

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4111712号
(P4111712)

(45) 発行日 平成20年7月2日(2008.7.2)

(24) 登録日 平成20年4月18日(2008.4.18)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 Z
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/53 P
請求項の数 22 (全 14 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2001-514568 (P2001-514568)
 (86) (22) 出願日 平成12年7月28日(2000.7.28)
 (65) 公表番号 特表2003-506684 (P2003-506684A)
 (43) 公表日 平成15年2月18日(2003.2.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/020769
 (87) 国際公開番号 W02001/009608
 (87) 国際公開日 平成13年2月8日(2001.2.8)
 審査請求日 平成16年8月13日(2004.8.13)
 (31) 優先権主張番号 09/365,065
 (32) 優先日 平成11年7月30日(1999.7.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502032437
 バイオイー, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ミネソタ 55127,
 セント ポール, センタービル ロー
 ド 4280
 (74) 代理人 100107489
 弁理士 大塩 竹志
 (72) 発明者 コリンズ, ダニエル ピー,
 アメリカ合衆国 ミネソタ 55014,
 リノ レイクス, ペリカン プレイス
 6656

審査官 白形 由美子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結合対の両方のメンバーを同時に検出するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生物学的サンプルにおける結合対の両方のメンバー A および B を同時に測定するための方法であって、該方法は、以下：

a) 固相試薬を提供する工程であって、該固相試薬は、捕捉抗体でコーティングされた粒子を含み、該捕捉抗体は、該結合対の該メンバー A に対して特異的な結合親和性を有する、工程；

b) 該メンバー A が、存在する場合には、該粒子において被覆される捕捉抗体と結合する条件下で、該生物学的サンプルを該固相試薬に接触させる工程；

c) 工程 (b) から得られた固相試薬を、該メンバー A に対して特異的な結合親和性を有する第 1 の抗体と、および該結合対の該メンバー B に対して特異的な結合親和性を有する第 2 の抗体と接触させる工程であって、ここで、該第 1 の抗体が第 1 の標識で標識されており、そして該第 2 の抗体が第 2 の標識で標識されている、工程；ならびに

d) 工程 (c) から得られた該固相試薬上の該第 1 および第 2 の標識を測定する工程、を包含する、方法。

【請求項2】

前記捕捉抗体の抗原結合領域が、前記結合対の前記メンバー A を結合するために利用可能であるように、実質的に全ての該捕捉抗体が前記粒子上で配向される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項3】

前記メンバー A が抗原であり、そして前記メンバー B が宿主抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗原がウイルス抗原である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ウイルス抗原が C 型肝炎抗原である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ウイルス抗原が B 型肝炎抗原である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ウイルス抗原がヒト免疫不全ウイルス抗原である、請求項 4 に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記抗原が自己抗原である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記自己抗原がグルタミン酸デカルボキシラーゼである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記メンバー A がリガンドであり、そして前記メンバー B がレセプターである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記リガンドがサイトカインであり、そして前記レセプターがサイトカインレセプターである、請求項 10 に記載の方法。

20

【請求項 12】

前記メンバー A が酵素であり、そして前記メンバー B が基質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記酵素がカスパーゼ - 3 であり、そして前記基質がポリ (A D P - リボース) ポリメラーゼである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記酵素がカスパーゼ - 1 であり、そして前記基質がプロインターロイキン - 1 である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記第 1 および第 2 の標識が蛍光団である、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 16】

前記生物学的サンプルが、血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液、痰、涙、羊水、硝子体液、唾液、および組織培養上清からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記捕捉抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記第 1 の抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記第 2 の抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 20】

生物学的サンプルにおける結合対の両方のメンバー A および B を同時に測定するためのキットであって、該キットは、以下：

a) 固相試薬であって、該固相試薬は、該結合対の該メンバー A に対して特異的な結合親和性を有する捕捉抗体でコーティングされた粒子を含み、ここで、該捕捉抗体の抗原結合領域が、該結合対の該メンバー A を結合するために利用可能であるように、実質的に全ての該捕捉抗体が該粒子上で配向される、固相試薬；

b) 該結合対の該メンバー A に対して特異的な結合親和性を有する、第 1 の抗体であって、ここで、該第 1 の抗体が、第 1 の標識で標識されている、第 1 の抗体；および

c) 該結合対の該メンバー B に対して特異的な結合親和性を有する、第 2 の抗体であっ

50

て、ここで、該第2の抗体が、第2の標識で標識されており、該第1の標識と該第2の標識とが異なる、第2の抗体、
を備える、キット。

【請求項21】

前記キットが、ラベルまたはパッケージ挿入物をさらに備え、ここで、前記固相試薬、前記第1の抗体、および前記第2の抗体が、フローサイトメトリーによって、生物学的サンプルにおける結合対の両方のメンバーAおよびBを同時に測定するために使用され得ることを、該ラベルまたはパッケージ挿入物が示す、請求項20に記載のキット。

【請求項22】

工程(d)が、フローサイトメトリーにより実行される、請求項1~19のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、生物学的サンプルにおける結合対の両方のメンバーを同時に検出するための方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

血液成分の輸血および移入のために使用される血液生成物は、以下のような感染性因子の存在について慣用的にスクリーニングされなければならない：ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、肝炎ウイルス、ヒトTリンパ球親和性ウイルス、およびサイトメガロウイルス。このような因子は、代表的に、酵素免疫アッセイ分析(EIA)またはラジオ免疫アッセイ(RIA)を使用して、ウイルス抗原の同定またはこのウイルスに対する免疫応答(すなわち、宿主由来の抗ウイルス抗体)の検出のいずれかによって、検出される。ウイルスへの感染と免疫アッセイ技術による検出との間のウィンドウ期間が、HIVについては2~4週間、そしてC型肝炎ウイルス(HCV)については約10週間まで変動するので、免疫アッセイ技術は、それがウイルス混入物の存在を感染の初期段階において検出する能力が制限される。逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)または分枝鎖DNA分析のような技術は、感染と検出との間の期間を短縮し得るが、個体ドナーに基づく使用のためには費用が手が出ないほどに高く、そしてウィンドウ期間を排除しない。

