

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-514992
(P2015-514992A)

(43) 公表日 平成27年5月21日(2015.5.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 B	2 G O 4 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 D	2 G O 5 4
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 33/53 J	
GO 1 N 21/76 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-507071 (P2015-507071)
 (86) (22) 出願日 平成25年4月12日 (2013. 4. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年10月15日 (2014. 10. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/036389
 (87) 国際公開番号 W02013/158494
 (87) 国際公開日 平成25年10月24日 (2013. 10. 24)
 (31) 優先権主張番号 61/624, 924
 (32) 優先日 平成24年4月16日 (2012. 4. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 13/794, 080
 (32) 優先日 平成25年3月11日 (2013. 3. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511214842
 アクセス メディカル システムズ, リミ
 ティド
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 943
 03, パロ アルト, エンバカデロ ウェ
 イ 2454
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

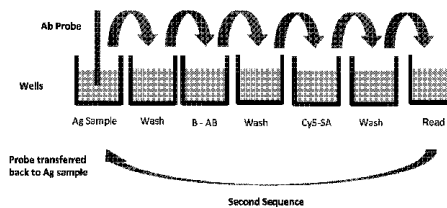
(54) 【発明の名称】 広範発光免疫アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、試料の希釈を必要とせず、かつアッセイを繰り返す必要なく、広範囲の濃度の分析物を1つのアッセイで定量化するための方法に関する。本発明の重要な特徴は、プローブに試料を結合させること、結合反応、および検出を含む事象のサイクルを2つ有することにある。結合および検出の第1のサイクル後、プローブを同じ試料容器に浸漬して、第1のサイクルにおける条件よりも結合に有利な条件で試料容器中のさらなる分析物と結合させる。

【選択図】 図4

Wide Range Protocol: Two Probe Transfer Sequences



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

液体試料中の広い濃度範囲の分析物を検出する方法であって、

(a) 先端表面の直径が 5 mm 以下のプローブ先端に第 1 の抗体が固定化されているプローブを得るステップと、

(b) 分析物を有する試料溶液を含有する試料容器中に前記プローブ先端を 10 秒 ~ 2 分間浸漬し、前記試料容器中で前記試料溶液を横方向に 0 ~ 500 rpm で流動させて、前記分析物を前記プローブ先端上の前記第 1 の抗体と結合させるステップと、

(c) 結合対の第 1 の要素と共役した第 2 の抗体の試薬を含む試薬溶液を含む試薬容器中に前記プローブ先端を浸漬して、前記試薬を前記分析物と結合させるステップと、

(d) 第 1 の洗浄溶液を含む第 1 の洗浄容器中に前記プローブ先端を浸漬して、前記プローブ先端を洗浄するステップと、

(e) 1 以上の発光標識と共役した前記結合対の第 2 の要素を含む増幅溶液を含む増幅容器中に前記プローブ先端を浸漬して、前記分析物、前記第 1 の抗体、前記第 2 の抗体、ならびに前記プローブ先端上の前記結合対の前記第 1 および前記第 2 の要素の免疫複合体を形成するステップと、

(f) 第 2 の洗浄溶液を含有する第 2 の洗浄容器中に前記プローブ先端を浸漬して、前記プローブ先端を洗浄するステップと、

(g) 前記プローブ先端上に形成された前記免疫複合体の発光シグナルを測定することによって第 1 の結果を得るステップと、

(h) 前記プローブ先端を同じ試料容器中に 1 ~ 30 分間浸漬し、前記試料容器中で前記試料溶液を横方向に 200 ~ 1200 rpm で流動させて、前記試料中のさらなる分析物を前記プローブ先端上の前記第 1 の抗体と結合させるステップと、

