽性のヒト血清(qc1、qc2、qc3)、および抗HIV抗体に陰性の血清(C0)を使用して、アッセイを行った。

【0052】

b) アッセイプロトコル

2つの系列を、平行して行った。

b1) 50 μLの血清を、本発明の共有結合プロトコルによって得た50 μgのBSA/HIV-2ビーズ、および350 μLのペプチド/ALP結合体に接触させた。混合物を

10

20

30

40

50

37 で20分間インキュベーションし、次に、ビーズを磁化によって分離し、上澄みを除去した。

200 μ Lの基質を添加し、37 で5分間インキュベーションした。

示度を取り、RLUを記録した。結果を、「信号/C0」RLU比率として表す(表IV参照)。

【0053】

b2) 50 μ Lの血清を、Bastos-Gonzalezのプロトコル1によって得た50 μ gのBSA/HIV-2ビーズ、および350 μ Lのペプチド/ALP結合体に接触させた。

プロトコルの残りは、上記の手順b1)と同じである。

【0054】

c) 結果および先行技術との比較

本発明の結合によって得た結果、およびプロトコル1の結合によって得た結果を、表IVに示す。

【0055】

【表4】

表 IV

| 被験血清 | プロトコル 1 | | 本発明のプロトコル | |
|------|---------|-------|-----------|--------|
| | RLU | 信号/C0 | RLU | 信号/C0 |
| C0 | 15,205 | 0.98 | 10,767 | 1.00 |
| | 15,741 | 1.02 | 10,771 | 1.00 |
| 平均値 | 15,473 | | 10,769 | |
| qc1 | 171,048 | 11.05 | 1,894,150 | 175.89 |
| | 168,968 | 10.92 | 1,904,600 | 176.86 |
| qc2 | 15,517 | 1.00 | 181,888 | 16.89 |
| | 15,444 | 1.00 | 183,826 | 17.07 |
| qc3 | 12,731 | 0.82 | 80,437 | 7.47 |
| | 12,591 | 0.81 | 80,462 | 7.47 |

【0056】

結果は、陽性試料に関して、本発明のプロトコルによって得た「信号/C0」比率は、先行技術のプロトコル1によって得た比率より顕著に高いことを示している。これは、かなり高い免疫反応性および高い分析感度(analytical sensitivity)を意味し、本発明の結合法は、プロトコル1と比較して最適な共有結合を付与することを極めて明確に示している。

【0057】

実施例 4

本発明のBSA/HIV-2結合体で被覆した磁性カルボキシルラテックスビーズ(BSA/HIV-2ビーズ)における安定性試験

長期安定性試験(+4において7ヶ月、12ヶ月、および18ヶ月)を、実施例3のプロトコルを使用して、BSA/HIV-2ビーズ(実施例3において初期バッチ477のビーズから得たバッチC7P184A、上記参照)に関して行った。表Vは得られた結果を要約するものであり、バッチは、+4で18ヶ月において免疫反応性を有意に失わなかったことを示している。下記表Vに示す結果において、「信号/C0」という表現は、表示のために省略形「S/C0」で置き換えられている。

【0058】

【表5】

表 V

| 被験血清 | T0 | | T=7ヶ月 | | T=12ヶ月 | | T=18ヶ月 | |
|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|
| | RLU | S/C0 | RLU | S/C0 | RLU | S/C0 | RLU | S/C0 |
| C0 | 12,144 | | 13,962 | | 12,898 | | 12,768 | |
| | 11,866 | | 13,692 | | 13,855 | | 12,773 | |
| 平均値 | 12,005 | 1.00 | 13,827 | 1.00 | 13,446 | 1.00 | 12,771 | 1.00 |
| qc2 | 139,029 | | 184,633 | | 170,026 | | 182,311 | |
| | 141,796 | | 185,985 | | 173,015 | | 182,952 | |
| 平均値 | 140,413 | 12 | 185,309 | 13 | 172,025 | 13 | 182,632 | 14 |
| qc1 | 1,732,230 | | 2,166,040 | | 2,159,050 | | 2,076,950 | |
| | 1,799,880 | | 2,142,940 | | 2,279,010 | | 2,127,930 | |
| 平均値 | 1,766,055 | 147 | 2,154,490 | 156 | 2,180,093 | 162 | 2,102,440 | 165 |