【0003】

(発明の要旨)

本発明は、生物学的サンプルから結合対の両方のメンバー(例えば、リガンドおよびレセプター、または抗原および宿主抗体)を同時に検出するための、迅速かつ感度のよい方法に基づく。本発明の方法は、例えば、初期段階において感染を検出する能力を増強して、この感染のより早期の処置をもたらす得る。

【0004】

本発明は、生物学的サンプルにおける結合対の両方のメンバーAおよびBを同時に測定するための方法の特徴とする。この生物学的サンプルは、血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液、痰、涙、羊水、硝子体液、唾液、および組織培養上清からなる群より選択される。この方法は、以下の工程を包含する：固相試薬を提供する工程であって、この固相試薬は、捕捉抗体でコーティングされた粒子を含み、この捕捉抗体は、結合対のメンバーAに対して特異的な結合親和性を有する、工程、およびこのメンバーAが、存在する場合には、この粒子と結合して第1の反応粒子を形成する条件下で、生物学的サンプルを固相試薬に接触させる工程。捕捉抗体は、モノクローナル抗体であり得る。第1の反応粒子は、メンバーAに対して特異的な結合親和性を有する第1の抗体と、および結合対のメンバーBに対して特異的な結合親和性を有する第2の抗体と接触されて、第2の反応粒子を形成し、ここで、第1の抗体は第1の標識で標識されており、そして第2の抗体は第2の標識で標識されている。第1および第2の抗体は、モノクローナル抗体であり得る。第1および第2の標識(例えば、蛍光団)は、第2の反応粒子上において、フローサイトメトリーを使用し

10

20

30

40

50

て測定される。

【 0 0 0 5 】

特定の実施形態においては、捕捉抗体の抗原結合領域が、結合対のメンバー A を結合するために利用可能であるように、実質的に全ての捕捉抗体が粒子上で配向される。

【 0 0 0 6 】

結合対のメンバー A は、例えば、抗原であり得、そしてメンバー B は、宿主抗体であり得る。この抗原は、C 型肝炎抗原、B 型肝炎抗原、またはヒト免疫不全ウイルス抗原のようなウイルス抗原、あるいはグルタミン酸デカルボキシラーゼのような自己抗原であり得る。結合対のメンバー A はまた、サイトカインのようなりガンドであり得、そしてメンバー B は、サイトカインレセプターのようなレセプターであり得る。さらに、メンバー A は酵素であり得、そしてメンバー B は基質であり得る。例えば、この酵素は、カスパーゼ - 3 またはカスパーゼ - 1 であり得、そしてこの基質は、それぞれポリ (A D P - リボース) ポリメラーゼまたはプロインターロイキン - 1 であり得る。

【 0 0 0 7 】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける結合対の両方のメンバー A および B を同時に測定するための、キットを特徴とする。このキットは、以下を備える：固相試薬であって、この固相試薬は、結合対のメンバー A に対して特異的な結合親和性を有する捕捉抗体でコーティングされた粒子を含む、固相試薬；結合対のメンバー A に対して特異的な結合親和性を有する、第 1 の抗体であって、ここで、この第 1 の抗体が、第 1 の標識で標識されている、第 1 の抗体；および結合対のメンバー B に対して特異的な結合親和性を有する、第 2 の抗体であって、ここで、この第 2 の抗体が、第 2 の標識で標識されている、第 2 の抗体。捕捉抗体の抗原結合領域が、結合対のメンバー A を結合するために利用可能であるように、実質的に全ての捕捉抗体が、粒子上で配向される。このキットは、ラベルまたはパッケージ挿入物をさらに備え得、このラベルまたはパッケージ挿入物は、固相試薬、第 1 の標識抗体、および第 2 の標識抗体が、フローサイトメトリーによって、生物学的サンプルにおける結合対の両方のメンバー A および B を同時に測定するために使用され得ることを示す。

【 0 0 0 8 】

他に定義しない限り、本明細書中において使用される全ての技術的用語および科学的用語は、本発明が属する分野の当業者により通常理解されると同じ意味を有する。本明細書中に記載されるものと類似であるかまたは等価である方法および材料が、本発明の実施において使用され得るが、適切な方法および材料を、以下に記載する。本明細書中において言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体が、本明細書中に参考として援用される。矛盾する場合には、本明細書が、定義を含めて、支配する。さらに、材料、方法、および実施例は、例示的であるのみであり、そして限定することを意図しない。

【 0 0 0 9 】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から、明らかである。

【 0 0 1 0 】

(詳細な説明)

(イムノアッセイ形式)

一般に、本発明は、生物学的サンプル中の結合対の両方のメンバーを同時に検出するためにサンドイッチイムノアッセイ方法を使用する。結合対としては、核酸、タンパク質 (または低分子およびタンパク質) から構成される対を含めて、複合体を形成する分子の任意の組み合わせが挙げられる。核酸対は、DNA : RNA 対または DNA : DNA 対であり得る。例えば、DNA / RNA 結合対 (例えば、一本鎖 (s s) DNA および mRNA) は、PCR 産物検出系として用いられ得る。DNA / DNA 結合対 (例えば、ssDNA およびウイルス DNA) は、増幅した DNA あたりのウイルスの定量的ための競合アッセイにおいて用いられ得る。

