

(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2004-538447
(P2004-538447A)

(43) 公表日 平成16年12月24日(2004.12.24)

(51) Int.Cl.⁷**G01N 33/53****C07K 14/76****G01N 33/531**

F 1

G01N 33/53

G01N 33/53

C07K 14/76

G01N 33/531

テーマコード(参考)

4 H 0 4 5

J

A

B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 107 頁)

(21) 出願番号	特願2002-589514 (P2002-589514)
(86) (22) 出願日	平成14年5月14日 (2002.5.14)
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月13日 (2003.11.13)
(86) 國際出願番号	PCT/NZ2002/000092
(87) 國際公開番号	W02002/092631
(87) 國際公開日	平成14年11月21日 (2002.11.21)
(31) 優先権主張番号	511705
(32) 優先日	平成13年5月14日 (2001.5.14)
(33) 優先権主張国	ニュージーランド (NZ)

(71) 出願人	503248411 ザ ホーティカルチャー アンド フード リサーチ インスティテュート オブ ニュージーランド リミテッド THE HORTICULTURE AND FOOD RESEARCH INSTITUTE OF NEW ZEALAND LIMITED ニュージーランド国 オークランド マウント アルバート マウント アルバート ロード 120
(74) 代理人	100123788 弁理士 宮崎 昭夫
(74) 代理人	100088328 弁理士 金田 暢之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】動力学アッセイ

(57) 【要約】

平衡に近づかない、動力学に基づいたアッセイである迅速アッセイで使用する、一般式 X - W - Y - Z を有するハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートである(式中、X はハプテンであり、W は任意選択でチオエーテルまたはエーテル基であり、Y は 10 個以上の原子長のリンカーであり、Z は、Y が存在しない場合に X のリガンドへの結合に対して立体障害を与えるのに十分なサイズの大型グループである)。また、このコンジュゲート、アッセイ方法およびキットを作成する方法も提供される。本発明のコンジュゲート [(5) - OVA] を利用した本発明のアッセイは、より短いリンカーを有するコンジュゲート [(2) - OVA および 3 - OVA] を用いた同じアッセイより優れた感度を提供する。

【特許請求の範囲】

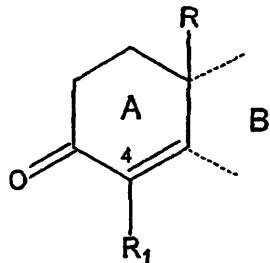
【請求項 1】

迅速アッセイで使用する、一般式 X - W - Y - Z を有するハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲート。

(式中、

X は、式 I の A 環構造を有する多環の融合環ステロイドハプテンであり、

【化 1】



式 I

10

式中、R は H、 CH_3 および CH_2OH を含む群から選択され、破線は隣接する B 環構造の環員を示し、R₁ は、リンカー Y または W が存在する場合、その付着点であり、

W は、任意選択でチオエーテルまたはエーテル基であり、

20

Y は、10 個以上の原子長のリンカーであり、

Z は、Y が存在しない場合に X のリガンドへの結合に対して立体障害を与えるのに十分なサイズの大型グループである)

【請求項 2】

W がチオエーテル架橋である、請求項 1 のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲート。

【請求項 3】

Y が 10 個以上 50 個以下の原子長である、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲート。

30

【請求項 4】

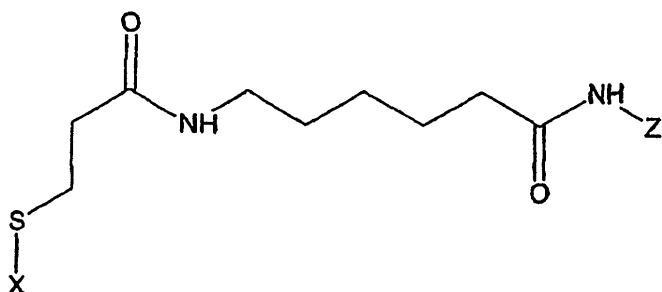
Y が 11 個以上 24 個以下の原子長である、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲート。

【請求項 5】

Y が 11 個以上 18 個以下の原子長である、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲート。

【請求項 6】

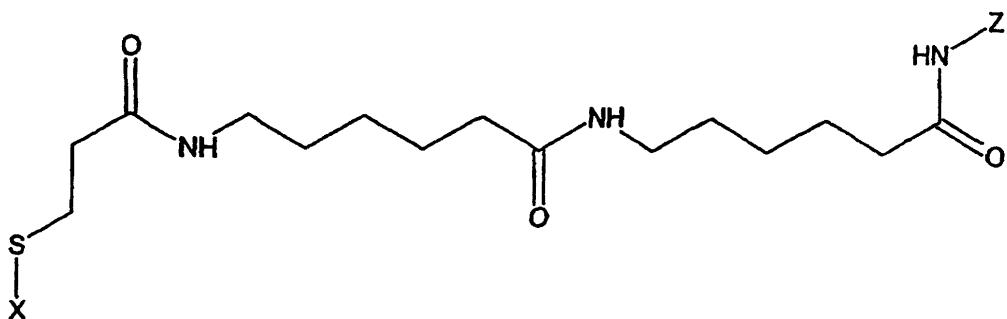
【化 2】



40

または

【化3】



10

(式中、XおよびZは請求項1で定義したものである)

である、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【請求項7】

Zがタンパク質またはポリペプチドである、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【請求項8】

Zが卵白アルブミンである、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【請求項9】

Zが指示薬グループである、請求項1から6のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

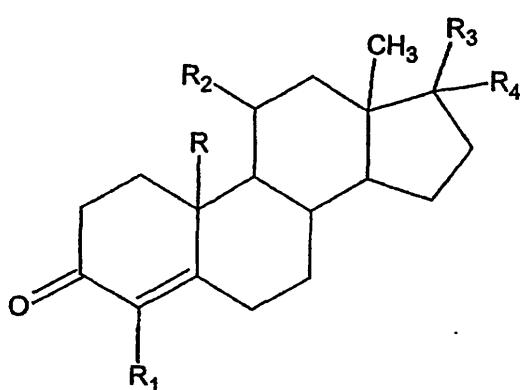
【請求項10】

Zがビリルビンである、請求項1から6および9のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【請求項11】

Xが式IIのハプテンである、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【化4】



30

式II

40

(式中、

Rは、H、CH₃およびCH₂OHを含む群から選択され、

R₁は、リンカーYの付着点であり、

R₂は、HまたはOHであり、

R₃は、オキシ、C₁～C₂アルキルまたはメチルカルボニルが任意選択でヒドロキシによって置換されている、オキシ、C₁～C₂アルキル、ヒドロキシ、およびメチルカルボニルを含む群から選択され、

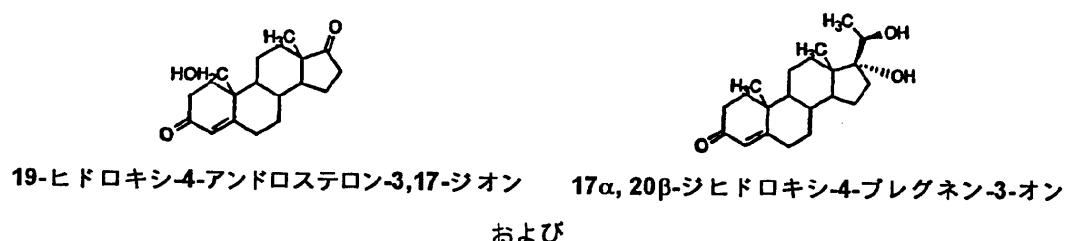
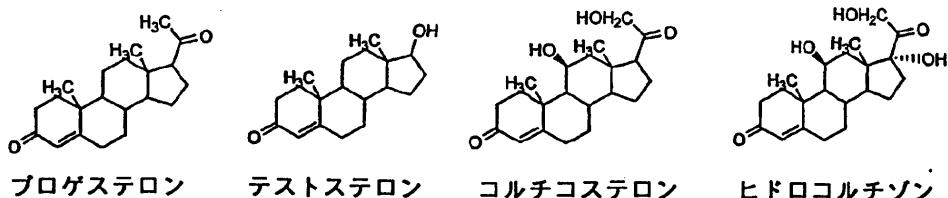
R₄は、水素またはヒドロキシである)

50

【請求項 1 2】

X が以下を含む群から選択される、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン - リンカ - 大型グループのコンジュゲート。

【化 5】

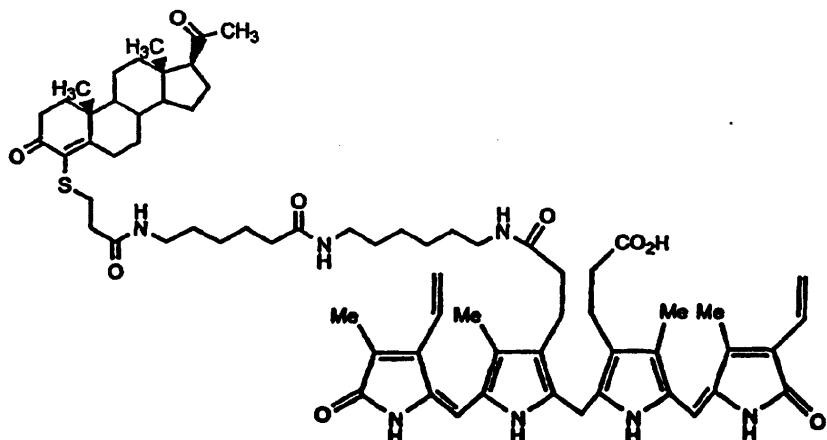


【請求項 1 3】

X がプロゲステロンである、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン - リンカ - 大型グループのコンジュゲート。

【請求項 1 4】

【化 6】



である、請求項 1 0 に記載のハプテン - リンカ - 大型グループのコンジュゲート。

【請求項 1 5】

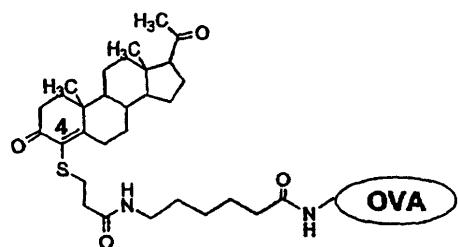
10

20

30

40

【化7】



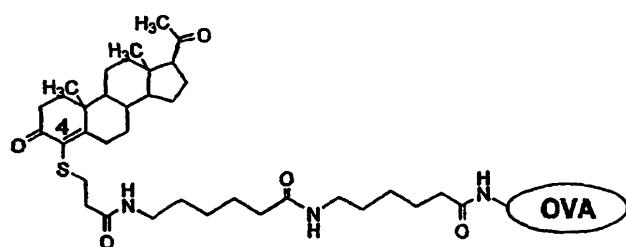
(式中、OVAは卵白アルブミンである)

10

である、請求項1から9および請求項11から13のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【請求項16】

【化8】



20

(式中、OVAは卵白アルブミンである)

である、請求項1から9および請求項11から13のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【請求項17】

リガンドが免疫グロブリン分子である、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【請求項18】

リガンドが抗体または抗体断片である、請求項16に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

30

【請求項19】

- a) ハプテンを結合する能力があるリガンドを試験試料と接触させるステップと、
- b) ステップa)のリガンドを一般式X-W-Y-Zのハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート

(式中、

Xは、ハプテンであり、

Wは、任意選択でチオエーテルまたはエーテル基であり、

Yは、10個以上の原子長のリンカーであり、

Zは、Yが存在しない場合にXのリガンドへの結合に対して立体障害を与えるのに十分なサイズの大型グループである)

40

とさらに接触させるステップと、

- c) 反応が実質的に平衡に達する前にリガンドに結合したコンジュゲートしていないハプテンの量を決定するステップと

を含む、試料中のハプテンを検出するための迅速アッセイ法。

【請求項20】

リガンドを接触させる第2ステップ(b)により、過剰の結合していないリガンドのほとんどが接触され結合される、請求項19に記載の迅速アッセイ法。

【請求項21】

ハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートが固定されている、請求項19または請求項20に記載の迅速アッセイ法。

50

【請求項 2 2】

ステップa)の混合物をステップb)のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートの上に流す、請求項19から21のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 2 3】

ハプテンがステロイドである、請求項19から22のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 2 4】

ハプテンがプロゲステロンである、請求項19から22のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 2 5】

リガンドが抗体である、請求項19から23のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 2 6】

a)試験試料を一般式X-W-Y-Zのハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート

(式中、

Xは、ハプテンであり、

Wは、任意選択でチオエーテルまたはエーテル基であり、

Yは、10個以上の原子長のリンカーであり、

Zは、Yが存在しない場合にXのリガンドへの結合に対して立体障害を与えるのに十分なサイズの大型グループである)

と混合するステップと、

b)生じた混合物を、このハプテンを結合する能力があるリガンドと接触させるステップと、

c)反応混合物が実質的に平衡に達する前にリガンドに結合したコンジュゲートしていないハプテンの量を決定するステップと

を含む、試料中のハプテンを検出するための迅速アッセイ。

【請求項 2 7】

リガンドが固定されている、請求項26に記載の迅速アッセイ。

【請求項 2 8】

生じた混合物を固定したリガンドと接触させるステップb)が、フロー オーバーまたはフロースルーシステムによって行われる、請求項26または請求項27に記載の迅速アッセイ。

【請求項 2 9】

ハプテンがステロイドである、請求項26から28のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 3 0】

ハプテンがプロゲステロンである、請求項26から29のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 3 1】

リガンドが抗体である、請求項26から30のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 3 2】

a)ハプテンに結合するリガンドと、
b)請求項1から18のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートと
を少なくとも含む、迅速アッセイのキット。

【請求項 3 3】

キットがさらに指示薬を含む、請求項32に記載の迅速アッセイのキット。

【請求項 3 4】

指示薬がハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートに結合している、請求項33に記載の迅速アッセイのキット。

10

20

30

40

50

【請求項 3 5】

指示薬がリガンドに結合している、請求項 3 3 に記載の迅速アッセイのキット。

【請求項 3 6】

フローオーバーキットである、請求項 3 2 から 3 5 のいずれか一項に記載の迅速アッセイのキット。

【請求項 3 7】

試験ストリップである、請求項 3 6 に記載の迅速アッセイのキット。

【請求項 3 8】

フロースルーキットである、請求項 3 2 から 3 5 のいずれか一項に記載の迅速アッセイのキット。 10

【請求項 3 9】

コンジュゲートを、コンジュゲート内のハプテンを結合する能力があるリガンドと、反応が実質的に平衡に達しない所定の時間接触させるステップを含む、一般式 X - W - Y - Z のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲート

(式中、

X は、ハプテンであり、

W は、任意選択でチオエーテルまたはエーテル基であり、

Y は、10 個以上の原子長のリンカーであり、

Z は、Y が存在しない場合に X のリガンドへの結合に対して立体障害を与えるのに十分な 20 サイズの大型グループである)

を結合させる方法。

【請求項 4 0】

リガンドが固定されている、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 1】

リガンドをハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートと接触させる前にハプテンと接触させる、請求項 3 8 または請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

リガンドをハプテンと接触させる前にまたは同時にハプテン - リンカー - 大型グループの 30 コンジュゲートと接触させる、請求項 3 8 または請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 3】

リガンドが免疫グロブリン分子である、前記請求項のいずれかに記載のハプテン - リンカ - 大型グループのコンジュゲート。

【請求項 4 4】

a) 極性有機溶媒に溶かした活性化されたステロイドハプテンを、1 ~ 10 モル等量の異種二官能性水溶性リンカーを含む水溶液と混合するステップと、

b) 混合物を反応させるステップと、

c) ステップ b) のハプテン - リンカー反応生成物の残りの遊離官能性リンカーグループに大型グループを付着させるステップと

を少なくとも含む、請求項 1 から 1 8 に記載のいずれか一項のハプテン - リンカー - 大型 40 グループのコンジュゲートを生成する方法を提供する。

【請求項 4 5】

ステップ b) と c) の間にハプテン - リンカー生成物を単離する単離ステップを含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

最終混合物が 2 ~ 30 % の含水率を有する、請求項 4 4 または請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

最終混合物が 5 ~ 15 % の含水率を有する、請求項 4 4 から 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

最終混合物が約10%の含水率を有する、請求項44から47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

ステップb)の反応時間がほぼ24時間程度までの時間である、請求項44から48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項50】

b)の反応が室温で起こる、請求項44から49のいずれか一項に記載の方法。

【請求項51】

b)の反応が実質的に中性のpHで起こる、請求項44から50のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項52】

ステップa)の水溶液が、活性化されたステロイドに比べて2~5モル等量の異種二官能性の水溶性リンカーを含む、請求項44から51のいずれか一項に記載の方法。

【請求項53】

活性化されたステロイドがステロイドの活性化されたエステルである、請求項44から52のいずれか一項に記載の方法。

【請求項54】

活性化されたステロイドがステロイドのスクシンイミドエステルである、請求項44から53のいずれか一項に記載の方法。

【請求項55】

異種二官能性リンカーの端の一方がカルボキシルであり、他方がアミノである、請求項44から54のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項56】

極性有機溶媒が、DMF、DMSO、アセトンおよびTHFを含む群から選択される、請求項44から55のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、小さいサイズのハプテン、より詳細には固定したまたは可動な免疫反応物質としての他の大分子とのコンジュゲート、および迅速アッセイ、具体的には免疫アッセイ、特にラテラルフロー試験またはストリップ試験、フロースルー形式およびフロー免疫センサーにおけるその使用に関する。

30

【0002】

(背景技術)

迅速なラテラルフローストリップ試験またはフロー免疫センサーは、利用しやすい形式であること、通常のELISAアッセイに比べて試験結果を得るまでの処理時間が比較的短いこと、および長期安定性を含めた多くの利点を有する。またこれらは比較的安価で作成される。

【0003】

ステロイドや薬物など小さいサイズのハプテンの免疫アッセイには一般的にいわゆる競合技術が必要である。コーティング抗原として、ハプテンは通常、捕獲ドットまたはラインとしてストリップ膜などの固相にコーティングして、色素、酵素または粒子にコンジュゲートした抗体と反応させ；あるいは、色素もしくは他の発色性粒子で標識し、可動な免疫反応物質として使用して、有色ドットを形成し、または免疫複合体を固相上に固定した抗体と結合させる。どちらの構造でも、固相に固定したまたは可動な免疫反応物質としてコーティングした抗原は、限られた数の抗体結合部位において遊離の試料抗原と競合する。したがって、捕獲ライン中のハプテン／抗体結合能力は、検出可能なハプテンの濃度範囲を、したがって免疫アッセイの感度を決定する重要な判断基準である。

40

【0004】

50

小さなハプテンは、サイズが小さいため、ハプテン特異的抗体に対する結合親和性を保持させたままでストリップ膜や粒子など固相上に直接吸着させることは不可能である。したがって、小さなハプテンを固相に固定するためには、タンパク質にコンジュゲートさせなければならない。付着の中間体としても使用できるN-ビニルピロリドンコポリマー(米国特許第5,723,344号)や核酸断片(米国特許第5,849,480号)など他の物質もいくつか存在するが、最も広く使用されている固相上の小さいサイズのハプテンの固定化技術は依然として、従来のタンパク質コンジュゲーション、すなわちハプテン-タンパク質コンジュゲートの調製である(Clinica Chimica Acta、162、1987、199～206)。

【0005】

反応性、すなわちハプテンに対する抗体の結合特異性に影響を与える最も重要な要素の1つが立体効果であることが一般的に受け入れられている。一部の文献は、伸長した柔軟なストレプトアビシン/ビオチン「架橋」によって(Immunology Letters、13、1986、313～316およびJ. Immunological Methods、111、1988、271～275)、あるいは長く伸長したリンカーによって(Bioconjugate Chem.、7、1996、88～95)、共有結合で固相にコンジュゲートさせた抗体の結合性が高くなることを報告している。異なるリンカーを介して大きなタンパク質抗原を固体の支持体に付着させた場合にも抗体の抗原捕獲能力が向上した(J. Immunological Methods、55、1982、1～12)。ハプテン-スペーサー-タンパク質コンジュゲートの概念はいくつかの特許にも現れている。スペーサーすなわちリンカーアームを介してハプテンを免疫原性担体タンパク質に付着させることにより、抗体の調製において免疫応答が改善されるかもしれない(米国特許第5,776,713号および米国特許第5,843,682号)。ハプテンと標識の間に伸長したリンカーを使用して様々な酵素または他のトレーサーで標識したハプテンは、より容易に認識され、ハプテンに対する抗体によってより密接に結合され、また、酵素活性や他のトレーサーの特性をよく保持している(米国特許第5,298,403号、米国特許第5,578,457号および米国特許第5,834,206号)。コンジュゲートの合成におけるこのような目的のためにリンカーグループを有する二官能性試薬も使用した(米国特許第5,595,741号)。リンカーグループを有する薬物ハプテン-担体タンパク質コンジュゲートの構築は、抗体による認識が最適であり、したがって、従来の他の薬物とのより優れた同時療法的な用法を有している(米国特許第5,876,727号)。米国特許第5,876,727号はまた、担体またはタンパク質から十分な距離だけハプテンを移動させて、抗体によるハプテンの最適な認識を可能にする利点を教示している。

【0006】

従来、プロゲステロンおよび同じ環構造を有する他の類似のステロイドハプテンを、そのb環の6位および7位で他の分子に付着させていた(G.Hatzidakis、A.StefanakisおよびE.Krambovitidis、1993、「Comparison of Different Antibody-Conjugate Derivatives for the Development of Sensitivity and Specific Progesteron Assay」、Journal of Reproduction and Fertility、97、ページ557～561)。

【0007】

本出願者らは今回、驚くべきことに、比較的短い時間のアッセイで、小さいサイズのハプテンを捕獲するリガンドの能力が、多くの迅速アッセイ、具体的にはラテラルフローストリップ試験やフローイムノセンサーなど免疫アッセイに対して感度を有するように高められることを発見した。これは、ハプテンと、タンパク質などハプテンが付着している大型グループ(large group)との間にリンカーを使用することによる従来のELISAには、特に適していない。

【0008】

本発明の目的は、ハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートを利用する迅速アッセイを提供すること、あるいは少なくとも有用な選択肢を社会に提供することである。

【0009】

(発明の概要)

第1の態様では、本発明は平衡に近づかない動力学に基づいたアッセイである迅速アッセイで使用する、一般式X-W-Y-Zで表されるハプテン-リンカー-大型グループのコ

10

20

30

40

50

ンジュゲートを提供する。

(式中、

Xは、ハプテンであり、

Wは、任意選択でチオエーテルまたはエーテル基であり、

Yは、10個以上の原子長のリンカーであり、

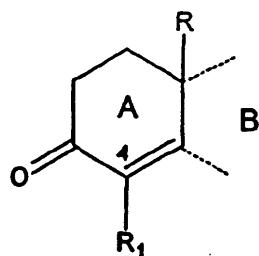
Zは、Yが存在しない場合にXのリガンドへの結合に対して立体障害を与えるのに十分なサイズの大型グループである)

好ましい実施形態では、Xは式IのA環構造を有する多環の融合環ハプテンである。

【0010】

【化1】

10



式I

式中、RはH、CH₃およびCH₂OHを含む群から選択され、破線は隣接するB環構造の環員を示し、R₁はリンカーYの付着点である。 20

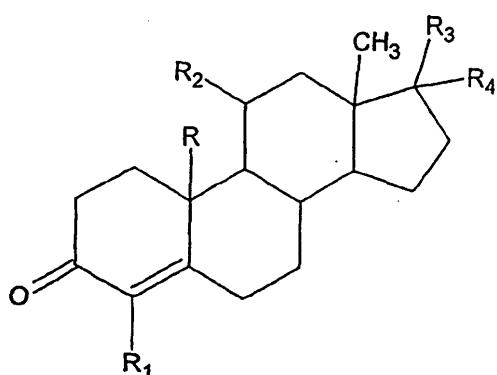
【0011】

より好ましい実施形態では、Xは式IIのハプテンである。

【0012】

【化2】

30



式II

式中、

Rは、H、CH₃およびCH₂OHを含む群から選択され、 40

R₁は、リンカーYの付着点であり、

R₂は、HまたはOHであり、

R₃は、オキシ、C₁～C₂アルキルまたはメチルカルボニルが任意選択でヒドロキシによって置換されている、オキシ、C₁～C₂アルキル、ヒドロキシ、およびメチルカルボニルを含む群から選択され、

R₄は、水素またはヒドロキシである。

【0013】

さらなる態様では、本発明は、

a)ハプテンを結合する能力があるリガンドを試験試料と接触させるステップと、

b)ステップa)のリガンドを、このリガンドに特異的な本発明のハプテン・リンカー・大 50

型グループのコンジュゲートとさらに接触させるステップと、

c)リガンドに結合した、コンジュゲートしていないハプテンの量を決定するステップとを含む、試料中のハプテンを検出するための、平衡に近づかない、動力学に基づいたアッセイである迅速アッセイ法を提供する。

【0014】

好ましくは、リガンドを接触させる第2ステップ(b)により、過剰の結合していないリガンドのほとんどが接触され結合される。

【0015】

好ましくは、ハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートは固定されている。

【0016】

好ましい実施形態では、ステップa)の混合物をステップb)のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートの上に流す。

【0017】

さらなる態様では、本発明は、

a)本発明のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートを試験試料と混合するステップと、

b)生じた混合物をこのハプテンを結合する能力があるリガンドと接触させるステップと、

c)リガンドに結合したコンジュゲートしていないハプテンの量を決定するステップとを含む、試料中のハプテンを検出するための、平衡に近づかない動力学に基づいたアッセイである迅速アッセイ法を提供する。

