

(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2018-501238

(P2018-501238A)

(43) 公表日 平成30年1月18日(2018.1.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	Z N A 4 H O 4 5
G01N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
C07K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705	
C07K 14/765 (2006.01)	C O 7 K 14/765	
C07K 14/78 (2006.01)	C O 7 K 14/78	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2017-532771 (P2017-532771)
 (86) (22) 出願日 平成27年12月17日 (2015.12.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年8月9日 (2017.8.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2015/053560
 (87) 国際公開番号 W02016/097613
 (87) 国際公開日 平成28年6月23日 (2016.6.23)
 (31) 優先権主張番号 1462709
 (32) 優先日 平成26年12月18日 (2014.12.18)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 304043936
 ビオメリュー
 B I O M E R I E U X
 フランス国 F-69280 マーシー
 レトワール
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 ベッツワース, フロランス
 フランス国 69380 ドマルタン,
 リュ ドゥ マラタヴェルヌ 356
 (72) 発明者 ビュスレ, サンドリーヌ
 フランス国 69001 リヨン, リュ
 ピエール ブラン 16

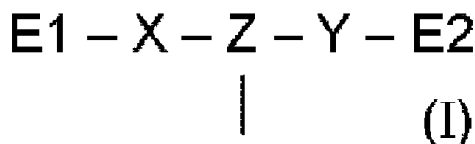
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 合成ピエピトープ化合物

(57) 【要約】

本発明は式 I、式中 - 同一または異なる E 1 および E 2 は、それぞれ別々に、被分析物の少なくとも 1 つのエピトープを含むペプチド配列を表し；同一または異なる X および Y は、それぞれ別々にリンキングアームを表す、- 担体分子は可溶性であり、かつ - Z は、担体分子との結合前にチオール機能を有するアミノ酸誘導体を表す、ピエピトープ化合物に関する。本化合物を含有する組成物、およびかかる化合物または本化合物を含有する組成物の、イムノアッセイにおける対照または標準としての使用、本化合物または本化合物を含有する組成物を対照または標準として用いる方法、ならびに最後に、本化合物または本化合物を含有する組成物を含む、イムノアッセイ実施するためのキットにも関する。

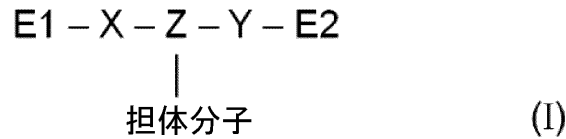
【選択図】なし



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) のビエピトープ化合物であって、



式中、

- E 1 および E 2 は、同一でも異なってもよく、それぞれ独立して、被分析物の少なくとも 1 つのエピトープを含むペプチド配列を表し；かつ
- X および Y は、同一でも異なってもよく、それぞれ独立してリンカーアームを表し、
- 担体分子は可溶性であり、かつ
- Z は、担体分子との結合前にチオール機能を有するアミノ酸誘導体を表す、化合物。

【請求項 2】

リンカーアーム X および Y が、それぞれ、一方が E 1 または E 2 とであり、他方が Z とである、二つのペプチド結合 - C O - N H - を形成するアミノ酸誘導体である、請求項 1 に記載の式 (I) のビエピトープ化合物。

【請求項 3】

リンカーアーム X および Y が、同一でも異なってもよく、それぞれ独立して 1 以上のアミノ酸誘導体を含む、請求項 2 に記載の式 (I) のビエピトープ化合物。

【請求項 4】

Z が、システイン誘導体、ホモシステイン誘導体およびペニシラミン誘導体から選択される、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の式 (I) のビエピトープ化合物。

【請求項 5】

担体分子が、その分子量が 2 0 k D a と 7 0 0 k D a との間、好ましくは 6 0 k D a と 2 5 0 k D a との間であるタンパク質である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の式 (I) のビエピトープ化合物。

【請求項 6】

担体分子がウシ血清アルブミンである、請求項 5 に記載の式 (I) のビエピトープ化合物。

【請求項 7】

E 1 および E 2 が、心筋トロポニン I エピトープまたはプロディフェンシン - A 6 エピトープの少なくとも 1 つを含むペプチド配列である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の式 (I) のビエピトープ化合物。

【請求項 8】

水、バッファーまたは生物学的流体溶液中に請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の式 (I) のビエピトープ化合物を含有する組成物。

【請求項 9】

イムノアッセイにおける対照または標準としての、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の化合物または請求項 8 に記載の組成物の使用。

【請求項 1 0】

心筋トロポニン I イムノアッセイまたはプロディフェンシン - A 6 イムノアッセイにおける対照または標準としての、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の化合物または請求項 8 に記載の組成物の使用。

【請求項 1 1】

被分析物を含有する可能性のある被検試料中で、イムノアッセイにより前記被分析物を検出するための方法であって、

10

20

30

40

50

- i . 前記被検試料を、被分析物の結合パートナーの 1 以上と接触させることによるイムノアッセイ検査、
- ii . 陽性対照として請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の式 (I) のビエピトープ化合物または請求項 8 に記載の組成物を、前記被分析物の結合パートナーの 1 以上と接触させることにより、イムノアッセイ検査の信頼性を検証する検査、
- iii . 信頼性検証検査が陽性の場合、イムノアッセイ検査を読みとること、
- iv . ステップ i のイムノアッセイ検査により得られるシグナルが、イムノアッセイ検査の検出閾値より大きい場合に、被検試料中に前記被分析物が存在すると決定することを含む方法。

10

【請求項 1 2】

被分析物が心筋トロポニン I またはプロディフェンシン - A 6 である、請求項 1 1 に記載のイムノアッセイにより被分析物を検出するための方法。

【請求項 1 3】

被分析物を含有する可能性のある被検試料中で、イムノアッセイにより前記被分析物を定量化するための方法であって、

- i . 前記被検試料を、被分析物の結合パートナーの 1 以上と接触させることによるイムノアッセイ検査
- ii . 陽性対照を、前記被分析物の結合パートナーの 1 以上と接触させることにより、イムノアッセイの信頼性を検証する検査、
- iii . 信頼性検証検査が陽性の場合、イムノアッセイ検査を読みとること、および
- iv . イムノアッセイ検査のシグナルを、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の式 (I) のビエピトープ化合物または請求項 8 に記載の組成物を用いて事前に得た標準曲線と比較することにより、被検試料中の前記被分析物の量を決定することを含む方法。

20

【請求項 1 4】

陽性対照が、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の式 I のビエピトープ化合物または請求項 8 に記載の組成物である、請求項 1 3 に記載の、イムノアッセイにより定量化するための方法。

【請求項 1 5】

被分析物を含有する可能性のある被検試料中で、イムノアッセイにより被分析物を定量化するための方法であって、

- i . 被検試料を、被分析物の結合パートナーの 1 以上と、接触させることによるイムノアッセイ検査、
- ii . 陽性対照として請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の式 (I) のビエピトープ化合物または請求項 8 に記載の組成物を、前記被分析物の結合パートナーの 1 以上と接触させることにより、イムノアッセイ検査の信頼性を検証する検査、
- iii . 信頼性検証検査が陽性の場合、イムノアッセイ検査を読みとること、および
- iv . イムノアッセイ検査と、標準曲線とを比較することにより、被検試料中の前記被分析物の量を決定することを含む方法。

30

【請求項 1 6】

被分析物が心筋トロポニン I またはプロディフェンシン - A 6 である、請求項 1 3 から 1 5 のいずれか一項に記載の、イムノアッセイにより定量化するための方法。

40

【請求項 1 7】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の式 I のビエピトープ化合物または請求項 8 に記載の組成物を含む、イムノアッセイを行うためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、診断または予後の分野に関する。特に、イムノアッセイの実施中に使用される、合成ビエピトープ化合物に関する。

【背景技術】

50

【0002】

イムノアッセイは、臨床、食品、製剤および化学分析の分野で一般的に用いられる。従って、それらの目的は、これらの被分析物を含有する可能性のある試料中における、タンパク質（抗原/抗体）、ペプチド、またはハプテン（たとえばステロイドまたはビタミン）の形態での多くの被分析物の存在を決定することである。イムノアッセイは、検出する被分析物と、この被分析物の1以上の結合パートナーとの間での免疫学的反応に關与する、当業者に広く知られた検査である。かかるイムノアッセイの例としては、「サンドイッチ」原理あるいは「競合」原理により動作し得る、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、ELFA（酵素結合蛍光アッセイ）およびRIA（放射免疫アッセイ）などの方法、ならびに免疫組織化学、免疫細胞化学、免疫蛍光、ウエスタンブロットおよびドットブロットなどの免疫検出方法について言及され得る。「競合」法は、通常は、ハプテンなどの低分子のために用いられ、「サンドイッチ」法は、他の被分析物のために用いられる。

10

【0003】

特に生物学的試験所において実行されるこれらのイムノアッセイは、結合パートナー、現出剤（revealing agent）あるいは希釈溶液などの検査に必要である試薬に加えて、研究される試料のための検査のものと類似している状況下、しばしば同時に、用いられ、イムノアッセイが正確に実行されたことを立証するのに役立つであろう、検査の陽性対照が、製造業者により提供されることが必要である。陽性対照が、実際、陽性であるとみとめられた場合、検査結果は、バリデーションが確認され、解釈することができる。陽性対照が、陽性であるとみとめられない場合、これは、イムノアッセイの実施が期待に沿って行われなかったことを示す。無効である検査の結果は、そのため、解釈されるべきでなく、分析は、再び始められるべきである。

20

【0004】

前記被分析物を含有する可能性のある生物学的試料中での、イムノアッセイによる被分析物の定量化に関しては、検査に必要である上述の試薬および陽性対照に加えて、標準曲線の使用を必要とする。前記曲線は、i) 被分析物または用いられるイムノアッセイにおいて被分析物と同一の抗原反応性を有する化合物の、漸増および既知の量または濃度に対応する、標準（キャリブレーションともよばれる）により生成するシグナルを測定することにより、ii) そして、当該量または当該濃度の関数としてのシグナルを与える曲線を描くときに、得られる。非常に多くの場合、定量的イムノアッセイの結果を容易に計算できるよう、シグナルと量または濃度との間のこの関係をできる限り信頼性高く表す数学的モデルを見出すことは、標準的な技法である。

30

【0005】

これを行うため、対照または標準溶液は、探索される被分析物を模倣しなければならない。従って、イムノアッセイの方法がサンドイッチ法である場合、対照または標準溶液は、用いられる2つの結合パートナーの認識のための2つのエピトープを有する化合物を含まなければならない。用語「ビエピトープ化合物」は、そのため使用される。

【0006】

ビエピトープ化合物の2つのエピトープが同一であることは、問題外ではない。検出されあるいは定量化される被分析物が、マルチマー、少なくともダイマーである場合、サンドイッチイムノアッセイの捕捉の際および検出の際に同一の結合パートナーを使用することが可能である。この場合、ビエピトープ化合物は、同一のエピトープを二倍含有するであろう。

40

【0007】

イムノアッセイ検査において通常用いられる対照または標準溶液は、ヒトまたは動物起源してもよく、自然な状態のように被分析物を含有してもよい。これらの溶液は、凍結乾燥物から調製され、単位用量で凍結され、-20 または -80 で保存される。かかる保存は、流体の実験室実務のために適してはいない。さらに、これらの凍結乾燥した対照または標準溶液は、それらが使用されることを可能とするため、再溶解される必要がある

50

。しかしながら、イムノアッセイ文脈において、検査の実施は素早くなくてはならず、この再溶解は時間の損失をもたらす。さらに、この再溶解を行うことは、希釈に起因するバイアスのため、測定エラーにつながる可能性がある。+ 2 / 8 で液体形態で保存される使用準備済の対照または標準溶液が、したがって特に推奨され、これは、利便性の明らかな理由のためである。それにもかかわらず、アッセイの実際の条件を代表するために、これらの使用準備済の対照または標準溶液は、関心のある被分析物の測定の範囲に応じて、たとえば約 1 p g / m l、1 n g / m l または 1 μ g / m l といった低濃度の被分析物のみを含有し、これは、影響が及ぼされる + 2 / 8 の温度においてそれらの安定性をもたらし。結果として、この欠点を克服するため、合成標準が用いられてきた。

