

(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2011-503568

(P2011-503568A)

(43) 公表日 平成23年1月27日 (2011.1.27)

(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 5 E	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	
GO 1 N 33/548 (2006.01)	GO 1 N 33/548 A	
	GO 1 N 33/543 5 2 1	
	GO 1 N 33/53 N	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁)		

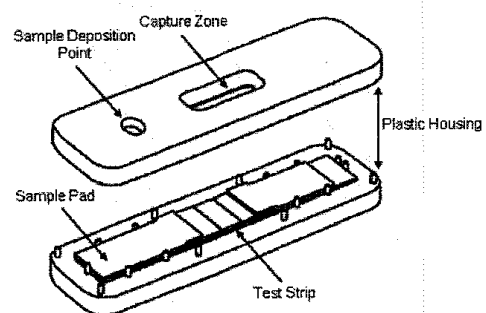
(21) 出願番号	特願2010-532618 (P2010-532618)	(71) 出願人	510129509 ユーロディアグノスティカ アーベー Euro-Diagnostica AB スウェーデン国 マルメ ビー. オー. ボ ックス 50117 ユーロディアグノス ティカ アーベー
(86) (22) 出願日	平成20年11月12日 (2008.11.12)	(74) 代理人	100075557 弁理士 西教 圭一郎
(85) 翻訳文提出日	平成22年7月12日 (2010.7.12)	(72) 発明者	ブーケル, ファン, マルティニユス, アド リアニユス, マリア オランダ国 ニステルローデ ヘット エ ルプ 5
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/065394	(72) 発明者	フェルヘイエン, ロナルド オランダ国 オーフェラッセルト ウィレ ム アレクサンデルストラート 6
(87) 国際公開番号	W02009/062959		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成21年5月22日 (2009.5.22)		
(31) 優先権主張番号	07021878.9		
(32) 優先日	平成19年11月12日 (2007.11.12)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 固体支持体上への捕捉分子の固定化のための方法

(57) 【要約】

本発明は、診断分析、より具体的には免疫アッセイの分野にあり、ここで捕捉分子は分析物を捕捉するために固体支持体上に固定化される。本発明は、固体支持体上への捕捉分子の固定化のための方法に関し、捕捉分子は、ビオチン化捕捉分子を得るためにビオチン分子に共有結合的に付着され、ビオチン化捕捉分子は、続いて、捕捉分子複合体を形成するために、高い親和性の結合メンバーと接触され、その後、捕捉分子複合体は固体支持体と接触される。

Figure 2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

固体支持体上での捕捉分子の固定化のための方法であって、捕捉分子は、ビオチン化捕捉分子を得るために、ビオチン分子に共有結合的に付着され、ビオチン化捕捉分子は、捕捉分子複合体を形成するために先ず結合メンバーと接触され、その後捕捉分子複合体は、固体支持体と接触されることを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記結合メンバーは、アビジン、キャプトアビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、もしくはストレプトアビジンヒドラジド、またはそれらの誘導体からなる群から選択される、高い親和性の結合因子であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記捕捉分子が小分子であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記捕捉分子がペプチドであることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記捕捉分子は、関節リウマチを患う患者から得られる抗体と反応性の抗原であることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記捕捉分子は環状シトルリン化ペプチドであることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記固体支持体はニトロセルロース膜であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記固体支持体は、高速流動膜であることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記膜は、Millipore HF075、HF090、HF120、HF135、HF180、もしくはHF240または匹敵するもしくは等価な流動特性を備える膜からなる群から選択されることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法によって得ることができる、捕捉分子複合体が固定化される固体支持体。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の固体支持体を含む抗体または抗原の検出のための免疫アッセイ。

【請求項 12】

関節リウマチに特異的な抗体の検出のための、請求項 11 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 13】

環状シトルリン化ペプチドが前記固体支持体上に固定化されることを特徴とする請求項 12 に記載の免疫アッセイ。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、診断アッセイ、より具体的には免疫アッセイの分野にあり、ここで捕捉分子は分析物を捕捉するために固体支持体上に固定化される。

【背景技術】

【0002】

（臨床的）診断および汚染防止プログラムの分野における研究者らの主な目的の 1 つは、可能な限り迅速に正確なデータを得るための新規な分析戦略を提供することからなる。新規なスクリーニング試験が、商業的な目的のために必要とされるとき、該方法は、感度

50

が高く、特異的であり、迅速であり、安価であり、および実施が容易でなければならない。一般に、免疫学的技術（免疫アッセイ）は、これらの要件をかなりの程度に満たし得る。

【0003】

過去10年間にわたって、使い捨ての側方流動免疫アッセイは、実験室、外来診療所、および一次診察の環境のどれにおいても、極めて成功してきた。このタイプのアッセイにおいて、典型的に、全ての反応成分は、多孔性の固体支持体、通常ニトロセルロース膜の上に、取込まれ得るかまたは固定化され得、そしてサンプルと、必要に応じて希釈剤の添加の後に、接触される（Zuk RF, Ginsberg VK, Houts T et al, (1985) Clin Chem 31:1144-1150, Bunce RA, Thorpe GH, Keen L (1991) Anal Chim Acta 249 : 263-269、および May K (1994) In: D Wild (ed): The Immunoassay Handbook. Macmillan Press, London, 233-235）。

10

【0004】

この免疫アッセイ形式はまた、ストリップ試験、一工程ストリップ試験、免疫クロマトグラフィー試験、高速流動診断、高速免疫アッセイ（試験）、側方流動免疫アッセイ（LFIT）、オンサイト試験（アッセイ）、またはニアペイシェント試験（NPIT）として知られる。

【0005】

免疫アッセイは、分析的な測定システムであり、これは、たとえば臨床的サンプルのような、サンプル中の特定の分析物の検出について、抗原と抗体との間の結合に依存する。

20

【0006】

典型的な免疫アッセイにおいて、抗原または抗体は、通常、いくつかの種類の標識に付着され、そして次いで分析物を検出するための検出試薬として使用される。標識に付着される抗体または抗原のような検出試薬は、通常、結合体といわれる。標識は、たとえば、放射性標識または比色検出のための酵素、または免疫反応の直接的な可視化のための金、炭素、シリカ、もしくはラテックスのような着色コロイド粒子であり得る（Leuvering, J HW, Thal P JHM, Van der Waart M, Schuurs AHWM (1980) J Immunoassay 1(1):77-91）。

【0007】

実際、コロイド状金粒子、または25～40nmの直径を有する金ナノクラスターはおそらく、側方流動免疫アッセイにおいて最も一般的に適用される標識である（Verheijen, R., in: Analytical Biotechnology 2002, Birkhauser Verlag Ed: T. Schalkhammer 134-166）。

30

【0008】

典型的な免疫アッセイは、図1において例示されるような、試験ストリップを含む。このような試験ストリップは、図2において例示されるような、プラスチック製ハウジング上に装着され得る。

