

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5426881号
(P5426881)

(45) 発行日 平成26年2月26日 (2014. 2. 26)

(24) 登録日 平成25年12月6日 (2013.12.6)

(51) Int. Cl. F I
 GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 8 1 A
 GO 1 N 33/548 (2006.01) GO 1 N 33/548 B
 GO 1 N 33/543 5 2 1

請求項の数 11 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2008-539499 (P2008-539499)	(73) 特許権者	505353331
(86) (22) 出願日	平成18年11月13日 (2006.11.13)		プラットフォーム・ダイアグノスティクス
(65) 公表番号	特表2009-516163 (P2009-516163A)		・リミテッド
(43) 公表日	平成21年4月16日 (2009.4.16)		イギリス国, ダブリューエフ5・9ダブリ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2006/004204		ューエス ウェスト・ヨークシャー、オセ
(87) 国際公開番号	W02007/054714		ット、デューズベリー・ロード 27, ピ
(87) 国際公開日	平成19年5月18日 (2007.5.18)		ー・オー・ボックス 88 スプリングス
審査請求日	平成21年11月12日 (2009.11.12)		トン・ハウス
(31) 優先権主張番号	0523124.6	(74) 代理人	100099623
(32) 優先日	平成17年11月12日 (2005.11.12)		弁理士 奥山 尚一
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100096769
(31) 優先権主張番号	0610973.0		弁理士 有原 幸一
(32) 優先日	平成18年6月3日 (2006.6.3)	(74) 代理人	100107319
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 松島 鉄男
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 凝集アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

i . 2つ以上の第一結合パートナーが結合している可溶性ハブであって、それぞれの前記第一結合パートナーが分析物の第一エピトープに結合することができる可溶性ハブと、
ii . 第二エピトープに結合している、または結合することができる第二結合パートナーを含む部分であって、検出可能な粒子にも結合することができる部分と
を含む、サンプル中の分析物を検出するために凝集アッセイを行うためのキットであって、前記キットが反応装置をさらに含み、前記反応装置が1つ以上の経路を含む毛細管試験装置であるキット。

【請求項2】

i . 2つ以上の第一結合パートナーが結合している可溶性ハブであって、それぞれの前記第一結合パートナーが分析物の第一エピトープに結合することができる可溶性ハブと、
ii . 第二エピトープに結合している、または結合することができる第二結合パートナーを含む部分であって、検出可能な粒子にも結合することができる部分と
を含む、サンプル中の分析物を検出するために凝集アッセイを行うためのキットであって、第二エピトープに結合することができる前記部分が、検出可能な粒子に結合しており、前記キットが反応装置をさらに含み、前記反応装置が1つ以上の経路を含む毛細管試験装置であるキット。

【請求項3】

毛細管装置が2つの経路を含む、請求項1または2に記載のキット。

【請求項 4】

前記試薬の一方または両方が、毛細管装置の経路に、製造中に予め適用される、請求項 1 ~ 3のいずれかに記載のキット。

【請求項 5】

検出手段と、シグナル処理手段と、表示手段と、電源とのうちの1つ以上をさらに含む、請求項 1 ~ 4のいずれかに記載のキット。

【請求項 6】

i . a) 2つ以上の第一結合パートナーが結合している可溶性ハブであって、それぞれの前記結合パートナーが、分析物の第一エピトープに結合することができる可溶性ハブと、

b) 前記分析物の第二エピトープに結合することができる第二結合パートナーを含む部分であって、検出可能な粒子にも結合することができる部分と、

c) 検出可能な粒子と、
に、サンプルを接触させるステップと、

i i . 前記ハブと、第二結合パートナーを含む部分と、サンプルと、検出可能な粒子とを反応させるステップと、

i i i . 前記ハブと、コンジュゲートと、検出可能な粒子と、分析物との凝集を検出するステップと

を含む、サンプル中の分析物を検出するための1つ以上の経路を含む毛細管試験装置を用いた凝集アッセイ。

【請求項 7】

第二エピトープに結合することができる前記部分が、検出可能な粒子に結合している、請求項 6に記載のアッセイ。

【請求項 8】

第二結合パートナーを含む前記部分が、検出可能な粒子に結合することができる第三結合パートナーをさらに含む、請求項 6 または 請求項 7に記載のアッセイ。

【請求項 9】

前記部分が、前記第二結合パートナーと第三結合パートナーとのコンジュゲートを含む、請求項 8に記載のアッセイ。

【請求項 10】

前記検出可能な粒子がサンプル中に天然に存在する、請求項 6 ~ 9のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 11】

前記検出可能な粒子が赤血球である、請求項 10に記載のアッセイ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サンプル中の分析物を検出するための凝集アッセイに関する。詳細には、本発明は、多孔質担体に基づくアッセイおよびアッセイ装置、そのようなアッセイを行うための手段を含むキット、ならびにサンプル中の分析物を検出するためのアッセイ方法に関する。

【背景技術】

【0002】

イムノアッセイは、サンプル中の分析物を検出および定量するための十分に確立された技術である。それらは、疾病の診断および予後判定の補助として、生体サンプル中の物質を検出および/または測定するために、ならびに治療法に対する患者の反応を予測するために特に有用である。ラジオイムノアッセイおよびエンザイムイムノアッセイなどの技術は、抗体抗原相互作用の検出に基づくものであり、診断医学に革命をもたらした。放射性標識抗原または酵素標識抗原、抗体またはそれらの複合体の使用を含む、非常に多数の検出システムを利用できる。多くのものは、比色分析または蛍光により終点を測定するため

10

20

30

40

50

に、特定の基質とのインキュベーションを必要とする。

【0003】

これらのアッセイは、高感度であるが、検出システムは、多くの場合複雑であり、従って高価である。一般に、これらのアッセイシステムにはいくつかの洗浄ステップが必要であり、これは、従来のアッセイが、多くの場合、ポイントオブケア型の評価には適さないことを意味する。

【0004】

凝集イムノアッセイは、当分野において周知であり、抗原または抗体が結合している粒子の凝集に依存して、サンプル中の対応する抗体または抗原の存在を示す。より単純な形態の凝集アッセイの1つでは、特定の分析物に対する抗体をビーズまたは他の目に見える物質（例えば、ラテックス凝集反応ではポリスチレン微小粒子）に結合させる。一般に、上記抗体は、二価であるため、分析物が存在する場合にはラテックスビーズに凝集塊を形成させる。そのような凝集塊は、陽性の結果を示すものであり、裸眼で見ることができる。

【0005】

WO 04/83859には、分析物との凝集反応を生じさせることができる試薬システムを含有する毛細管経路を含む、毛細管に基づく凝集アッセイが記載されている。上記試薬システムは、毛細管壁の所定の位置に結合した抗体、または毛細管システムの所定の位置に配置されたビーズに結合した抗体を含む。その毛細管経路に適用すると、サンプルは、凝集試薬システムに到達するまで、その経路に沿って流れる。分析物が存在する場合、凝集反応が発生して、管に沿ったサンプルのその後の流れを遅らせる。経路の下流端部でのサンプルの存在についての検出手段は、サンプルの適用から所定の時間を経た後に実施される。サンプルを検出することができなかつた場合には分析物が存在し、このことは陽性の結果を示す。この装置は、凝集手段としてラテックスビーズを用いる。

【0006】

主として結果を提供するためにかかる時間を短縮するために、より患者の近くでアッセイを行う必要が増している。そのようなアッセイは、ポイントオブケアアッセイとして知られ、一般に、実験室でない環境で、多くの場合、熟練していないスタッフによって行われるので、頑丈であることおよび簡単に行えることを必要とする。理想的には、それらは、十分に自己完結しており、付属機器を全く必要としない（読取装置は例外となる可能性あり）。ポイントオブケアアッセイは、いずれの臨床用途に用いることとなる場合も、実験室ベースのアッセイと同様の感度を必要とする。しかし、従来のイムノアッセイは、多くの場合、複雑なプロトコルおよび検出システムを含んでおり、このことは、それらが、多くの場合、ポイントオブケア型の用途に適さないことを意味する。

【0007】

特殊なポイントオブケアアッセイが、開発された。最も一般的なものは、ラテラルフローアッセイ (lateral flow assays) である。多くの場合、これらは、標識された可動成分（例えば、着色された粒子で標識された抗体）と、固定化成分（例えば、抗体のストライプまたはドット）と、サンプルを毛細管現象によって移動させる膜とに基づく。分析物が存在する場合、固定化抗体捕捉ゾーンにおいて「サンドイッチ」が形成され、それが着色ラインまたはドットの発現をもたらす。従来のラテラルフローアッセイは、例えば、Unilever Patent Holdings B.V (US 5,656,503) によって例示されている。これらのアッセイは、Geigel et al (Clin Chem 28(9) pp 1894-8, 1982) が教示したラジアル形式とは対照的に、ラテラルフロー形式においてであるが、固体化抗体捕捉ゾーンを規定する。

【0008】

ラテラルフローアッセイは、速度、利便性および比較的低いコストを含む多くの利点をもたらす。しかし、いくつかの欠点も有する。その抗体は、一般に、膜への吸着によって固定されるので、膜および/または抗体バッチの変動が、固定化される抗体の量の変動に

10

20

30

40

50

つながることがある。さらに、抗体の一部は、ゆるくしか結合されず、流体の先頭が通過すると可動性になる場合があり、シグナル喪失をもたらす。また、1つの抗体が固定されるので、それが分析物と反応する唯一の時間は、サンプルが流れ去るときであり、そのため、感度は、短いインキュベーション時間のために低下する場合がある。それぞれの分析物のために特異的な被覆膜を製造する必要もあり、従って、製造コストが増す。

【0009】

固定化捕捉抗体の使用を回避することにより、これらの不利益に対処する試みがなされた。例えば、Miles (EP 297292)、Hygeia Sciences (EP 310872) および株式会社ミズホメディー (Mizuhō) (EP 0962771) には、捕捉ゾーンを有する膜を2つの抗体でコーティングされた粒子 (一方は未標識であるが、大きいので上記ゾーンによって捕捉され、他方は小さいものであり、標識され、上記ゾーンを通過できる) と共に有するシステムが記載されている。分析物が存在する場合は、それらの小さいビーズが、捕捉された大きいビーズに結合して、着色ラインの形成をもたらす。これらの方法は、固定化捕捉抗体の使用を回避するが、捕捉ゾーンに加えて抗体でコーティングされた粒子の2つの集団を必要とする。多くの場合、そのような粒子は、実際には疎水性であるため、生体液が存在する場合には、それらを非特異的に凝集させ得る。

10

【0010】

他のものは、膜を通過して自由に移動することができる抗体でコーティングされた粒子を、分析物が存在する場合にはそれらの移動が停止するように凝集させる、より単純な形式を試みた。このような凝集に基づくイムノアッセイは、当分野において公知であり、抗原または抗体が結合している粒子の凝集に依存して、サンプル中の対応する抗原または抗体の存在を示す。より単純な形式の凝集アッセイの1つでは、特定の分析物に対する抗体をビーズまたは他の目に見える物質に結合させる。

20

【0011】

特に、Amersham (US 4,666,863) は、クロマトグラフ手段による遊離標識と結合標識の分離方法を開示している。1つの変形では、膜に沿った流れを利用する凝集性と非凝集性の抗体でコーティングされた着色粒子の分離を教示している。分離に先立ち、反応混合物を架橋剤と反応させて、凝集物を安定させる。第一化学薬品株式会社 (Daiichi) (EP 293779) も、着色ラテックス凝集反応を開示しており、この場合は、非凝集ラテックスは通り抜けることができるが凝集物は捕捉する毛細管により凝集粒子と非凝集粒子が分離される。Kodak (EP 280559) は、分析物標識が不在の場合にはフィルターを通過できるが、分析物が存在する場合には凝集物が形成され、それが捕捉される、多価分析物についてのアッセイを記載している。Akers (EP 556202) は、分析物に特異的な受容体を表面に有する着色粒子とサンプルとを接触させることにより試験混合物が形成されるシステムを記載している。着色粒子より大きい、粒子と分析物の凝集物より小さい細孔を有するフィルターに、上記試験混合物を通すため、凝集物の捕捉を生じさせる。混合物からの凝集物の存在は、フィルターの着色を確認することによって判定される。Genosis (US 6,472,226) は、固定化抗体を用いない、非常に大きい分析物についてのラテラルフローアッセイを記載している。分析物が、大きな細孔は通過できるが、小さな細孔のゾーンに達すると捕捉されることとなるように、1つは大きい細孔を有し、1つは小さい細孔を有する、2ゾーンシステムを記載している。これは、両方のゾーンを通過できる小さな標識 (例えば、金ゾル) と併用される。分析物が存在する場合、金ゾルの画分が分析物に結合し、小さな細孔のゾーンで捕捉されることとなる。

