

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6267650号  
(P6267650)

(45) 発行日 平成30年1月24日(2018.1.24)

(24) 登録日 平成30年1月5日(2018.1.5)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z
	GO 1 N 33/543 5 2 1
	GO 1 N 33/543 5 0 1 D

請求項の数 19 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2014-542574 (P2014-542574)	(73) 特許権者	505452771
(86) (22) 出願日	平成24年11月20日(2012.11.20)		アバクシス、 インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2015-500459 (P2015-500459A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4
(43) 公表日	平成27年1月5日(2015.1.5)		5 8 7 ユニオンシティー ウィップル
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/066108		ロード 3 2 4 0
(87) 国際公開番号	W02013/078227	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成25年5月30日(2013.5.30)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成27年11月18日(2015.11.18)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	61/562,302		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成23年11月21日(2011.11.21)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラテラルフローおよび関連する免疫アッセイにおけるシグナル増幅

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 試験サンプルを第一の検出体および第二の検出体と接触させて、該第一の検出体、該第二の検出体、および抗体を含む第一の複合体を形成する工程であって、該第一の検出体が、第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたFc結合分子を含み、該Fc結合分子が、該抗体のFc領域に特異的に結合することができ、該第二の検出体が、第二の検出可能な実体にコンジュゲートした抗原または抗原性ペプチドを含み、該抗原または抗原性ペプチドが、該抗体の可変領域に特異的に結合することができる、工程；

(b) 表面の試験領域に固定化された捕捉実体と該第一の複合体を接触させる工程であって、該捕捉実体が、該抗体に特異的に結合することができ、混合物中に存在する場合、該第一の検出体、該第二の検出体、および捕捉実体を含む捕捉複合体を形成して、それにより、試験領域に捕捉複合体を固定化する、工程；ならびに

(c) 試験領域における該第一および第二の検出可能な実体からのシグナルの存在を検出する工程であって、シグナルの存在が試験サンプル中の抗体の存在を示す、工程を含む、試験サンプル中の抗体の存在を検出するための方法。

【請求項 2】

第一の検出体が表面のコンジュゲート領域に固定化され、かつ該コンジュゲート領域が表面の試験領域と重複しない、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

Fc結合分子がプロテインAおよび/またはプロテインGである、請求項1記載の方法。

## 【請求項4】

捕捉実体が抗原または抗原性ペプチドである、請求項1記載の方法。

## 【請求項5】

抗原または抗原性ペプチドが、糸状虫、エーリキア・カニス (*Ehrlichia canis*)、エーリキア・シャフェンシス (*Ehrlichia chaffeensis*)、エーリキア・エウイング (*Ehrlichia ewingii*)、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、ボレリア・アフゼリ (*Borrelia afzelii*)、ボレリア・ガリニ (*Borrelia garinii*)、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム (*Anaplasma phagocytophilum*)、アナプラズマ・プラチス (*Anaplasma platys*)、ネコ白血病ウイルス、パルボウイルス、A型インフルエンザ株、B型インフルエンザ株、鳥インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、レジオネラ (*Legionella*)、アデノウイルス、ロタウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、およびA群レンサ球菌 (*Streptococcus*) からなる群より選択される生物由来のものである、請求項4記載の方法。

10

## 【請求項6】

第一の検出可能な実体が、金属ナノ粒子、金属ナノシェル、フルオロフォア、または着色ラテックス粒子である、請求項1記載の方法。

## 【請求項7】

金属性ナノ粒子または金属性ナノシェルが、金粒子、銀粒子、銅粒子、白金粒子、カドミウム粒子、複合材粒子、金中空球、金被覆シリカナノシェル、およびシリカ被覆金シェルからなる群より選択される、請求項6記載の方法。

20

## 【請求項8】

第一の検出体および第二の検出体がコンジュゲート領域に固定化され、かつ該コンジュゲート領域が表面の試験領域と重複しない、請求項1記載の方法。

## 【請求項9】

コンジュゲート領域が対照検出体をさらに含む、請求項2または8記載の方法。

## 【請求項10】

第一の検出可能な実体および第二の検出可能な実体が同じである、請求項1記載の方法。

## 【請求項11】

抗原または抗原性ペプチドが、糸状虫、エーリキア・カニス、エーリキア・シャフェンシス、エーリキア・エウイング、ボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アフゼリ、ボレリア・ガリニ、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム、アナプラズマ・プラチス、ネコ白血病ウイルス、パルボウイルス、A型インフルエンザ株、B型インフルエンザ株、鳥インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、レジオネラ、アデノウイルス、ロタウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、およびA群レンサ球菌からなる群より選択される生物由来のものである、請求項1記載の方法。

30

## 【請求項12】

第一の検出体および第二の検出体が20:1~1:1の比率で存在している、請求項1記載の方法。

## 【請求項13】

第一の検出体が、第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたFc結合分子を含み、かつ該Fc結合分子がプロテインAおよび/またはプロテインGである、請求項12記載の方法。

40

## 【請求項14】

表面が、ラテラルフローアッセイ装置における流路もしくは分析用ローターにおける流路であるか、または試験サンプルが、体液、身体器官の抽出物、血液、血清、もしくは血漿である、請求項1記載の方法。

## 【請求項15】

試験サンプルが、第一の検出体の前に第二の検出体と接触される、請求項2記載の方法。

## 【請求項16】

50

第二の検出体が、第二の検出可能な実体にコンジュゲートしたエーリキア (Ehrlichia) 抗原性ペプチドまたはその混合物である、請求項1記載の方法。

【請求項17】

第一の検出体および第二の検出体が、16:1~2:1の比率で混合物中に存在する、請求項1記載の方法。

【請求項18】

第一の検出可能な実体および第二の検出可能な実体が金ナノ粒子である、請求項10記載の方法。

【請求項19】

第一の検出体および第二の検出体が、4:1の比率で混合物中に存在する、請求項17記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2011年11月21日に提出された米国仮出願第61/562,302号の恩恵を主張するものであって、それは参照によりその全体として本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

20

免疫アッセイは、他の用途の中でもとりわけ感染因子を同定するために頻繁に用いられる。例えばその感染因子の1種または複数種の固有の抗原に特異的に結合する宿主抗体の存在について試験することによるある特定の免疫アッセイは、所定の感染因子に対する宿主の免疫応答に依存する。大規模な自動化中央ラボシステムおよび比較的簡易な市販の試験を含めた、数々のタイプの免疫アッセイシステムが診断目的のために利用可能である。これらの免疫アッセイは、凝集アッセイ、沈降アッセイ、酵素結合免疫アッセイ、直接蛍光アッセイ、免疫組織学的試験、補体結合 (complement-fixation) アッセイ、血清学的試験、免疫電気泳動アッセイ、ならびにラテラルフロー試験およびフロースルー試験 (すなわち、迅速な「ストリップ」試験) など、広範囲の試験形式を利用する。免疫アッセイは、多様な条件に対して迅速で、簡易で、かつ効果的な診断を提供し得る。しかしながら、当技術分野において、増大した感度を有する免疫アッセイの改善の必要性が依然として残っている。

30

【発明の概要】

【0003】

本発明は、一部は、免疫アッセイ、例えば抗原に基づく捕捉アッセイまたはサンドイッチ型アッセイにおける抗体の検出のために、検出可能なFc結合分子 (例えば、プロテインA-コンジュゲート、プロテインG-コンジュゲート、二次抗体-コンジュゲート) を用いることができるという発見に基づく。免疫アッセイにおける抗体の検出のために、これらの検出可能なFc結合分子を単独でまたは他の検出可能な実体と組み合わせて用いることができる。例えば、検出される対象となる抗体が抗体特異的結合実体、例えば抗原によっていったん捕捉されると、これらのFc結合分子を用いて抗体を検出することができる。別の例では、これらのFc結合分子を、例えば別の標識されたまたは検出可能な抗原などの抗体結合実体と組み合わせて、検出可能なシグナルの第二の供給源として用いることができる。

40

【0004】

この発見を、本明細書において記載される多様な捕捉型アッセイ、関連する方法、組成物、およびキットに適用することができる。

【0005】

したがって、ある特定の態様は、(a) 試験サンプルを第一の検出体と接触させて、該第一の検出体および抗体を含む第一の複合体を形成する工程であって、該第一の検出体は

50

第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたFc結合分子を含む、工程；(b)表面の試験領域に固定化された捕捉実体と該第一の複合体を接触させる工程であって、該捕捉実体は該抗体に特異的に結合し得る、工程；ならびに(c)試験領域における該第一の検出可能な実体からのシグナルの存在を検出する工程であって、シグナルの存在は試験サンプル中の抗体の存在の指標である、工程を含む、試験サンプル中の抗体を検出するための方法を含む。ある特定の態様において、第一の検出体を表面のコンジュゲート領域に固定化し、該コンジュゲート領域は表面の試験領域と重複しない。具体的な態様において、Fc結合分子は、プロテインA、プロテインG、またはその両方である。ある特定の態様において、第一の検出体は、検出可能な実体にそれぞれコンジュゲートしたプロテインAおよびプロテインGを含む。そのような態様において、プロテインA対プロテインGの比率を調整して、検出される対象となる免疫グロブリンの型に応じてシグナル増幅のレベルを最適化してよい。例えば、いくつかの態様において、プロテインAおよびプロテインGは約10:1~約1:10、より好ましくは約5:1~約1:5の比率で存在している。

10

**【0006】**

ある特定の態様において、捕捉実体は抗原または抗原性ペプチドである。特定の態様において、該抗原または抗原性ペプチドは、糸状虫、例えばイヌ糸状虫、エーリキア・カニス(*Ehrlichia canis*)、ボレリア・ブルグドルフェリ(*Borrelia burgdorferi*)、ボレリア・アフゼリ(*Borrelia afzelii*)、ボレリア・ガリニ(*Borrelia garinii*)、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム(*Anaplasma phagocytophilum*)、ネコ白血病ウイルス、パルボウイルス、A型インフルエンザ株、B型インフルエンザ株、鳥インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、レジオネラ(*Legionella*)、アデノウイルス、ロタウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、およびA群レンサ球菌(*Streptococcus*)からなる群より選択される生物由来のものである。

20

**【0007】**

ある特定の態様において、第一の検出可能な実体は、金属ナノ粒子、金属ナノシェル、フルオロフォア、または着色ラテックス粒子である。いくつかの態様において、金属性ナノ粒子または金属性ナノシェルは、金粒子、銀粒子、銅粒子、白金粒子、カドミウム粒子、複合材粒子、金中空球、金被覆シリカナノシェル、およびシリカ被覆金シェルからなる群より選択される。

**【0008】**

本明細書において提供されるある特定の方法は、試験サンプルを第二の検出体と接触させる工程であって、該第二の検出体は第二の検出可能な実体にコンジュゲートした抗原または抗原性ペプチドを含み、該抗原または抗原性ペプチドは抗体に特異的に結合し得る工程をさらに含む。いくつかの態様において、第一および第二の検出体をコンジュゲート領域に固定化し、該コンジュゲート領域は表面の試験領域と重複しない。ある特定の態様において、コンジュゲート領域は対照検出体をさらに含む。第一の検出体対第二の検出体の比率を調整することによって、シグナル増幅のレベルを選択することができる。ある特定の態様において、第一の検出体対第二の検出体の比率は約20:1~約1:20、より好ましくは約20:1~約1:1である。

30

**【0009】**

具体的な態様において、第一および第二の検出可能な実体は同じである。より具体的な態様において、第一および第二の検出可能な実体は両方とも金ナノ粒子である。他の態様において、第一および第二の検出可能な実体は異なる。

40

**【0010】**

ある特定の態様において、表面は、ラテラルフローアッセイ装置における流路、マイクロタイプレート表面、または分析用ローターにおける流路である。

**【0011】**

上述のように、ある特定の態様は、検出可能な実体にコンジュゲートしている第二の検出体を採用し、その第二の検出体は抗原または抗原性ペプチドである。これらの態様および関連する態様のいくつかにおいて、抗原または抗原性ペプチドは、糸状虫、例えばイヌ

50

糸状虫、エーリキア・カニス、エーリキア・シャフェンシス (*Ehrlichia chaffeensis*)、エーリキア・エウイング (*Ehrlichia ewingii*)、ボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アフゼリ、ボレリア・ガリニ、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム、アナプラズマ・プラチス (*Anaplasma platys*)、ネコ白血病ウイルス、パルボウイルス、例えばイヌパルボウイルス、A型インフルエンザ株、B型インフルエンザ株、鳥インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、レジオネラ、アデノウイルス、ロタウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、およびA群レンサ球菌からなる群より選択される生物由来のものである。

【0012】

いくつかの態様において、表面は、ラテラルフローアッセイ装置における流路または分析用ローターにおける流路である。特定の態様において、試験サンプルは、血液、血清、または血漿である。

10

【0013】

サンプルロード領域；第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたFc結合分子を含む可動性の第一の検出体を含むコンジュゲート領域；および、抗体に特異的に結合し得る固定化された捕捉実体を含む試験領域を含む装置であって、稼働中に液体サンプルがサンプルロード領域にロードされた場合にコンジュゲート領域および試験領域と流体連通している状態にあるように、サンプルロード領域、コンジュゲート領域、および試験領域が構成されている、抗体検出装置も含まれる。ある特定の態様において、Fc結合分子はプロテインAおよび/またはプロテインGである。

20

【0014】

いくつかの態様において、捕捉実体は抗原または抗原性ペプチドである。特定の態様において、抗原または抗原性ペプチドは、糸状虫、例えばイヌ糸状虫、エーリキア・カニス、エーリキア・シャフェンシス、エーリキア・エウイング、ボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アフゼリ、ボレリア・ガリニ、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム、アナプラズマ・プラチス、ネコ白血病ウイルス、パルボウイルス、例えばイヌパルボウイルス、A型インフルエンザ株、B型インフルエンザ株、鳥インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、レジオネラ、アデノウイルス、ロタウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、およびA群レンサ球菌からなる群より選択される生物由来のものである。

30

【0015】

特定の態様において、第一の検出可能な実体は、金属ナノ粒子、金属ナノシェル、フルオロフォア、または着色ラテックス粒子である。具体的な態様において、金属性ナノ粒子または金属性ナノシェルは、金粒子、銀粒子、銅粒子、白金粒子、カドミウム粒子、複合材粒子、金中空球、金被覆シリカナノシェル、およびシリカ被覆金シェルからなる群より選択される。

【0016】

いくつかの態様において、装置は、液体サンプルがサンプルロード領域にロードされた場合に液体サンプルと流体連通している状態にある対照領域をさらに含む。ある特定の態様において、対照領域は、対照検出体に特異的に結合し得る固定化された結合パートナーを含む。

