

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5031148号
(P5031148)

(45) 発行日 平成24年9月19日(2012.9.19)

(24) 登録日 平成24年7月6日(2012.7.6)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 X

CO 7 K 16/18 (2006.01)

CO 7 K 16/18

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 1 1 D

GO 1 N 33/577 (2006.01)

GO 1 N 33/577 B

請求項の数 8 外国語出願 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-101361 (P2001-101361)

(22) 出願日 平成13年3月30日(2001.3.30)

(65) 公開番号 特開2002-40024 (P2002-40024A)

(43) 公開日 平成14年2月6日(2002.2.6)

審査請求日 平成20年3月25日(2008.3.25)

(31) 優先権主張番号 193951

(32) 優先日 平成12年3月31日(2000.3.31)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-1353

微生物の受託番号 ATCC PTA-1354

(73) 特許権者 501131014

オーソークリニカル・ダイアグノスティック
クス・インコーポレイテッドOrtho-Clinical Diag
nostics, Inc.

アメリカ合衆国、14626-5101

ニューヨーク州、ロチェスター、インディ

ゴ・クリーク・ドライブ 100

100 Indigo Creek Dr

ive, Rochester, NY

14626-5101, U. S. A.

(74) 代理人 100088605

弁理士 加藤 公延

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C反応性蛋白についての免疫測定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C反応性蛋白を検出するための競合的免疫測定を実行するための方法において、

(i) サンプルを、C反応性蛋白に対する親和性が約 10^{-7} Mの固定した抗ヒトC反応性蛋白抗体および、PTA-1354の名称でATCCに寄託されたハイブリドーマが産生するCRP5-23に $Kd < 10^{-8}$ Mの親和性で結合することのできるラベル化した抗イディオタイプ抗体と接触させ、ここで、PTA-1354の名称でATCCに寄託されたハイブリドーマが産生するCRP5-23に対する結合は、C反応性蛋白の結合と相互に排他的である、または、

サンプルを、PTA-1354の名称でATCCに寄託されたハイブリドーマが産生するCRP5-23に $Kd < 10^{-8}$ Mの親和性で結合することのできる固定した抗イディオタイプ抗体およびC反応性蛋白への親和性が約 10^{-7} Mのラベル化した抗ヒトC反応性蛋白抗体と接触させ、ここで、PTA-1354の名称でATCCに寄託されたハイブリドーマが産生するCRP5-23に対する結合は、C反応性蛋白の結合と相互に排他的である

工程と、

(i i) 前記ラベルを検出する工程と、

(i i i) 前記ラベルの検出結果をサンプル内のC反応性蛋白の量に対して相関付ける工程とを備えた方法。

【請求項 2】

10

20

請求項 1 に記載の方法において、前記抗ヒト C 反応性蛋白抗体が、P T A - 1 3 5 4 の名称で A T C C に寄託された ハイブリドーマが産生する C R P 5 - 2 3 である、方法。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法において、前記抗イディオタイプ抗体が、P T A - 1 3 5 4 の名称で A T C C に寄託された ハイブリドーマが産生する C R P 5 - 2 3 に結合し得る、方法。

【請求項 4】

競合的免疫測定のための一式の装置において、

C 反応性蛋白への親和性が約 10^{-7} M の抗ヒト C 反応性蛋白抗体である第 1 の抗体と、当該第 1 の抗体に結合可能な抗イディオタイプ抗体である第 2 の抗体と

を含む装置。

【請求項 5】

P T A - 1 3 5 4 の名称で A T C C に寄託された、C R P 5 - 2 3 として同定される抗ヒト C 反応性蛋白抗体を生成できるハイブリドーマ細胞系。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のハイブリドーマにより生成した抗体。

【請求項 7】

抗ヒト C 反応性蛋白抗体に結合するための抗イディオタイプ抗体であって、P T A - 1 3 5 4 の名称で A T C C に寄託された ハイブリドーマが産生する C R P 5 - 2 3 に $K_d < 10^{-8}$ M の親和性で結合することができ、P T A - 1 3 5 4 の名称で A T C C に寄託された ハイブリドーマが産生する C R P 5 - 2 3 に対する結合は、C 反応性蛋白の結合と相互に相互に排他的である、抗イディオタイプ抗体。

【請求項 8】

P T A - 1 3 5 3 の名称で A T C C に寄託されている、C 2 3 i d 2 - 6 . 3 として同定される抗イディオタイプ抗体を生成できるハイブリドーマ細胞系。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は C 反応性蛋白 (C R P) を検出するためのインビトロ診断用免疫測定に関する。

【0002】

【従来の技術】

高濃度および高分子量の分析物の場合の最近の免疫測定は比色定量的または化学発光的な検出システムを使用する臨床化学的な分析器 (analyzers) を多様に用いて行うことが困難である。

