

(19)日本国特許庁(J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 296281

(P2002 - 296281A)

(43)公開日 平成14年10月9日(2002.10.9)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	581		G 0 1 N 33/543	581 D
				581 C
33/53			33/53	D
				G
				U

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 11数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 62627(P2002 - 62627)

(22)出願日 平成14年3月7日(2002.3.7)

(31)優先権主張番号 01105307.1

(32)優先日 平成13年3月7日(2001.3.7)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 591003013

エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー

F . HOFFMANN - LA ROC

HE AKTIENGESELLSCH

AFT

スイス・シーエイチ - 4070バーゼル・グレ

ンツアーヘルストラツゼ124

(72)発明者 ベルンド, フォグト

ドイツ連邦共和国 ディー - 82327 ツツ

ィング,ヘレシュトラーセ 14

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 改良された均一系イムノアッセイ法

(57)【要約】

【課題】 かなり低濃度のアナライトの検出にうまく使用できる多価の、特に多目的の担体試薬と同一の担体試薬を用いた、約 10^{-6} Mという濃度範囲の上限でのアナライトの測定を改良するための方法を探索し、提供する。

【解決手段】 サンプル中のアナライトを、多価担体試薬と、該担体に結合したまたは結合可能なアナライト-誘導体と、アナライト特異的結合パートナー(R1)とのアナライト依存型集合または凝集に基づいて検出するための均一系アッセイ法であって、該結合パートナー(R1)がオリゴマーであるか、または(R1)に対する結合部位を少なくとも2つ有する試薬(R2)によってオリゴマー化されていることを特徴とする、前記アッセイ法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中のアナライトを、多価担体試薬と、該担体に結合したまたは結合可能なアナライト-誘導体と、アナライト特異的結合パートナー(R1)とのアナライト依存型集合または凝集に基づいて検出するための均一系アッセイ法であって、該結合パートナー(R1)がオリゴマーであるか、または(R1)に対する結合部位を少なくとも2つ有する試薬(R2)によってオリゴマー化されていることを特徴とする、前記アッセイ法。

【請求項2】 イムノアッセイ法であることを特徴とする、請求項1に記載のアッセイ法。

【請求項3】 オリゴマーの試薬(R1)が化学架橋された免疫グロブリンG(IgG)を含むことを特徴とする、請求項1または2に記載のアッセイ法。

【請求項4】 試薬(R2)がポリクローナル抗体であることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のアッセイ法。

【請求項5】 アナライトが、対象となるサンプル中に 10^{-7} M以上の濃度で存在することが知られていることを特徴とする、請求項1～4のいずれか1項に記載のアッセイ法。

【請求項6】 均一系イムノアッセイが競合イムノアッセイ手法に基づくものであることを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載のアッセイ法。

【請求項7】 担体試薬が多目的試薬であることを特徴とする、請求項1～6のいずれか1項に記載のアッセイ法。

【請求項8】 多価担体試薬がストレプトアビジンを含むことを特徴とする、請求項1～7のいずれか1項に記載のアッセイ法。

【請求項9】 臨床上関連のある濃度範囲が少なくとも100倍離れている少なくとも2種の異なるアナライトを、担体試薬と、該担体に結合可能なアナライト-誘導体と、アナライト特異的結合パートナー(R1)とのアナライト依存型集合または凝集に基づいて信頼をもって測定するための均一系集合または凝集アッセイにおける、多価の多目的担体材料の使用であって、より高濃度のアナライトを結合パートナー(R1)の存在下で測定し、かつ該結合パートナー(R1)がオリゴマーであるか、または(R1)に対する結合部位を少なくとも2つ有する試薬(R2)によってオリゴマー化されていることを特徴とする、前記使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、サンプル中のアナライトを、多価担体試薬と、該担体に結合したまたは結合可能なアナライト-誘導体と、アナライト特異的結合パートナー(R1)とのアナライト依存型の集合または凝集に基づいて検出するための改良された均一系アッセイ法に関する。本発明は、特に、結合パートナー(R1)がオリ

ゴマーであるか、または該R1に対する結合部位を少なくとも2つ有する試薬(R2)によりオリゴマー化されていることを特徴とするアッセイに関する。

【0002】

【従来の技術】結合アッセイ、特に免疫学的結合アッセイは、現在、研究現場や臨床および/または診断上のルーチン作業を行う検査室において広く使用されている。

【0003】全く異なる範囲の濃度で存在する多くの種類のアナライトを、かかる手法により信頼をもって測定しなければならない。

【0004】様々な免疫学的測定法は、均一系法と不均一系法に分類される。標識化成分が結合したものを標識化成分が結合していないものから分離するために、不均一系法の一部として固相反応が常に行なわれる。このタイプの手法では、標識は容易に測定可能である。しかし、不均一反応に長時間要し、洗浄ステップが必要であるという欠点がある。

【0005】均一系法では、結合標識は非結合標識から分離されないため、結合標識と非結合標識の識別は別の方法で行なう必要がある。そのようなアッセイを行なうための多くの様々な方法が知られており、その中でも競合的均一系イムノアッセイが広く使用されている。

【0006】多くの競合的均一系凝集イムノアッセイの欠点は、原材料について、非常に時間のかかるパラメーター特異的な(parameter-specific)最適化が必要であるということである。これらの試験全てにおいて、最適識別と最適感度には相反する必要条件がある。なぜなら、一方では凝集粒子を含む試薬の濃度をサンプルとの競争反応を促進するために限定する必要があり、他方では、単位時間当たりの凝集およびシグナルにおける十分な変化を得るために、この試薬を高濃度で使用する必要があるからである。これらの必要条件を釣り合わせると、感度が限定され、妨害物質(interferences)(これは特定のサンプル前処理によってのみ排除可能である場合が多い)の影響を受けやすくなる。