30

40

【0012】

一般のポイントオブケアアッセイは、膜ラテラルフローアッセイであり、尿サンプルに対して一般に使用される。尿が含有する分析物の数は限られ、そのため、これらのアッセイの適用は限定される。より広範な分析物を含有する全血に対して使用するには、血球を除去するために、通常、濾過が必要である。そのようにしなければ、膜の閉塞および変色

50

が発生するからである。

【0013】

結果として、血液の濾過を必要としない、全血で使用するためのアッセイシステムが開発された。US 4,433,059において、Changは、サンプルに内在する粒子を利用することにより2つの抗体を「テール対テール」で共有結合させて自己凝集反応を促進する、非毛細管型凝集イムノアッセイを開示している。一方の抗体は、赤血球などの指示物質に担持された抗原に特異的である。この抗体は、一価であり、従って、非特異的凝集は避けられる。他方の抗体は、二価であり、分析物に特異的である。分析物が存在する場合、コンジュゲート抗体が、分析物と赤血球を架橋させて、赤血球の凝集物を生じさせることとなる。

10

【0014】

Agentは、様々な特許出願（US 5,413,913、US 4,894,347、WO 93/24630およびEP 308242）において、血液サンプルの赤血球を凝集粒子として使用する、全血で使用するための非毛細管型凝集システムを記載している。本システムは、2つの抗体または抗体フラグメント（その一方は、赤血球抗原に向けられるものであり、他方は、マルチエピトープ分析物に向けられるものである）を含むコンジュゲートの使用を必要とする。分析物が存在する場合には、抗体が赤血球を凝集させることとなる。

【0015】

サンプルとして全血を使用する、毛細管に基づく凝集システムは、以前に、例えばUS 3,951,606およびWO 99/35497により開示されている。これらの両方は、凝集物の位置、またはどの毛細管が閉塞されるかを判定することにより、分析物の存在/量の指標を与える。これらのアッセイの両方が、凝集が毛細管の全閉塞を生じさせることに依存する。

20

【0016】

現行の凝集アッセイの大多数において、粒子の凝集は、視覚的に検出される。しかし、視覚的終点は、主観的であり、電子的にデータを記録することは難しい。

【0017】

重要な考慮事項は、主として、これらの凝集に基づくアッセイが、大きな、安定した凝集物の形成を可能にする多数のエピトープを有する大きな分析物の検出に限られることである。より少数のエピトープを有するより小さい分析物でのそれらの有効性、または限られた数の利用可能なエピトープのみを使用する場合の有効性は、架橋事象数の減少が凝集物を弱体化させ、感度を喪失させる結果となり得るので、損なわれる。

30

【0018】

本発明は、先行技術のアッセイシステムに付随する上述の問題の一部または全てに対処し、または改良することを目的とする。

【発明の開示】

【0019】

本発明の基礎は、分析物の存在下で、安定した検出可能な凝集反応を生じさせることである。特に実験室ベースのアッセイについては、別の方法も可能であるが、ポイントオブケアアッセイについて、これは、多孔質担体中または毛細管通路を含む装置内で好都合に行われる。実際、そのような用途には、例えば比濁分析に基づく、完全液相形式を用いることができる。受当な凝集は、多数の結合事象が可能な大きなマルチエピトープの分析物を使用することにより達成することができるが、少数のエピトープしか含有しない、より小さな分析物を用いて安定な凝集を達成することは、難しい場合がある。実際、特異性の理由により、分析物上の2つのエピトープのみを利用することが望ましい場合が多い。

40

【0020】

これを克服するために、本発明は、担体に結合した多数の結合パートナーを含むハブを提供する。結果として生じるハブは、いくつかの分析物分子に結合することができ、要するに、分析物をマルチエピトープ性のようにし、その有効な結合能力を増幅する。このよ

50

うにして、小さな分析物についての強い安定した凝集を達成することができ、および/または分析物上の限られた数のエピトープしか利用できない状況で、外的な安定剤の必要を減少させることができる。

【 0 0 2 1 】

本発明は、分析物の有効な結合能力を増幅するために役立ち、より強い、より安定した凝集反応を可能にする、試薬の特定の組み合わせを使用することによって、当分野の膜に基づくアッセイと比較して向上した感度と単純化された製造性を有するアッセイを提供する。本発明は、膜上に予め固定された結合パートナーの必要性を回避または改善するアッセイを提供する。

【 0 0 2 2 】

サンプル中に分析物が存在する場合、ハブ、分析物および第二結合パートナーの凝集が発生することとなり、好ましくは、それを装置内で検出できる。本発明は、好ましくは1回のアッセイで、単一サンプル中の2つ以上の分析物の検出にも適する。そのような実施形態では、それぞれが異なる分析物に結合できる2つ以上の第一結合パートナーを備えることができる。これらは、単一の担体上に備えることができ、その結果、2つ以上の分析物が結合できるハブを製造することができる。あるいは、および好ましくは、それぞれが異なるエピトープに特異的である2つ以上のハブを製造するために、2つ以上の第一結合パートナーを、それぞれ、別の担体上に備えることができる。さらに、対応する数の第二結合パートナーであって、それぞれが異なるエピトープに特異的であり、それぞれが、検出可能な粒子に結合しているか結合することができる第二結合パートナーを備える。好ましくは、検出すべきそれぞれのエピトープについて、その存在または不在を判定できるように、異なる検出可能な粒子を備える。

【 0 0 2 3 】

分析物は、任意の部分であり得、好ましくは、結合パートナーにより結合されることができるものであり得る。ハブおよび第二結合パートナーでの凝集物の形成を可能にするために、本発明において検出できる分析物は、結合パートナーが結合できる少なくとも2つの結合部位、またはエピトープを有するものである。分析物の非限定的な選択としては、核酸、抗原、抗体、オリゴヌクレオチド、ホルモン、ホルモン受容体、ビタミン、ステロイド、代謝産物、アプタマー、糖、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖タンパク質、生物（例えば、真菌、細菌、ウイルス、原生動物および多細胞寄生生物）、治療用薬物もしくは非治療用薬物、またはこれらの任意の組み合わせもしくはフラグメントが挙げられる。好ましくは、分析物は、免疫学的に活性なタンパク質またはポリペプチド、例えば、抗原性のポリペプチドまたはタンパク質であり得る。本発明による検出に最も好ましい分析物としては、hCG、LH、FSH、およびHIVに対する抗体が挙げられる。当業者には明らかであるように、抗体は、免疫反応の証拠を測定する場合、特に重要な分析物である。従って、特定の抗体の血清力価の正確な測定は、本発明の重要な態様である。そのようなアッセイにおいて、使用される分析物結合試薬は、通常、測定される抗体が特異的に結合する抗原であることは理解される。

【 0 0 2 4 】

分析物の有効な結合能力の増幅は、分析物の第一エピトープに結合することができる2つ以上の第一結合パートナーが結合しているハブの使用によって達成される。上記ハブは、好ましくは均一であり、安定し、および結合パートナーを付着させることができる、任意の適する材料から形成されるものであり得る。上記ハブは、可溶性であってもよいし、または不溶性であってもよいが、前者のほうが好ましい。ハブの例としては、ポリスチレンラテックスビーズ、ガラスビーズ、金ゾル、細胞（例えば、赤血球）、繊維状材料（例えば、セルロース）、および高分子（例えば、多糖類およびタンパク質）が挙げられる。好ましいハブは、デキストラン、好ましくは、アミノデキストラン、アガロース、微結晶性セルロース、デンプンを含む、多糖類である。他の適する材料としては、ポリエチレンイミン、ポリビニルトルエン、またはスチレンブタジアミンコポリマー、ポリアクロレインマイクロスフェア、ポリウレタン、花粉粒子、スポロポレニン；ポリクリシジルメタク

10

20

30

40

50

リレート、微結晶性セルロースもしくはこれらの組み合わせのシェルによって包囲されたポリスチレンもしくはポリビニルナフタレンコア；ポリビニルアルコール、ヒドロキシエチルメタクリレートとメチルメタクリレートのコポリマー、シリコンおよびシリカ、ガラス、ゴム、ナイロン、珪藻土、シリカなどが挙げられる。可溶性ハブは、非特異的結合が少なく、柔軟性が增大しているという有利な点を有し、抗体または他の結合性分子が共有結合するための基の利用可能性を増大させるという有利な点を有する。好ましい可溶性ハブは、上述したものの、特にアミノデキストランおよびその誘導体を含む、可溶性タンパク質および多糖類である。ハブのサイズは、その表面に収容される結合パートナーの数、アッセイの間中ハブの安定性を保証する立体因子、およびアッセイが行われる多孔質担体の性質などの要素によって決定される。例えば、ハブは、好ましくは、凝集事象が不在の場合に膜の最小細孔を通して移動するために十分に小さいものである。ハブが不溶性ビーズから形成される場合、これらは、 $0.03 \sim 10 \mu\text{m}$ の範囲の直径、好ましくは $0.05 \sim 8 \mu\text{m}$ の範囲の直径である。可溶性ハブについて、これらは、 $250 \sim 2500 \text{kDa}$ の範囲内であり得、さらに好ましくは、例えば、アミノデキストラン分子について、 $500 \sim 2,500 \text{kDa}$ であり得る。

【0025】

ハブの表面には、分析物の第一エピトープに結合することができる第一結合パートナーが存在する。従って、分析物が存在する場合、ハブは、その表面の第一結合パートナーによってそれに結合することができる。これは、第二結合パートナーへの提示のために多数の分析物分子を効率的に集める。従って、ハブおよび第二結合パートナーを使用するアッセイは、感度を高め、用途を増加させる可能性を有する。

【0026】

従って、ハブが有効であるために、分析物の特定のエピトープに対する少なくとも2つの第一結合パートナーがその表面に存在することが好ましい。しかし、ハブ表面の任意の特定のエピトープに対する結合パートナーの数が多いほど、分析物と第二結合パートナーとの予想される相互作用の数が多くなり、従って、凝集物の予想されるサイズが大きくなる。従って、ハブ表面の結合パートナーの最適な数は、結合パートナー間またはハブと第二結合パートナーの間の任意の立体的干渉を最小限にしながらかアッセイ感度を維持するような数である。

【0027】

ハブに結合されている第一結合パートナーは、分析物の任意のエピトープに結合することができるか、分析物の任意のエピトープに向けることができるが、但し、このエピトープが、第二結合パートナーがターゲットにするエピトープとは異なることを条件とする。アッセイが、単一の分析物の検出に使用される場合、ハブに結合している全ての第一結合パートナーが、分析物の同じエピトープに結合でき、好ましくは実質的に同じであることが好ましい場合がある。しかし、単一のサンプルまたはアッセイにおいて2つ以上の分析物を検出することが望まれる本発明の実施形態では、検出すべきそれぞれのエピトープに結合することができる第一結合パートナーを、同じハブまたは異なるハブに設けることができる。