【0009】

商業的環境において、典型的な試験ストリップは、多くの要素から作製され得、サンプルパッド、結合パッド、吸収パッド、および捕捉ゾーンに捕捉試薬を含む側方流動膜を、通常、2つの捕捉ライン：試験ラインおよびコントロールラインの形態で含む。捕捉試薬は典型的に、側方流動膜上に固定化される。試験における捕捉試薬は、分析物を結合し得る（それを捕捉する）分子を含む。この分子は、本明細書中で捕捉分子として言及される。

40

【0010】

ハウジングの主な目的は、試験ストリップのいくつかの要素を固定すること、およびそれらを、互いに密接な接触に維持することである。さらに、ハウジングは、サンプルの寸法を良好に決定し得、そして通常、読み取り表示を備える表示ウィンドウを含む。

【0011】

免疫アッセイの原理を記載する場合、たんぱくのような高分子量の分析物を検出するた

50

めに通常使用される直接的なアッセイと、薬物残渣、抗体、ホルモンのような低分子量の分析物を検出するために通常使用される間接的または競合的なアッセイとを、区別しなくてはならない。

【0012】

両方のタイプの試験において、使用者は、液体サンプル（緩衝液抽出物、乳汁、尿、血清、血漿、全血など）をサンプルパッド上に分注する。典型的な免疫アッセイにおいて、次いでサンプルはサンプルパッドを介して、結合パッドに流動し、ここでこれは放出し、そして結合体と混合する。他の構成がまた、当該分野において公知であり、たとえば、ここではサンプルは、先ず、捕捉試薬と接触され、次いで、続いて、結合体は捕捉領域と接触される（Verheijen, R., in: Analytical Biotechnology 2002, Birkhauser Verlag Ed: T. Schalkhammer 134-166）。 10

【0013】

現在利用可能な免疫アッセイはしばしば、サンプル沈着点から近傍または下流に設置される結合体を用いる（図1）。次いで、サンプル自体は、結合パッドから結合体を再懸濁し、そしてそれを捕捉ゾーンに運搬するための頼みの綱である。このような免疫アッセイは、サンプルおよび結合体の十分な流動を提供するために、比較的大きなサンプルサイズを必要とし得る。

【0014】

あるいは、結合体はサンプル沈着ポイントから上流に位置し得る。このような免疫アッセイは、非常により小さなサンプル容量を必要とする。次いで、さらなる希釈剤が結合パッドから結合体を再懸濁し、そして捕捉ゾーンへのサンプルおよび結合体の十分な流動を提供するために、添加され得る。 20

【0015】

なお、「上流」および「下流」は、免疫アッセイにおけるサンプルの流動の方向に関した対象物の位置を言及している。

【0016】

たんぱくのような高分子量の分析物を検出するための直接的なアッセイ形式において、結合体は、分析物と反応性の特異的な抗体でコート化される金ナノクラスターからなり得る。その分析物がサンプル中に存在する場合、それは結合体と反応する。形成される分析物-結合体複合体は移動性であり、そして液体の流動とともに結合パッドから膜へ自由に移動し得る。試験ラインにて、複合体は、固定化された抗分析物抗体のような捕捉分子により捕捉され得る。それによって、サンプル中の分析物の存在は、着色された試験ラインを生じる。試験ラインの色強度は、サンプル中の分析物の濃度に比例し得る。 30

【0017】

分析物の濃度が最も低い検出濃度よりも低い場合、または分析物が完全に不在である場合、試験ラインはなんら可視的ではない。試験ラインおよびコントロールラインを超えて流動する過剰なサンプルは、吸収パッド中に採集される（Verheijen, R., in: Analytical Biotechnology 2002, Birkhauser Verlag Ed: T. Schalkhammer 134-166）。 40

【0018】

低分子量の分析物を検出するための競合アッセイ形式において、結合体は、分析物に対する抗体でコートされた金ナノクラスターからなる。ここでは、試験ラインは、いわゆるキャリアたんぱくに結合される分析物からなる。サンプルに存在する分析物が多いほど、それは、結合体の制限された量の抗体への結合について、膜上の固定化された分析物とより効果的に競合する。従って、サンプル中の分析物の不在は、着色された試験ラインを生じ、一方、分析物の量の増加は、検出ゾーンにおけるシグナルの減少を生じる。サンプル中の分析物のある濃度にて、試験ラインはもはや可視的ではない。検出の限界は、試験捕捉ラインの全体の不可視性をまさに引き起こす、サンプル中の分析物の量として規定される。 40

【0019】

ストリップ試験を含む免疫アッセイは、ますます多くの分析物（高分子量および低分子 50

量)のために市販されている。この試験形式についての最初の主な標的分析物は、妊娠の検出のためのヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)であった。現在、非常に多様な免疫アッセイが利用可能である(Anonymous, Syllabus of a two-day seminar on Solid Phase Membrane-Based Immunoassays, Paris, September 25-26th, 1997, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA, Anonymous, Syllabus of The Latex Course, London, October 1-3th, 1997, Organized by Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN, USA, Prince CP, Thorpe GHG, Hall J, Bunce RA (1997) CP Prince, DJ Newman (eds): Principles and Practices of Immunoassays (2nd edition). MacMillan Reference Ltd, London, 579-603, Hobbs FDR, Delaney BC, Fitzmaurice DA et al (1997). Health Technology Assessment 1(5))。

10

【0020】

市販の免疫アッセイの例は、たとえば、ホルモン(妊娠、肥満度、排卵、更年期、性的障害、および甲状腺機能)、腫瘍マーカー(前立腺、結腸直腸など)、ウイルス(HIV、B型およびC型肝炎)、細菌(連鎖球菌AおよびB、クラミジアトラコマチス、梅毒トレポネーマ、ヘリコバクターピロリなど)、IgE(アレルギー)、および心臓のモニタリングにおけるトロポニンTの検出のための免疫アッセイである。これらの分析物の全ては、それらの存在または不在に基づいて測定される。一次医療におけるニアペイシェント試験の多数の概説については、上述のようにHobbs et al. (上記参照)によって発表されている。

【0021】

20

免疫アッセイは単純に見えるが、それらの種々の要素間の複雑な相互作用は、開発および製造環境の両方において多くの挑戦を導く。これらの挑戦は定量的試験についてさらに多く、ここでは試験ラインの色強度は、生産ロット間で再現可能でなければならない。開発の観点から、首尾よい試験系を作製することは、その原材料間の相互作用、要素設計、および製造技術を最適化することを意味する。

【0022】

典型的な免疫アッセイにおいて、それは移動相と固定相との間で区別される。移動相は、免疫アッセイにおいて使用され得る膜および/または異なるパッド上を移動し得る全ての分子からなり、一方、固定相は、パッドおよびまたは膜上を移動しないそれらの分子からなる。典型的に、移動相は、サンプル、サンプル中の分析物、希釈剤、および結合体を含み、一方、固定相は、典型的に、捕捉試薬を含み、コントロール捕捉ラインおよび試験捕捉ラインにおいて固定化される。

