

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5871487号
(P5871487)

(45) 発行日 平成28年3月1日 (2016.3.1)

(24) 登録日 平成28年1月22日 (2016.1.22)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/56 (2006.01)

C 1 2 Q 1/56

C 1 2 Q 1/37 (2006.01)

C 1 2 Q 1/37

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/53

L

G O 1 N 33/542 (2006.01)

G O 1 N 33/542

Z

G O 1 N 21/76 (2006.01)

G O 1 N 21/76

請求項の数 9 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2011-126283 (P2011-126283)
 (22) 出願日 平成23年6月6日 (2011.6.6)
 (65) 公開番号 特開2011-254815 (P2011-254815A)
 (43) 公開日 平成23年12月22日 (2011.12.22)
 審査請求日 平成26年4月10日 (2014.4.10)
 (31) 優先権主張番号 10005971
 (32) 優先日 平成22年6月10日 (2010.6.10)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 510259921
 シーメンス ヘルスケア ダイアグノステ
 イクス プロダクツ ゲゼルシャフト ミ
 ット ベシユレンクテル ハフツング
 ドイツ連邦共和国 35041 マールブ
 ルグ、エミール-フォン-ペーリング-シ
 ュトラーセ 76
 (74) 代理人 100075166
 弁理士 山口 巖
 (72) 発明者 カタリーナ デケヴィク
 ドイツ連邦共和国 70437 シュトゥ
 ットガルト-ロート ゲンゼベルクシュト
 ラーセ 25

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素反応を測定するための均質な活性試験

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の血液凝固因子の阻害剤の測定方法であって、以下の工程 (a) 及び (b) を備えてなる方法。

(a) 下記を含有する反応混合物の調製及びインキュベーション。;

(i) 前記試料、

(i i) 前記反応混合物に加えられる別個の試薬中に含有される活性化された血液凝固因子であって、その活性が測定対象の前記阻害剤によって直接的又は間接的に影響され得る活性化された血液凝固因子の規定量、

(i i i) 前記添加された活性化された血液凝固因子によって結合され及び修飾され得る基質、及び

(i v) シグナル形成系の第 1 及び第 2 成分であって、前記シグナル形成系の前記第 1 成分が前記基質と結び付けられているか又は結び付けられるようになり、前記シグナル形成系の前記第 2 成分が前記添加された活性化された血液凝固因子と結び付けられており、前記シグナル形成系が、前記シグナル形成系の前記第 1 及び第 2 成分が、前記活性化された血液凝固因子と前記基質との結合によって、相互に空間的に近づけられたときのみに検出可能なシグナルが生成されるようなシグナル形成系である、前記シグナル形成系の第 1 及び第 2 成分、並びに

(b) 前記試料中の前記阻害剤の活性と関連している前記シグナルの測定。

【請求項 2】

10

20

ヘパリン、アルガトロバン、メラガトラン、キシメラガトラン、ビバリルジン、ダビガトラン、リバロキサバン及びヒルジンを含む群からの血液凝固因子の阻害剤を測定するための請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記基質が第 1 結合対 A / B の第 1 結合パートナー A を有し、前記シグナル形成系の前記第 1 成分が前記結合対 A / B の第 2 結合パートナー B を有し、前記第 1 結合パートナー A 及び B の結合によって、前記基質が前記シグナル形成系の前記第 1 成分に結合されているか又はインキュベーション中に結合されるようになる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記結合パートナー A 及び B が、それらが結合対 A / B を形成するように、FLAG タグ / 抗 FLAG タグ抗体、HIS タグ / 抗 HIS タグ抗体、フルオレセイン / 抗フルオレセイン抗体、ビオチン / アビジン及びビオチン / ストレプトアビジンを含む群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記測定対象の活性化された血液凝固因子が第 2 結合対 X / Y の第 1 結合パートナー X を有し、前記第 2 結合対 X / Y の第 2 結合パートナー Y が前記シグナル形成系の前記第 2 成分と結び付けられ、前記活性化された血液凝固因子が、前記結合パートナー X 及び Y の結合によって、前記シグナル形成系の前記第 2 成分に結合される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記結合パートナー X 及び Y が、X が活性化された血液凝固因子特異的な構造又は配列エピトープであり、Y が前記活性化された血液凝固因子特異的な構造又は配列エピトープに対する特異性を備える抗体又は抗体フラグメントであるように、選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記シグナル形成系の前記第 1 成分が第 1 粒子状固相と結び付けられ、前記シグナル形成系の前記第 2 成分が第 2 粒子状固相と結び付けられる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記シグナル形成系の前記第 1 成分が化学発光物質であり前記シグナル形成系の前記第 2 成分が感光剤であるか、又はその逆である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

血液凝固因子 I I a 又は X a の阻害剤を決定するための請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インビトロ (in-vitro) 診断学の分野に属し、試料中の酵素的に触媒された反応 (酵素触媒反応) を測定するための均質法に関する。本発明によれば、酵素触媒化学反応を測定することによって、酵素の活性状態又は該活性状態に影響を及ぼす物質の存在を測定することができる。

【背景技術】

【0002】

化学反応は、それによって物質が変換されるプロセスである。1 つ以上の反応生成物は、1 つ以上の出発物質 (遊離体又は反応体) から形成される。生成物の化学的又は物理的特性は、遊離体の化学的又は物理的特性とは相違する。

【0003】

酵素触媒反応では、酵素は、化学反応の開始、促進又は制御に参与する。

【0004】

10

20

30

40

50

診断学的に重要なパラメーターの多くは、酵素、反応体、反応生成物又は酵素活性の調節剤である。活性調節剤は、酵素の活性に対して、阻害剤、活性剤、アゴニスト、アンタゴニスト又は補因子として、影響を及ぼすことができる物質であると理解すべきである。

【0005】

診断学的に重要な酵素の1つの例は、セリンプロテアーゼ群内の血液凝固因子であるトロンビンであり、患者の血漿試料中のその活性の測定により、患者の血液凝固の状態についての情報を得ることができる。また、別の例は、血液凝固第ⅤⅠⅠ因子活性化プロテアーゼ(FSAP)であり、その活性の測定により、例えば、患者が血栓症を発生するリスクについての情報を得ることができる。

【0006】

10

酵素の活性は、通常、多かれ少なかれ特異的な基質の反応から測定される。公知の方法は、(分離工程を含まない)均質法と(1つ以上の分離工程を含む)不均質法とに分類される。

【0007】

不均質法では、検出対象の物質が濃縮される。つまり、調査対象の試料は、試料の他の成分の濃度が検出対象の物質に比較して減少させられるか又は試料の他の成分が完全に除去されるプロセスに、供せられる。このためには、例えば、親和性技術(affinity technique)が使用される。

【0008】

これとは対照的に、均質法では、試料はアッセイにおいて直接的に調査される。分離プロセス、例えば洗浄工程、は使用されない。

20

【0009】

酵素の活性を測定する均質法の例は、例えば特許文献1に記載されているETPアッセイのような、トロンビン活性アッセイである。血漿試料中のトロンビンが活性化され、発色性ペプチド基質が試料と混合され、トロンビンによるその特異的切断が光度測定法により測定される。しかし、この均質なアッセイフォーマットは、基質特異性の低い酵素の活性の測定には適合しないが、それは基質特異性の欠如により、基質が試料由来の他の酵素によっても変換され得るからである。均質法は、それに対する分析感受性が不十分な基質しか利用できない酵素の測定のためにも、適合しない。更に、この均質なアッセイフォーマットは、一般に、体積活性(volume activity)が低い酵素の活性を測定するためにも、また、適合しない。