40

【0017】

特定の態様において、第一の検出体は、第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたプロテインAまたはプロテインGを含み、かつ固定化された結合パートナーは、抗プロテインA抗体または抗プロテインG抗体である。

【0018】

いくつかの装置は、試験領域の下流に位置した吸収性パッドをさらに含む。ある特定の装置において、コンジュゲート領域はサンプルロード領域の上流に位置する。いくつかの態様において、コンジュゲート領域はサンプルロード領域の下流に位置する。いくつかの態様において、サンプルロード領域は血液分離材料を含む。ある場合には、コンジュゲ

50

ト領域は可動性の第二の検出体をさらに含み、該第二の検出体は第二の検出可能な実体にコンジュゲートした抗原または抗原性ペプチドを含み、該抗原または抗原性ペプチドは抗体に特異的に結合し得る。第一の検出体（例えば、第一の検出可能な実体にコンジュゲートした、プロテインAおよび/またはプロテインGなどのFc結合分子）対第二の検出体（第二の検出可能な実体にコンジュゲートした抗原/抗原性ペプチド）の比率を調整して、所望のレベルのシグナル増幅を選択することができる。いくつかの態様において、第一の検出体対第二の検出体の比率は約20:1～約1:20である。他の態様において、第一の検出体対第二の検出体の比率は約20:1～約1:1である。

【0019】

特定の態様において、第一および第二の検出可能な実体は同じである。具体的な態様において、第一および第二の検出可能な実体は金ナノ粒子である。他の態様において、第一および第二の検出可能な実体は異なる。

10

【0020】

特定の態様において、例えば抗微生物抗体の検出に関して、抗原または抗原性ペプチドは、糸状虫、例えばイヌ糸状虫、エーリキア・カニス、エーリキア・シャフェンシス、エーリキア・エウイング、ボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アフゼリ、ボレリア・ガリニ、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム、アナプラズマ・プラチス、ネコ白血病ウイルス、パルボウイルス、例えばイヌパルボウイルス、A型インフルエンザ株、B型インフルエンザ株、鳥インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、レジオネラ、アデノウイルス、ロタウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、およびA群レンサ球菌からなる群より選択される生物由来のものである。

20

【0021】

本明細書において記載される検出装置および検出システムのうちの1つまたは複数、ならびに試験サンプル中の抗体を検出するために該装置または該システムを用いるための指示書を含むキットも含まれる。ある特定のキットは、第二の検出体、ならびに検出システムのサンプルロード領域への適用前に該第二の検出体を試験サンプルと組み合わせるための指示書をさらに含み、該第二の検出体は第二の検出可能な実体にコンジュゲートした抗原または抗原性ペプチドを含み、該抗原または抗原性ペプチドは抗体に特異的に結合し得る。いくつかの態様において、指示書は、所望のレベルのシグナル増幅を達成するために、第二の検出体が第一の検出体と特定の比率で存在するように第二の検出体を試験サンプルと組み合わせる工程を提供する。

30

【0022】

本明細書において記載される検出装置または検出システムのうちの1つまたは複数のサンプルロード領域に試験サンプルを適用する工程、および試験領域における第一の検出可能な実体からのシグナルの有無を検出する工程を含む、試験サンプル中の抗体を検出する方法も含まれる。いくつかの方法は、検出システムのサンプルロード領域への適用前に第二の検出体を試験サンプルと組み合わせる工程をさらに含み、該第二の検出体は第二の検出可能な実体にコンジュゲートした抗原または抗原性ペプチドを含み、該抗原または抗原性ペプチドは抗体に特異的に結合し得る。

【0023】

40

ある特定の態様は、捕捉実体、試験サンプル中の抗体、および第一の検出体を含む1種または複数種の捕捉複合体に関するものであって、該捕捉実体は該抗体に結合し、かつ該第一の検出体は、第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたFc結合分子を含みかつ該抗体のFc領域に結合する。これらの態様および関連する態様のいくつかは、第二の検出体をさらに含み、該第二の検出体は抗体の可変領域に特異的に結合する。いくつかの態様において、捕捉複合体は表面の試験領域に固定化されている。

[本発明1001]

(a) 試験サンプルを第一の検出体と接触させて、該第一の検出体および抗体を含む第一の複合体を形成する工程であって、該第一の検出体は第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたFc結合分子を含む、工程；

50

(b) 表面の試験領域に固定化された捕捉実体と該第一の複合体を接触させる工程であって、該捕捉実体は該抗体に特異的に結合し得る、工程；ならびに

(c) 試験領域における該第一の検出可能な実体からのシグナルの存在を検出する工程であって、シグナルの存在は試験サンプル中の抗体の存在の指標である、工程を含む、試験サンプル中の抗体を検出するための方法。

[本発明1002]

第一の検出体を表面のコンジュゲート領域に固定化し、かつ該コンジュゲート領域は表面の試験領域と重複しない、本発明1001の方法。

[本発明1003]

Fc結合分子がプロテインAおよび/またはプロテインGである、本発明1001の方法。

10

[本発明1004]

捕捉実体が抗原または抗原性ペプチドである、本発明1001の方法。

[本発明1005]

抗原または抗原性ペプチドが、糸状虫、エーリキア・カニス (*Ehrlichia canis*)、エーリキア・シャフェンシス (*Ehrlichia chaffeensis*)、エーリキア・エウイング (*Ehrlichia ewingii*)、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、ボレリア・アフゼリ (*Borrelia afzelii*)、ボレリア・ガリニ (*Borrelia garinii*)、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム (*Anaplasma phagocytophilum*)、アナプラズマ・プラチス (*Anaplasma platys*)、ネコ白血病ウイルス、パルボウイルス、A型インフルエンザ株、B型インフルエンザ株、鳥インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、レジオネラ (*Legionella*)、アデノウイルス、ロタウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、およびA群レンサ球菌 (*Streptococcus*) からなる群より選択される生物由来のものである、本発明1004の方法。

20

[本発明1006]

第一の検出可能な実体が、金属ナノ粒子、金属ナノシェル、フルオロフォア、または着色ラテックス粒子である、本発明1001の方法。

[本発明1007]

金属性ナノ粒子または金属性ナノシェルが、金粒子、銀粒子、銅粒子、白金粒子、カドミウム粒子、複合材粒子、金中空球、金被覆シリカナノシェル、およびシリカ被覆金シェルからなる群より選択される、本発明1006の方法。

30

[本発明1008]

試験サンプルを第二の検出体と接触させる工程であって、該第二の検出体は第二の検出可能な実体にコンジュゲートした抗原または抗原性ペプチドを含み、該抗原または抗原性ペプチドは抗体に特異的に結合し得る、工程をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1009]

第一および第二の検出体をコンジュゲート領域に固定化し、かつ該コンジュゲート領域は表面の試験領域と重複しない、本発明1008の方法。

[本発明1010]

コンジュゲート領域が対照検出体をさらに含む、本発明1002または1009の方法。

[本発明1011]

第一および第二の検出可能な実体と同じである、本発明1008の方法。

40

[本発明1012]

第一および第二の検出可能な実体が金ナノ粒子である、本発明1011の方法。

[本発明1013]

第一および第二の検出可能な実体が異なる、本発明1008の方法。

[本発明1014]

表面が、ラテラルフローアッセイ装置における流路、マイクロタイタープレートの表面、または分析用ローターにおける流路である、本発明1008の方法。

[本発明1015]

抗原または抗原性ペプチドが、糸状虫、エーリキア・カニス、エーリキア・シャフェン

50

シス、エーリキア・エウイング、ボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アフゼリ、ボレリア・ガリニ、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム、アナプラズマ・プラチス、ネコ白血病ウイルス、パルボウイルス、A型インフルエンザ株、B型インフルエンザ株、鳥インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、レジオネラ、アデノウイルス、ロタウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、およびA群レンサ球菌からなる群より選択される生物由来のものである、本発明1008の方法。

[本発明1016]

第一の検出体および第二の検出体が約20:1～約1:1の比率で存在している、本発明1008の方法。

[本発明1017]

第一の検出体が、第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたFc結合分子を含み、かつ該Fc結合分子がプロテインAおよび/またはプロテインGである、本発明1016の方法。

[本発明1018]

第一の検出体が、第一の検出可能な実体にそれぞれコンジュゲートしたプロテインAおよびプロテインGを含む、本発明1016の方法。

[本発明1019]

プロテインAおよびプロテインGが約10:1～約1:10の比率で存在している、本発明1018の方法。

[本発明1020]

表面が、ラテラルフローアッセイ装置における流路または分析用ローターにおける流路である、本発明1001の方法。

[本発明1021]

試験サンプルが、体液、身体器官の抽出物、血液、血清、または血漿である、本発明1001の方法。

[本発明1022]

サンプルロード領域；

第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたFc結合分子を含む可動性の第一の検出体を含むコンジュゲート領域；および

抗体に特異的に結合し得る固定化された捕捉実体を含む試験領域を含み、稼働中に液体サンプルがサンプルロード領域にロードされた場合に、コンジュゲート領域および試験領域と流体連通している状態にあるように、サンプルロード領域、コンジュゲート領域、および試験領域が構成されている、抗体検出装置。

[本発明1023]

Fc結合分子がプロテインAおよび/またはプロテインGである、本発明1022の検出装置。

[本発明1024]

捕捉実体が抗原または抗原性ペプチドである、本発明1022の検出装置。

[本発明1025]

抗原または抗原性ペプチドが、糸状虫、エーリキア・カニス、エーリキア・シャフェンシス、エーリキア・エウイング、ボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アフゼリ、ボレリア・ガリニ、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム、アナプラズマ・プラチス、ネコ白血病ウイルス、パルボウイルス、A型インフルエンザ株、B型インフルエンザ株、鳥インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、レジオネラ、アデノウイルス、ロタウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、およびA群レンサ球菌からなる群より選択される生物由来のものである、本発明1024の検出装置。

[本発明1026]

第一の検出可能な実体が、金属ナノ粒子、金属ナノシェル、フルオロフォア、または着色ラテックス粒子である、本発明1022の検出装置。

[本発明1027]

金属性ナノ粒子または金属性ナノシェルが、金粒子、銀粒子、銅粒子、白金粒子、カドミウム粒子、複合材粒子、金中空球、金被覆シリカナノシェル、およびシリカ被覆金シェ

10

20

30

40

50



ルからなる群より選択される、本発明1026の検出装置。

[本発明1028]

液体サンプルがサンプルロード領域にロードされた場合に、液体サンプルと流体連通している状態にある対照領域をさらに含む、本発明1022の検出装置。

[本発明1029]

対照領域が、対照検出体に特異的に結合し得る固定化された結合パートナーを含む、本発明1028の検出装置。

[本発明1030]

第一の検出体が、第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたプロテインAまたはプロテインGを含み、かつ固定化された結合パートナーが、抗プロテインA抗体または抗プロテインG抗体である、本発明1029の検出装置。

10

[本発明1031]

試験領域の下流に位置する吸収性パッドをさらに含む、本発明1022の検出装置。

[本発明1032]

コンジュゲート領域がサンプルロード領域の上流に位置する、本発明1022の検出装置。

[本発明1033]

コンジュゲート領域がサンプルロード領域の下流に位置する、本発明1022の検出装置。

[本発明1034]

サンプルロード領域が血液分離材料を含む、本発明1022の検出装置。

[本発明1035]

コンジュゲート領域が可動性の第二の検出体をさらに含み、該第二の検出体は第二の検出可能な実体にコンジュゲートした抗原または抗原性ペプチドを含み、該抗原または抗原性ペプチドは抗体に特異的に結合し得る、本発明1022の検出装置。

20

[本発明1036]

第一および第二の検出可能な実体が同じである、本発明1035の検出装置。

[本発明1037]

第一および第二の検出可能な実体が金ナノ粒子である、本発明1036の検出装置。

[本発明1038]

第一および第二の検出可能な実体が異なる、本発明1035の検出装置。

[本発明1039]

抗原または抗原性ペプチドが、糸状虫、エーリキア・カニス、エーリキア・シャフェンシス、エーリキア・エウイング、ボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アフゼリ、ボレリア・ガリニ、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム、アナプラズマ・プラチス、ネコ白血病ウイルス、パルボウイルス、A型インフルエンザ株、B型インフルエンザ株、鳥インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、レジオネラ、アデノウイルス、ロタウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、およびA群レンサ球菌からなる群より選択される生物由来のものである、本発明1035の検出装置。

30

[本発明1040]

第一の可動性検出体および第二の可動性検出体が約20:1～約1:1の比率で存在している、本発明1033の検出装置。

40

[本発明1041]

第一の可動性検出体が、第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたFc結合分子を含み、かつ該Fc結合分子がプロテインAおよび/またはプロテインGである、本発明1040の検出装置。

[本発明1042]

第一の可動性検出体が、第一の検出可能な実体にそれぞれコンジュゲートしたプロテインAおよびプロテインGを含む、本発明1040の検出装置。

[本発明1043]

プロテインAおよびプロテインGが約10:1～約1:10の比率で存在している、本発明1042の検出装置。

50

[本発明1044]

試験サンプル中の抗体を検出するための本発明1022に規定の検出システムおよび該システムを用いるための指示書を含む、キット。

[本発明1045]

第二の検出体、ならびに検出システムのサンプルロード領域への適用前に該第二の検出体を試験サンプルと組み合わせるための指示書をさらに含み、該第二の検出体は第二の検出可能な実体にコンジュゲートした抗原または抗原性ペプチドを含み、該抗原または抗原性ペプチドは抗体に特異的に結合し得る、本発明1044のキット。

[本発明1046]

第一の可動性検出体および第二の検出体が約20:1～約1:1の比率で存在している、本発明1045のキット。

10

[本発明1047]

第一の可動性検出体が、第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたFc結合分子を含み、かつ該Fc結合分子がプロテインAおよび/またはプロテインGである、本発明1046のキット。

[本発明1048]

第一の検出体が、第一の検出可能な実体にそれぞれコンジュゲートしたプロテインAおよびプロテインGを含む、本発明1046のキット。

[本発明1049]

プロテインAおよびプロテインGが約10:1～約1:10の比率で存在している、本発明1048のキット。

20

[本発明1050]

本発明1022に規定の検出システムのサンプルロード領域に試験サンプルを適用する工程、および試験領域における第一の検出可能な実体からのシグナルの有無を検出する工程を含む、試験サンプル中の抗体を検出する方法。

[本発明1051]

検出システムのサンプルロード領域への適用前に第二の検出体を試験サンプルと組み合わせる工程をさらに含み、該第二の検出体は第二の検出可能な実体にコンジュゲートした抗原または抗原性ペプチドを含み、該抗原または抗原性ペプチドは抗体に特異的に結合し得る、本発明1050の方法。

30

[本発明1052]

第一の可動性検出体と約20:1～約1:1の比率で存在するように第二の検出体を試験サンプルに添加する、本発明1051の方法。

[本発明1053]