30

【0023】

全ての免疫アッセイに共通する典型的なジレンマは、移動相が、膜から可能な限り低い障害を受けながら、膜上を、または膜を介して自由に移動し得、一方、固定相は移動できずに膜に付着されるべきであることが所望されることである。膜の孔径は、移動相の流速を測定する。高速アッセイについて、高速流動膜が好ましく、そしてこのような膜は、比較的大きな孔径により特徴づけられる。固定相において、特に、捕捉試薬がペプチドのような小分子からなる場合、捕捉試薬を担持することが、このような膜についての問題である。

40

【0024】

ニトロセルロースはおそらく、免疫アッセイにおける側方流動膜について最も一般的に使用されるポリマーである。このような膜の孔径は、5~20 μm の間で変化し、これは、たばくブロッティングについて使用されるニトロセルロース膜の0.2~1.2 μm の孔径に比較して大きい。大きな孔径は、小さな膜表面積、従って低いたばく結合能力、すなわち、0.45 μm の孔径を備えるブロッティング膜について110 μg IgG / cm^2 の代わりに、20~30 μg IgG / cm^2 を意味する。

【0025】

多くの免疫アッセイが当該分野において記載されており、そして捕捉試薬、最も顕著には抗原または抗体の固定化のための方法は、当該分野において公知である。一般に、小ペ

50

プチドを固定化するための方法は、小ペプチドを、たとえばより大きなペプチド、ウシ血清アルブミン（BSA）のようなたんぱく、または糖のような、より大きな分子に結合する原理を用いる。一般に、組換え生物体において産生される、融合たんぱくを使用することがまた、記載されている。

【0026】

当該分野において周知の方法は、捕捉分子自体よりも良好に膜上に担持される捕捉試薬を得るために、小ペプチドのような捕捉分子を、BSAまたはオボアルブミンのようなより大きなたんぱくに結合することである。（Verheijen, R., in: Analytical Biotechnology 2002, Birkhauser Verlag Ed: T. Schalkhammer 134-166）。他の公知の方法は、固体支持体への捕捉分子の固定化に基づき、ここではビオチンおよびストレプトアビジンの高い親和性結合が用いられる。これらの先行技術の方法において、アビジンまたはストレプトアビジンは先ず、固体支持体上に固定化され、そしてその後、ペプチドのようなビオチン化捕捉分子を捕捉するために使用される。

10

【0027】

他の分子へのビオチンの結合は、ビオチン化として当該分野において公知のプロセスである。ビオチンは、アビジンおよびストレプトアビジンのようなたんぱくに強力に結合し、そしてビオチン化された分子は、固定化されたアビジンまたはストレプトマイシン分子をその上に有する表面によって容易に捕捉される。ビオチン-アビジン複合体およびビオチン-ストレプトアビジン複合体は、極めて大きな会合定数（ K_a = アビジンについて、 10^{15} M^{-1} 、およびストレプトアビジンについて 10^{13} M^{-1} ）を有し、共有結合にエネルギー的に等価であり、そして広範の温度およびpHにわたって安定である。

20

【0028】

ビオチン化は典型的に、標的たんぱく上の暴露されるリジン残基を標識するために、ビオチンの化学的に活性な形態を使用して達成される。リジンは、最も頻繁に存在するアミノ酸の1つであり、および化学的ビオチン化は、それゆえ、本質的に全てのたんぱくをビオチン化するために使用され得る。

【0029】

ビオチン/ストレプトアビジン相互作用は、いくつかの場合について、免疫アッセイ手順における他の方法において利用されてきた。たとえば、米国特許第5126241号において、固体支持体に接着されるストレプトアビジンは、複合体を形成するためのインキュベーションを包含する手順において、ビオチン化抗原を結合するために使用され、ここでは、測定される分析物は、標識および固体支持体と、これら3つ全てを結合し得る抗体への接近について競合する。

30

【0030】

米国特許第4496654号は、アビジン結合された紙ディスクを使用して、ビオチン化抗体を捕捉し、ディスク上の抗体と、hCGを含むと思われる溶液とを反応し、次いで標準的な測定技術を使用してディスク上のhCGの量を測定することにより行われる、ヒト絨毛ゴナドトロピンについてのアッセイを記載する。このアッセイは、ビオチン/アビジン連結を介して固体支持体に結合される抗hCGおよび標識化抗hCGから形成されるhCGのサンドイッチを生じる。このアッセイは、サンプルの側方流動を含まない。

40

【0031】

米国特許第5001049号は、ヒトHIVに対する抗体を測定するための方法を記載し、これはストレプトアビジンで誘導体化される固体支持体を、抗HIVと反応性のビオチン化ペプチドとともにインキュベートすること、次いで任意の結合抗体を標識化抗体受容体で検出することを包含する。また、これらのアッセイにおいて、側方流動は行われない。

【0032】

米国再発行特許第34132号は、米国特許第4945042号の再発行であるが、抗体についての直接的なアッセイを記載し、ここでは分析物は、標識化エピトープと、ストレプトアビジン/ビオチンリンクを介して基質に結合されるエピトープとの間のリンクと

50

して作用する抗体である。また、側方流動形式は必要とされないので、反応の速さは重要ではない。

【0033】

本出願の目的は、免疫アッセイにおける捕捉試薬の固定化のための代替の技術、好ましくは、先行技術よりも利点を伴う固定化技術を少なくとも提供することである。このような利点は、免疫アッセイの、特異性、感度、費用、もしくは製造する容易さにおいて、およびまたは最終的に診断アッセイ自体の費用もしくは操作する容易さにおける利点において、見出され得る。

【発明の概要】

【0034】

驚くべきことに、抗原または抗体のような捕捉分子が、ビオチンおよび結合メンバー、たとえば、抗ビオチン抗体、アビジン、キャプトアビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、もしくはストレプトアビジンヒドラジド、またはそれらの誘導体に結合されながら膜上に固定化され、その後、このように得られた複合体が固体支持体上に固定化される場合、改善された特異性およびまたは感度が達成され得ることが見出された。

【0035】

したがって、本発明は、固体支持体上への捕捉分子の固定化のための方法に関し、該方法において、捕捉分子は、ビオチン化捕捉分子を得るためにビオチン分子に共有結合的に付着され、ビオチン化捕捉分子は、続いて、複合体を形成するために結合メンバーと接触され、その後複合体は固体支持体と接触される。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】典型的な試験ストリップの模式図。Aは上面図。Bは側面図。

【図2】ストリップ装置において使用されたハウジングの例。

【発明を実施するための形態】

【0037】

捕捉分子がビオチンで標識され、次いで溶液中で抗ビオチン抗体、ストレプトアビジン、アビジン、ニュートラアビジン、またはストレプトアビジンヒドラジドのような結合メンバーに結合された後、このように得られた複合体を固体支持体に固定化する方法は、ビオチン標識化分子が固体支持体に既に固定化された結合メンバーによって捕捉される公知の固定化技術よりも特別の利点を生じたことが見出された。

