

(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2005-529348

(P2005-529348A)

(43) 公表日 平成17年9月29日(2005.9.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	X	2 GO 4 5
GO 1 N 21/78	GO 1 N 21/78	C	2 GO 5 4
GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15	Z	
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2004-513768 (P2004-513768)	(71) 出願人	397056695
(86) (22) 出願日	平成15年6月10日 (2003.6.10)		アベンティス・ファーマ・ドイツユラント
(85) 翻訳文提出日	平成17年1月20日 (2005.1.20)		・ゲゼルシャフト・ミット・ベシユレンク
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/006038		テル・ハフツング
(87) 国際公開番号	W02003/107000		ドイツ連邦共和国デー—65929フラン
(87) 国際公開日	平成15年12月24日 (2003.12.24)		クフルト・アム・マイン、プリユニングシ
(31) 優先権主張番号	102 26 011.7		ユトラーセ50
(32) 優先日	平成14年6月12日 (2002.6.12)	(74) 代理人	100091731
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 高木 千嘉
		(74) 代理人	100127926
			弁理士 結田 純次
		(74) 代理人	100105290
			弁理士 三輪 昭次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C-反応性タンパク質と、C-反応性タンパク質に結合する成分との相互作用を測定するための、HTS可能な方法および試験システム

(57) 【要約】

本発明は、C-反応性タンパク質(CRP)またはC1qを含む溶液の濃度を測定するために、および、CRPまたはC1qと、それらに結合する成分との相互作用、特にCRPとC1qとの相互作用に影響を与える物質を同定するために、CRPまたはC1qと、CRPまたはC1qに結合する成分との相互作用を測定するためのHTS可能な方法および試験システムに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

直接的に、または、1またはそれ以上の成分を介してCRPに結合する2種の成分の結合現象の測定方法であって、以下の工程：

(a) 初めに、CRP含有溶液を導入すること、

(b) 少なくとも1種のドナー成分、または、少なくとも1種のドナー成分を含む成分群を、上記CRP含有溶液に加えること[該ドナー成分は、光源により励起した後、シグナルを放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群(ドナー群)を含む成分であり、該ドナー成分は、直接的に、または、該成分群からの1またはそれ以上の成分を介してCRPに結合することができる]、

10

(c) 少なくとも1種のアクセプター成分、または、少なくとも1種のアクセプター成分を含む成分群を、上記CRP含有溶液に加えること[該アクセプター成分は、(b)に記載の化合物または化合物群によって放出されたシグナルを受信および電磁放射の形態で放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群(アクセプター群)を含む成分であり、該アクセプター成分は、直接的に、または、該成分群の1またはそれ以上の成分を介してCRPに結合することができる]、

(d) (b)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群(ドナー群)を光源によって励起すること、

(e) 上記結合現象を検出するために、(c)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群(アクセプター群)によって放出された電磁放射を検出すること、
を含む、上記方法。

20

【請求項 2】

直接的に、または、1またはそれ以上の成分を介してC1qに結合する2種の成分の結合現象の測定方法であって、以下の工程：

(a) 初めに、C1q含有溶液を導入すること、

(b) 少なくとも1種のドナー成分、または、少なくとも1種のドナー成分を含む成分群を、上記C1q含有溶液に加えること[該ドナー成分は、光源により励起した後、シグナルを放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群(ドナー群)を含む成分であり、該ドナー成分は、直接的に、または、該成分群からの1またはそれ以上の成分を介してC1qに結合することができる]、

30

(c) 少なくとも1種のアクセプター成分、または、少なくとも1種のアクセプター成分を含む成分群を、上記C1q含有溶液に加えること[該アクセプター成分は、(b)に記載の化合物または化合物群によって放出されたシグナルを受信および電磁放射の形態で放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群(アクセプター群)を含む成分であり、該アクセプター成分は、直接的に、または、該成分群の1またはそれ以上の成分を介してC1qに結合することができる]、

(d) (b)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群(ドナー群)を光源によって励起すること、

(e) 上記結合現象を検出するために、(c)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群(アクセプター群)によって放出された電磁放射を検出すること、
を含む、上記方法。

40

【請求項 3】

電磁放射は蛍光放射である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

(d)に記載の光源は、レーザーまたはランプである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 5】

(e)に記載の検出は、光電子増倍管を用いて行われる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 6】

50

(b) および / または (c) に記載の成分群の成分は、空間的に連続して C R P に、または互いに結合することができる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

(b) および / または (c) に記載の成分群の成分は、空間的に連続して C 1 q に、または互いに結合することができる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

成分はポリペプチドであるか、または、ポリペプチドを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

成分の少なくとも 1 種は、抗体である、請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 10】

抗体は、モノクローナルまたはポリクローナル抗体である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

成分の少なくとも 1 種は、C R P の天然の結合パートナーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

C R P の天然の結合パートナーは、C 1 q である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

請求項 1 (a) または請求項 1 (b) に記載の成分群は、C 1 q、および、抗 C 1 q 抗体を含む、請求項 12 に記載の方法。

20

【請求項 14】

成分の少なくとも 1 種は、C 1 q の天然の結合パートナーである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 15】

天然の結合パートナーは、C R P である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

請求項 2 (a) または請求項 2 (b) に記載の成分群は、C R P および抗 C R P 抗体を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

シグナルは、(b) に記載の少なくとも 1 種の化合物または化合物群 (ドナー群) から、(c) に記載の少なくとも 1 種の化合物または化合物群 (アクセプター群) へエミッションレスエネルギー伝達によって伝達される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

30

【請求項 18】

エミッションレスエネルギー伝達は、蛍光共鳴エネルギー移動である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

