

(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2005-524087  
(P2005-524087A)

(43) 公表日 平成17年8月11日(2005.8.11)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/566	
GO 1 N 33/531	GO 1 N 33/531	Z
// GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

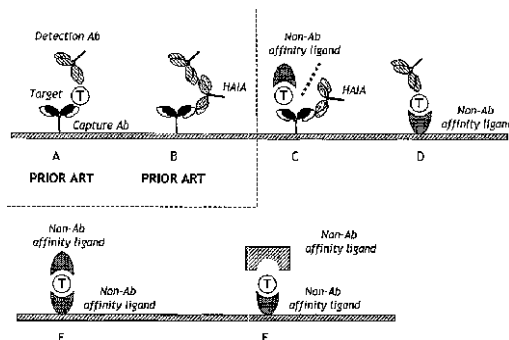
(21) 出願番号	特願2004-501937 (P2004-501937)	(71) 出願人	503250609 アフィボディ・アーバー スウェーデン国16102ブロンマ. ボックス20137
(86) (22) 出願日	平成15年4月29日 (2003. 4. 29)	(74) 代理人	100091731 弁理士 高木 千嘉
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月6日 (2004. 12. 6)	(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(86) 国際出願番号	PCT/SE2003/000703	(74) 代理人	100105290 弁理士 三輪 昭次
(87) 国際公開番号	W02003/093821	(72) 発明者	ニクラス・アールボルイ スウェーデン国S-116 61ストックホルム. リングヴェーゲン131
(87) 国際公開日	平成15年11月13日 (2003. 11. 13)		
(31) 優先権主張番号	0201306-8		
(32) 優先日	平成14年4月29日 (2002. 4. 29)		
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		
(31) 優先権主張番号	60/375, 823		
(32) 優先日	平成14年4月29日 (2002. 4. 29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サンドイッチアッセイおよびキット

(57) 【要約】

複雑な生物学的溶液を含むサンプル中の標的分子の存在を検出するためのサンドイッチアッセイ法が提供される。このアッセイは、標的分子への親和性を有し、固体支持体に結合できる第一アフィニティリガンドを提供すること；そのサンプル中に標的分子が存在する場合に、第一アフィニティリガンドへの結合を可能にするように、サンプルを加えること；標的分子への親和性を有し、その第二アフィニティリガンドの標的分子への結合を可能にするように、第二アフィニティリガンドを加えること；標的分子に未結合の第二アフィニティリガンドを除くこと；そして、その存在がサンプル中の標的分子の存在の指標であるような、第二アフィニティリガンドの存在を検出すること；を含んでいる。第一アフィニティリガンドは、該検出前のどの段階でも固体支持体に固定化され、そして、第一及び第二アフィニティリガンドの少なくとも1つは、抗体以外のアフィニティリガンドである。本発明は、また、本方法で用いられるキットも提供する。このキットは；標的分子への親和性を有し、固体支持体に結合できる第一アフィニティリガンド；標的分子



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

複雑な生物学的溶液を含むサンプル中の標的分子の存在を検出するためのサンドイッチアッセイ法であって、

- 標的分子への親和性を有し、固体支持体に固定化できる第一アフィニティリガンドを用意すること；

- そのサンプル中に標的分子が存在する場合に、第一アフィニティリガンドへの結合を可能にするように、サンプルを加えること；

- 標的分子への親和性を有し、その第二アフィニティリガンドの標的分子への結合を可能にするように、第二アフィニティリガンドを加えること；

- 標的分子に未結合の第二アフィニティリガンドを除くこと；および、

- その存在がサンプル中の標的分子の存在の指標であるような、第二アフィニティリガンドの存在を検出すること；

を含み、

第一アフィニティリガンドは、該検出前のどの段階でも固体支持体に固定化され、

第一および第二アフィニティリガンドの少なくとも1つは、抗体以外のアフィニティリガンドである、

上記のサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 2】

第一アフィニティリガンドが固体支持体に固定化されて用意される、請求項 1 のサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 3】

第一アフィニティリガンドが、サンドイッチアッセイ法の実施の間、固体支持体に固定化されている、請求項 1 のサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 4】

固体支持体が、マイクロタイタープレート；マイクロ流体チャネルを含むコンパクトディスク；タンパク質アレイチップ；膜；マイクロパーティクル；ピン構造体；スティック構造体；センサー表面；および、細胞表面から選ばれる、請求項 2 または 3 のサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 5】

固体支持体がマイクロタイタープレートである、請求項 4 のサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 6】

さらに第一アフィニティリガンドに結合していない標的分子を除くことを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 7】

第二アフィニティリガンドが抗体以外のアフィニティリガンドである、請求項 1 ~ 6 のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 8】

第一アフィニティリガンドが抗体以外のアフィニティリガンドである、請求項 1 ~ 7 のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 9】

第一および第二のいずれのアフィニティリガンドも、抗体以外のアフィニティリガンドである、請求項 1 ~ 8 のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 10】

第一および第二のアフィニティリガンドの少なくとも1つが、天然に存在するタンパク質またはそのドメインである、請求項 1 ~ 9 のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 11】

第一および第二のアフィニティリガンドの少なくとも1つが、天然に存在する細菌性レセプチンまたはそのドメインである、請求項 10 のサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 12】

10

20

30

40

50

天然に存在する細菌性レセプチンまたはそのドメインが、ブドウ球菌のプロテイン A、連鎖球菌のプロテイン G およびペプトストレプトコッカス・マグヌスのプロテイン L、並びにそれらのドメインから選ばれる、請求項 11 のサンドイッチアッセイ法。

【請求項 13】

第一および第二のアフィニティリガンドの少なくとも 1 つが、コンビナトリアル蛋白質工学により構築されたタンパク質ライブラリーから選ばれたタンパク質である、請求項 1 ~ 12 のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

【請求項 14】

第一および第二のアフィニティリガンドの少なくとも 1 つが、細菌性レセプチン；フィブロネクチン；プロテアーゼ・インヒビター；レチノール結合タンパク質；ビリリン結合タンパク質；アミラーゼ・インヒビター；CTL A - 4；チトクローム；および、セルロース結合タンパク質のドメインから選ばれたタンパク質ドメインを足場として用いて構築された、設計されたタンパク質である、請求項 1 ~ 13 のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

10

【請求項 15】

足場が、細菌性レセプチンドメインから選ばれる、請求項 14 のサンドイッチアッセイ法。

【請求項 16】

足場が、ブドウ球菌プロテイン A の免疫グロブリン結合ドメインから選ばれる、請求項 15 のサンドイッチアッセイ法。

20

【請求項 17】

足場が、ブドウ球菌プロテイン A の B ドメインである、請求項 16 のサンドイッチアッセイ法。

【請求項 18】

足場が、ブドウ球菌プロテイン A の B ドメインに由来する Z ドメインである、請求項 16 のサンドイッチアッセイ法。

【請求項 19】

足場が、ペプトストレプトコッカス・マグヌスのプロテイン L の免疫グロブリン結合ドメインから選ばれる、請求項 14 のサンドイッチアッセイ法。

【請求項 20】

足場が、連鎖球菌のプロテイン G の免疫グロブリン結合ドメインから選ばれる、請求項 14 のサンドイッチアッセイ法。

30

【請求項 21】

足場が、連鎖球菌のプロテイン G のアルブミン結合ドメインから選ばれる、請求項 14 のサンドイッチアッセイ法。

【請求項 22】

アフィニティリガンドとして使用される設計されたタンパク質が、用いた足場の変異体ライブラリーから選ばれる、請求項 14 ~ 21 のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

【請求項 23】

ライブラリーが、コンビナトリアル・ライブラリーである、請求項 22 のサンドイッチアッセイ法。

40

【請求項 24】

ライブラリーがファージ・ディスプレイ技術により構築された、請求項 22 ~ 23 のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

【請求項 25】

第一および第二のアフィニティリガンドの少なくとも 1 つが、リニアペプチドのライブラリーから由来する、請求項 1 ~ 24 のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

【請求項 26】

第一および第二のアフィニティリガンドの少なくとも 1 つが、サイクリックペプチドのライブラリーから由来する、請求項 1 ~ 25 のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

50

## 【請求項 27】

第一および第二のアフィニティリガンドの少なくとも1つが、オリゴヌクレオチドである、請求項1～26のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 28】

オリゴヌクレオチドが、RNAオリゴヌクレオチドである、請求項27のサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 29】

オリゴヌクレオチドが、DNAオリゴヌクレオチドである、請求項27のサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 30】

オリゴヌクレオチドが、RNAおよびDNAの混合物を含むオリゴヌクレオチドである、請求項27のサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 31】

オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド変異体のライブラリーから選ばれる、請求項28～30のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 32】

複雑な生物学的液体が、血清、血漿、唾液、全血、血漿交換由来の血漿、脳脊髄液、羊膜液、尿、精液、臍帯血、細胞培養上清、細胞培養液、滲出液、および、吸引液から選ばれる、請求項1～31のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 33】

サンプルが、ヒトのサンプルである、請求項1～32のいずれかのサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 34】

