

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-510219

(P2019-510219A)

(43) 公表日 平成31年4月11日 (2019.4.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	4 H 0 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
CO 7 K 7/06 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-548134 (P2018-548134)	(71) 出願人	518319034 クイデル カーディオバスキュラー イン コーポレイテッド アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92 130, サンディエゴ, ハイ ブラフ ド ライブ 12544, スイート 200
(86) (22) 出願日	平成29年3月7日 (2017.3.7)	(74) 代理人	100079108 弁理士 稲葉 良幸
(85) 翻訳文提出日	平成30年10月25日 (2018.10.25)	(74) 代理人	100109346 弁理士 大貫 敏史
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/021211	(74) 代理人	100117189 弁理士 江口 昭彦
(87) 国際公開番号	W02017/156038	(74) 代理人	100134120 弁理士 内藤 和彦
(87) 国際公開日	平成29年9月14日 (2017.9.14)		
(31) 優先権主張番号	62/304,762		
(32) 優先日	平成28年3月7日 (2016.3.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/346,347		
(32) 優先日	平成28年6月6日 (2016.6.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 免疫アッセイ対照およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、免疫アッセイ対照の設計において使用する組成物および方法に関する。様々な態様において、本発明は、配列 C P R R P Y I L またはそのアナログ； E L A G L G F A E L Q C またはそのアナログ；および C D W R K N I D A L またはそのアナログを含む合成ペプチド； C P R R P Y I L、E L A G L G F A E L Q C、または C D W R K N I D A L ペプチドに結合する特異的結合試薬；そのような試薬を製造する方法；ならびに分析物アッセイで使用される試薬が対照シグナルに寄与しないという点で、目的とする単数または複数の分析物の測定とは無関係なアッセイ対照シグナルを提供するために、そのような試薬を利用するアッセイを提供する。

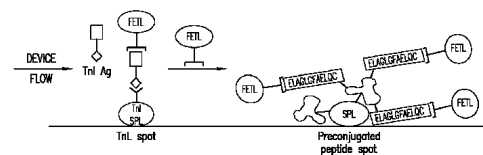


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも 1 つの診断レーンを規定する基質と、
試料適用ゾーンと、
乾燥試薬ゾーンと、

少なくとも 1 つの対照ゾーンおよび少なくとも 1 つのアッセイゾーンを含む検出ゾーンと
を含み、

(a) ~ (d)、すなわち、

(a) 少なくとも 1 つの対照ゾーンが、配列番号 1 に少なくとも 87.5 % 相同な配列を
有するペプチドを特異的に結合する抗体を含み、および乾燥試薬ゾーンが、配列番号 1 に
87.5 % 相同性を有するペプチドを含む、または

(b) 少なくとも 1 つの対照ゾーンが、配列番号 1 に 87.5 % 相同性を有するペプチド
を含み、および乾燥試薬ゾーンが、配列番号 1 に少なくとも 87.5 % 相同な配列を有す
るペプチドを特異的に結合する抗体を含み、または

(c) 少なくとも 1 つの対照ゾーンが、配列番号 4 に少なくとも 87.5 % 相同な配列を
有するペプチドを特異的に結合する抗体を含み、および乾燥試薬ゾーンが、配列番号 4 に
87.5 % 相同性を有するペプチドを含む、または

(d) 少なくとも 1 つの対照ゾーンが、配列番号 4 に 87.5 % 相同性を有するペプチド
を含み、および乾燥試薬ゾーンが、配列番号 4 に少なくとも 87.5 % 相同な配列を有す
るペプチドを特異的に結合する抗体を含む、または

(e) 少なくとも 1 つの対照ゾーンが、配列番号 8 に少なくとも 87.5 % 相同な配列を
有するペプチドを特異的に結合する抗体を含み、および乾燥試薬ゾーンが、配列番号 8 に
87.5 % 相同性を有するペプチドを含む、または

(f) 少なくとも 1 つの対照ゾーンが、配列番号 8 に 87.5 % 相同性を有するペプチド
を含み、および乾燥試薬ゾーンが、配列番号 8 に少なくとも 87.5 % 相同な配列を有す
るペプチドを特異的に結合する抗体を含む

の 1 つまたは複数が真実である装置。

【請求項 2】

(a) および (b) の少なくとも 1 つが真実であり、(c) および (d) の少なくとも 1 つ
が真実であり、ならびに (e) および (f) の少なくとも 1 つが真実である、請求項 1 に記
載の装置。

【請求項 3】

配列番号 1 に少なくとも 87.5 % 相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗
体が、配列 C P R R P Y I L (配列番号 1) を有するペプチドを特異的に結合する抗体で
ある、請求項 1 または 2 に記載の装置。

【請求項 4】

配列番号 1 に少なくとも 87.5 % 相同な配列を有するペプチドが、配列番号 1 を含む
ペプチドである、請求項 1 または 2 に記載の装置。

【請求項 5】

ペプチドが配列番号 1 から成る、請求項 4 に記載の装置。

【請求項 6】

配列番号 4 に少なくとも 87.5 % 相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗
体が、配列 E L A G L G F A E L Q C (配列番号 4) を有するペプチドを特異的に結合す
る抗体である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 7】

配列番号 4 に少なくとも 87.5 % 相同な配列を有するペプチドが、配列番号 4 を含む
ペプチドである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 8】

ペプチドが配列番号 4 から成る、請求項 7 に記載の装置。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

配列番号 8 に少なくとも 87.5% 相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体が、配列 C D W R K N I D A L (配列番号 8) を有するペプチドを特異的に結合する抗体である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 10】

配列番号 8 に少なくとも 87.5% 相同な配列を有するペプチドが、配列番号 8 を含むペプチドである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 11】

ペプチドが配列番号 4 から成る、請求項 10 に記載の装置。

【請求項 12】

配列番号 1 に少なくとも 87.5% 相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、F a b 断片、F a b 2 断片、F v 断片、S c F v 断片、または他のそのペプチド断片から選択される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の装置。

10

【請求項 13】

配列番号 4 に少なくとも 87.5% 相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、F a b 断片、F a b 2 断片、F v 断片、S c F v 断片、または他のそのペプチド断片から選択される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 14】

配列番号 8 に少なくとも 87.5% 相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、F a b 断片、F a b 2 断片、F v 断片、S c F v 断片、または他のそのペプチド断片から選択される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の装置。

20

【請求項 15】

配列番号 1 に少なくとも 87.5% 相同な配列を有するペプチドが、検出可能な標識にコンジュゲートされる、請求項 1 ~ 14 に記載の装置。

【請求項 16】

配列番号 4 に少なくとも 87.5% 相同な配列を有するペプチドが、検出可能な標識にコンジュゲートされる、請求項 1 ~ 15 に記載の装置。

【請求項 17】

配列番号 8 に少なくとも 87.5% 相同な配列を有するペプチドが、検出可能な標識にコンジュゲートされる、請求項 1 ~ 16 に記載の装置。

30

【請求項 18】

検出可能な標識が、酵素、金属ゾル粒子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子である、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 19】

検出可能な標識が、蛍光標識ラテックス粒子である、請求項 18 に記載の装置。

【請求項 20】

配列番号 1 に少なくとも 87.5% 相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体が、検出可能な標識にコンジュゲートされる、請求項 1 ~ 19 に記載の装置。

40

【請求項 21】

配列番号 4 に少なくとも 87.5% 相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体が、検出可能な標識にコンジュゲートされる、請求項 1 ~ 20 に記載の装置。

【請求項 22】

配列番号 8 に少なくとも 87.5% 相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体が、検出可能な標識にコンジュゲートされる、請求項 1 ~ 21 に記載の装置。

【請求項 23】

検出可能な標識が、酵素、金属ゾル粒子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子である、請求項 20 ~ 22 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 24】

50

検出可能な標識が、蛍光標識ラテックス粒子である、請求項 2 3 に記載の装置。

【請求項 2 5】

試料適用ゾーンと、試薬ゾーンと、少なくとも 1 つの対照結合ゾーンおよび少なくとも 1 つのアッセイ結合ゾーンを含む診断レーンとを含み、アッセイ結合ゾーンが、試料中に存在する目的とする分析物の量を示す検出可能なシグナルを生成する装置の一領域であり、(a) または (b)、すなわち、

(a) 少なくとも 1 つの対照結合ゾーンが、配列番号 1 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドを特異的に結合する抗体を含み、および試薬ゾーンが、配列番号 1 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドを含む、

(b) 少なくとも 1 つの対照結合ゾーンが、配列番号 1 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドを含み、および試薬ゾーンが、配列番号 1 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドを特異的に結合する抗体を含む、

が真実である免疫アッセイ装置を提供する工程と、

試料を試料適用ゾーンに適用する工程と、

試料と試薬ゾーンに組み込まれた試薬の混合物を試薬ゾーン内で形成する工程と、

試料試薬混合物を診断レーンに沿って流す工程と、

配列番号 1 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドを特異的に結合する抗体、および配列番号 1 に少なくとも 87.5 % 相同な前記ペプチドの結合から生じるシグナルを対照ゾーンで検出する工程と、

試料中に存在する目的とする分析物の量を示すシグナルをアッセイゾーンで検出する工程と、

対照ゾーンで得られた応答に基づきアッセイゾーンでの応答を調節する工程と

を含む、目的とする分析物のアッセイ結果を正規化する方法。

【請求項 2 6】

対照ゾーンでの応答が、試薬ゾーンに組み込まれた試薬の結果として独自に生じる、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

対照ゾーンでの応答が、試料の成分に起因して生じない、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

アッセイゾーンでの応答が、対照ゾーンでの応答に基づき増加または減少されるかのどちらかである、請求項 2 5 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

配列番号 1 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドが、配列番号 1 を含む、請求項 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

配列番号 1 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドが、配列番号 1 から成る、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

試料適用ゾーンと、試薬ゾーンと、少なくとも 1 つの対照結合ゾーンおよび少なくとも 1 つのアッセイ結合ゾーンを含む診断レーンとを含み、アッセイ結合ゾーンが、試料中に存在する目的とする分析物の量を示す検出可能なシグナルを生成する装置の一領域であり、(a) または (b)、すなわち、

(a) 少なくとも 1 つの対照結合ゾーンが、配列番号 4 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドを特異的に結合する抗体を含み、および試薬ゾーンが、配列番号 4 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドを含む、

(b) 少なくとも 1 つの対照結合ゾーンが、配列番号 4 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドを含み、および試薬ゾーンが、配列番号 4 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドを特異的に結合する抗体を含む、

が真実である免疫アッセイ装置を提供する工程と、

試料を試料適用ゾーンに適用する工程と、

10

20

30

40

50

試料と試薬ゾーンに組み込まれた試薬の混合物を試薬ゾーン内で形成する工程と、
試料試薬混合物を診断レーンに沿って流す工程と、
配列番号 4 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドを特異的に結合する抗体、および配列
番号 4 に少なくとも 87.5 % 相同な前記ペプチドの結合から生じるシグナルを対照ゾ
ンで検出する工程と、
試料中に存在する目的とする分析物の量を示すシグナルをアッセイゾーンで検出する工程
と、
対照ゾーンで得られた応答に基づきアッセイゾーンでの応答を調節する工程と
を含む、目的とする分析物のアッセイ結果を正規化する方法。

【請求項 3 2】

対照ゾーンでの応答が、試薬ゾーンに組み込まれた試薬の結果として独自に生じる、請
求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

対照ゾーンでの応答が、試料の成分に起因して生じない、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

アッセイゾーンでの応答が、対照ゾーンでの応答に基づき増加または減少されるかのど
ちらかである、請求項 3 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

配列番号 4 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドが、配列番号 4 を含む、請求項 3 1
~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

配列番号 4 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドが、配列番号 4 から成る、請求項 3
5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

試料適用ゾーンと、試薬ゾーンと、少なくとも 1 つの対照結合ゾーンおよび少なくとも
1 つのアッセイ結合ゾーンを含む診断レーンとを含み、アッセイ結合ゾーンが、試料中に
存在する目的とする分析物の量を示す検出可能なシグナルを生成する装置の一領域であり
、(a) または (b) 、すなわち、

(c) 少なくとも 1 つの対照結合ゾーンが、配列番号 8 に少なくとも 87.5 % 相同なペ
プチドを特異的に結合する抗体を含み、および試薬ゾーンが、配列番号 8 に少なくとも 8
7.5 % 相同なペプチドを含む、

(d) 少なくとも 1 つの対照結合ゾーンが、配列番号 8 に少なくとも 87.5 % 相同なペ
プチドを含み、および試薬ゾーンが、配列番号 8 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチド
を特異的に結合する抗体を含む、

が真実である免疫アッセイ装置を提供する工程と、

試料を試料適用ゾーンに適用する工程と、

試料と試薬ゾーンに組み込まれた試薬の混合物を試薬ゾーン内で形成する工程と、

試料試薬混合物を診断レーンに沿って流す工程と、

配列番号 8 に少なくとも 87.5 % 相同なペプチドを特異的に結合する抗体、および配列
番号 8 に少なくとも 87.5 % 相同な前記ペプチドの結合から生じるシグナルを対照ゾ
ンで検出する工程と、

試料中に存在する目的とする分析物の量を示すシグナルをアッセイゾーンで検出する工程
と、

対照ゾーンで得られた応答に基づきアッセイゾーンでの応答を調節する工程と

を含む、目的とする分析物のアッセイ結果を正規化する方法。

【請求項 3 8】

対照ゾーンでの応答が、試薬ゾーンに組み込まれた試薬の結果として独自に生じる、請
求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

対照ゾーンでの応答が、試料の成分に起因して生じない、請求項 3 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 40】

アッセイゾーンでの応答が、対照ゾーンでの応答に基づき増加または減少されるかのどちらかである、請求項 37 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

配列番号 8 に少なくとも 87 . 5 % 相同なペプチドが、配列番号 8 を含む、請求項 37 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

配列番号 4 に少なくとも 87 . 5 % 相同なペプチドが、配列番号 8 から成る、請求項 41 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】**【0001】**

[0001] 本発明は、2016 年 3 月 7 日に出願された米国仮出願第 62 / 304 , 762 号、および 2016 年 6 月 6 日に出願された米国仮出願第 62 / 346 , 347 号からの優先権を主張し、それらの各々は、全ての表、図、および特許請求の範囲を含むその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

[0002] 本発明は、アッセイ、詳細には免疫アッセイ、および特定の実施形態においては免疫クロマトグラフィーアッセイを用いて、分析物の量を測定するための方法および組成物に関する。

20

【背景技術】**【0003】**

[0003] 本発明の背景の以下の論考は、本発明を理解する上で読者を助けるために提供されているにすぎず、本発明の先行技術を記載または構成することを認めるものではない。

【0004】

[0004] その簡単さ、相対精度、迅速な結果報告、および使いやすさにより、特定の結合アッセイ、特に免疫アッセイは、診断産業において飛躍的な成長を遂げている。そのような技術は、妊娠および女性の健康の判定、心臓および緊急状態のモニタリングおよび検査、ウイルススクリーニングを含む感染症、癌マーカースクリーニング、ならびに薬物乱用検査に広く利用されている。しかし、どんな検査手法もそうであるように、そのようなアッセイにおける各観察は、目的とする分析物の機能だけでなく、結果を巻き込む複数の変動源の機能でもある。これらの変動源は、生物学および技術的要因の両方から生じる。生物学的要因には、試料マトリックスの特性、個々の患者の特徴、および検査で使用される生体分子（例えば、抗体）の特徴が含まれる。装置のばらつき、温度、検査システムの経時劣化等などの技術的要因は、アッセイの精度、感度、再現性、および特異度に影響を与えることに関与する生物学的要因と結び付いている。側方流動アッセイの場合、側方流動膜を通じた流体の流れ、ならびに流体試料の粘度および他の要因は、アッセイの性能の制約に寄与する可能性がある。

30

【0005】

[0005] これらの絡まった要因の影響を緩和する戦略が存在する。例えば、ブロッキング戦略は、非特異的結合の交絡作用を防ぐのに使用される。さらに、データの正規化は、技術的要因により導入された望ましくない系統的差異を除去するために行われる。米国特許第 5 , 356 , 782 号、第 5 , 753 , 517 号、第 7 , 691 , 595 号、および第 7 , 713 , 703 号は、免疫アッセイデータの絡まりを解こうとするアッセイ対照を含む様々なアッセイプラットフォームを記載する。データから生物学および技術的影響の絡まりを解くことにより、より正確な検査結果が得られる可能性がある。

40

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

[0006] 免疫アッセイ対照の設計において使用する組成物および方法を提供することが、

50

本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0007】

[0007] 様々な態様において、本発明は、配列 C P R R P Y I L (配列番号 1) またはそのアナログを含む合成ペプチド (以下に定義される「CPRRPYILペプチド」と呼ばれる) ; C P R R P Y I L ペプチドに結合する特異的結合試薬 ; そのような試薬を製造する方法 ; および分析物アッセイで使用される試薬が対照シグナルに寄与しないという点で、目的とする単数または複数の分析物の測定とは無関係なアッセイ対照シグナルを提供するために、そのような試薬を利用するアッセイを提供する。特定の態様において、C P R R P Y I L ペプチドへの特異的結合試薬の結合は、アッセイ結果を正規化またはさもなければ調節するのに使用される。

10

【0008】

[0008] 様々な態様において、本発明はまた、配列 E L A G L G F A E L Q C (配列番号 4) またはそのアナログを含む合成ペプチド (以下に定義される「ELAGLGFAELQCペプチド」と呼ばれる) ; E L A G L G F A E L Q C ペプチドに結合する特異的結合試薬 ; そのような試薬を製造する方法 ; および分析物アッセイで使用される試薬が対照シグナルに寄与しないという点で、目的とする単数または複数の分析物の測定とは無関係なアッセイ対照シグナルを提供するために、そのような試薬を利用するアッセイを提供する。特定の態様において、E L A G L G F A E L Q C ペプチドへの特異的結合試薬の結合は、アッセイ結果を正規化またはさもなければ調節するのに使用される。

