

(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2015-500487
(P2015-500487A)

(43) 公表日 平成27年1月5日(2015.1.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	2 G O 4 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
	GO 1 N 21/64 F	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2014-546200 (P2014-546200)
 (86) (22) 出願日 平成25年1月3日 (2013.1.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年6月6日 (2014.6.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/020138
 (87) 国際公開番号 W02013/103712
 (87) 国際公開日 平成25年7月11日 (2013.7.11)
 (31) 優先権主張番号 13/656, 715
 (32) 優先日 平成24年10月21日 (2012.10.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/583, 624
 (32) 優先日 平成24年1月6日 (2012.1.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 13/459, 192
 (32) 優先日 平成24年4月29日 (2012.4.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514143725
 チャン ジャンディ
 J I A N D I, Z h a n g
 アメリカ合衆国, 22032, バージニア
 州, フェアーファックス, ローンコート
 4601
 (74) 代理人 100108006
 弁理士 松下 昌弘
 (72) 発明者 チャン ジャンディ
 アメリカ合衆国, 22032, バージニア
 州, フェアーファックス, ローンコート
 4601
 Fターム(参考) 2G043 BA16 DA02 EA01

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質含有量の測定方法

(57) 【要約】

試料中の抗原量を測定する方法としてつぎの手順を包含する、それは資料中の抗原を固相に結合し、抗原に対して特異的な検出抗体を適用することにより固相上における抗原抗体免疫複合体を形成し、検出抗体と結合するため抗原と競合する競合分子を適用することによって免疫複合体を破壊し、免疫複合体から検出抗体を遊離し、遊離した検出抗体を回収して、そして試料中の抗原量を測定するために遊離した検出抗体を定量化する。

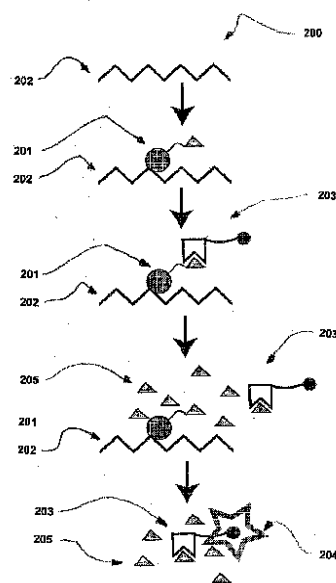


FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のステップを有する試料中の抗原の量を測定する測定方法。

- a . 前記抗原を固相に結合すること、
- b . 前記抗原に特異的な検出抗体を適用することにより、前記固相上に抗原抗体免疫複合体を形成すること、
- c . 前記検出抗体と結合することにおいて前記抗原に対して競合することで前記免疫複合体を崩壊させる競合分子を適用することにより前記免疫複合体から前記検出抗体を遊離させること、
- d . 前記遊離された検出抗体を回収すること、および、
- e . 前記試料中の抗原の量を測定するために前記遊離された検出抗体を定量化すること。

10

【請求項 2】

前記試料の少なくとも一部を前記固相に適用することによって前記抗原が前記固相に結合される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記免疫複合体を形成する前に、前記抗原により媒介されていない前記固相に対しての前記検出抗体の結合を防止するために前記固相がブロックされる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記免疫複合体の形成後、前記検出抗体の遊離前に、未結合の検出抗体を前記固相から取り除く請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記抗原はペプチド、化学薬品、RNA、DNA、細胞およびウイルス粒子からなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記競合分子がポリペプチドである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ポリペプチドはさらなる抗原を含む請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ポリペプチドは前記検出抗体に対し特異的な前記抗原のエピトープ(epitope)を含む請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記ポリペプチドは前記抗原の検出抗体相互作用領域を有する請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ポリペプチドは前記抗原の前記検出抗体相互作用領域の複数のコピーを有する請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ポリペプチドは前記抗原より強く前記検出抗体と結合するポリペプチドを有する請求項 6 に記載の方法。

【請求項 12】

前記検出抗体がラベリングされる請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記ラベリングの方法は無線(radio)ラベリング、赤外線ラベリング、蛍光ラベリングおよびレポーター酵素ラベリングからなる群から選択される請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記検出抗体が二次抗体を介してラベリングされた請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記競合分子が前記検出抗体とは異なるようにラベリングされた請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

この方法の特異性を改善するために、ラベリングされた競合分子を、異なったラベリン

50

グされた検出抗体とペアリングする請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記検出抗体が二次抗体を介してラベリングされた請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

ペアリングの方法はFRETに基づく方法と増幅型ルミネッセンス プロキシミティホモジニアス分析からなる群から選択される請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記固相は多孔性材料である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記多孔質材料は前記検出抗体による浸透 (penetration) を許すのに十分な多孔性を有する請求項 19 に記載の方法。

10

【請求項 21】

前記固相は膜およびマルチユニットプレートからなる群のなかから選択される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

前記固相の形状はフィルム、シート及びプレートからなる群のなかから選択される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

前記固相は紙、ガラス、プラスチック、ファブリックからなる群のなかから選択された材料を有する請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 24】

前記固相はELISAプレートである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

自動化された試験方法で行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

以下のステップを有する、試料中の多重抗原量を測定するための方法。

- a. 前記試料からサブ試料を取得すること、
- b. 少なくとも以下の手順により各サブ試料を別々に処理すること。
 - (1) 前記抗原を固相に結合すること、
 - (2) 前記抗原に対し特異的な検出抗体を適用することにより、前記固相上に抗原抗体免疫複合体を形成すること、
 - (3) 前記検出抗体と結合することにおいて前記抗原に対して競合することで前記免疫複合体を崩壊させる競合分子を適用することにより前記免疫複合体から前記検出抗体を遊離させること、
 - (4) 前記遊離された検出抗体を回収すること、および、
 - (5) 前記試料中における抗原の量を測定するために前記遊離された検出抗体を定量化すること。

30

【請求項 27】

以下のステップを有する試料中の複数の抗原の量を測定するための方法。

- a. 固相に複数の抗原を結合すること、
- b. 各々が複数の検出抗体のうちの一つに対して特異的である複数の検出抗体を適用することによって、前記固相上に複数の抗原抗体免疫複合体を形成すること、
- c. 検出抗体及びそれに対応する抗原によって形成された前記免疫複合体を崩壊させる競合分子であって、前記固相から前記検出抗体の一つを遊離すること、
- d. 前記遊離された検出抗体を回収すること、
- e. 少なくとも一つの他の前記検出抗体にステップ c 及び d を繰り返すこと、および、
- f. 試料中の対応する抗原の量を測定するために、各々の前記遊離した検出抗体を定量化すること。

40

【請求項 28】

以下のステップを有する、多重抗原試料中の抗原量を測定するための方法。

50

- a . 試料からサブ試料を取得すること、
- b . 各々の前記サブ試料を別個の固相に適用すること、
- c . それぞれの前記サブ試料中の抗原をサブ試料固相に結合すること、
- d . 固相上の試験抗原に特異的な試験検出抗体を適用することにより、各サブ試料固相上に抗原抗体免疫複合体を形成すること、
- e . サブ試料に下記の手順(1)、(2)を施すこと、
 - (1) 前記サブ試料固相に対して、対応する試験検出抗体と結合することにおいて前記抗原に対して競合することで前記抗原と共に前記免疫複合体を崩壊させる試験抗原に特異的な競合分子を適用すること、
 - (2) 前記試験抗原によって形成された前記免疫複合体から前記試験検出抗体を遊離すること、
- f . 他の前記サブ試料に対して2つのステップを施し、各ケースにおいて異なる試験抗原に特異的な競合分子を適用すること、
- g . 前記遊離された試験検出抗体を回収すること、および、
- h . 前記試料中の前記試験抗原量を測定するために、前記遊離された検出抗体を定量化すること。

