

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7645812号
(P7645812)

(45)発行日 令和7年3月14日(2025.3.14)

(24)登録日 令和7年3月6日(2025.3.6)

(51)国際特許分類		F I		
G 0 1 N	33/532 (2006.01)	G 0 1 N	33/532	B Z N A
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00	
C 0 7 K	14/31 (2006.01)	C 0 7 K	14/31	
C 0 7 K	14/315 (2006.01)	C 0 7 K	14/315	
C 1 2 N	15/115 (2010.01)	C 1 2 N	15/115	Z
		請求項の数 21		(全249頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-559761(P2021-559761)	(73)特許権者	593089149	
(86)(22)出願日	令和2年4月10日(2020.4.10)		プロメガ コーポレーション	
(65)公表番号	特表2022-526013(P2022-526013 A)		Promega Corporation	
(43)公表日	令和4年5月20日(2022.5.20)		アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537	
(86)国際出願番号	PCT/US2020/027711		11-5399 マディソン ウッズ ホ	
(87)国際公開番号	WO2020/210658	(74)代理人	100094569	
(87)国際公開日	令和2年10月15日(2020.10.15)		弁理士 田中 伸一郎	
審査請求日	令和5年4月7日(2023.4.7)	(74)代理人	100103610	
(31)優先権主張番号	62/832,052		弁理士 ▲吉▼田 和彦	
(32)優先日	平成31年4月10日(2019.4.10)	(74)代理人	100109070	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 須田 洋之	
		(74)代理人	100119013	
			弁理士 山崎 一夫	
		(74)代理人	100123777	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生物発光を使用した分析物検出のための組成物及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

発光基質と、
標的分析物結合要素、及び、生物発光複合体のポリペプチド構成成分または生物発光複合体のペプチド構成成分のうちの1つを含む標的分析物結合剤と、
を含み、
前記標的分析物結合剤の前記ポリペプチド構成成分が、
配列番号5と少なくとも90%の配列同一性、
配列番号9と少なくとも90%の配列同一性、または
配列番号12と少なくとも90%の配列同一性
を含み、
前記標的分析物結合剤の前記ペプチド構成成分が、
配列番号11と少なくとも90%の配列同一性、
配列番号13と少なくとも90%の配列同一性、または
配列番号14と少なくとも90%の配列同一性
を含む、組成物。

【請求項2】

前記生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分を更に含み、
前記標的分析物結合剤及び前記生物発光複合体の前記相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する、請求項1に記載

載の組成物。

【請求項 3】

前記相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分が、前記標的分析物の存在下で前記生物発光分析物検出複合体を形成する第 2 の標的分析物結合要素を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記標的分析物結合剤の前記ポリペプチド構成成分が、配列番号 6 と少なくとも 90 % の配列同一性を含み、

前記生物発光複合体の前記ペプチド構成成分が、配列番号 14 と少なくとも 90 % の配列同一性を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記発光基質の存在下で生成される生物発光シグナルが、前記標的分析物結合剤が前記生物発光複合体の前記相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分のうちの 1 つ以上と接触する場合、前記標的分析物結合剤及び前記発光基質単独によって生成される生物発光シグナルと比較して、実質的に増加する、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記標的分析物が、標的抗体である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記標的分析物結合要素が、抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組み換え抗体、抗体フラグメント、プロテイン A、プロテイン A の Ig 結合ドメイン、プロテイン G、プロテイン G の Ig 結合ドメイン、プロテイン A/G、プロテイン A/G の Ig 結合ドメイン、プロテイン L、プロテイン L の Ig 結合ドメイン、プロテイン M、プロテイン M の Ig 結合ドメイン、オリゴヌクレオチドプローブ、ペプチド核酸、DARPin、アプタマー、アフィマー、タンパク質ドメイン、及び精製タンパク質からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記発光基質が、セレンテラジン、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h-h、フリマジン、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、ヒドロキシプロピルβ-シクロデキストリン、環状糖高分子、ブロックコポリマー、ポリスチレン、ポリ(メタ)アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される高分子を更に含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記組成物が、緩衝液、界面活性剤、還元剤、塩、ラジカル捕捉剤、キレート化剤、タンパク質、またはこれらの任意の組み合わせを更に含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

発光基質と、

第 1 の標的分析物結合要素及び生物発光複合体の第 1 のポリペプチド構成成分を含む、第 1 の標的分析物結合剤と、

第 2 の標的分析物結合要素及び生物発光複合体の第 2 のポリペプチド構成成分を含む、第 2 の標的分析物結合剤と、

前記生物発光複合体の相補性ポリペプチド構成成分と、を含み、

前記標的分析物結合剤及び前記生物発光複合体の前記相補性ポリペプチド構成成分は、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成することが可能であり、

前記第 1 及び第 2 の標的分析物結合剤の前記第 1 または第 2 のポリペプチド構成成分が、配列番号 11 と少なくとも 90 % の配列同一性、または

配列番号 13 と少なくとも 90 % の配列同一性

を含み、

10

20

30

40

50

前記標的分析物結合剤の前記ポリペプチド構成成分が、
配列番号 6 と少なくとも 90 % の配列同一性、
配列番号 9 と少なくとも 90 % の配列同一性、または
配列番号 12 と少なくとも 90 % の配列同一性
を含む、組成物。

【請求項 12】

前記第 1 及び第 2 の標的分析物結合剤が、同じ標的分析物の別の部分に結合する、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記生物発光複合体の前記第 1 及び第 2 のポリペプチド構成成分が、前記生物発光複合体の前記相補性ポリペプチド構成成分に結合して、前記標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記第 1 及び前記第 2 のポリペプチド構成成分が、ハロアルカン基質と共有結合を形成することが可能な修飾デハロゲナーゼに連結される、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記第 1 及び前記第 2 の標的分析物結合要素が、ハロアルカン基質を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記標的分析物結合要素が、抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組み換え抗体、抗体フラグメント、プロテイン A、プロテイン A の Ig 結合ドメイン、プロテイン G、プロテイン G の Ig 結合ドメイン、プロテイン A/G、プロテイン A/G の Ig 結合ドメイン、プロテイン L、プロテイン L の Ig 結合ドメイン、プロテイン M、プロテイン M の Ig 結合ドメイン、オリゴヌクレオチドプローブ、ペプチド核酸、DARPin、アプタマー、アフィマー、タンパク質ドメイン、及び精製タンパク質からなる群から選択される、請求項 11 に記載の組成物

【請求項 17】

前記標的分析物が、抗体であり、前記第 1 の標的分析物結合剤の前記標的分析物結合要素が、前記抗体によって認識される抗原を含み、前記第 2 の標的分析物結合剤の前記標的分析物結合要素が、Fc 結合領域を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記第 1 及び／または第 2 の標的分析物結合剤が、前記生物発光複合体の前記第 1 及び／または第 2 のポリペプチド構成成分に結合されたフルオロフォアを更に含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記組成物の 1 つ以上の構成成分が、前記標的分析物を検出及び／または定量するために溶液中で再構成される場合、生物発光複合体を形成することが可能な凍結乾燥タブレット（ライオケーキ）の形態である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記組成物が、前記標的分析物を検出及び／または定量することが可能な液相検出プラットフォームに含まれる、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記ポリペプチド構成成分及び前記発光基質が、前記標的分析物を検出及び／または定量するために溶液中で再構成される場合、生物発光複合体を形成することが可能な凍結乾燥タブレット（ライオケーキ）の形態である、請求項 11 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019 年 4 月 10 日に出願された米国仮特許出願第 62/832,052

10

20

30

40

50

号の優先権及び利益を主張するものであり、全ての目的のために、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

本明細書で提供されるのは、サンプル中の1つまたは複数の分析物を検出するためのシステム及び方法である。特に、本開示は、標的分析物の存在、不在、または量に 관련된生物発光シグナルを生成することが可能な基質、ペプチド、及び／またはポリペプチドを含む生物発光複合体を使用して、標的分析物を検出及び／または定量するための組成物、アッセイ、及び方法を提供する。

【背景技術】

【0003】

生物学的プロセスは、分子、巨大分子、及び分子複合体の間の共有結合的及び非共有結合的相互作用に依存する。研究及び臨床ならびに他の実用的な用途のために、そのようなプロセスを理解し、それらを操作する技術及び化合物を開発するためには、これらの相互作用及び／または当該相互作用に關与する構成成分を検出及びモニタリングすることができると必要である。これらの相互作用の研究には、特に生理学的条件下（例えば、タンパク質相互作用をモニタリングするための正常な発現レベル）での研究には、高い感度が要求される。

【0004】

現場及び臨床環境で使用するための、より優れたアッセイの創生は、現在もなお急を要する分野である。速度、感度、選択性、頑健性、簡便性、定量的機能対定性的機能、及び費用は、全て、診断用バイオアッセイの妥当性に影響を与える重要な因子であり、したがって、関連業界での実用性及び採用に影響する。迅速な診断テストは、臨床環境に適切であるだけでなく、環境、産業への適用、及び消費者の状況に直接適用することもできる。

【発明の概要】

【0005】

本明細書で提供されるのは、発光基質と、標的分析物結合要素及び生物発光複合体のポリペプチド構成成分または生物発光複合体のペプチド構成成分のうちの1つを含む標的分析物結合剤と、を含む、組成物及び配合物である。

【0006】

これらの実施形態によれば、標的分析物結合剤のポリペプチド構成成分は、配列番号5と少なくとも60%の配列同一性、配列番号9と少なくとも60%の配列同一性、または配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を含む。

【0007】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のペプチド構成成分は、配列番号10と少なくとも60%の配列同一性、配列番号11と少なくとも60%の配列同一性、配列番号13と少なくとも60%の配列同一性、または配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を含む。

【0008】

いくつかの実施形態において、組成物は、生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分を含み、標的分析物結合剤及び生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する。

【0009】

いくつかの実施形態において、発光基質及び標的分析物結合剤を含む組成物は、乾燥配合物に合わされ、生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、液体配合物に含まれ、液体配合物は、乾燥配合物に添加され、再水和すると、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する。

【0010】

いくつかの実施形態において、発光基質、標的分析物結合剤、及び生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分を含む組成物は、乾燥配合物に合わされ、乾燥配合物は、再水和すると、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する。

10

20

30

40

50

【0011】

いくつかの実施形態において、相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する第2の標的分析物結合要素を含む。

【0012】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のポリペプチド構成成分は、配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を含み、生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を含む。

【0013】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のポリペプチド構成成分は、配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を含み、生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を含む。

10

【0014】

本開示の実施形態はまた、(a) 第1の標的分析物結合要素及び配列番号9と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤と、(b) 第2の標的分析物結合要素及び配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤と、を含む、乾燥配合物を含む、組成物を含む。

【0015】

いくつかの実施形態において、乾燥配合物は、発光基質を更に含む。

【0016】

いくつかの実施形態において、組成物は、標的分析物を含む液体配合物を更に含む。

20

【0017】

本開示の実施形態はまた、(a) 第1の標的分析物結合要素及び配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤と、(b) 第2の標的分析物結合要素及び配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤と、を含む、乾燥配合物を含む、組成物を含む。

【0018】

いくつかの実施形態において、乾燥配合物は、発光基質を更に含む。

【0019】

いくつかの実施形態において、組成物は、標的分析物を含む液体配合物を更に含む。

30

【0020】

本開示の実施形態はまた、(a) 第1の標的分析物結合要素及び配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を有するペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤と、(b) 第2の標的分析物結合要素及び配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤と、(c) 配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分と、を含む、乾燥配合物を含む、組成物を含む。

【0021】

いくつかの実施形態において、乾燥配合物は、発光基質を更に含む。

40

【0022】

いくつかの実施形態において、組成物は、標的分析物を含む液体配合物を更に含む。

【0023】

本開示の実施形態はまた、(a) 標的分析物結合要素及び配列番号9と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、(b) 標的分析物結合要素及び配列番号10または配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、を含む、組成物を含む。

【0024】

本開示の実施形態はまた、(a) 標的分析物結合要素及び配列番号10または配列番号

50

11と少なくとも60%の配列同一性を有するペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、(b)標的分析物結合要素及び配列番号9と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、を含む、組成物を含む。

【0025】

本開示の実施形態はまた、(a)標的分析物結合要素及び配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、(b)標的分析物結合要素及び配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、を含む、組成物を含む。

10

【0026】

いくつかの実施形態において、乾燥配合物は、発光基質を更に含む。

【0027】

いくつかの実施形態において、液体配合物は、発光基質を更に含む。

【0028】

いくつかの実施形態において、液体配合物は、標的分析物を含むサンプルを更に含み、生物発光分析物検出複合体は、乾燥配合物及び液体配合物を標的分析物の存在下で合わせることにより、形成される。

【0029】

いくつかの実施形態において、組成物は、生物発光複合体の第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分を更に含み、標的分析物結合剤、生物発光複合体の第1の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分、及び生物発光複合体の第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する。

20

【0030】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤を含む組成物は、乾燥配合物に含まれ、生物発光複合体の第1の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分及び第2の相補性ペプチドまたはポリペプチドは、液体配合物に含まれ、液体配合物は、乾燥配合物に添加され、再水和すると、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する。

【0031】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤、及び第1または第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分のいずれかを含む組成物は、乾燥配合物に合わされ、乾燥配合物中に存在しない第1または第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、液体配合物に含まれ、液体配合物は、乾燥配合物に添加され、再水和すると、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する。

30

【0032】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤、第1の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分、及び第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、乾燥配合物に合わされ、再水和すると、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する。

【0033】

いくつかの実施形態において、乾燥配合物は、発光基質を更に含む。

40

【0034】

いくつかの実施形態において、液体配合物は、発光基質を更に含む。

【0035】

いくつかの実施形態において、液体配合物は、標的分析物を含むサンプルを更に含み、ここで、生物発光分析物検出複合体は、乾燥配合物及び液体配合物を標的分析物の存在下で合わせると形成される。

【0036】

いくつかの実施形態において、第1または第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分のいずれかは、再水和すると、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する第2の標的分析物結合要素を含む。

50

【0037】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のポリペプチド構成成分は、配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を含み、生物発光複合体の第1または第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分のいずれかは、配列番号13または配列番号15のいずれかと少なくとも60%の配列同一性を含む。

【0038】

本開示の実施形態はまた、(a) 標的分析物結合要素及び配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、(b) 標的分析物結合要素及び配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤、ならびに配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する第2の相補性ペプチド構成成分を含む、液体配合物と、を含む、組成物を含む。

10

【0039】

本開示の実施形態はまた、(a) 標的分析物結合要素及び配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤、ならびに標的分析物結合要素及び配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、(b) 配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する第2の相補性ペプチド構成成分を含む、液体配合物と、を含む。

20

【0040】

本開示の実施形態はまた、(a) 標的分析物結合要素及び配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤、ならびに配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む、乾燥配合物と、(b) 標的分析物結合要素及び配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、を含む。

30

【0041】

本開示の実施形態はまた、(a) 標的分析物結合要素及び配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を有するペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤、ならびに標的分析物結合要素及び配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、(b) 配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分を含む、液体配合物と、を含む。

【0042】

本開示の実施形態はまた、(a) 配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分を含む、乾燥配合物と、(b) 標的分析物結合要素及び配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を有するペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤、ならびに標的分析物結合要素及び配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、を含む。

40

【0043】

本開示の実施形態はまた、標的分析物結合要素及び配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を有するペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤と、標的分析物結合要素及び配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤と、配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分と、を含む、乾燥配合物を含む、組成物を含む。

【0044】

いくつかの実施形態において、乾燥配合物は、発光基質を更に含む。

【0045】

いくつかの実施形態において、液体配合物は、発光基質を更に含む。

50

【0046】

いくつかの実施形態において、液体配合物は、標的分析物を含むサンプルを更に含み、生物発光分析物検出複合体は、乾燥配合物及び液体配合物を標的分析物の存在下で合わせるにより、形成される。

【0047】

いくつかの実施形態において、発光基質の存在下で生成される生物発光シグナルは、標的分析物結合剤が生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分のうちの1つ以上と接触する場合、標的分析物結合剤及び発光基質単独によって生成される生物発光シグナルと比較して、実質的に増加する。

【0048】

いくつかの実施形態において、標的分析物は、標的抗体である。

【0049】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、抗体に非特異的に結合する要素を含む。

【0050】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、抗体に特異的に結合する要素を含む。

【0051】

いくつかの実施形態において、標的抗体は、病原体、毒素、または治療用生物学的製剤に対する抗体である。

【0052】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合要素は、抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組み換え抗体、抗体フラグメント、プロテインA、プロテインAのIg結合ドメイン、プロテインG、プロテインGのIg結合ドメイン、プロテインA/G、プロテインA/GのIg結合ドメイン、プロテインL、プロテインLのIg結合ドメイン、プロテインM、プロテインMのIg結合ドメイン、オリゴヌクレオチドプローブ、ペプチド核酸、DARPin、アプタマー、アフィマー、タンパク質ドメイン、及び精製タンパク質からなる群から選択される。

【0053】

いくつかの実施形態において、発光基質は、セレンテラジン、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h-h、フリマジン、JRW-0238、JRW-1404、JRW-1482、JRW-1667、JRW-1743、JRW-1744、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される。

【0054】

いくつかの実施形態において、組成物は、高分子を更に含む。

【0055】

いくつかの実施形態において、高分子は、天然生体高分子である。いくつかの実施形態において、天然生体高分子は、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、及びこれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの実施形態において、天然生体高分子は、プルランである。

【0056】

いくつかの実施形態において、高分子は、環状糖高分子またはその誘導体である。いくつかの実施形態において、高分子は、ヒドロキシプロピルβ-シクロデキストリンである。

【0057】

いくつかの実施形態において、高分子は、合成高分子である。いくつかの実施形態において、合成高分子は、ポリスチレン、ポリ(メタ)アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの実施形態において、合成高分子は、少なくとも1つのポリ(プロピレンオキシド)ブロックと、少なくとも1つのポリ(エチレンオキシド)ブロックとを含む、ブロックコポリマーである。いくつかの実施形態において、合成高分子は、ポロキサマー188である。

10

20

30

40

50

【0058】

いくつかの実施形態において、組成物は、自己発光を低減する物質を更に含む。

【0059】

いくつかの実施形態において、自己発光を低減する物質は、ATT（6-アザ-2-チオチミン）、ATTの誘導体または類似体、チオヌクレオシド、チオウレアなどである。

【0060】

いくつかの実施形態において、組成物は、緩衝液、界面活性剤、還元剤、塩、ラジカル捕捉剤、キレート化剤、タンパク質、またはこれらの任意の組み合わせを更に含む。いくつかの実施形態において、界面活性剤は、ポリソルベート20、ポリソルベート40、及びポリソルベート80から選択される。

10

【0061】

いくつかの実施形態において、組成物は、サンプル中の分析物を検出するために、分析物検出プラットフォームとともに使用される。

【0062】

いくつかの実施形態において、サンプルは、血液、血清、血漿、尿、便、脳脊髄液、間質液、唾液、組織サンプル、水サンプル、土壌サンプル、植物サンプル、食物サンプル、飲料サンプル、油、及び産業流体サンプルから選択される。

【0063】

本開示の実施形態はまた、上に記載される組成物のいずれかを、標的分析物を含むサンプルと合わせることを含む、サンプル中の分析物を検出する方法を含む。

20

【0064】

いくつかの実施形態において、サンプル中の標的分析物を検出することは、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを検出することを含む。

【0065】

いくつかの実施形態において、方法は、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを定量することを更に含む。

【0066】

いくつかの実施形態において、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルは、分析物の濃度に比例する。

【0067】

いくつかの実施形態において、組成物の構成成分のうちの1つ以上が、溶液中の構成成分単独と比較して、組成物内で安定性の向上を示す。

30

【0068】

本開示の実施形態はまた、サンプル中の1つまたは複数の分析物を検出するためのシステム及び方法を含む。特に、本開示は、標的分析物の存在、不在、または量に相関する生物発光シグナルを生成することが可能な基質、ペプチド、及び／またはポリペプチドを含む生物発光複合体を使用して、標的分析物を検出及び／または定量するための組成物、アッセイ、及び方法を提供する。

【0069】

本開示の実施形態は、ラテラルフロー検出システムを含む。これらの実施形態によれば、システムは、検出領域及びコントロール領域を含む、分析メンブレンを含む。いくつかの実施形態において、検出領域は、検出領域に固定化された第1の標的分析物結合剤、第2の標的分析物結合剤を含むコンジュゲートパッド、及びサンプルパッドを含む。いくつかの実施形態において、第1の標的分析物結合剤及び第2の標的分析物結合剤は、サンプル中で標的分析物が検出される場合、少なくとも1つの検出領域において生物発光分析物検出複合体を形成する。

40

【0070】

いくつかの実施形態において、第1の標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素を含み、かつ非発光である。いくつかの実施形態において、第2の標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素及び生物発光ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、生物発光

50

ポリペプチドは、配列番号 5 と少なくとも 60 % の配列同一性を有する。

【0071】

いくつかの実施形態において、第 1 の標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素及び生物発光複合体のポリペプチド構成成分を含み、第 2 の標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素及び生物発光複合体のペプチド構成成分を含む。いくつかの実施形態において、発光基質の存在下で生成される生物発光シグナルは、第 1 の標的分析物結合剤が第 2 の標的分析物結合剤と接触する場合、第 1 の標的分析物結合剤及び発光基質単独によって生成される生物発光シグナルと比較して、実質的に増加する。

【0072】

いくつかの実施形態において、第 1 の標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素及び生物発光複合体のペプチド構成成分を含み、第 2 の標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素及び生物発光複合体のポリペプチド構成成分を含む。いくつかの実施形態において、発光基質の存在下で生成される生物発光シグナルは、第 1 の標的分析物結合剤が第 2 の標的分析物結合剤と接触する場合、第 1 の標的分析物結合剤及び発光基質単独によって生成される生物発光シグナルと比較して、実質的に増加する。

【0073】

いくつかの実施形態において、生物発光複合体のポリペプチド構成成分は、配列番号 6 と少なくとも 60 % の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、生物発光複合体のポリペプチド構成成分は、配列番号 10 と少なくとも 60 % の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、生物発光複合体のポリペプチド構成成分は、配列番号 12 と少なくとも 60 % の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、生物発光複合体のポリペプチド構成成分は、配列番号 14 と少なくとも 60 % の配列同一性を有する。

【0074】

いくつかの実施形態において、第 1 の標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素及び三成分生物発光複合体の第 1 のペプチド構成成分を含み、第 2 の標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素及び三成分生物発光複合体の第 2 のペプチド構成成分を含む。いくつかの実施形態において、発光基質の存在下で生成される生物発光シグナルは、第 1 の標的分析物結合剤が第 2 の標的分析物結合剤及び三成分生物発光複合体のポリペプチド構成成分と接触する場合、(i) 第 1 の標的分析物結合剤、第 2 の標的分析物結合剤、及び／またはポリペプチド構成成分ならびに (i i) 発光基質単独によって生成される生物発光シグナルと比較して、実質的に増加する。

【0075】

いくつかの実施形態において、三成分生物発光複合体の第 1 のペプチド構成成分は、配列番号 11 と少なくとも 60 % の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、三成分生物発光複合体の第 2 の第 1 のペプチド構成成分は、配列番号 13 と少なくとも 60 % の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、三成分生物発光複合体のポリペプチド構成成分は、配列番号 12 と少なくとも 60 % の配列同一性を有する。

【0076】

いくつかの実施形態において、標的分析物は、標的抗体である。いくつかの実施形態において、第 1 の標的分析物結合要素は、抗体に非特異的に結合する剤を含む。いくつかの実施形態において、第 2 の標的分析物結合要素は、標的抗体に特異的に結合する剤を含む。いくつかの実施形態において、標的抗体は、病原体、毒素、または治療用生物学的製剤に対する抗体である。

【0077】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合要素は、抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組み換え抗体、抗体フラグメント、プロテイン A、プロテイン A の Ig 結合ドメイン、プロテイン G、プロテイン G の Ig 結合ドメイン、プロテイン A / G、プロテイン A / G の Ig 結合ドメイン、プロテイン L、プロテイン L の Ig 結合ドメイン、プロテイン M、プロテイン M の Ig 結合ドメイン、オリゴヌクレオチドプローブ、ペプチド核酸、DARPin、アプタマー、アフィマー、タンパク質ドメイン、及び精製タン

10

20

30

40

50

パク質からなる群から選択される。

【0078】

いくつかの実施形態において、システムは、発光基質を更に含む。いくつかの実施形態において、発光基質は、セレンテラジン、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h-h、フリマジン、JRW-0238、JRW-1404、JRW-1482、JRW-1667、JRW-1743、JRW-1744、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される。いくつかの実施形態において、発光基質は、発光基質と、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、ポリスチレン、ポリ(メタ)アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される高分子と、を含む、組成物の一部としてシステムにアプライされる。いくつかの実施形態において、発光基質は、発光基質と、ATT(6-アザ-2-チオチミン)、ATTの誘導体または類似体、チオヌクレオシド、チオウレアなどの自己発光を低減する物質と、を含む、組成物の一部としてシステムにアプライされる。

10

【0079】

いくつかの実施形態において、組成物は、サンプルパッド、コンジュゲーションパッド、検出領域、及びコントロール領域のうちの少なくとも1つにアプライされる。

【0080】

いくつかの実施形態において、分析メンブレンは、複数の検出領域を含み、各検出領域は、異なる標的分析物結合要素を有する、異なる標的分析物結合剤を含む。

【0081】

いくつかの実施形態において、システムは、分析物検出複合体による生物発光シグナルを検出または定量するためのデバイスを更に含む。

20

【0082】

本開示の実施形態はまた、少なくとも1つの標的分析物結合剤を含むコンジュゲートパッドを含む。これらの実施形態によれば、少なくとも1つの標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素と、配列番号5と少なくとも60%の配列同一性を含む生物発光ポリペプチド、配列番号9と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチド、配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチド、配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、またはOplophorusルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアのうちの1つと、を含む。

30

【0083】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素と、配列番号5の生物発光ポリペプチド、配列番号9のポリペプチド、配列番号10のペプチド、配列番号11のペプチド、配列番号13のペプチド、配列番号12のポリペプチド、配列番号14のペプチド、またはOplophorusルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアのうちの1つと、を含む。

【0084】

いくつかの実施形態において、コンジュゲートパッドは、発光基質を更に含む。いくつかの実施形態において、発光基質は、セレンテラジン、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h-h、フリマジン、JRW-0238、JRW-1404、JRW-1482、JRW-1667、JRW-1743、JRW-1744、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される。いくつかの実施形態において、発光基質は、発光基質と、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、ポリスチレン、ポリ(メタ)アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される高分子と、を含む、組成物の一部としてコンジュゲートパッド上にまたはコンジュゲートパッド内に含有される。いくつかの実施形態において、発光基質は、発光基質と、ATT(6-アザ-2-チオチミン)、ATTの誘導体または類似体、チオヌクレオシド、チオウレアなどの自己発光を低減する物質と、を含む、組成物の一部としてシステムにアプライされる。

40

50

【0085】

本開示の実施形態はまた、検出領域及びコントロール領域を含む、分析メンブレンを含む。これらの実施形態によれば、検出領域は、検出領域に固定化された少なくとも1つの標的分析物結合剤を含む。

【0086】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素と、配列番号5と少なくとも60%の配列同一性を含む生物発光ポリペプチド、配列番号9と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチド、配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチド、配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、またはOplophorusルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアのうちの1つと、を含む。

10

【0087】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素と、配列番号5の生物発光ポリペプチド、配列番号9のポリペプチド、配列番号10のペプチド、配列番号11のペプチド、配列番号13のペプチド、配列番号12のポリペプチド、配列番号14のペプチド、またはOplophorusルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアのうちの1つと、を含む。

20

【0088】

いくつかの実施形態において、分析メンブレンは、複数の検出領域を更に含み、各検出領域は、異なる標的分析物結合要素を有する、異なる標的分析物結合剤を含む。いくつかの実施形態において、分析メンブレンは、発光基質を更に含む。いくつかの実施形態において、発光基質は、セレンテラジン、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h-h、フリマジン、JRW-0238、JRW-1404、JRW-1482、JRW-1667、JRW-1743、JRW-1744、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される。

【0089】

いくつかの実施形態において、発光基質は、発光基質と、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、ポリスチレン、ポリ(メタ)アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される高分子と、を含む、組成物の一部としてコンジュゲートパッドに可逆的にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、発光基質は、発光基質と、ATT(6-アザ-2-チオチミン)、ATTの誘導体または類似体、チオヌクレオシド、チオウレアなどの自己発光を低減する物質と、を含む、組成物の一部である。

30

【0090】

本開示の実施形態はまた、検出領域を含む固相検出プラットフォームを含む。これらの実施形態によれば、検出領域は、検出領域にコンジュゲートされた少なくとも1つの標的分析物結合剤を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素と、配列番号5と少なくとも60%の配列同一性を含む生物発光ポリペプチド、配列番号9と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチド、配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチド、配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、またはOplophorusルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアのうちの1つと、を含む。

40

【0091】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素と、配列番号5の生物発光ポリペプチド、配列番号9のポリペプチド、配列番号10のペプチド、配列

50

番号 11 のペプチド、配列番号 13 のペプチド、配列番号 12 のポリペプチド、配列番号 14 のペプチド、または O p l o p h o r u s ルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアのうちの 1 つと、を含む。

【0092】

いくつかの実施形態において、検出プラットフォームは、検出領域にコンジュゲートされる、標的分析物結合要素及び配列番号 6 と少なくとも 60 % の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第 1 の標的分析物結合剤と、検出領域にアプライされる、標的分析物結合要素及び配列番号 10 と少なくとも 60 % の配列同一性を含むペプチドを含む、第 2 の標的分析物結合剤と、を含む。

【0093】

いくつかの実施形態において、検出プラットフォームは、検出領域にコンジュゲートされる、標的分析物結合要素及び配列番号 10 と少なくとも 60 % の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第 1 の標的分析物結合剤と、検出領域にアプライされる、標的分析物結合要素及び配列番号 6 と少なくとも 60 % の配列同一性を含むペプチドを含む、第 2 の標的分析物結合剤と、を含む。

【0094】

いくつかの実施形態において、検出プラットフォームは、検出領域にコンジュゲートされる、標的分析物結合要素及び配列番号 11 と少なくとも 60 % の配列同一性を含むペプチドを含む、第 1 の標的分析物結合剤と、検出領域にアプライされる、標的分析物結合要素及び配列番号 13 と少なくとも 60 % の配列同一性を含むペプチドを含む、第 2 の標的分析物結合剤と、検出領域にアプライされる、配列番号 12 と少なくとも 60 % の配列同一性を含むポリペプチドと、を含む。

【0095】

いくつかの実施形態において、検出プラットフォームは、検出領域にコンジュゲートされる、標的分析物結合要素及び配列番号 6 と少なくとも 60 % の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第 1 の標的分析物結合剤と、検出領域にアプライされる、標的分析物結合要素及び配列番号 14 と少なくとも 60 % の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第 2 の標的分析物結合剤と、を含む。

【0096】

いくつかの実施形態において、検出プラットフォームは、検出領域にコンジュゲートされる、標的分析物結合要素及び配列番号 14 と少なくとも 60 % の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第 1 の標的分析物結合剤と、検出領域にアプライされる、標的分析物結合要素及び配列番号 6 と少なくとも 60 % の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第 2 の標的分析物結合剤と、を含む。

【0097】

いくつかの実施形態において、検出プラットフォームは、検出領域にコンジュゲートされる、標的分析物結合要素及び配列番号 5 と少なくとも 60 % の配列同一性の生物発光ポリペプチドを含む、第 1 の標的分析物結合剤と、検出領域にアプライされる、標的分析物結合要素及び生物発光ポリペプチドからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアを含む、第 2 の標的分析物結合剤と、を含む。

【0098】

いくつかの実施形態において、検出プラットフォームは、検出領域にアプライされる、標的分析物結合要素及び配列番号 5 と少なくとも 60 % の配列同一性の生物発光ポリペプチドを含む、第 1 の標的分析物結合剤と、検出領域にコンジュゲートされる、標的分析物結合要素及び生物発光ポリペプチドからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアを含む、第 2 の標的分析物結合剤と、を含む。

【0099】

いくつかの実施形態において、検出プラットフォームは、複数の検出領域を更に含み、各検出領域は、異なる標的分析物結合要素を有する、異なる標的分析物結合剤を含む。いくつかの実施形態において、検出プラットフォームは、コントロール領域を更に含む。い

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、検出プラットフォームは、発光基質を更に含む。いくつかの実施形態において、発光基質は、セレンテラジン、セレンテラジン-*h*、セレンテラジン-*h-h*、フリマジン、JRW-0238、JRW-1404、JRW-1482、JRW-1667、JRW-1743、JRW-1744、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される。いくつかの実施形態において、発光基質は、発光基質と、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、ポリスチレン、ポリ(メタ)アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される高分子と、を含む、組成物の一部としてコンジュゲートパッドに可逆的にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、発光基質は、発光基質と、A T T (6-アザ-2-チオチミン)、A T Tの誘導体または類似体、チオヌクレオシド、チオウレアなどの自己発光を低減する物質と、を含む、組成物の一部である。

10

【0100】

本開示の実施形態はまた、少なくとも1つの検出容器及び凍結乾燥タブレット(ライオケーキ)を含む、液相検出プラットフォームを含む。これらの実施形態によれば、ライオケーキは、標的分析物結合要素と、配列番号5と少なくとも60%の配列同一性を含む生物発光ポリペプチド、配列番号9と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチド、配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチド、配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、またはOplophorus

20

【0101】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素と、配列番号5の生物発光ポリペプチド、配列番号9のポリペプチド、配列番号10のペプチド、配列番号11のペプチド、配列番号13のペプチド、配列番号12のポリペプチド、配列番号14のペプチド、またはOplophorusルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアのうちの1つと、を含む。

【0102】

いくつかの実施形態において、ライオケーキは、標的分析物結合要素及び配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、標的分析物結合要素及び配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチドを含む、第2の標的分析物結合剤と、を含む。

30

【0103】

いくつかの実施形態において、ライオケーキは、標的分析物結合要素及び配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、標的分析物結合要素及び配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチドを含む、第2の標的分析物結合剤と、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチドと、を含む。

【0104】

いくつかの実施形態において、ライオケーキは、標的分析物結合要素及び配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、標的分析物結合要素及び配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第2の標的分析物結合剤と、を含む。

40

【0105】

いくつかの実施形態において、ライオケーキは、標的分析物結合要素及び配列番号5と少なくとも60%の配列同一性の生物発光ポリペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、標的分析物結合要素及び生物発光ポリペプチドからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアを含む、第2の標的分析物結合剤と、を含む。

【0106】

50

いくつかの実施形態において、検出プラットフォームは、複数の検出容器と、異なる標的分析物結合要素を含む少なくとも2つの異なる標的分析物結合剤と、を含む、96ウェルマイクロタイタープレートを含む。

【0107】

いくつかの実施形態において、ライオケーキは、発光基質を含む。いくつかの実施形態において、発光基質は、セレンテラジン、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h-h、フリマジン、JRW-0238、JRW-1404、JRW-1482、JRW-1667、JRW-1743、JRW-1744、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される。

【0108】

いくつかの実施形態において、ライオケーキは、発光基質と、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、ポリスチレン、ポリ(メタ)アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される高分子と、を含む。

【0109】

いくつかの実施形態において、ライオケーキは、発光基質と、ATT(6-アザ-2-チオチミン)、ATTの誘導体または類似体、チオヌクレオシド、チオウレアなどの自己発光を低減する物質と、を含む。

【0110】

いくつかの実施形態において、検出プラットフォームは、少なくとも1つのサンプルを更に含む。いくつかの実施形態において、サンプルは、血液、血清、血漿、尿、便、脳脊髄液、間質液、唾液、組織サンプル、水サンプル、土壌サンプル、植物サンプル、食物サンプル、飲料サンプル、油、及び産業流体サンプルから選択される。

【0111】

本開示の実施形態はまた、上に記載されるラテラルフローアッセイシステムを使用した、サンプル中の分析物を検出する方法を含む。これらの実施形態によれば、方法は、サンプルをサンプルパッドにアプライすることと、サンプルパッドからコンジュゲートパッドへ、次いで、コンジュゲートパッドから分析メンブレン上の検出領域及びコントロール領域へサンプルの流れを促進することと、を含む。いくつかの実施形態において、第1の標的分析物結合剤、第2の標的分析物結合剤、及び標的分析物は、サンプル中で標的分析物が検出される場合、少なくとも1つの検出領域において分析物検出複合体を形成する。

【0112】

いくつかの実施形態において、サンプルは、血液、血清、血漿、尿、便、脳脊髄液、間質液、組織、及び唾液から選択される、対象からのサンプルである。いくつかの実施形態において、サンプルは、水サンプル、土壌サンプル、植物サンプル、食物サンプル、飲料サンプル、油、及び産業流体サンプルから選択される。いくつかの実施形態において、サンプル中の標的分析物を検出することは、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを検出することを含む。

【0113】

いくつかの実施形態において、方法は、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを定量することを更に含む。いくつかの実施形態において、方法は、サンプルが取得された対象を、分析物の検出に基づいて、疾患に罹っているかいないかを診断することを更に含む。

【0114】

本開示の実施形態はまた、上に記載される固相検出プラットフォームを使用した、サンプル中の分析物を検出する方法を含む。これらの実施形態によれば、方法は、検出領域及びコントロール領域にサンプルを曝露することを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的分析物結合剤及び少なくとも1つの標的分析物は、サンプル中で標的分析物が検出される場合、少なくとも1つの検出領域において分析物検出複合体を形成する。

【0115】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、サンプルは、血液、血清、血漿、尿、便、脳脊髄液、間質液、組織、及び唾液から選択される、対象からのサンプルである。いくつかの実施形態において、サンプルは、水サンプル、土壌サンプル、植物サンプル、食物サンプル、飲料サンプル、油、及び産業流体サンプルから選択される。いくつかの実施形態において、サンプル中の標的分析物を検出することは、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを検出することを含む。

【0116】

いくつかの実施形態において、方法は、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを定量することを更に含む。いくつかの実施形態において、方法は、サンプルが取得された対象を、分析物の検出に基づいて、疾患に罹っているかいないかを診断することを更に含む。

10

【0117】

本開示の実施形態はまた、生物発光アッセイに使用するための基材を作製する方法を含む。これらの実施形態によれば、方法は、基材上に溶液を塗布することを含む。いくつかの実施形態において、溶液は、標的分析物結合要素と、生物発光複合体のポリペプチド構成成分または生物発光複合体のペプチド構成成分のうちの1つと、を含む、少なくとも1つの標的分析物結合剤を含有する。いくつかの実施形態において、方法は、溶液を含有する基材を乾燥させることを含む。

【0118】

いくつかの実施形態において、溶液は、生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分を更に含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤及び生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する。

20

【0119】

いくつかの実施形態において、溶液は、タンパク質緩衝液及び少なくとも1つの賦形剤を含む。いくつかの実施形態において、溶液は、発光基質を含む。

【0120】

いくつかの実施形態において、乾燥させた溶液を含む基材は、W-903ペーパー、FTAペーパー、FTA Eluteペーパー、FTA DMPKペーパー、Ahlsstrom A-226ペーパー、MTFNペーパー、FTAペーパー、FP705ペーパー、Bode DNA収集紙、ニトロセルロースペーパー、ナイロンペーパー、セルロースペーパー、Dacronペーパー、コットンペーパー、及びポリエステルペーパー、またはこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態において、基材は、プラスチック、ナイロン、金属、またはこれらの組み合わせを含むメッシュである。

30

【0121】

いくつかの実施形態において、溶液を含有する基材を乾燥させることは、約30℃～40℃の温度で、約30分～2時間の間、乾燥させることを含む。いくつかの実施形態において、溶液を含有する基材を乾燥させることは、基材を凍結乾燥及び／または凍結させることを含む。

【0122】

いくつかの実施形態において、方法は、第1の基材上で少なくとも1つの標的分析物結合剤及び／または生物発光複合体の相補性ペプチドもしくはポリペプチド構成成分を乾燥させることと、第2の基材上で発光基質を乾燥させることと、を更に含む。

40

【0123】

これらの実施形態によれば、生物発光シグナルは、溶液を含有する基材に標的分析物を曝すことで生成され、いくつかの実施形態において、生物発光シグナルは、標的分析物の濃度に比例する。

【0124】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的分析物結合剤及び／または生物発光複合体の相補性ペプチドもしくはポリペプチド構成成分は、基材上で乾燥させた場合、

50

向上した安定性を示す。

【0125】

本開示の実施形態は、発光基質と、標的分析物結合要素及び生物発光複合体のポリペプチド構成成分を含む標的分析物結合剤と、生物発光複合体の相補性ポリペプチド構成成分と、を含む、組成物を含む。これらの実施形態によれば、標的分析物結合剤及び生物発光複合体の相補性ポリペプチド構成成分は、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成することが可能である。

【0126】

いくつかの実施形態において、組成物は、第2の標的分析物結合要素及び生物発光複合体の第2のポリペプチド構成成分を含む、第2の標的分析物結合剤を更に含む。

10

【0127】

いくつかの実施形態において、第1及び第2の標的分析物結合剤は、同じ標的分析物の別の部分に結合する。

【0128】

いくつかの実施形態において、生物発光複合体の第1及び第2のポリペプチド構成成分は、生物発光複合体の相補性ポリペプチド構成成分に結合して、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する。

【0129】

いくつかの実施形態において、第1及び第2のポリペプチド構成成分は、ハロアルカン基質と共有結合を形成することが可能な修飾デハロゲナーゼに連結される。

20

【0130】

いくつかの実施形態において、第1及び第2の標的分析物結合要素は、ハロアルカン基質を含む。

【0131】

いくつかの実施形態において、第1及び第2の標的分析物結合剤の第1または第2のポリペプチド構成成分は、配列番号10と少なくとも60%の配列同一性、配列番号11と少なくとも60%の配列同一性、配列番号13と少なくとも60%の配列同一性、または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を含む。

【0132】

いくつかの実施形態において、相補性ポリペプチド構成成分は、配列番号6と少なくとも60%の配列同一性、配列番号9と少なくとも60%の配列同一性、または配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を含む。

30

【0133】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合要素は、抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組み換え抗体、抗体フラグメント、プロテインA、プロテインAのIg結合ドメイン、プロテインG、プロテインGのIg結合ドメイン、プロテインA/G、プロテインA/GのIg結合ドメイン、プロテインL、プロテインLのIg結合ドメイン、プロテインM、プロテインMのIg結合ドメイン、オリゴヌクレオチドプローブ、ペプチド核酸、DARPin、アプタマー、アフィマー、タンパク質ドメイン、及び精製タンパク質からなる群から選択される。

40

【0134】

いくつかの実施形態において、標的分析物は、抗体であり、第1の標的分析物結合剤の標的分析物結合要素は、抗体によって認識される抗原を含み、第2の標的分析物結合剤の標的分析物結合要素は、Fc結合領域を含む。

【0135】

いくつかの実施形態において、第1及び／または第2の標的分析物結合剤は、生物発光複合体の第1及び／または第2のポリペプチド構成成分に結合されたフルオロフォアを更に含む。

【0136】

いくつかの実施形態において、組成物の1つ以上の構成成分は、標的分析物を検出及び

50

／または定量するために溶液中で再構成される場合、生物発光複合体を形成することが可能な凍結乾燥タブレット（ライオケーキ）の形態である。

【0137】

いくつかの実施形態において、組成物は、標的分析物を検出及び／または定量することが可能な液相検出プラットフォームに含まれる。

【0138】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド構成成分及び発光基質は、標的分析物を検出及び／または定量するために溶液中で再構成される場合、生物発光複合体を形成することが可能な凍結乾燥タブレット（ライオケーキ）の形態である。

【0139】

本開示の実施形態はまた、上に記載される組成物のいずれかを、標的分析物を含むサンプルと合わせることを含む、サンプル中の分析物を検出する方法を含む。

【0140】

いくつかの実施形態において、サンプル中の標的分析物を検出することは、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを検出することを含む。

【0141】

いくつかの実施形態において、方法は、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを定量することを更に含む。

【0142】

いくつかの実施形態において、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルは、分析物の濃度に比例する。

【図面の簡単な説明】

【0143】

【図1】本開示の一実施形態による、生物発光複合体形成に基づいてサンプル中の標的分析物（複数可）を検出及び／または定量するためのラテラルフローアッセイの代表的な概略図を示す。

【図2】本開示の一実施形態による、生物発光複合体形成に基づいてサンプル中の標的分析物を検出及び／または定量するための固相検出プラットフォームの代表的な概略図を示す。

【図3】生物発光複合体の構成成分が固体支持体基材（例えば、メンブレン）にアプライされ、乾燥され、室温で保存された後、検出可能な生物発光を生成することを示す、代表的な画像を示す。

【図4】生物発光複合体の構成成分がメンブレン及びペーパーベースの固体支持体基材にアプライされた後、検出可能な生物発光を生成することを示す、代表的な画像を示す。

【図5】標的分析物を検出するための標的分析物結合剤上のレポーターとして使用される生物発光複合体の構成成分の能力を示す、代表的なアッセイ模式図（左）及び代表的なグラフ（右）を示す。

【図6】標的分析物を検出するための標的分析物結合剤上のレポーターとして生物発光複合体の構成成分を使用する、アッセイプラットフォームの代表的な図を示す。

【図7】本開示の一実施形態による、標的分析物を検出するための標的分析物結合剤上のレポーターとして生物発光複合体の構成成分を使用する、アッセイプラットフォームの代表的な安定性試験を示す（Aは4℃；Bは25℃；Cは37℃；DはNanoLucを添加して37℃；ならびにEはHiBiTを添加して4℃及び37℃）。

【図8】本開示の一実施形態による、標的分析物を検出するための標的分析物結合剤上のレポーターとして生物発光複合体の構成成分を使用する、アッセイプラットフォームの保管条件の代表的な試験を示す（Aは4℃及び25℃；Bはスクロースベースタンパク質緩衝液で4℃及び25℃）。

【図9】複雑なサンプリング環境（Bは全血及びCは血清）で生物発光シグナルが生成され、標的分析物の検出を示している、固相アッセイプラットフォーム（A）の代表的な画像を示す。

10

20

30

40

50

【図10】アッセイ緩衝液で再水和した後のWhatman 903ペーパースポットから得られたRLUシグナルが、定量的（A）または定性的（B）のいずれでも測定できることを示す。

【図11】高親和性ジペプチドPep263が生物発光複合体を形成する能力を示す、代表的なグラフを示す。（Pep263は、NanoTrip複合体のβ9及びβ10ストランドを含むペプチドである；例えば、米国特許出願第16／439,565号（PCT／US2019／036844）参照；その全体は参照により本明細書に援用される）。

【図12】iPhone（例えば、iPhone 6S）またはイメージャー（例えば、LAS4000）の標準的なカメラを使用して、標準的なマイクロタイタープレートに配置したペーパーパンチからの生物発光の定性評価を示す、固相アッセイの代表的な結果を示す。

10

【図13】図12に示されるものと同じ固相アッセイの定量的分析を示すが、発光は、25℃で保管して3日目にルミノメーターを使用して検出した。

【図14】図12～13に示されるものと同じ固相アッセイの定量的な時間経過を示し、この時間枠で試験した全ての温度での実験条件における全てのタンパク質の安定性を示す。

【図15】25℃及び60℃の2つの緩衝液条件下で実施した加速安定性試験の0日目に収集した代表的なRLUシグナルカイネティクス結果を示す。

【図16】図15に定義されるコンジュゲーション緩衝液条件を使用して配置したタンパク質の加速安定性試験の経時的結果を示す。

【図17】ニトロセルロースメンブレン上で乾燥させたNanoLucからの発光に対する緩衝液条件の影響の比較を示す。

20

【図18】20X SSC、1%BSA（pH7.0）、及び10μM N205（Live Cell Substrate；LCS）のランニング緩衝液で実施したラテラルフローアッセイにおける、メンブレンのブロッキング及びスクロース前処理の効果を示す。

【図19】0.01M PBS、1%BSA（pH7.0）及び10μM Permeable Cell Substrate（PCS）のランニング緩衝液で実施したラテラルフローアッセイにおける、メンブレンのブロッキング及びスクロースの前処理の効果を示す。

【図20】5x LCS希釈緩衝液+PBSで1Xに希釈した5x LCSのランニング緩衝液で実施したラテラルフローアッセイにおける、メンブレンのブロッキング及びスクロースの前処理の効果を示す。

30

【図21】ラテラルフローアッセイにおける生物発光試薬の吸収及び毛管現象へのメンブレン特性の影響を示す。

【図22】ニトロセルロース（左）及びWhatmanグレード541（右）ペーパー上のNanoBit／HiBit相補体による生物発光シグナル（A）と、全露光時間にわたって撮影された対応する動画からの編集画像を示す（B）。

【図23】Whatman 903ペーパー上のNanoBit／HiBit相補体による生物発光シグナルを示し、20分に追加の基質及び液体のスパイクがある。

【図24】Whatman 903ペーパー上のNanoBit／HiBit相補体による生物発光シグナルを示す。

【図25】BSAあり（B）またはBSAなし（A）で調製したWhatman 903ペーパー上で、LgTrip及び基質をジペプチドにより再構成したものから得られた生物発光シグナルを示し、図25Cは、図25Bで試験した各濃度の最大RLUシグナルを示す。

40

【図26】ライオケーキからLgTrip及び基質をジペプチドにより再構成したものから得られた生物発光シグナル（A）を、ジペプチドの滴定とともに示し、Bは、Aで試験した各濃度について得られた最大RLUシグナルを示す。

【図27】乾燥させたLgTrip及び基質へのジペプチドの添加、または乾燥させたLgTrip及び基質へのNanoLucの添加による再構成から得られた3つの異なる固相材料（Whatman 903、Ahlsstrom 237、及びAhlsstrom 6613H）における生物発光シグナルを示す。

50

【図28】Lg/Trip/基質を含有し、周囲条件で25日にわたって保存したWhatman 903スポットから生成された生物発光シグナルを示す。スポットをPBS中1nMのジペプチドに曝露した。

【図29】様々なタンパク質緩衝液配合物を用いてWhatman 903ペーパーを乾燥させ、フリマジンで再構成した、NanoLuc (A)、LgBiT (B)、及びLgTrip (C)の生物発光シグナル (RLU)を示す。

【図30】図29に示される、様々なタンパク質緩衝液配合物を用いてWhatman 903ペーパーを乾燥させ、フリマジンで再構成した、NanoLuc (A)、LgBiT (B)、及びLgTrip (C)の生物発光シグナル (Bmax)を示す。

【図31】図29に示される、様々なタンパク質緩衝液配合物を用いてWhatman 903ペーパーを乾燥させ、フリマジンで再構成した、LgBiT (A)及びLgTrip (B)の生物発光バックグラウンドレベルを示す。

【図32A】様々なタンパク質緩衝液配合物を用いてWhatman 903ペーパーを乾燥させ、60℃で6日間保管した後、フリマジンで再構成した、NanoLucの生物発光シグナル (フリマジンで再構成した後のRLUシグナルカインेटクス)を示す。

【図32B】様々なタンパク質緩衝液配合物を用いてWhatman 903ペーパーを乾燥させ、60℃で6日間保管した後、フリマジンで再構成した、LgBiTの生物発光シグナル (フリマジンで再構成した後のRLUシグナルカインेटクス)を示す。

【図32C】様々なタンパク質緩衝液配合物を用いてWhatman 903ペーパーを乾燥させ、60℃で6日間保管した後、フリマジンで再構成した、LgTripの生物発光シグナル (フリマジンで再構成した後のRLUシグナルカインेटクス)を示す。

【図32D】様々なタンパク質緩衝液配合物を用いてWhatman 903ペーパーを乾燥させ、60℃で6日間保管した後、フリマジンで再構成した、NanoLucの生物発光シグナル (Bmax)を示す。

【図32E】様々なタンパク質緩衝液配合物を用いてWhatman 903ペーパーを乾燥させ、60℃で6日間保管した後、フリマジンで再構成した、LgBiTの生物発光シグナル (Bmax)を示す。

【図32F】様々なタンパク質緩衝液配合物を用いてWhatman 903ペーパーを乾燥させ、60℃で6日間保管した後、フリマジンで再構成した、LgTripの生物発光シグナル (Bmax)を示す。

【図33】キュベット、試験管、大容量ボトル、スナップテストタイプのアッセイなどを含む、いくつかのタイプのアッセイフォーマットをサポートする分析物検出試験を実施するために必要な全ての試薬を含有する、オールインワン凍結乾燥ケーキ (「ライオケーキ」) または錠剤の代表的な実施形態である。

【図34】全露光時間にわたって撮影された動画に対応する編集画像から得た、NanoLucを含有するラテラルフローストリップを横切る基質の移動による生物発光シグナルを示す。

【図35】全露光時間にわたって撮影された動画に対応する編集画像から得た、ラテラルフローストリップを横切るNanoLucの移動による生物発光シグナルを示す。

【図36】フモニシンB1をペプチドタグ (例えば、配列番号10を含む) に、ピオチン/ストレプトアビジン連結を介して、HaloTag連結を介して、または直接 (例えば、例えば、米国特許出願第16/698,143号 (PCT/US2019/063652) (参照により本明細書に援用される) に記載されるsulfonamide標識を介して)、つなぐことによって生成される様々なトレーサーを示す。これらは、本明細書に記載される材料及び方法に従って、競合結合アッセイに使用することができる。

【図37】様々な濃度の非標識フモニシンB1が生物発光複合体を破壊し、その結果、発光が減少し、サンプル中のフモニシンB1の量を検出/定量する能力も低下する、例示的な競合結合アッセイを示す。

【図38】PBS中のジペプチドで再構成した場合のLgBiT及び基質を含有する凍結乾燥ケーキから得られた生物発光シグナル (A)を示し、Bは、Aで試験した各濃度につ

10

20

30

40

50

いて得られた最大RLUシグナルを示す。

【図39】基質を含むまたは含まない標準的な96ウェルプレートに直接凍結乾燥させたLgBiTまたはLgTrip 3546の再構成から得られた生物発光シグナルを示し、再構成は、基質を含むまたは含まないPBS中のジペプチドで実施した。

【図40A】様々な濃度のPBS中の標的分析物レミケードで再構成した後のWha t m a n 903ペーパースポットにおけるLgBiT-プロテインG、SmBiT-TNF α 、及び基質の相補性から得られた生物発光シグナルを示す。

【図40B】様々な濃度のPBS中の標的分析物レミケードで再構成した後のWha t m a n 903ペーパースポットにおけるLgBiT-プロテインG、SmBiT-TNF α 、及び基質の相補性から得られた生物発光シグナルを示す。

10

【図40C】様々な濃度のPBS中の標的分析物レミケードで再構成した後のライオケーキフォーマットにおけるLgBiT-プロテインG、SmBiT-TNF α 、及び基質の相補性から得られた生物発光シグナルを示す。

【図41A】様々な濃度のPBS中の標的分析物レミケードで再構成した後のWha t m a n 903ペーパースポットにおけるLgTrip、SmTrip9-プロテインG、HiBiT-TNF α 、及び基質の相補性から得られた生物発光シグナルを示す。

【図41B】様々な濃度のPBS中の標的分析物レミケードで再構成した後のライオケーキフォーマットにおけるLgTrip、SmTrip9-プロテインG、HiBiT-TNF α 、及び基質の相補性から得られた生物発光シグナルを示す。

【図41C】様々な濃度のPBS中の標的分析物レミケードで再構成した後のライオケーキフォーマットにおけるLgTrip、SmTrip9-プロテインG、HiBiT-TNF α 、及び基質の相補性から得られた生物発光シグナルを示す。

20

【図42A】基質を含まない形態で乾燥させた生物発光複合体の相補性から得られた生物発光シグナルを示す。基質を個別に添加すると、分析物の存在下で生物発光シグナルが生成する。

【図42B】基質を含まない形態で乾燥させた生物発光複合体の相補性から得られた生物発光シグナルを示す（メッシュベースライオケーキ）。基質を個別に添加すると、分析物の存在下で生物発光シグナルが生成する。

【図42C】基質を含まない形態で乾燥させた生物発光複合体の相補性から得られた生物発光シグナルを示す（メッシュベースライオケーキ）。基質を個別に添加すると、分析物の存在下で生物発光シグナルが生成する。

30

【図42D】基質を含まない形態で乾燥させた生物発光複合体の相補性から得られた生物発光シグナルを示す（メッシュベースフィルム）。基質を個別に添加すると、分析物の存在下で生物発光シグナルが生成する。

【図42E】基質を含まない形態で乾燥させた生物発光複合体の相補性から得られた生物発光シグナルを示す（メッシュベースフィルム）。基質を個別に添加すると、分析物の存在下で生物発光シグナルが生成する。

【図43】4つの異なるフリマジン基質配合物の凍結乾燥ケーキの形成及び比色pHを示す。

【図44】精製NanoLuc (NLuc) 酵素の存在下における様々なフリマジン (Fz) 基質配合物のカイネティクス活性性能を示す。

40

【図45】60℃で指定の日数保存したフリマジン基質配合物の活性性能を示す。

【図46】0.01%BSA含有PBS (pH7.0) で再構成した後に残存する絶対フリマジン濃度をHPLCによって分析した、周囲温度 (A) または60℃ (B) で維持した様々なフリマジン基質配合物の経時的な日数単位での熱安定性を示す。

【図47】液体安定性を示すHPLCによって分析した、様々なフリマジン基質配合物について、水での再構成から12日後に残っているフリマジンの量を示す。

【図48】分析物であるインターロイキン-6 (IL-6) のためのホモジニアス三成分イムノアッセイの模式図を示す。

【図49】三成分HaloTag融合タンパク質で標識した抗体のSDS-PAGEゲル

50

の一例を示す。マウス抗ヒトIL-6抗体を標識するために、SmTrip9またはSmTrip10のバリエーションをHaloTagに融合し、発現させ、精製し、使用した。

【図50】IL-6あり及びIL-6なしでの溶液ベースホモジニアス三成分IL-6イムノアッセイのシグナルカインेटクスを示す（Aは未処理RLU、及びBは倍率反応）。

【図51】溶液ベースホモジニアスIL-6三成分イムノアッセイにおける組み換えヒトIL-6の用量反応曲線を示す（Aは対数グラフ；Bは線形グラフ）。

【図52】凍結乾燥ケーキ生成物（A；#1及び#2）、ならびに周囲温度で指定の日数保管した後に再構成した、フリマジンなし（Fz；B）及びフリマジンあり（Fz；C）の様々な配合単一試薬凍結乾燥ケーキのIL-6イムノアッセイ性能及び保存安定性を示す。

【図53】ケーキの外観（A）ならびに周辺保管で90日間保存した配合凍結乾燥単一試薬IL-6三成分イムノアッセイの性能（B）及び保存安定性を示す。

【図54】再構成した後の単一試薬凍結乾燥三成分IL-6イムノアッセイのシグナルカインेटクスを示す。

【図55】複雑なヒトマトリックスによる凍結乾燥単一試薬IL-6イムノアッセイの適合性を示す。

【図56】予め充填した96ウェルマイクロタイタープレートでの凍結乾燥単一試薬IL-6三成分イムノアッセイ（A）、及び再構成後の凍結乾燥単一試薬IL-6三成分イムノアッセイアッセイプレートを使用したrhIL-6用量反応曲線（B）を示す。

【図57】単一配合の賦形剤（A）及び様々な配合溶液（B）での溶液ベースIL-6三成分イムノアッセイのアッセイ性能を示す。

【図58】モデル分析物である心筋トロポニンIのためのホモジニアス三成分イムノアッセイの模式図を示す。

【図59】組み換えヒト心筋トロポニンIを使用した溶液ベースホモジニアス心筋トロポニンI三成分イムノアッセイの用量反応曲線を、未処理のRLU（A）及びバックグラウンドに対するシグナル（B）で示す。

【図60】0.01%BSAを含むPBSまたは一般的な血清希釈液で希釈した10%正常プールヒト血清で再構成した後の単一試薬配合凍結乾燥トロポニン心筋I三成分イムノアッセイのアッセイ性能を未処理のRLUで示す。

【図61】0.01%BSAを含むPBSのアッセイ緩衝液（A）及び一般的な血清希釈液（B）を使用した場合のヒト血清の存在下における溶液ベースホモジニアスIL-6三成分イムノアッセイのバックグラウンドシグナルの未処理RLUの結果を示す。

【図62】0.01%BSAを含むPBSのアッセイ緩衝液（A）及び一般的な血清希釈液（B）を使用した場合のヒト血清の存在下における50ng/mlのrhIL-6の存在下での溶液ベースホモジニアスIL-6三成分イムノアッセイの未処理BmaxRLUの結果を示す。

【図63】50ng/mlのrhIL-6の存在下または不在下、漸増量の正常プールヒト血清（A及びC）または正常プールヒト血漿（B及びD）を用いた、アッセイ緩衝液として0.01%BSAを含むPBSまたはGeneral Serum Diluentのいずれかと、NanoGlo（Promegaカタログ番号N113）（C及びD）またはLive Cell（Promegaカタログ番号N205）基質（A及びB）で実施した場合における、溶液ベースホモジニアスIL-6三成分イムノアッセイのシグナル対バックグラウンドの結果を示す。

【図64】50ng/mlのrhIL-6の存在下または不在下、正常プールヒト血清及び内因性IgGを枯渇させたプールヒト血清の量を増加させた、アッセイ緩衝液として一般的な血清希釈液を使用した場合における、溶液ベースホモジニアスIL-6三成分イムノアッセイのシグナル対バックグラウンドの結果を示す。

【図65】50ng/mlのrhIL-6の存在下または不在下、VeriChemマトリックスプラスケミストリーレファレンスキットで提供される漸増量のヒト血液化学パネル成分を用いた、溶液ベースホモジニアスIL-6三成分イムノアッセイのバックグラウ

10

20

30

40

50

ンドRLU (A)、Bmax RLU (B)、及び得られたシグナル対バックグラウンド (C) の結果を示す。

【図66】50 ng/mlのrhIL-6の存在下または不在下、漸増量のプールされた正常ヒト尿及びNanoGlo (Promegaカタログ番号N113) またはLive Cell (Promegaカタログ番号N205) 基質を用いた、溶液ベースホモジニアスIL-6三成分イムノアッセイのバックグラウンドRLU (A)、Bmax RLU (B)、及び得られたシグナル対バックグラウンド (C) の結果を示す。

【図67】精製NanoLuc酵素 (Nluc) で試験した再構成した凍結乾燥配合フリマジン (A)、精製ジペプチド (配列番号14) で試験した配合LgTripポリペプチド (配列番号12) (B)、ならびに凍結乾燥バイアルの熱安定性の分析と合わせた精製ジペプチド (配列番号14) で試験した配合フリマジン及びLgTripポリペプチド (配列番号12) (C) の未処理のRLU活性アッセイ反応を示す。

【図68】3つの抗TNF α 生物学的製剤：レミケード、エンブレル、及びヒュミラのためのホモジニアス三成分イムノアッセイの模式図を示す。

【図69】抗TNF α 生物学的製剤のレミケード、ヒュミラ、及びエンブレルを定量する、溶液ベースホモジニアス三成分 (LgTrip 3546 + SmTrip9 pep521 + SmTrip10) イムノアッセイのアッセイ性能を未処理のRLUで示す。

【図70】NanoTrip (三成分NanoLuc; A) 及びNanoBit (B) を使用する、レミケードを検出するための、再構成した配合凍結乾燥単一試薬イムノアッセイのカイネティクスアッセイ性能を未処理のRLUとして示す。

【図71】レミケードを検出するための単一試薬凍結乾燥NanoBit (「Bits」) 及びNanoTrip (「Trips」; 三成分NanoLuc) イムノアッセイシステムの周囲温度での熱安定性を示す。ライオケーキは、100 nMのレミケードの不在下または存在下で、指定の時点で再構成し、得られた未処理のRLUを分析した。

【図72】レミケードを検出するNanoBitシステムを使用した代表的な結果を示す。配合構成成分は、アッセイの前には2つの個別のケーキに分かれている：(A) 2つの別個の凍結乾燥構成成分の画像であり、1つはLgBit-TNF α 融合体タンパク質及びフリマジン含有し (黄色)、もう1つはSmBit-プロテインG融合タンパク質を含有する (白色)。(B) 図72Aの2つの凍結乾燥構成成分を手作業で合わせた後の画像である。(C) 再構成した凍結乾燥構成成分の画像である。(D) 漸増量のレミケードの存在下で得られたカイネティクス生物発光RLUシグナルである。

【図73】デュアル凍結乾燥NanoTripイムノアッセイシステムを使用した、漸増量のレミケードの存在下で得られたカイネティクス生物発光RLUシグナルを示す。これにより、TNF α + フリマジン及びプロテインG融合タンパク質を配合し、個別に凍結乾燥させ、次いで、再構成の前に合わせた。

【図74】抗EGFR生物学的製剤 (例えば、パニツムマブ) を検出するためのホモジニアスNanoTrip (三成分NanoLuc) セルベースイムノアッセイシステムの模式図を示す。

【図75】抗EGFR生物学的製剤のためのホモジニアスセルベースNanoTripイムノアッセイシステムを使用した、パニツムマブの用量反応曲線を示す。

【図76】プロテインGに融合されたSmTrip9 (配列番号13) の異なるバリエーションを試験する、抗EGFR生物学的製剤のためのホモジニアスセルベースNanoTripイムノアッセイシステムを使用した、パニツムマブの用量反応曲線を示す。

【図77A】プロテインGに融合されたSmTrip9 (配列番号13) の様々なバリエーションを試験する、抗TNF α 生物学的製剤のためのホモジニアス溶液ベースNanoTripイムノアッセイシステムを使用した、レミケードの用量反応曲線を示す。

【図77B】抗TNF α 生物学的製剤のための凍結乾燥NanoTripイムノアッセイシステムを使用した、レミケードの用量反応曲線を示す。

【図78】反応性ペプチド (例えば、配列番号18) で直接標識された抗体を使用する、三成分IL-6イムノアッセイシステムの模式図を示す。

10

20

30

40

50

【図 79】直接標識された抗体コンジュゲートの変性 SDS-PAGE ゲル分析を示す。

【図 80】反応性ペプチド HW-0984（配列番号 20）、HW-1010（配列番号 24）、及び HW-0977（配列番号 18）で直接標識された抗 IL-6 抗体ペアの存在下における IL-6 滴定から得られた未処理の RLU 出力を示す。

【図 81】反応性ペプチド HW-0984（配列番号 20）及び HW-1053（配列番号 19）で直接標識された抗 IL-6 抗体ペアの存在下における IL-6 滴定から得られた未処理の RLU 出力を示す。

【図 82】反応性ペプチド HW-1042（配列番号 20）、HW-1050（配列番号 27）、HW-1052（配列番号 25）、HW-1043（配列番号 24）及び HW-1055（配列番号 25）で標識された抗 IL-6 抗体ペアの存在下における IL-6 滴
10

【図 83】反応性ペプチド HW-0977（配列番号 18）、HW-0984（配列番号 20）、HW-1010（配列番号 24）、HW-1042（配列番号 20）、HW-1050（配列番号 27）、HW-1052（配列番号 25）、HW-1053（配列番号 19）、HW-1043（配列番号 24）、及び HW-1055（配列番号 25）で直接標識された個々の抗 IL-6 抗体の存在下における IL-6 滴定から得られた未処理の RLU 出力を示す。

【図 84】LgTrip 5146（配列番号 451）ならびに反応性ペプチド HW-1050（配列番号 27）、HW-1043（配列番号 24）、及び HW-0977（配列番号 18）で標識された抗 IL-6 抗体ペアの存在下における IL-6 滴定から得られた
20

【図 85】ルシフェラーゼと標識抗体との間での BRET を可能にする、フルオロフォアを含有する反応性ペプチドで直接標識された抗体を使用する、三成分 IL-6 イムノアッセイモデルの模式図を示す。

【図 86】相補的な三成分ルシフェラーゼと標識抗 IL-6 抗体上のフルオロフォアとの間における IL-6 誘導 BRET を示す。

【図 87】複雑なマトリックスでの発光基質 N113 Fz (A)、JRW-1404 (B)、及び JRW-1482 (C) から得られた発光を示す。

【発明を実施するための形態】

【0144】

本開示の実施形態は、サンプル中の 1 つまたは複数の分析物を検出するためのシステム及び方法を提供する。特に、本開示は、標的分析物の存在、不在、または量に相関する生物発光シグナルを生成することが可能な基質、ペプチド、及び／またはポリペプチドを含む生物発光複合体を使用して、標的分析物を検出及び／または定量するための組成物、アッセイ、及び方法を提供する。

【0145】

ほとんどの迅速な診断バイオアッセイは、免疫学的原理に基づいている。いくつかの本開示の実施形態は、イムノアッセイに基づく概念と、生物発光の利点を組み合わせたものであり、これらの利点のなかでも、線形範囲がより広く、バックグラウンドが極めて低いことがある。しかしながら、これらの利点にもかかわらず、生物発光をベースにしたポイントオブケアのイムノアッセイは、未だ市販されていない。そのいくつかの理由は、現在利用可能なルシフェラーゼの多くが低シグナルであり、イムノアッセイにおける有用性が本質的に限られることであると思われる。更に、生物発光シグナルの出力が条件付きで構成される場合（例えば、相補性または生物発光共鳴エネルギー転移（BRET）を介する場合）、シグナルは更に低減され得る。現在利用可能なルシフェラーゼの多くはまた、高温、最適でない緩衝液組成物、及び複雑なサンプルマトリックスなどの特定のアッセイ条件に対する耐性または感度が低いことから、ポイントオブケアデバイスに適合させるには、特殊な化学的手法が必要とされる。

【0146】

本開示の実施形態はまた、分析物検出のための「オールインワン」アッセイフォーマッ

10

20

30

40

50

トの必要性にも対処しており、これは、本出願まで、従来技術において開発または記載されていない。例えば、Tenda, K. et al. (Angew. Chem. Int. Ed. 57, 15369-15373 (2018)) は、基質及び生物発光構成成分が、シングルフォーマットシステムと一緒に含まれるのではなく、紙の別々のセクション上に乾燥された紙デバイスを開示している。更に、Yu, Q. et al. (Science 361, 1122-1126 (2018)) は、生物発光構成成分と一緒に乾燥させることができるが、基質及び生物発光構成成分をシングルフォーマットシステムで乾燥させるのではなく、基質を目的の分析物と別々に混合し、その後、紙に添加することを開示している。本明細書で更に記載されるように、本開示の実施形態は、生物発光検出複合体の全ての必要な構成成分（目的の分析物を除く）をシングルフォーマット（例えば、「オールインワン」）システムに含む、方法、組成物、及びシステムを提供する。これは、必要な生物発光構成成分のうちの少なくとも1つを別々のフォーマット／ソリューションで含む現在利用可能なシステムとは対照的である。したがって、本開示の実施形態は、現在利用可能な生物発光分析物検出システムに比べて、驚くべき予想外の利点を提供する。

【0147】

典型的なイムノアッセイ試薬の使用に必ずしも限定されない、生物発光をベースにしたポイントオブケアのイムノアッセイプラットフォームの必要性に対処するために、本開示の実施形態は、2つ以上のペプチド及び／またはポリペプチド構成成分から生物発光複合体を構築するための組成物及び方法を含む、NanoLuc（登録商標）生物発光プラットフォームの使用を含む。いくつかの実施形態において、ペプチド及び／またはポリペプチド構成成分は、既存のタンパク質の断片ではない（例えば、既知のポリペプチド配列の相補的な部分配列ではない）が、本明細書で更に記載されるように、構造的相補性を介して生物発光活性を付与する（例えば、WO／2014／151736（国際出願第PCT／US2014／026354号）及び米国特許出願第16／439,565号（PCT／US2019／036844）参照。それらの全体が参照により援用される）。いくつかの実施形態において、ペプチド及び／またはポリペプチド構成成分は、相補性がない場合は、非発光であり、及び／または相補性がある場合は、ペプチドまたはポリペプチド構成成分の生物発光を促進する。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、結合剤の標的分析物への結合能力を損なうことなく、本明細書に記載される生物発光複合体の様々な構成成分で標識される。本開示の生物発光複合体の構成成分は、ラテラルフローデバイス、紙ベースのスポットテスト、ディップスティックテスト、ラボオンチップ、マイクロ流体デバイス、予め充填された96ウェルマイクロタイタープレートなどの現在利用可能なポイントオブケアデバイス及びシステムに適合するように構成される。

【0148】

例えば、本開示の実施形態は、NanoLuc（登録商標）をベースにした技術（例えば、NanoBiT、NanoTrip、Nano-Glo（例えば、NANOGLO Live Cell SubstrateまたはNANOGLO LCS（Promega カテゴリー番号N205及びN113））、NanoBRETなど）を標的分析物検出アッセイに組み込むものであり、このアッセイは、様々な組成のプラスチック、マトリックス、及びメンブレンを含む固相アッセイもしくはデバイスに組み込むこと、及び／または液相アッセイのための凍結乾燥ケーキもしくはタブレットなどの他のアッセイフォーマットで使用することができ、これらは全て、複雑なサンプリング環境（例えば、血液成分、食物マトリックス、土壌サンプル、便、尿、水、ならびに他のヒト及び動物の生体サンプル）であっても確実に機能する。いくつかの実施形態において、NanoLuc（登録商標）をベースにしたレポーターシステムは、ラテラルフローアッセイ（LFA）技術、紙スポットテスト、及び類似のデバイスに組み込まれる。LFAは、限定するものではないが、抗体、細菌及びウイルス抗原、代謝産物、タンパク質などを含む種々の標的分析物を測定するために使用されている一般的なポイントオブケア技術である。図1に示されるように、LFAは、NanoLuc（登録商標）をベースにしたレポーター技術と組み合わせ、抗ウイルス抗体をポイントオブケアで検出するマルチプレックス式ウイルス感染検

出アッセイを提供する。ジカへの曝露を検出する緊急用イムノアッセイで承認されている現在利用可能なものは、血液サンプル中の抗ジカ Ig M の存在を検出する従来のプレートベースのマルチステップサンドイッチ ELISA だけである。このシステムとは対照的に、NanoLuc（登録商標）をベースにした生物発光レポータープラットフォームは、そのマルチプレックス性能により、抗体が同じウイルスの複数の異なるエピトープを認識するかどうか、または 2 つ以上のウイルス上の複数の異なるエピトープを認識するかどうかにかかわらず、サンプル中の複数の抗体を迅速に検出することが可能である。生物発光によりウイルス感染を迅速かつ高感度に検出及び特定する能力は、治療法の決定に役立つ。抗体及び抗原に加えて、本明細書に記載される生物発光複合体の構成成分ペプチドは、サイズが小さいことから、限定するものではないが、DARPin、アプタマー、オリゴヌクレオチドプローブ、ペプチド核酸（PNA）、及びロックド核酸アッセイ（LNA）などの代替の結合剤及び材料を使用して、多くの他の標的分析物を検出することが可能である。

【0149】

本セクション及び本明細書の開示全体で使用されるセクションの見出しは、単に構成上のためであり、限定を意図するものではない。

【0150】

1. 定義

別途の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。矛盾が生じる場合、定義を含め、本文書が優先される。好ましい方法及び材料が以下に記載されるが、本明細書に記載されるものと同様または同等の方法及び材料も本開示の実施または検証に使用することができる。本明細書で言及される全ての公開物、特許出願、特許及び他の参考文献は、その全体が参照により援用される。本明細書で開示される材料、方法、及び例は、例示に過ぎず、限定することを意図するものではない。

【0151】

本明細書で使用される「含む（comprise(s)）」、「含む（include(s)）」、「有すること（having）」、「有する（has）」、「～することができる（can）」、「含有する（contain(s)）」という用語及びその変化形は、追加の行為または構造の可能性を排除しない、オープンエンドの移行句、用語、または単語であることが意図される。単数形「a」、「and」及び「the」は、文脈により別途明示される場合を除き、複数の指示対象を含む。本明細書における多くの実施形態は、オープンな「含む（comprising）」という語を使用して記載される。そのような実施形態は、複数のクローズドな「～からなる（consisting of）」及び／または「～から本質的になる（consisting essentially of）」実施形態を包含し、かかる表現を使用して代替的に特許請求または記載され得る。本開示はまた、明示的に記載されているかいないかにかかわらず、本明細書に提示される実施形態または要素「を含む（comprising）」、「～からなる（consisting of）」及び「～から本質的になる（consisting essentially of）」他の実施形態が企図される。

【0152】

本明細書における数値範囲の記述は、その間にあるそれぞれの数も、同じ精度で、明示的に企図される。例えば、6～9 の範囲の場合、6 及び 9 に加えて 7 及び 8 の数も企図され、6.0～7.0 の範囲の場合、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、及び 7.0 の数も明示的に企図される。

【0153】

「生物発光」は、酵素、タンパク質、タンパク質複合体、もしくは他の生体分子（例えば、生物発光複合体）によって触媒されるか、または可能にされる化学反応による光の生成及び放出を指す。典型的な実施形態において、生物発光実体（例えば、生物発光タンパク質または生物発光複合体）の基質が生物発光実体によって不安定な形態に変換され、そ

の後、基質が光を放出する。

【0154】

「相補性」は、2つ以上の構造要素（例えば、ペプチド、ポリペプチド、核酸、小分子など）がハイブリダイズ、二量体化、または別様に互いに複合体を形成することが可能であるという特徴を指す。例えば、「相補性ペプチドとポリペプチド」は、一緒になって、複合体を形成することが可能である。相補性要素は、複合体を形成するためには（例えば、相互作用要素から）、例えば、相補性に適切なコンフォーメーションで要素を配置すること、相補性要素を共局在化させること、相補性のために相互作用エネルギーを低下させることなどの支援を必要とし得る。

【0155】

「複合体」は、互いに直接的及び／または間接的に接触している分子（例えば、ペプチド、ポリペプチドなど）の集合体または凝集体を指す。一態様において、「接触」またはより具体的には「直接的な接触」とは、ファンデルワールス力、水素結合、イオン性及び疎水性相互作用などの非共有結合的な引力相互作用が、分子の相互作用を決定づけるように、2つ以上の分子が十分に近接していることを意味する。そのような態様において、分子（例えば、ペプチド及びポリペプチド）の複合体は、その複合体が熱力学的に有利であるようなアッセイ条件下で形成される（例えば、その構成分子の非凝集体または非複合体の状態と比較して）。本明細書で使用される場合、「複合体」という用語は、別途記載のない限り、2つ以上の分子（例えば、ペプチド、ポリペプチドまたはこれらの組み合わせ）の集合体を指す。

【0156】

本明細書で使用される抗体の「誘導体」は、真または親の抗体と比較して、そのアミノ酸配列に対して1つ以上の修飾を有する抗体を指し得、改変されたドメイン構造を示す。誘導体は、依然として、天然抗体に見られる典型的なドメイン構成及びアミノ酸配列を採用することができ、標的（抗原）に特異的に結合することが可能である。抗体誘導体の典型的な例は、他のポリペプチドに結合された抗体、再編成された抗体ドメイン、または抗体の断片である。誘導体はまた、共有結合または非共有結合によって連結されたタンパク質ドメインなどの少なくとも1つの更なる化合物を含み得る。連結は、当該技術分野において知られている方法に従った遺伝子融合に基づくものであり得る。抗体を含む融合タンパク質中に存在する追加のドメインは、好ましくは、フレキシブルリンカー、有利にはペプチドリンカーによって連結され得、当該ペプチドリンカーは、更なるタンパク質ドメインのC末端と抗体のN末端との間またはこの逆の距離を結ぶのに十分な長さを有する、複数の親水性ペプチド結合アミノ酸を含む。抗体は、生物活性または固体支持体に対する選択的結合に好適なコンフォーメーションを有するエフェクター分子、例えば、生物学的に活性な物質（例えば、サイトカインまたは成長ホルモン）、化学薬剤、ペプチド、タンパク質、または薬物に連結され得る。

【0157】

「断片」は、より大きな実体全体（例えば、タンパク質、ポリペプチド、酵素など）の切断または「断片化」から生じるペプチドもしくはポリペプチド、またはそれらと同じ配列を持つように調製されたペプチドもしくはポリペプチドを指す。したがって、断片は、その断片が作製及び／または設計される実体全体（例えば、タンパク質、ポリペプチド、酵素など）の部分配列である。既存するタンパク質全体の部分配列ではないペプチドまたはポリペプチドは、断片ではない（例えば、既存するタンパク質の断片ではない）。「既存する生物発光タンパク質の断片ではない」ペプチドまたはポリペプチドは、（1）ペプチドまたはポリペプチドの設計及び／または合成の前に物理的に存在しており、かつ（2）実質的な生物発光活性を呈する、タンパク質（例えば、天然または合成）の部分配列ではないアミノ酸鎖である。

【0158】

本明細書で使用される場合、「抗体断片」という用語は、抗原結合領域または可変領域の少なくとも一部を含む、全長抗体の一部を指す。抗体断片には、Fab、Fab'、F（

10

20

30

40

50

$ab')_2$ 、 Fv 、 $scFv$ 、 Fd 、可変軽鎖、可変重鎖、ダイアボディ、及びインタクト抗体の可変領域の少なくとも一部を保持する他の抗体断片が含まれるが、これらに限定されない。例えば、Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134を参照されたい（その全体が参照により本明細書に援用される）。特定の実施形態において、抗体断片は、インタクト抗体の酵素もしくは化学的切断（例えば、抗体のパパイン消化及びペプシン消化）によって生成され、組み換えDNA技術、または化学的なポリペプチド合成によって生成される。例えば、「Fab」断片は、1つの軽鎖と、1つの重鎖の CH_1 及び可変領域とを含む。Fab分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することができない。「Fab'」断片は、1つの軽鎖と、 CH_1 ドメインと CH_2 ドメインとの間に延在する追加の定常領域を含む1つの重鎖とを含む。鎖間ジスルフィド結合がFab'断片の2つの重鎖の間に形成され、「F(ab')₂」分子が形成され得る。「Fv」断片は、重鎖と軽鎖の両方に由来する可変領域を含むが、定常領域は含まない。一本鎖Fv (scFv)断片は、フレキシブルリンカーによって接続された重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、抗原結合領域を含む一本のポリペプチド鎖を形成する。例示的な一本鎖抗体は、WO 88/01649ならびに米国特許第4,946,778号及び同第5,260,203号に詳細に記載されており、それらの全体が参照により本明細書に援用される。ある特定の例では、単一の可変領域（例えば、重鎖可変領域または軽鎖可変領域）が、抗原を認識し、それに結合する能力を有し得る。他の抗体断片は、当業者によって理解されるであろう。

【0159】

本明細書で使用される「単離されたポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチド（例えば、ゲノム由来、cDNA由来、もしくは合成由来、またはこれらの組み合わせ）であって、その由来により、その単離されたポリヌクレオチドが、「単離されたポリヌクレオチド」が天然では一緒に見られるポリヌクレオチドの全てもしくは一部と関連しないこと、天然では連結していないポリヌクレオチドに作動可能に連結していること、またはより大きな配列の一部として天然では発生しないことを意味し得る。

【0160】

「非発光」は、可視スペクトルで検出可能量の光を（例えば、基質の存在下で）放出しないという特徴を示す実体（例えば、ペプチド、ポリペプチド、複合体、タンパク質など）を指す。例えば、実体は、所与のアッセイにおいて検出可能な発光を示さない場合、非発光であると称され得る。本明細書で使用される場合、「非発光」という用語は、「実質的に非発光」という用語と同義である。例えば、非発光ポリペプチドは、実質的に非発光であり、例えば、ポリペプチドとその非発光の相補性ペプチドとの複合体と比較して、10倍以上（例えば、100倍、200倍、500倍、 1×10^3 倍、 1×10^4 倍、 1×10^5 倍、 1×10^6 倍、 1×10^7 倍など）の発光の減少を示す。いくつかの実施形態において、任意の光の放出が特定のアッセイにおいて干渉するバックグラウンドを生じないほど十分に小さい場合、実体は「非発光」である。

【0161】

「非発光ペプチド」及び「非発光ポリペプチド」は、実質的に発光を（例えば、基質の存在下で）示さないか、あるいは、標準条件（例えば、生理学的条件、アッセイ条件など）下での典型的な機器（例えば、ルミノメーターなど）による有意なシグナル（例えば、発光複合体）と比較した場合、ノイズ以下、もしくは10倍以上（例えば、100倍、200倍、500倍、 1×10^3 倍、 1×10^4 倍、 1×10^5 倍、 1×10^6 倍、 1×10^7 倍など）の量を示す、ペプチド及びポリペプチドを指す。いくつかの実施形態において、そのような非発光ペプチド及び非発光ポリペプチドは、本明細書に記載される基準に従って集合し、生物発光複合体を形成する。本明細書で使用される場合、「非発光要素」は、非発光ペプチドまたは非発光ポリペプチドである。「生物発光複合体」という用語は、2つ以上の非発光ペプチド及び／または非発光ポリペプチドが集合した複合体を指す。生物発光複合体は、生物発光複合体の基質を不安定な形態に変換することを触媒するか、または可能にし、その後、基質が光を放出する。複合体化されていない場合、生物発光複合体

を形成する2つの非発光要素は、「非発光ペア」とも称され得る。生物発光複合体が3つ以上の非発光ペプチド及び／または非発光ポリペプチドによって形成される場合、生物発光複合体の複合体化されていない構成要素は、「非発光基」と称され得る。

【0162】

本明細書で使用される「ペプチド」及び「ポリペプチド」は、別途指定のない限り、2つ以上のアミノ酸がペプチドアミド結合（ $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ）によって主鎖を介して連結された高分子化合物を指す。「ペプチド」という用語は、典型的に、短いアミノ酸高分子（例えば、25個未満のアミノ酸を有する鎖）を指し、一方、「ポリペプチド」という用語は、典型的に、長いアミノ酸高分子（例えば、25を超えるアミノ酸を有する鎖）を指す。

【0163】

「既存するタンパク質」は、特定の事象または日付よりも前に物理的に存在していたアミノ酸配列を指す。「既存するタンパク質の断片ではないペプチド」は、ペプチドの設計及び／または合成の前に物理的に存在していたタンパク質（例えば、合成または天然）の断片または部分配列ではない短いアミノ酸鎖である。

【0164】

本明細書で使用される「サンプル」、「試験サンプル」、「検体」、「対象からのサンプル」、及び「患者サンプル」は、区別なく使用され得、血液、例えば、全血、組織、尿、血清、血漿、羊水、脳脊髄液、胎盤の細胞もしくは組織、内皮細胞、白血球、または単球のサンプルであり得る。サンプルは、患者から取得したものを直接使用することもできるし、あるいは、濾過、蒸留、抽出、濃縮、遠心分離、干渉成分の不活性化、試薬の添加などによって前処理して、本明細書で考察されるまたは別途当該技術分野において知られているいくつかの様式でサンプルの特徴を変えることもできる。