【0059】

本発明の方法は、経時において高安定性を有する親和性試薬（カルボキシル基によって官能化された疎水性固相に固定されている）の複合体を生じることをこれらの結果は明確に示している。

【0060】

実施例 5

磁性カルボキシルラテックスビーズへの核酸の共有結合

a) 材料および方法

5 × SSC および 2 × SSC 緩衝剤を、Maniatis T.ら、Molecular Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory, New York (1982) に記載されている方法によって調製する。

5'位においてアミン基で官能化されたプローブ（DNA）は、Perkin Elmer からの市販試薬アミノリンク 2 を使用して自動合成装置によって得られ、これを以下に 5'-NH₂ プローブと称する。

【0061】

使用されるアナライトは RNA または DNA である。プローブ結合の性能特性を、Beckman からの Access（登録商標）装置で、サンドイッチ交雑フォーマットにおいて評価した。

アナライト特異的 DNA プローブを、下記 b) に記載されるプロトコルによって、磁性粒子に結合させる。それは、アナライトを捕獲する働きをする（捕獲プローブ）。

暴露は、標識されたアナライト特異的検出プローブ（第一プローブと異なる）の補助によって、例えば酵素アルカリ性ホスファターゼを使用して、当業者に既知の方法で行う。

【0062】

プローブの非放射能標識の例は、フランス特許第 78.10975 号、M. S. Urdea ら、Nucleic Acids Symp. Ser., 24, 1991, 197-200、または R. Sanchez-Pescador, J. Clin. Microbiol., 26, 1988, 1934-1938 に記載されている。

磁性カルボキシルラテックスビーズへの核酸の共有結合の収率は、実施例 1 のように、HPLC によって、核酸に適合させた条件、例えば、固定相（C18）および移動相（緩衝剤 A の勾配：10⁻² M トリエチルアンモニウムアセテート、および緩衝剤 B：アセトニトリル/A：95/5）において、測定される。

【0063】

10

20

30

40

50

b) 磁性カルボキシルラテックスビーズへの5'-NH₂プローブの共有結合20μgの5'-NH₂プローブ(即ち、5'位にNH₂基を有するプローブ)を、実施例b1)と同じ条件において、200μLのEstapor M1-070/60磁性カルボキシルラテックスビーズに結合させる。

次に、ビーズを、500μLの5×SSC緩衝液で2回および500μLの2×SSC緩衝液で2回洗浄する。それらを、0.02%のNaN₃を含有する2×SSC緩衝液中に維持する。

【0064】

交雑アッセイ：捕獲および検出プローブとアナライトとの交雑は、別々に(2段階)または同時に(1段階)、特にLanghaleおよびMalcolm, Gene, 36, 1985, 201-210、Rankiら、Gene, 21, 1993, 77-85、DunnおよびHassel, Cell, 12, 1977, 23-36、またはRankiおよびSoderlundらの米国特許第4486539号および第4563419号に記載されている方法の1つによって行うことができる。

【0065】

当業者は、容易に交雑実験を再現し、本発明の結合法と先行技術の結合法とを比較することができる。言及されうる先行技術の結合方法の例は、よく知られている方法、特に受動吸着または共有結合によって(Cookら、Nucleic Acids Res., 16, 1988, 4077-4095; Nagataら、FEBS Lett., 183, 1985, 379-382; M. Longlaruら、欧州特許420260A2号; T. Gingerasら、欧州特許第276302号; E. KornesおよびL. M. Kornes, 欧州特許第446260号)、固体支持体に捕獲プローブを固定する方法である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 T₀における対照溶液(磁性ビーズに結合していないアッセイ)を使用して得たピークを示すクロマトグラム

【図2】 セクションb1)に記載した共有結合の終了時にT₀+1時で採取した上澄みを使用して得たピークを示すクロマトグラム

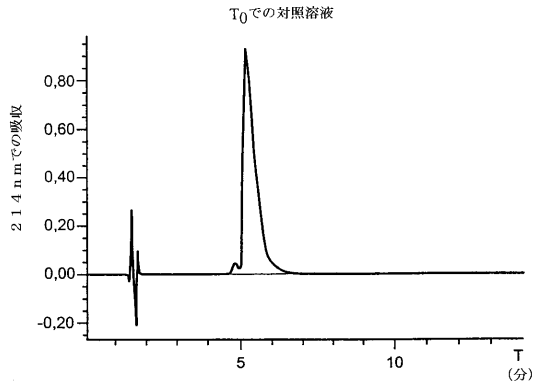
【図3】 セクションb2)に記載した受動結合の終了時にT₀+1時で採取した上澄みを使用して得たピークを示すクロマトグラム