【0018】

好ましくは、リガンドは固定されている。

【0019】

好ましい実施形態では、生じた混合物を固定したリガンドと接触させるステップb)は、フローオーバーまたはフロースルーシステムによって行われる。

【0020】

さらなる態様では本発明は少なくとも

ハプテンに結合するリガンドと、

本発明のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートと

を含む、平衡に近づかない動力学に基づいたアッセイである迅速アッセイのキットを提供する。

【0021】

好ましくは、このキットは指示薬をさらに含む。一実施形態では、この指示薬はハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートに結合している。代替実施形態では、この指示薬はリガンドに結合している。

【0022】

一般的にキットはフローオーバーまたはフロースルーアッセイキットであってよい。典型的なフロースルーキットは試験ストリップを含む。

【0023】

別の態様では、本発明のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートを、コンジュゲート内のハプテンと結合する能力があるリガンドと、反応が平衡に近づかない所定の時間接触させるステップを含む、本発明のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートをリガンドに結合させる方法を提供する。

【0024】

リガンドは固定されていることが好ましい。好ましい実施形態では、このリガンドはタンパク質-ハプテンのコンジュゲートと接触する前にはハプテンに結合していないことが好ましい。

【0025】

別の態様では本発明は少なくとも

10

20

30

40

50

a) 極性有機溶媒に溶かした活性化されたステロイドハプテンを、1~10モル等量の異種二官能性水溶性リンカーを含む水溶液と混合するステップと、

b) 混合物を反応させるステップと、

c) ステップb)のハプテン-リンカー反応生成物の残りの遊離官能性リンカーグループに大型グループを付着させるステップと

を含む、本発明のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートを生成する方法を提供する。

【0026】

(図面の簡単な説明)

本発明は広くは上に定義したとおりであるが、それだけに限定されるものではなく、以下の説明によって例が提供される実施形態も含められることは、当業者には理解されよう。さらに、添付の図を参照することによって本発明をより良く理解することができる。

【0027】

図1は、伸長した長さのリンカーを有する4-プロゲステロン誘導体の合成を示す。

【0028】

図2は、様々な長さのリンカー(4個、11個、または18個の原子のリンカー)を有する、1つの7-プロゲステロン-OVAコンジュゲート[(2)-OVA]および3つの4-プロゲステロン-OVAコンジュゲート[(3)-OVA、(5)-OVAおよび(7)-OVA]の構造を示す。

【0029】

図3は、類似の抗体(MoAb)結合曲線を有する、4-および7-プロゲステロン-OVAコンジュゲート[(2)-OVAは下の曲線、(3)-OVAは上の曲線]のどちらもを示す。

【0030】

図4は、抗体(MoAb)と(3)-OVAコンジュゲート(上の曲線)および(2)-OVAコンジュゲート(下の曲線)との標準曲線を示す。

【0031】

図5は、類似の抗体(MoAb)結合性能を有する3つの4-プロゲステロン-OVAコンジュゲート[(3)-OVAは下の曲線、(5)-OVAは真中の曲線、(7)-OVAは上の曲線]を示す。

【0032】

図6は、抗体(MoAb)と3つの4-プロゲステロン-OVAコンジュゲート[(3)-OVA、(5)-OVA、(7)-OVA]との、非常に類似した標準曲線を示す。

【0033】

図7は、免疫金にコンジュゲートした抗体(MoAb)とラテラルフロー試験ストリップ上にコーティングした3つの4-プロゲステロン-OVAコンジュゲート[(3)-OVAは上段のストリップ、(5)-OVAは中段のストリップ、(7)-OVAは下段のストリップ]との、様々な結合性能を示す。

【0034】

図8は、図7の走査計測分析(scannometric analysis)[(3)-OVAは下の曲線、(5)-OVAは真中の曲線、(7)-OVAは上の曲線]の結果を示す。

【0035】

図9は、固定したモノクローナル抗体と、3つの4-プロゲステロン-OVAコンジュゲート[(3)-OVAは上段のストリップ、(5)-OVAは中段のストリップ、(7)-OVAは下段のストリップ]の免疫金複合体との、様々な結合性能を示す。

【0036】

図10は、小さなハプテン用のバイオドットフロースルー免疫アッセイ形式の2ステップの設計を示す。

【0037】

図11は、金表面に固定した抗体または本発明のハプテン-リンカー大型グループのコン

10

20

30

40

50

ジュゲートを使用した、小さなハプテン用の表面プラズモン共鳴(S P R)フロー免疫センサーの2つの設計を示す。

【0038】

図12は、4つのプロゲステロン-O V Aコンジュゲート[(2)-O V A、~12 R U;(3)-O V A、~50 R U;(5)-O V A、~150 R U;(7)-O V A、~225 R U]と固定したモノクローナル抗プロゲステロン抗体(M o A b)との様々な結合性能を、S P Rバイオセンサーによって示す。

【0039】

図13は、3つのプロゲステロン-O V Aコンジュゲート[(2)-O V A、(3)-O V A、および(5)-O V A]を固定したバイオセンサー表面を使用した、抗体結合応答を示す。
10

【0040】

図14は、3つのプロゲステロン-O V Aコンジュゲート[(2)-O V A、(3)-O V A、および(5)-O V A]バイオセンサー表面を使用した、プロゲステロンの競合免疫アッセイの標準曲線を示す。

【0041】

図15は、競合S P Rに基づいた免疫アッセイから得られたプロゲステロンの検出の直線範囲 $0.1\sim10\text{ng.ml}^{-1}$ を示す図である。

【0042】

図16は、18個の原子のリンカー有するテストステロン-4-O V Aコンジュゲートの生成方法を示す。
20

【0043】

図17は、様々な長さのポリエチレングリコールリンカー有するプロゲステロン-4-O V Aコンジュゲートの生成の設計を示す。

【0044】

(発明の詳細な説明)

本発明の開示では、「迅速アッセイ」とは、アッセイ成分を混合した場合に、このアッセイから有意義な結果が得られる前に平衡状態に近づく必要がない反応を有するアッセイ成分によって、特徴付けられている。本発明は、アッセイを実行している期間中にアッセイ成分の反応が平衡に近づかない、迅速アッセイに特に適している。このような迅速アッセイは、非平衡の、動力学に基づいたアッセイである。通常、このアッセイは実施に20分未満、より適切には10分未満しかかからないはずである。
30

【0045】

「大型グループ」とは、10個の原子長未満のリンカーをリガンドとハプテンの間に挿入した場合に、付着したハプテンのリガンドへの結合に対して有意な立体障害を引き起こすのに十分なサイズのグループである。通常、本発明では、大型グループはタンパク質またはポリペプチドである。あるいは、この大型グループは、蛍光色素、たとえばビリルビンなどの指示薬である。

【0046】

一実施形態では、コンジュゲートの大型グループはタンパク質である。このタンパク質は、好ましくは安価であり、ハプテンとコンジュゲートするための多数のリジンを含む、容易に入手可能な任意のタンパク質である。当分野の適切なタンパク質の例には、ウシ血清アルブミン(B S A)、卵白アルブミン(O V A)、キーホールリンペットヘモシアニン(K L H)が含まれる。タンパク質には、酵素、分泌タンパク質、球状タンパク質が含まれ得る。本発明中で使用するための好ましいタンパク質は卵白アルブミン(O V A)である。タンパク質が酵素である場合、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アミンを富化した西洋ワサビペルオキシダーゼを含む群から選択されることが好ましい。
40

【0047】

「ハプテン」とは、検出するために選択される分子である。最も一般的には、このハプテ
50

ンは、抗体と特異的に反応し、それ自体では免疫応答を誘発させる能力がないが抗原性の担体と複合体を形成すると免疫原性になる、低分子量有機化合物である。本発明で対象となるハプテンは、それだけには限定されないが、炭化水素、ポリヌクレオチド、ステロイド、ステロイド類似体、ポリペプチド(ペプチドホルモンなど)、薬物および毒素を含む群から選択される。

【0048】

ハプテンが、プロゲステロンまたはプロゲステロンに類似のA環構造を有する分子などステロイドである場合は、ハプテンの結合がA環構造の4位で起こることが好ましい。ステロイドプロゲステロンのC-4位でのタンパク質コンジュゲート部位が良好なアッセイ感度を有することが見出された。これまでに、文献では、プロゲステロン分子とタンパク質の一般的なコンジュゲート部位のほとんど(3、6、7および11位)が調査され、最も感度の高いEIAアッセイの結果は、ステロイドの6または7位のどちらかを使用することによってしか得られなかつた(Journal of Reproduction and Fertility, 97, 1993, 557~561)。4-プロゲステロン誘導体は、より簡単に合成され、6や7類似体に比べて立体異性体の問題がない。これにより、プロゲステロンの4位、またはプロゲステロンと同じA環構造を有する他のステロイドの4位が、6や7位に代わる、優れた代替タンパク質コンジュゲート部位となる。しかし他の結合部位の使用も除外されない。

10

20

30

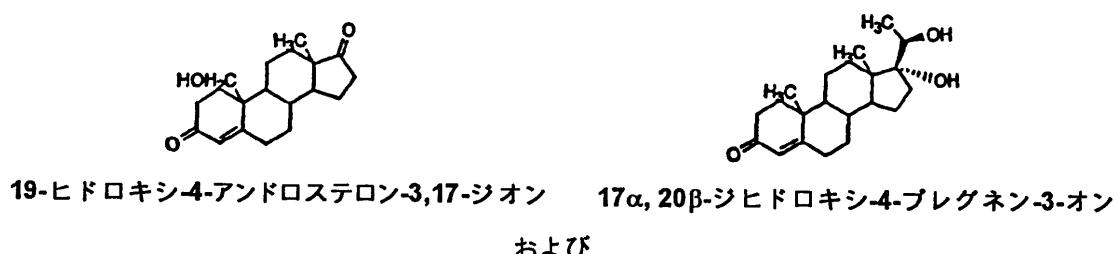
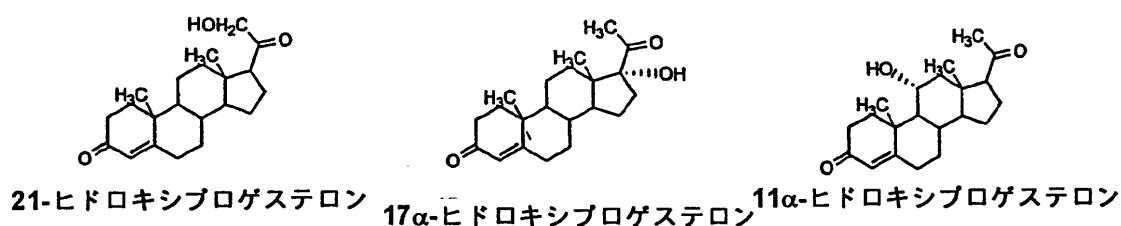
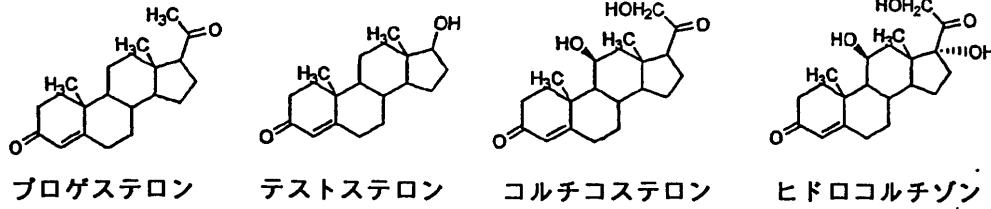
40

【0049】

好ましい実施形態では、このハプテンは以下を含む群から選択される。

【0050】

【化3】



最も好ましくは、このハプテンはプロゲステロンである。

【0051】

本明細書中で使用する「リガンド」は、抗原を結合する能力を有する任意の分子でよい。好ましくは、これは標的に特異的に結合する能力のある免疫グロブリン分子である。このような抗原標的には上記のハプテンが含まれる。リガンドには、完全な抗体だけでなく、その断片、たとえばF_{ab}、(F_{ab})₂、F_v、単鎖(ScFv)、それらの変異体、抗体

50

部分を含む融合タンパク質、および必要な特異性の抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の他の任意の改変した構造が包含される。代替実施形態ではこのリガンドはT細胞受容体でよい。

【0052】

リンカーは、好ましくは10~50個の原子長、より好ましくは11~24個の原子長、最も好ましくは11~18個の原子長の鎖を含む。当分野で周知の任意の適切なリンカーを使用することができる。リンカーは、ハプテンのリガンドへの結合に対する立体障害が最小限であることを保証するために、ハプテンに近位のかさ高くない基であるべきである。また、この鎖が炭素に基づいたものであることが好ましい。この炭素に基づいた鎖は、N、S、Oから選択された1つまたは複数の異種原子を含んでいてもよい。他の側鎖置換基を提供してもよい。

10

【0053】

好ましい鎖は、アミノ酸鎖、ポリエチレングリコール鎖、アルキル、アルケニル、核酸、および多糖を含む群から選択される。異種原子はアミノ基の一部でもよい。この鎖は、1つまたは複数、好ましくは3つ以下の不飽和部位を有することができる。アミノ酸断片を鎖に取り込んでもよい。ホモロゲーションによって複数のアミノ酸断片を提供してもよい。リンカーとしてハイブリッドペプチド-核酸断片を使用することも企図される。

20

【0054】

本発明者らは、立体障害を減らすための最適なリンカーの長さは約18個の原子であることを見出した。それ以降は、性能は最小限しか向上されないが、より長いリンカーを組み込むことによって混乱が生じる。明らかに、本発明の実施に18個の原子より長いリンカーを使用してもよいが、これは好ましくない。

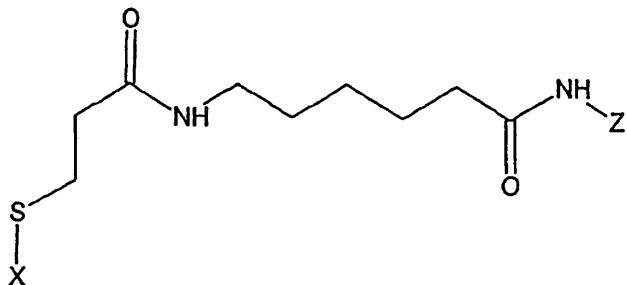
20

【0055】

好ましい実施形態では本発明のコンジュゲートは式IIIまたは式IVによって表される。

【0056】

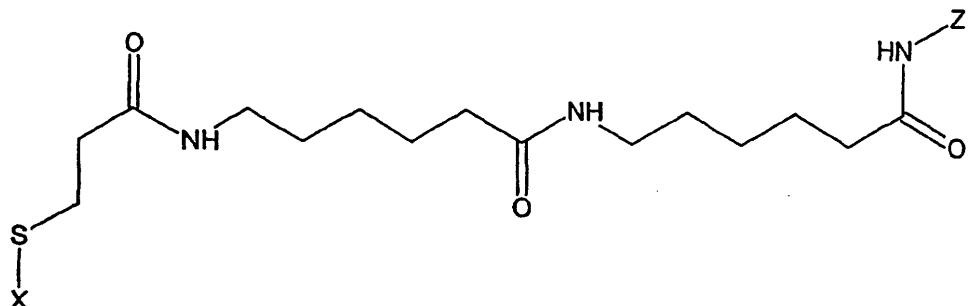
【化4】



式III

【0057】

【化5】



式IV

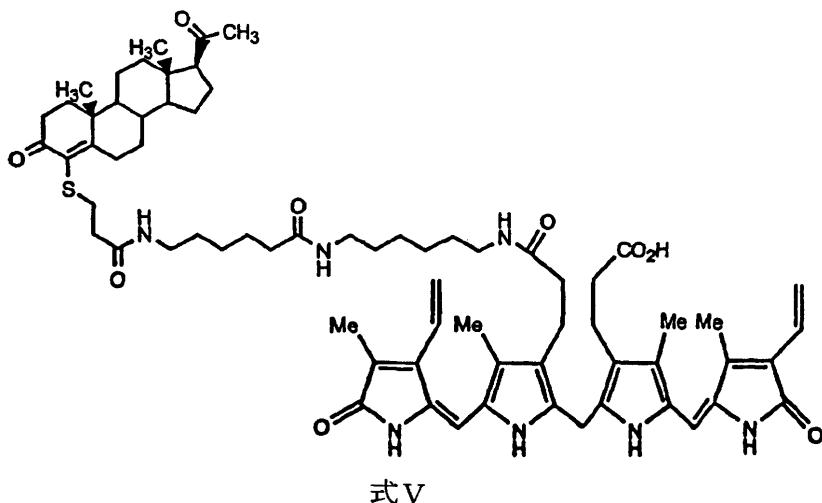
(式中、XおよびZは上に定義したとおりである)

50

一実施形態では本発明のコンジュゲートは以下のものである。

【0058】

【化6】



10

20

30

40

50

別の実施形態では、本発明の好ましいコンジュゲートは図2に示す(5)-OVAおよび(7)-OVAである。

【0059】

当分野で周知の任意の手段によってこのリンカーをハプテンとタンパク質に付着させることができる。好ましい方法には、(たとえばタンパク質上のアミン、カルボキシルまたはスルフヒドリル基への)共有結合反応、核酸ハイブリダイゼーション、またはリガンド相互作用による方法が含まれる。

【0060】

ステロイドをリンクグループに共有結合させるためには、多くの場合、チオエーテルまたはエーテルの架橋基、好ましくはチオエーテル基を含むことが必要である。

【0061】

固相が必要な場合は、リガンドまたはハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートを固相に固定することができる。リガンドとハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートの量が事前に決定されていることが好ましい。また、リガンドに比べてタンパク質-コンジュゲートが過剰量あることが好ましい。

【0062】

リガンドおよびハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートのどちらもが、ハプテンを定性分析および定量分析するためのコンジュゲートの迅速な検出を可能にするために、検出システムでの使用に適した指示薬をさらに含むことができる。

【0063】

本発明での使用に適した多くの検出システムが当分野に存在する。当分野の技術者は、周知の方法を使用してタンパク質の結合を検出することができる。様々な免疫アッセイ手順は、「Immunoassays for the 80's」、A. Voller.他編、University Park, 1981に記載されている。これには、酵素検出システム、色素(蛍光マーカー、有色イオンや錯体など)、金属または非金属の有色粒子(免疫金や着色ラテックスビーズなど)、および取り込まれた放射性同位元素(たとえばシンチレーション計数によって検出される)が含まれる。

【0064】

好ましい実施形態では、安価で比較的安定であるので免疫金粒子が使用される。標識した抗体を検出するのに使用してもよい適切な酵素には、それだけには限定されないが、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、-5-ステロイドイソメラーゼ、酵母菌アルコール脱水素酵素、-グリセロリン酸脱水素酵素、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸

脱水素酵素、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼが含まれる。

【0065】

抗体を放射標識することにより、放射性免疫アッセイ(RIA)を使用してそれを検出することが可能になる(たとえば、Work, T.S.他、「Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology」、North Holland Publishing Company、ニューヨーク、1978参照)。この放射性同位元素は、線計数器やシンチレーション計数器の使用、またはオートラジオグラフィーによる手段などによって検出することができる。本発明の目的に特に有用な同位元素は、³H、¹⁴C、³⁵S、¹²⁵Iおよび¹³¹Iである。

【0066】

蛍光標識は本発明の範囲内にある。蛍光標識した抗体を適切な波長の光に暴露させた場合、蛍光によってその存在を検出することができる。最も一般的に使用される蛍光標識化合物には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、フルオレスカミン、ビリルビンがある。

【0067】

また、この抗体を¹⁵²Euなどの蛍光放射金属またはランタニド系列の他のものを使用して検出可能に標識することもできる。ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)やエチレンジアミン四酢酸(EDTA)など金属キレート化グループを使用してこれらの金属を特定の抗体に付着させることができる。

【0068】

この抗体はまた化学発光化合物に結合させることによって検出可能に標識することができる。その後、化学反応の過程中に生じる発光の存在を検出することによって化学発光で標識した抗体の存在を決定する。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマチック(theromatic)アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルである。

【0069】

同様に、生物発光化合物を使用して抗体を標識してもよい。生物発光とは、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を高める、生物系内で見つかる化学発光の一種である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することによって決定される。標識の目的で重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。

【0070】

抗体の検出は、たとえば検出可能な標識が放射性 線放射源である場合はシンチレーション計数器によって、あるいは、たとえば標識が蛍光物質である場合は蛍光光度計によって行うことができる。

【0071】

酵素標識の場合、酵素の基質を使用する比色法によって検出を行うことができる。また、基質の酵素反応の程度を同様に調製した標準と比較する目視比較によって、検出を行うこともできる。

【0072】

抗体の結合活性は、周知の方法に従って決定することができる。当分野の技術者は、日常的な実験を用いることによって、それぞれの測定(determination)に有効で最適なアッセイ条件を決定することができる。本発明で企図される方法は、動力学に基づくものである。平衡に基づくシステムは、本発明の目的では企図されない。

【0073】

試験化合物を加えない、陽性対照アッセイを実施してもよい。

【0074】

一実施形態では、このハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲートは、図2に示したとおりである。

【0075】

本発明のコンジュゲートは、多くの様々な迅速免疫アッセイでの使用に適している。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 6 】

したがって、さらなる態様では、本発明は、本発明のコンジュゲートを、コンジュゲート内のハプテンに特異的なリガンドに結合させる方法を提供する。この結合ステップは一般的に、迅速なフローオーバーまたはフロースルー方式で、固相の表面上で行われる。

【 0 0 7 7 】

固相を使用する場合は、リガンドまたはハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートのどちらかを固定することができる。好ましくは、ハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートを固体の支持体に固定する。本発明の範囲内で使用できる固体の支持体は、それだけには限定されないが、主に、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリアクリロニトリル、ポリ塩化ビニル、ポリビニリデン、ポリスルホン、ポリアクリルアミド、セルロース、硝酸セルロース、架橋デキストラン、フッ化樹脂、アガロース、架橋アガロース、および多糖からなる群から選択される不溶性の高分子物質を含む。10

【 0 0 7 8 】

しかし、さらに、ガラス、ガラス繊維、ガラスピーズ、金属、ナイロンメッシュ物質、ナイロン膜、金属、金属ストリップおよび金属ビーズなど他の物質を使用することも考えられる。好ましい固体の支持体は、膜、ビーズ、マイクロプレート固体支持体、試験管、マイクロタイタープレート、ディップスティック、ラテラルフロー装置、樹脂、PVC、ラテックスビーズおよびニトロセルロースから選択される。担体の性質は本発明の目的ではある程度可溶性または不溶性とすることができます。支持体の形状は、ビーズのように球状、試験管の内部のように円柱状、または棒の外部表面であつてよい。あるいは、表面は、シート、試験ストリップなどのように平坦でもよい。当分野の技術者は、抗体や抗原を結合する多くの他の適切な担体を知つており、または日常的な実験を用いることによってこれを確認することができるであろう。20

【 0 0 7 9 】

この固体表面は膜であることがより好ましい。

【 0 0 8 0 】

支持体が金属である場合は、これが、金やプラチナなどバイオセンサーの表面としての使用に適した金属であることが好ましい。

【 0 0 8 1 】

固体の支持体への固定は、受動吸着、共有結合、またはアビシン / ビオチン複合体などリガンドの相互作用を介したものによる固定でよい(たとえば米国特許第4,467,031号、Galati他)。30

【 0 0 8 2 】

本出願者らは、予想外なことに、より長いリンカーを有するこれらのハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートが、迅速アッセイにおいて、従来のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートに比べて相当の利点を有することを見出した。競合ELISAタイプのアッセイで使用した場合はこのコンジュゲートの性能は従来のコンジュゲートと同等であるので、これは特に驚くべきことである。

【 0 0 8 3 】

特定の理論に拘泥するものではないが、迅速免疫アッセイにおける従来のタンパク質 - ハプテンコンジュゲートの感度の低さは、固定した抗体との免疫複合体を形成する際の立体障害が原因であることが提唱された。したがって、迅速アッセイの感度を上げるために、結合率に対する立体障害を最小限にするシステムが必要であると思われる。本発明のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートはこの目的を果たしていると思われる。40

【 0 0 8 4 】

特定の理論に拘泥するものではないが、本発明者らは、本発明の実施例で実証された、高められたハプテン抗体結合の動力学は、そこで提示する特定の実施形態の2つの主要な要素によって促進されることを提唱した。

【 0 0 8 5 】

10

20

30

40

50

1. リンカーがステロイドA環の4位に結合すること；および
 2. リンカーの長さが、ハプテンとタンパク質が互いに、迅速なリガンドによるハプテンの認識およびリガンドのハプテンへの結合に対して立体障害がないような長さであること。このハプテンとタンパク質は、互いに対し自由な運動が与えられており、したがって、リガンドのハプテンへの結合の迅速な認識が可能となっていると考えられる。

