

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3749263号
(P3749263)

(45) 発行日 平成18年2月22日(2006.2.22)

(24) 登録日 平成17年12月9日(2005.12.9)

(51) Int.C1.

F 1

GO 1 N 33/544 (2006.01)
GO 1 N 33/564 (2006.01)GO 1 N 33/544
GO 1 N 33/564A
Z

請求項の数 16 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願平9-538188
(86) (22) 出願日	平成9年4月18日(1997.4.18)
(65) 公表番号	特表2000-509492(P2000-509492A)
(43) 公表日	平成12年7月25日(2000.7.25)
(86) 國際出願番号	PCT/US1997/006448
(87) 國際公開番号	W01997/040387
(87) 國際公開日	平成9年10月30日(1997.10.30)
審査請求日	平成16年4月8日(2004.4.8)
(31) 優先権主張番号	08/636,733
(32) 優先日	平成8年4月19日(1996.4.19)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	パストゥール サノフィ ダイアグノスティクス、ソシエテ アノニム フランス国、エフー92430 マーラーコケット、ブルバール レイモン ポワンカレ、3
(74) 代理人	弁理士 石田 敏
(74) 代理人	弁理士 吉田 雄夫
(74) 代理人	弁理士 戸田 利雄
(74) 代理人	弁理士 西山 雅也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗リン脂質抗体を検出するためのイムノアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検査サンプル中の抗リン脂質抗体を検出するためのアッセイにおいて利用するためのリポソーム試薬であって；
リポソーム；

前記抗リン脂質抗体に特異的に結合するように選定され、且つ前記リポソームの膜に一体化したカルジオリビン；及び

前記リポソームの膜に一体化したハプテン化成分、ここで当該ハプテンは固相上のハプテンレセプターに特異的に結合するように選定されたものである；

を含んで成り、且つ前記リポソームが、当該アッセイの際に、前記カルジオリビン及びハプテン化成分が前記膜の一部に一体化したままであり続け、前記固相とリガンドとの間の連結が維持されるように調製されたものである、前記リポソーム試薬。

【請求項 2】

前記リポソームの膜に - 2 - 糖タンパク質 I がさらに一体化した、請求項 1 記載のリポソーム試薬。

【請求項 3】

検査サンプル中の抗リン脂質抗体の存在又は量を決定するための方法であって、請求項 1 または 2 記載のリポソームを採用し、

前記リポソーム試薬を検査サンプル及び前記ハプテンレセプターの結合している前記固相と、同時又は順次に、前記リポソーム試薬中のカルジオリビンに前記サンプル中の抗リン

10

20

脂質抗体が結合するのに十分、且つ前記固相上の前記レセプターに前記ハブテン化リポソーム試薬が結合するのに十分な時間及び条件下で接触させ、前記リポソーム膜の一部を介してハブテン - ハブテンレセプター複合体に連結された抗リン脂質抗体 - カルジオリピン複合体を形成し；そして前記固相に結合した抗リン脂質抗体 - カルジオリピン複合体の存在又は量を検出する；ことを含んで成る方法。

【請求項 4】

前記検査サンプル中の被検物が結合している前記固相を前記抗リン脂質抗体に特異的に結合するであろう所定量のラベル化試薬と接触させ、次いでこのラベルを検出することにより抗リン脂質抗体の量又は存在を決定することを更に含んで成る、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記ラベルが酵素、放射性同位元素、安定フリーラジカル、化学発光化合物、生物発光化合物、蛍光化合物、色素及び酵素基質より成る群から選ばれる、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

前記ラベルが酵素である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記ラベルがアルカリホスファターゼ及び西洋ワサビペルオキシダーゼより成る群から選ばれる酵素である、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

前記固相が試験管の壁、マイクロタイタープレートのウェル、粒子及びニトロセルロースストリップより成る群から選ばれる、請求項 3 ~ 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

前記固相が懸濁性粒子である、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

前記固相が磁性吸引性粒子である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

前記ハブテン化成分がハブテン化リン脂質である、請求項 3 ~ 10 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 12】

ハブテン化されている前記リン脂質がカルジオリピン、ホスファチジルイノシチル、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン及びホスファチジン酸より成る群から選ばれる、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

前記ハブテン化リン脂質がハブテン化ジパルミトイールホスファチジルエタノールアミンである、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

前記リポソーム試薬が前記リポソームの膜に一体化した - 2 - 糖タンパク質 I を含む、請求項 3 ~ 13 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 15】

前記リポソーム試薬及び検査サンプルを - 2 - 糖タンパク質 I を含んで成る溶液と接触させる段階を更に含んで成る、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

検査サンプル中に存在する抗リン脂質抗体の存在又は量を決定するためのアッセイにおいて利用するためのキットであって：

請求項 1 または 2 記載のリポソーム試薬及び前記ハブテンレセプターを担持する固相を含んで成るキット。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は患者サンプル中の被検物の検出を促進するためのリポソーム二重層の中に一体化した又は組込まれたリガンドを有する新規のリポソーム試薬を利用するアッセイに関する。一の態様において、本発明はリン脂質、例えばカルジオリピン等に対する抗体を検出す

10

20

30

40

50

るためにリポソーム試薬を利用するイムノアッセイに関する。

発明の背景

本発明は患者サンプル中の被検物を検出するためのアッセイにおいて新規リポソーム試薬を利用する新規アッセイ方式を詳述する。本発明の一の態様において、サンプル中の被検物を検出するために標的リガンドの組込まれたリポソームへと脂質を処方する。往々にして、特定の自己免疫疾患に関わるもの如き被検物の検出は、患者サンプル中の被検物の濃度が非常に低いために困難である。二重層の中にリガンドの一体化した又は組込まれたリポソームの利用はアッセイの高められたリガンド結合能力を可能にする。マイクロプレート方式アッセイが固相に直接結合したリガンド又は被検物を有する場合、分子相互作用は立体障害を受けうる。本発明のアッセイ方式においては、リガンドはより流動性のゲルタイプマトリックスの中に挿入されており、そのマトリックスは実質的な立体柔軟性を可能にしうる。更に、本発明のリポソーム試薬を利用するアッセイは、表層に直接結合しているリガンドが構造的に変化しうる固相アッセイにおいてよりも自然なコンホーメーションで被検物を検出又はそれと相互作用するリガンドを供する利点を有しうる。10

被検物を検出するための均質イムノアッセイにおける試薬としてリン脂質を含んで成るリポソームの利用が発表されている。これらのアッセイはリポーター分子を封入するためにリポソームを利用する。H. Rutnerらの米国特許第5,248,590号には、「イムノアッセイにおいて利用される場合、リポソームは一般にリポーター分子、例えば色素又は酵素を封入し、且つリガンド、通常は抗原又は抗体を複合している」と述べられている。このようなアッセイの例はUllmanらの米国特許第4,193,983号、Szokaの同第4,483,929号、Canova-Davisらの同第4,783,400号、Piranの同第4,874,710号、及びJanoffらの同第4,668,638号に記載されている。これらのアッセイにおいて、リポソームは疎水性分子又はかかる分子の一部の疎水性二重層への挿入を介して共有結合的に又は非共有結合的にリガンドと複合していることがある。このリガンドは通常サンプル中の検出すべき被検物に特異的に結合する抗体又は抗原である。上述の例において、リガンドの結合したリポソームが患者のサンプルと接触すると、サンプル中の被検物はリガンドと複合し、典型的には補体媒体式溶解を通じてリポソームを溶解せしめる。その水性溶液の中に遊離するリポーター分子の量を測定し、そしてこの量を検出すべき被検物の濃度と換算する。

このようなりポーター封入式イムノアッセイに関する著しい問題が同定されている。まず溶解を必要とするリポソームベースアッセイは検査サンプル中に存在する内性補体又はリポソームからのリポーター分子の漏出を招くリポソーム分解のいづれかによる非特異的溶解に対して感受性である。従って、リポソームの保全の維持がリポーター封入式アッセイの感度及び特異性のために必須である。溶解媒介式リポソーム検出系の第二の欠点は患者サンプル中の特定の被検物の濃度が低いとき、より濃厚な検査サンプルの利用が、内性補体の存在等により、かかる成分を除くように検査サンプルを予備処理しない限り、非特異的なリポソーム溶解をもたらしうることにある。しかしながら、サンプルの予備処理は全てのアッセイに対して時間及びコストを費やしてしまう。更に、予備処理試薬は、サンプル中に存在する被検物がかかる試薬により変性又は分解されず、且つリポソームの保全が維持されるように慎重に選ばなければならない。30

前述の通り現状利用されているリポソームベースアッセイの幾多の利点を維持しながら、本発明のアッセイはリポソーム封入式リポーター手法の有用性を制約する欠点を解消することによってかかるアッセイデザインの用途を広げる。例えば、本発明のアッセイは封入式リポーターを頼りにしない。従って、リポソームの保全の維持は本発明の機能にとっての要件ではない。また、高められた結合能力及び立体柔軟性に基づきマイクロプレートELISA方式に勝る有意義な長所が認められうる。40

