

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4447811号
(P4447811)

(45) 発行日 平成22年4月7日(2010.4.7)

(24) 登録日 平成22年1月29日(2010.1.29)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/531	(2006.01)	GO 1 N 33/531	A
CO 7 K 7/06	(2006.01)	CO 7 K 7/06	
CO 7 K 7/08	(2006.01)	CO 7 K 7/08	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D

請求項の数 23 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2001-517165 (P2001-517165)	(73) 特許権者	502056400
(86) (22) 出願日	平成12年8月14日 (2000.8.14)		バイオーラド パストゥール
(65) 公表番号	特表2003-507711 (P2003-507711A)		フランス国, エフ-92430 マルヌ
(43) 公表日	平成15年2月25日 (2003.2.25)		ラ コケット, プールパール ライモン
(86) 国際出願番号	PCT/FR2000/002323		ポワンカーレ, 3
(87) 国際公開番号	W02001/013114	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成13年2月22日 (2001.2.22)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成18年1月30日 (2006.1.30)	(74) 代理人	100092624
(31) 優先権主張番号	99/10526		弁理士 鶴田 準一
(32) 優先日	平成11年8月16日 (1999.8.16)	(74) 代理人	100108110
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		弁理士 日野 あけみ
		(74) 代理人	100082898
			弁理士 西山 雅也
		(74) 代理人	100081330
			弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫検定用の2個のエピトープを保持する合成化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

合成化合物において、

- 炭化水素鎖を有するキャリアー分子であって、該炭化水素鎖はオリゴペプチドまたはポリペプチドであり、ここで該炭化水素鎖は：

a) 7 ~ 50 個のアミノ酸であって、該アミノ酸は開鎖を形成し、該開鎖は該炭化水素鎖のアミノ酸により形成される結合が自由に回転しないようにキャリアー分子に剛性を導入する少なくとも1つのアミノ酸を含んでなるアミノ酸；または

b) 8 ~ 50 個のアミノ酸であって、該アミノ酸は環を形成するアミノ酸；

から成り、

ここで該炭化水素鎖は、塩基性の側鎖を有するアミノ酸、負に帯電した側鎖を有するアミノ酸、ヒドロキシル化した側鎖を有するアミノ酸、およびイオウを含有する側鎖を有するアミノ酸から成る群から選択される、該キャリアー分子上の少なくとも2つのサイドアームのグラフトを許容する少なくとも2つの残基を含んでなる、キャリアー分子；および

- 前記キャリアー分子上にグラフトされた少なくとも2つのサイドアームによって保持されたヒト心臓トロポニンIの少なくとも2つの異なるエピトープ、
を含んでなる合成化合物。

【請求項2】

前記キャリアー分子上のサイドアームのグラフトを許容する少なくとも2つの残基が、
少なくとも2つのリジンである、請求項1に記載の合成化合物。

10

20

【請求項 3】

前記炭化水素鎖がプロリンを含んでなる、請求項 1 または 2 に記載の合成化合物。

【請求項 4】

前記サイドアームの各々が、トロポニンIの少なくとも2つの異なるエピトープを含有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の合成化合物。

【請求項 5】

前記サイドアームの各々が、トロポニンIの2つの異なるエピトープを含有する、請求項 4 に記載の合成化合物。

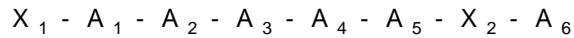
【請求項 6】

連続的であり、かつ少なくとも2つの異なるエピトープを保持する少なくとも2つのサイドアームのうちの2つがアミノ酸により保持され、該アミノ酸は、 $2n + 1$ 個（ここで n は 1 ~ 6 の整数を表す）のアミノ酸により相互に分離されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の合成化合物。

10

【請求項 7】

前記オリゴペプチドまたはポリペプチドが、以下の配列：



を含み、

ここで、

X_1 および X_2 は、同一でも異なってもよく、サイドアームを保持するアミノ酸であり、かつ塩基性の側鎖を有するアミノ酸、負に帯電した側鎖を有するアミノ酸、ヒドロキシル化した側鎖を有するアミノ酸、およびイオウを含有する側鎖を有するアミノ酸から成る群から選択され、

20

A_1 および A_2 は、 A_1 および A_2 の1つがプロリンおよびフェニルアラニンから成る群から選択されるという条件で、プロリン、フェニルアラニン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンから成る群から選択されるアミノ酸を表し、

A_3 は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンから成る群から選択されるアミノ酸を表し、

A_4 は、アルギニンおよびヒスチジンから成る群から選択されるアミノ酸を表し、

A_5 は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンから成る群から選択されるアミノ酸を表し、

30

A_6 は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンから成る群から選択されるアミノ酸を表す、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の合成化合物。

【請求項 8】

前記 X_1 および X_2 がリジンを表す、請求項 7 に記載の合成化合物。

【請求項 9】

前記 A_3 がグリシンを表す、請求項 7 または 8 に記載の合成化合物。

【請求項 10】

前記 A_4 がアルギニンを表す、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の合成化合物。

【請求項 11】

前記 A_5 がアラニンを表す、請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の合成化合物。

40

【請求項 12】

前記 A_6 がグリシンを表す、請求項 7 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の合成化合物。

【請求項 13】

前記オリゴペプチドまたはポリペプチドが、以下の配列：

- K G P G R A K G -

- K G F G R A K G -

- K P G G R A K G - および

- K F G G R A K G -

から成る群から選択される配列を含む、請求項 7 に記載の合成化合物。

【請求項 14】

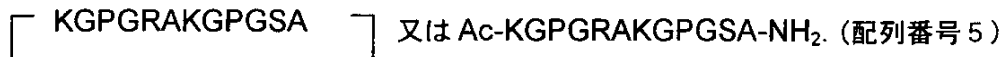
50

前記各々のエピトープが、
T E P H、
A L L G A R、および
F A E L

から成る群から選択される少なくとも1つの配列を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の合成化合物。

【請求項15】

前記キャリアー分子が、
【化1】



10

である、請求項1～14のいずれか1項に記載の合成化合物。

【請求項16】

トロポニンI免疫検定のための標準または対照としての請求項1～15のいずれか1項に記載の合成化合物の使用。

【請求項17】

水、血漿、または緩衝液の溶液中に請求項1～15のいずれか1項に記載の少なくとも1つの化合物を含有する組成物。

20

【請求項18】

前記緩衝溶液が、リン酸緩衝液、コハク酸緩衝液及びトリスHCl緩衝液から成る群から選択される、請求項17に記載の組成物。

【請求項19】

前記緩衝溶液が：

5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン、2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン、脱脂乳およびEDTAを含有するコハク酸緩衝液 (pH = 5 ~ 6)、

5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン、2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン、カゼインおよびEDTAを含有するコハク酸緩衝液 (pH = 5 ~ 6)

30

、
5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン、2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンおよびBSAを含有するコハク酸緩衝液 (pH = 5 ~ 6)、

5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン、2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン、脱脂乳およびEDTAを含有するリン酸緩衝液 (KH₂PO₄ / K₂HPO₄、0.1 M、pH = 6.5 ~ 7.5)、

5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン、2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン、カゼインおよびEDTAを含有するリン酸緩衝液 (KH₂PO₄ / K₂HPO₄、0.1 M、pH = 6.5 ~ 7.5)、