【 0 0 0 8 】

欧州特許出願 E P 0 6 5 0 0 5 3 A は、1 以上の受容体のための活性部位を含有し、樹木状の構造により互いに連結する合成標準について記載する。この出願は、トロポニン T 合成標準についてより具体的に記載する。それにもかかわらず、これらの標準は、4 で 3 週間を超えない、溶液中での安定時間を有する。

【 0 0 0 9 】

特許出願 W O 9 8 / 2 4 8 1 6 は、トロポニン I をアッセイするための「サンドイッチ」イムノアッセイにおける標準として使用することができ、数か月間安定である合成ピエプトーブ化合物を提供する。記載された式 - E 1 - Z - E 2 - の化合物は、最小のトロポニン I エピトープを含む 2 つのペプチド配列 E 1 および E 2 を含み、これらのエピトープのそれぞれが、1 から 4 0 のアミノ酸を含む中央ペプチドであり得るリンカー基 Z により互いに結合している。それぞれのエピトープは、その端に、1 から 1 0 のアミノ酸のペプチド配列 (および) も含み得る。それにもかかわらず、この特許出願において提案された溶液は、記載されたピエプトーブ化合物が、イムノアッセイに用いられる結合パートナーと十分に免疫反応性であるように、容易に合成されないようなわずかな数でないアミノ酸を有さなくてはならないという欠点を有する。さらに、それらの独自にペプチドの特性が理由で、イムノアッセイで用いられる結合パートナーと最適な免疫反応性を有するために、大量の化合物が対照または標準溶液中に必要とされ、それは、この対照またはこの標準を含有するキットの製造業者にとってそして製造されたキットを使用する実験室にとってわずかではないコストを表す。

【 0 0 1 0 】

特許 U S 6 1 1 4 1 8 0 は、溶液中でのその溶解性および / またはその安定性を増加させる目的で、B S A などの担体分子により互いに連結された 2 つのトロポニン I エピトープを含み、イムノアッセイにおける対照または標準として用いることのできる、合成化合物を提案する。しかしながら、この化合物の特別な構造により製造が難しくなり、担体分子と連結した 2 つのエピトープ間での等モル反応性の問題が生じる。

【 発明の概要 】

【 0 0 1 1 】

出願人は、驚くべきことに、先行技術に記載された欠点を克服する、「サンドイッチ」イムノアッセイに使用される合成化合物を実証した。実際、その合成は容易で、単純化されており、それは + 2 / 8、低濃度で安定であり、それは可溶性であり、かつそれはイムノアッセイにおいて用いられる結合パートナーとの卓越した免疫反応性を示す。さらに、化合物が対照または標準溶液中に存在する場合、大量のそれを使用する必要がなく、これはイムノアッセイにおいて用いられる結合パートナーと最適な免疫反応性を有するためである。最終的に、本発明による化合物の構築は、2 つのエピトープの等モル反応性を保証する。ある点で (a c e r t a i n e s)

【 0 0 1 2 】

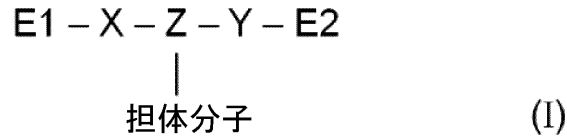
従って、本発明の最初の主題は、式 (I) のピエプトーブ化合物であって、

10

20

30

40



式中、

- E1およびE2は、同一でも異なってもよく、それぞれ独立して、被分析物の少なくとも1つのエピトープを含むペプチド配列を表し、
- XおよびYは、同一でも異なってもよく、それぞれ独立してリンカーアームを表し、
- 担体分子は可溶性であり、かつ
- Zは、担体分子との結合前にチオール機能を有するアミノ酸誘導体を表す、化合物である。

【0013】

本発明のもう一つの主題は、水、バッファーまたは生物学的流体溶液中に式Iの化合物を含有する組成物に関する。

【0014】

さらにもう一つの主題は、イムノアッセイにおける、かかるピエピトープ化合物のまたはこの化合物を含有するかかる組成物の、対照または標準またはアジャスターとしての使用に関する。

【0015】

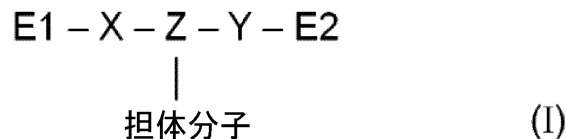
本発明のさらにもう一つの主題は、式Iのピエピトープ化合物またはこの化合物を含有する組成物を、対照および/または標準もしくはアジャスターとして用いるイムノアッセイ方法に関する。

【0016】

最後に、本発明の最後の主題は、式(I)のピエピトープ化合物またはかかる化合物を含有する組成物を含む、イムノアッセイを行うためのキットである。

【0017】

出願人は、このように、予想に反して、上記に言及した先行技術のすべての欠点を克服することを可能とする合成ピエピトープ化合物を開発した。本発明の化合物は、下記式(I)を有する化合物であって、



式中、

- E1およびE2は、同一でも異なってもよく、それぞれ独立して、被分析物の少なくとも1つのエピトープを含むペプチド配列を表し、
- XおよびYは、同一でも異なってもよく、それぞれ独立してリンカーアームを表し、
- 担体分子は可溶性であり、かつ
- Zは、担体分子との結合前にチオール機能を有するアミノ酸誘導体を表す、化合物である。

【0018】

本発明の化合物は、したがってピエピトープ化合物である。用語「ピエピトープ化合物」は、サンドイッチイムノアッセイにおいて、被分析物の抗原性認識を模倣するために、同一の被分析物の2つのエピトープを含む、化合物を意味することを意図する。当然なが

ら、合成ピエプトーブ化合物は、決して、模倣する被分析物と同一の配列から成るわけではない。この合成化合物は、したがって、自然に存在するアミノ酸の配列、たとえば、タンパク質またはタンパク質断片に対応しない。本発明の化合物は、本出願の至るところで、明らかかつ同等の方法で、ピエプトーブ化合物、非天然ピエプトーブ化合物、合成ピエプトーブ化合物または非天然合成ピエプトーブ化合物として、言及されるであろう。

【0019】

用語「イムノアッセイ」における接頭辞「イムノ」は、本出願において、たとえば、結合パートナーが必然的に抗体または抗体断片などの免疫学的起源のパートナーであることを厳密に示すようにみなされるべきではない。実際、当業者によく知られているように、この用語は、それにおいて結合パートナーが、免疫学的起源/性質のパートナーでなく、たとえば検出および/または定量化が望まれる被分析物の受容体からなる、検出および方法も指すようにより広く使用される。その起源またはその性質がどのようなものであっても、関心のある結合剤パートナーは、探索される被分析物と、好ましくは特異的に、結合する能力があるべきである。従って、用語「イムノ」は、省略せずに頭字語 E L I S A に対応する用語に含まれるが、用語「E L I S A アッセイ」は、「リガンド結合アッセイ」としても広く知られる厳密な意味において非免疫学的である結合パートナーを用いるアッセイに対して用いることが知られた習慣である。明確性および統一性の利益のために、本出願において用語「イムノ」は、少なくとも1つの結合パートナーであって探索される被分析物との結合に適しているものを用い、後者を、好ましくは特異的に、検出および/または定量化する、任意の生物学的分析を意味するために使用され、これは前記結合パートナーが厳密な意味での免疫学的性質または起源でない場合でさえも使用される。

10

20

【0020】

サンドイッチ型イムノアッセイ（あるいはより単純に「サンドイッチイムノアッセイ」）は、探索される被分析物と特異的に結合する「捕捉結合パートナー」と呼ばれる第一の結合パートナー、ならびに「検出結合パートナー」と呼ばれる第二の結合パートナーであって、標識され、かつ探索される被分析物と特異的に結合するようにも意図され、その結果捕捉結合パートナーおよび探索される被分析物間の結合を現出させ、その結果被分析物の存在を明らかにするものを使用する。言い換えれば、探索される被分析物は、前記第一および第二の結合パートナー間の「サンドイッチ中に」とらえられ、第一の（「捕捉」）結合パートナーは、探索される被分析物と比べて一般に過剰に存在する。捕捉結合パートナーは、たとえば、固体支持体上に（共有結合、吸着またはそのほかの適当な方法により）不動化され得る。

30

【0021】

抗原決定基とも呼ばれるエピトープは、抗体の可変部分であるパラトープにより認識され得る抗原の最も小さい部分である。エピトープの構造は、抗体のパラトープに相補的である。含まれる構造は、連続エピトープとも呼ばれる線状エピトープの場合には、一次構造であってもよく、あるいは不連続エピトープとも呼ばれる構造エピトープの場合には、三次構造であってもよい。

【0022】

線状エピトープの配列は、エピトープおよび抗体間の結合を、特異性の観点から著しく変化させない「保存的」修飾を含み得る。

40

【0023】

ミモトープは、あるエピトープの三次元構造を模倣する高分子であり、しばしばペプチドである。前記エピトープを認識する抗体は、このエピトープを模倣するミモトープを認識しおよび結合する能力もある。タンパク質性質の抗原の場合には、ペプチドミモトープ（すなわち、線状である）が、構造エピトープを模倣するためにしばしば用いられる。本発明によれば、構造エピトープは、ミモトープと交換することができる。ミモトープもまた、用語エピトープの交換物として、本出願の範囲に含まれる。

【0024】

よくあることだが、抗原がタンパク質性質である場合、線状エピトープおよびミモトー

50

ブは、さまざまな長さのペプチド配列に対応する。線状エピトープの場合には、最小エピトープおよび最適エピトープの概念の間には、区別がされるべきである。最小エピトープは、対応する抗体により特異的に認識される、最も小さいサイズのペプチド配列に対応する。前記ペプチド配列のN末端のアミノ酸またはC末端のアミノ酸が欠失している場合、抗体の結合は、もはや可能ではなく、認識は失われる。最小のエピトープは、3から20アミノ酸、より多くの場合には4から8アミノ酸を含有し得る。

【0025】

最適エピトープは、対応する抗体について、特異的に認識されかつ可能な限り最良の反応性（最も強いシグナル）を有するペプチド配列に対応する。それは、非常に多くの場合、6から30アミノ酸長のペプチド配列を含む。一般的な法則として、最適エピトープは、最小エピトープを含む。まれな場合において、最適エピトープおよび最小エピトープは、融合され得る。

10

【0026】

本発明の化合物は、被分析物の少なくとも1つのエピトープを含む2つのペプチド配列E1およびE2を含有するようなものである。表現「被分析物の少なくとも1つのエピトープを含むペプチド配列」は、該ペプチド配列が少なくとも最小エピトープのアミノ酸から成ることを意味するよう意図される。本発明の一実施態様によれば、該ペプチド配列は、最大で、最適エピトープのアミノ酸から成る。当然ながら、最適エピトープの片側または両側に、抗原性の認識に大きすぎる効果を有さない、1、2、3、4または5個の追加のアミノ酸を付加することもできることを、当業者は知っている。かかる追加のアミノ酸もまた定義に含まれる。

20

【0027】

これらのペプチド配列のアミノ酸は、被分析物の配列中に自然に見出されるアミノ酸であってもよく、あるいはアナログアミノ酸であってもよい。用語「アナログアミノ酸」は、二つのアミノ酸を意味するよう意図され、その交換は、自然に発生する、すなわちアミノ酸のファミリー中で起こる、保存的置換である。具体的には、アミノ酸は、一般に4つのファミリーすなわち(1)アスパラギン酸およびグルタミン酸などの酸性アミノ酸、(2)リジン、アルギニンおよびヒスチジンなどの塩基性アミノ酸、(3)アラニン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンおよびトリプトファンなどの非極性アミノ酸、および(4)グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニンおよびチロシンなどの極性無電荷アミノ酸に分けられる。フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは、時には芳香族アミノ酸として分類される。たとえば、イソロイシンまたはバリンとロイシンの、グルタミン酸とアスパラギン酸の、セリンとトレオニンの、孤立した交換、あるいは構造的に関係する別のアミノ酸とアミノ酸の、同様の保存的交換は、生物学的活性または抗原性への大きな効果を有さないであろうことを、合理的に予測することができる。当業者は、当技術分野でよく知られたHopp/WoodsおよびKyte-Doolittleプロットを参照して、変化を許容することができるアミノ酸を容易に決定するであろう。一実施態様によれば、ペプチド配列のアミノ酸は、被分析物中に自然に見出されるアミノ酸である。もう一つの実施態様によれば、ペプチド配列E1またはペプチド配列E2あるいは両方は、ミモトープであり、その結果として、ペプチド配列のアミノ酸は、大部分は被分析物中に自然に見出されるアミノ酸と異なる。