サンプルが、ヒトの血清サンプルである、請求項33のサンドイッチアッセイ法。

## 【請求項 35】

キットが、

- 標的分子への親和性を有し、固体支持体に固定化できる第一アフィニティリガンド；
- 標的分子への親和性を有し、そのリガンドの存在が検出可能な第二アフィニティリガンド；および、
- 第一アフィニティリガンドを固定化できる固体支持体；

を含み、

該キットにおいて、第一および第二アフィニティリガンドの少なくとも1つは、抗体以外のアフィニティリガンドである、請求項1～34のいずれかの方法において使用するためのキット。

## 【請求項 36】

固体支持体が、請求項4～5のいずれかに定義された、請求項35のキット。

## 【請求項 37】

第一および第二アフィニティリガンドが、請求項7～31のいずれかに定義された、請求項35～36のいずれかのキット。

## 【請求項 38】

キットが、請求項32～34のいずれかに定義されたサンプルを用いて実施される、請求項35～37のいずれかのキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、サンプル、特に複雑な生物学的液体を含むサンプル中の標的分子の検出をすためのサンドイッチアッセイ法に関する。本発明は、また、該アッセイを実施するためのキットにも関する。

## 【背景技術】

10

20

30

40

50

## 【0002】

抗体をベースにした捕捉型 (capture) 免疫アッセイ法 (例えば、サンドイッチ免疫アッセイ法) は、免疫グロブリン (Ig)、ホルモン、サイトカイン、補体因子、および、ヒト血清または血漿のような生物学的サンプル中にみられるその他の分子を含む、種々の分子の検出および定量のために用いられている。簡略して言えば、サンドイッチ免疫アッセイ法において、目的とする標的に親和性を有する最初の「捕捉」抗体を固体支持体の固定化し、続いて、サンプルと接触させる。サンプル中の標的分子は捕捉抗体に結合し、つぎに、過剰のサンプルを取除く。結合した標的分子は、標的分子に親和性を有する第二の「検出 (detector)」抗体と接触させる。全ての過剰の検出抗体を除去した後、標的と捕捉抗体の複合体に結合している検出抗体の存在を、1つまたはそれ以上の公知の検出原理により測定する。ポジティブなシグナルは、検出抗体が捕捉抗体に結合している標的分子と結合する場合に得られる。

10

## 【0003】

特に、この目的では捕捉型 E L I S A (酵素免疫吸着アッセイ法) の使用が広く普及しており、それは該アッセイの一般的な高い特異性と感度によるためと説明できる。捕捉型免疫アッセイ法は、捕捉抗体と検出抗体の結合を同時に保持するために十分な大きさを有する、事実上あらゆる可溶性の抗原性を有する分子の定量のために使用することができる。増幅系、例えば、ビオチン化検出抗体とアビジン酵素接合体と組合せて使用するときには、そうしたアッセイの感度は、例えばタンパク質抗原の場合は、検出限界の下限がピコグラム / mL のレベルまで達する。

20

## 【0004】

しかし、その一般的な有用性にもかかわらず、現在の捕捉型免疫アッセイ法をヒト血清や他の抗体を含有している生物学的液体のような、複雑な生物学的液体中の分子の検出および定量に用いることには問題点もある。すなわち、そうした複雑な生物学的液体が、免疫アッセイ法で使用した抗体に対する反応性抗体を含み、もし標的分子が存在していない場合でも、捕捉および検出抗体との交差結合により偽りのポジティブシグナルを生じさせる可能性のあることが当業者には良く知られている。ヒトのサンプルには、そうした交差結合によりそのサンプル中の標的分子の分析に干渉する異種親和性 (heterophilic) の抗動物 Ig 抗体 (H A I A) が含まれている可能性がある (Reinsberg, Clin Biochem 29巻: 145頁 (1996年); Kricka, Clin Chem 45巻: 942頁 (1999年); Klee, Arch Pathol Lab Med 124巻: 921頁 (2000年); Kellar等, Cytometry 45巻: 27頁 (2001年))。H A I A は、健常人由来の血清の 27 ~ 40% で検出されており (Boscato および Stuart, Clin Chem 34巻: 27頁 (1988年); Hennig等, J Immunol Methods 235巻: 71頁 (2000年))、それよりさらに高い検出率も報告されている (Kricka、上述)。多くの研究で、診断目的に利用される市販のアッセイ法も含め (Hennig等、上述; Ingels等, Clin Toxicol 38巻: 343頁 (2000年); Kellar等、上述)、免疫アッセイ法における異種親和性抗体によって生じる偽りのポジティブシグナルが記載されている。

30

## 【0005】

抗体を含有する複雑な生物学的液体サンプルの分析において免疫アッセイ法を使用することから生じる上記の問題のために、そうした抗体による干渉を低減するいくつかの方策が検討されてきた。かくして、関連のない動物の免疫グロブリンの過剰添加、ヒト血清からのヒト抗体の除去、例えばマウス抗ヒト Ig M 抗体の添加による H A I A 反応性の中和、断片化した抗体 (F a b または F (a b')<sub>2</sub>) の使用、および進化的に離れた種由来の抗体との組合せの利用、が検討されてきている (Reinsberg、上述; Kricka、上述; Span等, Int J Biol Markers 15巻: 184頁 (2000年); Butler および Cole, Clin Chem 47巻: 1332頁 (2001年))。こうした方法は干渉を防止するために効果的かもしれないが、干渉が本当に意図したように回避されたのか保証するための追加の管理が必要になる欠点を有する (Reinsberg、上述; Kricka、上述)。例えば、F a b 断片の使用は、ヒト血清サンプル中の F c 反応性 H A I A の干渉のリスクを回避できるかもしれない。しかし、F a b 領域と反応する H A I A 反応性も同定されているために、この方法も十分だとは思えな

40

50

い (Hennig等、上述)。捕捉および検出用の抗体の他に、追加の抗体試薬を含めることは、現実にはアッセイコストに大きな影響を与える可能性があり、経済的な面もまた考慮に入れなければならない。鳥と哺乳類の抗体を組み合わせることにより、H A I A 干渉のリスクは著しく減少するが (Span等、上述)、この方策はモノ特異的試薬によるアッセイ法の開発を許すものではない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

こうして、複雑な生物学的液体を含有するサンプルの分析のための、公知の免疫アッセイ法の利用に関連して、上記の問題を避ける、新規なアッセイ法のニーズが存在している。

10

【0007】

本発明の目的は、アフィニティリガンドを利用して標的分子のサンドイッチ型検出の改良された方法を提供し、こうしたニーズに応えることである。

【0008】

本発明の他の目的は、交差結合する抗体の干渉に対しては、先行方法より感受性が低いサンドイッチアッセイ法を提供することである。

【0009】

またさらに本発明の他の目的は、感受性、干渉の低減化、堅牢性またはその他の関心あるパラメーターの点で、アッセイの遂行を最適化するために、新規なサンドイッチアッセイ法において、異なった特性を有するアフィニティリガンドの組合せの利用を可能にすることである。

20

【課題を解決するための手段】

【0010】

前述およびその他の目的は、本開示から当業者には明らかなように、特許請求された本発明により満たされる。こうして、複雑な生物学的液体を含むサンプル中の標的分子の存在を検出するためのサンドイッチアッセイ法が提供される。このアッセイ法は、

- 標的分子への親和性を有し、固体支持体に結合できる第一アフィニティリガンドを用意すること；
- そのサンプル中に標的分子が存在する場合に、第一アフィニティリガンドへの結合を可能にするように、サンプルを加えること；
- 標的分子への親和性を有し、その第二アフィニティリガンドの標的分子への結合を可能にするように、第二アフィニティリガンドを加えること；
- 標的分子に未結合の第二アフィニティリガンドを除くこと；および、
- その存在がサンプル中の標的分子の存在の指標であるような、第二アフィニティリガンドの存在を検出すること；

30

を含んでおり、

第一アフィニティリガンドは、該検出前のどの段階でも固体支持体に固定化され、

第一および第二アフィニティリガンドの少なくとも1つは、抗体以外のアフィニティリガンドである、

40

【0011】

こうして、本発明は、サンドイッチアッセイにおける、1またはそれ以上の抗体を非抗体性アフィニティリガンドと置き換えることが、複雑な生物学的液体を含有するサンプルの分析での偽りのポジティブシグナルによる問題を緩和または解決するという知見を基にしている。

【0012】

本発明の方法の第一の作用は、サンプル中に存在する抗体と第一および第二アフィニティリガンドとの交差結合を低減することである。これは、例えば、構造および起源の点で互いに異なっている第一および第二アフィニティリガンドの提供により、達成される。し

50

かし、本発明はまた、両方が同じタイプの第一および第二の非抗体性アフィニティリガンドの使用も可能にする。ついで、交差結合の問題は、本方法に使用しているアフィニティリガンドのタイプが、先行技術のサンドイッチアッセイ法の「捕捉」および「検出」抗体のような抗体による交差結合が容易には起こらないという事実、または、サンプル中に存在するこれらのリガンドと交差結合できる抗体はずっと少ないという事実により、軽減される。こうして、本発明の方法において、第一および第二のアフィニティリガンドの1つは、抗体であっても良いが、「捕捉」および「検出」リガンドの両方が抗体以外のアフィニティリガンドの利用もまた考えられている。

