

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4982555号  
(P4982555)

(45) 発行日 平成24年7月25日(2012.7.25)

(24) 登録日 平成24年4月27日(2012.4.27)

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

請求項の数 15 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2009-502094 (P2009-502094)	(73) 特許権者	508277209
(86) (22) 出願日	平成19年3月29日 (2007. 3. 29)		ギロス パテント アーバー
(65) 公表番号	特表2009-534630 (P2009-534630A)		スウェーデン王国 ウブサラ ダグ ハマ
(43) 公表日	平成21年9月24日 (2009. 9. 24)		ースクジョールズ バーグ 54 ウブサ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/053040		ラ サイエンス パーク
(87) 国際公開番号	W02007/113211	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成19年10月11日 (2007.10.11)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成22年3月15日 (2010. 3. 15)	(74) 代理人	100119507
(31) 優先権主張番号	60/787, 468		弁理士 刑部 俊
(32) 優先日	平成18年3月30日 (2006. 3. 30)	(74) 代理人	100128048
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新見 浩一
(31) 優先権主張番号	0600729-8	(74) 代理人	100129506
(32) 優先日	平成18年3月30日 (2006. 3. 30)		弁理士 小林 智彦
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)	(74) 代理人	100130845
			弁理士 渡邊 伸一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I Gアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

液体試料において、ポリマー免疫グロブリン (I g) のクラス (I gG) の比率を定量的に決定するための方法であって、以下の段階を含む方法：

a) I gGが2つの親和性反応物1および2 (各々、R1およびR2) の間に挟まれる第一の濃度を有する第一の複合体を形成する段階であって、該複合体が、試料中のI gGの濃度に対して応答を提供し、該応答は、モノマーの形状であるI gGまたはポリマーの形状であるI gGとは独立したものであり、かつ該第一の濃度が、R1とR2の間に挟まれたモノマーI gGを用いて推定される、段階、

b) I gGが2つの親和性反応物3および4 (各々、R3およびR4) の間に挟まれる第二の濃度を有する第二の複合体を形成する段階であって、該複合体が、モノマーI gGに比べポリマーI gGの濃度に対して異なる応答を提供し、該第二の濃度が、R3とR4の間に挟まれたモノマーI gGを用いて推定される、段階、ならびに

c) 該液体試料中のポリマーI gGの比率を決定するために、該第一複合体と該第二複合体との濃度比を算出する段階。

【請求項 2】

親和性反応物R1、R3およびR4がI gGのFcドメインに対して親和性を有し、かつ親和性反応物R2が、R1、R3およびR4と比べてI gGへの異なる特異性を有する結合剤である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

10

20

R2がIgGと広く反応する試薬である、請求項2記載の方法。

【請求項4】

R2がF(ab')<sub>2</sub>である、請求項3記載の方法。

【請求項5】

R1、R3およびR4の少なくとも1つがFzであり、FzがプロテインA誘導体である、請求項2記載の方法。

【請求項6】

R1およびR3が固相へ固定化され、または固定化可能であり、かつR2およびR4が分析的に検出可能な基を含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

R1およびR3の少なくとも1つが、流路の反応キャピティにおける多孔質ベッドの形状の固相へ、多重分子形状で固定化され提供される、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

R1およびR3の少なくとも1つが、流路の反応キャピティにおける多孔質ベッドの形状の固相へ固定化され提供される、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

流路がマイクロ流体装置のマイクロチャンネル構造である、請求項7又は8記載の方法。

【請求項10】

マイクロチャンネル構造が、

a) R1が固定化される、または固定化可能な固相を含む、第一の反応マイクロキャピティ、

b) IgGを含む試料の導入のため、および、それに続く分析的に検出可能な基を有するR2を含む液体試料の導入のための、第一の入口配置、

c) R3が固定化される、または固定化可能な固相を含む、第二の反応マイクロキャピティ、ならびに

d) IgGを含む試料の導入のため、および、それに続く分析的に検出可能な基を有するR4を含む液体試料の導入のための、第二の入口配置を含む、請求項9記載の方法。

【請求項11】

容量計量ユニットが、マイクロチャンネルの少なくとも1つに存在し、かつ、少なくとも第一の部分に1~5000 nLの間の容量を有する液体計量マイクロキャピティを有する、請求項9~10のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

IgGを含む試料が希釈されていない、請求項1~11のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

試料が、1 μg/L ~ 10000 mg/Lの間のIgG濃度を含む、請求項12記載の方法。

【請求項14】

IgGを含む試料が、該IgGを産生している細胞培養物由来の上清、細胞溶解物、細胞ホモジェネート、または細胞培養により産生されたIgGを含んでいる液体に由来する、請求項1~13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

R2およびR4の少なくとも1つがモノマーである、請求項1~14のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は、液体試料において、IgGのようなあるクラス(IgX)の免疫グロブリン(Ig)を定量的に決定するための方法に関連する。該方法はサンドイッチアッセイであり、従って、2つの親和性反応物1および2(R1およびR2)の間でのIgXサンドイッチを含む、少なく

10

20

30

40

50

とも3成分の親和性複合体の形成を含む。

【背景技術】

【0002】

背景技術

例えば、癌または炎症性疾患の処置のためのより将来性のある新規治療方針の1つは、典型的にはIgGクラスの組み換えモノクローナル抗体の使用である。多数の代替的分子立体構造が使用されてもよいが、最も一般的な治療的薬剤の型は依然としてIgGであり、典型的には、少なくともIg定常ドメインの一部を多くの場合含むように組み換え技術により産生されるヒトIgGである。ヒトを処置するために認可されたモノクローナル製品の数は、依然としてむしろ限定されているが、時折めざましい臨床的結果によってその使用は増

10

【0003】

治療的モノクローナル抗体製品の産生のために利用されるバイオプロセスは、品質および生産性の双方について最適化されねばならない。最高度のIg産生能力を伴うクローンの選択は、製品開発の本質的な部分になる。従って、単一のIg候補のみならず、広範なIg製品の定量のために一般に実用的で、この種のIg製品の正確な定量および特徴付けのための、簡便、堅固、および一般的な解析方法へのアクセスが、製品開発において使用されうる不可欠な道具になるであろう。

【0004】

開発の初期段階の間の細胞上清中には、所望のIg製品濃度が20~2000 mg/Lで変動してもよい。後に、スケールアップの間および精製後、Ig製品濃度は1~100 g/Lの間であってもよい。従って、この広い範囲を網羅するために試料希釈が要されるであろう。しかしながら、簡便性、また系列希釈による誤差の導入を回避するという双方の目的のため、希釈係数を最小限に保持する強い願望が存在する。従って、非精製試料および本質的に未希釈形状の、すなわち1:5未満または1:2未満のように、1:10未満に希釈された試料のような、他の試料をアッセイすることが所望されるであろう。例えば、1 mg/Lおよび10 mg/Lの間、または10 mg/Lおよび100 mg/Lの間、または100 mg/Lおよび1000 mg/Lの間で始まるような、少なくとも2、または3桁以上のような少なくとも1桁の濃度範囲を網羅するアッセイが、この目的のために非常に魅力的であろう。

20

【0005】

アッセイ範囲に影響する可能性がある、少なくとも3つの要因が存在する。a) 例えば、固定化された捕捉剤としてのR1の親和性および選択性、および、おそらく、例えば検出可能な反応物としてR2の親和性および選択性、b) Ig分析物を含む試料の容量、およびc) Ig分析物を捕捉するための固相の容量（もしR1を固定化するために固相が使用される場合には）である。

30

【0006】

本発明者は、モノクローナルおよびポリクローナル抗IgGおよびそれらの抗原結合断片を、残る一方が微生物起源のIgG結合ポリペプチドのIgG結合組み換え構築物（プロテインGおよびプロテインA）を含むような、R1およびR2の1つまたは双方として使用し、組み換えIgG製品をアッセイした経験を有する。例えば、（R2として標識されたFab2断片との組み合わせで、R1としてはプロテインAのZ断片）を参照。R1およびR2の双方がモノクローナル抗IgGである変種にとって、実践的範囲は1 µg/L~10 mg/Lの分析物であった。残念なことに、これらのアッセイ、とりわけ抗体は、様々な様式で異なる組み換えIgG分子（分析物）と反応するよう見受けられる。この意義は、異なる組み換えIgG分析物を正確に定量するためには、各分析物には固有の参照が必要であろうということである。この問題の背後にある機構は現時点で不明確であるが、Ig分析物上の関連エピトープの発現における変動が1つの説明であってもよい。例えば、断片、変異体および接合体を含む組み換え誘導体を含むプロテインAまたはプロテインGのような細菌起源のIg結合分子を使用して、より一般的様式において分析物と反応する試薬のみを使用することがより魅力的であろう。

40

【0007】

50

R1およびR2の双方として微生物由来のIgG結合分子を使用することにより、少なくとも、もし実際に使用されるR1およびR2が分析物に同一の結合特異性を有する場合には、IgG分析物上で利用される結合部位に多少反復性があるべきであることが要されるであろう。a) 細菌由来のIgG結合分子のIgG上の結合部位の数、およびb) 2つのそのような部位が2つの細菌由来のIgG結合分子へ同時に結合する能力についての疑問は、少なくとも20年の間未解決のままである。恐らくこれは、同一の結合特異性をもつR1およびR2に基づくIgGアッセイの開発が阻害され、かつ決して実践へと向けられるよう見受けられないという事実の理由である。

【0008】

本発明の目標は、IgA、IgD、IgE、IgM等のようなあるIgクラスに対して特異的で、かつ元の試料を有意に希釈することなく、上述された範囲内の濃度範囲へ容易に適応可能な一般的Igアッセイを提供することである。他の目標は、時間単位当り遂行されるアッセイ数の観点において、高度な生産性を伴い、遂行および自動化することが容易な迅速および堅固なIgアッセイを提供することである。非常に重要な目標は、モノクローナルで、かつ様々な種類の細胞培養液または細胞培養液からの精製液体調製物中に存在する、組み換え抗原特異的IgG抗体の定量のための一般的アッセイを創出することである。