(i) ステップ (c) ~ (f) を 1 ~ 10 回繰り返すステップと、

(j) 前記プローブ先端上に形成された前記最終免疫複合体の前記発光シグナルを測定することによって第 2 の結果を得るステップと、

(k) 前記 2 つの結果を組み合わせ、広範囲の前記分析物濃度を分析するステップとをこの順序で含み、

前記第 1 の抗体および前記第 2 の抗体が前記分析物に対する抗体である、方法。

【請求項 2】

前記増幅溶液が、前記結合対の第 2 の要素の少なくとも 5 つの分子および少なくとも 25 の発光標識と共役したポリマーを含み、ポリマーが少なくとも 100 万ダルトンの分子量を有し、前記発光標識が 2,000 ダルトン未満の分子量を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記先端表面が約 2 mm 以下である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記結合対が、ハプテンとその抗体、リガンドとその受容体、核酸の相補鎖、またはレクチンと炭水化物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記結合対が、ビオチンおよびストレプトアビジン、ビオチンおよびアビジン、ビオチンおよびストレプトアビジン、ビオチンおよびニュートラアビジン、フルオレセインおよび抗フルオレセイン、ジゴキシゲニン / 抗ジゴキシゲニン、または DNP - 抗 DNP である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記結合対の前記第 1 の要素がビオチンであり、前記結合対の前記第 2 の要素がストレプトアビジンである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ポリマーが、多糖、ポリヌクレオチド、デンドリマー、ポリオール、またはポリエチレングリコールである、請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 8】
前記ポリマーが分枝多糖である、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 9】
前記ステップ (i) がステップ (c) ~ (f) を 1 ~ 3 回繰り返す、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 10】
前記発光標識が、シアニン、クマリン、キサンテンおよびその誘導体からなる群から選択される蛍光染料である、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 11】
前記発光標識がルテニウム (I I) トリス - ビピリジンまたはルミノールの化学発光標識である、請求項 1 に記載の方法。 10
- 【請求項 12】
液体試料中で広い濃度範囲の分析物を検出する方法であって、
(i) 先端表面の直径が 5 mm 以下のプローブ先端に第 1 の抗体が固定化されているプローブを得るステップと、
(i i) 前記プローブ先端を、分析物を有する試料溶液を含む試料容器中に 10 秒 ~ 2 分間浸漬し、前記試料溶液を試料容器中横方向に 0 ~ 500 rpm で流動させて、前記分析物を前記プローブ先端上の前記第 1 の抗体に結合させるステップと、
(i i i) 前記プローブ先端を、蛍光標識と共役した第 2 の抗体を含む試薬溶液を含む試薬容器中に浸漬して、前記分析物、前記第 1 の抗体、および前記第 2 の抗体の免疫複合体を形成するステップと、 20
(i v) 前記プローブ先端を、洗浄溶液を含有する洗浄容器中に浸漬して、前記プローブ先端を洗浄するステップと、
(v) 前記プローブ先端上で形成された前記第 1 免疫複合体の発光シグナルを測定することによって第 1 の結果を得るステップと、
(v i) 前記プローブ先端を同じ試料容器中に 1 ~ 30 分間浸漬し、前記試料溶液を横方向に試料容器中 200 ~ 1200 rpm で流動させて、試料中のさらなる分析物を前記プローブ先端上の前記第 1 の抗体と結合させるステップと、
(v i i) ステップ (i i i) および (i v) を繰り返すステップと、
(v i i i) 前記プローブ先端上で形成された前記最終免疫複合体の前記発光シグナルを測定することによって第 2 の結果を得るステップと、 30
(i x) 2 つの結果を組み合わせ、広範囲の分析物濃度を分析するステップと
をこの順序で含み、
前記第 1 の抗体および前記第 2 の抗体が前記分析物に対する抗体である、方法。
- 【請求項 13】
前記試薬溶液が、少なくとも 5 つの第 2 の抗体分子と、少なくとも 25 の発光標識と共役したポリマーとを含み、前記ポリマーが少なくとも 100 万ダルトンの分子量を有し、前記発光標識が 2 , 000 ダルトン未満の分子量を有する、請求項 12 に記載の方法。
- 【請求項 14】
前記先端表面が約 2 mm 以下である、請求項 1 に記載の方法。 40
- 【請求項 15】
前記ポリマーが、多糖、ポリヌクレオチド、 dendrimer、ポリオール、またはポリエチレングリコールである、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 16】
前記ポリマーが分枝多糖である、請求項 15 に記載の方法。
- 【請求項 17】
前記発光標識が、シアニン、クマリン、キサンテンおよびその誘導体からなる群から選択される蛍光染料である、請求項 12 に記載の方法。
- 【請求項 18】
前記発光標識が、ルテニウム (I I) トリス - ビピリジンまたはルミノールの化学発光 50

