

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-520124

(P2011-520124A)

(43) 公表日 平成23年7月14日(2011.7.14)

(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 33/576 (2006.01)	GO 1 N 33/576	B
	GO 1 N 33/576	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2011-508625 (P2011-508625)	(71) 出願人	391008788 アボット・ラボラトリーズ
(86) (22) 出願日	平成21年5月6日 (2009.5.6)		ABBOTT LABORATORIES
(85) 翻訳文提出日	平成22年12月13日 (2010.12.13)		アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/042956		パーク アボット パーク ロード 10
(87) 国際公開番号	W02009/137559		0
(87) 国際公開日	平成21年11月12日 (2009.11.12)	(74) 代理人	110001173 特許業務法人川口国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	12/117,550	(72) 発明者	マーテイン, リン・エイ
(32) 優先日	平成20年5月8日 (2008.5.8)		アメリカ合衆国、イリノイ・60046、
(33) 優先権主張国	米国 (US)		リンデンハースト、スタッフオード・コート・396

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルスを検出するための方法

(57) 【要約】

本発明は、試料中のウイルス標的を検出する感度を増大させる方法に関する。感度は、標的を含む複合体を破壊させることによって、又は試料のより多い容量から標的のレベルを測定することによって増加させ得る。前記方法は、2.5未満のpH、還元剤（例えば、DTT又はメルカプトエタノール）及び/又は温度（65 < X < 110）を用いて、抗原抗体複合体を破壊することを含む。

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
- (a) 試料を提供すること ;
 (b) 標的 / 第一の結合対複合体を追放すること ; 及び
 (c) 前記試料を第二の結合対と接触させること (標的 / 第二の結合対複合体の存在は、前記試料中の標的の存在の指標である。) ;
 を含む、試料中の標的 (該標的は第一の結合対に結合されている。) を検出するための方法。
- 【請求項 2】
- 第一の結合対が抗体である、請求項 1 に記載の方法。 10
- 【請求項 3】
- 第二の結合対が抗体である、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 4】
- 標的がタンパク質である、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 5】
- (b) 及び (c) が同時に実施される、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 6】
- 標的 / 第二の結合対複合体を検出することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 7】
- (b) 及び (c) 及び検出が同時に実施される、請求項 6 に記載の方法。 20
- 【請求項 8】
- 追放された第一の結合対を試料から除去することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 9】
- 第一の結合対が抗体結合試薬を使用することによって除去される、請求項 8 に記載の方法。
- 【請求項 10】
- 抗体結合試薬が抗ヒト I g である、請求項 9 に記載の方法。
- 【請求項 11】
- 抗体結合試薬が微粒子上に付着されている、請求項 9 に記載の方法。 30
- 【請求項 12】
- 第二の結合対がタンパク質の抗原に結合する、請求項 4 に記載の方法。
- 【請求項 13】
- 抗原が直鎖エピトープである、請求項 12 に記載の方法。
- 【請求項 14】
- 抗原がウイルス抗原である、請求項 12 に記載の方法。
- 【請求項 15】
- ウイルスが B 型肝炎ウイルスである、請求項 14 に記載の方法。
- 【請求項 16】
- 抗原が表面抗原である、請求項 15 に記載の方法。 40
- 【請求項 17】
- 試料が急性又は慢性 B 型肝炎ウイルス感染を有する患者から単離される、請求項 15 に記載の方法。
- 【請求項 18】
- 試料が潜在性 B 型肝炎ウイルス感染を有する患者から単離される、請求項 15 に記載の方法。
- 【請求項 19】
- ウイルスが C 型肝炎ウイルスである、請求項 14 に記載の方法。
- 【請求項 20】
- ウイルスがヒト免疫不全ウイルスである、請求項 14 に記載の方法。 50

【請求項 2 1】

試料が少なくとも 20 μ L の容量を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 2】

(b) 及び (c) が少なくとも 2 つ組みの試料に対して実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

試料の pH を 2 ないし 6 に減少させること、試料の温度を 60 ないし 110 に増加させること及びジスルフィド結合を還元することができる因子を添加することからなる群から選択される方法によって追放が実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

50 mM から 1 M の濃度でグリシンを含む溶液を用いて試料の pH が減少され、及び溶液の pH が 1 から 2 である、請求項 2 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、増加した感度でウイルス標的を検出するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

B 型肝炎ウイルス (HBV) は、世界中で、20 億以上の人々に感染してきたと推定されている。HBV は、軽度の潜伏性の感染から慢性の活動的で、劇症性の肝炎に至るまで、様々な病状を引き起こすことが知られている。4 億人以上の人々、特に、子供と高齢者が、HBV に慢性的に感染している。B 型肝炎ウイルスは、AIDS ウイルスより 100 倍以上感染性が高いが、ワクチン接種によって予防することが可能である。HBV 感染を管理する上で中心となる戦略は、汎用的なワクチン接種並びに感染個体の早期検出及び治療である。従って、HBV 診断アッセイは、HBV ウイルス抗原の改善された正確な検出に焦点を当ててきた。

【0003】

HBV 検出を改善するために、モノクローナル抗体、組換え抗原及び検出試薬などの試薬が開発されてきた。さらに、さらなるシグナルを生成するために、標識対抗体又は抗原取り込み比率を増加させることができる。しかしながら、これは、高いバックグラウンドレベル、減少した感度、より高い最初の反応速度及び非特異的結合をもたらす。血液スクリーニングイムノアッセイの品質を最大化するためには、特異性を維持すべきであり、偽陽性反応割合を最小化すべきである。核酸検査は、HBV を検出するための特に感受性が高い方法を与える。しかしながら、市販の検査は試料抽出操作をしばしば取り込み、検出の前に、標的又は HBV DNA を増幅することが必要である。これに対して、HBV 表面抗原 (HBsAg) を検出することを目的としたイムノアッセイは、試料抽出操作には依存せず、標的 DNA 増幅を一切必要としない。HBsAg の低いレベルを含有する試料中の HBV 表面抗体 (抗 HB) の存在は、HBV の検出を困難又は不可能なものにし得る。従って、HBV 感染症は、急性肝炎、慢性的な HBV 保有者又は潜在的 HBV 感染 (OBI) を有する患者においては、診断されないことがあり得る。従って、改善された感度を有する HBV イムノアッセイに対する要望が本分野に存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

第一の結合対に結合され得る、試料中の標的を検出するための方法が本明細書において提供される。この方法は、(a) 試料を提供すること、(b) 標的 / 第一の結合対複合体を追放すること、及び (c) 前記試料を第二の結合対と接触させることを含み得る。標的 / 第二の結合対複合体の存在は、試料中に標的が存在することの指標であり得る。前記方法は、標的 / 第二の結合対複合体を検出することをさらに含み得る。工程 (b) 及び (c) は、同時に行ってもよく、少なくとも 2 つ組みで、前記試料に対して行ってもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

第一及び第二の結合対は、それぞれ、抗体であり得、標的はタンパク質であり得る。第二の結合対は、標的の抗原に結合し得る。抗原は直鎖エピトープであり得、表面抗原又はコア抗原であり得る。抗原は、ウイルス（B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス又はヒト免疫不全ウイルスであり得る。）の抗原であり得る。試料は、急性又は慢性のB型肝炎ウイルス感染を有する患者から単離され得、潜在的B型肝炎ウイルス感染を有する患者からも単離され得る。試料は、少なくとも250µLの容量を有し得る。

【 0 0 0 6 】

追放は、2から6まで試料のpHを減少させることによって行うことができ、pHの減少は、50mMから1Mの濃度でグリシンを含む溶液を用いて行うことができ、前記溶液のpHは1から2であり得る。追放は、60から110まで試料の温度を増加させることによって、又はジスルフィド結合を還元することができる因子を添加することによっても行い得る。追放された第一の結合対は試料から除去することができ、試料からの除去は抗体結合試薬を使用することによって行い得る。抗体結合試薬は抗ヒトIgであり得、微粒子へ付着させ得る。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 0 7 】

【 図 1 】 図 1 は、非処理（PBS）試料と比較して、処理された（低pH）試料間で、HBsAgに対するHBV検出アッセイの感度が極めて類似していることを示している。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 0 8 】

ウイルス感染は、ウイルスタンパク質の存在を検出することによって診断することができる。しかしながら、患者がウイルスに対する免疫応答を生じた場合には、ウイルスのタンパク質を検出することは困難であり得る。ウイルスタンパク質が免疫複合体中に結合されている場合、本来検出抗体によって結合される抗原が遮蔽され、従って、検出がより困難となる。患者が低レベルの感染を有する場合に、検出の減少は、特により顕著である。このシナリオでは、試料中に存在する僅かなウイルス抗原の多くが、抗体を基礎とする標準的アプローチを用いた結合及び検出のために利用することができない場合があり得る。患者が慢性又は急性の感染を有する場合には、患者の免疫応答由来の抗体も、ウイルス抗原の検出を低下させ得る。

【 0 0 0 9 】

本発明者らは、標的抗原を検出する前に、抗HBV表面抗原免疫複合体からB型ウイルス標的タンパク質を追放することによって、HBVの改善された感度及び検出を達成できるという驚くべき発見を行った。検出の感度は、試料の増加した容量を使用し、及び少なくとも2つ組みの試料で標的抗原を検出することによっても増強することができる。これらのアプローチによって、低レベルのウイルス血症又は潜在的HBV感染に罹患している患者中などのHBVの低いレベルのよりよい検出が可能となる。潜在的なHBV感染症は、抗HB抗体の存在、持続的な低レベルのウイルス血症又はHBVエスケープ変異体の存在などの幾つかの要因から生じ得、これらの感染症は現行のHBsAgアッセイを用いて検出することはできない。

【 0 0 1 0 】

標的抗原追放の同じ原理は、複合体中に結合され得る他の標識を検出する感度を向上させるためにも使用することができる。例えば、核酸、核タンパク質及びポリペプチドの検出は、これらを追放することによって改善することができる。