【発明の開示】

【0009】

発明

本発明者は、R1およびR2の双方の反応物が細菌のIg結合ペプチド配列に基づくサンドイッチ免疫グロブリンアッセイは、少なくとも組み換え産生されたIg産物の観点において、高度に実施可能および有利であることを理解している。

【0010】

本発明は、液体試料中のあるクラス(IgX)の免疫グロブリン(Ig)の定量的決定のための方法である。該方法は、IgXが2つの親和性反応物1および2(各々、R1およびR2)の間に挟まれる、少なくとも3成分の親和性複合体を形成する1つ、または2つ以上の段階を含む。特徴的な特性は、各々R1およびR2が、該IgXの定常部内に位置する、結合部位へ親和性結合することが可能な細菌ポリペプチド(各々、P1およびP2)由来のペプチド配列(各々、seq1およびseq2)を含むことである。2つのペプチド配列は、3成分サンドイッチ複合体におけるR1およびR2のIg分析物への同時結合に役割を担い、これは、R1の結合部位がR2の結合部位と分離されている(空間的に配置される)ことを意味する。

【0011】

各々R1およびR2中のIg結合配列は、天然の細菌ポリペプチドまたは細菌ポリペプチド(各々、P1およびP2)の天然のIg結合能力の少なくともいくらかを保持する、その誘導体のものと同一である。誘導体という用語は、IgG結合を保持する変異型および断片を含む。P1はP2と同等であってもよく、すなわちR1およびR2におけるIg結合配列は同一の細菌ポリペプチドに由来する。

【0012】

好ましい態様においては、R1は固相に固定化される、または固定化可能であり、かつR2は分析的に検出可能/測定可能である。

【0013】

例えば、1つまたは複数のクラスまたはサブクラスの免疫グロブリンの定常部へ結合可能である細菌ポリペプチドは、当技術分野において周知である。

【0014】

最も研究されたこの種のポリペプチドは、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)由来のプロテインA、C群連鎖球菌(Streptococcus Group C)およびG Fcg由来のプロテインG、ストレプトコッカス・ピオゲネス(streptococcus pyogenes) Fcg由来のプロテインH、およびペプトストレプトコッカス・マグヌス(Peptostreptococcus magnus)由来のプロテインLである。他の類似タンパク質は、他の連鎖球菌由来のタンパク質MAGおよびZAGである。

10

20

30

40

50

## 【0015】

R1およびR2の各々については、そのIg結合活性はポリペプチド自体、またはその誘導体を含む天然のIg結合細菌ポリペプチドに由来し、問題となっている濃度範囲のような事項を含む、決定されるべき特定のIg分析物に必要な、結合時の親和性および特異性に十分な注意が払われる。

## 【0016】

免疫グロブリン分子は2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む。各鎖は、抗原結合を担う可変(V)ドメイン、および免疫グロブリンが関与する様々なエフェクター機構を担う定常(C)ドメインを含む。各鎖の可変ドメイン内に、CDR1~3のような超可変領域、およびFR1~3のような多少保存的な、いわゆるフレームワーク構造が存在する。定常ドメインは、IgG、IgA、IgMおよびIgEの重鎖内に、C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2、およびC<sub>H</sub>3と称される領域を含む。

10

## 【0017】

本発明の文脈において、免疫グロブリンの定常部は、定常ドメインならびに可変ドメインの保存的部分も含む。免疫グロブリンという用語はまた、例えば鳥類、両生類等の哺乳動物以外の動物における対応するタンパク質も含む。

## 【0018】

プロテインAは、主にC<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3の間の界面を通す古典的機構を介して、かつV<sub>H</sub>IIIクラスに属する可変ドメインを介してIgGと反応する。プロテインAはIgG3を除くヒトIgGの4つのサブクラスのうち、3つと相互作用することがよく確立されている。ヒトポリクローナル免疫グロブリンの30~50%は、V<sub>H</sub>IIIクラスを保持し、かつ一般に全てのIgG分子で発現されているわけではない。2つの型の反応性が、プロテインAの5つの免疫グロブリン結合領域(領域C、B、A、DおよびE)の全てで発現されている。1つの領域(領域B)由来の組み換え断片は、V<sub>H</sub>III結合活性を喪失しているが、C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3結合活性を残留するよう変異されている。この断片は断片Zと称され、かつアフィボディ(affibody)の原型分子である(Nilsson B et al., Protein Eng. 1(1987) 107-113)。

20

## 【0019】

1価の断片ZとIgGとの間の相互作用は、 $2 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ の桁である(Nilsson J et al., Eur J Biochem 224 (1994) 103-108)。V<sub>H</sub>IIIとの対応する相互作用は、約 $9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ である(Jansson B et al., FEMS Immunology and Medical Microbiology 20 (1998) 69-78)。

30

## 【0020】

組み換えプロテインG(天然のプロテインG中のアルブミン結合部位を欠如している)は、IgGの3つの結合領域(C1、C2、C3)を保持する。各領域は、免疫グロブリンの2つの異なる反応メカニズムを含むよう見受けられる。その1つは、免疫グロブリンのC<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3の間の界面と相互作用する。相互作用の機構はプロテインAとは異なるが、それらの各々の相互作用が他の分子の相互作用に影響を及ぼし、これはIgGの相互作用部位がほぼ近接していることを示唆する。他の機構はIgGのC<sub>H</sub>1ドメインを含む。利用可能な文献により、免疫グロブリンのC<sub>H</sub>1相互作用により表示される構造は、ヒトのみならず多数の他の種のIgGのFab断片全体において最も保存されている(Derrick JP et al., J Mol Biol 243 (1994) 906-918)ことが示唆される。

40

## 【0021】

IgGとC2断片との間の相互作用の親和性は、 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ の桁である(Gulich S et al., Protein Eng 15 (2002) 835-842)。本発明者は、C<sub>H</sub>1相互作用についての親和性データを未だ発見していない。しかしながら、マウスFab断片がプロテインG上で予備的に精製されることは可能であり、かつその相互作用は、プロテインGのC3断片とヒトIgGのC<sub>H</sub>1との間の相互作用の結晶学的解析のための結晶を創出するのに十分強固であることを示すデータが存在する(Kelley RF et al., Biochemistry 31 (1992) 5434-5441)。全ての可能性において、親和性は本明細書に記載される相互作用の機構と同一の桁である。

## 【0022】

プロテインGのIgG結合断片の変異を含むいくつかの研究が存在する。それらの1つにお

50

いては、変異体の $C_H2-C_H3$ 反応性が完全に破壊されうる (Sloan DJ et al., Protein Sci 8 (1999) 1643-1648)。変異体が依然として $C_H1$ 反応性を発現しているかについては、試験されていない。

【0023】

プロテインHは主に $C_H2-C_H3$ と反応する。

【0024】

プロテインLは、軽鎖の可変ドメイン中のフレームワーク構造と反応する。

【0025】

従って、例えばR1およびR2がIgXへの異なる結合特異性を有するような、R1およびR2の1つが、他方に利用されるIgX結合部位とは構造的に異なるIgX中の結合部位へ親和性結合をすることが可能であってもよい。あるいは、R1およびR2はIgX中に2個以上生じる結合部位(反復結合部位)へ親和性結合をすることが可能であってもよく、すなわちR1およびR2はIgXへの同一の結合特異性を有する。1つまたは複数のIg鎖における、1つ、または2つ以上の定常領域は、IgXにおける結合部位を典型的には重鎖のような1つの鎖に規定してもよい。従って、IgA、IgE、IgGおよびIgMの測定のために、1つまたは複数の $C1$ 、 $C2$ および $C3$ 領域によって、R1およびR2により使用される結合部位が規定されてもよい。IgGの測定のためR1またはR2により利用される結合部位は、 $C_H1$ または $C_H2-C_H3$ により規定されてもよく、例えば反応物の1つは $C_H1$ への特異性を伴うプロテインGに由来、または $C_H2-C_H3$ への特異性を伴うプロテインAに由来するペプチド配列を利用する反応物で、他の反応物は、プロテインA、プロテインGまたはプロテインHペプチド配列を利用し、かつ $C_H2-C_H3$ への特異性を伴う反応物である。

【0026】

天然の細菌Ig結合ペプチド配列は、典型的には上述のように2重の特異性を有する。R1およびR2にとって、一方の特異性、例えばもし反応物の配列がプロテインG由来の場合には、 $C_H1$ または $C_H2-C_H3$ の特異性(反応物の特異性を各々、 $C_H2-C_H3$ または $C_H1$ のみに供与する)が破壊された天然の配列の形状を組み入れることが好ましい可能性がある。例えば、 $C_H2-C_H3$ により規定される結合部位にのみ特異性を有する上述の断片Zのような、プロテインA由来のペプチド配列を組み入れるR1およびR2反応物にとって、 $V_H111$ への特異性は好ましくは破壊される。結合特異性のうちの1つの破壊は、典型的には天然の配列の適切な変異により達成される。

【0027】

反応物R1およびR2のIg結合能力は反復性があってもよく、すなわちR1およびR2の各々が、Igへの同一の結合特異性を有する1つ、2つ、3つ、4つ、5つ以上のペプチド配列/断片を含んでもよい。加えて、R1およびR2は、典型的にはR1およびR2のIg結合配列が由来する天然型の細菌ポリペプチド中に存在する可能性がある、付加的な結合特異性を欠如している。従って、プロテインGに由来する配列を含む反応物は、典型的には天然のプロテインGのアルブミン結合能力を欠如している。

【0028】

サンドイッチフォーマット

これらのフォーマットは、典型的に非制限量のR1および/またはR2を利用する。ある変種にとっては、R1および/またはR2が限量使用されてもよい。この文脈における量とは、濃度を含む。