【0165】

「配列同一性」は、2つの高分子配列（例えば、ペプチド、ポリペプチド、核酸など）が同じ配列組成のモノマーサブユニットを有する程度を指す。「配列類似性」という用語は、2つの高分子配列（例えば、ペプチド、ポリペプチド、核酸など）が類似の高分子配列を有する程度を指す。例えば、類似のアミノ酸は、同じ生物物理学的特徴を共有し、例えば、酸性（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、塩基性（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）及び無電荷極性（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン）のファミリーに分類することができるものである。「パーセントの配列同一性」（または「パーセントの配列類似性」）は、（1）最適にアライメントされた2つの配列を比較ウィンドウ（例えば、長いほうの配列の長さ、短いほうの配列の長さ、指定されたウィンドウ）にわたって比較すること、（2）同一（または類似）のモノマーを含有する（例えば、同じアミノ酸が両方の配列に存在する、類似のアミノ酸が両方の配列に存在する）位置の数を決定して、一致する位置の数を得ること、（3）一致した位置の数を、比較ウィンドウ（例えば、長いほうの配列の長さ、短いほうの配列の長さ、指定されたウィンドウ）内の位置の総数で除算すること、及び（4）その結果に100を乗じて、配列同一性パーセントまたは配列類似性パーセントを得ることによって、算出される。例えば、ペプチドA及びBがどちらも20アミノ酸長であり、1つの位置を除いて同一のアミノ酸を有する場合、ペプチドA及びペプチドBは、95%の配列同一性を有する。同一位置でないアミノ酸が同じ生物物理学的特徴（例えば、どちらも酸性）を共有する場合、ペプチドA及びペプチドBは、100%の配列類似性を有することとなる。別の例として、ペプチドCが20アミノ酸長であり、ペプチドDが15アミノ酸長であり、ペプチドDの15個のアミノ酸のうち14個がペプチドCの一部のアミノ酸と同一である場合、ペプチドCとDは、70%の配列同一性を有するが、ペプチドDは、ペプチドCの最適な比較ウィンドウに対して93.3%の配列同一性を有する。本明細書における「配列同一性パーセント」（または「配列類似性パーセント」）を算出する目的で、整列された配列のギャップはいずれも

10

20

30

40

50

その位置のミスマッチとして扱われる。

【0166】

本明細書で区別なく使用される「対象」及び「患者」は、哺乳動物及びヒトを含むがこれらに限定されない任意の脊椎動物を指す。いくつかの実施形態において、対象は、ヒトまたは非ヒトであり得る。対象または患者は、複数の治療を受けている状態であり得る。本明細書で使用される「哺乳動物」は、哺乳綱の任意のメンバーを指し、限定するものではないが、ヒト及び非ヒト霊長類、例えば、チンパンジー及び他の類人猿及びサル種、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ラマ、ラクダ、及びウマなどの家畜、イヌ及びネコなどの家庭用哺乳動物、マウス、ラット、ウサギ、モルモットなどの齧歯類を含む実験動物などを含む。この用語は、特定の年齢または性別を示すものではない。したがって、成体及び新生児の対象ならびに胎児が、雄性または雌性にかかわらず、この用語の範囲内に含まれることが意図される。

10

【0167】

「部分配列」は、より大きな別のペプチドまたはポリペプチドと100%の配列同一性を有するペプチドまたはポリペプチドを指す。部分配列は、より大きなアミノ酸鎖の一部と完全に配列が一致する。

【0168】

本明細書で使用される「実質的に」は、列挙される特徴、パラメータ、及び／または値が、正確に達成される必要はなく、例えば、許容誤差、測定誤差、測定精度限界及び当該技術分野において知られている他の因子を含む、ずれまたはばらつきが、提供することが意図された特徴の作用を妨げない量で生じ得ることを意味する。実質的に存在しない特徴または特性（例えば、実質的に非発光）は、ノイズ内、バックグラウンドの下、使用されるアッセイの検出能力未満、または重要な特徴（例えば、生物発光タンパク質または生物発光複合体の発光強度）のごくわずかな部分（例えば、<1%、<0.1%、<0.01%、<0.001%、<0.00001%、<0.000001%、<0.0000001%）であるものであり得る。

20

【0169】

「バリエーション」は、アミノ酸の挿入、欠失、または保存的置換によってアミノ酸配列が異なるが、少なくとも1つの生物活性を保持している、ペプチドまたはポリペプチドを記述するために使用される。「SNP」は、一塩基多型であるバリエーションを指す。「生物活性」の代表例としては、特定の抗体に結合する能力、または免疫応答を促進する能力が挙げられる。バリエーションはまた、少なくとも1つの生物活性を保持するアミノ酸配列を含む参照タンパク質と実質的に同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質を記載するために本明細書で使用される。アミノ酸の保存的置換（例えば、あるアミノ酸を、親水性、荷電領域の程度及び分布などの類似の特性を持つ異なるアミノ酸と置き換えること）は、典型的に軽微な変化を伴うものとして当該技術分野において認識されている。当該技術分野において理解されるように、これらの軽微な変化は、部分的には、アミノ酸の疎水性親水性指標を考慮することによって特定することができる。アミノ酸の疎水性親水性指標は、その疎水性及び電荷を考慮することに基づく。類似の疎水性親水性指標を持つアミノ酸を置換することができ、依然としてタンパク質機能を保持することが当該技術分野において知られている。一態様において、±2の疎水性親水性指標を有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性はまた、生物学的機能を保持するタンパク質をもたらす置換を明らかにするために使用することができる。ペプチド中のアミノ酸の親水性を考慮することで、当該ペプチドの最大の局所的な平均親水性の算出が可能となり、この指標は、抗原性及び免疫原性との相関性が報告されている有用な指標である。類似の親水性の値を有するアミノ酸の置換は、当該技術分野において理解されているように、生物活性、例えば、免疫原性を保持するペプチドをもたらすことができる。親水性の値が互いに±2以内であるアミノ酸を用いた置換が実施され得る。アミノ酸の疎水性指標及び親水性値はいずれも、当該アミノ酸の特定の側鎖による影響を受ける。この知見と一致して、生物学的機能に適合するアミノ酸置換は、疎水性、親水性、電荷、大きさ、及び他の特性によって明らかになる、アミ

30

40

50

ノ酸、特に、アミノ酸の側鎖の相対的な類似性に依存することが理解される。

【0170】

本明細書で使用される「標的分析物」または「分析物」は、多くの場合、プロセスまたは状態を評価する方法（例えば、診断または予後アッセイ）の一部として、検出、定量、測定、試験、及び／またはモニタリングすることができるサンプル中の物質を指す。標的分析物には、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、酵素、補助因子、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、低分子化合物、抗体、及びそれらの任意の変形形態、組み合わせ、及び誘導体が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0171】

本明細書で使用される「標的分析物結合剤」は、標的分析物に結合することが可能な剤を指す。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、標的分析物及び固相支持体などの複数の物質に結合することができる剤を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、標的分析物と、異なるペプチド／ポリペプチドの両方に（例えば、標的分析物結合要素を介して）結合して、標的分析物検出複合体を形成する（例えば、生物発光シグナルを生成する）剤と、を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、分析物のグループまたはクラスに結合することが可能な標的分析物結合要素（例えば、抗体に結合するプロテインL）を含み得、他の実施形態において、標的分析物結合剤は、特定の分析物に結合することが可能な標的分析物結合要素（例えば、モノクローナル抗体に結合する抗原）を含み得る。標的分析物結合剤は、抗体、抗体断片、標的リガンドに結合する受容体ドメイン、免疫グロブリンに結合するタンパク質もしくはタンパク質ドメイン（例えば、プロテインA、プロテインG、プロテインA／G、プロテインL、プロテインM）、免疫グロブリンに結合するタンパク質（例えば、プロテインA、プロテインG、プロテインA／G、プロテインL、プロテインM）の結合ドメイン、オリゴヌクレオチドプローブ、ペプチド核酸、DARPin、アプタマー、アフィマー、精製タンパク質、またはタンパク質ドメイン（分析物それ自体または分析物に結合するタンパク質のいずれか）、及びタンパク質の分析物結合ドメイン（複数可）などであり得る。表Aは、本明細書における方法、システム、及びアッセイ（例えば、イムノアッセイ）において、単一で、または様々な組み合わせで使用することができる、例示的な結合部分の一覧を提供する。

【0172】

表1：例示的な標的分析物結合剤。

10

20

30

40

50

結合部分 A	結合部分 B
プロテイン A	プロテイン A
プロテイン A の I _g 結合ドメイン	プロテイン A の I _g 結合ドメイン
プロテイン G	プロテイン G
プロテイン G の I _g 結合ドメイン	プロテイン G の I _g 結合ドメイン
プロテイン L	プロテイン L
プロテイン L の I _g 結合ドメイン	プロテイン L の I _g 結合ドメイン
プロテイン M	プロテイン M
プロテイン M の I _g 結合ドメイン	プロテイン M の I _g 結合ドメイン
分析物 X に対するポリクローナル抗体	ポリクローナル抗体：同じ標的分析物 X を認識する同じ抗体または第 2 のポリクローナル抗体
モノクローナル抗体	同じ標的分析物 X 上の異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体
組み換え抗体	同じ標的分析物 X 上の異なるエピトープを認識する組み換え抗体
s c F v	同じ標的分析物 X 上の異なるエピトープを認識する s c F v
標的分析物 X を認識する抗体（モノクローナル、組み換え、ポリクローナル）の可変軽鎖（V _L ）	標的分析物 X を認識する同じ抗体（モノクローナル、組み換え、ポリクローナル）の可変重鎖（V _H ）
分析物 X に結合するタンパク質（例えば、受容体）結合ドメイン 1	分析物 X に結合するタンパク質（例えば、受容体）結合ドメイン 2
（F a b）断片	同じ標的分析物 X に対して異なるエピトープを認識する異なる抗体に由来する（F a b）断片
F a b' 断片	同じ標的分析物 X に対して異なるエピトープを認識する異なる抗体に由来する F a b'
F v 断片	同じ標的分析物 X に対して異なるエピトープを認識する異なる抗体に由来する F v
F（a b'）2 断片	同じ標的分析物 X に対して異なるエピトープを認識する異なる抗体に由来する F（a b'）2

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチドプローブ	同じDNAまたはRNA標的に対するが、非重複配列を認識するオリゴヌクレオチドプローブ
DARPin	同じ標的の非重複ドメインを認識するDARPin
ペプチド核酸	同じDNAまたはRNA標的を認識するが、非重複配列を認識するペプチド核酸
アプタマー	同じ標的分析物Xに結合するが、非重複配列またはエピトープを認識するアプタマー
アフィマー	同じ標的分析物Xに結合するが、異なるエピトープを認識するアプタマー

10

【0173】

本明細書中に別途の記載がない限り、本開示に関して使用される科学技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。例えば、本明細書に記載される細胞及び組織の培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝子学ならびにタンパク質及び核酸の化学及びハイブリダイゼーションに関連して使用される任意の命名法及び技術は、当該技術分野においてよく知られており、一般的に使用されているものである。用語の意味及び範囲は、明確である必要があるが、潜在的な曖昧さが生じる場合は、本明細書で提供される定義が、いかなる辞書または外部の定義よりも優先される。更に、文脈により別途要求される場合を除き、単数形用語は複数形を含み、複数形用語は単数形を含むものとする。

20

【0174】

2. 生物発光

本開示は、生物発光ポリペプチド、生物発光複合体及びその構成成分、ならびに生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)に関する材料及び方法を含む。

【0175】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、*Oplophorus gracilirostris*由来のルシフェラーゼであるNanoLuc(登録商標)ルシフェラーゼ(Promega Corporation; 米国特許第8,557,970号; 米国特許第8,669,103号; その全体が参照により本明細書に援用される)、NanoBit(米国特許第9,797,889号; その全体が参照により本明細書に援用される)、またはNanoTrip(米国特許出願第16/439,565号; 及び米国仮出願第62/941,255号; どちらもその全体が参照により本明細書に援用される)をベースにした(例えば、構造的、機能的になど)生物発光ポリペプチド構成成分及び/または(非発光ペプチド(複数可)及び/または非発光ポリペプチド構成成分の)生物発光複合体を組み込んだ固相及び/またはラテラルフローアッセイ、デバイス、及びシステムである。以下に記載されるように、いくつかの実施形態において、本明細書における組成物、アッセイ、デバイス、方法、及びシステムは、市販されているNanoLuc(登録商標)をベースにした技術(例えば、NanoLuc(登録商標)ルシフェラーゼ、NanoBRET、NanoBit、NanoTrip、NanoGloなど)を組み込んでいるが、他の実施形態では、市販されているNanoLuc(登録商標)をベースにした技術の様々な組み合わせ、変形形態、または波生物が採用される。

30

40

【0176】

a. NanoLuc

PCT出願第PCT/US2010/033449号、米国特許第8,557,970号、PCT出願第PCT/2011/059018号、及び米国特許第8,669,10

50

3号（そのそれぞれは全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に援用される）は、生物発光ポリペプチドを含む組成物及び方法について記載している。そのようなポリペプチドは、本明細書の実施形態での使用が見出され、本明細書に記載される組成物、アッセイ、デバイス、システム、及び方法とともに使用することができる。

【0177】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される組成物、アッセイ、デバイス、システム、及び方法は、配列番号5、または配列番号5と少なくとも60%（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはその間の範囲）の配列同一性を有する生物発光ポリペプチドを含む。

【0178】

いくつかの実施形態において、上述の生物発光ポリペプチドのいずれかは、結合要素または本明細書に記載されるアッセイ及びシステムの他の構成成分に連結される（例えば、融合、化学的連結など）。

【0179】

いくつかの実施形態において、前述の生物発光ポリペプチドのいずれか、またはその融合体もしくはコンジュゲート（例えば、結合要素とのものなど）は、本明細書に記載されるデバイスの一部（例えば、ラテラルフローアッセイの検出領域またはコントロール領域、固相検出要素など）に固定化される。

【0180】

b. NanoBit

PCT出願第PCT/US14/26354号及び米国特許第9,797,889号（そのそれぞれは全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に援用される）は、生物発光複合体を構築するための組成物及び方法について記載しており、そのような複合体、ならびにそのペプチド及びポリペプチド構成成分は、本明細書の実施形態での使用が見出され、本明細書に記載されるアッセイ及び方法とともに使用することができる。

【0181】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、配列番号9と少なくとも60%（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはその間の範囲）の配列同一性を有するが、配列番号1、配列番号2、及び配列番号6と100%未満（例えば、<99%、<98%、<97%、<96%、<95%、<94%、<93%、<92%、<91%、<90%）の配列同一性を有する、非発光（NL）ポリペプチドである。

【0182】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、配列番号10と少なくとも60%（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはその間の範囲）の配列同一性を有するが、配列番号1、配列番号4、及び配列番号8と100%未満（例えば、<99%、<98%、<97%、<96%、<95%、<94%、<93%、<92%、<91%、<90%）の配列同一性を有する、非発光（NL）ペプチドである。

【0183】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、配列番号11と少なくとも60%（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはその間の範囲）の配列同一性を有するが、配列番号1、配列番号4、及び配列番号8と100%未満（例えば、<99%、<98%、<97%、<96%、<95%、<94%、<93%、<92%、<91%、<90%）の配列同一性を有する、NLペプチドである。

【0184】

いくつかの実施形態において、前述のNLペプチドまたはNLポリペプチドのいずれかは、結合要素または本明細書に記載される組成物、アッセイ、デバイス、方法、及びシス

10

20

30

40

50

テムの他の構成成分に連結される（例えば、融合、化学的連結など）。

【0185】

いくつかの実施形態において、前述のNLペプチドもしくはNLポリペプチドのいずれか、またはその融合体もしくはコンジュゲート（例えば、結合要素とのものなど）は、本明細書に記載されるデバイスの一部（例えば、ラテラルフローアッセイの検出領域またはコントロール領域、固相検出要素など）に固定化される。

【0186】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、検出領域及びコントロール領域を含む分析メンブレンであって、検出領域は、検出領域に固定化された第1の標的分析物結合剤を含む、分析メンブレンと、第2の標的分析物結合剤を含むコンジュゲートパッドと、サンプルパッドと、を含み、第1の標的分析物結合剤は、第1の標的分析物結合要素及び第1のNanoBITベースNLペプチドまたはNLポリペプチド構成成分（上記のもの）を含み、第2の標的分析物結合剤は、第2の標的分析物結合要素及び相補性NanoBITベースNLペプチドまたはNLポリペプチド構成成分（上記のもの）を含む、ラテラルフロー検出システムである。いくつかの実施形態において、第1の標的分析物結合剤及び第2の標的分析物結合剤は、サンプル中で標的分析物が検出される場合、少なくとも1つの検出領域において分析物検出複合体を形成する。いくつかの実施形態において、発光基質の存在下で生成される生物発光シグナルは、第1の標的分析物結合剤が第2の標的分析物結合剤と接触する場合、第2の標的分析物結合剤または第1の標的分析物結合剤及び発光基質単独によって生成される生物発光シグナルと比較して、実質的に増加する。

【0187】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、第1の標的分析物結合剤及び第2の標的分析物結合剤を含む固相基材を含み、第1の標的分析物結合剤は、第1の標的分析物結合要素及び第1のNanoBITベースNLペプチドまたはNLポリペプチド構成成分（上記のもの）を含み、第2の標的分析物結合剤は、第2の標的分析物結合要素及び相補性NanoBITベースNLペプチドまたはNLポリペプチド構成成分（上記のもの）を含む、固相検出システムである。いくつかの実施形態において、第1の標的分析物結合剤及び第2の標的分析物結合剤は、サンプル中で標的分析物が検出される場合、固相基材において分析物検出複合体を形成する。いくつかの実施形態において、発光基質の存在下で生成される生物発光シグナルは、第1の標的分析物結合剤が第2の標的分析物結合剤と接触する場合、第2の標的分析物結合剤または第1の標的分析物結合剤及び発光基質単独によって生成される生物発光シグナルと比較して、実質的に増加する。

【0188】

c. NanoTrip

米国特許出願第16／439,565号（PCT／US2019／036844）及び米国仮出願第62／941,255号（どちらも全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に援用される）は、生物発光複合体を構築するための組成物、システム、及び方法について記載している。そのような複合体、ならびにそのペプチド及びポリペプチド構成成分は、本明細書の実施形態での使用が見出され、本明細書に記載されるアッセイ及び方法とともに使用することができる。

【0189】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、配列番号12と少なくとも60％（例えば、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、100％、またはその間の範囲）の配列同一性を有するが、配列番号1、配列番号2、配列番号6、及び配列番号9と100％未満（例えば、<99％、<98％、<97％、<96％、<95％、<94％、<93％、<92％、<91％、<90％）の配列同一性を有する、非発光（NL）ポリペプチドである。

【0190】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、配列番号11と少なくとも

60%（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはその間の範囲）の配列同一性を有するが、配列番号1、配列番号4、及び配列番号8と100%未満（例えば、<99%、<98%、<97%、<96%、<95%、<94%、<93%、<92%、<91%、<90%）の配列同一性を有する、非発光（NL）ペプチドである。

【0191】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、配列番号13と少なくとも60%（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはその間の範囲）の配列同一性を有するが、配列番号1、配列番号3、及び配列番号7と100%未満（例えば、<99%、<98%、<97%、<96%、<95%、<94%、<93%、<92%、<91%、<90%）の配列同一性を有する、NLペプチドである。

10

【0192】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、配列番号14と少なくとも60%（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはその間の範囲）の配列同一性を有するが、配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号7、及び配列番号8と100%未満（例えば、<99%、<98%、<97%、<96%、<95%、<94%、<93%、<92%、<91%、<90%）の配列同一性を有する、NLペプチドである。

【0193】

いくつかの実施形態において、前述のNanoTripベースのNLペプチドまたはNLポリペプチドのいずれかは、結合要素または本明細書に記載される組成物、方法、デバイス、アッセイ、及びシステムの他の構成成分に連結される（例えば、融合、化学的連結など）。

20

【0194】

いくつかの実施形態において、前述のNanoTripベースのNLペプチドもしくはNLポリペプチドのいずれか、またはその融合体もしくはコンジュゲート（例えば、結合要素とのものなど）は、本明細書に記載されるデバイスの一部（例えば、ラテラルフローアッセイの検出領域またはコントロール領域、固相検出要素など）に固定化される。

【0195】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、検出領域及びコントロール領域を含む分析メンブレンであって、検出領域は、検出領域に固定化された第1の標的分析物結合剤を含む、分析メンブレンと、第2の標的分析物結合剤を含むコンジュゲートパッドと、サンプルパッドと、を含み、第1の標的分析物結合剤は、第1の標的分析物結合要素及び第1のNanoTripベースNLペプチド（上記のもの）を含み、第2の標的分析物結合剤は、第2の標的分析物結合要素及び相補性NanoTripベースNLペプチド（上記のもの）を含む、ラテラルフロー検出システムである。いくつかの実施形態において、第1の標的分析物結合剤及び第2の標的分析物結合剤は、サンプル中で標的分析物が検出される場合、NanoTripベースNLポリペプチド構成成分（上記のもの）の存在下で、少なくとも1つの検出領域において分析物検出複合体を形成する。いくつかの実施形態において、発光基質の存在下で生成される生物発光シグナルは、第1の標的分析物結合剤がNanoTripベースNLポリペプチド構成成分の存在下で第2の標的分析物結合剤と接触する場合、第2の標的分析物結合剤または第1の標的分析物結合剤及び発光基質単独によって生成される生物発光シグナルと比較して、実質的に増加する。

30

40

【0196】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、第1の標的分析物結合剤及び第2の標的分析物結合剤を含む固相（例えば、紙基材など）を含み、第1の標的分析物結合剤は、第1の標的分析物結合要素及び第1のNanoTripベースNLペプチド（上記のもの）を含み、第2の標的分析物結合剤は、第2の標的分析物結合要素及び相補性の第2のNL NanoTripベースペプチド（上記のもの）を含む、固相検出システム

50

である。いくつかの実施形態において、第1の標的分析物結合剤及び第2の標的分析物結合剤は、サンプル中で標的分析物が検出される場合、NanoTripベースNLポリペプチド（上記のもの）の存在下で、分析物検出複合体を形成する。いくつかの実施形態において、発光基質の存在下で生成される生物発光シグナルは、第1の標的分析物結合剤が第2の標的分析物結合剤及びNanoTripベースNLポリペプチドと接触する場合、第2の標的分析物結合剤または第1の標的分析物結合剤及び発光基質単独によって生成される生物発光シグナルと比較して、実質的に増加する。

【0197】

d. NanoBRET

PCT出願第PCT/US13/74765号及び米国特許出願第15/263,416号（全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に援用される）に開示されているように、生物発光共鳴エネルギー転移（BRET）組成物、システム、及び方法（例えば、NanoLuc（登録商標）をベースにした技術を組み込んでいるもの）について記載されており、そのような組成物、システム及び方法、ならびに生物発光ポリペプチド及びそのフルオロフォア結合構成成分は、本明細書の実施形態での使用が見出され、本明細書に記載される組成物、システム、デバイス、アッセイ、及び方法とともに使用することができる。

【0198】

いくつかの実施形態において、NanoLuc（登録商標）ベース、NanoBiTベース、及び／またはNanoTripベース（上記セクションa～cに記載されるもの）のペプチド、ポリペプチド、複合体、融合体、及びコンジュゲートのいずれも、本明細書に記載される組成物、アッセイ、方法、デバイス、及びシステムを用いたBRETベースのアプリケーションでの使用が見出され得る。例えば、特定の実施形態において、第1の標的分析物結合剤は、第1の標的分析物結合要素ならびにNanoLuc（登録商標）ベース、NanoBiTベース、及び／またはNanoTripベースのポリペプチド、ペプチド、または複合体を含み、第2の標的分析物結合剤は、第2の標的分析物結合要素ならびにフルオロフォア（例えば、蛍光タンパク質、小分子フルオロフォアなど）を含み、NanoLuc（登録商標）ベース、NanoBiTベース、及び／またはNanoTripベースのポリペプチド、ペプチド、または複合体の発光スペクトルは、フルオロフォアの励起スペクトルと重なるものである。いくつかの実施形態において、NanoLuc（登録商標）ベース、NanoBiTベース、及び／またはNanoTripベースのポリペプチド、ペプチド、または複合体は、凍結乾燥形態に調製することができ、これは、発光基質（例えば、フリマジン）を含んでも含まなくてもよい。

【0199】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素及び生物発光ポリペプチドからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアを含む。

【0200】

本明細書で使用される場合、「エネルギーアクセプター」という用語は、任意の小分子（例えば、発色団）、巨大分子（例えば、自家蛍光タンパク質、フィコビリタンパク質、ナノ粒子、界面など）、またはエネルギー吸収（例えば、共鳴エネルギー転移）に応答して容易に検出可能なシグナルを生成する分子複合体を指す。特定の実施形態において、エネルギーアクセプターは、フルオロフォアまたは他の検出可能な発色団である。好適なフルオロフォアには、キサンテン誘導体（例えば、フルオレセイン、ローダミン、オレゴングリーン、エオシン、テキサスレッドなど）、シアニン誘導体（例えば、シアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、チアカルボシアニン、メロシアニンなど）、ナフタレン誘導体（例えば、ダンシル及びプロダン誘導体）、オキサジアゾール誘導体（例えば、ピリジリオキサゾール、ニトロベンゾオキサジアゾール、ベンゾオキサジアゾールなど）、ピレン誘導体（例えば、カスケードブルー）、オキサジン誘導体（例えば、ナイルレッド、ナイルブルー、クレシルバイオレット、オキサジン170など）、アクリジン誘導体（例えば、プロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリジンイエローなど）、ア

リールメチン誘導体（例えば、オーラミン、クリスタルバイオレット、マラカイトグリーンなど）、テトラピロール誘導体（例えば、ポルフィン、フタロシアニン、ビリルビンなど）、CF色素（Biotium）、BODIPY（Invitrogen）、ALEX A FLUOR（Invitrogen）、DYLIGHT FLUOR（Thermo Scientific, Pierce）、ATTO及びTRACY（Sigma Aldrich）、FluoProbes（Interchim）、DY及びMEGASTOKES（Dyomics）、SULFO CY色素（CYANDYE, LLC）、SETAU AND SQUARE DYES（SETABioMedicals）、QUASAR及びCAL FLUOR色素（Biosearch Technologies）、SURELIGHT DYES（APC、RPE、PerCP、フィコビリソーム）（Columbia Biosciences）、APC、APCXL、RPE、BPE（Phyco-Biotech）、自家蛍光タンパク質（例えば、YFP、RFP、mCherry、mKate）、量子ドットナノ結晶などが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、ローダミン類似体（例えば、カルボキシローダミン類似体）、例えば、米国特許出願第13／682,589号に記載されているものであり、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0201】

e. HALOTAG

本明細書のいくつかの実施形態は、捕捉リガンドと共有結合を形成することが可能な捕捉タンパク質を含む。捕捉タンパク質は、第1の要素（例えば、生物発光複合体のペプチド構成成分）に連結され、捕捉リガンドは、第2の要素（例えば、標的分析物結合要素（例えば、抗体または抗原結合タンパク質））に連結され得、共有結合の形成により、第1の要素と第2の要素が互いに連結する。いくつかの実施形態において、第1及び第2の要素の連結により、標的分析物結合剤が生成する。いくつかの実施形態において、そのように形成された2つ以上の標的分析物結合剤は、相補性ポリペプチド構成成分（例えば、LgTrip）に結合することができ、分析物（例えば、標的分析物結合要素によって認識される標的抗原）の存在下で生物発光複合体を形成する（例えば、図48及び58参照）。いくつかの実施形態において、捕捉リガンドは、ハロアルカン（別名「アルキルハライド」）である。いくつかの実施形態において、捕捉リガンドは、クロロアルカンである。いくつかの実施形態において、捕捉リガンドは、 $-A-X$ である。いくつかの実施形態において、 X は、 Cl である。いくつかの実施形態において、 $-A-X$ は、 $-(CH_2)_6Cl$ である。捕捉リガンドがハロアルカンである場合、捕捉タンパク質は、典型的に、その基質と共有結合を形成するように修飾されたデハロゲナーゼ酵素である（例えば、米国特許第7,425,436号；米国特許第7,429,472号；米国特許第7,867,726号；米国特許第7,888,086号；米国特許第7,935,803号；米国特許第RE42,931号；米国特許第8,168,405号；米国特許第8,202,700号；米国特許第8,257,939号参照；その全体が参照により本明細書に援用される）。

【0202】

そのように修飾されたデハロゲナーゼの1つは、市販のHALOTAGタンパク質（配列番号720）である。いくつかの実施形態において、捕捉タンパク質は、配列番号720と少なくとも70%の配列同一性（例えば、75%の同一性、80%の同一性、85%の同一性、90%の同一性、95%の同一性、98%の同一性、99%の同一性）のポリペプチドを含む。いくつかの実施形態は、捕捉タンパク質（例えば、HALOTAG）と別のペプチド／ポリペプチド要素（例えば、結合部分、生物発光複合体のペプチド／ポリペプチド構成成分など）の融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、捕捉リガンドは、アルキル鎖（例えば、 $(CH_2)_{4-24}$ ）の末端に共有結合された、ハロゲン（例えば、 Cl 、 Br 、 F 、 I など）を含む、ハロアルカンである。いくつかの実施形態において、アルキル鎖のもう一方の端は、リンカーまたは別の要素（例えば、ペプチド、分析物、など）に結合される。リンカーは、アルキル鎖または置換アルキル鎖（例えば、 C

=O、NH、S、O、カルバメート、エチレンなど)を含み得、例えば、米国特許出願第14/207,959号に開示されているものであり、当該特許は、参照により本明細書に援用される。

【0203】

3. 組成物及び配合物

本開示の実施形態は、本明細書で提供される生物発光複合体のペプチド及び／またはポリペプチド構成成分のうちの1つ以上を含む、組成物及び配合物を含む。これらの実施形態によれば、本開示の組成物及び配合物は、発光基質及び／または様々な他の構成成分を含み得る。本明細書で提供される組成物及び方法は、長期間保管した後であっても、目的の分析物の存在下で発光シグナルを生成することが可能である、保存安定性の液体配合物（例えば、液相アッセイフォーマットに使用される）及び保存安定性の乾燥配合物（例えば、固相アッセイフォーマットに使用される）を配合するために使用することができる。以下に詳述されるように、本開示の組成物及び配合物は、NanoLuc、NanoBit、NanoTrip、及びNanoBRETのうちの1つ以上の構成成分、ならびに本明細書に記載される様々な発光基質（例えば、フリマジン）を含み得る。

【0204】

現在利用可能な多くの蛍光及び比色アッセイとは対照的に、本開示の組成物及び配合物は、生物発光複合体のペプチド及び／またはポリペプチド構成成分のうちの1つ以上が、例えば、相補性ペプチド／ポリペプチド及び／または発光基質を含有する溶液中で再構成可能な安定した乾燥配合物中に存在し、目的の分析物の存在下で生物発光複合体が形成されるようなバイオアッセイを実施するための手段を提供する。いくつかの実施形態において、本開示の組成物及び配合物は、生成される生物発光シグナルが定量的であり、目的の分析物の濃度に比例するロバストな固相バイオアッセイを実施するための手段を提供する。

【0205】

いくつかの実施形態において、本開示の組成物及び配合物は、発光基質と、標的分析物結合要素及び生物発光複合体のポリペプチド構成成分または生物発光複合体のペプチド構成成分を含む標的分析物結合剤と、を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のポリペプチド構成成分は、配列番号6と少なくとも60%の配列同一性、配列番号9と少なくとも60%の配列同一性、または配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のポリペプチド構成成分は、配列番号6と少なくとも70%の配列同一性、配列番号9と少なくとも70%の配列同一性、または配列番号12と少なくとも70%の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のポリペプチド構成成分は、配列番号6と少なくとも80%の配列同一性、配列番号9と少なくとも80%の配列同一性、または配列番号12と少なくとも80%の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のポリペプチド構成成分は、配列番号6と少なくとも85%の配列同一性、配列番号9と少なくとも85%の配列同一性、または配列番号12と少なくとも85%の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のポリペプチド構成成分は、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性、配列番号9と少なくとも90%の配列同一性、または配列番号12と少なくとも90%の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のポリペプチド構成成分は、配列番号6と少なくとも95%の配列同一性、配列番号9と少なくとも95%の配列同一性、または配列番号12と少なくとも95%の配列同一性を含む。

【0206】

他の実施形態において、標的分析物結合剤のペプチド構成成分は、配列番号10と少なくとも60%の配列同一性、配列番号11と少なくとも60%の配列同一性、配列番号13と少なくとも60%の配列同一性、または配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のペプチド構成成分は、配列番号10と少なくとも70%の配列同一性、配列番号11と少なくとも70%の配列同一性、配列番号13と少なくとも70%の配列同一性、または配列番号14と少なくとも70%の配列同一性を含む。

0%の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のペプチド構成成分は、配列番号10と少なくとも80%の配列同一性、配列番号11と少なくとも80%の配列同一性、配列番号13と少なくとも80%の配列同一性、または配列番号14と少なくとも80%の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のペプチド構成成分は、配列番号10と少なくとも85%の配列同一性、配列番号11と少なくとも85%の配列同一性、配列番号13と少なくとも85%の配列同一性、または配列番号14と少なくとも85%の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のペプチド構成成分は、配列番号10と少なくとも90%の配列同一性、配列番号11と少なくとも90%の配列同一性、配列番号13と少なくとも90%の配列同一性、または配列番号14と少なくとも90%の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のペプチド構成成分は、配列番号10と少なくとも95%の配列同一性、配列番号11と少なくとも95%の配列同一性、配列番号13と少なくとも95%の配列同一性、または配列番号14と少なくとも95%の配列同一性を含む。

【0207】

いくつかの実施形態において、組成物または配合物は、生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分を含む。これらの実施形態によれば、標的分析物結合剤及び生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成することができる。いくつかの実施形態において、発光基質及び標的分析物結合剤を含む組成物は、乾燥配合物に合わせることができ、生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、液体配合物として配合することができる。いくつかの実施形態において、液体配合物は、乾燥配合物に添加され、再水和すると、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する。他の実施形態において、発光基質、標的分析物結合剤、及び生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分を含む組成物または配合物は、乾燥配合物に合わせられ、乾燥配合物は、再水和すると、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する。

【0208】

いくつかの実施形態において、相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する第2の標的分析物結合要素を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のポリペプチド構成成分は、配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を含み、生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のポリペプチド構成成分は、配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を含み、生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を含む。

【0209】

本開示の実施形態はまた、第1の標的分析物結合要素及び配列番号9と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む、第1の標的分析物結合剤と、第2の標的分析物結合要素及び配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む、第2の標的分析物結合剤と、を含む、乾燥配合物を含む、組成物または配合物を含む。いくつかの実施形態において、乾燥配合物は、発光基質を更に含む。いくつかの実施形態において、組成物は、標的分析物を含む液体配合物を更に含む。

【0210】

本開示の実施形態はまた、第1の標的分析物結合要素及び配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む、第1の標的分析物結合剤と、第2の標的分析物結合要素及び配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む、第2の標的分析物結合剤と、を含む、乾燥配合物を含む、組成物を含む。いくつかの実施形態において、乾燥配合物は、発光基質を更に含む。いくつかの実施形態において、組成物は、標的分析物を含む液体配合物を更に含む。

【0211】

本開示の実施形態はまた、第1の標的分析物結合要素及び配列番号13と少なくとも6

0%の配列同一性を有するペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤と、第2の標的分析物結合要素及び配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤と、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分と、を含む、乾燥配合物を含む、組成物を含む。いくつかの実施形態において、乾燥配合物は、発光基質を更に含む。いくつかの実施形態において、組成物は、標的分析物を含む液体配合物を更に含む。

【0212】

本開示の実施形態はまた、標的分析物結合要素及び配列番号9と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、標的分析物結合要素及び配列番号10または配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、を含む、組成物を含む。

10

【0213】

本開示の実施形態はまた、標的分析物結合要素及び配列番号10または配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を有するペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、標的分析物結合要素及び配列番号9と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、を含む、組成物を含む。

【0214】

本開示の実施形態はまた、標的分析物結合要素及び配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、標的分析物結合要素及び配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、を含む、組成物を含む。いくつかの実施形態において、乾燥配合物は、発光基質を更に含む。いくつかの実施形態において、液体配合物は、発光基質を更に含む。いくつかの実施形態において、液体配合物は、標的分析物を含むサンプルを更に含む。これらの実施形態によれば、生物発光分析物検出複合体は、乾燥配合物及び液体配合物を標的分析物の存在下で合わせると形成される。

20

【0215】

いくつかの実施形態において、組成物は、生物発光複合体の第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分を更に含む。これらの実施形態によれば、標的分析物結合剤、生物発光複合体の第1の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分、及び生物発光複合体の第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する。

30

【0216】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤を含む組成物は、乾燥配合物として作製される。いくつかの実施形態において、生物発光複合体の第1の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分及び第2の相補性ペプチドまたはポリペプチドは、液体配合物として作製される。これらの実施形態によれば、液体配合物は、乾燥配合物に添加することができ、再水和すると、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体の形成が促進される。

40

【0217】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤、及び第1または第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分のいずれかを含む組成物は、乾燥配合物に合わされ、乾燥配合物中に存在しない第1または第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、液体配合物として作製される。液体配合物は、乾燥配合物に添加することができ、再水和すると、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体の形成が促進される。

【0218】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤、第1の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分、及び第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、乾燥配合物

50

に合わされ、再水和すると、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する。いくつかの実施形態において、乾燥配合物は、発光基質を更に含む。いくつかの実施形態において、液体配合物は、発光基質を更に含む。いくつかの実施形態において、液体配合物は、標的分析物を含むサンプルを更に含み、生物発光分析物検出複合体は、乾燥配合物及び液体配合物を標的分析物の存在下で合わせると形成される。

【0219】

いくつかの実施形態において、第1または第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分のいずれかは、再水和すると、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する第2の標的分析物結合要素を含む。

【0220】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤のポリペプチド構成成分は、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を含み、生物発光複合体の第1または第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分のいずれかは、配列番号13または配列番号15のいずれかと少なくとも60%の配列同一性を含む。

【0221】

本開示の実施形態はまた、標的分析物結合要素及び配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、標的分析物結合要素及び配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含み、配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する第2の相補性ペプチド構成成分を更に含む、液体配合物と、を含む、組成物を含む。

【0222】

本開示の実施形態はまた、標的分析物結合要素及び配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤、ならびに標的分析物結合要素及び配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物を含み、配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する第2の相補性ペプチド構成成分を含む、液体配合物を更に含む。

【0223】

本開示の実施形態はまた、標的分析物結合要素及び配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤、ならびに配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む、乾燥配合物と、標的分析物結合要素及び配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、を含む。

【0224】

本開示の実施形態はまた、標的分析物結合要素及び配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を有するペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤、ならびに標的分析物結合要素及び配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物を含み、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分を含む、液体配合物を更に含む。

【0225】

本開示の実施形態はまた、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分を含む、乾燥配合物と、標的分析物結合要素及び配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を有するペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤、ならびに標的分析物結合要素及び配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、を含む。

【0226】

本開示の実施形態はまた、標的分析物結合要素及び配列番号13と少なくとも60%の

配列同一性を有するペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤と、標的分析物結合要素及び配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤と、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分と、を含む、乾燥配合物を含む、組成物を含む。いくつかの実施形態において、乾燥配合物は、発光基質を更に含む。いくつかの実施形態において、液体配合物は、発光基質を更に含む。いくつかの実施形態において、液体配合物は、標的分析物を含むサンプルを更に含み、生物発光分析物検出複合体は、乾燥配合物及び液体配合物を標的分析物の存在下で合わせることで、形成される。

【0227】

いくつかの実施形態において、発光基質の存在下で生成される生物発光シグナルは、標的分析物結合剤が生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分のうちの1つ以上と接触する場合、標的分析物結合剤及び発光基質単独によって生成される生物発光シグナルと比較して、実質的に増加する。

10

【0228】

いくつかの実施形態において、標的分析物は、標的抗体である。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、抗体に非特異的に結合する要素を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、抗体に特異的に結合する要素を含む。いくつかの実施形態において、標的抗体は、病原体、毒素、または治療用生物学的製剤に対する抗体である。

【0229】

20

いくつかの実施形態において、標的分析物結合要素は、抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組み換え抗体、抗体フラグメント、プロテインA、プロテインAのIg結合ドメイン、プロテインG、プロテインGのIg結合ドメイン、プロテインA/G、プロテインA/GのIg結合ドメイン、プロテインL、プロテインLのIg結合ドメイン、プロテインM、プロテインMのIg結合ドメイン、オリゴヌクレオチドプローブ、ペプチド核酸、DARPin、アプタマー、アフィマー、タンパク質ドメイン、及び精製タンパク質からなる群から選択される。

【0230】

いくつかの実施形態において、発光基質は、セレンテラジン、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h-h、フリマジン、JRW-0238、JRW-1404、JRW-1482、JRW-1667、JRW-1743、JRW-1744、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される。いくつかの実施形態において、セレンテラジン類似体または誘導体は、前駆体発光基質であり、例えば、米国特許第9,487,520号に開示されているものであり、当該特許は、参照により本明細書に援用される。いくつかの実施形態において、セレンテラジン類似体または誘導体は、Enduazine (Promega Corporation) 及びVivazine (Promega Corporation) である。

30

【0231】

いくつかの実施形態において、組成物は、高分子を更に含む。いくつかの実施形態において、高分子は、天然生体高分子である。いくつかの実施形態において、天然生体高分子は、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、及びこれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの実施形態において、天然生体高分子は、プルランである。いくつかの実施形態において、高分子は、環状糖高分子またはその誘導体である。いくつかの実施形態において、高分子は、ヒドロキシプロピルβ-シクロデキストリンである。

40

【0232】

いくつかの実施形態において、高分子は、合成高分子である。いくつかの実施形態において、合成高分子は、ポリスチレン、ポリ(メタ)アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの実施形態において、合成高分子は、少なくとも1つのポリ(プロピレンオキシド)ブロックと、少なくとも1つのポリ(エチレンオキシド)

50

ブロックとを含む、ブロックコポリマーである。いくつかの実施形態において、合成高分子は、ポロキサマー 188 である。

【0233】

いくつかの実施形態において、組成物は、緩衝液、界面活性剤、還元剤、塩、ラジカル捕捉剤、キレート化剤、タンパク質、またはこれらの任意の組み合わせを更に含む。いくつかの実施形態において、界面活性剤は、ポリソルベート 20、ポリソルベート 40、及びポリソルベート 80 から選択される。

【0234】

いくつかの実施形態において、組成物は、自己発光を低減する物質を更に含む。いくつかの実施形態において、物質は、ATT (6-アザ-2-チオチミン)、ATT の誘導体または類似体、チオヌクレオシド、チオウレアなどである。いくつかの実施形態において、物質は、米国特許第 9,676,997 号に開示されているチオヌクレオシドであり、当該特許は、参照により本明細書に援用される。いくつかの実施形態において、物質は、チオウレアであり、自己発光を低減するための使用は、米国特許第 7,118,878 号、同第 7,078,181 号、及び同第 7,108,996 号に開示されており、当該特許は、参照により本明細書に援用される。

【0235】

いくつかの実施形態において、組成物は、サンプル中の分析物を検出するために、分析物検出プラットフォームとともに使用される。いくつかの実施形態において、サンプルは、血液、血清、血漿、尿、便、脳脊髄液、間質液、唾液、組織サンプル、水サンプル、土壌サンプル、植物サンプル、食物サンプル、飲料サンプル、油、及び産業流体サンプルから選択される。

【0236】

本開示の実施形態はまた、上に記載される組成物のいずれかを、標的分析物を含むサンプルと合わせることを含む、サンプル中の分析物を検出する方法を含む。いくつかの実施形態において、サンプル中の標的分析物を検出することは、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを検出することを含む。いくつかの実施形態において、方法は、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを定量することを更に含む。いくつかの実施形態において、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルは、分析物の濃度に比例する。いくつかの実施形態において、組成物の構成成分のうちの 1 つ以上が、溶液中の構成成分単独と比較して、組成物内で安定性の向上を示す。

【0237】

上に記載される組成物及び配合物の様々な実施形態は、実施例及び図面に示されるように、向上した安定性を示す。例えば、ライオケーキなどの乾燥配合物として作製される場合、基材またはマトリックス（例えば、Whatman 903、Ahlsstrom 237、及び Ahlsstrom 6613H；96 ウェルプレートのウェル、ナイロンメッシュ）上で乾燥させる場合、または様々なタンパク質緩衝液配合物中で乾燥させる場合、発光基質の有無にかかわらず、本開示の組成物及び配合物は、長期間保存される場合、向上した安定性を示す。本明細書で提供される場合、本開示の組成物及び配合物は、長期間保管しても、標的分析物の存在下で発光シグナルを生成することができる。いくつかの実施形態において、本開示の組成物及び配合物は、同じまたは類似の生物発光複合体の構成成分（例えば、相補性ペプチド／ポリペプチド、発光基質）を含有するが、配合物の他の構成成分のうちの 1 つ以上を含まずに配合され、及び／または本明細書に記載される方法に従って配合されていない組成物及び配合物と比較して、向上した安定性を示す。

【0238】

いくつかの実施形態において、本開示の組成物及び配合物は、少なくとも約 1 日間、2 日間、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、2 週間、3 週間、4 週間、1 ヶ月間、2 ヶ月間、3 ヶ月間、4 ヶ月間、5 ヶ月間、6 ヶ月間、7 ヶ月間、8 ヶ月間、9 ヶ月間、10 ヶ月間、12 ヶ月間、及び最大 1 年間、向上した安定性を示す。いくつかの実施形態において、本開示の組成物及び配合物は、約 0℃～65℃、約 4℃～65℃、約 10℃～

10

20

30

40

50

65℃、約15℃～65℃、約15℃～65℃、約20℃～65℃、約25℃～65℃、約30℃～65℃、約35℃～65℃、約37℃～65℃、約40℃～65℃、約45℃～65℃、約50℃～65℃、約55℃～65℃、約60℃～65℃、約4℃～55℃、約10℃～50℃、約15℃～45℃、及び約20℃～40℃の範囲の温度で向上した安定性を示す。

【0239】

4. 検出アッセイ及びシステム

本開示の実施形態は、サンプル中の1つ以上の分析物を検出するための組成物、システム、アッセイ、及び方法を含む。これらの実施形態に従って、本明細書の様々な実施形態と使用するための例示的なアッセイ及びデバイスが以下に記載される。以下のデバイス及びアッセイは、本明細書に記載されるシステム、アッセイ、及び方法の全範囲を制限するものとみなすべきではない。

【0240】

a. ラテラルフローアッセイ

特定の実施形態において、本開示は、ラテラルフローアッセイ（例えば、ラテラルフローイムノアッセイ）を実施するための組成物及び材料を提供する。ラテラルフローアッセイは、イムノクロマトグラフィーの原理に基づくものであり、限定するものではないが、排卵のモニタリング、感染症／感染生物の検出／診断、乱用薬物の分析、ヒトの生理機能に重要な分析物の検出／定量、セキュリティスクリーニング、獣医学的検査、農業用途、環境検査、製品の品質評価などに関する分析物などの様々な分析物の検出、定量、検査、測定、及びモニタリングに使用することができる。

【0241】

図1に示されるように、本開示の実施形態は、生物発光複合体形成に基づいて標的分析物を検出及び／または定量するためのラテラルフロー検出システム（100）を含む。いくつかの実施形態において、本開示のラテラルフローアッセイシステムは、1つ以上の検出領域（110）及び1つ以上のコントロール領域（115）に分けられた分析メンブレン（105）を含む。1つまたは複数の検出領域は、分析メンブレンを通過する横方向の流れを促進するときに位置がずれないように検出領域の一部に固定化された標的分析物結合剤を含むことができる。本開示のラテラルフローアッセイシステムはまた、標的分析物結合剤を含有するコンジュゲートパッド（120）を含むことができる。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、コンジュゲートパッド内に含有されているが、横方向の流れが発生すると、コンジュゲートパッドから分析メンブレンを越えて検出領域及びコントロール領域に向かって流れる。本開示のラテラルフローアッセイシステムはまた、ラテラルフローアッセイシステムの遠位端（例えば、吸収パッドの反対側）に配置されるサンプルパッド（125）を含むことができる。標的分析物を含有する（または含有し得る）サンプルは、サンプルパッドにアプライされる。いくつかの実施形態において、ラテラルフローアッセイシステムはまた、サンプルパッドの遠位にあるデバイスの端部にウィックパッド（130）を含む。ウィックパッドは、サンプルがサンプルパッドからコンジュゲートパッド、分析メンブレン、検出領域、及びコントロール領域を通過する毛管流を発生させる。

【0242】

これらの実施形態によれば、サンプルをサンプルパッドに添加すると、横方向の流れが促進され、サンプル中の標的分析物がコンジュゲートパッド中の第1の標的分析物結合剤と接触し、その後、横方向の流れにより、標的分析物及び第1の標的分析物結合剤が分析メンブレンの検出領域に固定化された第2の標的分析物結合剤と接触する。次いで、検出領域における分析物の検出に基づいて（例えば、生物発光複合体の発光基質の存在下で）及び／またはコントロールと比較して、標的分析物の存在及び／または量が決定される。

【0243】

いくつかの実施形態において、上記のラテラルフローシステムは、結合した標的分析物の検出のために、1つ以上のNanoLuc（登録商標）をベースにした技術（例えば、

NanoBiT、NanoTrip、NanoBRETなど)を利用する。

【0244】

例示的な実施形態において、図1に示されるように、標的分析物は、感染症／感染生物への曝露に応答して対象において生成される抗体である。第1の標的分析物結合剤は、抗体に結合する標的分析物結合要素（例えば、非特異的抗体結合剤（例えば、プロテインL））と、異なるペプチドまたはポリペプチドと相互作用して生物発光シグナルを発生することが可能な第1のペプチドまたはポリペプチド（例えば、NanoBiT非発光ペプチドもしくはポリペプチドまたはそのバリエーション（例えば、配列番号9～11または12／14のうちの1つ））の両方を含む。第2の標的分析物結合剤は、抗体に結合する標的分析物結合要素、例えば、抗体によって認識される抗原のエピトープ、及び第1のペプチドまたはポリペプチドと相互作用して生物発光シグナルを発生することが可能な第2のペプチドまたはポリペプチド（例えば、NanoBiT非発光ペプチドもしくはポリペプチドまたはそのバリエーション（例えば、配列番号9～11または12／14のうちの1つ））を含み得る。生物発光複合体が検出領域に留まれば、生物発光シグナルを検出及び／または定量することができ（例えば、生物発光複合体の発光基質の存在下で）、したがって、サンプル中の抗体の存在／量が示される。

10

【0245】

図1に示されるように、本開示のラテラルフローアッセイは、対象からの単一のサンプルで、異なる疾患／微生物に対して産生される抗体などの複数の異なる分析物を検査するように構成することができる（例えば、マルチプレックス化）。これらの実施形態によれば、分析メンブレンは、複数の検出領域を含むことができ、各検出領域は、異なる標的分析物結合要素（例えば、異なる疾患抗原）を有する異なる標的分析物結合剤を含む。

20

【0246】

図1に示されるものとは別のラテラルフローの実施形態において、標的分析物は、感染症／感染生物への曝露に応答して対象において生成される抗体である。第1の標的分析物結合剤は、抗体に結合する標的分析物結合要素（例えば、抗体によって認識される抗原のエピトープ）と生物発光ポリペプチド（例えば、NanoLucまたはそのバリエーション（例えば、配列番号5、配列番号6））の両方を含む。第2の標的分析物結合剤は、抗体に結合する標的分析物結合要素、例えば、非特異的抗体結合剤（例えば、プロテインL）を含むことができる。次いで、検出領域において生物発光が検出されること（例えば、生物発光複合体の発光基質の存在下で）は、標的分析物結合剤の両方が標的分析物に結合したことを示し、したがって、サンプル中に標的分析物が存在することを示す。

30

【0247】

別の例示的な代替的な実施形態において、標的分析物は、感染症／感染生物への曝露に応答して対象において生成される抗体である。第1の標的分析物結合剤は、抗体に結合する標的分析物結合要素（例えば、非特異的抗体結合剤（例えば、プロテインL）、標的特異的（例えば、抗体）結合剤）と、第2の非発光（NL）ペプチド（例えば、配列番号11もしくは13またはそのバリエーション）及び非発光（NL）ポリペプチド（例えば、配列番号12またはそのバリエーション）と相互作用して生物発光シグナルを発生することが可能な第1の非発光（NL）ペプチドタグ（例えば、配列番号13もしくは11またはそのバリエーション）の両方を含む。第2の標的分析物結合剤は、抗体（例えば、標的特異的（例えば、抗体）結合剤、非特異的抗体結合剤（例えば、プロテインL））に結合する標的分析物結合要素、及び第2のNLペプチドタグ（例えば、配列番号11もしくは13またはそのバリエーション）を含む。検出領域におけるNLポリペプチド構成成分（例えば、配列番号12またはそのバリエーション）及び発光基質の存在下での生物発光複合体の形成は、サンプル中に標的分析物が存在することを示す。生物発光シグナルを検出及び／または定量することで、サンプル中の抗体が検出／定量される。

40

【0248】

上述の例示的な実施形態に対する追加の代替物も企図される。例えば、代替的な結合剤、標的分析物、検出可能な要素、様々な構成成分の順序（例えば、非特異的結合剤／標的

50

特異的結合剤、標的特異的結合剤／非特異的結合剤、標的特異的結合剤／標的特異的結合剤など）は、本明細書に記載され、構成成分の様々な組み合わせを組み込む実施形態は、本明細書の範囲内である。

【0249】

いくつかの実施形態において、標的分析物は、抗体ではなく、小分子、ペプチド、タンパク質、炭水化物、脂質などである。いくつかの実施形態において、上に記載されるラテラルフローアッセイ及びシステムは、任意のそのような標的分析物の検出のために、構成される（例えば、1つ以上のNanoLuc（登録商標）をベースにした技術（例えば、NanoBIT、NanoTrip、NanoBRETなど）を使用する）。

【0250】

b. 固相アッセイ

本開示の実施形態は、サンプル中の1つ以上の分析物を検出するための組成物、アッセイ、システム、デバイス、及び方法を含む。これらの実施形態によれば、本開示は、固相アッセイを実施するための組成物及び材料（例えば、イムノアッセイを実施するための固相プラットフォーム）を提供する。固相検出プラットフォームは、一般に、最もシンプルな形式のイムノアッセイであり、限定するものではないが、排卵のモニタリング、感染症／感染生物の検出／診断、乱用薬物の分析、ヒトの生理機能に重要な分析物の検出／定量、獣医学的検査、セキュリティスクリーニング、農業用途、環境検査、製品の品質評価などに関する分析物などの様々な分析物の検出、定量、検査、測定、及びモニタリングに使用することができる。ラテラルフローアッセイとは対照的に、固相検出プラットフォームは、アッセイ試薬がメンブレンを通過する流れを促進することを含まず、代わりに、アッセイの構成成分が結合されたまたは含まれる固体支持体を典型的に含む（例えば、ディップスティックテストまたはスポットテスト）。

【0251】

図2に示されるように、本開示の実施形態は、生物発光複合体形成に基づいて標的分析物を検出及び／または定量するための固相検出プラットフォーム（200）を含む。いくつかの実施形態において、本開示の固相検出プラットフォームは、サンプルがアプライされる、1つ以上の検出領域（205）及び1つ以上のコントロール領域（210）を含む。いくつかの実施形態において、1つまたは複数の検出領域は、検出領域の一部内に及び／または検出領域の一部にコンジュゲートされた、標的分析物結合剤を含む。本開示の固相検出プラットフォームはまた、検出領域及びコントロール領域が取り付けられ、領域が互いに区切られ、検出領域及びコントロール領域にサンプルをアプライできる、固体支持体（215）を含み得る（例えば、ディップスティックテスト）。

【0252】

これらの実施形態によれば、サンプルまたはサンプルの一部は、固相アッセイプラットフォームの検出領域及びコントロール領域にアプライされ、それにより、標的分析物は、固相上での標的分析物の結合イベント及び／または固定化（例えば、生物発光実体が固定化され、生物発光複合体が形成されること）が検出可能である条件下で、検出領域にコンジュゲートされた及び／または検出領域内の標的分析物結合剤（220）と接触することで、サンプル中の分析物の存在が示される。

【0253】

いくつかの実施形態において、固相アッセイプラットフォームは、固相に固定化された第1の標的分析物結合剤（例えば、標的特異的結合剤（例えば、標的特異的抗体、標的抗体の抗原など））を含む。生物発光ポリペプチド（例えば、配列番号5またはそのバリエーション）に連結された第2の標的分析物結合剤（例えば、標的特異的結合剤（例えば、標的特異的抗体、標的抗体の抗原など）、非特異的結合剤（例えば、プロテインL））は、サンプルとともに固相に添加される（例えば、同時に、連続的になど）。どちらの標的分析物結合剤も標的分析物に結合し、生物発光ポリペプチドが固相上に固定化される。固相上の生物発光の検出／定量（例えば、洗浄ステップの後）は、サンプル中の標的分析物の存在／量を示す。いくつかの場合、第1の標的分析物結合剤は、検出領域にコンジュゲート

10

20

30

40

50

され、第2の標的分析物結合剤（生物発光ポリペプチドに結合されたもの）は、サンプルありまたはなしで、検出領域にアプライされる。いくつかの場合、第2の標的分析物結合剤は、検出領域にコンジュゲートされ、第1の標的分析物結合剤（生物発光ポリペプチドに結合されたもの）は、サンプルありまたはなしで、検出領域にアプライされる。これらの実施形態によれば、検出領域における生物発光の固定化は、発光基質（以下に詳述される）の存在下で検出及び／または定量することができ、したがって、サンプル中の抗体の存在（または不在）が示される。

【0254】

代替的な実施形態において、固相アッセイプラットフォームは、2つの非発光（NL）ペプチド／ポリペプチド構成成分（例えば、NanoBITシステム）が結合すると、生物発光複合体が形成される二成分相補性アプローチを利用して、標的分析物を検出する。二成分相補性アプローチを利用する固相アッセイ及びシステムの複数の構成は、本明細書の範囲内である。例えば、例示的なシステムは、（i）第2の異なるNLポリペプチドまたはNLペプチド（例えば、配列番号10もしくは9またはそのバリエーション）と高親和性で相互作用して生物発光シグナルを生成することが可能な第1のNLペプチドまたはNLポリペプチド（例えば、配列番号9もしくは10またはそのバリエーション）に連結された第1の標的分析物結合剤と、（ii）相補性NLポリペプチドまたはNLペプチドに連結された第2の標的分析物結合剤を含み得、第2の標的分析物結合剤は、固相に固定化される。標的分析物結合剤が標的分析物に結合すると、生物発光複合体が固相上で形成され、発光基質（以下に詳述される）の存在下で生物発光シグナルが検出可能／定量可能となる。

【0255】

他の実施形態において、固相アッセイプラットフォームは、2つの非発光（NL）ペプチド構成成分及び非発光（NL）ポリペプチド構成成分（例えば、NanoTripシステム）結合すると、生物発光複合体が形成される三成分相補性アプローチを利用して、標的分析物を検出する。いくつかの実施形態において、固相アッセイプラットフォームは、（i）標的分析物結合要素（例えば、一般的または特異的）及び三成分生物発光複合体（例えば、NanoTrip複合体）を形成することが可能なNLペプチド（例えば、配列番号11または13）の両方を含む、第1の標的分析物結合剤と、（ii）標的分析物結合要素（例えば、特異的）及び三成分生物発光複合体（例えば、NanoTrip複合体）を形成することが可能なNLペプチド（例えば、配列番号11または13）の両方を含む、第2の標的分析物結合剤と、（iii）三成分生物発光複合体（例えば、NanoTrip複合体）のNLポリペプチド構成成分と、（iv）発光基質と、を含む。いくつかの場合、第1の標的分析物結合剤は、検出領域にコンジュゲートされ、第2の標的分析物結合剤は、サンプルありまたはなしで、検出領域にアプライされる。いくつかの場合、第2の標的分析物結合剤は、検出領域にコンジュゲートされ、第1の標的分析物結合剤は、サンプルありまたはなしで、検出領域にアプライされる。生物発光複合体が検出領域において形成されると、生物発光シグナルが検出及び／または定量され、それにより、サンプル中の抗体の存在（または不在）が示される。

【0256】

他の実施形態において、固相アッセイプラットフォームは、（i）標的分析物結合要素及びNanoLuc（登録商標）ベースのペプチドまたはポリペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、（ii）標的分析物結合要素及びフルオロフォアを含む、標的分析物結合剤と、（iii）任意選択により、生物発光複合体を形成する追加のペプチド／ポリペプチド構成成分（例えば、NanoLuc（登録商標）ベースのペプチドまたはポリペプチドが生物発光ポリペプチドでない、例えば、非発光である実施形態の場合）と、を含み、第1及び第2の標的分析物結合剤がサンプル中の標的分析物に結合すると、生物発光に必要な任意の追加の構成成分（例えば、発光基質、相補性構成成分など）の存在下で、NanoLuc（登録商標）ベースの構成成分（例えば、NanoLuc（登録商標）タンパク質または生物発光複合体）からの発光がフルオロフォアを励起する（例えば、BRETを介して）。いくつかの場合、第1の標的分析物結合剤は、検出領域にコンジュゲー

トされ、第2の標的分析物結合剤は、サンプルありまたはなしで、検出領域にアプライされる。いくつかの場合、第2の標的分析物結合剤は、検出領域にコンジュゲートされ、第1の標的分析物結合剤は、サンプルありまたはなしで、検出領域にアプライされる。

【0257】

図2に示されるように、本開示の固相プラットフォームは、対象からの単一のサンプルで、異なる疾患／微生物に対して産生される抗体などの複数の異なる分析物を検査するように構成することができる（例えば、マルチプレックス化）。これらの実施形態によれば、固相プラットフォームは、複数の検出領域を含むことができ、各検出領域は、異なる標的分析物結合要素（例えば、異なる疾患抗原）を有する異なる標的分析物結合剤を含む。

【0258】

いくつかの実施形態において、本開示の固相プラットフォームは、例えば、マイクロタイタープレートの1つ以上のウェルなどの複数の検出領域を含むことができる。このような実施形態において、1つ以上の異なる標的分析物結合剤は、特定の生物発光アッセイを実施するのに必要とされる他の検出試薬（例えば、第2の標的分析物結合剤、発光基質、アッセイ緩衝液など）のうちの1つ以上とともに、マイクロタイタープレートのウェルにコンジュゲート（例えば、コーティング）することができる。いくつかの実施形態において、アッセイを実施するのに必要とされる他の検出試薬（マイクロタイタープレートにコンジュゲートされない試薬）のうちの1つ以上は、凍結乾燥ケーキ（ライオケーキ）またはタブレットの形態でマイクロタイタープレートのウェルに添加し、生物発光アッセイの一部として再構成することができる。

【0259】

c. 液相アッセイ

本開示の実施形態は、サンプル中の1つ以上の分析物を検出するための組成物、アッセイ、システム、デバイス、及び方法を含む。これらの実施形態によれば、本開示は、液相アッセイを実施するための組成物及び材料（例えば、溶液内でイムノアッセイを実施するための液体ベースフォーマット）を提供する。液相検出プラットフォームは、限定するものではないが、排卵のモニタリング、感染症／感染生物の検出／診断、乱用薬物の分析、ヒトの生理機能に重要な分析物の検出／定量、獣医学的検査、セキュリティスクリーニング、農業用途、環境検査、製品の品質評価などに関する分析物などの様々な分析物の検出、定量、検査、測定、及びモニタリングに使用することができる。ラテラルフローアッセイ及び固相検出プラットフォームとは対照的に、液相検出プラットフォームは、検出試薬のうちの1つ以上を固体支持体またはメンブレンにコンジュゲートして検出を容易にするのではなく、検出試薬を伴う反応を行う溶液／液体のための容器を典型的に含む。

【0260】

例えば、図33に示されるように、本開示の液相プラットフォームの実施形態は、分析物の検出を促進するための溶液（例えば、緩衝液）中で再構成することができるタブレットまたは凍結乾燥ケーキ中に、生物発光複合体の1つ以上の構成成分を含むことができる。いくつかの実施形態において、タブレットまたはライオケーキは、分析物を検出するための反応を実施するのに必要な全ての試薬を含み得る。そのようなライオケーキまたは錠剤は、多くの異なるアッセイフォーマット、例えば、限定するものではないが、キュベット、マイクロタイタープレート（例えば、96ウェルマイクロタイタープレート）のウェル、試験管、大容量ボトル、SNAPアッセイなどと適合する。

【0261】

いくつかの実施形態において、液相アッセイプラットフォームは、第1の標的分析物結合剤（例えば、標的特異的結合剤（例えば、標的特異的抗体、標的抗体の抗原など））、生物発光ポリペプチド（例えば、配列番号5及びそのバリエーション）に結合された第2の標的分析物結合剤（例えば、標的特異的結合剤（例えば、標的特異的抗体、標的抗体の抗原など））、及び非特異的結合剤（例えば、プロテインL））のうちの1つ以上を含む、ライオケーキまたはタブレットを含む。溶液中の生物発光の検出／定量は、サンプル中の標的分析物の存在／量を示す。

【0262】

いくつかの実施形態において、液相アッセイプラットフォームは、2つの非発光（NL）ペプチド／ポリペプチド構成成分（例えば、NanoBITシステム）が結合すると、生物発光複合体が形成される二成分相補性アプローチを利用して、標的分析物を検出する。二成分相補性アプローチを利用する液相アッセイ及びシステムの複数の構成は、本明細書の範囲内である。例えば、例示的なシステムは、（i）第2の異なるNLポリペプチドまたはNLペプチド（例えば、配列番号10もしくは9またはそのバリエーション）と高親和性で相互作用して生物発光シグナルを生成することが可能な第1のNLペプチドまたはNLポリペプチド（例えば、配列番号9もしくは10またはそのバリエーション）に連結された第1の標的分析物結合剤と、（ii）相補性NLポリペプチドまたはNLペプチドに連結された第2の標的分析物結合剤を含み得る。標的分析物結合剤が標的分析物に結合すると、生物発光複合体が溶液中で形成され、発光基質（以下に詳述される）の存在下で生物発光シグナルが検出可能／定量可能となる。

10

【0263】

他の実施形態において、液相アッセイプラットフォームは、2つの非発光（NL）ペプチド構成成分及び非発光（NL）ポリペプチド構成成分（例えば、NanoTripシステム）が結合すると、生物発光複合体が形成される三成分相補性アプローチを利用して、標的分析物を検出する。いくつかの実施形態において、液相アッセイプラットフォームは、（i）標的分析物結合要素（例えば、一般的または特異的）及び三成分生物発光複合体（例えば、NanoTrip複合体）を形成することが可能なNLペプチド（例えば、配列番号11または13）の両方を含む、第1の標的分析物結合剤と、（ii）標的分析物結合要素（例えば、特異的）及び三成分生物発光複合体（例えば、NanoTrip複合体）を形成することが可能なNLペプチド（例えば、配列番号11または13）の両方を含む、第2の標的分析物結合剤と、（iii）三成分生物発光複合体（例えば、NanoTrip複合体）のNLポリペプチド構成成分と、（iv）発光基質と、を含む。生物発光複合体が溶液中で形成されると、生物発光シグナルが検出及び／または定量され、それにより、サンプル中の抗体の存在（または不在）が示される。

20

【0264】

他の実施形態において、液相アッセイプラットフォームは、（i）標的分析物結合要素及びNanoLuc（登録商標）ベースのペプチドまたはポリペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、（ii）標的分析物結合要素及びフルオロフォアを含む、標的分析物結合剤と、（iii）任意選択により、生物発光複合体を形成する追加のペプチド／ポリペプチド構成成分（例えば、NanoLuc（登録商標）ベースのペプチドまたはポリペプチドが生物発光ポリペプチドでない、例えば、非発光である実施形態の場合）と、を含み、第1及び第2の標的分析物結合剤がサンプル中の標的分析物に結合すると、生物発光に必要な任意の追加の構成成分（例えば、発光基質、相補性構成成分など）の存在下で、NanoLuc（登録商標）ベースの構成成分（例えば、NanoLuc（登録商標）タンパク質または生物発光複合体）からの発光がフルオロフォアを励起する（例えば、BRETを介して）。

30

【0265】

本開示の液相プラットフォームは、対象からの単一のサンプルで、異なる疾患／微生物に対して産生される抗体などの複数の異なる分析物を検査するように構成することができる（例えば、マルチプレックス化）。いくつかの実施形態において、分析物を検出／定量するための生物発光反応を実施するのに必要とされる検出試薬のうちの1つ以上は、使用される特定のプラットフォームの1つ以上の容器（例えば、96ウェルプレートの個々のウェル）中に、例えば、緩衝液中で再構成されるライオケーキまたはタブレットとして、存在する。他の実施形態において、1種類以上のサンプル溶液が容器中に既に存在し、1つ以上のライオケーキまたはタブレットが容器に添加され、生物発光反応を促進するために水和される。これらの実施形態によれば、液相プラットフォームは、異なる標的分析物結合要素（例えば、異なる疾患抗原）を有する異なる標的分析物結合剤を含む、

40

50

複数の容器を含むことができる。

【0266】

d. 他のアッセイ

本開示の実施形態は、当該技術分野において知られている他のアッセイプラットフォームを使用する、サンプル中の1つ以上の分析物を検出するための組成物、アッセイ、システム、デバイス、及び方法を含む。例えば、標的分析物は、マイクロ流体及び／またはチップベースアッセイの状況において、本明細書に記載される生物発光ポリペプチド及び／または複合体を使用して、検出及び／または測定され得る。マイクロ流体システムは、化学的または生物学的サンプルなどの流体を操作するための多様な操作を統合したものである。これらのシステムは、生物学的及び医学的診断などの多くの異なる分野に適用できる。マイクロ流体デバイスの1つのタイプは、マイクロ流体チップである。マイクロ流体チップは、流体を貯蔵し、チップ上の様々な場所から流体を送り出し、及び／または流体試薬を反応させる、チャンネル、バルブ、ポンプ、及び／またはリザーバなどのマイクロスケールの特徴（またはマイクロフィーチャー）を含み得る。

10

【0267】

標的分析物の存在下で生物発光シグナルを生成することが可能なペプチド及びポリペプチドを含む生物発光ポリペプチド及び／または複合体で構成されたマイクロ流体チップまたはラボオンチップ（LOC）は、自動化、統合性、小型化、及びマルチプレックス化に関する柔軟性が高まる。例えば、マイクロ流体チップをベースにした病原体検出は、通常、マイクロスケールまたはナノスケールの反応チャンバを使用するため、デバイスを小型化及び携帯化することが可能であり、これは、特にポイントオブケア検査に有利である。LOC技術により、サンプル調製、増幅、及びシグナル検出の統合が可能になり、結果を出すのに必要な時間が短縮される。スループットが高く、サンプル及び試薬の消費が少ないため、この技術は柔軟性があり、比較的費用対効果が高い。細菌、ウイルス、及び真菌を検出する、核酸ベースのマイクロ流体病原体検出は、増幅するためのPCRまたはリアルタイムPCRを必要としないため、本開示の生物発光複合体の明確な利点である。

20

【0268】

5. アッセイ組成物、コンポーネント、及び製造方法

本開示の実施形態はまた、標的分析物を検出するための生物発光ペプチド及びポリペプチドとともに使用するアッセイプラットフォームを製造する方法を含む。アッセイプラットフォームは、検出される分析物、サンプリング環境の複雑さ、及び診断パラメータなどの様々な因子に応じて変わり得るが、本開示の組成物、材料及び方法は、固相アッセイ、ラテラルフローアッセイ、及びマイクロ流体ベースアッセイなどの現在利用可能なアッセイプラットフォームのほとんどに適用できる。

30

【0269】

a. 発光基質

いくつかの実施形態において、本開示のアッセイプラットフォームを製造する方法は、発光基質の利用を含む。セレンテラジンならびにその類似体及び誘導体などの発光基質は、保管中に分解することがあり、それにより、生物学的アッセイに添加または使用する前に基質が失われることがある。そのような分解は、溶液中の発光基質が経時的に温度に依存して不安定になる結果をもたらす得る。この分解により、発光基質が無駄になり、分解された発光基質を利用した生物学的アッセイから得られる発光測定の感度及び再現性が低下する。

40

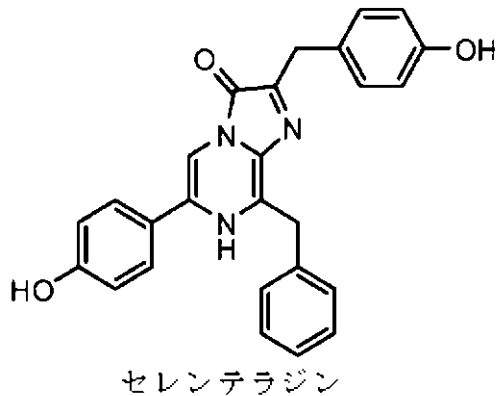
【0270】

本明細書で提供されるのは、セレンテラジンまたはその類似体もしくは誘導体などの発光基質を含む組成物である。例示的なセレンテラジン類似体としては、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h-h、フリマジン、JRW-0238、JRW-1404、JRW-1482、JRW-1667、JRW-1743、及びJRW-1744が挙げられる。

【0271】

50

いくつかの実施形態において、基質は、セレンテラジンであり、以下の構造を有する：



10

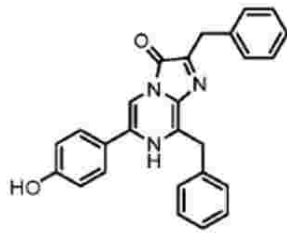
例示的なセレンテラジン類似体としては、セレンテラジン-h（2-デオキシセレンテラジンまたは2,8-ジベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン）、セレンテラジン-h-h（ジデオキシセレンテラジンまたは2,8-ジベンジル-6-フェニルイミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン）、フリマジン（8-ベンジル-2-(フラン-2-イルメチル)-6-フェニルイミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン）、JRW-0238（8-ベンジル-2-(フラン-2-イルメチル)-6-(3-ヒドロキシフェニル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン）、JRW-1404（8-ベンジル-6-(2-フルオロ-3-ヒドロキシフェニル)-2-(フラン-2-イルメチル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン）、JRW-1482（6-(3-アミノ-2-フルオロフェニル)-8-ベンジル-2-(フラン-2-イルメチル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン）、JRW-1667（6-(3-アミノ-2-フルオロフェニル)-8-(2-フルオロベンジル)-2-(フラン-2-イルメチル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン）、JRW-1744（6-(3-アミノ-2-フルオロフェニル)-8-ベンジル-2-(フラン-2-イルメチル)イミダゾ[1,2-α]ピラジン-3(7H)-オン）、及びJRW-1743（6-(3-アミノ-2-フルオロフェニル)-8-(2-フルオロベンジル)-2-(フラン-2-イルメチル)イミダゾ[1,2-α]ピラジン-3(7H)-オン）が挙げられ、以下の構造を有する：

20

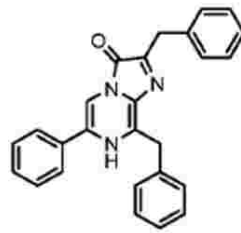
30

40

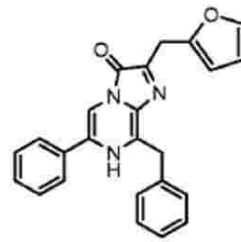
50



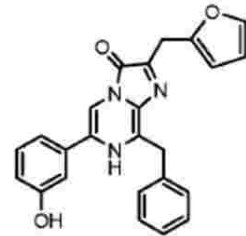
セレンテラジン-h



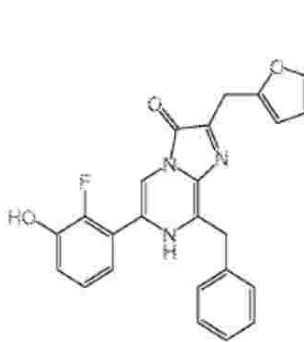
セレンテラジン-hh



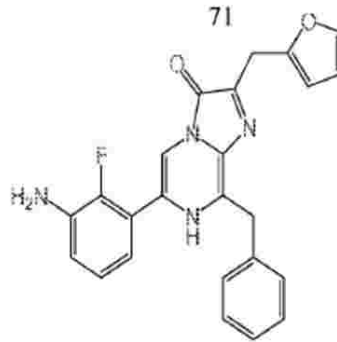
フリマジン



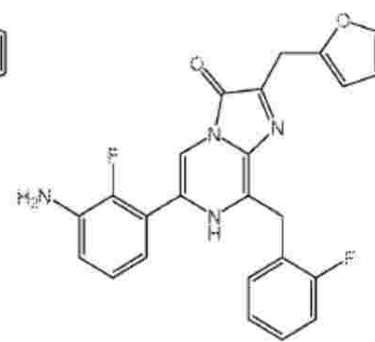
JRW-0238



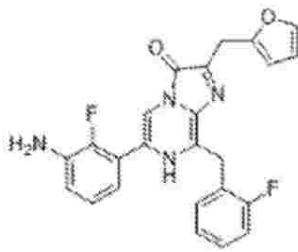
JRW-1404



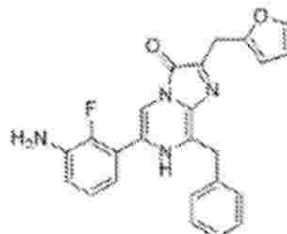
JRW-1482



JRW-1667



JRW-1743



JRW-1744

【0272】

追加の例示的なセレンテラジン類似体としては、セレンテラジン-n、セレンテラジン-f、セレンテラジン-hcp、セレンテラジン-cp、セレンテラジン-c、セレンテラジン-e、セレンテラジン-fcp、セレンテラジン-i、セレンテラジン-icp、セレンテラジン-v、2-メチルセレンテラジンなどが挙げられる。いくつかの実施形態において、化合物は、WO2003/040100；米国特許公開第2008/0248511号（例えば、段落[0086]）；米国特許第8,669,103号；WO2012/061529；米国特許公開第2017/0233789号；米国特許第9,924,073号；米国特許公開第2018/0030059号；米国特許第10,000,500号；米国特許公開第2018/0155350号；米国特許出願第16/399,410号（PCT/US2019/029975）；米国特許出願第16/548,214号（PCT/US2019/047688）；米国特許公開第2014/0227759号；米国特許第9,840,730号；米国特許第7,268,229号；米国特許第7,537,912号；米国特許第8,809,529号；米国特許第9,139,836号；米国特許第10,077,244号；米国特許第9,487,520号；米国特許第9,924,073号；米国特許第9,938,564号；米国特許第9,951,373号；米国特許第10,280,447号；米国特許第10,308,975号；米国特許第10,428,075号に記載されているセレンテラジン類似体であり得、これらの開示は、その全体が参照により本明細書に援用される。いくつかの実施形態において、セレンテラジン類似体は、米国特許公開第2008/0248511号；米国特許公開第2012/0707849号；米国特許公開第2014/0099654号；米国特許第9

， 4 8 7 ， 5 2 0 号；米国特許第 9 ， 9 2 7 ， 4 3 0 号；米国特許第 1 0 ， 3 1 6 ， 0 7 0 号に記載のものなどの前駆体基質を含み、その全体が参照により本明細書に援用される。いくつかの実施形態において、化合物は、フリマジンである。いくつかの実施形態において、化合物は、J R W-0 2 3 8 である。いくつかの実施形態において、化合物は、J R W-1 7 4 3 である。いくつかの実施形態において、化合物は、J R W-1 7 4 4 である。

【 0 2 7 3 】

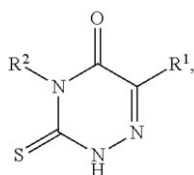
本明細書で提供されるのは、生物発光標的分析物検出プラットフォームを製造するための、セレンテラジンまたはその類似体もしくは誘導体などの発光基質と、高分子または紙／繊維基材と、を含む、組成物である。セレンテラジンまたはその類似体もしくは誘導体などの発光基質の再構成効率を安定化及び／または向上させる組成物は、米国特許出願第 1 6 / 5 9 2 ， 3 1 0 号（P C T / U S 2 0 1 9 / 0 5 4 5 0 1）に記載されており、その全体が参照により本明細書に援用される。いくつかの実施形態において、組成物は、分解に対して化合物を安定させる。いくつかの実施形態において、組成物は、高分子または紙／繊維基材を含有しない組成物と比較して、分解に対して化合物を安定させる。いくつかの実施形態において、高分子または紙／繊維基材は、化合物からの 1 つ以上の分解生成物の形成を低減または抑制する。いくつかの実施形態において、組成物は、基質の再構成効率または再構成速度を向上させる。

【 0 2 7 4 】

更に、本開示の実施形態は、本明細書に更に記載される組成物を安定化する（例えば、保管安定性を高める）ための手段を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される組成物の保管安定性を高めることは、発光基質を安定化させる方法及び組成物を含む。発光基質は、セレンテラジン、セレンテラジン-*h*、セレンテラジン-*h-h*、フリマジン、その誘導体、その類似体、またはこれらの任意の組み合わせであり得るが、これらに限定されない。組成物は、発光基質、チオヌクレオシド、及び有機溶媒を含み得る。組成物は、発光酵素を含まなくても、含有しなくてもよい。参照により本明細書に援用される米国特許第 9 ， 6 7 6 ， 9 9 7 号に提供されるように、チオヌクレオシドは、式（I）の化合物またはその互変異性体であり得、

【 0 2 7 5 】

(I)



【 0 2 7 6 】

式中、

【 0 2 7 7 】

R¹は、水素、アルキル、置換アルキル、アルキル-アリール、アルキル-ヘテロアリール、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、カルボン酸、エステル、N R^a R^b、イミン、ヒドロキシル、またはオキソであり、

【 0 2 7 8 】

R²は、水素、N R^a R^b、イミン、アルキル、またはアリールであり、

【 0 2 7 9 】

R^a及びR^bは、それぞれ独立して、水素、アルキル、またはアリールである。

【 0 2 8 0 】

いくつかの実施形態において、式（I）の化合物は、A T T（6-メチル-3-チオキソ-3，4-ジヒドロ-1，2，4-トリアジン-5（2H）-オン）；3-（4-アミノ-5-オキソ-3-チオキソ-2，3，4，5-テトラヒドロ-1，2，4-トリアジン-6-イル）プロパン酸；テトラヒドロ-2-メチル-3-チオキソ-1，2，4-ト

リアジン-5, 6-ジオン; 4-((2-フリルメチレン)アミノ)-3-メルカプト-6-メチル-1, 2, 4-トリアジン-5(4H)-オン; 6-ベンジル-3-スルファニル-1, 2, 4-トリアジン-5-オール; 4-アミノ-3-メルカプト-6-メチル-1, 2, 4-トリアジン-5(4H)-オン; 3-(5-オキソ-3-チオキソ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロ-1, 2, 4-トリアジン-6-イル)プロパン酸; (E)-6-メチル-4-((チオフェン-2-イルメチレン)アミノ)-3-チオキソ-3, 4-ジヒドロ-1, 2, 4-トリアジン-5(2H)-オン; (E)-6-メチル-4-((3-ニトロベンジリデン)アミノ)-3-チオキソ-3, 4-ジヒドロ-1, 2, 4-トリアジン-5(2H)-オン; (E)-4-((4-(ジエチルアミノ)ベンジリデン)アミノ)-6-メチル-3-チオキソ-3, 4-ジヒドロ-1, 2, 4-トリアジン-5(2H)-オン; ATCAエチルエステル; 米国特許第9, 676, 997号(参照により本明細書に援用される)に記載されるTAK-0021、TAK-0020、TAK-0018、TAK-0009、TAK-0014、TAK-0007、TAK-0008、TAK-0003、及びTAK-0004; 3-チオキソ-6-(トリフルオロメチル)-3, 4-ジヒドロ-1, 2, 4-トリアジン-5(2H)-オン; 6-シクロプロピル-3-チオキソ-3, 4-ジヒドロ-1, 2, 4-トリアジン-5(2H)-オン; 6-(ヒドロキシメチル)-3-チオキソ-3, 4-ジヒドロ-1, 2, 4-トリアジン-5(2H)-オン; または任意のこれらの組み合わせであり得る。

【0281】

いくつかの実施形態において、チオヌクレオシドは、時間の経過、光の存在下、光の不在下、及び/または異なる温度における分解に対して、発光基質を安定化させ得る。チオヌクレオシドは、時間の経過、光の存在下、光の不在下、及び/または異なる温度における1つ以上の分解生成物への分解に対して、発光基質を安定化させ得る。したがって、本明細書に更に記載される組成物にチオヌクレオシドを含めることにより、チオヌクレオシドを含まない組成物と比較して、1つ以上の分解生成物の形成を抑制または低減することによって、分解に対して、発光基質が安定化し得る。これにより、発光基質をアッセイに使用する前に発光基質が著しく分解することなく、特定の温度、光の存在下及び/または光の不在下で、一定期間、発光基質を保管またはインキュベートすることが可能となる。これらの実施形態によれば、本明細書に記載される組成物にチオヌクレオシドを含めることにより、組成物の保管安定性を高めることができる。これらの実施形態はまた、発光基質を安定化させるための方法に関する。そのような方法は、分解に対して発光基質を安定化させ、及び/または1つ以上の分解生成物の形成を抑制もしくは低減し得る。方法は、有機溶媒の存在下で、発光基質を有効量のチオヌクレオシド(例えば、225mM)と接触させることを含み得る。この接触させるステップは、上に記載される組成物を形成することを含み得る。

【0282】

いくつかの実施形態において、上に記載される生物発光複合体を形成する非発光(NL)ペプチド/ポリペプチド構成成分のうちの1つ以上は、発光基質の有無にかかわらず、凍結乾燥粉末などの組成物の一部として含まれ得る。これらの組成物は、他の構成成分とともに、またはなしで、検出プラットフォームの一部に直接アプライすることができ、あるいは、検出プラットフォームにアプライされる別個の溶液の一部として再構成することができる。

【0283】

セレンテラジンならびにその類似体及びその誘導体は、本明細書に記載される生物発光法などの多くのアッセイに使用される緩衝液系への再構成に関連した課題に悩まされることがある。例えば、セレンテラジン、またはその類似体もしくは誘導体、例えば、フリマジンは、緩衝液中にゆっくり及び/または不均一に溶解することがある(例えば、固体材料の不均質な微結晶性に起因する)。緩衝液で希釈する前に有機溶媒で溶解すると、より速くより均一な結果を得られるが、セレンテラジン化合物は、熱不安定性と光不安定性の両方を含む、保管時における有機溶液中での不安定性に悩まされることがある。いくつか

10

20

30

40

50

の実施形態において、組成物は、高分子を更に含む。本明細書に更に記載されるように、高分子の存在により、分解に対して化合物が安定化し得、高分子の存在により、水または水溶液中での化合物の可溶性が改善し得る。

【0284】

高分子は、天然生体高分子または合成高分子であり得る。いくつかの実施形態において、高分子は、天然生体高分子である。好適な天然生体高分子は、二糖（例えば、トレハロース及びマルトース）、及び多糖（例えば、プルラン、デキストラン、及びセルロース）を含む、炭水化物である。天然生体高分子の混合物も使用され得る。いくつかの実施形態において、高分子は、プルランであり、これは、マルトトリオース繰り返し単位を含む多糖である。マルトトリオースは、 $\alpha-1, 4$ グリコシド結合を介して連結された3つのグルコース単位を含む、三糖である。プルラン高分子内のマルトトリオース単位は、 $\alpha-1, 6$ グリコシド結合を介して互いに連結されている。