【0003】

一般に、市場における高濃度および高分子量の分析物の場合の免疫測定は分析物の多面的な特性に基づいて断定されている。最終的に、分析物は (混濁または比濁測定における) 凝集、析出 (放射状免疫拡散)、またはサンドイッチ式免疫測定のいずれかによるある種の架橋反応により検出される。これらの種類の免疫測定はそれぞれ自動化システムに翻訳するという相当な手間を要する。すなわち、放射状免疫拡散測定は極めて時間がかかり (数時間乃至数日)、慎重に選択した相当量の抗血清を必要とする。また、凝集反応に基づく測定は初期的な希釈処理および相当量の免疫材料が必要である。さらに、上記の各方法は現在の臨床分析器において通常的に存在していない特別な光学システムを必要とする。加えて、サンドイッチ式または 2 部位式 (two-site) 免疫測定は大量の初期的な希釈処理または高価な免疫材料の不所望に大量の濃縮処理のいずれかを必要とする。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

競合的な免疫測定に関するフォーマットの現状での可能性が多くの治療薬または薬物の乱用のような場合における高濃度で低分子量の分析物に対して最も好適に適用されている。これまで、上記のような競合的な免疫測定は遊離の薬物と薬物誘導したハプテンおよびホ

10

20

30

40

50

ースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（HRP）の化学的結合により調製される酵素ラベルとの間の有限数の薬物特定結合部位（固定化抗体分子）についての競合に基づいて断定されている。一般に、上記の診断検査における試薬の選択基準は、第1に、薬物-抗体複合物の解離定数（ K_d ）が血清サンプル中の薬物濃度に（10の係数以内で）一致する必要があること、第2に、ラベル-抗体複合物の解離定数が同一条件下における薬物-抗体複合物の解離定数よりも相当に（分析物の絶対濃度に基づいて1倍乃至数倍の程度で）低いことを含む。しかしながら、必要な親和性の諸条件を有する抗体およびラベルを作成する場合の困難さにおいて不都合が存在する。

【0005】

高濃度で高分子量の分析物の場合に上記の諸条件を満足することは困難である。特に、上記の第2の条件（ラベル化した分析物における比較的高い親和性）を達成することが困難である。一方、薬物のような比較的小さな分子の場合は、ラベルに対する抗体の親和性を、「リンカー作用（linker effect）」（抗体とリンカーとの間の相互作用による付加的な結合エネルギー）、ラベルのハプテンに対する多数部位置換（multisubstitution）、および、可能な場合における、ラベル表面上における薬物の好適な配向を含む幾つかの作用により高めることができる。しかしながら、高分子の分析物の場合には、分析物との間の相互作用におけるエピトープおよび分析物-酵素結合が同一であって分析物上の全体に存在しているために、同等の作用は期待できない。別の見方をすれば、このような分析物は溶液中に遊離している状態またはHRP分子に結合している状態のいずれであっても抗体と同様の作用を示すと考えられる。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者は目的的分析物が高濃度で高分子量である場合に高濃度で低分子量の分析物を検出するための従来手法を採用することにおける欠陥を解消した。従って、本発明の目的は高濃度で高分子量の目的の抗原に対して特異的な抗体に関連する抗イディオタイプの単クローン抗体母集団を得るための方法を提供することであり、当該方法において、上記の抗イディオタイプの抗体母集団が上記の目的の抗原に対して特異的な選択された抗体に対する広範囲な結合親和性を有しており、上記の抗イディオタイプの抗体母集団の一部が特定用途に対して必要な親和性を有するように選択できる。好ましい実施形態において、上記の抗イディオタイプの抗体母集団は上記の抗体に対応する目的の抗原の親和性よりも相当に高い目的の抗原に関連する抗体に対する親和性を示すように選択される。さらに、本発明者は上記の目的の抗原に対して低い親和性の抗体を得るための手段を開示する。

【0007】

別の態様において、本発明は新規なCRP免疫測定組成物に関する。この組成物は低親和性（ $K_D = 10^{-7} M$ ）の抗ヒトCRP単クローン抗体（CRP5-23）および当該CRP5-23に対して培養した抗イディオタイプ抗体を含んでいる。本発明者はCRPに対して効果的に結合するCRP5-23がイオン化したカルシウムに対して反応しないことを発見した。この抗体用のハイブリドーマはPTA-1354の名称でATCCにより寄託されている。

【0008】

さらに別の態様において、本発明は一般に競合的免疫測定法、ドライ-フィルムおよび溶液を基材とする構成要素およびキットに関し、特に、CRPについての免疫測定に関する。

【0009】

目的的分析物（抗分析物性抗体（antianalyte antibody））に対して適当な親和性を有する抗体を用いて開始することにより、抗イディオタイプ抗体を、（i）抗分析物性抗体に対する高い親和性を有していて、（ii）抗分析物性抗体に対する結合において相互に排他的な様式で目的の抗原に対して競合するように調製して選択できる。

【0010】

本発明者は本明細書において抗CRP性抗体に対応するCRPよりも高い親和性を有する

抗イディオタイプ抗体の使用に基づくヒトCRP（C反応性蛋白）についての競合的酵素免疫測定の開発について記載している。本発明は2種類の新規な免疫材料を具体化している。すなわち、第1の免疫材料は比較的低親和性の抗ヒトCRP単クローン抗体であるCRP5-23であり、この材料はCRPとの相互作用がイオン化したカルシウムに対して無反応性である（ $[Ca^{++}]$ が0mM乃至1mMの範囲内で変化する時に K_D が2の係数よりも小さい範囲で変化する）という極めて有用な付加的な特性を有している。このCRPの構造がカルシウムによって決まり、抗体およびCRPの結合がカルシウムに依存していないという事実が有用であり、実際に有利な点である。抗原であるCRPを含有する生物学的な各サンプルにおいてカルシウムの量が変化するので、上記の結合無反応性がCRPについての免疫測定において有効である。

