

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-180888

(P2015-180888A)

(43) 公開日 平成27年10月15日(2015.10.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	
	GO 1 N 33/543 5 7 5	

審査請求 有 請求項の数 52 O L (全 71 頁)

(21) 出願番号 特願2015-116308 (P2015-116308)  
 (22) 出願日 平成27年6月9日 (2015.6.9)  
 (62) 分割の表示 特願2012-542070 (P2012-542070) の分割  
 原出願日 平成22年11月17日 (2010.11.17)  
 (31) 優先権主張番号 12/630, 229  
 (32) 優先日 平成21年12月3日 (2009.12.3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 391008788  
 アボット・ラボラトリーズ  
 ABBOTT LABORATORIES  
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット  
 パーク アボット パーク ロード 100  
 (74) 代理人 110001173  
 特許業務法人川口国際特許事務所  
 (72) 発明者 マチエイ・アダムチツク  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60031、  
 ガーニー、クエール・ヘイブン・コート・  
 174

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心筋細胞損傷の診断のためのアッセイ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 対象における心筋細胞損傷を試験試料から検出するためのイムノアッセイ及びキットを提供する。

【解決手段】 心筋細胞損傷が疑われる対象からの試験試料中の心筋トロポニンI、心筋トロポニンT、クレアチンホスホキナーゼMB (CKMB)、ミオグロビン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、B型ナトリウム利尿ペプチド、心脂肪酸結合タンパク質 (H-FABP)、胎盤成長因子 (PLGF) およびインターロイキン-6 (IL-6) から成る群から選択される、複数の心筋細胞抗原のレベルが所定のレベルを超えるか否かを判定することによって心筋細胞損傷を検出する。

【選択図】 図1

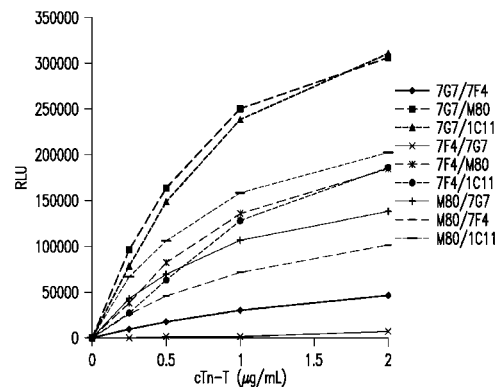


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象における心筋細胞損傷を試験試料から検出するためのイムノアッセイであって：

a) 心筋細胞損傷が疑われる対象からの試験試料を  $n'$  個の心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) 上の少なくとも  $n$  個のエピトープに結合する  $n$  個の抗体 ( $A^{n_a^{n'}}$ ) に接触させて、 $n'$  個の ( $n$  - 抗体：抗原) 免疫複合体 ( $A^{1_a^1}$ ) ( $A^{2_a^1}$ ) ... ( $A^{n_a^1}$ ) ( $a^1$ ) , ( $A^{1_a^2}$ ) ( $A^{2_a^2}$ ) ... ( $A^{n_a^2}$ ) ( $a^2$ ) , ... ( $A^{1_a^{n'}}$ ) ( $A^{2_a^{n'}}$ ) ... ( $A^{n_a^{n'}}$ ) ( $a^{n'}$ ) (式中、 $n$  は 1 から 10 の整数であり； $n'$  は 2 から 10 の整数である。) を形成するステップ；

b)  $n'$  個の ( $n$  - 抗体：抗原) 免疫複合体を含む a) で得られた混合物を、 $n'$  個の心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) 上の  $n''$  個のエピトープに結合する  $n''$  個の抗体 ( $B^{n''_a^{n'}}$ ) に接触させて、 $n'$  個の ( $(n+n'')$  抗体：抗原) 測定可能集合体 ( $(A^{1_a^1}) (A^{2_a^1}) \dots (A^{n_a^1}) (B^{1_a^1}) (B^{2_a^1}) \dots (B^{n_a^1}) (a^1)$  ,  $((A^{1_a^2}) (A^{2_a^2}) \dots (A^{n_a^2}) (B^{1_a^2}) (B^{2_a^2}) \dots (B^{n_a^2})) (a^2)$  , ...  $((A^{1_a^{n'}}) (A^{2_a^{n'}}) \dots (A^{n_a^{n'}}) (B^{1_a^{n'}}) (B^{2_a^{n'}}) \dots (B^{n_a^{n'}})) (a^{n'})$ ) (式中、 $n$  および  $n''$  は独立して、1 から 10 の整数であり、 $n'$  は 2 から 10 の整数であり、抗体 A および B は、心筋細胞抗原の ( $n+n''$ ) 個の異なるエピトープに結合する。) を形成するステップ；

c)  $n'$  個の ( $(n+n'')$  抗体：抗原) 測定可能集合体のうちの少なくとも 2 つの抗体：抗原の測定可能集合体の光学的、電気的、または状態変化シグナルを測定するステップ；ならびに

d) ステップ (c) の測定値が所定のレベルを超えるか否かを判定することによって心筋細胞損傷を検出するステップであって、

( $A^{n_a^{n'}}$ ) のそれぞれの抗体は、心筋細胞抗原  $a^{n'}$  上の少なくとも 1 つのエピトープに結合し、該エピトープは ( $B^{n''_a^{n'}}$ ) の抗体が結合するいずれのエピトープとも異なり、

心筋細胞抗原  $a^{n'}$  は、心筋トロポニン I、心筋トロポニン T、クレアチンホスホキナーゼ MB (CKMB)、ミオグロビン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、B 型ナトリウム利尿ペプチド、心脂肪酸結合タンパク質 (H-FABP)、胎盤成長因子 (PLGF) およびインターロイキン - 6 (IL-6) から成る群から選択され、B 型ナトリウム利尿ペプチドは pro-BNP、NT-proBNP 及び hBNP (1-32) からなる群から選択され、および

抗体 ( $A^{n_a^{n'}}$ )、抗体 ( $B^{n''_a^{n'}}$ ) 又は、抗体 ( $A^{n_a^{n'}}$ ) 及び抗体 ( $B^{n''_a^{n'}}$ ) はヒト化抗体を含むイムノアッセイ。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載のイムノアッセイであって、 $n' = 2$  であり、前記心筋細胞抗原  $a^{n'}$  が、心筋トロポニン I (cTnI) および心筋トロポニン T (cTnT) であるイムノアッセイ。

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載のイムノアッセイであって、前記抗体  $B^{n''_a^{n'}}$  が、抗ヒト IgG 抗体を含むイムノアッセイ。

## 【請求項 4】

請求項 1 に記載のイムノアッセイであって、前記抗体  $B^{n''_a^{n'}}$  が、検出可能な標識に結合され、該検出可能な標識が、酵素、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子ケミルミノフォア、フルオロフォア、蛍光消光剤、化学発光消光剤、またはビオチンであるイムノアッセイ。

## 【請求項 5】

請求項 1 に記載のイムノアッセイであって、前記光学シグナルが、化学発光、蛍光、リン光、電気化学発光、紫外線吸収、可視吸収、赤外線吸収、屈折、表面プラズモン共鳴に

10

20

30

40

50

おける心筋細胞抗原  $a^{n'}$  濃度依存性変化として測定されるイムノアッセイ。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のイムノアッセイであって、前記電気シグナルが、電流、抵抗、電位、質量対電荷比、またはイオンカウントにおける心筋細胞抗原  $a^{n'}$  濃度依存性変化として測定されるイムノアッセイ。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のイムノアッセイであって、前記状態変化シグナルが、サイズ、溶解度、質量または共鳴における心筋細胞抗原  $a^{n'}$  濃度依存性変化として測定されるイムノアッセイ。

【請求項 8】

請求項 1 に記載のイムノアッセイであって、前記抗体  $A^{n'}_a^{n'}$  が、固相に固定されているイムノアッセイ。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のイムノアッセイであって、前記固相が、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイプレート、キュベット、膜、足場分子、石英結晶、フィルム、濾紙、ディスクおよびチップから成る群から選択されるイムノアッセイ。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のイムノアッセイであって、前記試験試料が、全血、血清、または血漿であるイムノアッセイ。

【請求項 11】

対象における心筋細胞損傷を試験試料から検出するためのイムノアッセイであって：

a) 心筋細胞損傷が疑われる対象からの試験試料を、 $n'$  個の心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) 上の少なくとも  $n$  個のエピトープに結合する  $n$  個の抗体 ( $A^{n'}_a^{n'}$ ) に接触させて、 $n'$  個の ( $n$  - 抗体 : 抗原) 免疫複合体 ( $A^{n'}_1 a^1$ ) ( $A^{n'}_2 a^1$ ) ... ( $A^{n'}_n a^1$ ) ( $a^1$ ) , ( $A^{n'}_1 a^2$ ) ( $A^{n'}_2 a^2$ ) ... ( $A^{n'}_n a^2$ ) ( $a^2$ ) , ... ( $A^{n'}_1 a^{n'}$ ) ( $A^{n'}_2 a^{n'}$ ) ... ( $A^{n'}_n a^{n'}$ ) ( $a^{n'}$ ) (式中、 $n$  は 1 から 10 の整数であり ;  $n'$  は 2 から 10 の整数である。) を形成するステップ ;

b)  $n'$  個の ( $n$  - 抗体 : 抗原) 免疫複合体を含む a) で得られた混合物を  $n'$  個の心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) 上の  $n''$  個のエピトープに結合する  $n''$  個の抗体 ( $B^{n''}_a^{n'}$ ) に接触させて、 $n'$  個の ( $(n + n'')$  抗体 : 抗原) 測定可能集合体 ( $(A^{n'}_1 a^1)$  ( $A^{n'}_2 a^1$ ) ... ( $A^{n'}_n a^1$ ) ) ( $(B^{n''}_1 a^1)$  ( $B^{n''}_2 a^1$ ) ... ( $B^{n''}_n a^1$ ) ) ( $a^1$ ) , ( $(A^{n'}_1 a^2)$  ( $A^{n'}_2 a^2$ ) ... ( $A^{n'}_n a^2$ ) ) ( $(B^{n''}_1 a^2)$  ( $B^{n''}_2 a^2$ ) ... ( $B^{n''}_n a^2$ ) ) ( $a^2$ ) , ... ( $(A^{n'}_1 a^{n'})$  ( $A^{n'}_2 a^{n'}$ ) ... ( $A^{n'}_n a^{n'}$ ) ) ( $(B^{n''}_1 a^{n'})$  ( $B^{n''}_2 a^{n'}$ ) ... ( $B^{n''}_n a^{n'}$ ) ) ( $a^{n'}$ ) (式中、 $n$  および  $n''$  は独立して、1 から 10 の整数であり、 $n'$  は 2 から 10 の整数であり、抗体 ( $A^{n'}_a^{n'}$ ) および ( $B^{n''}_a^{n'}$ ) は、心筋細胞抗原の ( $n + n''$ ) 個の異なるエピトープに結合し、抗体 ( $A^{n'}_a^{n'}$ ) のそれぞれは心筋細胞抗原  $a^{n'}$  上の少なくとも 1 つのエピトープに結合し、該エピトープは、( $B^{n''}_a^{n'}$ ) 抗体が結合するいずれのエピトープとも異なり、ここで抗体 ( $B^{n''}_a^{n'}$ ) は、少なくとも 1 つのアクリジニウム化合物を含む検出可能な標識で標識され、抗体 ( $A^{n'}_a^{n'}$ )、抗体 ( $B^{n''}_a^{n'}$ ) 又は、抗体 ( $A^{n'}_a^{n'}$ ) 及び抗体 ( $B^{n''}_a^{n'}$ ) はヒト化抗体を含む。) を形成するステップ ;

c) 過酸化水素源をステップ (b) の混合物に発生させるまたは提供するステップ ;

d) ステップ (c) の混合物に塩基性溶液を添加して光シグナルを発生させるステップ ;

e) ステップ (d) によって発生したまたはステップ (d) において放出された光シグナルを測定するステップ ; および

f) ステップ (e) の測定値が所定のレベルを超えるか否かを判定することによって心筋細胞損傷を検出するステップ ;

を含むイムノアッセイ。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 2】

請求項 1 1 に記載のイムノアッセイであって、前記心筋細胞抗原  $a^{n'}$  が、心筋トロポニン I、心筋トロポニン T、クレアチンホスホキナーゼ MB (CKMB)、ミオグロビン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、B 型ナトリウム利尿ペプチド (pro-BNP、NT-proBNP および hBNP (1-32) を含む。)、心脂肪酸結合タンパク質 (H-FABP)、胎盤成長因子 (PLGF) およびインターロイキン - 6 (IL-6) から成る群から選択されるイムノアッセイ。

## 【請求項 1 3】

請求項 1 1 に記載のイムノアッセイであって、 $n' = 2$  であり、前記心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) が、心筋トロポニン I (cTnI) および心筋トロポニン T (cTnT) であるイムノアッセイ。

10

## 【請求項 1 4】

請求項 1 1 または 1 2 に記載のイムノアッセイであって、前記抗体  $A^{n_a^{n'}}$ 、抗体  $B^{n_a^{n'}}$ 、または抗体  $A^{n_a^{n'}}$  および  $B^{n_a^{n'}}$  が、ヒト化抗体を含むイムノアッセイ。

## 【請求項 1 5】

請求項 1 1 または 1 2 に記載のイムノアッセイであって、前記抗体  $B^{n_a^{n'}}$  が、抗 IgG 抗体を含むイムノアッセイ。

## 【請求項 1 6】

請求項 1 1 または 1 2 に記載のイムノアッセイであって、前記抗体  $A^{n_a^{n'}}$  が、固相に固定されているイムノアッセイ。

20

## 【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載のイムノアッセイであって、前記固相が磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタプレート、キュベット、膜、足場分子、石英結晶、フィルム、濾紙、ディスクおよびチップから成る群から選択されるイムノアッセイ。

## 【請求項 1 8】

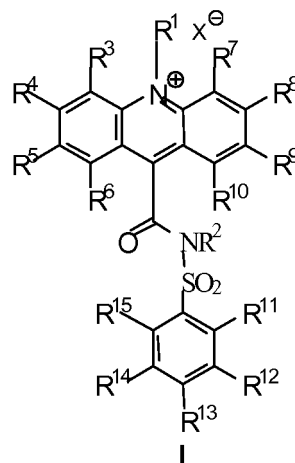
請求項 1 1 または 1 2 に記載のイムノアッセイであって、前記試験試料が、全血、血清または血漿であるイムノアッセイ。

## 【請求項 1 9】

請求項 1 1 または 1 2 に記載のイムノアッセイであって、前記アクリジニウム化合物が、式 I による構造を有するアクリジニウム - 9 - カルボキサミド：

30

## 【化 1】



40

(式中、R 1 および R 2 はそれぞれ独立して：アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキシアルキルから成る群から選択され、ならびに

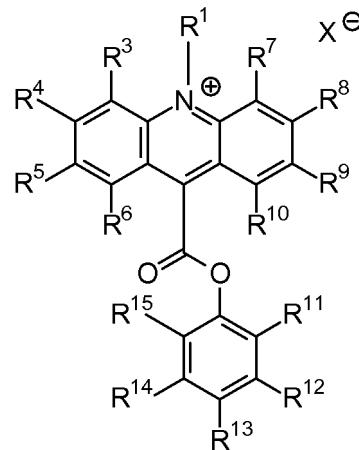
式中、R 3 から R 1 5 はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル

50

、アリアルまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアリルおよびオキサリルから成る群から選択され；ならびに  
 場合により、存在する場合、X はアニオンである。）  
 であるイムノアッセイ。

【請求項 20】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、前記アクリジニウム化合物が、式 II による構造を有するアクリジニウム - 9 - カルボキシラートアリアルエステル：  
 【化 2】



II

（式中、R1 は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリアルまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアリルおよびオキサリルであり；ならびに

式中、R3 から R15 はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリアルまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアリルおよびオキサリルから成る群から選択され；ならびに

場合により、存在する場合、X はアニオンである。）

であるイムノアッセイ。

【請求項 21】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、前記抗体 A<sup>n</sup> が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体および親和性成熟抗体から成る群から選択されるイムノアッセイ。

【請求項 22】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、前記抗体 B<sup>n</sup> が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体および親和性成熟抗体から成る群から選択されるイムノアッセイ。

【請求項 23】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、前記過酸化水素が、緩衝液または過酸化水素を含有する溶液を添加することによって提供されるイムノアッセイ。

【請求項 24】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、過酸化水素発生酵素を試験試料に添加することによって発生させるイムノアッセイ。

【請求項 25】

請求項 24 に記載のイムノアッセイであって、前記過酸化水素発生酵素が、(R) - 6 - ヒドロキシニコチンオキシダーゼ、(S) - 2 - ヒドロキシ酸オキシダーゼ、(S) - 6 - ヒドロキシニコチンオキシダーゼ、3 - aci - ニトロプロバノアートオキシダーゼ

10

20

30

40

50

、 3 - ヒドロキシアントラニレートオキシダーゼ、 4 - ヒドロキシマンデレートオキシダーゼ、 6 - ヒドロキシニコチネートデヒドロゲナーゼ、 アブシシンアルデヒドオキシダーゼ、 アシル - CoA オキシダーゼ、 アルコールオキシダーゼ、 アルデヒドオキシダーゼ、 アミンオキシダーゼ、 アミンオキシダーゼ（銅含有）、 アミンオキシダーゼ（フラビン含有）、 アリールアルコールオキシダーゼ、 アリールアルデヒドオキシダーゼ、 カテコールオキシダーゼ、 コレステロールオキシダーゼ、 コリンオキシダーゼ、 コルンバミンオキシダーゼ、 シクロヘキシルアミンオキシダーゼ、 シトクロム c オキシダーゼ、 D - アミノ酸オキシダーゼ、 D - アラビノノ - 1, 4 - ラクトンオキシダーゼ、 D - アラビノノ - 1, 4 - ラクトンオキシダーゼ、 D - アスパルテートオキシダーゼ、 D - グルタメートオキシダーゼ、 D - グルタメート（D - アスパルテート）オキシダーゼ、 ジヒドロベンゾフェナントリジンオキシダーゼ、 ジヒドロオロテートオキシダーゼ、 ジヒドロウラシルオキシダーゼ、 ジメチルグリシンオキシダーゼ、 D - マンニトールオキシダーゼ、 エクジソンオキシダーゼ、 エタノールアミンオキシダーゼ、 ガラクトースオキシダーゼ、 グルコースオキシダーゼ、 グルタチオンオキシダーゼ、 グリセロール - 3 - ホスフェートオキシダーゼ、 グリシンオキシダーゼ、 グリオキシラートオキシダーゼ、 ヘキサースオキシダーゼ、 ヒドロキシフィタネートオキシダーゼ、 インドール - 3 - アセトアルデヒドオキシダーゼ、 乳酸オキシダーゼ、 L - アミノ酸オキシダーゼ、 L - アスパルテートオキシダーゼ、 L - ガラクトノラクトンオキシダーゼ、 L - グルタメートオキシダーゼ、 L - グルノラクトンオキシダーゼ、 L - リジン 6 - オキシダーゼ、 L - リジンオキシダーゼ、 長鎖アルコールオキシダーゼ、 L - ピペコラートオキシダーゼ、 L - ソルボースオキシダーゼ、 マレートオキシダーゼ、 メタンチオールオキシダーゼ、 モノアミノ酸オキシダーゼ、 N 6 - メチル - リジンオキシダーゼ、 N - アシルヘキササミンオキシダーゼ、 NAD (P) H オキシダーゼ、 ニトロアルカンオキシダーゼ、 N - メチル - L - アミノ酸オキシダーゼ、 ニクレオシドオキシダーゼ、 オキサラートオキシダーゼ、 ポリアミンオキシダーゼ、 ポリフェノールオキシダーゼ、 ポリビニルアルコールオキシダーゼ、 プレニルシステインオキシダーゼ、 タンパク質 - リジン 6 - オキシダーゼ、 プトレシンオキシダーゼ、 ピラノースオキシダーゼ、 ピリドキサル 5' - ホスフェートシターゼ、 ピリドキシン 4 - オキシダーゼ、 ピロキノリンキノシンターゼ、 ピルベートオキシダーゼ、 ピルベートオキシダーゼ（CoA - アセチル化）、 レチクリンオキシダーゼ、 レチナルオキシダーゼ、 リファマイシン - B オキシダーゼ、 サルコシンオキシダーゼ、 2 級アルコールオキシダーゼ、 サルファイトオキシダーゼ、 スーパーオキシドジスムターゼ、 スーパーオキシドレダクターゼ、 テトラヒドロベルベリンオキシダーゼ、 チアミンオキシダーゼ、 トリプトファン - オキシダーゼ、 ウレートオキシダーゼ（ウリカーゼ、 尿酸オキシダーゼ）、 バニリルアルコールオキシダーゼ、 キサンチンオキシダーゼ、 キシリトールオキシダーゼおよびこれの組合せから成る群から選択されるイムノアッセイ。

【請求項 26】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、前記塩基性溶液が、少なくとも約 10 の pH を有する溶液であるイムノアッセイ。

【請求項 27】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、ステップ (e) の測定値が所定のレベルを超えるか否かを判定することによって心筋細胞損傷を検出するステップ (f) が、各心臓抗原 a の標準曲線の使用または各心臓抗原 a の参照標準への比較のどちらかによって、ステップ (e) の光シグナルの量を試験試料中の心臓抗原 a および b の量に関連付けることを含むイムノアッセイ。

【請求項 28】

請求項 27 に記載のイムノアッセイであって、各心臓抗原 a の参照標準への比較を備え、各参照標準が抗イディオタイプ抗体を含むイムノアッセイ。

【請求項 29】

請求項 27 に記載のイムノアッセイであって、各心臓抗原 a の参照標準への比較を備え、各参照標準が誘導体化心筋細胞抗原を含むイムノアッセイ。

10

20

30

40

50

## 【請求項 30】

請求項 29 に記載のイムノアッセイであって、前記誘導体化心筋細胞抗原が、ポリエチレングリコールによって誘導体化された前記心筋細胞抗原を含むイムノアッセイ。

## 【請求項 31】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、自動化システムまたは半自動化システムでの使用に適合させたイムノアッセイ。

## 【請求項 32】

試験試料から心筋細胞損傷を検出するためのキットであって：

a)  $n$  個の抗体 ( $A^{n_a^{n'}}$ ) であって、 $n'$  個の心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) 上の少なくとも  $n$  個のエピトープに結合して  $n'$  個の ( $n$  - 抗体：抗原) 免疫複合体 ( $(A^{1_a^1})$  ( $A^{2_a^1}) \dots (A^{n_a^1})$ ) ( $a^1$ ), ( $(A^{1_a^2})$  ( $A^{2_a^2}) \dots (A^{n_a^2})$ ) ( $a^2$ ), ... ( $(A^{1_a^{n'}})$  ( $A^{2_a^{n'}}) \dots (A^{n_a^{n'}})$ ) ( $a^{n'}$ ) (式中、 $n$  は 1 から 10 の整数であり；および  $n'$  は 2 から 10 の整数である。) を形成する抗体 ( $A^{n_a^{n'}}$ )；

b)  $n''$  個の抗体 ( $B^{n''_a^{n'}}$ ) であって、 $n'$  個の心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) 上の  $n''$  個のエピトープに結合して、 $n'$  個の ( $(n + n'')$  抗体：抗原) 測定可能集合体 ( $(A^{1_a^1})$  ( $A^{2_a^1}) \dots (A^{n_a^1})$ ) ( $(B^{1_a^1})$  ( $B^{2_a^1}) \dots (B^{n''_a^1})$ ) ( $a^1$ ), ( $(A^{1_a^2})$  ( $A^{2_a^2}) \dots (A^{n_a^2})$ ) ( $(B^{1_a^2})$  ( $B^{2_a^2}) \dots (B^{n''_a^2})$ ) ( $a^2$ ), ... ( $(A^{1_a^{n'}})$  ( $(A^{1_a^2})$  ( $A^{2_a^2}) \dots (A^{n_a^2})$ ) ( $(B^{1_a^2})$  ( $B^{2_a^2}) \dots (B^{n''_a^2})$ ) ( $a^2$ ), ... ( $(A^{1_a^{n'}})$  ( $A^{2_a^{n'}}) \dots (A^{n_a^{n'}})$ ) ( $(B^{1_a^{n'}})$  ( $B^{2_a^{n'}}) \dots (B^{n''_a^{n'}})$ ) ( $a^{n'}$ ) (式中、 $n$  および  $n''$  は独立して、1 から 10 の整数であり、 $n'$  は 2 から 10 の整数であり、ならびに抗体 A および B は心筋細胞抗原の ( $n + n''$ ) 個の異なるエピトープに結合する。) を形成し、それぞれの抗体 ( $A^{n_a^{n'}}$ ) は心筋細胞抗原  $a^{n'}$  上の少なくとも 1 つのエピトープに結合し、該エピトープは、( $B^{n''_a^{n'}}$ ) 抗体が結合するいずれのエピトープとも異なり；および

c) 試験試料中の心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) の全量が所定を超えるか否かを判定するための説明書；

を含むキット。

## 【請求項 33】

請求項 32 に記載のキットであって、前記心筋細胞抗原  $a^{n'}$  が、心筋トロポニン I、心筋トロポニン T、クレアチンホスホキナーゼ MB (CKMB)、ミオグロビン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、B 型ナトリウム利尿ペプチドから成る群から選択され、第 1 の心臓特異性抗原および第 2 の心臓特異性抗原が異なる抗原であるキット。

## 【請求項 34】

請求項 32 に記載のキットであって、 $n' = 2$  であり、前記心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) が、心筋トロポニン I (cTnI) および心筋トロポニン T (cTnT) であるキット。

## 【請求項 35】

請求項 32 または 33 に記載のキットであって、固相をさらに含み、前記抗体  $A^{n_a^{n'}}$  が、該固相に結合されているキット。

## 【請求項 36】

請求項 35 に記載のキットであって、前記固相が、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイプレート、キュベット、膜、足場分子、石英結晶、フィルム、濾紙、ディスクおよびチップから成る群から選択されるキット。

## 【請求項 37】

抗体  $B^{n''_a^{n'}}$  に結合された検出可能な標識をさらに含む請求項 32 または 33 に記載のキット。

## 【請求項 38】

請求項 37 に記載のキットであって、前記検出可能な標識が、酵素、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子ケミルミノフォア、フルオロフォア、蛍光消光剤、化学発光消光剤、または

10

20

30

40

50

ビオチンであるキット。

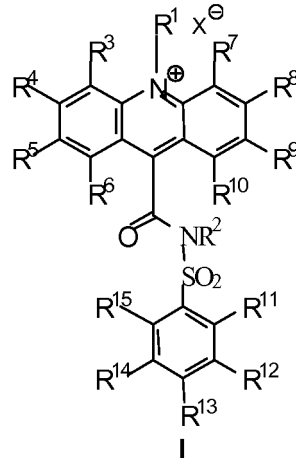
【請求項 39】

前記検出可能な標識がアクリジニウム化合物である、請求項 38 に記載のキット。

【請求項 40】

請求項 39 に記載のキットであって、前記アクリジニウム化合物が、式 I による構造を有するアクリジニウム - 9 - カルボキサミド：

【化 3】



10

20

(式中、R1 および R2 はそれぞれ独立して：アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルから成る群から選択され、ならびに

式中、R3 から R15 はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルから成る群から選択され；ならびに

場合により、存在する場合、X はアニオンである。)

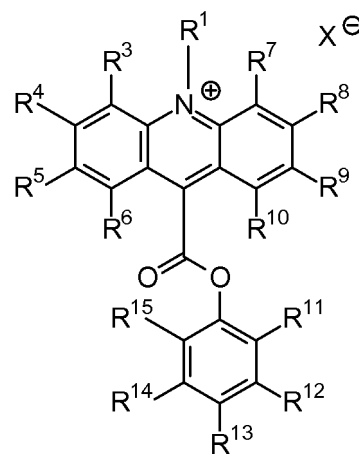
であるキット。

30

【請求項 41】

請求項 39 に記載のキットであって、前記アクリジニウム化合物が、式 II による構造を有するアクリジニウム - 9 - カルボキシラートアリールエステル：

【化 4】



40

(式中、R1 は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、ス

50

ルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルであり；ならびに

式中、R 3 から R 1 5 はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルから成る群から選択され；ならびに