【0007】試薬全てを検査中のいずれかのアナライトに対して個別に最適化するという問題は、最近、アナライト非依存型の結合ペアの使用に基づいたアッセイ法を用いることによってかなり改善されてきている。このアナライト非依存型の結合ペア、例えばビオチン-ストレプトアビジンペアは、広く利用可能な担体材料、例えばラテックスビーズ、に対するアナライト特異的反応を媒介するために使用される。そのような方法の詳細は、特に、米国特許第5,858,803号および米国特許第5,362,655号に記載されている。

【0008】様々なアナライトは、中～低濃度範囲の場合、高分子のストレプトアビジン、特にストレプトアビジン被覆ラテックスビーズの使用に基づいた均一系凝集

アッセイによってうまく分析することができることが分かっている。このような多価かつ広く利用可能な(多目的)担体試薬は大きな利点を有し、例えば、そのような担体試薬は大量に生産でき、そして該試薬に基づく試験開発は一般により簡便かつ安価である。なぜなら、様々なアナライトの検出のために異なるアナライト特異的試薬を使用するにもかかわらず、少なくとも担体に関しては、同様の問題解決法がこれらの試験系に当てはまるからである。

【0009】しかし、多価の、特に多目的の担体に基づく異なるアナライトの試験系も、一つの重大な欠点を有する。使用の簡便さおよび様々なアナライトに対するその広範な適合性は、しばしば、そのような多価担体に基づく試験系によってカバーできるアナライトの濃度範囲の縮小という犠牲を伴う。換言すると、低濃度で存在するアナライトの検出および高濃度で存在するアナライトの検出の両方に同じ多価担体を使用することは困難であることが判明した。

【0010】かかる問題は、この多価担体の量は、限られた範囲内、例えば臨床的の化学分析装置のハードウェアによる制限内のみで変動可能であるという事実によって容易に説明される。同様のハードウェアによる制限は、ピペットで計量されるサンプルの容量にも当てはまる。別の問題は、アナライト特異的モノクローナル抗体のような免疫学的試薬の利用可能性が限られていることである。

【0011】临床上関連のあるアナライトは、かなり様々な濃度でサンプル中に存在することが知られている。濃度範囲の下限でジゴキシンのようなアナライトを検出しなければならない。これは臨床的に関連のあるサンプル中にかなり低濃度で存在し、 1×10^{-10} M未満で信頼をもって測定しなければならない。別のアナライト、例えばフェノバルピツール酸またはゲンタマイシンは、 3×10^{-6} Mという高さの濃度範囲で存在し、パルプロ酸は 2×10^{-5} Mという高さであり得る。

【0012】アッセイ最適化の様々なステップにより、近年、非常に低濃度で存在するアナライト、例えばジゴキシンを競合的均一系イムノアッセイで検出できることを実証することが可能になった(Scholer, Aら, Clin. Chem. 43(1997) 92-99)。

【0013】**【発明が解決しようとする課題】**濃度範囲の下限では、完全に最適化された試薬を用いた場合にのみ、より高い感度が得られる。しかし、特に多目的担体を使用する場合、これは、濃度範囲の上限における測定精度を犠牲にして達成されるものであった。したがって、本発明の課題は、かなり低濃度、例えば 1×10^{-10} M未満の濃度のアナライトの検出にうまく使用できる多価の、特に多目的の担体試薬と同一の担体試薬を用いた、約 10^{-6} Mという濃度範囲の上限でのアナライトの測定を改良するための

方法を探索し、提供することである。

【0014】

【課題を解決するための手段】上記課題は、サンプル中のアナライトを、多価担体試薬と、該担体に結合したまたは結合可能なアナライト-誘導体と、アナライト特異的結合パートナー(R1)とのアナライト依存型集合または凝集に基づいて検出するための改良された均一系アッセイ法であって、該結合パートナー(R1)がオリゴマー化されていることを特徴とするアッセイ法によって解決されることが見出された。この方法では、より高濃度のアナライトについて、較正曲線とその対応する測定範囲とを調整することが可能であり、したがって低濃度で存在するアナライトの高感度検出に用いられる担体と同一の多価または多目的担体を用いたその正確かつ信頼できる測定が可能になる。

【0015】要約すると、本発明は、サンプル中のアナライトを、多価担体試薬と、該担体に結合したまたは結合可能なアナライト-誘導体と、アナライト特異的結合パートナー(R1)とのアナライト依存型の集合または凝集に基づいて検出するための改良された均一系アッセイ法であって、該結合パートナー(R1)がオリゴマーであることを特徴とするアッセイ法に関する。(R1)のオリゴマー形態は、(R1)モノマーを化学架橋することによって得られ、あるいは(R1)に対する結合部位を少なくとも2つ有する試薬(R2)によってオリゴマー化される。

【0016】今や、特定の临床上関連のあるサンプル中にかなり高濃度で存在することが知られているアナライトをより正確に測定することができ、しかもかかる測定に必要な高価な免疫学的試薬はより少量ですむ。

【0017】また本発明は、临床上関連のある濃度範囲が少なくとも100倍離れている少なくとも2種の異なるアナライトを、担体試薬と、該担体に結合可能なアナライト-誘導体と、アナライト特異的結合パートナー(R1)とのアナライト依存型の集合または凝集に基づいて信頼をもって測定するための均一系集合または凝集アッセイにおける、多価の多目的担体材料の使用であって、より高濃度のアナライトを、結合パートナー(R1)の存在下で測定し、かつ該結合パートナー(R1)がオリゴマーであるか、または(R1)に対する結合部位を少なくとも2つ有する試薬(R2)によってオリゴマー化されていることを特徴とする、使用も含む。

【0018】

【発明の実施の形態】多価担体試薬の有効性は、より高感度のアッセイ、特にイムノアッセイの発達を大いに促してきた。しかし、かなり低濃度で存在するアナライトの測定と、かなり高濃度で存在するアナライトの測定の両方について同一または類似の多価担体試薬を使用するには問題があった。

【0019】驚いたことに、かかる問題は、今や、サンプル中のアナライトを、多価担体試薬と、該担体に結合

したまたは結合可能なアナライト-誘導体と、アナライト特異的結合パートナー(R1)とのアナライト依存型の集合または凝集に基づいて検出するための改良された均一系アッセイ法であって、該結合パートナー(R1)がオリゴマーであるか、または(R1)に対する結合部位を少なくとも2つ有する試薬(R2)によってオリゴマー化されていることを特徴とするアッセイ法を適用することによって解決されることが見出された。