捕捉実体、試験サンプル中の抗体、および第一の検出体を含み、該捕捉実体は該抗体に結合し、かつ該第一の検出体は、第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたFc結合分子を含みかつ該抗体のFc領域に結合する、捕捉複合体。

[本発明1054]

第二の検出体をさらに含み、該第二の検出体は抗体の可変領域に特異的に結合する、本発明1053の捕捉複合体。

40

[本発明1055]

捕捉複合体が表面の試験領域に固定化されている、本発明1053の捕捉複合体。

【図面の簡単な説明】【0024】

【図1】図1は、試験表面（例えば、ニトロセルロース）に固定化された捕捉実体（例えば、BSAにコンジュゲートした抗体特異的抗原）によって捕捉される関心対象の抗体、標的抗体のFc領域に結合した検出可能なFc結合分子 - コンジュゲート（例えば、プロテインA - またはプロテインG - コロイド金コンジュゲート）、および任意で、関心対象の抗体の可変領域に結合した第二の検出可能なコンジュゲート（例えば、抗原 - コロイド金コンジュゲート）を有する、本発明の捕捉複合体の一例を図解している。

50

【図2】図2は、本発明に従ったラテラルフロー装置および方法の一例を図解している。関心対象の抗体に特異的な抗原性ペプチドをキャリアタンパク質のウシ血清アルブミン（BSA）に連結し、結果として生じたBSA - ペプチドコンジュゲートをニトロセルロース上の捕捉体として用いる。この同じ抗原性ペプチドを、この例示的なアッセイにおいて標識としての役割を果たすコロイド金にさらにコンジュゲートする。次いで、産生されたシグナルを、コンジュゲート混合物へのプロテインA/G - 金コンジュゲートの添加によってさらに増幅する。

【図3】図3は、図2に示されるラテラルフロー装置を用いた、ライム病特異的ラテラルフローアッセイの経時的なサンプルの流れを図解している。この例示的なアッセイでは、反応チューブ内で1滴の血液、血清、または血漿（移動用ピペットによるおよそ15~20 $\mu$ L）を4滴のコロイド金コンジュゲート溶液（滴下ボトルからおよそ30 $\mu$ L）と混合する。結果として生じた反応混合物からの1滴を、平坦な表面上に置かれた試験カセットのサンプルポートに移す。血液分離パッドは、全血由来の血液細胞を濾過する（図2を参照されたい）。血漿（または血清）およびB. ブルグドルフェリ抗体 - コンジュゲート複合体は、試験領域および対照領域を含有するニトロセルロース膜に移入する。3（3）滴（滴下ボトルからおよそ60 $\mu$ L）の追跡バッファの適用（サンプル適用の1分後）により、混合物全体は、ニトロセルロースを通過して、液体を引き寄せ続ける上部吸収性パッドへ向かって動く。陽性サンプル中に存在しているB. ブルグドルフェリに特異的な抗体は、金標識抗原 - コンジュゲートとすでに複合体形成している。標識抗原 - 抗体複合体は、固定化された抗原が抗体上の第二の結合部位を介して標識抗原 - 抗体複合体を捕捉する、試験ラインへ動く。コンジュゲート混合物中に存在しているプロテインA/G - 金コンジュゲートは、標的抗体のFc領域に結合し、かつ試験シグナルを増幅する。遊離した標識抗原および反応混合物の残りは、ニワトリ抗プロテインA抗体を含む対照捕捉体によってプロテインA金コンジュゲートが捕捉される、対照ラインに移行する。この例では、装置は約8分の時点で読み取られる。試験ゾーンにおける赤色ラインおよび対照ゾーンにおける第二の赤色ラインの出現は、B. ブルグドルフェリに対する抗体の存在を示す。対照ゾーンのみにおけるラインの出現は、B. ブルグドルフェリに対する抗体の非存在を示す。（a）試験ラインは出現するが対照ラインが形成されない場合、または（b）対照ラインも試験ラインも形成されない場合、試験は無効と見なされる。

【発明を実施するための形態】

【0025】

詳細な説明

本明細書において使用するとき、以下の用語は以下の意味を有するものとする。

【0026】

「a」および「an」という冠詞は、冠詞の1つまたは1つを上回る（すなわち、少なくとも1つの）文法上の対象を指すために本明細書において用いられる。例として、「要素（an element）」とは、1つの要素または1つを上回る要素を意味する。

【0027】

「約」とは、参照の分量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、大きさ、量、重量、または長さに対して30、25、20、25、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1%程度異なる分量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、大きさ、量、重量、または長さを意味する。

【0028】

本明細書を通して、文脈上別様に解すべき場合を除いて、「含む（comprise）」、「含む（comprises）」、および「含む（comprising）」という単語は、任意の他の工程もしくは要素、または工程もしくは要素の群の排除ではなく、記述された工程もしくは要素、または工程もしくは要素の群の包含を含意すると理解されるであろう。

【0029】

「からなる」とは、「からなる」という語句に続くものは何でも含むこと、かつそれに限定されることを意味する。ゆえに、「からなる」という語句は、列挙された要素が必要

または必須であること、かつ他の要素は存在しなくてもよいことを示す。「から本質的になる」とは、該語句の後に列挙されたいずれかの要素を含むこと、かつ列挙された要素に対して本開示において特定される活性または作用を妨げないまたは寄与する他の要素に限定されることを意味する。ゆえに、「から本質的になる」という語句は、列挙された要素が必要または必須であること、しかしながら他の要素は任意であり、列挙された要素の活性または作用にそれらが物質的に影響を及ぼすかどうかにかかわらず依存して存在しても存在しなくてもよいことを示す。

#### 【0030】

「ペプチド」および「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマー、ならびにその変種およびその合成類似体と天然に存在する類似体を指すために本明細書において代替可能に用いられる。ゆえに、これらの用語は、1個または複数個のアミノ酸残基が合成の天然に存在しないアミノ酸、例えば相当する天然に存在するアミノ酸の化学的類似体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーおよびそれらの天然に存在する化学的誘導体に適用される。

10

#### 【0031】

「増大した」または「増強した」量とは、任意で「統計的に有意な」量であり、例えば検出可能なFc結合分子なしで実施された抗体試験と比較して、約1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍、またはそれを上回る倍数の（1の間にあるおよび1を上回る、すべての整数、範囲、および小数点、例えば2.5、3.6、3.7、3.8等を含む）量または値（例えば、シグナル、または反応性スコアなどの値）である増大を含んでよい。「増大した」または「増強した」値または量は、例えば検出可能なFc結合分子なしで実施された抗体試験と比較して、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、200%、300%、400%、500%、またはそれを上回る割合の量または値の増大も含んでよい。

20

#### 【0032】

本明細書において引用されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、参照によりそれらの全体として本明細書によって組み入れられる。

#### 【0033】

### 方法

一局面において、本発明は、試験サンプル中の抗体を検出するための方法を含む。ある特定の態様において、これらの方法は、関連部分において、第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたFc結合分子（すなわち、検出可能なFc結合分子 - コンジュゲート）と試験サンプルを接触させて第一の複合体を形成する工程、表面の試験領域に固定化された捕捉実体と該第一の複合体を接触させる工程であって、該捕捉実体は抗体に特異的に結合し得る、工程、および試験領域における該検出可能なFc結合分子 - コンジュゲートからのシグナルの存在を検出する工程に関する。ここで、シグナルの存在は試験サンプル中の抗体の存在の指標である。

30

#### 【0034】

これらの方法の反応物質を、任意の順序または順番で接触させることができる。例えば、表面への適用前に、試験サンプルを検出可能なFc結合分子 - コンジュゲートと混合することができ、またはこれら2つの反応物質を表面に別個に、表面上の同じもしくは異なる位置に順番にもしくは同時に適用することができる。別個に添加した場合、反応物質は、それらが例えば毛細管作用または他の作用によって試験表面を通じて広がるまたは流れるにつれて互いに接触することになる。特定の態様において、検出可能なFc結合分子 - コンジュゲートを、表面の試験領域と重複しない表面のコンジュゲート領域に事前に固定化する。これらの態様のいくつかにおいて、試験サンプルを表面に適用することができ、そこでそれは毛細管作用または他の作用によりコンジュゲート領域および試験領域を通じて流れ、それによってFc結合分子および捕捉実体と接触する。関心対象の抗体がサンプル中に

40

50

存在している場合、それは検出可能なFc結合分子および捕捉実体と検出可能な複合体を形成する。具体的な態様において、Fc結合分子は、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、プロテインL、または例えばそれらの混合物もしくは融合タンパク質のような、それらの任意の組み合わせである。

#### 【0035】

本明細書において提供されるある特定の方法は、試験サンプルを第二の検出体分子と接触させる工程をさらに含む。これらの態様において、第二の検出体は、任意の適切な抗体結合実体であってよく、例えば第二の検出可能な実体にコンジュゲートし、かつ抗体に特異的に結合し得る抗原または抗原性ペプチドであってよい。組み合わせ、例えば第二の検出体と第二の検出可能な実体とのコンジュゲートは、ペプチド抗原および非ペプチド抗原を含む「検出可能な抗体特異的抗原 - コンジュゲート」または「検出可能な抗原 - コンジュゲート」と称されることもある。いくつかの態様において、第一および第二の検出可能な実体は同じであり、すなわち、Fc結合分子 - コンジュゲートおよび検出可能な抗原 - コンジュゲートは、金粒子などの同じタイプの検出可能な実体にコンジュゲートされている。他の態様において、第一および第二の検出可能な実体は異なる。具体的な態様において、第一および第二の検出可能な実体は両方とも、コロイド金コンジュゲート (CGC) を生成する金ナノ粒子である。これらの態様および関連する態様において、検出可能なFc結合分子を「Fc結合分子 - CGC」と称することができ、具体的な例には、プロテインA - CGC、プロテインG - CGC、プロテインA/G - CGC、およびプロテインL - CGCが含まれる。いくつかの態様において、Fc結合分子は、試験サンプル中の抗体のFc領域に結合し得る二次抗体またはそのフラグメントであり、一方で第二の検出体は任意の適切な抗体結合実体、例えば抗原または抗原性ペプチド等であってよい。

#### 【0036】

上記と同様に、これらの方法における反応物質を、任意の順序または順番で接触させることができる。一例として、表面への適用前に、試験サンプルを検出可能なFc結合分子 - コンジュゲート、検出可能な抗原 - コンジュゲート、またはその両方と混合することができ、またはこれら3つの反応物質を表面に別個に、表面上の同じもしくは異なる位置に順番にもしくは同時に適用することができる。別個に添加した場合、反応物質は、それらが例えば毛細管作用または他の作用によって試験表面を通じて広がるまたは流れるにつれて互いに接触することになる。

#### 【0037】

いくつかの態様において、Fc結合分子 - コンジュゲートを、試験領域と重複しない表面のコンジュゲート領域に固定化し、試験サンプルおよび検出可能な抗原 - コンジュゲートを、表面に別個にまたは一緒に適用する。他の態様において、検出可能な抗原 - コンジュゲートを、試験領域と重複しない表面のコンジュゲート領域に固定化し、試験サンプルおよび検出可能なFc結合分子 - コンジュゲートを、表面に別個にまたは一緒に適用する。ある特定の態様において、検出可能なFc結合分子 - コンジュゲートおよび検出可能な抗原 - コンジュゲートを、表面の試験領域と重複しない表面のコンジュゲート領域に両方とも固定化し、試験サンプルを試験表面に適用する。表面への適用後、試験サンプル (単独または他の反応物質と組み合わせ) は、コンジュゲート領域 (存在している場合) および試験領域を通じて毛細管作用または他の作用により表面にわたって流れるまたは広がることができ、それによって検出可能なFc結合分子 - コンジュゲート、検出可能な抗原 - コンジュゲート、および捕捉実体と接触することができる。関心対象の抗体がサンプル中に存在している場合、それはこれらの反応物質と1種または複数種の複合体を形成し、それによってサンプル中の抗体の存在を示す。当業者であれば、これらの例示的な組み合わせが非限定的なものであること、および他の可能性があり得ることに気付くであろう。

#### 【0038】

ある特定の態様において、コンジュゲート領域は対照検出体、例えばFc結合分子に特異的に結合する抗体をさらに含む。他のタイプの対照領域は当業者に明らかであろう。

#### 【0039】

試験サンプルは、通常、関心対象の抗体、例えば感染因子に特異的である抗体を有するまたは有する疑いがある対象から得られた生物学的サンプルである。生物学的サンプルは、好ましくは入手が容易であり、静脈血サンプルまたは指穿刺にも由来する血液、血清、または血漿を含んでよい。他の身体部分由来の組織または他の体液、例えば脳脊髄液（CSF）、唾液、胃分泌物、粘液、尿、糞便等は、抗体を含有することが知られており、試験サンプルの供給源として用いられてよい。他の態様において、サンプルは組織（例えば、組織ホモジネート）、身体器官からの抽出物、または細胞溶解物である。ある特定の態様において、対象は野生動物（例えば、シカ、またはマウス、シマリス、リス等の齧歯類）である。他の態様において、対象は実験動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、サル、霊長類等）である。他の態様において、対象は家畜または野生動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ）である。さらに他の態様において、対象はヒトである。

10

#### 【0040】

免疫グロブリンとも称される抗体は、細菌、酵母、寄生虫、およびウイルスの成分などの外来物または抗原を特異的に識別する、免疫システムのY字型タンパク質である。抗体の「Y」の各先端は、抗原上の特定のエピトープに特異的である抗原結合部位を含有し、これら2つの構造体が正確に一つに結合するのを可能にしている。所定の抗体の産生は、その抗体と特異的に相互作用する抗原（例えば、微生物抗原）に曝露されると増大する。それゆえ、対象由来のサンプルにおける抗原特異的抗体の検出は、その対象が、ウイルス、細菌、真菌、または寄生虫などの所定の微生物に現在曝露されているかどうかまたは以前に曝露されていたかどうかの情報を与え得る。

20

#### 【0041】

フラグメント結晶化可能領域（Fc領域）は、細胞表面Fc受容体および補体系のある特定のタンパク質と相互作用する抗体の尾部領域である。IgG、IgA、およびIgD抗体アイソタイプにおいて、Fc領域は、抗体の2本の重鎖の第二および第三の定常ドメインに由来する2つの同一タンパク質フラグメントから構成される。IgMおよびIgEのFc領域は、各ポリペプチド鎖に3つの重鎖定常ドメイン（ $C_H$ ドメイン2~4）を含有する。IgG抗体のFc領域は、高度に保存されたN型糖鎖付加部位を持つ。この部位に接着したN-グリカン、主に中心部がフコシル化された複合型の二分岐（diantennary）構造体である。加えて、これらのN-グリカンの少量は、二分しているGlcNAcおよび-2,6結合型シアル酸残基も持つ。抗体のFab領域は、抗体の標的特異性を規定する可変部を含有し、対照的に、1つのクラスにおけるすべての抗体のFc領域は、各種について同じであり、それらは可変ではなく定常である。