#### 【0013】

本発明の方法は、標的分子のいかなる濃度のサンプルの分析にも適している。しかし、本発明の有利性は、とりわけ、サンプル中の非常に低い濃度の標的分子を検出する場合、すなわち、アッセイを実施するときにサンプルを少ない程度にしか希釈できない場合に、明らかである。これは、複雑な生物学的液体を含有するサンプルでの交差結合の問題、特に、例えば希釈されていない高い濃度の複雑な生物学的液体の分析の場合の問題に起因するものである。先行技術の方法が希釈されていない、またはわずかしか希釈されていない複雑な生物学的液体サンプルの分析で干渉の問題を示すのに対して、本発明の方法は、そうしたサンプルであっても標的分子の正確な測定を可能にし、より低濃度の標的分子の検出を可能にする。こうして、例えば、高い血清濃度のサンプル中の希少標的分子の分析が、本発明により可能になる。

10

#### 【0014】

本発明はまた、上述の方法を実施するためのキットを提供する。このキットは、

- 標的分子への親和性を有し、固体支持体に結合できる第一アフィニティリガンド；
- 標的分子への親和性を有し、そのリガンドの存在が検出可能な、第二アフィニティリガンド；
- 第一アフィニティリガンドを固定化できる固体支持体；

を含んでおり、

20

該キットにおいて、第一および第二アフィニティリガンドの少なくとも1つは、抗体以外のアフィニティリガンドである。

#### 【0015】

本発明のキットは、本発明の方法の実施を可能にするように提供される。当業者はこのキットの種々の実施態様を、本発明の方法と以下に記載したものとを合わせた観点から理解できるであろう。こうして、例えば、第一および第二アフィニティリガンドならびに固体支持体の可能な選択は、以下にリストされたものの中で見出される。

30

#### 【0016】

次に図面を簡単に説明する。

図1：本発明と比較した先行技術、および本発明の異なった実施態様の図示的な説明。

A：先行技術である、2個の抗体による標的分子の検出；B：先行技術である、捕捉および検出抗体間のH A I Aによる交差結合；C：本発明による、第二アフィニティリガンドとしての非抗体性アフィニティリガンド；D：本発明による、第一アフィニティリガンドとしての非抗体性アフィニティリガンド；E：本発明による、第一および第二アフィニティリガンドが同じタイプである2つの非抗体性アフィニティリガンド；および、F：本発明による、第一および第二アフィニティリガンドが異なったタイプである2つの非抗体性アフィニティリガンド。

40

#### 【0017】

図2：A f f i b o d y<sup>(R)</sup> (Z<sub>IgA</sub>) および/またはポリクローナル抗体 (p A b<sub>IgA</sub>) を用いたI g Aのサンドイッチアッセイ分析

I g A 1、I g A 2、およびI g A 1 / I g A 2 標準液を二倍ずつ連続希釈し、Z<sub>IgA</sub> および/またはp A b<sub>IgA</sub> を指示に従って組み合わせ用いて分析した。記号は、I g A 1 / I g A 2 (円)、I g A 1 (四角) およびI g A 2 (三角) の標準を表す。グラフに表されたI g Aの濃度範囲が異なっていることに注目されたい。

50

## 【0018】

図3：抗体および/または合致しない特異性を表す  $Affibody^{(R)}$  分子ベースにしたサンドイッチアッセイ系でのヒト血清抗体の干渉

捕捉試薬は、5から15,625までの範囲で連続する5倍希釈の血清と反応させ、検出試薬との結合を測定した。このグラフは、抗体との組み合わせ(A)(公知技術による)、または、 $Affibody^{(R)}$ 分子と抗体もしくは $Affibody^{(R)}$ 分子との組み合わせ(B)(本発明による)を示している。符号は、表1に記載されたような、試薬の組み合わせを示す。

## 【0019】

図4： $Z_{Apo}$ および/または特異的mAbを用いた、アポリポプロテインA-1のサンドイッチアッセイ系の比較

全ての可能な縦横交差した、 $Z_{Apo}$ 、mAb 110<sub>Apo</sub>およびmAb 44<sub>Apo</sub> 10<sub>Apo</sub>の組み合わせを、アポリポプロテインA-1標準を測定するために用いた。4pg/mLから250pg/mLの範囲の濃度で、アポリポプロテインA-1を検出した全ての組み合わせを示した。

## 【0020】

本発明の詳細な説明

本発明は、複雑な生物学的液体を含有するサンプル中の標的分子を検出するサンドイッチアッセイ法に関する。この標的分子は、そのためのアフィニティリガンドを得ることができるいかなる可溶性物質または粒子(例えば、ウイルス粒子)であってもいい。例えば、標的分子に対する抗体応答の誘導により得られた抗体標的分子の場合は、標的分子が抗原性を有さなければならない。他の例では、例えばファージ・ディスプレイ選択技術もしくはその他のインビトロ選択システムにより、タンパク質ライブラリーからの選択で得られた免疫グロブリンおよび非免疫グロブリンのタンパク質クラスの両方のアフィニティリガンドの場合は、標的分子はそうした選択システムに適合していなければならない。限定するものではない可能な標的分子の例としては、免疫グロブリン、ホルモン、サイトカイン、補体因子、他の血清タンパク質、酵素、小分子、医薬、感染体由来分子(例えば、細菌、ウイルスおよびその他の寄生生物抗原)、腫瘍抗原、ペプチドおよび核酸があげられる。一般に、従来の上記のE L I S Aまたは他の公知のサンドイッチアッセイ法を用いた検出が可能などのような標的分子も、本発明の文脈の中で考慮される。

## 【0021】

標的分子の存在を試験するためのサンプルは、複雑な生物学的液体を含有する。本発明の文脈の中で、複雑な生物学的液体とは、従来の上記の免疫アッセイにおける偽陽性の上記の問題に通常関連しているものとして、そしてそのために、種々の特異性の抗体を含有している可能性のあるものとして、定義される。通常は、本発明で用いられるサンプルは、ヒトまたは動物の被験体から得られたものであり、例えば、血清、血漿、唾液、全血、血漿交換由来の血漿、脳脊髄液、羊膜液、尿、精液、臍帯血、細胞培養上清、細胞培養液、滲出液、および、吸引液(aspirate)のような複雑な生物学的液体を含有できる。

## 【0022】

本発明のサンドイッチアッセイ法は、いくつかの工程を含み、実施に適した好ましい順番で、以下のように設定される。その工程のあるものは、明確に記載された順序で実施される必要があるが、この実施の順序は、限定的なものとして意図するものではない。例えば、過剰の試薬の除去は、この方法の遂行の間に様々な工程で実施することができる。第一アフィニティリガンドの固体支持体への固定化に関する他の例では、例えば、本発明の方法の実施前に行ってもいいし、そのアフィニティリガンドと標的分子との間の複合体形成に引き続いて行っても良い。従来の上記のサンドイッチアッセイ法に熟達した当業者は、不必要な実験をすることなしに、それぞれのケースで好ましいプロトコルを確立することができる。

## 【0023】

本発明の方法は、第一アフィニティリガンドを固定化することのできる固体支持体に関

10

20

30

40

50

連して実施される。固体支持体は解析フォーマットを決定し、そうした支持体に適したもののなかから自由に選ぶことができる。例えば、公知の免疫アッセイで標準的に用いられるマイクロタイタープレートは、本発明の方法においても有利に利用することができる。支持体として利用できるマイクロタイタープレートは、商業的入手可能性という理由から、48、96または384ウエルを有している。本発明のサンドイッチアッセイ法を行うことができる他の適した固体支持体の例は、マイクロ流体チャンネルを含むコンパクトディスク；タンパク質アレイチップ；ニトロセルロースまたはPVDf膜のような膜；常磁性または非常磁性ビーズのようなマイクロパーティクル；ピン構造体；ディップスティックのようなスティック構造体；表面プラズモン共鳴機器に用いられるセンサーチップ表面のようなバイオセンサーのセンサー表面；および細胞表面があげられる。第一アフィニティリガンドのそうした支持体または基質への固定化は、選択された基質に利用可能な共有または非共有連結反応を用いて行われ、これは当業者が良く知っている範囲内のものである。

