

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-507890

(P2019-507890A)

(43) 公表日 平成31年3月22日 (2019. 3. 22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	4 B O 2 9
GO 1 N 33/545 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 C	4 H O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	
C 1 2 M 1/34 (2006. 01)	GO 1 N 33/545 Z N A	
CO 7 K 16/18 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 S	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-557296 (P2018-557296)
 (86) (22) 出願日 平成29年1月23日 (2017. 1. 23)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年9月19日 (2018. 9. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/014620
 (87) 国際公開番号 WO2017/127833
 (87) 国際公開日 平成29年7月27日 (2017. 7. 27)
 (31) 優先権主張番号 62/286, 297
 (32) 優先日 平成28年1月22日 (2016. 1. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

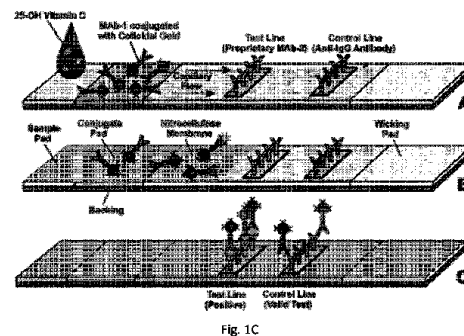
(71) 出願人 518258364
 アフィメディックス, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, マートル アベニュー 510, スイート ナンバー 101
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビタミンD代謝産物の検出のためのデバイス

(57) 【要約】

本発明は、側方流動デバイスを用いて、小さい被検体を含む被検体を迅速に検出する方法、デバイスおよび組成物を提供する。サンドイッチベースのイムノアッセイを用いることによって、全血、血清または血漿サンプル中のビタミンDを検出および定量できるそのような側方流動デバイスが、本明細書中に記載される。1種またはそれを超えるビタミンD分子を検出および計測するための代替のデバイス、方法およびキットが、大いに必要とされている。本発明は、このニーズに応え、さらなる利点を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を検出するための検査デバイスであって、

(a)

(i) 生物学的サンプルを吸収し、前記生物学的サンプルをコンジュゲートパッドに運搬するように構成された、サンプル適用パッド；

(i i) 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子に特異的に結合するビタミン D 結合剤を含む前記コンジュゲートパッド；および

(i i i) 前記ビタミン D 結合剤を前記 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子と複合体化することによって生成されるエピトープに特異的に結合する検出抗体が固定化された第 1 の領域を含む検出ゾーン

を含むハウジングを備える、検査デバイス。

【請求項 2】

前記 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子が、25 - ヒドロキシビタミン D₂、25 - ヒドロキシビタミン D₃、25 - ヒドロキシビタミン D₄、25 - ヒドロキシビタミン D₅ および 1, 25 - ヒドロキシビタミン D₃ からなる群より選択される、請求項 1 に記載の検査デバイス。

【請求項 3】

前記 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子が、25 - ヒドロキシビタミン D₂ および 25 - ヒドロキシビタミン D₃ からなる群より選択される、請求項 2 に記載の検査デバイス。

【請求項 4】

前記 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子が、25 - ヒドロキシビタミン D₂ および 25 - ヒドロキシビタミン D₃ である、請求項 2 に記載の検査デバイス。

【請求項 5】

前記 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子が、25 - ヒドロキシビタミン D₂ からなる、請求項 2 に記載の検査デバイス。

【請求項 6】

前記 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子が、25 - ヒドロキシビタミン D₃ からなる、請求項 2 に記載の検査デバイス。

【請求項 7】

前記検出ゾーンが、前記ビタミン D 結合剤が前記 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子に結合されているか否かを問わず前記ビタミン D 結合剤に結合することができる第 3 の抗体が固定化された第 2 の領域をさらに含む、請求項 1 に記載の検査デバイス。

【請求項 8】

前記ビタミン D 結合剤が、検出試薬にコンジュゲートされている、請求項 1 に記載の検査デバイス。

【請求項 9】

前記検出試薬が、金粒子、ラテックス粒子、炭素ナノ粒子、セレンナノ粒子、銀ナノ粒子、量子ドット、蛍光化合物、色素、酵素およびリポソームからなる群より選択される、請求項 8 に記載の検査デバイス。

【請求項 10】

前記検出試薬が、前記金粒子である、請求項 9 に記載の検査デバイス。

【請求項 11】

前記検出試薬が、前記ラテックス粒子である、請求項 9 に記載の検査デバイス。

【請求項 12】

前記サンプル適用パッド、前記コンジュゲートパッドおよび前記検出ゾーンが、前記生物学的サンプルが通る流路に沿って上流から下流に並んでいる、請求項 1 に記載の検査デバイス。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

前記生物学的サンプルの粒子性の部分を前記生物学的サンプルの水性の部分と分離するように構成された濾過構成要素を前記サンプル適用パッドと前記コンジュゲートパッドとの間にさらに備える、請求項 1 に記載の検査デバイス。

【請求項 1 4】

前記検出抗体が、軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖が、配列番号 1 ~ 5 および 1 6 ~ 2 0 からなる群より選択される配列を含み；前記重鎖が、配列番号 6 ~ 1 5 からなる群より選択される配列を含む、前述の請求項のいずれかに記載の検査デバイス。

【請求項 1 5】

前記検出抗体が、前記ビタミン D 結合剤よりも前記エピトープに対して高い結合親和性を示す、前述の請求項のいずれかに記載の検査デバイス。

10

【請求項 1 6】

前記検出抗体が、s c F v、V H、F a b または (F a b) 2 結合単位を含む、前述の請求項のいずれかに記載の検査デバイス。

【請求項 1 7】

前記検出抗体が、軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖が、配列番号 1 ~ 5 および 1 6 ~ 2 0 からなる群より選択される配列に対して少なくとも 8 0 % の配列相同性を共有する配列を含み、前記重鎖が、配列番号 6 ~ 1 5 からなる群より選択される配列に対して少なくとも 8 0 % の配列相同性を有する配列を含む、前述の請求項のいずれかに記載の検査デバイス。

【請求項 1 8】

(a) 前述の請求項のいずれか 1 項に記載の前記検査デバイスの前記サンプル適用パッドに生物学的サンプルを適用する工程；

20

(b) 前記サンプル適用パッドに追跡緩衝液を適用する工程；および

(c) 前記 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を検出する工程

を含む、方法。

【請求項 1 9】

前記サンプル中の前記 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を定量する工程をさらに含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記定量する工程が、前記血液サンプルを、十分レベル、不足レベルまたは欠乏レベルの前記 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を有すると分類する、サンプル 1 9 に記載の方法。

30

【請求項 2 1】

前記十分レベルが、少なくとも 3 0 n g / m L である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記不足レベルが、少なくとも 1 0 n g / m L かつ 3 0 n g / m L 未満である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記欠乏レベルが、1 0 n g / m L 未満である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記定量する工程が、前記検出膜のイメージを提供するイメージングデバイス、および前記検出膜の前記イメージに基づいて前記サンプル中の前記 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を定量するように構成されたプログラムされたコンピュータ上のソフトウェアを使用する工程をさらに含む、請求項 1 8 に記載の方法。

40

【請求項 2 5】

前記イメージングデバイスおよび前記プログラムされたコンピュータが、単一のデバイスである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記追跡緩衝液が、ビタミン D 結合タンパク質から前記 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を解離する試薬を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

50

【請求項 27】

前記生物学的サンプルが、全血、血清、血漿、尿、唾液、眼内液、髄液および汗からなる群より選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 28】

結合アッセイを行うように構成された検査デバイスを用いて、生物学的サンプル中の 1 つまたはそれを超えるビタミン D レベルを検出するための方法であって、

(a) 前記生物学的サンプルを前記検査デバイスに接触させる工程；

(b) 前記生物学的サンプルを、(1) ビタミン D 結合剤と(2) 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子とによって形成された複合体を含む反応混合物を利用する前記結合アッセイに供する工程；

(c) 前記ビタミン D 結合剤を前記 1 種またはそれを超えるビタミン D 結合分子と複合体化することによって形成されるエピトープに結合する検出剤に前記複合体をさらに曝露する工程

を含み、前記結合アッセイは、前記生物学的サンプルにおいて、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析の検出感度に匹敵する検出感度を有する、方法。

【請求項 29】

前記検出剤が、軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖が、配列番号 1 ~ 5 および 16 ~ 20 からなる群より選択される配列を含み、前記重鎖が、配列番号 6 ~ 15 からなる群より選択される配列を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記検出剤が、前記ビタミン D 結合剤よりも前記複合体に対して高い結合親和性を示す、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記検出剤が、s c F v、V H、F a bまたは(F a b) 2 結合単位を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 32】

前記検出剤が、軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖が、配列番号 1 ~ 5 および 16 ~ 20 からなる群より選択される配列に対して少なくとも 80 % の配列相同性を共有する配列を含み、前記重鎖が、配列番号 6 ~ 15 からなる群より選択される配列に対して少なくとも 80 % の配列相同性を有する配列を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 33】

前記生物学的サンプルが、全血、血清、血漿、尿、唾液、眼内液、髄液および汗からなる群より選択される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 34】

(a) 請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の前記検査デバイス、および

(b) 前記キットを使用するための書面の指示書

を含む、キット。

【請求項 35】

滅菌剤；皮膚を穿刺するデバイス；ガーゼ；追跡緩衝液；およびマイクロピペットからなる群より選択される 1 つまたはそれを超える構成要素をさらに含む、請求項 34 に記載のキット。

【請求項 36】

前記滅菌剤が、アルコールワイブである、請求項 34 に記載のキット。

【請求項 37】

前記皮膚を穿刺するデバイスが、ランセット、針およびシリンジからなる群より選択される、請求項 34 に記載のキット。

【請求項 38】

前記追跡緩衝液が、血液サンプル中のビタミン D 結合タンパク質から 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を解離するように構成された、請求項 34 に記載のキット。

【請求項 39】

10

20

30

40

50

シグナル強度を前記サンプル中の前記 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子の量に関係づけるカラーチャートをさらに含む、請求項 3 4 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2016 年 1 月 22 日に出版された米国仮出願番号第 62 / 286 , 297 号 (代理人書類番号 49821 - 701 , 101) の利益を主張しており、この仮出願は、その全体が参考として援用される。

【背景技術】

10

【0002】

発明の背景

ビタミン D は、カルシウムの腸管吸収の増大およびそのホメオスタシスの制御に関与するステロイドホルモン群のことをいう。ビタミン D の一般的な 2 つの形態は、ビタミン D₂ およびビタミン D₃ である。ビタミン D₃ は、紫外線への曝露を通じてヒトの皮膚において天然に産生されるのに対して、ビタミン D₂ は、主に食物および栄養補助食品から得られる。ビタミン D₂ およびビタミン D₃ は、生物学的に不活性である；活性化には、ビタミン D₂ およびビタミン D₃ が肝臓に運搬される必要があり、肝臓においてヒドロキシル化によって、本明細書中で 25 - ヒドロキシビタミン D (「25 - (OH) D」) と称される活性型に代謝され得る。ビタミン D 結合タンパク質 DBP は、すべてのビタミン D 代謝産物に対する主要な血清運搬タンパク質である。DBP は、全 25 - OH D の 95 ~ 99 % を運搬し、1 ~ 5 % だけが、アルブミンおよびリポタンパク質によって運ばれる。ビタミン D 欠乏は、骨粗鬆症、骨減少症、くる病、がん、自己免疫疾患、循環器疾患および感染症をはじめとした多くの疾患に関連付けられており、高い死亡リスクにも関連している。

20

【0003】

残念なことに、ビタミン D 欠乏は、世界的な健康衛生上の重大な懸念であり、世界的に蔓延している。全世界の推定 10 億人が、十分なビタミン D レベルを有していない。さらに、米国人の 64 % が十分なビタミン D を有しておらず、最適以下のビタミン D レベルを有していると推定されている。ビタミン D 欠乏の主な原因は、ほとんどのヒトにとって主要なビタミン D 源である適度な日光曝露を欠いていることである。

30

【0004】

25 - (OH) D の血液検査を用いることによって、被験体の循環ビタミン D 濃度を測定することができる。25 - OH (D₂) および 25 - OH (D₃) を含む 25 - (OH) D の血中濃度は、ビタミン D の状態の最良の指標であると考えられている。過去 10 年間で、患者集団における 25 - (OH) D レベルの解析の需要が世界的に高まりを見せている。

【0005】

ビタミン D は、高度に親油性の性質であり、ビタミン D 結合タンパク質 DBP に高親和性で結合するので、正確に計測するのが難しい被検体である。現在の計測は、主として、専門の研究室において時間のかかる方法 (例えば、液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析 (LC - MS / MS) アッセイ、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素結合競合免疫吸着アッセイ (ELISA) および競合タンパク質結合アッセイ (CPBA)) を用いて行われている。

40

【0006】

ビタミン D 代謝産物を検出および定量する方法を改善する必要性がある。簡易化された迅速かつ正確なアッセイによってビタミン D 代謝産物を検出および定量する方法、組成物およびデバイスが、本明細書中に提供される。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

50

【 0 0 0 7 】

発明の要旨

1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を検出および計測するための代替のデバイス、方法およびキットが、大いに必要とされている。本発明は、このニーズに応え、さらなる利点を提供する。1 つの態様において、本発明は、1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を検出するための検査デバイスであって、(a) (i) 生物学的サンプルを吸収し、生物学的サンプルをコンジュゲートパッドに運搬するように構成された、サンプル適用パッド；(i i) 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子に特異的に結合するビタミン D 結合剤を含むコンジュゲートパッド；および(i i i) ビタミン D 結合剤を 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子と複合体化することによって生成されるエピトープに特異的に結合する検出抗体が固定化された第 1 の領域を含む検出ゾーンを含むハウジングを備える、検査デバイスを提供する。

10

【 0 0 0 8 】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、1 種またはそれを超えるビタミン D 分子は、2 5 - ヒドロキシビタミン D₂、2 5 - ヒドロキシビタミン D₃、2 5 - ヒドロキシビタミン D₄、2 5 - ヒドロキシビタミン D₅ および 1, 2 5 - ヒドロキシビタミン D₃ からなる群より選択される。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、1 種またはそれを超えるビタミン D 分子は、2 5 - ヒドロキシビタミン D₂ および 2 5 - ヒドロキシビタミン D₃ からなる群より選択される。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、1 種またはそれを超えるビタミン D 分子は、2 5 - ヒドロキシビタミン D₂ および 2 5 - ヒドロキシビタミン D₃ である。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、1 種またはそれを超えるビタミン D 分子は、2 5 - ヒドロキシビタミン D₂ からなる。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、1 種またはそれを超えるビタミン D 分子は、2 5 - ヒドロキシビタミン D₃ からなる。