20

【0009】

[0009] 様々な態様において、本発明はまた、配列 C D W R K N I D A L (配列番号 8) またはそのアナログを含む合成ペプチド (以下に定義される「CDWRKNIDALペプチド」と呼ばれる) ; C D W R K N I D A L ペプチドに結合する特異的結合試薬 ; そのような試薬を製造する方法 ; および分析物アッセイで使用される試薬が対照シグナルに寄与しないという点で、目的とする単数または複数の分析物の測定とは無関係なアッセイ対照シグナルを提供するために、そのような試薬を利用するアッセイを提供する。特定の態様において、C D W R K N I D A L ペプチドへの特異的結合試薬の結合は、アッセイ結果を正規化またはさもなければ調節するのに使用される。

30

【0010】

[0010] 第 1 の態様において、本発明は、

- (a) 配列番号 1 を含む合成ペプチド、
 - (b) 8 隣接残基にわたって配列番号 1 に少なくとも 87.5 % 相同な配列を含む合成ペプチド、
 - (c) (a) および / もしくは (b) の合成ペプチドを特異的に結合する特異的結合試薬 (例えば、抗体)、
 - (d) その表面に固定化された (a) および / もしくは (b) の合成ペプチドを含む固相、
 - (e) その表面に固定化された (c) の特異的結合試薬を含む固相、
 - (f) (a) および / もしくは (b) の合成ペプチドにコンジュゲートされた検出可能な標識、ならびに / または
 - (g) (c) の特異的結合試薬にコンジュゲートされた検出可能な標識
- を提供する。

40

【0011】

[0011] 関連する態様において、本発明は、
少なくとも 1 つの診断レーンを規定する基質と、
試料を受け取るための基質上の試料適用ゾーンと、
試料適用ゾーンに流動的に接続された基質上の乾燥試薬ゾーンと、
少なくとも 1 つの対照ゾーンおよび少なくとも 1 つのアッセイゾーンを含む基質上の検出ゾーンであって、試料適用ゾーンに流動的に接続された検出ゾーンと、試料適用ゾーンに適用された試料が、検出ゾーンに達する前に乾燥試薬ゾーンを流れて流れるような試料適

50

用ゾーンと
を含み、

少なくとも1つの対照ゾーンが、C P R R P Y I L ペプチドに対する結合特異性を有する特異的結合試薬（例えば、抗体）を含み、および乾燥試薬ゾーンが C P R R P Y I L ペプチドを含み、または

少なくとも1つの対照ゾーンがC P R R P Y I L ペプチドを含み、および乾燥試薬ゾーンが、C P R R P Y I L ペプチドに対する結合特異性を有する特異的結合試薬（例えば、抗体）を含む、試料中の少なくとも1つの分析物の検出のためのアッセイ装置を提供する。

【0012】

[0012] 様々な実施形態において、

(i) 対照ゾーンもしくは乾燥試薬ゾーンは、配列C P R R P Y I L（配列番号1）（Cys ProArgArgProTyrIleLeu；配列番号1）を含む合成ペプチドを特異的に結合する抗体を含み、

(ii) 乾燥試薬ゾーンもしくは対照ゾーンは、配列C P R R P Y I L（配列番号1）（Cys ProArgArgProTyrIleLeu；配列番号1）を含む合成ペプチドを含み、

(iii) 合成ペプチドはC P R R P Y I Lであり；

(iv) 特異的結合試薬は、配列番号1を特異的に結合するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、F a b断片、F a b 2断片、F v断片、S c F v断片、もしくは他のそのペプチド断片から成る群から選択され、

(v) C P R R P Y I L ペプチドは、心臓トロポニンIのエピトープ、脳性ナトリウム利尿ペプチドのエピトープ、胎盤増殖因子のエピトープ、可溶性f m s様チロシンのエピトープ、および/もしくはエンドグリンのエピトープを含むエピトープ配列にコンジュゲートされ、もしくはペプチド結合により該エピトープ配列に結合され、

(vi) C P R R P Y I L ペプチドは、検出可能な標識と結合されており、検出可能な標識は、好ましくは酵素、金属ゾル粒子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子、および最も好ましくは蛍光標識ラテックス粒子であり、ならびに/または

(vii) 乾燥試薬ゾーンまたは対照ゾーンは、検出可能な標識と結合されている抗体を含み、検出可能な標識は、好ましくは酵素、金属ゾル粒子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子、および最も好ましくは蛍光標識ラテックス粒子である。

【0013】

[0013] 別の態様において、本発明は、

段落[0010]または[0011]に記載されたアッセイ装置を提供する工程と、

試料を試料適用ゾーンに適用する工程と、

試料と試薬ゾーンに組み込まれた試薬の混合物を試薬ゾーン内で形成する工程と、

試料試薬混合物を診断レーンに沿って流す工程と、

試料試薬混合物の成分の相互作用による応答を対照ゾーンで検出する工程と、

試料試薬混合物の成分の相互作用による応答をアッセイゾーンで検出する工程と、

対照ゾーンで得られた応答に基づきアッセイゾーンでの応答を調節する工程と

を含む、特異的結合に関するアッセイ結果（例えば、免疫アッセイ）を正規化する方法を提供する。

【0014】

[0014] 方法の様々な実施形態において、

(i) 対照ゾーンでの応答は、試薬ゾーンに組み込まれた試薬の結果として独自に生じ、

(ii) 対照ゾーンでの応答は、試料の成分に起因して生じず、および/または

(iii) アッセイゾーンでの応答は、対照ゾーンでの応答に基づき増加もしくは減少されるかのどちらかである。

【0015】

[0015] さらに別の態様において、本発明は、

少なくとも1つの診断レーンを規定する基質と、

試料適用ゾーンと、

10

20

30

40

50

乾燥試薬ゾーンと、
結合されたアッセイおよび対照ゾーンを含む検出ゾーンと
を含み、結合されたアッセイゾーンおよび対照ゾーンが、C P R R P Y I L ペプチドに対する結合特異性を有する第 1 の特異的結合試薬（例えば、抗体）、および目的とする分析物に特異的な第 2 の特異的結合試薬を含む装置を提供する。

【 0 0 1 6 】

[0016] 様々な実施形態において、装置は、次のようにさらに定義される：

(i) 第 1 の特異的結合試薬は、配列番号 1 の配列を含むペプチドを特異的に結合する抗体であり、ペプチドは好ましくは C P R R P Y I L (配列番号 1) であり、

(ii) 乾燥試薬ゾーンまたは結合されたアッセイゾーンおよび対照ゾーンは、配列番号 1 の配列を含むペプチドを含み、ペプチドは好ましくは C P R R P Y I L (配列番号 1) であり、

(iii) 特異的結合試薬は、配列番号 1 を特異的に結合するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、F a b 断片、F a b 2 断片、F v 断片、S c F v 断片、または他のそのペプチド断片から成る群から選択され、

(iv) 乾燥試薬ゾーンまたは結合されたアッセイゾーンおよび対照ゾーンは、検出可能な標識と結合されているペプチドを含み、検出可能な標識は、好ましくは酵素、金属ゾル粒子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子、および最も好ましくは蛍光標識ラテックス粒子であり、

(v) 乾燥試薬ゾーンまたは対照ゾーンは、検出可能な標識と結合されている抗体を含み、検出可能な標識は、好ましくは酵素、金属ゾル粒子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子、および最も好ましくは蛍光標識ラテックス粒子である。

【 0 0 1 7 】

[0017] 別の態様において、本発明は、

C P R R P Y I L ペプチドが、心臓トロポニン I のエピトープ、脳性ナトリウム利尿ペプチドのエピトープ、胎盤増殖因子のエピトープ、可溶性 f m s 様チロシンのエピトープ、および / もしくはエンドグリンのエピトープを含むエピトープ配列にコンジュゲートされ、またはペプチド結合により該エピトープ配列に結合される、段落 [0 0 1 4] または [0 0 1 5] に記載された装置を提供する工程と、

試料を試料適用ゾーンに適用する工程と、

試料と蛍光標識粒子と C P R R P Y I L ペプチドの混合物を試薬ゾーン内で形成し、これにより標的分析物および C P R R P Y I L ペプチドの両方が、蛍光標識粒子上で特異的結合試薬により結合される工程と、

試料試薬混合物を診断レーンに沿って流す工程と、

C P R R P Y I L ペプチドに存在する配列番号 1 のエピトープと対照ゾーンに固定化された抗体との相互作用による応答を検出する工程と、

標的分析物のエピトープとアッセイゾーンに固定化された抗体との相互作用による応答を検出する工程と、

対照ゾーンで得られた応答に基づきアッセイゾーンでの応答を調節する工程と

を含む、特異的結合に関するアッセイ結果（例えば、免疫アッセイ）を正規化する方法を提供する。

【 0 0 1 8 】

[0018] 方法の様々な実施形態において、

(i) 対照ゾーンでの応答は、C P R R P Y I L ペプチドの結果として独自に生じ、

(ii) 対照ゾーンでの応答は、試料の成分に起因して生じず、

(iii) アッセイゾーンで判定された応答は、対照ゾーンでの応答に基づき増加または減少されるかのどちらかであり、

(iv) C P R R P Y I L ペプチドは、C P R R P Y I L (配列番号 1) および標的分析物に固有のペプチド配列から成る。

【 0 0 1 9 】

10

20

30

40

50

[0019] 別の態様において、本発明は、

- (a) 配列番号 4 を含む合成ペプチド、
 - (b) 8 隣接残基にわたって配列番号 4 に少なくとも 87.5% 相同な配列を含む合成ペプチド、
 - (c) (a) および / もしくは (b) の合成ペプチドを特異的に結合する特異的結合試薬 (例えば、抗体)、
 - (d) その表面に固定化された (a) および / もしくは (b) の合成ペプチドを含む固相、
 - (e) その表面に固定化された (c) の特異的結合試薬を含む固相、
 - (f) (a) および / もしくは (b) の合成ペプチドにコンジュゲートされた検出可能な標識、ならびに / または
 - (g) (c) の特異的結合試薬にコンジュゲートされた検出可能な標識
- を提供する。

【0020】

[0020] 関連する態様において、本発明は、

少なくとも 1 つの診断レーンを規定する基質と、
試料を受け取るための基質上の試料適用ゾーンと、
試料適用ゾーンに流動的に接続された基質上の乾燥試薬ゾーンと、
少なくとも 1 つの対照ゾーンおよび少なくとも 1 つのアッセイゾーンを含む基質上の検出ゾーンであって、試料適用ゾーンに流動的に接続された検出ゾーンと、試料適用ゾーンに適用された試料が、検出ゾーンに達する前に乾燥試薬ゾーンを通して流れるような試料適用ゾーンと

を含み、
少なくとも 1 つの対照ゾーンが、E L A G L G F A E L Q C ペプチドに対する結合特異性を有する特異的結合試薬 (例えば、抗体) を含み、および乾燥試薬ゾーンが E L A G L G F A E L Q C ペプチドを含み、または
少なくとも 1 つの対照ゾーンが E L A G L G F A E L Q C ペプチドを含み、および乾燥試薬ゾーンが、E L A G L G F A E L Q C ペプチドに対する結合特異性を有する特異的結合試薬 (例えば、抗体) を含む、試料中の少なくとも 1 つの分析物の検出のためのアッセイ装置を提供する。

【0021】

[0021] 様々な実施形態において、

- (i) 対照ゾーンもしくは乾燥試薬ゾーンは、配列 E L A G L G F A E L Q C (配列番号 4) を含む合成ペプチドを特異的に結合する抗体を含み、
- (ii) 乾燥試薬ゾーンもしくは対照ゾーンは、配列 E L A G L G F A E L Q C (配列番号 4) を含む合成ペプチドを含み、
- (iii) 合成ペプチドは E L A G L G F A E L Q C であり、
- (iv) 特異的結合試薬は、配列番号 4 を特異的に結合するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、F a b 断片、F a b 2 断片、F v 断片、S c F v 断片、もしくは他のそのペプチド断片から成る群から選択され、
- (v) E L A G L G F A E L Q C ペプチドは、心臓トロポニン I のエピトープ、脳性ナトリウム利尿ペプチドのエピトープ、胎盤増殖因子のエピトープ、可溶性 f m s 様チロシンのエピトープ、および / もしくはエンドグリンのエピトープを含むエピトープ配列にコンジュゲートされ、もしくはペプチド結合により該エピトープ配列に結合され、
- (vi) E L A G L G F A E L Q C ペプチドは、検出可能な標識と結合されており、検出可能な標識は、好ましくは酵素、金属ゾル粒子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子、および最も好ましくは蛍光標識ラテックス粒子であり、ならびに / または
- (vii) 乾燥試薬ゾーンもしくは対照ゾーンは、検出可能な標識と結合されている抗体を含み、検出可能な標識は、好ましくは酵素、金属ゾル粒子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子、および最も好ましくは蛍光標識ラテックス粒子である。

【0022】

10

20

30

40

50

[0022] 別の態様において、本発明は、
段落 [0 0 1 9] または [0 0 2 0] に記載されたアッセイ装置を提供する工程と、
試料を試料適用ゾーンに適用する工程と、
試料と試薬ゾーンに組み込まれた試薬の混合物を試薬ゾーン内で形成する工程と、
試料試薬混合物を診断レーンに沿って流す工程と、
試料試薬混合物の成分の相互作用による応答を対照ゾーンで検出する工程と、
試料試薬混合物の成分の相互作用による応答をアッセイゾーンで検出する工程と、
対照ゾーンで得られた応答に基づきアッセイゾーンでの応答を調節する工程と
を含む、特異的結合に関するアッセイ結果（例えば、免疫アッセイ）を正規化する方法を
提供する。

10

【 0 0 2 3 】

[0023] 方法の様々な実施形態において、
(i) 対照ゾーンでの応答は、試薬ゾーンに組み込まれた試薬の結果として独自に生じ、
(ii) 対照ゾーンでの応答は、試料の成分に起因して生じず、および / または
(iii) アッセイゾーンでの応答は、対照ゾーンでの応答に基づき増加または減少される
かのどちらかである。

【 0 0 2 4 】

[0024] さらに別の態様において、本発明は、
少なくとも 1 つの診断レーンを規定する基質と、
試料適用ゾーンと、
乾燥試薬ゾーンと、
結合されたアッセイゾーンおよび対照ゾーンを含む検出ゾーンと
を含み、結合されたアッセイゾーンおよび対照ゾーンが、E L A G L G F A E L Q C ペプ
チドに対する結合特異性を有する第 1 の特異的結合試薬（例えば、抗体）、および目的と
する分析物に特異的な第 2 の特異的結合試薬を含む装置を提供する。

20

【 0 0 2 5 】

[0025] 様々な実施形態において、装置は、次のようにさらに定義される：
(i) 第 1 の特異的結合試薬は、配列番号 4 の配列を含むペプチドを特異的に結合する抗
体であり、ペプチドは好ましくは E L A G L G F A E L Q C （配列番号 4 ）であり、
(ii) 乾燥試薬ゾーンまたは結合されたアッセイゾーンおよび対照ゾーンは、配列番号 4
の配列を含むペプチドを含み、ペプチドは好ましくは E L A G L G F A E L Q C （配列番
号 4 ）であり、
(iii) 特異的結合試薬は、配列番号 4 を特異的に結合するモノクローナル抗体、ポリク
ローナル抗体、F a b 断片、F a b 2 断片、F v 断片、S c F v 断片、または他のそのペ
プチド断片から成る群から選択され、
(iv) 乾燥試薬ゾーンまたは結合されたアッセイゾーンおよび対照ゾーンは、検出可能な
標識と結合されているペプチドを含み、検出可能な標識は、好ましくは酵素、金属ゾル粒
子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子、および最も好ましくは蛍光標識ラテックス粒子で
あり、
(v) 乾燥試薬ゾーンまたは対照ゾーンは、検出可能な標識と結合されている抗体を含み
、検出可能な標識は、好ましくは酵素、金属ゾル粒子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子
、および最も好ましくは蛍光標識ラテックス粒子である。

30

40

【 0 0 2 6 】

[0026] 別の態様において、本発明は、
E L A G L G F A E L Q C ペプチドが、心臓トロポニン I のエピトープ、脳性ナトリウム
利尿ペプチドのエピトープ、胎盤増殖因子のエピトープ、可溶性 f m s 様チロシンのエピ
トープ、および / もしくはエンドグリンのエピトープを含むエピトープ配列にコンジュゲ
ートされ、またはペプチド結合により該エピトープ配列に結合される、段落 [0 0 2 3]
または [0 0 2 4] に記載された装置を提供する工程と、
試料を試料適用ゾーンに適用する工程と、

50

試料と蛍光標識粒子と E L A G L G F A E L Q C ペプチドの混合物を試薬ゾーン内で形成し、これにより標的分析物および E L A G L G F A E L Q C ペプチドの両方が、蛍光標識粒子上で特異的結合試薬により結合される工程と、
試料試薬混合物を診断レーンに沿って流す工程と、
E L A G L G F A E L Q C ペプチドに存在する配列番号 4 のエピトープと対照ゾーンに固定化された抗体との相互作用による応答を検出する工程と、
標的分析物のエピトープとアッセイゾーンに固定化された抗体との相互作用による応答を検出する工程と、
対照ゾーンで得られた応答に基づきアッセイゾーンでの応答を調節する工程と
を含む、特異的結合に関するアッセイ結果（例えば、免疫アッセイ）を正規化する方法を提供する。