場合により、存在する場合、X はアニオンである。）

であるキット。

【請求項 4 2】

塩基性溶液をさらに含む、請求項 4 0 または 4 1 に記載のキット。

【請求項 4 3】

請求項 4 2 に記載のキットであって、前記塩基性溶液が、少なくとも約 1 0 の pH を有する溶液であるキット。

【請求項 4 4】

過酸化水素源をさらに含む、請求項 4 3 に記載のキット。

【請求項 4 5】

請求項 4 4 に記載のキットであって、過酸化水素源が、緩衝液または過酸化水素を含有する溶液を含むキット。

【請求項 4 6】

請求項 4 5 に記載のキットであって、前記過酸化水素源が、過酸化水素発生酵素を含むキット。

【請求項 4 7】

請求項 4 6 に記載のキットであって、前記過酸化水素発生酵素が ( R ) - 6 - ヒドロキシニコチンオキシダーゼ、( S ) - 2 - ヒドロキシ酸オキシダーゼ、( S ) - 6 - ヒドロキシニコチンオキシダーゼ、3 - a c i - ニトロプロパノートオキシダーゼ、3 - ヒドロキシアントラニレートオキシダーゼ、4 - ヒドロキシマンデラートオキシダーゼ、6 - ヒドロキシニコチネートデヒドロゲナーゼ、アブシシンアルデヒドオキシダーゼ、アシル - C o A オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、アミノオキシダーゼ、アミノオキシダーゼ ( 銅含有 )、アミノオキシダーゼ ( フラビン含有 )、アリールアルコールオキシダーゼ、アリールアルデヒドオキシダーゼ、カテコールオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、コリンバミンオキシダーゼ、シクロヘキシルアミノオキシダーゼ、シトクロム c オキシダーゼ、D - アミノ酸オキシダーゼ、D - アラビノノ - 1 , 4 - ラクトンオキシダーゼ、D - アラビノノ - 1 , 4 - ラクトンオキシダーゼ、D - アスパルテートオキシダーゼ、D - グルタメートオキシダーゼ、D - グルタメート ( D - アスパルテート ) オキシダーゼ、ジヒドロベンゾフェナントリジンオキシダーゼ、ジヒドロオロテートオキシダーゼ、ジヒドロウラシルオキシダーゼ、ジメチルグリシンオキシダーゼ、D - マンニトールオキシダーゼ、エクジソンオキシダーゼ、エタノールアミノオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルタチオンオキシダーゼ、グリセロール - 3 - ホスフェートオキシダーゼ、グリシンオキシダーゼ、グリオキシラートオキシダーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、ヒドロキシフィタネートオキシダーゼ、インドール - 3 - アセトアルデヒドオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、L - アミノ酸オキシダーゼ、L - アスパルテートオキシダーゼ、L - ガラクトノラクトンオキシダーゼ、L - グルタメートオキシダーゼ、L - グルノラクトンオキシダーゼ、L - リジン 6 - オキシダーゼ、L - リジンオキシダーゼ、長鎖アルコールオキシダーゼ、L - ピペコラートオキシダーゼ、L - ソルボースオキシダーゼ、マレートオキシダーゼ、メタンチオールオキシダーゼ、モノアミノ酸オキシダーゼ、N 6 - メチル - リジンオキシダーゼ、N - アシルヘキソサミンオキシダーゼ、N A D ( P ) H オキシダーゼ、ニトロアルカンオキシダーゼ、N - メチル - L - アミノ酸オキシダーゼ、ヌクレオシドオキシダーゼ、オキサラートオキシダーゼ、ポリアミノオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ポリビニルアルコールオキシダーゼ、プレニルシステインオキシダーゼ、タンパク質 - リジン 6 - オキシダーゼ、プトレシンオキシダーゼ、ピラノースオキシダーゼ、ピリド

10

20

30

40

50

キサール 5' - ホスフェートシターゼ、ピリドキシン 4 - オキシダーゼ、ピロロキノリンキノシンターゼ、ピルベートオキシダーゼ、ピルベートオキシダーゼ (C o A - アセチル化)、レチクリンオキシダーゼ、レチナルオキシダーゼ、リファマイシン - B オキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、2 級アルコールオキシダーゼ、サルファイトオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、スーパーオキシドレダクターゼ、テトラヒドロベルベリンオキシダーゼ、チアミンオキシダーゼ、トリプトファン , - オキシダーゼ、ウレートオキシダーゼ (ウリカーゼ、尿酸オキシダーゼ)、バニリルアルコールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、キシリトールオキシダーゼおよびこれの組合せから成る群から選択されるキット。

【請求項 4 8】

請求項 3 2 または 3 3 に記載のキットであって、前記検出抗体が、抗ヒト I g G 抗体を含むキット。

【請求項 4 9】

少なくとも 1 つの心筋細胞抗原参照標準をさらに含む、請求項 3 2 または 3 3 に記載のキット。

【請求項 5 0】

請求項 4 9 に記載のキットであって、前記少なくとも 1 つの心筋細胞抗原参照標準が、抗イディオタイプ抗体を含むキット。

【請求項 5 1】

請求項 4 9 に記載のキットであって、前記少なくとも 1 つの心筋細胞抗原参照標準が、誘導体化心筋細胞抗原を含むキット。

【請求項 5 2】

請求項 5 1 に記載のキットであって、前記誘導体化心筋細胞抗原が、ポリエチレングリコールによって誘導体化された心筋細胞抗原を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本開示は概して、対象中の心筋細胞損傷を診断するアッセイおよびキットに、ならびに特に試験試料中の他の物質の存在による干渉の可能性も回避する、試験試料中の複数の心筋細胞抗原の存在を検出するための方法およびキットに関するものである。

【背景技術】

【0 0 0 2】

イムノアッセイ技法は、最近数十年にわたって公知であり、現在は生体試料中の標的検体を検出するために多種多様の診断目的で、医療において普通に使用されている。イムノアッセイは、標的検体である抗体の、抗体に対応する抗原への高度に特異的な結合を利用する。通例、抗体または抗原のどちらかの定量は、放射性標識または蛍光標識などのある形の標識によって達成される。サンドイッチイムノアッセイは、試料中の標的検体を ( 固体支持体に結合されていることが多い ) 抗体部位に結合すること、結合標識抗体を捕捉検体に結合すること、および次に結合した標識抗体の量を測定することを含み、標識抗体は検体が試料中に存在しない限り結合しないので、標識は標的検体の濃度に比例するシグナルを産生する。

【0 0 0 3】

臨床症状を診断するために現在利用可能なアッセイの中で、心筋細胞損傷から生じるリスクを評価し、または生じる成果を予測するのは、心筋トロポニン I、心筋トロポニン T、クレアチンホスホキナーゼ M B ( C K M B )、ミオグロビン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、B 型ナトリウム利尿ペプチド ( p r o - B N P、N T - p r o B N P および h B N P ( 1 - 3 2 ) を含む。 )、心脂脂肪酸結合タンパク質 ( H - F A B P )、胎盤成長因子 ( P L G F ) および / またはインターロイキン - 6 ( I L - 6 ) の濃度を決定するアッセイである。通例、このようなアッセイは、患者からの試験試料に対して順次行われるイムノアッセイのパネルとして実施され、各検体の試験はこのため、各アッセイ結果のために時

10

20

30

40

50

間、試料および試薬の体積の増加をさらに必要とする。検体の完全パネルのアッセイは、単一のベンダーからの単一のアッセイプラットフォームでは、または単一の検出技術によってさえ利用できないことが多く、このことによって患者の臨床状態の評価の複雑さが増大する。さらに個別におよび連続して行うとき、パネル中の任意の単一の検体の結果は信頼性がないかもしれない、つまり誤っているかもしれないし誤っていないかもしれない。個別のアッセイ結果の、たとえ誤っていると看做しても、どれが誤っているかを決定することは、困難であるかまたは実際的でない可能性があり、このため潜在的に矛盾する結果、従って矛盾する診断、リスクの評価または成果の予測がもたらされる。

#### 【0004】

2つの関連する抗原、心筋トロポニンTおよび心筋トロポニンIが例証的である。心筋トロポニンIアッセイは、複数のベンダーからただちに商業的に入手できるが、心筋トロポニンTアッセイは単一のベンダー Roche Diagnostics に限定されており、このことは代替手段が利用できないことを意味する。さらにどちらのアッセイも、偽陽性および偽陰性結果の複数の報告によれば、精度の面で限界がある。(例えば P. R. Kenny et al., J. 32 Rheumatol, 1258-61, (2005); R. I. Knoblock et al, Archives of pathology & laboratory medicine 2002; 126: 606-9; A. N. Makaryus et al, Clin Cardiol 2007; 30: 92-4を参照のこと)。さらに理論ではどちらの心筋トロポニンIおよび心筋トロポニンTも心筋細胞損傷に関連付けられているが、患者試料中の心筋トロポニンIおよび心筋トロポニンTの判定のためのイムノアッセイは、時間の約10%と相関できない。この不一致は、異なるアッセイ間の抗体配置の相違、他の生化学的な相違または分析によるものであり得る。

#### 【0005】

さらに循環抗原のためのこのようなイムノアッセイは、試験試料中に存在し得る他の物質、例えばヘテロ親和性内因性抗体および自己抗体からの干渉を受けやすいことが公知である。このような干渉は通例、問題のある試料を同定するための第2のアッセイを行うことによって対処されるが、このことは時間と費用がかかる。自己抗体の問題に対処するための別の手法は、自己抗体と反応する検体エピトープとは異なる特異性エピトープに結合する検体特異性抗体を選ぶことである。この一般的な手法に従って、自己抗体からの干渉を回避するために、2、3および4もの検体特異性抗体の数千の異なる組合せの使用を調査することに努力が注がれてきた。しかしこの努力は多くは成功していない。複合体タンパク質検体に対する自己抗体は特定の試料内でポリクローナルであるらしく、異なる個体からの試料の間ではなおさらに多様であり得ることが今や明らかである。多様なポリクローナル自己抗体からの干渉は、わずか25%またはなお低い検体タンパク質配列が検体特異性抗体に結合するという観察結果を説明し得て、このことは次に、この手法の使用により成功がないことを説明し得る。

#### 【0006】

このため少なくとも上述の理由で、心筋トロポニンIまたは心筋トロポニンTどちらか単独の、標準アッセイを使用する初期の試験は、MIの発生にもかかわらず陰性であり得る、即ち偽陰性結果を提供し得る。心筋トロポニンIまたは心筋トロポニンTについて利用可能なアッセイはMIの診断の適時性を改善しているが、これにもかかわらずMI症状を有する多くの患者は、提示後数時間まで陽性と診断されない。その結果、処置の遅延や延期が重篤な結果をもたらす可能性がある。

#### 【0007】

心筋細胞損傷の検出を改善するこのような検出の適時性を含む新たなイムノアッセイ方法へのおよびまた試験試料中に存在し得るヘテロ親和性内因性抗体および自己抗体による干渉を補償する方法へのならびに特に検体検出を再設計せずにこのような結果を達成し、または抗体を捕捉するこのような方法への要求が当分野に存在する。

#### 【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】P. R. Kenny et al., J. 32 Rheumatol, 1258-61, (2005)

【非特許文献2】R. I. Knoblock et al, Archives of pathology & laboratory medicine 2002; 126: 606-9

【非特許文献3】A. N. Makaryus et al, Clin Cardiol 2007; 30: 92-4

【発明の概要】

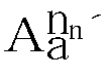
10

【課題を解決するための手段】

【0009】

1 態様において、本開示は対象における心筋細胞損傷を試験試料から検出するためのイムノアッセイを提供し、該イムノアッセイは：

a) 心筋細胞損傷が疑われる対象からの試験試料を、 $n'$  個の心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) 上の少なくとも  $n$  個のエピトープに結合する  $n$  個の抗体 [画像では



は、 $A^{n'}_a^{n'}$  で表現します。] ( $A^{n'}_a^{n'}$ ) に接触させて、 $n'$  個の ( $n$  - 抗体：抗原) 免疫複合体 ( $A^1_a^1$ ) ( $A^2_a^1$ ) ... ( $A^{n'}_a^1$ ) ( $a^1$ ) , ( $A^1_a^2$ ) ( $A^2_a^2$ ) ... ( $A^{n'}_a^2$ ) ( $a^2$ ) , ... ( $A^1_a^{n'}$ ) ( $A^2_a^{n'}$ ) ... ( $A^{n'}_a^{n'}$ ) ( $a^{n'}$ ) (式中、 $n$  は 1 から 10 の整数であり； $n'$  は 2 から 10 の整数である。) を形成するステップ；

20

b)  $n'$  個の ( $n$  - 抗体：抗原) 免疫複合体を含む前記化合物を、 $n'$  個の心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) 上の  $n''$  個のエピトープに結合する  $n''$  個の抗体 ( $B^{n''}_a^{n''}$ ) に接触させて、 $n'$  個の ( $(n + n'')$  抗体：抗原) 測定可能集合体 ( $(A^1_a^1)$  ( $A^2_a^1$ ) ... ( $A^{n'}_a^1$ )) ( $(B^1_a^1)$  ( $B^2_a^1$ ) ... ( $B^{n''}_a^1$ )) ( $a^1$ ) , ( $(A^1_a^2)$  ( $A^2_a^2$ ) ... ( $A^{n'}_a^2$ )) ( $(B^1_a^2)$  ( $B^2_a^2$ ) ... ( $B^{n''}_a^2$ )) ( $a^2$ ) , ... ( $(A^1_a^{n'})$  ( $A^2_a^{n'}$ ) ... ( $A^{n'}_a^{n'}$ )) ( $(B^1_a^{n''})$  ( $B^2_a^{n''}$ ) ... ( $B^{n''}_a^{n''}$ )) ( $a^{n'}$ ) (式中、 $n$  および  $n''$  は独立して、1 から 10 の整数であり、 $n'$  は 2 から 10 の整数であり、抗体 A および B は、心筋細胞抗原の ( $n + n''$ ) 個の異なるエピトープに結合する。) を形成するステップ；

30

c) 測定可能集合体の光学的、電気的、または状態変化シグナルを測定するステップ；ならびに

d) ステップ (c) の測定値が所定のレベルを超えるか否かを判定することによって心筋細胞損傷を検出するステップ；

を含む。

【0010】

心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) は、心筋トロポニン I、心筋トロポニン T、クレアチンホスホキナーゼ MB (CKMB)、ミオグロビン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、B 型ナトリウム利尿ペプチド (pro-BNP、NT-proBNP および hBNP (1-32) を含む。) 、心脂脂肪酸結合タンパク質 (H-FABP)、胎盤成長因子 (PLGF) およびインターロイキン - 6 (IL-6) から成る群から選択することができる。イムノアッセイの例示的な実施形態において、 $n' = 2$  であり、心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) は例えば、心筋トロポニン I (cTnI) および心筋トロポニン T (cTnT) である。抗体  $A^{n'}_a^{n'}$ 、抗体  $B^{n''}_a^{n''}$ 、または抗体  $A^{n'}_a^{n'}$  および  $B^{n''}_a^{n''}$  はヒト化抗体を含むことができる。

40

【0011】

上のイムノアッセイにおいて、抗体  $B^{n''}_a^{n''}$  は共有結合または非共有結合を通じ

50

て検出可能な標識、例えば酵素、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子ケミルミノフォア、フルオロフォア、蛍光消光剤、化学発光消光剤、またはビオチンに結合することができる。光学シグナルは、化学発光、蛍光、リン光、電気化学発光、紫外線吸収、可視吸収、赤外線吸収、屈折、表面プラズモン共鳴における抗原 ( $a^{n'}$ ) 濃度依存性変化として測定することができる。電気シグナルは、電流、抵抗、電位、質量対電荷比、またはイオンカウントにおける抗原 ( $a^{n'}$ ) 濃度依存性変化として測定することができる。状態変化シグナルは、サイズ、溶解度、質量、または共鳴における抗原 ( $a^{n'}$ ) 濃度依存性変化として測定することができる。

#### 【0012】

上のイムノアッセイにおいて、抗体  $B^{n'}-a^{n'}$  は抗ヒト IgG 抗体と複合したヒト化抗体を含むことができ、前記抗ヒト IgG 抗体は検出可能な標識にコンジュゲートされ、検出可能な標識は酵素、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子ケミルミノフォア、フルオロフォア、蛍光消光剤、化学発光消光剤、またはビオチンである。

10

#### 【0013】

上のイムノアッセイにおいて、抗体  $A^{n'}-a^{n'}$  を固相に固定することができる。固相は、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイプレート、キュベット、膜、足場分子、石英結晶、フィルム、濾紙、ディスクおよびチップから成る群から選択することができる。

#### 【0014】

別の態様において、本開示は対象における心筋細胞損傷を試験試料から検出するためのイムノアッセイを提供し、該イムノアッセイは：

20

a) 心筋細胞損傷が疑われる対象からの試験試料を、 $n'$  個の心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) 上の少なくとも  $n$  個のエピトープに結合する  $n$  個の抗体 ( $A^{n'}-a^{n'}$ ) に接触させて、 $n'$  個の ( $n$  - 抗体 : 抗原) 免疫複合体 ( $A^1-a^1$ ) ( $A^2-a^1$ ) ... ( $A^{n'}-a^1$ ) ( $a^1$ ) , ( $A^1-a^2$ ) ( $A^2-a^2$ ) ... ( $A^{n'}-a^2$ ) ( $a^2$ ) , ... ( $A^1-a^{n'}$ ) ( $A^2-a^{n'}$ ) ... ( $A^{n'}-a^{n'}$ ) ( $a^{n'}$ ) (式中、 $n$  は 1 から 10 の整数であり ;  $n'$  は 2 から 10 の整数である。) を形成するステップ ;

b)  $n'$  個の ( $n$  - 抗体 : 抗原) 免疫複合体を含む前記化合物を、 $n'$  個の心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) 上の  $n''$  個のエピトープに結合する  $n''$  個の抗体 ( $B^{n''}-a^{n''}$ ) に接触させて、 $n'$  個の ( $(n+n'')$  抗体 : 抗原) 測定可能集合体 ( $(A^1-a^1)$  ( $A^2-a^1$ ) ... ( $A^{n'}-a^1$ ) ) ( $(B^1-a^1)$  ( $B^2-a^1$ ) ... ( $B^{n''}-a^1$ ) ) ( $a^1$ ) , ( $(A^1-a^2)$  ( $A^2-a^2$ ) ... ( $A^{n'}-a^2$ ) ) ( $(B^1-a^2)$  ( $B^2-a^2$ ) ... ( $B^{n''}-a^2$ ) ) ( $a^2$ ) , ... ( $(A^1-a^{n'})$  ( $A^2-a^{n'}$ ) ... ( $A^{n'}-a^{n'}$ ) ) ( $(B^1-a^{n''})$  ( $B^2-a^{n''}$ ) ... ( $B^{n''}-a^{n''}$ ) ) ( $a^{n'}$ ) (式中、 $n$  および  $n''$  は独立して、1 から 10 の整数であり、 $n'$  は 2 から 10 の整数であり、抗体  $A^{n'}-a^{n'}$  および  $B^{n''}-a^{n''}$  は、心筋細胞抗原の  $(n+n'')$  個の異なるエピトープに結合し、ここで抗体  $B^{n''}-a^{n''}$  は、少なくとも 1 つのアクリジニウム化合物を含む検出可能な標識で標識されている。) を形成するステップ ;

30

c) 過酸化水素源をステップ (b) の混合物に発生または提供するステップ ;

d) ステップ (c) の混合物に塩基性溶液を添加して光シグナルを発生させるステップ ;

40

e) ステップ (d) によって発生したまたはステップ (d) において放出された光シグナルを測定するステップ ; および

f) ステップ (e) の測定値が所定のレベルを超えるか否かを判定することによって心筋細胞損傷を検出するステップ ;

を含む。

#### 【0015】

上のイムノアッセイにおいて、心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) は心筋トロポニン I、心筋トロポニン T、クレアチンホスホキナーゼ MB (CKMB)、ミオグロビン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、B 型ナトリウム利尿ペプチド (pro-BNP、NT-proBNP およ

50

び hBNP (1-32) を含む。)、心脂肪酸結合タンパク質 (H-FABP)、胎盤成長因子 (PLGF) およびインターロイキン-6 (IL-6) から成る群から選択することができる。イムノアッセイの例示的な実施形態において、 $n' = 2$  であり、心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) は、心筋トロポニン I (cTnI) および心筋トロポニン T (cTnT) である。抗体  $A^{n'}_{a^{n'}}$ 、抗体  $B^{n'}_{a^{n'}}$ 、または抗体  $A^{n'}_{a^{n'}}$  および  $B^{n'}_{a^{n'}}$  はヒト化抗体を含むことができる。

【0016】

上のイムノアッセイにおいて、抗体  $B^{n'}_{a^{n'}}$  は共有結合または非共有結合を通じて検出可能な標識、例えば酵素、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子ケミルミノフォア、フルオロフォア、蛍光消光剤、またはビオチンに結合することができる。光学シグナルは、化学発光、蛍光、リン光、電気化学発光、紫外線吸収、可視吸収、赤外線吸収、屈折、表面プラズモン共鳴における抗原 ( $a^{n'}$ ) 濃度依存性変化として測定することができる。電気シグナルは、電流、抵抗、電位、質量対電荷比、またはイオンカウントにおける抗原 ( $a^{n'}$ ) 濃度依存性変化として測定することができる。状態変化シグナルは、サイズ、溶解度、質量、または共鳴における抗原 ( $a^{n'}$ ) 濃度依存性変化として測定することができる。

10

【0017】

上のイムノアッセイにおいて、抗体  $B^{n'}_{a^{n'}}$  は抗ヒト IgG 抗体と複合したヒト化抗体を含むことができ、前記抗ヒト IgG 抗体は検出可能な標識にコンジュゲートされ、検出可能な標識は酵素、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子ケミルミノフォア、フルオロフォア、蛍光消光剤、化学発光消光剤、またはビオチンである。

20

【0018】

上のイムノアッセイにおいて、抗体  $A^{n'}_{a^{n'}}$  を固相に固定することができる。固相は、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイプレート、キュベット、膜、足場分子、石英結晶、フィルム、濾紙、ディスクおよびチップから成る群から選択することができる。

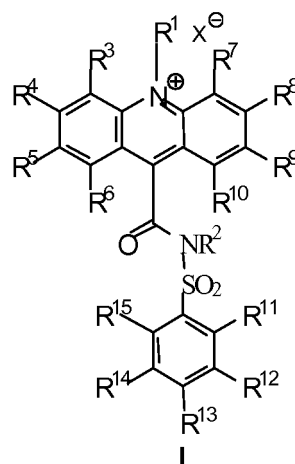
【0019】

上のイムノアッセイにおいて、アクリジニウム化合物は、式 I による構造を有するアクリジニウム-9-カルボキサミドであることができ：

【0020】

30

【化1】



40

式中、R1 および R2 はそれぞれ独立して：アルキル、アルケニル、アルキニル、アリーールまたはアラールキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキシアルキルから成る群から選択され、ならびに

式中、R3 から R15 はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリーールまたはアラールキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、

50

カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアリールおよびオキサリールから成る群から選択され；ならびに

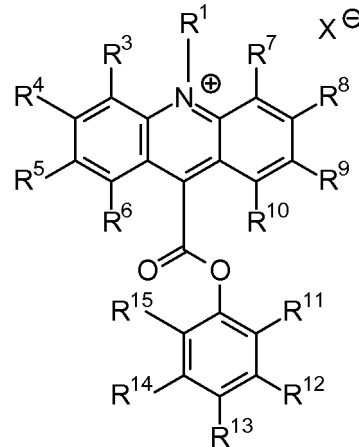
場合により、存在する場合、X はアニオンである。

【0021】

または上のイムノアッセイにおいて、アクリジニウム化合物は、式IIによる構造を有するアクリジニウム-9-カルボキシラートアリールエステルであることができ；

【0022】

【化2】



10

20

II

式中、R1は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラリール、スルホアルキル、カルボキシアリールおよびオキサリールであり；ならびに

式中、R3からR15はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラリール、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアリールおよびオキサリールから成る群から選択され；ならびに

場合により、存在する場合、X はアニオンである。

30

【0023】

上のイムノアッセイにおいて、抗体A<sup>n</sup>は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体および親和性成熟抗体から成る群から選択することができる。抗体B<sup>n</sup>は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体および親和性成熟抗体から成る群から選択することができる。

【0024】

上のイムノアッセイにおいて、過酸化水素は、緩衝液または過酸化水素を含有する溶液を添加することによって提供することができる。過酸化水素は、例えば過酸化水素発生酵素を試験試料に添加することによって発生させることができる。過酸化水素発生酵素は：

(R)-6-ヒドロキシニコチンオキシダーゼ、(S)-2-ヒドロキシ酸オキシダーゼ、(S)-6-ヒドロキシニコチンオキシダーゼ、3-acetyl-nitropropanoateオキシダーゼ、3-ヒドロキシアントラニレートオキシダーゼ、4-ヒドロキシマンデレートオキシダーゼ、6-ヒドロキシニコチネートデヒドロゲナーゼ、アブシシンアルデヒドオキシダーゼ、アシル-CoAオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、アミンオキシダーゼ、アミンオキシダーゼ(銅含有)、アミンオキシダーゼ(フラビン含有)、アリールアルコールオキシダーゼ、アリールアルデヒドオキシダーゼ、カテコールオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、コリンバミンオキシダーゼ、シクロヘキシルアミンオキシダーゼ、シトクロムcオキシダーゼ、D-アミノ酸オキシダーゼ、D-アラビノノ-1,4-ラクトンオキシダーゼ、D-アラビノノ-1,4-ラクトンオキシダーゼ、D-アスパルテートオキシダーゼ、D-グルタメ

40

50

ートオキシダーゼ、D - グルタメート ( D - アスパルテート ) オキシダーゼ、ジヒドロベンゾフェナントリジンオキシダーゼ、ジヒドロオロテートオキシダーゼ、ジヒドロウラシルオキシダーゼ、ジメチルグリシンオキシダーゼ、D - マンニトールオキシダーゼ、エクジソンオキシダーゼ、エタノールアミンオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルタチオンオキシダーゼ、グリセロール - 3 - ホスフェートオキシダーゼ、グリシンオキシダーゼ、グリオキシラートオキシダーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、ヒドロキシフィタネートオキシダーゼ、インドール - 3 - アセトアルデヒドオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、L - アミノ酸オキシダーゼ、L - アスパルテートオキシダーゼ、L - ガラクトノラクトンオキシダーゼ、L - グルタメートオキシダーゼ、L - グルノラクトンオキシダーゼ、L - リジン 6 - オキシダーゼ、L - リジンオキシダーゼ、長鎖アルコールオキシダーゼ、L - ピペコラートオキシダーゼ、L - ソルボースオキシダーゼ、マレートオキシダーゼ、メタンチオールオキシダーゼ、モノアミノ酸オキシダーゼ、N 6 - メチル - リジンオキシダーゼ、N - アシルヘキソサミンオキシダーゼ、NAD ( P ) H オキシダーゼ、ニトロアルカンオキシダーゼ、N - メチル - L - アミノ酸オキシダーゼ、ヌクレオシドオキシダーゼ、オキサラートオキシダーゼ、ポリアミンオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ポリビニルアルコールオキシダーゼ、プレニルシステインオキシダーゼ、タンパク質 - リジン 6 - オキシダーゼ、プレトシンオキシダーゼ、ピラノースオキシダーゼ、ピリドキサル 5 ' - ホスフェートシクターゼ、ピリドキシン 4 - オキシダーゼ、ピロロキノリンキノシンターゼ、ピルベートオキシダーゼ、ピルベートオキシダーゼ ( Co A - アセチル化 )、レチクリンオキシダーゼ、レチナルオキシダーゼ、リファマイシン - B オキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、2 級アルコールオキシダーゼ、サルファイトオキシダーゼ、スーパーオキシドジムスターゼ、スーパーオキシドレダクターゼ、テトラヒドロベルベリンオキシダーゼ、チアミンオキシダーゼ、トリプトファン、 - オキシダーゼ、ウレートオキシダーゼ ( ウリカーゼ、尿酸オキシダーゼ )、バニリルアルコールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、キシリトールオキシダーゼおよびこれの組合せから成る群から選択することができる。

10

20

## 【 0 0 2 5 】

上のイムノアッセイにおいて、塩基性溶液は少なくとも約 1 0 の pH を有する溶液であることができる。

## 【 0 0 2 6 】

上のイムノアッセイにおいて、ステップ ( e ) の測定値が所定のレベルを超えるか否かを判定することによって心筋細胞損傷を検出するステップ ( f ) は、各心筋細胞抗原  $a^{n'}$  の標準曲線の使用または各心筋細胞抗原  $a^{n'}$  の参照標準への比較のどちらかによって、ステップ ( e ) の光シグナルの量を試験試料中の心筋細胞抗原  $a^{n'}$  の量に関連付けることを含む。各心筋細胞抗原  $a^{n'}$  の参照標準は、抗イディオタイプ抗体を含むことができる。参照標準は、誘導体化心筋細胞抗原、例えばポリエチレングリコールによって誘導体化された心筋細胞抗原を含むことができる。

30

## 【 0 0 2 7 】

上のイムノアッセイのいずれも、自動化システムまたは半自動化システムでの使用に適合させることができる。

40

## 【 0 0 2 8 】

上のイムノアッセイのいずれにおいても、試験試料は全血、血清、または血漿であることができる。

## 【 0 0 2 9 】

別の態様において、本開示は試験試料から心筋細胞損傷を検出するためのキットを提供し、該キットは： $n$  個の抗体 (  $A^{n'}_{a^{n'}}$  ) であって、 $n'$  個の心筋細胞抗原 (  $a^{n'}$  ) 上の少なくとも  $n$  個のエピトープに結合して、 $n'$  個の (  $n$  - 抗体 : 抗原 ) 免疫複合体 (  $A^{n'}_{a^1}$  ) (  $A^{n'}_{a^2}$  ) ... (  $A^{n'}_{a^{n'}}$  ) (  $a^1$  ) , (  $A^{n'}_{a^2}$  ) (  $A^{n'}_{a^2}$  ) ... (  $A^{n'}_{a^{n'}}$  ) (  $a^2$  ) , ... (  $A^{n'}_{a^{n'}}$  ) (  $A^{n'}_{a^{n'}}$  ) ... (  $A^{n'}_{a^{n'}}$  ) (  $a^{n'}$  ) ( 式中、 $n$  は 1 から 1 0 の整数であり ; および  $n'$  は 2 から 1 0 の整数である。 ) を形成する  $n$  個の