10

#### 【0024】

本発明の方法は、標的分子への親和性を有し、固体支持体に固定化できる第一アフィニティリガンドを用意する工程を含む。本発明の実施態様は、アッセイ法を実施する前に、第一アフィニティリガンドを固体支持体に固定化する。例えば、第一アフィニティリガンドは、マイクロタイタープレートの少なくとも1つのウエルの内側、または上述の他の固体支持体構造のいずれかに固定化されうる。しかし、第一アフィニティリガンドが溶液として提供されることも考えられる。そうした場合は、本発明の方法は、第一アフィニティリガンドを、該方法の進行間、例えば、第一アフィニティリガンド、標的分子および第二アフィニティリガンド間の三次複合体形成に続いて、固体支持体に固定化する工程も含む。そうした実施態様では、特異的な結合ペアの1つのメンバーを含む、第一アフィニティリガンドを利用することができる。次いで、固体支持体は、その表面にそのペアの他のメンバーを連結させて、適切に提供される。この様式で使用できる特異的な結合ペアの、限定されない例としては、共有的に導入されたグループ、例えば、第一アフィニティリガンドに共有的に連結させたビオチンおよび固体支持体に連結されたアビジンまたはストレプトアビジン；ならびに、遺伝子組換え法により導入された配列、例えば、固定化金属イオンクロマトグラフィー（IMAC）吸着の原理（例えば、Nilsson等、Prot Exp Purif 1 1巻：1-16頁（1997年））を介して固体支持体と相互作用をするヘキサヒスチジル（His6）配列、があげられる。そして例えば、固体支持体は、形成された三次複合体が、第一アフィニティリガンドと固体支持体の表面との相互作用を介して固定化できる、ディップスティックから構成されてもいい。こうして、第一アフィニティリガンドに結合したどのような分子種も、溶液から「釣り上げ」て、検出することができる。

20

30

#### 【0025】

本発明の方法の他の工程は、そのサンプル中に標的分子が存在する場合に、第一アフィニティリガンドへの結合を可能にするように、サンプルを加えることである。こうして、サンプルは固定化された第一アフィニティリガンドに加えられ、そして、アフィニティリガンドと標的分子の間の結合に必要な時間、温度および他の条件の下でインキュベートする。そうしたインキュベートの後、過剰のサンプルは好ましくは、例えば緩衝液による洗浄により、除去される。そうした除去工程により、第一アフィニティリガンドに結合しない標的分子が除去される。

40

#### 【0026】

第一アフィニティリガンドへの標的分子の結合が上記の様式で可能になった後、標的分子への親和性を有する第二アフィニティリガンドが、その第二アフィニティリガンドの標的分子への結合を可能にする条件の下に適用される。この結合は、好ましくは、第一アフィニティリガンドに関して非競合的であるように起こる。第二アフィニティリガンドの添加は、第一アフィニティリガンド、標的分子および第二アフィニティリガンド間の三次複合体形成を可能にする。これは標的分子がサンプル中に存在するときのみ生じる。さらに、サンプル中の全ての標的分子が結合するのではなく、未結合標的分子に対する結合標的分子の割合は、標的分子の二つのアフィニティリガンドへの結合の反応平衡に依存する。

50

## 【0027】

標的分子がサンプル中に存在するか否かの測定は、上記のように形成された三次複合体の検出に依存している。この検出が正確な値を出せるように、固定化第一アフィニティリガンドに結合しなかったアッセイのどのような分子種も、検出前には除去されなければならない。この意味で、分子種は第一リガンドに結合して、標的分子のようにそれが直接結合しているのか、または第二アフィニティリガンドのように間接的に結合しているのかが、検討される。特に、本発明の方法は、そうした標的分子に結合しなかった第二アフィニティリガンドを、もしも除かなければ、そうした未結合の第二アフィニティリガンドの存在が、続く検出の間に偽りのポジティブシグナルを生じるために、除去することを含んでいる。

10

## 【0028】

本発明のサンドイッチアッセイ法は、さらに、どのような、残っている（または、上述の除去の時点で残っていた）第二アフィニティリガンドも標的分子に結合しているために、その存在がサンプル中の標的分子の存在の指標であるような、第二アフィニティリガンドの存在の検出を含む。第二アフィニティリガンドの検出は、当該分野で知られているどのような方法を用いて実施してもよい。例えば、第二アフィニティリガンドは蛍光マーカー分子、放射性標識体、または基質の添加によりその存在が確認できる活性型酵素に共有的に連結されていてもよい。そうした連結反応は適切には本発明の方法において、第二アフィニティリガンドの使用の前に行われる。本発明の方法のこの工程で有用な他の検出手段には、センサー、例えば、そのセンサーが光学的もしくは圧電性の検出原理に基づくことができる質量検出用のもの；免疫電子顕微鏡；または、可視化用のコロイド状金粒子があげられる。代わりに、第二アフィニティリガンドは、この第二アフィニティリガンドに親和性を有する第三アフィニティリガンドで検出されてもよい。この第三アフィニティリガンドは、つぎに例えば公知のマーカーまたは標識に連結させてもよい。本発明の方法への応用に適した、様々な他の検出手段および技術が、公知の免疫アッセイ法の分野で知られており、当業者にとってそうした応用は過度の実験を必要としないものである。標準的なマイクロタイタープレートを用いて行われる、本発明のアッセイ方法の場合、ストレプトアビジン-酵素抱合体として検出可能な、ビオチン標識第二アフィニティリガンドを用いることが好ましい。

20

## 【0029】

本発明の方法の特徴の一つは、第一および第二アフィニティリガンドの少なくとも1つは、抗体以外のアフィニティリガンドであることである。これにより、標的分子が存在しないとき、第一および第二アフィニティリガンドの間の交差結合の問題が改善される。このようにして、例えば、ヒトサンプル中のHAI Aの干渉作用が低減する。本発明の方法の実施態様において、標的分子に対する抗体は、第一または第二アフィニティリガンドのいずれかとして使用される。代わりに、第一および第二アフィニティリガンドの両方が抗体以外のリガンドであって良い。

30

## 【0030】

本発明の文脈の中で、抗体以外のアフィニティリガンドは、少なくとも $10^{-3}$  Mの $K_D$ 値で標的分子に結合できるあらゆる非抗体性リガンドであり、固体支持体に固定化される（もし第一アフィニティリガンドとして用いられる場合）か、または検出される（もし第二アフィニティリガンドとして用いられる場合）。本発明の方法の好ましい実施態様のあるものでは、抗体以外のアフィニティリガンドはポリペプチド、すなわちタンパク質またはペプチドである。他の実施態様では、抗体以外のアフィニティリガンドは非ペプチド性であり、例えば、オリゴヌクレオチドのようなポリヌクレオチドである。

40

## 【0031】

こうして、そうしたアフィニティリガンドは例えば、天然に存在するタンパク質またはそのドメインのようなタンパク質であっていい。代わりに、本発明の方法で使用されるアフィニティリガンドは、足場（scaffold；すなわち出発の時点での構造）としての天然に存在するタンパク質またはそのドメインを用いて、工学的に作成してもいい。タンパク質

50

工学は、例えば、そこから適切なアフィニティリガンドが選択できるような、タンパク質変異体のライブラリーを得るために使用される。そうしたライブラリーは、コンビナトリアル手段により構築することができ、足場タンパク質のアミノ酸残基の所与の数のランダム化により、高い特異性のアフィニティリガンドの進化を可能にする。コンビナトリアル・ライブラリーからのアフィニティリガンドの単離のための適切な手順は、例えば、フェージ・ディスプレイ技術および他のインピボ、またはインピトク選択である。これらは、当業者に知られており、例はFitzgerald、Drug Discovery Today 5巻：253-258頁（2000年）に記載されている。

**【0032】**

本発明のアフィニティリガンドとして使用される、天然に存在するタンパク質またはそのドメインは、例えば、細菌性のレセプチンまたはそのドメインであっていい。特に好ましい細菌性レセプチンは、ブドウ球菌プロテインA、連鎖球菌プロテインGおよびペプトストレプトコッカス・マグヌスのプロテインL、またはそのドメインである。

10

**【0033】**

本発明のアフィニティリガンドとして使用するための、工学的に作成されたタンパク質は、細菌性レセプチン；フィブロネクチン；プロテアーゼ・インヒビター；レチノール結合タンパク質；ピリン結合タンパク質；アミラーゼ・インヒビター；CTL A - 4；チトクローム；および、セルロース結合タンパク質からなるグループから選ばれるタンパク質ドメインを、足場として用いて構築できる。好ましい足場の例としては、細菌性レセプチンからのものが挙げられる。そうしたドメインのなかで、細菌性レセプチンは、ブドウ球菌プロテインA、連鎖球菌プロテインGおよびペプトストレプトコッカス・マグヌスのプロテインL、からなるグループに由来するドメインが、特に好ましい。

20

**【0034】**

こうして、実施態様において、本発明の方法で使用されるアフィニティリガンドは、ブドウ球菌プロテインAのいずれかの免疫グロブリン結合ドメインを足場として用いて構築される。好ましくは、このドメインは、ブドウ球菌プロテインAのBドメイン、またはそれに由来するZドメインである（Zドメインに由来するアフィニティリガンドは、時には、本明細書および文献中でAffibody<sup>(R)</sup>分子とも呼ばれている）。他の実施例では、ペプトストレプトコッカス・マグヌスのプロテインLのいずれかの免疫グロブリン結合ドメインが足場として用いられる。さらに、他の実施態様において、連鎖球菌のプロテインGのいずれかの免疫グロブリン結合ドメインが、足場として用いられる。また他の実施態様では、連鎖球菌のプロテインGのアルブミン結合ドメインが、足場として用いられる。

