

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-503854

(P2010-503854A)

(43) 公表日 平成22年2月4日(2010.2.4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 595	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2009-528199 (P2009-528199)	(71) 出願人	398005788
(86) (22) 出願日	平成19年9月12日 (2007. 9. 12)		バイアコア アーバー
(85) 翻訳文提出日	平成21年3月10日 (2009. 3. 10)		スウェーデン国 ウブサラ, エス-754
(86) 国際出願番号	PCT/SE2007/000792		50, ラブスゲーテン 7
(87) 国際公開番号	W02008/033073	(74) 代理人	100137545
(87) 国際公開日	平成20年3月20日 (2008. 3. 20)		弁理士 荒川 聡志
(31) 優先権主張番号	0601891-5	(74) 代理人	100105588
(32) 優先日	平成18年9月14日 (2006. 9. 14)		弁理士 小倉 博
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)	(74) 代理人	100129779
(31) 優先権主張番号	60/825, 664		弁理士 黒川 俊久
(32) 優先日	平成18年9月14日 (2006. 9. 14)	(72) 発明者	ベルリング, ヘンリク
(33) 優先権主張国	米国 (US)		スウェーデン、エス-754・47・ウブ サラ、カモミルガタン・25番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析物濃度を求める方法

(57) 【要約】

分析物の少なくとも一部が分析物結合性物質との複合体として存在する流体試料中の分析物の総濃度を決定する方法であり、a) 試料を、実質的にあらゆる分析物複合体を解離し実質的に全ての分析物を遊離形態で提供するように分析物と分析物結合性物質との間の結合親和性を十分に低下させる条件に付す工程、b) 試料を、分析物と分析物結合性物質との間の結合親和性を回復させる条件に付す工程、及びc) 結合親和性が回復された直後、分析物の実質的な複合体再形成が起こる前に、試料中の遊離分析物の濃度を決定する工程を含んでいる。試料中の複合体結合分析物の濃度を決定する方法も開示されている。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

分析物の少なくとも一部が分析物結合性物質との複合体として存在する流体試料中の分析物の総濃度を決定する方法であって、

a) 試料を、実質的にあらゆる分析物複合体を解離すると共に実質的に全ての分析物を遊離形態で提供するように分析物と分析物結合性物質との間の結合親和性を十分に低下させる条件に付す工程、

b) 試料を、分析物と分析物結合性物質との間の結合親和性を回復させる条件に付す工程、及び

c) 結合親和性が回復した直後、分析物の実質的な複合体再形成が起こる前に、試料中の遊離分析物の濃度を決定する工程

を含んでなる方法。

【請求項 2】

試料中の遊離分析物の決定が、分析物結合性リガンドが固定化されている固体支持体と試料を接触させて、固定化されたリガンドに分析物を結合させることを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

工程 a) において結合親和性を低下させ、工程 b) において結合親和性を回復させる条件が、試料の pH - 値を変化させることからなる、請求項 1 又は請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

複合体が酸で解離可能な複合体であり、工程 a) が試料を酸性化することを含み、工程 b) が酸性化された試料を中和することを含む、請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

複合体が免疫複合体である、請求項 1 乃至請求項 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

分析物が治療用抗体に対する抗体であり、試料が治療用抗体を含有する、請求項 1 乃至請求項 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

請求項 1 の工程 c) において、分析物の濃度を、標識を用いない検出技術を用いて決定する、請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

標識を用いない検出技術が、エバネッセント波感知、特に表面プラズモン共鳴 (SPR) を含む、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも工程 c) をフローセル内で行う、請求項 1 乃至請求項 8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

フローセルが、固定化されたリガンドを有する検出領域、及び接合部を介して第 1 及び第 2 の導管に接続された入口を含んでおり、請求項 1 の工程 b) が解離された分析物複合体を有する試料を第 1 の導管に、また分析物の結合能を回復させることができる流体を第 2 の導管に流すことを含んでいて、その結果 2 つの流体がフローセルの入口導管の接合部で混合し、この混合した流体がフローセルの検出領域上を通過する、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

(i) 検出領域と接合部との間隔、及び(ii) 第 1 及び第 2 の導管内の流体の流速を、混合した流体が検出領域に到達したときに、分析物の結合能が実質的に回復しているが、分析物の複合体再形成が実質的に起こっていないように選択する、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

第 1 の導管内を流れる流体が酸性化された試料であり、第 2 の導管内を流れる流体がアルカリ性流体である、請求項 10 又は請求項 11 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3】

混合した流体が検出領域に到達したとき、酸性化された試料が実質的に中和されているが、分析物の複合体再形成は実質的に起こらない、請求項 1 1 又は請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 4】

試料中の複合体結合分析物の濃度を決定する方法であって、

a) 請求項 1 乃至請求項 1 3 のいずれか 1 項記載の方法に従って試料中の分析物の総濃度を決定する工程、

b) 試料中の遊離分析物の濃度を決定する工程

を含んでなり、工程 a) 及び b) で得られた濃度の差が複合体結合分析物の濃度を表す、方法。

10

【請求項 1 5】

工程 a) における総分析物及び工程 b) における遊離分析物の決定が、分析物結合性リガンドが固定化されている固体支持体と試料を接触させて、固定化されたりガンドに分析物を結合させることを含む、請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】

分析物を含有する試料中でその分析物が 1 種以上の物質と複合体を形成する能力を決定する方法であって、

a) 試料を、実質的にあらゆる分析物複合体を解離すると共に実質的に全ての分析物を遊離形態で提供するように分析物と分析物結合性物質との間の結合親和性を十分に低下させる条件に付す工程、

20

b) 試料を、分析物と分析物結合性物質との間の結合親和性を回復させる条件に付す工程

c) 結合親和性が回復された直後、分析物の実質的な複合体再形成が起こる前に、分析物が固定化されている固体支持体と試料を接触させる工程、及び

d) 固定化された分析物に結合した物質を分析する工程

を含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、流体試料中の分析物の総濃度を求める方法に関する。分析物は少なくとも部分的に複合体の形態、通例免疫複合体として存在し得る。本発明は、かかる流体試料中で、総分析物濃度が遊離の分析物と複合体として結合した分析物との間でどのように分布しているのかを求める方法にも関する。