【0028】

第二結合パートナーは、分析物の第二エピトープに結合することができ、好ましくは同時に、検出可能な粒子に結合しているか結合することができる。好ましくは、第二結合パートナーは、対応する第一結合パートナーがターゲットにするエピトープとは異なる分析物上のエピトープをターゲットにする。第二結合パートナーは、多数の直接的または間接的方法で、検出可能な粒子に結合させることができる。一つの実施形態において、第二結合パートナーは、二価性のコンジュゲートの形態の第三結合パートナーに結合されており、分析物のエピトープと検出可能な粒子とに、特異的または非特異的に結合することができる。結合パートナーが、抗体またはそれらの機能的フラグメントもしくは誘導体である場合、第三結合パートナーは、検出可能な粒子の表面に直接提示されたエピトープに特異的に結合することができる。一つの実施形態において、この検出可能な粒子は赤血球であ

10

20

30

40

50

り、そのため、その第三結合パートナーは、赤血球表面抗原に特異的な抗体であり得る。

【0029】

本発明との関連において、エピトープは、結合パートナーが結合できる分析物上の単一部位である。従って、本明細書に記載される結合パートナーが結合するエピトープは、考え得るところでは、同じ分子上にある場合もあり、異なる分子上にある場合もある。好ましくは、立体的な理由で、第一結合パートナーおよび第二結合パートナーによってそれぞれ認識される、分析物の第一エピトープおよび第二エピトープは、立体的に離れた部位に存在することが好ましい。分析物が2つ以上のドメインを有する場合には、立体障害を回避するために、ハブの第一結合パートナーのものとは異なるドメイン上のエピトープを第二結合パートナーが認識することが、最も好ましい。例えばhCGの場合、第二結合パートナーは、鎖上のエピトープに対するものであり、ハブは、鎖のエピトープに対するものである。好ましくは、第一結合パートナーおよび/または第二結合パートナーがターゲットにする分析物エピトープは、その分析物に特異的であり、そのためその分析物が存在する場合にのみ、第一結合パートナーと第二結合パートナーとの両方の、その分析物への結合が発生する。

10

【0030】

ハブ、分析物と、第二結合パートナーとの間の凝集が検出可能であるためには、第二結合パートナーが、分析物と検出可能な粒子との両方に同時に結合できることが好ましい。従って、検出可能な粒子がアッセイ中に結合する場合、その検出可能な粒子のための第二結合パートナーにおける結合部位は、分析物と検出可能な粒子との同時結合を可能にするために、好ましくは、その分析物への結合部位から十分に離れている。第二結合パートナーがアッセイの前に検出可能な粒子に結合される場合、好ましくは、その結合パートナーは、分析物にさらに結合できるように、検出可能な粒子に付着させる。その検出可能な粒子は、下記で説明するような任意の適切な手段によって、第二結合パートナーに結合させることができる。

20

【0031】

結合パートナーは、任意の適切な様式、共有結合または非共有結合で、非ターゲット部分、例えばハブまたは検出可能な粒子に結合または固定されることができる。特に、検出可能な粒子がアッセイ中に第二結合パートナーに結合される場合、結合は一般に、その結合パートナーの結合部位と、ハブまたは検出可能な粒子上のエピトープ（または決定基）との間で形成され得る。そのような決定基は、好ましくは、ハブまたは検出可能な粒子上に本質的に存在するが、外来性であってもよい。好ましくは、それは表面タンパク質、好ましくはグリコホリンである。適切な手段としては、例えば化学的結合などの共有結合、または非共有結合によるもの、例えば、抗体抗原相互作用、ビオチン-ストレプトアビジン、タンパク質間相互作用、プロテインGもしくはプロテインA相互作用、または受動吸着が挙げられる。共有結合を用いる場合、一般に、これは、結合部位から遠位の結合分子の適切な残基と、ハブの分子の適切に利用できる部分との間である。好ましくは、共有結合は、アミノ酸、一般に、アミノ酸側鎖、例えばアミノ、スルフヒドリル、カルボキシル、フェノールまたは他のヘテロ芳香族もしくは芳香族の側鎖の間に形成される。

30

【0032】

上記で説明したような非共有結合を達成するために、結合パートナーをコンジュゲートとして備えることができ、この場合、本明細書中で前に説明した結合パートナーを、ハブ/検出可能な粒子に結合することができるさらなる結合パートナーに結合させる。この結合は、分析物結合の一切の障害を回避するように、好ましくはそれらの分析物結合部位から遠位の部位によるものである。結合パートナーが抗体である場合、そのような部位は、結合がテール間で起こるように、それらの結合パートナーのテールであってもよい。上記結合は、例えば結合パートナーのアミノ酸のアミノ側基、スルフヒドリル側基、カルボキシル側基、フェノール側基または他のヘテロ芳香族側基もしくは芳香族側基による、あるいは好ましくはチオール基による共有結合性であってもよい。あるいは、上記結合は、上記で説明したような非共有結合性であってもよい。

40

50

【0033】

本発明の結合パートナーは、所定のターゲット（例えば、分析物または検出可能な粒子）に結合することができ、好ましくは上記所定のターゲットに対する選択的親和性を有する（すなわち、そのターゲットに対して特異的である）任意の物質であり得る。従って、結合パートナーとしては、モノクローナルまたはポリクローナル抗体、抗原、タンパク質（酵素または他の結合タンパク質を含む）、受容体、アプタマー、オリゴヌクレオチド、糖、およびそれらのフラグメントが挙げられる。結合パートナーは、分析物および凝集性粒子の性質に基づいて、それぞれに結合できるように、上述のものから必要に応じて選択される。好ましくは、結合パートナーは、IgG、IgMなどの公知の免疫グロブリン、またはIgGの一価および二価の抗体フラグメント（それぞれ従来既知のFabおよびFab'、ならびに(Fab')₂）のような抗体、またはそれらのフラグメントであり得る。好ましくは、抗体は、一般には二価抗体フラグメント[(Fab')₂]、またはさらに好ましくは一価抗体フラグメント(FabもしくはFab')である。

10

【0034】

結合パートナーがそれらのターゲットに直接結合することは好ましいが、これは、絶対に必要なことではなく、結合は、分析物結合分子などの媒介物経由で発生する場合もある。上記媒介物は、サンプル中に自然に存在する場合もあり、または別途、供給される場合もある。これらの媒介物としては、結合パートナーなどに関連して上記で説明したような受容体、抗体、抗原、結合分子、ホルモン受容体、オリゴヌクレオチド、糖またはアプタマーが挙げられる。

20

【0035】

検出可能な粒子は、生物粒子であってもよいし、または非生物粒子であってもよく、分析されるサンプルの外部のものであってもよいし、またはサンプル内に天然に存在するものであってもよい。「検出可能な」とは、凝集の存在または不在下、任意の適する手段を使用して、多孔質担体中のその存在および/または位置を決定できることを意味する。好ましくは、上記粒子は、本質的に検出可能なものであり、すなわち、その検出は、外的因子に対するその作用ではなくその粒子の固有の特徴（例えば色）に基づく。従って、上記検出可能な粒子は、流速または吸光度などの凝集の外的因子を測定または評価することを必要とせず、凝集の存在および位置を観察できるようにする。検出は、例えば、視覚的にもしくは比色的に、または他の任意の適する方法によって行うことができる。検出可能な粒子の例としては、微生物、細胞（例えば、赤血球）、高分子、金属ゾル粒子（例えば、金または銀）、ビーズ、（好ましくは、ポリスチレンラテックス）、木炭、カオリナイト、またはベントナイトが挙げられる。粒子が生物粒子であり、サンプルにとって外部のものである場合には、それは、任意の適する供給源から得ることができ、場合によっては、使用前に任意の必要な前処理、例えば洗浄、固定、保存処理に付してもよい。赤血球の場合、これらは、任意の適する供給源、好ましくは、モルモットまたはシチメンチョウなどの動物から得ることができる。任意の適する方法を使用して、赤血球を抗体でコーティングしてもよいし、および/または保存もしくは固定してもよい。粒子の検出を可能にする「標識」は、その粒子のもともと備わっている部分である場合もあり、または本明細書において説明する方法を使用して凝集性粒子に付着させることもできる。好ましくは、全血アッセイのための検出可能な粒子は、サンプルに内在する赤血球（例えばクエン酸添加により、凝集を防止するように適切に処理されたもの）である。

30

40

【0036】

好ましくは、検出可能な粒子は、凝集性でもあり、これは、それが他の（好ましくは、類似したまたは同一の）検出可能な粒子と共に凝集するか、凝集物を形成することを意味する。検出可能な粒子の凝集する能力は、より大きな凝集物の形成を可能にし、この凝集物は好ましくは2つ以上のハブを含み、従って、検出しやすくし、安定性を増大させる。

【0037】

本発明の試薬の使用による凝集複合体の安定性向上に鑑みて、本発明の第一の実施形態は、毛細管装置内での反応の実施である。それぞれの試薬は、装置内の1箇所以上の所定

50

の位置に配置することができ、また一方では、それらの試薬は、同じ位置に配置することが好ましい場合もあり、または別の位置で適用することが好ましい場合もある。後者の場合、ハブはコンジュゲートの上流にあることが好ましい。

【0038】

分析物が存在する場合、凝集が発生して、経路に沿った流体の流れの停止または流速の低下をもたらす。これは、流体が設定点に到達するためにかかる時間、または設定時間内に流体が移動する距離によって検出することができる。設定点における流体の存在は、任意の手段によって検出することができ、それらの手段としては、流れ、集塊形成、色の変化などの視覚的検出；光学的手段、例えば、反射率計、光散乱の測定；流体検出；濁度分析；電気的手段および比濁分析が挙げられるが、これらに限定されない。非視覚的検出手段が好ましく、これは、検出領域におけるサンプルの存在または不在が、裸眼以外の手段によって決定されることを意味する。これは、人為ミスの影響を減少させ、また、ポイントオブケア環境において、使用者がアッセイを実施している間、モニターし続ける必要がないことを意味する。さらに、結果は不変であり、安定している。好ましい検出手段としては、電子光学的検出手段が挙げられ、電子光学的検出手段は例えば光依存性ダイオード(LDD)または感光性レジスタのアレイを含んでもよい。アッセイによって判定される分析物に依存して、一定の感光性要素(すなわち、サンプルの流れが停止されていない毛細管の検出領域におけるもの)が受光することは、理解される。電子光学的検出装置には、その電子光学的検出装置によって提供される特定のシグナルから分析物を決定することができるソフトウェアが付随する。

10

20

【0039】

好都合には、好ましい電子光学的検出装置は、(光の反射とは対照的に)光の透過によりバーコードを読み取るために使用されるタイプのものである。そのような実施形態において、反応装置の所定の領域(検出領域)は光学的に透明であり得、そのため、その反応装置の片側に照明源を設け、その装置の反対側に電子光学的検出装置を設けることにより、検出領域におけるサンプルの存在またはそうでない状態を判定することができる。好都合には、上記反応装置は、光透過性材料(例えば、ポリカーボネート)から製造することができる。

【0040】

検出手段は、その装置が正しく機能していることを確認する手段として、検出領域に到達するサンプルの存在を検出するようにプログラムすることができる。言い替えると、サンプルが、毛細管経路、一般には対照毛細管の検出領域において検出されない場合には、新たな装置で試験を繰り返すことが必要となるように、その反応装置が正しく機能していないことを想定しなければならない。毛細管経路の上流領域に、これらの経路にサンプルが入ったことを保障するために、(さらにその装置が正しく機能していることを確認する手段として)サンプルを検出するための検出手段を含むことも好ましい。

30

【0041】

本発明のアッセイを行う反応装置は、上記で説明したように、レセプタクルであり、典型的には手持ち式である。好ましくは使い捨てタイプの装置であり、1回のアッセイを行うために使用され、その後、廃棄される。

40

【0042】

上記装置は、アッセイを行う1つ以上の毛細管経路を含むことができる。好ましくは、2つの毛細管経路が設けられ、一方はアッセイ経路であり、他方は対照経路である。しかし、単一のサンプルを多数の分析物について試験することが望まれる場合または必要である場合には、追加の経路を設けることができると考えられる。