【 0 0 1 1 】

1. 定義

本明細書において使用される用語は、特定の実施形態のみを記述することを目的とするものであり、限定を意図するものではない。本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈上明確に別段の記載がなければ、複数表記を包含する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

本明細書の数的範囲の表記に関して、同じ精度を有するその間に介在するそれぞれの数字が明示的に想定される。例えば、6 から 9 の範囲に関しては、6 及び 9 の他に、7 及び 8 が想定され、6 . 0 から 7 . 0 の範囲に関しては、数字 6 . 0、6 . 1、6 . 2、6 . 3、6 . 4、6 . 5、6 . 6、6 . 7、6 . 8、6 . 9 及び 7 . 0 が明示的に想定される。

【 0 0 1 3 】

a . 抗体

本明細書において使用される「抗体」は、F a b、F (a b ')₂、F d 及び一本鎖抗体、ダイアボディ、二重特異的抗体、二機能性抗体及びこれらの誘導体を含む、クラス I g G、I g M、I g A、I g D 若しくは I g E の抗体又はこれらの断片若しくは誘導体を意味し得る。抗体は、所望のエピトープ又は所望のエピトープから得られる配列に対して十分な結合特異性を示す、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、アフィニティー精製された抗体又はこれらの混合物であり得る。ポリクローナル抗体は、ヒト、ヤギ、ウサギ又はヒツジなどの哺乳類起源のものであり得る。抗体は、キメラ抗体でもあり得る。抗体は、本分野において公知の 1 つ又はそれ以上の化学的、ペプチド又はポリペプチド部分の付着によって誘導化され得る。抗体は、化学的部分と連結させ得る。抗体は、特異的な結合要素であり得る。

10

【 0 0 1 4 】

b . 付着された

ポリペプチド及び固体支持体を参照するために本明細書において使用される「付着された」又は「固定化された」とは、ポリペプチドと固体支持体間の結合が結合、洗浄、分析及び除去の条件下で安定であるのに十分であることを意味する。結合は、共有又は非共有であり得る。共有結合は、ポリペプチドと固体支持体間で直接形成され得、又は架橋剤によって、又は固体支持体若しくはプローブ若しくは両分子の何れかの上に特異的な反応性基を含めることによって形成され得る。非共有結合は、静電的、親水的又は疎水的相互作用の 1 つ又はそれ以上であり得る。非共有結合に含まれるのは、ストレプトアビジンなどの分子の支持体への共有的付着及びビオチン化されたポリペプチドのストレプトアビジンへの非共有結合である。固定化は、共有的相互作用と非共有的相互作用の組み合わせも含み得る。

20

30

【 0 0 1 5 】

c . エピトープ

本明細書において使用される「エピトープ」又は「抗原」は、ポリペプチドの抗原決定基を意味し得る。エピトープは、当該エピトープに特有である空間的立体構造中に 3 つのアミノ酸を含み得る。エピトープは、少なくとも 5、6、7、8、9 又は 10 個のアミノ酸を含み得る。空間的立体構造を調べる方法は本分野において公知であり、X 線結晶解析及び二次元核磁気共鳴が含まれる。抗原は、直鎖エピトープでもあり得る。抗原は、組換え又は合成であり得る。

【 0 0 1 6 】

d . 断片

本明細書において使用される「断片」は、基準ペプチド又はポリペプチドの一部を意味し得る。

40

【 0 0 1 7 】

e . 同一の

2 つ又はそれ以上のポリペプチド配列に関して本明細書において使用される「同一の」又は「同一性」とは、当該配列が同一である残基の指定されたパーセントを指定された領域上に有することを意味し得る。パーセントは、2 つの配列を最適に並置し、指定された領域にわたって 2 つの配列を比較し、両配列中に同一の残基が存在する位置の数を求めて、合致した位置の数を与え、指定された領域中の位置の総数で合致した位置の数を除し、結果に 100 を乗じて、配列同一性のパーセントを得ることによって計算され得る。2 つ

50

の配列が異なる長さであり又は並置が1つ若しくはそれ以上のずれた末端をもたらし、及び指定された比較の領域が単一の配列のみを含む場合には、単一の配列の残基は計算の分母に含められるが、分子には含められない。

【0018】

f. 指標試薬

本明細書において使用される「指標試薬」は、外部手段によって検出することができる測定可能なシグナルを生成することができる標識を含み、及び特定のポリペプチドに対する特異的結合要素に連結又は付着され得る組成物であり得る。指標試薬は、特定のポリペプチドに対する特異的な結合対の抗体要素であり得る。指標試薬は、ビオチン若しくは抗ビオチン、アビジン、若しくはビオチン、炭水化物若しくはレクチン、相補的ヌクレオチド配列、エフェクター若しくは受容体分子、酵素補因子及び酵素又は酵素阻害剤及び酵素などのハプテン・抗ハプテン系を含むあらゆる特異的結合対の要素でもあり得る。

10

【0019】

g. 標識

本明細書において使用される「標識」又は「検出可能な標識」は、標識が付着されている分子の定量的な又は相対的な直接又は間接的測定を可能にするシグナルを生成することができる部分を意味し得る。標識は、マイクロタイタープレート、粒子、微粒子又は顕微鏡スライド；酵素；酵素基質；酵素阻害剤；補酵素；酵素前駆体；アポ酵素；蛍光性物質；顔料；化学発光化合物；発光性物質；発色性物質；磁気物質；又は金コロイドなどの金属粒子；¹²⁵I、¹³¹I、³²P、³H、³⁵S又は¹⁴Cなどの放射性物質；ニトロフェニルリン酸などのリン酸化されたフェノール誘導体、ルシフェリン誘導体又はジオキセタン誘導体などの固体であり得る。酵素は、脱水素酵素；還元酵素若しくは酸化酵素などの酸化還元酵素；アミノ；カルボキシル、メチル、アシル又はリン酸基などの官能基の転移を触媒する転移酵素；エステル、グリコシド、エーテル若しくはペプチド結合などの結合を加水分解し得る加水分解酵素；脱離酵素；異性化酵素；又は連結酵素であり得る。酵素は、別の酵素にも連結され得る。

20

【0020】

酵素は、酵素的サイクルによって検出され得る。例えば、検出可能な標識がアルカリホスファターゼである場合、ウンベリフェロン誘導体などの適切な基質から生成された蛍光又は発光を観察することによって、測定が為され得る。ウンベリフェロン誘導体は、4 -

30

【0021】

蛍光又は化学発光標識は、フルオレセイン・イソチオシアナート；ローダミンBイソチオシアナート又はテトラメチルローダミンイソチオシアナートなどのローダミン誘導体；ダンシルクロリド（5 - (ジメチルアミノ) - 1 - ナフタレンスルホニルクロリド）；ダンシルフルオリド；フルオレスカミン（4 - フェニルスピロ[フラン - 2 - (3H)；1y - (3yH) - イソベンゾフラン] - 3；3y - ジオン）；フィコシアニン又はフィコエリトリン（phycoerythrin）などのフィコピリンタンパク質；アクリジニウム塩；ルミフェリン、ルシフェラーゼ若しくはエコーリンなどのルミノール化合物；イミダゾール；シュウ酸エステル；ユーロピウム（Eu）、テルビウム（Tb）若しくはサマリウム（Sm）などの希土類元素のキレート化合物；又は7 - アミノ - 4 - メチルクマリンなどのクマリン誘導体であり得る。

40

【0022】

標識は、アダマンチン、フルオレセイン・イソチオシアナート又はカルバゾールなどのハプテンでもあり得る。ハプテンは、多価抗体又は（ストレブ）アビジン含有部分と接触したときに凝集物を形成させ得る。ハプテンは、固体支持体に付着される分子の簡単な付着も可能にし得る。

【0023】

標識は、電極の使用；色、光若しくは吸光度の分光学的測定；又は視覚的検査によるなど、検出可能な標識に付着された分子のレベルを定量することによって検出され得る。

50

【 0 0 2 4 】

h . ペプチド

本明細書において使用される「ペプチド」又は「ポリペプチド」は、アミノ酸の連結された配列を意味し得、天然、合成又は天然及び合成の修飾若しくは組み合わせであり得る。

【 0 0 2 5 】

i . 組換えポリペプチド

本明細書において使用される「組換えポリペプチド」又は「組換えタンパク質」は、その起源若しくは操作のために、自然状態で若しくはライブラリーの形態で伴われるポリヌクレオチドの全部若しくは一部を伴わず又は自然状態で結合されているポリヌクレオチド以外のポリヌクレオチドに結合されている、少なくともゲノム、半合成又は合成起源のポリペプチドを意味し得る。組換えポリペプチドは、H B Vの指定された核酸配列から必ずしも翻訳され得ない。組換えポリペプチドは、組換え発現系の化学的合成若しくは発現を含むあらゆる様式でも作製され得、又はH B Vから単離され得る。

10

【 0 0 2 6 】

j . 固体支持体

本明細書において使用される「固体支持体」、「固相」又は「固体基材」は、反応トレイのウェルの壁、試験管、ポリスチレンビーズ、磁気ビーズ、ニトロセルロース片、膜、ラテックス粒子などの微粒子及びその他であり得る。固体支持体は重要でなく、当業者によって選択され得る。従って、ラテックス粒子、微粒子、磁気若しくは非磁気ビーズ、膜、プラスチック管、マイクロタイターウェルの壁、ガラス又はシリコンチップ及びヒツジの赤血球は、全て適切な例である。固体支持体上にペプチドを固定化するための適切な方法には、イオン性、疎水性、共有的相互作用などが含まれる。固体支持体は、不溶性である又はその後の反応によって不溶性となり得るあらゆる物質でもあり得る。固体支持体は、捕捉試薬を惹き付け及び固定化するその固有の能力に関して選択され得る。あるいは、固体支持体は、捕捉試薬を惹きつけ及び固定化する能力を有するさらなる受容体を保持し得る。さらなる受容体には、捕捉試薬自体と反対に帯電した帯電物質又は捕捉試薬に連結された帯電物質と反対に帯電した帯電物質が含まれ得る。さらに別の例として、受容体分子は、固体支持体上に固定され（に付着され）、及び特異的な結合反応を通じて捕捉試薬を固定化する能力を有するあらゆる特異的な結合要素であり得る。受容体分子は、アッセイの実行前に又はアッセイの実行の間に、捕捉試薬の固体支持体材料への間接的な結合を可能にする。従って、固体支持体は、プラスチック、誘導化されたプラスチック、磁性又は非磁性金属、試験管のガラス又はシリコン表面、マイクロタイターのウェル、シート、ビーズ、微粒子、チップ及び当業者に公知の他の構成であり得る。