20

【 0 0 0 9 】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、検出ゾーンは、ビタミン D 結合剤が 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子に結合されているか否かを問わずビタミン D 結合剤に結合することができる第 3 の抗体が固定化された第 2 の領域をさらに含む。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、ビタミン D 結合剤は、検出試薬にコンジュゲートされている。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、検出試薬は、金粒子、ラテックス粒子、炭素ナノ粒子、セレンナノ粒子、銀ナノ粒子、量子ドット、蛍光化合物、色素、酵素およびリポソームからなる群より選択される。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、検出試薬は、金粒子である。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、検出試薬は、ラテックス粒子である。

30

【 0 0 1 0 】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、サンプル適用パッド、コンジュゲートパッドおよび検出ゾーンは、生物学的サンプルが通る流路に沿って上流から下流に並んでいる。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、検査デバイスは、生物学的サンプルの粒子性の部分を生物学的サンプルの水性の部分と分離するように構成された濾過構成要素をサンプル適用パッドとコンジュゲートパッドとの間にさらに備える。

40

【 0 0 1 1 】

1 つの態様において、本発明は、本明細書に開示の検査デバイスの任意の 1 つのサンプル適用パッドに生物学的サンプルを適用する工程；サンプル適用パッドに追跡緩衝液を適用する工程；および 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を検出する工程を含む、方法を提供する。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、方法は、サンプル中の 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を定量する工程をさらに含む。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、定量する工程は、血液サンプルを、十分レベル、不足レベルまたは欠乏レベルの 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を有すると分類する。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、十分レベルは、少なくとも 3 0 n g / m L である。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、不足レベルは、少な

50

くとも10 ng/mLかつ30 ng/mL未満である。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、欠乏レベルは、10 ng/mL未満である。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、定量する工程は、検出膜のイメージを提供するイメージングデバイス、および検出膜のイメージに基づいてサンプル中の1種またはそれを超えるビタミンD分子を定量するように構成されたプログラムされたコンピュータ上のソフトウェアを使用する工程をさらに含む。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、イメージングデバイスおよびプログラムされたコンピュータは、単一のデバイスである。

【0012】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、追跡緩衝液は、ビタミンD結合タンパク質から1種またはそれを超えるビタミンD分子を解離する試薬を含む。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、生物学的サンプルは、全血、血清、血漿、尿、唾液、眼内液、髄液および汗からなる群より選択される。

10

【0013】

いくつかの実施形態において、検出抗体は、軽鎖および重鎖を含み、軽鎖は、配列番号1～5および16～20からなる群より選択される配列を含み；重鎖は、配列番号5～15からなる群より選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、検出抗体は、ビタミンD結合剤よりも免疫複合体に対して高い結合親和性を示す。いくつかの実施形態において、検出抗体は、scFv、VH、Fabまたは(Fab)₂結合単位を含む。

【0014】

いくつかの実施形態において、検出抗体は、軽鎖および重鎖を含み、軽鎖は、配列番号1～5および16～20からなる群より選択される配列に対して少なくとも80%の配列相同性を共有する配列を含み、重鎖は、配列番号6～15からなる群より選択される配列に対して少なくとも80%の配列相同性を有する配列を含む。

20

【0015】

なお別の態様において、本発明は、結合アッセイを行うように構成された検査デバイスを用いて、生物学的サンプル中の1つまたはそれを超えるビタミンDレベルを検出するための方法であって、(a)生物学的サンプルを検査デバイスに接触させる工程；(b)生物学的サンプルを、(1)ビタミンD結合剤と(2)1種またはそれを超えるビタミンD分子とによって形成された複合体を含む反応混合物を利用する結合アッセイに供する工程；(c)ビタミンD結合剤を1種またはそれを超えるビタミンD結合分子と複合体化することによって形成されるエピトープに結合する検出剤に複合体をさらに曝露する工程を含み、結合アッセイは、生物学的サンプルにおいて、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析の検出感度に匹敵する検出感度を有する、方法を提供する。いくつかの実施形態において、生物学的サンプルは、全血、血清、血漿、尿、唾液、眼内液、髄液および汗からなる群より選択される。

30

【0016】

いくつかの実施形態において、検出剤は、軽鎖および重鎖を含み、軽鎖は、配列番号1～5および16～20からなる群より選択される配列を含み、重鎖は、配列番号6～15からなる群より選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、検出剤は、ビタミンD結合剤よりも複合体に対して高い結合親和性を示す。いくつかの実施形態において、検出剤が、scFv、VH、Fabまたは(Fab)₂結合単位を含む。

40

【0017】

いくつかの実施形態において、検出剤は、軽鎖および重鎖を含み、軽鎖は、配列番号1～5および16～20からなる群より選択される配列に対して少なくとも80%の配列相同性を共有する配列を含み、重鎖は、配列番号6～15からなる群より選択される配列に対して少なくとも80%の配列相同性を有する配列を含む。

【0018】

いくつかの実施形態において、生物学的サンプルは、全血、血清、血漿、尿、唾液、眼内液、髄液および汗からなる群より選択される。

【0019】

50

1つの態様において、本発明は、本明細書に開示される検査デバイスの任意の1つ、およびキットを使用するための書面の指示書を含む、キットを提供する。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、キットは、滅菌剤；皮膚を穿刺するデバイス；ガーゼ；追跡緩衝液；およびマイクロピペットからなる群より選択される1つまたはそれを超える構成要素をさらに含む。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、滅菌剤は、アルコールワイブである。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、皮膚を穿刺するデバイスは、ランセット、針およびシリンジからなる群より選択される。

【0020】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、追跡緩衝液は、血液サンプル中のビタミンD結合タンパク質から1種またはそれを超えるビタミンD分子を解離するように構成されている。本明細書で提供されるいくつかの実施形態において、キットは、シグナル強度をサンプル中の1種またはそれを超えるビタミンD分子の量に関係づけるカラーチャートを含む。

10

参照による援用

【0021】

本明細書において言及されるすべての刊行物、特許および特許出願は、各個別の刊行物、特許または特許出願が明確かつ個別に参照により援用されると示されたかのように同程度に参照により本明細書中に援用される。

【図面の簡単な説明】

【0022】

20

本発明の新規の特徴は、添付の請求項に詳細に示される。本発明の特徴および利点のより良い理解は、本発明の原理を利用した例証的な実施形態を示している以下の詳細な説明および添付の図面を参照することにより得られる。

【0023】

【図1A B】図1A～Bは、ビタミンD代謝産物レベルを検出するための例示的な側方流動デバイスを提供している。図1Aは、被験体におけるビタミンD代謝産物のレベルに関するバンド密度を示している。図1Bは、バンド密度を血液サンプル中のビタミン代謝産物の濃度の定量的範囲に関連づけるカラーチャートを示している。図1Cは、ビタミンDを検出するための例示的な側方流動デバイスの概略図を提供している。

30

【図1C】図1A～Bは、ビタミンD代謝産物レベルを検出するための例示的な側方流動デバイスを提供している。図1Aは、被験体におけるビタミンD代謝産物のレベルに関するバンド密度を示している。図1Bは、バンド密度を血液サンプル中のビタミン代謝産物の濃度の定量的範囲に関連づけるカラーチャートを示している。図1Cは、ビタミンDを検出するための例示的な側方流動デバイスの概略図を提供している。

【0024】

【図2】図2は、25-(OH)D₃:AF10抗体の免疫複合体へのマウス抗体クローンの結合を試験した酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)の結果を図示している。

【0025】

【図3】図3は、25-(OH)D₃:AF10抗体の免疫複合体への合成抗体クローンの結合を試験したELISAの結果を図示している。

40

【0026】

【図4】図4は、血清中のビタミンDレベルと、25-(OH)D:AF10抗体の免疫複合体に特異的に結合する抗体を用いるサンドイッチELISAのシグナルとの線形関係を図示している。

【0027】

【図5】図5は、例示的な側方流動デバイスを使用して被験体の血液中および血清中の25-(OH)Dレベルを試験した結果を示しており、シグナル強度と10ng/ml～80ng/mlの範囲の25-(OH)Dレベルとの線形相関を示している。

【0028】

【図6】図6は、(i)スマートフォンベースのリーダーによって計測される毛細管血の

50

ビタミンDレベルを計測する例示的な側方流動デバイス、および(i i) ELISAベースの血清検査およびまたは血液検査を用いて計測されたときのビタミンDレベルの比較結果を図示している。

【0029】

【図7】図7は、本明細書中に開示される検査デバイスの検出ゾーンのイメージを解析するために使用され得る例示的なコンピュータシステムを示している。

【0030】

【図8】図8は、ポータブル側方流動アッセイリーダーを用いた例示的なビタミンD計測手順を示している。

【0031】

【図9】図9は、側方流動アッセイおよび液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析アッセイから生成された試験結果の相関関係を示している。

【発明を実施するための形態】

【0032】

発明の詳細な説明

本明細書中に記載されるような本開示のシステムおよび方法は、別段示されない限り、当業者の技術の範囲内である、分子生物学(組換え手法を含む)、細胞生物学、生化学、マイクロアレイおよび配列決定技術の従来手法および説明を使用し得る。そのような従来の手法としては、オリゴヌクレオチドのポリマーアレイ合成、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションおよびライゲーション、オリゴヌクレオチドの配列決定、ならびに標識を用いたハイブリダイゼーションの検出が挙げられる。好適な手法の具体的な説明は、本明細書中の実施例を参照することにより、得ることができる。しかしながら、等価な従来の手順も当然のことながら使用できる。そのような従来の技術および説明は、Greenら編、Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV) (1999); Weinerら編、Genetic Variation: A Laboratory Manual (2007); Dieffenbach, Dveksler編、PCR Primer: A Laboratory Manual (2003); BowtellおよびSambrook, DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual (2003); Mount, Bioinformatics: SequenceおよびGenome Analysis (2004); SambrookおよびRussell, Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2006)などの標準的な研究所マニュアル; およびSambrookおよびRussell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2002) (全てCold Spring Harbor Laboratory Pressから); Stryer, L., Biochemistry (第4版) W.H. Freeman, N.Y. (1995); Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" IRL Press, London (1984); NelsonおよびCox, Lehninger, Principles of Biochemistry、第3版、W.H. Freeman Pub., New York (2000); およびBergら、Biochemistry、第5版、W.H. Freeman Pub., New York (2002)に見出すことができ、これらの全ては、その全体が全ての目的のために本明細書に参考として援用される。

【0033】

本開示は、記載される特定のシステムおよび方法、組成物、標的および使用法に限定されず、したがって当然のことながら変化し得ることが理解されるべきである。本明細書中で使用される用語は、単に特定の態様を説明する目的であって、本開示の範囲を限定すると意図されておらず、本開示の範囲は、添付の請求項によってのみ限定されることも理解

10

20

30

40

50

されるべきである。

【0034】

用語「約」または「およそ」は、当業者が決定した特定の値についての許容され得る誤差範囲内を意味し、それは、その値がどのようにして計測または決定されたか、すなわち、測定システムの限界に部分的に依存する。例えば、「約」は、当該分野における慣行に従って、1以内または1を超える標準偏差を意味し得る。あるいは、「約」は、所与の値の20%まで、10%まで、5%までまたは1%までの範囲を意味し得る。あるいは、特に生体系または生物学的プロセスに関して、この用語は、ある値の1桁以内、好ましくは、5倍以内、より好ましくは、2倍以内を意味し得る。特定の値が本願および請求項に記載される場合、別段述べられない限り、その特定の値についての許容され得る誤差範囲内を意味する用語「約」が想定されるべきである。

10

【0035】

用語「ポリヌクレオチド」、「核酸」および「オリゴヌクレオチド」は、交換可能に使用される。本明細書で使用される場合、それらは、任意の長さのヌクレオチド（デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれか、またはそれらのアナログ）の重合体型をいう。ポリヌクレオチドは、任意の3次元構造を有し得、既知または未知の任意の機能を果たし得る。ポリヌクレオチドの非限定的な例は、遺伝子または遺伝子フラグメントのコード領域または非コード領域、遺伝子間DNA、連鎖解析から導かれる遺伝子座、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、転移RNA、リボソームRNA、低分子干渉RNA（siRNA）、短ヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、核小体低分子RNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、アダプターおよびプライマー。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド（例えば、メチル化されたヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログ）を含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーの組み立ての前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、重合後に、標識成分とのコンジュゲーションなどによって、さらに修飾され得る。

20

【0036】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいうために本明細書中で交換可能に使用される。そのポリマーは、直鎖状であっても分枝状であってもよく、これは修飾されたアミノ酸を含んでもよく、これは非アミノ酸によって中断されてもよい。これらの用語は、修飾されたアミノ酸ポリマーも包含する；例えば、ジスルフィド結合の形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または他の任意の操作（例えば、標識成分とのコンジュゲーション）。本明細書中で使用されるとき、用語「アミノ酸」には、天然および/もしくは非天然のアミノ酸または合成アミノ酸（グリシンおよびDまたはL光学異性体の両方、ならびにアミノ酸アナログおよびペプチド模倣物を含む）が含まれる。

30

【0037】

「コントロール」は、実験において比較目的で使用される代替の被験体またはサンプルである。

40

【0038】

用語「被験体」、「個体」および「患者」は、脊椎動物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、ヒトのことをいうために本明細書中で交換可能に使用される。哺乳動物としては、ネズミ、サル、ヒト、農場動物、競技用動物およびペットが挙げられるが、これらに限定されない。インビボにおいて得られたまたはインビトロにおいて培養された生物学的実体の組織、細胞およびそれらの子孫も包含される。

【0039】

用語「決定すること（determining）」、「測定すること（measuring）」、「評価すること（evaluating）」、「評価すること（assess

50

ing)」、「アッセイすること」、「検出すること」および「解析すること」は、任意の形態の測定をいうために本明細書中で交換可能に使用され得、これらの用語には、エレメントが存在するか否かを決定すること（例えば、検出）が含まれる。これらの用語には、定量的および/または定性的な決定の両方が含まれ得る。評価することは、相対的または絶対的であり得る。「～の存在を検出すること」には、存在するものの量を決定すること、ならびに存在するか存在しないかを決定することが含まれ得る。

【0040】

「抗体」は、特異的に結合する領域を表面上または空洞内に有する、免疫グロブリン、またはその誘導体もしくはフラグメントもしくは活性なフラグメントであり、それにより、別の分子の特定の空間的構成および極性構成と相補的であると定義される。抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得、当該分野で周知の手法（例えば、宿主の免疫化および血清の収集またはハイブリッド細胞株技術）によって調製され得る。

10

検査デバイス

【0041】

1つの態様において、本開示は、1種またはそれを超えるビタミンD分子を検出するための検査デバイスであって、(a)(i)生物学的サンプルを吸収し、生物学的サンプルをコンジュゲートパッドに運搬するように構成された、サンプル適用ユニット；(ii)1種またはそれを超えるビタミンD分子に特異的に結合する第1の抗体を含むコンジュゲートパッド；および(iii)免疫複合体であって、(a)前記第1の抗体および(b)前記1種またはそれを超えるビタミンD分子を含む免疫複合体、あるいは前記第1の抗体および前記1種またはそれを超えるビタミンD分子を複合体化させることによって生成されるエピトープに特異的に結合する第2の抗体が固定化された第1の領域を含む検出ゾーンを含むハウジングを備える、検査デバイスを提供する。