【0285】

いくつかの実施形態において、高分子は、合成高分子である。合成高分子は、ホモポリマー、コポリマー、またはブロックコポリマー（例えば、ジブロックコポリマー、トリブロックコポリマーなど）であり得る。好適な高分子の非限定的な例としては、ポリアミン、ポリエーテル、ポリアミド、ポリエステル、ポリカルバメート、ポリウレア、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリイミド、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリアセチレン、ポリエチレン、ポリエチレンイミン、ポリイソシアネート、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリロニトリル、及びポリアリレートが挙げられるが、これらに限定されない。特定の高分子の非限定的な例としては、ポリ（カプロラクトン）（PCL）、エチレンビニルアセテートポリマー（EVA）、ポリ（乳酸）（PLA）、ポリ（L-乳酸）（PLLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA）、ポリ（乳酸-co-グリコール酸）（PLGA）、ポリ（L-乳酸-co-グリコール酸）（PLPGA）、ポリ（D, L-ラクチド）（PDLA）、ポリ（L-ラクチド）（PLLA）、ポリ（D, L-ラクチド-co-カプロラクトン）、ポリ（D, L-ラクチド-co-カプロラクトン-co-グリコリド）、ポリ（D, L-ラクチド-co-PEO-co-D, L-ラクチド）、ポリ（D, L-ラクチド-co-PPO-co-D, L-ラクチド）、ポリアルキルシアノアクリレート、ポリウレタン、ポリ-L-リシン（PLL）、ヒドロキシプロピルメタクリレート（HPMA）、ポリ（エチレングリコール）、ポリ-L-グルタミン酸、ポリ（ヒドロキシ酸）、ポリ酸無水物、ポリオルトエステル、ポリ（エステルアミド）、ポリアミド、ポリ（エステルエーテル）、ポリカーボネート、ポリアルキレン（例えば、ポリエチレン及びポリプロピレン）、ポリアルキレングリコール（例えば、ポリ（エチレングリコール）（PEG））、ポリアルキレンテレフタレート（例えば、ポリ（エチレンテレフタレート）など）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル（例えば、ポリ（ビニルアセテート）など）、ポリビニルハライド（例えば、ポリ（塩化ビニル）（PVC）など）、ポリビニルピロリドン、ポリシロキサン、ポリスチレン（PS）、ポリウレタン、誘導体化セルロース（例えば、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースなど）、アクリル酸のポリマー（「ポリアクリル酸」）（例えば、ポリ（メチル（メタ）アクリレート）（PMMA）、ポリ（エチル（メタ）アクリレート）、ポリ（ブチル（メタ）アクリレート）、ポリ（イソブチル（メタ）アクリレート）、ポリ（ヘキシル（メタ）アクリレート）、ポリ（イソデシル（メタ）アクリレート）、ポリ（ラウリル（メタ）アクリレート）、ポリ（フェニル（メタ）アクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、ポリ（オクタデシルアクリレート）、ポリジオキサノン及びそのコポリマー（例えば、ポリヒドロキシアルカノエート、ポリプロピレンフマレート）、ポリオキシメチレン、ポロキサマー、ポリ（オルト）エステル、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、ポリ（ラクチド-co-カプロラクトン）、トリメチレンカーボネート、ならびにこれらの混合物及びコポリマーが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0286】

いくつかの実施形態において、組成物は、紙基材を更に含む。本明細書に更に記載されるように、紙基材の存在により、分解に対して化合物が安定化し得、紙基材の存在により、水溶液中での化合物の可溶性が改善し得る。例示的な紙基材としては、Whatmanブランドペーパー（例えば、W-903ペーパー、FTAペーパー、FTA Eluteペーパー、FTA DMPKペーパーなど）、Ahlsstromペーパー（例えば、A-226ペーパーなど）、M-TFNペーパー、FTAペーパー、FP705ペーパー、Bode DNA収集紙、ニトロセルロースペーパー、ナイロンペーパー、セルロースペーパー、Dacronペーパー、コットンペーパー、及びポリエステルペーパー、ならびにこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0287】

化合物ならびに高分子及び／または紙基材に加えて、組成物は、緩衝液、界面活性剤、塩、タンパク質、またはこれらの任意の組み合わせなどの追加の構成成分を含み得る。例えば、組成物は、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酢酸緩衝液、もしくはクエン酸緩衝液などの緩衝液、またはピシン、トリシン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（トリス）、N-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕-3-アミノプロパンスルホン酸（TAPS）、3-〔N-トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ〕-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（TAPSO）、2-〔4-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジーン-1-イル〕エタンスルホン酸（HEPES）、N-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕-2-アミノエタンスルホン酸（TES）、ピペラジーン-N,N'-ビス（2-エタンスルホン酸）（PIPES）、2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）などの他の一般的な緩衝液を挙げることができる。

20

【0288】

いくつかの実施形態において、組成物は、界面活性剤を含み得る。例示的な界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、及び双極性界面活性剤が挙げられる。例えば、界面活性剤は、ソルビタン20などの非イオン性界面活性剤であり得る。

【0289】

いくつかの実施形態において、組成物は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウムなどの塩を含み得る。

30

【0290】

いくつかの実施形態において、組成物は、タンパク質を含み得る。例えば、組成物は、下流アッセイで添加され得る発光酵素の表面吸着を防ぐために、キャリアタンパク質を含み得る。いくつかの実施形態において、タンパク質は、ウシ血清アルブミン（BSA）であり得る。

【0291】

いくつかの実施形態において、組成物は、自己発光を低減する物質を含み得る。いくつかの実施形態において、物質は、ATT（6-アザ-2-チオチミン）、ATTの誘導体または類似体、チオヌクレオシド、チオウレアなどである。いくつかの実施形態において、物質は、米国特許第9,676,997号に開示されているチオヌクレオシドであり、当該特許は、参照により本明細書に援用される。いくつかの実施形態において、物質は、チオウレアであり、自己発光を低減するための使用は、米国特許第7,118,878号、同第7,078,181号、及び同第7,108,996号に開示されており、当該特許は、参照により本明細書に援用される。

40

【0292】

組成物は、凍結乾燥粉末の形態であり得る。そのような組成物は、組成物の構成成分の混合物を乾燥させることによって調製することができる。例えば、組成物は、化合物を溶媒（例えば、有機溶媒）中に溶解して第1の溶液を形成し、第1の溶液に高分子を添加して第2の溶液を形成し、次いで、第2の溶液を乾燥させて組成物を得ることによって、調製することができる。いくつかの実施形態において、乾燥させるステップは、凍結乾燥を

50

含み得る。これにより、組成物を粉末の形態で得ることができる。いくつかの実施形態において、乾燥させるステップは、風乾を含み得る。これにより、組成物を展性ディスクの形態で得ることができる。

【0293】

いくつかの実施形態（例えば、組成物が紙基材だけでなく高分子を含むもの）において、組成物は、溶液の形態である。組成物が溶液である場合、組成物は、約5.5～約8.0、例えば、約6.5～約7.5のpHを有し得る。いくつかの実施形態において、組成物は、約5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、または8.0のpHを有する。

10

【0294】

b. ラテラルフローコンポーネント

いくつかの実施形態において、本開示は、コンジュゲートパッド、分析メンブレン、サンプルパッド、及びメンブレンを横切る横方向の流れを促進するのに必要な他の構成成分（例えば、吸収パッド）を含む、ラテラルフローアッセイプラットフォームを製造する方法を提供する。例えば、コンジュゲートパッドは、コンジュゲートパッドに可逆的にコンジュゲートされた少なくとも1つの標的分析物結合剤を含み得、それにより、横方向の流れが適用された場合、標的分析物結合剤は、コンジュゲートパッドから分析メンブレンに移動することができ、その結果、標的分析物結合剤が標的分析物に結合し、生物発光複合体を形成することができる。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、標的分析物への結合を促進する標的分析物結合要素、及び生物発光ポリペプチドまたは生物発光複合体の構成成分、例えば、配列番号5の生物発光ポリペプチド（NanoLuc及びそのバリエーション）、配列番号9の非発光（NL）ポリペプチド（LgBit）、配列番号10のNLペプチド（SmBit）、配列番号11のNLペプチド（HiBit）、配列番号12のNLポリペプチド（LgTrip-3546）、配列番号13のNLペプチド（SmTrip）、配列番号14のNLペプチド（ $\beta 9/\beta 10$ ジペプチド）、またはそのバリエーションを含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、エネルギー転移（例えば、生物発光ポリペプチドまたは生物発光複合体の構成成分からのもの）によって活性化可能なフルオロフォアを含む。

20

【0295】

いくつかの実施形態において、コンジュゲートパッドは、第1の標的分析物結合剤を含む。いくつかの実施形態において、第1の標的分析物結合剤は、第1の標的分析物結合要素及び第1の生物発光ポリペプチドまたは生物発光複合体の第1の構成成分（例えば、NLペプチドまたはNLポリペプチド）を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、デバイスを介して横方向に移動するまでコンジュゲートパッドに留まるように、コンジュゲートパッド上またはコンジュゲートパッド内に保存される。

30

【0296】

いくつかの実施形態において、コンジュゲートパッドは、セレンテラジン、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h-h、フリマジン、JRW-0238、JRW-1404、JRW-1482、JRW-1667、JRW-1743、JRW-1744、他のセレンテラジン類似体もしくは誘導体、前駆体基質、及び／または本明細書に記載される他の基質（例えば、セレンテラジン類似体または誘導体）などの発光基質を含む。いくつかの実施形態において、発光基質は、コンジュゲートパッドに可逆的にコンジュゲートされている。いくつかの実施形態において、発光基質は、コンジュゲートパッド上またはコンジュゲートパッド内で乾燥される。いくつかの実施形態において、発光基質は、発光基質と、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、ポリスチレン、ポリ（メタ）アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせ（例えば、上に詳述されているもの及び／または米国仮出願第62/740,622号に記載のもの）から選択される高分子と、を含む、組成物の一部である。いくつかの実施形態において、発光基質は、組成物またはタンパク質緩衝液などの溶液の一部としてアプライされる。いくつかの実施形

40

50

態において、タンパク質緩衝液は、20mM Na_3PO_4 ；5%w/v BSA；0.25%v/v Tween 20；10%w/v スクロースを含む。いくつかの実施形態において、発光基質は、タンパク質緩衝液に添加され、基材またはマトリックス（例えば、濾紙またはメンブレン）上で37℃で1時間乾燥させる。他の実施形態において、発光基質は、アッセイ法またはシステムの一部である別個の試薬としてアプライされる。

【0297】

いくつかの実施形態において、アッセイプラットフォームは、標的分析物の検出を示す生物発光複合体の検出を容易にするための検出領域及びコントロール領域を含む、分析メンブレンを含む。検出領域は、メンブレンを通過する横方向の流れの適用によって位置がずれないように検出領域に固定化された少なくとも1つの標的分析物結合剤を含み得る。いくつかの実施形態において、分析メンブレンは、少なくとも1つの標的分析物結合剤を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素及び生物発光ポリペプチドまたは生物発光複合体の第1の構成成分（例えば、NLペプチドまたはNLポリペプチド）を含む。

【0298】

いくつかの実施形態において、分析メンブレンは、複数の検出領域を含み、各検出領域は、異なる標的分析物結合要素を含む、異なる標的分析物結合剤を含む（例えば、マルチプレックス性能）。

【0299】

いくつかの実施形態において、分析メンブレンは、セレンテラジン、セレンテラジン- h 、セレンテラジン- $h-h$ 、フリマジン、JRW-0238、JRW-1404、JRW-1482、JRW-1667、JRW-1743、JRW-1744、セレンテラジン類似体もしくは誘導体、前駆体基質、または本明細書に記載される他の基質（例えば、セレンテラジン類似体または誘導体）などの発光基質を含む。いくつかの実施形態において、発光基質は、例えば、発光基質と、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、ポリスチレン、ポリ（メタ）アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される高分子と、を含む、組成物の一部として、分析メンブレンに可逆的にコンジュゲートされ、及び／または分析メンブレン上／または分析メンブレン内に含有される。いくつかの実施形態において、発光基質は、組成物またはタンパク質緩衝液などの溶液の一部としてアプライされる。いくつかの実施形態において、タンパク質緩衝液は、20mM Na_3PO_4 ；5%w/v BSA；0.25%v/v Tween 20；10%w/v スクロースを含む。いくつかの実施形態において、タンパク質緩衝液は、20mM Na_3PO_4 ；5%w/v BSA；0.25%v/v Tween 20；5%w/v プルランを含む。いくつかの実施形態において、タンパク質緩衝液は、20mM Na_3PO_4 ；1~5%w/v BSA；0.25%v/v Tween 20を含む。いくつかの実施形態において、タンパク質緩衝液は、20mM Na_3PO_4 ；1~5%w/v P r i o n e x；0.25%v/v Tween 20を含む。いくつかの実施形態において、タンパク質緩衝液は、20mM Na_3PO_4 ；1~5%w/v BSA、5mM A T Tを含む。いくつかの実施形態において、タンパク質緩衝液は、20mM Na_3PO_4 ；1~5%v/v P r i o n e x、5mM A T Tを含む。いくつかの実施形態において、タンパク質緩衝液は、20mM Na_3PO_4 ；1~5%w/v BSA、5mM A T T、5mM アスコルビン酸を含む。いくつかの実施形態において、タンパク質緩衝液は、20mM Na_3PO_4 ；1~5%w/v P r i o n e x、5mM A T T、5mM アスコルビン酸を含む。いくつかの実施形態において、タンパク質緩衝液は、20mM Na_3PO_4 ；1~5%w/v BSA、5mM A T T、5mM アスコルビン酸を含む。いくつかの実施形態において、タンパク質緩衝液は、1~5%w/v BSA、5mM A T T、5mM アスコルビン酸を含む。いくつかの実施形態において、発光基質は、タンパク質緩衝液に添加され、基材またはマトリックス（例えば、濾紙またはメンブレン）上で37℃で1時間乾燥させる。他の実施形態において、発光基質は、アッセイ法またはシステムの一部である別個の試薬としてアプライされる。

10

20

30

40

50

【0300】

c. 固相コンポーネント

いくつかの実施形態において、本開示は、検出領域及びコントロール領域を含む固相検出プラットフォーム（例えば、ディップスティックアッセイまたはスポットテスト）を製造する方法を提供する。いくつかの実施形態において、検出領域は、検出領域にコンジュゲートされた少なくとも1つの標的分析物結合剤を含む。いくつかの実施形態において、検出領域は、検出領域にコンジュゲートされていない少なくとも1つの標的分析物結合剤を含む。そのようなコンジュゲートされていない結合剤は、検出領域に添加されてもよいし（例えば、サンプルと一緒に、または検出試薬の一部として）、検出領域上または検出領域内にコンジュゲートなしで存在してもよい。いくつかの実施形態において、コンジュゲートされていない結合剤は、標的分析物結合要素と、生物発光ポリペプチドまたは生物発光複合体の構成成分、例えば、配列番号5の生物発光ポリペプチド（NanoLuc及びそのバリエーション）、配列番号9の非発光（NL）ポリペプチド（LgBit）、配列番号10のNLペプチド（SmBit）、配列番号11のNLペプチド（HiBit）、配列番号12のNLポリペプチド（LgTrip-3546）、配列番号13のNLペプチド（SmTrip）、配列番号14のNLペプチド（β9/β10ジペプチド）、またはそのバリエーションと、を含む。

10

【0301】

いくつかの実施形態において、固相検出プラットフォームは、複数の検出領域を含み、各検出領域は、異なる標的分析物結合要素を含む、異なる標的分析物結合剤を含む（例えば、マルチプレックス性能）。いくつかの実施形態において、1つ以上の異なる標的分析物結合剤は、特定のアッセイを実施するのに必要とされる他の検出試薬（例えば、第2の標的分析物結合剤、発光基質、アッセイ緩衝液など）のうちの1つ以上とともに、マイクロタイタープレートのウェルにコンジュゲート（例えば、コーティング）することができる。他の実施形態において、検出試薬は、アッセイ法またはシステムの一部である別個の試薬としてアプライすることができる（例えば、ライオケーキまたはタブレットの一部として、またアッセイの一部として再構成される）。

20

【0302】

検出プラットフォームはまた、セレンテラジン、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h-h、フリマジン、JRW-0238、JRW-1404、JRW-1482、JRW-1667、JRW-1743、JRW-1744、他のセレンテラジン類似体もしくは誘導体、前駆体基質、または本明細書に記載される他の基質（例えば、セレンテラジン類似体または誘導体）などの発光基質を含み得る。いくつかの実施形態において、発光基質は、検出領域に可逆的にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、発光基質は、検出領域上または検出領域内で安定的に保存される。いくつかの実施形態において、発光基質は、発光基質と、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、ポリスチレン、ポリ（メタ）アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される高分子と、を含む、組成物の一部である。いくつかの実施形態において、発光基質は、組成物またはタンパク質緩衝液などの溶液、検出試薬の一部として、またはサンプルとともにアプライされる。いくつかの実施形態において、タンパク質緩衝液は、20 mM Na_3PO_4 ; 5% w/v BSA; 0.25% v/v Tween 20; 10% w/v スクロースを含む。いくつかの実施形態において、発光基質は、タンパク質緩衝液に添加され、基材またはマトリックス（例えば、濾紙、メンブレン、マイクロタイタープレートの個々のウェル）上で37℃で1時間乾燥させる。他の実施形態において、発光基質は、アッセイ法またはシステムの一部である別個の試薬としてアプライされる（例えば、ライオケーキまたはタブレットの一部として、またアッセイの一部として再構成される）。

30

40

【0303】

本開示の実施形態はまた、生物発光アッセイに使用するための基材またはマトリックスを作製する方法を含む。これらの実施形態によれば、方法は、標的分析物結合要素と、生

50

物発光複合体のポリペプチド構成成分または生物発光複合体のペプチド構成成分のうちの1つと、を含む、少なくとも1つの標的分析物結合剤を含有する溶液または液体配合物を生成することを含む。いくつかの実施形態において、溶液は、タンパク質緩衝液と、限定するものではないが、界面活性剤、還元剤、塩、ラジカル捕捉剤、キレート化剤、タンパク質、またはこれらの任意の組み合わせを含む少なくとも1つの賦形剤と、を含む。いくつかの実施形態において、溶液は、生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分を含み、それにより、標的分析物結合剤及び生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する。いくつかの実施形態において、溶液は、発光基質を含む。

【0304】

方法は、溶液または液体配合物を生成した後に、溶液を基材またはマトリックスの表面に塗布することを含む。いくつかの実施形態において、基材またはマトリックスは、W-903ペーパー、FTAペーパー、FTA Eluteペーパー、FTA DMPKペーパー、Ahlsstrom A-226ペーパー、MTFNペーパー、FTAペーパー、FP705ペーパー、Bode DNA収集紙、ニトロセルロースペーパー、ナイロンペーパー、セルロースペーパー、Dacronペーパー、コットンペーパー、及びポリエステルペーパー、またはこれらの組み合わせである。他の実施形態において、基材またはマトリックスは、プラスチック、ナイロン、金属、またはこれらの組み合わせを含むメッシュである。

【0305】

方法の実施形態はまた、溶液を基材またはマトリックスに塗布した後、基材またはマトリックスを乾燥させることを含む。いくつかの実施形態において、溶液を含有する基材またはマトリックスを乾燥させることは、基材またはマトリックスを約30℃～65℃、約30℃～60℃、約30℃～55℃、約30℃～50℃、約30℃～45℃、または約30℃～40℃の温度で乾燥させることを含む。いくつかの実施形態において、マトリックスまたは基材は、約15分～8時間、約30分～7時間、約45分～6時間、約1時間～5時間、約2時間～4時間、約30分～2時間、または約30分～1時間乾燥させる。いくつかの実施形態において、溶液を含有する基材を乾燥させることは、基材を凍結乾燥及び／または凍結させることを含む。

【0306】

いくつかの実施形態において、方法は、第1の基材上の少なくとも1つの標的分析物結合剤及び／または生物発光複合体の相補性ペプチドもしくはポリペプチド構成成分を乾燥させることと、第2の基材上の発光基質を乾燥させることと、を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的分析物結合剤及び／または生物発光複合体の相補性ペプチドもしくはポリペプチド構成成分は、紙ベースの基材上で乾燥され、発光基質は、メッシュ上で乾燥される（例えば、図42A～42E参照）。

【0307】

これらの実施形態によれば、基材またはマトリックスは、標的分析物を検出するために生物発光アッセイで使用することができる。例えば、生物発光シグナルは、溶液を含有する基材またはマトリックスが標的分析物に曝露されると、生成され得る。いくつかの実施形態において、生物発光シグナルは、標的分析物の濃度に比例する。いくつかの実施形態において、本明細書に更に記載されるように、少なくとも1つの標的分析物結合剤及び／または生物発光複合体の相補性ペプチドもしくはポリペプチド構成成分は、基材上で乾燥させた場合、向上した安定性を示す。

【0308】

d. 液相コンポーネント

いくつかの実施形態において、本開示は、1つ以上の検出領域及びコントロール領域（例えば、96ウェルマイクロタイタープレートのウェル）を含む液相検出プラットフォーム（本明細書に記載されるもの）を製造する方法を提供する。例えば、図33に示されるように、本開示の液相プラットフォームの実施形態は、分析物の検出を促進するための溶

10

20

30

40

50

液（例えば、緩衝液）中で再構成することができるタブレットまたは凍結乾燥ケーキ中に、本明細書に記載される生物発光複合体の1つ以上の構成成分を含むことができる。いくつかの実施形態において、タブレットまたはライオケーキは、分析物を検出するための反応を実施するのに必要な全ての試薬を含み得、液相検出プラットフォームの一部として含まれる（例えば、96ウェルマイクロタイタープレートの1つ以上のウェルに存在する）。そのようなライオケーキまたは錠剤は、多くの異なるアッセイフォーマット、例えば、限定するものではないが、キュベット、マイクロタイタープレート（例えば、96ウェルマイクロタイタープレート）のウェル、試験管、大容量ボトル、SNAPアッセイなどと適合する。

【0309】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される生物発光複合体の1つ以上の構成成分は、検出領域に添加することができ、及び／またはサンプルの存在下または不在下で検出領域内に予め存在し得る。次いで、検出試薬は、サンプル中の分析物の検出を実行する一部として、再構成（例えば、再水和）することができる。いくつかの実施形態において、検出試薬は、標的分析物結合要素と、生物発光ポリペプチドまたは生物発光複合体の構成成分、例えば、配列番号5の生物発光ポリペプチド（NanoLuc及びそのバリエーション）、配列番号9の非発光（NL）ポリペプチド（LgBit）、配列番号10のNLペプチド（SmBit）、配列番号11のNLペプチド（HiBit）、配列番号12のNLポリペプチド（LgTrip-3546）、配列番号13のNLペプチド（SmTrip）、配列番号14のNLペプチド（β9／β10ジペプチド）、またはそのバリエーションと、を含む。

【0310】

液相検出プラットフォームはまた、セレンテラジン、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h-h、フリマジン、JRW-0238、JRW-1404、JRW-1482、JRW-1667、JRW-1743、JRW-1744、他のセレンテラジン類似体もしくは誘導体、前駆体基質、または本明細書に記載される他の基質（例えば、セレンテラジン類似体または誘導体）などの発光基質を含み得る。いくつかの実施形態において、発光基質は、発光基質と、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、ポリスチレン、ポリ（メタ）アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される高分子と、を含む、組成物の一部である。いくつかの実施形態において、発光基質は、組成物またはタンパク質緩衝液などの溶液、検出試薬の一部として、またはサンプルとともにアプライされる。いくつかの実施形態において、発光基質は、アッセイ法またはシステムの一部である別個の試薬としてアプライされ、他の実施形態において、1つ以上の検出試薬を含むライオケーキまたはタブレットの一部である。

【0311】

6. 標的分析物

本開示の実施形態は、標的分析物の検出／定量での使用が見出され、標的分析物結合要素を介して標的分析物に結合または相互作用することが可能な標的分析物結合剤を含む。いくつかの実施形態において、標的分析物結合剤は、分析物のグループまたはクラスに結合することが可能な標的分析物結合要素（例えば、一般的に抗体に結合するプロテインL）を含み、そのような結合要素は、本明細書において「非特異的」などと称され得る。他の実施形態において、標的分析物結合剤は、特定の分析物に結合することが可能な標的分析物結合要素（例えば、モノクローナル抗体に結合する抗原）を含み、そのような結合要素は、本明細書において「標的特異的」などと称され得る。

【0312】

いくつかの実施形態において、病状または環境条件に関連する1つ以上の分析物を検出するために、標的分析物結合剤及び対応する標的分析物結合要素が生成される。標的分析物結合要素は、抗体（例えば、ポリクローナル、モノクローナル、及び／または組み換え）、抗体断片（例えば、Fab、Fab'、Fab'2、Fv、scFv、Fd、可変軽鎖、可変重鎖、ダイアボディ、scFvなど）、プロテインA、プロテインAのIg結合

10

20

30

40

50

ドメイン、プロテインG、プロテインGのIg結合ドメイン、プロテインA/G、プロテインA/GのIg結合ドメイン、プロテインL、プロテインLのIg結合ドメイン、プロテインM、プロテインMのIg結合ドメイン、オリゴヌクレオチドプローブ、ペプチド核酸、DARPin、アプタマー、アフィマー、精製タンパク質（例えば、分析物自体または分析物に結合するタンパク質のいずれか）、及びタンパク質の分析物結合ドメイン（複数可）からなる群から独立して選択することができる。

【0313】

いくつかの実施形態において、標的分析物結合要素は、抗体（標的分析物）によって認識される抗原またはエピトープを含み、例えば、抗体は、病原体に対する免疫原性応答に応じて対象によって産生されるものであり、対象がその病原体に感染していることを示し得る。いくつかの実施形態において、標的分析物は、ジカウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、及び／またはチクングニアウイルスに対する抗体であり、標的分析物結合要素は、抗体によって特異的に認識される免疫原性エピトープである。いくつかの実施形態において、標的分析物は、A型、B型、C型、D型またはE型肝炎に対する抗体である。いくつかの実施形態において、標的分析物は、ムンプス、麻疹、風疹、RSV、EBV、ヘルペス、インフルエンザ、水痘帯状疱疹、出生前ジカ、またはパラインフルエンザ1型、2型、もしくは3型に対する抗体である。いくつかの実施形態において、標的分析物は、アルボウイルス、HIV、出生前肝炎、CMV、ハンタウイルス、ポリオウイルス、パルボウイルスに対する抗体である。いくつかの実施形態において、標的分析物は、ダニ媒介疾患（例えば、ライム病）に対する抗体である。いくつかの実施形態において、標的分析物は、*Bordetella pertussis*、肺炎球菌、クラミジア菌、連鎖球菌、*M. pneumoniae*、*S. pneumoniae*、赤痢菌産生細菌、*E. coli*、エンテロバクター、梅毒、淋疾に対する抗体である。いくつかの実施形態において、標的分析物は、ANA、カルジオリピン、セリアック病、インスリン、GAD65、IA-2、レチクリン、サイログロブリン、RNP、好中球細胞質、チロトロピン受容体、甲状腺ペルオキシダーゼ、血小板抗体、PLA2、心筋、GBM、組織トランスグルタミナーゼ、または甲状腺刺激に対する自己抗体である。いくつかの実施形態において、標的分析物は、毒素または毒素（例えば、ジフテリア、破傷風）に対する抗体である。いくつかの実施形態において、標的分析物は、寄生生物に由来するもの、または寄生生物（例えば、旋毛虫、旋毛虫症、クルーズトリパノソーマ、*Toxoplasma gondii*）に対する抗体である。いくつかの実施形態において、標的分析物は、治療用生物学的製剤または治療用生物学的製剤（ベドリズマブ、アダリムマブ、インフリキシマブ、セルトリズマブ、エンタネルセプト、オブジーボ、キイトルーダ、イピリムマブ、ウステキヌマブ、セクキヌマブ、グセルクマブ、トシリズマブ、リツキシマブ、パニツムマブ、トラスツズマブ、セツキシマブ、オフアツムマブ、エプトラツズマブ、アバタセプト、トファシチニブ）に対する抗体である。

【0314】

他の標的分析物は、ウイルス、細菌、原生動物、プリオン、真菌、寄生性線虫、または他の微生物などの病原性生物に関連する既知のバイオマーカーを含む。疾患バイオマーカーは、病原性生物自体のマーカー及び／または病原性生物による感染に対する対象の反応のマーカーを含み得る。本開示のアッセイ及び方法を使用して検出することができる疾患には、次のいずれかが含まれる：アシネトバクター感染症（*Acinetobacter baumannii*）、放線菌症（*Actinomyces israelii*、*Actinomyces gerencseriae*及び*Propionibacterium propionicus*）、アフリカ睡眠病またはアフリカトリパノソーマ症（*Trypanosoma brucei*）、AIDS（HIV）、アメーバ症（*Entamoeba histolytica*）、アナプラズマ症（*Anaplasma*種）、広東住血線虫症（*Angiostrongylus*）、アニサキス症（*Anisakis*）、炭疽（*Bacillus anthracis*）、*Arcanobacterium haemolyticum*感染症（*Arcanobacterium haemolyticum*）、ア

10

20

30

40

50

ルゼンチンティーガン熱 (Juninウイルス)、回虫症 (Ascaris lumbricooides)、アスペルギルス症 (Aspergillus種)、アストロウイルス感染症 (Astroviridae科)、バベシア症 (Babesia種)、セレウス菌感染症 (Bacillus cereus)、細菌性肺炎 (複数の細菌)、バクテロイデス感染症 (Bacteroides種)、バランチジウム症 (Balantidium coli)、バルトネラ症 (Bartonella)、ベイリスアスカリス感染症 (Baylisascaris種)、BKウイルス感染症 (BKウイルス)、黒色砂毛 (Piedraia hortae)、ブラストシストーシス (Blastocystis種)、ブラストミセス症 (Blastomyces dermatitidis)、ボリビア出血熱 (Machupoウイルス)、ブラジル出血熱 (Sabiaウイルス)、ブルセラ症 (Brucella種)、腺ペスト (Yersinia Pestis)、バークホルデリア感染症 (通常、Burkholderia cepacia及び他のBurkholderia種)、ブルーリ潰瘍 (Mycobacterium ulcerans)、カリシウイルス感染症 (Caliciviridae科)、カンピロバクター症 (Campylobacter種)、カンジダ症 (通常、Candida albicans及び他のCandida種)、カリオン病 (Bartonella bacilliformis)、ネコひっかき病 (Bartonella henselae)、蜂巣炎 (通常、A群Streptococcus及びStaphylococcus)、シャーガス病 (Trypanosoma cruzi)、軟性下疳 (Haemophilus ducreyi)、水痘 (水痘帯状疱疹ウイルスまたはVZV)、チクングニア熱 (アルファウイルス)、クラミジア症 (Chlamydia trachomatis)、コレラ (Vibrio cholerae)、黒色分芽菌症 (通常、Fonsecaea pedrosoi)、ツボカビ症 (Batrachochytrium dendrobatidis)、肝吸虫症 (Clonorchis sinensis)、クロストリジウムディフィシル腸炎 (Clostridium difficile)、コクシジオイデス症 (Coccidioides immitis及びCoccidioides posadasii)、コロラドダニ熱 (コロラドダニ熱ウイルスまたはCTFV)、感冒 (通常、ライノウイルス及びコロナウイルス)、クロイツフェルト・ヤコブ病 (PRNP)、クリミア・コンゴ出血熱 (クリミア・コンゴ出血熱ウイルス)、クリプトコッカス症 (Cryptococcus neoformans)、クリプトスポリジウム症 (Cryptosporidium種)、皮膚幼虫移行症 (通常、Ancylostoma braziliense; 複数の他の寄生生物)、サイクロスポーラ症 (Cyclospora cayentanensis)、胞虫症 (Taenia solium)、サイトメガロウイルス感染症 (サイトメガロウイルス)、デング熱 (デングウイルス: DEN-1、DEN-2、DEN-3及びDEN-4)、デスマデスマス感染症 (Green algae Desmodermus armatus)、二核アメーバ症 (Dientamoeba fragilis)、ジフテリア (Corynebacterium diphtheriae)、裂頭条虫症 (Diphyllbothrium)、メジナ虫症 (Dracunculus medinensis)、エボラ出血熱 (エボラウイルスまたはEBOV)、エキノコックス症 (Echinococcus種)、エールリヒア症 (Ehrlichia種)、蟯虫症 (Enterobius vermicularis)、腸球菌感染症 (Enterococcus種)、エンテロウイルス感染症 (エンテロウイルス種)、発疹チフス (Rickettsia prowazekii)、伝染性紅斑 (パルボウイルス B19)、突発性発疹 (ヒトヘルペスウイルス6またはHHV-6; ヒトヘルペスウイルス7またはHHV-7)、肝蛭症 (Fasciola hepatica及びFasciola gigantica)、肥大吸虫症 (Fasciolopsis buski)、致死性家族性不眠症 (PRNP)、糸状虫症 (Filarioidea上科)、フソバクテリウム感染症 (Fusobacterium種)、ガス壊疽 (通常、Clostridium perfringens; 他のClostridium種)、ゲオトリクム症 (Geotrichum candidum)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー症候

10

20

30

40

50

群 (PRNP)、ジアルジア症 (*Giardia lamblia*)、鼻疽 (*Burkholderia mallei*)、顎口虫症 (*Gnathostoma spinigerum* 及び *Gnathostoma hispidum*)、淋疾 (*Neisseria gonorrhoeae*)、鼠径肉芽腫 (*Klebsiella granulomatis*)、A群レンサ球菌感染症 (*Streptococcus pyogenes*)、B群レンサ球菌感染症 (*Streptococcus agalactiae*)、インフルエンザ菌感染症 (*Haemophilus influenzae*)、手足口病 (エンテロウイルス、主にコクサッキーAウイルス及びエンテロウイルス71またはEV71)、ハンタウイルス肺症候群 (シンノンブレウイルス)、ハートランドウイルス病 (ハートランドウイルス)、ヘリコバクターピロリ感染症 (*Helicobacter pylori*)、溶血性尿毒症症候群 (*Escherichia coli* O157:H7、O111及びO104:H4)、腎症候性出血熱 (Bunyaviridae科)、A型肝炎 (A型肝炎ウイルス)、B型肝炎 (B型肝炎ウイルス)、C型肝炎 (C型肝炎ウイルス)、D型肝炎 (D型肝炎ウイルス)、E型肝炎 (E型肝炎ウイルス)、単純ヘルペス (単純ヘルペスウイルス1及び2 (HSV-1及びHSV-2))、ヒストプラズマ症 (*Histoplasma capsulatum*)、鉤虫感染症 (*Ancylostoma duodenale* 及び *Necator americanus*)、ヒトボカウイルス感染症 (ヒトボカウイルスまたはHBoV)、ヒトエーリキア症 (*Ehrlichia ewingii*)、ヒト顆粒球性アナプラズマ症 (*Anaplasma phagocytophilum*)、ヒトメタニューモウイルス感染症 (ヒトメタニューモウイルスまたはhMPV)、ヒト単球性エーリキア症 (*Ehrlichia chaffeensis*)、ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染症 (ヒトパピローマウイルスまたはHPV)、ヒトパラインフルエンザウイルス感染症 (ヒトパラインフルエンザウイルスまたはHPIV)、膜様条虫症 (*Hymenolepis nana* 及び *Hymenolepis diminuta*)、エプスタインバーウイルス感染による伝染性単核症 (エプスタインバーウイルスまたはEBV)、インフルエンザ (Orthomyxoviridae科)、イソスポーラ症 (*Isospora belli*)、キングセラ・キングエ感染症 (*Kingella kingae*)、クールー (PRNP)、ラッサ熱 (ラッサウイルス)、レジオネラ症 (*Legionella pneumophila*)、レジオネラ症 (*Legionella pneumophila*)、リーシュマニア症 (*Leishmania* 種)、ハンセン病 (*Mycobacterium leprae* 及び *Mycobacterium lepromatosis*)、レプトスピラ症 (*Leptospira* 種)、リステリア症 (*Listeria monocytogenes*)、ライム病 (*Borrelia burgdorferi*、*Borrelia garinii*、及び *Borrelia afzelii*)、リンパ系フィラリア症 (*Wuchereria bancrofti* 及び *Brugia malayi*)、リンパ球性脈絡髄膜炎 (リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスまたはLCMV)、マラリア (*Plasmodium* 種)、マールブルグ出血熱 (マールブルグウイルス)、麻疹 (麻疹ウイルス)、中東呼吸症候群 (中東呼吸症候群コロナウイルス)、類鼻疽 (*Burkholderia pseudomallei*)、髄膜炎菌病 (*Neisseria meningitidis*)、横川吸虫症 (通常、*Metagonimus yokagawai*)、微孢子虫症 (*Microsporidia* phylum)、伝染性軟属腫 (伝染性軟属腫ウイルスまたはMCV)、サル痘 (サル痘ウイルス)、ムンプス (ムンプスウイルス)、発疹熱 (*Rickettsia typhi*)、マイコプラズマ肺炎 (*Mycoplasma pneumoniae*)、菌腫 (多くの細菌 (*Actinomyces* 種) 及び真菌 (*Eumycetozoa* 種) の種)、ハエウジ症 (寄生する双翅目のハエ幼虫)、新生児結膜炎 (最も一般的には、*Chlamydia trachomatis* 及び *Neisseria gonorrhoeae*)、ノロウイルス (ノロウイルス)、ノカルジア症 (通常、*Nocardia asteroides* 及び他の *Nocardia* 種)、オンコセルカ症 (*Onchocerca volvulus*)、オピストルキス症 (*Opisthorchis viverrini* 及び *Opisthorc*

10

20

30

40

50

his felineus)、パラコクシジオイデス症(Paracoccidioides brasiliensis)、肺吸虫症(通常、Paragonimus westermani及び他のParagonimus種)、パスツレラ症(Pasteurella種)、アタマジラミ症(Pediculus humanus capitis)、コロモジラミ症(Pediculus humanus corporis)、ケジラミ症(Phthirus pubis)、百日咳(Bordetella pertussis)、悪疫(Yersinia pestis)、肺炎球菌感染症(Streptococcus pneumoniae)、ニューモシスチス肺炎(Pneumocystis jirovecii)、肺炎(複数の原因)、灰白髄炎(ポリオウイルス)、プレボテラ感染症(Prevotella種)、原発性アメーバ性髄膜脳炎(通常、Naegleria fowleri)、

進行性多巣性白質脳症(JCウイルス)、オウム病(Chlamydophila psittaci)、Q熱(Coxiella burnetii)、狂犬病(狂犬病ウイルス)、回帰熱(Borrelia hermsii、Borrelia recurrentis、及び他のBorrelia種)、呼吸器合胞体ウイルス感染症(呼吸器合胞体ウイルス(RSV))、ライノスポリジウム症(Rhinosporidium seeberi)、ライノウイルス 感染症(ライノウイルス)、リケッチア 感染症(Rickettsia種)、リケッチア痘(Rickettsia akari)、リフトバレー熱(リフトバレー熱ウイルス)、ロッキーマウンテン紅斑熱(Rickettsia rickettsia)、ロタウイルス感染症(ロタウイルス)、風疹(風疹ウイルス)、サルモネラ症(Salmonella種)、重症急性呼吸器症候群(SARSコロナウイルス)、疥癬(Sarcoptes scabiei)、猩紅熱(A群Streptococcus種)、住血吸虫症(Schistosoma種)、敗血症(複数の原因)、シゲラ症(Shigella種)、帯状疱疹(水痘帯状疱疹ウイルスまたはVZV)、痘瘡(大痘瘡または小痘瘡)、スポロトリックス症(Sporothrix schenckii)、ブドウ球菌性食中毒(Staphylococcus種)、ブドウ球菌感染症(Staphylococcus種)、糞線虫症(Strongyloides stercoralis)、亜急性硬化性全脳炎(麻疹ウイルス)、梅毒(Treponema pallidum)、条虫症(Taenia species)、破傷風(Clostridium tetani)、須毛部白癬(通常、Trichophyton種)、頭部白癬(通常、Trichophyton tonsurans)、体部白癬(通常、Trichophyton種)、股部白癬(通常、Epidermophyton floccosum、Trichophyton rubrum、及びTrichophyton mentagrophytes)、手白癬(Trichophyton rubrum)、黒癬(通常、Hortaea werneckii)、足白癬(通常、Trichophyton種)、爪白癬(通常、Trichophyton種)、癬風(Malassezia種)、トキソカラ症(Toxocara canisまたはToxocara cati)、トキソカラ症(Toxocara canisまたはToxocara cati)、トキソプラズマ症(Toxoplasma gondii)、トラコーマ(Chlamydia trachomatis)、旋毛虫症(Trichinella spiralis)、トリコモナス症(Trichomonas vaginalis)、鞭虫症(Trichuris trichiura)、結核(通常、Mycobacterium tuberculosis)、野兔病(Francisella tularensis)、チフス熱(Salmonella enterica subsp. enterica、serovar typhi)、発疹チフス(Rickettsia)、ウレアプラズマ・ウレアリチカム感染症(Ureaplasma urealyticum)、溪谷熱(Coccidioides immitisまたはCoccidioides posadasii)、ベネズエラウマ脳炎(ベネズエラウマ脳炎ウイルス)、ベネズエラ出血熱(Guanarito ウイルス)、ビブリオ・バルニフィカス感染症(Vibrio vulnificus)、腸炎ビブリオ腸炎(Vibrio parahaemolyticus)、

10

20

30

40

50

ウイルス性肺炎（複数のウイルス）、ウエストナイル熱（ウエストナイルウイルス）、白色砂毛（*Trichosporon beigeli*）、偽結核菌感染症（*Yersinia pseudotuberculosis*）、エルシニア症（*Yersinia enterocolitica*）、黄熱（黄熱ウイルス）、接合菌症（*Mucorales* 目（ムーコル症）及び *Entomophthorales* 目（エントモフトラ症））、ならびにジカ熱（ジカウイルス）。

【0315】

7. 検出、定量、及び診断の方法

本開示の実施形態は、標的分析物を検出するために生物発光ポリペプチドまたは生物発光複合体（及びその構成成分；例えば、非発光ペプチドまたはポリペプチド）を使用する、アッセイプラットフォーム（例えば、固相検出プラットフォームまたはラテラルフローアッセイ）により、サンプル中の標的分析物を検出及び／または定量する方法を含む。実施形態はまた、サンプル中の標的分析物の検出すること及び／または定量することに基づいて、病状を診断するまたは環境条件を評価する方法を含む。

【0316】

いくつかの実施形態において、サンプル中の分析物を検出する方法は、本明細書に記載されるラテラルフローアッセイシステムまたは固相検出プラットフォームを使用することを含む。これらの実施形態によれば、方法は、サンプルをサンプルパッドにアプライすることと、サンプルパッドからコンジュゲートパッドへ、次いで、コンジュゲートパッドから分析メンブレン上の検出領域及びコントロール領域へサンプルの流れを促進することと、を含む。方法は、サンプル中で標的分析物が検出される場合、少なくとも1つの検出領域において分析物検出複合体を形成する、第1の標的分析物結合剤、第2の標的分析物結合剤、及び標的分析物を含み得る。いくつかの実施形態において、方法は、サンプル添加、試薬（例えば、検出試薬）添加、洗浄、待機などのうちの1つ以上のステップを含む。

【0317】

いくつかの実施形態において、サンプルは、血液、血清、血漿、尿、便、脳脊髄液、間質液、及び唾液などの対象からの生体サンプルである。他の実施形態において、サンプルは、水サンプル、土壌サンプル、植物サンプル、食物サンプル、飲料サンプル、油、及び産業流体サンプルなどの天然または産業環境からのサンプルである。方法は、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを検出することによって、サンプル中の標的分析物を検出することを含む。いくつかの実施形態において、サンプル中の標的分析物は、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルに基づいて定量される。いくつかの実施形態において、方法は、サンプルが取得された対象を、分析物の検出に基づいて、疾患に罹っているかいないかを診断することを含む。

【0318】

8. 競合

本明細書のいくつかの実施形態は、サンプル中における標識された分析物と標的分析物との間の競合を利用して、サンプル中の標的分析物を検出／定量する。例示的な実施形態は、（i）本明細書に記載される検出可能な要素（例えば、NanoLuc（登録商標）をベースにした技術（例えば、NanoLuc、NanoBit、NanoTrip、NanoBRET、またはその構成成分（例えば、ペプチド、ポリペプチドなど）もしくはバリエーション）で標識された分析物（例えば、標的分析物と同一または類似するもの）と、（ii）標的分析物に対する結合部分（例えば、本明細書に記載される第2の検出可能な要素（例えば、NanoLuc（登録商標）をベースにした技術（例えば、NanoLuc、NanoBit、NanoTrip、NanoBRET、またはその構成成分（例えば、ペプチド、ポリペプチドなど）もしくはバリエーション）に融合または連結されたもの）の使用を含む。サンプルに標的分析物がない場合、検出可能な要素は、検出可能なシグナル（例えば、検出可能な要素間の相補性、BRETなどを介して）を生成し、システムによって生成される。システムがサンプル（例えば、生体サンプル、環境サンプルなど）に曝露された場合、サンプル中に標的分析物が存在すると、生物発光シグナルは、低減す

る（標識された分析物が複合体から離れる）。

【0319】

本明細書中の様々な実施形態は、低分子を検出するために、そのような競合イムノアッセイを利用する。いくつかの実施形態において、標的低分子は、毒素（例えば、マイコトキシンなど）、代謝産物（例えば、アミノ酸、グルコース分子、脂肪酸、ヌクレオチド、コレステロール、ステロイドなど）、ビタミン（例えば、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンHまたはビタミンKなど）、補酵素または補因子（例えば、補酵素A、補酵素B、補酵素M、補酵素Q、シチジン三リン酸、アセチル補酵素A、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）、ニコチンアミドアデニン（NAD⁺）、ヌクレオチドアデノシン三リン酸、ヌクレオチドアデノシン三リン酸、グルタチオン、ヘム、リポアミド、モリブドプテリン、3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸、ピロロキノリンキノン、テトラヒドロピオプテリンなど）、バイオマーカーまたは抗原（例えば、エリトロポエチン（EPO）、フェリチン、葉酸、ヘモグロビン、アルカリホスファターゼ、トランスフェリン、アポリポタンパク質E、CK、CKMB、副甲状腺ホルモン、インスリン、コレステリルエステル転送タンパク質（CEPT）、サイトカイン、シトクロムc、アポリポタンパク質AI、アポリポタンパク質AII、アポリポタンパク質BI、アポリポタンパク質B-100、アポリポタンパク質B48、アポリポタンパク質CII、アポリポタンパク質CIII、アポリポタンパク質E、トリグリセリド、HDコレステロール、LDLコレステロール、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ、パラオキシナーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸トランスフェラーゼ（AST）、CEA、HER-2、膀胱腫瘍抗原、サイログロブリン、アルファフェトプロテイン、PSA、CA125、CA19.9、CA15.3、レプチン、プロラクチン、オステオポンチン、CD98、ファシン、トロポニンI、CD20、HER2、CD33、EGFR、VEGFAなど）、薬物（カンナビノイド（例えば、テトラヒドロカンナビノール（THC）、カンナビジオール（CBD）、及びカンナビノール（CBN）など）、オピオイド（例えば、ヘロイン、アヘン、フェンタニルなど）、刺激剤（例えば、コカイン、アンフェタミン、メタンフェタミンなど）、クラブドラッグ（例えば、MDMA、フルニトラゼパム、γ-ヒドロキシ酪酸など）、解離性薬物（例えば、ケタミン、フェンシクリジン、サルビア、デキストロメトルファンなど）、幻覚剤（例えば、LSD、メスカリン、プシロシビンなど）など）、爆薬（例えば、2,4,6-トリニトロトルエン（TNT）及びヘキサヒドロ-1,3,5-トリニトロ-1,3,5-トリアジン（RDX）、四硝酸ペンタエリスリトール（PETN）など）、毒性化学物質（例えば、タブン（GA）、サリン（GB）、ソマン（GD）、シクロサリン（GF）、2-（ジメチルアミノ）エチル=N,N-ジメチルホスホリアミドフルオリダート（GV）、VE、VG、VM、VP、VR、VS、またはVX神経ガス）などである。

【0320】

いくつかの実施形態において、実施例5などに例示されるものなどの低分子検出イムノアッセイは、本明細書に記載される固相、ラテラルフロー、及び他のアッセイ及びデバイスで実施される。

【実施例】

【0321】

9. 実施例

本明細書に記載される本開示の方法の他の好適な改変及び適応は、容易に適応可能、かつ明らかであり、本開示の範囲または本明細書で開示される態様及び実施形態から逸脱することなく、好適な等価物を使用して行うことができることが当業者には容易に明らかであろう。ここまで本開示を詳細に記載してきたが、本開示は、以下の実施例を参照することにより、より明確に理解され、実施例は、本開示のいくつかの態様及び実施形態を単に例示することのみを意図しており、本開示の範囲を限定するものとみなされるべきではな

い。本明細書で言及される全ての雑誌論文、米国特許、及び公開物の開示は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0322】

本開示は、以下の非限定的な実施例によって例示される複数の態様を有する。

【0323】

実施例1

固相材料

図3に示されるように、本開示の生物発光複合体の構成成分は、固体支持体基材（例えば、メンブレン）にアプライされた後、検出可能な生物発光を生成する。NanoLuc（登録商標）構成成分（例えば、標的分析物結合剤）で標識された抗体を、ブロックしたメンブレン（緩衝液1；左右のパネルの上段2つのメンブレン）またはブロックしていないメンブレン（緩衝液2；左右のパネルの下段2つのメンブレン）にアプライし、次いで、窒素ありの室温で、または窒素なしの37℃で乾燥させた。Imagequant LAS4000イメージングプラットフォーム（1秒の曝露）を使用すると、検出可能な生物発光がこれらの条件下で生成された。これらの結果は、本開示の生物発光複合体の構成成分が、試薬の乾燥及び固相材料への適用、ならびに様々な温度及び処理条件への曝露を伴い得る固相及びラテラルフローアッセイプラットフォームにおいて良好に使用できることを示している。

【0324】

図4に示されるように、生物発光複合体の構成成分は、メンブレン及び紙ベースの固体支持体マトリックスにアプライされた後、検出可能な生物発光を生成する。緩衝液、基質（例えば、フリマジン）、及び生物発光複合体の2つの相補性構成成分（例えば、HiBiT及びLgBiT）を含む組成物をニトロセルロースメンブレン（左の3つのパネル）、または濾紙（真ん中の3枚のパネルに示されるWhatman 541；右の3枚のパネルに示されるWhatman 903）にアプライした。次いで、これらの構成成分を乾燥させ、4℃で発送し、次いで、24時間後に、LAS4000イメージングプラットフォームを使用して試験した（30秒及び5分の露光）。これらの条件下で検出可能な生物発光が生成され、濾紙マトリックスでは、ニトロセルロースメンブレンよりも明るい生物発光シグナルが得られた。グラスファイバー及び合成繊維で作られたマトリックス（例えば、Ahlsstromグレード8950）でも、検出可能な生物発光シグナルが得られ（データ示さず）、本開示の生物発光複合体の構成成分が様々なマトリックス材料と良好に使用できることを示している。

【0325】

実施例2

生物発光複合体による標的分析物の検出

図5に示されるように、本開示の生物発光複合体の構成成分（例えば、非発光ペプチド及びポリペプチド）は、標的分析物を認識するための標的分析物結合剤として使用することができる。例えば、図5（左パネル）に示されるように、ポリクローナルヤギ抗マウスIgG3抗体（例えば、標的分析物結合要素）を生物発光複合体の構成成分（例えば、LgBiT及びSmBiT）にコンジュゲートした。標的分析物（例えば、マウスIgG3）の存在下で、生物発光複合体が形成され、生物発光複合体の構成成分の相補性相互作用から生物発光シグナルが生成され（図5右パネル）、標的分析物の濃度が高くなるにつれてシグナルが増加した。これらの結果は、本開示の生物発光複合体の構成成分を使用して標的分析物を検出することが実現可能であることを示している。

【0326】

図6に示されるように、本開示の実施形態は、標的分析物を認識するための標的分析物結合剤として生物発光複合体の構成成分を使用する、固相アッセイプラットフォームを含む。示されるように、Whatman 903濾紙上に4つのテストスポットを用意し、その後、標的分析物を添加した（図6上部パネル）。一実施形態において、生物発光複合体の構成成分（例えば、SmBiT）にコンジュゲートしたヤギ抗マウス20ng、及び

生物発光複合体の相補性構成成分（例えば、L g B i T）にコンジュゲートしたヤギ抗マウス20ngをそれぞれ5μLのタンパク質緩衝液（20mM Na₃PO₄；5%w/v BSA；0.25%v/v Tween 20；10%w/vスクロース）中で調製し、紙上の示された位置で37℃で1時間乾燥させた。更に、5μLのエタノール中の5mMのフリマジン溶液を高真空下で15分間、指定のスポットにアプライした（図6上部パネル）。次いで、調製されたスポットを4℃で1週間保存した。示されるように、標的分析物（例えば、マウスIgG3；スポット#2）の存在下で、生物発光複合体が形成され、生物発光複合体の構成成分の相補性相互作用から生物発光シグナルが生成された（図6下部パネル）。標的分析物が存在しない場合にバックグラウンド生物発光シグナルが生成されたが（スポット#4）、標的分析物及び発光基質（例えば、フリマジン）の存在下で生成されたシグナルは、発光基質単独により生成されたシグナルと比較して実質的に増加した（スポット#2及び#4を比較）。

【0327】

基質及びタンパク質の安定性について、追加試験を実施した。図7A～7Eに示す。これらの試験は、標的分析物の添加後に、発光基質の安定性を試験するために、完全に機能する生物発光複合体（例えば、NanoLuc）を添加する、追加のステップを加えて、上記のように実施した。図7A～7Cに示されるように、生物発光複合体の構成成分は、より高い温度（例えば、37℃）で2週間保存すると、活性を失う。生物発光シグナルの消失は、完全に機能する生物発光複合体（例えば、NanoLuc）を添加すると、依然としてシグナルが生成されることから（図7D）、発光基質の不安定性または破壊に起因するものではないと思われる。更に、生物発光複合体の1つ以上の構成成分の破壊が生物発光シグナルの減少の原因であるかどうかを試験するために、保管条件の影響を受けない非抗体コンジュゲート構成成分（例えば、HiBiT）を添加した。図7Eに示されるように、非抗体コンジュゲート構成成分を添加すると、4℃では生物発光シグナルを生成するが、37℃では生成しないことから、生物発光複合体の相補性構成成分（例えば、L g B i T）の分解がシグナルの消失につながっている可能性が高いことを示している。

【0328】

保管条件の追加試験を実施した。図8A～8Bに示す。これらの試験は、テストスポットを合計3ヶ月間保存したことを除き、上に記載されるように実施した。図8Aに示されるように、活性がいくらか低下しているが、3ヶ月間保管した後でも、4℃と25℃の両方で、検出可能な生物発光シグナルが標的分析物の存在下で生成された。完全に機能する生物発光複合体（例えば、NanoLuc）を添加すると、シグナルが生成された（図8B）が、シグナルは、タンパク質緩衝液の使用に依存していると思われ（スポット#1及び#2を比較）、これは、タンパク質緩衝液によって発光基質が安定化されることを示唆している。

【0329】

実施例3

複雑なサンプリング環境における標的分析物の検出

図9A～9Cは、複雑なサンプリング環境で生物発光複合体の形成及び分析物の検出が実施可能かどうかを試験する、固相アッセイプラットフォーム（例えば、スポットテスト）の代表的な画像である。図9Aに示されるように、発光基質及び生物発光複合体の2つの相補性構成成分（HiBiT及びL g B i T）をWhatman 903濾紙にアプライした。各構成成分は、上に記載されるように、標的分析物結合要素（ポリクロナル抗マウスIgM）も有し、これを4℃で6週間保存した。EDTAで回収した全血サンプル（図9B）及び100%血清サンプル（図9C）は、10pgのマウスIgG3（標的分析物）でそれぞれスパイクし、図9Aに示されるスポットにアプライした。対応する対照サンプルは、マウスIgG3でスパイクしなかった。これらの結果は、複雑なサンプリング環境で、本開示の生物発光複合体の構成成分を使用して標的分析物を検出することが実現可能であることを示している。

【0330】

実施例 4

定性的及び定量的評価

図10A～10Bは、生物発光シグナルを定量的（図10A）及び定性的（図10B）の両方で評価できることを示す、固相アッセイの代表的な結果を含む。図10Aに示されるように、10 μ Mの発光基質（例えば、フリマジン）を濾紙にアプライし、マイクロタイタープレートに置いた。次いで、NanoLuc（登録商標）酵素を含有するPBSアッセイ緩衝液を加え、生物発光シグナルを定量的（図10A右パネル）及び定性的（図10B）に評価した。更に、ルミノメーター（図10B左パネル）及びスマートフォン（図10B右パネル）を使用して、生物発光シグナルを効果的に評価した。

【0331】

これらの結果は、本開示のアッセイ及び方法が、標的分析物の検出に対応する生物発光のレベルを、様々な対照サンプルと比較することを含み得、迅速な定量的及び定性的評価を容易にすることを示している。例えば、アッセイフォーマットは、試験サンプルを評価することができる標準として機能し得る様々な濃度の標的分析物を含む、複数の対照サンプルを含むことができる。

【0332】

これらの方法によれば、LgBiTまたはLgTripと生物発光複合体を形成することが可能な高親和性ジペプチドを使用して、生物発光シグナルを定量的及び定性的の両方で評価することができる。図11A～11Bに示される結果は、LgBiT及びLgTripと生物発光複合体を形成する高親和性ジペプチド pep263 の能力を示す、代表的なグラフ（図11AはRLU；図11BはS/B）である。高親和性ジペプチド pep263 は、NanoTrip複合体の β 9及び β 10のストランドを含む。（例えば、米国特許出願第16/439,565号（PCT/US2019/036844）、及び米国仮出願第62/941,255号参照。両特許は、その全体が参照により本明細書に援用される）。

【0333】

更に、図12は、iPhoneまたはイメージャー（例えば、LAS4000）の標準的なカメラを使用して、標準的なマイクロタイタープレートに配置したペーパーパンチからの生物発光を定性的に評価した、固相アッセイの代表的な結果を示す。このスポットテストアッセイは、Whatman 903ペーパー上で乾燥させた異なるLgBiT構成成分の機能安定性を評価するものであった。Whatman 903タンパク質セーバースポットカード（1/8インチのパンチ穴）を、以下のタンパク質緩衝液：20mM Na_3PO_4 、5%w/v BSA、0.25%v/v tween20、10%w/vスクロースとともに使用した。1000x NanoLuc（登録商標）ストック溶液をタンパク質緩衝液で1:1000に希釈した。約5 μ Lのこの反応溶液をスポット1にアプライした。HT-LgBiT複合体の場合、スポットあたり、約5 μ Lの106.8 nM タンパク質を使用した。約20 μ Mのストックタンパク質をタンパク質緩衝液で1:100に希釈した。約534 μ Lのストックをタンパク質緩衝液で466 μ Lに希釈した。約5 μ Lのこのコンジュゲーション溶液をスポット2に添加した。LgTrip（2098）複合体の場合、スポットあたり、約5 μ Lの106.8 nM タンパク質を使用した。約9.6 μ Mのタンパク質ストックを、約11.6 μ Lのストックを988 μ Lのタンパク質緩衝液で希釈することによって1mLの106.8 nM溶液とした。約5 μ Lのこのコンジュゲーション溶液をスポット3に添加した。LgTrip（3546）複合体の場合、スポットあたり、約5 μ Lの106.8 nM タンパク質とした。約94 μ Mのタンパク質ストックを、約1.13 μ LのLgTripストックを998.87 μ Lのタンパク質緩衝液に希釈することによって得た。約5 μ Lのこのコンジュゲーション溶液をスポット4に添加した。全てのタンパク質を添加した後に、サンプルを30℃で1時間、4℃、25℃、及び37℃で乾燥させた。

【0334】

これらの実験のRLU活性を評価する方法は、全てについて25℃及び37℃で6日目

10

20

30

40

50

(1日または2日間の4℃の後)、L g T r i p 3 5 4 6については4℃で8日目、ならびにN a n o L u c、L g B i T、及びL g T r i p 2 0 9 8については9日目でのイメージングを含んだ。フリマジンは50 μMで試験し、約1.2 μMのジペプチドをN a n o B i T及びN a n o T r i p実験に使用した。全てのスポットを基質試薬の入ったプレートに配置し、i P h o n e及びL A S 4 0 0 0イメージングシステムで画像を撮影し、次いで、プレートリーダーに挿入した。N a n o G l o L i v e C e l l S u b s t r a t e カタログ番号N 2 0 5 B (ロット1 8 9 0 9 6)をアッセイ緩衝液1×P B S、p H 7.0)とともに使用した。

【0335】

図13A～13Bは、図12に示されるものと同じ固相アッセイの定量的分析を示すものであるが、発光は、25℃で3日目にルミノメーターを使用して検出した(図13AはR L U; 図13BはS/B)。これらの定量的データは、図12の定性的データを裏付けるものである。図12に使用した材料及び方法は、図13A～13Bに使用したものと同じである(例えば、1 μMのジペプチド+50 μMの生細胞基質のP B S (p H 7.0)を添加し、ルミノメーターで読み取る)。いくつかの場合において、L g B i Tのバックグラウンドが高くなると、S/B比が低下し得る。

【0336】

図14A～14Cは、図12～13に示されるものと同じ固相アッセイの定量的な時間経過を示し、この時間枠で試験した全ての温度での実験条件における全てのタンパク質の安定性を示す。4℃(図14A)、25℃(図14B)、及び37℃(図14C)での50 μMフリマジンのB_{max} R L U値を経時的(0～60日間)に示す。これらの定量的データは図12及び図13と一致しており、試験した全ての複合体及びこの時間枠にわたって試験した全ての温度での安定性を示している。図12に使用した材料及び方法は、図14A～14Cに使用したものと同じである。

【0337】

実施例5

緩衝液の組成

異なる緩衝液組成における0～90分間の複合体の短期または加速安定性を試験するための実験も実施した。方法は、約1.068 nMの濃度の各タンパク質をW h a t m a n 9 0 3 ペーパースポット(1/8インチ)に吸収及び乾燥させたものを使用することを含んだ。タンパク質サンプルを調製し、タンパク質緩衝液またはP B S緩衝液のいずれかをペーパースポット上で乾燥させた(使用した具体的な緩衝液組成については各図を参照されたい)。ストック濃度は、N a n o L u cが1000x(0.4 mg/mL)、L g B i T-1 6 7 2-1 1 s-H i sが20 μM、L g T r i p (3 5 4 6)が94 μMであった。タンパク質緩衝液は、20 mM N a₃P O₄、5% w/v B S A、0.25% v/v t w e e n 2 0、10% w/v スクロースで構成された。発光活性は、100 μLのアッセイ緩衝液P B S (p H 7.0)中にフリマジンを添加したジペプチド(最終[ジペプチド]=1 nM; 最終[フリマジン]=50 μM)を使用して試験した。サンプルを時点0(4℃から取り出したばかりのもの)で読み取り、次いで、60℃及び25℃に置いて試験を継続した。N a n o L u cの1000xストック溶液をタンパク質緩衝液(1 mL)で1:1000に希釈するか、または10 μLのストックを990 μLのタンパク質緩衝液に希釈して1.068 nMのストックとした(使用した具体的な緩衝液組成については各図を参照されたい)。試験のために、各濃度約5 μLをペーパースポットに添加した。試験した各タンパク質(L g B i T及びL g T r i p)について、スポットあたり約5 μLの1.068 nM タンパク質が確実に使用されるように各緩衝液で適切な希釈を行った。全てのタンパク質を添加した後に、サンプルを35℃で1時間乾燥させ、条件及び温度ごとに40スポットを用意した。

【0338】

図15A～15Dは、25℃及び60℃の2つの緩衝液条件下で実施した加速安定性試験の0日目に収集した代表的な結果を示す(図15A及び15Cはタンパク質緩衝液を使

10

20

30

40

50

用するのに対し、図15B及び15DはPBSを使用)。これらのデータは、試験した複合体が、Whatman 903ペーパーへ組み込む緩衝液条件として、PBSに対する耐性がタンパク質緩衝液と比較してないことを示している。緩衝液条件は、早い時点でも安定性に影響を与えるようである。いくつかの場合において、LgTrip 3546は、より優れた活性を示しており、これらの条件下でNanoLuc及びLgBiTよりも化学安定性がいくらか優れていることを示唆している。

【0339】

図16A～16Bは、図15に示す加速安定性試験の結果を示すが、0～50日の時間経過にわたるものである。図16Aは、25℃のタンパク質緩衝液で試験したサンプルの結果であり、図16Bは、60℃のタンパク質緩衝液で試験したサンプルの結果である。図15と同じ材料及び方法を使用した。これらの結果は、複合体がこれらの条件（25℃及び60℃）で少なくとも50日までは安定していることを示している。

【0340】

図17は、ラテラルフローアッセイの状況におけるNanoLuc（登録商標）の安定性を評価するために、ニトロセルロースメンブレン上で乾燥させたNanoLucからの発光に対する緩衝液条件の影響を比較したものを示す。4つの異なる条件を試験した：条件1：マウス抗Hum+IgG-NLucを含むPBS（pH7.4）；条件2：IgG-NLucを含むPBS（pH7.4）；条件3：マウス抗Hum+IgG-NLucを含むローディング緩衝液（20mM Na₃PO₄、5%w/v BSA、0.25%v/v tween 20、10%w/v スクロース）；条件4：IgG-NLucを含むローディング緩衝液（20mM Na₃PO₄、5%w/v BSA、0.25%v/v tween 20、10%w/v スクロース）。各条件をメンブレンにアプライし、室温または37℃のいずれかで乾燥させた。

【0341】

これらの実験のために、次の溶液を調製した：（1）5μlのマウス／抗ヒトの995μl添加緩衝液（0.1M PBS、pH7.4）；（2）5μl抗マウス-NanoLucの995μl添加緩衝液（0.1M PBS、pH7.4）；（3）5μlマウス／抗ヒトのタンパク質緩衝液（20mM Na₃PO₄、5%w/v BSA、0.25%v/v tween 20、10%w/v スクロース）；及び（4）5μl抗マウス-NanoLucの995μlタンパク質緩衝液（20mM Na₃PO₄、5%w/v BSA、0.25%v/v tween 20、10%w/v スクロース）。約0.5mlの溶液（1）をエアブラシにロードし、ニトロセルロースストリップ（ストリップ1及び2）の左側にアプライした。ストリップを室温または37℃で1時間乾燥させた。約0.5mlの溶液（2）をストリップ1及びストリップ2のいずれかの表面にアプライし、室温または37℃で乾燥させ、それぞれ条件1及び2を形成した。約0.5mlの溶液（3）をエアブラシにロードし、ニトロセルロースストリップ（ストリップ3及び4）の左側にアプライした。ストリップを室温または37℃で1時間乾燥させた。約0.5mlの溶液（4）をストリップ3及びストリップ4のいずれかの表面にアプライし、室温または37℃で乾燥させ、それぞれ条件3及び4を形成した。イメージングのために、基質の1x溶液を調製し（4mlのPBS+1mlのNano-Glo LCS希釈緩衝液+50ulのNano-Glo Live Cell Substrate）、各ストリップに1mlの基質溶液を重ね、その後すぐにイメージングを開始した。

【0342】

これらのデータは、ラテラルフローメンブレンでの活性には緩衝液の配合が重要であることを示している。タンパク質をPBS中でメンブレンにアプライしただけの条件1～4では、新しく調製したNano-Glo Live Cell基質にメンブレンを曝しても、ほとんど光は観察されなかった。対照的に、Na₃PO₄、BSA、Tween 20、及びスクロースなどの追加の構成成分を含有するローディング緩衝液で調製したタンパク質は、かなりの発光出力を示した。これは、安定性及び機能性には、タンパク質をメンブレンの表面に添加するために使用する特定のローディング緩衝液が重要であることを示して

いる（図17）。

【0343】

実施例6

ラテラルフローアッセイコンポーネント

ラテラルフローアッセイ中のタンパク質及び標的の適切な移動を促進するために、異なるメンブレンブロック剤及びアッセイランニング緩衝液を試験する実験を実施した。4つのストリップを使用し、それぞれの設計（スクロース及びブロック剤ありまたはなし）を図18の左端の画像の下に概略図として示す。簡潔に述べると、ストリップ1は、コンジュゲーションパッド上でスクロースの前処理を行ったブロッキングメンブレンを含み、ストリップ2は、コンジュゲーションパッド上でスクロースの前処理を行わないブロッキングメンブレンを含み、ストリップ3は、コンジュゲーションパッド上でスクロースの前処理を行ったブロッキングなしメンブレンを含み、ストリップ4は、コンジュゲーションパッド上でスクロースの前処理を行わないブロッキングなしメンブレンを含んだ。

【0344】

ブロッキング緩衝液は、1%w/v ポリビニルアルコールを含む20mMトリス（pH7.4）で構成された。コンジュゲーションの前処理は、30%スクロースw/vのDI水が含まれた。コンジュゲーションパッドはAhlstromグレード8950（結合剤を含むチョップトグラス、50g/m²）であり、メンブレンはニトロセルロースであった。ブロッキングするために、メンブレンをブロッキング緩衝液に室温で30分間浸し、その後、緩衝液から取り出し、DI水で洗浄し、35℃で30分間乾燥させた。二次的な前処理として、コンジュゲーション試薬（基質）がアプライされる場所に近いメンブレンパッドにスクロース溶液を塗布した。メンブレンを35℃で1時間乾燥させた。タンパク質を調製するために、約5μLの抗マウス-NanoLucを995μLのタンパク質緩衝液に添加した。約1mLのタンパク質溶液をエアブラシに入れ、コンジュゲーションパッドに薄くコーティングした。これを35℃で1時間乾燥させた。次いで、ストリップを台紙に貼り付けた。更に、図18～20については、次の緩衝液組成を試験した：緩衝液1は、20X SSC、1%BSA（pH7.0）+10μM LCSで構成された（図18）。緩衝液2は、0.01M PBS、1%BSA（pH7.0）+10μM PCSで構成された（図19）。緩衝液3は、5x LCS希釈緩衝液+PBSで1Xに希釈した5x LCSで構成された（図20）。

【0345】

図18は、20X SSC、1%BSA（pH7.0）+10μM LCSのランニング緩衝液で実施したラテラルフローアッセイにおける、メンブレンのブロッキング及びスクロースの前処理の効果を示す。図19は、0.01M PBS、1%BSA（pH7.0）+10μM Permeable Cell Substrate（PCS）のランニング緩衝液で実施したラテラルフローアッセイにおける、メンブレンのブロッキング及びスクロースの前処理の効果を示す。図20は、5x LCS希釈緩衝液+PBSで1Xに希釈した5x LCSのランニング緩衝液で実施したラテラルフローアッセイにおける、メンブレンのブロッキング及びスクロースの前処理の効果を示している。これらのデータは、メンブレンの処理及びタンパク質緩衝液が、コンジュゲーションパッド内及びラテラルフローメンブレンを通過するアッセイ液の流れに影響を与えることを示している。

【0346】

吸収及び毛管現象に対するメンブレン特性の影響などの、ラテラルフローアッセイの状況における異なるメンブレン及びメンブレン特性を評価する実験も実施した。図21は、ラテラルフローアッセイにおける生物発光試薬の吸収及び毛管現象へのメンブレン特性の影響を示す。流れ効率について、異なる孔径を備えるメンブレンを試験した。各メンブレンはブロッキングなしで、ストリップの下部およそ1/3に30%w/vスクロースの前処理を施した。他の材料には、コンジュゲーションパッド（Ahlstromグレード8950、結合剤を含むチョップトグラス、50g/m²）；サンプルパッド（セルロースグラスファイバーCFSP203000（Millipore））；及び吸収パッド（コッ

トンリントー、グレード238 (Ahlsstrom)) が含まれた。以下のメンブレン条件を試験した：

1. ニトロセルロースFF170HP (Ahlsstrom)
2. ニトロセルロースHi-Flow Plus HFC18002 (Millipore) - 180秒 / 4cm
3. ニトロセルロースHi-Flow Plus HFC13502 (Millipore) - 135秒 / 4cm
4. ニトロセルロースHi-Flow Plus HFC09002 (Millipore) - 90秒 / 4cm
5. ニトロセルロースHi-Flow Plus HFC12002 (Millipore) - 120秒 / 4cm
6. ニトロセルロースHi-Flow Plus HFC07502 (Millipore) - 75秒 / 4cm
7. ニトロセルロースFF170HP (Ahlsstrom) - 陰性対照。

【0347】

ランニング緩衝液は、5x LCS希釈緩衝液+PBSで1Xに希釈した5x LCSで構成された。30%スクロース溶液をメンブレンに塗布し、ストリップの下部約1.5cmに及ぶようにし、35℃で1時間乾燥させることによって、メンブレンを前処理した。約5μLの抗マウス-NanoLucを995μLタンパク質緩衝液に添加することによって、タンパク質を調製した。約1mLのタンパク質溶液をエアブラシに加え、これを使用してコンジュゲーションパッドに軽くコーティングした。これを35℃で1時間乾燥させた。これらの実験の陰性対照は、タンパク質を含まないタンパク質緩衝液を含み、試験条件と同じようにエアブラシで塗布した。ストリップを台紙に貼り付けた。コンジュゲーションパッド、サンプルパッド、及びウィックパッドを2cm×1cmにカットした。サンプルパッド及びコンジュゲーションパッドは、約1.8cm重なっていた。ストリップの全体の寸法は、約6cm×1cmであった。

【0348】

イメージングプログラムは、30秒ごとに合計で約10分間、5秒の露光画像を撮るように作成した。NanoLucがまだメンブレンを通過して流れているように見える場合は、イメージングを繰り返した。ImageJを使用して、画像を重ねて動画にした。図21に含まれる最後の画像は、経時的に撮影された全ての画像の累積シグナルである。

【0349】

これらの結果は、これらの実験で使用した条件に基づくと、ストリップ4及び6 (図21の枠内) で、最も完全にNanoLucがコンジュゲーションパッドからサンプルリザーバへ移動したことが示されている。

【0350】

実施例7

生物発光複合体の形成

メンブレン及び濾紙上における生物発光複合体形成を様々な試薬の存在下で評価するために、実験を実施した。実験は、4つの異なる試験条件を示す、以下の概略図に従って設計及び実施した。

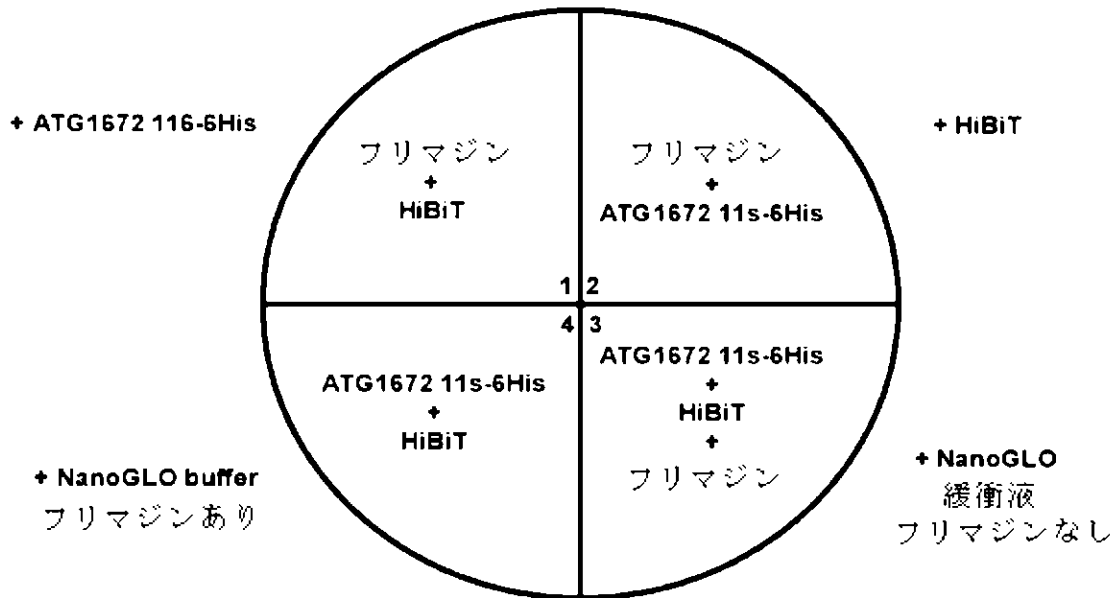
10

20

30

40

50



【0351】

これらの実験について、2.5 μ LのHaloTag-HiBiTを498 μ Lのタンパク質緩衝液に添加した。この溶液の約5 μ Lを、メンブレンと濾紙の両方の四象限の1、3、及び4（上の概略図参照）にスポットし、37℃で1時間乾燥させた。約2.5 μ LのATG-1672-11s-6Hisを498 μ Lのタンパク質緩衝液で希釈し、約5 μ Lをニトロセルロースメンブレン及び濾紙の四象限の2、3、及び4（上の概略図参照）に直接スポットした。メンブレンを室温で1時間乾燥させた。フリマジンをEtOH中の5mMストック溶液として調製した。この溶液の約5 μ Lをメンブレンと濾紙の両方の四象限の1、2、及び3にスポットし、すぐに高真空下に15分間置いた。約2.5 μ Lのストックタンパク質（20 μ M）を、基質を含有しない498 μ LのNanoGLO緩衝液中に希釈した。約5 μ Lを上記の四象限に添加し、その後、ルミノメーターで読み取った。

【0352】

図22A～22Bは、ニトロセルロース（左）及びWhatmanグレード541（右）ペーパー上のNanoBiT/HiBiT相補体による生物発光シグナル（図22A）と、全露光時間にわたって撮影された対応する動画からの編集画像を示す（動画は要望に応じて提供可能である）。画像は、26に示す試薬の添加後、1秒から始まって10分の露光で終了するように露光時間を増やして（1秒、3秒、10秒、30秒、1分、2分、3分、4分、5分、10分）、合計時間（26分）、撮影した。

【0353】

これらの結果は、濾紙が、メンブレンと比較して増加したシグナルを提供し得ることを示唆している。また、四象限の4の条件は、検出可能な発光を生成しなかった。これは、存在する他の試薬のうちの1つ以上によって複合体形成が妨げられたことを示し得る。

【0354】

複合体形成に対する基質濃度の増加の影響を評価するために、実験を実施した。図23は、Whatmanグレード903ペーパー上のNanoBiT/HiBiT相補体による生物発光シグナルを示し、20分に追加の基質及び液体のスパイクがある。図23は、全露光時間にわたって撮影された対応する動画からの代表的な編集画像である（動画は要望に応じて提供可能である）。約2.5 μ Lの精製LgBiTまたはHiBiTを498 μ L 1X LCS緩衝液で希釈し、10 μ Lの容量（LgBiTとHiBiTの比率は2:1）で濾紙（四象限の1と一致する条件）に直接添加した。元の基質は、NanoBR

ET NanoGloであり（5 μ lを5mMで添加）、追加の浸漬用基質は、PBSで1Xに希釈した1X NanoGlo緩衝液で1：5に希釈したNanoBRET NanoGlo（5mMストック）であった。濾紙を覆うように約500 μ lを添加した。全ての時間、30秒の露光を繰り返して画像を撮影した。

【0355】

過剰な液量の追加の基質（フリマジン）でスパイクするとシグナルが戻ることを示された。これは、追加の流体内で構成成分が移動し始めると、移動性が高くなるため、より多くの複合体が形成され得ることを示唆している。この実験はまた、酵素が活性を維持し、基質の濃度が制限要因となるが、過剰な基質を添加することで改善できることを示している。

【0356】

図24は、上記の概略図と一致する実験条件（図22の四象限1～4）における、Whatman 541ペーパーではなく、Whatman 903ペーパー上でのNanoB i T / H i B i T相補体による生物発光シグナルを示す。実験の終了近くに、緩衝液を添加してメンブレンを再水和した。図24は、全露光時間にわたって撮影された対応する動画からの代表的な編集画像である（動画は要望に応じて提供可能である）。四象限の2の条件が最も強い発光シグナルをもたらすようである。

【0357】

実施例8

LgTrip及び基質を用いたスポットテスト

まず、目的の分析物（例えば、ジペプチド）を添加することができる、LgTrip 3546及びフリマジンを含むペーパーマトリックスを試験することによって、「オールインワン」スポットの実現可能性を評価するために、実験を実施した。図25A～25Cは、BSAの存在下（図25B）及び不在下（図25A）で、LgTrip 3546及び基質をジペプチドにより再構成したものから得られたWhatman 903ペーパー上での生物発光シグナルを、BSAとのジペプチドの連続希釈（図25C）とともに示す。2セットのスポットを作製した。各スポットは、次の構成成分で構成された：1）5mM A T T、5mM アスコルビン酸、5 μ M LgTrip 3546、及び1mM フリマジン；2）5% BSA、5mM A T T、5mM アスコルビン酸、5 μ M LgTrip 3546、及び1mM フリマジン。

【0358】

スポットを調製するために、200 μ Lの5 μ M LgTrip 3546、5mM A T T、及び5mM アスコルビン酸を含むバイアル準備した。この溶液の約5 μ Lを各スポットに添加し、次いで、スポットを35℃で1時間乾燥させた。乾燥後、エタノールでフリマジン1mM ストックを調製した。この溶液の約5 μ Lを各スポットに添加し、35℃で更に30分間乾燥させた。発光を測定するために、試験時に、1.2mMのジペプチドストック水溶液をPBS（pH7.0）で $1e^{-10}$ Mまで連続希釈した。各ジペプチドストック約100 μ Lを、スポットを含む96ウェルプレートに添加し、すぐにカイネティクス測定を開始した。

【0359】

これらのデータは、ジペプチドを添加することにより、安定した濃度依存性反応が観察されたことを示している（図25）。この実験は、LgTrip 3546及び基質を含むペーパーフォーマットを作製した後、潜在的な目的分析物（例えば、ジペプチド）を含む緩衝水性媒体で再構成できることを明らかにしている。次いで、異なる材料を基質及びLgTrip 3546の利用で試験した。新しいジペプチドを1nMで添加してNanoTrip及び基質の活性を試験するか、あるいは、新しいNLucを添加して基質を単離するかのいずれかを行った。図27は、LgTrip 3546及び基質のジペプチドによる再構成、または乾燥させたLgTrip 3546及び基質へのNanoLucの添加から得られた、3つの異なる固相材料（Whatman 903、Ahls trom 237、及びAhls trom 6613H）における生物発光シグナルを示す

。A l h s t r o m 6 6 1 3 Hは、どちらの条件でも発光シグナルが減少しているように見えることから、シグナルの出力に経時的な悪影響があるように思われる。全体として、アッセイ構成成分の安定性は、それらが埋め込まれる固体マトリックス材料の組成によって影響を受け得る。

【0360】

図28は、L g T r i p 3 5 4 6と基質の両方を含有し、周囲条件で25日間保存したWhatman 903ペーパーからの生物発光シグナルを示す。試験時に、スポットをPBS中の1 n Mジペプチドに曝露した。全体として、この実験は、周囲温度下で長期間保管した後でも、材料からのシグナルは著しく消失しないことを示している。

【0361】

実施例9

L g T r i p及び基質を含有する凍結乾燥ケーキ

図26A～26Bは、ライオケーキからL g T r i p 3 5 4 6及び基質をジペプチドにより再構成したものから得られた生物発光シグナル（図26A）を、ジペプチドの滴定の要約データ（図26B）とともに示す。ライオケーキを調製するために、5 % w / v プルランを、26.3 mM A T T及び11.3 mM アスコルビン酸を含有する水に加えた（溶液1）。次いで、溶液1をスナップキャップバイアルに35 μ Lの容量で分注した。次いで、約10 μ Lの95 μ M L g T r i p 3 5 4 6タンパク質を各バイアルに添加し、ピペティングして混合した（溶液2）。10 mMのフリマジンストック溶液をエタノールで調製し、この溶液の5 μ Lを各バイアルに添加し、混合した（溶液3）。溶液3を含有するバイアルをドライアイス上に置いて1時間凍結させ、次いで、一晩かけて凍結乾燥させた。発光を測定するために、試験時に、水に加えた1.2 mMのジペプチドストックをPBS（pH 7.0）で 1×10^{-10} Mまで連続希釈した。各ジペプチドストック約100 μ Lを、L g T r i p 3 5 4 6及び基質を含有する凍結乾燥バイアルに添加し、短期間ピペティングして混合し、次いで、96ウェルプレートに置き、すぐにカイネティクス測定を開始した。

【0362】

これらのデータは、ジペプチドの添加により、安定した濃度依存的生物発光反応が観察されたことを示している（図26）。この実験は、L g T r i p 3 5 4 6及び基質を含有する固体フォーマット凍結乾燥ケーキまたはタブレットを作製した後、潜在的な目的分析物（例えば、ジペプチド）を含有する水性媒体で再構成できることを明らかにしている。

【0363】

実施例10

タンパク質緩衝液配合物

図29～33について、タンパク質構成成分と、異なるタンパク質緩衝液配合物との適合性を試験するために、以下の概略図に示す実験設計にしたがって、実験を実施した。

10

20

30

40

50



【0364】

これらの実験には、Whatman 903プロテインセーバースポットカードを以下のタンパク質緩衝液配合物とともに使用した：

タンパク質緩衝液1：20mM Na_3PO_4 、5%w/v BSA、0.25%v/v tween 20、10%w/v スクロース

タンパク質緩衝液2：20mM Na_3PO_4 、0.25%v/v tween 20、10%w/v スクロース

タンパク質緩衝液3：20mM Na_3PO_4 、5%w/v BSA、0.25%v/v tween 20

タンパク質緩衝液4：20mM Na_3PO_4 、5%w/v BSA、0.25%v/v tween 20、2.5% プルラン

タンパク質緩衝液5：20mM Na_3PO_4 、0.25%v/v tween 20、2.5% プルラン。

【0365】

NanoLucについては、1000xストック溶液をタンパク質緩衝液（1mL）で1：1000に希釈した。1.068nMのストック溶液は、3μLを297μLのタンパク質緩衝液に希釈した。各濃度約5μLを濾紙にスポットした。LgBIT-1672-11s-Hisについては、スポットあたり5μLの1.068nM タンパク質を使用した。約10μLを990μLのタンパク質緩衝液で希釈して 2×10^{-7} Mストックとした。次いで、約100μLの100nM タンパク質溶液を調製し、約10μLのストックを990μLのタンパク質緩衝液に希釈して1nMのストックとした。各濃度約5μLを濾紙にスポットした。LgTrip 3546については、スポットあたり約5μLの1.068nM タンパク質を使用した。約1.1μLのLgBIT-1672ストックを998.94μLのタンパク質緩衝液に希釈した。約3μLのストックを297μLのタンパク質緩衝液に希釈した。各濃度約5μLを濾紙にスポットした。全てのタンパク質を添加した後に、サンプルを30℃で約1時間乾燥させた。各条件で約40スポットを作製した（上記の概略図を参照）。スポットは、0日目にベースラインについて試験し、次いで、60℃に置いて、6日後に試験した。RLU活性は、PBS（pH7.0）中の1nMの高親和性ジペプチド+50μM生細胞基質を添加することによって試験した。

【0366】

図29A～29Cは、NanoLuc（図29A）、LgBiT-1672（図29B）、及びLgTrip 3546（図29C）に関して上述した様々なタンパク質緩衝液配合物における、RLUで測定した生物発光シグナルを示す。図30A～30Cは、NanoLuc（図30A）、LgBiT-1672（図30B）、及びLgTrip 3546（図30C）の様々なタンパク質緩衝液配合物における、B_{max}で測定した生物発光シグナルを示す。まとめると、これらのデータは、試験したタンパク質緩衝液配合物でBSAが重要な構成成分であり、NanoLuc及びLgTrip 3546でRLUが最も大きな減少を示した（緩衝液2及び5）ことを示唆している。

【0367】

上記の様々なタンパク質緩衝液組成物における発光バックグラウンドレベルを評価するための実験も実施した。図31A～31Bは、LgBiT-1672（図31A）及びLgTrip 3546（図31B）の様々なタンパク質緩衝液組成物における生物発光バックグラウンドレベルを示す。これらのデータは、BSAまたはプルランが、バックグラウンド発光を最小に抑えるためのLgBiT-1672のタンパク質緩衝液配合物の重要な構成成分であることを示唆しているが、これらの条件下のLgTrip 3546のバックグラウンドレベルには、ほとんど影響しないようである。