抗カルジオリピン抗体 (aCL) 又は抗リン脂質抗体 (aPL) は一次抗リン脂質症候群 (PAPS) 、全身性エリテマトーデス (SLE) 、HIV及び梅毒の患者由来の血清においてよく認められている。抗リン脂質抗体は血漿膜中のリン脂質に対して特異的なようである (McNeilら、「*Immunology and Clinical Importance of Antiphospholipid Antibodies*」Advances in Immunology, 49 : 193-281, 1991を参照のこと)。PAPS及びSLEの患者において、抗リ50

ン脂質抗体は再発性血栓症、自然流産及び血小板減少症に結びつく。かくして、これらの抗体の存在のモニターは診断的価値を有する。これらの抗体を検出する現状の方法にはラジオイムノアッセイ、半自動式マイクロプレートELISA(酵素、連結式免疫吸着アッセイ)アッセイ及び凝集型アッセイが挙げられる(例えば、BartaらのW090/07368を参照のこと)。負に帯電したリン脂質に対する抗体の検出のために利用されている各方法はいくつかの同定された制約をもつ。検査サンプル中の抗リン脂質抗体の存在を検出するために利用する凝集アッセイは主観的な判断に基づき検査結果につきやっかいである。更に、かかるアッセイは典型的には自動化されておらず、それ故大量の検体をスクリーニングするのに利用するには適切でない。

ELISA型マイクロプレートアッセイにおける抗リン脂質抗体の検出に関わる制約もある。
典型的には、これらのアッセイはカルジオリピン(ジホスファチジルグリセロール)又はその他の非イオン性リン脂質の市販のポリスチレンマイクロタイプレート上への吸着を包括する。かかるマイクロプレートアッセイは大量の検体をスクリーニングするには凝集アッセイよりも優れ、そして半定量的な結果を提供する。しかしながら、このようなマイクロプレートELISAアッセイは一部の凝集検査など特異的又は高感度ではない。例えば、かかるマイクロプレート方式により検査した一部のサンプルはサンプルの系列希釈を検査した場合に推定されるよりも弱い結合を示すことがわかっている。このことについての解釈ははっきりしていない。

抗リン脂質抗体についてのマイクロプレートELISAアッセイはNP-40(Nonidet P-40)又はTween 20(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート)の如き界面活性剤の存在下において十分に機能しないこともわかっている。マイクロプレートELISAアッセイにおける界面活性剤の利用は一般に固相に対するタンパク質又はその他の試薬成分の非特異的結合を抑制するものと信じられており、それ故アッセイの感度及び特異性を高める。従って、マイクロプレートELISA方式を利用して実施する検査は界面活性剤の非存在下における非特異的結合に関する偽陽性結果の高められたレベルを示す。従って、界面活性剤を必要としない、又は利用してもアッセイの性能に有意な影響を与えないで、サンプル中の抗リン脂質抗体の存在又は量を決定する方法を得ることが所望されるであろう。よって、本発明はかかる観点における改良も提供し、なぜなら当該アッセイはFC100等の界面活性剤の存在下で実施できうるからである。

抗リン脂質抗体に関するマイクロプレートELISAにかかる更なる別の問題はこれらのアッセイが固相に対する直接的なリガンドの物理的付着を必要とする点にある。前述の通り、直接カップリングはリガンド及び/又は被検物が効率的に反応することを妨げうるこれらの分子に対して付与される立体障害により、かかるアッセイにおける感度の低下の危険性を高めうる。

対照的に、本発明はリポソーム試薬の利用を通じて固相して被検物を結合する手段を提供し、これは立体障害に係る問題を軽減せしめうる。これは更にリガンド及び被検物の認識効率を最大にもし、そして固相の総リガンド結合能を高めうる。本発明はこのような特徴を併合し、そして更には完全自動化システムに容易に適用できる組成物及び方法を提供する。

発明の概要

本発明は検査サンプル中の被検物の存在又は量を決定するための方法であって、リポソーム、当該被検物に特異的に結合するように選定され、且つ当該リポソームの膜に一体化したりガンド、及び当該リポソームの膜に一体化したハプテン化成分であってそのハプテンが固相上に固定化されたレセプターに特異的に結合するように選定されたものを含んで成るリポソーム試薬を検査サンプル及び固相と、同時に、又は順々に、当該サンプル中の被検物が当該リポソーム中のリガンドに結合し、且つ当該リポソーム試薬が当該固相上のレセプターに結合するのに十分な時間及び条件下で接触させ、そして当該固相に結合して被検物の存在又は量を検出することを含んで成る方法を提供する。

別の態様において、本発明は検査サンプル中の抗リン脂質抗体の存在又は量を決定するための方法を提供し、それにおいてはかかる抗体に特異的に結合するリガンド、アニオン性

リン脂質が前記リポソームの膜の中に組込まれており、且つ前記ハブテン化成分はハブテンが結合しており、当該リガンドと同じリン脂質でありうるか又は別のアニオン性、中性もしくは双イオン性リン脂質でありうるリン脂質もある。

本発明の別の態様はリポソーム；被検物に特異的に結合するように選定され、且つ当該リポソームの膜に一体化したリガンド；及び当該リポソームの膜に一体化したハブテン化成分を含んで成るリポソーム試薬を利用する検査サンプル中の被検物を決定又は検出する方法に関する。この方法は検査サンプルを、その上で被検物を捕捉するように被検物に対するレセプターの結合した固相と接触させ、そして同時に又は順次、当該リポソーム試薬を添加することを含んで成る。次にこの固相を溶液から分離し、そして当該ハブテンのためのラベル化レセプターと接触させる。当該リポソーム試薬を介して当該固相に結合した被検物の量は結合したラベルの量を決定することにより決定される。

本発明の更なる別の態様は検査サンプル中の被検物を検出するためのアッセイにおいて利用するためのリポソーム試薬であって、リポソーム；被検物に特異的に結合するように選定され、且つ当該リポソームの膜に一体化したリガンド；及び当該リポソームの膜に一体化したハブテン化成分であって、ここで当該ハブテンが当該アッセイにおいて用いる固相上のリセプターに特異的に結合するように選定されたものであるハブテン化成分；を含んで成り、そしてここで当該リポソームは当該アッセイ中に当該リガンド及びハブテン化成分が当該膜の一部に一体化され、当該固相とリガンドとの連結を維持するように調製されたものである、リポソーム試薬に関する。

本発明は更に検査サンプル中の被検物の存在を検出するうえで利用するための検査キットにも関連し、ここで当該検査キットは本発明のリポソーム試薬と、当該リポソームのハブテンのためのレセプターがその上に固定化されている固相とを含む。

発明の詳細な説明

リポソーム試薬及びその利用方法が本明細書全体に詳述されている。この試薬は好ましくはリポソームを形成するように負に帯電したリン脂質を採用し、そしてその使用目的に応じて当該リン脂質の膜に挿入された又は一体化した様々な分子を有しうる。本明細書におけるリポソーム膜に関する「一体化した」とは分子間の安定な相互作用が共有又は非共有手段により形成且つ維持されていることを意味し、そして当該リポソーム膜に挿入又は組込まれた分子を含んでいる。このアッセイのための様々な用途、例えば限定することなく、抗リン脂質抗体アッセイのための試薬が挙げられる。

下記の定義を全体を通じて利用する：

「抗リン脂質抗体」とは負に帯電したリン脂質、例えばカルジオプリン（ジホスファチジルグリセロール）、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール及びホスファチジン酸に一般に結合する抗体を意味する。

本明細書における「被検物」とは好ましくは患者サンプルに由来する測定すべき化合物又は組成物を意味する。当該被検物は特異的結合性ペアの一方向構成員である。好適な態様において、この特異的結合性ペアの他方の構成員はリガンドである。本発明のアッセイに有用な被検物には抗体、タンパク質、抗原、核酸、ステロイド、並びにリガンドに対して特異的結合性親和力を有するその他の物質、好ましくは抗リン脂質抗体が挙げられる。

本明細書における「リガンド」とは特異的結合性ペアの構成員である化合物、分子又は当該分子の一部を意味し、その他方の構成員は被検物又は当該被検物に結合するレセプターである。リガンドは被検物又は当該被検物レセプターに特異的に結合するように選定され、従ってアッセイの際に当該リガンド又は被検物レセプターに結合した被検物の量は検査サンプル中に存在する被検物の量に相当する。リガンドにはリガンド類似体も含まれ、この場合当該リガンド分子は被検物又は被検物レセプターに特異的に結合する当該分子の部分が化学、酵素又は分子操作を通じて自然分子から除去され、且つ別の分子に固定又は一体化しているように改変されている。リガンドは一般に特異的な結合性ペアの二つの成分の小さい方であるが、これは必ずしもそうある必要はない。当該リガンドは1又は複数のエピトープを有し、抗原性又はハブテン化されていてよく、そして少なくとも一個の

