

(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2005-510696**(P2005-510696A)**

(43) 公表日 平成17年4月21日(2005.4.21)

(51) Int.Cl.⁷**G01N 33/53****G01N 33/543**

F I

G O 1 N 33/53

D

G O 1 N 33/543 5 O 1 D

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2003-547575 (P2003-547575)
 (86) (22) 出願日 平成14年11月26日 (2002.11.26)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年5月27日 (2004.5.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/037861
 (87) 国際公開番号 W02003/046140
 (87) 国際公開日 平成15年6月5日 (2003.6.5)
 (31) 優先権主張番号 60/333,133
 (32) 優先日 平成13年11月27日 (2001.11.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504204672
 ダイアジェニクス インターナショナル
 コーポレーション
 アメリカ合衆国, 01801 マサチュー
 セッツ, ウォバーン, ダブリュ. カミング
 ス パーク 260-262
 (74) 代理人 100066061
 弁理士 丹羽 宏之
 (72) 発明者 ノル, フランツ
 ドイツ, 13086 ベルリン, アマリー
 ン ストリート 25

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 患者サンプル中の生化学的標識の迅速同時検出のための免疫分析法および免疫分析キット

(57) 【要約】

本発明は、サンプル中の最低二つの抗原を測定するための免疫化学的分析を含む。前記免疫化学的分析は、患者から採取したサンプルを、それぞれがサンプル中の抗原の結合部位に特異的に結合する最低二つの捕捉抗体を含む担体分子と接触させることを含む。前記分析はさらに、捕捉抗体が使用する結合部位以外の異なる結合部位上で同じ抗原を特異的に結合する検出抗体を含む。さらに検出因子が、サンプル中の抗原の検出を容易にする一つあるいはそれ以上の検出プローブに付着する。本発明の免疫化学的分析は、患者サンプル中にさまざまな時点で放出される生化学的標識を検出するように、特異的に設計されている。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中の最低二つの抗原の存在を決定する方法であって、

a) 反応混合物を形成するために、ヒトあるいは動物から採取したサンプルを、それぞれ異なる抗原に対する結合特異性を持つ、最低二つの捕捉因子を含む担体分子と接触させ、

b) 反応混合物に最低一つの検出因子を添加し、
サンプル中の最低二つの抗原の濃度を検出することより成ることを特徴とする抗原の存在を決定する方法。

【請求項 2】

前記二つの抗原が、それぞれ心臓に特異的な早期発現および後期発現抗原であることを特徴とする請求項 1 記載の抗原の存在を決定する方法。

【請求項 3】

前記早期発現抗原が、グリコーゲンホスホリラーゼ B B (G P B B) であり、前記後期発現抗原が心筋トロポニン I であることを特徴とする請求項 2 記載の抗原の存在を決定する方法。

【請求項 4】

前記検出因子と捕捉因子が、抗体あるいは抗体断片を含むことを特徴とする請求項 1 記載の抗原の存在を決定する方法。

【請求項 5】

前記抗体が、モノクローナル、ポリクローナル、ヒト化、ヒト、キメラ、組み換え、二重特異性、多重特異性抗体あるいはこれらの組み合わせであることを特徴とする請求項 4 記載の抗原の存在を決定する方法。

【請求項 6】

前記抗体断片が、F a b、F a b (2) '、F c、F v、単鎖抗体あるいはこれらの組み合わせであることを特徴とする請求項 4 記載の抗原の存在を決定する方法。

【請求項 7】

前記サンプルが、ヒトから採取したものであることを特徴とする請求項 1 記載の抗原の存在を決定する方法。

【請求項 8】

前記サンプルが、組織、血液、唾液、血漿サンプル、リンパ液、脳脊髄液あるいは血清であることを特徴とする請求項 1 記載の抗原の存在を決定する方法。

【請求項 9】

前記方法が、i n v i t r oで行われることを特徴とする請求項 1 記載の抗原の存在を決定する方法。

【請求項 10】

前記方法が、さらに検出プローブを含むことを特徴とする請求項 1 記載の抗原の存在を決定する方法。

【請求項 11】

前記検出プローブが、検出可能な酵素、補欠分子族、常磁性体群、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、分散染料、金粒子あるいはこれらの組み合わせであることを特徴とする請求項 10 記載の抗原の存在を決定する方法。

【請求項 12】

患者の急性心筋梗塞を早期に検出するための診断試験キットであって、最低二つの捕捉因子を含む担体分子を含み、さらに最低一つの検出因子を含み、前記捕捉因子のそれぞれが抗原の結合部位に特異的に結合し、前記検出因子が前記捕捉因子の使用しない結合部位を介して抗原に結合することを特徴とする診断試験キット。

【請求項 13】

サンプルが、患者の組織、血液、唾液、血漿、血清、リンパ液あるいは脳脊髄液であることを特徴とする請求項 12 記載の診断試験キット。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

前記患者が、ヒトであることを特徴とする請求項 13 記載の診断試験キット。

【請求項 15】

生化学的標識が、GPBB およびトロポニン I であることを特徴とする請求項 12 記載の診断試験キット。

【請求項 16】

前記検出因子が、さらに検出プローブを含むことを特徴とする請求項 12 記載の診断試験キット。

【請求項 17】

前記検出プローブが、検出因子に結合していることを特徴とする請求項 16 記載の診断試験キット。 10

【請求項 18】

前記検出プローブが、検出因子に結合していないことを特徴とする請求項 16 記載の試験診断キット。

【請求項 19】

患者の心筋梗塞を検出する方法であって、

a) 患者から採取したサンプルを、抗 GPBB モノクローナル抗体、抗心筋トロポニン I モノクローナル抗体および最低一つの検出因子を含む担体分子と接触させ、

b) サンプル中の GPBB および心筋トロポニン I の濃度を検出し、ここで前記検出因子は、捕捉因子の使用しない結合部位で GPBB およびトロポニン I の両方に結合し、 20

c) 所定の時間に採取した新しいサンプルについて a) および b) を繰り返すことより成ることを特徴とする心筋梗塞を検出する方法。

【請求項 20】

前記検出因子が、一つあるいはそれ以上の検出プローブを含むことを特徴とする請求項 19 記載の心筋梗塞を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、疾患或いは障害の発現後のさまざまな期間における、生物学的サンプル中に存在する生化学的標識の検出のための組成物および方法に関する。 30

【背景技術】

【0002】

疾患の診断の遅れはしばしば、組織への一生残る損傷の危険性の増加あるいは更には死亡率の危険性の増加をもたらす。多くの疾患において、疾患の進行と関連した標識分子の発現の増加が見られる。標識分子は、疾患と関連するかあるいは疾患によって産生される抗原であり、疾患の進行とともに量が増加し、同時に濃度が変化し得る。したがって、標識分子の増加は病原性の増加と関連し得る。ゆえに標識分子の増加は、HIV 等のウイルス性病原体あるいはサルモネラ菌等の細菌性病原体等の疾患状態の悪化と関連し得る。罹病生物はまた、生物体内に通常存在しないかあるいは低レベルでしか存在しない標識の産生あるいは増加により、病原体あるいは病原性条件に反応し得る。例えば、心臓発作を起こした患者では、CK-MB、トロポニン T あるいは I の増加が見られる。 40

【0003】

急性心筋梗塞 (AMI) あるいは ST-T 変化を伴う不安定狭心症等により引き起こされる心筋細胞への虚血性損傷の検出あるいは除外に利用できる多数の生化学的標識がある。しかしながら、これらの標識のほとんどは心臓に特異的でもなく、早期診断に有用なように AMI 後十分早期に検出可能であるわけでもない。