シグナルは、一重項酸素を介して伝達される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 20】

請求項 1 (b) または請求項 2 (b) に記載の少なくとも 1 種の化合物または化合物群 (ドナー群) は、レーザーによる励起の後、三重項酸素を一重項酸素に変換することができる化合物を含み、請求項 1 (b) または請求項 2 (b) に記載の少なくとも 1 種の化合物または化合物群 (アクセプター群) は、一重項酸素によって励起可能な少なくとも 1 種の第一の化合物、ならびに、一重項酸素によって励起可能な該化合物によって吸収されたエネルギーをエミッションレス方式で吸収し、蛍光放射の形態で放出することができる少なくとも 1 種の第二の化合物を含む、請求項 19 に記載の方法。

40

【請求項 21】

ドナー群および / またはアクセプター群は、粒子上に局在している、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

粒子の平均直径は約 200 nm である、請求項 21 に記載の方法。

50

【請求項 23】

未知のCRP含量を有するCRP含有溶液の濃度を測定するのに用いられる、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

未知のC1q含量を有するC1q含有溶液の濃度を測定するのに用いられる、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

溶液は、血清、血漿、または、生理学的緩衝液または水で希釈した血清もしくは血漿である、請求項23または24に記載の方法。

【請求項 26】

生物の炎症の状態、および/または、心停止および/または卒中のリスクを測定するための診断方法である、請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

ワンステップ法として行うことができるHTS可能な均一方法である、請求項1～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

試験物質が、CRPとCRP結合成分との結合現象に影響を与えるかどうかを観察するために、工程(a)および/または工程(b)および/または工程(c)および/または工程(d)の前に、少なくとも1種の試験物質を加える追加の工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 29】

試験物質が、C1qとC1q結合成分との結合現象に影響を与えるかどうかを観察するために、工程(a)および/または工程(b)および/または工程(c)および/または工程(d)の前に、少なくとも1種の試験物質を加える追加の工程を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 30】

調節、阻害または活性化する方式で結合現象に作用する物質を測定するのに用いられる、請求項28または29に記載の方法。

【請求項 31】

CRPと、CRPへ結合する成分との結合現象を測定するためのHTS可能な診断分析システムであって、以下の成分：

(A) 少なくとも1種のドナー成分、または、少なくとも1種のドナー成分を含む成分群 [該ドナー成分は、光源により励起した後、シグナルを放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群 (ドナー群) を含む成分であり、該ドナー成分は、直接的に、または、該成分群からの1またはそれ以上の成分を介してCRPに結合することができる]、

(B) 少なくとも1種のアクセプター成分、または、少なくとも1種のアクセプター成分を含む成分群 [該アクセプター成分は、(A)に記載の化合物または化合物群によって放出されたシグナルを受信および電磁放射の形態で放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群 (アクセプター群) を含む成分であり、該アクセプター成分は、直接的に、または、該成分群の1またはそれ以上の成分を介してCRPに結合することができる]

を含む上記診断分析システム。

【請求項 32】

C1qとC1qへ結合する成分との結合現象を測定するためのHTS可能な診断分析システムであって、以下の成分：

(A) 少なくとも1種のドナー成分、または、少なくとも1種のドナー成分を含む成分群 [該ドナー成分は、光源により励起した後、シグナルを放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群 (ドナー群) を含む成分であり、該ドナー成分は、直接的に、または、該成分群からの1またはそれ以上の成分を介してC1qに結合するこ

10

20

30

40

50

とすることができる]、

(B) 少なくとも1種のアクセプター成分、または、少なくとも1種のアクセプター成分を含む成分群 [該アクセプター成分は、(A)に記載の化合物または化合物群によって放出されたシグナルを受信および電磁放射の形態で放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群(アクセプター群)を含む成分であり、該アクセプター成分は、直接的に、または、該成分群の1またはそれ以上の成分を介してC1qに結合することができる]

を含む上記診断分析システム。

【請求項33】

以下の追加の成分：

(C) 血清もしくは血漿、または、生理学的緩衝液もしくは水で希釈した血清もしくは血漿、

(D) (A)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群(ドナー群)を励起するための光源、

(E) (B)に記載の放出された電磁放射を検出するための検出システムを含む、請求項31または32に記載のHTS可能な分析システム。

【請求項34】

CRPとCRPへ結合する成分との相互作用に、調節する方式で作用する活性物質を測定するためのHTS可能な分析システムであって、以下の成分：

(A) 少なくとも1種のドナー成分、または、少なくとも1種のドナー成分を含む成分群 [該ドナー成分は、光源により励起した後、シグナルを放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群(ドナー群)を含む成分であり、該ドナー成分は、直接的に、または、該成分群からの1またはそれ以上の成分を介してCRPに結合することができる]、

(B) 少なくとも1種のアクセプター成分、または、少なくとも1種のアクセプター成分を含む成分群 [該アクセプター成分は、(A)に記載の化合物または化合物群によって放出されたシグナルを受信および電磁放射の形態で放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群(アクセプター群)を含む成分であり、該アクセプター成分は、直接的に、または、該成分群の1またはそれ以上の成分を介してCRPに結合することができる]、

(C) 少なくとも1種の試験化合物を含む上記分析システム。

【請求項35】

C1qとC1qへ結合する成分との相互作用に、調節する方式で作用する活性物質を測定するためのHTS可能な分析システムであって、以下の成分：

(A) 少なくとも1種のドナー成分、または、少なくとも1種のドナー成分を含む成分群 [該ドナー成分は、光源により励起した後、シグナルを放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群(ドナー群)を含む成分であり、該ドナー成分は、直接的に、または、該成分群からの1またはそれ以上の成分を介してC1qに結合することができる]、