30

【0010】

体積活性は、単位体積当たりの酵素の触媒活性を表現する。触媒活性は、単位時間内に反応する基質の量によって又は単位時間内に形成される生成物の量によって、定義される。体積活性は、1分間当たり1リットル当たりの(基質分解又は生成物形成) μmol 、即ち、 $\mu\text{mol}/\text{分} \cdot \text{L}$ 、で表示されることが多い。 $\mu\text{mol}/\text{分}$ に対しては、通常、単位(U)又は触媒単位(kU)の用語が使用される。国際単位系(SI)では、単位カタール(kat)、即ち、 $\text{mol}/\text{秒}$ が使用されなければならない。

【0011】

試料中の酵素の体積活性と共に、特に酵素の比活性は、その活性状態を表現する。比活性は、存在する酵素の量に対する酵素の触媒活性の比率、即ち、 $\mu\text{mol}/\text{分} \cdot \text{g}(\text{U}/\text{g})$ で表わされる。比活性は、例えば、活性化度、分解度又は酵素の阻害若しくは活性化についての情報を提供する。

40

【0012】

調査対象の試料が、使用された基質をも変換させる他の酵素を、含有する場合、これは特に体液の試料等の複合試料の場合に有りうるケースであるが、所望の酵素活性の特異的測定は、適切な高度に特異的な基質なしでは、試料中で直接的に実施することはできない。

【0013】

先行技術では、この課題は、例えば、酵素活性の代わりに、酵素濃度又は抗原濃度を、

50

特異的アッセイによって、例えばイムノアッセイによって、測定することによって解決することができる。抗原濃度は、予測酵素活性と相関している。酵素濃度から酵素活性を推定することは、酵素の活性状態が例えば活性調節剤によって影響を受ける場合には、適切ではない。このため、酵素の活性又はその活性状態は、必ずしも確実に測定することができない。

【0014】

更に、先行技術では、この課題は、通常、不均質なアッセイ系を使用することによって解決されている。この場合には、検出対象の酵素が試料の他の構成成分から分離され、その後酵素活性が測定される。分離は、通常、検出対象の酵素に対して特異的結合親和性を有する固相と試料とを接触させ、次いで、該固相を分離することによって実施される。

10

【0015】

これらの不均質法の不利な点は、それらが、少なくとも1つの分離工程と、おそらく追加の洗浄工程とを、含むことである。これらの追加の工程は、自動化をより困難にし、処理時間を延長させる。処理時間は、検出対象の酵素を固相に結合させるために、試料が所定の時間に亘って固相とともにインキュベートされる場合があるので、更に長くなる。また、別の不利な点は、固相のインキュベーション、分離及び洗浄が検出対象の酵素の活性に影響を及ぼす可能性がある点である。例えば、酵素の立体配座変化又は分解は、活性の変化を引き起こすことがある。不均質法のまた別の不利な点は、試料の他の構成成分が除去され又は少なくともそれらの濃度が減少させられるので、試料に固有であって検出対象の酵素の活性に影響を及ぼす結合相手、補因子、活性剤又は阻害剤も、また、除去され、その結果として、酵素活性又は該酵素と結合の可能性のあるパートナーを試料マトリックスの生理学的状況において測定できない点にある。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明の課題は、従って、使用される基質をも変換させる妨害酵素の存在下においてさえ、酵素の活性の特異的測定を可能にする均質法を提供することにある。更に本発明の課題は、酵素の活性状態を測定すること、つまり体積活性とは別に、酵素濃度、従って比活性又は活性調節剤の存在の、指標を入手することである。特に、比活性又は活性調節剤の測定、好ましくは定量的測定、が可能にされなければならない。更に、低体積活性で存在する酵素の活性を測定することが可能でなければならない。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

【特許文献1】欧州特許出願公開第A2-0420332号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0018】

この課題は、基質並びにシグナル形成系の第1及び第2成分が調査される試料に加えられることで解決されるが、このとき該シグナル形成系の第1成分は、該基質と結び付けられているか又は結び付けられるようになり、該シグナル形成系の第2成分は、測定対象の該酵素と結び付けられるようになる。シグナル形成系は、測定対象の酵素を基質に結合させることによって、シグナル形成系の第1及び第2成分が相互に空間的に近づけられた場合にのみ、検出可能なシグナルが生成されるような系である。他の可能性のある妨害酵素の基質への結合は、シグナルの生成を引き起こさないが、それは、検出対象の酵素のみが該シグナル形成系の第2成分と結び付けられるためである。結果として生じるシグナルは、試料中の酵素の活性についての情報を提供する。

40

【発明の効果】

【0019】

本発明によれば、使用される基質をも変換させる妨害酵素の存在下においてさえ、酵素

50

の活性の特異的測定を可能にする均質法が提供される。また、本発明によれば、酵素の活性状態を測定することが可能になり、特に、比活性又は活性調節剤の測定、好ましくは定量的測定、が可能になる。更に、低体積活性で存在する酵素の活性を測定することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】 L O C I（登録商標）シグナルの酵素活性又は濃度への依存性を示す図。

【図2】 デキストラン硫酸による活性化の有無によるシグナル高及びシグナル動力学の相違を示す図。

【図3】 時間経過によるシグナルの変化を示す図。

10

【図4】 使用したペプチド濃度の関数としての L O C I（登録商標）シグナルの動力学を示す図。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明は、試料中の酵素の活性を測定する方法に関する。

【0022】

用語「酵素」は、本発明において、プロセス中に消費されることなく反応を触媒できる任意の物質を意味する。用語「酵素」は、タンパク質及び核酸、例えば触媒的に活性な RNA 分子、いわゆるリボザイム類、を含んでいる。酵素は、機能に依存して、本質的に以下の種類の 1 つに割り当てられる：オキシドレダクターゼ類、トランスフェラーゼ類、ヒドロラーゼ類（ペプチダーゼ類、例えばセリンプロテアーゼ類、グリコシダーゼ類、グリコシラーゼ類及びヌクレアーゼ類）、リアーゼ類、イソメラーゼ類又はリガーゼ類。詳細には、用語「酵素」には、血液凝固因子である第 I I 因子、第 V I I 因子、第 I X 因子、第 X 因子、第 X I 因子、第 X I I 因子、第 X I I I 因子、プロテイン C、第 V I I 因子活性化プロテアーゼ（F S A P）、プレカリクライン、プラスミノゲン、組織プラスミノゲン活性剤（t P A）及びプロウロキナーゼが含まれる。

20

【0023】

用語「試料」は、本発明において、検出対象の酵素を含有すると推測される材料を意味する。用語「試料」は、特にヒト及び動物由来の、血液、血漿、血清及びその他の体液等の生体液若しくは生体組織、分泌物又は抽出物、を含む。必須ではないが、試料は、検出方法を酵素に適用できるようにするため又は試料から妨害成分を除去するために、前処理されなければならない。試料の前処理には、細胞の分離及び/若しくは溶解、試料の構成成分、例えばタンパク質、の沈降、加水分解若しくは変性、試料の遠心分離、試料の有機溶媒、例えばアルコール類、特にメタノール、を用いた処理；試料の界面活性剤による処理が含まれる。試料は、しばしば、別の、一般には水性の、可能であれば検出方法を妨害しない、媒体へ移される。

30

【0024】

本発明による方法は、試料、測定対象の酵素と結合して少なくとも 1 つの生成物に変換され得る少なくとも 1 つの基質、並びに、相互に空間的に近づけられると検出可能なシグナルが生成されるように相互作用するシグナル形成系の第 1 及び第 2 成分を、含有する反応混合物を供給するステップを備える。基質は、シグナル形成系の第 1 成分と結び付けられているか又は結び付けられるようになり、測定対象の酵素は、該シグナル形成系の第 2 成分と結び付けられる。酵素と基質との間の錯体形成の結果として、シグナル形成系の成分が相互に空間的に近づけられるので、試料中の酵素の活性と関連する検出可能なシグナルが生成される。