【0004】

血清中のクレアチンキナーゼ MB イソ酵素 (EC 2.7.3.2) の検出は、心筋梗塞 (“心臓発作”) の診断結果を確認するために、現在最も広く利用されている *in vitro* 試験である。しかしながら、この試験は概ね満足のいく結果を提供するものである 50

が、その実用性を制限する欠点もある。欠点の一つは、梗塞後、試験が有効な期間が比較的短い（24 - 48時間）ことである。胸痛が起きた後病院に到着して48時間以上の患者では、CK-MB試験は通常、心臓発作の診断の確認に有用ではない。これに加え、骨格筋組織は通常少量のCK-MBイソ酵素を包含するため、骨格筋組織の外傷（交通事故等）を被った患者は時々偽陽性を示し、それにより心筋梗塞の診断はより難しくなる。

【0005】

死亡あるいは罹患の危険性を最小限にするための適切な治療計画を開始するために、できるだけ迅速に標識を同定することは、診断医にとって利点となるであろう。大部分の検出分析において、標識が検出可能濃度に達するまでの時間の遅延がある。心臓発作の場合、CK-MB、トロポニンTあるいはトロポニンIが検出可能レベルになるまでに、胸痛が起こってから4 - 6時間の遅れがある。ミオグロビンはこれに先立って検出可能であるが、現行の試験は特異性が低い。したがって、サンプル中の微量レベルの生化学的標識を迅速に検出できる分析法が必要である。また、心臓発作の進行および継続的な梗塞の発現を監視できる分析法も必要である。

10

【発明の開示】

【0006】

（発明の要約）

本発明は、損傷後のさまざまな時間における標識および標識のレベルの検出のための免疫化学分析を含む。本発明はさらに、最低一つの抗原の結合部位と特異的に結合する最低二つの捕捉因子を含む担体分子とサンプルを接触させることを含む、サンプル中の最低二つの抗原の同時決定のための免疫化学的分析を含む。免疫化学分析はさらに、捕捉因子と結合した抗原に結合する検出因子を含む。検出因子はさらに検出プローブと結合され得る。あるいは検出因子は単独でサンプルに添加され得る。あるいは、担体分子はまた、検出プローブと結合した検出因子および抗原に特異的に結合する検出因子を含む。本発明の分析は、心臓に特異的な標識、グリコーゲンホスホリラーゼBB（GPBB）と心筋トロポニン-Iの検出に用いることができる。

20

【0007】

本発明の分析の検出因子および捕捉因子は、モノクローナル、ポリクローナル、ヒト化、ヒト、キメラ、組み換え、二重特異性、多重特異性抗体あるいはこれらの組み合わせを含む、抗体あるいは抗体断片を含み得る。抗体断片は、Fab、Fab(2)'、Fc、Fv、単鎖抗体あるいはこれらの組み合わせを含み得る。

30

【0008】

検出プローブは、検出可能な酵素、補欠分子族、常磁性体群、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、分散染料、金粒子あるいはこれらの組み合わせであり得る。

【0009】

本発明のさらなる実施例は、上記の担体分子および、さらには内部消耗のための担体あるいは希釈材を含む組成物を提供する。本発明の組成物は、診断あるいは治療に用いることができる。

【0010】

本発明の別の実施例は、サンプル中の最低二つの関連する生化学的標識を検出するためのキットを提供する。このキットは、最低二つの捕捉因子を含む担体分子を含み、またさらには最低一つ、好ましくは最低二つの検出因子を含む。各捕捉因子は、一つの抗原の結合部位に特異的に結合し、検出因子は異なる結合部位を介して同一の抗原に結合する。検出因子はさらに、検出因子と結合しているか、あるいはサンプルに単独で提供される検出プローブを含む。

40

【0011】

（発明の詳細な説明）

本発明は、早期発現および後期発現生化学的標識の両方の検査に基づく、急性心筋梗塞（AMI）の発現あるいは心筋へのその他の損傷を検出するための組成物および方法を含む。本発明はさらに、AMIの進行を追跡し、継続的な梗塞がないか確認するために、A

50

M I の発現後のさまざまな時点でのサンプル中のタンパク質を検出するための免疫化学的方法を含む。A M I の発現後のさまざまな時点で行われる標識の検査によって、早期治療に結びつく虚血性心筋損傷の早期検出、心筋により放出されその他の筋肉によって放出されない標識の使用を介した診断の特異性、継続的な A M I の監視、結果の直接評価および損傷の重傷度の測定が可能となる。

【 0 0 1 2 】

本発明は、サンプルを最低二つの捕捉因子と最低一つの検出因子を含む担体分子と接触させることを含む、サンプル中の最低二つの生化学的標識を測定するための免疫化学的分析を含む。各捕捉因子は抗原の結合部位に特異的に結合する。検出因子は、捕捉因子が使用する結合部位以外の異なる結合部位で、同一の抗原に特異的に結合する。検出因子はさらに、検出因子に結合しているか、あるいは単独でサンプルに添加される検出プローブを含む。本発明の免疫化学的分析は、患者のサンプル中の、さまざまな期間に放出される二つあるいはそれ以上の異なる抗原の存在と量を同時に検出することができる。

10

【 0 0 1 3 】

定義

ここに開示された“捕捉因子”という用語は、関連する最低一つの抗原と結合あるいは接触する結合特異性を持つ限り、抗体あるいは抗体断片、ペプチドあるいはペプチド断片、酵素、タンパク質、ペプチド複合体、ペプチドと炭化水素の複合体、核酸分子あるいはその他の化学物質等の任意の分子を含む。

【 0 0 1 4 】

“検出因子”という用語は、(a) 関連する最低一つの抗原および(b) 最低一つの検出プローブの結合部位と結合あるいは接触する、二つ以上の異なる結合特異性を持つ限り、抗体あるいは抗体断片、ペプチドあるいはペプチド断片、酵素、タンパク質、ペプチド複合体、ペプチドと炭化水素の複合体、核酸分子あるいはその他の化学物質等の任意の部位を含む。したがって、検出因子は、関連する抗原および検出プローブに結合する異種抗体、二重特異性、三重特異性、四重特異性およびその他の多重特異性分子を含むが、これらに限定されない。検出因子はまた担体分子にも結合し得る。

20

【 0 0 1 5 】

ここで用いられる“検出プローブ”という用語は、複合体分子の同定を容易にするために、検出因子かあるいは検出因子を包含するサンプルに結合する因子を示す。“検出プローブ”という用語は、検出因子と接触し、検出因子プローブ複合体を形成することができるプローブを含む。一つの実施例において、検出プローブは、1つあるいはそれ以上、2つあるいはそれ以上、3 - 6、6 - 12、12 - 20、あるいは20以上の検出可能ラベルで標識される。検出可能ラベルの例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質を含むが、これらに限定されない。

30

【 0 0 1 6 】

ここで用いられる“特異的結合”という用語は、その他の関連抗原に対するよりもより高い親和性で一つの抗原と結合する抗体を含む。通常、抗体は、最低約 1×10^{-7} M の親和性で結合し、所定の抗原と、所定の抗原あるいは密接に関連する抗原以外の非特異的抗原(例えば B S A、カゼイン)と結合する親和性よりも最低2倍大きい親和性で結合する。例えば、トロポニン I に対する特異的結合親和性を持つ抗体は、トロポニン T に対するよりもより高い親和性をもってトロポニン I と結合し得る。

