

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6114750号
(P6114750)

(45) 発行日 平成29年4月12日 (2017.4.12)

(24) 登録日 平成29年3月24日 (2017.3.24)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 O 1 L
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	D
GO 1 N 37/00	(2006.01)	GO 1 N	33/53	Q
		GO 1 N	37/00	1 O 2

請求項の数 20 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2014-530631 (P2014-530631)	(73) 特許権者	506329801
(86) (22) 出願日	平成24年9月14日 (2012.9.14)		ファディア・アクチボラグ
(65) 公表番号	特表2014-527181 (P2014-527181A)		スウェーデン国 7 5 1 3 7 ウブサラ
(43) 公表日	平成26年10月9日 (2014.10.9)		, ボックス 6 4 6 0
(86) 国際出願番号	PCT/SE2012/050977	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開番号	W02013/039450		弁理士 小野 新次郎
(87) 国際公開日	平成25年3月21日 (2013.3.21)	(74) 代理人	100075270
審査請求日	平成27年9月10日 (2015.9.10)		弁理士 小林 泰
(31) 優先権主張番号	1150834-8	(74) 代理人	100101373
(32) 優先日	平成23年9月14日 (2011.9.14)		弁理士 竹内 茂雄
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)	(74) 代理人	100118902
(31) 優先権主張番号	61/534, 578		弁理士 山本 修
(32) 優先日	平成23年9月14日 (2011.9.14)	(74) 代理人	100135415
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 中濱 明子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 校正試薬及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数の捕獲剤がその上に固定化されている固相に、校正用試薬を加え、
前記校正用試薬に結合する能力を有する検出分子を加え、
結合した検出分子を検出し、
これによって、多くの校正点 / 区間を含んでなる校正曲線を作成すること
を含んでなり、

前記校正用試薬が、少なくとも二つの異なった結合分子を含んでなり、ここにおいて、
それぞれの結合分子が、前記固相上に固定化された捕獲剤に特異的に結合する能力及び検
出分子に結合する能力を有し、そしてここにおいて、少なくとも二つの前記結合分子が、
異なった特異性を有し、そして前記校正用試薬中に異なった濃度で存在し、これによって
、前記校正曲線中に異なった校正点 / 区間を表すことを特徴とする、
マルチプレックスアッセイを校正するための方法。

【請求項 2】

前記結合分子が、組換え抗体、自己抗体のような天然の抗体、又は抗原性バイオマーカ
ーのようなペプチド / タンパク質バイオマーカである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記結合分子が、アレルゲン特異的モノクローナルマウス I g G の重鎖の可変領域及び
ヒト I g E 重鎖を含んでなるマウス - ヒトキメラ抗体のようなキメラ抗体である、請求項
1 又は 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

【請求項 4】

前記複数の捕獲剤が、少なくとも10種、少なくとも50種、又は少なくとも100種の異なった捕獲剤のように、少なくとも5種の異なった捕獲剤である、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記捕獲剤が、天然若しくは組換えアレルゲン成分のようなアレルゲン成分、又は感染性疾患若しくは自己免疫性疾患に関連する抗原性成分のような疾患関連抗原、或いはペプチド/タンパク質バイオマーカーに対して特異的である抗体である、請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

前記検出分子が、抗ヒトIgE複合体又は抗ヒトIgG複合体のような抗免疫グロブリン複合体であるか、或いはペプチド/タンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体である、請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

前記較正用試薬が、少なくとも10種のように、少なくとも15種のように、少なくとも5種の異なった結合分子を含んでなる、請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

前記較正用試薬が、少なくとも10種のように、少なくとも15種のように、少なくとも5種の異なったキメラIgE抗体を含んでなり、ここにおいて、それぞれのキメラ抗体が、Bet v 1、Der p 2、Ole e 1、Gal d 1、Art v 1、Fel d 1、Phl p 1、Amb a 1、Can f 1、Der p 1、Gal d 2、Can f 2、Can f 5、Phl p 5及びPru p 3からなる群から選択されるアレルゲン成分に特異的に結合する能力を有する、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記マルチプレックスアッセイが、マイクロアレイチップ上で行われる、請求項1ないし8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

- 反応容器、
- 固相上に固定化された複数の捕獲剤、
- (a) 抗免疫グロブリン検出分子又は(b) ペプチド/タンパク質バイオマーカーに結合する検出分子のような検出分子、
- 較正用試薬、
- 反応緩衝媒体
を含んでなり、

前記較正用試薬が、少なくとも二つの異なった結合分子を含んでなり、ここにおいて、それぞれの結合分子が固相上に固定化された捕獲剤に対して特異的に結合する能力及び検出分子に結合する能力を有し、そしてここにおいて、少なくとも二つの結合分子が、異なった特異性を有し、そして較正用試薬中に異なった濃度で存在することを特徴とする、
生物学的試料中に存在する(a) 免疫グロブリン又は(b) ペプチド/タンパク質バイオマーカーのような興味ある分子の検出のための、マルチプレックスアッセイ系。

【請求項 11】

前記興味ある分子が、(i) IgE抗体又は(ii) IgG抗体、或いは(iii) 疾病に対するペプチド/タンパク質バイオマーカーである、請求項10に記載の系。

【請求項 12】

前記検出分子が、(i) 抗ヒトIgE複合体、(ii) 抗ヒトIgG複合体、又は(iii) ペプチド/タンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体である、請求項10又は11のいずれか1項に記載の系。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

前記結合分子が、キメラ抗体のような組換え抗体、自己抗体のような天然の抗体、又はペプチド/タンパク質バイオマーカーである、請求項 10 - 12 のいずれか 1 項に記載の系。

【請求項 14】

前記捕獲剤が、天然若しくは組換えアレルゲン成分のようなアレルゲン成分、又は感染性疾患に関連する抗原性成分、若しくは自己免疫性疾患に関連する抗原性成分のような疾病関連抗原、或いはペプチド/タンパク質バイオマーカーに対して特異的である抗体である、請求項 10 - 13 のいずれか 1 項に記載の系。

【請求項 15】

前記較正用試薬が、15種の異なったマウス-ヒトキメラIgE抗体を含んでなり、ここにおいて、それぞれのキメラ抗体が、Bet v 1、Der p 2、Ole e 1、Gal d 1、Art v 1、Fel d 1、Phl p 1、Amb a 1、Can f 1、Der p 1、Gal d 2、Can f 2、Can f 5、Phl p 5及びPru p 3からなる群から選択されるアレルゲン成分に特異的に結合する能力を有する、請求項 10 - 14 のいずれか 1 項に記載の系。

10

【請求項 16】

それぞれのキメラ抗体が、表 1 に記載されたアレルゲン成分の少なくとも一つに特異的に結合する能力を有し、そしてここにおいて、少なくとも二つのキメラ抗体が、異なった特異性を有し、そして較正用試薬中に異なった濃度で存在する、少なくとも二つの異なったキメラ抗体を含んでなる較正用試薬。

20

【請求項 17】

少なくとも 10 種のように、少なくとも 15 種のように、少なくとも 5 種の異なったマウス-ヒトキメラIgE抗体を含んでなる、請求項 16 に記載の較正用試薬。

【請求項 18】

それぞれのキメラ抗体が、Bet v 1、Der p 2、Ole e 1、Gal d 1、Art v 1、Fel d 1、Phl p 1、Amb a 1、Can f 1、Der p 1、Gal d 2、Can f 2、Can f 5、Phl p 5及びPru p 3からなる群から選択されるアレルゲン成分に特異的に結合する能力を有する、請求項 17 に記載の較正用試薬。

【請求項 19】

15種の異なったマウス-ヒトキメラIgE抗体溶液からなり、ここにおいて、それぞれのキメラ抗体が、Bet v 1、Der p 2、Ole e 1、Gal d 1、Art v 1、Fel d 1、Phl p 1、Amb a 1、Can f 1、Der p 1、Gal d 2、Can f 2、Can f 5、Phl p 5及びPru p 3からなる群から選択されるアレルゲン成分に特異的に結合する能力を有する、請求項 18 に記載の較正用試薬。

30

【請求項 20】

請求項 1 - 9 のいずれか 1 項に記載の較正法における使用のために適合された請求項 16 - 19 のいずれか 1 項に記載の較正用試薬を含んでなるキットであって、ここにおいて、それぞれのキメラ抗体は、検出分子に結合する能力を有し、そしてここにおいて、少なくとも二つのキメラ抗体は、較正用試薬中に異なった濃度で存在する、前記キット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マルチプレックスアッセイの分野に、そして更に具体的にはマルチプレックスアッセイ系、マルチプレックスアッセイを較正するための方法及び較正試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

シングルプレックスアッセイにおいて、分析物は、分析的方法において測定される化学成分である。免疫アッセイにおいて、分析物は、抗体又は抗原のいずれかである。抗体

50

は、異物に対する保護のための免疫系によって産生される血液中のタンパク質であり、一方、異物は抗原である。抗体は、抗原に結合する。

【 0 0 0 3 】

抗原又は抗体は、測定可能なシグナルを得るために分析の前に標識される。この標識は、酵素、放射性同位体、又はフルオレセインであることができる。免疫アッセイから得られるシグナルは、放射能又は光の放出であることができる。これらのシグナルは、通常反応と呼ばれる。免疫アッセイは、患者から得られた臨床的試料及び試薬（即ち、化学的溶液）間の、標準化された条件下で行われる化学反応を含む。結果は、試料中の分析物の濃度に関連する反応である。競合的免疫アッセイにおいて、分析物は標識されず、そして標識された分子と競合する。従って、反応は、分析物の濃度の減少する関数である。非競合的免疫アッセイにおいて、標識された分子は分析物に結合し、そして反応は、増加する関数である。いずれの場合も、反応及び濃度間の正確な関係は、評価する必要がある。この評価は、較正と呼ばれる。較正のために、既知の濃度を持つ試料が必要である。これらの特定の試料は、較正用物質又は標準物質と呼ばれ、そして通常、あらかじめ調製される。例えば、既知の高濃度を持つ単一の試料を、測定の範囲を包含する幾つかの規定された低い濃度を持つ較正用物質を産生するために水又は動物の血清中に溶解することができる。較正のための統計的設計を考察する場合、規定された較正用物質濃度は、設計点と呼ばれる。較正用物質は具体的に調製されるが、しかし試料はそうではないために、較正用物質及び臨床試料は、僅かに異なった方法で反応することができる。