40

【0025】

用語「基質」は、本発明において、酵素と結合して少なくとも 1 つの反応生成物に変換される物質を意味する。例えばペプチド結合を加水分解的に切断するペプチダーゼ類を検出するための、好ましい基質は、タンパク質若しくはペプチドから成るか又は少なくとも 1 つのペプチド成分を含有してなる。

50

【0026】

用語「シグナル形成系」は、本発明においては、相互に空間的に近づけられて相互作用できるようにすると、検出可能なシグナルが生成されるように相互作用する、少なくとも第1及び第2成分を含む系を意味する。成分間の相互作用は、特に、エネルギー移動 - つまり、例えば光線又は電子の放射による、及び、反応性化学分子、例えば短寿命一重項酸素を経由する、成分間の直接的なエネルギー移動を、意味する。エネルギー移動は、1つの成分から他の成分へ起こることができるが、その全体に亘ってエネルギー移動が発生する様々な物質の連鎖も、また、考えられる。例えば、該成分は、エネルギードナー及びエネルギーアクセプターからなる対、例えば感光剤及び化学発光物質（欧州特許出願公開（EP-A2）第0515194号明細書、LOCI（登録商標）技術）、又は感光剤及びフルオロフォア（国際公開第95/06877号パンフレット）、又は放射性ヨウ素125及びフルオロフォア（Udenfriendら（1985）Proc. Natl. Acad. Sci. 82:8672-8676）、又はフルオロフォア及び蛍光消光剤（米国特許第3,996,345号明細書）、であってよい。

10

【0027】

シグナル形成系の第1及び/又は第2成分は、共有結合で又は特異的相互作用によって、粒子状固相へ結び付けることができ又は後者の中に挿入することができる。用語「粒子状固相」は、懸濁可能な粒子、例えば金属ゾル、シリカ粒子、磁気粒子又は特に好ましくはラテックス粒子、を意味する。0.01~10 μ mの直径を有する粒子が好ましく、0.1~1 μ mの直径を有する粒子が特に好ましい。

20

【0028】

本発明による方法の1つの実施形態では、基質は、第1結合対A/Bの第1結合パートナーAを有しており、シグナル形成系の第1成分は、結合対A/Bの第2結合パートナーBを有している。従って、基質は、シグナル形成系の第1成分と結び付けられることができる。基質のシグナル形成系の第1成分への結合は、反応混合物のインキュベーション中に、即ち、試料及びシグナル形成系の第2成分の存在下において、起きてよく、また、基質及び第1シグナル形成成分が反応混合物に加えられ前に別個にインキュベートされ、その後、基質とシグナル形成系の第1成分との錯体が反応混合物に加えられてもよい。

【0029】

結合パートナーA及びBは、相互に特異的に認識し結合する、2つの相異なる分子である。特異的な認識及び結合の例は、抗体-抗原相互作用、酵素-基質相互作用、ポリヌクレオチド相互作用、等である。

30

【0030】

適切な結合対A/Bは、主として、抗原/抗体の組み合わせであり、ここで、結合パートナーAは、基質の抗原性エピトープである。抗原性エピトープは、天然配列エピトープ又は天然タンパク質若しくはタンパク質フラグメントの構造的エピトープであってよい。抗原性エピトープは、更にまた、異種配列エピトープ又は修飾基質の構造的エピトープであってよい。異種配列エピトープ若しくは構造的エピトープの例は、FLAG、又はHIS若しくはフルオレセインタグであり、これらは、特に、ペプチド又はタンパク質を標識するために、使用される。その他の適切な結合対A/Bは、相補的ポリヌクレオチドA及びBである。シグナル形成系の第1成分と結合された結合パートナーBは、基質へ特異的に結合できるように選択されなければならない。好ましくは、結合パートナーBは、抗体又はその抗原結合性フラグメントからなる。特に好ましい結合対A/Bは、FLAGタグ/抗FLAGタグ抗体、HISタグ/抗HISタグ抗体、フルオレセイン/抗フルオレセイン抗体、ビオチン/アビジン及びビオチン/ストレプトアビジンである。

40

【0031】

本発明による方法のまた別の実施形態では、測定対象の酵素は、第2結合対X/Yの第1結合パートナーXを有しており、シグナル形成系の第2成分は、結合対X/Yの第2結合パートナーYと結び付けられるので、測定対象の酵素は、反応混合物のインキュベシ

50

ョン中に結合パートナー X 及び Y の結合によって、シグナル形成系の第 2 成分に結合させられる。

【 0 0 3 2 】

結合パートナー X 及び Y は、相互に特異的に認識して結合する、2 つの相異なる分子である。X は、酵素特異的な、構造又は配列エピトープであり、Y は、検出対象の酵素の性質に依存して、該酵素特異的な、構造又は配列エピトープに対する特異性を備える、抗体若しくは抗体フラグメント又はポリヌクレオチドである。

【 0 0 3 3 】

また別の実施形態は、第 I I 因子、第 V I I 因子、第 I X 因子、第 X 因子、第 X I 因子、第 X I I 因子及びプロテイン C を含む群から選ばれるタンパク質分解性凝固因子の活性を測定する方法であって、試料中のタンパク質分解性凝固因子の直接的又は間接的活性化のための試薬が反応混合物に追加添加される方法に関する。

10

【 0 0 3 4 】

試料中のタンパク質分解性凝固因子の直接的又は間接的活性化のためには、試料は、通常、タンパク質分解性凝固因子の直接的又は間接的活性化を引き起こす試薬と混合される。「直接的活性化」は、他の凝固因子の存在とは無関係に、測定対象のタンパク質分解性凝固因子を直接的に活性化する試薬が使用されることを意味している。「間接的活性化」は、血液凝固カスケードの 1 つ以上の血液凝固因子を活性化する試薬が使用されることを意味し、該カスケードが次いで調査対象のタンパク質分解性凝固因子を活性化する。試薬のタイプは、測定対象の凝固因子、凝固因子単独の活性を測定すべきかどうか、又は血液凝固カスケード若しくは血液凝固カスケードの部分領域（外因又は内因経路）の機能性を凝固因子によって測定すべきかどうかに、左右される。タンパク質分解性凝固因子の直接的又は間接的活性化を可能にする物質及び様々な物質の特定の混合物は、当業者には十分に公知であり、例えば、リン脂質類、例えば負荷電リン脂質類；リボタンパク質類、例えばトロンボプラスチン；タンパク質類、例えば組織因子、活性化セリンプロテアーゼ類、例えば第 I I a 因子（トロンビン）、第 V I I a 因子、第 I X a 因子、第 X a 因子、第 X I a 因子、第 X I I a 因子又は活性化プロテイン C；ヘビ毒、例えば、P R O T A C（登録商標）酵素、エカリン、テクスタリン、ノスカリン、パトロキソピン、トロンボシチン又はラッセルクサリヘビ毒（R V V）；接触活性剤、例えば、シリカ、カオリン、エラグ酸又はセライトを含んでいる。試薬を含有し得るその他の物質は、例えば、緩衝物質、塩、洗剤、イオン、特にカルシウムイオン、及びキレート剤である。

20

30

【 0 0 3 5 】

タンパク質分解性凝固因子の活性を測定するための本発明による方法の好ましい実施形態では、試料は、更にフィブリン凝集阻害剤と混合される。フィブリン凝集阻害剤は、トロンビン誘起フィブリンモノマーの凝集を防止する物質である。この方法で、フィブリノーゲン含有試料中でのフィブリン凝塊の形成が防止される。さもなければ、例えば拡散及びクエンチングを制限することによって、測定に有害な作用が及ぼされる可能性がある。好ましいフィブリン凝集阻害剤は、合成ペプチド類、例えばグリシン - プロリン - アルギニン - プロリン配列のペプチド（P e f a b l o c（登録商標）F G、スイス国、P e n t a p h a r m 社から市販されている）である。フィブリン凝集阻害剤として使用できるその他の好ましいペプチド類、特に、グリシン - プロリン - アルギニン - プロリン - アラニン配列の好ましいペプチドは、欧州特許出願公開（E P - A 2）第 4 5 6 1 5 2 号明細書に記載されている。