30

40

【0028】

用語「被分析物」は、試料中に含有され、分析により、検出され、同定されおよび/または定量化される生物学的起源の物質を示す。それは、1以上の分析の対象である、化学的、生物学的または生化学的物質を示すものとして、広い意味で理解されるべきである。被分析物の例としては、タンパク質またはペプチドについて言及され得る。

【0029】

被分析物は、病理学的状況または培地中での微生物の存在を代表するであろう。用語「病理学的状況」は、環境的（感染性）、遺伝的および/または生物学的因子などの多数の

50

因子に起因する疾患のため、患者の健康のいかなる損なわれた状態も意味するよう意図される。疾患の例としては、ウイルス、細菌または寄生生物などの微生物に起因する感染性疾患（肝炎、敗血症など）、自己免疫疾患、神経変性疾患、がん（乳、前立腺、結腸など）、心臓血管疾患（心筋梗塞など）などについて言及され得る。被分析物は、その結果、さまざまな疾患に関連する。被分析物の例としては、心筋梗塞のための被分析物としての使用される心筋トロポニンI、および結腸がん被分析物であるプロディフェンシン-A6について言及され得る。これらの被分析物は、続いて、より詳細に記述されるであろう。一実施態様によれば、E1およびE2は、少なくとも1つの心筋トロポニンIエピトープまたはプロディフェンシン-A6エピトープを含むペプチド配列である。

【0030】

中央のZ基は、担体分子との結合前にチオール機能を有するアミノ酸誘導体である。用語「アミノ酸誘導体」は、結合対象のリンカーアームXおよびYと2つのペプチド結合-CO-NH-を形成する任意の分子を意味するよう意図される。これを行うため、対応するアミノ酸は、リンカーアームXまたはYとの結合前に、反応性基-NH₂および反応性基-COOHを含む。リンカーアームXおよびYへの結合後、アミノ酸誘導体は、したがって-NH-基および-CO-基を含む。対応するアミノ酸は、担体分子との結合前に、チオール機能(-SH)をも含む。かかるZ基の例としては、システイン誘導体、ホモシステイン誘導体およびペニシラミン誘導体が挙げられる。これらの誘導体の形成に用いられる、対応するアミノ酸は、当然ながら、当業者に既知のアミノ酸である、システイン、ホモシステインおよびペニシラミンである。

【0031】

本発明の化合物の2つのリンカーアームXおよびYは、互いに同一または異なる。リンカーアームは、それぞれが、1つの手でE1またはE2と、もう1つの手で中央のZ基と、2つのペプチド結合-CO-NH-を形成する能力により特徴づけられる。リンカーアームXおよびYは、したがって-NH-基および-CO-基を含むアミノ酸誘導体である。これを行うため、リンカーアームを形成するために用いられる化合物は、ペプチド配列E1またはE2とその結合の前に、反応性基-NH₂および反応性基-COOHを含む。当然ながら、リンカーアームは、他の基、たとえば、そのように反応性でない、あるいはそれらが、たとえばトリチル、t-ブチル、t-ブチルエーテルベンジルまたはベンジルエステル基といった当業者に既知の保護基により保護されているため反応性でない側基を含むことができる。リンカーアームは、本発明のビエピトープ化合物に含まれる前に、それぞれが反応性基-COOHおよび反応性基-NH₂を有する1以上の化合物から得ることができる。これらの化合物は、「リンカーアームを形成するために使用されるモノマー」として言及されるであろう。

【0032】

リンカーアームを形成するために使用されるモノマーは、生物学的タンパク質の合成に必要であり、当業者に既知である、タンパク質構成アミノ酸であり得る。これらのタンパク質構成アミノ酸は、遺伝的にコードされ得、この場合においては、22のそれらがある。全ての生物において普遍的に分布している、20個のタンパク質構成アミノ酸は、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-トレオニン、L-トリプトファン、L-チロシンおよびL-バリンである。他の2つのタンパク質構成アミノ酸は、さらにまれである。L-ピロリジンは、いくつかのメタン生成アーキアにおいてのみ見出され、L-セレノシステインは、オキシドレダクターゼファミリーのいくつかの酵素においてのみに存在する。

【0033】

これらの22の遺伝的にコードされたアミノ酸に加え、たとえばL-シトルリン、L-ピログルタミン酸、L-オルニチン、L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン、アミノ酪酸およびドーモイ酸といった、酵素的修飾により上記から得ることができる、数

10

20

30

40

50

十のほかの生物学的アミノ酸がある。

【0034】

リンカーアームを形成するために使用されるモノマーは、人工アミノ酸としても知られ、すなわち非生物学的アミノ酸である、擬似アミノ酸でもあり得る。この場合において、唯一の必要なものは、化合物が、二つの遊離の機能、 $-COOH$ および $-NH_2$ を含むことである。

【0035】

本発明の特定の一実施態様によれば、リンカーアームXおよびYは、同一でも異なってもよく、それぞれが1以上のアミノ酸誘導体(タンパク質構成 - アミノ酸、および/または生物学的アミノ酸および/または擬似アミノ酸など)を含む。リンカーアームは、1から6個のアミノ酸、好ましくは1から4個のアミノ酸から調製され得る。たとえば、リンカーアームは、配列GGGS、または配列SGGG、または配列GSGSGSあるいは配列SGSGSGを有し得る。

10

【0036】

本発明の一実施態様によれば、式(I)中のXおよびYは、すなわち、E1/E2/Zとのペプチド結合の形成後、下記式(II)：



[式中、Rは、基 $(-C(R')H-C(R'')H, (-C(R')H-C(R'')H-O-), (-C(R')H-))$ および $(-C(R')H-O-)$ から、独立に選択される1以上の基から成る基であり、R'およびR''は、水素、ヒドロキシル基およびC₁-C₅アルキル基から、独立に選択される。]

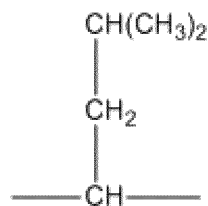
20

のモノマーの1以上の誘導体を示す。一実施態様によれば、Rは、 $(-CH_2-CH_2-O-), (-CH_2-O-)$ および $(-CH_2-)$ から、独立に選択される1以上の基から成る。特定の一実施態様によれば、R基は、1から6の基 $(-CH_2-CH_2-O-)$ 、好ましくは1から4の基 $(-CH_2-CH_2-O-)$ を含み得る。R基の非限定的な例としては、ペンタオキサオクタデカノイル、テトラオキサペンタデカノイル、トリオキサドデカノイル、トリオキサトリデカノイル、ジオキサオクタノイル、オキサペントイルおよびヘキサオキサヘニコサノイルならびにそれらの誘導体について言及され得る。式(II)のモノマー誘導体を与えるために使用される化合物の例としては、擬似アミノ酸として知られる8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(CAS No. : 134978-97-5)について言及され得る。たとえば、リンカーアームは、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸のダイマーまたはトリマー、 $(Ado)_2$ または $(Ado)_3$ であり得る。

30

【0037】

R基の基の他の例としては、残基形態での、すなわち、それらの $-COOH$ および $-NH_2$ 基を有さないが、 $NH-$ 基および $-CO-$ 基を含む、上記に言及した生物学的アミノ酸誘導体について言及され得る。したがって、たとえば、リンカーアームを形成する化合物が、式 $(CH_3)_2CH-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ のロイシンである場合、その結果、式(II)の化合物のRは、



40

であるだろう。

それぞれのリンカーアームは、2つの末端の $-CO$ および $-NH$ 基の間に、10から60、好ましくは20から30のサイズを有し、これは本発明の特定の一実施態様を構成する。

50

【0038】

リンカーアーム X および Y を形成するために使用されるモノマーは、それらが本発明の
ビエピトープ化合物に含まれる前は、反応性基 - COOH および - NH₂ を有し、それが
ペプチド結合を形成を可能とするので、配列 E 1 - X - Z - Y - E 2 は、

容易で、素早く規格化され、再現可能であり、単純化された合成、

E 1 および E 2 について等モルである化合物の生産、
の利点を有するペプチド合成により生み出され得るようなペプチド（ビエピトープペプチ
ドとして後述する）であるとみなすことができる。

【0039】

ビエピトープペプチドは、Merrifield, 1963により記載された固相ペプ
チド合成などの、当業者に周知の手順に従って得られる。この技術に対する改変は、Fi
elds and Noble, 1990により、レビューされ、議論されてきた。かか
る合成は、それに対して最初のC末端アミノ酸を付着させた固相を用い、この文脈におい
て、固相により掲示される - NH₂ 基と付加される新しいアミノ酸の - COOH 基との間
の反応を促進するために、ペプチドを形成するように付加される新しいアミノ酸の各 - N
H₂ 基は、当業者に周知であるように、Fmoc（9-フルオレニルメチルオキシカルボ
ニル）またはBoc（t-ブトキシカルボニル）型の保護基で保護される。

【0040】

本発明によれば、ビエピトープペプチドの長さは、100アミノ酸に対応する長さを超
えない、好ましくは20から30アミノ酸に対応する長さを超えず、より好ましくは、2
5から27アミノ酸に対応する長さを超えない。

【0041】

ビエピトープペプチドは、Z基を介して、担体分子と結合する。担体分子は、ビエピト
ープ化合物を安定化する役割を有し、前記ビエピトープ化合物の被分析物の少なくとも1
つのエピトープを含むペプチド配列 E 1 および E 2 を、より入手しやすくすることを可能
にし、これは一方で同時に E 1 および E 2 間での等モル反応性を保存する。

【0042】

用語「担体分子」は、ペプチドとカップリングされ得る、任意の可溶性分子を意味する
よう意図される。可溶性分子としてはウシ血清アルブミン、イムノグロブリン G およびサ
イログロブリンなどのタンパク質、およびポリリジンなどのポリマーについて言及され得
る。一実施態様によれば、担体分子が、その分子量が20kDaと700kDaとの間、
好ましくは、60kDaと250kDaとの間であるタンパク質である。

【0043】

ポリリジンは、当業者に既知のポリマーである。それらは、たとえばSigma-Ald
richから入手可能である。

【0044】

ウシ血清アルブミンおよびサイログロブリンは、当業者に既知である。イムノグロブリ
ンGに関して、それは、干渉問題を避けるために、イムノアッセイの抗体を得るために用
いられる種または分析される試料が由来する種のいずれにも由来しないように選択される
べきである。例としては、ウサギ、マウス、ウマ、ヤギ、ブタなどイムノグロブリンG（
包括的でないリスト）について言及され得る。

【0045】

一実施態様によれば、担体分子はウシ血清アルブミンである。

【0046】

もう一つの実施態様によれば、抗体がマウス由来であり分析される試料がヒト由来であ
るイムノアッセイにおいて、担体分子は、ウサギイムノグロブリンGである。

【0047】

Z基のレベルでの、ビエピトープペプチドおよびタンパク質性質の担体分子の間のカッ
プリングは、当業者に周知の方法に従って、共有原子価により起こり得る。Z基の側鎖に
存在するスルフヒドリル（sulfhydryl）基（-SH）は、マレイミド、ハロアセチルおよ

