

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 523503

(P2003 - 523503A)

(43)公表日 平成15年8月5日(2003.8.5)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/531		G 0 1 N 33/531	Z 4 B 0 3 3
C 1 2 N 11/02		C 1 2 N 11/02	
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D
			M
	33/566	33/566	
		審査請求 未請求 予備審査請求 (全 35数)	

(21)出願番号 特願2001 - 552089(P2001 - 552089)

(86)(22)出願日 平成13年1月12日(2001.1.12)

(85)翻訳文提出日 平成14年7月12日(2002.7.12)

(86)国際出願番号 PCT/FR01/00095

(87)国際公開番号 W001/051927

(87)国際公開日 平成13年7月19日(2001.7.19)

(31)優先権主張番号 00/00376

(32)優先日 平成12年1月13日(2000.1.13)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 ビオ - ラド・パストゥール
B I O - R A D P A S T E U R
フランス92430マルヌ・ラ・コケット、ブールヴァール・レイモン・ボワンカレ3番

(72)発明者 ファビアンヌ ババン
フランス国 エフ - 78180 モンティグニール ブルトンヌー, ルー ド ラ グルヌイレット 22

(72)発明者 ローランス アモン
フランス国 エフ - 75017 パリ, パサージュ ジュフロワ ディドロ 14

(74)代理人 弁理士 安富 康男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 疎水性固相に親和性試薬を固定する方法

(57)【要約】

カルボキシル基で官能化した疎水性固相に親和性試薬を固定する方法であって、上記方法が、上記固相を活性化する段階および上記固相に親和性試薬を結合させる段階を含んで成り、上記固相を活性化する段階が、補助活性剤の存在下に、酸性媒体中で、カルボジイミドとホスフェート緩衝剤との組合せを使用すること、および結合段階が塩基性媒体中で行われること、を特徴とする方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カルボキシル基で官能化した疎水性固相に親和性試薬を固定する方法であって、前記方法が、前記固相を活性化する段階および前記固相に親和性試薬を結合させる段階を含んで成り、前記固相を活性化する段階が、補助活性剤の存在下に、酸性媒体中で、カルボジイミドとホスフェート緩衝剤との組合せを使用すること、および結合段階が塩基性媒体中で行われること、を特徴とする方法。

【請求項2】 使用されるカルボジイミドが、CMC(N-シクロヘキシル-N'- (2-モルホリノエチル)カルボジイミドメチル-p-トルエンスルホネート)およびEDC(1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド)から成る群から選択される化合物であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 使用される補助活性剤が、s-NHS(スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド)、HOBt(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)およびN-ヒドロキシスクシンイミドから成る群から選択される化合物であることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 使用されるカルボジイミドが、CMC(N-シクロヘキシル-N'- (2-モルホリノエチル)カルボジイミドメチル-p-トルエンスルホネート)であり、使用される補助活性剤が、s-NHS(スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド)であることを特徴とする請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 カルボジイミドが、COOH基につき20~50モル当量の量で使用されることを特徴とする請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 補助活性剤が、COOH基につき3~10モル当量の量で使用されることを特徴とする請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 固相を活性化する段階が、約4~約6.5のpHを有する酸性媒体中で、COOH基につき3~10モル当量のスルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド補助活性剤の存在下に、30~200mMのホスフェート緩衝剤中の、COOH基につき20~50モル当量のCMCの組合せを使用し、結合が約7.2

～約10.5のpHを有する塩基性媒体中で行われることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 固相を活性化する段階が、pH6において、COOH基につき5モル当量のスルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド補助活性剤の存在下に、50mMのKH₂PO₄ホスフェート緩衝剤中の、COOH基につき30モル当量のCMCの組合せを使用し、結合がpH8.5の緩衝剤50%を含有する媒体中で行われることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 親和性試薬が、アミン基を含有するか、またはアミン基を人為的に付与しうることを特徴とする請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】 親和性試薬が、タンパク質、ペプチド、免疫グロブリン、抗原、ハプテン、抗体、酵素、酵素基質、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドから成る群から選択されることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項11】 請求項1～10のいずれか1項に記載の方法によって得られる反応性固体複合体。

【請求項12】 固相/抗原複合体、固相/タンパク質複合体、固相/ペプチド複合体、固相/ハプテン複合体、固相/抗体複合体、固相/免疫グロブリン複合体、固相/オリゴヌクレオチド複合体、固相/ポリヌクレオチド複合体、固相/酵素複合体および固相/酵素基質複合体等から成る群から選択される請求項9に記載の反応性固体複合体。

【請求項13】 イムノアッセイキット、交雑キットおよび酵素アッセイキットにおける、請求項11または12に記載の複合体の使用。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、アナライト検出のためのバイオアッセイに使用しうる疎水性固相に親和性試薬を固定する方法、この方法によって得られる反応性複合体、およびバイオアッセイキットにおける前述の複合体の使用に関する。

【0002】**(背景技術)**

相互親和性を有する試薬を使用する生物学的分析アッセイは、長年にわたって知られている。前述の試薬は、以下に「親和性試薬」または「親和性対試薬」と称する。従って、親和性対の一方を、他方を使用することによって探し、検出する方法が知られている。親和性試薬間の親和性反応を利用するバイオアッセイ、または「アフィニティアッセイ」は、例えば酵素およびその基質を使用する酵素分析、BersonおよびYalow(1959)の先駆的研究によって開始され、抗体と、対応する抗原またはハプテンとの反応を含む定性または定量イムノアッセイ、最近では、標的オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと、それと特異的に交雑しうる相補的ヌクレオチドブローブを使用する核酸交雑アッセイを包含する。

【0003】

1960年代以来、得られた遊離複合体と結合複合体との分離を必要とするアフィニティアッセイにおいて、この分離工程を単純化するために、反応性固相(または固体支持体)を使用しようとする努力がなされている。

親和性試薬は、例えばグルタルアルデヒドの補助によって、共有結合によって固相に固定することができる。1967年のCattおよびTregearの研究以来、簡単な受動吸着によって固相に親和性試薬を固定することも知られている。

受動吸着による固定は簡単であるという長所を有するが、不適切に固定された試薬を液体媒体に放出する。

【0004】

固相共有結合は一般に、より高い安定性を有する最終試薬を生成するという長所を有するだけでなく、より高い親和性の試薬を固体支持体に固定させることもできる。現在使用しうる多くの固相共有結合の方法および薬剤が存在する：言及されうる非制限的な例は、例えば、DMAP（ジメチルアミノピリジン）、HOBt（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール）、N-ヒドロスクシンイミドまたはs-NHS（スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド）といった補助活性剤の存在または非存在下での、グルタルアルデヒド、臭化シアンおよびカルボジイミドとの結合であり、これらは当業者によく知られている。

【0005】

共有結合によって固相に親和性試薬を固定する種々のプロトコルは、1、2または3段階で行われる。1段階結合においては、全ての成分を相互に接触させる。2段階結合は一般に、固体支持体をいわゆる「活性剤」によって活性化し、次に、洗浄して過剰の未反応活性剤を除去し、最後に親和性触媒に接触させる第一段階を含み、第二段階において実際の結合を実施する。

