

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5419993号
(P5419993)

(45) 発行日 平成26年2月19日(2014.2.19)

(24) 登録日 平成25年11月29日(2013.11.29)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 1 5 D
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 7 5
		GO 1 N 33/543	5 5 5 D
		GO 1 N 33/53	D

請求項の数 19 (全 52 頁)

(21) 出願番号	特願2011-543729 (P2011-543729)	(73) 特許権者	508012840
(86) (22) 出願日	平成21年12月30日(2009.12.30)		アボット ポイント オブ ケア インコ ーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2012-514202 (P2012-514202A)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O 8 5 4 0 プリンストン カレッジ ロー ド イースト 4 0 0
(43) 公表日	平成24年6月21日(2012.6.21)	(74) 代理人	110000855
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/069846		特許業務法人浅村特許事務所
(87) 国際公開番号	W02010/078443	(74) 代理人	100066692
(87) 国際公開日	平成22年7月8日(2010.7.8)		弁理士 浅村 皓
審査請求日	平成23年8月4日(2011.8.4)	(74) 代理人	100072040
(31) 優先権主張番号	61/142,048		弁理士 浅村 肇
(32) 優先日	平成20年12月31日(2008.12.31)	(74) 代理人	100162411
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 井上 慎一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヌクレオチドコンジュゲートを使用する免疫測定法のための方法及び装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的被験物を含有することが疑われる生物試料を受け入れるための試料流入口、
電極を含有する導管、
洗浄液を含有する領域、及び
廃液チャンバー、

を含み、

前記電極上で免疫測定法が形成され、この免疫測定法が、

前記標的被験物に結合した固定化一次抗体、

可溶化剤中に配置され、第1の一本鎖ヌクレオチドに結合した、前記標的被験物に 10
対する二次抗体、及び

第1の一本鎖ヌクレオチドと相補的な塩基対を有する第2の一本鎖ヌクレオチドと
それぞれ結合した1種又は複数種のシグナル成分、

を含み、ここで、

洗浄液が、前記導管の中の前記電極から前記廃液チャンバーへと前記生物試料を洗浄
することができ；

可溶化剤が、前記導管内に配置されるように構成されたマトリックスであり；

第1の一本鎖ヌクレオチド及び第2の一本鎖ヌクレオチドの3'末端又は5'末端が
、保護化学基を組み込むことによって、前記導管の中において、血液試料中の内因性エキ
ソヌクレアーゼ活性から保護される；

免疫測定法を実施するための単回使用カートリッジ。

【請求項 2】

1 種又は複数種のシグナル成分が、蛍光成分、色成分及び放射性成分からなる群から選択される非酵素的検出部分を含む、請求項 1 に記載のカートリッジ。

【請求項 3】

1 種又は複数種のシグナル成分が 1 種又は複数種のシグナル酵素を含み、カートリッジが、

酵素基質を含有する領域をさらに含み、

前記酵素基質が前記 1 種又は複数種のシグナル酵素と反応して、前記生物試料中の前記標的被験物の量に比例して前記電極においてシグナルを発生させることができる、請求項 1 に記載のカートリッジ。

10

【請求項 4】

一次抗体が標的被験物の第 1 のエピトープと結合する、請求項 3 に記載のカートリッジ。

【請求項 5】

二次抗体が標的被験物の第 2 のエピトープと結合する、請求項 3 に記載のカートリッジ。

【請求項 6】

1 種又は複数種のシグナル酵素が、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、ウレアーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びベータガラクトシダーゼからなる群から選択される、請求項 3 に記載のカートリッジ。

20

【請求項 7】

可溶化剤中に配置され、第 1 のヌクレオチドと共有結合した F A B 断片、及び第 2 のヌクレオチドとそれぞれ共有結合した 1 種又は複数種のシグナル成分、を含み、

前記第 1 のヌクレオチドが 1 つ又は複数の反復配列を有し、

第 2 のヌクレオチドが前記第 1 のヌクレオチド上の 1 つ又は複数の反復配列の 1 つに結合しており、F A B 断片とシグナル成分との比が反復配列の数によって調節され、

可溶化剤が、免疫測定法を行うよう構成された装置の導管内に配置されるように構成されたマトリックスであり；並びに

30

第 1 の一本鎖ヌクレオチド及び第 2 の一本鎖ヌクレオチドの 3' 末端又は 5' 末端が、保護化学基を組み込むことによって、前記導管の中において、血液試料中の内因性エキソヌクレアーゼ活性から保護される；

免疫測定法において使用するための組成物。

【請求項 8】

1 種又は複数種のシグナル成分が、蛍光成分、色成分及び放射性成分からなる群から選択される非酵素的検出部分を含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

1 種又は複数種のシグナル成分が、1 種又は複数種のシグナル酵素を含む、請求項 7 に記載の組成物。

40

【請求項 10】

第 1 のヌクレオチド及び第 2 のヌクレオチドが、5' 末端、3' 末端又はヌクレオチド配列内部にカップリング部分を含有する、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

カップリング部分が、アミノ修飾因子、チオール修飾因子及びジチオールからなる群から選択される修飾ホスホラミダイトから作製される、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

保護化学基がホスホロチオエートである、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 13】

50

1種又は複数種のシグナル酵素が、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、ウレアーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びベータガラクトシダーゼからなる群から選択される、請求項9に記載の組成物。

【請求項14】

第1のヌクレオチドが、少なくとも3つの1種又は複数種のシグナル酵素の、少なくとも3つの第2の配列と結合する少なくとも3つの反復配列を有する、請求項9に記載の組成物。

【請求項15】

第1のヌクレオチドが、少なくとも3つの1種又は複数種のシグナル酵素の、少なくとも5つの第2の配列と結合する少なくとも5つの反復配列を有する、請求項9に記載の組成物。

【請求項16】

被験物が固定化された一次抗体及び二次抗体と結合するように生物試料を接触させて、免疫測定法を形成するステップであって、二次抗体が可溶化剤中に配置され、合成ヌクレオチド架橋を介して少なくとも1種のシグナル酵素と結合する上記ステップ、

前記免疫測定法から前記生物試料を洗浄するステップ、及び

シグナル酵素との反応により発生したシグナルに基づいて被験物の存在を決定するステップ、

を含み、ここで、

可溶化剤が、免疫測定法を行うよう構成された装置の導管内に配置されるように構成されたマトリックスであり；並びに

第1の一本鎖ヌクレオチド及び第2の一本鎖ヌクレオチドの3'末端又は5'末端が、保護化学基を組み込むことによって、前記導管の中において、血液試料中の内因性エキソヌクレアーゼ活性から保護される；

生物試料中の被験物の存在を決定する方法。

【請求項17】

(a)患者由来の試料を、cTnI上の第1のエピトープと結合することができる一次抗体が結合された表面に適用するステップ、

(b)cTnI上の第2のエピトープと結合することができる二次抗体を加えるステップであって、この二次抗体が、可溶化剤中に配置され、シグナル成分と結合した1つ又は複数の第2の鎖ポリヌクレオチドと結合した第1の鎖ポリヌクレオチド配列をさらに含む上記ステップ、及び

(c)二次抗体の結合の程度を決定するステップ、
を含み、ここで、

可溶化剤が、cTnI検出のための免疫測定法を行うよう構成された装置の導管内に配置されるように構成されたマトリックスであり；並びに

第1の一本鎖ヌクレオチド及び1つ又は複数の第2の一本鎖ヌクレオチドの3'末端又は5'末端が、保護化学基を組み込むことによって、前記導管の中において、血液試料中の内因性エキソヌクレアーゼ活性から保護される；

患者が心筋梗塞を患っている可能性があるかどうかを決定する方法。

【請求項18】

シグナル成分がシグナル酵素を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

ステップ(a)より前に患者が心筋梗塞を患っていない、請求項17に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2008年12月31日出願の米国仮出願第61/142,048号の優先権を主張する。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

本発明は、ヌクレオチドコンジュゲートを使用する、試料中の被験物の存在を決定するための様々なアッセイを実施する方法及び装置に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

低濃度におけるいくつかの標的被験物の検出は、一部の病気の早期診断にとって重要である。例えば、最近の調査により、典型的な市販のアッセイのレベルより低いレベルにおける心筋トロポニン I (cTnI) の測定は、臨床医に価値のある情報を提供することが示唆されている。cTnI のレベルが非常に低くても、すなわち、急性心筋梗塞を示しているとみなされるレベルより低くても、将来の有害な心血管状態を示している可能性があることに留意されたい。例えば、Zetheliusら、(2006年、「冠動脈心疾患の予測因子としてのトロポニン I 及び70歳男性における死亡率：地域社会に基づくコホート研究 (Troponin I as a predictor of Coronary Heart Disease and Mortality in 70-year-old men: A community-based cohort study)」、Circulation、113巻：1071~1078頁)は、心筋TnI濃度と将来の冠動脈心疾患の予測との相関を調べるための研究を実施した。Zetheliusらは、心血管疾患の臨床兆候を全く示さなかったが、わずかに高い心筋TnIを示した70歳の男性において、やがて現れる冠動脈心疾患事象を予測できたことを観察した。さらに、Appleら(2008年、「急性冠症候群の症状を呈する患者における心筋梗塞及び有害事象の検出のためのCentaur TnI-Ultraアッセイの使用 (Use of the Centaur TnI-Ultra Assay for Detection of Myocardial Infarction and Adverse Events in Patients Presenting With Symptoms Suggestive of Acute Coronary Syndrome)」、Clinical Chemistry、54巻(4)：723~728頁)は、高感度トロポニンアッセイにおける研究を実施して、検出限界のcTnI値及び99番目のパーセンタイル基準値に基づいて短期有害事象の危険性を評価する予後値を評価した。Appleらは、「著者らのデータは、LoD [検出レベル] が低い、改善された強力な分析能力を持つcTnアッセイによって、任意の測定可能なcTnIが、アッセイのLoDを下回るcTnI濃度より高い危険性を示すという増えつつある証拠の1つとなる、」と結論付けた。

【 0 0 0 4 】

最新のポイント・オブ・ケア免疫測定技術は、様々な標的被験物の存在及び濃度を測定する能力において非常に有益であるが、cTnIなどの非常に低レベルの標的被験物を確実に検出する能力において、いくらか制限されている。したがって、cTnIなどの低レベルの標的被験物を確実に検出する、特に、ポイント・オブ・ケア免疫測定被験物を確実に検出する装置の必要性が存在する。

【 0 0 0 5 】

その全体が本明細書に参照により組み込まれる、米国特許第7,419,821号は、2種の捕捉抗体を電極に固定し、2種のシグナル抗体、例えばFAB (Fragment Antigen Binding) 抗体断片を、シグナル酵素、例えばアルカリホスファターゼ (ALP) を用いて標識し、シグナルコンジュゲートを形成する、サンドイッチアッセイを利用する。被験物、例えばcTnIなどの抗原は捕捉抗体及びシグナル抗体と結合し、被験物の存在を示すシグナルを提供するサンドイッチアッセイを形成する。通常、シグナル抗体はシグナル酵素と結合して、架橋技術を介してシグナルコンジュゲートを形成する。これらの合成条件は、広範囲のシグナル抗体対標識酵素の比率並びシグナルコンジュゲート当たりのシグナル酵素の数及びコンジュゲート当たりのシグナル抗体の数をもたらす。FAB抗体断片に関して、例えば、FABなし(0)からシグナルコンジュゲート当たりおよそ15FABまでを有する、シグナルコンジュゲートの統計集団がある。

10

20

30

40

50

結果として、合成シグナルコンジュゲートは、サイズ排除クロマトグラフィーにより通常精製され、シグナルコンジュゲート当たりのシグナル抗体、例えばF A B分子の数の範囲がより狭いシグナルコンジュゲート集合を作り出す。しかし、このような精製技術は、(i)シグナル抗体対シグナル酵素(例えば、F A B対A L P) ; (i i)シグナル酵素対シグナルコンジュゲート及び(i i i)シグナル抗体対シグナルコンジュゲートの低い予測可能性及び様々な比率を、残念ながらもたらす。これらの様々な比率は、試料中の非常に低レベルの対象被験物を確実に検出するサンドイッチアッセイの能力を制限する。

【 0 0 0 6 】

酵素結合免疫吸着法(E L I S A)に基づくアッセイは、体液及び環境試料を含む被験物、例えば試料中の抗原分子の濃度を評価するために使用され、通常、シグナル抗体とシグナル酵素とが共有結合してアッセイの検出成分を生み出す能力を必要とする。この技術の歴史及び総括は、Lequin(2005年、Enzyme Immunoassay (EIA) / Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)、Clinical Chemistry、51巻(12) : 2415 ~ 2418頁)に見出すことができる。いくつかの抗原は非常に低濃度で存在するので、ELISAアッセイの感度を増加させる必要がある。

【 0 0 0 7 】

米国特許第5,164,311号は、スルフヒドリル基を抗体に加え、マレイミジル基を酵素に加えて、修飾された抗体及び酵素を作製すること、及び修飾された抗体と酵素を反応させてコンジュゲートを作製することによって作製された抗体-酵素コンジュゲートを開示する。その実施において、第311号特許は、「直接抗体-酵素コンジュゲートは酵素対抗体の高い比率を達成でき、したがってアビジン-ビオチン標識系に近い又はそれと同等の高い度合の感度を提供する標識系を提供することが有利であろう。このような改善された直接抗体-酵素コンジュゲートは、ビオチン-アビジン標識系が必要とするような、さらなるインキュベーションステップ及び洗浄ステップを必要としないものである。」と述べている。第311号特許は、SPDPなどの架橋剤及び酵素-抗体コンジュゲートのためにスルフヒドリル基及びマレイミド基を架橋する能力を有する架橋分子の使用を記載しているが、合成オリゴヌクレオチドに対するこの使用に関しては述べていない。

【 0 0 0 8 】

酵素及び合成オリゴヌクレオチドに基づくコンジュゲートの合成は、サザンハイブリダイゼーションなどのDNAのハイブリダイゼーション技術の分子生物学適用のために開発された(Reyes & Cockerell、1993年、「純粋オリゴヌクレオチド-アルカリホスファターゼコンジュゲートの調製(Preparation of pure oligonucleotide-alkaline phosphatase conjugates)」、Nucleic Acids Research、21巻(23) : 5532 ~ 5533頁)。これらのコンジュゲートの適用は、ELISAに基づくアッセイに対するそれらの使用を予測していない。

【 0 0 0 9 】

きわめて感度が高いDNA増幅戦略、例えば、米国特許第5,656,493号及び他により取り扱われるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の開発に伴って、ELISA及びPCRの組み合わせは検出感度を向上させることができることが認識されている。例えば、Sanoら(2000年、「イムノPCR:特定の抗体-DNAコンジュゲートを用いる高感度抗原検出(Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates)」、Science、258巻(5079) : 120 ~ 122頁)は、抗原検出にこの戦略を最も早く適用した一例を記載している。Kozlovら、(2004年、「高感度タンパク質検出を可能にする、オリゴヌクレオチドと抗体のコンジュゲーションのための有効な戦略(Efficient strategies for the conjugation of oligonucleotides to Antibodies Enabling Highly Sensiti

10

20

30

40

50

ve Protein Detection)」、Biopolymers、73巻：621～630頁)を含むこの取り組みの適用に関する多くの文献があり、Kozlovらは、合成オリゴヌクレオチド抗体コンジュゲーションの合成戦略と共に高感度検出のためのこれらの特定のコンジュゲートの適用を記載している。この取り組みは、合成オリゴヌクレオチドはその後のDNAの増幅に使用されるので、高感度検出の取り組みとして使用される本発明とは異なる。

【0010】

PCRなどのDNA増幅の使用は、既存のELISA系に使用される合成オリゴヌクレオチド-抗体コンジュゲートの使用ができない場合に限られており、専用の装置を必要とする温度サイクル機能の使用をさらに必要とする。Adlerは、WO2008/122310において、免疫測定法に関連するPCRによる取り組みを記載している。多くの関連戦略が、Adlerら(2008年、「組み合わせによる感度：イムノPCR及び関連技術(Sensitivity by combination: immuno-PCR and related technologies)」Analyst、133巻：702～718頁)；及びNiemeyerら(2005年、「イムノPCR：核酸増幅によるタンパク質の高感度検出(Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification)」、Trends in Biotechnology、23巻(4)：208～216頁)により検討されている。

【0011】

Cantor及びChuck(米国特許第5,635,602号)は、アビジン/ストレプトアビジン結合を使用するピスタンパク質コンジュゲートを記載し、免疫測定法及びPCRアッセイに関して教示する。例えば、一次抗体はジスルフィド結合によりDNAと結合し、他方の末端において相補的DNAをビオチンで標識する。ビオチンは、ビオチン化ホースラッディッシュペルオキシダーゼ(HRP)とも結合するストレプトアビジンと結合できる。ビオチン化ホースラッディッシュペルオキシダーゼは、基質と反応し、化学発光シグナルを発生できる。この開示は、多価ストレプトアビジン分子と比較して高度の調節ができないビオチン-ストレプトアビジン部分の使用を教示しないので、異なる。

【0012】

Tennilaら、(2008年、「ペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、抗体及びDNAを有する安定且つ選択的複合体を形成する(Peptide-oligonucleotide conjugates form stable and selective complexes with Antibody and DNA)」、Bioconjugate Chemistry、19巻(7)：1361～1367頁)は、抗体のエピトープマッピングに使用される合成オリゴヌクレオチドとコンジュゲートした短鎖オリゴペプチドを記載している。Tennilaらは、ELISAアッセイに関しては述べていない。

【0013】

Ketomaki及びLonngberg、2006年、(「蛍光タグ付けし、PNAをコンジュゲートした抗体のペプチドエピトープの同時結合に基づく混合相免疫測定法：PNAで被覆した微粒子の定量化(A Mixed-Phase Immunoassay Based on Simultaneous Binding of Fluorescently Tagged and PNA-Conjugated peptide Epitopes on Antibodies: Quantification on PNA-Coated Microparticles)」、Bioconjugate Chemistry、17巻：1063～68巻。)は、一方のF(ab)結合部位が蛍光タグを有するペプチドと結合し、他方のF(ab)結合部位が核酸配列(PNA)を有するペプチド配列と結合する完全抗体(2F(ab)結合部位を有する)系を記載している。PNAは、微粒子上で相補的PNAと結合する。これらの著者は、酵素又は抗体のどちらかとの共有結合の使用を記載しておらず、むしろ抗体と、微粒子と結合し

10

20

30

40

50

た分子との非共有結合の使用を記載している。別の非共有結合方法は、シグナルを発生する抗体に関して使用される。

【0014】

Wackerら(2004年、「DNA指向固定化、直接スポットティング又はストレプトアビジン-ビオチン結合のいずれかにより組み立てられる抗体マイクロアレイの性能: 比較研究(Performance of antibody microarrays fabricated by either DNA-directed immobilization, direct spotting, or streptavidin-biotin attachment: a comparative study)」、Analytical Biochemistry、330巻: 281~287頁)は、抗体アレイを作製するための捕捉抗体に共有結合した合成オリゴヌクレオチドの使用を記載しており、これをWackerらはDNA指向固定化(DDI)と定義している。合成オリゴヌクレオチド-抗体コンジュゲートの別の適用は、固体支持体上への捕捉抗体の固定である(Jungら、2008年、「固体支持体上への抗体の固定方法における最新の進歩(Recent Advances in immobilization methods of antibodies on solid supports)」、Analyst、133巻: 697~701頁)。この適用は、固体支持体への抗体の固定を教示しない点で本取り組みとは異なる。Lovrinovicら、(2002年、「発現タンパク質のライゲーションによる、タンパク質-核酸コンジュゲートの合成(Synthesis of protein-nucleic conjugates by expressed protein ligation)」、Chemical Communications、7版: 822~823頁)は、組み換えタンパク質が、DNA指向固定化を使用してインテイン配列を含めて設計されるタンパク質-核酸コンジュゲートを開示している。インテインは、「隣接するポリペプチド(エクステイン)の同時ライゲーションとともに、一次翻訳産物から」それ自体を削除できる、およそ150アミノ酸のポリペプチド配列である(Cookら、1995年、「光化学的に開始されたタンパク質のスプライシング(Photochemically Initiated protein splicing)」、Angewandte Chemie International Edition in English、34巻(15): 1629~1630頁)。この論文において、Lovrinovicは、共有結合したインテイン配列を有する組み換えタンパク質と、その後にキチン結合ドメインを含有する発現タンパク質を使用した。この多機能タンパク質ハイブリッド分子を、キチンカラムにおいてキチン結合ドメインを使用してまず精製した。合成オリゴヌクレオチド配列に共有結合した、化学的に合成されたシステインペプチドを含有するさらなる分子を精製後の反応物に加え、エステル交換によりインテイン領域の削除後組み換えタンパク質のカルボキシ末端に結合させ、その後化学的にライゲーションしたシステイン-合成オリゴヌクレオチドハイブリッドとライゲーションする。ここで、これにより、インテイン配列を含まないシステイン-合成オリゴヌクレオチドハイブリッドに共有結合した組み換えタンパク質を有する分子が作製される。次いで、この新しい分子を使用して、抗原(組み換えタンパク質)と、固体支持体に結合した相補的合成オリゴヌクレオチドとを結合でき、抗原又は組み換えタンパク質分子を用いるこの適用において、抗体が置換されるDDI技術と非常に似ている。

【0015】

Fanら、2008年(「マイクロリットル量の血液中のタンパク質を迅速に多重分析するための集積バーコードチップ(Integrated Barcode chips for rapid, multiplexed analysis of protein in microliter quantities of blood)」、Nature Biotechnology、Advance Online Publication)は、このDDI技術のさらに別の変形を記載している。

【0016】

10

20

30

40

50

Heydukら(2008年、「分子はさみ：抗体ベースの同一タンパク質センサー(Molecular Pincers: Antibody-Based Homogeneous Protein Sensors)」、Analytical Chemistry、80巻：5152~5159頁)は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づく抗体検出技術を記載しており、この抗体検出技術において、1種の抗体分子がドナー発色団を保有する関連する第1の合成オリゴヌクレオチドを伴い、二次抗体分子は同じ抗原と、抗原の別の部位で結合し、アクセプター発色団を保有する第1の合成オリゴヌクレオチドと相補的な関連する第2の合成オリゴヌクレオチドを保有する。抗原上の非常に近接する2種の抗体は、合成オリゴヌクレオチドのハイブリダイズを可能にし、次いでドナー発色団及びアクセプター発色団を互いに非常に近接させ、結果として生じる蛍光が減少する。これが同一抗原検出の取り組みであり、捕捉抗体は用いない。

10

【0017】

Niemeyerら(2002年、「インビボバイオチニル化NAD(P)H由来の二酵素複合体のDNA指向性アセンブリ：FMNオキシドレダクターゼ及びルシフェラーゼ」(DNA-directed Assembly of Bienzymic complexes from In Vivo Biotinylated NAD(P)H:FMN Oxidoreductase and Luciferase)」、ChemBioChem、02~03番：242~245頁)は、DNA指向性組織化を使用した空間的に規則的な多酵素複合体(MEC)を記載しているが、ELISA及びより感度の高い免疫測定試験の開発については述べていない。

20

【0018】

Seeman(1999年、「DNA工学及びナノテクノロジーへのその適用(DNA engineering and its application to nanotechnology)」、TIBTECH、17巻：437~443頁)はDNA足場の適用を記載しており、相補的合成オリゴヌクレオチド配列が特有の構造を生み出すために設計され得るが、ELISAアッセイについては述べていない。