【0020】均一系イムノアッセイを実施するための様々な原理が当技術分野で多数知られている(David Wild, The Immunoassay Handbook, 第2版(2000)177-194)。濁度測定または比濁評価によって評価可能な均一系イムノアッセイが広く使用されている(Whicher, J.T.ら, Crit Rev Clin Lab Sci(1983) 213-60)。本発明は、多価担体試薬を使用する均一系イムノアッセイに関する。そのような多価担体試薬は、利便性、適用の簡便さ、ならびにかかる試薬を用いると良好なアッセイ感度が得られるなどの理由のために使用される(米国特許第5,858,803号、米国特許第5,362,655号)。

【0021】多くの種類の多価担体試薬が当技術分野で開示されている。タンパク質(例えばウシ血清アルブミン)、デキストランおよびその誘導体、核酸および核酸誘導体のような高分子の生体分子または粒状の担体材料に基づく多価担体試薬が最も適切であり、それに結合ペアのメンバーの一方が結合または被覆されている。

【0022】好ましくは、粒状の担体材料、特に直径50~1000nmのラテックスビーズが使用され、結合ペアの一方のパートナーが化学結合または吸着によって付着されている。

【0023】多価担体の特別かつ好ましい形態は多目的担体である。これは、アナライト非依存型の結合ペアの一方のパートナーを担体に付着させることによって得られる。このアナライト非依存型の結合ペアは、担体へのアナライト特異的結合パートナーの結合を媒介するのに有利に使用できる。担体に付着されるアナライト非特異的またはアナライト非依存型の結合ペアの一方のメンバーは、ハプテンまたはハプテン様分子に結合可能であるのが最も好ましい。

【0024】ハプテンは、それ自体では免疫原性を持たない小分子である。しかし、適切な担体分子に結合した場合、その結合体を用いてそれらを免疫原性にするのができ、よって適切な免疫応答を生じさせることができる。様々な種類のハプテンに対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が当技術分野でよく知られている。よく知られたハプテンは、例えば、フルオレセインジニトロフェニルリン酸、ステロイド性ホルモン、多くの低分子量薬物、ジゴキシンおよびジゴキシゲニンである。

【0025】ハプテン様分子という用語は、非免疫学的結合ペアの一部である小分子を記述するために用いられ

る。そのような結合ペアの中でよく知られた例は、特に、酵素の補欠分子団と酵素、基質誘導体と対応する酵素、ピオチン/アビジンまたはピオチン/ストレプトアビジンである。好ましくは、そのようなハプテン様分子は、分子量が10kD未満、より好ましくは5kD未満、さらに好ましくは2kD未満、最も好ましくは1kD未満であることを特徴とする。ハプテンまたはハプテン様分子を含み、かつかなり高い親和性を示す結合ペアが好ましい。そのような親和性は、好ましくは少なくとも 10^{-9} M/l、より好ましくは 10^{-10} M/lであり、最も好ましくは 10^{-11} M/l以上である。

【0026】本発明の「アナライト-誘導体」は、アナライト非特異的結合ペアの第2のメンバーに結合したアナライト自体またはその類似体である。最も好ましくは、アナライト-誘導体は、アナライトまたはその類似体とハプテンまたはハプテン様分子とを含む化学結合体である。

【0027】「アナライト類似体」は、特に、共有結合を可能にするように修飾されたアナライト分子、ならびにより一般的にはアナライトと免疫学的に等価な構造体を含む。免疫学的に等価な構造体は、例えば、大型分子のエピトープに相当するペプチドである。そのようなペプチドは、今や、高価な大型タンパク質が必要な場合に代わりに広く使用されている。いわゆる疑似構造体もよく知られており、例えば欧州特許741869号に記載されている。

【0028】アナライト-誘導体は、反応混合物へのサンプルの添加前または添加中に多価担体に結合され得る。次いで、この多価担体を用いて、サンプル中のアナライトを検出する。多価担体は、サンプルおよび/またはアッセイ実施時に反応混合物を形成するのに必要なその他の試薬と混合される。サンプルと混合される試薬は、サンプル中に存在するアナライトの濃度に直接的または間接的に相関する程度まで集合または凝集を可能にするように最適化されている。集合または凝集は、標準的な手順および装置にしたがって濁度測定または比濁測定を行なうことによって測定される。

【0029】臨床上での日常適用のための均一系イムノアッセイは、ピペッティング操作ステップなどの必要なハンドリングが、できるだけ少なくなるように設計される。これはユーザーにとって非常に都合がよく、そのようなアッセイを行なう際の過誤の機会が低減される。最も進んだアッセイでは、反応混合物は、アナライト特異的結合パートナー(R1)と、多目的の多価担体試薬と、該多目的試薬に結合するアナライト誘導体と、分析に供されるサンプルとを含む。

【0030】驚いたことに、今や、上記の均一系法を用いた、特定の関連のあるサンプル中により高濃度で存在することが知られている臨床上関連のあるアナライトの測定範囲の調節およびより正確な検出が、オリゴマーで

ある結合パートナー(R1)または(R1)に対する結合部位を少なくとも2つ有する結合パートナー(R2)によってオリゴマー化されている(R1)を用いることにより可能であることが見出された。

【0031】好ましい実施形態は、サンプル中のアナライトを、多価担体試薬と、該担体に結合したまたは結合可能なアナライト-誘導体と、アナライト特異的結合パートナー(R1)とのアナライト依存型の集合または凝集に基づいて検出するための均一系アッセイ法であって、該結合パートナー(R1)がオリゴマーであることを特徴とするアッセイ法である。