【 0 0 0 4 】

通常、未知の濃度を持つ一組の臨床試料が、一つの分析の実行において較正用物質と一緒に分析される。較正曲線は、抗生物質の反応に適合される。この曲線は、直線又は幾つかの他の単調関数であることができる。臨床試料の反応は、適合された較正曲線による濃度の評価に転換される。試料の濃度の評価のためのこの方法は、逆方向予測と呼ばれる。反応及び濃度間の関係がアッセイの実行間で変化することができるため、較正用物質は、しばしば、それぞれを別個に較正することができるように、それぞれのアッセイの実行に含まれる。然しながら、幾つかの系において、較正を少ない頻度で、例えば月1回、又は新しいバッチの試薬が使用される場合にのみ行う必要であるように、この関係が安定であると仮定されている（Forkman J., Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2008, ISSN 1652-6880, ISBN 978-91-86195-13-7）。

【 0 0 0 5 】

マルチプレックスアッセイという、複数の特異性の分析物が、単一の試薬の反応混合物を使用する単一の試料検体中で検出されるアッセイが、当技術において既知である。これらのアッセイの重要な要素は、このアッセイによって測定される試薬、即ち抗体又はバイオマーカーのレベルを定義するために使用される較正系である。古典的には、これらのレベルは、アッセイ系によって得られる定量化の程度によって、多くの任意の単位を使用して報告されていた。定量的アッセイにおいて、血清検体中の標的物質は、所定の陽性の閾値レベルと比較した測定された反応シグナルのレベルに基づき陽性又は陰性として報告される。多くの半定量的アッセイにおいて、陽性/陰性の結果の両方、測定されたシグナルの大きさ（例えば、発光単位 [LU]、ミリボルト [mボルト]）、クラスの得点、調節された又は正規化された得点（改良された得点法から）、又は最低の対照のパーセント（別の得点法）が報告されている。シグナルの大きさは、試験血清中に存在する分子の量に対する順番に関して関連する（しかし、一貫した直接比例ではない）。

【 0 0 0 6 】

本出願人等は、ここに、当技術において既知の3種の異なった型の試験のマルチプレックスアッセイを例示する：

- 1) 特異的 Ig E の分析；
- 2) 特異的 Ig G の分析；及び

3) 非免疫グロブリンバイオマーカー(抗原)の分析。

【0007】

特異的免疫グロブリンに対する普通の分析法は、1) アレルギー/過敏性を検出する目的のための特異的IgE分析、及び2) 例えば自己免疫性疾患又は感染性疾患を検出する目的のための特異的IgG分析である。疾患関連抗原は、規定された位置のマイクロアレイに沈着される。これらの抗原は、選択された抗原に結合することができる免疫グロブリンを含む患者の試料に暴露される。特異的免疫グロブリンは、特異的免疫グロブリンと相互作用する免疫グロブリン特異的試薬(レポーター分子)により検出され、そしてこの相互作用は、検出系により分析することができる。これによって、一定の抗原に対して特異的な全ての異なった免疫グロブリンを検出することが可能である。血清中の前立腺癌バイオマーカーのような非免疫グロブリンバイオマーカー(抗原)の分析の、3) 型の試験のために、興味あるバイオマーカーに結合する能力を有する分子が、規定された位置のマイクロアレイ上に沈着される。沈着された分子は、例えば、バイオマーカー特異的抗体、酵素又は興味あるバイオマーカーに相補的である他の分子であることができる。沈着された分子は、選択された沈着分子に結合することができるバイオマーカーを含む患者の試料に暴露される。特異的バイオマーカーは、特異的バイオマーカーと相互作用するバイオマーカー特異的試薬(レポーター分子)により検出され、そしてこの相互作用は、検出系により分析することができる。

10

【0008】

例えば、特異的IgE検出の分野において、WO2002029415A1は、試料中のアレルゲン特異的免疫グロブリンの検出のための方法、及び個体中のアレルギーの*in vitro*の診断のための方法を記載している。喘息、枯草病、アトピー性湿疹及び消化器症状のような臨床的症状は、特異的アレルゲンへの暴露後に発症する。特異的及び/又は交差反応性アレルゲン成分に対する感作パターンの決定は、アレルギー患者の更に詳細な評価を援助する。

20

【0009】

商業的に入手可能なIgE抗体のイムノアッセイは、試験検体中のIgE抗体の量を正確に反映するアッセイの結果の程度及びアッセイの要求精度によって、定性的、半定量的、又は定量的アッセイに分類することができる。このようなイムノアッセイは、伝統的に、全血清IgEレベル又はアレルゲン特異的IgEレベルのいずれかを測定する。

30

【0010】

然しながら、異なったテクノロジープラットフォームは、そのIgE結果を外見上同一のクラス又は単位で報告しているが、研究は、全IgE及び特異的IgE活性を検出する能力におけるテクノロジープラットフォーム間の差を示している(Wood R A et al, Ann Allergy Asthma Immunol. 2007, 99: 34-41)。

【0011】

定量的IgE抗体アッセイは、最も先端的なアッセイ較正の方法を使用する。定量的アッセイの較正部分の目的は、アッセイの用量反応関係を定義することであり、従って、患者の血清を試験することによって得られた反応の結果を、血清中のIgE抗体の相対的な量に関連する投与量単位に内挿することができる。相同性(homologous)及び異種性(heterologous)の両方の内挿法が好結果で使用されている。相同性の内挿法は、全体のアッセイの平行性を促進し、そしてアッセイをとおして同じ固相アレルゲンを使用し、そして試験血清中に検出されるものと同じアレルゲン特異性のヒトIgE抗体により較正曲線を構築することによって、アッセイの作業範囲を最大化する。一般的に、IgE抗体を含有する参照血清のプールを、試験血清のIgEと同様な方法で希釈し、従ってアッセイの平行性を確保する。この方法の主要な制約は、試験されるそれぞれのアレルゲン特異性に特異的なIgE抗体を含有する、リットル単位のヒト血清プールの必要性である。これらの大量のヒトの血清を、特に、一般的でないアレルゲン特異性に対してロット間を再現可能な様式で供給することができる血清バンクを維持することは困難である。制約されたIg

40

50

E抗体を含有するヒト血清プールの結果として相同性内挿の較正を使用するアッセイに与えられた制約のために、全IgE較正曲線からの相同性内挿が、数百の異なるアレルゲン特異性に関係する今日の定量的IgE抗体アッセイに対する較正戦略として適合されている。異種性内挿系は、工業的標準になっている。異種性内挿系において、全血清IgE較正曲線は、WHO 75 / 502 基準 (I / L A 20 - A 2 Analytical performance characteristics and clinical utility of immunological assays for human immunoglobulin E (IgE) antibodies and defined allergen specificities ; Approved Guideline , ISBN no . 1 - 56238 - 695 - 6) まで遡ることができる

10

【0012】

ImmunoCAP ISAC (登録商標) は、マイクロアレイチップ技術を使用する *in vitro* の診断試験である。これは、僅か数 μ l の流体、例えば、血清又は血漿試料を使用する単一の試験で特異的分子類の同時測定を可能にする。これは、IgE、IgG及び非免疫グロブリンバイオマーカー (抗原) を含むいずれものバイオマーカーの分析のために使用することができる。

【0013】

例えば、ImmunoCAP ISAC (登録商標) の使用による特異的IgE抗体を分析する場合、特異的IgE (sIgE) チップは、50種より多いアレルゲン源からの100種を超える成分に対する結果を供給する。マイクロアレイフォーマット中の固体の基質上に固定化されたアレルゲン成分は、患者の試料中の特異的IgEと反応する。非特異的IgEを洗浄した後、蛍光標識抗ヒトIgE抗体を加えて、複合体を形成する。インキュベーション後、非結合の蛍光標識抗ヒトIgE抗体を、洗浄によって除去する。この方法に続いて、適当なマイクロアレイスキャナーを使用する蛍光測定を行う。反応の値が高いほど、より多い特異的IgEが検体中に存在する。

20

【0014】

試験の結果は、Phadia (登録商標) Microarray Image Analysis (MIA) ソフトウェアで解析され、そして特異的IgEに対するISAC標準化単位 (ISU-E) が計算される (Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases : state-of-the-art and future development , Clinical Chemical Laboratory Medicine , Volume 43 , Issue 12 , Pages 1321 - 1326) 。

30

【0015】

結果は、四つのクラス (0 = 検出不能又は非常に低い、1 = 低い、2 = 中から高、3 = 非常に高い) で半定量的に与えられる。Phadia MIA ソフトウェアは、この計算を自動的に行う。