30

【背景技術】**【0002】**

免疫原性は、特定の物質が抗体の産生のような免疫応答を引き起こすことができる能力又はその程度である。免疫原性の研究において、免疫複合体中に「隠れた」成分を測定し定量することが次第に重要になっている。例えば、治療用抗体のようなタンパク質薬剤の研究において、その薬剤に対して生じた抗体を検出することが重要である。しかしながら、薬剤は血清中にかなり高い濃度で存在し得るので、抗-薬剤抗体は大体においてその薬剤と免疫複合体を形成し得る。特定の病原性タンパク質に対する免疫反応を引き出すのに使用する免疫療法用タンパク質の場合は状況が逆である。抗体は抗原に対して大過剰であり、高レベルの免疫複合体が複合体の活性化を開始し得るのでどの程度の抗原が複合体として結合しているのかを知ることが重要である。しかしながら、今日まで、血清試料中の遊離の分析物及び複合体として結合している分析物の総濃度、又はどの程度の分析物がそれぞれ遊離形態及び複合体形態であるのかを測定する便利で効率的な技術は存在しない。

40

【0003】

Moxness, M. S., et al., "Immunogenicity Testing for Antibodies Directed Against Therapeutic Human Monoclonal Antibodies Using Electrochemiluminescent Detection", Abstract 59 and Poster, 37th Annual Oak Ridge Conference, April 14 & 15, 2

50

005, Baltimore, MDには、ヒト治療用モノクローナル抗体（薬剤）に対する免疫応答をモニターするためのアッセイが開示されている。各薬剤に対して特異的なウサギポリクローナル抗体を代理分析物として使用し、血清に添加した。次に、薬剤を添加し、血清を酸（ $pH 3.3$ ）で1時間処理して分析物-薬剤複合体を解離させ、中性 pH にし、アッセイした。このアッセイにおいては、中性にされた血清試料を、(i)エレクトロルミネッセンス（ECL）により光を放出するルテニウム錯体と結合した薬剤、及び(ii)ビオチンと結合した薬剤と共に一晩インキュベートした。次いで、混合物を、電極を備えているストレプトアビジンを塗布したプレートに移してビオチン-薬剤/分析物-ルテニウム薬剤複合体を捕獲し、ECL信号をECL-分析器で測定し、アッセイ毎に負対照に対して規格化した。しかしながら、両方の結合部位でビオチン-薬剤コンジュゲートと、又は両方の結合部位でルテニウム-薬剤コンジュゲートと複合体を形成している分析物は検出されないため、複合体として結合している全ての分析物を測定することはできず、従って総分析物濃度を決定することはできない。

10

【0004】

Tomimori-Yamashita, J., et al., *Lepr. Rev.* (1999) 70: 261-271には、ハンセン病患者における抗-PGL-I特異的循環免疫複合体の測定が開示されている。ポリエチレングリコールを添加することにより血清中の循環免疫複合体を沈降させ、その沈殿を遠心分離により単離する。沈殿をEDTAに溶解させた後、その溶液をHCl-グリシンで酸性化し、次いでリン酸水素カリウムで中和した。その後、30分以内にPGL-1に対するIgG又はIgM抗体のレベルをELISAにより試験した。すなわち、PGL-Iを塗布したウェル中で90~180分溶液をインキュベートし、酵素コンジュゲート及び基質と反応させ、酵素活性によって生じた色を分光光度法で読み取った。しかしながら、当技術分野でよく知られているように、PEGは複合体を形成した分析物を全て沈降させるわけではなく、従って総分析物濃度は決定されない。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Moxness, M. S., et al., "Immunogenicity Testing for Antibodies Directed Against Therapeutic Human Monoclonal Antibodies Using Electrochemiluminescent Detection", Abstract 59 and Poster, 37th Annual Oak Ridge Conference, April 14 & 15, 2005, Baltimore, MD

30

【非特許文献2】Tomimori-Yamashita, J., et al., *Lepr. Rev.* (1999) 70: 261-271

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記した従来技術の方法はどちらも、長時間のインキュベーションを必要とし、従ってフローセルアッセイ形式には適さない。従って、遊離の分析物及び複合体を形成した分析物の測定が可能であり、全ての複合体を形成した分析物を検出することができ、またフローセル用にも適する迅速で実施が容易なアッセイに対するニーズがある。

【課題を解決するための手段】

40

【0007】

上記及びその他の目的及び利点は、遊離の分析物及び複合体を形成した分析物の総濃度を決定する方法によって提供される。この方法では、最初に試料を処理してあらゆる分析物複合体を分裂させることにより、全ての分析物を遊離形態にする。次に、試料を処理して、分析物の複合体再形成を可能にすると同時に遊離分析物の複合体再形成が実質的な程度まで起こり得る前に試料中の遊離分析物の濃度を決定する。従って、この決定された遊離分析物の濃度は試料中の分析物の総濃度を表す。

【0008】

1つの態様において、本発明は、分析物の少なくとも一部が分析物結合性物質との複合体として存在する流体試料中の分析物の総濃度を決定する方法を提供し、この方法は以下

50

の工程を含んでなる。

a) 実質的にあらゆる分析物複合体を解離し実質的に全ての分析物を遊離形態で提供するのに十分な程度に分析物と分析物結合性物質との間の結合親和性を低下させる条件に試料を付す。

b) 分析物と分析物結合性物質との間の結合親和性を回復させる条件に試料を付す。

c) 結合親和性が回復した直後、分析物の実質的な複合体再形成が起こる前に、試料中の遊離分析物の濃度を決定する。

【0009】

好ましい実施形態において、遊離分析物の測定は、分析物結合性リガンドが固定化されている固体支持体表面に試料を接触させて分析物をリガンドに結合させることを含む。

10

【0010】

別の態様において、本発明は、以下の工程を含む、試料中の複合体として結合している分析物（以下、単に、複合体結合分析物ともいう）の濃度を決定する方法を提供する。

a) 上記態様の方法に従って試料中の分析物の総濃度を決定する。

b) 試料中の遊離分析物の濃度を決定する。

ここで、工程 a) と b) で得られた濃度の差が複合体結合分析物の濃度を表す。

【0011】

さらに別の態様において、本発明は、分析物を含有する試料中でその分析物が1種以上の物質と複合体を形成する能力を決定する方法を提供し、この方法は以下の工程を含む。

20

a) 実質的にあらゆる分析物複合体を解離し実質的に全ての分析物を遊離形態で提供するのに十分な程度に分析物と分析物結合性物質との間の結合親和性を低下させる条件に試料を付す。

b) 分析物と分析物結合性物質との間の結合親和性を回復させる条件に試料を付す。

c) 結合親和性が回復した直後、分析物の実質的な複合体再形成が起こる前に、分析物が固定化されている固体支持体と試料を接触させる。

d) 固定化された分析物に結合した物質を分析する。

【0012】

以下の詳細な説明及び図面を参照することによって、本発明並びにそのさらなる特徴及び利点がさらに完全に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