10

20

30

40

50

びピリジルジスルフィド基について反応性である。従って、第一のステップにおいて、担体分子の接近可能なアミン基 ($-NH_2$) のレベルで反応する能力があり、結果として、担体分子の表面に、マレイミド類またはハロアセチル類から選択される反応性基を導入する能力があるであろう。モル過剰の架橋剤との反応により、担体分子は活性化されるべきである。これらの基は、それらが、安定であるチオエーテル結合を介したカップリングを得ることを可能とするため、好ましい。マレイミド基を導入することを可能とする架橋剤の中では、N-(マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミドエステル、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートあるいはスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートについて包括的
10
でなく言及され得る。ハロアセチル基を導入することを可能とする架橋剤の中では、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエートおよびスルホスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエートについて包括的
20
でなく言及され得る。活性化された担体分子は、その後、過剰な架橋剤および副生成物を取り除くために、たとえばゲルろ過クロマトグラフィーといった脱塩または透析により、精製される。最後に、活性化された担体分子を、相対的に中央位置にZ基を含むピエプトープペプチドの存在下に置く。マレイミドまたはハロアセチル基は、安定な共有結合性チオエーテル結合を形成するよう、ピエプトープペプチドのZ基のスルフィド基 ($-SH$) と反応する。マレイミドおよびスルフィド基の間の反応は、中性のpH (pH 6.5から7.5)に近い条件下で実行されるべきであり、カップリング部位に対する競合を避けるため、たと
30
えばほとんどの還元剤といった外来のチオールを反応バッファの組成物から排除するべきである。ハロアセチルおよびスルフィド基の間の反応は、pH 7.2から9で実行されるべきである。チロシン、ヒスチジンおよびトリプトファンと反応する能力がある遊離ヨウ素の生成を制限するため、暗所で反応を実行することが好ましい。当業者に既知であるかか
40
る方法は、たとえば、Shan S. Wongによる「Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking」CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, United States, 1991に記載されている。

【0048】

Z基上でのピエプトープペプチドのカップリングを促進するため、リンカーアームX/Yおよび/またはペプチド配列E1/E2がチオール機能を有するアミノ酸誘導体を含む
30
場合、前記ペプチドの形成のため、前記ペプチドの合成のステップの間および担体分子とのカップリングのステップの間に安定である保護基を用いて、このチオール機能のレベルで保護されているアミノ酸誘導体を使用するのは賢明である。従って、基Zを与えるために用いられるアミノ酸のみが、反応性なチオール機能を有するであろう。アームX/Yの
40
および/またはペプチド配列E1/E2のチオール機能を保護するかか
50
るステップを避けるため、XもしくはYまたはE1もしくはE2のいずれもチオール機能を有するアミノ酸誘導体を含むしないことが賢明であり、これは、本発明の特定の一実施態様を構成する。

【0049】

それらのチオール機能のレベルで保護されたアミノ酸は、たとえば、Novabiochem (登録商標) から入手可能である。
40

【0050】

担体分子とピエプトープペプチドのカップリング後、チオール機能は、当業者に既知の技術によって、任意に脱保護されるであろう。保護基としては、DTT (ジチオスレイトール) の存在下、水性媒体 (0.1M炭酸水素アンモニウム) 中で容易に除去されるt-ブチルチオ基について言及され得る。カップリングアームX/Yのみが、チオール機能を有するアミノ酸誘導体を含む場合、かかる脱保護は、必要でないであろうし、アドバ
50
イスされないであろう。ペプチド配列E1/E2が、チオール機能を有するアミノ酸誘導体を含む場合、これがエピトープ認識に影響を及ぼすならば、かかる脱保護が必要となるであろう。

【0051】

カップリングアームおよび/またはペプチド配列が、チオール機能を有するアミノ酸誘導体を含むことも可能である。従って、本発明のペプチド化合物は、下記の特徴の1以上を含む：

- リンカーアーム X は、チオール機能を有するアミノ酸誘導体を含まない、
- リンカーアーム Y は、チオール機能を有するアミノ酸誘導体を含まない、
- ペプチド配列 E 1 は、チオール機能を有するアミノ酸誘導体を含まない、および
- ペプチド配列 E 2 は、チオール機能を有するアミノ酸誘導体を含まない。

【0052】

特定の一実施態様によれば、ペプチド配列 E 1 および E 2 は、チオール機能を有するアミノ酸誘導体を含まない。さらにもう一つの実施態様によれば、X、Y、E 1 および E 2 の中のいずれの要素も、チオール機能を有するアミノ酸誘導体を含まない。

10

【0053】

本発明の化合物は、イムノアッセイにおけるその実施のため、組成物中に含有され得、これは、水中、バッファー中または生物学的流体中に溶解した前記式 (I) の化合物を含みあるいは含有し、これは本発明のもう一つの主題を構成する。

【0054】

水中に溶解した式 (I) のペプチド化合物を含有する組成物は、前記化合物と、水であって溶液の全体積に対して少なくとも 50% の体積を表す主要な溶媒との、完全な溶解により得られる透明な液体溶液である。溶媒の量は、当然ながら、関与する被分析物に依存し、当業者によって容易に決定されるであろう。

20

【0055】

式 (I) の化合物は、バッファー中に溶解されていてもよい。使用されるバッファーは、当業者に周知であり、関与する被分析物に依存する。バッファーの例としては、PBS、HEPES および Tris-HCl バッファーなどのバッファーについて言及され得る。

【0056】

組成物が生物学的流体を含有する場合、前記流体は、検査することが望まれる試料に対応し得る。例としては、全血またはたとえば血清もしくは血漿といったその派生物、尿、唾液および浸出液について言及され得る。

30

【0057】

本発明の組成物中の式 (I) の化合物の量は、関与する被分析物、および対応する測定範囲に依存する。それは、当業者により容易に決定されるであろう。従って、それは、約 1 pg/ml、1 ng/ml または 1 μg/ml であり得る。

【0058】

特に E 1、E 2、X、Y、Z、担体分子および被分析物の選択に関して、以前に記載した同一の特徴および選択は、本発明の組成物に対しても適用される。

【0059】

当然ながら、本発明の組成物は、塩、BSA またはデキストランもしくはポリエチレングリコール型の合成ポリマーなどのフィラータンパク質、または界面活性剤などの、当業者に周知のほかの化合物を含み得る。

40

【0060】

以前に示したように、本発明の化合物および組成物は、それらが容易に合成され、+2/8 で安定であり、イムノアッセイの条件下で可溶性であるため、特に有利である。さらに、本発明の化合物は、予想に反して、イムノアッセイにおいて用いられる結合パートナーに対して、特に高い免疫反応性を有し、すなわち、対照、標準および/またはアジャスターとしてそれらを使用することが望まれる場合、それらが、イムノアッセイ条件下で同一の時間において安定である一方で、対照、標準およびアジャスター溶液中で低い量で含有され得るように、結合パートナーがそれらを特によく認識する。

【0061】

50

従って、本発明のもう一つの主題は、かかるピエプトーブ化合物または、この化合物を含有するかかる組成物の、イムノアッセイにおける、対照または標準もしくはアジャスターとしての使用に関する。

【0062】

用語「式(I)の化合物、またはこの化合物を含有する組成物の、対照としての使用」は、とりわけ、イムノアッセイが予想に従って動作すること(陽性対照とも呼ばれる)および被検試料中の被分析物の検出が偽陰性でないことを検証するための、その使用を意味するよう意図される。

【0063】

表現「式(I)の化合物、またはこの化合物を含有する組成物の、標準としての使用」は、標準範囲を確立するためのその使用を意味するよう意図される。被分析物の定量化を実行し得るための必要なステップである標準範囲の確立は、以前に記載されているように当業者に周知であるステップである。それは、被分析物の漸増する既知の量または濃度により生成されたシグナルを測定すること、量または濃度の関数としてシグナルを与える曲線をプロットすること、およびこの関係をできる限り信頼性高く表す数学的モデルを見出すことにある。これを行うため、いくつかの本発明の水性組成物が使用され、それぞれは、異なる濃度の被分析物を含有する。数学的モデルは、被検試料中に含有される被分析物の未知の量または濃度を、外挿により決定するために使用されるであろう。

10

【0064】

表現「特定の標準である、キャリブレータとも呼ばれるアジャスターとしての、式(I)の化合物またはこの化合物を含有する組成物の使用」は、被分析物のイムノアッセイの測定を調整するための、その使用を意味するよう意図される。この場合、被分析物の濃度は、固定されかつ既知である。アジャスターによりイムノアッセイにおける使用の間に生成されたシグナルもまた既知である。アジャスターは、イムノアッセイの実施の間に実際に生み出された測定(シグナル)が、期待値に対応することを検証するのに役立つ。これが上記の場合でない場合、アジャスターは、デリベーション(derivation)を測定するために役立つ、それは、適当である場合には、数学的に補正するあるいは測定機器への物理的な介入により補正すること(調整)が可能であるだろう。利便性のため、用語「標準」は、本出願において、用語「アジャスター」を含むであろう。

20

【0065】

以前に示されたように、被分析物は、試料中に含有される、生物学的、化学的または生化学的起源の任意の物質であり、それは、分析により、検出され、同定され、および/または定量化される。

30

【0066】

第一の実施態様によれば、被分析物は、心筋トロポニンIであり、式(I)の化合物またはそれを含有する組成物は、心筋トロポニンIイムノアッセイにおいて、対照、標準またはアジャスターとして使用される。

【0067】

トロポニンは、3つのタンパク質、トロポニンI、TおよびCから成る筋細線維のタンパク質複合体であることが知られている。このタンパク質複合体は、ミオシンおよびアクチンと相互作用することにより、 Ca^{2+} イオン介在性筋肉収縮の制御に寄与することを可能とする。

40

【0068】

心筋トロポニンI(Uniprot accession No. P19429)は、ミオシンおよびアクチン間の結合の阻害の原因となるトロポニンサブユニットである。

【0069】

心筋トロポニンIエピトープおよびミモトープは、当業者に既知である。本発明の一つの特定の様式において、ペプチド配列E1およびE2は、以下の配列から選択される。

配列1: A T E P H A K K K

配列2: A G L G F A E L Q D L

50

配列 3 : K I S A S R K L Q L K T

アミノ酸の置換、欠失または挿入により前記ペプチド配列から派生するペプチド配列もまた、それらが問題となる抗体により認識される能力を保持する限りにおいて、本発明の分野に属する。

【 0 0 7 0 】

もう一つの実施態様によれば、式 (I) の化合物またはそれを含有する組成物は、プロディフェンシン - A 6 イムノアッセイにおいて、対照、標準またはアジャスターとして使用される。

【 0 0 7 1 】

ディフェンシンは、微生物の攻撃に対する宿主防御に關与する抗微生物性ペプチドのファミリーである。それらは、成熟形態において、30 から 40 アミノ酸から成り、膜を選択的に脱凝集させる特性を有する。ほかの真核生物タンパク質のように、ディフェンシンは、成熟タンパク質形態だけでなく、前駆体形態としてもまた存在し得る。用語「プロディフェンシン」は、そのため使用される。プロディフェンシン - A 6 (Uni prot a c c e s s i o n No . Q 0 1 5 2 4) は、特に、出願人による特許出願 WO 2 0 1 0 / 1 1 2 7 7 7 において、がんの、特に結腸直腸がんの文脈においてマーカーとしての使用の可能性が記載されている。

10

【 0 0 7 2 】

プロディフェンシン - A 6 タンパク質のエピトープおよびミモトープは、既知であり、たとえば特許出願 WO 2 0 1 0 / 1 1 2 7 7 7 に記載されている。本発明の一つの特定の様式において、ペプチド配列 E 1 および E 2 は、以下の配列のグループから独立に選択され、E 1 が 1 つのグループから選択される場合、E 2 は別のグループから選択されることが考慮される。

20

グループ 1 :

- 配列 4 : N Y V T P P W A I F R H
- 配列 5 : W T G V L S P T Q E Y R
- 配列 6 : S H L T P P W M D Y R V
- 配列 7 : V M A V T C S T C D S R
- 配列 8 : L T P P T E D L R P P D

グループ 2 :

- 配列 9 : Y G N H S C T H I G H C
- 配列 10 : G P S Y T C L H F G H C
- 配列 11 : T E R E V H N W F P F H

30

グループ 3 :

- 配列 12 : Y P H P W S M H V I R A
- 配列 13 : T T T P H P W A L F A V
- 配列 14 : T P H P W Q R W V V Y S
- 配列 15 : E D V L R W H P E W P G

グループ 4 :