10

【請求項29】

以下のステップを有する試料中の抗原の量を測定するための方法。

- a . 競合分子を固相に結合すること、
- b . 前記競合分子に対して特異である検出抗体を適用することによって、前記固相上に抗原抗体免疫複合体を形成すること、
- c . 前記試料を固相に適用することによって前記抗原抗体免疫複合体を崩壊し、前記抗原が、前記検出抗体を結合するために前記競合分子と競合することで前記検出抗体を遊離すること、
- d . 前記遊離された前記検出抗体を回収すること、および、
- e . 前記遊離された検出抗体を定量化して前記試料内の前記抗原の量を計測すること。

20

【請求項30】

前記抗原と前記検出抗体との間の類似性は、前記検出抗体と前記競合分子との間の類似性より小さい請求項29に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【関連する出願】

【0001】

本出願は、米国特許出願13/459192(2012.4.29に提出)の継続である米国特許出願13/656715(2012.10.21に提出)の一部継続である。その米国特許出願13/459192(2012.4.29に提出)、今では米国特許第8293487号は米国仮特許出願61/583624(2012.1.6に提出)の優先権を主張する。これらの各出願は、この出願にその全体が盛り込まれる。

【技術分野】

【0002】

本発明は、化学化合物、ペプチド、タンパク質、リボ核酸(RNA)、デオキシリボ核酸(DNA)、細胞(原の位置にて放出したタンパク質)、またはウイルス粒子(原の位置にて放出したタンパク質)などの抗原に対する免疫検出方法に関するものである。特に、本発明は、ウエスタンブロット分析、ドット分析、ELISA検定そしてそれらのマルチユニットプレート形式アプリケーションおよびタンパク質分析の自動化だけに限らない。この簡略化及び改良された免疫検出の方法により、定量化可能な結果を得ることができる。

40

【背景技術】

【0003】

タンパク質分析は現代生物学の研究において基本である。それは様々な医療または実験条件下で目標の抗原量を、抗原抗体相互作用に従って測定している。定義により抗原とは

50

体外物質で、体内に導入すると免疫系により抗体の産生を誘引する。特定の抗原に対して特異性の高い抗体は、臨床、製薬および生医学研究において強力な集団である。抗原は、化学化合物に限らず、ペプチド、タンパク質、RNA、DNA、細胞（原の位置にて放出したタンパク質）、またはウイルス粒子（原の位置にて放出したタンパク質）を含む。抗原の全体分子またはその一部は、動物宿主の口バ、ヤギ、またはウサギに導入することによって目標の抗原に対し大量の抗体を生成することができる。さらに、導入された抗原の全体分子またはその一部は一つ又は複数のエピトープ（epitope）を有するため、目標の抗原のエピトープの数に応じて、一つ又は複数の抗体を生成することができる。

【0004】

代表的な免疫検出方法は3つの重要な段階に分けることができる。(i) 試料の応用；目標の抗原を含有する試料を初めに、ニトロセルロース、PVDF膜、あるいは他のタンパク質結合能力を有する固相等のマルチウェルプレートに結合させる。(ii) ブロッキング/インキュベーション/洗浄；それは(a)(b)の順序で行われる。(a) 膜上の非特異的タンパク質結合部位をブロッキングバッファでブロックし膜上に非特異的タンパク質の結合を防ぐ。(b) 膜結合抗原と抗体との複合体を形成可能にするため目標の抗原に対する抗体とインキュベーションし膜上の非結合抗体を洗い流す。使用される抗体を直接的、または二次抗体を介して間接的に、レポーター酵素を結合させることができる。その後、(iii) 検出；膜上結合の免疫複合体の量や品質に関連する情報を検出するため膜上結合抗体レポーター酵素に置いてレポーター酵素反応を行う。ドットプロットおよびウェスタンプロット分析の両方に置ける免疫分析の最終結果は、さらにデンシトメトリー分析によって間接的に測定することができる。

10

20

【0005】

この一般的な順序の個々の段階に置いて複数の修正が行われている。例えば、上記(i)に、ドットプロット分析では直接適用、ウェスタンプロット分析ではゲル転写およびELISA分析では試料のコーティングといった様々な試料が適用されている。さらに上記(ii)においても、膜上に形成された免疫複合体を維持しながら膜上に直接結合する抗体を最大限に除去するための様々な手順、バッファの成分などいくつかの修正が行われている。ほとんどの場合、膜の表面に付着した目標の抗原と結合した一次抗体にレポーター酵素が直接結合されていない。そのため、一次抗体を検出にはその一次抗体に対するレポーター酵素の結合した二次抗体がおそらく必要となる。上記(iii)において、レポーター酵素の他に、多数の異なる方法で抗体にラベリングできるようになったために、多数の検出方法が可能となっている。例えば、検出方法は目視検査のできる色又はルミノメーター又はX線フィルムのいずれかを介して検出できる化学発光シグナルを用いることができる。または、抗体を蛍光でラベル付け、最終生成物をマイクロプレートリーダーを用いて異なる波長に置くことによって測定することも可能である。

30

【0006】

上記の免疫検出方法の説明は従来免疫分析の原則となっているが一例であり、一般的な免疫検出方法に関連する他の修正や順序もある。

【0007】

ドットプロット分析は上記の免疫検出方法の代表的な応用であり、試料を膜に直接ドット形に適用できることが特徴である。しかし、この方法は単純で早いにもかかわらず生医学、臨床、薬学研究への応用は特異性の不足のため制限されている。免疫検出方法に使用される多くの抗体は、様々な理由のため複数の抗原と反応する。したがって、ドットプロット分析に置ける免疫複合体付着レポーター酵素量は、正確には試料中の目標の抗原量を反映することになる。そのため、ウェスタンプロット分析およびELISA分析の両分析法の方が、改良された特異性のためにより一般的に使用されている。

40

【0008】

ウェスタンプロット分析では、まず目標の抗原を含有する試料は初めにゲル電気泳動を用いて分子量により分離される。その後、分離したタンパク質をニトロセルロース膜またはPVDF膜のいずれかに電気プロットングを経て転写する。続いて代表的な免疫検出方法

50

を用いることによって試料中の目標の抗原量はレポーター酵素反応を利用してその場で検出され、デンシトメトリー分析を介して間接的に抗原量が測定される。この方法における免疫検出の特異性は、ドットプロット分析で観察される、抗原・抗体相互作用並びに目標の抗原の予想分子量の仮性なシグナルを消去することである。しかし、ドットプロット分析およびウェスタンプロット分析の両方における目標の抗原の相対量は、デンシトメトリー分析によって間接的に測定することしかできない。また、ウェスタンプロット分析における複雑な手順は、臨床、薬学および実験研究における大規模分析の応用を阻んでいる。