【0086】

本発明者らは、免疫アッセイのために、プロゲステロンの6および7以外の他のコンジュゲーション部位を調査した。本発明者らによって、プロゲステロンのC-4位がプロゲステロンの6位に代わる、優れた代替コンジュゲーション部位であることが見出された。ELISAでは、プロゲステロン-4-OVA(1-OVA)およびプロゲステロン-7-OVAコンジュゲート(2-OVA)のどちらも類似の抗体結合性能を有する。驚くべきことに、SPRなど動力学に基づいた免疫アッセイでは、プロゲステロン-4-OVAコンジュゲートはプロゲステロン-7-OVAコンジュゲートより優れた抗体結合を示す。しかし、6-および7-プロゲステロン誘導体に比べて、C-4位のプロゲステロン誘導体の合成はより簡単であり、ステロイドの4,5-二重結合によってC-4位ではプロゲステロン誘導体の立体異性体が1つしか提供されないので、立体異性体の問題がない。

【0087】

最近、伸長した長さの異種二官能性リンカーを使用することによって捕獲抗体とアルカリホスファターゼ標識またはその微小粒子との間の距離が長くなれば抗体結合シグナルが増大することが見出された。この増大は一般的なバイオコンジュゲートの2成分(entity)間の距離が増加した結果と見なされている。本発明者らは、ELISAでコーティング抗原として使用した場合は、プロゲステロン-4-OVAコンジュゲート内のリンカーの長さ(4、11または18個の原子長)は、その抗体結合性能に有意な効果を及ぼさないを見出した。短い時間(20分)の抗体結合実験では、長いリンカーを有するコンジュゲート(4-および6-OVA)は、短いリンカーを有するOVA-コンジュゲート(1-OVA)に比べてむしろ僅かに悪かった。したがって、異なる長さのリンカー(4~18個の原子)を有する3つのプロゲステロン-4-OVAコンジュゲートは、ELISAでは同じプロゲステロンアッセイ感度を有している。

【0088】

以前の研究によりシグナルの増大が必ずしもリンカーの長さに比例するとは限らないことが示されている。たとえば、酵素-抗体コンジュゲート中のリンカーの長さを9個の原子から23個の原子に増加した場合はシグナルが64%増加し、30個の原子長のリンカーでは82%増加した。しかし、16個の原子のリンカーを有する同じ酵素-抗体コンジュゲートは、より長いリンカー(23個の原子)を有するコンジュゲートより僅かに優れた抗体結合性能を有していた。これらの結果は、シグナルを増大させるためには、抗体と他の成分との間のリンカーの理想的な長さは、関与する2つの成分のサイズおよびバイオコンジュゲートが形成される方法に依存することを示唆している。従来技術では、2つの大きな成分間で、すなわち抗体と酵素または微小粒子とバイオコンジュゲートが構築される。リンカーは、抗体を標識する目的のみで使用され、抗体-抗原の結合部位と同じ側には直接関与していないなかった。しかし本発明のプロゲステロン-OVAコンジュゲートは全く異なっている。これらは、大きなタンパク質(OVA)と非常に小さな成分、すなわちプロゲステロン分子(分子量314)を用いて構築される。この抗体/抗原結合部位にはリンカーも直接関与している。したがって、このバイオコンジュゲートは2つの異なるサイズの成分によって形成され、異なる方法で構築されているので、抗体結合性能に対するリンカーの長さの効果は、初期に報告された研究とは異なる可能性がある。本発明者らは、リンカーの長さも、様々なアッセイ形式、特に迅速アッセイにおける抗体結合に影響を与えることを発見した。

【0089】

本発明を実施するのに、いくつかの異なるアッセイタイプが有用であることが見出された

10

20

30

40

50

。これらには、本明細書中に記載の試験ストリップアッセイ、ドットプロットアッセイ(ドット試験またはドット免疫結合アッセイとしても知られる)、S P R バイオセンサーなどフローイムノセンサーが含まれる。

【 0 0 9 0 】

また本発明の免疫アッセイは、20分未満、より好ましくは10分未満、最も好ましくは5分未満で完了することが好ましい。

【 0 0 9 1 】

好ましい試験ストリップイムノアッセイでは、長いリンカーを有する所定量のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートは、それを固定するための固体支持体の一部に固定されている。固体の支持体は通常、セルロースベースの膜、または少なくとも水ベースの溶媒の毛管移動が可能な支持体である。試験試料を膜支持体に施用し、標識した抗体と混合し、ハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートによって固定された捕獲ラインに向かって迅速に移動させた。遊離試料ハプテンと結合した後、過剰の抗体は、捕獲ラインでハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートと色バンドを形成する。リガンドとしての標識した抗体の量は、捕獲ラインの色強度によって定量的または定性的に決定される。本発明のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートと結合する標識した抗体リガンドが少ないほど、試験試料中に多くのハプテンが存在する。

【 0 0 9 2 】

他の試験ストリップを形成することもできる。一実施形態では、試験試料を本発明の標識したタンパク質 - ハプテンコンジュゲートと混合する。標識したハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートおよび遊離ハプテンのどちらも、固定した抗体リガンド上の結合部位において競合するために捕獲ラインに向かって移動する。色強度、すなわちハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートの量は、試験試料中のハプテンの量に反比例している。

【 0 0 9 3 】

上で論じた任意の標識を使用することができるが、標識したコンジュゲートは肉眼で見えることが好ましい。したがって好ましい標識は可視色素である。

【 0 0 9 4 】

上記のストリップアッセイのどちらでも、本発明のタンパク質コンジュゲートは、短いリンカーを有するコンジュゲートに比べて、捕獲ライン内ではるかに優れた抗体結合性を有する。したがって、長いリンカーを有するコンジュゲートは、捕獲ライン内で比較的低い濃度の抗体を検出し、それによって迅速なストリップアッセイの感度を高めることができる。

【 0 0 9 5 】

本発明の別の実施形態はバイオドットのフロースルー免疫アッセイを提供する。このような免疫アッセイではまず抗体などのリガンドを膜上に固定する。微量濾過装置によって試料ハプテンを膜に貫流させた後、本発明の標識したハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートは残った抗体と反応して膜上に有色ドットを形成する。ドットの色強度、すなわちハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートの量も、試験試料中のハプテンの量に反比例する。

【 0 0 9 6 】

表面プラズモン共鳴(S P R)バイオセンサー技術は、抗体 - ハプテン相互作用の特徴付けに非常に有用なツールである。これは小さいサイズのハプテンの迅速免疫アッセイ用に設計することもできる。一般的に、ハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートまたはS P Rで使用するリガンドのいずれかを、バイオセンサー表面上に共有結合により固定する。最も一般的には微量流動フローセル中を用いて、遊離試料ハプテン(分析物)と抗体リガンドとの混合物またはハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートとの混合物をバイオセンサー表面上に流して、バイオセンサー表面上の限られた数の抗体結合部位において競合させる。S P R 検出器はハプテン - 抗体複合体形成の会合および解離によって誘発された表面近辺の溶媒層の屈折率の変化をモニターする。S P R 検出器の感度は

その分子量に比例するセンサー表面上の抗体 - ハプテン複合体の屈折率に依存している。したがって、抗体とハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートとの結合は、このタンパク質の分子量が大きいために、抗体と小さいサイズのハプテンとの結合による屈折率よりもはるかに高い屈折率による S P R 応答を与える。

【 0 0 9 7 】

本発明のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートは試験したすべてのアッセイで利点を示した。固体の支持体上にコーティングした抗原としてハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートを使用した場合、より長いリンカーを有するコーティングしたコンジュゲートでは、免疫金にコンジュゲートした抗体によって、ハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートをより低濃度で検出できる。同時に、抗体を固定した場合、より長いリンカーを有するコンジュゲートは、抗体の検出限界がより低濃度である。10

【 0 0 9 8 】

ストリップアッセイでは、どちらのアッセイ構造も免疫クロマトグラフィーストリップ試験の感度を高める。より長いリンカーを有するこれら新規のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートに基づいて、比較的短い時間内で低濃度(<10ng / ml)の小さなハプテンを検出できる高感度の免疫クロマトグラフィーストリップアッセイ形式が開発された。本発明の長いリンカーを有するハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートは、抗体 / ハプテンの結合を強く阻害する、乳など脂質の含有量が高い試験試料のストリップアッセイで特に有用である。本発明のプロゲステロン - O V A コンジュゲートを使用することで、乳中のプロゲステロンの最低検出限界(L D L)は、視覚検査によって判断されるように約10ng / mlであり、これは文献値30ng / mlより低いL D Lである(Acta Chirurgica Scandinavica, 50, 1996, 141 ~ 145)。この文献中では、ストリップ試験には、ストリップ試験毎に、正確な、フレッシュな金標識したプロゲステロン - O V A コンジュゲートを使用しなければならない。20

【 0 0 9 9 】

迅速な S P R (B I A c o r e)アッセイでは、長いリンカー(18個の原子)を有するハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲート(225応答ユニット)は、より短いリンカー(4個の原子)を有するコンジュゲート(50応答ユニットのみ)よりはるかに高い抗体結合性能が得られた。プロゲステロン分子の4 - 位のコンジュゲート(50応答ユニット)も、ちょうど同じ長さのリンカー(4個の原子)を有するプロゲステロンの7 - 位のコンジュゲート(12応答ユニットのみ)より優れた抗体結合を示した。30

【 0 1 0 0 】

したがって、本発明は、試験ストリップ、試験ストリップを有するキット、およびハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートの反応物質にまで及ぶ。

【 0 1 0 1 】

本発明のキットは、上記の固定したリガンドを有する固体の支持体、および本発明の標識したハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートを含むバイアルまたは容器を含む。

【 0 1 0 2 】

キットのさらなる実施形態では、キットは、固定した本発明のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートを有する固体の支持体、およびハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートに対する標識したリガンドを含むバイアルまたは容器を含んでもよい。40

【 0 1 0 3 】

本発明のキットの別の実施形態では、このキットは、上記の固定したリガンドを有する固体の支持体、およびハプテンを本発明のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートに変換する変換キットを含む容器のバイアルを含んでもよい。

【 0 1 0 4 】

最も一般的には、このキットは、試験試料および標識したコンジュゲートを固体の支持体

10

20

30

40

50

上で移動させるための溶媒、好ましくは水性溶媒をさらに含む。標識したコンジュゲートが肉眼で見えない場合は、標識したコンジュゲートの存在を検出する手段をキット中に提供してもよい。このキットは通常、好ましくは所定の試料および／またはコンジュゲートおよび／またはリガンドの体積を固体の支持体に運ぶための、アプリケーターを含む。

【0105】

本発明のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートは、以下によって生成することができる。

【0106】

1. ハプテンを上に定義したリンカーに結合させること。好ましくは、この結合は化学的共有結合反応による、あるいは、リンカーが核酸である場合は、核酸ハイブリダイゼーションによる結合である。

【0107】

2. リンカーの遊離末端をタンパク質など大型グループに結合させること。リンカーをタンパク質に結合させる周知の方法は、標準の参考文献(「Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences」、Mohammed AslamおよびAlastair Dent編)から選択することができる。

【0108】

あるいは、リンカーをまずタンパク質に結合させ、その後同じ方法でハプテンに結合させることも可能である。

【0109】

d) 極性有機溶媒に溶かした活性化されたステロイドハプテンを、1~10モル当量の異種二官能性水溶性リンカーを含む水溶液と混合するステップと、

e) 混合物を反応させるステップと、

f) ステップb)のハプテン - リンカー反応生成物の残りの遊離官能性リンカーグループに大型グループを付着させるステップと

を少なくとも含む、本発明のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートを生成する方法が提供される。

【0110】

この方法は、任意選択でステップb)とc)の間にハプテン - リンカー - 生成物を単離する単離ステップを含んでもよい。

【0111】

好ましくは、最終混合物は2~30%、より好ましくは5~15%、最も好ましくは約10%の含水率を有する。

【0112】

ステップb)の反応時間は、好ましくはほぼ24時間程度までの時間、より好ましくは12時間未満、最も好ましくは3時間である。b)の反応は通常室温で起こる。好ましい実施形態ではb)の反応は実質的に中性のpHで起こる。

【0113】

好ましくはステップa)の水溶液は2~5モル当量の異種二官能性の水溶性リンカーを含む。

【0114】

一実施形態では、活性化されたステロイドはステロイドの活性化されたエステルである。最も好ましい実施形態ではこれはステロイドのスクシンイミドエステルである。

【0115】

好ましくは、この異種二官能性リンカーは、カルボキシル、アミノ、チオール、ヒドロキシ、アルデヒド、および反応性ハロゲンを含む群から選択された2つの異なる官能基を有する。好ましい実施形態ではこの異種二官能基はカルボキシルおよびアミノである。

【0116】

反応性でない任意の極性有機溶媒を反応で使用することができる。この極性有機溶媒は、D M F、D M S O、アセトンおよびT H Fから都合良く選択することができる。

10

20

30

40

50

【0117】

(産業上の利用)

したがって、本発明によれば、試験試料中のハプテンを検出するアッセイが提供される。このコンジュゲートは、試験試料中のハプテンが低濃度であるかつ／または脂質含量が高く、従来の免疫アッセイでは十分に、または迅速に検出できない場合に特に有用である。このアッセイは、*in situ*での試験のために形成した場合に特に有用である。このような商業的な応用の1つは、ウシの妊娠診断および発情の検出に使用できる、ウシの低レベルの乳プロゲステロンを迅速にその場で検出することである。

【0118】

以降、本発明を以下の非限定的な実施例に則して例示する。

10

【0119】

(実施例1)

様々な長さのリンカーを有する4つのプロゲステロン-OVAコンジュゲートの合成

(a) プロゲステロン4-メルカプトプロピオン酸(1)-および7-メルカプトプロピオン酸(示さず)。これらの化合物は、文献(Steroids, 53, 1989, 727~738)の、11-ヒドロキシプロゲステロン4-および7-メルカプトプロピオン酸の調製手順に従って調製した。

【0120】

(b)スクシンイミジルプロゲステロン4-メルカプトプロピオネート(3)。プロゲステロン4-メルカプトプロピオン酸の無水DMF溶液3ml(434.8mg, 1.04mmol)に、1.0mlのDMFのジシクロヘキシリジミド(235.7mg, 1.14mmol)溶液を加え、次いで、1.0mlのDMFのN-ヒドロキシスクシンイミド(131.5mg, 1.14mmol)溶液を加えた。この溶液を室温で終夜攪拌した。フラッシュカラムクロマトグラフィーの後純粋な生成物(3)が得られた。

20

【0121】

(c)スクシンイミジルプロゲステロン4-メルカプトプロピオネート(5)の合成。プロゲステロン4-スクシンイミジルエステル3(300mg, 0.58mmol)を4mlの無水DMFに溶かした。この溶液に、0.3mlの脱イオン水中の-6-アミノカプロン酸(229mg, 0.91mmol)を加え、この反応混合物を室温で終夜攪拌した。精製後、反応からTLCプレート上の単一スポットとして白色の固体生成物4(収率63.6%)が得られ、これは、さらに精製せずに、そのスクシンイミジルエステル5の調製に直接使用した。化合物5は3の調製に類似の方法で調製した。

30

【0122】

(d)スクシンイミジルプロゲステロン4-メルカプトプロピオネート(7)の合成。3から4を調製する方法と類似の方法で化合物6を調製した。化合物5(157.6mg, 0.25mmol)および-6-アミノカプロン酸(98.7mg, 0.39mmol)を出発物質として、カラムフラッシュクロマトグラフィーの後に化合物6(収率57%)が得られた。5の調製と類似の方法で化合物7も調製した。化合物6(92.1mg, 0.14mmol)を出発物質として、カラムフラッシュクロマトグラフィーの後、透明な無色の油として生成物7が得られた。上記の合成したプロゲステロン誘導体(1~7)すべてを、ES-MSおよびNMR分析によって確認した。

40

【0123】

(e)タンパク質コンジュゲーション。一連のプロゲステロン-卵白アルブミンコンジュゲートを、プロゲステロン遊離酸(1を含む)または単離したプロゲステロンスクシンイミジルエステル(3、5および7)のいずれかから、以下のように調製した。

【0124】

化合物1(29.5mg, 0.07mmol)のDMF(0.5ml)溶液に、0.1mlのDMF中のジシクロヘキシリジミド(16.02mg, 0.078mmol)および0.1mlのDMF中のN-ヒドロキシスクシンイミド(8.94mg, 0.078mmol)を加えた。この溶液を室温で90分間攪拌し、その後この溶液をOVA(63.5mg, 0.0014mmol)のリン酸緩衝液(7ml, pH7.0)溶液に加えた。このコンジュゲーション反応物を4で終夜攪拌した。それから試料をNaHCO₃水溶液、脱イオン水、

50

およびP B S / T に対して透析した。P D - 1 0 カラムを用いてさらに精製した後、これら精製試料中のB C A アッセイで決定されたタンパク質量が、それぞれプロゲステロン - 4 - O V A は 4.11mg ml^{-1} 、プロゲステロン - 7 - O V A は 4.02mg ml^{-1} であることが分かった。

【 0 1 2 5 】

単離した純粋なプロゲステロンスクシンイミジルエステル(3、5、および7)も、タンパク質のコンジュゲーションに直接使用した。0.019mmolのプロゲステロン活性エステル(3、5または7)の、0.2mlのD M F またはD M S O 溶液を、卵白アルブミン(17.1mg 、 $0.38 \times 10^{-3}\text{ mmol}$)のリン酸緩衝液(1.5ml、pH7.0)溶液に、ゆっくり攪拌しながら加えた。これら3つのタンパク質コンジュゲートの精製は、既に上記した手順と同じ手順で実施した。同様にB C A タンパク質アッセイで決定したこれらプロゲステロン - 4 - O V A コンジュゲート中のタンパク質量は、それぞれ 1.09mg ml^{-1} (4個の原子のリンカー)、 3.56mg ml^{-1} (11個の原子のリンカー)、および 4.12mg ml^{-1} (18個の原子のリンカー)であった。このプロゲステロン - O V A コンジュゲートの平均コンジュゲーション度、すなわちタンパク質あたりのハプテン数は、各コンジュゲートで平均4個であると概算され、これは、MALDI TOF質量分析によって直接決定された。これらプロゲステロン - O V A コンジュゲートの構造を図2に示す。

10

【 0 1 2 6 】

(実施例 2)

プロゲステロン - O V A コンジュゲートをコーティング抗原として使用した直接または競合 E L I S A

直接E L I S A によって、プロゲステロン - O V A コンジュゲートのM A b に対する結合反応性が決定された。N a H C O₃(50mM、pH9.6)中の一連の濃度のプロゲステロン - 4 - または - 7 - O V A コンジュゲートで、マクロタイターブレートを事前にコーティングした。M A b のP B S / T 溶液($5\mu\text{g ml}^{-1}$ 、各ウェル $100\mu\text{l}$)を加えた。ブレートを3時間室温で振盪し、4で終夜放置した。その後、ブレートにペルオキシダーゼで標識した抗ラットI g G 溶液を加えた。最後に、 $200\mu\text{l}$ の基質溶液を各セルに加え、30分後に $50\mu\text{l}$ の1M H₂S O₄を加えることによって酵素反応を停止した。その後、15分後に450nmでブレートを読み取り記録した。4 - および7 - プロゲステロン - O V A コンジュゲートの抗体結合曲線を図3および5に示す。

20

30

【 0 1 2 7 】

N a H C O₃(50mM、pH9.6)中のプロゲステロン - O V A コンジュゲートをコーティング抗原として($1\mu\text{g ml}^{-1}$ 、各ウェル $100\mu\text{l}$)、標準曲線を作成した(図4および6参照)。競合E L I S A では、様々な標準プロゲステロン($0.001\sim 1000\text{ng ml}^{-1}$)のP B S / T 溶液(各ウェル $100\mu\text{l}$)、およびM A b ($1\mu\text{g ml}^{-1}$)のP B S / T 溶液(各ウェル $100\mu\text{l}$)を同時にブレートに加えた。他のすべてのE L I S A 手順は、直接E L I S A と同じように実施した。

【 0 1 2 8 】

本発明者らは、異なる長さのリンカーを有し、プロゲステロン上のコンジュゲート部位が異なる(4 - または7 -)プロゲステロン - O V A コンジュゲートは、従来のE L I S A による抗体結合性能に有意な効果を及ぼさないことを見出した。

40

【 0 1 2 9 】

(実施例 3)

モノクローナル抗体(M o A b)または4 - プロゲステロン - O V A コンジュゲートを用いた、免疫金複合体の調製

(a)コロイド金粒子(G 4 0)の調製。この調製は類似の文献(Analyst、123、1998、2437 ~ 2441)に従って実施した。

【 0 1 3 0 】

(b)モノクローナル抗体 - 、または4 - プロゲステロン - O V A コンジュゲートでコーティングしたコロイド金の調製。コロイド金(G 4 0)溶液をK₂C O₃(0.02M)でpH=7.7に滴

50

定した後、激しく渦攪拌しながら、pHを調整したコロイド金の溶液(10mI)に抗体(120μg)または4-プロゲステロン-OVAコンジュゲート(60μg)溶液(0.2mI)を加えた。その後、この免疫金溶液を20%OVAのPBS溶液(0.15mI)で遮断した。2%OVAで繰り返し洗浄し、6,000rpmで遠心分離した後、この免疫金溶液を4で、0.1%NaN₃を含むホウ酸(NaB₄O₄)緩衝液(2mM、pH=7.2)中で保存した。

【0131】

(実施例4)

4-プロゲステロン-OVAコンジュゲートをコーティング抗原として使用した、またはモノクローナル抗体を試験ストリップ上に固定した、免疫クロマトグラフィーストリップ試験

10

ポリエチルの補助支持体(GL-187、G&L Precision Die Cutting, Inc.、米国)でラミネートしたニトロセルロース膜(AE100、Schleicher & Schuell、ドイツ)を切断してストリップ(4または5mm幅)にした。0.01%Tween-20水溶液で10分間遮断し、その後40で2時間乾燥させた後、このストリップを、抗プロゲステロンMAb溶液(各ストリップあたり0.5μl)、または4-プロゲステロン-OVAコンジュゲート溶液(各ストリップあたり0.5μl)のいずれかでコーティングし、このストリップを再度40で2時間乾燥させた。このストリップは終夜シリカゲルの容器内で保存した。

【0132】

(a)様々な濃度のOVA-プロゲステロンコンジュゲート溶液でコーティングしたストリップでは、マイクロウェル中の半分のストリップの処理溶媒は以下のとおりである

20

15μlの、PBS中の1%Tween-20

15μlの、PBS中の2%ポリビニルピロリジン(PVP、分子量44000)

3μlの抗体-免疫金溶液(各ストリップ0.72μgのMab)。

【0133】

(b)様々な濃度のモノクローナル抗体溶液でコーティングしたストリップでは、マイクロウェル中の処理溶媒は以下のとおりである

20μlの、PBS中の2.5%Tween-20

20μlの、PBS中の2%ポリビニルピロリジン(PVP、分子量44000)

5μlの、プロゲステロン-OVAでコーティングした免疫金(各ストリップ0.3μgのタンパク質)。

30

【0134】

上記の2つの異なる形状における抗体結合性能を、図7および図9に示す。

【0135】

(c)走査分析。ストリップを処理した後、以下の手順に従って、意図とは無関係な「Image Tool、バージョン2.00」を使用した走査分析によって図8の様々な試験ストリップの色強度を分析した

40

1. ストリップを走査ベッドの上に置いた

2. Image Toolを開き、file、acquire、TWAINを選択した

3. 設定：スケール = 36%

幅 = 3.31cm

高さ = 3.49cm

解像度 = 400

40

4. Previewを押し、終わったらScanを押した

5. カラー画像をJPGファイルとして最高解像度で保存した

6. 「Processing」および「Colour to Greyscale」を選択することによって画像を8bppの白黒画像に変換した

7. 「Analysis」および「Line Profile」を選択し、線の端が白い面上に来るよう、バンドの上に線を引いた(1つのバンドに3回繰り返し、平均値をとる)

8. 「Image Tool」により、ストリップの色強度に関するすべてのピーク高さの値を自動的に記録した。

50

【0136】

(実施例5)

モノクローナル抗体バイオセンサー表面を使用した抗体結合性能の評価

抗体溶液(HBS緩衝液中 $100\mu\text{g}/\text{ml}$)によるバイオセンサー表面の固定化は、活性化させたCM-5センサーチップに抗体を標準アミン結合させることによって調製した。4つの異なるプロゲステロン-OVAコンジュゲート[(2)-OVA、(3)-OVA、(5)-OVA、および(7)-OVA](HBS緩衝液中 $1\text{mg}/\text{ml}$ の濃度)を連続的に、検量したバイオセンサー表面上に $10\mu\text{l}/\text{分}$ で3分間流した。各コンジュゲートの結合応答(応答ユニットすなわちRU)を測定し、これを図12に示す。コンジュゲートの結合親和性の結果により、プロゲステロンの4-位のコンジュゲートが7-プロゲステロン誘導体より優れており、また長いリンカーを有するコンジュゲートが短いリンカーを有するコンジュゲートよりもはるかに優れた抗体結合を与えることが明示された。

10

【0137】

(実施例6)

プロゲステロン-OVAコンジュゲートバイオセンサー表面を使用した抗体結合性能の評価

上記3つのプロゲステロン-OVAコンジュゲート[(2)-OVA、(3)-OVAおよび(5)-OVA]バイオセンサー表面を使用して、抗体結合の研究も評価した。具体的には、6つの濃度のMoAB(0から $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)を個別に、プランクおよび固定したプロゲステロン-OVAコンジュゲートの表面上に注入した。またそれぞれのコンジュゲート表面からのデータを、プランク表面からのセンサーグラムデータから減算することによって補正した。3つの同一の検量を実施し、それぞれの抗体濃度に有意な結合応答変化はなかった。したがって、1-、2-および4-OVAの3つの検量線はMoABのそれぞれの濃度の平均結合応答により得られ、抗体濃度に対してプロットした(図13)。リンカーの長さを4個の原子から11個の原子のリンカーに増やすと、プロゲステロン-4-OVAコンジュゲートの抗体結合シグナルが30%増加した。また、このシグナルの増大は、7-コンジュゲート[(2)-OVA]に比べてプロゲステロン-4-OVAコンジュゲート[(3)-OVA]で31%向上した。