【0038】

したがって、本発明は、固体支持体上への捕捉分子の固定化のための方法に関し、該方法において、捕捉分子は、ビオチン化捕捉分子を得るためにビオチン分子に共有結合的に付着され、ビオチン化捕捉分子は先ず、複合体を形成するために結合メンバーと接触され、その後、複合体は固体支持体と接触される。

【0039】

先行技術の方法において、結合メンバーへのビオチンの結合は、典型的に、結合メンバーは固体支持体に付着されながら行われる。本発明は、複合体が、溶液中でビオチン化捕捉分子と結合メンバーとの間で形成された後の捕捉分子の固定化に関する。その後のみ、ビオチン化捕捉分子および結合メンバーを含む複合体は、次いで、固体支持体上に固定化される。

【0040】

この状況における結合メンバーは、ビオチンに結合し得る分子として解釈されるべきである。これは、たとえば、抗ビオチン抗体のようなビオチンと可逆的な結合を形成し得る分子であり得る。それはまた、高い親和性定数を伴う分子のような、高い親和性の結合メンバーであり得る。このような高い親和性の結合メンバーは、共有結合に匹敵する結合をビオチン化複合体と形成し得る。当業者は、これが、 $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1} \sim 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 、ストレプトアビジンについて、典型的には 10^{13} M^{-1} の程度にあることを認識するであろう。

10

20

30

40

50

【0041】

高親和性の結合メンバーは、アビジン、キャプトアビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、またはストレプトアビジンヒドラジド、またはそれらの誘導体からなる群から有利に選択され得る。

【0042】

この方法は、結合メンバーは、ビオチン化捕捉分子と混合される際は固体支持体に結合されず、ビオチンと結合メンバーとの間の結合の形成の後にのみ、このように得られた複合体は、固体支持体上に固定化されるという点で上記の先行技術とは異なることが理解されるべきである。疑いの回避のために、捕捉分子複合体を形成するためのビオチン化捕捉分子と、結合メンバーとの接触は、溶液中または任意の他の形態中で行われ、ここではビオチン化捕捉分子および結合メンバーのいずれも固体支持体に付着されない。

10

【0043】

この文脈における用語「捕捉分子」は、分析物、特に抗原または抗体のような別の分子に結合し得る分子として解釈されるべきである。抗原は、ハプテン、糖、ペプチド、たんぱく、多糖、および当業者に公知の多くのもののような広範な分子からなり得る。抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得る。抗体は、ヒトの臨床的サンプル、または唾液、汗、痰、尿、血液、血漿、血清、膿液、もしくは脳脊髄液のような体液に由来し得る。これらはまた、マウス、ラット、ウサギ、ラマ、およびラクダのような実験動物に、または細菌、酵母、もしくはヒト細胞のような組換え供給源に由来し得る。

【0044】

20

本発明に従う方法は、捕捉分子が複数の小分子からなる場合、有利に用いられ得る。この文脈において、用語「小分子」は、100,000(10万)Daを下回る、好ましくは50,000Da、たとえば40,000、30,000、20,000、または10,000Daを下回る分子量を伴う分子を意味するとして解釈されるべきである。特に利点は、小分子がさらに10,000Daよりも小さい、たとえば、8000、6000、4000、2000、または1000Daよりも小さい場合に得られる。このような小分子の例は、抗体フラグメント、天然のペプチドの合成物質またはハプテンであり得る。

【0045】

あるいは、用語「複数の小分子」はまた、たとえば、膜のような固体支持体の孔径の関数として、機能的に規定され得る。固体支持体への分子の接着または結合は、固体支持体の孔径に依存することが当該分野において知られる。孔径が大きくなるほど、ペプチドのような捕捉分子の、固体支持体への結合は、より小さい孔径を備える固体支持体への結合よりも小さくなる。したがって、小分子はまた、特定の孔径を備える所与の膜には結合しない、または検出可能には結合しない分子として規定され得る。

30

【0046】

特に有利な結果は、複数の小分子がペプチドであった場合に得られた。本研究において、ペプチドは5~100アミノ酸の範囲において、たとえば、10、12、14、16、19、20、30、50、または80アミノ酸が使用された。このようなペプチドは、固体支持体、特に多孔性膜、さらに特に、大きな孔径を備える多孔性膜に対するそれらの乏しい結合が知られる。このようなペプチドがビオチンに結合され、そして本発明に従う方法において使用された場合、得られるアッセイの改善された感度および特異性が観察された。さらに、作製する方法は、先行技術の方法に比較して、より容易であり、およびより労働集約的でなかった。さらに、検出領域にて、陽性サンプルの得られるラインは、先行技術に比較してより鮮明およびより明瞭であった。

40

【0047】

この点における用語「固体支持体」は、免疫アッセイを行うのに適切な任意の支持体または表面として解釈されるべきである。特に、方法は、材料を介するキャピラリー流動を許容するために多孔性である固体支持体を用いる。このような多孔性の固体支持体の例はニトロセルロース膜である。

【0048】

50

小分子のような任意の捕捉分子にビオチン分子を共有結合的に付着するための方法は、当該分野において公知であり、およびビオチン化のためのキットは、たとえば、Roche Diagnostics, Indianapolis、カタログ番号11 008960 001から市販されている。当業者は、ビオチン化捕捉分子を、どのように扱い、結合メンバーまたはアビジン、キャプトアビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、もしくはストレプトアビジンヒドラジド、またはそれらの誘導体のような高い親和性の結合メンバーと、どのように結合させるのかを知っているであろう。

【0049】

ニトロセルロース膜Millipore HF075、HF090、HF120、HF135、HF180、またはHF240に、合成ペプチドを直接的に結合することが試みられた。その目的のために、国際公開第03/050542号において記載されるような以下の合成の12マーペプチドが、膜上にスポットされ、そして乾燥された。

0002-27 H Q K R G Cit G W S R A A
 0002-29 H Q R R V Cit G W S R A A
 0002-31 H Q R R T Cit G G S R A A
 0002-32 H Q R K W Cit G A S R A A
 0002-36 H Q F R F Cit G Cit S R A A
 0002-37 H Q K W R Cit G R S Cit A A
 0002-63 H Q F R F Cit G W S R A A
 0107-32 K P Y T V Cit K F M R R P
 0107-35 A R F Q M Cit H Cit R L I R
 0107-45 Y S F V W Cit S H A R P R
 0113-30 A R F Q M R H Cit R L I R
 0218-36 R N L R L Cit R E R N H A

【0050】

ここで、「Cit」は、シトルリンを表し、そして他のアミノ酸は、アミノ酸についての一文字コードにおいて示される。さらに、これらのペプチドの環状改変体（実施例1）がまた、同じ設定において試験された。

