

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 535678

(P2002 - 535678A)

(43)公表日 平成14年10月22日(2002.10.22)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/543	525	G 0 1 N 33/543	525 U 4 B 0 6 3
			525 W
	541		541 A
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	S
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 29数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000 - 596372(P2000 - 596372)

(86)(22)出願日 平成12年1月26日(2000.1.26)

(85)翻訳文提出日 平成12年9月26日(2000.9.26)

(86)国際出願番号 PCT/US00/01749

(87)国際公開番号 W000/45171

(87)国際公開日 平成12年8月3日(2000.8.3)

(31)優先権主張番号 60/117,578

(32)優先日 平成11年1月27日(1999.1.27)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 バイエル コーポレイション
BAYER CORPORATION
アメリカ合衆国 ペンシルヴェニア ピッ
ツバーグ バイエル ロード 100

(72)発明者 ニ, ウェイ - チャオ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0203
5, フォックスボロ, ロビンズ ロード
9

(72)発明者 ユースタス, ダニエル ダブリュー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0276
0, ノース アトルボロ, ウェスト スト
リート 115

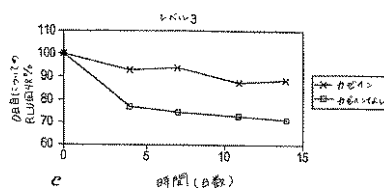
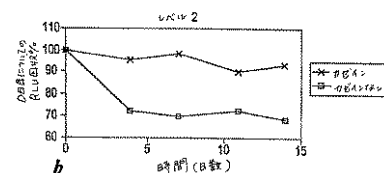
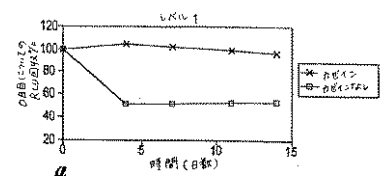
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 粒子のカゼインコーティングを用いる免疫アッセイ

(57)【要約】

カゼインおよびカゼインの塩が、所望の分析物の分離のための免疫アッセイおよび他の結合アッセイにおいて用いられる固相、特に磁性粒子をコーティングするための材料としてのBSAの置換物として、またはBSAに加えて、有用であることが見出された。カゼインを用いることにより、改善された安定性およびより少ない不一致サンプルを有する免疫アッセイが開発された。磁性粒子1グラムあたり0.05グラム～4.0グラムの濃度で用いられるカゼイン（最適には、磁性粒子1グラムあたり約0.78グラム～約1.2グラムのカゼイン）によってこの利点が付与されることが見出された。さらに、固相をコーティングするためのプロセスが発明され、上記プロセスは、30～60にて5～180時間、カゼインを、磁性粒子と混合する工程を含み、上記プロセスは、カゼインでコーティングした常磁性粒子をもたらし、上記粒子は、(1)結合アッセイにおいて必要とされる活性成分とすでに結合しているか、または(2)結合アッセイにおいて必要とされる活性成分と反応し得るかのいずれかである。さらに、カゼインでコーティングした常磁性粒子を用いるためのプロセスが開発され、上記粒子は、免疫アッセイにおいて用いられる活性成分と直接的または間接的に結合する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 カゼインでコーティングした固相を結合アッセイにおいて用いるためのプロセスであって、該固相が、該結合アッセイにおいて用いられる活性成分と直接的または間接的に結合する、プロセス。

【請求項2】 前記固相が、常磁性粒子であり、そして前記結合アッセイが、免疫アッセイまたは遺伝子プローブアッセイである、請求項1に記載のプロセス。

【請求項3】 前記活性成分が、抗原、抗体、核酸、核酸ポリマー、および他のレセプターからなる群より選択される、請求項1に記載のプロセス。

【請求項4】 前記カゼインが、カゼイン酸ナトリウムまたはカゼイン酸カリウムの形態である、請求項1に記載のプロセス。

【請求項5】 結合アッセイにおいて用いられる活性成分を含有する、カゼインでコーティングした常磁性粒子を作製するためのプロセスであって、該プロセスが、カゼインを、常磁性粒子および活性成分と混合する工程を包含し、該混合する工程を、30 ~ 60 にて5 ~ 180時間行って、カゼインでコーティングした常磁性粒子を形成し、該粒子は必要に応じて、中間反応性実体として作用して該結合アッセイにおいて必要とされる活性成分の添加を補助する1以上の成分を含有する、プロセス。

【請求項6】 前記常磁性粒子が、前記活性成分と予めカップリングされている、請求項5に記載のプロセス。

【請求項7】 前記成分が、ビオチン、アビジン、およびストレプトアビジンからなる群より選択される、請求項5に記載のプロセス。

【請求項8】 前記活性成分が、抗原、抗体、核酸、および核酸ポリマーからなる群より選択される、請求項5に記載のプロセス。

【請求項9】 前記カゼインが、カゼイン酸ナトリウムまたはカゼイン酸カリウムの形態である、請求項5に記載のプロセス。

【請求項10】 前記混合する工程が、37 ~ 50 にて14 ~ 144時間行われる、請求項5に記載のプロセス。

【請求項11】 結合アッセイにおいて用いるための、カゼインでコーティ

ングされた常磁性粒子であって、該コーティングされた粒子が、常磁性粒子1グラムあたり0.05グラム～4.0グラムのカゼインを含む、常磁性粒子。

【請求項12】 常磁性粒子1グラムあたり0.15グラム～3.2グラムのカゼインを含む、請求項11に記載の常磁性粒子。

【請求項13】 常磁性粒子1グラムあたり0.78グラム～1.2グラムのカゼインを含む、請求項11に記載の常磁性粒子。

【請求項14】 前記カゼインが、カゼイン酸ナトリウムまたはカゼイン酸カリウムの形態である、請求項11に記載の常磁性粒子。

【請求項15】 前記結合アッセイが、フェリチン；T-取り込み；チロキシン；3,3',5-トリヨードチロニン；遊離3,3',5-トリヨードチロニン；総ヒト絨毛性ゴナドトロピン；CA19-9；およびテストステロンからなる群より選択される分析物についてである、請求項2に記載のプロセス。

【請求項16】 非特異的結合により引き起こされる干渉が減少している、請求項2に記載のプロセス。

【請求項17】 サンプルの不一致により引き起こされる干渉が減少している、請求項2に記載のプロセス。

【請求項18】 安定性が、カゼインの添加に起因して改善されている、請求項2に記載のプロセス。

【請求項19】 前記常磁性粒子がまた、ウシ血清アルブミンでコーティングされる、請求項2に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(関連出願の引用)

本出願は、STABILIZATION OF PARTICLES AND REDUCTION OF DISCORDANT SAMPLES IN IMMUNOASSAYS USING CASEIN COATING OF PARTICLESという表題の、1999年1月27日に出願された米国仮特許出願第60/117,578号に対する、米国特許法第119条(e)項の下での優先権を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、結合アッセイに用いられる、コーティングされた粒子に関する。本発明はまた、上記粒子を作製するためのプロセスおよび上記粒子を用いるためのプロセスに関する。

【0003】

(発明の背景)

免疫アッセイを含む結合アッセイは、通常、種々の分析物の存在およびその濃度を決定するための医療診断道具として用いられる。免疫アッセイ手順は、何年もの間公知であり、そしてより初期の手動手順、その後のより近年の自動化手順(例えば、Bayer ACS:180(登録商標)およびADVIA(登録商標)CentaurTM Instrumentsで行われる自動化手順)を含む。

【0004】

免疫アッセイにおいて用いられる成分の1つは、固相(頻繁には常磁性粒子(PMP))であり、これは、磁性粒子を、磁性粒子と免疫アッセイにおいて用いられる活性成分とのさらなる反応を可能にする材料でコーティングすることにより調製される。従来、磁性粒子は、ウシ血清アルブミン(BSA)で頻繁にコーティングされてきた。しかし、BSAでコーティングされた粒子は、時々、不安定であり、そして信頼できないアッセイ結果を生じることが見出された。さらに

、B S A単独での使用は、高い非特異的結合を生じる。

【0005】

(発明の簡単な要旨)