20

【0138】

(実施例7)

30

プロゲステロン-OVAコンジュゲートバイオセンサー表面を使用したSPRによる競合プロゲステロン免疫アッセイ

プロゲステロン用の競合SPR免疫アッセイの開発では、抗体を固定したバイオセンサー表面に比べてより優れた結合応答を与えるために、プロゲステロン-OVAコンジュゲートをバイオセンサー表面上に固定した。様々なプロゲステロン-OVAコンジュゲートを抗体バイオセンサー表面に使用したスクリーニング試験(図12)から、18個の原子のリンカーを有するコンジュゲート[(7)-OVA]が最も高い抗体結合シグナル(225RU)を有していた。これは、競合BIAcoreアッセイの設計における表面上のセンサープローブとして最も優れていると思われる。しかし、このコンジュゲート[(7)-OVA]はセンサー表面上に固定されず、本発明者らは、他のプロゲステロン-OVAコンジュゲート[(2)-OVA、(3)-OVAおよび(5)-OVA]のみしか、競合BIAcoreアッセイのセンサー表面上に固定できない。

40

【0139】

固定濃度のMoAB($200\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)を、HBS緩衝液中の一連の濃度の遊離プロゲステロンと混合した後、次いで、各平衡混合物中の残存抗体をプロゲステロン-OVAコンジュゲートのバイオセンサー表面上に注入し、抗体結合応答を測定した。同じ実験を5回繰り返したが、それぞれの濃度のプロゲステロンの再現性は良好であった。抗体のチップ表面への結合は、溶液中の遊離プロゲステロンの量に反比例していた。遊離プロゲステロン濃度を抗体結合の平均応答(RU)に対してプロットすることにより、3つのプロゲステロン-OVAコンジュゲートの3つの標準競合曲線が得られた(図14)。このアッセイは、0

50

から 50ng.ml^{-1} の範囲のプロゲステロン濃度で良好な感度を示した。免疫アッセイの感度は通常、検量線の勾配、すなわち単位濃度に対する応答によって決定される。したがって、[(5)-OVA]コンジュゲートは、[(2)-OVA]コンジュゲートより僅かに感度が高い[(3)-OVA]コンジュゲートより優れたアッセイ感度を示した。この結果は、SPRに基づいた免疫アッセイにおける、コンジュゲートのリンカー、およびステロイド分子のコンジュゲーション部位の効果を明示した。また、このSPRに基づいたアッセイは、0.1~ 10ng.ml^{-1} で直線的な検出範囲を示し、この範囲の R^2 値は、3つのプロゲステロン-OVAコンジュゲートすべてで0.99を超えることが見出された(図15)。このSPRに基づいた免疫アッセイは、従来のELISA技術に完全に匹敵し、はるかに迅速で簡単である。

10

【0140】

(実施例8)

長いリンカー(18個の原子)を有する4-プロゲステロン-OVAコンジュゲートを使用した免疫クロマトグラフィーストリップ試験による、乳プロゲステロン濃度の決定

本発明の長いリンカー(18個の原子)を有する4-プロゲステロン-OVAコンジュゲートを様々な膜ストリップ上にコーティングすることができる。既に調製した抗体-金コンジュゲートを1~5%のショ糖水溶液で希釈することができる。様々なコンジュゲートパッドを小さなサイズに切断し、金溶液をシートに染み込ませることによって上記の希釈した免疫金溶液(~ $10\mu\text{l}$)を各コンジュゲートパッドに施用することができる。この金コンジュゲートパッドを乾燥させ、保管する。

20

【0141】

試料パッドとして低ウィック(lower wick)材料またはガラス纖維を、終夜Tris緩衝液と水中の1~5%Tween-20とに飽和させ、使用前に乾燥した。すべての試験材料(膜、金コンジュゲートパッド、試料パッドおよび溶媒吸収パッド)を補助プレートに貼り付け、プラスチックの枠(housing)にはめ込むことができる。このすぐに使用できるストリップ試験装置は、乾燥剤一袋の存在下で小袋に密封した場合、比較的安定である。

【0142】

この迅速ラテラルフローストリップ試験は、農場の乳プロゲステロン(P_4)を測定するのにうまく応用することができる。このストリップは、従来のELISAの便利な代替法である。またこれは、ELISAに基づいた試験よりもはるかに速い(10分以下)。これは、農業者がその場で使用するのに特に適している。この試験は、ウシの妊娠診断に使用することができる(プロゲステロン< 10ng/ml では、強い色バンドによって妊娠の陰性結果を表すが、プロゲステロン> 10ng/ml では、弱い色バンドまたは色バンドが現れることによって妊娠の陽性結果を表す)。

30

【0143】

(実施例9)

伸長したリンカーを有するテストステロン-4-OVAコンジュゲートの合成

18個の原子のリンカーを有するテストステロン-4-OVAコンジュゲートの合成、およびそのOVAコンジュゲーションは、ステロイドハプテンとしてプロゲステロンを使用する代わりにテストステロンを使用して、実施例1に示す手順と同じ手順で実施する。テストステロン-4-OVAコンジュゲートを生成する方法を図16に示す。

40

【0144】

上記手順は、テストステロン、コルチコステロン、17,20-ジヒドロキシ-4-ブレグネン-3-オン、11-ヒドロキシプロゲステロン、17-ヒドロキシプロゲステロン、21-ヒドロキシプロゲステロン、19-ヒドロキシ-4-アンドロステン-3,17-ジオンおよびヒドロコルチゾンなど、プロゲステロン分子と同じA環構造を有する他のステロイドに応用することができる。

【0145】

(実施例10)

様々な長さのポリエチレンギリコール(PEG)リンカーを有するプロゲステロン-OVA

50

コンジュゲートの合成

プロゲステロン-OVAコンジュゲートは、以下のステップで示すようにポリエチレンリコール(PEG)など様々な種類のリンカーを使用して合成することもできる(図17)。

【0146】

(a)異種二官能性PEGリンカー($H_2N-PEG-CO_2H$)。アミンの1つが保護されたPEGアミン化合物は、市販のPEGジアミンをジ-tert-ブチルジカルボネートと反応させることによって調製することができる。生じたアミンの1つが保護された生成物を市販の無水ジカルボン酸と反応させ、次いでアミンの保護を外すと、長さが24個の原子であり、リンカーの端の一方にカルボキシル基を有し、他方にアミン基を有する異種二官能性PEGアミノ酸リンカーがもたらされる。

10

【0147】

(b)様々な長さのリンカーを有するプロゲステロン-PEG-OVAコンジュゲートの合成。実施例1と同じ手順によって、プロゲステロン-4-メルカプトプロピオン酸(1)を活性スクシンイミジルエステルに変換することができる。生じた活性化されたステロイド(3)を上記PEGアミノ酸リンカー($H_2N-PEG-CO_2H$)と反応させて、より長いリンカー(44個の原子長)を有するプロゲステロンPEG誘導体を形成することができる。実施例1に示したものと類似のタンパク質コンジュゲーションによって、これらプロゲステロンPEG誘導体(24個および44個の原子のリンカー)をOVAタンパク質に結合させることができる。

20

【0148】

このプロゲステロン-PEG-OVAのコンジュゲートは、単純なアミノカプロン酸鎖を有するコンジュゲート[(3)-OVA、(5)-OVAおよび(7)-OVA]に比べてはるかに優れた水溶性を有する、長いリンカーを有するタンパク質コンジュゲートを構築するのに特に適している。

【0149】

(実施例11)

サイズ排除クロマトグラフィーによる迅速免疫アッセイ

この実施例は、サイズ排除ゲルカラムクロマトグラフィーによる迅速免疫アッセイを実施する方法を記載する。固相の固定化はない。上記実施例のようにタンパク質を使用する代わりに、伸長したリンカーによってプロゲステロンを蛍光色素とコンジュゲートさせ、式Vのプロゲステロン-リンカー-ビリルビンを形成する。

30

【0150】

この迅速免疫アッセイは、以下のように実施すべきである。

【0151】

ステップ1：固定量の式Vの上記プロゲステロン-リンカー-ビリルビンのコンジュゲートと、所定量の抗プロゲステロン抗体とを、プロゲステロン濃度を決定する試料溶液とよく混合すべきである。この混合物に、免疫複合体を形成させるべきである。

30

【0152】

ステップ2：上記の混合物は素早く短いサイズ排除カラム中を通り、これを、~450nmのUV検出器を備えたHPLCでモニターする。HPLCクロマトグラムでは、2つの主要なピークが検出される。第1のピークは、そのはるかに大きい質量(>150,000)により早期に溶出される、抗体とプロゲステロン-リンカー-ビリルビンのコンジュゲートとの免疫複合体を表し、第2のピークは、はるかに低い質量(<1,000)を有し後に溶出されるプロゲステロン-リンカー-ビリルビンのコンジュゲートを表す。他の種には蛍光色素が付着していないので、クロマトグラム上に他の構成成分は表れない。

40

【0153】

第1のピークは、プロゲステロン-ビリルビンのコンジュゲートと抗体との免疫複合体の量を表す。第2のピークは、免疫複合体に結合していないプロゲステロン-ビリルビンのコンジュゲートの量を表す。

【0154】

50

与えられた試料中の遊離プロゲステロン濃度が高い場合は、限られた数の抗体がプロゲステロン - ビリルビンのコンジュゲートと形成する免疫複合体は、より少なくなる。これにより、第1のピークは第2のピークより小さくなる。対照的に、与えられた試料中の遊離プロゲステロン濃度が低い場合は、限られた抗体がプロゲステロン - ビリルビンのコンジュゲートと形成する免疫複合体は、より多くなる。これにより、第1のピークは第2のピークより大きくなる。したがって、第1のピークの面積、または第1ピークの面積と第2ピークの比は、試料プロゲステロンの濃度に反比例する。

【0155】

上記の開示を例としてのみ提供することを、当分野の技術者は理解されよう。本発明の多くの様々な変化を行うことができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0156】

【図1】伸長した長さのリンカーを有する4-プロゲステロン誘導体の合成を示す図である。

【図2】様々な長さのリンカー(4個、11個、または18個の原子のリンカー)を有する、1つの7-プロゲステロン-OVAコンジュゲート[(2)-OVA]および3つの4-プロゲステロン-OVAコンジュゲート[(3)-OVA、(5)-OVAおよび(7)-OVA]の構造を示す図である。

【図3】類似の抗体(MoAb)結合曲線を有する、4-および7-プロゲステロン-OVAコンジュゲート[(2)-OVAは下の曲線、(3)-OVAは上の曲線]のどちらもを示す図である。

【図4】抗体(MoAb)と(3)-OVAコンジュゲート(上の曲線)および(2)-OVAコンジュゲート(下の曲線)との標準曲線を示す図である。

【図5】類似の抗体(MoAb)結合性能を有する3つの4-プロゲステロン-OVAコンジュゲート[(3)-OVAは下の曲線、(5)-OVAは真中の曲線、(7)-OVAは上の曲線]を示す図である。

【図6】抗体(MoAb)と3つの4-プロゲステロン-OVAコンジュゲート[(3)-OVA、(5)-OVA、(7)-OVA]との、非常に類似した標準曲線を示す図である。

【図7】免疫金にコンジュゲートした抗体(MoAb)とラテラルフロー試験ストリップ上にコーティングした3つの4-プロゲステロン-OVAコンジュゲート[(3)-OVAは上段のストリップ、(5)-OVAは中段のストリップ、(7)-OVAは下段のストリップ]との、様々な結合性能を示す図である。

30

【図8】図7の走査計測分析(scannometric analysis)[(3)-OVAは下の曲線、(5)-OVAは真中の曲線、(7)-OVAは上の曲線]の結果を示す図である。

【図9】固定したモノクローナル抗体と、3つの4-プロゲステロン-OVAコンジュゲート[(3)-OVAは上段のストリップ、(5)-OVAは中段のストリップ、(7)-OVAは下段のストリップ]の免疫金複合体との、様々な結合性能を示す図である。

【図10】小さなハプテン用のバイオドットフロースルー免疫アッセイ形式の2ステップの設計を示す図である。

【図11】金表面に固定した抗体または本発明のハプテン-リンカー大型グループのコンジュゲートを使用した、小さなハプテン用の表面プラズモン共鳴(SPR)フロー免疫センサーの2つの設計を示す図である。

40

【図12】4つのプロゲステロン-OVAコンジュゲート[(2)-OVA、~12RU；(3)-OVA、~50RU；(5)-OVA、~150RU；(7)-OVA、~225RU]と固定したモノクローナル抗プロゲステロン抗体(MoAb)との様々な結合性能を、SPRバイオセンサーによって示す図である。

【図13】3つのプロゲステロン-OVAコンジュゲート[(2)-OVA、(3)-OVA、および(5)-OVA]を固定したバイオセンサー表面を使用した、抗体結合応答を示す図である。

【図14】3つのプロゲステロン-OVAコンジュゲート[(2)-OVA、(3)-OVA

50

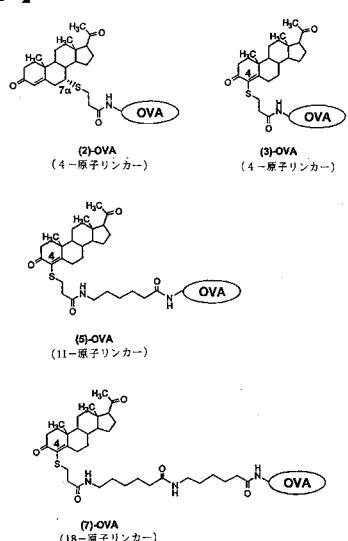
、および(5)-OVA]バイオセンサー表面を使用した、プロゲステロンの競合免疫アッセイの標準曲線を示す図である。

【図15】競合S P Rに基づいた免疫アッセイから得られたプロゲステロンの検出の直線範囲 $0.1\sim 10\text{ng.ml}^{-1}$ を示す図である。

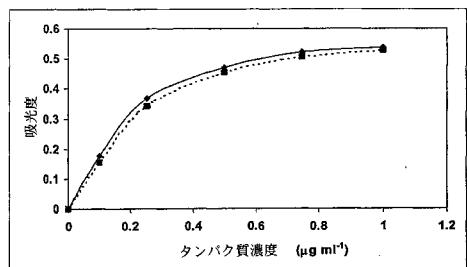
【図16】18個の原子のリンカー有するテストステロン-4-OVAコンジュゲートの生成方法を示す図である。

【図17】様々な長さのポリエチレンギリコールリンカーを有するプロゲステロン-4-OVAコンジュゲートの生成の設計を示す図である。

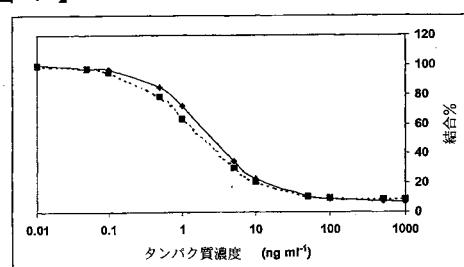
【図2】



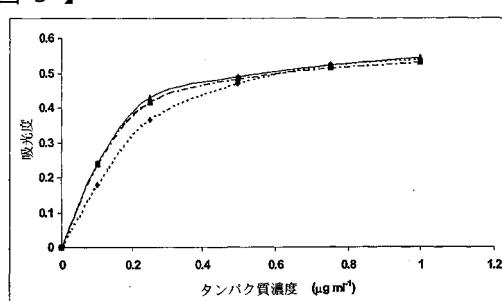
【図3】



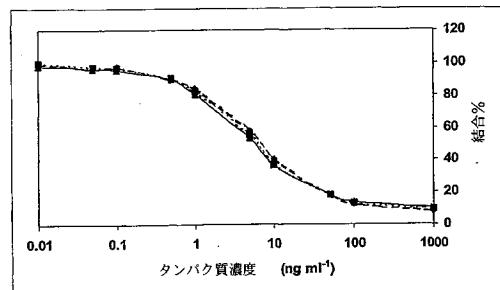
【図4】



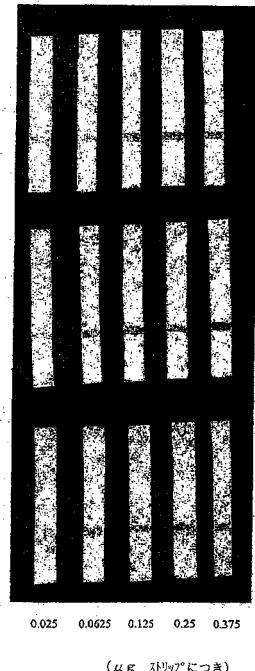
【図5】



【図6】

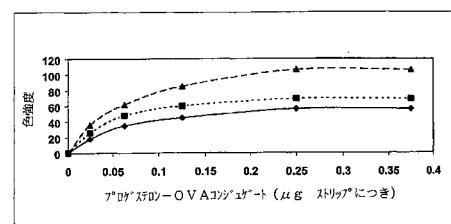


【図7】



(μg ストライピングにつき)

【図8】

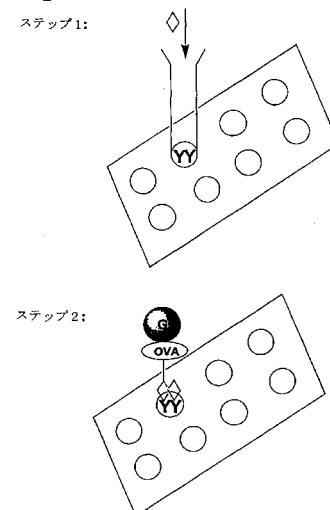


【図9】

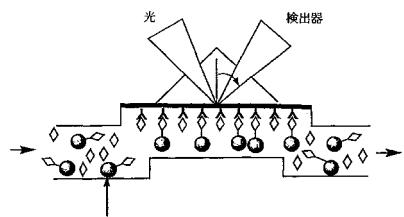


(ng ストライピングにつき)

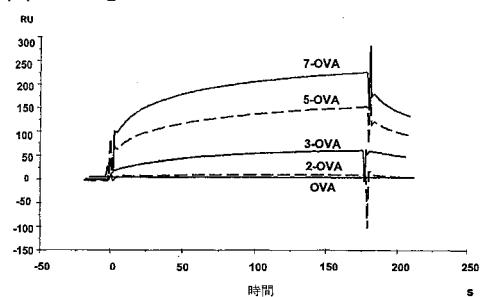
【図10】



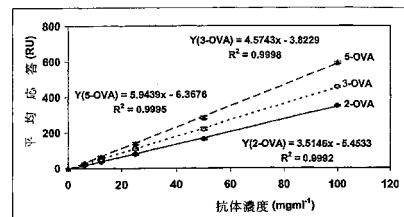
【図11】



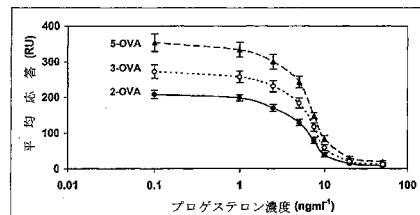
【図12】



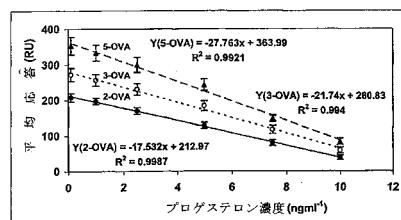
【図13】



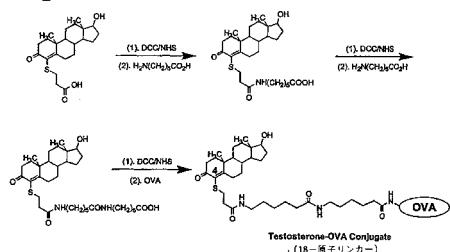
【図14】



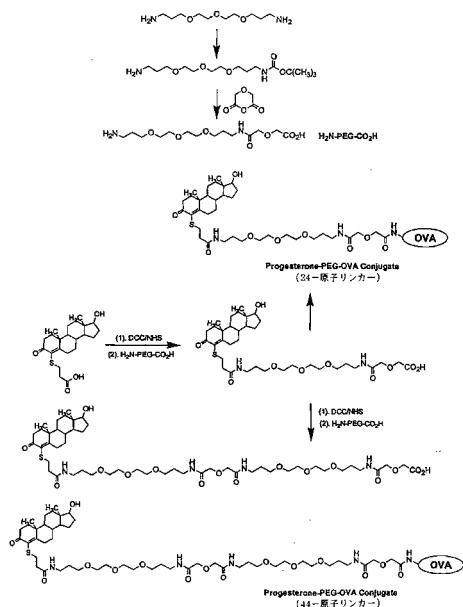
【図15】



【図16】



【図17】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/092631 A1(51) International Patent Classification: C07K 14/77,
C07J 33/00, 43/00, G01N 33/72, 33/53, 33/51(74) Agents: GRIFFITHS, Teresa, V et al.; A J Park, 6th Floor
Hudlari Parker Building, Post Office Square, PO Box 949,
Wellington 6015 (NZ).

(21) International Application Number: PCT/NZ/02/00092

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,

(22) International Filing Date: 14 May 2002 (14.05.2002)

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

(25) Filing Language: English

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, FE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,

(26) Publication Language: English

GM, IIR, IIU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

(30) Priority Data:
511705 14 May 2001 (14.05.2001) NZ

LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

(71) Applicant (for all designated States except US): THE
HORTICULTURE AND FOOD RESEARCH IN-
STITUTE OF NEW ZEALAND LIMITED [NZ/NZ];

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,

Corporate Office, Temmene Drive, Private Bag 11030,
PALMERSTON NORTH (NZ).

KE, IS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW);

(72) Inventors; and

Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM);

(75) Inventors/Applicants (for US only): COOK, Christian,
John [NZ/NZ]; 14 Seaview Avenue, Te Puri, COROMAN-

DEL (NZ); WU, Yinqiu [NZ/NZ]; 291 Cambridge Road,

Hillcrest, HAMILTON (NZ); MITCHELL, John, Stan-
ton [NZ/NZ]; 24 Basley Road, ROTORUA (NZ).European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report
with amended claimsFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

A1

WO 02/092631

(54) Title: KINETIC ASSAY

(57) Abstract: A hapten-linker-large group conjugate for use in a rapid assay, wherein the assay is kinetic-based not approaching equilibrium, the hapten-linker-large group conjugate being of the general formula: X - W - Y - Z where X is a hapten; W is an optional thioether or ether group; Y is a linker of 10 or more atoms in length; and Z is a large group of sufficient size to provide steric hindrance with respect to the binding of X to a ligand in the absence of Y. Also provided are processes for the production of the conjugates, assay methods and kits. The assays of the invention utilising conjugates of the invention [(S)-OVA] provide a better sensitivity than the same assays with conjugates with shorter linkers [(D)-OVA and D-OVA].

KINETIC ASSAY**5 FIELD OF THE INVENTION**

The present invention relates to small size haptens, more particularly to their conjugates with other large molecules as immobilised or mobile immunoreactants and their use in rapid assays, particularly immunoassays, especially for lateral flow tests or strip tests, flow 10 through formats and flow immunoassays.

BACKGROUND

Rapid lateral flow strip tests or flow immunoassays have many benefits including a user- 15 friendly format, a relatively short processing time before receiving a test result in comparison with typical ELISA assays, and long-term stability. They are also relatively inexpensive to make.

For the immunoassay of small size haptens, such as steroids or drugs, a so-called competitive 20 technique is usually required. As coating antigens, haptens are typically either coated onto a solid phase such as a strip membrane as a capture dot, or a line, to react with dye-, enzyme- or particle-conjugated antibodies; or labelled with dye, or other chromatically-active particles and used as mobile immunoreactants to form a colour dot or band an immunocomplex with immobilised antibodies on the solid phase. In both configurations, the 25 coated antigens, either immobilised on the solid phase or as mobile immunoreactants, compete with free sample antigens for a limited number of antibody binding sites. Therefore, the hapten/antibody binding capacity in the capture line is an important criteria that determines the detectable hapten concentration range and hence sensitivity of the immunoassays.

30 Because of their small size, it is impossible to adsorb small haptens directly onto a solid phase, such as strip membranes or particles, while retaining binding affinity to a hapten-specific antibody. Thus, small haptens have to be conjugated onto a protein for their immobilisation onto a solid phase. Although there are some other materials, such as a *N*-

vinylpyrrolidone copolymer (US: 5,723,344) or a nucleic acid fragment (US: 5,849,480) that can also be used as attachment intermediates, the conventional protein conjugations, or preparations of hapten-protein conjugates, are still the most widely used immobilisation techniques for small size haptens on solid phase (*Clinica Chimica Acta*, 162, 1987, 199-206).