【0368】

図32A～32Fにおいて、上記の条件のカイネティクスを、PBS中のジペプチド及び基質を添加した後に評価した。より詳細には、図32A～32Fは、60℃で6日後のNanoLuc（登録商標）（図32A及び32D）、LgBiT-1672（図32B及び32E）、及びLgTrip 3546（図32C及び32F）の様々なタンパク質緩衝液配合物における生物発光シグナル（図32A～32CはRLU；図32D～32FはB_{max}）を示す。これらのデータは、これらの条件下において、60℃で6日後もタンパク質が安定しており、活性を維持していることを示し、全てのタンパク質緩衝液配合物でBSAが重要な構成成分であることを示唆している。更に、図33は、限定するものではないが、キュベット、試験管、大容量ボトル、スナップテストタイプのアッセイなどを含む、いくつかのタイプのアッセイフォーマットをサポートする分析物検出試験を実施するために必要な全ての試薬を含有する、オールインワン凍結乾燥ケーキ（「ライオケーキ」）または錠剤の代表的な実施形態を含む。

【0369】

実施例11

ラテラルフローアッセイ

図34及び図35について、上記の実験で得られた情報を使用し、また、以下の概要図に示される実験設計に従って、ラテラルフローアッセイを実施した。

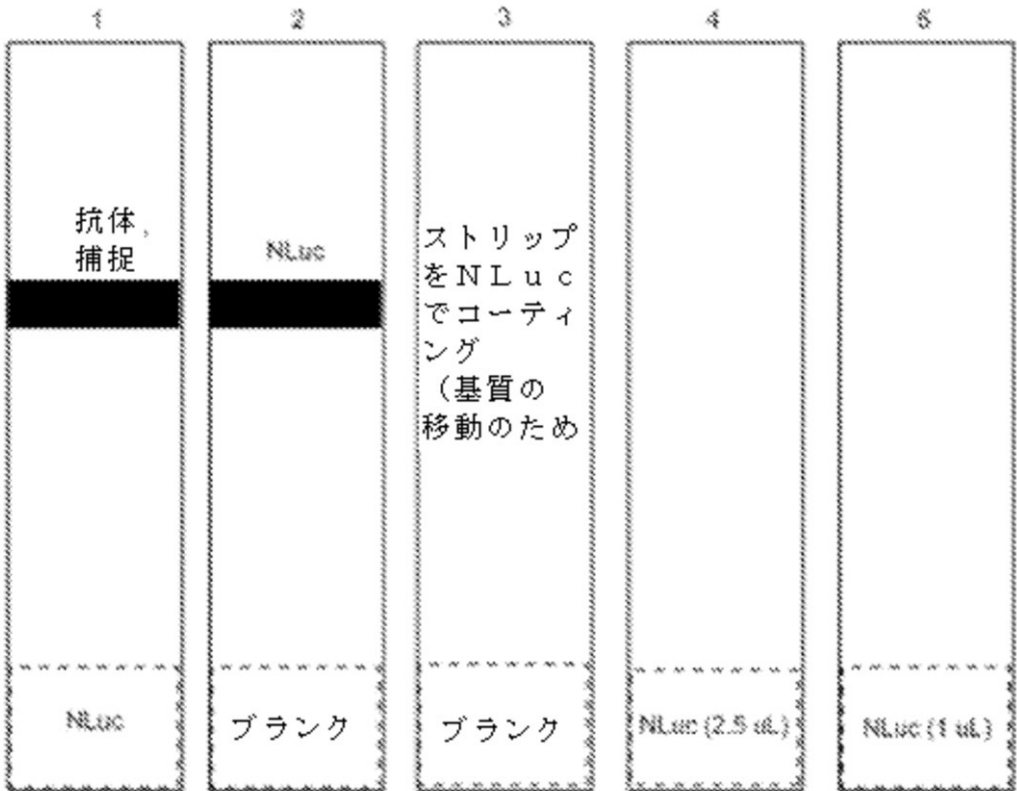
10

20

30

40

50



【0370】

これらの実験に使用した材料には、コンジュゲーションパッド（Ahlstromグレード8950、結合剤を含むチョップトグラス、 50 g/m^2 ）、サンプルパッド（セルコースグラスファイバーCFSP203000（Millipore））、吸収パッド（コットンリター、グレード238（Ahlstrom））、メンブレン（ニトロセルロスHi-Flow Plus HFC07502（Millipore））、ストリップテスト2の#6）、及びランニング緩衝液（ $5\times\text{ LCS}$ 希釈緩衝液+PBSで $1\times$ に希釈した $5\times\text{ LCS}$ ）が含まれた。30%スクロース溶液をメンブレンに塗布し、ストリップの下部約1.5 cmに及ぶようにし、メンブレンを調製した。メンブレンを 35°C で1時間乾燥させた。ストリップを最初に $4.5\text{ cm}\times 1\text{ cm}$ にカットした。

【0371】

タンパク質調製物を以下の条件に従って実施した：

条件1： $5\text{ }\mu\text{L}$ のマウス抗NanoLuc抗体を $995\text{ }\mu\text{L}$ のタンパク質緩衝液で希釈し、コンジュゲーションパッド全体にエアブラシで均一に塗布し、 37°C のオーブンで乾燥させた。2.5 μL のマウス抗体を0.5 mLのタンパク質緩衝液で希釈し、メンブレンに直接塗布した。

条件2：2.5 μL のNanoLucを0.5 mLのタンパク質緩衝液で希釈し、メンブレンに直接塗布した。 37°C で1時間乾燥させた。

条件3：タンパク質緩衝液で1 mLに希釈した5 μL のNanoLucでメンブレン全体を直接処理する。エアブラシで均一に塗布した。 37°C で1時間乾燥させた。

条件4：997 μL のタンパク質緩衝液中の2.5 μL のマウス抗NanoLuc抗体。コンジュゲーションパッド全体にエアブラシで均一に塗布した。 37°C で1時間乾燥させた。

条件5：999 μL のタンパク質緩衝液中の1 μL のマウス抗NanoLuc抗体。コンジュゲーションパッド全体にエアブラシで均一に塗布した。 37°C で1時間乾燥させた。

【0372】

ストリップを、 $1\text{ cm}\times 1\text{ cm}$ にカットしたコンジュゲーションパッド、サンプルパッ

ド、及びウィックパッドとともにバックリングカードに組み立てた。ストリップを組み立てたら、縦方向に半分にカットし、 $4.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ の最終寸法にした。イメージング解析のために、約 $250\text{ }\mu\text{L}$ の $1\times\text{ LCS}$ 緩衝液+ LCS を PBS で希釈した。画像を5秒の露光で撮影し、画像と画像の間には5秒の待ち時間を設けた。代表的な画像は、全露光時間にわたって撮影された対応する動画からの編集画像である（動画は要望に応じて提供可能である）。読み取り時間は合計で2:40分であった。

【0373】

図34は、全露光時間にわたって撮影された動画に対応する編集画像から得た、ラテラルフローストリップを横切る基質の移動による生物発光シグナルを示す。基質をラテラルフローアッセイカセットのサンプルウインドウに添加すると、リアルタイムイメージングにより、ストリップを横切る基質の移動が示され、テストウインドウ全体で NanoLuc （登録商標）活性を確認することができる（上記概略図のストリップ#3）。70秒には、サンプルウインドウ全体に基質が流れた。

10

【0374】

図35は、全露光時間にわたって撮影された動画に対応する編集画像から得た、ラテラルフローストリップを横切る NanoLuc （登録商標）の移動による生物発光シグナルを示す（上記概略図のストリップ#4及び5）。これらの条件下では、 NanoLuc （登録商標）がコンジュゲーションパッドから流れ出て、メンブレンを横切って、マウス抗 NanoLuc 抗体を含有するストリップに向かう流体の流れによって示されているように、ストリップ#5は、ストリップ#4よりも優れているようであった。

20

【0375】

実施例12

フモニシン検出

本明細書の実施形態の開発に際し、例示的な低分子毒素であるフモニシンB1を検出するための競合型イムノアッセイにおいて、 NanoLuc （登録商標）をベースにした技術の使用を実証するために、実験を実施した。そのようなアッセイは、本明細書に記載されるデバイス及びシステムで、他の小分子標的及び標的分析物とともに、実施することができる。

【0376】

例示的なアッセイにおいて、フモニシンB1を NL ペプチドタグ（例えば、配列番号10を含むペプチドタグ）に、ビオチン／ストレプトアビジン連結を介して、 HaloTag 連結を介して、または直接つなぐことによって、トレーサーを生成した（図36）。いくつかの実施形態において、トレーサーは、 NL ペプチドタグのポリペプチド相補体（例えば、配列番号9を含む相補体）に連結された抗フモニシンB1抗体と組み合わせることができる。生物発光複合体は、抗体がフモニシンB1に結合すると、ペプチドタグとポリペプチド構成成分との間で形成され得る。様々な濃度の非標識フモニシンB1へ曝露すると、生物発光複合体が破壊され、発光が減少し、サンプル中のフモニシンB1の量を検出／定量する能力も低下する（図37）。

30

【0377】

実施例13

LgBIT 及び基質を含有する凍結乾燥ケーキ

図38A～38Bは、ライオケーキから LgBIT 及び基質をジペプチドにより再構成したものから得られた生物発光シグナル（図38A）を、ジペプチドの滴定（図38B）とともに示す。 LgBIT を含むライオケーキを調製するために、 5 mM ATT 及び 5 mM アスコルビン酸を含有する水中の $5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ プルランを調製した（溶液1）。次いで、溶液1をスナップキャップバイアルに $45\text{ }\mu\text{L}$ の容量で分注した。次いで、約 $5\text{ }\mu\text{L}$ の $20\text{ }\mu\text{M}$ LgBIT タンパク質を各バイアルに添加し、ピペッティングして混合した（溶液2）。 10 mM のフリマジンスストック溶液をエタノールで調製し、この溶液の $5\text{ }\mu\text{L}$ を各バイアルに添加し、混合した（溶液3）。溶液3を含有するバイアルをドライアイス上に置いて1時間凍結させ、次いで、一晩かけて凍結乾燥させた。

40

50

【0378】

発光を測定するために、試験時に、1.2 mMのジペプチドストック水溶液をPBS (pH 7.0) で 1×10^{-10} Mまで連続希釈した。各ジペプチドストック100 μ lを、LgBit及び基質を含有する凍結乾燥バイアルに添加し、短期間ピペッティングして混合し、次いで、96ウェルプレートに置き、すぐにカイネティクス測定を開始した。

【0379】

これらのデータは、ジペプチドの添加により、安定した濃度依存的生物発光反応が観察されたことを示している。この実験は、LgBit及び基質を含有する固体フォーマットを作製した後、潜在的な目的分析物（例えば、ジペプチド）を含有する水性媒体で再構成できることを明らかにしている。

【0380】

実施例14

基質及びLgTrip 3546またはLgBit凍結乾燥

図39は、標準的な96ウェル組織培養処理プレート(Costar 3917)に直接調製したライオケーキから、LgBitまたはLgTrip 3546、及び基質をジペプチドにより再構成したものから得られた生物発光シグナルを示す。ライオケーキをプレートで調製するために、5 mM ATT及び5 mM アスコルビン酸を含有する水中の2.5 %w/v プルランを調製した(溶液1、pH 6.5)。次いで、溶液1をプレートの各ウェルに45 μ lの容量で分注した。次いで、2.6 μ lの95 μ M LgTrip 3546タンパク質を各バイアルに添加し、ピペッティングして混合し、条件1を形成した(LgTrip 3546単独)。更に、5 μ lの20 μ M LgBitタンパク質を各バイアルに添加し、ピペッティングして混合し、条件2を形成した(LgBit単独)。次いで、ビヒクル対照として、5 μ lのエタノールを条件1及び2の各ウェルに添加した。

【0381】

条件3 (LgTrip 3546/基質) 及び4 (LgBit/基質) を上に記載されるとおりに調製した: 5 mM ATT及び5 mM アスコルビン酸を含有する水中の2.5 %w/v プルランを調製した(溶液1、pH 6.5)。次いで、溶液1をプレートの各ウェルに45 μ lの容量で分注した。約2.6 μ lの95 μ M LgTrip 3546タンパク質または5 μ lの20 μ M LgBitタンパク質を各バイアルに添加し、ピペッティングして混合した。次いで、およそ5 μ lのエタノール中の10 mMのフリマジン各ウェルに添加し、条件3及び4をそれぞれ形成した。次いで、プレートをドライアイスの入ったクーラー内に置き、1時間凍結させ、続いて、一晩かけて凍結乾燥させて。

【0382】

発光を測定するために、試験時に、1.2 mMのジペプチドストック水溶液をPBS (pH 7.0) で 1×10^{-9} Mまで連続希釈した(図39)。次いで、新しいNanoGlo (登録商標) 基質をこのストックに添加し、最終濃度10 μ Mの基質とした。この溶液の100 μ lを条件1 (LgTrip 3546) 及び2 (LgBit) を含むウェルに添加した。条件3 (LgTrip 3546/基質) 及び4 (LgBit/基質) は、PBS中の100 μ lの 1×10^{-9} Mジペプチドのみを添加した。試験後、プレートをスズ箔で包み、周囲温度でベンチに置いた。

【0383】

このデータは、LgBitまたはLgTrip 3546のいずれか及び基質を含有するライオケーキを96ウェルプレート内で直接調製し、目的の分析物(ジペプチド)の存在下で再構成することができ、安定したロバストなシグナルを得られることを示している。

【0384】

実施例15

ペーパーベースオールインワン分析物検出システム

NanoBit (図40A~40B) 及びNanoTrip (図41A) の相補性システムを含有するペーパーベース検出プラットフォームの有効性を試験するために、実験を実施した。Whatman 903スポットペーパーから直径1/8インチの円をパンチ

10

20

30

40

50

することでペーパースポットを作製した。これらのスポットを、5 %w/v BSA、5 mM ATT、5 mM アスコルビン酸、40 nM LgBiT-プロテインG融合体、及び20 nM SmBiT-TNF α を水中に含有する5 μ lのマスターミックス溶液 (pH 6.5) で処理した。スポットを35℃で1時間乾燥させた。200 μ Mのフリマジン溶液をエタノールで調製し、この溶液の5 μ lを各スポットに添加した。スポットを35℃で更に30～60分間乾燥させた。試験時に、96ウェルNBSプレート (Costar 3917) の個々のウェルにスポットを置き、0 nM (ブランク)、1 nM、または100 nM レミケードのいずれかを含有するOpti-MEMアッセイ緩衝液で再構成した。

【0385】

図40A～40Bは、NanoBiT構成成分を使用したアッセイ結果を含む。1 nMのレミケードを含有するアッセイ緩衝液にスポットを曝露する条件では、レミケードを含有しないブランク条件／対照と比較して、全体的な発光出力が増加した。レミケードの濃度が100 nMに増加すると、シグナルの増加が観察される。図40Bに示されるように、レミケードは、opti-MEMアッセイ緩衝液で100 nM、10 nM、1 nM、及び0.1 nMの濃度に調製された。試験時に、レミケードを含有する各溶液100 μ lを、スポットを含有する96ウェルプレートのウェルに添加し、RLU出力を測定した。

【0386】

図41Aに示されるように、NanoTrip構成成分を使用した、同様の実験を実施した。Whatman 903スポットペーパーから直径1/8インチの円をパンチすることでスポットを作製した。各スポットを、5 %w/v BSA、5 mM ATT、5 mM アスコルビン酸、20 μ M LgTrip 3546、100 nM TNF α -15gs-VSHiBiT、SmTrip9 Pep521-15gs-プロテインGを水中に含有する5 μ lのマスターミックス溶液 (pH 6.5) で処理した。スポットを35℃で1時間乾燥させた。200 μ Mのフリマジン溶液をエタノールで調製し、この溶液の5 μ lを各スポットに添加した。スポットを35℃で更に30分間乾燥させた。試験時に、96ウェルNBSプレート (Costar 3917) の個々のウェルにスポットを置き、0 nM (ブランク)、1 nM、または100 nM レミケードのいずれかを含有するopti-MEMアッセイ緩衝液で再構成した。結果を図41Aに示す。

【0387】

これらの実験は、NanoBiT及びNanoTripの両方の相補性システムを使用して、目的の分析物を検出するためのオールインワンペーパーベース生物発光アッセイプラットフォームを構築することが可能であることを示している。加えて、これらの実験は、全体の発光出力の変化に基づいて、サンプルマトリックス中に存在する分析物の量を定量することが可能であることも示している。目的の分析物 (すなわち、レミケード) の濃度を増加させると、生物発光シグナルも比例して増加した (分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルは、分析物の濃度に比例する)。

【0388】

実施例 16

ライオケーキベースオールインワン分析物検出システム

NanoBiT (図40C) 及びNanoTrip (図41B～41C) 相補性システムを含有するライオケーキベース検出プラットフォームの有効性を試験するための実験も実施した。

【0389】

図40Cに示されるように、生物発光複合体の構成成分を乾燥させた場合の安定性条件を試験した。約45 μ lのマスターミックス溶液を1.5 mLのプラスチックナップキャップバイアルに添加した。マスターミックスは、5 %w/v プルラン、5 mM ATT、5 mM アスコルビン酸、40 nM LgBiT-プロテインG融合体、及び20 nM SmBiT-TNF α を含んだ (pH 6.5)。約5～10 μ lのエタノール中のフリマジン基質を各バイアルに添加し、混合し、ドライアイスに約1時間置いた。次いで、凍結

10

20

30

40

50

したサンプルを一晩かけて凍結乾燥させて、ライオケーキを形成した。試験時に、100 nM及び10 nMのレミケード溶液をOpti-MEMアッセイ緩衝液で調製した。これらの溶液の約100 µlをNanoBiotケーキを含有するバイアルに添加し、ピペティングして混合し、次いで、Costar 3600 96-ウェルプレートに移した。分析物のレミケードを含まないブランク対照を調製した。図40Cの結果は、基質を含む生物発光複合体の全ての構成成分を凍結させ、ライオケーキの形態で保存し、その後、目的の分析物に曝露した場合でも、分析物の濃度を増加させると、シグナルも比例して増加することを示している。

【0390】

図41B～41Cにおいて、生物発光複合体の構成成分を乾燥させた場合の安定性条件を試験した。約45 µlのマスターミックス溶液を1.5 mLのプラスチックスナップキャップバイアルに添加した。マスターミックスは、5% w/v プルラン、5 mM ATT、5 mM アスコルビン酸、9 µM LgTrip 3546、225 nM SmTrip 9-プロテインG、及び45 nM SmBiot-TNFαを含んだ(pH 6.5)。約5～10 µlのエタノール中のフリマジン基質を各バイアルに添加し、混合し、ドライアイスに約1時間置いた。次いで、凍結したサンプルを一晩かけて凍結乾燥させて、ライオケーキを形成した。試験時に、100 nM、10 nM及び1 nMのレミケード溶液をOpti-MEMアッセイ緩衝液で調製した。これらの溶液の約100 µlをNanoTripケーキを含有するバイアルに添加し、ピペティングして混合し、次いで、Costar 3600 96-ウェルプレートに移した。分析物のレミケードを含まないブランク対照を調製した。図41B～41Cの結果は、基質を含む生物発光複合体の全ての構成成分を凍結させ、ライオケーキの形態で保存し、その後、目的の分析物に曝露した場合でも、分析物の濃度を増加させると、シグナルも比例して増加することを示している。

【0391】

1 nMのレミケードを含有するアッセイ緩衝液にスポットを曝露する条件では、レミケードを含有しないブランク条件と比較して、全体的な発光出力が増加した。レミケードの濃度が100 nMに増加すると、シグナルの増加が観察された。これらの実験は、NanoBiot及びNanoTripの両方の相補性システムを使用して、目的の分析物を検出するためのオールインワンライオケーキベース生物発光ベースアッセイプラットフォームを構築することが可能であることを示している。加えて、これらの実験は、全体の発光出力の変化に基づいて、サンプルマトリックス中に存在する分析物の量を定量することが可能であることも示している。目的の分析物（すなわち、レミケード）の濃度を増加させると、生物発光シグナルも比例して増加した（分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルは、分析物の濃度に比例する）。

【0392】

実施例17

分析物を検出するための基質と生物発光複合体を分けたメッシュベースシステム

本明細書で提供される生物発光複合体のペプチド及びポリペプチド構成成分を、基質を含まないフォーマットで作製した場合に、生物発光シグナルの生成に必要な条件を調べるために、実験を実施した。例えば、一実施形態において、ある量の溶液（例えば、目的の分析物を含有する）を、発光基質が付着した（「ケーキされた」）メッシュまたはマトリックスに添加する。溶液を添加すると、メッシュ上で基質が再構成されることになり、その後、この溶液が、乾燥された本開示の生物発光複合体のペプチド及びポリペプチドを含有するペーパーの表面と相互作用することにより、生物発光シグナルが生成される（図42A）。メッシュフォーマットは、生物発光シグナルを検出する能力を妨げるものではなく、検出されるあらゆる生物発光は、ペーパーの表面からのものであり、実験中に形成された任意の液相からのものではない。

【0393】

図42Aに示されるように、このフォーマットを使用して生物発光を検出することができる。Whatman 903ペーパースポットを、ナイロンメッシュと同様に直径約0

．25インチを有するように作製した。生物発光ペプチド／ポリペプチド構成成分を含有するペーパースポットを作製するために使用したマスターミックスは、5%w/v BSA、5mM ATT、5mM アスコルビン酸、10μM NanoLucを含んだ(pH 6.5)。約10～20μlのマスターミックスをスポットに添加し、次いで、約35℃で約1時間乾燥させた。基質を含有するメッシュを生成するために、約0.75%のプルラン水溶液を調製した。この溶液の約450μlをプラスチックスナップキャップバイアルに添加した。約50μlのEtOH中の10mMのフリマジンをバイアルに添加し、ピペッティングして混合した。この溶液の約25μlをメッシュスポットの上に添加した。次いで、メッシュスポットをドライアイスで凍結させ、一晩かけて凍結乾燥した。試験時に、ライオケーキ基質を含有するメッシュを、NanoLuc（登録商標）タンパク質を含有するスポットの上に置いた。次いで、完全な系を96ウェルのcostar 3600プレートのウェルに添加した。次いで、約10μlのPBSをメッシュの上に添加して材料を再構成し、プレートのRLU発光出力を読み取った。

【0394】

LgTrip 3546生物発光構成成分をメッシュベースフォーマットで使用する実験も実施した。生物発光ペプチド／ポリペプチド構成成分を含有するペーパースポットを作製するために使用したマスターミックスは、5%w/v BSA、5mM ATT、5mM アスコルビン酸、100nM LgTrip 3546を含んだ(pH 6.5)。約10～20μlのマスターミックスをスポットに添加し、次いで、約35℃で約1時間乾燥させた。基質を含有するメッシュを生成するために、約0.75%のプルラン水溶液を調製した。この溶液の約450μlをプラスチックスナップキャップバイアルに添加した。約50μlのEtOH中の10mMのフリマジンをバイアルに添加し、ピペッティングして混合した。この溶液の約25μlをメッシュスポットの上に添加した。次いで、メッシュスポットをドライアイスで凍結させ、一晩かけて凍結乾燥した。試験時に、100nM～0.1nMの範囲のジペプチドをPBSで調製した。スポットをウェルに置き、基質を含有するスクリーンをスポットの表面上に置いた。各濃度のペプチドを含有する約10μlの溶液をスクリーンの表面に添加し、RLUを記録した(図42B～42C)。ブランク対照は、いかなるジペプチドも含有しなかった。

【0395】

LgTrip 3546生物発光構成成分をメッシュベースフォーマットで使用し、プルランの膜を形成することによる実験も実施した。生物発光ペプチド／ポリペプチド構成成分を含有するペーパースポットを作製するために使用したマスターミックスは、5%w/v BSA、5mM ATT、5mM アスコルビン酸、100nM LgTrip 3546を含んだ(pH 6.5)。約10～20μlのマスターミックスをスポットに添加し、次いで、約35℃で約1時間乾燥させた。基質を含有するメッシュを生成するために、約2.0%のプルラン水溶液を調製した。この溶液の約450μlをプラスチックスナップキャップバイアルに添加した。約50μlのEtOH中の10mMのフリマジンをバイアルに添加し、ピペッティングして混合した。この溶液の約25μlをメッシュスポットの上に添加した。次いで、スポットを周辺条件下、暗所で一晩かけて乾燥させた。この方法により、メッシュの穴を埋めるプルランの膜が形成された。試験時に、100nM～0.1nMの範囲のジペプチドをPBSで調製した。スポットをウェルに置き、基質を含有するスクリーンをスポットの表面上に置いた。各濃度のペプチドを含有する約10μlの溶液をスクリーンの表面に添加し、RLUを記録した(図42D～42E)。ブランク対照は、いかなるジペプチドも含有しなかった。

【0396】

これらの実験は、ペプチド／ポリペプチド構成成分と基質を分けたメッシュベースフォーマットで生物発光シグナルを検出することが実現可能であることを示している。加えて、このフォーマットの状況において、これらの実験は、目的の分析物(すなわち、ジペプチド)の濃度を増加させると、生物発光シグナルも比例して増加する(分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルは、分析物の濃度に比例する)ことを示している。

【0397】

実施例18

ケーキの外観、再構成したカイネティクス活性性能、及び加速熱安定性について、異なる配合の凍結乾燥基質を試験する。

フリマジン基質の保存に対する凍結乾燥の適用可能性を評価するために、フリマジンを含有する配合物を調製した。20Xストック配合物は、以下のとおりであった：

【0398】

条件1：エタノール中の100 μ M フリマジン、5mM アゾチオチミン、5mM アスכולビン酸、2.5%プルランw/v、ddH₂O (Millipore)；

【0399】

条件3：エタノール中の100 μ M フリマジン、5mM アゾチオチミン、5mM アスכולビン酸、2.5%プルランw/v、20mM HEPES緩衝液(pH8.0)、90mM グリシン、20mM ヒスチジン、25mg/mLのスクロース、0.01%ポリソルベート80；

【0400】

条件5：85%エタノール+15%グリコール中の40 μ M フリマジン、200mM MES緩衝液(pH6.0)、200mM ヒドロキシプロピルベータシクロデキストリン(m.w. 1396Da)、600mM アスכולビン酸ナトリウム、2.5%プルランw/v；及び

【0401】

条件7：エタノール中の20 μ M フリマジン、200mM MES緩衝液(pH6.0)、200mM ヒドロキシプロピルベータシクロデキストリン(m.w. 1396Da)、600mM アスכולビン酸ナトリウム、2.5%プルランw/v。

【0402】

20Xストック溶液の1mLのアリコートをして10mLアンバーガラスバイアルに分注し、ランナーstopperをバイアルに一部挿入した。4.7℃に予め冷却した棚を備える凍結乾燥機(Virtis Genesis 12EL凍結乾燥機)にバイアルをロードした。次いで、-50℃の保存温度で2時間の凍結ステップを生成物に行った後、凝縮ステップを開始した。実施中、凝縮器の温度は、-5℃~-87℃であった。次に、75mTorr及び200mTorrの圧力設定値で真空引きを行った。昇華は約7.5時間、脱着は約16.1時間続いた。凍結乾燥プロセスの最後に、バイアルに窒素を再充填し、約600Torrの圧力でstopperを完全に挿入して密封した。

【0403】

バイアルを25℃または60℃で保存し、凍結乾燥後の様々な時点で試験した。活性ベースアッセイでは、フリマジンケーキを10mLの0.01%BSA含有PBSで再構成した。バイアルを手で振盪し、室温で5分間平衡させた。同じBSA緩衝液で再構成した50 μ Lの1ng/mLの精製NANOLUC酵素(Promega)に、再構成した50 μ Lの基質を添加した(最終[NanoLuc]=0.5ng/mL)。使用した対照は、製造元のプロトコルに従ったNANOGLo Live Cell Substrate質(Promegaカタログ番号N205)またはNANOGLo基質(Promegaカタログ番号N113)であったが、キットで提供される希釈緩衝液(Promega)ではなく、0.01%BSA含有PBSに希釈した。アッセイを固体の白色ノンバインディングサーフェス(NBS)プレート(Costar)で実施し、GLOMAX Discover Multimode Microplate Reader(Promega)で分析し、実験に応じて、カイネティクスまたはエンドポイントの読み取りを使用して総発光を収集した。絶対[フリマジン]の分析では、再構成したサンプルをHPLCで分析し、波長245nmでの吸光スペクトルを得て、0日目からの残存絶対量をプロットした。

【0404】

これらの配合物から得られた凍結乾燥ケーキの外観を図43に示す。これは、試験した

10

20

30

40

50

4つの全ての条件でインタクトなケーキが作製されたことを示しているが、条件5及び7は、若干のひび割れが見られた。これらのバイアルに付属していたpHインジケーターでは、得られたケーキは、条件1で約2～3のpH値、条件3で約7.5のpH値、条件6及び7で約6のpH値を有していることが示された。再構成したフリマジンのシグナルカイネティクスは、精製NanoLucとともに試験した場合、-20℃で維持した標準的な有機保存緩衝液(N113及びN205)中のフリマジンと比較すると、配合された緩衝液及び凍結乾燥プロセス自体に起因して、観察可能な性能の低下はないことが示され、条件5及び7では半減期が改善した(図44)。

【0405】

加速熱安定性試験では、条件1で配合及び凍結乾燥されたフリマジンで3ヶ月間活性が失われないことが示された。これは、この高い温度で保存したときに約10日間で全ての活性を失った、有機溶媒中で保存したフリマジンとは全く対照的である(図45)。25℃及び60℃で保管した後に残っている絶対[フリマジン]に関するHPLC分析は、標準的な有機保存緩衝液中のフリマジンと比べて、配合及び凍結乾燥された基質には有意に高い純度のフリマジンが含有されており、活性の所見を裏付けるものであった(図46A及び46B)。配合された凍結乾燥フリマジンの液体安定性を決定するために、バイアルを水で再構成し、溶液中に12日間保持してから、0日目と比較して残存するフリマジンの総量について、HPLCによって分析した。条件5及び7の液体安定性が優れていることがわかった(図47)。

【0406】

実施例19

HaloTag-ペプチド融合体を使用してモノクローナル抗体ペアを化学的にコンジュゲートする、溶液ベースホモジニアスヒトインターロイキン6三成分イムノアッセイの開発

ホモジニアスNanoLuc三成分(NanoTrip)イムノアッセイの基本原則を図48に示す。まず、HaloTag(登録商標)技術を使用して、SmTrip9(配列番号13)またはHiBiT(配列番号11)に、IL-6上の非重複エピトープを標的とする抗体のペアを化学的にコンジュゲートさせる。標識抗体がIL-6分析物に結合すると、相補性サブユニットが接近し、それにより、LgTrip3546タンパク質(配列番号12)及びフリマジン基質の存在下で、明るイルシフェラーゼが再構成される。このアッセイは、標準的なプレート読み取りのルミノメーターによって生成される発光量が標的分析物の存在量に直接比例するため、定量的である。

【0407】

HaloTagのアミノ末端への2Xまたは3XのGly-Ser-Ser-Glyリンカーのいずれかで隔てられたSmTrip9バリエーション(SmTrip9 Pep521; 配列番号16)またはSmTrip10バリエーション(SmTrip10 Pep289またはVSHiBiT; 配列番号17)を含有する遺伝子融合体を、pFN29A His6HaloTag T7 Flexi Vector(Promega)を使用して実現した。HisTag-HaloTag融合タンパク質を発現するE.coliのグリセロールストックを使用して、50mLのスターター培養液に接種し、25ug/mLのカナマイシンを含有するLB培地中、37℃で一晩成長させた。スターター培養液を、25ug/mLのカナマイシン、0.12%グルコース、及び0.2%ラムノースを含有する500mLの新しいLB培地で1:100に希釈した。培養液を25℃で22~24時間成長させた。細胞を4℃で30分間遠心分離(10,000rpm)してペレット化し、50mLのPBS中に再懸濁した。1mLのプロテアーゼ阻害剤カクテル(Promega)、0.5mLのRQ1 DNase(Promega)、及び0.5mLの10mg/mLのリゾチーム(Sigma)を添加し、穏やかに攪拌しながら、細胞懸濁液を氷上で1時間インキュベートした。15%の出力で5秒間隔で1.5分間(合計3分間)超音波処理して細胞を溶解し、その後、4℃で30分間、10,000rpmで遠心分離した。上清を回収し、製造元の推奨プロトコルに従ってHisTagカラム(GE)を使用して、

タンパク質を精製した。タンパク質を500mM イミダゾールを使用して溶出し、PBSで透析し、SDS-PAGEゲルを使用して特性評価すると、95%を超える純度であった。タンパク質を50%グリセロール中-20℃で保存した。

【0408】

Halotag-ペプチド融合タンパク質に抗体を化学的にコンジュゲートするために、Zebaスピン脱塩カラム(ThermoFisher)を使用して、抗体を10mM炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH8.5)に2回緩衝液交換した。次いで、抗体を、22℃で1000rpmで振盪しながら、200μM アミン反応性Halotagスクシンイミジルエステル(04)リガンド(Promega)とともに2時間プライミングした。未反応のリガンドを、PBS緩衝液中でZebaスピнкаラムに2回通すことによって除去した。次いで、30μMのHalotag融合タンパク質を用いて、4℃で振盪しながら、抗体を共有結合で一晩標識した。Halolink Resin(Promega)を使用して、過剰の未反応Halotag融合タンパク質を除去した。非変性SDS-PAGEゲルを使用して、コンジュゲート抗体を特性評価した。ヒトIL-6イムノアッセイで使用したマウス抗ヒトIL-6モノクローナル抗体は、クローン5IL6(Thermoカタログ番号M620)及びクローン505E 9A12 A3(Thermoカタログ番号AHC0662)であった。標識抗体についてSDS-PAGEゲルを実施すると、各抗体が可変数のペプチド-Halotag融合タンパク質で標識され、一次種は3~5個のペプチド標識を含有することが判明した(図49)。

【0409】

図50に示されるように、完全な相補性システムの最大発光出力及びシグナル持続時間を確立するために、結合カインेटクス試験を実施した。シグナルカインेटクスを次の条件間で比較した：(1)ペプチド標識抗体及びLgTrip 3546(配列番号12)をrhIL-6で90分間前もって平衡させ、時間0でフリマジンを添加；(2)ペプチド標識抗体をrhIL-6で90分間前もって平衡させ、時間0でLgTrip 3546及びフリマジンを添加；ならびに(3)全てのアッセイ試薬を時間0でrhIL-6に添加。条件2は、ペプチド標識抗体：rhIL-6複合体に対するLgTrip 3546(配列番号12)の結合カインेटクスを追跡する。条件3は、分析物に対する抗体の結合カインेटクス及びペプチドに対するLgTrip 3546結合カインेटクスを追跡する。図50Aは、未処理のRLUを示し、図50Bは、5ng/mlのrhIL-6の存在下で生成されたRLU値を、rhIL-6の不在下で生成されたバックグラウンドシグナルで割ることによって算出した倍率反応を示す。使用したアッセイ緩衝液は、0.01%BSAを含むPBS(pH7.0)であり、アッセイ試薬濃度は、各ペプチド標識抗体、1μM LgTrip 3546(配列番号12)タンパク質、及びフリマジンについて、7ng/mlであった。図51は、0.01%BSAを含むPBS(pH7.0)からなる標準的なアッセイ緩衝液で実施した溶液ベースホモジニアスIL-6イムノアッセイの用量反応曲線を示す。このアッセイは、検出限界(LOD)が2.1pg/mlと非常に高い感度であることが示され、その結果、3~4桁を超える広いダイナミックレンジが得られ、線形範囲全体で、低い変動性(CV<10%)が維持された。これらの実験では、7ng/mlの各ペプチド標識抗体及び1μMのLgTrip 3546(配列番号12)タンパク質を、rhIL-6の存在下で90分間インキュベートした。フリマジンを添加し、発光シグナルを分析した。

【0410】

実施例20

バイアルにおける凍結乾燥単一試薬三成分イムノアッセイ

単一バイアル内でIL-6三成分イムノアッセイ全体を保存することに対する凍結乾燥の適用可能性を評価するために、ペプチド標識抗体(SmTrip9 Pep521(配列番号16)及びSmTrip10 Pep289(配列番号17))、LgTrip 3546(配列番号12)、及びフリマジンを含む配合物を調製した。20Xストック配合物は、以下のとおりである：

【0411】

配合物A：20mM HEPES緩衝液（pH8.0）、90mM グリシン、20mM ヒスチジン、25mg/mlのスクロース、0.01%ポリソルベート80、0.6ug/mlのHaloTag-SmTrip9 Pep521（配列番号16）で標識したクローン5IL6抗体、1.2ug/mlのHaloTag-SmTrip10 Pep289（配列番号17）で標識した505E A12 A3抗体、及び20μM LgTrip3546（配列番号17）。

【0412】

配合物B：20mM HEPES緩衝液（pH8.0）、90mM グリシン、20mM ヒスチジン、25mg/mlのスクロース、0.01%ポリソルベート80、0.6ug/mlのHaloTag-SmTrip9 Pep521（配列番号16）で標識したクローン5IL6抗体、1.2ug/mlのHaloTag-SmTrip10 Pep289（配列番号17）で標識した505E A12 A3抗体20μM LgTrip3546（配列番号12）、及びエタノール中100μMフリマジン。

10

【0413】

配合物C：5mM アゾチオチミン、5mM アスコルビン酸、2.5%プルランw/v、20mM HEPES緩衝液（pH8.0）、90mM グリシン、20mM ヒスチジン、25mg/mlのスクロース、0.01%ポリソルベート80、0.6ug/mlのHaloTag-SmTrip9 Pep521（配列番号16）で標識したクローン5IL6抗体、1.2ug/mlのHaloTag-SmTrip10 Pep289（配列番号17）で標識した505E A12 A3抗体、20μM LgTrip3546（配列番号12）、及びエタノール中の100μM フリマジン。

20

【0414】

20Xストック溶液の1mLのアリコートをして10mLアンバーガラスバイアルに分注し、ランナーstopperをバイアルに一部挿入した。4.7℃に予め冷却した棚を備える凍結乾燥機（Virtis Genesis 12EL凍結乾燥機）にバイアルをロードした。次いで、-50℃の保存温度で2時間の凍結ステップを生成物に行った後、凝縮ステップを開始した。実施中、凝縮器の温度は、-5℃~-87℃であった。次に、75mTorr及び200mTorrの圧力設定値で真空引きを行った。昇華は約7.5時間、脱着は約16.1時間続いた。凍結乾燥プロセスの最後に、バイアルに窒素を再充填し、約600Torrの圧力でstopperを完全に挿入して密封した。

30

【0415】

図52Aは、配合物A及びBを使用して得られた、単一試薬IL-6 NanoTrip（三成分NanoLuc）イムノアッセイのための凍結乾燥生成物を示す。

【0416】

バイアルを25℃で保存し、凍結乾燥後の様々な時点で試験した。活性ベースアッセイでは、単一試薬ケーキを10mLの0.01%BSA含有PBSで再構成した。バイアルを手で振盪し、室温で5分間平衡させた。同じBSA緩衝液で再構成した50μLの組み換えヒトIL-6（ソース）に、再構成した50μLの基質を添加した。配合物Aは、フリマジンの添加を必要とし、NANOGLo Live Cell Substrate（Promega N205）を使用した。アッセイを固体の白色ノンバインディングサーフェス（NBS）プレート（Costar）で実施し、GLOMAX Discover Multimode Microplate Reader（Promega）で分析し、実験に応じて、カインेटクスまたはエンドポイントの読み取りを使用して総発光を収集した。図52Bは、周囲温度での2週間にわたる配合物Aのシグナル/バックグラウンドアッセイ性能を示す。これは、この配合物が保存安定性であり、試験した時間にわたって優れた用量反応曲線を示すことを示している。しかしながら、フリマジンを添加した場合（すなわち、配合物B）は、保存安定性の低下が観察される（図52C）。

40

【0417】

図53Aは、配合物Cを使用して得られた、単一試薬IL-6 NanoTrip（三

50

成分 NanoLuc) イムノアッセイのための凍結乾燥生成物を示す。この配合は、断片化することなく、ガラス側面から無傷で移動可能な非常に望ましいケーキをもたらす。図 53B は、周囲温度で 3 ヶ月間の保存期間にわたる配合物 C のシグナル/バックグラウンドアッセイ性能を示す。これは、この配合物が保存安定性であり、試験した時間にわたって変化しない、優れた用量反応曲線を示すことを示している。図 54 は、0.01% BSA 含有 PBS で再構成した後の凍結乾燥配合物 C IL-6 用量反応のカイネティクスプロファイルを示す。

【0418】

凍結乾燥アッセイと複雑なヒトマトリックスとの適合性を決定するために、配合物 C で作製された凍結乾燥ケーキを 0.01% BSA 含有 PBS (pH 7.0) で再構成した。50 μ l を、20% 正常プールヒト血清、クエン酸で採取した血漿、または尿中の 50 μ l の rhIL-6 を含有する 96 ウェルマイクロタイタープレートのウェルに添加した。全ての実験において、プレートは、室温で 90 分間インキュベートした。全ての実験におけるアッセイ試薬の最終濃度は、SmTrip10 標識抗体が 60 ng/ml、SmTrip9 標識抗体が 30 ng/ml、LgTrip3546 が 1 μ M、フリマジンが 5 μ M であった。発光を分析した。図 55 は、これらの実験からのシグナル/バックグラウンドの結果を示し、配合物 C で作製された単一試薬 IL-6 NanoTrip イムノアッセイと複雑なサンプルマトリックスとの適合性を示している。

【0419】

実施例 21

予め充填した 96 ウェルマイクロタイタープレートにおける凍結乾燥単一試薬三成分イムノアッセイ

96 ウェルマイクロタイタープレートに IL-6 NanoTrip (三成分 NanoLuc) イムノアッセイ全体を直接保存することに対する凍結乾燥の適用可能性を評価するために、5 mM アゾチオチミン、5 mM アスコルビン酸、2.5% プルラン w/v、20 mM HEPES 緩衝液 (pH 8.0)、90 mM グリシン、20 mM ヒスチジン、25 mg/ml のスクロース、0.01% ポリソルベート 80、0.12 μ g/ml の HaloTag-SmTrip9 Pep521 (配列番号 16) で標識したクローン 5 IL6 抗体、0.24 μ g/ml の HaloTag-SmTrip10 Pep289 (配列番号 17) で標識した 505E A12 A3 抗体、4 μ M LgTrip3546 (配列番号 12)、及びエタノール中の 100 μ M フリマジンを含む配合物 (先の実施例の配合物 C と同じだが、バイアルで使用した 20x ストック試薬ではなく、4x 試薬を添加したもの) を使用した。

【0420】

4x ストック溶液のおよそ 25 μ l のアリコート を 96 ウェルマイクロタイタープレートに分注した。2 つのタイプのプレートを使用した: ノンバイディングサーフェス (Costar 3600) 及び無処理表面 (Costar 3912)。4.7°C に予め冷却した棚を備える凍結乾燥機 (Virtis Genesis 12EL 凍結乾燥機) にプレートをロードした。次いで、-50°C の保存温度で 2 時間の凍結ステップを生成物に行った後、凝縮ステップを開始した。実施中、凝縮器の温度は、-5°C ~ -87°C であった。次に、75 mTorr 及び 200 mTorr の圧力設定値で真空引きを行った。昇華は約 7.5 時間、脱着は約 16.1 時間続いた。凍結乾燥プロセスの最後に、プレートに窒素を再充填し、接着プレートカバーで密封した。

【0421】

図 56A は、ウェルの底に凍結乾燥材料を備えるプレートの 1 つを示す。凍結乾燥ケーキは、インタクトなケーキのまま留まったが、ノンバイディングサーフェスプレートを使用する場合、移動可能となった。無処理プレートでは、凍結乾燥材料はウェルの底に「詰まった」ままとなった。図 56B は、1x rhIL-6 をウェルに直接添加し、GLOMAX ルミノメーターを使用して発光を分析したときに得られた生物発光を示す。得られた用量反応曲線は、両方のプレートで優れた再構成及び性能を示した。

【0422】

実施例22

溶液ベースホモジニアスIL-6三成分イムノアッセイを使用した、配合物中の個々の賦形剤の影響試験

単一試薬NanoTrip（三成分NanoLuc）イムノアッセイの凍結乾燥配合物に使用した個々の賦形剤のアッセイ性能への影響を決定するために、溶液ベースアッセイにおけるIL-6モデルシステムを使用し、様々な賦形剤の影響を分析した。図57Aは、0.01%BSAを含むPBS（pH7.0）からなる標準的なアッセイ緩衝液で、X軸に示される様々な個々の賦形剤を添加して実施した溶液ベースホモジニアスIL-6イムノアッセイのアッセイバックグラウンドシグナルを示す。図57Bは、実施例20の配合物C及び配合物Cの改変バージョンからなる、異なる緩衝液でアッセイを実施した場合のIL-6用量反応曲線を示す。これらの実験では、30ng/mlのHaloTag-SmTrip9 Pep521（配列番号16）で標識した5IL6抗体、60ng/mlのHaloTag-SmTrip10 Pep289（配列番号17）で標識した505E A12 A3抗体、及び1μM LgTrip3546（配列番号12）を、rhIL-6の存在下で90分間インキュベートした。フリマジン（Promega Live Cell Substrate N205）を製造元の説明書に従って添加したが、緩衝液には、示される配合物を使用した。発光シグナルは、GLOMAXルミノメーターを使用して分析した。これらの実験は、NanoTripイムノアッセイに適切な緩衝液構成成分を決定するには、反復実験が必要であることを示した。

【0423】

実施例23

標的分析物がヒト心筋トロポニンIの場合のバイアルにおける溶液ベースの凍結乾燥単一試薬三成分イムノアッセイの創出

ホモジニアスNanoTrip（NanoLuc三成分）心筋トロポニンIイムノアッセイの基本原理を図58に示す。まず、HaloTag（登録商標）技術を使用して、SmTrip9（またはそのバリエーション）またはHiBiT（またはそのバリエーション）に、ヒト心筋トロポニンI上の非重複エピトープを標的とする抗体のペアを化学的にコンジュゲートさせた。標識抗体が心筋トロポニンI分析物に結合すると、相補性サブユニットが接近し、それにより、LgTrip3546タンパク質及びフリマジン基質の存在下で、明るいルシフェラーゼが再構成される。このアッセイは、標準的なプレート読み取りのルミノメーターによって生成される発光量が標的分析物の存在量に直接比例するため、定量的である。

【0424】

HaloTagのアミノ末端への2Xまたは3XのGly-Ser-Ser-Glyリンカーのいずれかで隔てられたSmTrip9 Pep521（配列番号16）またはSmTrip10 Pep289（配列番号17）を含有する遺伝子融合体を、pFN29A HIS6HaloTag T7 Flexi Vector（Promega）を使用して実現した。HisTag-HaloTag融合タンパク質を発現するE.coliのグリセロールストックを使用して、50mLのスターター培養液に接種し、25ug/mlのカナマイシンを含有するLB培地中、37℃で一晩成長させた。スターター培養液を、25ug/mlのカナマイシン、0.12%グルコース、及び0.2%ラムノースを含有する500mLの新しいLB培地に1:100で希釈した。培養液を25℃で22~24時間成長させた。細胞を4℃で30分間遠心分離（10,000rpm）してペレット化し、50mLのPBS中に再懸濁した。1mLのプロテアーゼ阻害剤カクテル（Promega）、0.5mLのRQ1 DNase（Promega）、及び0.5mLの10mg/mlのリゾチーム（Sigma）を添加し、穏やかに攪拌しながら、細胞懸濁液を氷上で1時間インキュベートした。15%の出力で5秒間隔で1.5分間（合計3分間）超音波処理して細胞を溶解し、その後、4℃で30分間、10,000rpmで遠心分離した。上清を回収し、製造元の推奨プロトコルに従ってHisTagカラム（GE）を使用

して、タンパク質を精製した。タンパク質を500mM イミダゾールを使用して溶出し、PBSで透析し、SDS-PAGEゲルを使用して特性評価すると、95%を超える純度であった。タンパク質を50%グリセロール中-20℃で保存した。

【0425】

HaloTag-ペプチド融合タンパク質に抗体を化学的にコンジュゲートするために、Zebaスピン脱塩カラム(ThermoFisher)を使用して、抗体を10mM炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH8.5)に2回緩衝液交換した。次いで、抗体を、22℃で1000rpmで振盪しながら、200μM アミン反応性HaloTagスクシンイミジルエステル(04)リガンド(Promega)とともに2時間プライミングした。未反応のリガンドを、PBS緩衝液中でZebaスピнкаラムに2回通すことによって除去した。次いで、30μMのHaloTag融合タンパク質を用いて、4℃で振盪しながら、抗体を共有結合で一晩標識した。HaloLink Resin(Promega)を使用して、過剰の未反応HaloTag融合タンパク質を除去した。非変性SDS-PAGEゲルを使用して、コンジュゲート抗体を特性評価した。ヒト心筋トロポニンIイムノアッセイに使用した抗ヒト心筋トロポニンIモノクローナル抗体は、組み換えウサギクローン1H11L19(Invitrogen)及びモノクローナルマウス抗体クローン16A11(Invitrogen)であった。

【0426】

図59A(未処理のRLU)及び59B(シグナル/バックグラウンド)は、0.01%BSAを含むPBS(pH7.0)からなる標準的なアッセイ緩衝液で実施した溶液ベースホモジニアス心筋トロポニンIイムノアッセイの用量反応曲線を示す。精製した組み換えヒト心筋トロポニンI(Fitzgerald)を使用して、用量反応曲線を生成した。これらの実験では、2ng/mlのHaloTag-24gly/ser-SmTrip9 Pep521(配列番号16)で標識したクローン1H11L19、40ng/mlのHaloTag-8gly/ser-SmallTrip10 Pep289(配列番号17)で標識したクローン16A11、及び1μM LgTrip3546(配列番号12)タンパク質を、組み換えヒト心筋トロポニンIの存在下で90分間インキュベートした。フリマジン(Promega Live Cell Substrate N205)を製造元の説明書に従って添加したが、緩衝液には、0.01%BSAを含むPBSを使用した。発光シグナルは、GLOMAXルミノメーターで分析した。

【0427】

単一バイアル内で心筋トロポニンI三成分イムノアッセイ全体を保存することに対する凍結乾燥の適用可能性を評価するために、ペプチド標識抗体(SmTrip9 Pep521(配列番号16)及びSmTrip10 Pep289(配列番号17))、LgTrip3546(配列番号12)、及びフリマジンを含む配合物を調製した。20Xストック配合物は、以下のとおりである：

【0428】

おおよそで、5mM アゾチオチミン、5mM アスコルビン酸、2.5%プルランw/v、20mM HEPES緩衝液(pH8.0)、90mM グリシン、20mM ヒスチジン、25mg/mlのスクロース、0.01%ポリソルベート80、0.08ug/mlのHaloTag-SmTrip9 Pep521(配列番号16)で標識したクローン1H11L19抗体、1.6ug/mlのHaloTag-SmTrip10 Pep289(配列番号17)で標識したクローン16A11抗体、20μM LgTrip3546(配列番号12)、及び200μM フリマジン(Promega NANOGLO基質N113)。

【0429】

20Xストック溶液の1mLのアリコートに10mLアンバーガラスバイアルに分注し、ランナーストップパーをバイアルに一部挿入した。4.7℃に予め冷却した棚を備える凍結乾燥機(Virtis Genesis 12EL凍結乾燥機)にバイアルをロードした。次いで、-50℃の保存温度で2時間の凍結ステップを生成物に行った後、凝縮ステッ

ブを開始した。実施中、凝縮器の温度は、 -5°C ～ -87°C であった。次に、 75 mTorr 及び 200 mTorr の圧力設定値で真空引きを行った。昇華は約7.5時間、脱着は約16.1時間続いた。凍結乾燥プロセスの最後に、バイアルに窒素を再充填し、約 600 Torr の圧力でストッパーを完全に挿入して密封した。

【0430】

活性ベースアッセイでは、単一試薬ケーキを 10 mL の 0.01% BSA含有PBSで再構成した。バイアルを手で振盪し、室温で5分間平衡させた。同じBSA緩衝液またはGeneral Serum Diluent (Immunochemistry Technologies)で希釈した 20% ヒト血清で再構成した $50\mu\text{L}$ の組み換えヒト心筋トロポニンI (Fitzgerald)に、再構成した $50\mu\text{L}$ の単一試薬心筋トロポニンI NanoTrip (三成分NanoLuc)イムノアッセイを添加した。アッセイを固体の白色ノンバインディングサーフェス(NBS)プレート(Costar)で実施し、GLOMAX Discover Multimode Microplate Reader (Promega)で分析し、エンドポイントの読み取りを使用して総発光を収集した。図60は、単一試薬トロポニンNanoTripイムノアッセイを、 0.01% BSAを含むPBS緩衝液中のサンプルまたはGeneral Serum Diluent中で希釈したヒト血清の複雑なマトリックスサンプルの存在下で再構成した際に得られた生物発光に対する心筋トロポニンIの用量反応曲線を示す。トロポニンは、血清中であっても、このイムノアッセイを使用して、効果的に検出された。

【0431】

実施例24

複雑なサンプルマトリックスが三成分イムノアッセイ性能に及ぼす影響に関する調査及び軽減

溶液ベースホモジニアスIL-6 NanoTrip (三成分NanoLuc)イムノアッセイを試験して、このアッセイが臨床バイオマーカーとして一般的に分析されるヒトサンプルの種類と適合するかどうかを決定し、アッセイの性能に影響し得るサンプルの因子及びこれらの影響を軽減する可能性のある解決策を調査した。これは、サンプル中に存在する物質の影響により、結果の正確な値が変更されることと定義される、イムノアッセイにおけるサンプルマトリックス干渉効果が、特にホモジニアスフォーマットでは洗浄ステップをなくすことに起因して一般的な現象であるため、非常に重要である。

【0432】

以下の実験で使用した試薬は、実施例19に記載されるHaloTag-ペプチド標識抗体、 30 ng/mL のHaloTag-SmTrip9 Pep521 (配列番号16)で標識したクローン5IL6抗体、 60 ng/mL のHaloTag-SmTrip10 Pep289 (配列番号17)で標識した505E A12 A3抗体、 $1\mu\text{M}$ Lg Trip 3546 (配列番号12)、及びNANOGLO Live Cell Substrate (Promega N205)またはNANOGLO基質 (Promega N113)であり、製造元の説明書に従って使用したが、当該実験の所定の緩衝液で希釈した。アッセイは、 $+/-50\text{ ng/mL}$ の組み換えヒトIL-6 (R&Dシステム)をアッセイバックグラウンドで実施し、Bmaxを分析した。アッセイは、ベンチで90分間インキュベートし、その後、基質を添加した。アッセイを固体の白色ノンバインディングサーフェス(NBS)プレート(Costar)で実施し、GLOMAX Discover Multimode Microplate Reader (Promega)で分析し、エンドポイントの読み取りを使用して総発光量を収集した。

【0433】

図61は、漸増する正常プールヒト血清の存在下で、(A) 0.01% BSAを含むPBS (pH7.0)アッセイ緩衝液または(B)General Serum Diluent (Immunochemistry Technologies)中で、NANOGLO Live Cell Substrate (Promega N205)を使用してアッセイを実施した場合における、溶液ベースホモジニアスIL-6 NanoTrip

(三成分NanoLuc) アッセイのバックグラウンドを示す。General Serum Diluentは、非特異的なIgG効果を軽減し、アッセイバックグラウンドを減少させる肯定的な効果があった。図62は、50 ng/mlのrhIL-6及び漸増するヒト血清の存在下で、(A) 0.01% BSAを含むPBS (pH 7.0) アッセイ緩衝液または(B) General Serum Diluent中で、NANOGLo Live Cell Substrate (Promega N205) を使用してアッセイを実施した場合における、生物発光反応を示す。General Serum Diluentは、全体的にわずかに低いBmaxを示したが、ヒト血清の増加に伴うシグナルの消失はそれほどでもなかった。図63A~Dは、0.01% BSAを含むPBS (pH 7.0) またはGeneral Serum Diluentと、NANOGLo Live Cell Substrate (Promega N205) またはNANOGLo基質 (Promega N113) を使用し、正常プールヒト血清または血漿の量を増加させて試験するようにrhIL-6スクリーニングアッセイを実施した場合における結果の倍率反応を示す。全体として、General Serum DiluentをNANOGLo Live Cell Substrate (Promega N205) と組み合わせて使用すると、これらの複雑なサンプルマトリックスで最善のアッセイ結果が得られた。

【0434】

次に、ヒト血清サンプル中の内因性IgGがアッセイ能力に及ぼす影響を決定した。溶液ベースホモジニアスIL-6 NanoTripアッセイ+/- 50 ng/ml rhIL-6をGeneral Serum Diluent中で使用して、正常プールヒト血清または内因性IgGを枯渇させた血清でアッセイを実施した場合における生物発光反応を分析した。図64は、この実験の倍率反応を示し、これは、内因性IgGが、イムノアッセイの性能に悪影響を及ぼす血清中の構成成分のうちの1つであることを示している。

【0435】

次に、以下を含有するVeriChemレファレンスプラスケミストリーキットを使用して、溶液ベースホモジニアスIL-6三成分イムノアッセイに対する血液生化学の影響を調査した。

10

20

30

40

50

分析物	単位	レベル A	レベル B	レベル C	レベル D	レベル E
グルコース	mg / d L	5	4 0	7 5	1 1 0	1 4 5
尿素窒素	mg / d L	1 . 0	7 . 5	1 4 . 0	2 0 . 5	2 7 . 0
クレアチニン	mg / d L	0 . 0 4	1 . 2 4	2 . 4 4	3 . 6 4	4 . 8 4
カルシウム	mg / d L	1 . 0	1 . 5	2 . 0	2 . 5	3 . 0
リン	mg / d L	0 . 2	0 . 7	1 . 2	1 . 7	2 . 2
マグネシウム	mg / d L	0 . 1 6	0 . 4 6	0 . 7 6	1 . 0 6	1 . 3 6
マグネシウム	mEq / L	0 . 1 3 2	0 . 3 8	0 . 6 3	0 . 8 7	1 . 1 2
トリグリセリド	mg / d L	2	4 9	2 4 0	1 4 3	1 9 0

【0436】

一般的な血清希釈液で希釈したレベルA～Eの存在下で、NANOGLO Live Cell Substrate (Promega N205) を使用して、IL-6 NanoTripアッセイを実施し、これらの血液化学成分の増加によるアッセイ性能への影響を決定した。図65Aは、未処理のRLUでのアッセイバックグラウンドを示し、図65Bは、50 ng/mlのrhIL-6の存在下でのBmaxシグナルを示し、図65Cは、バックグラウンド結果に対するシグナルを示す。結果は、これらの化学成分の増加が、アッセイバックグラウンドを増加させる効果があり、Bmaxの減少が、アッセイ性能の全体的なシグナル／バックグラウンドに影響を与えることを示している。

【0437】

溶液ベースホモジニアスIL-6 NanoTripイムノアッセイ性能に対する尿の影響を決定するために、General Serum Diluentで希釈した漸増する正常プールヒト尿及びNANOGLO基質 (Promega N113) またはNANO

GLO Live Cell Substrate (Promega N205) の存在下で、IL-6スクリーニングアッセイを実施した。図66Aは、未処理のRLUでのアッセイバックグラウンドを示し、図66Bは、50 ng/mlのrhIL-6の存在下でのBmaxシグナルを示し、図66Cは、バックグラウンド結果に対するシグナルを示す。結果は、IL-6 NanoTripイムノアッセイが、NANO GLO Live Cell Substrate (Promega N205) と組み合わせてGeneral Serum Diluentを使用した場合、ヒト尿と適合することを示している。

【0438】

実施例 25

単一バイアルにおける安定した凍結乾燥基質及びLgTripケーキ試薬の創出

フリマジンの保存に対する凍結乾燥の適用可能性を評価するために、LgTrip及びフリマジンを、三成分アプリケーションの一般的な検出試薬として使用されているLgTrip 3546と組み合わせ、単一バイアルで提供した。フリマジン、LgTrip 3546（配列番号12）、及びフリマジンとLgTrip 3546を含有する配合物を調製した。20Xストック配合物は、以下のとおりである：

【0439】

フリマジンのみの配合物：5mM アゾチオチミン、5mM アスコルビン酸、2.75%プルランw/v、エタノール中の200 µM フリマジン、及びddH₂O (millipore)

【0440】

LgTrip 3546のみの配合物：5mM アゾチオチミン、5mM アスコルビン酸、2.75%プルランw/v、20 µM LgTrip 3546（配列番号12）、及びddH₂O (Millipore)

【0441】

フリマジンとLgTrip 3546の配合物：5mM アゾチオチミン、5mM アスコルビン酸、2.75%プルランw/v、エタノール中の200 µM フリマジン、20 µM LgTrip 3546（配列番号12）及びddH₂O (Millipore)。

【0442】

20Xストック溶液の1mLのアリコートに10mLアンバーガラスバイアルに分注し、ランナーストッパーをバイアルに一部挿入した。4.7℃に予め冷却した棚を備える凍結乾燥機（Virtis Genesis 12EL凍結乾燥機）にバイアルをロードした。次いで、-50℃の保存温度で2時間の凍結ステップを生成物に行った後、凝縮ステップを開始した。実施中、凝縮器の温度は、-5℃~-87℃であった。次に、75mTorr及び200mTorrの圧力設定値で真空引きを行った。昇華は約7.5時間、脱着は約16.1時間続いた。凍結乾燥プロセスの最後に、バイアルに窒素を再充填し、約600Torrの圧力でストッパーを完全に挿入して密封した。

【0443】

バイアルを25℃または60℃で保存し、凍結乾燥後の様々な時点で試験した。活性ベースアッセイでは、凍結乾燥ケーキを10mLの0.01%BSA含有PBSで再構成した。バイアルを手で振盪し、室温で5分間平衡させた。同じBSA緩衝液で再構成した50 µLの精製NANOLUC酵素（Promega）またはジペプチド（配列番号14）に、再構成した50 µLの基質を添加した。LgTrip 3546のみの配合物は、フリマジンの添加を必要とし、NANO GLO Live Cell Substrate (Promega N205) を使用した。アッセイを固体の白色ノンバインディングサーフェス（NBS）プレート（Costar）で実施し、GLOMAX Discover Multimode Microplate Reader (Promega) で分析し、エンドポイントの読み取りを使用して総発光を収集した。図67は、（A）NanoLucの存在下におけるフリマジンのみの配合物、（B）ジペプチドの存在下におけるLgTrip 3546のみの配合物、及び（C）ジペプチドの存在下におけるフリマジンとLgTrip 3546の配合物について生成されたBmaxシグナルを示す。全ての配合物

10

20

30

40

50

が、有機溶媒中に予め溶解したN2O5基質とは対照的に、100日間の保管条件で試験した全ての温度で熱安定性を示した。

【0444】

実施例26

標的分析物が抗TNF α 生物学的製剤の場合のバイアルにおける溶液ベースの凍結乾燥単一試薬三成分イムノアッセイの創出

ホモジニアス抗TNF α 生物学的製剤NanoTrip（三成分NanoLuc）イムノアッセイの基本原理を図68に示す。このモデルでは、プロテインG-SmTrip9（またはそのバリエーション）融合タンパク質及びTNF α -HiBiT（またはそのバリエーション）融合タンパク質を使用した。プロテインGは、抗TNF α 生物学的抗体分析物のFc領域に結合し、分析物自体は、TNF α に結合するため、相補性サブユニットが接近し、それにより、LgTrip3546タンパク質及びフリマジン基質の存在下で、明るいシフェラーゼが再構成される。このアッセイは、標準的なプレート読み取りのルミノメーターによって生成される発光量が標的分析物の存在量に直接比例するため、定量的である。

【0445】

6xHis-TNF α -15GS-HiBiT（ATG-3998）。TNF α のカルボキシル末端への15GSリンカー（SSSGGGSGGGSSGG）によって隔てられたSmTrip10（配列番号15）を含有する遺伝子融合体は、pF4Ag CMV Flexi Vector（Promega）を使用して実現した。TNF α -ストランド10融合体の精製プラスミドDNAをShuffle T7 E. coli K12（New England Biolabs）に形質転換し、100 μ g/mLのアンピシリンを含有するLBプレート上に1:100の希釈でプレーティングし、37°Cで一晩インキュベートした。このプレートのコロニーを使用して、50mLのスターター培養液に接種し、100 μ g/mLのアンピシリンを含有するLB培地中、37°Cで一晩成長させた。スターター培養液を、100 μ g/mLのアンピシリンを含有する500mLの新しいLB培地に1:100で希釈し、ODが0.6に達するまで、37°Cでインキュベートした。この時点で、最終濃度1mMのIPTGをサンプルに添加した。IPTG接種後、培養液を25°Cで一晩成長させた。細胞を4°Cで30分間遠心分離（10,000rpm）してペレット化し、50mLのTBS、1mLのプロテアーゼ阻害剤カクテル（Promega）、0.5mLのRQ1 DNase（Promega）、及び1mLの10mg/mLのリゾチーム（Sigma）中に再懸濁し、穏やかに攪拌しながら、細胞懸濁液を氷上で1時間インキュベートした。−80°Cのフリーザーから37°Cの水浴までの3回の凍結融解サイクルによって細胞を溶解し、その後、4°Cで30分間、10,000rpmで遠心分離した。上清を回収し、製造元の推奨プロトコルに従ってNi Sepharose 6 Fast Flow樹脂（GE）を使用して、タンパク質を精製した。タンパク質を、100mM イミダゾールから開始して500mM イミダゾールに達するまでの段階的なイミダゾール溶出を使用して溶出し、TBSで透析し、SDS-PAGEゲルを使用して特性評価すると、95%を超える純度であった。タンパク質を50%グリセロール中−20°Cで保存した。

【0446】

SmTrip9（521）-15GS-PtnG-6xHis（ATG4002）。プロテインGのアミノ末端へのリンカー（SSSGGGSGGGSSSG）によって隔てられたSmTrip9（配列番号13）を含有する遺伝子融合体は、pF1A T7 Flexi Vector（Promega）を使用して実現した。SmTrip9（521）-PtnG融合タンパク質を発現するE. coliのグリセロールストックを使用して、50mLのスターター培養液に接種し、100 μ g/mLのアンピシリンを含有するLB培地中、37°Cで一晩成長させた。スターター培養液を、100 μ g/mLのアンピシリン、0.15%グルコース、及び0.1%ラムノースを含有する500mLの新しいLB培地に1:100で希釈した。培養液を25°Cで16〜24時間成長させた。細胞を4

10

20

30

40

50

℃で30分間遠心分離(10,000rpm)してペレット化し、50mLのTBS中に再懸濁した。1mLのプロテアーゼ阻害剤カクテル(Promega)、0.5mLのRQ1 DNase(Promega)、及び1mLの10mg/mLのリゾチーム(Sigma)を添加し、穏やかに攪拌しながら、細胞懸濁液を氷上で1時間インキュベートした。−80℃のフリーザーから37℃の水浴までの3回の凍結融解サイクルによって細胞を溶解し、その後、4℃で30分間、10,000rpmで遠心分離した。上清を回収し、製造元の推奨プロトコルに従ってHisTagカラム(GE)を使用して、タンパク質を精製した。タンパク質を、最終濃度500mMのイミダゾールを用いるグラジエント溶出を使用して溶出し、TBSで透析し、SDS-PAGEゲルを使用して特性評価すると、95%を超える純度であった。タンパク質を50%グリセロール中−20℃で保存した。

【0447】

10

図69は、0.01%BSAを含むPBS(pH7.0)からなる標準的なアッセイ緩衝液で実施した溶液ベースホモジニアス抗TNFα生物学的製剤イムノアッセイの用量反応曲線を示す。これらの実験では、10nM プロテインG-15gly/ser-SmTrip9 Pep521(配列番号16)、10nM TNFα-15gly/ser-SmTrip10 Pep289(配列番号17)、及び1μM LgTrip3546(配列番号12)タンパク質を、(A)レミケード、(B)ヒュミラ、及び(C)エンブレルの存在下で90分間インキュベートした。フリマジン(NANOGLO Live Cell Substrate; Promega N205)を添加し、GLOMAX Discoverを使用して総発光シグナルを分析した。

20

【0448】

抗TNFαTNFα生物学的製剤全体を保存することに対する凍結乾燥の適用可能性を評価するために、ペプチド標識融合タンパク質及びLgTrip3546(配列番号12; NanoTripアッセイの場合)及びフリマジンを含む単一バイアル配合物でのNanoTrip及びNanoBiTイムノアッセイを調製した。20Xストック配合物は、以下のとおりである：

【0449】

NanoTrip抗TNFα生物学的製剤イムノアッセイ：5mM アゾチオチミン、5mM アスコルビン酸、2.75%w/vプルラン、ddH2O(Millipore)、エタノール中の200μM フリマジン、20μM LgTrip3546タンパク質(配列番号12)、200nM プロテインG-SmTrip9 Pep521(配列番号16)融合タンパク質、及び200nM TNFα-SmTrip10 Pep289(配列番号17)融合タンパク質。

30

【0450】

NanoBiT抗TNFα生物学的製剤イムノアッセイ：5mM アゾチオチミン、5mM アスコルビン酸、2.75%w/vプルラン、ddH2O(Millipore)、エタノール中の200μM フリマジン、200nM プロテインG-SmBiT(配列番号10)融合タンパク質、及び200nM TNFα-LgBiT(配列番号12)融合タンパク質。

【0451】

40

20Xストック溶液の1mLのアリコートをも10mLアンバーガラスバイアルに分注し、ランナーstopperをバイアルに一部挿入した。4.7℃に予め冷却した棚を備える凍結乾燥機(Virtis Genesis 12EL凍結乾燥機)にバイアルをロードした。次いで、−50℃の保存温度で2時間の凍結ステップを生成物に行った後、凝縮ステップを開始した。実施中、凝縮器の温度は、−5℃〜−87℃であった。次に、75mTorr及び200mTorrの圧力設定値で真空引きを行った。昇華は約7.5時間、脱着は約16.1時間続いた。凍結乾燥プロセスの最後に、バイアルに窒素を再充填し、約600Torrの圧力でstopperを完全に挿入して密封した。

【0452】

活性ベースアッセイでは、単一試薬ケーキを10mLの0.01%BSA含有PBSで

50

再構成した。バイアルを手で振盪し、室温で5分間平衡させた。同じBSA緩衝液で再構成した50 μ lの滴定のレミケードに、再構成した50 μ lの単一試薬抗TNF α 生物学的製剤NanoTrip及びNanoBiTimノアッセイを添加した。アッセイを固体の白色ノンバイディングサーフェス(NBS)プレート(Costar)で実施し、GLOMAX Discover Multimode Microplate Reader (Promega)で分析し、カインेटイクスの読み取りを使用して総発光を収集した。図70は、単一試薬レミケード(A) NanoTripイムノアッセイまたは(B) NanoBiTimイムノアッセイを再構成した際に得られた生物発光に対するレミケード用量反応曲線を示す。

【0453】

これらの凍結乾燥単一試薬抗TNF α 生物学的製剤NanoTrip及びNanoBiTimノアッセイを周囲温度で保存した場合の熱安定性について試験すると、100nMのレミケードの存在下または不在下で0.01%BSAを含むPBS(pH7.0)で再構築すると、両方のアッセイで保存安定性が示され、分析物レミケードが存在する場合はシグナルが有意に増加することを示した。結果を図71に示す。

【0454】

実施例27

分割試薬アプローチを使用した、安定した凍結乾燥三成分NanoBiTimノアッセイの開発

抗TNF α 生物学的製剤の個別の構成成分を保存することに対する凍結乾燥の適用可能性を評価するために、ペプチド標識融合タンパク質及びLgTrip 3546(配列番号12; NanoTripアッセイの場合)及びフリマジンを含む単一バイアル配合物にその後組み合わせられるNanoTrip及びNanoBiTimノアッセイを調製した。20Xストック配合物は、以下のとおりである：

【0455】

NanoBiTim抗TNF α 生物学的製剤イムノアッセイ：

【0456】

フリマジンとLgBiTim-TNF α ：5mM アゾチオチミン、5mM アスコルビン酸、2.75%w/vプルラン、ddH₂O(Millipore)、エタノール中の200 μ M フリマジン、及び200nM TNF α -LgBiTim(配列番号12)融合タンパク質。

【0457】

NanoBiTimプロテインG：5mM アゾチオチミン、5mM アスコルビン酸、2.75%w/vプルラン、ddH₂O millipore、200nM プロテインG-SmBiTim(配列番号10)融合タンパク質

【0458】

NanoTrip抗TNF α 生物学的製剤イムノアッセイ：

【0459】

フリマジンとLgTrip 3546：5mM アゾチオチミン、5mM アスコルビン酸、2.75%w/vプルラン、ddH₂O(Millipore)、エタノール中の200 μ M フリマジン、20 μ M LgTrip 3546タンパク質(配列番号12)、

【0460】

プロテインGとTNF α ：5mM アゾチオチミン、5mM アスコルビン酸、2.75%w/vプルラン、ddH₂O(Millipore)、200nM プロテインG-SmTrip9 Pep521(配列番号16)融合タンパク質、及び200nM TNF α -SmTrip10 Pep289(配列番号17)融合タンパク質。

【0461】

配合物を個別の構成成分として凍結乾燥させ、次いで、手作業で組み合わせて、完全なイムノアッセイを作製した。ケーキをOpti-MEM(Gibco)で再構成し、50 μ lを、50 μ lの用量滴定のレミケードに添加した。アッセイを固体の白色ノンバイ

10

20

30

40

50

ディングサーフェス (NBS) プレート (Costar) で実施し、GLOMAX Discover Multimode Microplate Reader (Promega) で分析し、カイネティクスの読み取りを使用して総発光を収集した。図72は、NanoBiot抗TNF α 生物学的製剤「分割ケーキ」凍結乾燥イムノアッセイのプロセス及びアッセイ結果を示す。図72Aは、独立した凍結乾燥生成物を示す。図72Bは、2つの個別のケーキを1つのマイクロ遠心チューブに手作業で組み合わせた後の結果を示す。図72Cは、Opti-MEM緩衝液で再構成した後の凍結乾燥生成物を示す。図72Dは、漸増量のレミケードの存在下におけるカイネティクス生物発光の結果を示す。図73は、抗TNF α 生物学的製剤NanoTripアッセイのカイネティクス生物発光の結果を、図72に示されるものと同じプロセスに従った後のレミケードの存在下における生物発光のカイネティクスの読み取りを使用して示す。デュアルケーキフォーマットは、レミケードのイムノアッセイでも作製に成功した。

【0462】

実施例28

抗EGFR生物学的製剤を定量するためのセルベースホモジニアス三成分アッセイの開発
IL6-VSHiBiT-15GS-EGFR (GSSGGGSGGGGSS) (ATG-4288) とpGEM3ZキャリアDNA (Promega) を1:10に希釈したDNAの10 μ g/ml溶液を調製することによって、HEK293細胞にバルクトランスフェクションを実施した。FuGENE HDをDNA混合物に加え、脂質:DNA複合体を形成した。この複合体を、細胞密度を2 $\times$ 10⁵細胞/mlに調整したHEK293細胞に加え、37 $^{\circ}$ C及び5%CO₂で一晩インキュベートした。

【0463】

トランスフェクトしたHEK293細胞を96ウェルNBSプレート(試験されるSmTrip-15GS-Gごとに個別のプレート)に最終濃度2 $\times$ 10⁵細胞/ウェルで加えた。LgTrip 3546とSmTrip9-Gの試薬混合物を、最終濃度1 μ M LgTrip 3546及び10nM SmTrip9-15GS-Gになるように細胞に加えた。24ポイントのパニツムマブ滴定液を最終開始濃度100nMで各ウェルに加え、1:2に希釈して最終終了濃度0nMとした。全てのプレートにカバーをし、37 $^{\circ}$ C及び5%CO₂で1時間インキュベートした。NANOLUC Live Cell Substrateを最終濃度10 μ Mで全てのウェルに加え、その後、各プレートの発光をルミノメーターで読み取った。次のSmTrip9-Gコンストラクトを試験した: ATG4002 SmTrip9(521)-15GS-G(配列番号724); ATG4496 SmTrip9(743)-15GS-G(配列番号(726)); ATG4558 SmTrip9(759)-15GS-G(配列番号728); 及びATG4551 SmTrip9(760)-15GS-G(配列番号730)。いずれの構成も、パニツムマブを定量的に検出するのに成功した。

【0464】

実施例29

溶液ベースホモジニアス抗TNF α 生物学的製剤三成分イムノアッセイにおける様々なSmTrip9-プロテインG融合タンパク質の試験

図77は、0.01%BSAを含むPBS(pH7.0)からなる標準的なアッセイ緩衝液中のSmTrip9バリエーションであるSmTrip9 pep521(配列番号16)、SmTrip9 pep743(配列番号21)、SmTrip9 pep759(配列番号22)、またはSmTrip9 pep760(配列番号23)を使用した、溶液ベースホモジニアス抗TNF α 生物学的製剤イムノアッセイの用量反応曲線を示す。これらの実験では、10nM プロテインG-15gly/ser-SmTrip9バリエーション、10nM TNF α -15gly/ser-SmTrip10 Pep289(配列番号17)、及び1 μ M LgTrip 3546(配列番号12)タンパク質を、レミケードの存在下で90分間インキュベートした。フリマジン(NANOGLO Live Cell Substrate; Promega N205)を添加し、GLOMAX Di

10

20

30

40

50

s c o v e rを使用して総発光シグナルを分析した。全てのS m T r i p 9バリエーションは、バックグラウンド及びB m a xのレベルは異なるものの、レミケードを検出するアッセイに成功した。

【0465】

抗T N F α生物学的製剤全体を保存することに対する凍結乾燥の適用可能性を評価するために、ペプチド標識融合タンパク質及びL g T r i p 3 5 4 6（配列番号12）及びフリマジンを含む単一バイアル配合物でのN a n o T r i p イムノアッセイを調製した。20Xストック配合物は、以下のとおりである：

【0466】

N a n o T r i p 抗T N F α生物学的製剤イムノアッセイ：5mM アゾチオチミン、5mM アスコルビン酸、2.75%w/v プルラン、d d H 2 O（M i l l i p o r e）、エタノール中の200μM フリマジン、20μM L g T r i p 3 5 4 6タンパク質（配列番号12）、200nM プロテインG-S m T r i p 9バリエーション融合タンパク質、及び200nM T N F α-S m T r i p 10 P e p 2 8 9（配列番号17）融合タンパク質。

【0467】

20Xストック溶液の1mLのアリコートに10mLアンバーガラスバイアルに分注し、ランナーstopperをバイアルに一部挿入した。4.7℃に予め冷却した棚を備える凍結乾燥機（V i r t i s G e n e s i s 1 2 E L凍結乾燥機）にバイアルをロードした。次いで、-50℃の保存温度で2時間の凍結ステップを生成物に行った後、凝縮ステップを開始した。実施中、凝縮器の温度は、-5℃~-8.7℃であった。次に、75mT o r r及び200mT o r rの圧力設定値で真空引きを行った。昇華は約7.5時間、脱着は約16.1時間続いた。凍結乾燥プロセスの最後に、バイアルに窒素を再充填し、約600T o r rの圧力でstopperを完全に挿入して密封した。図77Bは、凍結乾燥抗T N F α生物学的製剤イムノアッセイを使用したレミケードの用量反応曲線を提供する。

【0468】

実施例30

溶液ベースホモジニアスI L - 6イムノアッセイを開発するための反応性ペプチドを介した抗体の直接標識

直接標識された抗体を用いるホモジニアスN a n o L u c三成分イムノアッセイの基本原理を図78に示す。まず、I L - 6上の非重複エピトープを標的とする抗体のペアをS m T r i p 9またはS m T r i p 10ベース反応性ペプチドに化学的にコンジュゲートさせる。標識抗体がI L - 6分析物に結合すると、相補性サブユニットが接近し、それにより、L g T r i pタンパク質及びフリマジン基質の存在下で、生物発光シグナルを精製する明るいシフェラーゼが再構成される。このアッセイ構成により生成される発光量は、標的分析物の量に直接比例する。

【0469】

P e p 6 9 3（配列番号20）、P e p 8 9 5（配列番号24）、及びP e p 9 2 9（配列番号25）などのS m T r i p 9バリエーション、またはP e p 6 9 1（配列番号18）及びP e p 6 9 2（配列番号19）などのS m T r i p 10バリエーションを、DMF中に個別に溶解して5mMとした。Z e b aスピン脱塩カラム（T h e r m o F i s h e r）を使用して、抗体を10mM 炭酸水素ナトリウム緩衝液（pH8.5）に2回緩衝液交換した。その後、タンパク質を共有結合的に標識するために、これらの抗体と20倍モル過剰の反応性ペプチドを、振盪しながら、4℃で1時間合わせた。未反応の標識を、P B S緩衝液中でZ e b aスピンカラムに2回通すことによって除去した。例示的なヒトI L - 6イムノアッセイの試薬を作製するために、マウス抗ヒトI L - 6モノクローナル抗体クローン5 I L 6（T h e r m oカタログ番号M 6 2 0）及びクローン5 0 5 E 9 A 1 2 A 3（T h e r m oカタログ番号A H C 0 6 6 2）を使用した。S m T r i p 9反応性ペプチドを使用して抗体5 I L 6を標識し、S m T r i p 10反応性ペプチドを使用して抗体5 0 5 Eを標識した。図79に示される変性S D S - P A G Eゲルを使用して、コンジ

ュゲート抗体を特性評価した。ゲルにより、抗体の標識の程度がペプチド配列及び標識の化学構造に依存することが明らかになった。

【0470】

図80～82は、*rhIL-6*の滴定系列の存在下における抗体コンジュゲートの未処理のRLU用量反応曲線を示す。これらの実験では、*rhIL-6*及び抗体コンジュゲートを、0.01%BSAを含むPBS (pH7.0)中の $1\mu\text{M}$ LgTrip 3546 (配列番号12)とともに90分間インキュベートした。N205の添加後、発光シグナルを測定した。図80のデータは、 15 ng/ml のSmTrip9標識バリエーション (HW-0984またはHW-1010) 5IL6抗体及び 60 ng/ml のSmTrip10標識バリエーション (HW-0977) 505E抗体を使用して生成した。図81のデータは、 62.5 ng/ml のSmTrip9標識 (HW-0984) 5IL6抗体及び 60 ng/ml のSmTrip10標識 (HW-1053) 505E抗体を使用して生成した。図82のデータは、次の濃度の抗体コンジュゲートを使用して生成した： 15 ng/ml のHW-1043 (配列番号24) + 30 ng/ml のHW-1053 (配列番号18)、 15 ng/ml のHW-1052 (配列番号25) + 15 ng/ml のHW-1053 (配列番号18)、 15 ng/ml のHW-1055 (配列番号25) + 15 ng/ml のHW-1053 (配列番号18)、 60 ng/ml のHW-1042 (配列番号20) + 8 ng/ml のHW-1053 (配列番号18)、及び 60 ng/ml のHW-1050 (配列番号27) + 8 ng/ml のHW-1053 (配列番号18)。この実験では、SmTrip9バリエーション標識HW-1050 (配列番号27) 及びHW-1043 (配列番号24) が最良のシグナル/バックグラウンドを与え、高濃度の*rhIL-6*の存在下で 10^6 RLUに近い値を示し、分析物が存在しない場合、低い発光出力を示す。対照的に、SmTrip9バリエーション標識HW-1055 (配列番号25 (SulfoSE-PEG3)) 及びHW-1052 (配列番号25 (SulfoSE-PEG6)) は、*rhIL-6*がない場合でも高いシグナルを有していることから、これらの標識は、再構成されたルシフェラーゼに自発的に結合することが示唆される。図83は、0.01%BSAを含むPBS (pH7.0)中の個々の抗体コンジュゲートの滴定、 $1\mu\text{M}$ LgTrip 3546 (配列番号12)、及びN205からの発光出力を示す。ほとんどのコンジュゲートは、フリマジンバックグラウンドと同等のRLU (約100RLU)を示し、標識抗体の濃度を増加させても、RLUは増加しなかった。コンジュゲートHW-0984 (配列番号20) 及びHW-1053 (配列番号19) は例外であり、濃度とともにRLUが増加し、 100 ng/ml を超える濃度では1,000以上に達した。図84において、S/Bが高い2つのSmTrip9コンジュゲート (HW-1050 (配列番号27) 及びHW-1043 (配列番号24) で標識) を、図82に記載の条件下であるが $1\mu\text{M}$ LgTrip 5146 (配列番号451) を用いてアッセイしたところ、LgTrip 3546 (配列番号12) と同様の結果が得られ、異なるLgTripバリエーションを使用してこれらのアッセイを構築することが実現可能であることを示している。

【0471】

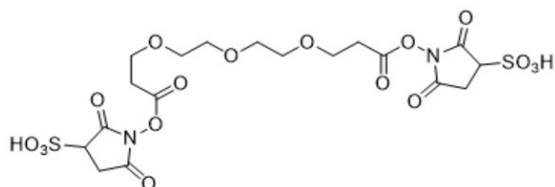
ホモジニアス三成分NanoLucイムノアッセイの構成成分はまた、テトラメチルロダミン (TMR) などのフルオロフォアを含有するSmTrip9またはSmTrip10バリエーションを抗体に直接標識することによっても構築することができる。これを、図85に模式的に示し、ルシフェラーゼからフルオロフォア標識へのBRETが予想されることを含む。IL-6イムノアッセイにおける標識HW-0987 (TMRを含むSmTrip9バリエーション) 及びHW-0992 (TMRを含むSmTrip10バリエーション) によるBRETのカイネティクス読み取りを図86に示す。*rhIL-6*分析物の存在下でのみBRETが観察され、これは、分析物がこれらの構成成分と一緒にあったときに相補性及びエネルギー転移が生じることを示している。

【0472】

実施例31

SulfoSE-PEG3-SmTrip9 Pep693 (HW-0984)

PEG3ビスSulfo-SE

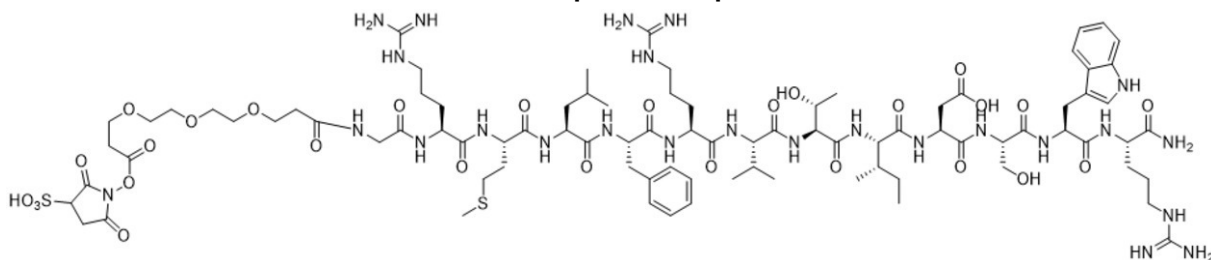


【0473】

3, 3' - ((オキシビス (エタン - 2, 1 - ジイル)) ビス (オキシ)) ジプロピオン酸 (55 mg、0.22 mmol) を無水 DMF に溶解し、次いで、ジイソプロピルエチルアミン (120 mg、0.88 mmol) 及び HATU (176 mg、0.45 mmol) を加えた。混合物を 5 分間攪拌した。その間、N - ヒドロキシ - 2, 5 - ジオキソピロリジン - 3 - スルホン酸 (90 mg、0.46 mmol) を 5 ml の DMSO に溶解し、次いで、先の溶液に滴加した。LC - MS が酸の消失を示すまで、混合物を更に 1 時間攪拌した。溶液を次のステップに直接使用した。計算値： $m/z = 603.05$ [M^-] ; 測定値 (ESI) : $m/z = 603.04$ [M^-] .