30

**【0035】**

上記のタンパク質およびタンパク質ドメインの代わりとして、アフィニティリガンドは、直鎖状ペプチド変異体のライブラリーから、または環状ペプチド変異体のライブラリーから選択されても良い。

**【0036】**

本発明の範囲の中での使用が考えられる、他のアフィニティリガンドは、オリゴヌクレオチドであり、例えば、RNA、DNAまたは混合されたRNA/DNAオリゴヌクレオチドである。特定の標的分子に親和性のあるオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド変異体のライブラリーから、タンパク質またはペプチド変異体の選択と同様な方法で、選択することができる。

40

**【0037】**

さらに、本発明の方法は、その最も直接的な実施態様で、一つの分子種だけを第一アフィニティリガンドとして、および、一つの分子種を第二アフィニティリガンドとして利用することで、設計することができる。しかし、この方法は、異なった分子種のいかなる数であっても、捕捉または検出リガンドとして用いて行うことができる。例として、異なった相補的な決定領域を有する、2つの異なった検出抗体を、結合した標的分子の検出のための「第二アフィニティリガンド」として組み合わせ、例えばアッセイの感度を高める

50

目的で、用いることができる。他の例は、2つの、異なった結合特異性を有する、同じまたは異なったクラスの非抗体リガンドと、類似の様式で使用するこゝである。

【0038】

本発明をさらに説明し図示するために、図1を参照する。図1-Aおよび1-Bは、ヒトサンプルの分析において、H A I Aによる交差結合の問題を図示しており；シグナルは、標的分子が存在している（図1-A）または存在していない（図1-B）かどうかにかかわらず、検出抗体の検出により得られる。図1-Cは非抗体性リガンドを第二「検出」アフィニティリガンドとして使用する場合を図示している。もし利用できる標的分子がなければ、非抗体性アフィニティリガンドは、H A I A抗体（点線）とは交差結合しない。図1-Dは、本発明の他の実施態様の図示であり、非抗体性アフィニティリガンドを第一アフィニティリガンドとして、そして抗体を第二アフィニティリガンドとして使用している。図1-Eは、本発明の他の実施態様を図示しており、一つのタイプの非抗体性アフィニティリガンドが、本発明の方法における第一および第二アフィニティリガンドの両方で使用される。図1-Fは、さらに他の実施態様を図示しており、二つの異なったタイプの非抗体性アフィニティリガンドが、第一および第二アフィニティリガンドとして使用される。

10

【0039】

本発明は、ここで、これに準じて実施された実験の詳細により、例示され、さらに説明される。これらの実施例は、特許請求された本発明の範囲を限定するものとは解釈されるべきではない。

20

【実施例】

【0040】

材料および方法

A f f i b o d y <sup>(R)</sup> 分子：

本研究で用いられた、ファージ・ディスプレイによる選択およびA f f i b o d y <sup>(R)</sup>分子の特性は以前に記載されている。簡単にいえば、ヒトミエローマI g A、組換えヒトアポリポプロテインA - 1<sub>Milano</sub>、または、組換え呼吸器合胞体ウイルス（R S V）表面プロテインGの標的、Z<sub>IgA1</sub>（Ronmark等、投稿中論文（2002年））、Z<sub>Apolipo24:4</sub>（Nord等、Nat Biotechnol 15巻：772頁（1997年））、およびZ<sub>RSV1</sub>（Hansson等、Immunotechnology 4巻：237頁（1999年））、A f f i b o d y <sup>(R)</sup>分子が、ファージ・ディスプレイ技術により、ブドウ球菌プロテインA（Nord等、Protein Eng 8巻：601頁（1995年）、Nord等、上述（1997年））に由来する、6 k D aドメイン（ドメインZ）の13個の表面位置でのランダム化により構築したタンパク質ライブラリーから選択された。3個の全てのA f f i b o d y <sup>(R)</sup>分子は、それぞれの標的に対して、ほぼマイクロモルの解離定数（K<sub>D</sub>）を示している。Z<sub>IgA1</sub>は、ヒトI g A<sub>1</sub>およびI g A<sub>2</sub>の両方に結合する（Ronmark等、上述）。この研究において、大腸菌により産生された、Z<sub>RSV1</sub>-A B D、(Z<sub>IgA1</sub>)<sub>2</sub>-H i s<sub>6</sub>、または、(Z<sub>Apolipo24:4</sub>)<sub>2</sub>-c y s構築体が用いられ、血清アルブミン結合ドメイン（A B D）、ヘキサヒスチジル・タグまたはC-末端位置のシステイン残基のいずれかに遺伝子操作で融合した一価または二価の構築物に対応している。タンパク質は、振動フラスコ培地から、H S A - アフィニティークロマトグラフィー（A B D融合体）、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー（H i s<sub>6</sub>-融合体）またはイオン交換/逆相クロマトグラフィー（C y s融合体）により精製された。検出試薬、すなわち第二アフィニティリガンドとして用いたとき、A f f i b o d y <sup>(R)</sup>分子はモル比で25倍過剰のE Z - L i n k<sup>TM</sup>スルホ-N H S - L C - ビオチン・N H S - ビオチン（Pierce社、Rockford, アイルランド）でビオチン化された。過剰のビオチン化試薬はP D 10カラム（Amersham Biosciences社、Uppsala, スウェーデン）を用いたゲル濾過により除去した。本研究で用いたZ構築体は、精製を進めるために加えたタグを含んでおり、本明細書では、Z<sub>RSV</sub>、Z<sub>IgA</sub>およびZ<sub>Apo</sub>と呼称する（表1）。

30

40

【0041】

抗体試薬：

50

ヒト I g A に特異的な、非ビオチン化およびビオチン化、アフィニティ精製ヤギ p A b を、I g A の測定に用いた (Sigma社, St Louis, MO)。ヒトアポリポプロテイン A - 1 の検出のためには、非ビオチン化およびビオチン化マウス m A b 4 4 ( I g G 2 b ) および m A B 1 1 0 ( I g G 1 ) を用いた (Mabtech社, Nacka, スウェーデン)。ヒト血清抗体に起因する偽りのポジティブシグナルを評価するために用いた他の抗体は：ヤギ p A b 抗マウス I g G + I g M ( Jackson Immuno Research Laboratories Inc, West Grove, PA ) ; ビオチン化ヤギ p A b 抗ウサギ I g G ( Vector社, Burlingame, CA ) ; ヒトインターフェロン - ガンマに特異的なマウス m A b 1 - D 1 K ( I g G 1 ) ; ヒトインターロイキン - 4 に特異的なビオチン化マウス m A b 1 2 . 1 ( I g G 1 ) ; ヒトインターロイキン - 5 に特異的なラット m A b T R F K 5 ( I g G 1 ) 、 および、ヒトインターロイキン - 1 0 に特異的なビオチン化ラット m A b 1 2 G 8 ( Mabtech社 ) であった。全ての抗体は表 1 にリストされている。

10

## 【 0 0 4 2 】

標準液およびヒト血清サンプル：

3 つの異なった I g A 標準液、ヒトポリクローナル I g A 1、ヒトミエローマ I g A 2 ( Calbiochem社, San Diego, CA ) ならびに、I g A 1 および I g A 2 の両方を含むヒトポリクローナル I g A 1 / I g A 2 ( Sigma社 ) 、を用いた。用いたアポリポプロテイン A - 1 の標準液はSigma社から入手した。ヒト血清中の I g A およびアポリポプロテイン A - 1 レベルを評価するために、オーストリアの健常人献血者から得られた 5 0 以上の血清のプールを用いた ( PAA Laboratories GmbH, Linz, オーストリア ) 。

20

## 【 0 0 4 3 】

ヒト I g A を検出するためのサンドイッチアッセイ：

E L I S A プレート ( C o s t a r 3 5 9 0 ; Costar社, Cambridge, MA ) を、捕捉試薬、すなわち第一アフィニティリガンドを含有するリン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) で、4 で終夜インキュベートした。高い特異的なシグナルおよび低いバックグラウンドを生じるタイトレーションに従って、A f f i b o d y <sup>(R)</sup> 分子を、8 μ g / m L の濃度で、および p A b または m A b を 2 μ g / m L の濃度で用いた。全てのインキュベーションについて、1 ウエル当たり液体 1 0 0 μ L を用いた。ウエルは、P B S 中 1 % ウシ血清アルブミン ( B S A ) 2 0 0 μ L で、2 0 、 1 時間ブロックし、ついで、2 本ずつ連続的に希釈した標準液または血清サンプルの希釈液を加え、2 0 で 2 時間インキュベートした。全てのサンプルおよび続く検出試薬は 0 . 1 % B S A および 0 . 0 5 % ツウイーンを含有する P B S で希釈された。ウエルは空にされ、0 . 0 5 % ツウイーンを含む P B S で 5 回洗浄し、ついで、高いシグナル対ノイズ比を生じるタイトレーションにより決められた濃度のビオチン化検出試薬とインキュベートした；A f f i b o d y <sup>(R)</sup> および m A b 試薬は 1 μ g / m L の濃度で、ならびに p A b 試薬は 0 . 5 μ g / m L の濃度で使用した。2 0 で 1 時間のインキュベーションに続いて、ウエルを洗浄し、5 0 n g / m L のストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ抱合体 ( Mabtech社 ) を加えた。最後に、p - ニトロフェニルリン酸 ( Sigma社 ) 緩衝液 1 0 0 μ L を、それぞれのウエルに加え、つぎに、約 1 時間後に、プレートを 4 5 0 n m で読み取った ( Molecular Device社, Menlo Park, CA ) 。それぞれの捕捉および検出試薬の組み合わせのバックグラウンドレベルは、緩衝液のみを用いて評価した。それぞれの系の検出レベルの下限は、その系のバックグラウンドレベルの 2 倍の吸光度を与える、最も低い標準液濃度として決定した。ヒト血清プール中の被分析物質 ( a n a l y t e ) の濃度は、希釈血清サンプルの分析、および、4 つのパラメーターでのロッドバード ( R o d b a r d ) 関数 ( S o f t M a x P r o ; Molecular Device社 ) で作成されたタンパク質の標準曲線との比較により定量した。