【0016】

ImmunoCAP ISAC (登録商標) マイクロアレイチップの較正は、インハウスの参照標品、又は較正試薬に対して行われ、そして測定された抗体濃度は、適当な単位 ; IgE に対する ISAC 標準化単位 (ISU - E) として表示される。ImmunoCAP ISAC (登録商標) のインハウス参照標品は、ImmunoCAP 特異的 IgE (リットル当たりのキロ単位 ; kU_A / l の IgE として表示される抗体濃度を持つ) に対して較正され、これは、IgE に対する WHO 参照標品 75 / 502 に対して標準化される (Hamilton R G , Assessment of human allergic diseases . In : Clinical Immunology , Principles and Practice , ed . Rich R R , 3rd ed , 2008 , p . 1471 - 84 ; 1476 頁を参照されたい) 。

40

50

【0017】

ImmunoCAP ISAC (登録商標)は、更に、特異的IgG及び/又は他のバイオマーカー(抗原及び抗体)を分析するために類似の方法で使用することもできる。

【0018】

現在の較正系は、通常、対応する特異的抗体に対するそれぞれの抗原の独立の較正を含む。これは、Biorad's Bioplex ANAスクリーニングによって例示することができ、これは、マルチプレックスイムノアッセイフローを使用し、そしてこれは、血清又は血漿中の臨床的に関連する循環自己抗体の存在を検出する。同時に、これは、先に記述したようなマルチプレックスアッセイの第2の型、即ち特異的IgGの分析の例である。Bioplex系は、ビーズベースのマルチプレックスアッセイフォーマットを使用し、そして較正方法は、次のように記載されている：“染色されたビーズの正体は染料の蛍光によって決定されるが、抗原によって捕獲された抗体の量は、接続されたPE(即ち、フィコエリトリン；蛍光検出分子)の蛍光によって決定される。”“生のデータは、相対的蛍光強度(RFI)及び蛍光比(FR)で計算される。3種の異なる染色されたビーズ、内部標準ビーズ(ISB)、血清検証ビーズ(SVB)及びブランクビーズ(BB)が、検出反応、反応容器への血清又は血漿の添加、及び血清又は血漿中の有意な非特異的結合の非存在を検証するために、それぞれの反応混合物中に存在する。異なる情報はBioplex 2200系の操作説明書を参照されたい。計器は、Bio-Rad Laboratoriesによって別に供給される六(6)種の別個の較正物質のバイアルの組を使用して較正される。dsDNAに対して、六(6)種の異なるレベルの抗体濃度である六(6)個のバイアルが、定量的較正のために使用され、そして患者の試料に対する結果はIU/mLで表示される。sAIU/mLの結果は陰性であり、5-9IU/mLは不確定であり、そして10IU/mL又はそれより高い結果はdsDNA抗体に対して陽性である。他の十二(12)種のビーズに対して、四(4)種の異なる抗体濃度である四(4)個のバイアルは、半定量的較正のために使用される。これらの抗体のそれぞれの結果は、抗体指数(AI)として表示される。1.0のAIは、非疾病集団から得られた値の概略99パーセントイルに対応する抗体のカットオフ濃度を示す；1.0又はそれより高い結果は、陽性として報告される。<0.1の結果は、陰性として報告される”(Biorad, Bioplex 2200 Ana Screen SIO(k) Summary, FDA 510(k), SIO(k) Number k041658)。

【0019】

マルチプレックスアッセイの第3の型は、非免疫グロブリンバイオマーカー(抗原)、例えば前立腺癌バイオマーカーの分析を含む。これは、伝統的なシンプレックスイムノアッセイが、マルチプレックスフォーマットに転換された例である。これは、幾つかのビーズベースアッセイ、並びに各種の固体アレイを使用する制約された多重化により例示される。全てのこれらのアッセイにおいて、それぞれの個々の試験が別個に較正されることが核心であり、これは、マルチプレックスフォーマットを行う場合、退屈でそして厄介なことになる傾向がある。

【0020】

Beckman Coulterは、そのAccess HybritechフリーPSAアッセイの較正を記載し、これは、5種の異なる基準点及び一つの陰性の試料の組の合計の6種の異なる較正区間としての前立腺癌バイオマーカーPSAの遊離型の分析である。遊離PSA濃度が、アッセイを較正するために使用される基準に依存することも更に明白である(Beckman Coulter, Inc., 2010, A85087C, Access Hybritech free PSA)。

【0021】

現時点において、先に記載したように、異なる型の分子の検出のためのイムノアッセイの較正は、通常、異なる濃度の較正試料、及び異なる較正物質分子を含有する較正試料を含むそれぞれの試験のための幾つかの較正試料を実験することが必要である。従って、このような較正技術は、時間がかかり、そして継時的な系統的アッセイ系の可変性の

10

20

30

40

50

ために不正確になり得る。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0022】

【特許文献1】国際特許出願公開WO2002029415A1。

【非特許文献】

【0023】

【非特許文献1】Forkman J., Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2008, ISSN 1652-6880, ISBN 978-91-86195-13-7;

10

【非特許文献2】Wood R A et al, Ann Allergy Asthma Immunol. 2007, 99:34-41;

【非特許文献3】I/LA20-A2 Analytical performance characteristics and clinical utility of immunological assays for human immunoglobulin E (IgE) antibodies and defined allergen specificities; Approved Guideline, ISBN no. 1-56238-695-6;

【非特許文献4】Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development, Clinical Chemical Laboratory Medicine, Volume 43, Issue 12, Pages 1321-1326;

20

【非特許文献5】Hamilton R G, Assessment of human allergic diseases. In: Clinical Immunology, Principles and Practice, ed. Rich R R, 3rd ed, 2008, p. 1471-84; refer page 1476.

【非特許文献6】Biorad, Bioplex 2200 Ana Screen SIO(k) Summary, FDA 510(k), SIO(k) Number k041658;

30

【非特許文献7】Beckman Coulter, Inc., 2010, A85087C, Access Hybritech free PSA.

【発明の概要】

【0024】

本発明の目的は、現時点で既知の技術に関連する上述の問題を排除する、又は少なくとも軽減する参照標品或いは校正試薬を提供することである。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1A】図1A及びBは、実施例1(以下)による15種の異なったキメラ抗体を含んでなる校正試薬に対するImmunoCAP ISAC(登録商標)sIgEアッセイを行うことによって得られた校正曲線を示す。四つの校正点は、1.0、4.0、15.0及び50ISU-Eに位置する。校正曲線は、観察された蛍光強度(y軸)及び任意の単位の特異的IgE(ISU-E)に対するISAC標準化単位(x軸)間の相関性を与える。図中に示された点(dots)が、校正点である。図1Aにおいて、使用された式は、 $y = x + 6.22$ 、 $R^2 = 1.00$ である。図1Bにおいて、使用された式は、 $\ln(FI) = 5.87 + 1 * \ln(ISU-E)$ 、 $R^2 = 0.99$ である。

40

【図1B】同上。

【図2A】図2A及び2Bは、異なったアレルゲン成分に対する相関性プロットを示し、ここで、実施例1(以下)による校正試薬がISU-E値を計算するために使用されてい

50

る。直線は、対数対対数に転換された適合を象徴する。図中の黒い点は、それぞれ ImmunoCAP ISAC (登録商標) sIgE アッセイで実験された患者の試料中で検出され、そして参照法の ImmunoCAP sIgE アッセイと比較された、Phl p 5 (図2A) 及び Bet v 1 (図2B) に対して特異的な IgE 抗体である。図2Aは、アレルゲン成分 Phl p 5 に対する相関性プロットを示す。kUA/l の Phl p 5 による ISU/カiproットの二変数適合。Log (ISU/カiproット) = 0.1735344 + 0.8732028 * Log (kUA/l)。図2Bは、アレルゲン成分 Bet v 1 に対する相関性プロットを示す。kUA/l の Bet v 1 による ISU/カiproットの二変数適合。Log (ISU/カiproット) = 0.4851362 + 0.8967003 * Log (kUA/l)。

10

【図2B】同上。

【図3】図3は、実施例2(以下)による、リウマチ様関節炎を持つ患者からの五つのプールされたヒトの血清を含んでなる較正試薬に対する ImmunoCAP ISAC (登録商標) sIgG アッセイを5回行うことによって得られた五つの較正曲線を示す。較正曲線は、観察された蛍光強度(y軸)及び特異的 IgG に対する任意の単位の ISAC 標準化単位(x軸)間の対数/対数のプロットの相関性を与える。図中の矢印は、選択された標的較正区間/点(points)である。

【図4】図4は、図3に示した結果に基づき、観察された蛍光強度(y軸)及び特異的 IgG に対する任意の単位の ISAC 標準化単位(x軸)間の自然対数/自然対数のプロット中の中央値を示す。

20

【図5】図5は、実施例3(以下)による前立腺癌に対する五つの異なった抗原性バイオマーカーを含んでなる較正試薬に対する ImmunoCAP ISAC (登録商標) 抗原バイオマーカーアッセイを行うことによって得られた五つの較正曲線を示す。較正曲線は、観察された蛍光強度(y軸)及び抗原性バイオマーカーに対する任意の単位の ISAC 標準化単位(x軸)間の相関性を与える。細い点線で分割された四つの異なった較正区間は、図中に示されている。斜めの太い点線の矢印は、全ての20個の基準点間の相互関係に基づき計算された平均である。較正曲線及び太い点線の矢印間に伸びる細い矢印は、ダイナミックレンジ及び濃度区間に関係なく、それぞれの較正曲線が、この場合、全ての20個の異なった基準点の関数として説明することができることを例示する。