20

30

【 0 0 2 7 】

固体支持体は、検出抗体による接近を可能にするのに十分な多孔性及び抗原を結合するのに適切な表面親和性を有するあらゆる適切な多孔性材料も含み得ることが想定され、本発明の範囲に属する。微孔性構造が一般に好ましいが、水和された状態のゲル構造を有する材料も使用され得る。このような有用な固体支持体には、天然のポリマー性炭水化物及びそれらの合成的に修飾され、架橋され又は置換された誘導體（寒天、アガロース、架橋されたアルギン酸、置換された及び架橋されたグアルゴム、特に、硝酸及びカルボン酸を有するセルロースエステル、混合されたセルロースエステル及びセルロースエーテル）；架橋された又は修飾されたゼラチンを含む、タンパク質及び誘導體などの含窒素天然ポリマー；ラテックス及びゴムなどの天然の炭化水素ポリマー；ビニルポリマーなどの適切に多孔性の構造を用いて調製され得る合成ポリマー（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、ポリ酢酸ビニル及び部分的に加水分解されたその誘導體、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリエステル、ポリアミドなどの上記重縮合物の共重合体及びターポリマー並びにポリウレタン又はポリエポキシドなどのその他のポリマーなど）；硫酸バリウム、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、アルカリ及びアルカリ土類金属、アルミニウム及びマグネシウムのケイ酸塩を含む、アルカリ土類金属及びマグネ

40

50

シウムの硫酸塩又は炭酸塩などの多孔性無機材料；並びに粘土、アルミナ、タルク、カオリン、ゼオライト、シリカゲル又はガラス（これらの材料は、上記ポリマー性材料とともに、フィルターとして使用され得る。）などの、アルミニウム又はケイ素の酸化物又は水和物；並びに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られるグラフト共重合体などの、上記クラスの混合物又は共重合体が含まれる。これらの材料の全ては、フィルム、シート若しくはプレートなどの適切な形状で使用され得、又は紙、ガラス、プラスチックフィルム若しくは織物などの適切な不活性担体上に被覆され、又はこれらに結合され、又は薄層化させ得る。

【0028】

ニトロセルロースの多孔性構造は、モノクローナル抗体などの多様な試薬に対して、優れた吸収及び吸着品質を有する。ナイロンも、類似の特徴を有しており、同じく適切である。本明細書に上記されているこのような多孔性固体支持体は、好ましくは、約0.01から0.5mm、好ましくは0.1mmの厚さのシートの形態であることが想定される。孔径は、広い限度内で変動し得、好ましくは、約0.025から15ミクロン、特に、約0.15から15ミクロンである。このような支持体の表面は、支持体への抗原又は抗体の共有結合を引き起こす化学的プロセスによって活性化され得る。しかしながら、一般に、理解が乏しい疎水的な力による多孔性材料上での吸着によって、抗原又は抗体の不可逆的な結合が得られる。適切な固体支持体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願227,272号にも記載されている。

10

【0029】

k. 特異的結合要素

本明細書において使用される「特異的結合要素」は、特異的結合対の様子を意味し得る。特異的結合対は、分子の1つが、化学的又は物理的手段を通じて、第二の分子に特異的に結合する2つの異なる分子であり得る。特異的結合要素は免疫反応性であり得、特定のポリペプチドに結合することができる、抗体、抗原又は抗体/抗原複合体であり得る。

20

【0030】

l. 実質的に同一な

本明細書において使用される「実質的に同一な」とは、8から100又はそれ以上の残基の領域にわたって、第一及び第二の配列が50%から99%同一であることを意味し得る。

30

【0031】

m. 変形物

ポリペプチドに関して本明細書において使用される「変形物」は、(i)8から100又はそれ以上のアミノ酸であり得る参照ポリペプチドの一部；又は(ii)基準ポリペプチドと実質的に同一であるポリペプチドを意味し得る。変形物は、タンパク分解、リン酸化又は他の翻訳後修飾などの異なってプロセッシングされたポリペプチドでもあり得る。

【0032】

2. 標的

標的を検出する方法が本明細書において提供される。標的は、タンパク質、核酸又は核タンパク質などのあらゆる検出可能な分子であり得る。標的は、別の分子と複合体を結合することが可能であり得、これは、標的の感度又は検出を減少させ得る。標的を複合体から追放することによって、標的の感度又は検出を増加させることが望ましい場合があり得る。標的は、ウイルス、細菌、寄生生物、真菌、植物、動物又はあらゆる他の生物又は癌又はサイトカインであり得る。標的の存在は、生物、癌又はサイトカインの指標であり得る。例えば、標的は、ウイルス又はウイルス感染の指標であり得る。

40

【0033】

ウイルスの代表的な例には、アデノウイルス、ヘルペスウイルス若しくはボックスウイルスなどの二本鎖DNAウイルス；パルボウイルスなどの一本鎖(+)センスDNAウイルス；レオウイルスなどの二本鎖RNAウイルス；ピコルナウイルス若しくはトガウイルスなどの一本鎖(+)センスRNAウイルス；オルソミクソウイルス又はラドウイルス

50

などの一本鎖(-)センスRNAウイルス；レトロウイルスなどの生活環においてDNA中間体を有する一本鎖(+)センスRNAウイルス；又はヘパドナウイルスなどのRNA中間体を有する二本鎖DNAが含まれる。ウイルスは、ヒトパピローマウイルス、HSV1、HSV2、RSV、EBV、A型インフルエンザ、ワクシニアウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス又はヒト免疫不全ウイルスでもあり得る。HIVは、HIV-1群O、HIV-1群M及びHIV-2の単離株であり得る。

【0034】

細菌の代表的な例には、バチラス・アンスラシス(*Bacillus anthracis*)、ブルセラ・アボルトス(*Bruceella abortus*)、シアノバクテリア(*Cyanobacteria*)、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)、クロストリジウム・ディフィシーユ(*Clostridium difficile*)、ラクトバシラス・ブルガリカス(*Lactobacillus bulgaricus*)、マイコバクテリウム・チューバキュロシス(*Mycobacterium tuberculosis*)、シュードモナス・アエルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)、ミコバ(*Mycoba*)、リゾビア(*Rhizobia*)、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)、ストレプトコッカス・ニューモニアエ(*Streptococcus pneumoniae*)などの(連鎖球菌種(*Streptococcus species*))、ストレプトミセス・グリセウス(*Streptomyces griseus*)及びサーマス・アクアティカス(*Thermus aquaticus*)が含まれる。エス・ニューモニアエ標的(*targe*)は、種特異的なC-多糖、型特異的な莢膜多糖又はニューモリシンであり得る。ピー・アエルギノサ標的は、調製されたピー・アエルギノサ抽出物であり得る。

10

20

【0035】

真菌の代表例には、シー・ネオフォルマンズ(*C. neoformans*)などのクリプトコッカス及びピー・ブラシリエンシス(*P. brasiliensis*)などのパラコクシジオイデス(*Paracoccidioides*)が含まれる。シー・ネオフォルマンズ標的は、可溶性の莢膜多糖(CPS)抗原であり得る。ピー・ブラシリエンシス標的は、免疫優性抗原又はgp43であり得る。

【0036】

寄生生物の代表例には、トリパノソーマ・クルチ(*Trypanosoma cruzi*)及びプラスモジウム・ファルシパラム(*Plasmodium falciparum*)、ピー・ビバックス(*P. vivax*)、ピー・マラリアエ(*P. malariae*)及びピー・オバーレ(*P. ovale*)などの種が含まれる。ピー・ファルシパラム標的は、175kDaの赤血球結合タンパク質、EBA-175、ヒスチジンリッチタンパク質(PfHRP-2)、メロゾイト表面タンパク質1(MSP1)又はMSP2であり得る。ティー・クルチ標的は、ティー・クルチ循環抗原(cAg)、Gp90、Gp60/50、LPPG、FP10、FP6、FP3若しくはTcFなどの抗原又は米国特許第5,645,838号、米国特許第5,623,058号、米国特許第5,583,204号又は米国特許第5,550,027号(これらの内容は、参照により、本明細書中に開示される。)開示されている標的であり得る。

30

40

【0037】

癌標的は、癌胎児性抗原(CEA)、癌抗原15-3(CA15-3)又はDF3決定抗原(DF3 defined antigen)であり得る。サイトカインは、IL-8であり得る。

【0038】

a. タンパク質

(1) B型肝炎ウイルスタンパク質

タンパク質は、HBVタンパク質又はその変形物であり得る。HBVタンパク質は、「Kimura T, et al, J Clin Microbiol 2002 Feb; 40(2): 439-45」(その内容は、参照により、本明細書に組み込まれる

50

。) に開示されているように、HBVコア抗原 (HBcAg)、HBVコア関連抗原 (HBcrAg) 又はHBVe抗原 (HBeAg) であり得る。HBVタンパク質は、HBV外被の一部を形成することが可能であり得るHBV表面抗原タンパク質 (HBsAg) であり得る。HBsAgは、HBV粒子の表面上に露出され得る。HBsAgは、エピトープを含み得、エピトープは抗原性であり得又は免疫監視の標的であり得る。エピトープは、変異体エピトープであり得る。また、HBsAgは、グリコシル化され得る。