30

#### 【0042】

抗体の「抗原結合部位」または「結合部」とは、抗原結合に関与する免疫グロブリン分子の部分の部分を指す。抗原結合部位は、重（「H」）鎖および軽（「L」）鎖のN末可変（「V」）領域のアミノ酸残基によって形成される。重鎖および軽鎖のV領域内にある大きく相違する3つの伸縮は「超可変領域」と称され、「フレームワーク領域」、すなわち「FR」として知られる、より保存された隣接する区域の間に介在する。ゆえに、「FR」という用語は、免疫グロブリンにおける超可変領域の間および近接に天然に見出されるアミノ酸配列を指す。抗体分子において、軽鎖の3つの超可変領域および重鎖の3つの超可変領域は、互いに対して三次元空間に配置して、抗原結合面を形成する。抗原結合面は、結合した抗原の三次元面に相補的であり、重鎖および軽鎖のそれぞれの3つの超可変領域は「相補性決定領域」、すなわち「CDR」と称される。

40

#### 【0043】

抗体は、典型的に、Fc結合分子による検出を容易にするFc領域のすべてまたは一部を含み、かつ抗原または抗原性ペプチドなどの抗体特異的結合物質による検出を容易にする1つまたは複数の抗原結合部位も含み得る。抗体は、例えばIgG、IgE、IgD、IgM、またはIgA型のものであってよい。一般的に、例えば感染症の初期段階での検出には、IgMおよび/またはIgA抗体が検出される。

#### 【0044】

50

Fc結合分子には、抗体のFc領域または抗体の可変領域の外側である任意の領域に特異的に結合する任意の結合物質が含まれる。ある特定の態様において、Fc結合分子は抗体またはその抗原結合フラグメントではない。他の態様において、Fc結合分子はFc特異的二次抗体、例えばウサギ抗イヌ抗体、ヤギ抗イヌ抗体である。ある特定の態様において、Fc結合分子は、試験サンプル中の検出される対象となる抗体に対する二次抗体である。Fc結合分子の一般的な例には、免疫グロブリンのFc領域に特異的に結合するポリペプチド、可溶性受容体、アドネクチン (adnectin)、小ペプチド、ペプチド模倣物、小分子、アプタマー等が含まれる。Fc結合分子の具体的な例には、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G融合タンパク質、プロテインL、ならびに抗体のFc領域に特異的に結合し得る能力を保持するそれらのフラグメントおよび変種が含まれる。

10

## 【0045】

プロテインAは、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の細胞壁に見出される40~60kDaのMSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule) 表面タンパク質であり、spa遺伝子によってコードされる。野生型プロテインAは、3ヘリックスバンドルに折り重なりかつ抗体のFc領域に個々に結合し得る、5つの相同なIg結合ドメインから構成される。プロテインAは、高いアフィニティーでヒトIgG1およびIgG2に結合し、中程度のアフィニティーでヒトIgM、IgA、およびIgEに結合する。

## 【0046】

プロテインGは、C群およびG群ストレプトコッカス (*Streptococcal*) 菌において発現される免疫グロブリン結合タンパク質である (例えば、Sjoberg et al., *J Biol Chem.* 266: 399-405, 1991を参照されたい)。プロテインGのNMR溶液構造 (Lian et al., *Journal of Mol. Biol.* 228: 1219-1234, 1992を参照されたい) および結晶構造 (Derrick and Wigley, *Journal of Mol. Biol.* 243: 906-918, 1994を参照されたい) は、1オングストロームまで分解されている。プロテインAおよびプロテインGは当技術分野において周知であり、種々のコンジュゲート形態および非コンジュゲート形態で市販されている。

20

## 【0047】

プロテインAおよびプロテインGの全長または野生型バージョンの機能的な変種およびフラグメントも含まれる。ある特定の態様において、変種ポリペプチドは、プロテインAおよび/またはプロテインGの野生型配列と少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、またはそれを上回る割合の配列同一性または類似性を有するアミノ酸配列を含む。機能的フラグメントは、野生型プロテインAおよび/またはプロテインGの例えば10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、450、500個、またはそれを上回る個数の連続または不連続残基であるポリペプチドフラグメントであってよい。プロテインAおよびプロテインGの変種およびフラグメントは、典型的に、1種または複数種の免疫グロブリンアイソタイプのFc領域に対する特異的な結合を保持する。

30

## 【0048】

パーセント配列同一性は当技術分野において認識される意味を有し、2種のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の同一性を測定する多数の方法が存在する。例えば、Lesk, Ed., *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, Ed., *Biocomputing: Informatics And Genome Projects*, Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., *Computer Analysis Of Sequence Data, Part I*, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, *Sequence Analysis In Molecular Biology*, Academic Press, (1987); およびGribskov & Devereux, Eds., *Sequence Analysis Primer*, M Stockton Press, New York, (1991)を参照されたい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを整列させるための方法は、GCGプログラムパッケージ (Devereux et al., *Nuc. Acids Res.* 12: 387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul et al., *J Molec. Biol.* 215: 403 (1990))、およびSmith and Watermanの局所ホモロジアルゴ

40

50

リズム (Adv. App. Math., 2: 482-489 (1981)) を用いる Bestfit プログラム (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711) を含めた、コンピュータプログラムに盛り込まれている。例えば、-12 のギャップ開始ペナルティ (gap open penalty) および -2 のギャップ伸長ペナルティを有するアフィンギャップ検索を用いて、FASTA アルゴリズムを採用するコンピュータプログラム ALIGN を用いることができる。

【0049】

プロテイン A 融合体およびプロテイン G 融合体を含めた、Fc 結合ポリペプチドを含む融合タンパク質も検討する。Fc 結合分子を、別の Fc 結合分子のすべてもしくは一部に、または 1 種もしくは複数種の異種ポリペプチドに融合させることができる。プロテイン A/G 融合タンパク質の具体的な例では、プロテイン A 由来の 4 つの Fc 結合ドメインをプロテイン G 由来の 2 つと組み合わせる (例えば、Sikkema, J.W.D., Amer. Biotech. Lab, 7: 42, 1989; および Eliasson et al., J. Biol. Chem. 263, 4323-4327, 1988 を参照されたい); しかしながら、他の組み合わせを用いることができる。宿主細胞におけるポリペプチドの精製を向上させ、溶解度を向上させ、発現を増強するために、検出を助けるために、およびポリペプチドを安定させる等のために、融合パートナー (例えば、ペプチドまたは他の構成成分) を用いることができる。融合パートナーの例には、キャリアタンパク質 (例えば、ウシ血清アルブミンなどの血清アルブミン)、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ヒスチジンタグ等が含まれる。

【0050】

捕捉実体は、本明細書において記載される方法および装置によって検出される対象となる関心対象の抗体、つまり微生物特異的抗体などの標的抗体に特異的に結合する任意の結合物質であってよい。典型的に、捕捉実体は、抗体の可変領域に特異的に結合し、ゆえに抗体の抗原結合部位に特異的である 1 つまたは複数のエピトープを含有する。ある特定の態様において、捕捉実体は抗体またはその抗原結合フラグメントではない。特定の態様において、捕捉実体は、関心対象の抗体に特異的に結合する抗原または抗原性ペプチドである。例示的な抗原および抗原性ペプチドは下記に記載されている。関心対象の抗体、つまり本明細書において提供される方法に従って検出される対象となる抗体に特異的に結合する可溶性受容体、アドネクチン、ペプチド模倣物、小分子、アプタマー等も含まれる。

【0051】

上述のように、捕捉実体を、通常、固形または半固形担体などの試験表面または基質に接着または固定化する。接着は共有的または非共有的であってよく、かつ共有結合または非共有結合を可能にする、捕捉実体と結び付いた構成成分、例えばキャリア、担体、または表面に接着した成分に対する高いアフィニティを有する構成成分によって促進され得る。例えば、捕捉実体は、ピオチンなどのリガンドと結び付くことができ、表面に結び付いた成分は、アビジンなどの対応するリガンド受容体であってよい。あるいは、捕捉実体は、アビジンなどのリガンド受容体と結び付くことができ、表面に結び付いた成分は、ピオチンなどの対応するリガンドであってよい。免疫アッセイの間、抗体を含有するサンプルの添加前または添加後のいずれかに、捕捉実体を試験表面または基質に接着または固定化することができる。

【0052】

特定の態様において、試験表面は、ビーズ、ドットプロット、ラテラルフローアッセイ装置における流路、または分析用ローターにおける流路である。例えば、捕捉実体を PVDF 膜 (例えば、Immobilon (商標) 膜)、ニトロセルロース膜、ポリエチレン膜、ナイロン膜、または同様のタイプの膜などの多孔質膜に接着または固定化することができる。他の態様において、試験表面または基質は、チューブまたはウェル、例えば ELISA または他のサンドイッチ型アッセイにおける使用に適したプレート (例えば、マイクロタイタープレート) におけるウェルである。いくつかの態様において、試験表面または基質は、電気化学的、光学的、または光電子的センサーなどのセンサーである。

【0053】



そのような試験表面または基質には、ガラス、セルロースペースの材料、熱可塑性ポリマー、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、もしくはポリエステル、粒子材料（例えば、ガラスまたは種々の熱可塑性ポリマー）から構成される焼結された構造体、またはニトリロセルロース、ナイロン、ポリスルホン等から構成されるキャスト膜フィルムが含まれてよい。試験表面または基質は、多孔性ポリエチレンとして一般に知られるポリエチレンの焼結された微粒子、例えばChromex Corporation (Albuquerque, NM) 製の0.2~15ミクロンの多孔性ポリエチレン、Porex (商標) 等であってよい。これらの試験表面または基質材料のすべてを、フィルム、シート、もしくはプレートなどの適切な形状で用いることができ、またはそれらを、紙、ガラス、プラスチックフィルム、もしくは織物などの適当な不活性キャリアに被覆する、もしくは結合させる、もしくはラミネート加工してよい。

10

**【0054】**

固相上のペプチドなど、捕捉実体を固定化するための適切な方法には、イオン性、疎水性、共有結合性の相互作用等が含まれる。固形もしくは半固形のキャリア、担体、または表面への特異的または半特異的結合は、固形もしくは半固形のキャリア、担体、または表面へのその共有結合または非共有結合を可能にする構成成分を有する、それと結び付いた捕捉実体によって達成され得る。例えば、構成成分は、キャリア、担体、または表面に接着した成分に対するアフィニティーを有し得る。この場合、構成成分は、例えば6-アミノヘキサン酸など、ペプチドのアミノ酸基 (amino acid group) に結合しているビオチンもしくはビオチニル基、またはそれらの類似体であってよく、その場合に成分は、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン (neutravidin)、またはそれらの類似体である。代替策は、構成成分が6個の連続ヒスチジン残基のアミノ酸配列 (例えば、6x-His タグ) を有し、かつキャリアがNi<sup>++</sup>またはCo<sup>++</sup>イオンを帯電したニトリロ三酢酸 (NTA) 誘導体を含む状況である。上記に付け加えて、適切なキャリア、担体、および表面には、ビーズ (例えば、磁気ビーズ、コロイド金などのコロイド粒子もしくはコロイドナノ粒子、またはシリカ、ラテックス、ポリスチレン、ポリカーボネート、もしくはPDVFを含むナノ粒子)、スチレン-ジビニルベンゼンなどのコポリマーのラテックス、水酸化スチレン-ジビニルベンゼン、ポリスチレン、カルボキシル化ポリスチレン、カーボンブラックのビーズ、不活性化ガラスまたはポリスチレン活性化ガラスもしくはポリ塩化ビニル活性化ガラス、エポキシ活性化多孔質磁気ガラス、ゼラチン粒子もしくは多糖粒子、あるいは他のタンパク質粒子が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

20

30

**【0055】**

上述のように、抗原および抗原性ペプチドを捕捉実体としておよび/または抗体特異的検出体として用いることができる。選択された抗原または抗原性ペプチドは、最も頻繁には抗体の抗原結合部位の一方または両方を介して標的抗体に特異的に結合し得る。それゆえ、本明細書において用いられる「抗原」という用語は、抗体の少なくとも1つの抗原結合部位を介して抗体によって特異的に結合され得る分子を指す。抗原は、抗体の抗原結合部位に特異的に結合する抗原の特定の連続または不連続領域である1つまたは複数のエピトープを含んでよい。エピトープは、直線状エピトープ、連続的 (sequential) エピトープ、または立体構造エピトープであってよい。

**【0056】**

40

抗原は、例えばペプチドもしくはその修飾形態、または小分子などの非ペプチド抗原であってよい。上述のように、抗原には、関心対象の抗体に特異的に結合する可溶性受容体、アドネクチン、ペプチド模倣物、小分子、アプタマー等も含まれてよい。

**【0057】**

捕捉実体、すなわち「捕捉抗原」として用いられる場合、抗原または抗原性ペプチドは、通常標識されておらず、試験表面に固定化または何らかの方法で接着されている。ある特定の態様のために、捕捉抗原をウシ血清アルブミンまたは多抗原性ペプチド (MAPS) などの1種または複数種の異種タンパク質に融合またはコンジュゲートまたは複合体形成させて、試験表面への接着または他の目的を容易にすることができる。

**【0058】**

50

抗体特異的検出体としての使用のために、抗原または抗原性ペプチドは、通常、検出可能な実体にコンジュゲートされ、それによって「検出可能な抗原 - コンジュゲート」を形成する。ある特定の態様において、これらの検出可能な抗原 - コンジュゲートもウシ血清アルブミンまたはMAPSなどの1種または複数種の異種タンパク質に融合またはコンジュゲートまたは複合体形成させる。検出可能な抗原 - コンジュゲートを、下記に記載されるように、直接的または間接的検出のいずれかのために設計することができる。

【0059】

抗原性ペプチドを含む融合タンパク質も企図される。同じもしくは異なる結合特異性を有する（例えば、同じまたは異なるエピトープの1つまたは複数）1種もしくは複数種の抗原性ペプチドのすべてもしくは一部に、または1種もしくは複数種の異種ポリペプチドに抗原性ペプチドを融合させることができる。宿主細胞におけるペプチドの精製を向上させ、溶解度を向上させ、発現を増強するために、検出を助けるために、および抗原性ペプチドを安定させるために、試験表面への固定化を容易にする等のために、融合パートナー（例えば、ペプチドまたは他の構成成分）を用いることができる。融合パートナーの例には、キャリアタンパク質（例えば、ウシ血清アルブミンなどの血清アルブミン）、  
-ガラクトシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ヒスチジンタグ等が含まれる。