- 配列 16 : Y H E T W P P K S A Q L
- 配列 17 : Y H D N W P Q P S R S W
- 配列 18 : Q H N H Q R H G A M G A
- 配列 19 : Y H D M W P M S G R M A
- 配列 20 : Y H D N W P P L N G A R
- 配列 21 : Y H D M W P A I Q L S P
- 配列 22 : Y H E K F P G P V V L P

40

グループ 5 :

- 配列 23 : Q A E D D P L Q A K

【 0 0 7 3 】

これらの対照、標準および / またはアジャスターは、イムノアッセイにより、前記被分

50

析物を含有する可能性のある被検試料中の被分析物の検出および/または定量化するための方法における使用に特に適している。

【0074】

従って、本発明のもう一つの主題は、

- i . 前記被検試料を、被分析物の結合パートナーの1以上と接触させることによるイムノアッセイ検査、
- ii . 陽性対照として、以前に定義した式Iのビエビトープ化合物または以前に定義した組成物を、前記被分析物の結合パートナーの1以上と接触させることにより、イムノアッセイ検査の信頼性を検証する検査、
- iii . 信頼性検証検査が陽性の場合、イムノアッセイ検査を読みとること、
- iv . ステップiのイムノアッセイ検査により得られるシグナルが、イムノアッセイ検査の検出閾値より大きい場合に、被検試料中に前記被分析物が存在すると決定すること、を含む、イムノアッセイにより、前記被分析物を含有する可能性のある被検試料中の被分析物を検出するための方法に関する。

10

【0075】

本発明の文脈において、被検試料は、さまざまな起源であってもよく、たとえば、食品、環境的、生物学的、獣医学的、臨床的、製薬学的または化粧品起源であってもよい。

【0076】

食品起源の試料の中では、乳製品（ヨーグルト、チーズなど）、肉、魚、卵、果物、野菜、水、飲料（牛乳、フルーツジュース、ソーダなど）の試料について、非包括的に言及され得る。当然ながら、食品起源のこれらの試料は、ソース、またはより手の込んだ料理、または変形されていない、あるいは部分的に変形された原材料に由来してもよい。食品試料は、油かすまたはアニマルミールなどの動物飼料に由来してもよい。これらの試料の全ては、それらが液体でない場合、液体形態になるように前処理される。

20

【0077】

以前に示されたように、試料は、環境的起源のものであってもよく、たとえば表面採取物、採水物などのものから成ってもよい。

【0078】

試料は、ヒトまたは動物起源の生物学的試料から成ってもよく、これは、生物学的流体（尿、全血またはたとえば血清もしくは血漿といったその派生物、唾液、膿、脳脊髄液など）の採取物、排せつ物（たとえば、コレラ性下痢）、鼻、喉、皮膚、傷、臓器、組織または単離された細胞の採取物、あるいはぬぐい液試料に対応してもよい。このリストは、明らかに包括的ではない。

30

【0079】

一般に、用語「試料」は、分析目的のため1以上の実在物からとった、部分または量、より具体的には小さな部分または少量に言及する。この試料は、任意に、特に出発実在物が固体状態である場合、たとえば混合、希釈あるいは粉碎工程を含む、前処理を受けたものであり得る。

【0080】

分析される試料は、検出され、特徴づけられまたはモニターされる微生物または疾患の存在を代表する少なくとも1つの被分析物を、一般に含有してもよく、あるいは含有が疑われてもよい。

40

【0081】

イムノアッセイにより被分析物を検出するためのこの方法のステップは、以前に記載されてきた、当業者に周知のステップである。特に、第一のステップは、被検試料を、被分析物の結合パートナーの1以上、好ましくはサンドイッチ検査のために2つの結合パートナーと接触させることにある。以前に記載されたように、2つのパートナーの1つは、コンジュゲートまたはトレーサーを形成するため、標識とカップリングされ得る。ほかの結合パートナーは、当業者に既知であるように、固体支持体上に捕捉され得る。そのため、用語「捕捉パートナー」は、後者のために、「検出パートナー」は前者のために使用され

50

る。

【0082】

コンジュゲートにより発せられる、測定されたシグナルは、したがって、生物学的試料中の被分析物の量に比例する。

【0083】

興味のある被分析物の結合パートナーは、被分析物に対して結合能力がある任意の分子である。被分析物の結合パートナーの例として、当業者に周知の、(モノクローナルまたはポリクローナル)抗体および抗体断片などの、免疫学的性質または起源の結合パートナー、nanofitin、存在する場合には被分析物の受容体、アプタマー、DARPinsまたは前記被分析物と相互作用を有することが知られているほかの任意の分子などの、免疫学的性質または起源でない結合パートナーについて言及され得る。

10

【0084】

Nanofitin(商品名)は、低分子タンパク質であり、抗体のように、生物学的標的に対する結合能力があり、したがって、それを検出し、それを捕捉し、あるいは生物内でそれを極めて単純に標的とすることを可能とする。

【0085】

アプタマーは、「Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment」(Ellington AD and Szostak JW., 1990)のためSELEXと呼ばれるin vitro選択の組合せ的手法により、 10^{15} の異なる配列を含有するライブラリー中で同定される、オリゴヌクレオチド、一般にRNAまたはDNAである。多くのアプタマーは、RNA化合物であるが、これは、RNAの、さまざまな複雑な構造を選択し、それにより、その表面にさまざまな形状の空洞を作り出すことを可能とし、さまざまなリガンドと結合することを可能とする能力のためである。それらは、生物工学、診断または治療応用において使用され得る、興味のある生化学なツールである。それらの選択性およびそれらのリガンド結合特性は、抗体のものに匹敵する。

20

【0086】

Designed Ankyrin Repeat ProteINS(Boersma YL and Plutckthun A, 2011)についての「DARPins」は、抗体を模倣することを可能とし、標的タンパク質に対して高い親和性および高い選択性をもって結合することができる別のクラスのタンパク質である。それらは、細胞形質膜の「脊柱」を構成するスペクトリン/アクチンネットワークに不可欠な膜タンパク質と結合することを可能とするアダプタータンパク質であるアンキリンタンパク質のファミリーに由来する。アンキリンの構造はおよそ33アミノ酸のユニットの繰り返しに基づき、同じことはDARPinsにも当てはまる。それぞれのユニットは、ヘリックス-ターン-ヘリックス型の二次構造を有する。DARPinsは、少なくとも3つ、好ましくは4から5の繰り返しユニットを含有し、組合せ的ライブラリーのスクリーニングにより得られる。

30

【0087】

用語「標識」は、特に、化学修飾なしに直接的に、あるいはかかる基を含むような化学修飾後に、結合パートナーの基と反応性である基を含有する任意の分子であって、その分子が直接的にあるいは間接的に検出可能なシグナルを生成する能力がある分子を意味するよう意図される。これらの直接的な検出標識の非限定的なリストは、

40

・セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼまたはグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼなどの、たとえば、測色、蛍光または発光によって検出可能なシグナルを生み出す酵素、

・蛍光、発光または染料化合物などの発色団、

・ ^{32}P 、 ^{35}S または ^{125}I などの放射性分子、

・Alexaまたはフィコシアニンなどの蛍光分子、および

・アクリジニウムまたはルテニウムに基づく有機金属誘導体などの、電気化学発光塩、から成る。

【0088】

50

間接的な検出システム、たとえば、抗リガンドと反応する能力があるリガンドが、使用され得る。リガンドは、そのため、結合パートナーと、コンジュゲートを構成するための標識に対応する。

【0089】

リガンド/抗リガンドのペアは、当業者に周知であり、これは、たとえば、以下のペア：ビオチン/ストレプトアビジン、ハプテン/抗体、抗原/抗体、ペプチド/抗体、糖/レクチン、ポリヌクレオチド/それに対し相補的なポリヌクレオチドを用いる場合である。

【0090】

抗リガンドは、そのため、以前に記載された直接的な検出標識により直接的に検出可能であってもよく、あるいは、それ自身が、ほかのリガンド/抗リガンドのペアなどにより検出可能であってもよい。

10

【0091】

これらの間接的な検出システムは、ある条件下で、シグナルの増幅をもたらし得る。このシグナル増幅技術は、当業者に周知であり、出願人による先の特許出願FR2781802またはWO95/08000が参照され得る。

【0092】

使用される標識の型に応じて、当業者は、標識の可視化、または、たとえば、分光光度計、分光蛍光光度計、濃度計あるいは高解像度のカメラといった、任意の型の適当な測定デバイスにより検出可能なシグナルの発生、を可能にする試薬を添加するであろう。

20

【0093】

イムノアッセイ検査の信頼性を検証する検査であるステップは、以前に記載したとおりである。

【0094】

イムノアッセイ検査 i) および検証検査 i i) は、任意の順で、同時にまたは引き続いて、任意に同一の固体支持体上で、実行され得る。

【0095】

イムノアッセイ検査の読み取りも用いられる検査に依存する、当業者に周知のステップである。

【0096】

最後に、最後のステップは、ステップ i のイムノアッセイ検査により得られるシグナルが、イムノアッセイ検査の検出閾値より大きい場合に、被検試料中に前記被分析物の存在の決定から成る。このステップは当業者に周知である。

30

【0097】

検出に加えて、本発明の化合物は、被検試料中の被分析物の定量化にも適している。従って、本発明のもう一つの主題は、被分析物を含有する可能性のある被検試料中で、イムノアッセイにより被分析物を定量化するための方法であって、

i . 前記被検試料を、被分析物の結合パートナーの 1 以上と接触させることによるイムノアッセイ検査

i i . 陽性対照を、前記被分析物の結合パートナーの 1 以上と接触させることにより、イムノアッセイ検査の信頼性を検証する検査、

40

i i i . 信頼性検証検査が陽性の場合、イムノアッセイ検査を読みとること、および

i v . イムノアッセイ検査のシグナルを、以前に定義した式 I のビエピトープ化合物または以前に定義した組成物を用いて事前に得た標準曲線と比較することにより、被検試料中の前記被分析物の量を決定すること、を含む方法。

【0098】

定量化方法の前記ステップは、以前に定義した。特に、イムノアッセイ検査 i) および検証検査 i i) は、任意の順で、同時にまたは引き続いて、任意に同一の固体支持体上で、実行され得る。

【0099】

50

この定量化方法において、陽性対照は、用いられるイムノアッセイにおいて被分析物に匹敵する抗原反応性を有する、対照として使用される任意の化合物であってよい。一実施態様によれば、陽性対照は、以前に定義されたピエピトープ化合物または組成物である。

【0100】

標準曲線は、本発明の化合物または組成物を用いて準備される。それにもかかわらず、ほかの任意の適当な標準溶液が用いられ得る。従って、本発明のもう一つの主題は、前記被分析物を含有する可能性のある被検試料中で、イムノアッセイによる被分析物を定量化するための方法であって、

i. 前記被検試料を、被分析物の結合パートナーの1以上と接触させることによるイムノアッセイ検査、

ii. 陽性対照として、以前に定義された式Iのピエピトープ化合物または以前に定義された組成物を、前記被分析物の結合パートナーの1以上と接触させることにより、イムノアッセイ検査の信頼性を検証する検査、

iii. 信頼性検証検査が陽性的の場合、イムノアッセイ検査を読みとること、および

iv. イムノアッセイ検査のシグナルと、標準曲線とを比較することにより、被検試料中の前記被分析物の量を決定することを含む方法に関する。

【0101】

特に特定の化合物および被分析物の選択に関する、イムノアッセイのさまざまなステップに対して以前に記載した同一の特徴および選択は、本発明の検出方法および定量化方法に対しても適用される。

【0102】

特に、これらの全ての検出および定量化方法において、被分析物は、心筋トロポニンIまたはプロディフェンシン-A6であってもよい。

【0103】

本発明のイムノアッセイ方法は、本発明の化合物または組成物を含む診断キットの使用に関与し、これは、本発明のもう一つの主題を構成する。

【0104】

上記のような本発明の化合物または組成物に加えて、本発明によるキットは、イムノアッセイにより興味のある被分析物の存在を検出するまたは定量化するための方法の実施に必要な化合物も含有し得、たとえば、サンドイッチ型イムノアッセイにより、結合パートナー並びに結合パートナーおよび興味のある被分析物の間の反応を実証するために必要である全ての化合物などを含有し得る。