10

【0027】

[0027] 方法の様々な実施形態において、

- (i) 対照ゾーンでの応答は、E L A G L G F A E L Q C ペプチドの結果として独自に生じ、
- (ii) 対照ゾーンでの応答は、試料の成分に起因して生じず、
- (iii) アッセイゾーンで判定された応答は、対照ゾーンでの応答に基づき増加または減少されるかのどちらかであり、
- (iv) E L A G L G F A E L Q C ペプチドは、E L A G L G F A E L Q C（配列番号 4）および標的分析物に固有のペプチド配列から成る。

20

【0028】

[0028] 別の態様において、本発明は、

- (a) 配列番号 8 を含む合成ペプチド、
 - (b) 8 隣接残基にわたって配列番号 8 と少なくとも 87.5% 相同な配列を含む合成ペプチド、
 - (c) (a) および / もしくは (b) の合成ペプチドを特異的に結合する特異的結合試薬（例えば、抗体）、
 - (d) その表面に固定化された (a) および / もしくは (b) の合成ペプチドを含む固相、
 - (e) その表面に固定化された (c) の特異的結合試薬を含む固相、
 - (f) (a) および / または (b) の合成ペプチドにコンジュゲートされた検出可能な標識、ならびに / または
 - (g) (c) の特異的結合試薬にコンジュゲートされた検出可能な標識
- を提供する。

30

【0029】

[0029] 関連する態様において、本発明は、

少なくとも 1 つの診断レーンを規定する基質と、
試料を受け取るための基質上の試料適用ゾーンと、
試料適用ゾーンに流動的に接続された基質上の乾燥試薬ゾーンと、
少なくとも 1 つの対照ゾーンおよび少なくとも 1 つのアッセイゾーンを含む基質上の検出ゾーンであって、試料適用ゾーンに流動的に接続された検出ゾーンと、試料適用ゾーンに適用された試料が、検出ゾーンに達する前に乾燥試薬ゾーンを通して流れるような試料適用ゾーンと
を含み、
少なくとも 1 つの対照ゾーンが、C D W R K N I D A L ペプチドに対する結合特異性を有する特異的結合試薬（例えば、抗体）を含み、および乾燥試薬ゾーンが C D W R K N I D A L ペプチドを含み、または
少なくとも 1 つの対照ゾーンが C D W R K N I D A L ペプチドを含み、および乾燥試薬ゾーンが、C D W R K N I D A L ペプチドに対する結合特異性を有する特異的結合試薬（例えば、抗体）を含む、試料中の少なくとも 1 つの分析物の検出のためのアッセイ装置を提供する。

40

50

【 0 0 3 0 】

[0030] 様々な実施形態において、

(i) 対照ゾーンまたは乾燥試薬ゾーンは、配列 C D W R K N I D A L (配列番号 8) を含む合成ペプチドを特異的に結合する抗体を含み、

(ii) 乾燥試薬ゾーンまたは対照ゾーンは、配列 C D W R K N I D A L (配列番号 8) を含む合成ペプチドを含み、

(iii) 合成ペプチドは C D W R K N I D A L であり、

(iv) 特異的結合試薬は、配列番号 8 を特異的に結合するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、F a b 断片、F a b 2 断片、F v 断片、S c F v 断片、もしくは他のそのペプチド断片から成る群から選択され、

(v) C D W R K N I D A L ペプチドは、心臓トロポニン I のエピトープ、脳性ナトリウム利尿ペプチドのエピトープ、胎盤増殖因子のエピトープ、可溶性 f m s 様チロシンのエピトープ、および / もしくはエンドグリンのエピトープを含むエピトープ配列にコンジュゲートされ、もしくはペプチド結合により該エピトープ配列に結合され、

(vi) C D W R K N I D A L ペプチドは、検出可能な標識と結合されており、検出可能な標識は、好ましくは酵素、金属ゾル粒子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子、および最も好ましくは蛍光標識ラテックス粒子であり、ならびに / または

(vii) 乾燥試薬ゾーンまたは対照ゾーンは、検出可能な標識と結合されている抗体を含み、検出可能な標識は、好ましくは酵素、金属ゾル粒子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子、および最も好ましくは蛍光標識ラテックス粒子である。

【 0 0 3 1 】

[0031] 別の態様において、本発明は、

段落 [0 0 2 8] または [0 0 2 9] に記載されたアッセイ装置を提供する工程と、

試料を試料適用ゾーンに適用する工程と、

試料と試薬ゾーンに組み込まれた試薬の混合物を試薬ゾーン内で形成する工程と、

試料試薬混合物を診断レーンに沿って流す工程と、

試料試薬混合物の成分の相互作用による応答を対照ゾーンで検出する工程と、

試料試薬混合物の成分の相互作用による応答をアッセイゾーンで検出する工程と、

対照ゾーンで得られた応答に基づきアッセイゾーンでの応答を調節する工程と

を含む、特異的結合に関するアッセイ結果 (例えば、免疫アッセイ) を正規化する方法を提供する。

【 0 0 3 2 】

[0032] 方法の様々な実施形態において、

(i) 対照ゾーンでの応答は、試薬ゾーンに組み込まれた試薬の結果として独自に生じ、

(ii) 対照ゾーンでの応答は、試料の成分に起因して生じず、および / または

(iii) アッセイゾーンでの応答は、対照ゾーンでの応答に基づき増加または減少されるかのどちらかである。

【 0 0 3 3 】

[0033] さらに別の態様において、本発明は、

少なくとも 1 つの診断レーンを規定する基質と、

試料適用ゾーンと、

乾燥試薬ゾーンと、

結合されたアッセイゾーンおよび対照ゾーンを含む検出ゾーンと

を含み、結合されたアッセイゾーンおよび対照ゾーンが、C D W R K N I D A L ペプチドに対する結合特異性を有する第 1 の特異的結合試薬 (例えば、抗体)、および目的とする分析物に特異的な第 2 の特異的結合試薬を含む装置を提供する。

【 0 0 3 4 】

[0034] 様々な実施形態において、装置は、次のようにさらに定義される：

(i) 第 1 の特異的結合試薬は、配列番号 8 の配列を含むペプチドを特異的に結合する抗体であり、ペプチドは好ましくは C D W R K N I D A L (配列番号 8) であり、

(ii) 乾燥試薬ゾーンまたは結合されたアッセイゾーンおよび対照ゾーンは、配列番号 8 の配列を含むペプチドを含み、ペプチドは好ましくは C D W R K N I D A L (配列番号 8) であり、

(iii) 特異的結合試薬は、配列番号 8 を特異的に結合するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、F a b 断片、F a b 2 断片、F v 断片、S c F v 断片、または他のそのペプチド断片から成る群から選択され、

(iv) 乾燥試薬ゾーンまたは結合されたアッセイゾーンおよび対照ゾーンは、検出可能な標識と結合されているペプチドを含み、検出可能な標識は、好ましくは酵素、金属ゾル粒子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子、および最も好ましくは蛍光標識ラテックス粒子であり、

(v) 乾燥試薬ゾーンまたは対照ゾーンは、検出可能な標識と結合されている抗体を含み、検出可能な標識は、好ましくは酵素、金属ゾル粒子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子、および最も好ましくは蛍光標識ラテックス粒子である。

【0035】

[0035] 別の態様において、本発明は、

C D W R K N I D A L ペプチドが、心臓トロポニン I のエピトープ、脳性ナトリウム利尿ペプチドのエピトープ、胎盤増殖因子のエピトープ、可溶性 f m s 様チロシンのエピトープ、および/もしくはエンドグリンのエピトープを含むエピトープ配列にコンジュゲートされ、またはペプチド結合により該エピトープ配列に結合される、段落 [0032] または [0033] に記載された装置を提供する工程と、

試料を試料適用ゾーンに適用する工程と、

試料と蛍光標識粒子と C D W R K N I D A L ペプチドの混合物を試薬ゾーン内で形成し、これにより標的分析物および C D W R K N I D A L ペプチドの両方が、蛍光標識粒子上で特異的結合試薬により結合される工程と、

試料試薬混合物を診断レーンに沿って流す工程と、

C D W R K N I D A L ペプチドに存在する配列番号 8 のエピトープと対照ゾーンに固定化された抗体との相互作用による応答を検出する工程と、

標的分析物のエピトープとアッセイゾーンに固定化された抗体との相互作用による応答を検出する工程と、

対照ゾーンで得られた応答に基づきアッセイゾーンでの応答を調節する工程と

を含む、特異的結合に関するアッセイ結果 (例えば、免疫アッセイ) を正規化する方法を提供する。

【0036】

[0036] 方法の様々な実施形態において、

(i) 対照ゾーンでの応答は、C D W R K N I D A L ペプチドの結果として独自に生じ、

(ii) 対照ゾーンでの応答は、試料の成分に起因して生じず、

(iii) アッセイゾーンで判定された応答は、対照ゾーンでの応答に基づき増加または減少されるかのどちらかであり、

(iv) C D W R K N I D A L ペプチドは、C D W R K N I D A L (配列番号 8) および標的分析物に固有のペプチド配列から成る。

【0037】

[0037] 当業者は、本明細書に記載された C P R R P Y I L ペプチドおよびその対応する抗体、本明細書に記載された E L A G L G F A E L Q C ペプチドおよびその対応する抗体、ならびに本明細書に記載された C D W R K N I D A L ペプチドおよびその対応する抗体は、同じ装置内で一緒に使用することもできることを理解するであろう。故に、特定の態様において、本発明は、

少なくとも 1 つの診断レーンを規定する基質と、

試料適用ゾーンと、

乾燥試薬ゾーンと、

少なくとも 1 つの対照ゾーンおよび少なくとも 1 つのアッセイゾーンを含む検出ゾーンと

10

20

30

40

50

を含み、a ~ f、すなわち、

(a) 少なくとも1つの対照ゾーンは、配列番号1に少なくとも87.5%相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体を含み、および乾燥試薬ゾーンは、配列番号1に87.5%相同性を有するペプチドを含む、または

(b) 少なくとも1つの対照ゾーンは、配列番号1に87.5%相同性を有するペプチドを含み、および乾燥試薬ゾーンは、配列番号1に少なくとも87.5%相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体を含む、または

(c) 少なくとも1つの対照ゾーンは、配列番号4に少なくとも87.5%相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体を含み、および乾燥試薬ゾーンは、配列番号4に87.5%相同性を有するペプチドを含む、または

(d) 少なくとも1つの対照ゾーンは、配列番号4に87.5%相同性を有するペプチドを含み、および乾燥試薬ゾーンは、配列番号4に少なくとも87.5%相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体を含む、または

(e) 少なくとも1つの対照ゾーンは、配列番号8に少なくとも87.5%相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体を含み、および乾燥試薬ゾーンは、配列番号8に87.5%相同性を有するペプチドを含む、または

(f) 少なくとも1つの対照ゾーンは、配列番号8に87.5%相同性を有するペプチドを含み、および乾燥試薬ゾーンは、配列番号8に少なくとも87.5%相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体を含む

の1つまたは複数が真実である装置を提供する。

【0038】

[0038] 特定の実施形態において、(a) および (b) の少なくとも1つは真実であり、(c) および (d) の少なくとも1つは真実であり、ならびに (e) および (f) の少なくとも1つは真実である。

【0039】

[0039] 特定の実施形態において、配列番号1に少なくとも87.5%相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体は、配列C P R R P Y I L (配列番号1) を有するペプチドを特異的に結合する抗体であり、好ましくは配列番号1に少なくとも87.5%相同な配列を有するペプチドは、配列番号1を含むペプチドである。最も好ましくは、ペプチドは配列番号1から成る。

【0040】

[0040] 特定の実施形態において、配列番号4に少なくとも87.5%相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体は、配列E L A G L G F A E L Q C (配列番号4) を有するペプチドを特異的に結合する抗体であり、好ましくは配列番号4に少なくとも87.5%相同な配列を有するペプチドは、配列番号4を含むペプチドである。最も好ましくは、ペプチドは配列番号4から成る。

【0041】

[0041] 特定の実施形態において、配列番号8に少なくとも87.5%相同な配列を有するペプチドを特異的に結合する抗体は、配列C D W R K N I D A L (配列番号8) を有するペプチドを特異的に結合する抗体であり、好ましくは配列番号8に少なくとも87.5%相同な配列を有するペプチドは、配列番号8を含むペプチドである。最も好ましくは、ペプチドは配列番号8から成る。

【0042】

[0042] 乾燥試薬ゾーンまたは対照ゾーンは、検出可能な標識と結合されているペプチドまたは抗体を含むことができる。検出可能な標識は、酵素、金属ゾル粒子、ラテックス粒子、磁気感受性粒子、または蛍光標識ラテックス粒子であってもよい。本発明の他の実施形態は、以下の詳細な説明、例示的实施形態、および特許請求の範囲から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図 1】[0043]本発明の例示的アッセイ装置を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0044】

[0044] 本発明は、アッセイ、特に免疫アッセイ、および特定の実施形態においては免疫クロマトグラフィーアッセイを用いて、分析物の量を測定するための方法および組成物に関する。特に、本発明は、目的とする単数または複数の分析物の測定とは無関係な特異的結合試薬を利用する対照が提供されるアッセイに関する。これらの特異的結合試薬は、配列 C P R R P Y I L（配列番号 1）を有するペプチドもしくはそのアナログ（本明細書ではまとめて「CPRRPYILペプチド」と呼ばれる）、配列 E L A G L G F A E L Q C（配列番号 4）を有するペプチドもしくはそのアナログ（本明細書ではまとめて「ELAGLGFAELQCペプチド」と呼ばれる）、または配列 C D W R K N I D A L（配列番号 8）を有するペプチドもしくはそのアナログ（本明細書ではまとめて「CDWRKNIDALペプチド」と呼ばれる）に結合する。後述の通り、C P R R P Y I L、E L A G L G F A E L Q C、または C D W R K N I D A L ペプチドへの特異的結合試薬の結合は、アッセイ結果を正規化またはさもなければ調節するのに使用される。

10

【0045】

[0045] 明確にするために、本発明の化合物に関する以下の用語の定義が提供される。

【0046】

[0046] 「アッセイ」は、本明細書で使用される場合、1つまたは複数の分析物の存在、非存在、または量を判定する試料の分析のためのインピット処置を指す。本発明のアッセイは、典型的には、分析物および分析物に特異的に結合する少なくとも1つの分析物結合剤を利用する。分析物および分析物結合剤は、特異的「結合対」のメンバーであり、結合対の第1のメンバー（例えば、分析物）は、第2のメンバー（例えば、結合剤）と特異的に反応する。結合対の一方または両方のメンバーは、抗体であってもよい。例えば、結合対の第1のメンバー（例えば、目的とする分析物）は抗体であってもよく、結合対の第2のメンバー（例えば、結合剤）は抗免疫グロブリン抗体であってもよい。あるいは、結合対の第1のメンバー（例えば、分析物）は抗原であってもよく、結合対の第2のメンバー（例えば、結合剤）は抗体であってもよい（本明細書では「免疫アッセイ」と呼ばれる）。

20

【0047】

[0047] 好ましい実施形態において、アッセイは「サンドイッチ」アッセイである。これは、分析物の有無、または量に関して評価される流体試料が、分析物に結合する抗体などの第1の分析物結合剤、および同様に分析物に結合する第2の分析物結合試薬と接触された分析物の検査である。分析物および2つの結合試薬の「サンドイッチ」複合体が検出される。典型的にはこのフォーマットにおいて、一方の抗体は検出可能に標識され、他方の抗体は固相に結合される。

30

【0048】

[0048] 用語「側方流動アッセイ」は、試料が側方流動マトリックスに適用されるアッセイフォーマットを指す。試料は側方流動マトリックスに沿って流れ、試料中の検出される1つまたは複数の分析物成分は、側方流動マトリックス中に提供され、または該マトリックスに添加された少なくとも1つの試薬と反応する。少なくとも1つの試薬は、典型的には、検出される分析物成分またはその試薬との反応のために装置に固定化され、固定化された試薬との反応の程度を測定するのに標識が典型的には使用される。例えば、米国特許および特許出願公開第5,602,040号、第5,622,871号、第5,656,503号、第6,187,598号、第6,228,660号、第6,818,455号、第2001/0008774号、第2005/0244986号、第6,352,862号、第2003/0207465号、第2003/0143755号、第2003/0219908号、第5,714,389号、第5,989,921号、第6,485,982号、第11/035,047号、第5,656,448号、第5,559,041号、第5,252,496号、第5,728,587号、第6,027,943号、第6,

40

50

506, 612号、第6, 541, 277号、第6, 737, 277 B1号、第5, 073, 484号、第5, 654, 162号、第6, 020, 147号、第4, 956, 302号、第5, 120, 643号、第6, 534, 320号、第4, 942, 522号、第4, 703, 017号、第4, 743, 560号、第5, 591, 645号、およびRE38, 430参照。側方流動アッセイ装置は、試料孔および試料孔の下流の結果窓を有するハウジング、ならびに任意選択により、結果窓の下流の対照窓を含んでもよい。試料孔は、ハウジング内の側方流動マトリックスを介して側方流動路を横切り、試料孔から下流の位置まで広がる多量の液体緩衝液またはこれに適用される試料を受け取るように適合される。ハウジングは、任意の適切な材料で形成することができる。任意の適切な材料の例は成形プラスチックを含み、好ましくは、中に内蔵される側方流動路(path)または路(paths)に支持および安定性をもたらすのに十分剛性であり、接着剤は、側方流動マトリックスをハウジング内の適切な位置に維持するのに役立つように側方流動マトリックスに面して接着剤でハウジング表面に構築することができる。