【0060】

抗原および抗原性ペプチドおよび他の抗体特異的結合物質は、種々の供給源に由来してよい。特定の態様は、ウイルス、細菌、真菌、および寄生虫を含めた微生物供給源に由来するものを含む。具体的な例には、糸状虫、例えばイヌ糸状虫、エーリキア・カニス、ボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アフゼリ、ボレリア・ガリニ、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム、ネコ白血病ウイルス、パルボウイルス、例えばイヌパルボウイルス、A型インフルエンザ株、B型インフルエンザ株、鳥インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、レジオネラ、アデノウイルス、A群レンサ球菌、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、ロタウイルス等のうちのいずれか1つまたは複数由来である抗原が含まれる。ライム病抗体の検出のためのボレリア抗原の例を、米国出願第13/667,909号、米国特許公報第US 2011/0136155号、およびWO 2011/063003（そのそれぞれは参照によりその全体として組み入れられる）において見出すことができる。エーリキア抗体の検出のためのエーリキア抗原の例を、米国出願第61/712,578号、米国特許公報第2011/0124125号、およびWO 2011/063235（そのそれぞれは参照によりその全体として組み入れられる）において見出すことができる。

【0061】

本明細書において記載される方法に従った使用のための抗原性ペプチドを、合成化学によって調製することができる（すなわち、「合成ペプチド」）。他の態様において、抗原性ペプチドを生物学的に（すなわち、リボソームなどの細胞機構によって）産生することができる。ある特定の態様において、抗原性ペプチドを単離する。本明細書において使用するとき、「単離した」ペプチドとは、合成的または生物学的に産生され、次いで、該ペプチドを産生するために用いられた化学物質および/または細胞機構から少なくとも部分的に精製されているペプチドである。ある特定の態様において、単離したペプチドは実質的に精製されている。本明細書において用いられる「実質的に精製された」という用語は、細胞材料（タンパク質、脂質、炭水化物、核酸等）、培養培地、化学的前駆体、ペプチドの合成に用いられる化学物質、またはそれらの組み合わせを実質的に含んでいない、ペプチドなどの分子を指す。実質的に精製されているペプチドは、約40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、2%、1%未満、またはそれを下回る割合の細胞材料、培養培地、他のポリペプチド、化学的前駆体、および/または該ペプチドの合成に用いられる化学物質を有する。したがって、実質的に純粋なペプチドなどの分子は、乾燥重量で少なくとも約60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の関心対象の分子であってよい。単離したペプチドは、例えばキットの一部として、水、バッファ中であってよく、または再構成を待つ乾燥形態であってよい。単離したペプチドは、薬学的に許容さ

10

20

30

40

50

れる塩の形態であってよい。本発明のペプチドと塩を形成し得る適切な酸および塩基は、当業者に周知であり、無機および有機の酸および塩基を含む。

【0062】

関心対象の抗体またはその抗原結合フラグメントは、それが実体または検出体と（例えば、ラテラルフローアッセイ、ウェスタンブロット、またはELISAアッセイの範囲内の）検出可能なレベルで反応し、かつ同様の条件下で非関連のポリペプチドまたは作用物質と統計的に有意な様式で検出可能に反応しない場合、捕捉実体もしくは抗体特異的検出体（例えば、抗原または抗原性ペプチド）に「特異的に結合する」、「免疫学的に結合する」と言われ、かつ/またはそれに対して「免疫学的に反応性」である。「特異的に結合する」という用語は、捕捉実体または抗体特異的検出体が、サンプル中の他の抗体に対してより関心対象の抗体に対してより高いアフィニティー（例えば、より高い程度の選択性）を有することも意味し得る。

10

【0063】

本文脈において用いられる免疫学的結合は、概して、免疫グロブリンと該免疫グロブリンが特異的である抗原との間で起こるタイプの非共有結合性相互作用を指す。免疫学的結合相互作用などの結合の強度、すなわちアフィニティーを、より小さな $K_d$ ほどより強いアフィニティーを表す、相互作用の解離定数( $K_d$ )という観点から表現することができる。選択されたポリペプチドの免疫学的結合特性を、当技術分野において周知の方法を用いて定量化することができる（例えば、Davies et al., Annual Rev. Biochem. 59: 439-473, 1990を参照されたい）。ある特定の例証的な態様において、抗体は、少なくとも約0.01

20

【0064】

同様に、Fc結合分子は、それがFc領域と検出可能なレベルで反応し、かつ同様の条件下で非関連のポリペプチドまたは作用物質と統計的に有意な様式で検出可能に反応しない場合、免疫グロブリンのFc領域に「特異的に結合する」と言われる。いくつかの例証的な態様において、Fc結合分子は、少なくとも約0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、または50nMの、選択された免疫グロブリンアイソタイプのFc領域に対するアフィニティーを有する。ある特定のFc結合分子は、他と比較して、1種または複数種の免疫グロブリンアイソタイプに対してより強いまたはより弱いアフィニティーを有する。

30

【0065】

そのようなアフィニティーまたは特異性の程度を、例えば競合的な結合調査を含めた種々のルーチン手順によって判定することができる。ELISAアッセイにおいて、陽性応答は、対照または対照の群の平均値を上回る2または3の標準偏差の値として定義される。

40

【0066】

上述のように、Fc結合分子、抗原、および/または抗原性ペプチドなどのある特定の検出体分子を、検出可能な実体にコンジュゲートする。コンジュゲートは、典型的に、共有結合性接着によって達成される。検出可能な実体には、金属ナノ粒子、金属ナノシェル、着色ラテックス粒子、放射性同位体、およびフルオロフォアなどの「直接的に検出可能な実体」、ならびにシグナル伝達をもたらすリガンド-受容体相互作用にしばしば依存する「間接的に検出可能な実体」が含まれる。前者の場合、検出体分子（例えば、抗原性ペプチド、プロテインA/GなどのFc結合分子）を直接的に検出可能な実体にコンジュゲートする。後者の場合、検出体分子をリガンドにコンジュゲートし、次いでそれはそのリガンド-受容体と相互作用し、後者は直接的に検出可能な実体にコンジュゲートされている - ま

50

たはその逆である。リガンドの例には、ビオチン（例えば、システインまたはリジン残基を介して）、脂質分子（例えば、システイン残基を介して）、およびキャリアタンパク質（例えば、血清アルブミン）が含まれる。ビオチンなどのリガンドへの接着は、検出体をアビジン、ストレプトアビジン、またはニュートラアビジンなどのリガンド受容体と結び付けるのに有用であり得る。アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジンを、今度は、直接的に検出可能な実体（例えば、可視化され得るシグナル伝達構成成分、例えばコロイド金、蛍光構成成分、またはホースラディッシュペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼなどの酵素）に連結することができる。あるいは、検出体を、アビジン、ストレプトアビジン、またはニュートラアビジンなどのリガンド受容体に融合または連結することができ、それによって対応するリガンドとの結び付きが促進され、今度は、それを直接的に検出可能な実体に連結する。他のリガンド - 受容体ペアの例は当技術分野において周知であり、同様に使用され得る。

10

## 【 0 0 6 7 】

直接的に検出可能な実体（またはシグナル伝達構成成分）の例には、放射性同位体、フルオロフォア、色素、酵素、ナノ粒子、着色ラテックス粒子、化学発光マーカー、発光色素、および本明細書において記載されかつ当技術分野において公知の他のものが含まれる。

## 【 0 0 6 8 】

直接的に検出可能な実体として使用され得る放射性同位体の例には、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$ 、および $^{125}\text{I}$ が含まれる。これらの放射性同位体は、特定のプロトコルの要求に合うように調整され得る、異なる半減期、減衰のタイプ、およびエネルギーのレベルを有する。例えば、 $^3\text{H}$ は、低いバックグラウンドレベルをもたらす低エネルギー放出体であるが、しかしながら、この低エネルギーは、オートラジオグラフィおよび他の測定結果に対して長期の期間ももたらす。

20

## 【 0 0 6 9 】

直接的に検出可能な実体として使用され得るフルオロフォアまたは蛍光色素（fluorochrome）の例には、フルオレセイン、テトラメチルローダミン、Texas Red、および多数の他のもの（例えば、Haugland, Handbook of Fluorescent Probes - 9th Ed., 2002, Molecular Probes, Inc., Eugene OR; Haugland, The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies- 10th Ed., 2005, Invitrogen, Carlsbad, CA）が含まれる。発光によりまたは別様に検出可能な色素も含まれる。色素によって放出される光は、可視光または不可視光、例えば紫外線または赤外光であってよい。例示的な態様において、色素は、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）色素；キサンテン色素、例えばフルオレセインおよびローダミン；位もしくは位にアミノ基を有する色素（例えば、ナフチルアミン色素、1-ジメチルアミノナフチル-5-スルホネート、1-アニリノ-8-ナフタレン（naphthalene）スルホネート、および2-p-トルイジニル（toidinyl）-6-ナフタレンスルホネート）；3-フェニル-7-イソシアナートクマリンを有する色素；アクリジン、例えば9-イソチオシアナートアクリジンおよびアクリジンオレンジ；ピレン、ベンゾオキサジアゾール（benzoxadiazole）、およびスチルベン；3-( -カルボキシペンチル)-3'-エチル-5,5'-ジメチルオキサカルボシアニン（CYA）を有する色素；6-カルボキシフルオレセイン（FAM）；5&6-カルボキシローダミン-110（R110）；6-カルボキシローダミン-6G（R6G）；N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン（TAMRA）；6-カルボキシ-X-ローダミン（ROX）；6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン（JOE）；ALEXA FLUOR（商標）；Cy2；Texas RedおよびRhodamine Red；6-カルボキシ-2',4,7,7'-テトラクロロフルオレセイン（TET）；6-カルボキシ-2',4,4',5',7,7'-ヘキサクロロフルオレセイン（HEX）；5-カルボキシ-2',4',5',7'-テトラクロロフルオレセイン（ZOE）；NAN；NED；Cy3；Cy3.5；Cy5；Cy5.5；Cy7；およびCy7.5；IR800CW、ICG、Alexa Fluor 350；Alexa Fluor 488；Alexa Fluor 532；Alexa Fluor 546；Alexa Fluor 568；Alexa Fluor 594；Alexa Fluor 647；Alexa Fluor 680、またはAlexa Fluor 750であってよい。

30

40

## 【 0 0 7 0 】

50

ナノ粒子と呼ばれる非常に小さな粒子も、直接的に検出可能な実体として用いることができる。これらの粒子は、通常、大きさが1~1000nmに及び、かつ金および銀粒子、ならびに量子ドットなどの様々な化学構造体を含む。角度のある (angled) 入射白色光を照射された場合、約40~120nmに及び銀または金ナノ粒子は、高強度の単色光を散乱させると考えられる。散乱光の波長は、粒子の大きさに依存する。ごく接近している4~5個の異なる粒子は、それぞれ単色光を散乱させ、それは重なり合った場合に特異的な固有の色を与えると考えられる。銀または金粒子などの誘導体化ナノ粒子を、タンパク質、抗体、小分子、受容体リガンド、および核酸を含めた広域アレイに接着することができる。ナノ粒子の具体的な例には、金属性ナノ粒子および金属性ナノシェル、例えば金粒子、銀粒子、銅粒子、白金粒子、カドミウム粒子、複合材粒子、金中空球、金被覆シリカナノシェル、およびシリカ被覆金シェルが含まれる。シリカ、ラテックス、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリアクリレート、PVDFナノ粒子、およびこれらの材料のいずれかの着色粒子も含まれる。

10

## 【0071】

量子ドットも直接的に検出可能な実体として用いることができる。量子ドットは、広範囲の波長にわたる光によって励起可能である、直径1~5nmの蛍光性結晶である。適当な波長を有する光によって励起されると、これらの結晶は、それらの化学組成および大きさに依存した波長を有する単色光などの光を発する。CdSe、ZnSe、InP、またはInAsなどの量子ドットは固有の光学特性を有し；これらのおよび同様の量子ドットは、多数の商業的供給源（例えば、NN-Labs, Fayetteville, AR ; Ocean Nanotech, Fayetteville, AR ; Nanoco Technologies, Manchester, UK ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）から入手可能である。

20

## 【0072】

シグナルの存在の検出は、アッセイによって採用されている標識または検出可能な実体に適当な任意の手段によって達成され得る。例えば、検出工程には、捕捉複合体を色変化について可視的に点検する工程；または捕捉複合体を物理的・化学的变化について点検する工程が含まれてよい。物理的・化学的变化は、酸化反応または他の化学反応とともに起こり得る。それらを、分光光度計等を用いて目視によって検出してよい。

## 【0073】

シグナルは、典型的に、それらが陰性対照のシグナルよりも強い場合には関心対象の抗体の存在の指標であるが、しかしながら、すべての試験が陰性対照を必要とするわけではない。ある場合には、陽性シグナルの強度は数値的に定量化され得、その強度が対照と比較して統計的に有意である場合には抗体の存在の指標であるが、必ずしもそうであるわけではない。ある場合には、特定の試験タイプに関するルーチン知識および経験が、どのような場合にシグナルが陽性または陰性であるかを確立し、ゆえに関心対象の抗体の有無を示す。

30

## 【0074】

一例として、ある特定のラテラルフローアッセイからのシグナルを、より強くかつより多くの陽性シグナルほどより高い数のスコアを与えられる、0~5のスコア（間にある小数点を含む）である反応性スコアに従って測定することができる。陰性対照は、典型的に、ゼロにより近いスコア、例えば約0.25またはそれ未満を有する。

40

## 【0075】

例えば個々の反応物質の比率を調整することによって、検出シグナルを最適化することができる。一例には、(i) 検出可能なFc結合分子コンジュゲートと(ii) 検出可能な抗原/抗原性ペプチドコンジュゲートとの比率を、以下のように：間にあるすべての比率および比率の範囲を含めた、約1:200、1:100、1:90、1:80、1:70、1:60、1:50、1:40、1:30、1:20、1:19、1:18、1:17、1:16、1:15、1:14、1:13、1:12、1:11、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1、または200:1の(i):(ii)の比率（例えば、モル比）に

50

調整することが含まれる。いくつかの態様において、Fc結合分子コンジュゲート対検出可能な抗原/抗原性ペプチドコンジュゲートの比率は約20:1～約1:20、好ましくは約20:1～約1:1、より好ましくは約16:1～約2:1である。ある特定の態様において、検出可能なコンジュゲートにおけるFc結合分子は、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G融合タンパク質、プロテインL、または抗体のFc領域に特異的に結合し得る能力を保持するそれらのフラグメントおよび変種である。

