

(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2017-508967  
(P2017-508967A)

(43) 公表日 平成29年3月30日(2017.3.30)

(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 1 1 A 4 B O 6 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	B 4 H O 4 5
CO 7 K 16/26 (2006.01)	CO 7 K 16/26	Z N A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2016-555546 (P2016-555546)  
 (86) (22) 出願日 平成27年3月4日 (2015.3.4)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年10月13日 (2016.10.13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2015/050624  
 (87) 国際公開番号 WO2015/132588  
 (87) 国際公開日 平成27年9月11日 (2015.9.11)  
 (31) 優先権主張番号 1403815.2  
 (32) 優先日 平成26年3月4日 (2014.3.4)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 516122335  
 モロジック・リミテッド  
 Mologic Limited  
 英国エムケイ44・2ワイビー、ベッドフォードシャー、サーリー、ベッドフォード・テクノロジー・パーク  
 (74) 代理人 100101454  
 弁理士 山田 卓二  
 (74) 代理人 100062144  
 弁理士 青山 稜  
 (74) 代理人 100106518  
 弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アッセイ法

(57) 【要約】

液体サンプル中に存在する分析対象物の存在を決定するための方法であって、該液体サンプルを、既定量の分析対象物の類縁体および過剰量の第一の結合部位と接触させ、ここで、第一の結合部位は、分析対象物および類縁体のそれぞれに独立して結合可能であり；該混合物を第二の結合部位と接触させ；そして、第二の結合部分に結合した類縁体 - 第一結合部位複合体の存在を示すシグナルレベルを決定する（ここで、決定されたシグナルレベルが、分析対象物が存在しないときに決定された最大シグナルレベルより低いとき、分析対象物がサンプル中に存在する）ことを含む方法を提供する。対応するキットもまた提供される。

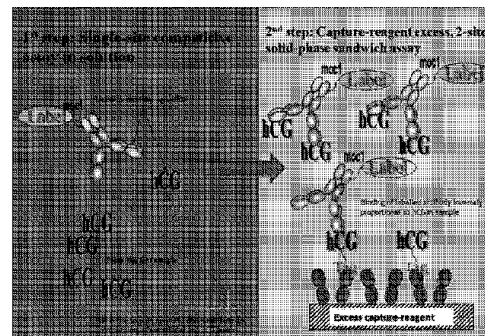


Figure 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

液体サンプル中に存在する分析対象物の存在を決定する方法であって、

a) 該液体サンプルを、既定量の分析対象物の類縁体および過剰量の第一の結合部位と接触させること、

ここで、第一の結合部位は、混合物が、類縁体 - 第一結合部位複合体を含んで形成されるか、または分析対象物がサンプル中に存在するとき、( i ) 類縁体 - 第一結合部位複合体および分析対象物 - 第一結合部位複合体、または ( i i ) 分析対象物 - 第一結合部位複合体を含み、かつ類縁体 - 第一結合部位複合体を含まないで形成されるように、分析対象物および類縁体のそれぞれに独立して結合可能であり；

b) 該混合物を第二の結合部位と接触させること、

ここで、第二の結合部位は、類縁体 - 第一結合部位複合体に結合できるが、分析対象物 - 第一結合部位複合体には結合できず、そして固相に固定化されているか、または固定化可能であり；

c) 第二の結合部分に結合した類縁体 - 第一結合部位複合体の存在を示すシグナルレベルを決定すること；

ここで、工程 c) で決定されたシグナルレベルが、分析対象物が存在しないときに決定された最大シグナルレベルより低いとき、分析対象物がサンプル中に存在する、を含む、方法。

**【請求項 2】**

液体サンプル中に存在する分析対象物の存在を決定する方法であって、

a) 該液体サンプルを、既定量の分析対象物の類縁体および過剰量の第一の結合部位と接触させること、

ここで、第一の結合部位は、混合物が、類縁体 - 第一結合部位複合体を含んで形成されるか、または分析対象物がサンプル中に存在するとき、( i ) 類縁体 - 第一結合部位複合体および分析対象物 - 第一結合部位複合体、または ( i i ) 分析対象物 - 第一結合部位複合体を含み、かつ類縁体 - 第一結合部位複合体を含まないで形成されるように、分析対象物および類縁体のそれぞれに独立して結合可能であるが、分析対象物および類縁体の両方には同時には結合不可能であり；

b) 該混合物を第二の結合部位と接触させること、

ここで、第二の結合部位は、類縁体 - 第一結合部位複合体に結合できるが、分析対象物 - 第一結合部位複合体には結合できず、そして固相に固定化されているか、または固定化可能であり；

c) 第二の結合部分に結合した類縁体 - 第一結合部位複合体の存在を示すシグナルレベルを決定すること；

ここで、工程 c) で決定されたシグナルレベルが、分析対象物が存在しないときに決定された最大シグナルレベルより低いとき、分析対象物がサンプル中に存在する、を含む、方法。

**【請求項 3】**

サンプルを、類縁体と接触させる前に、第一の結合部位と接触させる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

工程 c) で決定されたシグナルレベルをキャリブレーションデータと比較することにより、サンプル中に存在する分析対象物の量または濃度を決定する工程をさらに含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5】**

分析対象物が hCG またはそのフラグメントもしくは一部である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

シグナルが、第一の結合部位に直接的または間接的に結合されている標識に由来する、

10

20

30

40

50

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

標識が、酵素、フルオロフォア、放射性核種、コロイド状ゾル、発色団および発光化合物からなる群より選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

分析対象物がアミノ酸配列を含み、類縁体が、該分析対象物の完全な配列または一部の配列のいずれかと同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

類縁体が、分析対象物中に存在していない結合領域を含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 10】

類縁体がアミノ酸配列を含み、組換え的に発現される、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

第一の結合部位および/または第二の結合部位が抗体である、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

第一の結合部位が Fab または  $F(ab)_2$  である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 13】

第一の結合部位が、hCG に特異的に結合する、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

第一の結合部位が、hCG 3 - ループ - 特異的モノクローナル抗体である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

サンプルが、血液、血清、血漿、間質液、唾液、痰、接眼レンズ液、汗、尿、乳汁、腹水液、粘液、滑膜液、腹膜液、経皮滲出液、咽頭滲出液、気管支肺胞洗浄液、気管内吸引液 (tracheal aspiration)、脳脊髄液、精液、子宮頸管粘液、膣もしくは尿道分泌物または羊水を含む生理的供給源に由来するか、またはそれから構成される、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 16】

i) 分析対象物類縁体 ;  
 ii) (a) 標識された第一の結合部位、または (b) 標識されていない第一の結合部位および標識された第三の結合部位、のいずれか ; および  
 iii) 固定化可能な第二の結合部位  
 を含む、目的の分析対象物を検出するためのテストキットであって、  
 ここで、第一の結合部位が、類縁体および目的の分析対象物のそれぞれに独立して結合可能であり、第二の結合部位が、類縁体および第一の結合部位の複合体に結合できるが、分析対象物または第一の結合部位および分析対象物の複合体に結合できず、そして第三の結合部位が、第一の結合部位または類縁体 - 第一結合部位複合体に結合可能である、  
 テストキット。

40

【請求項 17】

i) 分析対象物類縁体 ;  
 ii) (a) 標識された第一の結合部位、または (b) 標識されていない第一の結合部位および標識された第三の結合部位、のいずれか ; および  
 iii) 固定化可能な第二の結合部位  
 を含む、目的の分析対象物を検出するためのテストキットであって、  
 ここで、第一の結合部位が、類縁体および目的の分析対象物のそれぞれに独立して結合で

50

きるが、類縁体および分析対象物の両方に同時には結合できず、第二の結合部位が、類縁体および第一の結合部位の複合体に結合できるが、分析対象物または第一の結合部位および分析対象物の複合体に結合できず、そして第三の結合部位が、第一の結合部位または類縁体 - 第一結合部位複合体に結合可能である、

テストキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、液体サンプル中の分析対象物(analyte)の存在を決定するための方法およびキットに関する。

10

【背景技術】

【0002】

液体サンプル中の分析対象物の存在を決定するためのイムノアッセイ法はよく知られている。イムノアッセイ法の一般的な方法はサンドイッチイムノアッセイ法である。かかるアッセイ法において、サンプルを捕捉抗体でコーティングされたテストプレートに添加する。サンプル中に存在する分析対象物は捕捉抗体と結合し、プレート上に保持される。プレートを洗浄して、結合していない分析対象物を除去し、その後、捕捉抗体に結合されている分析対象物に結合する検出抗体を加え、それにより2つの抗体間の分析対象物のサンドイッチが形成される。分析対象物サンドイッチは、検出抗体に結合された標識によって、または検出抗体に結合する標識された抗体をさらに添加することによって、検出することが

20

【0003】

別のアプローチは、競合的阻害アッセイである。上記と同様に、捕捉抗体をテストプレート上に提供する。サンプルおよび標識された目的の分析対象物をテストプレートに添加する。標識された分析対象物は、捕捉抗体への結合に関して、サンプル中に存在する分析対象物と競合する。プレートを洗浄し、捕捉された標識分析対象物の存在量を決定する。一般的に、検出される標識された分析対象物の量は、サンプル中の分析対象物の濃度に反比例する。

【0004】

公知のアッセイには、多くの問題がある。例えば、特定のアッセイ法では、立体障害が抗体と分析対象物との免疫複合体の形成を損なうことがあり、例えば、かかる相互作用が表面上で生じるとき、それを制限し得る。

30

【発明の概要】

【0005】

一面において、本発明は、液体サンプル中に存在する分析対象物の存在を決定する方法を提供する。本発明は、液体サンプル中に存在する分析対象物の存在を決定する方法であって、

a) 該液体サンプルを、既定量の分析対象物の類縁体(analogue)および過剰量の第一の結合部位と接触させること、ここで、第一の結合部位は、混合物が、類縁体 - 第一結合部位複合体を含んで形成されるか、または分析対象物がサンプル中に存在するとき、(i) 類縁体 - 第一結合部位複合体および分析対象物 - 第一結合部位複合体を含んで形成されるか、または(ii) 分析対象物 - 第一結合部位複合体を含み、かつ類縁体 - 第一結合部位複合体を含まないで形成されるように、分析対象物および類縁体のそれぞれに独立して結合可能であり；

40

b) 該混合物を第二の結合部位と接触させること、ここで、第二の結合部位は、類縁体 - 第一結合部位複合体に結合できるが、分析対象物 - 第一結合部位複合体には結合できず、そして固相に固定化されているか、または固定化可能であり；

c) 第二の結合部分に結合した類縁体 - 第一結合部位複合体の存在を示すシグナルレベルを決定すること；

ここで、工程c)で決定されたシグナルレベルが、分析対象物が存在しないときに決定

50

された最大シグナルレベルより低いとき、分析対象物がサンプル中に存在する、を含む、方法を提供する。

【0006】

上記の工程(a)において、第一の結合部位は、類縁体と分析対象物の両方に同時に結合することができる。

【0007】

本発明はさらに、液体サンプル中に存在する分析対象物の存在を決定する方法であって、

a) 該液体サンプルを、既定量の分析対象物の類縁体および過剰量の第一の結合部位と接触させること、ここで、第一の結合部位は、混合物が、類縁体 - 第一結合部位複合体を含んで形成されるか、または分析対象物がサンプル中に存在するとき、(i) 類縁体 - 第一結合部位複合体および分析対象物 - 第一結合部位複合体を含んで形成されるか、または(ii) 分析対象物 - 第一結合部位複合体を含み、かつ類縁体 - 第一結合部位複合体を含まないで形成されるように、分析対象物および類縁体のそれぞれに独立して結合可能であるが、分析対象物および類縁体の両方に同時には結合不可能であり；

b) 該混合物を第二の結合部位と接触させること、ここで、第二の結合部位は、類縁体 - 第一結合部位複合体に結合できるが、分析対象物 - 第一結合部位複合体には結合できず、そして固相に固定化されているか、または固定化可能であり；

c) 第二の結合部分に結合した類縁体 - 第一結合部位複合体の存在を示すシグナルレベルを決定すること；

ここで、工程c)で決定されたシグナルレベルが、分析対象物が存在しないときに決定された最大シグナルレベルより低いとき、分析対象物がサンプル中に存在する、を含む、方法を提供する。