10

【0011】

第2の免疫材料はCRP5-23に対して培養された抗イディオタイプ抗体であり、CRP5-23に対してヒトCRPと競合してCRPおよびこの抗イディオタイプ抗体のCRP5-23に対する結合が相互に排他的になるような機能について選択される。このような抗イディオタイプ抗体を生成することのできるハイブリドーマはPTA-1353の名称でATCCにより寄託されている。

【0012】

1989年5月9日に発行された米国特許第4,828,981号、および1993年6月15日に発行された米国特許第5,219,730号のような既に発行された少なくとも2件の米国特許が抗イディオタイプ抗体を使用する免疫測定を記載している。

20

【0013】

【発明の実施の形態】

本明細書において使用する「抗イディオタイプ抗体」は、その定義において、同類の（cognate）抗体、この場合においてCRP5-23の V_H および/または V_L ドメインに結合する抗体である。この場合において、抗イディオタイプ抗体はその同類の抗体に対する結合が分析物CRPの結合により相互に排他的になるという付加的な特性を有している。

【0014】

本明細書において使用する「サンプル」とは、関与する分析物を含有し得るあらゆる基質を意味する。このサンプルは全血、または赤血球、白血球、血小板、血清およびプラズマ、腹水、尿、脳脊髄流体、および関与する分析物を含有し得るその他の成分を含む全血成分のような生物学的流体とすることができる。必要に応じて、このサンプルは水、土、草木から得ることができる。

30

【0015】

また、「競合的免疫測定（competitive immunoassay）」とは、有限数の相互に排他的な結合部位に対して測定する分析物およびラベル化した検出器分子が競合するように構成されている免疫測定を意味する。このような種類の免疫測定においては、分析物が多量にあることが検出器分子の結合と相反的な関係を有する。

【0016】

この測定は検出器分子に付着してラベル化した検出器分子を形成することのできる任意の酵素ラベルにより行うことができる。例えばグルコース・オキシダーゼ等のオキシダーゼ、例えばホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ等のペルオキシダーゼ、アルカリ・ホスファターゼおよびガラクトシダーゼのような酵素が好ましいラベルである。

40

【0017】

さらに、任意のラベルに対する適当な基質を決定することは、例えば、臨床化学分野における作業等、通常の熟練者が有する技術の範囲内である。この基質は酵素ラベルにより直接的に作用を受ける材料であるか、ラベルの酵素的反応に関連する一連の反応に係る材料とすることができる。

【0018】

本発明において効果的に使用できるその他のラベルは例えばフルオレセイン、ダンシル等の蛍光ラベル、化学発光ラベル、および例えば ^{125}I または ^{14}C を含む放射性ラベルであ

50

る。

【0019】

本発明の効果および利点を以下の各実施例によりさらに説明する。これらの実施例は本発明の趣旨および範囲を説明するためのものであり、本発明の趣旨および範囲を制限するためのものではない。

【0020】

実施例1：低親和性抗CRP単クローン抗体の調製

ヒト血清中に見られるC反応性蛋白(CRP)の濃度範囲は5mg/L(40nM)よりも小さい正常値から300mg/L(2.6μM)よりも大きな値までに及ぶ。CRPについての適当な競合的免疫測定を構成するためには、同一濃度範囲内、すなわち、40nM乃至2.6μMの範囲内のCRPに対応する解離定数(Kd)を有する単クローンの抗体が必要である。そこで、CRPに対する単クローン抗体をCRP-リムルス・ヘモシアニン結合体によるCAF1マウスの免疫処置に続いて発生させ、ELISAによりCRPに対する結合についてスクリーニングした。得られたCRP反応性培養体をクローン化し、これらが分泌した抗体を競合的ELISA技法によりCRPに対する親和性について測定した。まず、この抗体の培養体をCRP・ELISAプレート上において滴定して最大の吸光度の値が一定のプラトーに到達する濃度を決定した。このプラトーにおける最大の吸光作用が生じる最小の濃度を競合的ELISA技法に用いて抗体濃度が制限されていることを確認した。種々の濃度における可溶性CRPをサンプルの抗体と共に混合した後に、ELISAプレートに供給して阻害プロファイルを作成した。この場合の最大吸光度の値の50%の減少を生じる濃度が抗体-CRPの相互作用の解離定数に概ね相当する。図1はそれぞれの阻害プロファイルから導いた幾つかの抗体の親和性測定値を示している図である。抗体のCRP5-23(IgG1,)は0.4μMの解離定数を示し、この値はCRPについての競合的免疫測定を構成するための第1の必須基準(分析物に対する比較的低い親和性)を満たしている。