【発明を実施するための形態】

30

【0026】

用語

本出願中で使用される全ての用語は、当技術においてこれらに通常与えられる意味を有することが意図されている。明確化のために、幾つかの用語が更に以下に記載される。

【0027】

“マルチプレックスアッセイ”は、これによって検出される複数の特異性の分析物が検出され、そしてある場合には、単一の試薬の反応混合物を使用して単一の血清検体中において定量化する方法を意味すると解釈される。例えば、マルチプレックスアッセイは、単一の反応工程を使用して複数のアレルゲン特異性に対する IgE 抗体を測定するものであるものである。マルチプレックス IgE アッセイの一つの例示は、個々の精製されたアレルゲン(しばしば実質的に組換え)が、ケイ素マイクロチップ上に三重のスポット上に吸着されたチップベースマイクロアレイ化試験である。少量の血清のマイクロアレイチップとのインキュベーションは、患者の血清を、多くの異なったアレルゲン特異性に一度に暴露する。未結合の血清蛋白質を除去するための緩衝液洗浄後、結合された IgE は、次いで抗ヒト IgE 複合体及びその後の基質の添加により検出される。

40

【0028】

用語“捕獲剤”(capturing agent)は、興味ある分析物を直接又は間接的に結合することが可能な分子と解釈される。捕獲剤は、分析物が IgE 抗体である場合、アレルゲンのような抗原であることができる。

【0029】

50

“検出分子” (detection molecule) は、二つの、即ち 1) 捕獲剤に特異的に結合する能力を有する、及び 2) 共通の検出可能な特徴を有する本質的特徴を伴う構造として定義される。検出分子の例は：可変及び固定領域を持つ抗体、DNA からなるが、しかし規定された結合構造を持つアプタマー、DNA に結合し、そしてそれを含有する表面抗原を持つ細菌であり、これらは、標識し、そして検出することができる。ヒト IgE に対して特異的な抗体は、全及びアレルゲン特異的 IgE 抗体アッセイにおける検出分子として使用されることが知られている。これらの重要な試薬は、アッセイに対して特異性を与え、そして従って、これらは、イプシロン - 重鎖に対する独特の決定因子に対して高度に特異的でなければならない。精製された場合、ポリクローナル又はモノクローナルな抗ヒト IgE 試薬抗体は、溶液相抗体として直接的に使用されるか、或いは放射性標識、酵素標識又は固相基質上の化学的及び物理的固定化の形態中の化学的修飾にかけられるかのいずれかである。

10

【0030】

本発明によれば、“結合分子” (binding molecule) は、二つの本質的な特徴、即ち、1) 捕獲剤に特異的に結合する能力、及び 2) 検出分子に結合する能力を有する分子を意味すると解釈される。免疫グロブリン及びその断片は、このような結合分子の例である。他の例は、細胞受容体、可溶性受容体及びそのリガンド、並びに抗原性バイオマーカーのような更なるペプチドバイオマーカー及びタンパク質バイオマーカーを含む。

【0031】

発明の概要

本発明は、単独の及び / 又は他の結合分子との組合せの中の免疫グロブリンのような結合分子の検出のためのマルチプレックスアッセイの較正に関する上述の問題を解決する。

20

【0032】

本発明はマルチプレックスアッセイを較正するための方法を提供し、該方法は以下の工程：

複数の捕獲剤がその上に固定化された固相に較正試薬を加え、
 所望により非結合の較正試薬を除去するためにこの相を洗浄し、
 較正試薬に結合する能力を有する検出分子を添加し、
 所望により非結合の検出分子を除去するために固相を洗浄し、
 結合した検出分子を検出し、

30

これによって、多くの較正点 / 区間を含んでなる較正曲線を作成すること、
 を含み、較正試薬が少なくとも二つの異なった結合分子を含んでなることを特徴とし、
 ここで、それぞれの結合分子は、固相上に固定化された捕獲剤に特異的に結合する能力及び検出分子に結合する能力を有し、そしてここで、少なくとも二つの結合分子は、較正試薬中に異なった濃度で存在し、これによって、較正曲線の異なった較正点 / 区間を表現する。

【0033】

一つの態様において、捕獲剤は、固相上に多くのスポット中に固定化される。

【0034】

もう一つの態様において、固相は、捕獲剤がその上に固定化されたビーズの形態である。このようなビーズは、液相中に存在することができる。

40

【0035】

この方法の一つの態様において、結合分子は、組換え抗体、自己抗体のような天然の抗体、又は抗原性バイオマーカーのようなペプチド / タンパク質バイオマーカーである。

【0036】

この方法の更に具体的な態様において、結合分子は、アレルゲン特異的モノクローナルマウス IgG の重鎖の可変領域及びヒト IgE 重鎖を含んでなるマウス - ヒトキメラ抗体のようなキメラ抗体である。

【0037】

この方法の一つの態様において、複数の捕獲剤は、少なくとも 10 種、少なくとも 50

50

種、又は少なくとも100種の異なった捕獲剤のように少なくとも5種の異なった捕獲剤である。

【0038】

この方法の一つの態様において、捕獲剤は、天然の若しくは組換えアレルゲン成分のようなアレルゲン成分、又は感染性疾病若しくはリウマチ様関節炎のような自己免疫性疾病に関連する抗原性成分のような疾病関連抗原、或いはペプチド/タンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体である。

【0039】

この方法の一つの態様において、検出分子は、抗ヒトIgE複合体又は抗ヒトIgG複合体のような抗免疫グロブリン複合体であるか、或いはペプチド/タンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体である。

10

【0040】

この方法の一つの態様において、結合分子は、組換え抗体、好ましくはキメラIgE抗体であり、捕獲剤は、天然の又は組換えアレルゲン成分のようなアレルゲン成分であり、そして検出分子は、抗ヒトIgE複合体である。

【0041】

この方法のもう一つの態様において、結合分子は、天然の抗体、好ましくはIgG自己抗体であり、捕獲剤は、感染性又は自己免疫性疾病、好ましくは自己免疫性疾病に関連する抗原性成分のような疾病関連抗原であり、そして検出分子は、抗ヒトIgG複合体である。

20

【0042】

この方法のなおもう一つの態様において、結合分子は、ペプチド/タンパク質バイオマーカー、好ましくは前立腺癌に対するバイオマーカーであり、捕獲剤は、前記ペプチド/タンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体であり、そして検出分子は、前記ペプチド/タンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体である。

【0043】

この方法の一つの態様において、較正試薬は、少なくとも10種のように、少なくとも15種のように、少なくとも5種の、組換え抗体、自己抗体のような天然の抗体、或いはペプチド/タンパク質バイオマーカーのような異なった結合分子を含んでなる。

【0044】

この方法の更なる具体的な態様において、較正試薬は、少なくとも5種の、好ましくは少なくとも10種、更に好ましくは少なくとも15種の異なったキメラIgG抗体を含んでなり、ここにおいて、それぞれのキメラ抗体は、Bet v 1、Der p 2、Ole e 1、Gal d 1、Art v 1、Fel d 1、Phl p 1、Amb a 1、Can f 1、Der p 1、Gal d 2、Can f 2、Can f 5、Phl p 5及びPru p 3からなる群から選択されるアレルゲン成分に特異的に結合する能力を有する。

30

【0045】

この方法の一つの態様において、マルチプレックスアッセイは、マイクロアレイチップ上で行われる。

40

【0046】

本発明の第2の側面によれば、生物学的試料中に存在する(a)免疫グロブリン又は(b)ペプチド/タンパク質バイオマーカーのような興味ある分子の検出のためのマルチプレックスアッセイ系が提供され、該アッセイ系は：

反応容器、

固相上に固定化された複数の捕獲剤、

(a)抗免疫グロブリン検出分子又は(b)ペプチド/タンパク質バイオマーカーに結合する検出分子のような検出分子、

較正試薬、

反応緩衝媒体

50

を含んでなり、校正試薬が、少なくとも二つの異なった結合分子を含んでなることを特徴とし、ここにおいて、それぞれの結合分子は、固相上に固定化された捕獲剤に特異的に結合する能力及び検出分子に結合する能力を有し、そしてここにおいて、少なくとも二つの結合分子は、校正試薬中に異なった濃度で存在する。

【0047】

反応容器は、プラスチック（ポリエチレン）又はガラスの試験管、プラスチックのマイクロタイプレートウェル、プラスチックの棒、内部のスポンジ基質を持つポリエチレンキャップ、及び炭水化物線維で被覆されたシリコンチップの形態であることができる。

【0048】

一つの態様において、捕獲剤は、固相上の多くのスポット中に固定化される。別の方法として、固相は、捕獲剤がその上に固定化されたビーズの形態である。このようなビーズは、液相中に存在することができる。

【0049】

この系の一つの態様において、興味ある分子は、(i) IgE抗体又は(ii) IgG抗体、或いは(iii) 癌のような疾病に対するペプチド/タンパク質バイオマーカーである。

【0050】

この系の一つの態様において、検出分子は、(i) 抗ヒトIgE複合体、(ii) 抗ヒトIgG複合体、又は(iii) ペプチド/タンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体である。

【0051】

この系の一つの態様において、生物学的試料は、ヒト血清又は血漿試料である。

【0052】

この系の一つの態様において、校正試薬は、少なくとも10種のような、少なくとも15種のような、少なくとも5種の異なった結合分子を含んでなる。

【0053】

この系の一つの態様において、結合分子は、キメラ抗体のような組換え抗体、自己抗体のような天然の抗体、又はペプチド/タンパク質バイオマーカーである。

【0054】

この系の一つの態様において、捕獲剤は、天然の若しくは組換えアレルゲン成分、又は感染性疾患に関連する抗原性成分のような疾患関連アレルゲン成分、又は自己免疫性疾患に関連する抗原性成分、或いはペプチド/タンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体である。

【0055】

この系の一つの態様において、結合分子は、組換え抗体、好ましくはキメラIgE抗体であり、捕獲剤は、天然の又は組換えアレルゲン成分のようなアレルゲン成分であり、そして検出分子は、抗ヒトIgE複合体である。