【0043】

それぞれの毛細管経路は、上流および下流端部を有し、好ましくは、その上流端部にサンプル/試薬を受け取るためのゾーンまたはウエルを有する。このゾーンは、パッドを含むことができ、このパッドにサンプル/試薬が適用され、このパッドからそれらは毛細管経路に入る。パッドは、吸収性材料、好ましくは繊維状材料、例えばセルロースから形成

50

されるものであり得る。繊維パッドは、逆毛細管力を毛細管路に及ぼすことができ、パッド材料の選択は、毛細管路の寸法に依存する。これは、毛細管経路の寸法が毛細管力を決定するためである。あるいは、毛細管経路の入口の上記ゾーン内に逆止め弁を設けることができるので、そのゾーンに適用されるサンプル/試薬は、その弁を開くとその経路に入ることはできるが、出ることはできない。あるいは、ピペットまたは他の適する装置を使用して、その経路に液体を直接適用することができる。

【0044】

一部の既知の毛細管に基づく凝集アッセイ、例えばW004/083859の場合のように、上記経路は、その経路の所定の地点に凝集試薬を含むことができる。好ましくは、これは、サンプルと接触する装置の任意の部分であり、従って、上記ゾーンまたは毛細管経路の全てまたは一部、好ましくは、流体を検出すべき任意の地点の上流であり得る。全ての試薬を混合し、その毛細管の1つ以上の地点に配置してもよいし、または異なる地点に別々に配置してもよい。分析物が存在する場合、流体が最も下流の試薬に到達すると、流れの遅延が始まる。一般に、毛細管経路に沿った流速は、隣接した毛細管経路内の対照サンプルに対して測定され、対照サンプルは、(例えば、分析物が不在であるため)凝集することができない。

【0045】

別の方法では、試薬は、毛細管経路の上流端部に、サンプルと同じ場所に、サンプルと共にまたはサンプルの前に添加することができる。試薬は、あらかじめ混合してもよいし、別々に添加してもよい。ハブを含む試薬は、コンジュゲートを含む試薬の上流の毛細管内に配置するほうが好ましい。分析物が存在するかどうかを判定するために、標準物質と比較した流速の変化をモニターする。

【0046】

反応装置の経路は、好ましくは毛細管である。それは、任意の適する材料、好ましくは、その反応装置の残りの部分と同じもの、例えば、任意選択的に透明な、ポリカーボネート、ポリスチレンまたは射出成形プラスチックで製造することができる。毛細管経路は、好ましくは、その装置の表面に上部が開いた流路として形成され、好ましくは本来親水性である膜の(例えば、ポリエステルの)固定、またはシールによって閉じられている。これは、任意の適切な手段、例えば、親水性接着剤、最も好ましくは、「ガス放出」または「クリープ」しないもの、によってその装置の本体に取り付けられる。好ましく使用されるいずれの手段も、タンパク質を変性させる成分(例えば、シアン化物)を含有せず、さもなければその装置の機能は損なわれる場合がある。装置を成形するプラスチック材料は、疎水性であってもよく、任意選択的に、毛細管経路は、例えば0.1~10%のTween 20中での洗浄により、製造中に親水性試薬で処理される。その後、凝集試薬および他の試薬をその上部が開いている経路に供給することができる。

【0047】

この反応装置は、検出手段および/または検出手段によってもたらされるシグナルを翻訳する手段を含むことができる。典型的には、これらは、表示するための結果を処理するシグナル処理手段と表示手段とを含む。従って、試験、シグナル処理および表示に必要な全ての手段を含む一体型装置を提供することができる。あるいは、シグナル処理手段および/または表示手段、ならびに任意選択的に、本明細書において反応領域と定義する反応装置内の所定の位置におけるサンプルの存在または不在を判定するための検出手段を含む、別の読取装置を備えることができる。従って、この反応装置は、廃棄を必要とする一方で、シグナル処理/表示装置を再使用することができる。これは、アッセイのコストと廃棄物の両方を減少させる。

【0048】

別の読取装置を備える場合、それは、それぞれの検出手段からの結果を得ることができ、分析することができる方法で、任意の適切な手段により、反応装置に脱着可能および動作可能に取り付けることができる。好ましくは、反応装置は、アッセイを実施する際、読取装置と反応装置が一時的に一体型装置になるように、読取装置内に脱着自在に搭載する

10

20

30

40

50

ことができる。従って、上記読取装置および/または反応装置は、検出装置を搭載するとき、好ましくは接触によって、反応装置内の検出領域と通信することができる手段を含むか、または通信できるように配置される。絶対必要なことではないが、反応装置および読取装置の一方または両方に対して、これらの手段は、例えば固定メカニズムまたはロックメカニズムにより、それらの構成要素の係合を可能にすることができる。単純な実施形態において、それらの手段は、読取装置での連動ステップでユニットの位置決めするための構成（例えば、ステップ構成）を試験装置において構成する。

【0049】

検出手段を反応装置の一部として設ける場合、それらは、1箇所以上の適する所定の位置に存在することができる。毛細管に基づく反応装置では、上記で説明したように、アッセイにおいて使用される検出方法に適する検出手段を、それぞれの毛細管経路に設けることができる。検出手段は、毛細管経路に沿って1箇所以上の位置に、および1つの経路の少なくとも1つの下流領域に設けることができるので、毛細管に沿って流速を測定することによりサンプル中の分析物に関する定量結果が得られる。従って、サンプル中の分析物の量が多いほど、凝集反応は強くなり、経路に沿った流速は遅くなる。経路に沿って2つ以上の検出手段を設け、サンプルがそれぞれに到達するためにかかる時間を測定することにより、流速を決定することができる。分析物の量の概算は、その流速を校正チャートと比較することによって行うことができる。

【0050】

検出手段は、検出領域内に存在する任意の液体の存在または不在を検出する。この液体は、典型的に、本明細書中で説明するような試薬および/またはサンプルであるが、対照を目的としてまたはその装置の操作性を判定するために使用される他の試験液を含むことができる。

【0051】

検出手段は、毛細管経路内の検出領域の1つ以上と通信して、液体の存在または不在を判定する。それぞれの検出領域についてイエス/ノーの形で得られる結果は、電子的手段によって分析物の存在および/または量に翻訳されるパターンを形成する。毛細管経路の長さは、その経路の断面積ならびにサンプルおよび試薬の性質および流速などの要因と併せて、凝集反応のタイムスケールに左右される。分析物が存在する場合、それは、凝集反応が発生するための時間的余裕を与えるために少なくとも十分な長さを有さなければならない。典型的に、その経路の長さは、30~500mm、さらに好ましくは35~45cmの範囲である。毛細管経路は、製造基準および流量基準に基づいて任意の断面、例えば、円形、方形または三角形を有することができる。これらの経路は、断面が一辺50から1000μmの長さの正三角形の形であってもよい。

【0052】

便宜上、上記経路は、必ずしも線状でなくてよく、反応装置のサイズおよび形状に合う任意の形をとることができる。従って、上記経路は、その長さに沿って一連の屈曲部または湾曲部を呈することができる。試薬/サンプルの流れを可能にする任意の形が許容されるが、好ましい形は、180度の屈曲部によって接続された一連の平行線状経路を含む。2つ以上の経路が設けられる場合、これらは、その流れを容易に視覚的にモニターすることができるように互いに並んで平行に続いている場合もあり、またはその装置上に別の構成物として備えられる場合もある。

【0053】

毛細管経路に沿った試薬/サンプルの流れを促進するために、または反応の容積を増加させるため、もしくは前に述べたような電解質などの追加の試薬を供給するために、流体を供給することができる。緩衝液を試薬/サンプルと一緒に、または別途に（反応開始後（追跡緩衝液（chase buffer））を含む）、添加することができる。適する流体としては、PBS pH7.4および生理食塩水などの緩衝液が挙げられる。

【0054】

アッセイ液が、導電性でない場合、検出手段の上流で電解質を添加してもよい。これは

10

20

30

40

50

、溶解するとその液体を導電性になるようにさせる固体であってもよく、または例えば緩衝液の形態で、予め溶解しておいてもよい。

【0055】

シグナル処理および表示手段に、電源または電源に接続するための手段を任意選択的に設けることができる。電源は、W004/85389に記載されているような、適用によって起動されるものであってもよい。あるいは、電源は、従来のバッテリーであってもよい。

【0056】

シグナル処理手段は、反応装置内の検出手段からの結果を、表示手段上の読み取り可能な出力に変換することができる。好ましくは、シグナル処理手段は、試験中、適切な時点で起動されるタイマーも含む。従って、反応装置と接続すると、シグナル処理手段は、検出装置と通信して、その結果をデジタルまたは他のシグナルに変換する。その後、このシグナルを表示装置に送信し、その表示装置が、読み取り可能な形式でそのシグナルを提示する。これは、言葉もしくは記号形式でのイエス/ノータイプの結果である場合もあり、または存在する分析物の量を示す値を提供する定量的結果である場合もある。後者の場合、好ましくは、その結果のさらなる翻訳が必要ないような数値が提供される。好ましくは、この装置は、PCT出願第PCT/GB2005/004166号に記載されているような装置である。

【0057】

第二の実施形態において、本発明のアッセイは膜に基づくものであり、このことは、試薬が多孔質担体上に導入され、その担体の中で任意の凝集反応が発生することを意味する。

【0058】

好ましくは、ハブおよび検出可能な粒子は異なる存在であり、好ましくは、異なる材料または試薬から形成される。

【0059】

本発明の利点として、一般にサンプルおよび試薬を別々に、決められた順序で適用するように限定されている当分野のラテラルフローアッセイとは異なり、試薬およびサンプルを任意の順序および任意の組み合わせで多孔質担体に適用することができ、決められた地点での試薬の固定化を必要としない。アッセイ開始前、任意の1つ以上の試薬および/またはサンプルを、別の容器（例えば、毛細管もしくはウエル）で、または多孔質担体それ自体の中で（例えば、凝集粒子および非凝集粒子が自由に移動できる大きな細孔を有する多孔質担体の一定領域内で）、混合することができる。特に、アッセイ前にハブ、第二結合パートナーおよび/または検出可能な粒子を混合することが好ましい場合がある。任意の混合物を、多孔質担体に適用する前に短期間、例えば、1～6分、好ましくは2～5分、インキュベートしてもよい。

【0060】

本発明のアッセイは、様々な形式で行うことができる。

【0061】

「オフライン」形式では、試薬およびサンプルを互いに反応させた後、凝集粒子と非凝集粒子を分離するために多孔質担体に導入することができる。あるいは、試薬およびサンプルを多孔質担体に別々に適用することができ、またはその担体内で反応が発生するように一緒に適用することができる。「湿式」形式では、試薬およびサンプルを、アッセイ開始時または直前に、多孔質担体に適用する。あるいは、アッセイは、「乾式」であってもよく、この場合、例えば湿潤によって再び活性化されるまで多孔質担体内での自由な移動を防止する様式で1つ以上の試薬を多孔質担体に予め適用する。好ましくは、任意の予め適用された試薬は、サンプルまたは他の流体が多孔質担体を通過する際に、サンプルまたは他の流体によって再構築される。

【0062】

従って、第二の態様に関連して上で詳述したように、本発明の装置は、ハブ、第二結合

10

20

30

40

50

パートナー、検出可能な粒子、および/または他の試薬が予め適用された多孔質担体を、好ましくは乾燥された再構成可能な形態で含むことができる。そのような試薬は、多孔質担体中の同じ場所または異なる場所に、一緒にまたは別々に適用することができる。多孔質担体に予め適用することにより、先行技術の不利益を回避することができる。なぜなら、(i) その位置が正確である必要がない(読み取りを可能にし、ぼやけた、または不明瞭な結果を回避するために正確な位置にあることが重要である、従来のラテラルフローアッセイでの固定化された捕捉ラインと比較して)、および(ii) 既知のラテラルフローアッセイでは、固定化された捕捉ラインおよび標識抗体を別の位置で適用しなければならず、適用器具の2回の通過、またはより複雑な機械を必要とするからである。本発明では試薬を前もって混合できるので、1回の適用しか必要ない。多孔質担体に試薬を予め適用する方法は、当分野において周知であり、それらの方法には、乾燥(drying)、完全乾燥(desiccating)、空気乾燥、真空乾燥、凍結乾燥が挙げられる。典型的に、これは、膜への試薬の適用と、その後、25~30の温度範囲での乾燥を18時間まで必要とするだろう。