カゼインおよびカゼインの塩が、所望の分析物の分離のための免疫アッセイおよび他の結合アッセイにおいて用いられる固相、特に磁性粒子をコーティングするための材料としてのB S Aの置換物として、またはB S Aに加えて、有用であることが見出された。カゼインを用いることにより、改善された安定性およびより少ないサンプル不一致を有する免疫アッセイが開発された。磁性粒子1グラムあたり約0.05グラム～4.0グラムの濃度で用いられるカゼイン(最適には、磁性粒子1グラムあたり約0.78グラム～約1.2グラムのカゼイン)によってこの利点が付与されることを見出された。

【0006】

さらに、固相をコーティングするためのプロセスが発明され、上記プロセスは、30～60 にて5～180時間、カゼインを、磁性粒子と混合する工程を含み、上記プロセスは、カゼインでコーティングした常磁性粒子をもたらし、上記粒子は、(1)結合アッセイにおいて必要とされる活性成分とすでに結合しているか、または(2)結合アッセイにおいて必要とされる活性成分と反応し得るかのいずれかである。

【0007】

さらに、カゼインでコーティングした常磁性粒子を用いるためのプロセスが開発され、上記粒子は、免疫アッセイにおいて用いられる活性成分と直接的または間接的に結合する。

【0008】

(発明の詳細な説明)

結合アッセイは、何年もの間、医学的診断試験を実施する場合に分析物の存在およびその濃度を決定するための手段として用いられている。用語、結合アッセイは、広範囲のアッセイ(核酸アッセイ、遺伝子プローブアッセイ、免疫アッセイ、および膜結合を含む)を含むことが意図される。一般に、これらのアッセイは、溶液から分析物を分離するための、分析物(または分析物の濃度と関連させ

られ得る何か)と固相との反応、およびこの分析物の検出を可能にする標識との反応を含んでいる。

【0009】

2つの主要な型の免疫アッセイは、競合アッセイおよび非競合アッセイである。競合アッセイでは、測定されるシグナルは、分析物に結合しない特異的バインダーから発するシグナルである。多数の形式の競合アッセイが存在する。例えば、いくつかの競合アッセイでは、標識抗体が、分析物および固相に固定化された分析物誘導体を含むサンプルとともにインキュベートされる。分析物に結合しなかった標識抗体はこの固相に結合し、そしてこの固相に結合した標識抗体から発するシグナルが測定される。他の型の競合アッセイでは、標識されていない抗体が、分析物および標識された分析物誘導体(または分析物模倣物)を含むサンプルとともにインキュベートされる。標識された分析物誘導体は、占有されていない抗体結合部位に結合する。抗体に結合した標識された分析物誘導体によって由来するシグナルを測定することにより、化学者は実際に、分析物に結合しなかった概算抗体部位濃度を得る。従って、両方の型の競合アッセイにおいて、分析物に結合しなかった特異的バインダー部位の画分に関連したシグナルを測定する。競合アッセイから生じたシグナルは、分析物の濃度が増加するにつれて減少する。低レベルの分析物が高いシグナルに対応するので、低濃度の分析物の小さな変化は、正確には測定することが困難である、大きな数の間の小さな差をもたらす。

【0010】

第2の型の結合アッセイは、非競合型である。このアッセイでは、標識された特異的バインダー(例えば、標識抗体)は、サンプルと共にインキュベートされ、そして分析物の一部に結合する。非競合アッセイの1つのバリエーションでは、固相に固定化された、標識されていない特異的バインダーが同時にまたは次々と添加されて、分析物上の別のエピトープに結合する。この場合、これは、「サンドイッチ」アッセイと呼ばれる。例えば、固定化された分子は、分析物上の第2のエピトープに対する抗体であり得、そしてこの分析物は、標識された抗体および固定化された、標識されていない抗体と共に三次複合体を形成し得る。次いで、固相は洗浄され、そして測定されるシグナルは、この分析物を含む三次複合

体に由来するシグナルである。この場合、シグナルは、分析物の濃度が増加するに従って増加する。

【0011】

上記で議論したアッセイは全て、固相、およびこの固相に付着（すなわち、結合または会合）する標識の使用に基づく。多くの型の標識（例えば、放射化学的標識、発光標識、蛍光標識、化学発光標識、酵素標識、リポソーム標識、ならびに種々の金属粒子および非金属粒子）が結合アッセイにおいて用いられている。好ましくは、標識は化学発光標識（例えば、アクリジニウムエステル）である。標識は、共有結合によってバインダーに直接的に付着し得るか、または結合対（例えば、ビオチン / アビジン、DNP / 抗DNPまたは任意の他の結合対）を用いて間接的に付着し得る。

【0012】

固相は一般に、プロセスの何らかの段階で反応混合物から分離され、そして上記固相に付着した標識の量が決定される。固相は一般に、制御された孔径のガラスから作製される粒子、ポリマー粒子、ラテックス、コロイド状金属粒子もしくはコロイド状金属酸化物粒子、不混和性液相、拡張（extended）表面、多孔性紙、多孔性ゲル、リポソーム、セルロースビーズ、エマルジョン、静置もしくは遠心分離によって容易には沈降しない非常に小さい粒子の系、常磁性粒子、セルロースビーズ、架橋デキストラン、または任意の他の粒子から作製される。これらは、サイズが直径10nmから数ミクロンまで変化し得る粒子、任意のサイズのより大きなビーズ、平坦な表面、試験管壁、計量棒の表面、繊維、膜、棒、ディスク、固定化されたバインダーを保有し得る任意の拡張された表面もしくは粒子状表面を含み得る。好ましい固相は、磁性粒子または拡張された表面である。

【0013】

分離工程を含むアッセイにおける磁性粒子の使用は、かなり長い間公知である（米国特許第4,554,088号を参照のこと）。磁性粒子を頻繁に、生物学的に活性な成分を付着させるために、中間体（例えば、シランおよびグルタルアルデヒド）と反応させる。ウシ血清アルブミンは頻繁に、これらの結合成分のう

ちの1つとして用いられている。

【0014】

磁性粒子を生成する際に、不安定性が、PMP上にBSAの薄いコーティングが存在すること（すなわち、BSAのPMPに対する低いコーティング比）に起因することが見出された。さらに、BSAでコーティングされた粒子は、いくつかのアッセイにおいて干渉およびサンプル不一致（すなわち、不適切なアッセイの結果）を引き起こした。

【0015】

不活性タンパク質であるカゼインをBSAの置換物として、またはBSAに加えて用いた場合、これらの問題を排除することを助けることが見出された。カゼインを、1グラムのPMPあたり0.05グラム～4.0グラムのカゼインの範囲で、好ましくは1グラムのPMPあたり0.15グラム～3.2グラムのカゼインの範囲で、そして最も好ましくは1グラムのPMPあたり0.78グラム～1.2グラムのカゼインの範囲で用いた場合、これらの問題はずっと低減された。カゼインとPMPとの混合は、約30～約60にて5～180時間で、好ましくは約37～約50にて14～144時間で起きた。（（フェリチンアッセイにおいて用いられる）カゼインでコーティングした粒子を作製するための代表的なプロセスを実施例5に示す。このプロセスのバリエーションは、他のアッセイについて固相を作製する場合に用いられ得る。）

粒子安定性は、ADVIA（登録商標）CentaurTM装置上で揺り動かす前および後の粒子サイズ分布を評価することにより調べられた。揺り動かすことは、アッセイを装置上で実施する場合に試薬を混合するときに起きる。カゼインでコーティングした粒子は、粒子の相互作用に起因して、より少ない凝集または脱凝集（deaggregation）を示した。従って、カゼインは、この粒子が凝集物を形成するのを防ぐクッション層として役立ったと考えられる。揺り動かす場合対静置の場合であって、上記試薬が1.2グラムのBSA/1グラムのPMPでコーティングされた（図1a）または1.2グラムのカゼイン/1グラムのPMPでコーティングされた（図1b）、フェリチンアッセイにおいて用いられた固相の粒子サイズ分布を示す図1を参照のこと。