【0006】

多くの固相または固体支持体が知られており、使用されている：親水性固相（例えば、Pharmaciaによって市販されているSephadex（登録商標））および疎水性固相（例えば、ポリプロピレン、ポリスチレン、ラテックス等）。後者は一般に、例えば、アミン、カルボキシル、トシル、アルデヒド、ヒドロキシル、チオール、クロロメチル、ヒドラジドおよびその他の基といった予めグラフトされた官能基を介する反応を提供する。

【0007】

カルボキシル基によって官能化された疎水性固相に親和性試薬を共有結合させる種々の方法が提示されている：MES（2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸）とカルボジイミドの組合せのような、緩衝剤と活性剤の種々の組合せを使用する。言及されうる例は、D. Bastos-Gonzalezら、J. of Colloid and Interface Science, 176, 232-239 (1995)、またはC. Bieniarzら、Bioconjugate Chem., 1996, 7, 88-95に記載されている、MESおよ

びEDC(1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド)の存在下における抗体とカルボンキシル化合物ラテックスとの共有結合である。

【0008】

しかし、ホスフェート緩衝剤とカルボジイミド(活性剤として)の組合せは、カルボジイミドがホスフェートも活性化し、従って、それらの活性の大部分を失うという短所を有する故に、避けるべきであることが以前から知られている。これは、同時に、不十分な有効性の共有結合、高い割合の受動吸着、および、その結果として得られた生成物の不安定性を生じる(Wong, S、「Chemistry of protein conjugation and crosslinking」、第6章、p.196(1991)、およびM.A.Gillesら、Analytical Biochemistry, 184, 244-248(1990))。

【0009】

Bangs(Bangs Laboratories Inc., Tech. Note # 13c, Covalent coupling protocols, p.3)は、水性溶液中でカルボジイミドEDCの補助とともにカルボキシル基によって官能化された疎水性固相を活性化するプロトコルを提示しているが、得られる結果は、結合有効性の見地から、決して満足できるものではない。実際に、結合は量的ではなく、共有結合と比較して受動吸着の割合が高い(下記実施例1参照)。

【0010】

一般に、カルボキシル基によって官能化された疎水性固相に親和性試薬を固定するために共有結合を使用する全ての先行技術法において、親和性試薬と固相との実際の共有結合は、前述の固相への前述の親和性試薬の受動吸着によるかなりの程度の固定が共存するという好ましくない観察がなされる。言い換えれば、これらの方法は、所望される最大程度の共有結合を得ることができないという短所を有する。受動吸着は、共有結合に有利になるように調節することができないので、これらの方法は、親和性試薬の共有結合固定を最適化することができないか、または再現性のある共有結合を得ることができない。従って、それらは、時間の

経過とともに不安定な生成物を生じる。

従って、結合の共有結合性を再現可能に調節し、最適化し、それと共に、同時受動吸着の可能性を最小限にする、カルボキシル基によって官能化された疎水性固相に親和性試薬を固定する方法が求められている。

【0011】

驚くことに、活性剤としてのカルボジイミドとホスフェート緩衝剤との組合せの補助によって、カルボキシル基で官能化された疎水性固相に親和性試薬を固定する反応の共有結合性を再現可能に調節し、最適化しうることが見いだされた。

従って、本発明は、カルボキシル基によって官能化された疎水性固相に親和性試薬を固定する方法に関し、前述の方法が、前述の固相を活性化する段階および固相に親和性試薬を結合させる段階を含んで成り、前述の固相を活性化する段階が、補助活性剤の存在下において、酸性媒体中でカルボジイミドとホスフェート緩衝剤との組合せを使用し、親和性試薬の結合の段階が塩基性媒体中で行われることを特徴とする。

【0012】

この分野において、およびペプチド合成の分野において、カルボキシル基活性剤として使用されるあらゆるカルボジイミドを、本発明の目的に使用することができる。

カルボジイミドの例は、特に、Lundblad, R. L.ら、Chemical Reagents for Protein Modification、第2巻、第4章、CRC Press; Boca Raton, F. L.およびMarion Mikolajczykら、Tetrahedron、第37巻、p. 233 - 284 (1981)に記載されている。

【0013】

本発明の活性剤として使用することができるカルボジイミドの例として特にCMC(N-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメチル-p-トルエンスルホネート)およびEDC(1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド)を挙げることができ、CMCが特に好ましい。

【0014】

カルボジイミドは、COOH基に対して過剰で使用しなければならない。使用される量は、COOH基につき20～50モル当量であるのが好ましい。

「ホスフェート緩衝剤」は、本発明において、一般に30～200mMの濃度で使用される通常のホスフェート緩衝剤（ナトリウムおよび/またはカリウム）を意味すると理解されるものとし、50mMのホスフェート緩衝剤が特に好ましい。

【0015】

この分野で使用されるあらゆる補助活性剤を使用することができる。補助活性剤の例は、特に、Staros, J. V., Biochemistry, 21, 3950-3955 (1982); O'Sullivan, M. J.ら、Anal. Biochem., 100, 100-108 (1979); Abdella, P. M.ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 87, 734-742 (1979)に記載されている。

【0016】

本発明によって使用しうる補助活性剤のうち、特にs-NHS（スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド）、HOBt（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール）およびN-ヒドロキシスクシンイミドが使用され、s-NHS（スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド）が特に好ましい。

カルボジイミドと同様に、補助活性剤は、COOH基に対して過剰で使用しなければならない。使用される量は、COOH基につき3～10モル当量であるのが好ましい。

【0017】

本発明の方法の活性化段階における「酸性媒体」は、約4～約6.5のpHを有する媒体を意味すると理解されるものとし、pH6が特に好ましく、前述の媒体の酸性性質はホスフェート緩衝剤によって付与される。

本発明の方法の結合段階における「塩基性媒体」は、約7.2～約10.5のpHを有する媒体を意味すると理解されるものとし、pH8.5の緩衝剤50%を含有する媒体が特に好ましい。

【0018】

媒体の塩基性性質は、適切な一般的な緩衝剤、例えば、ボレート緩衝剤またはホスフェート緩衝剤/ボレート緩衝剤混合物を使用することによって得られる。

従って、本発明の好ましい実施形態において、固相の活性化段階は、約4～約6.5のpHを有する酸性媒体中で、COOH基につき3～10モル当量のスルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド補助活性剤の存在下に、30～200mMのホスフェート緩衝剤中の、COOH基につき20～50モル当量のCMCの組合せを使用し、結合は約7.2～約10.5のpHを有する塩基性媒体中で行う。

【0019】

本発明の特に好ましい実施形態において、固相の活性化段階は、pH6で、COOH基につき5モル当量のスルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド補助活性剤の存在下において、50mMのKH₂PO₄ホスフェート緩衝剤中において、COOH基につき30モル当量のCMCの組合せを使用し、結合はpH8.5のボレート緩衝剤50%を含有する媒体中で行う。

