

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-107509

(P2010-107509A)

(43) 公開日 平成22年5月13日(2010.5.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 27/26 3 O 1 B	
GO 1 N 33/561 (2006.01)	GO 1 N 27/26 3 3 1 E	
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/561	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/536 Z	
	GO 1 N 33/53 N	
審査請求 未請求 請求項の数 15 O L 外国語出願 (全 18 頁)		

(21) 出願番号 特願2009-244569 (P2009-244569)  
 (22) 出願日 平成21年10月23日 (2009.10.23)  
 (31) 優先権主張番号 08168195.9  
 (32) 優先日 平成20年11月3日 (2008.11.3)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 509294380  
 ヘレナ ラボラトリーズ (ユナイテッドキ  
 ングダム) リミテッド  
 HELENA LABORATORIES  
 (UK) LTD.  
 イギリス国, タイン アンド ウェアー  
 エヌイー11 オエスディー, ゲーツヘッ  
 ド, チーム バレー トレーディング エ  
 ステート, クイーンズウェイ サウス (番  
 地なし)  
 (74) 代理人 100085545  
 弁理士 松井 光夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫置換電気泳動

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 標的化合物又は標的化合物の集団を含みうる試料の分析の為の方法に関する。

【解決手段】 該標的化合物又は標的化合物の集団のための結合性パートナーと該試料の少  
 なくとも一部とを混合すること、該結合性パートナーは、(i) 該標的化合物に特異的に  
 結合することができるセグメント及び(ii) ポリアニオン性ポリマーセグメントを含むマ  
 クロ分子である；及び該結合性パートナーが正味の負電荷を有する分離媒体中で、該結合  
 性パートナーを含む該試料を電気泳動により分離することを含む。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

標的化合物又は標的化合物の集団を含みうる試料の分析の為の方法であって、

該標的化合物又は標的化合物の集団のための結合性パートナーと該試料の少なくとも一部を混合すること、該結合性パートナーは、(i) 該標的化合物に特異的に結合することができるセグメント及び(ii) ポリアニオン性ポリマーセグメントを含むマクロ分子である；及び

該結合性パートナーが正味の負電荷を有する分離媒体中で、該結合性パートナーを含む該試料を電気泳動により分離することを含む上記方法。

10

**【請求項 2】**

該標的化合物又は標的化合物の集団が、血清タンパク質の群から、特に血清イムノグロブリン、マクログロブリン及びミクログロブリンの群から、選ばれる請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

該ポリアニオン性セグメントが、ポリアニオン性のポリ(アミノ酸)、ポリ(カルボン酸)、ポリ(スルホン酸)、ポリヌクレオチド、カルボキシ化ポリサッカライド、硫酸化ポリサッカライド及びホスホリル化ポリサッカライド、並びにそれらのコポリマーの群から選ばれる請求項 1 又は 2 に記載の方法。

20

**【請求項 4】**

該ポリアニオン性セグメントが、アミン側基の少なくとも過半がアニオン側基へと変形されているポリリシン、アミン側基の少なくとも過半がアニオン側基へと変形されているポリアルギニン、アミン側基の少なくとも過半がアニオン側基へと変形されているポリヒスチジン、アミン側基の少なくとも過半がアニオン側基へと変形されているポリアスパラギン、アミン側基の少なくとも過半がアニオン側基へと変形されているポリグルタミン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、カルボキシアルキルセルロース、ヘパリン、硫酸化デキストラン、ヒアルロン酸、ポリスルホン酸、ポリマレイン酸及びポリアクリル酸、並びにそれらのコポリマーの群から選ばれる、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

該ポリアニオン性セグメントが、アミン側基の少なくとも過半が、ポリカルボン酸又はそれらの無水物により修飾されているポリリシンの群から選ばれる、請求項 4 に記載の方法。

30

**【請求項 6】**

該ポリアニオン性ポリマーセグメントが、少なくとも 20 kD、好ましくは少なくとも 40 kD、より好ましくは少なくとも 50 kD の数平均分子量を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 7】**

該標的化合物に特異的に結合することができる該セグメントが、該標的化合物に対する抗原特異性を有する抗体、又は該標的化合物に対する抗原特異性を有する、抗体の断片である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

**【請求項 8】**

該試料の分離が、8.0 ~ 11.0 の pH、特に 9.0 ~ 10.7 の pH、より特に 9.5 ~ 10.5 の pH を有するバッファーを用いて実施される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 9】**

さらに、該試料の一部が、該結合性パートナーと混合されること無く、他は同じ条件下で、電気泳動を用いて分析され、そして、該部分の分析の結果と、該結合性パートナーと混合された後に分析された部分の分析の結果とを比較する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 10】**

50

該分析が、血清タンパク質の群から選ばれる化合物、特にイムノグロブリン、ミクログロブリン、マクログロブリン、トランスフェリン及び、炭水化物を欠くトランスフェリンの群から選ばれる化合物、の存在を定性的に及び/又は定量的に決定することを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1】

キャピラリー電気泳動による試料の分析における使用の為のキットであって、

- a) (i) 標的化合物に特異的に結合することができるセグメント及び(ii) ポリアニオン性ポリマーセグメントを含むマクロ分子を含む第 1 の容器；及び
- b) 電気泳動による該試料の分離の為のアルカリ性バッファーを含む第 2 の容器；
- c) 任意的にキャピラリー、その内壁は、該アルカリ性バッファーと接触したときに少なくとも一部が解離する酸性基を含む；及び
- d) 任意的に、該キャピラリーを洗浄するための洗浄流体を含む第 3 の容器、を含む上記キット。

10

【請求項 1 2】

該マクロ分子が、請求項 3、4、5、6 又は 7 のいずれか 1 項に定義されたものである、請求項 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 3】

少なくとも 20 kD、特に少なくとも 40 kD、より特に少なくとも 50 kD の数平均分子量を有するポリアニオン性ポリマーセグメントを含む修飾された抗体又はその抗原結合性断片、好ましくは該セグメントが請求項 3、4 又は 5 のいずれか 1 項に定義されたものである修飾された抗体又はその抗原結合性断片。

20

【請求項 1 4】

電気泳動分析において、(i) 分析されるべき試料中に存在しうる標的化合物又は標的化合物の集団に特異的に結合することができるセグメントと(ii) ポリアニオン性ポリマーセグメントとを含むマクロ分子、好ましくは請求項 3、4、5、6 又は 7 のいずれか 1 項に定義されたマクロ分子、を使用する方法であって、該試料中におけるその存在が決定されるべき 1 以上の他の化合物と一緒に移動しうる、該マクロ分子に結合していない該標的化合物又は標的化合物の集団の実効移動度を選択的に修飾する為に上記マクロ分子を使用し、それにより該 1 以上の(該マクロ分子に結合した) 干渉する化合物が、その存在が決定されるべき該 1 以上の化合物の移動ゾーンの外側に位置されたゾーンに移動する上記方法。