50

抗体 (A<sup>n</sup>a<sup>n'</sup>) ; ならびに n' 個の抗体 (B<sup>n'</sup>a<sup>n'</sup>) であって、n' 個の心筋細胞抗原 (a<sup>n'</sup>) 上の n' 個のエピトープに結合して、n' 個の ((n + n')) 抗体 : 抗原 測定可能集合体 ((A<sup>1</sup>a<sup>1</sup>) (A<sup>2</sup>a<sup>1</sup>) ... (A<sup>n</sup>a<sup>1</sup>)) ((B<sup>1</sup>a<sup>1</sup>) (B<sup>2</sup>a<sup>1</sup>) ... (B<sup>n</sup>a<sup>1</sup>)) (a<sup>1</sup>), ((A<sup>1</sup>a<sup>2</sup>) (A<sup>2</sup>a<sup>2</sup>) ... (A<sup>n</sup>a<sup>2</sup>)) ((B<sup>1</sup>a<sup>2</sup>) (B<sup>2</sup>a<sup>2</sup>) ... (B<sup>n</sup>a<sup>2</sup>)) (a<sup>2</sup>), ... ((A<sup>1</sup>a<sup>n'</sup>) (A<sup>2</sup>a<sup>n'</sup>) ... (A<sup>n</sup>a<sup>n'</sup>)) ((B<sup>1</sup>a<sup>n'</sup>) (B<sup>2</sup>a<sup>n'</sup>) ... (B<sup>n</sup>a<sup>n'</sup>)) (a<sup>n'</sup>) (式中、n および n' は独立して、1 から 10 の整数であり、ならびに n は 2 から 10 の整数であり、ならびに抗体 A および B は、心筋細胞抗原の (n + n') 個の異なるエピトープに結合する。) を形成する n' 個の抗体 (B<sup>n'</sup>a<sup>n'</sup>)、ならびに試験試料中の心臓抗原 (a<sup>n'</sup>) の全量が所定のレベルを超えるか否かを判定するための説明書を含む。キットにおいて、心筋細胞抗原 (a<sup>n'</sup>) は、心筋トロポニン I、心筋トロポニン T、クレアチンホスホキナーゼ MB (CKMB)、ミオグロビン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、B 型ナトリウム利尿ペプチドから成る群から選択することができ、第 1 の心臓特異性抗原および第 2 の心臓特異性抗原は異なる抗原である。キットの例示的な実施形態において、n' = 2 であり、心筋細胞抗原 (a<sup>n'</sup>) は、心筋トロポニン I (cTnI) および心筋トロポニン T (cTnT) である。

10

【0030】

上のキットは固相をさらに含み得て、抗体 A<sup>n</sup>a<sup>n'</sup> は固相に結合されている。固相は、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場分子、石英結晶、フィルム、濾紙、ディスクおよびチップから成る群から選択することができる。

20

【0031】

上のキットは、抗体 B<sup>n'</sup>a<sup>n'</sup> が共有結合または非共有結合を通じて結合されている、検出可能な標識をさらに含み得る。検出可能な標識は、酵素、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子ケミルミノフォア、フルオロフォア、蛍光消光剤、化学発光消光剤、またはビオチンであることができる。

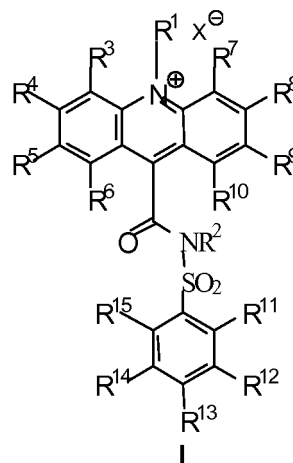
【0032】

キットのある実施形態において、検出可能な標識はアクリジニウム化合物であることができる。アクリジニウム化合物は、式 I による構造を有するアクリジニウム - 9 - カルボキサミドであることができ：

30

【0033】

【化3】



40

式中、R1 および R2 はそれぞれ独立して：アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラールキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキシアルキルから成る群から選択され、ならびに

式中、R3 から R15 はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル

50

、アリールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアリールおよびオキソアルキルから成る群から選択され；ならびに

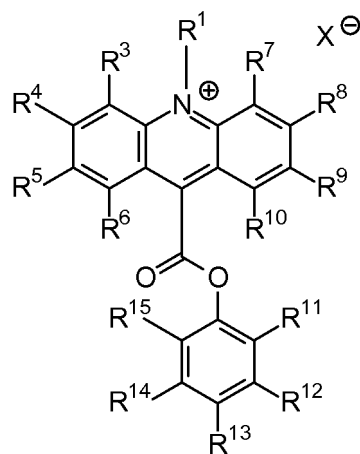
場合により、存在する場合、X はアニオンである。

【0034】

または上のキットにおいて、アクリジニウム化合物は、式IIによる構造を有するアクリジニウム - 9 - カルボキシラートアリールエステルであることができ；

【0035】

【化4】



II

式中、R1は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアリールおよびオキソアルキルであり；ならびに

式中、R3からR15はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアリールおよびオキソアルキルから成る群から選択され；ならびに

場合により、存在する場合、X はアニオンである。

【0036】

キットは、塩基性溶液、例えば少なくとも約10のpHを有する溶液をさらに含む得る。キットは過酸化水素源をさらに含む得る。過酸化水素源は、緩衝液または過酸化水素を含有する溶液を含むことができる。過酸化水素源は、過酸化水素発生酵素を含むことができる。過酸化水素発生酵素は：(R) - 6 - ヒドロキシニコチンオキシダーゼ、(S) - 2 - ヒドロキシ酸オキシダーゼ、(S) - 6 - ヒドロキシニコチンオキシダーゼ、3 - aci - ニトロプロパノートオキシダーゼ、3 - ヒドロキシアントラニレートオキシダーゼ、4 - ヒドロキシマンデラートオキシダーゼ、6 - ヒドロキシニコチネートデヒドロゲナーゼ、アブシシンアルデヒドオキシダーゼ、アシル - CoAオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、アミノオキシダーゼ、アミノオキシダーゼ(銅含有)、アミノオキシダーゼ(フラビン含有)、アリールアルコールオキシダーゼ、アリールアルデヒドオキシダーゼ、カテコールオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、コリンバミンオキシダーゼ、シクロヘキシルアミノオキシダーゼ、シトクロムcオキシダーゼ、D - アミノ酸オキシダーゼ、D - アラビノノ - 1, 4 - ラクトンオキシダーゼ、D - アラビノノ - 1, 4 - ラクトンオキシダーゼ、D - アスパルテートオキシダーゼ、D - グルタメートオキシダーゼ、D - グルタメート(D - アスパルテート)オキシダーゼ、ジヒドロベンゾフェナントリジンオキシダーゼ、ジヒドロオロテートオキシダーゼ、ジヒドロウラシルオキシダーゼ、ジメチルグリシンオキシダーゼ、D - マンニトールオキシダーゼ、エクジソンオキシダーゼ、エタノールアミノオキシダーゼ、ガ

10

20

30

40

50

ラクトースオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルタチオンオキシダーゼ、グリセロール-3-ホスフェートオキシダーゼ、グリシンオキシダーゼ、グリオキシラートオキシダーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、ヒドロキシフィタネートオキシダーゼ、インドール-3-アセトアルデヒドオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、L-アミノ酸オキシダーゼ、L-アスパルテートオキシダーゼ、L-ガラクトノラクトンオキシダーゼ、L-グルタマートオキシダーゼ、L-グルノラクトンオキシダーゼ、L-リジン6-オキシダーゼ、L-リジンオキシダーゼ、長鎖アルコールオキシダーゼ、L-ピペコラートオキシダーゼ、L-ソルボースオキシダーゼ、マレートオキシダーゼ、メタンチオールオキシダーゼ、モノアミノ酸オキシダーゼ、N6-メチル-リジンオキシダーゼ、N-アシルヘキソサミンオキシダーゼ、NAD(P)Hオキシダーゼ、ニトロアルカンオキシダーゼ、N-メチル-L-アミノ酸オキシダーゼ、ヌクレオシドオキシダーゼ、オキサラートオキシダーゼ、ポリアミンオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ポリビニルアルコールオキシダーゼ、プレニルシステインオキシダーゼ、タンパク質-リジン6-オキシダーゼ、プレトシンオキシダーゼ、ピラノースオキシダーゼ、ピリドキサル5'-ホスフェートシタターゼ、ピリドキシン4-オキシダーゼ、ピロロキノリンキノンシタターゼ、ピルベートオキシダーゼ、ピルベートオキシダーゼ(CoA-アセチル化)、レチクリンオキシダーゼ、レチナルオキシダーゼ、リファマイシン-Bオキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、2級アルコールオキシダーゼ、サルファイトオキシダーゼ、スーパーオキシドジウムスタターゼ、スーパーオキシドレダクターゼ、テトラヒドロベルベリンオキシダーゼ、チアミンオキシダーゼ、トリプトファン、  
-オキシダーゼ、ウレートオキシダーゼ(ウリカーゼ、尿酸オキシダーゼ)、パニリルアルコールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、キシリトールオキシダーゼおよびこれの組合せから成る群から選択することができる。

#### 【0037】

上のキットにおいて、抗体A<sup>n</sup><sub>a</sub><sup>n</sup>、抗体B<sup>n</sup><sub>a</sub><sup>n</sup>、または抗体A<sup>n</sup><sub>a</sub><sup>n</sup>およびB<sup>n</sup><sub>a</sub><sup>n</sup>はヒト化抗体を含むことができる。キットの例示的な実施形態において、抗体B<sup>n</sup><sub>a</sub><sup>n</sup>は抗ヒトIgG抗体を含む。

#### 【0038】

上のキットは、1つ以上の心臓抗原の参照標準をさらに含み得る。心臓抗原の参照標準は、抗イディオタイプ抗体を含むことができる。各心臓抗原の参照標準は、誘導体化心臓抗原、ポリエチレングリコールによって誘導体化された心臓抗原を含むことができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0039】

【図1】検出および捕捉抗体の異なる組合せの用量応答のグラフである。

【図2】ヒト心筋トロポニンT(cTnT)のアミノ酸配列である。

【図3】cTnT自己抗体エピトープの頻度プロットである。

【図4】マウス抗心筋トロポニンT M8020207のエピトープマップである。

【図5】マウス抗心筋トロポニンT 1C11のエピトープマップである。

【図6】ヒト心筋トロポニンI(cTnI)のアミノ酸配列である。

【図7】ヒト心筋トロポニンI自己抗体に見出される反応性心筋トロポニンIエピトープの頻度を示す。

【図8】モノクローナル19C7のエピトープマップである。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0040】

本開示は、試験試料から対象における心筋細胞損傷を検出するための改良アッセイを提供する。アッセイは、心筋細胞損傷に関連する臨床状態を診断するために、リスクを評価するために、または成果を予測するために有用である。開示したイムノアッセイ方法およびキットにより、心筋細胞損傷を心筋細胞死の程度までも診断することができる。さらにイムノアッセイ方法およびキットは、対象からの試験試料に基づく心筋細胞損傷を検出するためにとりわけ有用であり、該試験試料は、心臓損傷インジケータの判定を、特にこのような判定が単一のアッセイ結果として報告される場合に干渉し得る他の物質も含有し得

る。対照的に、本明細書で開示する方法およびキットは、心筋細胞損傷の少なくとも2つの異なるインジケータからの結果を組み合わせて、シグナルを単一の結果として報告することによって心筋細胞損傷のアッセイを強化する新たな手法を提供するものであり、この場合のインジケータは心筋細胞抗原である。異なる心筋細胞抗原の判定からの結果は、連続的または同時に行うことができる。

#### 【0041】

このため本開示は、心筋細胞損傷の単一インジケータに基づく方法、例えば心筋トロポニンI (cTnI) 単独の、または心筋トロポニンT (cTnT) 単独の判定に依存する方法よりも分析および臨床感受性が向上した方法およびキットを提供する。従って、本発明で開示された方法およびキットは、MIのより信頼性の高い診断、リスク層別化および予後を提供する。方法およびキットは、心臓病状、例えばうっ血性心不全、急性冠不全症候群、心筋梗塞、心筋炎などにおよび腎臓病、腎臓傷害などにも罹患している患者の診断およびケアに有用である。

10

#### 【0042】

該方法は一部は、特異性を改善するための1を超える捕捉相抗体および1を超える検出抗体の使用に基づいている。本アッセイの手法は、検体特異性検出抗体または捕捉抗体を再設計することなく、他の物質、例えばヘテロ親和性内因性抗体および試験試料中に存在し得る自己抗体の存在も補償して、問題のある試料を同定するための第2のアッセイの必要を回避する。さらに該方法は、ヘテロ親和性抗体の干渉を克服するためのヒト化免疫試薬の使用を提供する。抗ヒトIgG検出抗体の使用は内因性自己抗体を補正し、ヒト化免疫試薬と併せて使用されるときには、「万能」シグナル発生物質を提供する。誘導体化心筋細胞抗原もアッセイ標準化に好適な参照標準として記載されている。

20

#### 【0043】

##### A. 定義

本節および本明細書の開示全体で使用するような節の見出しは、限定するものではない。

#### 【0044】

本明細書で使用する場合、単数形の「a」、「an」および「the」は、文脈が明確に別途指示しない限り、複数の指示対象を含む。本明細書の数値範囲の列挙では、同じ程度の精度を有するこの間に介在する各数は、明示的に検討される。例えば範囲6から9では、数7および8が6および9に加えて検討され、範囲6.0から7.0では、数6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9および7.0が明示的に検討される。

30

#### 【0045】

##### a) アシル (および他の化学構造基の定義)

本明細書で使用する場合、「アシル」という用語は、R<sub>1</sub>が水素、アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、フェニルまたはフェニルアルキルである-C(O)R<sub>1</sub>基を指す。アシルの代表的な例は、これに限定されるわけではないが、ホルミル、アセチル、シクロヘキシルカルボニル、シクロヘキシルメチルカルボニル、ベンゾイル、ベンジルカルボニルなどを含む。

40

#### 【0046】

本明細書で使用する場合、「アルケニル」という用語は2から10個の炭素を含有し、2個の水素の除去により形成された少なくとも1個の炭素間2重結合を含有する直鎖または分枝鎖炭化水素を意味する。アルケニルの代表的な例は、これに限定されるわけではないが、エテニル、2-プロペニル、2-メチル-2-プロペニル、3-ブテニル、4-ペンテニル、5-ヘキセニル、2-ヘプテニル、2-メチル-1-ヘプテニルおよび3-デセニルを含む。

#### 【0047】

本明細書で使用する場合、「アルキル」という用語は1から10個の炭素原子を含有する直鎖または分枝鎖炭化水素を意味する。アルキルの代表的な例は、これに限定されるわ

50

けではないが、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、*n*-ヘキシル、3-メチルヘキシル、2,2-ジメチルペンチル、2,3-ジメチルペンチル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチル、*n*-ノニルおよび*n*-デシルを含む。

【0048】

本明細書で使用する場合、「アルキル基 (radical)」という用語は、直鎖または分枝鎖炭化水素に由来する一般式  $C_n H_{2n+1}$  の一連の1価基のいずれかを意味する。

【0049】

本明細書で使用する場合、「アルコキシ」という用語は、酸素原子を通じて親分子基部分に付加された、本明細書で定義するようなアルキル基を意味する。アルコキシの代表的な例は、これに限定されるわけではないが、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、2-プロポキシ、ブトキシ、*tert*-ブトキシ、ペンチルオキシおよびヘキシルオキシを含む。

10

【0050】

本明細書で使用する場合、「アルキニル」という用語は2から10個の炭素原子を含有し、少なくとも1個の炭素間3重結合を含有する直鎖または分枝鎖炭化水素基を意味する。アルキニルの代表的な例は、これに限定されるわけではないが、アセチレニル、1-プロピニル、2-プロピニル、3-ブチニル、2-ペンチニルおよび1-ブチニルを含む。

【0051】

本明細書で使用する場合、「アミド」という用語は、カルボニル基 (ここで「カルボニル基」という用語は  $-C(O)-$  基を指す。) を通じて親分子基部分に結合されたアミノ基を指す。

20

【0052】

本明細書で使用する場合、「アミノ」という用語は、 $R_b$  および  $R_c$  が独立して、水素、アルキルおよびアルキルカルボニルから成る群から選択される  $-NR_b R_c$  を意味する。

【0053】

本明細書で使用する場合、「アラルキル」という用語は、本明細書に定義するように、アルキル基を通じて親分子基部分に付加されたアリール基を意味する。アリールアルキルの代表的な例は、これに限定されるわけではないが、ベンジル、2-フェニルエチル、3-フェニルプロピルおよび2-ナフタ-2-イルエチルを含む。

30

【0054】

本明細書で使用する場合、「アリール」という用語は、フェニル基、または縮合環の1個以上がフェニル基である2環式もしくは3環式縮合環系を意味する。2環式縮合環系は、シクロアルケニル基、シクロアルキル基、または別のフェニル基に縮合されたフェニル基によって例示される。3環式縮合環系は、本明細書で定義するようなシクロアルケニル基、シクロアルキル基または別のフェニル基に縮合された2環式縮合環系によって例示される。アリールの代表的な例は、これに限定されるわけではないが、アントラセニル、アズレニル、フレオニル、インダニル、インデニル、ナフチル、フェニルおよびテトラヒドロナフチルを含む。本開示のアリール基は、アルコキシ、アルキル、カルボキシル、ハロおよびヒドロキシルから成る群から独立して選択される1、2、3、4、または5個の置換基によって場合により置換することができる。

40

【0055】

本明細書で使用する場合、「カルボキシ」または「カルボキシル」という用語は、 $-CO_2H$  または  $-CO_2$  を指す。

【0056】

本明細書で使用する場合、「カルボキシアルキル」という用語は、*n* が1から10である、 $-(CH_2)_n CO_2H$  または  $-(CH_2)_n CO_2-$  基を指す。

【0057】

本明細書で使用する場合、「シアノ」という用語は  $-CN$  基を意味する。

50

## 【0058】

本明細書で使用する場合、「シクロアルケニル」という用語は、3から10個の炭素原子および1から3個の環を有する非芳香族環式または2環式環系を指し、ここで各5員環は1個の2重結合を有し、各6員環は1または2個の2重結合を有し、各7および8員環は1から3個の2重結合を有し、ならびに各9から10員環は1から4個の2重結合を有する。シクロアルケニル基の代表的な例は、シクロヘキセニル、オクタヒドロナフタレニル、ノルボルニレニルなどを含む。シクロアルケニル基は、アルコキシ、アルキル、カルボキシル、ハロおよびヒドロキシルから成る群から独立して選択される1、2、3、4または5個の置換基によって場合により置換することができる。

## 【0059】

本明細書で使用する場合、「シクロアルキル」という用語は、1から12個の炭素原子を有する飽和単環式、2環式、または3環式炭化水素環系を指す。シクロアルキル基の代表的な例は、シクロプロピル、シクロペンチル、ビシクロ[3.1.1]ヘプチル、アダマンチルなどを含む。本開示のシクロアルキル基は、アルコキシ、アルキル、カルボキシル、ハロおよびヒドロキシルから成る群から独立して選択される1、2、3、4または5個の置換基によって場合により置換することができる。

10

## 【0060】

本明細書で使用する場合、「シクロアルキルアルキル」という用語は、 $R_d$ がアルキレン基であり、 $R_e$ がシクロアルキル基である $-R_dR_e$ 基を意味する。シクロアルキルアルキル基の代表的な例は、シクロヘキシルメチルなどである。

20

## 【0061】

本明細書で使用する場合、「ハロゲン」という用語は、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ または $-F$ を意味する；「ハライド」という用語は、一方の部分がハロゲン原子であり、他方の部分がハロゲンよりも電気陰性が低い元素または基(radical)、例えばアルキル基(radical)である、2元化合物を意味する。

## 【0062】

本明細書で使用する場合、「ヒドロキシル」という用語は $-OH$ 基を意味する。

## 【0063】

本明細書で使用する場合、「ニトロ」という用語は $-NO_2$ 基を意味する。

## 【0064】

本明細書で使用する場合、「オキソアルキル」という用語は、 $R_a$ が水素、アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、フェニルまたはフェニルアルキルであり、 $n$ が1から10である $-(CH_2)_nC(O)R_a$ を指す。

30

## 【0065】

本明細書で使用する場合、「フェニルアルキル」という用語は、フェニル基によって置換されているアルキル基を意味する。

## 【0066】

本明細書で使用する場合、「スルホ」という用語は $-SO_3H$ 基を意味する。

## 【0067】

本明細書で使用する場合、「スルホアルキル」という用語は、 $n$ が1から10である、 $-(CH_2)_nSO_3H$ または $-(CH_2)_nSO_3-$ 基を指す。

40

## 【0068】

## b) アニオン

本明細書で使用する場合、「アニオン」という用語は、無機酸または有機酸、例えばこれに限定されるわけではないが、塩酸、臭化水素酸、硫酸、メタンスルホン酸、ギ酸、酢酸、シュウ酸、コハク酸、酒石酸、マンデル酸、フマル酸、乳酸、クエン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、ホスフェート、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸およびフルオロスルホン酸ならびにこれのいずれかの組合せのアニオンを指す。

## 【0069】

## c) 抗体

50

本明細書で使用する場合、「抗体」という用語は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによって実質的にコードされる1個以上のポリペプチドから成るタンパク質を指し、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体およびこれのフラグメント、ならびに免疫グロブリン遺伝子配列から作られた分子を包含する。認識された免疫グロブリン遺伝子は、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンおよびミュー定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は、カッパまたはラムダのどちらかとして分類される。重鎖はガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはイプシロンとして分類され、これは次に免疫グロブリンクラスIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEをそれぞれ定義する。ここに示すように、表記形式「 $A^{n_a^n}$ 」は抗原 $n$ 上のエピトープ $n$ に結合する抗体を示すものである。例えば $A^{1_a^1}$ は抗原 $a^1$ 上の1個のエピトープに結合する抗体であり得て、抗原 $a^1$ は心筋トロポニンIであり、 $A^{1_a^2}$ は抗原 $a^2$ 上の1個のエピトープに結合する抗体であり得て、抗原 $a^2$ は心筋トロポニンTである。

10

**【0070】**

## d) 過酸化水素発生酵素

本明細書で使用する場合、「過酸化水素発生酵素」という用語は、反応生成物として分子式 $H_2O_2$ を有する化学化合物、即ち過酸化水素を産生することができる酵素を指す。過酸化水素発生酵素の非制限的な例を下の表A-1に挙げる。

**【0071】**

【表 1】

表 A-1

承認一般名	IUBMB 酵素命名法	好ましい基質
(R)-6-ヒト <sup>°</sup> ロキシニコチンオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.5.3.6	(R)-6-ヒト <sup>°</sup> ロキシニコチン
(S)-2-ヒト <sup>°</sup> ロキシ酸オキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.15	(S)-2-ヒト <sup>°</sup> ロキシ酸
(S)-6-ヒト <sup>°</sup> ロキシニコチンオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.5.3.5	(S)-6-ヒト <sup>°</sup> ロキシニコチン
3-aci-ニトロブ <sup>°</sup> ロバ <sup>°</sup> ノアトオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.7.3.5	3-aci-ニトロブ <sup>°</sup> ロバ <sup>°</sup> ノアト
3-ヒト <sup>°</sup> ロキシアントラニレートオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.10.3.5	3-ヒト <sup>°</sup> ロキシアントラニレート
4-ヒト <sup>°</sup> ロキシマンテ <sup>°</sup> ラートオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.19	(S)-2-ヒト <sup>°</sup> ロキシ-2-(4-ヒト <sup>°</sup> ロキシフェニル) アセテート
6-ヒト <sup>°</sup> ロキシニコチネートヒト <sup>°</sup> ロゲ <sup>°</sup> ナーゼ <sup>°</sup>	EC 1.17.3.3	6-ヒト <sup>°</sup> ロキシニコチネート
アブ <sup>°</sup> シシアルテ <sup>°</sup> ヒト <sup>°</sup> オキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.2.3.14	アブ <sup>°</sup> シシアルテ <sup>°</sup> ヒト <sup>°</sup>
アシル-CoA オキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.3.3.6	アシル-CoA
アルコールオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.13	1 級アルコール
アルテ <sup>°</sup> ヒト <sup>°</sup> オキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.2.3.1	アルテ <sup>°</sup> ヒト <sup>°</sup>
アミノオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>		
アミノオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup> (銅含有)	EC 1.4.3.6	1 級モノアミン、ジ <sup>°</sup> アミンおよびヒスタミン
アミノオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup> (フラビ <sup>°</sup> ン含有)	EC 1.4.3.4	1 級アミン
アリールアルコールオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.7	芳香族 1 級アルコール (2-ナフチル)メタノール 3-メトキシヘ <sup>°</sup> ンジ <sup>°</sup> ルアルコール
アリールアルテ <sup>°</sup> ヒト <sup>°</sup> オキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.2.3.9	芳香族アルテ <sup>°</sup> ヒト <sup>°</sup>
カテコールオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.14	カテコール
コレステロールオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.6	コレステロール
コリンオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.17	コリン
コルハ <sup>°</sup> ミンオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.21.3.2	コルハ <sup>°</sup> ミン
シクロヘキシルアミノオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.4.3.12	シクロヘキシルアミン
シトクロム c オキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.9.3.1	
D-アミノ酸オキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.4.3.3	D-アミノ酸
D-アラビ <sup>°</sup> ノノ-1,4-ラクトンオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.37	D-アラビ <sup>°</sup> ノノ-1,4-ラクトン
アラビ <sup>°</sup> ノノ-1,4-ラクトンオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.37	D-アラビ <sup>°</sup> ノノ-1,4-ラクトン
D-アスパ <sup>°</sup> ルテートオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.4.3.1	D-アスパ <sup>°</sup> ルテート
D-グ <sup>°</sup> ルタメートオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.4.3.7	D-グ <sup>°</sup> ルタメート
D-グ <sup>°</sup> ルタメート(D-アスパ <sup>°</sup> ルテート)オキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.4.3.15	D-グ <sup>°</sup> ルタメート
ジ <sup>°</sup> ヒト <sup>°</sup> ロベ <sup>°</sup> ンソ <sup>°</sup> フェナントリジ <sup>°</sup> ンオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.5.3.12	ジ <sup>°</sup> ヒト <sup>°</sup> ロサンキ <sup>°</sup> ナリン
ジ <sup>°</sup> ヒト <sup>°</sup> ロオロテートオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.3.3.1	(S)-ジ <sup>°</sup> ヒト <sup>°</sup> ロオロテート
ジ <sup>°</sup> ヒト <sup>°</sup> ロウラシルオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.3.3.7	5,6-ジ <sup>°</sup> ヒト <sup>°</sup> ロウラシル
ジ <sup>°</sup> メチルグ <sup>°</sup> リシンオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.5.3.10	N,N-ジ <sup>°</sup> メチルグ <sup>°</sup> リシン
D-マンニトールオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.40	マンニトール
エグジ <sup>°</sup> ソンオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.16	エグジ <sup>°</sup> ソン
エタノールアミンオキシタ <sup>°</sup> ーゼ <sup>°</sup>	EC 1.4.3.8	エタノールアミン

10

20

30

40

カ <sup>ラ</sup> クトースオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.1.3.9	D-カ <sup>ラ</sup> クトース
ク <sup>ル</sup> コースオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.1.3.4	$\beta$ -D-ク <sup>ル</sup> コース
ク <sup>ル</sup> タチオンオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.8.3.3	ク <sup>ル</sup> タチオン
ク <sup>ル</sup> リセロール-3-ホスフェートオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.1.3.21	sn-ク <sup>ル</sup> リセロール 3-ホスフェート
ク <sup>リ</sup> シンオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.4.3.19	ク <sup>リ</sup> シン
ク <sup>リ</sup> オキシラートオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.2.3.5	ク <sup>リ</sup> オキシラート
ヘキソースオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.1.3.5	D-ク <sup>ル</sup> コース D-カ <sup>ラ</sup> クトース D-マンノース マルトース ラクトース セロビ <sup>オ</sup> ース
ヒト <sup>ロ</sup> キシフィタネートオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.1.3.27	L-2-ヒト <sup>ロ</sup> キシフィタネート
イント <sup>ール</sup> -3-アセトアルデ <sup>ヒド</sup> オキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.2.3.7	(イント <sup>ール</sup> -3-イル)アセトアルデ <sup>ヒド</sup>
乳酸オキシタ <sup>ーゼ</sup>		乳酸
L-アミノ酸オキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.4.3.2	L-アミノ酸
L-アスパ <sup>ル</sup> テートオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.4.3.16	L-アスパ <sup>ル</sup> テート
L-カ <sup>ラ</sup> クトラクトンオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.3.3.12	L-カ <sup>ラ</sup> クトノ-1, 4-ラクトン
L-ク <sup>ル</sup> タメートオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.4.3.11	L-ク <sup>ル</sup> タメート
L-ク <sup>ロ</sup> ノラクトンオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.1.3.8	L-ク <sup>ロ</sup> ノ-1, 4-ラクトン
L-リジ <sup>ン</sup> 6-オキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.4.3.20	L-リジ <sup>ン</sup>
L-リジ <sup>ン</sup> オキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.4.3.14	L-リジ <sup>ン</sup>
長鎖アルコールオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.1.3.20	長鎖アルコール
L-ヒ <sup>ペ</sup> コラートオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.5.3.7	L-ヒ <sup>ペ</sup> コラート
L-ソルホ <sup>ス</sup> オキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.1.3.11	L-ソルホ <sup>ス</sup>
マレートオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.1.3.3	(S)-マレート
メタンチオールオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.8.3.4	メタンチオール
モノアミノ酸オキシタ <sup>ーゼ</sup>		
N6-メチル-リジ <sup>ン</sup> オキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.5.3.4	6-N-メチル-L-リジ <sup>ン</sup>
N-アシルヘキサミンオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.1.3.29	N-アセチル-D-ク <sup>ル</sup> コサミン N-ク <sup>リ</sup> コリク <sup>ル</sup> コサミン N-アセチルカ <sup>ラ</sup> クトサミン N-アセチルマンノサミン
NAD(P)H オキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.6.3.1	NAD(P)H
ニトロアルカンオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.7.3.1	ニトロアルカン
N-メチル-L-アミノ酸オキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.5.3.2	N-メチル-L-アミノ酸
ヌクレオシト <sup>ス</sup> オキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.1.3.39	アデ <sup>ン</sup> ノシン
オキサラートオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.2.3.4	オキサラート
ホ <sup>リ</sup> アミンオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.5.3.11	1-N-アセチルス <sup>ペ</sup> ルミン
ホ <sup>リ</sup> フェノールオキシタ <sup>ーゼ</sup>	EC 1.14.18.1	