上述の結合条件に関連する活性化パラメーター(カルボジイミド、ホスフェート緩衝剤、補助活性剤および酸性pH)の適切な組合せは、本発明の方法の実施に重要である。

【0020】

本発明によって固定しうる親和性試薬は、アミン基を有するか、または人為的にアミン基を付与しうる化合物である。言及されうるそのような親和性試薬の例は、タンパク質、ペプチド、免疫グロブリン、抗原、ハプテン、抗体、酵素、酵素基質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド等、ならびに当業者に知られている他の生物試薬である。

「疎水性固相」は、本発明の開示において、当分野で一般に使用される疎水性ポリマー、例えば、ポリプロピレンおよびポリスチレンのようなビニル芳香族ポリマー、特にこれらのポリマーのラテックスから成る固相を意味すると理解されるものとする。これらの固相は、当業者によく知られている方法を使用してカルボキシル基によって官能化される。これに関して、例えば、Ottewill R. H.ら、Kolloid Zu Z. Polymere, 215, 161-1

66(1967)の論文を参照することができる。

【0021】

本発明に使用しうる、カルボキシル基で官能化された疎水性固相の例は、ラテックス粒子、例えば、Estapor(登録商標)(Prolabo、フランス)の商品名で知られているラテックス粒子、DynalからのDynabeads(登録商標)磁性粒子、Polysciences, Inc.からのPolybead(登録商標)微小球、およびそれらの相当物等である。

【0022】

本発明はさらに、本発明の方法によって得られる反応性固体複合体、例えば、イムノアッセイに使用しうる固相/抗原複合体、固相/ハプテン複合体、固相/抗体複合体等、核酸交雑アッセイ、増幅アッセイ等に使用しうる固相/オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド複合体、固相/酵素複合体または固相/酵素基質複合体等にも関する。

【0023】

本発明はさらに、バイオアッセイ用のキットにおけるこれらの複合体の使用にも関し、非制限的な例は、当業者に知られている定性的または定量的なイムノアッセイ、核酸交雑アッセイ、核酸増幅アッセイ、酵素アッセイ等である。

例示するものにすぎず、どのような方法においても本発明の範囲を限定するものではないと理解すべき下記の実施例によって、本発明がより明確に理解される。

【0024】

(実施例)

実施例1

カルボキシルビーズへのペプチドの結合

a) 試薬

a1) カルボキシルビーズ

フランスのProlaboによって製造された磁性カルボンキシルラテックスビーズ(参考Estapor M1-070/60)を、カルボキシル基を有する疎水性固相として使用した。それらは、COOH基によって官能化されたポリスチレンおよび酸化鉄の多分散粒子から成る。使用される固相は、下記の特徴を有

する：平均径(0.8 μm)、鉄のパーセント(62%)、官能化度(150 μeq COOH/g)。それは0.1 g/mLの水性懸濁液の形態である。

全てのビーズ洗浄工程は下記のように行われる：

各実験において、試験管に存在する磁性ビーズを、磁化支持体を使用して溶液から分離する。上澄みをピペットで除去し、磁性ビーズを、磁化支持体によって各試験管に保持する。新しい溶液または新しい緩衝剤の各添加後に、ビーズを、約10秒間かき混ぜることによって再懸濁させる。

洗浄は、洗浄溶液の添加、ビーズの再懸濁、および磁化によるこの溶液の除去を含んで成る。

【0025】

a 2) ペプチド

下記配列を有する17個のアミノ酸のペプチドを、この実施例において使用した：
KGSYSVDHFRWGRPVSG-NH₂。

このペプチドは、E. AthertonおよびR. L. Sheppard、「Solid phase peptide synthesis, a practical approach」、IRL PRESS(1989)、Oxford University Press、pp. 25-34に記載されている方法によって製造した。

使用したホスフェート緩衝液は、pH6のKH₂PO₄50mM水溶液であった。

全ての操作を、室温、即ち19~24で行った。

【0026】

b) カルボキシルビーズへのペプチドの固定

b 1) カルボキシルビーズへのペプチドの共有結合

ステップ1：カルボキシルビーズの洗浄

試験管中の50 μLの磁性カルボキシルラテックスビーズを、pH9の0.1 mM、NaOH750 μLで2回、二重蒸留水750 μLで1回、最後にホスフェート緩衝液750 μLで1回、洗浄する。

ステップ2：カルボキシルビーズの活性化

250 μ L のホスフェート緩衝液、200 μ L (30 eq / COOH基) のCMC (N - シクロヘキシル - N' - (2 - モルホリノエチル) カルボジイミドメチル - p - トルエンスルホネート) (Fluka) の水溶液、および50 μ L (5 eq / COOH) のs - NHS (スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミド) (Pierce) の水溶液を、ステップ1で得た洗浄ビーズの残留物に添加する。

反応混合物を、振とうしながら室温で1時間インキュベーションする。次に、ビーズを500 μ L のホスフェート緩衝液で洗浄する。

ステップ3 : ビーズへのペプチドの結合

0.25 eq (COOH基に基づく) のセクションa2) に記載したペプチドを含有する、250 μ L のホスフェート緩衝液、およびpH 8.5の250 μ L の37.5 mMボレート / 50 mM NaCl 緩衝液を、ステップ2で得た活性化ビーズの残留物に添加する。

反応混合物を、振とうしながら室温で1時間インキュベーションする。ビーズを磁化によって分離し、上澄みをHPLCによる測定(下記セクションc) 参照) のために保持する。洗浄後、ビーズをpH 7.4のPBSか、または他の好適な同等の緩衝液中に維持する。

【0027】

b2) カルボキシルビーズへのペプチドの受動吸着

「受動」型の結合(「受動吸着」とも呼ばれる)を活性剤およびカップリング剤、CMCおよびs - NHSを除いた上記と全く同じ試薬を使用して行う。「受動」型の結合後、ビーズを磁化によって分離し、上澄みをHPLCによる測定(セクションc) 参照) のために保持する。

【0028】

c) HPLCによる共有結合収率の計算および受動結合の測定

結合の後、無極性固定相(C18)および極性移動相(勾配: アセトニトリル / 0.08% TFA水溶液 ~ 0.1% TFA)を有する装置(例えば、Waters)での逆相高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)を行う。

各結合(共有または受動)の終了時に、セクションb1)またはb2)で得た30 μ Lの上澄みをHPLC装置に入れる。

【0029】

同量の「対照溶液」（即ち、結合に使用したのと同じであるが、磁性ビーズに結合していないペプチド溶液（pH 8.5の250 μL、37.5 mMボレート/50 mM NaCl緩衝液、および250 μLのホスフェート緩衝液中））もHPLC装置に入れる。

分で表される時間Tの関数としての、214 nmでの吸収を測定することによって得たHPLCクロマトグラムを、図1～3に示す。図1のクロマトグラムは、T₀における対照溶液（磁性ビーズに結合していないアッセイ）を使用して得たピークを示し、前述の溶液は、導入された全量のペプチドを示すことによって基準となる。