10

20

30

40

50

エピトープ部位を共有する一の組成物又は一群の組成物であつてよい。代表的なリガンドには自己抗原、アレルゲン、アニオン性リン脂質、腫瘍マーカーに対する抗体等が挙げられる。

本明細書において用いる「ハプテン」又は「ハプテン化」とは、特異的結合性ペアの一介の構成員のみを意味するか、又は別の化合物もしくは分子に付加された一方の構成員を意味しており、この場合他方の構成員は被検物又はリガンドではないレセプターである。ハプテンは膜に、通常は担体に接合しているときに実験動物において免疫応答を誘導できる低分子量化合物であり、例えばビオチン、ジニトロフェニル基(DNP)、フルオレセイン又はその誘導体、例えばフルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ジゴキシゲニン等である。

本明細書において用いる「レセプター」とはハプテン、ハプテン化化合物、リガンド又は被検物に対して特異的結合親和力を有する任意の化合物又は組成物を意味する。本発明のアッセイに有用なレセプターには抗体、例えば抗ビオチン及び抗-ジゴキシゲニン抗体又は抗被検物抗体、並びにその他の結合性物質、例えばアビジン、ストレプトアビジン、レクチン、酵素、内因子、葉酸結合性タンパク質等が挙げられる。「被検物レセプター」は本明細書において被検物に対する特異的結合親和性を有するレセプターを意味するように用いている。本明細書において用いる「ハプテンレセプター」とはハプテン又はハプテン化成分に対する特異的結合親和力を有するレセプターを意味する。

「ラベル」又は「ラベル化」は本明細書においてシグナル検出系の一部として検出可能なシグナルの産物に直接又は間接的に関わり、且つ当該アッセイの1又は複数の分子に直接結合しているものを意味するように聞いている。ラベルは被検物もしくはリガンドに特異的に結合する担体に接合されているか、又はリポソーム試薬の膜の中に組込まれているかもしくは一体化していてよい。ラベルの代表例には当業者に公知の任意のもの、例えば酵素、顔料、色素、蛍光団、放射性同位元素、安定フリーラジカルルミネッサー、例えば化学発光体、生物発光体、等が挙げられる。「検出因子」なる語はラベルに一体化した任意の化合物を意味する。好適なシグナル検出系において、当該ラベルは酵素であり、検出可能なシグナルは当該ラベル化試薬を特定の基質に対して曝露させ、そして発色、発蛍光又は化学発光のためにインキュベーションすることにより構築されうる。

本明細書において「リポソーム」は水性環境においては基本構造保全を維持することができ、そして親水性界面が周囲水性媒質にさらされ、且つ親水性界面が内部水性空間にもさらされている両親媒性分子から形成された小独立粒子を意味するように用いている。当該リポソームの膜は「膜二重層」、「二重層」又は「膜」を同義語で意味している。リポソームは更に例えばMLV(多重層小胞)へと分類することができ、それは脂質の多重同心円層を含んで成る。

本明細書において「キット」は必須の緩衝剤、塩類及び安定化剤と共に通常処方されている試薬の組合せを意味し、ここで当該試薬をアッセイ感度を少なくとも実質的に最適化するように予備決定されている。

本明細書において用いる語「タンパク質」とはタンパク質成分、ポリペプチド及びペプチドフラグメントを有する分子を含むような意味である。

本明細書において用いる語「同時に」とは、アッセイ成分、例えばリポソーム試薬、検査サンプル又は固相をそれぞれ反応槽に同時に、又は他のすぐ後に加え、全てのアッセイ成分が反応混合物の中で組合さるようにすることを意味する。本明細書において用いる語「順々」とは、一のアッセイ成分、例えばリポソーム試薬を別のアッセイ成分、例えば検査サンプル及び/又は固相に、他のアッセイ成分の一つ又は全てを反応混合物に加える前に反応が起こるのに十分な時間接触させておくことを意味する。

本発明の一の態様において、抗リン脂質抗体はリポソーム試薬を採用するトイムノアッセイにおいて検出される。かかる抗リン脂質抗体(aPL)はPAPS(一次抗リン脂質症候群)の患者、全身性エリテマトーデス(SLE)患者の一部、一定の感染症障害の患者の血漿又は血清において認められる自己抗体であり、そして時折り薬剤誘導されることもある。抗リン脂質抗体はカルジオリピン又はその他の負に帯電した脂質に結合する。かくして、本

発明の好適な観点において、当該アッセイはカルジオリピンを含んで成るリポソーム試薬を利用する。抗リン脂質抗体を検出するのに利用できうるその他の負に帶電した脂質にはホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸等が挙げられる。リポソーム支持体を構成するのに利用されうるその他のリン脂質等が挙げられる。リポソーム支持体を構成するのを利用されうる。その他のリン脂質（リガンドであるアニオン性リン脂質との組合せ）にはホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン等が挙げられる。

本発明のアッセイの実施及び検査サンプル中の抗リン脂質抗体の検出のための第一段階として、上記の1又は複数種の負に帶電したリン脂質を含んで成るリポソームを調製する。この負に帶電したリン脂質カルジオリピンは所望するにはリポソームを構築するようにその他のリン脂質と組合せる。好ましくは、当該リポソームはリガンドとして機能する未改変リン脂質と、アッセイ過程の際の被検物の結合したリポソームの分離を促進するハプテン化成分とを含んで成る。このハプテン化成分は好ましくはハプテン化脂質である。

ハプテン化脂質とは親水性部分においてハプテンの付加されたリポソームを形成するのに適當な脂質を意味する。これらのハプテン化脂質にはビオチン、アビジン、ジゴキシゲニン、DNP等に共有結合した脂質が挙げられる。このハプテンは所望するには、脂質に容易に付加されうる低分子量化合物、例えばビオチンである。本発明に有用なハプテン化脂質は商業的に購入できる、例えばPierce Chemicals, Rockford, IL.より入手できるビオチニル化ジパルミトイロホスファチジルエタノールアミン（DPPE）であるか、又はRivnayら「Use of Avidin-Biotin Technology for Liposome Targeting」Methods in Enzymology, Vol.149、頁119-123 (1987) により開示された方法を利用して製造できうる。

簡単には、当該リン脂質をビオチニルN - ヒドロキシスクシニミドエステル（BNHS）を含むクロロホルム - メタノールの溶液に溶かし、次いで15% (v / v) のトリエチルアミンを含むクロロホルム溶液を添加する。反応を室温で約2時間進行させ、次いでこの混合物を約-70°で保存する。精製は勾配式高性能液体クロマトグラフィーを利用して実施する。そのカラムをまだn - ヘキサン / 2 - プロパンノール / 水 (60 : 80 : 14, v / v / v) を含む溶媒混合物で定常基底値が確立されるまで洗い、次いで初期基底値よりも約0.07の光学密度(OD)単位高い新たな基底値が確立するまでn - ヘキサン / 2 - プロパンノール / 水 (60 : 80 : 7, v / v / v) を含む別の溶媒混合物を導入する。次に脂質サンプルを載せ、そして溶出をM - 441独立波長紫外光検出器 (214nm) によりモニターする。次にこのカラムを上記溶媒溶液で、第二溶液による5分、続いて第二溶液中の0 ~ 100%の第一溶液の20分線状勾配により溶出させる。次に安定な基底値を達成するために45 ~ 70分間の第一溶液における更なる溶出を実施する。これらのピークを集め、溶出物質をプールし、そして溶媒を窒素流で蒸発させる。

本発明の好適な態様において、当該未改変の負に帶電したリン脂質リガンドにはカルジオリピンが挙げられ、そしてハプテン化脂質にはビオチニル化DPPEが挙げられる。その他の考えられる組合せにはホスファチジルセリンとビオチニル化DPPE又はホスファチジルイノシトールとビオチニル化DPPEとが挙げられる。しかしながら、抗リン脂質抗体の結合する任意のアニオン性リン脂質リガンドが任意のその他のリン脂質（それはハプテン化されていてよい）、例えばその他のアニオン性リン脂質、中性及び双イオン性リン脂質と組合されて利用されうる。

適當なリン脂質リガンドがビオチニル化成分を有するリポソームの中に組込まれたか又は一体化したら、当該リポソーム試薬は抗リン脂質抗体を検出するアッセイに利用できうる。患者サンプルの中に存在する被検物はリポソームの中に組込まれたリガンドに結合し、そしてハプテン化脂質を介して固相により捕捉される。本発明の好適な態様において、抗 - ビオチン抗体に接合した磁気吸引性粒子を標的リガンドリン脂質に一体化したビオチニル化リン脂質を捕捉するために用いる。当該アッセイの好適なバージョンにおいて、ビオチニル化(bt-)DPPEを混合カルジオビリン / bt - DPPEリポソーム試薬の捕捉の媒介のために用いた。