10

20

30

40

ホ <sup>°</sup> リビ <sup>°</sup> ニルアルコールオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.30	ホ <sup>°</sup> リビ <sup>°</sup> ニルアルコール
ブレニルシステインオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.8.3.5	S-ブレニル-L-システイン
タンハ <sup>°</sup> ク質-リジン6-オキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.4.3.13	ヘ <sup>°</sup> ブ <sup>°</sup> チン <sup>°</sup> ル-L-リジ <sup>°</sup> リル <sup>°</sup> ヘ <sup>°</sup> ブ <sup>°</sup> チト <sup>°</sup>
プトレシンオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.4.3.10	ブ <sup>°</sup> タン-1,4-ジ <sup>°</sup> アミン
ヒ <sup>°</sup> ラノースオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.10	D-グ <sup>°</sup> ルコース D-キシロース L-ソルボ <sup>°</sup> ース D-グ <sup>°</sup> ルコノ-1,5-ラクトン
ヒ <sup>°</sup> リト <sup>°</sup> キサール5'-ホスフェートシク <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.4.3.5	ヒ <sup>°</sup> リト <sup>°</sup> キサミン5'-ホスフェート
ヒ <sup>°</sup> リト <sup>°</sup> キシ <sup>°</sup> ン4-オキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.12	ヒ <sup>°</sup> リト <sup>°</sup> キシ <sup>°</sup> ン
ヒ <sup>°</sup> ロキノリンキノニンシク <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.3.3.11	6-(2-アミノ-2-カルボ <sup>°</sup> キシエチル)-7,8-ジ <sup>°</sup> オキソ-1,2,3,4,5,6,7,8-オクタヒト <sup>°</sup> ロキノリン-2,4-ジ <sup>°</sup> カルボ <sup>°</sup> キシラート
ヒ <sup>°</sup> ルヘ <sup>°</sup> ートオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.2.3.3	ヒ <sup>°</sup> ルヘ <sup>°</sup> ート
ヒ <sup>°</sup> ルヘ <sup>°</sup> ートオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup> (CoA-アセチル化)	EC 1.2.3.6	ヒ <sup>°</sup> ルヘ <sup>°</sup> ート
レチクリンオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.21.3.3	レチクリン
レチナルオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.2.3.11	レチナル
リファマイシンBオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.10.3.6	リファマイシンB
サルコシンオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.5.3.1	サルコシン
2級アルコールオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.18	2級アルコール
サルファイトオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.8.3.1	サルファイト
スーパ <sup>°</sup> ーオキシト <sup>°</sup> シ <sup>°</sup> ムスターセ <sup>°</sup>	EC 1.15.1.1	スーパ <sup>°</sup> ーオキシト <sup>°</sup>
スーパ <sup>°</sup> ーオキシト <sup>°</sup> レタ <sup>°</sup> ク <sup>°</sup> ターセ <sup>°</sup>	EC 1.15.1.2	スーパ <sup>°</sup> ーオキシト <sup>°</sup>
テトラヒト <sup>°</sup> ロヘ <sup>°</sup> ルヘ <sup>°</sup> リンオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.3.3.8	(S)-テトラヒト <sup>°</sup> ロヘ <sup>°</sup> ルヘ <sup>°</sup> リン
チアミンオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.23	チアミン
トリプ <sup>°</sup> トファン <sup>°</sup> α,β-オキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.3.3.10	L-トリプ <sup>°</sup> トファン
ウレートオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup> (ウリカーセ <sup>°</sup> 、尿酸オキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup> )	EC 1.7.3.3	尿酸
ハ <sup>°</sup> ニルアルコールオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.38	ハ <sup>°</sup> ニルアルコール
キサンチンオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.17.3.2	キサンチン
キシリトールオキシタ <sup>°</sup> ーセ <sup>°</sup>	EC 1.1.3.41	キシリトール

10

20

30

## 【0072】

## e) 自己抗体

40

本明細書で使用する場合、「自己抗体」という句は、抗体が産生された対象において内因的に産生された、検体に結合する抗体を指す。

## 【0073】

## f) n'個(n-抗体:抗原)免疫複合体

本明細書で使用する場合、「n'個(n-抗体:抗原)免疫複合体」は、n個の抗体Aおよびn'個の心筋細胞抗原の組合せを指し、該抗体および抗原は、各抗体の少なくとも1つの抗原結合部位とn'個の心筋細胞抗原a<sup>n'</sup>それぞれの少なくとも1つのエピトープとの間の特異性非共有相互作用によって結合され、nは1から10の整数であり、n'は2から10の整数である。ここに示すように、表記形式(A<sup>1</sup>\_a<sup>1</sup>)(A<sup>2</sup>\_a<sup>1</sup>)...(A<sup>n</sup>\_a<sup>1</sup>)(a<sup>1</sup>), (A<sup>1</sup>\_a<sup>2</sup>)(A<sup>2</sup>\_a<sup>2</sup>)...(A<sup>n</sup>\_a<sup>2</sup>)(a<sup>2</sup>), ... (A<sup>1</sup>\_a<sup>n</sup>)

50

$(A^{2_a^n}) \dots (A^{n_a^n}) (a^n)$  は、2個以上の抗体：抗原免疫複合体を示すものである。例えば  $(A^{1_a^1}) (A^{2_a^2}) \dots (A^{n_a^1}) (a^1)$  は第1の抗体：抗原免疫複合体であり、 $A^{1_a^1}$  は抗原  $a^1$  上の1個のエピトープに結合する第1の抗体であり、場合により  $A^{2_a^1}$  は抗原  $a^1$  上の第2のエピトープに結合する第2の抗体であり、抗原  $a^1$  の  $n$  番目のエピトープに結合する  $n$  番目の抗体である  $A^{n_a^1}$  まで同様であり、抗原  $a^1$  は心筋トロポニンIである；および  $(A^{1_a^2}) (A^{2_a^2}) \dots (A^{n_a^2}) (a^2)$  は第2の抗体：抗原免疫複合体であり、 $A^{1_a^2}$  は抗原  $a^2$  上の1個のエピトープに結合する第1の抗体であり、場合により  $A^{2_a^2}$  は抗原  $a^2$  上の第2のエピトープに結合する第2の抗体であり、抗原  $a^2$  上の  $n$  番目のエピトープに結合する  $n$  番目の抗体である  $A^{n_a^2}$  まで同様であり、抗原  $a^2$  は心筋トロポニンTである。

10

【0074】

g)  $n'$  個の  $(n+n')$  抗体：抗原測定可能集合体

本明細書で使用する場合、「 $n'$  個の  $(n+n')$  抗体：抗原測定可能集合体」という用語は、 $n'$  個の  $(n+n')$  測定可能な抗体：抗原免疫複合体を形成するための、 $n$  個の抗体 A、 $n'$  個の抗体 B および  $n'$  個の心筋細胞抗原の組合せを指し、 $n$  および  $n'$  は独立して、1から10の整数であり、 $n$  は2から10の整数であり、抗体 A および B は心筋細胞抗原の  $(n+n')$  個の異なるエピトープに結合する。抗体および心筋細胞抗原の組合せは、検出および定量することができる光学、電気、または状態変化シグナルを産生し、このため組合せは「測定可能」である。ここに示すように、表記形式  $((A^{1_a^1}) (A^{2_a^1}) \dots (A^{n_a^1})) ((B^{1_a^1}) (B^{2_a^1}) \dots (B^{n_a^1})) (a^1)$  ,  $((A^{1_a^2}) (A^{2_a^2}) \dots (A^{n_a^2})) ((B^{1_a^2}) (B^{2_a^2}) \dots (B^{n_a^2})) (a^2)$  , ...  $((A^{1_a^{n'}}) (A^{2_a^{n'}}) \dots (A^{n_a^{n'}})) ((B^{1_a^{n'}}) (B^{2_a^{n'}}) \dots (B^{n_a^{n'}})) (a^{n'})$  は、2個以上の抗体：抗原測定可能集合体を示すものである。例えば  $((A^{1_a^1}) (A^{2_a^1}) \dots (A^{n_a^1})) ((B^{1_a^1}) (B^{2_a^1}) \dots (B^{n_a^1})) (a^1)$  は、第1の測定可能集合体であり、式中、 $A^{1_a^1}$  は抗原  $a^1$  上の1個のエピトープに結合する第1の抗体であり、および場合により  $A^{2_a^1}$  は抗原  $a^1$  上の第2のエピトープに結合する第2の抗体であり、抗原  $a^1$  上の  $n$  番目のエピトープに結合する  $n$  番目の抗体である  $A^{n_a^1}$  まで同様であり、ならびに  $B^{1_a^1}$  は抗原  $a^1$  上の1個のエピトープに結合する第1の抗体であり、および場合により  $B^{2_a^1}$  は抗原  $a^1$  上の第2のエピトープに結合する第2の抗体であり、抗原  $a^1$  上の  $n$  番目のエピトープに結合する  $n$  番目の抗体である  $B^{n_a^1}$  まで同様であり、抗原  $a^1$  は心筋トロポニンIである；ならびに  $((A^{1_a^2}) (A^{2_a^2}) \dots (A^{n_a^2})) ((B^{1_a^2}) (B^{2_a^2}) \dots (B^{n_a^2})) (a^2)$  は第2の測定可能集合体であり、式中、 $A^{1_a^2}$  は抗原  $a^2$  上の1個のエピトープに結合する第1の抗体であり、場合により  $A^{2_a^2}$  は抗原  $a^2$  上の第2のエピトープに結合する第2の抗体であり、抗原  $a^2$  上の  $n$  番目のエピトープに結合する  $n$  番目の抗体である  $A^{n_a^2}$  まで同様であり、ならびに  $B^{1_a^2}$  は抗原  $a^2$  上の1個のエピトープに結合する第1の抗体であり、場合により  $B^{2_a^2}$  は抗原  $a^2$  上の第2のエピトープに結合する第2の抗体であり、抗原  $a^2$  上の  $n$  番目のエピトープに結合する  $n$  番目の抗体である  $B^{n_a^2}$  まで同様であり、抗原  $a^2$  は心筋トロポニンTである。

20

30

40

【0075】

h) 検出可能な標識

本明細書で使用する場合、「検出可能な標識」という用語は、基部分に結合された1個または複数の分子の状況の変化の光学、電気または他の物理的指標を介して測定可能信号を発生するいずれの基部分も指す。このような物理的インジケータは、分光的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電磁的、放射化学的および化学的手段、例えばこれに限定されるわけではないが、蛍光、化学蛍光、化学発光、などを包含する。好ましい検出可能な標識は、アクリジニウム化合物、例えば本明細書の下のB節で述べるような式Iによる構造を有するアクリジニウム-9-カルボキシミド、および本明細書の下のB節でまた述べるような式IIによる構造を有するアクリジニウム-9-カルボキシラートアリアルエステ

50

ルを含む。

【0076】

i) 対象

本明細書で使用する場合、「対象」および「患者」という用語は、対象がいかなる形態であれ治療を過去または現在受けているかどうかにかかわらず、互換的に使用される。本明細書で使用する場合、「1つまたは複数の対象」という用語は、これに限定されるわけではないが、哺乳動物（例えばウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラットおよびマウス、非ヒト霊長動物（例えばサル、例えばカニクイザル、チンパンジーなど）およびヒト）を含むいずれの脊椎動物も指す。好ましくは、対象はヒトである。

10

【0077】

j) 試験試料

本明細書で使用する場合、「試験試料」という用語は概して、興味のある検体について試験され、および/または興味のある検体を含有することが疑われ、興味のある1つまたは複数の検体に対する自己抗体も含み得る生体材料を指す。生体材料は、いずれの生体源からも由来し得るが、好ましくは心筋細胞抗原を含有していると思われる生体液である。生体材料の例は、これに限定されるわけではないが、便、全血、血清、血漿、赤血球、血小板、間質液、唾液、眼内レンズ液、脳脊髄液、汗、尿、腹水、粘液、鼻汁、痰、滑液、腹膜水、腔液、月経、羊水、精液、汚物などを含む。試験試料は、生体源から得たまま直接または試料の特徴を調節するための前処置の後に使用され得る。例えばこのような前処置は、血液から血漿の調製、粘液の希釈などを含み得る。前処置の方法は、濾過、沈殿、希釈、蒸留、混合、濃縮、妨害構成要素の不活性化、試薬の添加、溶解なども含み得る。前処置のこのような方法が試験試料に関して用いられる場合、このような前処置方法は、未処置試験試料（例えば即ちいずれのこのような前処置方法も受けていない試験試料）中の濃度に比例する濃度で試験試料中に残存するようになっている。

20

【0078】

B. 試験試料中の心筋細胞抗原を検出するためのイムノアッセイ

本開示は、心筋細胞抗原の免疫検出を妨害し得る他の物質を含有し得る試験試料での使用のために特に有用な試験試料中の心筋細胞抗原を検出するためのイムノアッセイに関する。このような物質は、例えばヘテロ親和性内因性抗体、および心筋細胞抗原に対する自己抗体を含む。本開示のイムノアッセイは、対象から試験試料を得ること、および次に、試料中に存在し得るいずれのこのような物質の存在も補償しながら、免疫検出を使用して心筋細胞抗原の存在を検出することを包含する。このことは一部は、 $n$  個の抗体：抗原免疫複合体  $(A^1_a^1)$   $(A^2_a^1)$  ...  $(A^n_a^1)$   $(a^1)$  ,  $(A^1_a^2)$   $(A^2_a^2)$  ...  $(A^n_a^2)$   $(a^2)$  , ...  $(A^1_a^n)$   $(A^2_a^n)$  ...  $(A^n_a^n)$   $(a^n)$  ) を形成するための  $n$  個の心筋細胞抗原  $(a^n)$  に結合する  $n$  個の抗体  $(A^n_a^n)$  ) および  $n$  個の抗体：抗原免疫複合体  $( (A^1_a^1)$   $(A^2_a^1)$  ...  $(A^n_a^1)$  )  $( (B^1_a^1)$   $(B^2_a^1)$  ...  $(B^n_a^1)$  )  $(a^1)$  ,  $( (A^1_a^2)$   $(A^2_a^2)$  ...  $(A^n_a^2)$  )  $( (B^1_a^2)$   $(B^2_a^2)$  ...  $(B^n_a^2)$  )  $(a^2)$  , ...  $( (A^1_a^n)$   $(A^2_a^n)$  ...  $(A^n_a^n)$  )  $( (B^1_a^n)$   $(B^2_a^n)$  ...  $(B^n_a^n)$  )  $(a^n)$  ) の測定可能集合体を形成するための  $n$  個の心筋細胞抗原  $(a^n)$  に結合する  $n$  個の抗体  $(B^n_a^n)$  ) を提供することによって達成され、式中、各心筋細胞抗原  $a^n$  は独立して少なくとも2個のエピトープを備え、抗体  $A^n_a^n$  および  $B^n_a^n$  は抗原  $a^n$  上の  $n$  個の異なるエピトープに結合し、 $n$  は1から10の整数である。言い換えれば、 $n$  個の抗体  $A^n_a^n$  はそれぞれ心筋細胞抗原  $a^n$  上の少なくとも1個のエピトープに結合して、 $n$  個の抗体  $B^n_a^n$  はそれぞれ、 $n$  個の抗体  $A^n_a^n$  のいずれかが結合するエピトープのいずれとも異なる心筋細胞抗原  $a^n$  上の少なくとも1個のエピトープに結合する。抗体  $B^n_a^n$  は例えば、検出可能な標識で標識された「検出抗体」であることができる。抗体は、固体支持体であることができる固相上に提供することができる、固体支持体上に例えば抗体  $A^n_a^n$  または  $B^n_a^n$  が固定される。

30

40

50

## 【0079】

## イムノアッセイ方法

本開示のイムノアッセイ方法は、多種多様の形式のいずれでも行うことができる。イムノアッセイの総説は、これの全体が参照により本明細書に組み入れられている、METHODS IN CELL BIOLOGY VOLUME 37: ANTIBODIES IN CELL BIOLOGY, Asai, ed. Academic Press, Inc. New York (1993)、およびBASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY 7TH EDITION, Stites & Terr, eds. (1991)で入手できる。代表的な異種サンドイッチイムノアッセイは(固体支持体としての)固相を用い、この上に抗原である興味のある検体上の少なくとも1個のエピトープと反応性の第1の(捕捉)抗体が結合される。第2の(検出)抗体も、抗原である興味のある検体上の少なくとも1個のエピトープと反応性である。第2の抗体は、検出抗体が捕捉検体に結合した後に測定されるシグナルを提供する検出可能な標識にコンジュゲートされ得る。検体を含有する試験試料が第1の抗体と接触するとき、第1の抗体は興味のある検体を捕捉する。興味のある検体を第2の抗体に接触させると、第1の抗体、興味のある検体および第2の抗体から成る免疫検出複合体の形成がもたらされ、該複合体は固相に結合される。第2の(検出)抗体によって発生したシグナルは、免疫検出複合体の形成速度( $k_1$ )対免疫検出複合体の解離速度( $k_2$ )によって決定されるような、興味のある検体の濃度に比例する。ヘテロ親和性内因性抗体および任意の自己抗体は、存在する場合興味のある検体上でこれらが結合する正確な箇所について予測不可能であり、第1のおよび/または第2の抗体の結合を、このように得られたシグナルを実質的に妨害することが可能である。

10

20

## 【0080】

公知のイムノアッセイとは対照的に、本開示のイムノアッセイは、心筋細胞抗原である、興味のある少なくとも2つの検体の免疫検出結果を組み合わせることに基づいている。心筋細胞抗原aは、抗原のインピボレベルの上昇と心筋細胞損傷との間に関連が確立されている任意の抗原であることができる。公知のこのような抗原は例えば、心筋トロポニンI、心筋トロポニンT、クレアチンホスホキナーゼMB(CKMB)、ミオグロビン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、B型ナトリウム利尿ペプチド(pro-BNP、NT-proBNPおよびhBNP(1-32)を含む。)、心脂脂肪酸結合タンパク質(H-FABP)、胎盤成長因子(PLGF)およびインターロイキン-6(IL-6)を含む。イムノアッセイの例示的な実施形態において、2つの心筋細胞抗原が使用され、これは例えばトロポニンI(cTnI)および心筋トロポニンT(cTnT)である。

30

## 【0081】

また代表的なイムノアッセイ形式と対照的に、および本明細書の別の箇所に記載するように、本開示の例示的な実施形態によるイムノアッセイは、多重抗体 $A^{n_a^n}$ および多重抗体 $B^{n_a^n}$ を用い、各抗体 $A^{n_a^n}$ は、抗体 $B^{n_a^n}$ が結合するエピトープのいずれとも異なる心筋細胞抗原 $a^n$ 上の少なくとも1個のエピトープに結合する。多重抗体 $A^{n_a^n}$ および $B^{n_a^n}$ の使用により( $A^{n_a^n}$ および $B^{n_a^n}$ は、いずれかの心筋細胞抗原 $a^n$ 上の同じエピトープに対する結合特異性の欠如によって区別される。)、検出の特異性が改善され、シグナルの品質が、ゆえに心筋細胞損傷に関するこの精度が改善され、任意のヘテロ親和性内因性抗体および/または自己抗体の存在の存在による非特異性結合からのシグナル中のノイズも減少される。抗体 $B^{n_a^n}$ によって発生したシグナルは、 $n$ 個の心筋細胞抗原 $a^n$ の合せた濃度になお比例しているが、新たな免疫検出複合体の解離速度に対する新たな免疫検出複合体： $((A^{1_a^1})(A^{2_a^1})\dots(A^{n_a^1}))((B^{1_a^1})(B^{2_a^1})\dots(B^{n_a^1}))(a^1)$ 、 $((A^{1_a^2})(A^{2_a^2})\dots(A^{n_a^2}))((B^{1_a^2})(B^{2_a^2})\dots(B^{n_a^2}))(a^2)$ 、 $\dots((A^{1_a^n})(A^{2_a^n})\dots(A^{n_a^n}))((B^{1_a^n})(B^{2_a^n})\dots(B^{n_a^n}))(a^n)$ の形成速度によって決定される。このため1個を超える抗体 $A^{n_a^n}$ および1個を超える抗体 $B^{n_a^n}$ の使用により、特異性結合

40

50

から各心筋細胞抗原  $a^n$  へのシグナルを上昇させることによって、イムノアッセイの精度が改善される。該方法はヒト化免疫試薬の使用も提供し、これにより試験試料中に存在し得るヘテロ親和性抗体からのいずれの干渉も克服される。さらに抗ヒトIgG抗体は、各心筋細胞抗原  $a^n$  に対する内因性自己抗体を修正するために抗体  $B^n_{a^n}$  に使用することができる。さらにヒト化免疫試薬と併せて使用すると、抗ヒトIgGは「万能」シグナル発生物質を提供する。誘導体化心筋細胞抗原、例えば誘導体化心筋トロポニンIまたは誘導体化心筋トロポニンTを使用して、アッセイ標準化に好適な可溶性試薬を提供することができる。例えば心筋細胞抗原は、ポリエチレングリコールによって好適に誘導体化することができる。

【0082】

このため一実施形態により、少なくとも2個の心筋細胞抗原心筋細胞抗原  $a^n$  の存在を検出するための本開示のイムノアッセイは、固相を用いることができる異種アッセイであり、固相は固体支持体であることができる。イムノアッセイは例えば1個以上の抗体 ( $A^1_{a^1}$ ), ( $A^2_{a^1}$ ), ... ( $A^n_{a^n}$ ) を固相に固定することによって行うことができ、ここで各抗体  $A^n_{a^n}$  は、心筋細胞抗原  $a^n$  上の少なくとも1つのエピトープと反応性である外因性抗体である。各抗体  $A^n_{a^n}$  の  $a^n$  への特異性結合に十分な条件下で、心筋細胞抗原 ( $a^1$ ), ( $a^2$ ), ... ( $a^n$ ) を含有することが疑われ、他の干渉物質を含有し得るまたは含有し得ない試験試料は抗体 ( $A^1_{a^1}$ ), ( $A^2_{a^1}$ ), ... ( $A^n_{a^n}$ ) と接触して、このため免疫複合体 ( $A^1_{a^1}$ ) ( $A^2_{a^1}$ ) ... ( $A^n_{a^n}$ ) ( $a^1$ ), ( $A^1_{a^2}$ ) ( $A^2_{a^2}$ ) ... ( $A^n_{a^2}$ ) ( $a^2$ ), ... ( $A^1_{a^n}$ ) ( $A^2_{a^n}$ ) ... ( $A^n_{a^n}$ ) ( $a^n$ ) を形成する。免疫複合体 ( $A^1_{a^1}$ ) ( $A^2_{a^1}$ ) ... ( $A^n_{a^1}$ ) ( $a^1$ ), ( $A^1_{a^2}$ ) ( $A^2_{a^2}$ ) ... ( $A^n_{a^2}$ ) ( $a^2$ ), ... ( $A^1_{a^n}$ ) ( $A^2_{a^n}$ ) ... ( $A^n_{a^n}$ ) ( $a^n$ ) は抗体 ( $B^1_{a^1}$ ), ( $B^2_{a^1}$ ), ... ( $B^n_{a^n}$ ) と接触して、 $n$  個の抗体：抗原免疫複合体の測定可能集合体 ( $(A^1_{a^1})(A^2_{a^1}) \dots (A^n_{a^1})(B^1_{a^1})(B^2_{a^1}) \dots (B^n_{a^1})(a^1)$ ), ( $(A^1_{a^2})(A^2_{a^2}) \dots (A^n_{a^2})(B^1_{a^2})(B^2_{a^2}) \dots (B^n_{a^2})(a^2)$ ), ... ( $(A^1_{a^n})(A^2_{a^n}) \dots (A^n_{a^n})(B^1_{a^n})(B^2_{a^n}) \dots (B^n_{a^n})(a^n)$ ) を形成し、ここで各心筋細胞抗原  $a^n$  は独立して少なくとも2個のエピトープを備え、抗体  $A^n_{a^n}$  および  $B^n_{a^n}$  は抗原  $a^n$  上の  $n$  個の異なるエピトープに結合し、 $n$  は2から10の整数である。本ステップは、試験試料中に存在する心筋細胞抗原  $a^n$  のいずれかへの抗体  $B^n_{a^n}$  の特異性結合に十分な条件下で行われる。

【0083】

「測定可能集合体」とは、物理的検出および/または定量に感受性であるシグナルを発生する分子の配置を意味する。例えばある実施形態において、抗体  $B^n_{a^n}$  は検出可能な標識によって標識され得る。検出手法に応じて、集合体の光学的、電気的、または状態変化シグナルを測定する。さらに抗ヒトIgG抗体を抗体の検出に使用することができ、これにより心筋細胞抗原  $a^n$  に対する内因性自己抗体が修正される。

【0084】

イムノアッセイは例証目的で一連のステップを含めて上に記載されているが、試験試料は抗体Aおよび検出抗体Bと同時にまたは順次、任意の順序で接触され得る。

【0085】

本開示によるサンドイッチイムノアッセイの1つの形式において、検出することは、 $n$  個の抗体：抗原免疫複合体 ( $(A^1_{a^1})(A^2_{a^1}) \dots (A^n_{a^1})(B^1_{a^1})(B^2_{a^1}) \dots (B^n_{a^1})(a^1)$ ), ( $(A^1_{a^2})(A^2_{a^2}) \dots (A^n_{a^2})(B^1_{a^2})(B^2_{a^2}) \dots (B^n_{a^2})(a^2)$ ), ... ( $(A^1_{a^n})(A^2_{a^n}) \dots (A^n_{a^n})(B^1_{a^n})(B^2_{a^n}) \dots (B^n_{a^n})(a^n)$ ) である固相固定免疫検出複合体からシグナルを検出することを含む。一実施形態において、免疫検出複合体は通例洗浄によって固相から分離され、結合標識からのシグナルが検出される。本開示によるサンドイッチイムノアッセイの別の形式において、免疫検

10

20

30

40

50

出複合体は固相固定複合体として残存し、次に検出される。

【0086】

抗体

本開示によるイムノアッセイにおいて、各抗体  $A^{n_a^n}$  は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、親和性成熟抗体または抗体フラグメントであることができる。同様に各抗体  $B^{n_a^n}$  は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、親和性成熟抗体または抗体フラグメントであることができる。

【0087】

モノクローナル抗体は検体/抗原に対して高度に特異性であるが、ポリクローナル抗体は好ましくは、可能な限り多くの検体/抗原を固定するために抗体  $A^{n_a^n}$  として使用することができる。検体/抗原に対して本質的により高い結合特異性を有するモノクローナル抗体は次に、各抗体  $B^{n_a^n}$  に使用され得る。いずれにせよ抗体  $A^{n_a^n}$  および  $B^{n_a^n}$  は各心筋細胞抗原  $a^n$  上の重複していないエピトープを認識し、例示的な実施形態においては、それぞれ他方の結合に干渉せずに、各心筋細胞抗原上の異なるエピトープに同時に結合することができる。

10

【0088】

ポリクローナル抗体は、免疫原を好適な非ヒト哺乳動物（例えばマウスまたはウサギ）に注射（例えば皮下または筋肉内注射）することによって産生される。概して、免疫原は標的抗原に対して比較的高い親和性を有する抗体の高い力価の産生を誘発すべきである。

【0089】

所望ならば、心筋細胞抗原は、当分野で周知であるコンジュゲーション技法によって担体タンパク質にコンジュゲートされ得る。普通に使用される担体は、キーホール・リンペット・ヘモシアニン (KLH)、チログロブリン、ウシ血清アルブミン (BSA) および破傷風トキソイドを含む。次にコンジュゲートは、動物を免疫化するために使用される。

20

【0090】

次に、動物から採取された血液試料より抗体が得られる。ポリクローナル抗体を産生するために使用する技法は、文献に広範囲にわたって記載されている（例えば *Method s of Enzymology*, 「*Production of Antisera With Small Doses of Immunogen: Multiple Intradermal Injections*」, Langone, et al. eds. (Acad. Press, 1981) を参照のこと）。動物によって産生されたポリクローナル抗体は、標的抗原が結合されているマトリックスへの結合およびこれからの溶離によってさらに精製することができる。当業者には、ポリクローナルならびにモノクローナル抗体の精製および/または濃縮のための、免疫学分野で一般的な各種の技法が公知となる（例えば Coligan, et al. (1991) *Unit 9, Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience を参照のこと）。

30

【0091】

多くの用途でモノクローナル抗体 (mAb) が好ましい。ハイブリドーマ分泌 mAb の産生に使用される一般的な方法は周知である (Kohler and Milstein (1975) *Nature*, 256:495)。簡潔には、Kohler および Milstein によって記載されるように、該技法は、黒色腫、奇形癌または子宮頸癌、神経膠腫または肺癌のいずれかを有する別々の癌患者 5 名の局所流入リンパ節からリンパ球を単離すること（試料を外科標本より得た場合）、細胞をプールすること、および細胞を SHFP-1 と融合することを伴う。ハイブリドーマを癌株化細胞に結合した抗体の産生についてスクリーニングした。mAb 間の特異性の確認は、興味のある mAb の素反応パターンを決定するための日常的なスクリーニング技法（例えば酵素結合免疫吸着測定法、即ち「ELISA」）を使用して達成することができる。

40

【0092】

本明細書で使用する場合、「抗体」という用語は、ファージ提示技術を使用して産生 /

50

選択することができる抗原結合抗体フラグメント、例えば単鎖抗体 (s c F v またはその他) を含む。細菌に感染するウイルス (バクテリオファージまたはファージ) の表面上で抗体フラグメントを発現する能力によって、例えば  $10^{10}$  個を超える非結合クローンのライブラリから単一の結合抗体フラグメントを単離することが可能となる。ファージ表面上で抗体フラグメントを発現するために (ファージ提示)、抗体フラグメント遺伝子をファージ表面タンパク質をコードする遺伝子 (例えば p I I I) 中に挿入すると、抗体フラグメント - p I I I 融合タンパク質がファージ表面に提示される (M c C a f f e r t y et al. (1990) Nature, 348: 552 - 554; H o o g e n b o m et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4133 - 4137)。