40

5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン、2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンおよびBSAを含有するリン酸緩衝液 (KH₂PO₄ / K₂HPO₄、0.1 M、pH = 6.5 ~ 7.5)、

から成る群から選択される、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

請求項1～15のいずれか1項に記載の少なくとも1つの合成化合物を標準または対照として用いる免疫検定法。

【請求項21】

免疫検定がサンドウィッチ式のものである、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

50

免疫検定キットであって、

- 請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項で規定した少なくとも 1 つの合成化合物、及び
- 免疫検定を行なうための少なくとも 1 つの通例の試薬、

を含む免疫検定キット。

【請求項 23】

免疫検定キットであって、

- 請求項 17 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの組成物、及び
- 免疫検定を行なうための少なくとも 1 つの通例の試薬、

を含む免疫検定キット。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

本発明は、免疫検定において、特にトロポニン I の検定用の標準または対照として使用することができる合成化合物、その調製方法、そのような化合物を含有する組成物およびキット、ならびにそのような化合物を用いた免疫検定法に関する。

【0002】

トロポニンは 3 種類のタンパク質、トロポニン I、T および C からなる筋原繊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の相互作用によりそれが Ca^{2+} イオンによる筋収縮の制御に寄与することを可能にしている。より正確には、神経の刺激が筋の運動終板のレベルに達すると、筋小胞体に伝達される活動電位が発生することが知られている。次いで Ca^{2+} がサイトゾル中に放出され、トロポニン C と結合し、トロポニン I とトロポニン C の間の相互作用を強め、その結果トロポニン I、T、C 複合体の高次構造の変化をもたらす。次いで筋収縮運動を可能にするアクチン - ミオシン相互作用の部位が解放される。

20

【0003】

それが心筋梗塞に続く心筋の壊死時の心筋であろうと、持続的な物理的力の加わった時の骨格筋であろうと筋が損傷すると、解放されるトロポニンが多かれ少なかれ血流中に急速に現れる。

【0004】

こうして最近、「Circulation」83、902-912 (1991) 中のトロポニン T の検定でも、「Am. Heart J.」110、1333-1344 (1987) および「Molecular Immunology」29 (2)、271-278 (1992) 中のトロポニン I の検定でも、トロポニンの検定は心筋梗塞の早期診断のために推奨されている。同様に、心筋梗塞後の血栓融解治療が成功したかどうかを測定するための心筋のトロポニン T の検定が「Br. Heart J.」71、242-248 (1994) で提案され、また骨格筋の損傷を測定するための骨格のトロポニン I の検定 (American Association for Clinical Chemistry, 46th National Meeting, New Orleans, 1994年7月17 ~ 21日の抄録第 35号) も提案されている。様々な心筋および骨格のトロポニンの検定が今日、ヒトおよび動物の病状診断に非常に役に立つ手段であることに注目されたい。

30

【0005】

生物学的分析を行なう研究所で実施される免疫検定には、検定に必要な試薬 (すなわち標識または別の方法による抗体、顕現剤、および希釈液) に加えて、試験される試料と類似の条件下で用いられ、結果を計算するための参照としておよび / または正の制御として働くことになる、判定すべき化合物に対する標準の製造業者による供給が必要である。

40

【0006】

判定すべき化合物に用いる標準および / または対照を得るには、凍結乾燥の形態 (ユーザーがその化合物を使用前に溶解することになる溶媒を添えた) またはすぐ使える精製された上記化合物を使用することができる。

【0007】

生物学的試薬は不安定であるため、凍結乾燥した製品から調製される標準または対照溶液は、用量単位で凍結され - 80 で貯蔵される。さらにこれらの溶液は、たとえプロテアーゼ阻害剤または抗菌剤を加えたとしても + 4 で数時間を超えて安定ではないことが観

50

察された。したがってユーザーは使用直前にその標準溶液を調製することが必要である。

【0008】

フランス特許公開第A-2,701,954号には、トロポニンCと混合したトロポニンIまたはT、具体的にはトロポニンIまたはトロポニンT 1当量当たりトロポニンC 1~10モル当量の割合と塩化カルシウムを含有する水溶液からなることを特徴とする免疫検定用のトロポニンIまたはTの安定化した組成物が開示されている。この技術は、より大きなまたはより小さな程度まで希釈したトロポニンIまたはトロポニンTの標準溶液を+4で数日間保存することを可能にする。

【0009】

フランス特許公開第2,734,267号は、トロポニンI、トロポニンT、およびトロポニンCによって形成される三重複合体から構成されるトロポニンの標準溶液について記述している。

10

【0010】

これらの標準を得るために用いられる原料はヒトまたは動物起源のものであり、こうして得られた標準または対照は+4で約1ヶ月間安定である。

【0011】

国際公開第94/15217号は、トロポニンIのN末端ペプチドを認識する抗体調製用の免疫原として有用な幾つかの合成ペプチドについて記述している。これらのペプチドの幾つかは、国際公開第94/15217号が対象範囲とする発明の主題である抗体を用いたトロポニンIの免疫検定の標準として使用することができる。

20

【0012】

同様に、国際公開第94/27156号は、心筋のトロポニンIに特異的な抗体を用いて心筋のトロポニンIを検定する方法に関する。これらの抗体は、骨格筋のトロポニンIのない、したがって心筋のトロポニンIに特異的な配列を有するペプチド断片から調製することができる。しかしながらこの出願は、トロポニンIの免疫検定における標準としてある種のペプチドを使用する可能性については開示しておらず、また示唆もしていない。

【0013】

国際公開第96/27661号がタンパク質およびペプチドを安定化させるための水溶液について記述していることもまた知られている。これらの溶液は、特にタンパク質またはペプチドの診断検査に用途が見出される。

30

【0014】

国際公開第97/27661号によればこれら水溶液は、全トロポニンIよりも不安定なことが分かっているトロポニンI断片の安定性を増すことさえも可能にする。

【0015】

1997年1月8日公開の欧州特許公開第A-752 426号もまた、高分子量タンパク質(>100 KD)またはポリマーなどのキャリアー分子と結合した1以上のペプチドから構成されるトロポニンIの標準について記述している。

【0016】

欧州特許公開第A-650 053号は、樹枝状構造で相互に結合した1以上の受容体に対する活性部位を含有する合成による標準について記述している。この出願は、より具体的にわずか3週間のみ溶液中で安定なトロポニンT用の合成による標準について記述している。

40

【0017】

国際公開第98/24816号は、トロポニンIの生物学的検定において標準として使用することができる合成ペプチド化合物について記述している。

【0018】

これらの化合物は、炭化水素骨格および/またはペプチド骨格からなるリンカーによって相互に結合したトロポニンIの2つの異なるエピトープペプチド配列を含む線状構造からなり、これに加えてその2個のエピトープはそれぞれそのNおよびC末端により付加的なペプチド配列と結合してもよい。

【0019】

50

こうして得られた合成エピトープ化合物は溶液中ですぐれた安定性を示すが、十分な希釈直線性は示さない。

【0020】

「希釈直線性」という表現は、参照用化合物に対する希釈因子の関数として得られる信号を表す関数を意味するものと理解され、それは理想的には直線によって表されるはずである。