【0051】

これらの直鎖状および環状ペプチドは、関節リウマチを患う患者からの血清中の抗体とのそれらの優れた反応性が知られる。乾燥された膜は、抗体の低い力価から非常に高い力価にわたる20個のこのような血清を用いて、反応性について試験され、そしていずれのペプチドも膜上に担持されないようであり、このことは、ペプチドが適用されたいずれのラインも抗体との有意な反応を与えなかったという事実により明らかであった。

【0052】

次いで、同じペプチドがビオチン化され（実施例2）、そして上記と同じ様式において反応性について試験された。また、反応は何ら観察されず、このことは、ビオチン化ペプチドが膜によって担持されるにはまた小さすぎたという事実に起因された。実施例の節において、高い血漿サンプル、中程度の血漿サンプル、低い血漿サンプルのみの参照パネルを用いて得られた結果が示される。

【0053】

比較例を提供するために、先行技術の方法が、ペプチドをより効果的に固定化するために使用された。したがって、結合体は、ペプチドとウシ血清アルブミン（BSA）との間で調製され、そしてその結合体はニトロセルロース上にスポットされた。いくつかの偽陽性の結果が、偽陰性と同様に得られた。全体で、これは平均の結果として評価された（表1）。

【0054】

次に、ビオチン化ペプチドは、抗ビオチンモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体（Jacksons laboratories、製品200-002-096 IgG画分）を含む結合メンバーと反応され、次いで膜上にスポットされた。このことはアッセイの感度を改善した

10

20

30

40

50

が、ペプチド-B S A 結合体を用いる先行技術の方法と同じ特異性が観察された（表 2 および表 3）。

【0055】

ビオチン化ペプチドが、捕捉分子複合体を膜上に固定化する前に、アビジン、キャプトアビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、もしくはストレプトアビジンヒドラジドまたはそれらの誘導体のような、高い親和性の結合メンバーと混合された場合、結果が非常に改善された。上述のいずれの方法に比較しても、より少ない偽陽性が確認され、そして良好な特異性が得られた。特に、ストレプトアビジンは非常に良好に作用し、このことは、100%の特異性および100%の感度を伴うアッセイを生じた（表 2 および表 3）。

10

【0056】

実施例において、いくつかのペプチドが、関節リウマチ（RA）を伴う患者からの抗体とのそれらの反応性について試験された。全ての場合において、先行技術の方法に比較して改善された反応性が観察された。この意味における改善された反応性は、アッセイの改善された感度もしくは特異性、またはその両方として解釈されるべきである。したがって、本発明はまた、上記の方法に関し、ここで捕捉分子は、関節リウマチを患う患者から得られた抗体と反応性の抗原である。

【0057】

RA 抗体との改善された反応性が、環状シトルリン化ペプチドが捕捉分子として使用された場合に観察された（表 3）。

20

【0058】

本発明に従う方法は、広範な固体支持体を伴って用いられ得る。有利な結果は、固体支持体が、Millipore HF075、HF090、HF120、HF135、HF180、またはHF240のような高速流動膜、または同等の流動特性を伴う膜からなる群から選択された場合に得られた。

【0059】

本発明はまた、本発明に従うプロセスにより得ることが可能な、そこに固定化される捕捉分子複合体を備える固体支持体に関する。このような固体支持体は、たとえば、抗体または抗原の検出、たとえば、関節リウマチに特異的な抗体の検出、のための免疫アッセイにおいて使用され得る。このような免疫アッセイにおいて、環状シトルリン化ペプチドは固体支持体上に有利に固定化される。

30

【0060】

実施例において、いくつかの捕捉分子複合体が固体支持体とどのように接触されるのかが記載される。これは機械の補助を伴って行われたが、このことが必須であると解釈されるべきではない。当業者は、捕捉分子を固体支持体上に沈着するための他の選択肢を認識し、浸漬、噴霧、プロッティング、スポッティング、およびその他多くのものが挙げられるが、これらに制限されない。

【実施例】

【0061】

実施例 1：ペプチド

以下の直鎖状ペプチドは、Polypeptide Laboratories, 365 Maple Avenue, Torrance CA 90503から商業的に得られた。

40

2-27	H Q K R G Cit G W S R A A
2-29	H Q R R V Cit G W S R A A
2-31	H Q R R T Cit G G S R A A
2-32	H Q R K W Cit G A S R A A
2-36	H Q F R F Cit G Cit S R A A
2-37	H Q K W R Cit G R S Cit A A
2-63	H Q F R F Cit G W S R A A
107-32	K P Y T V Cit K F M R R P
107-35	A R F Q M Cit H Cit R L I R

50

107-45 Y S F V W Cit S H A R P R
 113-30 A R F Q M R H Cit R L I R
 218-36 R N L R L Cit R E R N H A

【0062】

これらのペプチドの環状改変体はまた、Polypeptide Laboratories, 365 Maple Avenue, Torrance CA 90503から商業的に得られた。これらのペプチドは、それらのシステイン残基を介して環状化され、そして以下の一次配列を有した。

環状2-27 G S Q H C H Q K R G Cit G W S R A A C G-NH2
 環状2-29 G S Q H C H Q R R V Cit G W S R A A C G-NH2
 環状2-31 G S Q H C H Q R R T Cit G G S R A A C G-NH2
 環状2-32 G S Q H C H Q R K W Cit G A S R A A C G-NH2
 環状2-36 G S Q H C H Q F R F Cit G Cit S R A A C G-NH2
 環状2-37 G S Q H C H Q K W R Cit G R S Cit A A C G-NH2
 環状2-63 G S Q H C H Q F R F Cit G W S R A A C G-NH2
 環状107-32 G S Q H C K P Y T V Cit K F M R R P C G-NH2
 環状107-35 G S Q H C A R F Q M Cit H Cit R L I R C G-NH2
 環状107-45 G S Q H C Y S F V W Cit S H A R P R C G-NH2
 環状113-30 G S Q H C A R F Q M R H Cit R L I R C G-NH2
 環状218-36 G S Q H C R N L R L Cit R E R N H A C G-NH2

10

ペプチドのC末端はアミド化された。

20

【0063】

先行技術例：BSAへのペプチドの結合

BSA-ペプチド複合体を、実施例1において示されるような直鎖状または環状ペプチドにBSAを架橋することにより調製した。その目的のために、ペプチドを合成し、ここではシステイン残基は、実施例1において示されるペプチドのN-末端側に付加された。BSAの架橋は、Pierce, Meridian Road Rockford IL, 製品番号22322から得られたクロスリンカー *sulfo-SMCC* を、製造業者のプロトコルに従って使用して達成された。要するに、BSAは、PBS中で1mg/mlにて溶解された際に活性化され、そして1mg BSA当たり、20μgのクロスリンカーが添加された。混合物は室温で1時間インキュベートされ、そして反応は、1mM Tris-HCl, pH7.4の最終濃度でブロックされた。遊離のクロスリンカーはPD10カラムで除去された。ペプチドは活性化BSAの1mg当たり1mgにて添加され、そして2時間室温にてインキュベートされた。遊離ペプチドは、PBS pH7.4に対する透析によって除去された。