【0008】

本発明は、従来のアッセイ法よりも多くの利点を提供し、それには、従来のアッセイ法と比較してより少ない洗浄工程を伴う、溶液相中での第一の抗体 - 標的複合体の形成；溶液相中での競合的イムノアッセイ法の実行、その後の、表面への捕捉、および遊離標識からの結合標識の分離が含まれる。本発明の方法は、液体サンプル中の分析対象物の存在を公知の方法、例えば、RIAアッセイおよび/またはImmuliteアッセイよりも迅速に決定することができる。好ましくは、本発明の方法は、液体サンプル中の分析対象物の存在を24時間未満、12時間未満または4時間未満で決定することができる。

【0009】

一旦、液体サンプルを類縁体および第一の結合部位と接触させると、該類縁体、第一の結合部位および、存在する場合には分析対象物は、ブラウン運動の周知の原理に従って溶液中に自由に拡散し、互いに相互作用し合う。サンプル中に分析対象物が存在しない場合、第一の結合部位は類縁体のみ結合することができ、類縁体 - 第一結合部位複合体を含む混合物が形成される。この混合物を第二の結合部位と接触させる。第二の結合部位は、類縁体に結合し(それが第一の結合部位との複合体であっても)、それ故に、類縁体 - 第一結合部位複合体は、好ましくは過剰量で提供される第二の結合部位に捕捉される。第二の結合部位は、例えば、マイクロタイタープレートのウェルのような表面上に固定化されていてよい。あるいは、第二の結合部位は、類縁体 - 第一結合部位複合体を結合する前または後のいずれかで表面上に固定化されるように、例えば固定化された結合部分の手段のように、固定化可能であり得る。この場合、本方法は、表面上に第二の結合部位を固定するために、第二の結合部位と表面を接触させるさらなる工程を含んでいてよい。第二の結合部位によって捕捉されていない第一の結合部位は、工程(c)が行われる前に捕捉された類縁体 - 第一結合部位複合体から分離され得る。これにより、第二の結合部位により捕捉されなかった第一の結合部位の検出を避ける。任意の好適な分離法、例えば、緩衝液での洗浄、空気での洗浄、磁気分離、濾過またはイムノクロマトグラフィーを用いることができる。その後、捕捉された類縁体 - 第一結合部位複合体の存在を示すシグナルのレベルが決定される

10

20

30

40

50

## 【0010】

シグナルは、好ましくは、第一の結合部位に直接的または間接的に連結または結合される、ある標識に（直接的または間接的に）由来する。シグナルがどのように形成され、標識がどのように第一の結合部位に結合するかに関係なく、シグナルレベルは、第二の結合部位に捕捉された類縁体 - 第一の結合部位の量に比例し得る。

## 【0011】

第一の結合部分は、それ自体が標識を含んでいてよい。あるいは、第一の結合部分は、標識を含まなくてもよく、本方法はさらに、第一の結合部分と第三の結合部分とを接触させることを含んでいてよく、ここで、第三の結合部分が第一の結合部分を（直接的または間接的に）結合し、標識を含む。従って、このような態様において、標識された第三の結合部分は、捕捉された類縁体 - 第一の結合部分複合体の存在を示すシグナルを提供する。第三の結合部分は、シグナルレベルが決定される前に、該方法の何れかの段階で第一の結合部分と接触させてもよい。例えば、第三の結合部分は、液体サンプルを第一の結合部分と接触させる前に、またはこの工程の後であるが、混合物を第二の結合部分と接触させる前に、または混合物を第二の結合部分と接触させた後であるが、シグナルレベルの決定前に、第一の結合部位と接触させてもよい。第三の結合部分は、第一の結合部分が類縁体と複合体を形成しており、該複合体が、第二の結合部分によって捕捉されているとき、第一の結合部分と接触させてもよい。1個またはそれ以上の中間結合部分は、第一の結合部分に第三の結合部分または標識を結合するために使用され得る。シグナルは、標識により直接的または間接的に生成され得る。例えば、標識は、試薬と反応してシグナルの生成をもたらし得る。この場合、本方法はさらに、シグナルを生成するのに好適な試薬を添加する工程を含んでいてよい。好適な標識を以下に詳述する。

10

20

## 【0012】

サンプル中に分析対象物が存在しないときに検出されるシグナルレベルは、本試験の最大シグナルである。これは、第一の結合部位に結合するのに類縁体と競合する分析対象物が存在せず、それ故に、最大量の類縁体 - 第一結合部位複合体が形成され、第二の結合部位により捕捉されるからである。このように、最大シグナルは、分析対象物を包含することが知られていないサンプルに対して本発明の方法を実施することにより得られ得る。この最大シグナルは、分析対象物含量が未知のサンプルに対して同じ条件下（例えば、第一の結合部位、類縁体および第二の結合部位の濃度）で行った試験と、分析対象物が存在するかどうか、およびどの程度存在するかを決定するために、比較することができる。

30

## 【0013】

第一の結合部位は、分析対象物および類縁体のそれぞれに独立して結合することができるが、好ましくは、分析対象物および類縁体の両方と同時に結合しない。好ましくは、分析対象物に対する第一の結合部位の親和性は、類縁体に対する第一の結合部位の親和性と実質的に同じである。サンプルおよび類縁体を、第一の結合部位と同時に接触させ得る。この場合、分析対象物がサンプル中に存在するとき、第一の結合部位に対する結合への類縁体と分析対象物との直接的な競合がある。あるいは、サンプルを、第一の結合部位と接触させ、その後該サンプルまたは第一の結合部位を類縁体と接触させてもよい。この場合、分析対象物がサンプル中に存在するとき、それは、利用可能な第一の結合部位の一部に結合する。その後、類縁体は、分析対象物によって占有されていない第一の結合部位にのみ結合し得る（実際に、第一の結合部位は分析対象物によって占有されていない）。両態様において、分析対象物は、第一の結合部位への結合に類縁体と競合すると言われ、分析対象物 - 第一結合部位複合体は、サンプル中の分析対象物の濃度に比例する量で形成される。その結果、分析対象物がサンプル中に存在しないときよりも、少ない類縁体 - 第一結合部位複合体が形成される。分析対象物が非常に高濃度で存在する場合、それは、第一の結合部位に結合するのに類縁体より完全に競合優位であり、類縁体 - 第一の結合部位は形成されない。従って、混合物は、(i)類縁体 - 第一結合部位複合体および分析対象物 - 第一結合部位複合体、または(ii)分析対象物 - 第一結合部位複合体のみ、のいずれかを含んで形成される。

40

50

## 【0014】

該混合物を、第二の結合部位（表面上に固定化されていても、固定化されていなくてもよい）と接触させる。分析対象物がサンプル中に存在しない場合よりも混合物中に存在する類縁体 - 第一結合部位複合体が少ない（または、類縁体 - 第一結合部位複合体が全くない）ため、第二の結合部位によって捕捉される類縁体 - 第一結合部位複合体の量もまた、分析対象物がサンプル中に存在しない場合に捕捉される量よりも少ない。第二の結合部位は、分析対象物 - 第一結合部位複合体に結合しないため、この複合体は、第二の結合部位によって捕捉されない。第二の結合部位は分析対象物に対する結合親和性を有しない。このことは、第二の結合部位のみが類縁体に対する結合親和性を有するため、第二の結合部位の最大量を、類縁体 - 第一結合部位複合体を捕捉するために利用可能であることを意味する。

10

## 【0015】

第二の結合部位を該混合物と接触させた後、第二の結合部位に結合した類縁体 - 第一結合部位複合体の存在を示すシグナルレベルを、上記の通りに決定する。第二の結合部位は、それが類縁体 - 第一結合部位複合体に結合するとき表面上に固定化されていない場合、本方法は、好ましくは、シグナルレベルを決定する前に、第二の結合部位をそれが固定化される表面と接触させる工程を含む。

## 【0016】

分析対象物がサンプル中に存在するとき、形成され、かつ第二の結合部位によって捕捉される類縁体 - 第一結合部位複合体が少ないため、工程（c）で決定されたシグナルレベルは、サンプル中に分析対象物が存在しない時に決定されたシグナルレベルよりも低いであろう。言い換えると、検出されるシグナルは、サンプル中の分析対象物の濃度に反比例する。

20

## 【0017】

本発明の方法は、サンプル中に存在する分析対象物の量または濃度を決定するために使用することもできる。これを達成するために、工程（c）で決定されたシグナルレベルを、一般に、キャリブレーションデータと比較する。キャリブレーションデータは、対照（コントロール）を分析することにより得られ、そこでは、一連の既知の分析対象物濃度について得られるシグナルレベルが測定される。類縁体、第一の結合部位および第二の結合部位の濃度は、試験する各分析対象物濃度について一定に保たれるべきである。同様に、試験に用いたこれらの各々の濃度も、試験結果が比較されるべきキャリブレーションデータを作成するために使用される濃度と同じであるべきである。従って、本発明の方法は、工程（c）で決定されたシグナルレベルをキャリブレーションデータと比較することにより、サンプル中に存在する分析対象物の量または濃度を決定することを含み得る。

30

## 【0018】

検出されたシグナルレベルは、分析対象物の濃度に反比例するため、シグナルレベルが高いほど、サンプル中の分析対象物の濃度は低く、逆に、シグナルレベルが低いほど、サンプル中の分析対象物の濃度は高い。この反比例関係は、分析対象物が非常に低レベルで存在する場合に特に有用である。なぜなら、そのような状況において検出されるシグナルレベルが高いため、シグナルレベルが分析対象物の濃度に比例する（従って、分析対象物が低濃度で存在するとき、非常に低いシグナルが生成される）場合、常套のアッセイ法よりも検出が容易だからである。従って、本発明の方法は、低レベルの分析対象物に対して高感度であるという利点を有する。

40

## 【0019】

分析対象物は、本発明の第一の結合部位によって結合され得る任意の物質（entity）であり得る。例えば、分析対象物は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、ポリヌクレオチド、炭水化物、病原体、ホルモン、ビタミン、ステロイド、薬物（例えば、薬物濫用者または病院到着時死亡者の薬物）、感染性因子もしくは感染状態を示唆する物質、微生物、細菌、ウイルス、毒素、有機化合物、汚染物質、農薬、疾患バイオマーカー、妊娠のバイオマーカーまたは上記の何れかの代謝産物もしくはそれらに対する抗体であるか

50

、またはそれらを含んでいてよい。用語“分析対象物”にはまた、抗原性物質、ハプテン、抗体、巨大分子、およびそれらの組み合わせが含まれる。好ましくは、分析対象物は、抗体により認識されるエピトープを含む。一態様において、分析対象物は、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)またはそのフラグメントもしくは一部であり、無傷の二量体hCG、遊離サブユニット、遊離サブユニット、ならびに無傷の二量体hCG、遊離サブユニット、遊離サブユニットのクリップされた形態、切断された形態または短縮型形態(グリコシル化変異体を含む、特に遊離コアを含み得る)を含む。