20

【0042】

「1種またはそれを超えるビタミンD分子」は、カルシウム、鉄、マグネシウム、リン酸塩および亜鉛の腸管吸収の増大に関与する脂溶性のセコステロイド(secosteriods)の群のメンバーをいう。この群の例示的なメンバーは、ビタミンD₁、ビタミンD₂、ビタミンD₃、ビタミンD₄およびそれらのヒドロキシ化されたバージョンである。例示的なヒドロキシ化されたビタミンD分子は、25-ヒドロキシビタミンD₂(25-OHD₂または25-(OH)D₂)および25-ヒドロキシビタミンD₃(25-OHD₃または25-(OH)D₃)である。1種またはそれを超えるビタミンD分子は、1-α位にさらなるヒドロキシ基をビタミンD化合物(例えば、1,25-ヒドロキシビタミンD₃(1,25-OHD₃または1,25-(OH)D₃))を含み得る。

30

【0043】

検査デバイスは、側方流動検査デバイスであり得る。側方流動デバイスは、テストストリップが閉じ込められたハウジングを備え得る。テストストリップは、サンプル適用ユニット、コンジュゲートパッドおよび/または検出ユニットを備え得る。テストストリップは、1種またはそれを超える材料を含み得る。テストストリップが、1種より多い材料を備える場合、その1種またはそれを超える材料は、好ましくは、流体連通している。テストストリップの1つの材料は、テストストリップの別の材料上を覆い得る(例えば、ニトロセルロースの上を覆う濾紙)。あるいはまたはさらに、テストストリップは、1種またはそれを超える材料を含む領域に続いて、1種またはそれを超える異なる材料を含む領域を備え得る。この場合、これらの領域は、流体連通しており、互いに部分的に重なっていてもよいし、重なっていなくてもよい。テストストリップに適した材料としては、セルロース由来の材料(例えば、濾紙、クロマトグラフィー紙、ニトロセルロースおよび酢酸セルロース)ならびにガラス繊維、ナイロン、ポリエチレンテレフタレート、ポリ塩化ビニル、ポリアクリルアミド、架橋デキストラン、アガロース、ポリアクリレート、セラミック材料でできている材料などが挙げられるが、これらに限定されない。テストストリップの材料は、それらの毛細管流動の特徴または適用されたサンプルの特徴を改変するために必要に応じて処理され得る。例えば、テストストリップのサンプル適用領域は、最適な試

40

50

験条件を確保するために、適用された尿サンプルのpHまたは比重を補正する緩衝液で処理され得る。

【0044】

テストストリップ材料は、単一の構造（例えば、ストリップに切断されるシート）であり得るか、あるいはいくつかのストリップ、または例えば薄層クロマトグラフィーに見られるような、支持体もしくは固体表面に結合された粒子性材料であり得、吸収パッドを一体部分としてまたは液体と接触してのいずれかが有し得る。この材料は、レーンの形成を誘導するようにスポットすることができる、レーンを有するシートでもあり得、別個のアッセイを各レーンにおいて行うことができる。この材料は、長方形、円形、楕円形、三角形（triagonal）または他の形状を有し得るが、但し、毛細管移動による検査液の少なくとも1つの横断方向が存在する。楕円形または円形の片においてその中心で検査液と接触したときのように、他の横断方向も存在し得る。しかしながら、考慮すべき主要な事柄は、所定の部位への少なくとも1つの流動方向が存在するということである。以下の考察において、ストリップは、例証として説明されるのであって、限定として説明されるのではない。

【0045】

テストストリップのための支持体は、支持体が望まれるかまたは必要である場合、一般に、水不溶性であり、非多孔性かつ剛性であることが多いが、弾性であってもよく、通常、疎水性で多孔性であり、通常、ストリップと同じ長さおよび幅であるが、それより大きくても小さくてもよい。支持体材料は、透明であり得、本発明の検査デバイスがアセンブルされたとき、透明の支持体材料がテストストリップ上に保護層を形成するように、透明の支持体材料は、ユーザーによって見られ得るテストストリップの側に存在し得、それは、検査デバイスの前面における開口などによって外部環境に露出され得る。天然と合成の両方の多種多様の非可動性および非可動性の材料ならびにそれらの組み合わせが使用され得るが、但し、その支持体は、その材料の毛管現象を干渉しないか、またはアッセイの構成要素に非特異的に結合しないか、またはシグナル生成系を干渉しない。例証的なポリマーとしては、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（4-メチルブテン）、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ（エチレンテレフタレート）、ナイロン、ポリ（ビニルブチレート）、ガラス、セラミックス、金属などが挙げられる。弾性支持体は、ポリウレタン、ネオプレン、ラテックス、シリコーンゴムなどでできている場合がある。

【0046】

検査デバイスは、サンプル適用ユニットに通じるサンプル適用開口部を備え得る。いくつかの場合において、「サンプル適用開口部」は、検査デバイスまたはテストストリップの一部をいうことがあり、その検査デバイスにおける開口は、テストストリップのサンプル適用ユニットへのアクセスを提供する。本発明の1つの実施形態において、サンプル適用開口部は、開放端のチャネルによって検査デバイスの近位端に作製されている。好ましくは、テストストリップは、サンプル適用開口部と接触したサンプルがテストストリップに適用されるように開放端のチャネルに係合している。代替の実施形態では、サンプル適用開口部は、テストストリップのサンプル適用ユニットが検査デバイスの外部と流体連通するように、検査デバイスの前面における開口によって形成されている。

【0047】

「サンプル適用ユニット」は、サンプルが適用され得るテストストリップの一部であり得る。本発明のテストストリップのサンプル適用ゾーンは、好ましくは、本発明の検査デバイスのサンプル適用開口部に存在し、そのサンプル適用開口部と流体連通している。いくつかの場合において、サンプル適用ユニットは、生物学的流体の粒子性の部分を除去して水性成分だけを残すように構成された濾過構成要素を備える。例えば、血液細胞を濾別するための構成要素が、WO 2003 014726およびWO 2009 069017（これらの全体が参照により本明細書に援用される）に記載されている。

【0048】

「コンジュゲートパッド」は、試薬が提供されているテストストリップの領域（試薬ゾ

10

20

30

40

50

ーンと称され得る)をいう。コンジュゲートパッドは、テストストリップ上に含められた吸収性または非吸収性の材料の別個のセグメントであり得るか、または他のゾーン(例えば、被検体検出ゾーン)も含むテストストリップの吸収性または非吸収性の材料の領域であり得る。試薬ゾーンは、直接的または間接的な標識であり得る検出試薬を有し得る。好ましくは、検出試薬は、乾燥した状態では不動であるが湿った状態では可動性である形態で提供される。試薬は、特異的結合メンバー(例えば、抗体)、被検体または被検体アナログ、酵素、基質、指示薬、シグナル生成系の構成要素、テストストリップアッセイの機能に寄与する化学物質または化合物(例えば、緩衝剤、還元剤、キレート剤、界面活性剤など)であり得る。

【0049】

10

いくつかの場合において、標識は、検出可能なシグナルを生成し得る、特異的結合メンバーに結合した任意の分子であり得る。本発明では、標識は、不活性であり得、検出ゾーンにおいて濃縮することによってシグナルを提供し得るか、または単独でシグナル生成系のメンバーに対する結合部位として働き得るか、または検出可能なシグナルを自発的に生成し得るか、またはシグナル生成系とともに、検出可能なシグナルを生成し得る。標識は、金粒子、ラテックス粒子、炭素ナノ粒子、セレンナノ粒子、銀ナノ粒子、量子ドット、蛍光化合物、織物染料、酵素およびリボソームからなる群より選択され得る。標識は、金粒子であり得る。標識は、ラテックス粒子であり得る。

【0050】

「特異的結合メンバー」は、特異的に結合する領域を表面上または空洞内に有する2つの異なる分子のうちの1つであり、それにより、他方の分子の特定の空間的構成および極性構成と相補的であると定義される。特異的結合メンバーは、抗原-抗体などの免疫学的対のメンバーであり得るが、他の特異的結合対(例えば、リガンド-キャリアタンパク質、ビオチン-アビジン、ホルモン-ホルモンレセプター、核酸二重鎖、IgG-プロテインA、DNA-DNA、DNA-RNAなど)は、免疫学的対ではないが、この定義に含まれる。特異的結合メンバーは、結合剤であり得る。

20

【0051】

結合剤は、1つまたはそれを超える分子に相補的に結合する分子であり得る。結合剤は、タンパク質、核酸、リガンド、レセプターなどであり得る。

【0052】

30

結合剤である例示的なタンパク質としては、赤血球凝集素、小分子結合タンパク質、活性もしくは不活性な酵素、または断片化された抗体が挙げられ得る。赤血球凝集素は、抗体またはレクチンを含み得る。抗体は、免疫グロブリン(Ig)の1つまたはそれを超えるクラスであり得る。例えば、抗体は、IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgWまたはそれらの改変されたバージョンであり得る。抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得る。抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体または二重特異性抗体であり得る。抗体は、様々なタイプの結合領域を含み得る。例えば、抗体は、scFv、VH、Fabまたは(Fab)₂結合領域を有し得る。抗体は、様々な修飾を含み得る。例えば、抗体は、1つまたはそれを超える検出試薬によって修飾され得る。抗体は、別の結合剤、オリゴヌクレオチドまたはタンパク質にコン

40

【0053】

結合剤は、様々な組み合わせのタンパク質サブユニットを組み込んでいる融合タンパク質であり得る。そのタンパク質サブユニットの組み合わせは、天然に存在しないことがあるか、または天然に存在し得る。非限定的な例として、融合タンパク質は、抗体の態様(例えば、Fc領域)および1つまたはそれを超えるレセプタードメインを組み込み得る。融合タンパク質は、2つまたはそれを超えるサブユニットを含み得る。例えば、融合タンパク質は、二量体、三量体、四量体または五量体であり得る。

【0054】

本発明の1つの態様において、1つまたはそれを超える結合剤は、1種またはそれを超

50

えるビタミンD分子を検出するために使用され得る。ある実施形態において、ビタミンD結合剤は、1種またはそれを超えるビタミンD分子に特異的に結合する。ビタミンD結合剤は、特異的結合メンバーであり得る。ビタミンD結合剤は、1種またはそれを超えるビタミンD分子に結合することができる特異的結合メンバーであり得る。ビタミンD結合剤は、本明細書中で称される第1の抗体であり得る。

【0055】

検出剤が使用され得、検出剤は、ビタミンD結合剤と1種またはそれを超えるビタミンD分子との複合体に結合し得る。検出剤は、ビタミンD結合剤または第1の抗体と複合体化された1種またはそれを超えるビタミンD分子を検出するために使用され得る。検出剤は、ビタミンD結合剤とビタミンD分子との第1の複合体に特異的に結合する検出抗体であり得る。検出剤は、本明細書中で称される第2の抗体または検出抗体であり得る。

10

【0056】

ビタミンD結合剤が1種またはそれを超えるビタミンD分子に結合しているか否かを問わずビタミンD結合剤に結合することができる第3の結合剤が使用され得る。

【0057】

結合剤は、表1に列挙されるアミノ酸配列（配列番号1～20）のいずれかまたはそれらの組み合わせを含み得る。

【0058】

いくつかの実施形態において、コンジュゲートパッドは、検出試薬を含み、その検出試薬は、1種またはそれを超えるビタミンD分子に特異的に結合する第1の抗体である。ビタミンD抗体は、当該分野で公知である。例示的なビタミンD抗体であるAF10は、実施例1に記載されているように作製された。1種またはそれを超えるビタミンD分子に結合することができる他の抗体は、当該分野で公知であり、例えば、US20130059825（その全体が参照により本明細書に援用される）に記載されている抗体である。

20

【0059】

「検出ゾーン」は、上に記載されたような色素が、位置のシフト、出現、色の变化または必要に応じて消失として観察され得るテストストリップの領域である。検出ゾーンの検出または観察は、検出可能な標識の選択に応じて任意の簡便な手段によって行われ得る。例えば、検出または観察は、視覚的に、蛍光的に、反射率によって、エックス線撮影で、または当業者に公知の他の任意の手段によって、行われ得る。

30

【0060】

検出ゾーンは、(a) 1種またはそれを超えるビタミンD分子に特異的に結合する第1の抗体（例えば、AF10）および(b) 1種またはそれを超えるビタミンD分子を含む免疫複合体に特異的に結合する検出剤または第2の抗体が固定化された第1の領域を含み得る。いくつかの場合において、検出剤または第2の抗体は、ビタミンD結合剤または第1の抗体と1種またはそれを超えるビタミンD分子との複合体が形成されたとき生成されるエピトープに結合する。例えば、第2の抗体は、1種またはそれを超えるビタミンD分子と第1の抗体との間の接合部に結合し得る。いくつかの場合において、ビタミンD結合剤または第1の抗体と1種またはそれを超えるビタミンD分子との結合は、検出剤または第2の抗体によって認識されるエピトープをビタミンD結合剤上または第1の抗体上に形成させ得る。いくつかの場合において、1種またはそれを超えるビタミンD分子が結合した際に形成されるエピトープは、1種またはそれを超えるビタミンD分子の結合部位ではなく、第1の抗体の別の部位におけるエピトープである。いくつかの場合において、第2の抗体は、第1の抗体に結合したとき、1種またはそれを超えるビタミンD分子を認識し得る。検出ゾーンの第1の領域は、被検体の存在を示す検出可能なシグナルを提供し得る。検出ゾーンの第1の領域は、被検体（「特異的結合メンバー」）に特異的な固定化された結合試薬、および/または被検体と反応する酵素を含み得る。被検体の検出を可能にし得るかまたは増大し得る他の物質（例えば、基質、緩衝液、塩）も、検出ゾーンに提供され得る。シグナル生成系の1つまたはそれを超えるメンバーは、検出ゾーンに直接または間接的に結合され得る。検出ゾーンは、必要に応じて、その検査が適切に行われたという

40

50

示唆を提供する 1 つまたはそれを超えるコントロールゾーンを含む第 2 の領域を含み得る。

【0061】

いくつかの場合において、検出ゾーンは、第 2 の領域をさらに含み得る。この領域は、1 種またはそれを超えるビタミン D 分子に結合されているか否かを問わず第 1 の抗体に結合する特異的結合メンバーが固定化されたコントロール領域であり得る。例えば、その特異的結合メンバーは、第 1 の抗体の定常領域に結合し得る第 3 の抗体であり得る。第 3 の抗体は、1 種またはそれを超えるビタミン D 分子が結合されているか否かを問わず変化しない第 1 の抗体上のエピトープに結合し得る。いくつかの場合において、第 2 の領域は、コントロール領域であり得、そこに固定化された特異的結合メンバーは、プロテイン A であり得る。いくつかの場合において、コンジュゲートパッドは、第 1 の抗体とは異なる種に由来するさらなる抗体を含み、そのさらなる抗体は、第 1 の抗体、ビタミン D またはビタミン D 結合タンパク質に結合しない。いくつかの場合において、第 2 の領域は、コントロール領域であり、第 3 の抗体は、さらなる抗体を認識するが、第 1 の抗体または第 2 の抗体を認識しない。例えば、第 1 の抗体および第 2 の抗体が、それぞれマウスおよびラットに由来する場合、さらなる抗体は、ニワトリに由来し得、第 3 の抗体は、ヤギ抗ニワトリ抗体、ラット抗ニワトリ抗体などであり得る。