【0029】

上記に示されるように、IgのR1およびR2の結合部位は、Ig分析物に対する2つの反応物の同時結合のために互いに十分に間隔がなければならない。好ましい変種においては、R1が固相へ固定化される、または固定化可能で、かつR2が分析的に検出可能/測定可能であり、よってサンドイッチ複合体へ取り込まれた他の反応物および/または測定の間この複合体と共存する可能性のある他の成分と区別されうる。

【0030】

サンドイッチフォーマットは、2段階フォーマット(連続的フォーマット)および1段階

10

20

30

40

50

フォーマット（同時フォーマット）へ分割されてもよい。固定化されたR1を利用する変種にとって、2つの主要な2段階変種が存在する：a）第一段階が、Ig分析物と、固定化された、または固定化可能な形状のR1との保温を含み、第一段階で形成された複合体と分析的に検出可能な形状のR2との保温を含む第二段階が続く、フォワードフォーマット、およびb）第一段階が分析的に検出可能な形状のR2と分析物との保温を含み、第一段階で形成された複合体の、固定化されたまたは固定化可能な形状のR1との保温を含む第二段階が続く、リバースフォーマットである。好ましい1段階サンドイッチフォーマットは、2つの反応物のみ（Ig分析物に加え、R1およびR2のうちの1つ）を含む2成分複合体を個別に事前形成することなく、上述の3成分複合体の形成のため、固定化されたまたは固定化可能な形状のR1、分析的に検出可能な形状のR2、およびIg分析物の保温を含む。

10

**【0031】**

フォワードフォーマット、とりわけ固定化された形状のR1が好ましい。

**【0032】**

固定化可能な形状のR1を含む変種にとって、典型的には固定化可能な反応物（R1）および分析物を含む可溶性の固定化可能な複合体の形成が存在する。この複合体は、別々の固定化段階において、固定基を示す固相へ、典型的にはR1の固定タグを介して固定化される。固定タグおよび基は、R1の固定化の概要と同一の原理に従い選択される。固定化段階は、典型的にIg分析物およびR1を含む固定化可能な複合体が形成された後に遂行され、フォワード2段階フォーマットにとっては、第一および第二段階の間または第二段階の後を意味し、リバースフォーマットにおいては、第二段階の後を意味する。同時フォーマットにおいては、固定化段階はR1、R2およびIg分析物が互いに保温される単一段階の後である。

20

**【0033】**

上述の基本的な変種の変種も存在する。そのような変種は、典型的に付加的反応物、および例えばR2の検出可能基を測定するため（以下を参照）、または固定化可能な反応物R1の固定化のための付加的段階を利用する。

**【0034】**

サンドイッチフォーマットにおいて、分析物の量は好ましくは形成された3成分サンドイッチ複合体の量から、例えば固相上で、好ましくは3成分複合体を介して固相へ結合されたR2を測定することにより決定される。原理上、3成分複合体の形成後に、液体中の残留R2を測定することによる固相のR2の測定が間接的に可能であってもよい。

30

**【0035】**

典型的には、測定値を1つまたは複数の標準的試料で得られた対応する値と比較することにより、サンドイッチ複合体中のR2測定値と試料中のIg分析物の量の間の関係を見出すために、既知の原理が適用される。

**【0036】**

本発明の有利な変種においては、可溶性の固定化可能な反応物、または複合体および固相の間の反応を含むアッセイ反応は、少なくとも適切な流路において流動条件下で遂行される。好ましい変種においては、R1、Ig分析物およびR2を含む全ての反応はそのような流路内で遂行される。好ましい流路はマイクロ流体流路である。流動条件下で遂行されないアッセイ反応は、使用される流路内で静的条件下または流路外の適切な管内で行われてもよい。

40

**【0037】**

あるいは、R1の固定化またはR1およびIg分析物を含む固定化可能な複合体の固定化を含む全てのアッセイ反応は、マイクロタイタープレートのマイクロタイター穴のようなマイクロスケール管内のような適切なアッセイ管内で、静的条件下、ことによると攪拌、振盪等の乱流条件下で遂行されてもよい。

**【0038】**

固相および反応物R1（捕捉物）

もし使用される場合には、固相は典型的にA）例えば粒子または多孔質モノリス（monolith）が充填されたベッドのような多孔質ベッド（porous bed）、またはB）Ig分析物との

50

保温に使用された管の内壁、またはC)多孔質ベッドへの沈降が可能な懸濁粒子の形態である。

【0039】

固相に適する粒子は、好ましくは球状または回転楕円体（ビーズ）、または非球状である。粒子の適切な平均直径は、好ましくは10 $\mu\text{m}$ 以上、または15 $\mu\text{m}$ 以上、および/または50 $\mu\text{m}$ 以下のような、5 $\mu\text{m}$ 以上の平均直径である、典型的に1~100 $\mu\text{m}$ の間に見出される。例えば、平均直径が0.1 $\mu\text{m}$ より小さい小型の粒子もまた使用されうる。直径は「流体力学的」直径を意味する。使用される粒子は、国際公開公報第02075312号（Gyros AB）で使用されるのと同じの意味において、単分散（単一径）または多分散（複合径）であってもよい。

10

【0040】

固相の基礎物質は、無機および/または有機物質で作成されてもよい。典型的な無機物質はガラスを含む。典型的な有機物質は有機ポリマーを含む。ポリマー物質は、ガラスおよびシリコンゴムのようない無機ポリマー、および合成または生物起源（生物ポリマー）の有機ポリマーを含む。「生物ポリマー」という用語は、天然の生物ポリマー由来のポリマーバックボーンが存在する、半合成ポリマーを含む。適切な合成有機ポリマーは、典型的には架橋され、かつ頻繁に重合可能な炭素-炭素二重結合を含むモノマーの重合化により得られる。適するモノマーの例は、ヒドロキシアルキルアクリル酸塩であり、例えば、2-ヒドロキシエチルアクリル酸塩のような2-ヒドロキシアルキルアクリル酸塩、および対応するメタクリル酸塩、アクリルアミド、およびメタクリルアミド、ビニル、およびスチリルエーテル、アルケン置換されたポリヒドロキシポリマー、スチレン等である。ほとんどの場合において、典型的な生物ポリマーは、例えばアガロース、デキストラン、スターチ等のような炭水化物構造を示す。

20

【0041】

固相の粒子は、例えば、フェライトのような磁気性物質の微量粒子が取り込まれた高分子のような非磁気性物質から製造されてもよく、または粒子が適切に表面修飾されていてもよい、フェライトのような磁気性粒子状物質をベースにしてもよい。

【0042】

本発明で使用される固相は、好ましくは親水性である。多孔質ベッドにとってこれは、ベッドが水と接触（吸収）する際、多くの場合にベッドの孔表面は水が毛細管現象によってベッド中に拡散する（多くの場合ベッド全体に）十分な水和性を有するべきであることを意味する。水溶性液体と接触される固相の表面は、典型的に、各々が例えば、酸素および窒素から選択されるヘテロ原子を有する、多数の極性官能基を曝露する。適切な官能基が水酸基、エチレンオキシド基（ $-\text{X}-[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$ 、 $n$ は1を超える整数、かつ $\text{X}$ は窒素または酸素である）、アミノ基、アミド基、エステル基、カルボキシ基、スルホン基等から、好ましくは本質的に例えば、2~12の間隔内のpHで独立的に無電荷な基が選択されうる。

30

【0043】

もし固相物質の基礎物質が疎水性である、または十分に親水性でない場合、例えばスチレン（共）ポリマーベースの場合には、水溶性液体と接触される表面は親水化されてもよい。典型的なプロトコールは、上述のものと同一型の極性官能基を示す化合物または化合物の混合物を、酸素プラズマ等による処置を用いて被覆する段階を含む。

40

【0044】

固相に固定化された形状の反応物R1の導入のための技術は、典型的に以下を含む：

- a) 可溶性形状のR1を固相へ強固に付着させる、または
- b) 固相で段階的に固定化形状のR1を構築する（固相合成）。

双方の経路は当技術分野において一般に公知である。固相物質への結合は共有結合、親和性結合（例えば、生体特異的親和性結合）、物理的吸着、静電的結合等を介してもよい。

【0045】

代替としては、a)典型的に固相上の固定基、および本発明の方法を遂行する際に提供

50

される条件下で、望ましくない切断に抵抗性のある結合の形成へと互いに相互反応性があるR1の固定タグを利用する。固定基は固定タグとの反応前に固相物質上へ導入される。固定基および固定タグは固定対を規定する。

【0046】

変種(a)の共有結合型固定化とは、切断抵抗性結合が共有結合型であることを意味する。固定基および固定タグは、典型的に相互反応性のある各々、求電子性および求核性基から選択される。基の例は、例えば国際公開公報第2004083109号、PCT/SE第06/000071号、およびPCT/SE第06/000072号に供与される(全てGyros AB/Gyros Patent AB)。

【0047】

親和性結合を介する固定化は、1つの要素(固定化されたりガンドL=固定基)が固相物質へ強固に付着し、一方他の要素(固定結合剤B)が結合剤B(=固定タグ)を含む第一部分、およびIg結合ペプチド配列を含む第二部分を含む接合体(固定接合体)の一部である固定親和性対を利用してよい。固定結合対は使用される反応物の所望の結合活性を負に阻害するべきでなく、かつこの意味においては一般的である(結合剤Bおよび親和性リガンドLの双方が一般的である)。典型的には、好ましい固定親和性対は、ストレプトアビジン、アビジン、ニュートラアビジン(neutravidin)、抗ビオチン抗体等、およびビオチンのようなビオチン結合化合物、b)抗ヘプタン抗体および対応するヘプタンまたは抗原、およびc)クラス/サブクラス特異的抗体および対応するクラス由来のIgsである。