5

It is generally accepted that the steric effect is one of the most important factors influencing the reactivity, or the binding specificity of antibodies with haptens. Some literature reports enhanced binding of the antibody covalently conjugated to the solid phase through an extended, flexible Streptavidin/Biotin "bridging" (*Immunology Letters*, 13, 1986, 313-316 and *J. Immunological Methods*, 111, 1988, 271-275), or through extended length linkers (*Bioconjugate Chem.*, 7, 1996, 88-95). The antigen capture capacity of the antibody was also increased when large protein antigens were attached to solid supports through different linkers (*J. Immunological Methods*, 55, 1982, 1-12). The concept of hapten-spacer-protein conjugates also appears in several patents. The attachment of hapten to an immunogenic carrier protein via a spacer or linker arm may improve the immune response for the preparation of antibodies (US5,776,713 and US5,843,682). Hapten labelled with different enzymes, or other tracers, using extended linkers between the hapten and the label are more readily recognised and tightly bound by antibodies to haptens, and also maintain good enzyme activities or properties of the other tracers (US5,298,403; US5,578,457 and US5,834,206). Bifunctional reagents with a linker group were also used for such purpose in the synthesis of the conjugates (US5,595,741). It was found that construction of a drug hapten-carrier protein conjugate with a linker group have its optimal recognition by the antibodies and thus have better co-therapeutic use with other conventional drugs (US5,876,727). US 5,876,727 also teaches the advantage of having a hapten displaced by a sufficient distance from a carrier or protein to allow optimal recognition of the hapten by an antibody.

Conventionally, progesterone and other similar steroid haptens with the same a ring structure have been attached to other molecules at the six and seven positions on their b ring (G. Hatzidakis, A. Stefanakis and E. Krambovitis (1993), "Comparison of Different Antibody-Conjugate Derivates for the Development of Sensitivity and Specific Progesterone Assay" *Journal of Reproduction and Fertility*, 97, pages 557-561).

WO 02/092631

PCT/NZ02/00092

3

The applicants have now surprisingly discovered that small size hapten capture capacity of a ligand can be enhanced in a relatively short-duration assay with sensitivities for many rapid assays, particularly immunoassays, such as lateral flow strip tests or flow immunosensors, not particularly suitable for conventional ELISA by the use of a linker between the hapten 5 and a large group to which the hapten is attached, such as a protein.

It is an object of the invention is to provide a rapid assay utilising a hapten-linker-large group conjugate, or at least to provide the public with a useful choice.

10 SUMMARY OF THE INVENTION

In a first aspect, the present invention provides a hapten-linker-large group conjugate for use in a rapid assay, wherein the assay is kinetic-based not approaching equilibrium, the hapten-linker-large group conjugate being of the general formula:

15 X - W - Y - Z

wherein:

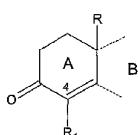
X is a hapten;

W is an optional thioether or ether group;

Y is a linker of 10 or more atoms in length; and

20 Z is a large group of sufficient size to provide steric hindrance with respect to the binding of X to a ligand in the absence of Y.

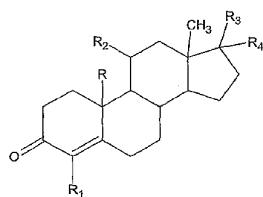
In a preferred embodiment, X is a multi-cyclic fused-ring hapten having an A-ring structure of Formula I:



25 Formula I

wherein R is selected from the group comprising H, CH₃ and CH₂OH and the broken lines indicate members of an adjacent B-ring structure, and R₁ is the attachment point for the linker Y.

In a more preferred embodiment, X is a hapten of Formula II:



Formula II

wherein:

- 5 R is selected from the group comprising: H, CH₃ and CH₂OH;
- R₁ is the attachment point for the linker Y;
- R₂ is H or OH;
- R₃ is selected from the group comprising: oxy, C₁-C₂ alkyl, hydroxy, and methylcarbonyl, which oxy, C₁-C₂ alkyl or methylcarbonyl is optionally substituted by hydroxy; and
- 10 R₄ is hydrogen or hydroxy.

In a further aspect, the present invention provides a rapid assay method wherein the assay is kinetic-based not approaching equilibrium, the assay being for detecting a hapten in a sample, comprising the steps of:

- 15 a) contacting a ligand capable of binding the hapten with a test sample;
 - b) further contacting the ligand of step a) with a hapten-linker-large group conjugate of the invention specific for the ligand; and
 - c) determining the amount of unconjugated hapten bound to the ligand.
- 20 Preferably, the second step (b) of contacting the ligand results in contacting and binding of much of the excess unbound ligand.

Preferably, the hapten-linker-large group conjugate is immobilised.

In a preferred embodiment, the mixture of step a) is flowed over the hapten-linker-large group conjugate of step b).

In a still further aspect, the present invention provides a rapid assay wherein the assay is kinetic-based not approaching equilibrium, the assay being for detecting a hapten in a sample, comprising the steps of:

- 5 a) combining hapten-linker-large group conjugate of the invention with a test sample;
- b) contacting the resultant mixture with ligand capable of binding the hapten; and
- c) determining the amount of unconjugated hapten bound to the ligand.

The ligand is preferably immobilised.

- 10 In a preferred embodiment, the step b) of contacting the resultant mixture with an immobilised ligand takes place by a flow over or flow through system

In a yet further aspect, the present invention provides a rapid assay kit, wherein the assay is kinetic-based not approaching equilibrium, the kit including at least:

- 15 a ligand which binds to a hapten; and
a hapten-linker-large group conjugate of the invention.

Preferably, the kit further includes an indicator. In one embodiment, the indicator is bound to the hapten-linker-large group conjugate. In an alternative embodiment, the indicator is
20 bound to the ligand.

Typically, kits may be flow over or flow through assay kits. A typical flow-through kit comprises a test strip.

- 25 In another aspect, the present invention provides a process for binding a hapten-linker-large group conjugate of the invention to a ligand comprising the steps of contacting the conjugate with a ligand capable of binding the hapten in the conjugate for a predetermined time where the reaction does not approach equilibrium.

- 30 The ligand is preferably immobilised. In a preferred embodiment, the ligand is preferably not bound to a hapten before being contacted by the protein-hapten conjugate.

In another aspect, the present invention provides a process for producing a hapten-linker-large group conjugate of the invention including at least the steps of:

- a) mixing an activated steroid hapten dissolved in an polar organic solvent with an aqueous solution comprising 1-10 molar equivalents of a heterobifunctional water-soluble linker;
- b) allow the mixture to react; and
- 5 c) attaching a large group to the remaining free functional linker group of the reaction hapten-linker product of step b).

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

10

While the present invention is broadly as defined above, it will be appreciated by those persons skilled in the art that it is not limited thereto but that it also includes embodiments of which the following description provides examples. In addition, a better understanding of the invention will be gained through reference to the accompanying drawings in which:

15

FIGURE 1 shows the synthesis of 4-progesterone derivatives with extended length linkers.

FIGURE 2 shows the structures of one 7α -progesterone-OVA conjugate [(2)-OVA] and three 4-progesterone-OVA conjugates [(3)-OVA, (5)-OVA and (7)-OVA] with various 20 length linkers (4-, 11-, or 18-atom linker).

FIGURE 3 shows both 4- and 7α -progesterone-OVA conjugates [(2)-OVA, lower curve and (3)-OVA, upper curve] having similar antibody (MoAb) binding curves.

25

FIGURE 4 shows standard curves of antibody (MoAb) with (3)-OVA conjugate (upper curve) and (2)-OVA conjugate (lower curve).

FIGURE 5 shows three 4-progesterone-OVA conjugates [(3)-OVA, lower curve; (5)-OVA, middle curve; (7)-OVA, upper curve] having similar antibody (MoAb) binding performance.

30

FIGURE 6 shows very similar standard curves of antibody (MoAb) with three 4-progesterone-OVA conjugates [(3)-OVA, (5)-OVA, and (7)-OVA].

FIGURE 7 shows different binding performance of immunogold conjugated antibody (MoAb) with three coated 4-progesterone-OVA conjugates [(3)-OVA, upper strips; (5)-OVA, middle strips; (7)-OVA, lower strips] on lateral flow test strip.

5 FIGURE 8 shows the results of scannometric analysis [(3)-OVA, lower curve; (5)-OVA, middle curve; (7)-OVA, upper curve] of FIGURE 7.

FIGURE 9 shows different binding performance of three immunogold complexes with 4-progesterone-OVA conjugates [(3)-OVA, upper strips; (5)-OVA, middle strips; (7)-OVA, 10 lower strips] with immobilised monoclonal antibodies.

FIGURE 10 shows a design of two-steps of a bio-dot flow through immunoassay format for small haptens.

15 FIGURE 11 shows two designs of a Surface Plasmon Resonance (SPR) flow immunosensor for small haptens using an immobilised antibody or a hapten-linker-large group conjugate of the invention onto the gold surface.

FIGURE 12 shows different binding performance of four progesterone-OVA conjugates 20 [(2)-OVA, ~12 RU; (3)-OVA, ~50 RU; (5)-OVA, ~150 RU; (7)-OVA, ~225 RU] with immobilised monoclonal anti-progesterone antibody (MoAb) by SPR biosensor.

FIGURE 13 shows antibody binding responses using three progesterone-OVA conjugates [25 (2)-OVA, (3)-OVA and (5)-OVA] immobilised biosensor surfaces.

FIGURE 14 shows standard curves of competitive immunoassay of progesterone using three 30 progesterone-OVA conjugates [(2)-OVA, (3)-OVA and (5)-OVA] biosensor surfaces.

FIGURE 15 shows linear ranges of detection of progesterone obtained between 0.1 and 10 ng.ml⁻¹ from the competitive SPR-based immunoassay.

FIGURE 16 depicts a process for the production of a testosterone-4-OVA conjugate with an 18-atom linker.

FIGURE 17 depicts a design of synthesis of progesterone-4-OVA conjugates with various lengths of polyethylene glycol linkers.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5

In the present disclosure, a "rapid assay" is characterised by the assay components, when mixed, having a reaction that does not require it to approach a state of equilibrium before a meaningful result may be obtained from the assay. The invention is particularly suited to a rapid assay where the assay component reactions do not approach equilibrium during the 10 period that the assay is run. Such rapid assays are non-equilibrium, kinetic-based assays. Typically, the assay should take less than 20 minutes to perform, more suitably less than 10 minutes.

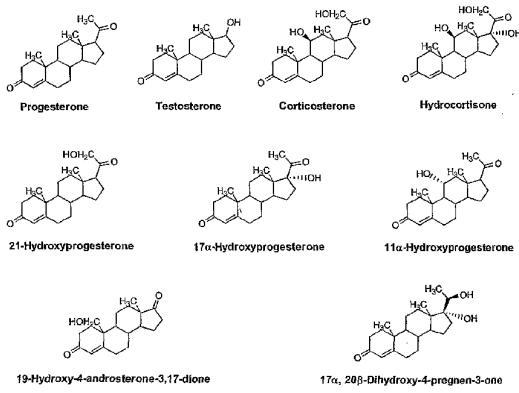
A "large group" is a group of sufficient size to cause significant steric hindrance with respect 15 to the binding of an attached hapten to a ligand when a linker of less than 10 atoms in length is interposed between the ligand and the hapten. Typically, in the present invention, a large group is a protein or polypeptide. Alternatively, the large group is an indicator, such as a fluorescent dye, for example bilirubin.

20 In one embodiment, the large group of the conjugate is a protein. The protein is any readily available protein, which is preferably inexpensive and which contains large numbers of lysine for hapten conjugations. Examples of suitable proteins in the art include bovine serum albumin (BSA), ovalbumin (OVA) or keyhole limpet hemocyanin (KLH). Proteins may include enzymes, secretory proteins, globular proteins. A preferred protein for use herein is 25 ovalbumin (OVA). Where the protein is an enzyme, it is preferred that it be selected from the group comprising alkaline phosphatase, glucose oxidase, horseradish peroxidase and amine-enriched horseradish peroxidase.

A "hapten" is a molecule selected for detection. Most usually, the hapten is a low molecular 30 weight organic compound that reacts specifically with an antibody and which is incapable of eliciting an immune response by itself but is immunogenic when complexed with an antigenic carrier. Haptens of interest here are selected from the group comprising carbohydrates, polynucleotides, steroids, steroid analogues, polypeptides (such as peptide hormones), drugs and toxins, but are not limited thereto.

Where the hapten is a steroid, such as progesterone or a molecule having an A-ring structure similar to progesterone, it is preferred that binding of the hapten occurs at the 4-position of the A-ring structure. It has been discovered that the protein conjugation site of the steroid 5 progesterone at the C-4 position has good assay sensitivities. Previously, the literature has examined most of the common conjugation sites (3, 6 β , 7 α and 11 α positions) of the progesterone molecule to proteins, and the most highly sensitive EIA assay results were only obtained by using either 6 β or 7 α positions of the steroid (*Journal of Reproduction and Fertility*, 97, 1993, 557-561). The 4-progesterone derivatives are simpler to synthesise and 10 have no stereoisomeric difficulties compared with 6 β or 7 α analogues. This makes the 4-position of progesterone, or the 4-position of other steroids having the same A-ring structure as progesterone, an excellent alternative protein conjugation site for the 6 β or 7 α position. However, use of the other binding sites is not excluded.

- 15 In a preferred embodiment, the hapten is selected from the group comprising:



Most preferably, the hapten is progesterone.

As used herein, a "ligand" may be any molecule that has binding capacity for an antigen. It is preferably an immunoglobulin molecule capable of specific binding to a target. Such antigen targets comprise haptens as discussed above. Ligands encompass not only intact antibodies, but also fragments thereof such as Fab, (Fab)₂, Fv, single chain (ScFv), mutants thereof, fusion proteins comprising an antibody portion, and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site of the required specificity. In an alternative embodiment, the ligand may be a T-cell receptor.

The linkers preferably comprise a chain of between 10 and 50 atoms in length, more 10 preferably 11 to 24 atoms in length, most preferably 11 to 18 atoms in length. Any suitable linker known in the art may be employed. Linkers should be non-bulky groups proximal the hapten to ensure minimal steric hindrance wrt binding of hapten to ligand. It is also preferred that the chain be carbon-based. The carbon-based chain may also comprise one or more heteroatoms selected from N, S, O. Other side chain substituent groups may also be 15 provided.

Preferred chains are selected from the group comprising an amino acid chain, a polyethylene glycol chain, alkyl, alkenyl, nucleic acid, and polysaccharide. Heteroatoms may be part of an amino group. The chain can have one or more sites of unsaturation, preferably 3 or less. 20 Amino acid fragments may be incorporated into the chain. Multiple amino-acid fragments may be provided by homologation. The use of hybrid peptide-nucleic acid fragments as linkers is also contemplated.

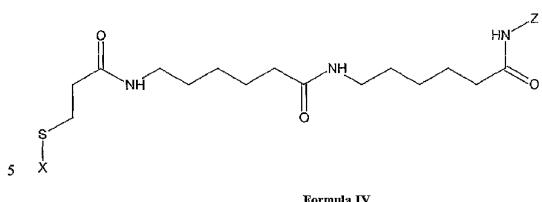
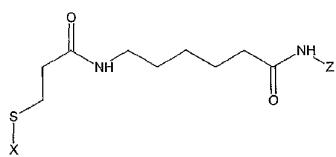
The inventors have discovered that an optimal length of linker for reducing steric hindrance 25 is about 18 atoms. Thereafter, minimal gains in performance are made but complications are introduced by assembly of longer linkers. Obviously, linkers longer than 18 atoms may be employed in the practice of the present invention, but they are not preferred.

In a preferred embodiment, the conjugate of the invention is represented by Formula III or by 30 Formula IV,

WO 02/092631

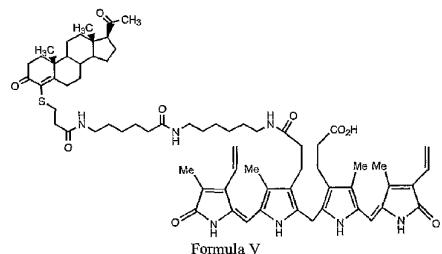
PCT/NZ02/00092

11



wherein X and Z are as defined above.

10 In one embodiment, the conjugate of the invention is:



15 In another embodiment, preferred conjugates of the invention are (5)-OVA and (7)-OVA as depicted in FIGURE 2.

The linker may be attached to the hapten and protein by any means known in the art. Preferred methods include by a covalent coupling reaction (e.g. to an amine, a carboxyl or sulfhydryl group on the protein), nucleic acid hybridisation, or ligand interaction.

- 5 In order to covalently bind steroids to linking groups, it is often necessary to include a thioether or ether bridging group, preferably a thioether group.

When a solid phase is required, the ligands or the hapten-linker-large group conjugates can be immobilised onto a solid phase. It is preferred that the amount of ligand and the hapten-linker-large group conjugate be predetermined. It is also preferred that there be an excess of protein-conjugate compared with ligands.

Both the ligand and the hapten-linker-large group conjugate can further comprise an indicator suitable for use in a detection system to enable rapid detection of the conjugate for 15 qualitative or quantitative analysis of the hapten.

Many detection systems suitable for use in the present invention exist in the art. One having ordinary skill in the arts can detect protein binding using well-known methods. Various immunoassay procedures are described in *Immunoassays for the 80's*, A. Voller, *et al.*, Eds., 20 University Park, 1981. These include enzyme detection systems, dyes (such as fluorescent markers, and chromatic ions and complexes) and metal or non-metal colour particles (such as immunogold and coloured latex beads), and incorporated radioactive isotopes (detectable by, for example, scintillation counting).

25 In a preferred embodiment, immunogold particles are used because they are inexpensive and relatively stable. Suitable enzymes which may be used to detect to be label the antibody include, but are not limited to, staphylococcal nuclease, delta-5-steroid isomerase, yeast alcohol dehydrogenase, alpha-glycerophosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase, beta-30 galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucoamylase and acetylcholinesterase.

By radioactively labelling the antibody, it is possible to detect it through the use of a radioimmunoassay (RIA) (see, for example, Work, T. S., *et al.*, Laboratory Techniques and

Biochemistry in Molecular Biology, North Holland Publishing Company, N.Y., 1978). The radioactive isotope can be detected by such means as the use of a gamma counter or a scintillation counter or by autoradiography. Isotopes which are particularly useful for the purpose of the present invention are: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I and ^{131}I .

5

Fluorescent labels fall within the scope of the present invention. When a fluorescent-labelled antibody is exposed to light of the proper wavelength, its presence can then be detected due to fluorescence. Among the most commonly used fluorescent labelling compounds are fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, o-phthaldehyde, fluorescamine and bilirubin.

10 The antibody can also be detectably labelled using fluorescence-emitting metals such as ^{152}Eu , or others of the lanthanide series. These metals can be attached to the specific antibody using such metal chelating groups as diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

15 The antibody also can be detectably labelled by coupling to a chemiluminescent compound. The presence of the chemiluminescently labelled antibody is then determined by detecting the presence of luminescence that arises during the course of a chemical reaction. Examples 20 of particularly useful chemiluminescent labelling compounds are luminol, isoluminol, theromatic acridinium ester, imidazole, acridinium salt and oxalate ester.

Likewise, a bioluminescent compound may be used to label the antibody. Bioluminescence 25 is a type of chemiluminescence found in biological systems in which a catalytic protein increases the efficiency of the chemiluminescent reaction. The presence of a bioluminescent protein is determined by detecting the presence of luminescence. Important bioluminescent compounds for purposes of labelling are luciferin, luciferase and aequorin.

Detection of an antibody may be accomplished by a scintillation counter, for example, if the 30 detectable label is a radioactive gamma emitter, or by a fluorometer, for example, if the label is a fluorescent material.

In the case of an enzyme label, the detection can be accomplished by colorimetric methods, which employ a substrate for the enzyme. Detection may also be accomplished by visual

comparison of the extent of enzymatic reaction of a substrate in comparison with similarly prepared standards.

- The binding activity of an antibody may be determined according to well-known methods.
- 5 Those skilled in the art will be able to determine operative and optimal assay conditions for each determination by employing routine experimentation. The methods contemplated for the present invention are kinetic-based. Equilibrium-based systems are not contemplated for the purposes of this invention.
- 10 Positive control assays may be performed in which no test compound is added.

In one embodiment, the hapten-linker-large group conjugate is as depicted in FIGURE 2.

The conjugates of the invention are suitable for use in many different rapid immunoassays.

- 15 In a further aspect, the invention therefore provides a process for binding a conjugate of the invention to a ligand specific for the hapten in the conjugate. This binding step is generally conducted in the surface of the solid phase in a rapid flow over or flow through mode.
- 20 Where a solid phase is used either the ligand or the hapten-linker-large group conjugate can be immobilised. Preferably, the hapten-linker-large group conjugate is immobilised on a solid support. Solid supports which can be used within the scope of the present invention comprise primarily insoluble, polymeric materials, selected from the group consisting of polystyrene, polypropylene, polyester, polyacrylonitrile, polyvinyl chloride, polyvinylidene,
- 25 polysulfone, polyacrylamide, cellulose, cellulose nitrate, cross-linked dextrans, fluorinated resins, agarose, crosslinked agarose, and polysaccharides but are not limited thereto.

- In addition, however, other materials are also conceivable for use, such as glass, glass fibres, glass beads, metal, nylon mesh material, nylon membranes, metal, metal strips and metal beads. Preferred solid supports are selected from membranes, beads, microplate solid supports, test tubes, microtitre plates, dipssticks, lateral flow devices, resins, PVC, latex beads and nitrocellulose. The nature of the carrier can be either soluble to some extent or insoluble for the purposes of the present invention. The support configuration may be spherical, as in a bead, or cylindrical, as in the inside surface of a test tube, or the external surface of a rod.

Alternatively, the surface may be flat such as a sheet, test strip, etc. Those skilled in the art will know many other suitable carriers for binding antibody or antigen, or will be able to ascertain the same by use of routine experimentation.

- 5 The solid surface is more preferably a membrane.

Where the support is a metal, it is preferred that it be a metal suitable for use as a biosensor surface, such as gold or platinum.

- 10 Immobilisation on the solid support may be by passive adsorption, covalent coupling or via a ligand interaction, such as an avidin/biotin complex (for example, U.S. 4,467,031 Galati et al.).

The applicant has unexpectedly found that these hapten-linker-large group conjugates with
15 longer linkers have a considerable advantage over conventional hapten-linker-large group conjugates in rapid assays. This is particularly surprising, as the performance of the conjugate is comparable with conventional conjugates when used in competitive ELISA-type assays.

- 20 Without wishing to be bound by theory, it is proposed that low sensitivities with conventional protein-hapten conjugates in rapid immunoassays may be due to steric hindrance when forming immunocomplexes with immobilised antibody. Therefore, to increase sensitivities of rapid assays, a system that minimises steric hindrance to binding rates appears to be necessary. The hapten-linker-large group conjugates of the present
25 invention appear to achieve this end.

Without wishing to be bound by theory, the inventors proposed that the enhanced kinetics of the hapten antibody binding demonstrated in the examples of the present invention is facilitated by two key elements of the specific embodiments presented therein:

- 30 1. Binding of the linker to the 4-position of the steroid A ring; and
2. The length of the linker such that the hapten and the protein are not sterically constrained with respect to one another allowing rapid recognition and binding of the hapten by the ligand. It is believed that the hapten and the protein are

afforded freedom of movement relative to one another thereby allowing rapid recognition of the binding of the hapten by the ligand.

The inventors investigated other conjugation sites besides 6β - and 7α and in progesterone for immunoassays. The C-4 position of the progesterone was found by the inventors to be an excellent alternative conjugation site to the 6β -position of progesterone. Both progesterone-4-OVA (1-OVA) and progesterone- 7α -OVA conjugates (2-OVA) have similar antibody-binding performance in ELISA. The progesterone-4-OVA conjugate surprisingly demonstrates better antibody binding than the progesterone- 7α -OVA conjugate in kinetic-based immunoassays, such as SPR. However, compared with 6β - or 7α -progesterone derivatives, the synthesis of progesterone derivatives at C-4 position is simpler, and there is no stereoisomer problem, since the 4,5-double bond of the steroid provides only one progesterone derivative stereoisomer at the C-4 position.

Recently, it has been found that the antibody-binding signal increases with longer distances between the capture antibody and alkaline phosphatase label or the microparticle, by using extended length heterobifunctional linkers. This enhancement is regarded as a result of the increasing distance between the two entities in a general bioconjugate. The inventors have discovered that the length of linkers (4-, 11- or 18-atoms long) in the progesterone-4-OVA conjugates has no significant effect on their antibody binding performance when used as coating antigens in ELISA. The conjugates with a long linker (4- and 6-OVA) were even slightly worse than the OVA-conjugate with a short linker (1-OVA) for a short time(20 min) antibody-binding experiment. Therefore, three progesterone-4-OVA conjugates with different length linkers (4-18 atoms) have the same assay sensitivities of progesterone in ELISA.

Previous studies have shown that signal enhancement was not always proportional to the length of the linker. For example, the signal increased 64% when the length of linker was incremented from 9 atoms to 23 atoms and 82% for a 30-atom long linker in an enzyme-antibody conjugate. However, the same enzyme-antibody conjugate with a 16-atom linker had slightly better antibody-binding performance than the conjugate with a longer linker (23-atoms). These results suggest that for signal enhancement, the ideal length of the linker between the antibody and the other entity depends on the size of two entities involved and the way in which the bioconjugate is formed. In the prior art the bioconjugates were

constructed between two large entities, ie an antibody and an enzyme or a microparticle. A linker was used only for antibody-labelling purposes, which was not directly involved in the same side of the binding-site of antibody-antigen. However, progesterone-OVA conjugates here are quite different. These were constructed with a large protein (OVA) and a very small entity ie a progesterone molecule (MW 314). A linker is also directly involved in the binding site of the antibody/antigen. Therefore, it is likely that the effect of length of the linker on antibody-binding performance was different from early reported studies because the bio-conjugates were formed by two different sized entities and constructed in different ways. The inventors have discovered that the length of the linker also affects antibody binding in different assay formats, particularly rapid assays.