【0021】

実施例2：CRP5-23に対する抗イディオタイプ抗体の調製

CAF1マウスをリムルス・ヘモシアニンに対して結合したCRP5-23抗体により免疫処置した。これらのマウスを殺して、この免疫処置したマウスから得た脾臓細胞をSP2/0-Ag14骨髄腫細胞と共に融合した。まず、得られたハイブリドーマをCRP5-23により調製した固定Fabフラグメントに対して結合した抗体の分泌について従来のELISA技法によりスクリーニングした。このスクリーニングによりCRP5-23のFabフラグメントに対する公称の反応性を有する母集団を定めることができる。

【0022】

さらに、選別を行って競合的免疫測定において重要な特性を有する抗体を識別した。適当な抗イディオタイプ抗体を選別するために採用した基準は、

1. 比較的高い親和性($K_d < 10^{-8} M$)でCRP5-23に結合する必要があること、および、
2. そのCRP5-23に対する結合が分析物であるCRPの結合により相互に排他的であることが必要であることである。

【0023】

Biacore装置を使用する表面プラズモン共鳴により陽性クローンを再スクリーニングして(脱離速度(off-rate)において反映される場合の)CRP5-23に対する抗イディオタイプ抗体の親和性および結合の相互排他性を測定した。ラビットの抗マウスIgG(Fc)をバイオセンサーの表面上に固定して、ハイブリドーマ培養体の上澄み液から抗イディオタイプ抗体を捕捉するために用いた。0.2nMにおけるCRP5-23のFabフラグメントの単独物および0.9nMのCRPが存在している物を固定化した抗イディオタイプ抗体の表面上に注射して相対質量の累積を比較した。その結果、抗イディオタイプ抗体の1種であるC23ID2-6.3(IgG1,)は抗イディオタイプ抗体についての本発明者の基準を満たした。すなわち、この抗イディオタイプ抗体はバイオセンサー

の表面からの脱離速度が極めて遅いことにより示される見かけ上において高い親和性で C R P 5 - 2 3 の F a b フラグメントに結合し、その結合が競合体 (competitor) として使用した比較的 low 濃度の C R P の存在下において約 3 3 % 阻害された。

【 0 0 2 4 】

実施例 3 : 従来の E L I S A 技法における抗イディオタイプ抗体による競合的免疫測定
の調製

抗 C R P 抗体である C R P 5 - 2 3 およびその抗イディオタイプ抗体である C 2 3 I D 2 - 6 . 3 をこれらの H R P 結合した各相当物と共に用いて 2 種類の E L I S A 技法に基づく競合的免疫測定を開発した。これらの 2 種類の E L I S A フォーマットを図 2 に示し、C R P に対するそれぞれの対応する投与応答曲線を図 3 に示す。これらの図に示すように、フォーマット 1 はプレート表面上に固定した抗イディオタイプ抗体により構成されており、H R P ラベル化した抗 C R P 抗体が固定した抗イディオタイプ抗体上の部位において可溶性の C R P と共に競合する。フォーマット 2 は各試薬の逆の配向を採用しており、この方式においては、抗 C R P 抗体が固定されていて、溶液内の H R P ラベル化した抗イディオタイプ抗体および C R P がプレート上の抗 C R P 抗体の部位において競合する。標準的な F L I S A 技法を行って抗体を固定し、非特異的部位をブロックし、ラベルを滴定して、信号の発生および検出を行った。この結果、図示のように、C R P 濃度の増加に伴う投与応答曲線の減少または降下が両方のフォーマットの使用において見られた。

【 0 0 2 5 】

実施例 4 : 可溶性ラベルを含有するドライ - フィルム・フォーマット内の抗イディオタイプ
抗体による C R P に対する投与応答曲線の作成

上記の免疫材料の作用は E L I S A フォーマット内において明瞭に示されたので、本発明者はこれらの材料のドライ - フィルム・フォーマットにおける有用性を次に調べた。免疫 - 速度測定用のコーティング材料を各フォーマットに対して作成した。フォーマット 1 のコーティング材料はビーズ上に固定されて受容体または散布層のいずれかの形態においてコーティングされた抗イディオタイプ抗体 C 2 3 I D 2 - 6 . 3 により構成されている。その後、可溶性の H R P ラベル化した抗 C R P 抗体の C R P 5 - 2 3 を血清サンプルに添加して標準的な免疫速度測定方法に従って VITROS (登録商標) 2 5 0 分析器により処理して各コーティング材料を評価した。フォーマット 2 のコーティング材料は、これらのコーティング材料がビーズ上に固定した抗 C R P 抗体の C R P 5 - 2 3 により構成されていて、H R P ラベル化した抗イディオタイプ抗体を各サンプルに加えたことを除いて、上記と同様に製造して評価した。図 4 は C R P に対する投与応答曲線の各フォーマットについての実施例を示している図である。これらの両方のフォーマットは C R P 濃度の増加に伴って下降する投与応答曲線を示しており、これらの曲線は C R P 濃度の臨床的に関連する濃度の範囲内において下降している。