10

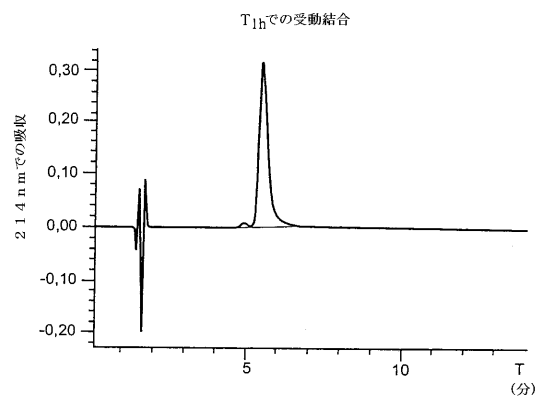
20

30

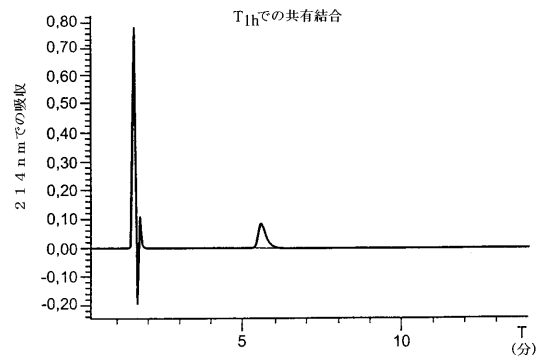
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (72)発明者 ローランス アモン
フランス国 エフ - 7 5 0 1 7 パリ , パサージュ ジュフロワ デイドロ 1 4
- (72)発明者 フランソワ リウニエ
フランス国 エフ - 7 8 3 9 0 ボワダルシー , ルー ドゥ ボワ 5

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 ANALYTICAL BIOCHEMISTRY , 1 9 9 1年 , Vol.198 , p.268-277
BASTOS-GONZALEZ, HIDALGO-ALVAREZ, JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE , 1 9 9 5年
, V176 , P232-239

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)
G01N 33/48-98

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 将亲和试剂固定在疏水性固相上的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP4746810B2 | 公开(公告)日 | 2011-08-10 |
| 申请号 | JP2001552089 | 申请日 | 2001-01-12 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中提琴德巴斯德 BIO RAD巴斯德 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 生物 - Rad公司巴斯德 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 生物 - Rad公司巴斯德 | | |
| [标]发明人 | ファビアンヌババン ローランスアモン フランソワリウニエ | | |
| 发明人 | ファビアンヌ ババン ローランス アモン フランソワ リウニエ | | |
| IPC分类号 | G01N33/543 G01N33/531 C12N11/02 G01N33/53 G01N33/566 | | |
| CPC分类号 | G01N33/54393 | | |
| FI分类号 | G01N33/543.525.U G01N33/543.525.G | | |
| 优先权 | 2000000376 2000-01-13 FR | | |
| 其他公开文献 | JP2003523503A | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及将亲和试剂或亲和试剂固定在疏水固相上的方法，该方法可用于分析物检测的生物学试验。本发明更具体地涉及将亲和试剂固定在由羧基官能化的疏水性固相上的方法，所述方法包括激活所述固相的步骤和将亲和试剂偶联到所述固相的步骤，表征在所述固相的活化步骤中，在共活化剂和酸性介质存在下使用碳二亚胺和磷酸盐缓冲剂的组合，并且在碱性介质中进行偶联步骤。本发明还涉及通过该方法获得的反应性复合物及其在免疫测定试剂盒，杂交试剂盒或酶测定试剂盒中的用途。

| プロトコル | 受動結合 ペプチドの% | 共有結合 ペプチドの% | Δ (共有-受動) |
|--|----------------|----------------|--------------|
| Bangs | 47 | 57 | 10 |
| ラテックスコース (J. Sackrison) | 80 | 82 | 2 |
| プロトコル 1 (D. Bastos-Gonzalez et al.) | 8 | 13 | 5 |
| 本発明のプロトコル | 54 | 100 | 46 |