10

【0062】

第 2 の領域に出現するシグナルは、第 1 の抗体が検出され得ることおよびテストストリップが適切に機能していることを示唆するために使用され得る。第 2 の領域は、検出可能な標識が位置のシフト、出現、色の変化または必要に応じて消失として観察され得るテストストリップの領域であり得る。第 2 の領域の検出または観察は、色素の特定の選択に応じて、任意の簡便な手段によって行われ得、それらの手段としては、特に、例えば、視覚的に、蛍光的に、反射率によって、エックス線撮影で、側方流動リーダーによってなどであるがこれらに限定されない。

20

【0063】

生物学的サンプルは、被検体の存在または量について試験される任意の材料である。好ましくは、生物学的サンプルは、流体サンプル、好ましくは、液体サンプルである。本発明の検査デバイスを用いて試験され得る液体サンプルの例としては、血液、血清、血漿、唾液、尿、眼内液、精液、汗および髄液を含む体液が挙げられる。生物学的サンプルは、血液または血漿であり得る。粘稠性液体、半固体または固体の検体を用いて、サンプルになり得る液体の溶液、溶出液、懸濁液または抽出物が生成され得る。例えば、咽頭または生殖器スワブが、液体溶液に懸濁されて、サンプルが生成され得る。

30

【0064】

例示的な側方流動アッセイは、図 1 C に提供されている。例示的な側方流動アッセイは、前記生物学的サンプルが通る流路に沿って上流から下流に並んでいる、サンプル適用パッド、コンジュゲートパッドおよび前記検出ゾーンを備える。サンプルが、サンプル適用パッドまたはサンプルパッドに適用され得る。サンプルの適用の後、追跡緩衝液が適用され得る。血液サンプルから、ビタミン D (例えば、25-(OH)D) が、1 種またはそれを超えるビタミン D 分子に特異的に結合する第 1 の抗体 (Mab-1) を含むコンジュゲートパッドに流動して、免疫複合体を生成し得る。第 1 の抗体は、コロイド金などの検出試薬にコンジュゲートされている場合がある。免疫複合体化した抗体および複合体化していない抗体が、検出ゾーンに流動し得る。検出ゾーンは、コントロールラインおよび検査ラインを含み得る。検査ラインは、Mab-1 と 1 つまたはそれを超える 25-(OH)D 分子とが複合体化することによって生成されるエピトープに特異的に結合する第 2 の抗体 (Mab-2) を含み得る。免疫複合体化した Mab-1 および複合体化していない Mab-1 は、Mab-1 が 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子に結合されているか否かを問わず Mab-1 に結合することができる第 3 の抗体 (抗 IgG 抗体) を含むコントロールラインに側方流動し得る。複合体化していない Mab-1 抗体および / または免疫複合体化した Mab-1 抗体が、コントロールラインにおいて検出され得る。Mab-

40

50

2 に結合した免疫複合体化した M a b - 1 抗体は、検査ラインにおいて検出され得る。検査ラインにおける検出レベルは、ビタミン D のレベルを示し得る。

方法

【 0 0 6 5 】

1 つの態様において、本開示は、本明細書中に開示される検査デバイスを用いて 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子のレベルを検出することができる方法を提供する。方法は、本明細書に開示の検査デバイスのサンプル適用ユニットに生物学的サンプルを適用する工程；サンプル適用ユニットに追跡緩衝液を適用する工程；および 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子のレベルを検出する工程を含み得る。そのような検出は、検査デバイスの第 2 の領域に出現するシグナルを可視化することによって（例えば、特異的結合剤による検出ゾーンにおける標識された第 1 の抗体の濃縮によって）行われ得る。

10

【 0 0 6 6 】

いくつかの場合において、方法は、サンプル中の 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を定量する工程をさらに含む。定量は、検出ゾーンの第 1 の領域におけるシグナル強度と生物学的サンプル中に存在する被検体の量との関係性を判定することによって行われ得る。シグナル強度と生物学的サンプル中に存在する被検体の量との関係性は、既知量の 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を含む標準の適用によって、各バッチまたは各テストストリップに対して判定されることが認識されるだろう。

【 0 0 6 7 】

いくつかの場合において、定量は、生物学的サンプル中に十分レベル、不足レベルまたは欠乏レベルの 1 種またはそれを超えるビタミン D 分子を有すると被験体を分類することなどによる、半定量的であり得る。十分レベルのビタミン D は、少なくとも 1 0 n g / m L、少なくとも 1 5 n g / m L、少なくとも 2 0 n g / m L、少なくとも 2 5 n g / m L、少なくとも 3 0 n g / m L、少なくとも 3 5 n g / m L、少なくとも 4 0 n g / m L または少なくとも 5 0 n g / m L であり得る。不足レベルのビタミン D は、少なくとも 5 n g / m L かつ最大で 4 5 n g / m L、少なくとも 5 n g / m L かつ最大で 4 0 n g / m L、少なくとも 5 n g / m L かつ最大で 3 5 n g / m L、少なくとも 5 n g / m L かつ最大で 3 0 n g / m L、少なくとも 5 n g / m L かつ最大で 2 5 n g / m L、少なくとも 5 n g / m L かつ最大で 2 0 n g / m L、少なくとも 5 n g / m L かつ最大で 1 5 n g / m L、少なくとも 5 n g / m L かつ最大で 1 0 n g / m L、少なくとも 1 0 n g / m L かつ最大で 4 5 n g / m L、少なくとも 1 0 n g / m L かつ最大で 4 0 n g / m L、少なくとも 1 0 n g / m L かつ最大で 3 5 n g / m L、少なくとも 1 0 n g / m L かつ最大で 3 0 n g / m L、少なくとも 1 0 n g / m L かつ最大で 2 5 n g / m L、少なくとも 1 0 n g / m L かつ最大で 2 0 n g / m L、少なくとも 1 0 n g / m L かつ最大で 1 5 n g / m L、少なくとも 1 5 n g / m L かつ最大で 4 5 n g / m L、少なくとも 1 5 n g / m L かつ最大で 4 0 n g / m L、少なくとも 1 5 n g / m L かつ最大で 3 5 n g / m L、少なくとも 1 5 n g / m L かつ最大で 3 0 n g / m L、少なくとも 1 5 n g / m L かつ最大で 2 5 n g / m L、少なくとも 1 5 n g / m L かつ最大で 2 0 n g / m L、少なくとも 2 0 n g / m L かつ最大で 4 5 n g / m L、少なくとも 2 0 n g / m L かつ最大で 4 0 n g / m L、少なくとも 2 0 n g / m L かつ最大で 3 5 n g / m L、少なくとも 2 0 n g / m L かつ最大で 3 0 n g / m L、少なくとも 2 0 n g / m L かつ最大で 2 5 n g / m L、少なくとも 2 5 n g / m L かつ最大で 4 5 n g / m L、少なくとも 2 5 n g / m L かつ最大で 4 0 n g / m L、少なくとも 2 5 n g / m L かつ最大で 3 5 n g / m L、少なくとも 2 5 n g / m L かつ最大で 3 0 n g / m L、少なくとも 3 0 n g / m L かつ最大で 4 5 n g / m L、少なくとも 3 0 n g / m L かつ最大で 4 0 n g / m L、少なくとも 3 0 n g / m L かつ最大で 3 5 n g / m L、少なくとも 3 5 n g / m L かつ最大で 4 5 n g / m L、少なくとも 3 5 n g / m L かつ最大で 4 0 n g / m L、少なくとも 4 0 n g / m L かつ最大で 4 5 n g / m L であり得る。欠乏レベルのビタミン D は、最大で 1 0 n g / m L、最大で 1 5 n g / m L、最大で 2 0 n g / m L、少なくとも 2 5 n g / m L、最大で 3 0 n g / m L、最大で 3 5 n g / m L、最大で 4 0 n g / m L または最大で 5 0 n g / m L あり得る。例

20

30

40

50

えば、被験体は、 30 ng/mL 超の1種またはそれを超えるビタミンD分子を有し得、十分レベルの1種またはそれを超えるビタミンD分子を有すると分類され得る。例えば、被験体は、 $10\sim 30\text{ ng/mL}$ の1種またはそれを超えるビタミンD分子を有し得、不足レベルの1種またはそれを超えるビタミンD分子を有すると分類され得る。例えば、被験体は、 10 ng/mL 未満の1種またはそれを超えるビタミンD分子を有し得、欠乏レベルの1種またはそれを超えるビタミンD分子を有すると分類され得る。

【0068】

いくつかの場合において、定量する工程は、検出ゾーンのイメージを生成するイメージングデバイス、およびその検出ゾーンのイメージに基づいて生物学的サンプル中の1種またはそれを超えるビタミンD分子を定量するように設定されたプログラムされたコンピュータ上のソフトウェアを使用する工程をさらに含んだ。そのイメージは、シグナル強度について解析され得る。いくつかの場合において、シグナル強度は、変数（例えば、光強度、光質およびイメージングデバイス間の変動）についてイメージを正規化するために、コントロール領域のシグナル強度と比較される。

【0069】

図7は、本開示の方法を実行するようにプログラムされているかまたはその他の方法で設定されているコンピュータシステム701を示している。コンピュータシステム701は、本明細書中に提供される方法を実行するのに不可欠であり得、本明細書中に提供される方法は、コンピュータシステム701の非存在下において別の方法で実行するのは極めて困難であり得る。コンピュータシステム701は、本開示の方法（例えば、検出ゾーンのイメージに基づいて生物学的サンプル中の1種またはそれを超えるビタミンD分子を定量する方法）の様々な態様を制御し得る。コンピュータシステム701は、ユーザーの電子デバイス、またはその電子デバイスに対して遠く離れて位置するコンピュータシステムであり得る。その電子デバイスは、携帯型電子デバイスであり得る。代替として、コンピュータシステム701は、コンピュータサーバーであり得る。

【0070】

コンピュータシステム701は、シングルコアもしくはマルチコアプロセッサまたは並列処理のための複数のプロセッサであり得る中央処理装置（CPU、本明細書中では「プロセッサ」および「コンピュータプロセッサ」でもある）705を備える。コンピュータシステム701は、メモリーまたはメモリーロケーション710（例えば、ランダムアクセスメモリー、読み出し専用メモリー、フラッシュメモリー）、電子記憶装置715（例えば、ハードディスク）、1つまたはそれを超える他のシステムと通信するための通信用インターフェース720（例えば、ネットワークアダプター）、および周辺機器725（例えば、キャッシュ、他のメモリー、データストレージおよび/または電子ディスプレイアダプター）も備える。メモリー710、記憶装置715、インターフェース720および周辺機器725は、マザーボードなどのコミュニケーションバス（実線）を介してCPU705と通信している。記憶装置715は、データを格納するためのデータ記憶装置（またはデータリポジトリ）であり得る。コンピュータシステム701は、通信用インターフェース720を活用してコンピュータネットワーク（「ネットワーク」）730に作動可能に連結され得る。ネットワーク730は、インターネット（Internet）、インターネット（internet）および/もしくはエクストラネット、またはインターネットと通信しているイントラネットおよび/もしくはエクストラネットであり得る。ネットワーク730は、いくつかの場合において、テレコミュニケーションおよび/またはデータネットワークである。ネットワーク730は、クラウドコンピューティングなどの分散コンピューティングを可能にし得る1つまたはそれを超えるコンピュータサーバーを含み得る。ネットワーク730は、いくつかの場合において、コンピュータシステム701を活用して、コンピュータシステム701に連結されたデバイスがクライアントまたはサーバーとして振る舞うことを可能にし得るピアツーピアネットワークを実装し得る。

【0071】

CPU705は、プログラムまたはソフトウェアにおいて具体化され得る、一連の機械可読命令を実行し得る。それらの命令は、メモリー710などのメモリーロケーションに格納され得る。それらの命令は、CPU705に向けられ得、続いて、本開示の方法を実行するようにCPU705をプログラムできるかまたはその他の方法で設定できる。CPU705によって実行されるオペレーションの例としては、フェッチ、デコード、実行および書き戻しが挙げられ得る。

【0072】

CPU705は、集積回路などの回路の一部であり得る。システム701の1つまたはそれを超える他の構成要素は、その回路に含まれ得る。いくつかの場合において、その回路は、アプリケーション向け集積回路(ASIC)である。

10

【0073】

記憶装置715は、ファイル(例えば、ドライバー、ライブラリーおよび保存されたプログラム)を格納し得る。記憶装置715は、ユーザーデータ、例えば、ユーザー選択およびユーザープログラムを格納し得る。コンピュータシステム701は、いくつかの場合において、コンピュータシステム701に対して外付けである(例えば、イントラネットまたはインターネットを介してコンピュータシステム701と通信しているリモートサーバー上に存在する)1つまたはそれを超えるさらなるデータ記憶装置を備え得る。

【0074】

コンピュータシステム701は、ネットワーク730を介して1つまたはそれを超えるリモートコンピュータシステムと通信し得る。例えば、コンピュータシステム701は、ユーザー(例えば、患者、医療提供者またはサービス提供者)のリモートコンピュータシステムと通信し得る。リモートコンピュータシステムの例としては、パーソナルコンピュータ(例えば、ポータブルPC)、スレートPCまたはタブレットPC(例えば、Apple(登録商標) iPad(登録商標)、Samsung(登録商標) Galaxy Tab)、電話、スマートフォン(例えば、Apple(登録商標) iPhone(登録商標)、Android対応デバイス、BlackBerry(登録商標))または携帯情報端末が挙げられる。ユーザーは、ネットワーク730を介してコンピュータシステム701にアクセスできる。

20

【0075】

本明細書中に記載されるような方法は、コンピュータシステム701の電子記憶ロケーション(例えば、メモリー710または電子記憶装置715)に格納された、機械(例えば、コンピュータプロセッサ)が実行可能なコードを経て実行され得る。メモリー710は、データベースの一部であり得る。機械が実行可能なコードまたは機械可読コードは、ソフトウェアの形態で提供され得る。使用において、そのコードは、プロセッサ705によって実行され得る。いくつかの場合において、そのコードは、記憶装置715から検索され得、プロセッサ705によってすぐにアクセスできるようにメモリー710に格納され得る。いくつかの状況において、電子記憶装置715は除外され得、機械が実行可能な命令がメモリー710に格納される。