30

【0013】

【図1】図1は、表面プラズモン共鳴（SPR）に基づくバイオセンサーシステムの概略側面図である。

【図2】図2は、工業用バイオセンサー機器の一体型（integrated）マイクロ流体カートリッジ内の流路の概略部分説明図である。

【図3】図3は、2つの流体を混合する1つの変形例を説明するマイクロ流体システムの概略部分図である。

【図4】図4A及び4Bは、2つの流体を混合する別の変形例を説明するマイクロ流体システムの概略部分図である。

【発明を実施するための形態】

40

【0014】

上で述べたように、本発明は、分析物が少なくとも部分的に分析物結合性物質との複合体、通例免疫複合体として存在し得る流体試料中の分析物の総濃度を決定する方法に関する。

【0015】

本発明によると、最初に試料を、（分析物と分析物結合性物質との間の結合に対する親和性を低下させることにより）、通例解離剤を試料に添加することにより、試料中に存在するあらゆる複合体を解離する条件に付すことによって、全ての分析物を遊離形態にする。次に、その試料を、結合親和性を回復させる条件に付し、分析物の実質的な複合体再形成が起こる実質的に直前に、好ましくは分析物特異的なリガンドへの結合によって、試料

50

中の遊離分析物の濃度を決定する。

【0016】

試料は、少なくとも部分的に複合体形態にある所定の分析物を含有するか又は含有すると疑われるいかなる試料であってもよい。しかしながら、通例、試料は哺乳類、好ましくはヒトに由来する血清又は血漿試料であり、複合体は免疫複合体（すなわち抗原 - 抗体複合体）である。

【0017】

例えば、分析物は、ある薬剤、例えば治療用抗体のようなタンパク質薬剤に応答して生じた抗体であり得る。

【0018】

本明細書で使用する場合、用語「抗体」とは、天然又は部分的若しくは全体的に合成的に製造され得る免疫グロブリンをいい、またFab抗原 - 結合性断片、一価断片及び二価断片を始めとする活性断片も包含する。この用語はまた、免疫グロブリン結合ドメインと相同な結合ドメインを有するあらゆるタンパク質も包含する。かかるタンパク質は天然由来であることができ、又は部分的若しくは全体的に合成することもできる。代表的な抗体は免疫グロブリンアイソタイプ並びにFab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dAb、及びFd断片である。

【0019】

分析物を測定可能にするために解離する必要がある他の分析物複合体（通常タンパク質複合体）の例としてはPSA（前立腺特異的抗原）であり、PSAは大部分が複合体形態にあり複体の割合を決定することができるということが重要なタンパク質である。血液中において、PSAの約70～90%が-1-抗キモトリプシンとの複合体であるが、PSAはまた例えばプロテインCインヒビター、-1-抗トリプシン及び-2-マクログロブリンと共に複合体を形成することも知られている。総PCAに対する遊離の比は前立腺癌の有用なマーカーであろうが、現在のところ-2-マクログロブリンとの複合体を検出するのに使用することができる抗体はなく、PSAはその複合体において-2-マクログロブリンにより完全に包囲されている（Balk et al. (2003) J. Clin. Oncology 21, 383-391）。おそらく、他のタンパク質複合体でもそうであろう。

【0020】

分析物を含有する複体の解離を達成するには様々な試薬と条件を使用することができる。免疫複合体は、例えば、複合体をそれぞれ低いか又は高いpH条件にする酸性又は塩基性剤によって解離することができる。この場合、分析物の結合活性の回復はその酸性化又はアルカリ化された試料を実質的に中性のpHにすることによって実施し得る。他の試薬と条件として、例えば、カオトロピック塩、高又は低イオン強度の有機塩がある。

【0021】

本発明の基本的な特徴は、酸性化又はアルカリ化された試料の中和のような、（リガンド及び複合体形成性物質に対する）結合能を回復させるための処理が試料に対して行われた実質的に直後に、分析物濃度の測定が行われるということである。「実質的に直後」とは、（とりわけ分析物、複合体形成性物質及び使用するアッセイ装置に応じて）分析物の複合体再形成が認識できる程度に起こる時間がないということである。他方、（とりわけ試薬及び使用するアッセイ装置に応じて）測定が行われる前に、分析物の結合能を回復させるための試料の中和のような処理が実質的に完了するのに十分な時間がなければならない。しかしながら、各々の特定のアッセイシステムに対する測定のための最適な時間を見出すのは当業者の技能の範囲内である。好ましくは、分析物濃度を測定するとき、約5%以下、より好ましくは約1%未満の分析物が複合体形態であるべきである。

【0022】

また、複合体を解離することなく分析物濃度を決定することにより、試料中の遊離分析物の複合体結合分析物に対する割合を決定することもできる。

【0023】

好ましくは、固体支持体表面に固定化された分析物特異的なリガンドを含む不均一アッ

10

20

30

40

50

セイシステムを用いて、固体支持体表面に対する分析物（直接アッセイ、例えばサンドイッチアッセイ又は置換アッセイ）又は検出可能な分析物アナログ（競合アッセイ）の結合の量を直接又は間接に検出することによって分析物濃度を測定する。

【0024】

固体支持体表面はそれ自体が当技術分野で公知の様々な形状をとることができるが、通例キュベット又はマイクロウェル若しくは、好ましくはフローセルウェルのような表面領域を含む。

【0025】

分析物が抗体の場合、固定化されたりリガンドは抗原であり得る。他方、分析物が例えば P S A であるとき、固体支持体表面には例えば抗 - P S A 並びに好ましくは - 1 - 抗キモトリプシン、プロテイン C インヒビター、 - 1 - 抗トリプシン及び - 2 - マクログロブリンも固定化され得る。