(B) 少なくとも1種のアクセプター成分、または、少なくとも1種のアクセプター成分を含む成分群 [該アクセプター成分は、(A)に記載の化合物または化合物群によって放出されたシグナルを受信および電磁放射の形態で放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群(アクセプター群)を含む成分であり、該アクセプター成分は、直接的に、または、該成分群の1またはそれ以上の成分を介してC1qに結合することができる]、

(C) 少なくとも1種の試験化合物を含む上記分析システム。

【請求項36】

請求項34または35に記載のHTS可能な分析システムであって、以下の追加の成分

10

20

30

40

50

:

(D) (A) に記載の少なくとも 1 種の化合物または化合物群 (ドナー群) を励起するための光源、

(E) (B) に記載の放出された電磁放射を検出するための検出システムを含む上記分析システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、C - 反応性タンパク質 (CRP) および C 1 q を含む溶液の濃度をそれぞれ測定するため、および、CRP および C 1 q と、それぞれそれらに結合する成分との相互作用に影響を与える物質を測定するために、CRP および C 1 q と、それぞれ CRP および C 1 q へ結合する成分との相互作用を測定するための HTS 可能な方法および分析システムに関する。 10

【背景技術】

【0002】

C - 反応性タンパク質 (CRP) は、急性期血漿タンパク質であり、感染または組織損傷の後にその血清濃度は迅速かつ著しく増加する (Volanakis (2001 年) , Molecular Immunology 38 , 189 ~ 197) 。 CRP は、Ca²⁺ イオンの存在下でホスホコリン (PCh) に結合する。PCh は、病原微生物の多糖類、および、損傷した細胞や壊死細胞の細胞膜において極めて普遍的に存在する。PCh に結合した CRP は、タンパク質 C 1 q へ結合することにより、古典的な補体カスケードを活性化することができる。 20

【0003】

補体は、免疫系の一構成成分であり、主に抗体が介在する免疫防御に関与する。補体の 3 つの生理学的な機能は、細菌感染に対する防御、先天性と後天性免疫との連結、および、免疫複合体とアポトーシス細胞の除去である。古典的な補体カスケード、代替補体カスケード、および、マンノース - レクチン補体カスケードは、区別される (Walport (2001 年) , N Engl J Med 344 , 1058 ~ 1066) 。古典的な補体カスケードは、細菌細胞を溶解させ、まず C 1 q と、細胞表面へ結合する抗体または PCh 結合 CRP との連結を開始させる。 30

【0004】

C - 反応性タンパク質は、先進工業国において最も一般的な死亡原因である冠状動脈性心疾患に関するマーカーとして、さらに予測値として用いられる (Rifai および Ridker (2001 年) , Clinical Chemistry 47 , 403 ~ 411) 。

【0005】

新しい研究によれば (Jialal 等 (2001 年) , Circulation 103 , 1933 ~ 1935) 、CRP レベルを低下させること、または、CRP が介在するエフェクターの機能 (例えば C 1 q へ結合することによる補体活性化) をブロックすることが、冠状動脈性心疾患の予防と治療に有用であると推測されている。 40

【0006】

それゆえに、まず、簡単な方法で CRP および / または C 1 q の血漿濃度を測定し、次に、CRP および / または C 1 q とその他の成分との相互作用、特に CRP と C 1 q との相互作用に、調節する方式 (すなわち活性化または阻害する方式) で作用する物質を同定することができる、方法を提供することが望ましい。

【0007】

CRP と C 1 q との結合を測定する方法は、例えば、Jiang 等 (1991 年) , J . Immunol . 146 , 2324 ~ 2330 、および、Agrawal 等 (2001 年) , J . Immunol . 166 , 3998 ~ 4004 で説明されている。いずれの文献も ELISA 法を利用している。これらはいずれも、極めて時間と材料を浪費する、多 50

段階式の不均一方法である。従って、これらの方法を実行するためには、反応物質の1つは常に、予め固相に固定されている必要がある。その上、多数の洗浄工程が必要である。

【0008】

Lebduie等(1998年), Ann Clin Biochem 35, 745~753では、CRPの免疫比濁検出方法が説明されている。この目的のために、サンプルをポリスチレン粒子にローディングした抗CRP抗体と共にインキュベートしている。前記方法は、比濁計が必要である点と、この方法を実行するために比較的大量のサンプルを用いなければならない点において重大な不利益がある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0009】

それゆえに、本発明の目的は、CRPまたはC1qの血漿濃度を簡単な方法で測定、さらに、CRPまたはC1qとその他の成分との相互作用、特にC1qとCRPとの相互作用に調節、活性化または阻害する方式で作用する物質を同定することができる方法を提供することであり、前記方法は、以前に説明された方法に比べて、感度が高く、費用効果が高く、材料を節約することができ、より簡便および/または迅速に行われる点で、先行技術に比べて有利に優れている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記目的は、直接的に、または、1またはそれ以上の成分を介してCRPまたはC1qに結合する2種の成分の結合現象の測定方法によって達成され、本方法は、以下の工程を含む：

- (a) 初めに、CRPまたはC1q含有溶液を導入すること、
- (b) 少なくとも1種のドナー成分、または、少なくとも1種のドナー成分を含む成分群を、前記CRPまたはC1q含有溶液に加えること [前記ドナー成分は、光源により励起した後、シグナルを放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群(ドナー群)を含む成分であり、前記ドナー成分は、直接的に、または、前記成分群からの1またはそれ以上の成分を介してCRPまたはC1qに結合することができる]、
- (c) 少なくとも1種のアクセプター成分、または、少なくとも1種のアクセプター成分を含む成分群を、前記CRPまたはC1q含有溶液に加えること [前記アクセプター成分は、(b)に記載の化合物または化合物群によって放出されたシグナルを受信および電磁放射の形態で放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群(アクセプター群)を含む成分であり、前記アクセプター成分は、直接的に、または、前記成分群の1またはそれ以上の成分を介してCRPまたはC1qに結合することができる]、
- (d) (b)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群(ドナー群)を光源によって励起すること、
- (e) 前記結合現象を検出するために、(c)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群(アクセプター群)によって放出された電磁放射を検出すること。