10

【0049】

[0049] 本発明のアッセイの特定の実施形態において、結合剤の1つまたは複数抗体ではない。例えば、結合対の第1のメンバーはリガンドであってもよく、および結合対の第2のメンバーは受容体であってもよい。あるいは、結合対の第1のメンバーはレクチンであってもよく、および結合対の第2のメンバーは糖であってもよい。さらに別の実施形態において、結合対の第1のメンバーは核酸(例えば、DNA、RNA)であってもよく、および結合対の第2のメンバーは、結合対の第1のメンバーに特異的にハイブリダイズする核酸であってもよい。分析物および結合剤の組成にかかわらず、これらの2つの成分はそれでもなお、第1のメンバーが第2のメンバーと特異的に反応する特異的結合対を形成する。結合対のメンバー間の特異的相互作用は、結合対の第1のメンバーが、好ましくはアッセイにおける別の化合物への任意の結合を除外して、結合対の第2のメンバーと優先的に結合またはさもなければ相互作用することを示す。

20

【0050】

[0050] 用語「分析物」または「目的とする分析物」は、本明細書で使用される場合、量が測定される分子または化合物を指す。分析物の例には、孢子；ホルモンまたは酵素などのタンパク質；糖タンパク質；ペプチド；小分子；多糖；抗体；核酸；薬物；毒素(例えば、環境毒素)；ウイルスまたはウイルス粒子；細胞壁の部分；および他の化合物が含まれる。好ましい実施形態において、分析物は「免疫原性」である。「免疫原性」は、抗体(以下に記載)が、分析物、または担体に結合される分析物(例えば、抗体がハプテンに対して産生され得るハプテン-担体コンジュゲート)に対して産生され得ることを示す。幾つかの代表的な実施形態において、目的とする分析物は、ミオグロビン；CK-MB；トロポニンI；PSA；ジゴキシン；テオフィリン；ホルモン(例えば、T-3またはT-4)；乱用薬物(LSD、THC、バルビツール酸等)；または炭疽菌(Bacillus anthracis)(炭疽(anthrax))の孢子であってもよい。目的とする分析物は、液体試料中であってもよい。あるいは、目的とする分析物は、乾燥(非流動性)試料(例えば、微粒子試料、粉末試料、または土壌試料などの固体)中であってもよい。

30

【0051】

[0051] 特定の実施形態において、流体試料は、目的とする分析物の有無、または量に関して評価される。流体は、膜材料を湿らせる；抗体/抗原反応などの目的とする分析物と分析物結合剤の間の反応を支持する(すなわち、抗体/抗原相互作用を妨げない)；および毛管作用による流体の移動を可能にする十分に低い粘度を有する流体であってもよい。好ましい実施形態において、流体は、水溶液(体液などの)である。流体試料は、比較的成分の少ない流体、例えば、目的とする分析物を含有する水溶液であってもよい。あるいは、流体試料は、複合環境試料(例えば、汚水、廃水、地下水、または他の水試料)、または複合生体液(例えば、全血、血漿、血清、尿、脳脊髄液、唾液、精液、硝子体液、滑液、または他の生体液)などの多くの成分を有する流体であってもよい。流体が生体液である好ましい実施形態において、流体は、全血、血漿、または血清である。必要に応じて

40

50

、流体試料は希釈することができる。例えば、複合生体液が流体試料として使用される場合、複合生体液は溶液（例えば、水溶液）で希釈することができる。

【0052】

[0052] 用語「抗体」は、本明細書で使用される場合、抗原またはエピトープを特異的に結合することができる、免疫グロブリン遺伝子（gene）もしくは免疫グロブリン遺伝子（genes）、またはその断片に由来する、これをモデルとする、またはこれによって実質的にコードされるペプチドまたはポリペプチドを指す。例えばFundamental Immunology、第3版、W. E. Paul 編、Raven Press、N. Y.（1993）；Wilson（1994）J. Immunol. Methods 175：267-273；Yarmush（1992）J. Biochem. Biophys. Methods 25：85-97参照。抗体という用語は、（i）VL、VH、CL、およびCH1ドメインから成る一価断片であるFab断片；（ii）ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価断片であるF（ab'）₂断片；（iii）VHおよびCH1ドメインから成るFd断片；（iv）抗体の片腕のVLおよびVHドメインから成るFv断片、（v）VHドメインから成るdAb断片（Wardら、（1989）Nature 341:544-546）；ならびに（vi）単離された相補性決定領域（CDR）を含む、抗原を結合する能力を保持する抗原結合部分、すなわち、「抗原結合部位」（例えば、断片、部分配列、相補性決定領域（CDR））を含む。一本鎖抗体も用語「抗体」に参照により含まれる。

10

20

【0053】

[0053] 用語「ポリペプチド」は、本明細書で使用される場合、ペプチド結合により連結されたアミノ酸の配列を有する分子を指す。この用語には、タンパク質、融合タンパク質、オリゴペプチド、環状ペプチド、およびポリペプチド誘導体が含まれる。抗体および抗体誘導体は、独立したセクションで上記に論じられているが、抗体および抗体誘導体は、本発明の目的のためにポリペプチドおよび誘導体のサブクラスとして扱われる。タンパク質という用語は、天然源から単離され、または組み換えDNA技術を用いて単離cDNAから製造された、および少なくとも約200個のアミノ酸の長さを有するアミノ酸の配列を有するポリペプチドを指す。

【0054】

[0054] 用語「ペプチド」は、本明細書で使用される場合、70個以下のアミノ酸、より好ましくは50個以下のアミノ酸、およびさらにより好ましくは25個以下のアミノ酸、および最も好ましくは12個以下のアミノ酸のポリペプチドを指す。「合成ペプチド」とは、生物に内在性の遺伝子の発現およびプロセッシングにより得られるペプチドとは対照的に、インビトロまたは組み換え法により合成されるペプチドを意味する。

30

【0055】

[0055] 用語「核酸」は、本明細書で使用される場合、ポリデオキシリボヌクレオチド（2'-デオキシ-D-リボースまたはその修飾形態を含有する）、ポリリボヌクレオチド（D-リボースまたはその修飾形態を含有する）、およびプリンもしくはピリミジン塩基、または修飾プリンもしくはピリミジン塩基のN-グリコシドである任意の他のポリヌクレオチド型に対する総称であるものとする。

40

【0056】

[0056] 用語「アプタマー」は、本明細書で使用される場合、標的分子を特異的に結合し、および該標的分子の生物学的機能を変化させる、一本鎖または二本鎖オリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、または修飾誘導体である。標的分子は、タンパク質、ペプチド、およびそれらの誘導体として定義される。アプタマーは、生理的条件下で標的分子を結合することができる。アプタマー効果は、タンパク質、ペプチド、およびそれらの誘導体への結合により誘導され、生理的条件下での核酸との相互作用または結合により誘導されないという点で、アプタマー効果はアンチセンス効果と区別される。

【0057】

[0057] 用語「多糖」は、本明細書で使用される場合、10個を超えるグリコシド結合単

50

糖残基を含む分子を指し、一方、用語「オリゴ糖」は、2～10個のグリコシド結合単糖残基を含む分子を指す。

【0058】

[0058] 用語「小分子」は、分子量約5,000ダルトン(Da)未満、好ましくは約2,500Da未満、より好ましくは1,000Da未満、最も好ましくは約500Da未満を有する任意の分子を含む。

【0059】

[0059] C P R R P Y I L ペプチド

【0060】

[0060] 本明細書に記載されているように、C P R R P Y I L ペプチドへの特異的結合試薬の結合は、アッセイ結果を正規化またはさもなければ調節するのに使用される。用語「C P R R P Y I L ペプチド」は、配列C P R R P Y I L (配列番号1)を含む合成ペプチド、および隣接する8残基ストレッチにわたって配列C P R R P Y I L (配列番号1)に少なくとも87.5%相同性を有する1つまたは複数の合成ペプチドを指すのに本明細書で使用される。C P R R P Y I L ペプチドの定義の範囲に入るこの配列のアナログの例は、ヒトニューロテンシン(Swiss-Prot P30990)(配列番号3)の残基156～163に相当する配列K P R R P Y I L (配列番号5)である：

10

【0061】

【表1】

20

10	20	30	40	50	60
MMAGMKIQLV	CMLLLAFSSW	SLCSDSEEEM	KALEADFLTN	MHTSKISKAH	VPSWKMTLLN
70	80	90	100	110	120
VCSLVNNLNS	PAEETGEVHE	EELVARRKLP	TALDGFSLA	MLTIYQLHKI	CHSRAFAQHWE
130	140	150	160	170	
LIQEDILDTG	NDKNGKEEVI	KRKIPYILKR	QLYEN <u>KPRRP</u>	<u>YILK</u> RDSYYY	

【0062】

[0061] E L A G L G F A E L Q C ペプチド

【0063】

30

[0062] 本明細書に記載されているように、E L A G L G F A E L Q C ペプチドへの特異的結合試薬の結合は、アッセイ結果を正規化またはさもなければ調節するのに使用される。用語「E L A G L G F A E L Q C ペプチド」は、配列E L A G L G F A E L Q C (配列番号4)を含む合成ペプチド、および隣接する8残基ストレッチにわたって配列E L A G L G F A E L Q C (配列番号4)に少なくとも87.5%相同性を有する1つまたは複数の合成ペプチドを指すのに本明細書で使用される。E L A G L G F A E L Q C ペプチドの定義の範囲に入るこの配列のアナログの例は、心筋由来のヒトロポニンI(Swiss-Prot P19429)(配列番号7)の残基84～95に相当する配列E L A G L G F A E L Q D (配列番号6)である：

【0064】

40

【表 2】

10	20	30	40	50	60
MADGSSDAAR	EPRPAPAPIR	RRSSNYRAYA	TEPHAKKSK	ISASRKLQLK	TLLLQIAKQE
70	80	90	100	110	120
LEREAEERRG	EKGRALSTRC	QPLELAGLGF	AELQDL	CRQL	HARVDKVDDEE
					RYDIEAKVTK
130	140	150	160	170	180
NITEIADLTQ	KIFDLRGKFK	RPTLRRVRIS	ADAMMQALLG	ARAKESLDLR	AHLKQVKKED
190	200	210			
TEKENREVG	DWRKNIDAL	SG	MEGRKKKFES		

10

【0065】

[0063] CDWRKNIDAL ペプチド

【0066】

[0064] 本明細書に記載されているように、CDWRKNIDAL ペプチドへの特異的結合試薬の結合は、アッセイ結果を正規化またはさもなければ調節するのに使用される。用語「CDWRKNIDAL ペプチド」は、配列 CDWRKNIDAL (配列番号 8) を含む合成ペプチド、および隣接する 8 残基ストレッチにわたって配列 CDWRKNIDAL (配列番号 8) に少なくとも 87.5% 相同性を有する 1 つまたは複数の合成ペプチドを指すのに本明細書で使用される。CDWRKNIDAL ペプチドの定義の範囲に入るこの配列のアナログの例は、心筋由来のヒトトロポニン I (Swiss-Prot P19429) (配列番号 7) の残基 189 ~ 198 に相当する配列 GDWRKNIDAL (配列番号 9) である：

20

【0067】

【表 3】

10	20	30	40	50	60
MADGSSDAAR	EPRPAPAPIR	RRSSNYRAYA	TEPHAKKSK	ISASRKLQLK	TLLLQIAKQE
70	80	90	100	110	120
LEREAEERRG	EKGRALSTRC	QPLELAGLGF	AELQDL	CRQL	HARVDKVDDEE
					RYDIEAKVTK
130	140	150	160	170	180
NITEIADLTQ	KIFDLRGKFK	RPTLRRVRIS	ADAMMQALLG	ARAKESLDLR	AHLKQVKKED
190	200	210			
TEKENREVG	DWRKNIDAL	SG	MEGRKKKFES		

30

【0068】

[0065] 本発明の CPRRPYIL、ELAGLGFAELQC、および CDWRKNIDAL ペプチドは、抗体を生成するのに使用されてもよい。合成ペプチドによる免疫化の利点は、無制限の量の純粋、安定な抗原が使用できることである。このアプローチは、短いペプチド配列を合成すること、これを大きな担体分子にカップリングすること、および最適な動物をペプチド担体分子で免疫化することを伴う。抗体の特性は、一次配列情報に依存している。所望のペプチドに対する良好な応答は、通常は配列およびカップリング方法の慎重な選択により生成することができる。ほとんどのカップリング方法は、-NH₂、-COOH、-SH、およびフェノール性 -OH などのアミノ酸の反応性官能基に依存する。例示的カップリング方法は、以下に記載される。

40

【0069】

[0066] 本発明の CPRRPYIL、ELAGLGFAELQC、および CDWRKNIDAL ペプチドなどの小分子は、アジュバントの存在下で投与されるときでさえ、通常は免疫原性でない。これらの化合物に対する免疫応答を生成するために、これらの化合物を、担体と呼ばれる、免疫原性であるタンパク質または他の化合物に結合させることがしば

50

し必要である。担体タンパク質に結合される場合、小分子免疫原はハプテンと呼ばれる。ハプテンも、免疫アッセイで使用するために担体タンパク質にコンジュゲートされる。担体タンパク質は、マイクロタイタープレートまたはニトロセルロース膜などの固体支持体にハプテンを結合させる手段を提供する。アガロースに結合される場合、担体タンパク質は抗ハプテン抗体の精製に使用され得る。担体タンパク質は、大きな抗原抗体複合体を形成することができる多価抗原を作成するのに使用され得る。担体タンパク質を選ぶとき、動物は、担体タンパク質および結合されたハプテンに対する抗体を形成することを思い出すこと。したがって、アッセイ試料中に見出され得るタンパク質とは無関係な、免疫化のための担体タンパク質を選択することが重要である。ハプテンが免疫化およびアッセイの両方のためにコンジュゲートされる場合、2つの担体タンパク質はできるだけ異なるべきである。これにより、抗担体抗体から抗ハプテン抗体を単離する必要なしに、抗血清を使用することが可能になる。

【0070】

[0067] キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) は、軟体動物において見出される呼吸タンパク質である。その大きなサイズにより、KLHは極めて免疫原性となり、コンジュゲーションに利用可能な多数のリジン残基により、KLHは本発明のCPRRPYILペプチドなどの小さなペプチドの担体として極めて有用となる。哺乳動物と軟体動物の間の系統学的分離が免疫原性を高め、哺乳動物試料におけるKLH担体に対する抗体と天然に存在するタンパク質の間の交差反応のリスクを減少させる。

【0071】

[0068] 結合試薬

【0072】

[0069] 好ましくは、目的とするマーカー、この場合CPRRPYILペプチドを特異的に結合し、試料中に存在し得る特定の望ましくない非標的分子に結合しない、アッセイで使用される抗体または他の結合パートナーが選択される。用語「特異的に結合する」は、抗体/結合パートナーが、意図された標的にだけ結合することを示すことを意図するものではない。むしろ、非標的分子に対するその親和性と比較して、その意図された標的に対するその親和性が約5倍大きければ、抗体/結合パートナーは「特異的に結合する」。好ましくは抗体の親和性は、非標的分子に対するその親和性より、標的分子に対して少なくとも約5倍、好ましくは10倍、より好ましくは25倍、さらにより好ましくは50倍、および最も好ましくは100倍以上大きいであろう。好ましい実施形態において、抗体または他の結合剤と抗原の間の特異的結合は、少なくとも 10^6 M^{-1} の結合親和性を意味する。好ましい抗体は、少なくとも約 10^7 M^{-1} 、および好ましくは約 10^8 M^{-1} ~ 約 10^9 M^{-1} 、約 10^9 M^{-1} ~ 約 10^{10} M^{-1} 、または約 10^{10} M^{-1} ~ 約 10^{11} M^{-1} の親和性で結合する。

【0073】

[0070] 親和性は、 $K_d = k_{off} / k_{on}$ (k_{off} は乖離速度定数、 k_{on} は会合速度定数、および K_d は平衡定数として計算される。親和性は、様々な濃度(c)の標識リガンドの結合画分(r)を測定して平衡状態で判定することができる。データは、スキッチャード式： $r / c = K (n - r)$ ：

式中、

r = 平衡状態の結合リガンドのモル / 受容体のモル；

c = 平衡状態の遊離リガンド濃度；

K = 平衡状態会合定数；および

n = 受容体分子当たりのリガンド結合部位の数

を用いてグラフに表される。

グラフ分析により、X軸のrに対してr/cはY軸にプロットされ、故にスキッチャードプロットをもたらす。親和性は負勾配の直線である。 k_{off} は、結合標識リガンドを非標識過剰リガンドと競合させて判定することができる（例えば、米国特許第6,316,409号参照）。標的剤のその標的分子に対する親和性は、好ましくは少なくとも約1

10

20

30

40

50

$\times 10^{-6}$ モル/リットルであり、より好ましくは少なくとも約 1×10^{-7} モル/リットルであり、さらにより好ましくは少なくとも約 1×10^{-8} モル/リットルであり、さらになおより好ましくは少なくとも約 1×10^{-9} モル/リットルであり、および最も好ましくは少なくとも約 1×10^{-10} モル/リットルである。スキャッチャード分析による抗体親和性測定は、当技術分野で周知である。例えば、van Erp ら、J. Immunol. 127: 425-43, 1991; Nelson および Griswold、Comput. Methods Programs Biomed. 27: 65-8, 1988 参照。

【0074】

[0071] 抗体の生成および選択は、幾つかの方法により達成することができる。例えば、1つの方法は目的とするポリペプチドを精製すること、または例えば当技術分野で周知の固相ペプチド合成方法を用いて、目的とするポリペプチドを合成することである。例えば、Guide to Protein Purification、Murray P. Deutcher 編、Meth. Enzymol. 182 巻 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis、Greg B. Fields 編、Meth. Enzymol. 289 巻 (1997); Kiso ら、Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 38: 1192-99, 1990; Mostafavi ら、Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 1: 255-60, 1995; Fujiwara ら、Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 44: 1326-31, 1996 参照。選択されたポリペプチドは、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を生成するために、次いで例えばマウスまたはウサギに注射されてもよい。当業者は、例えば、Antibodies, A Laboratory Manual、Harlow および David Lane 編、Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、Cold Spring Harbor, N. Y. に記載されているように、多くの手順が抗体の製造に利用可能であることを認識するであろう。当業者はまた、抗体を模倣する結合断片または Fab 断片も、様々な手順により遺伝子情報から調製され得ることも理解するであろう (Antibody Engineering: A Practical Approach (Borrebäck, C. 編), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914-3920 (1992))。