本発明のリポソーム試薬は当業界において公知の様々な方法により形成されうる。例えば

10

20

30

40

50

、本方法はSzokaら (Ann. Rev. Biophys., Bioeng. 9 : 467-508, 1980) 及びPlantら (Analyt. Biochem. 176 : 420-426 (1989) に記載の方法の改良を採用する (その教示内容は引用することで本明細書に組入れる)。リポソームを形成するための好適な方法は、本明細書の実施例1において更に示す通り、D.Papahadjopoulos and F. Szoka Jrの米国特許第4,235,871号に記載の方法の改良である。簡単には、この方法は3段階を含んで成る：(a)有機溶媒の中での堆積する脂質溶液の調製及び混合；(b)ガラス容器上のリン脂質の薄膜を供するための窒素ガスの充実気流を利用する当該溶液の乾燥に至るまでのエバボレーション；並びに(c)適當なバッファー中のポルテクス(又はその他の機械的手段)によるリポソームの水和及び形成。当該膜二重層の結果構造は当該脂質の疎水性(非極性)テールが内側を向き、一方で親水性(極性)ヘッドが水性相に向って外側を向いているようになっている。リポソーム調製品は、適宜、Loughreyら、J. Immun. Meth., Vol. 132、頁25-35 (1990) に記載のカラムクロマトグラフィー、遠心分離及び/又は透析により更に分離してよい。

リポソームの形成のために利用できうるその他の方法にはBatzri and Korn (BioChim. Biophys. Acta, 281 : 1015, 1973) に記載のものが挙げられる。これにおいては、リポソームは有機相中の脂質を水性溶液に射出することに調製されている。向上した安定性を有するリポソームを製造するための方法にはLawら、米国特許第5,094,785号に記載の非凝集性リガンド連結化リポソームを製造する方法が挙げられる。アッセイ結果及び製造の再現性を高める一貫したリポソームサイズを有するリポソームを製造するための方法は米国特許第5,017,501号に記載されている。

様々なリン脂質誘導リポソームが本発明の診断方法の実施において利用できうることが更に考慮される。例えば、任意の様々なリポソーム構造、例えば単層(一枚の膜二重層を有する)又は多重層(複数の膜層を特徴とする)構造が利用できうる。

標的リガンド、対、ハプテン化リン脂質、好ましくはカルジオリピン、対、ビオチニル化DPPEの所定の比率は診断イムノアッセイにおいてその他のものよりも良く機能するものと期待される。1:2.5~1:100の(ビオチニル化DPPE:カルジオリピン)のモル比が本発明のアッセイに利用し得、1:5~1:20の比をほとんどの実施例において利用した。実施例2は標的リガンド、対、ハプテン化リン脂質の様々な比率が本発明において機能し、且つ最適脂質比を同定することによって特定のアッセイを最適化するのに有用な検査手法が提供されるとともに実証するために提供する。これらのアッセイはカルジオリピン及びビオチニル化DPPEの組合せに対して向けられているが、脂質化学の当業者はその他の比率及びその他の脂質がめんどうな実験をすることなく至適活性について似たように試験できることを容易に理解できるであろう。

本発明に有用な固相は当業界において周知であり、そして当該アッセイの一の成分が結合しうる水溶性材料を意味し、そして試験管の壁及びマイクロタイタープレートのウェル、ポリスチレンビーズ、磁気吸引性ビーズ(例えば強磁性粒子)、ニトロセルロースストリップ、膜、ラテックス微粒子及びその他のものが含まれ、そして炭化水素ポリマー、例えばポリスチレン及びポリプロピレン、ガラス、金属、ゲル又はその他の材料より成る。「固相」は本質的なものではなく、そして当業者により選定されうる。所望するには、固相は粒状固相であり、当該粒子は反応の際に懸濁ができる。固相は分離を助長することからの粒子の利用の利点は公知であり、そしてその利点のいくつかは米国特許第4,554,088号に記載されている。好ましくは、本発明のアッセイにおいて利用する固相粒子は米国特許第4,554,088号に記載の如き磁気吸引性粒子である。この特許は更に当該アッセイにおける固相としての磁気吸引性粒子の利用により供される利点も述べている。磁気吸引性粒子は分離工程を磁気分離を介して行われるようにし、従って粒子を溶液の中で沈降させるための遠心分離又は待機の必要性を回避する。

本発明との関連で、「結合」又は「固定化」なる語は抗体及びタンパク質、例えば本発明のハプテン/レセプターペラーのうちのレセプターが固相に直接又は間接的に結合し、これにより当該アッセイの実施の最中に抗体又はタンパク質が固相に一体化したままであり続けるための全てのメカニズムを包括する。かかるメカニズムには共有結合、非共有結合

10

20

30

40

50

、化学カップリング、疎水性／疎水性、親水性／親水性又はイオン性相互作用による吸着、等が挙げられる。

好適な態様において、当該ハプテンレセプターは固相上に吸着したロバ抗 - ヤギ抗体により固相に間接的に結合したヤギ抗ビオチン抗体を含んで成る。

リガンドは様々な起源から入手でき、そして患者サンプル中の被検物に対して結合するその能力に基づいて選定される。被検物が抗リン脂質抗体なら、カルジオリピンが好適なリガンドであり、そして市販されている。

リガンドの組込まれた又はリガンドの一体化したリポソームが調製できたら、当該リガンドが検査被検物に特異的であることを保証するように当該リポソームを試験することが有用である。検査被検物に対するリガンド特異性は様々な方法で決定できうる。 10

例えば、リガンド - 被検物結合の特異性を実証するために競合アッセイが利用できうる。かかるアッセイにおいて、抗リン脂質抗体を含むことのわかっているサンプルを、組込まれた又は一体化したリガンドを有する未ハプテン化リポソームを接触させ、次いで組込まれた又は一体化したリガンドを有するハプテン化リポソームと接触させる。もしこのリガンドが被検物に特異的に結合するなら、未ハプテン化とハプテン化リポソームとは当該被検物の同じ部位に対する結合について競合し、未ハプテン化リガンドを添加せずに実施したアッセイコントロール反応と比べ検出シグナルの低下を供する。

他方、本明細書の実施例3は検査被検物に対するリポソーム試薬の特異性を決定するための別の方法を詳述する。実施例3に示すように、様々なリポソーム調製品がリガンド、例えばカルジオリピンの濃度を増やしながら用いることにより調製し得る。抗リン脂質抗体を含む検査血清を各リポソーム調製品で試験する。反応性の値をリポソーム調製品において使用したリガンドの濃度の関数としてプロットする。リガンドの量の増大に伴う用量の直線性をリガンド特異性を実証するために用いる。 20

本発明のアッセイの一の態様において、リガンド、例えばカルジオリピン及びハプテン化成分、例えばビオチニル化DPPEの組込まれたリポソーム試薬を、固相がハプテンのための固定化レセプターを含む不均質アッセイにおいて利用する。被検物を含むと推定されるサンプルをリポソーム試薬及び固相と、当該サンプル中に存在する被検物が当該リポソームの中に組まれているリガンドと複合し、且つ当該リポソーム試薬 - 被検物複合体がハプテン / レセプター相互作用を通じて当該固相に結合するのに適当な時間及び条件下で接触させる。被検物の結合した固相を次にサンプルから分離し、洗い、そして被検物のためのラベル化特異的バインダーに当該ラベル化バインダーが結合被検物に結合できるのに適当な時間及び条件下で接触させる。次に結合ラベルの量を測定し、そしてサンプル中に存在する被検物の量と相同させる。一般に、サンプル中の検出されるラベルの量は当該サンプル中の被検物の量に多く、既知濃度の被検物を含むサンプルにより得られるシグナルを患者サンプルにより得られるシグナルと比較することにより相同させる。 30

本発明の別の態様において、当該リポソーム試薬は、当該固相をサンプルと接触させる前に、ハプテン / レセプター相互作用を通じてレセプターの固定化された固相と複合させてよい。好適なアッセイ方式において、当該アッセイは固相として、固定化抗ビオチン抗体を担持する磁気吸引性粒子を採用する。次にこのリポソーム試薬をそのハプテン化成分、例えばビオチニル化リン脂質を介して粒子に連結させる。 40

本発明のアッセイの更なる別の態様において、当該リポソーム試薬は更にラベル化合物、例えば酵素、そして好ましくはアルカリ性ホスファターゼを更に含んで成り、ここで当該ラベル化合物は当該リポソーム膜の中に組まれている、又は一体化している。この態様において、当該リポソーム試薬を被検物を含むと推定される検査サンプルと、ハプテンレセプターを担持する固相と同時に又は順次に混合する。上記の通り、被検物がリポソーム試薬のリガンドに結合し、このリポソーム試薬がハプテン / ハプテンレセプター相互作用を通じて固相に結合した後、結合した被検物をサンプル中の未結合物質から分離し、そして抗ラベルの量を検出する。