30

【0064】

ポリアクリルアミドゲル分析は、BSA-ペプチド複合体について100kDaの分子量を表し、平均して約13個のペプチド分子が1つのBSA分子に付着されたことを意味する。

【0065】

以下のペプチドが得られた。

BSA2-27 BSA C H Q K R G Cit G W S R A A
 BSA2-29 BSA C H Q R R V Cit G W S R A A
 BSA2-31 BSA C H Q R R T Cit G G S R A A
 BSA2-32 BSA C H Q R K W Cit G A S R A A
 BSA2-36 BSA C H Q F R F Cit G Cit S R A A
 BSA2-37 BSA C H Q K W R Cit G R S Cit A A
 BSA2-63 BSA C H Q F R F Cit G W S R A A
 BSA107-32 BSA C K P Y T V Cit K F M R R P
 BSA107-35 BSA C A R F Q M Cit H Cit R L I R
 BSA107-45 BSA C Y S F V W Cit S H A R P R
 BSA113-30 BSA C A R F Q M R H Cit R L I R

40

50

BSA218-36 BSA C R N L R L Cit R E R N H A

【0066】

実施例2：捕捉分子のビオチン化

実施例1において示される直鎖状および環状ペプチドのセットはまた、Polypeptide Laboratories, 365 Maple Avenue, Torrance CA 90503から得られ、N末端ビオチン残基を伴った。これらのペプチドは以下の一次構造を有した。

ビオチン2-27	ビオチンH Q K R G Cit G W S R A A	
ビオチン2-29	ビオチンH Q R R V Cit G W S R A A	
ビオチン2-31	ビオチンH Q R R T Cit G G S R A A	
ビオチン2-32	ビオチンH Q R K W Cit G A S R A A	10
ビオチン2-36	ビオチンH Q F R F Cit G Cit S R A A	
ビオチン2-37	ビオチンH Q K W R Cit G R S Cit A A	
ビオチン2-63	ビオチンH Q F R F Cit G W S R A A	
ビオチン107-32	ビオチンK P Y T V Cit K F M R R P	
ビオチン107-35	ビオチンA R F Q M Cit H Cit R L I R	
ビオチン107-45	ビオチンY S F V W Cit S H A R P R	
ビオチン113-30	ビオチンA R F Q M R H Cit R L I R	
ビオチン218-36	ビオチンR N L R L Cit R E R N H A	

【0067】

ビオチン化および環状：

ビオチン環状2-27	ビオチンG S Q H C H Q K R G Cit G W S R A A C G-NH2	
ビオチン環状2-29	ビオチンG S Q H C H Q R R V Cit G W S R A A C G-NH2	
ビオチン環状2-31	ビオチンG S Q H C H Q R R T Cit G G S R A A C G-NH2	
ビオチン環状2-32	ビオチンG S Q H C H Q R K W Cit G A S R A A C G-NH2	
ビオチン環状2-36	ビオチンG S Q H C H Q F R F Cit G Cit S R A A C G-NH2	
ビオチン環状2-37	ビオチンG S Q H C H Q K W R Cit G R S Cit A A C G-NH2	
ビオチン環状2-63	ビオチンG S Q H C H Q F R F Cit G W S R A A C G-NH2	
ビオチン環状107-32	ビオチンG S Q H C K P Y T V Cit K F M R R P C G-NH2	
ビオチン環状107-35	ビオチンG S Q H C A R F Q M Cit H Cit R L I R C G-NH2	
ビオチン環状107-45	ビオチンG S Q H C Y S F V W Cit S H A R P R C G-NH2	30
ビオチン環状113-30	ビオチンG S Q H C A R F Q M R H Cit R L I R C G-NH2	
ビオチン環状218-36	ビオチンG S Q H C R N L R L Cit R E R N H A C G-NH2	

【0068】

実施例3：アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、またはストレプトアビジンヒドラジドを使用する捕捉分子複合体の調製

上記されるようなペプチドを、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）中に1mg/mlの濃度にて溶解した。それらは、ペプチド：アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、またはストレプトアビジンヒドラジドのモル比5：2において、PBS中のアビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、またはストレプトアビジンヒドラジドのいずれかの1mg/ml溶液と混合された。混合物は室温にて10分間インキュベートされ、そして迅速に使用された。アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、またはストレプトアビジンヒドラジドはPierceから得られた。

【0069】

比較実験において、ここではペプチドは、1：1、2：1、4：1および5：2のモル比において、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、またはストレプトアビジンヒドラジドと混合され、そしてRA抗体の制限されたセットを用いて試験された。5：2モル比が至適であるようであった。他の比率もなお、受容され得る結果を生じ、それゆえ、比率は重要ではなく、そしてそれぞれ個々の捕捉分子複合体について至適化され得ることが結論される。一般に、モル過剰のペプチドまたはたんぱくを使用することは有利である。

10

20

30

40

50

【0070】

実施例4：モノクローナル抗ビオチン抗体を使用する捕捉分子複合体の調製

上記のようなビオチン化ペプチドが、 1 mg/ml の濃度にてリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）中に溶解された。それらは、Jacksons laboratories、製品200-002-096 IgG画分から得られるモノクローナル抗ビオチン抗体の 1.3 mg/ml 溶液と混合された。混合物は 37°C にて30分間インキュベートされ、そして迅速に使用された。

【0071】

実施例5：固体支持体上への捕捉分子複合体の固定化。

捕捉分子複合体は、Kinematic 1600を使用して細線の形態において固体支持体上にスポットされた。使用された固体支持体は、Millipore HF075、HF090、HF120、HF135、HF180、およびHF240膜であった。ストライプ速度は、 10 cm/秒 の速度にて、 $0.9\text{ }\mu\text{l/cm}$ であった。膜は1%ウシ血清アルブミン（BSA）および1%Pluronic F68、市販の界面活性剤、を含有するPBS溶液を使用してブロックされた。その目的のために、全ストリップは、以下の設定：流動速度 5 cm/秒 、ディスペンサー $10\text{ }\mu\text{l/秒}$ 、y軸20、およびマイクロメーター0.0を使用して、空気ジェットディスペンス先端を備えるBiodot XYZ 3000を使用して噴霧された。膜は、乾燥室において室温（ 21°C ）で24時間乾燥され、そして5mm幅の切片に切断された。切片の長さは約30mmであり、捕捉分子複合体は、上部から約7mmに縞状に配置した。種々の膜タイプを用いて得られた結果は本質的に同じであった。HF180膜は、流動特性および感度/特異性の至適な組合せを提供した。これらの結果は、表1～表3において示され、他の膜を用いて得られた結果は、同一でない場合、同等のものであった。