30

【0076】

上記コードは、そのコードを実行するように適合されたプロセッサを有する機械とともに使用するようにプリコンパイルおよび設定され得るか、または実行時にコンパイルされ得る。そのコードは、そのコードがプリコンパイルされた形式またはコンパイルされたままの形式で実行するのを可能にするように選択され得るプログラミング言語で供給され得る。

40

【0077】

本明細書中に提供されるシステムおよび方法の態様(例えば、コンピュータシステム701)は、プログラミングにおいて具体化され得る。この技術の様々な態様は、代表的には、機械可読媒体の1タイプにおいて保持されるかまたは具体化される、機械(またはプロセッサ)が実行可能なコードおよび/または関連するデータの形態の「製品」または「製造品」として考えられ得る。機械が実行可能なコードは、メモリー(例えば、読み出

50

し専用メモリー、ランダムアクセスメモリー、フラッシュメモリー)またはハードディスクなどの電子記憶装置に格納され得る。「ストレージ」タイプの媒体は、コンピュータの有形のメモリー、プロセッサなど、またはソフトウェアプログラミングのために非一時的なストレージをいつでも提供し得るそれらの関連するモジュール(例えば、様々な半導体メモリー、テープドライブ、ディスクドライブなど)のいずれかまたはすべてを含み得る。そのソフトウェアの全部または一部は、時々、インターネットまたは他の様々なテレコミュニケーションネットワークを介して通信され得る。そのような通信は、例えば、1つのコンピュータまたはプロセッサから別のコンピュータまたはプロセッサに、例えば、管理サーバーまたはホストコンピュータからアプリケーションサーバーのコンピュータプラットフォームに、ソフトウェアのローディングを可能にし得る。したがって、ソフトウェアエレメントを有し得る別のタイプの媒体としては、例えば、有線の光学的な陸線ネットワークを介しておよび様々なエアリンクを通じて、ローカルデバイス間の物理インターフェースを越えて使用される、光波、電波および電磁波が挙げられる。そのような波を運ぶ物理的エレメント(例えば、有線または無線リンク、光リンクなど)も、ソフトウェアを有する媒体として見なされ得る。本明細書中で使用されるとき、コンピュータ「可読媒体」または機械「可読媒体」などの用語は、非一時的な有形の「記憶」媒体に限定されない限り、実行のためにプロセッサに命令を提供する際に関与する任意の媒体をいう。

10

【0078】

したがって、機械可読媒体、例えば、コンピュータで実行可能なコードは、有形の記録媒体、搬送波媒体または物理的な伝送媒体を含むがこれらに限定されない多くの形態を取り得る。不揮発性記憶媒体としては、例えば、光学ディスクまたは磁気ディスク(例えば、任意のコンピュータ(複数可)などにおける任意の記憶デバイス)が挙げられ、例えば、図面に示されるデータベースなどを実行するために使用され得る。揮発性記憶媒体としては、ダイナミックメモリー(例えば、そのようなコンピュータプラットフォームのメインメモリー)が挙げられる。有形の伝送媒体としては、同軸ケーブル;銅線および光ファイバー(コンピュータシステム内のバスを含むワイヤーを含む)が挙げられる。搬送波伝送媒体は、電気信号もしくは電磁信号または音波もしくは光波の形態(例えば、無線周波(RF)および赤外(IR)データ通信において生成されるもの)をとり得る。ゆえに、コンピュータ可読媒体の一般的な形態としては、例えば、フロッピー(登録商標)ディスク、フレキシブルディスク、ハードディスク、磁気テープ、他の任意の磁気媒体、CD-ROM、DVDまたはDVD-ROM、他の任意の光学媒体、パンチカード 紙テープ、穴のパターンを有する他の任意の物理的記録媒体、RAM、ROM、PROMおよびEPROM、FLASH-EPROM、他の任意のメモリーチップまたはカートリッジ、データもしくは命令を搬送する搬送波、そのような搬送波を搬送するケーブルもしくはリンク、またはコンピュータがプログラミングコードおよび/もしくはデータを読むことができる他の任意の媒体が挙げられる。これらの形態のコンピュータ可読媒体の多くが、実行するために、プロセッサへの1つまたはそれより多い順序の1つまたはそれより多い命令を保持することに関わり得る。

20

30

【0079】

コンピュータシステム701は、例えば遺伝情報(例えば、単一個体または個体群における、疾患を引き起こす対立遺伝子の同定)を提供するためのユーザーインターフェース(UI)740を備える電子ディスプレイ735を備え得るかまたはそれと通信し得る。UIの例としては、グラフィカルユーザーインターフェース(GUI)およびウェブベースのユーザーインターフェース(またはウェブインターフェース)が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0080】

追跡緩衝液は、1種またはそれを超えるビタミンD分子を検出するために使用され得る。追跡緩衝液は、ビタミンD結合タンパク質および/またはアルブミンから1種またはそれを超えるビタミンD分子を解離する試薬を含むように構成され得る。1種またはそれを

50

超えるビタミンD分子を解離する試薬の非限定的な例は、酸性溶液、アルカリ性溶液、8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホン酸 (n a p t h a l e n e s u l f o n i c a c i d)、3 - (アセトニルベンジル) - 4 - ヒドロキシマリニン、アルキルアミノフルオロ界面活性剤、ペルフルオロヘキサノ酸、ペルフルオロオクタノ酸、プロテイナーゼK、尿素および塩酸グアニジンである。例えば、追跡緩衝液は、WO 2 0 0 4 0 6 3 7 0 4 (その全体が参照により本明細書に援用される) に記載されているような、酸性溶液またはアルカリ性溶液であり得る。別では、追跡緩衝液は、米国特許第 7 , 4 8 2 , 1 6 2 号 (その全体が参照により本明細書に援用される) に記載されているような 8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホン酸および / または 3 - (アセトニルベンジル) - 4 - ヒドロキシマリニンを用いて、内在性の結合タンパク質からビタミンDを競合的に置換することに依存し得る。

10

【 0 0 8 1 】

追跡緩衝液は、例えば、3 . 8 ~ 4 . 8 の pH を有し、5 ~ 3 0 % D M S O、液体の有機アミド、および必要に応じて 0 . 5 ~ 5 % の短鎖アルコールを含む試薬 (例えば、WO 2 0 0 7 0 3 9 1 9 4 (その全体が参照により本明細書に援用される) に記載されているもの) であり得る。追跡緩衝液は、安定化剤、およびアルキルアミノフルオロ界面活性剤を含む、WO 2 0 0 8 0 3 9 2 6 6 (その全体が参照により本明細書に援用される) に記載されているような捕捉リガンドを含み得る。

キット

【 0 0 8 2 】

1 つの態様において、本開示は、1 種またはそれを超えるビタミンD分子のレベルを検出することができるキットを提供し、そのキットは、本明細書中に開示される検査デバイスおよびそのキットを使用するための書面の指示書を含む。いくつかの実施形態において、キットは、滅菌剤 ; 皮膚を穿刺するデバイス ; ガーゼ ; 追跡緩衝液 ; およびマイクロピペットからなる群より選択される 1 つまたはそれを超える構成要素をさらに含み得る。

20

【 0 0 8 3 】

滅菌剤は、例えば、ヒトの皮膚を消毒することができるアルコールワイプであり得る。

【 0 0 8 4 】

皮膚を穿刺するためのデバイスは、少量の血液を得るために被験体の皮膚を穿通することができる小さい鋭利な物体であり得る。皮膚を穿刺するためのデバイスは、ランセット、針およびシリンジからなる群より選択され得る。ランセットは、例えば、バネで動き得る。

30

【 0 0 8 5 】

追跡緩衝液は、先に記載されたような、ビタミンD結合タンパク質から 1 種またはそれを超えるビタミンD分子を解離するための試薬を含み得る。

【 0 0 8 6 】

マイクロピペットは、既知体積の生物学的サンプルをデバイスに提供し得る。

【 0 0 8 7 】

キットは、シグナル強度をサンプル中の前記 1 種またはそれを超えるビタミンD分子の量に関係づけるカラーチャートを含み得る。バッチごとにばらつきが生じる可能性があるため、カラーチャートは、既知量の 1 種またはそれを超えるビタミンD分子を含む標準を流し、生物学的サンプル中の種々の範囲の量の 1 種またはそれを超えるビタミンD分子に対応する色を判定することによって、検査デバイスの各バッチに対して経験的に生成され得る。

40

【 実施例 】

【 0 0 8 8 】

実施例 1 : 2 5 - (O H) D に対するモノクローナル抗体の作製

【 0 0 8 9 】

2 5 - (O H) D に対するモノクローナル抗体を、K o h l e r および M i l s t e i n (G . K o h l e r a n d C . M i l s t e i n N a t u r e , 1 9 7 5 , 2 5

50

6, 495) の変法によって調製した。3 位においてキャリアタンパク質 K H L にコンジュゲートされた 25 - (O H) D の皮下注射によってマウスを免疫した。フロイント完全アジュバントを抗原とともに注射した。フロイント不完全アジュバントを抗原の追加免疫のために使用した。25 - (O H) D₃ に対する免疫応答を E L I S A によってモニターした。4 ~ 5 回の抗原の追加免疫の後、脾臓細胞を回収し、ポリエチレングリコール (P E G) の存在下においてミエローマ細胞と融合した。融合した細胞を 96 ウェルプレートに播種し、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン (H A T) 選択培地の存在下において生育した。融合細胞からの上清を、E L I S A によって 25 - (O H) D₃ および 25 - (O H) D₂ への結合活性について試験した。25 - (O H) D₃ と 25 - (O H) D₂ の両方に対する結合について高親和性を有するクローン A F 10 を、大規模な抗体産生および精製に向けて選択した。

10

【 0 0 9 0 】

実施例 2 : 25 - (O H) D と免疫されたマウス由来の m A b との免疫複合体に対するモノクローナル抗体の作製

【 0 0 9 1 】

26 位においてキャリアタンパク質キーホールリンペットヘモシアニン (K L H) にコンジュゲートされた 25 - (O H) D の皮下注射によってマウスを免疫した。フロイント完全アジュバントを抗原とともに注射した。K L H コンジュゲートおよびフロイント不完全アジュバントを 1 回目および 3 回目の追加免疫に使用し、25 - (O H) D : 抗体 A F 10 の免疫複合体を 2 回目および 4 回目の追加免疫に使用した。25 - (O H) D : 抗体 A F 10 の免疫複合体に対する免疫応答を E L I S A アッセイによってモニターした。4 回の追加免疫の後、脾臓細胞を回収した。次いで、脾臓細胞から R N A を単離し、可変遺伝子の増幅を行った。

20

【 0 0 9 2 】

D y n a b e a d s (登録商標) m R N A 精製キット (T h e r m o F i s h e r) を製造者のプロトコルに従って使用することによって、m R N A を単離した。続いて、S u p e r s c r i p t I I 逆転写酵素 (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) を用いて、第 1 鎖 (f i r s t s t r a n d) c D N A を作製した。その c D N A から、P h a g e D i s p l a y : A L a b o r a t o r y M a n u a l (C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s) に従って記載されているように、マウス V H 、 V K および V λ に対するプライマーセットを使用する P C R によって重鎖可変遺伝子および軽鎖可変遺伝子を別々に増幅した。(G S 3)₄ リンカーの部分配列を 3 ' V H および 5 ' V L に付加するために、重鎖可変領域遺伝子および軽鎖可変領域遺伝子を P C R によってさらに増幅した。一本鎖可変フラグメント (s c F v) のアセンブリのために、3 回目の P C R 反応において、2 回目に増幅された等量の V H および V L D N A を混合した。最終的な s c F v D N A を、Q i a g e n P C R 精製カラム (Q I A G E N I n c . , G e r m a n y) を用いて精製した。精製された s c F v D N A および P C A N T A B 5 ベクター D N A を制限酵素 N c o I および N o t I (N e w E n g l a n d L a b) で消化し、次いで、1 % アガロースゲルによってサイズ選択した。Q I A q u i c k ゲル抽出キットを用いて、切り出したバンドを精製した。消化された s c F v 、ベクター D N A および T 4 リガーゼ (N e w E n g l a n d L a b) を、16 における一晩のライゲーションのために混合した。20 μ g のライゲートした D N A を精製し、エレクトロポレーションによって大腸菌 T G 1 のコンピテントセルに形質転換した。形質転換の後、T G 1 細胞を S O C 培地に懸濁し、37 および 250 r p m の振盪で 1 時間インキュベートした。T G 1 細胞を、100 μ g / m l のカルベニシリンおよび 2 % グルコースを含む 2 Y T - 寒天プレートにプレーティングした。30 で一晩インキュベーションした後、T G 1 形質転換体を、15 % グリセロール、100 μ g / m l のカルベニシリンおよび 2 % グルコースを含む 2 Y T に回収し、そのライブラリーアリコート进行を貯蔵のために - 80 で維持した。この手順によって、1 . 2 $\times$ 10⁹ コロニーというライブラリーサイズがもたらされた。

30

40

50

【0093】

ファージディスプレイライブラリーを以下のとおり調製した。200 mLの2YT培地（100 μ g/mLのカルベニシリンおよび2%グルコースを含む）に、開始時のODが0.1のライブラリーTG1細胞を接種した。37、250 rpmの振盪での3~4時間のインキュベーションの後、K07ヘルパーファージを1:10比の細胞対ファージで添加し、培養物を振盪せずに37で1時間インキュベートした。TG1細胞を遠心分離し、細胞ペレットを、100 μ g/mLのカルベニシリンおよび35 μ g/mLのカナマイシンを含む2 Lの2YTに再懸濁した後、30、250 rpmの振盪で一晩インキュベーションした。次いで、TG1細胞を4、6000 $\times$ gで30分間遠心分離した。ライブラリーファージ粒子を培養上清からのPEG沈殿によって精製し、リン酸緩衝食塩水（PBS）に再懸濁し、OD268の計測によって滴定した。そのファージディスプレイ抗体ライブラリーを、20%グリセロールを含むPBS中において-80で貯蔵した。

10

【0094】

免疫複合体特異的抗体を、以下の選択手順によって上記のマウスscFvファージディスプレイライブラリーから選択した。マイクロタイターウェルを1 μ gのmAb AF10で4において一晩コーティングした。1 $\times$ chemi blocker（EMD Millipore）で2時間ブロッキングした後、1 μ gの25-(OH)D₃を4の一晩のインキュベーションのために各ウェルに添加した。そのウェルをPBSで3回洗浄し、1 $\times$ chemi blockerで1時間、室温においてブロッキングした。25-(OH)D：抗体AF10の免疫複合体に対する親和性選択を行う前に、400 μ lのファージライブラリー溶液（合計1,012個のファージ粒子）を、ビタミンDを含まず抗体AF10を含むウェルにおいて2時間、室温でブレインキュベートし、その後、未結合のファージを、室温での2時間のインキュベーションのために、25-(OH)D：抗体AF10の免疫複合体を含む4つのウェルに移した。未結合のファージを除去し、ウェルをPBS-Tweenで10回洗浄した。結合したファージを100 μ lの100 mM HClで10分間溶出し、溶出したファージを回収し、10%1 M Tris-HClで中和した。次いで、溶出したファージを、37での1時間のインキュベーションのために、10 mLの新鮮TG1細胞（OD600約0.8）に添加した。感染したTG1細胞を、一晩生育するために、カルベニシリンおよびグルコースを含む2枚の2YTプレートにプレティングし、一晩経過した細胞を、上に記載されたような1回目のファージ調製のために回収した。記載されたばかりのこれらの2回目のファージに対して親和性選択手順を行った。合計3回の親和性選択を行った。