【0016】

熱安定性を、総ヒト絨毛性ゴナドトロピン (ThCG)、テストステロン、CA19-9、および遊離のT3を用いて調べ、そしてカゼインでコーティングされた粒子について有意に改善されたことが見出された。(図2および図6、表1および表5、ならびに以下の実施例1を参照のこと。) 積載安定性 (on-board stability) および貯蔵検定安定性 (stored calibration stability) (下記の通りに実施された) はまた、T4、T3、遊離T3、およびT取り込みについて改善されたことが見出された。(実施例2(以下)、表2、および図3~4を参照のこと。)

貯蔵検定安定性を、以下の通りに調べた。0日目に、ADVIA(登録商標) CentaurTMアナライザーで、2~8にて貯蔵した試薬処方物からの検定点をアッセイした。貯蔵した試薬を用いる時間経過研究は、28日間続けられた。特定の日に、BSAでコーティングした粒子およびカゼインでコーティングした粒子の両方を用いるアッセイを行った。各データ点を、対応する試薬に関して0日目の貯蔵検定点に対して比較した。0日目に関するコントロールおよび患者サンプルのプールの用量回収パーセントを決定した。

【0017】

積載安定性試験を行うために、サンプルを連続的に揺り動かす、ADVIA(登録商標) CentaurTMの冷蔵(2~8)チャンバー中にサンプルを貯蔵した。サンプルを、実験開始前に試験した(0日目の値)。さらなるサンプルを、分析のために定期的に(28日目まで)取り出した。結果を、0日目からのデータに対してプロットし、生成物の性能に対する積載貯蔵の効果を決定した。

【0018】

カゼインまたはその塩(例えば、カゼイン酸ナトリウムおよびカゼイン酸カリウム)は、有用なコーティング剤であることが見出された。カゼインの形態の選択は、一部、合成が行われる媒体に依存する。例えば、カゼイン自体は、疎水性であり、そして水溶液中で比較的乏しい溶解度を有する。一方、塩であるカゼイン酸ナトリウムは、水溶液中でさらに良好な溶解度を有し、このことは、それゆえ、水溶液中でより高濃度のカゼイン酸塩を導き、続いて、固相上に沈着した、

カゼインのより厚いフィルムを導く。

【0019】

固相粒子をコーティングするために一般に用いられる材料であるBSAの使用は、干渉および非特異的結合の原因であった。BSAがリガンドに対する複数の結合部位を有するので、BSAが内因性物質（すなわち、ヒトにおいて生成される内因性物質）（例えば、L-チロキシン、プロゲステロン、テストステロン、エストラジオール、およびコルチゾール）による干渉を可能にすることが推測された。さらに、負に荷電した薬物（例えば、イブプロフェンおよびサリチレートなど）、中性薬物（例えば、ワルファリンおよびヨープアノエートなど）、正に荷電した薬物（例えば、キニジン、プロカイン、およびリドカインなど）、ならびに無機イオン（例えば、 Cu^+ 、 Mn^{+2} 、 Ni^{+2} 、 Co^{+2} 、 Ca^{+2} 、および Mg^{+2} ）は、干渉を引き起こすことが見出された。

【0020】

BSA上の複数の結合部位は、患者に特定の薬物が薬物投与される場合、おそらく、サンプル不一致をもたらし得る。多くの薬物がアルブミンに強固に結合することが公知である。（Ulrich Kragh-Hansen, 33 Pharmacological Reviews (1991) 17~53, Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albuminを参照のこと。）薬物分子をBSAに結合した際に、予測される抗原-抗体結合反応に加えて、粒子上での副反応の誘発が存在し得る。このことは、アッセイ系を複雑にし得、そしてサンプル不一致についての偽のシグナルを生じ得る。粒子表面上でBSAを不活性なカゼインで置換することにより、この問題を排除し得る。たとえ、BSAが完全には除去されないが、カゼインが主要なコーティング剤である場合（少なくとも75%のカゼイン/BSA混合コーティングを含む）でも、改善が観察される。

【0021】

コーティング材料としてのカゼインへの変更は、甲状腺ホルモン、ステロイドホルモン結合、および他の非特異的結合からの干渉を除去した。例えば、T4アッセイでは、BSAからカゼインへの変更は、 $0.24 \mu\text{g}/\text{dl}$ から $0.18 \mu\text{g}$

/ d l へと減少した最少の検出可能な用量をもたらした。さらに、このアッセイの低い終点での精度 (1 . 1 2 μ / d l) は有意に改善され、そして変動係数は 2 6 . 5 % から 9 . 3 % へと改善された。

【 0 0 2 2 】

カゼインは、診断アッセイにおいて以前に用いられているが、粒子をコーティングするため、および安定性を改善するためには用いられていない。S n y d e r (米国特許第 4 , 8 2 8 , 9 8 0 号) では、カゼインを用いて、膜構造をコーティングして、膜表面に対するタンパク質の非特異的結合を防止した。W a r r e n (米国特許第 4 , 8 1 2 , 4 1 4 号) では、トレーサー (標識) を含む粒子をカゼインと反応させて、正に荷電した材料および負に荷電した材料からのバックグラウンドシグナルを低減させた (その中の第 2 欄、5 ~ 1 3 行、5 7 - 6 0 行を参照のこと) 。 (すなわち、カゼインは、電荷 - 電荷相互作用を予防する場合にのみいくらかの利益を示した。) カゼインは、非荷電レセプター分子を用いて何らかの利益を示すことは実証されていなかった。さらに、W a r r e n は、標識層 (その中の請求項 1 を参照のこと) 上のカゼインを用い、そしてこのカゼインを抗体の添加と同時に添加した (' 4 1 4 の第 1 3 欄、2 4 ~ 2 9 行を参照のこと) 。 F r e i t a g (米国特許第 5 , 1 3 2 , 2 0 8 号) は、試験条件下でサンプル液において不溶性であるタンパク質で固体成分 (ポリエステル織物) がコーティングされたいくつかの免疫アッセイにおいて用いられる試験片を開示する。カゼインは、これらのアッセイにおいて有用であることが見出された。なぜなら、カゼインはほぼ完全に不溶性であり、そして活性な試薬が、カゼインでコーティングした布上に沈着するのを可能にすることが見出されたからである。

【 0 0 2 3 】

カゼインの使用が全ての型の免疫アッセイにおける安定性 (甲状腺関連アッセイ (例えば、T 取り込み、サイロキシシン (T 4) 、3 , 3 ' , 5 - トリヨードチロニン (T 3) 、遊離 3 , 3 ' , 5 - トリヨードチロニン (遊離 T 3)) 、貧血アッセイ (例えば、フェリチン) 、ホルモンアッセイ (例えば、総ヒト絨毛性ゴナドトロピン、テストステロン) 、ならびに癌マーカーアッセイ (例えば、C A 1 9 - 9) についての安定性を含む) を改善すると考えられる。

【0024】

以下の実施例は、本発明を例示することが意図されるが、本発明を限定することとは意図されない。

【0025】

(実施例1：熱安定性)

カゼインでコーティングした粒子の37での熱安定性を、試薬のいくつかの瓶をオープンの中に配置し、そして各試験点で分析のために1つの瓶を取り出すことにより行った。カゼインでコーティングした粒子の使用は、時間の関数として決定された分析物濃度を、実験開始時に見出された分析物濃度に対して比較することにより示されるように、顕著な改善を示した。図2に示す結果は、カゼインでコーティングした粒子(「改変した」といわれる)について有意な改善が存在することを示す。テストステロンおよびFT3についてのアッセイにおける安定性を図2に示し、一方、ThCGアッセイにおける安定性についてのデータを表Iに示す。CA19-9についての熱安定性を、図6および表5に示す。

【0026】

(実施例2：積載安定性(自動化装置における混合のシミュレーション))

積載安定性試験を行って、カゼインコーティングの影響を決定した。積載安定性試験は、アッセイを行った場合にADVIA(登録商標)Centaur™装置により行われる連続混合をシミュレートする。遊離T3、T3、T4、およびT取り込みデータからのアッセイデータについて図3および図4ならびに表2におけるデータを参照のこと。T取り込みについてのアッセイの他の性能基準は、図5および表3において示されるように、等価なままであった。

【0027】

(実施例3：T4性能試験)

