

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4399115号  
(P4399115)

(45) 発行日 平成22年1月13日 (2010. 1. 13)

(24) 登録日 平成21年10月30日 (2009. 10. 30)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/563 (2006. 01)

GO 1 N 33/563

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53

D

請求項の数 21 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2000-555093 (P2000-555093)  
 (86) (22) 出願日 平成11年5月14日 (1999. 5. 14)  
 (65) 公表番号 特表2002-518675 (P2002-518675A)  
 (43) 公表日 平成14年6月25日 (2002. 6. 25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/SE1999/000828  
 (87) 国際公開番号 W01999/066325  
 (87) 国際公開日 平成11年12月23日 (1999. 12. 23)  
 審査請求日 平成18年5月12日 (2006. 5. 12)  
 (31) 優先権主張番号 A 1068/98  
 (32) 優先日 平成10年6月19日 (1998. 6. 19)  
 (33) 優先権主張国 オーストリア (AT)

(73) 特許権者 597064713  
 ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス  
 ・アクチボラグ  
 スウェーデン国エスエー 7 5 1 8 4  
 ウプサラ ビヨルクガタン 3 0  
 (74) 代理人 100062144  
 弁理士 青山 稔  
 (74) 代理人 100067035  
 弁理士 岩崎 光隆  
 (72) 発明者 フランツ・シュタインドル  
 オーストリア、アー 1 2 1 0 ヴィエンナ  
 、シュッフェル・シュトラセ 7 / 9 / 1  
 3 番

審査官 山村 祥子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 天然または組換えタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの定量的解離の方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

熱安定性免疫リガンドであって、免疫グロブリンのFc部分に結合できる天然または組換えタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの、種々のサンプルマトリックス中の複合体からの定量的解離方法であって、pHおよびタンパク質含量によるサンプルの変動を補うために緩衝剤および/またはタンパク質をそれぞれサンプルに添加し、該サンプルを免疫グロブリンに非特異的に吸着または結合できる試薬化合物と混合し、その後サンプルを加熱処理し、続いて冷却工程に付すことを特徴とする方法。

【請求項 2】

キレート化剤を、存在し得る重金属イオンを結合するために加熱段階前に添加することを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

試薬化合物が疎水性および陰性荷電末端を有す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】

試薬化合物がドデシル硫酸ナトリウム (SDS) であることを特徴とする、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

試薬化合物の加熱段階前のサンプル中の濃度が、10 から 40 mM、好ましくは 30 から 40 mM の範囲であることを特徴とする、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 6】

加熱段階を 3 から 180 分の間の範囲および 60 から 100 の間の範囲で適用することを特徴とする、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7】

冷却段階において、加熱段階後の温度を 0 から 40 、好ましくは、4 から 35 の範囲の温度に低下させることを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 8】

加熱段階中の pH が、5 から 8 の範囲、好ましくは 6 から 7.5 の間であることを特徴とする、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 9】

加熱段階前にサンプルに添加する緩衝液がリン酸緩衝液またはホウ酸緩衝液であることを特徴とする、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 10】

加熱段階前のサンプル中の緩衝剤の濃度が 5 から 100 mM の範囲内で選択されることを特徴とする、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 11】

加熱段階前にサンプルに添加するタンパク質の濃度が、添加した試薬化合物の 1 / 20 から 1 / 100、即ち、0.1 から 2 mM、好ましくは 0.3 から 2 mM の範囲内で選択されることを特徴とする、請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 12】

キレート化剤がサンプル中に加熱段階前に 0.5 から 5 mM の範囲内の濃度で存在することを特徴とする、請求項 2 から 11 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 13】

以下の段階：

a) アッセイされるサンプルを、定められたタンパク質含量を有するリン酸緩衝化溶液で前希釈し、前希釈したサンプルを、熱安定性免疫リガンドを解離するためにこのサンプルマトリックスのために調節された定められた試薬と混合し；

b) アッセイされるサンプルを、加熱し、続いて冷却し；そして

c) アッセイに使用されるサンプル希釈緩衝液に比例して添加された試薬と共に、免疫化学アッセイを実施する

ことにより特徴付けられる、請求項 1 から 12 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 14】

熱安定性免疫リガンドの解離用試薬が、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) とキレート化剤、好ましくはジエチレントリアミン五酢酸 (DETAPAC) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含むことを特徴とする、請求項 13 記載の方法。

## 【請求項 15】

未知サンプルにおいて、サンプルを定められたタンパク質溶液と 1 + 4 の比率で混合し、本混合物を次いで試薬溶液と 1 + 2 の比率で混合することを特徴とする、請求項 13 または 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

試薬を、アッセイに使用されるサンプル希釈緩衝液に比例して、サンプル希釈緩衝液中 0.02 % の遊離 SDS 濃度まで添加することを特徴とする、請求項 13 から 15 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 17】

アッセイされる前希釈サンプルの加熱を 2 時間、100 で行い、続いて室温に冷却することを特徴とする、請求項 13 から 16 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 18】

二つの反応溶液、即ち定められたタンパク質溶液および試薬溶液の pH が、6.0 - 7.5 に調節されていることを特徴とする、請求項 13 から 17 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 19】

10

20

30

40

50

1 (サンプル) : 4 (タンパク質溶液) : 10 (試薬溶液)の混合比率を使用することを特徴とする、請求項 13 から 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

定められたタンパク質溶液がリン酸緩衝液であり、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{NaCl}$ およびウシ血清アルブミンまたは卵アルブミンまたは他のアルブミンまたはこれらの混合物からなる群から選択されるタンパク質を含むことを特徴とする、請求項 13 から 19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

方法が熱安定性免疫リガンドの測定のための免疫アッセイの一部であることを特徴とする、請求項 1 から 20 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、解離した天然または組換えタンパク質、ポリペプチドまたはタンパク質を、免疫化学アッセイにおいて定量的に利用可能にし、定量的に利用可能に保つための、種々のサンプルマトリックスの複合体からの免疫グロブリンのFc部分(抗体、特にIgGクラスおよび主にパラトープの外側で結合する)に結合できる天然または組換えタンパク質、ポリペプチドまたはペプチド(熱安定性免疫リガンド)の定量的解離の方法に関する。解離の方法は、主に上記のタンパク質、ポリペプチドおよびペプチドの種類の免疫アッセイにおける前段階として、それらが種々の免疫グロブリン/抗体調製物に汚染物として、または多かれ少なかれ純粋な調製物として存在するときに記載するような使用することを意図している。

【0002】

本発明の内容において、“細菌起源”なる用語は、天然に細菌または他の微生物に由来するポリペプチドまたはタンパク質を意味する。“組換え”は、遺伝子操作の手段により任意のタイプの細胞で発現されるタンパク質、ポリペプチドまたは短い抗体結合フラグメントを示す。“合成ペプチド”は、機能的領域を含むタンパク質またはポリペプチドの一部が、化学ペプチド合成の手段により製造されることを意味する。