30

【請求項 1 5】

医学的疾患の診断の為の、特にガンマグロブリン血症、パラプロテイン血症、肝臓の病、アルコール依存症、タンパク尿症を含む腎臓の病気から選択される医学的疾患の診断の為の、請求項 1 1 若しくは 1 2 に記載されたキット、又は請求項 1 3 に定義された修飾された抗体若しくはその抗原結合性断片、ここで該診断は、体液試料の電気泳動分離の分析を含み、該分析が該キット又は修飾された抗体若しくはその抗原結合性断片を使用することを含む。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、電気泳動による試料の分析の為の方法であって、該試料中に存在しうる標的化合物又は標的化合物の集団のための結合性パートナーを使用する上記方法に関する。本発明はさらに、電気泳動分析における使用の為のキット、修飾された抗体又はその断片、及び該キット又は修飾された抗体若しくはそれらの断片の特定の使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

電気泳動は、何十年もの間、生物学的化合物、例えばタンパク質など、を含む試料を含む、種々の試料を分析する為のよく確立された方法である。

【0003】

50

長年にわたり、よく確立された方法が開発されてきた。例えば、一連の特徴的なバンドの血清タンパク質、一般には、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  - 1 及び 2 並びにアルブミンと呼ばれる、の電気泳動による分離が、当技術分野の当業者によく知られており、そして、幅広い参考資料、例えばハンドブック 'Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis' by David F. Keren, 2003, Arnold Publications' など、においてよく記載されている。

【0004】

一般に知られている方法は、特定の化合物が、特定の結合性パートナー、例えばその化合物に対する抗体など、との複合体化に付される技術を使用することを含む。そのような技術は、電気泳動分離に先立ち該試料から該化合物を除去する為に（抗体が結合性パートナーとして用いられる場合、典型的にはイムノサブトラクションと言われる）又は電気泳動の間のその化合物の電気泳動実効移動度を修飾する為に（抗体が結合性パートナーとして用いられる場合、免疫置換と呼ばれる）用いられうる。

10

【0005】

該結合性パートナーと複合体を形成する標的化合物は、同定されるべき化合物、例えばモノクローナル グロブリン血症 (gammopathy) についての指標でありうるモノクローナルイムノグロブリン、でありうる。該結合性パートナーが抗体である場合、この方法はイムノタイピングと言われうる。

【0006】

代わりに、該標的化合物は、妨害因子、すなわち、例えば関心のある分析物と一緒に移動することにより又は他の方法ではその存在をマスクすることにより、その存在が決定されるべき他の化合物についての試料の分析を潜在的に妨害する因子、例えばトランスフェリンの炭水化物欠損アイソフォームと非常に近接して移動し及びそれ故に過剰アルコール消費についての診断マーカーとしてのそれらの使用を妨害しうる  $\alpha_2$  - グロブリン、でありうる。

20

【0007】

キャピラリー電気泳動は、特定の形の電気泳動であり、キャピラリーが該電気泳動を実施する為に用いられる。キャピラリー電気泳動は、利点、例えば短い分析時間及び高い分解能など、を提供する。その存在が決定されるべき化合物（すなわち分析物）を含む試料のキャピラリー電気泳動分析の為の方法であって、該分析物についての結合性パートナーとして抗体を使用する上記方法が、国際公開第 95 / 20160 号パンフレットに記載されている。該方法は、

30

(a) 該試料の第 1 部分を、キャピラリー電気泳動により構成成分分析物部分へと分離すること、及び該部分の検出すること；

(b) 該試料の第 2 部分を、予め定められた候補分析物への少なくとも 1 つの特異的結合性パートナーと混合すること、該特異的結合性パートナーは該候補分析物の電気泳動移動度と異なる電気泳動移動度を有し、それ故に、形成された得られた複合体に、結合しなかった分析物と異なる電気泳動移動度を授ける；

(c) 該第 2 部分を、キャピラリー電気泳動により構成成分部分へと分離すること、及び該部分を検出すること；及び

40

(d) 工程 (c) の該分離された構成成分部分と工程 (a) の該分離された構成成分部分とを比較すること

を含む。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

特異的結合性パートナーとして、好ましくは、無水物、例えば無水コハク酸など、により化学的に修飾された抗体が、アルカリ性の pH で負の、追加的なカルボン酸官能基を該抗体に備える為に用いられる。実施例において記載された分析の条件下において (pH 10)、該修飾された抗体の全体の負電荷はそれ故に、修飾されていない抗体と比較して、

50

増加される。しかしながら、国際公開第95/20160号パンフレットの図1に示されたとおり、該修飾された抗体はなお、ヒトイムノグロブリン(IgG)と接近して移動し、及び特には、該修飾された抗体とIgGとの複合体が、複合体化していないIgGから十分に分離されない。1以上の血清タンパク質の存在について分析されるべき現実の生物学的試料(例えば、血液血清、尿、脳脊髄流体)において、該試料中の該修飾された抗体の電気泳動の移動及び特には抗体とイムノグロブリンとの複合体の電気泳動の移動は、それらが、血清タンパク質(それについて該試料が分析されるべきである)、例えば他のイムノグロブリン、トランスフェリン、アルブミン又はビス-アルブミン、と一緒に移動しうるとなるものだろう。

#### 【0009】

米国特許出願公開第2005/0164302号明細書は、生物学的試料の成分を分離し及び該分析されるべき生物学的試料中に存在しうるモノクローナルタンパク質のタイピングを許す免疫置換を実施する代替的方法を提案する。該方法が、該試料のタンパク質についての移動プロファイルに相当するゾーンの外側での、特には該グロブリン移動ゾーンの外側での、置換を許すことが言及されている。これは、特定の方法において該結合性パートナー(抗体)を修飾することにより達成されると述べられている。示された該特定の修飾は、抗体のトリカルボン酸無水物による修飾及びメリト酸による修飾である。実施例から、該修飾された抗体が、免疫置換が起こることにおける効果を有することが明白であるが、該試料の該修飾された抗体又は該試料の修飾された抗体とイムノグロブリンとの複合体が、該試料中の他のタンパク質から十分に分離されないことも明白である。特に、いくつかの電気泳動図、例えば米国特許出願公開第2005/0164302号明細書の図2e、4b、5a、9a及び9b、は、該試料のアルブミンと該イムノグロブリンとの間を移動するアルブミン及びありうる他のタンパク質との重なりを示唆する。さらに、本発明者らにより実施された試験において、修飾されていない抗体(IgG)及びベンゼントリカルボン酸無水物により修飾された抗体(IgG)の、pH10でのバッファー(3-シクロヘキシルアミノ-1-プロパンスルホン酸(CAPS)及びN-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)を含む)中における移動時間、該修飾された抗体は、アルブミンの移動時間と似た移動時間(最大の先端の時間(peak top time))を有することが発見された。これは該修飾された抗体が、血液血清試料中のアルブミンからベースライン分離されないだろうことを示唆する。さらに、これは、血清試料中の該修飾された抗体とイムノグロブリンとの複合体が、イムノグロブリンの移動時間とアルブミンの移動時間との間の移動時間を有しうることを示唆である。すなわち、該複合体は、そのようなバッファーを用いる電気泳動分析において、他のタンパク質、例えばγ-バンド血清タンパク質、と少なくとも部分的に、一緒に移動しそうだろう。すなわち、特には複雑な試料、例えば血液血清又は他の生物学的試料など、の分離において、該複合体の望ましくない一緒に移動を回避することの挑戦が残っている。