#### 【0020】

ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)は、妊娠および腫瘍学において重要なバイオマーカーであり、通常、特定のイムノアッセイにより検出され、定量化されている。妊娠中に必須であり、受精から数日以内に検出可能なhCGは、最も高頻度にアッセイされるホルモンの一つとなっており、簡易な1工程の抗体ベースのhCG測定法は、現在、標準的な妊娠検査法である。さらに、悪性絨毛性疾患(絨毛癌)の診断および管理におけるhCGアッセイ法の役割は、腫瘍分野における重大なサクセスストーリーの一部である。それは、理想的な腫瘍マーカーであり、絨毛癌細胞が存在する場合に常に存在し、そしてその細胞数に量的に直接関連する。適切な治療との組み合わせでのhCGアッセイの正しい使用法は、この他の進行性の癌において生存率を100%に近づけている(Gregor, CR et al., J 2011, 'Antibody Recognition of a Human Chorionic Gonadotropin Epitope (hCG beta<sub>66-80</sub>) Depends on Local Structure Retained in the Free Peptide', Journal of Biological Chemistry, vol 286, no. 28, pp. 25016 - 25026)。

10

20

#### 【0021】

分析対象物の類縁体は、第一の結合部位が、好ましくは実質的に等しい親和性で、類縁体および分析対象物の両方に結合できるという点で、分析対象物に関係する。従って、類縁体および分析対象物は、構造、配列、化学的または免疫学的類似性を有してもよく、結合エピトープを含んでもよい。例えば、分析対象物がアミノ酸または核酸配列を含むとき、類縁体は、分析対象物の配列と配列同一性を有し得る。ある態様において、類縁体は、完全な分析対象物配列または分析対象物配列の一部の何れかと同一である配列を含む。他の態様において、類縁体は、完全な分析対象物配列または分析対象物配列の一部と、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一である配列を含む。類縁体配列の一部と同一である分析対象物配列の一部は、約5から約1000残基長であってよい。例えば、該部分は、約5から約10残基長、約10から約15残基長、約15から約20残基長、約20から約30残基長、約30から約50残基長、約50から約70残基長、約70から約100残基長、約100から約150残基長、約150から約250残基長、約250から約500残基長、約500から約750残基長、または約750から約1000残基長であってよい。

30

#### 【0022】

類縁体-第一結合部位複合体は、第二の結合部位によって結合され得る。好ましくは、類縁体自体は、第二の結合部位によって結合され得る。しかしながら、第二の結合部位は、類縁体および第一の結合部位の複合体にのみ結合することができる。これとは対照的に、第二の結合部位は、分析対象物-第一結合部位複合体には結合できない。従って、類縁体は、分析対象物中に存在しないか、または存在するが、第二の結合部位によって結合され得ない、第二の結合部位に対する結合領域を含んでいてよく、例えば、それは、第二の結合部位にアクセスできない分析対象物中の位置にある。そのような結合領域は、例えば、類縁体がアミノ酸配列または核酸配列のみで構成されるとき、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列を含んでいてよい。類縁体がアミノ酸配列を含むとき、第二の結合部位によって認識される結合領域は、類縁体のアミノ酸配列のN末端、C末端または任意の他の位置であってよい。類縁体が核酸配列を含むとき、第二の結合部位によって認識される結合領域は、類縁体の核酸配列の5'末端、3'末端または任意の他の位置であってよい。

40

#### 【0023】

50

類縁体がアミノ酸配列を含むとき、それは、好ましくは、第二の結合部位によって結合され得て、分析対象物中に存在しないか、または分析対象物中に存在するが、第二の結合部位にアクセスできない、アミノ酸配列(結合領域)を含むように組換え的に発現される。あるいは、類縁体は、標準的なペプチド合成技術を用いて合成することができる。第二の結合部位によって認識されるアミノ酸結合領域を含むように、類縁体を組換え的に発現するか、またはデノボで合成する利点は、これらの結合領域の1つのみを各類縁体分子に組み込むことができることである。第二の結合部位によって認識される結合領域が、類縁体が合成された後に該類縁体に付加されているとき、複数の結合領域が類縁体に組み込まれる可能性がある。類縁体における複数の結合領域の存在は、本発明の方法を破壊または阻害し得る。例えば、複数の結合領域は、第一の結合部位を結合するのに分析対象物と類縁体をとの競合を避けるか、または第一の結合部位と複合体を形成しているとき、第二の結合部位に類縁体が結合するのを阻止し得る。

10

## 【0024】

N末端配列またはC末端配列は、一般にタグと称されるタイプのものであってよい。非限定的な例としては、一般的に、親和性タグ、可溶性タグ、クロマトグラフィー用タグおよびエピトープタグが挙げられる。特定のタグの非限定例としては、FLAG-tag、MYC-tag、HA-tag、GST-tag、Strep-tagおよびポリヒスチジンタグが挙げられる。当業者は、多くの他の一般的なタグクラスおよび各クラスの具体的な例を知っているであろうし、それに応じて、適当な第二の結合部位を選択することができるだろう。ある態様において、結合領域は、抗原由来の既知のエピトープであるか、または合成されてよい。合成の場合は、分析対象物の観点から類縁体に特異的に設計され得る。既知の抗体または抗体フラグメントが特異的であるエピトープは、類縁体の一部を形成してよい。

20

## 【0025】

一態様において、分析対象物はhCGであり、類縁体は、配列番号1または配列番号2と75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む：

## 【化1】

配列番号1:

HHHHHHHNELSHFLEGSSSS KEPLRPRCRP INATLAVEKE GCPVCITVNT TICAGYCPTM  
TRVLQGVLPALPQVVCNYRDRD VRFESIRLPG CPRGVNPVVS YAVALSCQCA LCRRSTTDCG  
GPKDHPLTCD DPRFQDSSSS KAPPPSLPSP SRLPGPSDTP ILPQ

30

配列番号2:

NELSHFLEGS SSSKEPLRPR CRPINATLAV EKEGCPVCIT VNTTICAGYC PTMTRVLQGV  
LPALPQVVCNYRDVRFESIR LPGCPRGVNP VVSYAVALSC QCALCRRSTT DCGGPKDHPL  
TCDDPRFQDS SSSKAPPPSL PPSRLPGPS DTPILPQ

## 【0026】

両配列の下線部は、ユニークなエピトープ領域を示し、本明細書中“ST068”と記載する。該下線部には第二の結合部位が結合し、分析対象物、すなわちhCG中には存在しない。

40

## 【0027】

配列番号1および2の二重下線部、すなわち、配列：SIRLPGCPRGVN PVVSYAは、hCGに見いだされる3として公知の結合ドメインを示す。従って、類縁体は、配列番号1の二重下線部、すなわち配列番号1の残基85から102または配列番号2の二重下線部、すなわち配列番号2の残基78から95を含むかまたはそれから構成される配列を含み得る(および、第一の結合部位が結合し得る)。類縁体は、配列番号1の残基8から15または配列番号2の残基1から8、すなわち、配列：NELSHFLE(これは、TAGエピトープと称

50

され得る)を含むかまたはそれから構成される配列を含み得る(および、第一の結合部位が結合し得る)。類縁体は、配列：SIRLPGCPRGVNPVVSYAと少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有する配列を含み得る、および/または配列：NELSHFLEと少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有する配列を含み得る。類縁体は、ポリヒスチジンタグ、例えば配列番号1の残基1から7を含み得る。

#### 【0028】

他の態様において、特に、分析対象物がhCGであるとき、類縁体は、少なくとも157アミノ酸残基を含んでいてよく、少なくとも配列番号2のアミノ酸1から8および84から95を含み得る。あるいは、類縁体は、少なくとも164アミノ酸残基を含んでいてよく、少なくとも配列番号1のアミノ酸1から15および95から102を含み得る。一態様において、類縁体は、配列番号1と50%の配列同一性を有し、少なくとも配列番号1のアミノ酸1から15および71から83を含む。

10

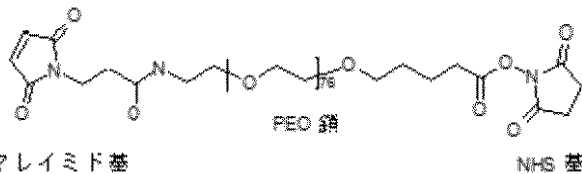
#### 【0029】

別の態様において、類縁体は、NELSHFLEX<sub>m</sub>SIRLPGZ<sub>n</sub>PVVSYA(配列番号3)(ここで、Xは、長さ“m”を有するリンカーであり、Zは、長さ“n”を有するリンカーである)を含む。XおよびZは、同一であってもよいし、異なってもよく、それぞれ独立して、例えば、アミノ酸配列、ポリエチレングリコール(PEG)、VA(下記の構造を参照)またはベータ-アラニンであってよい。

20

#### 【化2】

VA リンカー:



#### 【0030】

リンカーXの機能は、TAGエピトープとhCG配列との立体障害を低減することである。このためには、少なくとも1.5nm(15オングストローム)の距離がなければならない。これは、5アミノ酸残基または2個のAEEAcリンカー(PEGよりも短いリンカー)または適当なPEGリンカー(例えば、2つの繰り返し単位を有する)とほぼ等しい。

30

#### 【0031】

リンカーZの機能は、hCG-3の2つの隣接配列が第一の結合部位によって結合され得る立体配座エピトープにアライメントするように逆平行ターン構造を形成することである。この立体配座エピトープに対する第一の結合部位の親和性は、アッセイの観点において重要であり、リンカーの特性、例えばその長さおよびアミノ酸含有量を調整することにより最適化することができる。

#### 【0032】

Xおよび/またはZがアミノ酸配列であるとき、“m”および“n”は、それぞれ約3から約100残基長、約5から約90残基長、約10から約80残基長、または約20から約70残基長であり得る。例えば、“m”および/または“n”は、3、4または5残基長であってよい。“m”および/または“n”が3残基長である態様において、配列PPNを使用できる。本明細書で用いる用語“アミノ酸”には、天然アミノ酸、非天然アミノ酸およびアミノ酸誘導体、例えばAEEAcおよびアミノ-PEG-酸等を含む、アミノ基および刈るボン酸基を有する分子が含まれる。

40

#### 【0033】

必要とされる類縁体の量は、種々の因子によって変わる。一般に、類縁体は、低濃度の制限された濃度で提供される。これは、約4-8ピコグラム/mlであり得るが、必要と

50

される濃度は、バッチ毎に異なり、適当な濃度は、当業者によって決定され得る。

【0034】

(第一、第二および/または第三の)結合部分は、天然由来であるか、または完全もしくは部分的に合成することができる。結合部分およびその標的は共に結合パートナー対を形成する(類縁体および分析対象物は、第一の結合部位の標的であり、類縁体 - 第一結合部位複合体は、第二の結合部位の標的であり、そして第一の結合部位は、存在するとき、第三の結合部位の標的である)。該対メンバーは、互いに特異的に結合する特性を有する。特異的結合対型の例は、抗原 - 抗体、ビオチン - アビジン、ホルモン - ホルモン受容体、相補的ヌクレオチド配列、相補的ペプチド配列、受容体 - リガンド、酵素補因子 - 酵素、酵素阻害剤 - 酵素、酵素 - 基質、炭水化物 - レクチン、高分子酸 - 塩基、色素 - タンパク質結合物質、ペプチド - 特異的タンパク質結合物質(例えば、リボヌクレアーゼ、S - ペプチドおよびリボヌクレアーゼ S - タンパク質)などが挙げられる。本発明は、概して、抗原 - 抗体型反応と関係しており、本発明の好ましい結合部位は、抗体またはそのフラグメントであるが、結合部分と結合対の他のタイプを採用する他の態様もまた、考慮される。