【0075】

[0072] さらに、数多くの刊行物が、選択された標的への結合についてポリペプチドのライブラリーを製造およびスクリーニングするためのファージディスプレイ技術の使用を報告している。例えば、Cwirlla ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-82, 1990; Devlin ら、Science 249, 404-6, 1990; Scott および Smith、Science 249, 386-88, 1990; ならびに Ladner ら、米国特許第 5,571,698 号参照。ファージディスプレイ方法の基本概念は、スクリーニングされるポリペプチドをコードする DNA とポリペプチドの間の物理的関連の確立である。この物理的関連は、ポリペプチドをコードするファージゲノムを取り囲むカプシドの一部としてポリペプチドを提示するファージ粒子により提供される。ポリペプチドとその遺伝子材料の間の物理的関連の確立は、異なるポリペプチドを有する極めて多数のファージの同時マスキングを可能にする。標的に親和性を有するポリペプチドを提示するファージは標的に結合し、これらのファージは、標的に対する親和性スクリーニングにより濃縮される。これらのファージから提示されるポリペプチドの同一性は、それらのそれぞれのゲノムから判定することができる。これらの方法を用いて所望の標的に結合親和性を有すると同定されたポリペプチドは、次いで従来手段により大量に合成され得る。例えば、全ての表、図、および特許請求の範囲を含むその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第 6,057,098 号参照。

【0076】

[0073] これらの方法により生成される抗体は、次いで、目的とする精製ポリペプチドとの親和性および特異性について第 1 のスクリーニングにより、ならびに必要であれば、結

合から除外されることが望ましいポリペプチドとの抗体の親和性および特異性と結果を比較して選択することができる。スクリーニング手順は、マイクロタイタープレートの別のウェルでの精製ポリペプチドの固定化を伴う場合がある。潜在的な抗体または抗体群を含有する溶液は、次いでそれぞれのマイクロタイターウェルに入れられ、約30分～2時間インキュベートされる。マイクロタイターウェルは、次いで洗浄され、標識二次抗体（例えば、産生抗体がマウス抗体ならば、アルカリホスファターゼにコンジュゲートされた抗マウス抗体）がウェルに添加され、約30分間インキュベートされ、次いで洗浄される。基質がウェルに添加され、固定化ポリペプチドに対する抗体が存在する場所に呈色反応が現れるであろう。

【0077】

10

[0074] あるいは、抗原特異的ファージの捕捉を最適化し、無関係なファージ抗体の結合を最小化するために、同時の陽性および陰性選択戦略が使用される。この場合、少量の抗原（例えば、細胞表面、磁性粒子、他の固相等の）と過剰量の望ましくない交差反応物の間で競合が用意され、無関係なファージ抗体の非特異的付着に対するシンクとして機能する。例として、目的とする抗原（CPRRPYILペプチド）を有する細胞は、過剰の望ましくない交差反応物フィブリノーゲンに希釈されてもよい。細胞混合物とファージライブラリーとのインキュベーション後、抗原陽性細胞集団が回収され、抗原特異的抗体をコードするファージが溶出され、細菌培養で増殖される。

【0078】

[0075] そのように同定された抗体は、次いで、選択されたアッセイ設計で親和性および特異性についてさらに分析することができる。標的タンパク質に関する免疫アッセイの開発において、精製標的タンパク質は、選択された抗体を用いて免疫アッセイの感度および特異度を判断するための基準として作用する。様々な抗体の結合親和性は異なり得る、すなわち、特定の抗体対（例えば、サンドイッチアッセイの）は互いを立体的に干渉し得る等のため、抗体のアッセイ性能は、抗体の絶対親和性および特異性より重要な尺度となり得る。

20

【0079】

[0076] 当業者は、抗体または結合断片の製造、ならびに様々なポリペプチドの親和性および特異性についてのスクリーニングおよび選択において多くのアプローチが取られ得ることを認識するであろうが、これらのアプローチは本発明の範囲を変えるものではない。

30

【0080】

[0077] 抗体に加えて、免疫グロブリンスキャフォールドに依存しない他の特異的結合種がその代わりに使用されてもよい。例として、核酸アプタマーは、インビトロ選択の複数回の繰り返しにより、または同等に、S E L E X (systematic evolution of ligands by exponential enrichment (試験管内進化法))により、小分子、タンパク質、核酸、ならびにさらには細胞、組織、および生物などの様々な分子標的に結合するように改変されている核酸種である。ペプチドアプタマーは、細胞内の他のタンパク質相互作用を妨げるように設計されたタンパク質である。ペプチドアプタマーは、タンパク質スキャフォールドに両端で付着された可変ペプチドループから成る。この二重の構造的制約は、ペプチドアプタマーの結合親和性を、抗体のそれ（ナノモル範囲）に匹敵するレベルまで大幅に高める。アプタマーは、一般に使用される生体分子、抗体に匹敵する分子認識特性を提供することから、生物工学的および治療的応用において有用である。その識別認識に加えて、アプタマーは、試験管内で完全に改変でき、化学合成により容易に製造され、望ましい貯蔵特性を有し、治療的応用において免疫原性をほとんどまたは全く誘発しないことから、抗体に勝る利点を提供する。アプタマーの発見以来、多くの研究者が、結合アッセイのための適切な結合パートナーの生成手段としてアプタマー選択を使用している。

40

【0081】

[0078] 免疫アッセイ対照におけるCPRRPYIL、ELAGLGFAELQC、およびCDWRKNIDALペプチドならびに結合試薬

【0082】

50

[0079] C P R R P Y I L、E L A G L G F A E L Q C、およびC D W R K N I D A L ペプチドならびにそれらの対応する結合試薬は、任意の免疫アッセイフォーマットでアッセイ対照として使用することができる。基本的に、試薬は、C P R R P Y I L、E L A G L G F A E L Q C、またはC D W R K N I D A L ペプチドの、その対応する結合パートナーへの結合が、分析物アッセイと同じ試料マトリックス、温度、貯蔵条件等にさらされるといふ点で、試料マトリックスと混合される場合、目的とする分析物アッセイに同じように反応する結合対として機能する。

【 0 0 8 3 】

[0080] 1つの例において、検査装置は、「分析物A」の存在または量を検出するのに使用される。配列C P R R P Y I L（配列番号1）および/またはE L A G L G F A E L Q C（配列番号4）および/またはC D W R K N I D A L（配列番号8）を含むペプチドは、検出可能に標識され、配列番号1、配列番号4、または配列番号8にそれぞれ特異的に結合する抗体または他の結合試薬は、固相上の「対照捕捉ゾーン」で固定化される。対照捕捉ゾーンおよび分析物捕捉ゾーンの両方でアッセイ条件が類似する（例えば、基本的に同じとなる）ように、対照捕捉ゾーンは、分析物捕捉ゾーン（例えば、分析物Aに対する抗体などの「分析物捕捉試薬」が固定化される固相上の位置）に近接するように置かれる。

10

【 0 0 8 4 】

[0081] 代替の実施形態において、検査装置は、「分析物B」の存在または量を検出するのに使用される。配列C P R R P Y I L（配列番号1）および/またはE L A G L G F A E L Q C（配列番号4）および/またはC D W R K N I D A L（配列番号8）を含むまたはから成るペプチドは、固相上の「対照捕捉ゾーン」で固定化され、一方、配列番号1、配列番号4、または配列番号8にそれぞれ特異的に結合する抗体または他の結合試薬は、検出可能に標識される。対照捕捉ゾーンおよび分析物捕捉ゾーンの両方でアッセイ条件が類似する（例えば、基本的に同じとなる）ように、対照捕捉ゾーンは、分析物捕捉ゾーン（例えば、分析物Bに対する抗体などの「分析物捕捉試薬」が固定化される固相上の位置）に近接するように置かれる。

20

【 0 0 8 5 】

[0082] いずれの場合も、C P R R P Y I L ペプチド/結合試薬対および/またはE L A G L G F A E L Q C ペプチド/結合試薬対および/またはC D W R K N I D A L ペプチド/結合試薬対の検出可能に標識されたメンバーが、分析される試料と混合され、次いで、対照捕捉ゾーンおよび分析物捕捉ゾーンに接触するように検査装置に適用される。アッセイシグナルは、分析物の存在または量に関連する分析物捕捉ゾーンから発生され、対照シグナルは、C P R R P Y I L ペプチドおよび/またはE L A G L G F A E L Q C ペプチドおよび/またはC D W R K N I D A L ペプチドの、その結合試薬への結合に関連する対照捕捉ゾーンから発生される。シグナルは、使用される標識の種類に適切な手段を用いて検出される。好ましい実施形態において、量は、分析物結合粒子の標識の蛍光量の測定などの光学的方法により検出される。あるいは、シグナルは、導電率または誘電率（静電容量）を用いて検出されてもよい。あるいは、H a y e s ら（Analytical Chem. 66:1860-1865（1994））により記載されているインジウム、ビスマス、ガリウム、もしくはテルルイオン、またはR o b e r t s およびD u r s t（Analytical Chem. 67:482-491（1995））により示唆されているフェロシアン化物などの放出された電気活性剤の電気化学的検出が使用されてもよい。

30

40

【 0 0 8 6 】

[0083] 免疫アッセイ対照における特異的ペプチドおよび結合試薬

【 0 0 8 7 】

[0084] 標的分析物に関する目的とするエピトープを提示する、担体および合成ペプチドの予め定義されたコンジュゲートが、調製され、アッセイ装置内の検査位置の下流の位置に固定化される、免疫アッセイが行われ得る。担体コンジュゲートは、1つまたは複数の合成エピトープが、標識検出抗体と混合された試料が流される診断検査レーンの表面で提

50

示されるように構成される。試料中に存在する標的に結合されなかったいずれの標識検出抗体も、検査レーンに沿って流れることになり、検査レーンで該抗体は、検査ゾーンの下流の固相位置で固定化される担体コンジュゲート上に提示された1つまたは複数の合成エピトープに結合し得る。

【0088】

[0085] 検査スポットの下流のそのような合成エピトープの使用は、(i) 標識捕捉抗体がうまく再水和され、試料流体に懸濁されたこと、および(ii) 標識捕捉抗体の抗体が生物活性であり、機能性であることを示すシグナルを生成するであろう。したがって、アッセイ装置におけるそのような陽性対照配列の実施は、指定試薬が予想通りに働いているという信頼を与える。

10

【0089】

[0086] ヒト心臓トロポニンI(hcTnI)に関するアッセイにおいて、hcTnIのアミノ酸領域84~94を代表するアミノ酸配列ELAGLGFAELQCを有する合成ペプチドが合成され、アッセイに組み込まれてもよい。任意選択によりまたはさらに、hcTnIのアミノ酸領域190~198を代表するアミノ酸配列CDWRKNIDALを有する合成ペプチドが合成され、アッセイに組み込まれてもよい。合成ELAGLGFAELQCおよび/またはCDWRKNIDALペプチドは、標準的なペプチド固定化化学法を用いて、例えばヒト血清アルブミンなどの適切な担体タンパク質にコンジュゲートされる。担体タンパク質は、その後、hcTnIの例えばアミノ酸27~39および34~55などの異なるエピトープ領域を認識する抗hcTnI抗体(捕捉抗体)が固定化されている領域の下流(すなわち、試料が最初に適用される所まで試料流体が移動する、検査レーンにさらに沿って少し離れた)で、アッセイ装置の検査レーン内に固定化される。

20

【0090】

[0087] 検出可能な標識にコンジュゲートされる、アミノ酸領域84~94またはアミノ酸領域190~198に対する抗体が、免疫アッセイで使用される。適切な標識の例には、酵素、蛍光標識、放射性核種、電気化学的活性種、化学発光種、金ゾルまたはラテックス粒子などのコロイドゾル粒子が含まれる。幾つかの実施形態において標識は、蛍光エネルギー移動ラテックス(FETL)粒子である。検出抗体は、捕捉抗体により結合されているhcTnIに同時に結合することができる。そのため、アミノ酸領域27~39/34~55および84~94または190~198は、捕捉抗体および検出抗体が両方ともhcTnIに結合されるとき、立体障害が起こらないほど十分に空間的に離される。

30

【0091】

[0088] 図1は、診断レーンに沿った検査試料の流れに関して、検査スポットの下流の特異的対照スポット(プレコンジュゲートペプチドスポット)と共にhcTnIの存在(TnIスポット)を検出するように構成されたアッセイ検査スポットを含む、例示的实施形態のアッセイ装置を表す。検査スポットは、hcTnIのアミノ酸領域27~39/34~55に対する固定化捕捉抗体を含む。対照スポットは、アミノ酸配列ELAGLGFAELQCがヒト血清アルブミン担体(HSA)タンパク質に共有結合された合成ペプチドから成るコンジュゲートを含む。CPRRPYILペプチドおよびCDWRKNIDALペプチドは、同じように使用されるであろう。

40

【0092】

[0089] 例えば血液、血清、血漿、尿、唾液、精液、脳脊髄液などの、目的とする標的(hcTnI)を含有している疑いがある試料流体が、上流位置で検査装置に適用される。上流位置内で過剰量の乾燥検出抗体が提供され、該検出抗体は試料流体により可溶化される。検出抗体は、その後、試料内に存在する任意の標的と相互作用し、該標的に結合する。標識試料は、その後、診断レーンに沿って流れる。試料は初めに検査スポットに接触し、そこで標的は、固定化捕捉抗体と相互作用し、該抗体上で捕捉され得る。試料流体が診断レーンに沿って進み続けるときに、過剰な検出抗体は、対照スポットに固定化された合成ペプチドと相互作用し、該ペプチドを結合する。

【0093】

50

[0090] 検出可能なシグナルは故に、検査および対照スポットの両方でそれぞれ発生する。検査スポットにおけるシグナルの強度は、試料流体中に存在する標的の存在または量を示す。対照におけるシグナルの存在は、(i) 乾燥検出抗体を再懸濁させ、検査スポットを過ぎて対照スポットまでこれを運んでいくのに十分な試料が装置に適用されたこと、および(ii) 検出抗体が生物活性であり、標的を結合できることを示している。

【0094】

[0091] アッセイシグナルの補正

【0095】

[0092] 米国特許第5,356,782号、第5,753,517号、第7,691,595号、および第7,713,703号に記載されているものなどの方法を用いる対照シグナルを用いるアッセイシグナルの補正。1つの例において、補正アッセイシグナルは、以下の式：

正規化アッセイシグナル = $A * (\text{シグナル}_{\text{アッセイ}}) / \text{シグナル}_{\text{対照}}$
に従って決定することができる。

【0096】

[0093] 別の例において、補正アッセイシグナルは、以下の式：

正規化アッセイシグナル = $A * (\text{シグナル}_{\text{アッセイ}})^{B_3} / (\text{シグナル}_{\text{対照1}}^{B_1} * \text{シグナル}_{\text{対照2}}^{B_2})$
に従って決定することができる。

【0097】

[0094] 上述の通り、免疫アッセイなどのアッセイは、検出のための方法を必要とし、結果の定量のための最も一般的な方法の1つは、酵素、フルオロフォア、または他の分子をコンジュゲートして抗体-標識コンジュゲートを形成することである。検出可能な標識には、それ自体検出可能な分子（例えば、蛍光部分、電気化学的標識、金属キレート等）、および検出可能な反応産物（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどの酵素等）の産生により、またはそれ自体検出可能であり得る特異的結合分子（例えば、ビオチン、ジゴキシゲニン、マルトース、オリゴヒスチジン、2,4-ジントロベンゼン、フェニルアルセネート、ssDNA、dsDNA等）により間接的に検出され得る分子が含まれ得る。特に好ましい検出可能な標識は、米国特許第5,763,189号、第6,238,931号、および第6,251,687号；ならびに国際公開WO95/08772に記載されているものなどの蛍光ラテックス粒子であり、それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。そのような粒子への例示的コンジュゲーションが、以下に記載される。直接標識には、抗体に付着される蛍光または発光タグ、金属、色素、放射性核種等が含まれる。間接標識には、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ等などの、当技術分野で周知の様々な酵素が含まれる。

【0098】

[0095] 固相固定化

【0099】

[0096] 上記にも述べられている通り、免疫アッセイなどのアッセイは、アフィニティー担体としての使用のためまたは試料分析のために固相マトリックスに固定化される試薬にしばしば依存する。故に、抗体またはその結合断片、CPRRPYILペプチド、ELAGLGFAELQCペプチド、CDWRKNIDALペプチド等は、固相マトリックスに固定化されてもよい。用語「固相」は、本明細書で使用される場合、典型的には分子を捕捉するのに当業者により使用される固体、半固体、ゲル、フィルム、膜、メッシュ、フェルト、複合材料、粒子、紙等を含む多種多様な材料を指す。固相は、非多孔性または多孔性であってもよい。適切な固相には、固相結合アッセイの固相として開発および/または使用されるものが含まれる。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Immunoassay、E.P.DianianandisおよびT.K.Christopoulos編、Academic Press: New York、1996の第9章参照。適切な固相の例には、膜フィルター、セルロースベースの紙、ビーズ（ポリマー粒子、ラテック

10

20

30

40

50

ス粒子、および常磁性粒子を含む)、ガラス、シリコンウエハー、微粒子、ナノ粒子、TentaGel、AgroGel、PEGAGel、SPGCCゲル、およびマルチプルウェルプレートが含まれる。例えば、Leonら、Bioorg. Med. Chem. Lett. 8: 2997、1998; Kesslerら、Agnew. Chem. Int. 第40版: 165、2001; Smithら、J. Comb. Med. 1: 326、1999; Orainら、Tetrahedron Lett. 42: 515、2001; Papanikosら、J. Am. Chem. Soc. 123: 2176、2001; Gottschlingら、Bioorg. Med. Chem. Lett. 11: 2997、2001 参照。