#### 【0010】

関心のある1以上の化合物、例えば1以上の血清タンパク質など、の存在について、試料、特には1以上の血清タンパク質を含みうる体液の試料、を分析する為の新規方法であって、特定の標的化合物に結合することができる結合性パートナー、例えば抗体又はその断片など、を使用し、それは存在が決定されるべき化合物(分析物)又は該試料の該分析を邪魔しうる化合物でありうる上記方法を提供することが本発明の目的である。

#### 【0011】

特に、該試料の任意成分からの該結合性パートナーのベースライン分離(baseline separation)、及び好ましくは該結合性パートナーと該標的化合物との複合体のベースライン分離、又は少なくとも存在が決定されるべき任意タンパク質のベースライン分離を許す方法を提供することが本発明の目的である。

#### 【0012】

本発明に従い満たされる1以上の他の目的が、明細書及び/又は請求項から明らかになるであろう。

10

20

30

40

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0013】

本発明者らは、電気泳動分析方法における特定の方法において、修飾された結合性パートナーを用いることが可能であることを発見した。

## 【0014】

従って、本発明は、標的化合物又は標的化合物の集団を含みうる試料の分析の為の方法に関し、該方法は、

該標的化合物又は標的化合物の集団のための結合性パートナーと、該試料の少なくとも一部を混合すること、該結合性パートナーは、(i) 該標的化合物に特異的に結合することができるセグメント及び(ii) ポリアニオン性ポリマーセグメントを含むマクロ分子である；及び

該結合性パートナーが負電荷を有する分離媒体中で、該結合性パートナーを含む該試料を電気泳動により分離することを含む。

## 【0015】

本発明の好ましい実施態様において、該試料の一部は、該結合性パートナーと一緒にされた後（通常は電気泳動を開始する前に混合される）に分析され、そして、該試料の他の部分は、該結合性パートナーと混合され又は他の方法と一緒にされること無く、その他は同じ条件下で、電気泳動を用いて分析される。その後、両部分の分析の結果が、関心のある該分析物が存在するかどうかを確かめる為に比較されうる。

## 【0016】

該試料がキャピラリー電気泳動を用いて分離されるところの本発明に従う方法により、良い結果が達成された。

## 【0017】

さらに、本発明は、キャピラリー電気泳動による試料の分析における使用のためのキットに関し、該キットは、

- a) (i) 標的化合物に特異的に結合することができるセグメント及び(ii) ポリアニオン性ポリマーセグメントを含むマクロ分子を含む第1の容器；及び
- b) キャピラリー電気泳動による該試料の分離の為にアルカリ性バッファーを含む第2の容器；
- c) 任意的に、キャピラリー電気泳動を実施する為のキャピラリー又は該電気泳動が実施されるところのチャンネルを含むマイクロ流体デバイス；及び
- d) 任意的に、該キャピラリーを洗浄するための洗浄流体を含む容器を含む。

## 【0018】

本発明はさらに、ポリアニオン性セグメントを含む修飾された抗体又はその抗原結合性断片に関し、該ポリアニオン性ポリマーセグメントは、少なくとも20kD、特に少なくとも40kD、より特に少なくとも50kDの数平均分子量を有する。

## 【0019】

本発明はさらに、電気泳動分析におけるマクロ分子の使用方法に関し、該マクロ分子が、(i) 分析されるべき試料中に存在しうる標的化合物又は標的化合物の集団に特異的に結合することができるセグメントと(ii) 該試料中におけるその存在が決定されるべき1以上の他の化合物と一緒に移動しうる、該マクロ分子に結合していない該標的化合物又は標的化合物の集団の実効移動度を選択的に修飾する為のポリアニオン性セグメントとを含む上記方法に関し、それにより該1以上の干渉する化合物（該マクロ分子に結合している）が、その存在が決定されるべき該1以上の化合物の移動ゾーンの外側に位置されたゾーンに移動する。

## 【0020】

語「又は（若しくは）」は、本明細書において用いられるときに、他に明示されない限り、「及び/又は（若しくは）」を意味する。

10

20

30

40

50

## 【0021】

単数で表される語は、本明細書において用いられるときに、他に明示されない限り、少なくとも1つの当該語を意味する。

## 【0022】

単数で名詞を言及するとき（例えば、化合物、添加物など）、複数形が包含されることが意味される。

## 【0023】

本明細書においてpHを言及するとき、他に明示されない限り、integral Argenthal参照電極を伴うInLab Expert Proオープン注入電極及び温度センサーを有するMettler-Toledo SevenEasyメーターにより測定されたときのpHであって、20での、4.00、7.00及び10.00の参照pHによる3点キャリブレーション曲線により校正された上記pHが意味される。

10

## 【発明の効果】

## 【0024】

本発明は特に、しかし排他的にはなく、複雑な試料、例えば血液血清、尿、脳脊髄流体又は他の体液など、の中の種々の分析物の決定を、電気泳動図からのそれらの選択的な除去により許す。

## 【0025】

あるいは、関心のある分析物又は分析物群と一緒に移動しうるか又は該分析物又は分析物群の存在をマスクしうる、該試料中の標的化合物の移動を選択的に修飾することにより、干渉の減少された水準を有する分析が実施されうる。

20

## 【0026】

本発明に従い用いられる結合性パートナーは、種々の標的化合物の移動度を（該標的化合物との複合体化又は他の結合により）修飾する為に用いられることができ、その結果、該結合性パートナーにより結合された該標的化合物及び該結合していない結合性パートナーの両方が、電気泳動分離プロセスにおいて1以上の分析物から十分に離れて移動して、該分析物又は分析物群からのベースライン分離を許すことが意図される。

## 【0027】

特に、驚くべきことに、本発明に従い、血清イムノグロブリン画分の移動度と十分に異なる、好ましくはまた血清タンパク質の画分とも十分に異なる、より好ましくはまた血清タンパク質の1画分及び2画分とも十分に異なる、特にまたアルブミン画分とも十分に異なる及びより特にはビス-アルブミン画分とも十分に異なる電気泳動移動度（少なくともアルカリ性のpHで、特には9超のpHで）を有するポリアニオン性ポリマーセグメントを含む結合性パートナーを用いて、該画分又は画分群の、該試料中に存在しうる標的化合物に結合していない該結合性パートナー及び該試料中に存在しうる標的化合物（例えばイムノグロブリンなど）と結合した該結合性パートナーの両方からの、少なくともアルカリ性pH、例えば8~11のpHなど、でのベースライン分離を許すことが可能であることが発見された。