【0011】

タンパク質（または低分子およびタンパク質）の結合対の非限定的な例としては、ホルモン、サイトカイン、ペプチド、薬物、ウイルスタンパク質、または他の抗原および同族レセプターもしくは宿主抗体が挙げられる。ウイルスタンパク質/レセプター結合対は、例えば、HIV gp120および可溶性CD4であり得る。薬物および薬物レセプター結合対は、例えば、コカインおよびドーパミンレセプターであり得る。ペプチドおよびペプチドレセプター結合対は、例えば、アセチルコリンおよびムスカリン性レセプター、またはドーパミンおよびドーパミンレセプターであり得る。ホルモンおよびホルモンレセプター結合対は、例えば、インスリンおよびインスリンレセプターであり得る。サイトカインおよびサイトカインレセプター結合対は、例えば、腫瘍壊死因子（TNF）およびTNFのI型または2型のレセプター、またはインターロイキン2（IL-2）およびIL-2レセプターであり得る。抗原および抗体対は、例えば、ウイルスタンパク質および宿主抗ウイルスタンパク質抗体、または自己抗原および宿主抗自己抗原抗体であり得る。HIV gp24/ヒト抗HIV抗体、HIV gp120/ヒト抗HIV gp120抗体、HBV表面抗原/ヒト抗HBV表面抗原、およびHCVコアタンパク質/ヒト抗HCVコア抗体は、ウイルスタンパク質および宿主抗体結合対の例である。自己抗原および宿主抗自己抗原抗体結合対は、例えば、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）および宿主抗GAD抗体であり得る。

10

【0012】

検出され得る他のタンパク質結合対は、酵素および酵素基質結合対である。例えば、酵素/基質対は、カスパーゼ-3/ポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼまたはカスパーゼ-1/プロインターロイキン-1であり得る。

20

【0013】

メンバーA（これは、結合対のいずれかのメンバーであり得る）は、メンバーAについての特異的結合親和性を有する捕捉抗体でコーティングされた粒子である固相試薬で捕捉される。例えば、同時に検出されるべき結合対がHIV gp120/宿主抗HIV gp120抗体である場合、その粒子は、HIV gp120または抗宿主免疫グロブリン（Ig）について特異的結合親和性を有する抗体でコーティングされ得る。

【0014】

メンバーAは、生物学的サンプルを、捕捉抗体でコーティングされた粒子と接触させることによって捕捉される。本明細書中で使用される場合、適切な生物学的サンプルは、細胞または細胞性物質を含み、そして適切な生物学的サンプルとしては、例えば、血液、血漿、血清、尿、唾液、痰、涙、羊水、硝子体液および脳脊髄液が挙げられる。他のサンプルは、インビトロ組織培養培地/上清を含み得る。生物学的サンプルは、非イオン性界面活性剤（例えば、0.5% Triton-X 100またはNonidet P40（Sigma Chemical Company, St. Louis, MO））で処理されて、病原体由来のコア抗原を曝露し得る。

30

【0015】

固相試薬および生物学的サンプルを、メンバーA（存在する場合）のこの粒子に対する結合を促進する条件下で接触させることによって、第1の反応粒子を形成する。このような条件は、室温でのリン酸緩衝化生理学的食塩水（PBS）中に1%ウシ胎仔血清（FBS）および0.1%アジ化ナトリウムを含む緩衝液の使用、または生理学的pH条件下での任意の生物学的流体の使用を含み得る。次いで、第1の反応粒子を、2セットの標識抗体（すなわち、レポーター抗体）と接触させて、第2の反応粒子を形成する。第1の抗体は、メンバーAについての特異的結合親和性を有し、そして第1の標識で標識される。第1の抗体は、メンバーAが捕捉抗体に結合したままでメンバーAに結合し得る。従って、捕捉抗体および第1の抗体は、対として作用しなければならない。第2の抗体は、結合対のメンバーBについての特異的結合親和性を有し、そして第2の標識で標識される。蛍光標識した抗体はこの方法において特に有用である。

40

【0016】

50

図1は、メンバーAおよび宿主抗メンバーA抗体を検出するためのアッセイの模式図を提供する。この実施形態では、ビオチン化した捕捉抗体は、メンバーAについての特異的結合親和性を有し、そして抗原捕捉ビーズに対してアビジンを介して結合されている。第1の抗体は、メンバーAについての特異的結合親和性を有し、そしてフィコエリトリン(第1の標識)で標識される。第2の抗体は、シアニンフィコエリトリン(第2の標識)で標識され、そして宿主Ig(メンバーB)についての特異的結合親和性を有する。第1の反応粒子は、メンバーA、宿主抗メンバーA抗体、捕捉抗体、および固相試薬(例えば、抗原捕捉ビーズ)を含み、一方、第2の反応粒子は、第1の反応粒子およびこれらの2つの標識された抗体を含む。

【0017】

フローサイトメトリーを用いて、第2の反応粒子に対する標識の量を測定し得る。本明細書中で使用される場合、用語「測定する」とは、定性的測定および定量的測定をいう。言い換えると、用語「測定する」は、第2の反応粒子に対する標識の存在または非存在を報告すること、ならびに存在する標識の量を決定することを含む。フローサイトメーターは、光学フィルターを用いて蛍光発光を分割し、そして別々の光電子増倍管を用いて個々の発光シグナルを増幅することによって、少なくとも3つの別の蛍光発光波長範囲を測定し得る。この粒子に関連した蛍光発光強度は、生物学的サンプル中に存在する分析物の濃度に直接比例する。従って、各色素が異なる抗体に結合されている、異なる発光スペクトルを有する異なる色素の使用は、粒子集団あたりの複数の分析物の分析を可能にする。フローサイトメーターはまた、異なる大きさの粒子を区別し得、その結果、例えば、直径約7 μm の粒子は、直径約10 μm の粒子から識別され得る。それゆえ、さらなる成分は、複数の蛍光色素とおよび2または3つの異なる平均直径の粒子集団との組み合わせを用いることによって検出され得る。