【0056】

この系のもう一つの態様において、結合分子は、天然の抗体、好ましくはIgG自己抗体であり、捕獲剤は、感染性又は自己免疫性疾患、好ましくは自己免疫性疾患に関連する抗原性成分のような疾患に関連する抗原であり、そして検出分子は、抗ヒトIgG複合体である。

【0057】

この系のなもう一つの態様において、結合分子は、ペプチド/タンパク質バイオマーカー、好ましくは前立腺癌に対するバイオマーカーであり、捕獲剤は、前記ペプチド/タンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体であり、そして検出分子は、前記ペプチド/タンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体である。

【0058】

この系の一つの態様において、校正試薬は、15種の異なったマウス-ヒトキメラIg

10

20

30

40

50

E抗体を含んでなり、ここにおいて、それぞれのキメラ抗体は、Bet v 1、Der p 2、Ole e 1、Gal d 1、Art v 1、Fel d 1、Phl p 1、Amb a 1、Can f 1、Der p 1、Gal d 2、Can f 2、Can f 5、Phl p 5及び Pru p 3 からなる群から選択されるアレルゲン成分に特異的に結合する能力を有する。

【0059】

本発明は、更に少なくとも二つの異なったキメラ抗体を含んでなる較正試薬を提供し、ここにおいて、それぞれの結合分子は、付属する表1に記載されたアレルゲン成分の少なくとも一つに特異的に結合する能力を有する。

【0060】

【表 1 - 1】

表 1. マルチプレックスアッセイにおいて使用することができるアレルゲン性成分

原料	成分	組換え(R)/天然(N)	タンパク質ファミリー又は機能
キイウイ	Act d 1	N	システインプロテアーゼ
	Act d 2	N	タウマチン様タンパク質
	Act d 5	N	Kiwellin
	Act d 8	R	PR-10
ハンノキ	Aln g 1	R	PR-10
アルテルナリア	Alt a 1	R	酸性糖タンパク質
	Alt a 6	R	エノラーゼ
ブタクサ	Amb a 1	N	ペクチン酸リアーゼ
カシューナッツ	Ana o 2	R	貯蔵タンパク質, 2S アルブミン
アニサキス	Ani s 1	R	セリンプロテアーゼ阻害剤
	Ani s 3	R	トロポミオシン
セロリ	Api g 1	R	PR-10
ミツバチ	Api m 1	R	ホスホリパーゼ A2
	Api m 4	N	メリチン
ピーナッツ	Ara h 1	R	貯蔵タンパク質, 7S グロブリン
	Ara h 2	R	貯蔵タンパク質, 2S アルブミン
	Ara h 3	R	貯蔵タンパク質, 11S グロブリン
	Ara h 6	N	貯蔵タンパク質, 2S アルブミン
	Ara h 8	R	PR-10
	Ara h 9	R	LTP
オオヨモギ	Art v 1	N	デフェンシン
	Art v 3	N	LTP
アスペルギルス	Asp f 1	R	ミトゲリンファミリーγ
	Asp f 3	R	ペルオキシソーマルタンパク質
	Asp f 6	R	Mn スーパーオキシドディスムターゼ
ブラジルナッツ	Ber e 1	R	貯蔵タンパク質, 2S アルブミン
カバノキ	Bet v 1	N	PR-10
	Bet v 2	R	プロフィリン
	Bet v 4	R	ポリカルシン
ゴキブリ	Bla g 1	R	ゴキブリグループ 1
	Bla g 2	R	アスパラギン酸プロテアーゼ
	Bla g 5	R	グルタチオン S-トランスフェラーゼ
	Bla g 7	N	トロポミオシン

10

20

30

40

【 0 0 6 1 】

【表 1 - 2】

タマニクダニ	Blo t 5	R	
ミルク	Bos d 4	N	アルファ-ラクトアルブミン
	Bos d 5	N	ベータ-ラクトグロブリン
牝ウシ	Bos d 6	N	血清アルブミン
ミルク	Bos d 8	N	カゼイン
	Bos d Lactoferrin	N	トランスフェリン
イヌ	Can f 1	R	リポカリン
	Can f 2	R	リポカリン
	Can f 3	N	血清アルブミン
	Can f 5	R	アルギニンエステラーゼ
アカザ	Che a 1	R	トリプシン阻害剤
クラドスポリウム	Cla h 8	R	マンニトールデヒドロゲナーゼ
ハシバミ	Cor a 1.0101	R	PR-10
ヘーゼルナッツ	Cor a 1.0401	R	PR-10
	Cor a 8	R	LTP
	Cor a 9	N	貯蔵タンパク質, 11S グロブリン
スギ	Cry j 1	N	ペクチン酸リアーゼ
イトスギ	Cup a 1	N	ペクチン酸リアーゼ
ギョウギシバ	Cyn d 1	N	シバグループ 1
	Der f 1	N	システインプロテアーゼ
	Der f 2	R	NPC2 ファミリー
ヒョウヒダニ	Der p 1	N	システインプロテアーゼ
	Der p 2	R	NPC2 ファミリー
	Der p 10	R	トロポミオシン
ウマ	Equ c 1	R	リポカリン
	Equ c 3	N	血清アルブミン
ソバ	Fag e 2	N	貯蔵タンパク質, 2S アルブミン
ネコ	Fel d 1	R	ウテログロビン
	Fel d 2	N	血清アルブミン
	Fel d 4	R	リポカリン
タラ	Gad c 1	R	パルブアルブミン
卵白	Gal d 1	N	オボムコイド
	Gal d 2	N	オボアルブミン
	Gal d 3	N	コンアルブミン

10

20

30

40

【 0 0 6 2 】

【表 1 - 3】

卵黄/ニワトリ	Gal d 5	N	リベチン (血清アルブミンしかし種特異的)	
	Gly m 4	R	PR-10	
	Gly m 5	N	貯蔵タンパク質, ベーター-コングリシニン	
	Gly m 6	N	貯蔵タンパク質, グリシン	
ラテックス	Hev b 1	R	ゴム伸長因子	
	Hev b 3	R	小さいゴム粒子タンパク質	
	Hev b 5	R	酸性タンパク質	
	Hev b 6.01	R	ヘベイン	10
	Hev b 8	R	プロフィリン	
クルミ	Jug r 1	N	貯蔵タンパク質, 2S アルブミン	
	Jug r 2	N	ビシリン種子貯蔵タンパク質	
	Jug r 3	N	LTP	
サヤアシニクダニ	Lep d 2	R	NPC2ファミリー	
リンゴ	Mal d 1	R	PR-10	
水銀	Mer a 1	R	プロフィリン	
マウス	Mus m 1	N	リボカイン	
	MUXF3	N	CCD	20
オリーブ	Ole e 1	N	トリプシン阻害剤	
	Ole e 7	N	LTP	
	Ole e 9	R	グルカナナーゼ	
カベイラクサ	Par j 2	R	LTP	
エビ	Pen m 1	N	トロボミオシン	
	Pen m 2	N	アルギニンキナーゼ	
	Pen m 4	N	筋形質 Ca 結合タンパク質	
チモシー	Phl p 1	R	グラスグループ 1	
	Phl p 2	R	グラスグループ 2	30
	Phl p 4	N	ベルベリン架橋酵素	
	Phl p 5b	R	グラスグループ 5	
	Phl p 6	R	グラスグループ 6	
	Phl p 7	R	ボルカルシン	
	Phl p 11	R	トリプシン阻害剤	
	Phl p 12	R	プロフィリン	
プラタナス	Pla a 1	R	インバルターゼ阻害剤	
	Pla a 2	N	ポリガラクトツロナーゼ	40

【 0 0 6 3 】

【表 1 - 4】

	Pla a 3	R	LTP
オオバコ	Pla l 1	R	ペクチン酸リアーゼ
アシナガバチ	Pol d 5	R	Ag 5
モモ	Pru p 1	R	PR-10
	Pru p 3	R	LTP
オカヒジキ	Sal k 1	N	ペクチンメチルエステラーゼ
ゴマ	Ses i 1	N	貯蔵タンパク質, 2S アルブミン
コムギ	Tri a 14	R	LTP
	Tri a 19.0101	N	オメガ 5 グリアジン
	Tri a aA_TI	N	アルファアミラーゼ / トリプシン阻害剤
スズメバチ	Ves v 5	R	Ag 5

10

【 0 0 6 4 】

一つの態様において、校正試薬は、少なくとも 10 種のように、少なくとも 15 種のように、少なくとも 5 種の異なったマウス - ヒトキメラ I g E 抗体を含んでなる。

【 0 0 6 5 】

もう一つの態様において、校正試薬のそれぞれのマウス - ヒトキメラ I g E 抗体は、B e t v 1、D e r p 2、O l e e 1、G a l d 1、A r t v 1、F e l d 1、P h l p 1、A m b a 1、C a n f 1、D e r p 1、G a l d 2、C a n f 2、C a n f 5、P h l p 5 及び P r u p 3 からなる群から選択されるアレルゲン成分に特異的に結合する能力を有する。

20

【 0 0 6 6 】

一つの態様において、校正試薬は、15 種の異なったマウス - ヒトキメラ I g E 抗体溶液からなり、ここにおいて、それぞれのキメラ抗体は、B e t v 1、D e r p 2、O l e e 1、G a l d 1、A r t v 1、F e l d 1、P h l p 1、A m b a 1、C a n f 1、D e r p 1、G a l d 2、C a n f 2、C a n f 5、P h l p 5 及び P r u p 3 からなる群から選択されるアレルゲン成分に特異的に結合する能力を有する。