【0026】

本発明の概念に基づく不均一アッセイはいわゆるリガンドフィッシング (ligand fishing) で使用することもできよう。例えば、インビボで特定のタンパク質に結合するタンパク質のような物質を知ることが重要であるとしよう。その際、特定のタンパク質を固体支持体表面に固定化し、表面を処理して最初に複合体を解離させ、次いで相互作用性物質の結合親和性を回復させた直後に、特定のタンパク質を含有する試料（例えば細胞抽出物又は血漿）を表面に接触させる（試料のかかる処理がないと、全て又は実質的に全ての結合性タンパク質が既に試料中の特定のタンパク質に結合していると、結合性タンパク質と表面の結合は殆ど又は全く起こらない）。その後、表面上に固定化された特定のタンパク質に結合したタンパク質を質量分析法などにより同定することができる。

【0027】

上で述べたように、試料を処理して分析物の結合能を回復させた実質的に直後に試料を固体支持体表面、又は検出領域と接触させることが重要である。従って、フローセルの場合後者は、接合部を介して第 1 及び第 2 の導管に接続された入口からなり得る。解離した複合体を含有する試料は第 1 の導管内に導入し得、分析物の結合能を回復させるための作用物質を含有する流体は第 2 の導管に導入し得、その結果 2 つの流体はフローセル入口導管の接合部で混合され、その混合した流体は固体支持体領域を超えてフローセルを通過する。

【0028】

検出領域と接合部との間の間隔、並びに第 1 及び第 2 の導管内の流体の流速を選択して、混合した流体が固体支持体領域に到達したときに、分析物の結合能が実質的に回復している（例えば、酸性化された試料がアルカリ性流体により実質的に中和されている）が、分析物の複合体再形成は実質的に起こっていないようにしなければならない。

【0029】

場合により、混合は、例えば、流体混合物をサイドチャンネル若しくはループに流した後、その混合物をフローセル内に入れる、又はその他手段によって、改良することができる。

【0030】

分析物濃度を測定するのに使用する検出システムは標識を使用する系でもよいし、又は好ましくは標識を用いないものとすることができる。好ましくは、検出はバイオセンサーのようなセンサーで実施するが、この場合固体支持体表面が（バイオ）センサーの感知面である。

【0031】

バイオセンサーは広い意味で、半導体の物理化学的変換器と直接結合しているか、又は変換器と共同する移動性の担体ビーズ / 粒子と共に分子識別用の部品（例えば、固定化された抗体を有する層）を使用する装置と定義される。かかるセンサーは通例固定化された層の質量、屈折率又は厚さの変化を検出する標識なしの技術に基づいているが、ある種の標識付けを利用するバイオセンサーもある。本発明の目的に合う典型的なセンサーとして

10

20

30

40

50

は、限定されることはないが、質量検出法、例えば光学的方法及び圧電又は音響波法、例えば表面音響波（SAW）及び水晶振動子マイクロバランス（QCM）法がある。代表的な光学的検出方法としては、質量表面濃度を検出するもの、例えば、角度、波長、分極、若しくは位相分解し得る外部及び内部反射法の両方を含む反射・光学法、例えば表面プラズモン共鳴（SPR）を介したエバネッセント場増強を含み得るエバネッセント波偏光解析及びエバネッセント波分光法（EWS、又は内部反射分光法）、プリュスター角屈折計法、臨界角屈折計法、フラストレーティッド・トータル・リフレクション（FTR）、散乱全反射（STIR）（散乱増強標識を含み得る）、導光板センサー、外部反射イメージング、エバネッセント波系イメージング、例えば臨界角解像イメージング、プリュスター角分解イメージング、SPR-角度分解イメージング、などがある。さらに、光度計及びイメージング/顕微鏡法「自体」又はこれと、例えば表面増強ラマン分光法（SER S）、表面増強共鳴ラマン分光法（SERRS）、エバネッセント波蛍光（TIRF）及びリン光に基づく反射法との組合せ、並びに導波干渉計、導波漏洩型分光法、反射干渉分光法（RIFS）、透過干渉法、ホログラフィック分光法、及び原子間力顕微鏡（AFR）を挙げることができる。

10

20

30

40

50

【0032】

SPR及びその他の検出技術に基づくバイオセンサーシステムは今日市販されている。代表的なかかるSPR-バイオセンサーには上述のBiacore（登録商標）機器がある。Biacore（登録商標）機器の技術的な面及びSPRの現象の詳細な説明は米国特許第5313264号に見られる。バイオセンサー感知面に対するマトリックスコーティングのより詳細な情報は例えば、米国特許第5242828号及び同第5436161号にある。加えて、Biacore（登録商標）機器に関連して使用されるバイオセンサーチップの技術的な面の詳細な説明は米国特許第5492840号に見られる。上述の米国特許の開示内容は全て援用により本明細書の一部をなす。

【0033】

ここで、図1及び2を参照して、例示の目的のみで、Biacore（登録商標）又は類似のバイオセンサーシステムによりどのように本発明を実施し得るかを簡単に説明する。

【0034】

Biacore（登録商標）機器の処理装置は通例、センサーチップ表面上を通る液体の一定の流れを維持するためと、試料を取り扱うためとの2つの液体配送ポンプ、オートサンプラー、液体配送チャンネル、試料ループ及び弁を有する一体型マイクロ流体カートリッジ（IFC）、SPR応答を作成し測定するための光学的及び電子的部品を含む検出器ユニット、IFCをセンサーチップに押し付けることによって形成される4つの検出器フローセル、並びにポンプ、オートサンプラー及びIFC弁を制御し、SPR信号をベイスック処理するためのマイクロプロセッサを含んでいる。

【0035】

検出システムの概略説明図を図1に示す。センサーチップ1は、流路5を通る、例えば抗原を有する分析物4を含む試料の流れに暴露される捕捉用分子3（リガンド）、例えば抗体を支持する金膜2を有している。センサーチップ1と共に流路は「フローセル」を画定し、抗体を含む金膜が「感知面」を形成している。光源7からの単色のp-偏光した光6がプリズム8によりガラス/金属界面9とカップリングし、そこで光が全反射する。反射した光ビーム10の強度を光学的検出ユニット11（光検出器アレイ）により検出する。

【0036】

試料中の分子がセンサーチップ表面上の捕捉用分子に結合すると、その表面の濃度、従って屈折率が変化し、SPR応答が検出される。相互作用中の時間に対して応答をプロットすることにより、その相互作用の進行の定量的尺度が得られる。かかるプロットは通常センサーグラムといわれる。Biacore（登録商標）システムにおいて、SPR応答値は共鳴単位（RU）で表される。1RUは最小反射光強度の角度における0.0001