【0063】

従って、試薬およびサンプルそれぞれを同時にまたは連続的に、および任意の組み合わせで、添加することができる。連続的に適用するとき、試薬の後にサンプルを添加すること、さらに好ましくはハブの後に第二結合パートナーを添加することが好ましい場合がある。

【0064】

任意の試薬、特に、予め適用される試薬は、多孔質内の1箇所以上の所定の位置に配置することができ、また一方では、2つ以上の試薬を同じ位置に配置するほうが好ましい場合もあり、またはそれらを別々の位置に適用することが好ましい場合もある。後者の場合、ハブは、第二結合パートナーの上流にあることが好ましい。

【0065】

試薬および/またはサンプルは、任意の適する手段を使用して、例えば、1つ以上の試薬および/もしくはサンプルが入っている容器の中に多孔質担体を配置することにより、または試薬および/もしくはサンプルを担体上にピペットで直接添加することにより、多孔質担体に適用することができる。単一のアッセイにおいて、適用方法の任意の組み合わせを用いてもよい。

【0066】

サンプル中に分析物が存在する場合、試薬の凝集が発生する。アッセイ中に形成されるいずれの凝集物も、膜内の所定の部位(検出ゾーン)で移動が防止または低減されるまで、多孔質担体に沿ってその遠位端部の方へと流れて行く。典型的にこれは、凝集物を補正するための手段、例えば、細孔径の縮小、または予め固定された特定の結合試薬に依存しない当業者に公知の任意の他の適する手段の存在に起因する。従って、分析物が存在する場合、凝集物は、検出ゾーンのその部位に蓄積するため、検出することができる。好ましくは、凝集の検出は、例えばクロマトグラフ手段を使用して、凝集物を捕捉することにより達成される。従って、本発明が機能するには、その検出に固有の強い剪断力が凝集物を破壊しないように強い凝集反応を構成する必要がある。本発明ではハブの使用によりこれを達成できる。

【0067】

反応装置の経路は、多孔質担体であり、これは、試薬および流体を通すことができる任意の適する材料である。好ましくは、それは、固体マトリックスであり、好ましくは繊維状のものである。それは、好ましくは可撓性でもあり、他の多孔質材料または無孔質材料に結合することもでき、シグナルの視覚化を可能にし、好ましくは吸水性であり、従って、毛細管現象によってそれを通る流体の移動を促進する。適する材料としては、紙、ガラス繊維、多孔質プラスチック、焼結ガラスもしくはプラスチック、セルロース粒子、ニトロセルロース、アガロースもしくは他のポリマーのゲル、あるいは不織材料、例えば布、ナイロンもしくは他のポリマーメッシュ材料、または他の繊維状材料(天然または合成材

10

20

30

40

50

料から製造されたもの)が挙げられる。

【0068】

担体の細孔径は、例えば、凝集物を捕捉できるように、単一のストリップ中でも異なる場合がある。好ましくは、任意の検出ゾーンの上流の担体の細孔径は、試薬、サンプルおよび凝集物が自由に移動できるように十分な径である。検出ゾーンでの細孔径を縮小して、担体に沿った凝集物のさらなる移動を防止し、従って、その検出を可能にすることができる。従って、検出ゾーンでの細孔径は、検出すべき分析物が存在する場合に特異的に形成し得る任意の凝集物より小さいが、任意の非凝集試薬またはサンプルが自由に移動できる十分な大きさのものであり得る。これは、使用されるハブ、分析物および結合パートナーの性質などの要因に依存して明らかに変化し得る。

10

【0069】

多孔質担体の全てまたは一部を、その担体に試薬および/またはサンプルが非特異的に結合するのを防止または低減する物質で前処理してもよい。適する物質としては、界面活性剤(例えば、Tween 20(商標)、Triton X-100(商標)またはドデシル硫酸ナトリウム(SDS))、担体タンパク質(例えば、ウシ血清アルブミン)、糖(例えば、スクロース、トレハロースなど)などが挙げられる。これらは、好ましくはアッセイの前に、担体に添加してもよいし、または1つ以上の試薬およびサンプルに添加してもよい。

【0070】

多孔質担体は、行われるアッセイの性質に合わせた任意の適するサイズおよび形状であり得る。好ましくは、担体は、試薬およびサンプルが適用される近位端部とそれらが流れてくる場合がある遠位端部とを有するストリップの形態であり得る。担体のサイズは、典型的に、適用されるアッセイの性質およびサンプルのサイズの性質、ならびにアッセイの所望の継続時間に依存する。担体の厚さは、好ましくは、任意の視覚的シグナルが検出可能であり、それらが担体に「埋もれた」状態にならないような厚さである。好ましくは、担体の寸法は、ポイントオブケアのために、手持ち式装置の中に備えることができるような寸法である。従って、担体がストリップである場合、それは、好ましくは、約20mm以下の幅、好ましくは約1.0mmから12mmの幅、さらに好ましくは約3.0mmから8.0mmの幅、および最も好ましくは5mmの幅であり得る。担体の長さは、担体の断面積ならびにサンプルおよび試薬の性質および流速などの要因と併せて、凝集反応のタイムスケールに左右され得る。それは、分析物が存在する場合、凝集反応が発生するための時間的余裕を与えるために少なくとも十分な長さを有さなければならない。分離/検出ゾーンの前の部分を延ばすことによって反応時間(従って、潜在感度)を増すことができ、ストリップを短くすることによってアッセイを加速することができる。その長さは、一般に、約2.0cmから40cmの長さ、好ましくは4.0cmから25cmの長さ、さらに好ましくは約6.0cmから20cmの長さ、および最も好ましくは6cmから15cmの長さであり得る。

20

30

【0071】

必要な場合、アッセイの速度は、粘度を変える物質、例えばデンプン、メチルセルロース、ポリエチレングリコール、アルブミンなどによって調整することができる。

40

【0072】

本発明の多孔質担体は、本明細書で説明するような異なるゾーンを含む場合がある。例えば、これらのゾーンとしては、試薬およびサンプルを担体に適用することができる適用ゾーン、任意の凝集物を検出する上記適用ゾーンの下流の検出ゾーン、および/または1つ以上の試薬が予め適用されているゾーン(これは、適用ゾーンの下流だが、検出ゾーンの上流にあるだろう)を挙げることができる。好ましくは、それぞれのゾーンは、物理的に別個の部分である。これらのゾーンは、全てが単一の連続した担体から形成される場合もあり、または流体的に接続されている(fluidly connected)、それぞれの目的に適した、物理的に別個の担体から形成される場合もある。後者の場合、それらの物理的に別個の担体は、担体の長さ方向に沿って配置される場合もあり、または層の

50

形態で、積層される場合もあり、好ましくは小さな重なりを有し、好ましくはほぼ1mmの重なりを有する。好ましくは、適用ゾーン（または試薬放出パッド）は、材料の支持体としての機能を果し、任意の適する材料から形成され得、この材料は好ましくは0.05μmから500μm、さらに好ましくは0.1μmから100μm、および最も好ましくは0.2μmから30μmの細孔径を有する。検出ゾーンの捕捉膜は、適用ゾーンと比較すると縮小された細孔径を有するが、類似の材料のものであり得る。担体は、毛細管現象によって多孔質担体を通して流体を取り出すために役立つ芯（wick）またはシンクを検出ゾーンの上流に含む場合もある。

【0073】

多孔質担体の汚染または試薬の漏れを防止するために、好ましくは、その少なくとも片側、好ましくは両側を防水シールでコーティングする。視覚的手段による凝集物の検出を可能にするために、好ましくはそのシールは透明である。さらに好ましくは、それは担体に、その性質に支障をきたすことなく、付着させることができる。好ましいシールとしては、プラスチック積層コーティングが挙げられ、好ましくは自己粘着性である。

10

【0074】

剛性をもたらすために、好ましくは、多孔質担体を固体の、無孔質の支持体に搭載する。その担体の機能の性質に支障をきたさない、任意の適切に支持する材料を使用することができる。適する支持材料としては、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（4-メチルブテン）、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ（エチレンテレフタレート）、ナイロン、ポリ（ビニルブチレート）、ガラス、セラミックス、金属などが挙げられる。

20

【0075】

好ましくは、特に本発明が、非当業者による使用を意図したものである場合には、多孔質担体を装置またはレセプタクル（これは、好ましくは手持ち式である）に収容することができる。この装置は、好ましくは、担体を全面から囲うが、試薬/サンプルを担体に適用することができ、任意の凝集を目で見えるようにすることができる。従って、好ましくは、上記装置は、少なくとも1つ、好ましくは2つ以上の開口部を含み、それによって、検出ゾーンを目で見えるようにすることができ、適用ゾーンにおいて担体を露出させることができる。一部の好ましい実施形態において、担体は、適用ゾーンでその装置から伸長することができ、そのようにして試薬/サンプルの適用を促進することができる。この装置は、適用ゾーンと流体連絡している、ウエルまたは他のサンプル受け容器を含む場合もある。あるいは、この装置は、別の容器との係合を可能にする手段を含む場合がある。

30

【0076】

上記装置は、任意の適する材料、好ましくは、剛性、耐水性、不透過性、軽量であり、および/またはタンパク質を変性させる成分（例えばシアン化物）を含有しない（さもなければその装置の機能は損なわれる場合がある）材料で製造することができる。好ましくは、上記装置は、プラスチック材料で製造される。好ましくは、上記装置は、1回のアッセイを行うために使用し、その後、廃棄するような使い捨てタイプの装置である。

【0077】

上記装置は、例えば単一の装置で多数の分析物を試験することが望まれる場合、アッセイを行う1つ以上の多孔質担体を含むことができる。2つ以上の担体を備える場合、これらは、互いに並んで平行に並んでいてもよく、それにより、その流れを容易に視覚的にモニターすることができ、または共通サンプル適用ゾーンなどから容易に配置される。1つ以上の追加の担体を対照経路として設けることができる。

40

【0078】

好ましくは、検出は、検出可能な粒子を含有する凝集物の蓄積に起因する、検出ゾーンでのバンドまたはシグナルの視覚化による（すなわち、裸眼による）。これは、結果を迅速に読み取ることができ、ならびに読取装置およびシグナル処理手段などの補助装置の必要をなくす。非視覚的検出手段も使用することができ、それらとしては、分光光度法、蛍光定量法などが挙げられる。後者は、人為ミスの影響を減少させ、また、ポイントオブケア環境において、使用者がアッセイを行っている間、モニターし続ける必要がないことを

50

意味する。さらに、結果は、不変であり、安定している。

【0079】

非視覚的検出方法を使用する場合には、検出装置（例えば、反射率計、蛍光計など）およびシグナル処理手段が必要であり得る。

【0080】

視覚的検出手段を使用する場合、結果は、（例えば、検出ゾーンにおいて線の形で、好ましくは裸眼で見える）着色シグナルとして与えることができる。そのシグナルの性質は、当然のことながら、使用される標識および/または検出可能な粒子に依存する。イエス/ノー表示を与えるばかりでなく、シグナルの強度またはサイズを利用して、例えば読取装置（任意の関連シグナル処理手段を備える電子的または非電子的な読み取り装置）を使用することによりまたは、より簡単には、較正チャートを参照することにより、それらの結果を定量することができる。適する方法としては、シグナルの反射率もしくは吸光度の測定、または較正チャート（例えば、任意の所定の色についての強度の範囲を与え、存在する分析物の量に従って等級付けすることができるカラーチャート）とシグナルの比較が挙げられる。