30

【 0 0 6 7 】

本発明による校正試薬は、所望により K a t h o n C G 又はアジ化ナトリウムのような保存剤、又は当業者にとって既知の他の保存剤を含んでなることができる。

【 0 0 6 8 】

本発明は、更に先に記載したような校正試薬を含んでなるキットを提供し、これは、先に記載したような校正法に使用するために適合される。

【 0 0 6 9 】

更に、本発明はマルチプレックスアッセイに対する校正試薬を産生するための方法を提供し、該方法は：

40

- それぞれの結合分子が、アッセイの固相上に固定化された捕獲剤に特異的に結合する能力及び検出分子に結合する能力を有する少なくとも二つの結合分子を用意し、
- 前記結合分子の濃度をアッセイの関連する測定範囲に調節し、
- 前記結合分子の混合物を調製し、

これによって、校正試薬を得ることを含んでなる。

【 0 0 7 0 】

発明の詳細な説明

本発明は、時間効率の良い、そして正確な校正法及びマルチプレックス設定における多数の抗原及び / 又はバイオマーカー結合部位を含む校正分子の混合物を含んでなる校正試薬を提供する。本発明によれば、全ての校正分子は、一つの単一の校正試薬に混合され、そ

50

して異なった濃度並びに異なった特異性の結合分子を含む同一溶液中に存在する幾つかの結合分子を使用することができることを示している。

【0071】

現時点で、それぞれが5種の較正濃度を要する6種の異なったイムノアッセイ(標的較正分子)を伴う普通の状況において、これは、実験されるべき $6 \times 5 = 30$ 種の異なったアッセイの分析を必要とする。本発明の使用によって、これは、最低まで減少される。加えて、異なった濃度で存在する組合された較正分子の一組の分析は、異なった結合分子間の相対的相互関係を、分析される必要がある30種の異なった個々のアッセイの結果であることができる潜在的な系統的アッセイ系の可変性を伴わずに確立する可能性を可能にする。本発明は、これによって較正の要求を満たすために必要な濃度区間の数、及び必要な量を、伝統的なシンプレックスアッセイと比較して減少することができる。

10

【0072】

本発明は、ここに、本発明の三つの具体的な態様を参照することによって更に詳細に記載されるものである：

1) 較正試薬が、少なくとも二つの異なったキメラIgE抗体を含んでなり、これらのそれぞれが、較正されるマイクロアレイチップ上に固定化されたアレルゲン性成分に特異的に結合する能力を有する、特異的IgE抗体の分析。

【0073】

2) 較正試薬が、少なくとも二つの異なったIgG抗体を含んでなり、これらのそれぞれが、較正されるマイクロアレイチップ上に固定化された抗原性成分(ペプチド又はタンパク質のような)に特異的に結合する能力を有する、特異的IgG自己抗体の検出。

20

【0074】

3) 較正試薬が、少なくとも二つの異なったペプチド/タンパク質バイオマーカーを含んでなる、ペプチド/タンパク質バイオマーカーの検出。較正されるマイクロアレイチップ上に、抗体が固定化される。前記抗体のそれぞれは、ペプチド/タンパク質バイオマーカーの一つの型に特異的に結合することが可能である。

【0075】

実施例 1

この方法は、アレルギー性の個体中に存在する特異的IgE抗体の定量化のための較正曲線を作成するために使用される。較正物質は、結合分子を、緩衝液中のキメラIgE抗体の形態で含有する試料からなる。キメラIgE抗体のそれぞれは、異なった特異性を有し、そしてキメラIgE抗体は、試料中に異なった濃度で存在する。

30

【0076】

キメラ抗体の調製のために、マウス細胞株を、モノクローナルなIgG抗体を産生するために使用する。アレルゲン特異的モノクローナルIgG抗体の重鎖の可変領域のためのエクソン及びイントロンを、クローン化し、そして発現ベクター中にシグナル配列及びヒトIgE重鎖のためのコード配列と一緒に挿入する。発現ベクターを、Sp2/0骨髓腫細胞株に形質転換し、アレルゲン特異的ヒトIgE重鎖の発現をもたらす。IgE重鎖を産生するSp2/0細胞を、IgG重鎖及び軽鎖を発現するハイブリドーマ細胞株と融合し、そしてこれから可変領域を最初にクローン化した。ヒトIgE重鎖及びマウスIgG軽鎖を含んでなるキメラIgE抗体を正しく発現する融合細胞は、関連するアレルゲン及び抗IgE複合体を含んでなるELISAの使用によって確認される。好ましくは、IgE抗体を排他的に産生し、そしてIgG重鎖を産生する能力を喪失した細胞のクローンのみが、キメラ抗体の産生のために選択される。

40

【0077】

キメラ抗体を調製するための別の方法は、発現ベクターを、上記の記載によって、可変領域がそれから最初にクローン化されるハイブリドーマ細胞株に直接形質転換することを含んでなる。このように作成されたIgE陽性のハイブリドーマクローンは、IgEに加えてIgG抗体を産生するものである。IgE抗体は、抗IgEカラムのアフィニティークロマトグラフィーによって精製することができる(Bohman et al 200

50

7, Allergy, Vol 62, supplement 83, p. 49)。

【0078】

このように産生され、そして精製されたキメラ抗体の溶液の濃度は、先に記述したように、IgEのためのWHO参照標品75/502に対して標準化されたImmunoCAP sIgEアッセイの使用によって決定することができる(Hamilton RG、上記を参照されたい)。

【0079】

定量的ImmunoCAP sIgEアッセイの使用によって、 kU_A/l として表示される濃度が決定された場合、このようなキメラ抗体の溶液は、次いで前記アッセイ中のキメラ抗体の任意の単位ISU-Eとして表示される濃度を決定するために、半定量的ImmunoISAC(登録商標)sIgEアッセイで実験される。

10

【0080】

本発明によれば、ImmunoCAP ISAC(登録商標)sIgEアッセイは、その規定された濃度が、ImmunoCAP系で決定される幾つかのキメラ抗体の溶液を含んでなる校正試薬の使用によって校正される。

【0081】

校正試薬中で使用されるそれぞれのキメラ抗体は、特異的IgE抗体が枯渇した血清(いわゆる陰性血清)中に、 $0.3 - 100 ISU-E$ の臨床的に関連する測定範囲に個々に希釈される。 $1 kU_A/l$ は、 $2.42 ng$ のsIgE/mlに対応し、これは、それぞれのキメラ抗体に対する希釈係数を計算するために使用される。

20

【0082】

陰性の血清に対する別の方法として、キメラ抗体の希釈のために緩衝液を使用することができる。例えば、ImmunoCAPアッセイ中で使用される緩衝液を希釈のために使用することができ、そして従って、本発明による校正試薬の一部であることができる。

【0083】

患者の試料から検出されるような特異的IgE抗体に対するImmunoCAP値(kU_A/l)及びImmunoCAP ISAC(登録商標)値(ISU-E)を、グラフ上中に互いに対してプロットすることができ、本発明によるキメラ校正の概念が妥当である証拠を与える。このような相関性プロットは、それぞれ図2A及び図2B中の直線によって例示される(x軸上の kU_A/l 及びy軸上のISU-E)。

30

【0084】

本発明による校正試薬は：

- 臨床的に関連する測定範囲内に少なくとも二つの校正点、好ましくは少なくとも三つ、更に好ましくは少なくとも四つの校正点を決定し；
 - 校正点当たり少なくとも一つのキメラ抗体、好ましくは少なくとも二つ、更に好ましくは少なくとも三つ又は四つのキメラ抗体を使用し；
 - 全ての校正点が、ImmunoCAP ISAC(登録商標)アッセイの蛍光強度(FI)として測定されるおおよそ同じ反応を与えるように、即ち、使用されるキメラ抗体の全ての溶液が、殆ど等しい濃度を有するように校正点を選択すること；
- によって得られる。

40

【0085】

先に記述したように、ImmunoCAP ISAC(登録商標)アッセイは、半定量的であり、四つのクラスの結果(0 = 検出不能又は非常に低い、1 = 低い、2 = 中から高、3 = 非常に高い)を与える。

【0086】

それぞれの校正点は、原則として測定範囲のどこかに位置することができる。然しながら、試験が半定量的であるために、校正点を、少なくとも幾つかのクラスの終点に選択することが好都合である。0.3より小さいISU-E値はクラス0に；0.3から1.0までのISU-E値はクラス1に属し；クラス2は1.0から15.0までのISU-E値を示し；そして15より上のISU-E値はクラス3に属する。好ましくは、一つの較

50

正点は 1 I S U - E に位置し、そしてもう一つの較正点は 1 5 I S U - E に位置する。

【 0 0 8 7 】

更に、較正点は、好ましくは全測定範囲にわたってかなり均等に広がる。従って、更に二つの較正点が、測定範囲の残りの部分を包含するように選択される。最も好ましくは、前記の更なる二つの較正点は、それぞれ、4 I S U - E 及び 5 0 I S U - E に位置する。

【 0 0 8 8 】

本発明による較正試薬は、次のように調製された。それぞれが、以下のアレルゲンの一つに対して特異的な 1 5 種の異なったキメラ抗体溶液が使用された：

【 0 0 8 9 】

【表 2】

10

表 2. アレルゲン特異的キメラIgE抗体

抗 Gal d 1 オボムコイド
抗 Gal d 2 オボアルブミン
抗 Phl p 1
抗 Phl p 5
抗 Bet v 1
抗 Fel d 1
抗 Der p 1
抗 Der p 2
抗 Amb a 1
抗 Ole e 1
抗 Art v 1
抗 Can F1
抗 Can F2
抗 Can F5
抗 Pru p 3