【0072】

実施例6：免疫アッセイ、すなわち、側方流動アッセイの実施

吸収パッドは、ストリップの上部に付着され、そしてストリップの底部は、 $75\text{ }\mu\text{l}$ の抗体溶液を含有する 1.5 ml のエッペンドルフ反応容器中に置かれた。抗体溶液は、ストリップ内に十分に移動することを許容された。次いで、ストリップは、 $75\text{ }\mu\text{l}$ の結合体溶液を含有する別の容器中に置かれ、そして液流は吸収パッドに到達することを許容された。このことは、20分間室温にて行われることを許容された。

【0073】

抗体溶液は、 $15\text{ }\mu\text{l}$ ヒト血漿と、 $60\text{ }\mu\text{l}$ PBS/1% BSAとを混合することにより調製された。4つの異なるヒト血漿サンプルが使用された。

- a) 正常なヒト血漿、非反応性
- b) 低い力価の関節リウマチ血漿
- c) 中程度の力価の関節リウマチ血漿
- d) 高い力価の関節リウマチ血漿。

【0074】

血漿サンプルは、Trina International Nanikon Switzerland、カタログ番号DA 1708から得られたマスターバッチに由来した。高い力価の血漿は、EuroDiagnostica免疫スキャンRA抗CCP試験キット；EuroDiagnostica BV Arnhem、The Netherlands、カタログ番号RA-96RTにおいて測定された場合、 1600 ユニット/ml の力価が得られるまで、マスターバッチ血漿を正常なヒト血漿中に希釈することにより調製された。中程度の力価の血漿は、 400 ユニット/ml の力価が得られるまで高い力価の血漿を希釈することにより得られ、低い力価の血漿は、 25 ユニット/ml の力価が得られるまで、正常なヒト血漿中のさらなる希釈により得られた。

【0075】

結合体溶液は、British Biocell International（BBI）；抗ヒトIgG金結合体カタログ番号BA GAHL 40から得られた $30\text{ }\mu\text{l}$ の金結合体と、 $70\text{ }\mu\text{l}$ の分離用緩衝液とを混合することにより調製された。使用された分離用緩衝液は、1%BSAを含有するPBSからなった。

【0076】

各装置に対するラインの色強度が、0～11にわたる視覚的尺度（「R a n n 尺度」）を使用して測定され、ここでは0は無色を表し、および11は最も強い色調を示す。R A N N 尺度は、比較計として使用され、ここでは試験シグナル強度は、等価なR A N N 尺度の強度に比較され、そして結果を記録する目的のために値を割り当てられる。R A N N 記録カードは、5つの列からなり、強度は非常に弱いから非常に強いまでにわたって変化する。カードの両端は1および10のライン強度に対応する。試験ラインの強度が記録カード上の最小の強度ラインを下回る場合、試験ラインの強度は0と記録される。試験ラインの強度が記録カード上の最小の強度ラインに等しい場合、試験ラインの強度は1と記録される。試験ラインの強度が記録カード上の最小の強度ラインと、次の強度ラインとの間にある場合、試験ラインの強度は2と記録されるというようである。得られ得る最大の値は、11であり、R A N N 記録カード上の最大の強度ラインよりも強いことを示す。

10

【0077】

上記のような材料を用いて得られた各試験ゾーンにおけるストリップの強度は、表1～表3においてまとめられる。

【0078】

表 1：先行技術に従う種々の捕捉分子および捕捉分子複合体で得られた試験ラインの R A N N 値。

ペプチド	直鎖状	環状	バイオチン 直鎖状	バイオチン 環状	B S A 直鎖状	B S A 環状
2-27	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/1	0/0/1/4	1/0/0/4
2-29	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/1/2/4	2/4/4/4
2-31	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	3/3/3/4	2/2/5/5
2-32	0/0/0/1	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	2/2/2/4
2-36	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/2/3	0/0/3/3
2-37	0/0/0/0	0/0/0/1	0/0/0/0	0/0/0/0	2/2/3/3	1/0/0/0
2-63	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/2	0/0/2/4
107-32	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/1	1/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/3
107-35	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/4	0/0/0/0
107-45	0/0/0/0	2/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	2/0/0/3	1/0/0/0
113-30	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/1	0/0/0/0	0/0/0/3	0/0/2/4
218-36	0/0/0/0	0/0/0/0	1/0/0/0	0/0/0/0	1/0/0/0	0/0/0/0

表 1：示されるように捕捉分子および捕捉分子複合体を保有する試験ストリップで得られた正常なヒト血清／低い力価／中程度の力価／高い力価の血漿サンプルの R A N N 値。

表 2：先行技術の直鎖状 B S A 結合体に比較される、本発明に従う種々の捕捉分子および捕捉分子複合体で得られた試験ラインの R A N N 値。直鎖状ペプチドでの結果が示される。

ペプチド	B S A 直鎖状	アビジン-ビオチン- ペプチド	ストレプトアビジン- ビオチン-ペプチド	ニュートラアビジン- ビオチン-ペプチド	ストレプトアビジン- ドラジド-ビオチン- ペプチド	抗体-ビオチン- ペプチド
2-27	0/0/1/4	0/2/4/4	0/2/4/6	0/2/4/6	0/2/4/4	1/0/1/4
2-29	0/1/2/4	0/2/4/4	0/1/4/6	0/2/4/4	0/2/4/4	2/4/4/4
2-31	3/3/3/4	0/2/3/3	0/2/4/6	0/2/3/5	2/2/2/3	2/2/5/5
2-32	0/0/0/0	0/2/3/3	0/2/3/6	0/2/3/4	0/2/2/3	2/2/2/4
2-36	0/0/2/3	0/2/3/3	0/2/4/6	0/2/3/6	0/1/3/3	0/0/3/3
2-37	2/2/3/3	1/2/4/6	0/2/3/6	0/2/4/6	1/2/5/6	1/0/1/0
2-63	0/0/0/2	0/2/4/6	0/3/4/6	0/2/4/6	0/2/2/6	4/0/2/4
107-32	0/0/0/0	0/2/2/4	0/1/2/7	0/2/2/2	0/2/2/2	1/0/0/3
107-35	0/0/0/4	1/2/2/3	0/1/2/4	0/2/2/3	2/2/2/3	0/0/0/0
107-45	2/0/0/3	0/2/3/6	0/1/2/4	0/2/3/6	0/2/3/6	1/0/0/0
113-30	0/0/0/3	1/2/4/4	0/1/1/4	1/2/4/4	1/2/4/4	4/0/2/4
218-36	1/0/0/0	1/2/4/6	0/1/2/2	1/2/4/6	1/2/4/6	0/0/0/0

表 2：示されるように本発明に従う捕捉分子および捕捉分子複合体を保有する試験ストリップで得られた正常なヒト血清/低い力価/中程度の力価/高い力価の血漿サンプルの R A N N 値。