【 0 0 2 6 】

実施例 5 : コーティングしたラベルを含有するドライ - フィルム・フォーマット内の抗イ
ディオタイプ抗体による C R P に対する投与応答曲線の作成

これらの免疫材料のドライ - フィルム中における有用性を示すために、H R P ラベルをインクジェット印刷処理により両方のフォーマットのコーティング材料の中に混入させた。フォーマット 1 の場合は、H R P 結合した C R P 5 - 2 3 を、固定した C 2 3 I D 2 - 6 . 3 を含有するドライ - フィルム・コーティング材料上に供給した。1 0 μ L の血清サンプルによる再塗布処理後の公称濃度は 2 . 5 n M \cdot I g G であった。同様に、H R P 結合した C 2 3 I D 2 - 6 . 3 を 1 0 μ L の血清サンプルの再塗布時における最終濃度が約 0 . 5 n M \cdot I g G になるように固定化した C R P 5 - 2 3 を含有するドライ - フィルム・コーティング上に供給した。これらのインクジェット印刷処理したコーティング材料を自然乾燥させた後に、種々の C R P 濃度における血清サンプルを VITROS (登録商標) 2 5 0 分析器における免疫速度アッセイとして評価した。この結果、図 5 に示すように、両方のフォーマットが C R P 濃度の増加に伴って下降する投与応答曲線を示した。

【 0 0 2 7 】

実施例 6：完全に製造した免疫速度測定用ドライ・スライド・フィルム・フォーマットにおける C R P に対する投与応答曲線の作成

このドライ・フィルムの製造方法を説明する。完全な免疫速度測定用コーティング材料を既にフォーマット 1 について説明したように調製した。その後、抗 C R P 性 H R P ラベルを免疫速度測定用グラビア・シリンダー印刷処理によりドライ・フィルム内に混入させた。この完全な機械的に製造したコーティング材料を切断し、VITROS（登録商標）250 分析器に取り付けて異なる C R P 濃度の血清を基材とする各サンプルと共に測定した。結果として得られた C R P 濃度の増加に伴って下降する投与応答曲線は希釈または予備処理を行うことなく C R P に対応する分析物の範囲内で未知のサンプルの C R P 値を測定するために使用できる（図 6 を参照されたい）。

10

【 0 0 2 8 】

実施例 7：VITROS（登録商標）E C i 自動化免疫測定用分析器における抗イディオタイプ抗体による C R P に対する投与応答曲線の作成

フォーマット 1 の場合において、従来法により、C R P 5 - 2 3 を H R P に結合させ、C 2 3 I D - 6 . 3 をビオチンに結合させた。図 7（A）に示すように、0 . 1 m g / L 乃至 1 0 0 0 m g / L の範囲で変化する C R P 濃度を有する各サンプルを用いて投与応答曲線を作成した。さらに、フォーマット 2 についての同様のデータを図 7（B）に示す。

【 0 0 2 9 】

以上の結果から、本発明の免疫材料により構成した免疫測定法において以下のような幾つかの利点が見られた。

20

- 1 . 種々のフォーマットに対して容易に適応できる競合的免疫測定。
- 2 . 分析範囲：分析範囲は幅において約 2 倍程度であり、ヒト血清における既知の C R P 濃度の有用な範囲内である。この分析範囲は各主成分の濃度およびいずれの成分が固定または移動可能であるかの選択により適宜変更できる。
- 3 . 多様性：本発明の測定方法（アッセイ）は 2 種類以上の方法で構成できる。

本発明において具体化した構成の例は、

（ i ） C R P 5 - 2 3 が固定されており、抗イディオタイプ抗体の H R P 結合物が移動可能である構成、および、

（ i i ）抗イディオタイプ抗体が固定されており、C R P 5 - 2 3 の H R P 結合物が移動可能である構成である。

30

4 . 希釈：無希釈が必要であるが、別の理由で希釈が必要である場合は、類似の免疫材料が分析物の濃度減少に適合するために選択できる。

5 . 少量の材料の必要性：特定の交換可能な方法が実質的な希釈または不所望に多量の免疫材料を必要とする場合に、これらのフォーマットは 1 n M 乃至 1 0 n M の各材料（1 回の測定当たり数 μ g 程度の量）を必要とするだけである。

6 . 患者サンプルにおける異好性作用に対する感受性の低下：抗 C R P 抗体および抗イディオタイプ抗体は異なる重鎖亜網となるように選択または修飾できる。

【 0 0 3 0 】

以上、本発明をその好ましい実施形態に基づいて説明したが、上記の実施形態の多数の変更および変形が本発明の範囲および趣旨に逸脱することなく行うことができることを理解すべきである。

40

【 0 0 3 1 】

本発明の実施態様は以下の通りである。

（ A ） C 反応性蛋白を検出するための競合的免疫測定を実行するための方法において、

（ i ）固定した低親和性の抗ヒト C 反応性蛋白抗体およびラベル化した抗イディオタイプ抗体にサンプルを接触させる工程と、

（ i i ）前記ラベルを検出する工程と、

（ i i i ）前記ラベルの検出結果をサンプル内の C 反応性蛋白の量に対して相関付ける工程とを備えた方法。

50

(B) C反応性蛋白を検出するための競合的免疫測定を実行するための方法において、

(i) 固定した抗イディオタイプ抗体およびラベル化した低親和性の抗ヒトC反応性蛋白抗体にサンプルを接触させる工程と、

(ii) 前記ラベルを検出する工程と、

(iii) 前記ラベルの検出結果をサンプル内のC反応性蛋白の量に対して相関付ける工程とを備えた方法。

(C) 競合的免疫測定のための一式の装置において、低親和性の抗ヒトC反応性蛋白抗体である第1の抗体と、当該第1の抗体に結合可能な抗イディオタイプ抗体である第2の抗体とを含む装置。