度の変化を表し、これは殆どのタンパク質の場合センサー表面上における約 $1 \text{ pg} / \text{mm}^2$ の変化とほぼ等価である。

【0037】

液体のセンサーチップへの配送は、プラスチックハウジングに入れられた一連のチャンネルと空気弁からなる上述の IFC によって制御される。試料はオートサンプラーから、検出器フローセルと直接接続している IFC 中に注入する。

【0038】

図 2 は、以下の実施例で使用する Biacore (登録商標) T100 の IFC と類似の Biacore (登録商標) 3000 機器のフローセル及び試料ループ部分の概略説明図である。

【0039】

図 2 で、以下ではループチャンネルというチャンネル 21 は、フローセル 22 (簡明にするために、4 つのフローセルのうちの一つのみを示す) の入口端とチャンネル 21 上でフローセルに近接する接合部 23 との間でループ様に延在している。典型的な IFC において、ループチャンネルは約 $100 \mu\text{l}$ の容量をもっている。試料のための入口チャンネル 24 (オートサンプラー入口) は、フローセル入口からさらに離れた接合部 25 でチャンネル 21 に接続している。連続的な液体の流れ (緩衝液) のための入口チャンネル 26 が、接合部 27 でチャンネル 21 のループ端部に接続されている。フローセル 22 の出口端は第 1 の廃液チャンネル 28 に開放されている。第 2 の廃液チャンネル 29 がチャンネル 21 上の接合部 23 と 25 の間の接合部 30 から延在している。第 3 の廃液チャンネル 31 が接合部 32 でチャンネル 21 に取り付けられている。空気弁 33 ~ 36 がチャンネル 21 上に設けられており、弁 37 が試料入口チャンネル 24 上に設けられており、弁 38 と 39 がそれぞれ廃液チャンネル 29 と 31 上に設けられている。これらの弁は圧縮空気システム (図には示していない) によって作動する。チャンネル 21 の接合部 25 と 32 との間に延在する部分は、以下に説明するように試料を装填するための「試料ループ」として使用できる。入口チャンネル 24 及び 26 並びに廃液チャンネル 28、29 及び 31 は、IFC の (フローセル 22 に対して) 遠隔端まで延びており、そこで緩衝液の流れと試料 / 試薬のための 2 つの入口 (オートサンプラーニードル口) を有するコネクタブロック (図には示していない) に接続している。

【0040】

試料の注入は、弁とポンプの適正な制御により 2 つの操作モード、「直接注入」と「ループ注入」で行うことができる。

【0041】

直接注入では、弁 34、36 及び 38 を閉じ、残りの弁を開く。試料は、試料入口チャンネル 24 及びループチャンネル 21 の接合部 25 とフローセル 22 との間に延在する部分を介してポンプで直接フローセル 22 中に送る。

【0042】

一方、ループ注入では、最初弁 33、35 及び 38 を閉じ、残りの弁を開き、試料を試料入口チャンネル 24 を介してループチャンネル 21 中に装填する一方、緩衝液の一定の流れを入口チャンネル 26 を介してポンプでフローセル 22 に通す。次に、弁 33 及び 35 を開くと共に弁 36、37 及び 39 を閉じ、緩衝液をポンプで入口チャンネル 26 を通ってループチャンネル 21 中に流して、装填された試料体積を装填とは反対方向で試料ループからフローセル 22 中に押し込む。

【0043】

ここで、抗体と抗原 - 抗体複合体を形成する抗原を試料が含有しており、従って標的抗体の少なくとも一部分が複合体形態にある場合の試料中の抗体を検出すると仮定しよう。本発明の方法を実施するために、図 2 においてフローセル 22 の感知面が抗原を支持している。最初に試料を酸性化して抗原 - 抗体複合体を解離し、次にこの酸性化された試料溶液を中和して抗体の結合能を回復させ、遊離抗体を含有する中和された試料溶液をフローセルに通して流して、感知面上に固定化された抗原に抗体を結合させる。上で述べたよう

10

20

30

40

50

に、中和用の溶液がフローセル感知面に到達する前に抗原 - 抗体複合体の再形成が実質的な程度まで起こることがないように確実にするために、酸性化された試料と中和用の溶液の混合はフローセル入口に近接して起こるべきである。Biacore（登録商標）機器の外で溶液を混合し、中和した試料を、例えば上記直接注入モードで注入すると、試料がフローセルに到達する前に試料中で広範に過ぎる複合体再形成が起こり得ることが明らかになった。従って、修正された注入モードを開発した。

【0044】

このモードでは、図2を参照して、上記試料の装填の場合と同様に、中和用溶液を試料入口24を介して導入し、試料ループ21内に装填する、すなわち弁33、35及び38を閉じ、残りの弁を開く。次に、入口26を通る緩衝液の流れを使用して、上記のように、中和用溶液をフローセル22中に注入する。すなわち、弁33及び35を開き、弁36及び39を閉じ、緩衝液を入口チャンネル26を介してループチャンネル21中にポンプで送ると同時に、酸性化された試料溶液を試料入口24を通して供給する。こうして、酸性化された試料溶液と中和用溶液は接合部25で出会って混合し始める。酸性化された試料溶液と中和用溶液の割合は試料入口24及び入口26を通る流体の流れの流速比を変えることによって変えることができる。

10

【0045】

また、当然であるが、試料溶液を試料ループ内に装填し、中和用溶液を試料入口24を介して供給してもよい。

【0046】

2つの流体の混合の起こり方のより詳細な表示を図3、4A及び4Bに概略的に示す。これらは各々サイドチャンネル41及び42を有する第1のチャンネル40、及びサイドチャンネル44を有する交差チャンネル43を含むマイクロ流体システムの一部を示す。このチャンネルシステムを通してポンプで送られる流体の通過を制御するために弁（図には示していない）が設けられている。

20

【0047】

図3は、図2に関連して上記したものに対応する混合の変形を示しており、ここでは2つの溶液が混合され、次に直接フローセルに導かれる。酸性化された試料溶液45はサイドチャンネル42を通して導入され、中和用溶液46はサイドチャンネル41を通して導入される。又はこの逆である。次いで、これら2つの溶液はチャンネル44を介してフローセル（図には示していない）に至るまでの間に混合される。