【0018】

(抗体産生)

メンバーAまたはメンバーBについての特異的結合親和性を有する抗体は、標準的な方法によって産生され得る。あるいは、抗体は、例えば、以下から市販され得る: Bios Pacific (Emeryville, CA)、Coulter (Hialeah, FL)、Maine Biotechnology Service (Portland, ME) または Biodesign International (Kennebunk, ME)。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、メンバーAまたはメンバーB中のエピトープ決定基に結合し得る、インタクトな分子ならびにそのフラグメントを含む。用語「エピトープ」とは、抗体のパラトープが結合する、抗原上の抗原性決定基をいう。エピトープ決定基は通常、分子の化学的に活性な表面グルーピング(例えば、アミノ酸または糖側鎖)からなり、そして代表的に、特異的三次元構造特徴ならびに特異的電荷特徴を有する。エピトープは一般的に、少なくとも5連続したアミノ酸を有する。従って、用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体、単鎖Fv抗体フラグメント、FabフラグメントおよびF(ab)₂フラグメントを包含する。モノクローナル抗体は特に有用である。

【0019】

一般に、目的のタンパク質は、組換えによって、化学合成によって、またはネイティブタンパク質の精製によって産生され、次いで、動物を免疫するために用いられる。種々の宿主動物(例えば、ウサギ、ニワトリ、マウス、モルモットおよびラットを含む)は、目的のタンパク質の注射によって免疫され得る。アジュバントを用いて、宿主の種に依存して免疫学的応答を増大させ得、そしてアジュバントとしては、Freundアジュバント(完全および不完全)、ミネラルゲル(例えば、水酸化アルミニウム)、界面活性物質(例えば、リゾレシチン)、プルロニック(pluronic)ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁物、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)およびジニトロフェノールが挙げられる。ポリクローナル抗体は、免疫した動物の血清において含まれる、特定の抗原について特異的である抗体分子の不均質集団である。モノクローナル抗体は、抗

10

20

30

40

50

原内に含まれる特定のエピトープに対する抗体の均質な集団であり、標準的なハイブリドーマ技術を用いて調製され得る。特に、モノクローナル抗体は、例えば、Kohler, G.ら, Nature, 1975, 256:495によって記載される培養中の連続細胞株によって抗体分子の産生を提供する任意の技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosborら, Immunology Today, 1983, 4:72; Coleら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80:2026)およびEBVハイブリドーマ技術(Coleら, 「Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy」, Alan R. Liss, Inc., 1983, 77-96頁)によって入手され得る。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDおよびそれらの任意のサブクラスを含む任意の免疫グロブリンクラスの抗体であり得る。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、インビトロまたはインビボで培養され得る。

10

【0020】

キメラ抗体は、異なる部分が、異なる動物種に由来する分子(例えば、マウスモノクローナル抗体から誘導された可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する分子)である。キメラ抗体は、標準的な技術によって産生され得る。

【0021】

メンバーAまたはメンバーBについて特異的結合親和性を有する抗体フラグメントは、公知の技術によって生成され得る。例えば、このようなフラグメントとしては、抗体分子のペプシン消化によって産生され得るF(ab')₂フラグメントおよびF(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成され得るFabフラグメントを含むがこれらに限定されない。あるいは、Fab発現ライブラリーは、構築され得る。例えば、Huseら, 1989, Science, 246:1275を参照のこと。単鎖Fv抗体フラグメントは、Fv領域の重鎖フラグメントと軽鎖フラグメントとをアミノ酸架橋(例えば、15~18アミノ酸)によって連結することによって形成されて、単鎖ポリペプチドを生じる。単鎖Fv抗体フラグメントは、標準的技術によって産生され得る。例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと。

20

【0022】

一旦産生すると、抗体またはそのフラグメントを、標準的なイムノアッセイ方法によってメンバーAまたはメンバーBの認識について試験する。これらの方法としては、例えば、ELISA技術またはRIAが挙げられる。Short Protocols in Molecular Biology、第11章、Green Publishing Associates and John Wiley & Sons、Ausubel、F.Mら編、1992を参照のこと。適切な抗体は、好ましくは、組換えタンパク質およびネイティブタンパク質に対して等しい結合親和性を有する。

30

【0023】

あるいは、抗体を、以下の様式での蛍光サンドイッチアッセイにおいて、結合対を形成するそれらの能力について評価し得る。ビーズを、ビオチン化抗体(例えば、抗ウイルスタンパク質抗体)でコーティングし得、次いで、100 μ l容量で2ng/mlの適切なタンパク質(例えば、組換えウイルスタンパク質)と共に約30分間インキュベートし得る。これらのビーズを、PBS中、1% FBSおよび0.1% アジ化ナトリウムを含有する2mlの緩衝液で2回洗浄した後、これらのビーズを、約0.5 μ gのフィコエリトリン標識抗体と共にインキュベートする。強い蛍光シグナルを生じる抗体の対は、本発明のアッセイにおける使用に適切である。

40

【0024】

(固相試薬)

適切な粒子(例えば、ビーズ)は、約2 μ m~15 μ mの平均直径を有し、そして、ポリスチレンであるか、強磁性であるか、または常磁性であり得る。例えば、これらの粒子は、約4 μ m~約11 μ mの平均直径を有し得る。代表的な平均粒子直径は、約4~5 μ m、7~8 μ m、および10~11 μ mである。粒子は、例えば、Spherotech