【0003】

殆どの哺乳類の主要なクラスG免疫グロブリン(Ig)(IgG)のFc部分と結合できる天然に存在するタンパク質は、主に細菌起源である。結合強度は、種およびサブクラスに依存して異なる。この特性は、最初にStaphylococcus aureusのプロテインA(SPA)に関して1966年(Forsgren A., Sjoquist J. J. Immunol. 1966; 17:822-27)に、少し遅れて、Staphylococcus pneumoniaeのプロテインG(SPG)に関して1973年(Kronvall G., J. Immunol. 1973; 111:1401-06)に記載された。これらのタンパク質は、重鎖の定常領域2および3(CH2およびCH3)の間の領域で抗体と結合する。プロテインAおよびGは、更にVH3ファミリーに属するIgA、IgE、IgGおよびIgMの重鎖の可変領域に結合できることが既知である(Ingaes M. et al., Scand. J. Immunol. 1983; 17:201-09)。抗体の重鎖の可変領域の3つのセクションのアミノ酸(FR1、CDR2およびFR3)は、このいわゆる“選択的反応性”に関与する(Potter KN. et al., J. Immunol. 1996; 157(7):2982-88およびPotter KN. et al., Int. Rev. Immunol. 1997; 14(4):291-308)。プロテインAおよびGは、抗体に同じ部位または、少なくとも、密接に重なった部位で結合する(Eliasson M. et al., J. Immunol. 1989; 142(2):575-81)。プロテインAは5(A-E)IgG結合サブユニットを有する(Moks T. et al., Eur. J. Biochem. 1986; 153(3):637-43)。“選択的反応性”は、全ての単ドメインの機能であり得るが、ドメインB(Ingaes M. et al., Scand. J. Immunol. 1980; 12:23-31, Ingaes M. et al., Scand. J. Immunol. 1981; 13:343-352, Ingaes M. et al., Scand. J. Immunol. 1981; 14:379-388)およびドメインD(Roben PW. et al., J. Immunol. 1995; 154(12):6437-45)に関しては二つのフラグメント(ドメイン)で試験されている。

【0004】

プロテインAおよびGとは別に、更なる結合タンパク質が既知であるが、例えば、プロテ

10

20

30

40

50

ンH(Akesson P. et al., Mol. Immunol. 1990; 27(6):523-31)またはクルステリン(clust erine)(Wilson MR. et al., Biochim. Biophys. Acta 1992; 1159(3):319-326)のような異なる特性および結合領域を有する。上記IgG結合タンパク質、ポリペプチドおよびペプチド(パラトープの外側に結合)は、熱処理(溶液中)に相対的に耐性であり、従って、本明細書では熱安定性免疫リガンドと呼ぶ。

#### 【0005】

これらのタンパク質(特にプロテインA)は、種々の適用で使用され、モノクローナルおよびポリクローナル抗体の精製において主に大規模で用いられる。両方の天然および組換え形を免疫親和性クロマトグラフィーでリガンドとして使用する。この精製法は、複合体溶液からの非常に有効な抗体の精製を提供する。抗体は通常、中程度のpHで、これらの免疫グロブリン結合タンパク質の一つをリガンドとして担持しているクロマトグラフィーマトリックスに結合し、酸性環境(pH = 2.7 - 3.5、または2.7 - 3.2)で脱着する。これらの条件下で、しかし、ある程度のリガンド結合を避けるのは不可能である。

#### 【0006】

これは、臨床適用で使用する抗体調製物にとって非常に重要である。プロテインA(同じことがプロテインGにも当て嵌まる)は、高い生物学的活性を有すると仮定され、多くの刊行物が動物モデルおよびヒトにおける毒性効果を記載している(Bensinger WL. et al., J. Biol. Response Mod. 1984; 3(3):347-51, Messerschmidt GL. et al., J. Biol. Response Mod. 1984; 3(3):325-29, Terman DS. et al., Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 1985 Oct; 21(19):1115-22, Ventura GJ. et al., Cancer Treat. Rep. 1987 Apr.; 71(4):411-13)。エンテロトキシンAおよびBと一緒に、プロテインAはまたStaphylococcus aureus感染の病因に役割を担うと考えられる。この“選択的反応性”のために、ファミリーVH3 B - 細胞の有糸分裂促進刺激をもたらすこともできる。したがって、これらのリガンドを感受性に、特異的に、そして、特に正確に、免疫グロブリン調製物において同定できる。

#### 【0007】

多くの刊行物およびレビュー文献が、抗体のFc部分に結合できるポリペプチドを使用する可能性のある方法、および臨床的適用のための生産物に汚染物として存在する場合のその可能性のある危険性を扱っている(例えば、Langone JJ. et al., J. Adv. Immunol. 1982; 17:157-252)。

#### 【0008】

これまで、ELISA(酵素酵素結合免疫吸着検定)またはRIA(放射免疫アッセイ)のような免疫化学アッセイが、Ig結合タンパク質および/またはポリペプチドの検出および定量的ために異なるバリエーションで用いられている。

#### 【0009】

このタイプのアッセイの一つの問題は、Fc(IgG)結合タンパク質(検体)が抗体/免疫グロブリンGのFc部分と、種、IgGサブクラスおよび抗体ですら依存して異なる親和性で複合体を形成することである。これは、抗体フラグメント(Fab、Fab')または特異的二ワトリ抗体(タンパク質AまたはGにFc部分で結合しない)を検出に使用することにより先に解決されている(例えば、Langone JJ. et al., J. Immunol. Meth. 1982;63:145-57)。

#### 【0010】

IgGのFc部分からFc(IgG)結合タンパク質およびポリペプチドを、それらをIgG存在下で同定するために解離するために、サンプルを慣用的には酸性環境(各々pH = 3.2または3.5)でアッセイする(Berglund A. and Inganaes M., 米国特許第4,752,571号; Knicker S. et al., J. Immunol. Meth. 1991; 142:53-59)。この方法は、例えば、マウスIgG(種々のサブクラス)を、250 µgのIgG/mlまでの濃度で含むサンプルにおけるプロテインAの測定に有用である。

#### 【0011】

この先に既知の方法は、以下の限界がある：

1. 全ての抗体 - リガンド複合体を、先に使用されている条件下で分解できない。この方法の有効性は、種、抗体およびサンプルマトリックスの量に依存する。この方法はヒトIg

10

20

30

40

50

Gおよび血清および血漿サンプルで特に適していない。

2. 多くの場合必要である可能性がある、更なるpHの低下が、アッセイで使用する抗体との反応を阻害するため、不可能である。

3. サンプルの酸性化は、サンプルマトリックスに依存して種々の強度のタンパク質沈殿を導き、これは検出するタンパク質またはペプチドの種々の程度の損失をもたらす。

4. pHの僅かな偏差がアッセイにおいて異なる反応行動を導き、標準タンパク質希釈およびサンプル希釈がアッセイで異なる強度の反応をもたらし得る。

#### 【0012】

SDS(ドデシル硫酸水素ナトリウム)およびDETAPAC(ジエチレントリアミン五酢酸)の組合せを、加熱段階と組合わせて、免疫複合体抗原分子(抗体のFab部分により結合している)を免疫アッセイに利用可能とすることを示唆する(AT403,378A1, Steindl F.)。抗原の解離は、この処理が抗体の抗原結合物(Fab)を介した複合体化を困難にするという事実依存する。しかし、IgGのFc部分での結合は、Fab結合とは別のものである。