【0030】

図2のクロマトグラムは、セクションb1)に記載した共有結合の終了時にT₀で採取した上澄みを使用して得たピークを示す。

図3のクロマトグラムは、セクションb2)に記載した受動結合の終了時にT₀で採取した上澄みを使用して得たピークを示す。

【0031】

各クロマトグラムについて、ピーク領域をソフトウェアプログラム（例えば、Millenniumソフトウェア）によって集約する。これは、対照溶液に関する領域A0、共有結合に関する領域A1、および「受動型」結合に関する領域A2を測定する。

従って、結合収率は、下記式を使用して、当業者に既知の逆測定（back determination）によって求められる：

$$\% \text{共有結合} = [(A0 - A1) / A0] \times 100$$

$$\% \text{「受動型」結合} = [(A0 - A2) / A0] \times 100$$

【0032】

d) 本発明の結合と先行技術の結合との比較

この試験は、先行技術の3つのプロトコルおよび本発明のプロトコルで行った。カップリング剤および活性剤を使用しない「受動」条件下の結合は、全プロトコルについて平行して行った。共有結合および受動結合の収率を、c)に記載した

方法で求めた。

【0033】

先行技術のプロトコル：

- 「Bangs」プロトコル、Bangs Laboratories Inc . , Tech , note # 13 c、Covalent coupling protocols , p . 3。

【0034】

ビーズを予備賦活緩衝液 (pH 4 . 5 の 5 0 m M ホスフェート緩衝液) で洗浄し、次に、少ないパーセント (2 0 %) の予備賦活緩衝液の存在下に E D C の水溶液で活性化した。結合を、pH 8 . 5 の 0 . 2 M ボレート緩衝液中で行った。結合後、未反応カルボキシル基をエタノールアミン溶液でブロックした。ビーズを、BSA、グリシン、Tween (登録商標) 洗浄剤およびアジ化ナトリウムを含有する緩衝液中に維持した。

【0035】

- J . Sackrisson プロトコル、ラテックス粒子への共有結合および微小球を使用する診断開発、ラテックスコース、1997。

pH 8 . 5 の 1 0 m M ボレート緩衝液、pH 5 . 0 の 1 0 m M 酢酸ナトリウム溶液、および pH 1 0 . 2 の 5 0 m M ジエタノールアミン溶液を使用してビーズを数回洗浄し、次に、pH 1 0 . 2 の 5 0 m M ジエタノールアミン緩衝液中の C M C の溶液で活性化した。カップリングを、pH 7 . 4 の 1 0 0 m M ホスフェート / 1 5 0 m M N a C l 緩衝液中で行った。

【0036】

- D . Bastos - Gonzalez 氏、J . of Colloid and Interface Science , 176 , 232 - 239 , 1995 に記載のプロトコル 1。

ラテックスビーズを pH 5 . 6 の緩衝液 (M E S) に添加した。カップリングを、弱酸性媒体 (pH 5 . 6 の M E S 緩衝液) 中に行った。E D C の水溶液を添加し、次に、試料を室温でインキュベーションした。結合後、過剰のカルボキシル基を、エタノールアミンで処理することによってブロックした。

HPLC測定によって得た結果を、表Iにおいて、結合収率(%)、および共有結合と受動結合の差()で示す。

【0037】

【表1】

表 I

プロトコル	受動結合 ペプチドの%	共有結合 ペプチドの%	Δ (共有-受動)
Bangs	47	57	10
ラテックスコース (J. Sackrison)	80	82	2
プロトコル 1 (D. Bastos-Gonzalez et al.)	8	13	5
本発明のプロトコル	54	100	46

【0038】

先行技術のプロトコルを使用して得た結果と比較して、本発明の結合プロトコルを使用した場合に最良の性能特性が得られる：したがって、本発明の結合プロトコルを使用した場合、共有結合収率は量的(100%)であり、共有結合と受動結合の差は、2つの形態の結合の差が相対的に小さい先行技術のプロトコルと比較して、かなり大きい。

【0039】

e) 本発明の結合法の再現性

本発明の結合法の再現性を、一方で、全く同一のバッチのビーズへの3つの結合を行い、他方で、異なるバッチのビーズへの結合を行うことによって試験した。セクションb1)(上記)に記載したプロトコルによる共有結合、およびセクションb2)(上記)に記載したプロトコルによる「受動」型結合を、各実験において平行して行った。結合収率の計算、および受動結合の測定は、上記プロトコルc)によって行った。

HPLC測定によって得た結果を、表IIに、結合収率(%)、および共有結合と受動結合の差()で示す。

【0040】

【表2】

表 II

ビーズのバッチ	受動結合 ペプチドの%	共有結合 ペプチドの%	Δ (共有－受動)
477	52	98	46
477	54	100	46
477	58	100	42
583	56	93	37

【0041】

これらの結果は、全く同一のバッチ（バッチ477）を使用した場合に再現性が優れていることを示す。異なるバッチ（バッチ583）を使用した場合、結合収率は完全に許容されるものであり、第一バッチで得た収率に比較しうるものである。

【0042】

実施例2

a) 磁性カルボキシルビーズへのウシ血清アルブミン(BSA)の結合

175 μgのBSA(Pantex)を、実施例1のセクションb1)に記載した条件下に結合させる。実際の結合反応は、室温において22時間(1時間の代わりに)行う。

受動吸着は、同じ条件であるが、カップリング剤、CMC、および補助活性剤s-NHSを使用せずに行う。結合後、ビーズを磁化によって分離し、上澄みはHPLCによる測定のために保持する。

【0043】

b) 本発明のBSA結合と先行技術の結合との比較

本発明のプロトコルを、先行技術の2つのプロトコル、即ち、「Bangs」プロトコルおよび「ラテックスコース」プロトコル(J. Sackrison)と比較した。

3つのプロトコルを使用した共有結合および受動吸着の収率を、実施例1のセクションc)に記載した方法で求めた。

HPLC測定によって得た結果を、表IIIにおいて、結合収率(%）、および

共有結合と受動吸着との差()で示す。

【0044】

【表3】

表 III

プロトコル	受動結合 BSAの%	共有結合 BSAの%	Δ (共有-受動)
Bangs	13	17	4
ラテックスコース (J. Sackrison)	31	34	3
本発明のプロトコル	25	65	40

【0045】

結果は、本発明のプロトコルがより高い結合(共有-受動)を与える故に、先行技術のプロトコルと比較してより優れていることを示す。

【0046】

実施例3

抗HIV抗体の検出のための診断試験への適用

下記に示すように、磁性ビーズに固定した捕獲抗原と酵素で標識した抗原の間に抗HIV-2特異性抗体を挟む既知のELISA試験、即ち、Bio-Rad Laboratories, Marnes la Coquette, フランスからカタログ番号34020で入手可能なAccess(登録商標)HIV 1-2 New試験において、本発明の方法によって得たビーズを抗HIV抗体の検出に使用した。信号の暴露および測定は、化学発光酵素基質を添加し、生じた発光を読み取ることによって行う。

【0047】

a) 材料および方法

a1) 捕獲抗原(ペプチド)

必須免疫優性エピトープ(essential immunodominant epitope)を含有する27AAのペプチド、即ち、HIV-2のgp36のヘプタペプチドCAFRQVCを、上述のE. AthertonおよびR. L. Sheppardの方法によって合成し、次に、ホモ二官能価試薬ビス(ス