更なる別の態様において、当該リポソーム試薬は特異的な反応を介して固相により捕捉された被検物を検出するのに利用してよい。この被検物は所望するには、被検物と捕捉する 50

ように選定された固定化結合性ペアー構成員に対し、リガンド結合性部位とは別の部位、そして好ましくは立体障害を最少限にするよう当該リガンド結合性部位から十分に物理的に離されている部位において結合する。一の態様において、カルジオリピンがリガンドであり、そして検出する被検物は抗リン脂質抗体である。抗ヒト抗体（これは抗リン脂質抗体のFc部分に結合する）を固相に固定化する。抗リン脂質抗体を含むものと推定される患者サンプルを次に固相と、リポソーム試薬と同時に又は順々に、サンプル中に存在する抗体の全てが固相に結合するのに、且つリポソーム試薬が任意の結合した抗リン脂質抗体に特異的に結合するのに適当な時間及び条件下で接触させる。結合したリポソーム試薬をサンプル中の未結合物質から分離させた後、ハプテンのための所定量のラベル化レセプターを含む溶液を固相と接触させ、そして結合したリポソーム試薬の量を決定し、その量をサンプル中の被検物の量と相關させる。

サンプル中の抗リン脂質抗体の量又は存在を決定するための本発明のアッセイの別の態様において、補因子（当業者の一部により抗リン脂質抗体／リン脂質相互作用のために重要であると信じられている）をこのアッセイに含ませる。一の態様において、この補因子は本発明のリポソーム試薬の中に当該リガンド及びハプテン化リン脂質と一緒に挿入されていてよく、又はハプテン化され、そしてリポソーム試薬の中に挿入されていてよい。

Krilisらの米国特許第5,344,758号は抗リン脂質抗体の負に帯電したリン脂質に対する結合性が、ベーター2 - 糖タンパク質 - I (- 2 GPI)として同定された精製済み補因子の存在により高めることを教示する。それらの発見はベーター2 GPIの存在、又はその類似体の存在が抗体リン脂質相互作用にとって重要なことを示唆し、結合したベーター2 GPIが抗リン脂質抗体の特異的な抗原を形成することを想定させている。補因子が必要であるというこの所見は多大な論争の的となっていることは注目すべきである。- 2 - 糖タンパク質 - I（精製又は未精製形態）は当該リポソーム試薬の中に組込むことにより本発明のアッセイに含ませてよく、又は水性溶液において当該アッセイ混合物に加えてよい。- 2 - 糖タンパク質 - Iはアフィニティクロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーにより正常ヒト血漿又は血清から精製されうる。補因子を単離するためのクロマトグラフィー法はKrilisらの米国特許第5,344,758号、第10行から始まって詳述され、そして第13欄、Example 4及び5を参照されたい。

補因子を利用する好適な態様において、補因子のストック溶液を血清サンプルに加え、希釈サンプル中で50 μg / mlの最終補因子濃度を得る。これらのサンプルは本明細書におけるアッセイ方法を利用して抗リン脂質抗体についてアッセイする。Krilisらの方法はマイクロプレートELISA型アッセイを利用することに注目すべきであり、そして本発明に係るビオチニル化リポソーム／小胞の利用はリン脂質をマイクロプレートに直接コーティングするときに供されるものとはかなり異なるコンホーメーションにおけるリン脂質／補因子を供することが予測されるであろう。

本発明の一の観点として、当該リポソームは自動化アッセイ方式において抗リン脂質抗体の存在を検出するためのアッセイにおいて利用する。本実施例において、自動化分析器は一般にPCT出願PCT / US93 / 04209、国際公開番号W093 / 22686に記載されている。かかる分析器はSanofi Diagnostics Pasteur, Inc. USAから商標ACCESSで市販されている。以降に記載していない任意の操作上の詳細はこの市販の分析器及び／又はその一体化したマニュアルから容易にわかりうる。

低濃度において血清又は検査サンプル中に存在する被検物を検出するためにリポソーム試薬を利用する著しい利点がある。例えば、リポソーム試薬は複数の結合性部位を有するため、アッセイにおいて被検物を認識する能力は高まっている。更に、抗リン脂質抗体アッセイに係る一般的な問題はリガンド提示の不均質性である。本発明はリポソーム試薬を利用する固相へのリガンドの結合は、カルジオリピンの如きリン脂質リガンドの提示の再現性を、固相表層に直接固定化されたリン脂質リガンドを採用するその他のアッセイよりも向上させるものと予測される。

更に、本発明のリポソーム試薬は現状のマイクロプレート方式よりも自然なりガンド構造を提供する。更に、これらのエピトープは抗体に対してよりアクセス可能なようであり、

10

20

30

40

50

負に帯電したリン脂質が抗リン脂質抗体の固相アッセイにおいて認められるが如き特定のコンホーメーションへと封じ込められたアッセイと比べて高まつたアッセイ感度を供する。更に、経時的なリポソーム調製品の不安定性は従来発表されたリポソームを基礎とするアッセイ方式に係る問題でありうる。我々は本発明のリポソームが4にて16ヶ月以上窒素雰囲気下で貯蔵したときに本発明のアッセイ方式において利用するのに機能的であり続けることを見い出し、これらの調製品はアッセイキットにおいて利用するのに極めて適当である。

ここで説明の参考文献は引用することで本明細書に組入れる。

実施例 1

リポソームの調製

本実施例において、リポソームはリン脂質、カルジオリピン（これらの実施例においてはリガンドでもある）及びビオチニル化ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（bt-DPPE, Pierce Chemicals, Rockford, IL）の混合物を利用して調製した。

リポソームのストック調製品を調製するため、 $1 \mu\text{mole}$ （総量）のリン脂質を約1:20のbt-DPPE:CLのモル比（ボルテクスによる）において含む $0.2\text{ml} \sim 0.5\text{ml}$ の容量のエタノールを $12 \times 75\text{mm}$ のガラスチューブの上で窒素又はアルゴンガス流下で、好ましくは目に見える溶媒が蒸発して30分経過するまで乾かした。総リン脂質溶液がガラスチューブの底を覆うのに十分でないなら（ 0.3ml ）、乾燥前に追加のエタノールを添加する。乾燥したリン脂質膜を有するチューブをデシケーターの中でアルゴンもしくは窒素下で、又は真空下で、周囲温度において膜が水和してリポソームを形成するまで数週間保存する。このような条件下で保存した脂質膜はリポソーム試薬の機能における顕著な低下を示さなかった。リポソームを調製するため、上記の通りにして調製して脂質膜をリン酸緩衝食塩水（PBS, pH7.2~7.4）の適当な水和容量に至るまでの添加により水和させ、そして約1分間強力にボルテクスにかけた。この水和工程において利用したその他の緩衝剤にはトリス緩衝食塩水（TBS, pH7.4）及び牛血清アルブミン（BSA）又はヒト血清アルブミン（HSA）のいづれかのタンパク質1%を有するPBSが含まれる。水和溶液中のリン脂質濃度が十分に高いとき（例えば、仕込んだ脂質固体より 1mg/ml ）、この溶液は目に見えて曇って見える。リポソーム調製品のボルテクス後、それをオービタル型シューカーで30~60分振盪させることによりインキュベーションしてリポソーム収量を高めた。この工程は調製品中のより均一なサイズのリポソームも提供しうる。

組込まれなかつた分子は三通りの方法を利用してリポソーム調製品から分離した。これらの実施例において、当該リポソーム調製品を $13,000 \times g$ でマイクロ遠心分離し、PBSで洗い、そしてペレット画分を使用のために単離した。

組込まれなかつた分子をリポソームから分離する別の方法にはSephacryl 300カラム（Pharmacia）でのクロマトグラフィー及びPBSによる平衡化が含まれる。この方法において、リポソームはボイドボリュームの中にある及び/又は最初の数本の画分の中にあるであろう。従って、これらの画分を更なる研究のために用いた。更なる第三の方法において、水和化リポソーム調製品を50,000ダルトンの相対分子量カットオフ値のチューブを用いてPBSの中で透析した。

リポソーム調製品を遠心分離したとき、抗リン脂質抗体を有するサンプルに対する反応性が上清液及びリポソームのペレットの双方において見い出され、カルジオリピンの組込まれたリポソーム又はそのフラグメントが双方において存在することが示唆される。このペレットはリポソームのみを含むものと仮定され、従って上清液とのことわりのない限り、これらの実施例のほとんどにおいてペレット画分を使用した。

本実施例において記載の通りにして調製したリポソームはマイクロ遠沈管又はスクリューキャッププラスチックチューブの中で保存したときに窒素雰囲気下で4にて16ヶ月以上安定であった（抗リン脂質抗体を有するサンプルとの反応性の保持に関して）。