30

## 【0028】

さらに、本発明は、比較的低い濃度での該結合性パートナーの使用を許すことができ、一方で、電気泳動分離プロセスにおいて、本質的に全ての該標的化合物又はそれらの少なくとも実質的に一部の移動時間を変化させることにおいてなお有効であることが意図される。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0029】

【図1】タンパク質バンドがどのように分離されたかを示すグラフである。

【図2】ポリ-L-グルタミン酸（390kg/mol）修飾された抗体を添加された試料が、どのように分離されたかを示すグラフである。

【図3】ポリ-L-グルタミン酸（2250kg/mol）修飾された抗体を添加された試料が、どのように分離されたかを示すグラフである。

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0030】

原理上、任意の形の電気泳動が用いられうる。特に、ゾーン電気泳動により良い結果が得られた。

## 【0031】

原理上、本発明に従う方法はプレート上又は同様物上で（慣用のフラットゲル電気泳動におけるように）実施されうるが、好ましくは、該電気泳動はチャンネルにおいて実施される。特に好ましい実施態様において、該チャンネルはキャピラリーであり、この場合、該電気泳動技術は一般に、キャピラリー電気泳動（CE）と言われる。特定の実施態様において、電気泳動は、マイクロ流体デバイス又は同様物のチャンネルにおいて実施されてよく、この技術はしばしば、「チップ上のCE（CE on a chip）」と当技術分野において言われる。CEについてのより多くの情報が、Sam Liによる総説「Clinical Analysis by Microchip Capillary Electrophoresis」及びLarry Kricka, Clinical Chemistry 52, p37-45, 2006、並びにそこで引用された参考文献中に見られうる。

10

## 【0032】

該チャンネル（キャピラリー）の内壁は、特に、酸性基を含んでよく、このうち、少なくとも一部が、アルカリ性バッファーとの接触のときに解離し、その結果、該分離の間、電気浸透流を利用することができる。キャピラリー電気泳動を用いる本発明の特に好ましい実施態様において、該電気浸透流は、該キャピラリーの入口側から、該キャピラリーの出口側に向けられ、それにより出口電極と同じ電荷の符号（負電荷）を有する試料成分（例えばタンパク質など）も検出器に向かって引っ張られ、及びすなわち検出される。適当な物質は、一般的に当技術分野において知られている。そのような酸性基を含む非常に好ましい物質は、シリカ、特に溶融シリカ、である。

20

## 【0033】

該結合性パートナーは、1以上の標的化合物と結合することができるセグメント（結合性セグメント）及びポリアニオン性ポリマーセグメントを含む。典型的には、該結合性パートナーは、合成のマクロ分子である。とはいえ、該マクロ分子は、生物学的起源又は合成の起源である1以上の結合性セグメント及び/又は1以上のポリアニオン性ポリマーセグメントを含みうる。原理上、該結合性セグメントは、特定の標的化合物（例えば特異的モノクローナルイムノグロブリン）又は特定の標的化合物の集団（例えばIgG集団）に特異的に結合することができる任意の天然又は合成のセグメントでありうる。

30

## 【0034】

特に、該結合性セグメントは、抗体又は該抗体の抗原結合性断片でありうる。該抗体又はその断片は、市販入手可能であってよく又は免疫付与技術により調製されてよく、この技術は、当技術分野において一般に知られている。抗体又はその断片は、特に、該標的化合物が抗原性化合物であるときに用いられうるが、それ自体が抗原性でない化合物に対する抗体を、例えば抗原性であるマクロ分子により該化合物（一般的にはハプテンと言われる）を固定することにより、作ることも可能である。そのような技術もまた一般に知られている。該結合性セグメントは、モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体又はそれらの断片でありうる。意図される適用に依存して、ポリクローナル抗体が好まれる。なぜなら、それは、密接に関連した複数の標的化合物の移動の修飾を許しうるからである。

40

## 【0035】

他方、モノクローナル抗体は、高い選択性を有する特定の標的化合物を標的とすることにとって有利でありうる。結合性セグメントとして用いられる抗体は原理上、任意の種類の抗体でありうる。例えば、それは、哺乳類のIgG、IgA、IgE、IgD又はIgMであってよく、又は他の哺乳類の抗体であってよく、例えば普通でない哺乳類抗体、例えばラクダ科動物のシングルドメイン又はV<sub>H</sub>H抗体など、又は鳥類抗体、例えばIgYなど、でありうる。

## 【0036】

50

上記に示されるとおり、抗体の抗原結合性断片を用いることも可能である。そのような断片は、それ自体当技術分野において知られる方法において、抗体の酵素分解により産生されうる。

【0037】

これらの抗体又はそれらの断片のうち、IgG又はその抗原結合性断片が特に、結合性セグメントとして有用である。IgG又はそれらに由来する抗原結合性断片は、本発明における使用にとって適当な結合性パートナーを得るために、特によく修飾されうると考えられる。

【0038】

結合性セグメントを提供する為に用いられうる他の分子は、タンパク質結合性分子の群から、例えばプロテインA、アビジン、ストレプトアビジン、及びビオチン、レセプター（例えば細胞膜で又は細胞質中に見られるようなもの）、並びに関心のある結合性標的との特異的親和性を有する他の分子の群から、選ばれうる。

10

【0039】

ポリアニオン性ポリマーは、（該ポリマーが少なくとも概念上形成される）モノマー単位の少なくとも実質的な部分が、（十分に高いpHの）水性液体中でイオン化可能である少なくとも1つの基を含み、その結果、該ポリマーは負に荷電する。該ポリマーは合成又は天然のものでありうる。

【0040】

一般に、該ポリアニオン性ポリマーセグメントは、該結合性パートナーが用いられることが意図されるpH付近の又はそれより低いpKa、好ましくは少なくとも2pH単位低いpKa、を有する複数の酸性基を含み、その結果該電気泳動分離において用いられた場合、該基の少なくとも大多数が解離される（本明細書において、語「アニオン基」は、ポリアニオン性ポリマーの酸性基のイオン化していない形及びイオン化した形の両方について用いられうる；ポリアニオン性ポリマーの酸性基を言及する場合に、この語が、解離していない酸、共役塩基及びそれらの塩を包含する為に意味されるように）。該ポリアニオン性セグメントが、7以下のpKaを有する複数の酸性基を含むことが、特に好ましい。原理上、モノマー単位の一部は、イオン化可能基を含む必要はないが、モノマー集団の50～100%、特に75～100%、より特に90～100%が、イオン化可能であってアルカリ性pHでアニオン基を形成する以上の基を含むことが好ましい。

20

30

【0041】

ポリアニオン性ポリマーセグメントのイオン化した基の例は、カルボキシレート官能基、サルフェート官能基、スルホネート官能基、ホスフェート官能基及びホスホネート官能基を含む。