#### 【0013】

したがって、抗体の個々の鎖における領域のみを認識するタンパク質またはポリペプチド(熱安定性免疫リガンド)の検出に関して、しかし、本方法は以下の理由のために適していない:

1. Fc領域における重鎖の復元、したがって、このようなタンパク質およびポリペプチドの重鎖への再結合が、最適な方法で防止されない。

2. 親和性クロマトグラフィーで使用する緩衝剤イオンとして使用する種々の分子、特にアミノ基(アミノ酸、例えば、グリシン、ヒスチジンまたはTRISのような分子)はまた熱処理中にSDSを吸着し、したがって効果を減少させる。これらの効果は、タンパク質濃度にSDS濃度を適合させるのを、特に、低タンパク質濃度を有するサンプルにおいて困難にする。

3. 使用する試薬溶液は、非常に小さい緩衝能である(pHに関して)。この方法が血漿および血清サンプルに関して主に最適化されているため、SDS濃度の最適調節のために、サンプルの予めの知識を必要とする(サンプルにおけるタンパク質含量、緩衝剤イオンのタイプ)。これは、方法が一般的に適用可能でないことを意味する。未知のサンプルの場合、最初の試みで最適SDS濃度を見つけることは通常不可能である。

4. 熱処理の時間が短すぎ、SDS濃度が抗体の3次元構造、従って特異的抗原結合領域(パラトープ)およびアッセイのためのサンプルにおける定量的分離の維持の最適な変性に十分高くない。

#### 【0014】

Fc結合タンパク質と抗体/IgGの間の複合体の分離のための先行技術の方法の欠点を解決することが本発明のひとつの目的である。

#### 【0015】

本発明により、この目的は、サンプルを免疫グロブリンと非特異的に結合できる試薬化合物と混合し、その後、サンプルを加熱処理、続く冷却段階に付すことにより達成される。冷却段階後、サンプルを更なる処置、例えば、パラトープの外で免疫グロブリンと結合することができる熱安定性免疫リガンドの存在および/または量のアッセイに付し得る。本発明の更なる態様において、存在し得る重金属イオンを結合させるために、緩衝液および/またはタンパク質を加熱段階前に添加する。

#### 【0016】

非特異的に免疫グロブリンと結合できる試薬化合物は、この特性を有する任意の化合物であり得、加熱段階中結合を維持し得る。例は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量に従ってタンパク質を分離するために使用し得る化合物、例えば、SDS-PAGE、および全体的な電荷を付与するためにタンパク質分子の封入により活性化されるものである。このタイプの試薬化合物の一つの特徴的性質は、それらが疎水性および陰性荷電末端を有することである。それらは、更に、最も好ましい化合物がドデシル硫酸ナトリウム(S

10

20

30

40

50

DS)であるという事実に基づき、SDS様化合物と呼ぶ。SDS様化合物の加熱段階前のサンプル中の濃度は、10から40mM、好ましくは30から40mMである。

【0017】

加熱段階は、通常3から180分の間および60から100の間で適用し、重要なことは、Fc部分における立体配置が、熱安定性リガンドが、サンプルの冷却後、もはや明らかな程度では免疫グロブリンに結合しないように変化することである。

【0018】

加熱段階後の冷却手段は、続く段階で適用すべき温度に低下させる。これは、特に免疫アッセイで適用される、0°から40°、例えば、4°から35°の範囲を意味する。

【0019】

加熱段階中のpHは、通常5から8の間、好ましい範囲は6から7.5である。緩衝成分は、好ましくはこれらの範囲内で十分な緩衝能を提供するように選択する。これはまた好ましい酸-塩基システムが同じpH範囲内またはそれに近いpKa値を有することを意味する。

【0020】

多くのサンプルが意図され、特に、熱安定性リガンドを使用した親和性クロマトグラフィーで得られるものは、しばしばアミンおよび/またはアミノ酸由来の緩衝性成分を含み、従って、陽性イオンとして出現し得る。このタイプの成分は、陰性荷電SDS様分子で容易に中和される。これは、緩衝物質の中で、陰性荷電のものが好ましいことを意味する。

【0021】

一般に、これは、リン酸またはホウ酸緩衝液が加熱段階前にサンプルに添加するのに好ましいことを意味する。

加熱段階前のサンプルにおける緩衝剤の濃度は、5から100mM、例えば、20mMの範囲内で選択すべきであり、これは特にホウ酸およびリン酸緩衝剤に適用される。

【0022】

キレート化合物は、意図するサンプル中にまたは添加試薬に汚染物質として存在し得る種々の重金属イオンのための任意のキレート化剤であり得る。例はEDTA(エチレンジアミン四酢酸)およびDETAPAC(ジエチレントリアミン五酢酸)である。添加キレート化剤は、サンプル中に加熱段階前に0.5から5mMの範囲内の濃度で存在すべきである。

【0023】

タンパク質は、タンパク質濃度が添加したSDSの1/20から1/100、即ち、0.1から2mM、好ましくは0.3から2mMになるように加熱段階前に添加し得る。適当なタンパク質は、解離段階または続く段階、例えば、免疫アッセイ段階を妨害しない任意のタンパク質であり得る。使用するタンパク質は、種々の起源のアルブミンにより最も良く代表される。

【0024】

可能なサンプルは、例えば、上記の熱安定性免疫リガンドを親和性リガンドとして含む親和性吸着剤から得られた抗体および他の免疫グロブリン、更に添加剤有りおよび無しで種々の緩衝液において更に加工された溶液、臨床目的のための最終製剤；および天然血漿または血清サンプルおよび上記熱安定性免疫リガンドで汚染されている可能性がある他のサンプルである。サンプルはまた熱安定性免疫リガンドの精製形の種々の調製物であり得る。

【0025】

本発明の好ましい態様により、サンプルを、決定されたタンパク質濃度を有するリン酸緩衝溶液と好ましくは前希釈し、熱安定性免疫リガンドを解離するためにこのサンプルマトリックスのために決定された試薬と混合する。この決定された試薬はドデシル硫酸ナトリウム(SDS)および、DTPAまたはEDTAのようなキレート化剤である。サンプルを試薬と混合し、加熱し、続いて室温に冷却する。可能性のあるサンプルは、免疫親和性クロマトグラフィーで溶出した抗体、添加剤有りおよび無しの種々の緩衝溶液中の加工抗体溶液、臨床目的の最終製剤および天然血漿および血清サンプルである。