(D) CRP5-23として同定される低親和性の抗ヒトC反応性蛋白抗体を生成できるハイブリドーマ細胞系。

(E) 実施態様(D)に記載のハイブリドーマにより生成した抗体。

(F) 低親和性の抗ヒトC反応性蛋白抗体に対して培養された抗イディオタイプ抗体。

(G) C23id2-6.3として同定される抗イディオタイプ抗体を生成できるハイブリドーマ細胞系。

(1) 前記低親和性の抗ヒトC反応性蛋白抗体がCRP5-23である実施態様(A)または実施態様(B)に記載の方法。

(2) 前記抗イディオタイプ抗体がCRP5-23に結合可能な抗体である実施態様(A)または実施態様(B)に記載の方法。

(3) 前記抗体がイオン化したカルシウムに対して無反応性である実施態様(E)に記載の抗体。

【0032】

【発明の効果】

従って、本発明によれば、従来に比して優れた有用性を示す新規な免疫測定用の組成物が提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】ELISAにおける抗CRP抗体および可溶性CRPの競合プロファイルによる親和性定数の評価を示すグラフである。5種類の抗体による競合プロファイルが示されており、これらは最大吸光度の50%の減少を生じるCRP濃度により決定される親和性の範囲を示している。ヒト血清におけるCRPの正常な範囲が縦軸(y軸)により示されている。また、CRP5-10(0.4nM)およびCRP5-23(0.4μM)に対する正常な親和性がx軸上に突き出した矢印により示されている。

【図2】低親和性の抗CRP抗体およびこれに対応する抗イディオタイプ抗体により構成可能な2種類のフォーマットを示す図である。フォーマット1(図2(A))において、CRPの代理として作用する抗イディオタイプ抗体C23ID2-6.3はプラスチック微量滴定用プレートの表面上に固定されている。HRP結合した抗CRP単クローン抗体のCRP5-23がCRPを含有するサンプルと共にこのウェルに添加される。このCRPの量が固定された抗イディオタイプ抗体に結合するHRP-CRP5-23の量に最終的に反映する。フォーマット2(図2(B))においては、CRP5-23の単クローン抗体が固定されて、HRP結合した抗イディオタイプ抗体がCRP5-23結合部位においてサンプル内のCRPに対して競合する。

【図3】従来の微量滴定用プレートにおける各フォーマットの場合のCRP投与応答曲線を示す図である。両方のフォーマットはCRP濃度の増加と共に下降する投与曲線を示しており、各投与曲線は臨床的に関連する範囲内に存在している。フォーマット1は図において左側のグラフ(A)に示されており、フォーマット2は右側のグラフ(B)に示されている。414nmにおける吸光度は検出可能なHRPの活性の量を反映する。グラフ(A)において、ダイヤモンド形の点で示した曲線は固定したC23ID2-6.3およびHRPラベル化したCRP5-23により得られた投与応答曲線を示しており、正方形の

10

20

30

40

50

点で示した曲線はC R P 5 - 2 3をC 2 3 I D 2 - 6 . 3に置換した場合の対照としての投与応答曲線を示している。一方、グラフ(B)においては、正方形の点で示した曲線は固定したC R P 5 - 2 3およびH R Pラベル化したC 2 3 I D 2 - 6 . 3により得られた投与応答曲線を示しており、ダイヤモンド形の点で示した曲線はC 2 3 I D - 6 . 3をC R P 5 - 2 3に置換した場合の対照としての投与応答曲線を示している。各エラー・バー(誤差範囲)は再現実験における平均値および標準偏差を示している。

【図4】スポット状ラベルによる薄膜免疫測定におけるフォーマット1およびフォーマット2のC R P投与応答曲線を示す図である。各フォーマットにおいて、固定した抗体は当該技術分野において周知のコーティング法により薄いドライ・フィルム内に混入されている。また、H R Pラベル化した試薬はC R Pを含有するサンプルと共に混合されて、この混合物を薄膜の中心部に載置した。5分間の培養処理の後に、洗浄流体を調節して加えながらこの薄膜を洗浄して未結合の要素を培養領域の周辺部に移動させた。この際に、結合部分(H R P活性)を過酸化物の同時添加により測定し、この過酸化物は薄膜内に予め混入されている色素による色の展開を開始する。色の展開の最大速度(V_{max})を[C R P](C R P濃度)の関数としてプロットした。フォーマット1の場合を正方形の点により表現し、フォーマット2の場合を円形の点により示した。

【図5】インクジェット印刷により混入したラベルによるC R P投与応答曲線を示す図である。フォーマット1の曲線を正方形の点で示し、フォーマット2の曲線をダイヤモンド形の点で示した。