10

【0035】

本明細書で用いる用語“抗体”は、天然か、または部分的もしくは完全に合成された、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を意味する。該用語はまた、抗体結合ドメインであるか、またはそれに相同である、結合ドメインを有する任意のポリペプチドまたはタンパク質を包含する。これらは、天然源に由来し得るか、または部分的もしくは完全に合成的に製造されてよい。抗体の例は、免疫グロブリンアイソタイプ(例えば、I g G、I g E、I g M、I g DおよびI g A)ならびにそれらのアイソタイプサブクラス; F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、s c F v、F v、d A b、F d等の抗原結合ドメインを含むフラグメント; ならびに、二重特異性抗体である。抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであってよい。モノクローナル抗体は、本明細書中、“mab”と称する。

20

【0036】

モノクローナル抗体および他の抗体を用いること、ならびに元の抗体の特異性を保持する他の抗体またはキメラ分子を産生するための組み換えDNA技術を用いることができる。かかる技術は、異なる免疫グロブリンの定常領域または定常領域 + フレームワーク領域に対する抗体の、免疫グロブリン可変領域または相補性決定領域(CDR)をコードするDNAを組み込むことを含み得る。例えば、E P - A - 1 8 4 1 8 7、G B 2 1 8 8 6 3 8 AまたはE P - A - 2 3 9 4 0 0を参照のこと。

30

【0037】

抗体は多くの方法で作製され、または改変され得るように、抗体という用語には、必要とされる特異性を有する結合ドメインを有する特異的結合メンバーまたは物質が包含されると解釈されるべきである。従って、この用語は、天然のまたは完全もしくは部分的に合成した、免疫グロブリン結合ドメインを含む任意のポリペプチドを含む、抗体フラグメント、誘導體、機能的等価物および抗体ホモログ、ヒト化抗体を包含する。従って、別のポリペプチドに融合した、免疫グロブリン結合ドメインまたは等価物を含むキメラ分子も包含される。キメラ抗体のクローニングおよび発現は、E P - A - 0 1 2 0 6 9 4およびE P - A - 0 1 2 5 0 2 3に記載されている。ヒト化抗体は、非ヒトの、例えばマウスの可変領域およびヒト抗体の定常領域を有する修飾抗体であり得る。ヒト化抗体の作製方法は、例えば、米国特許第5 2 2 5 5 3 9に記載されている。

40

【0038】

完全抗体のフラグメントは、結合抗原の機能を果たし得ることが示されている。結合フラグメントの例は、( i ) V L、V H、C LおよびC H 1ドメインからなるF a bフラグメント; ( i i ) V HおよびC H 1ドメインからなるF dフラグメント; ( i i i ) 単一抗体のV LおよびV HからなるF vフラグメント; ( i v ) V Hドメインからなるd A bフラグメント(Ward, E.S. et al., Nature 341:544 - 546 (1989)); ( v ) 単離された

50

C D R 領域 ; ( v i ) F ( a b ' ) 2 フラグメント、 2 つの連結された F a b フラグメントを含む二価のフラグメント ; ( v i i ) 一本鎖 F v 分子 ( s c F v )、ここで、V H ドメインおよび V L ドメインは、 2 つのドメインを結合させて、抗原結合部位を形成するのを可能とするペプチドリンカーによって連結されている (Bird et al., Science 242:423 - 426 (1988); Huston et al., PNAS USA 85:5879 - 5883 (1988)) ; ( v i i i ) 二重特異性一本鎖 F v 二量体 ( P C T / U S 9 2 / 0 9 9 6 5 )、ならびに ( i x ) “ 二重特異性抗体 ”、遺伝子融合により構築される多価または多重特異性フラグメント (W094 / 13804 ; P. Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448 (1993)) である。

#### 【 0 0 3 9 】

二重特異性抗体は、ポリペプチドの多量体であり、各ポリペプチドは、免疫グロブリン軽鎖の結合領域を含む第一ドメインおよび免疫グロブリン重鎖の結合領域を含む第二ドメインを含み、該 2 つのドメインは、(例えば、ペプチド リンカーにより)結合しているが、互いに結合できず、抗原結合部位を形成している。抗原結合部位は、多量体内のあるポリペプチドの第一ドメインと多量体内の別のポリペプチドの第二ドメインとの連結により形成される (W094 / 13804)。

10

#### 【 0 0 4 0 】

二重特異性抗体が使用されるとき、これらは、種々の方法、例えば、化学的な製造法またはハイブリッドからの製造法で製造可能な従来の二重特異性抗体であってよいか (Hollinger & Winter, Current Opinion Biotechnol. 4:446 - 449 (1993))、または上記の二重特異性抗体フラグメントのいずれかであってよい。完全抗体よりも、s c F v 二量体または二重特異性抗体を用いることが好ましい。二重特異性抗体および s c F v は、F c 領域を含まず、可変ドメインのみを用いて構築することができ、抗イディオタイプ反応の効果を減少させる可能性がある。二重特異性抗体の他の形態は、一本鎖を含む (Traunecker et al., “Janusins”, EMBO Journal 10:3655 - 3659 (1991))。

20

#### 【 0 0 4 1 】

二重特異性完全抗体とは対照的に、二重特異性抗体は、それらを容易に構築し、大腸菌中で発現させることができるため有用であり得る。適当な結合特異性を有する二重特異性抗体(および、抗体フラグメントなどの多くの他のポリペプチド)は、容易にライブラリーからファージディスプレイ (W094 / 13804) を用いて容易に選択することができる。二重特異性抗体の一方のアームが一定に維持される、例えば、抗原 X に対する特異性を有する場合、ライブラリーは、他方のアームを変化させ、かつ選択した適当な特異性を有する抗体で作成することができる。

30

#### 【 0 0 4 2 】

“抗原結合ドメイン”は、抗原の一部または全てに特異的に結合する領域を含む抗体の一部である。抗原が大きいとき、抗体は該抗原の特定の部分に結合することができ、該部分をエピトープと言う。抗原結合ドメインは、1つまたはそれ以上の抗体可変ドメインにより提供され得る。抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域 (VL) および抗体重鎖可変領域 (VH) を含み得る。

#### 【 0 0 4 3 】

“特異的”とは、一般的に、結合部分がその標的以外の分子への有意な結合を示さないであろう状況を意味するために用いられ、例えば、他の分子との交差反応性が約 30% 未満、好ましくは 20%、10%、1%、0.5%、0.3%、0.2% または 0.1% であることを意味する。該用語はまた、例えば、抗原結合ドメインが、多数の抗原により担持される特定のエピトープに対して特異的である場合に適用可能であり、この場合、抗原結合ドメインを担持する結合部分は、エピトープを担持する種々の抗原に結合することができる。

40

#### 【 0 0 4 4 】

第一、第二および第三の結合部分は、必ずしも、同じタイプの結合部分である必要はないが、ある態様において、同じであってもよい。

#### 【 0 0 4 5 】

50

第一の結合部位は、hCG 3ループ - 特異的モノクローナル抗体であってよく、例えば、抗体“8G5”である(Gregor et al., J Biol Chem. 2011 Jul 15;286(28):25016 - 26を参照のこと)。第一の結合部位は、約1 ng / mlの濃度で使用可能であり、抗体 - HRP複合体であってよい。

【0046】

第二の結合部位は、マイクロタイタープレート、ニトロセルロースマトリックス、ガラス繊維マトリックス、粒子、膜、ペグ、スライド、吸水性膜、マイクロ流体デバイスの表面、クロマトグラフィー材料を含む群から選択される表面上に固定化されまたは固定化可能であり得る。例えば、粒子は、磁性粒子、ラテックス粒子、ガラス粒子、磁気感受性粒子、またはコロイド状金属粒子であってよい。

10

【0047】

上記の通り、シグナルは、好ましくは、第一の結合部位に直接的または間接的に連結された、または結合された標識から(直接的または間接的に)誘導される。“標識”は、視覚的手段または機器測定手段により検出可能なシグナルを生じ得る任意の物質を意味する。本発明において有用な種々の標識には、例えば光学的に検出可能であるように、化学的または物理的手段の何れかによりシグナルを生じる標識が含まれる。かかる標識には、酵素と基質、色素原、触媒、蛍光化合物、化学発光化合物、電気活性種、色素分子、放射性標識および粒子標識が含まれる。第一の結合部位自体が、本質的に検出可能なシグナルを生じることにも可能である。標識は、共有結合により第一の結合部位に結合することができる。具体的には、標識は、光学的に検出可能なものから選択することができる。標識が酵素を含むとき、本方法は、シグナルを生成するために酵素と基質を接触させる工程を含み得る。一態様において、標識は、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)である。

20

【0048】

標識には、金、銀などの粒子、セレンもしくはテルルなどのコロイド状非金属粒子、色素を組み込んだポリマー粒子のような染色もしくは着色粒子、または染色ゾルが含まれ得る。色素は、例えば青色などの好適な色であってよい。色素は、蛍光色素であってよい。染色ゾルは、Foron Blue SRP (Sandoz)およびResolin Blue BBL5 (Bayer)などの市販の疎水性染料から調製することができる。好適なポリマーラベルは、ポリスチレン、ポリビニルトルエン、ポリスチレン - アクリル酸およびポリアクロレインなどの合成ポリマーの範囲から選択することができる。使用されるモノマーは、通常、水に不溶性であり、モノマーミセルが形成されるように水性界面活性剤中に乳化され、その後、エマルジョンにイニシエーターを添加することにより重合化が誘導される。実質的に球状のポリマー粒子が製造される。かかるポリマー粒子の理想的なサイズ範囲は、約0.05から約0.5 μmである。例示的態様によれば、標識は、青色のポリマー粒子または金粒子である。

30

【0049】

上記の通り、第二の結合部位は表面上に固定化されてもよいが、該方法の初めから固定化されなくてもよい。後者の場合、第二の結合部位は、それが表面と接触し、固定化される前または後に、類縁体 - 第一結合部位複合体を接触させることができる。

【0050】

液体サンプルは、産業的、環境的、農業上、または生物学的供給源などの供給源に由来し得る。サンプルは、血液、血清、血漿、間質液、唾液、痰、接眼レンズ液、汗、尿、乳汁、腹水液、粘膜、滑膜液、腹膜液、経皮滲出液、咽頭滲出液、気管支肺胞洗浄液、気管内吸引液(tracheal aspiration)、脳脊髄液、精液、子宮頸管粘液、膣もしくは尿道分泌物または羊水を含む生理的供給源に由来するかまたはそれから構成され得る。液体サンプルは、水性液体中への希釈、処理または抽出により半固体または固体源に由来し得る。

40

【0051】

特定の状況下では、サンプルは、非常に高濃度の分析対象物を含むことが予想され得る。これは、例えば、サンプルが進行した病態を有する対象から得られた場合でもよい。そのような状況下では、サンプルは、アッセイに適する範囲内に分析対象物濃度をもたらすために、第一の結合部位および類縁体と接触させる前に希釈されてもよい。

50

## 【0052】

第二の面において、本発明は、目的の分析対象物を検出するためのテストキットを提供する。本発明は、i) 分析対象物類縁体；

ii) (a) 標識された第一の結合部位、または (b) 標識されていない第一の結合部位および標識された第三の結合部位のいずれか；および

iii) 固定化可能な第二の結合部位

を含む、目的の分析対象物を検出するためのテストキットであって、

ここで、第一の結合部位が、類縁体および目的の分析対象物のそれぞれに独立して結合可能であり、第二の結合部位が、類縁体および第一の結合部位の複合体に結合できるが、分析対象物または第一の結合部位および分析対象物の複合体に結合できず、そして第三の結合部位が、第一の結合部位または類縁体 - 第一結合部位複合体に結合可能である、目的の分析対象物を検出するためのテストキットを提供する。