ルホスクシニミル) スベレートの補助によって、共有結合によってBSAに結合させた。得られたBSA/HIV-2ペプチド結合体を以下に「BSA/HIV-2」と称する。

【0048】

a2) 捕獲抗原の固定

次に、上記BSA/HIV-2結合体を、本発明の共有結合プロトコルおよび先行技術のプロトコルによって、磁性カルボキシルラテックスビーズ(Estapor)に結合させた。

・12 μ gのBSA/HIV-2結合体を、実施例1b)に記載した方法によって100 μ Lのビーズに結合させた。

・12 μ gのBSA/HIV-2結合体を、先行技術の方法(Bastos-Gonzalezのプロトコル1、実施例1d)参照)によって100 μ Lのビーズに結合させた。

BSA/HIV-2ペプチドを有する得られた磁性ビーズを以下に「BSA/HIV-2ビーズ」と称する。

【0049】

a3) 暴露抗原

上記a1)で使用したのと同じ、必須免疫優性エピトープを含有する27AAのペプチド、即ち、HIV-2のgp36のヘプタペプチドCAFRQVCを、ホモ二官能価試薬ビス(スルホスクシニミル)スベレートの補助によって、共有結合によってBiozymeからのアルカリ性ホスファターゼ(以下に「ALP」と称する)に結合させた。得られたHIV-2ペプチド/ALP結合体を以下に「ペプチド/ALP」と称する。

【0050】

a4) 信号の検出

アルカリ性ホスファターゼに特異的なジオキセタンに基づく基質を使用して暴露を得る。信号は、フランスのBio-Rad Laboratoriesから入手可能なAccess(登録商標)光度計で読み取る。信号は、RLU(相対発光単位)で表される。

【0051】

a 5) 試料

陰性ヒト血清で希釈した抗HIV-2抗体に陽性のヒト血清(qc1、qc2、qc3)、および抗HIV抗体に陰性の血清(C0)を使用して、アッセイを行った。

【0052】

b) アッセイプロトコル

2つの系列を、平行して行った。

b1) 50 μ Lの血清を、本発明の共有結合プロトコルによって得た50 μ gのBSA/HIV-2ビーズ、および350 μ Lのペプチド/ALP結合体に接触させた。混合物を37 で20分間インキュベーションし、次に、ビーズを磁化によって分離し、上澄みを除去した。

200 μ Lの基質を添加し、37 で5分間インキュベーションした。

示度を取り、RLUを記録した。結果を、「信号/C0」RLU比率として表す(表IV参照)。

【0053】

b2) 50 μ Lの血清を、Bastos-Gonzalezのプロトコル1によって得た50 μ gのBSA/HIV-2ビーズ、および350 μ Lのペプチド/ALP結合体に接触させた。

プロトコルの残りは、上記の手順b1)と同じである。

【0054】

c) 結果および先行技術との比較

本発明の結合によって得た結果、およびプロトコル1の結合によって得た結果を、表IVに示す。

【0055】

【表4】

表 IV

被験血清	プロトコル 1		本発明のプロトコル	
	RLU	信号/C0	RLU	信号/C0
C0	15,205	0.98	10,767	1.00
	15,741	1.02	10,771	1.00
平均値	15,473		10,769	
qc1	171,048	11.05	1,894,150	175.89
	168,968	10.92	1,904,600	176.86
qc2	15,517	1.00	181,888	16.89
	15,444	1.00	183,826	17.07
qc3	12,731	0.82	80,437	7.47
	12,591	0.81	80,462	7.47

【0056】

結果は、陽性試料に関して、本発明のプロトコルによって得た「信号/C0」比率は、先行技術のプロトコル1によって得た比率より顕著に高いことを示している。これは、かなり高い免疫反応性および高い分析感度(analytical sensitivity)を意味し、本発明の結合法は、プロトコル1と比較して最適な共有結合を付与することを極めて明確に示している。

【0057】

実施例4

本発明のBSA/HIV-2結合体で被覆した磁性カルボキシルラテックスビーズ(BSA/HIV-2ビーズ)における安定性試験

長期安定性試験(+4において7ヶ月、12ヶ月、および18ヶ月)を、実施例3のプロトコルを使用して、BSA/HIV-2ビーズ(実施例3において初期バッチ477のビーズから得たバッチC7P184A、上記参照)に関して行った。表Vは得られた結果を要約するものであり、バッチは、+4で18ヶ月において免疫反応性を有意に失わなかったことを示している。下記表Vに示す結果において、「信号/C0」という表現は、表示のために省略形「S/C0」で置き換えられている。

【0058】

【表5】

表 V

被験血清	T0		T = 7ヶ月		T = 12ヶ月		T = 18ヶ月	
	RLU	S/C0	RLU	S/C0	RLU	S/C0	RLU	S/C0
C0	12,144 11,866		13,962 13,692		12,898 13,855 13,586		12,768 12,773	
平均値	12,005	1.00	13,827	1.00	13,446	1.00	12,771	1.00
qc2	139,029 141,796		184,633 185,985		170,026 173,015 173,033		182,311 182,952	
平均値	140,413	12	185,309	13	172,025	13	182,632	14
qc1	1,732,230 1,799,880		2,166,040 2,142,940		2,159,050 2,279,010 2,102,220		2,076,950 2,127,930	
平均値	1,766,055	147	2,154,490	156	2,180,093	162	2,102,440	165

【0059】

本発明の方法は、経時において高安定性を有する親和性試薬（カルボキシル基によって官能化された疎水性固相に固定されている）の複合体を生じることをこれらの結果は明確に示している。

【0060】

実施例 5

磁性カルボキシルラテックスビーズへの核酸の共有結合

a) 材料および方法

5 × SSC および 2 × SSC 緩衝剤を、Maniatis T.ら、Molecular Cloning、A laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory, New York (1982) に記載されている方法によって調製する。

5'位においてアミン基で官能化されたプローブ(DNA)は、Perkin Elmerからの市販試薬アミノリンク2を使用して自動合成装置によって得られ、これを以下に5'-NH₂プローブと称する。

【0061】

使用されるアナライトはRNAまたはDNAである。プローブ結合の性能特性を、BeckmanからのAccess（登録商標）装置で、サンドイッチ交雑フ

フォーマットにおいて評価した。

アナライト特異的DNAプローブを、下記b)に記載されるプロトコルによって、磁性粒子に結合させる。それは、アナライトを捕獲する働きをする(捕獲プローブ)。

暴露は、標識されたアナライト特異的検出プローブ(第一プローブと異なる)の補助によって、例えば酵素アルカリ性ホスファターゼを使用して、当業者に既知の方法で行う。

【0062】

プローブの非放射能標識の例は、フランス特許第78.10975号、M.S. Urdeaら、Nucleic Acids Symp. Ser., 24, 1991, 197-200、またはR. Sanchez-Pescador, J. Clin. Microbiol., 26, 1988, 1934-1938に記載されている。