【0048】

上記および本発明における他の文脈での「接合体」という用語は、化学的接合体および組み換え産生された接合体のような、共有結合的接合体を意味する。接合体は、少なくとも2つの、典型的にはリンカーを介する共有結合的に共結合された部分を含む。本発明において、1つの部分は、少なくとも1つのIg結合配列を示すポリペプチドであってもよく、一方別の1つの部分は、一般的な結合剤Bまたは分析的に検出可能な基であってもよい(以下を参照)。もし適用可能な場合には、該用語はいわゆる天然の接合体、すなわち互いに隔離して配置され、かつ2つの異なる分子独立体へ方向付けられた親和性を有する、2つの結合部位を各々示す親和性反応物も含む。

【0049】

好ましい固定親和性対(LおよびB)は、典型的にはせいぜいストレプトアビジンおよびビオチンの親和性定数に対応するのと同程度、またはこの後者の親和性定数より  $10^1$  倍または  $10^2$  倍または  $10^3$  倍大きい親和性定数 ( $K_{L-B} = [L][B]/[L-B]$ ) を有する。これは、典型的に各々およそ  $10^{-13}$  mole/l以下、 $10^{-12}$  mole/l以下、 $10^{-11}$  mole/l以下、および  $10^{-10}$  mole/l以下である親和性定数を意味するであろう。これらの親和性定数の範囲はBiacore(Uppsala, Sweden)由来のバイオセンサー(表面プラズモン共鳴)により得られる値、すなわちデキストラン被覆された金表面に固定されたりガンドLを用いて得られる値を意味する。

【0050】

結合剤Bの適する結合容量の範囲、およびそのような結合容量の測定法は、国際公開公報第2004083109号、PCT/SE第06/000071号、およびPCT/SE第06/000072号に供与されている(全てGyros AB/Gyros Patent AB)。

【0051】

固定基および固定化された捕捉反応物は、国際公開公報第2004083109号、PCT/SE第06/000071号、およびPCT/SE第06/000072号(全てGyros AB/Gyros Patent AB)に記載されるように固相上へ導入されてもよい。

【0052】

固定親和性対は、R1の固定化のために好ましい。

【0053】

検出可能な反応物R2

分析的に検出可能な形状のR2は、典型的には検出可能な基が存在する部分1、および1つまたは複数のIg結合ペプチド配列を含む部分2を含む。従って検出可能な反応物R2は、部

10

20

30

40

50

分1および部分2が、好ましくは共有結合により互いに強固に付着した接合体であってもよい。検出可能基はまた標識とも称されるであろう。

【0054】

2つの主要な検出可能基の型が存在する：a) シグナル生成基およびb) 親和性基である。シグナル生成基は放射線放出、または放射線吸収基および他の様式で所定の放射線を干渉する基から選択されてもよい。特定のシグナル生成基は、酵素、コファクター、基質、補酵素等のような酵素学的に活性型の基である；放射性または非放射性のような特定のアイソトープを含む基；蛍光性または蛍光発生性基；化学発光性、および化学発光発生性基を含む発光性、および発光発生性基；生物発光性、および生物発光性発生基等；金属がイオン性の形状等である基を含む金属含有基である。この文脈における親和性基は、検出可能な親和性基に対する親和性対応物と、検出可能反応物における検出可能基とは異なり、かつ好ましくは、典型的に標識の形状におけるシグナル生成基である第二の検出可能基との間の接合体である2次的に検出可能な反応物の使用によって、典型的に検出される。典型的な親和性ベースの検出可能基は、本明細書の他の部分で議論される固定親和性対の個々の要素の中から選択されてもよい。もしそのような対が固相へのR1の固定化（すなわち、捕捉物）のために使用される場合には、該方法の間は親和性ベースの検出可能基の、固定結合対の要素への親和性結合が可能であるべきではないという条件を伴う。

10

【0055】

流路および流動条件

流路は、好ましくはマイクロ流体装置中に存在する種類のもの、すなわち基質中に製作されるマイクロチャンネル構造で、かつユニット間のマイクロ導管輸送も含む構造中で遂行されるべき、アッセイプロトコールの全ての段階を可能にする機能ユニットを含むマイクロ導管系により規定される。典型的なマイクロ流体装置は、例えばGyros AB/Amersham Biosciences（国際公開公報第99055827号、国際公開公報第99058245号、国際公開公報第02074438号、国際公開公報第02075312号、国際公開公報第03018198号（米国特許第20030044322号）等）；Tecan/Gamera Bioscience（国際公開公報第01087487号、国際公開公報第01087486号、国際公開公報第00079285号、国際公開公報第00078455号、国際公開公報第00069560号、国際公開公報第98007019号、国際公開公報第98053311号）；Amic AB（国際公開公報第03024597号、国際公開公報第04104585号、国際公開公報第03101424号等）等により記載されている。比較的好ましくはない変種においては、流路は反応キャビティ、混合キャビティ、バルブ機能等のような様々な機能ユニットを連結する管の形状であってもよい。さらに他の変種においては、流路は毛細管現象の力により液体輸送が発生する、例えば様々な種類の慣習的テストストリップのようなある種の吸収物質/多孔質物質に規定される。

20

30

【0056】

流路は典型的にはマイクロフォーマットの様式で、すなわち寸法を有し、かつ/または「好ましい流路」の下で議論されるサイズの液体容量を操作することが可能である。

【0057】

適する流路は、典型的には1つまたは複数の反応キャビティを含み、そのうちの1つが（104a~h）固定化形状中の固定基またはR1を提示する上述の固相を含む。他の反応キャビティは、懸濁粒子へ固定化された反応物を含む可溶性反応物との間の反応のために使用されてもよい。また、キャビティの形状で混合機能が存在してもよい。混合キャビティは反応キャビティと一致してもよい。これら後者の型のキャビティ/機能ユニットは、典型的に固相を含むキャビティの上流に位置する。

40

【0058】

反応キャビティ（104a~h）は、R1を保持する固相または固定基が存在する流路の一部（101a~h）として定義される。反応キャビティはより大型の反応チャンバーの一部であってもよい。

【0059】

反応キャビティ（104a~h）は典型的にマイクロフォーマットで、すなわち500 μm以下

50

、または200  $\mu\text{m}$ 以下（深さおよび/または広さ）のように、1,000  $\mu\text{m}$ 以下の少なくとも1つの断面積寸法を有し、かつマイクロキャピティと称される。最小の断面積寸法は、典型的に25  $\mu\text{m}$ 以上または50  $\mu\text{m}$ 以上のように、5  $\mu\text{m}$ 以上である。好ましい流路の反応キャピティ（104a~h）の全容量は、典型的に5,000 nL以下、1,000 nL以下、または500 nL以下、100 nL以下、または50 nL以下、または25 nL以下のように、nLの範囲である。

#### 【0060】

「流動条件」という用語は、固相と、固定化可能な反応物R1、Ig分析物およびR1およびIg分析物を含む固定化可能な複合体のような、可溶性の固定化可能な反応物との間の反応の間に、固定化可能な反応物を含む液体規定量が、反応の起こる時期に継続的に反応キャピティ/固相を流動することを意味する。使用される流速は、反応の非拡散制限条件または拡散制限条件を提供するよう適応されてもよい。非拡散制限条件を提供する流速は、典型的に固相の上流区域中で捕捉された反応物の濃縮（最高値）をもたらす。

10

#### 【0061】

多孔質ベッドを通過する適切な流速は、多数の要因に依存する：固相に結合した反応物（例えば、R1）および可溶性反応物（例えば、Ig分析物）の間の親和性；b）Ig分析物の種類；c）反応キャピティの寸法（容量、長さ等）；d）固相の種類（物質、有孔性、ベッドまたは被覆された内壁等）；等である。

#### 【0062】

マイクロフォーマット中の流路にとって、流速は典型的に、例えばR1を示す固相を通過するIg分析物を含む液体規定量のように、反応キャピティ/固相を通過する可溶性反応物にとって、0.050秒以上または0.1秒以上のように0.010秒以上の滞留時間を供与するべきである。滞留時間の上限は、典型的に1時間以下または15分以下または5分以下または1分以下のように2時間以下、または45秒以下のように更に短い時間である。例証的流速は、0.01~1,000 nL/secまたは0.01~100 nL/secまたは0.1~10 nL/secのような0.001~10,000 nL/sec内である。これらの流速間隔は、主に1~200 nLまたは1~50 nLまたは1~25 nLのように、1~1,000 nLの範囲における固相容量にとって有用であってもよい。滞留時間とは、液体規定量が固相を通過するために所要する時間を意味する。最適化には、典型的に各特定の系/フォーマット/反応物対について実験的試験を要するであろう。

20

#### 【0063】

固相を通過する液体流動は、原理上、例えば電気運動的または非電気運動的に創出された動力のような、任意の動力種により駆動される。マイクロ流動装置の流路にとって、遠心動力は恐らく毛細管動力と組み合わせられる。「好ましい流路」の項をさらに参照。

30

#### 【0064】

好ましい流路（主にマイクロ流動装置）

マイクロ流動装置は $\mu\text{L}$ 範囲、典型的にはナノリットル（nL）範囲の容量を有する、1つまたは複数の液体規定量/試料が輸送および/または加工される、1つまたは2つ以上のマイクロチャンネル構造（101a~h）を含む装置である。少なくともこれらの規定量/試料の1つは、Ig分析物の中から選択される1つまたは複数の反応物、検出可能な反応物R2のような試薬、固定化可能な反応物R1、アッセイにおいて形成された固定化可能な複合体、緩衝液および/または他等を含む。 $\mu\text{L}$ 範囲とは、100  $\mu\text{L}$ 以下または10  $\mu\text{L}$ 以下のように1000  $\mu\text{L}$ 以下の容量を意図し、かつ上限が5000 nLを有し、多くの場合500 nL以下または100 nL以下のように1000 nL以下の容量に関連するnLの範囲を含む。100 mg/L以上のような高濃度において加工される規定量中に存在するIg分析物にとっては、さらにより少ない容量、例えば40 nL以下のように、50 nL以下が関与する。nLの範囲はピコリットル（pL）範囲を含む。マイクロチャンネル構造は、断面積寸法が $10^3 \mu\text{m}$ 以下、好ましくは $10^2 \mu\text{m}$ 以下のように、 $5 \times 10^2 \mu\text{m}$ 以下である1つまたは複数のキャピティおよび/または導管を含む。