【0032】「オリゴマー」という用語は、結合パートナー(R1)が化学架橋されていることを示すために使用される。結合パートナー(R1)を化学架橋するには、当技術分野で知られている数多くの様々な手法が使用できる。架橋オリゴマー分子を、通常分子篩クロマトグラフィーによって精製し、適切なオリゴマー画分を回収し、所期の均一系アッセイで試験する。結合パートナー(R1)はアナライトに特異的に結合している。アナライトの種類に依存して、この結合パートナーは、例えば核酸、受容体に対するリガンド、受容体、抗原、糖、レクチン、または抗体、ならびにそれらと等価な構造またはその等価な断片である。

【0033】好ましくは、アナライトは低分子量、すなわち5000D未満である。アナライトは、好ましくは、例えば、表1に示したアナライトのリストから選択することができる。

【0034】5000Dを超える分子量のアナライトの場合、かかるアナライトの部分構造、例えばペプチドエピトープを、高価なタンパク質が必要な場合に代わりに使用することができる。5000Dを超える分子量を有するアナライトの場合、類似体、例えばそのようなアナライトにおける対象となるエピトープに相当するペプチドまたはミミトープ(mimitopes)を使用するのが好ましい。

【0035】好ましい実施形態では、アッセイはイムノアッセイであり、試薬(R1)は化学的または免疫学的に架橋されている抗体である。

【0036】好ましくは、抗体を化学架橋して、2~30個のモノマー免疫グロブリンからなる免疫グロブリンオリゴマーを得る。好ましくは、オリゴマー免疫グロブリンは2~20個の免疫グロブリンモノマーを含み、より好ましくは2~10個の免疫グロブリンモノマーを含み、最も好ましくは2~6個の免疫グロブリンモノマーを含む。好ましくは、免疫グロブリンはGクラスの免疫グロブリン(IgG)である。

【0037】化学架橋は、例えばP.Tijssen, "Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology", 第11章(巨大分子コンジュゲーション)(1985)またはその最新版に記載されているような当技術分野で公知の手法にしたがってホモおよびヘテロ二官能性試薬によ

て行なうことができる。当業者は、重合される抗体の抗原結合特性に影響を与えない試薬を選択するだろう。架橋された抗体は、適切なクロマトグラフィー手法によりそのサイズにしたがって分離される。

【0038】好ましくは、架橋(R1)試薬は、0.1~200 μg/ml、より好ましくは1~100 μg/ml、最も好ましくは2~50 μg/mlの濃度で使用される。

【0039】したがって、化学架橋された免疫グロブリンを含むオリゴマー試薬をさらなる特徴とする本発明の方法は、もう1つの好ましい実施形態に相当する。最も好ましくは、架橋免疫グロブリンはGクラスの免疫グロブリン(IgG)である。

【0040】さらなる好ましい実施形態は、サンプル中のアナライトを、多価担体試薬と、該担体に結合したまたは結合可能なアナライト-誘導体と、アナライト特異的結合パートナー(R1)とのアナライト依存型の集合または凝集に基づいて検出するための均一系アッセイ法であって、該結合パートナー(R1)が、(R1)に対する結合部位を少なくとも2つ有する試薬(R2)によってオリゴマー化されていることを特徴とするアッセイ法である。

【0041】試薬(R2)によって「オリゴマー化された」という用語は、モノマーの結合パートナー(R1)が、(R2)とインキュベートすることによってオリゴマーになることを表すために使用される。(R2)試薬は、(R1)に対する結合部位を少なくとも2つ有する。(R2)は(R1)に結合することによって(R1)をオリゴマーにする。日常実験によって、検査中のアナライトまたはアッセイに適した(R1)および(R2)の濃度が選択される。

【0042】測定に供されるアナライトに依存して、(R1)と(R2)の両方の試薬の濃度は0.1 μg/ml~300 μg/mlで変動可能である。交差力価測定法で、(R1)と(R2)の両方の最適濃度が選択される。

【0043】好ましくは、少なくとも2価の(R2)試薬によってオリゴマー化されるモノマーの(R1)試薬は、0.1~500 μg/ml、好ましくは1~200 μg/ml、より好ましくは2~100 μg/ml、最も好ましくは3~50 μg/mlの濃度範囲で使用される。

【0044】試薬(R2)は、(R1)に関して使用される。(R2)1部に対して(R1)10部から、(R2)5部に対して(R1)1部までの範囲の相対モル濃度が好ましい。より好ましくは、(R2)と(R1)比は、5:1~1:3の範囲であり、最も好ましくは、(R2)と(R1)比は、3:1~1:2の範囲である。

【0045】好ましくは、試薬(R2)は、(R1)と反応性のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を含む免疫学的試薬である。最も好ましい(R2)はポリクローナル抗体である。各抗体は、その抗原に対する結合部位を少なくとも2つ有するので、(R1)に対する抗体は、必然的に、(R1)のオリゴマー化に必要な結合部位を少なくとも2つ含む。

【0046】図1~3に示したように、オリゴマー(R1)

の使用により、R1が化学的にオリゴマー化されているか、少なくとも二価の試薬(R2)によってオリゴマー化されているかとは無関係に、示された標準曲線で例示される測定範囲の調節がもたらされる。調節された標準曲線は、低濃度範囲で勾配がより小さくなっており、高濃度範囲で勾配がより大きくなっている。

【0047】標準曲線の勾配が大きくなればなるほど、対応する濃度範囲での測定がより正確になることは当技術分野では一般的に知られている。図1~3に示した例では、高濃度範囲で勾配がより大きくなった曲線によって、より豊富なアナライトの測定が改良される。このことは、2つの異なるアナライト、すなわち図1および2のHbA1cならびに図3のゲンタマイシンでそれぞれ実証されている。