【0009】

一方、ELISA分析はドットプロット分析及びウェスタンプロット分析の両方に関する問題を解決し、マルチウェルプレートフォーマットにおいて、速く、簡単に、そして定量化を可能にした。ELISA分析では目標の抗原と排他的に反応する抗体を選択することが特徴である。抗体・抗原反応の高い特異性は、マルチウェルプレートフォーマットにおけるシグナルの強度を直接に測定することを可能にする。これらの利点は、生医学および臨床研究の両方においてELISA技術の幅広い利用につながっている。しかし、ELISA分析の成功は、抗体に高い特異性を要求するため、目標の抗原に排他的に反応したもの以外応用することができない。この制約が高度なELISA分析の開発コストにつながり、そして生医学研究分野における有効性を制限している。また、ELISAプレートの低結合能力も生医学研究分野での利用を難しくしている。

【発明の概要】

【0010】

本開示は、試料中の抗原量の測定(quantification)を急速かつ正確にできる方法を提示する。また、ウェスタンプロット分析におけるゲル電気泳動の手順をなくしながら免疫検出手順における溶出手順を追加することによってドットプロット分析の特異性を改良する。追加された手順は、膜に結合した(即ち、膜に固定化された)抗原・抗体免疫複合体を、過剰な量の競合分子、すなわち一つの分子内の一つ又は複数の複製内の抗原(又は抗原の一部)にさらず、一態様では、検出抗体をレポーター酵素で直接または間接的にラベリングできる。別の態様では、競合分子は溶出溶液中に存在することもある。競合分子と、検出抗体に結合する固相化された抗原との間の競合により、免疫複合体から抗体が溶出溶液中に解放される。膜から解放された検出抗体に付着していたレポーター酵素量を測定し、そしてその結果を試料中の目標の抗原量を計算するために使用することができる。一態様において、試料中の目標の抗原量は、固相から解放された検出抗体量に比例する。別の態様では、抗体を前もってラベリングせずに、溶出後、測定の手順の前にラベリングしてもよい。

【0011】

一実施形態では、追加された溶出の手順は、競合分子を用いて目標の抗原と結合した抗体のみを免疫複合体から解放できるため分析の特異性を高めることができる。ドットプロット分析及びウェスタンプロット分析の両方と比較して、開示された方法は溶液中及びマルチユニットプレートフォーマット中における免疫検出の分析の結果を直接的に測定することができる。この事は現在の臨床そして薬学研究及び診断的応用において強く要求されている。さらに、この方法は一般的にELISA分析の開発に伴うコストと労力を減少させ、臨床、薬学、生医学研究および診断的応用での実用化の可能性を高める。また、その分野におけるタンパク質アレイ分析及びタンパク質分析の自動化のための基礎を提供する。また、自動化されたアッセイ(assay)において使用できる。

【0012】

一実施形態として、マルチユニットプレートは、マルチウェルプレートがある

【0013】

一実施形態として、ドットプロットまたはウェスタンプロット分析に基づいて改良された免疫検出方法は、現在使用されている免疫検出方法の様々な制約を飛躍的に減少させた。本免疫検出方法が簡略化、迅速化され、直接測定可能であり、特異的、そして臨床、薬学研究および診断応用における大規模な応用に最適である。

【0014】

一実施形態として、開示された方法は以下の手順を含む。それらは固相への抗原の結合、固相上の抗原に対して特異的な検出抗体を使用することによる固相上への抗原・抗体免疫複合体の形成、検出抗体に結合するために抗原と競合することで免疫複合体を崩壊する競合分子を適用することによる免疫複合体からの検出抗体の遊離、そして試料中の抗原量を得るため遊離した検出抗体の測定である。この方法は溶出手順後に遊離された検出抗体を採取する手順を含む。この方法は"Zestern"分析と名付ける。

【0015】

一方では、抗原を含む試料又は試料の一部を固相に適用することで、抗原を固相に固定することができる。他方では、検出抗体を遊離する前で免疫複合体の形成後、固定された抗原と結合していない抗体を洗浄することにより固相から除去することができる。

10

【0016】

一実施形態として、競合分子は、ポリペプチドであってもよい。別の実施形態では、競合分子は検出抗体に対する特異的な抗原のエピトープを含有するポリペプチドであってもよい。また別の実施形態では、競合分子は、抗原が持つ全てのエピトープを含有するポリペプチドであってもよい。ここで、競合分子は、検出抗体への結合のために固定された抗原に対して効果的に競合できる。別の実施形態では、ポリペプチドは、抗原の抗体相互作用の領域を有していてもよい。別の実施形態では、ポリペプチドは、競合分子内の複数コピー中に抗原の抗体相互作用の領域を有していてもよい。別の実施形態としては、ポリペプチドおよび検出抗体との親和性は、抗原及び検出抗体との間のよりも大きい。従って、ポリペプチドが、検出抗体と結合するために、固定された抗原に対して効果的に検出抗体と競合することができる。別の実施形態において、ポリペプチドは、固定された抗原量（モル単位）の少なくとも2倍、または3倍やそれ以上、または固定された抗原同量（モル単位）で存在する。一つの実施例として競合分子はポリペプチド混合物中に存在することができる。

20

【0017】

別の実施形態では、試料中の多重(multiple)抗原量を測定するための方法が開示されている。それは以下の手順を含む：試料から複数の(multiple)サブ試料を取る：各サブ試料をそれぞれの分離された固相に置き各サブ試料に前述のZestern方法を行う。試料中の複数の抗原量を測定するために以下の手順を代用することもできる。：固相に複数の抗原を結合させ、複数の抗原の一つに対して各々特異となる複数の検出抗体を適用することにより固相に複数の抗原・抗体免疫複合体を形成させる。次に、固相から、検出抗体によって形成された免疫複合体を崩壊する競合分子を適用することによって検出抗体の一つを遊離し、検出抗体と結合するために抗原と競合することによってそれに対応する抗原を遊離する。遊離された検出抗体を採取する。試料中の抗原量を測るためにその抗原に対応する検出抗体の遊離量を測定をする。このように遊離手順および採取手順は、異なる検出抗体に対して特異的な異なる複数の競合分子を使用することで、複数繰り返すことができる。

30

【0018】

別の実施形態では、試料中の多重抗原量を測定するための方法が開示されている。それは以下の手順を含む：試料から複数のサブ試料を取りそれぞれのサブ試料を各分離された固相に適用させ、試料中に存在または不存在の複数の試験抗原の中の各サブ試験抗原に対して特異的な複数の試験抗体を使用することで、固相に複数の試験抗原・抗体免疫複合体を形成する。試験検出抗体及びそれに対応した試験抗原によって形成された免疫複合体を崩壊する競合分子を適用することで、固相から検出抗体の一つを遊離する。他の試験検出抗体及びそれに対応する試験抗原によって形成された免疫複合体を解放する異なる競合分子を用いて他の固相に対して当該手順（プロセス）を実行する。試料中における試験抗原量を測るために遊離された検出抗体を回収し、各遊離検出抗体を測定する。

40

【0019】

検出抗体を固相に結合させる前に検出抗体をラベリングできる。あるいは、検出抗体は、測定前、及び溶出手順の後に、ラベル剥がし及びラベル付けを行ってもよい。検出抗体

50

は直接、または二次抗体を介して間接的にラベル付けることもできる。検出用抗体のラベル付けの方法は放射性ラベルに限定されず、赤外線ラベル、蛍光ラベルまたはレポーター酵素ラベルなどでもよい。