【0026】

10

20

30

40

50

未知(定義されていない)サンプルの場合、サンプルを好ましくはリン酸緩衝化タンパク質溶液と1 + 4の比率で混合し、本混合物を次いで試薬溶液と1 + 2の比率で混合する。このように、本方法は本発明のタンパク質マトリックスによる消費に容易に適合でき、続くアッセイ、例えば、ELISAにおける反応溶液成分によりもたらされる妨害作用を防止する。

#### 【0027】

アミノ基を含む緩衝系を含まない定められたサンプルの場合、希釈比率を減少でき、適当なタンパク質：SDS比率を維持する。

#### 【0028】

検出前および検出中にIgG抗体の重鎖の復元を防止するため、したがって、リガンドと重鎖の再結合をさせないため、試薬を定量的分析のためのアッセイで使用するサンプル希釈緩衝液に比例して添加する。これは重鎖に吸着したSDS分子を、サンプルの希釈により、陰性荷電の数の減少が結合部位の復元(再折りたたみ)を可能にする程度まで脱着されることをさせない。復元は、0.02%の遊離SDS濃度で、アッセイに不利な影響をすることなく効率的に防止される。

#### 【0029】

例えば、本発明の方法は下記のように行う。

完全にまたは部分的に抗体 - リガンド - 複合体の形で結合したリガンドを含むサンプルを、リン酸緩衝化された定められたタンパク質溶液と1 + 4の比率で混合し、続いて試薬溶液と密封可能反応容器で1 + 2の比率で混合する。続いて、反応容器を加熱処理(2時間、100℃)に付し、続いて室温に冷却する。

#### 【0030】

本発明は、抗体 - リガンド - 複合体からのリガンドの一定の解離を可能にする。例えば、リン酸緩衝化された定められたタンパク質溶液のために、本発明の方法は、試薬溶液の均質な使用を可能とするために、pH、タンパク質濃度、およびサンプルの組成の差異に関する十分な緩衝能を提供する。二つの反応溶液、即ち定められたタンパク質溶液および試薬溶液のpHは、6.0 - 7.5、例えば、6.0 - 7.0に、例えば、1N NaOHまたは1N HClの手段により調節することが望ましい。更に、熱処理は好ましくは100℃で、例えば、120分まで行う。記載した混合比率は、また種々の量の残りの遊離SDS分子の量を変え、続く定量的免疫化学アッセイ(例えば、ELISA)における過剰の高濃度をもたらず負の作用を防止する。

#### 【0031】

更に、アッセイにおける試薬溶液のサンプル希釈緩衝液への添加は、抗体の重鎖の復元に対して対応して働き、SDS分子の脱着、したがってリガンドの再結合を防止する。

#### 【0032】

1(サンプル)：4(タンパク質溶液)：10(試薬溶液)の好ましい混合比率で、タンパク質溶液および試薬溶液を以下の最適濃度で使用する：

定められたタンパク質含量を有するリン酸緩衝化溶液：

1リットル当たり

1.15g/lの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.2g/lの $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0.2g/lのKCl

8gのNaCl

50g/lのウシ血清アルブミンまたは卵アルブミンまたは他のアルブミン。

pH = 6 - 7.5、例えば6 - 7(1N HClで調節)

試薬溶液

SDS 15g/l

DTPA 1g/l

#### 【0033】

リガンドの可能性のある変性は、正確に同じ方法で定められたタンパク質溶液および試薬溶液の標準の前希釈および処理により補正される。

#### 【0034】

本発明の方法は、欠点、および、加えて、アッセイにおける定量的分析を妨げる異なるサンプル濃度による非常に可変性の影響を除くことを目的とする。例えば、ELISAにおいて、この目的は、標準タンパク質の希釈シリーズおよび抗体を含むサンプルで測定した吸光度が同じ傾斜である場合、達成される。この問題は、最も強くプロテインAと反応する抗体に関するプロテインA検出に関して(例えば、ヒトおよびイヌIgG)、または一般に、非常に高い抗体濃度(> 1 mg/ml)で解決されないままである。更に、非常にしばしば、特異的(抗体 - プロテインA)抗体がサンプル中に存在する場合、プロテインAの正確な定量は不可能である。

10

#### 【0035】

図は：

図1a - 1d：100 でのインキュベーション時間に対する(水浴中、0、30、60および120分)ELISAの手段によるヒト血漿に添加した天然Staphylococcus aureusプロテインAの回復の比較。これらのサンプルを本発明の方法により希釈した。

図1e：図1dに示すサンプル一定量を試薬添加無しのアッセイにおける希釈緩衝液で希釈した場合のアッセイにおけるSPAの有効性の比較。

図1f：これらのサンプルで先行技術により得られた結果(酸解離)。

図2a - 2c：ウサギ抗プロテインA血清の形を有する複合体から回復したプロテインAの場合の本発明の方法と先行技術の方法との比較。

20

図3a - 3b：1 mgのヒトポリクローナルIgG/mlの存在下で形成された複合体から回復したプロテインAの場合の本発明の方法と先行技術の方法との比較。

図4a - 4b：10 mgのヒトポリクローナルIgG/mlの存在下で形成された複合体から回復したプロテインAの場合の本発明の方法と先行技術の方法との比較。

図5：アッセイ設定および抗プロテインA 2重抗体サンドイッチELISAの実行の模式図。

#### 【0036】

以下の実施例および比較実施例は、本発明の更なる説明を意図する。

#### 【0037】

実験部分

30

実施例1：

本実施例の目的は、天然Staphylococcus aureusプロテインA(SPA)の、高親和性を有するヒトIgG抗体の非存在下および存在下の特異的ELISAにおける反応性の測定、100 での種々のインキュベーション時間(図1a - 1d参照)でのタンパク質解離の測定、試薬をサンプル希釈緩衝液に適当な濃度で添加しない場合の結合部位の復元の程度の測定(図1e)、および本発明の方法と先行技術の方法の比較である(酸解離、図1f)。

#### 【0038】

1.1 材料および方法：

感受性抗プロテインA ELISAをIAM(Institute of Applied Microbiology, Vienna)で構築した。アッセイスキームおよび実行は図5に示す。モノクローナルマウス抗SPA(P-2921, Sigma, St. Louis, U.S.A.)を捕獲抗体として使用した。アッセイにおける2次抗体(ニワトリ抗プロテインA, Biogenesis 7839-9006)をNHS - ビオチン(N - ヒドロキシスクシンイミド活性化ビオチン, Amersham Pharmacia Biotech, England)でビオチニル化した。このELISAは、同様にAmersham Pharmacia Biotechからの天然および組換えSPAの両方に適している。

40

#### 【0039】

標準SPAタンパク質の8個の1：2希釈を、各試験プレートでデュプリケートで調製した(標準範囲2000 - 15.6 pg SPA/ml)。これらの実施例において、非常に純粋な天然SPA(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden . Lot No. T-249789)をSPA標準として使用し、異なるサンプルマトリックスに抗体を添加した。

50



## 【 0 0 4 0 】

プロテインA(天然プロテインA Lot T-249789、組換えプロテインA Lot T-238881)の種々の標準を凍結乾燥形で得た。標準タンパク質を蒸留水中に溶解して秤量して入れ、次いで、275nmでの光学密度を測定し、プロテインA含量を適当なモル吸光度係数の手段で計算した。標準タンパク質をPBS-TPに前希釈し、等分し、-30℃で貯蔵した。