30

40

## 【 0 0 4 4 】

サンドイッチアッセイにおけるヒト血清抗体により生じる偽りのポジティブシグナルの解析：

原則的に、上記と同じプロトコルを用いた。A f f i b o d y <sup>R</sup> 分子、m A b または p A b は上記のように、E L I S A プレートに吸着され、ついでブロッキングおよび洗浄

50

の後、ヒト血清プールの連続する5倍希釈液を加え、インキュベートした。非合致特異性を表す、ビオチン化 A f f i b o d y<sup>R</sup>分子、m A b または p A b は、続いて偽りのポジティブシグナルのレベルを評価するために、用いられた。ヒト血清抗体に起因する吸収シグナルは血清サンプルで得られた吸光度から、その系のバックグラウンド吸光度（緩衝液のみ）を差し引くことにより算出した。異なった実験の結果を比較するために、内部標準をそれぞれの実験に含めた。

【 0 0 4 5 】

【表 1】

表 1: 本研究で使用された Affibody<sup>(R)</sup> 分子および抗体

試薬	起源	特異性	標識	識別記号
Affibody <sup>(R)</sup>	細菌	ヒト IgA	—	Z <sub>IgA</sub>
	細菌	ヒト IgA	ビオチン	Z <sub>IgA-b</sub>
	細菌	ヒトアポリポプロテインA-1	—	Z <sub>Apo</sub>
	細菌	ヒトアポリポプロテインA-1	ビオチン	Z <sub>Apo-b</sub>
	細菌	RSV	—	Z <sub>RSV</sub>
PAb	ヤギ	ヒト IgA	—	pAb <sub>IgA</sub>
	ヤギ	ヒト IgA	ビオチン	pAb <sub>IgA-b</sub>
	ヤギ	マウス IgG + IgM	—	pAb <sub>mIg</sub>
	ヤギ	ウサギ IgG	ビオチン	pAb <sub>RIGG-b</sub>
MAb	マウス	ヒトアポリポプロテインA-1	—	mAb110 <sub>Apo</sub>
	マウス	ヒトアポリポプロテインA-1	ビオチン	mAb110 <sub>Apo-b</sub>
	マウス	ヒトアポリポプロテインA-1	—	mAb44 <sub>Apo</sub>
	マウス	ヒトアポリポプロテインA-1	ビオチン	mAb44 <sub>Apo-b</sub>
	マウス	ヒトインターフェロニン-ガンマ	—	mmAb <sub>IFN</sub>
	マウス	ヒトインターロイキン-4	ビオチン	mmAb <sub>IL-4-b</sub>
	ラット	ヒトインターロイキン-5	—	r mAb <sub>IL-5</sub>
	ラット	ヒトインターロイキン-10	ビオチン	r mAb <sub>IL-10-b</sub>

10

20

30

40

【0046】

結果

ポリクローナル抗体および/または Affibody<sup>(R)</sup> 分子を基にしたサンドイッチアッセイを用いた IgA 標準液およびヒト血清 IgA 濃度の解析:

50

ヒトIgAを選択的に認識することができるAffibody<sup>(R)</sup>を、本発明による抗体試薬の代わりに用いた。このAffibody<sup>(R)</sup>Z<sub>IgA</sub>は、先に、単一のブドウ球菌プロテインAドメインのコンビナトリアル・エンジニアリングにより構築されたタンパク質ライブラリーから選択されており、ヒトのIgA1およびIgA2に同等の親和性で結合することが示されている(Ronnmark等、上述)。Z<sub>IgA</sub>とIgA特異的ヤギpAb(pAb<sub>IgA</sub>)の、縦横交差する捕捉および検出の組み合わせについて、IgA1、IgA2およびIgA1/IgA2標準液に対する反応性を解析した。公知の方法による比較実験として、捕捉および検出にpAb(pAb<sub>IgA</sub>/pAb<sub>IgA</sub>-b)を使用したELISAフォーマットでは、異なった標準液に対するほぼ匹敵する反応性(図2A)、ならびに、62から125pg/mLの間のIgA標準液についてのより低い検出限界の下限(表2)を示した。興味深いことに、本発明による、Z<sub>IgA</sub>とpAb<sub>IgA</sub>-bの組み合わせは、異なった標準液に対する反応性(図2B)、および、検出限界の下限(表2)の意味でも、いずれも完全に匹敵していた。逆の組み合わせ(pAb<sub>IgA</sub>/Z<sub>IgA</sub>-b)は、3つの全ての標準液でより低い反応性を示し、および、Z<sub>IgA</sub>/Z<sub>IgA</sub>-b(図2CおよびD)を基礎とした検出ではさらに低い感度であった。これらの後者のフォーマットに関して、IgA標準液の検出できる最低濃度は、それぞれ4および200~800ng/mLであった(表2)。

10

## 【0047】

異なった系を、続いて、ヒト血清プールのIgAを、それぞれの系の検出範囲に従って設定した血清希釈率で、定量するために用いた。pAb<sub>IgA</sub>/pAb<sub>IgA</sub>-b(比較例)、および、Z<sub>IgA</sub>/pAb<sub>IgA</sub>-b(本発明による)を用いて、 $3 \times 10^6$ 倍希釈した血清の分析は、それぞれ、2.7および3.0mg/mLのIgA濃度を示した(表2)。pAb<sub>IgA</sub>/Z<sub>IgA</sub>-b(本発明による)による測定結果は、分析のために $1 \times 10^4$ 倍または $1 \times 10^5$ 倍希釈した血清サンプルを用いて、IgA濃度が2.2mg/mLであった。より低い感度のフォーマットZ<sub>IgA</sub>/Z<sub>IgA</sub>-b(本発明による)では、500倍に希釈した血清で、IgA濃度が4.8mg/mLであった。

20

## 【0048】

合わせて、これらの解析結果は非免疫グロブリンのアフィニティリガンドZ<sub>IgA</sub>が、特異的な標的定量用サンドイッチアッセイ法において、pAbと組み合わせることで用いることができること、および、Affibody<sup>(R)</sup>分子を捕捉試薬、すなわち第一アフィニティリガンドとして使用することが好ましいフォーマットであることを示していた。

30

## 【0049】

【表 2】

表2: A f f i b o d y (R) (Z<sub>IgA</sub>) および/またはポリクローナル抗体 (pA b<sub>IgA</sub>) を基にしたヒト I g A サンドイッチアッセイの比較

アッセイ系		I g A 標準品の低い検出限界 <sup>a</sup>		血清 I g A の測定値 <sup>b</sup>
コーディング	検出	I g A 1 / I g A 2 (n g / m L)	I g A 1 I g A 2 (n g / m L)	(m g / m l)
pA b <sub>IgA</sub>	pA b <sub>IgA</sub> -b	0.062	0.062	2.7
Z <sub>IgA</sub>	pA b <sub>IgA</sub> -b	0.062	0.062	3.0
pA b <sub>IgA</sub>	Z <sub>IgA</sub> -b	4.0	4.0	2.2
Z <sub>IgA</sub>	Z <sub>IgA</sub> -b	800	200	4.8

a) I g A 標準品の連続する2倍希釈についてそれぞれの系で解析した。低い検出限界は、それぞれの系のバックグラウンドの2倍の吸収値を与える最も低い濃度として定義した。

b) 血清プールの、それぞれの系の感度に従って設定した希釈率で解析し、I g A 濃度は、I g A 1 / I g A 2 標準品との比較により定量した。血清 I g A 濃度は、I g A 濃度に希釈率をかけて算出した。

10

20

30

40

【0050】

サンドイッチアッセイ法でのヒト血清抗体に起因する偽りのポジティブシグナル:

50

本発明による、 $Z_{IgA}$ アフィニティ試薬の細菌性起源は、サンドイッチアッセイ法での  $Affibody^{(R)}$  / 抗体試薬の組み合わせの使用により、捕捉的免疫アッセイでのヒト血清抗体に関連する偽りのポジティブシグナルの問題に注意を向ける。非特異性 (non-matched specification) を示す試薬との組み合わせにより、血清とのインキュベーションの後でそれぞれの系で観察されるシグナルは交差結合性を有する抗体の存在に関連づけられるかもしれない。二つの抗体 (ヤギ pAb、マウス mAb および / または ラット mAb) の全ての組み合わせは、異なったレベルの交差結合をもたらし、いくつかの場合は血清プールを 3, 125 倍希釈した後もみられた (図 3A)。反対に、捕捉用抗体と検出用  $Affibody^{(R)}$  分子の組み合わせ、またはその逆の組み合わせ、は全く交差結合を示さなかった (図 3B)。注目すべきは、黄色ブドウ球菌プロテイン A 由来の  $Affibody^{(R)}$  分子の非修飾のフレームワーク領域と抗体との反応性は、自然での細菌への接触の結果と同じであることが予想されていたが、異なった特異性を示す 2 つの  $Affibody^{(R)}$  分子の組み合わせ ( $Z_{RSV}$  および  $Z_{APO-b}$ ) は、ヒト血清とは交差結合しなかった (図 3B)。

#### 【0051】

$Affibody^{(R)}$  およびモノクローナル抗体を基にしたサンドイッチアッセイ法を用いたヒトアポリポプロテイン A - 1 の測定：

$Affibody^{(R)}$  および mAb を基にした第二のアッセイ系を評価した (図 4)。この場合、被分析物質である非 Ig 分子 (アポリポプロテイン A - 1) は、 $Affibody^{(R)} Z_{APO}$  と特異的 mAb とを組み合わせ用い、測定した。アポリポプロテイン A - 1 標準液を検出するために、 $Z_{APO}$ 、 $mAb 110_{APO}$ 、および  $mAb 44_{APO}$  との組み合わせの能力を比較したとき、 $mAb 110_{APO}$  および  $mAb 44_{APO-b}$  が最も高い感度を示した。捕捉用  $Z_{APO}$  およびいずれかの検出用 mAb の組み合わせもまた、低い感度ではあったが、アポリポプロテイン A - 1 を検出した。全ての有効な試薬の組み合わせは、それぞれの系の感度に従って希釈したヒト血清プールの中のアポリポプロテイン A - 1 を定量するために使用することができる (表 3)。それぞれの系での適切な吸収シグナルは、 $mAb 110_{APO} / mAb 44_{APO-b}$  では  $1 - 3 \times 10^6$  倍希釈、他の系では、 $1 - 3 \times 10^5$  倍希釈により得られた。 $Z_{APO}$ 、および / または mAb の異なった組み合わせを用いて、測定されたアポリポプロテイン A - 1 の血清濃度は  $0.8 \sim 1.7 \text{ mg/mL}$  であった。

#### 【0052】

10

20

30

【表 3】

表3：Affibody<sup>(R)</sup> (Z<sub>APO</sub>) および/またはモノクローナル抗体 (mAb44<sub>APO</sub>およびmAb110<sub>APO</sub>) を基にした、ヒトアポリポroteinA-1 サンドイッチアッセイ系の比較

アッセイ系		アポリポroteinA-1 標準品の低い検出限界 <sup>a</sup>	アポリポroteinA-1の 血清濃度の測定値 <sup>b</sup>
コーティング	検出	ng/mL	mg/mL
mAb110 <sub>APO</sub>	mAb44 <sub>APO</sub> -b	0.062	0.8
mAb44 <sub>APO</sub>	mAb110 <sub>APO</sub> -b	2.0	1.3
Z <sub>APO</sub>	mAb110 <sub>APO</sub> -b	0.49	1.6
Z <sub>APO</sub>	mAb44 <sub>APO</sub> -b	0.49	1.7
Z <sub>APO</sub>	mAb44 <sub>APO</sub> -bおよび mAb110 <sub>APO</sub> -b	0.49	1.7

a) アポリポroteinA-1 標準品の連続する2倍希釈についてそれぞれの系で解析した。低い検出限界は、それぞれの系のバックスラウンドの2倍の吸収値を与える最も低い濃度として定義した。

b) 血清ブールを、それぞれの系の感度に従って設定した希釈率で解析し、アポリポroteinA-1濃度は、標準品との比較により定量した。血清アポリポroteinA-1濃度は、測定した濃度に希釈率をかけて算出した。

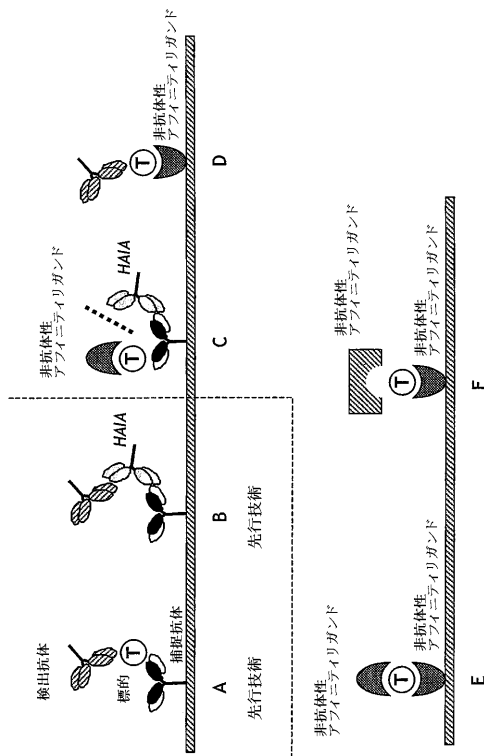
【図面の簡単な説明】

【0053】

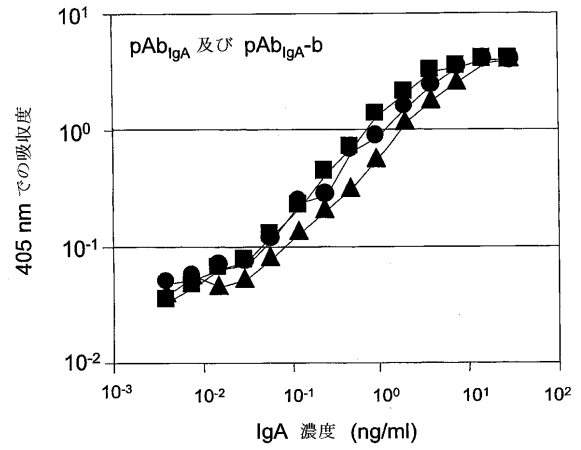
【図1】本発明と比較した先行技術、および本発明の異なる実施態様の図示的な説明。

- 【図 2 A】  $pAb_{IgA}$  および  $pAb_{IgA-b}$  の組み合わせ (公知方法による比較実験)。
- 【図 2 B】  $Z_{IgA}$  および  $pAb_{IgA-b}$  の組み合わせ (本発明)。
- 【図 2 C】  $pAb_{IgA}$  および  $Z_{IgA-b}$  の組み合わせ (逆の組み合わせ)。
- 【図 2 D】  $Z_{IgA}$  および  $Z_{IgA-b}$  の組み合わせ。
- 【図 3 A】 二つの抗体 (ヤギ  $pAb$ 、マウス  $mAb$  および / またはラット  $mAb$ ) の全ての組み合わせ (公知技術による)。
- 【図 3 B】 捕捉用抗体と検出用  $Affibody^{(R)}$  分子の組み合わせ、またはその逆の組み合わせ (本発明による)。
- 【図 4】  $Z_{Apo}$  および / または特異的  $mAb$  を用いた、アポリポプロテイン A - 1 のサンドイッチアッセイ系の比較。