40

【 0 0 1 7 】

“抗原を認識する抗体”および“抗原に特異的な抗体”という語句は、ここでは“抗原に特異的に結合する抗体”という用語と同じ意味で用いられる。

【 0 0 1 8 】

ここに開示された“担体分子”という用語は、固相面を含む。固相面は、特定の形態に限定されない。固相面は、プラスチックチューブ、ビーズ、マイクロタイタープレート、ラテックス粒子、磁性粒子、セルロースビーズ、アガロースビーズ、紙、ディップスティック等を含む、この分野における通常の知識を有する者に知られた種々のものから選択す

50

ることができる。より好ましくは、本発明の担体分子は、ディップスティックを含む。

【0019】

ここで用いられる“抗原”という用語は、本発明の免疫分析を用いて検出することができる任意の分子あるいは生化学的標識を含む。抗原は例えば、疾患あるいは障害の結果、体内で新規に発現するかあるいは発現の増加あるいは減少を示す任意の分子を含む。この用語は例えば、薬物、毒素、自己抗体、自己抗原、タンパク質、炭水化物、核酸あるいはそれらの組み合わせ等の体液中に存在する小分子を含む。

【0020】

ここで用いられる“サンプル”という用語は、抗原を包含する混合物を含む。好ましくは、サンプルは、動物等の生物資源、例えば哺乳類、より好ましくはヒトから採取される。サンプルは好ましくは、血液、血漿、唾液、尿その他等の体液であり、また組織サンプルも含む。

10

【0021】

ここで用いられる“抗体あるいは抗体断片”という用語は、抗原に特異的に結合する抗体あるいはその断片を示す。分子に特異的に結合する抗体あるいは断片は、例えば免疫分析により、あるいはこの分野における通常の知識を有する者が知っているその他の技術により、同定することができる。

【0022】

“組み換え抗体”という用語は、ファージディスプレイ抗体、形質転換動物（例えばマウス）から単離した抗体、宿主細胞中にトランスフェクションされた組み換え体発現ベクターを用いて発現させた抗体、組み換え体あるいは組み合わせ抗体ライブラリーから単離した抗体等の、組み換え法により調整し、発現させ、作成しあるいは単離した全ての抗体、あるいは免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを含むその他の方法により調整し、発現させ、作成しあるいは単離した抗体を含む。

20

【0023】

“モノクローナル抗体”という用語は、特定のエピトープに対する唯一の結合特異性および親和性を示す抗体を含む。好ましくは、これらの抗体は、マウス、ヒトおよびヒト化抗体を含む哺乳類抗体である。

【0024】

“ヒトモノクローナル抗体”という用語は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列由来の可変領域および定常領域を持つ、唯一の結合特異性を見せる抗体を示す。一実施例において、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合したヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを持つ形質転換非ヒト動物、例えば形質転換マウスから得られたB細胞を含むハイブリドーマによって産生される。

30

【0025】

“ヒト化抗体”という用語は、一つあるいはそれ以上の非ヒト種由来の相補性決定領域（CDRs）とヒト免疫グロブリン分子由来の枠組み領域を持つ、非ヒト種由来の抗体分子を示す（合衆国特許5585089号参照、これは全体で引用例としてここに組み込まれている）。前記キメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、例えば合衆国特許4816567号および5225539号に開示された方法を用いて、この分野において知られた組み換えDNA技術によって産生することができる。合衆国特許4816567号および5225539号は全体で引用例としてここに組み込まれている。

40

【0026】

本発明における“キメラ抗体”は、組み換えにより、あるいは化学的に産生される。例えば、組み換えキメラ抗体は、適切な抗原特異性を持つモノクローナル抗体由来の遺伝子を適切な生物学的活性を持つ第二のヒト抗体由来の遺伝子とスプライシングすることにより産生される。より好ましくは、キメラ抗体は、抗体の可変領域をコード化する遺伝子を第二の抗体分子由来の定常領域遺伝子とスプライシングすることにより産生され得る。この方法は、相補性決定領域がマウスのものであり、枠組み領域がヒトのものであるヒト化モノクローナル抗体の生成に用いられる（合衆国特許4816567号、4816397

50

号、5693762号、5585089号、5565332号および5821337号を参照。これらは全体で引用例としてここに組み込まれている）。

【0027】

ここで用いられるように、“トロポニン”という用語は、トロポニンアイソフォームの複合体あるいは単一のトロポニンアイソフォームを示す。1) 心筋三成分複合体、2) I (酸化型) / Tの心筋トロポニン二成分複合体、3) I (還元型) / Tの心筋トロポニン二成分複合体、4) I (酸化型) / Cの心筋トロポニン二成分複合体、5) I (還元型) / Cの心筋トロポニン二成分複合体、6) T / Cの心筋トロポニン二成分複合体、7) 非結合心筋トロポニンI (酸化型)、8) 非結合心筋トロポニンI (還元型) および9) 非結合心筋トロポニンTを含む、9個のトロポニン形態がある。ここで用いられるように、非結合トロポニンは、複合体の状態でないトロポニンである。トロポニン複合体は、二成分あるいは三成分であり得る。

10

【0028】

多数の生化学的標識が、AMIあるいはST-T変化を伴う不安定狭心症において見られる心筋への虚血性損傷の検出あるいは除外に利用できる。しかしながら、これらの標識のほとんどは、心臓に特異的でもなく、有用なほど十分に検出可能であるわけでもない。本発明の分析に用いることができる標識の例としては、トロポニンアイソフォームの複合体あるいは単一のトロポニンアイソフォーム (すなわち、トロポニンI、トロポニンC、トロポニンT) を含むトロポニン、トロポミオシン、アクチン、GPBB、薬物 (例えば、バルビツール酸塩、三環形抗鬱薬およびジギタリス)、腫瘍抗原 (例えば、乳腺、前立腺、脳、肝臓、腎臓、大腸、膵臓、胃あるいは肺ガンに関連する抗原)、ウイルス抗原 (例えば、HIV、インフルエンザあるいはその他のウイルスと関連するかあるいはこれらにより産生される抗原)、細菌抗原、ホルモン (例えば、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、ヒト成長ホルモン、プロゲステロン、テストステロン、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG))、血漿タンパク質 (例えば、フィブリン分解生成物 (FDP)、C反応性タンパク質 (CRP)、ガン胎児性タンパク質、アルファフェトプロテイン (AFP)、ガン胎児性抗原 (CEA))、血小板抗原、ハプテン (例えば、アンギオテンシンI、バソプレッシン、ソマトスタチン、心房性ナトリウム利尿ホルモン、エンドセリン、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH-RH)、カシニンあるいはその他のペプチド)、ステロイド (例えばコルチゾール)、およびインターロイキン1 (IL-1)、インターフェロ

20

30

【0029】

本発明はさらに、心筋損傷に対する早期発現抗原としてのグリコーゲンホスホリラーゼのBBイソ酵素の使用を含む。何れかの見解に束縛されることを望まない一方で、グリコーゲンホスホリラーゼイソ酵素BB (GPBB) は、虚血性心臓損傷の早期検出のための重要な酵素であることが報告されている (Mair J., Clin Chim Acta 6; 272: 79-86 (1998))。相当量のGPBBは、ヒトの心臓および脳にのみ見られる。GPBBは、胸痛の開始から2時間以内の血中で検出可能である。GPBBレベルはまた、入院時に不安定狭心症および安静時心電図における改善可能なST-T変化を伴う患者において早期に増加し、重傷度分類に役立てることができる。GPBBは、心臓に特異的であり、心筋への虚血性損傷の発現後16-24時間で血中から消失する。前記酵素の残存期間が短いために、前記酵素は、単に血流中のGPBBレベルの増加を検出するだけで、例えばバイパス手術後の新たな梗塞の指標として有効に利用できる。