40

#### 【0065】

従って、マイクロチャンネル構造（101a~h）は、以下より選択される1つ、2つまたは3つ以上の機能ユニットを含んでもよい：a）例えば入口/入口開口部（105a~b、107a~h）のように、恐らく容量規定ユニット（106a~h、108a~h）（装置内で加工される液体規定量

50

の計量のため)を伴う入口配置(102、103a~h)、b)液体輸送のためのマイクロ導管、c)反応マイクロキャピティ(104a~h);d)混合マイクロキャピティ/ユニット;e)粒子状物質を液体から分離するためのユニット(入口配置中に存在してもよい)、f)例えば毛細管電気泳動、クロマトグラフィー等のような、試料中で溶解された、または懸濁された成分を互いに分離するためのユニット;g)検出マイクロキャピティ;h)廃棄導管/マイクロキャピティ(112、115a~h);i)バルブ(109a~h、110a~h);j)周辺大気への通気孔(116a~i);液体分割(液体ルーター)等である。機能ユニットは、いくつかの機能を有してもよく、例えばマイクロキャピティ(114a~h)は、反応を遂行するためおよび測定/検出のための双方に使用されてもよい。

【0066】

固相へ向けられた反応マイクロキャピティ(104a~h)は、典型的に大型マイクロチャンパー(114a~h)の一部である。反応マイクロキャピティ(104a~h)は、典型的にマイクロチャンパー(114a~h)の排出口末端に近接して位置する。

【0067】

マイクロ流体装置の様々な種類の機能装置は、Gyros AB/Amersham Pharmacia Biotech AB:国際公開公報第99055827号、国際公開公報第99058245号、国際公開公報第02074438号、国際公開公報第02075312号、国際公開公報第03018198号、国際公開公報第04103890号、国際公開公報第05032999号、国際公開公報第05094976号、国際公開公報第05072872号、PC T/SE第2005/001887号;Tecan/Gamera Bioscience国際公開公報第01087487号、国際公開公報第01087486号、国際公開公報第00079285号、国際公開公報第00078455号、国際公開公報第00069560号、国際公開公報第98007019号、国際公開公報第98053311号等により記載されている。このリストに含まれるものは、対応する発行された米国特許および刊行された米国特許出願である。

【0068】

有利な形状においては、固相へ向けられた反応マイクロキャピティ(104a~h)は、1つまたは複数の入口配置(102、103a~h)(上流方向)へ連結され、各々が入口(105a~b、107a~h)および少なくとも1つの容量規定ユニット(106a~h、108a~h)を含む。1つの入口配置(103a~h)は、1つのマイクロチャンネル構造(101a~h)および/または反応マイクロキャピティ(104a~h)のみに連結される(個別の入口)。入口配置の他の種類は(102)は、マイクロチャンネル構造(101a~h)および/または反応マイクロキャピティ(104a~h)の全てまたはサブセット(100)に共通である。後者の変種は、典型的には、サブセット(100)の各マイクロチャンネル構造/マイクロキャピティ(101a~h/104a~h)の1つの容量規定ユニット/容量計量マイクロキャピティ(106a~h)を有する分配多岐管と組み合わせられた、共通の入口(105a~b)を含む。双方の変種において、容量計量マイクロキャピティ(106a~h、113a~h)を含む各容量規定ユニット(106a~h、108a~h)は、順に例えばマイクロキャピティ(104a~h)のように、そのマイクロチャンネル構造(101a~h)の下流部分と通じている。各容量規定ユニット/容量計量マイクロキャピティ(106a~h、108a~h/106a~h、113a~h)は、典型的に排出口末端にバルブ(109a~h、110a~h)を有する。このバルブは典型的に受動的で、例えば親水性および疎水性表面の間の境界のような排出口末端の化学的表面特性における変化(疎水性表面破壊)(国際公開公報第99058245号、国際公開公報第2004103890号、国際公開公報第2004103891号および米国特許出願第10/849,321号(Amersham Pharmacia Biotech ABおよびGyros AB))、および/または幾何学的/物理学的表面特性における変化(国際公開公報第98007019号(Gamera))を利用している。

【0069】

規定/計量される容量は、マイクロチャンネル構造のさらに下流で輸送および加工される液体規定量の容量である。上述されるように、高濃度におけるlg分析物を含む規定量に使用される計量マイクロキャピティ(例えば、個々の入口へ連結されるものが好ましい106a~h、113a~h)の容量は、好ましくは100 nl以下、または50 nl以下、または30 nl以下のように200 nl以下の容量を有する。

10

20

30

40

50

## 【0070】

入口を伴う典型的な入口配置、容量規定ユニット、分配多岐管、バルブ等は国際公開公報第02074438号、国際公開公報第02075312号、国際公開公報第02075775号および国際公開公報第02075776号、に提示されている（全てGyros AB）。

## 【0071】

各マイクロチャネル構造は、少なくとも1つの液体の入口開口部（105a~b、107a~h）および過剰の空気（開口部）（116a~i、112）、および恐らく液体（廃棄チャネル中の循環（112））のための、少なくとも1つの排出開口部を有する。

## 【0072】

本発明において使用されるマイクロ流体装置は、例えば10個以上、例えば25個以上、または90個以上、または180個以上、または270個以上、または360個以上のマイクロチャネル構造のように、多数のマイクロチャネル構造を含む。上限は、典型的に500個以下のような1000個以下である。

10

## 【0073】

2つ以上の機能ユニットの間のマイクロ流体装置/マイクロチャネル構造内の液体輸送のため、異なる原理が利用されてもよい。例えば、以下に続くパラグラフ中で議論されるように、ディスクを回転させることによる慣性動力が使用されてもよい。他の有用な動力は、毛細管動力、電気運動力、毛細管動力のような非電気運動力、静水学的圧力等である。

## 【0074】

マイクロ流体装置は、典型的にディスクの形状である。好ましいフォーマットは、ディスク面に垂直または一致する対称軸（ $C_n$ ）を有し、 $n$ は2以上、3以上、4以上または5以上、好ましくは（ $C$ ）である。言い換えれば、ディスクは正方形および他の多角形状のような長方形であってよいが、円形が好ましい。典型的には、ディスク面に垂直または平行な回転軸の周囲で装置を回転することにより、要される遠心力が創出されてもよい。回転軸がディスク面に対して垂直でない変種は、国際公開公報第04050247号（Gyros AB）に供与される。

20

## 【0075】

好ましい装置は、典型的に慣習的なCDフォーマットと類似の大きさおよび/または形状を伴うディスク型で、例えば慣習的なCD直径（12 cm）を伴う円形ディスクの10%から300%までの間の大きさである。

30

## 【0076】

本発明の文脈において、マイクロチャネル構造中の内部表面の「湿潤性の」（親水性の）および「非湿潤性の」（疎水性の）という用語は、表面が各々、水接触角 $90^\circ$ 以下または $90^\circ$ 以上を有することを考慮する。マイクロチャネル構造の異なる機能部分の間の液体の効率的な輸送を促進するために、個々の部分の内部表面は主に湿潤性があるべきであり、好ましくは接触角が $50^\circ$ 以下、または $40^\circ$ 以下、または $30^\circ$ 以下、または $20^\circ$ 以下のように、 $60^\circ$ 以下を伴う。これらの湿潤度数は、マイクロ導管の少なくとも1つ、2つ、3つまたは4つの内壁に適用する。1つまたは複数の内壁がより高い水接触角を有する、例えば疎水性である場合には、1つまたは複数の他の内壁のより湿潤性の表面により補われる。とりわけ、入口配置での湿潤性および導管寸法は、一旦液体がキャピティ/マイクロ導管（マイクロキャピティ/マイクロ導管は親水性である）へ入り始めたら、使用される水溶性液体が毛細管現象（自己吸引）により目的のマイクロキャピティ/マイクロ導管を充填することが可能であるように適応されるべきである。マイクロチャネル構造の親水性の内表面は、例えば、受動性バルブ、抗毛管吸収手段、周辺外気への開口部としてのみ機能する開口部等（図1の長方形）を導入するため、親水性内壁中の1つまたは複数の局部的疎水性表面破壊を含んでもよい。例えば、国際公開公報第99058245号、国際公開公報第02074438号、米国特許第20040202579号、国際公開公報第2004105890号、国際公開公報第2004103891号を参照（全てGyros AB）。

40

## 【0077】

固定化可能な親和性複合体を、試料中での分析物の量の関数としての分量を産生するた

50

めの、可溶性反応物（例えば、固定化可能な形状のR1、検出可能な形状のR2、Ig分析物、および他の反応物）の混合および/または保温を含むフォーマットの典型的なマイクロチャネル構造は、PCT/SE第2005/001887号（Gyros Patent AB）および2005年12月出願の、対応する正規米国特許出願「Microfluidic assays and microfluidic devices」中に記載されている。国際公開公報第02075312号（Gyros AB）も参照。これらの種類のマイクロチャネル構造においては、典型的に固相を含むマイクロキャビティの上流に最初の混合機能が存在し、かつ最初の混合機能と少なくとも部分的に一致してもよい、またはしなくてもよいそれらの最初の保温マイクロキャビティが恐らく存在する。混合機能は、混合される液体および/または反応物の数に依存して、1つまたは2つ以上の入口を含んでもよい。得られる混合物は、複合体が固定化されうる固相を含むマイクロキャビティ中へさらに輸送される前に、反応物が親和性複合体を形成するために互いに反応しうる最初の保温マイクロキャビティを恐らく介して、固相を含むマイクロキャビティへと下流へ輸送される。最初の混合機能の上流、およびこの混合機能の1つまたは複数の入口を伴う液体の伝達において、最初の混合機能が最初の保温マイクロキャビティに付随するのと同様の様式で各保温マイクロキャビティに付随してもよい、またはしなくてもよい1つまたは複数の付加的な混合機能が存在してもよい。最初の混合機能および固相を含むマイクロキャビティとの間の流路へ、例えば最初の保温マイクロキャビティの上流および/または下流へ連結される保温マイクロキャビティと、恐らく組み合わせられた付加的な混合機能も存在してもよい。これらの付加的な混合機能/保温マイクロキャビティは、典型的に固相を含むマイクロキャビティ、および最初の混合機能との間の流路の支流で生じる。この種のマイクロチャネル構造の入口は、典型的に構造内で加工される液体規定量の装置上での計量のための入口で、容量規定ユニットを有する。容量規定ユニットは、個々の入口または分配多岐管中のような2つ以上の構造へ共通の入口に付随してもよい。各々、図1中の入口配置（103a～h）および（102）を比較。