【0039】

(a) 中央B型肝炎表面抗原タンパク質 (M-HBsAg)

HBsAgは、中央Hb s A G (M-HBsAg) であり得る。M-HBsAgは第一の部分及び第二の部分を含み得、約281アミノ酸の全長を有し得る。第一の部分はpreS2領域を含み得、M-HBsAgの最初の55アミノ酸であり得る。第二の部分は226アミノ酸の長さであり得、S-HBsAgの配列を含み得る。M-HBsAgは表1に記載されている配列又はその変形物を含み得る。M-HBsAgの第一の部分はエピトープも含み得る。エピトープは、抗体によって結合されることが可能であり得る。抗体は、抗M-HBsAg特異的抗体であり得る。

10

【0040】

【表1】

表1

配列番号	中央HBV表面抗原タンパク質
1	1 mqwnsttfhq tlqdrvrval yfpagsssg tvspaqtvs aissilsktg dpvpmnia 61 sgllgpllv l qagfflltki ltipqslsw wtslnflggt pvclgqnsqs qisshsptcc 121 ppicpgyrwm clrrfiiflc illlclifll vlldyqgmlp vcclipgsst tstgpkctct 181 tpaqgtsmfp scctkptdg nctcipipss wafakylwew asvrfswlsl lvpfvqwfvg 241 lsptvwlsvi wmmwywgpsl ynispfmp l piffclwvy i

20

【0041】

(b) 小B型肝炎表面抗原タンパク質 (S-HBsAg)

HBsAgは、小Hb s A G (S-HBsAg) であり得る。S-HBsAgは約226アミノ酸長であり得、S領域を含み得る。S-HBsAgは、野性型S-HBsAgであり得る。S-HBsAgは表2に記載されている配列又はその変形物を含み得る。S-HBsAgはエピトープも含み得、エピトープは米国特許第5,925,512号又は米国特許第7,141,242号(これらの内容は、参照により、本明細書に組み込まれる。)に開示されている「a」決定基の一部であり得る。S-HBsAgのアミノ酸100から160はエピトープも含み得る。

30

【0042】

【表2】

表2

配列番号	小HBV表面抗原タンパク質
2	1 meniasgllg pllv l qagff lltkiltipq slswwtsln flggtpvclg qnsqsqissh 61 sptccppicp gyrwmlrrf iiflcilllc lifllvlldy qgmlpvcpli pgssttstgp 121 cktcttpaqq tsmfpscct kptdgnctci pipsswafak ylwewasvrf swsl l lvpfv 181 qwfvglsp tv wlsviwmmwy wgpslynils pfmp l l piff clwvyi

40

【0043】

(2) C型肝炎ウイルスタンパク質

タンパク質は、HCVタンパク質又はその変形物であり得る。HCVタンパク質はGe

50

n B a n k 受付番号 P 2 7 9 5 8 に記載されているポリタンパク質を含み得る。H C V タンパク質はコア又はヌクエオキヤプシドタンパク質を含み得、ポリタンパク質の最初の 1 9 1 アミノ酸を含み得る。コアタンパク質は抗原を含み得、コア抗原、N S 3、N S 4 又は N S 5 であり得る。

【 0 0 4 4 】

(3) ヒト免疫不全ウイルスタンパク質

タンパク質は、H I V タンパク質又はその変形物であり得る。H I V タンパク質は、g a g - p o l ポリタンパク質又は g a g - p o l ポリタンパク質前駆体 (P r 1 8 0 g a g - p o l) であり得る。H I V タンパク質は、p o l 前駆体又は g a g 前駆体 (P r 5 5 g a g) でもあり得る。H I V タンパク質は、p 1 7 (ミリスチル化された g a g タンパク質)、p 2 4 (主要な構造タンパク質)、p 7 (核酸結合タンパク質) 又は p 9 (プロリンリッチタンパク質) P r 5 5 g a g タンパク質切断産物も含み得る。H I V タンパク質は、g p 1 6 0 外被ポリタンパク質前駆体又は g p 1 2 0 (外被糖タンパク質) 若しくは g p 4 1 (膜貫通タンパク質) などの g p 1 6 0 切断産物も含み得る。

10

【 0 0 4 5 】

b . 抗体

標的は、ウイルス性であり得るタンパク質、核酸又は核タンパク質に結合ことが可能であり得る抗体でもあり得る。抗体は、タンパク質又は核タンパク質の抗原を結合することが可能であり得る。抗体は、タンパク質、核酸又は核タンパク質に対する対象の免疫反応によって作製され得る。

20

【 0 0 4 6 】

3 . 標的を検出する方法

試料中の標的を検出する方法が本明細書において提供される。標的は第一の結合対に結合され得、これは標的を検出する感度を低下させ得る。標的 / 第一の結合対複合体を追放することは、標的を遊離状態にし、標的の検出を容易にし得る。例えば、第一の結合対は標的タンパク質の抗原を塞ぎ得る。第一の結合対から標的タンパク質を追放することによって、抗原はより容易に検出可能となり得る。標的 / 第一の結合対複合体を追放すると、第一の結合対は試料から除去され得る。試料は、標的を結合することが可能であり得る第二の結合対と接触させ得る。標的 / 第二の結合対複合体が検出され得、試料中のこの複合体の存在は標的の存在の指標であり得る。標的 / 第二の結合対複合体の量は、試料中の標的の量の指標でもあり得る。追放及び検出工程は、少なくとも 2 つ組みで実施され得る。追放、除去及び検出工程は、少なくとも 2 つ組みでも実施され得る。

30

【 0 0 4 7 】

a . 追放

(1) 第一の結合対

標的は、タンパク質、核酸、核タンパク質又は他のこのような分子であり得る第一の結合対に結合され得る。第一の結合対タンパク質は、標的又は標的の抗原に結合することが可能であり得る抗体であり得る。抗体は、標的に対する対象の免疫応答の結果であり得る。

【 0 0 4 8 】

第一の結合対タンパク質は、ウイルス性であり得る抗原でもあり得る。抗原は、第一の結合対抗原に対する対象の免疫応答の結果であり得る抗体へ結合することが可能であり得る。

40

【 0 0 4 9 】

(2) 追放因子

標的 / 第一の結合対複合体は、低 P H であり得る追放因子を使用することによって追放され得る。p H は、2 から 6 であり得る。この p H は、1 から 2 の p H を有する溶液を使用することによって達成され得る。溶液は、5 0 m M から 1 M のグリシン濃度を有するグリシン試薬であり得る。低 p H は、塩酸又は酢酸を使用することによっても達成され得る。追放因子による破壊後に、試料は、5 0 0 m M から 2 M T r i s であり得る中和剤を用

50

いて中和され得、7から12のpHを有し得る。追放因子は、10から13のpHであり得る高いpHでもあり得る。高いpHは、ボラート、リン酸、ジエチルアミン又はトリエチルアミンを使用することによって達成され得る。

【0050】

追放因子は熱でもあり得、60から110の温度であり得る。追放因子は、メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、グルタチオン、システイン又はTris(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩などのジスルフィド結合を還元することが可能な因子でもあり得る。追放因子は、1から5Mの塩濃度を有し得る濃縮された塩溶液でもあり得、これは、MgCl₂又はLiClを使用することによって達成され得る。追放因子は尿素、SDSなどの変性剤又はチオシアン酸ナトリウムなどのカオトロピック剤であり得る。

10

【0051】

標的/第一の結合対複合体を追放すると、第一の結合対は除去され得、これは、第一の結合対結合試薬を使用することによって達成され得る。第一の結合対結合試薬は、抗ヒトIgであり得る抗体結合試薬であり得る。第一の結合対結合試薬は、第一の結合対へ結合することができる抗原でもあり得る。抗体結合試薬は、プロテインA/G、プロテインG又はプロテインAでもあり得る。抗体結合試薬は固体支持体に付着され得る。

【0052】

b. 接触

試料中の標的から第一の結合対を追放すると、試料は標的に結合することが可能であり得る第二の結合対と接触させることができる。標的が第一の結合対から追放されると、第二の結合対は標的にさらに容易に結合することが可能であり得る。接触は、標的/第二の結合タンパク質複合体の形成に十分な時間及び条件下で行い得る。接触工程は、標的/第一の結合対複合体の追放と同時に行われ得る。

20

【0053】

(1) 第二の結合対

第二の結合対は標識を含み得、指標試薬の一部であり得る。第二の結合対は固体支持体にも付着され得る。

【0054】

第二の結合対は、ウイルス反応性抗体へ結合することが可能であり得る抗抗体などの抗体を含み得る。ウイルス反応性抗体は、ウイルスタンパク質又は抗原へ結合することが可能であり得る。

30

【0055】

第二の結合対は、標的に結合することが可能であり得る抗原も含み得る。標的は、ウイルス反応性抗体であり得る。第二の結合対抗原は、ウイルス性、組換え又は合成であり得る。

【0056】

(a) B型肝炎ウイルス第二の結合対

第二の結合対は、HBVタンパク質の抗原を結合することが可能であり得る。第二の結合対は、50-80、116-34、H166、H57、H40、H53若しくはH35モノクローナル抗HB抗体又は類似の抗体であり得る。

40

【0057】

(b) C型肝炎ウイルス第二の結合対

第二の結合対はHCV第二の結合対であり得、HCVタンパク質の抗原に結合することが可能であり得る。第二の結合対は、13-959-270、14-1269-281、14-1287-252、14-153-234、14-153-462、14-1705-225、14-1708-269、14-1708-403、14-178-125、14-188-104、14-283-112、14-635-225、14-726-217、14-886-216、14-947-104、14-945-218、13-975-157、14-1350-210、107-35-54、110-81-17