【0474】

SulfoSE-PEG3-SmTrip9 Pep693 (HW-0984)



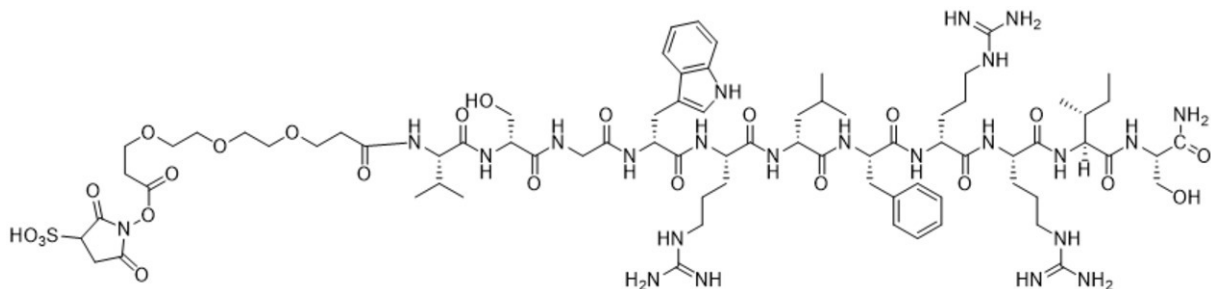
【0475】

SmTrip9 Pep693 (GRMLFRVTINSWR、27 mg、0.045 mmol) を DMF 中に溶解した。次いで、溶液を先の PEG3ビスSulfo-SE 溶液に加えた。次いで、混合物を更に 1 時間攪拌し、分取 HPLC によって直接精製した。計算値： $m/z = 1022.98$ [$M+2H$] $^{2+}$; 測定値 (ESI) : $m/z = 1023.09$ [$M+2H$] $^{2+}$.

【0476】

実施例 32

SulfoSE-PEG3-SmTrip10 Pep691 (HW-0977)



HW-0977 を HW-0984 と同じ方法によって合成した。計算値： $m/z = 892.93$ [$M+2H$] $^{2+}$; 測定値 (ESI) : $m/z = 893.61$ [$M+2H$] $^{2+}$.

【0477】

実施例 33

SulfoSE-PEG3-SmTrip9 Pep895 (HW-1010)

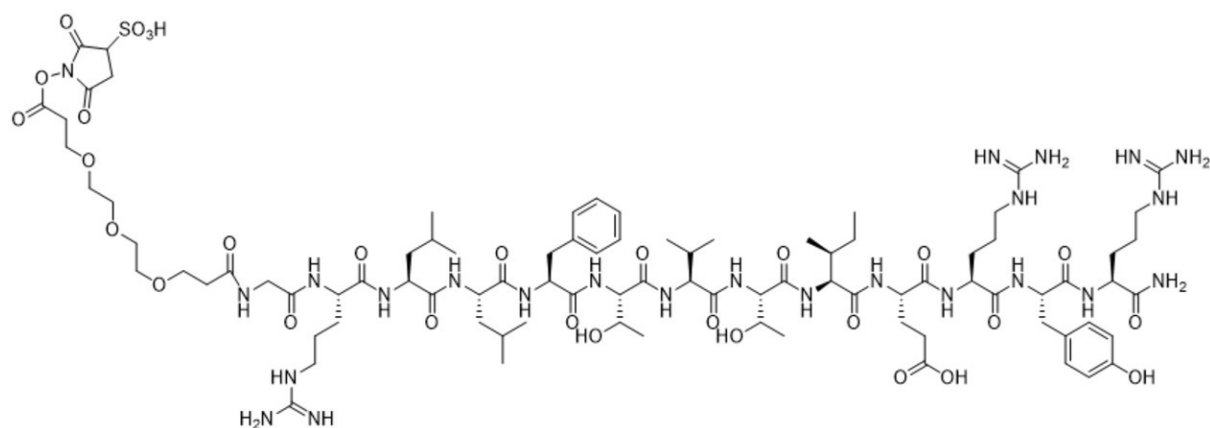
10

20

30

40

50

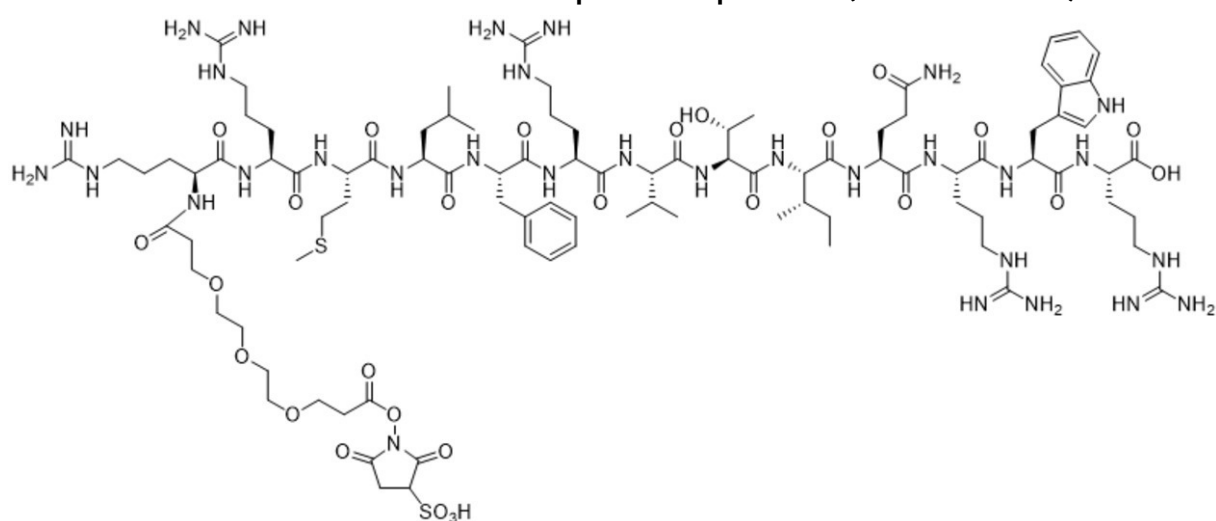


HW-1010をHW-0984と同じ方法によって合成した。計算値： $m/z = 1016.51$ $[M+2H]^{2+}$ ；測定値（ESI）： $m/z = 1016.92$ $[M+2H]^{2+}$ 。

【0478】

実施例34

SulfoSE-PEG3-SmTrip9 Pep929 (HW-1055)



HW-1055をHW-0984と同じ方法によって合成した。計算値： $m/z = 1114.06$ $[M+2H]^{2+}$ ；測定値（ESI）： $m/z = 1113.95$ $[M+2H]^{2+}$ 。

【0479】

実施例35

SulfoSE-PEG6-SmTrip9 Pep693 (HW-1042)

PEG6ビスSulfo-SE

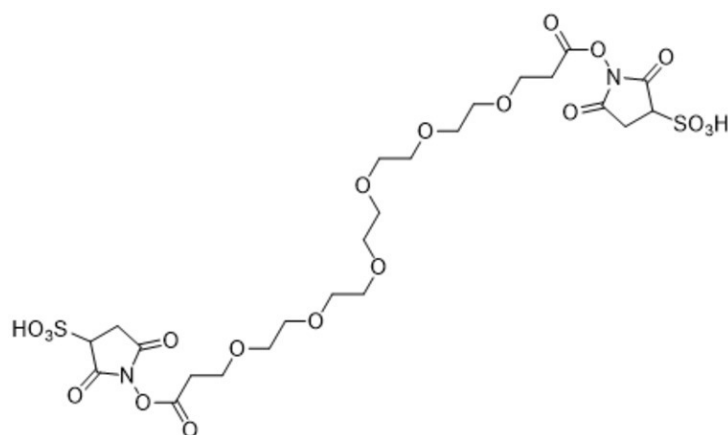
10

20

30

40

50



10

【0480】

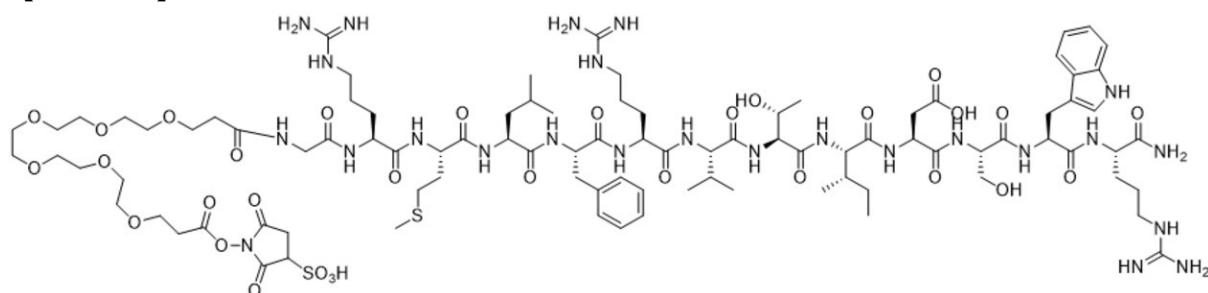
ビスPEG6酸（39mg、0.10mmol）を無水DMFに溶解し、次いで、ジイソプロピルエチルアミン（53mg、0.4mmol）及びHATU（78mg、0.20mmol）を加えた。混合物を5分間攪拌した。その間、N-ヒドロキシ-2,5-ジオキソピロリジン-3-スルホン酸（40mg、0.20mmol）を5mlのDMSOに溶解し、次いで、先の溶液に滴加した。LC-MSが酸の消失を示すまで、混合物を更に1時間攪拌した。溶液を次のステップに直接使用した。計算値： $m/z = 735.13$ [M⁻]；測定値（ESI）： $m/z = 735.04$ [M]。

20

【0481】

SulfoSE-PEG6-SmTrip9 Pep693 (HW-1042)

【0482】



30

【0483】

SmTrip9 Pep693 (GRMLFRVTINSWR、20mg、0.013mmol)をDMF中に溶解した。次いで、溶液を先のPEG6ビスSulfo-SE溶液に加えた。次いで、混合物を更に1時間攪拌し、分取HPLCによって直接精製した。計算値： $m/z = 1089.02$ [M+2H]²⁺；測定値（ESI）： $m/z = 1088.94$ [M+2H]²⁺。

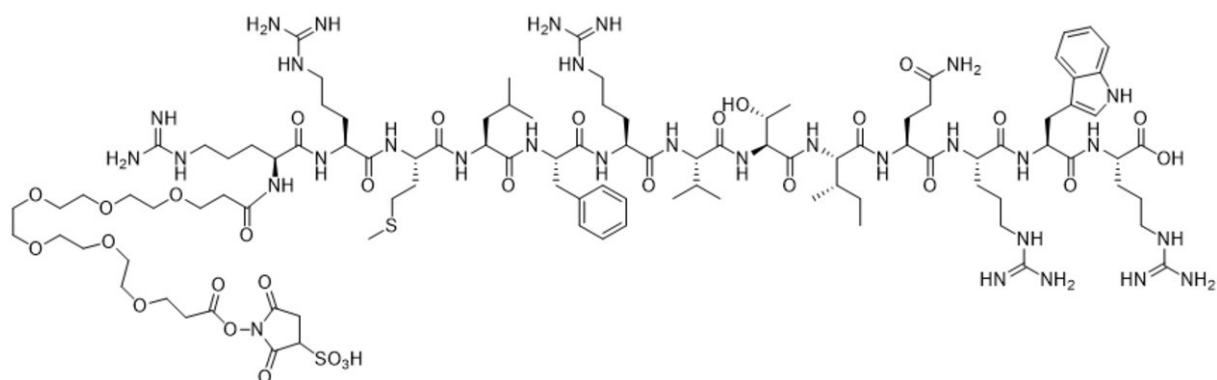
【0484】

実施例36

SulfoSE-PEG6-SmTrip9 Pep929 (HW-1052)

40

50



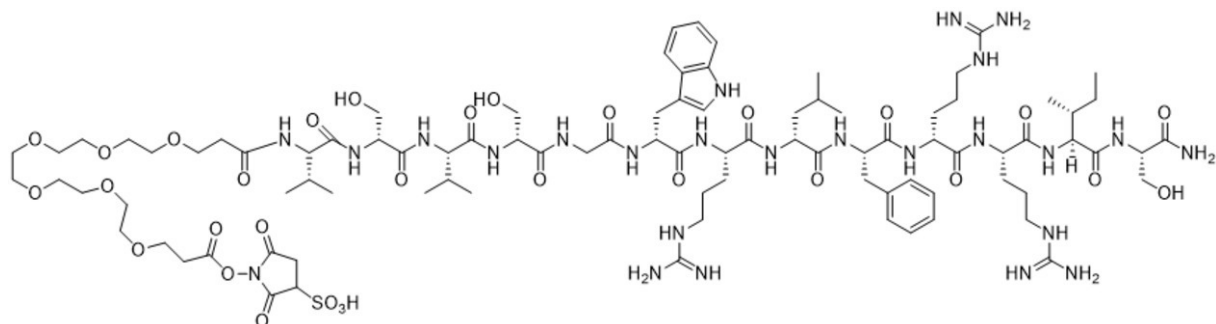
10

HW-1052をHW-1042と同じ方法によって合成した。計算値： $m/z = 1180.10$ $[M+2H]^{2+}$ ；測定値（ESI）： $m/z = 1179.82$ $[M+2H]^{2+}$ 。

【0485】

実施例37

SulfoSE-PEG6-SmTrip10 Pep692 (HW-1053)



20

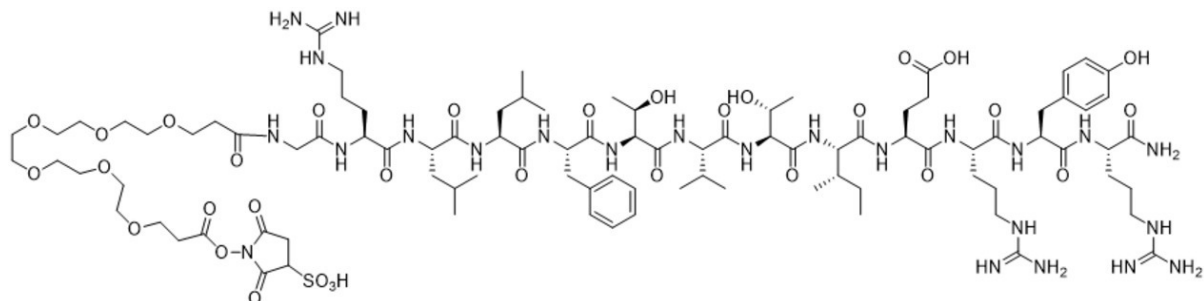
HW-1053をHW-1042と同じ方法によって合成した。計算値： $m/z = 1052.03$ $[M+2H]^{2+}$ ；測定値（ESI）： $m/z = 1051.92$ $[M+2H]^{2+}$ 。

30

【0486】

実施例38

SulfoSE-PEG6-SmTrip9 Pep895 (HW-1043)



40

HW-1043をHW-1042と同じ方法によって合成した。計算値： $m/z = 1082.55$ $[M+2H]^{2+}$ ；測定値（ESI）： $m/z = 1082.34$ $[M+2H]^{2+}$ 。

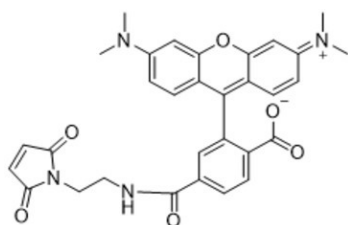
【0487】

実施例39

SulfoSE-PEG3-SmTrip9 Pep938-TAMRA (HW-0992)

TAMRA-マレイミド

50

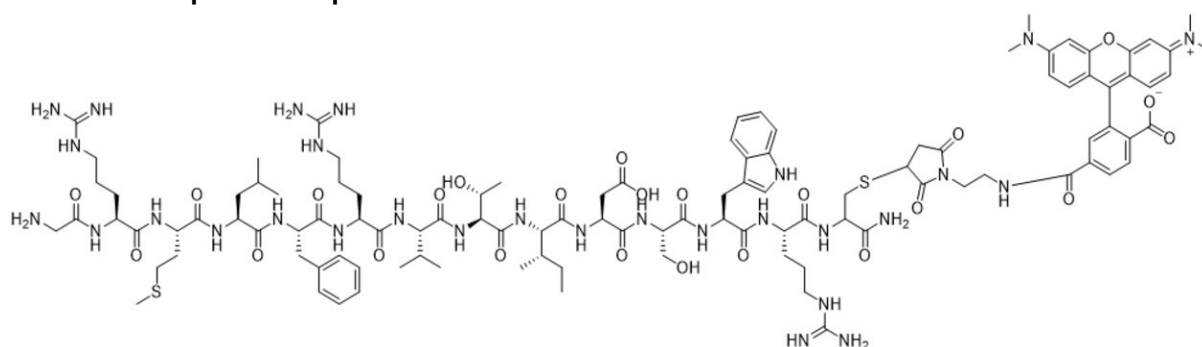


【0488】

5-TAMRA (50 mg、0.116 mmol) を DMF 中に溶解した。ジイソプロピルエチルアミン (45 mg、0.128 mmol)、続いて、TSTU (38 mg、0.128 mmol) を加えた。混合物を 20 分間攪拌し、1-(2-アミノエチル)-1H-ピロール-2,5-ジオン (18 mg、0.128 mmol) を加え、得られた反応混合物を更に 1 時間攪拌し、分取 HPLC によって直接精製した。計算値： $m/z = 553.20$ $[M+H]^+$ ；測定値 (ESI)： $m/z = 553.40$ $[M+H]^+$ 。

【0489】

SmTrip9 Pep938-TAMRA

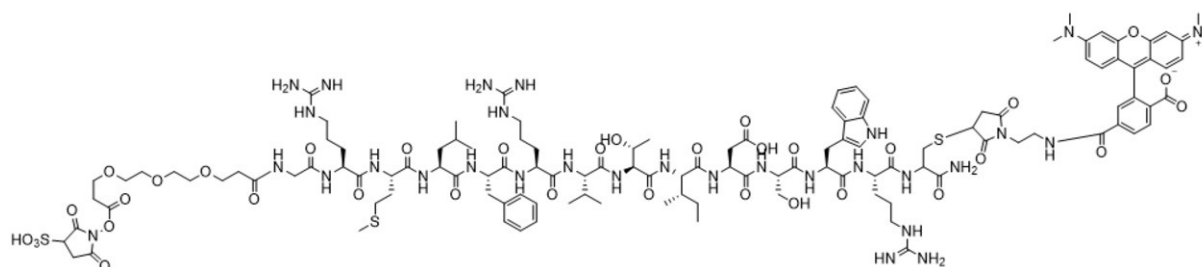


【0490】

TAMRA-マレイミド (8 mg、0.014 mmol) を DMF 中に溶解した。PBS 緩衝液 (pH 7.4、200 mM) 中の SmTrip9 (Pep938) (GRMLF RVTINSWRC、25 mg、0.014 mmol) の溶液を加えた。反応混合物を 2 時間攪拌し、分取 HPLC によって直接精製した。計算値： $m/z = 1146.05$ $[M+2H]^{2+}$ ；測定値 (ESI)： $m/z = 1146.33$ $[M+2H]^{2+}$ 。

【0491】

SulfoSE-PEG3-SmTrip9 Pep938-TAMRA (HW-092)



【0492】

SmTrip9 Pep938-TAMRA (8.5 mg、0.0038 mmol) を DMF 中に溶解した。次いで、溶液を、HW-0984 の合成に示されるように調製した PEG3 ビスSulfo-SE に加えた。反応混合物を 2 時間攪拌し、分取 HPLC によって直接精製した。計算値： $m/z = 901.05$ $[M+3H]^{3+}$ ；測定値 (ESI)： $m/z = 901.20$ $[M+3H]^{3+}$ 。

【0493】

10

20

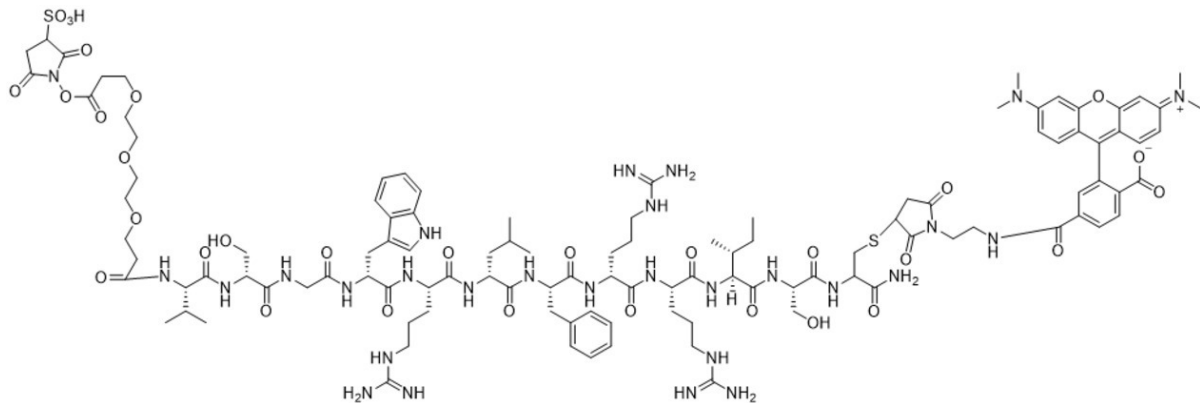
30

40

50

実施例 40

SulfoSE-PEG3-Strnd 9 (Pep937) - TAMRA (HW-0987)



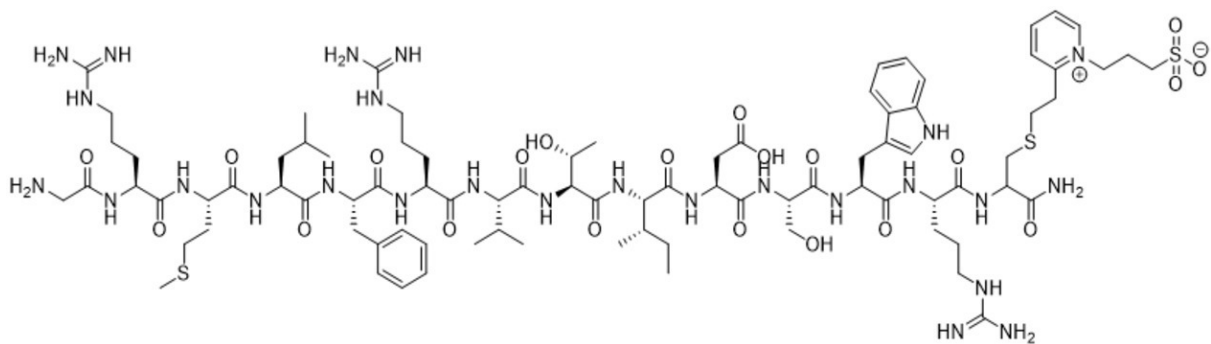
10

HW-0987をHW-0992と同じ方法によって合成した。計算値： $m/z = 814.03 [M+3H]^{3+}$ ；測定値（ESI）： $m/z = 814.40 [M+3H]^{3+}$ 。
【0494】

実施例 41

SulfoSE-PEG3-SmTrip9 Pep938-SA (HW-1050)
SmTrip9 Pep938-SA

20



30

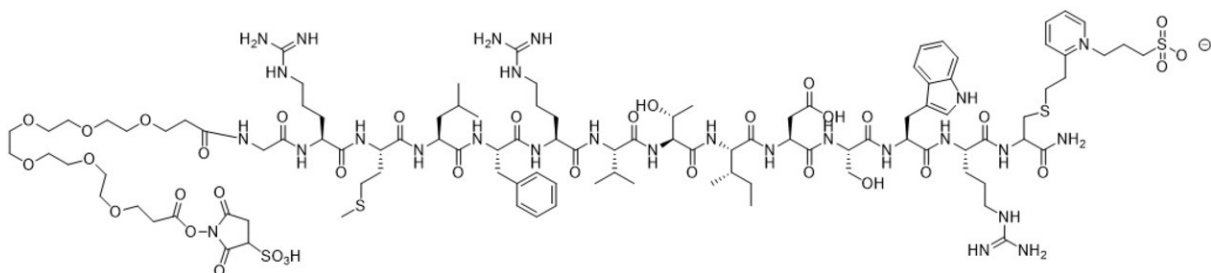
【0495】

SmTrip9 Pep938 (GRMLFRVTINSWR、26mg、0.015 mmol)をDMSOに溶解した。1-(3-スルホプロピル)-2-ビニルピリジニウムヒドロキシド分子内塩 (3.40mg 0.015 mmol)をリン酸緩衝液 (pH=7.4、100mM)に溶解し、ペプチド溶液にゆっくり加えた。混合物を更に3時間攪拌し、分取HPLCによって直接精製した。計算値： $m/z = 983.48 [M+2H]^{2+}$ ；測定値（ESI）： $m/z = 983.39 [M+2H]^{2+}$ 。

【0496】

SulfoSE-PEG3-SmTrip9 Pep938-SA (HW-1050)

40



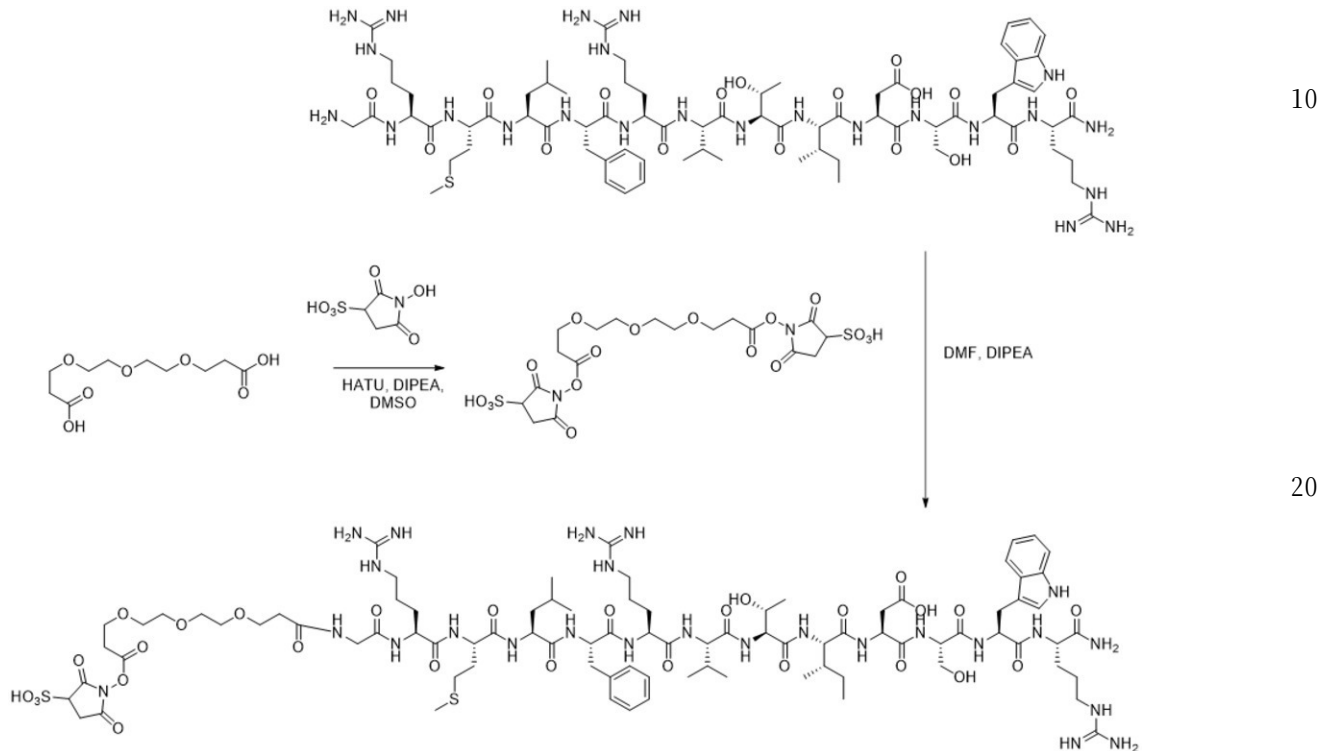
【0497】

50

SmTrip9 Pep938-SA (10mg、0.005mmol) をDMF中に溶解した。次いで、溶液を、HW-0984に示されるように調製したPEG6ビスSulfonateに加えた。反応混合物を2時間攪拌し、分取HPLCによって直接精製した。計算値： $m/z = 1254.05$ $[M+2H]^{2+}$ ；測定値(ESI)： $m/z = 1253.98$ $[M+2H]^{2+}$ 。

【0498】

以下にPEG連結ペプチドSulfonateの代表的な合成スキームを示す。



【0499】

以下にフルオロフォアに連結したPEG連結ペプチドSulfonateの代表的な合成スキームを示す。

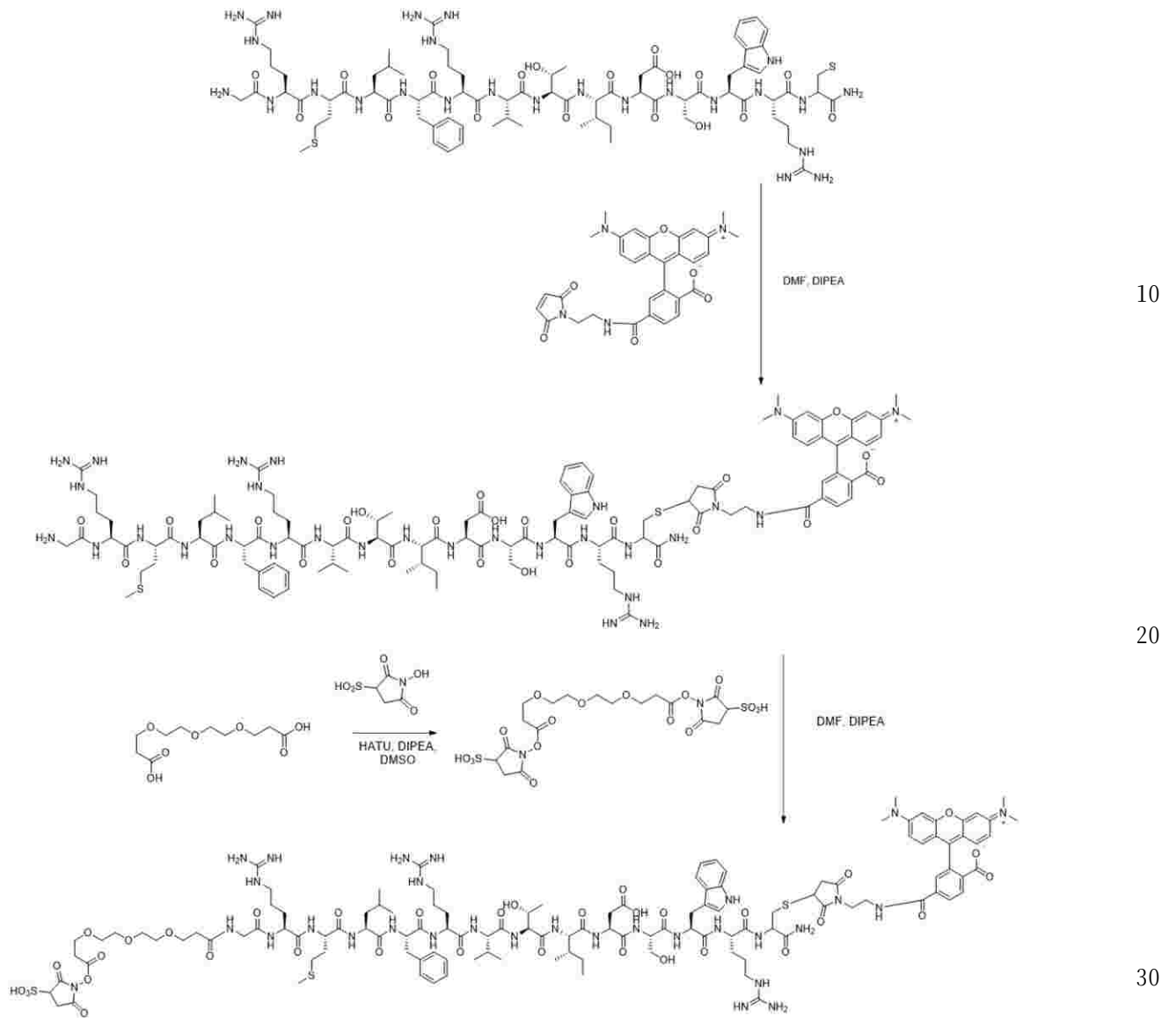
10

20

30

40

50



【0500】

実施例42

セレンテラジン誘導体JRW-1404及びJRW-1482の性能に対する複雑なサンプルマトリックスでの発光の調査

図87は、複雑なサンプルマトリックスにおけるセレンテラジン誘導体基質JRW-1404及びJRW-1482から得られた発光を示す。血漿（12/28/18）、尿（Innovative research 2/25/19）、及びHuman-Sera（2/11/19）の100%サンプルをPBSで10%、20%、0%、及び80%に希釈した。「0%」のサンプルは、PBSである。デュプリケートで、各サンプルの50 μ lを、PBSで0.4 ng/mlに希釈した50 μ lのNanoLucと合わせた。各基質を20 μ MのPBSに希釈し、次いで、希釈した各基質100 μ lをNanoLuc/サンプル混合物に添加した。GloMax（登録商標）Discoverプレートルミノメーターで発光を測定した。

【0501】

前述の詳細な説明及び添付の実施例は、単なる例示であり、添付の特許請求の範囲及びその等価物によってのみ定義される本開示の範囲を限定するものではないことを理解されたい。

【0502】

10

20

30

40

50

本開示の実施形態に対する様々な変更及び改変は、当業者には明らかであろう。そのような変更及び改変は、限定するものではないが、本開示の化学構造、置換基、誘導体、中間体、合成、組成物、配合物、または使用の方法に関連するものを含め、本開示の趣旨及び範囲から逸脱することなく、行うことができる。

配列

【0503】

以下のポリペプチド配列は、それぞれN末端のメチオニン残基または対応するA T G コドンを含んでおり、N末端のメチオニン残基または対応するA T G コドンを含まないポリペプチド配列もまた本明細書の範囲内であり、参照により本明細書に援用される。

【0504】

以下のペプチド配列は、それぞれN末端のメチオニン残基を含まず、N末端のメチオニン残基を含むペプチド配列もまた本明細書の範囲内であり、参照により本明細書に援用される。

【0505】

10

20

30

40

50

表2. 例示的なペプチド、ジペプチド、及びポリペプチドの配列。

配列 番号	名称	配列
1	WT O g L u c	MFTLADFDVGDWQQTAGYNQDQVLEQGG LSSSLFQALGVSVTP IQKVVLSENGLK ADIHV I I P Y E G L S G F Q M G L I E M I F K V V Y P V D D H H F K I I L H Y G T L V I D G V T P N M I D Y F G R P Y P G I A V F D G K Q I T V T G T L W N G N K I Y D E R L I N P D G S L L F R V T I N G V T G W R L C E N I L A
28	WT O g L u c	a t g g t g t t t a c c t t g g c a g a t t t c g t t g g a g a c t g g c a a c a g a c a g c t g g a t a c a a c c a a g a t c a a g t g t t a g a a c a a g g a g g a t t g t c t a g t c t g t t c c a a g c c c t g g g a g t g t c a g t c a c c c c a a t c c a g a a a g t t g t g c t g t c t g g g g a g a a t g g g t t a a a a g c t g a t a t t c a t g t c a t c a t c c c t t a c g a g g g a c t c a g t g g t t t t c a a a t g g g t c t g a t t g a a a t g a t c t t c a a a g t t g t t t a c c c a g t g g a t g a t c a t c a t t t c a a g a t t a t t c t c c a t t a t g g t a c a c t c g t t a t t g a c g g t g t g a c a c c a a a c a t g a t t g a c t a c t t t g g a c g c c c t t a c c c t g g a a t t g c t g t g t t t g a c g g c a a g c a g a t c a c a g t t a c t g g a a c t c t g t g g a a c g g c a a c a a g a t c t a t g a t g a g c g c c t g a t c a a c c c a g a t g g t t c a c t c c t c t t c c g c g t t a c t a t c a a t g g a g t c a c c g g a t g g c g c c t t t g c g a g a a c a t t c t t g c c
5	N a n o L u c	MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQG GVSSSLFQNLGVSVTP IQRIVLSENGL KIDIHV I I P Y E G L S G D Q M G Q I E K I F K V V Y P V D D H H F K V I L H Y G T L V I D G V T P N M I D Y F G R P Y E G I A V F D G K K I T V T G T L W N G N K I I D E R L I N P D G S L L F R V T I N G V T G W R L C E R I L A

10

20

30

40

50

29	NanoLuc	atgaaacatcaccatcaccatcatgcg atcgccatgggtcttcacactcgaagat ttcggttggggactggcgacagacagcc ggctacaacctggaccaagtccttgaa cagggagggtgtgtccagtttgtttcag aatctcgggggtgtccgtaactccgatac caaaggattgtcctgagcgggtgaaaaat gggctgaagatcgacatccatgtcatc atccccgtatgaagggtctgagcggcgac caaatggggccagatcgaaaaaattttt aagggtgggtgtacctgtggatgatcat cactttaagggtgatcctgcactatggc acactggtaatcgacgggggttacgccg aacatgatcgactatttcggacggccg tatgaaggcatcgccgtgttcgacggc aaaaagatcactgtaacaggggaccctg tggaacggcaacaaaaattatcgacgag cgctgatcaaccccgacggctccctg ctgttccgagtaaccatcaacggagtg accggctggcggctgtgcgaacgcatt ctggcggtt
2	WT OGL uc Lg	MFTLADDFVGDWQQTAGYNQDQVLEQGG LSSLFQALGVSVTPIQKVVLSGENGLK ADIHV IIPYEGLSGFQMGLIEMIFKV YPVDDHHFKIILHYGTLVIDGVTPNMI DYFGRPYPGIAVFDGKQITVTGTLWNG NKIYDERLINPD
3	WT OGL uc β 9	GSLLFRVTIN
4	WT OGL uc β 10	GVTGWRLCENILA
6	WT NanoLuc Lg	MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGG GVSSLLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGL KIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEKIFKV VYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNM IDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN GNKIIDERLINPD
7	WT NanoLuc β 9	GSLLFRVTINV
8	WT NanoLuc β 10	GVTGWRLCERILA
9	LgBit	MVFTLEDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQGG GVSSLLQNLAVSVTP IQRIVRSGENAL KIDIHV IIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNM LNYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN GNKIIDERLITPDGSMLFRVTIN

10

20

30

40

50

30	LgBit	atgggtctttcacactcgaagattttcggtt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagtttgcctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatccaaagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcggccgaccaaag gcccagatcgaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacttt aagggtgatcctgcccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacatg ctgaactatttcggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgttccgacggcaaaaag atcactgtaacaggggaccctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgacggctccatgctgttc cgagtaaccatcaacagccatcatcac catcaccac
10	SmBit	VTGYRLFEEIL
31	SmBit	gtgaccggctaccggctgttcgaggag attctg
11	HiBit	VSGWRLFKKIS
32	HiBit	gtgagcggctggcggctgttcaagaag attagc
33	LgTrip 2098	MVFTLEDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIQRIVRSGENAL KIDIHVIIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNM LNYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN GNKIIDERLITPD
34	LgTrip 2098	atgggtctttcacactcgaagattttcggtt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagtttgcctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatccaaagg attgtccggagcgggtgaaaatgCcctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcggccgaccaaag gcccagatcgaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgttgatgatcatcacttt aagggtgatcctgcccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacatg ctgaactatttcggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgttccgacggcaaaaag atcactgtaacaggggaccctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgac

10

20

30

40

50

35	LgTrip 3092 His	MKHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRI V RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT VTGTLWNGNKIIDERLITPD
36	LgTrip 3092 His	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgaagatttcgttggggac tgggaacagacagccgctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagttttgctgcagaatctcggcgtg tccgtaactccgatccaaaggattgtc cggagcgggtgaaaatgcccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgatatgaa ggctctgagcggcggaccaaatggcccag atcgaagagggtgttttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgcccgaacatgctgaac tatttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttcgacggcaaaaagatcact gtaacagggaacctgttggaacggcaac aaaattatcgacgagcgcctgatcacc cccgac
37	LgTrip 3092	MVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIMRI VRS GENAL KIDIHV IIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN GNKIIDERLITPD
38	LgTrip 3092	atgggtcttcacactcgacgatttcgtt ggggactgggaacagacagccgctac aacctggaccaagtccttgaacaggga gggtgtgtccagtttgctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatcatgagg attgtccggagcgggtgaaaatgcccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcggcggaccaaatg gcccagatcgaagagggtgttttaagggtg gtgtaccctgttgatgatcatcacttt aagggtgatcctgcccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgcccgaacaag ctgaactatttcggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgttcgacggcaaaaag atcactgtaacagggaacctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgac
13	SmTrip 9	GSMLFRVTINS

10

20

30

40

50

39	SmTrip 9	ggctccatgctgtttccgagtaaccatc aacagc
15	SmTrip 10	VSGWRLFKKIS
40	SmTrip 10	gtgagcggcctggcggcctgtttcaagaag attagc
41	5P-B9	MVFTLEDVFGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLFQNLAVSVTPIQRIVLSGENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEKIFKV VYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNM INYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN GNKIIDERLITPD
42	5P-B9	atgggtctttcacactcgaagattttcggtt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagttttgtttcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatccaaagg attgtcctgagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcggccgaccaaatg gcccagatcgaaaaaatttttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacttt aagggtgatcctgcactatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacatg atcaactattttcggaacggccgtatgaa ggcatcgccgtgtttcgacggcaaaaag atcactgtaacagggaaccctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgac
43	5P (147 -157)	GSMLFRVTINV
44	5P (147 -157)	ggctccatgctgtttccgagtaaccatc aac
45	LgTrip 2098 His	MKHHHHHHVFTLEDVFGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIQRIV RSGENALKIDIHVIIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNMLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT VTGTLWNGNKIIDERLITPD
46	LgTrip 2098 His	atgaaacatcaccatcacatcatgtc ttcacactcgaagattttcggttggggac tggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagttttgctgacagaatctcgccgtg tccgtaactccgatccaaaggattgtc cggagcgggtgaaaatgccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgatatgaa ggtctgagcggccgaccaaatggcccag atcgaagagggtgttttaagggtggtgtac

10

20

30

40

50

		cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgccgaacatgctgaac tatttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttcgacggcaaaaagatcact gtaacagggaccctgttggaacggcaac aaaattatcgacgagcgcctgatcacc cccgac
14	SmTrip 9/10 ジ ペプチド (p ep263)	GSMLFRVTINSVSGWRLFKKIS
47	SmTrip 9/10 ジ ペプチド (P ep263)	ggctccatgctgttccgagtaaccatc aacagcgtgagcggcctggcggcctgttc aagaagattagc
48	SmTrip 9+ (p ep286)	SSWKRGSMLEFRVTINS
49	SmTrip 9+ (p ep286)	Agcagctggaagcgcggcctccatgctg ttccgagtaaccatcaacagc
50	LgTrip 3440	MKHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHVIIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGDTPNKLNYFGRPYDGI AVFDGKKIT VTGTLWNGNKIIDERLITPD
51	LgTrip 3440	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgacgatttctgttggggac tgggaaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccctgaacaggagggtgtg tccagtttgcctgcagaatctcgccgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgcccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggctctgagcgcgcgaccaaattggcccag atcgaagagggtgtttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggatacgccgaacaagctgaac tatttcggacggccgtatgatggcatc gccgtgttcgacggcaaaaagatcact gtaacagggaccctgttggaacggcaac aaaattatcgacgagcgcctgatcacc cccgac

10

20

30

40

50

52	LgTrip 3121	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPSKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT VTGTLWNGNKIIDERLITPD
53	LgTrip 3121	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgcacgatttctgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagtttgcctgcagaatctcgcctg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgcccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgatatgaa ggctctgagcgcgcgaccaaattggcccag atcgaagagggtgtttaagggtggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgcccgaacaagctgaac tatttccggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttctgacggcaaaaagatcact gtaacagggaacctgttggaacgggcaac aaaattatcgcacgagcgcctgatcacc cccgac
54	LgTrip 3482	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGFAVFDGKKIT VTGTLWNGNKIIDERLITPD
55	LgTrip 3482	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgcacgatttctgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagtttgcctgcagaatctcgcctg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgcccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgatatgaa ggctctgagcgcgcgaccaaattggcccag atcgaagagggtgtttaagggtggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgcccgaacaagctgaac tatttccggacggccgtatgaaggcttc gccgtgttctgacggcaaaaagatcact gtaacagggaacctgttggaacgggcaac aaaattatcgcacgagcgcctgatcacc cccgac

10

20

30

40

50

56	LgTrip 3497	MKHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVCDGKKIT VTGTLWNGNKIIDERLITPD
57	LgTrip 3497	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgacgatttcgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagtttgctgcagaatctcgccgtg tccgttaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgcccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggctctgagcgcgcgaccaaattggcccag atcgaagagggtgtttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgcccgaacaagctgaac tatttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttgacggcgaaaaagatcact gtaacaggggaccctgttggaacggcaac aaaattatcgacgagcgcctgatcaccc ccgac
58	LgTrip 3125	MKHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIS VTGTLWNGNKIIDERLITPD
59	LgTrip 3125	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgacgatttcgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagtttgctgcagaatctcgccgtg tccgttaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgcccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggctctgagcgcgcgaccaaattggcccag atcgaagagggtgtttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgcccgaacaagctgaac tatttcgggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttcgacggcgaaaaagatcctt gtaacaggggaccctgttggaacggcaac aaaattatcgacgagcgcctgatcaccc ccgac

10

20

30

40

50

60	LgTrip 3118	MKHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHVIIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT ATGTLWNGNKIIDERLITPD
61	LgTrip 3118	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgcacgatttctgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagtttgcctgcagaatctcgccgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaaatgcccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggctctgagcgcgcgaccaaattggcccag atcgaagagggtgttttaagggtgggtgtac cctgttggaatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgcccgaacaagctgaac tatttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttctgacggcaaaaagatcact gcaacagggaacctgttggaacgggcaac aaaattatcgcacgagcgcctgatcacc cccgac
12	LgTrip 3546	MKHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHVIIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT TTGTLWNGNKIIDERLITPD
62	LgTrip 3546	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgcacgatttctgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagtttgcctgcagaatctcgccgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaaatgcccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggctctgagcgcgcgaccaaattggcccag atcgaagagggtgttttaagggtgggtgtac cctgttggaatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgcccgaacaagctgaac tatttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttctgacggcaaaaagatcact accacagggaacctgttggaacgggcaac aaaattatcgcacgagcgcctgatcacc cccgac

10

20

30

40

50

63	LgTrip 3546+ G (ATG 3572)	MVFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENAL KIDIHV IIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWN GNKIIDERLITPDG
64	LgTrip 3546+ G (ATG 3572)	atgggtcttcacactcgacgatttctgtt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagttttgctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatcatgagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcggccgaccaaatg gcccagatcgaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacttt aagggtgatcctgcccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacaag ctgaactatttcggacggccgtatgaa ggcatcggccgtgttcgacggcaaaaag atcactaccacagggaccctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgacggc
65	LgTrip 3546- D (ATG 3573)	MVFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENAL KIDIHV IIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWN GNKIIDERLITP
66	LgTrip 3546- D (ATG 3573)	atgggtcttcacactcgacgatttctgtt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagttttgctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatcatgagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcggccgaccaaatg gcccagatcgaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacttt aagggtgatcctgcccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacaag ctgaactatttcggacggccgtatgaa ggcatcggccgtgttcgacggcaaaaag atcactaccacagggaccctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcaccccc
67	LgTrip 3546- PD (ATG	MVFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENAL KIDIHV IIPYEGLSADQMAQIEEVFKV

10

20

30

40

50

	3574)	VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWN GNKIIDERLIT
68	LgTrip 3546- PD (ATG 3574)	atgggtctttcacactcgacgatttcgtt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagttttgctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatcatgagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtcttgagcgccgaccaaattg gcccagatcgaaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacctt aagggtgatcctgcccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacaag ctgaactatttcggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgttcgacggcaaaaag atcactaccacagggaacctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacc
69	LgTrip 3546+ GS (ATG 3575)	MVFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWN GNKIIDERLITPDGS
70	LgTrip 3546+ GS (ATG 3575)	atgggtctttcacactcgacgatttcgtt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagttttgctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatcatgagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtcttgagcgccgaccaaattg gcccagatcgaaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacctt aagggtgatcctgcccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacaag ctgaactatttcggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgttcgacggcaaaaag atcactaccacagggaacctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacc
71	-V_LgB iT (ATG 3618)	MFTLEDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQGG VSSLLQNLAVSVTPIQRIVRSGENALK IDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKVV YPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNML NYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNG NKIIDERLITPDGSMLFRVTINSHHHH

10

20

30

40

50

		HH
7 2	-V_LgB iT (ATG 3618)	atgtttcacactcgaagattttcgttggg gactggggaacagacagccgcctacaac ctggaccaagtccttgaacaggagggt gtgtccagttttgctgcagaatctcgcc gtgtccgtaactccgatccaaaggatt gtccggagcgggtgaaaatgcccctgaag atcgacatccatgtcatcatcccgtat gaagggtctgagcgcgcgaccaaattggcc cagatcgaagagggtgtttaagggtgggtg taccctgtggatgatcatcactttaag gtgatcctgcccctatggcacactggta atcgacgggggttacgccgaacatgctg aactattttcggacggccgtatgaaggc atcgccgtgtttcgacggcaaaaagatc actgtaacagggaaccctgttggaacggc aacaataattatcgacgagcgcctgatc accccgacggctccatgctgtttccga gtaaccatcaacagccatcatcaccat caccactaa
7 3	-VF_Lg BiT (AT G3619)	MTLEDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQGGV SSLLQNLAVSVTPIQRIVRSGENALKI DIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVY PVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNMLN YFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGN KIIDERLITPDGSMLFRVTINSHHHHH H
7 4	-VF_Lg BiT (AT G3619)	atgacactcgaagattttcgttggggac tggggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagttttgctgcagaatctcgccgtg tccgtaactccgatccaaaggattgtc cggagcgggtgaaaatgcccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggctctgagcgcgcgaccaaattggcccag atcgaagagggtgtttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgccgaacatgctgaac tatttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgtttcgacggcaaaaagatcact gtaacagggaaccctgttggaacggcaac aaaataattatcgacgagcgcctgatcac cccgacggctccatgctgtttccgagta accatcaacagccatcatcaccatcac cactaa

10

20

30

40

50

75	-VFT_L gBiT (A TG3620)	MLEDVFGDWEQTAAYNLDQVLEQGGVS SLLQNLAVSVTPIQRIVRSGENALKID IHV IIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYP VDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNMLNY FGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNK IIDERLITPDGSMLFRVTINSHHHHHH
76	-VFT_L gBiT (A TG3620)	atgctcgaagatttctgttggggactgg gaacagacagccgcctacaacctggac caagtccttgaacagggagggtgtgtcc agtttctgctgcagaatctcgcctgtgtcc gtaactccgatccaaaggattgtccgg agcgggtgaaaatgcccctgaagatcgac atccatgtcatcatcccgtatgaagggt ctgagcggccgaccaaataggcccagatc gaagagggtgtttaagggtggtgtaccct gtggatgatcatcactttaagggtgatc ctgcccctatggcacactggtaatcgac gggggttacgccgaacatgctgaactat ttcggacggccgtatgaaggcatcgcc gtgttcgacggcaaaaagatcactgta acaggggaccctgttggaacggcaacaaa attatcgacgagcgcctgatcaccccc gacggctccatgctgtttccgagtaacc atcaacagccatcatcaccatcacccac taa
77	-VFTL_ LgBiT (A TG362 1)	MEDVFGDWEQTAAYNLDQVLEQGGVSS LLQNLAVSVTPIQRIVRSGENALKIDI HV IIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYPV DDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNMLNYF GRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKI IDERLITPDGSMLFRVTINSHHHHHH
78	-VFTL_ LgBiT (A TG362 1)	atggaagatttctgttggggactgggaa cagacagccgcctacaacctggaccaa gtccttgaacagggagggtgtgtccagt ttgctgcagaatctcgcctgtgtccgta actccgatccaaaggattgtccggagc ggtgaaaaatgcccctgaagatcgacatc catgtcatcatcccgtatgaagggtctg agcggccgaccaaataggcccagatcgaa gagggtgtttaagggtggtgtaccctgtg gatgatcatcactttaagggtgatccctg ccctatggcacactggtaatcgacggg gttacgccgaacatgctgaaciatcttc ggacggccgtatgaaggcatcgccgtg ttcgaacggcaaaaagatcactgtaaca gggaccctgttggaacggcaacaaaatt atcgacgagcgcctgatcacccccgac ggctccatgctgtttccgagtaaccatc

10

20

30

40

50

		aacagccatcatcaccatcaccactaa
79	(M) FKK IS-GSS G-LgBi T (ATG3 632)	MFKKISGSSGVFTLEDFVGDWEQTAAY NLDQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIQR IVRSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQM AQIEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTL VIDGVTPNMLNYPGRPYEGIAVFDGKK ITVTGTLWNGNKIIDERLITPDGSMLF RVTINSHHHHHH
80	(M) FKK IS-GSS G-LgBi T (ATG3 632)	atgttcaagaagatttagcggctcgcgagc ggtgtcttccacactcgaagatttctggt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagtttgcctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatccaaagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcgccgaccaaatg gcccagatcgaagagggtgttttaagggtg gtgtaccctgttggtatgatcatcacttt aagggtgatcctgcccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacatg ctgaactatttccggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgttccgacggcaaaaag atcactgtaacagggaacctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgacgggtccatgctgttc cgagtaaccatcaacagccatcatcac catcaccactaa
81	(M) KKI S-GSSG -LgBiT (ATG36 33)	MKKISGSSGVFTLEDFVGDWEQTAAYN LDQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIQRI VRSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMA QIEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLV IDGVTPNMLNYPGRPYEGIAVFDGKKI TVTGTTLWNGNKIIDERLITPDGSMLFR VTINSHHHHHH
82	(M) KKI S-GSSG -LgBiT (ATG36 33)	atgaagaagatttagcggctcgcgagcgggt gtcttccacactcgaagatttctggtggg gactgggaacagacagccgcctacaac ctggaccaagtccttgaacaggggaggt gtgtccagtttgcctgcagaatctcgcc gtgtccgtaactccgatccaaaggatt gtccggagcgggtgaaaatgccctgaag atcgacatccatgtcatcatcccggtat gaagggtctgagcgccgaccaaatggcc

10

20

30

40

50

		cagatcgaagagggtgtttaagggtggtg tacctgtggatgatcatcactttaag gtgatcctgcccctatggcacactggta atcgacgggggttacgccgaacatgctg aactatttcggacggccgtatgaaggc atcgccgtgttcgacggcaaaaagatc actgtaacagggaacctgtggaacggc aacaaaaattatcgacgagcgccctgatc acccccgacggcctccatgctgttccga gtaaccatcaaacagccatcatcaccat caccactaa
83	(M) KIS -GSSG- LgBiT (ATG363 4)	MKISGSSGVFTLEDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIQRI RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNMLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT VTGTLWNGNKIIDERLITPDGSMLFRV TINSHHHHHH
84	(M) KIS -GSSG- LgBiT (ATG363 4)	atgaagatttagcggctcgagcgggtgtc ttcacactcgaagatttcgttggggac tgggaaacagacagccgctacaacctg gaccaagtccttgaacagggaagggtgtg tccagtttgctgcagaaatctcgccgtg tccgtaactccgatccaaaggattgtc cggagcgggtgaaaaatgccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgatatgaa ggctctgagcggccgaccaaattggccag atcgaagagggtgtttaagggtggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgccgaacatgctgaac tatttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttcgacggcaaaaagatcact gtaacagggaacctgtggaacggcaac aaaattatcgacgagcgccctgatcacc cccgacggcctccatgctgttccgagta accatcaaacagccatcatcaccatcac cactaa
85	(M) IS- GSSG-L gBiT (A TG3635)	MISGSSGVFTLEDFVGDWEQTAAYNLD QVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIQRI RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQI EEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVID GVTPNMLNYFGRPYEGIAVFDGKKITV TGTLWNGNKIIDERLITPDGSMLFRVT INSHHHHHH

10

20

30

40

50

86	(M) IS- GSSG-L gBiT (ATG3635)	atgatttagcggctcagagcgggtgtcttc acactcgaagatttctgttggggacttgg gaacagacagccgcctacaacctggac caagtccttgaacaggagggtgtgtcc agtcttgcctgcagaaatctcgccgtgtcc gtaaactccgatccaaaggattgtccgg agcgggtgaaaatgcccctgaagatcgac atccatgtcatcatcccgtatgaagggt ctgagcgcgcgaccaaataggcccagatc gaagagggtgttttaagggtgggtgtaccct gtggatgatcatcacttttaagggtgatc ctgcccctatggcacacttggtaatcgac ggggttacgcccgaaacatgctgaactat ttcgggacggccgtatgaaggcatcgcc gtgttcgacggcaaaaagatcactgta acaggggaccctgttggaacggcaacaaa attatcgacgagcgcctgatcaccccc gacggctccatgctgtttccgagtaacc atcaacagccatcatcaccatcaccac taa
87	(M) S-G SSG-Lg BiT (ATG3636)	MSGSSGVFTLEDFVGDWEQTAAYNLDQ VLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIQRIVRS GENALKIDIHVIIIPYEGLSADQMAQIE EVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVIDG VTPNMLNYFGRPYEGIAVFDGKKITVT GTLWNGNKIIDERLITPDGSMLFRVTI NSHHHHHH
88	(M) S-G SSG-Lg BiT (ATG3636)	atgagcggctcagagcgggtgtcttcaca ctcgaagatttctgttggggacttgggaa cagacagccgcctacaacctggaccaa gtccttgaacaggagggtgtgtccagt ttgctgcagaaatctcgccgtgtccgta actccgatccaaaggattgtccggagc ggtgaaaatgcccctgaagatcgacatc catgtcatcatcccgtatgaagggtctg agcgcgcgaccaaataggcccagatcgaa gagggtgttttaagggtgggtgtaccctgtg gatgatcatcacttttaagggtgatcctg ccctatggcacacttggtaatcgacggg gttacgcccgaaacatgctgaactatttc ggacggccgtatgaaggcatcgccgtg ttcgacggcaaaaagatcactgtaaca gggaccctgttggaacggcaacaaaatt atcgacgagcgcctgatcacccccgac ggctccatgctgtttccgagtaaccatc aacagccatcatcaccatcaccactaa

10

20

30

40

50

89	LgTrip +GSM (A TG3722)	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHVIIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT TTGTLWNGNKIIDERLITPDGSM
90	LgTrip + GSM (ATG3 722)	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgacgatttctgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacagggagggtgtg tccagtttgcctgcagaatctcgcctgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggctctgagcggccgaccaaattggcccag atcgaagagggtgttttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgccgaacaagctgaac tatttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttctgacggcaaaaagatcact accacagggacccctgttggaacggcaac aaaattatcgacgagcgcctgatcacc cccgacgggcagcatgttaa
91	LgTrip +GSML (ATG372 3)	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHVIIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT TTGTLWNGNKIIDERLITPDGSML
92	LgTrip + GSM L (ATG 3723)	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgacgatttctgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacagggagggtgtg tccagtttgcctgcagaatctcgcctgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggctctgagcggccgaccaaattggcccag atcgaagagggtgttttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgccgaacaagctgaac tatttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttctgacggcaaaaagatcact accacagggacccctgttggaacggcaac aaaattatcgacgagcgcctgatcacc cccgacgggcagcatgtctgttaa

10

20

30

40

50

93	LgTrip +GSMLF (ATG37 24)	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT TTGTLWNGNKI IIDERLITPDGSMLF
94	LgTrip + GSM LF (AT G3724)	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgcacgatttctgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagtttgctgcagaaatctcgccgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggctctgagcgcgcgaccaaattggcccag atcgaagagggtgttttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgccgaacaagctgaac tatttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttcgacggcaaaaagatcact accacagggaacctgtggaacgggcaac aaaattatcgacgagcgcctgatcacc cccgacggcagcatgctgtttctaa
95	LgTrip -TPD (A TG3725)	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT TTGTLWNGNKI IIDERL I
96	LgTrip - TPD (ATG3 725)	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgcacgatttctgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagtttgctgcagaaatctcgccgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggctctgagcgcgcgaccaaattggcccag atcgaagagggtgttttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgccgaacaagctgaac tatttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttcgacggcaaaaagatcact accacagggaacctgtggaacgggcaac aaaattatcgacgagcgcctgatcctaa

10

20

30

40

50

97	LgTrip -ITPD (ATG3726)	MKHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT TTGTLWNGNKI I DERL
98	LgTrip - ITP D (ATG 3726)	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgacgatttctgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacagggagggtgtg tccagtttgcctgcagaatctcgccgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaaatgcccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgatgaa ggctctgagcgcgcgaccaaatggcccag atcgaagagggtgtttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgcccgaacaagctgaac tatttccgacggccgctatgaaggcatc gccgtgttgcacggcaaaaagatcact accacagggaccctgttggaacggcaac aaaattatcgacgagcgcctgttaa
99	LgTrip -LITPD (ATG3727)	MKHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT TTGTLWNGNKI I DER
100	LgTrip - LIT PD (AT G3727)	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgacgatttctgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacagggagggtgtg tccagtttgcctgcagaatctcgccgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaaatgcccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgatgaa ggctctgagcgcgcgaccaaatggcccag atcgaagagggtgtttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgcccgaacaagctgaac tatttccgacggccgctatgaaggcatc gccgtgttgcacggcaaaaagatcact accacagggaccctgttggaacggcaac aaaattatcgacgagcgcctaa
101	FRB-15 GS-AI- 86 (ATG	MVA I L W H E M W H E G L E E A S R L Y F G E R N V K G M F E V L E P L H A M M E R G P Q T L K E T S F N Q A Y G R D L M E A Q E W C R K Y M K S G N V K D L T

10

20

30

40

50

	1634)	QAWDLYYHVFRRIISGGSGGGSGGSSS GGAIIVSGWRLFKKIS
10 2	FRB-15 GS-AI- 86 (AT G1634)	atgggtggccatcctcttggcatgagatg tggcatgaaggccttggaagaggcatct cgtttgtacttttggggaaagggaacgtg aaaggcatgttttgagggtgctggagccc ttgcatgctatgatggaaacggggcccc cagactctgaaggaaacatcctttaat caggccctatggtcgagattttaatggag gccccagagtggtgacaggaagtacatg aaatcagggaatgtcaaggacctcacc caagccctgggacctctattatcatgtg ttccgacgaatcagtggttggttcagggt ggtggcgggagcgggtggctcgagcagc ggtggagcgcgtcgtgagcggcctggcgg ctgtttcaagaagattagctaa
10 3	FRB-15 GS-AI- 289 (AT G3586)	MVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNV KGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLT QAWDLYYHVFRRIISGGSGGGSGGSSS GGAIIVSVSGWRLFKKIS
10 4	FRB-15 GS-AI- 289 (AT G3586)	atgggtggccatcctcttggcatgagatg tggcatgaaggccttggaagaggcatct cgtttgtacttttggggaaagggaacgtg aaaggcatgttttgagggtgctggagccc ttgcatgctatgatggaaacggggcccc cagactctgaaggaaacatcctttaat caggccctatggtcgagattttaatggag gccccagagtggtgacaggaagtacatg aaatcagggaatgtcaaggacctcacc caagccctgggacctctattatcatgtg ttccgacgaatcagtggttggttcagggt ggtggcgggagcgggtggctcgagcagc ggtggagcgcgttagcgttagcggc tggcggcctgtttcaagaagatcagctaa
10 5	FRB-15 GS-AI- 86-His 6 (ATG3 743)	MVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNV KGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLT QAWDLYYHVFRRIISGGSGGGSGGSSS GGAIIVSGWRLFKKISHHHHHHH
10 6	FRB-15 GS-AI- 86-His 6 (ATG3 743)	atgggtggccatcctcttggcatgagatg tggcatgaaggccttggaagaggcatct cgtttgtacttttggggaaagggaacgtg aaaggcatgttttgagggtgctggagccc ttgcatgctatgatggaaacggggcccc cagactctgaaggaaacatcctttaat caggccctatggtcgagattttaatggag

10

20

30

40

50

		gccccaaagagtgggtgcagggaagtacatg aaatcagggaatgtcaaggacctcacc caagcctggggacctctattatcatgtg ttccgacgaatcagtgggtgggttcagggt gggtggcgggagcgggtggctcgagcagc gggtggagcgatcgtgagcggctggcgg ctgtttcaagaagattagccatcatcac catcaccactaa
10 7	FRB-15 GS-AI- 289-Hi s6 (ATG 3744)	MVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNV KGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLT QAWDLYYHVFRRISGGSGGGGSGGSSS GGAIVSVSGWRLFKKISHHHHHH
10 8	FRB-15 GS-AI- 289-Hi s6 (ATG 3744)	atgggtggccatcctctggcatgagatg tggcatgaaggcctggaaagaggcatct cgtttgtacttttggggaaaaggaaacgtg aaaggcatgttttgagggtgctggagccc ttgcatgctatgatggaaacggggcccc cagactctgaaggaaaacatccttttaat caggcctatgggtcgagattttaatggag gccccaaagagtgggtgcagggaagtacatg aaatcagggaatgtcaaggacctcacc caagcctggggacctctattatcatgtg ttccgacgaatcagtgggtgggttcagggt gggtggcgggagcgggtggctcgagcagc gggtggagcgatcgttagcgtgagcggc tggcggctgtttcaagaagattagccat catcaccatcaccactaa
10 9	His6-F RB-5GS -86 (AT G3760)	MKHHHHHHVAAILWHEMWHEGLEEASRL YFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQT LKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLTQAWDLYYHVFRRISGGSGGV SGWRLFKKIS
11 0	His6-F RB-5GS -86 (A TG3760)	atgaaacatcaccatcaccatcatgtg gccatcctctggcatgagatgtggcat gaaggcctggaaagaggcatctcgtttg tacttttggggaaaaggaaacgtgaaaggc atgttttgagggtgctggagcccccttgc atgctatgatggaaacgggggccccagact ctgaaggaaaacatccttttaatcaggcc tatgggtcgagattttaatggaggcccaa gagtggtgcagggaagtacatgaaatca gggaatgtcaaggacctcacccaagcc tgggacctctattatcatgtgtttccga cgaatcagtggtgggttcagggtgggtgtg agcggctggcggctgtttcaagaagatt agctaa

10

20

30

40

50

11 1	His6-F RB-10G S-86 (A TG3761)	MKHHHHHHVAILWHEMWHEGLEEASRL YFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQT LKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLTQAWDLYYHVFRRISSGSGGG GSGGVSGWRLFKKIS
11 2	His6-F RB-10G S-86 (A TG3761)	atgaaacatcaccatcaccatcatgtg gccatcctcttgccatgagatgtggcat gaaggccttggaagaggcatctcgtttg tactttgggggaaagggaacgtgaaaggc atgttttgagggtgctggagcccttgcat gctatgatggaaacggggccccagact ctgaagggaacatccttttaatcaggcc tatgggtcgagattttaatggaggcccaa gagtggtgacaggaagtacatgaaatca gggaatgtcaaggacctcaccacaagcc tgggacctctattatcatgtgttccga cgaatcagtggttggttcagggtggtggc gggagcgggtggcgtgagcggcctggcgg ctgtttcaagaagatttagctaa
11 3	His6-F RB-15G S-86 (A TG3762)	MKHHHHHHVAILWHEMWHEGLEEASRL YFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQT LKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLTQAWDLYYHVFRRISSGSGGG GSGGSSSGGVSGWRLFKKIS
11 4	His6-F RB-15G S-86 (A TG3762)	atgaaacatcaccatcaccatcatgtg gccatcctcttgccatgagatgtggcat gaaggccttggaagaggcatctcgtttg tactttgggggaaagggaacgtgaaaggc atgttttgagggtgctggagcccttgcat gctatgatggaaacggggccccagact ctgaagggaacatccttttaatcaggcc tatgggtcgagattttaatggaggcccaa gagtggtgacaggaagtacatgaaatca gggaatgtcaaggacctcaccacaagcc tgggacctctattatcatgtgttccga cgaatcagtggttggttcagggtggtggc gggagcgggtggcctcgagcagcgggtgga gtgagcggcctggcggcctgtttcaagaag atttagctaa
11 5	His6-F RB-5GS -289 (A TG3763)	MKHHHHHHVAILWHEMWHEGLEEASRL YFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQT LKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLTQAWDLYYHVFRRISSGSGGV SVSGWRLFKKIS
11 6	His6-F RB-5GS -289 (A TG3763)	atgaaacatcaccatcaccatcatgtg gccatcctcttgccatgagatgtggcat gaaggccttggaagaggcatctcgtttg tactttgggggaaagggaacgtgaaaggc atgttttgagggtgctggagcccttgcat

10

20

30

40

50

		gctatgatgggaacgggggccccagact ctgaaggaaacatccttttaatcaggcc tatgggtcgagattttaatggaggcccaa gagtggtgacaggaagtacatgaaatca gggaatgtcaaggacctcaccacaagcc tgggacctctattatcatgtgttccga cgaatcagtggtggttcagggtggtgtt agcggttagcggctggcgcctgttcaag aagatcagctaa
11 7	His 6-F RB-10G S-289 (ATG376 4)	MKHHHHHHVAIILWHEMWHEGLEEASRL YFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQT LKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLTQAWDLYYHVFRRI SGGSGGG GSGGVS SVSGWRLFKKIS
11 8	His 6-F RB-10G S-289 (ATG376 4)	atgaaacatcacccatcacccatcatgtg gccatcctctggcatgagatgtggcat gaaggcctgggaagaggcatctcgtttg tactttggggaaaggaaacgtgaaaggc atgttttgagggtgctggagcccttgcat gctatgatgggaacgggggccccagact ctgaaggaaacatccttttaatcaggcc tatgggtcgagattttaatggaggcccaa gagtggtgacaggaagtacatgaaatca gggaatgtcaaggacctcaccacaagcc tgggacctctattatcatgtgttccga cgaatcagtggtggttcagggtggtggc gggagcgggtggcgttagcgttagcggc tggcgcctgtttcaagaagatcagctaa
11 9	His 6-F RB-15G S-289 (ATG376 5)	MKHHHHHHVAIILWHEMWHEGLEEASRL YFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQT LKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLTQAWDLYYHVFRRI SGGSGGG GSGGSSS GGVSVSGWRLFKKIS
12 0	His 6-F RB-15G S-289 (ATG376 5)	atgaaacatcacccatcacccatcatgtg gccatcctctggcatgagatgtggcat gaaggcctgggaagaggcatctcgtttg tactttggggaaaggaaacgtgaaaggc atgttttgagggtgctggagcccttgcat gctatgatgggaacgggggccccagact ctgaaggaaacatccttttaatcaggcc tatgggtcgagattttaatggaggcccaa gagtggtgacaggaagtacatgaaatca gggaatgtcaaggacctcaccacaagcc tgggacctctattatcatgtgttccga cgaatcagtggtggttcagggtggtggc gggagcgggtggcctcagagcagcgggtgga gttagcgttagcggctggcgcctgttca aagaagatcagctaa

10

20

30

40

50

12 1	SmTrip 9-FKBP 融合体テンプレート (ATG780)	M- GSMLFRVTINS -SSSGGGGSGGG SSGGGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCV VHYTG MLEDGKKFDSSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVEL LKLE
12 2	SmTrip 9-FKBP 融合体テンプレート (ATG780)	atggggctccatgctgttccgagtaacc atcaacagctcaggttcagggtggtggc gggagcgggtggaggaggagcagcgggtgga ggaggtgcaggtggaaaaccatctcccca ggagacggggcgcaccttccccaagcgc ggccagacctgctgtggtgcactacacc gggatgcttgaagatggaaaagaaattt gattcctcccgggacagaaaacaagccc tttaagtttatgctaggcaagcaggag gtgatccgagggtgggaagaagggtt gcccagatgagtggtgggtcagagagcc aaactgactatatctccagattatgcc tatggtggccactggggcaccagggcatc atcccaccacatgccactctcgtcttc gatgtggagcttctaaaactggaataa
12 3	FKBP-S mTrip9 融合体テンプレート (ATG777)	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHY TGMLLEDGKKFDSSRDRNKPFKFM LGKQ EVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTI SPDY AYGATGHPGIIPPHATLVFDVEL LKLE GGSGGGGSGGSSSGGAI- GSMLFRVT INS
12 4	FKBP-S mTrip9 融合体テンプレート (ATG777)	Atggggagtgaggtggaaaaccatctcc ccaggagacggggcgcaccttccccaag cgcgccagacctgctgtggtgcactac accgggatgcttgaagatggaaaagaaa tttgattcctcccgggacagaaaacaag ccctttaagtttatgctaggcaagcag gaggtgatccgagggtgggaagaagggt gttgcccagatgagtggtgggtcagaga gccaaactgactatatctccagattat gcctatggtggccactggggcaccagggc atcatcccaccacatgccactctcgtc ttcgatgtggagcttctaaaactggaa ggtggttcagggtggtggcgaggagcgggt ggctcgagcagcgggtggagcgatcggc tccatgctgttccgagtaaccatcaac agc
12 5	LgBiT (ATG2623)	MVFTLEDVFGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIQRIVRSGENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVT PNM LNYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN

10

20

30

40

50

		GNKIIDERLITPDGSMLFRVTINSHHH HHH
12 6	LgBiT (ATG2623)	atgggtcttcacactcgaagatttctgtt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagtttgctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatccaaagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaaggctctgagcggccgaccaaag gcccagatcgaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgttggaatgatcatcacttt aaggatgatccctgcccctatggcacactg gtaatcgacggggttacgccgaacatg ctgaactatttcggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgttcgacggcaaaaag atcactgtaacaggggaccctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgacggctccatgctgttc cgagtaaccatcaacagccatcatcac catcaccactaa
12 7	pep78	NVSGWRLFKKISN
12 8	pep79	NVTGYRLFKKISN
12 9	pep80	VSGWRLFKKISN
13 0	pep81	SGWRLFKKISN
13 1	pep82	GWRLFKKISN
13 2	pep99	VTGYRLFEEKIS
13 3	pep219	SGWRLFKKIS
13 4	pep225	VSGWRL
13 5	pep226	VSGWRLF
13 6	pep227	VSGWRLFK
13 7	pep228	VSGWRLFKK
13 8	pep229	VSGWRLFKKI
13 9	pep243	VSGWRLYKKIS
14	pep272	GSMLFRVTINSVSGWALFKKIS

10

20

30

40

50

0		
14 1	pep274	GSMLFRVTINSVTGYRLFEEIL
14 2	pep287 (WT Sm Trip9) +C末端溶解 性タグ	GSMLFRVTINSSSWKR
14 3	pep288	VSGVSGWRLFKKIS
14 4	pep290	VVSGWRLFKKIS
14 5	pep291	SSWKRSMMLFRVTINS
14 6	pep292	SSWKRMLFRVTINS
14 7	pep293	SSWKRDGSMMLFRVTINS
14 8	pep294	SSWKRPDGSMMLFRVTINS
14 9	pep296	SSWKRSMMLFRVTINSV
15 0	pep297	SSWKRMLFRVTINSV
15 1	pep298	SSWKRDGSMMLFRVTINSV
15 2	pep299	SSWKRPDGSMMLFRVTINSV
15 3	pep301	SSWKRSMMLFRVTINSVS
15 4	pep302	SSWKRMLFRVTINSVS
15 5	pep303	SSWKRDGSMMLFRVTINSVS
15 6	pep304	SSWKRPDGSMMLFRVTINSVS
15 7	pep305	SSWKRGSMMLFRVTIN
15 8	pep306	SSWKRGSMMLFRVTI
15 9	pep307	SSWKRSMMLFRVTIN
16 0	pep308	SSWKRMLFRVTIN
16 1	pep309	SSWKRDGSMMLFRVTIN
16 2	pep310	SSWKRPDGSMMLFRVTIN
16	pep311	SSWKRSMMLFRVTI

10

20

30

40

50

3		
16 4	pep312	SSWKRLFRVTI
16 5	pep313	SSWKRDGSMLFRVTI
16 6	pep314	SSWKRPDGSMLFRVTI
16 7	pep316	VSGWRLFKKISVFTL
16 8	pep317	VSGWRLFKKISVFT
16 9	pep318	VSGWRLFKKISVF
17 0	pep319	VSGWRLFKKISV
17 1	pep320	VSGWRLCKKIS
17 2	pep326	VSGWRLFKKISGSMLFRVTINS
17 3	pep380	SSWKRLFRVTINS
17 4	pep383	SSWKRFRTINS
17 5	pep386	SSWKRRVTINS
17 6	pep389	SSWKRTPDGSMLFRVTINS
17 7	pep392	SSWKRLITPDGSMLFRVTINS
17 8	pep395	SSWKRLITPDGSMLFRVTINS
17 9	pep396	SSRGSMFLFRVTINSWK
18 0	pep397	SKRGSMFLFRVTINSWS
18 1	pep398	SWRGSMFLFRVTINS
18 2	pep400	SSRGSMFLFRVTIWK
18 3	pep401	SSWKRGSMFLYRVTINS
18 4	pep402	SSWKRGSMFLWRVTINS
18 5	pep403	SSWKRGSMFLHRVTINS
18 6	pep404	SSWKRGSLFLFRVTINS
18 7	pep405	SSWKRGSKLFRVTINS

10

20

30

40

50

188	pep406	SSWKRGSR LFRVTINS
189	pep407	SSWKRGSF LFRVTINS
190	pep408	SSWKRGSW LFRVTINS
191	pep409	SSWKRGSM LFRVSINS
192	pep410	SSWKRGSM LFRVQINS
193	pep411	SSWKRGSM LFRVNINS
194	システインを含むSmTrip9-286	SSWKRGSM LFRVTINSC
195	システインを含むHiBit	CVSGWRLF K K I S
196	アジドを含むSmTrip9-286	SSWKRGSM LFRVTINSK (A z a)
197	アジドを含むHiBit	(a z a) K V S G W R L F K K I S
198	WT O g L u c ジペプチド	GSLLFRVT I N G V T G W R L C E N I L A
199	WT N a n o L u c ジペプチド	GSLLFRVT I N V G V T G W R L C E R I L A
200	pep157	SVSGWRLF K K I S
201	pep158	NSVSGWRLF K K I S
202	pep206	GWRLF K K I S
203	HiBiT-His-Lg Trip3546 (ATG 3745)	A t g g t g a g c g g c t g g c g g c t g t t c a a g a a g a t t a g c c a c c a t c a c c a t c a c c a t c a t c a c t t c a c a c t c g a c g a t t t c g t t g g g g a c t g g g a a c a g a c a g c c g c c t a c a a c c t g g a c c a a g t c c t t g a a c a g g g a g g t g t g t c c a g t t t g c t g c a g a a t c t c g c c g t g t c c g t a a c t c c g a t c a t g a g g a t t g t c c g g a g c g g t g a a a a t g c c c t g a a g a t c g a c a t c c a t g t c a t c a t c c c g t a t g a a g g t c t g a g c g c c g a c c a a a t g g c c c a g a t c g a a g a g g t g t t t a a g g t g g t g t a c c c t g t g g a l g a t c a t c a c t t t a a g g t g a t c c t g c c c t a t g g c a c a c t g

10

20

30

40

50

		gtaatcgacgggggttacgccgaacaag ctgaactattttcggacggccgtatgaa ggcaatcgccgtgtttcgacggcaaaaag atcactaccacagggaccctgtggaac ggcaacaaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgactaa
20 4	HiBiT- His-Lg Trip35 46 (ATG 3745)	MVSGWRLFKKISHHHHHHHHFTLDDFV GDWEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNL AVSVTPIMRIVRSGENALKIDIHVIIP YEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHF KVILPYGTLVIDGVTPNKLNYFGRPYE GIAVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDERL ITPD
20 5	His-Hi BiT-GS SG-LgT rip354 6 (ATG 3746)	Atgaaacatcacccatcacccatcatgtg agcggctggcggctgtttcaagaagatt agcggcagctccgggtttcacactcgac gatttcgttggggactgggaacagaca gccgcctacaacctggaccaagtcctt gaacagggagggtgtgtccagtttgctg cagaatctcgccgtgtccgtaactccg atcatgaggattgtccggagcgggtgaa aatgcccctgaagatcgacatccatgtc atcatcccgtatgaagggtctgagcggc gaccaaatggcccagatcgaagagggtg tttaagggtgggtgtaccctgtggatgat catcacitttaagggtgatccctgccctat ggcacactggtaatcgacgggggttacg ccgaacaagctgaactattttcggacgg ccgtatgaaggcatcgccgtgtttcgac ggcaaaaagatcactaccacagggacc ctgtggaacggcaacaaaaattatcgac gagcgcctgatcacccccgactaa
20 6	His-Hi BiT-GS SG-LgT rip354 6 (ATG 3746)	MKHHHHHHVSGWRLFKKISGSSGFTLD DFVGDWEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLL QNLA VSVTPIMRIVRSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDD HHFKVILPYGTLVIDGVTPNKLNYFGR PYEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNKIID ERLITPD
20 7	リンカーにA IがないFR B-15GS -86 (AT G3768)	Atgggtggccatcctctggcatgagatg tggcatgaaggccttggaagaggcatct cgtttgtactttgggggaaagggaacgtg aaaggcatgtttgagggtgctggagccc ttgcatgctatgatggaacggggcccc cagactctgaaggaaacatcctttaat caggccatgtggtcgagatttaatggag gccccaaagagtgggtgcagggaagtacatg aaatcagggaatgtcaaggacctcacc caagcctgggacctctattatcatgtg

10

20

30

40

50

		ttccgacgaatcagtggttggttcagggt ggtggcgggagcggctcgagcagc ggtggagttagcggctggcggctgttc aagaagattagctaa
208	リンカーにA IがないFR B-15GS -86 (AT G3768)	MVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNV KGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLT QAWDLYYHVFRRISGGSGGGSGGSSS GGVSGWRLFKKIS
209	FRB-15 GS-289 (ATG37 69)	Atggtggccatcctctggcatgagatg tggcatgaaggcctggaaaggcatct cgtttgtacttttggggaaaggaaacgtg aaaggcatgttttgagggtgctggagccc ttgcatgctatgatggaaacgggggcccc cagactctgaaggaaacatccttttaat caggcctaigtgtcgagatttaatggag gcccgaagagtgggtgcagggaagtacatg aaatcagggaatgtcaaggacctcacc caagcctgggacctctattatcatgtg ttccgacgaatcagtggttggttcagggt ggtggcgggagcggctcgagcagc ggtggagttagcgttagcggctggcgc ctgttcaagaagatcagctaa
210	FRB-15 GS-289 (ATG3 769)	MVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNV KGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLT QAWDLYYHVFRRISGGSGGGSGGSSS GGVSVSGWRLFKKIS
211	リンカーにA IがないFK BP-SmT rip9融合 体テンプレ ート (ATG3 770)	atggggagtgcagggtggaaaccatctcc ccaggagacgggcgccaccttccccaag cgcgggccagacctgctgtggtgcactac accgggatgcttgaagatggaaagaaa tttgatctcctcccggggacagaaacaag ccctttaagtttatgctaggcaagcag gaggtgatccgaggctgggaagaagggg gttgcccagatgagtggtgggtcagaga gccaaactgactataatctccagattat gcctatgggtgccactggggcaccagggc atcatcccaccacatgccactctcgtc ttcgatgtggagcttctaaaactggaa ggtggttcagggtgggtggcgggagcgggt ggctcgagcagcgggtgga
212	リンカーにA IがないFK BP-SmT rip9融合 体テンプレ ート (ATG3	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHY TGMLEDGKKFDSSSRDRNKPFFKMLGKQ EVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTI SPDY AYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE GSGSGGGSGGSSSGG

10

20

30

40

50

	7 7 0)	
2 1 3	2 9 5	GSMLFRVTINSV
2 1 4	3 0 0	GSMLFRVTINSVS
2 1 5	4 1 2	MLFRVTINSVSG
2 1 6	4 1 3	MLFRVTINSVSGW
2 1 7	4 1 5	MLFRVTINSVSGWK
2 1 8	4 1 6	MLFRVTINSVSGWR
2 1 9	4 1 8	GSMLFRVTINSVSG
2 2 0	4 1 9	GSMLFRVTINSVSGW
2 2 1	4 2 2	GSMLFRVTINSVSGWR
2 2 2	4 2 3	GSMLFRVTINSVSGWK
2 2 3	4 3 4	GSMLFRVTIWK
2 2 4	4 3 5	GSMLFRVTINSWK
2 2 5	4 7 7	MLFRVTINSWK
2 2 6	4 7 8	MLFRVTINSWS
2 2 7	4 7 9	MLFRVTIWS
2 2 8	4 8 0	MLFRVTIWK
2 2 9	4 8 1	MLFRVKINS
2 3 0	4 8 2	GSMLFRVTINSWS
2 3 1	4 8 3	GSMLFRVKINS
2 3 2	4 8 4	GSMLFRVTIWS
2 3 3	4 8 5	MLFRVNINS
2 3 4	4 8 6	MLFRVWINS
2 3 5	4 8 7	LLFRVKINS

10

20

30

40

50

23 6	488	FLFRVTINS
23 7	295	SSWKRGSMFLFRVTINSV
23 8	300	SSWKRGSMFLFRVTINSVS
23 9	412	SSWKRMFLFRVTINSVSG
24 0	413	SSWKRMFLFRVTINSVSGW
24 1	414	SSWKRMFLFRVTINSVSGWR
24 2	415	SSWKRMFLFRVTINSVSGWK
24 3	417	MLFRVTINSVSGWK
24 4	418	SSWKRGSMFLFRVTINSVSG
24 5	419	SSWKRGSMFLFRVTINSVSGW
24 6	420	SSWKRGSMFLFRVTINSVSGWR
24 7	421	SSWKRGSMFLFRVTINSVSGWK
24 8	424	SSWKRGSYLFRVTINS
24 9	425	SSWKRGSMFLFRVKINS
25 0	426	SSWKRGSMFLFRVRINS
25 1	427	SSWKRGSMFLFRVWINS
25 2	428	SSKRGSMFLFRVTIWSV
25 3	429	SSKRGSMFLFRVTIWSVS
25 4	430	SSWRGSMFLFRVTIKS
25 5	431	KRSSGSMFLFRVTIWS
25 6	432	SSKRMLFRVTIWS
25 7	433	KRSSMFLFRVTIWS
25 8	445	GSMKFRVTINSWK
25 9	450	GSMLFRKTINSWK
26	455	GSMLFRVTKNWK

10

20

30

40

50

0		
2 6 1	5 2 2	GKMLFRVTIWK
2 6 2	5 2 3	GSMKFRVTINSWK
2 6 3	5 2 4	GSMKFRVTIWK
2 6 4	5 2 5	GRMLFRVTINSWK
2 6 5	5 2 6	GRMLFRVTIWK
2 6 6	5 2 7	GSMRFRVTINSWK
2 6 7	5 2 8	GSMRFRVTIWK
2 6 8	5 2 9	GDMLFRVTINSWK
2 6 9	5 3 0	GDMLFRVTIWK
2 7 0	5 3 1	GSMDFRVTINSWK
2 7 1	5 3 2	GSMDFRVTIWK
2 7 2	5 3 3	GEMLFRVTINSWK
2 7 3	5 3 5	GSMEFRVTINSWK
2 7 4	5 3 6	GSMEFRVTIWK
2 7 5	5 3 8	GSMLFRVTIWKVK
2 7 6	5 3 9	GSMLFRVTIWSVK
2 7 7	5 4 0	GSMLFRVTIWSK
2 7 8	5 4 1	GSMLFRVTIWKWK
2 7 9	5 4 2	GSMLFRVTIWKK
2 8 0	2 4 5	GSMLFRVTINS
2 8 1	2 9 2. x	MLFRVTINS
2 8 2	2 9 7. x	MLFVTINSV
2 8 3	3 0 2. x	MLFRVTINSVS
2 8 4	3 0 5. x	GSMLFRVTIN