【0042】

好ましい実施態様において、該ポリアニオン性セグメントは、ポリアニオン性のポリ（アミノ酸）、ポリ（カルボン酸）、ポリ（スルホン酸）、ポリヌクレオチド、カルボキシル化ポリサッカライド、硫酸化ポリサッカライド及びホスホリル化ポリサッカライド、それらのコポリマーを含む、の群から選ばれる。

【0043】

良い結果が、ポリ（アミノ酸）により実現された。該ポリ（アミノ酸）は通常は、複数の酸性側基を有する。これらの側基は、カルボン酸側基を有する天然アミノ酸、例えばグルタミン酸又はアスパラギン酸など、の側基、又は他の酸性基、例えばヒドロキシル基（チロシン中にあるものなど、約10のpKaを有する）であってよい。本発明の特定の実施態様において、ポリアニオン性ポリマーセグメントは、ポリ（アミノ酸）セグメントであり、このうち複数のアミン側基（例えば複数のリシンアミノ酸残基）が、誘導体化されて酸性基を形成する。これを達成する為に、そのような官能基が、ポリ酸又はその無水物、例えばジカルボン酸、トリカルボン酸又は、3超のカルボン酸官能基を有するカルボン酸、と反応されうる。特に、該アミン側基は、コハク酸、メリト酸、ベンゼントリカルボン酸、スルホン酸、リン酸、又はこれらのいずれかの無水物により誘導体化されうる。その

40

50

ようなポリ(アミノ酸)は、市販で購入されることができ、又は、例えば上記言及された先行技術文献中の、それ自体既知の方法で誘導体化されうる。

【0044】

特に好ましいポリ(アミノ酸)セグメントは、複数のリシン残基を含むポリ(アミノ酸)セグメントであって、該複数のリシン残基のうち、アミン側基の少なくとも過半が、好ましくはカルボキシル化により、例えばスクシニル化により、アニオン側基へと変形されている上記セグメントであり、特に該アミン側基の90~100%、又は優先的には98~100%が、アニオン側基へと変形されているポリリシンである。そのようなセグメントを含む結合性パートナーは、試料が、血清タンパク質の存在について分析される方法における使用にとって特に有利であると分かった。

10

【0045】

さらに好ましい実施態様において、ポリアスパラギン酸又はポリグルタミン酸を含むポリアニオン性セグメントが提供される。

【0046】

さらなる実施態様において、該アニオン性セグメントは、ポリアルギニン、ポリアスパラギン、ポリグルタミン又はポリヒスチジンのセグメントであって、アミン側基の少なくとも過半(好ましくは90~100%)が、好ましくはコハク酸又は他のポリカルボン酸又はそれらの無水物との反応により、アニオン側基へと変形されている上記セグメントを含む。

20

【0047】

アニオン性ポリサッカライドセグメントは特に、カルボキシアルキルセルロース、例えばカルボキシメチルセルロースなど;ヘパリン;硫酸化デキストラン;ヒアルロン酸及び同様物の群から選ばれうる。

【0048】

適当なポリスルホン酸はポリ(4-スチレンスルホン酸)である。

【0049】

適当なポリカルボン酸は、ポリマレイン酸、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びポリフマル酸、それらのコポリマーを含む、の群から選ばれうる。適当なコポリマーは、例えば、ポリ(4-スチレンスルホン酸-コ-マレイン酸)コポリマーである。

30

【0050】

ポリマーの平均サイズ(分子量)は、特にはその意図される使用に依存して、広い範囲内で選ばれうる。標的化合物と該結合性パートナーとの複合体の実効移動度は、ポリアニオン性セグメント分子質量が(該セグメントの、同様の質量対荷電の割合で)増加するにつれて増加しうる(すなわち、より負になる)。すなわち、該ポリアニオン性ポリマーセグメントの平均分子量を選択することにより、該標的化合物-結合性パートナー複合体の所望の移動度が、微調整されうるということが意図される。

【0051】

本明細書において用いられるときに、(平均)分子量は、マトリックス支援光散乱スペクトロメトリー(MALLS)又は粘度(もし市販で入手されたポリマーが、該結合性パートナーを調製するために用いられるならば、供給者により特定される)に基づく(平均)分子量であり、又は分析超遠心(AUC)により決定されたときの(平均)分子量である。

40

【0052】

該ポリアニオン性ポリマーセグメントの(AUCにより決定可能である)数平均分子量は、少なくとも1kg/mol、少なくとも10kg/mol又は少なくとも20kg/molでありうる。好ましくは、該数平均分子量は、少なくとも40kg/mol、より好ましくは少なくとも50kg/mol又は少なくとも75kg/molである。

【0053】

上限は、該結合性パートナーの溶解度/分散性により主として定められる。さらに、該ポリマーセグメントが大きくなればなるほど、その粘度はより高くなる傾向にある。すなわ

50

ち、通常、選ばれる該ポリマーセグメントは、該結合性パートナーを含む該試料の粘度が取り扱うのになお容易であるように、平均分子量を有する。当業者は、適当な上限粘度及び分子量をどのように決定するかを知っているであろう。一般に、数平均分子量は、10000 kg/mol以下だけであり、好ましくは5000 kg/mol以下であり、特に1000 kg/mol以下であり、より特に750 kg/mol以下であろう。

【0054】

該試料は好ましくは、生物学的試料、特に体液を含む試料、より特に血液血漿、血液血清、リンパ流体、尿又は脳脊髄流体から選ばれる体液を含む試料である。

【0055】

該分析物は原理上、電気泳動により分離されうる任意の分析物（動電学的クロマトグラフィーにより分離可能な任意の分析物を含む）でありうる。特に、該分析物は、生体分子から、より特にタンパク質及び他のペプチドから選ばれうる。該分析物は、該標的化合物であってよく、又は該結合性パートナーの不在下において該標的化合物と一緒に移動しそである化合物であってよい。特に、該分析物は、疾患、例えばガンマグロブリン血症（gammaphies）、パラプロテイン血症、肝臓の病及びアルコール依存症から選択される疾患など、についてのマーカーであってよい。

10

【0056】

分析物の好ましい例は、血清タンパク質、特にイムノグロブリン；トランスフェリン；アルブミン；ビス-アルブミン；ミクログロブリン、例えば - 2ミクログロブリンなど；及びマクログロブリン、これはイムノグロブリン、例えば IgMなど、又は他のマクログロブリン、例えば - 2マクログロブリンなど、でありうる、の群から選ばれる血清タンパク質である。

20

【0057】

分離条件は、例えば特定の分析物の分析についての上記記載の先行技術文献における、それ自体既知の方法に基づきうる。また、電気泳動のためのバッファー溶液は、種々の分析物について、市販入手可能である。