【0021】

さらに樹枝状結合を介して母体ペプチドの側方基上の分岐ペプチドによって形成される枝を含むペプチド性の母体からなる合成のペプチド構造が、国際公開第95/04543号で知られている。

10

【0022】

これらの分岐ペプチド構造は、明確ならせんトポロジーを有するタンパク質を設計するために有用である。

【0023】

本発明をもたらす本発明者等の研究は、トロポニンIの少なくとも2つの異なるエピトープ配列を保持する分岐サイドアームを備えた国際公開第95/04543号に記載の型の分岐構造が、4の溶液中で高い安定性とすぐれた希釈直線性の両方を示すトロポニンI検定のための免疫検定用の標準または対照を提供するという発見を可能にした。

【0024】

本発明の主題は、

20

C、N、O、S、P、およびSiから選択された少なくとも10個、有利には少なくとも12個、好ましくは少なくとも14個、かつ多くとも300個、有利には多くとも100個、好ましくは多くとも50個の原子を有し、しかも炭化水素鎖上にサイドアームをグラフトすることを可能にする反応性のあるまたは反応することが可能な少なくとも2個の官能基を備えた炭化水素鎖を持つキャリアー分子と、

上記キャリアー分子上にグラフトされた上記サイドアームによって保持された少なくとも2個の異なるエピトープ、

とを含む少なくとも1種類の合成化合物の生体分子、特にポリペプチドまたはタンパク質の免疫検定用の標準または対照としての使用法である。

【0025】

30

具体的には、炭化水素鎖は本質的に一連の $-(CH_2)_n-$ 連鎖(ただし、 n は10~300、有利には10~100、好ましくは10~50の整数)で形成することができ、上記鎖は、問題のエピトープを保持するサイドアームを上記炭化水素鎖上へグラフトすることを可能にする少なくとも2個の原子または基、具体的にはアミノ、ヒドロキシル、チオール、カルボキシル、またはカルボニル基が炭化水素鎖または炭化水素鎖の置換基に割り込むメンバーとして存在するという条件で、O、S、N、P、およびSiなどの1以上のヘテロ原子またはヘテロ基、特に窒素含有ヘテロ基によって、および/またはハロゲン、 $(C_6 \sim C_{12})$ アルキル、 $(C_6 \sim C_{12})$ アリール、 $(C_6 \sim C_{12})$ アリール- $(C_1 \sim C_{12})$ アルキル、アルコキシ、ヒドロキシル、アルデヒド、 $(C_1 \sim C_{12})$ アルキルカルボニル、アミノ、チオ、カルボキシル、オキソ、ヒドロキシ- $(C_1 \sim C_{12})$ アルキル、チオ $(C_1 \sim C_{12})$ アルキル、カルボキシ- $(C_1 \sim C_{12})$ アルキル、アミノ $(C_1 \sim C_{12})$ アルキル、あるいはヘテロ環が特にO、S、=N、またはNR(Rは水素原子または $C_1 \sim C_{12}$ アルキル基)である飽和または不飽和のヘテロ環式の $C_1 \sim C_{12}$ の基などの原子または基で置換された1以上のヘテロ原子またはヘテロ基によって割り込まれている。

40

【0026】

エピトープを保持するサイドアームがその上にグラフトされる、反応性のあるまたは反応することが可能な官能基の最小限のスペースを有することが望ましい。

【0027】

これについてはエピトープは、サイドアーム上に炭素、窒素、または酸素原子のサイズの少なくとも9原子の間隔、あるいはペプチド性の炭化水素鎖の場合には少なくともアミノ

50

酸 3 個の間隔に相当する少なくとも 40 だけ離して配置されることが好ましい。

【0028】

これに加えて、エピトープを保持するサイドアームは、特にこれらエピトープの 1 以上と抗体との免疫反応中に、上記アームの間のステアリン酸障害または相互作用が生じないようにキャリア分子上に配列されることが好ましい。

【0029】

有利にはサイドアームは相互に角度を形成するように配列され、サイドアームが非平行配列、好ましくは反対方向に配列するように炭化水素鎖中にねじれまたは剛性を導入することにより相互作用を避けることができる。

【0030】

炭化水素鎖は有利には、原核または真核タンパク質中に見出されるものなど天然のアミノ酸、あるいは非天然のアミノ酸からなるオリゴペプチドまたはポリペプチドである。

【0031】

この場合、2つの連続するサイドアームは、好ましくは反応性の側鎖を含有しない、または不活性化した反応性の側鎖を含有する $2n + 1$ 個のアミノ酸（ただし n は整数を表し、有利には $1 \sim 6$ である）により相互に分離された上記で規定した 2 個のアミノ酸によって保持されることが好ましい。好ましくは $n = 2$ であるが、 $n = 3$ 、 $n = 4$ 、および $n = 5$ の値でもよい結果が得られる。

【0032】

本発明の第一の実施形態によれば炭化水素鎖は開いており、炭化水素鎖、特にオリゴペプチドまたはポリペプチドのすべての原子は回転が自由な結合、すなわち環外の結合を形成する。

【0033】

この場合、一方のサイドアームの原子ともう一方のサイドアームの原子の間の相互作用を避けることを可能にする 2つの連続するサイドアームの間隙は、アミノ酸によって保持された 2つの連続するサイドアームが上記の間隔の条件に相当する場合に得られる（すなわち「 $2n + 1$ 」）。

【0034】

本発明の第二の実施形態によれば炭化水素鎖は開いており、もはや炭化水素鎖の原子によって形成される結合がすべて自由回転することがないように分子中に剛性を導入する少なくとも 1つの結合を含む。

【0035】

例えば、炭化水素鎖がペプチド性のものまたは環の炭素原子でないか、あるいはそれのみではない場合、これは例えば sp^2 炭素原子を意味してもよい。

【0036】

炭化水素鎖がペプチド性のものでない場合、一方のサイドアームの原子ともう一方のサイドアームの原子の間の相互作用を避けることを可能にする 2つの連続するサイドアームの間隙は、サイドアームを保持するアミノ酸の間に $2n + 1$ 個（ n は上記の定義による）のアミノ酸間隙をとることにより、またはペプチド鎖にその鎖中に剛性を生じさせる環状アミノ酸を導入することにより、またはこれら選択肢のどちらも同時に考慮に入れることにより得られる。

キャリア分子の剛性は例えば、プロリン残基によって付与することができる。

【0037】

本発明の第三の実施形態によれば炭化水素、特にオリゴペプチドまたはポリペプチドの鎖は閉じて環を形成する。

【0038】

所望の間隙を得るための上記条件を最もよく満たすことを可能にするペプチド配列は、式 $X_1 - A_1 - A_2 - A_3 - A_4 - A_5 - X_2 - A_6$ に相当し、

上式で X_1 および X_2 は、同じでも異なってもよく、サイドアームを保持するアミノ酸

10

20

30

40

50

であり、塩基性の側鎖をもつアミノ酸、ヒドロキシル化された側鎖をもつアミノ酸、およびイオウを含有する側鎖をもつアミノ酸から選択され、 X_1 および X_2 は好ましくはリシンを表し、

A_1 および A_2 は、 A_1 および A_2 の一方がプロリンおよびフェニルアラニンから選択されるという条件で、プロリン、フェニルアラニン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンから選択されるアミノ酸を表し、