50

、C I I - 3、C I I - 7、C I I - 10、C I I - 14若しくはC I I - 15抗H C Vタンパク質モノクローナル抗体又は類似の抗体であり得る。

【0058】

H C V第二の結合対は、H C V反応性抗体へ結合することができる抗原であり得る。抗原はコア抗原、N S 3、N S 4、N S 5又はこれらの変形物であり得る。抗原は、米国特許第6,596,476号(これらの内容は、参照により、本明細書に組み込まれる。)に記載されているようなp380-JH1、p380-LG、p380-J又はp408Jでもあり得る。

【0059】

(c) H I Vタンパク質第二の結合対

第二の結合対はH I V標的に結合することが可能であり得、米国特許公開2002/0606636号A1(その内容は、参照により、本明細書に組み込まれる。)に開示されているような120A-270、115B-151、117-289、108-394、115B-303又は103-350モノクローナル抗体又は他の抗体であり得る。

【0060】

c. 検出

標的を第二の結合対と接触させると、標的/第二の結合対複合体が検出され得る。これは、標的/第二の結合対複合体を形成するのに十分な時間及び条件下で、試料を第二の結合対と接触させ、標的/第二の結合対複合体からの検出可能なシグナルのレベルを測定することによって達成され得る。試料中で検出されたシグナルのレベルは標的の存在の指標となり得、標的の量の指標ともなり得る。シグナルのレベルは、試料中の標的の量に比例し得る。シグナルのレベルは、対照と比較され得る。試料中の標的/第二の結合タンパク質複合体から検出されるシグナルの、対照と比較されたレベルの差は、標的の存在又は量の指標であり得る。検出工程は、一工程の捕捉/検出操作の第一の温置工程など、追放及び接触工程と一緒に実施され得る。

【0061】

標的が抗ウイルス抗原抗体に結合されたウイルス抗原であれば、試料中のウイルス抗原から抗ウイルス性抗原抗体を追放すると、検出標的ウイルス抗原/検出抗ウイルス抗原抗体複合体を形成させるのに十分な時間及び条件下で、抗ウイルス抗原抗体を含む指標試薬と試料を接触させることによって、標的を検出し得る。標的のレベルは、標識によって生成された測定可能なシグナルを検出することによって測定され得る。

【0062】

標的がウイルス抗原に結合されている抗ウイルス抗体であれば、試料中の抗ウイルス抗原抗体からウイルス抗原を追放すると、抗ウイルス抗体/検出抗ウイルス抗体複合体を形成させるのに十分な時間及び条件下で、抗ウイルス抗体を含む指標試薬と試料を接触させることによって、標的を検出し得る。標的のレベルは、標識によって生成された検出可能なシグナルを測定することによって測定され得る。

【0063】

標的が抗ウイルス抗体であれば、試料中の抗ウイルス抗体からウイルス抗原を追放すると、抗ウイルス抗体/検出ウイルス抗原複合体を形成させるのに十分な時間及び条件下で、ウイルス抗原を含む指標試薬と試料を接触させることによって、標的を検出し得る。標的のレベルは、標識によって生成された検出可能なシグナルを測定することによって測定され得る。

【0064】

この方法において、非固相診断アッセイを使用し得る。これらのアッセイは当業者に周知であり、本発明の範囲に属するものと考えられる。このようなアッセイの例には、米国特許第5,925,521号又は米国特許第7,141,242号(その内容は、参照により、本明細書に組み込まれる。)に記載されているアッセイが含まれる。

【0065】

標識は、固体支持体を含み得る検出系を用いて検出され得る。固体支持体は、半自動化

10

20

30

40

50

された又は完全に自動化された免疫分析装置によって使用されるように改変され得る。検出系は、反応容器に試料及び試薬（抗原、抗体、標識、緩衝液などを含み得る。）を送達し、温置を行い、及び結合された標識されたポリペプチドから結合していない標識されたポリペプチドの場合によって洗浄し得る。試料及び試薬が系内に挿入されると、検出系は使用者の介入なしに自動化され得る。自動化された検出系は、使用者の介入なしに、48時間の期間に、系が少なくとも8、16、64又は128アッセイを実行できる点で、手動の系又は自動化の程度が低い系から区別され得る。系は、ヒトの計算又は入力が必要ななしに、試料中のポリペプチドの濃度又は量を自動的に計算することも可能であり得る。

【0066】

検出系は、カートリッジフォーマット又は検査片アッセイも含み得る。検出系は、使い捨て装置中への単位用量を搭載可能なアッセイ試薬を提供し得、単位用量はポリペプチドを検出するためのアッセイに必要な全ての試薬を含有し得る。使い捨て装置は、ナイロン、ニトロセルロース又は他の適切な材料の使い捨て膜様構造を含み得るプラスチック収容部を含み得る。試料は、前処理され得、又は使い捨て装置の搭載ゾーン上に直接搭載され得る。次いで、試料は、膜上に含有される複数のゾーンを通じて、膜様構造を横切って場合によって流動し得る。膜様構造は、変性剤又は側方流補助（lateral-flow aid）をさらに含み得る。膜様構造は、過剰な液体を集めるための及び/又は膜を横切る側方流を促進するための吸収剤も含有し得る。検出系は、各パックが1、2、4、8、10又は12のアッセイを実行するのに十分な試薬を含み得るマルチパック系を含み得る。

【0067】

検出系は、 μL 域（例えば、 $4\mu\text{L}$ 、 $12\mu\text{L}$ 、 $50\mu\text{L}$ 、 $250\mu\text{L}$ 未満）の試料を分析するように設計された微小流体装置も含み得る。微小流体装置を通過する試料若しくはアッセイ試薬又は両者の輸送を補助するために、微小流体装置は、流動補助、（膨張ゲル、ワックス又は気体を含み得る）推進装置、ナノバルブなどを含み得る。

【0068】

もちろん、本明細書中の例示的なフォーマットの全て及び本発明のあらゆるアッセイ又はキットは、米国特許第5,089,424号及び米国特許第5,006,309号（これらの内容は、参照により本明細書に組み込まれる。）に記載されているように、例えば、AbbottのATCHITECT^(R)、ASYM、IMX、PRISM及びQuantumIIプラットフォーム及び他のプラットフォームなどの（但し、これらに限定されない。）、Abbott Laboratories（Abbott Park, IL）によって市販されているように、自動化及び半自動化された系（微粒子を含む固相がその中に存在するものを含む。）における使用のために改変し、又は最適化することができることは言うまでもない。

【0069】

さらに、本明細書に記載されているアッセイ及びキットは、AbbottのPoint of Care（i-STATTM）電気化学的イムノアッセイ系を含む治療地点でのアッセイ系（point of care assay system）に対して、場合によって改変又は最適化することができる。イムノセンサー並びに使い捨ての検査装置においてイムノセンサーを製造及び操作する方法は、例えば、米国特許第5,063,081号及び公開された米国特許公開20030170881号、20040018577号、20050054078号及び206016164号（これらの内容は、参照により、本明細書に組み込まれる。）に記載されている。

【0070】

4. 試料

標的を含む試料は、患者から単離され得る。試料は、ヒトなどの動物から単離された生物学的組織又は流体であり得る。試料は、生検又は剖検試料、組織学的な目的のために採取された凍結切片などの組織の切片、血液、血漿、血清、痰、便、涙、粘膜、毛髪又は皮膚でもあり得る。試料は、外植片又は動物若しくは患者の組織に由来する一次細胞培養若

10

20

30

40

50

しくは形質転換された細胞培養物でもあり得る。試料は、動物から細胞の試料を取り出すことによって提供され得るが、以前に単離された（例えば、別の者によって、別の時点で、及び/又は別の目的のために単離された）細胞を使用することによっても達成され得る。保存組織（治療又は転帰歴を有するものなど）も使用され得る。試料は、血液、血液画分、滲出物、腹水液、唾液、脳脊髄液、子宮頸管分泌物、膺分泌物、子宮内膜分泌物、胃腸分泌物、気管支分泌物、痰、細胞株、組織試料又は乳房からの分泌物でもあり得る。

【0071】

試料は、20 μ L に等しい又はそれ以上の容量を有し得る。試料は、250 μ L に等しい又はそれ以上の容量も有し得る。

【0072】

5. 患者

患者は、ウイルス（B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス又はヒト免疫不全ウイルスであり得る。）に感染し得る。感染は、HBV潜在型感染などの潜在型感染であり得る。

【0073】

6. キット

本明細書では、標的を検出するために使用され得るキットが提供される。キットは、追放因子、第二の結合対を含み得、及び第二の結合対を含む指標試薬を含み得る。キットは、第一の結合対結合試薬も含み得る。キットは、試料からのタンパク質を結合するのに適した固体支持体も含み得る。キットは、陽性対照として使用するために既知濃度で標的を含む組成物も含み得る。

【0074】

キットは、タンパク質 - タンパク質相互作用を促進し若しくは抑制するために、又は結合していないタンパク質を固体支持体から除去するために必要とされ得る、緩衝液又は塩などのさらなる試薬も含み得る。キットは、指標試薬上の標識に検出可能なシグナルの生成を誘導させることができる因子をさらに含み得る。キットは、標識がシグナルを生成するのを停止させることができる因子も含み得る。

【0075】

キットは、各々の容器が別個の試薬を含有する1つ又はそれ以上の容器（バイアル又は瓶など）も含み得る。キットは、本明細書に記載されているアッセイをどのようにして実行し又は解釈するかを記載し得る指示書をさらに含み得る。