【0048】本発明は、対象のサンプル中に 10^{-7} M以上の濃度で存在することが知られているアナライトの測定に広く適用可能である。

【0049】表1に列挙した診断上関心のあるアナライ*

表1:いくつかの臨床に関連のあるアナライトに必要な LDL

アナライト	MW	LDL
カルバマセピン	236	2.1×10^{-8}
サイクロスポリン	1100	1.4×10^{-8}
ジギトキシン	765	3.9×10^{-9}
ジゴキシン	781	1.9×10^{-10}
フォラット (folat)	441	1.4×10^{-9}
ゲンタマイシン	448	5.4×10^{-7}
N-アセチルプロカインアミド	277	2.2×10^{-8}
フェノバルビタール	231	5.2×10^{-6}
フェニトイン	252	2.4×10^{-6}
プロカインアミド	235	1.7×10^{-8}
T4	777	6.4×10^{-9}
テオフィリン	180	4.4×10^{-8}
トブラマイシン	452	5.3×10^{-7}
バルプロ酸	144	2.1×10^{-5}
アンフェタミン	135	8.1×10^{-8}
バルビツール酸塩	230	8.7×10^{-9}
ベンゾジアゼピン	284	4.6×10^{-8}
カンナビノイド (THC)	314	9.6×10^{-9}
コカイン	303	8.6×10^{-8}
メタドン	309	6.1×10^{-8}
オピエート (モルヒネ)	285	1.8×10^{-8}
フェンシクリジン (PCP)	243	2.5×10^{-9}

MW = 分子量、 LDL = 下方検出限界

【0053】好ましい実施形態においては、改良された均一系アッセイは、競合イムノアッセイ法に基づくものである。競合型のアッセイでは、サンプル中のアナライトは、限られた数の(R1)結合部位に対して、担体に結合したまたは結合可能なアナライトもしくはアナライト類似体と競合する。サンプル中に存在するアナライトが多ければ多いほど、担体結合(または結合可能な)アナライト(または誘導体)に結合しうる(R1)は少なくなる。結果として、集合または凝集と、アナライト濃度は間接的に相関する。

【0054】オリゴマーのアナライト特異的結合パートナー(R1)の使用を含む本発明の方法は、より高い濃度範囲でのより正確な測定が要求される時はいつでも、多価担体に基づく均一系アッセイに適用可能である。

【0055】好ましい実施形態では、多価担体試薬は、アナライト非依存型の結合ペアのメンバーで被覆された

*トは、生物学的サンプル中にかなり様々な濃度で存在するということが表1から明らかである。例えば、要求されるアッセイ感度(LDL=下方検出限界)は、ジゴキシンについての 1.9×10^{-10} Mからバルプロ酸についての 2.1×10^{-5} Mまでの範囲である。オリゴマー(R1)が 10^{-7} 以上のLDLを必要とするアナライトの測定にきわめて有用であることが分かった。当業者は測定範囲を認識しているので、アッセイのLDLは、医者にとって関連のある濃度に適合するように調節される。

【0050】好ましい実施形態においては、本発明は、対象のサンプル中に 10^{-7} M以上の濃度で存在することが知られているアナライトの評価に使用される。

【0051】さらに好ましくは、本発明の方法は、 $2 \times 10^{-7} \sim 2 \times 10^{-5}$ Mの範囲のLDLを必要とするアナライトに使用される。

【0052】

【表1】

多目的試薬である。好ましくは、本発明の方法は、アビジンまたはストレプトアビジンを含む多価の多目的担体試薬に基づく。ストレプトアビジンが最も好ましい。

【0056】多価の多目的担体材料または試薬、例えばストレプトアビジンを含む担体、特にストレプトアビジンで被覆されたラテックス粒子は、様々な異なるアナライトに対して、アッセイの開発およびコスト削減において有利に使用される。本発明に基づくそのような多価の多目的担体材料は、今や、関連のある臨床サンプル中にかなり様々な濃度で存在する種々のアナライトの信頼できる検出に使用することができる。換言すると、これらの多目的担体材料は、本発明にしたがって使用する場合、LDLが少なくとも100倍離れた複数のアナライトに対して使用可能である。したがって、さらに好ましい実施形態は、临床上関連のある濃度範囲が少なくとも100倍離れている少なくとも2種の異なるアナライトを、担体

試薬と、該担体に結合可能なアナライト-誘導体と、アナライト特異的結合パートナー(R1)とのアナライト依存型の集合または凝集に基づいて信頼をもって測定するための均一系集合または凝集アッセイにおける、多価の多目的担体材料の使用であって、より高濃度のアナライトを結合パートナー(R1)の存在下で測定し、かつ該結合パートナー(R1)がオリゴマーであるか、または(R1)に対する結合部位を少なくとも2つ有する試薬(R2)によってオリゴマー化されていることを特徴とする、使用である。

【0057】下記の実施例、参考文献および図面は、特許請求の範囲に記載した本発明の範囲の理解を促すために提供されるものである。本発明の範囲を逸脱することなく明示した手順に変更修正がなされ得ることは理解されるだろう。

【0058】図面の説明

図1は、二次抗体の添加によるHbA1c-アッセイにおける感度の調節を示す図である。様々な量のポリクローナルヒツジ抗マウス免疫グロブリン鎖抗体(=PAb<M-Fcg>S-IgG)を反応混合物に加えた。例えば20 µgについての上方の較正曲線は、より高濃度範囲において傾きが大きくなっており、例えばPab<MFcg>S-IgGを添加していない急勾配の較正曲線から読み取った測定値と比較して、高濃度で存在するアナライトを含むサンプルの測定をより正確かつ信頼できるものにする。

【0059】図2は、化学架橋された抗体の使用によるHbA1c-アッセイにおける感度の調節を示す図である。この場合、ポリマー(R1)試薬として、ヒツジから免疫精製した、化学重合されたポリクローナル抗HbA1c抗体(=PAB<HbA1c>S-IgG(1S)-ポリマー)を10~40 µg/mlで加えた。30~40 µg/mlのポリマー-PABの存在下では、40 µg/mlのモノマー(=PAB<HbA1c>S-IgG(1S)-モノマー)R1抗体を用いて行なったアッセイと比較して、アッセイの較正曲線が有意に相違している、すなわち調節されていることは明らかである。

【0060】図3は、二次抗体の使用によるゲンタマイシンアッセイにおける感度の調節を示す図である。二価の(R2)試薬(PAb<M-Fcg>S-IgG)の添加量を増大させるにつれて、示されたアッセイの場合ゲンタマイシンのアッセイ感度の減少が生じた。