A_3 は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンから選択されるアミノ酸を表し、好ましくはグリシンであり、

A_4 は、アルギニンおよびヒスチジンから選択されるアミノ酸を表し、好ましくはアルギニンであり、

A_5 は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンから選択されるアミノ酸を表し、好ましくはアラニンであり、

A_6 は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンから選択されるアミノ酸を表し、好ましくはグリシンである。

【0039】

したがって、特に好ましい最小限のペプチド配列は、配列

K G P G R A K G、

K G F G R A K G、

K P G G R A K G、および

K F G G R A K G

である。

【0040】

キャリアー分子は、開鎖の場合には少なくとも5個、有利には少なくとも7個のアミノ酸で、かつ多くとも100個、有利には50個、好ましくは30個のアミノ酸、特に20個のアミノ酸、また環状の場合には少なくとも8個、好ましくは少なくとも10個で、かつ多くとも100個、有利には50個、好ましくは30個、特に20個のアミノ酸の結合のみからなり、しかもそれは塩基性の側鎖をもつアミノ酸、具体的にはリシン；負に帯電した側鎖をもつアミノ酸、具体的にはグルタミン酸またはアスパラギン酸；ヒドロキシル化された側鎖をもつアミノ酸、具体的にはセリンおよびトレオニン；およびイオウを含有する側鎖をもつアミノ酸、具体的にはシステイン；から選択される少なくとも2個の残基を含むことが好ましく、リシンは〔ラクナ〕のものである。

【0041】

一般に本発明によるキャリアー分子は、分子質量が約10 kDaを超えず、好ましくは約8 kDaを超えない。本発明による好ましいキャリアー分子は約5 kDa未満の分子質量を有する。望ましい最小分子質量は一般に約 1 ± 0.2 kDaである。

【0042】

エピトープは、抗体、好ましくは特定の抗体が存在するかどうかを検定される生体分子の任意のエピトープからなる。

【0043】

トロポニンIについては、Larue等 (Molec. Immunology, vol.20, No.29, 271-278 (1992))、Bodor等 (Clin. Chem. Vol.38, No.11, 2203-2214 (1992))、Granier等 (Protein Science, vol.6, suppl. 1, p.61 (1997))によって記述された、また国際公開第94/15217号中に記述された抗体を挙げることができる。これら抗体の大部分は市販されている (H ytest LTD, Turku, Finland)。抗体11E12および8E1が特に好ましい。

【0044】

この後、エピトープをE1およびE2と呼び、E1とE2は異なる。

エピトープE1およびE2はキャリアー分子上に各々単一コピーとして、あるいは数コピー、具体的には2、3、または4コピーとして存在することができる。

後者の場合、同一エピトープの2つのコピーが同一のサイドアーム上または2つの異なるサイドアーム上に存在することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

キャリアー分子に付着するエピトープE1およびE2の数を保証するために本発明による化合物の合成を厳しく制御するのが有利であり、手順書、Gregory A. Grantによって発表された「Synthetic Peptides A user's guide」(UWBC Biotechnological Resource Series, Richard R. Burgess series editor (1992))の第4章Evaluation of the finished productを用いることができる。下記参照。

【 0 0 4 6 】

しかしながら同一のサイドアームは、2個を超える同一または異なるエピトープを含まないことが好ましい。

エピトープが2コピーを超えて存在する場合には、それらは同数の追加のサイドアームによって保持されることが好ましい。

同一のサイドアーム上に2コピーが存在する場合には、エピトープE1およびE2は有利にはペプチド性または非ペプチド性のリンカーZにより相互に分離される。

【 0 0 4 7 】

したがってリンカーZは、

エピトープとリンカーZによって形成される結合が検定すべき生体分子配列、具体的にはトロポニンIの一部と一緒に形成しないという条件で、アミノ酸1~40個、好ましくは3~20個のペプチド配列か、

【 0 0 4 8 】

線状または分岐したアミノ($C_1 \sim C_{10}$)アルキルカルボニル鎖か、またはアミノ酸1~10個の少なくとも1つのペプチド配列、および少なくとも1つの線状または分岐したアミノ($C_1 \sim C_{10}$)アルキルカルボニル鎖からなる混合構築物を表すことができる。

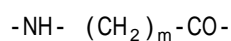
【 0 0 4 9 】

-E₁-Z-E₂-は、その-E₁-Z-E₂-が検定すべき分子配列、例えば少なくともアミノ酸1個、好ましくはアミノ酸2個、特にアミノ酸5個の非保存的置換、欠失、または挿入によるトロポニンIの与えられた断片と異なる場合、検定すべき生体分子、具体的にはトロポニンIの配列の一部ではないと考えられる。

【 0 0 5 0 】

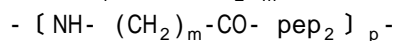
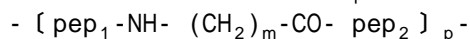
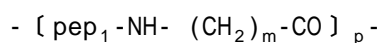
Zは具体的には、

式



の鎖(ただしmは1から10の整数を表す)、または

式



の混合構築物(ただし、mは1~10の整数を表し、pは1~5の整数を表し、またpep₁およびpep₂は同一でも異なっていてもよくアミノ酸2~10個を含有するペプチド鎖を表す)を表すことができる。

【 0 0 5 1 】

エピトープを保持するサイドアームは、好ましくはエピトープのNおよびC末端、またはE₁-Z-E₂によって形成される結合のNおよびC末端にそれぞれ付加的な基、Z₁およびZ₂を備える。

【 0 0 5 2 】

Z₁は有利には、

水素原子;アセチル基;アミノ酸1~10個のペプチド配列;アミノ酸1~10個の -アセチル化したN末端のペプチド配列;システイニル、ピオチニル、またはピオシチニル基;システイニル、アミノ、ヒドロキシル、ハロ、カルボキシル、ピオチニル、またはピオシチニル残基を保持するアミノ酸1~10個のペプチド配列か、

10

20

30

40

50

線状または分岐したアミノ ($C_1 \sim C_{10}$) アルキルカルボニル鎖か、
 線状または分岐した N - - アセチル化したアミノ ($C_1 \sim C_{10}$) アルキルカルボニル鎖か、
 、
 アミノ酸 1 ~ 10 個の少なくとも 1 つのペプチド配列、および少なくとも 1 つの線状または分岐したアミノ ($C_1 \sim C_{10}$) アルキルカルボニル鎖からなる混合構築物か、または
 アミノ酸 1 ~ 10 個の少なくとも 1 つのペプチド配列と、アミノ、ハロ、ヒドロキシル、カルボキシル、ピオチニル、ピオシチニル、またはシステイニル残基を保持する少なくとも 1 つの線状または分岐したアミノ ($C_1 \sim C_{10}$) アルキルカルボニル鎖とからなる混合構築物を表す。