【0019】

Niemeyer(2000年、「DNAに基づく自己組織化ナノ構造：ナノバイオテクノロジーの開発に向けて(Self-assembled nanostructures based on DNA: towards the development of nanobiotechnology)」、Current Opinion in Chemical Biology、4巻：609~618頁)は、規則構造の足場骨格を生み出すためのDNAの適用を記載しているが、ELISA及びより感度の高い他の免疫測定試験については述べていない。

30

【0020】

Storhoff&Mirkin(1999年、「DNAを用いたプログラム化材料の合成(Programmed materials synthesis with DNA)」、Chemical Review、99巻：1849~1862頁)は、足場材料としてのDNAの使用を記載しているが、ELISAアッセイのためのその使用については述べていない。

40

【0021】

Niemeyerら、(1998年、「新規なバイメタルナノ構造のための積み木としてのDNA ストレプトアビジン共有コンジュゲート(Covalent DNA-Streptavidin Conjugates as Building Blocks for novel Biometallic Nanostructures)」、Angew.Chem.Int.Ed.、37巻(16)：2265~2268頁)は、バイオメタル凝集体の多ストレプトアビジン凝集体に結合したピオチンストレプトアビジン免疫グロブリンを使用する、多ストレプトアビジン分子凝集体を有する構造化分子を製作するためのDNA足場の使用を記載している。

【0022】

50

Tomkinsら(2001年、「分子の足場としてDNAを用いる、対称な、及び非対称なDNA-タンパク質コンジュゲートの調製(Preparation of Symmetrical and Unsymmetrical DNA-Protein Conjugates with DNA as a molecular Scaffold)」、ChemBio Chem、5版:375~378頁)は、ストレプトアビジン-DNAダンベルに関する原子間力顕微鏡法により観測された、ストレプトアビジン-DNAコンジュゲートの作製を記載している。この参考文献は、ELISA及びより感度の高い他の免疫測定試験については述べていない。

【0023】

Takedaら、(2008年、「オリゴヌクレオチドによるタンパク質のN末端特異的修飾を介して作成される、分割タンパク質断片-DNAの共有結合ハイブリッド(Covalent split protein fragment-DNA hybrids generated through N-terminus specific modification of proteins by oligonucleotides)」、Organic and Biomolecular Chemistry、6巻:2187~2194頁)は、活性酵素分子の形成のための、分割タンパク質に結合したDNAハイブリッドの使用を記載しているが、ELISA又は他の感度の高い免疫測定法については予測していない。

【0024】

Niemeyerら(1994年、「タンパク質のオリゴヌクレオチド指向性自己集合:巨視的アレイの作製及び超分子バイオコンジュゲート構築のためのコネクタとしての、半合成DNA-ストレプトアビジンハイブリッド分子(Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semi-synthetic DNA-streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates)」、Nucleic Acids Research、22巻(25):5530~5539号)は、ビオチン化抗体並びにビオチン化アルカリホスファターゼ及び2つのDNA配列に結合したストレプトアビジンを使用する、抗体とALP酵素とのハイブリッドを記載しており、この2つのタンパク質は、互いにビオチン-ストレプトアビジン結合を介して結合している。この発明は、ビオチン化抗体及びアルカリホスファターゼ分子に結合する末端ストレプトアビジン分子を使用して、DNAのハイブリダイゼーションを介して直接共に足場を組まれる2つの分子を記載している。末端結合部位はストレプトアビジンであるので、共有結合した合成オリゴヌクレオチド配列に見出されるような制御合成のレベルは得られない、例えば、多価ストレプトアビジン分子は、ビオチン化された抗体又はアルカリホスファターゼ分子のどちらとも結合できる。

【0025】

Duckworthら(2007年、「タンパク質ナノ構造の作出において使用するための共有タンパク質-DNAコンジュゲートの調製のための普遍的な方法(A Universal Method for the preparation of Covalent Protein-DNA Conjugates for use in Creating Protein Nanostructures)」、Angew. Chem. Int. Ed. 46巻:8819~8822頁)は、緑色蛍光タンパク質を正確に結合する足場構造としてのDNA-タンパク質構造の使用を記載しているが、ELISA及び他の免疫測定技術については述べていない。

【0026】

Niemeyer(2000年、「DNAに基づく自己組織化ナノ構造:ナノバイオテクノロジーの開発に向けて(Self-assembled nanostructures based on DNA: towards the development

10

20

30

40

50

of nanobiotechnology)」、Current Opinion in Chemical Biology、4巻：609～618頁)は、共有結合したDNAを使用するタンパク質の組織化構造について記載しているが、ELISA及び他の免疫測定技術については述べていない。

【0027】

Kawabataら(2005年、「DNA結合抗体及びキャピラリーチップ電気泳動を使用する、アルファ胎児タンパク質の液相結合アッセイ(Liquid-Phase Binding Assay of alpha-Fetoprotein Using DNA-Coupled Antibody and Capillary Chip Electrophoresis)」、Analytical Chemistry、77巻：5579～5582頁)は、クロマトグラフィーに基づく免疫測定法を開発し、このアッセイにおいてKawabataらは、DNAコンジュゲート抗体分子と抗原を加え、クロマトグラフィー後の分子量の増加により抗原の結合の存在を決定し、この特定のアッセイにおいて、Kawabataらはキャピラリー電気泳動を使用した。この方法は、捕捉抗体を使用せず、ELISAアッセイにおいて使用されるような酵素結合コンジュゲートも使用せず、したがって本発明とは異なる。

10

【0028】

Zhang & Guo(2007年、「蛍光免疫測定法における感度の改善のための、染料/DNAによる多重標識抗体コンジュゲート(Multiple labeling of Antibodies with Dye/DNA Conjugate for Sensitivity Improvement in Fluorescence Immunoassay)」、Bioconjugate Chemistry、18巻(5)：1668～1672頁)は、まず抗原の固体支持体への固定を必要とし、その後ビオチン化抗体を加え、次いで蛍光標識した合成オリゴヌクレオチドに結合した、ビオチン-ストレプトアビジン-ビオチン部分を使用する、免疫検出の方法を記載している。このコンセプトは本発明とは異なる。

20

【0029】

Zhuら(2008年、「抗体の多重標識としてDNA/染料コンジュゲートを使用する競合的蛍光免疫測定法による、エストラジオールの1兆分の1レベルの検出(Part-per-trillion level detection of estradiol by competitive fluorescence immunoassay using DNA/dye conjugate as antibody multiple labels)」、Analytica Chimica Acta、624巻：141～146頁)は、蛍光タグ付したDNAを使用してシグナルを増加させた。合成オリゴヌクレオチドは、多重蛍光タグ及びストレプトアビジンに結合したビオチン含有し、合成オリゴヌクレオチドは、次いで、ビオチン化抗体に結合する。この構築体の目的は、抗体に付随する蛍光タグの数を増加させ、次いでシグナルレベルを増加させることである。これは、少なくとも合成オリゴヌクレオチドが抗体と共有結合しているという理由で、本発明とは異なる。

30

【0030】

Niemeyerら(2001年「共有オリゴヌクレオチド-ストレプトアビジンコンジュゲートからなるDNA-タンパク質集合体(Nanostructured DNA-Protein Aggregates Consisting of Covalent Oligonucleotide-Streptavidin Conjugates)」、Bioconjugate Chemistry、12巻(3)：364～371頁)は、イムノPCR反応において使用するための構造を作製するためにビオチン化抗体に結合する、ストレプトアビジン-ビオチン-DNA-ビオチン-ストレプトアビジン-ビオチン-DNA-ビオチン-ストレプトアビジンのマルチマーのナノ構造を作製した。これは本発明とは異なる。

40

【0031】

50

K u j i p e r s ら (1 9 9 3 年、「放射標識されたアンチセンスヌクレオチドによる、抗体 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの特異的認識：癌の2段階放射免疫療法のための新規な手法 (Specific Recognition of Antibody - Oligonucleotide Conjugates by Radiolabeled Antisense Nucleotides: A Novel Approach for Two-Step Radioimmunotherapy of Cancer)」、Bioconjugate Chemistry、4巻：94～102頁)は、がん患者の「プレターゲット」放射性免疫療法に使用される、DNA抗体コンジュゲートを作製した。これは、非放射性DNA抗体コンジュゲートの標的部位への付加、その後、非常に特異的な放射線療法を可能にする、放射標識された相補性DNAの付加を可能にした。本発明は、放射免疫測定法は取り扱わない。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0032】

第1の態様において、本発明は、標的被験物、例えば抗原を含有することが疑われる生物試料を受け入れるための試料注入口、電極を含有する導管、洗浄液を含有する領域及び廃液チャンバーを含む、免疫測定法を実施するための単回使用カートリッジを対象とする。サンドイッチアッセイは、電極上で形成される。サンドイッチアッセイは、標的被験物、例えば抗原に結合した固定化一次抗体、第1の一本鎖ヌクレオチドと結合した、標的被験物、例えば抗原に対する二次抗体、及び第1の一本鎖ヌクレオチドと相補的な塩基対を有する第2の一本鎖ヌクレオチドとそれぞれ結合した1種又は複数種のシグナル成分(例えば、シグナル酵素又は蛍光染料)を含む。洗浄液は、導管の中の電極から廃液チャンバーへと生物試料を洗浄することができる。シグナル成分がシグナル酵素である実施形態において、カートリッジは、シグナル酵素と反応して、生物試料中の標的抗原の量に比例して電極においてシグナルを発生させることができる酵素基質を含有する領域をさらに含む。

20

【0033】

本発明の第2の態様において、第1のヌクレオチドと共有結合したFAB断片、及び第2のヌクレオチドとそれぞれ共有結合した1種又は複数種のシグナル成分(例えばシグナル酵素又は蛍光染料)を含み、前記第1のヌクレオチドが1つ又は複数の反復配列を有し、第2のヌクレオチドが前記第1のヌクレオチド上の1つ又は複数の反復配列の1つに結合しており、FAB断片とシグナル成分との比が反復配列の数によって調節される、免疫測定法において使用するための組成物が提供される。

30

【0034】

本発明の第3の態様において、被験物が固定化された一次抗体及び二次抗体と結合するように生物試料を接触させて、免疫測定法を形成するステップであって、二次抗体が合成ヌクレオチド架橋を介して少なくとも1種のシグナル酵素と結合する上記ステップ、前記コンジュゲートから前記生物試料を洗浄するステップ、及びシグナル酵素との反応により発生したシグナルに基づいて被験物の存在を決定するステップを含む、生物試料中の被験物の存在を決定する方法を提供する。

40

【0035】

第4の態様において、(a)患者由来の試料を、cTnI上の第1のエピトープと結合することができる一次抗体が結合された表面に適用するステップ、(b)cTnI上の第2のエピトープと結合することができる二次抗体を加えるステップであって、この二次抗体が、シグナル成分(例えば、シグナル酵素又は染料)と結合した1つ又は複数の第2の鎖ポリヌクレオチドと結合した第1の鎖ポリヌクレオチド配列をさらに含む上記ステップ、及び(c)少なくとも二次抗体の結合の程度を決定するステップを含む、患者が心筋梗塞を患っている可能性があるかどうかを決定する方法を提供する。

【0036】

本発明の前述及び他の目的及び有利性は、本発明の限定されない好ましい実施形態の添

50

付図面と関連して作成された、以下の説明からより十分に現れると思われ、同様の文字は、図面を通して同じ又は類似の部分指す。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】対象となる被験物を検出するための、標準的サンドイッチアッセイを表す図である。

【図2】対象となる被験物を検出するための、標準的DNA指向性固定化を表す図である。

【図3】対象となる被験物を検出するための、標準的DNA指向性固定化を表す図である。

【図4】ビーズに固定された核酸を有する、標準的検出アッセイを表す図である。

【図5】本発明の実施形態に従って、DNAコンジュゲートを使用する、被験物の電気化学的検出を表す図である。

【図6】本発明の実施形態に従って、コンジュゲートとして複数の酵素種と組み合わせたポリマーDNA足場を使用する、被験物の電気化学的検出を表す図である。

【図7】本発明の実施形態に従って、検出抗体及びシグナル酵素と結合したDNAを使用する、被験物の電気化学的検出を表す図である。

【図8】本発明の実施形態に従って、DNAを使用して共有結合した抗体種を表す図である。

【図9】本発明の実施形態に従って、DNAを使用して酵素と結合した、共有結合した抗体種を表す図である。

【図10】本発明の実施形態に従って、DNAを使用して、個々の種に結合したDNA足場を有する共有結合した抗体種を表す図である。

【図11】本発明の実施形態に従って、酵素コンジュゲート集合を表す図である。

【図12】本発明の実施形態に従って、コンジュゲートとして、様々な酵素種と組み合わせたポリマーDNA足場を使用する、被験物の電気化学的検出を表す図である。

【図13】本発明の実施形態に従って、コンジュゲートとして様々な酵素種と組み合わせたポリマーDNA足場を使用する、被験物の電気化学的検出を表す図である。

【図14】本発明の実施形態に従って、多重抗原検出アッセイを表す図である。

【図15A】本発明の実施形態に従って、抗原結合に依存する、ハイブリダイゼーション種の作製を表す図である。

【図15B】本発明の実施形態に従って、抗原結合に依存する、ハイブリダイゼーション種の作製を表す図である。

【図15C】本発明の実施形態に従って、抗原結合に依存する、ハイブリダイゼーション種の作製を表す図である。

【図15D】本発明の実施形態に従って、抗原結合に依存する、ハイブリダイゼーション種の作製を表す図である。

【図16】核酸鎖置換ステップによるシグナル増幅に基づく抗原の分析的検出を表す図である。

【図17】イムノセンサーカートリッジのカバーの等角上面図である。

【図18】イムノセンサーカートリッジのカバーの等角底面図である。

【図19】イムノセンサーカートリッジのためのテープガスキットのレイアウトの上面図である。

【図20】イムノセンサーカートリッジのベースの等角上面図である。

【図21】イムノセンサーカートリッジのレイアウトの略図である。

【図22】乾燥試薬により流体を修正する部位を含む、イムノセンサーカートリッジ内部の流体路及び空気路の略図である。

【図23】本発明の実施形態に従うサイズ排除カラムからの蛍光画分の図である。

【図24】ALP LC-SPDP反応からのS300カラムの画分の図である。

【図25】DTT処理合成オリゴヌクレオチドと反応したALP LC-SPDPからの

10

20

30

40

50

S 3 0 0 カラムの画分の図である。

【図 2 6】WinI S D ソフトウェアを使用して、i - S T A T 「イムノ」カートリッジを含有する「A」において試験した、A L P - A' コンジュゲートの 3 つの希釈液 (1 0 - 1 (3 7 . 3 n g)、1 0 - 2 (3 . 7 3 n g)、1 0 - 3 (0 . 3 7 n g)) の時間電流測定プロットである。

【図 2 7】L C - S P D P と反応した P E P - 3 F (a b ') 2 からの S 3 0 0 カラムの画分の図である。

【図 2 8】D T T 処理した A 合成オリゴヌクレオチドと反応した P E P - 3 F (a b ') 2 L C - S P D P からの S 3 0 0 カラムの画分の図である。

【図 2 9】遊離の抗体又はコンジュゲートを使用した試料に添加することによる被験物の競合を使用する、c T n I カートリッジの生産バージョンの時間電流測定プロットである。[1] M W C 9 2 3 5 3 を 2 . 5 9 n g / m l に希釈し、2 μ L [5 . 2 p g] を使用。[2] 被験物に 4 9 . 2 n g の P E P - 3 F (a b) を添加、[3] 被験物に 6 1 . 8 n g の P E P - 4 F (a b) を添加、[4] 被験物に 1 0 9 n g の E 0 0 3 1 コンジュゲートを添加。

【図 3 0】[2] 抗原とともに、及び [1] M W C 抗原なしで、E 0 0 3 0 [7 4 7 n g] = E 0 0 3 1 [2 1 8 n g] を加えた、c T n I 捕捉ビーズを含みコンジュゲートを含まない i - S T A T イムノカートリッジの時間電流測定結果を示す図である。

【図 3 1】推定されるクローンの制限消化の図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 8 】

様々な実施形態において、本発明は、相補的ヌクレオチド配列の装飾された鎖を使用することによる、実質的に狭い及び/又は調節可能な比率又は化学量を有するシグナルコンジュゲートの作製及び使用のための装置及び方法を対象とする。シグナル抗体は、好ましくは D N A の相補鎖を有するシグナル成分と結合することが好ましい。本明細書において「シグナルコンジュゲート」という用語は、1 種又は複数種のシグナル成分と結合した、1 種又は複数種のシグナル抗体を指す。「シグナル成分」は、シグナル抗体を介して被験物と結合した場合、被験物、例えば抗原の存在を示すことができる成分を意味する。シグナル成分の例は、例えばアルカリホスファターゼ (A L P) などのシグナル酵素及び蛍光染料を含む。好ましい実施形態において、シグナルコンジュゲートは、1 つ又は複数の A L P 分子と結合した、1 つ又は複数の (好ましくは 1 対の) 抗原結合断片 (F A B) 抗体の断片を含む。本標識方法は、シグナル抗体、例えば F A B 断片対シグナル成分、例えば A L P などのシグナル酵素又は蛍光染料、対シグナルコンジュゲート当たりのシグナル抗体の数及び対シグナルコンジュゲート当たりのシグナル成分の数の比にわたって高度の調節をもたらす。

【 0 0 3 9 】

伝統的なサンドイッチアッセイは、普通、個々の F A B に対する 0 ~ 1 5 A L P のシグナル抗体対シグナル成分 (例えば F A B 対 A L P) の比及びシグナルコンジュゲート当たりのシグナル抗体及びシグナル成分のそれぞれの数は可変である。これらの可変比により、生物試料中の低レベルの被験物に対してより感度の高いと思われる予測可能なシグナルを得ることは難しい。

【 0 0 4 0 】

一実施形態において、シグナル成分、例えば A L P などのシグナル酵素又は蛍光染料のシグナルコンジュゲート当たりの平均数は、約 1 から約 1 0 0 まで、例えば 1 から約 5 まで、例えば約 5 から約 1 0 まで、又は約 1 0 から約 1 0 0 までに及び、大型の凝集体と比較して高い拡散係数を保有している。好ましくは、これらの範囲は、シグナルコンジュゲートを分離するステップなしに、例えばサイズ排除クロマトグラフィーを介して達成可能であり、所望のシグナルコンジュゲート当たりのシグナル成分数を有するシグナルコンジュゲートに到達する。さらに、このようなシグナルコンジュゲート、例えば F A B - A L P コンジュゲートは、A L P 対 F A B の比が調節可能であるためにオペレーターが高度に

10

20

30

40

50

予測可能な結果を得ることができる免疫測定法において、有用であり得る。予測可能な結果によって、免疫測定法の感度の改善をもたらすことができ、したがって c T n I などの低レベルの標的被験物の信頼できる検出をもたらすことができる。

【 0 0 4 1 】

シグナルコンジュゲートは、シグナル成分対シグナルコンジュゲートの比の分布が狭いことがさらに好ましく、このことは検出装置及び検出方法の精度の改善をもたらす。例えば、様々な実施形態において、この検出装置又は検出方法において形成された、又は使用されたシグナルコンジュゲートの少なくとも 5 0 w t . %、例えば少なくとも 7 0 w t . %、少なくとも 9 0 w t . % 又は少なくとも 9 5 w t . % は、シグナルコンジュゲート当たり 5 から 1 0 のシグナル成分を有する。別の実施形態において、この検出装置又は検出方法において形成された、又は使用されたシグナルコンジュゲートの少なくとも 5 0 w t . %、例えば少なくとも 7 0 w t . %、少なくとも 9 0 w t . % 又は少なくとも 9 5 w t . % は、シグナルコンジュゲート当たり 1 から 5 のシグナル成分を有する。さらに別の実施形態において、この検出装置又は検出方法において形成された、又は使用されたシグナルコンジュゲートの少なくとも 5 0 w t . %、例えば少なくとも 7 0 w t . %、少なくとも 9 0 w t . % 又は少なくとも 9 5 w t . % は、シグナルコンジュゲート当たり 1 0 から 1 0 0 のシグナル成分を有する。

10

【 0 0 4 2 】

さらに、縮小 $F(a, b)^2$ シグナルコンジュゲートは、シグナルコンジュゲートにつき単一のシグナル抗体を含有することが好ましい。しかし、シグナルコンジュゲートを形成する従来の技術は、シグナルコンジュゲート当たりのシグナル抗体の数（例えば 0 ~ 4 又はそれより多く）の分布が広いシグナルコンジュゲートの形成をもたらし得る。本発明の方法及び装置に従った、シグナルコンジュゲート当たりのシグナル抗体の平均数、例えば、縮小 $F(a, b)^2$ 断片の平均数は、図 5 に例示するように、1 から 4 までの範囲が好ましく、好ましくは 2 である。好ましくは、これらの範囲は、シグナルコンジュゲートを分離するステップなしに、例えばサイズ排除クロマトグラフィーを介して達成可能であり、所望のシグナルコンジュゲート当たりのシグナル成分数を有するシグナルコンジュゲートに到達する。

20

【 0 0 4 3 】

シグナルコンジュゲートは、シグナル抗体対シグナルコンジュゲートの比の分布が狭いことがさらに好ましく、このことは検出装置及び検出方法の精度の改善を提供する。例えば、様々な実施形態において、この検出装置又は検出方法において形成された、又は使用されたシグナルコンジュゲートの少なくとも 5 0 w t . %、例えば少なくとも 7 0 w t . %、少なくとも 9 0 w t . % 又は少なくとも 9 5 w t . % は、シグナルコンジュゲート当たり 1 から 4 のシグナル抗体を有する。好ましい実施形態において、この検出装置又は検出方法において形成された、又は使用されたシグナルコンジュゲートの少なくとも 5 0 w t . %、例えば少なくとも 7 0 w t . %、少なくとも 9 0 w t . % 又は少なくとも 9 5 w t . % は、シグナルコンジュゲート当たり 2 つのシグナル抗体を有する。

30

【 0 0 4 4 】

本発明の様々な実施形態に従って、シグナルコンジュゲートは、シグナルコンジュゲートの集団中で、シグナル成分対シグナル抗体の全体の比において高度の調節可能性を有することがさらに好ましい。いくつかの例示的实施形態において、シグナル成分、例えば A L P 又は蛍光染料などのシグナル酵素の、シグナル抗体、例えば F A B 断片に対する比の平均数は、個別に、及びシグナルコンジュゲートの全体集団において、0 . 5 から 1 0 0 まで、例えば 0 . 5 から 5 まで、例えば 5 から 1 0 まで、又は 1 0 から 1 0 0 までに及ぶ。この場合も同様に、好ましくは、これらの範囲は、シグナルコンジュゲートを分離するステップなしに、例えばサイズ排除クロマトグラフィーを介して達成可能であり、所望のシグナル成分対シグナル抗体の比を有するシグナルコンジュゲートに到達する。

40

【 0 0 4 5 】

シグナルコンジュゲートは、シグナルコンジュゲート当たりのシグナル成分対シグナル

50

抗体の数の比の分布が狭いことがさらに好ましく、このことは検出装置及び検出方法の精度の改善をもたらす。例えば、様々な実施形態において、この検出装置又は検出方法において形成された、又は使用されたシグナルコンジュゲートの少なくとも50wt.%、例えば少なくとも70wt.%、少なくとも90wt.%又は少なくとも95wt.%は、1から5までの範囲のシグナル成分対シグナル抗体の数の比を有する。好ましい実施形態において、この検出装置又は検出方法において形成された、又は使用されたシグナルコンジュゲートの少なくとも50wt.%、例えば少なくとも70wt.%、少なくとも90wt.%又は少なくとも95wt.%は、5から10までの範囲のシグナル成分対シグナル抗体の数の比を有する。別の実施形態において、この検出装置又は検出方法において形成された、又は使用されたシグナルコンジュゲートの少なくとも50wt.%、例えば少なくとも70wt.%、少なくとも90wt.%又は少なくとも95wt.%は、10から100までの範囲のシグナル成分対シグナル抗体の数の比を有する。