【図6】グラビア印刷により混入したラベルによる薄膜免疫測定におけるC R P投与応答曲線を示す図である。固定した相補的抗体を含有する免疫速度測定用の薄膜コーティング上へのグラビア印刷によりH R P結合物を混入した。その後、種々の濃度でC R Pを含有する血清サンプルを各フォーマットにおいて調製したコーティング上にスポットした。5分間の培養処理後に、洗浄流体を調節して加えながらこの薄膜を洗浄して未結合の要素を培養領域の周辺部に移動させた。この際に、結合部分(H R P活性)を過酸化物の同時添加により測定し、この過酸化物は薄膜内に予め混入されている色素による色の展開を開始する。色の展開の最大速度(V_{max})を[C R P](C R P濃度)の関数としてプロットした。フォーマット1の場合を円形の点により表現し、フォーマット2の場合を正方形の点により示した。

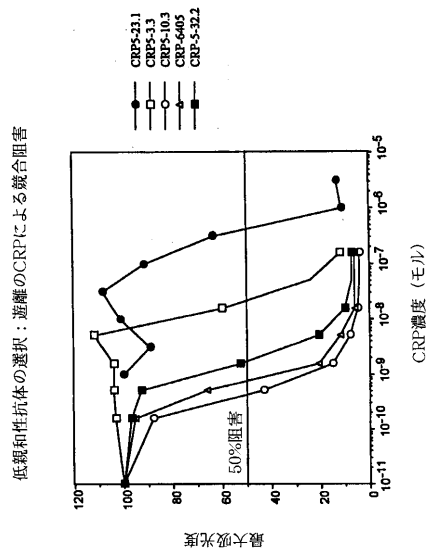
【図7】VITROS(登録商標)ECi自動化免疫測定分析器システムに対応して構成された免疫測定によるC R P投与応答曲線を示す図である。これらの変更様式においては、固定された成分がビオチンに結合して初期的に可溶性の成分として存在している。50 μ Lのビオチン処理した試薬を40 μ LのC R P含有サンプルの添加後で50 μ LのH R P結合試薬の添加前にストレプトアビジン・コーティング処理したウエルに加えた。8分間の培養処理後に、ウエルをよく洗浄して、このウエルに付随するH R P活性を化学発光性基質により検出した。フォーマット1の場合の結果をグラフ(A)に示し、フォーマット2の場合の結果をグラフ(B)に示した。