【 0 0 5 3 】

Z_2 は有利には、
 ヒドロキシルラジカル；アミノラジカル；アミノ酸 1 ~ 10 個のペプチド配列；および末端のアミノ、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロ、システイニル、ピオチニル、またはピオシチニル基を保持するアミノ酸 1 ~ 10 個のペプチド配列か、
 線状または分岐したアミノ ($C_1 \sim C_{10}$) アルキルカルボニル鎖か、
 ヒドロキシルラジカルまたはアミノラジカルを保持する線状または分岐したアミノ ($C_1 \sim C_{10}$) アルキルカルボニル鎖か、
 アミノ酸 1 ~ 10 個の少なくとも 1 つのペプチド配列、および少なくとも 1 つの線状または分岐したアミノ ($C_1 \sim C_{10}$) アルキルカルボニル鎖からなる混合構築物か、または
 ヒドロキシルラジカルまたはアミノラジカルを保持する、アミノ酸 1 ~ 10 個の少なくとも 1 つのペプチド配列および少なくとも 1 つの線状または分岐したアミノ ($C_1 \sim C_{10}$) アルキルカルボニル鎖からなる混合構築物を表す。

【 0 0 5 4 】

側鎖は直接またはスペーサーを介してキャリアー分子と結合しており、このスペーサーはキャリアー分子によって保持された反応基と、また Z_1 および Z_2 とそれぞれ反応するように選択された 2 種類の反応性官能基をその末端に備えた二官能性の基であることができる。

【 0 0 5 5 】

サイドアームはアミノ酸を多くとも 10 個、有利には多くとも 6 個からなるエピトープを含み、また Z 、 Z_1 、および Z_2 基は天然および / または非天然アミノ酸からなるのが好ましい。

【 0 0 5 6 】

本発明の合成化合物は、下記の段階を含む方法によって得ることができる。
 段階 A：サイドアームのグラフトを可能にする少なくとも 2 個の反応基を備えたキャリアー分子を準備すること、
 段階 B：任意にそのキャリアー分子を環化すること、
 段階 C：そのキャリアー分子の反応基と反応性のある少なくとも 1 個の官能基を備えたサイドアーム形成用の分子を準備すること、
 段階 D：適切な条件下でサイドアームのカップリングとキャリアー分子のカップリングを行なうこと。

【 0 0 5 7 】

炭化水素鎖およびスペーサーがポリペプチド性のものである場合、有利には上記の段階は下記の段階からなる。

【 0 0 5 8 】

段階 A：少なくとも 2 個の同一または異なる官能性の側方基（例えばアミノ）を含有する少なくとも 2 個のアミノ酸残基を備えたオリゴペプチドまたはポリペプチドを準備すること。

【 0 0 5 9 】

環化したペプチドの場合には、官能基が環化中に干渉が起きないように、またはそれらが通例の保護基を用いて一時的に保護されるように選択される。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 0 】

段階 B : 直接またはカップリング剤を介してペプチドの予想される環化を行なうこと。

【 0 0 6 1 】

例えば、アミド結合を形成する場合、カップリングは塩基の存在下でヘキサフルオロリン酸ベンゾトリアゾリル - オキシ - トリス (ジメチルアミノ) ホスホニウム / 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール (BOP/HOBt) の対を介して得ることができる。

【 0 0 6 2 】

段階 C : 直接またはカップリング剤を介して反応することが可能な官能基を各々保持する保護されていないサイドアームのペプチドを準備し、次いで

段階 D : 本発明による合成化合物を含有するように、サイドアームを形成するペプチドで
上記オリゴペプチドまたはポリペプチドをカップリングすること。 10

【 0 0 6 3 】

好ましい実施形態においてキャリアー分子の反応性官能基は、二官能性の基、SMCCを介して活性化されるアミノ官能基である。

【 0 0 6 4 】

段階 D においてサイドアームとキャリアー分子の間の結合は、上記サイドアームのペプチドの-SH残基とキャリアー分子のマレイミド基の間の求核置換反応によって行なわれる。

【 0 0 6 5 】

キャリアー分子およびサイドアームは、適切な場所では有機合成および / またはペプチド化学の従来の方法によって得られる。 20

【 0 0 6 6 】

キャリアー分子のペプチドおよびエピトープを保持するサイドアームのペプチドは、「J. Amer. Chem. Soc.」85、2149-2154 (1963) の R. B. Merrifield の論文 ; 「Peptides 1971」(Nesvadba H. 編、North Holland, Amsterdam, p.111) 中の R. C. Sheppard の記述 ; 「Solid phase Peptide Synthesis, a practical approach」(IRL PRESS, Oxford University Press, p.25-34 (1989)) 中の E. Atherton および R. L. Sheppard の記述に記載されている従来の方法による固相合成によって得ることができる。

【 0 0 6 7 】

自動合成装置として Millipore 製の合成装置「9050 Plus Pep Synthesizer」、Perspective 製の「Pioneer」、または ABI 製の「433A」を用いることができる。 30

【 0 0 6 8 】

ペプチドはまた、均質相合成によっても得ることができる。

合成に用いられる固形の担体は使用される技術および化学に適合しなければならない。例えば合成装置「9050 Plus Pep Synthesizer」上で合成するには、いわゆる「定常流」の技術に適した樹脂を使用することが推奨され、PEG PS樹脂がこの基準を満たす。これらの担体は、ビーズのポリスチレンの官能基と第一アミノ酸の付着点の間に位置するポリエチレングリコール (PEG) を基材とするスペーサーアームからなる。この固定点の性質は選択される C 末端の官能基により変わる可能性がある。例えばアミドの形態のペプチドに対しては PAL PEG PS 型の樹脂を採用することができるはずである。 40

【 0 0 6 9 】

Novabiochem 製の樹脂類もまた、定常流固相合成にとって必要な基準を満たす。さらにこれらは合成後いわゆる穏やかな酸性条件下でペプチドを放出することができるという利点を有し、アミノ酸の側鎖が化学的な基によって未だ保護されたままのペプチド断片を得ることを可能にする。

【 0 0 7 0 】

出発の樹脂および原料として用いられるアミノ酸は、市販されている製品 (PerSeptive-Biosystem、Perkin-Elmer、Novabiochem) である。

【 0 0 7 1 】

使用することができる側鎖保護基は表 I で与えられる。

【 0 0 7 2 】

【表 1】

表 I : 保護基

アミノ酸	保護基
アルギニン	2, 2, 4, 6, 7-ヘキサメチル-5-ジヒドロペプソフランソルホニル (Pbf)
アスパラギン、 グルタミン	トリチル (Trt)
グルタミン酸	t-ブチルエステル (otBu)
トレオニン、 チロシン、 セリン	t-ブチルエーテル (tBu)
リシン	t-ブチルオキシカルボニル (Boc)

10

【0073】

アミノ酸の位置での第一アミンの一時的保護は、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 基の助けを借りて行なうことができる。脱保護は、ジメチルホルムアミドに溶かしたピペリジンの20%溶液で行なうことができる。

20

【0074】

カップリングには、好ましくは過剰のジイソプロピルカルボジイミド (DIPCDI) および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT) が用いられる。

【0075】

キャリアー分子を構成する環状ペプチドには、好ましくはFmoc Ala Nova Syn樹脂が用いられる。

【0076】

合成後、樹脂を有機溶剤で洗浄し (ジメチルホルムアミド、次いでジクロロメタン)、真空下で乾燥し、次いで酸をベースとする溶液で処理する。

【0077】

次いでこうして単離したペプチドを沈殿させ、エーテルで洗浄する。環状ペプチドからなるキャリアー分子に対しては、例えば、いわゆる「同じ方向に一列に並んだ (head-to-tail)」環化を行なうことができる。この段階に関してはペプチドはDMFに溶解し、カップリング剤はジイソプロピルエチルアミン (DIEA) またはN-メチルモルホリン (NMM) などの塩基の存在下のBOP/HOBTの対である。抽出後、環化したペプチドを沈殿させ、次いでエーテルベースの溶液で洗浄する。