10

#### 【0093】

ファージ表面上の抗体フラグメントは機能性であるために、ファージ担持抗原結合抗体フラグメントを非結合ファージから抗原親和性クロマトグラフィーによって分離することができる (M c C a f f e r t y et al. (1990) Nature, 348: 552 - 554)。抗体フラグメントの親和性に応じて、1回の親和性選択で20倍から1,000,000倍の濃縮係数が得られる。しかし細菌に溶離ファージを感染させることにより、さらにファージを増大させて、もう1回選択させることができる。このようにして1回で1000倍の濃縮を、2回の選択で1,000,000倍にすることができる (M c C a f f e r t y et al. (1990) Nature, 348: 552 - 554)。このため濃縮が低いときでも (M a r k s et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581 - 597)、複数回の親和性選択によって、希少なファージの単離がもたらされる。抗原でのファージ抗体ライブラリの選択は濃縮を生じるため、わずか3から4回の選択の後に、大半のクローンは抗原を結合する。このため抗原への結合を分析するために、比較的少数の (数百の) クローンのみが必要である。

20

#### 【0094】

ヒト抗体は、事前の免疫化なしに、ファージ上での非常に大きく多様な V 遺伝子レパートリーを提示することによって産生することができる (M a r k s et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581 - 597)。一実施形態において、ヒト末梢血リンパ球に存在する天然 V H および V L レパートリーは、免疫化されていないドナーから P C R によって単離される。V 遺伝子レパートリーは P C R を使用してランダムに共にスプライスされて s c F v 遺伝子レパートリーを生成することができ、s c F v 遺伝子レパートリーをファージベクター中にクローニングして3000万個のファージ抗体のライブラリを生成することができる (I d .)。単一の「未変性」ファージ抗体ライブラリから、結合抗体フラグメントが、ハプテン、ポリサッカライドおよびタンパク質を含む17を超える異なる抗原に対して単離されている (M a r k s et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581 - 597; M a r k s et al. (1993) Bio/Technology. 10: 779 - 783; G r i f f i t h s et al. (1993) EMBO J. 12: 725 - 734; C l a c k s o n et al. (1991) Nature. 352: 624 - 628)。抗体はヒトチログロブリン、免疫グロブリン、腫瘍壊死因子および C E A を含む自己タンパク質に対して産生された (G r i f f i t h s et al. 12: 725 - 734)。抗体フラグメントは選択に使用される抗原に対して高度に特異性であり、1 n M から 100 n M の範囲の親和性を有する (M a r k s et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581 - 597; G r i f f i t h s et al. (1993) EMBO J. 12: 725 - 734)。より大きいファージ抗体ライブラリは、より大きい割合の抗原に対してより高い結合親和性を含むより多くの抗体の単離を生じる。

30

40

#### 【0095】

当業者がただちに認識するように、抗体は幾つかの商業サービス (例えば B e r k e l e y Antibody Laboratories, B e t h y l Laboratories, A n a w a, E u r o g e n e t e c など) のいずれかによって調製すること

50

ができる。

【0096】

固相

固相は抗体、例えば各抗体  $A^{n_a}$  もしくは各抗体  $B^{n_a}$ 、または各抗体  $A^{n_a}$  および各抗体  $B^{n_a}$  を結合するのに十分な表面親和性を有する任意の好適な材料であることができる。例示的な実施形態において、各  $A^{n_a}$  は固相に結合されている。固相は幾つかの形、例えば磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイプレート、キュベット、膜、足場分子、石英結晶、フィルム、濾紙、ディスクまたはチップのいずれかを取ることができる。有用な固相材料は：天然ポリマー系炭水化物およびこれの合成修飾、架橋または置換誘導体、例えば寒天、アガロース、架橋アルギン酸、置換および架橋グアーガム、とりわけ硝酸およびカルボン酸によるセルロースエステル、混合セルロースエステルおよびセルロースエーテル；窒素を含有する天然ポリマー、例えば架橋または修飾ゼラチンを含むタンパク質および誘導体；天然炭化水素ポリマー、例えばラテックスおよびゴム；合成ポリマー、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニルおよびこれの部分加水分解誘導体を含むビニルポリマー、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、重縮合体のコポリマーおよびターポリマー、例えばポリエステル、ポリアミドおよび他のポリマー、例えばポリウレタンまたはポリエポキシド；無機材料、例えば硫酸バリウム、硫酸カルシウム、炭酸カルシウムを含む、アルカリ土類金属およびマグネシウムの硫酸塩または炭酸塩、アルカリおよびアルカリ土類金属、アルミニウムおよびマグネシウムのケイ酸塩；ならびに酸化アルミニウムまたはケイ素または水和物、例えば粘土、アルミナ、タルク、カオリン、ゼオライト、シリカゲル、またはガラス（これらの材料は上のポリマー材料と共にフィルタとして使用され得る。）；および上のクラスの混合物またはコポリマー、例えば既存の天然ポリマー上で合成ポリマーの重合を開始することによって得たグラフトコポリマーを含む。これらの材料はすべて好適な形状、例えばフィルム、シート、管、微粒子、もしくはプレートで使用され得るか、またはこれらは適切な不活性担体、例えば紙、ガラス、プラスチックフィルム、布などにコーティング、結合もしくはラミネートされ得る。ニトロセルロースは、モノクローナル抗体を含む多種多様の試薬に対して優れた吸収および吸着品質を有する。ナイロンも同様の特徴を所有し、また好適である。

10

20

30

【0097】

または固相は、微小粒子を構成することができる。本開示で有用な微小粒子は、当業者が任意の好適な種類の微粒子材料から選択することができ、ポリスチレン、ポリメチルアクリレート、ポリプロピレン、ラテックス、ポリテトラフルオロエチレン、ポリアクリロニトリル、ポリカーボネート、または同様の材料で構成されるものを含む。さらに微小粒子は、磁場内での微小粒子の操作を容易にするために、磁性または常磁性微小粒子であることができる。例示的な実施形態において、微小粒子はカルボキシラート化磁性微小粒子である。

【0098】

微小粒子は、可溶性試薬および試験試料の混合物中に懸濁させることができるか、または支持体材料によって保持および固定することができる。後者の場合では、支持体材料の上または中の微小粒子は、支持体材料内の他の位置に実質的に移動することはできない。または微小粒子は、可溶性試薬および試験試料の混合物中の懸濁物から沈降または遠心分離によって分離することができる。微小粒子が磁性または常磁性であるとき、微小粒子は可溶性試薬および試験試料混合物中の懸濁物から磁場によって分離することができる。

40

【0099】

本開示の方法は、固相が微小粒子を含む自動化および半自動化システムを含む、微小粒子技術を利用するシステムでの使用に適合させることができる。このようなシステムは、公開された E P O App . Nos . E P 0 4 2 5 6 3 3 および E P 0 4 2 4 6 3 4 にそれぞれ相当する係属中の U . S . App . No . 4 2 5 , 6 5 1 および U . S . Pat . No . 5 , 0 8 9 , 4 2 4 ならびに U . S . Pat . No . 5 , 0 0 6 , 3 0 9 に記載さ

50

れたものを含む。

【0100】

特定の実施形態において、固相は1個以上の電極を含む。例えば抗体  $A^{n_a^n}$  は、例えば電極に直接または間接的に付着させることができる。一実施形態において、例えば抗体  $A^{n_a^n}$  は磁性または常磁性微小粒子に付着させることができ、微小粒子は次に磁石を使用して電極表面付近に配置される。1個以上の電極が固相として作用するシステムは、検出が電気化学相互作用に基づく場合に有用である。この種の例示的なシステムは、例えば U.S. Pat. No. 6,887,714 (2005年5月3日発行) に記載される。電気化学検出に関する基本的な方法は、さらに下で記載されている。

【0101】

抗体  $A^{n_a^n}$  または  $B^{n_a^n}$  は、抗体が疎水性力によって保持される吸着により固相に付着させることができる。または固相の表面は、抗体を支持体に共有結合させる化学的方法によって活性化することができる。

【0102】

固相の固有の電荷を変化または上昇させるために、帯電物質を固相上に直接コーティングすることができる。EP Publication No. 0326100 に相当する U.S. App. No. 150,278、および U.S. App. No. 375,029 (EP Publication No. 0406473) に記載された、固定可能な反応複合体を負に帯電したポリマーによって固定するためのイオン捕捉手順を本開示に従って用いて、高速溶液相免疫化学反応に影響を及ぼすことができる。このような手順では、固定可能な免疫複合体は、負に帯電したポリアニオン/免疫複合体と先に処理された正に帯電したマトリックスとの間のイオン性相互作用によって反応混合物の残りから分離されて、EPO Publication No. 0273,115 に相当する U.S. App. No. 921,979 に記載されているような、例えば化学発光システムを含む幾つかのシグナル発生システムのいずれかを使用することによって検出される。

【0103】

固相がケイ素またはガラスである場合、表面は概して、各抗体  $A^{n_a^n}$  または  $B^{n_a^n}$  を付着させる前に活性化させる必要がある。活性化シラン化合物、例えばトリエトキシアミノプロピルシラン (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. から入手可能である。)、トリエトキシビニルシラン (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.)、および (3-メルカプト-プロピル)-トリメトキシシラン (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) を使用して反応性基、例えばアミノ-、ビニルおよびチオールをそれぞれ導入することができる。このような活性化表面を使用して抗体に直接結合することができる (アミノまたはチオールの場合)、または活性化表面をリンカー、例えばグルタルアルデヒド、ビス(スクシンイミジル)スベレート、SPPD 9スクシンイミジル3-[2-ピリジルジチオ]プロピオナート)、SMCC (スクシンイミジル-4-[Nマレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシラート)、SIAB (スクシンイミジル[4ヨードアセチル]アミノベンゾアート) および SMPB (スクシンイミジル4-[1マレイミドフェニル]ブチラート) とさらに反応させて、表面から抗体を分離することができる。ビニル基を酸化して共有結合のための手段を提供することができる。ビニル基は、特異性抗体の複数の結合点を供給することができる各種のポリマー、例えばポリアクリル酸の重合のためのアンカーとしても使用することができる。アミノ基は、各種の分子量の酸化デキストランと反応して、異なるサイズおよび能力の親水性リンカーを提供することができる。酸化可能なデキストランの例は、デキストラン T-40 (分子量 40,000 ダルトン)、デキストラン T-110 (分子量 110,000 ダルトン)、デキストラン T-500 (分子量 500,000 ダルトン)、デキストラン T-2M (分子量 2,000,000 ダルトン) (このすべては Pharmacia, Piscataway, N.J. より入手可能である。) または Ficoll (分子量 70,000 ダルトン; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. から入手可能である。)。さら

10

20

30

40

50

に高分子電解質相互作用を使用して、参照によりこのそれぞれが本明細書に組み入れられている1988年1月29日に提出されたU.S.App.No.150,278および1989年7月7日に提出されたU.S.App.No.375,029に記載されている技法および化学作用を用いて、特異性抗体を固相に固定することができる。

【0104】

固相の選出に影響を及ぼす他の考慮事項は、標識された実態の非特異性結合を最小化する能力および用いた標識系との適合性を含む。例えば蛍光標識と共に使用される固相は、シグナル検出を可能にするために十分に低いバックグラウンド蛍光を有するべきである。

【0105】

特異性抗体の結合後、固体支持体の表面は材料、例えば血清、タンパク質または他の遮断薬によってさらに処置されて、非特異性結合が最小化され得る。

【0106】

一般的な検出システム

上で考察したように、本開示によるイムノアッセイは、それぞれが抗体心筋細胞抗原 $a^n$ に特異性である1個以上の抗体 $B \wedge n_a^n$ を用いる。ある実施形態において、各抗体 $B \wedge n_a^n$ は検出可能な標識に結合される。

【0107】

本開示の検出抗体での使用に好適な検出可能な標識は、分光的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段によって検出可能である基部分を有する任意の化合物または組成物を含む。このような標識は例えば、酵素、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子ケミルミノフォア、フルオロフォア、蛍光消光剤、化学発光消光剤、またはビオチンを含む。このため例えば光学シグナルを用いるイムノアッセイにおいて、光学シグナルは、化学発光、蛍光、リン光、電気化学発光、紫外線吸収、可視吸収、赤外線吸収、屈折、表面プラズモン共鳴における検体濃度依存性変化として測定される。電気シグナルを用いるイムノアッセイにおいて、電流、抵抗、電位、質量対電荷比またはイオンカウントにおける検体濃度依存性変化として測定される。状態変化シグナルを用いるイムノアッセイにおいて、状態変化シグナルは、サイズ、溶解度、質量または共鳴における検体濃度依存性変化として測定される。

【0108】

本開示による有用な標識は、磁性ビーズ（例えばDynabeads（商標））、蛍光染料（例えばフルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質）など（例えばMolecular Probes, Eugene, Oreg., USAを参照のこと）、化学発光化合物、例えばアクリジニウム（例えばアクリジニウム-9-カルボキサミド）、フェナントリジニウム、ジオキセタン、ルミノールなど、放射性標識（例えば $^3H$ 、 $^{125}I$ 、 $^{35}S$ 、 $^{14}C$ または $^{32}P$ ）、触媒、例えば酵素（例えばELISAで普通に使用される、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼおよびその他）および比色標識、例えばコロイド金（例えば40-80nm直径サイズ範囲の金粒子は、緑色光を高い効率で散乱させる。）または着色ガラスもしくはプラスチック（例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）ビーズを含む。このような標識の使用を教示する特許は、U.S.Pat.Nos.3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149;および4,366,241を含む。

【0109】

標識は生体試料との接触の前、間または後に各抗体 $B \wedge n_a^n$ に結合することができる。標識は共有または非共有相互作用によって抗体と結合することができる。いわゆる「直接標識」は、アッセイでの使用前に検出抗体に直接結合されるまたは検出抗体中に組み入れられる検出可能な標識である。直接標識は、当業者に周知の幾つかの手段のいずれかによって抗体 $B \wedge n_a^n$ に結合し、または抗体 $B \wedge n_a^n$ 中に組み入れることができる。

【0110】

対照的に、いわゆる「間接標識」は通例、アッセイの間のある時点で各抗体 $B \wedge n_a^n$

10

20

30

40

50

に結合する。間接標識はしばしば、使用前に検出剤に結合されるまたは検出剤中に組み入れられる基部分に結合する。このため例えば各抗体  $B \wedge n_a^n$  は、アッセイでの使用前にビオチン化することができる。アッセイの間に、アビジン・コンジュゲート・フルオロフォアはビオチン担持検出剤を結合して、容易に検出される標識を提供することができる。

【0111】

間接標識の別の例において、免疫グロブリン定常領域を特異的に結合することができるポリペプチド、例えばポリペプチドAまたはポリペプチドGは、検出抗体の標識として使用することもできる。これらのポリペプチドは、連鎖球菌の細胞壁の通常の構成物質である。これらは多種多様の種による免疫グロブリン定常領域との強い非免疫原性反応性を呈する(概してKronval, et al. (1973) J. Immunol, 111: 1401-1406、およびAkerstrom (1985) J. Immunol., 135: 2589-2542を参照)。このようなポリペプチドはこのため標識してアッセイ混合物に添加することができ、アッセイ混合物ではこれらは各抗体  $A \wedge n_a^n$  および  $B \wedge n_a^n$  に自己抗体と同様に結合し、すべてを標識して、試料中に存在する検体および自己抗体に起因する複合シグナルを提供する。

10

【0112】

本開示で有用な幾つかの標識は、検出可能なシグナルを産生するために追加の試薬の使用を必要とし得る。ELISAでは例えば、酵素標識(例えばベータ-ガラクトシダーゼ)は、検出可能なシグナルを産生するための基質(例えばX-gal)の添加を必要とする。アクリジニウム化合物を直接標識として使用するイムノアッセイでは、塩基性溶液および過酸化水素源が添加される。

20

【0113】

検出システム - 例示的な形式

化学発光イムノアッセイ: 例示的な実施形態において、化学発光化合物を、各抗体  $B \wedge n_a^n$  にコンジュゲートされた直接標識として上記の方法で使用する。化学発光化合物は例えばアクリジニウム化合物であることができる。アクリジニウム化合物が検出可能な標識として使用されるとき、次に上記の方法は、試験試料を抗体Aおよび抗体  $B \wedge n_a^n$  と接触させることから生じる混合物に対して過酸化水素源を発生または提供すること、ならびに少なくとも1つの塩基性溶液を混合物に添加して光シグナルを発生することをさらに含み得る。混合物によって発生または放出された光シグナルを次に測定して、試験試料中の心筋細胞抗原  $a^n$  を検出する。

30

【0114】

過酸化水素源は、緩衝溶液もしくは過酸化水素を含有する溶液または試験試料に添加されるときに過酸化水素を発生する酵素であり得る。塩基性溶液はトリガ溶液として作用して、少なくとも1つの塩基性溶液および検出可能な標識が添加される順序は重要ではない。該方法で使用される塩基性溶液は、少なくとも1つの塩基を含有し、10以上の、好ましくは12以上のpHを有する溶液である。塩基性溶液の例は、これに限定されるわけではないが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化アンモニウム、水酸化マグネシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウムおよび重炭酸カルシウムを含む。試験試料に添加される塩基性溶液の量は、アッセイで使用される塩基性溶液の濃度によって変わる。使用した塩基性溶液の濃度に基づいて、当業者は本明細書に記載する方法で使用される塩基性溶液の量を容易に決定することができる。

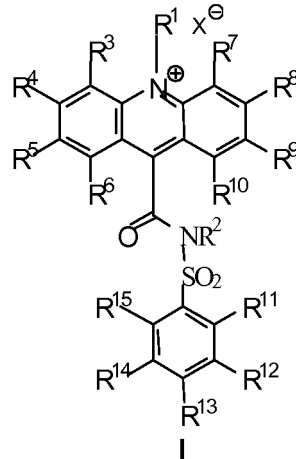
40

【0115】

本開示によるおよびアクリジニウム化合物を検出可能な標識として使用する化学発光イムノアッセイにおいて、好ましくは、アクリジニウム化合物はアクリジニウム-9-カルボキサミドである。特にアクリジニウム-9-カルボキサミドは、式Iによる構造を有する:

【0116】

## 【化5】



10

式中、 $R^1$  および  $R^2$  はそれぞれ独立して：アルキル、アルケニル、アルキニル、アリーールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキシアルキルから成る群から選択され、ならびに

式中、 $R^3$  から  $R^{15}$  はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリーールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキシアルキルから成る群から選択され；

20

ならびにさらに式中、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリーールまたはアラルキルのいずれかが1個以上のヘテロ原子を含有し得て；ならびに

場合により、存在する場合、 $X$  はアニオンである。

## 【0117】

アクリジニウム9-カルボキサミドを調製する方法は、Mattingly, P. G. J. Biolumin. Chemilumin., 6, 107-14; (1991); Adamczyk, M.; Chen, Y.-Y., Mattingly, P. G.; Pan, Y. J. Org. Chem., 63, 5636-5639 (1998); Adamczyk, M.; Chen, Y.-Y.; Mattingly, P. G.; Moore, J. A.; Shreder, K. Tetrahedron, 55, 10899-10914 (1999); Adamczyk, M.; Mattingly, P. G.; Moore, J. A.; Pan, Y. Org. Lett., 1, 779-781 (1999); Adamczyk, M.; Chen, Y.-Y.; Fishpaugh, J. R.; Mattingly, P. G.; Pan, Y.; Shreder, K.; Yu, Z. Bioconjugate Chem., 11, 714-724 (2000); Mattingly, P. G.; Adamczyk, M. In Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications; Dyke, K. V. Ed.; CRC Press: Boca Raton, pp. 77-105 (2002); Adamczyk, M.; Mattingly, P. G.; Moore, J. A.; Pan, Y. Org. Lett., 5, 3779-3782 (2003); ならびに U.S. Patent Nos. 5,468,646, 5,543,524 および 5,783,699 に記載されている(調製方法に関する文献の教示について、文献の全体が参照により本明細書にそれぞれ組み入れられている。)

30

40

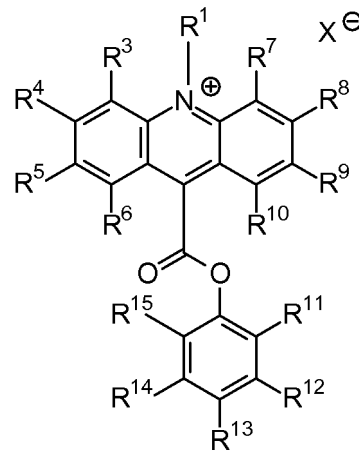
## 【0118】

またはアクリジニウム化合物は、アクリジニウム-9-カルボキシラートアリーールエステルであることができ；アクリジニウム-9-カルボキシラートアリーールエステルは、式 I I による構造を有することができ；

## 【0119】

50

## 【化6】



10

## II

式中、 $R^1$  は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルであり；ならびに

式中、 $R^3$  から  $R^{15}$  はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルから成る群から選択され；ならびに

20

場合により、存在する場合、 $X$  はアニオンである。

## 【0120】

本開示で使用することができる、上の式 I I を有するアクリジニウム - 9 - カルボキシラートアリールエステルの例は、これに限定されるわけではないが、10 - メチル - 9 - (フェノキシカルボニル) アクリジニウムフルオロスルホナート (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI から入手可能である。)。アクリジニウム 9 - カルボキシラートアリールエステルを調製する方法は、McCabra, F., et al., Photochem. Photobiol., 4, 1111 - 21 (1965) ; Razavi, Z et al., Luminescence, 15 : 245 - 249 (2000) ; Razavi, Z et al., Luminescence, 15 : 239 - 244 (2000) ; および U.S. Patent No. 5, 241, 070 に記載されている (調製方法に関する文献の教示について、文献の全体が参照により本明細書にそれぞれ組み入れられている。)

30

## 【0121】

少なくとも 1 つのアクリジニウム化合物に加えて、インジケータ溶液は少なくとも 1 つの界面活性剤も含有することができる。水に溶解したときに水の表面張力を低下させて、有機化合物の溶解度を上昇させる、いずれの界面活性剤も本発明で使用することができる。使用できる界面活性剤の例は、1 つ以上の非イオン性またはイオン性界面活性剤 (例えばアニオン性、カチオン性または両性イオン界面活性剤) である。使用できる非イオン性界面活性剤の例は、これに限定されるわけではないが、t - オクチルフェノキシポリエトキシエタノール (トリトン X - 100, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (ツイン 20)、ノニルフェノールポリオキシエチレンエーテル (ノニデット P 10)、デシルジメチルホスフィンオキシド (APO - 10)、シクロヘキシル - n - エチル - D - マルトシド、シクロヘキシル - n - ヘキシル - D - マルトシド、シクロヘキシル - n - メチル - D - マルトシド、n - デカノイルスクロース、n - デシル - D - グルコピラノシド、n - デシル - D - マルトピラノシド、n - デシル - D - チオマルトシド、ジギトニン、n - ドデカノイルスクロース、n - ドデシル - D - グルコピラノシド、n - ドデシル -

40

50

- D - マルトシド、ポリオキシエチレン ( 1 0 ) ドデシルエーテル ( ゲナポール C - 1 0 0 )、イソトリデカノールポリグリコールエーテル ( ゲナポール X - 8 0 )、イソトリデカノールポリグリコールエーテル ( ゲナポール X - 1 0 0 )、ヘプタン - 1, 2, 3 - トリオール、n - ヘプチル - D - グルコピラノシド、n - ヘプチル - D - チオグルコピラノシドおよびこれの組合せを含む。使用できるイオン性界面活性剤の例は、コール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸、コール酸、デヒドロコール酸、ドクサートナトリウム、ドクサートナトリウム塩、グリコール酸水和物、グリコデオキシコール酸 1 水和物、グリコリトコール酸エチルエステル、N - ラウロイルサルコシンナトリウム塩、N - ラウロイルサルコシン、リチウムドデシルサルフェート、カルシウムプロピオナート、1 - オクタンスルホン酸ナトリウム塩、ナトリウム 1 - ブタンスルホナート、ナトリウムケノデオキシコレート、ナトリウムコレート水和物、ナトリウム 1 - デカンスルホナート、ナトリウム 1 - デカンスルホナート、ナトリウムデオキシコレート、ナトリウムデオキシコレート 1 水和物、ナトリウムドデシルベンゼンスルホナート、ナトリウムドデシルサルフェート、ナトリウムグリコデオキシコレート、ナトリウムグルココレート水和物、ナトリウム 1 - ヘプタンスルホナート、ナトリウムヘキサンスルホナート、ナトリウム 1 - ノナンスルホナート、ナトリウムオクチルサルフェート、ナトリウムペンタンスルホナート、ナトリウム 1 - プロパンスルホナート水和物、ナトリウムタウロデオキシコレート水和物、ナトリウムタウロヒオデオキシコレート水和物、ナトリウムタウロウルソデオキシコレート、タウロコール酸ナトリウム塩水和物、タウロリトコール酸 3 - サルフェートジナトリウム塩、トリトン ( 登録商標 ) X - 2 0 0、トリトン ( 登録商標 ) Q S - 1 5、トリトン ( 登録商標 ) Q S - 4 4、トリトン ( 登録商標 ) X Q S - 2 0、トリズマ ( 登録商標 ) ドデシルサルフェート、ウルソデオキシコール酸、アルキルトリメチルアンモニウムブロミド、アンプロリウムヒドロクロリド、ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムヒドロキシド、ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド、ベンジルドデシルジメチルアンモニウムブロミド、塩素 p - トルエンスルホナート塩、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、ドデシルエチルジメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、エチルヘキサデシルジメチルアンモニウムブロミド、グリニャール試薬、ヘキサデシルピリジニウムブロミド、ヘキサデシルピリジニウムクロリド 1 水和物、ヘキサデシルピリジニウムクロリド 1 水和物、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム p - トルエンスルホナート、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム p - トルエンスルホナート、ハイアミン ( 登録商標 ) 1 6 2 2、メチルベンゼトニウムクロリド、ミリスチルトリメチルアンモニウムブロミド、オキシフェノニウムブロミド、N, N', N' - ポリオキシエチレン ( 1 0 ) - N - タロー - 1, 3 - ジアミノプロパン、テトラヘプチルアンモニウムブロミド、テトラキス ( デシル ) アンモニウムブロミド、トンゾニウムブロミドおよびルピカット ( 商標 ) F C 3 7 0、ルピカット ( 商標 ) H M 5 5 2、ルピカット ( 商標 ) H O L D、ルピカット ( 商標 ) M S 3 7 0、ルピカット ( 商標 ) P Q 1 1 P N およびこれの組合せ ( すべて A l d r i c h , S t . L o u i s , M O より入手可能である。 ) を含む。

10

20

30

40

#### 【 0 1 2 2 】

場合により試験試料は、少なくとも 1 つの塩基性溶液、過酸化水素源および検出可能な標識のいずれか 1 つ以上の添加の前に処置され得る。このような処置は、希釈、限外濾過、抽出、沈殿、透析、クロマトグラフィーおよび消化を含み得る。このような処置は、本明細書で先に考察したような、試験試料が受け入れ得るまたは対象となり得る任意の前処置に加えられ得るか、または該前処置とは別であり得る。加えて、処置方法が試験試料に使用される場合、このような処置方法は、心筋細胞抗原が未処置試験試料 ( 例えば即ち、いずれのこのような処置方法も受けていない試験試料 ) 中の濃度に比例する濃度で試験試料中に残存するようになっている。

#### 【 0 1 2 3 】

本明細書で先に簡単に言及したように、混合物を形成するために試験試料、少なくとも

50

1つの塩基性溶液、過酸化水素源および検出可能な標識を添加する時間および順序は重大ではない。さらに少なくとも1つの塩基性溶液、過酸化水素源および検出可能な標識によって形成された混合物は場合により、ある期間にわたってインキュベートすることができる。例えば混合物は、約1秒から約60分の期間にわたってインキュベートすることができる。特に混合物は、約1秒から約18分の期間にわたってインキュベートすることができる。

#### 【0124】

各抗体  $B \wedge n_a^n$  に使用される検出可能な標識は、好適な標準曲線または参照標準が各抗原  $a^n$  について得られるという条件で同じであることができ、各抗原の結果の混同を回避するために、各抗体からのシグナルが個別に測定されて、各抗原の校正された測定抗原量が決定され、次にそれぞれの他の抗原  $a^n$  の測定抗原量と組み合わせられる。各抗体  $B \wedge n_a^n$  に異なる検出可能な標識が使用され得て、選択された標識化合物に応じてシグナルが相互からただちに区別できる場合には、抗原  $a^n$  を超えるシグナルの同時測定が可能となる。例えば異なる発光スペクトルを有する異なる蛍光標識が使用され得る。

10

#### 【0125】

検出可能な化学発光標識を使用するとき、少なくとも1つの塩基性溶液、過酸化水素源および検出可能な標識の試験試料への添加の後に、検出可能なシグナル、即ち化学発光シグナルが発生する。混合物によって発生したシグナルは、一定期間にわたって検出される。好ましくは、混合物が形成されて、同時にシグナルが検出される。検出の期間は、約0.01から約360秒の、さらに好ましくは約0.1から約30秒のおよび最も好ましくは約0.5から約5秒の範囲に及び得る。発生した化学発光シグナルは、当業者に公知の所定の技法を使用して検出することができる。