10

【0046】

シグナルコンジュゲートの拡散係数は、検出装置中でシグナルコンジュゲートの効率的な輸送を提供するために十分低いことが好ましい。拡散係数が低いほど、サンドイッチ免疫測定法の形成に必要な時間を減少させる。免疫測定法の形成時間の減少は、感度も増加させながら、リアルタイムで試験の効率を改善する。いくつかの例示的实施形態において、シグナルコンジュゲートの拡散係数は、約 1×10^{-8} から約 $1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 / \text{秒}$ に及ぶ(Bruner & Kim、1993年、Proceedings of the National Academy of Sciences、90巻：3835~3839頁)。

20

【0047】

検出される標的被験物は変化に富む場合がある。いくつかの例示的实施形態において、被験物は、TnI、TnT、TnC、CK-M、CK-B、CK-MB、ミオグロビン、TSH、FSH、CRP、BNP、pro-BNP、PSA、PCA、アポリポタンパク質及びそれらの組み合わせから選択される。標的被験物は抗原であってよい。本発明は、標的被験物としてcTnIに関して記載されるが、本発明の実施形態はcTnIの検出に限定されるものではなく、当業者には明らかであるように、本発明は他の被験物の検出にも同様に用いることができる。本発明の実施形態は、血液試料を含む生物試料中の心筋トロポニンI(cTnI)を測定するための、センサー装置の改善及び感度が増加した方法に全般に関する。

30

【0048】

cTnIは、活動性の心筋梗塞(MI)後すぐに血清中で検出可能であり、MIの発症後2~3日より長く存在し続ける、正確な心臓特異的生物学的パラメーターとして使用される。トロポニンは、3つのサブユニット：トロポミオシン結合サブユニットであるトロポニンT(「TnT」)、 Ca^{2+} 結合サブユニットであるトロポニンC(「TnC」)及びアクトミオシン Mg^{2+} ATPaseを阻害するサブユニットであるトロポニンI(「TnI」)の複合体として心臓組織に存在する。TnIは、細フィラメントの調節タンパク質複合体であり、心筋及び横紋筋にカルシウム感受性をもたらす。心筋TnIは、存在する唯一のイソ型である心筋中に特有に局在する。心筋TnIは、MI後迅速に(およそ4から6時間以内)ヒト血清中に出現する。18~24時間後にピークレベルに達し、6~10日まで血流中でレベルが上昇したままである。結果として、心筋から循環に放出されたcTnIは、心臓の損傷に非常に特異的である。一実施形態において、本発明のセンサー及び装置は、より高いレベルの感度を必要とする、非常に低レベルのcTnIの検出において有用である。上述のように、非常に低レベルのcTnIであっても、すなわち、急性心筋梗塞を示していると思われるレベルより低くても、将来の有害な心血管状態を示している可能性がある。いくつかの例示的实施形態において、本発明は10pg/mL未満の量のcTnI、例えば、1pg/mL未満又は0.1pg/mL未満を検出できる装置及び方法を提供し、その結果、心筋梗塞を予測する能力を提供する。

40

【0049】

50

抗原及び/又は被験物 (An) 101 は、米国特許公開第 2004/0018577 号に記載のように、図 1 に示すようなサンドイッチアッセイ 100 に基づくシステム及び処理によって従来から検出されており、米国特許公開第 2004/0018577 号の全体は、参照により本明細書に組み込まれる。本出願の目的のために、抗原及び/又は被験物 101 は、トロポニン cTnI を全般にさすが、他の型の抗原及び/又は被験物もアッセイによって検出できる。共有結合した捕捉抗体 (Ab1) 104 を有するカルボキシ誘導体化ポリスチレンビーズ 103 又は抗体若しくはそれらの結合断片を含む捕捉ビーズ 102 は、通常金又はプラチナで作られた金属電極 105 の上に位置する。分析アッセイの間に、血液などの被験試料中に見出される抗原 101 は捕捉抗体 104 に結合される。検出抗体 (Ab2) 106、抗体又はそれらの結合断片は、シグナル発生酵素 (ENZ) 107、例えばアルカリホスファターゼ (ALP) とコンジュゲートされる。従来のシグナル成分に関して、架橋剤、例えばスクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]-シクロヘキサン-1-カルボキシ[6-アミド-カプロエート]、グルタルアルデヒド、アジピン酸ジヒドラジド、ビス-ジアゾ化ベンチジン、1,4-ブタンジグリシジルエーテル、ビス-マレイミドヘキサン、スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート又はN-ヒドロキシスクシンイミジル4-アジドサリチル酸は、ENZ を用いて Ab2 を標識するために使用できる。市販の免疫測定製品及びそれらが基づく技術に関するさらなる情報に関しては、参照により本明細書に組み込まれる、Wild (編)、The Immunoassay Handbook、Stockton Press N.Y.、1994 年を参照されたい。検出抗体 106 及び酵素 107 は、共有結合しており、検出抗体コンジュゲート 108 を形成する。コンジュゲートの集団 108 は、上で参照した米国特許第 7,419,821 号に記載の酵素 107 により発生された起電性種が、金属電極 105 に近接し、次いで発生されるべき電気化学シグナルを発生可能にする。An は、エピトープ (e1 及び e2) を介してそれぞれ Ab1 及び Ab2 に結合する。

【0050】

DNA 指向性固定化 (DNA-Directed Immobilization: DDI) は、抗原 101 の別の従来の検出系であり、図 2 に表される。共有結合した核酸 111 を有するカルボキシ誘導体化ポリスチレンビーズ 103 を含む捕捉ビーズ 102 は、通常金又はプラチナで作られた金属電極 105 の上に位置する。捕捉抗体 104 (単数又は複数) 又はそれらの結合断片は、核酸 110 と共有結合している。110 及び 111 で表される核酸は、ハイブリダイズされた二本鎖 DNA の安定な領域を生み出す相補的な領域を有する。タンパク質及び核酸の共有結合が、5' 若しくは 3' 末端において、又は 1 つ若しくは複数の塩基の修飾を介して起こりうることは、当業者に理解されるであろう。DDI を使用する分析アッセイ中、検出は、図 1 に記載の処理と同様である。検出コンジュゲート 108 の検出抗体 106 は、抗原 101 と結合し、酵素 107 は、電極 105 により検出されるシグナルを発生する。

【0051】

別の従来の検出系は、図 3 に表されている DNA 指向性固定化により示される。共有結合した核酸 111 を有するカルボキシ誘導体化ポリスチレンビーズ 103 を含む捕捉ビーズ 102 は、通常金又はプラチナで作られた金属電極 105 の上に位置する。核酸配列 112 は、捕捉ビーズ 103 と結合した核酸 111 とハイブリダイゼーションすることができる領域 110'、図 1 を参照して上記で説明された抗体サンドイッチ構造 100 と結合した相補的核酸配列 114 とハイブリダイゼーションする配列 113、及び任意選択のスペーサー配列 115 を有することが特徴である。図 3 に示すように、複数配列 113'、相補的核酸配列 114' とハイブリダイズする 113''、複数のサンドイッチ構造と結合するための 114'' が存在し得る。さらなるスペーサー配列 115' は核酸 112 の個々の配列 113 を分離し得る。3 つのサンドイッチ構造 100 を図 3 に示すが、他の DNA 指向性固定化において、核酸配列 112 を介して結合した、より多くのサンドイッチ構造 100 が存在し得る。捕捉抗体 104 は、核酸配列 114 と共有結合している。上記のよ

10

20

30

40

50

うに、抗原 101 は捕捉抗体 104 により捕捉され、酵素 107 を有する検出抗体 106 は捕捉抗原 101 と結合する。

【0052】

従来の検出アッセイの1つの派生物を図4に示す。核酸 116 は電極 105 上のビーズ 103 と共有結合している。捕捉抗体 104 は、核酸 116 と共有結合しており、この捕捉種にさらなる可撓性をもたらす。抗原 101 は、上記のように検出抗体 106 及び酵素 107 により検出される。

【0053】

本発明の一実施形態において、分析スキームは、低濃度の免疫活性被験物、例えば c T n I の検出のために提供される。この分析スキームは、1つ又は複数のシグナル抗体（好ましくは1対のシグナル抗体）が、DNA 架橋を介して1つ又は複数のシグナル成分と結合する、シグナルコンジュゲートの形成によるものである。シグナルコンジュゲート中のシグナル抗体は被験物と結合し、これが次いで捕捉抗体と結合して「サンドイッチ」複合体を形成する。用いるシグナル成分に依存して、試料中の被験物の濃度は、比例するシグナルに変換され得る。例えば、シグナル成分が ALP などのシグナル酵素を含む場合は、試料中の被験物の濃度は、比例するシグナル酵素の表面濃度に変換され得る。酵素は、基質を検出可能な生成物に変換することによって、被験物の化学的シグナルを増幅することができる。例えば、ALP が酵素の場合、単一酵素分子は、1分間で約 9000 の検出可能分子を生成することができ、電気活性種が、アルカリホスファターゼの代わりに抗体に結合するスキームと比較して、被験物の検出能において数桁の改善をもたらす。

【0054】

低レベルの被験物 201、例えば c T n I を検出するために、図5及び6に示すような新規な捕捉抗体方法を用いてもよい。示すように、共有結合した捕捉抗体 204 を有するカルボキシ誘導体化ポリスチレンビーズ 203 を含む捕捉ビーズ 202 は、金属電極 205 の上に位置する。「捕捉抗体」202 又は「捕捉試薬」は、対象の被験物 201 のエピトープと特異的に結合する抗体を意味し、捕捉抗体 204 は、対象の被験物 201 と (i) 結合前、(i i) 結合後、又は (i i i) 結合中にビーズ 203 に固定される。ビーズ 203 に固定されていない検出抗体又はシグナル抗体 206 は、生物試料中に存在するのであれば、対象の被験物 201 のさらなるエピトープと結合する。初めに、シグナル抗体 206 は、装置の導管内（例えば、試料が装置に導入される下流であるが、固定された捕捉抗体の上流）で、試料が可溶化剤に接触するとき、シグナル抗体 206 が試料に可溶化されるように、可溶化剤、例えば糖マトリックス中に配置できる。本発明に使用する抗体 204、206 は、完全長抗体、一本鎖抗体又は F A B 断片などの抗体断片を含むことができる。当業者は、対象被験物 201 のエピトープと特異的に結合できる任意の結合メンバーを使用することによって、本明細書に記載の発明が対象被験物 201 を検出できることを認識するであろう。結合メンバーは、限定するものではないが、細胞外又は細胞内の受容体、ポリヌクレオチド、ペプチド核酸及びそれらの誘導体を含む。

【0055】

第1の一本鎖ヌクレオチド 210 は、シグナル抗体 206 に共有結合している。シグナル成分 207、例えば蛍光染料のシグナル酵素は、第1の一本鎖ヌクレオチド 210 と相補的である第2の一本鎖ヌクレオチド 211 と共有結合している。第1の一本鎖ヌクレオチド 210 及び第2の一本鎖ヌクレオチド 211 は合成ヌクレオチドであり、5' 末端、3' 末端又はヌクレオチド配列内部にカップリング部分を含有することができる。カップリング部分は、アミノ修飾因子、チオール修飾因子及びジチオールからなる群から選択される修飾ホスホラミダイトから作製され得る。合成オリゴヌクレオチドの3' 末端又は5' 末端は、保護化学基、例えばホスホロチオエート（又は S - オリゴ）を組み込むことによって、試料中の内因性エキソヌクレアーゼ活性から保護される。抗体 206、酵素 207、第1の一本鎖ヌクレオチド 210 及び第2の一本鎖ヌクレオチド 211 は、検出抗体コンジュゲート 208 を含む。

【0056】

10

20

30

40

50

シグナル成分がシグナル酵素である実施形態において、シグナル酵素は、アルカリホスファターゼ（ALP）、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、ウレアーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びベータガラクトシダーゼからなる群から選択されることが好ましい。好ましい実施形態において、ALPはシグナル酵素である。

【0057】

様々な代替の実施形態において、1種又は複数種のシグナル成分は、1種又は複数種の非酵素的検出部分を含む。非酵素的検出部分の例は、蛍光、色及び放射性的成分、種又は染料を含み、これらの具体例は6-FAM（6-カルボキシフルオロセイン）、放射能又は量子ドットを含む。

10

【0058】

一実施形態において、第1及び第2の鎖ヌクレオチドは、18~10,000塩基の残基を有する合成オリゴヌクレオチドである。好ましい一実施形態において、個々の配列はスペーサー、例えば反復塩基残基を有し、シグナルコンジュゲート、例えばFAB-ALPコンジュゲートを形成することができる。図5に示すように、第1及び第2の鎖ヌクレオチドはハイブリダイズして、シグナル抗体と、シグナル成分、例えばALPとの間に架橋を形成する。

【0059】

一実施形態において、図6に示すように、反復する第1の鎖ヌクレオチド210、210'の一部は複数の第2の鎖ヌクレオチド211、211'と結合して、DNA足場又はマルチマー構造212を形成する。第1の鎖ヌクレオチド210、210'の各部分は、反復配列であってもよい。第2の鎖ヌクレオチド211、211'は、第1の鎖ヌクレオチド210、210'の利用可能部分と結合する。例えば、FAB:ALPコンジュゲートの場合、1:5（FAB:ALP）の比は、ALP207、207'にそれぞれ結合した5つの第2の配列211、211'と結合する5つの反復配列を有する、第1の鎖ヌクレオチド210、210'によって達成され得る。一実施形態において、第1の鎖ヌクレオチド210は、少なくとも3つの1種又は複数種のシグナル酵素207の、少なくとも3つの第2の配列211と結合する、少なくとも3つの反復配列を有する。一実施形態において、第1の鎖ヌクレオチド210は、少なくとも3つの1種又は複数種のシグナル酵素207の、少なくとも5つの第2の配列211と結合する、少なくとも5つの反復配列を有する。一実施形態において、異なるシグナル成分207、例えばシグナル酵素又は蛍光染料と結合するための、第1の鎖ヌクレオチド210の少なくとも2つの異なる部分が存在する。

20

30

【0060】

場合により、1つ又は複数のスペーサー配列（図示せず）が、第1の鎖ヌクレオチド210、210'及び/又は第2の鎖ヌクレオチド211、211'を分離し得る。第2の鎖ヌクレオチド211、211'は、酵素207に結合するスペーサー配列213、213'もまた有し得る。

【0061】

一実施形態において、図6のDNA足場212は、検出抗体206が抗原201に結合した場合、酵素207、207'により発生されたシグナルを増幅できる。

40

【0062】

図7は、検出抗体206が核酸配列214と共有結合しており、核酸配列214が他の末端において酵素207とさらに共有結合している本発明の実施形態を表す。これにより、この構造の柔軟性を増加させる。

【0063】

図8は、抗体300の詳細な表示である。抗体300は、本出願の全体で記載している検出抗体又は捕捉抗体であってよい。抗体300は、2種の抗体種301及び302を含む。2種の抗体種301、302はそれぞれ、長鎖又は断片303、304及び軽鎖305、306を含む。抗体種301は、核酸配列309と共有結合している。抗体種302

50

は、核酸配列 310 と共有結合している。核酸配列 309 及び 310 は、ハイブリダイズ可能な結合領域を有する。一実施形態において、抗体種は異なり、ハイブリダイゼーション事象を介して 1 つにつながる。抗体種 301 及び 302 は、同じエピトープ、同じ抗原上の異なるエピトープ又は異なる抗原を認識できる。

【0064】

図 9 は、酵素 307 を有するコンジュゲート 308 を含む抗体 300 の別の詳細な表示である。種 302 の長鎖 304 は核酸配列 313 と共有結合している。酵素 307 は、核酸配列 314 と共有結合している。核酸配列 313 及び核酸配列 314 は、ハイブリダイズ可能な結合領域を有する。当業者には、核酸配列がいずれかの種の長鎖と共有結合できることは理解されるであろう。さらに、図 9 に示した抗体種の両方が、それらと共有結合した異なる配列又は同じ配列を有することができる。この配列が異なる場合、機能性を伴う異なる相補的配列、例えば異なる酵素コンジュゲートを使用できる。

10

【0065】

一実施形態において、図 10 に示すように、第 1 の鎖ヌクレオチド 313 の一部は複数の第 2 の鎖ヌクレオチド 314、315、315' と結合して、DNA 足場又はマルチマー構造 312 を形成する。各抗体種 301、302 は、それぞれ DNA 足場 312、322 と結合している。DNA 足場 312 は、核酸 316、316' とハイブリダイズ可能な結合領域をそれぞれ有する反復核酸 315、315' を含む。核酸 316、316' は、スペーサー配列 317、317' を使用して酵素 307、307' と結合している。同様に、DNA 足場 322 は、核酸 324、324' とハイブリダイズ可能な結合領域をそれぞれ有する反復する核酸 323、323' を含む。核酸 324、324' は、スペーサー配列 325、325' を使用して酵素 318、318 と結合している。DNA 足場 322 は、種 301 と共有結合している核酸 319 とハイブリダイズする結合領域を有する核酸 320 をさらに含む。いくつかの実施形態において、核酸と酵素との間にスペーサーは使用されない。他の実施形態において、それぞれの足場 312 及び 322 において反復する核酸の間にさらなるスペーサーが提供される。

20

【0066】

図 11 は、本発明の一実施形態に従う酵素コンジュゲート集合 400 を表す。酵素コンジュゲート集合 400 は、4 種の抗体 401、402、403 及び 404 並びに 2 種の酵素 405 及び 406 を含む。酵素 405 は、それに結合する核酸 407 を有する。酵素 406 は、それに結合する核酸 408 を有する。抗体 401 に関しては、2 つの異なる核酸配列、410 及び 411 が共有結合している。抗体 402 は、2 つの核酸配列、420 及び 421 が共有結合している。抗体種 403 は、2 つの核酸配列、430 及び 431 が共有結合している。抗体種 404 は、2 つの核酸配列、440 及び 441 が共有結合している。核酸配列対は、以下の結合対を形成している：407 と 410、411 と 420、421 と 430、431 と 440 及び 441 と 408。

30

【0067】

図 6 に戻ると、同じ型の多数の酵素を有する 1 つの DNA 足場が示されている。一実施形態において、DNA 足場は、図 12 に示すように異なる型の酵素を有することができる。図 12 において捕捉ビーズ 202 は、共有結合している捕捉抗体 204 を有するカルボキシ誘導体化ポリスチレンビーズ 203 を、電極 205 上に含む。この描写において抗原がトロポニン c T n I である場合、分析アッセイの間に血液などの被験試料中に見出される抗原 201 は、捕捉抗体 204 に結合される。検出抗体 (単数又は複数) 又はそれらの結合断片 206 は、結合領域 210、210' 及び 220、220' の交互の反復により構成される DNA 足場 212 の一部である核酸配列 210 にコンジュゲートしている。2 種の異なる核酸コンジュゲートが、この分析アッセイに使用される。グルコースオキシダーゼ酵素 217、217' は、スペーサー配列 213、213' を用いて核酸配列 211、211' にコンジュゲートしている。ホースラディッシュペルオキシダーゼ酵素 218、218' は、スペーサー配列 223、223' を用いて核酸配列 221、221' にコンジュゲートしている。核酸配列 211、211' は、それぞれ核酸配列 210、210

40

50

’と結合している。核酸配列 2 2 1、2 2 1’は、それぞれ核酸配列 2 2 0、2 2 0’と結合している。この分析アッセイにおいて、グルコースは、グルコースオキシダーゼにより過酸化水素に変換される。過酸化水素は、基質のテトラメチルベンジジンの存在下でシグナルを示す青色の化学種に変換される。

【 0 0 6 8 】

図 1 3 は、異なる型の酵素を有する別の DNA 足場 2 1 2 を表す。D - 乳酸デヒドロゲナーゼ [E C 1 . 1 . 2 . 7] 2 2 7、2 2 7’は、スパーサー配列 2 1 3、2 1 3’を使用して核酸配列 2 1 1、2 1 1’と共有結合している。ピルビン酸オキシダーゼ [E C 1 . 2 . 3 . 3] 2 2 8、2 2 8’は、スパーサー配列 2 2 3、2 2 3’を使用して核酸配列 2 2 1、2 2 1’と共有結合している。核酸配列 2 1 1、2 1 1’及び 2 2 1、2 2 1’は、それぞれ核酸配列 2 1 0、2 1 0’及び 2 2 0、2 2 0’と結合している。乳酸は、乳酸デヒドロゲナーゼによりピルビン酸に変換される。ピルビン酸は、ピルビン酸オキシダーゼにより過酸化水素に変換される。これらの成分の集合により、酵素 2 2 7、2 2 7’及び 2 2 8、2 2 8’により発生される起電性種の過酸化水素が金属電極 2 0 5 に非常に近接して存在し、次いで電気化学的シグナルを発生させることを可能にする。

10

【 0 0 6 9 】

図 1 4 は多重抗原検出 (M A D) アッセイを表す。このような M A D アッセイは、米国特許公開番号 2 0 0 5 / 0 0 9 5 6 2 7 号にさらに記載されており、この内容及び開示の全体は参照により本明細書に組み込まれる。抗体種 5 0 1 は、核酸 5 0 2 と共有結合している。抗体種 5 0 3 は、核酸 5 0 4 と共有結合している。抗原断片又は抗原種 5 0 5 及び 5 0 6 が互いに結合しており、抗体 5 0 1 及び 5 0 3 がそれら各自の抗原断片又は抗原種 5 0 5 及び 5 0 6 とそれぞれ結合している場合、核酸配列 5 0 2 及び 5 0 4 は、相補的領域において互いに結合している。

20

【 0 0 7 0 】

図 1 5 A ~ 1 5 D は、抗原 6 0 3 の 2 つの異なる位置において 2 つの抗体 6 0 1、6 0 2 と結合する抗原 6 0 3 に依存する、ハイブリダイゼーション種の作製を表す。核酸のハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション領域に基づき非効率的であり、抗体の相互作用の高い熱力学的安定性を必要とする。抗体種 6 0 1 及び 6 0 2 は、2 つの異なる位置において抗原 6 0 3 と結合している。各抗体種 6 0 1 及び 6 0 2 は、重鎖 6 0 4 及び軽鎖 6 0 5 を含有する。抗体種 6 0 1 は、核酸配列 6 0 6 と共有結合している。抗体種 6 0 2 は、核酸配列 6 0 7 と共有結合している。核酸配列 6 0 6 は、スパーサー領域 6 1 0、結合領域 6 1 1、結合領域 6 1 2 及び DNA 重合化ブロッキングヌクレオチド 6 1 3、例えばジデオキシヌクレオチド塩基又はアシクロヌクレオチド塩基から構成される。核酸配列 6 0 7 は、スパーサー領域 6 1 5、結合領域 6 1 6、結合領域 6 1 7 及び DNA 重合化ブロッキングヌクレオチド 6 1 8 から構成される。結合配列 6 1 2 及び 6 1 7 は、互いにハイブリダイズする。スパーサー配列 6 1 0 及び 6 1 5 はハイブリダイズしない。