【0061】

【実施例1】実施例1：二次抗体の添加によるHbA1c-アッセイにおける感度の調節

a) SALTINIA法の原理

SALTINIA法を用いて、HbA1cアッセイを開発した。SALTINIAは、ストレプトアビジンラテックス比濁阻害イムノ

アッセイ(Streptavidin latex turbidimetric inhibition immunoassay)を意味する。この方法は、米国特許第5,858,803号に詳細に記載されている。この技術においては、直径約130nmの「万能」(すなわち多価かつ多目的)のSA被覆ラテックス粒子を使用した。

【0062】SALTINIAアッセイは競合または阻害型のアッセイである。これは、サンプル中のアナライトが、二価の抗アナライト抗体への結合に対して、ビオチン-アナライト結合体と競合することを意味する。ビオチン-ハプテン結合体が抗体に結合する場合、三次元複合体が形成される。これは、複数のビオチン-ハプテン結合体が、ラテックス粒子に被覆されているストレプトアビジンに対し、ビオチン側により結合するからである。サンプル中に存在する(競合する)アナライトが多ければ多いほど、形成される三次元複合体または凝集体は少なくなる。

【0063】b) HbA1c-試薬

HbA1cに対する抗体を、米国特許第4,247,533号(ポリクローナル抗体)または欧州特許316306号および欧州特許201187号(モノクローナル抗体)に記載の手順にしたがって産生させた。ヘモグロビン鎖の4個のN末端アミノ酸を含み、C末端がビオチン化されており、かつN末端にグリケート(glycated)バリンを含むビオチン化グリケートHbA1c-ペプチド(bi-HbA1c)を使用した。ビオチン化ペプチドを、例えば米国特許第5,804,371号またはFieldsおよびNoble, Int. J. Peptide Res. 35(1990)161-214に記載されたような通常の固相合成手順にしたがって合成し、その後、0.2Mのリン酸ナトリウムバッファー(pH7.4)中、室温にて20倍モル過剰のグルコースとともに21日間インキュベートすることによってグリケート化した。

【0064】c) アッセイ手順

測定を行なうために、2 µlのサンプルまたはキャリブレーションをピペティング操作により日立アナライザーのキュベットに入れ、ビオチン化HbA1c-結合体を含む200 µlのR1試薬を加え、混合した。5分後、50 µlの第2の試薬R2(この試薬R2はHbA1c特異的抗体とSA被覆ラテックス粒子を含む)を加えた。ただちに反応混合物を攪拌し、凝集反応を開始させた。5分間反応させた後、濁度を546nmの波長で測定した。アナライト濃度の計算のために、反応開始時の濁度シグナルと5分後の濁度シグナルの差を使用した。

【0065】下記の試薬を使用した：

R1-試薬:

50mM MBS/バッファー、pH6.6

0.5% 界面活性剤

0.1% ウシ血清アルブミン

0.01% 保存剤

0.1μg/ml ビオチン化HbA1c-ペプチド

+ 様々な濃度の、抗マウスFcγ特異性を有するポリクローナル抗体 (=PAB<M-Fcγ>S-IgG (IS))

13

R2-試薬:

5mM HEPES、pH7.5

0.01% 保存剤

40μg/ml MAB抗HbA1c

0.25% SA被覆ラテックス粒子

【0066】マウスIgGに対して誘導されたポリクローナル抗体の添加により、マルチマー<HbA1c>-抗体凝集体¹⁰がその場で(in situ)形成され、これは、0-キャリブレータの濁度シグナルを高めかつ較正曲線の傾きを減らすことができる(図1)。

【0067】実施例2: PAB<HbA1c>S-IgG(IS)のIg-Gの架橋

合成で得たHbA1c-ペプチド(例えば実施例1b)をウシ血清アルブミンに化学的に結合させた。このハプテン-担体結合体を用いてヒツジを免疫し、ポリクローナルヒツジ¹⁰抗HbA1c(=PAB<HbA1c>S-IgG)をCNBr活性化セファロースに結合したHbA1c-ペプチドを用いて免疫精製した。免疫吸着後のこのポリクローナル抗体を、PAB<HbA1c>S-IgG(IS)と呼ぶ。

【0068】50mgのPAB<HbA1c>S-IgG(IS)を0.05モル/リットルのリン酸カリウムバッファー(pH7.5)2mlに溶解し、ジオキサニに溶解したスベリン酸ジスクシンイミジル(Pierce製、7.4mg/ml)0.4mlを攪拌しながら加えた。25℃で2時間インキュベートした後、リシン塩酸塩(0.1モル/リットル)を0.2ml加えることによって反応を停止²⁰させた。反応バッチを0.2mlのリン酸カリウムバッファー(前掲)0.2mlで希釈し、遠心分離にかけた。上清をUltrogel AcA202カラム(LKB, Grafelfing, ドイツ連邦共和国)で脱塩し、45mgのタンパク質を含む11.3mlが得られた。この調製物の一部を、Superose-6-カラム(Deutsche*

R1-試薬:

50mM MBS/バッファー、pH6.0

150mM NaCl

0.1% 界面活性剤

0.1% ウシ血清アルブミン

0.01% 保存剤

0.2μg/ml ビオチン化ゲンタマイシン

+ 様々な濃度の、抗マウスFcγ特異性を有するポリクローナル抗体 (=PAB<M-Fcγ>S-IgG (IS))

【0071】ゲンタマイシンアッセイにおいて、3μlのサンプルまたはキャリブレータをピペティング操作により日立アナライザーのキュベットに入れ、ビオチン化ゲンタマイシンを含むR1-試薬180μlを加えた。攪拌し、5分間インキュベートした後、MAB抗ゲンタマイシ⁴⁰ンおよびSA被覆ラテックス粒子を含む試薬2(R2)80μlを

* Pharmacia GmbH)で、リン酸カリウムバッファー(pH7.0、0.05モル/リットル)中0.5ml/分の流量にて分画し、約300,000~1.5×10⁶の分子量を有する画分をさらに使用した。