磁性カルボキシルラテックスビーズへの核酸の共有結合の収率は、実施例1のように、HPLCによって、核酸に適合させた条件、例えば、固定相(C18)および移動相(緩衝剤Aの勾配: 10^{-2} M トリエチルアンモニウムアセテート、および緩衝剤B: アセトニトリル/A: 95/5)において、測定される。

【0063】

b) 磁性カルボキシルラテックスビーズへの5'-NH₂プローブの共有結合
20 μgの5'-NH₂プローブ(即ち、5'位にNH₂基を有するプローブ)を、実施例b1)と同じ条件において、200 μLのEstapor M1-070/60磁性カルボキシルラテックスビーズに結合させる。

次に、ビーズを、500 μLの5×SSC緩衝液で2回および500 μLの2×SSC緩衝液で2回洗浄する。それらを、0.02%のNaN₃を含有する2×SSC緩衝液中に維持する。

【0064】

交雑アッセイ: 捕獲および検出プローブとアナライトとの交雑は、別々に(2段階)または同時に(1段階)、特にLanghaleおよびMalcolm, Gene, 36, 1985, 201-210、Rankiら、Gene, 21, 1

993, 77-85、DunnおよびHassel、Cell, 12, 1977, 23-36、またはRankiおよびSoderlundらの米国特許第4486539号および第4563419号に記載されている方法の1つによって行うことができる。

【0065】

当業者は、容易に交雑実験を再現し、本発明の結合法と先行技術の結合法とを比較することができる。言及されうる先行技術の結合方法の例は、よく知られている方法、特に受動吸着または共有結合によって(Cookら、Nucleic Acids Res., 16, 1988, 4077-4095; Nagataら、FEBS Lett., 183, 1985, 379-382; M. Longlaruら、欧州特許420260A2号; T. Gingerasら、欧州特許第276302号; E. KornesおよびL. M. Kornes, 欧州特許第446260号)、固体支持体に捕獲プローブを固定する方法である。

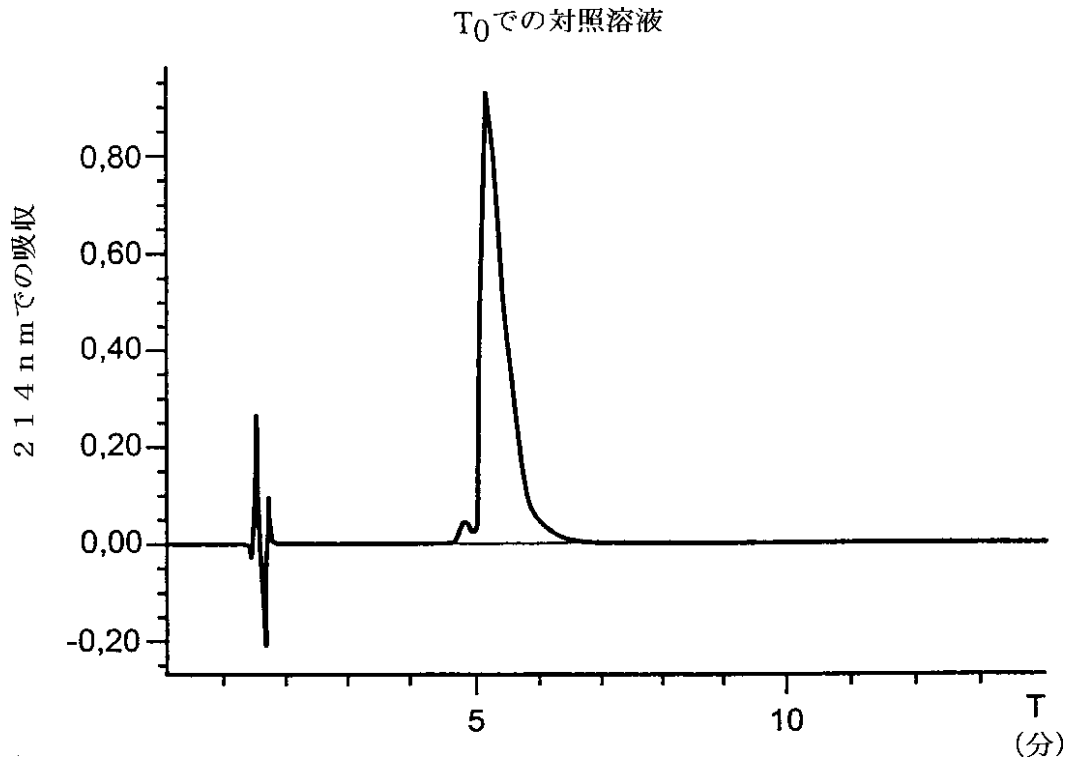
【図面の簡単な説明】

【図1】 T_0 における対照溶液(磁性ビーズに結合していないアッセイ)を使用して得たピークを示すクロマトグラム

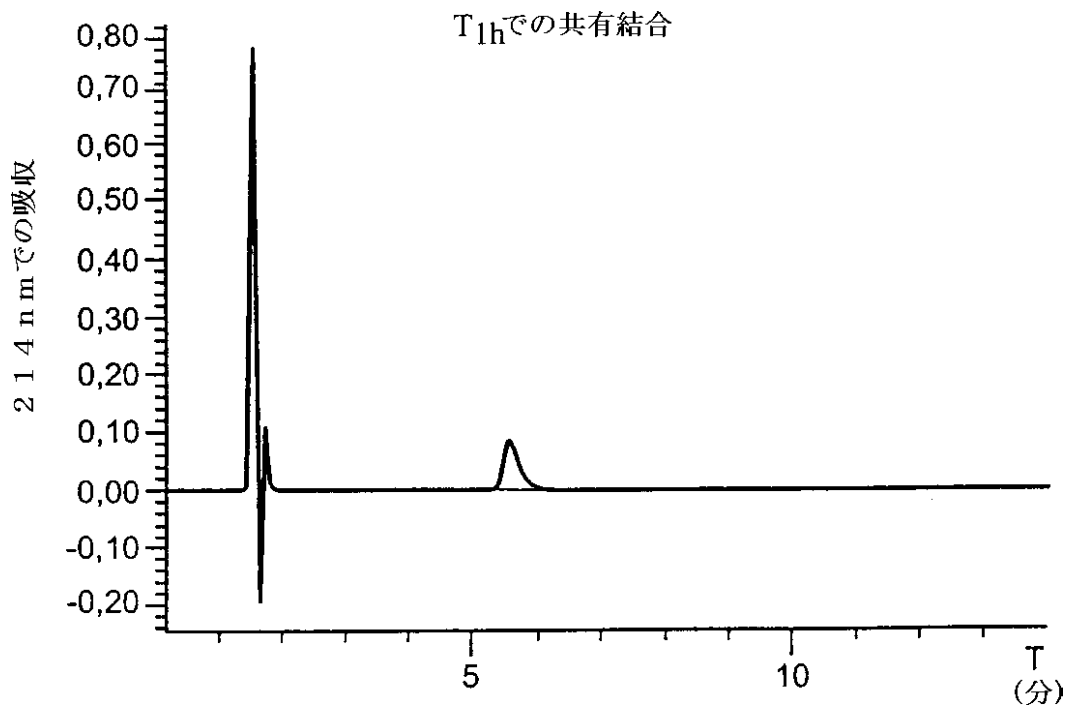
【図2】 セクションb1)に記載した共有結合の終了時に $T_{0+1時}$ で採取した上澄みを使用して得たピークを示すクロマトグラム