10

【0081】

多孔質担体に沿った試薬/サンプルの流れを促進するために、または反応容積を増加させるためもしくは電解質などの追加の試薬を供給するために、流体を供給することができる。緩衝液は、試薬/サンプルと一緒に、または反応開始後を含む（チェイス緩衝液）別途に、添加することができる。適する流体としては、PBS pH 7.4 および生理食塩水などの緩衝液が挙げられる。

20

【0082】

従って、本発明は、サンプル中の分析物を検出するために凝集アッセイを行うためのキットを提供し、このキットは、

i. 2つ以上の第一結合パートナーが結合しているハブであって、それぞれの第一結合パートナーが分析物の第一エピトープに結合することができるハブと、

ii. 第二エピトープに結合している、または結合することができる第二結合パートナーを含む部分であって、検出可能な粒子にも結合している、または結合することができる部分と

を含む。

30

【0083】

本発明の一つの実施形態において、上記第二結合パートナーを含む部分は、検出可能な粒子に結合することができる第三結合パートナーをさらに含む。好ましくは、上記部分は、分析物の第二エピトープと、検出可能な粒子に結合することができる第三結合パートナーとの両方に結合することができる第二結合パートナーのコンジュゲートからなる。1つの好ましい実施形態において、上記第二結合パートナーおよび第三結合パートナーは、修飾抗体またはそれらの機能的抗原結合フラグメントである。

【0084】

別の実施形態において、第二結合パートナーは、検出可能な粒子に直接結合しているか、直接結合することができる。従って、この場合のキットは、

40

i) 2つ以上の第一結合パートナーが結合しているハブであって、それぞれの第一結合パートナーが、分析物の第一エピトープに結合することができるハブと、

ii) 分析物の第二エピトープに結合することができ、検出可能な粒子に結合しているか、検出可能な粒子に結合することができる第二結合パートナーとを含む。

【0085】

好ましい実施形態において、分析物の第一エピトープと第二エピトープは異なり、さらに好ましくは、それら複数のエピトープは、分析物の異なるドメイン上に存在する。第二結合パートナーが、対応する第一結合パートナーがターゲットにするエピトープとは異なる分析物上のエピトープに結合することも好ましい。好ましくは、第二エピトープは、分

50

析物に特異的である。

【0086】

第一の非常に好ましい実施形態において、キットは、ラテラルフロー形式であり、多孔質担体を含む。上記多孔質担体が、固体マトリックス、最も好ましくは繊維状マトリックスであることは、さらに好ましい。有利には、上記多孔質担体は検出ゾーンを有し、上記検出ゾーンは、上記検出ゾーンの下流への凝集物の移動を防止する細孔径を有する。好ましくは、上記検出ゾーンの上流の細孔径は、ハブ、第二結合パートナー、サンプルおよび任意の凝集物が自由に移動できるように十分な径である。

【0087】

好ましくは、キットは、単一サンプル中の第一、第二およびさらなる分析物のためのものであり、キットは、2つ以上の第一結合パートナーであって、それぞれが、第一、第二およびさらなる分析物のうちの1つに結合することができる第一結合パートナーと、2つ以上の第二結合パートナーであって、それぞれが、上記第一、第二およびさらなる分析物のうちの1つに結合することができ、それぞれの第二結合パートナーは、検出可能な粒子に結合しているか、結合することができる第二結合パートナーとを含む。さらに好ましくは、それぞれの第二結合パートナーは、異なる検出可能な粒子に結合しているか、結合することができる。

10

【0088】

上述のハブが、第一結合パートナーを付着させることができる安定な担体を含むことが好ましく、非常に好ましい実施形態では、ハブは可溶性である。さらに好ましくは、ハブは、タンパク質または多糖類であり、最も好ましくは、アミノデキストランまたはその誘導体を含む。

20

【0089】

あるいは、ハブは、不溶性部分、好ましくは、赤血球、ポリスチレンラテックスビーズ、金ゾルまたは不溶性高分子である。

【0090】

上述の結合パートナーは、モノクローナルまたはポリクローナル抗体、抗原、タンパク質、酵素、受容体、アプタマー、オリゴヌクレオチド、糖、およびこれらのフラグメントから選択される。

【0091】

検出可能な粒子が凝集性分子であることが非常に好ましく、上記凝集性粒子をキットに含むことがさらに好ましい。このキットの一つの好ましい実施形態において、分析物の1つのエピトープに結合することができる第二結合パートナーを含む部分は、凝集性粒子、好ましくは赤血球上のグリコホリン分子に結合することができる第三結合パートナーも含む。

30

【0092】

あるいは、上記検出可能な粒子は、微生物、細胞、高分子、金属ゾル粒子、ビーズ、木炭、カオリナイトまたはベントナイトである。好ましくは、それは金ゾル粒子である。

【0093】

別の実施形態において、このキットは、反応装置をさらに含む。好ましくは、上記反応装置は、毛細管試験装置であり、さらに好ましくは、2つの経路を含む。それぞれの経路が、上流端部および下流端部を含むことはさらに好ましく、この場合、試薬のサンプルの適用のためのゾーンが上流端部に設けられる。複数の試薬の一方または両方を、その毛細管装置の経路に、この装置の製造中に予め適用することができる。

40

【0094】

このキットは、検出手段と、シグナル処理手段と、表示手段と、電源とのうちの1つ以上をさらに含むことができ、それらは、反応装置の一体化部分であり得る。

【0095】

本発明のさらなる態様において、上記で説明したようにサンプルをハブおよびコンジュゲート結合分子に接触させ、流れの遅延を検出するアッセイ方法を提供する。試薬のセッ

50

トを毛細管経路内に予め付着させて乾燥しない場合、それらは、混合物として、または別々に、反応装置に適用することができる。前者の場合、混合物は、その混合物を毛細管経路に適用する前に、短期間、例えば、1～6分、好ましくは2～5分間、インキュベートしてもよい。チェイス緩衝液を使用する場合、これは、さらなる短い間隔をおいた後、例えば2分後、適用することができる。流速を決定する目的での反応の計時は、好ましくは、緩衝液の適用と同時に開始される。所定の期間が経過した後、任意の凝集反応が発生したと推定され、任意の対照は、毛細管経路の下流の端部に達している。この時点で、表示手段での読取値を得ることができる。

【0096】

従って、サンプル中の分析物を検出するための凝集アッセイを提供し、このアッセイは

10

i . a) 2つ以上の第一結合パートナーが結合しているハブであって、それぞれの第一結合パートナーが、分析物の第一エピトープに結合することができるハブと

b) 分析物の第二エピトープに結合することができる第二結合パートナーを含む部分であって、凝集性粒子に結合しているか結合することができる部分と、

c) 検出可能な粒子と

を、サンプルと接触させるステップと、

i i . 上記ハブと、第二結合パートナーを含む部分と、サンプルと、検出可能な粒子とを反応させるステップと、

i i i . 上記ハブと、コンジュゲートと、凝集性粒子と、分析物との凝集を検出するステップとを含む。

20

【0097】

好ましくは、第二エピトープに結合することができる部分は、検出可能な粒子に結合している。あるいは、それは、第二結合パートナーを含み、検出可能な粒子に結合することができる第三結合パートナーをさらに含む。この場合、好ましくは、それは上記第二結合パートナーと第三結合パートナーのコンジュゲートを含む。

【0098】

一つの実施形態において、上記凝集性粒子は、サンプル中に天然に存在し、好ましくは赤血球である。上記試薬およびサンプルは、混合した後、反応装置に適用することができる、そして所定の時間後、緩衝液を適用することができる。結果が表示手段によって示されることも好ましく、所定の時間後、読み取ることができる。

30

【0099】

一つの例示される実施形態において、本発明は、サンプル中の分析物を検出するための凝集アッセイを提供し、このアッセイは、

i . 2つ以上の第一結合パートナーと結合しているハブであって、それぞれの第一結合パートナーは、分析物の第一エピトープと結合することができるハブ；および、分析物の第二エピトープに結合することができる、検出可能な粒子に結合しているか結合することができる第二結合パートナー；および、サンプル；および/または、任意選択的に、検出可能な粒子を多孔質担体と接触させるステップと、

i i . 上記ハブ、第二結合パートナー、サンプル、および任意選択的に上記検出可能な粒子を反応させるステップと、

40

i i i . 多孔質担体内の上記ハブと、第二結合パートナーと、分析物との凝集を検出するステップであって、凝集はそのサンプル中の分析物の存在および/または量を示すステップとを含む。

【0100】

好ましくは、上記ハブ、第二結合パートナー、サンプルおよび/または検出可能な粒子を多孔質担体に適用した後、アッセイを開始する。凝集の検出がバンドまたはシグナルの視覚化によることは、非常に好ましい。

【0101】

本発明の第三の態様では、凝集アッセイのための装置を提供し、これは、サンプルを受

50

け取るための近位端部と、サンプルが多孔質担体に沿って移動してくる遠位端部とを有し、上記多孔質担体は、2つ以上の第一結合パートナーが結合しているハブを乾燥された再構成可能な形態で含み、それぞれの第一結合パートナーは、分析物の第一エピトープに結合することができる。

【0102】

本発明のキットは、例えばポイントオブケア環境において使用するための、単一の反応装置と1回のアッセイのために十分な試薬とを含むことができるパッケージとして提供することができる。あるいは、複数の装置と、これと同数のアッセイのために十分な試薬とを備えることができる。好ましくは、この場合、それぞれのアッセイのための試薬は、個々にパッケージングされる。任意選択的に、上述した材料および器具、例えば、緩衝液、

10

【0103】

最後に、本発明は、サンプル中の分析物を検出するための凝集アッセイのための装置を提供し、この装置は、サンプルを受け取るための近位端部と、サンプルが多孔質担体に沿って移動してくる遠位端部とを含み、上記多孔質担体は、2つ以上の第一結合パートナーが結合しているハブを乾燥された再構成可能な形態で含み、それぞれの第一結合パートナーは、分析物の第一エピトープに結合することができる。

【0104】

好ましくは、上記装置は、多孔質担体に、好ましくは乾燥された再構成可能な形態で予め適用された第二結合パートナー、検出可能な粒子および/または他の試薬を含み、好ましくは手で持つことができる装置またはレセプタクルに収容されている。

20

【0105】

本発明は、体液サンプル、例えば尿、全血、血液画分（例えば、血漿）、精液、汗、唾液、羊水、脳脊髄液、胸膜液、歯肉滲出液、嚢胞抽出物および組織抽出物の試験に適する。尿および血液サンプルが好ましい。血液サンプルをアッセイする場合、凝固を防止するために血液を処理しなければならない。

【0106】

本明細書の説明および特許請求の範囲全体を通して、用語「含む (comprise)」および「含有する (contain)」ならびにこれらの語の変形、例えば「含んでいる (comprising)」および「含む (comprises)」は、「含む (include)」が、それらに限定されない」ことを意味し、他の部分、添加物、成分、整数またはステップを除外することを意図していない（除外しない）。

30

【0107】

本明細書の説明および特許請求の範囲全体を通して、単数形は、その文脈が別様に要求していない限り、複数形を包含する。特に、不定冠詞が使用されている場合、本明細書は、その文脈が別様に要求していない限り、単数形だけでなく複数形も意図されると理解しなければならない。

【0108】

本発明の特定の態様、実施形態または実施例に関連して記載されている特徴、整数、特性、化合物、化学的部分または基は、矛盾しない限り、本明細書に記載されているいずれの他の態様、実施形態または実施例にも適用できると理解しなければならない。

40

【0109】

添付図面を参照しながら、非限定的な一例として、本発明について以下に説明する。

【実施例1】

【0110】

[可溶性ハブ試薬1の調製]

(1) 1.6 x 15 cm G25M Sephadexカラムを使用して、0.1 Mのリン酸緩衝液 (pH 7.5) で抗hCG (サブユニット) を脱塩し、濃度および収率を決