40

【 0 0 3 6 】

試料、測定対象の酵素が結合して修飾できる物質、並びにシグナル形成系の第 1 及び第 2 成分を含有する反応混合物が調製されると、反応混合物は、一定時間に亘ってインキュベートされ、酵素と基質との十分な結び付きを確実にする。用語「十分な」は、本方法が、全体として、酵素の活性の定量的測定を可能にすることを意味する。特定アッセイ系の最適インキュベーション時間は、実験的に決定することができる。反応混合物中で生成されるシグナル又はシグナルの経時的な変化は、検出対象の酵素の活性又は活性調節剤と相

50

関している。この相関に基づいて、シグナル又はシグナルの時間的变化から、酵素の活性を測定することができる。このために、標準物質を用いた較正が実施されることが好ましい。標準物質は、既定の活性又は濃度を有する酵素又は活性調節剤である。

【0037】

本発明の課題は、更に、酵素活性の特異的測定とは別に、同一反応混合物中の酵素の量を同時に測定することを可能にする均質法を提供することにある。

【0038】

この課題は、シグナル形成系の第3成分が、また、調査される試料に加えられ、これがインキュベーション中に測定対象の酵素と結び付けられることで解決される。シグナル形成系の第3成分は、第1シグナルとは相違して、シグナル形成系の第3及び第2成分が測定対象の酵素への同時結合によって相互に空間的に近づけられた場合にのみ生成される第2の検出可能なシグナルが生成されるような成分である。生成された第2シグナルは、試料中の酵素の量と比例する。

【0039】

同一反応混合物中の酵素の活性と量とを同時測定するためのこの方法は、単一試験ランにおいて、例えば、酵素活性が基準より低い原因が酵素量の減少のためであるかどうか、又は、酵素の量が基準に一致しており、減少した活性についてのまた別の原因、例えば阻害剤等の活性調節剤、又は酵素の機能障害を想定しなければならないかどうかを確定することが可能であるという利点を有する。単一反応混合物中における様々なパラメーターの同時測定は、更に、試料のピペッティングにおいて発生する可能性のある不正確さ、又は試料のエイジングプロセスによって誘発されるであろう不正確さが回避されるという利点を有する。従って、特異的酵素活性の正確な測定が可能である。

【0040】

シグナル形成系の第3成分は、第1シグナルとは相違して、該シグナル形成系の第3及び第2成分が測定対象の酵素への同時結合によって相互に空間的に近づけられた場合にのみ生成される第2の検出可能なシグナルが生成されるような成分である。シグナル形成系の第3成分は、代替エネルギードナー又は代替エネルギーアクセプターのいずれかであってよい。シグナル形成系の第3成分は、更に特定の固相と結び付けることもできる。

【0041】

酵素の量を同時測定する1つの実施形態では、測定対象の酵素は、更に、第3結合対C/Dの第1結合パートナーCを有しており、ここで、第3結合対C/Dの第2結合パートナーDは、シグナル形成系の第3成分と結び付けられ、酵素は、インキュベーション中に結合パートナーC及びDの結合を通して、シグナル形成系の第3成分に結合させられる。第3結合対C/Dは、第2結合対X/Yとは相違していなければならない。

【0042】

結合パートナーC及びDは、相互を特異的に認識して結合する2つの相異なる分子である。Cは、酵素特異的な構造又は配列エピトープであり、Dは、検出対象の酵素の性質に依存して、酵素特異的な構造又は配列エピトープに対する特異性を備える抗体若しくは抗体フラグメント又はポリヌクレオチドである。

【0043】

1つの実施形態では、例えば、シグナル形成系の第1成分は第1化学発光物質であり、シグナル形成系の第2成分は感光剤であり、そして第3成分は第2化学発光物質であり、このとき第1及び第2化学発光物質は、相互に相違する発光スペクトルを有する。相違する発光スペクトルを備える2つの光シグナルの測定は、一方では同一反応混合物中の酵素活性の定量的測定及び酵素の量の定量的測定を可能にする。

【0044】

また別の実施形態では、例えば、シグナル形成系の第1成分は第1感光剤であり、シグナル形成系の第2成分は化学発光剤であり、そして、第3成分は第2感光剤であり、ここで、第1及び第2感光剤は、相異なる波長の光線によって励起可能である。波長Xの光線を用いた第1感光剤の励起後の光シグナル測定は、酵素活性の定量的測定を可能にする。

波長 γ の光線を用いた第2感光剤の励起後の光シグナル測定は、同一反応混合物中の酵素の量の定量的測定を可能にする。

【0045】

本発明の課題は、更に、酵素活性の調節因子を測定することを可能にする均質法を提供することである。

【0046】

用語「酵素活性の調節因子」は、阻害剤、活性剤、アゴニスト、アンタゴニスト又は補因子として、酵素の活性に影響を及ぼす（調節する）ことのできる物質を意味する。

【0047】

この課題は、測定対象の酵素活性の調節因子によって、その活性が直接的又は間接的に影響を受ける可能性がある酵素の規定量が、調査対象の試料に、別個の試薬の形態で加えられることによって解決される。更に、加えられた酵素が結合及び修飾できる基質、並びにシグナル形成系の第1及び第2成分 - ここで、シグナル形成系の第1成分は基質と結び付けられているか結び付けられるようになり、そしてシグナル形成系の第2成分は加えられた酵素と結び付けられる - が、反応混合物に加えられる。シグナル形成系は、測定対象の酵素を基質に結合させることによってシグナル形成系の第1及び第2成分が相互に空間的に近づけられた場合にのみ、検出可能なシグナルが生成されるような系である。測定されたシグナルは、試料中の酵素調節因子の酵素調節活性と関連している。

10

【0048】

本発明による方法は、酵素阻害剤の測定及び酵素活性剤の測定の両方に適合する。酵素阻害剤を測定するためには、酵素は活性化形態で反応混合物に加えられる。酵素活性剤を測定するためには、酵素は非活性化形態で反応混合物に加えられる。

20

【0049】

特に、本発明による方法は、抗凝固剤、即ち、所定の血液凝固因子、の活性を阻害する物質を測定するために適合する。

【0050】

試料中の抗凝固剤を測定するためには、規定量の公知の活性化凝固因子が反応混合物に加えられる。どの活性化凝固因子が加えられるかは、どの抗凝固剤が測定対象であるかに依る。

【0051】

ヘパリン、つまり高分子量未分画ヘパリン（HMWヘパリン）又は低分子量ヘパリン（LMWヘパリン）又はヘパリノイド、の測定のためには、特に、第IIa因子（トロンビン）若しくは第Xa因子の添加が適合する。直接的トロンビン阻害剤、例えばアルガトロバン、メラガトラン、キシメラガトラン、ビパリルジン、ダビガトラン又はヒルジン、の測定のためには、特に、第IIa因子（トロンビン）の添加が適合する。直接的第Xa因子阻害剤、例えばリバロキサバン、の測定のためには、特に第Xa因子の添加が適合する。

30

【0052】

酵素調節因子の定量的測定のための本発明による方法においては、測定対象の酵素調節因子によって、規定量の酵素の活性が直接的又は間接的に影響を受ける可能性があり、酵素が反応混合物に加えられる別個の試薬中に含有されるということとは無関係に、酵素の活性を測定するための方法を実施することについての上記の説明は、酵素調節因子の定量的測定のための本発明による方法にも当てはまる。