20

#### 【0126】

このため本開示による化学発光イムノアッセイにより、検出可能な化学発光標識を使用して試験試料に添加すると、塩基性溶液および検出可能な標識の添加後に発生した化学発光シグナルは、試験試料中の各心筋細胞抗原  $a^n$  の存在を示し、該シグナルを検出することができる。試験試料中の各心筋細胞抗原心筋細胞抗原  $a_n$  の量または濃度は、発生したシグナルの強度に基づいて定量することができる。特に各心筋細胞抗原  $a^n$  では、試験試料に含有される心筋細胞抗原  $a^n$  の量は、発生したシグナルの量に比例する。特に、存在する心筋細胞抗原  $a^n$  の量は、発生した光の量を心筋細胞抗原  $a^n$  の標準曲線と比較することに基づいて、または心筋細胞抗原  $a^n$  に特異性の参照標準への比較によって定量することができる。このような参照標準はそれぞれ、例えば抗イディオタイプ抗体を含み得る。各参照標準は、例えば誘導体化心筋細胞抗原、例えばポリエチレングリコールによって誘導体化された心筋細胞抗原を含み得る。例えば心筋トロポニンIに好適な参照標準は、誘導体化心筋トロポニンI、例えばポリエチレングリコールによって誘導体化された心筋トロポニンIである。同様に、心筋トロポニンTに好適な参照標準は、誘導体化心筋トロポニンT、例えばポリエチレングリコールによって誘導体化された心筋トロポニンTである。本明細書の他の箇所に記載したような他の心筋細胞抗原も、イムノアッセイに選択された心筋細胞抗原に基づいて適切な参照標準を得るためにただちに誘導体化されることが理解される。各心筋細胞抗原の好適な標準曲線は、公知の濃度の心筋細胞抗原の段階希釈液、または溶液を使用して、質量分析法、重量測定、または当分野で公知の他の方法によって生成することができる。

30

40

#### 【0127】

蛍光偏光イムノアッセイ (FPIA) : 例示的な実施形態において、蛍光標識は本発明による蛍光偏光イムノアッセイ (FPIA) で用いられる。概して、蛍光偏光技法は、蛍光標識が特徴的な波長の平面偏光によって励起されたときに、所与の媒体中の標識の偏光に反比例する入射光に対して偏光度を保持する別の特徴的な波長の光 (即ち蛍光) を放出するという原理に基づく。この特性の結果として、回転が拘束された標識、例えば別の溶液構成要素に比較的低い回転率で結合した標識は、溶液中で遊離しているときよりも比較的大きい放出光の偏光度を保持する。

50

## 【0128】

本技法は、例えば所与の平面で放出された光の強度の変化が検出できるように、蛍光標識された実体の結合がサイズの十分に異なる複合体を形成するように試薬を選択することによって、本発明によるイムノアッセイで用いることができる。例えば標識された心筋トロポニン抗体が捕捉抗体および/または心筋トロポニンと反応性の自己抗体によって捕捉された1個以上の心筋トロポニン抗原によって結合されているとき、得られた複合体は遊離した標識心筋トロポニン抗体と比較して十分に大きく、これの回転は十分に制約されているため、結合は容易に検出される。

## 【0129】

FPIAで有用なフルオロフォアは、フルオレセイン、アミノフルオレセイン、カルボキシフルオレセインなど、好ましくは5および6 - アミノメチルフルオレセイン、5および6 - アミノフルオレセイン、6 - カルボキシフルオレセイン、5 - カルボキシフルオレセイン、チオ尿素フルオレセインおよびメトキシトリアジノリル - アミノフルオレセイン、ならびに同様の蛍光誘導体を含む。蛍光偏光アッセイを行うことができる市販の自動化機器の例：IMxシステム、TDxシステムおよびTDxFLxシステム(すべてAbbott Laboratories, Abbott Park, Ill. から入手可能である。)を含む。

## 【0130】

走査型プローブ顕微鏡法(SPM)：イムノアッセイへの走査型プローブ顕微鏡法(SPM)の使用も、本開示のイムノアッセイ方法が容易に適合できる技術である。SPMにおいて、特に原子間力顕微鏡法において、捕捉抗体は、結合自己抗体を結合できることに加えて、走査に好適な表面を有する好適な固相に付着される。抗体 $A_n$ は例えば、プラスチックまたは金属表面に吸着させることができる。または抗体 $A_n$ は、当業者に公知の方法により、例えば誘導体化プラスチック、金属、ケイ素またはガラスに共有結合させることができる。抗体 $A_n$ の結合後に、試験試料を固相と接触させて、走査型プローブ顕微鏡を使用して固相付着複合体を検出および定量する。SPMの使用により、イムノアッセイシステムに用いられる標識の必要がなくなる。このようなシステムは、参照により本明細書に組み入れられているU.S. App. No. 662, 147に記載されている。

## 【0131】

微小電気機械システム(MEMS)：本開示によるイムノアッセイは、微小電気機械システム(MEMS)を使用して行うこともできる。MEMSは、機械要素、光学要素および流体要素を電子機器と組み合わせるシリコン上に組み込まれた微視的構造であり、興味のある検体を好都合に検出できるようにする。本開示での使用に好適な例示的なMEMSデバイスは、Protiverisのマルチカンチレバーアレイである。本アレイは、特別に設計されたシリコンマイクロカンチレバーの化学機械的作動およびその後のマルチカンチレバーの偏向の光学的検出に基づいている。片側を結合パートナーによってコーティングしたとき、マイクロカンチレバーは相補的分子を含有する溶液に曝露されると湾曲する。この湾曲は、結合事象による表面エネルギーの変化によって引き起こされる。湾曲(偏向)度の光学検出によって、マイクロカンチレバーに結合した相補的分子の量を測定することができる。

## 【0132】

電気化学検出システム：他の実施形態において、本開示によるイムノアッセイは電気化学検出を使用して行われ、この技法は当業者に周知である。このような電気化学検出は、電流を測定および記録するデバイスに接続された1個以上の電極を用いることが多い。このような技法は幾つかの市販のデバイス、例えば携帯型電気化学検出器具および独立型アッセイ特異性試薬カートリッジを含むI-STAT(登録商標)(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)システムで実現することができる。例えば本発明において、塩基性トリガ溶液を独立型ヘモグロビン試薬カートリッジ内に含有することができ、試験試料の添加時に試験試料中のヘモグロビンの量に比例する電流

10

20

30

40

50

が、少なくとも1個の電極にて発生する。電気化学検出の基本的な手順は、例えばHeinemanおよび共同研究者らによって記載されている。これは1次抗体(Ab、ラット抗マウスIgG)の固定と、続いての抗原(Ag、マウスIgG)、酵素標識(AP-Ab、抗ラットマウスIgGおよびアルカリ性ホスファターゼ)にコンジュゲートされた2次抗体およびp-アミノフェニルホスフェート(PAPP)を含有する一連の溶液への曝露を必要とした。APはPAPPをp-アミノフェノール(PAP<sub>R</sub>、「R」は、還元形をキノニンである酸化形のPAP<sub>O</sub>と区別するためのものである。)に変換し、この変換は最適活性を呈するpH9.0にて酸素および水の還元に干渉しない電位にて電気化学的に可逆性である。PAP<sub>R</sub>はフェノールとは違って電極汚損を引き起こさず、フェノールの前駆体のフェニルホスフェートは酵素基質として使用されることが多い。PAP<sub>R</sub>は空気および光酸化を受けるが、これらは小規模および短い時間枠で容易に防止される。20μlから360μlの範囲に及ぶPAPP量を使用する微小電気化学イムノアッセイで達成されたPAP<sub>R</sub>のピコモル検出限界およびIgGのフェムトグラム検出限界は、先に報告されている。電気化学検出を用いるキャピラリーイムノアッセイでは、これまでに報告された最低検出限界は、70μlの量、および30分または25分のアッセイ時間を使用して、マウスIgG 3000分子である。

#### 【0133】

本開示による電気化学検出を用いる例示的な実施形態において、心筋細胞抗原と反応性である抗体A<sup>n</sup>-a<sup>n</sup>を固相である電極の表面上に固定することができる。次に電極を例えばヒトからの試験試料と接触させる。試料中のいずれの検体も抗体A<sub>n</sub>に結合して、第1の固相付着複合体を形成する。自己抗体も電極表面に結合して、これにより電極の表面上に固定されるようになる。捕捉抗体A<sup>n</sup>-a<sup>n</sup>によって結合されていない試験試料中の検体は、検体と反応性である固定化自己抗体に結合して、第2の固相付着複合体を形成する。これらの固相付着複合体を、また検体特異性であり、検出可能な標識を有する抗体B<sup>n</sup>-a<sup>n</sup>と接触させる。A<sup>n</sup>-a<sup>n</sup>-B<sup>n</sup>-a<sup>n</sup>に加えて自己抗体-a<sup>n</sup>-B<sup>n</sup>-a<sup>n</sup>複合体を含む免疫検出複合体の形成により、検出可能な標識のシグナルが発生して、次にこのシグナルが検出される。

#### 【0134】

各種の電気化学検出システムは、U.S. Pat. No. 7,045,364(2006年5月16日発行;参照により本明細書に組み入れられている。)、U.S. Pat. No. 7,045,310(2006年5月16日発行;参照により本明細書に組み入れられている。)、U.S. Pat. No. 6,887,714(2005年5月3日発行;参照により本明細書に組み入れられている。)、U.S. Pat. No. 6,682,648(2004年1月27日発行;参照により本明細書に組み入れられている。);U.S. Pat. No. 6,670,115(2003年12月30日発行;参照により本明細書に組み入れられている。)に記載されている。

#### 【0135】

##### C. キット

本開示は、心筋細胞抗原の免疫検出に干渉する他の物質も含有し得る試験試料を、心筋細胞抗原の存在についてアッセイするためのキットも提供する。本開示によるキットは、1個以上の本開示によるイムノアッセイを実施するのに有用な1つ以上の試薬を含む。キットは概して、試薬を1つ以上の別個の組成物として、または場合により試薬の適合性が許す場合には混和物として保持する1個以上の容器を含むパッケージを含む。試験キットは、使用者の観点から所望であり得る他の材料、例えば緩衝液、希釈剤、標準および/または試料の処理、洗浄、もしくはアッセイのその他のステップの実行に有用なその他の材料も含むことができる。

#### 【0136】

ある実施形態において、試験キットはヒト化モノクローナル抗体または抗体を含み、各ヒト化モノクローナル抗体は選択された心筋細胞抗原に対して特異性である。本構成要素は、本発明によるイムノアッセイで正の対照として使用することができる。所望ならば、

本構成要素を試験キットに複数の濃度で含ませて、試験試料中で検出されたシグナルを比較できる標準曲線の作成を容易にすることができる。または標準曲線は、キットで提供された単一のヒトモノクローナル抗体溶液の希釈物を調製することによって作成することができる。

【0137】

本開示によるキットは、心筋細胞抗原  $a_n$  上の少なくとも1個のエピトープにそれぞれ結合している1つ以上の抗体  $A_n$  および  $A_n$  が結合するいずれのエピトープとも異なる心筋細胞抗原  $a_n$  上の少なくとも1個のエピトープにそれぞれ結合している1つ以上の検出抗体  $B_n$ 、ならびに各心筋細胞抗原  $a_n$  を検出または定量するための説明書を含むことができる。ある実施形態において、本開示による試験キットは、抗体  $A_n$  および/または抗体  $B_n$  が結合されている固相を含み得る。固相は、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場分子、石英結晶、フィルム、濾紙、ディスクまたはチップであり得る。

10

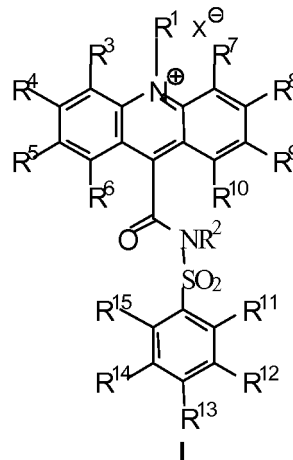
【0138】

本開示による試験キットは例えば、抗体  $A_n$  および抗体  $B_n$  のような、それぞれ心筋細胞抗原  $a_n$  に対する1つ以上の非ヒトモノクローナル抗体を含むことができる。キットは、各抗体  $B_n$  にコンジュゲートすることができる、またはコンジュゲートしている1つ以上の検出可能な標識も含み得る。ある実施形態において、試験キットは酵素、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子ケミルミノフォア、フルオロフォア、蛍光消光剤、化学発光消光剤、またはビオチンであり得る少なくとも1つの直接標識を含む。幾つかの実施形態において、直接標識はアクリジニウム化合物、例えば式Iによるアクリジニウム - 9 - カルボキサミドであり：

20

【0139】

【化7】



30

式中、R1およびR2はそれぞれ独立して：アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルから成る群から選択され、ならびに

40

式中、R3からR15はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルから成る群から選択され；ならびに場合により、存在する場合、Xはアニオンである。

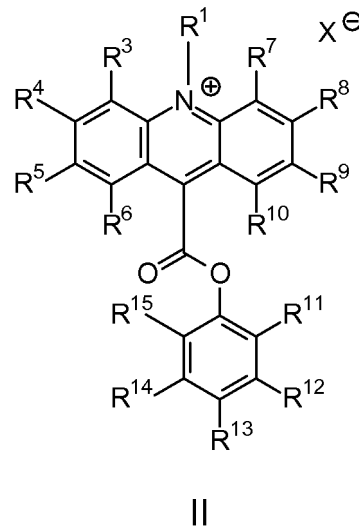
【0140】

またはアクリジニウム化合物は、式IIによる構造を有するアクリジニウム - 9 - カルボキシラートアリールエステルであることができ：

【0141】

50

## 【化 8】



10

式中、R 1 は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルであり；ならびに

式中、R 3 から R 1 5 はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルから成る群から選択され；ならびに場合により、存在する場合、X<sup>-</sup> はアニオンである。

20

## 【0142】

本開示によるおよびアクリジニウム化合物を含む試験キットは、塩基性溶液も含むことができる。例えば塩基性溶液は、少なくとも約 10 の pH を有する溶液であることができる。

## 【0143】

ある実施形態において、本開示による試験キットは、過酸化水素源、例えば緩衝溶液、過酸化水素を含有する溶液、または過酸化水素発生酵素をさらに含む。例えば試験キットは、(R) - 6 - ヒドロキシニコチンオキシダーゼ、(S) - 2 - ヒドロキシ酸オキシダーゼ、(S) - 6 - ヒドロキシニコチンオキシダーゼ、3 - aci - ニトロプロパノアートオキシダーゼ、3 - ヒドロキシアントラニレートオキシダーゼ、4 - ヒドロキシマンデラートオキシダーゼ、6 - ヒドロキシニコチネートデヒドロゲナーゼ、アブシシンアルデヒドオキシダーゼ、アシル - CoA オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、アミンオキシダーゼ、アミンオキシダーゼ (銅含有)、アミンオキシダーゼ (フラビン含有)、アリールアルコールオキシダーゼ、アリールアルデヒドオキシダーゼ、カテコールオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、コリンバミンオキシダーゼ、シクロヘキシルアミンオキシダーゼ、シトクロム c オキシダーゼ、D - アミノ酸オキシダーゼ、D - アラビノノ - 1, 4 - ラクトンオキシダーゼ、D - アラビノノ - 1, 4 - ラクトンオキシダーゼ、D - アスパルテートオキシダーゼ、D - グルタメートオキシダーゼ、D - グルタメート (D - アスパルテート) オキシダーゼ、ジヒドロベンゾフェナントリジンオキシダーゼ、ジヒドロオロテートオキシダーゼ、ジヒドロウラシルオキシダーゼ、ジメチルグリシンオキシダーゼ、D - マンニトールオキシダーゼ、エクジソンオキシダーゼ、エタノールアミンオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルタチオンオキシダーゼ、グリセロール - 3 - ホスフェートオキシダーゼ、グリシンオキシダーゼ、グリオキシラートオキシダーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、ヒドロキシフィタネートオキシダーゼ、インドール - 3 - アセトアルデヒドオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、L - アミノ酸オキシダーゼ、L - アスパルテートオキシダーゼ、L - ガラクトノラクトンオキシダーゼ、L - グルタメートオキシダーゼ、L - グ

30

40

50

ロノラクトンオキシダーゼ、L-リジン6-オキシダーゼ、L-リジンオキシダーゼ、長鎖アルコールオキシダーゼ、L-ピペコラートオキシダーゼ、L-ソルボースオキシダーゼ、マレートオキシダーゼ、メタンチオールオキシダーゼ、モノアミノ酸オキシダーゼ、N6-メチル-リジンオキシダーゼ、N-アシルヘキソサミンオキシダーゼ、NAD(P)Hオキシダーゼ、ニトロアルカンオキシダーゼ、N-メチル-L-アミノ酸オキシダーゼ、ヌクレオシドオキシダーゼ、オキサラートオキシダーゼ、ポリアミンオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ポリビニルアルコールオキシダーゼ、プレニルシステインオキシダーゼ、タンパク質-リジン6-オキシダーゼ、プレトシンオキシダーゼ、ピラノースオキシダーゼ、ピリドキサル5'-ホスフェートシターゼ、ピリドキシン4-オキシダーゼ、ピロロキノリンキノシンターゼ、ピルベートオキシダーゼ、ピルベートオキシダーゼ(CoA-アセチル化)、レチクリンオキシダーゼ、レチナルオキシダーゼ、リファマイシンBオキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、2級アルコールオキシダーゼ、サルファイトオキシダーゼ、スーパーオキシドジムスターゼ、スーパーオキシドレダクターゼ、テトラヒドロベルベリンオキシダーゼ、チアミンオキシダーゼ、トリプトファン、-オキシダーゼ、ウレートオキシダーゼ(ウリカーゼ、尿酸オキシダーゼ)、パニルアルコールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、キシリトールオキシダーゼおよびこれの組合せから選択される過酸化水素発生酵素のある量を含み得る。

10

#### 【0144】

本開示による試験キットは好ましくは、本発明のイムノアッセイの1つ以上を行うための説明書を含む。本開示のキットに含まれる説明書は、梱包材料に付着させることができるか、または添付文書として含めることができる。説明書は通例、記載または印刷された材料であるが、これらはこれに限定されない。このような説明書を格納して、これらをエンドユーザに伝えることができるいずれの媒体も、本開示によって考慮される。このような媒体は、これに限定されるわけではないが、電子記憶媒体(例えば磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ)、光学媒体(例えばCD-ROM)などを含む。本明細書で使用する場合、「説明書」という用語は、説明書を提供するインターネットサイトのアドレスを含むことができる。

20

#### 【0145】

##### D. 本開示の方法の適合

本開示は例えば、TnI、CKMBおよびBNPを含む複数の心臓マーカーのサンドイッチイムノアッセイを行う、共有の市販Abbott Point of Care(iSTAT(商標))電気化学イムノアッセイシステムに適用できる。免疫センサおよび単回使用試験デバイスでのこれの操作方法は、共有のPublication Nos. US20030170881、US20040018577、US20050054078およびUS20060160164に記載され、このそれぞれは参照により本明細書に組み入れられている。電気化学および他の種類の免疫センサの製造に関する追加の背景は、参照によりまた組み入れられている、共有のU.S. Pat. No. 5,063,081に見出される。

30

#### 【実施例】

#### 【0146】

限定するものではなく、一例として、本発明の実施例をここに示すものとする。

40

#### [実施例1]

##### 検出抗体コンジュゲート

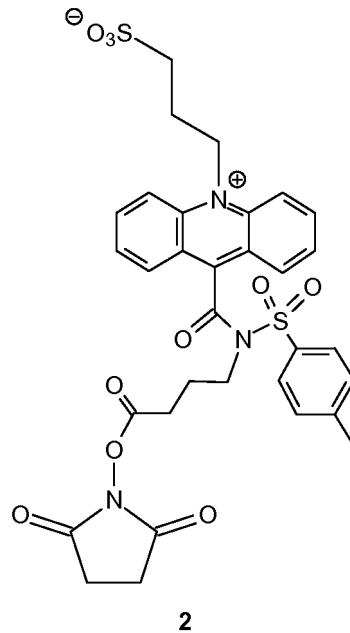
一般コンジュゲーション手順：検出抗体をコンジュゲーション緩衝液(100mMナトリウムホスフェート、150mM NaCl、pH8.0)に溶解させて、1-10mg/mL(6.25-62.5μM)の濃度を得た。アクリジニウム、9-[4-[2,5-ジオキソ-1-ピロリジンイル)オキシ]-4-オキソブチル][4-メチルフェニル]スルホニル]アミノ]カルボニル]-10-(3-スルホプロピル)-、分子内塩、2(Adamczyk, M.; Chen, Y.-Y.; Mattingly, P. G.; Pan, Y. J. Org. Chem. 1998, 63, 5636-5639) 標識

50

試薬を、下の式 2 に示すように N, N - ジメチルホルムアミド (DMF) 中で 1 - 50 m M の濃度にて調製した：

【0147】

【化9】



10

20

選択した抗体を 1 - 35 倍のモル過剰のアクリジニウム標識試薬によって、周囲温度で暗所にて 3 - 14 時間処置した。この後、アクリジニウム - 9 - カルボキサミド - 抗体コンジュゲート溶液を周囲温度にて 20 時間にわたって 10 キロダルトン分子量カットオフ膜を使用して、3 倍の体積 (1000 × コンジュゲート溶液体積) の、0.1% CHAPS (3 - [(3 - コラミドアミドプロピル)ジメチルアンモニオ] - 1 - プロパンスルホナート) を含有する 10 mM リン酸緩衝食塩水 (PBS) から成る透析緩衝液で透析した。

【0148】

アクリジニウム - 9 - カルボキサミド - 抗体コンジュゲートを 280 / 369 nm の UV 吸光度によって分析して、式に従って計算した、アクリジニウム - 9 - カルボキサミド標識のタンパク質に対する取込比 (IR) を決定した：

$$IR = A_{369} / 369 / ([A_{280} - (A_{369} / 4.1)] / 280)$$

式中：

A<sub>280</sub> および A<sub>369</sub> は、コンジュゲートの UV - 可視スペクトルから得た吸光度値であり；

4.1 は、アクリジニウム - 9 - カルボキサミド標識のおよその A<sub>369</sub> / A<sub>280</sub> 比であり；

280 は、280 nm における抗体の消衰係数であり (即ち IgG mAb では、280 = 210,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) ；

ならびに

369 は、369 nm におけるアクリジニウム - 9 - カルボキサミド標識の消衰係数である。

30

40

【0149】

プールの平均取込比は、使用したアクリジニウム - 9 - カルボキサミド標識試薬の 0.4 - 0.8 × モル過剰の範囲に及ぶことができる。

【0150】

a) エピトープ cTnT<sub>60-70</sub> にマップされたマウス抗心筋トロポニン T 7G7 (Biodesign International / Meridian Life Sciences, Saco, ME ; カタログ番号 H86429M) を PBS で透析して、

50

0.35 mg/mL の溶液濃度を得た。コンジュゲーションの後、計算した I R は 3.1 であった。

【0151】

b) エピトープ c T n T<sub>61-70</sub> にマップされたマウス抗心筋トロポニン T 7 F 4 (Fitzgerald Ind Intl, Concord, MA、カタログ番号 10R-T127C) を PBS で透析して、0.469 mg/mL の溶液濃度を得た。コンジュゲーションの後、計算した I R は 2.8 であった。

【0152】

c) エピトープ c T n T<sub>95-181</sub> にマップされたマウス抗心筋トロポニン T 1 C 11 (Fitzgerald Ind Intl, Concord, MA、カタログ番号 10R-T127D) を PBS で透析して、0.469 mg/mL の溶液濃度を得た。コンジュゲーションの後、計算した I R は 2.8 であった。

10

【0153】

d) エピトープ c T n T<sub>c T n T<sub>73-87</sub></sub> にマップされたマウス抗心筋トロポニン T M 8 0 2 0 2 0 7 (Fitzgerald Ind Intl, Concord, MA、カタログ番号 10R-T85D) を PBS で透析して、0.413 mg/mL の溶液濃度を得た。コンジュゲーションの後、計算した I R は 4.1 であった。

【0154】

e) エピトープ c T n I<sub>41-49</sub> にマップしたマウス抗心筋トロポニン I 1 9 C 7 (HyTest, Turku, Finland, カタログ番号 4T21)。コンジュゲーションの後、計算した I R は 2.2 であった。

20

【0155】

[ 実施例 2 ]

磁性微小粒子上の捕捉抗体

カルボキシ常磁性微小粒子 (5% 固体、公称直径 5 ミクロン、Polymer Labs, Varian, Inc. Amherst, MA) を 2 - (N - モルホリノ) エタンサルホン酸緩衝液 (MES、2 mL、pH 6.2、50 mM) 中で 1% 固体濃度まで希釈し、次に MES 緩衝液 (3 x 2 mL) で洗浄して、最後に MES (2 mL) に再懸濁させた。粒子を 1 - エチル - 3 - [3 - ジメチルアミノプロピル] カルボジイミドヒドロクロリド (11 mg / 水 1.129 mL の 20 μL) と 20 分間混合することによって活性化させ、次に洗浄して (MES、2 mL)、MES (2 mL) に再懸濁させた。マウス抗心筋トロポニン T 1 C 11 (Fitzgerald Ind Intl, Concord, MA、カタログ番号 10R-T127D) を懸濁液に 60 μg/mL にて添加した。60 分間混合した後、抗原コート粒子を磁氣的に封鎖して、抗原溶液を PBS 中 1% BSA (2 mL) から成る遮断溶液に代えた。30 分間混合した後、粒子を PBS 中 1% BSA (3 x 2 mL) で洗浄して、最後に PBS 中 1% BSA (2 mL) に再懸濁させて、1% 固体の最終濃度に調整した。

30

【0156】

微小粒子を以下のマウス抗心筋トロポニン T 抗体を用いて同様に調製した：7 G 7 (Biodesign International / Meridian Life Sciences, Saco, ME; カタログ番号 H86429M); 7 F 4 (Fitzgerald Ind Intl, Concord, MA、カタログ番号 10R-T127C); および M 8 0 2 0 2 0 7 (「M80」, Fitzgerald Ind Intl, Concord, MA、カタログ番号 10R-T85D)。

40

【0157】

微小粒子は同様に、以下のマウス抗心筋トロポニン I 抗体：エピトープ c T n I<sub>86-92</sub> にマップされた 8 E 1 0 (HyTest, Turku, Finland、カタログ番号 4T21; カタログ番号 4T21) および M O 6 (Strategic Biosolutions, Inc, Newark, DE、カタログ番号 D2440M406-MA) の混合物を用いて同様に調製した。

50

【0158】

[実施例3]

捕捉抗体および検出抗体の組合せに対する化学発光イムノアッセイ心筋トロポニンT用量応答

実施例2で調製した各捕捉抗体微小粒子の作用懸濁液は、原懸濁液をスクロース(13.6%)および抗菌剤を含有するMES緩衝液(20mM、pH6.6)で0.05%固体まで希釈することによって調製した。各検出抗体コンジュゲートの作用溶液は、原液を10ng/mLまで希釈することによって調製した。心筋トロポニンT(Biospacific、カタログ番号J34510359)標準溶液は、0、0.25、0.5、1.0および2.0μg/mLで調製した。

10

【0159】

アッセイは、ARCHITECT(登録商標)i2000機器(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)で行った。簡潔には、心筋トロポニンT標準溶液(10μL)をARCHITECT(登録商標)プレインキュベーション希釈剤(50μL)および捕捉抗体微小粒子(50μL)で希釈して、機器の反応容器内でインキュベートした。インキュベーションの後、微小粒子を磁氣的に封鎖して、ARCHITECT(登録商標)洗浄緩衝液で洗浄した。検出抗体溶液(50μL)を添加して、懸濁液をインキュベートし、次に微小粒子を再度洗浄した。過酸化水素を含有するARCHITECT(登録商標)プレトリガ溶液およびナトリウムヒドロキsidを含有するARCHITECT(登録商標)トリガ溶液を次に順次添加して、化学発光シグナル(相対光ユニット、RLU)を記録した。

20

【0160】

捕捉抗体および検出抗体の組合せの用量-応答曲線を表1に、およびグラフで図1に示す。

【0161】

【表2】

表1

検出コンジュゲート/捕捉抗体(RLU)

トロポニンT (μg/mL)	7G7 / 7F4	7G7/ M80202 07	7G7/ 1C11	7F4/ 7G7	7F4/ M80202	7F4/ 1C11	M8020 207/ 7G7	M8020 207/ 7F4	M8020 207/ 1C11
2	468	305420	3105	6870	184343	18588	137713	100426	202062
	29		18			6			
1	298	250755	2384	1469	136026	12732	106585	71224	157435
	77		64			5			
0.5	172	163605	1488	618	82486	63012	70107	45245	105484
	46		94						
0.25	908	96153	7937	452	38363	26439	42508	25611	66447
	1		4						
0	333	338	317	269	297	256	367	379	368

30

40

【0162】

[実施例4]

自己抗体の心筋トロポニンTへのエピトープマッピング

50

抗体を図2に示すようなcTnTアミノ酸配列全体(UniProtKB/Swiss-Prot P45379(TN T2\_HUMAN)、開始剤メチオニン除去、297aa、配列番号96)、各ペプチド長、15aa;オーバーラップ、12aa;PEPscreen(登録商標),Sigma-Genosys,The Woodlands, TX)を含むビオチン化ペプチドライブラリ(表2)に対して、ストレプトアビジン・コート・マイクロプレート(Reacti-Bind(商標)、ストレプトアビジン;Pierce, Rockford, IL)上でスクリーニングした。

**【0163】**

このためペプチド(100 $\mu$ L、1200pmol/mL)をマイクロプレート上に整列させた;該マイクロプレートを次に密封して、周囲温度にて1時間インキュベート/混合した。次にマイクロプレートをARCHITECT(登録商標)洗浄緩衝液で洗浄して、吸引乾固した。試料(500 $\mu$ L)をAxSYMトロポニンプレインキュベーション希釈剤9.5mLで希釈して、次にペプチドライブラリを用いてマイクロプレートに整列させた(100 $\mu$ L/ウェル)。プレートを次に密封して、37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートし、28rpmにて2時間混合した。後にプレートをARCHITECT(登録商標)洗浄緩衝液で洗浄して、マイクロプレートリーダー(Berthold Technologies Inc, Oak Ridge, TN)上での化学発光検出を使用して、各ペプチドに対する応答を決定した。マウス抗ヒトIgGアクリジニウム標識コンジュゲート溶液(100 $\mu$ L)を各試験ウェルに添加した。コンジュゲートをすべての試験試料に添加した後、次にマイクロプレートを密封して、28rpmのオービタルシェーカー上に置き、37 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートした。次にコンジュゲート溶液を除去して、マイクロプレートのウェルをARCHITECT(登録商標)Line希釈剤(3 $\times$ 300 $\mu$ L)で洗浄した。マイクロプレートを37 $^{\circ}$ Cで平衡させた機器に装填した。ARCHITECT(登録商標)プレトリガ溶液(100 $\mu$ L)を各ウェルに分配した。プレトリガ溶液を添加した後、プレートを72秒間振とうした。次にARCHITECT(登録商標)トリガ溶液(100 $\mu$ L)を各ウェルに分配して、化学発光シグナルを2秒間記録した。図3は、ヒト心筋トロポニンT自己抗体中に見出された反応性心筋トロポニンTエピーブの頻度を示す。