実施例 2

リポソーム試薬の特性決定

A. ハプテン化リン脂質、対、リガンドリン脂質のモル比の変動効果

10

20

30

40

50

ビオチニル化成分の組込みに対するbt - DPPE、対、カルジオリピンのモル比の変動の効果を調べるため、出発リン脂質比率における40倍の変動を研究した。カルジオリピン含有リポソームはカルジオリピン溶液（エタノール中の5 mg / mlのカルジオリピン：Sigma, St. Louis, Missouri USA）をbt - DPPE溶液（2 : 1のクロロホルムとメタノールとの混合物中で1又は5 mg / ml；bt - DPPEのLC形態；Pierce, Rockford, Illinois, Cat No.22010）と混合させることにより調製した。下記のbt - DPPE : CLの比を有するリポソーム調製品を、一定量のカルジオリピン（100 μg）を0 μgから40 μgに至る様々な量のbt - DPPEと混合することにより作った：1 : 100, 1 : 50, 1 : 25, 1 : 10, 1 : 5及び1 : 2.5。各調製品にエタノールを200 T 1の総容量に至るまで加え、その調製品をボルテクスにかけ、次いで実施例1に記載の通りにしてチューブの上に膜状に乾燥させた。この脂質膜を前記の通りにして水和し、そして組込まれていない分子を遠心分離を介して除去した。次いでリポソーム含有ペレットをPBSの中に40 μg / mlの総リン脂質濃度となるまで再懸濁した。

リポソームにおけるbt - DPPE、対、カルジオリピンの比を変えることがリポソーム試薬の固相（本実施例においては抗ビオチン強磁性粒子）に結合する能力に影響を及ぼすかどうかを調べるため、抗ビオチン抗体 - ビオチン相互作用を通じて、固相に対し、リポソームの中に組込まれたbt - DPPEに結合したアビジン - アルカリ性ホスファターゼコンジュゲート（アビジン - ALPコンジュゲート）を利用してアッセイを実施した。

これらのアッセイ成分は様々な比率のbt - DPPE及びカルジオリピンのみのリポソームを有する一の調製品、抗ビオチン強磁性粒子、希釈緩衝液中のアビジン - ALPコンジュゲート、洗浄緩衝液並びに化学発光基質を有するリポソーム試薬調製品を含んでいた。

これらのアッセイにおいて利用する強磁性粒子はPhone Poulenc (Paris, France) より入手し、そして下記の通りにしてヤギ抗 - ビオチン抗体でコーティングを施した。抗ビオチン抗体はキーホール・リンベット・ヘモシアニン (KLH) - ビオチン免疫原をヤギに注射し、次いでビオチニル化BSAカラムを用いて所望の検体をアフィニティー精製することにより得たポリクローナル抗体とした。粒子を脱イオン水及び2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸 (MES) 緩衝液で洗い、そしてそれらを約30分、N - ヒドロキシスルホスクシニミド (スルホ - NHS) 及び1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸塩 (EDC) の溶液とインキュベーションすることにより活性化させた。活性化粒子は未反応成分から、磁場を適用し、そしてMES緩衝液の中で再懸濁することにより分離した。ロバ抗ヤギ抗体は、粒子と100 μg / mlの抗ヤギ抗血清 (Pel-Freez, Inc., Rogers, Arkansasより入手し、そしてヤギ IgGでアフィニティー精製）との混合物を約2時間インキュベーションすることにより粒子に吸着させた。

これらの粒子を緩衝液（1 Mのグリシン、pH6.0）で洗い、次いでまずトリス緩衝液pH8、次いでグリシン緩衝液pH2.5、その後再びトリス緩衝液pH8により一連の洗浄を行った。次にこれらの粒子を保存緩衝液（0.1%のBSA、保存剤及び塩を有するトリス緩衝液）の中に再懸濁した。抗ヤギ抗体の結合したこれらの粒子を上記の通りにして得た15 μg / mgの濃度のヤギ抗ビオチン抗血清と組合せ、そして周囲温度で一夜インキュベーションした。

アビジン - ALDコンジュゲートはCalBiochem/Behring Diagnostics (La Jolla, California, Cat. #189732) より入手し、そして希釈緩衝液pH7.7の中で0.25 μg / mlにまで希釈した。これらの実施例において使用した希釈緩衝液は0.1Mのトリス、0.1%のBSA、0.25mg / mlのマウスIgG、1.0mMのMgCl₂、0.1mMのZnCl₂、0.15MのNaCl、0.2%のツイーン20、0.1%のProClin (Rohm and Haasより製造された保存剤)、0.1%のNaN₃、及び7% (v / v) の熱不活性化正常ウマ血清 (NES) を含んだ。

これらの実施例において利用した洗浄緩衝液は20mMのトリス、0.15MのNaCl、0.05%（活性固形分）のFC100（フルオロアルキルスルホネート界面活性剤、ナトリウム塩、イオン性界面活性剤；3M, St. Paul, MNより市販）及び0.1%のProClinを含んだ。

これらのアッセイにおいて使用した化学発光基質はLumiPhos（登録商標）ジオキセタン化学発光基質とした（LumiPhos（登録商標）530はLumigen, Inc. Detroit, Michigan, USAより市販）。この組成物はアルカルホスファターゼと反応し、検出可能な化学発光シグナ

10

20

30

40

50

ルを生成する。

本実験においては、 $25\mu\text{l}$ づつのリポソーム調製品 ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) を $50\mu\text{l}$ の $1\text{mg}/\text{ml}$ の抗ビオチン強磁性粒子と混合し、そしてその反応混合物の容量を洗浄緩衝液で約 $250\mu\text{l}$ にし、そしてその混合物を 37°C で約30分インキュベーションした。結合したリポソーム試薬を一連の3回の分離及び洗浄工程を介して未結合反応成分から分離した。ここでは、強磁性粒子を含む反応槽を磁場に置き、そして粒子をこの反応槽の側部に吸引させ(磁場分離段階)、溶液を反応槽から吸引し、ついで粒子を洗浄緩衝液の中に再懸濁させた。3回目の洗浄及び吸引工程の後、粒子を $100\mu\text{l}$ のアビジン-ALPコンジュゲート及び $250\mu\text{l}$ の洗浄緩衝液を含む溶液の中で再懸濁させた。この混合物を 37°C で約30分インキュベーションし、次いで未結合のコンジュゲートをこの粒子に結合したコンジュゲートから上記の磁場分離及び洗浄により分離した。次にこれらの粒子を $250\mu\text{l}$ のLumiPhos(登録商標)530基質と混合し、そして約5分インキュベーションし、そしてこの混合物の化学発光をルミノメーターを用いて測定し、そして相対ルミノメーター単位(RLU)として表示した。
表1の中で反映されている通り、 $1:2.5 \sim 1:100$ のbt-DPPE:CLの範囲のハプテン化リン脂質、対、リガンド(本実施例においてはカルジオリピン)のモル比率を有するリポソームは固相に対し、バックグランドよりも高い検出可能な化学発光シグナルを生成するのに十分な量で結合し、そしてS/N比はより多くのbt-DPPEがリポソームの中に組込まれるほど上昇した。表1において、S/Nはシグナル、対、ノイズ比を表わす。これらの実施例におけるS/Nはコントロール調製品(カルジオリピンのみのリポソーム、ビオチンは存在しない)により得られたRLU値を本アッセイにおいて用いたリポソーム試薬調製品により得られたRLU値から差し引き、そしてその結果をコントロール調製品値で除することにより決定した[(bt-DPPE:CL RLU値 - コントロールRLU値) / コントロールRLU値]。これらのアッセイにおいて、5より大きいS/N比は陽性(P)又はバックグランドより有意に高いと考え、2~5のS/N比は中間又はボーダーライン(B)と考え、そして2未満のS/N比は陰性(N)と考えた。

表1

アビジン-ALPコンジュゲートによるBt-DPPE効率応答

リポソームの組成	BtDPPE:CL比	平均RLUs	S/N
CLのみ	n/a	24,156	0
bt-DPPE:CL	1:100	648,818	26
bt-DPPE:CL	1:50	1,393,385	57
bt-DPPE:CL	1:25	1,844,640	75
bt-DPPE:CL	1:10	2,810,540	115
bt-DPPE:CL	1:5	3,737,520	154
bt-DPPE:CL	1:2.5	4,404,780	181

B. 水和の際の総リン脂質濃度の変動効果

本発明のリポソーム試薬を更に、一定量の総リン脂質と、 $1:10$ のbt-DPPE、対、カルジオリピンの1通りのモル比とを利用するが、但し様々な再懸濁容量を利用して調べ、水和の際の脂質濃度が固相に対するリポソーム試薬の結合効率に影響を及ぼすかどうかを決定

した。本実施例において利用したリポソーム試薬調製品は前述の通りに調製したが、様々な量の1%のHSAを有するPBSで水和させた：400 μl (20 μg / mlの総リン脂質)、200 μl (40 μg / mlの総リン脂質)、80 μl (100 μg / mlの総リン脂質)又は40 μl (200 μg / mlの総リン脂質)のそれぞれ。カルジオリビンのみのコントロールは1%のHSAを有する200 μl のPBSで40 μg / mlの濃度に至るまで水和させた。各リポソーム試薬調製品は前例の通りにアッセイした。表2に示すように、試験した総リン脂質濃度の範囲内で、水和容量は本アッセイにおけるリポソーム試薬の性能にとって本質ではなかった（試験した範囲内で）。