20

30

【0095】

scFv-p3融合物の発現および結合活性の確認のために、3回目の親和性選択からの感染したTG1コロニーを拾った。簡潔には、単離されたTGコロニーを、100 μ lの2YT/カルベニシリンおよびグルコースを含む96ウェルプレートに拾い（5枚のプレートおよび合計480個のコロニー）、30で一晩インキュベートした。2日目に、1ウェルあたり10 μ lの培養物を、1ウェルあたり500 μ lの、カルベニシリンおよび0.1%グルコースを含む2YT培地を含む、96ウェル深プレートにおける対応するウェルに移した。その深ウェルプレートを、培養物が0.8~1のOD600に達するまで、37の振盪恒温器において250 rpmで振盪してインキュベートした。次いで、6 mM IPTGを含む100 μ lの2YTを各ウェルに添加し、発現プレートを、250 rpmで振盪して30で一晩インキュベートした。次いで、2.5 mg/mLのリゾチームおよび5 mM EDTAを含む160 μ lの溶解緩衝液を発現プレートの各ウェルに添加し、培養物を室温において1時間振盪した。培養上清を、1ウェルあたり140 μ lの2 $\times$ Chemi Blockerと混合し、250 rpmで振盪しつつ、さらに30分間インキュベートした。培養上清を遠心分離し、下記のような結合アッセイのために調製した。

40

【0096】

25-(OH)D：抗体AF10の免疫複合体に結合することができるクローンについ

50

てスクリーニングするために、各発現プレートに対して2枚の96ウェルアッセイプレートを準備し、1枚のプレートは、AF10抗体のみでコーティングし、他方は、25-(OH)D₃:抗体AF10の免疫複合体でコーティングした。これらのアッセイプレートを、室温において2時間、1×Chemiblockerでブロッキングした。発現プレートからの培養上清を、アッセイプレートの対応するウェルに移した。室温における1時間のインキュベーションおよびPBS-Tweenによる3回の洗浄の後、100μLのマウス抗M13 p3抗体(New England Lab)を、室温における1時間のインキュベーションのために各ウェルに添加した。サンプルをPBS-Tweenで3回洗浄し、100μLの西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲートヤギ抗マウスIgGを、1時間のインキュベーションのために各ウェルに添加した。サンプルをPBS-Tweenで3回洗浄し、100μLの基質3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を各ウェルに添加した。10~30分の発色の後にOD630を計測した。25-(OH)D₃:抗体AF10の免疫複合体に結合したがAF10抗体のみには結合しなかったクローンを、確認のために選択した。陽性の培養上清を1:3の比で段階希釈し、上記の手順に従って再度アッセイした。図2は、25-(OH)D₃:抗体AF10の免疫複合体に対する結合活性を有する6つのクローンを示している。重鎖可変領域(配列番号6~15)および軽鎖可変領域(配列番号1~5および16~20)のユニークな配列を表1に列挙する。

10

【0097】

軽鎖は、配列番号1~5および16~20からなる群より選択される配列を含み得る。重鎖は、配列番号6~15からなる群より選択される配列を含み得る。いくつかの場合において、軽鎖は、配列番号1~5および16~20からなる群より選択される配列に対して少なくとも80%の配列相同性を有する配列を含み得る。いくつかの場合において、重鎖は、配列番号6~15からなる群より選択される配列に対して少なくとも80%の配列相同性を有する配列を含み得る。

20

【0098】

抗体は、以下のアミノ酸配列: 配列番号6の重鎖および配列番号1の軽鎖、配列番号6の重鎖および配列番号2の軽鎖、配列番号6の重鎖および配列番号3の軽鎖、配列番号6の重鎖および配列番号4の軽鎖、配列番号6の重鎖および配列番号5の軽鎖、配列番号6の重鎖および配列番号16の軽鎖、配列番号6の重鎖および配列番号17の軽鎖、配列番号6の重鎖および配列番号18の軽鎖、配列番号6の重鎖および配列番号19の軽鎖、配列番号6の重鎖および配列番号20の軽鎖、のいずれかを有する軽鎖CDRおよび重鎖CDRを含み得る。

30

【0099】

抗体は、以下のアミノ酸配列: 配列番号7の重鎖および配列番号1の軽鎖、配列番号7の重鎖および配列番号2の軽鎖、配列番号7の重鎖および配列番号3の軽鎖、配列番号7の重鎖および配列番号4の軽鎖、配列番号7の重鎖および配列番号5の軽鎖、配列番号7の重鎖および配列番号16の軽鎖、配列番号7の重鎖および配列番号17の軽鎖、配列番号7の重鎖および配列番号18の軽鎖、配列番号7の重鎖および配列番号19の軽鎖、配列番号7の重鎖および配列番号20の軽鎖、のいずれかを有する軽鎖CDRおよび重鎖CDRを含み得る。

40

【0100】

抗体は、以下のアミノ酸配列: 配列番号8の重鎖および配列番号1の軽鎖、配列番号8の重鎖および配列番号2の軽鎖、配列番号8の重鎖および配列番号3の軽鎖、配列番号8の重鎖および配列番号4の軽鎖、配列番号8の重鎖および配列番号5の軽鎖、配列番号8の重鎖および配列番号16の軽鎖、配列番号8の重鎖および配列番号17の軽鎖、配列番号8の重鎖および配列番号18の軽鎖、配列番号8の重鎖および配列番号19の軽鎖、配列番号8の重鎖および配列番号20の軽鎖、のいずれかを有する軽鎖CDRおよび重鎖CDRを含み得る。

【0101】

50

番号 1 5 の重鎖および配列番号 4 の軽鎖、配列番号 1 5 の重鎖および配列番号 5 の軽鎖、配列番号 1 5 の重鎖および配列番号 1 6 の軽鎖、配列番号 1 5 の重鎖および配列番号 1 7 の軽鎖、配列番号 1 5 の重鎖および配列番号 1 8 の軽鎖、配列番号 1 5 の重鎖および配列番号 1 9 の軽鎖、配列番号 1 5 の重鎖および配列番号 2 0 の軽鎖、のいずれかを有する軽鎖 C D R および重鎖 C D R を含み得る。

【表 1 - 1】

表 1 : 例示的な重鎖および軽鎖可変領域

配列番号	アミノ酸配列
1	DIQMTQSPAIMASPGGEKVTITCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPK LWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQ RSSYPYTFGGGGTKLEIK
2	DIVLTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQS PKALIYSASYRYSQVDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC QQHYSTPYTFGGGGTKLEIK
3	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQQKP GQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAAT YYCQQSNEDPFTFGSGTKLELK
4	DIVLTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQEPDGTIKR LIYATSSLDGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFVDYYCQQHG ESPLTFGAGTKLEIK
5	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQS PKLLIYWASTRHTGVDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC QQYASSPYTFGGGGTKLEIK
6	EVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPG QGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSL TSEDSVYYCARQDGYVGYFDYWGQGTTTLTVSS
7	EVELQESGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTNYWMNWVRQRPG QGFIEWIGEINPSNGDTFYNQKFKGKATLIVDKSSSTAYMELLSLT SEDSAVYYCARIGGYFDYWGQGTTTLTVSS
8	EVNVVESGAELVKPGASVRLSCTTSGFNIEDSYIHWVKQRPEQG LEWIGRIDPANGNIKSDPKFQGKATISADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCLYYYDSSDYWGQGTTTLTVSS
9	EVKLVESGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNGK SLEWIGNIDPYYGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLT SEDSAVYYCARWSYYGNYVYWFYFDVWGAGTTTLTVSS
10	EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYMHYMWVKQRPEQ GLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTS EDTAVYYCARSYYFDYWGQGTTTLTVSS

10

20

30

40

【表 1 - 2】

11	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y T V N W V R Q A P G K GLEWLSVISGDGSNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKALNAGWGFDYWGQGTLVTVSS	
12	QVQLLES G G G L V K P G G S L R L S C A A S G F T F S G S A M H W V R Q A P G K GMEWVSAISGSGGSTYYADSMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARNGYTDGYGMDYWGQGTLVTVSS	10
13	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S D S S V N W V R Q A P G K GLEWLAVISGDGGSTYYADSVKGRVTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARAIFPSYMDVWGQGTLVTVSS	
14	EVQLVQSGPEVKKPGTSVKVSC KASGFTFTSSAVDWVRQARGQ RLEWIGWIVVGSNTSYAQKFQERVITRDMSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCAKSVTYYYMDHWGQGTLVTVSS	
15	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFNSY AISWVRQAPGQ GLEWMGVIIIGIFGTATYAQSVQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARSGRYSR SFDVWGQGTLVTVSS	20
16	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRANRLVSSSMLAWYQQKPGQA PRLIGASKRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCAQ YDGSSYTFGQGTKLEIKR	
17	QSVLTQPPSVSGSPGQRVTISCTGNNLSGYV VSWYQQLPGTAPK LLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAMDEADYYCA AAYSGTYVFGQGTKLTVLGQ	30
18	SYELTQPLSVSVSLGQTARITCWDNVGGYNVHWYQQKPGQSPV LVIYRDSERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISR AQAGDEADYYCSSY YQSTVLFGGGTKLTVLGQ	
19	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASNVGGNYLNWYQQKPGKA PKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATYYCS AYHQSTYTFGQGTKVEIKR	40
20	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKVGSSYVNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCAS YYSTSTFGGGTKVEIKR	

【0108】

実施例 3：合成ライブラリーからの 25 - (OH) D : mAB の免疫複合体に対するモノクローナル抗体の作製

【0109】

合成抗体ライブラリーを、天然の VH / VL 対形成頻度 (Protein Engin

eering, Design & Selection pp. 1 - 7, 2012 doi: 10.1093/protein/gzs043に記載されている)に基づいてデザインし、頻繁に対形成されたヒトVH1、VH3、VK1、VK3、Vλ1、Vλ2およびVλ3のフレームワークを遺伝子合成のためのマスター遺伝子として選択した。選択されたマスター遺伝子を、重複するオリゴのPCRアセンブリによって合成した。オリゴの長さは、60～80塩基であり、すべてのCDRに対するオリゴが、アミノ酸残基をランダム化するためにヌクレオチドNNSおよび/またはMVSを用いた縮重オリゴであった。1回目のPCRアセンブリの後、5つの軽鎖マスター遺伝子を、PCRによって軽鎖定常領域とアセンブルした。得られた完全長軽鎖遺伝子を制限酵素HindIIIおよびNcoI(New England Lab)で消化し、1%アガロースゲルにおいてサイズ選択した。サイズ選択されたフラグメントをQIAquickゲル抽出キットで精製および抽出した。消化された軽鎖遺伝子、pAXD20ベクターDNAおよびT4リガーゼ(New England Lab)を混合し、ライゲーションを16において一晩進めた。各軽鎖遺伝子構築物に対して、20μgのライゲートされたDNAを精製し、エレクトロポレーションによって大腸菌TOP10のコンピテントセルに形質転換した。次いで、形質転換体を、100μg/mlのカルベニシリンおよび2%グルコースを含む100枚の2YT-寒天プレートにおいて生育した。30での一晩のインキュベーションの後、ライブラリー形質転換体を回収し、15%グリセロールを含む2YTに懸濁した。そのストックの半分を、ライブラリーアリコートとして-80で貯蔵し、残りをQiaGen Maxiprepキットによって処理した。得られたライブラリーのサイズを表2に列挙する。重鎖クローニングの次の工程のために、AFK1およびAFK3のDNAを組み合わせ、AFL1、AFL2およびAFL3も組み合わせた。

【表2】

表2：軽鎖ライブラリーの特徴

ライブラリー	ライブラリーサイズ
AFK1	1.1×10^9
AFK3	1.2×10^9
AFL1	8.5×10^8
AFL2	7.6×10^8
AFL3	8×10^8

【0110】

PCRによってアセンブルされたVH1およびVH3マスター遺伝子を、さらにPCRによってCH1定常領域とアセンブルし、得られたFd遺伝子を制限酵素NcoIおよびSalI(New England Biolab)で消化し、1%アガロースゲルによってサイズ選択した。サイズ選択されたフラグメントを、QIAquickゲル抽出キットで精製および抽出した。消化されたFd遺伝子、軽鎖ライブラリーDNAおよびT4リガーゼ(New England Lab)を混合し、ライゲーションを16において一晩進めた。各Fd鎖遺伝子ライブラリーに対して、40μgのライゲートされたDNAを精製し、エレクトロポレーションによって大腸菌TG1のコンピテントセルに形質転換した。次いで、形質転換体を、100μg/mlのカルベニシリンおよび2%グルコースを含む400枚の2YT-寒天プレートにおいて生育した。30での一晩のインキュベーションの後、ライブラリー形質転換体を回収し、15%グリセロールを含む2YTに懸濁した。ライブラリーアリコートを調製し、-80で貯蔵した。得られたライブラリーサイズを表3に列挙する。

【表 3】

表 3：ファージディスプレイライブラリーの特徴

ライブラリー	ライブラリーサイズ
AFH1K	3.6×10^9
AFH3K	3.3×10^9
AFH1L	3.5×10^9
AFH3L	3.2×10^9
合計	1.4×10^{10}

10

【0111】

ファージディスプレイライブラリーを以下のとおり調製した。500の2YT(100 μ g/mlのカルベニシリンおよび2%グルコースを含む)培養物に、開始時のODが0.1のライブラリーTG1細胞を接種した。37、250rpmの振盪での3~4時間のインキュベーションの後、KOFヘルパーファージを1:10比で添加した。次いで、培養物を振盪せずに37で1時間インキュベートした。30、250rpmの振盪で一晩インキュベーションのために、TG1細胞を遠心分離し、細胞ペレットを、100 μ g/mlのカルベニシリンおよび35 μ g/mlのカナマイシンを含む2Lの2YTに再懸濁した。次いで、TG1細胞を4、6000 $\times$ gで30分間遠心分離した。ライブラリーファージ粒子を培養上清からのPEG沈殿によって精製し、PBSに再懸濁し、OD268の計測によって滴定した。そのファージディスプレイ抗体ライブラリーを、20%グリセロールを含むPBS中において-80で貯蔵した。各ライブラリーを別々に調製し、別々に維持した。