【0020】

別の実施形態では、検出抗体を第1の蛍光で、競合分子を第2の蛍光でラベリングすることができる。溶出手順後遊離された検出抗体と競合分子が免疫複合体を形成し、第1の蛍光ラベリングまたは第2の蛍光ラベリングのいずれかを刺激したとき、蛍光共鳴エネルギー伝達 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) が発生するように、第1及び第2の蛍光ラベリングの発光波長と励起波長を選択することができる。一例として、第1蛍光ラベリングが励起され、当該第1蛍光ラベリングからの発光が第2信号を励起する場合、並びに第1及び第2発光ラベリングが接近してFRETが生じた場合に、第1蛍光ラベリングの発光波長は第2発光ラベリングの励起波長内に入る。逆に、第2蛍光ラベリングの発光波長は、第1蛍光ラベリングの励起波長内に入ることができる。第1及び第2ラベリングの例としてはAlexa 488nm対Alexa 555nm、FITC (520nm) 対TRITC(550nm) およびCy3 (566nm) 対Cy5 (649nm) 等がある。FRETは、第1及び第2ラベリングが接近している場合、例えば両方のラベリングが同じ免疫複合体に存在する時のみに起きる。この特徴が上記特異性(Specificity)を高める。これは、競合分子と結合した遊離検出抗体からのシグナルのみを測定し、これに基づいて試料中の目標抗原量を割り出すことを可能にする。

10

【0021】

別の実施形態では、溶出緩衝液における競合分子と検出抗体の複合体の検出は化学増幅型ルミネッセンス プロキシミティホモジニアスアッセイ (amplified luminescent proximity homogeneous assay、ALPHA) によって達成することができる。

20

検出抗体と競合分子を異なる蛍光または発光シグナルでラベリングできる。Zestern分析において競合分子が検出抗体と接近して非特異的なシグナルを除去する場合にのみ強いシグナルを喚起することができる。

【0022】

別の実施形態では、開示されるプロセス葉、以下のステップを含む。

抗原を固相に結合する。前記競合分子に特異的な検出抗体を適用することにより、前記固相上に抗原抗体免疫複合体を形成する。前記固相上に目標の抗原を含む又は含まない試料又は試料の一部を適用することにより前記免疫複合体から前記検出抗体を遊離する。ここで、前記試料内の前記抗原は、検出抗体に結合するために競合分子と競合することで免疫複合体を崩壊する。

30

また、遊離された前記検出抗体を定量化して前記試料中の抗原の量を得る。

この代替プロセスは、Reverse Zesternと呼ばれている。Reverse Zesternの一つの面において、試料内の目標の抗原量が、固相から遊離した検出抗体の量と比例している。

他の面は、試料内の抗原と検出抗体との親和性は、競合分子と検出抗体との間の親和性 (試料内で抗原が固相から検出抗体を溶出することを可能にする) と同じか、より大きい。

他の面は、試料内の抗原は、固相上に固定化された競合ポリペプチドに対して効果的に競合して試料内の目標の抗原の存在を示す。

40

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は一般的な免疫検出プロセスの一般図を示す。100：免疫検出プロセス；101：目標の抗原を含む試料；102：膜 (メンブレン、Membrane)；103：検出抗体、および104：標識方法。

【0024】

【図2】図2はZesternの一実施例の一般的な図を示す、それは改善された免疫検出方法である。201：目標の抗原を含む試料；202：膜 (メンブレン、Membrane)；203：検出抗体；204：標識方法；205：競合分子。

50

【発明を実施するための形態】

【0025】

本開示に定義されない限り、使用されているすべての技術用語および科学用語は本発明が属する技術分野の技術業者に一般的に理解されているものと同じである。本明細書で示された全ての出版物及び特許は参照により本明細書に組み込まれている。

【0026】

本開示は試料中の抗原または抗体を検出し、定量化するための有用な方法を提供するものである。従来のウェスタンブロット (Burnette, W.N., 1981)、ドットブロット (Hawkes, R., et al, 1982)、およびELISA法 (Engvall E. et al, 1971a, 1971b, and 1972) を大幅に改善し、試料中の目標抗原を簡単に迅速に特異的にかつ定量的、免疫学的 (immunological) に分析することを可能にする。開示される方法はまた臨床、医薬学及び生医学研究における大規模な目標抗原量の分析を可能にする。

10

【0027】

従来の免疫分析は図1で示した3つの部分に要約することができる。当業者は免疫分析用の試料100を作製する方法を知っている。試料101は化学分子、ペプチド分子、タンパク質分子、RNA分子、DNA分子、2つの重鎖及び2つの軽鎖を含んだ伝統的な抗体、組換え (recombinant) 抗体またはその断片を含んだ試料、細菌細胞、ウイルス粒子、細胞、粒子、又は架橋 (crosslinking) によって接続された上記に言及された2以上の試料を有する製品を含む。

【0028】

技術者は当技術を行う際、試料101を膜102に適用する方法を知っている必要がある。その方法というのは直接的にドットブロット分析およびウェスタンブロット分析におけるゲル電気泳動およびブロット転送、そしてELISA分析におけるマルチウェルプレートのコーティングなどに限定されるものではない。

20

【0029】

技術者は当技術を行う際、膜102をブロックする方法を知っている。その方法というのは0.1% TWEEN 20で補足されたPBSまたはTBS緩衝液に5% 無脂肪乳または2% BSAのいずれかを含んだブロッキングバッファーを使用することであるが、それに限らず、試薬濃度およびこれらの代替のバリエーションが存在することが知られている。

【0030】

技術者は当技術を行うために、準備された試料と抗体103をインキュベートする方法を知っている。従来の方法は、膜についての一次抗体のインキュベーション、洗浄及び二次抗体のインキュベーションといったステップを含み、本発明の概念から逸脱しない範囲でこれらのステップにはバリエーションがあることは知られている。

30

【0031】

従来者は当技術を行う際、従来の免疫分析100における結果を検出する方法を知っている。検出処理において、膜に結合した免疫複合体の量を読み出すために、一次抗体を直接ラベリングするか (104)、又は間接的に二次抗体を用いてラベリングするか (104) といった複数の方法が存在する。

例えば、抗体の酵素結合、抗体の放射性物質ラベリングまたは蛍光染料 (dye) を用いた抗体のラベリング及び読み出し値は、目視による色反応の検査、又は放射性物質でラベリングする場合にはX線フィルムを用いて検出される。これらのバリエーションは、本発明の広範な発明概念の範疇に含まれる範囲において限定されない。

40

【0032】

図2に証明されたように本発明において、追加の溶出手順は、従来の免疫分析方法内で、ブロッキング・インキュベーション・洗浄手順と検出手順との間に含まれている。ブロッキング・インキュベーション・洗浄手順で形成された膜結合抗原抗体免疫複合体201・203は、溶出緩衝液中の単数の分子中の複数コピー又は単数コピー内で競合分子205にさらされる。