10

20

30

40

50

28 5	306. x	GSMLFRVTI
28 6	307. x	SMLFRVTIN
28 7	308. x	MLFRVTIN
28 8	312. x	MLFRVTI
28 9	399	SSKRGSMLFRVTIWS
29 0	273	GSMLFRVTINSGVSGWALFKKIS
29 1	264	GSMLFRVTINSGVSGWRLFKKIS
29 2	167	VSGWALFKKIS
29 3	331	GSMLFRVTINSVSGVSGWRLFKKIS
29 4	LgTrip 3546 (His6なし)	MVFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWN GNKIIDERLITPD
29 5	LgTrip 3546 (His6なし)	atgggtccttcacactcgacgatttcgtt ggggactggggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagtttgcctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatcatgagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcgccgaccaaatg gcccagatcgaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacttt aagggtgatcctgcccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacaag ctgaactatttcggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgttcgacggcaaaaag atcactaccacagggaaccctgtggaac ggcaacaaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgac
29 6	LgTrip 2098 (His6なし)	MVFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN GNKIIDERLITPD

10

20

30

40

50

29 7	LgTrip 2098 (His6なし)	atgggtcttccacactcgaagatttctgtt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtcttgaacaggga ggtgtgtccagtcttgcagaaatctc gccgtgtccgtaactccgatccaaagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaaggctctgagcggccgaccaaatg gcccagatcgaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacttt aagggtgatccctgccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacatg ctgaactatttctggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgttctgacggcaaaaag atcactgtaacaggggaccctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgac
29 8	157	SVSGWRLFKKIS
29 9	158	NSVSGWRLFKKIS
30 0	206	GWRLFKKIS
30 1	264	GSMLFRVTINSGVSGWRLFKKIS
30 2	489	GSMLFRVTINSWK (N末端ブロッキングなし)
30 3	490	GSMLFRVTINSWK (C末端ブロッキングなし)
30 4	491	GSMLFRVTINSWK (両末端ブロッキングなし)
30 5	492	GSMLFRVTINKWK
30 6	493	GSMLFRVTIKSWK
30 7	494	GSMLFRVTINRWK
30 8	495	GSMLFRVTIRSWK
30 9	496	GSMLFRVTINDWK
31 0	497	GSMLFRVTIDSWK
31 1	498	GSMLFRVTINEWK
31 2	499	GSMLFRVTIESWK
31 3	465	GSMRFRVTINSWK (両末端ブロッキングなし)

10

20

30

40

50

3 1 4	4 6 6	GSMDFRVTINSWK (両末端ブロッキングなし)
3 1 5	4 6 7	GSMEFRVTINSWK (両末端ブロッキングなし)
3 1 6	4 6 8	GSMLFRRTINSWK (両末端ブロッキングなし)
3 1 7	4 6 9	GSMLFRDTINSWK (両末端ブロッキングなし)
3 1 8	4 7 0	GSMLFRETINSWK (両末端ブロッキングなし)
3 1 9	4 7 2	GSMLFRVTDNSWK (両末端ブロッキングなし)
3 2 0	4 7 3	GSMLFRVTENSWK (両末端ブロッキングなし)
3 2 1	4 7 4	GSМКFRVTINSWK (両末端ブロッキングなし)
3 2 2	4 7 5	GSMLFRKTINSWK (両末端ブロッキングなし)
3 2 3	4 7 6	GSMLFRVTKNSWK (両末端ブロッキングなし)
3 2 4	4 3 6	GSMLFRVTINS (N末端ブロッキングなし)
3 2 5	4 3 7	GSMLFRVSINS (N末端ブロッキングなし)
3 2 6	4 3 8	GSMLFRVNINS (N末端ブロッキングなし)
3 2 7	4 3 9	GSKLFRVTINS (N末端ブロッキングなし)
3 2 8	4 4 0	GSRLFRVTINS (N末端ブロッキングなし)
3 2 9	4 4 1	GSMWFRVTINS (N末端ブロッキングなし)
3 3 0	4 4 2	GSMSFRVTINS (N末端ブロッキングなし)
3 3 1	4 4 3	GSMNFRVTINS (N末端ブロッキングなし)
3 3 2	4 4 4	GSМКFRVTINS (N末端ブロッキングなし)
3 3 3	4 4 6	GSMLFRWTINS (N末端ブロッキングなし)
3 3 4	4 4 7	GSMLFRSTINS (N末端ブロッキングなし)
3 3 5	4 4 8	GSMLFRNTINS (N末端ブロッキングなし)
3 3 6	4 4 9	GSMLFRKTINS (N末端ブロッキングなし)
3 3 7	4 5 1	GSMLFRVTWNS (N末端ブロッキングなし)
3 3	4 5 2	GSMLFRVTSNS (N末端ブロッキングなし)

10

20

30

40

50

8		
3 3 9	4 5 3	GSMLFRVTNNS (N末端ブロッキングなし)
3 4 0	4 5 4	GSMLFRVTKNS (N末端ブロッキングなし)
3 4 1	4 5 6	GSMLFRVTIKS (N末端ブロッキングなし)
3 4 2	Antares ATG 3802	MKHHHHHHVSKGEELIKENMRSKLYLE GSVNGHQFKCTHEGEGKPYEGKQTNRI KVVEGGPLPFAFDILATHFMYGSKVFI KYPADLPDYFKQSFPEGFTWERVMVFE DGGVLTATQDTS LQDGELIYNVKVRGV NFPANGPVMQKKTLGWEPSTETMYPAD GGLEGRC DKALKLVGGGHLHVNFKTTY KSKKPVKMPGVHYVDRRLERIKEADNE TYVEQYEHAVARYSNLGGGFTLEDFVG DWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLG VSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPY EGLSGDQMGGQIEKIFKVVYPVDDHHFK VILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEG IAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLI NPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAR HELIKENMRSKLYLEGSVNGHQFKCTH EGEKPYEGKQTNRIKVVEGGPLPFAF DILATHFMYGSKVFIKYPADLPDYFKQ SFPEGFTWERVMVFEDGGVLTATQDTS LQDGELIYNVKVRGVNFPANGPVMQKK TLGWEPSTETMYPADGGLEGRC DKALK LVGGGHLHVNFKTTYKSKKPVKMPGVH YVDRRLERIKEADNETYVEQYEHAVAR YSNLGGGMDELYK

10

20

30

40

50

34	Antare	atgaaacatcaccatcaccatcatgtg
3	s ATG	agcaaggaggagaagaacttataaaagaa
	3802	aacatgcggtctaaactgtacctcgag
		ggctccgtcaatggggcaccagttttaag
		tgtacccacgagggtgagggaagccc
		tatgaggggaagcagacaaaccgcatc
		aaggtcgtcgaagggggacccctcccg
		tttgccttttgatatctttggctactcac
		tttatgtacggaagcaaagttttcata
		aagtatcctgcccgaaccttcctgattat
		tttaaacagtcattttcccgagggtttc
		acatggggaaggggtcatgggtgtttgag
		gatggaggcgtgctcactgcaactcag
		gacacctcactgcaggacggcgagctg
		atctacaatgtgaagggtccgggggtgta
		aacttccctgccaacggggcctgtaatg
		cagaagaagaccctggggatgggagccg
		tccaccgaaaccatgtaccttgctgat
		ggtagggctggaggggccgatgtgacaag
		gctctgaagctcgttggagggtgggtcat
		ttgcacgtataattttcaagacaacttac
		aagagcaaaaaaacccgtaaaaatgcc
		gggggttcattacgttgacagaaggctt
		gaacgcataaagggaagctgataacgag
		acatacgtggagcagtagcagcacgcc
		gttggcccggtactcaaacctgggggggt
		ggctttacactggagggtttttgtggga
		gattggagacagacagccggctacaat
		ctggatcagggtgctgggaacaaggaggga
		gtgtcttctctgttttcagaatctggga
		gtgagcgtgacacctatccagaggatc
		gtgctgtctggcgagaatggactgaag
		atcgatatcaccgtgatcatccctac
		gaaggcctgtctggagaccagatgggc
		cagattgagaagatcttcaaagtgggtg
		tatcctgtggacgatcaccacttcaag
		gtgatcctgcactacggcacccctgggtg
		attgatggagtgacacctaacatgatk
		gactacttccggaagaccttacgaggga
		atcgccgtgttctgacgggaaagaagatc
		accgtgacagggaacactgttggaatgga
		aacaagatcatcgacgagcggctgatk
		aaccctgatggatctctgctgtttcaga
		gtgaccatcaacggagtgacaggatgg
		agactgtgcgagagaattctggctaga
		catgagctaatacagggaaaatatgaga
		agtaagctatacttagagggggtccgtc
		aacgggtcaccagttttaaatgcactcat
		gaagggtgagggggaaccttatgaagggt
		aagcagactaatcgaataaaagtgggtc

10

20

30

40

50

		g a g g g c g g t c c t c t g c c a t t c g c t t t c g a t a t t c t g g c c a c t c a c t t t a t g t a t g g g t c t a a g g t c t t t a t t a a a t a c c c c g c t g a t t t g c c a g a c t a c t t t a a a c a g t c c t t c c c t g a a g g a t t c a c a t g g g a g c g g g t g a t g g t g t t c g a g g a t g g a g g c g t t c t t a c t g c a a c t c a g g a t a c t t c c t t g c a a g a c g g g g a a c t g a t c t a c a a c g t t a a g g t c c g c g g c g t c a a t t t c c c a g c c a a t g g t c c a g t g a t g c a g a a g a a a a c c t t g g g g t g g g a g c c c t c a a c g g a g a c a a t g t a c c c t g c g g a c g g c g g g c t t g a g g g t a g a t g t g a t a a g g c a t t g a a a c t c g t c g g g g g c g g c c a c c t t c a t g t g a a t t t c a a g a c t a c a t a t a a a a g t a a a a a a c c a g t c a a g a t g c c t g g a g t g c a c t a c g t g g a t c g t a g g t t g g a g a g g a t a a a a g a a g c c g a c a a c g a a a c t t a t g t a g a g c a a t a t g a g c a c g c c g t g g c t c g t t a t t c c a a c t t g g g c g g a g g a a t g g a t g a a c t g t a c a a g
344	Antares (LgBiT) ATG 3803	MKHHHHHHVSKGEELIKENMRSKLYLE GSVNGHQFKCTHEGEGKPYEGKQTNRI KVVEGGPLPFAFDILATHFMYGSKVFI KYPADLPDYFKQSFPEGFTWERVMVFE DGGVLTATQDTS LQDGELIYNVKVRGV NFPANGPVMQKKTLGWEPSTETMYPAD GGLEGRCDKALKLVGGGHLHVNFKTTY KSKKPVKMPGVHYVDRRLERIKEADNE TYVEQYEHAVARYSNLGGGFTLED FVG DWEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLA VSVTP IQRIVRSGENALKIDIHVIIPY EGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFK VILPYGTLVIDGVTPNMLNYFGRPYEG IAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLI TPDGSM LFRVTINSRHELIKENMRSKL YLEGSVNGHQFKCTHEGEGKPYEGKQT NRIKVVEGGPLPFAFDILATHFMYGSK VFIKYPADLPDYFKQSFPEGFTWERVM VFEDGGVLTATQDTS LQDGELIYNVKV RGVNFPANGPVMQKKTLGWEPSTETMY PADGGLEGRCDKALKLVGGGHLHVNFK TTYKSKKPVKMPGVHYVDRRLERIKEA DNETYVEQYEHAVARYSNLGGGMDELY K

10

20

30

40

50

34	Antares (LgBi	atgaaacatcaccatcaccatcatgtg
5	T) ATG	agcaagggagagaagaacttataaaagaa
	3803	aacatgcgggtctaaactgtacctcgag
		ggctccgtcaatggggcaccagttttaag
		tgtacccacgaggggtgagggaagccc
		tatgaggggaagcagacaaaccgcac
		aaggctcgtcgaagggggacccctcccg
		tttgccctttgatatacttggtactcac
		tttatgtacggaagcaagtttttcata
		aagtatcctgcccgaaccttcctgattat
		tttaaacagtcattttcccgagggtttc
		acatggggaaggggtcatgggtgtttgag
		gatggaggcgtgctcactgcaactcag
		gacacctcactgcaggacggcgagctg
		atctacaatgtgaagggtccgggggtgta
		aacttccttgccaacggggcctgtaatg
		cagaagaagaccctgggatgggagccg
		tccaccgaaaccatgtaccctgctgat
		ggtagggctggaggggccgatgtgacaag
		gctctgaagctcgttggagggtgggtcat
		ttgcacgtaaaattttcaagacaacttac
		aagagcaaaaaaacccgtaaaaatgccc
		ggggttcatttacgttggacagaaggcct
		gaacgcataaaagggaagctgataacgag
		acatacgtggagcagtaacgagcacgcc
		gttgcccgggtactcaaacctgggggggt
		ggcttcacactcgaagatttctgttggg
		gactggggaacagacagccgcctacaac
		ctggaccaagtccttgaaacaggggagggt
		gtgtccagttttgctgcagaatctcggc
		gtgtccgttaactccgatccaaaggatt
		gtccggagcgggtgaaaatgccctgaag
		atcgacatccatgtcatcatcccgatat
		gaagggtctgagcggccgaccaaatggcc
		cagatcgaagagggtgttttaagggtgggtg
		taccctgttggaatgatcatcacttttaag
		gtgatcctgcccctatgggcacactgggta
		atcgacgggggttacgccgaacatgctg
		aaactatttcggacggccgtatgaaggc
		atcgccgtgttfcgacggcaaaaagatc
		actgtaacaggggaccctgttggaacggc
		aaacaaaattatcgacgagcggcctgatc
		accccccgaaggctccatgctgtttccga
		gtaaccatcaacagcagacatgagcta
		atcaaggaaaaatatgagaagtaagcta
		tacttagagggggtccgtcaacgggtcac
		cagttttaaatgcactcatgaagggtgag
		gggaaaaccttatgaaggtaagcagact
		aatcgaaataaaaagtgggtcgaggggcgggt
		cctctgcccatttcgcttttcgatattctg

10

20

30

40

50

		g c c a c t c a c t t t t a t g t a t g g g t c t a a g g t c t t t a t t a a a t a c c c c g c t g a t t t g c c a g a c t a c t t t t a a a c a g t c c t t c c c t g a a g g a t t c a c a t g g g a g c g g g t g a t g g t g t t c g a g g a t g g a g g c g t t c t t a c t g c a a c t c a g g a t a c t t t c c t t g c a a g a c g g g g a a c t g a t c t a c a a c g t t a a g g t c c g c g g c g t c a a t t t t c c c a g c c a a t g g t c c a g t g a t g c a g a a g a a a a c c t t g g g g t g g g a g c c c t c a a c g g a g a c a a t g t a c c c t g c g g a c g g c g g g c t t g a g g g t a g a t g t g a t a a g g c a t t g a a a c t c g t c g g g g g c g g c c a c c t t c a t g t g a a t t t c a a g a c t a c a t a t a a a a g t a a a a a a c c a g t c a a g a t g c c t g g a g t g c a c t a c g t g g a t c g t a g g t t g g a g a g g a t a a a a g a a g c c g a c a a c g a a a c t t a t g t a g a g c a a t a t g a g c a c g c c g t g g c t c g t t a t t c c a a c t t g g g c g g a g g a a t g g a t g a a c t g t a c a a g
34 6	Antares (LgTr ip 354 6) ATG 3804	MKHHHHHHVSKGEELIKENMRSKLYLE GSVNGHQFKCTHEGEGKPYEGKQTNRI KVVEGGPLPFAFDILATHFMYGSKVFI KYPADLPDYFKQSFPEGFTWERVMVFE DGGVLTATQDTS LQDGELIYNVKVRGV NFPANGPVMQKKTLGWEPSTETMYPAD GGLEGRCDKALKLVGGGHLHVNFKTTY KSKKPVKMPGVHYVDRRLERIKEADNE TYVEQYEHAVARYSNLGGGFTLDDFVG DWEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLA VSVTPIMRIVRSGENALKIDIHVIIPY EGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFK VILPYGTLVIDGVTPNKLNYFGRPYEG IAVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDERLI TPDRHEL IKENMRSKLYLEGSVNGHQF KCTHEGEGKPYEGKQTNRIKVVEGGPL PFAFDILATHFMYGSKVFIKYPADLPD YFKQSFPEGFTWERVMVFEDGGVLTAT QDTS LQDGELIYNVKVRGVNFPANGPV MQKKTLGWEPSTETMYPADGGLEGRCD KALKLVGGGHLHVNFKTTYKSKKPVKM PGVHYVDRRLERIKEADNETYVEQYEH AVARYSNLGGGMDELYK

10

20

30

40

50

34 7	Antares (LgTr ip 354 6) ATG 3804	atgaaacatcaccatcaccatcatgtg agcaaggaggagaagaacttataaaagaa aacatgcggtctaaactgtacctcgag ggctccggtcaatgggacaccagtttaag tgtacccacgaggggtgagggaaagccc tatgagggggaagcagacaaaccgcatc aagggtcgtcgaagggggacccctcccg tttgccctttgatatcttggctactcac tttatgtiacggaagcaaagttttcata aagtatcctgcccgaaccttcctgattat tttaaacagtcatttcccagagggtttc acatgggaaagggtcatgggtgtttgag gatggaggcgtgctcactgcaactcag gacacctcactgcaggacggcgagctg atctacaatgtgaagggtccgggggtgta aaccttcccctgccaacggggcctgtaatg cagaagaagaccctggggatggggagccg tccaccgaaaccatgtacctgtctgat ggtgggctggaggggccgatgtgacaag gctctgaagctcgttggagggtgggtcat ttgcacgtaaattttcaagacaacttac aagagcaaaaaaacccgtaaaaatgccc gggggttcattacgttgcagaaaggctt gaacgcataaaagggaagctgataacgag acatacgtggagcagtagcagcacgcc gttgcccgggtactcaaacctgggggggt ggcttcacactcgcacgatttctgttggg gactggggaacagacagccgcctacaac ctggaccaagtccttgaacaggggagggt gtgtccagttttgctgcagaatctcggcc gtgtccgttaactccgatacatgaggatt gtccggagcgggtgaaaaatgccctgaag atcgacatccatgtcatcatcccgatat gaagggtctgagcgcgcgaccaaatggcc cagatcgaagagggtgttttaagggtgggtg taccctgttggtatgatcatcactttaag gtgatcctgcccctatggcacactgggta atcgacgggggttacgccgaacaagctg aactattttcggaacggccglatgaaggc atcgccggtgttgcacggcaaaaagatc actaccacagggaacctgttggaacggc aacaaaaattatcgacgagcgcctgatc acccccgacagacatgagctaataag gaaaaatatgagaagtaagctatactta gaggggtccgtcaacgggtcaccagttt aaatgcacacatgaagggtgaggggaaa ccttatgaaggtaagcagactaatacga ataaaaagtgggtcgagggcgggtcctctg ccatttcgctttcgataattctggccact cactttatgtatgggtctaaagggtcttt
---------	---	--

10

20

30

40

50

		attaaataaccccgctgattttgccagac tacttttaaacagtccttccctgaaggga ttcacatggggagcgggtgatgggtgttc gaggatggaggcgttcttactgcaact caggatacttcccttgcaagacgggggaa ctgatctacaacggttaagggtccgcggc gtcaattttcccagccaatgggtccagtg atgcagaagaaaaaccttggggtgggag cccctcaacgggagacaaatgtaccctgcg gacggcggggccttgagggtagatgtgat aaggcatattgaaactcgtcggggggcggc cacccttcattgtgaattttcaagactaca tataaaaagtaaaaaaaccagtcaagatg cctggagtgcaactacgtggatcgtagg ttggagaggataaaaagaagccgacaac gaaacttatgtagagcaatatgagcac gccgtggctcgttattccaacttgggc ggagggaatggatgaactgtacaag
34 8	ATG 38 15	MKHHHHHHFTLEDFVGDWEQTAAYNLD QVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIQRIVR SGENALKIDIHVIIPYEGLSADQMAQI EEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVID GVTPNMLNYFGRPYEGIAVFDGKKITV TGTLWNGNKIIDERLITPDGSMLFRVT INSGGSGGSSGELIKENMRSKLYLEGS VNGHQFKCTHEGEGKPYEGKQTNRIKV VEGGPLPFAFDILATHFMYGSKVFIKY PADLPDYFKQSFPEGFTWERVMVFEDG GVL TATQDTS LQDGELIYNVKVRGVNF PANGPVMQKKTLGWEPSTETMYPADGG LEGRCDKALKLVGGGHLHVNFKTTYKS KKPVKMPGVHYVDRRLERIKEADNETY VEQYEHAVARYSNLGGGMDELYK

10

20

30

40

50

34	ATG 38	atgaaacatcaccatcaccatcatttc
9	15	acactcgaagattttcgttggggactgg
		gaacagacagccgcctacaacctggac
		caagtccttgaacaggagggtgtgtcc
		agttttgctgcagaaatctcgccgtgtcc
		gtaaactccgatccaaaggattgtccgg
		agcgggtgaaaaatgccctgaagatcgac
		atccatgttcattcattcccgatatgaagg
		ctgagcggcggaccaaaatggcccagatc
		gaagagggtgttttaagggtgggtgtaccct
		gtgggatgatcattcacttttaagggtgatc
		ctgcccctatggcacacactgggtaatcgac
		gggggttacgccggaacatgctgaactat
		ttcgggacggccggtatgaaggcatcgcc
		gtgtttcgacgggcaaaaagatcactgta
		acaggggacccctgttggaacgggcaacaaa
		attatcgacgagcggcctgatcaccccc
		gacggcttcattgctgtttccgagtaacc
		atcaacagcggagggtcagggtggatcc
		tcagggtgagctaatcaaggaaaaatatg
		agaagtaagctatacttagagggggtcc
		gtcaacgggtcacccagttttaaattgcact
		catgaagggtgaggggaaaccttatgaa
		ggtaagcagactaatcgaaataaaaagt
		gtcgaggggcgggtccctctgccattcgcct
		ttcgatatattctggccactcacttttatg
		tatgggtcttaagggtctttatttaaatac
		cccgctgatatttgccagactacttttaa
		cagtcctttccctgaaggattcacatgg
		gagcgggtgatgggtgttcgaggatgga
		ggcgtttcttactgcaactcaggatact
		tccttgcaagacgggggaactgatctac
		aacgtttaagggtccgcggcggtcaatttc
		ccagccaatgggtccagtgatgcagaag
		aaaaccttgggggtgggagccctcaacg
		gagacaatgtaccctgcggacggcggg
		cttgagggttagatgtgataaggcatatg
		aaactcgtcggggggcggccaccttcatt
		gtgaattttcaagactacatataaaagt
		aaaaaaccagtcagagatgcctggagtg
		cactacgtggatcgtaggttggagagg
		ataaaagaagccgacaaacgaaacttat
		gtagagcaatatgagcacgccgtggct
		cgttatctccaacttggggcggagggaatg
		gatgaactgtacaag

10

20

30

40

50

35 0	ATG 38 16	MKHHHHHHFTLEDFVGDWEQTAAYNLD QVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIQRIVR SGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQI EEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVID GVTPNMLNYFGRPYEGIAVFDGKKITV TGT LWNGNKI I DERLITPDGSMLFRVT INSRHEL I KENMRSKLYLEGSVNGHQF KCTHEGEGKPYEGKQTNRIKVVEGGPL PFAFDILATHFMYGSKVFIKYPADLPD YFKQSFPEGFTWERVMVFEDGGVLTAT QDTS LQDGELIYNVKVRGVNFPANGPV MQKKTLGWEPSTETMYPADGGLEGRCD KALKLVGGGHLHVNFKTTYKSKKPVKM PGVHYVDRRLERI KEADNETYVEQYEH AVARYSNLGGGMDELYK
35 1	ATG 38 16	Atgaaacatcaccatcaccatcatttc acactcgaagatttcggttgaggactgg gaacagacagccgcctacaacctggac caagtccttgaaacaggagggtgtgtcc agtttgctgcagaatctcgccgtgtcc gtaactccgattccaaaggattgtccgg agcgggtgaaaatgccctgaagatcgac atccatgtcatcatcccgtatgaagggt ctgagcgcgcgaccaaaatggcccagatc gaagagggtgttttaagggtggtgtaccct gtggatgatcatcacttttaagggtgatc ctgccctatggcacacactgggtaatcgac ggggttacgcccgaacatgctgaactat ttcggacggccgtatgaaggcatcgcc gtgttcgacggcaaaaagatcactgtta acaggggaccctgttggaacggcaacaaa attatcgacgagcgccctgatcaccccc gacggctccatgctgttccgagtaacc atcaacagcagacatgagctaatacag gaaaatatgagaagtaagctatactta gaggggtccgtcaacgggtcaccagttt aaatgcactcatgaagggtgaggggaaa ccttatgaagggttaagcagactaatcga ataaaagttggtcgaagggcgggtccctctg ccattcgcctttcgatatcttggccact cacttttatgtatgggtcttaagggtcttt attaaatacccccgctgatcttgccagac tacttttaaacagtccttccctgaaggga ttcacatgggagcgggtgatgggtgttc gaggatggaggcgttcttactgcaact caggatacttcccttgcaagacgggggaa ctgatctacaacggttaagggtccgcggc gtcaatttcccagccaatgggtccagtg atgcagaagaaaaccttgggggtgggag cctcaacgggagacaatgtaccctgcg

10

20

30

40

50

		gacggcggggccttgagggtagatgtgat aaggcatttgaaactcgtcggggggcggc caccttcatgtgaatttcaagactaca tataaaagtataaaaccagtcagatg cctggagtgcaactacgtggatcgtagg ttggagaggataaaagaagccgacaac gaaacttatgttagagcaatatgagcac gccgtggctcgttattccaacttgggc ggagggaatggatgaactgtacaag
35 2	ATG 38 17	MKHHHHHHFTLDDFVGDWEQTAAYNLD QVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVR SGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ I EEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVID GVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKITT TGTLWNGNKI IDERLITPDGSGGSSG ELIKENMRSKLYLEGSVNGHQFKCTHE GEGKPYEGKQTNRIKVVEGGPLPFAFD ILATHFMYGSKVFIKYPADLPDYFKQS FPEGFTWERVMVFEDGGVLTATQDTS QDGELIYNVKVRGVNFPANGPVMQKKT LGWEPSTETMYPADGGLEGRCDKAIKL VGGGHLHVNFKTTYKSKKPVKMPGVHY VDRRLERIKEADNETYVEQYEHAVARY SNLGGGMDELYK
35 3	ATG 38 17	Atgaaacatcacccatcacccatcatttc acactcgacgatttcgttgggggactgg gaacagacagccgcctacaacctggac caagtccttgaacaggagggtgtgtcc agtttgcctgcagaatctcgccgtgtcc gtaactccgatcatgaggattgtccgg agcgggtgaaaatgccctgaagatcgac atccatgtcatcatcccgatatgaagggt ctgagcgcgcgaccaaaatggcccagatc gaagagggtgtttaagggtggtgtaccct gtggatgatcatcactttaagggtgatc ctgccctatggcacacttggtaatcgac gggggttacgccgaacaagctgaactat ttcgggacggccgtatgaaggcatcgcc gtgttcgacggcaaaaagatcacctacc acaggggaccctgttggaacggcaacaaa attatcgacgagcgcctgatcaccccc gacggaggctcagggtggatcctcagggt gagctaatacaaggaaaaatatgagaagt aagctatacttagaggggtccgtcaac ggtcaccagtttaaatgcactcatgaa ggtgaggggaaaccttatgaaggtaag cagactaatcgaataaaaagtggtcgag ggcgggtcctctgccatttcgctttcgat attctgggccactcactttatgtatggg

10

20

30

40

50

		t c t a a g g t c t t t a t t a a a t a c c c c g c t g a t t t g c c a g a c t a c t t t a a a c a g t c c t t c c c t g a a g g a t t c a c a t g g g a g c g g g t g a t g g t g t t c g a g g a t g g a g g c g t t c t t a c t g c a a c t c a g g a t a c t t c c t t g c a a g a c g g g g a a c t g a t c t a c a a c g t t a a g g t c c g c g g c g t c a a t t t c c c a g c c a a t g g t c c a g t g a t g c a g a a g a a a a c c t t g g g g t g g g a g c c c t c a a c g g a g a c a a t g t a c c c t g c g g a c g g c g g g c t t g a g g g t a g a t g t g a t a a g g c a t t g a a a c t c g t c g g g g g c g g c c a c c t t c a t g t g a a t t t c a a g a c t a c a t a t a a a a g t a a a a a a c c a g t c a a g a t g c c t g g a g t g c a c t a c g t g g a t c g t a g g t t g g a g a g g a t a a a a g a a g c c g a c a a c g a a a c t t a t g t a g a g c a a t a t g a g c a c g c c g t g g c t c g t t a t t c c a a c t t g g g c g g a g g a a t g g a t g a a c t g t a c a a g
35 4	ATG 38 18	MKHHHHHHFTLDDFVGDWEQTAAYNLD QVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVR SGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQI EEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVID GVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKITT TGTLWNGNKI IDERLITPDRHEL IKEN MRSKLYLEGSVNGHQFKCTHEGEGKPY EGKQTNRIKVVVEGGPLPFAFDILATHF MYGSKVFIKYPADLPDYFKQSFPEGFT WERVMVFEDGGVLTATQDTS LQDGELI YNVKVRGVNFPANGPVMQKKT LGWEP S TETMYPADGGLEGRCDKALKLVGGGHL HVNFKTTYKSKKPKMPGVHYVDRRLE RIKEADNETYVEQYEHAVARYSNLGGG MDELYK
35 5	ATG 38 18	A t g a a a c a t c a c c a t c a c c a t c a t t t c a c a c t c g a c g a t t t c g t t g g g g a c t g g g a a c a g a c a g c c g c c t a c a a c c t g g a c c a a g t c c t t g a a c a g g g a g g t g t g t c c a g t t t g c t g c a g a a t c t c g c c g t g t c c g t a a c t c c g a t c a t g a g g a t t g t c c g g a g c g g t g a a a a t g c c c t g a a g a t c g a c a t c c a t g t c a t c a t c c c g t a t g a a g g t c t g a g c g c c g a c c a a a t g g c c c a g a t c g a a g a g g t g t t t a a g g t g g t g t a c c c t g t g g a t g a t c a t c a c t t t a a g g t g a t c c t g c c c t a t g g c a c a c t g g t a a t c g a c g g g g t t a c g c c g a a c a a g c t g a a c t a t t t c g g a c g g c c g t a t g a a g g c a t c g c c g t g t t c g a c g g c a a a a g a t c a c t a c c

10

20

30

40

50

		acaggggaccctgtgggaacgggcaacaaa attatcgacgagcgccctgatcaccccc gacagacatgagctaatacaaggaaaat atgagaagtaagctatacttagagggg tccgtcaacgggtcaccagttttaaatgc actcatgaagggtgaggggaaaccttat gaaggtaagcagactaatacgaataaaa gtgggtcgagggcggttcctctgccattc gcttttcgataattctggccactcacttt atgtatgggtctaaaggcttttattaaa taccgccgtgatcttgccagactacttt aaacagtccttccctgaaggattcacat tgggagcgggtgatgggtgttcgaggat ggaggcggttcttactgcaactcaggat acttcccttgcaagacgggggaactgac tacaacggttaagggtccgcggcggtcaat tccccagccaatgggtccagtgatgcag aagaaaaccttgggggtgggagccctca acggagacaaatgtaccctgcggacggc gggcttgagggttagatgtgataaaggca ttgaaactcgtcggggggcggccacctt catgtgaattttcaagactacatataaa agtaaaaaaccagtcagatgcctggga gtgcactacgtggatcgtagggttgag aggataaaaagaagccgacaaacgaaact tatgtagagcaatatgagcacgccgtg gctcgttattccaacttggggcggaggga atggatgaactgtacaag
35 6	LgTrip 2899 (LgTrip 2098+ Q42L)	MKHHHHHHVFTLEDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPILRIV RSGENALKIDIHVIIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNMLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT VTGTLWNGNKIIDERLITPD
35 7	LgTrip 2899 (LgTrip 2098+ Q42L)	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgaagatttctgttgggggac tgggaaacagaccgcgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagtttgcctgcagaatctcgccgtg tccgttaactccgatacctaaggattgtc cggagcgggtgaaaatgccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgatatgaa ggctctgagcgcgcgaccaaattggcccag atcgaagagggtgttttaagggtgggtgac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctggcctatggcacactggtaatc gacgggggttacgccgaacatgctgaac tatttccggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttcgacggcaaaaagatcact

10

20

30

40

50

		g t a a c a g g g a c c c t g t g g a a c g g c a a c a a a a t t a t c g a c g a g c g c c t g a t c a c c c c c g a c
35 8	ATG-39 30	a t g A A A C A T C A C C A T C A C C A T C A T g t c T T C A C A C T C G A C G A T T T C G T T G G G G A C T G G G A A C A G A C A G C C G C C T A C A A C C T G G A C C A A G T C C T T G A A C A G G G A G G T G T G T C C A G T T T G C T G C A G A A T C T C G C C G T G T C C G T A A C T C C G A T C A T G A G G A T T G T C C G G A G C G G T G A A A A T G C C C T G A A G A T C G A C A T C C A T G T C A T C A T C C C G T A T G A A G G T C T G A G C G C C G A C C A A A T G G C C C A G A T C G A A G A G G T G T T T A A G G T G G T G T A C C C T G T G G A T G A T C A T C A C T T T A A G G T G A T C C T G C C C T A T G G C A C A C T G G T A A T C G A C G G G G T T A C G C C G A A C A A G C T G A A C T A T T T C G G A C G G C C G T A T G A A G G C A T C G C C G T G T T C G A C G G C T A A
35 9	ATG-39 30	M K H H H H H H V F T L D D F V G D W E Q T A A Y N L D Q V L E Q G G V S S L L Q N L A V S V T P I M R I V R S G E N A L K I D I H V I I P Y E G L S A D Q M A Q I E E V F K V V Y P V D D H H F K V I L P Y G T L V I D G V T P N K L N Y F G R P Y E G I A V F D G
36 0	SmTrip 9-15GS -プロテイン G (ATG 4002)	g g g a g c t c c G G T G G T G G C G G G A G C G G A G G T G G A G G c t c g A G C G G T A T G A C G T A T A A G T T A A T C C T T A A T G G T A A A A C A T T G A A A G G C G A G A C A A C T A C T G A A G C T G T T G A T G C T G C T A C T G C A G A A A A A G T C T T C A A A C A A T A C G C T A A C G A C A A C G G T G T T G A C G G T G A A T G G A C T T A C G A C G A T G C G A C G A A A A C C T T T A C G G T C A C C G A A A A A C C A G A A G T G A T C G A T G C G T C T G A A T T A A C A C C A G C C G T G A C A A C T T A C A A A C T T G T T A T T A A T G G T A A A A C A T T G A A A G G C G A A A C A A C T A C T G A G G C T G T T G A T G C T G C T A C T G C A G A G A A G G T G T T C A A A C A A T A T G C G A A T G A C A A C G G T G T T G A C G G T G A G T G G A C T T A C G A C G A T G C G A C T A A G A C C T T T A C A G T T A C T G A A A A A C C A G A A G T G A T C G A T G C G T C T G A G T T A A C A C C A G C C G T G A C A A C T T A C A A A C T T G T T A T T A A T G G T A A A A C A T T G A A A G G C G A A A C A A C T A C T A A A G C A G T A G A C G C A G A A A C T G C G G A G A A G G C C T T C A A A C A A T A C G C T

10

20

30

40

50

		AACGACAACGGTGTTGATGGTGTTTGG ACTTATGATGATGCCACAAAAACCTTT ACGGTAACTGAGCATCATCACCATCAC CACTAA
36 1	SmTrip 9-15GS -プロテイン G(ATG 4002)	GSSGGGGS GGGGSSGMTYKLI LNKKTL KGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGV DGEWTYDDATKTFTVTEKPEVIDASEL TPAVTTYKL VINGKTLKGETTTEAVDA ATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATK TFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVI NGKTLKGETTTKA VDAETA EKAFKQYA NDNGVDGVW TYDDATKTFTVTEHHHHH H
36 2	ATG-39 29	atgAAACATCACCATCACCATCATgtc TTCACACTCGACGATTTCGTTGGGGAC TGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGTCATCATCCCGTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATC GACGGGGTTACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTTCGGATAA
36 3	ATG-39 29	Mkhhhhhhhvftl ddfv gdw eqtaaynl dqvleqggvssllqnlavsvtpimriv rsgenalkidihvii pyeglsadqmaq ieevfkvvypvddhhfkvilpygtlvi dgvtpnklnyfg
36 4	ATG-39 30	atgAAACATCACCATCACCATCATgtc TTCACACTCGACGATTTCGTTGGGGAC TGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGTCATCATCCCGTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATC

10

20

30

40

50

		GACGGGGTTACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTCCGACGGCCGTATGAAGGCATC GCCGTGTTTCGACGGCTAA
36 5	ATG-39 30	Mkhhhhhhhvftlddfvgdweqtaaynl dqvleqggvssllqnlavsvtpimriv rsgenalkidihviipyeglsadqmaq ieevfkvvypvddhhfkvilpygtlvi dgvtpnklnyfgropyegiaavfdg
36 6	ATG-39 31	atgAAACATCACCATCACCATCATgtc TTCACACTCGACGATTTTCGTTGGGGAC TGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGTCATCATCCCGTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATC GACGGGGTTACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTCCGACGGCCGTATGAAGGCATC GCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACT ACCACAGGGACCTGTAA
36 7	ATG-39 31	Mkhhhhhhhvftlddfvgdweqtaaynl dqvleqggvssllqnlavsvtpimriv rsgenalkidihviipyeglsadqmaq ieevfkvvypvddhhfkvilpygtlvi dgvtpnklnyfgropyegiaavfdgkkit ttgtl
36 8	ATG-39 32	atgAAACATCACCATCACCATCATgtc TTCACACTCGACGATTTTCGTTGGGGAC TGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGTCATCATCCCGTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATC GACGGGGTTACGCCGAACAAGCTGAAC

10

20

30

40

50

		TATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATC GCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACT ACCACAGGGACCCTGTGGAACGGCTAA
36 9	ATG-39 32	Mkhhhhhhhvftlddfvgdweqtaaynl dqvleqggvssllqnlavsvtpimriv rsgenalkidihviiipyeglsadqmaq ieevfkvvypvddhhfkvilpygtlvi dgvtpnklnyfgropyegiavf dgkkit ttgtlwnng
37 0	ATG-48 08	Atgggtttccgtgagcggctggcggctg ttcaagaagattagcttcacactcgac gatttcgttggggactgggaacagaca gccgcctacaacctggaccaagtcctt gaacaggagggtgtgtccagtttgctg cagaatctcgccgtgtccgtaactccg atcatgaggattgtccggagcggtgaa aatgccctgaagatcgacatccatgtc atcatcccgtatgaagggtctgagcggc gaccaaattggcccagatcgaagagggtg tttaagggtgggtgtacctgtggatgat catcactttaagggtgatcctgcccctat ggcacactggtaatcgacgggggttacg ccgaacaagctgaactatttcggacgg ccgtatgaaggcatcgccgtgttcgac ggcaaaaagatcactaccacaggggacc ctgtggaacggcaacaaaattatcgac gagcgcctgatcacccccgactaa
37 1	ATG-48 08	Mvsvs gwrlfkkisftlddfvgdweqt aaynldqvleqggvssllqnlavsvtp imriv rsgenalkidihviiipyeglsa dqmaqieevfkvvypvddhhfkvilpy gtlvidgvtpnklnyfgropyegiavf d gkkitttgtlwnngnkiiderlitpd
37 2	ATG-48 09	Atgggtttccgtgagcggctggcggctg ttcaagaagattagcggcagctccgggt ttcacactcgacgatttcgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagtttgctgcagaatctcgccgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcggtgaaaatgccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggctctgagcggccgaccaaattggcccag

10

20

30

40

50

		atcgaagagggtgttttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgccgaacaagctgaac tatttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttcgacggcaaaaagatcact accacaggggaccctgtgtggaaacggcaac aaaatttatcgacgagcgcctgatcacc cccgactaa
37 3	ATG-48 09	MVSVSGWRLFKKISGSSGFTLDDFVGD WEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAV SVTPIMRIVRSGENALKIDIHVIIPYE GLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFKV ILPYGTLVIDGVTPNKLNYFGRPYEGI AVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDERLIT PD
37 4	ATG-48 10	Atgggtttccgtgagcggcctggcggcctg ttcaagaagattagcggcctcgagcgggt ggctcgagcgggtttcacactcgacgat ttcgttggggactgggaacagacagcc gcctacaacctggaccaagtccttgaa cagggagggtgtgtccagtttgctgcag aatctcgccgtgtccgtaactccgatac atgaggattgtccggagcgggtgaaaat gccctgaagatcgacatccatgtcatic atcccgtatgaagggtctgagcggccgac caaattggcccagatcgaaagggtgttt aagggtgggtgtaccctgtggatgatcat cactttaagggtgatecctgccctatggc acactggtaatcgacgggggttacgccg aacaagctgaactatttcggacggccg tatgaaggcatcgccgtgttcgacggc aaaaagatcactaccacaggggaccctg tggaaacggcaacaaaattatcgacgag cgccctgatcacccccgactaa
37 5	ATG-48 10	MVSVSGWRLFKKISGSSGGSSGFTLDD FVGDEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQ NLAVSVTPIMRIVRSGENALKIDIHVI IPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDH HFKVILPYGTLVIDGVTPNKLNYFGRP YEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDE RLITPD
37 6	ATG-48 11	Atgggtttccgtgagcggcctggcggcctg ttcaagaagattagcggcctcgagcgggt ggctcgagcgggtggctcgagcgggtttc acactcgacgatttcgttggggactgg gaacagacagccgcctacaacctggac caagtccttgaaacaggagggtgtgtcc

10

20

30

40

50

		agtttgcctgcagaatctcgcctgtgtcc gtaactccgatcatgaggattgtccgg agcgggtgaaaatgccctgaagatcgac atccatgtcatcatcccgtatgaagggt ctgagcgcgcgaccaaatggcccagatc gaagagggtgttttaagggtggtgtaccct gtggatgatcatcactttaagggtgatc ctgcccctatggcacacactggtaatcgac ggggtttacgccgaacaagctgaactat ttcggacggccgtatgaaggcatcgcc gtgttcgacggcaaaaagatcactacc acaggggaccctgttggaacggcaacaaa attatcgacgagcgcctgatcacccccc gactaa
37 7	ATG-48 11	MVSVSGWRLFKKISGSSGGSSGGSSGF TLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQGGVS SLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENALKID IHV IIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYP VDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNKLNY FGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNK IIDERLITPD
37 8	ATG-48 12	Atggttttccgtgagcggctggcggctg ttcaagaagatttagcggctcgagcgggt ggctcgagcgggtggctcgagcgggtggc tcgagcgggtttcacactcgacgatttc gttgggggactgggaacagacagccgcc tacaacctggaccaagtccttgaaacag ggagggtgtgtccagtttgctgcagaat ctcgccgtgtccgtaactccgatcatg aggattgtccggagcgggtgaaaatgcc ctgaagatcgacatccatgtcatcatc ccgtatgaagggtctgagcgcgcgaccaa atggcccagatcgaagagggtgttttaag gtgggtgtaccctgttgatgatcatcac ttttaagggtgatcctgcccctatggcaca ctggtaatcgacgggggttacgccgaac aagctgaactattttcggacggccgtat gaaggcatcgccgtgtttcgacggcaaaa aagatcactaccacaggggaccctgtgg aacggcaacaaaattatcgacgagcgc ctgatcaccccccgactaa

10

20

30

40

50

379	ATG-4812	MVSVSGWRLFKKISGSSGGSSGGSSGGSSGFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENALKIDIHVIIIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDERLITPD
380	ATG-4813	Atgggtttccgtgagcggcctggcggcctgttcaagaagattagcggcctcgagcgggtggcctcgagcgggtggcctcgagcgggtggcctcgagcgggtttcacactcgacgattttcggttggggactgggaaacagacagccgcctacaacctggaccaaagtcccttgaaacagggagggtgtgtccagtttgcctgcagaatctcgccgtgtccgtaactccgatcatgaggattgtccggagcgggtgaaaatgccctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaagggtctgagcggcggaccaaaatggcccagatcgaaagggtgttttaagggtgggtgtaccctgtgatgatcatcacttttaagggtgatccctgccctatggcacactggtaatcgacggggtttacgccggaacaagctgaactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactaccacagggaccctgttggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaccccgactaa
381	ATG-4813	MVSVSGWRLFKKISGSSGGSSGGSSGGSSGGSSGFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENALKIDIHVIIIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDERLITPD
382	ATG-4814	Atgggtgagcggcctggcggcctgtttcaagaagattagcggcctcgagcgggtggcctcgagcgggtggcctcgagcgggtggcctcgagcgggtttcacactcgacgattttcggttggggactgggaaacagacagccgcctacaacctggaccaaagtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgcctgcagaatctcgccgtgtccgtaactccgatcatgaggattgtccggagcgggtgaaatgccctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaagggtctgagcggc

10

20

30

40

50

		gaccaaatggcccagatcgaagagggtg ttaaagggtggtgtaccctgtggatgat catcacctttaagggtgatcctgccctat ggcacactggtaatcgacgggggttacg ccgaacaagctgaactatctcggaacgg ccgtatgaaggcatcgccgtgttcgac ggcaaaaagatcactaccacaggggacc ctgtgggaacggcaacaaaattatcgac gagcgcctgatcacccccgactaa
38 3	ATG-48 14	MVSGWRLFKKISGSSGGSSGGSSGGSS GGSSGFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVL EQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGE NALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQIEEV FKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVT PNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGT LWNGNKIIDERLITPD
38 4	ATG-48 15	Atggctcttcacactcgacgattttcgtt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtcccttgaaacaggga ggtgtgtccagttttgctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatcatgagg attgtccggagcgggtgaaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtcttgagcgccgaccaaattg gcccagatcgaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgttggtatgatcaccttt aagggtgatcctgccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacaag ctgaactatctcggaacggccgtatgaa ggcatcgccgtgttcgacggcaaaaag atcactaccacaggggaccctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgacgttttccgtgagcggc tggcggctgttcaagaagattagctaa
38 5	ATG-48 15	MVFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENAL KIDIHV IIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVT PNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGT LWNGNKIIDERLITPDVSVSGWRLFKKIS

10

20

30

40

50

38 6	ATG-48 16	Atgggtcttcacactcgcacgattttcggtt ggggactggggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagttttgctgcagaatctc gccgtgtccgtaacctccgatcatgagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcggccgaccaaag gcccagatcgaagagggtgttttaagggtg gtgtaccctgttggaatgatcatcacttt aagggtgatcctgcccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacaag ctgaactattttcggacggccgtatgaa ggcatcggccgtgtttcgacggcaaaaag atcactaccacaggggaccctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgacggctcgagcgggtgtt tccgtgagcggctggcggctgtttcaag aagattagctaa
38 7	ATG-48 16	MVFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWN GNKIIDERLITPDGSSGVSWSGWRLFK KIS
38 8	ATG-48 17	Atgggtcttcacactcgcacgattttcggtt ggggactggggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagttttgctgcagaatctc gccgtgtccgtaacctccgatcatgagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcggccgaccaaag gcccagatcgaagagggtgttttaagggtg gtgtaccctgttggaatgatcatcacttt aagggtgatcctgcccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacaag ctgaactattttcggacggccgtatgaa ggcatcggccgtgtttcgacggcaaaaag atcactaccacaggggaccctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgacggctcgagcgggtggc tcgagcgggtgttttccgtgagcggctgg cggctgtttcaagaagattagctaa

10

20

30

40

50

38 9	ATG-48 17	MVFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWN GNKIIDERLITPDGSSGGSSGVSVSGW RLFKKIS
39 0	ATG-48 18	Atgggtcttcacactcgacgatttcgtt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagtttgcctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatcatgagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcggccgaccaaattg gcccagatcgaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacttt aagggtgatcctgcccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacaag ctgaactatttcggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgttcgacggcaaaaag atcactaccacaggggaccctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgacggctcgagcgggtggc tcgagcgggtgtgagcggctggcggctg ttcaagaagattagctaa
39 1	ATG-48 18	MVFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWN GNKIIDERLITPDGSSGGSSGVSGWRL FKKIS
39 2	ATG-48 19	Atgggtttccgtgagcggctggcggctg ttcaagaagattagcttcacactcgac gatttcgttggggactgggaacagaca gccgcctacaacctggaccaagtcctt gaacaggggagggtgtgtccagtttgcctg cagaatctcgccgtgtccgtaactccg atcatgaggattgtccggagcgggtgaa aatgccctgaagatcgacatccatgtc atcatcccgtatgaagggtctgagcggc gaccaaattggcccagatcgaagagggtg tttaagggtggtgtaccctgttgatgat catcactttaagggtgatcctgcccctat ggcacactggtaatcgacgggggttacg ccgaacaagctgaactatttcggacgg ccgtatgaaggcatcgccgtgttcgac

10

20

30

40

50

		ggcaaaaagatcactaccacagggacc ctgtgggaacggcaacaaaattatcgac gagcgccctgatcaccccgaccatcac catcaccatcattaa
39 3	ATG-48 19	MVSVSGWRLFKKISFTLDDFVGDWEQT AAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTP IMRIVRSGENALKIDIHV IIPYEGLSA DQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFKVILPY GTLVIDGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFD GKKITTTGTLWNGNKIIDERLITPDHH HHHH
39 4	ATG-48 20	Atgggtttccgtgagcggctggcggctg ttcaagaagatttagcggcagctccggt ttcacactcgacgatttcgttggggac tgggaacagacagccgctacaacctg gaccaagtccttgaacagggagggtgtg tccagtttgctgcagaatctcgccgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgccctgaagatc gacatccaatgtcatcatcccgatatgaa ggctctgagcgcgcgaccaaattggcccag atcgaagagggtgtttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgccgaacaagctgaac tatttcggacggccggtatgaaggcatc gccgtgttcgacggcaaaaagatcact accacaggggaccctgttggaacggcaac aaaattatcgacgagcgcctgatcacc cccgaccatcaccatcaccatcattaa
39 5	ATG-48 20	MVSVSGWRLFKKISGSSGFTLDDFVGD WEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAV SVTPIMRIVRSGENALKIDIHV IIPYE GLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFKV ILPYGTLVIDGVTPNKLNYFGRPYEGI AVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDERLIT PDHHHHHH
39 6	ATG-48 21	Atgggtttccgtgagcggctggcggctg ttcaagaagatttagcggctcgagcgggt ggctcgagcgggtttcacactcgacgat ttcgttggggactgggaacagacagcc gcctacaacctggaccaagtccttgaac cagggagggtgtgtccagtttgctgcag aatctcgccgtgtccgtaactccgac

10

20

30

40

50

		atgaggattgtccggagcgggtgaaaat gccctgaagatcgacatccatgtcatc atcccgatatgaagggtctgagcggcgac caaattggcccagatcgaagagggtgttt aagggtgggtgtaccctgtggatgatcat cactttaagggtgatcctgcccctatggc acactggtaatcgacgggggttacgccg aacaagctgaactatcttcggacggccg tatgaaggcatcgccgtgttcgacggc aaaaagatcactaccacaggggaccctg tggaacggcaacaaaaattatcgacgag cgccctgatcacccccgaccatcaccat caccatcattaa
39 7	ATG-48 21	MVSVSGWRLFKKISGSSGGSSGFTLDD FVG DWEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQ NLAVSVTPIMRIVRSGENALKIDIHVI IPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDH HFKVILPYGTLVIDGVTPNKLNYFGRP YEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDE RLITPDHHHHHH
39 8	ATG-48 22	Atgggtttccgtgagcggcctggcggcctg ttcaagaagattagcggcctcgagcgggt ggctcgagcgggtggctcgagcgggtttc acactcgacgattttcggttgggggactgg gaacagacagccgcctacaacctggac caagtccttgaacaggggagggtgtgtcc agtttgctgcagaaatctcgccgtgtcc gtaactccgatcatgaggattgtccgg agcgggtgaaaatgccctgaagatcgac atccatgtcatcatcccgatatgaagggt ctgagcggccgaccaaaatggcccagatc gaagagggtgttttaagggtgggtgtaccct gtggatgatcatcactttaagggtgatc ctgcccctatggcacacttggtaatcgac gggggttacgccgaacaagctgaactat ttcggacggccgtatgaaggcatcgcc gtgttcgacggcaaaaagatcactacc acaggggaccctgttggaacggcaacaaa attatcgacgagcgcctgatcaccccc gaccatcaccatcaccatcattaa
39 9	ATG-48 22	MVSVSGWRLFKKISGSSGGSSGGSSGF TLDDFVG DWEQTAAYNLDQVLEQGGVS SLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENALKID IHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYP VDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNKLNY FGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNK IIDERLITPDHHHHHH

10

20

30

40

50

40 0	ATG-48 23	Atgggttttcggtgagcggcctggcggcctg ttcaagaagatttagcggcctcgagcgggt ggctcgagcgggtggctcgagcgggtggc tcgagcgggtttcacactcgacgatattc gttggggactgggaacagacagccgcc tacaacctggaccaagtccttgaacag ggagggtgtgtccagttttgctgcagaat ctgcgccgtgtccgttaactccgatcatg aggattgtccggagcgggtgaaaatggc ctgaagatcgacatccatgtcatcatc ccgtatgaagggtctgagcggccgaccaa atggcccagatcgaagagggtgtttaag gtgggtgtacctgtggatgatcatcac ttttaagggtgatcctgcccctatggcaca ctgggtaatcgacgggggttacgccgaac aagctgaactattttcggaacggccgtat gaaggcatcgccgtgtttcgacggcaaa aagatcactaccacagggaccctgtgg aacggcaacaaaaattatcgacgagcgc ctgatcacccccgaccatcacccatcac catcattaa
40 1	ATG-48 23	MVSVSGWRLFKKISGSSGGSSGGSSGG SSGFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQ GGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENA LKIDIHVIIIPYEGLSADQMAQIEEVFK VVYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPN KLNYPGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLW NGNKIIDERLITPDHHHHHH
40 2	ATG-48 24	Atgggtgagcggcctggcggcctgtttcaag aagatttagcggcctcgagcgggtggctcg agcgggtggctcgagcgggtggctcgagc ggtggctcgagcgggtttcacactcgac gatttcgttggggactgggaacagaca gccgcctacaacctggaccaagtcctt gaacagggagggtgtgtccagttttgctg cagaatctcgccgtgtccgttaactccg atcatgaggattgtccggagcgggtgaa aatgccctgaagatcgacatccatgtc atcatcccgtatgaagggtctgagcggc gaccaaaatggcccagatcgaagagggtg ttttaagggtgggtgtacctgtggatgat cateacttttaagggtgatcctgccctat ggacacactgggtaatcgacgggggttacg ccgaacaagctgaactattttcggaacgg ccgtatgaaggcatcgccgtgtttcgac ggcaaaaagatcactaccacagggacc ctgttggaacggcaacaaaaattatcgac gagcggcctgatcacccccgaccatcac

10

20

30

40

50

		catcaccatcataa
40 3	ATG-48 24	MVSGWRLFKKISGSSGGSSGGSSGGSS GGSSGFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQVL EQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGE NALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQIEEV FKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVT PNKLNYPGRPYEGIAVFDGKKITTTGT LWNGNKIIDERLITPDHHHHHH
40 4	ATG-48 25	Atggtttccgtgagcggctggcggctg ttcaagaagattagcggctcgagcgggt ggctcgagcgggtggctcgagcgggtggc tcgagcgggtggctcgagcgggtttcaca ctcgacgatttctgttggggactgggaa cagacagccgcctacaacctggaccaa gtccttgaacagggagggtgtgtccagt ttgctgcagaatctcgcctgtgtccgtat actccgatcatgaggattgtccggagc ggtgaaaatgccctgaagatcgacatc catgtcatcatcccgtatgaagggtctg agcggccgaccaaataggcccagatcgaa gagggtgtttaagggtgggtgtacctgtg gatgatcatcactttaagggtgatcctg ccctatggcacacactggtaatcgacggg gttacgccgaacaagctgaactatttc ggacggccgtatgaaggcatcgccgtg ttcgacggcaaaaagatcactaccaca gggacctgttggaacggcaacaaaatt atcgacgagcgcctgatcaccccgac catcaccatcaccatcataa
40 5	ATG-48 25	MVSVSGWRLFKKISGSSGGSSGGSSGG SSGGSSGFTLDDFVGDWEQTAAYNLDQ VLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRS GENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQIE EVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVIDG VTPNKLNYPGRPYEGIAVFDGKKITTT GTLWNGNKIIDERLITPDHHHHHH

10

20

30

40

50

40 6	ATG-48 26	Atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgcacgattttcggttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagttttgctgcagaaatctcgccgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggtctgagcgcgcgaccaaattggcccag atcgaagagggtgttttaagggtggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgcgcgaacaagctgaac tattttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgtttcgacggcaaaaagatcact accacagggaacctgttggaacggcaac aaaattatcgacgagcgcctgatcacc ccgacggtttccgtgagcggcttggcgg ctgttcaagaagattagctaa
40 7	ATG-48 26	MKHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT TTGTLWNGNKI IIDERLITPDVSVSGWR LFKKIS
40 8	ATG-48 27	Atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgcacgattttcggttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggagggtgtg tccagttttgctgcagaaatctcgccgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggtctgagcgcgcgaccaaattggcccag atcgaagagggtgttttaagggtggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgcgcgaacaagctgaac tattttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgtttcgacggcaaaaagatcact accacagggaacctgttggaacggcaac aaaattatcgacgagcgcctgatcacc ccgacggctcgagcgggtgtttccgtg agcggcttggcggctgttcaagaagatt agctaa

10

20

30

40

50

40 9	ATG-48 27	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT TTGTLWNGNKI IDERLITPDGSSGVS SGWRLFKKIS
41 0	ATG-48 28	Atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgacgattttcgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacagggagggtgtg tccagttttgctgcagaatctcgccgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggctctgagcggcggaccaaaatggcccag atcgaagagggtgttttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcacttttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc gacgggggttacgccgaacaagctgaac tatttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttcgacggcaaaaagatcact accacaggggaccctgttggaacggcaac aaaattatcgacgagcgcctgatcacc cccgacggctcgagcgggtggctcgagc gggtgtgagcggctggcggctgttcaag aagattagctaa
41 1	ATG-48 28	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT TTGTLWNGNKI IDERLITPDGSSGGSS GVSGWRLFKKIS
41 2	ATG-48 29	Atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgacgattttcgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacagggagggtgtg tccagttttgctgcagaatctcgccgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggctctgagcggcggaccaaaatggcccag atcgaagagggtgttttaagggtgggtgtac cctgtggatgatcatcacttttaagggtg atcctgcccctatggcacactggtaatc

10

20

30

40

50

		gacgggggttacgccgaacaagctgaac tatttcggacggccgtatgaaggcatc gccgtgttcgacggcaaaaagatact accacagggaccctgttggaacggcaac aaaattatcgacgagcgcctgatcacc cccgacggctcgagcgggtggctcgagc gggtgtttccgtgagcggctggcggctg ttcaagaagattagctaa
41 3	ATG-48 29	MKHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHVIIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT TTGTLWNGNKIIDERLITPDGSSGGSS GVSVSGWRLFKKIS
41 4	ATG-26 23	atgggtcttcacactcgaagatttcggtt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctlggaccaagtccttgaacaggga gggtgtgtccagtttgcctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatccaaagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaaggctcagagcggccgaccaaatg gcccagatcgaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacttt aagggtgatccctgccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacatg ctgaactatttcggacggccgtatgaa ggcatcggcgtgttcgacggcaaaaag atcactgtaacagggaccctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgacggctccatgctgttc cgagtaaccatcaacagccatcatcac catcaccactaa
41 5	ATG-26 23	MVFTLEDFVGDWEQTAAAYNL DQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIQRIVRSGENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNM LNYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN GNKIIDERLITPDGSMLFRVTINSHHH HHH
41 6	ATG-37 45	atgggtgagcggctggcggctgtttcaag aagattagccaccatcaccatcaccat catcacttcacactcgacgatttcggtt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga gggtgtgtccagtttgcctgcagaatctc

10

20

30

40

50

		g c c g t g t c c g t a a c t c c g a t c a t g a g g a t t g t c c g g a g c g g t g a a a a t g c c c t g a a g a t c g a c a t c c a t g t c a t c a t c c c g t a t g a a g g t c t g a g c g c c g a c c a a a t g g c c c a g a t c g a a g a g g t g t t t a a g g t g g t g t a c c c t g t g g a t g a t c a t c a c t t t a a g g t g a t c c t g c c c t a t g g c a c a c t g g t a a t c g a c g g g g t t a c g c c g a a c a a g c t g a a c t a t t t c g g a c g g c c g t a t g a a g g c a t c g c c g t g t t c g a c g g c a a a a a g a t c a c t a c c a c a g g g a c c c t g t g g a a c g g c a a c a a a a t t a t c g a c g a g c g c c t g a t c a c c c c c g a c t a a
41 7	ATG-37 45	MVSGWRLFKKISHHHHHHHHFTLDDFV GDWEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNL AVSVTPIMRIVRSGENALKIDIHV IIP YEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHF KVILPYGTLVIDGVTPNKLNYFGRPYE GIAVFDGKKITTTGTLWNGNKI IDERL ITPD
41 8	ATG-37 46	a t g a a a c a t c a c c a t c a c c a t c a t g t g a g c g g c t g g c g g c t g t t c a a g a a g a t t a g c g g c a g c t c c g g t t t c a c a c t c g a c g a t t t c g t t g g g a c t g g g a a c a g a c a g c c g c c t a c a a c c t g g a c c a a g t c c t t g a a c a g g g a g g t g t g t c c a g t t t g c t g c a g a a t c t c g c c g t g t c c g t a a c t c c g a t c a t g a g g a t t g t c c g g a g c g g t g a a a a t g c c c t g a a g a t c g a c a t c c a t g t c a t c a t c c c g t a t g a a g g t c t g a g c g c c g a c c a a a t g g c c c a g a t c g a a g a g g t g t t t a a g g t g g t g t a c c c t g t g g a t g a t c a t c a c t t t a a g g t g a t c c t g c c c t a t g g c a c a c t g g t a a t c g a c g g g g t t a c g c c g a a c a a g c t g a a c t a t t t c g g a c g g c c g t a t g a a g g c a t c g c c g t g t t c g a c g g c a a a a a g a t c a c t a c c a c a g g g a c c c t g t g g a a c g g c a a c a a a a t t a t c g a c g a g c g c c t g a t c a c c c c c g a c t a a
41 9	ATG-37 46	MKHHHHHHVSGWRLFKKISGSSGFTLD DFVGDWEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLL QNLAVSVTPIMRIVRSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDD HHFKVILPYGTLVIDGVTPNKLNYFGR PYEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNKI ID ERLITPD

10

20

30

40

50

42 0	ATG-46 32	atggtgagcggcctggcggcctgtttcaag aagattagcggcagctccggttttcaca ctcgacgattttcgttggggactgggaa cagacagccgcctacaacctggaccaa gtccttgaacaggagggtgtgtccagt ttgctgcagaatctcgcctgttccgta actccgatacatgaggattgtccggagc ggtgaaaaatgccctgaagatcgacatc catgtcatcatcccgtatgaagggtctg agcggccgaccaaatggcccagatcgaa gagggtgttttaagggtggtgtaccctgtg gatgatcatcacttttaagggtgatcctg ccctatggcacactggtaatcgacggg gttacgccgaacaagctgaactatttc ggacggccgtatgaaggcatcgccgtg ttcgacggcaaaaagatactaccaca gggaccctgtgggaacggcaacaaaatt atcgacgagcgcctgatcaccccgac catcaccatcaccatcattaa
42 1	ATG-46 32	MVSGWRLFKKISGSSGFTLDDFVGDWE QTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAVSV TPIMRIVRSGENALKIDIHV IIPYEG L SADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFKVIL PYGTLVIDGVTPNKLNYFGRPYEGIAV FDGKKITTTGTLWNGNKIIDERLITPD HHHHHH
42 2	ATG-27 57	atggtccttcacactcgaagattttcgtt ggggactgggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagttttgctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatccaaagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcggccgaccaaatg gcccagatcgaagagggtgttttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacttt aagggtgatcctgccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacatg ctgaactatttcggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgttcgacggcaaaaag atcactgtaacaggggaccctgtggaac

10

20

30

40

50

		gagaacaaaatttatcgacgagcgcctg atcacccccgacggctccatgctgttc cgagtaaccatcaacagccatcatcac catcaccactaa
42 3	ATG-27 57	MVFTLEDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIQRIVRSGENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNM LNYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN ENKIIDERLITPDGSMLFRVTINSHHH HHH
42 4	ATG-27 60	atgggtcttccacactcgaagatttctgtt ggggactggggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagttttgctgcagaatctc gccgtgtccgttaactccgatccaaagg attgtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcgcgcgaccaaattg gcccagatcgaagagggtgttttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacttt aagggtgatccctgcccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacatg ctgaactattttcggacggccgtatgaa ggcatcgcggtgttccgacggcaaaaag atcactgtaacaggggaccctgtggaac ggcgttaaaatttatcgacgagcgcctg atcacccccgacggctccatgctgttc cgagtaaccatcaacagccatcatcac catcaccactaa
42 5	ATG-27 60	MVFTLEDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIQRIVRSGENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNM LNYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN GVKIIDERLITPDGSMLFRVTINSHHH HHH
42 6	ATG-38 82	atgggtcttccacactcgaagatttctgtt ggggactggggaacagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagttttgctgcagaatctc gccgtgtccgttaactccgatccaaagg atgggtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcgcgcgaccaaattg

10

20

30

40

50

		gcccagatcgaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacttt aagggtgatacctgccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacatg ctgaactattttcggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgtttcgacggcaaaaag atcactgtaacaggggaccctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgacggctccatgctgttc cgagtaaccatcaacagccatcatcac catcaccactaa
42 7	ATG-38 82	MVFTLEDFVGDWEQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIQRMVRS GENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNM LNYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN GNKIIDERLITPDGSMLFRVTINSHHH HHH
42 8	ATG-39 01	atgggtccttcacactcgaagattttcgtt ggggactggaagcagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaaacaggga ggtgtgtccagttttgctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatccaaagg atgggtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatcccg tatgaagggtctgagcggccgaccaaatg gcccagatcgaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacttt aagggtgatacctgccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacatg ctgaactattttcggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgtttcgacggcaaaaag atcactgtaacaggggaccctgttggaac ggcaacaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgacggctccatgctgttc cgagtaaccatcaacagccatcatcac catcaccactaa
42 9	ATG-39 01	MVFTLEDFVGDWKQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIQRMVRS GENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNM LNYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN GNKIIDERLITPDGSMLFRVTINSHHH HHH

10

20

30

40

50

43 0	ATG-39 45	atgggtcttcacactcgaagatttcgtt ggggacttggaagcagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagttttgctgcagaatctc gccgtgtccgttaactccgatccaaagg atgggtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgttcattcatcccg tatgaagggtcttgagcggccgaccaaatg gcccagatcgaagagggtgttttaagggtg gtgtaccctgttggtatgatcatcacttt aagggtgatccttgccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacatg ctgaactatttcggacggccggtatgaa ggcatcgccgtgttcgacggcaaaaaag atcactgtaacaggggaccctgttggaac gacgtcaaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgacgggtcccatgtctgttc cgagtaaccatcaacagccatcatcac catcaccactaa
43 1	ATG-39 45	MVFTLEDFVGDWKQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIQRMVRSGENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNM LNYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN DVKIIDERLITPDGSMLFRVTINSHHH HHH
43 2	ATG-39 84	atgggtcttcacactcgaagatttcgtt ggggacttggaagcagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtgtccagttttgctgcagaatctc gccgtgtccgttaactccgatccaaagg atgggtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgttcattcatcccg tatgaagggtcttgagcggccgaccaaatg gcccagatcgaagagggtgttttaagggtg gtgtaccctgttggtatgatcatcacttt aagggtgatccttgccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacatg ctgaactatttcggacggccggtatgaa ggcatcgccgtgttcgacggcaaaaaag atcactgtaacaggggaccctgttggaac gacgtcaaaaattatcgacgagcgcctg atcacccccgacgggtcccatgtctccttc cgagtaaccatcaacagccatcatcac catcaccactaa

10

20

30

40

50

43 3	ATG-39 84	MVFTLEDFVGDWKQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIQRMVRSGENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNM LNYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN DVKIIDERLITPDGSM SFRVTINSHHH HHH
43 4	ATG-41 47	atgggtcttcacactcgaagatttcgtt ggggacttggaagcagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagtttgctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatccaaagg atgggtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatccc tatgaagggtctgagcgccgaccaaattg gcccagatcgaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacttt aagggtgatcctgccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacatg ctgaactatttcggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgttgcacggcaaaaag atcactgtaacagggaacctgttggaac ggcaacaaaaattatcgacgagcgccctg atcacccccgacgggtccatgttccttc cgagtaaccatcaaacagccatcatcac catcaccactaa
43 5	ATG-41 47	MVFTLEDFVGDWKQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTPIQRMVRSGENAL KIDIHVIIPYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNM LNYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN GNKIIDERLITPDGSM SFRVTINSHHH HHH
43 6	ATG-41 66	atgggtcttcacactcgaagatttcgtt ggggacttggaagcagacagccgcctac aacctggaccaagtccttgaacaggga ggtgtgtccagtttgctgcagaatctc gccgtgtccgtaactccgatccaaagg atgggtccggagcgggtgaaaatgccctg aagatcgacatccatgtcatcatccc tatgaagggtctgagcgccgaccaaattg gcccagatcgaagagggtgtttaagggtg gtgtaccctgtggatgatcatcacttt aagggtgatcctgccctatggcacactg gtaatcgacgggggttacgccgaacatg ctgaactatltcggacggccgtatgaa ggcatcgccgtgttgcacggcaaaaag

10

20

30

40

50

		atcactgtaacagggaccctgtggaac ggcgtaaaaattatcgacgagcgctg atcaccccgacggctccatgtccttc cgagtaaccatcaacagccatcatcac catcaccactaa
43 7	ATG-41 66	MVFTLEDFVGDWKQTAAYNLDQVLEQG GVSSLLQNLAVSVTP I QRMVRS GENAL KIDIHVI I PYEGLSADQMAQIEEVFKV VYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNM LNYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN GVKIIDERLITPDGSM SFRVTINSHHH HHH
43 8	ATG-50 37	ATGAAACATCACCATCACCATCATGTC TTCACACTCGACGATTTTCGTTGGGGAC TGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGTCATCATCCCGTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATC GACGGGGTTACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTCCGACACCCGTATGAAGGCATC GCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACT ACCACAGGGACCCTGTGGAACGGCAAC AAAATTATCGACGAGCGCCTGATCACC CCCGACTAA
43 9	ATG-50 37	MKHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHVI I PYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGHPYEGIAVFDGKKIT TTGTLWNGNKIIDERLITPD
44 0	ATG-50 38	ATGAAACATCACCATCACCATCATGTC TTCACACTCGACGATTTTCGTTGGGGAC TGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGTCATCATCCCGTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG

10

20

30

40

50

		ATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATC GACGGGGTTACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATC GCCGTGTTTCGACGGCGAGAAGATCACT ACCACAGGGGACCCTGTGGAACGGCAAC AAAATTATCGACGAGCGCCTGATCACC CCCGACTAA
44 1	ATG-50 38	MKHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGEKIT TTGTLWNGNKI I DERLITPD
44 2	ATG-50 39	ATGAAACATCACCATCACCATCATGTC TTCACACTCGACGATTTTCGTTGGGGAC TGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGTTCATCATCCCGTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGATAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATC GACGGGGTTACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATC GCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACT ACCACAGGGGACCCTGCCTAACGGCAAC AAAATTATCGACGAGCGCCTGATCACC CCCGACTAA
44 3	ATG-50 39	MKHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT TTGTLPNGNKI I DERLITPD
44 4	ATG-50 40	ATGAAACATCACCATCACCATCATGTC TTCACACTCGACGATTTTCGTTGGGGAC TGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGTTCATCATCCCGTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAG

10

20

30

40

50

		ATCGAAGAGGTGTTTAAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATC GACGGGGTTACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATC GCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACT ACCAACAGGGACCCTGTGGAACGGCAAC AAAATTATCGACGAGCGCCTGATCGAT CCCGACTAA
44 5	ATG-50 40	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHVIIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT TTGTLWNGNKIIDERLIDPD
44 6	ATG-50 41	ATGAAACATCACCATCACCATCATGTC TTCACACTCGACGATTTTCGTTGGGGAC TGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGTCATCATCCCGTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATC GACGGGGTTACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATC GCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACT ACCAACAGGGACCCTGTGGAACGGCAAC AAAATTATCGACGAGCGCCTGATCACC GATGACTAA
44 7	ATG-50 41	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHVIIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKIT TTGTLWNGNKIIDERLITDD
44 8	ATG-51 35	ATGAAACATCACCATCACCATCATGTC TTCACACTCGACGATTTTCGTTGGGGAC TGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC

10

20

30

40

50

		GACATCCATGTCATCATCCC GTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATC GACGGGGTTACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTTCGGACACCCGTATGAAGGCATC GCCGTGTTTCGACGGCGAGAAGATCACT ACCACAGGGACCCTGTGGAACGGCAAC AAAATTATCGACGAGCGCCTGATCACCC CCCGACTAA
44 9	ATG-51 35	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGHPYEGIAVFDGEKIT TTGTLWNGNKI I DERLITPD
45 0	ATG-51 46 (LgTri p 5146)	ATGAAACATCACCATCACCATCATGTC TTCACACTCGACGATTTTCGTTGGGGAC TGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGTCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGTCATCATCCC GTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATC GACGGGGTTACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTTCGGACACCCGTATGAAGGCATC GCCGTGTTTCGACGGCGAGAAGATCACT ACCACAGGGACCCTGTGGAACGGCAAC AAAATTATCGACGAGCGCCTGATCGAT CCCGACTAA
45 1	ATG-51 46 (LgTri p 5146)	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGHPYEGIAVFDGEKIT TTGTLWNGNKI I DERLIDPD

10

20

30

40

50

45 2	ATG-51 58	ATGAAACATCACCATCACCATCATGTC TTCACACTCGACGATTTTCGTTGGGGAC TGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGTCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGTTCATCATCCCGTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATC GACGGGGTTACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTTCGGACACCCGTATGAAGGCATC GCCGTGTTTCGACGGCGAGAAGATCACT ACCACAGGGACCCTGTGGAACGGCAAC AAAATTATCGACGAGCGCCTGATCGAT GATGACTAA
45 3	ATG-51 58	MKHHHHHHVFTLDDFVG DWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHVIIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI DGVTPNKLNYFGHPYEGIAVFDGEKIT TTGTLWNGNKIIDERLIDDD
45 4	ATG-52 60	ATGAAACATCACCATCACCATCATGAT TTCACACTCGACGATTTTCGTTGGGGAC TGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGTCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGTTCATCATCCCGTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCATCGGCACACTGGTAATC GACGGGGTTACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTTCGGACACCCGTATGAAGGCATC GCCGTGTTTCGACGGCGAGAAGATCACT ACCACAGGGACCCTGTGGAACGGCAAC AAAATTATCGACGAGCGCCTGATCGAT CCCGACTAA

10

20

30

40

50

45 5	ATG-52 60	MKHHHHHHHDFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPIGTLVI DGVTPNKLNYFGHPYEGIAVFDGEKIT TTGTLWNGNKI I DERLIDPD
45 6	ATG-52 66	ATGAAACATCACCATCACCATCATGTC TTCACACTCGACGATTTTCGTTGGGGAC TGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGTCATCATCCCGTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCATCGGCACACTGGTAATC GACGGGGAGACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTCCGACACCCGTATGAAGGCATC GCCGTGTTTCGACGGCGAGAAGATCACT ACCACAGGGACCCTGTGGAACGGCAAC AAAATTATCGACGAGCGCCTGATCGAT CCCGACTAA
45 7	ATG-52 66	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPIGTLVI DGETPNKLNYFGHPYEGIAVFDGEKIT TTGTLWNGNKI I DERLIDPD
45 8	ATG-52 67	ATGAAACATCACCATCACCATCATGTC TTCACACTCGACGATTTTCGTTGGGGAC TGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAACTCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGTCATCATCCCGTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCATCGGCACACTGGTAATC GACGGGGTTACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTCCGACACCCGTATGAAGGCATC GCCGATTTTCGACGGCGAGAAGATCACT ACCACAGGGACCCTGTGGAACGGCAAC

10

20

30

40

50

		AAAATTATCGACGAGCGCCTGATCGAT CCCGACTAA
45 9	ATG-52 67	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPIGTLVI DGVTPNKLNYFGHPYEG IADFDGEKIT TTGTLWNGNKI I DERLIDPD
46 0	ATG-52 78	ATGAAACATCACCATCACCATCATGTC TTCACACTCGACGATTTTCGTTGGGGAC TGGGAACAGACAGCCGCTACAACCTG GACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTG TCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTG TCCGTAAC TCCGATCATGAGGATTGTC CGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATC GACATCCATGT CATCATCCC GTATGAA GGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAG ATCGAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGTAC CCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG ATCCTGCCCATCGGCACACTGGTAATC GACGGGGAGACGCCGAACAAGCTGAAC TATTTCCGACACCCGTATGAAGGCATC GCCGATTTTCGACGGCGAGAAGATCACT ACCACAGGGACCCTGTGGAACGGCAAC AAAATTATCGACGAGCGCCTGATCGAT CCCGACTAA
46 1	ATG-52 78	MKHHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPIGTLVI DGETPNKLNYFGHPYEG IADFDGEKIT TTGTLWNGNKI I DERLIDPD
46 2	ATG-47 94	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc ttcacactcgacgatttctgttggggac tgggaacagacagccgcctacaacctg gaccaagtccttgaacaggaggtgtg tccagtttgctgcagaatctcgccgtg tccgtaactccgatcatgaggattgtc cggagcgggtgaaaatgccctgaagatc gacatccatgtcatcatcccgtatgaa ggctctgagcggcgaccaaattggcccag atcgaagaggtgttttaagggtggtgtac cctgtggatgatcatcactttaagggtg

10

20

30

40

50

		atcctgccctatggcacactggtaatc gac
46 3	ATG-47 94	MKHHHHHHVFTLDDFVGDWEQTAAYNL DQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIV RSGENALKIDIHV IIPYEGLSADQMAQ IEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVI D
72 0	HALOTA G	MAEIGTGFPFDPHYVEVLGERMHYVDV GPRDGT PVLFLHGNPTSSYVWRNIIPH VAPTHRCIAPDLIGMGKSDKPDLGYFF DDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVIHDWG SALGFHWAKRNP ERVKGIAFMEFIRPI PTWDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLI IDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHY REPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPA NIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTP GVLIPPAEAAARLAKSLPNCKAVDIGPG LNLLQEDNPDLIGSEIARWLSTLEISG
72 1	ATG399 8 [6xHis-TNFa (sol)- VS-HiB iT]	atgaaacatcaccatcaccatcatgtc agatcatcttctcgaaccccgagtgc aagcctgttagcccatgttgttagcaaac cctcaagctgagggggcagctccagtgg ctgaaccgcccggggccaatgccctcctg gccaatggcggtggagctgagagataac cagctgggtgggtgccatcagaggggcctg tacctcatctactcccagggtcctcttc aaggggccaaggctgccccctccaccat gtgctcctcaccacacccatcagccgc atcgccgctctcctaccagaccaaggctc aacctcctctcttgccatcaagagcccc tgccagaggggagacccagagggggct gaggccaagccctgggtatgagcccatc tatctgggaggggtcttccagctggag aagggtgaccgactcagcgcctgagatc aatcgggcccgactatctcgactttgcc gagtcctgggcagggtctactttgggac attgccctgtcgagttcagggtgggtggc gggagcgggtggaggaggcagcgggtgga gtttccgtgagcggctggcggctgttc aagaagattagctaa

10

20

30

40

50

722	ATG3998 [6xHis-TNFα(sol)-VS-HisB iT]	MKHHHHHHVRSSSRTPSDKPVAVHVVAN PQAEQGQLQWLNRRANALLANGVELRDN QLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGC PSTH VLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSP CQRETPEGAEAKPWYEP IYLGGVFQLE KGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IALSSSSGGGSGGGSSGGVSVSGWRLF KKIS.
723	ATG4002 [smTr ip9 (521) -15G S-プロテインG-6xHis]	ATGGgcaagatgctgttccgagtaacc atcaacagctggaaggaggagctccGGT GGTGGCGGGAGCGGAGGTGGAGGctcg AGCGGTATGACGTATAAGTTAATCCTT AATGGTAAAACATTGAAAGGCGAGACA ACTACTGAAGCTGTTGATGCTGCTACT GCAGAAAAAGTCTTCAAACAATACGCT AACGACAACGGTGTGACGGTGAATGG ACTTACGACGATGCGACGAAAACCTTT ACGGTCACCGAAAAACCAGAAGTGATC GATGCGTCTGAATTAACACCAGCCGTG ACAACTTACAACTTGTATTATTAATGGT AAAACATTGAAAGGCGAAACAACACTACT GAGGCTGTTGATGCTGCTACTGCAGAG AAGGTGTTCAAACAATATGCGAATGAC AACGGTGTGACGGTGAGTGGACTTAC GACGATGCGACTAAGACCTTTACAGTT ACTGAAAAACCAGAAGTGATCGATGCG TCTGAGTTAACACCAGCCGTGACAACT TACAACTTGTATTATTAATGGTAAAACA TTGAAAGGCGAAACAACACTACTAAAGCA GTAGACGCAGAAACTGCGGAGAAGGCC TTCAAACAATACGCTAACGACAACGGT GTTGATGGTGTGTTGGACTTATGATGAT GCCACAAAAACCTTTACGGTAACTGAG CATCATCACCATCACCCTAA
724	ATG4002 [smTr ip9 (521) -15G S-プロテインG-6xHis]	MGKMLFRVTINSWKSSGGGGSGGGGS SGMTYKLIILNGKTLKGETTTEAVDAAT AEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTF TVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVING KTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYAND NGVDGEWTYDDATKTF TVTEKPEVIDA SELTPAVTTYKLVINGKTLKGETT TKA VDAETA EKAFKQYANDNGVDGVW TYDD ATKTFTVTEHHHHHH.
725	ATG4496 SmTr ip9 (743) -15G S-G	atggacaagatgctgttccgagtaacc atcaacaagtggaggaggagctccggt ggtggcgaggagcggaggtggaggctcg agcgggtatgacgtataagttaatcctt aatggtaaaacattgaaaggcgagaca actactgaagctgttgatgctgctact

10

20

30

40

50

		gcagaaaaagtccttcaaacaatacgcct aacgacaacgggtgttgacgggtgaatgg acttacgacgatgacgacgaaaaccttt acggtcaccgaaaaaccagaagtgatc gatgctctgaattaacaccagccgtg acaacttacaaacttggttattaatgggt aaaacattgaaaggcgaaacaactact gaggctgttgatgctgctactgcagag aagggtgttcaaacaatatgcgaatgac aacgggtgttgacgggtgagtggaacttac gacgatgacgactaagacctttacagtt actgaaaaaccagaagtgatcgatgcg tctgagttaacaccagccgtgacaact tacaaacttggttattaatgggtaaaaaca ttgaaaggcgaaacaactactaaagca gtagacgcagaaactgacggagaaaggcc ttcaaacaatacgcctaacgacaacgggt gttgatgggtgtttggacttatgatgat gccacaaaaacctttacggtaactgag catcatcaccatcaccac
7 2 6	ATG449 6 SmTr ip9 (74 3) -15G S-G	MDKMLFRVTINKWKSSGGGGSGGGGS SGMTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAAT AEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTF TVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLIVING KTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYAND NGVDGEWTYDDATKTF TVTEKPEVIDA SELTPAVTTYKLIVINGKTLKGETTTKA VDAETAEKAFKQYANDNGVDGVWTYDD ATKTFTVTEHHHHHH
7 2 7	ATG455 8 SmTr ip9 (75 9) -15G S-G	atggacaagctcctgtttcacggtaacc atcgagaagtataagggggagctccgggt gggtggcgggagcggagggtggaggctcg agcgggtatgacgiataagttaatcctt aatggtaaaaacattgaaaggcgagaca actactgaagctgtttgatgctgctact gcagaaaaagtccttcaaacaatacgcct aacgacaacgggtgttgacgggtgaatgg acttacgacgatgacgacgaaaaccttt acggtcaccgaaaaaccagaagtgatc gatgctctctgaattaacaccagccgtg acaacttacaaacttggttattaatgggt aaaacattgaaaggcgaaacaactact gaggctgtttgatgctgctactgcagag aagggtgttcaaacaatatgcgaatgac aacgggtgttgacgggtgagtggaacttac gacgatgacgactaagacctttacagtt actgaaaaaccagaagtgatcgatgcg tctgagttaacaccagccgtgacaact

10

20

30

40

50

		t a c a a a c t t g t t a t t a a t g g t a a a a c a t t g a a a g g c g a a a c a a c t a c t a a a g c a g t a g a c g c a g a a a c t g c g g a g a a g g c c t t c a a a c a a t a c g c t a a c g a c a a c g g t g t t g a t g g t g t t t g g a c t t a t g a t g a t g c c a c a a a a a c c t t t a c g g t a a c t g a g c a t c a t c a c c a t c a c c a c
728	ATG455 8 SmTr ip9 (75 9) -15G S-G	MDKLLFTVTIEKYKGSSGGGGSGGGGS SGM TYKL I L N G K T L K G E T T T E A V D A A T A E K V F K Q Y A N D N G V D G E W T Y D D A T K T F T V T E K P E V I D A S E L T P A V T T Y K L V I N G K T L K G E T T T E A V D A A T A E K V F K Q Y A N D N G V D G E W T Y D D A T K T F T V T E K P E V I D A S E L T P A V T T Y K L V I N G K T L K G E T T T K A V D A E T A E K A F K Q Y A N D N G V D G V W T Y D D A T K T F T V T E H H H H H
729	ATG455 1 SmTr ip9 (76 0) -15G S-G	a t g a a g a a g a t g c t g t t c c g a g t a a c c a t c c a g a a g t g g a a g g g g a g c t c c g g t g g t g g c g g g a g c g g a g g t g g a g g c t c g a g c g g t a t g a c g t a t a a g t t a a t c c t t a a t g g t a a a a c a t t g a a a g g c g a g a c a a c t a c t g a a g c t g t t g a t g c t g c t a c t g c a g a a a a a g t c t t c a a a c a a t a c g c t a a c g a c a a c g g t g t t g a c g g t g a a t g g a c t t a c g a c g a t g c g a c g a a a a c c t t t a c g g t c a c c g a a a a a c c a g a a g t g a t c g a t g c g t c t g a a t t a a c a c c a g c c g t g a c a a c t t a c a a a c t t g t t a t t a a t g g t a a a a c a t t g a a a g g c g a a a c a a c t a c t g a g g c t g t t g a t g c t g c t a c t g c a g a g a a g g t g t t c a a a c a a t a t g c g a a t g a c a a c g g t g t t g a c g g t g a g t g g a c t t a c g a c g a t g c g a c t a a g a c c t t t a c a g t t a c t g a a a a a c c a g a a g t g a t c g a t g c g t c t g a g t t a a c a c c a g c c g t g a c a a c t t a c a a a c t t g t t a t t a a t g g t a a a a c a t t g a a a g g c g a a a c a a c t a c t a a a g c a g t a g a c g c a g a a a c t g c g g a g a a g g c c t t c a a a c a a t a c g c t a a c g a c a a c g g t g t t g a t g g t g t t t g g a c t t a t g a t g a t g c c a c a a a a a c c t t t a c g g t a a c t g a g c a t c a t c a c c a t c a c c a c