30

【 0 0 7 1 】

次いで、図 1 5 A のこの構造は、制限エンドヌクレアーゼを用いて処理され、図 1 5 B に示す構造を作り出す。抗体種 6 0 1 は、元の核酸配列 6 0 6 から、ハイブリダイゼーション及び制限エンドヌクレアーゼによる酵素的切断により作製された核酸 6 2 0 と共有結合している。抗体種 6 0 2 は、元の核酸配列 6 0 7 から、ハイブリダイゼーション及び制限エンドヌクレアーゼによる酵素的切断により作製された核酸配列 6 2 1 と共有結合している。核酸配列 6 2 0 及び 6 2 1 の両方は、3’末端ヒドロキシ基を含有する。核酸構造 6 3 0 は、E p i c e n t r e 社製の C i r c L i g a s e を用いて環状化された合成オリゴヌクレオチド又は一本鎖ファージ若しくはファージミドから作製された一本鎖環状核酸である。核酸構造 6 3 0 は、6 1 1 とハイブリダイズした結合領域 6 3 1 並びに結合領域 6 3 2、6 3 3 及び 6 3 4 の成分を含有する。結合領域 6 1 1 において、遊離の 3’ - ヒドロキシにより結合している一本鎖プライマー配列 6 2 0 は、鎖置換 DNA ポリメラーゼ及び d N T P による DNA 合成の鋳型として環状構造 6 3 0 を使用できる。結果として生じる構造を図 1 5 C に記載する。

40

50

【 0 0 7 2 】

図 1 5 C の構造 6 4 0 は、抗体種 6 0 2 に共有結合した核酸配列 6 2 1、トロポニン抗原 6 0 3、核酸配列 6 4 1 に共有結合した抗体種 6 0 1 から構成される。核酸配列 6 4 1 は、結合配列 6 1 1、6 4 2、6 4 3 及び 6 4 4 の反復単位から構成される。環状核酸種 6 3 0 に由来する結合領域 6 3 2 は、結合領域 6 4 4 においてハイブリダイズする。

【 0 0 7 3 】

構造 6 5 0 に示すように、結合配列 6 4 2 とハイブリダイズする合成オリゴヌクレオチド配列 6 5 1 を反応に加える。制限エンドヌクレアーゼを、構造 6 6 0 を作り出す構造 6 5 0 を用いる反応に加える。分子は分断されて、互いに共有結合した核酸配列 6 2 1 及び抗体種 6 0 2 を有する分子と、抗体種 6 0 2 に結合したトロポニン抗原 6 0 3 とになるであろう。抗原 6 0 3 はまた、核酸配列 6 1 1 と共有結合した抗体種 6 0 1 とさらに結合するであろう。結合領域 6 4 3、6 4 4 及び 6 1 1 を含有するさらなる断片 6 6 1 及び 6 6 2 が生み出される。分析的検出ステップにおけるこれらの断片 6 6 1、6 6 2 を、図 1 5 D に記載する。

10

【 0 0 7 4 】

図 1 5 D は、核酸配列 6 7 3 とハイブリダイズする副成分 6 4 3 を有する断片 6 6 1 が、金属電極 6 7 1 の上部に位置するカルボキシポリスチレンビーズ 6 7 2 と共有結合した、検出ステップを表す。断片 6 6 1 は、アルカリホスファターゼ 6 7 5 と共有結合する核酸配列 6 7 4 とハイブリダイズする領域 6 4 4 をさらに有する。これらの成分の集合により、酵素 6 7 5 により発生される起電性種が金属電極 6 7 1 に非常に近接して存在し、次いで発生されるべき電気化学的シグナルが発生させることを可能にする。

20

【 0 0 7 5 】

図 1 6 は、核酸鎖置換ステップによるシグナル増幅に基づく抗原の分析検出を表す。図 1 6 A から開始すると、捕捉ビーズ 7 0 3 は捕捉抗体 7 0 4 に共有結合している。抗原 7 0 1 は、抗体種 7 0 4 に結合している。結合配列 7 1 1、7 1 2 及び 7 1 3 からなり、検出抗体 7 0 6 に共有結合している核酸配列 7 1 0 は、抗原 7 0 1 と結合している。

【 0 0 7 6 】

試料を洗浄し、その後結合配列 7 1 0 と相補的な核酸配列 7 2 0 を加え、その後、図 1 6 B に示すように、構造 7 1 5 を生み出す新しい合成配列を作製する DNA の重合を実施する。核酸配列 7 2 0 は、それぞれ 7 1 1、7 1 2 及び 7 1 3 と指定された、核酸配列 7 1 0 上の結合成分とハイブリダイズ可能な、結合成分 7 2 1、7 2 2 及び 7 2 3 を含有する。

30

【 0 0 7 7 】

図 1 6 C に示すように、鎖置換反応は、結合成分 7 2 2 及び 7 2 3 を含有する核酸配列 7 2 5 を生み出す。核酸配列 7 2 2 は、第 2 の捕捉部位において反応したカルボキシポリスチレンビーズ 7 3 0 と共有結合した相補的結合配列 7 0 8 と結合する。核酸配列 7 0 9 は核酸結合配列 7 2 3 と共有結合し、核酸配列 7 0 9 がアルカリホスファターゼ酵素 7 0 7 と結合される。

【 0 0 7 8 】

これらの成分の集合により、上記 ' 8 2 1 の参考文献に記載されている酵素 7 0 7 により発生される起電性種が金属電極（図示せず）に非常に近接して存在し、次いで発生されるべき電気化学的シグナルが発生されることを可能にする。

40

【 0 0 7 9 】

第 1 及び第 2 の鎖ヌクレオチドの結合は、シグナル抗体とシグナル成分とを結合するために従来使用されてきた架橋剤に取って代わることは理解されるべきである。したがって、本発明の好ましい実施形態は、架橋剤を必要とせず、又は用いず、このような架橋剤を実質的に又は完全に含まなくてもよい。

【 0 0 8 0 】

抗体が被験物の 2 つのエピトープと結合することに関して上に記載しているが、いくつかの実施形態において、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開番号

50

第2004/0018577号に記載のように、被験物の3つのエピトープと結合する3つの抗体が存在してもよい。対象の被験物及びそれらの1種又は複数種のサブフォームは、(i)サンドイッチの捕捉側、(ii)サンドイッチのシグナル側、(iii)又は両方のいずれかの被験物上の複数のエピトープに特異的な抗体を使用する免疫測定法を実施することによって検出できる。全体で、対象の被験物上の少なくとも3つのエピトープを標的化することにより、特定のエピトープがサブフォームにおいて結合に利用できない場合であっても、捕捉抗体により結合可能な少なくとも1つのエピトープ及びシグナル抗体による結合に利用できる少なくとも1つのエピトープが存在する限り、本発明の多重サンドイッチアッセイは、被験物及びそれらのサブフォームの存在を検出できる。

【0081】

図1～16が系の様々な部分の機能性を概念的に表す目的であることにもまた留意すべきである。例えば、被験物がF(ab)分子間のポケットに結合する抗体分子が示されているが、被験物は、個々のF(ab)断片の結合領域と結合することが当分野において知られている。

【0082】

イムノセンサーの実施形態において、まずセンサーと試料を接触させ、次いで洗浄液を接触させ、その後センサーからの反応を記録することは有利である。洗浄は、電極に結合していない生物試料、すなわち対象でない試料を除去するために使用できる。特定の実施形態において、試料は、試料内の対象の被験物と結合する(シグナル抗体(単数又は複数)とシグナル成分(単数又は複数)との間の上記のヌクレオチド架橋を有する)シグナルコンジュゲートを用いて修正され、その後修正試料とセンサーとを接触させる。試料における結合反応は、被験物/シグナルコンジュゲート複合体を生成する。センサーは、電極表面に密着させた、被験物に対する固定化抗体を含む。センサーの接触において、被験物/シグナルコンジュゲート複合体は電極表面近くの固定化抗体と結合する。この時点において、電極の近くからできる限り多くの結合していない抗体を除去し、センサーからのバックグラウンドシグナルを最小化することは有利である。シグナル成分が、ALPなどのシグナル酵素を含む場合、シグナルコンジュゲート複合体は、流体中に提供された基質を有利に変換することができ、電気化学的に活性な種を生成する。この活性種は、電極近くに生成され、適切な電位が印加された場合(電流測定操作)、電極での酸化還元反応によるいずれかの電流を提供する。或いは、電気活性種がイオンである場合、それを電位差測定で測定できる。電流測定において、電位は、測定の間固定されていても、又は所定の波型に従って変動してもよい。例えば、サイクリックボルタメトリーのよく知られている技術において使用されるように、三角波を使用して制限の間で電位を掃引できる。或いは、矩形波などのデジタル技術を使用して、電極に近接する電気活性種の検出における感度を改善できる。電流又は電圧測定により、試料中の被験物の量又は存在を計算できる。このシグナルは、生物試料中の対象の被験物の量に比例する。これら及び他の分析電気化学法は、当分野においてよく知られている。

【0083】

カートリッジがイムノセンサーを含む実施形態において、イムノセンサーは、非反応性金属、例えば金、プラチナ又はイリジウムのセンサーベース及び微粒子、例えばラテックス粒子に結合する生物活性層を重ねた多孔質の選択透過性の層から有利に微細加工される。この微粒子は、電極表面を覆っている多孔質層上に分配され、接着した多孔質生物活性層を形成する。生物活性層は、対象被験物に特異的に結合する特性、又は被験物が存在する場合、検出可能な変化を明らかにする特性を有し、被験物に対する最も好ましい固定化抗体である。

【0084】

本発明の装置は、カートリッジ、カラム、注射器、キュベット又は他の分析装置又は当分野において知られている系を含む。カートリッジは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,419,821号及び第5,096,669号に記載された型のカートリッジであってもよい。他のカートリッジの形状の例は、それらの全体が参

10

20

30

40

50

照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,416,026号、第5,593,638号、第5,447,440号、第5,628,961号、第5,514,253号、第5,609,824号、第5,605,664号、第5,614,416号、第5,789,253号、第6,030,827及び第6,379,883号に見出される。さらに他のカートリッジの形状は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、PCT/US00/31158、PCT/US01/04345、PCT/US2005/046772及び米国特許公開番号第2007/0154922号、第2005/0054078号、第2004/0018577号及び第2006/0160164号に記載されている。好ましい実施形態において、適切なカートリッジは、i-Statにより製造されるi-STAT cTnlを含み、i-STAT cTnlは、i-STAT Portable Clinical Analyzer、i-STAT1 Analyzer及びPhilips Medical Systems Blood Analysis Moduleと一緒に使用できる。

10

【0085】

本発明の例示的实施形態において、内蔵型の検知装置及びリーダーを提供する。内蔵型の検知装置は、使い捨て、又は単回使用のカートリッジであってよい。このリーダーは、画面又はプリンターなどの出力装置を有するハンドヘルドリーダーであってよい。操作者、例えば医師、看護師また又は技術者は、被験試料を検知装置に配置し、検知装置をリーダーに挿入する。工程が完了したら、操作者はリーダーから装置を取り外し、それを廃棄するだけである。その後リーダーは、別の検知装置の挿入により開始される別の測定を実施できる状態になる。

20

【0086】

適切な単回使用カートリッジは、生物試料を受け入れる試料流入口を有するハウジングを含む。試料は、存在する場合、標的被験物を含有する。試料流入口は1つ又は複数の電極を有する導管と接続される。電極には、捕捉抗体が結合されている。導管は、流入口と、上記のように可溶化剤、例えば糖マトリックス内の固定化捕捉抗体との間に配置されるシグナルコンジュゲートを含むことが好ましい。ハウジングは、洗浄液を含有する領域、(シグナル成分がシグナル酵素を含む実施形態において)酵素基質を含有する領域及び廃液チャンバーをさらに含む。これらの領域及び廃液チャンバーは、洗浄液が、これらの領域から導管にポンプ輸送又は吸引により輸送され、導管から廃液チャンバーに生物試料が除去され得るように導管に接続される。さらに、シグナルコンジュゲートがシグナル酵素を含む実施形態において、酵素基質を含有する領域は、酵素基質が、電極においてシグナル発生するシグナル酵素と反応できるように導管と接続される。これらの特徴に加えて、カートリッジは、以下にさらに記載するような1つ又は複数のさらなる特徴を含むことができる。

30

【0087】

カートリッジに関する図面は、図17~22に示され、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,419,821号及び米国特許公開番号第2006/0160164号及び第2005/0054078号にさらに記載されている。一実施形態において、検知装置は、本発明のカートリッジを含むことができる。このカートリッジは、図17及び18に示すようなカバー、図20に示すベース、及びベースとカバーとの間に配置される図19に示す薄膜接着ガasketを含む。ここで図17を参照すると、カバー1は、可撓性のヒンジ領域5、9、10において亀裂なしに繰り返し変形可能な剛体材料、好ましくはプラスチックで作られる。カバーは、可撓性のヒンジ9によりカバーの本体とつながっている蓋2を含む。操作において、試料を試料保持チャンバー34に導入後、蓋を試料流入口4の入り口の上に締め付けることができ、試料の漏れを防ぎ、蓋はフック3により適切な位置に保たれる。一実施形態において、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開番号第2005/0054078号に記載のように、カバーはスライド可能な閉鎖用具を含む。カバーは、カバーの本体に呼応して動くことができ、可撓性のヒンジ領域5、10によりカバーにつながっている2つのパドル6、7をさ

40

50

らに含む。

【0088】

操作において、ポンプ手段により操作される場合、パドル6は、薄膜ガスケット21により覆われている空洞43に含まれる気胞に対して力を加え、カートリッジの導管内の流体を置換する。第2のポンプ手段により操作される場合、パドル7は、ガスケット21に対して力を加え、ガスケット21は切り込まれたスリット22のため変形できる。カートリッジは、読み取り機器への挿入に適合し、したがって、この目的のための複数の機械的及び電氣的接続を有する。カートリッジの手動操作が可能なることも明らかであるはずである。従って、カートリッジの読み取り機器への挿入において、ガスケットは、空洞42に位置する、およそ130 μ lの分析/洗浄溶液(「流体」)で満たされた、流体含有ホイールパック上に圧力を伝え、スパイク38上のパッケージを破壊し、流体を、ベース中の短い横断導管を介してセンサー導管に接続される導管39に放出する。分析液は、キャピラリーストップとして作用するテープガスケット中の小型の開口部に流体を最初に押し出す分析導管の前面に満たされる。カートリッジに適用される分析器の機構の他の動作を使用して、1つ又は複数のセグメントを、分析導管内の調節位置において分析液に注入する。これらのセグメントを使用して、センサー表面及び周囲の導管を最小の流体で洗浄することを助ける。

10

【0089】

カバーは、柔軟な薄膜8により覆われた穴をさらに含む。操作において、膜にかけられた圧力は、1つ又は複数の空気セグメントを、ガスケット中の小孔28を介して導管20内に放出する。

20

【0090】

図18を参照すると、ベースの下面は第2の導管11及び第1の導管15をさらに含む。第2の導管11は狭窄部12を含み、これは、流体の流れに対する抵抗性を提供することによって流体流を調節する。任意選択のコーティング13、14は疎水性表面を提供し、ガスケットの孔31、32と一緒に導管11、15の間の液流を調節する。ベース中のくぼみ17は、導管34中の空気を、ガスケット中の孔27を介して導管34へ通過させる経路を提供する。

【0091】

図19を参照すると、薄膜ガスケット21は、様々な孔及びスリットを含み、ベース及びカバー内の導管の間の流体輸送を容易にし、必要に応じて圧力下のガスケットの変形を可能にする。従って、孔24は、流体が導管11から廃液チャンバー44へ流れることを可能にし、孔25は、導管34及び11の間のキャピラリーストップを含み、孔26は、空気がくぼみ18と導管40との間を流れることを可能にし、孔27は、くぼみ17と導管34との間の空気の動きを提供し、孔28は、任意選択の閉鎖可能なバルブ41を介して、導管19から廃液チャンバー44に流体が流れることを可能にする。孔30及び33は、それぞれカットウェイ35及び37内に収容された複数の電極が導管15内で流体に接触することを可能にする。特定の実施形態において、カットウェイ37は、接地電極及び/又は対向-参照電極を収容し、カットウェイ35は、少なくとも1つの被験物センサー及び場合により電気伝導度センサーを収容する。図19の構成要素29は、図17のカバー及び図18のベース中の領域に接触するテープの開口として機能する。孔92は、流体が、流入口4から導管34に流れることを可能にする。

30

40

【0092】

図20を参照すると、導管34は、組み立てられたカートリッジにおいて試料流入口4と第1の導管11とを接続する試料保持チャンバーである。カットウェイ35は、被験物センサー(単数又は複数)又は被験物応答性表面を、任意選択の電気伝導度センサー(単数又は複数)と一緒に収容する。カットウェイ37は、電気化学的センサーのリターン電流路として必要であれば接地電極を収容し、任意選択の電気伝導度センサーもさらに収容できる。カットウェイ36は、流体が第1の導管と第2の導管との間を通れるような、ガスケットの孔31と32との間の流体路を提供する。くぼみ42は、組み立てられたカー

50

トリッジにおいて、読み取り機器内への挿入においてパドル7にかかる圧力のためスパイク38により孔をあけられる流体含有パッケージ、例えば、破裂可能な小袋を収容する。孔をあけられたパッケージから流体は、39において第2の導管に流れる。気泡は、上面がガスケット21により密閉されているくぼみ43に含まれる。気泡は、ポンプ手段の一実施形態であり、導管40において空気を移動させ、その結果試料を試料チャンバー34から第1の導管15に移動させるパドル6にかけられた圧力により作動する。

【0093】

空気が気泡から試料チャンバー（ガスケットの孔27）に流入する位置及びキャピラリーストップ25は、試料チャンバーの所定の容量と一緒に規定する。パドル6が押し下げられる時、この容量に応じた量の試料が第1の導管に移動する。したがって、この構成は、未測定試料の一定量をカートリッジの導管に送達する、測定手段の実施形態の一候補である。

10

【0094】

本カートリッジにおいて、試料のセグメントを測定する手段を、ベースのプラスチック部分において提供する。セグメントサイズはベース中のコンパートメントのサイズ及びテーブガスケット中のキャピラリーストップ及び空気パイプ孔の位置により調節される。この容量は、2から200μリットルまで容易に変動させることができる。試料サイズのこの範囲の拡大は、本発明の背景において可能である。

【0095】

流体は、試薬（例えば、粒子又は可溶性分子）を修正するために使用できる予備分析導管11を介して試料中に押し出され、次いでセンサー導管19に提示される。又は、修正試薬は、16部分を超えて15部分に位置してもよい。予備分析導管からの試料の押し出しは、隔膜ポンプのパドル7に張力を導入するようにも機能し、これにより流体移動を起こす際のパドルの応答性が改善する。

20

【0096】

いくつかのアッセイにおいて、被験物の定量が必要な場合、測定は有利である。試料及び/又は導管から排出される流体用の廃液チャンバー44を提供し、カートリッジの外側表面の汚染を防ぐ。廃液チャンバーから外気に接続した脱気口45もさらに提供する。カートリッジの特徴は、一度試料を添加したら、分析は完了し、操作者又は他者が試料に接触することなくカートリッジを廃棄できることである。

30

【0097】

図21を参照すると、カートリッジ及び構成要素の特徴の概略図が提供され、51～57は、試料又は流体を修正するための、場合によって可溶化剤中にある乾燥試薬、例えばシグナルコンジュゲートで場合によってはコーティングされ得る導管部分及び試料チャンパーである。試料又は流体は、少なくとも1回は乾燥試薬の中を通り、それを溶解する。試料又は流体を修正するために使用するカートリッジ内の試薬は、シグナルコンジュゲート、又はアッセイ化合物の中で特異的又は非特異的ないずれかの結合反応を防ぐブロッキング剤を含む。可溶性ではないが、アッセイ成分がカートリッジの内部表面に非特異的に吸着することを防ぐのに役立つ表面コーティングもまた提供できる。

40

【0098】

試料又は流体のセグメント内で、修正物質は優先的に溶解され、セグメントの所定の領域内で濃縮され得る。このことは、セグメントの位置及び動きの調節を介して達成される。したがって、例えば、セグメントの一部、例えば最先端だけが修正物質に対して交換された場合、その場合は、高い局所濃度の物質が、最先端の近くにおいて達成され得る。或いは、物質の均一な分布が所望の場合、例えば、定量分析において既知の濃度の修正物質が必要な場合、その場合は、試料又は流体のさらなる交換が混合及びさらには分配においてもたらされるであろう。

【0099】

特定の実施形態において、閉鎖可能なバルブは、第1の導管と廃液チャンパーとの間に提供される。一実施形態において、このバルブ58は、不浸透性物質によりコーティング

50

された乾燥スポンジ材料を含む。操作において、スポンジ材料と試料又は流体とを接触させることにより、スポンジの膨潤がもたらされ、空洞41を満たし、その結果実質的に廃液チャンバー44へのさらなる液体の流れが実質的にブロックされる。さらに、濡れたバルブは第1の導管と廃液チャンバーとの間の空気の流れもブロックし、このことにより試料チャンバーと接続された第1のポンプ手段が、第2の導管内の流体を移動させることを可能にし、次の様式で第2の導管から第1の導管へ流体を移動させる。試料が制御された時間センサーに曝露された後、試料は別の試薬により修正され得る分析後導管19に移動される。その後、センサーに戻ることができ、第2の反応期間が開始され得る。又は、分析後導管は、単にセンサーから試料セグメントを分離するために機能し得る。この分析後導管内には、センサー導管の空気脱気口と隔膜空気ポンプとを接続する単一の閉鎖可能なバルブが存在する。このバルブを閉鎖した場合、試料は分析後導管に閉じ込められ、センサーチップには戻ることができない。このバルブには、本発明の範囲内に包含されるいくつかの異なる設計がある。いくつかの設計は機械的に活性化されるが、他は液体の接触により活性化される。本発明に包含される閉鎖可能なバルブの他の型は、限定するものではないが、可溶性の接着剤又はゲル化ポリマーにより開放状態が保たれ、又は流体若しくは試料と接触して膨潤し、したがってフラップが閉鎖される柔軟なフラップ、或いは特定の実施形態において、紙が、乾燥していると空気に対して透過性であるが、濡れると非透過性であるような、導管と廃液チャンバー又は周囲空気とのどちらかとの間に差し込まれた多孔質紙又は同様の材料の薄層を含む。後者の事例において、バルブは閉鎖前に液体をほとんど又は全く通過させないので、閉鎖可能なバルブを導管と廃液チャンバーの間に差し込む必要はなく、そのためバルブは、導管とカートリッジを取り巻く周囲空気との間に位置する場合、適切に配置される。実用的構造において、1枚のろ紙を、調節される流体経路中のテープガスキットの開口に配置する。空気はこの媒体を容易に進むことができ、流体は流体路を進むことができる。流体がこのフィルターを押した場合、フィルター媒体は液体で満たされ、液体路を通るさらなる動きは停止される。一度フィルターが濡れると、液体がフィルターの孔を進むためにはかなりの圧力が必要であると思われる。フィルターの外に液体を押し出すためにかなり高い圧力が必要なため、フィルターを通る空気流もまた妨げられる。このバルブの実施形態は、バルブを作動させるために必要な液体は非常に少なく、作動は迅速且つ確実に起こる。材料、それらの面積、孔隙率、湿潤性、膨潤特性及び関連するパラメーターが、迅速な閉鎖、試料との最初の接触後1秒以内又はそれより遅い、例えば60秒までを、特定の所望の閉鎖時間にしたがって提供するために選択される。