10

## 【0053】

第一の結合部位は、類縁体と分析対象物の両方に同時に結合可能であってよい。

## 【0054】

本発明は、i) 分析対象物類縁体；

ii) (a) 標識された第一の結合部位、または (b) 標識されていない第一の結合部位および標識された第三の結合部位のいずれか；および

iii) 固定化可能な第二の結合部位

を含む、目的の分析対象物を検出するためのテストキットであって、

ここで、第一の結合部位が、類縁体および目的の分析対象物のそれぞれに独立して結合できるが、類縁体および分析対象物の両方に同時には結合できず、第二の結合部位が、類縁体および第一の結合部位の複合体に結合できるが、分析対象物または第一の結合部位および分析対象物の複合体に結合できず、そして第三の結合部位が、第一の結合部位または類縁体 - 第一結合部位複合体に結合可能である、目的の分析対象物の検出のためのテストキットをさらに提供する。

20

## 【0055】

分析対象物、類縁体、ならびに第一、第二および第三の結合部位は、本発明の第一の面で定義される通りであり得る。

## 【0056】

第三の面において、本発明は、配列番号1または配列番号2の配列またはと75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれから構成されるポリペプチド、またはアミノ酸配列NELSHFLEX<sub>m</sub>SIRLPGZ<sub>n</sub>PVVSYA(配列番号3)(ここで、XおよびZは、それぞれ長さ“m”および“n”を有するリンカーであり、X、Z、“m”および“n”は本発明の第一の面で定義の通りである)を含むかまたはそれから構成されるポリペプチドを提供する。

30

## 【0057】

該ポリペプチドは、配列：SIRLPGCPRGVNPVVSYAと少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有する配列を含んでいてよく、および/または配列：NELSHFLEと少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有する配列を含んでいてよい。該ポリペプチドは、少なくとも164アミノ酸残基を含んでいてよく、少なくとも配列番号1のアミノ酸1から15および95から102を含み得る。該ポリペプチドは、少なくとも157アミノ酸残基を含んでいてよく、少なくとも配列番号2のアミノ酸1から8および84から95を含み得る。一態様において、該ポリペプチドは、配列番号1と50%の配列同一性を有し、少なくとも配列番号1のアミノ酸1から15および71から83を含む。

40

## 【0058】

本発明のポリペプチドは、単離された形態または組み換え形態で提供されてよく、他の

50

分子と融合されていてよい。該ポリペプチドは、実質的に純粋な形態で提供されてよく、すなわち、他のタンパク質を実質的な程度まで含まないことを意味する。従って、ポリペプチドは、それが主成分として存在する組成物として提供され得る(すなわち、溶媒または担体を除く重量/重量ベースで測定されるとき、少なくとも50%のレベル、好ましくは少なくとも75%のレベル、少なくとも90%のレベル、または少なくとも95%のレベルで存在する。)

【0059】

本発明の第四の面は、第三の面のポリペプチドをコードする核酸を提供する。

【0060】

核酸分子に関して本明細書で使用されている、単離または組換えとは、a)例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によりインピットで増幅すること、b)クローニングにより組換え的に製造すること、c)例えば、ゲル分離により精製すること、d)化学合成などによって合成すること、のいずれかを意味する。

10

【0061】

核酸、例えばDNAおよびRNAは、当技術分野で公知の方法、例えば常套の化学的方法またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅または他の増幅法を用いて合成され得る。

【0062】

第五の面において、本発明は、第三の面に記載のポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。

【0063】

種々の宿主発現ベクターシステムが、本発明のポリペプチドを発現するために利用可能である。かかる宿主発現システムとは、目的のコード配列が産生され、その後精製され得るビヒクルを意味するが、適当なヌクレオチドコード配列で形質導入またはトランスフェクトされたとき、インサイチュウで本発明のポリペプチドを発現し得る細胞もまた意味する。これらには、微生物、例えばポリペプチドコード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、大腸菌、枯草菌);ポリペプチドコード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、出芽酵母、ピキア酵母);ポリペプチドコード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)で感染させた昆虫細胞系;ポリペプチドコード配列を含む、組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV;タバコモザイクウイルス、TMV)で感染させたか、または組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系;または、哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)または哺乳動物ウイルス由来のプロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター;ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)を含む組換え発現構築物を有する哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3細胞)が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0064】

細菌システムにおいて、多数の発現ベクターを、発現されるポリペプチドについて意図される使用に応じて有利に選択することができる。例えば、そのようなポリペプチドを大量に製造する場合、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を導くベクターが望ましい。かかるベクターには、大腸菌発現ベクター-pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791); pINベクター(Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101 - 3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503 - 5509)などが含まれるが、これに限定されない。pGEXベクターもまた、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合たんぱく質として外来ポリペプチドを発現するために使用可能である。一般的に、かかる融合タンパク質は可溶性であり、吸着させ、グルタチオン-アガロースビーズを含むマトリックスに結合させ、次いで、遊離グルタチオンの存在下で溶出させて、容易に溶解細胞から精製することができる。pGEXベクターは、クローニングされた標的遺伝子産物がGST部位から放出され得るように、トロンピンまたはXa因子プロテアーゼ切断

40

50

部位を含むように設計されている。

【0065】

昆虫系において、オートグラフィア・カリフォルニカ核多角体病ウイルス(AcNPV)を、外来遺伝子を発現するためのベクターとして使用する。該ウイルスは、ヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞中で増殖する。ポリペプチドコード配列は、ウイルスの非必須領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)に個々にクローニングし、AcNPVプロモーター(例えば、ポリヘドリンプロモーター)の制御下に置くことができる。哺乳動物宿主細胞において、多数のウイルススペースの発現系(例えば、アデノウイルス発現系)を利用することができる。

【0066】

上記の通り、挿入配列の発現を調節する、または変更する、所望の特定の様式で遺伝子産物进行处理する宿主細胞株が選択され得る。タンパク質産物のそのような修飾(例えば、グリコシル化)およびプロセッシング(例えば、切断)は、タンパク質の機能にとって重要である。

【0067】

本発明のポリペプチドの長期間の高収率産生には、安定な発現が好ましい。例えば、該ポリペプチドを安定に発現する細胞株は、ポリペプチドのヌクレオチド配列および選択可能な(例えば、ネオマイシンまたはハイグロマイシン)のヌクレオチド配列を含む発現ベクターで細胞をトランスフェクトし、選択可能なマーカーの発現について選択することにより製造可能である。そのように操作された細胞株は、ポリペプチドと直接的または間接的に相互作用する化合物のスクリーニングおよび評価において特に有用であり得る。

【0068】

本発明のポリペプチドの発現レベルは、ベクター増幅によって増加させることができる(総説、Bebington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)を参照のこと)。ポリペプチドを発現するベクター系におけるマーカーが増幅可能な場合、宿主細胞の培養物中に存在する阻害剤のレベルの増加は、マーカー遺伝子のコピー数を増加させる。増幅された領域は、ポリペプチド遺伝子と関連しているので、ポリペプチドの産生も増加する(Crouse et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257)。

【0069】

一旦、本発明のポリペプチドを組換え的に発現させると、それは、ポリペプチドの精製のために当技術分野で公知の何れかの方法、例えばクロマトグラフィー(例えば、イオン交換クロマトグラフィー、タンパク質A、ポリヒスチジンまたは特異的抗原などの親和性クロマトグラフィー、およびサイズ排除カラムクロマトグラフィー)、遠心、示差溶解度により、またはタンパク質の精製のための他の標準的技術によって精製することができる。

【0070】

あるいは、任意の融合タンパク質を、発現される融合タンパク質に特異的な抗体を利用することにより容易に精製することができる。例えば、Janknechtらによって記載されたシステムは、ヒト細胞株において発現される変性していない融合タンパク質の容易な精製を可能にする(Janknecht et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972 - 897)。このシステムにおいて、目的の遺伝子は、該遺伝子のオープンリーディングフレームが6個のヒスチジン残基からなるアミノ末端タグに翻訳可能に融合されるように、ワクシニア組換えプラスミド中にサブクローニングされる。タグは、融合タンパク質のマトリックス結合ドメインとして機能する。組換えワクシニアウイルスで感染させた細胞からの抽出物を、Ni<sup>2+</sup> ニトリロ酢酸 - アガロースカラム上にローディングし、ヒスチジンタグ付きタンパク質が、イミダゾール含有緩衝液を用いて選択的に溶出される。

【0071】

本発明の一態様において、第一の反応段階において、標識された抗体を、類縁体 - 標識

10

20

30

40

50

された抗体複合体を形成するために、限界量 (limiting quantity) の意図された標的分子 (分析対象物) の修飾された形態 (“ タグ付けされた標的 ” または “ 類縁体 ” ) の存在下でインキュベートする。少量の類縁体を混合物に適用し、類縁体がサンプル中に存在する天然の分析対象物と抗体への結合について競合するのを避ける。従って、アッセイの構成により、調査中のサンプル中に存在する分析対象物の量が多いほど、より少量の類縁体が、第一の結合によって捕捉され得る。従って、アッセイとしては、標識された抗体由来の検出可能なシグナルが、サンプル中に存在する目的の分析対象物の濃度に反比例するため、負のリードイムノアッセイが考慮される。

【 0 0 7 2 】

第二段階において、類縁体 - 標識された抗体複合体は、反応チャンバー内の類縁体分子に固有のタグに特異的な捕捉種をその上に固定化した固相に適用される。固相は、溶液中に存在する類縁体 - 標識された抗体複合体の効率的な捕捉を確実にするために、過剰量の捕捉分子がロードされている。固相捕捉分子上の類縁体 - 標識された抗体複合体の捕捉後、結合していない標識された抗体 (すなわち、標的対象物と複合体形成しているもの) を洗浄工程により反応チャンバーから取り除き、固相上に捕捉されている類縁体 - 標識された抗体複合体のみを残す。その後、標識の存在を、使用されている標識に応じて、適当な方法を用いて定量する。

10

【 0 0 7 3 】

抗体上の標識は、酵素、フルオロフォア、放射性核種、コロイド状ゾル、発色団、発光性化合物から選択され得る。選択された酵素に応じて、酵素の反応生成物は、光学的に (吸光度または蛍光または視覚的) または電気化学的に決定され得る。

20

【 0 0 7 4 】

本発明はまた、以下を提供する：

- 1 . 配列番号 1 の配列と少なくとも 5 0 % の同一性を有する組換えペプチド。
- 2 . 配列番号 1 の配列と少なくとも 7 5 % の同一性を有する組換えペプチド。
- 3 . 配列番号 2 の配列と少なくとも 5 0 % の同一性を有する組換えペプチド。
- 4 . 配列番号 2 の配列と少なくとも 7 5 % の同一性を有する組換えペプチド。
- 5 . 少なくとも配列番号 2 のアミノ酸 1 から 8 および 8 4 から 9 5 からなる、少なくとも 1 5 7 アミノ酸を含む組換えペプチド。
- 6 . 少なくとも配列番号 1 のアミノ酸 1 から 1 5 および 9 5 から 1 0 2 からなる、少なくとも 1 6 4 アミノ酸を含む組換えペプチド。
- 7 . 配列番号 3 の配列を含む組換えペプチド (ここで、X および Z は、それぞれリンカーを表す)。
- 8 . イムノアッセイの製造における、配列番号 1 のペプチドの使用であって、  
アミノ酸 9 5 から 1 0 2 を含む領域に結合特異性を有する第一の抗体；  
アミノ酸 8 から 1 5 を含む領域に結合特異性を有する第二の抗体；  
(ここで、第二の抗体は、固相上に固定化され、第一の抗体は、検出可能な標識に結合されている)  
を含む、使用。