50

Inc., Libertyville, ILから市販されている。粒子は、公知技術によって捕捉抗体でコーティングされ得る。例えば、アビジンまたはストレプトアビジンでコーティングした常磁性ビーズを、ビオチン化捕捉抗体でコーティングし得る。一般に、アビジンまたはストレプトアビジンでコーティングしたビーズを、ビオチン化抗体を飽和状態で混合した(3.9×10^7 個の $7 \mu\text{m}$ ビーズあたり約 $40 \mu\text{g}$ のタンパク質) 生理食塩水溶液(例えば、PBS)に再懸濁させ、そして室温でインキュベートする。結合が完了した後、ビーズを、例えば、PBS中、1% FBSおよび0.1% アジ化ナトリウムを含有する緩衝液で、洗浄およびブロックする。

【0025】

核酸結合対を測定する場合、アビジンまたはストレプトアビジンでコーティングしたビーズを、ビオチン化核酸に結合させ得る。核酸は、標準的なニックトランスレーション反応におけるビオチン-11-dUTPの取り込みによって、ビオチンで標識され得る。

【0026】

特定の実施形態において、実質的に全ての捕捉抗体が、粒子上で配向され、その結果、その抗原結合領域は、メンバーAを結合するために利用可能であり、アッセイの全体の感度を増加する。用語「実質的に全て」とは、少なくとも80%、そして好ましくは、少なくとも90%(例えば、95%または99%)の抗体が、この様式で配向されることを示す。パーセント配向性は、フィコエリトリン標識ヤギ抗マウス抗体の結合に関連する蛍光を測定し、そして標準化した蛍光粒子と比較することによって、定量的に推測され得る。抗体の抗原結合領域は、その抗体が、抗原結合領域の直ぐ外側のアミノ酸残基でビオチン化される場合に、メンバーAを結合するために利用可能である。従って、抗体のビオチン化において、約5:1~約10:1のビオチン:抗体のモル比および他の標準的な反応条件を使用する。例えば、ビオチンN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルまたはビオチンスクシンイミジルエステルを、約8.1のpHで使用し得る。あるいは、ビオチンヒドラジドを、4.5~5.0のpHで使用し得る。

【0027】

アッセイの感度もまた増加し得る。なぜなら、生物学的サンプルからのメンバーAの捕捉は、従来のアッセイのように、 $200 \mu\text{l}$ 以下の反応容量に限定されないからである。粒子は、磁気的分離または遠心分離のいずれかによって、大量の生物学的サンプルから容易に収集される。さらに、各々の粒子は、平均して、1粒子あたり約180,000~240,000個の抗体結合部位および約300,000~350,000個のビオチン化抗原結合部位を含む。従って、各々の粒子は、抗原の濃度に対して、大きな結合能力および大きな分析効果範囲を有する。

【0028】

(検出可能な標識)

各々の標識した抗体は、他の蛍光団と対比する色の光を放出する蛍光団での標識によって、別々に可視化され得る。例えば、以下の蛍光団の組み合わせを使用し得る: 7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸(AMCA)、Texas Red™(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)、5-(および6-)-カルボキシ-X-ローダミン、リサミンローダミンB、5-(および6-)-カルボキシフルオレセイン、フルオレセイン-5-イソチオシアネート(FITC)、7-ジエチルアミノクマリン-3-カルボン酸、テトラメチルローダミン-5-(および6-)-イソチオシアネート、5-(および6-)-カルボキシテトラメチルローダミン、7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸、6-[フルオレセイン5-(および6-)-カルボキサミド]ヘキサ酸、N-(4,4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4aジアザ-3-インダセンプロピオン酸、エオシン-5-イソチオシアネート、エリトロシン-5-イソチオシアネート、フィコエリトリン(B-, R-またはシアニン-)、アロフィコシアニン、Oregon Green™およびCascade™ブルーアセチルアジド(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)。

【0029】

抗体はまた、半導体ナノクリスタルで標識され得る。水溶性ナノクリスタルは、異なるサイズの、シリカシェル中に封入されたカドミウム - セレン / カドミウム - 硫黄コアシェルナノクリスタルまたはメルカプト酢酸に可溶化されたカドミウム - セレン / 亜鉛 - 硫黄ナノクリスタルから作製される。このような水溶性ナノクリスタルは、狭い、整調可能な、対称性の発光スペクトルを有し、そして測光的に安定である。Bruchez Jr.ら、*Science*、1998、281:2013-2016；およびChanら、*Science*、1998、281:2016-2018を参照のこと。

【0030】

(複数の抗原および宿主抗体の検出)

標識(例えば、Oregon GreenTM(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)、フィコエリトリン、およびシアニン - フィコエリトリン)の組み合わせは、とりわけ、2つの抗原および1つの宿主抗体を検出するために使用され得る。例えば、HCV、HBV表面抗原、宿主抗HCV抗体および宿主抗HBV表面抗原抗体が、フィコエリトリン標識抗体(HCVに対する特異的結合親和性を有する)、Oregon GreenTM標識抗体(HBV表面抗原に対する特異的結合親和性を有する)、およびシアニン - フィコエリトリン標識抗宿主Ig抗体を使用して、同時に検出される。3つの異なる標識および異なるサイズ(例えば、平均直径7~8 μmおよび10~11 μm)を有する2つの粒子集団を使用して、6つの異なるウイルス抗原および宿主抗体までが同時に検出されるのを可能にする。異なる平均直径の第3の粒子集団の使用は、9つの異なるウイルス抗原および宿主抗体までが同時に検出されるのを可能にする。