50

定する。

(2) 8モル当量のNHS-PEG-MALを使用して、その抗hCG抗体を活性化させる。2時間、20℃でその反応混合物をインキュベートする。100モル当量のグリシンで反応を停止させ、1.6×15cm G50F Sephadexカラムを2回使用して5mMのEDTP、PBS緩衝液(pH7.3)でマレイミド活性化抗hCGを脱塩する。活性化抗体の濃度および収率を決定する。

(3) 1000モル当量の2-イミノチオラン(2-IT)を使用して、500kダルトンのアミノデキストランを活性化させる。110分間、20℃でその反応混合物をインキュベートする。G25M Sephadex媒体を使用して、5mMのEDTA、PBS緩衝液(pH7.3)でそのチオール活性化アミノデキストランを脱塩する。Ellman

10

のアッセイを使用して、チオール：アミノデキストランの配合比率を決定する。
(4) 25モル当量のマレイミド活性化抗hCG抗体をチオール活性化アミノデキストランに添加し、16時間、15℃でその反応混合物をインキュベートする。1000当量のN-エチルマレイミドでその反応混合物の反応を停止させる。50mMのPBS緩衝液(pH7.2)を溶離剤として使用して2.6×50cm Superdex 200PGカラムでそのコンジュゲートを精製する。コンジュゲートの濃度および収率を決定し、その後、0.2µmのMinisartフィルターによって濾過する。

【実施例2】

【0111】

[可溶性ハブ試薬2の調製]

20

(1) 1.6×15cm G25M Sephadexカラムを使用して、0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.5)で抗hCG(サブユニット)を脱塩し、濃度および収率を決定する。

(2) 8モル当量のNHS-PEG-MALを使用して、その抗hCG抗体を活性化させる。2時間、20℃でその反応混合物をインキュベートする。100モル当量のグリシンで反応を停止させ、1.6×15cm G50F Sephadexカラムを2回使用して5mMのEDTA、PBS緩衝液(pH7.3)でマレイミド活性化抗hCGを脱塩する。活性化抗体の濃度および収率を決定する。

(3) 1000モル当量の2-イミノチオラン(2-IT)を使用して、500kダルトンのアミノデキストランを活性化させる。110分間、20℃でその反応混合物をインキュベートする。G25M Sephadex媒質を使用して、5mMのEDTA、PBS緩衝液(pH7.3)でそのチオール活性化アミノデキストランを脱塩する。Ellman

30

のアッセイを使用して、チオール：アミノデキストランの配合比率を決定する。
(4) 25モル当量のマレイミド活性化抗hCG抗体をチオール活性化アミノデキストランに添加し、16時間、15℃でその反応混合物をインキュベートする。

(5) 8モル当量のmPEG-SMB(10kダルトン)を使用して、「PEG」基でそのコンジュゲートをコーティングする。2時間、20℃でその反応混合物をインキュベートする。グリシンおよびN-エチルマレイミドを使用して反応を停止させる。50mMのPBS緩衝液(pH7.2)を溶離剤として使用して2.6×50cm Superdex 200PGカラムでそのコンジュゲートを精製する。コンジュゲートの濃度および収率

40

【実施例3】

【0112】

[湿潤試薬を使用する試験のための膜ストリップの調製]

膜材料を次のとおりのサイズに切断した。

(i) 芯、例えば、Surewick G028-14(Millipore)、30mm×60mm。

(ii) 凝集物捕捉膜、例えば、Fusion 5(Whatman)、5mm×60mm。

(iii) 吸収シンク、例えば、Absorbent Pad 222(Ahlstro

50

m)、55mm×60mm。

(iv) 自己粘着性プラスチック(×2)

例えば、D/C親水性PSAを伴う0.04''透明ポリエステル(G&L)、70mm×100mm。

【0113】

上記の材料の複合「カード」を、図1に示すとおり組み立てた。隣接する膜材料を約1mm重ねて、ストリップの連続するセクション間の良好な流体移行性を確保した。その上面に、自己粘着性プラスチックの第二シートをしっかりと貼りつけた。得られた「カード」を5mmストリップに切り取り、そのプラスチックを、試薬およびサンプルがその芯に入ることができるようにトリミングした。

10

【実施例4】

【0114】

[乾燥試薬を含有する膜ストリップの調製]

以下の試薬混合物を、6mm×50mmの寸法の、コンジュゲート放出パッド(例えば、Ahlsstrom 8964)のストリップ上にピペットで添加した。

75µL 抗hCGイムノゴールド(B.A.bHCG40、BBI)

50µL 抗hCGハブ試薬(実施例1または2において説明したとおり調製される)

42µL 1MのTris-HCl(pH8.2)、20%トレハロース。

【0115】

そのストリップを一晩、28℃で乾燥させた。

20

【0116】

吸収シンク材料(GF/D、Whatman)を0.1%のTween 20の溶液に浸漬した。過剰な流体は、排出し、吸収性の紙の間に挟んで吸い取らせることによって除去し、その後、その処理したシンクを一晩、28℃で乾燥させた。

【0117】

膜材料を次のとおりのサイズに切断した。

(i) 芯(×2)、

例えば、コンジュゲート放出パッド8964(Ahlsstrom)、7mm×50mm

。

(ii) 凝集物捕捉膜、例えば、Fusion 5(Whatman)、5mm×50mm

30

(iii) 吸収シンク、例えば、Tweenで処理されたGF/D(Whatman)、50mm×50mm。

(iv) 自己粘着性プラスチック(×2)、

例えば、D/C親水性PSAを伴う0.04''透明プラスチック(G&L)、80mm×60mm。

【0118】

上記の材料の複合「カード」を、図2に示すとおり組み立てた。隣接する膜材料を約1mm重ねて、ストリップの連続するセクション間の良好な流体移行性を確保した。その上面に、自己粘着性プラスチックの第二シートをしっかりと貼りつけた。得られた「カード」を5mmストリップに切り取り、そのプラスチックを、サンプルがその芯に入ることができるように、トリミングした。

40

【実施例5】

【0119】

[湿潤試薬を使用するhCG試験]

次の試薬混合物を微量遠心管の中で併せ、その後、膜ストリップ(実施例3において説明したとおりに調製される)の芯端部に適用した。

5µL 抗hCGイムノゴールド(B.A.bHCG40、BBI)

5µL 抗hCGハブ試薬(実施例1において説明したとおりに調製される)。

【0120】

50

そのストリップの芯端部を、そのストリップを縦向きにして、0～25 IU/mLのhCG（hCG濃度の値は、第4のI.S.，NIBSCと対照して割り当てられた）を含有する250 μLの0.01 M PBS（pH7.4）、0.1% BSAに浸漬した。試験が完了した、すなわち、流体がそのストリップの頂部に達したとき、その凝集物捕捉膜での着色シグナルを標準カラーチャート（Dulux colour range FR4、50RR83/040-62RR21/444）と比較し、そのシグナルに、+/- から++++の尺度を割り当てた。デジタル写真を撮って、新たに実行した試験の様子を記録した。

【0121】

次の試験結果を得た。

【表1】

HCG 濃度 mIU/ml	シグナル
0	+/-
250	+
5000	+
25000	++

10

【実施例6】

【0122】

[乾燥試薬（ハブ試薬1）を使用するhCG試験]

乾燥試薬を含有する膜ストリップを、ハブ試薬1（実施例1参照）を使用して、実施例4において説明したとおり調製した。0～25 IU/mLのhCG（hCG濃度値は、第4のI.S.，NIBSCと対照して割り当てられた）を含有する模擬サンプル（合成尿）にそれぞれのストリップの芯端部を浸漬し、そのストリップを縦向きに進ませることによって、試験を行った。

20

【0123】

試験が完了したとき、すなわち、流体がそのストリップの頂部に達したとき、その凝集物捕捉膜での着色シグナルを標準カラーチャート（Dulux colour range FR4、50RR83/040-62RR21/444）と比較し、そのシグナルに、+/- から++++の尺度を割り当てた。デジタル写真を撮って、新たに実行した試験の様子を記録した。

30

【0124】

次の結果を得た。

【表2】

HCG 濃度 mIU/ml	シグナル
0	+/-
25	+
250	+
1000	++
5000	++
25000	+++

40

【実施例7】

【0125】

[乾燥試薬（ハブ試薬2）を使用するhCG試験]

乾燥試薬を含有する膜ストリップを、ハブ試薬2（実施例2参照）を使用して、実施例4において説明したとおり調製した。試験は、実施例6において説明したとおり行った。次の結果を得た。

【表 3】

HCG 濃度 mlU/ml	シグナル
0	+/-
25	+
250	+
1000	+++
5000	+++
25000	+++

【実施例 8】

10

【0126】

[hCG についての試験の概要]

イムノゴールドと抗hCGハブの試薬混合物を緩衝液/添加剤と前もって混合し、6mm x 50mmの寸法の試薬放出パッド(例えば、Ahlstrom 8964)のストリップ上にピペットで添加した。それらのストリップを、乾燥剤および湿度指示薬が入っている密封容器の中に置き、28℃で放置して乾燥させた。

【0127】

裁断機を使用して、試薬放出パッド、捕捉膜、積層シールおよび吸収シートのストリップを切断して所定の大きさにした。積層シールの糊面を上にして、隣接するストリップ構成要素と1mm重ねて膜カードを組み立てた(図2参照)。積層シールの第二片を使用して、それらの膜ストリップを完全に封止した。

20

【0128】

得られた膜カードを、吸収シートの周りの積層が開かないようにしながら、はさみで幅5mmのストリップに注意深く切断した。

【0129】

試験すべきhCG溶液(模擬尿サンプル)の250µLアリコート、マイクロタイタープレートにピペットで添加した。膜ストリップの試薬放出パッド端部を、そのストリップが縦に並んだ状態を維持しながら、hCG溶液に浸漬した。その溶液をその膜ストリップの先端まで進ませた。試験すべきそれぞれのhCG濃度について、このプロセスを繰り返した。シグナルを明瞭に見るために、使用した膜ストリップを一枚のWhatman 1濾紙の上に置いた。実施例5において説明したようにシグナル強度を割り当て、デジタル写真を撮った。その後、その濾紙を組織培養トレーの上に置き、28℃で放置して乾燥させた。

30

【実施例 9】

【0130】

(i) 抗hCG および抗グリコホリン抗体を、0.25M Sephadex 媒体を使用して、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)で脱塩した。

(ii) 8モル当量の4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SMCC)を抗グリコホリン抗体に添加し、その反応物を70分間、20℃でインキュベートした。100モル当量のグリシンを使用して反応を停止させ、マレイミド活性化抗グリコホリン抗体を、0.25M Sephadex 媒体を使用して5mMのEDTA、PBS緩衝液(pH6.5)で脱塩した。

40

(iii) 2.0モル当量のN-スクシンイミジルS-アセチルチオアセテート(SATA)を抗hCG抗体に添加し、その反応混合物を75分間、20℃でインキュベートした。50mMのEDTA、2.5Mのヒドロキシルアミン緩衝液(pH7.0)を使用して、反応を停止させた。そのチオール活性化抗hCG抗体を、0.25M Sephadex 媒体を使用して5mMのEDTA、PBS緩衝液(pH6.5)で脱塩し、チオール:抗体の配合比率を決定した。

(iv) 5モル当量のチオール活性化抗hCG抗体をマレイミド活性化抗グリコホリン抗体に添加し、その混合物を17時間、2~8℃でインキュベートした。その反応混合物を

50

N - エチルマレイミドで反応停止させ、抗グリコホリン：抗hCGコンジュゲートを、10 mMのPBS緩衝液（pH 7.2）を溶離剤として使用してSuperdex 200 PG媒体で精製した。そのコンジュゲートの濃度を280 nmでのUV吸収によって決定した。Proclin 300を1%（w/w）まで添加し、そのコンジュゲートを濾過して0.2 μmにした。

【実施例10】

【0131】

[不溶性ハブ（ラテックス粒子）を利用する試薬3の調製]