20

30

【 0 0 9 0 】

表 2 のアレルゲン特異的キメラ抗体は、マウス - ヒトキメラ抗体であり、それぞれは、アレルゲン特異的モノクローナルマウス I g G の重鎖の可変領域及びヒト I g E 重鎖から構成されていた。

【 0 0 9 1 】

前記抗体溶液の濃度は、最初、ImmunoCAP アッセイ (k U _A / l の値を与える) の使用によって決定され、そして対応する I S U - E 値は、溶液を ImmunoCAP I S A C (登録商標) アッセイで実験することによって確立された。

40

【 0 0 9 2 】

それぞれの較正点 (calibration point) に対して、以下のように三つ又は四つのキメラ抗体を使用して、四つの較正点が決定された：

ポイント a、1 . 0 I S U - E : B e t v 1、D e r p 2、O l e e 1、G a l d 1。

ポイント b、4 . 0 I S U - E : A r t v 1、F e l d 1、P h l p 1。

ポイント c、1 5 . 0 I S U - E : A m b a 1、C a n f 1、D e r p 1、G a l d 2。

ポイント d、5 0 I S U - E : C a n f 2、C a n f 5、P h l p 5、P r u p 3

50

u p 3。

【0093】

それぞれのキメラ抗体の溶液を、これが上述の所望のISU-E値(表3)を与えるものであるように希釈した。使用された希釈媒体は、特異的IgEが枯渇したヒト血清であった。

【0094】

【表3】

表 3. 較正試薬のキメラIgE抗体に対する希釈プロトコル

ISU キメラロット	希釈係数 1/X
1_Bet v 1_009125	10114
1_Der p 2_011571	5088
1_Gal d 1_011534	2968
1_Ole e 1_006381	6033
4_Art v 1_009834	1822
4_Fel d 1_07128	10602
4_Phl p 1_007121	1855
15_Amb a 1_06310	1865
15_Can f 1_009119	1004
15_Der p 1_007121	948
15_Gal d 2_011583	58
50_Can f 2_009844	344
50_Can f 5_009853	2513
50_Phl p 5_007132	825
50_Pru p 3_012813	953

10

20

30

40

【0095】

それぞれのキメラ抗体の個々の希釈後、全ての15種のキメラ抗体溶液を一緒に混合し、このようにして本発明による較正試薬を得た。

【0096】

較正試薬を、それぞれ観察された蛍光強度(y軸)及び特異的IgEに対する任意の単位のISAC標準化単位(ISU-E)(x軸)間の相関性を示す図1A及び図1Bによる較正曲線を作成するために使用した。

【0097】

較正試薬がImmunoCAP ISAC(登録商標)sIgEマイクロアレイチップに加えられた場合、先に記載した15種のキメラ抗体は、前記キメラ抗体がそれに対して

50

特異性を有する 15 種のアレルゲン成分に結合するものである。然しながら、加えて、キメラ抗体は、15 種のアレルゲン成分のいずれか一つと類似の構造を有するマイクロチップ上に固定化された更なるアレルゲン成分とも更に交差反応する。

【0098】

従って、所望により、このような更なるアレルゲン成分は、較正試薬のための対照として使用することができ、そして別個の対照試料に対する必要性は存在しないものである。

この実施例において、三つの更なるアレルゲン：

低レベルの蛍光強度 (1.0 より下の ISU - E 値) において：M a l d 1 又は A c d 8、

中レベル (1 - 15 ISU - E)：D e r f 1、P l a a 2 又は P l a a 3、

高レベル (> 15 ISU - E)：A r t v 3

が対照として使用された。

【0099】

アッセイ中で使用された検出分子は、抗ヒト Ig E 複合体であった。

【0100】

実施例 2

この方法は、リウマチ様関節炎 (RA) を有する患者中に存在する特異的 Ig G 抗体の定量化のための較正曲線を作成するために使用された。較正物質は、異なった特異性及び異なった濃度の Ig G 自己抗体の形態の結合分子を含有する試料から構成された。これは、試料が、RA 患者からの異なったヒト血清のプールから構成されたことを除き、上記実施例 1 に記載された Ig E 較正物質と類似である。ここで、5 人の異なった患者からの血清がプールされた。然しながら、得られる試料が、要求される数の較正点 / 区間を包含する各種の濃度である Ig G 抗体の各種の異なった特異性を含有する限りは、より少ない又はより多い数の血清をプールすることができる。

【0101】

RA 較正物質は、以下の体積の五つの異なった血清から構成された：

血清 1 = 5 μ L

血清 2 = 5 μ L

血清 3 = 5 μ L

血清 4 = 10 μ L

血清 5 = 5 μ L

合計体積 = 30 μ L。

【0102】

血清のプールは、ISAC アッセイのために希釈剤中で 1 : 50 に希釈された。

【0103】

RA に関連する抗原性成分の形態 (ペプチド又はタンパク質のような) の捕獲剤は、マイクロアレイチップ上に固定化される。ここで、32 種の異なった抗原が固定化された (表 4 の抗原番号 1 - 32)。

【0104】

アッセイで使用された検出分子は、抗ヒト Ig G 複合体であった。

【0105】

10

20

30

40

【表 4】

表 4 4. マイクロアレイチップ上に固定化された抗原

抗原番号	任意の単位
1	38
2	41
3	43
4	47
5	88
6	93
7	97
8	98
9	101
10	103
11	142
12	174
13	336
14	446
15	487
16	564
17	595
18	652
19	691
20	1259
21	1325
22	1389
23	2293
24	2692
25	2706
26	2918
27	3226
28	3344
29	4008
30	4394
31	4597
32	4722

10

20

30

40

【0106】

較正試薬は、観察された蛍光強度（y 軸）及び任意の単位の特異的 I g G に対する I S A C 標準化単位（x 軸）間の相関性を示す対数 / 対数プロットの図 3 による較正曲線を作成するために使用された。この実施例において、本出願人等は、較正試料を 5 回分析し、

50

そして図3は、試料が分析された異なった5回の間の緊密な相関性を示す。完全な曲線の範囲が包含されるような方法で選択され、そして希釈された32種の異なった抗体を、患者の血清免疫グロブリンと結合させた。図中の矢印は、選択された標的較正区間/点である。図4は、図3に示した結果に基づき、そしてアレイ中のそれぞれの変数の整合性がインタクトであることを確実にする全ての32個の値を使用した非常に安定した較正曲線を発生する、観察された蛍光強度(y軸)及び任意の単位の特異的IgGに対するISAC標準化単位の中央値の自然対数/自然対数プロットを示す。

【0107】

実施例3

この方法は、男性の前立腺癌の診断のためのバイオマーカーとして使用されるペプチド/タンパク質の定量化のための較正曲線を作成するために使用された。較正物質は、異なった濃度の異なったペプチド/タンパク質バイオマーカーの形態の結合分子を含有する試料から構成された。

【0108】

前立腺癌に関連する異なったペプチド/タンパク質成分に対して特異的な抗体の形態の捕獲剤は、マイクロアレイチップ上に固定化された。

【0109】

アッセイで使用された検出分子は、固定化された抗体(即ち、捕獲剤)が、それに対して特異的であるエピトープより、抗原性成分(即ち、結合分子)上の異なったエピトープに対して特異的な二次抗体であった。

【0110】

較正試薬は、観察された蛍光強度(y軸)及び任意の単位の抗原性バイオマーカーに対するISAC標準化単位(x軸)間の相関性を示す図5による較正曲線を作成するために使用された。

【0111】

図5は、如何に異なった濃度範囲を持つバイオマーカー間の相互関係を、バイオマーカーとして連結することができるかを、単一のアレイで分析し、そしてこれによって多数の異なった濃度の使用を最小化するかを説明する例である。全ての検出された濃度は、共通の平均を形成し、これは、実際の濃度を再計算するために使用される。これらの計算は、単一アレイにおいて同時に分析されたバイオマーカーの独特のグループのそれぞれの組に対して最適化されなければならない。ここで、五つの異なったペプチド/タンパク質成分が使用され、そして通常六つの異なった基準点を要するシングルプレックスPSAアッセイのための現時点の方法と比較して、四つの異なった濃度で分析された。実際に、本出願人等は、これによって、単一の分析の数を有意に減少し、そして五つの異なったアッセイに対する較正曲線を定義するために、全ての20個の基準点を使用することによって精度を増加している。細い点線で分割された四つの異なった較正区間が図に示されている。斜めの太い点線の矢印は、全ての20個の基準点間の相互関係に基づき計算された平均である。較正曲線及び太い点線の矢印間に伸びる細い矢印は、ダイナミックレンジ及び濃度区間に関係なく、それぞれの較正曲線が、この場合、全ての20個の異なった基準点の関数として記載することができることを例示する。これは、単一アッセイのために通常存在する6個の個々の較正点と比較して、改良された精度を、より少ない較正試料濃度を使用して可能にする。

【0112】

それぞれの較正点のために、幾つかの結合分子(例えば、キメラ抗体のような組換え抗体(実施例1)、ヒトIgG自己抗体(実施例2)、又はペプチド/タンパク質バイオマーカー(実施例3))を使用するための理由は、マイクロアレイチップの製造中に起こることができる捕獲剤(例えば、アレルゲン成分(実施例1)、ヒトIgG自己抗体がそれに結合する抗原(実施例2)、又は興味あるペプチド/タンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体(実施例3)の固定化の変動による較正における可能な変動を減少するためである。従って、一つ又は二つの成分が予期された値から逸脱するものであっても、こ