40

【0030】

加えて本発明は、早期発現標識としてのGPBBを心筋の虚血性誘導損傷に特異的な後

50

期発現標識と一組にすることを含む免疫化学分析および診断方法を含む。この後期発現標識は好ましくは心筋トロポニンIである。血清中の心筋トロポニンIは、心筋細胞の構造タンパク質であり、その放出は心筋中でのネクロシスの開始の兆候である。後期標識である心筋トロポニンIは、胸痛の開始後約4時間で循環する血液中に現れ、その循環血液中での残存期間は、GPBBよりも極めて長い。したがって、心筋トロポニンIの測定によって、発現後長い時間あるいは日にちが経った後の虚血性症状の診断が可能である。

【0031】

本発明は、特異性の増加した組成物および検出分析の方法を含む。これは、疾患の発現後さまざまな期間で患者サンプル中に存在する、最低二つの抗原に結合する担体分子の使用により得られる。

10

【0032】

特に、担体分子は最低二つの捕捉因子を含み、さらに最低一つの検出因子を含み得る。各捕捉因子は異なる抗原あるいは標識に結合する。検出因子は、担体の一部であるか、あるいは単独で添加され得る。検出因子は、さまざまな結合部位で、捕捉因子と結合した抗原に特異的に結合する。検出因子はさらに、検出因子に結合しているかあるいはサンプル中に単独で添加される検出プローブを含む。

【0033】

本発明はさらに、反応混合物を形成するために、ヒトあるいは動物由来のサンプルを、それぞれ異なる抗原に対する結合特異性を持つ最低二つの捕捉因子を含む担体分子と接触させることを含む、サンプル中の最低二つの抗原の存在を測定するための方法を含む。検出因子はその後反応混合物に添加され、検出プローブは検出因子に結合しているか、あるいは反応混合物に添加される。サンプル中の最低二つの抗原の濃度は、その後測定される。

20

【0034】

本発明の免疫化学分析は、好ましくは心筋梗塞の発現を検出するために用いられる。一見地にしたがって、本発明は、心筋梗塞を検出するための方法を示し、前記方法は、反応混合物を形成するために、患者サンプルを二つの捕捉因子を包含する担体分子と接触させるステップを含む。捕捉因子の一つはGPBBの結合部位に結合し、他方の捕捉因子はトロポニンIの結合部位に結合する。検出因子は、反応混合物に添加され、ここで検出因子は試薬、好ましくはGPBBおよびトロポニンIに特異的なモノクローナル抗体を含み、そのため検出因子の結合部位は、固相に固定された捕捉抗体の結合部位とは異なる。検出因子はさらに検出プローブと結合する。本発明の免疫分析は、トロポニンIとGPBBの両方を同時に検出することができる。さらなる実施例は、捕捉因子と検出因子を伴う担体分子を含む。

30

【0035】

本発明の別の実施例にしたがって、サンプルは、疾患の進行を追跡し、あるいは継続する心筋梗塞を検出するために、例えば心筋梗塞の疑いの後のさまざまな時間に患者から採取され、本分析で試験される。

【0036】

本発明のさらなる実施例は、患者の心筋梗塞を検出するための方法を含み、前記方法は、患者から採取したサンプルを、抗GPBBモノクローナル抗体、抗心筋トロポニンIモノクローナル抗体および最低一つの検出因子を含む担体分子と接触させ、サンプル中のGPBBと心筋トロポニンIの濃度を検出することを含む。ここで検出因子は、捕捉因子が使用していない結合部位で、GPBBとトロポニンIの両方を結合する。本分析は、損傷の進行を監視し継続する梗塞を検出するために、長期間にわたって、新しいサンプルを用いて繰り返すことができる。

40

【0037】

本発明の一実施例にしたがって、捕捉因子、検出因子あるいはその両方は、抗体あるいは抗体断片である。本発明の好ましい実施例において、抗体は、単一特異性、二重特異性あるいは多重特異性抗体である。二重および多重特異性分子を調製する方法は、例えば、

50

合衆国特許 5 2 6 0 2 0 3 号、5 4 5 5 0 3 0 号、4 8 8 1 1 7 5 号、5 1 3 2 4 0 5 号、5 0 9 1 5 1 3 号、5 4 7 6 7 8 6 号および 5 0 1 3 6 5 3 号に開示され、これらは全体で引用例としてここに組み込まれている。

【 0 0 3 8 】

好ましい実施例において、二重特異性あるいは多重特異性抗体は、検出される分子に対する特異性を持つ第一可変領域と、第二の分子に対する特異性を持つ第二可変領域を持つ。抗体はポリマーと連結し、ここでポリマーは最低 1 つあるいはそれ以上、好ましくは 2 つあるいはそれ以上の検出分子と結合する。

【 0 0 3 9 】

特に、検出抗体は、検出される二つの関連抗原に特異的な最低二つの結合領域と、単独で添加されるプローブに特異的な別の結合領域を含む。

10

【 0 0 4 0 】

本発明の一実施例にしたがって、抗体の一部は、抗体複合体を形成するために互いに結合する。抗体複合体はヘテロ抗体を含み、ヘテロ抗体は、互いに結合した二つあるいはそれ以上の抗体あるいは抗体断片を示し、ここで抗体複合体は異なる特異性を持つ最低二つの結合領域を持つ。これらの異なる特異性は、例えば、検出プローブの結合部位に対する結合特異性と、G P B B および心筋トロポニン抗原等の二つの関連する抗原に対する二つの結合特異性を含み得る。

【 0 0 4 1 】

本発明の別の実施例にしたがって、抗体あるいは抗体断片は組み換え技術により作製される。本発明の好ましい実施例において、抗体あるいは抗体断片はモノクローナル抗体である。別の実施例において、抗体あるいは抗体断片は、個々のモノクローナル抗体の単離、各特異的抗体のジスルフィド結合の破壊およびそれに続く *in vitro* での抗体重鎖、軽鎖ポリペプチドの組み換えにより産生される（例えば、Arathoon et al. , WO 9 8 / 5 0 4 3 1 参照）。また別の実施例において、本発明は免疫化学分析において一つあるいはそれ以上のキメラ抗体を用いる。

20

【 0 0 4 2 】

本発明の抗体は、抗体をペプシンあるいはパパイン等の酵素で処理することにより生成することができる、F (a b) および F (a b ') 2 等の免疫グロブリン分子の免疫学的活性断片を含む。抗体の免疫学的活性断片を生成、発現させる方法の例は、合衆国特許 5 6 4 8 2 3 7 号に示されており、これは全体で引用例としてここに組み込まれている。

30

【 0 0 4 3 】

免疫グロブリン分子は、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンおよびミュー定常領域と任意の数の免疫グロブリン可変領域を含む遺伝子によりコード化される。軽鎖はカッパあるいはラムダに区分される。軽鎖は、可変軽鎖 (V L) および定常軽鎖 (C L) ドメインを含む。重鎖はガンマ、ミュー、アルファ、デルタあるいはイプシロンに区分され、これらは順番にそれぞれ免疫グロブリンクラス I g G 、 I g M 、 I g A 、 I g D および I g E を規定する。重鎖は、可変重鎖 (V H) 、定常重鎖 1 (C H 1) 、ヒンジ、定常重鎖 2 (C H 2) および定常重鎖 3 (C H 3) ドメインを含む。ヒト I g G 重鎖はさらに、配列の違いに基づいてサブクラスに分けられ、サブクラスは I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 および I g G 4 のように指定される。