レポーター酵素でラベリングされた抗体203・205は、抗原抗体免疫複合体201・203から解

50

放されたものであり、膜から溶出緩衝液中に放出される。

検出手順では、レポーター分析は、膜の表面上ではなく溶出緩衝液中で始まり、そのことによりレポーター分析の読み出し値は直接的に定量化できる。

【0033】

他の従来免疫検出方法に追加の溶出手順を含むことによって本発明はドットプロット分析の特異性を向上させ、検出結果を直接的に定量化できるようにする。さらに本発明はドットプロット分析の利点である単純さ及び迅速さを保持し、大規模なアプリケーションおよびマルチユニットプレートフォーマットを用いることを可能にする。

【0034】

さらにこの発明は従来免疫検出方法以上に付加的な利点がある。従来免疫分析におけるシグナルの読み出しとは"その場所において"、つまり検出される免疫複合体は膜に付着した目標の抗原との緊密な関連付けを持って膜に結合されたまま行われる。従来免疫分析から本発明の偏差(deviation)は、検出過程において膜が持つ可能性がある全ての物理的な制限を回避するために、ラベリングされた抗体を膜に結合した免疫複合体から溶出液中に解放することである。例えば、ドットプロットとウエスタンブロット分析の両方の免疫分析における一般的な方法(practice)は、抗体を山葵大根ペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase)でラベリングすることである。これは、その膜の"その場所において"ECL基板を化学発光性シグナルに変換することである。化学発光性シグナルの強度は化学発光感応膜を用いて明らかにされ、デンシトメトリー(densitometric)分析を介して間接的に定量化する。全体的にこの過程は事実上複雑で不正確である。一方、本発明はマイ

10

20

【0035】

さらに本発明は結合能力を増加させ、抗体の特異性に関する要求を緩めながらELISA分析の利点を保持している。溶出手順における競合分子の過剰量の含有によって目標の抗原に結合した抗体のみを膜から遊離し、一般に現在の生物学的研究で観察される非特異的相互作用による干渉を防止することができる。したがって、マルチユニットプレートフォーマットにおける免疫検出に適した抗体の可用性は本発明により明らかに増加する。

30

【0036】

本開示の目的のために、固相とは、膜、スライドプレート、マルチユニットプレート又は複数のビーズであってもよい。マルチユニットプレートの一実施例としてマルチウェルプレートがある。その中で使用される場合、"膜"はそれが用いられる文脈において幅広くとらえるべきである。膜は、検出抗体によるアクセスを可能にするために十分な表面気孔率及び抗原に結合するために適した表面親和性を有する任意な材料から構成される。これら全ての材料は、フィルム、シート、またはプレートなどの適切な形状で使用される。また、これらは紙、ガラス、プラスチックまたはファブリック(fabrics)等の適切な挿入キャリアにコーティング、ボンド又はラミネートする事ができる。膜は、ニトロセルロース膜、PVDF膜、ELISA分析におけるマルチウェルプレート等に限られない。

40

【0037】

本明細書で使用した、"レポーター酵素"は、その文脈において幅広くとらえるべきである。レポーター酵素は、抗体の検出を補助する目標で、免疫アッセイにおける抗体のいずれかの変形例であってもよい。例えば、レポーター酵素は、放射性同位体のようなヨウ素125で直接ラベリングされた抗体、又はアルカリホスファターゼ(phosphatase)または山葵大根ペルオキシダーゼのようなレポーター酵素に限定されるものではない。抗体に関連付けられたレポーター酵素の量の検出は、検出反応におけるレポーター酵素量の読み出しと同様に、検出可能な生成物(product)の形成により行われる。当該生成物は、放射性、発光性、蛍光性があるもの、または可視または可視範囲外において特徴吸光度または反射スペクトルを持つものである。抗原抗体複合体を検出するための補足物(complement)が使用され

50

る場合、上記のいずれかの方法でラベリング、または特定の抗補足抗体(anti-complement antibody)によって順番に検出する事ができる。

【0038】

本明細書で使用した"抗原"と"抗体"は、それが用いられる文脈において幅広くとらえるべきである。"抗原"とは、分子、細胞、ウイルス、または粒子である。化学化合物、ペプチド、タンパク質、RNA、DNA、細胞(インサイチュで放出されたタンパク質)、またはウイルス粒子(インサイチュで放出されたタンパク質)、または人を含む宿主動物により一つまたは一つ以上の抗体の産生(production)を誘起するすことのできるその任意の分子を"抗原"という用語で称する事ができる。抗原はまた、架橋された2つ以上の上記分子またはその部分のいずれかを含む生成物であってもよい。抗原は、その原型、あるいは混合された状態で存在する。抗原は修正された形態(例えば、化学物質による修正)または修正されていない形態であってもよい。

10

【0039】

本明細書において"抗体"と称するものはその文脈において幅広くとらえるべきである。"抗体"は"抗原"に結合するポリペプチドである。抗体には、従来の抗体、抗原結合部位を持った従来の抗体断片、抗原結合部位を持った遺伝子組み換え抗体、抗原に結合するタンパク質、及び上記のいずれかの2つまたは2つ以上のものを架橋された生成物を含むが、しかしこれらだけに限定されるものではない。抗体その原型、あるいは混合された状態で存在する。抗体は修正された形態(例えば、化学物質による修正)または修正されていない形態であってもよい。

20

【0040】

本明細書に置ける"溶出手順"と称するものはその文脈において幅広くとらえるべきである。"溶出"は、目標の抗体と競合分子または抗体と同じ結合部位もしくはその複数部位を共有する任意の分子を用いて、レポータ酵素と共に二次抗体を通じて直接又は非直接にラベリングされた抗体を、膜上の目標の抗原を含む結合した免疫複合体から解放することである。それは、免疫検出過程における特異性を維持しつつ、抗体の同じ結合部位を共用しないが、膜上の結合した免疫複合体を崩壊できる分子を含むものに限定されるものではない。この目的のために競合分子は、一つのコピー内、又は一つの分子内での複数のリピート(repeats)内に存在できる。

【0041】

本明細書で用いる"競合分子"と称するものはその文脈において幅広くとらえるべきである。化学化合物、ペプチド、タンパク質、RNA、DNA、細胞(本来の場所(in situ)で放出されたタンパク質)、またはウイルス粒子(本来の場所で放出されたタンパク質)、または抗原と検出抗体の間に形成された免疫複合体を競合により崩壊させるその任意の分子を"競合分子"と称する。また、検出分子は上記のいずれか2つ以上の分子又はその一部(moieties)が架橋された生成物を含む。検出分子は、その抗原の原型または混合された状態で存在できる。また、検出分子は、修正された形態(modified form)(例えば、化学物質による修正)または修正されていない形態であってもよい。競合分子の一部が結合された抗原-抗体免疫複合体における目標の抗原と競合することが分かっている場合、競合分子は抗原の競合分子、又は目標の抗原分子の一部であってもよい。特異的な抗体に対するエピトープ(epitope)が知られている場合は、競合分子はここで一つ又は複数のコピー内のエピトープペプチドであってもよい。

30

40

【0042】

一つの側面では本発明は改善されたドットプロット分析を修正して提供している。この過程は、好ましくはできればマルチユニットプレートフォーマットにおいて目標の抗原を含んだ試料を膜に適用することから始まる。膜上の非特異的タンパク質結合部位はブロックし、続いてリポーター酵素で直接ラベリングされた抗体を加える。又は、一次抗体を加える、そして、それに続いてリポーター酵素でラベリングされた二次抗体を逐次洗浄後に加える。確立された抗原抗体相互作用に干渉することなく、未結合抗体は洗浄緩衝液を用いて洗い流される。膜上に結合した抗体は、抗原抗体相互作用により競合分子を含む溶