【0058】

一般に、該ポリアニオン性ポリマーセグメントの（平均）pKaとほぼ同じ又はそれより高いpHを有するバッファー溶液を用いることが有利であり、その結果、該酸性官能基の少なくとも過半がイオン化されて、アニオン基を形成する。特に、該試料の分離は、アルカリ性のpH、特に、pH 8.0 ~ 11.0の範囲のpH、より特にpH 9.0 ~ 10.7の範囲のpH、さらにより特に9.5 ~ 10.5のpHを有する溶液を用いて実施されうる。好ましくは、該溶液はpHバッファーを含む。そのようなバッファーは一般に、少なくとも1つの酸と少なくとも1つの塩基（該酸の共役塩基でありうる）との組み合わせであり、該溶液のpH付近のpKaを有する（一般に、該pKaは、pH ± 1 pH単位の範囲のpKa、好ましくはpH ± 0.5 pH単位のpKaである）。

30

【0059】

バッファー溶液を提供する為に用いられうる酸/塩基の例は、生物学的バッファーとして知られる、ボレート、ホスフェート及びカーボネートのバッファー、バッファーを提供する為のアミノ酸及び両性イオン化合物に基づくバッファーである。生物学的バッファーの為の酸/塩基の例は、ビス-TRIS（2-ビス[2-ヒドロキシエチル]アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール）、ADA（N-[2-アセトアミド]-2-イミノ二酢酸）、ACES（2-[2-アセトアミノ[-2-アミノエタンスルホン酸）、PIPES（1,4-ピペラジンジエタンスルホン酸）、MOPSO（3-[N-モルホリノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）、ビス-TRIS PROPANE（1,3-ビス[トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノプロパン]）、BES（N,N-ビス[2-ヒドロキシエチル]-2-アミノエタンスルホン酸）、MOPS（3-[N-モルホリノ]プロパンスルホン酸）、TES（2-[2-ヒドロキシ-1,1-ビス（ヒドロキシメチル）エチルアミノ]エタンスルホン酸）、HEPES（N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン)酸）、DIPSO（3-N,

40

50

N - ビス [ 2 - ヒドロキシエチル ] アミノ - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 )、MOBS ( 4 - N - モルホリノブタンスルホン酸 )、TAPSO ( 3 [ N - トリス - ヒドロキシメチル - メチルアミノ ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 )、TRIS ( 2 - アミノ - 2 - [ ヒドロキシメチル ] - 1, 3 - プロパンジオール )、HEPPO ( N - [ 2 - ヒドロキシエチル ] ピペラジン - N' - [ 2 - ヒドロキシプロパンスルホン ] 酸 )、POPSO ( ピペラジン - N, N' - ビス [ 2 - ヒドロキシプロパンスルホン ] 酸 )、TEA ( トリエタノールアミン )、EPPS ( N - [ 2 - ヒドロキシエチル ] - ピペラジン - N' - [ 3 - プロパンスルホン ] 酸 )、TRICINE ( N - トリス [ ヒドロキシメチル ] メチルグリシン )、GLY - GLY ( ジグリシン )、BICINE ( N, N - ビス [ 2 - ヒドロキシエチル ] グリシン )、HEPBS ( N - [ 2 - ヒドロキシエチル ] ピペラジン - N' - [ 4 - ブタンスルホン ] 酸 )、TAPS ( N - トリス [ ヒドロキシメチル ] メチル - 3 - アミノプロパンスルホン酸 )、AMPD ( 2 - アミノ - 2 - メチル - 1, 3 - プロパンジオール )、TABS ( N - トリス [ ヒドロキシメチル ] メチル - 4 - アミノブタンスルホン酸 )、AMPPO ( 3 - [ ( 1, 1 - ジメチル - 2 - ヒドロキシエチル ) アミノ ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 )、CHES ( 2 - ( N - シクロヘキシルアミノ ) エタンスルホン酸 )、CAPSO ( 3 - [ シクロヘキシルアミノ ] - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホン酸 )、AMP ( 2 - アミノ - 2 - メチル - 1 - プバノール )、CAPS ( 3 - シクロヘキシルアミノ - 1 - プロパンスルホン酸 ) 及び CABS ( 4 - [ シクロヘキシルアミノ ] - 1 - ブタンスルホン酸 ) を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0060】

例えば、血清タンパク質の分析の為に、特に、pH 9.0 ~ 10.7 の範囲の pH を有するバッファー溶液が用いられうる。バッファー及び説明書を含む適当なキット、例えば CE - Sure SPE キット ( Helena Biosciences ( Gateshead, 英国 ) から、1990年代半ばから入手可能である )、が市販入手可能である。さらに、米国特許出願第 2002/0162744 号明細書 ( これは少なくとも 1 つの血清タンパク質、特にアルブミン、と相互作用し、そして、その電気泳動移動度を修飾する添加物を記載する ) において、pH 10 のアルカリ性バッファー溶液が記載されている。同様に、例えば Journal of Chromatography B, 742 ( 2000 ), 79 - 89 において記載されるように、血清トランスフェリンシアロフォームの分離が、例えば、8 ~ 9 の範囲の pH で、ボレート及びジアミノブタンを含むバッファー溶液中で、実施されうる。

#### 【0061】

本発明は、以下の実施例により今説明されるであろう。

#### 実施例

##### 【実施例 1】

#### 【0062】

実施例 1 ポリ (アミノ酸) により修飾された抗体を用いる免疫置換 CE

#### 【0063】

結合性パートナーの調製

#### 【0064】

流体 A : 抗体 ( ヒツジ抗ヒト IgG 、 8 mg / ml ) が、100 mM のリン酸ナトリウム、900 mM NaCl pH 7.4、中へ一晚透析された。500  $\mu$ l のこの抗体溶液が反応ごとに用いられた。

流体 B : 10 mg のポリ (アミノ酸) が、250  $\mu$ l の 100 mM のリン酸ナトリウム、900 mM の NaCl、pH 7.4、中に溶解された。

流体 C : 10 mg の NHS ( N - ヒドロキシスルホスクシンイミド ナトリウム塩 ) が、40  $\mu$ l の 100 mM リン酸ナトリウム、100 mM の NaCl、pH 7.4、中に溶解された。

流体 D : 10 mg の EDC ( N - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - N - エチルカルボジイミドヒドロクロライド ) が、40  $\mu$ l の 100 mM のリン酸ナトリウム、100 mM の

NaCl、pH 7.4、中に溶解された。

【0065】

流体A、B、C及びDが一緒にされ、そして、ボルテックスにより反応混合物を形成する為に混合された。該混合物中の該試薬は、室温（約20℃）で一晩反応することが許され、同時に、回転器上で回転混合され、それにより、ポリ（アミノ酸）が共有結合された抗体、すなわち該修飾された抗体又は結合性パートナーを形成した。

【0066】

その後、該反応混合物が、100 kg/molの排除分子量（molecular weight cut-off）の透析チュービングを用いて、50 mMのリン酸ナトリウム溶液、200 mMのNaCl、pH 8.1、に対して透析された。

10

【0067】

その後、該修飾された抗体は、Spectra/Gel吸収剤（Spectrum Labs、Rancho Dominguez、カリフォルニア州、米国）中に該修飾された抗体を含む透析チュービングを置くことにより濃厚にされた。