【図面の簡単な説明】

【0105】

本発明は、非限定的具体例として提供される以下の実施例によって、さらには図によって、より明確に理解されるであろう。

【図1】先行技術によるピエピトープ化合物(REF化合物)、本発明によるピエピトープ化合物(化合物1)および本発明のピエピトープ化合物1に対応するピエピトープペプチドであるが担体分子とカップリングされていない(非カップリングペプチド1)により発せられる、VIDAS(登録商標)自動デバイスにより決定された蛍光シグナルRFVを、その濃度の関数として与えるグラフである。

【図2】先行技術によるピエピトープ化合物(REF化合物)、および本発明によるピエピトープ化合物(化合物1および3)により発せられる、VIDAS(登録商標)自動デバイスにより決定された蛍光シグナルRFVを、その濃度の関数として与えるグラフである。

【図3】先行技術によるピエピトープ化合物(REF化合物)、および本発明によるピエピトープ化合物(化合物1および4)により発せられる、VIDAS(登録商標)自動デバイスにより決定された蛍光シグナルRFVを、その濃度の関数として与えるグラフである。

【実施例】

10

20

30

40

50

【0106】

実施例1：ペプチド合成

ペプチド合成は、アブライドバイオシステムズ（フォスターシティ、CA、米国）からのABI 433Aシンセサイザ、またはCEM Corporation（マシューズ、NC、米国）からのLibertyシンセサイザのいずれかを用いて実行した。Rink Amide MBHA resin（Cat. No. 855003、Novabiochem（登録商標）、メルクミリポア、モルスアイム、フランス）を、重合固相支持体として用いた。

【0107】

化学合成の最後に、トリフルオロ酢酸 - エタンジチオール - トリイソプロピルシラン - 水（94/2.5/1/2.5 V/V/V/V）の混合物の存在下、およそ2時間、ペプチドを脱保護し、ポリマーから開裂させた。ろ過によるポリマーの排除後、0 でジエチルエーテルからの沈殿により、ペプチドを単離した。

10

【0108】

純度を増加させるため、Vynac Denali（商標）120 C18, 10 μmカラム（Mandel Scientific Company Inc.、ゲルフ、オンタリオ、カナダ）上での逆相分取高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によりペプチドを精製した。各ペプチドは、0.1%のトリフルオロ酢酸を含有する水溶液中のアセトニトリル（0から95%）の段階的勾配を用いて溶出され、ステップのアセトニトリルのパーセンテージは、興味のあるペプチドに対応するピークの単離を最適化するように選択された。この最後のステップ後、得られたペプチドを検証し、特徴付けするために、2つの異なる分析技術が実行された。

20

【0109】

Chromolith（登録商標）High Resolution RP-18 encapped逆相カラム（メルクミリポア、モルスアイム、フランス）上、それぞれのペプチドに対する分析HPLCプロファイルが生成された。0.1%トリフルオロ酢酸を含有する水性溶液中のアセトニトリル（0から100%）の直線勾配により溶出は実行され、214 nmでの吸光度を測定することによりモニターされた。この分析は、ペプチドの純度のレベルを決定することを可能とする。

【0110】

それぞれのペプチドも、Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 6540 UHDマスペクトロメーター（アジレント・テクノロジー）と連結したZorbax Eclipse Plus C18 RRHD 2.1 x 50 mmカラム、粒子径1.8 μm（アジレント・テクノロジー、サンタクララ、CA、米国）上の液体クロマトグラフィー - マスペクトロメトリー（LC/MS）により分析された。この分析は、ペプチドのモル質量を決定することを可能とする。

30

【0111】

合成したペプチドの配列および特徴づけ結果を表1に示す。

表1 合成したペプチドの配列および特徴

識別子	被分析物	配列	得られた量 (m g)	純度	測定された モル質量 (ダルトン)
ペプチド1	TnI	ATEPHAKKK-Ado ₂ -C-Ado ₂ -AGLG FAELQDL-NH ₂	78.8	97%	2806.47
ペプチド2	TnI	ATEPHAKKKC-NH ₂	48.0	97%	1110.60
ペプチド3	TnI	AGLGFAELQDLC-NH ₂	50.0	95%	1234.60
ペプチド4	TnI	KISASRKLQLKT-Ado ₂ -C-Ado ₂ -AG LGFAELQDL-NH ₂	59.7	99%	3169.75
ペプチド5	TnI	ATEPHAKKKGGGSCSGGGAGLG FAELQDL-NH ₂	10.0	89%	2741.36
ペプチド6	PDEF-A6	QAEDDPLQAK-Ado ₂ -C-Ado ₂ -WT GVLSPTQEYR-NH ₂	32.0	99%	3215.50

10

20

略称 T n I は、心筋トロポニン I に、P D E F - A 6 はプロディフェンシン - A 6 に対応する。略称 A d o は、8 - アミノ - 3 , 6 - ジオキサオクタン酸 (C A S No . : 1 3 4 9 7 8 - 9 7 - 5) に対応する。

【 0 1 1 2 】

表2 免疫反応性の点から検査された、得られた本発明によるビエピトープ化合物 (式

I) の概要

識別子	被分析物	エピトープE1	エピトープE2	アームX	アームY	担体分子
化合物1	TnI	ATEPHAKKK	AGLGFAELQDL	(Ado) ₂	(Ado) ₂	BSA
化合物2	TnI	KISASRKLQLKT	AGLGFAELQDL	(Ado) ₂	(Ado) ₂	BSA
化合物3	TnI	ATEPHAKKK	AGLGFAELQDL	(Ado) ₂	(Ado) ₂	IgG
化合物4	TnI	ATEPHAKKK	AGLGFAELQDL	GGGS	SGGG	BSA
化合物5	PDEF-A6	QAEDDPLQAK	WTGVLSPTQEYR	(Ado) ₂	(Ado) ₂	BSA

30

略称 T n I は、心筋トロポニン I に、P D E F A 6 はプロディフェンシン - A 6 に対応する。略称 A d o は、8 - アミノ - 3 , 6 - ジオキサオクタン酸 (C A S No . : 1 3 4 9 7 8 - 9 7 - 5) に対応する。略称 B S A は、ウシ血清アルブミンに対応する。I g G は、ウサギイムノグロブリン G である。

40

【 0 1 1 3 】

実施例 2 : ビエピトープ化合物の調製

ビエピトープ化合物は、一方である実施例 1 において得られたペプチドと、もう一方である担体分子との間の共有結合性カップリングを実行することにより得られた。表 2 は、調製されたさまざまな、本発明によるビエピトープ化合物を詳細に示す。これらの化合物のすべては、式 I に対応する。表 3 は、行われたすべてのカップリングを要約し、ペプチドおよび担体分子のペアを特定した。

【 0 1 1 4 】

50

カップリングのための手順は、以下のとおりである：

最初に、担体分子として選択されたタンパク質を、過剰な、スルホ - S M C C (スルホスクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、C A S No. : 9 2 9 2 1 - 2 4 - 9、C a t . N o . 2 2 3 2 2、P i e r c e , T h e r m o S c i e n t i f i c、ヴィルボン・シュール・イエヴェット、フランス)の存在下で、活性化させた。ウシ血清アルブミン (B S A、P r o l i a n t H e a l t h & B i o l o g i c a l s、アンケニー、I A、米国) に対し、1 / 2 0 の B S A / S M C C モル比が選択された。従って、B S A は、1 0 m g / m l P B S (リン酸緩衝生理食塩水) p H 7 . 2 に希釈され、用事調製された 2 5 m g / m l スルホ - S M C C 水溶液 5 3 μ l が滴下された。ウォーターバス中での、3 0 \pm 2、1 時間 \pm 5 分間の、おだやかな磁気攪拌を伴うインキュベーション後、B S A - S M C C は、1 2 から 1 4 k D a のカットオフ閾値を有する透析チューブ中、1 5 0 m M N a C l を含有する 5 0 m M リン酸バッファー p H 6 . 8 に対し透析された。透析は、常温で行われ、透析バスは、1 時間ごとに 3 回、交換された。透析後、B S A - S M C C 溶液のタンパク質濃度は、2 8 0 n m で吸光度を測定することにより決定され、この濃度は、1 5 0 m M N a C l を含有する 5 0 m M リン酸バッファー p H 6 . 8 中 5 m g / m l に調整された。このステップは、担体分子の表面を修飾することを可能とし、これはその時からマレイミド型のいくつかの反応性基を有する。

10

【 0 1 1 5 】

カップリングされるペプチドは、純度が考慮に入れられ、1 5 0 m M N a C l および 5 m M E D T A を含有する 5 0 m M リン酸バッファー p H 6 . 8 中に、5 m g / m l で溶解された。B S A / ペプチドモル比 1 / 1 0 が選択された。従って、5 m g / m l の濃度の B S A - S M C C 2 . 3 5 m g (0 . 4 7 m l) を、5 m g / m l の濃度のペプチド 1 m g (2 0 0 μ l) に対して添加した。この混合物は、ホイール上で、2 / 8 で最低 1 6 時間、インキュベートされた。用事調製した、1 5 0 m M N a C l を含有する 5 0 m M リン酸バッファー p H 6 . 8 中の 0 . 1 M の 2 - メルカプトエチルアミン (C A S No. : 6 0 - 2 3 - 1、システアミン) を添加することにより、その後反応を妨げた。ホイール上で、実験室温度での 2 0 \pm 5 分間のインキュベーション後、ペプチド - B S A コンジュゲートは、1 2 から 1 4 k D a のカットオフ閾値を有する透析チューブ中で、P B S バッファー p H 7 . 2 に対して透析された。透析は 2 / 8 で最低 1 6 時間継続し、透析後、タンパク質濃度を、P B S バッファー p H 7 . 2 中、2 m g / m l B S A の理論濃度に調整した。ペプチド - B S A コンジュゲートの濃度は、そのため、2 8 0 n m の吸光度測定により決定された。このステップは、チオエーテル結合を形成させるため、カップリングされるペプチド配列に依存して、末端または中央のシステインのレベルで、ペプチドのマレイミド基およびスルフヒドリル (s u l f h y d r i l) 基 (- S H) 間の反応を可能にする。

20

30

【 0 1 1 6 】

化合物 1、2、4 および 5 は、すべて、上記の手順の適用により得られた。特許 U S 6 1 1 4 1 8 0 に記載されたペプチド化合物に対応する R E F 化合物について、2 つのペプチド (ペプチド 2 およびペプチド 3) を B S A - S M C C の存在下に同時に置き、それぞれのペプチドを 1 / 1 0 の理論上の B S A / ペプチドモル比でカップリングさせたことを除いては同一の手順を適用した。化合物 3 については、ペプチド 1 は、ウサギポリクローナルイムノグロブリン G (ビオメリュー) とカップリングされた。手順は、B S A がほかの担体分子と交換されることを除いては、同一である。理論上の担体分子 / ペプチドモル比は 1 / 1 0 であった。

40

表3 ペプチド-担体分子カップリングの概要

	識別子	ペプチド	担体分子
本発明による ビエピトープ化合物	化合物1	ペプチド1	B S A (ウシ血清アルブミン)
	化合物2	ペプチド4	B S A
	化合物3	ペプチド1	ウサギイムノグロブリンG
	化合物4	ペプチド5	B S A
	化合物5	ペプチド6	B S A
先行技術による ビエピトープ化合物 (U S 6 1 1 4 1 8 0)	R E F 化合物	ペプチド2 および ペプチド3	B S A

10

【0117】

実施例3：本発明によるビエピトープ化合物1の免疫反応性の研究

化合物のビエピトープ性質の研究は、V I D A S (登録商標)イムノ分析自動デバイス(ピオメリュー)を用いる心筋トロポニンイムノアッセイにより、実行された。使い捨てのチップは、反応のための固相、およびピペッティングシステムのいずれとしても役立つ。カートリッジは、10ウェルから構成される。(密封され、標識されたアルミニウムのシートでカバーされているX0からX9。第一のウェル(X0)は、試料の導入を容易にするために、事前に切られた部分を含む。最後のウェル(X9)は、その中で基質の蛍光が測定される光学キュベットである。分析に必要であるさまざまな試薬は、中間のウェルに含有された。検査のすべてのステップは、機器により自動的に実行された。それらは、反応媒体の吸引/吹き戻しの一連のサイクルから成る。心筋トロポニンイムノアッセイは、シングルステップサンドイッチ検査によって実行された。