【0069】実施例3: 化学架橋された抗体の使用によるHbA1c-アッセイにおける感度の調節

アッセイ条件は実施例1に記載した条件と同一である。この実験では、R1試薬におけるPAB<M-Fc>S-IgG(IS)の添加によってポリマー抗HbA1c抗体は形成しない。この場合、モノマーMAB抗HbA1cの代わりに、実施例2にしたがって様々な濃度で産生させたポリマーPAB抗HbA1cを用いた。図2に示したように、この化学架橋されたポリマー抗体を用いることにより、同じモノマー抗体と比較して較正曲線の傾きが要求に応じて調節されていた。例えば、30μg/mlのR1を用いることにより、低濃度範囲では傾きは小さくなるものの、かなり低濃度のアナライトの測定にも依然として完全に適合しており、高濃度範囲では曲線の傾きが大きくなり、よってその濃度範囲での正確な測定に非常に適合していた。

【0070】実施例4: 二次抗体の使用によるゲンタマイシンアッセイにおける感度の調節

このアッセイにもSALTINIA法を使用した。HbA1c試薬の代わりにゲンタマイシン特異的試薬を用いた。アッセイバッファーおよびアッセイ条件は実施例2と比べて下記のように若干変更した:

R2-試薬:

5mM HEPES、pH7.5

0.01% 保存剤

15μg/ml MAB抗ゲンタマイシン

(RDC製品0737844中に含有)

0.1% SA被覆ラテックス粒子

加えた。ただちに反応混合物を攪拌し、凝集反応を開始させた。5分間反応させた後、濁度を546nmの波長で測定した。アナライト濃度の計算のために、反応開始時の濁度シグナルと5分後の濁度シグナルの差を使用した。

【0072】オリゴマー抗体を用いるHbA1cアッセイと同様に、ゲンタマイシンアッセイにおいて、マルチマー

抗ゲンタマイシン抗体凝集体を、マウスIgGに対して誘導されたポリクローナル抗体の添加によりその場で形成した。その場で形成したマルチマー抗ゲンタマイシン凝集体は、要求に応じて較正曲線の傾きを調整することができた。これによって、より高濃度のゲンタマイシンでは曲線の傾きがより大きくなり(図3)、高濃度のアナライトを含むサンプル中でのゲンタマイシンの測定がより正確なものになる。

【0073】参考文献一覧

- 米国特許第5,362,655号
- 欧州特許第741869号
- 米国特許第5,858,803号
- 米国特許第5,804,371号
- 欧州特許第201187号
- 欧州特許第316306号
- 米国特許第4,247,533号
- Scholer, A.ら, Clin. Chem. 43(1997)92-99

*Tijssen, "Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology", 第11章(巨大分子コンジュゲーション)(1985)

David Wild, The Immunoassay Handbook, 第2版 (2000年11月)177-194

Whicher, J.T.ら, Crit Rev Clin Lab Sci(1983) 213-60

Fields, G.B.およびNoble R.L., Int. J.Peptide Res.35(1990)161-214

10 【図面の簡単な説明】

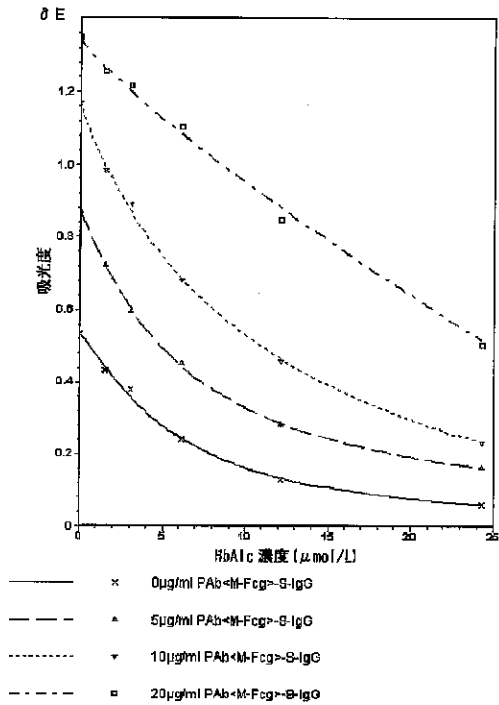
【図1】二次抗体の添加によるHbA1c-アッセイにおける感度の調節を示すグラフである。