【0076】

本発明は、以下の非限定的な実施例によって例示される複数の態様を有する。

【実施例1】

【0077】

HBsAg / 抗HBsA抗体複合体を追放した際に、B型肝炎表面抗原を検出することは、免疫複合体を有する試料の検出を改善する。

【0078】

本実施例は、標的 / 抗体免疫複合体を崩壊させた際に標的タンパク質を検出することが、対照免疫複合体試料中の標的を検出する感度を改善することを示す。抗HBを含有する試料を正常なヒト血漿中に150 pg / mLになるように希釈されたHBsAg（サブタイプad）の溶液と合わせることによって、免疫複合体試料を調製した。150 pg / mLのHBsAg溶液中に、抗HB試料を10、25、50、100又は200倍希釈することによって、免疫複合体試料中の抗体の量を変動させた。室温で少なくとも1時間、混合物を温置した後、原型Abbott PRISM HBsAgアッセイ（Abbott Laboratories, Abbott Park, IL）で使用し、又は4で保存した。これらの試料は、免疫複合体を解離させる低いpHでの処理と比べて、シグナルが増加するかどうかを測定するための免疫複合体対照試料としての役割を果たす。

【0079】

抗HBs / HBsAg複合体試料中のHBsAgを検出する前に、Eppendorf 5415C Microfuge（New York, NY）中で15分間、14,00

10

20

30

40

50

0 rpmで試料を回転させた。低pHで試料を処理した後、中和するための多数の条件が、最適化の間に試され、これらは、表3に示されている。試料のpHを低下させるために、列記されているグリシン試薬は、250mMグリシン、pH1.5、250mMグリシン、0.3%BSA、pH1.5及び50mMグリシン、0.3%BSA、pH2.0である。処理されていない試料のための対照試薬は、PBS、0.3%BSAであった。列記されている中和剤は、1MTris、pH9.0、1MTris、pH7.4及び2MTris、pH11.5である。

【0080】

処理された試料に関しては、0から14のcolorpHast片(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)を用いて測定すると、各試料の最終pHは2から6の範囲であった。処理されていない処理に関しては、グリシン試薬の代わりに、PBS、0.3%BSAを添加した。次いで、Dynamic Incubator(DI; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)上で回転させながら、試料を37で30から60分間温置した。次に、colorpHast片5から10を用いて測定したときに6から9のpHになるように、処理された試料をTrisで中和した。処理されていない試料に関しては、中和工程でPBS又はTris溶液を添加した。

【0081】

【表3】

表3 処理条件

条件	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
μL Gly, pH1.5	250				500	700						1000			
μL GlyBSA, pH1.5									250	250				1000	
μL GlyBSA, pH2.0		500	700	700			500	500			250		1000		250
μL 水	250								250	250	250				750
μL Tween 20, 10%								7.5		10					18
μL 試料	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	500	500	500	250
分(37C, DI)	60	30	60	30	60	60	60	30	60	60	60	60	60	60	60
μL 1MTris, pH9			50	50		50					20	300		300	20
μL 1MTris, pH7.4	250								250	250					
μL 2MTris, pH11.5		10			10		10	10					25		

【0082】

免疫複合体を解離するための処理の後に、次いで、Eppendorf Microfuge中において、試料を14,000rpmで15分間回転させた。PRISM HBsAgアッセイにおけるように、次いで、37で18分間、微粒子50μLを試料とともに温置した(回転なしのDI)。2つの抗HBモノクローナル抗体H166及び116-34で、微粒子を被覆した。温置後に、Eppendorf Microfuge中において、10,000rpmで5分間、試料を遠心した。上清を取り除き、PRISM HBsAg Transfer Wash(PRISM HBsAg 3A47C)1mLを管に添加した。Eppendorf Microfuge中において、10,000rpmで5分間、管を遠心した。上清を除去し、PBS100μLを管に添加した。次いで、管を短時間遠心し、ピペットを用いて、微粒子沈降物を5回再懸濁した。

【0083】

Abbott PRISM Reaction Tray(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)の試料壁に、反応された微粒子(100μL)を添加した。Transfer Washステーションまで、装置によって、何もトレイ中に分配されなかった。この時点において、製造業者の指示書((Abb

ott Laboratories, Abbott Park, IL)に従って、トレイをAbbott PRISM免疫分析にかけた。連結物は、150 ng/mLのアクリジニウム連結ヤギ抗HBsポリクローナル及び130 ng/mLのアクリジニウム連結抗体HBsH35から構成された。Conjugate Washプロトコルを除き、市販のPRISM HBsAgアッセイのために使用した装置の系列を使用した。この工程は、ホウ酸緩衝化された生理的食塩水(BBS)300 µLの1回の洗浄、その後、BBS100 µLの2回の洗浄を含めるために改変された。シグナル又は相対光単位(rlu)は、PRISM装置上で測定した。

【0084】

表3に示されているアレイ条件のうち、条件7、9、13及び15は、HBV陰性血漿試料に対して最も低いバックグラウンドカウント及び微粒子取り付けに伴う問題が最も小さかった。表3から、150 pg/mLのHBsAg試料中に、50倍希釈された(DF50)抗HB試料との免疫複合体試料を検査するために、条件7、9、13及び15を使用した。これらの試料の検査結果が、表4に見出される。処理されていない試料のrluに対する処理された試料の比が、比較のために示されている。条件9は、処理されていない免疫複合体対照試料と比較した処理された免疫複合体試料に対するrlu値に最大の増加をもたらした。

【0085】

【表4】

表4 免疫複合体を解離させるための様々な処理条件の結果

条件	7	9	13	15
試料	処理:非処理	処理:非処理	処理:非処理	処理:非処理
150pg/mLのHBsAg	0.9	1.0	1.0	1.2
免疫複合体試料 DF50 Rep 1	1.1	2.2	1.2	1.7
免疫複合体試料 DF50 Rep 2	0.8	1.9	1.4	1.7

【0086】

処理された(すなわち、低pHで)及び処理されていない(すなわち、PBSで)試料に対するカットオフ(CO)値を計算するために、陰性試料から測定された検出可能なシグナルを使用した。実験は、一般的な上記検出方法及びアッセイ条件9(表3)に従って行った。CO値は、陰性試料の平均+5標準偏差であった。非処理試料に関しては、CO値は373(平均=187、標準偏差=37.1)であり、処理された試料に関しては、CO値は358(平均=218、標準偏差=28.1)であった。

【0087】

抗HBsの変動する量を有する免疫複合体対照試料を低pHで処理し、値を低pHで処理されなかった試料と比較した(表5)。実験は、一般的な上記検出方法及びアッセイ条件9(表3)に従って行った。抗HBsが100倍又は200倍希釈された処理された試料に関しては、シグナル対カットオフ(S/CO)は、1より大きかった。処理:非処理試料のrlu又はS/COの比は1.5又はそれ以上であり、HBsAgを検出する前に、抗HBで免疫複合体からHBsAgを追放することはシグナルを改善することを示唆している。これは、HBsAgから抗HBsを解離させるために含められた工程を有するHBsAgアッセイは、免疫複合体を有する試料の改善された検出をもたらすことを示す。潜在型試料を検査する場合、これは、HBsAgアッセイの改善された性能をもたらすはずである。

【0088】

【表 5】

表5 免疫複合体を解離させるために免疫複合体対照試料を処理することの結果

試料	処理rlu	非処理rlu	処理:非処理
免疫複合体試料DF10	239	161	1.5
免疫複合体試料DF25	315	154	2.0
免疫複合体試料DF50	326	172	1.9
免疫複合体試料DF100	430	177	2.4
免疫複合体試料DF200	548	281	2.0

10

【実施例 2】

【0089】

試料容量を増加させること、及びHBsAg / 抗HBsA抗体複合体を追放した際に、B型肝炎表面抗原を検出することは、潜在的免疫複合体を有する試料の感度及び検出を改善する

本実施例は、標的 / 免疫複合体を崩壊させた際に標的タンパク質を検出することが標的を検出する感度を増加させることを示し、これらの結果を以前の検査と比較する。処理された試料及び非処理試料中でのレベルを測定するために、実施例1の一般的な検出方法を使用した。免疫複合体を解離させるための処理方法は、表6に見出され、本実施例における全ての検査に対して使用された。免疫複合体の解離を用いるアッセイにおいて使用された試料容量は250µLであった。免疫解離検査結果の分析において、HBsAgを含有する処理された（追放された）試料及び非処理（追放なし）試料から測定されたシグナルのレベルを互いに比較し、それらのそれぞれのCO値とも比較した。

20

【0090】

試料容量250µL及び免疫複合体解離工程を用いるアッセイの分析感度値は、Abbott HBsAg Sensitivityパネルの要素を検査することによって測定した。これは、試料250µLを使用することの影響及び低pH処理のアッセイ性能に対する影響に関する情報を獲得するために行われた。最終のHBsAgアッセイの構成では、免疫複合体を解離するために全ての試料が処理されるので、分析感度を維持することは重要である。adサブタイプに関しては、非処理試料フォーマットの分析感度は0.042ng/mLであり、処理された試料は0.018ng/mLの感度を有していた。従って、HBsAg / 抗HBs複合体を追放して、HBsAgレベルを測定することは、この実験における分析感度を損なわず、実際には、処理された試料中でのHBsAg検出の増加した感度が存在した。

30

【0091】

試料番号401及び408は、HBVに関して陽性であることが知られていた。これらの試料は、PRISM HBsAg Prototype 2アッセイにおいて以前に検査された。PRISM HBsAg Prototype 2アッセイでは、実施例1の一般的な方法において試料1000µLを使用した。PRISM HBsAg Prototype 2アッセイの分析感度は、サブタイプad/ayに対して0.008から0.009ng/mLである。

40

【0092】

追放を用いた試料408中では、抗HBs-HBsAg免疫複合体は検出できなかったが（すなわち、処理：非処理の比は、1未満であった。）、試料容量を250µLから1000µLにさらに増加させることによってのみ条件を変動させると、4.40及び4.90の非処理（追放されていない）の値（表7）から得られるS/CO値は7.94ないし10.82の範囲に変化した。従って、免疫複合体を追放せずに試料容量を増加させることも、HBsAgを検出する感度を向上させる。