【0031】

一旦個体がセロコンバージョンを生じる(seroconverted)(すなわち、宿主抗体を発生すると)、ウイルス抗原を、血漿サンプル中で検出することが困難であり得る。なぜなら、そのウイルス粒子上の捕捉抗体またはレポーター抗体に対する結合部位が、宿主抗体によってブロックされてしまうからである。本発明は、このアッセイの従来のイムノアッセイ形式を超える改善された感度に起因して、この困難性を克服する。従って、ウイルス抗原は、従来のイムノアッセイ形式が検出し得ない状況下で、本発明の方法を使用して検出され得る。本明細書中に記載されるように、ウイルス抗原は、このウイルスタンパク質に対する特異的な結合親和性を有する、モノクローナル抗体でコーティングした粒子を使用して捕捉され得、そしてそれらの存在は、セロポジティブの個体中のこのウイルスタンパク質に対するレポーターモノクローナル抗体で検出され得る。このウイルスタンパク質に対する宿主抗体は、標識ヤギ抗ヒトIgによって同時に検出され得る。宿主抗体を伴わないウイルスタンパク質の検出は、この宿主が、最近感染され、そしてセロコンバージョンを生じていないことを示し、一方、ウイルスタンパク質および宿主抗体の検出は、感染およびセロコンバージョンの存在を示す。特定のサンプルにおいて、例えば、第1の抗体に対する結合部位が利用可能でない場合、宿主抗体は検出され得るが、ウイルスタンパク質は検出されない。この例において、ウイルスタンパク質は、直接測定されないが、ウイルスタンパク質は、サンプル中になお存在し、このウイルスタンパク質に対する抗体をコーティングした捕捉ビーズが、ウイルス抗原および宿主抗体の免疫複合体を捕捉する。

【0032】

本発明は、以下の実施例においてさらに記載され、これらの実施例は、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定しない。

【0033】

(実施例)

(実施例1 - タンパク質のビオチン化) : 抗体を、5 mg / mlの濃度で結合体化させ；ウイルス抗原を、1 mg / mlの濃度で結合体化させた。抗ウイルスタンパク質抗体およびウイルス抗原をビオチン標識するために、これらのタンパク質を、適切なサイズのCentricon (Amicon) フィルターを使用して、100 mM KH₂CO₃緩衝液(pH 8.3)中に交換した。

10

20

30

40

50

【0034】

DMSO (10 mg/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Cat. #D8779) 中のビオチンN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル (Molecular Probes, Eugene, OR) を、使用直前に調製し、そして5:1または10:1のモル比でビオチン化するタンパク質に加えた。このタンパク質溶液を軽くボルテックスし、そしてこのビオチン/DMSOをこのタンパク質溶液に添加し、そして激しく混合することによって、反応させた。タンパク質およびビオチンエステルを、暗所中、室温にて1時間反応させた。結合体化された抗体を、1×PBSを溶出に使用する、10ml Sephadex-25ゲルカラムまたはスピнкаラム上での分離によって、遊離ビオチンから分離した。個々の1ml画分を収集し、A280nmでの吸光度を測定した。A280の初期ピークを示す画分を、収集およびプールし、残りの画分(第2のA280ピークを示す画分を含む)を廃棄した。

10

【0035】

スピнкаラムを使用する場合、反応混合物を、4つのスピнкаラム間で均等に分配し、そしてSerofuge遠心分離機を使用して高速で2分間スピンした。カラムを通過する物質を収集し、そしてカラムを、1×PBSをカラムに充填しそしてSerofugeにおいて高速で2分間スピンして、これを5回繰り返すことによって、洗浄した。収集した物質を、4つのカラム間で均等に再分配し、次いで、Serofuge遠心分離機を使用して高速で2分間スピンした。カラムを通過する物質を、収集し、プールし、そしてA280について再分析し、そして濃度を決定した。結合体化されたタンパク質を、4で保存した。

20

【0036】

(実施例2 - 分析物捕捉ビーズの生成) : 分析物捕捉ビーズを、十分に混合することによってアビジンコーティングした常磁性ビーズ(7µm, Spherotech, VM-60-100)を十分に再懸濁することにより、調製した。ビーズ(代表的に、 3.8×10^6 個のビーズ)を、50mlの遠心分離チューブに置き、そして30mlの1×PBSと混合させた。磁石によってチューブの側面にビーズを保持させた後、全PBSを除去した。ビーズを、PBSでさらに2回洗浄した。

【0037】

最後のPBS洗浄後、必要量のビオチン化抗体(代表的に、40µg)および2mlの1×PBSを、ビーズに添加した。ビーズを、最小3時間、連続的にボルテックスするか、または1時間ボルテックスし、次いで4で一晚保存することによって、再懸濁させた。一晚保存したビーズを、翌朝さらに2時間ボルテックスした。PBS中1% FBSおよび0.1% NaN₃を含有する約30mlの緩衝液を使用して、結合体化されたビーズを3回洗浄した。ビーズを、19.25mlの同緩衝液で再懸濁し、そして使用時まで4で保存した。

30

【0038】

抗体を、フルオレセイン誘導体Oregon Green™ (Molecular Probes, Eugene, OR) で標識するために、抗体を、5mg/mlの濃度で100mM KH₂CO₃緩衝液(pH9.0)中に交換した。Oregon Green™ (ジメチルホルムアミド(DMF)中10mg/ml)を、25:1のモル比で抗体に添加し、暗所中、室温で1時間インキュベートした。遊離のOregon Green™をG-25 Sephadexカラム上で抗体から分離した。R-フィコエリトリン(PE, Intergen BioDiagnostics, Purchase, NY) およびシアニンフィコエリトリン(Cy5PE)の結合体を、2-イミノチオラン(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)を1625:1のモル比で使用して生成し、その抗体を改変するために、20:1のモル比で蛍光色素およびスルホSMCC(Pierce)を改変した。改変した蛍光色素および抗体を、暗所中、室温で1時間、一緒にインキュベートした。遊離の蛍光色素および抗体を、Sephacryl S-300-HRカラム(Sigma Chemical Co., St. Louis, M