【0100】

[0097] 上記に記載されたものなどの表面は、例えばプロモアセチル化、シリル化、硝酸を用いたアミノ基の付加、ならびに中間タンパク質、デンドリマー、および/または星型ポリマーの付着により結合部位を提供するために修飾されてもよい。このリストは、限定を意味するものではなく、当業者に公知の任意の方法が使用され得る。

【0101】

[0098] 試薬のカップリング

【0102】

[0099] 化学的架橋剤は、抗体 - 検出可能な標識コンジュゲート、抗原コンストラクト、免疫毒素、ならびに他の標識タンパク質試薬および核酸試薬を調製するための有益なツールである。これらの試薬は、以下に基づき分類することができる：

1. 官能基および化学特異度；
2. 架橋の長さおよび組成；
3. 架橋基が類似している（ホモ二官能性）または異なる（ヘテロ二官能性）かどうか；
4. 基が化学的または光化学的に反応するかどうか；
5. 試薬が切断可能かどうか；および
6. 試薬が放射標識されまたは別の標識でタグ付けされ得るかどうか。

【0103】

[0100] 本発明のCPRRPYIL、ELAGLGFAELQC、およびCDWRKNIDALペプチドのシステイン残基は、付着点として作用する利用可能なチオールを提供することから、標的は、適切なチオール反応性部位を提供するように調製されてもよい。スルフヒドリル（チオール）を通じてカップリングする架橋試薬は、多くの商業的供給源から利用可能である。マレイミド、ハロゲン化アルキルおよびアリール、ならびにアルファ - ハロアシルは、スルフヒドリルと反応してチオールエーテル結合を形成し、一方、ピリジルジスルフィドは、スルフヒドリルと反応して混合ジスルフィドを産生する。ピリジルジスルフィド産物は切断可能である。そのような試薬は、試薬の第2の部位が、チオール反応性部位を組み込むためにコンジュゲーション標的を修飾する上で使用するのに利用可能であるという点で、二官能性となり得る。チオールに加えて、架橋剤を用いて標的化することができる反応性基には、第一級アミン、カルボニル、炭水化物、およびカルボン酸が含まれる。さらに、多くの反応性基が、光反応性フェニルアジドなどの架橋剤を用いて非選択的にカップリングされてもよい。適切な試薬については、参照により本明細書に組み込まれるPierce 2003~2004 Applications Handbook and Catalog #1600926 参照。一端でアミン反応性、および他端でスルフヒドリル反応性である架橋剤は、ごく一般的である。ヘテロ二官能性試薬を使用する場合、有効な架橋を確保し、不必要な重合を避けるために、最も不安定な基が典型的には最初に反応される。

【0104】

[0101] 最適な架橋剤対標的モル比を決定するために、多くの要因が考慮されなければならない。適用に応じて、コンジュゲーションの程度は重要な要因となる。例えば、免疫原コンジュゲートを調製する場合、抗原の免疫原性を高めるために、高度のコンジュゲーションが通常所望される。しかし、抗体または酵素にコンジュゲートする場合、タンパク

質の生物学的活性が保持されることを確保するのに、低度から中程度のコンジュゲーションが最適となり得る。タンパク質表面の反応性基の数を考慮することも重要である。数多くの標的基がある場合、より低い架橋剤対タンパク質比が使用され得る。限られた数の潜在的標的には、より高い架橋剤対タンパク質比が求められ得る。これは、低分子量タンパク質については1グラム当たりのより多くの架橋剤に変わる。

【0105】

[00102] 相互作用の前後に架橋試験を行うことにより、特定の相互作用に関連するタンパク質のコンフォメーション変化を分析することもできる。比較は、異なるアーム長の架橋剤を使用し、コンジュゲーションの成功を分析することにより行われる。立体障害アミノ酸が架橋に利用可能になるように、タンパク質のコンフォメーションが変化する場合、異なる反応性基および/またはスペーサーアームを有する架橋剤の使用が望ましいことがある。

10

【0106】

[00103] 反応性末端をつなぐ様々な長さのスペーサーアームまたは架橋を有する架橋剤が利用可能である。架橋の最も明白な特質は、連結される部分の立体的考察を処理するその能力である。立体効果は架橋の潜在的反応部位間の距離を決定するため、種々の長さの架橋が相互作用に関して検討され得る。より短いスペーサーアームは分子内架橋試験においてしばしば使用され、一方、分子間架橋はより長いスペーサーアームを含有する架橋剤が有利である。

20

【0107】

[00104] 架橋剤へのポリマー部分（例えば、ポリエチレングリコール（「PEG」）ホモポリマー、ポリプロピレングリコールホモポリマー、他のアルキルポリエチレンオキシド、ビスポリエチレンオキシド、およびポリ（アルキレンオキシド）のコポリマーまたはブロックコポリマー）の包含は、特定の環境下で有利となる可能性がある。例えば、米国特許第5,643,575号、第5,672,662号、第5,705,153号、第5,730,990号、第5,902,588号、および第5,932,462号；ならびにTopchievaら、Bioconjug. Chem. 6: 380-8、1995参照）。例えば、米国特許第5,672,662号は、PEGポリマー部分および単一のエステル結合を含む二官能性架橋剤を開示している。そのような分子は、水中で約10~25分の半減期を示すと言われている。

30

【0108】

[00105] 架橋剤の設計は、使用される官能基の選択を伴う。官能基の選択は、架橋される種の利用可能な標的部位に完全に依存している。幾つかの種（例えば、タンパク質）は、標的化に利用可能な幾つかの部位（例えば、リジンε-アミノ基、システインスルフィドリル基、グルタミン酸カルボキシル基等）を示し得、特定の官能基の選択は、目的とする生物学的特性（例えば、抗体の結合親和性、酵素の触媒活性等）を最もよく保存するために経験的に行われ得る。

【0109】

[00106] 1. アミン基を通じたカップリング

【0110】

[00107] イミドエステルおよびN-ヒドロキシスクシンイミジル（「NHS」）エステルは、典型的にはアミン特異的官能基として使用される。NHSエステルは、第一級または第二級アミンと反応すると安定な産物をもたらす。カップリングは生理的pHにおいて効率的であり、NHSエステル架橋剤は、溶液中でそのイミダート対応物より安定である。ホモ二官能性NHSエステルコンジュゲーションは、アミン含有タンパク質を一段階または二段階反応のどちらかで架橋するのに一般に使用される。第一級アミンは、NHSエステルの原理標的である。タンパク質のN末端に存在する接触可能なα-アミン基が、NHSエステルと反応してアミドを形成する。しかし、タンパク質上のα-アミンは常に利用可能とは限らないため、アミノ酸の側鎖との反応が重要になる。5個のアミノ酸はその側鎖に窒素を有するが、リジンのε-アミノ基のみがNHSエステルと著しく反応する。NHSエステル架橋剤が第一級アミンと反応すると、共有アミド結合が形成され、N-ヒドロ

40

50

キシスクシンイミドを放出する。

【 0 1 1 1 】

[00108] 2. スルフヒドリル基を通じたカップリング

【 0 1 1 2 】

[00109] マレイミド、アルキル、およびハロゲン化アリール、 α -ハロアシル、およびピリジルスルフィドが、スルフヒドリル特異的官能基として典型的には使用される。反応混合物のpHがpH 6.5 ~ 7.5の間に保たれるとき、マレイミド基はスルフヒドリル基に特異的となる。pH 7では、マレイミドのスルフヒドリルとの反応は、アミンとの反応より1000倍速い。マレイミドは、チロシン、ヒスチジン、またはメチオニンと反応しない。遊離スルフヒドリルが十分な量で存在しない場合、遊離スルフヒドリルは利用可能なジスルフィド結合の還元によりしばしば生成することができる。

10

【 0 1 1 3 】

[00110] 3. カルボキシル基を通じたカップリング

【 0 1 1 4 】

[00111] カルボジイミドは、カルボキシルを第一級アミンまたはヒドラジドにカップリングし、アミドまたはヒドラゾン結合の形成をもたらす。カルボジイミドと、カップリングされる分子の間に架橋は形成されず、むしろ、利用可能なカルボキシル基と利用可能なアミン基の間でペプチド結合が形成されるという点で、カルボジイミドは、他のコンジュゲーション反応とは異なる。グルタミン酸およびアスパラギン酸側鎖だけでなく、タンパク質のカルボキシ末端が標的化され得る。タンパク質はカルボキシルおよびアミンの両方を含有するため、過剰な架橋剤の存在下で重合が起こり得る。架橋が形成されず、およびアミド結合はペプチド結合と同じであるため、タンパク質を破壊せずに架橋を逆行させることは不可能である。

20

【 0 1 1 5 】

[00112] 4. 非選択的標識

【 0 1 1 6 】

[00113] 光親和性試薬は、化学的に不活性であるが、紫外線または可視光にさらされると反応性になる化合物である。アリールアジドは、波長250 ~ 460 nmで光分解され、反応性アリールニトレンを形成する光親和性試薬である。アリールニトレンは、非選択的に反応して共有結合を形成する。還元剤はアジド基を還元する可能性があるため、注意して使用されなければならない。

30

【 0 1 1 7 】

[00114] 5. カルボニル特異的架橋剤

【 0 1 1 8 】

[00115] カルボニル(アルデヒドおよびケトン)は、pH 5 ~ 7でアミンおよびヒドラジドと反応する。ヒドラジドとの反応はアミンとの反応より速く、カルボニルを部位特異的架橋に有用なものにしている。カルボニルは、タンパク質中に容易には存在しない。しかし、メタ過ヨウ素酸ナトリウムを用いた糖部分の温和な酸化は、隣接するヒドロキシルをアルデヒドまたはケトンに変換するであろう。

40

【 0 1 1 9 】

[00116] アッセイ系

【 0 1 2 0 】

[00117] 受容体結合アッセイの実践に関して、数多くの方法および装置が当業者に周知である。例えば、米国特許第6,143,576号;第6,113,855号;第6,019,944号;第5,985,579号;第5,947,124号;第5,939,272号;第5,922,615号;第5,885,527号;第5,851,776号;第5,824,799号;第5,679,526号;第5,525,524号;および第5,480,792号参照。これらの各々は、全ての表、図、および特許請求の範囲を含むその全体が参照により本明細書に組み込まれる。これらの装置および方法は、様々なサンドイッチ、競合、または非競合アッセイフォーマットにおいて検出可能に標識された分

50

子および抗体固相を利用して、目的とする分析物の存在または量に関連するシグナルを生成することができる。当業者は、Beckman Access、Abbott AxSym、Roche Elecsys、Dade Behring Stratusシステムを含むがこれらに限定されないロボット計測は、そのような免疫アッセイを行うことができる免疫アッセイ分析器の1つであることも認識する。さらに、バイオセンサーおよび光学的免疫アッセイなどの特定の装置および装置が、標識分子の必要なく分析物の存在または量を判定するのに使用されてもよい。例えば、米国特許第5,631,171号；および第5,955,377号参照。これらの各々は、全ての表、図、および特許請求の範囲を含むその全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に記載されているように、好ましいアッセイは、CPRRPYILペプチドに対して産生された抗体を利用する。

10

【0121】

[00118] その最も簡単な形態において、本発明によるアッセイ装置は、目的とする1つまたは複数の分析物を特異的に結合する受容体を含む固体表面を含んでもよい。例えば、抗体は、磁性またはクロマトグラフィーマトリックス粒子、アッセイプレート（マイクロタイターウェルなどの）の表面、固体基質材料または膜（プラスチック、ナイロン、紙などの）の薄片等などの様々な固体支持体に、本発明の架橋剤を用いて固定化されてもよい。複数の分析物の分析は、1つの検査試料で別々にまたは同時に実施されてもよい。マーカの独立または逐次アッセイに関して、適切な器具には、Elecsys（Roche）、AxSym（Abbott）、Access（Beckman）、ADVIA（登録商標）CENTAUR（登録商標）（Bayer）免疫アッセイシステム、NICHOLS ADVANTAGE（登録商標）（Nichols Institute）免疫アッセイシステム等などの臨床検査室分析器が含まれる。好ましい器具またはタンパク質チップは、複数の分析物の同時アッセイを単一表面で行う。特に有用な物理的フォーマットは、複数の異なる分析物を検出するための複数の個別のアドレス指定可能な位置を有する表面を含む。そのようなフォーマットには、タンパク質マイクロアレイ、または「タンパク質チップ」（例えば、Ng and Ilag, J. Cell Mol. Med. 6: 329-340（2002）参照）、および特定のキャピラリー装置（例えば、米国特許第6,019,944号参照）が含まれる。これらの実施形態において、各個別の表面位置は、各位置で検出するための1つまたは複数の分析物（例えば、マーカ）を固定化する抗体を含んでもよい。表面は、あるいは、表面の個別の位置で固定化された1つまたは複数の個別の粒子（例えば、微粒子またはナノ粒子）を含んでもよく、表面の個別の位置で微粒子は、検出のための1つの分析物（例えば、マーカ）を固定化する抗体を含む。

20

30

【実施例】

【0122】

[00119] 実施例

【0123】

[00120] 以下の例は、本発明を例証するのに役立つ。これらの例は、本発明の範囲を限定することを決して意図するものではない。

【0124】

[00121] 実施例1 PLYENKPRRPYILCおよびCPRRPYILペプチドコンジュゲート

40

【0125】

[00122] キーホールリンペットヘモシアニン（KLH、Calbiochem #374817、グリセロール中50mg/mL）を、0.1Mリン酸カリウム、0.1Mホウ酸、0.15M塩化ナトリウム緩衝液、pH7.5で平衡化した40mL GH25カラムに通してグリセロールを除去した。1.5倍モル過剰のN-エチルマレイミドを添加し、混合物を室温で30分インキュベートした。蒸留水中50mMストックからの200倍モル過剰のスルホ-SMCC（Pierce #22322）をボルテックスしながら添加した。ボルテックスをもう30秒続け、その後、室温で10分間のインキュベーションを行った。アセトニト

50

リル中 80 mM ストックからの 100 倍モル過剰の S M C C (Pierce # 22360) をボルテックスしながら添加した。1 M K O H を添加して 7.2 ~ 7.4 の pH を維持した。混合物を室温で 90 分間撹拌した。90 分インキュベーション後、K L H - S M C C を、0.1 M リン酸カリウム、0.02 M ホウ酸、0.15 M 塩化ナトリウム緩衝液、p H 7.0 で平衡化した G H 25 カラムを用いてゲル濾過により精製した。

【0126】

[00123] ペプチド - キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) コンジュゲートは基本的に、以下の変更により米国特許第 6,057,098 号の実施例 21 に記載されているように作成した: K L H - S M C C を、2 倍過剰のペプチドおよび P A D R E 各 5 % (Alexander ら、Immunity 1: 751-761、1994 からのペプチド 1024.03) と反応させた。

10

【0127】

[00124] ペプチドとのウシ血清アルブミン (BSA) コンジュゲートは基本的に、米国特許第 6,057,098 号の実施例 21 に記載されているように作成した。B S A ビオチンペプチドコンジュゲートは、最初に B S A をビオチニル化し (米国特許第 6,057,098 号の実施例 9)、次いで S M C C を用いてペプチドとコンジュゲートして作成した。以下に記載されるファージディスプレイパニングには、B S A - S M C C にコンジュゲートされた P L Y E N K P R R P Y I L C (配列番号 2) を使用した。

【0128】

[00125] 実施例 2 磁性ラテックス粒子

【0129】

[00126] 磁性ラテックス (Estapor、10% 固体、Bangs Laboratories、フィッシャーズ、インディアナ州) を完全に再懸濁し、2 ml を 15 ml コニカルチューブにアリコートした。磁性ラテックスを 12 ml 蒸留水に懸濁し、磁石を用いて 10 分間、溶液から分離した。まだ磁石中にある間に、液体を 10 ml 滅菌ピペットで慎重に除去した。この洗浄プロセスを 3 回繰り返した。最終洗浄後、ラテックスを 2 ml の蒸留水に再懸濁した。別個の 50 ml コニカルチューブで、10 mg のアビジン - H S (Neutr Avidin、Pierce、ロックフォード、イリノイ州) を 40 mM T r i s、0.15 M 塩化ナトリウム、p H 7.5 (TBS) 18 ml に溶解した。ボルテックスしながら、2 ml の洗浄磁性ラテックスを希釈アビジン - H S に添加し、混合物をさらに 30 秒ボルテックスした。この混合物を 30 分ごとに振盪しながら、45 で 2 時間インキュベートした。アビジン磁性ラテックスを磁石を用いて溶液から分離し、上記に記載した 20 ml B B S で 3 回洗浄した。最終洗浄後、ラテックスを 10 ml B B S に再懸濁し、4 で貯蔵した。

20

30

使用の直前に、アビジン磁性ラテックスをパニング緩衝液 (40 mM T R I S、150 mM N a C l、20 mg / ml BSA、0.1% Tween 20 (Fisher Scientific、ピッツバーグ、ペンシルベニア州)、p H 7.5) に平衡化した。パニング実験に必要なアビジン磁性ラテックス (200 μ l / 試料) を滅菌 15 ml 遠心管に添加し、パニング緩衝液で 10 ml にした。管を磁石上に 10 分間置いてラテックスを分離した。溶液を、上記に記載したように 10 ml 滅菌ピペットで慎重に除去した。磁性ラテックスを 10 ml のパニング緩衝液に再懸濁して、第 2 の洗浄を開始した。磁性ラテックスをパニング緩衝液で合計 3 回洗浄した。最終洗浄後、ラテックスをパニング緩衝液に最初のアリコート体積まで再懸濁した。

40

【0130】

[00127] 実施例 3 抗 P L Y E N K P R R P Y I L C 抗体を発現するファージの選択および P L Y E N K P R R P Y I L C に対するモノクローナル F a b の選択