40

【0053】

酵素反応は、平衡が確立されるまでの反応の全時間間隔に亘って又は少なくとも1つの特定の時間間隔中又は少なくとも1つの時点において、測定することができる。活性を測定するためには、測定値は、そのまま又は時間間隔に関連付けて使用できる。活性が時間間隔に関連付けた光度測定データから測定される、即ち、変換若しくは反応速度が検出される場合は、変換又は反応速度を測定するための様々な方法を使用できる。例えば、変換速度は、時間 - 変換率曲線によって測定できる。時間 - 変換率曲線については、基質の

50

反応が時間に対してプロットされる。変換速度を測定するためには、直線が時間 - 変換率曲線のゼロ次反応の領域内に、通常、酵素反応の測定開始時に、作図される。直線の勾配により、変換速度、即ち、特定時間間隔内の基質又は生成物の濃度変化、が与えられる。

【 0 0 5 4 】

変換の動力学的の評価に適合する測定量又はパラメーターは、例えば、反応動力学、例えば曲線そのものの考察、を記述する全パラメーターであるが、特に、最大勾配、即ち、反応速度 (v_{max})、シグモイド性パラメーター、直線性パラメーター、曲線下面積等のような、反応動力学の個別パラメーターである。試験評価のために適合するパラメーターは、例えば、絶対測定値、例えば特定時点又は特定測定値 (例えば最大値) に達する時点に測定される L O C I (登録商標) 測定値、である。

10

【 0 0 5 5 】

基質の変換において、酵素はそれらの基質と適切な条件下で反応し、酵素 - 基質錯体を形成する。条件が適切に選択されれば、その後の工程で、基質が少なくとも 1 つの生成物へ変換することがある。

【 0 0 5 6 】

「シグナル形成系」の使用によって、シグナルの様々な時間的關係を酵素活性の測定に利用できる。

【 0 0 5 7 】

酵素に対するシグナル形成系の結合パートナーが十分な濃度で使用されると、遊離酵素 (F E) の濃度、従って活性は、系が平衡状態にあれば、無視することができる。そうでない場合は、少なくとも反応の開始時に、酵素と酵素の結合パートナーとの錯体の形成がシグナルに影響を及ぼす可能性がある。結合パートナーに結合した酵素 (B E) は、基質と反応することができる。基質については、遊離基質 (F S) とシグナル形成系の対応する結合パートナーに結合した基質 (B S) とが区別されなければならない。B E は、従って、F S 又は B S のいずれかに結合する、即ち、S 及び F S が、B E への結合において、相互に競合する。同じことが、F S 又は B S の変換に対応して当てはまる。F S 及び B S が必ずしも B E に対して同一親和性を有する必要はないことを念頭に置いておかなければならない。シグナル形成系への基質の結合は、親和性の変化を導く可能性がある。F S の親和性が B S の親和性より高い場合は、より多くの F S が B E に結合され、その逆もまた同様である。これは、更にまた、F S 及び B S の生成物への変換にも当てはまる。基質から生成物への反応性又は変換可能性は変化する、即ち、シグナル形成系への結合に伴って増加又は減少する、場合がある。基質がシグナル形成系に結合した後の基質の変換反応が、結合した基質の変換反応が結合反応に比較して無視できるように又は結合形態にある基質が辛うじて変換され若しくは全く変換されないように、低下させられることも考えられる。

20

30

【 0 0 5 8 】

シグナル形成系として L O C I (登録商標) を使用した場合は、B E への B S の結合だけがシグナルを与えるので、従って、F S 及び B S の競合はシグナル又はその反応動力学に影響を及ぼす。前記競合は、F S 及び B S の、各々の濃度、親和性又は変換可能性に左右される。

40

【 0 0 5 9 】

主として B S が存在するように基質の量が選択された場合は、F S の濃度は無視することができる。F S は、このとき、シグナル形成においてほとんど役割を果たさない。つまり、B S の濃度、親和性及び変換可能性は、シグナル又はその反応動力学に決定的な影響を及ぼす。B S の変換反応が結合反応に比して優勢である場合は、経時的なシグナルの減少が予想される。これとは逆に、結合反応が変換反応に比して優勢である場合は、最初に該シグナルの経時的増加が予想される。この状況は、実施例 1 に提示した。十分な変換反応が存在する場合は、後ほど、結合が平衡状態に近付いたときに、シグナルの減少が経時的に再び生じる可能性がある。

【 0 0 6 0 】

50

以下の実施例は、本発明を例示するために役立つが、何らかの制限であると理解すべきではない。

【実施例】

【0061】

[材料]

別途記載しない限り、全ての試薬はSigma-Aldrich社（米国ミズーリ州セントルイス）から入手した。

【0062】

[基質]

以下のFSAP感受性ペプチドは、標準Fmocペプチド合成方法によって調製した：
1．アルギニン、プロリン、アルギニン、フェニルアラニン及びリシンの順序の配列のアミノ酸残基でビオチンに結合し、C末端リシン残基上にビオチンを有するペンタペプチド（ペプチドI）；

2．イソロイシン、プロリン、アルギニン及びリシンの順序の配列のアミノ酸残基でビオチンに結合し、C末端リシン残基上にビオチンを有するテトラペプチド（ペプチドII）；

3．N末端リシン残基とビオチンとの間に12エチレングリコール単位（PEG₁₂スペーサー）のポリエチレングリコールを有する、1又は2のペプチド（1によるペプチドIII及び2によるペプチドIV）。

【0063】

[シグナル形成系]

本明細書で使用したシグナル形成系は、公知のLOCI（登録商標）技術（発光酸素チャネリングアッセイ、欧州特許出願公開（EP-A1）第0515194号明細書をも参照されたい）に基づいている。本系は、感光剤及び化学発光物質を含んでいる。感光剤の光線による励起は、化学発光物質を活性化し得る短寿命一重項酸素の生成を誘発し、これにより発光シグナルが放出される。

【0064】

[ケミビーズ（Chemibeads）]

シグナル形成系の第1成分は、以下では「ケミビーズ」と称する。ケミビーズは、粒子状ラテックス固相と結び付けられた化学発光物質を含んでいる。ケミビーズは、ハイブリドーマ細胞系DSMACC2453（欧州特許出願公開（EP-A1）第1650305号明細書を参照されたい）から形成されるモノクローナル抗FSAP抗体（Siemens HealthCare Diagnostics Products社、MAK番号1102-677（26））と、以下の方法によって、接合させた：抗体は、Sephadex（登録商標）G-25カラム内の300mMのNaCl、0.05%のTween（登録商標）20、10mMリン酸緩衝液（pH 7.0）中で緩衝し、20mg/mLに濃縮した。4mgの抗体を、25mg/mLのNaCNBH₃を添加して20mgのケミビーズに共有結合させた。インキュベーション工程及びまだ遊離している反応物質のブロッキング後に、抗体と接合したケミビーズを透析濾過によって精製し、次に50mMのHEPES、300mMのNaCl、1mMのEDTA、0.1%のTriton（登録商標）X-405、1mg/mLのBSA、0.15%のPROCLIN（登録商標）300、0.1mg/mLの硫酸ネオマイシン（pH 8.0）中に採取した。

【0065】

[センシビーズ（Sensibeads）]

シグナル形成系の第2成分は、以下では「センシビーズ」と称する。センシビーズは、感光剤（トリヘキシル）シリコーン-t-ブチルフタロシアニンを含んでいるが、このものは、粒子状ラテックス固相と結び付けられ、その後、ストレプトアビジンで被覆される。

【0066】

[第VII因子活性化プロテアーゼ（FSAP）]

二本鎖 F S A P (t c - F S A P) は、K a n n e m e i e r & K a n n e m e i e r , C . & (2 0 0 1) F a c t o r V I I a n d s i n g l e - c h a i n p l a s m i n o g e n a c t i v a t o r - a c t i v a t i n g p r o t e a s e : a c t i v a t i o n a n d a u t o a c t i v a t i o n o f t h e p r o e n z y m e . E u r . J . B i o c h e m . 2 6 8 (1 3) : 3 7 8 9 - 3 7 9 6) に記述されているように調製した。