【0093】

試料401は、PRISM HBsAgアッセイ(Abbott PRISM HBs

50

Ag Assay, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)の標準的な市販バージョンにおいてHBsAgに関して陰性であった。しかしながら、免疫複合体の追放を行わない実施例1の一般的な方法(PRISM HBsAg Prototype 2)において、試料1000 μ Lを使用すると、HBsAgは試料401から検出可能であった。PRISM HBsAg Prototype 2アッセイでは、試料401に対するS/CO範囲は0.80から1.54であり、この試料は、5回のうち3回検出された。従って、免疫複合体を追放せずに試料容量を増加させることは、HBsAgを検出する感度を向上させ、検査の反復も検出を向上させる。

【0094】

免疫複合体を解離させるための試料401の処理は、S/CO値を増加させた。表7において、S/CO値及び処理：非処理S/CO値の比較は、追放なしの値と比較した追放後の上昇したシグナルを示している。従って、標的タンパク質を検出するときに、試料容量を増加させることと一緒に免疫複合体から標的タンパク質を追放することも、標的タンパク質の検出を増加させる。

【0095】

【表6】

表6 潜在的免疫複合体を有する試料を検査するために使用されたアッセイ条件

条件	
μ L GlyBSA, pH1.5	250
μ L 水	250
μ L 試料	250
分(37°C, DI)	60
μ L IMTris, pH7.4	250

【0096】

【表7】

表7 潜在的免疫複合体を有する試料を処理することの結果

試料	処理S/CO	非処理S/CO	処理:非処理S/CO
401、実験1	1.68	0.80	2.1
401、実験2	1.82	0.75	2.4
408、実験1	3.68	4.40	0.8
408、実験2	4.07	4.90	0.8

【実施例3】

【0097】

HBsAg/抗HBsA抗体複合体を追放した際に、B型肝炎表面抗原を検出することは、磁気微粒子アッセイにおける免疫複合体を有する試料の検出を改善する

この実施例は、標的/抗体免疫複合体を破壊した際に標的タンパク質を検出することが、磁気微粒子及びKing Fisher(KF)装置を使用するアッセイフォーマットにおいて、免疫複合体を含有する試料中での標的の検出を向上させることを示す。King Fisherは、96ウェルプレートのウェルからウェルへ磁気微粒子を移動させるマイクロタイタープレート試料プロセッサである。使い捨てのカバー又はチップコームで覆われた12の磁石が存在する。コームから磁石を吸引することによって微粒子をウェル中に放出させることができ、コーム中に磁石を挿入することによって微粒子を取り出すことができる。KF装置上で試料を処理する前に、試料と試薬がプレートに添加される。装置の系列を選択し、KF上でプレートを処理した。1つのマイクロタイタープレートで、合計12の試料を検査することができた。列AからHに、試料及び試薬を添加した。アッセイの最後の工程において、ARCHITECT Pret r i g g e r 溶液を含有するウェル

に、結合された試料及び連結物を有する微粒子を添加した。プレートをマイクロタイタープレートリーダーまで移動され、引き金を引き、シグナルを測定した。

【0098】

抗HBを含有する試料を正常なヒト血漿中に250pg/mLになるように希釈されたHBsAg(サブタイプad)の溶液と合わせることによって、免疫複合体試料を調製した。この試料は、HBsAg250pg/mLと称した。250pg/mLのHBsAg溶液中に抗HBsを50倍希釈した。室温で少なくとも1時間、混合物を温置し、次いで、HBsAgアッセイで使用し、又は4で保存した。この試料は、免疫複合体を解離させるための低いpHでの処理と比べて、シグナルが増加するかどうかを測定するための免疫複合体対照(IC試料)としての役割を果たす。

10

【0099】

低pHで試料を処理した後、中和するための幾つかの条件が試みられ、これらは、表8に示されている。試料のpHを低下させるために、変動する濃度の1Mグリシン溶液を添加した。処理されていない試料に関しては、グリシン試薬の代わりに、PBSを添加した。PBSを含有する対照のための中和剤は1.5M Tris、pH7.4であり、グリシン溶液で処理された試料のための中和剤は、2M Tris、pH11.5であった。

【0100】

表9に示されている試薬及び容量をマイクロタイタープレートに添加した。試料を最後に添加し、添加の直後に、Dynamic Incubator(DI; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)上で、回転させながら、プレートを37で15分間温置した。処理された試料に関しては、0から6のcolorpHast片(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)を用いて測定すると、各試料の最終pHは2から4の範囲であった(表10)。15分の終了時に、試料をTrisで中和した。colorpHast片5から10を用いて測定したところ、Tris添加後の試料のpHは、7から8のpHであった。

20

【0101】

【表8】

表8 処理及び試料の容量

コード	A	B	C	D	E
μL 1Mグリシン	20	30	40	41.5	62.25
μL 水	40	30	20	0	0
μL 試料	100	100	100	125	125
37°Cで15分(DI)					
μL 2M Tris	9	13	17	17	27

30

【0102】

【表9】

表9 KFHBsAgアッセイのための試薬の配置/マイクロタイタープレート中の容量(フォーマット1)

ウェル	試薬	μL容量
A	試料/処理	表8参照
B	微粒子	50
C	Architect WB	150
D	連結物	50
E	連結物洗浄緩衝液(CWB)	150
F	CWB	150
G	CWB	150
H	Architect Pretrigger	50

40

50

【 0 1 0 3 】

【 表 1 0 】

表10 試薬添加後の試料のpHの測定

条件	A	B	C	D	E
mMグリシン	125	183	250	250	375
μ L試料	100	100	100	125	125
pH試料	3.5	3.0	2.5	2.5	2.0

【 0 1 0 4 】

10

免疫複合体の解離のための処理に続いて、中和された試料を有するマイクロタイタープレート及び試薬をKF装置中に配置した。抗HBsモノクローナル抗体H166で被覆された微粒子を列Bから列A、ウェル1から12へ添加することによって、装置の系列が開始した。試料と微粒子を18分間温置し、次いで、磁気微粒子を列Aから列Cへ移動させた。洗浄工程後、列Dから列Dへ微粒子を移動させた。微粒子を連結物とともに8分間温置した後、列E、F及びG中で連続的な洗浄工程を行った。連結物は、250ng/mLのアクリジニウム連結ヤギ抗HBsポリクローナル及び100ng/mLのアクリジニウム連結抗体HBsH35を含んだ。連結物洗浄緩衝液(CWB)は、50mMMEES、pH6.3中に、0.5%ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド(SigmaD8638)及び1M塩化ナトリウムを含んだ。洗浄後、列Gから列Hへ微粒子を移動させた。微粒子及びARCHITECTPretriggerを2分間温置し、微粒子をウェルGへ移動させる。装置の系列の終了時に、指定されたウェル(この事例では、列H)内にARCHITECTTrigger150 μ Lが注入されたマイクロタイタープレート読み取り装置に、マイクロタイタープレートを移動させ、3秒間読み取りを行った。

20

【 0 1 0 5 】

表11には、検査した全ての条件に関して、IC試料に対するシグナル対ノイズ(S/N)比が示されている。試料のrluを正常なヒト血漿(NC)rluによって除することによって、S/N値を計算した。IC試料に対する最も高いS/N値は、条件Dを用いて得られた。処理：非処理値の比較は、追放なしの値と比較した、追放後の上昇したシグナルを示している。条件Dを使用すると、IC試料に対する処理：非処理の値は、HBsAg250pg/mL試料を検査したときに得られた1.0と比べて5.5であり、HBsAgを検出する前に、抗HBを用いて免疫複合体からHBsAgを追放することはシグナルを向上させたことを示唆している。これは、HBsAgから抗HBsを解離させるために含まれた工程を有するHBsAgアッセイは、免疫複合体を有する試料の改善された検出をもたらすことを示す。

30

【 0 1 0 6 】

【 表 1 1 】

表11 免疫複合体を解離させるための変動する条件の結果

条件	A	B	C	D	E
試料	TR S/N	TR S/N	TR S/N	TR S/N	TR S/N
HBsAg 250pg/mL	9.6	9.7	10.7	12.2	6.2
IC試料	2.0	3.0	4.8	5.3	3.3
				TR:UN	TR:UN
HBsAg 250pg/mL				1.0	1.0
IC試料				5.5	3.4

40

50

【実施例4】

【0107】

HBsAg / 抗HBsAg抗体複合体を追放した際にB型肝炎表面抗原を検出することは、精度又はアッセイ感度を損なわず、磁気微粒子アッセイにおいて潜在的免疫複合体を有する試料の検出を改善する。

【0108】

本実施例は、標的 / 免疫複合体を破壊した際に標的タンパク質を検出することが標的を検出する感度を増加させることを示す。別段の記載がなければ、処理された及び非処理試料中のレベルを測定するために、実施例3の一般的な検出方法及び実施例3において使用された同じ試薬を使用した。免疫複合体を解離させるための処理方法は、表12に見出され、本実施例における全ての検査に対して使用された。処理されていない試料に関しては、実施例3に論述されている方法に従った。アッセイにおいて使用された試料容量は、125から250 μ Lまで増加させた。試料容量を増加させることによって、HBsAg 250 μ g/mLの試料を検査したときに増加したシグナルがもたらされた。

10

【0109】

【表12】

表12アッセイ処理の容量及び温置

条件	ウェル当り
μ L 1Mグリシン, pH1.5	41.5
μ L 試料	125
分(37°C、DI)	15
μ L 2MTris, pH11.5	17

20

【0110】

【表13】

表13 KFHBsAgアッセイのための試薬の配置及びマイクロタイタープレート中の容量(フォーマット2)

ウェル	試薬	μ L容量
A	試料 / 処理	表12参照
B	試料 / 処理	表12参照
C	微粒子	50
D	Architect WB	150
E	連結物	50
F	連結物洗浄緩衝液(CWB)	150
G	CWB	150
H	Architect Pretrigger	50