20

30

【0011】

本発明において、(c)に記載の放出された電磁放射は、好ましくは蛍光放射である。(d)に記載の光源は、例えばレーザーまたはランプ、例えばヘリウムまたはハロゲンランプでもよい。(e)に記載の電磁放射は、例えば光電子増倍管を用いて検出してもよい。

40

【0012】

好ましくは、本発明で用いられ得る成分は、ポリペプチドであるか、または、ポリペプチドを含む。本発明の特に好ましい実施形態において、少なくとも1種の前記成分は抗体であり、この抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。

【0013】

成分群が用いられる場合、前記成分は、好ましくは、空間的に連続して、CRPもしくはC1qに、または、互いに結合することができる。前記結合は、結合カスケードの形態

50

で起こり、その例としては、抗体（一次抗体、二次抗体など）の連続的な結合が挙げられる。本発明において、（b）および（c）に記載のCRPまたはC1qに直接結合する成分は、いずれの場合においても、好ましくは、CRPまたはC1qの特定の結合領域、または、特定のエピトープに結合する成分であり、（b）に記載の前記CRPまたはC1q結合成分は、（c）に記載のCRPまたはC1q結合成分とは異なる結合部位へ結合する。

【0014】

その他の本発明の方法の好ましい実施形態において、CRPまたはC1qに直接結合する成分の一方は、CRPまたはC1qの天然に存在する結合パートナーであり、CRPの場合、このようなパートナーとして特に好ましくはC1qであり、逆もまた同様である。従って、前記ドナーまたはアクセプター成分が、CRPまたはC1qに直接結合する場合、前記ドナーまたはアクセプター成分のいずれかは、ドナー群またはアクセプター群を含むC1qまたはCRPのいずれかである。従って、結合カスケードを形成することができる成分群を用いる場合、C1qまたはCRPは、CRPまたはC1qへ結合する第一の成分であり、これを介して、前記ドナーまたはアクセプター成分のいずれかを、CRPまたはC1qに結合させることができる。前記成分群の残りの成分は、特に好ましくは抗体分子である。

10

【0015】

従って、例えば、初めにCRP含有溶液を導入する場合、この実施形態において好ましくは、前記ドナーまたはアクセプター成分のいずれかそれ自体がC1qを含むか、または、前記ドナーまたはアクセプター成分は、C1qを介してCRPに結合する。この場合、前記ドナーまたはアクセプター成分は、抗C1q抗体、または、前記抗C1q抗体へ結合することができる二次抗体を含んでもよい。従って、いずれの場合においても、その他の成分（アクセプターまたはドナー成分）は、抗CRP抗体、または、前記抗CRP抗体へ結合することができる抗体、または、後者に対して向けられた三次抗体を含む。

20

【0016】

好ましい実施形態において、（b）に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群（ドナー群）および/または（c）に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群（アクセプター群）は、粒子上に局在し、前記粒子の平均直径は、好ましくは150～250nmであり、特に好ましくは約200nmである。従って、この場合、前記ドナーまたはアクセプター成分は、前記粒子を含み、前記粒子は、高分子材料製のものが可能である。

30

【0017】

本発明の方法は、HTS（ハイスループットスクリーニング）可能な方法であり、本方法は、ワンステップ法の形態で均一に実施することができる。

【0018】

好ましい実施形態において、本発明の方法は、「ミックス・アンド・メジャー（mix and measure）」原理に従って実行され、それにより顕著に時間を節約でき、高い精度の測定データを得ることができる。

【0019】

本発明の方法により、CRPのC1qへの結合を測定することができ、それにより、以前に説明されてきた不均一方法を用いた場合に必要とされた時間の10%未満の時間で、前記結合に影響を与える物質、および、測定しようとする複合体媒体中のCRPまたはC1qの濃度を同定することができる。

40

【0020】

この新規の方法の特筆すべき特徴は、反応物質を固相に固定する必要がないため、溶液中の2種のタンパク質間の結合をモニターすることが可能なことである。その上、生物学的な源から得られたタンパク質を直接測定することができ、例えば蛍光団を結合させることによりCRPまたはC1qを改変する必要がない。それゆえに、本方法は、タンパク質をその自然な状態で分析処理することができるという特定の利点を有し、従って、タンパク質を固定および/または改変する際に生じ得る変性のリスクをなくすることができる。

50

【0021】

本発明の方法のその他の利点は、本発明の方法のサンプルの量を従来の方法に比べてかなり低減できることである。従って、10 μ l未満の量を用いることが可能であり、従って、材料コストを最小化することができる。その上、CRPまたはC1q濃度が1 nM未満、さらには100 pM未満の、かなり希釈した溶液を用いることができる。それに加えて、本方法は、極めて高感度である。その上、以上の観察によれば、これは、CRPがC1qに結合することによる補体活性化に影響を与える物質のハイスループットスクリーニングを可能にした最初の方法である。

【0022】

好ましい本発明の方法の実施形態において、前記シグナルは、(b)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群(ドナー群)から、(c)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群(アクセプター群)へ、一重項酸素を介して伝達される。