【表 3】

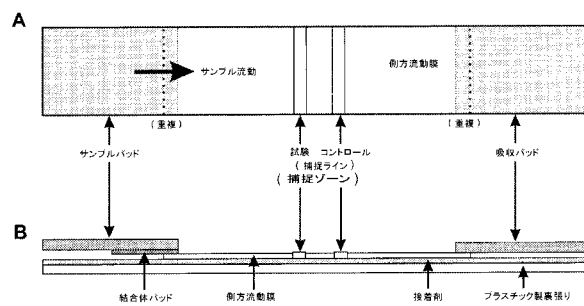
表 3：B S A 結合体に比較される、本発明に従う種々の捕捉分子および捕捉分子複合体で得られた試験ラインの R A N N 値。環状ペプチドでの結果が示される。

ペプチド	B S A 環状	アビジン-ビオチン- ペプチド	ストレプトアビジン- ビオチン-ペプチド	ニュートララビジン- ビオチン-ペプチド	ストレプトアビジン- ドラジド-ビオチン- ペプチド	抗体-ビオチン- ペプチド
2-27	1/0/0/4	0/2/4/7	0/2/6/11	0/2/4/8	1/2/6/8	1/0/0/8
2-29	2/4/4/4	0/2/4/7	0/1/6/10	0/2/4/8	0/2/6/6	3/4/4/8
2-31	2/2/5/5	0/0/5/6	0/2/6/9	0/2/3/7	0/2/6/8	2/2/5/8
2-32	2/2/2/4	0/2/5/6	0/2/6/9	0/2/3/6	1/2/5/7	3/2/2/4
2-36	0/0/3/3	0/2/5/8	0/2/5/9	1/2/3/7	0/1/7/7	3/0/3/3
2-37	1/0/0/0	0/2/5/9	0/2/5/9	0/2/4/8	1/2/5/8	1/0/8/8
2-63	0/0/2/4	0/2/5/9	0/2/7/11	0/2/4/9	0/2/2/8	4/0/8/6
107-32	0/0/0/3	0/2/2/6	0/1/4/9	0/2/2/9	0/2/8/8	1/2/6/6
107-35	0/0/0/0	1/2/2/7	0/1/4/9	0/2/2/9	1/2/3/5	0/2/2/7
107-45	1/0/0/0	0/0/3/7	0/1/2/8	0/2/3/9	0/2/3/8	1/3/4/6
113-30	0/0/2/4	0/2/4/8	0/1/3/8	0/2/4/6	1/2/4/8	4/0/2/4
218-36	0/0/0/0	1/2/4/7	0/1/4/8	0/2/4/6	1/2/4/8	0/2/2/6

表 3：示されるように本発明に従う捕捉分子および捕捉分子複合体を保有する試験ストリップで得られた正常なヒト血清/低い力価/中程度の力価/高い力価の血漿サンプルの R A N N 値。

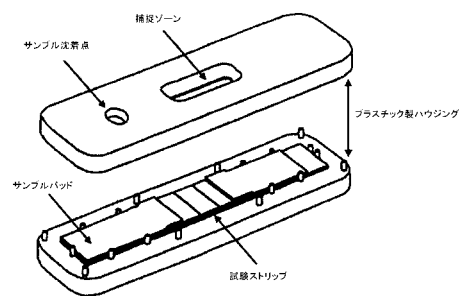
【図 1】

Figure 1



【図 2】

Figure 2



【配列表】

2011503568000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/065394

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/564

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

B. FIELDS SEARCHEDMinimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

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

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

EPO-Internal, WPI Data, COMPENDEX, INSPEC, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/148704 A1 (KLAUSE URSULA [DE] ET AL) 28 June 2007 (2007-06-28)	1-6
Y	paragraphs [0036], [0102] - [0107]; claims 1-5	7-13
X	WO 2007/039280 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; FUEHLING IRIS [DE] 12 April 2007 (2007-04-12)	1-6
Y	claims 1-6; example 2	7-13
	-/-	

☒ 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 document 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.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 2009

Date of mailing of the international search report

16/03/2009

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stachowiak, Olaf

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/065394

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOIVULA MARJA-KAISA ET AL: "SENSITIVE IMMUNOASSAYS FOR THE AUTOANTIBODIES REACTING AGAINST CITRULLINATED CARBOXY-TERMINAL TELOPEPTIDES OF TYPE I AND TYPE II COLLAGENS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS" CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE, WALTER DE GRUYTER UND CO, DE, vol. 43, no. 12, December 2005 (2005-12), pages 1400-1405, XP008072567 ISSN: 1434-6621	1-6
Y	page 1401; figure 1	7-13
X	WO 2007/017556 A (PROCOLLAGEN OY [FI]; KOIVULA MARJA-KAISA [FI]; RISTELI JUHA [FI]) 15 February 2007 (2007-02-15)	1-6
Y	examples 1-3	7-13
Y	WO 2005/116651 A (DIASYS CORP [US]; WITCHEL GREGORY [US]; SCHUMANN G BERRY [US]; DEMATTE) 8 December 2005 (2005-12-08) paragraph [0072]; claims 1-33	7-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/065394

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007148704 A1	28-06-2007	NONE	
WO 2007039280 A	12-04-2007	CA 2623167 A1 CN 101283278 A EP 1934612 A1	12-04-2007 08-10-2008 25-06-2008
WO 2007017556 A	15-02-2007	EP 1946109 A1	23-07-2008
WO 2005116651 A	08-12-2005	NONE	

フロントページの続き

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

(72)発明者 サルデン, マルティニウス, ヒューベルツス, レオナルデウス
オランダ国 ネイメーヘン ウェーゼンホフ 80-49

专利名称(译)	将捕获分子固定在固体支持物上的方法		
公开(公告)号	JP2011503568A	公开(公告)日	2011-01-27
申请号	JP2010532618	申请日	2008-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	EURO DIAGNOSTICA		
申请(专利权)人(译)	欧元 - 鹿INGÉ½锡卡安倍晋三		
[标]发明人	ブーケルファンマルティニユスアドリアニユスマリア フェルハイエンロナルド サルデンマルティニユスヒューベルツスレオナルデウス		
发明人	ブーケル,ファン,マルティニユス,アドリアニユス,マリア フェルハイエン,ロナルド サルデン,マルティニユス,ヒューベルツス,レオナルデウス		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/548		
CPC分类号	G01N33/54353 G01N33/558 G01N2800/102		
FI分类号	G01N33/543.525.E G01N33/53.U G01N33/548.A G01N33/543.521 G01N33/53.N		
优先权	2007021878 2007-11-12 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明属于诊断测定领域，更具体地是免疫测定，其中第一结合成员固定在固体支持物上以捕获第二结合成员。本发明涉及一种将分析物固定在固体支持物上的方法，其中分析物与生物素分子共价连接以获得生物素化的分析物，并且其中生物素化的分析物随后与高亲和力结合成员接触以形成分析物复合物。在分析物复合物与固体支持物接触之后。

Figure 2