## 【 0 0 4 1 】

SPA陰性ヒト結晶をOctapharma, Viennaから得た。

EAR400をELISA Readerとして使用し、SLT(Groedig, Austria)からのD-Softを評価ソフトウェアとして使用した。SDSはMerck, Darmstadtから、DTPAおよびポリビニルピロリドン(PVP-T40)はSigma, St. Louis, U.S.A.から、ウシ血清アルブミンはHaemosan(11z, Austria)からである。

10

## 【 0 0 4 2 】

ELISA緩衝液：

コーティング緩衝液

0.1N  $\text{NaHCO}_3$  緩衝液、pH = 9.6 - 9.8

8.4 g / l の  $\text{NaHCO}_3$

4.0 g / l の  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

洗浄緩衝液：

PBS、pH = 7.2 - 7.4

1.15 g / l の  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.2 g / l の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0.2 g / l の KCl

8.0 g / l の NaCl

1 ml の Tween 20

貯蔵寿命：20℃で1日

20

## 【 0 0 4 3 】

サンプル調製：

サンプルを1：5に洗浄緩衝液 + 5% BSAで希釈し、次いで1：3に試薬溶液(2% SDS、0.1% DTPA)で希釈し、十分に混合し、100℃で120分インキュベートする。

希釈緩衝液：

30

洗浄緩衝液 + 1% PVP + 試薬溶液 1：1000 貯蔵寿命：20℃で1日

結合緩衝液(SA\* - ガラクトシダーゼ)：

希釈緩衝液 + 2 mM  $\text{MgCl}_2$

染色緩衝液：pH = 7.6

10 mM イミダゾール

2 mM  $\text{MgCl}_2$

1 M NaCl

1 N HClで調節

- ガラクトシダーゼ基質：

レゾルフィン - ガラクトピラノシド：100  $\mu\text{l}$  の DMSO 中に溶解した 1 mg を 10 ml の染色緩衝液で希釈。

40

100  $\mu\text{l}$  の染色溶液 / ウェルを適用。

## 【 0 0 4 4 】

1.2. 実験の実行

SPA標準(3 mg / ml)を、0.1% トウイン 20 (PBST)および1% ポリビニルピロリドン(PBS-TP)含有リン酸緩衝化食塩溶液(PBS)に、平行形態で希釈し、ヒト血清に10倍濃縮形で添加した(10血漿 + 1 SPA溶液)。サンプルを混合し、室温で1時間インキュベートした。[各2 mlのヒト血漿に、PBS + 0.1% トウイン 20 + 1% PVP中の200  $\mu\text{l}$  のSPA溶液(6  $\mu\text{g}$  / mlまたは600 ng / ml)を添加 = 各々545.4 ngのSPA / mlおよび54.5 ngのSPA / ml。]

50

## 【0045】

続いて、等量を先行技術の方法および本発明の方法(下記の通り)により処理した。非処理サンプルを各々適当な媒体で希釈した。1 : 2 希釈シリーズを全ての処理および非処理サンプルおよび標準から調製し(8 希釈段階)、等量を試験プレートに移した。

## 【0046】

酸pHでのアッセイ法(比較アッセイ、到達水準) :

サンプルおよび標準を、0.1 M NaClおよび0.1 % トウイン 20 含有 0.5 M 酢酸 / HCl 緩衝液(pH = 3.5)に前希釈し、アッセイ用の希釈シリーズを同様にこの緩衝液で調製した。希釈シリーズの等量(50  $\mu$ l)を96 ウェル試験プレートに移し、室温で60分インキュベートした。

10

## 【0047】

本発明の方法 :

サンプルを5 % BSA(ウシ血清アルブミン)または卵アルブミン(50  $\mu$ lのサンプル + 200  $\mu$ lのBSA溶液)含有PBSに1 : 5 で前希釈し、次いで反応溶液で1 : 3 に希釈し、混合し、ねじ蓋式反応溶液中、100 の水浴中で120分インキュベートした。PBS-TP + 7 mM SDSおよび25  $\mu$ M DTPA中の希釈シリーズ(50  $\mu$ l)の等量を96 ウェル試験プレートに移し、室温で60分インキュベートした。

## 【0048】

この5 % BSA溶液での1 : 5 前希釈に使用した反応溶液の濃度は70 mM SDS (= 2 % )、2.5 mM DTPA (= 0.1 %)であった。これは、タンパク質よりもSDSが100倍モル過剰に対応する。抗体重鎖の復元を防止するために、試薬溶液をアッセイの1 : 100の比率でサンプル希釈緩衝液に添加した。ヒト血漿に天然SPA(各々545 ngおよび54.5 ng/ml)を添加し、5 % BSA溶液中1 : 5 に希釈し、次いで70 mM SDS + 2.5 mM DTPA溶液で1 : 3 に希釈した。545 ngのSPAを含むサンプルを続いてPBS-TP + 試薬(1 : 100)で1 : 20に、54.5 ngのSPA含有サンプルを1 : 2に、続いて8倍1 : 2に連続して希釈した。標準プロテインA(60 ng/ml)を希釈し、54.5 ngのSPA/ml含有サンプルのように処理した(= SPA標準処理)。SPAは溶液中で二量体になる傾向にある。これは、アッセイでの検出の減少を導き得る。従って、SPAをPBS + 0.1 % トウイン 20 + 1 % PVP(PBS中標準)でのみの希釈に付し、単量体化がまた適当な時間の熱処理および適当なSDS濃度下に、起こることを証明した。

20

30

## 【0049】

“サンプル - タンパク質溶液 - 反応溶液”(1 + 4 + 10)の混合比率は、一般に、定量的解離および結合SPAの検出を得るために、全ての共通サンプルマトリックス(タンパク質精製において)、血漿および血清サンプルに適している。サンプル : タンパク質溶液(1 : 5)の高い希釈比率のために、例えば、アミノ基含有緩衝剤イオンへの多すぎるSDS分子の吸着による、解離の可能性のある減少は、十分に緩衝化される。感受性に関して必要な場合、希釈比率を減少し得、タンパク質 : SDS比率(アミノ基含有緩衝系無しおよび5 - 8.5のpHを有する場合)が観察される。

## 【0050】

1.3. Ad 図1a - 1f :

図1aは、熱処理無しの抗SPA ELISAの結果を示す。60 ng SPA/mlが添加された、添加されていないヒト血漿サンプルにおいて、および600 ngのSPA/ml含有サンプルにおいて、非常に僅かな量のみが本アッセイで利用可能である。

図1bは、30分、100 で熱処理下後、54.5 ng/ml含有サンプル中のSPAは既に定量的に利用可能であるが、しかし、545 ngのSPA/ml含有サンプルにおいては、50 %のみしか利用可能でないことを示す。