30

【 0 0 7 5 】

- 9 . 検出可能な標識が、酵素、フルオロフォア、放射性核種、コロイド状ゾル、発色団、発光化合物を含む群から選択される、項 8 に記載のイムノアッセイ。
- 1 0 . 第二の抗体が、マイクロタイタープレート、磁性粒子、膜、ペグ、ラテックス粒子、スライド、吸水性膜、マイクロ流体装置の表面、クロマトグラフィー材料を含む群から選択される固相に固定化される、項 8 に記載のイムノアッセイ。
- 1 1 . 目的の標的を含むと予想されるサンプルと第一の標識抗体および配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 のいずれか 1 つの組換えペプチドとを接触させ、第一の標識抗体の標的への結合について競合的イムノアッセイを開始して、第一の抗体 - 組換えペプチド複合体を形成させ；

40

第一の標識抗体 - 標的複合体を第二の抗体に適用して、第二の抗体 - 第一の標識抗体 -

50

組換えペプチド複合体を形成させ；

結合していない第一の抗体を、第二の抗体 - 第一の抗体 - 組換えペプチド複合体混合物から分離し；そして、

第二の抗体によって捕捉された組換えペプチドに対する第一の標識抗体の存在を検出する

ことを含む、イムノアッセイを行う方法。

12．第一の標識抗体 - 標的複合体を形成する工程がバルク溶液中で起こる、項11に記載の方法。

13．第二の抗体 - 第一の標識抗体組換えペプチド複合体を形成する工程が、表面で起こり、第二の抗体が表面上に固定化されている、項11に記載の方法。

14．検出可能な標識が、酵素、フルオロフォア、放射性核種、コロイド状ゾル、発色団、発光化合物を含む群から選択される、項11に記載の方法。

15．第二の抗体が、粒子、膜、マイクロタイタープレート、スライド、ニトロセルロースマトリックス、ガラス繊維マトリックスの表面上に固定化される、項13に記載の方法。

。

16．粒子が、磁気感受性粒子、コロイド金属粒子、ラテックス粒子またはガラス粒子である、項15に記載の方法。

17．結合していない第一の標識抗体を第二の抗体 - 第一の標識抗体 - 標的複合体から分離する工程が、緩衝液での洗浄、空気での洗浄、磁石、濾過またはイムノクロマトグラフィーを用いる、複合体からの溶液の除去を含む、項11に記載の方法。

18．配列番号1の配列と少なくとも50%の相同性を有し、少なくとも配列番号1のアミノ酸1から15および71から83からなる、組換えペプチド。

【0076】

本発明は、以下の番号を付した項でさらに定義され得る：

1．液体サンプル中に存在する分析対象物の存在を決定する方法であって、

a) 該液体サンプルを、既定量の分析対象物の類縁体および過剰量の第一の結合部位と接触させること、ここで、第一の結合部位は、混合物が、類縁体 - 第一結合部位複合体を含んで形成されるか、または分析対象物がサンプル中に存在するとき、(i) 類縁体 - 第一結合部位複合体および分析対象物 - 第一結合部位複合体、または(ii) 分析対象物 - 第一結合部位複合体を含み、かつ類縁体 - 第一結合部位複合体を含まないで形成されるように、分析対象物および類縁体のそれぞれに独立して結合可能であり；

b) 該混合物を第二の結合部位と接触させること、ここで、第二の結合部位は、類縁体 - 第一結合部位複合体に結合できるが、分析対象物 - 第一結合部位複合体には結合できず、そして固相に固定化されているか、または固定化可能であり；

c) 第二の結合部分に結合した類縁体 - 第一結合部位複合体の存在を示すシグナルレベルを決定すること；

ここで、工程c)で決定されたシグナルレベルが、分析対象物が存在しないときに決定された最大シグナルレベルより低いとき、分析対象物がサンプル中に存在する、を含む、方法。

2．サンプルを、類縁体と接触させる前に、第一の結合部位と接触させる、項1に記載の方法。

3．工程c)で決定されたシグナルレベルをキャリブレーションデータと比較することにより、サンプル中に存在する分析対象物の量または濃度を決定する工程をさらに含む、項1または2に記載の方法。

4．分析対象物がhCGまたはそのフラグメントもしくは一部である、項1から3のいずれかに記載の方法。

5．シグナルが第一の結合部位に直接的または間接的に結合されている標識に由来する、項1から4のいずれかに記載の方法。

6．標識が、酵素、フルオロフォア、放射性核種、コロイド状ゾル、発色団および発光化合物からなる群より選択される、項5に記載の方法。

10

20

30

40

50

7. 分析対象物がアミノ酸配列を含み、類縁体が、分析対象物の完全な配列または分析対象物の一部の配列のいずれかと同一のアミノ酸配列を含む、項1から6のいずれかに記載の方法。

8. 類縁体が、分析対象物中に存在していない結合領域を含む、項1から7のいずれかに記載の方法。

9. 類縁体がアミノ酸配列を含み、組換え的に発現される、項1から8のいずれかに記載の方法。

【0077】

10. 類縁体が、アミノ酸配列 N E L S H F L E X<sub>m</sub> S I R L P G Z<sub>n</sub> P V V S Y A (配列番号3) (ここで、XおよびZは、それぞれ長さ“m”および“n”を有するリンカーである)を含む、項1から9のいずれかに記載の方法。 10

11. 類縁体が、(i)少なくとも164アミノ酸を含み、少なくとも配列番号1のアミノ酸1から15および95から102を含むか、または(ii)少なくとも157アミノ酸を含み、少なくとも配列番号2のアミノ酸1から8および84から95を含む、項1から10のいずれかに記載の方法。

12. 類縁体が、配列番号1の残基8から15および/または配列番号1の残基85から102を含む、項1から11のいずれかに記載の方法。

13. 類縁体が、配列番号1、または配列番号2の配列と、90%、95%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、項1から12のいずれかに記載の方法。

14. 第一の結合部位および/または第二の結合部位が抗体である、項1から13のいずれかに記載の方法。 20

15. 第一の結合部位が、hCG 3-ループ-特異的モノクローナル抗体である、項1から14のいずれかに記載の方法。

16. サンプルが、血液、血清、血漿、間質液、唾液、痰、接眼レンズ液、汗、尿、乳汁、腹水液、粘液、滑膜液、腹膜液、経皮滲出液、咽頭滲出液、気管支肺胞洗浄液、気管内吸引液(tracheal aspiration)、脳脊髄液、精液、子宮頸管粘液、膣もしくは尿道分泌物または羊水を含む生理的供給源に由来するかまたはそれから構成される、項1から15のいずれかに記載の方法。

17. i) 分析対象物類縁体；

ii) (a) 標識された第一の結合部位、または(b) 標識されていない第一の結合部位および標識された第三の結合部位のいずれか；および 30

iii) 固定化可能な第二の結合部位

を含む、目的の分析対象物を検出するためのテストキットであって、

ここで、第一の結合部位が、類縁体および目的の分析対象物のそれぞれに独立して結合可能であり、第二の結合部位が、類縁体および第一の結合部位の複合体に結合できるが、分析対象物または第一の結合部位および分析対象物の複合体に結合できず、そして第三の結合部位が、第一の結合部位または類縁体-第一結合部位複合体に結合可能である、テストキット。

18. 配列番号1または配列番号2の配列に75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、もしくはそれからなるポリペプチド、または配列 N E L S H F L E X<sub>m</sub> S I R L P G Z<sub>n</sub> P V V S Y A (配列番号3) (ここで、XおよびZは、それぞれ長さ“m”および“n”を有するリンカーである)を含むか、もしくはそれからなるポリペプチド。 40

19. 項18に記載のポリペプチドをコードする核酸。

20. 項19に記載の核酸を含む発現ベクター。

【0078】

本発明のそれぞれの面の好ましい特徴は、必要な変更を加えた他の面のそれぞれの場合と同様である。本明細書に記載の先行技術文献は、法律で認められる最大限の範囲に包含させる。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 9 】

【図 1】図 1 は、本発明の態様によるハイブリッド競合イムノアッセイの概略的説明を示し、標的分析対象物とサンプル中に存在するまたは存在する可能性のある別の種との間で生じる可能性のある交差反応を示す。標的分析対象物が hCG である例示的態様において、交差反応種は LH である。

【図 2】図 2 は、阻害曲線を示し、hCG アッセイのために選択されたモノクローナル抗体である、保存的 3-hCG ループ領域に対して作製された moc1 が、LH と交差反応する程度を示している。データは、LH との交差反応性は、抗体の 50% を飽和するのに必要なリガンドの量に基づいて、hCG と比較して 0.27% であることを示す。

【図 3】図 3 は、hCG への結合について、モノクローナル抗体である moc1 の特異性を示す、さらに特徴付けるデータを提供する。グラフは、y 軸に、タグ付けされた hCG を結合している <sup>125</sup>I 放射性標識した moc1 によるカウント数を示し、x 軸に、1000 倍から 512000 倍の希釈レベルを示す。データは、hCG と hCG または LH のいずれかとを区別するための moc1 抗体の能力を実証する一連の曲線を示す。緩衝液対照、569 遊離 および LH はすべて、同様のプロファイルを示し、低希釈で高カウントであり、サンプルが希釈されるにつれて低下した。しかしながら、抗体およびタグ付けされた hCG を、遊離 hCG、“ニックの入った” hCG、無傷の hCG、“ニックの入った” hCG または“コア” hCG (標識されていない標的) のいずれかと共にインキュベートしたとき、シグナルは、低希釈であっても顕著に低下し、これは、標識されていない標的が、抗体への結合に関してタグ付けされた hCG との競合に打ち勝ったためである。

【図 4】図 4 は、組換え moc1 Fab<sub>1</sub> (単量体) および Fab<sub>2</sub> (二量体) の比較を示す。

【図 5】図 5 は、低から高濃度の hCG を含むサンプルベースの血清 TAG アッセイと RIA アッセイとの比較を示す。x 軸は、TAG アッセイにより測定された hCG 濃度 (IU/L) を示す。y 軸は、RIA アッセイにより測定された hCG 濃度 (IU/L) を示す。

【図 6】図 6 は、低から高濃度の hCG を含むサンプルベースの血清 TAG アッセイと Immulite アッセイとの比較を示す。x 軸は、TAG アッセイにより測定された hCG 濃度 (IU/L) を示す。y 軸は、Immulite アッセイにより測定された hCG 濃度 (IU/L) を示す。

【図 7】図 7 は、中から高濃度の hCG を含むサンプルベースの血清 TAG アッセイと RIA アッセイとの比較を示す。x 軸は、TAG アッセイにより測定された hCG 濃度 (IU/L) を示す。y 軸は、RIA アッセイにより測定された hCG 濃度 (IU/L) を示す。

【図 8】図 8 は、中から高濃度の hCG を含むサンプルベースの血清 TAG アッセイと Immulite アッセイとの比較を示す。x 軸は、Immulite アッセイにより測定された hCG 濃度 (IU/L) を示す。y 軸は、TAG アッセイにより測定された hCG 濃度 (IU/L) を示す。

## 【実施例】

## 【 0 0 8 0 】

実施例 1 血清 TAG アッセイのプロトコール

## 試薬

標準希釈剤	- Serasub (SS)	40
サンプルプレ希釈剤	- ヒツジ正常血清 (NSS)	
moc1	- 4ml 3% BSA / 1% NSS / PBS 中、10ul ストック溶液 (1:1000)	
TAG	- 4ml 3% BSA / 1% NSS / PBS 中、10ul ストック溶液 (1:1000)	
マイクロタイタープレート	- 抗TAGで予めコーティング。	

## サンプル調製

0 - 100 IU/L	- SS で 1:2 希釈。
100 - 1000	- NSS で 1:5 希釈し、その後、要すればさらに SS で希釈。
> 1000	- NSS で 1:50 希釈し、要すればさらに、SS で希釈。