40

50

0) 上で、蛍光色素結合体化抗体から分離した。アフィニティー精製し、そしてマウス抗体、ウマ抗体、ウシ抗体、ラット抗体およびウサギ抗体に対して吸収させたヤギ F (a b ')₂ 抗ヒト I g 抗血清 (重鎖および軽鎖特異的) を、 P E または C y 5 - P E で標識した。タンパク質に対する蛍光色素の比を変更して、特定の抗体またはウイルス抗原についての蛍光シグナルを最適化し得る。

【 0 0 3 9 】

(実施例 3 - ウイルス抗原および宿主抗体の検出) : 正常個体および H C V、H I V または H B V に対して陽性の個体由来の血漿サンプルを、New York Biologicals (Southampton, NY)、Scantibodies Laboratory (Santee, CA)、または Intergen BioDiagnos- 10
tics (Purchase, NY) から得た。試験前に、血漿サンプルを、最終濃度 0.5 % の Triton - X 界面活性剤で処理し、ウイルス膜を溶解し、そしてコア粒子を露出させた。E. coli 由来の組換えウイルス抗原 (表面抗原およびコア抗原を含む) を、Bios Pacific (Emeryville, CA) または Intergen BioDiagnos- 10
tics から得た。抗原を、正常な非病的血清サンプルに添加し、参照標準曲線を作成し、そしてスパイク (spike) および回復分析に使用した。

【 0 0 4 0 】

フローサイトメトリー分析を、ビーズ集団をゲートするために、直線の前方 対 側方の光散乱を使用する、Coulter EPICS Profile II、Coulter 20
XL または Partec PAS フローサイトメーター上で行った。蛍光シグナルを、対数的に増幅させた。蛍光放出を、光学フィルターによって別個の色に分離した。525 nm のバンドパスフィルターを使用して、緑色の蛍光 (Oregon Green および FITC) を収集し、565 nm のバンドパスフィルターを使用して、オレンジ色の蛍光 (PE) を収集し、そして 630 nm のロングパスフィルターを使用して、赤色の蛍光 (Cy5 PE) を収集した。

【 0 0 4 1 】

サンプルを、PE 標識および Cy5 PE 標識 F (a b ')₂ ヤギ抗ヒト I g (重鎖および軽鎖特異的) 抗体と共にインキュベートした。各場合において、宿主抗ウイルス抗体を、捕捉された抗原を有するビーズ上で検出し、そして正常サンプルまたは異なるウイルス由来のビーズ上で検出されなかった。H B V 表面抗原および抗 H B V 抗体、ならびに H C V 30
コア抗原および抗 H C V 抗体を、PE 標識抗体 (H C V コア抗原に対する特異的結合親和性を有する)、Oregon Green 標識抗体 (H B V 表面抗原に対する特異的結合親和性を有する)、および Cy5 PE 標識ヤギ抗ヒト I g 抗体を使用して検出した。図 2 A ~ 2 H に示されるように、H C V、H B V および宿主抗体の個々および同時の検出が、可能であった。

【 0 0 4 2 】

(他の実施形態)

本発明を、その詳細な説明と共に記載したが、この前述の説明が、例示であって、添付の特許請求の範囲に定義される本発明の範囲を限定することが意図されないことが理解される。他の局面、利点および改変は、上記の特許請求の範囲内にある。 40

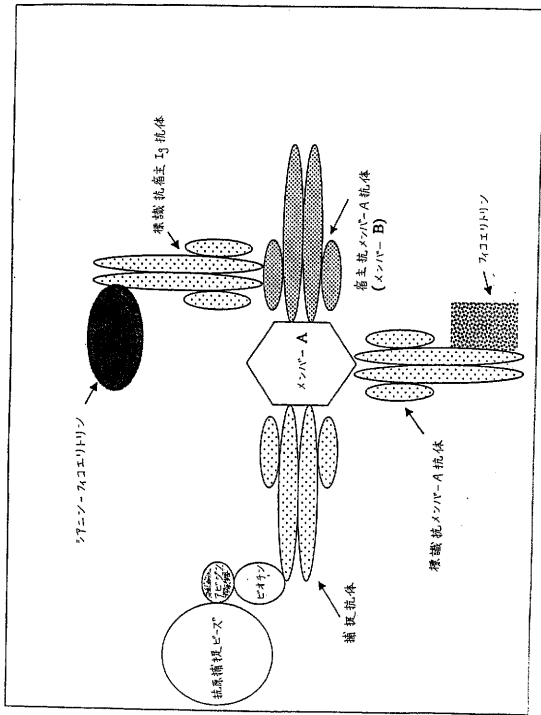
【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 図 1 は、メンバー A および宿主抗メンバー A 抗体 (メンバー B) を検出するためのアッセイの模式図である。

【 図 2 】 図 2 A ~ 図 2 H は、フローサイトメトリーによる B 型肝炎ウイルス (H B V) 表面抗原、抗 H B V 宿主抗体、H C V コア抗原および抗 H C V 宿主抗体の同時検出を示す散布図である。図 2 A は、正常サンプル中の H B V 抗原および抗体である。図 2 B は、正常サンプル中の H C V 抗原および抗体である。図 2 C は、H B V ポジティブサンプル中の H B V 抗原および抗体である。図 2 D は、H B V ポジティブサンプル中の H C V 抗原および抗体である。図 2 E は、H C V ポジティブサンプル中の H B V 抗原および抗体である。図 2 F は、H C V ポジティブサンプル中の H C V 抗原および抗体である。図 2 G は、H 50