20

【0118】

a) チップの感作および不動態化

使用された抗体の特徴および供給元を表4に示す。チップは、P B S バッファー、p H 6.2 中で 2.5 μ g / ml にそれぞれ希釈された 19C7 および B90 モノクローナル抗体溶液 300 μ l を用いて感作した。感作溶液を用いて + 18 / 25 でのおよそ 20 h のインキュベーション後、チップを空にした。10 g / l のウシ血清アルブミンを含有するこの同一溶液 300 μ l を、その後、添加した。不動態化は、+ 18 / 25 で一晩継続する。チップを空にし、乾燥して、その後、使用まで湿気の無い環境にて + 4 で保存される。

30

表4 心筋トロポニンIイムノアッセイのために用いられる抗体

抗体名	標的	E 1またはE 2の配列	供給元 (Cat.No.)
19C7	TnI	KISASRKLQLKT	Hytest (4T21-19C7)
B90	TnI	ATEPHAKKK	SDIX (B9085MA06-MA)
3D5F7	TnI	AGLGFAELQDL	バイオメリユー (非商用)
7B9	TnC	NA	Hytest (4T27-7B9)

10

NA：入手可能でない。略称TnIは、心筋トロポニンIに対応し、略称TnCは、心筋トロポニンCに対応する。略称Cat.No.は、供給元のカタログ参照に対応する。

【0119】

b) イムノアッセイ手順

検査化合物は、PBS-BSAバッファー中、さまざまな濃度で希釈され、試料としてアッセイされた。

このチップ上で捕捉抗体が不動化されているため、VIDAS（登録商標）チップが試料と接触するとすぐ、免疫学的反応が開始する。自動デバイスは、被検試料（135μl）を、270μlのコンジュゲート溶液と混合する。この溶液は、アルカリホスファターゼとカップリングされたFab'断片の形態の、2つのモノクローナル抗体3D5F7および7B9を含有する。これらのコンジュゲートを、150mMのNaClおよびフィラータンパク質も含有する100mMリン酸バッファー、pH6.4中、およそ0.75μg/mlで希釈した。

【0120】

インキュベーションは、37℃で6.8分続き、一方の手でのチップに吸着した抗体との、もう一方の手でのコンジュゲートとの、心筋トロポニンIのまたは心筋TnIピエピトープ化合物もしくは心筋TnIペプチドの特異的な結合を可能にする。非結合成分は、その後、300mM NaClおよび0.2% Triton X-100を含有する200mM TrisバッファーpH7.8を用いる3回の洗浄により取り除かれる。最終的な現出ステップの間、4-メチルウンベリフェリルホスフェート基質は、チップ中で、吸い上げられ、その後、吹き戻される；コンジュゲートの酵素は、この基質の4-メチルウンベリフェロンへの加水分解のための反応を触媒し、その発せられる蛍光が、450nmで測定される。蛍光シグナル（RFV=相対的蛍光値）の値は、試料中に存在する抗原の濃度に比例する。

【0121】

表5は、REFピエピトープ化合物（先行技術）、本発明によるピエピトープ化合物1および非カップリングペプチド1（実施例1）の免疫反応性を比較する際の、VIDAS（登録商標）自動デバイスにより決定された蛍光シグナル（RFV=相対的蛍光値）を要約する。図1は、グラフ形態での、これらの同一のデータを表す。リマインダーとして、ペプチド1は、1つが以前に記載されたイムノアッセイのB90捕捉抗体により認識され、もう1つが3D5F7検出抗体により認識される、2つの心筋TnIエピトープを含む。本発明による化合物1において、ペプチド1を、そのより良い抗原提示および改善された安定性を確保するため、BSA上の中央のシステインを介してカップリングさせた。R

20

30

40

50

EF化合物は、BSAともカップリングさせた、同一の2つのTnIエピトープを有する。化合物1と違い、2つのエピトープのそれぞれは、末端システインのレベルでBSAとカップリングしている個別のペプチド（ペプチド2および3）の形態である。化合物1、特許US6114180に記載されるピエピトープ化合物に対応するREF化合物、および、特許出願WO98/24816に記載の合成ピエピトープ化合物に対応するペプチド1、はいずれも心筋TnIイムノアッセイにおいて反応性であったが、それらの反応性のレベルは、非常に異なっていた。従って、およそ1000RFVのシグナルを得るため、1118 μ MのREF化合物と比較して、21 μ Mの化合物1が必要であり、すなわち、およそ50分の1である。化合物1は、REF化合物よりはるかによい免疫反応性を示した。さらに、化合物1を用いて得られるVIDAS（登録商標）シグナルの良いダイナミクスは、REF化合物を用いては、はるかに高い濃度のこの化合物を検査する場合でさえ、再現されない。非カップリングペプチド1は、BSAとカップリングされた2つのピエピトープ化合物よりもはるかに低く認識された。

10

表5 ピエピトープ化合物1、3、4およびREFの並びに心筋TnIペプチド1の免疫反応性

[c]ペプチド ng/mL	REF化合物 (89kDa)		化合物1 (94kDa) ペプチド 1-BSA		非カップリン グペプチド1 (28kDa)		化合物3 (188kDa) ペプチド 1-IgG		化合物4 (93kDa) ペプチド 5-BSA	
	[c]	S	[c]	S	[c]	S	[c]	S	[c]	S
0.5	—	—	5.3	270	—	—	—	—	—	—
1	—	—	11	451	—	—	5,3	175	11	60
2	—	—	21	935	—	—	11	360	21	118
5	56	62	53	1903	—	—	27	882	54	295
10	112	120	106	3606	—	—	53	1688	107	545
20	224	223	213	5911	713	2	106	3276	214	1100
50	559	617	—	—	1781	21	266	6209	535	2569
100	1118	997	—	—	3562	69	—	—	—	—
200	2236	1484	—	—	7125	356	—	—	—	—
500	5589	2102	—	—	17811	1825	—	—	—	—
1000	11179	2155	-	-	35623	3798	—	—	—	—
2000	—	—	—	—	71245	6140	—	—	—	—
4000	—	—	—	—	142491	7542	—	—	—	—

20

30

40

略称 [c] は、 μ Mでの化合物の濃度に対応する。略称 S は、RFVにおけるシグナルに対応する。

【0122】

実施例4：さまざまな担体分子を用いる、本発明によるピエピトープ化合物の免疫反応性の比較

本実施例において、心筋TnIの2つの異なるエピトープを含むペプチド1を、2つの異なる担体分子：BSA（化合物1）およびウサギイムノグロブリンG（化合物3）とカ

50

ップリングさせた。これらのピエプトーブ化合物を得ることは、実施例 2 において記載されている。心筋 T n I イムノアッセイにおける、これらの化合物の免疫反応性の比較は、実施例 3 に記載されたように、実行され、結果が上記表 5 および図 2 に示され、これは、先行技術によるピエプトーブ化合物 (R E F 化合物) および本発明によるピエプトーブ化合物 (化合物 1 および 3) といったさまざまな化合物により発せられる R F V 蛍光シグナルを、それらの濃度の関数として与えるグラフを表す。結果は、化合物 1 および 3 がいずれも心筋 T n I イムノアッセイにおいて反応性であって同等の反応性を示し、それは R E F 化合物に対して観察されたものよりはるかに大きいことを示す。

【 0 1 2 3 】

実施例 5 : さまざまなスパーサーアームを用いる本発明によるピエプトーブ化合物の免疫反応性の比較

本実施例において、比較されるピエプトーブ化合物は、スパーサーアームについてのみ異なる。化合物 1 の場合には、2 つのスパーサーアームが同一であり、それは人工アミノ酸 A d o のダイマーである。化合物 4 は、アーム X として G G G S 配列、およびアーム Y として S G G G 配列を含む。リマインダーとして、2 つの化合物は、2 つの心筋 T n I エピトープを有し、担体分子は B S A である。これらのピエプトーブ化合物を得ることは、実施例 2 に記載されている。心筋 T n I イムノアッセイにおけるこれらの化合物の免疫反応性の比較が、実施例 3 に記載のとおり実行され、結果を上記表 5 および図 3 に示した。先行技術によるピエプトーブ化合物 (R E F 化合物) および本発明によるピエプトーブ化合物 (化合物 1 および 4) といったさまざまな化合物により発せられる R F V 蛍光シグナルを、それらの濃度の関数として与えるグラフを表す。結果は、G G G S および S G G G アームを含む化合物 4 が、A d o アームを含む化合物 1 よりは低いが、R E F 化合物よりはるかによく認識されることを示す。

【 0 1 2 4 】

実施例 6 : 安定性検査

化合物 1 および 2 は、表 6 において示されたさまざまなバッファー中、3 . 7 5 n g / m l に希釈された。第一のアッセイは、溶液が調製された日である、D 0 に実行された。得られた値は、安定性をモニターするための参照として役立った。ピエプトーブ化合物の希釈された溶液は、+ 2 / 8 で保存され、D 7 (調製 7 日後) にアッセイされた。以下の表 6 は、イムノアッセイの R F V シグナルにおける、D 0 および D 7 (シグナル D 7 / シグナル D 0 × 1 0 0) 間での変化を示す。化合物 1 および 2 は、安定であり、それらが + 2 / 8 で 1 週間保存される場合もその抗原性特性は保存される。

表 6 + 2 / 8 ° C、7 日間での、化合物 1 および 2 の安定性

希釈バッファー	化合物 1	化合物 2
クエン酸 pH5、150mM NaCl、50g/l BSA	102%	98%
クエン酸 pH6、150mM NaCl、50g/l BSA	99%	95%
PBS pH6.2、50g/lBSA	99%	89%

【 0 1 2 5 】

第二のステップにおいて、より長い期間の安定性研究が、5 0 g / l の B S A を含有する P B S p H 6 . 2 中に希釈された化合物 1 のみについて実行された。+ 2 / 8 で保存する場合、化合物 1 は、希釈溶液中で安定である : イムノアッセイのシグナルの 9 7 % が 1 月、9 4 % が 3 月、さらに 9 0 % が 6 月保存時に、見出された。+ 1 8 / 2 5 で保存する場合、希釈溶液中、およそ 1 月間 (8 8 % のシグナルが見出された)、化合物 1 は安定である。化合物 1 は、- 2 0 での、少なくとも 3 回の凍結 / 融解サイクルに、その抗原性特性のいかなる低下も伴わずに耐える能力があることに気が付くことも重要である。より多い回数の凍結 / 融解サイクルは、検査しなかった。

【 0 1 2 6 】

これらの結果のすべては、本発明による化合物 1 の溶液の卓越した安定性を実証する。

【 0 1 2 7 】

実施例 7：ミモトープを含む本発明によるピエピトープ化合物 5 の免疫反応性の研究

ピエピトープ化合物 5 は、プロディフェンシン A 6 イムノアッセイ中の対照および / または標準および / またはアジャスターとして動作するために設計された。化合物 5 は、線状エピトープ (Q A E D D P L Q A K L) およびミモトープ (W T G V L S P T Q E Y R) を結合させる。プロディフェンシン A 6 イムノアッセイは、出願 WO 2 0 1 0 / 1 1 2 7 7 7 に記載されたプロトコルに従って、すなわち、配列 E D D P L Q の線状最小エピトープを認識する 1 2 H 4 E 1 クローン (ビオメリュー) を捕捉抗体として用い、エピトープが線状ではなく配列 W T G V L S P T Q E Y R のミモトープである 1 H 8 C 9 クローン (ビオメリュー) を検出抗体として用いて、V I D A S (登録商標) 自動イムノ分析デバイス (ビオメリュー) を用いて実行された。これらのエピトープ / ミモトープは、化合物 5 中に見出されるものである。

10

【 0 1 2 8 】

以下の表 7 は、さまざまな濃度の化合物 5 (分子のモル質量 : 9 8 1 5 5 ダルトン) が検査される場合の、V I D A S (登録商標) 自動デバイスにより決定された蛍光シグナル (R F V = 相対的蛍光値) を要約する。化合物 5 は、実際、プロディフェンシン A 6 イムノアッセイにおいて、反応性である。