#### 【0078】

試料

輸送され、かつマイクロチャネル構造内で加工される液体試料は、典型的に水溶性で、かつ希釈剤、洗浄液体および/かつIg分析物および/または固定化されたまたは固定化可能なR1および検出可能なR2のような試薬のような反応物を含む液体であってもよい。

#### 【0079】

マイクロチャネル構造および/または固相を含むマイクロキャビティへ導入される分析試料は、未加工のIg含有生物学的液体試料であってもよく、またはそのような液体試料に由来してもよい。好ましい変種において、Ig分析物を含む試料は、未加工で未希釈の形状において使用される。この文脈における、「未加工」および「未希釈」という用語は、試料から、凝結または凝集および/または1:3以上のように希釈係数1:5以上のような低希釈を引き起こす可能性がある粒子状物質および他の物質が取り除かれていることを含む。「生物学的液体」という用語は、とりわけIgのような生物有機的化合物を含む任意の液体を考慮する。Ig含有生物学的液体は、細胞培養上清ホモジェネートおよび溶解物、組織ホモジェネート、血液および血清または血漿、リンパ球等のような様々な血液分画、ならびに含有の様々な液体調製物であってもよい。

#### 【0080】

試料の容量および使用される試料中のIg分析物の濃度は、本明細書中の他の部分で議論される。

#### 【0081】

発展中でかつ重要な生物治療学のサブセグメントは、治療学的モノクローナル抗体である。規制認可を獲得したおよそ20個の製品、臨床開発中の100～150個の候補抗体、および前臨床開発中の他の何百個が存在する。2005年の間に全体のビジネスはおよそ13 BUSDの売り上げを含み、かつ2010年には30 BUSDに増加することが予測される。

#### 【0082】

ビジネスは、様々な型の製品基準（用量、半減期、免疫抗原性、特異性、親和性、炭水

10

20

30

40

50

化物組成等)へ変換される有効性および有害事象に関する義務的な規制基準に準拠せねばならない。別の基準は、製品が薬物の投与において生じる可能性のあるいくつかの潜在的な有害事象(例えば、補体活性化)、および/または増加した免疫抗原性(凝集体はより免疫抗原性があると考慮される)を減少させるため、1%未満の凝集体、すなわち2量体、3量体およびより大型の凝集体を含むべきことである。

#### 【0083】

モノクローナル抗体の凝集体は多数の理由により形成されうる：

抗体の生来の特性により、凝集が引き起こされる傾向がある(例えば、抗原結合部位が非常に疎水性である)、

製造条件、例えば異常な炭水化物組成により凝集を誘導する可能性がある、

精製手法によって、凝集を誘導する可能性があるモノクローナルIgGの変性を誘導する可能性がある、

凍結-溶解サイクル。

#### 【0084】

もし治療抗体が皮下投与される場合には、投与されうる容量は数mlに制限される。従って、要されるモノクローナル抗体の用量を投与するために、濃度が非常に高くなければならない(典型的に100~200 g/Lの範囲)。これらの状況下において、IgGの凝集体形成のリスクは高い。

#### 【0085】

IgG凝集体の含有について試料の解析に使用されうるいくつかの方法が存在する(ゲル電気泳動、超遠心法、サイズ排除クロマトグラフィー、濁度測定法、比濁法または動的光散乱(DLS)のような様々な光学的手法)(参考文献を参照)。サイズ排除クロマトグラフィーの1つの問題点は、非常に大型の凝集体はカラムに入ることさえできず、かつ凝集体の検出を免れ、かつカラムの頂点で留まる可能性があることである。他の問題点は、ごく弱く付随する小型の凝集体は、分離手法の間に解離する可能性があることである。

#### 【0086】

各方法は、常に固有の長所および短所を有する。いくつかの方法は、天然試料中で凝集体の解析が可能であり、他の方法は、例えばサイズ排除クロマトグラフィーのようなIgG定量のための直交性の方法との組み合わせにおいて、精製された試料を要する。理想的には、分析手法は、例えば細胞懸濁中ならびに凝集体を誘導する可能性がある精製手法の後など、純度の状態に関わらず試料に適用可能であるべきである。他の局面は、短期間の間に多数の試料を、好ましくは並行して解析する方法の容量である。さらに他の局面は、試料中の凝集体の少ない比率も開示する方法の能力である(凝集体のアッセイ感度)。

#### 【0087】

モノクローナル抗体の時代においては、タンパク質の凝集体のアッセイを設計することがより容易になってきている。同一の捕捉および検出抗体を伴うサンドイッチアッセイ原理を使用して、免疫アッセイに使用されるエピトープが1度のみ発現される真にモノマーのタンパク質が、2つの同一モノクローナル抗体を使用するアッセイの反応を生成することは可能でないと考えられる。該アッセイにおいては、凝集したタンパク質のみが検出されるであろう。

#### 【0088】

対照的に、免疫グロブリンは、天然のタンパク質において4量体を形成する2つの重および2つの軽鎖からなるより複雑な構造を示し、かつこの観点において「ヘテロ2量体の2量体」として記載されうる。従って、免疫グロブリンの任意のエピトープは、モノマーのタンパク質分子表面で常に「2重に」発現される。これは、サンドイッチ免疫アッセイにおいて、モノクローナル試薬を使用した免疫グロブリン凝集体の解析を複雑化する。

#### 【0089】

この提案は、Gyrolab Bioaffyを使用する治療モノクローナル抗体の調製における、IgGの解析のために示唆された手法に対処している。この観点は、以下により詳細に記載される。

10

20

30

40

50

## 【0090】

本発明者らは、IgGを市販のプロテインA誘導体であるビオチン化Fragment z (Fz) へ捕捉することをベースにした、IgGの定量のためのアッセイを設計した。Fzの反応性(プロテインAの領域B由来の変異型)は、様々な種由来のIgGのFc部分のC<sub>2</sub>HおよびC<sub>3</sub>Hの間の領域に対して唯一方向付けられる。理論的には、Fzは独立に2つの重鎖と相互作用する。従って、Fzの捕捉ならびにFzの検出をベースにしたアッセイがモノマーIgGのシグナルを生成することが予測される。

## 【0091】

ビオチン化Fz (Affibodyから市販) の分子特徴を詳細に分析すると、2つの結合領域およびジスルフィド結合を通して、Fzへ付着したビオチン分子から構成される。図解表示を以下に示す。



Fzはまた以下の形式においても市販されている。



## 【0092】

Fz:Fzアッセイにおいて、本発明者らはこれまでに、固定化のために「2量体Fz」をおよび検出試薬としてALEXA標識された「4量体Fz」を使用している。好ましい設定の様式においては、固相上で4量体様式を、かつ検出試薬として2量体様式の使用が、恐らくIgGの凝集体の検出の感度を増強するであろうと思われる。Fz:FzアッセイをFzの捕捉およびヒトIgGのF(ab')<sub>2</sub>断片の検出をベースにしたアッセイと比較すると、とりわけ2つのアッセイの濃度範囲の低限において異なる結果が得られた。他の観察結果は、ヒトIgGのFc断片を解析する際に、Fz:FzアッセイがFz:F(ab')<sub>2</sub>アッセイと比較して非比例的な強い応答を提示したことである。Fc断片は凝集体を形成する傾向があり、かつ容易に結晶化されうる(Fcのcは「結晶可能」を意味する)。

## 【0093】

これらのアッセイは、Bioaffy 20 HCとの組み合わせにおいて使用されてきている。HC粒子は、解析の遂行にとって重要である可能性がある。従って、少なくとも濃度範囲の低限においては、カラムに固定化された大容量のFzは、モノマーIgG分子の双方の重鎖が絡む中で、局部的に利用可能な過剰量の固定化されたFzと反応するであろう可能性が増加すると考えられる。結果として、Fz-ALEXAを生成するシグナルを、モノマータンパク質中へ組み入れることがより困難であると考えられ、したがってモノマータンパク質は、これらの環境下、少なくとも測定範囲の低濃度範囲において、未検出として免れると考えられる。未だ遂行されていない実験ではあるが、この原理は、固相に「4量体Fz」を検出試薬として「2量体Fz」を使用することにより、さらに際立つ可能性がある。

## 【0094】

ここまで、Fz:F(ab')<sub>2</sub>アッセイは可能な限り高濃度でIgGを定量するために設計されてきた。大まかに、アッセイの実践範囲は1~1200 ug IgG/ml (20 nl 試料容量) である。この範囲を達成するために、検出抗体は実践範囲をより高い濃度へ移行させる非標識抗体と混合されるべきである。検出試薬として標識抗体のみが使用される場合、実践範囲が大まかに2~10000 ng/ml (200 nl 試料容量) を網羅する低い濃度へ移行する。Fz:Fzアッセイを使用する対応するアッセイ範囲は、図7に示されるように、およそ1~200 ug/ml (200 nl 試料容量) である。