A number of different assay types have been found to be useful in the practice of the invention. These include the test strip assays, dot-blot assays described herein (also known as the dot test or the dot immuno-binding assay), flow immunosensors such as SPR biosensor.

It is also preferred that immunoassays of the present invention take less than 20 minutes, more preferably less than 10 minutes, most preferably less than 5 minutes to complete.

20 In preferred test strip immunoassays, a predetermined amount of hapten-linker-large group conjugate with a long linker is immobilised onto a portion of a solid support to immobilise it. The solid support is generally cellulose-based membrane or at least a support, which allows for capillary migration of water-based solvents to occur. A test sample is applied to the membrane support and mixed with labelled antibody and rapidly migrated towards the capture line, which was immobilised by hapten-linker-large group conjugate. After binding with free sample haptens the excess antibodies form a colour band with the hapten-linker-large group conjugate at the capture line. The amount of labelled antibody as ligand is quantitatively or qualitatively determined by the colour intensities of the capture line. The less the labelled antibody ligand is bound to the hapten-linker-large group conjugate of the invention, the greater the amount of hapten is in the test sample.

Other test strips may also be formulated. In one embodiment, a test sample is mixed with labelled protein-hapten conjugate of the invention. Both labelled hapten-linker-large group conjugate and the free hapten migrated together towards the capture line to compete for

binding sites on immobilised antibody ligands. The colour intensities, or the amount of the hapten-linker-large group conjugate, are inversely proportional to the amount of hapten in the test sample.

- 5 While any of the labels discussed above may be employed, it is preferred that the labelled conjugate be visible to the naked eye. Accordingly, a visible dye is a preferred label.

In both above strip assays, a protein conjugate of the invention has much better antibody binding in the capture line of the strip than a conjugate with a short linker. Therefore, the 10 conjugate with a long linker can detect relatively lower antibody concentration in the capture line, thus increasing the sensitivity of the rapid strip assay.

Another embodiment of the invention provides a bio-dot flow-through immunoassay. In such an immunoassay, ligand such as antibody is immobilised on the membrane first. After 15 sample hapten flow through the membrane through a microfiltration apparatus, the marked hapten-linker-large group conjugate of the invention react with remained antibodies to form a coloured dot on the membrane. The colour intensities of the dot, or the amount of the hapten-linker-large group conjugate, are also inversely proportional to the amount of hapten in the test sample.

20 Surface plasmon resonance (SPR) biosensor technology is a very useful tool for characterisation of antibody-hapten interactions. It can also be designed for a rapid immunoassay of small sized haptens. Either the hapten-linker-large group conjugate or a ligand used in SPR is usually covalently immobilised on the biosensor surface. A mixture of 25 free sample hapten (analyte) and antibody ligand, or hapten-linker-large group conjugates, passes over the biosensor surface most usually through a microfluidic flow cell to compete for a limited number of antibody binding sites on the biosensor surface. SPR detectors monitor the change in the refractive index of the solvent layer near the surface induced by association and dissociation of the hapten-antibody complex formation. The sensitivity of 30 SPR detectors is dependent on the refractive index of the antibody-hapten complexes on the sensor surface, which is proportional to their molecular mass. Thus, the binding of the antibody with a hapten-linker-large group conjugate gives much higher SPR response on the refractive index due to its large molecular mass of proteins than the refractive index response by antibody binding with a small size hapten.

Hapten-linker-large group conjugates of the invention demonstrate advantages in all assays tested. When the hapten-linker-large group conjugates are used as coated antigens on a solid support, immunogold conjugated antibodies can detect the hapten-linker-large group conjugate in a lower concentration for the coated conjugate with a longer linker. While for the immobilisation of antibodies, a conjugate with a longer linker also has a lower concentration detection limit of the antibody.

In strip assays, both assay configurations enhance the sensitivities of the immunochemical strip tests. Based on these new hapten-linker-large group conjugates with a longer linker, a highly sensitive immunochemical strip assay format has been developed, which can detect the small haptens at a lower concentration (< 10 ng/ml) in a relatively short time. The hapten-linker-large group conjugate with a long linker of the invention is particularly useful for the strip assay when the test sample such as milk containing high content of fat, which strongly inhibits the antibody/hapten binding. Using the progesterone-OVA conjugate of the invention the lowest detection limit (LDL) of progesterone in milk is ~ 10 ng/ml as judged by visual inspection, which has a lower LDL than the literature value of 30 ng/ml (*Acta Chemica Scandinavica*, 50, 1996, 141-145). In this literature, the strip assay has to use accurate, freshly gold-labelled progesterone-OVA conjugate for every strip assay.

For the rapid SPR (BIAcore) assay, the hapten-linker-large group conjugate with a long linker (18-atoms) gave a much better antibody binding performance (225 Response Units) than the conjugate having a short linker (4-atoms) (only 50 Response Units). The conjugate at 4-position of the progesterone molecule is also shown better antibody binding (50 Response Units) compared with the conjugate at the 7 α -position of the progesterone which has the exactly same length linker (4-atoms) (only 12 Response Units).

The invention therefore also extends to test strips, kits with test strips and hapten-linker-large group conjugate reactants.

Kits of the invention comprise a solid support with immobilised ligand as described above, and a vial or container comprising labelled hapten-linker-large group conjugate of the invention.

- 5 In a still further kit embodiment, a kit comprises a solid support with immobilised hapten-linker-large group conjugate of the invention and a vial or container comprising labelled ligand to the hapten-linker-large group conjugate.

In another kit embodiment of the invention, the kit may comprise a solid support with
10 immobilised ligand as described above and a vial or container comprising a conversion kit
for converting a hapten to a hapten-linker-large group conjugate of the present invention.

Most usually, the kit also comprises a solvent, preferably an aqueous solvent, for migrating a
test sample and the labelled conjugate over the solid support. Where the labelled conjugate
15 is not visible to the naked eye, means may be provided in the kit for detecting the presence of
the labelled conjugate. The kits would also usually comprise applicators, preferably for
delivering a predetermined volume of sample and/or conjugate and/or ligand to the solid
support.

- 20 The hapten-linker-large group conjugates of the present invention may be produced by:
1. binding a hapten to a linker as defined above. Preferably, the binding is through
chemically covalent coupling reaction; or it may be by nucleic acid hybridisation where
the linker is a nucleic acid.
2. binding the free end of the linker to a large group, such as a protein. Known processes
25 for binding linkers to proteins may be selected from the standard reference
*(Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, Edited by
Mohammed Aslam and Alastair Dent)*

Alternatively, it is possible to first bind the linker to the protein and then to the hapten by the
30 same processes.

A process for producing a hapten-linker-large group conjugate of the invention is provided,
including at least the steps of:

- d) mixing an activated steroid hapten dissolved in an polar organic solvent with an aqueous solution comprising 1-10 molar equivalents of a heterobifunctional water-soluble linker;
 - e) allow the mixture to react; and
- 5 f) attach a large group to the remaining free functional linker group of the reaction hapten-linker product of step b).

The process may optionally include an isolation step between steps b) and c) for isolating the hapten-linker product.

10

Preferably, the final mixture has an aqueous content of between 2 and 30%, more preferably between 5 and 15%, most preferably 10%.

Step b) reaction time is preferably in the order of up to 24 hours, more preferably, less than
15 12 hours, most preferably 3 hours. The reaction in b) generally takes place at room temperature. In a preferred embodiment, the reaction in b) takes place at substantially neutral pH.

Preferably, the aqueous solution of step a) comprises 2-5 molar equivalents of a
20 heterobifunctional water-soluble linker.

In one embodiment, the activated steroid is an active ester of the steroid. In a most preferred embodiment, it is a succinamide ester of the steroid.

25 Preferably, the heterobifunctional linker has two different functional groups selected from the group comprising: carboxyl, amino, thiol, hydroxy, aldehyde and reactive halide. In a preferred embodiment, the heterobifunctional groups are carboxyl and amino.

Any non-reactive polar organic solvent may be used in the reaction. The polar organic
30 solvent may be conveniently selected from DMF, DMSO, acetone and THF.

INDUSTRIAL APPLICATION

Thus in accordance with the present invention, there are provided assays for detecting haptens in a test sample. The conjugates are particular useful where the haptens are in low concentrations and/or containing high content fat in test samples that conventional immunoassays do not sufficiently or can not rapidly detect them. The assays are particularly useful when formulated for *in situ* testing. One such commercial application is for rapid, on-site detection of milk progesterone at low levels in cattle, which can be used for pregnancy diagnosis and oestrus detection of the cattle.

10

The invention will now be illustrated with reference to the following non-limiting examples:

EXAMPLE 1

15 Synthesis of four progesterone-OVA conjugates with various length linkers.

(a). *Progesterone 4-mercaptopropionic acid (1) - and 7 α -mercaptopropionic acid (not shown).* These Compounds were prepared according to a literature procedure (*Steroids*, 53, 1989, 727-738) for the preparation of 11 α -hydroxyprogesterone 4- and 7 α -mercaptopropionic acids.

(b). *Succinimidyl progesterone 4-mercaptopropionates (3).* To a 3 ml dry DMF solution of progesterone 4-mercaptopropionic acid 1 (434.8 mg, 1.04 mmol) a solution of dicyclohexylidene (235.7 mg, 1.14 mmol) in 1.0 ml of DMF was added, followed by *N*-hydroxysuccinimide (131.5 mg, 1.14 mmol) in 1.0 ml of DMF. The solution was stirred at room temperature overnight. Pure product (3) was obtained after flash column chromatography.

(c). *Synthesis of succinimidyl progesterone 4-mercaptopropionates (5).* Progesterone 4-succinimidyl ester 3 (300 mg, 0.58 mmol) was dissolved in 4 ml of dry DMF. To this solution was added ϵ -6-aminocaproic acid (229 mg, 0.91 mmol) in 0.3 ml of deionised water, and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. After purification, the reaction gave a white solid product 4 (63.6% yield) as a single spot on a TLC plate, which

was used for the preparation of its succinimidyl ester **5** directly without any further purification. Compound **5** was prepared in a manner analogous to the preparation of **3**.

(d). *Synthesis of succinimidyl progesterone 4-mercaptopropionates (7).* Compound **6** was prepared in a similar manner to the preparation of **4** from **3**. With compound **5** (157.6 mg, 0.25 mmol) and e-6-aminocaproic acid (98.7 mg, 0.39 mmol) as starting material, compound **6** (57% yield) was obtained after column flash chromatography. Compound **7** was also prepared in a manner analogous to the preparation of **5**. With compound **6** (92.1 mg, 0.14 mmol) as starting material, product **7** was obtained as a clear, colorless oil after column flash chromatography. All the above synthesized progesterone derivatives (**1** ~ **7**) were confirmed by ES-MS and NMR analysis.

(e). *Protein conjugations.* A series of progesterone-ovalbumin conjugates were prepared from either progesterone free acids (including **1**), or the isolated progesterone succinimidyl esters (**3**, **5** and **7**) as follows:

To a solution of compound **1** (29.5 mg, 0.07 mmol) in DMF (0.5 ml) were added dicyclohexylcarbodiimide (16.02 mg, 0.078 mmol) in 0.1 ml of DMF and *N*-hydroxysuccinimidate (8.94 mg, 0.078 mmol) in 0.1 ml of DMF. The solution was stirred at room temperature for 90 min, after which time the solution was added to a solution of OVA (63.5 mg, 0.0014 mmol) in phosphate buffer (7 ml, pH, 7.0). The conjugation reaction was left stirring at 4 °C overnight. The samples were then dialyzed against aqueous NaHCO₃, deionised water, and PBS/T. After further purification with a PD-10 column, the amount of protein in these purified samples, as determined by the BCA assay, was found to be 4.11 mg ml⁻¹ for progesterone-4-OVA, and 4.02 mg ml⁻¹ for progesterone-7α-OVA, respectively.

The isolated, pure progesterone succinimidyl esters (**3**, **5**, and **7**) were also used for the protein conjugations directly. A solution of 0.019 mmol of progesterone active ester (**3**, **5** or **7**) in 0.2 ml of DMF or DMSO was slowly added to a solution of ovalbumin (17.1 mg, 0.38 × 10⁻³ mmol) in phosphate buffer (1.5 ml, pH, 7.0) while stirring. The purification of these three protein conjugates was performed in the same procedure as previously described above. The amount of protein in these progesterone-4-OVA conjugates, as determined also by the BCA protein assay, was found to be 1.09 mg ml⁻¹ (4 atoms linker), 3.56 mg ml⁻¹ (11

atoms linker), and 4.12 mg ml⁻¹ (18 atoms linker) respectively. The average conjugation degrees for the progesterone-OVA conjugates, or the hapten numbers per protein, are estimated to be four on average for each conjugate, which were directly determined by MALDI TOF mass spectrometry. The structures of these progesterone-OVA conjugates are
5 shown in FIGURE. 2.

EXAMPLE 2

Direct or competitive ELISA using progesterone-OVA conjugates as coating antigens.

10 A direct ELISA determined the binding reactivity of progesterone-OVA conjugates to MAb. The microtitre plates were pre-coated with progesterone-4- or -7 α -OVA conjugates in a series of concentrations in NaHCO₃ (50 mM, pH 9.6). MAb solution in PBS/T (5 µg ml⁻¹, 100 µl per well) was added. The plates were shaken for 3 hours at room temperature and left
15 at 4 °C overnight. The plates were then added peroxidase-labeled anti-rat IgG solution. Finally, 200 µl of substrate solution were added into each cell, and the enzymatic reaction was stopped after 30 min by addition of 50 µl of 1 M H₂SO₄. The plates were then read and recorded at 450 nm after 15 minutes. The antibody binding curves for both 4-and 7 α -progesterone-OVA conjugates are shown in FIGURE 3 and 5.

20 Standard curves (see FIGURE 4 and 6) were produced using progesterone-OVA conjugates in NaHCO₃ (50 mM, pH 9.6) as coating antigens (1 µg ml⁻¹, 100 µl per well). Various standard progesterone solutions (0.001 ~ 1000 ng ml⁻¹) in PBS/T (100 µl per well) and MAb solution (1 µg ml⁻¹) in PBS/T (100 µl per well) were added to the plates at the same time for
25 competitive ELISA. All the other ELISA procedure was performed in the same fashion as that for the direct ELISA.

It has been found by the inventors that the progesterone-OVA conjugates with different length linkers and different conjugating positions (4- or 7 α) on progesterone have no
30 significant effect on the antibody binding performance by conventional ELISA.

EXAMPLE 3

Preparation of immunogold complexes with monoclonal antibody (MoAb), or with 4-progesterone-OVA conjugates.

- 5 (a). *Preparation of colloidal gold particles (G40).* The preparation was performed according to a similar literature (*Analyst*, 123, 1998, 2437-2441).
- 10 (b). *Preparation of monoclonal antibody-, or 4-progesterone-OVA conjugates-coated colloidal gold.* After titration of the colloidal gold (G40) solution to pH = 7.7 with K₂CO₃ (0.02 M), antibody (120 µg) or the 4-progesterone-OVA conjugates (60 µg) solution (0.2 ml) was added into the pH adjusted colloidal gold solution (10 ml) with vigorous vortex mixing. The immunogold solutions were then blocked with 20% OVA solution in PBS (0.15 ml). After repeated washing with 2% OVA and centrifugation at 6,000 rpm, the immunogold 15 solutions were stored in borate (NaB₄O₇) buffer (2 mM, pH = 7.2) containing 0.1% NaN₃ at 4°C.

EXAMPLE 4

- 20 Immunochemical strip tests using 4-progesterone-OVA conjugates as coating antigens, or immobilising monoclonal antibody onto the test strip.

Nitro-cellulose membrane (AE 100, Schleicher & Schuell, Germany) laminated with polyester backing support (GL-187, G & L Precision Die Cutting, Inc. USA) was cut into 25 strips (4 or 5 mm wide). After blocked with 0.01% Tween-20 solution in water for 10 min, and followed by drying at 40 °C for 2 hours, the strips were coated with either anti-progesterone MAb solution (0.5 µl per strip), or 4-progesterone-OVA conjugate solutions (0.5 µl per strip), the strips were again dried at 40 °C for 2 hours. The strips were stored in a silica gel container overnight.

- 30 (a). For strip coating with different concentrations of OVA-progesterone conjugate solutions, the running solvents for half strip in a microwell are as follows:

15 µl of 1% Tween-20 in PBS
15 µl of 2% polyvinyl pyrrolidone (PVP, MW 44000) in PBS

3 µl of antibody-immunogold solution (0.72 µg MAb per strip).

(b). For strip coating with the different concentrations of monoclonal antibody solutions, the running solvents in a microwell are as follows:

- 5 20 µl of 2.5% Tween-20 in PBS
 20 µl of 2% polyvinyl pyrrolidine (PVP, MW 44000) in PBS
 5 µl of progesterone-OVA coated immunogold (0.3 µg protein per strip).

The antibody binding performance in above two different configurations are shown in
10 FIGURE 7 and FIGURE 9.

(c). *Scanning Analysis.* After running the strips the colour intensities of different test strips in FIGURE. 8 were analysed by scanning analysis using "Image Tool, Version 2.00", which is free from the intent, according to following procedure:

- 15 1. Placed strips onto scanner bed
 2. Opened Image Tool and selected file, acquire, TWAIN
 3. Settings: Scaling = 36%
 Width = 3.31 cm
 Height = 3.49 cm
 20 Resolution = 400
 4. Pressed preview and once finished pressed Scan
 5. Saved colour image as JPG file and maximum resolution
 6. Converts image into 8 bpp black and white image by selecting "Processing"
 and "Colour to Greyscale"
 25 7. Selected "Analysis" and "Line Profile", dragged line over band trying to get
 the ends of the line on the white surface (repeat three times for one band and
 take the average value).
 8. "Image Tool" automatically recorded the entire peak height values which
 were related the colour intensities on the strips.

EXAMPLE 5Evaluation of antibody binding performance using monoclonal antibody biosensor surface

5 A biosensor surface immobilising by antibody solution (100 µg/ml in HBS buffer) was prepared by standard amine coupling of antibody to an activated CM-5 sensor chip. Four different progesterone-OVA conjugates [(2)-OVA, (3)-OVA, (5)-OVA, and (7)-OVA] (at 1 mg/ml concentration in HBS buffer) were injected serially over the calibrated biosensor surface at 10 µl/min for 3 minutes. The binding responses (Response Units or RU) were
10 measured for each conjugate, which is shown in FIGURE 12. The results of binding affinities for the conjugates have clearly indicated that the conjugate at 4-position of the progesterone is better than the 7 α -progesterone derivative, and also the conjugate having a long linker gave a far better antibody binding than the conjugate with a short linker.

15

EXAMPLE 6Evaluation of antibody binding performance using progesterone-OVA conjugate biosensor surfaces

20 Antibody binding studies were also evaluated using the above three progesterone-OVA conjugates [(2)-OVA, (3)-OVA and (5)-OVA] biosensor surfaces. Specifically, six concentrations of MoAB (0-100 µg.ml⁻¹) were individually injected over the blank and immobilized progesterone-OVA conjugate surfaces. Data from each conjugate surface was
25 also corrected by subtraction of the sensorgram data from the blank surface. Three identical calibration studies were performed with no significant changes in the binding response for each of the antibody concentrations. Therefore, three calibration curves for 1-, 2- and 4-OVA were obtained by taking average binding responses for each concentration of the MoAB, and plotted against the antibody concentrations (FIGURE 13). The antibody-binding signal of the
30 progesterone-4-OVA conjugates was increased by 30% as the length of the linker was increased from a 4-atom to an 11-atom linker. The signal enhancement was also improved by 31% for progesterone-4-OVA conjugate [(3)-OVA] compared with the 7 α -conjugate [(2)-OVA].

35

EXAMPLE 7

Competitive progesterone immunoassay by SPR using progesterone-OVA conjugates biosensor surfaces

5 For development of a competitive SPR immunoassay for progesterone, a progesterone-OVA conjugate is immobilized on the biosensor surface to give better binding responses, compared to an antibody-immobilized biosensor surface. From screening tests using different progesterone-OVA conjugates on the antibody biosensor surface (FIGURE 12), the
10 10 conjugate [(7)-OVA] with a linker of 18-atoms had the highest antibody-binding signal (225 RU). This appears best as a sensor probe on the surface for design of a competitive BIAcore assay. However, this conjugate [(7)-OVA] failed to immobilize on the sensor surface, and we can only immobilize the other progesterone-OVA conjugates [(2)-OVA, (3)-OVA and (5)-OVA] on the sensor surfaces for competitive BIAcore assays.

15 After mixing a fixed concentration of MoAB (200 µg.ml⁻¹) with each of a series of concentrations of free progesterone in HBS buffer, the remaining antibody in each equilibrium mixture was subsequently injected on to the progesterone-OVA conjugate biosensor surfaces and antibody binding responses measured. The same experiments were
20 repeated five times with good reproducibility for each concentration of progesterone. The binding of antibody to the surface of the chip was inversely proportional to the amount of free progesterone in solution. A plot of concentrations of free progesterone versus average response (RU) of antibody binding provided three standard competition curves for three progesterone-OVA conjugates (FIGURE 14). The assays demonstrated good sensitivities
25 over the range 0-50 ng.ml⁻¹ of progesterone concentrations. The immunoassay sensitivity is normally determined by the steepness of the calibration curve, i.e. response per unit concentration. Therefore, the [(5)-OVA] conjugate has shown a better assay sensitivity than the [(3)-OVA] conjugate, which is slightly more sensitive than the [(2)-OVA] conjugate. The results have clearly indicated the effects of the linker of the conjugates and the conjugation
30 positions in the steroid molecule for SPR-based immunoassay. The SPR-based assays also exhibited a linear range of detection between 0.1 and 10 ng.ml⁻¹, and the R² values for this range were found to be over 0.99 for all three progesterone-OVA conjugates (FIGURE 15). The SPR-based immunoassays were fully competitive with conventional ELISA techniques but much more rapid and simple.

EXAMPLE 8

5 Determination of milk progesterone concentration by Immunochromatographic strip tests using 4-progesterone-OVA conjugate with a long linker (18-atoms)

- The 4-progesterone-OVA conjugate with a long linker (18-atoms) of the invention can be coated onto different membrane strips. The previously prepared antibody-gold conjugate can 10 be diluted with 1-5% sucrose solution in water. The different conjugate pads can be cut into small size, and the above diluted immunogold solution (~ 10 µl) can be applied to each conjugate pad by soaking the gold solution into the sheet. The gold conjugate pad will be dried, and stored.
- 15 A lower wick material, or glass fibre, as a sample pad is saturated with Tris-buffer with 1-5% Tween-20 in water overnight and dried before use. All the test ingredients (membrane, gold conjugate pad, sample pad and solvent absorbent pad) can be pasted onto the backing plate and mounted in the plastic housing. This ready to use strip test device will be relatively stable when it is sealed in a pouch in the presence of a bag of drying agent.

20

This rapid lateral flow strip test can be successfully applied to measuring farm milk progesterone (P₄). The strip is a convenient alternative to conventional ELISA. It is also much faster than ELISA-based tests (10 minutes or less). It is particularly suited for on-site use by farmers. The test can be used for cow pregnancy diagnosis (For progesterone < 10 ng/ml, an intensive colour band will show a negative pregnancy result; while for progesterone > 10 ng/ml, a weak colour band or no colour band will show a positive pregnancy result).

EXAMPLE 9

Synthesis of testosterone-4-OVA conjugate with an extended linker

- 5 The synthesis of testosterone-4-OVA conjugate with an 18-atom linker and its OVA conjugation will be carried out in the same procedure as shown in Example 1 using testosterone as steroid hapten instead of using progesterone. The process for the production of the testosterone-4-OVA conjugate is depicted in FIGURE 16.
- 10 The above procedure can be applied to other steroids having the same A-ring structure to progesterone molecule, such as testosterone, corticosterone, 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnene-3-one, 11 α -hydroxypregesterone, 17 α -hydroxyprogesterone, 21-hydroxypregesterone, 19-hydroxy-4-androstene-3,17-dione and hydrocortisone.

15 EXAMPLE 10

Synthesis of progesterone-OVA conjugates with various length of polyethylene glycol (PEG) linkers.

- 20 The progesterone-OVA conjugates can be also synthesised using different types of linkers such as polyethylene glycol (PEG) (FIGURE 17) as shown by following steps:
- (a). *Heterobifunctional PEG linker ($H_2N-PEG-CO_2H$)*. Mono-protected PEG amine compound can be prepared by reaction of a commercial PEG diamine with di-*tert*-butyl dicarbonate. The resulted mono-protected product can be reacted with a commercial dicarboxylic acid anhydride, followed by de-protection of amine to provide a heterobifunctional PEG amino acid linker with 24-atoms in length, which has the carboxylic acid group at one end, and the amine group at the other end of the linker.
- 25 (b). *Synthesis of progesterone-PEG-OVA conjugates with various length linkers*. The progesterone-4-mercaptopropionic acid (1) can be converted into the active succinimidyl ester as the same procedure as in Example 1. The resulted activated steroid (3) can be reacted with the above PEG amino acid linker ($H_2N-PEG-CO_2H$) to form progesterone PEG derivative with a longer linker (44-atoms in length). The progesterone PEG derivatives (24-

and 44-atom linkers) can be coupled to the OVA proteins *via* the similar protein conjugations as shown in the Example 1.