【 0 0 6 7 】

実施例 1

F S A P 活性を測定するための本発明による方法

上述した F S A P 感受性ペプチド I ~ I V を、蒸留水中に 2 m g / m L の濃度で溶解し (濃縮液) 、試験のために試験バッファー (2 5 m M の H E P E S 、 1 4 0 m M の N a C l 、 1 0 m M の C a C l ₂ 、 1 % の T w e e n (登録商標) 2 0 、 1 % の B S A 及び 1 % のデキストラン T - 5 0 0 (p H 6 . 3)) 中に、およそ 2 0 μ g / m L に希釈した。試験バッファー中で、ケミビーズを 2 0 0 μ g / m L に、そして、センシビーズを 4 0 0 μ g / m L に希釈した。

【 0 0 6 8 】

[アッセイ I :]

1 2 0 μ L の試験バッファーを 1 0 μ L の抗 F S A P ケミビーズ、試験バッファー (1 0 μ g / m L) 中の 1 0 μ L の精製 t c - F S A P 、 1 0 μ L のビオチン化ペプチド基質及び 1 0 μ L のセンシビーズと混合し、D I M E N S I O N V I S T A (登録商標) 反応キュベット (S i e m e n s H e a l t h c a r e D i a g n o s t i c s P r o d u c t s 社、独国マールブルク (M a r b u r g , G e r m a n y)) 内で 1 0 分間に亘り 3 7 ° でインキュベートした。この後に、反応混合物の化学発光 (以下では L O C I (登録商標) シグナルとも呼ぶ) の動力学的測定を、3 0 分間に亘り、市販で入手可能な D I M E N S I O N V I S T A (登録商標) L O C I (登録商標) 測定ユニット (S i e m e n s H e a l t h c a r e D i a g n o s t i c s P r o d u c t s 社) 内で、実施した。各測定点について、反応混合物を 2 0 0 m s に亘り波長 6 8 0 n m の光線で照射し、生じた L O C I (登録商標) シグナルを 1 , 0 0 0 m s に亘り 6 1 2 n m で測定した。

【 0 0 6 9 】

1 つの試験シリーズでは、上述した 4 つのペプチド基質 I ~ I V を使用した場合のシグナル形成を調査した。表 1 は、活性酵素の存在下で、そして酵素なしで、調査したペプチド基質のシグナル形成を、キロカウント数 (キロカウント) で示している。調査した全 4 つのビオチン化ペプチドだけが、活性酵素の存在下で 3 0 分間に亘る明確なシグナル動力学を示した。酵素が存在しない場合は、該シグナルの有意な経時的な変化を検出できない。

【 0 0 7 0 】

【表 1】

アッセイ	測定動力学 [分間]	ペプチドI [キロカウント]	ペプチドII [キロカウント]	ペプチドIII [キロカウント]	ペプチドIV [キロカウント]
アッセイI(全成分)	2	25.013	23.352	18.237	17.364
	5	37.83	35.704	29.534	26.484
	10	59.635	54.607	49.056	45.347
	15	85.131	79.409	72.159	66.918
	30	144.879	128.201	88.234	81.497
負の コントロール	測定動力学 [分間]	ペプチドI [キロカウント]	ペプチドII [キロカウント]	ペプチドIII [キロカウント]	ペプチドIV [キロカウント]
アッセイI (tc-FSAPを 含まない)	2	15.456	13.875	1.946	2.877
	5	16.814	14.672	2.231	3.214
	10	16.478	16.427	2.433	3.544
	15	17.127	16.127	2.412	3.724
	30	16.972	16.423	2.573	3.709

【 0 0 7 1 】

活性酵素の単なる検出と同様に、活性酵素を定量的に測定することもできる。表 2 は、活性 F S A P（二本鎖（t c）形）の濃度への L O C I（登録商標）シグナルの依存性を示している。F S A P 活性を測定するために、一連の t c - F S A P 希釈液を試験バッファ（18 ~ 600 血漿等量単位（P E U）/ m L、即ち 1 . 5 ~ 5 0 μ g / m L）中で、アッセイ I に記載したように、20 μ g / m L のペプチド基質濃度で、試験した。測定は、30 分間に亘る 37 °C でのインキュベーション後に行なった。表 2 は、F S A P の濃度及び関連活性がシグナルと相関しており、従って、定量することもできることを示している。定量は、例えば、公知の活性を備える活性 F S A P の対応する標準物質を用いた校正によって、実施することができる。本アッセイに t c - F S A P 又はペプチド基質が加えられないと、信号形成は生じない（表 3）。

【 0 0 7 2 】

【表 2】

tc-FSAP [μg/mL]	tc-FSAP [PEU/mL]	シグナル [キロカウント]
0	0	2.735
1.5	18	51.4
3	36	80.146
6	72	101.731
12.5	150	116.522
25	300	146.279
50	600	215.144

【 0 0 7 3 】

【表 3】

tc-FSAP [μg/mL]	ペプチド基質 [μg/mL]	シグナル [キロカウント]
12.5	0	2.391
0	20	2.735
12.5	20	116.522

10

【 0 0 7 4 】

図 1 は、表 2 のデータに基づいて、L O C I (登録商標) シグナルの酵素活性又は濃度への依存性を示している。2 相依存性は興味深い。低 F S A P 濃度において、シグナルの急増が見られる。これは、より高濃度では顕著ではなくなる。低濃度領域内では、酵素濃度、従って結合した酵素の比率、の増加がシグナル形成に寄与する度合いが、より高濃度の領域におけるよりも、より大きいと推測できる。これとは反対に、酵素濃度がより高い範囲内では、シグナル又はシグナル内の変化に結合反応又は変換反応が寄与する度合いがより大きい。

【 0 0 7 5 】

20

酵素の抗原濃度は、必ずしも酵素の活性とは相関しない。例えば、F S A P が、不活性酵素前駆体 (一本鎖 (s c) 形) 及び活性酵素 (t c - F S A P) の両方として、血漿中で循環する際に、F S A P - 抗原濃度と F S A P との間の 1 0 0 % 相関は必ずしも保証されない。本発明による方法を用いると、酵素の活性及び量の両方を測定することができる。このため、酵素の比活性も、また、検出することができる。

【 0 0 7 6 】

これを明確にする目的で、s c - F S A P を活性化するため、クエン酸塩血漿を 2 0 μ g / m L の高分子量デキストラン硫酸 (ロイコノストック種 (L e u c o n o s t o c s p p .) からのデキストラン硫酸ナトリウム塩、平均分子量 5 0 0 k D a) 中で 1 5 分間に亘りブレインキュベートし、F S A P の活性化のための高分子量デキストラン硫酸を添加していない試料と比較試験を行なった。デキストラン硫酸の存在下での活性化は、同一試料に対して、同一 F S A P 濃度でデキストラン硫酸による活性化を行なわなかった場合とは、相違するシグナル高及びシグナル動力学をもたらした (表 4 及び図 2)。F S A P の活性化によって生成されるシグナル高は、1 P E U / m L の酵素活性を有する等濃度の 1 2 μ g / m L の精製 t c - F S A P のシグナルに、大まかに、対応する (図示していない)。

30

【 0 0 7 7 】

【表 4】

血漿中FSAPの活性化の補因子としてデキストラン硫酸(DXS)が及ぼす影響

インキュベーション 時間	DXS (20 μ g/mL, MW $\geq$ 500kDa) を含む試験バッファー		DXSを含まない試験バッファー	
	ペプチド濃度 [μ g/mL]		ペプチド濃度 [μ g/mL]	
	10	0	10	0
+37°C で	シグナル [キロカウント]	シグナル [キロカウント]	シグナル [キロカウント]	シグナル [キロカウント]
5	50.303	1.166	19.359	0.856
10	106.500	1.220	36.009	1.005
15	118.096	1.204	41.630	0.823