## 【 0 0 8 1 】

10

20

30

40

50

## アッセイ

- ・ 50、25、12.5、6.25、3.125および1.56 IU/Lの基準を生成するために、SSで6回、段階希釈トップのhCG標準(100 IU/L)による標準曲線を作製する。SSのみを0基準として包含させる。
- ・ 血清サンプルを適当に希釈する(上記で詳述)。
- ・ マルチチャンネルピペットを用いて、35  $\mu$ lのmoc1溶液をマイクロタイタープレートのウェルに加える。
- ・ 35  $\mu$ lの標準液およびサンプルを加える。
- ・ マルチチャンネルピペットを用いて、35  $\mu$ lのTAG溶液を全てのウェルに添加する。
- ・ プレートを室温にて1時間振盪する。
- ・ ティッシュペーパー上へ滲ませてウェルの内容物を取り除く。
- ・ 0.1% トゥイーン/PBSで6回洗浄する。
- ・ 100  $\mu$ lのフェムト基質を添加し、BMG フルオスター照度計で読み取る。
- ・ BMG Omega Marsデータ分析ソフトウェアを用いて結果を計算する。

10

## 【0082】

## 実施例2 尿TAGアッセイのプロトコール

## 試薬

- |         |  |    |
|---------|--|----|
| 標準希釈剤   | - Urisub (US)  |    |
| サンプル希釈剤 | - 10% ヒツジ正常血清 (NSS) / US                                   |    |
| moc1    | - 4ml 3% BSA / 1% NSS / 20% FCS / PBS中、10ul ストック溶液(1:1000) | 20 |
| TAG     | - 4ml 3% BSA / 1% NSS / PBS中、2.3ul ストック溶液(1:1000)          |    |
- マイクロタイタープレート - 抗TAGで予めコーティング。

## サンプル調製

- 0 - 100 IU/L - そのまま
- > 100 IU/L - 10% NSS / USで希釈。

## 【0083】

## アッセイ

- ・ 50、25、12.5、6.25、3.125および1.56 IU/Lの基準を作成するために、SSで6回、倍数希釈トップのhCG標準(100 IU/L)による標準曲線を作製する。0基準を得るためにSSのみを含ませる。
- ・ 尿サンプルを適当に希釈する(上記で詳述)。
- ・ マルチチャンネルピペットを用いて、35  $\mu$ lのmoc1溶液をマイクロタイタープレートのウェルに加える。
- ・ 35  $\mu$ lの標準液およびサンプルを加える。
- ・ マルチチャンネルピペットを用いて、35  $\mu$ lのTAG溶液を全てのウェルに添加する。
- ・ プレートを37  $^{\circ}$ Cにて2時間振盪する。
- ・ ティッシュペーパー上へ滲ませてウェルの内容物を取り除く。
- ・ 0.1% トゥイーン/PBSで6回洗浄する。
- ・ 100  $\mu$ lのフェムト基質を添加し、BMG フルオスター照度計で読み取る(セッティングデータを参照)。
- ・ BMG Omega Marsデータ分析ソフトウェアを用いて結果を計算する(セッティングデータを参照)。

30

40

## 【0084】

## 実施例3 moc1 Fab変異体の比較

組換えmoc1 Fab<sub>1</sub>(単量体)およびFab<sub>2</sub>(二量体)を、当業者により当技術分野で公知の方法で大腸菌において産生した。各Fab変異体(単量体変異体および二量体変異体)を精製し、製造者の指示に従ってライトニングリンクHRPキット(Innova Bioscience)を

50

用いて西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) に結合させた。各 F a b 変異体の分子量は、単量体 F a b<sub>1</sub> 変異体および二量体 F a b<sub>2</sub> 変異体がHRPで同程度のレベルで標識されるように、結合プロセスを考慮に入れた。

【 0 0 8 5 】

HRPで標識して、初期活性試験後に、標識されたFab変異体を、実施例 1 に提供される一般的な方法に従って標準曲線を導出するためにTAGおよびhCGを用いた競合アッセイで評価した。

【 0 0 8 6 】

アッセイの結果を表 1 および図 4 に示す。

【表 1】

10

表 1. 負のhCG標準に対するアッセイ出力および%シグナルの相対を示す平均データ

hCG 標準 (IU/L)	化学発光値(RLU)		%シグナル	
	単量体	二量体	単量体	二量体
0	1202503	2572679	100	100
1.56	1165822	2346433	97	91
3.125	1080330	2162202	90	84
6.25	961748	1900875	80	73.9
12.5	687755	1340029	57	52
25	440407	848495	36.6	33
50	197693	504683	16.4	19.6
100	49539	130589	4	5
200	11774	23302	1	0.9

20

【 0 0 8 7 】

表 1 および図 4 は、F a b<sub>2</sub> 二量体変異体が、同等のアッセイ条件下で、F a b<sub>1</sub> 単量体変異体と比較して、顕著な約 2 倍の化学発光出力の増加を示したことを実証する。加えて、F a b<sub>2</sub> 二量体変異体は、h C G 濃度範囲 1 . 5 6 - 2 5 I U / L に亘って、この範囲で%シグナルの急激な低下を示す F a b<sub>1</sub> 単量体変異体と比較して、サンプル中の h C G 濃度に対してより高い感度を有する (図 4 参照のこと)。

30

【 0 0 8 8 】

実施例 4 T A G アッセイと Immulite および R I A アッセイとを比較する臨床試験

試験を、本明細書に記載の F a b<sub>2</sub> 二量体変異体用いる T A G アッセイの能力と、公知のアッセイである Immulite アッセイおよび R I A アッセイとを比較するために行い、臨床サンプル中の hCG を検出した。

【 0 0 8 9 】

臨床血清サンプルを、各アッセイ法による hCG の存在および濃度について分析した。T A G アッセイを実施例 1 に記載の通りに行った。Immulite アッセイ (Siemens) を、製造者の指示に従って行った。R I A アッセイを、National Health Service、UK により提供されるプロトコール指示書に従って行った。簡単には、アッセイには、精製したポリクローナル抗体およびヨウ素化 hCG を使い、ここで、サンプルを希釈し、抗体と混合し、測定前の 2 4 時間 hCG を標識した。

40

【 0 0 9 0 】

該アッセイの結果を、表 2 および 3 ならびに図 5 から 8 に示す。サンプル全体での hCG 濃度範囲がローからハイの hCG 濃度にしたことにより、TAG アッセイ、Immulite アッセイまたは RIA アッセイ法による臨床血清サンプル中の表 2 の hCG 検出。

【表 2】

表 2. TAGアッセイ、ImmuliteアッセイまたはRIAアッセイ法による臨床血清サンプル中のhCG検出（ここで、サンプル全体でのhCG濃度範囲は、低から高hCG濃度であった）。

サンプル	hCG濃度 (IU/L)		
	TAG	RIA	Immulite
1	17	13	16
2	5	4	5
3	70	46	100
4	18	5	7
5	7	5	8
6	104	75	176
7	26	14	33
8	397	321	398
9	14	10	11
10	1163	1148	1279
11	82	70	95
12	76	75	120
13	1391	1336	1834
14	726	779	875
15	15	5	5
16	949	1305	1200
17	23	11	28
18	34040	49380	58146
19	96546	122920	177465
20	154	108	156
21	14	12	13
22	175265	194800	164721
23	24615	22330	25561
24	1545	1067	1425
25	3	<4	<1
26	2	<4	<1
27	12	9	13
28	1405	1063	1402
29	8	9	11
30	1	<4	<1
31	33	32	39
32	2	<4	<1
33	9	6	10
34	10	9	13

10

20

30

40

## 【表 3】

表 3. TAGアッセイ、ImmuliteアッセイまたはRIAアッセイ法による臨床血清サンプル中のhCG検出（ここで、サンプル全体でのhCG濃度範囲は、低から高hCG濃度であった）。

hCG濃度 (IU/L)		
Immulite	RIA	TAG
164721	194800	175265
25561	22330	24615
21884	17700	19028
721139	676000	640363
21884	17290	12977
721139	735400	675028
182140	166750	164552
39602	30430	36581
26551	19230	23276
58258	51900	44120
36871	41600	38110
25546	35000	23997
17112	13350	12132
154163	147200	150430
17494	17200	14079
14202	10210	14459
14230	9700	19655
220085	193900	314760
69034	41860	48667
435384	264200	333333
19546	19670	15863
22642	14285	21467
27591	25800	14364
156336	106600	86333
376837	273500	148267
28086	18550	15583
66289	46560	33289
114379	59160	114315
28862	16770	26918

10

20

30

## 【0091】

図 5 から図 8 は、TAGアッセイによる臨床血清サンプル中のhCG濃度の検出および測定が、全ての場合において、0.9以上の $R^2$ 値で公知のImmuliteおよびRIAアッセイと強く相関することを実証する。アッセイ法間の変動が、hCG上の標的エピトープの抗体認識の違いのために存在するが、全てのアッセイは、正確に臨床血清中のhCGを検出することができる。

40

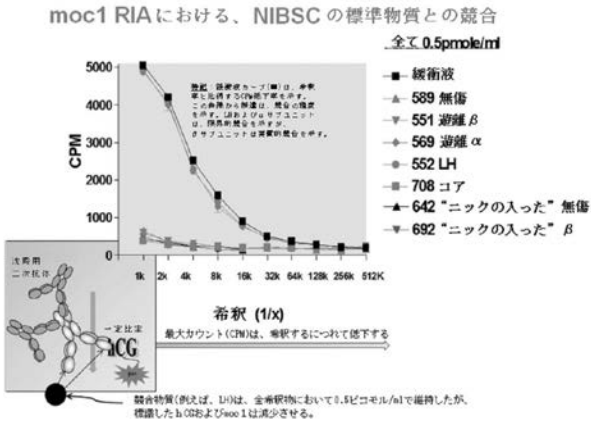
## 【0092】

また、さらなる臨床試験は、TAGアッセイの重要な利点が優れた感度で特異性を報告する能力であることを実証した。治療を受ける患者をモニターするのに有益となるように、特にhCGレベルが非常に低い場合、公知のRIAおよびImmuliteアッセイを実施することができるようになる前に、非常に低レベルのhCGを検出し、患者サンプル中における増

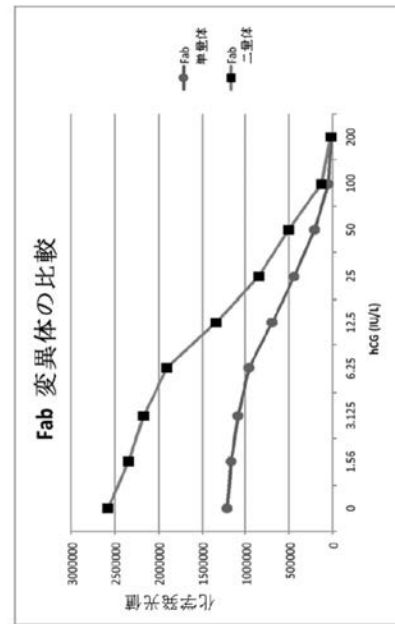
50



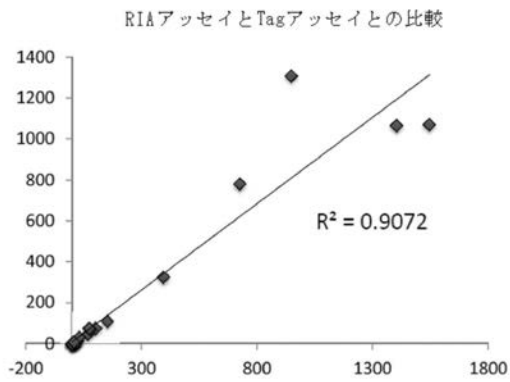
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