5 The Progesterone-PEG-OVA conjugates are especially suitable for construction of protein conjugates with long linkers, which have much better water solubility than the conjugates with simple aminocaproic acid chain [(3)-OVA, (5)-OVA and (7)-OVA].

EXAMPLE 11

10 A rapid immunoassay by size exclusion chromatography

This example describes a process for performing a rapid immunoassay by size exclusion gel column chromatography. There is no solid phase immobilization. Instead of using a protein, 15 as in the examples above, progesterone is conjugated with a fluorescent dye via an extended linker to form the progesterone-linker-bilirubin of Formula V.

The rapid immunoassay should be carried out as follows:

20 Step 1: A fixed amount of the above progesterone-linker-bilirubin conjugate of Formula V and a predetermined amount of anti-progesterone antibody should be well mixed with a sample solution whose progesterone concentration is to be determined. The mixture should be permitted to form immunocomplexes.

25 Step 2: The above mixtures quickly flow through a short size exclusion column, which will be monitored by HPLC with an UV detector at ~ 450 nm. Two major peaks will be detected in the HPLC chromatogram. The first peak will represent immunocomplex of the antibody with progesterone-linker-bilirubin conjugate, which will elute early due to its much higher mass (> 150,000), while the second peak represented the progesterone-linker-bilirubin 30 conjugate has much lower mass (< 1,000) and will elute later. No other components show up on the chromatogram since there is no fluorescent dye attached to any other species.

The first peak will be representative of the amount of progesterone-bilirubin conjugate and antibody immunocomplex. The second peak will be representative of the amount of 35 progesterone-bilirubin conjugate not bound in an immunocomplex.

If the concentration of free progesterone in a given sample is high, then the limited antibodies form less immunocomplex with the progesterone-bilirubin conjugate. This causes the first peak to be smaller than the second peak. In contradistinction, if the concentration of 5 free progesterone in a given sample is low, then the limited antibodies form more immunocomplex with the progesterone-bilirubin conjugate. This causes the first peak to be larger than the second peak. Therefore, the area of the first peak, or the ratio of the first peak area to the second peak will be inversely proportional to the sample progesterone concentrations.

10

It will be appreciated by art skilled workers that the above disclosure is provided by way of example only. Many different variations of the present invention may be made.

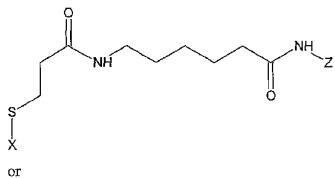
Claims:

1. A hapten-linker-large group conjugate for use in a rapid assay, wherein the assay is kinetic-based not approaching equilibrium, the hapten-linker-large group conjugate being of the general formula:

$$X - W - Y - Z$$

Wherein:

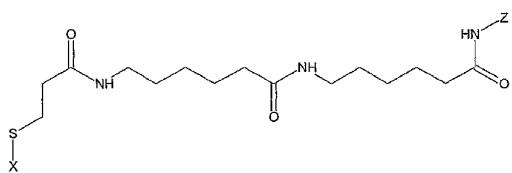
 - X is a hapten;
 - W is an optional thioether or ether group;
 - Y is a linker of 10 or more atoms in length; and
 - Z is a large group of sufficient size to provide steric hindrance with respect to the binding of X to a ligand in the absence of Y.
2. A hapten-linker- large group conjugate of claim 1, wherein W is a thioether bridge.
3. A hapten-linker-large group conjugate of any one the preceding claims, wherein Y is of between 10 to 50 atoms inclusive in length.
4. A hapten-linker-large group conjugate of any one of the preceding claims, wherein Y is of between 11 to 24 atoms inclusive in length.
5. A hapten-linker-large group conjugate of any one of the preceding claims, wherein Y is of between 11 to 18 atoms inclusive in length.
6. A hapten-linker-large group conjugate of any one of the preceding claims, which is:



WO 02/092631

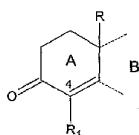
34

PCT/NZ02/00092



wherein X and Z are as defined in claim 1.

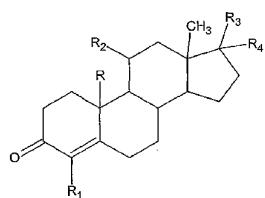
7. A hapten-linker-large group conjugate of any one of the preceding claims wherein Z is a protein or a polypeptide.
8. A hapten-linker-large group conjugate of any one of the preceding claims wherein Z is ovalbumin.
9. A hapten-linker-large group conjugate of any one of 1 to 9, wherein Z is an indicator group.
10. A hapten-linker-large group conjugate of any one of 1 to 9, wherein Z is bilirubin.
11. A hapten-linker-large group conjugate of any one of the preceding claims, wherein X is a steroid or steroid analogue.
12. A hapten-linker-large group conjugate of any one of the preceding claims wherein X is a multi-cyclic fused-ring hapten having an A-ring structure of Formula VI:



Formula VI

wherein R is selected from the group comprising H, CH_3 and CH_2OH and the broken lines indicate members of an adjacent B-ring structure, and R₁ is the attachment point for the linker Y.

13. A hapten-linker-large group conjugate of any one of the preceding claims, wherein X is a hapten of Formula VII:



Formula VII

wherein:

R is selected from the group comprising: H, CH₃ and CH₂OH;

R₁ is the attachment point for the linker Y;

R₂ is H or OH;

R₃ is selected from the group comprising: oxy, C₁-C₂ alkyl, hydroxy, and methylcarbonyl, which oxy, C₁-C₂ alkyl or methylcarbonyl is optionally substituted by hydroxy; and

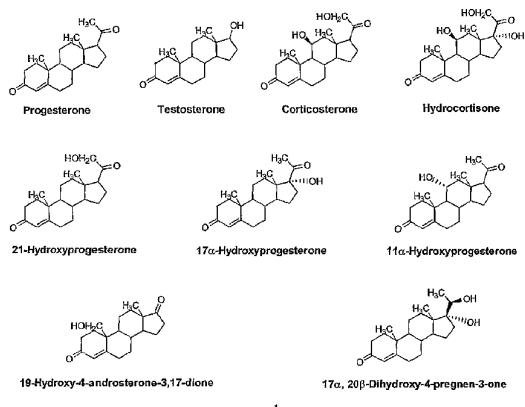
R₄ is hydrogen or hydroxy.

14. A hapten-linker-large group conjugate of any one of the preceding claims, wherein X is selected from the group comprising:

WO 02/092631

36

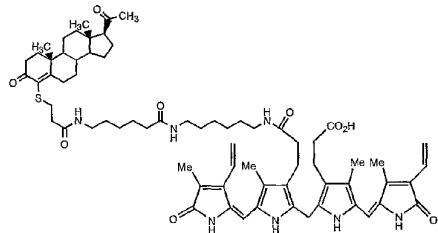
PCT/NZ02/00092



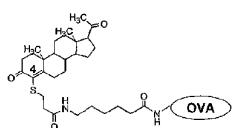
and

15. A hapten-linker-large group conjugate of any one of the preceding claims, wherein X is progesterone.

16. A hapten-linker-large group conjugate of claim 10 that is:

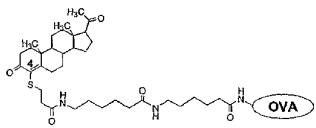


17. A hapten-linker-large group conjugate of any one of claims 1 to 9 and 11 to 15 that is:



wherein OVA is ovalbumin.

18. A hapten-linker-large group conjugate of any one of claims 1 to 9 and 11 to 15 that is:



wherein OVA is ovalbumin.

19. A hapten-linker-large group conjugate of any one of the preceding claims, wherein the ligand is an immunoglobulin molecule.

20. A hapten-linker-large group conjugate of claim 18, wherein the ligand is an antibody or an antibody fragment.

21. A rapid assay method wherein the assay is kinetic-based not approaching equilibrium, the assay being for detecting a hapten in a sample, comprising the steps of:

- d) contacting a ligand capable of binding the hapten with a test sample;
- e) further contacting the ligand of step a) with a hapten-linker-large group conjugate of any one of claims 1 to 20 specific for the ligand; and
- f) determining the amount of unconjugated hapten bound to the ligand.

22. A rapid assay method according to claim 21, wherein the second step (b) of contacting the ligand results in contacting and binding of much of the excess unbound ligand.

23. A rapid assay method according to claim 21 or claim 22, wherein the hapten-linker-large group conjugate is immobilised.
24. A rapid assay method according to any one of claims 21 to 23, wherein the mixture of step a) is flowed over the hapten-linker-large group conjugate of step b).
25. A rapid assay method according to any one of claims 21 to 24, wherein the hapten is a steroid.
26. A rapid assay method according to any one of claims 21 to 24, wherein the hapten is progesterone.
27. A rapid assay method according to any one of claims 21 to 25, wherein the ligand is an antibody.
28. A rapid assay wherein the assay is kinetic-based not approaching equilibrium, the assay being for detecting a hapten in a sample, comprising the steps of:
 - a) combining hapten-linker-large group conjugate of any one of claims 1 to 20 with a test sample;
 - b) contacting the resultant mixture with ligand capable of binding the hapten; and
 - c) determining the amount of unconjugated hapten bound to the ligand.
29. A rapid assay according to claim 28, wherein the ligand is immobilised.
30. A rapid assay according to claim 28 or claim 29, wherein the step b) of contacting the resultant mixture with an immobilised ligand takes place by a flow over or flow through system.
31. A rapid assay method according to any one of claims 28 to 30, wherein the hapten is a steroid.
32. A rapid assay method according to any one of claims 28 to 31, wherein the hapten is progesterone.

WO 02/092631

PCT/NZ02/00092

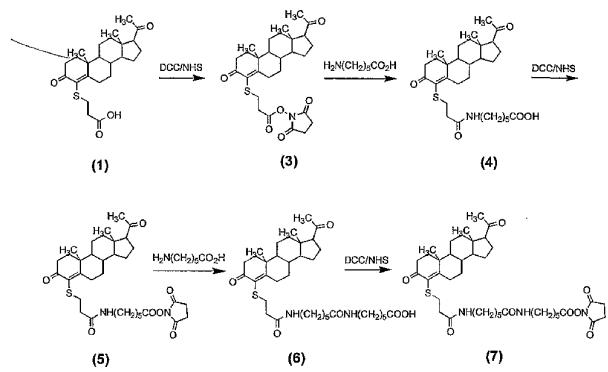
39

33. A rapid assay method according to any one of claims 28 to 32, wherein the ligand is an antibody.
34. A rapid assay kit, wherein the assay is kinetic-based not approaching equilibrium, the kit including at least:
 - a) a ligand which binds to a hapten; and
 - b) a hapten-linker-large group conjugate of any one of claims 1 to 20.
35. A rapid assay kit of claim 34, wherein the kit further includes an indicator.
36. A rapid assay kit of claim 35, wherein the indicator is bound to the hapten-linker-large group conjugate.
37. A rapid assay kit of claim 35, wherein the indicator is bound to the ligand.
38. A rapid assay kit of any one of claims 34 to 37, which is a flow over kit.
39. A rapid assay kit of claim 38, which is a test strip.
40. A rapid assay kit of any one of claims 34 to 37, which is a flow through kit.
41. A process for binding a hapten-linker-large group conjugate of any one of claims 1 to 20 to a ligand comprising the steps of contacting the conjugate with a ligand capable of binding the hapten in the conjugate for a predetermined time where the reaction does not approach equilibrium.
42. The process according to claim 41, wherein the ligand is immobilised.
43. The process according to claim 41 or claim 42, wherein the ligand is contacted with a hapten before being contacted by the hapten-linker-large group conjugate.
44. The process according to claim 41 or claim 42, wherein the ligand is contacted with the hapten-linker-large group conjugate before or simultaneously with being contacted by a hapten.

45. A haptene-linker-large group conjugate of any one of the preceding claims, wherein the ligand is an immunoglobulin molecule.
46. A process for producing a haptene-linker-large group conjugate of any one of claims 1 to 20 is provided, including at least the steps of:
 - g) mixing an activated steroid haptene dissolved in an polar organic solvent with an aqueous solution comprising 1-10 molar equivalents of a heterobifunctional water-soluble linker;
 - h) allow the mixture to react; and
 - i) attach a large group to the remaining free functional linker group of the reaction haptene-linker product of step b).
47. The process according to claim 46, which includes an isolation step between steps b) and c) for isolating the haptene-linker product.
48. The process according to claim 46 or claim 47, wherein the final mixture has an aqueous content of between 2 and 30%.
49. The process according to any one of claims 46 to 48, wherein the final mixture has an aqueous content of between 5 and 15%.
50. The process according to any one of claims 46 to 49, wherein the final mixture has an aqueous content of about 10%.
51. The process according to any one of claims 46 to 50, wherein the step b) reaction time is in the order of up to 24 hours.
52. The process according to any one of claims 46 to 51, wherein the reaction in b) takes place at room temperature.
53. The process according to any one of claims 46 to 52, wherein the reaction in b) takes place at substantially neutral pH.

54. The process according to any one of claims 46 to 53, wherein the aqueous solution of step a) comprises 2-5 molar equivalents of a heterobifunctional water-soluble linker when compared with the activated steroid.
55. The process according to any one of claims 46 to 54, wherein the activated steroid is an activated ester of a steroid.
56. The process according to any one of claims 46 to 55, wherein the activated steroid is a succinamide ester of a steroid.
57. The process according to any one of claims 46 to 56, wherein the heterobifunctional linker is carboxyl at one end and amino at the other end.
58. The process according to any one of claims 46 to 57, wherein the polar organic solvent is selected from the group comprising DMF, DMSO, acetone and THF.

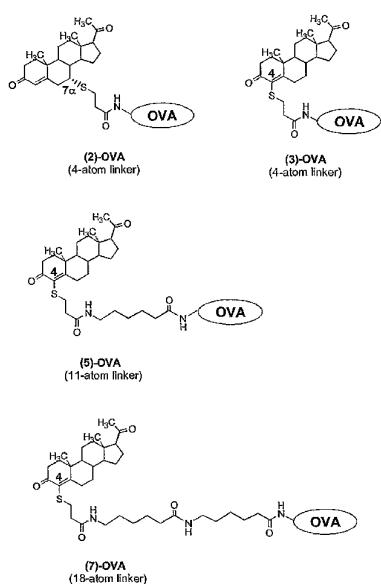
FIGURE 1



WO 02/092631

PCT/NZ02/00092

2/17

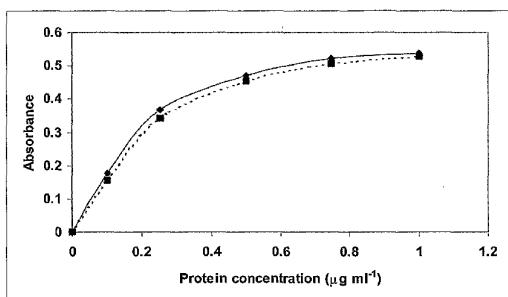
FIGURE 2.

WO 02/092631

PCT/NZ02/00092

3/17

FIGURE 3

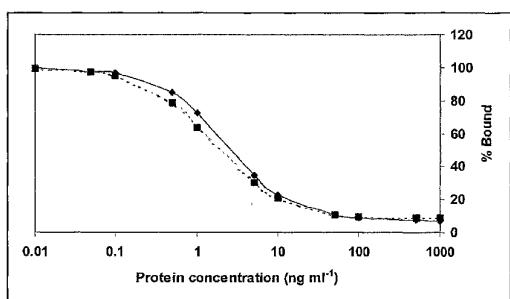


WO 02/092631

PCT/NZ02/00092

4/17

FIGURE 4

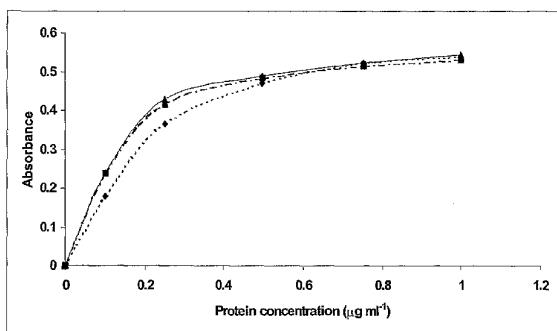


WO 02/092631

PCT/NZ02/00092

5/17

FIGURE 5

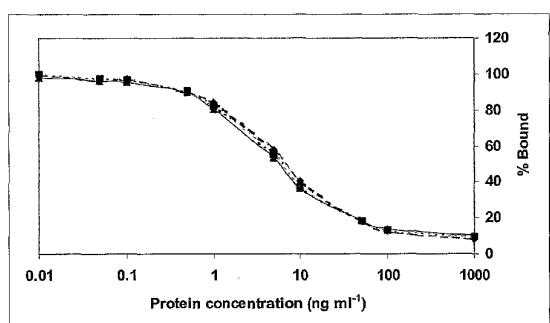


WO 02/092631

PCT/NZ02/00092

6/17

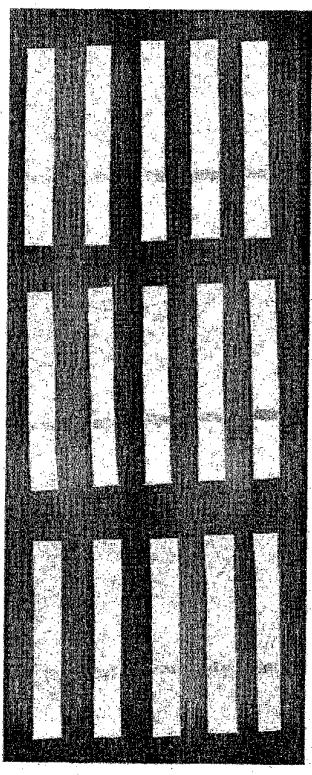
FIGURE 6.



WO 02/092631

PCT/NZ02/00092

7/17

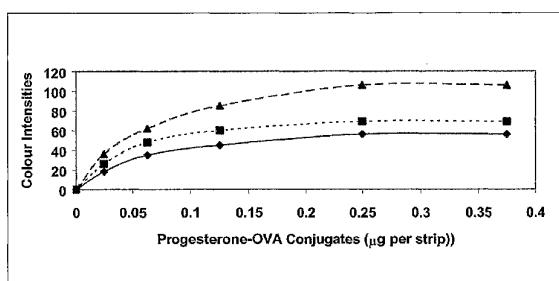
FIGURE 7

WO 02/092631

PCT/NZ02/00092

8/17

FIGURE 8

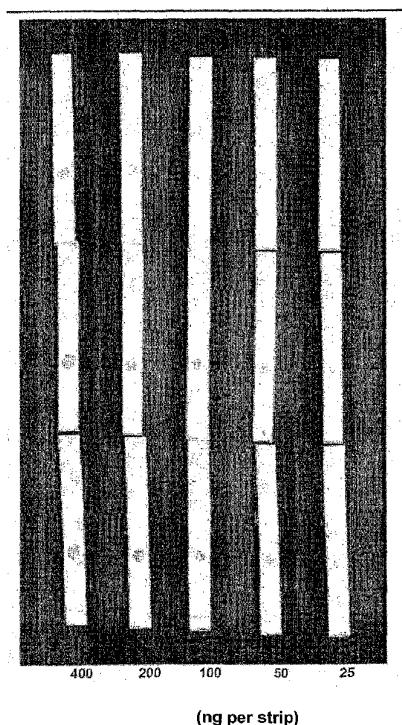


WO 02/092631

PCT/NZ02/00092

9/17

FIGURE 9

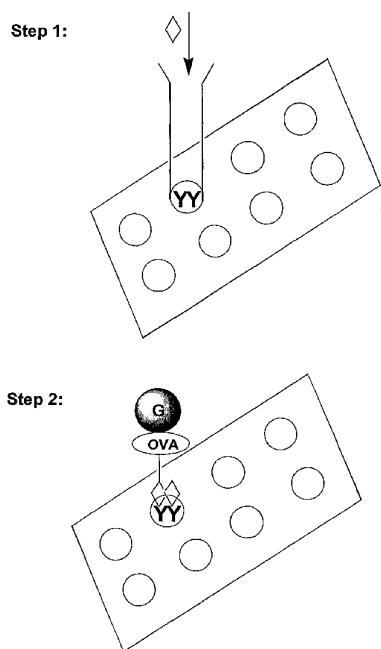


WO 02/092631

PCT/NZ02/00092

10/17

FIGURE 10.

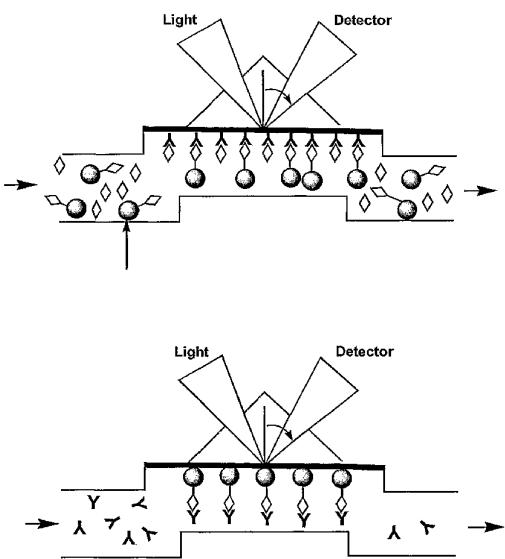


WO 02/092631

PCT/NZ02/00092

11/17

FIGURE 11



WO 02/092631

PCT/NZ02/00092

12/17

FIGURE 12.

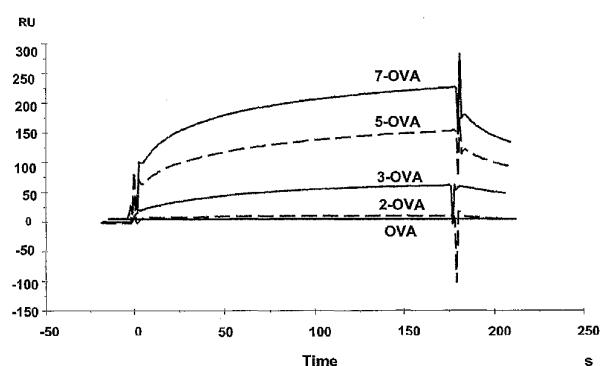
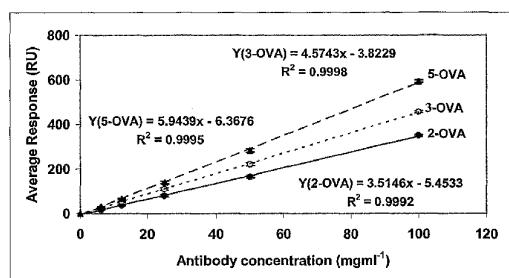


FIGURE 13



WO 02/092631

PCT/NZ02/00092

14/17

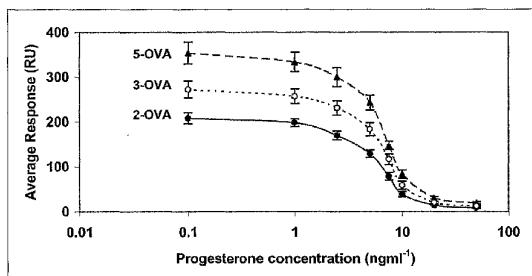
FIGURE 14

FIGURE 15

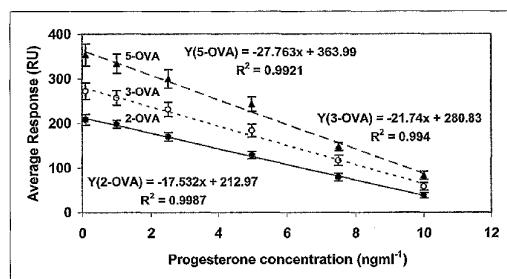


FIGURE 16/17

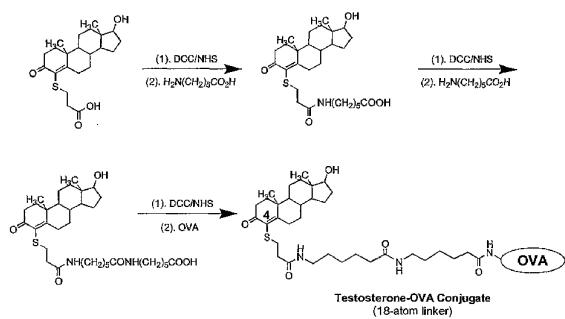
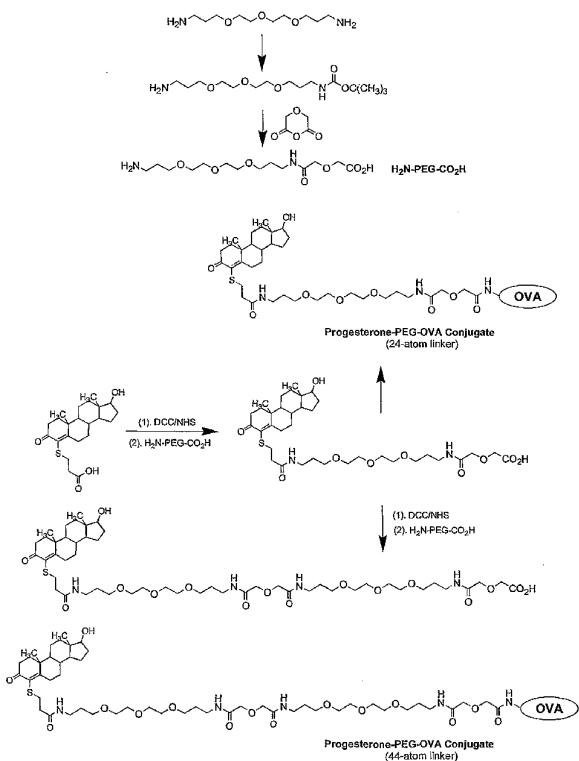


FIGURE 17.