10

【0023】

この場合、前記ドナー群は、好ましくは、レーザーによる励起の後三重項酸素を一重項酸素に変換できる化合物を含み、および、前記アクセプター群は、一重項酸素によって励起可能な少なくとも1種の第一の化合物、ならびに、一重項酸素によって励起可能な群によって吸収されたエネルギーを、エミッションレス方式で吸収すること、および、蛍光放射の形態で放出することができる第二の化合物を含む。

【0024】

形成された一重項酸素は、前記ドナー群から前記アクセプター群へ拡散し、そこに存在する化学発光物質と反応することができる。このプロセスで放出されたエネルギーは、蛍光団に伝達され、最終的に、前記エネルギーを蛍光放射の形態で放出し、これは、光電子増倍管を用いて検出することができる。検出可能なシグナルに関する前提条件は、水溶液中では、一重項酸素は不安定であり減衰するため、ドナーおよびアクセプタービーズが空間的に近接していることである。それゆえに、この方法で用いられ得る結合成分は、結合現象が起こる場合に、ドナー群とアクセプター群との距離が好ましくは200 nm未満になるように選択され、なぜなら、それより長い距離だと、一重項酸素の減衰時間のために一重項酸素による効果的なエネルギー伝達が不可能なためである。

20

【0025】

この実施形態において特に好ましくは、ドナー群およびアクセプター群が粒子上に局在しており、前記粒子の平均直径は、好ましくは150~250 nmであり、特に好ましくは約200 nmであることである。この場合、前記粒子の好ましい使用形態は、ドナー群含有粒子の最終濃度が1~40 μ g/mlであり、アクセプター群含有粒子の最終濃度が1~80 μ g/mlであることである。前記粒子の結合能は、例えば、粒子1 μ g/mlあたり約0.1 nM~1 nMであり得る。

30

【0026】

特に好ましくは、本方法において、パーキン-エルマーライフサイエンス社製のアルファ-スクリーン(Alpha-Screen)-ビーズを粒子として用いることである。この実施形態において、前記ドナー群は、レーザーを波長680 nmで放射することによって励起され、アクセプター群により放出された放射は、波長520~600 nmで検出可能である。

40

【0027】

従って、この場合、本方法は、初めにドナー群およびアクセプター群を含有するドナービーズおよびアクセプタービーズを導入するような方法で行うことができる。次に、それ自体、または、さらなる成分を介するかのいずれかによってCRPまたはC1qに結合することができる成分は、前記ドナーおよびアクセプタービーズに結合する。すでに上述したように、これら成分は、C1qもしくはCRPのいずれか、または、抗CRPもしくは抗C1q抗体、もしくは、前記抗CRPまたは抗C1q抗体に対して向けられた二次抗体であり得る。

【0028】

50

さらに好ましい本発明の方法の実施形態において、前記シグナルは、(b)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群(ドナー群)から、(c)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群(アクセプター群)に、エミッションレスエネルギー伝達を介して、特に好ましくは蛍光共鳴エネルギー移動を介して伝達される。

【0029】

この場合、本方法は、以下のようにして行うことができる；例えば、(b)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群(ドナー群)は、ユーロピウム塩含有化合物を含み、および、(c)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群(アクセプター群)は、アロフィコシアニンを含んでもよい(Grepin等(2000年), Drug Discovery Today 5, 212)。あるいは、前記ドナー群およびアクセプター群は、エミッションレスエネルギー伝達に適した色素であってもよい。その上、エミッションレスエネルギー伝達、特に蛍光共鳴エネルギー移動に適した当業者既知の全ての化合物を用いることができる(例えば、Pope等(1999年), Drug Discovery Today 4, 350を参照)。

10

【0030】

この実施形態において、好ましくは、結合の後のドナー群およびアクセプター群の距離が10nm未満になるように用いられる結合成分を選択することであり、なぜなら、それより長い距離だと、効果的なエミッションレスエネルギー伝達が不可能なためである。

【0031】

本発明に係る好ましい実施形態において、本発明の方法は、CRPまたはC1q含量が未知のCRPまたはC1q含有溶液の濃度を測定するのに用いられ、前記溶液は、好ましくは、血漿もしくは血清、または、適切な生理学的緩衝液または水で希釈した血漿もしくは血清である。前記方法は、例えば、診断目的で、特に生物の炎症の状態、および/または、心停止および/または卒中のリスクを測定するために用いることができる。

20

【0032】

それゆえに、本発明は同様に、CRPまたはC1qと、CRPまたはC1qへ結合する成分との結合現象を測定するためのHTS可能な診断分析システムに関し、本システムは、以下の成分を含む：

(A) 少なくとも1種のドナー成分、または、少なくとも1種のドナー成分を含む成分群[前記ドナー成分は、光源により励起した後、シグナルを放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群(ドナー群)を含む成分であり、前記ドナー成分は、直接的に、または、前記成分群からの1またはそれ以上の成分を介してCRPまたはC1qに結合することができる]、

30

(B) 少なくとも1種のアクセプター成分、または、少なくとも1種のアクセプター成分を含む成分群[前記アクセプター成分は、(A)に記載の化合物または化合物群により放出されたシグナルを受信および電磁放射の形態で放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群を含む成分であり、および、前記アクセプター成分は、直接的に、または、前記成分群の1またはそれ以上の成分を介してCRPまたはC1qに結合することができる]。

【0033】

この場合、HTS可能な分析システムは、好ましくは、以下の追加の成分を含む：

(C) 血清もしくは血漿、または、生理学的緩衝液または水で希釈した血液、

(D) (A)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群を励起するための光源、

(E) (B)に記載の放出された電磁放射を検出するための検出システム。

40

【0034】

その他の本発明の方法の好ましい実施形態において、試験物質が、結合現象に影響を与えるかどうかを観察するために、工程(a)および/または工程(b)および/または工程(c)および/または工程(d)の前に、少なくとも1種の試験物質を添加する。この方法において、CRPまたはC1qとバインダーとの相互作用、特にCRPとC1qとの相互作用に調節、阻害または活性化する方式で作用する物質を測定することが可能で