10

20

30

40

50

730	ATG455 1 SmTr ip9 (76 0) -15G S-G	MKKMLFRVTIQKWKGSSGGGGSGGGGS
		SGMTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAAT
		AEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTF
		TVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLIVING
		KTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYAND
		NGVDGEWTYDDATKTFTVTEKPEVIDA
		SELTPAVTTYKLIVINGKTLKGETTTKA
		VDAETAEKAFKQYANDNGVDGVWTYDD
		ATKTFTVTEHHHHH

10

【0506】

表3. 例示的なペプチド配列

20

30

40

50

ペプチドID	配列番号	配列
521 (SmTrip9 Pep521)	16	GKMLFRVTINSWK
289 (SmTrip10 Pep289; VSH iBiT)	17	VSVSGWRLFKKIS
691 (SmTrip10 Pep691; HW- 0977)	18	VSGWRLFRRIS
692 (SmTrip10 Pep692; HW- 1053)	19	VSVSGWRLFRRIS
693 (SmTrip9 Pep693; HW-0 984 (SulfoSE-PEG3); HW- 1042 (SulfoSE-PEG6))	20	GRMLFRVTINSWR
743 (SmTrip9 Pep743)	21	GKMLFRVTINKWK
759 (SmTrip9 Pep759)	22	DKLLFTVTIEKYK
760 (SmTrip9 Pep760)	23	KKMLFRVTIQKWK
895 (SmTrip9 Pep895; HW-1 010 (SulfoSE-PEG3); HW- 1043 (SulfoSE-PEG6))	24	GRLLFVVVIERYR

10

20

30

40

50

929 (SmTrip9 P ep929; HW-1 055 (SulfoS E-PEG3); HW -1052 (Sulfo SE-PEG6))	25	RRMLFRVTIQRWR
937 (SmTrip9 P ep937; HW-0 987)	26	VSGWRLFRRISC
938 (SmTrip9 P ep938; HW-0 992 (TAMRA) ; HW-1050 (S A))	27	GRMLFRVTINSWRC
86	464	VSGWRLFKKIS
229	465	VSGWRLFKKI
543	466	WNGNKIIDERLITPD
544	467	KKITTTGTLWNGR
545	468	RPYEGIAVFDGK
591	469	GKMLFRVTIWKVSVSGW RLFKKIS
592	470	GKMLFRVTIWKVSGWRL FVKKIS
593	471	GSMKFRVTINSWKVSVS GWRLFVKKIS
594	472	GSMKFRVTINSWKVSGW RLFVKKIS
595	473	GSMKFRVTINSWKNVGTG YRLFVKKISN
596	474	GSMKFRVTINSWKVTGY RLFVKKIS
597	475	GSMKFRVTIWKVSVSGW RLFVKKIS

10

20

30

40

50

5 9 8	4 7 6	G S M K F R V T I W K V S G W R L F K K I S
5 9 9	4 7 7	G R M L F R V T I N S W K V S V S G W R L F K K I S
6 0 0	4 7 8	G R M L F R V T I N S W K V S G W R L F K K I S
6 0 1	4 7 9	G R M L F R V T I W K V S V S G W R L F K K I S
6 0 2	4 8 0	G R M L F R V T I W K V S G W R L F K K I S
6 0 3	4 8 1	G S M L F R V T I N S V S V S G W R L F K K I S
6 0 4	4 8 2	G S M L F K V T I N S V S G W R L F K K I S
6 0 5	4 8 3	G S M L F Q V T I N S V S G W R L F K K I S
6 0 6	4 8 4	G S M L F E V T I N S V S G W R L F K K I S
6 0 7	4 8 5	G S M L F N V T I N S V S G W R L F K K I S
6 0 8	4 8 6	G R P Y E G I A V F D G K K I T T T G T L
6 0 9	4 8 7	G S M K F R V T I N S W K V T G Y R L F E K E S
6 1 0	4 8 8	G S M K F R V T I N S W K V E G Y R L F E K I S
6 1 1	4 8 9	K K I T T T G T L W N G N K I I D E R L I T P D
6 1 2	4 9 0	W N G N K I I D E R L I T P D G S M L F R V T I N S
6 7 1	4 9 1	G K M L F R V T I Q K W K
6 6 8	4 9 2	G K M L F R V T I G K W K
7 2 7	4 9 3	G K M L F R V T I G R W K
6 6 9	4 9 4	G K M L F R V T I G N W K
6 7 4	4 9 5	G K M L F R V T I Q N W K
7 0 2	4 9 6	G K M L F R V T I D K W K
7 0 3	4 9 7	G K M L F R V T I E K W K
7 0 5	4 9 8	E K M L F R V T I E S W K
7 2 4	4 9 9	E K L L F R V T I E S W K

10

20

30

40

50

7 2 5	5 0 0	EKLLFRVTIESYK
7 3 0	5 0 1	GKMLFRVTIERWK
7 3 1	5 0 2	GKMLFRVTIDRWK
7 3 8	5 0 3	DKMLFRVTIQKWK
7 3 9	5 0 4	DKMLFRVTIGKWK
8 4 8	5 0 5	DKMLFRVTIGRWK
7 4 0	5 0 6	DKMLFRVTIGNWK
7 4 1	5 0 7	DKMLFRVTIQNWK
7 3 2	5 0 8	DKMLFRVTIDKWK
7 4 2	5 0 9	DKMLFRVTIEKWK
7 3 5	5 1 0	DKMLFRVTIERWK
7 3 3	5 1 1	DKMLFRVTIDRWK
7 9 8	5 1 2	RPYEGIAVFDGKKITVT GTLWNGNKIIDERLITP D
8 4 9	5 1 3	EKMLFRVTIQKWK
7 0 8	5 1 4	EKMLFRVTIGKWK
7 0 9	5 1 5	EKMLFRVTIGRWK
7 7 5	5 1 6	DKMLFTVTIQKVS GWRLFKKIS
7 8 8	5 1 7	DKLLFTVTIEKVS GWRLFKKIS
7 8 9	5 1 8	DKLLFTVTIEKWKVS GWRLFKKIS
7 9 0	5 1 9	DKLLFTVTIEKYKVS GWRLFKKIS
7 9 2	5 2 0	DKLLFTVTIEKYKVS VSGWRLFKKIS
7 9 5	5 2 1	KKMLFRVTIQKVS GWRLFKKIS
7 9 7	5 2 2	KKMLFRVTIQKWKVS VSGWRLFKKIS
7 9 6	5 2 3	KKMLFRVTIQKWKVS GWRLFKKIS

10

20

30

40

50

8 0 4	5 2 4	DKLLFTVTIGKVSGWRL FKKIS
8 0 5	5 2 5	DKLLFTVTIGKYKVS GWRRLFKKIS
8 0 6	5 2 6	DKLLFTVTIGKYKVS GWRRLFKKIS
8 0 7	5 2 7	DKLLFTVTIGKWKVS GWRRLFKKIS
8 0 8	5 2 8	DKLLFTVTIQKVSGWRL FKKIS
8 1 3	5 2 9	KKMLFTVTIQKVSGWRL FKKIS
8 1 6	5 3 0	KKLLFRVTIQKVSGWRL FKKIS
8 2 5	5 3 1	DKLLFTVTIEKVSGWRL FKKI
8 2 6	5 3 2	DKLLFTVTIEKYKVS GWRRLFKKI
8 2 7	5 3 3	DRLLFTVTIERVSGWRL FKKIS
8 3 1	5 3 4	EKLLFTVTIEKVSGWRL FKKIS
8 3 2	5 3 5	KKLLFTVTIGKVSGWRL FKKIS
8 3 3	5 3 6	GSMRFRVTINSWRVTGY RLFERS
8 3 4	5 3 7	GSMKFRVTINSVTGYRL FEKES
8 4 4	5 3 8	KKITTTGTLWNGNKIID
8 4 5	5 3 9	ERLITPDGSMLFRVTIN SVSGWRLFKKIS
8 4 6	5 4 0	GRPYEGIAVDFGKKITT TGTWNGNKIIDERLIT PDGSMLFRVTINSVSGW RLFKKIS
8 4 7	5 4 1	GVT PNKLN YFG RPYEG I AVDFGKKITTTGTWNG NKIIDERLITPDGSMLF RVTINSVSGWRLFKKIS

10

20

30

40

50

8 5 0	5 4 2	E K M L F R V T I G N W K
8 5 1	5 4 3	E K M L F R V T I Q N W K
7 0 6	5 4 4	E K M L F R V T I D K W K
7 0 7	5 4 5	E K M L F R V T I E K W K
7 3 7	5 4 6	E K M L F R V T I E R W K
7 3 6	5 4 7	E K M L F R V T I D R W K
8 5 2	5 4 8	K K M L F R V T I G K W K
8 5 3	5 4 9	K K M L F R V T I G R W K
8 5 4	5 5 0	K K M L F R V T I G N W K
8 5 5	5 5 1	K K M L F R V T I Q N W K
8 5 6	5 5 2	K K M L F R V T I D K W K
8 5 7	5 5 3	K K M L F R V T I E K W K
8 5 8	5 5 4	K K M L F R V T I E R W K
8 5 9	5 5 5	K K M L F R V T I D R W K
8 6 0	5 5 6	R K M L F R V T I Q K W K
8 6 1	5 5 7	R K M L F R V T I G K W K
8 6 2	5 5 8	R K M L F R V T I G R W K
8 6 3	5 5 9	R K M L F R V T I G N W K
8 6 4	5 6 0	R K M L F R V T I Q N W K
8 6 5	5 6 1	R K M L F R V T I D K W K
8 6 6	5 6 2	R K M L F R V T I E K W K
8 6 7	5 6 3	R K M L F R V T I E R W K
8 6 8	5 6 4	R K M L F R V T I D R W K
6 5 6	5 6 5	E Q M L F R V T I N S W K
8 6 9	5 6 6	S R M L F R V T I N S W K
5 3 3	5 6 7	G E M L F R V T I N S W K
6 9 0	5 6 8	G K M K F R V T I N S W K
6 7 8	5 6 9	G K M L F R V K I N S W K
6 7 9	5 7 0	G K M L F R V R I N S W K
6 8 1	5 7 1	G K M L F R V D I N S W K
6 6 3	5 7 2	G K M L F R V T I D S W K
7 1 4	5 7 3	E K M L F K V T I Q K W K
8 7 0	5 7 4	E K M L F T V T I Q K W K
8 7 1	5 7 5	E K M L F K V T I D K W K
8 7 2	5 7 6	E K M L F T V T I D K W K

10

20

30

40

50

8 7 3	5 7 7	E K M L F K V T I G R W K
7 4 4	5 7 8	D K M L F K V T I Q K W K
7 4 5	5 7 9	D K M L F T V T I Q K W K
8 7 4	5 8 0	D K M L F K V T I D K W K
8 7 5	5 8 1	D K M L F T V T I D K W K
8 7 6	5 8 2	G K M L F K V T I E K W K
8 7 7	5 8 3	G K M L F T V T I E K W K
7 4 8	5 8 4	D K M L F K V T I G K W K
7 4 9	5 8 5	D K M L F T V T I G K W K
8 7 8	5 8 6	D K M L F K V T I G N W K
8 7 9	5 8 7	D K M L F K V T I Q N W K
7 8 1	5 8 8	G K M L F K V T I N K W K
7 8 2	5 8 9	G K M L F T V T I N K W K
7 5 2	5 9 0	D K M L F K V T I E K W K
7 5 3	5 9 1	D K M L F T V T I E K W K
7 5 0	5 9 2	D K L L F K V T I G K W K
7 8 6	5 9 3	D K M L F T V T I N K W K
7 5 6	5 9 4	D K L L F T V T I Q K W K
7 5 7	5 9 5	D K L L F T V T I Q K Y K
7 5 8	5 9 6	D K L L F T V T I E K W K
7 9 3	5 9 7	D K L L F T V T I G K W K
7 9 4	5 9 8	D K L L F T V T I G K Y K
7 9 9	5 9 9	D K L L F T V T I N K W K
8 0 0	6 0 0	D K L L F T V T I N K Y K
7 8 0	6 0 1	G K M L F R V T I N S
7 6 5	6 0 2	D K M L F T V T I Q K
7 7 9	6 0 3	D K M L F K V T I Q K
8 2 0	6 0 4	D K L L F T V T I G K
8 1 9	6 0 5	D K M L F T V T I G K
8 2 2	6 0 6	D K M L F T V T I E K
8 2 1	6 0 7	D K L L F T V T I E K
6 2 7	6 0 8	* D K M L F R V T I N S W K
6 2 8	6 0 9	* E K M L F R V T I N S W K
6 2 9	6 1 0	* R K M L F R V T I N S W K
6 3 0	6 1 1	* K K M L F R V T I N S W K
6 3 1	6 1 2	* H K M L F R V T I N S W K

10

20

30

40

50

6 3 2	6 1 3	*GLMLFRVTINSWK
6 3 3	6 1 4	*GQMLFRVTINSWK
6 3 4	6 1 5	*GTMLFRVTINSWK
6 3 5	6 1 6	*GKLLFRVTINSWK
6 3 6	6 1 7	*GKMLFKVTINSWK
6 3 7	6 1 8	*GKMLFRVTIQSWK
6 3 8	6 1 9	*GKMLFRVTIDSWK
6 3 9	6 2 0	*GKMLFRVTIGSWK
6 4 0	6 2 1	*GKMLFRVTINTWK
6 4 1	6 2 2	*GKMLFRVTINNWK
6 4 2	6 2 3	*GKMLFRVTINQWK
6 4 3	6 2 4	*GKMLFRVTINPWK
6 4 4	6 2 5	*GKMLFRVTINKWK
6 4 5	6 2 6	*GKMLFRVTINSWQ
6 4 6	6 2 7	*GKMLFRVTINSWN
6 4 7	6 2 8	*GKMLFRVTINSWT
6 4 8	6 2 9	*GKMLFRVTINSWH
6 4 9	6 3 0	*GKMLFRVTINSWP
6 5 0	6 3 1	*GKMLFRVTINSWR
6 7 7	6 3 2	GKMKFRVTIDSWK
6 8 0	6 3 3	GKMLFRVEINSWK
6 8 2	6 3 4	GKMLFRVQINSWK
6 8 3	6 3 5	GKMKFRVKINSWK
6 8 4	6 3 6	GKMKFRVRINSWK
6 8 5	6 3 7	GKMKFRVEINSWK
6 8 6	6 3 8	GKMKFRVDINSWK
6 8 7	6 3 9	GKMKFRVQINSWK
6 8 8	6 4 0	GKMKFRVNINSWK
6 8 9	6 4 1	GKMKFRVSINSWK
6 1 3	6 4 2	GKMLFRVNINSWK
6 1 4	6 4 3	GKMLFRVSINSWK
6 1 5	6 4 4	GKMLFRVWINSWK
6 1 6	6 4 5	GKMSFRVTINSWK
6 1 7	6 4 6	GKMWFRVTINSWK
6 1 8	6 4 7	GKMNFRVTINSWK

10

20

30

40

50

6 1 9	6 4 8	G S M L F R V T I N S Y K
6 2 0	6 4 9	G K M L F R V T I N S Y K
6 2 1	6 5 0	G K M L F R V T I K S W K
6 2 2	6 5 1	G K M L F R V T I E S W K
7 1 6	6 5 2	G K M K F R V T I Q S W K
7 1 7	6 5 3	G K M K F R V T I E S W K
7 1 8	6 5 4	G K M K F R V T I K S W K
7 1 9	6 5 5	G K M K F R V T I R S W K
6 5 1	6 5 6	R L M L F R V T I N S W K
6 5 2	6 5 7	R Q M L F R V T I N S W K
6 5 3	6 5 8	K L M L F R V T I N S W K
6 5 4	6 5 9	K Q M L F R V T I N S W K
6 5 5	6 6 0	E L M L F R V T I N S W K
6 5 7	6 6 1	D L M L F R V T I N S W K
6 5 8	6 6 2	D Q M L F R V T I N S W K
6 5 9	6 6 3	D K M L F R V T I N S W K
6 6 0	6 6 4	E K M L F R V T I N S W K
6 6 1	6 6 5	R K M L F R V T I N S W K
6 6 2	6 6 6	K K M L F R V T I N S W K
6 6 5	6 6 7	G K M L F R V T I G S W K
6 6 7	6 6 8	G K M L F R V T I N K W K
6 7 0	6 6 9	G K M L F R V T I S K W K
6 7 1	6 7 0	G K M L F R V T I Q K W K
6 7 2	6 7 1	G K M L F R V T I T K W K
6 7 3	6 7 2	G K M L F R V T I K K W K
6 7 5	6 7 3	G K M L F K V T I N S W K
6 7 6	6 7 4	R L M L F R V T I G K W K
7 0 1	6 7 5	G K M L F R V T I N R W K
7 1 0	6 7 6	E K M L F T V T I G K W K
7 1 1	6 7 7	E K L L F T V T I G K W K
7 1 2	6 7 8	E K M L F T V T I G R W K
7 2 0	6 7 9	E K M L F T V T I E K W K
7 2 2	6 8 0	D K M L F R V T I E S W K
7 2 6	6 8 1	E K L L F R V T I G K Y K

10

20

30

40

50

7 4 6	6 8 2	DKLLFKVTIQKWK
7 4 7	6 8 3	DKLLFKVTIQKYK
7 5 1	6 8 4	DKLLFKVTIGKYK
7 5 4	6 8 5	DKLLFKVTIEKWK
7 5 5	6 8 6	DKLLFKVTIEKYK
7 6 1	6 8 7	KKLLFRVTIQKWK
7 6 2	6 8 8	DRMLFRVTIQRWR
7 6 6	6 8 9	ERMLFRVTIGRWR
7 6 8	6 9 0	GRMLFRVTINRWR
7 7 0	6 9 1	DRMLFRVTIERWR
7 8 3	6 9 2	DKMLFKVTIQKYK
7 8 4	6 9 3	DKMLFRVTINKWK
7 8 5	6 9 4	DKMLFKVTIEKYK
7 8 7	6 9 5	DKMLFKVTINKWK
6 9 3	6 9 6	GRMLFRVTINSWR
8 9 5	6 9 7	GRLLFVVVIERYR
9 3 7	6 9 8	VSGWRLFRRISC
9 3 8	6 9 9	GRMLFRVTINSWRC
9 3 9	7 0 0	GRLLFTVTIERYRC
8 4 0	7 0 1	GKLLFVVVIEKYK
9 0 0	7 0 2	GKLLFVTIEKVSGWRLF KKIS
* 末端ブロッキングなし		

10

20

【 0 5 0 7 】

30

40

50

表 4. 例示的なルシフェラーゼ塩基配列。

ベアチド ID	配列番号	配列
LgTrip 35 46-WTストラ ント ⁹ -HiBiT	703	MVFTLDDFVGDEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENA LKIDIHVIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDERLITPDGSMLEFRVTINSVSG WRLFKKIS
LgTrip 35 46-WTストラ ント ⁹ -SmBiT	704	MVFTLDDFVGDEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENA LKIDIHVIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDERLITPDGSMLEFRVTINSVTG YRLFEEIL
LgTrip 35 46(1-5)	705	MVFTLDDFVGDEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENALKIDIH VIIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVID
LgTrip 35 46(1-6)	706	MVFTLDDFVGDEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENA LKIDIHVIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDG
LgTrip 35 46(1-7)	707	MVFTLDDFVGDEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENA LKIDIHVIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTL
LgTrip 35 46(1-8)	708	MVFTLDDFVGDEQTAAYNLDQVLEQGGVSSLLQNLAVSVTPIMRIVRSGENA LKIDIHVIPYEGLSADQMAQIEEVFKVVYPVDDHHFKVILPYGTLVIDGVTPNK LNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDERLITPD
LgTrip 35 46(ストラント ⁶ - 8)-WTストラ ント ⁹ -HiB iT	709	GVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDERLITPDGSMLEFRV TINSVSGWRLFKKIS
LgTrip 35 46(ストラント ⁷ - 8)-WTストラ ント ⁹ -HiB iT	710	KKITTTGTLWNGNKIIDERLITPDGSMLEFRVTINSVSGWRLFKKIS
LgTrip 35 46(ストラント ⁸ - 8)-WTストラ ント ⁹ -HiBiT	711	WNGNKIIDERLITPDGSMLEFRVTINSVSGWRLFKKIS
WTストラント ⁹ - HiBiT	712	GSMLEFRVTINSVSGWRLFKKIS
LgTrip 35 46(ストラント ⁶ - 8)-WTストラ ント ⁹ -SmB	713	GVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDGKKITTTGTLWNGNKIIDERLITPDGSMLEFRV TINSVTGYRLFEEIL

10

20

30

40

50

iT		
LgTrip 35 46(ストラント [*] 7-8)-WTスト ラント [*] 9-SmB iT	714	KKITTTGTLWNGNKIIDERLITPDGSMLFRVTINSVTGYRLFEEIL
LgTrip 35 46(ストラント [*] 8)-WTストラ ント [*] 9-SmBiT	715	WNGNKIIDERLITPDGSMLFRVTINSVTGYRLFEEIL
WTストラント [*] 9 -SmBiT	716	GSMLFRVTINSVTGYRLFEEIL
β 6様	717	GVTPNKLNYFGRPYEGIAVFDG
β 7様	718	KKITTTGTL
β 8様	719	WNGNKIIDERLITPD
ATG3998[6 xHis-TNF α (sol)-VS- HiBiT]	721	atgaaacatcaccateaccatcatgtcagatcatcttctogaacccogagtgaacaagcc ttagcccatgtttagcaaacctcaagctgaggggcagctccagtggctgaaccgcc gggccaatgccctcctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctgggtggcgca tcagaggccctgtacctcatctactcccaggctcctcttcaaggccaaggctgcccctc caccatgtgtcctcaccacacacatcagccgcatcgccgtctcctaccagaccaagg tcacctcctctctgccatcaagagccctgccagaggagaccccagaggggctgag gccaagccctggatgagcccatctatctgggagggtcttccagctggagaagggtga ccgactcagcgtgagatcaatcgcccgactatctogactttgcgagctotgggcagg tctactttgggatcattgccctgtcgagttcaggtggtggcgggagcgggtggaggagc agcgggtggagttccgtgagcggctggcggctgttcaagaagattagctaa
ATG3998[6 xHis-TNF α (sol)-VS- HiBiT]	722	MKHHHHHVRSSRTPSDKPVAVHVNPAEGQLQWLNRRNALLANGVBLRDNQLVVP SEGLYLIYSQVLFKGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAE AKPWYEPYIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIALSSSGGGSGGGS SGGVSVSGWRLFKKIS.
ATG4002[s mTrip9(52 1)-15GS-7 *ロテインG-6x His]	723	ATGGcaagatgctgttccgagtaaccatcaacagctggaaggggagctccGGTGGTGG CGGGAGCGGAGGTGGAGGctcAGCGGTATGACGTATAAGTTAATCCTTAATGGTAAAA CATTGAAAGGCGAGACAACTACTGAAGCTGTTGATGCTGCTACTGCAGAAAAAGTCTTC AAACAATACGCTAACGACAACGGTGTGACGGTGAATGGACTTACGACGATGCGACGAA AACCTTTACGGTCACCGAAAAACCAGAAAGTATCGATGCGTCTGAATTAACACGAGCCG TGACAACTTACAACTTGTATTAAATGTTAAACATTGAAAGCGGAAACAACTACTGAG GCTGTTGATGCTGCTACTGCAGAGAAGGTGTTCAAACAATATGCGAATGACAACGGTGT TGACGGTGAGTGGACTTACGACGATGCGACTAAGACCTTTACAGTTACTGAAAAACCAG AAGTATCGATGCGTCTGAGTTAACACCAGCCGTGACAACCTTACAACTTGTATTAAAT GGTAAACATTTGAAAGGCGAAACAACCTAAAGCAGTAGACGAGAACTGCGGAGAA GGCCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTGATGGTGTGTTGGACTTATGATGATG CCACAAAAACCTTTACGGTAACTGAGCATCATCACCATCACCATAA
ATG4002[s mTrip9(52 1)-15GS-7 *ロテインG-6x His]	724	MGKMLFRVTINSWKSSGGGSGGGSSGMYKLIILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVF KQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVLINGKTLKGETTTE AVDAATAEKVFQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVIN GKTLKGETTTKAVIDAETAEKAFKQYANDNGVDGVWYDDATKTFTVTEHHHHHH.

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔1〕発光基質と、

標的分析物結合要素及び生物発光複合体のポリペプチド構成成分または生物発光複合体のペプチド構成成分のうちの1つを含む標的分析物結合剤と、
を含む、組成物。

〔2〕前記標的分析物結合剤の前記ポリペプチド構成成分が、
配列番号5と少なくとも60%の配列同一性、
配列番号9と少なくとも60%の配列同一性、または
配列番号12と少なくとも60%の配列同一性

を含む、前記〔１〕に記載の組成物。

〔３〕前記標的分析物結合剤の前記ペプチド構成成分が、
配列番号１０と少なくとも６０％の配列同一性、
配列番号１１と少なくとも６０％の配列同一性、
配列番号１３と少なくとも６０％の配列同一性、または
配列番号１４と少なくとも６０％の配列同一性
を含む、前記〔１〕に記載の組成物。

〔４〕前記生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分を更に含み、
前記標的分析物結合剤及び前記生物発光複合体の前記相補性ペプチドまたはポリペプチド
構成成分は、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する、前記〔１〕～
〔３〕のいずれか１項に記載の組成物。

10

〔５〕前記発光基質及び前記標的分析物結合剤を含む前記組成物が、乾燥配合物に合わされ、
前記生物発光複合体の前記相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分が液体配合物
に含まれ、

前記液体配合物は、前記乾燥配合物に添加され、再水和すると、前記標的分析物の存在下
で前記生物発光分析物検出複合体を形成する、前記〔４〕に記載の組成物。

〔６〕前記発光基質、前記標的分析物結合剤、及び前記生物発光複合体の前記相補性ペプ
チドまたはポリペプチド構成成分を含む前記組成物が、乾燥配合物に合わされ、
前記乾燥配合物は、再水和すると、前記標的分析物の存在下で前記生物発光分析物検出複
合体を形成する、前記〔４〕に記載の組成物。

20

〔７〕前記相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分が、前記標的分析物の存在下で前
記生物発光分析物検出複合体を形成する第２の標的分析物結合要素を含む、前記〔１〕～
〔６〕のいずれか１項に記載の組成物。

〔８〕前記標的分析物結合剤の前記ポリペプチド構成成分が、配列番号６と少なくとも６
０％の配列同一性を含み、前記生物発光複合体の前記相補性ペプチドまたはポリペプチド
構成成分が、配列番号１０と少なくとも６０％の配列同一性を含む、前記〔１〕～〔７〕
のいずれか１項に記載の組成物。

〔９〕前記標的分析物結合剤の前記ポリペプチド構成成分が、配列番号６と少なくとも６
０％の配列同一性を含み、前記生物発光複合体の前記相補性ペプチドまたはポリペプチド
構成成分が、配列番号１４と少なくとも６０％の配列同一性を含む、前記〔１〕～〔７〕
のいずれか１項に記載の組成物。

30

〔１０〕（ａ）第１の標的分析物結合要素及び配列番号９と少なくとも６０％の配列同一
性を有するポリペプチド構成成分を含む第１の標的分析物結合剤と、

（ｂ）第２の標的分析物結合要素及び配列番号１０と少なくとも６０％の配列同一性を
有する相補性ペプチド構成成分を含む第２の標的分析物結合剤と、
を含む、乾燥配合物を含む、組成物。

〔１１〕前記乾燥配合物が、発光基質を更に含み、前記〔１０〕に記載の組成物。

〔１２〕前記標的分析物を含む液体配合物を更に含み、前記〔１０〕または〔１１〕に記
載の組成物。

〔１３〕（ａ）第１の標的分析物結合要素及び配列番号１２と少なくとも６０％の配列同
一性を有するポリペプチド構成成分を含む第１の標的分析物結合剤と、

40

（ｂ）第２の標的分析物結合要素及び配列番号１４と少なくとも６０％の配列同一性を
有する相補性ペプチド構成成分を含む第２の標的分析物結合剤と、
を含む、乾燥配合物を含む、組成物。

〔１４〕前記乾燥配合物が、発光基質を更に含み、前記〔１３〕に記載の組成物。

〔１５〕前記標的分析物を含む液体配合物を更に含み、前記〔１３〕または〔１４〕に記
載の組成物。

〔１６〕（ａ）第１の標的分析物結合要素及び配列番号１３と少なくとも６０％の配列同
一性を有するペプチド構成成分を含む第１の標的分析物結合剤と、

（ｂ）第２の標的分析物結合要素及び配列番号１５と少なくとも６０％の配列同一性を

50

有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤と、

〔c〕配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分と、

を含む、乾燥配合物を含む、組成物。

〔17〕前記乾燥配合物が、発光基質を更に含む、前記〔16〕に記載の組成物。

〔18〕前記標的分析物を含む液体配合物を更に含む、前記〔16〕または〔17〕に記載の組成物。

〔19〕(a) 標的分析物結合要素及び配列番号9と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、

(b) 標的分析物結合要素及び配列番号10または配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、

を含む、組成物。

〔20〕(a) 標的分析物結合要素及び配列番号10または配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を有するペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、

(b) 標的分析物結合要素及び配列番号9と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、
を含む、組成物を含む。

〔21〕(a) 標的分析物結合要素及び配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、

(b) 標的分析物結合要素及び配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、
を含む、組成物を含む。

〔22〕前記乾燥配合物が、発光基質を更に含む、前記〔19〕～〔21〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔23〕前記液体配合物が、発光基質を更に含む、前記〔19〕～〔21〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔24〕前記液体配合物が、標的分析物を含むサンプルを更に含み、生物発光分析物検出複合体が、前記乾燥配合物及び前記液体配合物を前記標的分析物の存在下で合わせると形成される、前記〔19〕～〔21〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔25〕前記生物発光複合体の第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分を更に含み、

前記標的分析物結合剤、前記生物発光複合体の前記第1の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分、及び前記生物発光複合体の前記第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分が、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する、前記〔1〕～〔4〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔26〕前記標的分析物結合剤を含む組成物が、乾燥配合物に含まれ、前記生物発光複合体の前記第1の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分及び前記第2の相補性ペプチドまたはポリペプチドが、前記液体配合物に含まれ、

前記液体配合物は、前記乾燥配合物に添加され、再水和すると、前記標的分析物の存在下で前記生物発光分析物検出複合体を形成する、前記〔25〕に記載の組成物。

〔27〕前記標的分析物結合剤、及び前記第1または前記第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分のいずれかを含む前記組成物が、乾燥配合物に合わされ、前記乾燥配合物中に存在しない前記第1または第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分が、液体配合物に含まれ、

前記液体配合物は、前記乾燥配合物に添加され、再水和すると、前記標的分析物の存在下で前記生物発光分析物検出複合体を形成する、前記〔25〕に記載の組成物。

〔28〕前記標的分析物結合剤、前記第1の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分、及び前記第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分が、乾燥配合物に合わされ

10

20

30

40

50

、再水和すると、前記標的分析物の存在下で前記生物発光分析物検出複合体を形成する、前記〔25〕に記載の組成物。

〔29〕前記乾燥配合物が、発光基質を更に含む、前記〔25〕～〔27〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔30〕前記液体配合物が、発光基質を更に含む、前記〔25〕～〔27〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔31〕前記液体配合物が、標的分析物を含むサンプルを更に含み、生物発光分析物検出複合体が、前記乾燥配合物及び前記液体配合物を前記標的分析物の存在下で合わせると形成される、前記〔25〕～〔27〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔32〕前記第1または前記第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分のいずれかが、再水和すると、前記標的分析物の存在下で前記生物発光分析物検出複合体を形成する第2の標的分析物結合要素を含む、前記〔25〕～〔31〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔33〕前記標的分析物結合剤の前記ポリペプチド構成成分が、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を含み、前記生物発光複合体の前記第1または前記第2の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分のいずれかが、配列番号13または配列番号15のいずれかと少なくとも60%の配列同一性を含む、前記〔25〕～〔32〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔34〕（a）標的分析物結合要素及び配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、

（b）標的分析物結合要素及び配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、

配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する第2の相補性ペプチド構成成分と、を含む、組成物。

〔35〕（a）標的分析物結合要素及び配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤、ならびに標的分析物結合要素及び配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、

（b）配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する第2の相補性ペプチド構成成分を含む、液体配合物と、を含む、組成物。

〔36〕（a）標的分析物結合要素及び配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤、ならびに配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む、乾燥配合物と、

（b）標的分析物結合要素及び配列番号13または配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、を含む、組成物。

〔37〕（a）標的分析物結合要素及び配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を有するペプチド構成成分を含む第1の標的分析物結合剤、ならびに標的分析物結合要素及び配列番号15と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第2の標的分析物結合剤を含む、乾燥配合物と、

（b）配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分を含む、液体配合物と、を含む、組成物。

〔38〕（a）配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分を含む、乾燥配合物と、

〔b〕 標的分析物結合要素及び配列番号 13 と少なくとも 60 % の配列同一性を有するペプチド構成成分を含む第 1 の標的分析物結合剤、ならびに標的分析物結合要素及び配列番号 15 と少なくとも 60 % の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第 2 の標的分析物結合剤を含む、液体配合物と、を含む、組成物。

〔39〕 標的分析物結合要素及び配列番号 13 と少なくとも 60 % の配列同一性を有するペプチド構成成分を含む第 1 の標的分析物結合剤と、標的分析物結合要素及び配列番号 15 と少なくとも 60 % の配列同一性を有する相補性ペプチド構成成分を含む第 2 の標的分析物結合剤と、配列番号 12 と少なくとも 60 % の配列同一性を有する相補性ポリペプチド構成成分と、を含む、乾燥配合物を含む、組成物。

10

〔40〕 前記乾燥配合物が、発光基質を更に含む、前記〔34〕～〔39〕のいずれか 1 項に記載の組成物。

〔41〕 前記液体配合物が、発光基質を更に含む、前記〔34〕～〔39〕のいずれか 1 項に記載の組成物。

〔42〕 前記液体配合物が、標的分析物を含むサンプルを更に含み、生物発光分析物検出複合体が、前記乾燥配合物及び前記液体配合物を前記標的分析物の存在下で合わせると形成される、前記〔34〕～〔39〕のいずれか 1 項に記載の組成物。

〔43〕 前記発光基質の存在下で生成される生物発光シグナルが、前記標的分析物結合剤が前記生物発光複合体の前記相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分のうちの 1 つ以上と接触する場合、前記標的分析物結合剤及び前記発光基質単独によって生成される生物発光シグナルと比較して、実質的に増加する、前記〔1〕～〔42〕のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

〔44〕 前記標的分析物が、標的抗体である、前記〔1〕～〔43〕のいずれか 1 項に記載の組成物。

〔45〕 前記標的分析物結合剤が、抗体に非特異的に結合する要素を含む、前記〔1〕～〔44〕のいずれか 1 項に記載の組成物。

〔46〕 前記標的分析物結合剤が、抗体に特異的に結合する要素を含む、前記〔1〕～〔44〕のいずれか 1 項に記載の組成物。

〔47〕 前記標的抗体が、病原体、毒素、または治療用生物学的製剤に対する抗体である、前記〔44〕に記載の組成物。

30

〔48〕 前記標的分析物結合要素が、抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組み換え抗体、抗体フラグメント、プロテイン A、プロテイン A の Ig 結合ドメイン、プロテイン G、プロテイン G の Ig 結合ドメイン、プロテイン A/G、プロテイン A/G の Ig 結合ドメイン、プロテイン L、プロテイン L の Ig 結合ドメイン、プロテイン M、プロテイン M の Ig 結合ドメイン、オリゴヌクレオチドプローブ、ペプチド核酸、DARPin、アプタマー、アフィマー、タンパク質ドメイン、及び精製タンパク質からなる群から選択される、前記〔1〕～〔47〕のいずれか 1 項に記載の組成物。

〔49〕 前記発光基質が、セレンテラジン、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h-h、フリマジン、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される、前記〔1〕～〔48〕のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

〔50〕 高分子を更に含む、前記〔1〕～〔49〕のいずれか 1 項に記載の組成物。

〔51〕 前記高分子が、天然生体高分子である、前記〔50〕に記載の組成物。

〔52〕 前記天然生体高分子が、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、及びこれらの任意の組み合わせから選択される、前記〔51〕に記載の組成物。

〔53〕 前記天然生体高分子が、プルランである、前記〔51〕に記載の組成物。

〔54〕 前記高分子が、環状糖高分子またはその誘導体である、前記〔50〕に記載の組成物。

〔55〕 前記高分子が、ヒドロキシプロピルβ-シクロデキストリンである、前記〔54〕に記載の組成物。

50

- 〔５６〕前記高分子が、合成高分子である、前記〔５０〕に記載の組成物。
- 〔５７〕前記合成高分子が、ポリスチレン、ポリ（メタ）アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される、前記〔５６〕に記載の組成物。
- 〔５８〕前記合成高分子が、少なくとも１つのポリ（プロピレンオキシド）ブロックと、少なくとも１つのポリ（エチレンオキシド）ブロックとを含む、ブロックコポリマーである、前記〔５６〕に記載の組成物。
- 〔５９〕前記合成高分子が、ポロキサマー１８８である、前記〔５８〕に記載の組成物。
- 〔６０〕前記組成物が、緩衝液、界面活性剤、還元剤、塩、ラジカル捕捉剤、キレート化剤、タンパク質、またはこれらの任意の組み合わせを更に含む、前記〔１〕～〔５９〕のいずれか１項に記載の組成物。
- 〔６１〕前記界面活性剤が、ポリソルベート２０、ポリソルベート４０、及びポリソルベート８０から選択される、前記〔６０〕に記載の組成物。
- 〔６２〕前記組成物が、サンプル中の分析物を検出するために、分析物検出プラットフォームとともに使用される、前記〔１〕～〔６１〕のいずれか１項に記載の組成物。
- 〔６３〕前記サンプルが、血液、血清、血漿、尿、便、脳脊髄液、間質液、唾液、組織サンプル、水サンプル、土壌サンプル、植物サンプル、食物サンプル、飲料サンプル、油、及び産業流体サンプルから選択される、前記〔６２〕に記載の組成物。
- 〔６４〕前記〔１〕～〔６３〕に記載の組成物のいずれかを、標的分析物を含むサンプルと合わせることを含む、サンプル中の分析物を検出する方法。
- 〔６５〕前記サンプル中の前記標的分析物を検出することが、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを検出することを含む、前記〔６４〕に記載の方法。
- 〔６６〕前記分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを定量することを更に含む、前記〔６５〕に記載の方法。
- 〔６７〕前記分析物検出複合体から生成される前記生物発光シグナルが、前記分析物の濃度に比例する、前記〔６６〕に記載の方法。
- 〔６８〕前記組成物の前記構成成分のうちの１つ以上が、溶液中の前記構成成分単独と比較して、前記組成物内で安定性の向上を示す、前記〔１〕～〔６７〕のいずれか１項に記載の組成物。
- 〔６９〕検出領域及びコントロール領域を含む分析メンブレンであって、前記検出領域は、前記検出領域に固定化された第１の標的分析物結合剤を含む、前記分析メンブレンと、第２の標的分析物結合剤を含むコンジュゲートパッドと、サンプルパッドと、を含み、前記第１の標的分析物結合剤及び前記第２の標的分析物結合剤は、サンプル中で標的分析物が検出される場合、前記少なくとも１つの検出領域において生物発光分析物検出複合体を形成する、ラテラルフロー検出システム。
- 〔７０〕前記第１の標的分析物結合剤が、標的分析物結合要素を含み、かつ非発光であり、前記第２の標的分析物結合剤が、標的分析物結合要素及び生物発光ポリペプチドを含む、前記〔６９〕に記載のシステム。
- 〔７１〕前記生物発光ポリペプチドが、配列番号５と少なくとも６０％の配列同一性を有する、前記〔７０〕に記載のシステム。
- 〔７２〕前記第１の標的分析物結合剤が、標的分析物結合要素及び生物発光複合体のポリペプチド構成成分を含み、前記第２の標的分析物結合剤が、標的分析物結合要素及び生物発光複合体のペプチド構成成分を含み、発光基質の存在下で生成される生物発光シグナルは、前記第１の標的分析物結合剤が前記第２の標的分析物結合剤と接触する場合、前記第１の標的分析物結合剤及び前記発光基質単独によって生成される生物発光シグナルと比較して、実質的に増加する、前記〔６９〕に記載のシステム。
- 〔７３〕前記第１の標的分析物結合剤が、標的分析物結合要素及び生物発光複合体のペプチド構成成分を含み、前記第２の標的分析物結合剤が、標的分析物結合要素及び生物発光複合体のポリペプチド構成成分を含み、発光基質の存在下で生成される生物発光シグナルは、前記第１の標的分析物結合剤が前記第２の標的分析物結合剤と接触する場合、前記第

10

20

30

40

50

1の標的分析物結合剤及び前記発光基質単独によって生成される生物発光シグナルと比較して、実質的に増加する、前記〔69〕に記載のシステム。

〔74〕前記生物発光複合体のポリペプチド構成成分が、配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を有し、前記生物発光複合体のペプチド構成成分が、配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を有する、前記〔72〕または前記〔73〕に記載のシステム。

〔75〕前記生物発光複合体のポリペプチド構成成分が、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有し、前記生物発光複合体のペプチド構成成分が、配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を有する、前記〔72〕または前記〔73〕に記載のシステム。

〔76〕前記第1の標的分析物結合剤が、標的分析物結合要素及び三成分生物発光複合体の第1のペプチド構成成分を含み、前記第2の標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素及び前記三成分生物発光複合体の第2のペプチド構成成分を含み、発光基質の存在下で生成される生物発光シグナルは、前記第1の標的分析物結合剤が前記第2の標的分析物結合剤及び前記三成分生物発光複合体のポリペプチド構成成分と接触する場合、(i)前記第1の標的分析物結合剤、前記第2の標的分析物結合剤、及び／または前記ポリペプチド構成成分ならびに(ii)前記発光基質単独によって生成される生物発光シグナルと比較して、実質的に増加する、前記〔69〕に記載のシステム。

〔77〕前記三成分生物発光複合体の第1のペプチド構成成分が配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を有し、前記三成分生物発光複合体の第1のペプチド構成成分が配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を有し、前記三成分生物発光複合体のポリペプチド構成成分が配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を有する、前記〔76〕に記載のシステム。

〔78〕前記標的分析物が、標的抗体である、前記〔69〕～〔77〕のいずれか1項に記載のシステム。

〔79〕前記第1の標的分析物結合剤が、抗体に非特異的に結合する要素を含む、前記〔78〕に記載のシステム。

〔80〕前記第2の標的分析物結合剤が、前記標的抗体に特異的に結合する要素を含む、前記〔79〕に記載のシステム。

〔81〕前記標的抗体が、病原体、毒素、または治療用生物学的製剤に対する抗体である、前記〔78〕に記載のシステム。

〔82〕前記標的分析物結合要素が、抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組み換え抗体、抗体フラグメント、プロテインA、プロテインAのIg結合ドメイン、プロテインG、プロテインGのIg結合ドメイン、プロテインA/G、プロテインA/GのIg結合ドメイン、プロテインL、プロテインLのIg結合ドメイン、プロテインM、プロテインMのIg結合ドメイン、オリゴヌクレオチドプローブ、ペプチド核酸、DARPin、アプタマー、アフィマー、タンパク質ドメイン、及び精製タンパク質からなる群から選択される、前記〔69〕～〔77〕のいずれか1項に記載のシステム。

〔83〕発光基質を更に含む、前記〔69〕～〔82〕のいずれか1項に記載のシステム。

〔84〕前記発光基質が、セレンテラジン、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h-h、フリマジン、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される、前記〔83〕に記載のシステム。

〔85〕前記発光基質が、前記発光基質と、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、ポリスチレン、ポリ(メタ)アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される高分子と、を含む、組成物の一部として前記システムにアプライされる、前記〔69〕～〔84〕のいずれか1項に記載のシステム。

〔86〕前記組成物が、前記サンプルパッド、前記コンジュゲーションパッド、前記検出領域、及び前記コントロール領域のうちの少なくとも1つにアプライされる、前記〔69〕～〔84〕のいずれか1項に記載のシステム。

〔87〕前記分析メンブレンが、複数の検出領域を含み、各検出領域が、異なる標的分析物結合要素を含む、異なる標的分析物結合剤を含む、前記〔69〕～〔86〕のいずれか1項に記載のシステム。

10

20

30

40

50

〔 8 8 〕 前記システムが、分析物検出複合体による生物発光シグナルを検出または定量するためのデバイスを更に含む、前記〔 6 9 〕～〔 8 7 〕のいずれか 1 項に記載のシステム。

〔 8 9 〕 少なくとも 1 つの標的分析物結合剤を含む、コンジュゲートパッドであって、前記少なくとも 1 つの標的分析物結合剤が、標的分析物結合要素と、

配列番号 5 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含む生物発光ポリペプチド、

配列番号 9 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含むポリペプチド、

配列番号 1 0 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含むペプチド、

配列番号 1 1 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含むペプチド、

配列番号 1 3 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含むペプチド、

配列番号 1 2 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含むポリペプチド、

配列番号 1 4 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含むペプチド、または

O p l o p h o r u s ルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアのうちの 1 つと、

を含む、前記コンジュゲートパッド。

〔 9 0 〕 前記標的分析物結合剤が、標的分析物結合要素と、

配列番号 5 の生物発光ポリペプチド、

配列番号 9 のポリペプチド、

配列番号 1 0 のポリペプチド、

配列番号 1 1 のポリペプチド、

配列番号 1 3 のポリペプチド、

配列番号 1 2 のポリペプチド、

配列番号 1 4 のポリペプチド、または

O p l o p h o r u s ルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアのうちの 1 つと、

を含む、前記〔 8 9 〕に記載のコンジュゲートパッド。

〔 9 1 〕 発光基質を更に含む、前記〔 8 9 〕または〔 9 0 〕に記載のコンジュゲートパッド。

〔 9 2 〕 前記発光基質が、セレンテラジン、セレンテラジン－h、セレンテラジン－h－h、フリマジン、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される、前記〔 9 1 〕に記載のコンジュゲートパッド。

〔 9 3 〕 前記発光基質が、前記発光基質と、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、ポリスチレン、ポリ（メタ）アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される高分子と、を含む、組成物の一部として前記コンジュゲートパッド上にまたは前記コンジュゲートパッド内に含有される、前記〔 9 1 〕に記載のコンジュゲートパッド。

〔 9 4 〕 前記発光基質が、前記発光基質と、自己発光を低減する物質と、を含む、組成物の一部として前記コンジュゲートパッド上にまたは前記コンジュゲートパッド内に含有される、前記〔 9 1 〕に記載のコンジュゲートパッド。

〔 9 5 〕 自己発光を低減する前記物質が、A T T、A T T の誘導体、またはチオウレアである、前記〔 9 4 〕に記載のコンジュゲートパッド。

〔 9 6 〕 検出領域及びコントロール領域を含む分析メンブレンであって、前記検出領域は、前記検出領域に固定化された少なくとも 1 つの標的分析物結合剤を含み、前記少なくとも 1 つの標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素と、

配列番号 5 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含む生物発光ポリペプチド、

配列番号 9 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含むポリペプチド、

配列番号 1 0 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含むペプチド、

配列番号 1 1 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含むペプチド、

配列番号 1 3 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含むペプチド、

配列番号 1 2 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含むポリペプチド、

配列番号 1 4 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含むペプチド、または

10

20

30

40

50

O p l o p h o r u sルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオ
ロフォアのうちの1つと、

を含む、前記分析メンブレン。

〔97〕前記標的分析物結合剤が、標的分析物結合要素と、

配列番号5の生物発光ポリペプチド、

配列番号9のポリペプチド、

配列番号10のポリペプチド、

配列番号11のポリペプチド、

配列番号13のポリペプチド、

配列番号12のポリペプチド、

配列番号14のポリペプチド、または

O p l o p h o r u sルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオ
ロフォアのうちの1つと、

を含む、前記〔96〕に記載の分析メンブレン。

〔98〕複数の検出領域を更に含み、各検出領域が、異なる標的分析物結合要素を含む、
異なる標的分析物結合剤を含む、前記〔96〕に記載の前記分析メンブレン。

〔99〕発光基質を更に含む、前記〔97〕または〔98〕に記載の分析メンブレン。

〔100〕前記発光基質が、セレンテラジン、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h
-h、フリマジン、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される、前記〔
97〕に記載の分析メンブレン。

〔101〕前記発光基質が、前記発光基質と、プルラン、トレハロース、マルトース、セ
ルロース、デキストラン、ポリスチレン、ポリ（メタ）アクリレート、及びこれらの任意
の組み合わせから選択される高分子と、を含む、組成物の一部として前記コンジュゲート
パッドに可逆的にコンジュゲートされる、前記〔99〕に記載の分析メンブレン。

〔102〕前記発光基質が、前記発光基質と、自己発光を低減する物質と、を含む、組成
物の一部として前記コンジュゲートパッド上にまたは前記コンジュゲートパッド内に含有
される、前記〔99〕に記載の分析メンブレン。

〔103〕自己発光を低減する前記物質が、A T T、A T Tの誘導体、またはチオウレア
である、前記〔99〕に記載の分析メンブレン。

〔104〕検出領域を含む固相検出プラットフォームであって、前記検出領域は、前記検
出領域にコンジュゲートされた少なくとも1つの標的分析物結合剤を含み、前記少なくと
も1つの標的分析物結合剤は、標的分析物結合要素と、

配列番号5と少なくとも60%の配列同一性を含む生物発光ポリペプチド、

配列番号9と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチド、

配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、

配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、

配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、

配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチド、

配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、または

O p l o p h o r u sルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオ
ロフォアのうちの1つと、

を含む、前記固相検出プラットフォーム。

〔105〕前記標的分析物結合剤が、標的分析物結合要素と、

配列番号5の生物発光ポリペプチド、

配列番号9のポリペプチド、

配列番号10のポリペプチド、

配列番号11のポリペプチド、

配列番号13のポリペプチド、

配列番号12のポリペプチド、

配列番号14のポリペプチド、または

10

20

30

40

50

O p l o p h o r u sルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアのうちの1つと、

を含む、前記〔104〕に記載の固相検出プラットフォーム。

〔106〕前記検出プラットフォームが、

前記検出領域にコンジュゲートされた、標的分析物結合要素及び配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、

前記検出領域にアプライされる、標的分析物結合要素及び配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチドを含む、第2の標的分析物結合剤と、

を含む、前記〔104〕に記載の検出プラットフォーム。

〔107〕前記検出プラットフォームが、

前記検出領域にコンジュゲートされた、標的分析物結合要素及び配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、

前記検出領域にアプライされる、標的分析物結合要素及び配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチドを含む、第2の標的分析物結合剤と、

を含む、前記〔106〕に記載の検出プラットフォーム。

〔108〕前記検出プラットフォームが、

前記検出領域にコンジュゲートされた、標的分析物結合要素及び配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、

前記検出領域にアプライされる、標的分析物結合要素及び配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチドを含む、第2の標的分析物結合剤と、

前記検出領域にアプライされる、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチドと、

を含む、前記〔106〕に記載の検出プラットフォーム。

〔109〕前記検出プラットフォームが、

前記検出領域にコンジュゲートされた、標的分析物結合要素及び配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、

前記検出領域にアプライされる、標的分析物結合要素及び配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第2の標的分析物結合剤と、

を含む、前記〔106〕に記載の検出プラットフォーム。

〔110〕前記検出プラットフォームが、

前記検出領域にコンジュゲートされた、標的分析物結合要素及び配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、

前記検出領域にアプライされる、標的分析物結合要素及び配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第2の標的分析物結合剤と、

を含む、前記〔106〕に記載の検出プラットフォーム。

〔111〕前記検出プラットフォームが、

前記検出領域にコンジュゲートされた、標的分析物結合要素及び配列番号5と少なくとも60%の配列同一性の生物発光ポリペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、

前記検出領域にアプライされる、標的分析物結合要素及び前記生物発光ポリペプチドからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアを含む、第2の標的分析物結合剤と、

を含む、前記〔106〕に記載の検出プラットフォーム。

〔112〕前記検出プラットフォームが、

前記検出領域にアプライされる、標的分析物結合要素及び配列番号5と少なくとも60%の配列同一性の生物発光ポリペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、

前記検出領域にコンジュゲートされた、標的分析物結合要素及び前記生物発光ポリペプチドからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアを含む、第2の標的分析物結合剤と、

を含む、前記〔106〕に記載の検出プラットフォーム。

〔113〕複数の検出領域を更に含み、各検出領域が、異なる標的分析物結合要素を含む

10

20

30

40

50

、異なる標的分析物結合剤を含む、前記〔106〕に記載の検出プラットフォーム。
〔114〕コントロール領域を更に含む、前記〔106〕に記載の検出プラットフォーム。
〔115〕発光基質を更に含む、前記〔106〕に記載の検出プラットフォーム。
〔116〕前記発光基質が、セレンテラジン、セレンテラジン-*h*、セレンテラジン-*h*-*h*、フリマジン、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される、前記〔115〕に記載の検出プラットフォーム。
〔117〕前記発光基質が、前記発光基質と、プルラン、トレハロース、マルトース、セルロース、デキストラン、ポリスチレン、ポリ(メタ)アクリレート、及びこれらの任意の組み合わせから選択される高分子と、を含む、組成物の一部として前記コンジュゲートパッドに可逆的にコンジュゲートされる、前記〔115〕に記載の検出プラットフォーム。
〔118〕前記発光基質が、前記発光基質と、自己発光を低減する物質と、を含む、組成物の一部として前記コンジュゲートパッド上にまたは前記コンジュゲートパッド内に含有される、前記〔115〕に記載の検出プラットフォーム。
〔119〕自己発光を低減する前記物質が、A T T、A T Tの誘導体、またはチオウレアである、前記〔118〕に記載の分析メンブレン。
〔120〕少なくとも1つの検出容器及び凍結乾燥タブレット(ライオケーキ)を含む、液相検出プラットフォームであって、前記ライオケーキは、標的分析物結合要素と、配列番号5と少なくとも60%の配列同一性を含む生物発光ポリペプチド、配列番号9と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチド、配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチド、配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチド、または O p l o p h o r u s ルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアの中の1つと、を含む、標的分析物結合剤を含む、前記液相検出プラットフォーム。
〔121〕前記標的分析物結合剤が、標的分析物結合要素と、配列番号5の生物発光ポリペプチド、配列番号9のポリペプチド、配列番号10のポリペプチド、配列番号11のポリペプチド、配列番号13のポリペプチド、配列番号12のポリペプチド、配列番号14のポリペプチド、または O p l o p h o r u s ルシフェラーゼからのエネルギー転移によって活性化可能なフルオロフォアの中の1つと、を含む、前記〔120〕に記載の検出プラットフォーム。
〔122〕前記ライオケーキが、標的分析物結合要素及び配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、標的分析物結合要素及び配列番号10と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチドを含む、第2の標的分析物結合剤と、を含む、前記〔120〕に記載の検出プラットフォーム。
〔123〕前記ライオケーキが、標的分析物結合要素及び配列番号11と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチドを含む、第1の標的分析物結合剤と、標的分析物結合要素及び配列番号13と少なくとも60%の配列同一性を含むペプチドを含む、第2の標的分析物結合剤と、配列番号12と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチドと、

10

20

30

40

50

を含む、前記〔120〕に記載の検出プラットフォーム。

〔124〕前記ライオケーキが、
標的分析物結合要素及び配列番号6と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチド
を含む、第1の標的分析物結合剤と、
標的分析物結合要素及び配列番号14と少なくとも60%の配列同一性を含むポリペプチ
ドを含む、第2の標的分析物結合剤と、
を含む、前記〔120〕に記載の検出プラットフォーム。

〔125〕前記ライオケーキが、
標的分析物結合要素及び配列番号5と少なくとも60%の配列同一性の生物発光ポリペプ
チドを含む、第1の標的分析物結合剤と、
標的分析物結合要素及び前記生物発光ポリペプチドからのエネルギー転移によって活性化
可能なフルオロフォアを含む、第2の標的分析物結合剤と、を含む、前記〔120〕に記
載の検出プラットフォーム。

〔126〕前記検出プラットフォームが、複数の検出容器と、異なる標的分析物結合要素
を含む少なくとも2つの異なる標的分析物結合剤と、を含む、96ウェルマイクロタイ
タープレートを含む、前記〔120〕に記載の検出プラットフォーム。

〔127〕前記ライオケーキが、発光基質を含む、前記〔120〕に記載の検出プラット
フォーム。

〔128〕前記発光基質が、セレンテラジン、セレンテラジン-h、セレンテラジン-h
-h、フリマジン、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される、前記〔
127〕に記載の検出プラットフォーム。

〔129〕前記ライオケーキが、発光基質と、プルラン、トレハロース、マルトース、セ
ルロース、デキストラン、ポリスチレン、ポリ(メタ)アクリレート、及びこれらの任意
の組み合わせから選択される高分子と、を含む、前記〔127〕に記載の検出プラットフ
ォーム。

〔130〕前記発光基質が、前記発光基質と、自己発光を低減する物質と、を含む、組成
物の一部として前記コンジュゲートパッド上にまたは前記コンジュゲートパッド内に含有
される、前記〔127〕に記載の検出プラットフォーム。

〔131〕自己発光を低減する前記物質が、ATT、ATTの誘導体、またはチオウレア
である、前記〔120〕に記載の分析メンブレン。

〔132〕少なくとも1つのサンプルを更に含む、前記〔120〕に記載の検出プラット
フォーム。

〔133〕前記サンプルが、血液、血清、血漿、尿、便、脳脊髄液、間質液、唾液、組織
サンプル、水サンプル、土壌サンプル、植物サンプル、食物サンプル、飲料サンプル、油
、及び産業流体サンプルから選択される、前記〔132〕に記載の検出プラットフォーム。

〔134〕前記〔1〕に記載のラテラルフローアッセイシステムを使用してサンプル中の
分析物を検出する方法であって、

サンプルを前記サンプルパッドにアプライすることと、
前記サンプルパッドから前記コンジュゲートパッドへ、次いで、前記コンジュゲートパッ
ドから前記分析メンブレン上の前記検出領域及び前記コントロール領域へ前記サンプルの
流れを促進することと、を含み、

前記第1の標的分析物結合剤、前記第2の標的分析物結合剤、及び前記標的分析物は、前
記サンプル中で前記標的分析物が検出される場合、前記少なくとも1つの検出領域におい
て前記分析物検出複合体を形成する、前記方法。

〔135〕前記サンプルが、血液、血清、血漿、尿、便、脳脊髄液、間質液、組織、及び
唾液から選択される、前記〔134〕に記載の方法。

〔136〕前記サンプルが、水サンプル、土壌サンプル、植物サンプル、食物サンプル、
飲料サンプル、油、及び産業流体サンプルから選択される、前記〔134〕に記載の方法。

〔137〕前記サンプル中の前記標的分析物を検出することが、前記分析物検出複合体か
ら生成される生物発光シグナルを検出することを含む、前記〔134〕に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔138〕前記方法が、前記分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを定量することを更に含む、前記〔134〕に記載の方法。

〔139〕前記方法が、前記サンプルが取得された対象を、前記分析物の検出に基づいて、疾患に罹っているかいないかを診断することを更に含む、前記〔134〕に記載の方法。

〔140〕前記〔34〕に記載の固相検出プラットフォームを使用してサンプル中の分析物を検出する方法であって、

前記検出領域及び前記コントロール領域にサンプルを曝露することと、

前記少なくとも1つの標的分析物結合剤及び前記少なくとも1つの標的分析物は、前記サンプル中で前記標的分析物が検出される場合、前記少なくとも1つの検出領域において分析物検出複合体を形成する、前記方法。

〔141〕前記サンプルが、血液、血清、血漿、尿、便、脳脊髄液、間質液、組織、及び唾液から選択される、前記〔140〕に記載の方法。

〔142〕前記サンプルが、水サンプル、土壌サンプル、植物サンプル、食物サンプル、飲料サンプル、油、及び産業流体サンプルから選択される、前記〔140〕に記載の方法。

〔143〕前記サンプル中の前記標的分析物を検出することが、前記分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを検出することを含む、前記〔140〕に記載の方法。

〔144〕前記方法が、前記分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを定量することを更に含む、前記〔140〕に記載の方法。

〔145〕前記方法が、前記サンプルが取得された対象を、前記分析物の検出に基づいて、疾患に罹っているかいないかを診断することを更に含む、前記〔140〕に記載の方法。

〔146〕生物発光アッセイに使用するための基材を作製する方法であって、

基材上に溶液を塗布することであって、前記溶液は、標的分析物結合要素と、生物発光複合体のポリペプチド構成成分または生物発光複合体のペプチド構成成分のうちの1つと、を含む、少なくとも1つの標的分析物結合剤を含む、前記塗布することと、前記溶液を含有する基材を乾燥させることと、を含む、前記方法。

〔147〕前記溶液が、前記生物発光複合体の相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分を更に含み、前記標的分析物結合剤及び前記生物発光複合体の前記相補性ペプチドまたはポリペプチド構成成分は、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する、前記〔146〕に記載の方法。

〔148〕前記溶液が、タンパク質緩衝液及び少なくとも1つの賦形剤を含む、前記〔146〕または〔147〕に記載の方法。

〔149〕前記溶液が、発光基質を含む、前記〔146〕～〔148〕のいずれか1項に記載の方法。

〔150〕前記基材が、W-903ペーパー、FTAペーパー、FTA Eluteペーパー、FTA DMPKペーパー、Ahlsstrom A-226ペーパー、MTFNペーパー、FTAペーパー、FP705ペーパー、Bode DNA収集紙、ニトロセルロースペーパー、ナイロンペーパー、セルロースペーパー、Dacronペーパー、コットンペーパー、及びポリエステルペーパー、またはこれらの組み合わせである、前記〔146〕～〔149〕のいずれか1項に記載の方法。

〔151〕前記基材が、プラスチック、ナイロン、金属、またはこれらの組み合わせを含むメッシュである、前記〔146〕～〔150〕のいずれか1項に記載の方法。

〔152〕前記溶液を含有する前記基材を乾燥させることが、約30℃～40℃の温度で、約30分～2時間の間、乾燥させることを含む、前記〔146〕～〔151〕のいずれか1項に記載の方法。

〔153〕前記溶液を含有する前記基材を乾燥させることが、前記基材を凍結乾燥及び／または凍結させることを含む、前記〔146〕～〔152〕のいずれか1項に記載の方法。

〔154〕第1の基材上の前記少なくとも1つの標的分析物結合剤及び／または前記生物発光複合体の前記相補性ペプチドもしくはポリペプチド構成成分を乾燥させることと、第2の基材上の前記発光基質を乾燥させることと、を更に含む、前記〔146〕～〔153〕のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔155〕生物発光シグナルが、前記溶液を含有する前記基材に前記標的分析物を曝すことで生成され、前記生物発光シグナルは、前記標的分析物の濃度に比例する、前記〔146〕～〔154〕のいずれか1項に記載の方法。

〔156〕前記少なくとも1つの標的分析物結合剤及び／または前記生物発光複合体の前記相補性ペプチドもしくはポリペプチド構成成分が、前記基材上で乾燥させた場合、向上した安定性を示す、前記〔146〕～〔155〕のいずれか1項に記載の方法。

〔157〕発光基質と、

標的分析物結合要素及び生物発光複合体のポリペプチド構成成分を含む、標的分析物結合剤と、

前記生物発光複合体の相補性ポリペプチド構成成分と、を含み、

前記標的分析物結合剤及び前記生物発光複合体の前記相補性ポリペプチド構成成分は、標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成することが可能である、組成物。

〔158〕前記組成物が、第2の標的分析物結合要素及び生物発光複合体の第2のポリペプチド構成成分を含む、第2の標的分析物結合剤を更に含む、前記〔157〕に記載の組成物。

〔159〕前記第1及び第2の標的分析物結合剤が、同じ標的分析物の別の部分に結合する、前記〔157〕または〔158〕に記載の組成物。

〔160〕前記生物発光複合体の前記第1及び第2のポリペプチド構成成分が、前記生物発光複合体の前記相補性ポリペプチド構成成分に結合して、前記標的分析物の存在下で生物発光分析物検出複合体を形成する、前記〔157〕～〔159〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔161〕前記第1及び前記第2のポリペプチド構成成分が、ハロアルカン基質と共有結合を形成することが可能な修飾デハロゲナーゼに連結される、前記〔157〕～〔160〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔162〕前記第1及び前記第2の標的分析物結合要素が、ハロアルカン基質を含む、前記〔157〕～〔161〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔163〕前記第1及び第2の標的分析物結合剤の前記第1または第2のポリペプチド構成成分が、

配列番号10と少なくとも60%の配列同一性、

配列番号11と少なくとも60%の配列同一性、

配列番号13と少なくとも60%の配列同一性、または

配列番号15と少なくとも60%の配列同一性

を含む、前記〔157〕～〔162〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔164〕前記相補性ポリペプチド構成成分が、

配列番号6と少なくとも60%の配列同一性、

配列番号9と少なくとも60%の配列同一性、または

配列番号12と少なくとも60%の配列同一性

を含む、前記〔157〕～〔163〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔165〕前記標的分析物結合要素が、抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組み換え抗体、抗体フラグメント、プロテインA、プロテインAのIg結合ドメイン、プロテインG、プロテインGのIg結合ドメイン、プロテインA/G、プロテインA/GのIg結合ドメイン、プロテインL、プロテインLのIg結合ドメイン、プロテインM、プロテインMのIg結合ドメイン、オリゴヌクレオチドプローブ、ペプチド核酸、DARPin、アプタマー、アフィマー、タンパク質ドメイン、及び精製タンパク質からなる群から選択される、前記〔157〕～〔164〕のいずれか1項に記載の組成物

〔166〕前記標的分析物が、抗体であり、前記第1の標的分析物結合剤の前記標的分析物結合要素が、前記抗体によって認識される抗原を含み、前記第2の標的分析物結合剤の前記標的分析物結合要素が、Fc結合領域を含む、前記〔157〕～〔165〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔167〕前記第1及び／または第2の標的分析物結合剤が、前記生物発光複合体の前記

10

20

30

40

50

第1及び／または第2のポリペプチド構成成分に結合されたフルオロフォアを更に含む、前記〔157〕～〔166〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔168〕前記組成物の1つ以上の構成成分が、前記標的分析物を検出及び／または定量するために溶液中で再構成される場合、生物発光複合体を形成することが可能な凍結乾燥タブレット（ライオケーキ）の形態である、前記〔157〕～〔167〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔169〕前記組成物が、前記標的分析物を検出及び／または定量することが可能な液相検出プラットフォームに含まれる、前記〔157〕～〔168〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔170〕前記ポリペプチド構成成分及び前記発光基質が、前記標的分析物を検出及び／または定量するために溶液中で再構成される場合、生物発光複合体を形成することが可能な凍結乾燥タブレット（ライオケーキ）の形態である、前記〔157〕～〔169〕のいずれか1項に記載の組成物。

10

〔171〕前記〔157〕～〔170〕に記載の組成物のいずれかを、標的分析物を含むサンプルと合わせることを含む、サンプル中の分析物を検出する方法。

〔172〕前記サンプル中の前記標的分析物を検出することが、分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを検出することを含む、前記〔171〕に記載の方法。

〔173〕前記分析物検出複合体から生成される生物発光シグナルを定量することを更に含む、前記〔172〕に記載の方法。

〔174〕前記分析物検出複合体から生成される前記生物発光シグナルが、前記分析物の濃度に比例する、前記〔173〕に記載の方法。

20

〔175〕前記発光基質が、セレンテラジン、セレンテラジン－h、セレンテラジン－h－h、フリマジン、及び他のセレンテラジン類似体または誘導体から選択される、前記〔157〕に記載の組成物。

〔176〕前記ライオケーキが、自己発光を低減する物質を更に含む、前記〔170〕に記載の組成物。

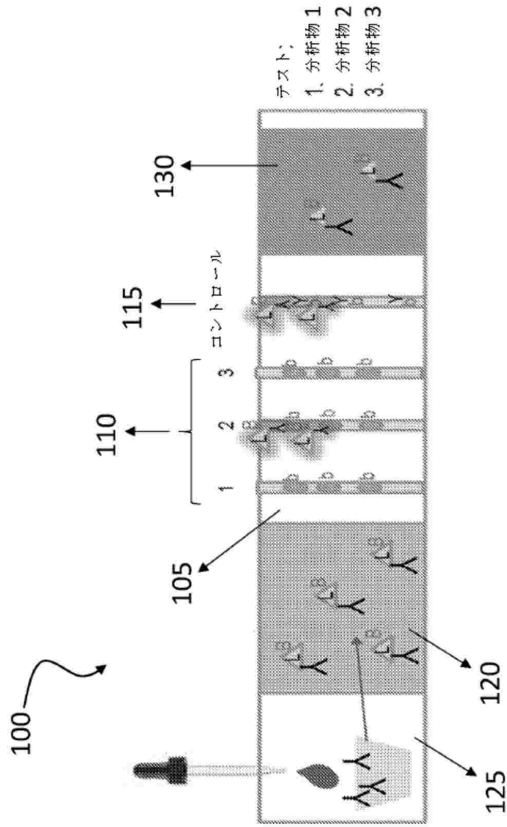
〔177〕自己発光を低減する前記物質が、ATT、ATTの誘導体もしくは類似体、またはチオウレアである、前記〔176〕に記載の組成物。

30

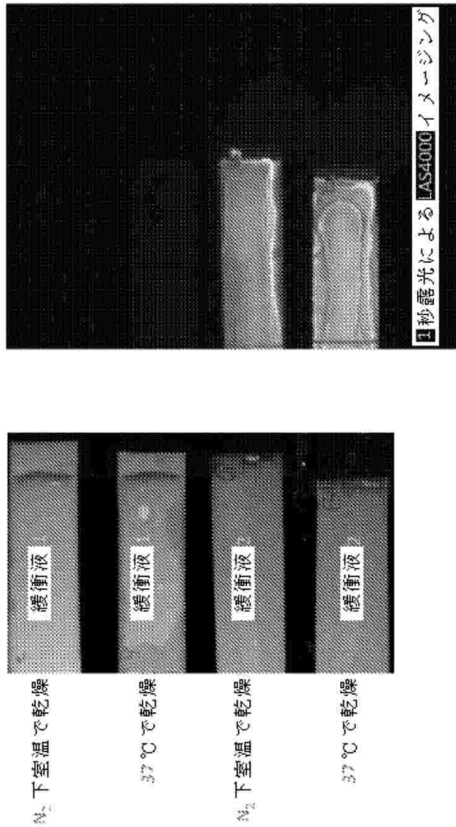
40

50

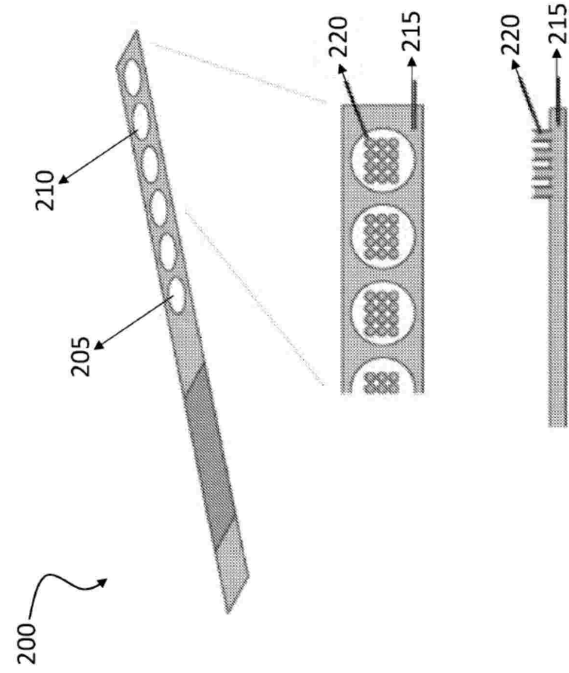
【図面】
【図 1】



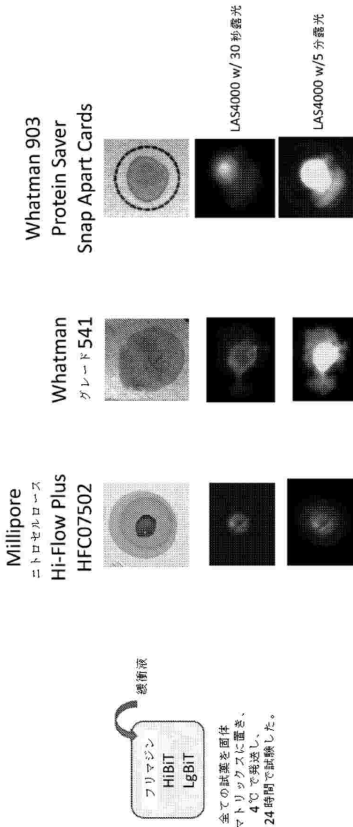
【図 3】



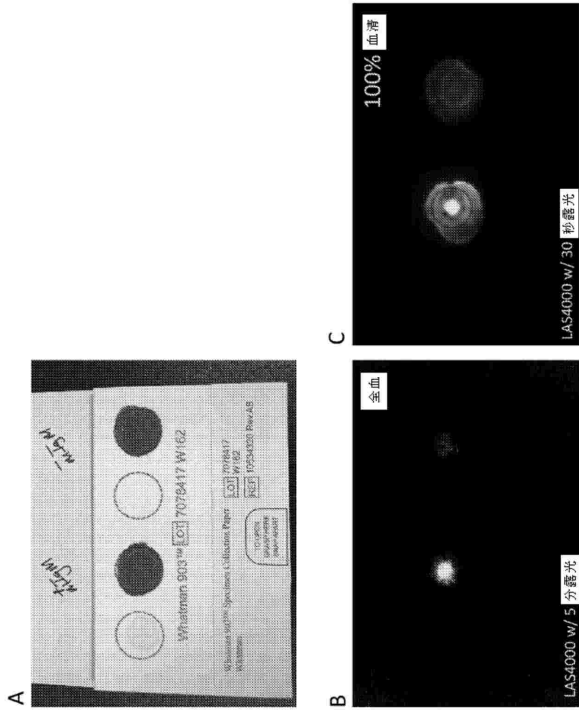
【図 2】



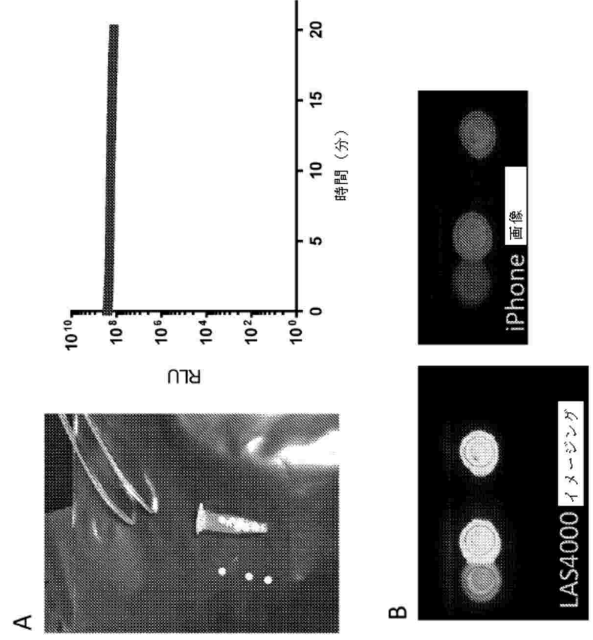
【図 4】



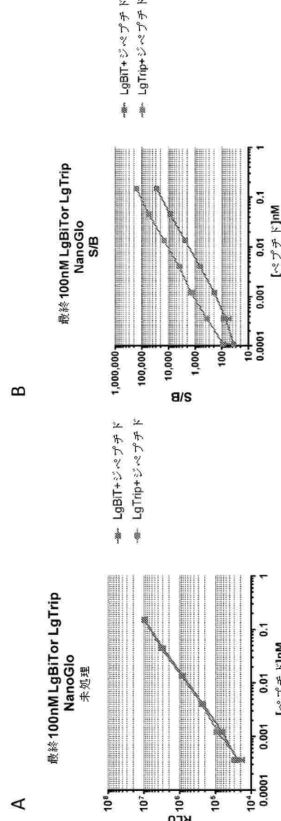
【図 9】



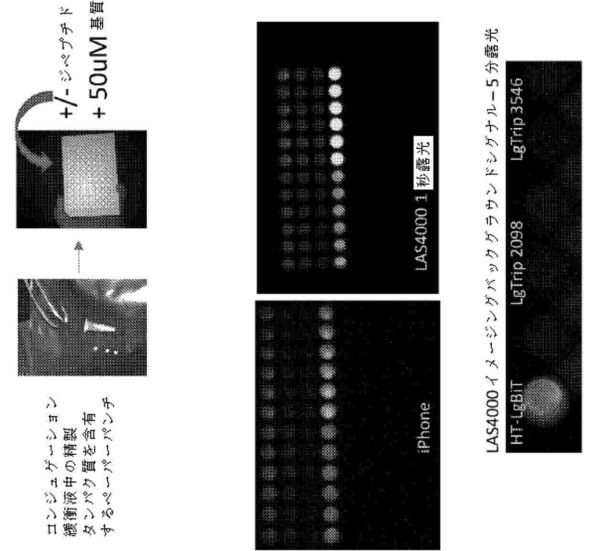
【図 10】



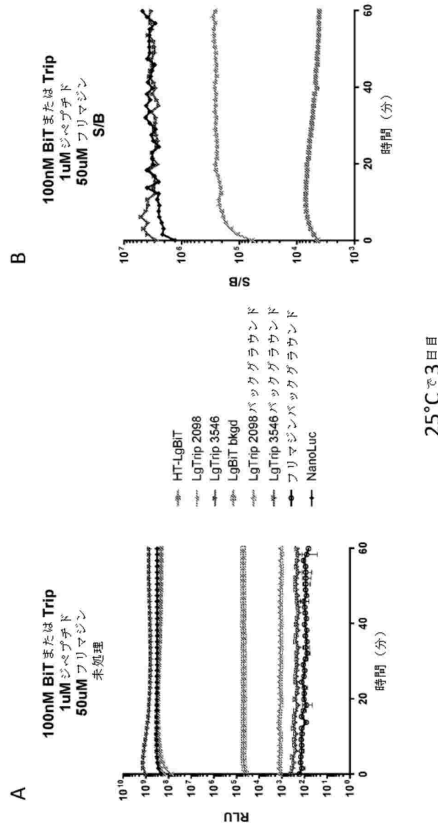
【図 11】



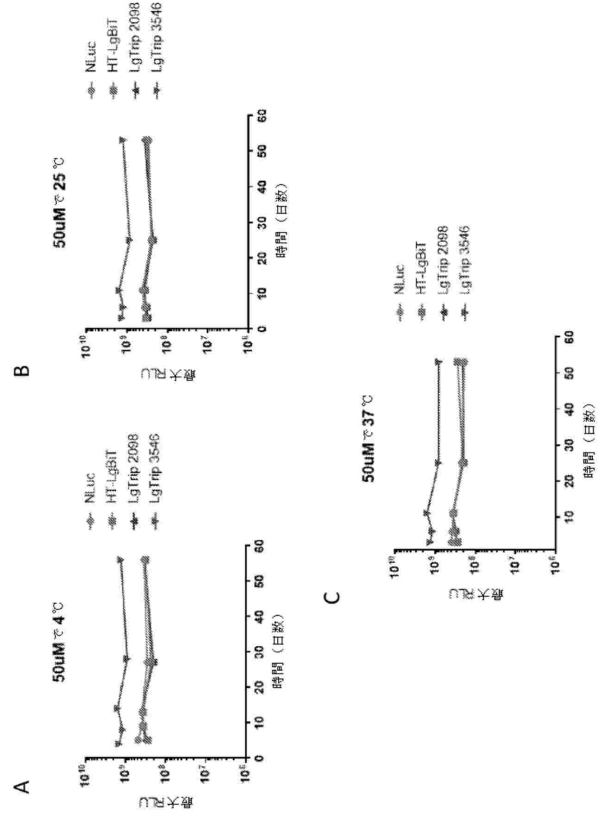
【図 12】



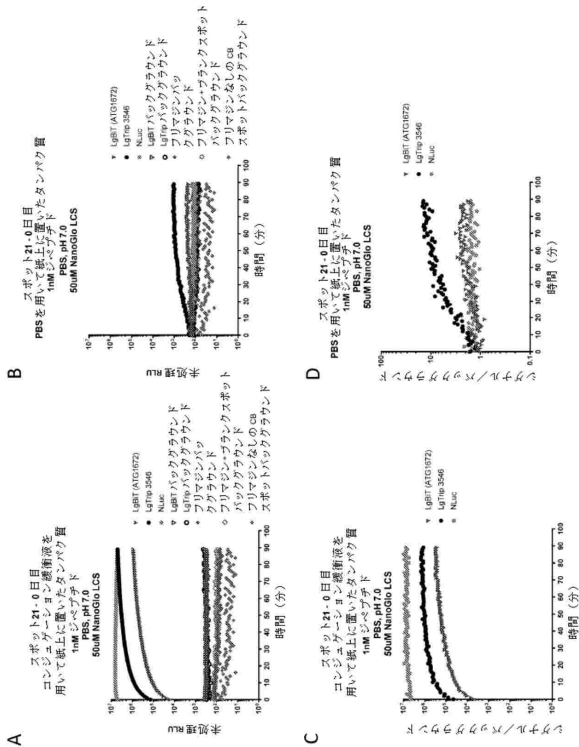
【図 1 3】



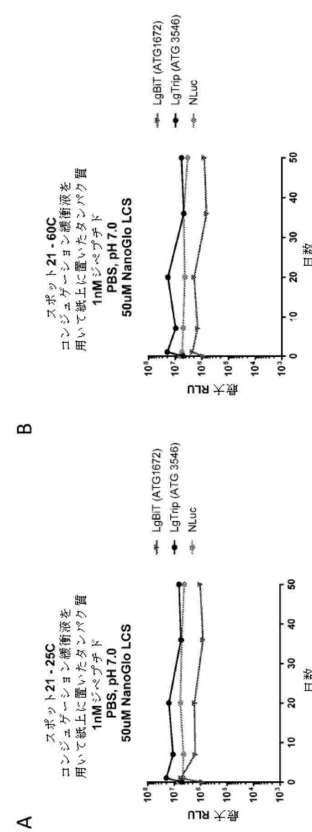
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