30

【0078】

次いで、こうして得られたペプチドをトリフルオロ酢酸溶液で処理し、次いで再度沈殿させ、エーテルで洗浄する。

【0079】

非環状ペプチド性のキャリアー分子に対してはPALPEG PS樹脂が用いられる。合成後、樹脂を有機溶剤 (ジメチルホルムアミド、ジクロロメタン) で洗浄し、真空下で乾燥し、次いで適切なスカベンジャーを含有する0に冷却したトリフルオロ酢酸ベースの溶液で処理する。例えば、トリフルオロ酢酸82%、フェノール5%、チオアニソール5%、およびエタンジチオール3%を含有するK試薬を用いることが可能かも知れない。

40

サイドアームを形成するペプチドは、具体的には国際公開第98/24816号に記載のように得ることができる。

次いでこうして単離された合成ペプチドをエーテルで沈殿させる。

【0080】

次いで環状または線状の合成化合物を逆相液体クロマトグラフィにより精製し、その純度

50

を質量分析法により決定する。相としては、例えばBondapak C-18相を用いることができる。ペプチドを2種類の緩衝液の間の直線勾配により溶出し、その第一部は本質的に水性（例えば、水およびTFA 0.1%）であり、その第二部はむしろ有機性（例えば、アセトニトリル60%、水40%、およびTFA 0.08%を含有する混合物）である。集められた純粋な画分を一緒にし、真空下で濃縮し、凍結乾燥し、その純度を手順書、Gregory A. Grantによって発表された「Synthetic Peptides A user's guide」(UWBC Biotechnological Resource Series, Richard R. Burgess series editor (1992))の第4章Evaluation of the finished product中に示されているように質量分析法によって検査する。

【0081】

次いで、1以上のペプチド（サイドアームを形成する）の特異的または非特異的結合を可能にする二官能性の基で、キャリアーのオリゴペプチドまたはポリペプチドのある特定の構成アミノ酸（例えば、リシン、アルギニン、システインなど）の側鎖の官能基を活性化する。この型の結合に用いることができる上記で標的にされる側鎖の例としては、アミノ（第一/第二）、カルボキシル、チオール、水酸化物、およびアルデヒド基などを保持する鎖を挙げることができる。

10

【0082】

二官能性の基を備える化合物の例としては、下記の化合物を用いることができる。すなわち、

BS₃：スベリン酸ビス（スルホスクシニミジル）

SMCC：シクロヘキサン-1-カルボン酸（スルホスクシニミジル-4-N-マレイミド-メチル）

20

BMH：ビス-マレイミドヘキサン

DSG：グルタル酸ジスクシニミジル

5MBS：m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシニミドエステル

MPBH：水酸化4-(4-N-マレイミドフェニル)酪酸

EDC：1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピラート)-カルボジイミド

【0083】

本発明による最終合成化合物については、当業技術者により前述の質量分析技術を用いてこのような化合物の純度を検証することができる。さらに当業技術者ならば、分光測定法によって有効に測定される上記化合物の分子質量が、出発分子（キャリアー分子、エピトープなど）の分子質量に照らして予想される分子質量に確かに相当することをはっきりと曖昧でなく確認することができる。したがって本発明は、当業技術者が自分が行なっている合成を精密に制御し、自分が何をしているかを正確に知ることを可能にする。

30

【0084】

本発明の主題はまた、上記で規定したトロポニンIの2つの異なるエピトープを備えた化合物である。

【0085】

トロポニンIのエピトープとしては、具体的にはペプチド配列TEPH、ALLGARおよびFAEL、あるいはその後者を含む配列を挙げることができる。

【0086】

本発明の主題はまた、トロポニンIの少なくとも2個のエピトープを備えた本発明の化合物を含有する組成物である。

40

【0087】

それは、好ましくは緩衝液に溶かした前述のピエピトープの合成化合物からなる水溶液または組成物である。緩衝液としては例えば、Kathon（登録商標）およびウシ血清アルブミン（BSA）；あるいはKathon（登録商標）、Regilait v（登録商標）、およびEDTA；あるいはKathon（登録商標）、Plasmion（登録商標）および任意にEDTA；あるいはKathon（登録商標）、カゼイン、およびEDTAを含有するリン酸緩衝液（KH₂PO₄/K₂HPO₄、pH=6.5~7.5）を用いることができる。

【0088】

50

また、Kathon（登録商標）およびウシ血清アルブミン（BSA）；あるいはKathon（登録商標）、Regilait（登録商標）、およびEDTA；あるいはKathon（登録商標）、Plasmion（登録商標）および任意にEDTA；あるいはKathon（登録商標）、カゼイン、およびEDTAを含有するコハク酸緩衝液（pH=5～6）またはトリス-HCl緩衝液（pH=7.5～8.5）を用いることもできる。

【0089】

また、グリシン、Kathon（登録商標）、Regilait（登録商標）、およびEDTAを含有する緩衝液を用いることもできる。

【0090】

Kathon（登録商標）、Regilait（登録商標）およびEDTAを含有するコハク酸またはリン酸緩衝液の使用が好ましい。

10

【0091】

Kathon（登録商標）、すなわちRohm and Haas社により販売されている抗菌剤は、5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンおよび2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン（1.5%）からなる。

【0092】

Regilait（登録商標）は、Regilait社（フランス）により販売されている脱脂粉乳である。

【0093】

Plasmion（登録商標）はBellon Laboratories（フランス）により販売され、水に溶かした変性液状ゼラチン（30 g/l）、NaCl（5.382 g/l）、MgCl₂（143 mg/l）、KCl（373 mg/l）、乳酸ナトリウム（3.360 g/l）からなる。

20

【0094】

下記の緩衝液が特に好ましい。

Kathon（登録商標）（0.2%）、Regilait（登録商標）（0.05～2%）、および2mM EDTAを含有する0.1Mコハク酸緩衝液（pH=6）；

Kathon（登録商標）（0.2%）、カゼイン（0.01～0.5%）、および2mM EDTAを含有する0.1Mコハク酸緩衝液（pH=6）；

Kathon（登録商標）（0.2%）および1% BSAを含有する0.1Mコハク酸緩衝液（pH=6）；

Kathon（登録商標）（0.2%）、Regilait（登録商標）（0.05～0.5%）、および2mM EDTAを含有する0.1Mリン酸緩衝液KH₂PO₄/K₂HPO₄（pH=7.5）；

30

Kathon（登録商標）（0.2%）、カゼイン（0.01～0.1%）、および2mM EDTAを含有する0.1Mリン酸緩衝液KH₂PO₄/K₂HPO₄（pH=7.5）；および

Kathon（登録商標）（0.2%）および1% BSAを含有する0.1Mリン酸緩衝液KH₂PO₄/K₂HPO₄（pH=7.5）。

【0095】

血漿または血清を含有する組成物および上記で規定した本発明の化合物もまた、本発明の一部を形成する。

【0096】

上記で規定した化合物を標準または対照として用いる免疫検定法もまた、本発明の一部を形成する。

40

【0097】

本発明はまた、上記で規定した少なくとも1種類のピエピトープ化合物または上記で規定したピエピトープ化合物を含有する少なくとも1種類の組成物を包含する免疫検定を実施するためのキットに関する。