50

ある。この実施形態は、好ましくは、望ましい特性を有する物質を測定するために、HTS方法で試験物質のライブラリーをスクリーニングすることを含む。

【0035】

それゆえに、本発明は同様に、CRPまたはC1qと、CRPまたはC1qへ結合する成分との相互作用に調節する方式で作用する活性物質を測定するための、HTS可能な分析システムに関し、本システムは、以下の成分を含む：

(A) 少なくとも1種のドナー成分、または、少なくとも1種のドナー成分を含む成分群 [前記ドナー成分は、光源により励起した後、シグナルを放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群(ドナー群)を含む成分であり、前記ドナー成分は、直接的に、または、前記成分群からの1またはそれ以上の成分を介してCRPまたはC1qに結合することができる]、

(B) 少なくとも1種のアクセプター成分、または、少なくとも1種のアクセプター成分を含む成分群 [前記アクセプター成分は、(A)に記載の化合物または化合物群により放出されたシグナルを受信および電磁放射の形態で放出することができる少なくとも1種の化合物または化合物群を含む成分であり、および、前記アクセプター成分は、直接的に、または、前記成分群の1またはそれ以上の成分を介してCRPまたはC1qに結合することができる]、

(C) 少なくとも1種の試験化合物。

【0036】

この場合、前記HTS可能な分析システムは、好ましくは以下の追加の成分を含む：

(D) (A)に記載の少なくとも1種の化合物または化合物群を励起するための光源、

(E) (B)に記載の放出された電磁放射を検出するための検出システム、

(F) CRPまたはC1q含有溶液。

【0037】

この場合、本発明のHTS可能な分析システムは、好ましくは、上述の本発明の方法を行うために用いられる。それゆえに、分析システムの要素および成分の特定の実施形態は、本発明の方法で用いられる上述の特定の実施形態に相当する。

【0038】

図1は、実施例で説明された方法を図式的に示したものである。ここで、用いられるドナー成分は抗C1q抗体であり、ドナー群は粒子上に局在しており、前記抗C1q抗体に結合する。この場合、ドナー成分は、C1qを介してCRPに結合可能である。この場合、アクセプター成分は、抗ウサギ二次抗体であり、アクセプター群は粒子上に局在しており、前記抗ウサギ二次抗体に結合する。この場合、アクセプター成分は、ウサギ由来抗CRP抗体を介してCRPに結合することができる。

【実施例】

【0039】

典型的な実施形態：CRPのC1qへの結合を測定するための結合分析

この実験は、パッカー・バイオサイエンス社製のアルファ・スクリーン検出キットを用いて行われており、このキットは、ドナーおよびアクセプタービーズを含み、前記ドナービーズは、所定の波長で励起した後、三重項酸素を一重項酸素に変換することができる化合物を含み、前記アクセプタービーズは、一重項酸素によって励起可能な化合物、さらに、励起される化合物からエネルギーを、エミッションレスエネルギー伝達の形態で受信すること、次に、蛍光放射の形態で放出することができる化合物を含む。ここで上記化合物は、いずれの場合も、ヒドロゲルマトリックスに埋め込まれた。用いられたビーズは、製造元により、ドナービーズはストレプトアビジンで、アクセプタービーズは抗ウサギ抗体で予めプレコーティングされていた。

【0040】

【表 1】

表 1 : 用いられる材料の概要

試薬/プレート	分子量または濃度	供給元, カタログ番号
マイクロプレート, 384K, PS, 白色		Greiner 784075
C-反応性タンパク質, ヒト, エシエリキア・コリからの組換え体	1mg/ml, 115kd (5mer)	カルバイオケム (Calbiochem) 236608
c1q, ヒト	1mg/ml, 410kd	カルバイオケム204876
抗CRP, ウサギ	3.57mg/ml, 165kd	カルバイオケム235752
アルファスクリーン IgG検出キット (プロテインA)		パッカード・バイオサイエンス 6760617
アルファスクリーン ウサギIgG検出キット		パッカード・バイオサイエンス 6760607
抗C1q, ヤギ	ポリクローナル血清	カルバイオケム234390
抗ストレプトアビジン	ポリクローナル血清	シグマS6390
EZ-結合スルホ-NHS-LC- ビオチン化キット		ピアス21430
塩化ナトリウム	58.44 g/mol	メルク101540
塩化カルシウム (CaCl ₂ × 2H ₂ O)	147.02 g/mol	メルク102382
トリス (ヒドロキシメチル) - アミノメタン塩酸塩 (トリス)	157.6 g/mol	メルク108219
ウシ血清アルブミン (BSA)		シグマP7888
塩化ホスホリルコリン	329.7 g/mol	シグマP0378
リン酸緩衝食塩水 (Mg ²⁺ および Ca ²⁺ 非含有) (PBS)		ギブコBRL 14200-067
スライドAライザーミニ (Slide- A-Lyzer mini) 透析ユニット 10,000 MWCO		ピアスP. 69570
ジメチルスルホキシド(DMSO)		メルクKGaA, 1.02931
エタノール		リーデルデハーン (Riedel de Haen), 32250
ブルニックF-68	10%濃度溶液	シグマ, P5556
塩酸	1M	メルク, 109057
水酸化ナトリウム溶液	1M	メルク, 109137
ミリQ水		