性能試験を、T4アッセイについての試薬を用いて行い、1つのバージョンは、カゼインでコーティングしたPMP(表4における「改変した」)に対してPMP上にコーティングされたBSAを含む(表4における「現行」を参照のこと)。最少検出可能用量および精度について表4において示された改善を参照のこと。他の特性において、BSAでコーティングした固相とカゼインでコーティン

グした固相との間での変化は示されなかった。従って、このことは、カゼイン含有アッセイが信頼性があるままであることを示す。（「改変した」固相が、1 g の P M P あたり 0 . 1 g の B S A および 1 . 0 g のカゼインを含んでいたことに留意されたい。）

（実施例4：C A 1 9 - 9 安定性）

癌マーカーである C A 1 9 - 9 についてのアッセイにおける安定性は、このアッセイにおいて用いられる固相へのカゼインの添加によって有意に改善されている。3つの分析物のレベル（22 . 0 m / m L、88 . 9 U / m L、および173 U / m L）で有意に改善された安定性を示す、図6および表5を参照のこと。

【0028】

（実施例5：カゼインでコーティングした粒子を作製するための代表的プロセス）

1 . P M P を、3 . 1 2 5 % グルタルアルデヒド（0 . 0 1 M 酢酸ナトリウム、p H 5 . 5 中）の添加により活性化し、この混合物を室温で3時間混合する。

【0029】

2 . 抗体を、140 m g 抗体 / g P M P を添加し、そして混合しながら室温にて16 . 5 時間反応させることにより、グルタルアルデヒド活性化 P M P へとカップリングする。

【0030】

3 . 未反応のアルデヒドを、エタノールアミンとの反応によりクエンチングする。P M P を、容器への磁気力の適用により磁氣的に分離する。粒子を、0 . 1 リン酸ナトリウム緩衝液（p H 8 . 0）で洗浄し、次いで0 . 1 M リン酸ナトリウム緩衝液（p H 8 . 0）中に再懸濁する。懸濁した粒子に、エタノールアミン（最終反応混合物中で1 . 1 M）を添加し、そしてこの混合物を室温にて1時間攪拌する。

【0031】

4 . シッフ塩基を、ボラン - ピリジンの添加により還元する。粒子を、磁界の適用により分離し、そして0 . 1 M リン酸ナトリウム緩衝液（p H 8 . 0）で洗浄し、次いで0 . 1 M リン酸ナトリウム緩衝液（p H 8 . 0）中に再懸濁する。

ボラン - ピリジン (4 : 1 の容量 / 容量比でジメチルスルホキシドに対して混合したボラン - ピリジン) (最終反応混合物中で 50 ~ 100 mM) を添加し、そして室温にて 1 時間反応させる。

【0032】

5 . 粒子を、磁気力の適用により分離し、そして 1 M NaCl 溶液で洗浄する。この粒子を 0 . 01 リン酸ナトリウム緩衝液で洗浄する (pH 8 . 0) 。粒子を、熱ストレス緩衝液で洗浄し、次いで熱ストレス緩衝液中に再懸濁し、そして混合物を 50 にて 16 . 5 時間インキュベートする。 (熱ストレス緩衝液は、0 . 220 g / L リン酸ナトリウム (一塩基性) 、 4 . 03 g / L リン酸ナトリウム (二塩基性) 、 8 . 75 g / L 塩化ナトリウム、 1 g / L スルフヒドリル修飾 BSA、 0 . 010 g / L ウシ γ グロブリン (BgG) 、および 39 g / L カゼイン (ナトリウム塩) からなり、 pH 8 . 0 である。)

6 . 粒子を、磁界の適用により分離し、そして 1 M NaCl で洗浄し、磁気的に分離し、そしてタンパク質緩衝液で洗浄する。 (タンパク質緩衝液は、 0 . 220 g / L リン酸ナトリウム (一塩基性) 、 4 . 03 g / L リン酸ナトリウム (二塩基性) 、 8 . 75 g / L 塩化ナトリウム、 1 g / L スルフヒドリル修飾 BSA、および 0 . 010 g / L BgG からなり、 pH 8 . 0 である。) 得られる粒子を、固相緩衝液 (10 mM バルビタールナトリウム、 8 . 75 g / L 塩化ナトリウム、 0 . 095 % アジ化ナトリウム、 0 . 372 g / L EDTA 二ナトリウム、 2 . 5 g / L ゼラチン、 1 . 0 g / L BgG、 3 . 0 g / L スルフヒドリル修飾 BSA、 0 . 02 g / L マウス免疫グロブリン G (IgG) 、 0 . 02 g / L カプリン IgG、 0 . 2 mL / L アンホテリシン B、 0 . 48 mL / L 硫酸ゲンタマイシン、 0 . 2 % コール酸ナトリウム、および 0 . 05 g / L アンチフォーム B (anti foam B) 、 pH 8 . 5 に調整) 中に再懸濁する。

【0033】

本発明と矛盾しない改変物は、当業者に明らかである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、1グラムのPMPあたり1.2グラムのBSAまたはカゼインを用いて固相をコーティングした場合のフェリチンアッセイにおける固相の粒子サイズの分布を（容量の変化% 対 粒子サイズで）示す。

【図2】

図2は、BSAでコーティングした磁性粒子（現行）およびカゼインでコーティングした粒子（改変した）の両方についてテストステロンおよびFT3の両方についての37℃での安定性を（用量回収% 対 日数での時間で）示す。

【図3】

図3は、BSAでコーティングした磁性粒子（現行）およびカゼインでコーティングした粒子（改変した）の両方についてFT3、T3、およびT4についてシミュレートした積載安定性（Simulated On-Board Stability）を（用量回収% 対 日数での時間で）示す。

【図4】

図4は、BSAでコーティングした磁性粒子（現行）およびカゼインでコーティングした粒子（改変した）の両方についてT取り込みについてシミュレートした積載安定性（Simulated On-Board Stability）を（TU比回収% 対 日数での時間で）示す。