【0100】

或いは、閉鎖可能なバルブは機械的バルブである。この実施形態において、ラテックスの隔膜を、特別に構築されたウェルの上部の気胞の底部に配置する。このウェルは、脱気口と試料導管とを流体的に接続する2つの開口部を含む。分析器のブランジャーは気胞の底部を押すので、裏が接着性であるこのラテックス隔膜を圧迫し、2つの穴の間の接続を密閉する。これにより試料の脱気口がブロックされ、試料はその場に閉じ込められる。

【0101】

図22を参照すると、これは、イムノセンサーカートリッジの配置図を例示し、3つのポンプ手段、61~63が提供される。これらのポンプは、特定の実施形態の観点から記載されるが、ポンプ手段61~63のそれぞれの機能を実施できる任意のポンプ手段が本発明において使用できることは、容易に理解されるであろう。したがって、ポンプ手段1、61は、試料保持チャンバーから第1の導管へ試料を移動できなければならず、ポンプ手段2、62は、流体を第2の導管へ移動できなければならず、ポンプ手段3、63は、少なくとも1つのセグメントを第2の導管に挿入できなければならない。本出願において想定されるポンプの他の型は、限定するものではないが、圧力が空気袋にかかる、空気圧手段と接触する前記空気袋、可撓性の隔膜、ピストン及びシリンダー、電気力学的ポンプ及び音波ポンプを含む。ポンプ手段3、63に関して、「ポンプ手段」という用語は、1つ又は複数のセグメントが第2の導管に挿入されるすべての方法、例えば、空気を空気袋

10

20

30

40

50

から移動させる空気圧手段、溶解した場合ガスを発生する粉末薬品又は電流供給源と動作可能に接続された複数の電気分解用電極を含む。特定の実施形態において、セグメントは、複数の気泡又はチャンバーを有することができる、機械的セグメントを作製する隔膜を使用して作り出される。ウェル 8 は、内部隔膜ポンプと接続する単一の開口部及びセグメントが注入される流体で満たされた導管 20 を有する。隔膜は、多数のセグメントを作製するために分割され、流体で満たされた導管内の特定の位置にそれぞれが注入され得る。

【 0 1 0 2 】

代替の実施形態において、セグメントは、受動的な特徴を使用して注入される。カートリッジのベース中のウェルは、テープガasketにより密閉される。ウェルを覆うテープガasketは、どちらかの端に 2 つの小さな穴を有する。1 つの穴は開放されているが、他方は、流体と接触すると濡れるフィルター材料で覆われている。ウェルは、セルロース繊維のフィルター、ろ紙又はグラスファイバーフィルターなどの遊離した親水性材料で満たされている。この親水性材料は、毛細管現象を介してベース中のウェルに液体を引き込み、もともとウェル内にあった空気を移動させる。空気は、容量がウェルの容量及び遊離した親水性材料の容量によって決定されるセグメントを生み出す、テープガasket中の開口部を介して放出される。ベース中のウェルへの注入口の 1 つを覆うために使用されるフィルターは、流体がウェルを満たす速度を測定し、それによりセグメントがカバー中の導管に注入される速度を調節するために選択され得る。この受動的な特徴は、任意の数の調節されたセグメントが流体路内の特定の位置に注入されることを可能にし、必要とする空間は最小である。

【 0 1 0 3 】

本発明の実施形態は、シグナルを訂正する技術をさらに使用する。適切な技術は、米国特許第 2 0 0 6 / 0 1 6 0 1 6 4 号に記載され、この全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 0 4 】

この実施形態の使用は医療環境において特に有利であり、その関連で記載されるが、この実施形態は、リアルタイムに匹敵する速度において流体試料の化学分析を実施することが望まれる任意の状況において実践できることは理解されるであろう。例えば、このように具現化された方法及び装置を使用し、患者が心筋梗塞を患うかどうか、又は患者が心筋梗塞を患っているかどうかを決定できる。

【 0 1 0 5 】

本発明は、以下の限定されない例によりさらによく理解されるであろう。

【 0 1 0 6 】

(例 1)

第 1 の例は、図 5 に示すように、被験物のためのコンジュゲートとして検出抗体及び A L P 酵素を架橋する合成オリゴヌクレオチドに基づく酵素結合免疫測定法 (E L I S A) である。

【 0 1 0 7 】

この例は、A L P 酵素分子が、E L I S A 試験における使用のために検出 A b 又は縮小 F (a b) 分子と結合するための D N A 足場を使用するという、この系の基本構想を実証する。より複雑な足場分子を、この構想の系から開発できる。

【 0 1 0 8 】

以下に示す合成オリゴヌクレオチド配列 A 及び A ' が好ましい。

A (D E) 5 ' - アミノ C 1 2 - (T) 2 0 - T G A T C G C T A C G G T G G T A T T G T - 3 ' (配列番号 1) 6 - F A M、ここで F A M は蛍光標識である

A ' (A P) 5 ' - チオール修飾因子 C 6 S - S - (T) 2 0 - A C A A T A C C A C C G T A G C G A T C * A - 3 ' 6 F A M (配列番号 2) (F A M は蛍光標識である)

* はホスホロチオエート結合を表す

(T) 2 0 は、2 0 個の「 T 」残基を表す

【0109】

全体の系を実証するために、個々の成分を、下記のように作製し、それらの機能性に関して試験した。

【0110】

一連の実験を実施し、以下のようにALP-A' DNAタンパク質コンジュゲートの作製を実証した。

【0111】

合成オリゴヌクレオチドビーズ：

下記のALP-DNAコンジュゲートのための試験系として、相補的合成オリゴヌクレオチド配列と結合したビーズを作製した。

【0112】

20 μ Lの0.33 μ mカルボン酸ビーズ(最終固体2%)(Bangs Lab)を、シラン処理された0.5 mLの微小遠心管に移した。これを12500 RPMで1分、微量遠心分離し、チューブを180°回転させ、次いでさらに4分間微量遠心分離した。上清を取り除き、95 μ Lの100 mMのMES(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)、pH 7.1を加えた。ビーズを、上記のように微量遠心分離し、上清を取り除いた。次に、7.5 mgのEDAC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)を、300 μ LのMES緩衝液、pH 7.1に加えた。EDACは、アミノ基をカップリングするカルボキシ基の活性化因子である。この処理における第1ステップは、カルボキシ基が、利用可能なアミン基とその後反応できるo-アシルイソ尿素基に活性化され、これが合成オリゴヌクレオチド(A)に合成され、合成オリゴヌクレオチドとカルボキシビーズ上のカルボキシ基との共有結合を形成することである。これをビーズに加え、溶液をボルテックスにかけ、よく混合した。次いでビーズを、超音波処理槽において10分間超音波処理した。ビーズを、上記のように微量遠心分離によりペレット化し、上清を取り除いた。次に、288 μ LのMES、pH 7.1を加え、ピペッティングにより混合した。12 μ Lの100 μ Mのアミン修飾オリゴヌクレオチドをチューブに加えた。この溶液をボルテックスにかけ、よく混合した。次いで、溶液を、超音波処理槽において10分間超音波処理した。その後、チューブを、室温でインキュベーターにおいて2時間混合させた。ビーズを、上記のように微量遠心分離により濃縮した。95 μ Lのクエンチ緩衝液(50 mMのMES、pH 7.1、35 mMのグリシン、0.25%のBSA、0.05%のTween-20、0.05%のNaN₃)を加え、溶液をピペッティングにより混合した。グリシンはアミノ基を含有し、アミノ基は任意のカップリングしていないEDAC活性化カルボキシ基と反応し、EDAC活性化カルボキシ基をブロックし、反応におけるさらなるクロスカップリングを防ぐため、この緩衝液を加えた。チューブを、Clay Adams(商標)nutator(Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ)において混合し、室温において30分間、複数方向に連続混合した。ビーズを、上記のようにペレット化した。95 μ Lの保存緩衝液(50 mMのMES、pH 7.1、0.05%のBSA、0.05% NaN₃)を加え、ビーズをピペッティングにより混合した。チューブをパラフィルムで覆い、乾燥を避け、次いで-80 °Cにおいて長期保存した(又は4度において短期保存した)。

【0113】

バイオセンサー電極上への微量塗布用に調製する場合、チューブを解凍し、その後上記のように、ビーズを微量遠心分離によりペレット化した。95 μ Lの、オートクレーブにかけ、脱イオン化した水を加え、ビーズをピペッティングにより混合した。次いで、図5に示すように、これらのビーズをバイオセンサー電極、例えばPt及びAuの金属電極表面に微量塗布した。

【0114】

バックグラウンドシグナル検出器として使用する参照ビーズは、米国特許公開番号第2006/0160164号に記載されており、この内容及び開示の全体は参照により本明細書に組み込まれる。参照ビーズは、微量塗布用に調製される。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 5 】

合成オリゴヌクレオチド処理：

タンパク質 - DNA のコンジュゲーションのために、チオール修飾合成オリゴヌクレオチドを、メルカプトタン (D T T) を用いて処理し、遊離のスルフヒドリル基を作り出し、遊離のスルフヒドリル基はその後、その N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) エステル基を介してタンパク質のアミン基と結合した L C - S P D P (スクシンイミジル 6 - [3 ' - (2 - ピリジルジチオ) - プロピオンアミド) ヘキサノエートクロスリンカーの 2 - ピリジルジチオ基と反応させることができる。

【 0 1 1 6 】

この手順は、通常、可能な限り短時間で実施することに留意するべきである。この合成オリゴヌクレオチドは蛍光タグを含有するので、反応及びカラムはアルミホイル下又は暗くした室内において実施する。およそ 5 0 , 0 0 0 p m o l の A ' 合成オリゴヌクレオチドを、 1 0 μ L の 1 × P B S E (1 3 6 m M の N a C l 、 2 . 7 m M の K C l 、 1 0 . 1 m M の N a ₂ H P O ₄ 、 1 . 8 m M の K H ₂ P O ₄ 、 5 m M の E D T A (エチレンジアミン四酢酸) 、 p H 7 . 4) に再懸濁し、オートクレーブにかけ、脱イオン化した水中の 1 M の D T T (ジチオスレイトール) 、 2 0 μ L を加えた。反応を、室温において 1 5 分間進行させる。この反応が完了したら、 5 0 μ L の 1 × P B S E を加え、全反応液をサイズ排除カラムに添加する。

10

【 0 1 1 7 】

未反応の D T T はその後のステップに干渉すると思われるので、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して除去する。

20

【 0 1 1 8 】

P - 6 (B i o - R a d) サイズ排除カラムを、「 0 」 (m L) のマークで切り取った 5 m L のプラスチックピペットを使用して調製し、シリコン処理したガラスウールを、ピペットのチップ内に配置し、オートクレーブにかけ、脱イオン化した水中の、事前に膨潤させた P - 6 スラリーを、カラムの樹脂が「 1 」 (m L) のマークに満ちるまで加えた。カラムを、オートクレーブにかけ、脱イオン化した 5 m L の水ですすいだ。このカラムに、D T T 処理した合成オリゴヌクレオチドを添加した。 1 4 の 2 0 0 μ L の画分を、水を緩衝液として使用して、個別の微小遠心分離管に回収した。合成オリゴヌクレオチドを含有する画分を、特徴的な黄色により決定した。さらに、 1 μ L の試料を各画分から採取し、UV トランスイルミネーターの上端に配置されたサララップ (登録商標) の上にスポットした。図 2 3 に示すように、明るく蛍光発光したスポットが、蛍光部分を伴う合成オリゴヌクレオチドを含有した。

30

【 0 1 1 9 】

サイズ排除カラムにおいて、大型分子 (合成オリゴヌクレオチド) は、小型分子 (D T T) より早く溶出される。小型分子である D T T が溶出された画分には、蛍光標識された合成オリゴヌクレオチドは見出されなかった。黄色及び蛍光発光した画分では、合成オリゴヌクレオチドに共有結合した 6 - F A M (6 - カルボキシフルオロセイン) 蛍光染料を含有する合成オリゴヌクレオチドの存在が確認される。

【 0 1 2 0 】

蛍光発光材料を含有する画分 (図 2 3) を合わせ、暗所において 6 0 分で真空遠心分離して乾燥させた。

40

【 0 1 2 1 】

A L P 酵素処理：

オリゴヌクレオチドを含有するスルフヒドリルを処理する間、L C - S P D P クロスリンカーの N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) エステル部分は、タンパク質分子上のアミン基と反応し、クロスリンカーとタンパク質との共有結合を形成し、D T T と反応した合成オリゴヌクレオチドと反応させるために後で使用される、露出された 2 - ピリジルジチオ基が残る。

【 0 1 2 2 】

50

N, N - ジメチルホルムアミド中 20 mM の LC - SPDP 溶液 (Pierce) を調製し、5 μ L を、1 mg の Calf Intestinal アルカリホスファターゼ [E . C . 3 . 1 . 3 . 1] (ALP) 酵素に加え、1 \times PBSE 中 100 μ L にした。この反応を、振とうしながら室温において 1 時間進行させた。この材料を、AKTAPrime plus (Amersham Biosciences) に結合した S - 300 サイズ排除カラムに添加し、データ収集のために PrimeView ソフトウェアを使用した。未反応の LC - SPDP クロスリンカーを反応したタンパク質試料から除去して、未反応のクロスリンカーと、この処理の次のステップにおいて加えられる、活性化タンパク質分子と反応するべきであるが未反応のクロスリンカーとは反応するべきではない合成オリゴヌクレオチドとの混入反応を避ける。1 / 5 \times PBSE (27 . 2 mM の NaCl、0 . 54 mM の KCl、2 mM の Na₂HPO₄、0 . 4 mM の KH₂PO₄、5 mM の EDTA、pH 7 . 4) を、緩衝液として使用した。図 24 に示すように、カラムを、2 mL / 分で 4 mL の画分 30 個で処理した。

10

【 0 1 2 3 】

得られたカラムのデータを、画分の番号と吸光度を関連付けるソフトウェアを使用して示した。

【 0 1 2 4 】

この例において、11 から 14 及び 15 から 18 の画分を別個に組み合わせた。試料を、ULTRA - 15 10 MWCO 透析ろ過カラム (Amicon) において 35 分間 4 , 000 RPM で遠心分離することによって、画分を約 200 ~ 300 μ L まで濃縮した。

20

【 0 1 2 5 】

酵素活性画分を確認するために、各画分の 1 μ L を、1 . 2 M のジエタノールアミン、0 . 5 mM の MgCl₂、19 mM の 4 - ニトロフェノールリン酸に加えた。活性酵素画分 (画分 15 から 18) は、5 分以内に黄色に変わり、ALP 酵素活性を示し、次の処理に使用した。

【 0 1 2 6 】

活性酵素活性を含有し、かなりの LC - SPDP コンジュゲートタンパク質を含有することが予測される濃縮画分の 15 から 18 を、乾燥させた DTT 処理合成オリゴヌクレオチドに直接加えた。乾燥合成オリゴヌクレオチドの使用は、反応物質の濃度の増加を助ける。上記のように、共有結合した LC - SPDP クロスリンカーの 2 - ピリジルジチオ基は、DTT 処理合成オリゴヌクレオチド上のスルフヒドリルと反応するであろう。この溶液を穏やかにピペティングし、乾燥合成オリゴヌクレオチドの溶解を確実にした。振とうしながら 4 において一晩反応させた。

30

【 0 1 2 7 】

図 25 に示すように、DTT 処理合成オリゴヌクレオチドと反応した LC - SPDP 活性化 ALP を、次いで S300 カラムに添加し、上記のように処理した。

【 0 1 2 8 】

画分 15 から 21 の主要なピークを組み合わせ、上記のように透析ろ過によって濃縮した。材料を、4 においてアルミホイル内で保存した。

40

【 0 1 2 9 】

この材料を試験し、A' 合成オリゴヌクレオチドの結合を確認した。この材料の一連の希釈液を作製した。2 μ L のこの材料を、18 μ L の 1 \times PBSE (10 - 1) に加え、2 μ L の 10 - 1 を、18 μ L の 1 \times PBSE (10 - 2) に加え、2 μ L の 10 - 2 を 1 \times PBSE (10 - 3) に加えた。これらの希釈液のそれぞれ 2 μ L を、18 μ L の血漿に加え、A 合成オリゴヌクレオチドと結合したビーズを含有する修飾 i - STAT「イムノ」カートリッジ (上記) において試験した。カートリッジは、電極にビーズが固定化されていることを除いて市販の cTnI 装置と同じであり、市販の cTnI 装置は、ビーズに結合した合成 DNA オリゴヌクレオチドを有し、ALP 酵素活性は、ALP 分子とコンジュゲートした DNA により供給される。ALP の切断後、起電性基質 (p - アミノフ

50

ェノールリン酸)の存在下でビーズ上のA配列と結合する、A'合成オリゴヌクレオチドを有するALPの存在が、検出される電流測定シグナルを発生させる(図26を参照されたい)。

【0130】

E0030と名付けたこのDNAコンジュゲートを酵素活性及びタンパク質濃度に関して、Bradford法を使用して試験した。結果を以下の表に示す。

【表1】

タンパク質濃度 (ug/mL)	186.7
酵素特異的活性 (U/mg)	984.4

10

【0131】

検出抗体処理：

この項では、抗体構成オリゴヌクレオチドコンジュゲートの合成について記載する。

【0132】

合成オリゴヌクレオチド処理：

上記のように、合成オリゴヌクレオチドを、メルカプタンを用いて処理し、遊離のスルフィドリル基を作製する。

【0133】

およそ50,000 pmolのA合成オリゴヌクレオチドをオートクレーブにかけ、脱イオン化した水に再懸濁した。次いで、10 µLの1×PBSE(136 mMのNaCl、2.7 mMのKCl、10.1 mMのNa₂HPO₄、1.8 mMのKH₂PO₄、5 mMのEDTA、pH 7.4)及びオートクレーブにかけ、脱イオン化した水中1 Mの20 µLのDTTを加えた。反応を、室温において15分間進行させる。この反応が完了したら、20 µLの1×PBSEを加え、全反応液をサイズ排除カラムに添加する。

20

【0134】

上記のように、サイズ排除クロマトグラフィーにより合成オリゴヌクレオチドからDTTを取り除き、タンパク質分子の還元を防ぐ。

【0135】

P-6(Bio-Rad)サイズ排除カラムを、「0」(mL)のマークで切り取った5 mLのプラスチックピペットを使用して調製し、シラン処理したガラスウールを、ピペットのチップ内に配置し、オートクレーブにかけ、脱イオン化した水中の、事前に膨潤させたP-6スラリーを、カラムの樹脂が「1」(mL)のマークに満ちるまで加えた。カラムを、オートクレーブにかけ、脱イオン化した5 mLの水ですすいだ。このカラムに、DTT処理した合成オリゴヌクレオチドを添加した。14の200 µLの画分を、水を緩衝液として使用して、個別の微小遠心分離管に回収した。合成オリゴヌクレオチドを含有する画分を、特徴的な黄色により決定した。さらに、1 µLの試料を各画分から採取し、UVトランスイルミネーターの上部に配置されたサランラップ(登録商標)の上にスポットした。明るく蛍光発光したスポットが、合成オリゴヌクレオチドを含有した。

30

40

【0136】

蛍光発光材料を含有する画分を合わせ、暗所において60 で真空遠心分離して乾燥させた。

【0137】

PEP-3 F(ab')₂処理：

PEP-3 F(ab')₂を、当業者にはよく知られている標準的手順を使用して、R&D Systems, Incのヤギ抗TNIペプチド3抗体、カタログ番号G-129-Cのペプシン切断により調製した。およそ200 µL中1 mgのこのタンパク質を、10 µLの20 mMのLC-SPDPと、室温において混合しながら1.5時間反応させた。次いで、先に記載したように、S-300カラムに試料を添加し、処理した。

50

【 0 1 3 8 】

画分 16 から 19 (図 27) を合わせ、上記のように透析る過により最終容量約 500 μ L まで濃縮した。濃縮した LC - SPDP 活性化 PEP - 3F (a b ') 2 を、乾燥させ、メルカプトタン処理したチオール A 合成オリゴヌクレオチドに直接加えた。この溶液を穏やかにピペティングし、乾燥合成オリゴヌクレオチドの適切な溶解を確実にした。反応液を、振とうしながら 4 において一晩インキュベートした。この材料を、先に記載のように S - 300 カラムにおいて精製した (図 28) 。

【 0 1 3 9 】

画分を、(チューブを UV トランスイルミネーター上に配置することによって) UV 蛍光の決定によって確認した。画分 18 から 21 (図 28) を合わせ、上記のように透析る過によって濃縮した。E0031 と名付けたこの抗体 - DNA コンジュゲートを、Bradford 法を使用してタンパク質濃度に関して試験し、タンパク質濃度が 54.5 μ g / mL であることを決定した。このタンパク質試料の黄色及び UV 蛍光により、合成オリゴヌクレオチドの結合を確認した。

【 0 1 4 0 】

DNA に基づくコンジュゲートによる被験物の検出：

標準的な cTnI カートリッジを使用すること及び、コンジュゲート試料を含む又は含まない MWC cTnI 被験物を使用することにより抗体競合アッセイを実施した。シグナルの減少は、被験物が DNA コンジュゲートの F (a b) 分子又は F (a b) 分子を含有する標準的コンジュゲートにより結合されていることを示す。図 29 において観察されるように、上で作製された DNA - コンジュゲートはシグナルを減少させ、被験物を結合させる能力を有することが予想される。

【 0 1 4 1 】

被験物結合能力の試験：

DNA に基づくコンジュゲートによる被験物の検出：

4 μ L の PEP - 3F (a b ') 2 - A [E0031] を、4 μ L の ALP - A ' [E0030] コンジュゲートに加え、51.9 pg の cTnI MWC (Manufacturer's Working Calibrator : 製造業者実用キャリブレータ) を、16 μ L の血漿に加え、コンジュゲートを含まない「イムノ」i - STAT カートリッジ (捕捉抗体と結合したビーズ、起電性基質を含有するが、cTnI 検出コンジュゲートは含有しない標準的 cTnI カートリッジ、この能力は上記の新たに合成されたコンジュゲートにより供給される) において試験した。MWC を含まない対照もまた実施した。

【 0 1 4 2 】

図 30 は、図 5 に記載の二重コンジュゲート (ALP - A ' + 抗体 - A) が捕捉ビーズに結合し、低いシグナルを発生することを示唆する。参照ビーズはいずれの試料においても有意なシグナルを発生しなかった。

【 0 1 4 3 】

(例 2)

本発明の第 2 の例は、図 6 に示すように、被験物のためのポリマーコンジュゲートとして検出抗体及び ALP 酵素を架橋する合成オリゴヌクレオチドに基づく酵素結合免疫測定法 (ELISA) である。この例において、シグナルコンジュゲートは、被験物が存在する場合、捕捉部位におけるシグナル発生の可能性を増加させる、多数の ALP - 合成オリゴヌクレオチドコンジュゲートとその後ハイブリダイズする、抗体に結合した反復する相補的 DNA 配列により作製される。反復する相補的 DNA 配列は、環状の合成 DNA を作ることににより作製され、その後 5 ' - チオール含有合成オリゴヌクレオチドをプライマー配列として使用し、ローリングサークル型増幅に使用される Phi29 DNA ポリメラーゼを使用して、この配列の相補的マルチマー DNA を作製する。次いで、特定の DNA 配列を抗体分子にコンジュゲートし、その後相補的合成オリゴヌクレオチドとコンジュゲートした ALP 分子とハイブリダイズする。

【 0 1 4 4 】

光パターン化金属の作製、捕捉抗体のビーズへのコンジュゲーション、カートリッジの設計及び組み立て並びに微量塗布は、すでに上に記載している。

合成オリゴヌクレオチド配列

A (DE) 5' - - チオール修飾因子 C6 S - S - (T) 20 - T G A T C G C T A C G G T G G T A T T G T - 3' (配列番号3)