**【0164】**

10

20

【表 3】

表2 cTnT抗原ペプチドライブラリ

cTnTペプチド番号	配列番号	cTnT配列	AA 位置
1	1	SDIEEVVEEYEEEEQ	1-15
2	2	EEVVEEYEEEEQEEA	4-18
3	3	VEEYEEEEQEEAAVE	7-21
4	4	YEEEEQEEAAVEEEE	10-24
5	5	EEQEEAAVEEEEDWR	13-27
6	6	EEAAVEEEEDWREDE	16-30
7	7	AVEEEEDWREDEDEQ	19-33
8	8	EEEDWREDEDEQEEA	22-36
9	9	DWREDEDEQEEAAEE	25-39
10	10	EDEDEQEEAAEEDAE	28-42
11	11	DEQEEAAEEDAEAEA	31-45
12	12	EEAAEEDAEAEAETE	34-48
13	13	AEEDAEAEAETEETR	37-51
14	14	DAEAEAETEETRAEE	40-54
15	15	AEAETEETRAEEDEE	43-57
16	16	ETEETRAEEDEEEEEE	46-60
17	17	ETRAEEDEEEEEEAKE	49-63
18	18	AEDEEEEEEAKEAED	52-66
19	19	DEEEEEEAKEAEDGPM	55-69
20	20	EEEAKEAEDGPMEEES	58-72
21	21	AKEAEDGPMEEKPK	61-75
22	22	AEDGPMEEKPKPRS	64-78
23	23	GPMEESKPKPRSFMP	67-81
24	24	EESKPKPRSFMPNLV	70-84
25	25	KPKPRSFMPNLVPPK	73-87
26	26	PRSFMPNLVPPKIPD	76-90

10

20

30

40

27	27	FMPNLVPPKIPDGER	79-93
28	28	NLVPPKIPDGERVDF	82-96
29	29	PPKIPDGERVDFDDI	85-99
30	30	IPDGERVDFDDIHRK	88-102
31	31	GERVDFDDIHRKRME	91-105
32	32	VDFDDIHRKRMEKDL	94-108
33	33	DDIHRKRMEKDLNEL	97-111
34	34	HRKRMEKDLNELQAL	100-114
35	35	RMEKDLNELQALIEA	103-117
36	36	KDLNELQALIEAHFE	106-120
37	37	NELQALIEAHFENRK	109-123
38	38	QALIEAHFENRKKEE	112-126
39	39	IEAHFENRKKEEEL	115-129
40	40	HFENRKKEEELVSL	118-132
41	41	NRKKEEELVSLKDR	121-135
42	42	KEEELVSLKDRIER	124-138
43	43	EELVSLKDRIERRA	127-141
44	44	VSLKDRIERRAERA	130-144
45	45	KDRIERRAERAEQQ	133-147
46	46	IERRAERAEQQRIR	136-150
47	47	RRAERAEQQRIRNER	139-153
48	48	ERAEQQRIRNEREKE	142-156
49	49	EQQRIRNEREKERQN	145-159
50	50	RIRNEREKERQNRLA	148-162
51	51	NEREKERQNRLAEER	151-165
52	52	EKERQNRLAEERARR	154-168
53	53	RQNRLAEERARREEE	157-171
54	54	RLAEERARREEEENR	160-174
55	55	EERARREEEENRRKA	163-177
56	56	ARREEEENRRKAEDE	166-180
57	57	EEENRRKAEDEARK	169-183
58	58	ENRRKAEDEARKKKA	172-186

10

20

30

40

59	59	RKAEDEARKKKALS	175-189
60	60	EDEARKKKALSMMH	178-192
61	61	ARKKKALSMMHFGG	181-195
62	62	KKALSMMHFGGYIQ	184-198
63	63	LSNMMHFGGYIQQA	187-201
64	64	MMHFGGYIQQAQTE	190-204
65	65	FGGYIQQAQTERKS	193-207
66	66	YIQQAQTERKSGKR	196-210
67	67	KQAQTERKSGKRQTE	199-213
68	68	QTERKSGKRQTEREK	202-216
69	69	RKSGKRQTEREKKKK	205-219
70	70	GKRQTEREKKKKILA	208-222
71	71	QTEREKKKKILAERR	211-225
72	72	REKKKILAERRKVL	214-228
73	73	KKKILAERRKVLAI	217-231
74	74	ILAERRKVLAIHLN	220-234
75	75	ERRKVLAIHLNEDQ	223-237
76	76	KVLAIHLNEDQLRE	226-240
77	77	AIDLHLNEDQLREKAK	229-243
78	78	HLNEDQLREKAKELW	232-246
79	79	EDQLREKAKELWQSI	235-249
80	80	LREKAKELWQSIYNL	238-252
81	81	KAKELWQSIYNLEAE	241-255
82	82	ELWQSIYNLEAEKFD	244-258
83	83	QSIYNLEAEKFDLQE	247-261
84	84	YNLEAEKFDLQEKFK	250-264
85	85	EAEKFDLQEKFKQQK	253-267
86	86	KFDLQEKFKQQKYEI	256-270
87	87	LQEKFKQQKYEINVL	259-273
88	88	KFKQQKYEINVLNR	262-276
89	89	QQKYEINVLNRIND	265-279
90	90	YEINVLNRINDNQK	268-282

10

20

30

40

91	91	NVLRNRINDNQKVS	271-285
92	92	RNRINDNQKVS	274-288
93	93	INDNQKVS	277-291
94	94	NQKVS	280-294
95	95	VSKTRGKAKVTGRWK	283-297

## 【0165】

10

## [実施例5]

モノクローナル抗体の心筋トロポニンTへのエピトープマッピング

実施例1からのマウス抗心筋トロポニンT M8020207アクリジニウム-9-カルボキシアミドコンジュゲートをビオチン化ペプチドライブラリ(表2、実施例4)に対してスクリーニングした。コンジュゲートを100ng/mLまで希釈して、次にコンジュゲート溶液(100μL)各試験ウェルに添加した。コンジュゲートを添加した後、次にマイクロプレートに密封して、28rpmのオービタルシェーカー上に置いて、37にて1時間インキュベートした。次にコンジュゲート溶液を除去して、マイクロプレートのウェルをARCHITECT(登録商標)Line希釈剤(3×300μL)で洗浄した。マイクロプレートを37で平衡させた機器に装填した。ARCHITECT(登録商標)プレトリガ溶液(100μL)を各ウェルに分配した。プレトリガ溶液を添加した後、プレートを72秒間振とうした。次にARCHITECT(登録商標)トリガ溶液(100μL)を各ウェルに分配して、化学発光シグナルを2秒間記録した。図4に示すように、1次応答はcTnT<sub>73-87</sub>に相当するペプチド25に対してであった。

20

## 【0166】

実施例1からのマウス抗心筋トロポニンT 1C11をビオチン化ペプチドライブラリ(表2、実施例4)に対してスクリーニングした。抗体を100ng/mLまで希釈して、次に100μLを各試験ウェルに添加した。プレートを次に密封して、37にてインキュベートし、28rpmにて2時間混合した。後にプレートをARCHITECT(登録商標)洗浄緩衝液で洗浄した。ヤギ抗マウスIgGアクリジニウム標識コンジュゲート溶液(100μL)を各試験ウェルに添加した。コンジュゲートをすべての試験試料に添加した後、次にマイクロプレートに密封して、28rpmのオービタルシェーカーに置き、37にて1時間インキュベートした。次にコンジュゲート溶液を除去して、マイクロプレートのウェルをARCHITECT(登録商標)Line希釈剤(3×300μL)で洗浄した。マイクロプレートを37で平衡させた機器に装填した。ARCHITECT(登録商標)プレトリガ溶液(100μL)を各ウェルに分配した。プレトリガ溶液を添加した後、プレートを72秒間振とうした。次にARCHITECT(登録商標)トリガ溶液(100μL)を各ウェルに分配して、化学発光シグナルを2秒間記録した。図5に示すように、1次エピトープ応答はcTnT<sub>181-195</sub>に相当するペプチド61に対してであった。

30

40

## 【0167】

## [実施例6]

心筋トロポニンTの標準曲線

実施例2からのマウス抗心筋トロポニンT M8020207コート微小粒子を0.3%固体まで希釈した。実施例1からのマウス抗心筋トロポニンT 7G7アクリジニウム-9-カルボキシアミドコンジュゲートを30ng/mLまで希釈した。標準溶液をヒト心筋トロポニンI-T-C複合体(HyTest, Turku Finland、カタログ番号8T62)から作製して、cTnT濃度:0、7.0、13.0、40.0および269.0pMを得た。hcTnITCを陰性のヒト血漿中にスパイクすることによって3つの試験試料を調製して、0、7.0および40pMの公称cTnT濃度を得た。

50

## 【 0 1 6 8 】

標準溶液およびヒト血漿試料は、実施例 3 のように ARCHITECT (登録商標) i 2000 で分析した。ポイント間校正曲線をプロットした (RLU 対 cTnT 濃度)。結果を表 3 に挙げる。

## 【 0 1 6 9 】

## 【 表 4 】

表3 磁性微小粒子心筋トロポニンTアッセイ結果

試料	RLU	pM cTnT
Cal A	2,369	0
Cal B	15,275	7
Cal C	28,071	14
Cal D	81,462	42
Cal E	422,814	279
陰性血漿	2,074	#N/A
スパイクした血漿 @7pM	13,788	6.18
スパイクした血漿 @42 pM	74,126	38.07

10

20

## 【 0 1 7 0 】

## [ 実施例 7 ]

自己抗体の心筋トロポニン I へのエピトープマッピング

抗体を図 6 に示すような cTnI アミノ酸配列全体 (UniProtKB/Swiss-Prot PI 9429-1 (TNNI3\_HUMAN)、開始剤メチオニン除去、209 aa、配列番号 97) ペプチド長、15 aa; オーバーラップ、12 aa; PEPscreen (登録商標)、Sigma-Genosys, The Woodlands, TX) を含むペプチドライブラリ (表 4) に対して、ストレプトアビジン・コート・マイクロプレート (Reacti-Bind (商標)、ストレプトアビジン; Pierce, Rockford, IL) 上でスクリーニングした。このためペプチド (100 μL、1200 pmol/mL) をマイクロプレート上に整列させた; 該マイクロプレートを次に密封して、周囲温度にて 1 時間にわたってインキュベート/混合した。次にマイクロプレート (500 μL) を AxSYM トロポニンプレインキュベーション希釈剤 9.5 mL で希釈して、次にペプチドライブラリを用いてマイクロプレートに整列させた (100 μL/ウェル)。プレートを次に密封して、37 °C にてインキュベートし、28 rpm にて 2 時間混合した。後にプレートを ARCHITECT (登録商標) 洗浄緩衝液で洗浄して、マイクロプレートリーダー (Berthold Technologies Inc, Oak Ridge, TN) 上での化学発光検出を使用して、各ペプチドに対する応答を決定した。マウス抗ヒト IgG アクリジニウム標識コンジュゲート溶液 (100 μL) を各試験ウェルに添加した。コンジュゲートをすべての試験試料に添加した後、次にマイクロプレートを密封して、28 rpm のオービタルシェーカー上に置いて、37 °C にて 1 時間イン

30

40

50

キュベートした。次にコンジュゲート溶液を除去して、マイクロプレートのウェルをARCHITECT（登録商標）Line希釈剤（ $3 \times 300 \mu\text{L}$ ）で洗浄した。マイクロプレートを $37^\circ\text{C}$ で平衡させた機器に装填した。ARCHITECT（R）プレトリガ溶液（ $100 \mu\text{L}$ ）を各ウェルに分配した。プレトリガ溶液を添加した後、プレートを72秒間振とうした。次にARCHITECT（登録商標）トリガ溶液（ $100 \mu\text{L}$ ）を各ウェルに分配して、化学発光シグナルを2秒間記録した。図7は、ヒト心筋トロポニンI自己抗体に見出される反応性心筋トロポニンIエピトープの頻度を示す。

【0171】

【表5】

表4 cTnIペプチドライブラリ

cTnIペプチド番号	配列番号	cTnI配列	AA位置
1	98	ADGSSDAAREPRPAP	1-15
2	99	SSDAAREPRPAPAPI	4-18
3	100	AAREPRPAPAPIRRR	7-21
4	101	EPRPAPAPIRRRSSN	10-24
5	102	PAPAPIRRRSSNYRA	13-27
6	103	APIRRRSSNYRAYAT	16-30
7	104	RRRSSNYRAYATEPH	19-33
8	105	SSNYRAYATEPHAKK	22-36
9	106	YRAYATEPHAKKSK	25-39
10	107	YATEPHAKKSKISA	28-42
11	108	EPHAKKSKISASRK	31-45

10

20

30

12	109	AKKKSKISASRKLQL	34-48
13	110	KSKISASRKLQLKTL	37-51
14	111	ISASRKLQLKTLLLQ	40-54
15	112	SRKLQLKTLLLQIAK	43-57
16	113	LQLKTLLLQIAKQEL	46-60
17	114	KTLLLQIAKQELERE	49-63
18	115	LLQIAKQELEREAEE	52-66
19	116	IAKQELEREAERRG	55-69
20	117	QELEREAERRGKKG	58-72
21	118	EREAERRGKGRAL	61-75
22	119	AEERRGKGRALSTR	64-78
23	120	RRGKGRALSTRCQP	67-81
24	121	EKGRALSTRCQPLEL	70-84
25	122	RALSTRCQPLELAGL	73-87
26	123	STRCQPLELAGLGFA	76-90
27	124	CQPLELAGLGFAELQ	79-93
28	125	LELAGLGFAELQDLC	82-96
29	126	AGLGFAELQDLRQL	85-99
30	127	GFAELQDLRQLHAR	88-102
31	128	ELQDLRQLHARVDK	91-105
32	129	DLRQLHARVDKVDE	94-108
33	130	RQLHARVDKVDEERY	97-111
34	131	HARVDKVDEERYDIE	100-114
35	132	VDKVDEERYDIEAKV	103-117
36	133	VDEERYDIEAKVTKN	106-120
37	134	ERYDIEAKVTKNITE	109-123
38	135	DIEAKVTKNITEIAD	112-126
39	136	AKVTKNITEIADLTQ	115-129
40	137	TKNITEIADLTQKIF	118-132
41	138	ITEIADLTQKIFDLR	121-135
42	139	IADLTQKIFDLRGKF	124-138
43	140	LTQKIFDLRGKFKRP	127-141

10

20

30

40

44	141	KIFDLRGKFKRPTLR	130-144
45	142	DLRGKFKRPTLRRVR	133-147
46	143	GKFKRPTLRRVRISA	136-150
47	144	KRPTLRRVRISADAM	139-153
48	145	TLRRVRISADAMMQA	142-156
49	146	RVRISADAMMQALLG	145-159
50	147	ISADAMMQALLGARA	148-162
51	148	DAMMQALLGARAKES	151-165
52	149	MQALLGARAKESLDL	154-168
53	150	LLGARAKESLDLRAH	157-171
54	151	ARAKESLDLRAHLKQ	160-174
55	152	KESLDLRAHLKQVKK	163-177
56	153	LDLRAHLKQVKKEDT	166-180
57	154	RAHLKQVKKEDTEKE	169-183
58	155	LKQVKKEDTEKENRE	172-186
59	156	VKKEDTEKENREVGD	175-189
60	157	EDTEKENREVGDWK	178-192
61	158	EKENREVGDWKKNID	181-195
62	159	NREVGDWKKNIDALS	184-198
63	160	VGDWKKNIDALSGME	187-201
64	161	WRKNIDALSGMEGRK	190-204
65	162	NIDALSGMEGRKKKF	193-207
66	163	ALSGMEGRKKKFES	196-209

10

20

30

40

50

## 【 0 1 7 2 】

## [ 実施例 8 ]

モノクローナル抗体の心筋トロポニン I へのエピトープマッピング

実施例 1 からのマウス抗心筋トロポニン I 19C7 アクリジニウム - 9 - カルボキシ  
 アミドコンジュゲートをビオチン化ペプチドライブラリ ( 実施例 7 ) に対してスクリー  
 ングした。コンジュゲートを 100 ng / mL まで希釈して、次にコンジュゲート溶液 ( 40  
 100  $\mu$  L ) 各試験ウェルに添加した。コンジュゲートを添加した後、次にマイクロプレ  
 ートを密封して、28 rpm のオービタルシェーカー上に置いて、37  $^{\circ}$ C にて 1 時間イン  
 キュベートした。次にコンジュゲート溶液を除去して、マイクロプレートのウェルを A R  
 C H I T E C T ( 登録商標 ) L i n e 希釈剤 ( 3  $\times$  300  $\mu$  L ) で洗浄した。マイクロ  
 プレートを 37  $^{\circ}$ C で平衡させた機器に装填した。A R C H I T E C T ( 登録商標 ) プレトリ  
 ガ溶液 ( 100  $\mu$  L ) を各ウェルに分配した。プレトリガ溶液を添加した後、プレートを  
 72 秒間振とうした。次に A R C H I T E C T ( 登録商標 ) トリガ溶液 ( 100  $\mu$  L ) を  
 各ウェルに分配して、化学発光シグナルを 2 秒間記録した。図 8 に示すように、1 次応答  
 は、ベンダーからのエピトープ割当てを含む c T n I <sub>37-57</sub> に相当するペプチド 13  
 - 15 に対してであった。( 配列番号 110、111 および 112 )。

【 0 1 7 3 】

[ 実施例 9 ]

心筋トロポニンIアッセイの標準曲線

実施例 2 からのマウス抗心筋トロポニンI 8 E 1 0 / M O 6 コート微小粒子を 0 . 3 % 固体まで希釈した。実施例 1 からのマウス抗心筋トロポニンI 1 9 C 7 アクリジニウム - 9 - カルボキシアミドコンジュゲートを 3 0 n g / m L まで希釈した。標準溶液をヒト心筋トロポニンI - T - C 複合体 ( H y T e s t , T u r k u F i n l a n d 、カタログ番号 8 T 6 2 ) から作製して、c T n I 濃度 : 0 、 1 0 . 0 、 2 1 . 0 、 6 3 . 0 および 4 1 9 . 0 p M を得た。h c T n I T C を陰性のヒト血漿中にスパイクすることによって 3 つの試験試料を調製して、0 、 1 0 . 0 および 6 3 p M の公称 c T n I 濃度を得た。標準溶液およびヒト血漿試料は、実施例 3 のように A R C H I T E C T ( 登録商標 ) i 2 0 0 0 で分析した。ポイント間校正曲線をプロットした ( R L U 対 c T n I 濃度 ) 。結果を表 5 に挙げる。

10

【 0 1 7 4 】

【 表 6 】

表5 磁性微小粒子心筋トロポニンIアッセイ結果

試料	RLU	pM cTnI
Cal A	449	0
Cal B	10,173	10
Cal C	20,244	21
Cal D	59,799	63
Cal E	377,720	419
陰性血漿	867	0.45
スパイク血漿@10 pM	6,059	6.04
スパイク血漿 @63 pM	35,742	37.35

20

30

【 0 1 7 5 】

[ 実施例 1 0 ]

心筋トロポニンIアッセイの標準曲線

実施例 2 からのマウス抗心筋トロポニンI 8 E 1 0 / M O 6 コート微小粒子およびマウス抗心筋トロポニンT M 8 0 2 0 2 0 7 コート微小粒子を 1 : 1 で 0 . 3 % 固体懸濁物となるまで希釈した。実施例 1 からのマウス抗心筋トロポニンI 1 9 C 7 アクリジニウム - 9 - カルボキシアミドコンジュゲートおよびマウス抗心筋トロポニンT 7 G 7 アクリジニウム - 9 - カルボキシアミドコンジュゲートを 1 : 1 で 3 0 n g / m L の溶液となるまで希釈した。標準溶液をヒト心筋トロポニンI - T - C 複合体 ( H y T e s t , T u r k u F i n l a n d 、カタログ番号 8 T 6 2 ) から作製して、c T n I 濃度 : 0 、 1 7 . 0 、 3 4 . 0 、 1 0 3 . 0 および 6 8 7 . 0 p M を得た。h c T n I T C を陰性のヒト血漿中にスパイクすることによって 3 つの試験試料を調製して、0 、 1 7 . 0 および 1 0 3 p M の公称 c T n I 濃度を得た。標準溶液およびヒト血漿試料は、実施例 3 のように A R C H I T E C T ( 登録商標 ) i 2 0 0 0 で分析した。ポイント間校正曲線をプロットした ( R L U 対 c T n I 濃度 ) 。結果を表 6 に挙げる。

40

【 0 1 7 6 】

50

## 【表 7】

表6 磁性微小粒子心筋トロポニンアッセイ結果

試料	RLU	pM cTn
Cal A	13,623	0
Cal B	20,953	17
Cal C	45,617	34
Cal D	92,650	103
Cal E	465,222	687
陰性血漿	13,542	#N/A
スパイク血漿 @17pM	30,008	23.50
スパイク血漿 @103 pM	92,899	103.51

10

20

## 【0177】

当業者は、本開示に記載したイムノアッセイが目的を遂行し、言及された目標および利点を達成するのに適していることを、イムノアッセイに本来備わっているものと同様にただちに認識するであろう。本明細書に記載する分子複合体および方法、手順、処置、分子、特異性化合物は好ましい実施形態を現在表し、例示的であり、本発明の範囲を限定するものではない。本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書で開示された本開示に様々な代替および修正が行われ得ることが当業者には明らかとなる。

## 【0178】

明細書で言及したすべての特許および刊行物は、本開示が関わる当業者の水準を示す。すべての特許および刊行物は、個別の刊行物がそれぞれ具体的および個別に参照により組み入れられていることが示されているのと同じ程度まで、参照により本明細書に組み入れられている。

30

## 【0179】

本明細書に例として記載した本開示は、本明細書で具体的に開示されていないいずれかの1つまたは複数の要素、1つまたは複数の限定の非存在下で好適に実施され得る。このため、例えば各例において、「含む」、「から本質的に成る」および「から成る」という用語のいずれも他の2つの用語のどちらかと置き換えられ得る。用いられた用語および表現は、限定の用語ではなく説明の用語として使用され、このような用語および表現の使用において、提示および説明された特徴のいずれかの均等物またはこれの一部を除外する意図はないが、請求された本開示の範囲内での各種の修正が可能であることが認識される。このため本開示は好ましい実施形態および任意の特徴によって具体的に開示してきたが、本明細書で開示した概念の修正および変更が当業者によって用いられ得ること、およびこのような修正および変更が添付請求項によって定義されるような本発明の範囲内であることが理解されるべきである。

40

## 【0180】

上記の説明が本発明の範囲を限定するのではなく、例証するものであることが理解されるはずである。本発明の他の態様、利点および修正は、下で述べる請求項の所期の範囲内である。

【 図 1 】

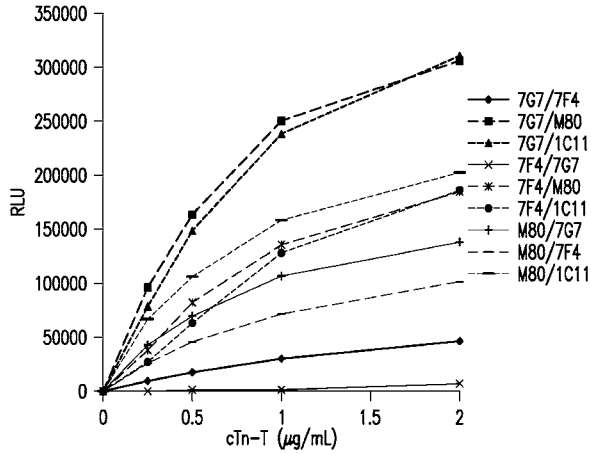


FIG. 1

【 図 2 】

SDIEEVVEEY.EEEEEQEEAAV EEEEDWREDE DEQEEAAEED AEAETAETEET  
 RAEDEEEEE AKEAEDGPM ESKPKPRFSM PNLVPPKIPD GERVDFDDIH  
 RKRMEKDLNE LQALIEAHFE NRKKEEEELV SLKDRIERRR AERAEQQRIR  
 NEREKERQNR LAEERARREE EENRRKAEDE ARKKKALSNN MHFGGYIQKQ  
 AQTERKSGKR QTEREKKKKI LAERRKVLAI DHLNEDQLRE KAKELWQSIY  
 NLEAEKFDLQ EKFKQKQYEI NVLRNRINDN QKVSCTRGA KVTGRWK

(297 aa)

FIG. 2

【 図 3 】

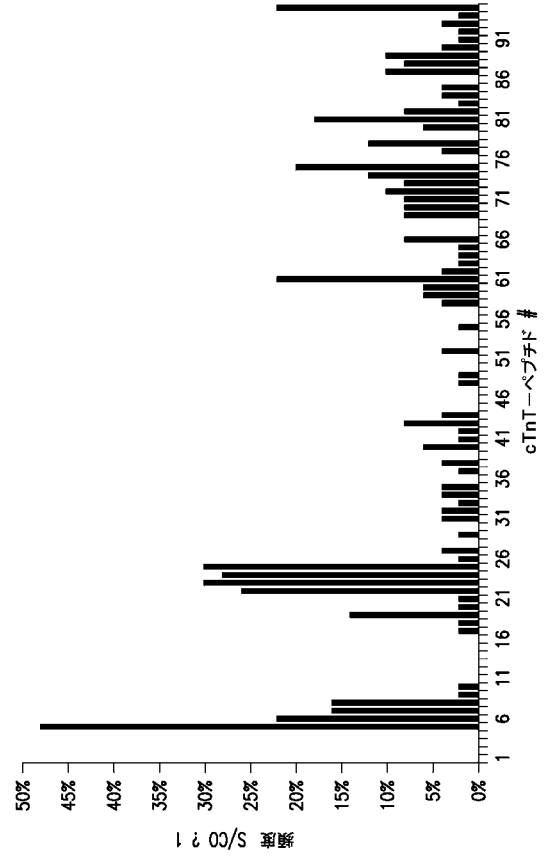


FIG. 3

【 図 4 】

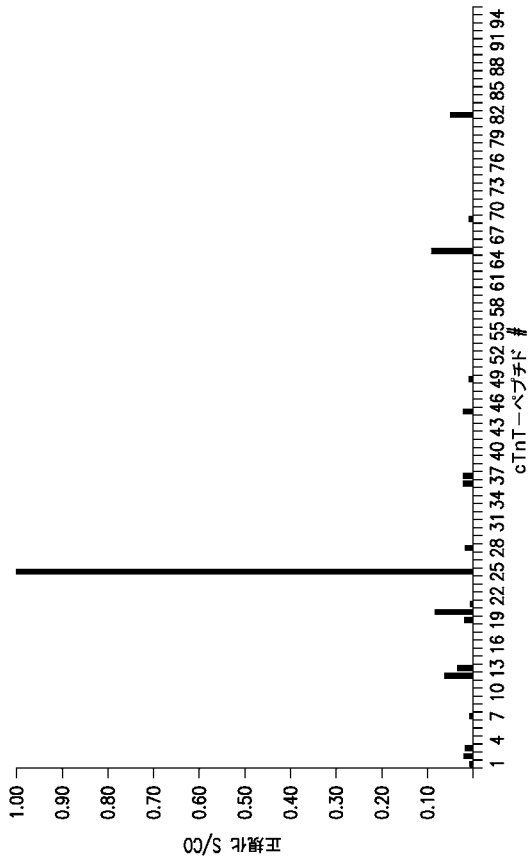


FIG. 4

【 図 5 】

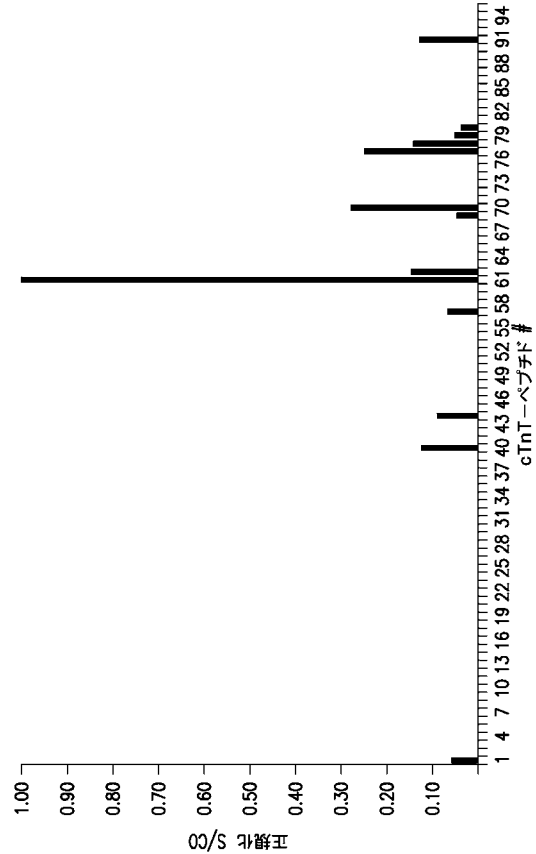


FIG. 5

【 図 6 】

ADGSSDAARE PRPAPAPIRR RSSNYRAYAT EPHAKKSKI SASRKLQKLT  
 LLLQIAKQEL EREAERRGE KGRALSTRCQ PLELAGLGA ELQDLCRQLH  
 ARVDKVDDEER YDIEAKVTKN ITEIADLTQK IFDLRGKFKR PTLRRVRISA  
 DAMMQALLGA RAKESLDLRA HLKQVKKEDT EKENREVGDW RKNIDALSGM  
 EGRKKKFES