図1cは60分の熱処理後、SPAが545 ng/ml含有サンプルでさえ、殆ど定量的に利用可能であることを示す。

## 【0051】

40

50

図 1 d は 1 0 0 で 1 2 0 分の熱処理後の両方のサンプル(各々 5 4 . 5 ng および 5 4 5 ng の SPA / ml) の SPA の定量的解離を示す。

図 1 a から 1 d は、1 2 0 分後、サンプルおよび標準曲線がどのように一致し、1 0 0 % 回復をもたらすかを、明らかに示す。IgG 抗体の重鎖がこの処置後、プロテイン A が結合する領域で比例的に還元し得、SDS 濃度が低すぎる場合、再び、SPA と反応し得ることを示すために、図 1 d に示すサンプルを、試薬添加無しのアッセイ希釈緩衝液で平行形態で希釈し、同様に試験した。

【 0 0 5 2 】

図 1 e は、SDS が過剰に希釈された場合、同じ方法で処理した SPA 標準と比較して、サンプル希釈シリーズおよび回復の傾斜がどのように変化するかを示す。これは、図 1 e に見ることができるように、アッセイ中で、0 . 7 mM SDS をサンプル希釈緩衝液に添加することにより防止できる。

10

【 0 0 5 3 】

図 1 f は、酸性環境 (pH = 3 . 5 ) におけるサンプル希釈および回復の反応性(傾斜)が、PBS 中の標準および同様の方法で処理した SPA 標準と比較してどのように変化するかを示す。この方法において、サンプルの pH の非常に僅かな差でさえ、結果に作用する。5 4 5 ng の SPA / ml 含有サンプルを 1 : 3 0 0 に、5 4 . 5 ng の SPA / ml を 1 : 3 0 に、0 . 1 M NaCl および 0 . 1 % トウイン 2 0 含有 0 . 5 M 酢酸緩衝液で前希釈した。

【 0 0 5 4 】

実施例 2 :

20

SPA の添加およびインキュベーション(1 時間、3 7 )後のウサギ抗 SPA 血清の形を有する複合体からの SPA の回復の測定。多くの特異的抗体の存在が、いくぶん強く、より激しい架橋および複合体形成を可能にする。

【 0 0 5 5 】

2 . 1 . 材料および方法 :

ヒト血漿の代わりに、ウサギ抗 SPA 血漿 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden ; 血漿番号 1 1 8 3 ) に、2 つの異なる濃度 (5 4 5 ng / ml および 5 4 . 5 ng / ml) の天然 SPA を添加した。特記しない限り、本実施例は実施例 1 と同様に行った。

【 0 0 5 6 】

2 . 2 . 実験の実行

30

SPA 標準 (3 mg / ml) を、0 . 1 % トウイン 2 0 (PBST) および 1 % ポリビニルピロリドン (PBS -TP) 含有リン酸緩衝化食塩溶液 (PBS) に、平行形態で希釈し、ヒト血清に 1 0 倍濃縮形で添加した (1 0 血漿 + 1 SPA 溶液)。サンプルを混合し、室温で 1 時間インキュベートした。

【 0 0 5 7 】

続いて、等量を先行技術の方法および本発明の方法(下記の通り)により処理した。非処理サンプルを各々適当な媒体で希釈した。1 : 2 希釈シリーズを全ての処理および非処理サンプルおよび標準から調製し(8 希釈段階)、等量を試験プレートに移した。

【 0 0 5 8 】

2 . 3 . Ad 図 2 a - 2 c :

40

図 2 a は、熱処理無しの結果を示す。SPA が、5 4 5 ng の SPA / ml 含有サンプルでさえ検出不可能であることが明らかである。

図 2 b は、1 2 0 分、1 0 0 の熱処理後、ヒト血漿での結果(図 1 d)と同様に、二つのサンプル(各々 5 4 5 ng および 5 4 . 5 ng の SPA / ml) に添加した SPA は定量的に解離され、検出可能であることを示す。

図 2 c は、この場合、先行技術の方法にしたがって SPA が解離されず、検出されないことを示す。5 4 5 ng の SPA / ml サンプルを 1 : 3 0 0 に、5 4 . 5 ng の SPA / ml のサンプルを 1 : 3 0 に、0 . 1 M NaCl および 0 . 1 % トウイン 2 0 含有 0 . 5 M 酢酸緩衝液で前希釈した。

【 0 0 5 9 】

50

## 実施例 3 :

SPA添加およびインキュベーション(1時間、37℃)後のポリクローナルヒトIgG(1mg/ml)と形成された複合体からの組換えSPAの回復の測定。

天然および異なって修飾した組換えSPAをIgG精製のための免疫リガンドとして使用する。従って、解離のための本発明の方法およびアッセイ系が種々の修飾に等しく適合することが重要である。

## 【0060】

## 3.1. 材料および方法

Cohn沈殿およびゲル濾過の方法で前精製したポリクローナルヒトIgGに、組換えSPA(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden, Lot No. 238881)を2つの異なる濃度(545 ng/mlおよび54.5 ng/ml)で添加した。特記しない限り、本実施例は実施例1と同様に行った。

## 【0061】

## 3.2. 実験の実行

ポリクローナルIgG(Cohn fraciton, Immunom Vienna)をPBS(30 mg/ml)に溶解して濃縮し、ゲル濾過した。濃度を抗ヒトIgG ELISAの手段で測定した。リン酸緩衝化食塩水(PBS)中の組換えSPA標準(3 mg/ml)を、0.1% トウイン20 (PBST)および1% ポリビニルピロリドン(PBS-TP)で、平行形態で希釈し、1.1 mg/mlでIgG溶液(各々6 μg/mlおよび600 ng/ml)に10倍濃縮形で添加した(10部のIgG溶液+1部のSPA溶液)。サンプルを混合し、室温で1時間インキュベートした。

## 【0062】

続いて、等量を先行技術の方法および本発明の方法(下記の通り)により処理した。非処理サンプルを対応する媒体で希釈した。1:2希釈シリーズを全ての処理および非処理サンプルおよび標準から調製し(8希釈段階)、等量を試験プレートに移した。

## 【0063】

## 3.3. Ad 図3a-3c:

図3aは、120分、100℃の熱処理後、両方のサンプル(545 ngおよび54.5 ngのSPA/ml)に添加した組換えSPAが、前精製ポリクローナルヒトIgGを1mg/mlの抗体濃度で含むサンプル中でさえ、定量的に解離され、検出可能であることを示す。

図3bは、3.5のpHでの反応性が、サンプルの全イオン強度および僅かなpH変化に大きく依存し、特に、溶解していない複合体は、標準と比較して過剰に高いSPA濃度であるという錯覚さえさせ得ることを示す。

## 【0064】

545 ng/mlのSPA/ml含有サンプルを1:300に、および54.5 ng/ml含有サンプルを1:30に、0.1M NaClおよび0.1% トウイン20含有0.5M酢酸緩衝液で前希釈した。