10

【0078】

上述したように、酵素活性がシグナル形成に及ぼす影響は、酵素濃度と比較すると、反応時間が増加するにつれて増加すると推定できる。これは、図2から明らかである。

20

【0079】

5分間インキュベーションにおけるシグナルに対する15分間インキュベーションにおけるシグナルの比率は、活性化FSAPについてはおよそ2.35、そして、非活性化FSAPについてはおよそ2.15である。後の時点で、酵素活性が酵素又は抗原濃度よりもシグナル形成に対してより大きく寄与すると想定されるならば、2.35対2.15のより高いシグナル比は、活性化試料対非活性化試料におけるFSAPのより高い比活性の指標である。

【0080】

この状況は、15分間及び5分間における、活性化FSAP対非活性化FSAPのシグナル比、2.84及び2.6に類似する。より高いシグナル比は、やはりまた、活性化試料対非活性化試料におけるFSAPのより高い比活性の尺度である。

30

【0081】

シグナルの時間依存性についての他のパラメーターも、また、抗原又は酵素濃度、酵素活性及び結果としての比活性の尺度として使用することができる。例えば、活性化FSAPについては、勾配の数値は、10分間までは10.65キロカウント/分であり、10分後には2.32キロカウント/分である。

【0082】

非活性化FSAPについての10分間までの勾配の数値は、3.60キロカウント/分、10分後には1.12キロカウント/分である。

【0083】

40

10分後の経時的なシグナル増加(勾配)の減少は、活性化FSAPについての方が非活性化FSAPについてよりも、顕著に高い。この減少は、例えば、勾配の比率又は差、即ち、3対2及び7対1.2、によって定量化することができる。より活性なFSAPによる結合基質のより高度の変換が、おそらく、より不活性なFSAPと比較すると、シグナルの経時的な増加を顕著に減少させる。原則として、曲線を考察するための他のパラメーターは、抗原濃度、酵素活性又は比活性を測定するためにも使用することができる。

【0084】

実施例2

酵素活性の阻害剤を測定するための本発明による方法

酵素の比活性の測定は、活性調節剤の存在の可能性についての情報を提供することでも

50

きる。しかし、本発明による方法は、更にまた、影響の定量化及び従って活性調節剤の定量的測定も可能にする。これを、以下に、F S A Pの阻害剤であるアプロチニンの例について示す。シグナル又はその経過は、阻害剤の濃度の関数として変動する。酵素 - 阻害剤相互作用の動力学は、阻害剤の量の関数として酵素活性を測定することによって調査した。t c - F S A P阻害アッセイにおいては、酵素 - 阻害剤錯体の形成を可能にするために、一定量の酵素 (t c - F S A P、 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を、阻害剤 (ウシ肺由来アプロチニン、F l u k a社) 濃度を変えて、プレインキュベートした。また別のアッセイは、プレインキュベーションを行わずに実施した。残留プロテアーゼ活性は、実施例 1 に記載したように、ペプチド基質を加えた後に測定した。

【 0 0 8 5 】

10

アッセイ系：

1 2 0 μL の試験バッファー (p H 6 . 3)、1 0 μL の抗 F S A P ケミビーズ (試験バッファー中、2 0 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及び 1 0 μL の精製 t c - F S A P (1 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を、それぞれ、0、4 . 7 及び 4 7 . 2 U / m L のアプロチニンを含む 1 0 μL の試験バッファーと、D I M E N S I O N V I S T A (登録商標) L O C I (登録商標) 反応キュベット内で混合した。1 0 μL のピオチン化ペプチド基質及び 1 0 μL のセンシビーズ (試験バッファー中の 4 0 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の試験バッファー中への添加は、プレインキュベーションを行わずに、又は 3 7 °C での 1 0 分間のプレインキュベーション後に実施した。生じた L O C I (登録商標) シグナルは、市販の D I M E N S I O N V I S T A (登録商標) L O C I (登録商標) 測定ユニット (S i e m e n s H e a l t h c a r e D i a g n o s t i c s P r o d u c t s 社) において、6 8 0 n m での 2 0 0 m s の照射及び 6 1 2 n m での測定時間 1 , 0 0 0 m s を用いて、動力学的に、3 7 °C で 1 5 分間に亘って、測定した。アプロチニンは、強度のシグナル低減作用を、主として、t c - F S A P を用いたプレインキュベーション後に示す (表 5)。

20

【 0 0 8 6 】

【表 5】

プレインキュベーションを行わない又は行なった場合の、アプロチニンによるtc-FSAP活性の阻害; 15分後の測定値

アプロチニン [U/mL]	プレインキュベーションを行 わない場合のシグナル[キロカウント]	10分間のプレインキュベーション 行なった場合のシグナル[キロカウント]
0	117.27	117.27
4.7	71.18	15.03
47.3	67.8	11.77

30

【 0 0 8 7 】

使用した別の阻害剤は、アプロチニンを用いたアッセイと同様に、F S A Pの軽鎖を対象としており、ハイブリドーマ細胞系 D S M A C C 2 5 3 3 (欧州特許出願公開 (E P - A 2) 第 1 3 3 4 9 8 3 号明細書を参照されたい) によって形成される、F S A P 活性を阻害するモノクローナル抗体 (S i e m e n s H e a l t h c a r e D i a g n o s t i c s P r o d u c t s 社、M A k 番号 1 1 0 2 / 5 7 0) であった。表 6 は、使用したモノクローナル抗体の濃度が増加するにつれて増加する阻害作用を示している。

40

【 0 0 8 8 】

【表 6】

抗FSAP MAk 1102/570を用いたtc-FSAP活性の阻害

抗FSAP MAk 1102/570 [μg/mL]	プレインキュベーションを 行なわない 場合のシグナル [キロカウント]
0	86.5
24	10.3
240	2.7

10

【0089】

アプロチニンを用いた場合及び阻害性抗体を用いた場合のいずれも、シグナルは、活性調節剤の個々の濃度に伴って変動する。適切に較正すると、これは活性調節剤の定量を可能にする。阻害剤は、基質；結合した基質又は未結合基質、の結合又は変換に影響を及ぼす。結合された酵素の結合された基質への結合又は結合プロセスが、選択されたアッセイ系において優勢である場合は、阻害剤濃度の増加に伴って、実施例に示したように、シグナルの絶対値又は経時的な増加の縮小が生じる。これとは反対に、変換反応が優勢である場合は、阻害剤濃度の増加に伴って、シグナルの増加又は経時的なシグナルの減少の縮小が生じる可能性がある。

20

【0090】

更に、本発明による方法は、基質の特性の測定を可能にする。これは、図3から明らかになるであろう。シグナル又はシグナル動力学もまた基質のタイプに左右される。

【0091】

この原因は、様々な結合反応及び/又は変換反応に帰することができる。15分後までのシグナルの増加は、4種の相違するペプチドについて同等である。これは、結合動力学が同等であることを示すものである可能性がある。しかしながら、30分間に亘るインキュベーション後には、ペプチドIIからの、特にペプチドIII及びIVからのシグナルは、ペプチドIと比較して、はるかに低い。同等のペプチド濃度が使用されたので、これは、おそらく、これらのペプチドの親和性の相違又は変換における相違を、示している。例えば、センシビーズに結合したペプチドIの反応は、センシビーズへの結合によって、大幅に制限される可能性がある。このため、特に、結合した酵素と結合した基質との錯体によるシグナルが測定される。結合した基質の変換は、この場合には、減少するか不可能である。しかしながら、もし、結合した基質が変換されると、酵素が少ししか又は全く結合しない、結合した生成物の比率が増加するので、シグナルは、もはや、それ程大きく増加することはできない。このため、LOC I（登録商標）シグナルが減少する。そこで、特に、結合したペプチドIII及びIVは、ペプチドI及びIIより良好に変換されると推測できる。基質は、それらがセンシビーズに結合した後は、もはや酵素によって結合されることができず、変換されることさえできないと考えられる。センシビーズに結合した、もはや該酵素によっては結合されない、基質は適切ではない。まだ辛うじて変換されるか又はもはや測定可能には変換されないが酵素には結合する結合した基質は、依然として適切である。