(209 aa)

FIG.6

【 図 7 】

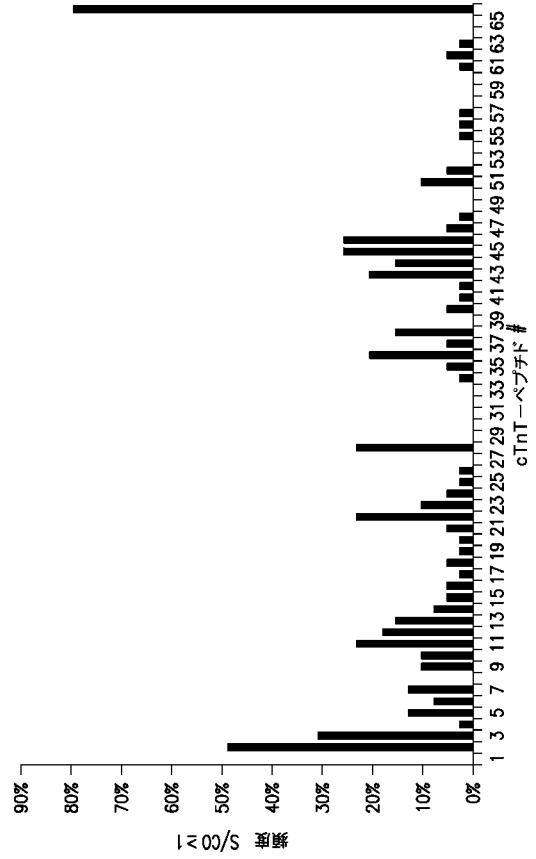


FIG.7

【 図 8 】

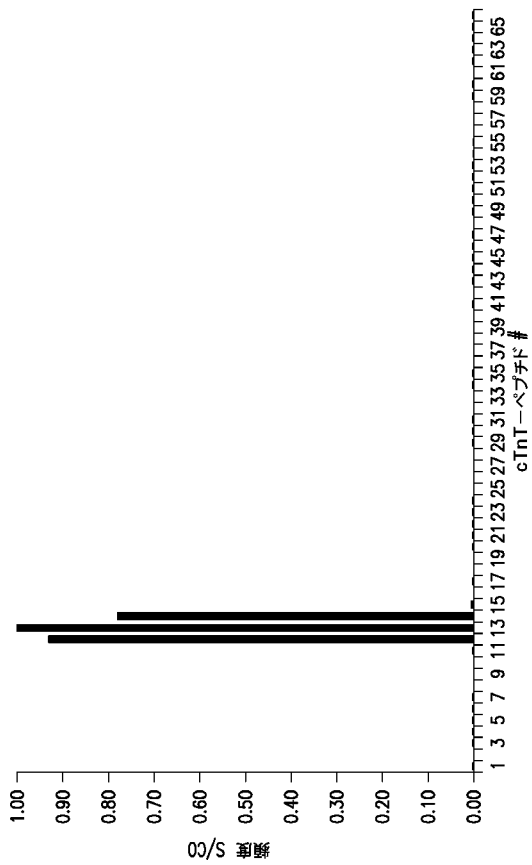


FIG.8

## 【配列表】

2015180888000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成27年7月6日(2015.7.6)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象における心筋細胞損傷を試験試料から検出するためのイムノアッセイであって：

a) 心筋細胞損傷が疑われる対象からの試験試料を  $n'$  個の心筋細胞抗原 a 上の少なくとも  $n$  個のエピトープに結合する  $n$  個の抗体 A に接触させて、 $n'$  個の免疫複合体(ここで、 $n$  は1から10の整数であり； $n'$  は2から10の整数である。)を形成するステップ；

b)  $n'$  個の免疫複合体を含む a) で得られた混合物を、 $n'$  個の心筋細胞抗原 a 上の  $n''$  個のエピトープに結合する  $n''$  個の抗体 B に接触させて、 $n'$  個の測定可能集合体(ここで、 $n$  および  $n''$  は独立して、1から10の整数であり、 $n'$  は2から10の整数であり、抗体 A および B は、心筋細胞抗原の  $(n + n'')$  個の異なるエピトープに結合する。)を形成するステップ；

c) 少なくとも2つの測定可能集合体の光学的、電気的、または状態変化シグナルを測定するステップ；ならびに

d) ステップ(c)の測定値が所定のレベルを超えるか否かを判定することによって心筋細胞損傷を検出するステップであって、

それぞれの抗体 A は、心筋細胞抗原 a 上の少なくとも1つのエピトープに結合し、該エピトープは抗体 B が結合するいずれのエピトープとも異なり、

心筋細胞抗原 a は、心筋トロポニンI、心筋トロポニンT、クレアチンホスホキナーゼMB(CKMB)、ミオグロビン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、B型ナトリウム利尿ペプチド、心脂肪酸結合タンパク質(H-FABP)、胎盤成長因子(PLGF)およびインターロイキン-6(IL-6)から成る群から選択され、B型ナトリウム利尿ペプチドはpro-BNP、NT-proBNP及びhBNP(1-32)からなる群から選択され、および

抗体 A 又は、抗体 B はヒト化抗体を含むイムノアッセイ。

【請求項2】

請求項1に記載のイムノアッセイであって、 $n' = 2$  であり、前記心筋細胞抗原 a が、心筋トロポニンI(cTnI)および心筋トロポニンT(cTnT)であるイムノアッセイ。

【請求項3】

請求項1に記載のイムノアッセイであって、前記抗体 B が、抗ヒトIgG抗体を含むイムノアッセイ。

【請求項4】

請求項1に記載のイムノアッセイであって、前記抗体 B が、検出可能な標識に結合され、該検出可能な標識が、酵素、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子ケミルミノフォア、フルオロフォア、蛍光消光剤、化学発光消光剤、またはビオチンであるイムノアッセイ。

【請求項5】

請求項1に記載のイムノアッセイであって、前記光学シグナルが、化学発光、蛍光、リン光、電気化学発光、紫外線吸収、可視吸収、赤外線吸収、屈折、表面プラズモン共鳴における心筋細胞抗原 a 濃度依存性変化として測定されるイムノアッセイ。

【請求項6】

請求項 1 に記載のイムノアッセイであって、前記電気シグナルが、電流、抵抗、電位、質量対電荷比、またはイオンカウントにおける心筋細胞抗原 a 濃度依存性変化として測定されるイムノアッセイ。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のイムノアッセイであって、前記状態変化シグナルが、サイズ、溶解度、質量または共鳴における心筋細胞抗原 a 濃度依存性変化として測定されるイムノアッセイ。

【請求項 8】

請求項 1 に記載のイムノアッセイであって、前記抗体 A が、固相に固定されているイムノアッセイ。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のイムノアッセイであって、前記固相が、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタプレート、キュベット、膜、足場分子、石英結晶、フィルム、濾紙、ディスクおよびチップから成る群から選択されるイムノアッセイ。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のイムノアッセイであって、前記試験試料が、全血、血清、または血漿であるイムノアッセイ。

【請求項 11】

対象における心筋細胞損傷を試験試料から検出するためのイムノアッセイであって：

a) 心筋細胞損傷が疑われる対象からの試験試料を、 $n'$  個の心筋細胞抗原 a 上の少なくとも  $n$  個のエピトープに結合する  $n$  個の抗体 A に接触させて、 $n'$  個の免疫複合体（ここで、 $n$  は 1 から 10 の整数であり； $n'$  は 2 から 10 の整数である。）を形成するステップ；

b)  $n'$  個の免疫複合体を含む a) で得られた混合物を  $n'$  個の心筋細胞抗原 a 上の  $n''$  個のエピトープに結合する  $n''$  個の抗体 B に接触させて、 $n'$  個の測定可能集合体（ここで、 $n$  および  $n''$  は独立して、1 から 10 の整数であり、 $n'$  は 2 から 10 の整数であり、抗体 A および B は、心筋細胞抗原の  $(n + n'')$  個の異なるエピトープに結合し、抗体 A のそれぞれは心筋細胞抗原 a 上の少なくとも 1 つのエピトープに結合し、該エピトープは、抗体 B が結合するいずれのエピトープとも異なり、ここで抗体 B は、少なくとも 1 つのアクリジニウム化合物を含む検出可能な標識で標識され、抗体 A 又は、抗体 B はヒト化抗体を含む。）を形成するステップ；

c) 過酸化水素源をステップ (b) の混合物に発生させるまたは提供するステップ；

d) ステップ (c) の混合物に塩基性溶液を添加して光シグナルを発生させるステップ；

e) ステップ (d) によって発生したまたはステップ (d) において放出された光シグナルを測定するステップ；および

f) ステップ (e) の測定値が所定のレベルを超えるか否かを判定することによって心筋細胞損傷を検出するステップ；

を含むイムノアッセイ。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のイムノアッセイであって、前記心筋細胞抗原 a が、心筋トロポニン I、心筋トロポニン T、クレアチンホスホキナーゼ MB (CKMB)、ミオグロビン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、B 型ナトリウム利尿ペプチド (pro-BNP、NT-proBNP および hBNP (1-32) を含む。)、心脂肪酸結合タンパク質 (H-FABP)、胎盤成長因子 (PLGF) およびインターロイキン - 6 (IL-6) から成る群から選択されるイムノアッセイ。

【請求項 13】

請求項 11 に記載のイムノアッセイであって、 $n' = 2$  であり、前記心筋細胞抗原 a が、心筋トロポニン I (cTnI) および心筋トロポニン T (cTnT) であるイムノアッセイ。

## 【請求項 14】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、前記抗体 A または抗体 B が、ヒト化抗体を含むイムノアッセイ。

## 【請求項 15】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、前記抗体 B が、抗 I g G 抗体を含むイムノアッセイ。

## 【請求項 16】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、前記抗体 A が、固相に固定されているイムノアッセイ。

## 【請求項 17】

請求項 16 に記載のイムノアッセイであって、前記固相が磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場分子、石英結晶、フィルム、濾紙、ディスクおよびチップから成る群から選択されるイムノアッセイ。

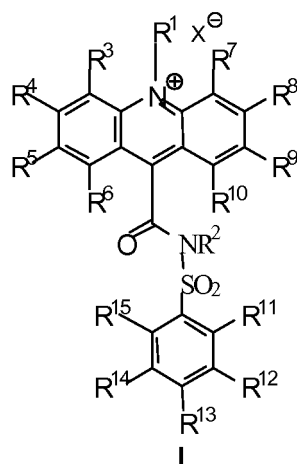
## 【請求項 18】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、前記試験試料が、全血、血清または血漿であるイムノアッセイ。

## 【請求項 19】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、前記アクリジニウム化合物が、式 I による構造を有するアクリジニウム - 9 - カルボキサミド：

## 【化 1】



(式中、R1 および R2 はそれぞれ独立して：アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキシアルキルから成る群から選択され、ならびに

式中、R3 から R15 はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキシアルキルから成る群から選択され；ならびに

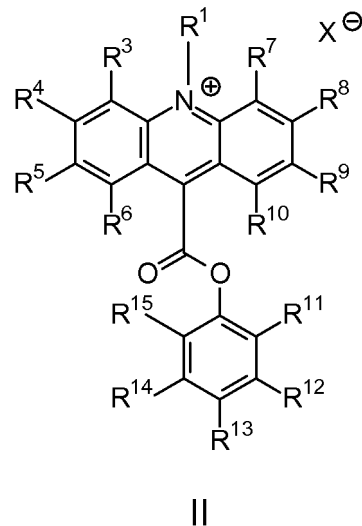
場合により、存在する場合、X はアニオンである。)

であるイムノアッセイ。

## 【請求項 20】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、前記アクリジニウム化合物が、式 II による構造を有するアクリジニウム - 9 - カルボキシラートアリールエステル：

## 【化 2】



(式中、R 1 は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルであり；ならびに

式中、R 3 から R 1 5 はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキソアルキルから成る群から選択され；ならびに

場合により、存在する場合、X はアニオンである。)

であるイムノアッセイ。

## 【請求項 2 1】

請求項 1 1 または 1 2 に記載のイムノアッセイであって、前記抗体 A が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体および親和性成熟抗体から成る群から選択されるイムノアッセイ。

## 【請求項 2 2】

請求項 1 1 または 1 2 に記載のイムノアッセイであって、前記抗体 B が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体および親和性成熟抗体から成る群から選択されるイムノアッセイ。

## 【請求項 2 3】

請求項 1 1 または 1 2 に記載のイムノアッセイであって、前記過酸化水素が、緩衝液または過酸化水素を含有する溶液を添加することによって提供されるイムノアッセイ。

## 【請求項 2 4】

請求項 1 1 または 1 2 に記載のイムノアッセイであって、過酸化水素発生酵素を試験試料に添加することによって発生させるイムノアッセイ。

## 【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載のイムノアッセイであって、前記過酸化水素発生酵素が、(R) - 6 - ヒドロキシニコチンオキシダーゼ、(S) - 2 - ヒドロキシ酸オキシダーゼ、(S) - 6 - ヒドロキシニコチンオキシダーゼ、3 - aci - ニトロプロパノートオキシダーゼ、3 - ヒドロキシアントラニレートオキシダーゼ、4 - ヒドロキシマンデラートオキシダーゼ、6 - ヒドロキシニコチネートデヒドロゲナーゼ、アブシシンアルデヒドオキシダーゼ、アシル - CoA オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、アミノオキシダーゼ、アミノオキシダーゼ (銅含有)、アミノオキシダーゼ (フラビン含有)、アリールアルコールオキシダーゼ、アリールアルデヒドオキシダーゼ、カテコールオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、コリンバミンオキシダーゼ、シクロヘキシルアミノオキシダーゼ、シトクロム c オキシダーゼ、D - アミノ酸オキシダーゼ、D - アラビノノ - 1, 4 - ラクトンオキシダーゼ、D - アラビノノ - 1,

4 - ラクトンオキシダーゼ、D - アスパルテートオキシダーゼ、D - グルタメートオキシダーゼ、D - グルタメート (D - アスパルテート) オキシダーゼ、ジヒドロベンゾフェナントリジンオキシダーゼ、ジヒドロオロテートオキシダーゼ、ジヒドロウラシルオキシダーゼ、ジメチルグリシンオキシダーゼ、D - マンニトールオキシダーゼ、エクジソンオキシダーゼ、エタノールアミンオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルタチオンオキシダーゼ、グリセロール - 3 - ホスフェートオキシダーゼ、グリシンオキシダーゼ、グリオキシラートオキシダーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、ヒドロキシフィタネートオキシダーゼ、インドール - 3 - アセトアルデヒドオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、L - アミノ酸オキシダーゼ、L - アスパルテートオキシダーゼ、L - ガラクトノラクトンオキシダーゼ、L - グルタメートオキシダーゼ、L - グルノラクトンオキシダーゼ、L - リジン 6 - オキシダーゼ、L - リジンオキシダーゼ、長鎖アルコールオキシダーゼ、L - ピペコラートオキシダーゼ、L - ソルボースオキシダーゼ、マレートオキシダーゼ、メタンチオールオキシダーゼ、モノアミノ酸オキシダーゼ、N 6 - メチル - リジンオキシダーゼ、N - アシルヘキソサミンオキシダーゼ、NAD (P) Hオキシダーゼ、ニトロアルカンオキシダーゼ、N - メチル - L - アミノ酸オキシダーゼ、ヌクレオシドオキシダーゼ、オキサラートオキシダーゼ、ポリアミンオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ポリビニルアルコールオキシダーゼ、プレニルシステインオキシダーゼ、タンパク質 - リジン 6 - オキシダーゼ、プトレシンオキシダーゼ、ピラノースオキシダーゼ、ピリドキサル 5' - ホスフェートシンターゼ、ピリドキシン 4 - オキシダーゼ、ピロロキノリンキノシンターゼ、ピルベートオキシダーゼ、ピルベートオキシダーゼ (CoA - アセチル化)、レチクリンオキシダーゼ、レチナルオキシダーゼ、リファマイシン - B オキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、2 級アルコールオキシダーゼ、サルファイトオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、スーパーオキシドレダクターゼ、テトラヒドロベルベリンオキシダーゼ、チアミンオキシダーゼ、トリプトファン - オキシダーゼ、ウレートオキシダーゼ (ウリカーゼ、尿酸オキシダーゼ)、バニリルアルコールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、キシリトールオキシダーゼおよびこれの組合せから成る群から選択されるイムノアッセイ。

【請求項 26】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、前記塩基性溶液が、少なくとも約 10 の pH を有する溶液であるイムノアッセイ。

【請求項 27】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、ステップ (e) の測定値が所定のレベルを超えるか否かを判定することによって心筋細胞損傷を検出するステップ (f) が、各心臓抗原 a の標準曲線の使用または各心臓抗原 a の参照標準への比較のどちらかによって、ステップ (e) の光シグナルの量を試験試料中の心臓抗原 a および b の量に関連付けることを含むイムノアッセイ。

【請求項 28】

請求項 27 に記載のイムノアッセイであって、各心臓抗原 a の参照標準への比較を含み、各参照標準が抗イディオタイプ抗体を含むイムノアッセイ。

【請求項 29】

請求項 27 に記載のイムノアッセイであって、各心臓抗原 a の参照標準への比較を含み、各参照標準が誘導体化心筋細胞抗原を含むイムノアッセイ。

【請求項 30】

請求項 29 に記載のイムノアッセイであって、前記誘導体化心筋細胞抗原が、ポリエチレングリコールによって誘導体化された前記心筋細胞抗原を含むイムノアッセイ。

【請求項 31】

請求項 11 または 12 に記載のイムノアッセイであって、自動化システムまたは半自動化システムでの使用に適合させたイムノアッセイ。

【請求項 32】

試験試料から心筋細胞損傷を検出するためのキットであって：

a)  $n$  個の抗体 A であって、 $n'$  個の心筋細胞抗原 a 上の少なくとも  $n$  個のエピトープに結合して  $n'$  個の免疫複合体 (ここで、 $n$  は 1 から 10 の整数であり; および  $n'$  は 2 から 10 の整数である。) を形成する抗体 A ;

b)  $n''$  個の抗体 B であって、 $n'$  個の心筋細胞抗原 a 上の  $n''$  個のエピトープに結合して、 $n'$  個の測定可能集合体 (ここで、 $n$  および  $n''$  は独立して、1 から 10 の整数であり、 $n'$  は 2 から 10 の整数であり、ならびに抗体 A および B は心筋細胞抗原の ( $n + n''$ ) 個の異なるエピトープに結合する。) を形成し、それぞれの抗体 A は心筋細胞抗原 a 上の少なくとも 1 つのエピトープに結合し、該エピトープは、抗体 B が結合するいずれのエピトープとも異なり; および

c) 試験試料中の心筋細胞抗原 ( $a^{n'}$ ) の全量が所定のレベルを超えるか否かを判定するための説明書;

を含むキット。

【請求項 33】

請求項 32 に記載のキットであって、前記心筋細胞抗原 a が、心筋トロポニン I、心筋トロポニン T、クレアチンホスホキナーゼ MB (CKMB)、ミオグロビン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、B 型ナトリウム利尿ペプチドから成る群から選択され、第 1 の心臓特異性抗原および第 2 の心臓特異性抗原が異なる抗原であるキット。

【請求項 34】

請求項 32 に記載のキットであって、 $n' = 2$  であり、前記心筋細胞抗原 a が、心筋トロポニン I (cTnI) および心筋トロポニン T (cTnT) であるキット。

【請求項 35】

請求項 32 または 33 に記載のキットであって、固相をさらに含み、前記抗体 A が、該固相に結合されているキット。

【請求項 36】

請求項 35 に記載のキットであって、前記固相が、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイプレート、キュベット、膜、足場分子、石英結晶、フィルム、濾紙、ディスクおよびチップから成る群から選択されるキット。

【請求項 37】

抗体 B に結合された検出可能な標識をさらに含む請求項 32 または 33 に記載のキット。

【請求項 38】

請求項 37 に記載のキットであって、前記検出可能な標識が、酵素、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子ケミルミノフォア、フルオロフォア、蛍光消光剤、化学発光消光剤、またはビオチンであるキット。

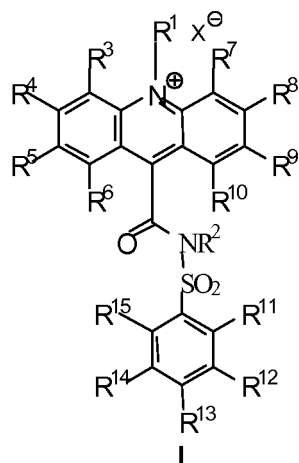
【請求項 39】

前記検出可能な標識がアクリジニウム化合物である、請求項 38 に記載のキット。

【請求項 40】

請求項 39 に記載のキットであって、前記アクリジニウム化合物が、式 I による構造を有するアクリジニウム - 9 - カルボキサミド:

## 【化 3】



( 式中、R 1 および R 2 はそれぞれ独立して：アルキル、アルケニル、アルキニル、アリーールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキシアルキルから成る群から選択され、ならびに

式中、R 3 から R 1 5 はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリーールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキシアルキルから成る群から選択され；ならびに

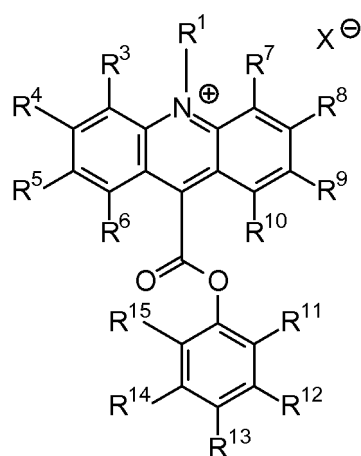
場合により、存在する場合、X はアニオンである。)

であるキット。

## 【請求項 4 1】

請求項 3 9 に記載のキットであって、前記アクリジニウム化合物が、式 I I による構造を有するアクリジニウム - 9 - カルボキシラートアリーールエステル：

## 【化 4】



## II

( 式中、R 1 は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリーールまたはアラルキル、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキシアルキルであり；ならびに

式中、R 3 から R 1 5 はそれぞれ独立して：水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリーールまたはアラルキル、アミノ、アミド、アシル、アルコキシル、ヒドロキシル、カルボキシル、ハロゲン、ハライド、ニトロ、シアノ、スルホ、スルホアルキル、カルボキシアルキルおよびオキシアルキルから成る群から選択され；ならびに

場合により、存在する場合、X はアニオンである。)

であるキット。

【請求項 4 2】

塩基性溶液をさらに含む、請求項 4 0 または 4 1 に記載のキット。

【請求項 4 3】

請求項 4 2 に記載のキットであって、前記塩基性溶液が、少なくとも約 1 0 の pH を有する溶液であるキット。

【請求項 4 4】

過酸化水素源をさらに含む、請求項 4 3 に記載のキット。

【請求項 4 5】

請求項 4 4 に記載のキットであって、過酸化水素源が、緩衝液または過酸化水素を含有する溶液を含むキット。

【請求項 4 6】

請求項 4 5 に記載のキットであって、前記過酸化水素源が、過酸化水素発生酵素を含むキット。

【請求項 4 7】

請求項 4 6 に記載のキットであって、前記過酸化水素発生酵素が ( R ) - 6 - ヒドロキシニコチンオキシダーゼ、( S ) - 2 - ヒドロキシ酸オキシダーゼ、( S ) - 6 - ヒドロキシニコチンオキシダーゼ、3 - a c i - ニトロプロパノアートオキシダーゼ、3 - ヒドロキシアントラニレートオキシダーゼ、4 - ヒドロキシマンデラートオキシダーゼ、6 - ヒドロキシニコチネートデヒドロゲナーゼ、アブシシンアルデヒドオキシダーゼ、アシル - C o A オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、アミノオキシダーゼ、アミノオキシダーゼ ( 銅含有 )、アミノオキシダーゼ ( フラビン含有 )、アリールアルコールオキシダーゼ、アリールアルデヒドオキシダーゼ、カテコールオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、コルンバミンオキシダーゼ、シクロヘキシルアミノオキシダーゼ、シトクロム c オキシダーゼ、D - アミノ酸オキシダーゼ、D - アラビノノ - 1 , 4 - ラクトンオキシダーゼ、D - アラビノノ - 1 , 4 - ラクトンオキシダーゼ、D - アスパルテートオキシダーゼ、D - グルタメートオキシダーゼ、D - グルタメート ( D - アスパルテート ) オキシダーゼ、ジヒドロベンゾフェナントリジンオキシダーゼ、ジヒドロオロテートオキシダーゼ、ジヒドロウラシルオキシダーゼ、ジメチルグリシンオキシダーゼ、D - マンニトールオキシダーゼ、エクジソンオキシダーゼ、エタノールアミノオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルタチオンオキシダーゼ、グリセロール - 3 - ホスフェートオキシダーゼ、グリシンオキシダーゼ、グリオキシラートオキシダーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、ヒドロキシフィタネートオキシダーゼ、インドール - 3 - アセトアルデヒドオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、L - アミノ酸オキシダーゼ、L - アスパルテートオキシダーゼ、L - ガラクトノラクトンオキシダーゼ、L - グルタメートオキシダーゼ、L - グルノラクトンオキシダーゼ、L - リジン 6 - オキシダーゼ、L - リジンオキシダーゼ、長鎖アルコールオキシダーゼ、L - ピベコラートオキシダーゼ、L - ソルボースオキシダーゼ、マレートオキシダーゼ、メタンチオールオキシダーゼ、モノアミノ酸オキシダーゼ、N 6 - メチル - リジンオキシダーゼ、N - アシルヘキソサミンオキシダーゼ、N A D ( P ) H オキシダーゼ、ニトロアルカンオキシダーゼ、N - メチル - L - アミノ酸オキシダーゼ、ヌクレオシドオキシダーゼ、オキサラートオキシダーゼ、ポリアミノオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ポリビニルアルコールオキシダーゼ、プレニルシステインオキシダーゼ、タンパク質 - リジン 6 - オキシダーゼ、プトレシンオキシダーゼ、ピラノースオキシダーゼ、ピリドキサル 5 ' - ホスフェートシターゼ、ピリドキシン 4 - オキシダーゼ、ピロロキノリンキノシンターゼ、ピルベートオキシダーゼ、ピルベートオキシダーゼ ( C o A - アセチル化 )、レチクリンオキシダーゼ、レチナルオキシダーゼ、リファマイシン - B オキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、2 級アルコールオキシダーゼ、サルファイトオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、スーパーオキシドレダクターゼ、テトラヒドロベルベリンオキシダーゼ、チアミンオキシダーゼ、トリプトファン , - オキシダーゼ

、ウレートオキシダーゼ（ウリカーゼ、尿酸オキシダーゼ）、バニリルアルコールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、キシリトールオキシダーゼおよびこれの組合せから成る群から選択されるキット。

【請求項 48】

請求項 32 または 33 に記載のキットであって、前記検出抗体が、抗ヒト I g G 抗体を含むキット。

【請求項 49】

少なくとも 1 つの心筋細胞抗原参照標準をさらに含む、請求項 32 または 33 に記載のキット。

【請求項 50】

請求項 49 に記載のキットであって、前記少なくとも 1 つの心筋細胞抗原参照標準が、抗イディオタイプ抗体を含むキット。

【請求項 51】

請求項 49 に記載のキットであって、前記少なくとも 1 つの心筋細胞抗原参照標準が、誘導体化心筋細胞抗原を含むキット。

【請求項 52】

請求項 51 に記載のキットであって、前記誘導体化心筋細胞抗原が、ポリエチレングリコールによって誘導体化された心筋細胞抗原を含むキット。

---

フロントページの続き

(72)発明者 ジェフリー・アール・ブラツシアー

アメリカ合衆国、イリノイ・60060、マンダライン、ノース・シルバン・ドライブ・145

(72)発明者 フィリップ・ジー・マツテイングリー

アメリカ合衆国、イリノイ・60030、サード・レイク、シーフエアラー・ドライブ・204

专利名称(译)	诊断心肌细胞损伤的诊断		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015180888A</a>	公开(公告)日	2015-10-15
申请号	JP2015116308	申请日	2015-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	マチエイアダムチツク ジエフリーアールブラツシアー フィリップジーマツテイングリー		
发明人	マチエイ・アダムチツク ジエフリー・アール・ブラツシアー フィリップ・ジー・マツテイングリー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553		
CPC分类号	G01N33/6878 C07D219/14 G01N33/56966 G01N33/6893 G01N2333/4712 G01N2333/5412 G01N2333/58 G01N2800/325		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.545.A G01N33/553 G01N33/543.575		
优先权	12/630229 2009-12-03 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

<b>摘要(译)</b> 公开了用于诊断临床病症，评估风险或预测由于心肌细胞损伤导致的结果的测定法。免疫测定方法和试剂盒通过测定测试样品中多种心肌细胞抗原的存在，并在单个测定结果中组合多次测定，提供心肌细胞损伤的评估。	(21) 出願番号 特願2015-116308 (P2015-116308) (22) 出願日 平成27年6月9日 (2015.6.9) (62) 分割の表示 特願2012-542070 (P2012-542070) の分割 原出願日 平成22年11月17日 (2010.11.17) (31) 優先権主張番号 12/630,229 (32) 優先日 平成21年12月3日 (2009.12.3) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 391008788 アボット・ラボラトリーズ ABBOTT LABORATORIES アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット パーク アボット パーク ロード 10 0 (74) 代理人 110001173 特許業務法人川口国際特許事務所 (72) 発明者 マチエイ・アダムチツク アメリカ合衆国、イリノイ・60031、 ガーニー、クエール・ヘイブズ・コート・ 174
	最終頁に続く	