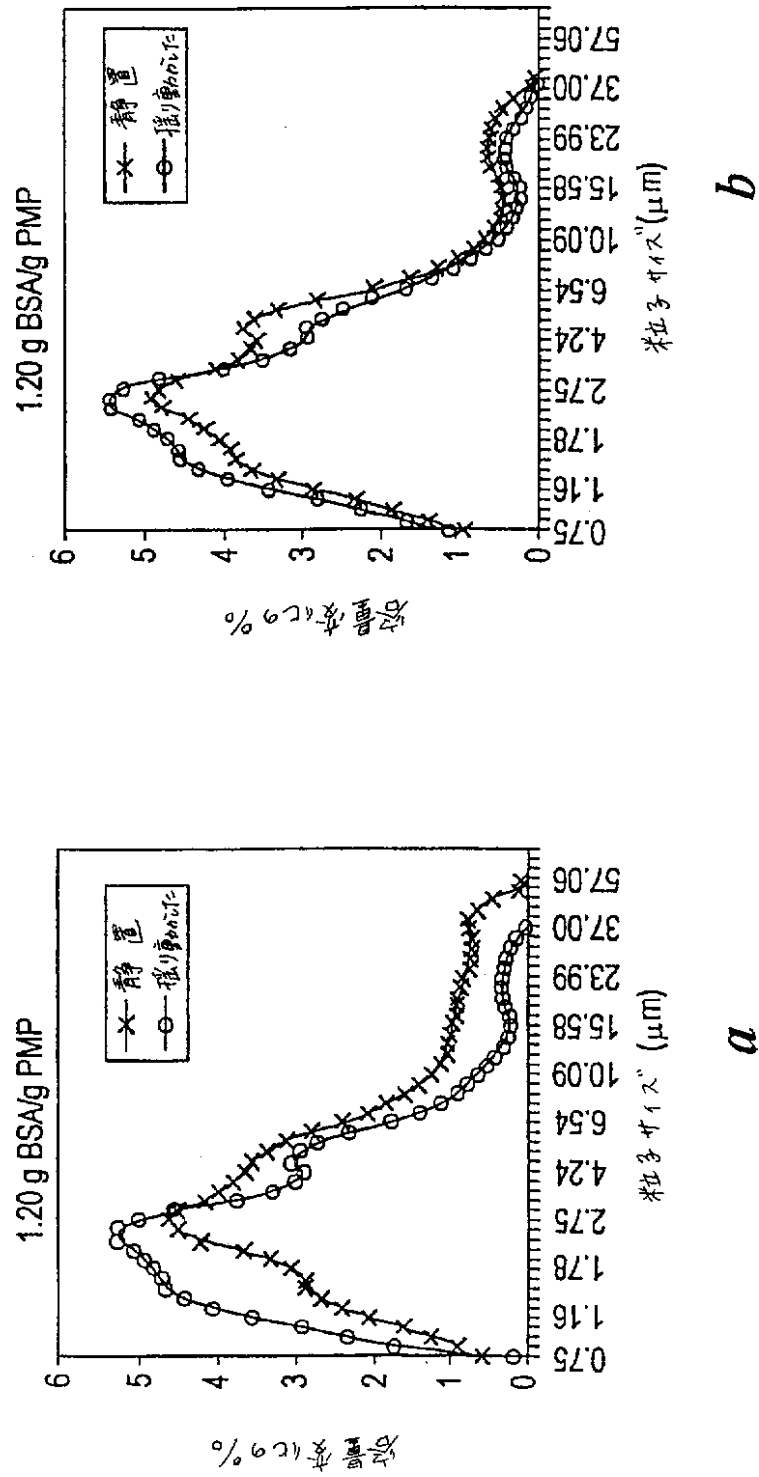
【図5】

図5は、100個の患者サンプルについてのT取り込み%を示す相関研究であり、各々、カゼインでコーティングした固相（改変した）をBSAでコーティングした固相（現行）に対して用いて試験した。

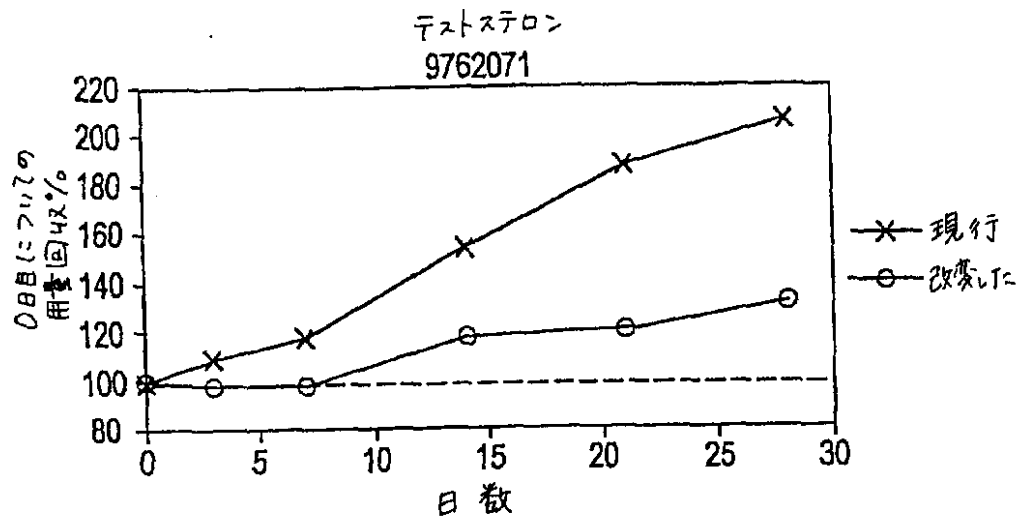
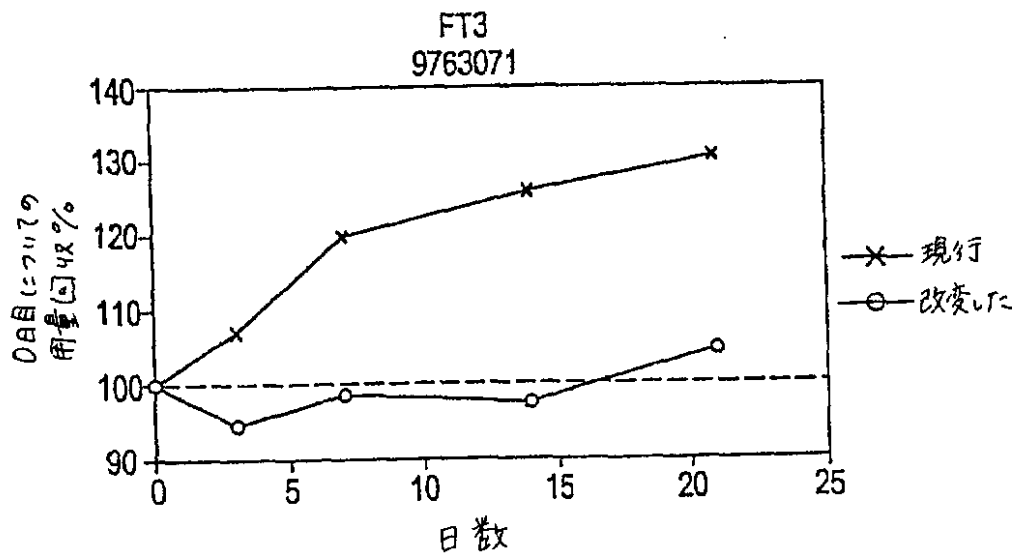
【図6】

図6は、BSAでコーティングした磁性粒子（カゼインなし）およびカゼインでコーティングした粒子（カゼイン）の両方について、3つの異なる分析物レベルでのCA19-9アッセイについて37℃での固相安定性を（用量回収% 対 日数での時間で）示す。