20

【0112】

免疫複合体特異的抗体を選択する手順は、実施例2における説明と似ている。簡潔には、2種類のマイクロタイターウェルを準備し、1つは、AF10抗体のみでコーティングし、2つ目は、25-(OH)D₃:AF10の免疫複合体でコーティングした。親和性選択の前に、AF10だけに結合するファージを枯渇させるために、個別のライブラリーを、AF10のみのウェルにおいてプレインキュベートした。次いで、上清を、25-(OH)D₃:AF10の免疫複合体でコーティングされたマイクロタイターウェルに移す。1回目の親和性選択では、合計8ウェルを使用し、各ライブラリーファージを2ウェルに添加した。2回目の親和性選択では、1回目からのファージを混合し、インキュベーションのために4ウェルを使用した。合計3回の親和性選択を行った。

30

【0113】

p3融合物の発現および結合活性の確認のために、3回目の親和性選択からのコロニーを拾った。この手順は、実施例2に記載された手順に似ている。簡潔には、5枚の96ウェルプレートおよび合計480個のコロニーを拾って、マスタープレートを作製した。2日目に、1ウェルあたり10 μ lの培養物を、96ウェル深ウェル発現プレートにおける対応するウェルに移した。その深ウェルプレートを、培養物が0.8~1のOD600nmに達するまで、37の振盪恒温器において250rpmで振盪しながらインキュベートした。6mM IPTGを含む100 μ lの2YTを各ウェルに添加し、発現プレートを、250rpmで振盪しながら30で一晩インキュベートした。2.5mg/mlのリゾチームおよび5mM EDTAを含む160 μ lの溶解緩衝液を発現プレートの各ウェルに添加し、プレートを室温において1時間振盪しながらインキュベートした。培養上清を、1ウェルあたり140 μ lの2 $\times$ ChemiBlockerと混合し、250rpmでさらに30分間インキュベートした。培養上清を遠心分離し、下記のような結合アッセイのために調製した。

40

50

【0114】

E L I S Aスクリーニング手順は、実施例2に記載された手順に似ていた。簡潔には、各発現プレートに対して、2枚の96ウェルアッセイプレートを準備し、1枚のプレートは、A F 1 0抗体のみでコーティングし、2枚目は、25 - (O H) D₃ : A F 1 0の免疫複合体でコーティングした。発現プレートからの培養上清を、アッセイプレートの対応するウェルに移した。室温における1時間のインキュベーションの後、サンプルをP B S - T w e e nで3回洗浄した。100 μ lのH R Pコンジュゲート抗F a b抗体 (J a c k s o n I m m u n o R e a e a r c h L a b , U S A) を、室温における1時間のインキュベーションのために各ウェルに添加した。P B S - T w e e nで3回洗浄した後、100 μ lの基質T M Bを、10 ~ 30分の発色のために各ウェルに添加し、50 μ lの停止液を添加した。次いで、O D 4 5 0を計測した。25 - (O H) D₃ : A F 1 0の免疫複合体に結合したがA F 1 0抗体のみには結合しなかったクローンを、確認のために選択した。陽性の培養上清の1 : 3段階希釈物を、上記手順に従ってアッセイした。図3は、表1に列挙された可変領域配列を有する、25 - (O H) D₃ : A F 1 0の免疫複合体に対する5つのクローンの結合活性を示している。

10

【0115】

実施例4：組換え抗体の発現および精製

【0116】

組換えF a bを発現させるために、V HおよびV L遺伝子 (g e n s) を大腸菌発現ベクターp E xにクローニングした。各個別のクローンに対して、20 m lの一晩培養物を、2 %グルコースおよび100 μ g / m lのカルベニシリンを含む2 Y T中に調製し、37 の振盪恒温器においてインキュベートした。翌日、0 . 1 %グルコースおよび100 μ g / m lのカルベニシリンを含む700 m lの2 Y Tに、7 m lの一晩培養物を移すことによって、2 LのU l t r a y i e l dフラスコ (T h o m s o n I n s t r u m e n t C o m p a n y) において接種した。35 、280 r p mの振盪で、O D 6 0 0が約0 . 8になるまでおよそ2 ~ 3時間、培養物を生育した。次いで、350 μ lの1 M I P T Gをその培養物に添加し、22 、280 r p mの振盪で一晩誘導した。7500 $\times$ gでの20分間の遠心分離によって細胞ペレットを回収し、室温における1時間のインキュベーションのために、1 m g / m lのリゾチームおよび5 m M E D T Aを含む溶解緩衝液に再懸濁した。可溶性F a bを含む上清を、4 、15 , 000 r p mの25000 $\times$ gで2回遠心することによって回収した。次いで、その上清を、F a b結合用の5 m lのプロテインGカラム (G E h e a l t h c a r e) にロードし、50 m lのP B Sで洗浄した。次いで、F a bタンパク質を0 . 3 M酢酸 , p H 3緩衝液で溶出した。溶出した画分を回収し、0 . 5体積の1 M T r i s - H C l , p H 8 . 5緩衝液で中和した。F a bサンプルの緩衝液をP B Sに交換し、3 ~ 5 m g / m lの濃度に濃縮した。このF a bサンプルを - 8 0 で貯蔵した。

20

30

【0117】

I g G発現のために、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを、それぞれサイトメガロウイルスプロモーターベースの哺乳動物発現ベクターP M X 3 0およびp M X 3 1にクローニングした。重鎖ベクターDNAおよび軽鎖ベクターDNAを1 : 3の比で混合し、無血清培地中の30 m lのH E K 2 9 3細胞懸濁液に一過性にトランスフェクトした。20時間後、細胞をサンプリングし、生存率および生細胞数を測定し、力価を計測した (O c t e t Q K e , F o r t e B i o) 。それらの培養物を5日目に回収し、各々に対するさらなるサンプルを計測して、細胞密度、生存率および力価を測定した。I g Gを含む条件培地を回収し、一過性のトランスフェクション生成物から遠心分離および濾過によって浄化した。上清をプロテインAカラムに流し、低p H緩衝液 (p H = 3) で溶出した。0 . 2 μ mメンブランフィルターを用いる濾過を行った後、等分した。精製および濾過の後、O D 2 8 0および消衰係数に基づいてタンパク質濃度を計算した。概して、この手順から1 ~ 5 m gのI g Gが生成された。

40

【0118】

50

実施例 5 : 血清中 25 - (OH) D の計測のためのサンドイッチ ELISA アッセイ

【0119】

25 - (OH) D : AF10 の免疫複合体に対するモノクローナル抗体を用いて、サンドイッチベースの ELISA アッセイを調製した。遊離 25 - (OH) D₃ をそのアッセイに使用した。簡潔には、100 μ L / ウェルの AF10 抗体 (3 μ g / mL の PBS 溶液) を使用して、4 で一晚、マイクロタイタープレートにコーティングした。

【0120】

そのアッセイプレートを PBS で洗浄し、室温において 2 時間、1 $\times$ ChemiBlocker でブロッキングした。0.5 ~ 50 ng / mL の濃度における 5 μ L / ウェルの 25 - (OH) D₃ をそのプレートに添加し、その後、3 μ g / mL の 200 μ L の抗免疫複合体抗体を添加した。室温における 1 時間のインキュベーションの後、そのプレートを PBS - Tween で 3 回洗浄し、100 μ L の HRP コンジュゲートヤギ抗マウス抗体 (Jackson ImmunoResearch Lab, USA) を、室温における 30 分間のインキュベーションのために各ウェルに添加した。PBS - Tween で 3 回洗浄した後、100 μ L の基質 TMB を、30 分の発色のために各ウェルに添加した。50 μ L の停止液を添加し、OD450 を計測した。このデータは、用量依存的応答を示し、25 - (OH) D 検出のためのサンドイッチ ELISA の概念証明として働いた。臨床サンプルを検出するためのこのアッセイの有用性をさらに確かめるために、25 - (OH) D 値 (ADVIA Centaur Vitamin D Total assay, Siemens によって測定された) を有する患者血清サンプルを、上記サンドイッチ ELISA アッセイを用いて計測した。このアッセイは、25 - (OH) D : AF10 の免疫複合体に対する 3 μ g / mL のモノクローナル抗体を含む 200 μ L の CalBioTech 放出緩衝液 (CalbioTech, California, USA) を各ウェルに添加した後、5 μ L の血清サンプルを添加したことを除いては、遊離 25 - (OH) D₃ に対するように行われた。混合の後、プレートを室温において 1.5 時間インキュベートした。図 4 は、血清中 25 - (OH) D のサンドイッチ ELISA の成功した検出を示しており、ビタミン D 濃度を計測する 2 つの方法の間の線形関係を示している。

【0121】

実施例 6 : 25 - (OH) D を計測するための側方流動アッセイ

【0122】

例示的な側方流動デバイスは、サンプル運搬のためのサンプル適用ユニット (例えば、Ahlsstrom または Millipore 製)、標識された抗体を含むコンジュゲートパッド、ならびに固定化された捕捉試薬および吸収パッド (例えば、Ahlsstrom または Millipore 製) を含む検出ゾーンを備える。

【0123】

乾燥したコンジュゲートパッドを以下のとおり調製した。クエン酸ナトリウムで塩化金を沸点において還元することによって、0.04 % コロイド溶液を調製した。25 μ g の抗 25 - (OH) D 抗体を 1 mL の 0.04 % コロイド溶液に添加し、室温において 30 分間インキュベートした。次いで、そのコンジュゲートを 10000 rpm で 20 分間遠心分離した。次いで、上清をデカントし、ペレットを 1 mL の 15 mM リン酸緩衝液、pH 7.4 に懸濁した。類似の手順を行って、ポジティブコントロールのために使用されるコロイド金 - 抗ニワトリ IgG 抗体のコンジュゲートを調製した。抗 25 - (OH) D コンジュゲートおよび抗ニワトリ IgG コンジュゲートを、コンジュゲートパッド基剤と 1 : 10 の比で混合した。10 mL のコンジュゲートパッド基剤混合物を 8 cm $\times$ 8 cm の繊維ガラスシート片に適用し、室温において 4 時間真空乾燥した。そのパッドを乾燥剤とともに乾燥室において貯蔵した。

【0124】

検出膜を調製するために、25 - (OH) D : AF10 の免疫複合体に対するモノクローナル抗体を、検査ライン溶液として 0.2 ~ 1.5 mg / mL の濃度範囲で 15 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 中に調製した。その検査ライン溶液を、0.6 ~ 1.0 μ L / cm

の量でニトロセルロース膜（Millipore 125またはGE AE99）上に分注した。同様に、抗ニワトリIgGを含むコントロールライン溶液をニトロセルロース膜上のコントロールラインの位置に分注した。次いで、その膜を、30%未満の湿度の環境において1時間風乾させ、次いで、乾燥剤とともに乾燥室において貯蔵した。

【0125】

検査デバイスを構築するために、検出膜、コンジュゲートパッドおよびサンプルウィッキング材料を並べ、アSEMBLされたストリップをプラスチックのハウジング内に入れた。

【0126】

既知の25-(OH)D濃度を含む血清または血液サンプルを使用することによって、そのデバイスを評価した。5μLの血清または10μLの毛細管血をサンプルパッドに適用した後、3滴（100μL）のサンプル追跡緩衝液を適用した。15分後、検査ラインおよびコントロールラインを読み出した。図5に示されている結果は、血清中のビタミンD濃度が上昇するにつれて、サンプルにおける検査ライン上のシグナル密度が高まることを示している。この検査デバイスは、被験体が、十分なビタミンD、不足しているビタミンD、または欠乏したビタミンDを有することを示す（図1A）。さらに、この検査デバイスは、シグナル強度と、サンプル中の10ng/mL～80ng/mLの範囲の25-(OH)Dレベルとの間に線形関係を示した。半定量的カラーチャート（図1B）を用いて計測されたビタミンDレベルについて、さらなるサンプルを試験した。そのデータを、ADVIA Centaur VitDアッセイによって測定されたビタミンDレベルと比較した。表4に示されているように、側方流動検査デバイスの結果は、ADVIA Centaur VitDアッセイの試験と一致した。これらの試験は、異なる製造ロットのデバイスで再現された。

【表4-1】

表4：側方流動検査デバイスおよびADVIA Centaur VitDアッセイを用いた計測の比較

		ADVIA Centaur VitD アッセイ	側方流動試験の結果 (半定量的)	
患者#	患者ID	25-(OH)D ng/mL	25-(OH)D ng/mL	ビタミンD十分性
1	03928913	4.2	< 10	欠乏
2	03928920	4.2	< 10	欠乏
3	1023110935	9	≤ 10	欠乏
4	1023110936	10	10	欠乏

【表 4 - 2】

5	1023110968	10	10	欠乏
6	1023110755	10	10	欠乏
7	1023110768	10	≤10	欠乏
8	1022110849	11	10	欠乏
9	1023110943	11	10	欠乏
10	1023110949	11	10	欠乏
11	1023110957	19.4	≤20	不足
12	1023110763	20	20	不足
13	1023110788	20	≥20	不足
14	1023110831	20	20	不足
15	1023110866	20	≤20	不足
16	1023110876	20	20	不足
17	1023110958	20	20	不足
18	1023110743	21	20	不足
19	1022110782	29	30	十分
20	1022110783	29	30	十分
21	1022110784	30	≥30	十分
22	1022110863	30	30	十分
23	1023110910	30	30	十分
24	1023110813	29.1	30	十分
25	10411110254	32.7	30	十分
26	10411110267	33.5	≥30	十分
27	10052015WK	42	>30	十分
28	10052015JA	41	>30	十分
29	1120834	67	>>30	十分
30	1124761	80	>>30	十分
31	1123647	97	>>30	十分

10

20

30

【0127】

さらに、スマートフォンベースのリーダーを毛細管血サンプル中のビタミンDレベルの定量的検出に使用した。10 μl の毛細管血をサンプルパッドに適用した後、3 滴 (100 μl) のサンプル追跡緩衝液を適用した。15 分後、検査ラインを読み出した。対応する個体の血清サンプルを回収し、ELISA 試験に供した。図 6 は、側方流動検査デバイスを用いた毛細管血検査と ELISA ベースの血清試験との比較を示している。このデータは、0.91 という相関係数 R を有する正の線形相関を示している。

40

【0128】

実施例 7 : Cube - Reader を用いた 25 - (OH) D の計測のための側方流動アッセイ

【0129】

25 - OH ビタミン D の完全に定量的な計測のために、Cube - Reader (op Tricon GmbH, Germany 製) を使用した。Cube - Reader は、

50

縁の長さがおおよそ 41 mm で重さが 40 g である立方体の形状を有するポータブル側方流動アッセイリーダーである。計測手順は、図 8 に示されている。

【 0 1 3 0 】

液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS) アッセイによって測定された 25-OH ビタミン D 値を有する合計 20 個のヒト血清サンプルを側方流動試験に適用した。計測手順は、実施例 6 に記載されている。表 5 に列挙される結果は、側方流動試験の 25-OH ビタミン D 値が、LC-MS/MS アッセイ (25-OH ビタミン D の計測の「ゴールド」スタンダードな方法) から生成された真の値に非常に近いことを示している。