40

【 0 0 4 4 】

抗体はさらに、二組みの軽鎖および重鎖ドメインに分解することができる。一組の V L および V H ドメインはそれぞれ、抗体抗原認識ドメインを構成する一連の 7 つのサブドメイン、枠組み領域 1 (F R 1) 、相補性決定領域 1 (C D R 1) 、枠組み領域 2 (F R 2) 、相補性決定領域 2 (C D R 2) 、枠組み領域 3 (F R 3) 、相補性決定領域 3 (C D R 3) 、枠組み領域 4 (F R 4) を含む。

【 0 0 4 5 】

別の実施例において、本発明は、ポリペプチドリンカーによって重鎖の可変ドメインに融合させた軽鎖の可変ドメインにより構成される融合ポリペプチドを通常含む単鎖抗体 (

50

s c F v) を用いる。

【 0 0 4 6 】

検出は、抗体の検出可能ラベルへの結合により、容易にすることができる。検出可能ラベルの例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、分散染料および金粒子を含むが、これらに限定されない。前記の検出可能ラベルとして適切なものの例としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼあるいはアセチルコリンエステラーゼ等の適切な酵素が含まれ、適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれるがこれらに限定されず、適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセイン イソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン フルオレセイン、ダンシル クロライドあるいはフィコエリトリンが含まれるがこれらに限定されず、発光物質の例としては、ルミノールが含まれるがこれらに限定されず、生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが含まれるがこれらに限定されず、適切な放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{99}Tc あるいは ^{65}Zn が含まれるがこれらに限定されない。抗体は、同一あるいは異なる検出ラベルに結合させることができる。

10

【 0 0 4 7 】

市販の抗体は、例えば ATCC、RTM、から購入し、検出因子を生成するために用いることができる。本発明の好ましい実施例において、抗体は市販のハイブリドーマ細胞系列により作製される。より好ましい実施例において、ハイブリドーマはヒト抗体を分泌する。

20

【 0 0 4 8 】

血清酵素の検出用の全ての既存の ELISA、ラジオイムノアッセイおよびディップステック分析と、抗体を利用する任意の分析は、感度を増強させるために、本発明の方法にしたがって修正することができる。加えて、本発明の方法を用いて標的シグナルを増強するための *in vivo* での使用もまた可能である。

【 0 0 4 9 】

本発明の捕捉因子は、この分野における通常の知識を有する者に知られた方法で、固相面に直接付着させることができ、あるいは免疫分析インキュベーション (*in situ*) の間、固定することができる。捕捉因子は、好ましくは担体分子の表面に固定される。担体分子の表面に捕捉因子を固定する方法は、特定の方法に限定されず、例えば受動吸収、共有結合、物理的捕捉等を含む。例えば、固相面はアビジンあるいはストレプトアビジンでコーティングすることができ、またあるいは検出因子はアビジンあるいはストレプトアビジンで標識することができる。

30

【 0 0 5 0 】

あるいは、捕捉因子あるいは検出因子は、関連抗原を包含する生物学的流動体に、液相において添加することができる。けれども、捕捉因子と検出因子は好ましくは担体分子の表面に固定される。

【 0 0 5 1 】

本発明の一実施例にしたがって、抗体は、ここに列挙された一つあるいはそれ以上のタンパク質に対する特異的結合親和性を持つ。例えば、ある抗体はトロポニン T に対する特異的結合親和性を持たず、トロポニン I のみに対して特異的結合親和性を持つ。あるいは、ある抗体はトロポニン I とトロポニン T の両方に特異的に結合し得る。ある抗体は、例えば (a) この抗体が二つのタンパク質中に保存された別個のエピトープに結合するために、あるいは (b) この抗体が二つのタンパク質上の別個の近接したエピトープに結合するために、二つあるいはそれ以上のタンパク質に対する特異的結合親和性を持つ。例 (a) において、抗体は別個にタンパク質に結合し得るが、例 (b) においては、抗体は、タンパク質が互いに複合体の状態にある場合に、タンパク質に結合し得る。

40

【 0 0 5 2 】

心臓から放出されたトロポニンの形態、すなわち単独か、二成分あるいは三成分複合体

50

かは、心臓の特定の状態を示唆し得る。ここに開示された分析法は、医師が例えば心筋梗塞と比較した不安定狭心症といった患者の状態を診断することあるいは梗塞が起きた時間を決定することを可能にする、標識の放出パターンの分析法を提供する。

【0053】

本発明の別の実施例にしたがって、担体分子は、トロポニンIあるいはトロポニンTに特異的な抗体と、GPBBに特異的でさらに一つあるいはそれ以上の検出プローブに結合した第二の抗体を含む。トロポニンIは、筋収縮組織の細いフィラメント上に位置するトロポニン複合体の三つのサブユニットの一つである。このトロポニン複合体は、筋収縮プロセスの制御において中心的な役割を果たし、したがってこれら三つのサブユニットは調節タンパク質と呼ばれる。その他の(TおよびCと指定される)二つのサブユニットもまた、心筋組織および骨格筋組織の両方において、トロポニンIと同様に細い筋フィラメント上に固定される。トロポニンIは、心筋組織、遅筋骨格筋組織および速筋骨格筋組織において異なる遺伝子によりコード化されている。ヒトにおいて、アミノ酸配列のおおよそ60%が、これら三つの型のトロポニン間で相同である。心筋型の異なる領域により、二つの骨格筋型と交差反応しない抗体の作製が可能となり、それにより心筋特異的試験が可能となる。

10

【0054】

Cummins, et al., American Heart Journal 113: 1333-1344 (1987) は、ヒト血清における心筋トロポニンIの測定のためのラジオイムノアッセイの開発について記載している。この分析は、トロポニンIの骨格筋型とのかなりの交差反応性を持つポリクローナル抗体を利用し、そのため、心筋梗塞の診断の確実性という点においてその価値は抑えられた。加えてこの試験は、血清中の低レベルのトロポニンIの検出に十分な感度を有していなかった。

20

【0055】

Bodard, et al., Clinical Chemistry 38: 2203-2214 (1992) は、血清中のトロポニンIに対する二モノクローナル抗体“サンドイッチ”分析法の開発について記載している。この分析法はマウスモノクローナル抗体を用いることで、改善された心筋特異性を示したが、この分析法の不確実性は、臨床試験としては許容し難いほど高かった(変動係数11-21%)。

【0056】

本発明の一見地にしたがって、サンプル中の最低二つの関連する生化学的標識を検出するためのキットが提供される。キットは、最低二つの捕捉因子と最低一つの検出因子を含む担体分子を含み、各捕捉因子は一つの抗原の結合部位に特異的に結合し、検出因子は同一の抗原に異なる結合部位を介して結合する。検出因子はさらに、検出因子と結合しているか、あるいはサンプルに単独で提供される検出プローブを含む。

30

【0057】

本発明の別の見地にしたがって、in vitroあるいはin vivoで最低二つの生化学的標識と結合できる診断用あるいは治療用組成物が開示される。特に、組成物は最低二つの抗原に対する結合特異性を持つ最低二つの捕捉因子を持ち、さらに同じ抗原に対する結合特異性を持つ検出因子を含み、またさらに検出プローブを含む担体分子を含む。一実施例において、検出因子は、組み換え技術により発現させた、トロポニンIおよびGPBBに対する二重特異性抗体である。別の実施例において、検出因子は、トロポニンとGPBBのそれぞれに対する二つのモノクローナル抗体を含む。