30

【0048】

代わりの混合の変形を図4Aと4Bに示す。ここでは、溶液混合物を最初にサイドチャンネル（又はループ）に導いた後にフローセルに再導入する。酸性化された試料溶液45及び中和用溶液46はそれぞれサイドチャンネル42及び41を介して導入する。しかしながら、混合溶液45と46は次に第1工程（図4A）で図3のように直接サイドチャンネル44を通してフローセルに導かれるのではなく、サイドチャンネル接合部を過ぎてさらにチャンネル43中に流れる。次いで、この流れを止め、逆転させて、混合した流体体積をサイドチャンネル44を通してフローセル（図4B）にポンプで送る。これを各回に少量の流体体積で繰り返して行って、2つの溶液が（複合体再形成を防止するために）あまりに長時間混合されず、すなわち混合流体の長時間の注入ではなく複数のパルスがフローセルに送られるようにする。図3における変形と比較して、図4Aと4Bの混合手順は、2つの溶液の互いのより良好な混合を確実にし得、その結果センサーチップに対する非特異的な結合を低下させ得る。

40

【0049】

当然であるが、マイクロ流体システムにおける混合を改良する多くの他の方法がある。例えば、チャンネルシステムに層流を崩す静止狭窄部、屈曲部などを含むように設計したり、又は活性ミキサーを使用する。後者の場合、例えば、上述のBiacore（登録商標）3000及びBiacore（登録商標）T100機器のマイクロ流体システム中に存在する弁膜のような膜を、振動させて層流を崩す攪拌を生じさせるアクチュエーターと

50

して使用してもよい。代わりに、一方又は両方の流体の流れをパルスにして、試料と中和用緩衝液を好ましくは非常に小さい区分に分割することができる。さらに他の代わりの手法として、流れを微細に分割する交互弁、マイクロ-プロペラー、不安定フラップ、磁気攪拌機、磁性ビーズなどを使用するものがある。活性ミキサーの代わりに、超音波場又は電場のような外部場を使用して混合を加速することも可能であろう。

【実施例】

【0050】

以下の実施例で、本発明の様々な態様を例示のためにより具体的に開示するが、限定するものではない。

【0051】

計測

Biacore (登録商標) T100 (Biacore AB (スウェーデン、ウプサラ)) を使用した。この機器は、センサーチップ上の金表面における表面プラズモン共鳴 (SPR) 検出に基づいており、4つの個別に検出されるフローセル (Fc1 ~ Fc4、個別又は直列) に試料を通し緩衝液を流すためにマイクロ流体システム (一体型マイクロ流体カートリッジ (IFC)) を使用する。IFCはドッキング機構によりBiacore (登録商標) T100機器内に押し込まれてセンサーチップと接触する。

【0052】

センサーチップとしてSeries CM5 (Biacore AB (スウェーデン、ウプサラ)) を使用したが、これはカルボキシメチル-修飾デキストランポリマーの共有結合したヒドロゲルマトリックス (約100nm) と共に金を塗布した (約50nm) 表面をもっている。

【0053】

機器の出力は、検出器応答 (「共鳴単位」RUで測定) を時間の関数としてプロットした「センサーグラム」である。1000RUの増大が、およそ1ng/mm²のセンサー表面の質量の増大に対応する。

【0054】

以下の実施例で、分析は直列に結合したフローセルFc1 ~ Fc4を用いて行った。図2を参照して上記したのと同様にしてフローセル上に注入する間IFCのフローセルに隣接して2つの溶液を混合する「プロトタイプ注入」を使用した。

【0055】

流す緩衝液として、HBS-EP+ (0.01mM HEPES、0.15M NaCl、3mM EDTA及び0.05% v/vのSurfactant P20、pH7.4) (Biacore AB) を使用した。特に断らない限り、流速は試料が5ml/min、中和用溶液が30ml/minであり、温度は25であった。

【実施例1】

【0056】

高濃度HSA存在下での少量の抗-HSA抗体の緩衝液中の測定

ヒト血清アルブミン (Sigma-Aldrich、Missouri、USA) を10mMアセテート (pH5.0) 中で50µg/mlに希釈し、標準アミンカップリング (アミンカップリングキット、Biacore AB) を用いてBiacore (登録商標) T100内のフローセル3 (Fc3) に約9kRUで固定化した。

【0057】

110µg/mlのHSA (Sigma-Aldrich) と様々な濃度の抗-HSA (社内試薬) を含有する100µlの試料を調製した。対照として、HSAを含まない試料を用いた。

【0058】

試料を50µlの0.2Mグリシン (pH2.8) で酸性化した。

【0059】

次に、プロトタイプ注入を用いて各試料をBiacore (登録商標) T100中に注

10

20

30

40

50

入し、試料を HBS - EP + (0 . 1 M HEPES、0 . 15 M NaCl、3 mM EDTA 及び 0 . 05 % v / v の Surfactant P20、pH 7 . 4 (Biacore AB)) と 15 : 85 の割合で混合することにより試料を中和した後、順次 IFC の全てのフローセルに通した。検出は Fc3 で行った (以前の実験で、酸性試料と中和用溶液の混合物はこのフローセルで最適であることが示されていた。すなわち、Fc1 と Fc2 では試料の中和が完全ではなく、一方 Fc4 では複合体再形成が開始していた) 。 HSA の再生は 10 mM グリシン (pH 2 . 0、Biacore AB) で行った。結果を次の表 I に示す。

【 0060 】

【 表 1 】

10

表 I

抗-HSA ($\mu\text{g/ml}$)	HSA 0 $\mu\text{g/ml}$ (RU)	HSA 110 $\mu\text{g/ml}$ (RU)
50	2785	2364
5	222	248
0.5	9	14
0.05	-26	-23

20

表に示されているように、5 $\mu\text{g/ml}$ の抗 - HSA を 50 倍モル過剰の HSA の存在下で検出することができる。

【 実施例 2 】

【 0061 】

- 2 - マイクログロブリン含有及び非含有の緩衝液中の抗 - 2 - マイクログロブリンの測定

標準アミンカップリング (アミンカップリングキット、Biacore AB) を用いて、10 mM アセテート (pH 4 . 5、Biacore AB) 中の 20 $\mu\text{g/ml}$ の - 2 - マイクログロブリン (2 μ) (社内試薬) を Biacore (登録商標) T100 内のフローセル 3 (Fc3) に約 1 . 7 kRU で固定化した。