50

液で溶出する。レポーター酵素でラベリングされた遊離抗体の量は例えば、X線フィルム等のような媒体を用いることなく、レポーター酵素媒介性生成物の形成によって溶出溶液中において直接測定される。

【0043】

一つの側面では本発明は、従来のウェスタンブロット解析におけるゲル電気泳動の手順を排除することにより簡素化し、実験、臨床及び医薬研究場面におけるタンパク質試料の大規模な分析を可能にする。タンパク質分析の結果は直接測定することができる。従って、従来の方法に関連付けられた継承不正確さを排除する。

【0044】

本発明のもう一つの目標は、ELISA分析に関連付けられている複雑な発達過程を簡素化することである。本発明は、標準として競合分子の連続投与を含む(inclusion of a series of dosage)ことで、同じ精度を保ちながらかつ結合能力及び適合した抗体の可用性を高め、容易にELISA分析に変換できる。

10

【0045】

本発明の別の目標は従来のタンパク質分析方法の効率を高めることである。この方法は目標の多重抗原を含有する用意された試料を膜上に適用することから始まり、続いてブロッキング手順及び個々の目標の抗原に対する抗体を同時に混合したものをを用いた膜のインキュベーションを行う。本発明における溶出手順の添加は、目標となる他の抗体及びそれらの抗原の結合した免疫複合体に干渉することなく、その抗体に対する競合分子を含む溶出液を用いて、結合した免疫複合体からそれらの抗体(直接または間接的にレポーター酵素でラベリングされている)の遊離を可能にする。溶出緩衝液中における個々の抗体と結合したレポーター酵素量の直接測定により、調整された(prepared)試料中の目標の抗原量を決定する。個々の競合分子を用いた溶出手順を繰り返し行うことで、短期間に段階的に調製した試料中の目標のすべての抗原の定量化が行われる。

20

【0046】

本発明の別の目標はタンパク質マイクロアレイ解析に用いられることでもある。この方法はマルチユニットプレート形式において調製した試料の適用から始まる。目標の試験抗原が付着したマルチユニットプレートがブロックされて、任意の非特異的タンパク質結合部位が除去され、続いてレポーター酵素で直接または間接的にラベリングされた多重抗体と共に同時にインキュベート(培養)される。マルチユニットプレートに溶出緩衝液が与えられ、各ウェルは検査する目標の試験抗原の異なる競合分子を保持する。そして、溶出緩衝(elution buffer)の培養が、複数ユニットプレートの各ユニット内の結合された免疫複合体から、それに適合した抗体を遊離する。溶出緩衝液はマルチユニットプレートの固相から分離され、各ウェルにおける異なる試験抗原の相対量がレポーター酵素媒介反応により同時に計量化される(quantified)。

30

【0047】

この方法は、その単純さ故に、自動式過程で使用されることもある。従来の方法と比べて、本発明の免疫分析のために必要な手順は、異なる溶液のインキュベーション及び変更に限定され、これが臨床的、実験的、および薬学研究における大規模な自動式過程および診断目標のための使用を可能にする。従って、全体的な方法を有意に簡素化している。

40

【0048】

本発明の別の目標は、典型的な免疫ブロット(immunoblot)手順を短縮するということである。従来の免疫ブロット手順は、典型的には、集中洗浄、インキュベーション、緩衝交換手順を有し、時間がかかる。この手順に要する時間を短縮するためにはかなり努力が行われたが、この方法の本来的な性質のため、それは回避できない。Reverse Zesternは、以下に示すように、競合分子を用いた固相上への免疫複合体の前形成及び検出によって当該手順の短縮を達成する。そのため、real assay 手順は、溶出手順に限定される。これは資料を用いたものであり、溶出緩衝としての目標の抗原のあるなしに係らない。試料内の目標の抗原は検出抗体と比べて同じかより強い親和性で結合し、試料内の目標の抗原の量は、競合分子のそれに対して低い、高い、同じかである。当該競合分子は、assayの

50

性質に応じた検出抗体と共に(with)固相に既に結合されている。

【0049】

本発明の別の目標はその特異性をFRET (Sekar et al.2003:セカーら、2003)または化学増幅型ルミネッセンス プロキシミティホモジニアスアッセイ (ALPHA ASSAY: アルファ アッセイ)を含むFRETの - 様な技術 (Bosse, et al., PerkinElmer application note: ボッセーら、パーキンエルマーのアプリケーションノート)を介して改善することである。検出抗体の一定割合は、溶出緩衝の競合分子の存在とは無関係に、単独または免疫複合体と一緒に固相から洗い流されることが避けられない。この現象は、大まかに背景溶出として定義することができる。背景(background)溶出は従来の免疫プロット方法において主要な問題になることはないが、本発明の方法においては特に一定の試料中の目標の抗原が極端に少ない場合に、アッセイの特異性を損なうことがある。これは溶出緩衝液中における競合分子の濃度が増加するに従って、このような背景溶出の傾向は様々な要因によって増加するためであると考えられる。

10

【0050】

FRETに基づくアッセイおよびALPHAアッセイは、2分子が近接している場合のみ発生する。検出抗体及び競合ポリペプチドを一組にされた(paired)蛍光性又は発光染料でラベリングしてFRET効果やALPHAアッセイにおける化学増幅型シグナルを達成することで、アッセイの特異性が大幅に改善させる。それは、背景溶出による干渉を大幅に検出過程において減少させながら、競合により溶出した検出抗体のみを有効なシグナルとして記録するものである。

20

【0051】

当業者には、FRET又はALPHA技術のようにその広い発明概念から逸脱することなく同じ目標を達成するために、他の技術があることが理解される。本発明は本明細書に開示されたFRET又はFRETの様な技術に限定されるものではなく、従ってFRET技術は、本発明の精神および発明の範囲内における改変を例示するために開示されている。

【0052】

当業者には上述した実施例において、その広い発明概念から逸脱することなく、変更し得ることが理解されるであろう。本発明は開示された特定の実施例に限定されるものではなく、従って本発明はむしろ添付の請求項に規定されているように本発明の精神および範囲内における改変を例示するものである。

30

【0053】

本発明の方法の実施例はさらに本発明の性質を例示するためのものである。本発明はこれらに限定されない。

例1 HEK-293細胞におけるFLAG タグIRS- 2タンパク質発現(expression)の分析の改良方法 (Zestern)

【0054】

HEK -293細胞をFLAG タグIRS- 2コンストラクトの「2 µg/60 mm」培養皿においてFugene 6方法を用いてトランスフェクト(transfect)した。トランスフェクションの48時間後、全細胞溶解物 (Zhang, J., 2007) はプロテアーゼ阻害剤(protease inhibitors)を含む溶解緩衝液中において調製された。全細胞溶解物を4XSDS試料緩衝液 (Laemmli緩衝液) に再遊離し、そしてそれらを標準的なドットプロット手順に続いて、PVDF膜の個々のユニットに適用する前に75 °Cで5分間加熱した。これらの個々のユニットPVDF膜を、ブロッキング緩衝液に1:1000希釈されたM2 FLAG抗体 (Sigma, St. Louis) に2時間さす前に、ブロッキング緩衝液 (0.1%のTween20 (一般的に"TBST"として知られている) で補足されたトリス緩衝生理食塩溶液(Tris buffered saline)中の5%の無脂肪乳) によって(with)、1時間ブロックされる。続いて3X5分間TBSTバッファーで洗浄し、そして2時間 1:5000希釈のドンキー(Donkey)抗マウス二次抗体において培養した。追加の3X5分間のTBSTバッファー洗浄後、これらの個々のユニットのPVDF膜は、100 µL溶出溶液 (3XFLAGペプチド (Sigma, St. Louis, MO) を最終濃度150ng/ µLで含む1X PBS) を用いてさらに1時間インキュベートされ、結合した抗体 (リポーター酵素ラベリング二次抗体と結合した一次抗体) を