#### 【0076】

いくつかの態様において、プロテインAとプロテインGとの混合物を、各プロテインAおよびプロテインG分子が検出可能な実体にコンジュゲートされているFc結合分子 - コンジュゲートとして用いる。プロテインAおよびプロテインGの両方を検出可能なFc結合分子コンジュゲートとして用いるそのような態様では、検出される対象となる免疫グロブリンクラスの型に応じてプロテインA対プロテインGの比率を変更することによって、検出シグナルを最適化してよい。上記に説明されるように、プロテインAおよびプロテインGは、異なる免疫グロブリンクラスの（例えば、IgG、IgE、IgD、IgM、またはIgAの）Fc領域に対して異なる結合アフィニティを有する。したがって、プロテインA対プロテインGの比率を、検出することを所望する免疫グロブリンクラスに基づいて調整してよい。例として、主にIgM免疫グロブリンを検出することを所望する場合、より低い比率のプロテインA対プロテインG（すなわち、プロテインAコンジュゲートと比較してより多量のプロテインGコンジュゲート）を用いてよい。他方で、主にIgG免疫グロブリンを検出することを所望する場合、より高い比率のプロテインA対プロテインG（すなわち、プロテインGコンジュゲートと比較してより多量のプロテインAコンジュゲート）を用いてよい。プロテインA対プロテインGコンジュゲートの例示的な比率（例えば、モル比）には、1:20、1:19、1:18、1:17、1:16、1:15、1:14、1:13、1:12、1:11、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、および20:1が含まれるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、プロテインAコンジュゲート対プロテインGコンジュゲートの比率は約10:1～約1:10、好ましくは約5:1～約1:5、より好ましくは約2:1～約1:2である。一態様において、プロテインAコンジュゲート対プロテインGコンジュゲートの比率は約1:1である。

#### 【0077】

ある特定の態様において、検出可能な抗原/抗原性ペプチドコンジュゲートの量との関連でプロテインA対プロテインGの比率を調整することによって、検出シグナルをさらに最適化してよい。例えば、いくつかの態様において、プロテインAコンジュゲート対プロテインGコンジュゲート対検出可能な抗原/抗原性ペプチドコンジュゲートの比率（例えば、モル比）は約20:20:1～約1:1:20、約10:10:1～約2:2:1、または約4:2:1～約1:2:1であってよい。

#### 【0078】

特異的抗体の検出に抗原を用いる免疫アッセイのプロトコールは、当技術分野において周知である。例えば、従来のサンドイッチアッセイを用いることができ、または従来の競合アッセイ形式を用いることができる。いくつかの適切なタイプのアッセイについての考察に関しては、*Current Protocols in Immunology* (Coligan et al., editors, John Wiley & Sons, Inc) を参照されたい。いくつかの態様において、検出工程は、ラテラルフロー免疫アッセイを実施する工程を含む。ある特定の態様において、検出工程は、ELISAアッセイを実施する工程を含む。他の態様において、検出工程は、分析用ローター中のサンプルを回転させる工程を含む。さらに他の態様において、検出工程は、電気化学的、光学的、または光電子的センサーでサンプルを分析する工程を含む。

#### 【0079】

とくに有用なアッセイ形式は、ラテラルフロー免疫アッセイ形式である。非限定的な一例として、Fc結合分子（例えば、プロテインAおよび/またはG）および任意で抗体特異的抗原を含むレポーターまたは検出体分子を、検出可能な実体（例えば、コロイド金）で標

10

20

30

40

50

識し、次いで乾燥させ、ガラス繊維パッド（サンプル適用パッドまたはコンジュゲートパッド）上に配置する。非標識の抗原または抗原性ペプチド（すなわち、捕捉実体）を、ニトロセルロース膜またはPVDF（ポリフッ化ビニリデン）膜（例えば、Immobilon（商標）膜）などの膜に固定化する。サンプルの溶液（血液、血清等）がサンプル適用パッドに適用される（またはコンジュゲートパッドを通じて流れる）と、それは標識検出体を溶解し、次いでそれは、存在する場合にはサンプル中の抗体に結合する。結果として生じた複合体は、次いで次の膜（捕捉実体を含有するPVDFまたはニトロセルロース）へ毛細管作用によって輸送される。捕捉実体に対する抗体が存在する場合、次いでそれらは検出体および膜上の診断用捕捉実体と複合体形成し、それによってシグナル（例えば、目視するまたは可視化することができるバンド）を生じる。

10

**【0080】**

別の非限定的な例として、サンプルパッドは検出体分子（すなわち、検出可能なFc結合分子、検出可能な抗原 - コンジュゲート）の縞が入っておらず、つまりサンプルパッドは固定化前の検出体分子のコンジュゲート領域を含有していない。他のすべての成分は、非標識の抗原または抗原性ペプチド（すなわち、捕捉実体）がニトロセルロース膜またはPVDF（ポリフッ化ビニリデン）膜（例えば、Immobilon（商標）膜）などの膜に固定化されている、上記に記載されるものと本質的に同じである。試験サンプル（血液、血清等）を一方または両方の検出体分子と予備混合し、次いでサンプルパッドに適用する。あるいは、試験サンプルおよび検出体分子をサンプルパッドに別個に、同時にまたは順番に適用する。他の組み合わせは当業者に明らかであろう。それらが混合されるまたは適用される順序に関わらず、サンプル中の抗体と検出体分子との結果として生じた複合体は、次いで次の膜（捕捉実体を含有するPVDFまたはニトロセルロース）へ毛細管作用によって輸送される。捕捉実体に対する抗体が存在する場合、次いでそれらは検出体および膜上の診断用捕捉実体と複合体形成し、それによってシグナル（例えば、目視するまたは可視化することができるバンド）を生じる。

20

**【0081】**

具体的な態様において、方法は、試験サンプルをプロテインAおよび/またはプロテインG - コロイド金コンジュゲート（CGC）と接触させて、第一の複合体を形成する工程、ニトロセルロースまたはPVDF膜の試験領域に固定化されたペプチド抗原と該第一の複合体を接触させる工程であって、該ペプチド抗原は微生物供給源に由来しかつ関心対象の抗体（例えば、抗細菌抗体、抗ウイルス抗体、抗寄生虫抗体、抗真菌抗体）に特異的に結合する工程を含む。ペプチド抗原を、BSAにまたはMAPSとして合成されたものにコンジュゲートすることができる。試験領域におけるプロテインA - CGCおよび/またはプロテインG - CGCからのシグナルの存在は、試験サンプル中の抗体の存在の指標である。

30

**【0082】**

ある特定の方法は、上記に記載される同じペプチド抗原を含むペプチド抗原 - CGCコンジュゲートと試験サンプルを接触させる工程をさらに含む。ある特定の態様において、プロテインA/G - CGCもしくは二次抗体 - CGCまたはそれらの組み合わせおよびペプチド抗原 - CGCを、試験領域と重複しないように膜（または別個であるが接続している膜）のコンジュゲート領域に固定化する。他の態様において、プロテインA/G - CGCもしくは二次抗体 - CGCまたはそれらの組み合わせおよびペプチド抗原 - CGCを膜に固定化せず、むしろ試験サンプルと一緒に同時にまたは順番に表面に適用する。プロテインA/G - CGCおよび/または二次抗体 - CGCおよびペプチド抗原 - CGCからの組み合わせさったシグナルは、試験サンプル中の抗体の存在を示し、かつペプチド抗原 - CGC単独で、すなわちプロテインA - CGC、プロテインG - CGC、または二次抗体 - CGCなしで実施される試験からのシグナルよりも典型的に強い。具体的な態様において、ペプチド抗原はボレリア抗原（天然に存在するまたは合成された、例えば天然に存在する抗原と同一のまたは模倣の）であり、かつ試験サンプルは、ライム病を有する疑いがある対象由来のものである。陽性シグナルは、サンプル中のライム病特異的抗体の存在を同定する。他の態様において、ペプチド抗原はエーリキア抗原（天然に存在するまたは合成された、例えば天然に存在する抗原と同一のまたは模倣

40

50

倣の)であり、かつ対象は、アナプラズマ科、エーリキア属およびアナプラズマ属の細菌によって引き起こされるダニ媒介性細菌感染症であるエーリキア症を有する疑いがある。

【0083】

血液産物または他の生理的もしくは生物学的流体のスクリーニングのための別のアッセイは、酵素結合免疫吸着アッセイ、すなわちELISAである。典型的にELISAでは、捕捉実体(例えば、抗体特異的抗原)をマイクロタイターウェルの表面に直接的にまたは捕捉マトリックス(例えば、抗体)を介して吸着させる。次いで、表面上の残りの非特異的タンパク質結合部位を、例えばウシ血清アルブミン(BSA)、熱不活性化した正常ヤギ血清(NGS)、またはBLOTTO(防腐剤、塩、および消泡剤も含有する、脱脂粉乳のバッファー溶液)などの適当な作用物質でブロックする。次いで、ウェルを、関心対象の抗体を含有する疑いがある生物学的サンプルとインキュベートする。サンプルを未希釈で(neat)適用することができ、またはより頻繁にはそれを、通常少量(0.1~5.0重量%)のBSA、NGS、またはBLOTTOなどのタンパク質を含有するバッファー溶液に希釈することができる。特異的結合を起こすのに十分な長さの時間インキュベートした後、非結合のタンパク質を除去するためにウェルを洗浄し、次いで、標準的手順によって酵素または他の標識にコンジュゲートしかつブロックングバッファー中に溶解しているFc結合分子(例えば、プロテインAおよび/またはプロテインG)および任意で別の抗体特異的抗原(通常、捕捉実体と同じもの)を含む1種または複数種の検出体分子とインキュベートする。ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等を含めた種々の酵素から標識を選ぶことができる。特異的結合を十分な時間再度起こさせ、次いで非結合のコンジュゲートを除去するためにウェルを再度洗浄し、酵素に対する適切な基質を添加する。発色させ、ウェルの内容物の光学密度を視覚的にまたは(適当な波長で測定される)機器によって判定する。カットオフOD値を、ライム病が流行していない地域からの個体から収集された少なくとも50個の血清サンプルの平均OD+3標準偏差(SD)として、または他のそのような従来 of 定義によって定義してよい。非常に特異的なアッセイの場合、OD+2 SDをカットオフ値として用いることができる。ELISAアッセイを実施するための条件は、当技術分野において周知である。

【0084】

任意の数の従来 of タンパク質アッセイ形式、とくに免疫アッセイ形式を、本明細書に記載される種々の態様を利用するように設計し得ることは当業者によって理解されるべきである。ゆえに、本発明は、特定のアッセイ形式の選択によって限定されず、当業者に公知であるアッセイ形式を包含すると考えられる。

【0085】

「抗体を含有するサンプル」または「サンプル中の抗体を検出する」などの語句は、抗体が含有されていないまたは検出されないサンプルまたは判定(例えば、検出の試み)を排除することを意味しない。一般的な意味において、本発明は、それが検出されるかどうかに関係なく、感染性微生物による感染にตอบสนองして産生される抗体がサンプル中に存在しているかどうかを判定するアッセイに関わる。

【0086】

抗原/ペプチドと抗体とを、それらが特異的に反応するように反応させるための条件は、当業者に周知である。例えば、Current Protocols in Immunology (Coligan et al., editors, John Wiley & Sons, Inc)を参照されたい。

【0087】

装置および組成物

別の局面において、本発明は、サンプル中の抗体を検出するための装置を含む。ある特定の態様は、サンプルロード領域、コンジュゲート領域、および試験領域を含む抗体検出装置または抗体検出システムを含む。コンジュゲート領域は典型的に試験領域と重複しない;しかしながら、サンプル領域およびこれら2つの領域は、稼働中に液体サンプルがサンプルロード領域にロードされた場合に、コンジュゲート領域および試験領域と流体連通している状態にあるように構成されている。通常、試験サンプルは、毛細管作用によりコ

10

20

30

40

50



ンジュゲート領域および試験領域を通じて流れるまたはそれらと連通する。コンジュゲート領域は、第一の検出可能な実体（すなわち、検出可能なFc結合分子 - コンジュゲート、例えばプロテインAおよび/もしくはプロテインG - コンジュゲート、またはFc - 特異的二次抗体 - コンジュゲート）にコンジュゲートした可動性Fc結合分子を含み、試験領域は、抗体に特異的に結合し得る固定化された捕捉実体を含む。これらの特質のそれぞれは、本明細書における他の箇所に記載されている。

【0088】

いくつかの態様において、装置は、液体サンプルがサンプルロード領域にロードされた場合にそれと流体連通している状態にある対照領域をさらに含む。再度、液体サンプルは、毛細管作用により対照領域を通じて流れ得るまたはそれらと連通し得る。ある特定の態様において、対照領域は、対照検出体に特異的に結合し得る固定化された結合パートナーを含む。一例として、対照領域は、抗プロテインA抗体、抗プロテインG抗体、またはプロテインAもしくはプロテインGと反応性である哺乳類IgGのいずれかを含む。

10

【0089】

いくつかの装置は、試験領域の下流に位置した吸収性パッドをさらに含む。ある特定の装置において、コンジュゲート領域はサンプルロード領域の上流に位置する。いくつかの態様において、コンジュゲート領域はサンプルロード領域の下流に位置する。いくつかの態様において、サンプルロード領域は血液分離材料を含む。

【0090】

ある場合には、コンジュゲート領域は可動性の第二の検出体をさらに含み、該第二の検出体は第二の検出可能な実体にコンジュゲートした抗原または抗原性ペプチドを含み、該抗原または抗原性ペプチドは抗体に特異的に結合し得る。ある特定の態様において、第一の検出体（例えば、検出可能なFc結合分子）および第二の検出体（例えば、検出可能な抗原 - コンジュゲート）は、同じタイプの検出可能な実体を有する。他の態様において、第一および第二の検出体は、異なるタイプの検出可能な実体を有する。特定の態様において、第一の検出体対第二の検出体の比率（例えば、モル比）を調整して、所望のレベルのシグナル増幅を達成する。例えば、第一の検出体（例えば、プロテインA/プロテインGなどの検出可能なFc結合分子）対第二の検出体（例えば、検出可能な抗原 - コンジュゲート）の比率は、間にあるすべての比率および比率の範囲を含めた、約1:200、1:100、1:90、1:80、1:70、1:60、1:50、1:40、1:30、1:20、1:19、1:18、1:17、1:16、1:15、1:14、1:13、1:12、1:11、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1、または200:1であってよい。いくつかの態様において、Fc結合分子コンジュゲート対検出可能な抗原/抗原性ペプチドコンジュゲートの比率は約20:1～約1:20、好ましくは約20:1～約1:1、より好ましくは約16:1～約2:1である。プロテインAおよびプロテインGコンジュゲートの両方を検出可能なFc結合分子として用いる態様では、上記に記載されるように、プロテインAコンジュゲート対プロテインGコンジュゲートの比率を調整して、検出される対象となる免疫グロブリンクラスに基づいて検出シグナルを最適化することができる。プロテインAコンジュゲート対プロテインGコンジュゲートの適切な比率（例えば、モル比）には、1:20、1:19、1:18、1:17、1:16、1:15、1:14、1:13、1:12、1:11、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、および20:1が含まれるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、プロテインAコンジュゲート対プロテインGコンジュゲートの比率は約10:1～約1:10、好ましくは約5:1～約1:5、より好ましくは約2:1～約1:2である。一態様において、プロテインAコンジュゲート対プロテインGコンジュゲートの比率は約1:1である。