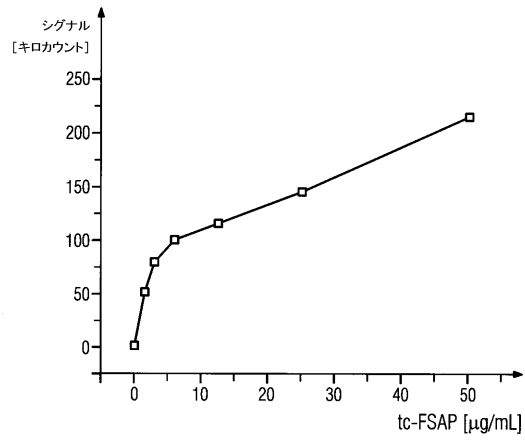
30

40

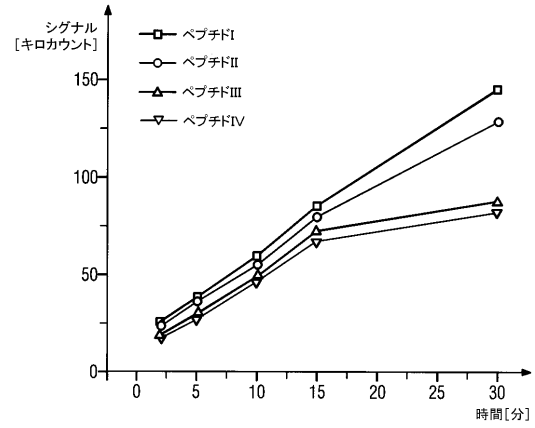
【0092】

酵素の活性及び濃度の測定並びに相違する基質を用いた場合の挙動の相違とともに、また別の実施例は、基質の濃度をもまた測定できることを証明するであろう。図4は、使用したペプチド濃度の関数としてのLOC I（登録商標）シグナルの動力学を示している。シグナル動力学の勾配は、ペプチド濃度が増加するのに伴って増加する。

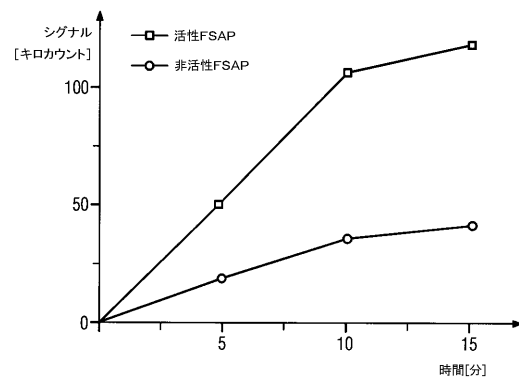
【図 1】



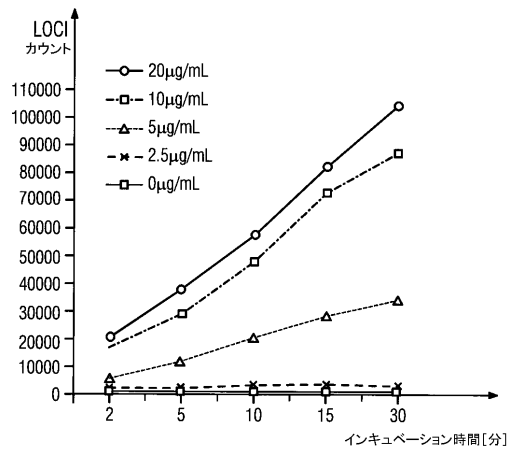
【図 3】



【図 2】



【図 4】



フロントページの続き

- (72)発明者 ヘルベルト シュヴァルツ
ドイツ連邦共和国 35102 ローラ アム ヴィーゼンヴェーク 16
(72)発明者 フランク フィツフム
ドイツ連邦共和国 35094 ランタール ザントヴェーク 6アー

審査官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 特表平09-502520(JP,A)
特開2003-128577(JP,A)
特開平05-180773(JP,A)
Assay Drug Dev. Technol., 2002, Vol. 1, No. 1-1, pp. 97-104

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/00-3/00
G01N 33/53
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

专利名称(译)	用于测量酶反应的均相活性测试		
公开(公告)号	JP5871487B2	公开(公告)日	2016-03-01
申请号	JP2011126283	申请日	2011-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	西门子医疗诊断PRODS		
申请(专利权)人(译)	西门子医疗诊断产品Gezerushiyafuto Mitsuto Beshiyurenkuteru有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	西门子医疗诊断产品Gezerushiyafuto Mitsuto Beshiyurenkuteru有限公司		
[标]发明人	カタリーナデケヴィク ヘルベルトシュヴァルツ フランクフィツフム		
发明人	カタリーナ デケヴィク ヘルベルト シュヴァルツ フランク フィツフム		
IPC分类号	C12Q1/56 C12Q1/37 G01N33/53 G01N33/542 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/573 G01N33/5041 G01N33/542 G01N33/58 G01N33/86 G01N2021/6432 G01N2021/6441 G01N2333/745 G01N2333/95 G01N2333/96433 G01N2500/00 G01N2500/02		
FI分类号	C12Q1/56 C12Q1/37 G01N33/53.L G01N33/542.Z G01N21/76 C12Q1/26		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/AB03 2G054/AB05 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CA28 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EB01 2G054/GA03 2G054/GA04 2G054/GE05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ22 4B063/QQ36 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QQ96 4B063/QQ97 4B063/QR02 4B063/QR16 4B063/QR66 4B063/QS26 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	山口 岩		
优先权	2010005971 2010-06-10 EP		
其他公开文献	JP2011254815A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种均匀的方法来确定体外诊断样品中分析物的酶活性，以便同时测定同一反应混合物中的酶量，并确定酶活化剂或抑制剂。溶解情况：提供（a）制备和温育反应混合物的方法，所述反应混合物包含样品，至少一种能够与待测量的目标酶结合或转化的底物，以及信号形成系统中的第一组分和第二组分，其中信号形成系统中的第一分量和第二分量相互作用，以便当它们在空间上相互接近时产生可检测信号，此时，信号形成系统中的第一分量被约束或变为在孵育期间与底物结合，并使待测量的目标酶与信号形成系统的第二组分结合在孵化期间；（b）用于测量样品中酶活性的方法，该方法用于测量与样品中酶活性相关的信号。

(21) 出願番号	特願2011-126283 (P2011-126283)	(73) 特許権者	510259921
(22) 出願日	平成23年6月6日 (2011.6.6)		シーメンス ヘルスケア ダイアグノステ
(65) 公開番号	特開2011-254815 (P2011-254815A)		イクス プロダクツ ゲゼルシャフト ミ
(43) 公開日	平成23年12月22日 (2011.12.22)		ット ベシユレンクテル ハフツング
審査請求日	平成26年4月10日 (2014.4.10)		ドイツ連邦共和国 35041 マールブ
(31) 優先権主張番号	10005971		ルグ、エミール-フォン-パーリング-シ
(32) 優先日	平成22年6月10日 (2010.6.10)		ュトラーセ 76
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100075166
			弁理士 山口 巖
		(72) 発明者	カタリーナ デケヴィク
			ドイツ連邦共和国 70437 シュトゥ
			ットガルト-ロート ゲンゼバルクシュト
			ラーセ 25