【表 5 - 1】

表 5. 側方流動試験および液体クロマトグラフィー質量分析試験からの試験結果

10

サンプル ID	25-OH ビタミン D (ng/ml)	25-OH ビタミン D (ng/ml)
	LC-MS/MS 試験	側方流動試験
S-1	14.3	14.4
S-2	14.0	16.0
S-3	18.9	19.9
S-4	19.8	19.1
S-5	20.0	22.4
S-6	26.4	22.1
S-7	29.3	31.0
S-8	40.1	37.2
S-9	40.3	47.4
S-10	45.9	51.8
S-11	46.4	39.2
S-12	49.0	42.6
S-13	56.3	57.4
S-14	60.3	72.7
S-15	63.1	67.8
S-16	75.5	71.2

20

30

【表 5 - 2】

40

S-17	87.4	85.9
S-18	92.3	97.9
S-19	92.4	94.4
S-20	103.9	93.1
平均	49.8	50.2

側方流動試験と LC-MS/MS アッセイとの間の 25-OH ビタミン D 値の比較は、0

50

． 9 8 という相関係数を有する線形回帰 $Y = 0.98X + 1.49$ をもたらす。この比較結果を図 9 に示す。

【 0 1 3 1 】

本発明の好ましい実施形態が、本明細書中に示され、記載されてきたが、そのような実施形態は単なる例として提供されていることが当業者に明らかである。数多くのバリエーション、変更および置換が、本発明から逸脱することなく当業者には想起される。本明細書中に記載される本発明の実施形態に対する様々な代替物が、本発明の実施において使用され得ることが理解されるべきである。以下の請求項は、本発明の範囲を定義すること、ならびにこれらの請求項の範囲内の方法および構造ならびにそれらの等価物がこれらの請求項によって包含されることが意図されている。

10

【 図 1 A B 】

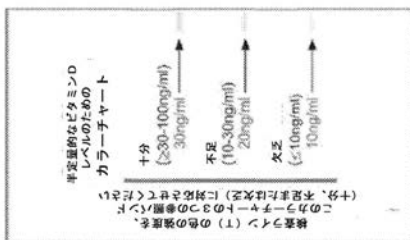


Fig. 1B

【 図 1 C 】

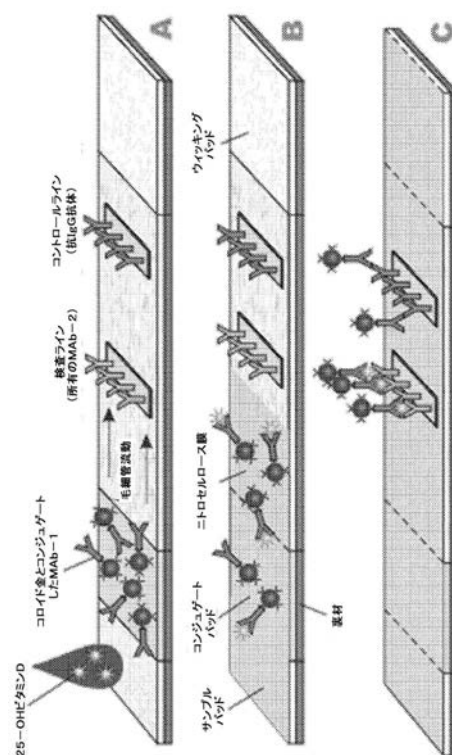


Fig. 1C

Fig. 1 (つづき)

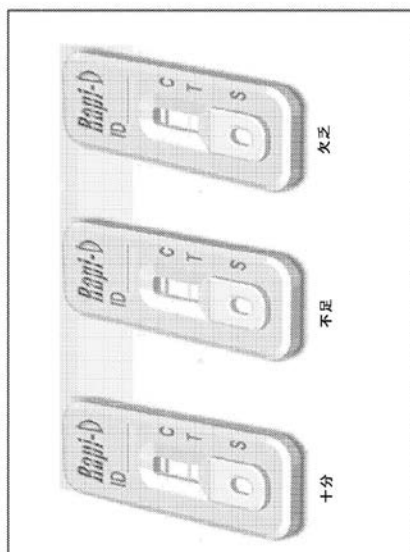


Fig. 1A

Fig. 1

【 図 2 】

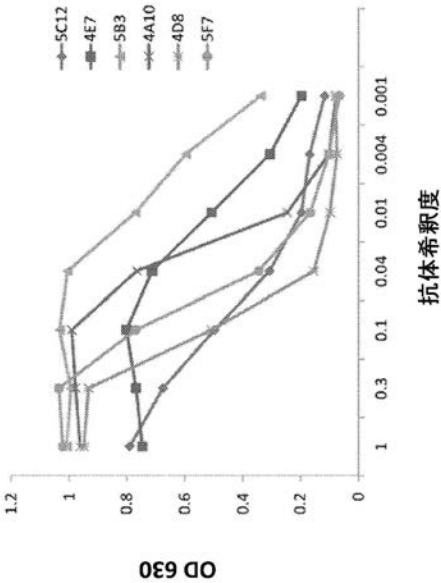


Fig. 2

【 図 3 】

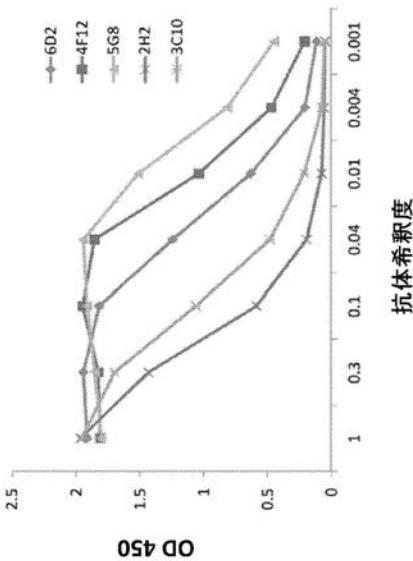


Fig. 3

【 図 4 】

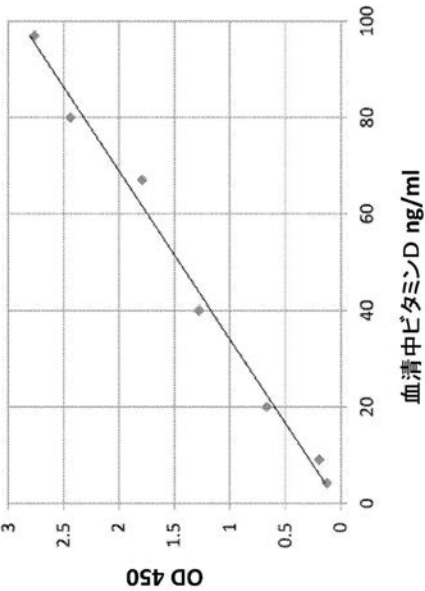


Fig. 4

【 図 5 】

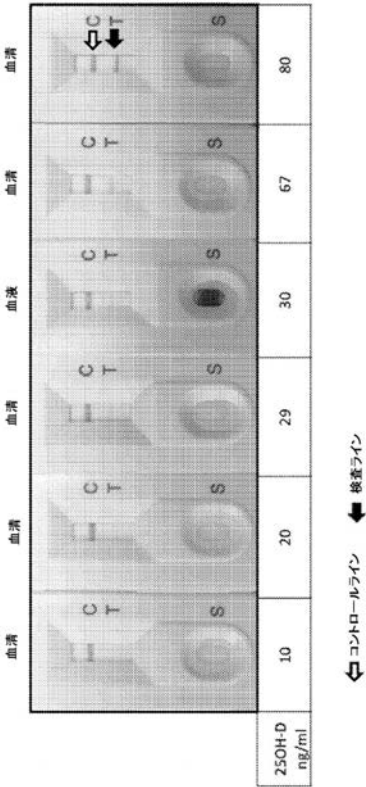


Fig. 5

【図 6】

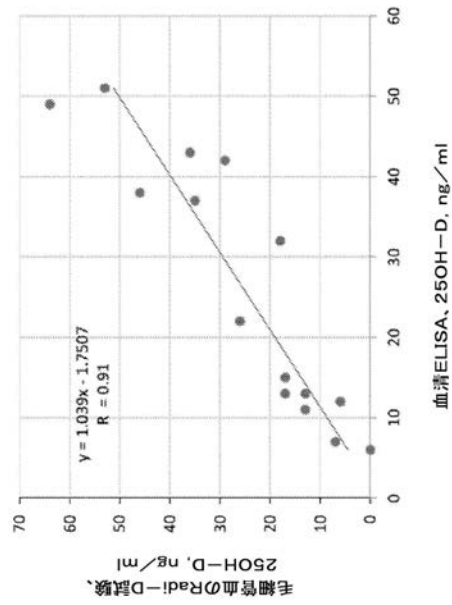


Fig. 6

【図 7】

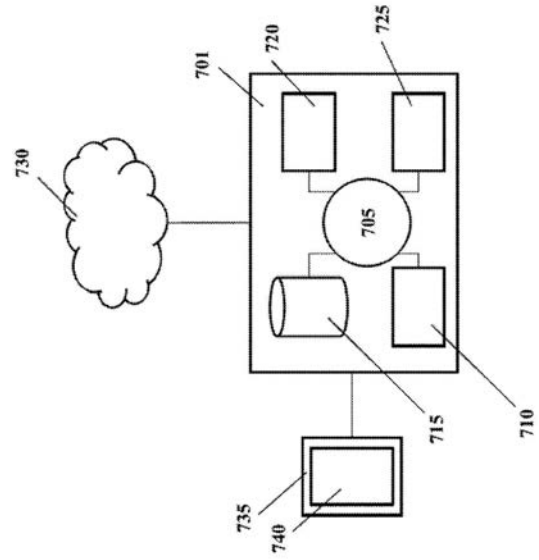


Fig. 7

【図 8】

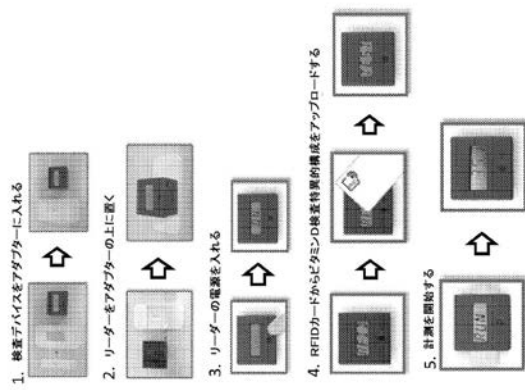
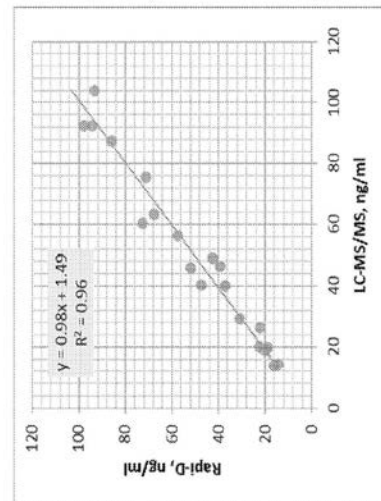


Fig. 8

【図 9】



相関係数 (r) = 0.98

Fig. 9

【配列表】

20195078900000001.app

【国際調査報告】

PCT/US2017/014620 14.04.2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/014620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 31/593; C07C 401/00; G01N 33/53; G01N 33/532; G01N 33/543; G01N 33/558 (2017.01)

CPC - C07C 401/00; G01N 33/53; G01N 33/532; G01N 33/558; G01N 33/6857; G01N 33/82 (2017.02)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

USPC - 422/69; 435/29; 435/7.92; 436/501 (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/0370616 A1 (GUPTA et al) 18 December 2014 (18.12.2014) entire document	1-13, 27, 28, 30, 33
Y	WO 2012/162165 A2 (SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS, INC. et al) 29 November 2012 (29.11.2012) entire document	31, 32
A	LEE et al. "A smartphone platform for the quantification of vitamin D levels," Lab on a Chip, 21 April 2014 (21.04.2014), Vol. 14, No. 8, Pgs. 1437-1442, entire document	1-14, 27-33
A	CN 104062440 A (YA-JUN HAN) 24 September 2014 (24.09.2014) entire document; see machine translation	1-14, 27-33
A	VALCOUR et al. "A novel, fully-automated, chemiluminescent assay for the detection of 1,25-dihydroxyvitamin D in biological samples," The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 21 August 2015 (21.08.2015), Vol. 164, Pgs. 120-126, entire document	1-14, 27-33
A	WO 2014/114780 A1 (DIASORIN S.P.A.) 31 July 2014 (31.07.2014) entire document	1-14, 27-33
P, A	WO 2016/091755 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al) 16 June 2016 (16.06.2016) entire document	1-14, 27-33

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 2017

Date of mailing of the international search report

14 APR 2017

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

PCT/US2017/014620 14.04.2017**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US2017/014620

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 15-26, 34-39
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 M 1/34 B
C 0 7 K 16/18

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1 . A N D R O I D

2 . T W E E N

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ワン , ケビン シー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 2 2 , サンフランシスコ , 2 4 ティーエイチ アベニュー 1 7 2 5

Fターム(参考) 4B029 AA07 AA21 BB17 CC03 FA12

4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	用于检测维生素D代谢物的装置		
公开(公告)号	JP2019507890A	公开(公告)日	2019-03-22
申请号	JP2018557296	申请日	2017-01-23
发明人	ワン, ケビン シー.		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/545 G01N33/53 C12M1/34 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/82 C07C401/00 G01N33/543 G01N33/54306 G01N33/558		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/543.525.C G01N33/543.541.Z G01N33/545.ZNA G01N33/53.S C12M1/34.B C07K16/18		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/BB17 4B029/CC03 4B029/FA12 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	62/286297 2016-01-22 US		
其他公开文献	JP2019507890A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了使用侧向流动装置快速检测分析物（包括小分析物）的方法，装置和组合物。本文描述了这种能够通过使用基于夹心的免疫测定法检测和定量全血，血清或血浆样品中的维生素D的侧向流动装置。非常需要用于检测和测量一种或多种维生素D分子的替代装置，方法和试剂盒。本发明满足了这种需要并提供了进一步的优点。

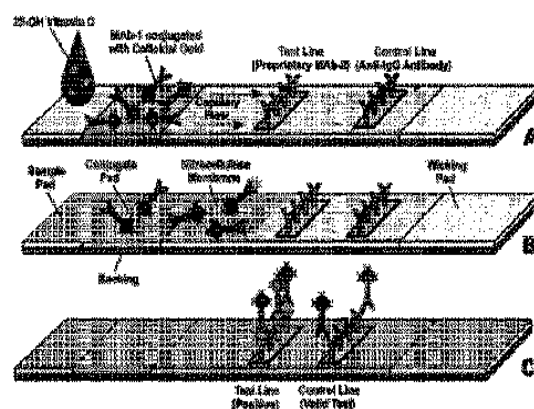


Fig. 1C