## 【0095】

参照カーブの形状中の参照として、真にモノマーのIgGを使用し、かつ、モノマーおよびポリマーのIgGの比率と本質的に独立な、IgG濃度を定量するR1:R2 (例えば、Fz:F(ab')<sub>2</sub>) アッセイ、例えば、試料中のIgG含有量に対して比例的な応答を提供するアッセイ、および、

10

20

30

40

50

試料中のポリマー-IgGの相対量に相関する偏った反応を提供するR3:R4 (例えば、Fz:Fz) アッセイ

において解析される、IgG凝集体の様々な比率を含む試料を使用し、

2つの方法によって決定される濃度割合を算出し、それにより最終結果における2つのアッセイにおいて、各々、真にモノマーおよび凝集体のIgGの異なる挙動を組み入れる。

液体試料中のポリマー-IgGの比率は、参照として真にモノマーのIgGを用いて算出され、すなわちFz: F(ab')<sub>2</sub>およびFz:Fzアッセイの反応は、双方とも真にモノマーの試料および同定される試料に対して試験される。

【0096】

試料中のポリマー対モノマータンパク質相対割合の評価を簡略化するために、2つのアッセイが、好ましくは高容量粒子を使用して同一のCDで実施されるべきである。

10

【0097】

本発明に係る他の態様においては、例えばプロテインAまたはプロテインGのようなIgGと広く反応する任意の試薬が、アッセイにおいてF(ab')<sub>2</sub> (R2)の代わりに使用されてもよい。IgGの結合容量を増強するために、Fzの多重結合分子がマイクロチャネルの表面、またはマイクロチャネルのビーズに提供されてもよい。

【0098】

引き続き、本発明に係る別の態様においては、R1、R3およびR4は、IgGのFc部分と反応する以下の親和性反応物のいずれであってもよい：

affibodyであるFz

20

プロテインGのFc結合機能

プロテインH

IgGへの特異性を有する合成結合剤 (Fc)

Fab断片

scFv

Vドメイン

生物特異的scFv

カメロイド (cameloid) HC抗体由来のナノボディー (nanobodies)

リポカリン (lipocalins) 由来のアンチカリン (anticalins)

ミノボディー (minobodies)

30

ダイアボディー (diabodies)

トライボディー (triabodies)

テトラボディー (tertrabodies)。

【0099】

本発明に係るさらなる態様においては、R1、R3およびR4は、IgGのF(ab')<sub>2</sub>部分と反応する以下の親和性反応物のいずれであってもよい：

プロテインGのCH<sub>1</sub>結合機能

プロテインL

IgGへの特異性を有する合成結合剤

Fab断片

40

scFv

Vドメイン

生物特異的scFv

ナノボディー

リポカリン由来のアンチカリン

ミノボディー

ダイボディー

トライボディー

テトラボディー。

【0100】

50

## 実験部

## マイクロ流体装置および器械使用

2つの異なるマイクロ流体装置が使用された。1つは市販のもの、ならびに、製造者の使用説明書に一致させ、固相がストレプトアビジンが事前に固定化されたトレスシル活性型 (tresyl-activated) 多孔質粒子 (10 μm 多孔質粒子 (TSKgel Tresyl-5PW, Tosoh Bioscience, Stuttgart, Germany)) であることを除けば、図1および国際公開公報第04083108号 (Gyros AB) および国際公開公報第04083109号 (Gyros AB) に詳述される Bioaffy CD micro laboratory (Gyros AB, Uppsala, Sweden) であった。構造の各部分は、個々の200 nlの計量マイクロキャピティ (113a~h) を有していた。他の装置は、類似のものであるが、構造の各部分が個々の20 nlの計量マイクロキャピティを有していた。加工のために使用された機器はレーザー蛍光検出器が装備された Gyrolab Workstation であった (Gyros AB, Uppsala, Sweden)。

10

## 【0101】

## 反応物および液体：

分析物 (IgX)：ヒトポリクローナルIgG。保管溶液5 mg/ml

ビオチン化断片Z ( $V_H$  III 結合能力を破壊するため変異された (プロテインAの) 断片B) : Affibody Technology, Stockholm, Swedenより得られた。

ビオチン化組み換えプロテインG：3つのIgG結合区域 (ペプチド配列) を有し、かつ天然のプロテインGが有する他のタンパク質への結合能力を欠如する市販のもの。ビオチン化はEZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin/Sulfo-NHS-LC-ビオチン (Pierce、製品# 21335、Perbio Science UK Limited, Cheshire, United Kingdom) を用いて遂行される。

20

蛍光体標識された断片Z：断片はAffibody Technologyから得られ、かつAlexa蛍光体647モノクローナル抗体標識キット (A-20186、Molecular Probe) を使い、反応色素 (Alexa蛍光体) を含む2倍量の液体が使用されたことを除いては、製造者の使用説明書に一致させて標識された。保温は、3時間進行するよう許容された。断片Zの非常に小さいサイズのため、標識されたポリペプチドの分離は、透析膜 (Pierce # 69558) を用いてなされた。

蛍光体標識されたプロテインG：裸のプロテインGは組み換え産生され、かつ???から得られた。標識は、製造者の使用説明書に一致させてAlexa蛍光体647モノクローナル抗体標識キット (A-20186、Molecular Probe) により遂行された。

## 【0102】

洗浄液体：捕捉段階に付随する洗浄および検出段階は、1xPBS 0.01% Tween (登録商標) を用いて遂行された。

30

## 【0103】

## 希釈：

捕捉試薬 (R1) は0.01% BSAを含む1xPBS中で希釈され、

検出試薬は1xPBS 0.01% Tween (登録商標) 中で希釈され、

分析物 (IgX、Ig分析物) は1xPBS 0.01% Tween (登録商標) 中で希釈された。

## 【0104】

## アッセイ手法

活性化段階1：捕捉物 (R1) は、マイクロチャンパー中 (114a~h) のカラム (104a~h) 上に共通の入口 (105aまたはb) へビオチン化された試薬 (R1) を導入し、続いて、計量マイクロキャピティ (106a~h) 中の液体を、マイクロチャンパー (114a~h) へ、かつ固相 (104a~h) を通して通過させ、それにより捕捉物 (R1) を各カラムへ導入するように装置を回転させることにより固定化された。

40

## 【0105】

段階1：Ig分析物の捕捉。Ig保管溶液の希釈された試料が、個々の入口 (107a~h) の各々へ導入され、それにより計量マイクロキャピティ (各々113a~h) が充満される。続いて装置が回転され、それにより各々の充満された計量マイクロキャピティ中の液体を、下流のマイクロキャピティ (114a~h) へ、および分析物が捕捉される対応するカラム (104a~h) を通して通過させた。

50

## 【0106】

段階2：検出反応物R2。蛍光体標識されたR2は、共通のカラム入口（105aまたはb）を介して導入された。活性化段階および段階1のように、続いて装置が回転され、それにより各々の充填された計量マイクロキャピティ（106a～h）中の液体を、下流のマイクロキャピティ（114a～h）へ、およびR1が捕捉される対応するカラム（104a～h）を通して通過させた。カラムからの蛍光は、固相へR2の導入の前および後で異なるPMT設定を用いて測定された。

## 【0107】

別々の洗浄段階が、R1、R2および分析物の各々の添加の前、間、および後に含まれた。洗浄液体は共通の入口（105aまたはb）を介して導入された。次のパラグラフで供与される回転プロトコールを比較。

## 【0108】

## 回転プロトコール

最初の針洗浄 共通： 粒子 洗浄1、粒子 洗浄回転1、粒子 洗浄2 構造、粒子 洗浄2 共通、粒子 洗浄回転2

捕捉試薬添加 共通入口： 捕捉試薬 回転、捕捉試薬 洗浄1、捕捉試薬 洗浄回転1、捕捉試薬 洗浄2、捕捉試薬 洗浄回転2

分析物添加 個々の入口： 分析物 回転、分析物 洗浄1、分析物 洗浄回転1、分析物 洗浄2、分析物 洗浄回転2

CDアラインメント1： 検出 バックグラウンドPMT 1、検出 バックグラウンドPMT 2および検出 バックグラウンドPMT 3、回転

検出試薬添加 共通入口： 検出試薬 回転、検出試薬 洗浄1、検出試薬 洗浄回転1、検出試薬 洗浄2、検出試薬 洗浄回転2、検出試薬 洗浄3、検出試薬 洗浄回転3、検出試薬 洗浄4、検出試薬 洗浄回転4

CDアラインメント2： 検出PMT 1、検出PMT 2、検出PMT 3

共通の入口を介する洗浄液体。

## 【0109】

本発明のある発明局面は、添付の特許請求の範囲においてより詳細に定義される。本発明およびその利点は詳細に記載されているが、様々な変更、置換および代替が、添付の特許請求の範囲により定義される、発明の精神および範囲から逸脱することなくここに作成されうる。さらに本出願の範囲は、本明細書に記載される加工、機械、製造、物質組成、手段、方法および段階の特定の態様に限定されることを意図しない。当業者は本発明の開示から、工程、機械、製造、物質組成、手段、方法、または段階を容易に理解するであろうと考えられるため、実質的に同一の機能、または本明細書において記載される態様に対応するのと同様の結果を実質的に達成する、現存または後発の手法が、本発明に従い利用されてもよい。従って添付の特許請求の範囲は、そのような工程、機会、製造、物質組成、手段、方法、または段階を含むことを意図する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0110】

実験の結果は図2～6に例証される。

【図1】実験部で使用される装置のマイクロチャンネル構造セットを示す。

【図2】実験部の結果を提示する。詳細は実験部を参照。断片Zおよび組み換えプロテインGの異なる組み合わせ。(1) ビオチン化断片Z (R1) および蛍光体標識された断片Z (R2)、(2) ビオチン化プロテインG (R1) および蛍光体標識されたプロテインG (R2)、(3) ビオチン化プロテインG (R1) および蛍光体標識された断片Z (R2)、および(4) ビオチン化断片Z (R1) および蛍光体標識されたプロテインG (R2)。分析物試料は200 nI。実験は、IgG結合構築物の異なる組み合わせにより、動的範囲および検出限界のようなパラメーターの観点について異なるアッセイ成果が示されるであろうことを例証する。