【図3】 セクションb2)に記載した受動結合の終了時に $T_{0+1時}$ で採取した上澄みを使用して得たピークを示すクロマトグラム

【図1】

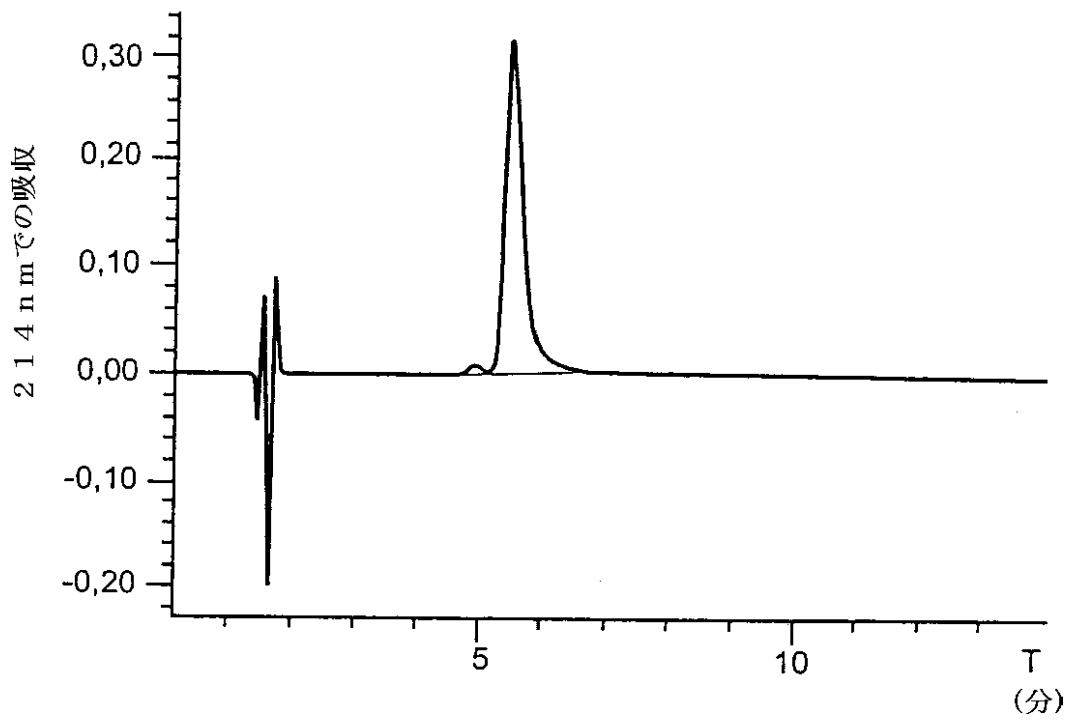


【図2】



【図3】

T_{1h} での受動結合



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成14年1月14日(2002.1.14)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【請求項1】 カルボキシル基で官能化した疎水性固相に親和性試薬を固定する方法であって、前記方法が、前記固相を活性化する段階および前記固相に親和性試薬を結合させる段階を含んで成り、前記固相を活性化する段階が、補助活性剤の存在下に、約4～約6.5のpHを有する酸性媒体中で、カルボジイミドとホスフェート緩衝剤との組合せを使用すること、および結合段階が約7.2～約10.5のpHを有する塩基性媒体中で行われること、を特徴とする方法。

【請求項2】 使用されるカルボジイミドが、CMC(N-シクロヘキシル-N'- (2-モルホリノエチル)カルボジイミドメチル-p-トルエンスルホネート)およびEDC(1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド)から成る群から選択される化合物であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 使用される補助活性剤が、s-NHS(スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド)、HOBt(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)およびN-ヒドロキシスクシンイミドから成る群から選択される化合物であることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 使用されるカルボジイミドが、CMC(N-シクロヘキシル-N'- (2-モルホリノエチル)カルボジイミドメチル-p-トルエンスルホネート)であり、使用される補助活性剤が、s-NHS(スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド)であることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 カルボジイミドが、COOH基につき20～50モル当量の量で

使用されることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 補助活性剤が、COOH基につき3～10モル当量の量で使用されることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 固相を活性化する段階が、約4～約6.5のpHを有する酸性媒体中で、COOH基につき3～10モル当量のスルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド補助活性剤の存在下に、30～200mMのホスフェート緩衝剤中の、COOH基につき20～50モル当量のCMCの組合せを使用し、結合が約7.2～約10.5のpHを有する塩基性媒体中で行われることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 固相を活性化する段階が、pH6において、COOH基につき5モル当量のスルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド補助活性剤の存在下に、50mMのKH₂PO₄ホスフェート緩衝剤中の、COOH基につき30モル当量のCMCの組合せを使用し、結合が、pH8.5の緩衝剤1容量及び前記ホスフェート緩衝剤1容量を含有する媒体中で行われることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 親和性試薬が、アミン基を含有するか、またはアミン基を人為的に付与しうることを特徴とする請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】 親和性試薬が、タンパク質、ペプチド、免疫グロブリン、抗原、ハプテン、抗体、酵素、酵素基質、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドから成る群から選択されることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項11】 固相/抗原複合体、固相/タンパク質複合体、固相/ペプチド複合体、固相/ハプテン複合体、固相/抗体複合体、固相/免疫グロブリン複合体、固相/オリゴヌクレオチド複合体、固相/ポリヌクレオチド複合体、固相/酵素複合体および固相/酵素基質複合体等から成る群から選択されることを特徴とする、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法によって得られる反応性固体複合体。

【請求項12】 イムノアッセイキット、交雑キットおよび酵素アッセイキットにおける、請求項11に記載の複合体の使用。

【手続補正書】

【提出日】平成14年8月23日(2002.8.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0004】

固相共有結合は一般に、より高い安定性を有する最終試薬を生成するという長所を有するだけでなく、より高い親和性の試薬を固体支持体に固定させることもできる。現在使用している多くの固相共有結合の方法および薬剤が存在する：言及される非制限的な例は、例えば、DMAP(ジメチルアミノピリジン)、HOBt(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)、N-ヒドロキシスクシンイミドまたはs-NHS(スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド)といった補助活性剤の存在または非存在下での、グルタルアルデヒド、臭化シアンおよびカルボジイミドとの結合であり、これらは当業者によく知られている。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0026】

b) カルボキシルビーズへのペプチドの固定

b1) カルボキシルビーズへのペプチドの共有結合

ステップ1：カルボキシルビーズの洗浄

試験管中の50 μ Lの磁性カルボキシルラテックスビーズを、pH9の0.1mM、NaOH750 μ Lで2回、二重蒸留水750 μ Lで1回、最後にホスフェート緩衝液750 μ Lで1回、洗浄する。