30

【 0062 】

HBS - EP + (Biacore AB) 中に 100 $\mu\text{g/ml}$ の抗 - 2 - マイクログロブリン (抗 - 2 μ) (社内試薬) と様々な濃度の - 2 - マイクログロブリン (2 μ) (社内試薬) を含有する 100 μl の緩衝液試料を調製した。次に、50 μl の 0 . 2 M グリシン (pH 2 . 8) と混合することにより緩衝液試料を酸性化した。対照試料は酸性化しなかった。

【 0063 】

次いで、プロトタイプ注入を用いて各試料を Biacore (登録商標) T100 中に注入し、試料を HBS - EP + (Biacore AB) と 15 : 85 の割合で混合することにより試料を中和した後、順次 IFC の全てのフローセルに通した。再生はグリシン (pH 1 . 5、Biacore AB) で行った。結果を下記表 II に示す。

40

【 0064 】

【表 2】

表 II

$\beta 2\mu$ ($\mu\text{g/ml}$)	対照試料 (RU)	酸性化試料 (RU)
0	1445	1483
10	660	1316
50	17	1239

10

表から分かるように、酸性化された試料の場合、 2μ が添加されたかされなかったに関係なく（抗- 2μ と 2μ との複合体が分裂された）ほぼ同じ応答レベルが得られたが、対照試料（酸性化されてない）の場合 2μ が存在すると（抗- 2μ との複合体形成）応答レベルが劇的に低下した。

【実施例 3】

【0065】

- 2 - マイクログロブリン含有及び非含有のヒト血漿中での抗 - 2 - マイクログロブリンの測定

標準アミンカップリング（アミンカップリングキット、Biacore AB）を用いて、 10mM アセテート（ $\text{pH}4.5$ 、Biacore AB）中の $20\mu\text{g/ml}$ の 2μ （社内試薬）をBiacore（登録商標）T100内のフローセル3（Fc3）に約 1.7kRU で固定化した。

20

【0066】

(i) $50\mu\text{g/ml}$ の抗- 2μ 又は(ii) $50\mu\text{g/ml}$ の抗- 2μ 及び $5\mu\text{g/ml}$ の 2μ 、並びに $1\% \text{v/v}$ のSurfactant P20（Biacore AB）を含有する $100\mu\text{l}$ のヒト血漿試料を調製した（ヒト血漿試料は通常約 $1\mu\text{g/ml}$ の 2μ を含有する）。次に、 $15\mu\text{l}$ の 1M HCl と混合することにより血漿試料を酸性化した（ $\text{pH}2\sim 3$ になった）。

【0067】

次いで、プロトタイプ注入を用いて、各試料をBiacore（登録商標）T100中に注入し、試料を $0.1\text{M K}_2\text{HPO}_4$ （ $\text{pH}9.0$ ）、及び $1\% \text{v/v}$ のSurfactant P20（Biacore AB）と $15:85$ の割合で混合することにより試料を中和した後、順次IFCの全てのフローセルに通した。再生はグリシン（ $\text{pH}1.5$ 、Biacore AB）で行った。結果を以下の表IIIに示す。

30

【0068】

【表 3】

表 III

血漿 (番号)	抗-β2μ 含有酸性化試料 (RU)	抗-β2μ 及び β2μ 含有酸性化試料 (RU)
1953	1465 1460	1419 1415
1954	1213 1175	1182 1179
1955	1142 1117	1118 1130
1956	1010 991	981 980
1957	1144 1132	1118 1120
1958	1172 1164	1142 1143
1961	884 879	866 878

10

20

表から分かるように、抗体が 2 μ と複合体を形成しているかいないかに関係なく、抗体応答は各々 2 つずつの試料で実質的に同じであった。血漿試料間で変わる応答レベルは、様々な場合に様々なセンサーチップを用いて実験を行ったためである。これは、血漿試料のうち 3 つを上記のように流したが、1 つの同じセンサーチップ表面で同じ時間実験したときに得られた結果を示す下記表 IV によって明らかである。血漿試料は 100 μg / ml の抗 - 2 μ と 1 % v / v の Surfactant P20 を含有していた。対照として、100 μg / ml の抗 - 2 μ (社内試薬) と 1 % v / v の Surfactant P20 を HBS - EP + (pH 7.4) 中に含有する緩衝液試料を用いた。

【0069】

30

【表 4】

表 IV

血漿 (番号)	抗-β2μ 含有酸性化試料 (RU)
1953	2039
1958	1836
1961	1746
1958	1812
1953	1857
緩衝液	1949