【図 1】

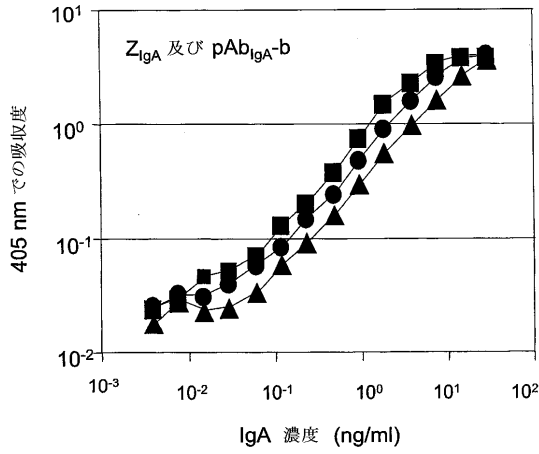


【図 2 A】

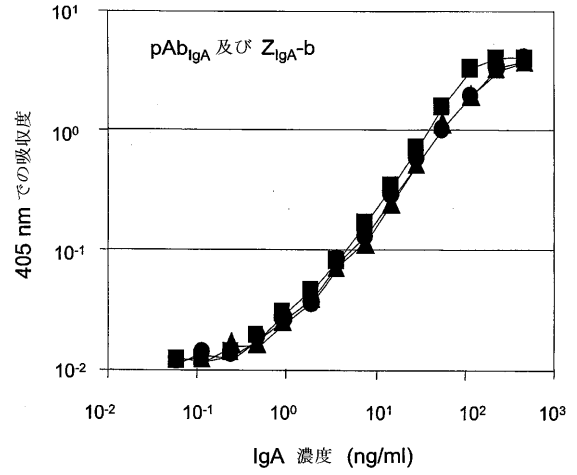


先行技術

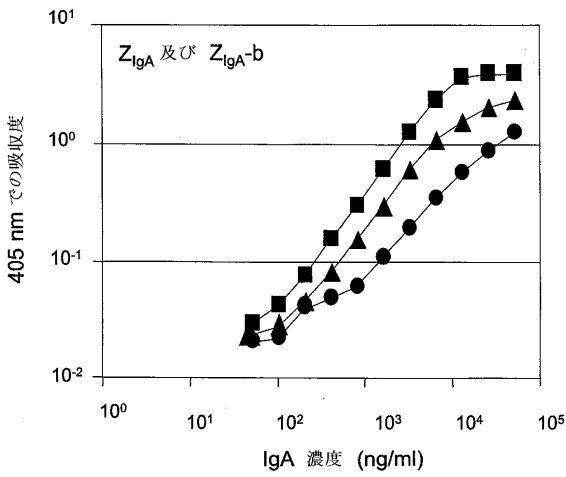
【 図 2 B 】



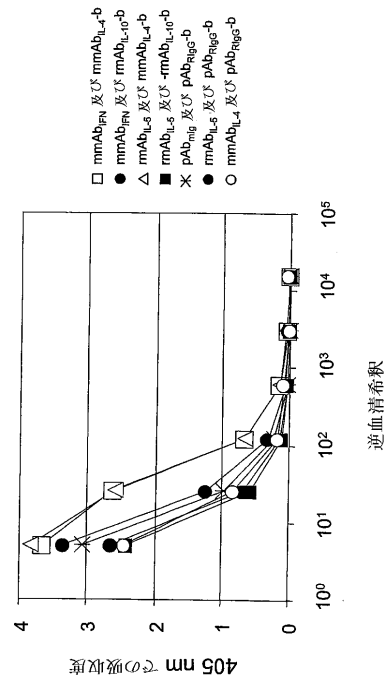
【 図 2 C 】



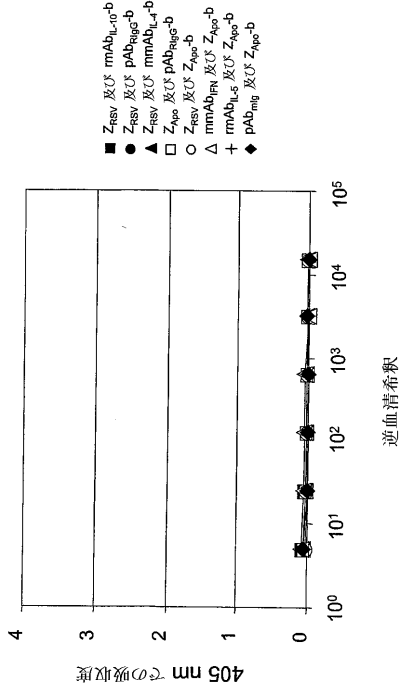
【 図 2 D 】



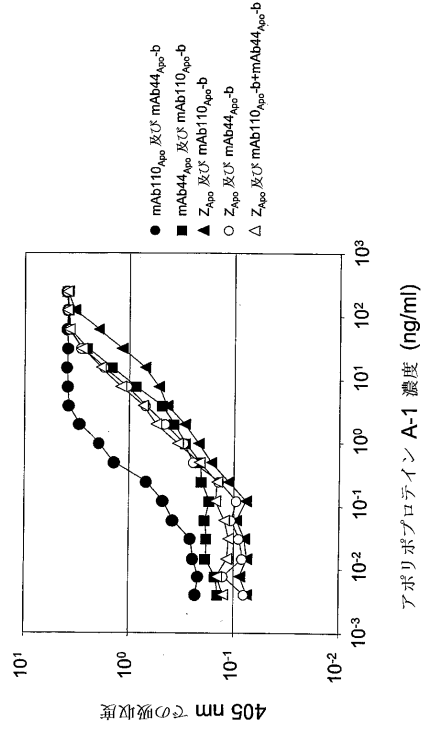
【 図 3 A 】



【 図 3 B 】



【 図 4 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE 03/00703

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: G01N 33/543, G01N 33/68 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)		
IPC7: G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
.SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-INTERNAL, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	National Library of Medicine (NLM), file Medline, Medline accession no. 88259064, Moyle WR et al: "Bioimmunoassay (BIA): a sandwich immunoassay scheme employing monoclonal antibodies and hormone receptors to quantify analytes"; & J Recept Res 1988;8(1-4):419-36 --	1-10,27-38
X	WO 0181924 A2 (BIOTRACES, INC.), 1 November 2001 (01.11.01), pages 42-43, claims 43-62, pages 11-12 --	1-38
X	Immunotechnology, Vol. 4, 1999, M. Hansson et al: "An in vitro selected binding protein (affibody) shows conformation-dependent recognition of the respiratory syncytial virus (RSV) G protein", page 237 - page 252, page 245, left column --	1-38
<input checked="" 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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
21 July 2003	22-07-2003	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Carl-Olof Gustafsson/EÖ Telephone No. +46 8 782 25 00	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 03/00703

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Nature Biotechnology, Vol. 15, August 1997, Karin Nord et al: "Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain", page 772 - page 777, see page 774 --	1-38
A	Applied and Environmental Microbiology, Vol. 65, no. 9, September 1999, Elin Gunneriusson et al: "Staphylococcal Surface Display of Immunoglobulin A (IgA)- and IgE-Specific In Vitro-Selected Binding Proteins (Affibodies) Based on Staphylococcus aureus Protein A", page 4134 - page 4140 --	1-38
X	US 5801064 A (MARK D. FORESMAN ET AL), 1 Sept 1998 (01.09.98), see the claims --	1-10,13, 27-38
A	WO 0063243 A1 (PHARMACIA & UPJOHN AB), 26 October 2000 (26.10.00)	1
X	example 8 --	35-38
A	US 6107045 A (EUGEN KOREN ET AL), 22 August 2000 (22.08.00), example 12 and 13 -- -----	1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

29/06/03

International application No.

PCT/SE 03/00703

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0181924 A2	01/11/01	AU 5558201 A	07/11/01
US 5801064 A	01/09/98	NONE	
WO 0063243 A1	26/10/00	AU 4162400 A AU 5664999 A EP 1179014 A JP 2002542259 T SE 9901379 D	02/11/00 14/03/00 13/02/02 10/12/02 00/00/00
US 6107045 A	22/08/00	AU 710945 B AU 3001595 A CA 2194163 A EP 0767914 A JP 10507514 T US 2002098597 A WO 9600903 A	30/09/99 25/01/96 11/01/96 16/04/97 21/07/98 25/07/02 11/01/96

---

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ベル - オーケ・ニューグレン

スウェーデン国 S - 1 7 8 4 0 エーケレー . シンゲルグレンド 3 6

【要約の続き】

への親和性を有し、そのリガンドへの存在が検出可能な、第二アフィニティリガンド；及び、第一アフィニティリガンドを固定化できる固体支持体；を含んでいる。このキットにおいて、第一及び第二アフィニティリガンドの少なくとも1つは、抗体以外のアフィニティリガンドである。

专利名称(译)	夹心测定和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005524087A</a>	公开(公告)日	2005-08-11
申请号	JP2004501937	申请日	2003-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	阿菲博迪公司		
申请(专利权)人(译)	亲和体 - 安倍晋三		
[标]发明人	ニクラス・アールボリイ ペル・オーケ・ニューグレン		
发明人	ニクラス・アールボリイ ペル・オーケ・ニューグレン		
IPC分类号	G01N33/566 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/537 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/54306 G01N33/56938 G01N33/56944		
FI分类号	G01N33/566 G01N33/531.Z G01N33/53.N		
优先权	0201306 2002-04-29 SE 60/375823 2002-04-29 US		
其他公开文献	JP4554356B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了用于检测包含复杂生物溶液的样品中靶分子的存在的双夹心测定法。该测定法包括提供对靶分子具有亲和力并能够与固体支持物结合的第一亲和配体;添加样品以便当样品中存在靶分子时允许与第一亲和配体结合;将样品添加到第二亲和配体的靶分子中,添加第二亲和配体以允许第二亲和配体与靶分子结合;并检测第二亲和配体的存在,其存在表明样品中存在靶分子。在检测之前的任何阶段将第一亲和配体固定在固体支持物上,并且第一和第二亲和配体中的至少一种是除抗体之外的亲和配体。本发明还提供了用于在本发明方法使用的试剂盒。的试剂盒;具有亲和性靶分子,所述第一亲和配体能够结合到固体载体上;具有亲和性靶分子,可检测存在于它的配体,该第二亲和配体;并且,能够固定所述第一亲和配体的固体支持物;包含。在所述试剂盒中,第一和第二亲和配体中的至少一个是除抗体以外的亲和配体。