(i) 混合しながら、2時間、抗hCG抗体を、20%エタノールを含有する10 mMリン酸緩衝液（pH 7.4）中で、3 μmのポリスチレンラテックスマイクロスフェアに、10×表面結合能力で受動的に吸着させた。

(ii) 余剰表面結合部位を1%BSAで1時間、ブロックした。

(iii) マイクロスフェアを7000×gでの10分間の遠心分離によってペレット化し、その後、ラテックス希釈緩衝液（HEPES pH 7.4）中で3回洗浄した。

(iv) 抗体吸着を、hCG - アルカリホスファターゼコンジュゲートに関連して、アルカリホスファターゼアッセイにより、および抗hCGラテックスとhCGを混合した、スライド凝集アッセイによって、確認した。

【実施例10】

【0132】

[可溶性ハブ（ストレプトアビジン複合体）を使用する試薬3の調製]

(i) ストレプトアビジンおよびビオチン化抗hCG抗体を、10 mMのPBS（pH 7.4）/0.1%のBSA中で併せ、2時間、4℃でインキュベートして、複合体を形成させた。

【実施例11】

【0133】

[毛細管試験装置を作製する方法]

WO200408359に開示されている毛細管装置を、超音波処理により50%エタノール中で浄化し、その後、Tween 20の溶液中で洗浄して表面を親水性にすることにより作製した後、試薬を置いた。Tweenで処理した試験装置を、使用する前に、乾燥させ、感圧接着テープを使用して封止した。

【実施例12】

【0134】

[スライド凝集試験の実施方法]

ヒト血液（20 μL、所望の濃度のhCGでスパイクしたもの）を同量の可溶性「ハブ」複合体（試薬3、実施例3）および5 μLの試薬1（0.1 mg/mL）と混合した。2～5分後、その混合物の20 μLを顕微鏡用スライドガラスに移し、30秒間、振動/回転させた。反応混合物を100倍の倍率で見、凝集の程度を評価した。

【0135】

次の結果を得た。

【表4】

hCG 濃度	凝集強度
0 mIU/ml	+/-
570 mIU/ml	+
5,700 mIU/ml	+++

【実施例13】

【0136】

[不溶性ハブ試薬を使用する毛細管凝集試験]

毛細管装置は、実施例4に従って作製した。

試薬 1 は、実施例 1 に従って調製した。

試薬 3 は、実施例 2 に従って調製した。

【 0 1 3 7 】

反応混合物を次のように組み立てた。

60 μ L 抗 hCG ラテックス 3% 懸濁液 (試薬 1)

60 μ L ヒト全血 (hCG 含有)

15 μ L 抗体コンジュゲート (99 ng / μ L) (試薬 3)。

【 0 1 3 8 】

反応混合物を 2 ~ 5 分間、インキュベートし、その後、20 μ L を手作業でのピペティングにより、試験装置の流体タンク内の毛細管入口に導入した。その後、流体混合物は、毛細管力により、それぞれの毛細管トラックの始端に引き込まれた。タイマーを始動させ、2 分経過させ、その後、0.5 mL の PBS (pH 7.4) 「チェイス緩衝液」をその試験装置の流体タンクに添加した。「チェイス緩衝液」を添加し次第、第二タイマーを始動させ、その流体混合物が毛細管装置の末端に到達するためにかかる時間を測定した。

10

【 0 1 3 9 】

実施例の毛細管走行時間対 hCG 濃度を下に示す。(それぞれの hCG 濃度について n = 12。)

【 0 1 4 0 】

「オフライン」実験からの予備データ

【表 5】

20

HCG 濃度	平均毛管走行時間
0 IU/ml	96.3 秒
0.57 IU/ml	102.2 秒
5.7 IU/ml	117.6 秒

【実施例 1 4】

【 0 1 4 1 】

[可溶性ハブを使用する毛細管凝集試験]

試薬 1 は、実施例 1 に従って調製した。

試薬 3 は、実施例 3 に従って調製した。

毛細管装置は、感圧接着テープで封止する前に試薬 1 および 3 をその装置の試験毛細管トラックに置き、インサイチュで乾燥させたことを除き、実施例 4 に従って作製した。対照トラックには試薬を置かなかった。その装置は、WO 200408359 に記載されているように封止し、いつでも使用できる状態で閉じた。

30

【 0 1 4 2 】

本発明の反応を実施するための方法および段階は、次のとおりであった。

(i) 作製した試験装置の毛細管の始点に、20 μ L のヒト血液 (所望の濃度の hCG を混合したもの) を導入した。(流体は、毛細管現象によってトラックの最初の 10 cm に (それぞれのトラックに約 10 μ L) 引き込まれた)。

(i i) 2 分後、0.5 mL の PBS をその装置の流体タンクに導入した。(これにより毛細管の流れを再開させた)。

(i i i) PBS の導入から、流体が毛細管トラックの末端に到達するためにかかる時間を記録した。

40

【 0 1 4 3 】

得られた結果を図 5 に示す。

図 5 に示すように、2 つの別の実験において、毛細管走行時間は、血液サンプル (n = 12) 中に hCG (5 IU / mL) が存在したとき、平均 87 (実験 1) および 141 (実験 2) 秒遅かった。エラーバーは、標準偏差を表す。

【 0 1 4 4 】

50

本明細書の説明および特許請求の範囲全体を通して、用語「含む (comprise)」および「含有する (contain)」ならびにこれらの語の変形、例えば「含んでいる (comprising)」および「含む (comprises)」は、「含む (include)」が、それらに限定されない」ことを意味し、他の部分、添加物、成分、整数またはステップを除外することを意図していない (除外しない)。

【0145】

本明細書の説明および特許請求の範囲全体を通して、単数形は、その文脈が別様に要求していない限り、複数形を含む。特に、不定冠詞が使用されている場合、本明細書は、その文脈が別様に要求していない限り、単数形ばかりでなく複数形を意図していると理解しなければならない。

【0146】

本発明の特定の態様、実施形態または実施例に関連して記載されている特徴、整数、特性、化合物、化学的部分または基は、矛盾しない限り、本明細書に記載されているいずれの他の態様、実施形態または実施例にも適用できると理解しなければならない。

【図面の簡単な説明】

【0147】

【図1】湿潤試薬を使用する試験のための膜ストリップの組み立てを示す。表示されている構成要素は、符号1が芯であり、2が凝集物捕捉膜であり、3が吸収シンクであり、4が接着面が上を向いている自己粘着性プラスチックである。

【図2】乾燥試薬を使用する試験のための膜ストリップの組み立てを示す。表示されている構成要素は、符号1が芯であり、2が凝集物捕捉膜であり、3が吸収シンクであり、4が接着面が上を向いている自己粘着性プラスチックであり、5が乾燥試薬を含有するパッドである。

【図3】膜ストリップの一例を示す。表示されている構成要素は、符号1が膜ストリップ全体を覆う積層シールであり、2が0.1% Tween (登録商標) で処理した吸収芯 GFD であり、3が芯 (Ahlstrom grade 8964) であり、4が Fusion 捕捉膜であり、5が乾燥された試薬を含有する試薬放出パッドである。

【図4】本発明の一つの態様、分析物 (符号3、例えば、およびサブユニットを含む hCG である) の第一エピトープに結合することができる第一結合パートナー (符号2、例えば、抗ヒト絨毛性ゴナドトロピン、すなわち抗 hCG である) を提示するハブ (符号1) ; 検出可能な粒子 (この場合、第三結合パートナーが特異的に結合するグリコホリン抗原決定基を有する赤血球 (符号5)) に結合することができる第三結合パートナーと一緒に分析物の第二エピトープに結合することができる第二結合パートナーのコンジュゲートを含む部分 (符号4) に基づく凝集アッセイの略図を示す。そのとき、全ての成分は安定な凝集生成物を形成する。

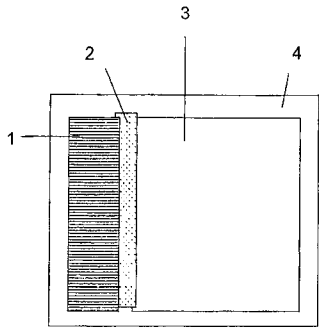
【図5】実施例15において詳述したような、可溶性ハブと抗体コンジュゲートを使用するアッセイからの結果を示す。

10

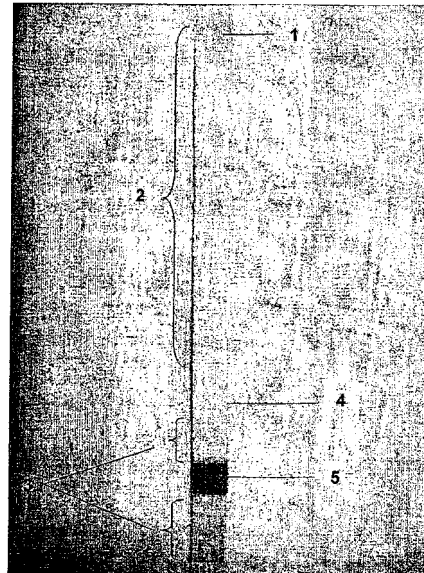
20

30

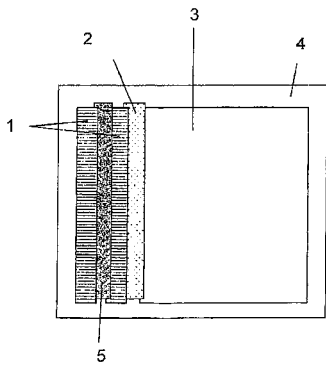
【図1】



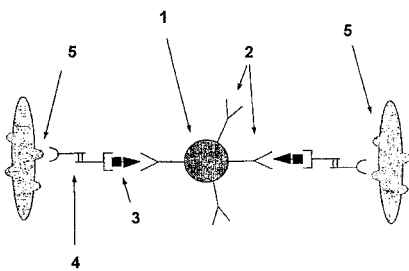
【図3】



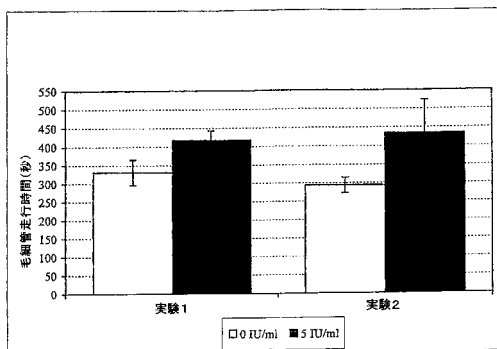
【図2】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

- (74)代理人 100114591
弁理士 河村 英文
- (74)代理人 100125380
弁理士 中村 綾子
- (74)代理人 100142996
弁理士 森本 聡二
- (74)代理人 100154298
弁理士 角田 恭子
- (72)発明者 ルデル, カロライン・ジェニファー
イギリス国, シーエイチ61・6ユージェイ マージーサイド, ウィラル, ヘスウォール, ヒルフ
ィールド・ドライヴ 67
- (72)発明者 アレン, ジェラルド・ジョン
イギリス国, エヌジー32・3ディーエフ リンカーンシャー, ケイソープ, オールド・リンカー
ン・ロード 16エイ, ピーチフィールド
- (72)発明者 エヴァンス, ダグラス・ロバート
イギリス国, シーエイチ3・6ディーエックス チェシャー, チェスター, ハンティントン, スピ
ードウェル・クローズ 19
- (72)発明者 ガーナー, エリザベス
イギリス国, ダブリューエヌ2・5ピーエイ ランカシャー, ウィガン, プラット・ブリッジ, ダ
ーリントン・ロード 15

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 特開平05 - 249117 (JP, A)
特開平01 - 153960 (JP, A)
特開2001 - 159632 (JP, A)
特開昭58 - 055759 (JP, A)
特表2006 - 520898 (JP, A)
特表2007 - 523348 (JP, A)
特表2002 - 526774 (JP, A)
国際公開第2004/083859 (WO, A1)

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