【0068】

該濃厚にする工程の後、50 mMのリン酸ナトリウム、200 mMのNaCl、pH 8.1、の溶液が、最大で500 µlの体積で、該抗体溶液に添加された。

【0069】

免疫置換CEのための試料調製

【0070】

2 µlのヒト血液血清が、98 µlのCEバッファー溶液に添加された。該バッファーは、水の中の200 mMのCAPS、66 mMのTAPS、pH 9.7、であり、そして混合された。その後、20 µlの修飾された抗体溶液が添加された。混合後、該試料は、CEによる分離のために用意された。

20

【0071】

免疫置換電気泳動

【0072】

CE系の構造は以下のとおりであった：

装置：PrinCE CEC 760, DAX 3D 8.1 ソフトウェア

キャピラリー：溶融シリカ（内部コーティングなし）

検出器へのキャピラリー長：23 cm

総キャピラリー長：30 cm

キャピラリー内部直径：50 µm

30

【0073】

試料は、圧力注入（25 mbar、6秒）を用いて注入され、そして、分離の為に、13 kVが適用された。温度は25℃であった。

【0074】

さらに、血清試料が調製され、そして、該修飾された抗体が添加されたことを除き、同じ方法で分離された。

【0075】

実施例1A：ポリリシンスクシニル化修飾された抗体

40

【0076】

ヒツジ抗ヒトIgGが、上記に記載されたとおり、ポリ-L-リシンスクシネート（Sigma-Aldrich、カタログナンバーP3513、Mw > 50000 g/mol、ポリ-L-リシン粘度に基づくMw、MALLSによっても測定された）により修飾された。

【0077】

該血清試料が、ヒト血清標準対照試料、すなわち健康なヒトからの試料であった。

【0078】

図1は、どのようにタンパク質バンドが分離されたかを示す。上のグラフは、ヒトイムノ

50

グロブリンへの結合性パートナー（修飾された抗体）が添加された試料のものであり、下のグラフは、結合性パートナー無しの試料のものである。図1において示されるとおり、該結合性パートナーは、血清中のイムノグロブリンに結合することにおいて有効であり、且つ、該結合性パートナーそれ自身又は結合性パートナーとヒトイムノグロブリンとの複合体のいずれもが該血清タンパク質バンドの内では又は近くで移動しなかった。該分離は、4分後（最後のバンド（アルブミン）が検出器を過ぎて十分に移動した後約45秒で）に停止され、そのときに、該複合体又は複合体化していない結合性パートナーのいずれもが、該検出器をまだ過ぎて移動していなかった。これは、本発明に従う結合性パートナーが、血清タンパク質の分析における使用にとって特に適当であることを説明する。

【0079】

実施例1B ポリ-L-グルタミン酸修飾された抗体

【0080】

ヒツジ抗ヒトIgGが、ポリ-L-グルタミン酸（Sigma-AldrichカタログナンバーP4886、分子量50000~100000g/mol、64000g/mol平均、粘度に基づく決定及びMALLSによる決定）により、上記に記載されたとおりに修飾された。

【0081】

その後、ポリ-L-グルタミン酸修飾された抗体が添加された（上記のとおり）、異常バンド水準を有するヒト血液血清試料（いわゆる異常対照試料）及び、修飾された抗体がそこに添加されていない試料が、CEにより（上記のとおり）分離された。該修飾された抗体が、該バンド中の該異常ヒトイムノグロブリンをほぼ完全に除去するのに有効であることが分かった。最後の血清タンパク質バンド（アルブミン）は、3分15秒以内で完全に移動した。4分後、該分離が停止され、そのときに、修飾された抗体又はそれらとヒトイムノグロブリンとの複合体は、まだ検出されなかった。

【0082】

実施例1C ポリ-グルタミン酸修飾された抗体

【0083】

ヒツジ抗ヒトIgGが、ポリ-グルタミン酸（PGGA）（Natto Biosciences、モントリオール、カナダ）（390kg/mol又は2250kg/molの分子量を有する）により、修飾反応当たり5mgのポリ（アミノ酸）を用いて、上記に記載されたとおりに、修飾された。

【0084】

該修飾された抗体のそれぞれが、上記に記載されたとおりに、血清対照試料に添加された。結果が図2（390kg/mol）及び図3（2250kg/mol）に示される。点線は、該修飾された抗体により処理された試料を表し、実線は修飾された抗体が添加されていない試料を表す。それぞれの試験において、該修飾された抗体は、該バンドからヒトイムノグロブリンを除去するのに有効であること及び該免疫置換されたヒトイムノグロブリン並びに該修飾された抗体は、該最後の血清タンパク質バンド（アルブミン）の後に移動することが分かる。

【実施例2】

【0085】

実施例2 カルボキシル化ポリサッカライドにより修飾された抗体を用いた免疫置換CE

【0086】

結合性パートナーの調製

【0087】

ポリアニオン性ポリマー（この場合2つの異なるカルボキシメチルセルロース（CMC））の量が以下の通りに変動した条件で、実施例1に記載されたのと同じプロトコルが用いられた。

【0088】

CMCナトリウム塩（平均Mw90000g/mol（Aldrich製品番号4192

10

20

30

40

50

73) の、2、5又は10mgが、ヒツジ抗ヒトIgGを修飾する為に用いられた。

【0089】

CMCナトリウム塩(平均Mw250000g/mol(Aldrich製品番号419303)の、2、4又は6mgが用いられた。

【0090】

免疫置換CEの為に試料調製

【0091】

ヒト異常対照血清試料が、上記に記載されたとおり、結合性パートナーの有り又は無しで、調製された。

【0092】

免疫置換電気泳動

【0093】

CE分離が、上記に記載されたとおりに実施された。CMCのいずれのタイプにより修飾された結合性パートナーも、該血清試料中のイムノグロブリンに結合することにおいて及び該結合性パートナーに結合した該イムノグロブリンが最後の血清タンパク質バンド(アルブミン)の後に移動することを引き起こすことにおいて有効であることが分かった。90000g/molの平均分子量を有するCMCを含む(ヒトイムノグロブリンと複合体化した)該結合性パートナーが、250000g/molの平均分子量を有するCMCを含む該結合性パートナー(ヒトイムノグロブリンと複合体化した)よりも、最後の血清タンパク質バンドにより近く移動すること、とはいえ、結合性パートナーの両方のタイプについて、該結合性パートナー(複合体)とアルブミンとの間のベースライン分離が実行可能であることが分かった。

【0094】

さらに、結合性パートナー(複合体)とアルブミンとの間の分解能が、4、5、6又は10mgのCMCにより得られた結合性パートナーについてのときのほうが、2mgだけのCMCを添加することにより得られた結合性パートナーについてのときよりも、より高かった。