10

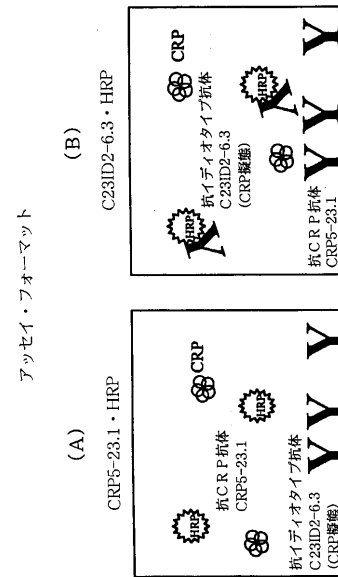
20

30

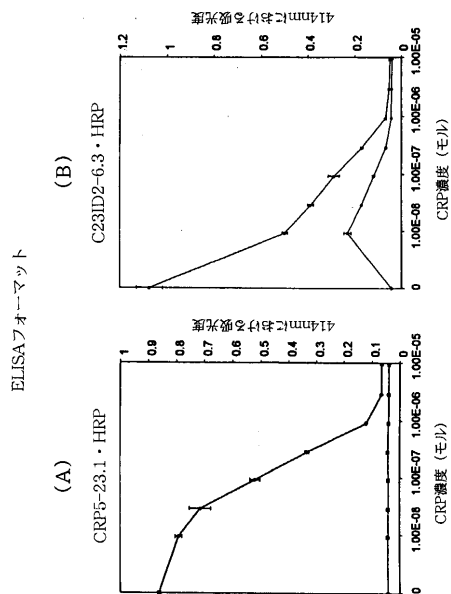
【 図 1 】



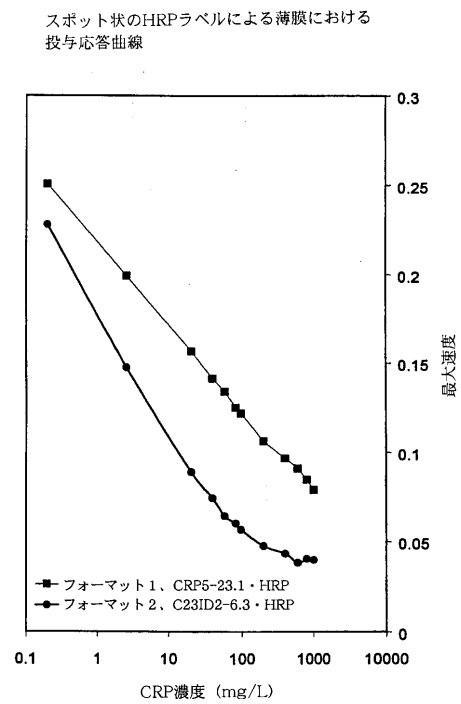
【 図 2 】



【 図 3 】

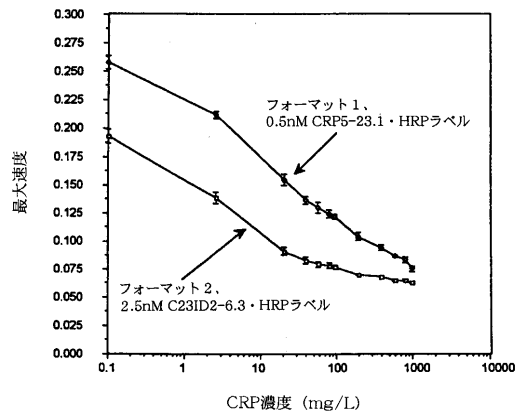


【 図 4 】



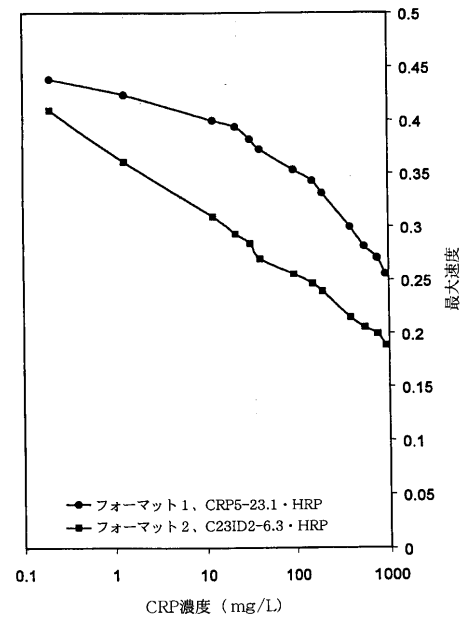
【図 5】

インクジェット印刷により供給したラベルによる
薄膜における投与応答曲線



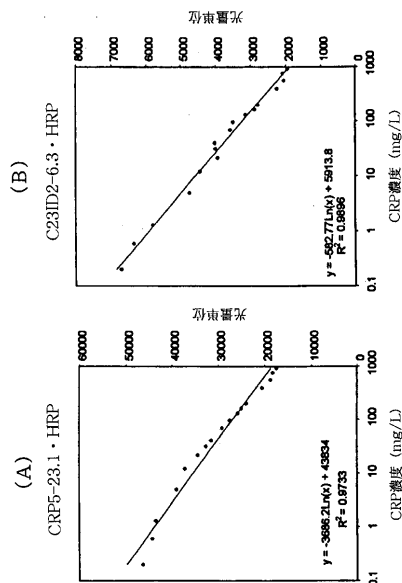
【図 6】

コーティングしたHRPラベルによる
薄膜における投与応答曲線



【図 7】

ECiフォーマット



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(72)発明者 エドワード・アール・スカリス
アメリカ合衆国、 1 4 5 2 6 ニューヨーク州、ペンフィールド、コブルストーン・クロッシング
3 0

(72)発明者 ジョン・エル・ダイス
アメリカ合衆国、 1 4 6 2 0 ニューヨーク州、ロチェスター、マルベリー・ストリート 2 9 9

審査官 吉田 将志

(56)参考文献 特開昭 6 0 - 0 7 0 3 6 1 (J P , A)
特開昭 6 1 - 0 8 4 5 6 1 (J P , A)
米国特許第 0 5 2 1 9 7 3 0 (U S , A)
特開平 0 5 - 3 4 0 9 4 6 (J P , A)
特開昭 6 2 - 0 2 5 2 6 3 (J P , A)
特開平 1 0 - 2 8 2 0 9 8 (J P , A)
特表平 0 3 - 5 0 2 2 4 3 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/53
C07K 16/18
C12N 5/10
G01N 33/543
G01N 33/577
C12P 21/08
CA/MEDLINE(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	C反应蛋白的免疫分析		
公开(公告)号	JP5031148B2	公开(公告)日	2012-09-19
申请号	JP2001101361	申请日	2001-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥索 - 临床诊断公司		
当前申请(专利权)人(译)	奥索 - 临床诊断公司		
[标]发明人	エドワードアールスカリス ジョンエルダイス		
发明人	エドワード・アール・スカリス ジョン・エル・ダイス		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12N5/10 G01N33/543 G01N33/577 C12P21/08 C07K16/42 C12N5/20 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/686 C07K16/18 C07K16/4241 G01N33/68 G01N2333/4737 Y10S435/965 Y10S435/975		
FI分类号	G01N33/53.X C07K16/18 C12N5/00.102 G01N33/543.511.D G01N33/577.B C12P21/08 C12N5/00.B C12N5/16		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065 /AB04 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
审查员(译)	吉田正志		
优先权	09/193951 2000-03-31 US		
其他公开文献	JP2002040024A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为CRP免疫测定提供新的组合物。解决方案：该组合物包括低亲和力抗人CRP单克隆抗体和针对CRP抗体培养的抗独特型抗体。还提供了获得与针对具有高浓度和高分子量的目标抗原的特异性抗体相关的抗独特型单克隆抗体群的方法。

低亲和力抗体的选择：遊離のCRPによる競合阻害