A' (AP) 5' - チオール修飾因子 C6 S - S - (T) 20 - A C A A T A C C A C C G T A G C G A T C * A - 3' (配列番号2) 6 F A M

X 5' - p A C A A T A C C A C C G T A G C G A T C A A G T T A T G C A A C G C G G G A G T T G T G T A T G A A G T - 3' (配列番号4)

* は、ホスホロチオエート結合を表す

(T) 20 は、20個の「T」残基を表す

p は、リン酸化5'を表す

【0145】

A L P - A' DNAタンパク質コンジュゲートの作製

A L P - A' DNAタンパク質コンジュゲートを作製するために例1に記載した同じ方法を、例2にも使用する。このコンジュゲートは、E0030と名付ける。

【0146】

P E P - 3 F (a b') 2 DNAタンパク質コンジュゲートの作製

合成オリゴヌクレオチドサークルの構築：

100,000 pmolの合成オリゴヌクレオチドXを、0.05M MOPS (2-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸)、pH7.5、0.01MのKCL、5mMのMgCl₂、1.0mMのDTT、0.05mMのATP、2.5mMのMnCl₂及び20,000単位のCirclease ssDNA Ligase (Epicentre)中でインキュベートした。反応を、60において一晩進行させる。この材料のアリコート、後のゲル分析のために4に配置する。次いで、処理した合成オリゴヌクレオチドを、10,000単位の個々のExonuclease I及びExonuclease IIIを用いて、37において45分間処理し、その後90に10分間加熱することによって不活性化する。処理したオリゴヌクレオチドを、上記のようにP-6樹脂 (BioRad)を使用してサイズ排除クロマトグラフィーによって精製する。次いで、処理したオリゴヌクレオチドを、20%のアクリルアミド/7Mの尿素変性ゲルにおけるゲル電気泳動により、環状であることを確認する。未処理の合成オリゴヌクレオチドと比較した電気泳動の変化により、環状化を確認する。

【0147】

50,000 pmol量の合成オリゴヌクレオチドAを、1xPBSE中の調製した合成オリゴヌクレオチドXのサークルに加える。混合物を65に加熱し、100mLの水を含むビーカーにおいて、1時間かけて室温にゆっくりと冷却させる。このことにより、遊離の3'-ヒドロキシを有するチオール含有合成オリゴヌクレオチドと、上で調製した環状DNA構造とは効率的にアニーリングされる。

【0148】

アニーリングした反応液を、最終濃度が40mMのTris-HCl、pH7.5、50mMのKCl、10mMのMgCl₂、5mMの(NH₄)₂SO₄、4mMのDTT及び2000単位のRepliphil 29 DNAポリメラーゼ並びにそれぞれ40nmolのdATP、dCTP、dGTP及びdTTPを含有する緩衝液に加える。これにより、チオール含有合成オリゴヌクレオチドは3'ヒドロキシルにおいて伸長され、環状鑄型に基づく確定した相補的マルチマーが作製される。個々のこれらのマルチマーは、5'-チオール及び環状DNAの反復する相補的配列を含有し、「テール付き合成オリゴヌクレオチド」と称される。

【0149】

テール付き合成オリゴヌクレオチド処理：

タンパク質-DNAのコンジュゲーションのために、テール付き合成オリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドのチオール修飾部分を、メルカプタン (DTT) を用いて処理し、遊離のスルフヒドリル基を作り出し、遊離のスルフヒドリル基はその後、そのN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステル基を介してタンパク質のアミン基と結合したLC-SPDP (スクシンイミジル6-[3'-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエートクロスリンカーの2-ピリジルジチオ基と反応させることができる。

【0150】

この手順は、通常、可能な限り短時間で実施することに留意するべきである。およそ50,000 pmolのテール付きA'合成オリゴヌクレオチドを、10 µLの1×PBSE (136 mMのNaCl、2.7 mMのKCl、10.1 mMのNa₂HPO₄、1.8 mMのKH₂PO₄、5 mMのEDTA、pH 7.4) に再懸濁し、オートクレーブに

10

【0151】

未反応のDTTはその後のステップに干渉と思われるので、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して除去する。

【0152】

P-100 (Bio-Rad) サイズ排除カラムを、「0」(mL)のマークで切り取った5 mLのプラスチックピペットを使用して調製し、シリコン処理したガラスウールを、ピペットのチップ内に配置し、オートクレーブにかけ、脱イオン化した水中の、事前に膨潤させたP-100スラリーを、カラムの樹脂が「1」(mL)のマークに満ちるまで加えた。カラムを、オートクレーブにかけ、脱イオン化した5 mLの水ですすいだ。このカラムに、DTT処理した合成オリゴヌクレオチドを添加した。14の200 µLの画分を、水を緩衝液として使用して、個別の微小遠心分離管に回収した。DNAは260 nmの波長において吸光度を有するので、この波長において吸光度を有する試料を組み合わせた。DNAを吸収する画分を合わせ、60 において真空遠心分離で乾燥させた。

20

【0153】

PEP-3F (ab')₂ 処理:

PEP-3F (ab')₂ を、標準的手順を使用して、R&D Systems, Incのヤギ抗TnIペプチド3抗体、カタログ番号G-129-Cのペプシン切断により調製した。およそ200 µL中1 mgのこのタンパク質を、10 µLの20 mMのLC-SPDPと、室温において混合しながら1.5時間反応させた。次いで、先に記載したように、S-300カラムに試料を添加し、処理した。

30

【0154】

最大の吸収ピークを含む画分を合わせ、上記のように、最終容量約500 µLまで透析ろ過により濃縮した。濃縮LC-SPDP活性化PEP-3F (ab')₂ を、乾燥させ、メルカプタン処理したチオールAテール付き合成オリゴヌクレオチドに直接加えた。この溶液を穏やかにピペティングし、乾燥DNAの溶解を確実にした。反応液を、振とうしながら4 において一晩インキュベートした。この材料を、先に記載のようにS-300カラムにおいて精製した。

40

【0155】

DNAに基づくコンジュゲートによる被験物の検出:

4 µLのPEP-3F (ab')₂ -テール付きオリゴヌクレオチドを、4 µLのALP-A' [E0030]コンジュゲートに加え、51.9 pgのcTnI MWC (製造業者実用キャリブレータ) を、16 µLの血漿に加え、コンジュゲートを含まない「イムノ」i-STATTカートリッジ (捕捉抗体と結合したビーズ、起電性基質を含有するが、cTnI検出コンジュゲートは含有しない標準的cTnIカートリッジ、この能力は上記の新たに合成されたコンジュゲートにより供給される) において試験した。MWCを含まない対照もまた実施した。

【0156】

50

(例3)

本発明の別の例は、図6に示すように、被験物のためのポリマーコンジュゲートとして検出抗体及びALP酵素を架橋する合成オリゴヌクレオチドに基づく酵素結合免疫測定法(ELISA)である。この例において、コンジュゲートは、被験物が存在する場合、捕捉部位におけるシグナル発生の可能性を増加させる、多数のALP-合成オリゴヌクレオチドコンジュゲートとその後ハイブリダイズする、抗体に結合した反復する相補的DNA配列により作製される。反復する相補的DNA配列は、合成オリゴヌクレオチドをファージミドにクローニングし、当業者によく知られている技術によって一本鎖DNAを単離し、その後5'-チオール含有合成オリゴヌクレオチドをプライマー配列として使用し、T4 DNAポリメラーゼ(又は鎖置換能を有する任意の他のDNAポリメラーゼ)を使用してこの配列の相補的マルチマーDNAを作製する。次いで、特定のDNA配列を抗体分子にコンジュゲートし、その後相補的合成オリゴヌクレオチドとコンジュゲートしたALP分子とハイブリダイズする。

10

【0157】

光パターン化金属の作製、捕捉抗体のビーズへのコンジュゲーション、カートリッジの設計及び組み立て並びに微量塗布は、すでに上に記載している。

合成オリゴヌクレオチド配列

A(DE) 5'-チオール修飾因子C6 S-S-(T)20-TGATCGCT
ACGGTGGTATTGT-3'(配列番号3)

A'(AP) 5'-チオール修飾因子C6 S-S-(T)20-ACAATACC
ACCGTAGCGATC*A-3'6FAM(配列番号2)

20

Y 5'-AATTACAATACCACCGTAGCGATCACTACT-3'(配列番号5)

Y' 5'-AGCTAGTAGTGATCGCTACGGTGGTATTGT-3'(配列番号6)

*は、ホスホロチオエート結合を表す

(T)20は、20個の「T」残基を表す

pは、リン酸化5'を表す

【0158】

ALP-A' DNAタンパク質コンジュゲートの作製

30

ALP-A' DNAタンパク質コンジュゲートを作製するために例1に記載した同じ方法を、例3にも使用する。このコンジュゲートは、E0030と名付ける。

【0159】

一本鎖環状DNA鋳型のクローニング及び作製

DNAプラスミドを利用して、特定のDNA断片をそれらの中にクローニングできる環状DNA断片を作製する。f1複製起点を含むファージミドのプラスミドは、ヘルパーファージを使用して一本鎖DNAに変換できる。この一本鎖DNAは、容易に拡大、単離及び精製できる。すべてのプロトコルは当業者にはよく知られており、Sambrook及びRussell(2001年、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbour Laboratory Press、Cold Spring Harbour、New York)に見出されるプロトコルに基づく。次いで、この材料をその後使用して、Phi29又はT4 DNAポリメラーゼなどの鎖置換DNAポリメラーゼを使用して、ELISAアッセイに使用するテール付きDNA断片を作製できる。

40

【0160】

10ugのプラスミドpGEM 11Zf+(Promega Corp、Genbank配列情報:X65313)を、それぞれ100UのR.EcoRI及びR.HindIII制限酵素(New England Biolabs)を用いて、NEBuffer 2を使用して、37°Cにおいて1時間制限消化した。次いで制限消化されたDNAを、100UのAntarctic Phosphatase(NEB)を用いて、37°Cに

50

において1時間処理し、その後65 において5分間熱不活性化した。この材料を、低融点のアガロースゲルを使用してゲル精製し、その後ベータアガラゼ (New England Biolabs) を使用し、DNAのエタノール沈殿のための製造業者のプロトコルを使用して、アガロースを除去した。このDNAを、60 において真空内で乾燥させ、その後20 uLの水に再懸濁した。

【0161】

100 pmolの合成オリゴヌクレオチドY及びY'を組み合わせ、TE緩衝液(10 mMのTris、pH7.6、0.1 mMのEDTA)において、まず65 に加熱し、100 mLの水の中で室温までゆっくりと約1時間冷却することによってハイブリダイズさせる。次いで、ハイブリダイズさせた合成オリゴヌクレオチドを、上で調製した制限消化したプラスミドに加える。DNAを、100 UのT4 DNAリガーゼを使用して、14 において一晩ライゲーションする。そして、ライゲーションは、それぞれ20単位のR. EcoRI及びR. HindIIIを含有した。非切断材料のバックグラウンドを減少させるために、その後、ライゲーションした混合物を、R. BamHI (New England Biolabs) を用いて37 において1時間、製造業者の指示書に従って制限消化した。反応液を、フェノール/エーテル抽出し、次いでエタノール沈殿によって濃縮し、その後上記のようにゲル精製する。

【0162】

精製したDNAを、次いで、Hanahanらのプロトコル(1991年、「大腸菌及び他の細菌のプラスミドの形質転換(Plasmid Transformation of Escherichia coli and other bacteria)」、Methods in Enzymology、204巻:63~113頁)に従って、コンピテントInvitrogen Top10F'コンピテント細菌細胞(Invitrogen)に形質転換する。これらの細胞は、DNAの取り込みに対してコンピテントである。これらの細胞は、相補的lacZ遺伝子において欠失を含有し、アンピシリン、テトラサイクリン及びカナマイシンに感受性であり、テトラサイクリンにより選択可能であり、ファージミドによる一本鎖DNAの作製を可能にする雄F'-エピソームを含有し、IPTGにより堅固に抑制解除され得るlacIqリプレッサー及びエンドヌクレアーゼ活性の減少のためのendA1を含有する。形質転換材料を、10 ug/mLアンピシリンを含む2xYT培地プレートに播種し、37 において一晩成長させる。12の単一コロニーを選択し、100 ug/mLアンピシリンを含む5 mLの2xYTブロス中で37 において一晩成長させた。プラスミドDNAを、迅速なプラスミド調製法(Birnboim & Doly、1979年、Nucleic Acids Research、7巻(6):1513~1523頁)を使用して調製した。DNAを、20 uLの水に再懸濁した。5 uLの各コロニーのDNA調製品を、10単位のR. BamHIを用いて37 において約2時間、制限消化した。制限消化したDNAを、0.5%アガロースゲル(1xTBE)において電気泳動させた。R. BamHIによって切断されていないことが観察されたDNA及び明らかな共有結合閉環状(CCC)DNAのバンドを有するDNAを、DNAの配列決定のために選択した(図31)。これらのクローンを、M13フォワードプライマー(配列番号7)を使用して配列決定した。

【0163】

推定クローン由来の一本鎖DNA及び未処理ファージミドクローンを、60 ug/mLのアンピシリン、M13K07ヘルパーバクテリオファージ及び25 ug/mLのカナマイシンを含む、5 mLの2xYTブロスにおいて成長させた細胞から、Sambrook & Russellのプロトコル(上記)を使用して調製する。これらの一本鎖調製物を、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ標識合成オリゴヌクレオチドAからドットプロット法を使用して作製された、アルファ-32P放射性標識プローブを使用してスクリーニングする。

【0164】

ドットプロット分析の2つの陽性クローンを、10x500 mLまで拡大し、一本鎖D

10

20

30

40

50

NAを、これらのブロスから上記のように調製して、約1mgの一本鎖鋳型DNAを作製した。

【0165】

PEP-3F(ab')₂DNAタンパク質コンジュゲートの作製

5,000pmol量の合成オリゴヌクレオチドAを、1×PBSE中の調製した一本鎖DNA鋳型に加える。混合物を65℃に加熱し、100mLの水を含むビーカーにおいて、1時間かけて室温にゆっくりと冷却させる。このことにより、遊離の3'-ヒドロキシを有するチオール含有合成オリゴヌクレオチドと、上で調製した環状DNA構造とは効率的にアニーリングされる。

【0166】

アニーリングした反応液を、最終濃度が40mMのTris-HCl、pH7.5、50mMのKCl、10mMのMgCl₂、5mMの(NH₄)₂SO₄、4mMのDTT及び2000単位のRepliPhiPhi29DNAポリメラーゼ並びにそれぞれ40nmolのdATP、dCTP、dGTP及びdTTPを含有する緩衝液に加える。これにより、チオール含有合成オリゴヌクレオチドは3'-ヒドロキシルにおいて伸長され、環状鋳型に基づく確定した相補的マルチマーが作製される。個々のこれらのマルチマーは、5'-チオール及び環状DNAの反復する相補的配列を含有し、「テール付き合成オリゴヌクレオチド」と称される。

【0167】

テール付き合成オリゴヌクレオチド処理：

タンパク質-DNAのコンジュゲーションのために、テール付き合成オリゴヌクレオチドのチオール修飾部分を、メルカプタン(DTT)を用いて処理し、遊離のスルフヒドリル基を作り出し、遊離のスルフヒドリル基はその後、そのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステル基を介してタンパク質のアミン基と結合したLC-SPDP(スクシンイミジル6-[3'-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエートクロスリンカーの2-ピリジルジチオ基と反応させることができる。

【0168】

この手順は、通常、可能な限り短時間で実施することに留意するべきである。およそ5,000pmolのテール付きA'合成オリゴヌクレオチドを、10μLの1×PBSE(136mMのNaCl、2.7mMのKCl、10.1mMのNa₂HPO₄、1.8mMのKH₂PO₄、5mMのEDTA、pH7.4)に再懸濁し、オートクレーブにかけ、脱イオン化した水中の1MDTT(ジチオスレートール)、20μLを加えた。反応を、室温において15分間進行させる。この反応が完了したら、50μLの1×PBSEを加え、全反応液をサイズ排除カラムに添加する。

【0169】

未反応のDTTはその後のステップに干渉すると思われるので、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して除去する。

【0170】

P-100(Bio-Rad)サイズ排除カラムを、「0」(mL)のマークで切り取った5mLのプラスチックピペットを使用して調製し、シリコン処理したガラスウールを、ピペットのチップ内に配置し、オートクレーブにかけ、脱イオン化した水中の、事前に膨潤させたP-100スラリーを、カラムの樹脂が「1」(mL)のマークに満ちるまで加えた。カラムを、オートクレーブにかけ、脱イオン化した5mLの水ですすいだ。このカラムに、DTT処理した合成オリゴヌクレオチドを添加した。14の200μLの画分を、水を緩衝液として使用して、個別の微小遠心分離管に回収した。DNAは260nmの波長において吸光度を有するので、この波長において吸光度を有する試料を組み合わせた。DNAを吸収する画分を合わせ、60℃において真空遠心分離で乾燥させた。

【0171】

PEP-3F(ab')₂処理：

PEP-3F(ab')₂を、標準的手順を使用して、R&D Systems, Inc

10

20

30

40

50

c のヤギ抗 T N I ペプチド 3 抗体、カタログ番号 G - 1 2 9 - C のペプシン切断により調製した。およそ 2 0 0 μ L 中 1 0 0 u g のこのタンパク質を、1 0 μ L の 2 0 m M の L C - S P D P と、室温において混合しながら 1 . 5 時間反応させた。次いで、先に記載したように、S - 3 0 0 カラムに試料を添加し、処理した。

【 0 1 7 2 】

最大の吸収ピークを含む画分を合わせ、上記のように、最終容量約 5 0 0 μ L まで透析る過により濃縮した。濃縮 L C - S P D P 活性化 P E P - 3 F (a b ') 2 を、乾燥させ、メルカプトタン処理したチオール A テール付き DNA に直接加えた。この溶液を穏やかにピペティングし、乾燥 DNA の溶解を確実にした。反応液を、振とうしながら 4 において一晩インキュベートした。この材料を、先に記載のように S - 3 0 0 カラムにおいて精製した。

10

【 0 1 7 3 】

D N A に基づくコンジュゲートによる被験物の検出：

4 μ L の P E P - 3 F (a b ') 2 - テール付き DNA を、4 μ L の A L P - A ' [E 0 0 3 0] コンジュゲートに加え、5 1 . 9 p g の c T n I M W C (製造業者実用キャリアプレータ) を、1 6 μ L の血漿に加え、コンジュゲートを含まない「イムノ」i - S T A T カートリッジ (捕捉抗体と結合したビーズ、起電性基質を含有するが、c T n I 検出コンジュゲートは含有しない標準的 c T n I カートリッジ、この能力は上記の新たに合成されたコンジュゲートにより供給される) において試験した。M W C を含まない対照もまた実施した。

20

【 0 1 7 4 】

本発明を、例示的实施形態及び例を参照して記載してきたが、この記載は限定の意味で解釈されることは意図していない。したがって、例示的实施形態及び本発明の他の実施形態の様々な変更は、この記載を参照すれば当業者には明らかであると思われる。したがって、添付の特許請求の範囲が任意のこのような変更形態又は実施形態を含むであろうことが企図される。本明細書において言及したすべての公報、特許及び特許出願は、各個々の公報、特許又は特許出願が具体的且つ個別に、その全体が参照により組み込まれることを示したのと同じ程度に、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 図 5 】

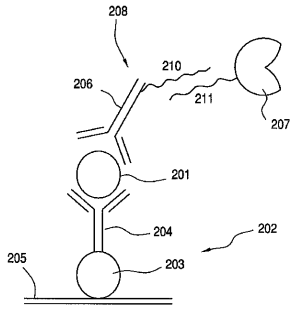
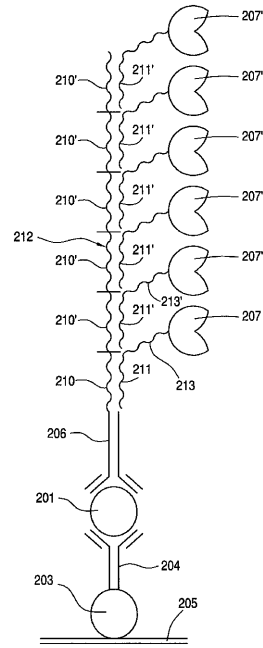