【0098】

下記の実施例は、本発明を例示するものであり、限定することなしに提供される。

【0099】

実施例1：本発明による合成ピエピトープ化合物の調製

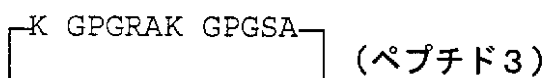
A．キャリアー分子の調製

50

下記の式の環状ペプチドを調製する。

【0100】

【化1】



【0101】

符号は1文字符号である。

このペプチドは、上記に記載したようにMerrifield (J. Am. Chem. Soc. 85,2149-2154 (1963)) によって1963年に開発された技術により固相上で合成される。

【0102】

上記化合物の合成には、合成装置として合成装置9050 Plus Pep Synthesizer、樹脂としてFmoc Ala Nova Syn樹脂を用いた。合成の様々な段階を下記の表IIにまとめる。

【0103】

【表2】

表II：合成の段階

アミノ酸残基	NH ₂ 保護付	サイド保護付	カップリング法	当量数/持続時間/ カップリング数
Ser	Fmoc	Tbu	DIPCDI/HOBt	5当量/30分/Dc*
Gly	〃	—	〃	〃
Pro	〃	—	〃	〃
Gly	〃	—	〃	〃
Lys	〃	Boc	〃	〃
Ala	〃	—	〃	〃
Arg	〃	Pbf	〃	〃
Gly	〃	—	〃	〃
Pro	〃	—	〃	〃
Gly	〃	—	〃	〃
Lys	〃	Boc	〃	〃

【0104】

Dc* は二重カップリングを意味する。二重カップリングはペプチドの純度を高めるために行なうことができる。

【0105】

合成の終わりに樹脂をジメチルホルムアミド、次いでジクロロメタンで洗浄し、真空下で乾燥する。

【0106】

次に、酢酸、メタノール、およびジクロロメタン (5/1/4 v/v/v) を含有する溶液で樹脂を処理する。

【0107】

濾過により樹脂を溶液中のペプチドから単離する。濾液を濃縮し、ペプチドを冷エーテルで沈殿させて単離した。こうして化合物0.145gが得られる。

【0108】

次いでペプチドを下記の方法で環化する。

化合物100gをジメチルホルムアミド18 ml中に溶解し、それにBOP 2当量、HOBt 2当量、およびDIEA 5当量を相次いで加える。

【0109】

2時間の反応の後、環化されたペプチドを分離用漏斗で抽出する。

次いで有機相をNa₂SO₄上で乾燥し、次いでRotavapor（登録商標）または任意の他の適切な回転式蒸発器を用いて濃縮する。次いでエーテル、酢酸エチル、およびヘキサンの混合物（6/3/1 v/v/v）から、環化されたペプチドを0 で15時間沈殿させる。環化されたペプチド70 mg、すなわちキャリアー分子70 mgが得られる。

10

【0110】

B. 本発明によるピエプトープの合成化合物の調製

DMF / 緩衝液（1/3 : 2/3）の混合物中に溶解したキャリアー分子（すなわち上記環化されたペプチド）8 mgに、SMCC 6当量を1滴ずつ加えて活性化させる。反応物を18 ~ 25で約45分間撹拌し続ける。活性化したキャリアー分子をHPLCによって過剰のSMCCから分離する。純粋な画分を一緒にし、凍結乾燥する。活性化したキャリアー分子4.5 mgが得られる（収率約45%）。

【0111】

活性化したキャリアー分子2 mgをPBS緩衝液、pH 6.5中に溶解する。この溶液にペプチドTRP 1116 Ac、すなわち、Ac-GSSNYRAYA-(TEPH)-AKK-Hx-PLELAGLG-(FAEL)-QDLCRQ-NH₂ 2当量（すなわち8 mg）を加える。

20

【0112】

括弧内のペプチド配列はトロポニンIのエピトープを表す。

反応物を18 ~ 25 で4時間撹拌し続ける。

次いで、こうして得られた本発明による化合物を脱塩する（HPLC / 透析）。

その分子質量を質量分析法によって評価する（Gregory A. Grantによって発表された手順書、「Synthetic Peptides A user's guide」(UWBC Biotechnological Resource Series, Richard R. Burgess series editor (1992))の第4章Evaluation of the finished product中に示されている実験計画案による）。

30

【0113】

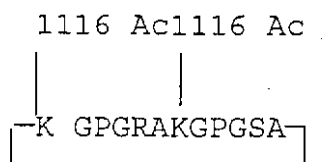
同様の方法で、下記の式の本発明による化合物PEP 5、PEP 9、およびPEP 10を調製した。

【0114】

化合物PEP 5:

【0115】

【化2】



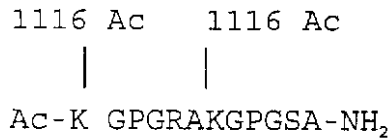
40

【0116】

化合物PEP 9:

【0117】

【化3】



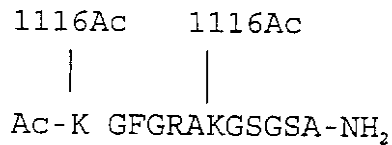
【0118】

化合物PEP 10:

2つのバッチ、PEP 10 P1およびPEP 10 P2について

10

【化4】



【0119】

本発明による化合物に関する希釈の結果の安定性および直線性を下記に示す。

実施例2: 本発明による化合物の安定性

20

化合物PEP 5、PEP 9、およびPEP 10の安定性を、Bio-Rad (Marnes la Coquette, France) から販売されているBeckman社製の自動装置Access (登録商標) の助けを借りた化学発光表示値 (相対発光単位すなわちRLUで表される信号) を用いたELISA検定によって評価し、次いで同じ方法で分析した従来技術の環化していない参照用ピエプトープ化合物 (TRP 1116 Ac) の値と比較した。

【0120】

結果を下記の表IIIに示す。

【0121】

【表3】

表Ⅲ

化合物	希釈性* (緩衝液***)	「実施時+X時間後における信号/実施時における信号」の比によって表される緩衝液中+4℃の液体Aの安定性**					
		実施時+24時間 /実施時	実施時+1ヶ月/ 実施時	実施時+3ヶ月/ 実施時	実施時+6ヶ月/ 実施時	実施時+9ヶ月/ 実施時	実施時+12ヶ月 /実施時
TRP 1116 Ac	なし	0.77	—	—	—	—	—
PEP 5	あり		0.94	0.89	1.06	1.04	1.03
PEP 9	あり		1.01	0.94	0.95	測定不可	測定不可
PEP 10 P1	あり		1.12	1.07	測定不可	測定不可	測定不可
PEP 10 P2	あり		1.13	1.13	測定不可	測定不可	測定不可

【0122】

* 希釈度の受け入れ基準：化合物が希釈可能であるためには、与えられた希釈度に対する実験に基づく信号/理論に基づく信号の比が 1.00 ± 0.2 と同等であるべきである。100,000 RLU未満の信号を示す希釈度は考慮に入れるべきではない。