20

30

40

【0091】

特異的結合アッセイ、とくに免疫アッセイを実施するための装置は公知であり、本方法における使用のために容易に適合させることができる。固相アッセイは、一般的に、試薬

50

の分離がより速くかつより簡単であるため、沈殿、遠心分離、濾過、クロマトグラフィー、または磁性 (magnetism) など、分離工程を必要とする不均一アッセイ法よりも実施が容易である。固相アッセイ装置には、マイクロタイタープレート、フロースルーアッセイ装置 (例えば、ラテラルフロー免疫アッセイ装置)、ディップスティック、および免疫キャピラリーまたは免疫クロマトグラフィーによる免疫アッセイ装置が含まれる。

【0092】

いくつかの態様において、装置はラテラルフロー免疫アッセイである。ある特定の態様において、装置はELISAアッセイに適したマイクロタイタープレートである。他の態様において、装置は分析用ローターにおける使用に適している。さらに他の態様において、装置は電気化学的、光学的、または光電子的センサーを含む。

10

【0093】

ある特定の態様において、サンプル/血液分離パッド、ニトロセルロース膜、およびハウジング内に置かれた上部ウィック (upper wick) を用いて、ラテラルフロー装置を構築する (例えば、図2を参照されたい)。ニトロセルロース膜は、非標識の抗体特異的抗原 (例えば、ペプチド抗原または非ペプチド抗原) などの捕捉実体を含む試験ラインまたは領域、および任意で、Fc結合分子に対して反応性である抗体を含有する対照ラインまたは領域 (下記に示される) の縞が入っている。関心対象の抗体を含有する疑いがあるサンプルを、検出可能なFc結合分子 - コンジュゲートと予備混合し、次いでラテラルフローアッセイ装置に適用することができる。または、予備混合ではなく、サンプルおよびFc結合分子を、任意の順序で、アッセイ装置に同時にまたは順番に適用することができる。

20

【0094】

あるいは、ニトロセルロース膜は上記のように調製され、かつコンジュゲート領域と試験領域とが重複しない、検出可能なFc結合分子 - コンジュゲートを含むコンジュゲートラインまたは領域の縞がさらに入っている。いくつかの態様において、関心対象の抗体を含有する疑いがあるサンプルを、次いで、ラテラルフローアッセイ装置に適用することができる。他の態様において、関心対象の抗体を含有する疑いがあるサンプルを、抗体に特異的に結合する (典型的には、捕捉実体と同じ結合特異性を有する) 検出可能な抗原 - コンジュゲートと予備混合し、次いでラテラルフローアッセイ装置に適用することができる。上記と同様に、予備混合ではなく、サンプルおよび検出可能な抗原 - コンジュゲートを、任意の順序で、アッセイ装置に同時にまたは順番に適用することができる。

30

【0095】

いくつかの態様において、サンプル/血液分離パッド、ニトロセルロース膜、およびハウジング内に置かれた上部ウィックを用いて、ラテラルフロー装置を構築する (例えば、図2を参照されたい)。ニトロセルロース膜は、非標識の抗体特異的抗原 (例えば、ペプチド抗原または非ペプチド抗原) などの捕捉実体を含む試験ラインまたは領域、任意で、Fc結合分子に対して反応性である抗体を含有する対照ラインまたは領域 (下記に示される)、および抗体に特異的に結合する (典型的には、捕捉実体と同じ結合特異性を有する)、検出可能な抗原 - コンジュゲートを含むコンジュゲートラインまたは領域の縞が入っている。コンジュゲート領域および試験領域は、通常重複しない。関心対象の抗体を含有する疑いがあるサンプルを、検出可能なFc結合分子 - コンジュゲートと予備混合し、次いでラテラルフローアッセイ装置に適用することができる。また、予備混合ではなく、サンプルおよびFc結合分子を、任意の順序で、アッセイ装置に同時にまたは順番に適用することができる。例示的な一態様において、試験サンプル、コンジュゲート、および追跡バッファの順次的適用のために、2ポートの装置も用いてよい。

40

【0096】

ある特定のラテラルフロー装置において、ニトロセルロース膜は、非標識の抗体特異的抗原 (例えば、ペプチド抗原または非ペプチド抗原) などの捕捉実体を含む試験ラインまたは領域、任意で、Fc結合分子に対して反応性である抗体を含有する対照ラインまたは領域 (下記に示される)、ならびに抗体に特異的に結合する (典型的には、捕捉実体と同じ結合特異性を有する)、検出可能なFc結合分子および検出可能な抗原 - コンジュゲートを

50

含むコンジュゲートラインまたは領域の縞が入っている。次いで、関心対象の抗体を含有する疑いがあるサンプルを、ラテラルフローアッセイ装置に適用することができる。

【0097】

ライム特異的抗体の検出のための例示的な装置において、サンプル/血液分離パッド、ニトロセルロース膜、およびハウジング内に置かれた上部ウイックを用いて、ラテラルフロー装置を構築する(例えば、図2を参照されたい)。ニトロセルロース膜は、ボレリア抗原を模倣するまたは模擬するペプチドの混合物を含む試験ラインまたは領域(例えば、米国出願第12/948,209号を参照されたい)、および任意のプロテインA反応性またはプロテインG反応性免疫グロブリン(例えば、抗プロテインA IgG、マウス、ヒト、または他のプロテインA反応性IgG等)を含む対照ラインまたは領域の縞が入っている。ボレリア・ブルグドルフェリに対する抗体を含有する疑いがあるサンプルを、プロテインAおよび/もしくはGのコロイド金コンジュゲート(プロテインA/G - CGC)、または(ii)プロテインA/G - CGCとボレリア抗原のコロイド金コンジュゲート(ボレリア抗原 - CGC)との混合物のいずれかと混合することができる。次いで、このサンプルコンジュゲート混合物を、ラテラルフローアッセイ装置に適用することができる。

10

【0098】

あるいは、ラテラルフロー装置は上記のように構築されるが、ニトロセルロースパッドは、試験領域から分離した1つまたは複数のコンジュゲート領域の縞が入っている。コンジュゲート領域は、例えば(i)プロテインA/G - CGCのみ、(ii)ボレリア抗原 - CGCのみ、または(iii)プロテインA/G - CGCとボレリア抗原 - CGCとの組み合わせを含んでよい。本明細書においてまたは本出願における他の箇所で使用するとき、ボレリア抗原、エーリキア抗原、または任意の抗原もしくは抗原性ペプチドには、天然ボレリア抗原、天然エーリキア抗原、または任意の天然抗原をそれぞれ模倣するまたは模擬する合成ペプチドの混合物が含まれる。ある特定の態様において、例えば(i)または(iii)において、いかなる予備混合もなしで、試験サンプルを単独でラテラルフロー装置に適用する。他の態様において、例えば(i)において、サンプルをボレリア抗原 - CGCと予備混合し、次いでラテラルフロー装置に適用することができる。いくつかの態様において、例えば(ii)において、サンプルをプロテインA/G - CGCと予備混合し、次いでラテラルフロー装置に適用することができる。しかしながら、これらの例示的な組み合わせは非限定的であり、他の可能性は当業者に明らかであろう。

20

30

【0099】

サンプル/血液分離パッドを通じた輸送、ならびに任意のコンジュゲートラインおよび試験ラインを通じた移入の間に、プロテインA/G - CGC、サンプル中の抗体、および任意のボレリア抗原 - CGCを含む捕捉複合体が形成される。状況(例えば、ボレリア抗原 - CGCの任意の使用)に応じて、複合体またはサンドイッチは、固定化されかつ非標識のボレリア抗原、抗体、および標識プロテインA/G - CGCから形成される。ボレリア抗原 - CGCの存在下において、複合体またはサンドイッチは、非標識ボレリア抗原、抗体、標識ボレリア抗原 - CGC、および標識プロテインA/G - CGCから形成される。後者の複合体へのプロテインA/G - CGCの添加により、標識ボレリア抗原 - CGCからのシグナルがさらに増幅される。ある特定の態様において、本明細書において記載されるようにかつ当技術分野において公知であるように、すべての反応物質の比率を調整することによって、増幅の増大を達成することができる。

40

【0100】

エーリキア症特異的抗体の検出のための例示的な装置において、サンプル/血液分離パッド、ニトロセルロース膜、およびハウジング内に置かれた上部ウイックを用いて、ラテラルフロー装置を構築する。ニトロセルロース膜は、エーリキア抗原を含む試験ラインまたは領域、および任意のプロテインA反応性またはプロテインG反応性免疫グロブリン(例えば、抗プロテインA IgG)を含む対照ラインまたは領域の縞が入っている。エーリキア(例えば、E. カニス、E. シャフエンシス、E. エウイング)に対する抗体を含有する疑いがあるサンプルを、プロテインAおよび/もしくはGのコロイド金コンジュゲート(プロ

50

テインA/G - CGC)、または(ii)プロテインA/G - CGCとエーリキア抗原のコロイド金コンジュゲート(エーリキア抗原 - CGC)との混合物のいずれかと混合することができる。次いで、このサンプルコンジュゲート混合物を、ラテラルフローアッセイ装置に適用することができる。

【0101】

あるいは、ラテラルフロー装置は上記のように構築されるが、ニトロセルロースパッドは、試験領域から分離した1つまたは複数のコンジュゲート領域の縞が入っている。コンジュゲート領域は、例えば(i)プロテインA/G - CGCのみ、(ii)エーリキア抗原 - CGCのみ、または(iii)プロテインA/G - CGCとエーリキア抗原 - CGCとの組み合わせを含んでよい。ある特定の態様において、例えば(i)または(iii)において、いかなる予備混合もなしで、試験サンプルを単独でラテラルフロー装置に適用する。他の態様において、例えば(i)において、サンプルをエーリキア抗原 - CGCと予備混合し、次いでラテラルフロー装置に適用することができる。いくつかの態様において、例えば(ii)において、サンプルをプロテインA/G - CGCと予備混合し、次いでラテラルフロー装置に適用することができる。しかしながら、これらの例示的な組み合わせは非限定的であり、他の可能性は当業者に明らかであろう。

【0102】

サンプル/血液分離パッドを通じた輸送、ならびに任意のコンジュゲートラインおよび試験ラインを通じた移入の間に、プロテインA/G - CGC、サンプル中の抗体、および任意のエーリキア抗原 - CGCを含む捕捉複合体が形成される。状況(例えば、エーリキア抗原 - CGCの任意の使用)に応じて、複合体またはサンドイッチは、固定化されかつ非標識のエーリキア抗原、抗体、および標識プロテインA/G - CGCから形成される。エーリキア抗原 - CGCの存在下において、複合体またはサンドイッチは、非標識エーリキア抗原、抗体、標識エーリキア抗原 - CGC、および標識プロテインA/G - CGCから形成される。後者の複合体へのプロテインA/G - CGCの添加により、標識エーリキア抗原 - CGCからのシグナルがさらに増幅される。ある特定の態様において、本明細書において記載されるようにかつ当技術分野において公知であるように、すべての反応物質の比率を調整することによって、増幅の増大を達成することができる。

【0103】

ELISAに適したマイクロタイタープレートの一態様において、捕捉実体を、アルカリ被覆バッファー中に最適な濃度で、ストレプトアビジンまたは同等のビオチン結合化合物、例えばアビジンまたはニュートラアビジンで被覆された96ウェルELISAプレートまたは同等の固相などの表面に固定化し、4℃で一晩インキュベートする。標準的洗浄バッファーによる適切な回数の洗浄後、最適な濃度のビオチン化形態のFc結合分子および任意で、捕捉実体として用いられたものと同じ抗原を、従来のブロッキングバッファー中に溶解し、各ウェルに適用する。次いで、サンプルを添加し、本明細書において記載されるようにかつ当技術分野において公知であるように、アッセイを進める。

【0104】

別の局面において、本発明は、サンプル中の抗体の検出に関連した組成物を提供する。ある特定の態様は、捕捉実体、試験サンプル中の抗体、および第一の検出体を含む1種または複数種の捕捉複合体に関するものであって、該捕捉実体は該抗体に結合し、かつ該第一の検出体は、第一の検出可能な実体にコンジュゲートしたFc結合分子を含みかつ該抗体のFc領域に結合する。ある特定の態様は、第二の検出体をさらに含み、該第二の検出体は抗体の変領域に特異的に結合する。いくつかの態様において、捕捉複合体は固形または半固形担体などの表面の試験領域に固定化されている。例えば、ある特定の態様において、固形担体は、ビーズ(例えば、コロイド粒子またはナノ粒子)、ラテラルフロー免疫アッセイ装置における流路、分析用ローターにおける流路、またはチューブもしくはウェル(例えば、プレートにおける)である。任意の第二の検出体コンジュゲートおよび任意の試験表面を含む、これらの態様および関連する態様の図解に関しては図1を参照されたい。

## 【0105】

特定の態様において、複合体は、関心対象の抗体（例えば、抗ウイルス抗体、抗細菌抗体、抗真菌抗体、または抗寄生虫抗体などの抗微生物抗体）、プロテインA-コンジュゲートおよび/またはプロテインG-コンジュゲート、固定化された抗体特異的抗原、ならびに任意で抗原-コンジュゲートを含む。ある特定の態様において、プロテインA-コンジュゲートおよび/またはプロテインG-コンジュゲートは金ナノ粒子を含み（例えば、プロテインA-CGCまたはプロテインG-CGC-「コロイド金コンジュゲート」）、かつ抗原-コンジュゲートは金ナノ粒子を含む（例えば、抗原-CGC）。いくつかの態様において、本明細書において記載されるようにかつ当技術分野において公知であるように、抗原-コンジュゲートまたは抗原-CGCは、ウイルス抗原、細菌性抗原、真菌抗原、または寄生虫抗原などの微生物抗原を含む。具体的な態様において、抗原-コンジュゲートまたは抗原-CGCは、ボレリア抗原などのライム病特異的抗原を含む（上記を参照されたい）。他の態様において、抗原-コンジュゲートまたは抗原-CGCは、エーリキア抗原などのエーリキア症疾患特異的抗原を含む。

10

## 【0106】

## キット

さらに別の局面において、本発明はキットを提供する。ある特定の態様において、キットは、本明細書において記載される本発明の装置またはシステムを含む。ある特定の態様において、キットは、本発明の2種、3種、4種、またはそれを上回る種類の装置またはシステムを含む。