FIG. 5

【 図 6 】

FIG. 6



【 図 7 】

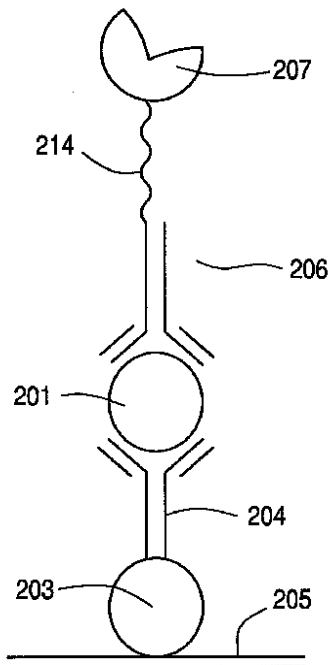


FIG. 7

【 図 8 】

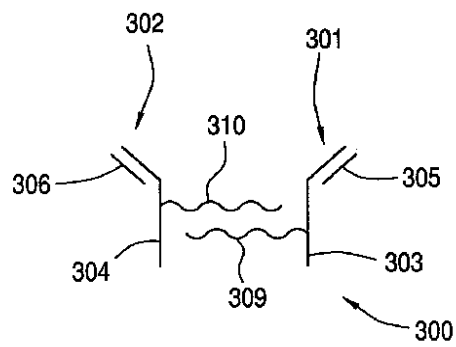


FIG. 8

【 図 9 】

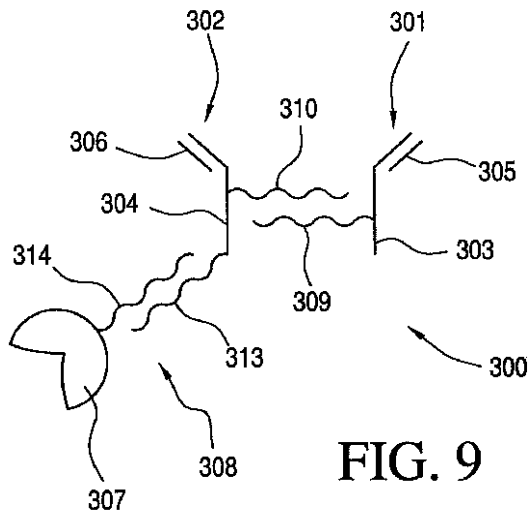


FIG. 9

【 図 10 】

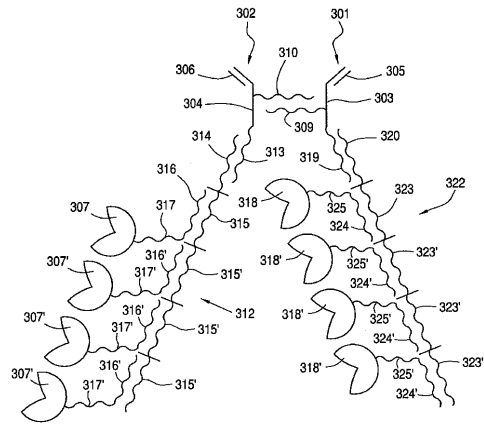


FIG. 10

【 図 11 】

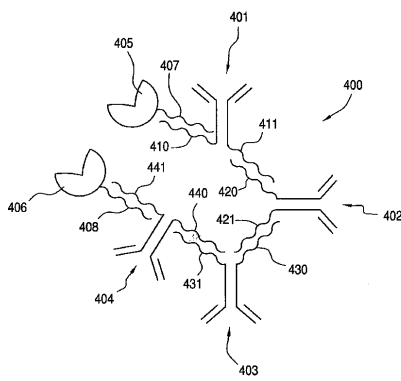


FIG. 11

【 図 12 】

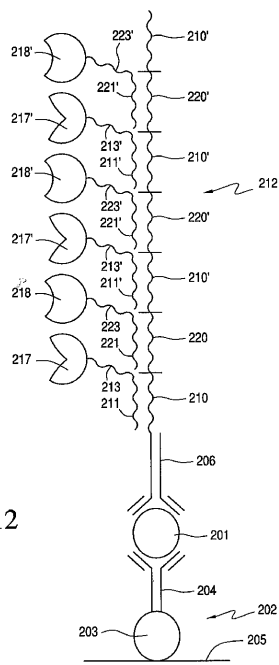


FIG. 12

【 図 1 3 】

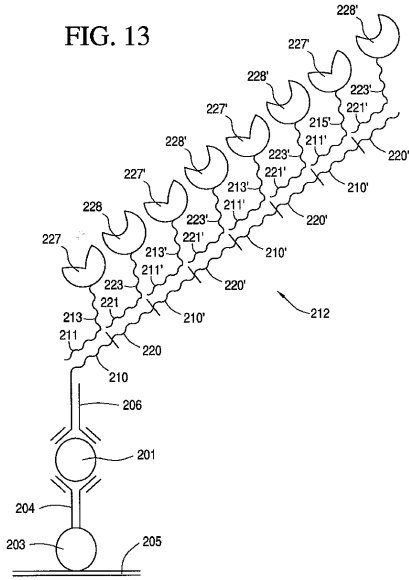


FIG. 13

【 図 1 4 】

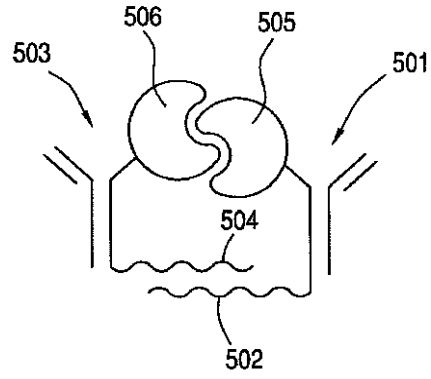


FIG. 14

【 図 1 5 A 】

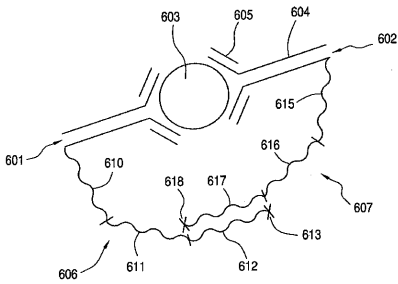


FIG. 15A

【 図 1 5 B 】

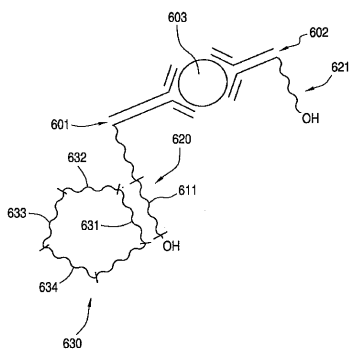


FIG. 15B

【 図 1 5 C 】

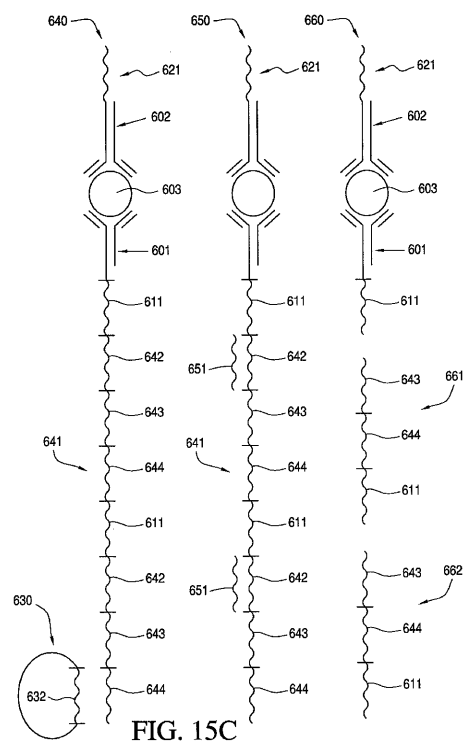


FIG. 15C

【 図 15 D 】

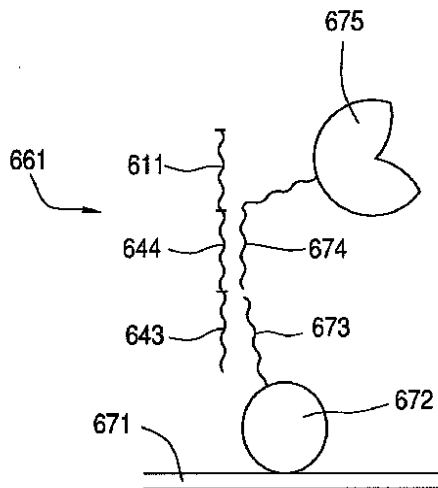


FIG. 15D

【 図 17 】

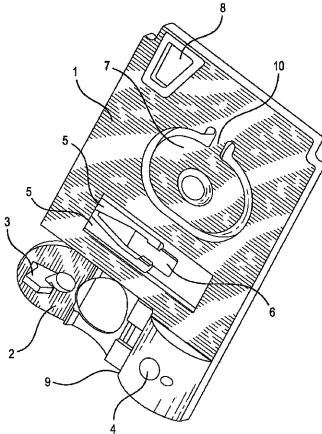


FIG. 17

【 図 18 】

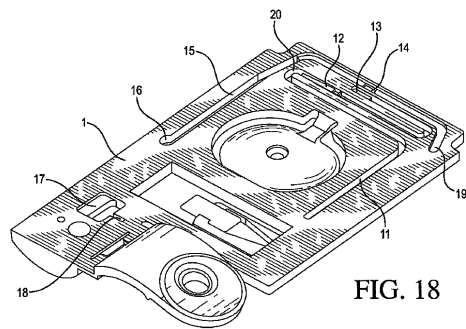


FIG. 18

【 図 19 】

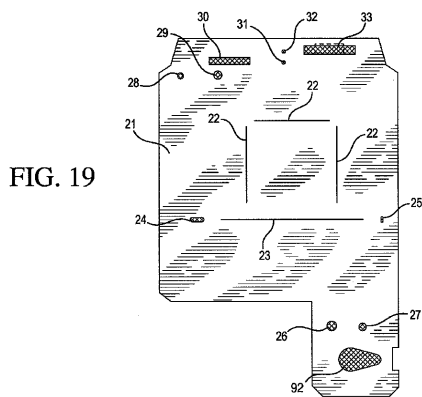


FIG. 19

【 図 20 】

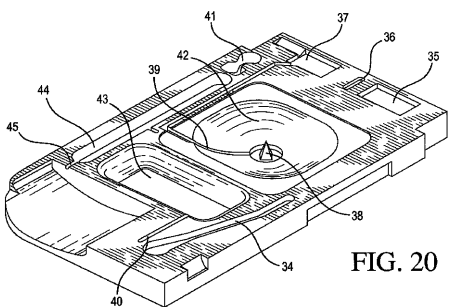
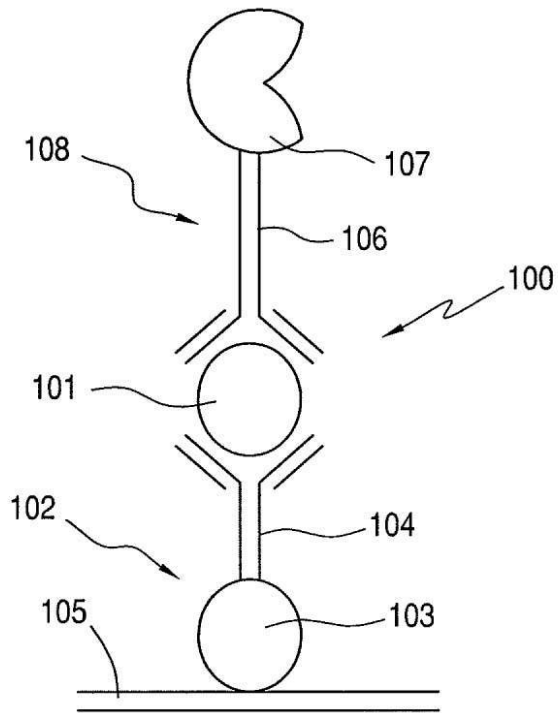