40

50

PVDF膜の個々のユニットから溶出する。溶出液は標準的なルミノメーターによって定量化される前に、50 μ Lの溶出液を96ウェルブラックフラット底プレート(well block flat bottom plate)に移し、そして準備した50 μ LのECL溶液(GE Healthcare)と混合される。

【0055】

ルミノメーターの読取値(readings)(任意単位)は下の表1に示される。

(表1) 特異的抗原による抗体の溶液のルミノメーター読取値

試料	ルミノメーター読取値(任意単位)	
ブランク	98+/-5	10
3XFLAG ペプチドを用いて溶出され、擬似トランスフェクトされた細胞からの全細胞溶解物	211+/-20	
3XFLAG ペプチドを用いて溶出された FLAG-IRS-2	34023+/-3265	
FLAG-IRS-2 でトランスフェクトされ、TBS のみで溶出された細胞からの全細胞溶解物	1041+/-130	

結果はデュプリケート(duplicate)を3回繰り返したものの平均値である。

【0056】

ステップ1:

【0057】

ステップ2:

例3 Zestern分析の特異性を改善する

【0058】

HEK-293細胞が例1に記載のようにFLAG-IRS-2プラスミド(plasmid)でトランスフェクトされる。全細胞溶解物は膜の個々のユニットに適用される。膜は、3時間FLAGエピトープ(epitope)に対するM2一次抗体と共にインキュベートされる前に、1時間ブロッキング緩衝液(TBST中に5%ミルク)でブロックされる。膜を各5分間TBST緩衝液で3回洗浄する。次いで、膜は、さらに2時間アレクサ488でラベリングされたドンキー抗マウス抗体と共に(with)インキュベートされる。膜の個々のユニットを3回、1回5分間づつTBST緩衝液で再度洗浄する。

【0059】

アレクサ555でラベリングした過剰量の3XFLAGペプチドが膜の個々のユニットと共に、30分間インキュベートされる。溶出液をマルチウェルプレートに移し、そしてFRET効果の検出が可能な条件下で分析される。競合分子と検出抗体とが近接していることがFRET効果およびこのアッセイの特異性を確保する。

【0060】

参考文献一覧

次の参照、特許および特許出願の公開は本開示で引用されているかまたは本開示と関連性を持っているものである。以下に記載した全ての文献は他の論文、特許および本開示において引用されている特許出願の公開とともに参照として組み込まれており全内容が本明細書に再現されているかのように公開されている。

1. Burnette, W. N.. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from Sodium Dodecyl sulfate-Polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Analytical Biochemistry (1981) V. 112, pp. 195-203.

2. Hawkes, R., Niday, E., Gordon, J.. A Dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Analytical Biochemistry (1982) V. 119, pp. 142-147.

3. Engvall, E., Perlmann, P.. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry (1971) V. 8, pp. 871-874.

4. Engvall, E., Jonsson, K., Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay 50

11. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labeled antigen and antibody-coated tubes. *Biochemica et biophysica acta* (1971) V. 251, pp. 427-434

5. Engvall, E., Perlmann, P.. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *The journal of Immunology* (1972) V. 109, pp.129-135.

6. Yalow, R. S., Berson, S. A.. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *Journal of Clinical Investigation* (1960) V.39, pp. 1157-1175.

7. Zhang, J.. The direct involvement of SirT1 in insulin-induced insulin receptor substrate-2 tyrosine phosphorylation (2007). V. 282, pp. 34356-34364.

8. Sekar, R. B., Periasamy, A.. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations (2003). V. 160, pp. 629-633.

9. Bosse, R., Illy, C., Chelsky, D.. Application note: Principles of AlphaScreen. Amplified Luminescent Proximity Homogenous assay. PerkinElmer Life Sciences. AlphaScreen application note ASC-001

10

【 図 1 】

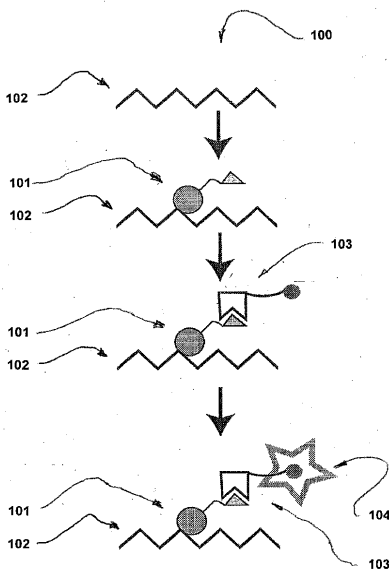


FIG. 1
(Prior Art)

【 図 2 】

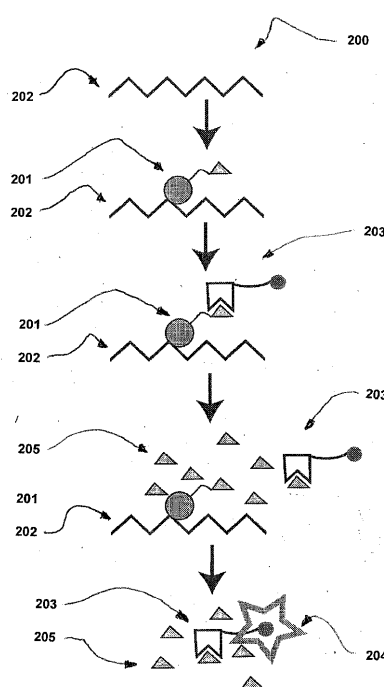


FIG. 2

【手続補正書】**【提出日】**平成26年6月6日(2014.6.6)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**全文**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項1】**

以下のステップ a, b, c, d, e を有する試料中の抗原の量を測定する測定方法。

a. 前記抗原を固相に結合すること、

b. 前記抗原に特異的な検出抗体を適用することにより、前記固相上に抗原抗体免疫複合体を形成すること、

c. 前記検出抗体と結合することにおいて前記抗原に対して競合することで前記免疫複合体を崩壊させるポリペプチドを適用することにより前記免疫複合体から前記検出抗体を遊離させること、

d. 前記遊離された検出抗体を回収すること、および、

e. 前記試料中の抗原の量を測定するために前記遊離された検出抗体を定量化すること。

【請求項2】

前記試料の少なくとも一部を前記固相に適用することによって前記抗原が前記固相に結合される請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記免疫複合体の形成後、前記検出抗体の遊離前に、未結合の検出抗体を前記固相から除去する請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記免疫複合体を形成する前、前記抗原により媒介されていない抗体結合を防止するために前記固相がブロックされる請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記抗原はポリペプチド、化学薬品、RNA、DNA、細胞およびウイルス粒子からなる群から選択される請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記ポリペプチドはさらなる同じ抗原を含む請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記ポリペプチドは前記抗体に対し特異的な前記抗原のエピトープを含む請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記ポリペプチドは前記抗原の抗体相互作用領域を有する請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記ポリペプチドは前記抗原の前記抗体相互作用領域の複数のコピーを有する請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記ポリペプチドは前記抗原より強く前記抗体と結合するポリペプチドを有する請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記検出抗体がラベリングされる請求項1に記載の方法。