ステップ2：カルボキシルビーズの活性化

250 μ L のホスフェート緩衝液、200 μ L (30 eq / COOH基) のCMC (N - シクロヘキシル - N' - (2 - モルホリノエチル) カルボジイミドメチル - p - トルエンスルホネート) (Fluka) の水溶液、および50 μ L (5 eq / COOH) のs - NHS (スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミド) (Pierce) の水溶液を、ステップ1で得た洗浄ビーズの残留物に添加する。

反応混合物を、振とうしながら室温で1時間インキュベーションする。次に、ビーズを500 μ L のホスフェート緩衝液で洗浄する。

ステップ3：ビーズへのペプチドの結合

0.25 eq (COOH基に基づく) のセクションa2) に記載したペプチドを含有する、250 μ L のホスフェート緩衝液、およびpH 8.5の250 μ L の37.5 mMボレート / 50 mM NaCl 緩衝液を、ステップ2で得た活性化ビーズの残留物に添加する。

反応混合物を、振とうしながら室温で1時間インキュベーションする。ビーズを磁化によって分離し、上澄みをHPLCによる測定(下記セクションc) 参照) のために保持する。洗浄後、ビーズをpH 7.4のPBSか、または他の好適な同等の緩衝液中に維持する。

【手続補正書】

【提出日】平成14年8月23日(2002.8.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0026】

b) カルボキシルビーズへのペプチドの固定

b1) カルボキシルビーズへのペプチドの共有結合

ステップ1: カルボキシルビーズの洗浄

試験管中の50 μ Lの磁性カルボキシルラテックスビーズを、pH9の0.1mM、NaOH750 μ Lで2回、二重蒸留水750 μ Lで1回、最後にホスフェート緩衝液750 μ Lで1回、洗浄する。

ステップ2: カルボキシルビーズの活性化

250 μ Lのホスフェート緩衝液、200 μ L(30eq/COOH基)のCMC(N-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノ)カルボジイミドメチル-p-トルエンスルホネート)(Fluka)の水溶液、および50 μ L(5eq/COOH)のs-NHS(スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド)(Pierce)の水溶液を、ステップ1で得た洗浄ビーズの残留物に添加する。

反応混合物を、振とうしながら室温で1時間インキュベーションする。次に、ビーズを500 μ Lのホスフェート緩衝液で洗浄する。

ステップ3: ビーズへのペプチドの結合

0.25eq(COOH基に基づく)のセクションa2)に記載したペプチドを含有する、250 μ Lのホスフェート緩衝液、およびpH8.5の250 μ Lの37.5mMボレート/50mMNaCl緩衝液を、ステップ2で得た活性化ビーズの残留物に添加する。

反応混合物を、振とうしながら室温で1時間インキュベーションする。ビーズを磁化によって分離し、上澄みをHPLCによる測定(下記セクションc)参照)

のために保持する。洗浄後、ビーズをpH 7.4のPBSか、または他の好適な同等の緩衝液中に維持する。

国内書面作成時に代理人の錯誤により誤訳した。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/00095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/544		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, INSPEC, COMPENDEX, FSTA, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 437 983 A (WATTS RICHARD P ET AL) 1 August 1995 (1995-08-01) column 15, line 38 -column 16, line 56 ---	1-3,5,6, 9-13
Y	SITUMORANG M., GOODING J.J., HIBBERT D.B.: "Immobilisation of enzyme throughout a polytyramine matrix: a versatile procedure for fabricating biosensors" ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 394, 9 August 1999 (1999-08-09), pages 211-223, XP000946857 cited in the application abstract page 212, right-hand column, paragraph 3 -page 213, left-hand column, paragraph 1 page 216, left-hand column, paragraph 2 --- -/-	1-3,5-7, 9-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 April 2001		Date of mailing of the international search report 23/04/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Menidje1, R

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. l. Application No.
 PCT/FR 01/00095

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BASTOS-GONZALEZ, HIDALGO-ALVAREZ ET AL.: "Carboxylated Latexes for Covalent Coupling Antibodies, I" JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, vol. 176, - 1995 pages 232-239, XP000952060 cited in the application page 238, left-hand column, paragraph 3 -right-hand column, paragraph 1 page 234, right-hand column, paragraph 2 ---	1-3,5-7, 9-13
A	SÜDI P., DALA E., SZAJANI B.: "Preparation, Characterization, and application of a Novel Immobilized Carboxypeptidase B" APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 22, - 1989 pages 31-43, XP000952096 abstract page 33, paragraph 3 ---	1,2,5, 9-13
A	DAGENAIS P., DESPREZ B., ALBERT J., ESCHER E.: "Direct Covalent Attachment of Small Peptide Antigens to Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Plates Using Radiation and Carbodiimide Activation" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 222, 1994, pages 149-155, XP002149598 abstract page 151, left-hand column, line 1 - line 2 page 152, left-hand column, line 3 -right-hand column, line 1 -----	1,2,5, 9-13

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 01/00095

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5437983 A	01-08-1995	AT 167302 T	15-06-1998
		CA 2022518 A	05-02-1991
		DE 69032383 D	16-07-1998
		DE 69032383 T	10-12-1998
		EP 0411944 A	06-02-1991
		JP 3095463 A	19-04-1991

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 フランソワ リウニエ
フランス国 エフ - 78390 ボワダルシー,
ルー ドゥ ボワ 5

Fターム(参考) 4B033 NA01 NA21 NA22 NA42 NA43
NB04 NB22 NB34 NB43 NB62
NC03 NC12 ND05 ND11

专利名称(译)	将亲和试剂固定在疏水性固相上的方法		
公开(公告)号	JP2003523503A	公开(公告)日	2003-08-05
申请号	JP2001552089	申请日	2001-01-12
[标]申请(专利权)人(译)	中提琴德巴斯德 BIO RAD巴斯德		
申请(专利权)人(译)	生物 - Rad公司巴斯德		
[标]发明人	ファビアンヌババン ローランスアモン フランソワリウニエ		
发明人	ファビアンヌ ババン ローランス アモン フランソワ リウニエ		
IPC分类号	G01N33/531 C12N11/02 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566		
CPC分类号	G01N33/54393		
FI分类号	G01N33/531.Z C12N11/02 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	4B033/NA01 4B033/NA21 4B033/NA22 4B033/NA42 4B033/NA43 4B033/NB04 4B033/NB22 4B033/NB34 4B033/NB43 4B033/NB62 4B033/NC03 4B033/NC12 4B033/ND05 4B033/ND11		
优先权	2000000376 2000-01-13 FR		
其他公开文献	JP4746810B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种将亲和试剂固定在用羧基官能化的疏水性固相上的方法，该方法包括以下步骤：活化固相并将亲和试剂结合至固相。在共活化剂的存在下，使用碳二亚胺和磷酸盐缓冲液的组合在酸性介质中活化固相，并在碱性介质中进行偶联步骤，一种方法的特点是。

プロトコル	受動結合 ペプチドの%	共有結合 ペプチドの%	Δ (共有-受動)
Bangs	47	57	10
ラテックスコース (J. Sackrison)	80	82	2
プロトコル 1 (D. Bastos-Gonzalez et al.)	8	13	5
本発明のプロトコル	54	100	46