【0131】

[00128] 第 1 ラウンド抗体ファージは、K L H および P A D R E (パンDRヘルパーTエпитープ) にコンジュゲートした P L Y E N K P R R P Y I L C (配列番号 2) で免疫化したマウスから単離した R N A から、米国特許第 6,057,098 号の実施例 7 に記載されているように概ね調製した。抗体ファージ試料を、米国特許第 6,057,098 号の実施例 16 に概ね記載されているように、D y n a l M - 280 ストレプトアビジン磁

50

性ラテックス (Life Technologies、カールスバッド) でパニングした。第 1 ラウンド抗体ファージ試料 (5 つの異なる脾臓由来の 10 試料) を、 2×10^{-9} M 最終 BSA 濃度の BSA - SMCC - ビオチンにコンジュゲートした PLYENKPRRPYILC (配列番号 2) を用いて選択し、 9×10^{-7} M BSA - SMCC を添加して SMCC アームに特異的な抗体を除去した。溶出した第 2 ラウンドファージを 7F11 磁性ラテックス (米国特許第 6,057,098 号の実施例 22) で濃縮し、次いで濃縮ファージに、 2×10^{-9} M 最終 BSA - ペプチドビオチン濃度および 9×10^{-7} M BSA - SMCC で 2 回目のパニングを行った。第 2 ラウンドのパニングから溶出したファージをプールし、第 3 ラウンドのパニングを 2×10^{-9} M 最終 BSA ペプチドビオチン濃度で行った。選択したファージを、米国特許第 6,057,098 号の実施例 18 に概ね記載されているようにプラスミド発現ベクターにサブクローニングした。モノクローナル抗体を、N 末端でペプチドを結合することが示されたサブクローニングライブラリーから選択した。そのモノクローナル抗体は、ST0115 ZIZM 01421 である。その抗体を、米国特許第 6,057,098 号の実施例 9 に概ね記載されているようにビオチン化した。

10

【0132】

[00129] 実施例 4 抗 ELA GLGF AELQC 抗体を発現するファージの選択および抗体がトロポニン I 複合体と交差反応する ELA GLGF AELQC に対するモノクローナル抗体の選択

【0133】

20

[00130] 第 1 ラウンド抗体ファージは、KLH にコンジュゲートした ELA GLGF AELQC (配列番号 4) で免疫化したマウスから単離した RNA から、米国特許第 6,057,098 号の実施例 7 に記載されているように概ね調製した。抗体ファージ試料を、米国特許第 6,057,098 号の実施例 16 に概ね記載されているように、Dyna1 M - 280 ストレプトアビジン磁性ラテックス (Life Technologies、カールスバッド) でパニングした。第 1 ラウンド抗体ファージ試料 (2 つの異なる脾臓由来の 4 試料) を、 1×10^{-9} M 最終 BSA 濃度の BSA - SMCC - ビオチンにコンジュゲートした ELA GLGF AELQC (配列番号 4) を用いて選択し、 1.4×10^{-6} M BSA - SMCC を添加して SMCC アームに特異的な抗体を除去した。溶出した第 2 ラウンドファージに、 1×10^{-8} M トロポニン TIC 複合体ビオチンで 2 回目のパニングを行った。第 2 ラウンドのパニングから溶出したファージをプールし、第 3 ラウンドのパニングを 1×10^{-8} M トロポニン TIC 複合体ビオチンで行った。第 3 ラウンドのパニングから溶出したファージに、 5×10^{-10} M トロポニン TIC 複合体ビオチンで 4 回目のパニングを行った。選択したファージを、米国特許第 6,057,098 号の実施例 18 に概ね記載されているようにプラスミド発現ベクターにサブクローニングした。

30

【0134】

[00131] 実施例 5 抗 CDWRKNIDAL 抗体を発現するファージの選択および抗体がトロポニン I 複合体と交差反応する CDWRKNIDAL に対するモノクローナル抗体の選択

【0135】

40

[00132] 第 1 ラウンド抗体ファージは、心臓トロポニン I (Dako、フィンランド) で免疫化したマウスから単離した RNA から、米国特許第 6,057,098 号の実施例 7 に記載されているように概ね調製した。抗体ファージ試料を、米国特許第 6,057,098 号の実施例 16 に概ね記載されているように、Dyna1 M - 280 ストレプトアビジン磁性ラテックス (Life Technologies、カールスバッド) でパニングした。第 1 ラウンド抗体ファージ試料 (5 つの異なる脾臓由来の 10 試料) を、 5×10^{-9} M 最終 TIC ビオチン濃度のトロポニン C およびトロポニン T と複合体化した心臓トロポニン I (TIC 複合体) ビオチンを用いて選択した。溶出した第 2 ラウンドファージに、 1×10^{-9} M TIC 複合体ビオチンで 2 回目のパニングを行った。第 2 ラウンドのパニングから溶出したファージをプールし、第 3 ラウンドのパニングを 1×10^{-9} M 心臓トロポニン I

50

ビオチンで行った。選択したファージを、米国特許第 6, 057, 098 号の実施例 18 に概ね記載されているようにプラスミド発現ベクターにサブクローニングした。

【0136】

[00133] 実施例 6 抗 C P R R P Y I L (配列番号 1) 抗体を発現するファージの選択および C P R R P Y I L に対するモノクローナル抗体の選択

【0137】

[00134] 第 1 ラウンド抗体ファージは、K L H および P A D R E (パンDRヘルパーTエпитープ) にコンジュゲートした C P R R P Y I L (配列番号 1) で免疫化したマウスから単離した R N A から、米国特許第 6, 057, 098 号の実施例 7 に記載されているように概ね調製した。抗体ファージ試料を、B S A ペプチドビオチン濃度が 1×10^{-9} M であったこと以外は上記の実施例 2 に概ね記載されているように、D y n a l M - 280 ストレプトアビジン磁性ラテックス (Life Technologies、カールスバッド) でパニングした。第 2 ラウンドの選択の後、個々のファージ試料をプールし、プールしたファージを、米国特許第 6, 057, 098 号の実施例 15 に概ね記載されているように、 1×10^{-8} M のビオチン化 S T 0 1 1 5 Z I Z M 0 1 4 2 1 抗体および 1×10^{-9} M の非標識ニューロテンシンペプチド (Bachem、トランス) を用いて選択した。この選択を 2 回繰り返し、得られた第 4 ラウンドファージを、米国特許第 6, 057, 098 号に概ね記載されているようにプラスミド発現ベクターにサブクローニングした。モノクローナル抗体 S T 0 1 2 8 Z 7 Z M 0 1 4 2 1 を、モノクローナルの得られたセットから選択した。

【0138】

[00135] 実施例 7 免疫アッセイフォーマット

【0139】

[00136] サンドイッチ免疫アッセイのために、血漿試料を、H A M A 阻害剤を含む全ての必要なアッセイ試薬を乾燥形態で含有するマイクロ流体装置に添加した。血漿はフィルターを通過して微粒子状物質を除去した。血漿は、毛管作用により「反応チャンバ」に入った。この反応チャンバは、目的とする分析物に適した蛍光ラテックス粒子 - 抗体コンジュゲート (以下、F E T L - 抗体コンジュゲートと呼ぶ) を含有した。該反応チャンバは、幾つかの選択された分析物に対して F E T L - 抗体コンジュゲートを含有し得る。F E T L - 抗体コンジュゲートは、血漿に溶解して反応混合物を形成した。反応混合物を、インキュベーション期間中 (約 1 分) 反応チャンバに維持して血漿中の目的とする分析物を抗体に結合させた。インキュベーション期間後、反応混合物は毛管作用により検出レーンを下った。目的とする分析物に対する抗体を、「検出レーン」の表面の個別の捕捉ゾーンに固定化した。反応チャンバで形成された分析物 / 抗体 - F E T L 複合体を、適切な検出ゾーンで捕捉してサンドイッチ複合体を形成し、一方、非結合 F E T L - 抗体コンジュゲートは、過剰な血漿により検出レーンから廃棄チャンバに洗い流した。捕捉ゾーンに結合された分析物 / 抗体 - F E T L 複合体の量を、スポット全体にわたるシグナルの統合により蛍光光度計 (Triage (登録商標) MeterPro、Alere) で定量化し、血漿標本中の選択された分析物の量と関連付けた。この場合、2 種類のアッセイを、2 つの別々に決定した捕捉ゾーン - B 型ナトリウム利尿ペプチド (「BNP」) およびガレクチン - 3 (「Gal-3」) において装置で行った。

【0140】

[00137] 該計測器は、固相スポットに結合される F E T L の量に比例するスポットごとの蛍光強度積分 (またはシグナル) を決定する。分析物スポットごとに、シグナルを検量線により分析物濃度の単位に変換する。これは、数学表記で次のように記される：

X = 分析物スポットシグナル (積分)

Y = 分析物濃度 (検査結果) = $R(X)$

【0141】

[00138] $R(X)$ は、検査装置の各ロットの較正中に決定された用量 / 反応曲線の逆数に等しい、試験中の特定の分析物アッセイの検量線である。典型的には用量 / 反応曲線はシ

グモイド曲線であり、分析物の測定可能な（報告される）範囲ではほぼ直線となり得る。

【 0 1 4 2 】

[00139] 検量線 $R(X)$ は、 R が通らなければならない幾つかの数の (X, Y) 対（「ロット」と呼ばれる）を前提とした三次スプラインとして表される。アッセイの測定可能な範囲は、11種類のキャリブレーターレベル（A、B、C、...J、およびZ）に分けられ、 Cal_A は測定可能な範囲の上限より上であり、 Cal_J は測定可能な範囲の下限に近く（ただし、下限より上）、 Cal_Z はゼロ濃度の分析物を含有する「ブランク」試料である。5～8ロットは、これら11種類のキャリブレーターレベルにわたる検量線を表すのに使用される。

【 0 1 4 3 】

[00140] 各キャリブレーター試料の分析物濃度は、較正の前に指定される。較正中、各キャリブレーター試料（レベルA～JおよびZ）は、較正される装置ロットで反復して検査され（典型的には、1レベル当たり20～32回検査）、 X_0 の平均がレベルごとに計算される。検量線は、 X_0 の平均を既知のキャリブレーター濃度と並べることにより決定される。

【 0 1 4 4 】

[00141] 実施例 8 アッセイ正規化

【 0 1 4 5 】

[00142] アッセイ正規化システムを、8個のアミノ酸ペプチド配列（CPRRPYIL；配列番号1）およびこのペプチドに特異的な抗体（本明細書では「ST128」と呼ばれる）に基づき装置内に含めた。ST128抗体は、天然のニューロテンシンペプチドに結合すること、ヒトおよびCHO細胞株に由来する細胞培養上清を結合することもないことから選択された。CPRRPYILペプチドを検査装置の反応チャンバ中のFETLに置き、抗体は検出レーンの固有のゾーンに置いた。

【 0 1 4 6 】

[00143] ST128検出ゾーンからのシグナルは、装置単独の精度に基づき予測され得るような平均および標準偏差を有する、すなわち、マトリックス効果、または干渉が最小の集団にしっかり分布させた。

【 0 1 4 7 】

[00144] 分析物シグナルおよびST128シグナルを、非正規化シグナルと比べて検量線を保つように設計された4パラメーター回帰モデルに統合した。

【 0 1 4 8 】

[00145] アッセイ正規化の目的は、個々の検査装置間で異なる、およびロットベースの検量線によって説明されないマトリックスおよび装置効果を排除することによる、精度の向上（変動係数、すなわちCV）の改善）である。単純な、正規化「による割り算」を、以下の式により適用することができる：

$$Y = A * X_0 / (X_1 * X_2)^{1/2}$$

（式中、Aは、全ての反復にわたって $(X_1 * X_2)^{1/2}$ の平均であり； X_0 =分析物スポットシグナル（積分）； X_1 =対照スポット1シグナル（積分）； X_2 =対照スポット2シグナル（積分）； Y =正規化分析物シグナル= $F(X_0, X_1, X_2)$ ；および分析物濃度（検査結果）= $R(Y)$ ）

。これの単純な一般化は、

$$Y = A * X_0^{\beta_0} / (X_1^{\beta_1} * X_2^{\beta_2})$$

（式中、 $(A, \beta_0, \beta_1, \beta_2)$ は、最小2乗回帰により決定される係数であり、残差は、 $\text{残差} = \log(Y_{ik}) - \log(\text{平均}X_0)_k$

（式中、平均は、全ての反復にわたって、各キャリブレーターレベルkにおけるiである）として定義される）。回帰は、任意の分析物の全てのキャリブレーターレベルにわたって行う。各分析物は、個々のロットごとに最適化した独自の係数セット $(A, \beta_0, \beta_1, \beta_2)$ を有する。

【 0 1 4 9 】

[00146] 単純な、正規化「による割り算」（固定係数 $\beta_0=1$ 、 $\beta_1=0.5$ 、 $\beta_2=0.5$ ）は、口

10

20

30

40

50

ット特異的（および分析物特異的）係数を有する４パラメーター（ A 、 β_0 、 β_1 、 β_2 ）モデルとして機能しない。特定の分析物に関して、正規化「による割り算」は、アッセイ CV を実際に増やすと考えられた。したがって、正規化係数は分析物ごとに調整することにより改善される。より複雑なモデルは、追加の自由パラメーターを有する別の関数形態 $Y = F(X_0, X_1, X_2)$ を検討することにより構築することができる。例えば、 Y の対数を、式【０１５０】

$$[00147] \quad \ln Y = A + \beta_0 * \ln X_0 + \beta_1 * \ln X_1 + \beta_2 * \ln X_2 + \beta_3 * \ln X_0 * \ln X_1 + \beta_3 * \ln X_0 * \ln X_2 + \beta_5 * \ln X_1 * \ln X_2 + \beta_6 * \ln X_0 * \ln X_0 + \beta_7 * \ln X_1 * \ln X_1 + \beta_8 * \ln X_2 * \ln X_2$$

（式中、 $(A, \beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_8)$ は、以前に定義された残差による最小２乗回帰により決定された１０個の係数である）の二次多項式にすることにより。しかし、二次項は、 CV 減少に関して何のメリットもない。これらの考察は、４パラメーター（ A 、 β_0 、 β_1 、 β_2 ）モデルは、最小限の自由パラメーターで各分析物（および各ロット）の正規化を調整するのに十分であることを示している。しかし、この４パラメーターモデルの特定の関数形態が唯一の解ではないことに留意するべきである。測定可能な範囲の特定の部分の精度を改善するために、残差の別の関数形態および／または別の定義が、例えば、より低濃度とは対照的に、より高濃度に対して重み付けして、正規化を調整するのに使用されてもよい。

【０１５１】

[00148] 実施例 9 ブランク上限（LOB）の計算

【０１５２】

[00149] 正規化方法と一致するブランク上限（LOB）を計算する方法を有することが重要である。

【０１５３】

[00150] Y は、測定可能な範囲にわたって定義されているが、本発明者らは、正規化係数の決定において $Cal Z$ を除外し、すなわち、回帰を試料 $Cal A \sim J$ に限定し、 $Cal J$ は LOB より上である。

【０１５４】

[00151] $Cal Z$ は、計測器によるバックグラウンド減算により約ゼロの平均シグナルを有し、および正規化モデルの関数形態は $X_0 < 0$ について定義されないため、 $Cal Z$ の検討にさらなる問題が生じる。 LOB を計算するために、 Y に関する式を次のように再調整する。

$$Y = A * X_0^{\beta_0} / (X_1^{\beta_1} * X_2^{\beta_2}) = (X_0 / D)^{\beta_0} \quad (\text{式中、} D = (X_1^{\beta_1} * X_2^{\beta_2} / A)^{1/\beta_0})$$

【０１５５】

[00152] LOB は、「ブランク」試料（ $Cal Z$ ）の分布の上位 97.5 パーセンタイルとして定義される。本発明者らは、それ故に X_0 / D の分布を抽出し、その上位 97.5 パーセンタイルを推定する。これを、（正規分布ノイズの）パラメトリック近似を用いて行って、正規化シグナル Y の LOB に関する以下の式を導き出すことができる：

$$LOB(Y) = (1.96 * SD)^{\beta_0} \quad (\text{式中、} SD \text{ は } X_0/D \text{ の標準偏差である})。$$

【０１５６】

[00153] これは、 X_0 のみの標準偏差の 1.96 倍である、非正規化シグナル X_0 の LOB と直接比較することができる。 $Cal Z$ で分析物シグナル X_0 は、対照（ X_1, X_2 ）と無相関の純粋にノイズであり、そのため X_0 は X_0 / D よりノイズが少ないことから、正規化により LOB は上がる。 LOB は正規化により上がったが、乗数により非正規化システムの LOB の 1.05 ~ 1.15 倍上がったにすぎない。典型的には LOB は、アッセイの測定可能な（報告可能な）範囲の下限の少なくとも 2 倍下であり、したがってこの効果は、アッセイの下限より上の偽上昇の数にほとんど影響を与えないと予想される。特に、 TNI の正常基準範囲（明らかに正常な健康個体由来の血漿、または全血に基づく）の上位 99 パーセンタイルは、正規化または非正規化方法のどちらかに関して 0.05 n

10

20

30

40

50

g / m L より下となるはずである。

【 0 1 5 7 】

[00154] 実施例 1 0 プレコンジュゲート固相

【 0 1 5 8 】

[00155] さらに例示的实施形態において、標的分析物に関する目的とするエピトープを提示する、担体および合成ペプチドの予め定義されたコンジュゲートを調製し、アッセイ装置内の検査位置の下流の位置に固定化するアッセイを行った。担体コンジュゲートは、1つまたは複数の合成エピトープが、標識検出抗体と混合された試料が流される診断検査レーンの表面で提示されるように構成した。試料中に存在する標的に結合されなかったいずれの標識検出抗体も、検査レーンに沿って流れ、検査レーンで該抗体は、検査ゾーンの下流の固相位置で固定化された担体コンジュゲート上に提示された1つまたは複数の合成エピトープに結合した。