表2

リポソーム試薬に対するリン脂質濃度の変動効果

リポソーム リン脂質濃度	BtDPPE:CL 比	平均 RLUs	S/N
CLのみ	n/a	24,156	0
bt - DPPE:CL, 20 μ g / ml	1:10	3,168,020	130
bt - DPPE:CL, 40 μ g / ml	1:10	2,810,540	115
bt - DPPE:CL, 100 μ g / ml	1:10	2,059,150	84
bt - DPPE:CL, 200 μ g / ml	1:10	2,865,070	118

C. 検査サンプル中の抗リン脂質抗体による認識についてのリポソーム試薬の能力に対するハプテン化リン脂質、対、リガンドリン脂質のモル比の変動効果

リポソーム中のbt - DPPE、対、カルジオリビンの比の変動が血清サンプル中の抗リン脂質抗体と反応するリポソーム試薬の能力に影響を及ぼすかどうかを決定するため、様々な比のbt - DPPEとカルジオリビンのみのリポソームを有する一の調製品とを利用してアッセイを実施した。このリポソーム調製品は抗リン脂質抗体を含む血清（Shield Diagnostics Ltd., The Technology Park, Dundee DD1 1SW, UK由来のDiastat抗カルジオリビンキット及びSanofi Diagnostics Pasteur, Inc., Chaska, MN 55318由来のKallestad抗カルジオリビンマイクロプレートEIAキットを用いて決定）、上記の抗ビオチン強磁性粒子、希釈緩衝液の中で0.1 μg / mlに希釈したモノクローナル抗ヒトIgGのアルカリホスファターゼラベル化コンジュゲート（抗ヒトIgG - ALb, Fc特異性、The Binding Site, San Diego, CAより入手）、洗浄緩衝液及び化学発光基質と組合せた。

アッセイは2 μl 当量の血清、100 μl の抗ビオチン強磁性粒子及びこのアッセイの第一段階で組合せたリポソーム試薬調製品により上記の通りに実施した。また、上記アッセイにおいて用いたアビジン - ALPコンジュゲートの代わりに抗ヒトIgG - ALPコンジュゲートを使用した。

表3に示す通り、1 : 2.5から1 : 100のbt - DPPE : CLに至るハプテン化リン脂質、対、リガンド（本実施例においてはカルジオリビン）のモル比を有するリポソームは血清サンプル中の抗リン脂質抗体に対し、バックグラウンドより高い検出可能な化学発光シグナルを生成するのに十分な量で結合できた。更に、S / N比のわずかな変化がリポソームの調製品において用いる様々な量のbt - DPPEで観察され、1 : 100の比での十分な捕捉能力が示唆

10

20

30

40

50

された。
表 3

血清及び抗 IgG-ALP ホスファターゼによる Bt-DPPE 効価

リポソーム 試薬組成	BtDPPE:CL 比	平均 RLUs	S/N
CLのみ	n/a	677,022	0
bt-DPPE:CL	1:100	8,651,140	12
bt-DPPE:CL	1:50	9,622,645	13
bt-DPPE:CL	1:25	8,853,780	12
bt-DPPE:CL	1:10	8,310,435	11
bt-DPPE:CL	1:5	8,600,020	12
bt-DPPE:CL	1:2.5	6,497,990	9

D. 抗リン脂質抗体に対して結合するリポソーム試薬の能力に対する水和の際の総リン脂質濃度の変動効果

本発明のリポソーム試薬を更に、一定量の総リン脂質と 1 : 10 の bt - DPPE、対、カルジオリピンの 1 通りのモル比率に利用し、但し様々な再懸濁容量を利用して調べ、かかる容量の変動が抗リン脂質抗体の検出におけるリポソーム試薬の有用性に影響を及ぼすかを決定した。本実施例において用いたリポソーム試薬調製品は上記の通りに調製したが、1 % の HSA を有する PBS の量を $400 \mu l$ ($20 \mu g / ml$)、 $200 \mu l$ ($40 \mu g / ml$)、 $80 \mu l$ ($100 \mu g / ml$) 及び $40 \mu l$ ($200 \mu g / ml$) でそれぞれ変動させて水和させた。カルジオリピンのみのコントロールは 1 % の HSA を有する PBS $200 \mu l$ で水和させた。

各リポソーム調製品は $100 \mu l$ (2 μl 当量) の希釈ヒト血清サンプル及び抗ヒト IgG - ALP コンジュゲートを用い、上記の通りにアッセイした。表 4 に示す通り、試験した総リン脂質濃度の範囲内で、これらの結果は出発リン脂質濃度に基づく抗リン脂質抗体による認識の有意な変化はないことを示した。

10

20

30

表 4

抗リン脂質抗体によるリポソーム試薬認識に対するリン脂質濃度の
変動効果

リポソーム リン脂質濃度	BtDPPE:CL 比	平均 RLUs	S/N
CLのみ	n/a	677,022	0
bt-DPPE:CL, 20 μ g / ml	1:10	9,182,860	13
bt-DPPE:CL, 40 μ g / ml	1:10	8,310,435	11
bt-DPPE:CL, 100 μ g / ml	1:10	10,285,220	14
bt-DPPE:CL, 200 μ g / ml	1:10	8,945,220	12

当業者は当該検査アッセイの効率に対する脂質の比率及び濃度の効果を決定するためのこれらの方針を利用してそのアッセイを容易に最適化できる。

実施例 3

アッセイにおけるリガンド濃度の上昇の効果

リポソーム試薬調製品は本質的に実施例 3 の通りに調製した。前記参照。本件の場合、5 : 1 の比のため、300 μ l の 5 mg / ml のリガンド溶液（カルジオリビン溶液（1.5mg））及び300 μ l の 1 mg / ml の bt - DPPE (300 μ g) をチューブ上で乾燥させた。各調製品のストック溶液は総容量1.8mlのPBSにより水和させることにより得た。0 ~ 1 μ g / 検査のリガンド濃度を下記の通りにして自動分析器でカルジオリビン陽性コントロール血清により分析した：100 μ l のリポソーム試薬調製品、100 μ l の希釈血清サンプル（血清サンプルは抗リン脂質抗体を含むことのわかっている血清又は正常ヒト血清のいづれかとした）、50 μ l の 1 mg / ml の強磁性粒子及び100 μ l のウマ抗ヒト IgG - ALP コンジュゲート（1 % のヒト血清アルブミンを有する PBS 中で 0.6 mg / ml ）を反応槽に順番に加え（同時に）、30 分インキュベーションし、次いで実施例 2 に記載の通りに 3 回洗浄した。LumiPhos（登録商標）530ジオキセタン化学発光基質（250 μ l ）を加え、そしてサンプルのルミネッセンスを測定した。表 5 からわかる通り、血清中の抗リン脂質抗体の結合の上昇がリガンド濃度の増大とともに観察された。

10

20

30

40

表 5

血清によるリガンド力値

リガンド濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	平均	S/N
0	196,034	0
0.25	2,128,345	9.86
0.5	4,066,795	19.7
1.0	7,696,555	38.3
1.5	9,890,825	49.5
2.0	12,135,000	60.9
5.0	17,695,300	89.3
10.0	21,466,300	109

10

20

30

40

実施例 4

抗リン脂質抗体を検出するためのアッセイ

リガンドとしてのカルジオリビン及びbt - DPPEの組込まれたリポソームを本質的に実施例 1 の通りに調製した。本件の場合、5 : 1 の比率のために300 μl の5 mg / mlのカルジオリビン溶液及び300 μl の1 mg / mlのbt - DPPEをチューブ上で乾燥させた。調製品は総容量1.8mlのPBSで水和し、ストック濃度は1 mg / mlとした。リポソーム試薬調製品をPBSで1 / 200に希釈し、そしてアッセイを実施例 2 に記載の通りにし、固相として強磁性粒子を用い、様々な患者サンプル及び抗IgG - ALPコンジュゲートにより実施した。同じ患者サンプルを抗リン脂質抗体を検出するために利用される2種類の市販のマイクロプレートキットで実施するアッセイにおいても利用した。マイクロプレートキットはSanofi Diagnostics Pasteur, Inc., Chaska, MNより入手できるKallestad抗カルジオリビンマイクロプレートEIAキット及びShield Diagnostics Ltd., The Technology Park, Dundee, Scotlandより入手できるDiastat総抗カルジオリビンキットとした。