【請求項12】

前記ラベリングの方法は無線ラベリング、赤外線ラベリング、蛍光ラベリングおよびレポーター酵素ラベリングからなる群から選択される請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記抗体が二次抗体を介しラベリングされる請求項11に記載の方法。

【請求項 14】

前記固相は多孔性材料である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記固相は前記検出抗体による浸透を許すのに十分な多孔性を有する請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記固相は膜およびマルチウェルプレートからなる群のなかから選択される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記固相の形状はフィルム、シート及びプレートからなる群のなかから選択される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記固相は紙、ガラス、プラスチック、ファブリックからなる群のなかから選択された材料を有する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記固相はELISAプレートである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

自動化された試験方法で行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

以下のステップ a, b を有する試料中の多重抗原量を測定するための方法。

- a. 前記試料から複数のサブ試料を取得すること、
- b. 各サブ試料を、固相を持つ容器内に置くこと、および、各サブ試料に対して、
 - (1) 前記抗原を固相に結合すること、
 - (2) 前記抗原に対し特異的な検出抗体を適用することにより、前記固相上に抗原抗体免疫複合体を形成すること、
 - (3) 前記検出抗体と結合することにおいて前記抗原に対して競合することで前記免疫複合体を崩壊させるポリペプチドを適用することにより前記免疫複合体から前記検出抗体を遊離させること、
 - (4) 前記遊離された検出抗体を回収すること、および、
 - (5) 前記それぞれのサブ試料中における抗原の量を測定するために前記遊離された検出抗体を定量化すること。

【請求項 22】

以下のステップ a, b, c, d, e, f を有する試料中の複数の抗原の量を測定するための方法。

- a. 固相に複数の抗原を結合すること、
- b. 各々が複数の検出抗体のうちの一つに対して特異的である複数の検出抗体を適用することによって、前記固相上に複数の抗原抗体免疫複合体を形成すること、
- c. 検出抗体及びそれに対応する抗原によって形成された前記免疫複合体を崩壊させるポリペプチドであって、前記検出抗体と結合することにおいて前記抗原に対して競合するポリペプチドを適用することで、前記固相から前記検出抗体の一つを遊離すること、
- d. 前記遊離された検出抗体を回収すること、
- e. 前記ステップ c 及び d を少なくとも 1 回繰り返すこと、および、
- f. 試料中の対応する抗原の量を測定するために、各々の前記遊離した検出抗体を定量化すること。

【請求項 23】

以下のステップ a, b, c, d, e, f, g, h を有する、多重抗原試料中の抗原量を測定するための方法。

- a. 試料から複数のサブ試料を取得すること、
- b. 各々の前記サブ試料を別個の固相に適用すること、
- c. それぞれの前記サブ試料中の抗原をサブ試料固相に結合すること、

- d . 固相上の試験抗原に特異的な試験検出抗体を適用することにより、各サブ試料固相上に抗原抗体免疫複合体を形成すること、
- e . サブ試料に下記の手順（１），（２）を施すこと、
 - （１）前記サブ試料固相に対して、対応する試験検出抗体と結合することにおいて前記抗原に対して競合することで前記抗原と共に前記免疫複合体を崩壊させる試験抗原に特異的なポリペチドを適用すること、
 - （２）前記試験抗原によって形成された前記免疫複合体から前記試験検出抗体を遊離すること、
- f . 他の前記サブ試料に対して、前記（e）（１），（e）（２）の２つのステップを施し、各ケースにおいて異なる試験抗原に特異的なポリペチドを適用すること、
- g . 前記遊離された試験検出抗体を回収すること、および、
- h . 前記試料中の前記試験抗原量を測定するために、前記遊離された検出抗体を定量化すること。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/020138

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 ADD.		
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) 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 4 446 232 A (LIOTTA LANCE A [US]) 1 May 1984 (1984-05-01) the whole document particularly fig. 5, 6, claims 13-21 -----	29,30 1-28
X A	US 6 020 209 A (NARANG UPVAN [US] ET AL) 1 February 2000 (2000-02-01) fig. 1A, 1B, col. 2, lines 38-45, col. 5, lines 8-29 -----	29,30 1-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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		Date of mailing of the international search report
13 February 2013		06/03/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoesele, Heidi

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/020138

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date				
US 4446232	A	01-05-1984	BE 894662 A2	11-04-1983			
			CA 1200483 A1	11-02-1986			
			DE 3237046 A1	21-04-1983			
			DK 451982 A	14-04-1983			
			FR 2514511 A1	15-04-1983			
			GB 2111676 A	06-07-1983			
			GR 76996 A1	04-09-1984			
			IE 53533 B1	07-12-1988			
			IT 1149089 B	03-12-1986			
			JP 4016745 B	25-03-1992			
			JP 4064062 A	28-02-1992			
			JP 58076763 A	09-05-1983			
			LU 84402 A1	13-06-1983			
			NL 8203946 A	02-05-1983			
			SE 462606 B	23-07-1990			
			SE 8205751 A	08-10-1982			
			US 4446232 A	01-05-1984			
			-----	-----	-----	-----	
			US 6020209	A	01-02-2000	US 6020209 A	01-02-2000
						US 6323042 B1	27-11-2001
-----	-----	-----	-----				

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

专利名称(译)	测量蛋白质含量的方法		
公开(公告)号	JP2015500487A	公开(公告)日	2015-01-05
申请号	JP2014546200	申请日	2013-01-03
[标]申请(专利权)人(译)	陈迪吉恩 涧底张		
申请(专利权)人(译)	张尚宏机械		
[标]发明人	チャンジャンディ		
发明人	チャン ジャンディ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N33/5306 G01N33/6803		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.575 G01N33/543.545.A G01N21/64.F		
F-TERM分类号	2G043/BA16 2G043/DA02 2G043/EA01		
代理人(译)	松下正弘		
优先权	13/656715 2012-10-21 US 61/583624 2012-01-06 US 13/459192 2012-04-29 US		
其他公开文献	JP5703460B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了改进的，简单和可定量的免疫检测方法，其具有改进的特异性，允许其在临床，制药和生物医学研究和诊断应用中的大规模应用。与传统的免疫检测方法相比，本发明消除了凝胶分离和转移步骤，并且可以直接定量结果以提高特异性。本发明在典型的免疫检测过程中添加一个洗脱步骤，其中结合的免疫复合物暴露于含有过量的抗原或部分抗原的单个或多个拷贝在一个分子内的洗脱溶液，以将用报道酶标记的结合抗体释放到溶液中直接量化。本发明对于提高多孔板形式中的蛋白质印迹，斑点印迹，ELISA和蛋白质微阵列分析的效率和准确性可能特别有用。它还可用于临床，制药和生物医学应用及其诊断应用的蛋白质分析自动化。