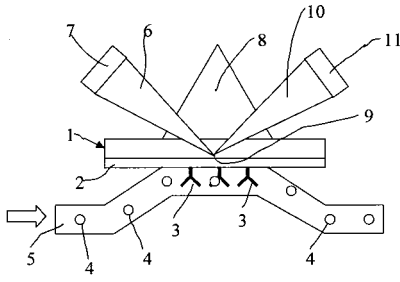
40

表から分かるように、様々な血漿試料間で良好な一致が見られた。血漿試料の値はまた緩衝液中の抗体に対する値ともうまく対応していた。

【0070】

本発明は上記した本発明の特定の実施形態に限定されることはなく、本発明の範囲は特許請求の範囲によって決定されるものと理解されたい。

【 図 1 】



従来技術
FIG. 1

【 図 2 】

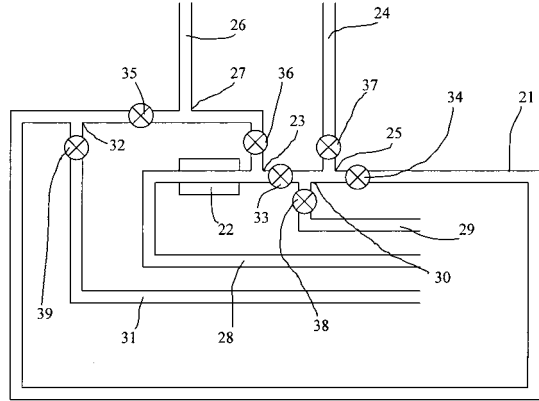


FIG. 2

【 図 3 】

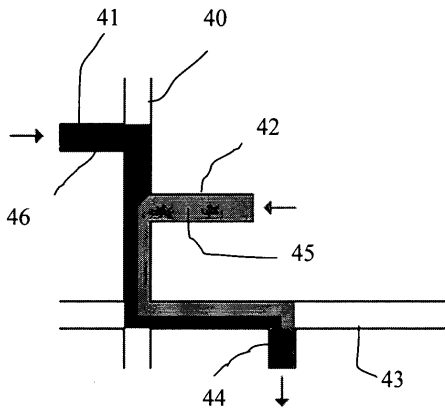


FIG. 3

【 図 4 】

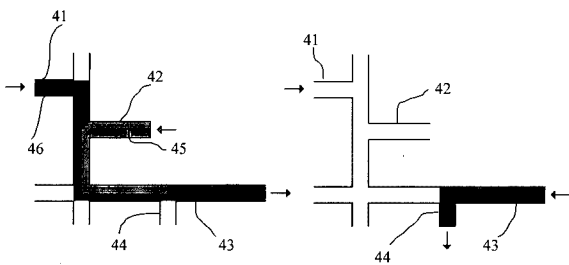


FIG. 4A

FIG. 4B

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2007/000792

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: see extra sheet According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, TXTE, MEDLINE, EMBASE, BIOBIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOXNESS MICHAEL ET AL, "Immunogenicity Testing by Electrochemiluminescent Detection for Antibodies Directed against Therapeutic Human Monoclonal Antibodies", Clinical Chemistry 2005, Vol. 51, No. 10, s. 1983-1985	1-9,14-15
A	--	10-13
X	EP 0375439 A2 (SYNTEX INC.), 27 June 1990 (27.06.1990), page 2, line 30 - line 36; page 3, line 36 - line 42, claim 1	1-9,14-15
A	--	10-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 December 2007		Date of mailing of the international search report 03 -01- 2008
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Yvonne Siösteen/EÖ Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2007/000792

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4459359 A (NEURATH), 10 July 1984 (10.07.1984), column 2, line 30 - line 54; column 4, line 5 - line 12; column 4, line 23 - line 32, claim 1	1-9,14-15
A	--	10-13
A	US 20030003503 A1 (TSAI ET AL), 2 January 2003 (02.01.2003), page 4, paragraph [0052], claim 1	1-15
A	--	
A	US 5256541 A (POULETTY ET AL), 26 October 1993 (26.10.1993), abstract	1-15
A	--	
A	EP 0440044 A1 (ABBOTT LABORATORIES), 7 August 1991 (07.08.1991), abstract	1-15
A	--	
A	US 5219730 A (POTOCNJAK ET AL), 15 June 1993 (15.06.1993), abstract	1-15
A	--	
A	National Library of Medicine (NLM) file Medline, Medline accession no. 10603715, Tomimori-Yamashita J et al, "Antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of anti-PGL-I specific circulating immune complex in leprosy patients"; & Liprosy review, volume 70, No. 3, Sep 1999, p. 261-271, abstract	1-15
A	--	
A	NEDELKOV DOBRIN ET AL, "Detection of bound and free IGF-1 and IGF-2 in human plasma via biomolecular interaction analysis mass spectrometry", FEBS Letters 2003, Vol. 536, p. 130-134	1-15
	-- -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2007/000792
--

International patent classification (IPC)**G01N 33/543** (2006.01)**G01N 21/05** (2006.01)**G01N 33/564** (2006.01)**G01N 21/55** (2006.01)**Download your patent documents at www.prv.se**

The cited patent documents can be downloaded at www.prv.se by following the links:

- In English/Searches and advisory services/Cited documents (service in English) or
- e-tjänster/anförda dokument (service in Swedish).

Use the application number as username.

The password is **UACVQYCSTE**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

01/09/2007

International application No.

PCT/SE2007/000792

EP	0375439	A2	27/06/1990	SE	0375439	T3	
				AT	127588	T	15/09/1995
				CA	2006474	A,C	22/06/1990
				DE	68924141	D,T	11/04/1996
				ES	2076221	T	01/11/1995
				JP	2270847	A	05/11/1990
				JP	2682716	B	26/11/1997
				US	5063165	A	05/11/1991
				US	5256575	A	26/10/1993
				US	5378636	A	03/01/1995

US	4459359	A	10/07/1984	DE	3273658	D	00/00/0000
				EP	0080108	A,B	01/06/1983
				SE	0080108	T3	
				EP	0080109	A	01/06/1983
				JP	58135962	A	12/08/1983
				JP	58135963	A	12/08/1983
				US	4604348	A	05/08/1986

US	20030003503	A1	02/01/2003	NONE			

US	5256541	A	26/10/1993	CA	2099862	A	07/05/1993
				DE	69228418	D,T	08/07/1999
				EP	0570553	A,B	24/11/1993
				WO	9309434	A	13/05/1993

EP	0440044	A1	07/08/1991	CA	2035162	A	01/08/1991
				JP	6317589	A	15/11/1994

US	5219730	A	15/06/1993	NONE			

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

- (72)発明者 ジャヒデ, タンジャ
スウェーデン、エス - 7 4 3 ・ 9 1、ストーヴレタ、エドシャマー (番地なし)
- (72)発明者 ラーソン, アニータ
スウェーデン、エス - 7 5 6 ・ 5 3 ・ ウプサラ、ヤーブワーゲン ・ 2 7 番
- (72)発明者 ロース, ホーカン
スウェーデン、エス - 7 5 2 ・ 6 4 ・ ウプサラ、オスロガタン ・ 8 5 番

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2010503854A5	公开(公告)日	2010-10-14
申请号	JP2009528199	申请日	2007-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	基于阿的Biacore		
申请(专利权)人(译)	安倍晋三的Biacore		
[标]发明人	ベルリングヘンリク ジャヒデタンジャ ラーソンアニータ コースホーカン		
发明人	ベルリング,ヘンリク ジャヒデ,タンジャ ラーソン,アニータ コース,ホーカン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N15/1459 G01N15/1484 G01N33/54366 G01N33/54393		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.595		
代理人(译)	小仓 博		
优先权	0601891 2006-09-14 SE 60/825664 2006-09-14 US		
其他公开文献	JP2010503854A		

摘要(译)

一种确定流体样品中分析物总浓度的方法，其中至少部分分析物作为与分析物结合物质的复合物存在。该方法包括以下步骤：a) 使样品经受降低分析物和分析物结合物质之间的结合亲和力的条件，足以基本上解离任何分析物复合物并提供基本上所有游离形式的分析物，b) 使样品经受以下条件：恢复分析物和分析物结合物质之间的结合亲和力，和c) 在结合亲和力恢复后立即，并且在分析物发生任何实质性重新复合之前，确定样品中游离分析物的浓度。还公开了一种确定样品中复合物结合分析物浓度的方法。