30

【0111】

処理プロトコールがKFHBsAgアッセイの精度に対して影響を有するかどうかを測定するために、非処理条件と処理された条件の両方を用いて、4つの反復試料において、試料を検査した。免疫複合体の解離のための処理に続いて、中和された試料を有するマイクロタイタープレート及び試薬をKF装置中に配置した。マイクロタイタープレートのウェル中への試薬の配置及び添加された容量は、表13に見出される。装置の系列は、列Cから列A、ウェル1から12へ微粒子を添加することによって開始した。試料と微粒子を9分間温置し、次いで、磁気微粒子を列Aから列Bへ移動させた。列B中の試料と微粒子を9分間温置し、次いで、磁気微粒子を列Dへ添加した。洗浄後、列Dから列Eへ微粒子を移動させた。微粒子を連結物と8分間温置した後、列F及びG中で連続的な洗浄工程を行った。洗浄後、列Gから列Hへ微粒子を移動させた。

40

50

【0112】

微粒子及びARCHITECT Pretriggerを2分間温置し、微粒子をウェルGへ移動させる。装置の系列の終了時に、列H中のウェル内にARCHITECT Trigger 150 μ Lが注入されたマイクロタイプレート読み取り装置にマイクロタイプレートを移動させ、3秒間読み取りを行った。

【0113】

この研究では、非処理及び処理試料の平均rlu値に関連する標準偏差の比較は、処理がアッセイ精度の喪失をもたらさないことを示唆する(表14)。さらに、陰性対照及びHBsAg 250 pg/mL試料に対する平均値は類似していた。これは、処理がシグナルに対して有害な影響を有していないことを示唆する。

10

【0114】

【表14】

表14 反復試料の処理の結果

条件D					
処理されていない試料	平均rlu	S/N	s.d.	%CV	TR:UN
NC	137		19.0	13.9	
HBsAg 250pg/mL	1462	10.7	76.5	5.2	1.0
IC試料	134	1.0	17.5	13.0	4.2
処理されていない試料					
NC	139		15.2	11.0	
HBsAg 250pg/mL	1451	10.4	43.8	3.0	
IC試料	578	4.2	40.6	7.0	

20

【0115】

試料容量250 μ L及び免疫複合体解離工程を用いるアッセイの分析感度は、Abbott HBsAg Sensitivityパネルの要素を検査することによって測定した。これは、低pH処理を用いることのアッセイ性能に対する影響に関する情報を獲得するために行われた。微粒子の容量(70 μ L対50 μ L)を除き、上に示されている並びに表12及び表13に示されている一般的な検出方法に従った。

30

【0116】

処理された(すなわち、低pHで)及び処理されていない(すなわち、PBSで)試料に対するカットオフ(CO)値を計算するために、陰性試料から測定された検出可能なシグナルを使用した。CO値は、陰性試料の平均+10標準偏差であった。非処理試料に関しては、CO値は450(平均=174、標準偏差=27.6)であり、処理された試料に関しては、CO値は330(平均=170、標準偏差=16.0)であった。

【0117】

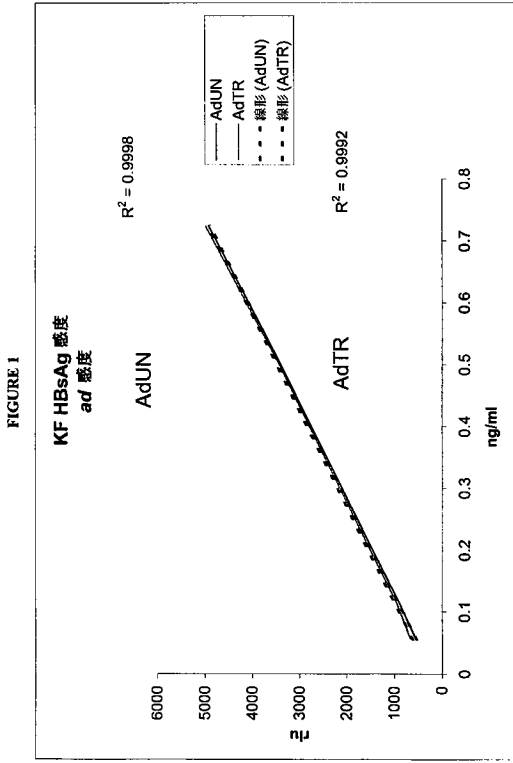
a dサブタイプに関しては、非処理試料フォーマットの分析感度は0.044 ng/mLであり、処理された試料の分析感度は0.013 ng/mLであった。この実験では、処理された試料に対して計算されたCOは、処理されていない試料より低く、これは、処理された試料を検査する場合に、改善された感度に寄与した。計算された感度に基づき、低pHのグリシンでの処理は、HBsAg KFアッセイの感度を損なわないように見受けられる。

40

【0118】

シグナル又はrlu値は、非処理条件と処理された条件間で極めて似通っていた(図1)。従って、HBsAg/抗HB複合体を追放した際に、HBsAgレベルを測定することは、分析感度を損なわなかった。改善された感度及び免疫複合体を有する試料を検出する能力を有するHBsAgアッセイは、HBsAgアッセイの改善された性能及びHBV潜在型試料の増加した検出をもたらすはずである。

【 図 1 】



【 配列表 】

201152012400001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2009/042956
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/53 G01N33/537 G01N33/569 G01N33/576		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	AU 2004 201 550 B2 (US GOVERNMENT) 18 January 2007 (2007-01-18) page 5, lines 9-14; claims 1-4,14-16,18-20; example 1 page 6, lines 4,5 page 21, lines 24-26 page 22, columns 14-15 page 25, lines 20-22 page 26, lines 3-5 page 26, lines 13-15 page 27, lines 12,13 page 28, lines 8-14 page 34, line 1 - page 35, line 21 page 38, lines 20-30 page 65, line 12 ----- -/-	1-13,21, 23,24 12-20,22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 July 2009		Date of mailing of the international search report 04/08/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Landré, Julien

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2009/042956

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 703 001 A (VODIAN MORTON A [US] ET AL) 27 October 1987 (1987-10-27)	1-13,21, 23,24
Y	column 2, lines 14-27 column 3, lines 38-44 column 4, lines 14-32 column 5, lines 20-24 column 5, lines 50-59; claim 1; example 1	12-20,22
X	STUDENTSOV ET AL: "Development of a non-denaturing electrophoresis system for characterization of neutralizing epitopes on HPV virus-like particles" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 139, no. 2, 13 January 2007 (2007-01-13), pages 208-219, XP005829386 ISSN: 0166-0934	1-13,21, 23,24
Y	the whole document	12-20,22
X	EP 0 407 813 A (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC [US] BAYER AG [US]) 16 January 1991 (1991-01-16)	1-13,21, 23,24
Y	the whole document	12-20,22
X	US 4 658 022 A (KNOWLES WILLIAM J [US] ET AL) 14 April 1987 (1987-04-14)	1-13,21, 23,24
Y	the whole document	12-20,22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/042956

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
AU 2004201550	B2	18-01-2007	AU 2004201550 A1
US 4703001	A	27-10-1987	NONE
EP 0407813	A	16-01-1991	AT 147167 T 15-01-1997
			AU 633115 B2 21-01-1993
			AU 5872790 A 10-01-1991
			CA 2019671 A1 10-01-1991
			DE 69029540 D1 13-02-1997
			DE 69029540 T2 07-05-1997
			DK 0407813 T3 16-06-1997
			ES 2095847 T3 01-03-1997
			GR 3022906 T3 30-06-1997
			IE 902493 A1 13-02-1991
			IL 94993 A 30-05-1994
			JP 2915970 B2 05-07-1999
			JP 3068868 A 25-03-1991
			NO 902833 A 11-01-1991
			NZ 234396 A 25-02-1992
			PT 94633 A 20-03-1991
			US 5061790 A 29-10-1991
			ZA 9005360 A 24-04-1991
US 4658022	A	14-04-1987	NONE

フロントページの続き

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

(72)発明者 デバレ, スシル・ジー

アメリカ合衆国、イリノイ・60062、ノースブルック、ファーンズワース・レイン・2492

(72)発明者 クーンズ, メアリー・シー

アメリカ合衆国、イリノイ・60069、リンカーンシャー、トラファルガー・スクエア・20、
アパートメント・211

专利名称(译)	检测病毒的方法		
公开(公告)号	JP2011520124A	公开(公告)日	2011-07-14
申请号	JP2011508625	申请日	2009-05-06
[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	マーテインリンエイ デバレスシルジー クーンズメアリーシー		
发明人	マーテイン,リン・エイ デバレ,スシル・ジー クーンズ,メアリー・シー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/576		
CPC分类号	G01N33/576 G01N33/5306 G01N2333/02 G01N2333/186		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/576.B G01N33/576.Z		
优先权	12/117550 2008-05-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及提高检测样品中病毒靶标的灵敏度的方法。通过破坏含有靶标的复合物，或通过从较高体积的样品中测量靶标的水平，可以提高灵敏度。所述方法包括使用低于2.5的pH，还原剂（例如DTT或巯基乙醇）和/或温度（65°C<X<110°C）破坏抗原-抗体复合物。

配列番号	中央HBV表面抗原タンパク質
1	<p>1 mqwnttfnq tlgqprvral yfpagqsssg tvspaqntvs aissilsktg dvrpnmnia</p> <p>61 sgllgpllv l qagfilltki ltipqslsw wtslnflggt pvcigqnsqs qisshsptcc</p> <p>121 ppicpgyrm clrrfiiflc illlclifll vldyggmlp wclipgsst tstgpkctot</p> <p>181 tpaggtsmfp scctkptdg ntcipipss wafakylwew asvrfswsl lvpfvqfvq</p> <p>241 lsptvwlsvi wmmwywqpsl ynllspfmpl lpiffclwvy i</p>