10

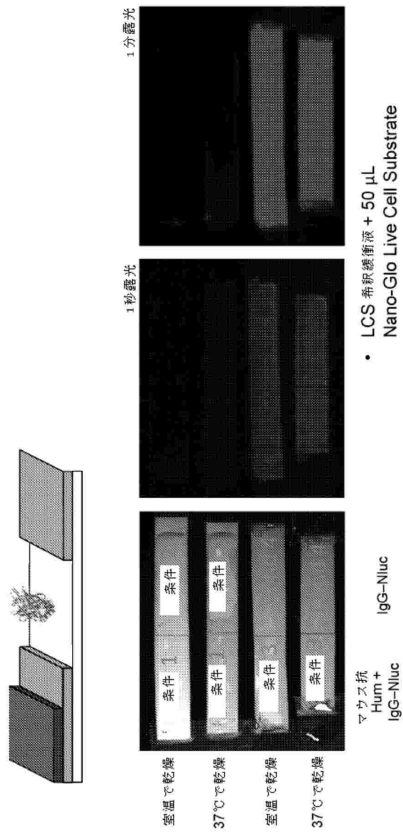
20

30

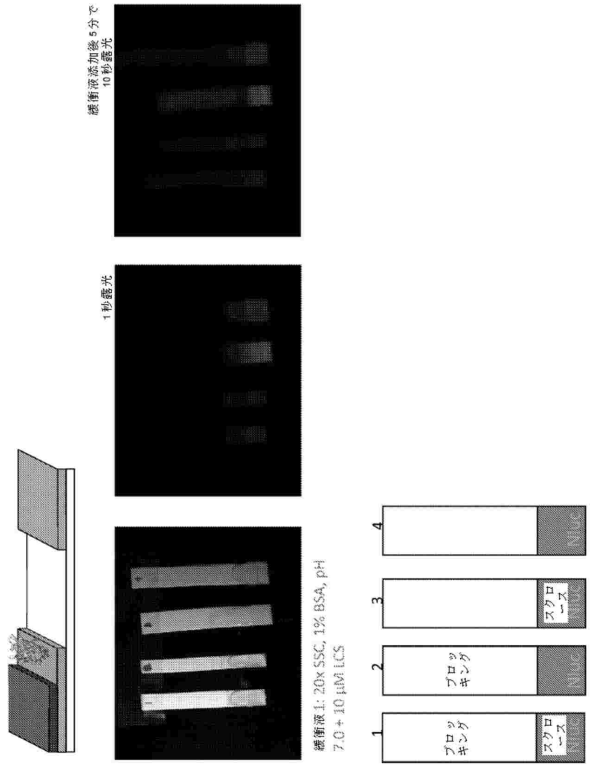
40

50

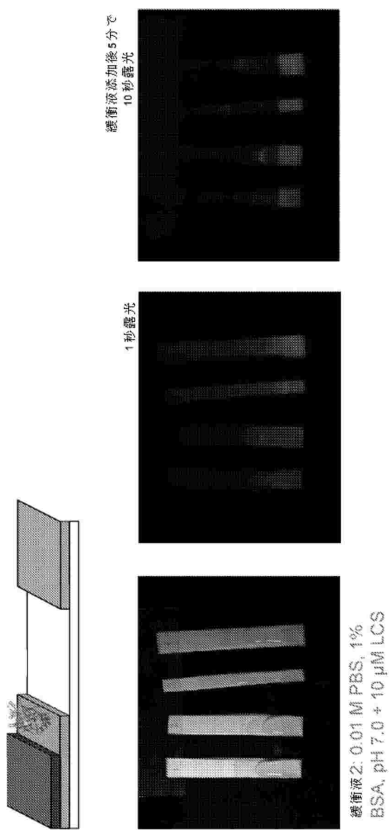
【図 17】



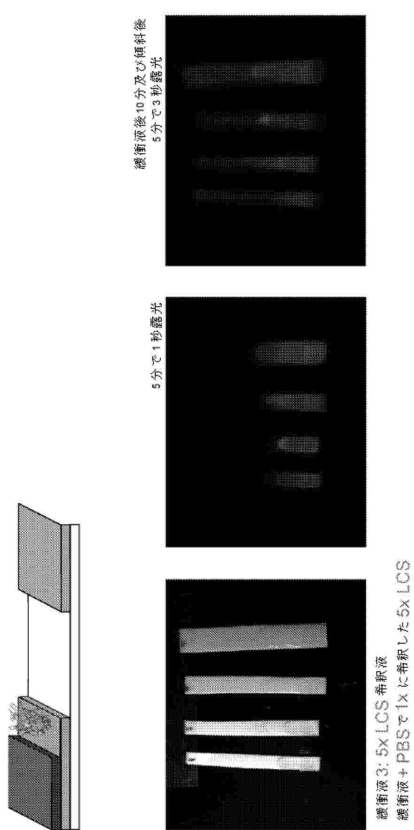
【図 18】



【図 19】



【図 20】



10

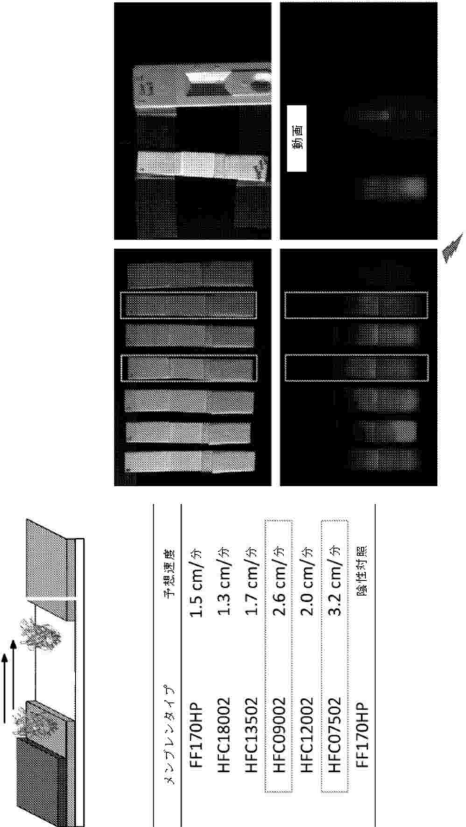
20

30

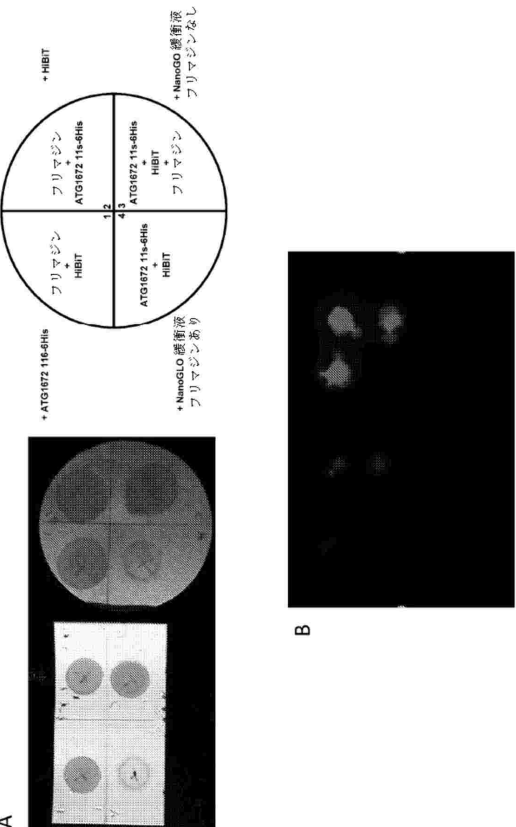
40

50

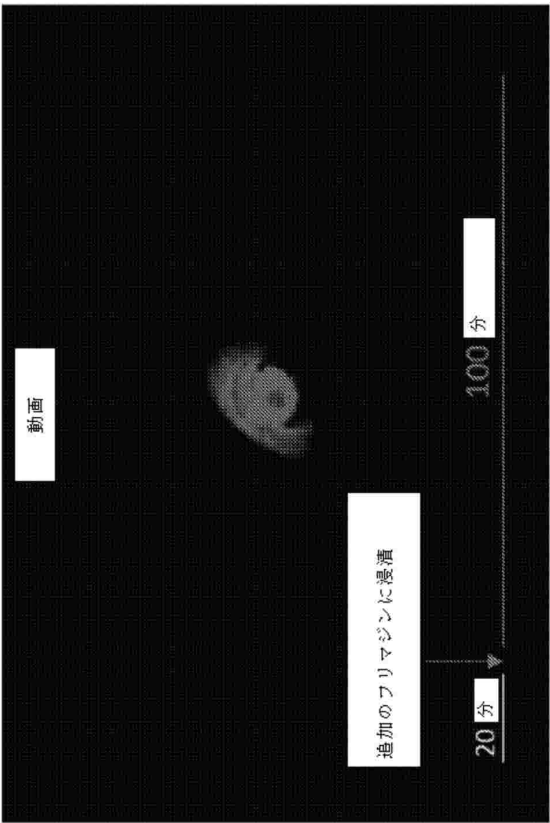
【図 2 1】



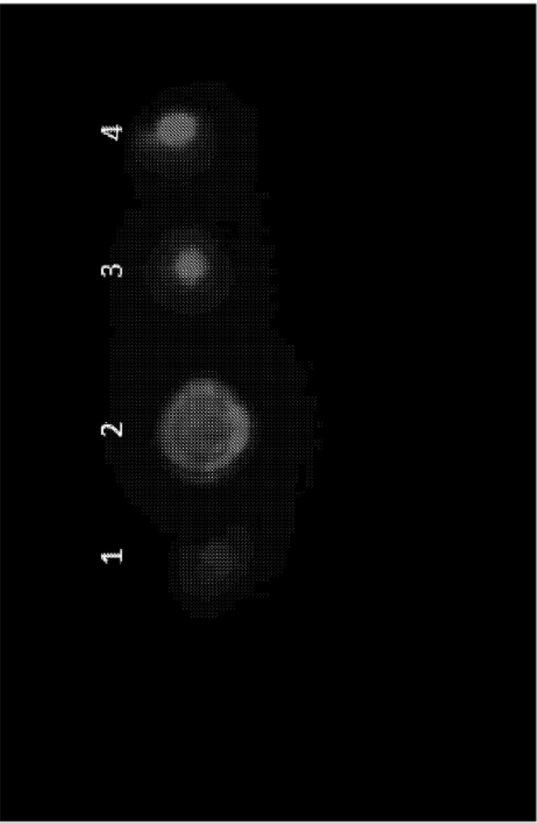
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



10

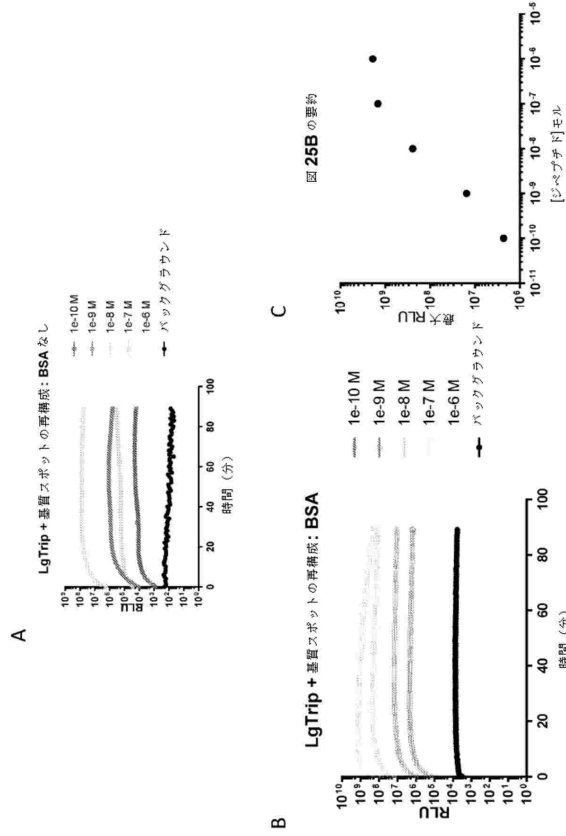
20

30

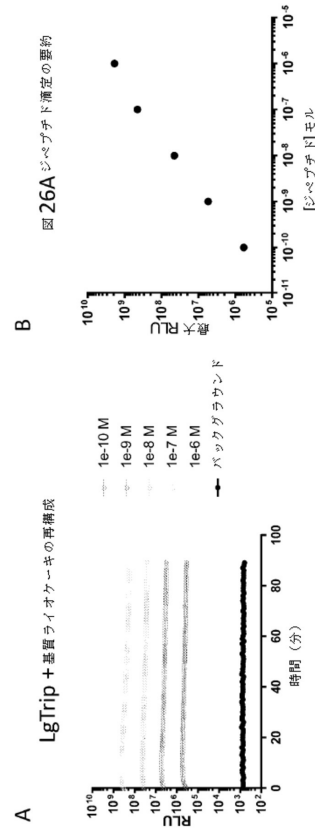
40

50

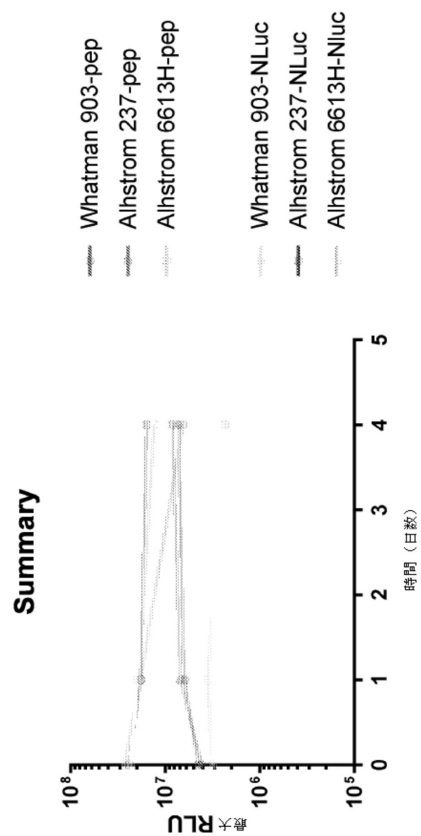
【図 2 5】



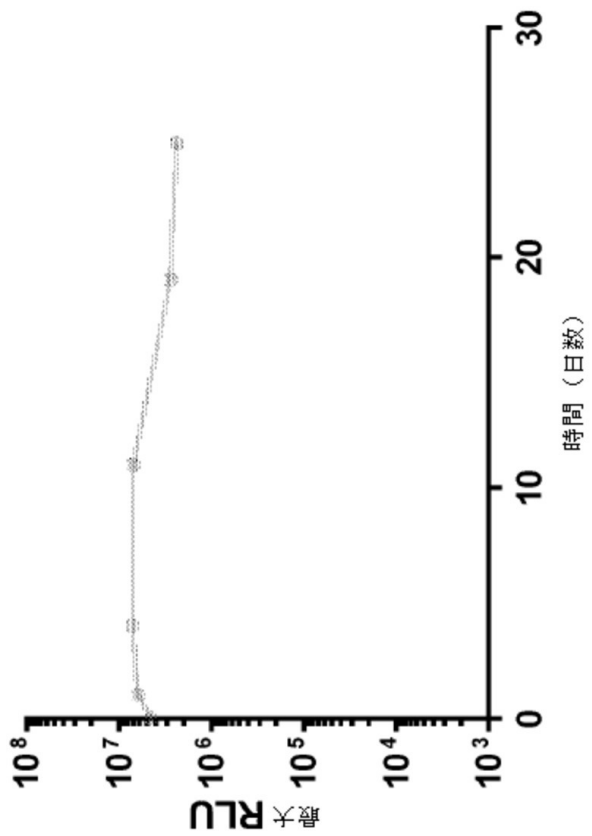
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



10

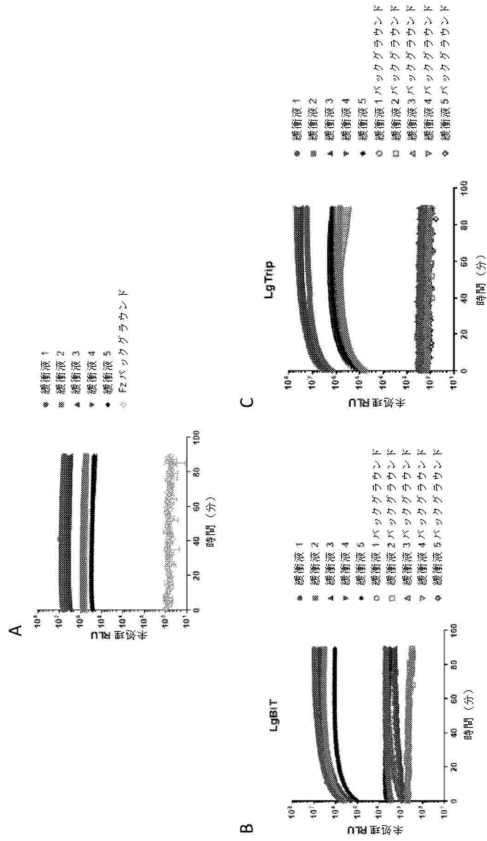
20

30

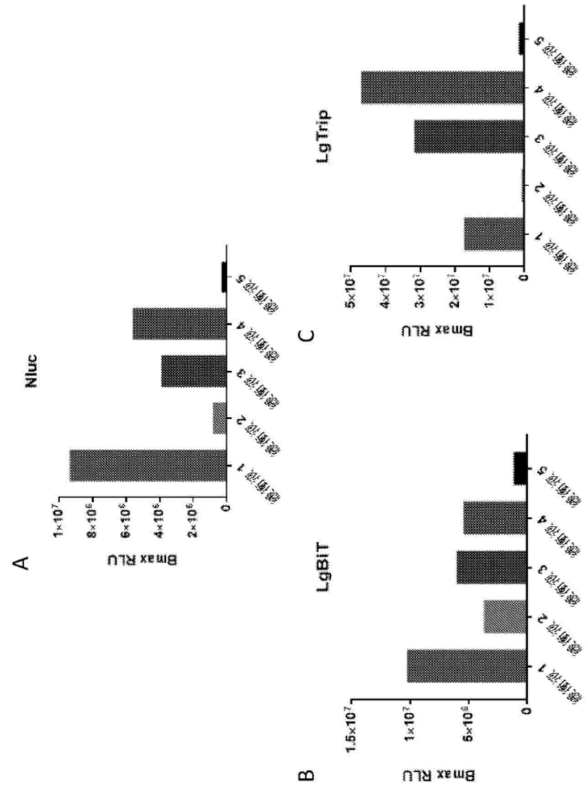
40

50

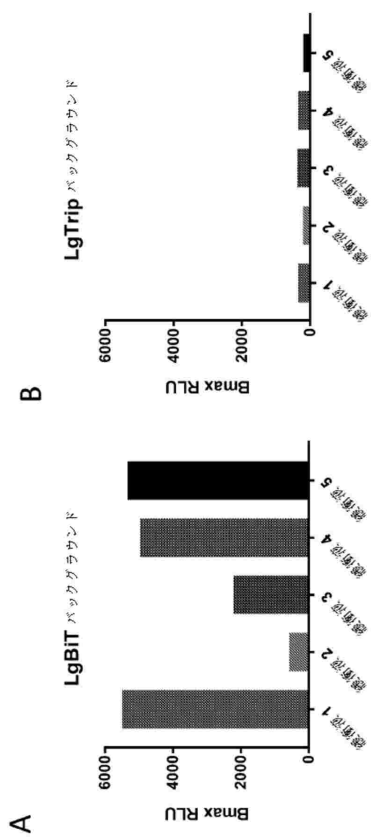
【図 29】



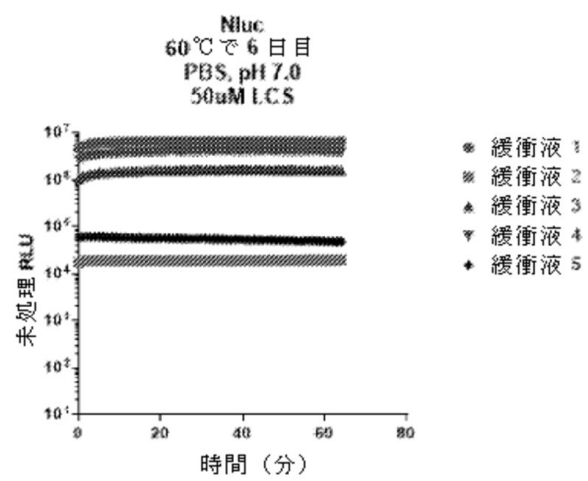
【図 30】



【図 31】



【図 32 A】



10

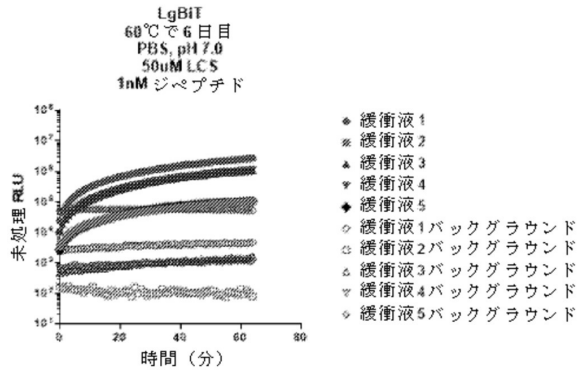
20

30

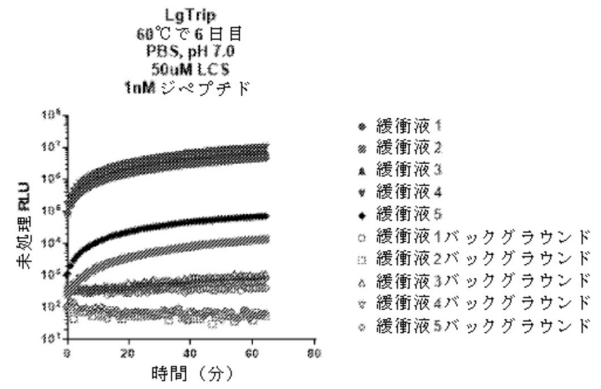
40

50

【図 3 2 B】

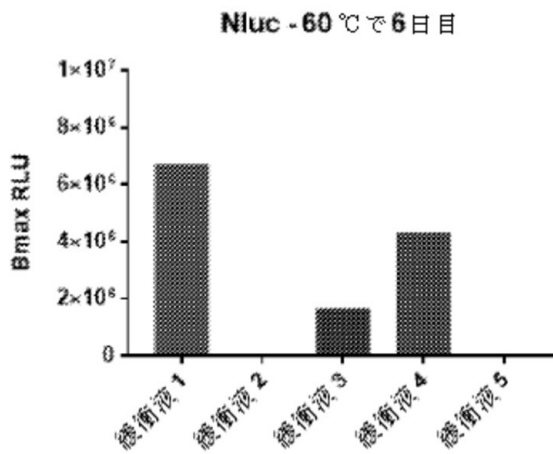


【図 3 2 C】

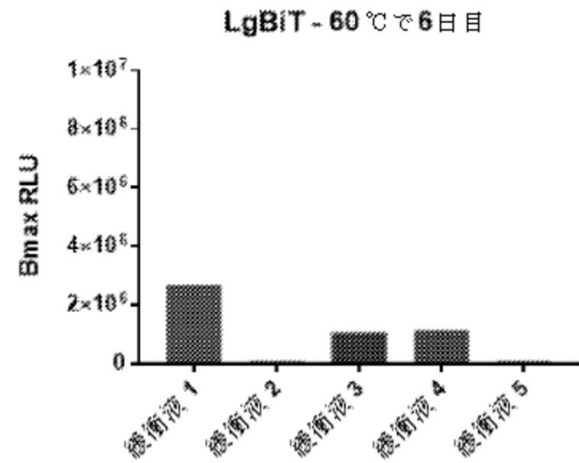


10

【図 3 2 D】



【図 3 2 E】



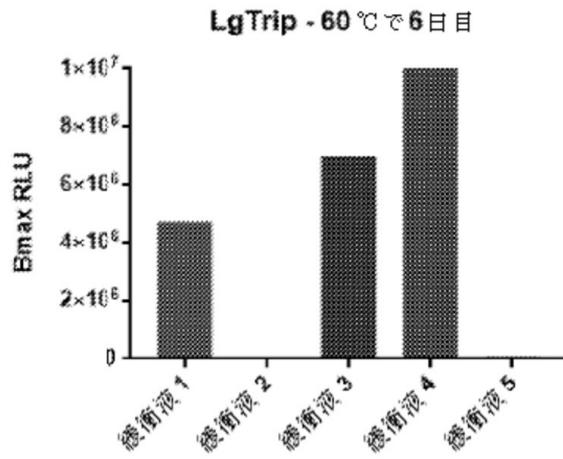
20

30

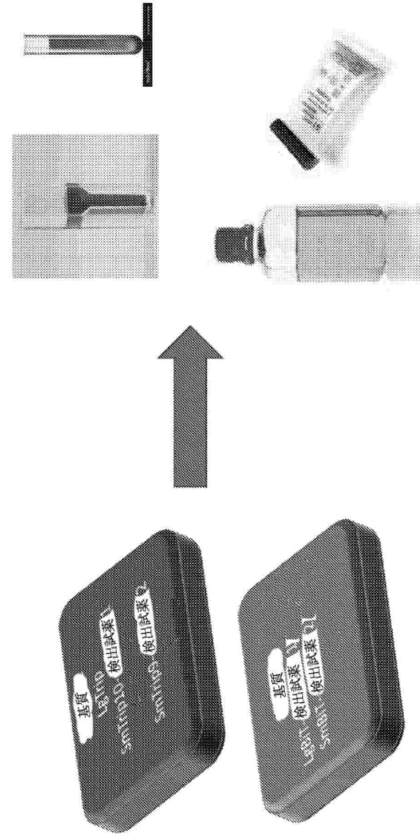
40

50

【図 3 2 F】



【図 3 3】

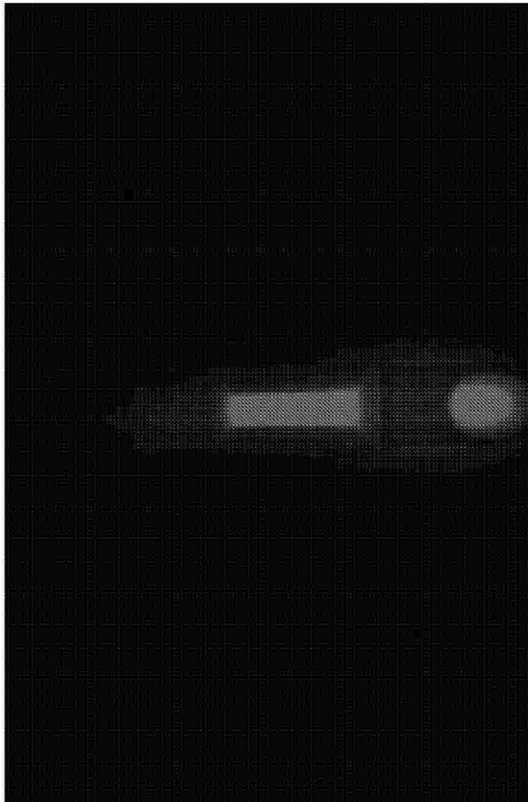


キユベット、試験管、ボトル、スナップチップ、テストダイレクトプロファイルなどを使用して行うことができる。また、アッセイ構成成分を含む試薬を添加することによって、アッセイの感度を向上させることができる。

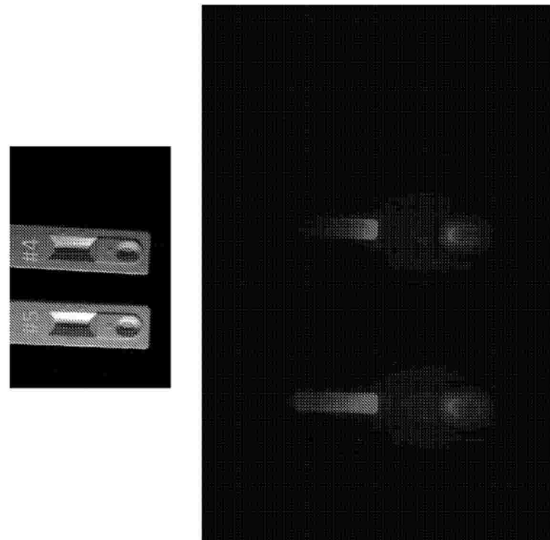
10

20

【図 3 4】



【図 3 5】

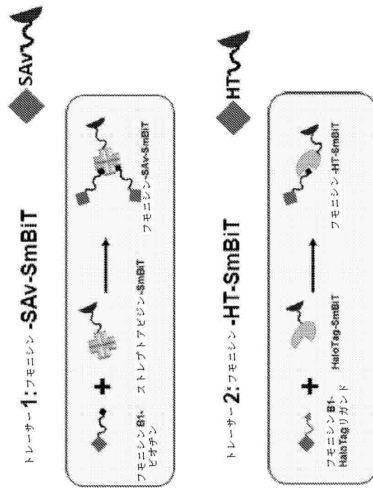


30

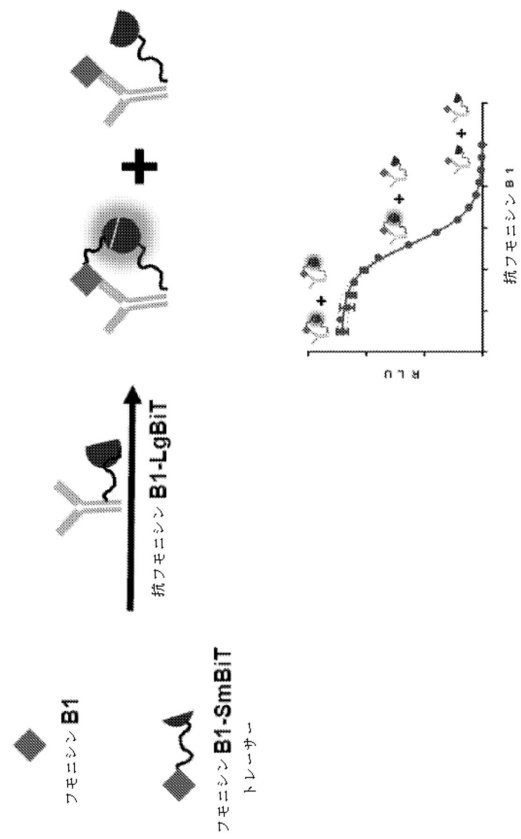
40

50

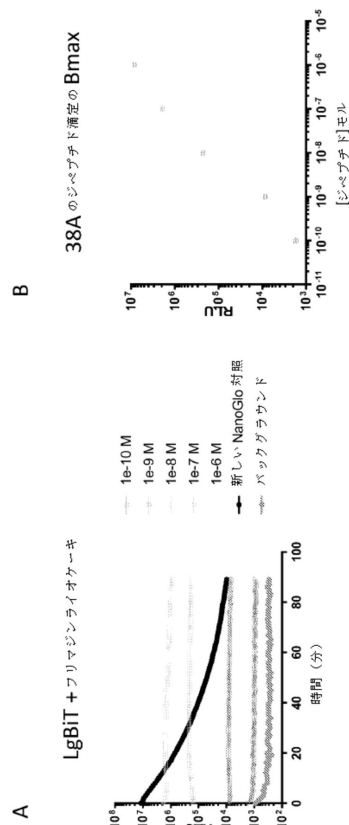
【図 3 6】



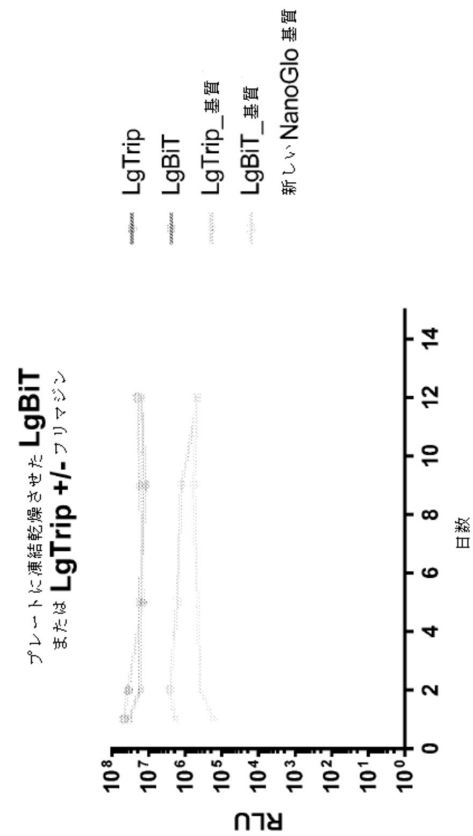
【図 3 7】



【図 3 8】



【図 3 9】



10

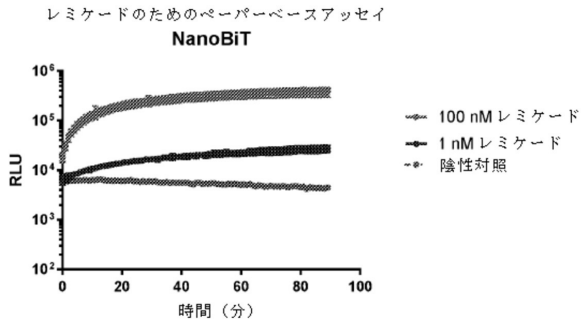
20

30

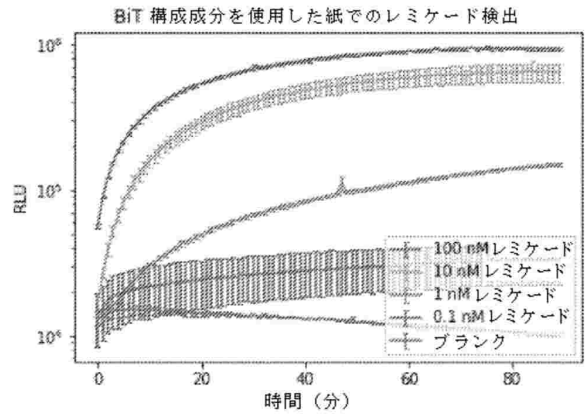
40

50

【図 40 A】

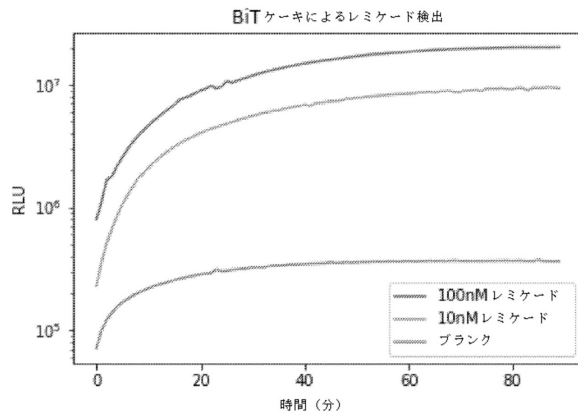


【図 40 B】

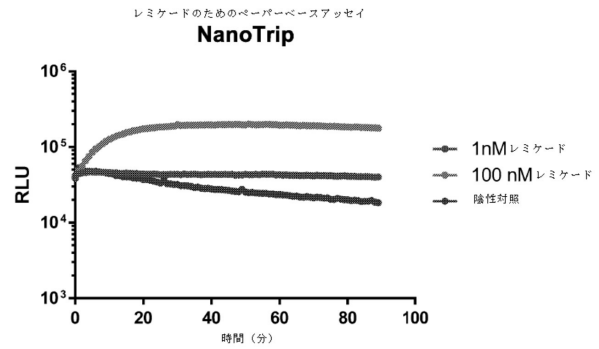


10

【図 40 C】



【図 41 A】



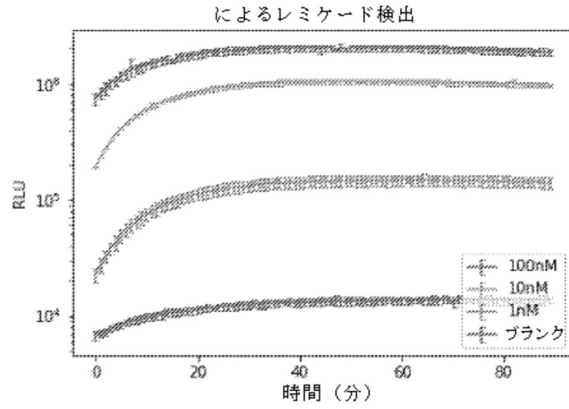
20

30

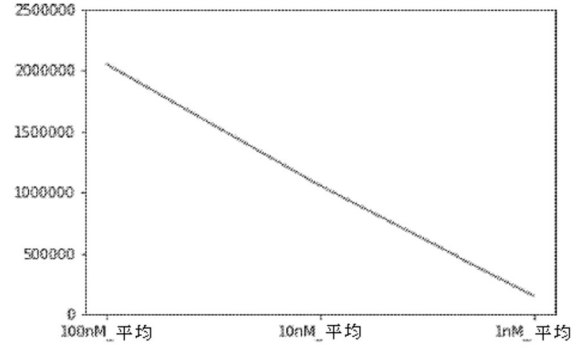
40

50

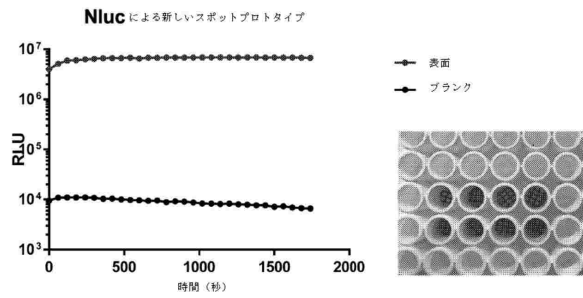
【図 4 1 B】



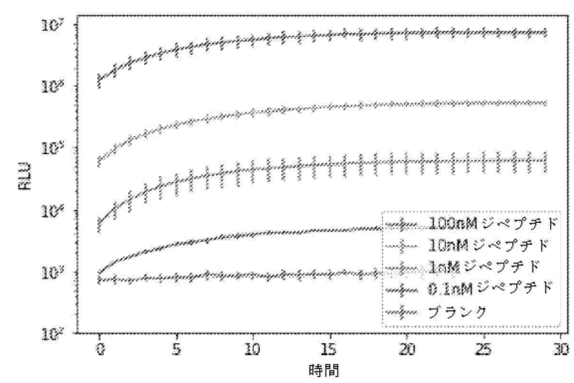
【図 4 1 C】



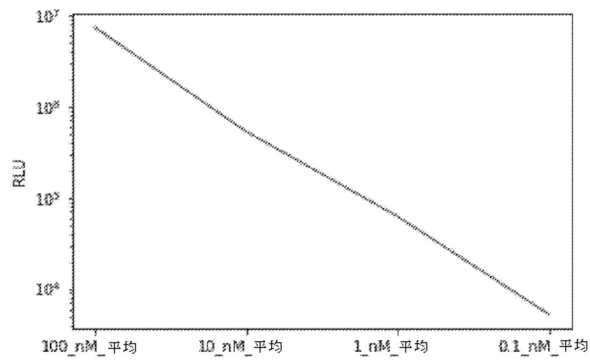
【図 4 2 A】



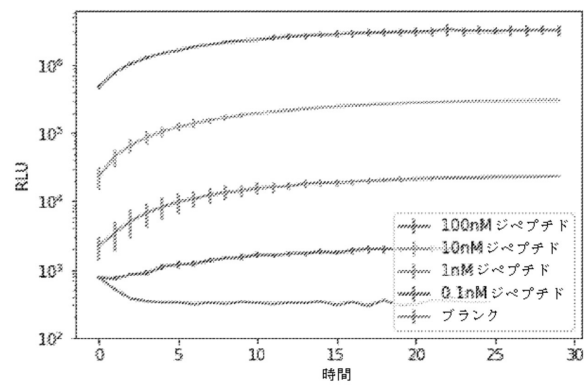
【図 4 2 B】



【図 4 2 C】



【図 4 2 D】



10

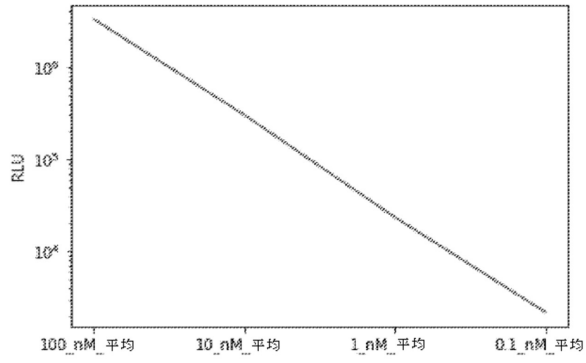
20

30

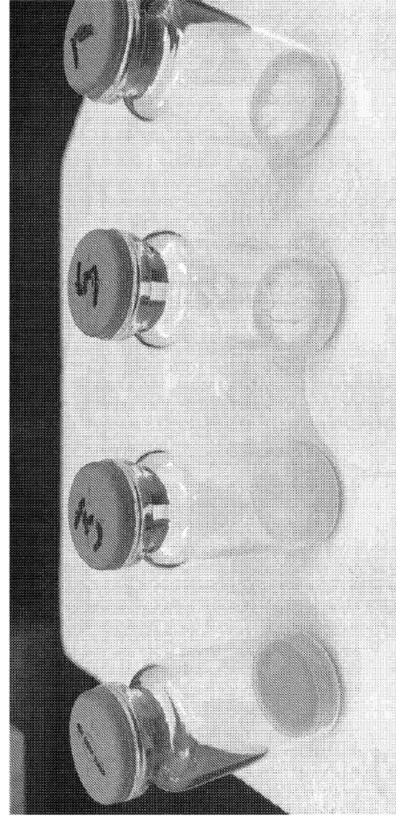
40

50

【図 4 2 E】



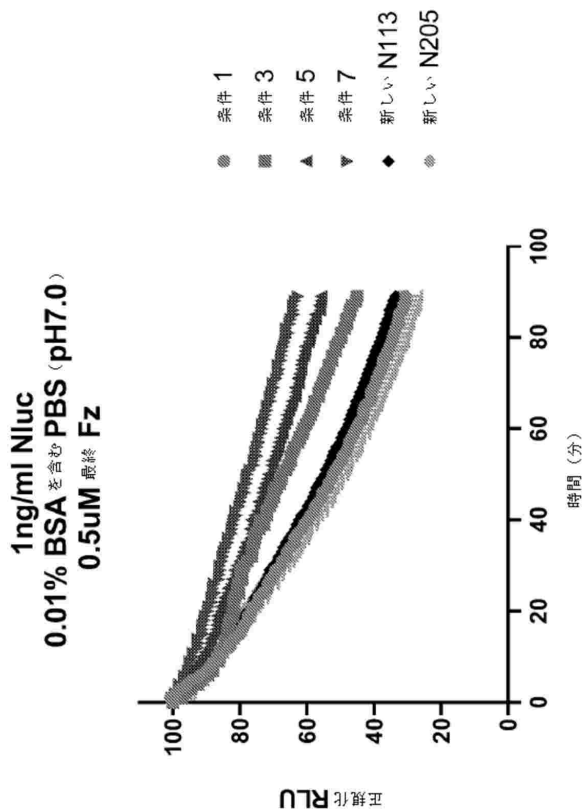
【図 4 3】



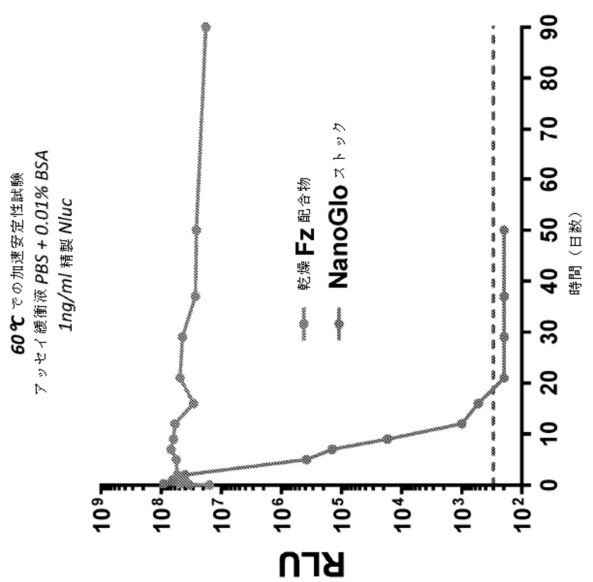
10

20

【図 4 4】



【図 4 5】

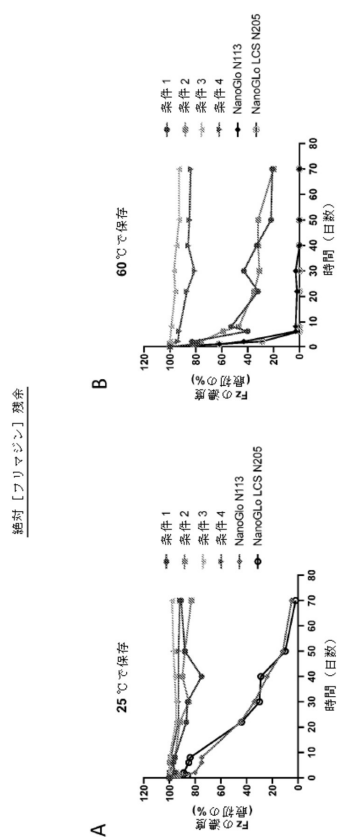


30

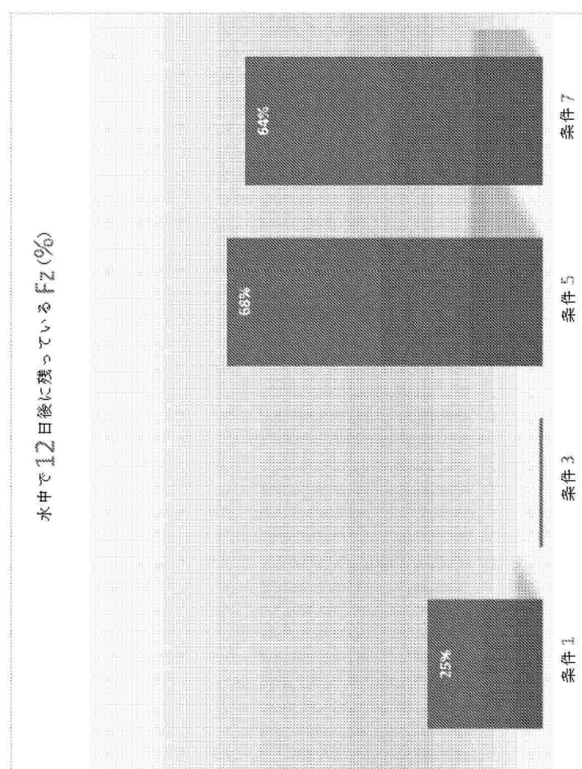
40

50

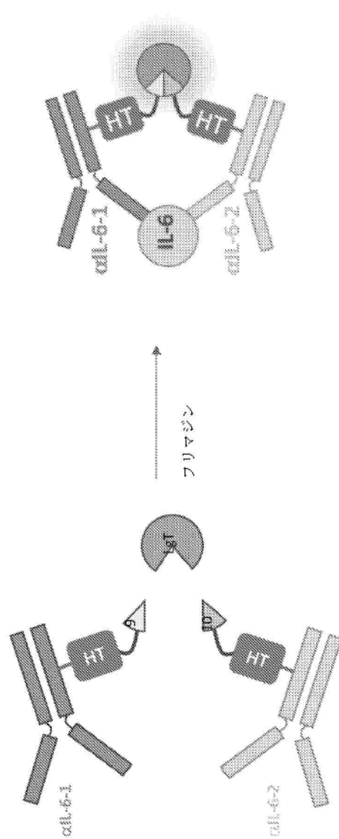
【図 4 6】



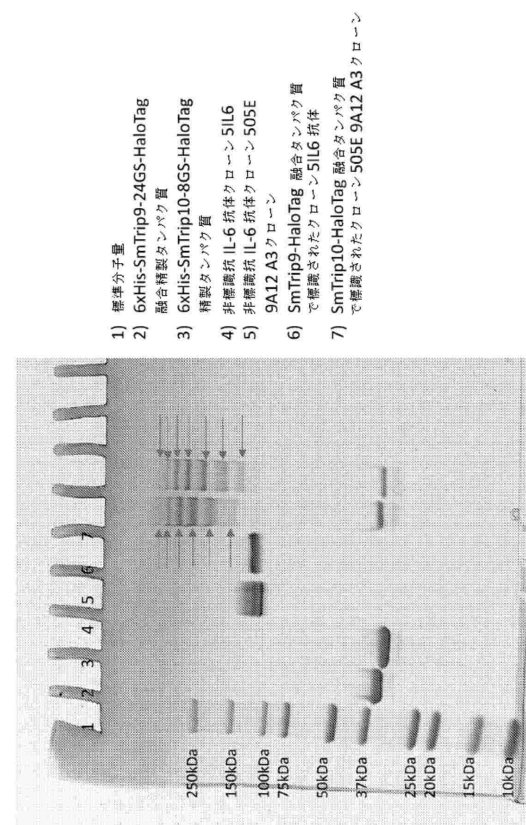
【図 4 7】



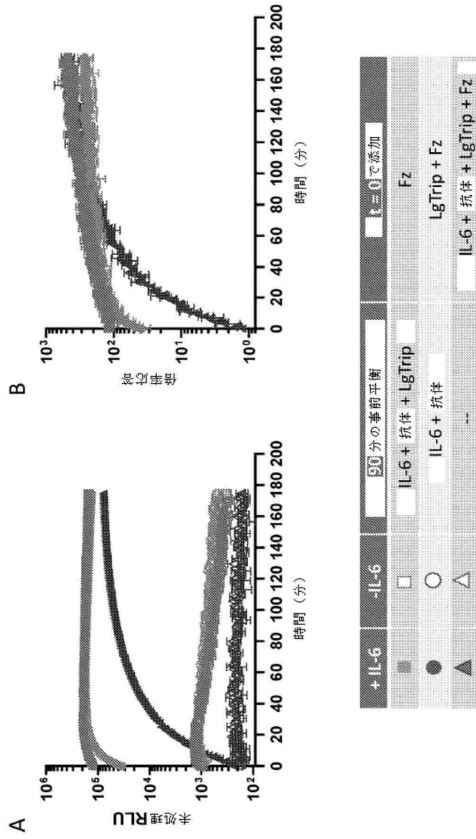
【図 48】



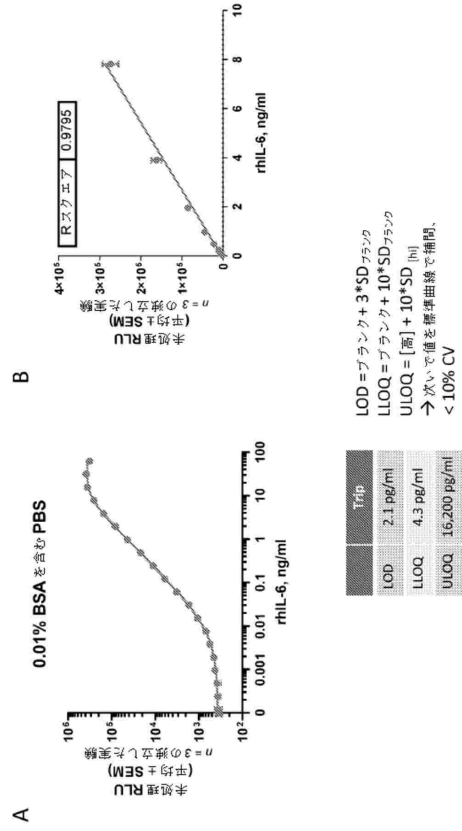
【図 49】



【図 5 0】

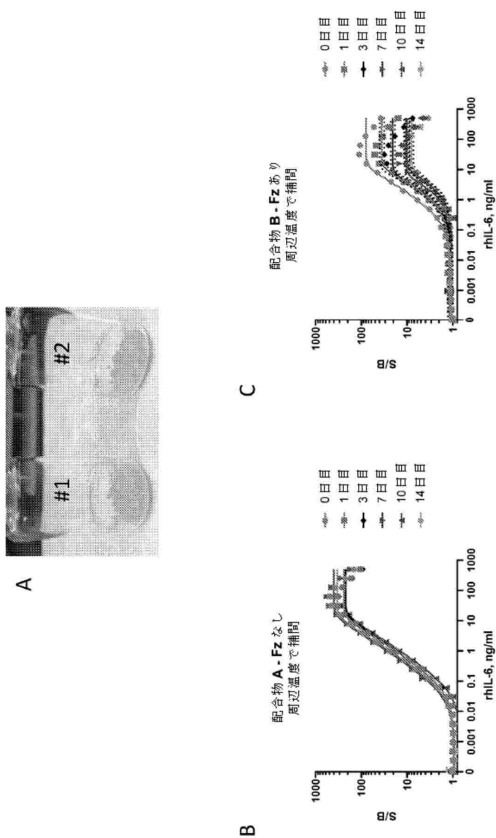


【図 5 1】

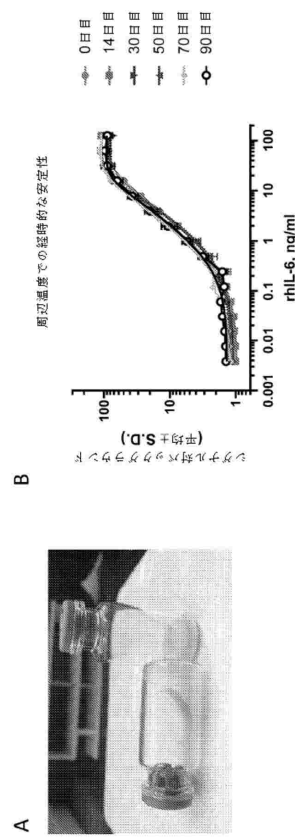


LOD = プランク + 3 * SD プランク
LLOQ = プランク + 10 * SD プランク
ULOQ = [高] + 10 * SD_{high}
→ 次の値を標準曲線で補間,
< 10% CV

【図 5 2】



【図 5 3】



10

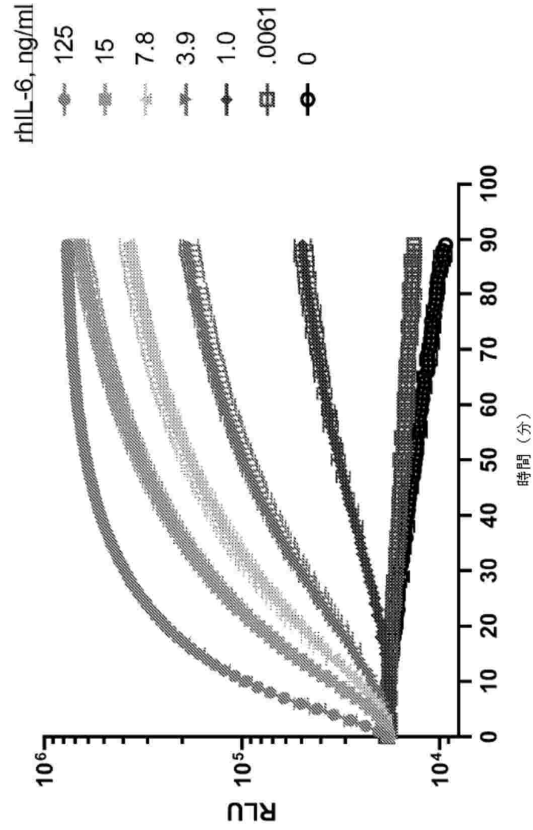
20

30

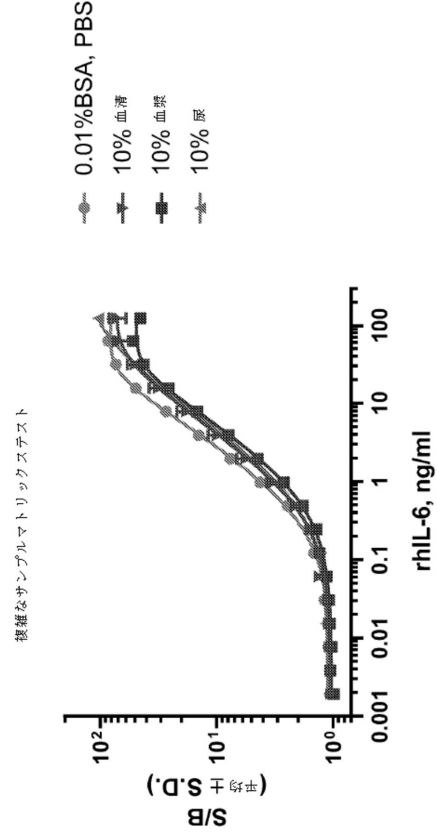
40

50

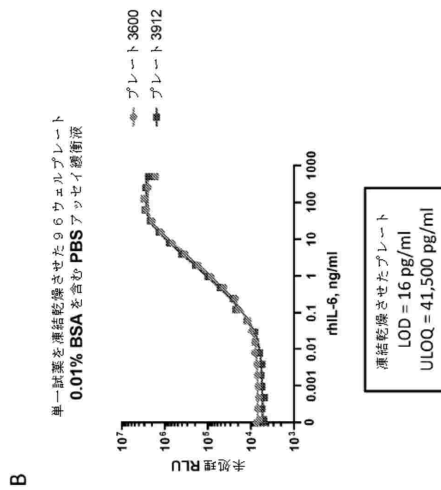
【図 5 4】



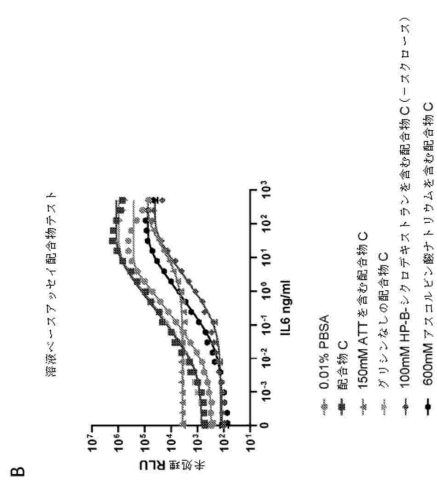
【図 5 5】



【図 5 6】



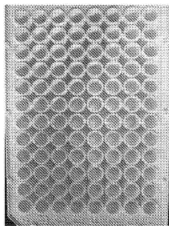
【図 5 7】



B

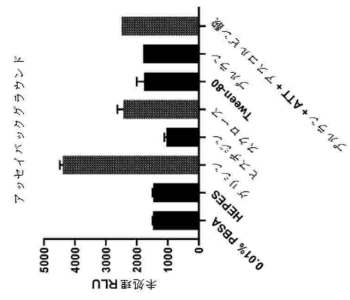
A

サンプルの添加及び読み取り



B

A



10

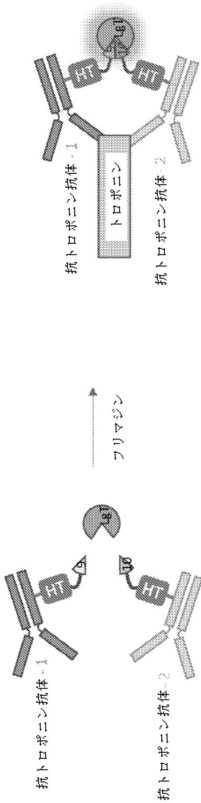
20

30

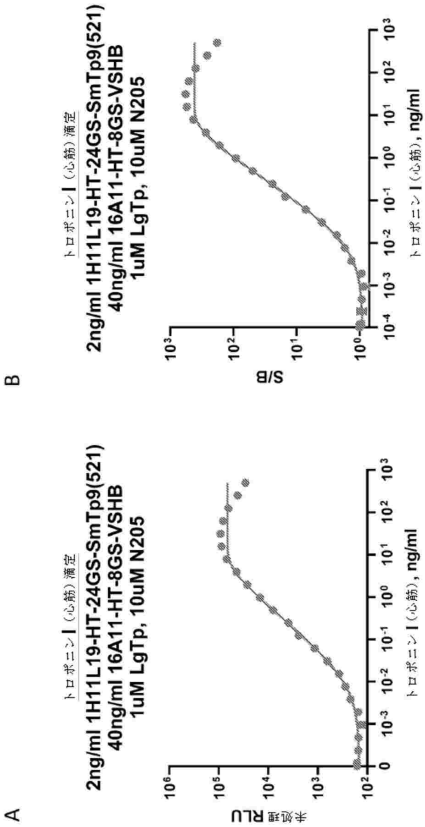
40

50

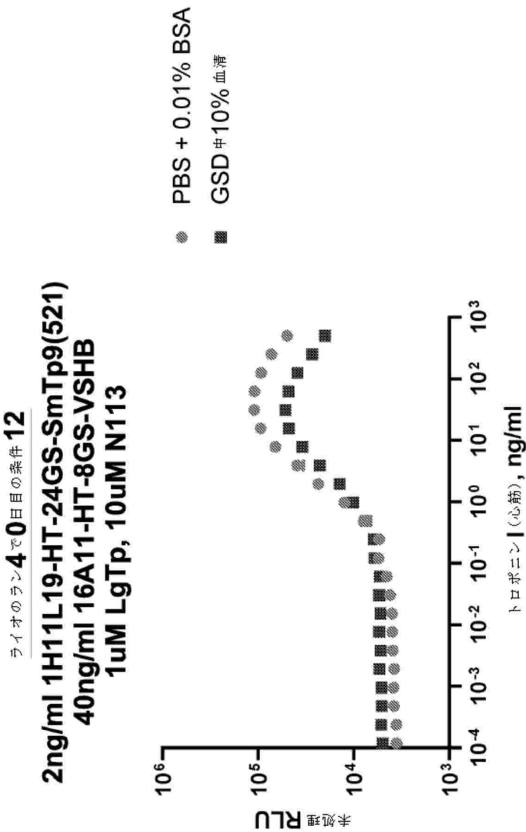
【図 5 8】



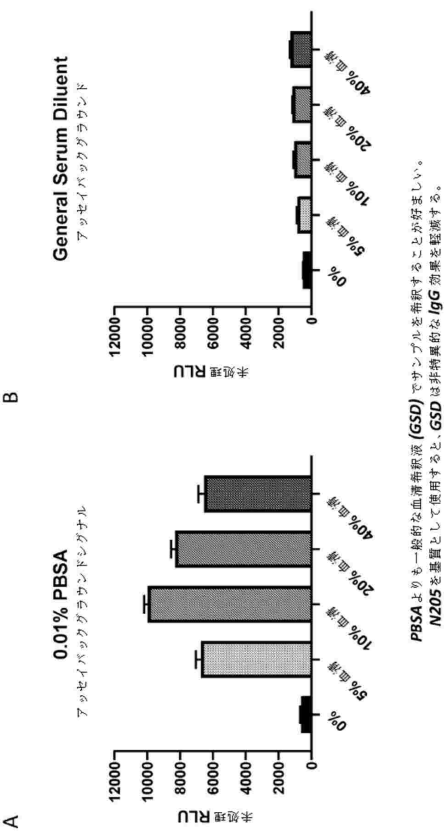
【図 5 9】



【図 6 0】



【図 6 1】



PBSAよりも一般的な血清希釈液 (GSD) でサンプルを希釈することが好ましい。
N205を基質として使用すると、GSDは非特異的なIgG効果を軽減する。

10

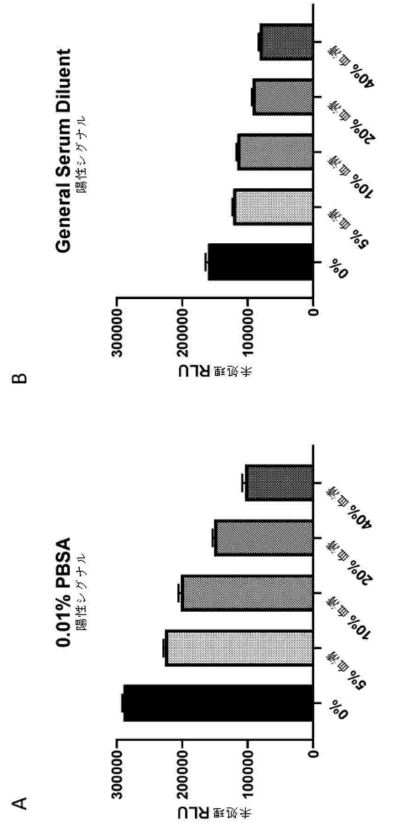
20

30

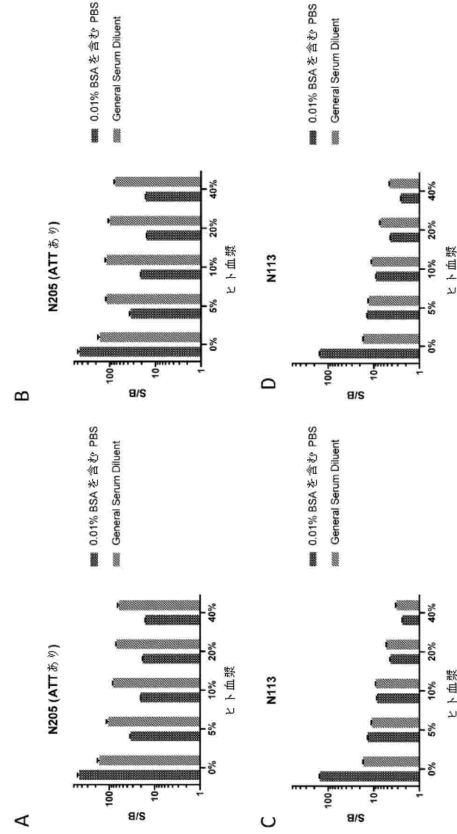
40

50

【図 6 2】



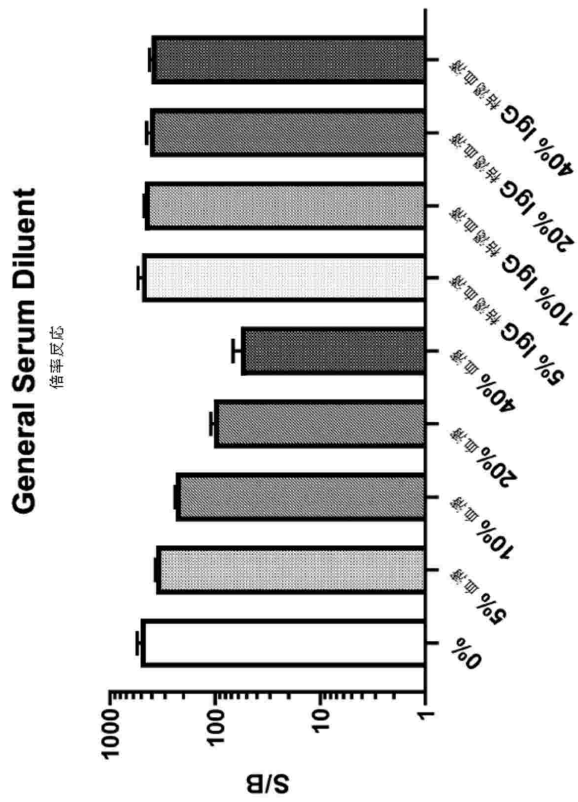
【図 6 3】



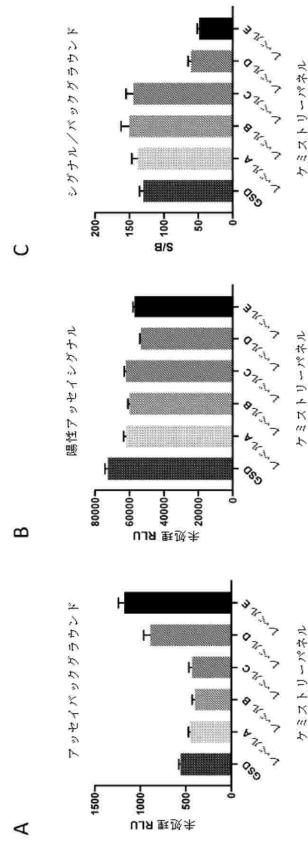
10

20

【図 6 4】



【図 6 5】

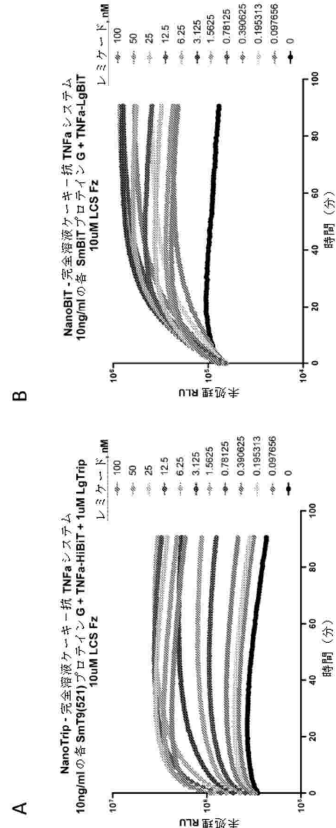


30

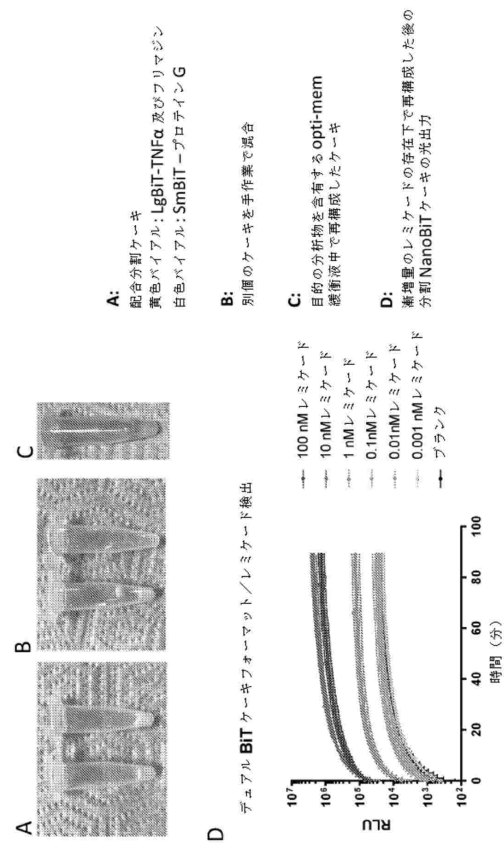
40

50

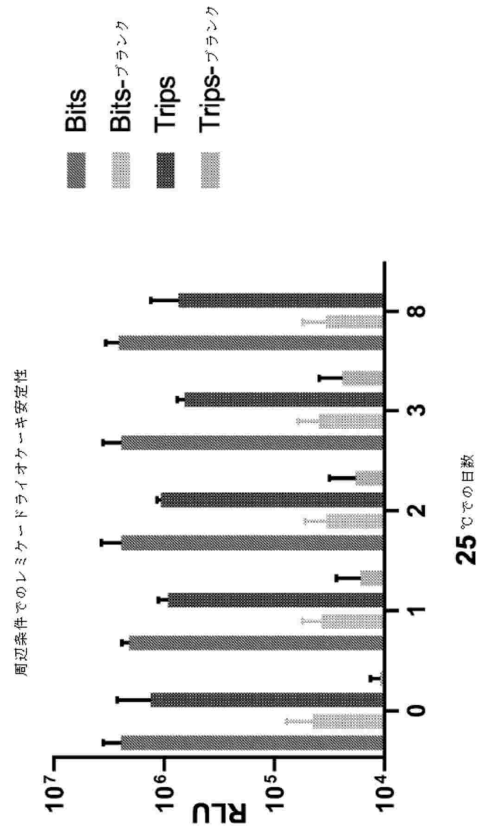
【図 7 0】



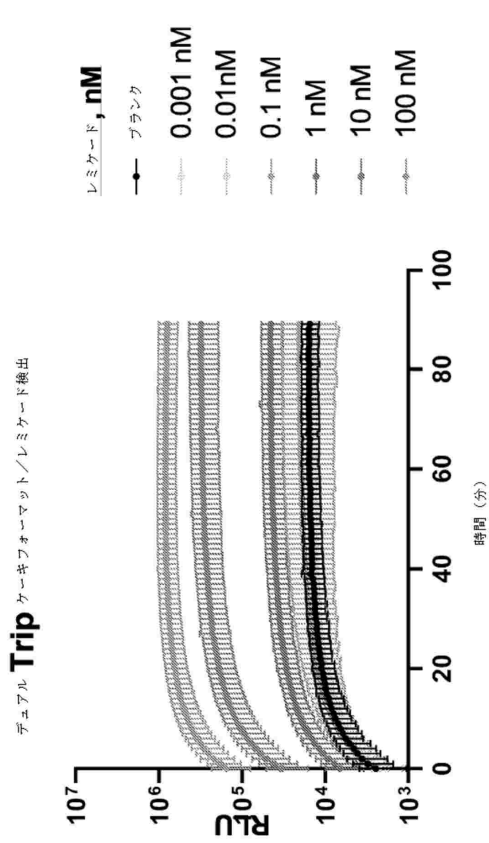
【図 7 2】



【図 7 1】



【図 7 3】



10

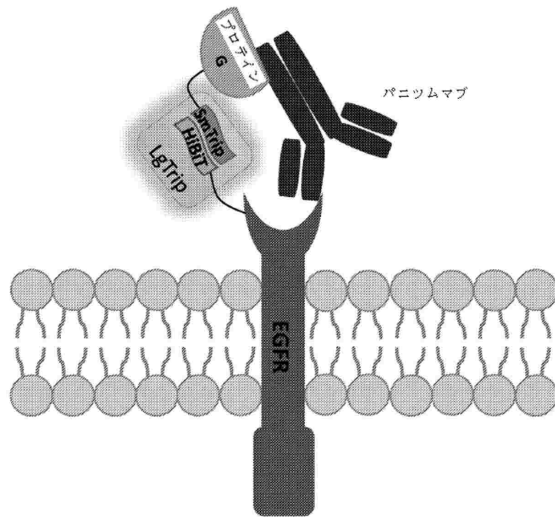
20

30

40

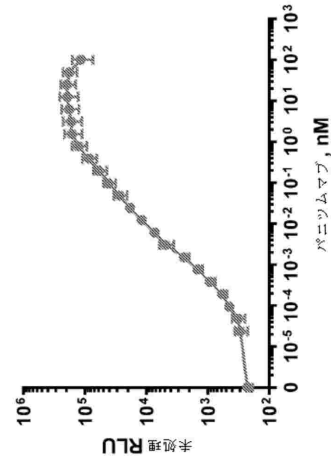
50

【図 7 4】



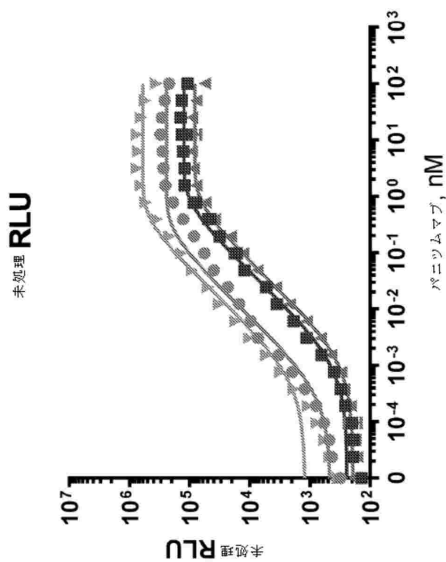
【図 7 5】

- 5nM SmTrip9-プロテイン G
- 20,000 SmTrip10-EGFR 発現細胞 / ウェル
- 1uM LgTrip
- 37℃で1時間インキュベーション
- Opti-MEM アッセイ緩衝液
- 10uM 最終 LCS
- $n = 3$ の独立した実験



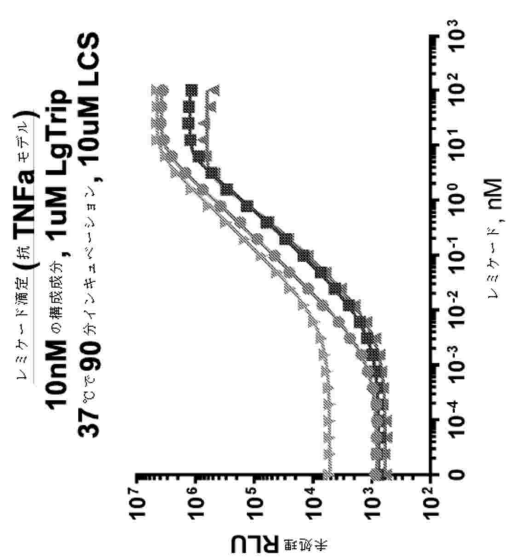
【図 7 6】

- pep521 との Trips
- pep743 との Trips
- ▲ pep759 との Trips
- ▼ pep760 との Trips



【図 7 7 A】

- pep521 との Trips
- pep743 との Trips
- ▲ pep759 との Trips
- ▼ pep760 との Trips



10

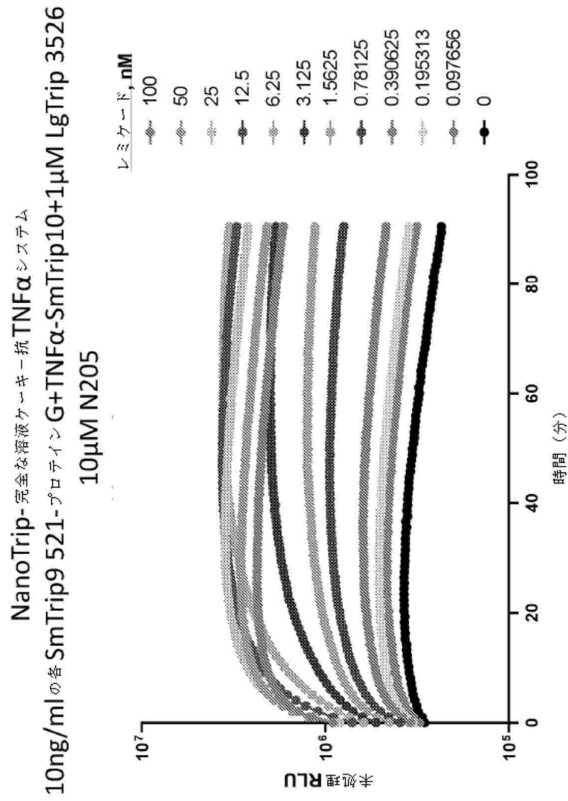
20

30

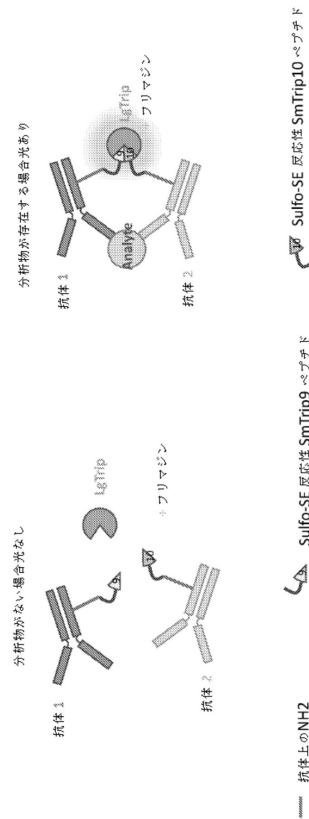
40

50

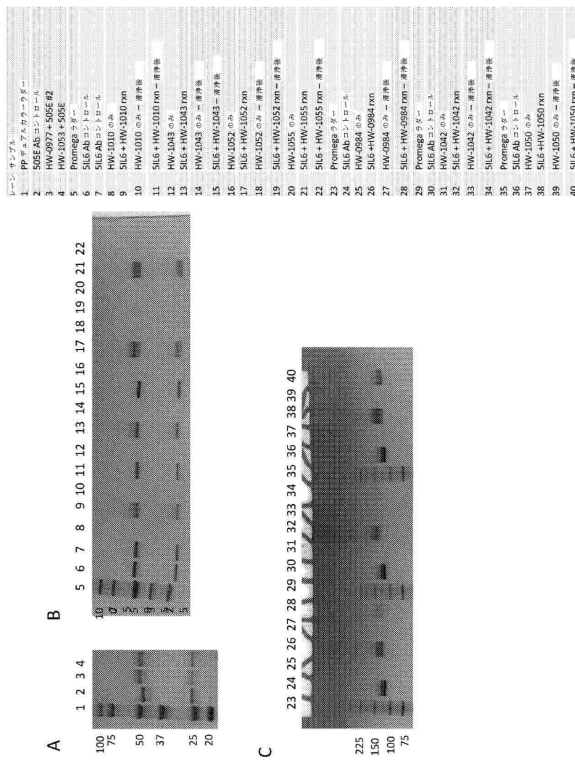
【図 7 7 B】



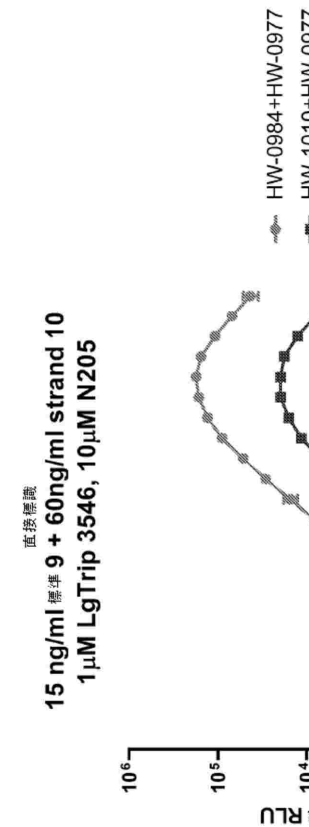
【図 7 8】



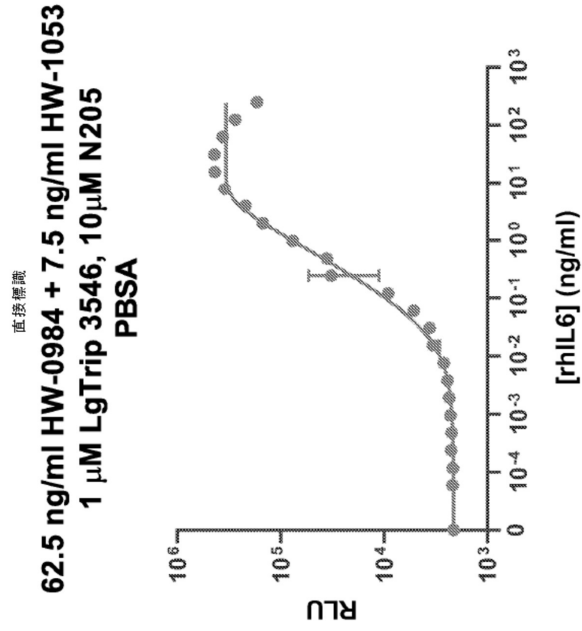
【図 7 9】



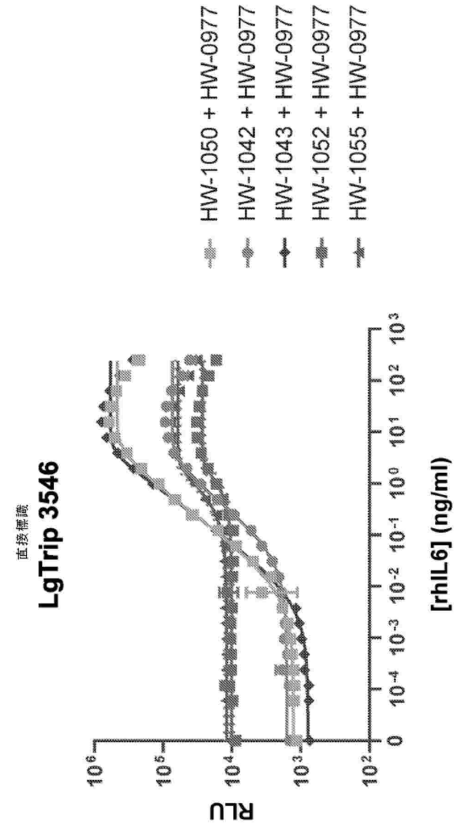
【図 8 0】



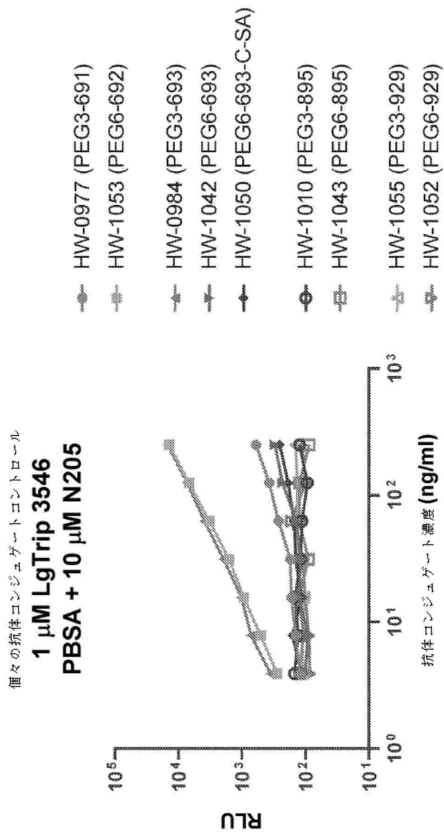
【図 8 1】



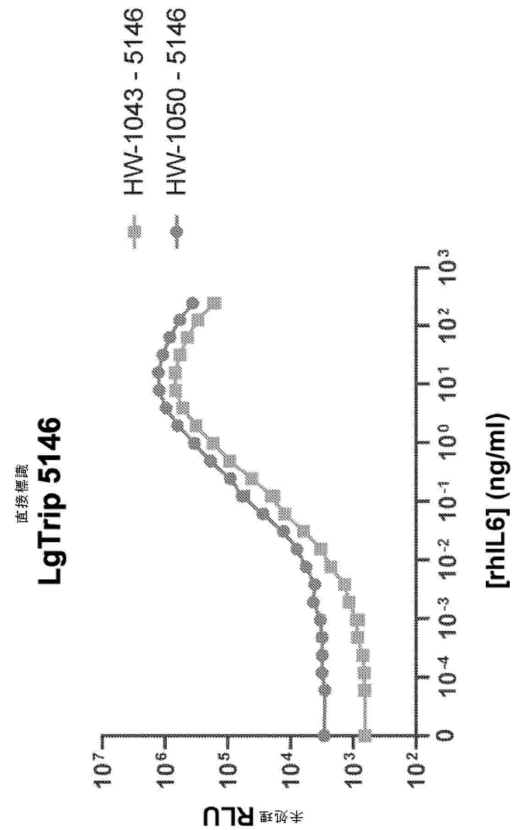
【図 8 2】



【図 8 3】



【図 8 4】



10

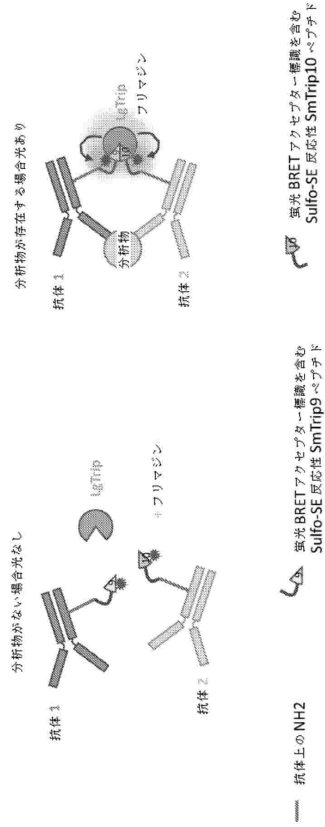
20

30

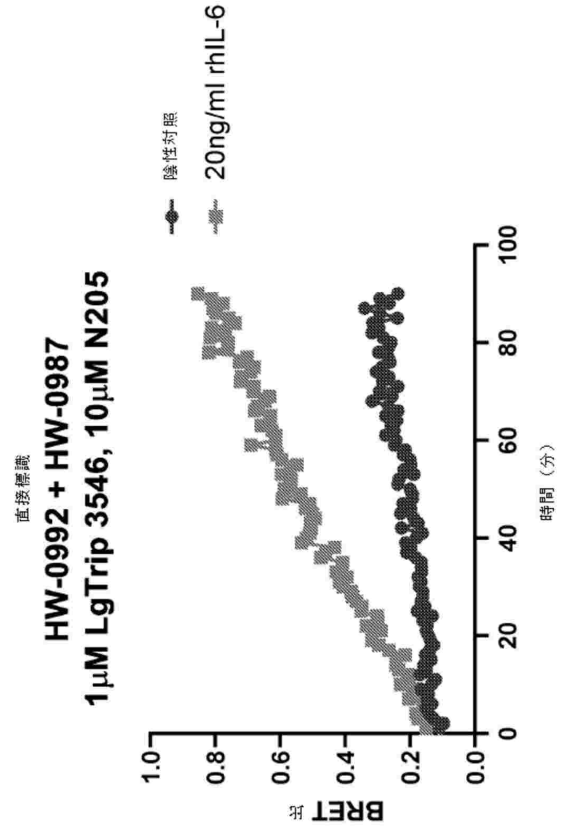
40

50

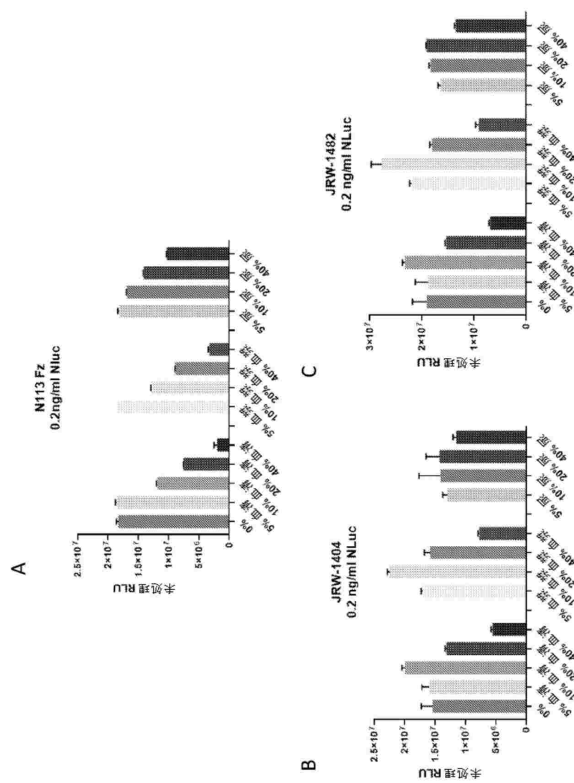
【図 8 5】



【図 8 6】



【図 8 7】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007645812000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 M 1/34 (2006.01)
C 1 2 Q 1/66 (2006.01)
C 1 2 N 9/02 (2006.01)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 E
C 1 2 Q 1/66
C 1 2 N 9/02
G 0 1 N 33/543 5 2 1
G 0 1 N 33/543 5 7 5

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100136249

弁理士 星野 貴光

(72)発明者 カークランド トーマス

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン ウッズ ホロー ロード 2 8 0 0 プ
 ロメガ コーポレーション内

(72)発明者 ダート メラニー

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン ウッズ ホロー ロード 2 8 0 0 プ
 ロメガ コーポレーション内

(72)発明者 ゼン ジヤン

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン ウッズ ホロー ロード 2 8 0 0 プ
 ロメガ コーポレーション内

(72)発明者 スミス トーマス

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン ウッズ ホロー ロード 2 8 0 0 プ
 ロメガ コーポレーション内

(72)発明者 ウッド キース

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン ウッズ ホロー ロード 2 8 0 0 プ
 ロメガ コーポレーション内

(72)発明者 マクライト トーマス

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン ウッズ ホロー ロード 2 8 0 0 プ
 ロメガ コーポレーション内

(72)発明者 ジョスト エミリー

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン ウッズ ホロー ロード 2 8 0 0 プ
 ロメガ コーポレーション内

(72)発明者 キンケイド バージニア

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン ウッズ ホロー ロード 2 8 0 0 プ
 ロメガ コーポレーション内

(72)発明者 ワン フィ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン ウッズ ホロー ロード 2 8 0 0 プ
 ロメガ コーポレーション内

(72)発明者 ジョウ ウェンファイ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン ウッズ ホロー ロード 2 8 0 0 プ
 ロメガ コーポレーション内

(72)発明者 エンセル ランス

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン ウッズ ホロー ロード 2 8 0 0 プ
 ロメガ コーポレーション内

(72)発明者 ホール メアリー

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン ウッズ ホロー ロード 2 8 0 0 プ
 ロメガ コーポレーション内

(72)発明者 ハースト ロビン

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン ウッズ ホロー ロード 2 8 0 0 プ
 ロメガ コーポレーション内

審査官 大瀧 真理

- (56)参考文献 特表2016-519065 (JP, A)
特表2016-500263 (JP, A)
国際公開第2018/148489 (WO, A1)
米国特許出願公開第2007/0048807 (US, A1)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98
C07K 16/00
C07K 14/31
C07K 14/315
C12N 15/115
C12M 1/34
C12Q 1/66
C12N 9/02