40

【0058】

ここで、また請求の範囲において用いられるように、単数形の記載は、文脈から明らかに異なることが示されている場合を除いて、複数形も含む。したがって、例えば“化合物”という記載は、一つあるいはそれ以上の前記化合物についての言及であり、この分野における通常の知識を有する者に知られたそれらの相当物等を含む。

【0059】

別に定義されている場合を除いて、ここで用いられる全ての技術用語および科学用語は

50

、本発明の属する分野における通常の知識を有する者に一般的に理解されている意味と同じ意味を持つ。ここに開示されたものと類似あるいは同等の方法、装置および材料を本発明の方法あるいは試験に用いることができるが、好ましい方法、装置および材料は、以下に開示される。ここに記載された全ての刊行物および特許は、例えば、刊行物中に記載された構成や方法論を開示する目的で引用例としてここに組み込まれており、これらは本発明と関連して使用され得る。上記の、また全体にわたって論じられた刊行物は、本発明の出願日前の公開のみによって提供される。先行発明の効力によって、発明者が前記開示を先行する資格がないと認めていると解釈されるべきものはここにはない。

【 0 0 6 0 】

処方設計、工程段階および材料は多少異なり得るため、本発明が、ここに開示された特定の処方設計、工程段階、材料に限定されないことは理解されるべきである。本発明の範囲は、請求の範囲およびそれに相当するもののみにによって限定されるものであるため、ここで使用された専門用語は、特定の実施例を記載する目的のみのために使用され、限定することを意図していないこともまた理解されるべきである。本出願を通じて引用された全ての引例、特許および公開された特許出願の内容は、引用例として明確にここに組み込まれている。

【 実施例 1 】

【 0 0 6 1 】

虚血性心臓の診断のための免疫化学分析

本免疫化学分析は、二つの異なるモノクローナル抗体 (m A b)、一つは早期発現標識 G P B B に対するもの、他方は後期発現標識トロポニン I に対するもの、を用いる 2 部位結合分析を包含する、固相担体分子の使用に基づくものである。二つの m A b s は、固相上の異なる部位で取り込まれる。取り込まれた抗体は、患者の血中に存在する標を特異的に結合する“捕捉抗体”として働く。早期発現標識と後期発現標識上の異なるエピトープに対するさらなる抗体は、酵素、蛍光染料、分散染料あるいは金粒子で標識される。この抗体は、固相の部位 1 および 2 に付着した抗原に対する“検出抗体”として働く。早期発現標識と後期発現標識に対する捕捉 m A b s の両者は、標識上の異なるエピトープに結合し、そのため、2 部位結合試験が可能となる。例えば胸痛の発症後 2 - 4 時間といった、急性心筋梗塞 (A M I) の初期段階は、固相上の部位 1 で測定可能であることが、データに示されている。A M I のピーク (胸痛の発症後 4 - 1 6 時間) は部位 1 および 2 で測定可能であり、A M I の末期 (2 4 時間以降) は部位 2 のみで測定可能である。

【 実施例 2 】

【 0 0 6 2 】

トロポニン I の精製

マウス抗トロポニン I 抗体を作製するために、心筋トロポニン I を最初に、以下の S y s k a e t a l . , F E B S L e t t e r s 4 0 : 2 5 3 - 2 5 7 (1 9 7 4) の方法を用いて単離する。約 5 0 0 m g のトロポニン I を、1 0 m M リン酸カリウム、1 M 塩化カリウム、p H 6 . 5 (結合緩衝液) で 5 0 m l のゲルを洗浄することにより、A C T I G E L - A L D ゲル (S t e r o g e n e C o r p o r a t i o n , A r c a d i a , C a l i f .) に結合させる。トロポニン C をその後ゲルに添加し、シアノボロ水素化ナトリウムを最終濃度の 0 . 1 M となるまで添加する。その結果得られた懸濁液を室温で 4 時間攪拌し、ゲルを回収するためにカラム中に注ぐ。その後ゲルを 2 2 5 m l の結合緩衝液で洗浄する。ゲルをカラムから取り出し、0 . 1 M エタノールアミンを包含する 1 5 0 m l の 1 0 m M リン酸カリウム、1 M 塩化カリウム、p H 6 . 5 に添加する。シアノボロ水素化ナトリウムを、最終濃度の 0 . 1 M となるまで懸濁液中に添加する。未反応の結合基を阻止するために、懸濁液を 4 で一晩攪拌する。その後ゲルをカラムに戻し、1 5 0 m l の結合緩衝液で洗浄し、最後に 0 . 1 5 M 塩化ナトリウムと 0 . 0 5 % アジ化ナトリウムを包含する 1 0 0 m l の 1 0 m M リン酸ナトリウム、p H 7 . 2 で洗浄する。

【 0 0 6 3 】

10

20

30

40

50

ヒト心臓を切り取り、4 で1 cm角に切断する。その結果得られた組織を、室温で、8 M尿素、15 mMメルカプトエタノールおよび1 mM塩化カルシウムを含む75 mMトリス緩衝液、pH 8.0（抽出緩衝液）の750 mlでホモジナイズする。

【0064】

その結果得られたホモジネートを7000 × gで30分間遠心分離し、その結果得られた上清液を、粒子を除去するために目の粗い薄地の綿布を通して濾過する。上述のように調製したトロポニンC結合ゲルをカラム中に配置し、室温において250 mlの抽出緩衝液で洗浄する。ゲルをカラムから取り出し、濾過した心臓抽出物に添加する。その結果得られた懸濁液を室温で80分間攪拌し、その後7000 × gで20分間遠心分離する。上清液を排除し、ペレット状のゲルを抽出緩衝液とともにカラム中に移す。カラムを室温で、全量700 mlの抽出緩衝液で洗浄し、精製トロポニンIをその後、8 M尿素、15 mMメルカプトエタノール、10 mMエチレンジアミン四酢酸を含む75 mMトリス緩衝液、pH 8.0（溶出緩衝液）でカラムから溶出する。相当量のトロポニンIを含む分画をまとめて溜め、10 mMエチレンジアミン四酢酸と15 mMメルカプトエタノールを含む75 mMトリス緩衝液、pH 8.0に添加する。その結果得られた溶液を窒素圧下で濃縮する。

10

【実施例3】

【0065】

マウス抗トロポニンI抗体の調製

上記実施例2の方法で得られた精製トロポニンIを、等量の完全フロイントアジュバントと混合する。その結果得られた混合物を、初期免疫原を構成する水性/油性エマルジョンを産生するためにホモジナイズする。マウスを、始めに250 μgの心筋トロポニンIを含む免疫原の注入により免疫する。その後マウスに、250 μg - 500 μgの精製心筋トロポニンIを免疫原として毎月一回注入し、その後、マウス抗トロポニンI血清を供給するために、注入の約7 - 10日後、毎月採血する。