20

## 【0107】

特定のタイプのアッセイ用の試薬も、本発明のキット内に提供されてよい。ゆえに、キットは、ナノ粒子の集合、ビーズ（例えば、凝集アッセイまたはラテラルフローアッセイに適した）、またはプレート（例えば、ELISAアッセイに適したプレート）を含んでよい。他の態様において、キットは、ラテラルフロー免疫アッセイ装置、分析用ローター、または電気化学的、光学的、もしくは光電子的センサーなどの装置を含む。ナノ粒子の集合、ビーズ、プレート、および装置は、免疫アッセイを実施するのに有用である。例えば、それらは、サンプル由来の抗体、抗原性ペプチド（標識および/または非標識）、およびFc結合分子を含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出するのに有用であり得る。

30

## 【0108】

ある特定の態様において、抗原（または異なる抗原の混合物）は金ナノ粒子などの検出可能な実体にコンジュゲートされ、その同じ抗原（または抗原の混合物）もプレート、ニトロセルロース試験表面、または他の試験表面もしくは装置に接着または固定化され、かつFc結合分子は金ナノ粒子などの検出可能な実体にコンジュゲートされている。具体的なキットにおいて、任意で、ラテラルフローアッセイ装置を含有するキットの一部として、抗原性ペプチドは金ナノ粒子にコンジュゲートされかつ任意でBSAにコンジュゲートされ、その同じ抗原（金ナノ粒子はないが、任意でBSAにコンジュゲートされている）はニトロセルロース表面の規定の試験領域または切片に固定化され、かつプロテインAおよび/またはプロテインGは金ナノ粒子にコンジュゲートされている。いくつかの態様において、プロテインA-および/またはプロテインG-金粒子コンジュゲートは、ニトロセルロース表面の別個の領域、すなわち試験領域と重複しないコンジュゲート領域に固定化されている。

40

## 【0109】

加えて、キットは、種々の希釈剤およびバッファー、特異的に結合している抗原または抗体の検出のための標識コンジュゲートまたは他の作用物質、ならびに酵素基質、補因子、および色原体などの他のシグナル産出試薬を含んでよい。キットの他の成分は、当業者によって容易に決定され得る。そのような成分には、被覆試薬、プロテインAおよび/もしくはプロテインGなどのFc結合分子に特異的なポリクローナルもしくはモノクローナル捕捉抗体、または2種もしくはそれを上回る種類の抗体のカクテル、標準物質としての抗原もしくは抗体の精製もしくは半精製された抽出物、モノクローナル抗体検出体抗体、それ

50

にコンジュゲートした指標分子を有する抗マウス抗体、抗イヌ抗体、抗ニワトリ抗体、もしくは抗ヒト抗体、比色分析比較のための指標チャート、使い捨て手袋、除染指示書、適用棒もしくは容器、サンプル準備用カップ等が含まれてよい。一態様において、キットは、ペプチド - 抗体複合体の形成を可能にする反応媒体を構成するのに適当なバッファーまたは他の試薬を含む。

#### 【0110】

そのようなキットは、本明細書の他の箇所において記載されるようなおよび当技術分野において公知であるような、微生物因子、とくに病原性微生物因子による感染症を診断するための便利で効率的な方法を臨床試験室に提供する。そのようなキットは、関心対象の任意の抗体の存在に関連した他の症状を診断するための便利で効率的な方法も臨床試験室に提供し得る。例えば、ある特定の自己免疫障害は、ある特定のタイプの抗体と関連があり得る。ゆえに、疾患関連の抗体/抗原の組み合わせが公知である範囲で、本発明は、そのような疾患の高感度でかつ正確な診断を提供し得る。具体的なキットは、B. ブルグドルフェリなどのボレリアの検出を提供し、ゆえにライム病の診断に役立つ。

10

#### 【0111】

ある特定の態様において、キットは指示書をさらに含む。例えば、ある特定の態様において、キットは、微生物抗原（例えば、ボレリア抗原、エーリキア抗原）に対する抗体などの抗体を検出するための、または微生物関連疾患（例えば、ライム病、エーリキア症）などの疾患の診断するための、キットの使用法を示している指示書を含む。ある特定の態様において、キットは、ボレリア抗原もしくはエーリキアなどの微生物抗原に対する抗体を検出するための、またはライム病（ボレリア症）もしくはエーリキア症などの微生物関連疾患を診断するための、ビーズの集合、プレート、もしくは装置（例えば、ラテラルフロー装置）の使用法を示している指示書を含む。ある特定の態様において、キットは、検出システム（例えば、ラテラルフローアッセイ装置、マイクロタイタープレート、分析用ローター）のサンプルロード領域への適用前に、検出可能なFc結合分子、抗体特異的な検出可能な抗原 - コンジュゲートまたは抗原性ペプチド - コンジュゲート、および試験サンプルを任意の順序で組み合わせるための指示書を提供する。いくつかの態様において、キットは、所望のレベルのシグナル増幅を達成するために、検出可能な抗原 - コンジュゲートまたは抗原性ペプチド - コンジュゲートが検出可能なFc結合分子と特定の比率で存在するように、検出可能な抗原 - コンジュゲートまたは抗原性ペプチド - コンジュゲートを試験サンプルと組み合わせるための指示書を含む。キットは、バッファーの最適化、種々の成分（例えば、Fc結合分子、抗原または抗原性ペプチド、試験サンプル）の比率の最適化、ならびに混合および適用工程の順序（例えば、適用前にすべての成分を混合する、ある特定の成分のみを混合しかつ他のものを別個に適用する）の最適化のための指示書も提供し得る。

20

30

#### 【0112】

本発明のペプチド、組成物、ならびにペプチド、キット、および方法を含む装置は、多数の利点を与える。例えば、それらは、簡易で安価で迅速で高感度でかつ正確な関心対象の抗体の検出、ならびに重大な偽陽性またはバックグラウンドシグナルのない関連症状の診断を可能にする。これは、非常に低いレベルの、かつ別様では検出不能なレベルさへの抗体を含有するサンプルさへの正確でかつ高感度な診断を可能にする。

40

#### 【実施例】

#### 【0113】

実施例1：ライム病特異的ラテラルフローアッセイ装置において、プロテインAは抗体の特異的検出を増強する

ライム病特異的ラテラルフローアッセイにプロテインA - CGC（コロイド金コンジュゲート）を添加することの影響を判定するための試験を実施し、一方で陰性サンプル、ライム陽性サンプル、および低レベルのライム陽性サンプルを試験した。目的は、アッセイの十分な感度を維持しながら、可能性のある偽シグナルに対するプロテインA - CGCの効果を観察しかつ分類することであった。プロテインA - CGC陰性対照と比較して、種々のプロテ

50

ンA - CGC濃度を試験した。本試験において実施されたラテラルフローアッセイは、図2および3に図解されているものと同様である。結果を、反応性スコア（より高い数ほど陽性の結果を示す0～5の尺度）によって示される下記の表1に示す。

【0114】

（表1）試験結果の概要（反応性スコア）

試験条件:	低陽性 WB 1:8 希釈 CB25 予備混合物	低陽性 WB 1:8 希釈 CB25 予備混合物	Dolly 陽性 WB 1:8 希釈 CB25 予備混合物	Dolly 陽性 WB 1:8 希釈 CB25 予備混合物	陰性_345 血漿 1:8 希釈 CB25 予備混合物	陰性_345 血漿 1:8 希釈 CB25 予備混合物
対照:プロテインAなし	0	0.25	1.5	1.5	0.25	0.25
1× プロテインA	3.5	3.5	3.5	3.5	0.5	0.5
1:2希釈 プロテインA	3.5	3.5	3.75	3.75	0.25	0.25
1:4希釈 プロテインA	1.25	1.25	2.25	2.25	0.25	0.25
1:8希釈 プロテインA	0.5	0.75	2	2	0.25	0.25

10

【0115】

表1に示されるように、プロテインA - CGCの添加は、試験したすべてのライム陽性サンプルのシグナルを増幅し、とくに「低」陽性サンプルの検出を可能にした。プロテインA - CGCなしでは、低陽性サンプルは検出不能であり、陰性サンプルに匹敵する反応性スコア（約0.25またはそれ未満）を示した。対照的に、1×濃度および1:2希釈でのプロテインA - CGCの添加は、シグナルを有意に増幅し、約3.5の反応性スコアを示した。ゆえに、プロテインA - CGCは、このライム病特異的ラテラルフローアッセイにおいて標的抗体の検出を向上させる。

20

【0116】

実施例2：ストレスを受けた生物学的サンプルに対して実施されたラテラルフローアッセイにおいて、プロテインAは抗体の特異的検出を増強する

あらかじめストレスを受けた48BSA（ウシ血清アルブミン）/DAG IgGコンジュゲート混合物にプロテインA - CGC（コロイド金コンジュゲート）を添加することの影響を判定するための試験を実施した。コンジュゲート混合物は、35℃でのインキュベーターで15日間事前ストレスを受けた。本実験は、プロテインA - CGCの存在下または非存在下でのストレスを受けたおよびストレスを受けていないサンプルの両方を試験した。本試験において実施されたラテラルフローアッセイは、図2および3に図解されているものと同様である。結果を、反応性スコア（より高い数ほど陽性の結果を示す0～5の尺度）によって示される下記の表1に示す。結果を下記の表2に示す。

30

【0117】

（表2）ストレスを受けたサンプル対ストレスを受けていないサンプルに関する試験結果の概要

サンプル	陽性_11-0483	陽性_11-0483	陰性_SCA30 - 2235HI	陰性_SCA30 - 2235HI
温度	2-8°C	35°C	2-8°C	35°C
1日間	2.25	2.0	0	0
15日間	2.5	0.75	0	0
15日間+PA	2.75	1.25	0	0

40

【0118】

上記の表2に示されるように、ラテラルフローアッセイ混合物へのプロテインA - CGCの添加は、0.75から1.75への反応性スコアの増大によって示されるように、プロテインA - CGCの非存在と比較して、15日間ストレスを受けた（35℃）生物学的サンプルのシグナルを増幅した。15日間ストレスを受けていないサンプル（2～8℃）も、2.25から2.75への反応

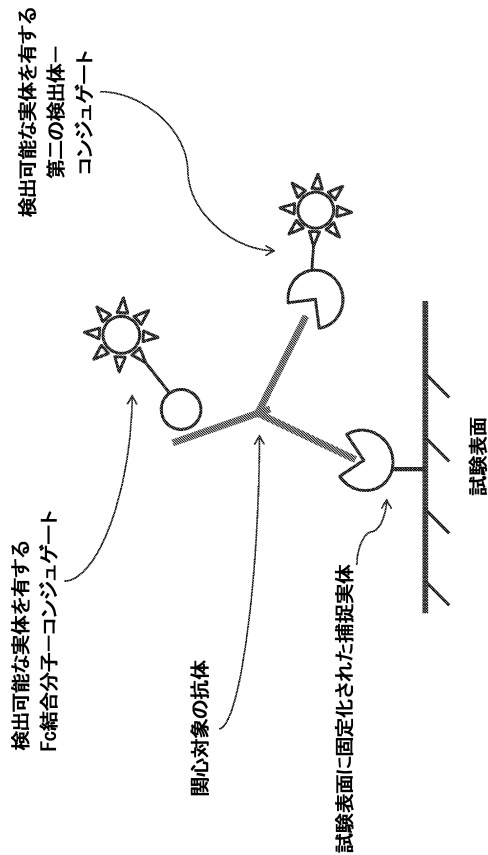
50

性スコアの増大によって示されるように、プロテインA - CGCの添加によってわずかに影響を受けた。また、陰性サンプルは、プロテインA - CGCの添加によって変わらなかった。

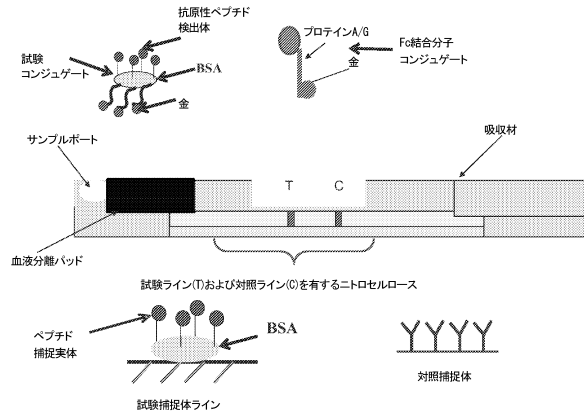
【 0 1 1 9 】

参照により組み入れられる文献における任意の定義が本明細書において提供される定義と矛盾する範囲では、本明細書において提供される定義が制御する。本発明は現在好ましい態様に関して記載されているが、当業者に明白であろうように、本発明の精神から逸脱することなく、種々の変更および修正がなされ得ることを理解すべきである。したがって、本発明は、以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。

【 図 1 】

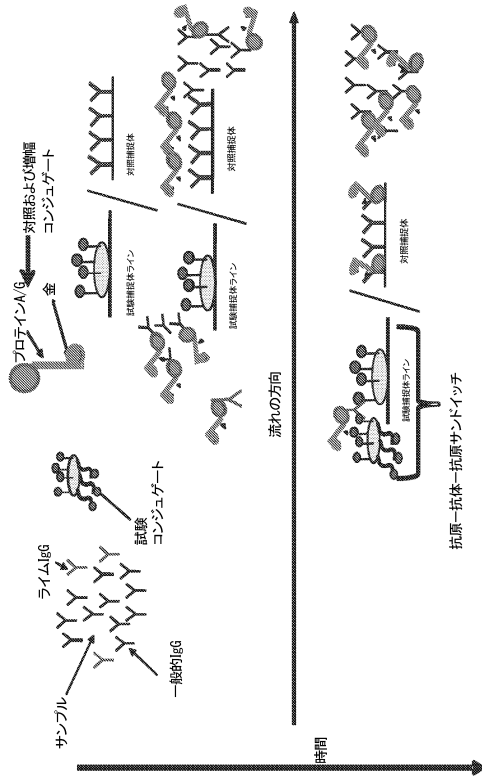


【 図 2 】





【 図 3 】



## フロントページの続き

- (74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ケシコ クリスティーナ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フレモント アルハンブラ ドライブ 4587
- (72)発明者 ウォーカー ジェレミー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カストロ バレー センター ストリート 22120
- (72)発明者 メーラ ラジェッシュ ケイ.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ハイワード サウスウイック ドライブ 25410 #1  
09
- (72)発明者 アロン ケニス ピー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンフランシスコ フェア オークス ストリート 201
- (72)発明者 ブレイル デニス エム.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンラモン ウインターサイド サークル 800

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 国際公開第2011/063235(WO, A1)  
特表2009-516199(JP, A)  
特開平10-132818(JP, A)  
国際公開第2007/061793(WO, A2)  
特開2000-028614(JP, A)  
特開2000-028612(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48-33/98