## 【0065】

## 実施例 4 :

SPA添加およびインキュベーション(1時間、37℃)後の高ポリクローナルヒトIgG(10 mg/ml)で形成された複合体からの組換えSPAの回復の測定。

## 【0066】

## 4.1. 材料および方法

Cohn沈殿およびゲル濾過の方法で前精製したポリクローナルヒトIgGに、組換えSPA(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden, Lot No. 238881)を2つの異なる濃度(545 ng/mlおよび54.5 ng/ml)で添加した。特記しない限り、本実施例は実施例1と同様に行った。

## 【0067】

## 4.2. 実験の実行

ポリクローナルIgG(Cohn fraciton, Immunom Vienna)をPBS(30 mg/ml)に溶解して濃縮し、ゲル濾過した。濃度を抗ヒトIgG ELISAの手段で測定した。リン酸緩衝化食塩水(PBS

)中の組換えSPA標準(3 mg/ml)を、0.1%トウイン20(PBST)および1%ポリビニルピロリドン(PBS-TP)で、平行形態で希釈し、11 mg/mlでIgG溶液(各々6 μg/mlおよび600 ng/ml)に10倍濃縮形で添加した(10部のIgG溶液+1部のSPA溶液)。サンプルを混合し、室温で1時間インキュベートした。

【0068】

続いて、等量を先行技術の方法および本発明の方法(下記の通り)により処理した。非処理サンプルを対応する媒体で希釈した。1:2希釈シリーズを全ての処理および非処理サンプルおよび標準から調製し(8希釈段階)、等量を試験プレートに移した。

【0069】

4.3. Ad 図4a - 4c:

10

図4aは、120分、100の熱処理後、両方のサンプル(545 ngおよび54.5 ngのSPA/ml)に添加した組換えSPAが、前精製ポリクローナルヒトIgGを1 mg/mlの抗体濃度で含むサンプル中でさえ、定量的に解離され、検出可能であることを示す。

図4bは、SPAのIgGとの反応性が濃度比率に依存すること示す(図3a参照)。本発明の方法とは逆に、これらのサンプル中のSPA含量は、先行技術の方法では正確に決定できない(図1-3参照)。545 ngのSPA/ml含有サンプルを1:300に、および54.5 ng/ml含有サンプルを1:30に、0.1 M NaClおよび0.1%トウイン20含有0.5 M酢酸緩衝液で前希釈した。

【図面の簡単な説明】

【図1a - 1d】 100でのインキュベーション時間に対する(水浴中、0、30、60および120分)ELISAの手段によるヒト血漿に添加した天然Staphylococcus aureus プロテインAの回復の比較。これらのサンプルを本発明の方法により希釈した。

20

【図1e】 図1dに示すサンプル一定量を試薬添加無しのアッセイにおける希釈緩衝液で希釈した場合のアッセイにおけるSPAの有効性の比較。

【図1f】 これらのサンプルで先行技術により得られた結果(酸解離)。

【図2a - 2c】 ウサギ抗プロテインA血清の形を有する複合体から回復したプロテインAの場合の本発明の方法と先行技術の方法との比較。

【図3a - 3b】 1 mgのヒトポリクローナルIgG/mlの存在下で形成された複合体から回復したプロテインAの場合の本発明の方法と先行技術の方法との比較。

【図4a - 4b】 10 mgのヒトポリクローナルIgG/mlの存在下で形成された複合体から回復したプロテインAの場合の本発明の方法と先行技術の方法との比較。

30

【図5】 アッセイ設定および抗プロテインA2重抗体サンドイッチELISAの実行の模式図

。

## 【図 1 a - 1 b】

Fig.1a

1/8

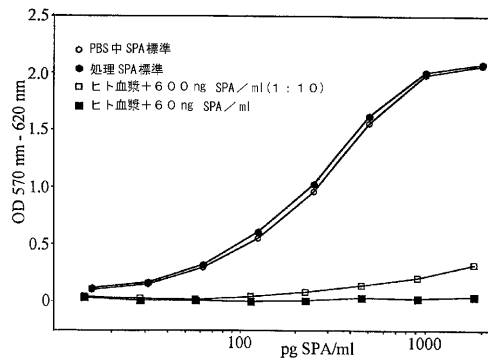
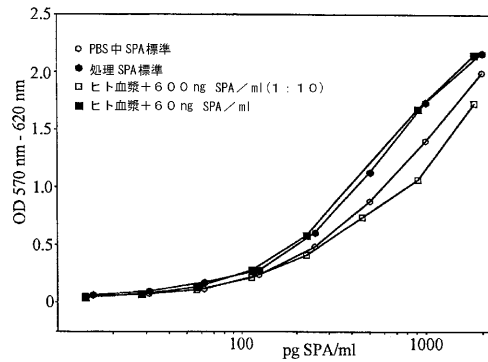


Fig.1b



## 【図 1 e - 1 f】

Fig.1e

3/8

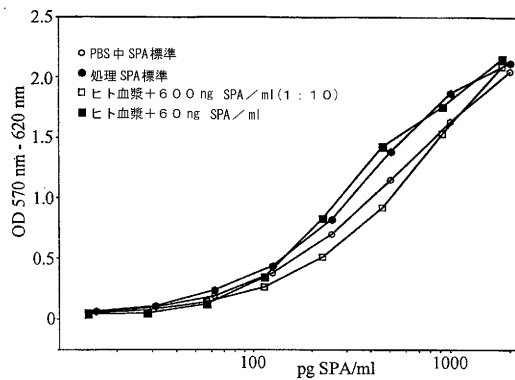
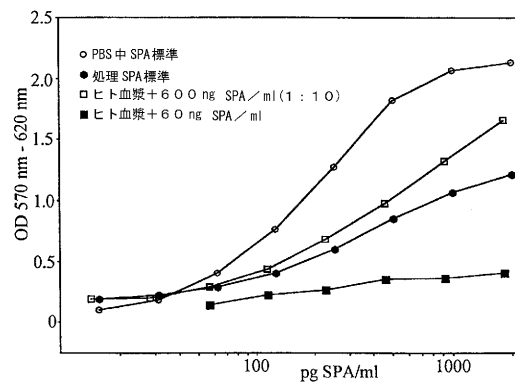


Fig.1f



## 【図 1 c - 1 d】

Fig.1c

2/8

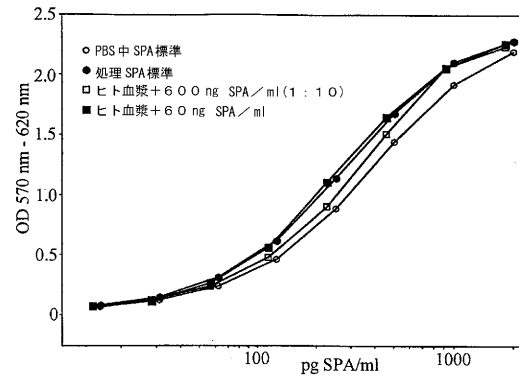
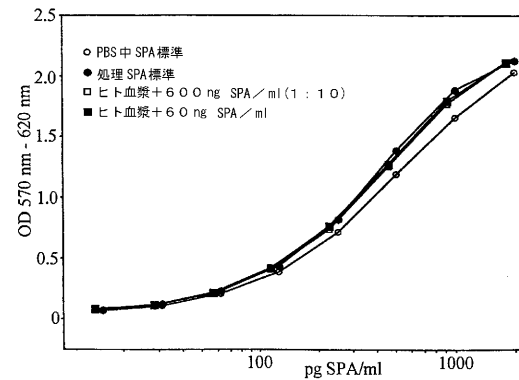