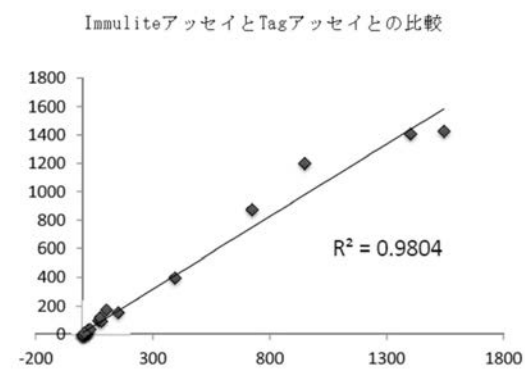


Figure 5

Figure 6

【 図 7 】

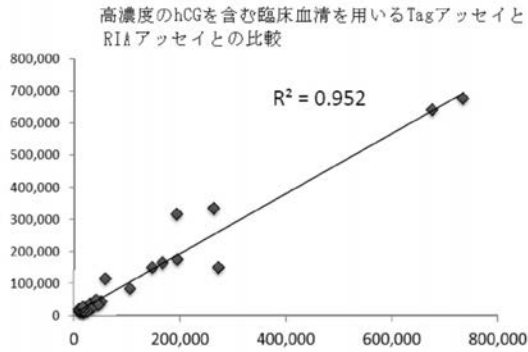


Figure 7

【 図 8 】

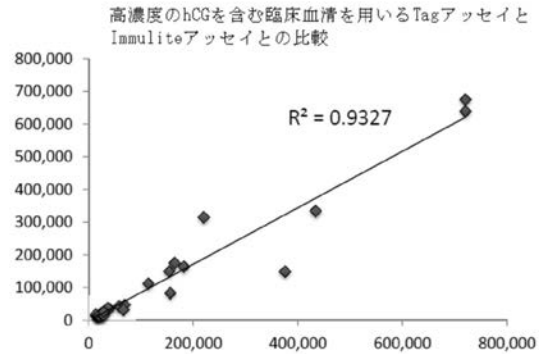


Figure 8

## 【 配 列 表 】

2017508967000001.app

## 【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平成28年4月12日 (2016.4.12)

## 【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

## 【 請 求 項 1 】

液体サンプル中に存在する分析対象物の存在を決定する方法であって、

a) 該液体サンプルを、既定量の分析対象物の類縁体および第一の結合部位と接触させること、

ここで、類縁体は、それが1つのみの結合領域を包含するように、第二の結合部位により結合され得るアミノ酸からなる該結合領域を含んでインビトロで組み換え的に発現されるか、または合成されるアミノ酸配列を含み、

該結合領域は、分析対象物中に存在しないか、または存在するが、第二の結合部位にアクセス不可能であり、そして

第一の結合部位は、混合物が、類縁体 - 第一結合部位複合体を含んで形成されるか、または分析対象物がサンプル中に存在するとき、(i) 類縁体 - 第一結合部位複合体および分析対象物 - 第一結合部位複合体、または(ii) 分析対象物 - 第一結合部位複合体を含み、かつ類縁体 - 第一結合部位複合体を含まないで形成されるように、分析対象物および類縁体のそれぞれに独立して結合可能であり、

b) 該混合物を第二の結合部位と接触させること、

ここで、第二の結合部位は、類縁体 - 第一結合部位複合体に結合できるが、分析対象物 - 第一結合部位複合体には結合できない抗体であり、そして固相に固定化されているか、または固定化可能であり；

c) 第二の結合部分に結合した類縁体 - 第一結合部位複合体の存在を示すシグナルレベルを決定すること；

ここで、工程 c) で決定されたシグナルレベルが、分析対象物が存在しないときに決定された最大シグナルレベルより低いとき、分析対象物がサンプル中に存在する、を含む、方法。

【請求項 2】

液体サンプル中に存在する分析対象物の存在を決定する方法であって、

a) 該液体サンプルを、既定量の分析対象物の類縁体および第一の結合部位と接触させること、

ここで、類縁体は、それが 1 つのみの結合領域を包含するように、第二の結合部位により結合され得るアミノ酸からなる該結合領域を含んでインビトロで組み換え的に発現されるか、または合成されるアミノ酸配列を含み、

該結合領域は、分析対象物中に存在しないか、または存在するが、第二の結合部位にアクセス不可能であり、そして

第一の結合部位は、混合物が、類縁体 - 第一結合部位複合体を含んで形成されるか、または分析対象物がサンプル中に存在するとき、( i ) 類縁体 - 第一結合部位複合体および分析対象物 - 第一結合部位複合体、または ( i i ) 分析対象物 - 第一結合部位複合体を含み、かつ類縁体 - 第一結合部位複合体を含まないで形成されるように、分析対象物および類縁体のそれぞれに独立して結合可能であるが、分析対象物および類縁体の両方に同時には結合不可能であり；

b) 該混合物を第二の結合部位と接触させること、

ここで、第二の結合部位は、類縁体 - 第一結合部位複合体に結合できるが、分析対象物 - 第一結合部位複合体には結合できない抗体であり、そして固相に固定化されているか、または固定化可能であり；

c) 第二の結合部分に結合した類縁体 - 第一結合部位複合体の存在を示すシグナルレベルを決定すること；

ここで、工程 c) で決定されたシグナルレベルが、分析対象物が存在しないときに決定された最大シグナルレベルより低いとき、分析対象物がサンプル中に存在する、を含む、方法。

【請求項 3】

サンプルを、類縁体と接触させる前に、第一の結合部位と接触させる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 c) で決定されたシグナルレベルをキャリブレーションデータと比較することにより、サンプル中に存在する分析対象物の量または濃度を決定する工程をさらに含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

分析対象物が hCG またはそのフラグメントもしくは一部である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

シグナルが、第一の結合部位に直接的または間接的に結合されている標識に由来する、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

標識が、酵素、フルオロフォア、放射性核種、コロイド状ゾル、発色団および発光化合物からなる群より選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

類縁体が、該分析対象物の完全な配列または一部の配列のいずれかと同一のアミノ酸配

列を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

第一の結合部位が抗体である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

第一の結合部位が F a b または F ( a b )<sub>2</sub> である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

第一の結合部位が、hCG に特異的に結合する、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

第一の結合部位が、hCG 3 - ループ - 特異的モノクローナル抗体である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

サンプルが、血液、血清、血漿、間質液、唾液、痰、接眼レンズ液、汗、尿、乳汁、腹水液、粘液、滑膜液、腹膜液、経皮滲出液、咽頭滲出液、気管支肺胞洗浄液、気管内吸液 ( tracheal aspiration )、脳脊髄液、精液、子宮頸管粘液、膣もしくは尿道分泌物または羊水を含む生理的供給源に由来するか、またはそれから構成される、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

i ) 分析対象物類縁体 ;

i i ) ( a ) 標識された第一の結合部位、または ( b ) 標識されていない第一の結合部位および標識された第三の結合部位、のいずれか ; および

i i i ) 固定化可能な第二の結合部位

を含む、目的の分析対象物を検出するためのテストキットであって、

ここで、類縁体は、それが 1 つのみの結合領域を包含するように、第二の結合部位により結合され得るアミノ酸からなる該結合領域を含んでインビトロで組み換式的に発現されるか、または合成されるアミノ酸配列を含み、

該結合領域は、分析対象物中に存在しないか、または存在するが、第二の結合部位にアクセス不可能であり、そして

第一の結合部位が、類縁体および目的の分析対象物のそれぞれに独立して結合可能であり、第二の結合部位が、類縁体および第一の結合部位の複合体に結合できるが、分析対象物または第一の結合部位および分析対象物の複合体に結合できない抗体であり、そして第三の結合部位が、第一の結合部位または類縁体 - 第一結合部位複合体に結合可能である、テストキット。

【請求項 15】

i ) 分析対象物類縁体 ;

i i ) ( a ) 標識された第一の結合部位、または ( b ) 標識されていない第一の結合部位および標識された第三の結合部位、のいずれか ; および

i i i ) 固定化可能な第二の結合部位

を含む、目的の分析対象物を検出するためのテストキットであって、

ここで、類縁体は、それが 1 つのみの結合領域を包含するように、第二の結合部位により結合され得るアミノ酸からなる該結合領域を含んでインビトロで組み換式的に発現されるか、または合成されるアミノ酸配列を含み、

該結合領域は、分析対象物中に存在しないか、または存在するが、第二の結合部位にアクセス不可能であり、そして

第一の結合部位が、類縁体および目的の分析対象物のそれぞれに独立して結合できるが、類縁体および分析対象物の両方に同時には結合できず、第二の結合部位が、類縁体および第一の結合部位の複合体に結合できるが、分析対象物または第一の結合部位および分析対象物の複合体に結合できない抗体であり、そして第三の結合部位が、第一の結合部位または類縁体 - 第一結合部位複合体に結合可能である、

テストキット。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2015/050624
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/53 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, PAJ, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/069940 A1 (GYROS PATENT AB [SE]; HOLMQUIST MATS [SE]; JESSON GERALD [SE]) 21 June 2007 (2007-06-21) pages 6, 8,9; figure 6 -----	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 May 2015		15/06/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Lunter, Pim

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2015/050624

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2007069940	A1	21-06-2007	EP 2032984 A1	11-03-2009
			EP 2237037 A1	06-10-2010
			WO 2007069940 A1	21-06-2007
-----				

## フロントページの続き

(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, 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, KN, KP, KR, 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, UA, UG, US

(72)発明者 ポール・デイビス

英国エムケイ 4 4 ・ 1 ピーワイ、ベッドフォードシャー、シャーンブルック、テンブラーズ・ウェイ、グリーン・エイカーズ

(72)発明者 サンドラ・ヘミントン

英国エムケイ 4 0 ・ 4 エイジー、ベッドフォードシャー、ベッドフォード、ビッデンハム、ウィンドミル・ヒル・5 エイ番

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 DA13

4H045 AA11 AA30 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017508967A</a>	公开(公告)日	2017-03-30
申请号	JP2016555546	申请日	2015-03-04
[标]申请(专利权)人(译)	莫洛迪克有限公司		
[标]发明人	ポール・デイビス サンドラ・ヘミントン		
发明人	ポール・デイビス サンドラ・ヘミントン		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 C07K16/26 C12P21/08		
FI分类号	G01N33/543.511.A G01N33/53.B C07K16/26.ZNA C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	山田卓司		
优先权	2014003815 2014-03-04 GB		
其他公开文献	JP6484250B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种确定液体样品中存在分析物的方法，其中使液体样品与预定量的分析物类似物和过量的第一结合位点接触，其中第一结合位点能够独立地与分析物和类似物中的每一个结合；使混合物与第二结合位点接触；并且类似物与第二结合部分结合- 确定指示第一结合位点复合物存在的信号水平（其中确定的信号水平低于不存在分析物时确定的最大信号水平，样品中的分析物为 现有）。还提供了相应的套件。

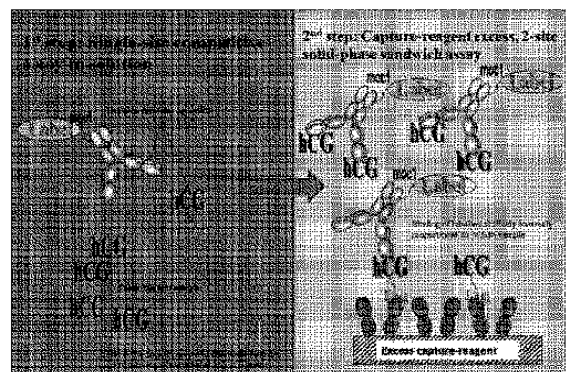


Figure 1