20

【実施例4】

【0066】

心筋特異的トロポニンI抗体の単離および精製

実施例3において調製した抗血清を回収し、その56 mlを0.15 M塩化ナトリウムを含む5 mMイミダゾール緩衝液、pH 7.2の56 mlで希釈する。抗血清中のプロテアーゼを阻害するために、フェニルメチルスルフォニルフルオリド（PMSF）、ロイペプチン、アプロチニンおよびペプスタチンAをそれぞれ最終濃度が15 μg/ml、0.5 μg/ml、0.5 μg/ml、0.75 μg/mlとなるまで添加する。実施例2において調製した合成ペプチドゲルを、希釈抗血清に添加し、室温で1時間攪拌する。その結果得られた混合物をカラム中に移し、室温で、1 M塩化ナトリウムおよび0.05%アジ化ナトリウムを含む5 mMイミダゾール、pH 7.2の55 mlで洗浄する。精製心筋特異的抗体を、55 mlの第一溶出緩衝液とそれに続く55 mlの第二溶出緩衝液（3 Mチオシアン酸ナトリウムおよび0.05%アジ化ナトリウムを含む5 mMイミダゾール、pH 7.2）で、ゲルから溶出させる。これらの溶出液の両方に含まれる精製抗体を、0.15 M塩化ナトリウムを含む5 mMイミダゾール、pH 7.2に対して最終希釈率が10⁶となるまで透析し、窒素圧下で約25 mlまで濃縮し、その後0.15 M塩化ナトリウムおよび0.05%アジ化ナトリウムを含む10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.2において最終希釈率が10⁹となるまで透析する。次に、その結果得られた透析物を、不溶性物質を除去するために、7000 × gで15分間遠心分離する。その結果得られた、精製された心筋特異的トロポニンI抗体を含む上清液のタンパク質濃度を分光光度法で測定する。

30

40

【実施例5】

【0067】

トロポニンI - アルカリホスファターゼ結合体の調製

実施例3の方法で調製したトロポニンIを、以下の方法で、アルカリホスファターゼと

50

化学的に結合する。トロポニン I を $25 \mu\text{l}$ の S A T A (N - スクシンイミジル S - アセチルチオアセレート) で処理する。反応溶液を室温で 30 分間攪拌した後、溶液を、 2 mM E D T A を含む 50 mM リン酸ナトリウム、 $\text{pH} 7.5$ の 2 リットルに対して、4 で一晚透析する。ヒドロキシルアミンを最終濃度 50 mM となるまで添加し、溶液を室温で 2 時間置くことにより、S A T A で修飾したトロポニン I からアセチル基を取り除く。次に、修飾されたトロポニン I は、 2 mM E D T A を含む 30 mM トリエタノールアミン、 $\text{pH} 7.2$ の 2 リットルに対して、一晚透析する。 1.55 ml 量における、仔牛腸管由来のアルカリホスファターゼ (A P) (B i o z y m e C o r p o r a t i o n , S a n D i e g o , C a l i f .) の 6 mg をガラス試験管に入れる。スルホ S M C C (スルホスクシンイミジル 4 - N - マレイミドメチル シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート) の新鮮溶液を、純水で、 $5 \text{ mg} / \text{ml}$ の濃度で調製する。全量 $87 \mu\text{l}$ の S M C C 溶液を A P に添加し、室温で 1 時間攪拌する。

10

【 0 0 6 8 】

その後、修飾 A P 溶液を、 5 mM 塩化マグネシウムおよび 1 mM 塩化亜鉛を含む 30 mM トリエタノールアミン、 $\text{pH} 7.2$ に対して、4 で一晚透析する。S A T A 修飾トロポニン I の全量 1.35 mg を、 4 mg の S M C C 修飾 A P と混合し、4 で 24 時間攪拌する。メルカプトエチルアミンおよびヨードアセトアミドを、最終濃度 10 mM となるまで溶液に添加し、室温で 20 分間攪拌する。その後、その結果得られた A P 結合トロポニン I を、未反応生成物から A P トロポニン I 結合体を精製するために、S E P H A C R Y L S - 300 のカラム (P h a r m a c i a B i o t e c h I n c . , P i s c a t a w a y , N . J .) に通す。

20

【 実施例 6 】

【 0 0 6 9 】

トロポニン I 免疫分析競合結合

実施例 4 にしたがって調製した精製トロポニン I 抗体を、 0.05% アジ化ナトリウムを含む 100 mM クエン酸ナトリウム、 $\text{pH} 4.0$ 中に、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ となるまで希釈する。ポリスチレン マイクロタイター プレートを、 $100 \mu\text{l}$ 量の抗体で、室温で一晚コーティングする。マイクロタイタープレートを、 1 M 塩化トリウムを含む 10 mM トリス緩衝液、 $\text{pH} 7.2$ で 3 回洗浄し、 10 mM トリス、 $\text{pH} 7.2$ 、 10% グリコン酸、 1% ウシ血清アルブミン、 0.05% P R O C L I N (登録商標) 300、5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアキソリン - 3 - オン (C A S 26172 - 55 - 4)、2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン (C A S 2682 - 20 - 4)、アルキルカルボキシレート、修飾グリコールを含む溶液でブロッキングする。余分な液体をマイクロタイタープレートウェルから吸引し、プレートを室温で乾燥させる。その後、抗体をコーティングしたプレートを使用するまで 4 で保存する。実施例 2 に示したように調製した精製心筋トロポニン I を、免疫分析用の基準を得るために、最終濃度 5、25 および $50 \text{ ng} / \text{ml}$ となるまで、トロポニン I を含まない正常ヒト血清中で希釈する。トロポニン I 標識アルカリホスファターゼを、 50 mM トリエタノールアミン、 $\text{pH} 7.4$ 、 1 mM 塩化マグネシウム、 0.1 mM 塩化亜鉛および 0.05% アジ化ナトリウムで、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 濃度となるまで希釈する。

30

40

【 0 0 7 0 】

血清サンプルあるいはトロポニン I 基準を、事前に調製した抗体をコーティングしたマイクロタイタープレートウェルにそれぞれ添加する。その後、トロポニン I 標識 A P ($80 \mu\text{l}$) をウェルに添加し、室温で 2 時間培養する。次にマイクロタイタープレートウェルを、 5 mM 塩化マグネシウム、 0.1 mM 塩化亜鉛、 0.02% T W E E N 20 を含む 25 mM ジエタノールアミン、 $\text{pH} 9.80$ 中で、純水および $0.83 \text{ mg} / \text{ml}$ パラニトロフェニルリン酸の基質溶液 ($100 \mu\text{l}$) で 5 回洗浄し、 0.05% P R O C L I N (登録商標) 300 をその後全てのウェルに添加する。基質溶液を室温で 30 分間培養し、 $100 \mu\text{l}$ の 2 N 水酸化ナトリウムを添加して反応を停止させる。その後、マイクロタイタープレート中の溶液の吸光度を、適切な読み取り機を用いて 405 nm で読み取る。

50

【実施例 7】

【0071】

ビオチン化トロポニン抗体アビジン - H S 磁気ラテックスの調製

ジメチルホルムアミド中で 40 mM のビオチン - スクシンイミジルエステル (6 - ((6 - ((ビオチノイル) アミノ) ヘキサノイル) アミノ) ヘキサン酸、スクシンイミジルエステルを、ビオチン / 抗体が 20 / 1 の最終モル比を得るために、50 mM ホウ化カリウム、150 mM 塩化ナトリウム、pH 8.2 (BBS) 中で 2 mg / ml の抗体溶液に攪拌しながら徐々に添加する。溶液を室温で 2 時間培養し、その後溶液を 4 で最低 12 時間透析する。

【0072】

水溶液中 10 % 固体のエスタポール常磁性ラテックス粒子の 1 ml を、50 mM トリス塩酸塩、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.5 中で 0.55 mg / ml のアビジン - H S (Scripps Laboratories, San Diego, Calif.) の 9 ml に添加する。ラテックス溶液を 45 で 2 時間培養する。ラテックスを 10 ml BBS で 3 回洗浄し、10 ml BBS 中で再懸濁する。