【図2】化学架橋された抗体の使用によるHbA1c-アッセイにおける感度の調節を示すグラフである。

【図3】二次抗体の使用によるゲンタマイシンアッセイにおける感度の調節を示すグラフである。

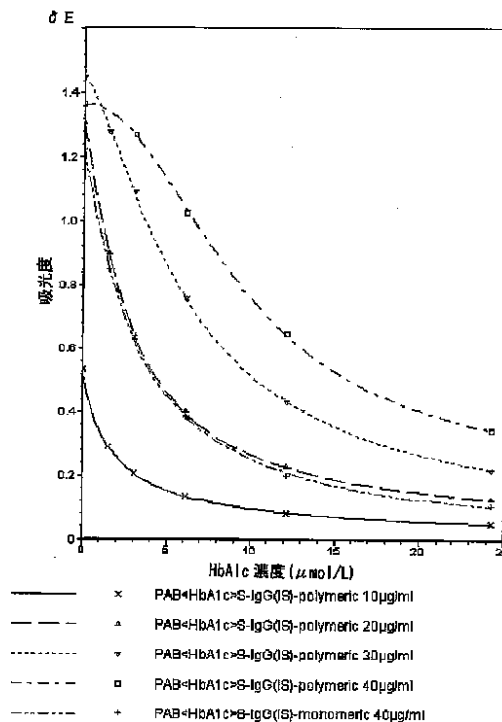
【図1】

二次抗体の添加によるHbA1c-アッセイにおける感度の調節



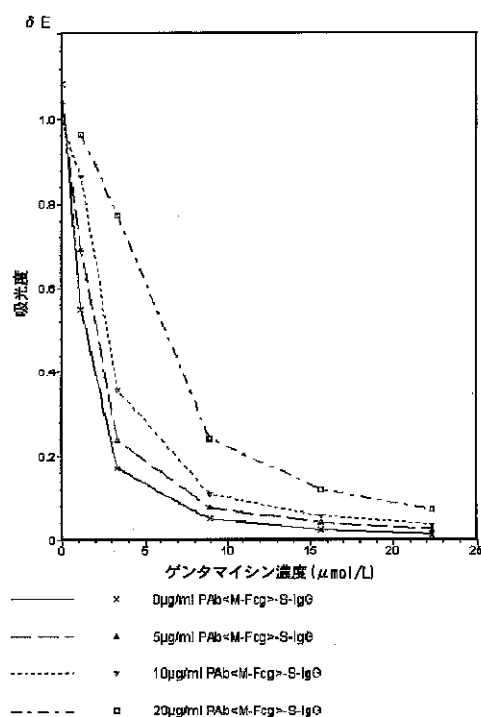
【図2】

化学架橋された抗体の使用によるHbA1c-アッセイにおける感度の調節



【図3】

二次抗体の使用によるゲンタマイシンアッセイにおける感度の調節



【手続補正書】

【提出日】平成14年3月7日(2002.3.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中のアナライトを、多価担体試薬と、該担体に結合したまたは結合可能なアナライト-誘導体と、アナライト特異的結合パートナー(R1)とのアナライト依存型集合または凝集に基づいて検出するための均一系アッセイ法であって、該結合パートナー(R1)がオリゴマーであるか、または(R1)に対する結合部位を少なくとも2つ有する試薬(R2)によってオリゴマー化されていることを特徴とする、前記アッセイ法。

【請求項2】 イムノアッセイ法であることを特徴とする、請求項1に記載のアッセイ法。

【請求項3】 オリゴマーの試薬(R1)が化学架橋された免疫グロブリンG(IgG)を含むことを特徴とする、請求項1または2に記載のアッセイ法。

【請求項4】 試薬(R2)がポリクローナル抗体であるこ

とを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のアッセイ法。

【請求項5】 均一系イムノアッセイが競合イムノアッセイ手法に基づくものであることを特徴とする、請求項1～4のいずれか1項に記載のアッセイ法。

【請求項6】 担体試薬が多目的試薬であることを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載のアッセイ法。

【請求項7】 臨床上関連のある濃度範囲が少なくとも100倍離れている少なくとも2種の異なるアナライトを、担体試薬と、該担体に結合可能なアナライト-誘導体と、アナライト特異的結合パートナー(R1)とのアナライト依存型集合または凝集に基づいて信頼をもって測定するための均一系集合または凝集アッセイにおける、多価の多目的担体材料の使用であって、より高濃度のアナライトを結合パートナー(R1)の存在下で測定し、かつ該結合パートナー(R1)がオリゴマーであるか、または(R1)に対する結合部位を少なくとも2つ有する試薬(R2)によってオリゴマー化されていることを特徴とする、前記使用。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	FI	テ-マコード(参考)
G01N 33/531		G01N 33/531	B
(72)発明者 ヨハン, カール		(72)発明者 アニータ, マイヤー	
ドイツ連邦共和国 ディー - 82380 パイ		ドイツ連邦共和国 ディー - 82327	トラ
センベルグ, ベルト - シュラッツルゼーア		ウビング, リードシュトラーセ	70
- シュトラーセ 7			

专利名称(译)	改进的均相免疫测定方法		
公开(公告)号	JP2002296281A	公开(公告)日	2002-10-09
申请号	JP2002062627	申请日	2002-03-07
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ベルンドフォグト ヨハンカール アニータマイヤー		
发明人	ベルンド,フォグト ヨハン,カール アニータ,マイヤー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/536 G01N33/543 G01N33/72 G01N33/94		
CPC分类号	G01N33/9446 G01N33/536 G01N33/54306 G01N33/723		
FI分类号	G01N33/543.581.D G01N33/543.581.C G01N33/53.D G01N33/53.G G01N33/53.U G01N33/531.B		
优先权	2001105307 2001-03-07 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：使用与多价载体试剂相同的载体试剂以约10⁻⁶M的浓度范围上限测量分析物，可用于检测相当低浓度的分析物，特别是通用载体试剂。探索并提供改进方法。用多价载体试剂，与载体结合或可结合的分析物衍生物和分析物特异性结合伴侣（R1）分析或聚集样品中的分析物。基于以下方法进行均相检测：其中，结合伴侣（R1）是寡聚物或被具有至少两个（R1）结合位点的试剂（R2）寡聚 如上所述的测定方法。

アナライト	MW	LDL
カルバマゼピン	235	2.1x10 ⁻⁶
サイクロスポリン	1100	1.4x10 ⁻⁶
ジギトキシン	765	3.9x10 ⁻⁶
ジゴキシン	781	1.9x10 ⁻⁶
フォラット (folat)	441	1.4x10 ⁻⁶
ゲンタマイシン	448	5.4x10 ⁻⁷
W-アセチルプロカインアミド	277	2.2x10 ⁻⁶
フェニバルビタール	231	5.2x10 ⁻⁶
フェニトイン	252	2.4x10 ⁻⁶
プロカインアミド	235	1.7x10 ⁻⁶
T4	777	6.4x10 ⁻⁶
テオフィリン	180	4.4x10 ⁻⁶
トブラマイシン	452	5.3x10 ⁻⁷
バルプロ酸	144	2.1x10 ⁻⁶
アンフェタミン	135	8.1x10 ⁻⁶
バルビツール酸塩	230	8.7x10 ⁻⁶
ベンゾジアゼピン	284	4.6x10 ⁻⁶
カンナビノイド (THC)	314	9.6x10 ⁻⁶
コカイン	303	8.8x10 ⁻⁶
メタドン	309	6.1x10 ⁻⁶
オピエート (モルヒネ)	285	1.8x10 ⁻⁶
フェンシクリジン (PCP)	243	2.5x10 ⁻⁶

MW = 分子量, LDL = 下方検出限界