10

20

30

【0041】

反応緩衝液の製造

アルファ - スクリーン - システムでは、以下の反応緩衝液が用いられた：20mM トリス - HCl (pH 7.2)、150mM NaCl、5mM CaCl₂、1mM ホスホリルコリン、0.1% BSA。トリス - NaCl 緩衝液のストック溶液を、トリス - HCl (3.15g) と NaCl (8.77g) を H₂O に溶解させ、1M NaOH で pH を 7.2 に調節し、次に、H₂O を加えて 1L にすることによって製造した。この緩衝液を室温で保存した。反応緩衝液を、CaCl₂ (36.7mg)、ホスホリルコリン (12.9mg) および BSA (50mg) を トリス - NaCl 緩衝液 (50ml) に加えることにより製造した。

40

【0042】

抗 C1q 抗体のビオチン化

50

抗 C 1 q 抗体がストレプトアビジン被覆ドナービーズに結合できるようにするために、抗 C 1 q 抗体をまずビオチン化する必要がある。この目的のために、抗 C 1 q ポリクローナル血清 (1 0 0 μ l) を P B S (2 0 0 m l) に対して、室温で 1 時間、2 回透析した。1.5 m M スルホ - N H S 溶液 (ミリ Q 水溶液) (2 0 μ l) を添加した後、この溶液を室温で 3 0 分間静置し、次に、過量のビオチン化試薬を除去するために P B S に対して 2 回透析した。

【 0 0 4 3 】

分析方法

初めにドナービーズ / 抗 C R P 溶液 (2 μ l) を導入し、次に、C 1 q (2 μ l)、C R P (2 μ l) およびアクセプタービーズ / 抗 C R P (2 μ l) を加えることによって分析を行った。それにより、以下の最終濃度が得られた：C R P : 1 n M ; C 1 q : 1 0 n M ; 抗 C R P : 7.3 n M ; 抗 C 1 q : 1 : 1 5 0 0 ; ドナービーズ : 2 0 μ g / m l ; アクセプタービーズ : 4 0 μ g / m l 。ネガティブコントロールにおいて、反応緩衝液の代わりに、C R P 溶液、C 1 q 溶液、または、これら溶液の両方を用いた。室温で 2 時間インキュベートした後、アルファクエスト (A l p h a Q u e s t) リーダーでデータを読み込んだ。

10

【 0 0 4 4 】

結果

C R P 濃度 1 n M、C 1 q 濃度 1 0 n M で放出された放射の測定された強度は以下の通りであった (光電子増倍管のカウントを列挙する) :

20

C R P 非存在、および、C 1 q 非存在の場合 : 9 5 2

C R P 存在、および、C 1 q 非存在 : 1 2 5 5

C R P 非存在、および、C 1 q 存在 : 1 1 1 4

C R P 存在、および、C 1 q 存在 : 8 0 3 7 6。

【 0 0 4 5 】

以上より、C 1 q 含有溶液と C R P 含有溶液を合わせた際に、ネガティブコントロールは、強いシグナルは観察されたが、ポジティブな結果は示さないことがわかる。

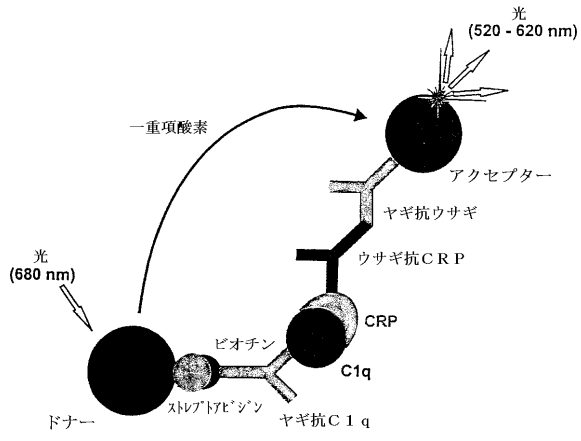
【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 6 】

【 図 1 】 実施例で説明された方法を図式的に示したものである。

30

【 図 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/EP 03/06038

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/542 G01N33/564 G01N33/68		
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 7 G01N		
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 practical, search terms used) MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JIANG H ET AL: "Binding and complement activation by C-reactive protein via the collagen-like region of C1q and inhibition of these reactions by monoclonal antibodies to C-reactive protein and C1q" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 146, no. 7, 1 April 1991 (1991-04-01), pages 2324-2330, XP002251585 ISSN: 0022-1767 cited in the application the whole document	1-36
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 3 March 2004		Date of mailing of the international search report 16/03/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Niemann, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/06038

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>AGRAWAL A ET AL: "Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 15 MAR 2001, vol. 166, no. 6, 15 March 2001 (2001-03-15), pages 3998-4004, XP002272307 ISSN: 0022-1767 cited in the application the whole document</p>	1-36
Y	<p>GLICKMAN J FRASER ET AL: "A comparison of ALPHAScreen, TR-FRET, and TRF as assay methods for FXR nuclear receptors" JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING, vol. 7, no. 1, February 2002 (2002-02), pages 3-10, XP008028213 ISSN: 1087-0571 the whole document</p>	1-36
Y	<p>SEETHALA R.: "Homogeneous assays" HANDBOOK OF DRUG SCREENING MARCEL DEKKER PUB., - 2001 pages 106-128, XP008028242 page 106 -page 110</p>	1-36
A	<p>GREPIN C ET AL: "High-throughput screening. Evolution of homogeneous time resolved fluorescence (HTRF) technology for HTS" DRUG DISCOVERY TODAY 01 MAY 2000 UNITED KINGDOM, vol. 5, no. 5, 1 May 2000 (2000-05-01), pages 212-214, XP002272308 ISSN: 1359-6446 cited in the application the whole document</p>	
T	<p>"Alphascreen™" PERKINELMER, 2003, XP002272309 the whole document</p>	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/06038