【図3】実験部の結果を提示する。詳細は実験部を参照。(1) ビオチン化断片Z (R1) および蛍光体標識された断片Z (R2)、(2) ビオチン化プロテインG (R1) および蛍光体標

10

20

30

40

50

識されたプロテインG (R2) の比較。分析物試料は200 nl。

【図4】実験部の結果を提示する。詳細は実験部を参照。ビオチン化断片Z (R1) および蛍光体標識された断片Z (R2)。分析物試料は200 nl。IgGフィルターの使用により最小化されたIgG-蛍光。動的範囲 (少なくとも3桁の規模) に注意。

【図5】実験部の結果を提示する。詳細は実験部を参照。異なる容量の分析試料の間の比較。200 nl (1) および20 nl (2)。ビオチン化断片Z (R1) および蛍光体標識された断片Z (R2)。IgGフィルターなし。

【図6】実験部の結果を提示する。詳細は実験部を参照。R1としてビオチン化断片ZおよびR2として蛍光体標識された断片Zを使用する際の洗浄段階の排除。分析物試料は20 nl。異なるグラフは洗浄段階が排除された実験に対応する：(1) 上記に供与された回転プロトコール、(2) 1回の検出洗浄の排除、(3) 1回の捕捉洗浄の排除、(4) 1回の捕捉洗浄および1回の検出洗浄の排除、(5) 1回の捕捉洗浄および2回の検出洗浄の排除。グラフは、洗浄段階は排除可能で、それにより1つの装置を稼動する時間が短縮されることを示す。104構造を含む1つの装置について、全体の短縮は、53分29秒~39分15秒であった。もし200 nlの個々の計量マイクロキャピティを有する装置で稼動される変種1が変種5 (20 nl) と比較される場合には、短縮は60分7秒~39分15秒であろう。

10

【図7】モノマー対ポリマーのIgGの測定結果を描画する。以下は、Bioaffy 200で表面上のモノマーIgGの測定範囲の観点において、2つの異なるアッセイがどのように反応するかについての2つの図解。測定範囲は2つのアッセイにおいておよそ100~1000倍の係数異なることに注意。

20

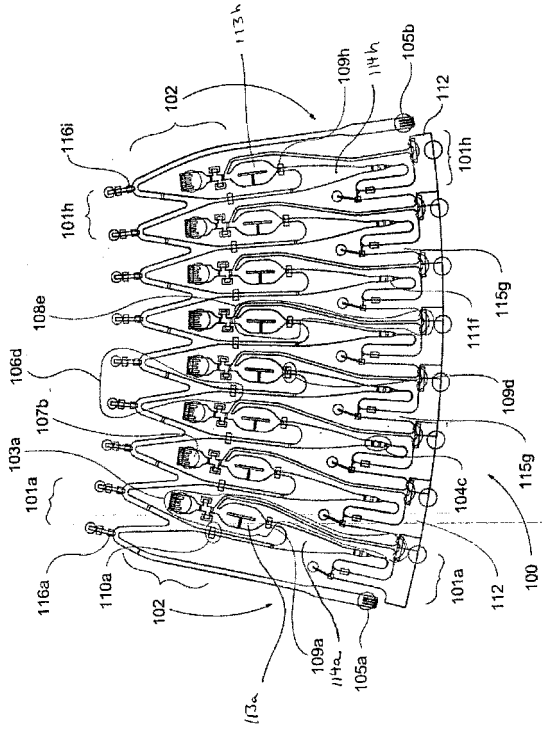
【図8】モノマー対ポリマーのIgGの測定結果を描画する。各々、1.5x30 cm Superdex 200カラム上での天然IgGのゲル濾過 (PBS、pH7.4中で2 mg/mlのIgG1) (上部パネル)、63 で5分間熱凝集されたIgG (中央パネル)、および63 で10分間熱凝集されたIgG (下部パネル)。収集された画分については、IgGの濃度をFz : FzおよびFz : F(ab')<sub>2</sub>アッセイにおいて解析する。

【図9】モノマー対ポリマーIgGの測定結果を描画する。3つの異なる試料 (天然IgG、各々、63 で5分間および10分間事前処置されたIgG) のSuperdex 200のゲル濾過からの画分が各々、Fz : F(ab')<sub>2</sub>およびFz : Fzアッセイにおいて解析された。画分25~35のIgG濃度は、このアッセイにおいて著しく過小評価される。

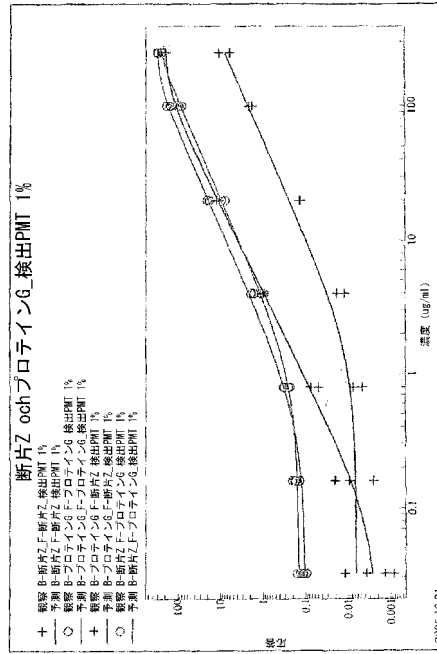
【図10】モノマー対ポリマーのIgGの測定結果を描画する。3つの異なる試料 (天然IgG、各々、63 で5分間および10分間事前処置されたIgG) のSuperdex 200のゲル濾過からの画分が各々、Fz : F(ab')<sub>2</sub>およびFz : Fzアッセイにおいて解析された。

30

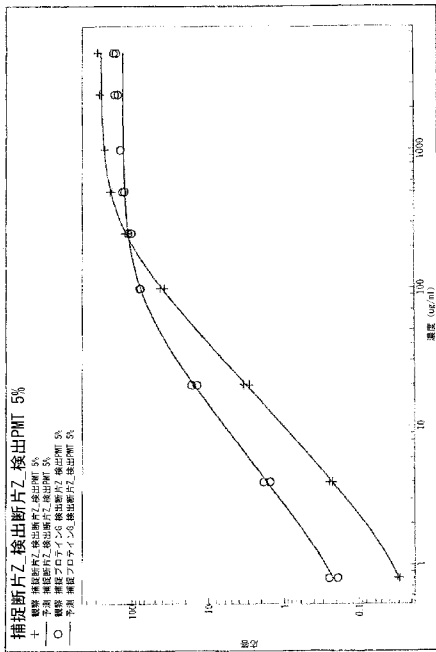
【図1】



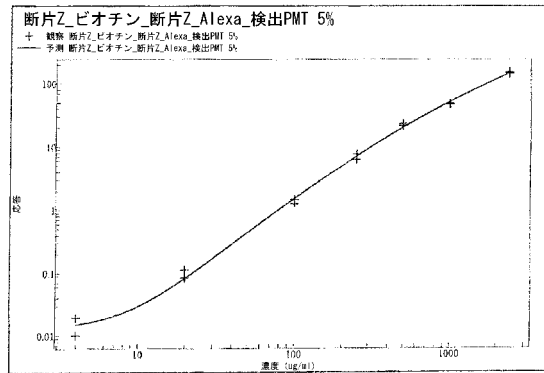
【図2】



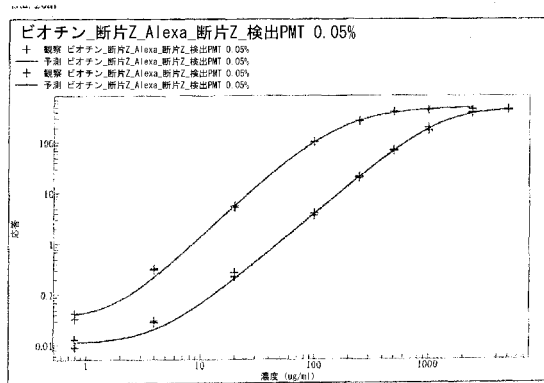
【図3】



【図4】

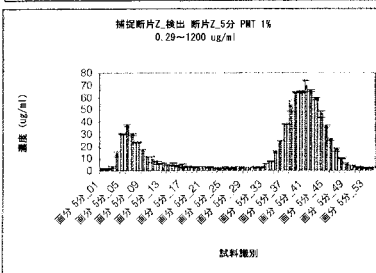
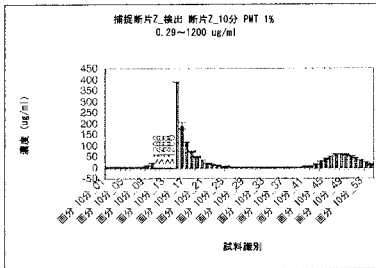
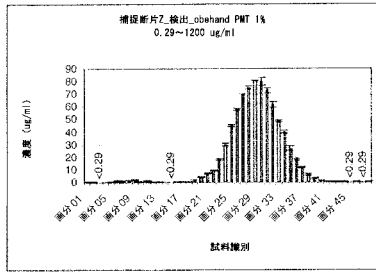


【図5】





【 10 】



---

フロントページの続き

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(72)発明者 インガナス マッツ

スウェーデン王国 ウブサラ ラップランドスレサン 14

(72)発明者 エッカーステン アン

スウェーデン王国 ウブサラ トジャダーバーゲン 25ビー

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特開昭63-255662(JP,A)

特表2005-524087(JP,A)

特開平11-295311(JP,A)

特表2006-524816(JP,A)

特開昭61-254861(JP,A)

特開昭60-237363(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

G01N 37/00