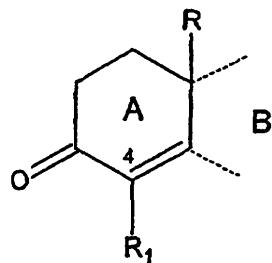


【手続補正書】**【提出日】**平成15年1月27日(2003.1.27)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**全文**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項1】**

迅速アッセイで使用する、一般式X-W-Y-Zを有するハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

(式中、

Xは、式IのA環構造を有する多環の融合環ステロイドハプテンであり、

【化1】**式I**

式中、RはH、CH₃およびCH₂OHを含む群から選択され、破線は隣接するB環構造の環員を示し、R₁は、リンカーYまたはWが存在する場合、その付着点であり、

Wは、任意選択でチオエーテルまたはエーテル基であり、

Yは、10個以上の原子長のリンカーであり、

Zは、Yが存在しない場合にXのリガンドへの結合に対して立体障害を与えるのに十分なサイズの大型グループである)

【請求項2】

Wがチオエーテル架橋である、請求項1のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【請求項3】

Yが10個以上50個以下の原子長である、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【請求項4】

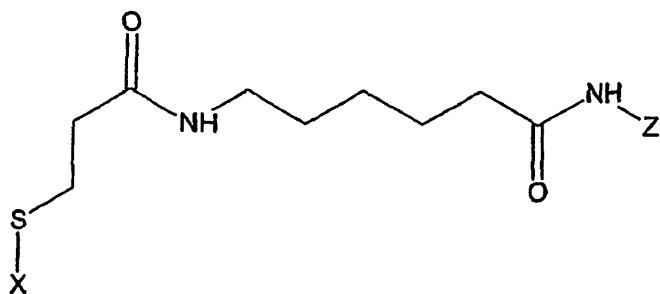
Yが11個以上24個以下の原子長である、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【請求項5】

Yが11個以上18個以下の原子長である、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

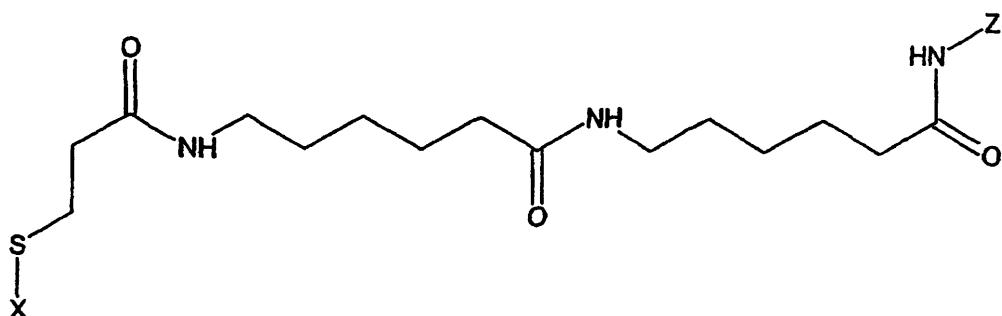
【請求項6】

【化2】



または

【化3】



(式中、XおよびZは請求項1で定義した通りである)

である、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【請求項7】

Zがタンパク質またはポリペプチドである、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【請求項8】

Zが卵白アルブミンである、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【請求項9】

Zが指示薬グループである、請求項1から6のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

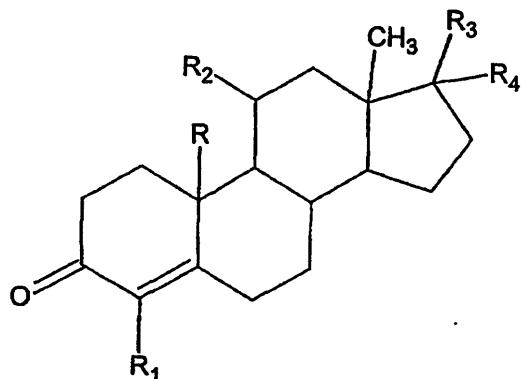
【請求項10】

Zがビリルビンである、請求項1から6および9のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【請求項11】

Xが式IIのハプテンである、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン-リンカー-大型グループのコンジュゲート。

【化4】



式 I I

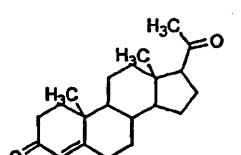
(式中、

Rは、H、CH₃およびCH₂OHを含む群から選択され、R₁は、リンカーYの付着点であり、R₂は、HまたはOHであり、R₃は、オキシ、C₁～C₂アルキルまたはメチルカルボニルが任意選択でヒドロキシによって置換されている、オキシ、C₁～C₂アルキル、ヒドロキシ、およびメチルカルボニルを含む群から選択され、R₄は、水素またはヒドロキシである)

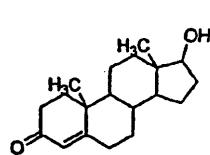
【請求項12】

Xが以下を含む群から選択される、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン-リンカ-大型グループのコンジュゲート。

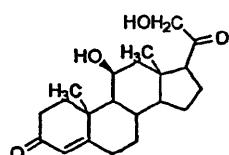
【化5】



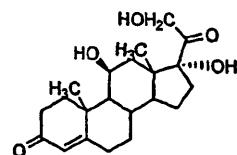
Progesterone



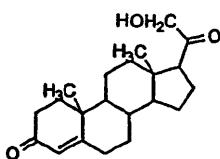
Testosterone



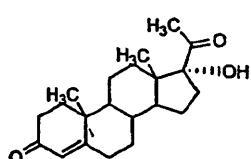
Cortisol



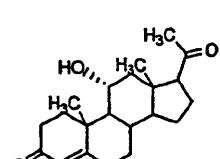
Hydrocortisone



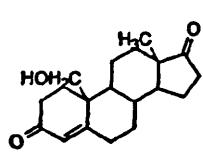
21-Hydroxyprogesterone



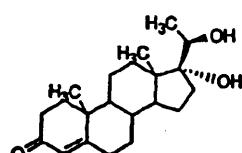
17α-Hydroxyprogesterone



11α-Hydroxyprogesterone



19-Hydroxy-4-androsten-3,17-dione



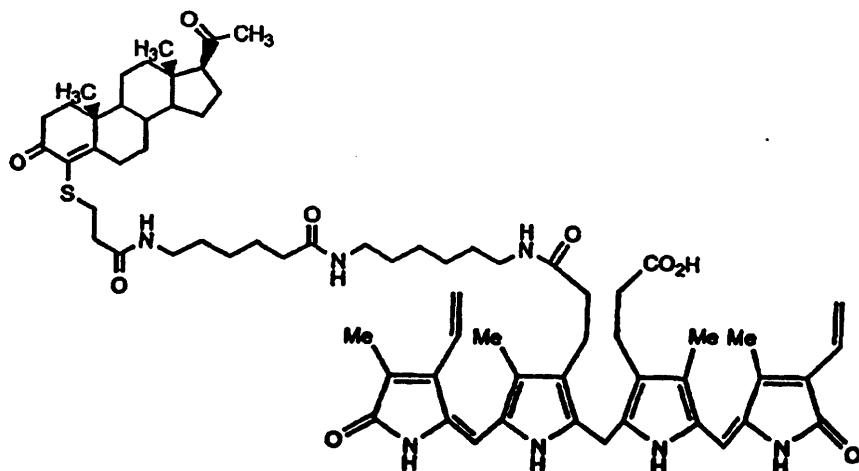
および

【請求項13】

Xがプロゲステロンである、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン-リンカ-大型グループのコンジュゲート。

【請求項 14】

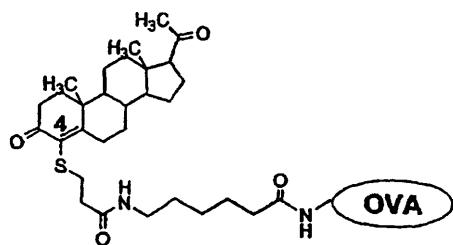
【化6】



である、請求項 10 に記載のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲート。

【請求項 15】

【化7】

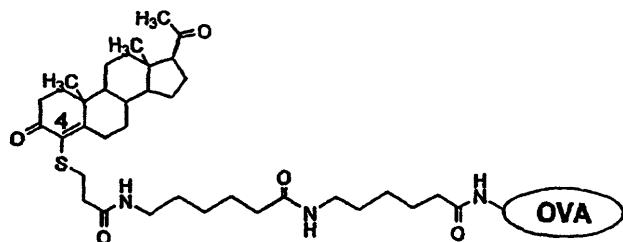


(式中、OVA は卵白アルブミンである)

である、請求項 1 から 9 および請求項 11 から 13 のいずれか一項に記載のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲート。

【請求項 16】

【化8】



(式中、OVA は卵白アルブミンである)

である、請求項 1 から 9 および請求項 11 から 13 のいずれか一項に記載のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲート。

【請求項 17】

リガンドが免疫グロブリン分子である、前記請求項のいずれか一項に記載のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲート。

【請求項 18】

リガンドが抗体または抗体断片である、請求項 16 に記載のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲート。

【請求項 19】

リガンドが免疫グロブリン分子である、前記請求項のいずれかに記載のハプテン - リンカ - - 大型グループのコンジュゲート。

【請求項 20】

a) ハプテンを結合する能力があるリガンドを試験試料と接触させ、ステップ a) のリガンドを請求項 1 ~ 19 のいずれかに定義した X - W - Y - Z のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートとさらに接触させるステップと、

b) 反応が実質的に平衡に達する前にリガンドに結合したコンジュゲートしていないハプテンの量を決定するステップと

を含む、試料中のハプテンを検出するための迅速アッセイ法。

【請求項 2 1】

リガンドを接触させる第 2 ステップ (b) により、過剰の結合していないリガンドのほとんどが接触され結合される、請求項 2 0 に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 2 2】

ハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートが固定されている、請求項 2 0 または請求項 2 1 に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 2 3】

ステップ a) の混合物をステップ b) のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートの上に流す、請求項 2 0 から 2 2 のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 2 4】

ハプテンがステロイドである、請求項 2 0 から 2 3 のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 2 5】

ハプテンがプロゲステロンである、請求項 2 0 から 2 3 のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 2 6】

リガンドが抗体である、請求項 2 0 から 2 4 のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 2 7】

a) 試験試料を請求項 1 ~ 19 で定義したハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートと混合するステップと、

b) 生じた混合物を、このハプテンを結合する能力があるリガンドと接触させるステップと、

c) 反応混合物が実質的に平衡に達する前にリガンドに結合したコンジュゲートしていないハプテンの量を決定するステップと

を含む、試料中のハプテンを検出するための迅速アッセイ。

【請求項 2 8】

リガンドが固定されている、請求項 2 7 に記載の迅速アッセイ。

【請求項 2 9】

生じた混合物を固定したリガンドと接触させるステップ b) が、フロー オーバーまたはフロースルーシステムによって行われる、請求項 2 7 または請求項 2 8 に記載の迅速アッセイ。

【請求項 3 0】

ハプテンがステロイドである、請求項 2 7 から 2 9 のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 3 1】

ハプテンがプロゲステロンである、請求項 2 7 から 3 0 のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 3 2】

リガンドが抗体である、請求項 2 7 から 3 1 のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【請求項 3 3】

a) ハプテンに結合するリガンドと、

b) 請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートと

を少なくとも含む、迅速アッセイのキット。

【請求項 3 4】

キットがさらに指示薬を含む、請求項 3 3 に記載の迅速アッセイのキット。

【請求項 3 5】

指示薬がハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートに結合している、請求項 3 4 に記載の迅速アッセイのキット。

【請求項 3 6】

指示薬がリガンドに結合している、請求項 3 4 に記載の迅速アッセイのキット。

【請求項 3 7】

フロー オーバーキットである、請求項 3 3 から 3 6 のいずれか一項に記載の迅速アッセイのキット。

【請求項 3 8】

試験ストリップである、請求項 3 7 に記載の迅速アッセイのキット。

【請求項 3 9】

フロースルーキットである、請求項 3 3 から 3 6 のいずれか一項に記載の迅速アッセイのキット。

【請求項 4 0】

請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに定義したハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートをリガンドに結合させる方法であって、

該方法は、コンジュゲートを、コンジュゲート内のハプテンを結合する能力があるリガンドと、反応が実質的に平衡に達しない所定の時間接触させるステップを含む、方法。

【請求項 4 1】

リガンドが固定されている、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

リガンドをハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートと接触させる前にハプテンと接触させる、請求項 3 9 または請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

リガンドをハプテンと接触させる前にまたは同時にハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートと接触させる、請求項 3 9 または請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

a) 極性有機溶媒に溶かした活性化されたステロイドハプテンを、1 ~ 1 0 モル等量の異種二官能性水溶性リンカーを含む水溶液と混合するステップと、

b) 混合物を反応させるステップと、

c) ステップ b) のハプテン - リンカー 反応生成物の残りの遊離官能性リンカーグループに大型グループを付着させるステップと

を少なくとも含む、請求項 1 から 1 8 1 9 に記載のいずれか一項のハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートを生成する方法を提供する。

【請求項 4 5】

ステップ b) と c) の間にハプテン - リンカー 生成物を単離する単離ステップを含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

最終混合物が 2 ~ 3 0 % の含水率を有する、請求項 4 4 または請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

最終混合物が 5 ~ 1 5 % の含水率を有する、請求項 4 4 から 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

最終混合物が約 1 0 % の含水率を有する、請求項 4 4 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

ステップ b) の反応時間がほぼ 2 4 時間程度までの時間である、請求項 4 4 から 4 8 のい

すれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

b) の反応が室温で起こる、請求項 4 4 から 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

b) の反応が実質的に中性の pH で起こる、請求項 4 4 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

ステップ a) の水溶液が、活性化されたステロイドに比べて 2 ~ 5 モル等量の異種二官能性の水溶性リンカーを含む、請求項 4 4 から 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

活性化されたステロイドがステロイドの活性化されたエステルである、請求項 4 4 から 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4】

活性化されたステロイドがステロイドのスクシンイミドエステルである、請求項 4 4 から 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

異種二官能性リンカーの端の一方がカルボキシルであり、他方がアミノである、請求項 4 4 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

極性有機溶媒が、D M F 、 D M S O 、アセトンおよび T H F を含む群から選択される、請求項 4 4 から 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【手続補正書】

【提出日】平成 15 年 4 月 1 日 (2003.4.1)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 2 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 2 0】

a) ハプテンを結合する能力があるリガンドを試験試料と接触させるステップと、

b) ステップ a) のリガンドを請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに定義した X - W - Y - Z のハ

プテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートとさらに接触させるステップと、

c) 反応が実質的に平衡に達する前にリガンドに結合したコンジュゲートしていないハプテンの量を決定するステップと

を含む、試料中のハプテンを検出するための迅速アッセイ法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 2 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 2 3】

ステップ a) の試験サンプルとリガンドとを含む混合物をステップ b) のハプテン - リンカ - 大型グループのコンジュゲートの上に流す、請求項 2 0 から 2 2 のいずれか一項に記載の迅速アッセイ法。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 2 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 2 7】

- a) 試験試料を請求項 1 ~ 19 で定義したハプテン - リンカー - 大型グループのコンジュゲートと混合するステップと、
b) 生じた混合物を、このハプテンを結合する能力があるリガンドと接触させるステップと、
c) 反応混合物が実質的に平衡に達する前にリガンドに結合したコンジュゲートしていないハプテンの量を決定するステップと
を含む、試料中のハプテンを検出するための迅速アッセイ。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NZ02/00092
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. 7: C07K 14/77; C07J 33/00, 43/00; G01N 33/72, 33/53, 33/531 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)		
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 practicable, search terms used) STN Files: Medline, CA, Biosis, WPDS; keywords: steroid, sterone, cortiso, cholesterol, pregnan, linker, conjugat		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/32783 A1(PE CORPORATION) 10 May 2001 See Scheme 1 (page 61), claims 2, 14 and 61	1, 3-5, 7
X	WO 99/63346 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS CORPORATION) 9 December 1999 See pages 26-29 and claims	1, 3-5, 7
X	EP 992512 A2 (ORTHO-CLINICAL DIAGNOSTICS, INC.) 12 April 2000 See claims 1-7	1, 3-5, 7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 2 August 2002	Date of mailing of the international search report 20 AUG 2002	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No.: (02) 6285 3920	Authorized officer  CHRISTINE BREMERS Telephone No.: (02) 6283 2313	

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/NZ02/00092
Category*		Relevant to claim No.
X	US 5834206 A (NEUENHOFER, S et al) 10 November 1998 See column 2	1, 3-5, 7
X	BIENIARZ, C et al Extended Length Heterobifunctional Coupling Agents for Protein Conjugations. Bioconjugate Chemistry. 1996, vol 7, pages 88-95 See abstract, page 88 column 1, page 91 column 1, column 2 paragraph 1	1, 3-5, 7
X	US 5578457 A (BRUMMOND, B A et al) 26 November 1996 See claim 1	1, 3-5, 7, 21-58
X	US 5298403 A (DANIELSON, S J et al) 29 March 1994 See column 1 lines 13-30, column 2 line 13- column 4 line 52, claim 1	1, 3-5, 7
X	US 5191066 A (BIENIARZ, C et al) 2 March 1993 See column 3-4	1, 3-5, 7
X	WO 90/10448 A2 (GENENTECH, INC) 20 September 1990 See page 17 paragraphs 1 and 2, claims 1-20	1, 3-5, 7, 21-58
X	WO 89/00291 A1 (SCLAVO INC., WEST COAST) 12 January 1989 See claims 7 and 10	1, 3-5
X	US 4039385 (ULLMAN, E F et al) 2 August 1977 See columns 11 and 12 and claim 1	1, 3-5, 46
X	WO 01/32662 A2 (NST NEUROSURVIVAL TECHNOLOGIES LTD.) 10 May 2001 See pages 6-12, claims 3, 7, 14-16, 28-29	1, 3-5, 7, 9
X	WO 01/16306 A2 (CHIRON CORPORATION) 8 March 2001 See claims 10 and 11	1, 3-5, 7
X	WO 01/00247 A1 (THE LIPOSOME COMPANY, INC.) 4 January 2001 See pages 10-11 and claim 1	1, 3-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NZ02/00092
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/09073 A2 (PROTEIN DELIVERY, INC.) 24 February 2000 See claims 1, 4, 5, 15 (formula 4), section 5.8.3	1, 3, 7, 11, 13
X	US 6022959 A (MAGDA, D et al) 8 February 2000 See claims 1, 2, 13	1, 3, 11
X	WO 99/57124 A1 (KESEL, A et al) 11 November 1999 See claims 4 and 5	1, 3-5, 7
X	DE 19814814 A1 (STEFFAN, G DR) 7 October 1999 See claims 1, 4-9	1, 3-5, 7
X	US 5876727 A (SWAIN, P A et al) 2 March 1999 See column 16 line 45- column 17 line 55	1, 3-5, 7
X	US 5773001 A (HAMANN, P R et al) 30 June 1998 See columns 1-3 and claim 1	1, 3-5, 11
X	WO 97/23243 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 3 July 1997 See pages 23-24, claims 42 and 55-75	1-5, 7, 11, 19-20, 45
X	WO 97/15316 A1 (MERCK & CO., INC.) 1 May 1997 See page 15, claims 1-10	1-5, 7-8
X	CA 2156618 A1 (INSTITUT FUR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AND DER FREIEN UNIVERSITAT BERLIN) 13 October 1994 See claims 1, 2 and 11	1, 3-5, 11
X	ANNUNZIATO, M E et al. P-Maleimidophenyl Isocyanate: A Novel Heterobifunctional Linker for Hydroxyl to Thiol Coupling. <i>Bioconjugate Chemistry</i> , 1993, vol 4 no 3, pages 212-218	1, 3-5, 7
X	AU 12148/92 A (INSTITUT FUR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AND DER FREIEN UNIVERSITAT BERLIN) 10 September 1992 See claims 1 and 2	1, 3-5, 7
X	AU 12147/92 A (INSTITUT FUR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AND DER FREIEN UNIVERSITAT BERLIN) 10 September 1992 See claims 1 and 2	1, 3-5, 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NZ02/00092
C (Continuation)		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91/14696 A1 (GILEAD SCIENCES, INC.) 3 October 1991 See page 13, claims 1, 5-7, 10, 115	1, 3-5, 7, 11
X	EP 398305 B1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 22 November 1990 See claims	1, 3-5
X	EP 313873 A1 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 3 May 1989 See pages 8-11	1-5, 7, 19-20
X	US 4351760 A (KHANNA, P et al) 28 September 1982 See column 4 line 35-column 5 line 40, column 6 line 43-column 7 line 42	1, 3-5
P,X	US 6251382 B1 (GREENWALD, R B et al) 26 June 2001 See columns 2-4	1, 3-5, 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/NZ02/00092

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report			Patent Family Member		
WO	9963546	AU 32350/99 US 6139299	EP 961009	JP 11351170	
EP	992512	US 5934179	EP 932358	WO 9858579	
US	5834206	AU 40320/95 EP 716304	CA 2164767 JP 8233812	DE 4444002	
US	5578457	EP 584854 US 5543311	HK 1011082	JP 6206870	
US	5298403	CA 2062240	EP 517326	JP 5172814	
US	5191066	AU 91452/91 WO 9210507	CA 2097920	EP 560912	
WO	9010448	CA 2049028	EP 462145		
WO	8900291	AU 20868/88	US 4894348		
US	4039385	CA 1003770 ES 402720 GB 1401298 NL 7206434 US 3867366 US 3966556 US 4046636 US 4190496 US 4282325 US 4423143	CH 553410 FR 2139505 IL 39323 US 3817837 US 3875011 US 3975237 US 4065354 US 4191613 US 4376825 CA 956106	DE 2223385 GB 1401297 IT 972332 US 3852157 US 3905871 US 4040907 US 4067774 US 4203802 CA 956106	
US	6022959	NONE			
DE	19814814	NONE			
US	5876727	AU 53749/96 WO 9630049 US 6054127 AU 64834/98 WO 9814216	CA 2216658 US 5840307 US 2002032316 CN 1244130	EP 814843 US 5760184 US 5773003 EP 1024834	
US	5773001	AU 20449/95 BR 1100990 FI 952720	BR 1101078 CA 2150785 IL 113984	BR 1100941 EP 639845 IL 129953	

Form PCT/ISA/210 (citation family annex) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International application No. PCT/NZ02/00092
IL	132974	JP	8048637	NO 952206
NZ	272274	NZ	328762	ZA 9504570
US	5739116	US	5767285	US 5877296
WO 9723243	EP 871490	US	5824805	
WO 9715316	AU 74681/96			
CA 2156618	AU 65015/94	DE	4311021	EP 692979
	HU 72733	NO	953865	NZ 263792
	WO 9422491			
AU 12148/92	CA 2062454	DE	4107571	EP 502595
	IE 920761	JP	6100519	PT 100200
	ZA 9201716			
AU 12147/92	CA 2062483	DE	4107570	EP 502594
	IE 920762	JP	6024972	ZA 9201717
WO 9114696	AU 77592/91	CA	2079109	EP 537299
EP 398305	US 5122368	AU	55117/90	CA 2016584
	HK 1005018	IL	94379	JP 3027321
	NO 902197	NZ	233696	PT 94064
	ZA 9003757	DK	639/89	EP 328147
	FI 890599	IL	106992	JP 1246295
	NO 890593	NO	950099	NZ 227911
	PT 89683	ZA	8900938	CA 2010164
	AU 49762/90			
EP 313873	AU 24489/88	AU	24494/88	BR 1100939
	BR 1101084	BR	1101079	CA 1321582
	DK 6024/88	DK	6025/88	EP 313874
	FI 884983	FI	884984	HK 1318/97
	HK 1319/97	IL	87947	IL 87946
	JP 1193282	JP	2096599	NO 884833
	NO 884834	NZ	226726	NZ 226727
	ZA 8808123	ZA	8808127	US 5053394
	US 5606040	US	5770701	US 5770710
	AU 53241/90	CA	2014486	CN 1046333
	CN 1110280	EP	392384	IL 93733
	IL 115770	JP	2292294	NO 901655
	NO 932192	NZ	233148	PH 30494
	PT 93716	SG	47848	ZA 9002840
US 4351760	CA 1159823	EP	25912	JP 56043279

Form PCT/ISA/210 (citation family annex) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/NZ02/00092	
	JP 1308485 US 4481136 US 4774191	US 4588697	
US 6251382	US 2002009426		
END OF ANNEX			

フロントページの続き

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

(74)代理人 100106297

弁理士 伊藤 克博

(74)代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(72)発明者 クック、クリスチャン ジョン

ニュージーランド国 コロマンデル テ ブル シーヴュー アヴェニュー 14

(72)発明者 ウー、インキュ

ニュージーランド国 ハミルトン ヒルクレスト ケンブリッジ ロード 291

(72)発明者 ミッセル、ジョン スタントン

ニュージーランド国 ロトルア バスレイ ロード 24

F ターム(参考) 4H045 AA10 BA55 DA86 EA50 FA50