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/542 G01N33/564 G01N33/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	JIANG H ET AL: "Binding and complement activation by C-reactive protein via the collagen-like region of C1q and inhibition of these reactions by monoclonal antibodies to C-reactive protein and C1q" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, Bd. 146, Nr. 7, 1. April 1991 (1991-04-01), Seiten 2324-2330, XP002251585 ISSN: 0022-1767 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-36
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung befragt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nützlich ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
3. März 2004		16/03/2004
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Niemann, F

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/06038

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>AGRAWAL A ET AL: "Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 15 MAR 2001, Bd. 166, Nr. 6, 15. März 2001 (2001-03-15), Seiten 3998-4004, XP002272307 ISSN: 0022-1767 In der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1-36
Y	<p>GLICKMAN J FRASER ET AL: "A comparison of ALPHAScreen, TR-FRET, and TRF as assay methods for FXR nuclear receptors" JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING, Bd. 7, Nr. 1, Februar 2002 (2002-02), Seiten 3-10, XP008028213 ISSN: 1087-0571 das ganze Dokument</p>	1-36
Y	<p>SEETHALA R.: "Homogeneous assays" HANDBOOK OF DRUG SCREENING MARCEL DEKKER PUB., - 2001 Seiten 106-128, XP008028242 Seite 106 -Seite 110</p>	1-36
A	<p>GREPIN C ET AL: "High-throughput screening. Evolution of homogeneous time resolved fluorescence (HTRF) technology for HTS" DRUG DISCOVERY TODAY 01 MAY 2000 UNITED KINGDOM, Bd. 5, Nr. 5, 1. Mai 2000 (2000-05-01), Seiten 212-214, XP002272308 ISSN: 1359-6446 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	
T	<p>"Alphascreen™" PERKINELMER, 2003, XP002272309 das ganze Dokument</p>	

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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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, 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, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 アイモ・カント

ドイツ連邦共和国 6 0 5 9 8 フランクフルト・メルフェルダールントシュトラッセ 1 2 3

(72) 発明者 アンティエ・ポメロ

ドイツ連邦共和国 6 7 6 9 7 オッターベルク・バウムシュトラッセ 2 8

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB51 CA26 DA20 DA36 DA77 FB01 FB03 FB07
FB12 FB15 GC15
2G054 AA07 AB04 CA23 CA28 CE02 CE08 EA03 FA12 GA04 GE01
JA09

专利名称(译)	用于测量C-反应蛋白和与C-反应蛋白结合的组分之间相互作用的HTS启用方法和测试系统		
公开(公告)号	JP2005529348A	公开(公告)日	2005-09-29
申请号	JP2004513768	申请日	2003-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	安万特制药德国疗伤植物GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tzungu		
申请(专利权)人(译)	安万特制药Doichiyuranto-GESELLSCHAFT米特Beshurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	アイモカント アンティエポメロ		
发明人	アイモカント アンティエポメロ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/78 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/542 G01N33/566		
CPC分类号	A61P9/00 A61P29/00 G01N33/542 G01N33/566 G01N2333/4737 G01N2500/00		
FI分类号	G01N33/53.X G01N21/78.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB51 2G045/CA26 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/GC15 2G054/AA07 2G054/AB04 2G054/CA23 2G054/CA28 2G054/CE02 2G054/CE08 2G054/EA03 2G054/FA12 2G054/GA04 2G054/GE01 2G054/JA09		
优先权	10226011 2002-06-12 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种具有HTS能力的方法和测试系统，用于确定C反应蛋白(CRP)或C1q与结合CRP或C1q的组分之间的相互作用，以便确定包含CRP或C1q的溶液的浓度。以鉴定影响CRP或C1q与结合其的组分之间的相互作用的物质，尤其是CRP与C1q之间的相互作用。

試薬/プレート	分子量または濃度	供給元、カタログ番号
マイクロプレート, 384孔, P.S., 白色		Greiner 784075
C-反応性タンパク質, ヒト, エシエリキア・コリからの組換え体 c1q, ヒト	1mg/ml, 115kd (5mer)	カルバイオケム (Calbiochem) 236608
抗CRP, ウサギ	1mg/ml, 410kd	カルバイオケム204876
抗CRP, ウサギ	3.57mg/ml, 165kd	カルバイオケム235752
アルファエスクリニン I g G検出キット (プロテインA)		バックワード・バイオサイエンス 6760617
アルファエスクリニン ウサギ I g G検出キット		バックワード・バイオサイエンス 6760607
抗C1q, ヤギ	ポリクローナル血清	カルバイオケム234390
抗ストレプトアビジン	ポリクローナル血清	シグマS6390
EZ-結合スルホ-NHS-LC-ビオチン化キット		ピアス21430
塩化ナトリウム	58.44g/mol	メルク101540
塩化カルシウム (CaCl ₂ × 2H ₂ O)	147.02g/mol	メルク102382
トリス (ヒドロキシメチル) -アミノメタン塩酸塩 (トリス)	157.6g/mol	メルク108219
ウシ血清アルブミン (BSA)		シグマP7888
塩化ホスホリルコリン	329.7g/mol	シグマP0378
リン酸緩衝液塩水 (Mg ²⁺ および Ca ²⁺ 非含有) (PBS)		ギブコBRL 14200-067
スライドAライザーミニ (Slide-A-Lyzer mini) 透析ユニット 10,000 MWCO		ピアスP. 69570
ジメチルスルホキシド(DMSO)		メルクKGaA, 1.02931
エタノール		リーデルデハーン (Riedel de Haen), 32250
ブルロニックF-68	10%濃度溶液	シグマ, P5556
塩酸	1M	メルク, 109057
水酸化ナトリウム溶液	1M	メルク, 109137
ミリQ水		