12種類のサンプルを本発明の方法及び上記マイクロプレートキットと共に供される仕様に従って抗リン脂質抗体の存在について検査した。表 6 に示す通り、各マイクロプレートキットで実施した検査の結果は12のサンプルのうちの6つにおいて互いと異なっていた。この6つのサンプルのうち、双方のキットで得られる結果は同じであり、本発明のアッセイの結果はそれらの結果と一致した。マイクロプレートの一一致した結果のない場合、12のサンプルのうちの6から何ら結論を引き出せなかった。しかしながら、本実施例は本発明のアッセイが検査サンプル中の抗リン脂質抗体の検出において有用であることを示した。

表 6

リポソーム試薬アッセイ及び2種類のマイクロプレートキット

サンプルNo.	リポソーム試薬 アッセイ	キット1 の結果	キット2 の結果
ブランク	n/a	n/a	n/a
1	P	P	B
2	P	P	P
3	N	N	P
4	P	P	P
5	P	P	P
6	P	P	P
7	P	P	P
8	N	N	P
9	N	N	P
10	N	P	B
11	N	N	P
12	N	P	P

P - 陽性結果

B - ボーダーライン結果

N - 陰性結果

実施例 5

マイクロプレートELISA方式におけるハプテン化リポソームリガンドの利用

カルジオリビン及びbt-DPPEの組込まれたリポソームを本質的に実施例1の通りに調製した。本件の場合、ハプテン化リポソーム試薬をマイクロプレートのウェル上に固定化された抗ヒト抗体（これは被検抗体のFc部に結合する）により捕捉される被検物に結合させた。本件の場合、被検物/リポソーム試薬複合体をハプテンのためのレセプター及びアルカリホスファターゼラベルを含んで成るコンジュゲートを用いて検出した。マイクロプレート（Nunc, Denmark #4-41653）を脱イオン水で洗浄し、次いで下記の通りにしてヤギ抗ヒト抗体（ヤギ抗ヒト抗体、抗-IgG、抗-IgM, Jackson Laboratories, Cat #109005127）でコーティングを施した。抗体を0.05Mのグリシン/0.1MのNaCl, pH 3の中に1mg/mlに希釈し、そして室温で15分インキュベーションした。pHはこの抗体溶液を50倍過剰量の0.1Mのリン酸カリウムpH7.4の中で20μg/mlの最終抗体濃度となるように希釈することにより中和した。100μlの中和抗体溶液を洗浄済みのプレートの各ウェルに加え、そし

10

20

30

40

50

て4で一夜インキュベーションした。次にこれらのプレートをPBSで3回洗って未結合抗体を除き、次いでPBS/1%のBSA(フラクションV,Sigma Chemicals)と37で60分インキュベーションした。

アッセイにおいて使用する前にプレートを再び洗った。このアッセイにおいて、100μlの患者サンプル(0.1%のBSAを有するPBSに1:25で希釈)を適切なウェルに加え、そして37で2時間インキュベーションした。正常ヒト血清コントロール及び抗リン脂質抗体血清を陰性及び陽性コントロールとして含ませた。

2時間のインキュベーション後、プレートをPBSで3回洗った。リポソーム試薬調製品は実施例2の通りであるが、5:1~20:1のCL:bt-DPPE比及びbt-DPPEのないCLコントロールで調製した。100μlづつの各リポソーム調製品(オリジナルストックの1mg/mlのリポソーム試薬調製品の1:25及び1:100の希釈物)及び陰性コントロール(リガンドなし)を適切なウェルに加え、そして室温で90分インキュベーションした。
10

これらのプレートを3回洗浄して過剰のリポソーム試薬を除去し、そしてストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲート(Jackson #016050084, PBS/0.1%のBSAで1/10,000に希釈)を加え、そしてこれらのプレートを室温で60分インキュベーションした。次にこれらのプレートを洗い、そして100μlのp-NITROフェニルホスフェート(PNPP)基質を加えた。30分のインキュベーション後、反応を停止させ、そして発生したシグナルの値を405nmで光度学的に測定した。

これらの結果はリポソーム試薬が検査サンプル中の抗リン脂質抗体により捕捉されることを示した。
20

実施例6

膜に一体化したラベルを有するリポソームリガンド

本実施例においては、リポソーム試薬はリン脂質リガンドをリポソーム膜の中に、ハプテン化リン脂質及びタンパク質、本件においてはラベル化合物アルカリホスファターゼと共に組込んで調製した。

5種類のリポソーム調製品を一般に実施例1に記載の通りにして作った。実施例1に記載の方法の第一乾燥段階においては、20μlのカルジオリピンストック溶液(5mg/ml)をチューブ1においてbt-DPPE抜きで180μlのエタノールを組合せた。チューブ2~5においては、20μlのカルジオリピンストック溶液を5μlのbt-DPPEストック溶液(5mg/ml)及び175μlのエタノールを組合せた。水和段階においては、アルカリホスファターゼ溶液(Boehringer, West Germany, Cat. #556602)、アルカリホスファターゼ緩衝液(上述のアルカリホスファターゼ溶液と同じ緩衝液であるが、酵素が入っていない:3MのNaCl, 1mMのMgCl₂, 0.1mMのZnCl₂, 30mMのトリエタノールアミン、pH7.6)及びリン酸緩衝液(50mM, pH7.2)をリン脂質膜がその上に乾燥して載っているチューブ1~5に様々な量で加えた。110μlのALP溶液及び890μlのリン酸緩衝液をチューブ1に加えた。10μlのALP緩衝液及び890μlのリン酸緩衝液をチューブ2に加えた。22μlのALP溶液、88μlのALP緩衝液及び890μlのリン酸緩衝液をチューブ3に加えた。55μlのALP溶液、55μlのALP緩衝液及び890μlのリン酸緩衝液をチューブ4に加えた。110μlのALP溶液及び890μlのリン酸緩衝液をチューブ5に加えた。
30

これらのチューブをボルテクスにかけ、そして実施例1に記載の通りにインキュベーションした。これらのチューブを洗浄して組込まれていないALPを除去した。次に1mlのPBSを各調製品に加え、混合し、マイクロ遠沈管の中で遠心分離し、そして上清液を除去した。この洗浄工程を更に2回繰り返し、次いでリポソームペレットを500μlのPBSの中に再懸濁した。アルカリホスファターゼがリポソーム試薬の中に組込まれた/一体化したかどうかを決定するため、25μlづつのリポソーム調製品を50μlの抗ビオチン強磁性粒子と混合し、そして反応混合物の容量を洗浄緩衝液で約250μlにし、そしてこの混合物を37で約30分インキュベーションした。次いで結合したリポソーム試薬を実施例2に記載の一連の分離及び洗浄工程を介して未結合反応成分から分離した。これらの粒子を250μlのLumiPhos(登録商標)530基質と混合し、そして約5分インキュベーションし、そしてこの混合物のルミネッセンスをルミノメーターを用いて測定し、そして相対ルミノメーター単
40

位 (RLU) として表示する。シグナルの生成はリポソームへのALPの組込み / 一体化を示唆する。

表7

リポソームに一体化したアルカリホスファターゼ

リポソーム試薬 調製品の希釀率	チューブ1 bt-DPPEなし CL/ALP 550 μg/ml ALP		チューブ2 ALPなし CL/bt-DPPE		チューブ3 100 : 1 CL/ALP 110 μg/ml ALP		チューブ4 50 : 1 CL/ALP 220 μg/ml ALP		チューブ5 20 : 1 CL/ALP 550 μg/ml ALP	
	平均	S/N	平均	S/N	平均	S/N	平均	S/N	平均	S/N
1/10	157,050	0	10,980	-1	1,705,640	10	3,996,975	24	7,854,870	49
1/100	37,316	0	9,976	-1	324,739	8	782,348	20	1,531,940	40
1/1000	10,175	0	9,261	0	45,834	4	97,220	9	213,132	20
1/10,000	9,441	0	9,439	0	12,442	0	15,931	1	18,797	1

表7に示すように、これらの結果はALPがリポソーム試薬に一体化 / 挿入され、そしてリポソーム試薬が組込まれていないALPを除去するためのマイクロ遠心分離による基本的分

離後に機能的であることを示す。S / N 比はリポソーム調製段階において利用した最大ALP濃度において上昇し続け、所望するならS / N比を高めるために追加のALPを添加できることを示唆している。本実施例において、S / N比は下記の通りに決定した：〔(リポソーム試薬により得られる平均値 - チューブ1における同希釈率のリポソーム試薬により得られる平均値) / チューブの平均値〕。

フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 マックスフィールド ウィルソン, ナンシー

アメリカ合衆国, ミネソタ 55437, ブルーミントン, クレストウッドロード 8920

(72)発明者 ラリュ, カテリーヌ

フランス国, 92420 ポークレッソン, アブニユ ルノートル 11, レジドンス ドゥ ボークレッソン

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 特開昭54-151097(JP, A)

特開昭62-269070(JP, A)

国際公開第93/010226(WO, A1)

特開平6-88823(JP, A)

特開平1-124382(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/544

G01N 33/564