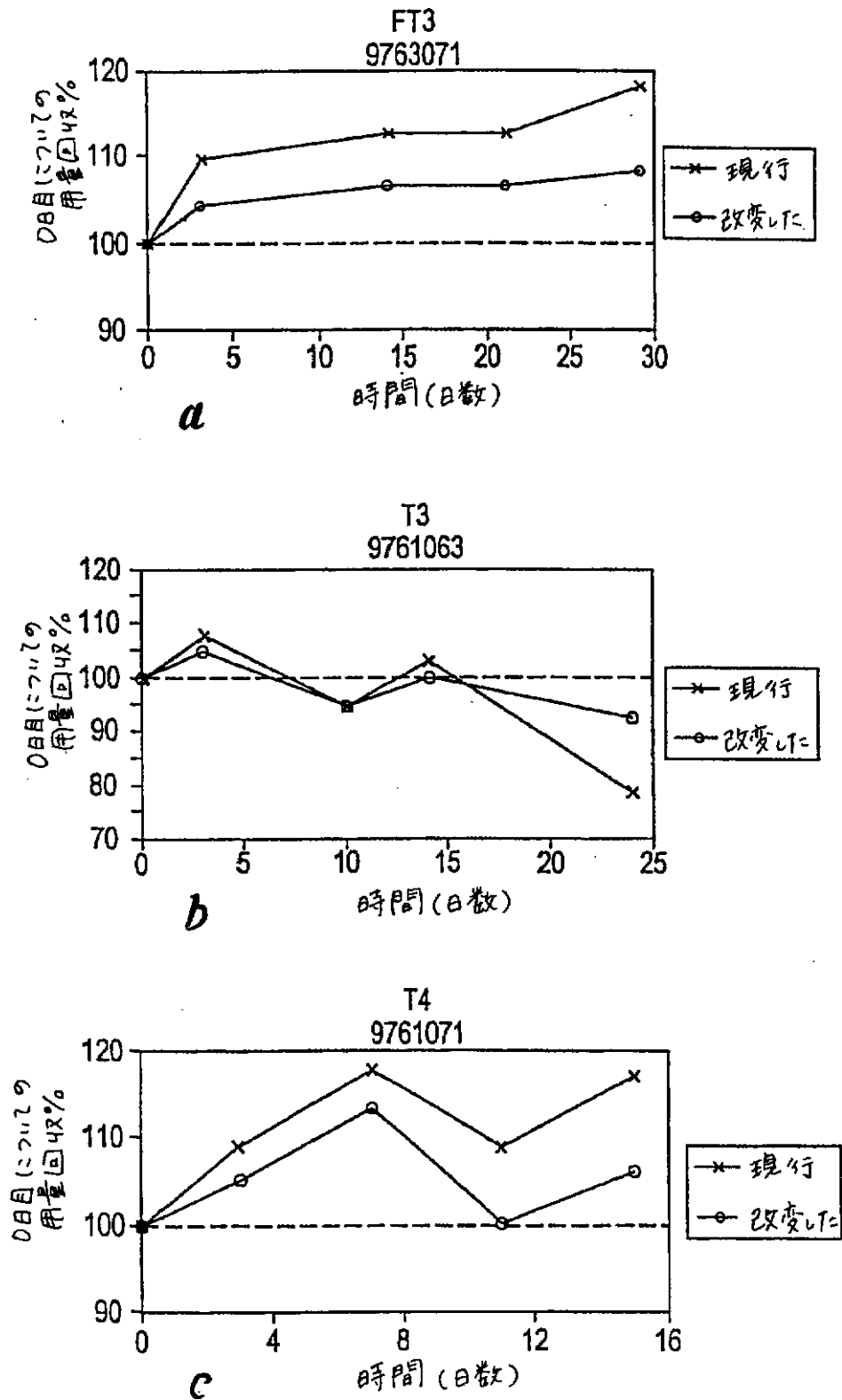
【図1】



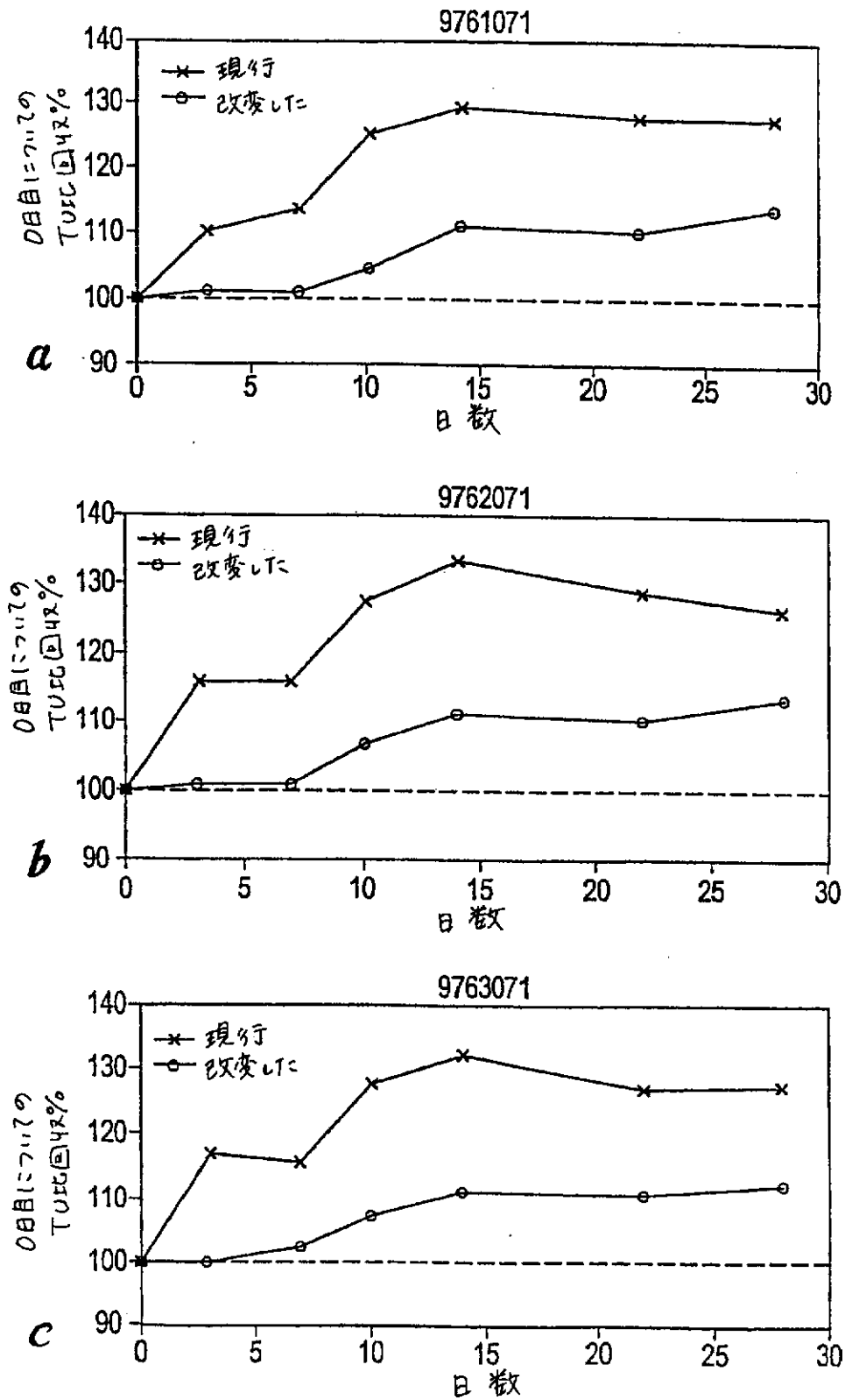
【図2】

*a**b*

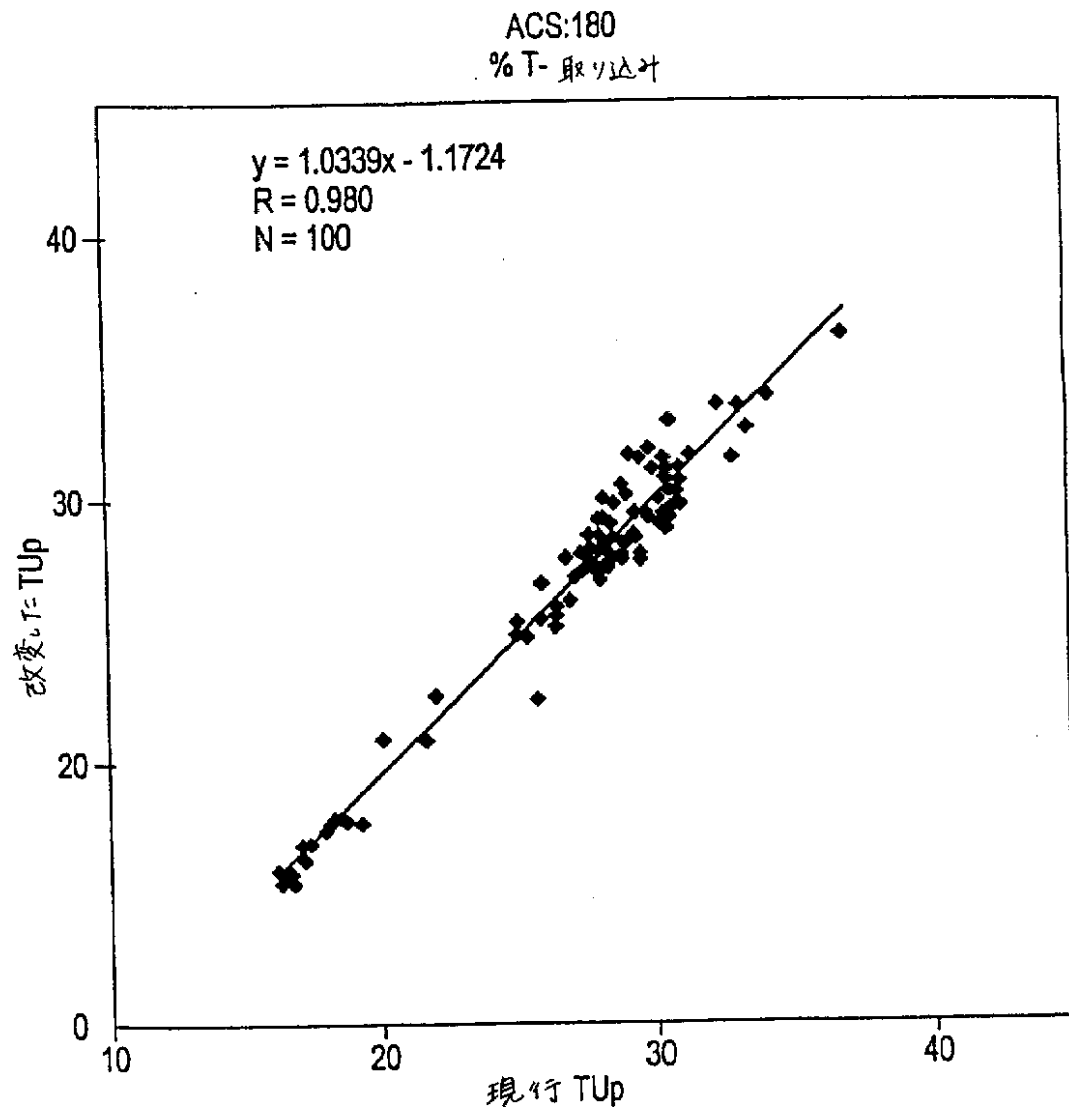
【図3】



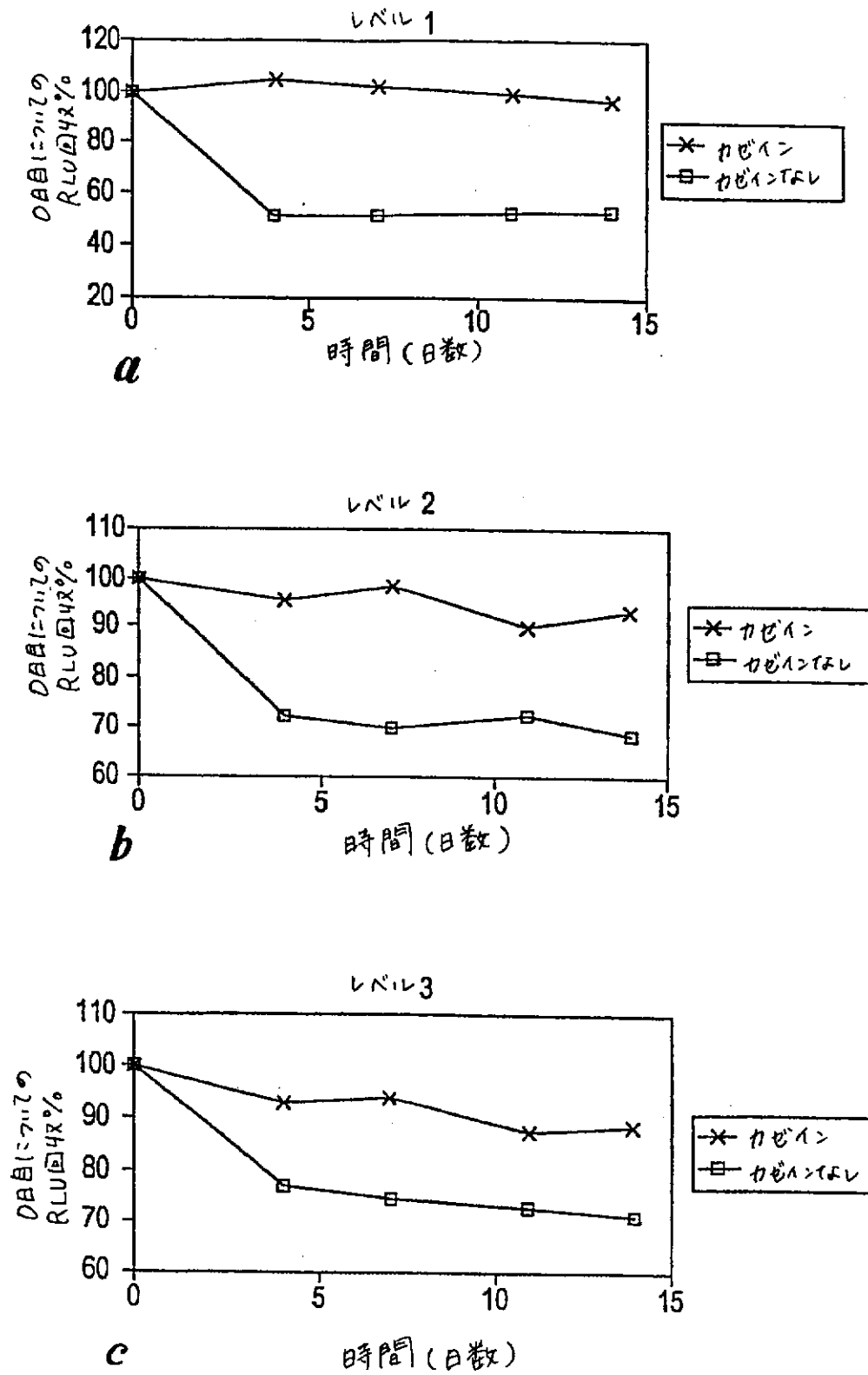
【図4】



【図5】



【図6】



【図7】

Chiron カラム コントロール	コントロールの固相			改変した固相		
	0.08 g BSA / g PMP			1 g カゼイン + 0.08 g BSA / g PMP		
	RLU		0日目回収 %	RLU		0日目回収 %
	0日目	14日目		0日目	14日目	
9761063	13331	9855	73.9	10315	9430	91.4
9762063	43134	33654	78.0	34951	31779	90.9
9763063	417489	302001	72.3	349680	285432	81.6
9761071	14300	10047	70.3	10867	9790	90.1
9762071	28003	20857	74.5	22336	19673	88.1
9763071	352662	270656	76.7	316818	255631	80.7
平均			74.3			87.1

表 1
ACS: 180 ThCG 固相 - 37℃ 安定性

【図8】

Chiron 11カド化合物		0日目			
		現行		変更した	
		RLU	TU比	RLU	TU比
9761071	0.77 - 1.19	217213	1.04	136931	1.06
9762071	0.99 - 1.51	176143	1.28	108564	1.33
9763071	1.30 - 1.98	132623	1.70	80358	1.80

コントロール	3日目								7日目							
	現行				変更した				現行				変更した			
	RLU	TU比	回収%		RLU	TU比	回収%		RLU	TU比	回収%		RLU	TU比	回収%	
9761071	196681	1.15	110.3		134373	1.07	101.2		190801	1.18	113.9		135095	1.07	101.1	
9762071	151770	1.48	115.9		107260	1.34	101.0		151572	1.49	116.0		107824	1.34	101.1	