** 安定性の受け入れ基準：許容される実施X日後の安定性については、 1.00 ± 0.2 と同等の実施時+X日後における信号/実施時における信号の比を得る必要がある。

*** 0.2%のKathon、0.2%のRegilait、および2mM EDTAを含有する0.1Mコハク酸緩衝液、pH

10

20

30

40

50

6.0 (または0.2%のKathonおよび1%のBSAを含有する0.1Mコハク酸緩衝液、pH 6.0)。

【0123】

従来技術の化合物TRP 1116 Acは、実施時+24時間以上、+4 で安定でない。
本発明による化合物PEP 5、PEP 9、およびPEP 10はすべて+4 で3ヶ月後も安定であり、またPEP 9の場合は6ヶ月後、PEP 5の場合は12ヶ月後でさえ安定である。

【0124】

実施例3：希釈曲線の直線性の結果

結果を下記の表5に示す。

希釈度の受け入れ基準：化合物が希釈可能であるためには、与えられた希釈度に対する実験に基づく信号/理論に基づく信号の比が 1.00 ± 0.2 と同等であるべきである。100,000 RLU未達の信号を示す希釈度は考慮に入れるべきではない。

【0125】

信号単位 (RLU) で表わした結果

【表4】

表5

化合物 TRP 1116 Ac	希釈度	実験に基づく 信号 (RLU)	理論に基づく 信号 (RLU)	実験に基づく 信号/理論に 基づく信号
	1/10 000	11 039 697		
	1/20 000	3 779 387	5 519 849	0.68
	1/40 000	1 573 457	2 759 924	0.57
	1/50 000	1 125 417	2 207 939	0.51
	1/100 000	471 714	1 103 970	0.43
	1/300 000	132 054	367 990	0.36

【0126】

【表5】

化合物 PEP 5	希釈度	実験に基づく 信号 (RLU)	理論に基づく 信号 (RLU)	実験に基づく 信号/理論に 基づく信号
	1/50 000	6 175 137		
	1/100 000	3 175 837	3 087 569	1.03
	1/200 000	1 513 547	1 543 784	0.98
	1/500 000	547 444	617 514	0.89
1/1000 000	251 103	308 757	0.81	

【0127】

【表6】

化合物 PEP 9	希釈度	実験に基づく 信号 (RLU)	理論に基づく 信号 (RLU)	実験に基づく 信号/理論に 基づく信号
	1/50 000	6 416 384		
	1/100 000	3 411 124	3 208 192	1.06
	1/200 000	1 685 334	1 604 096	1.05
	1/500 000	655 134	641 638	1.02
	1/1000 000	321 101	320 819	1.00

10

【 0 1 2 8 】

【表 7】

化合物 PEP 10 P1	希釈度	実験に基づく 信号 (RLU)	理論に基づく 信号 (RLU)	実験に基づく 信号/理論に 基づく信号
	1/50 000	4 786 295		
	1/100 000	2 433 915	2 393 148	1.02
	1/200 000	1 230 715	1 196 574	1.03
	1/500 000	455 405	478 630	0.95
	1/1000 000	215 853	239 315	0.90

20

【 0 1 2 9 】

【表 8】

化合物 PEP 10 P2	希釈度	実験に基づく 信号 (RLU)	理論に基づく 信号 (RLU)	実験に基づく 信号/理論に 基づく信号
	1/50 000	4 569 989		
	1/100 000	2 287 659	2 284 995	1.00
	1/200 000	1 208 499	1 142 497	1.06
	1/500 000	407 015	456 999	0.89
	1/1000 000	192 408	228 499	0.84

30

【 0 1 3 0 】

本発明による化合物PEP 5、PEP 9、およびPEP 10に対する希釈曲線は、ペプチドTRP 1116 Acとは異なり、高い希釈度でさえ未だよい直線性を示す。

【 0 1 3 1 】

その結果、本発明による化合物を使って信頼性のある結果を得ることができ、これらが従来技術の化合物よりもすぐれた安定性をもつことが分かるだけでなく、直線的な希釈曲線を得ることも可能になる。すなわちこれらは提起された問題を解決する。

40

フロントページの続き

- (72)発明者 ギャリック, イサベル ナタリー
フランス国, エフ - 7 8 3 3 0 フォントウナイ - ル - フルーリー, アブニュ ジャン ルーサ,
1
- (72)発明者 ジュリアーニ, イサベル カリーヌ
フランス国, エフ - 6 9 7 8 0 ミオン, リュ イブ ファルジュ, 8
- (72)発明者 ラール, カトリーヌ クリスティアーヌ マリー
フランス国, エフ - 9 2 4 2 0 ボクレッソン, アブニュ ルノートル, 2 1
- (72)発明者 リュニエ, フランソワ イブ
フランス国, エフ - 7 8 3 9 0 ボワ ダルシー, リュ デュ ボワ, 5
- (72)発明者 トランキエ, シルビー マリー - フランス
フランス国, エフ - 6 7 0 0 0 ストラスブール, ルート ドゥ ラ バントゼノー, 2 8 0 アー

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 国際公開第 9 8 / 0 2 4 8 1 6 (W O , A 1)
特開平 0 7 - 1 9 1 0 2 4 (J P , A)
特開平 0 9 - 0 2 6 4 2 3 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G01N 33/48-G01N 33/98
C07K 7/06
C07K 7/08

专利名称(译)	一种合成化合物，其保留两个表位用于免疫测定		
公开(公告)号	JP4447811B2	公开(公告)日	2010-04-07
申请号	JP2001517165	申请日	2000-08-14
[标]申请(专利权)人(译)	Bio-Rad公司巴斯德		
申请(专利权)人(译)	生物 - Rad公司巴斯德		
当前申请(专利权)人(译)	生物 - Rad公司巴斯德		
[标]发明人	ギャリックイサベルナタリー ジュリアーニイサベルカリーヌ ラールカトリーヌクリスティアーヌマリー リュニエフランソワイブ トランキエシルビーマリーフランス		
发明人	ギャリック,イサベル ナタリー ジュリアーニ,イサベル カリーヌ ラール,カトリーヌ クリスティアーヌ マリー リュニエ,フランソワ イブ トランキエ,シルビー マリー-フランス		
IPC分类号	G01N33/531 C07K7/06 C07K7/08 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/6887 G01N2333/4712		
FI分类号	G01N33/531.A C07K7/06 C07K7/08 G01N33/53.D		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	1999010526 1999-08-16 FR		
其他公开文献	JP2003507711A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供选自C, N, O, S, P和Si的至少10种, 优选作为生物分子, 特别是多肽或蛋白质的免疫测定的标准或对照。它含有至少12个, 优选至少14个且不超过300个, 有利地不超过100个, 优选不超过50个原子, 并且具有用于将侧臂接枝到烃链上的反应性。或具有至少一个具有至少两个能够反应的官能团的烃链的载体分子, 以及由接枝到所述载体分子上的所述侧臂携带的至少两个不同的表位与至少一种合成化合物的使用有关, 包括和。

アミノ酸	保護基
アラニン	2,2,4,6,7-ペントメチル-5-ジヒドロベンゾフランソルホニル(Pbf)
アラギン、 グルタミン	トリチル(Trt)
グルタミン酸	t-ブチルエステル(tBu)
ヒスチン、 ロイシン、 セリン	t-ブチルエーテル(tBu)
リシン	t-ブチルオキシカルボニル(Boc)