表 7 ピエピトープ化合物 5 の免疫反応性

20

[c]ペプチド ng/ml	[c]mM	RFVシグナル
17.5	0.2	385
35	0.4	583
175	1.8	1306
1750	18	2637
17 500	178	3448

30

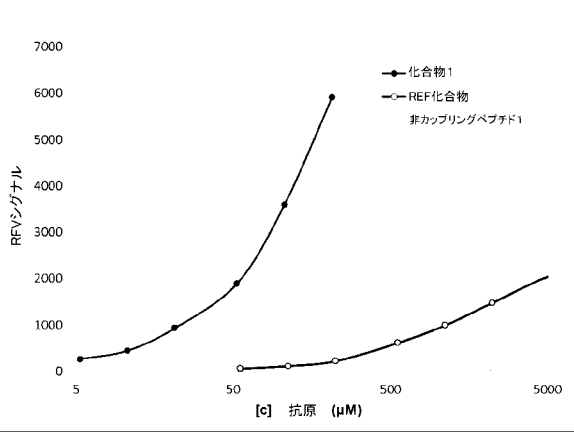
【 0 1 2 9 】

文献参照

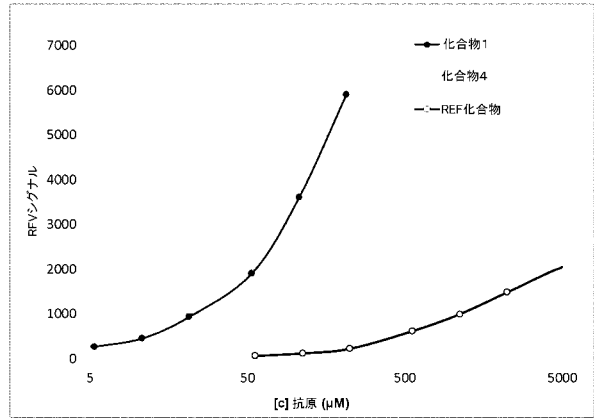
- Boersma YL and Plutckthun A, 2011, Curr. Opin. Biotechnol, 22 : 849-857
- Ellington AD and Szostak JW., 1990, Nature, 346: 818-822
- Fields and Noble, 1990, Int J Pept Protein Res., 35:161-214
- Merrifield 1963, J Am Chem Soc. 85:2149-2154
- Shan S. Wong, 1991, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking , CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, United States

40

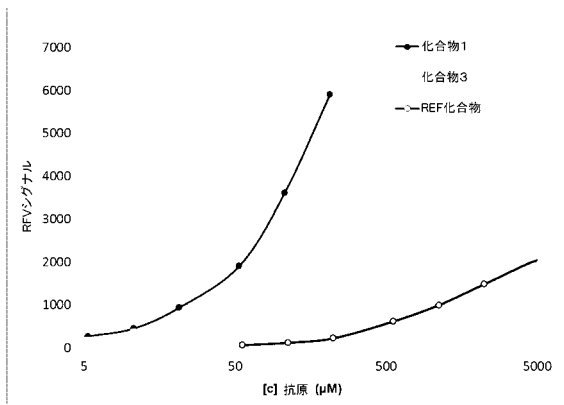
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



【 配列表 】

[201850123800001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/FR2015/053560

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/47 G01N33/68 ADD.		
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) C07K 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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HILLSON ET AL: "Resolution of thiol-containing proteins by sequential-elution covalent chromatography", JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL METHODS, AMSTERDAM, NL, vol. 4, no. 2, 1 February 1981 (1981-02-01), pages 101-111, XP023453999, ISSN: 0165-022X, DOI: 10.1016/0165-022X(81)90023-3 [retrieved on 1981-02-01] figure 1 ----- -/--	1-8,17
<input checked="" 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 February 2016		17/03/2016
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
		Mabit, Hélène

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2015/053560

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOAN G. SCHELLINGER ET AL: "A general chemical synthesis platform for crosslinking multivalent single chain variable fragments", ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY, vol. 10, no. 8, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 1521-1526, XP055186813, ISSN: 1477-0520, DOI: 10.1039/C00B01259A	1-5,17
Y	page 1522, column 2; figure 2 -----	1-17
Y	US 6 114 180 A (DOTH MARGIT [DE] ET AL) 5 September 2000 (2000-09-05) cited in the application the whole document -----	1-17
Y	FR 2 756 827 A1 (PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS [FR]) 12 June 1998 (1998-06-12) cited in the application page 3; claims 1-14 -----	1-17
A	LARUE C ET AL: "New monoclonal antibodies as probes for human cardiac troponin I: Epitopic analysis with synthetic peptides", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 29, no. 2, 1 February 1992 (1992-02-01), pages 271-278, XP023683127, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/0161-5890(92)90109-B [retrieved on 1992-02-01] -----	1-17
Y	WO 2010/112777 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]; ATAMAN-OENAL YASEMIN [FR]; BEAULIEU CORINNE [FR];) 7 October 2010 (2010-10-07) figure 4 -----	1-17

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2015/053560

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 6114180	A	05-09-2000	DE 19524572 A1	09-01-1997
			EP 0752426 A2	08-01-1997
			JP H0926423 A	28-01-1997
			US 6114180 A	05-09-2000

FR 2756827	A1	12-06-1998	AT 353338 T	15-02-2007
			AU 735873 B2	19-07-2001
			AU 5326198 A	29-06-1998
			CA 2274303 A1	11-06-1998
			DE 69737329 T2	28-06-2007
			EP 0964871 A1	22-12-1999
			ES 2283031 T3	16-10-2007
			FR 2756827 A1	12-06-1998
			JP 3843136 B2	08-11-2006
			JP 2001505571 A	24-04-2001
			JP 2006036782 A	09-02-2006
			US 6867011 B1	15-03-2005
			WO 9824816 A1	11-06-1998
			ZA 9710964 A	07-06-1999

WO 2010112777	A1	07-10-2010	AU 2010231255 A1	03-11-2011
			CA 2756156 A1	07-10-2010
			CN 102439042 A	02-05-2012
			EP 2443152 A1	25-04-2012
			FR 2944019 A1	08-10-2010
			JP 5662412 B2	28-01-2015
			JP 2012522979 A	27-09-2012
			US 2012129200 A1	24-05-2012
			US 2015253342 A1	10-09-2015
WO 2010112777 A1	07-10-2010			

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/053560

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE	
INV. C07K14/47 G01N33/68 ADD.	
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB	
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE	
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07K G01N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche	
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE	
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS	
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents
	no. des revendications visées
X	HILLSON ET AL: "Resolution of thiol-containing proteins by sequential-elution covalent chromatography", JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL METHODS, AMSTERDAM, NL, vol. 4, no. 2, 1 février 1981 (1981-02-01), pages 101-111, XP023453999, ISSN: 0165-022X, DOI: 10.1016/0165-022X(81)90023-3 [extrait le 1981-02-01] figure 1 ----- -/--
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents
<input checked="" type="checkbox"/>	Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:	
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
26 février 2016	17/03/2016
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Mabit, Hélène

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/053560

Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.c de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, la recherche internationale a été effectuée sur la base d'un listage des séquences :
- a. faisant partie de la demande internationale telle que déposée :
- sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25.
- sur papier ou sous forme d'un fichier image.
- b. remis avec la demande internationale, exclusivement aux fins de la recherche internationale en vertu de la règle 13ter.1.a), sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25.
- c. remis postérieurement à la date de dépôt international exclusivement aux fins de la recherche internationale :
- sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25 (règle 13ter.1.a)).
- sur papier ou sous forme d'un fichier image (règle 13ter.1.b) et instruction administrative 713).
2. De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences a été déposée ou remise, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles faisant partie de la demande telle que déposée et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, selon le cas, ont été remises.
3. Commentaire complémentaires:

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/053560

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOAN G. SCHELLINGER ET AL: "A general chemical synthesis platform for crosslinking multivalent single chain variable fragments", ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY, vol. 10, no. 8, 1 janvier 2012 (2012-01-01), pages 1521-1526, XP055186813, ISSN: 1477-0520, DOI: 10.1039/C00B01259A	1-5,17
Y	page 1522, colonne 2; figure 2 -----	1-17
Y	US 6 114 180 A (DOTH MARGIT [DE] ET AL) 5 septembre 2000 (2000-09-05) cité dans la demande le document en entier -----	1-17
Y	FR 2 756 827 A1 (PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS [FR]) 12 juin 1998 (1998-06-12) cité dans la demande page 3; revendications 1-14 -----	1-17
A	LARUE C ET AL: "New monoclonal antibodies as probes for human cardiac troponin I: Epitopic analysis with synthetic peptides", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 29, no. 2, 1 février 1992 (1992-02-01), pages 271-278, XP023683127, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/0161-5890(92)90109-B [extrait le 1992-02-01] -----	1-17
Y	WO 2010/112777 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]; ATAMAN-OENAL YASEMIN [FR]; BEAULIEU CORINNE [FR];) 7 octobre 2010 (2010-10-07) figure 4 -----	1-17

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2015/053560

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6114180	A	05-09-2000	DE 19524572 A1	09-01-1997
			EP 0752426 A2	08-01-1997
			JP H0926423 A	28-01-1997
			US 6114180 A	05-09-2000

FR 2756827	A1	12-06-1998	AT 353338 T	15-02-2007
			AU 735873 B2	19-07-2001
			AU 5326198 A	29-06-1998
			CA 2274303 A1	11-06-1998
			DE 69737329 T2	28-06-2007
			EP 0964871 A1	22-12-1999
			ES 2283031 T3	16-10-2007
			FR 2756827 A1	12-06-1998
			JP 3843136 B2	08-11-2006
			JP 2001505571 A	24-04-2001
			JP 2006036782 A	09-02-2006
			US 6867011 B1	15-03-2005
			WO 9824816 A1	11-06-1998
			ZA 9710964 A	07-06-1999

WO 2010112777	A1	07-10-2010	AU 2010231255 A1	03-11-2011
			CA 2756156 A1	07-10-2010
			CN 102439042 A	02-05-2012
			EP 2443152 A1	25-04-2012
			FR 2944019 A1	08-10-2010
			JP 5662412 B2	28-01-2015
			JP 2012522979 A	27-09-2012
			US 2012129200 A1	24-05-2012
			US 2015253342 A1	10-09-2015
			WO 2010112777 A1	07-10-2010

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 ポシオン, カトリーヌ

フランス国 69005 リヨン, リュ ドクトル アルベリック ポン 43

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA16 BA41 CA40 DA86 EA50 EA51 FA34

GA21

专利名称(译)	合成双表壳化合物		
公开(公告)号	JP2018501238A	公开(公告)日	2018-01-18
申请号	JP2017532771	申请日	2015-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	生物梅里埃		
[标]发明人	ベッツワースフロランス ビュスレサンドリーヌ ポシオンカトリーヌ		
发明人	ベッツワース, フロランス ビュスレ, サンドリーヌ ポシオン, カトリーヌ		
IPC分类号	C07K19/00 G01N33/53 C07K14/705 C07K14/765 C07K14/78		
CPC分类号	G01N33/5308 C07K14/47 C07K14/4716 C07K14/4723 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/6887 G01N33/96 G01N2333/4712 G01N2800/32		
FI分类号	C07K19/00.ZNA G01N33/53.D C07K14/705 C07K14/765 C07K14/78		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA16 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA34 4H045/GA21		
优先权	2014062709 2014-12-18 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供式I，其中相同或不同的E1和E2各自独立地代表包含分析物的至少一个表位的肽序列；相同或不同的X和Y各自独立地具有连接臂。代表-载体分子是可溶的，-Z代表双表位化合物，其代表在与载体分子结合之前具有硫醇功能的氨基酸衍生物。包含本发明化合物的组合物，以及此类化合物或包含本发明化合物的组合物作为对照或标准品在免疫测定中的用途，使用本发明化合物或包含本发明化合物的组合物作为对照物或标准品的方法，以及最后 特别地，本发明还涉及用于进行免疫测定的试剂盒，其包含本发明的化合物或包含本发明的化合物的组合物。[选择图]无