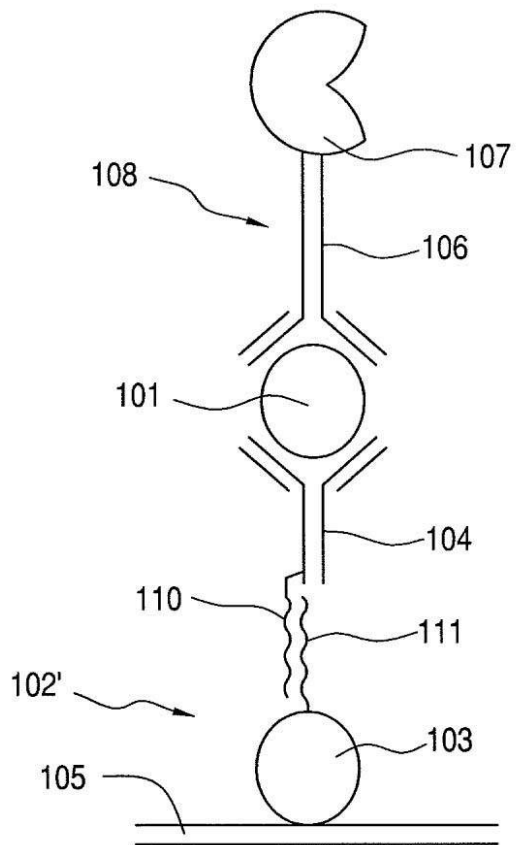
FIG. 20

【図1】



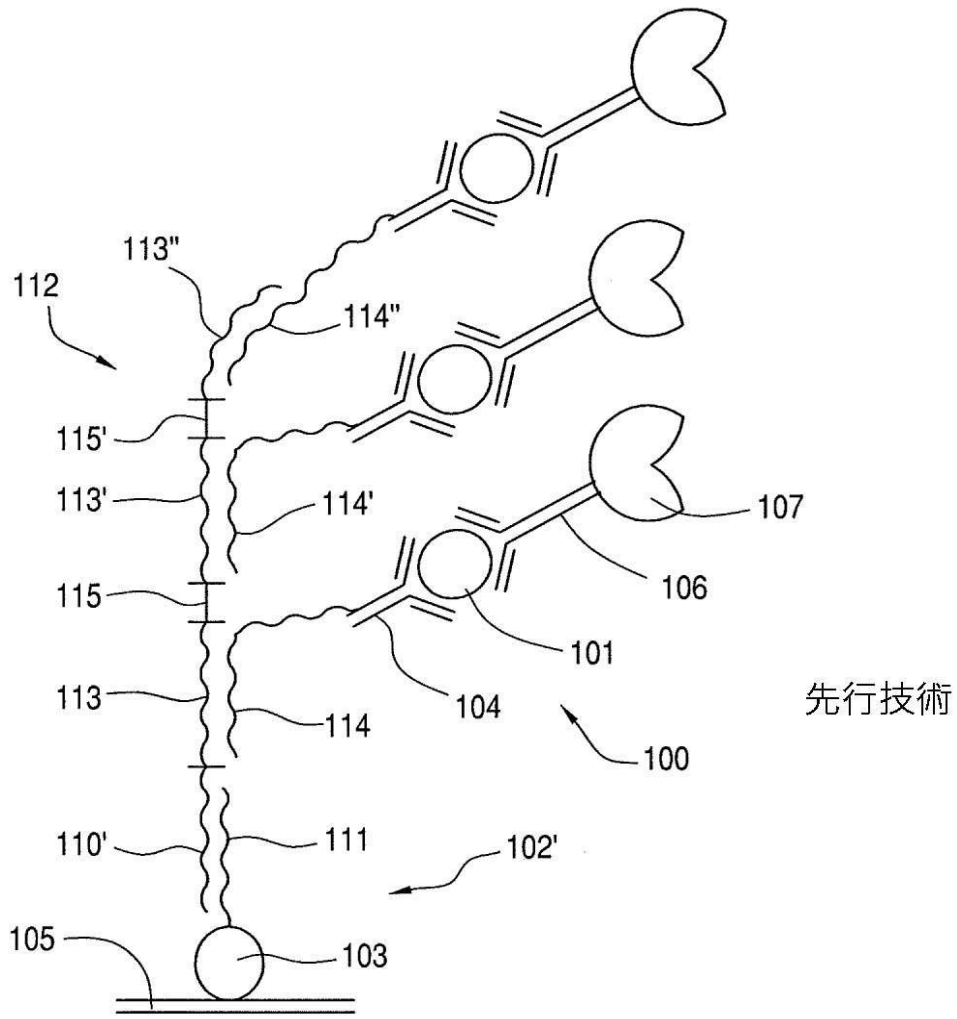
先行技術

【図2】

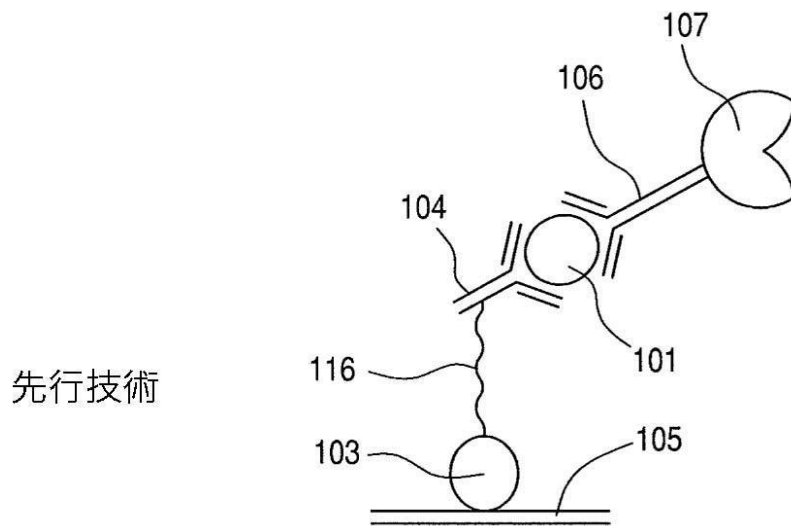


先行技術

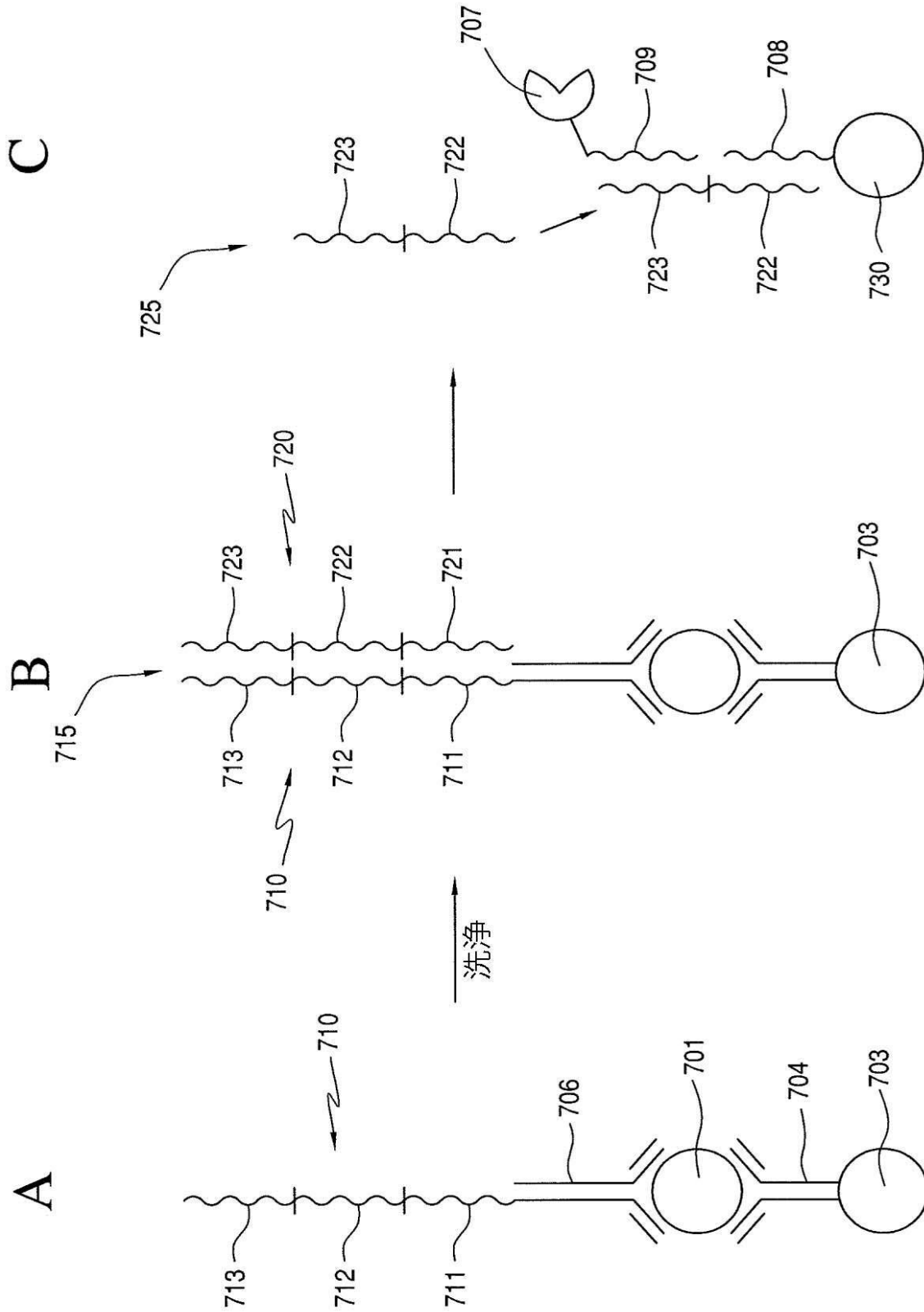
【 図 3 】



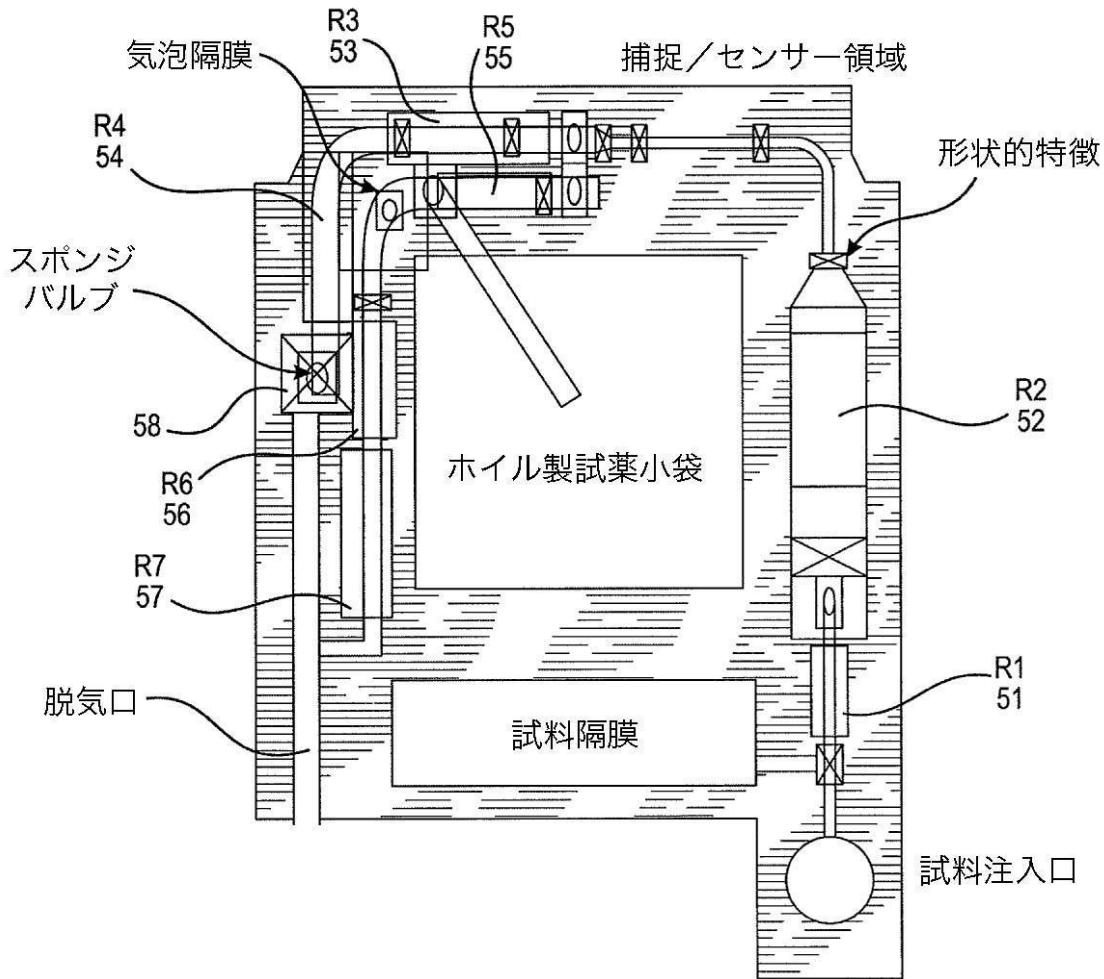
【 図 4 】



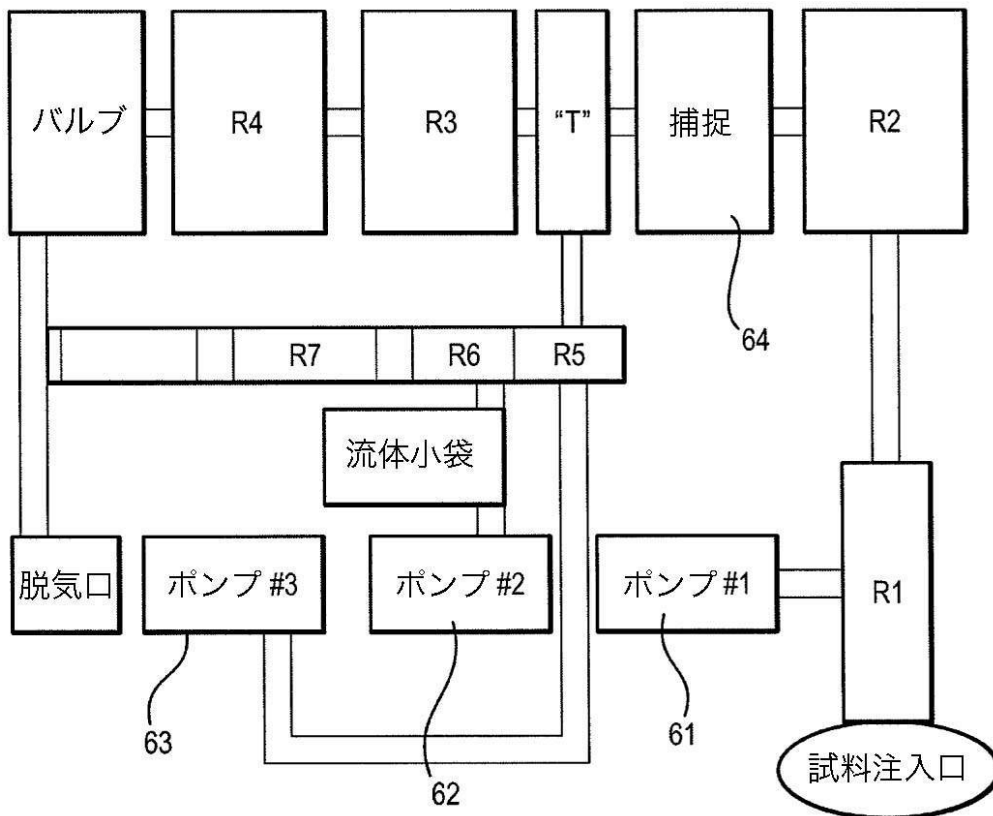
【 図 16 】



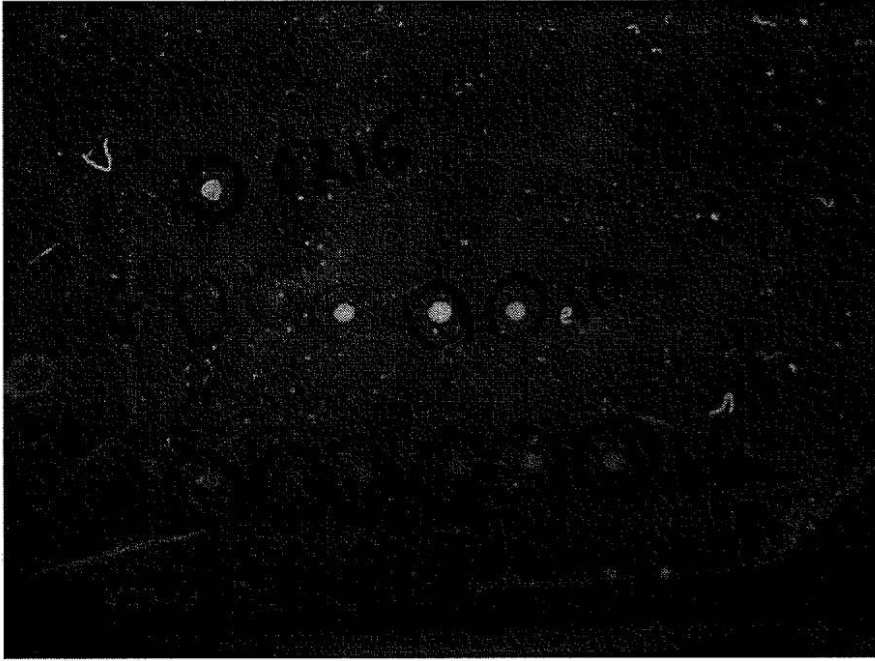
【図21】



【図22】

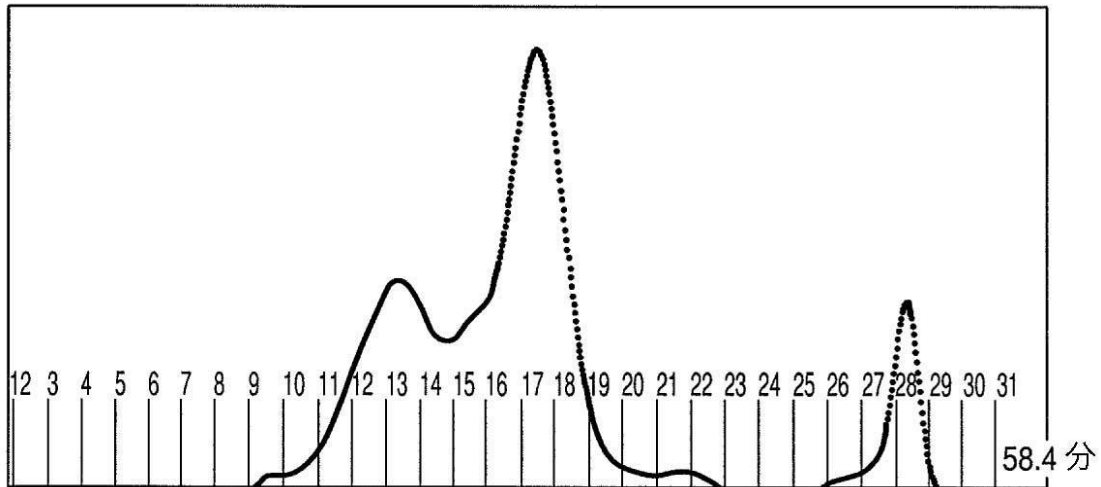


【図23】



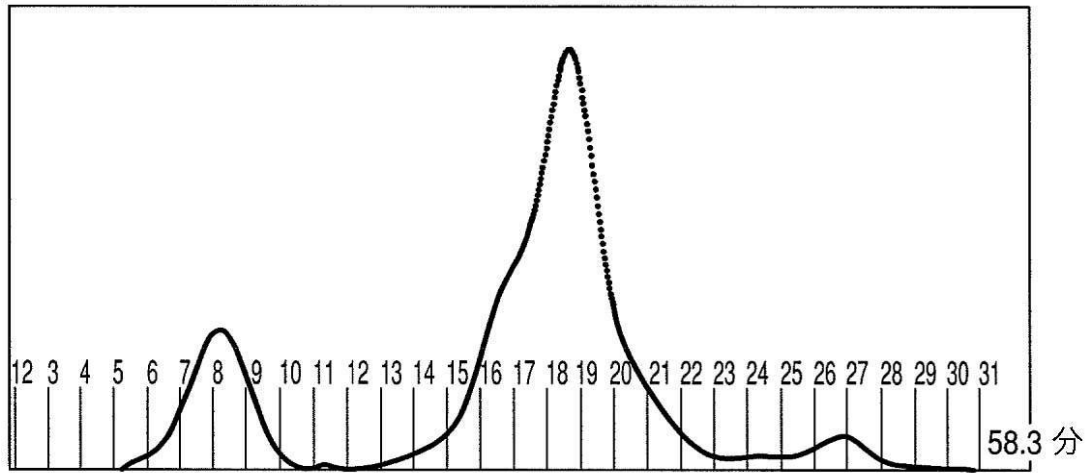
サイズ排除カラムによる蛍光画分

【図24】



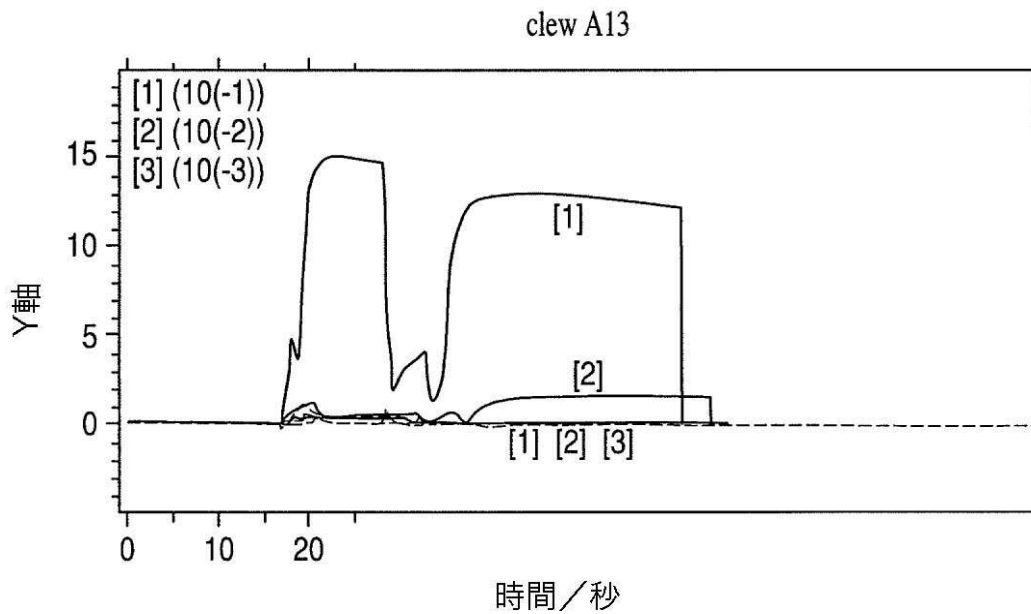
ALP LC-SPDP反応のS300カラム画分

【図25】



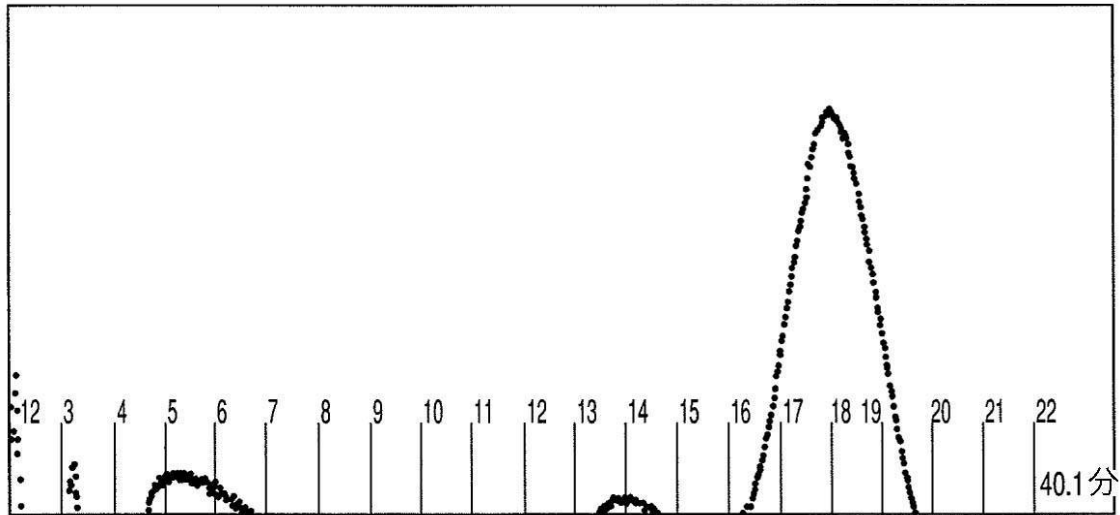
DTT処理合成オリゴヌクレオチドと反応させた
ALP LC-SPDPのS300カラム画分

【図26】



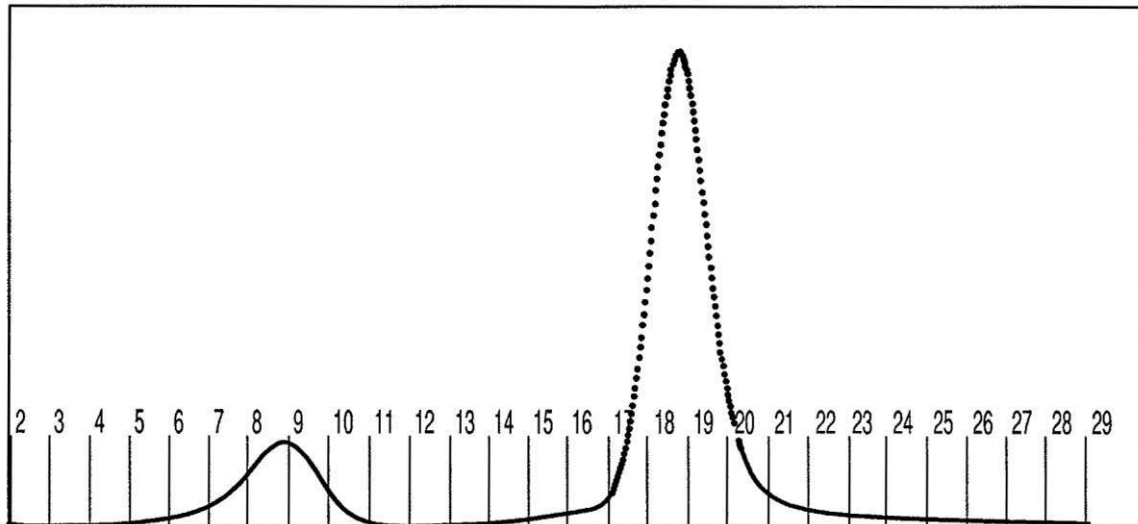
Bill Keoghにより開発されたWinISDソフトウェアを使用して、
i-STAT「イムノ」カートリッジを含有する「A」において試験した、
ALP-A'コンジュゲートの3つの希釈液(10^{-1} (37.3ng)、
 10^{-2} (3.73ng)、 10^{-3} (0.37ng)の時間電流測定プロット。

【図27】



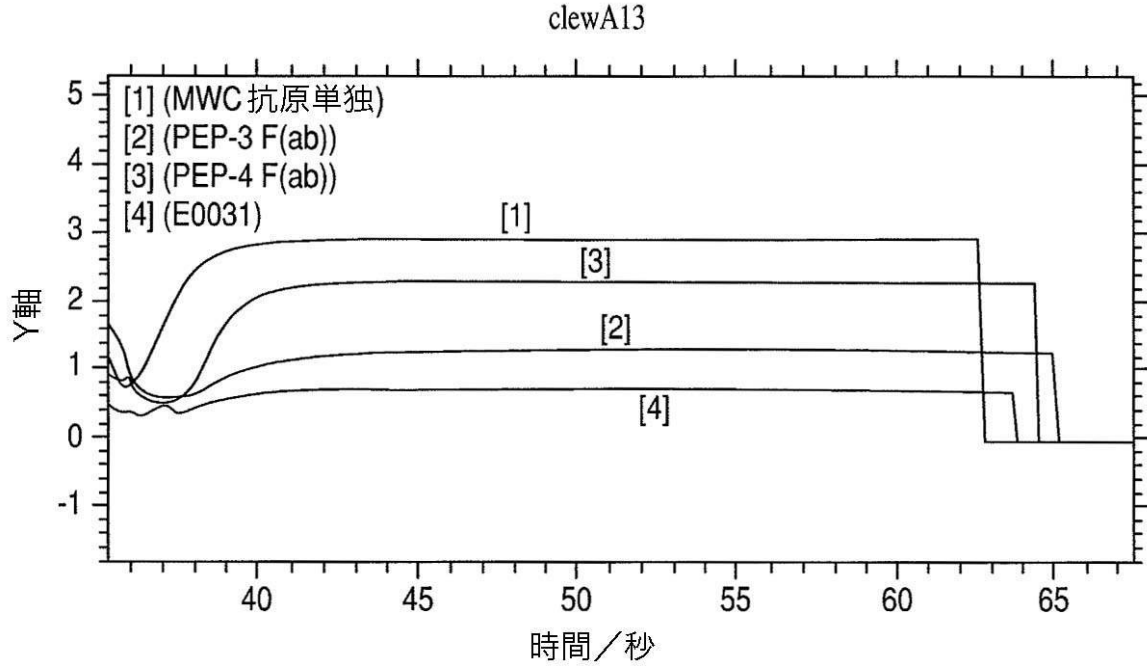
LC-SPDPと反応させたPEP-3F(ab')₂のS300カラム画分

【図28】



DTT処理したA合成オリゴヌクレオチドと反応させた
PEP-3F(ab')₂LC-SPDPのS300カラム画分

【 図 2 9 】



使用した試料への遊離抗体又はコンジュゲートの添加による抗原の競合を使用した、cTnlカートリッジの生産バージョンの時間電流測定プロット。

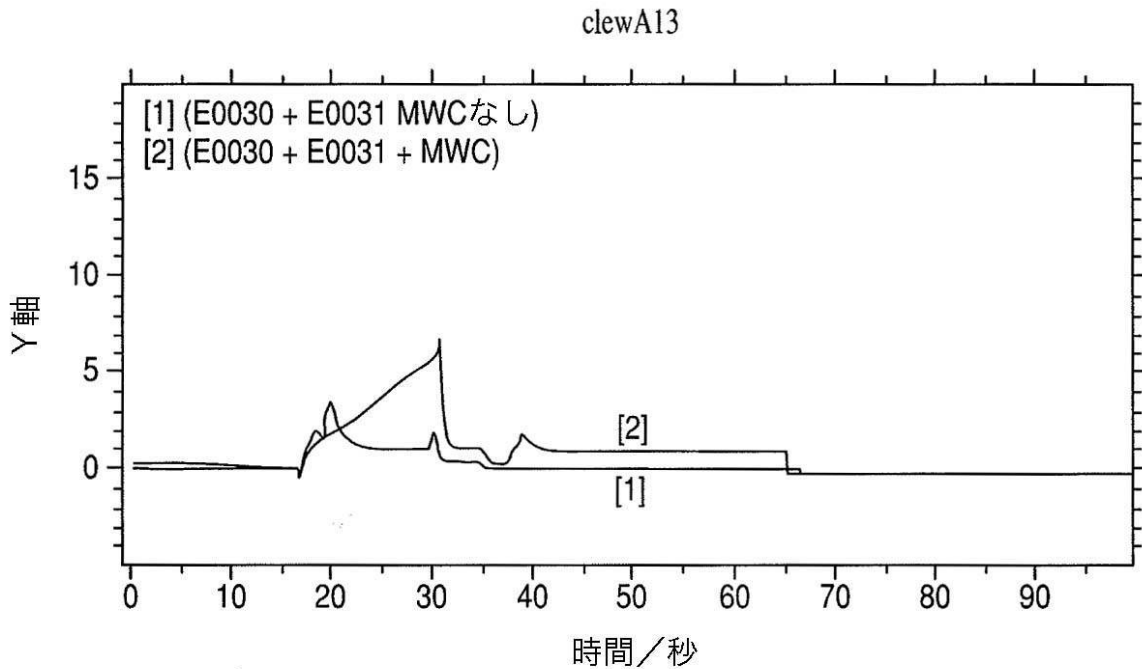
[1]MWC92353を2.59ng/mlに希釈し、2 μ L[5.2pg]を使用。

[2]抗原に49.2ngのPEP-3F(ab)を添加、

[3]抗原に61.8ngのPEP-4F(ab)を添加、

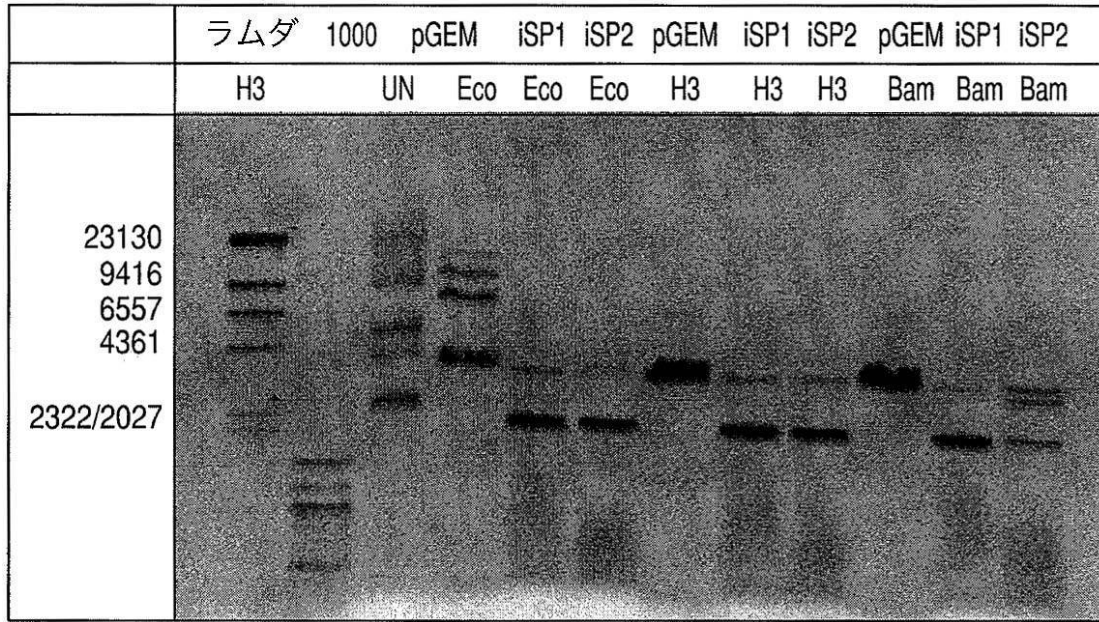
[4]抗原に109ngのE0031コンジュゲートを添加。

【 図 3 0 】



[2]抗原とともに、及び[1]MWC抗原なしで、E0030[747ng]=E0031[218ng]を加えた、cTnl捕捉ビーズを含みコンジュゲートを含まないi-STATイムノカートリッジの時間電流測定結果

【 図 3 1 】



【 配列表 】

0005419993000001.app

 フロントページの続き

- (74)代理人 100088926
 弁理士 長沼 暉夫
- (74)代理人 100102897
 弁理士 池田 幸弘
- (74)代理人 100097870
 弁理士 梶原 斎子
- (74)代理人 100140556
 弁理士 新村 守男
- (74)代理人 100114719
 弁理士 金森 久司
- (74)代理人 100143258
 弁理士 長瀬 裕子
- (74)代理人 100124969
 弁理士 井上 洋一
- (74)代理人 100132492
 弁理士 弓削 麻理
- (74)代理人 100163485
 弁理士 渡邊 義敬
- (74)代理人 100112243
 弁理士 下村 克彦
- (72)発明者 コリアー、ゴードン ブルース
 カナダ国、オンタリオ、オタワ、フィッツロイ ハーバー、モアヘッド ドライブ 252
- (72)発明者 ミラー、カリー ジェイムズ
 カナダ国、オンタリオ、オタワ、チックソー クレセント 93

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特表2005-519304(JP,A)
 特表2008-545142(JP,A)
 特表平10-508741(JP,A)
 特表2001-503517(JP,A)
 特開2002-209594(JP,A)
 特表2005-524403(JP,A)
 特表2005-534006(JP,A)
 特表2005-534907(JP,A)
 特表2006-501808(JP,A)
 米国特許第05635602(US,A)
 ZHU S, PART-PER-TRILLION LEVEL DETECTION OF ESTRADIOL BY COMPETITIVE FLUORESCENCE IMMUNOASSAY 以下備考, ANALYTICA CHIMICA ACTA, NL, ELSEVIER, 2008年 8月22日, V624 N1, P141-146, USING DNA/DYE CONJUGATE AS ANTIBODY MULTIPLE LABELS

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G01N 33/48 - 33/98
 C12Q 1/68

专利名称(译)	使用核苷酸缀合物进行免疫测定的方法和装置		
公开(公告)号	JP5419993B2	公开(公告)日	2014-02-19
申请号	JP2011543729	申请日	2009-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	雅培医护站股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	保健公司雅培点		
当前申请(专利权)人(译)	保健公司雅培点		
[标]发明人	コリアーゴードンブルース ミラーカリージェイムズ		
发明人	コリアー、ゴードンブルース ミラー、カリージェイムズ		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/543.515.D G01N33/543.575 G01N33/543.555.D G01N33/53.D		
代理人(译)	井上慎一 池田幸 新村守男 井上洋一 下村胜彦		
优先权	61/142048 2008-12-31 US		
其他公开文献	JP2012514202A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于免疫测定装置的物质组合物和方法，包括与第一核苷酸共价连接的信号抗体，例如FAB片段；和一个或多个信号元件，例如信号酶，例如ALP或荧光染料，各自与第二核苷酸共价连接，其中第一核苷酸具有一个或多个重复序列，第二核苷酸与一个或多个核苷酸中的一个结合在所述第一核苷酸上重复序列，并且其中信号抗体与信号元件的比例由重复序列的数量控制。

タンパク質濃度 (ug/mL)	186.7
酵素特異的活性 (U/mg)	984.4