9763071	113409	1.99	116.9		80287	1.80	100.0		114639	1.96	115.6		78584	1.84	102.4	

コントロール	10日目								14日目							
	現行				変更した				現行				変更した			
	RLU	TU比	回収%		RLU	TU比	回収%		RLU	TU比	回収%		RLU	TU比	回収%	
9761071	172986	1.30	125.4		129944	1.11	104.8		166385	1.35	129.8		122499	1.18	111.3	
9762071	138110	1.63	127.5		101831	1.42	106.8		131601	1.71	133.6		97931	1.48	111.3	
9763071	103776	2.17	127.9		74889	1.93	107.3		99970	2.25	132.4		72412	2.00	111.1	

コントロール	22日目								28日目							
	現行				変更した				現行				変更した			
	RLU	TU比	回収%		RLU	TU比	回収%		RLU	TU比	回収%		RLU	TU比	回収%	
9761071	169901	1.33	127.9		123569	1.17	110.4		167356	1.33	127.9		119414	1.21	114.2	
9762071	136337	1.65	128.9		97964	1.47	110.5		139312	1.62	126.6		95585	1.51	113.5	
9763071	104469	2.16	127.1		72755	1.99	110.6		103832	2.17	127.6		71668	2.02	112.2	

表 2

AD VIA Centaur TUP シミュレーション積載安定性研究

【図9】

		現行	改変した
精度 (n = 10)		CV%	
TU比 0.98		2.41	1.09
0.125		1.98	2.74
0.164		0.82	2.08
コントロールの回収		TU比	
Chiron リカンド	TU比		
9761071	0.77 - 1.19	1.02	1.02
9762071	0.99 - 1.51	1.28	1.31
9763071	1.30 - 1.98	1.66	1.74