10

20

30

40

50

れは、校正曲線に顕著に影響しないものである。

【0113】

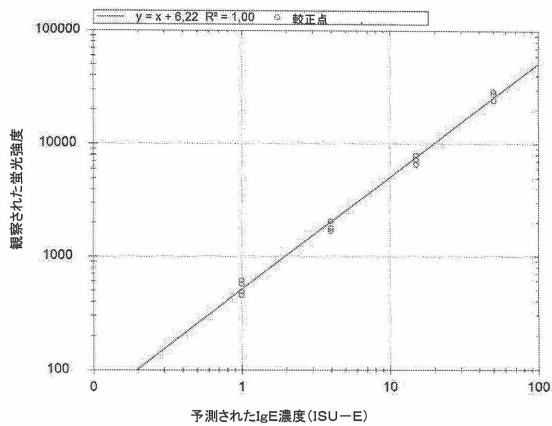
校正曲線は、直線近似（実施例に対して図1に示すように）又はS字型曲線の形態であることができる。より大きい数の結合分子（例えば、キメラ抗体のような組換え抗体（実施例1）、ヒトIgG自己抗体（実施例2）、又はペプチド/タンパク質バイオマーカー（実施例3））を使用し、そして幾つかの異なった校正曲線を決定し、これによって、更に捕獲剤（例えば、アレルギー成分（実施例1）、ヒトIgG自己抗体がそれに結合する抗原（実施例2）、又は興味あるペプチド/タンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体（実施例3））の変化する特性による曲線型の差を補償することも、更に本発明の範囲内である。

10

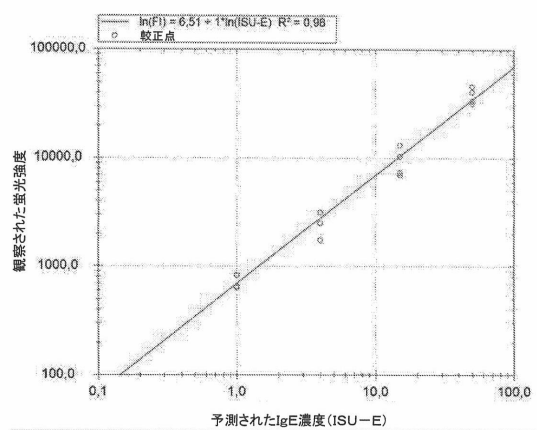
【0114】

上記の実施例は、校正試薬、その製造の方法及びその使用に関する本発明を例示する。実施例は、例示であり、そして付随する特許請求の範囲によって定義される本発明を制約すると考えられるべきではない。

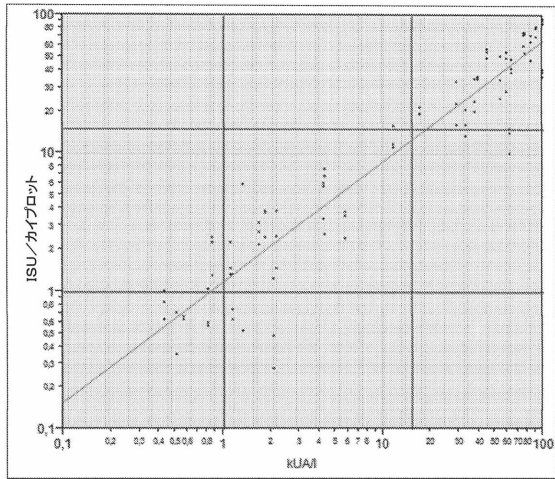
【図1A】



【図1B】

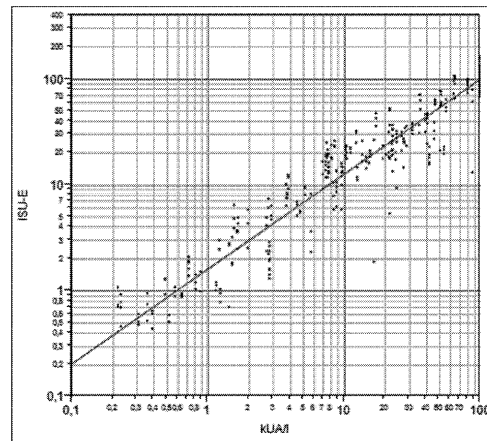


【図 2 A】



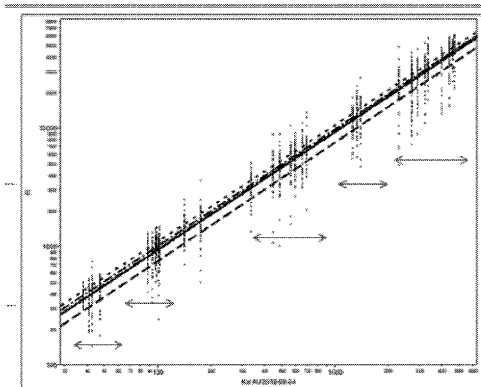
【図 2 B】

Fig. 2B

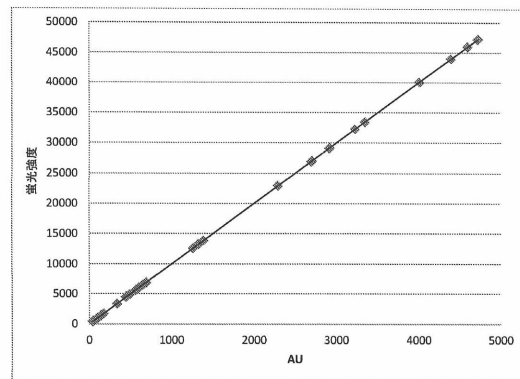


【図 3】

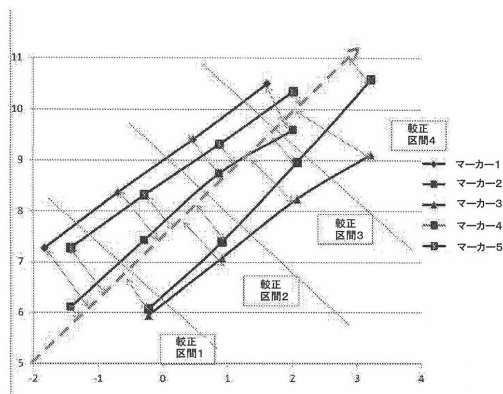
Fig. 3



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

- (72)発明者 エルフバーソン, ヨーラン
スウェーデン国 743 86 ベーリング, イスグレナ 47
- (72)発明者 マットソン, ペル
スウェーデン国 741 43 クニヴスタ, タルコツヴェーイェン 4デー
- (72)発明者 ニストランド, マツ
スウェーデン国 756 53 ウプサラ, エクヴェーイェン 3

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 特表2000-505543(JP, A)
国際公開第2011/050463(WO, A1)
BOHMAN S, ORAL ABSTRACT SESSION 21 THE BASIS OF ALLERGY DIAGNOSTICS: ENHANCING THE TOOLS, ALLERGY, 2007年 1月 1日, V62 N83, P49

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98
G01N 37/00

专利名称(译)	校准试剂和方法		
公开(公告)号	JP6114750B2	公开(公告)日	2017-04-12
申请号	JP2014530631	申请日	2012-09-14
申请(专利权)人(译)	Phadia - Akuchiboragu		
当前申请(专利权)人(译)	Phadia - Akuchiboragu		
[标]发明人	エルフバーソンヨーラン マツソンベル ニストランドマツ		
发明人	エルフバーソン,ヨーラン マツソン,ベル ニストランド,マツ		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N37/00		
FI分类号	G01N33/543.501.L G01N33/53.D G01N33/53.Q G01N37/00.102		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修 中濱 明子		
优先权	1150834 2011-09-14 SE 61/534578 2011-09-14 US		
其他公开文献	JP2014527181A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测校准曲线的方法，包括以下步骤：将校准试剂添加到其上固定有多种捕获剂的固相，添加能够结合校准试剂的检测分子，以及检测结合的检测分子，其中校准试剂包含至少两种不同的结合分子，其中每种结合分子在固相上与固相结合具有与固定化捕获剂特异性结合并与检测分子结合的能力。还提供了包含这种校准试剂的多重测定系统。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6114750号 (P6114750)
(45) 発行日 平成29年4月12日(2017.4.12)	(24) 登録日 平成29年3月24日(2017.3.24)	
(51) Int. Cl.	F I	
G01N 33/543 (2006.01)	G01N 33/543	501L
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	D
G01N 37/00 (2006.01)	G01N 33/53	Q
	G01N 37/00	102
請求項の数 20 (全 27 頁)		
(21) 出願番号 特願2014-530631 (P2014-530631)	(73) 特許権者 506329801 ファディア・アクチボラグ スウェーデン 751 37 ウプサラ 、ボックス 6460	
(86) (22) 出願日 平成24年9月14日(2012.9.14)	(74) 代理人 弁理士 小野 新次郎	
(65) 公表番号 特表2014-527181 (P2014-527181A)	(74) 代理人 100075270 弁理士 小林 泰	
(43) 公表日 平成26年10月9日(2014.10.9)	(74) 代理人 100101373 弁理士 竹内 茂雄	
(86) 国際出願番号 PCT/SE2012/050977	(74) 代理人 100118902 弁理士 山本 修	
(87) 国際公開番号 W02013/039450	(74) 代理人 100135415 弁理士 中濱 明子	
(87) 国際公開日 平成25年3月21日(2013.3.21)		
審査請求日 平成27年9月10日(2015.9.10)		
(31) 優先権主張番号 1150834-8		
(32) 優先日 平成23年9月14日(2011.9.14)		
(33) 優先権主張国 スウェーデン(SE)		
(31) 優先権主張番号 61/534,578		
(32) 優先日 平成23年9月14日(2011.9.14)		
(33) 優先権主張国 米国(US)		
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 校正試薬及び方法		