10

【 0 1 5 9 】

[00156] 検査スポットの下流のそのような合成エピトープの使用は、(i) 標識捕捉抗体がうまく再水和され、試料流体に懸濁されたこと、および(ii) 標識捕捉抗体の抗体が生物活性であり、機能性であることを示すシグナルを生成した。したがって、アッセイ装置におけるそのような陽性対照配列の実施は、指定試薬が予想通りに働いているという信頼を与えた。

【 0 1 6 0 】

[00157] ヒト心臓トロポニン I (hcTnI) に関するアッセイにおいて、hcTnI のアミノ酸領域 84 ~ 94 を代表するアミノ酸配列 E L A G L G F A E L Q C を有する合成ペプチドを合成した。任意選択によりまたはさらに、hcTnI のアミノ酸領域 190 ~ 198 を代表するアミノ酸配列 C D W R K N I D A L を有する合成ペプチドを合成した。合成 E L A G L G F A E L Q C および / または C D W R K N I D A L ペプチドは、その後、標準的なペプチド固定化化学法を用いて、適切な担体タンパク質にコンジュゲートした。担体タンパク質は、その後、hcTnI の例えばアミノ酸 27 ~ 39 および 34 ~ 55 などの、異なるエピトープ領域を認識する抗 hcTnI 抗体 (捕捉抗体) が固定化されている領域の下流で、アッセイ装置の検査レーン内に固定化された。

20

【 0 1 6 1 】

[00158] アミノ酸領域 84 ~ 94 またはアミノ酸領域 190 ~ 198 に対する抗体を、検出可能な標識にコンジュゲートした。適切な標識の例には、酵素、蛍光標識、放射性核種、電気化学的活性種、化学発光種、金ゾルまたはラテックス粒子などのコロイドゾル粒子が含まれる。幾つかの実施形態において標識は、蛍光エネルギー移動ラテックス (FETL) 粒子である。検出抗体は、捕捉抗体により結合されている hcTnI に同時に結合することができる。そのため、アミノ酸領域 27 ~ 39 / 34 ~ 55 および 84 ~ 94 または 190 ~ 198 は、捕捉抗体および検出抗体が両方とも hcTnI に結合されるとき、立体障害が起こらないほど十分に空間的に離される。

30

【 0 1 6 2 】

[00159] 対照スポットは、アミノ酸配列 E L A G L G F A E L Q C または C D W R K N I D A L がヒト血清アルブミン担体 (HSA) タンパク質に共有結合された合成ペプチドから成るコンジュゲートを含む。HSA は、その後、診断レーンに固定化された。

40

【 0 1 6 3 】

[00160] 例えば血液、血清、血漿、尿、唾液、精液、脳脊髄液などの、目的とする標的 (hcTnI) を含有している疑いがある試料流体を、上流位置で検査装置に適用した。上流位置内で過剰量の乾燥検出抗体を提供し、該検出抗体は試料流体により可溶化される。検出抗体は、その後、試料内に存在する任意の標的と相互作用し、該標的に結合した。標識試料は、その後、診断レーンに沿って流れた。試料は初めに検査スポットに接触し、そこで標的は、固定化捕捉抗体と相互作用し、該抗体上で捕捉された。試料流体が診断レーンに沿って進み続けるときに、過剰な検出抗体は、対照スポットに固定化された合成ペプチドと相互作用し、該ペプチドを結合した。

50

【 0 1 6 4 】

[00161] 検出可能なシグナルは、検査および対照スポットの両方でそれぞれ発生した。検査スポットにおけるシグナルの強度は、試料流体中に存在する標的の存在または量を示した。対照におけるシグナルの存在は、(i) 乾燥検出抗体を再懸濁させ、検査スポットを過ぎて対照スポットまでこれを運んでいくのに十分な試料が装置に適用されたこと、および(ii) 検出抗体が生物活性であり、標的を結合できたことを示した。

【 0 1 6 5 】

[00162] 本発明は、当業者がこれを作成および使用するのに十分詳細に記載および例示されているが、様々な代替、変更、および改善は、本発明の趣旨および範囲を逸脱することなく明らかなはずである。

10

【 0 1 6 6 】

[00163] 当業者は、本発明が、目的を実施し、述べられた目標および利点ならびにそれらに固有のものを得るためによく適合されていることを容易に理解する。本明細書に示された例は、好ましい実施形態を代表するものであり、例示的であり、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。その変更および他の使用を当業者は思いつくであろう。これらの変更は、本発明の趣旨の範囲内に包含され、特許請求の範囲の範囲により定義される。

【 0 1 6 7 】

[00164] 様々な置き換えおよび変更が、本発明の範囲および趣旨を逸脱することなく本明細書に開示された本発明に行われ得ることは、当業者には容易に明らかとなろう。

20

【 0 1 6 8 】

[00165] 本明細書に述べられた全ての特許および刊行物は、本発明が属する技術分野の通常の技術を有する者のレベルを示している。全ての特許および刊行物は、個々の刊行物のそれぞれが、参照により組み込まれると具体的および個別に示されるのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 6 9 】

[00166] 適切に本明細書に例示的に記載された本発明は、本明細書に具体的に開示されていない任意の要素 (element) または要素 (elements)、限定 (limitation) または限定 (limitations) の非存在下で実践され得る。故に、例えば、本明細書の各例において、用語「含む (comprising)」、「基本的に～から成る (consisting essentially of)」、および「から成る (consisting of)」のいずれも、他の2つの用語のどちらかと置き換えることができる。使用されている用語および表現は、説明であって限定ではない用語として使用され、そのような用語および表現の使用において、示されおよび記載された特徴またはその部分のいずれの同等物も除外する意図はないが、様々な変更が、特許請求された本発明の範囲内で可能であることが認識される。故に、本発明は、好ましい実施形態および任意選択の特徴により具体的に開示されているが、本明細書に開示された概念の変更および変形形態が当業者により使用されてもよいこと、ならびにそのような変更および変形形態は、添付の特許請求の範囲により定義された本発明の範囲内であると見なされることが、理解されるべきである。

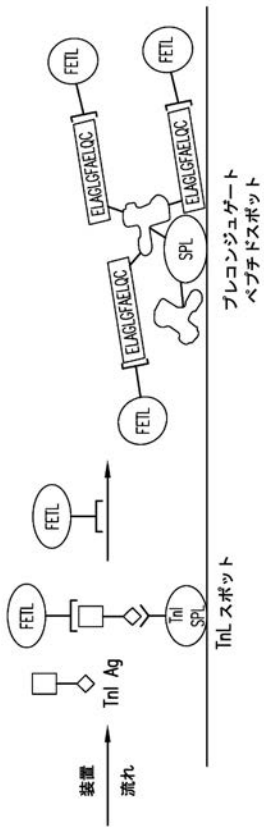
30

【 0 1 7 0 】

[00167] 他の実施形態が、以下の特許請求の範囲内に記載される。

40

【図 1】



【配列表】

2019510219000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/21211

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - G01N 33/53, 33/563, 33/68; C07K 7/06, 16/18 (2017.01) CPC - G01N 33/53, 33/563, 33/68; C07K 7/06, 16/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2014/0377879 A1 (ALERE SWITZERLAND GMBH) December 25, 2014; paragraphs [0018]-[0020], [0027], [0045], [0056], [0064], [0069], [0083]-[0084], [0087], [0091], [0105], [0120], [0172]	1, 2, 3/1-2, 4/1-2, 5/4/1-2, 25-27, 28/25-27
A	US 2001/0008774 A1 (MAY, et al.) July 18, 2001; paragraphs [0001], [0006]-[0007], [0016], [0019]	1, 2, 3/1-2, 4/1-2, 5/4/1-2, 25-27, 28/25-27
A	US 2006/0036072 A1 (LICHA, et al.) February 16, 2006; paragraph [0161]; SEQ ID NO: 194	1, 2, 3/1-2, 4/1-2, 5/4/1-2, 25-27, 28/25-27
A	US 2003/0105299 A1 (ACHILEFU, et al.) June 5, 2003; paragraph [0049]; SEQ ID NO: 8	1, 2, 3/1-2, 4/1-2, 5/4/1-2, 25-27, 28/25-27
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 02 August 2017 (02.08.2017)		Date of mailing of the international search report 25 AUG 2017
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/21211

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-24, 29, 30, 35, 36, 41, 42
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

-***Continued Within the Next Supplemental Box-***

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1 (in-part), 2 (in-part), 3 (in-part), 4 (in-part), 5 (in-part), 25-28

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US17/21211

***-Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking ***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-5, 25-28, 31-34, 37-40 and SEQ ID NO: 1 are directed toward an assay device and method.

The device and method will be searched to the extent they encompass a peptide encompassing SEQ ID NO: 1 (first exemplary peptide) and an antibody that binds thereto. Applicant is invited to elect additional peptide(s), with specified SEQ ID NO: for each, and corresponding antibody(ies) thereto, to be searched. Additional peptide sequence(s) and corresponding antibody(ies) thereto will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1 (in-part), 2 (in-part), 3 (in-part), 4 (in-part), 5 (in-part) and 25-28 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (peptide) and antibody(ies) thereto. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected peptide sequence(s) and corresponding antibody(ies) thereto. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a peptide encompassing SEQ ID NO: 4 (first exemplary elected peptide) and antibodies thereto.

No technical features are shared between the peptide sequences and/or antibodies of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups I+ share the technical features including: a device comprising: a substrate defining at least one diagnostic lane; a sample application zone; a dried reagent zone; and a detection zone comprising at least one control zone and at least one assay zone; wherein: (a) the at least one control zone comprises an antibody that specifically binds a peptide, and wherein the dried reagent zone comprises the peptide; or (b) the at least one control zone comprises a peptide and wherein the dried reagent zone comprises an antibody that specifically binds the peptide; and a method of normalising an assay result for an analyte of interest, comprising: providing an immunoassay device comprising a sample application zone, a reagent zone, and a diagnostic lane comprising at least one control binding zone and at least one assay binding zone, wherein the assay binding zone is a region of the device which generates a detectable signal indicative of the amount of the analyte of interest present in a sample, wherein: (a) the at least one control binding zone comprises an antibody that specifically binds a peptide and the reagent zone comprises the peptide; or (b) the at least one control binding zone comprises a peptide and the reagent zone comprises an antibody that specifically binds the peptide; applying the sample to the sample application zone; forming a mixture within the reagent zone between the sample and a reagent incorporated in the reagent zone; flowing the sample reagent mixture along the diagnostic lane; detecting a signal resulting from binding of the antibody that specifically binds a peptide at the control zone; detecting a signal indicative of the amount of the analyte of interest present in the sample at the assay zone; and modulating the response at the assay zone based on the response obtained at the control zone.

However these shared technical features are previously disclosed by US 2014/0377879 A1 to Alere Switzerland GmbH (hereinafter 'Alere') in view of US 2001/0008774 A1 to May et al. (hereinafter 'May').

Alere discloses a device (a device; abstract) comprising: a substrate (a porous carrier (a substrate); paragraph [0018]) defining at least one diagnostic (diagnostic; paragraph [0064]) lane (microchannel (lane); paragraph [0069]); a sample application zone (a sample receiving portion of a test strip (a sample application zone); paragraph [0091]); a dried reagent zone (a dried reagent zone; paragraphs [0019], [0032], [0105]); and a detection zone (a detection zone; paragraph [0019]) comprising at least one control zone (comprising at least one control zone; paragraphs [0045], [0056]) and at least one assay zone (and at least one test (assay) zone; paragraphs [0019], [0083]); wherein the dried reagent zone comprises an antibody that specifically binds a peptide (wherein the reagent zone comprises a specific binding reagent (an antibody) labelled with a detectable particle; paragraphs [0019], [0027], [0105]); and a method of normalising an assay result for an analyte of interest (a method of normalising an assay result for an analyte of interest; paragraphs [0087], [0172]), comprising: providing an immunoassay device (providing a device comprising a specific binding agent (an immunoassay device); abstract, paragraphs [0019], [0066]) comprising a sample application zone (comprising a sample receiving portion of a test strip (a sample application zone); paragraph [0091]), a reagent zone (a reagent zone; paragraphs [0019], [0027], [0032]), and a diagnostic (diagnostic; paragraph [0064]) lane (microchannel (lane); paragraph [0069]) comprising at least one control binding zone comprising at least one control zone; paragraphs [0045], [0056]) and at least one assay zone (and at least one test (assay) zone; paragraphs [0019], [0083]), wherein the assay binding zone is a region of the device which generates a detectable signal indicative of the amount of the analyte of interest present in a sample (wherein the assay binding zone is a region of the device which generates a detectable signal indicative of the amount of the analyte of interest present in a sample; paragraphs [0019], [0020], [0028]), wherein: the at least one reagent zone comprises an antibody that specifically binds a peptide (wherein the reagent zone comprises a specific binding reagent (an antibody) labelled with a detectable particle; paragraphs [0019], [0027], [0105]); applying the sample to the sample application zone (applying the sample to the sample receiving (application) zone; paragraph [0091]); forming a mixture within the reagent zone between the sample and a reagent incorporated in the reagent zone (forming a mixture within the reagent zone between the sample and a reagent incorporated in the reagent zone; paragraphs [0019], [0091]); flowing the sample reagent mixture along the diagnostic lane (flowing the sample reagent mixture along the diagnostic lane; paragraphs [0019], [0064], [0091]); detecting a signal indicative of the amount of the analyte of interest present in the sample at the assay zone (detecting a signal indicative of the amount of the analyte of interest present in the sample at the assay zone; paragraphs [0087], [0091], [0172]); and modulating the response at the assay zone based on the response obtained at the control zone (normalizing (modulating) the response at the assay zone based on the response obtained at the control zone; paragraphs [0087], [0091], [0172]).

Alere does not disclose wherein: (a) the at least one control zone comprises an antibody that specifically binds a peptide, or (b) the at least one control zone comprises a peptide; and detecting a signal resulting from binding of the antibody that specifically binds a peptide at the control zone

May discloses an analytical device (an analytical device; abstract) for a liquid sample (for a liquid sample; abstract) applied to a porous carrier (applied to a porous carrier; abstract), including a control zone comprising an immobilized analyte that binds to excess labelled specific binding reagent (a control zone comprising an immobilized analyte that binds to excess labelled specific binding reagent; paragraphs [0008], [0016], [0019]).

-Continued Within the Next Supplemental Box-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/21211

-***-Continued from Previous Supplemental Box-***-

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Alere to have provided a control zone comprising an analyte, such as a peptide hormone capable of being bound by a specific binding reagent, such as a mobile antibody, as disclosed by May, in the control zone disclosed by Alere, in order to enable the accurate normalization and calibration of the amount of the same analyte detected in the assay zone, as disclosed by Alere.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Alere and May references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/553	
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	G 0 1 N 37/00 1 0 1	
	C 0 7 K 7/06	
	C 0 7 K 16/00	
	C 0 7 K 7/08	

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

(72) 発明者 ゲーリー, ジョナサン
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 1 2 4, サンディエゴ, ヴィア プロメサ 1 1 4 1 9
 (72) 発明者 ロンジー, スコット
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 1 2 9, サンディエゴ, ピペット プレイス 7 7 2 5
 (72) 発明者 パウエル, ジェームス
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 1 2 9, サンディエゴ, ヴィア シマ ベッラ 1 3 7
 1 2

F ターム(参考) 4H045 AA11 AA30 AA40 BA10 BA15 BA16 BA52 BA56 BA61 BA62
 BA63 DA75 DA76 DA86 EA50 FA10 FA74

专利名称(译)	免疫测定控制及其用途		
公开(公告)号	JP2019510219A	公开(公告)日	2019-04-11
申请号	JP2018548134	申请日	2017-03-07
[标]发明人	ロンジースコット		
发明人	ゲーリー, ジョナサン ロンジー, スコット パウエル, ジェームス		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/553 G01N37/00 C07K7/06 C07K16/00 C07K7/08		
CPC分类号	C07K7/06 C07K7/08 G01N33/54393 G01N33/558 G01N2333/4712 G16H40/63 C07K16/18		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/53.D G01N33/543.541.A G01N33/543.575 G01N33/543.545.A G01N33/553 G01N37/00.101 C07K7/06 C07K16/00 C07K7/08		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/AA40 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA52 4H045/BA56 4H045/BA61 4H045/BA62 4H045/BA63 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA10 4H045/FA74		
代理人(译)	江口明彦 内藤一彦		
优先权	62/304762 2016-03-07 US 62/346347 2016-06-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于设计免疫测定对照的组合物和方法。在各种实施方案中，本发明提供了序列CPRRPYIL或其类似物；ELAGLGFAELQC或其类似物；以及包含CDWRKNIDAL或其类似物；与CPRRPYIL，ELAGLGFAELQC或CDWRKNIDAL肽结合的特异性结合试剂的合成肽；这种试剂。一种制造方法；以及提供与所关注的分析物的测量无关的分析控制信号的方法，因为在分析物分析中使用的试剂对控制信号无贡献。提供了一种利用试剂的测定法。

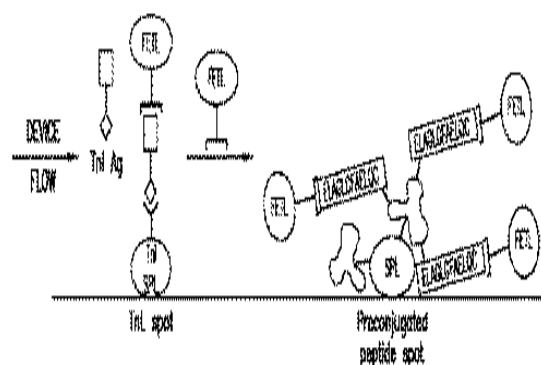


FIG.1