【実施例3】

【0095】

実施例3 スルホン酸カルボン酸コポリマーにより修飾された抗体を用いた免疫置換CE

【0096】

結合性パートナーの調製

【0097】

2つのポリ(4-スチレンスルホン酸-コ-マレイン酸)コポリマー(PSSA-MA)が、抗ヒト抗体を修飾する為に用いられた。該PSSA-MA(Sigma-Aldrichから得られた)は、両方とも約20000g/molの平均分子量を有した。1のPSSA-MAは、1:1のスチレンスルホン酸対マレイン酸のモル比を有し(Aldrichカタログナンバー434558)、他方は、3:1のスチレンスルホン酸対マレイン酸のモル比を有した(Aldrichカタログナンバー434566)。

【0098】

該量が、10mgの代わりに、15mg又は20mgであることを条件として、実施例1において記載されたのと同じプロトコルが用いられた。

【0099】

免疫置換CEの試料調製

【0100】

ヒト異常対照血清試料が、上記に記載されたとおり、結合性パートナーの有り又は無しで、調製された。

【0101】

免疫置換電気泳動

【0102】

10

20

30

40

50

C E分離が、上記に記載されたとおりに実施された。

【0103】

いずれのタイプのPSSA-MAにより修飾された結合性パートナーも、該血清試料中のイムノグロブリンに結合することにおいて、及び該結合性パートナーに結合したイムノグロブリンが、最後の血清タンパク質バンド(アルブミン)の後に移動することを引き起こすことにおいて、有効であることが分かった。

【図1】

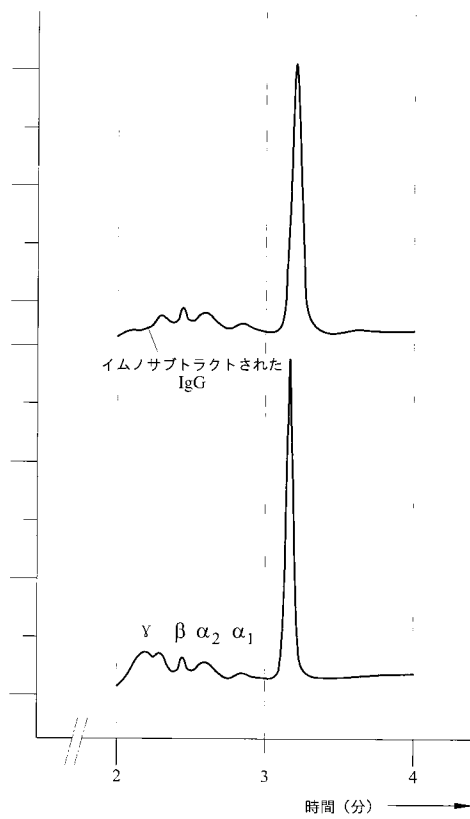


図1

【図2】

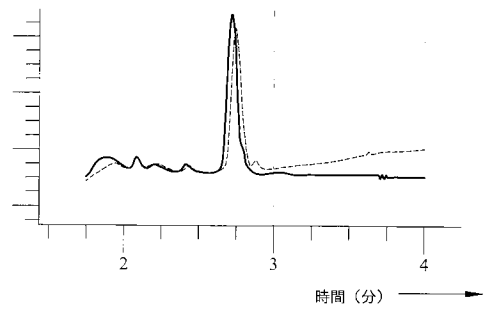


図2

【図3】

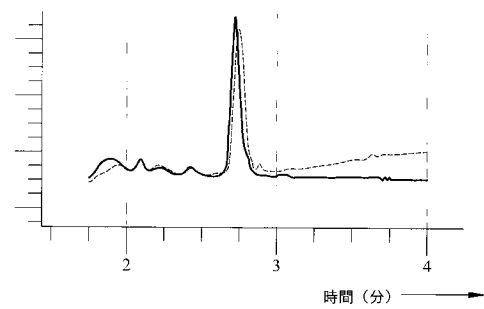


図3

---

フロントページの続き

- (72)発明者 ベン, チャファイ  
イギリス国, ニューキャッスル - アポン - タイン エヌイー4 9エヌユー, フェンハム, バルド  
ウィン アベニュー 8
- (72)発明者 ジョアン, バクスター  
イギリス国, ノーサンバーランド エヌイー15 9エスエー, ブライス, サンドリンガム メド  
ウズ 27
- (72)発明者 ケヴィン, ウォルサム  
イギリス国, ニューキャッスル - アポン - タイン, ウォルボトル, ビバリー テラス 8
- (72)発明者 ビバリー, アスキュー  
イギリス国, ニューキャッスル - アポン - タイン, イェスモンド, ローズベリー クレセント 3  
4

【外国語明細書】

2010107509000001.pdf

2010107509000002.pdf

2010107509000003.pdf

2010107509000004.pdf

专利名称(译)	免疫取代电泳		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010107509A</a>	公开(公告)日	2010-05-13
申请号	JP2009244569	申请日	2009-10-23
[标]申请(专利权)人(译)	赫莲娜实验室英国有限公司 HELENA LAB英国		
申请(专利权)人(译)	海伦娜实验室(英国)有限公司		
[标]发明人	ベンチャファイ ジョアンバクスター ケヴィンウォルサム ビバリーアスキュー		
发明人	ベン,チャファイ ジョアン,バクスター ケヴィン,ウォルサム ビバリー,アスキュー		
IPC分类号	G01N27/447 G01N33/561 G01N33/536 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/561		
FI分类号	G01N27/26.301.B G01N27/26.331.E G01N33/561 G01N33/536.Z G01N33/53.N G01N27/447.301.B G01N27/447.331.E		
代理人(译)	松井光夫		
优先权	2008168195 2008-11-03 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**  
 分析可能包含目标化合物或目标化合物群的样品的的方法。 解决方案：将目标化合物或目标化合物群体的结合伴侣与至少一部分样品混合，该结合伴侣 (i) 与目标化合物特异性结合 并且 (ii) 包含聚阴离子聚合物链段的大分子；以及在分离介质中电泳分离包含结合伴侣的样品，其中所述结合伴侣具有净负电荷。 包括。 [选择图]无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特開2010-11 (P2010-10) (43) 公開日 平成22年5月13日 (2010.05.13)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 27/447 (2006.01)</b>	GO 1 N 27/26 301 B	
<b>GO 1 N 33/561 (2006.01)</b>	GO 1 N 27/26 331 E	
<b>GO 1 N 33/536 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/561	
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/536 Z	
	GO 1 N 33/53 N	
	審査請求 未請求 請求項の数 15 O L 外国語出願 (全 1)	
(21) 出願番号 特願2009-244569 (P2009-244569)	(71) 出願人 509294380	
(22) 出願日 平成21年10月23日 (2009.10.23)	ヘレナ ラボラトリーズ (ユニテック ングダム) リミテッド	
(31) 優先権主張番号 08168195.9	HELENA LABORATOR I (U K) L T D.	
(32) 優先日 平成20年11月3日 (2008.11.3)	イギリス国, タイン アンド ウェア エヌイー11 Oエステイ, ゲーツ ド, チーム, バレー トレーディング ステート, クイーンズウェイ サウフ 地なし)	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人 100085545 弁理士 松井 光夫	