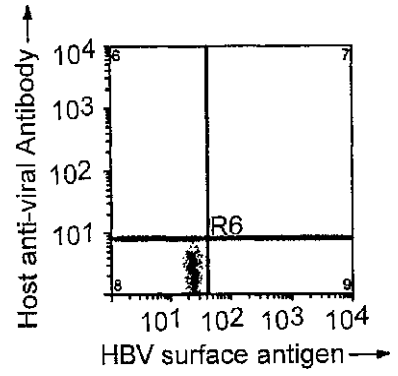
B V ポジティブ / H C V ポジティブサンプル中の H B V 抗原および抗体である。図 2 H は、H B V ポジティブ / H C V ポジティブサンプル中の H C V 抗原および抗体である。

【 図 1 】



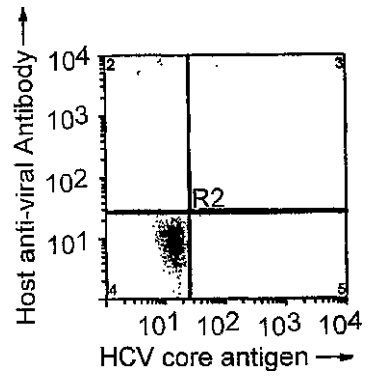
【 図 2 A 】

FIG. 2A



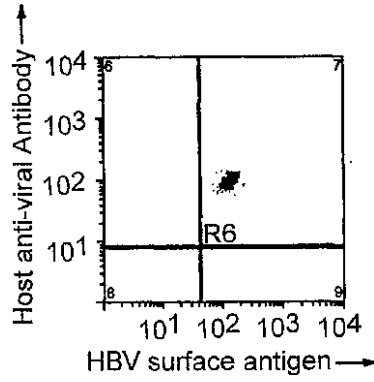
【 図 2 B 】

FIG. 2B



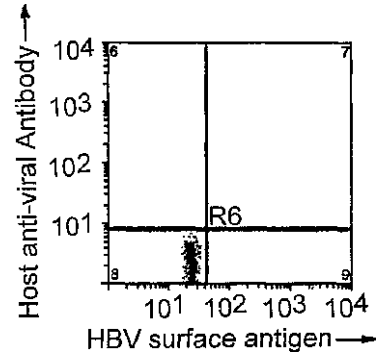
【 2 C 】

FIG. 2C



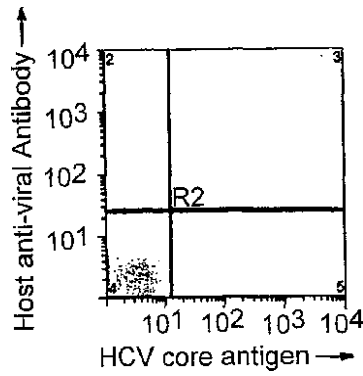
【 2 E 】

FIG. 2E



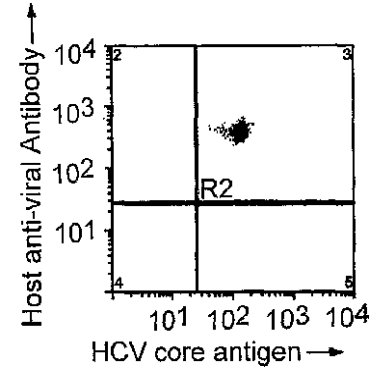
【 2 D 】

FIG. 2D



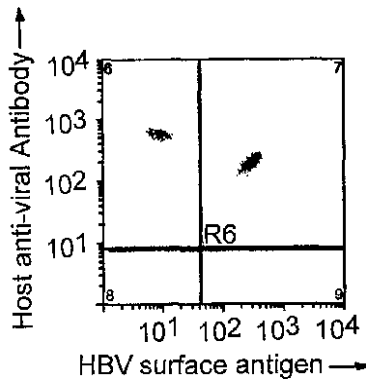
【 2 F 】

FIG. 2F



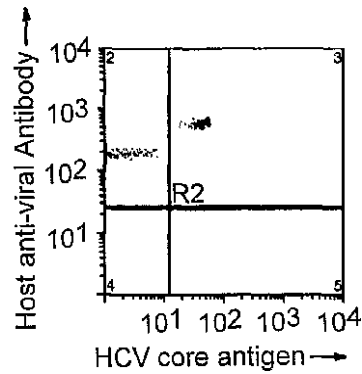
【 2 G 】

FIG. 2G



【 2 H 】

FIG. 2H



フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I

G 0 1 N 33/576 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	G
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	H
	G 0 1 N 33/573	A
	G 0 1 N 33/576	B
	G 0 1 N 33/576	Z
	G 0 1 N 33/577	B

(56) 参考文献 特開平 0 2 - 1 2 4 4 6 1 (J P , A)
特開平 0 4 - 2 3 3 4 6 1 (J P , A)
国際公開第 0 0 / 0 0 7 0 2 3 (W O , A 1)

(58) 調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
G01N 33/53
JMEDIus(JDream2)

专利名称(译)	同时检测结合对的两个成员的方法		
公开(公告)号	JP4111712B2	公开(公告)日	2008-07-02
申请号	JP2001514568	申请日	2000-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	生物工程学结构公司		
申请(专利权)人(译)	生物工程学结构, 公司		
当前申请(专利权)人(译)	Baioi公司		
[标]发明人	コリンズダニエルピー		
发明人	コリンズ, ダニエル ピー.		
IPC分类号	G01N33/543 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/573 G01N33/576 G01N33/577 G01N33/52		
CPC分类号	G01N33/54306 Y10S435/96 Y10S435/968 Y10S435/971 Y10S435/973 Y10S435/974 Y10S435/975		
FI分类号	G01N33/543.501.Z G01N33/543.597 G01N21/78.C G01N33/53.N G01N33/53.P G01N33/569.G G01N33/569.H G01N33/573.A G01N33/576.B G01N33/576.Z G01N33/577.B		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	09/365065 1999-07-30 US		
其他公开文献	JP2003506684A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了用于同时测量结合对的两个成员的方法和试剂盒。

2A