表 3

ACS:180 TUp 性能データ

【図10】

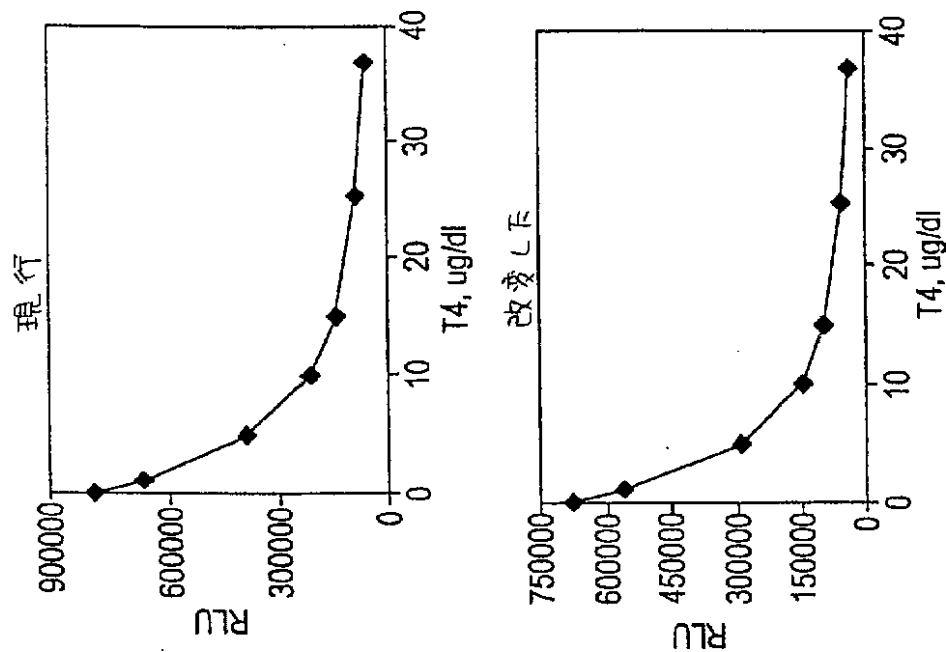


表4
ACS: 180 T4 性能データ

詳細		現在	変更した
最少検出可能用量, 0.5 ug/dl		0.24	0.18
% Bo/TC: > 18		24.8	20.6
ED50: 3.79 - 4.83 ug/dl		4.82	4.17
Cal 高 / Cal 低: 0.10 - 0.55		0.290	0.256
S2 RLU / S6 RLU: 7.71 - 10.3		7.70	9.55
総数, RLU		3282492	3282492
精度, (n = 10)		CV%	
ug/dl			
1.12		26.5	9.33
4.73		3.85	3.10
10.1		1.66	1.58
19.0		2.26	4.98
コントロールの回収		T4, ug/dl	
ロット			
範囲, ug/dl			
4.0 - 6.0		4.84	4.91
8.5 - 10.5		9.22	9.00
15.3 - 19.9		15.4	15.6
2.5 - 5.1		3.48	3.92
5.3 - 8.9		6.99	6.95
10.3 - 16.7		14.1	14.5
主曲線, ug/dl		RLU	
0		813787	676287
1.12		675847	560528
5.01		391975	291768
10.06		217109	149196
15.1		144808	99469
25.3		87740	58685
36.7		59543	38585
現在 0.1g BSA/g PMP			
変更した 0.1g BSA/g PMP			
1.0g カゼイン/g PMP			

【図11】

レベル	U/mL	日数	カゼインあり **		カゼインなし	
			RLU	RLU 回収%	RLU	RLU 回収%
1	22.0	0	15544	100.0	23601	100.0
		4	16400	105.5	12340	52.3
		7	16043	103.2	12329	52.2
		11	15568	100.2	12680	53.7
		14	15174	97.6	12837	54.4
		平均 *		101.6		53.2

レベル	U/mL	日数	カゼインあり **		カゼインなし	
			RLU	RLU 回収%	RLU	RLU 回収%
2	88.9	0	45080	100.0	52938	100.0
		4	43273	96.0	38291	72.3
		7	44524	98.8	37094	70.1
		11	40778	90.5	38439	72.6
		14	42190	93.6	36420	68.8
		平均 *		94.7		71.0

レベル	U/mL	日数	カゼインあり **		カゼインなし	
			RLU	RLU 回収%	RLU	RLU 回収%
3	173	0	86516	100.0	98803	100.0
		4	80469	93.0	76285	77.2
		7	81352	94.0	73698	74.6
		11	75595	87.4	72128	73.0
		14	76487	88.4	70349	71.2
		平均 *		90.7		74.0

* 4～14日目α平均回収%

** 1.0 gカゼイン/g PMP

表5

ADVIA Centaur CA 19-9
37°C 固相安定性

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/01749	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/543	
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)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
X A	EP 0 369 361 A (BECTON DICKINSON AND COMPANY) 23 May 1990 (1990-05-23) claims 1,2,4 1-4 5-19
☐ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ 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 doubt 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 25 May 2000	Date of mailing of the international search report 07/06/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Van Bohenen, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/US 00/01749

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 369361 A	23-05-1990	AT 127589 T	15-09-1995
		AU 625297 B	09-07-1992
		AU 4298789 A	24-05-1990
		CA 2000685 A	17-05-1990
		DE 68924129 D	12-10-1995
		DE 68924129 T	01-02-1996
		DK 575989 A	18-05-1990
		EP 0633472 A	11-01-1995
		ES 2076948 T	16-11-1995
		FI 96802 B	15-05-1996
		GR 3018020 T	29-02-1996
		IE 69041 B	07-08-1996
		JP 2187662 A	23-07-1990
		JP 2589830 B	12-03-1997
		US 5208143 A	04-05-1993

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト [*] (参考)
G 0 1 N 33/553		G 0 1 N 33/553	
	33/566		33/566
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
(72)発明者	ユースタス , ダニエル ダブリュー . アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02760 , ノース アトルボロ , ウエス ト ストリート 115		
(72)発明者	チャン , スティーブ チン - シェン アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02038 , フランクリン , ミラー スト リート 65		
F ターム(参考)	4B063 QA01 QA18 QQ01 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR82 QS03 QS15 QS34 QS36 QX02		

【要約の続き】

した常磁性粒子を用いるためのプロセスが開発され、上
記粒子は、免疫アッセイにおいて用いられる活性成分と
直接的または間接的に結合する。

专利名称(译)	使用酪蛋白包覆颗粒的免疫测定		
公开(公告)号	JP2002535678A	公开(公告)日	2002-10-22
申请号	JP2000596372	申请日	2000-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳公司		
[标]发明人	ニウェイチャオ ユースタスダニエルダブリュー チャンスティーブチンシェン		
发明人	ニ, ウェイ-チャオ ユースタス, ダニエル ダブリュー. チャン, スティーブ チン-シェン		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/566		
CPC分类号	G01N33/54333 G01N33/5434 G01N33/54393 G01N2333/4731 G01N2446/84 Y10S435/963 Y10S436/81 Y10S530/815 Y10T428/2991 Y10T428/2998		
FI分类号	G01N33/543.525.U G01N33/543.525.W G01N33/543.541.A C12Q1/68.A G01N33/53.S G01N33/553 G01N33/566		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS15 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
优先权	60/117578 1999-01-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

将酪蛋白和酪蛋白的盐添加到BSA或替代BSA，作为包被固相的材料，尤其是用于免疫分析和其他用于分离所需分析物的结合分析中的磁性颗粒。并且被发现是有用的。通过使用酪蛋白，开发了具有改善的稳定性和较少不协调样品的免疫测定法。已经发现酪蛋白以每克磁性颗粒0.05克至4.0克的浓度（每克磁性颗粒最佳约0.78克至约1.2克酪蛋白的浓度）使用具有该优点。此外，发明了涂覆固相的方法，该方法包括在30至60°C下将酪蛋白与磁性颗粒混合5至180小时，该方法通常包括用酪蛋白涂覆。提供磁性颗粒，所述颗粒或者（1）已经与结合测定中所需的活性成分结合，或者（2）能够与结合测定中所需的活性成分反应。有。另外，已经开发出一种使用涂有酪蛋白的顺磁性颗粒的方法，该颗粒直接或间接结合免疫测定中使用的活性成分。