10

【実施例 8】

【0073】

ヒト心筋トロポニン I およびトロポニン T の免疫分析

以下の免疫分析を、ヒト血清、血漿中あるいは精製タンパク質を含む溶液中に存在するトロポニン I およびトロポニン T を検出するために用いる。

20

【0074】

トロポニン I あるいはトロポニン T を含むサンプルを、10 mM 3 - (N - モルホリノ) プロパンスルホン酸、650 mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウム、0.1 mM 塩化亜鉛、1 mg / ml ポリビニルアルコール (10000 mw)、10 mg / ml ウシ血清アルブミン、1 mg / ml アジ化ナトリウム、pH 7.0 を含む分析緩衝液中に、1 - 10 ng / ml トロポニン I あるいはトロポニン T となるまで希釈する。マイクロタイタープレートウェル中の希釈サンプルの 25 μ l に、反応混合物を形成するために、2.5 μ g / ml の抗トロポニン I あるいは抗トロポニン T 抗体結合体と 2.5 μ g / ml のビオチン化抗トロポニン I あるいは抗トロポニン T ポリクローナル抗体を含む分析緩衝液の 50 μ l を添加する。反応混合物を室温で 30 分間培養した後、アビジン - H S をコーティングした磁気ラテックスの 25 μ l (緩衝液中 0.5 % ラテックス) をマイクロタイタープレートウェルに添加し、続いて室温で 5 分間培養する。磁気ラテックスをペレット状にし、BBS - Tween (20 mM ホウ酸塩、150 mM 塩化ナトリウム、0.1 mg / ml アジ化ナトリウム、0.02 % ポリオキシエチレン - 20 - ソルビタン モノラウレート (Tween - 20)、pH 8.2) で 2 回、TBS (40 mM トリス、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.5) で 1 回洗浄する。ペレットを、使用説明書にしたがって ELISA 増幅試薬 (Gibco GRL, Gaithersburg, Md.) 中に再懸濁する。増幅の完了後、磁気ラテックスをペレット状にし、着色した上清の 80 μ l を新しいマイクロタイタープレートに移す。マイクロタイタープレート読み取り機を用いて、490 nm で吸光度を測定する。

30

40

【0075】

上記記載の観点において、本発明の多くの修正および変更が可能である。したがって、請求の範囲内において、本発明は特異的に開示されている以外のものも保護され得ることは理解されるべきである。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/37861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : G01N 33/53, 33/573, 33/534, 33/533, 33/543

US CL : 435/7.1, 7.4, 7.9, 7.92, 975; 436/545, 546, 518

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)

U.S. : 435/7.1, 7.4, 7.9, 7.92, 975; 436/545, 546, 518

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LANG, K. et al. Comparison of biochemical markers for the detection of minimal myocardial injury: superior sensitivity of cardiac troponin - T ELISA. J. Int. Med. January 2000, Vol. 247, pages 119-123, especially pages 119 and 120.	1-20
Y	BODOR, G.S. et al. Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. Clin. Chem. 1992, Vol. 38, No. 11, pages 2203-2214, especially Materials and Methods.	1-20
Y	CUMMINS, B. et al. Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. Am. Heart J. June 1987, Vol. 113, No. 6, pages 1333-1344, especially Methods and Results.	1-20
Y	Mair, J. Glycogen phosphorylase isoenzyme BB to diagnose ischaemic myocardial damage. Clin. Chim. Acta 1998, Vol. 272, pages 79-86, especially sections 2, 3 and 4.	1-20
X	EP 0 949 508 A1 (DAKO A/S) 13 October 1999 (13.10.1999), claims.	1, 7-14 and 16-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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 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

"I"

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

21 April 2003 (21.04.2003)

Date of mailing of the international search report

12 JUN 2003

Name and mailing address of the ISA/US

Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

S. DeW, Ph.D.

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/37861

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

PCT/US02/37861

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-11, 19 and 20, drawn to a method of determining the presence of at least two antigens in a sample.

Group II, claim(s) 12-18, drawn to a diagnostic kit comprising a carrier with two capture agents and a detection agent.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

A diagnostic kit comprising a carrier having at least two capture agents and a detection agent is the special technical feature of the instant application. However, such a kit is already disclosed in the prior art, for example, by Staffeldt Schou et al. (EP 0 949 508 A1). See claims 27-29. Since the apparent unifying feature is already disclosed in the prior art, unity of invention does not exist between groups I and II, because the unifying feature is not a special technical feature.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

DIALOG, WEST, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

troponin, GPBB or glycogenphosphorylase, simultaneous detect?, heart or cardiac, myocardial infarction, kit

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

专利名称(译)	免疫测定和免疫测定试剂盒，用于快速同时检测患者样品中的生化标记		
公开(公告)号	JP2005510696A	公开(公告)日	2005-04-21
申请号	JP2003547575	申请日	2002-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	DIAGENICS INT		
申请(专利权)人(译)	迪亚杰弗里尼克斯国际公司		
[标]发明人	ノルフランツ		
发明人	ノル,フランツ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/573 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N33/54393 G01N33/573		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.501.D		
代理人(译)	丹羽浩之		
优先权	60/333133 2001-11-27 US		
其他公开文献	JP2005510696A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明包括用于测量样品中至少两种抗原的免疫化学分析。所述免疫化学分析涉及使取自患者的样品与包含至少两种捕获抗体的载体分子接触，所述捕获抗体各自特异性结合样品中抗原的结合位点。所述分析还包括检测抗体，其在与捕获抗体使用的结合位点不同的结合位点上特异性结合相同的抗原。另外，检测因子附着于一个或多个检测探针，其有助于检测样品中的抗原。本发明的免疫化学分析专门设计用于检测在患者样品中的不同时间点释放的生化标记。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/97861
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC Cl. : G01N 33/53, 33/573, 33/584, 33/585, 33/586 US Cl. : 435/7, 1, 7, 4, 7, 9, 7, 92, 975, 436/542, 540, 218 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) U.S. : 435/7, 1, 7, 4, 7, 9, 7, 92, 975, 436/542, 540, 218		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Please see Continuation Sheet		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please see Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim NO.
X	LARU, K. et al. Comparison of biochemical markers for the detection of myocardial infarction: superior sensitivity of cardiac troponin. T. ELISA. J. Int. Med. January 2000, Vol. 247, pages 1-9, 125, especially pages 119 and 125.	1-20
Y	BODOR, G.S. et al. Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. Clin. Chem. 1992, Vol. 38, No. 1, pages 2203-2216, especially Materials and Methods.	1-20
Y	CUMMINS, D. et al. Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. Am. Heart J. June 1987, Vol. 113, No. 6, pages 1333-1344, especially Methods and Results.	1-20
Y	Mair, J. Glycogen phosphorylase isoenzyme Rb to diagnose ischemic myocardial damage. Clin. Chim. Acta 1998, Vol. 272, pages 98-106, especially sections 2, 3 and 4.	1-20
X	EP 0 549 508 A1 (DARO A/S) 13 October 1999 (13.10.1999), claims.	1, 7-14 and 16-18
☐ Further documents are listed in the continuation of this C. ☐ See patent family annex.		
A documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier applications or prior art published on or after the international filing date *C* documents which may change the state of the art (standards) or which are cited to establish the prior art of the invention (standards) or which are cited to establish the prior art of the invention (standards) *D* documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *E* documents published prior to the international filing date but later than the date of the actual completion of the international search		
Date of mailing of the international search report 21 April 2003 (21.04.2003) Name and mailing address of the ISA/US International Patent Office P.O. Box 1000 Washington, D.C. 20044 Telephone No. (703) 595-3230		Date of mailing of the international search report 12 JUN 2003 Name and mailing address of the ISA/US International Patent Office P.O. Box 1000 Washington, D.C. 20044 Telephone No. (703) 595-3230

Form: PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)