Fig.1d



## 【図 2 a - 2 b】

Fig.2a

4/8

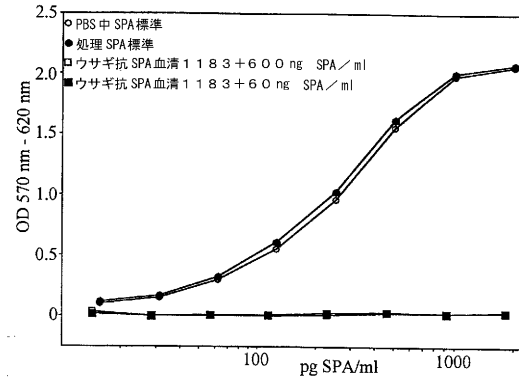
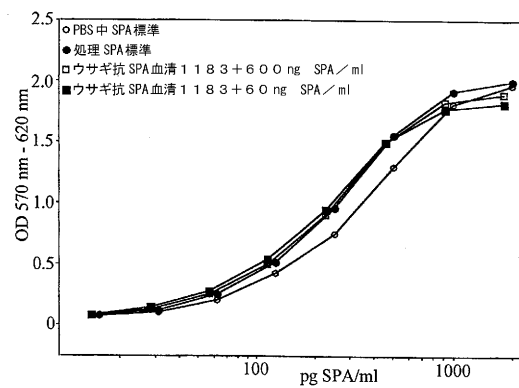


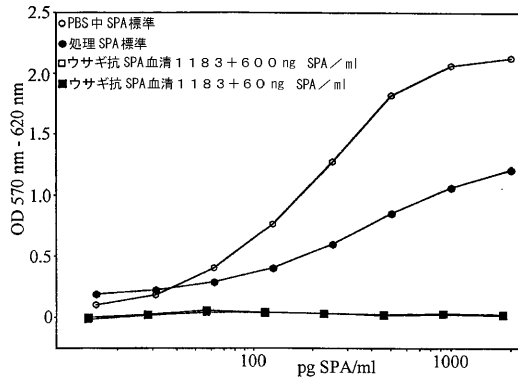
Fig.2b



【図 2 c】

Fig.2c

5/8



【図 3 a - 3 b】

Fig.3a

6/8

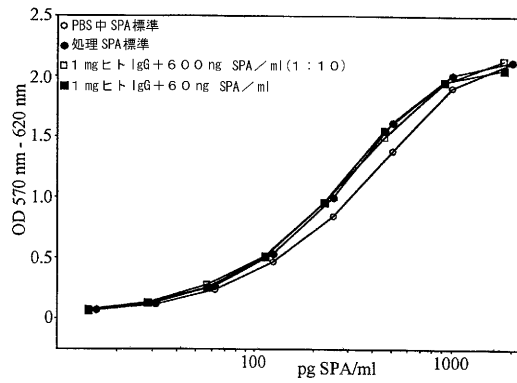
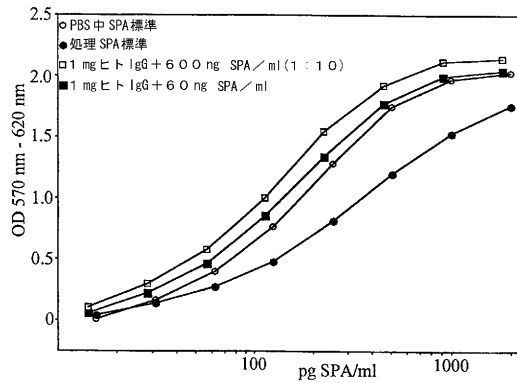


Fig.3b



【図 4 a - 4 b】

Fig.4a

7/8

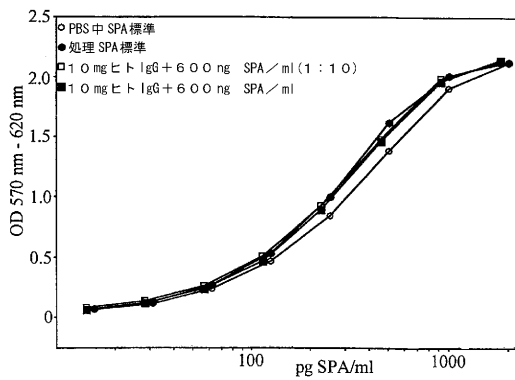
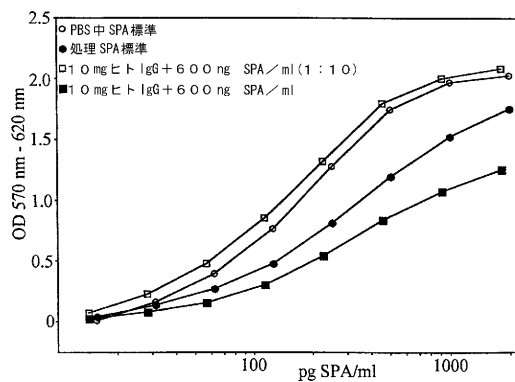


Fig.4b



【図 5】

8/8

## IAM 抗プロテインA(SPA)ELISA

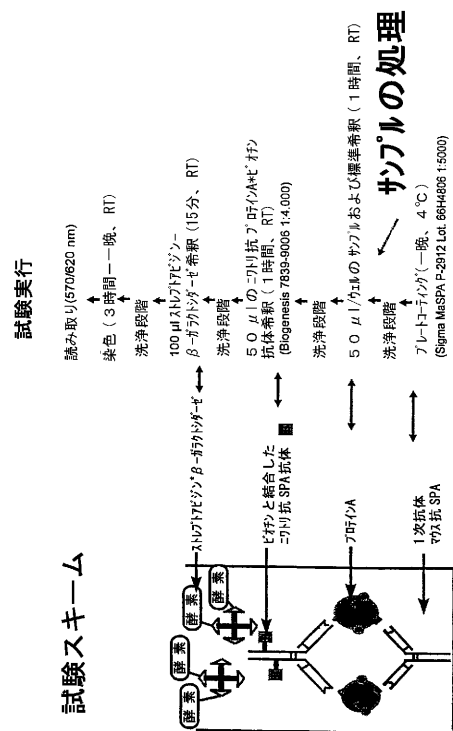


Fig.5: 試験設計および試験法の模式的例示

---

フロントページの続き

(56)参考文献 オーストリア国特許発明第00403378(AT, B)

特開昭62-012859(JP, A)

米国特許第05556745(US, A)

特開平02-107196(JP, A)

特開昭61-205861(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98