標識である、請求項 1 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

臨床診断法では多くの場合、免疫アッセイによって定量化される特定の試料は、ハイレンジ外の値を生じる、すなわち、分析物濃度が、アッセイにより正確かつ再現性のある結果が得られるレベルよりも高くなることがある。そのような分析物試料がハイレンジ外となる患者は、高い罹患率および死亡率を有することが多く、医療を必要とするので、このような試料を定量化する必要がある。これらの臨床的状況における診断のみならず、治療をモニターするためにも、免疫アッセイは有用なツールである。

10

【背景技術】

【0002】

ハイレンジ外の試料による標準的な実験室手法では、分析物濃度が定量化範囲内に収まるように検査技師が試料をさらに希釈し、続いて繰り返し第 2 のアッセイを行う。再アッセイの結果が出るのに長時間を要し、このことは、救急処置もしくは緊急治療室では致命的である可能性があり、研究室にさらなる試薬コストをさらに課す点で、このプロトコルは問題となる。一部の一般的に用いられる側方流動免疫アッセイ装置は、試料を希釈するための手段を有さず、このため、使用者は、試料希釈プロトコルを可能にする別の器具でその後のアッセイを実施しなければならない。

20

【0003】

固相免疫アッセイは、分析物濃度が固定化抗体の結合能力を超える可能性があるので、ハイレンジ試料では限界がある。一部の臨床アッセイは、低分析物レベルの超高感度検出と多量の分析物の定量化との組み合わせをさらに必要とし、それゆえに広い定量化範囲が望ましい。B 型ナトリウム利尿ペプチドである NT pro BNP、およびプロカルシトニンがその例である。

【0004】

低レベルの検出と高レベルの検出との広い定量化範囲を有する固相免疫アッセイの開発は、相反する技術目標である。例えば、高い分析物レベルを有する固定化抗体結合能力を超えないために、試料は高度に希釈 ($1/10 \sim 1/100$) されるか、または固相で短いインキュベーション時間を有する。高感度アッセイは多くの場合、検出可能な量の微量分析物の結合を実施するために、最低試料希釈 (未希釈、 $1/2 \sim 1/3$) および固相で比較的長いインキュベーション時間を必要とする。最終結果は多くの場合、準最適臨床成績を有する分析物範囲の下限または上限のいずれかを有する適切な定量範囲に満たない。

30

【0005】

アリアルスルホネートシアニン蛍光染料は、Mujumdar et al. (1993) Bioconjugate Chemistry, 4: 105 - 111; Southwick et al. (1990) Cytometry, 11: 418 - 430; および米国特許第 5, 268, 486 号に記載されている。Cy5 は、参考文献のそれぞれで記載され、Biological Detection Systems, Inc., (ペンシルベニア州ピッツバーグ) から商品名 FLUOROLINK (商標) Cv5 (商標) として市販されている。アリアルスルホネートシアニン蛍光染料は、高い吸光係数 (典型的には $130,000 \text{ L/mol} \sim 250,000 \text{ L/mol}$)、良好な量子収率、ほとんどの生体物質およびプラスチックの自己蛍光波長の外側の範囲 ($500 \text{ nm} \sim 750 \text{ nm}$) 内の蛍光発光スペクトル、良好な溶解度、および低い非特異的結合特性を有する。

40

【0006】

これらの優れた特性にも関わらず、アリアルスルホネートシアニン蛍光染料にはある制限がある。詳細には、これらの染料は比較的狭いストークシフトを有し、その結果、染料の励起スペクトルと発光スペクトルとの間でかなりのオーバーラップを生じる。励起および発光スペクトルのオーバーラップは、染料分子が互いに近くに位置する場合に励起されると蛍光の自己消光を引き起こし得る。そのような自己消光は、免疫アッセイで使用する

50

ために1つの抗体分子と共役することができるアリアルスルホネート染料分子の数を制限する。アリアルスルホネートシアニン蛍光染料の一例であるCy5の場合、ストークシフトは17nm(650nmの励起波長と667nmの発光波長との差)である。最適蛍光収率は、2~4個のCy5分子が1つの抗体分子と共役する場合に得られる。蛍光シグナル出力は、4個より多い染料分子が1つの抗体分子と共役する場合に激減する。4を超える染料分子を個々の抗体分子と共役させることができないため、Cy5で標識された抗体および他の結合物質を用いる免疫アッセイの感度が著しく制限される。

【0007】

米国特許出願公開第2011/0312105号は、検出システムおよび蛍光免疫アッセイを開示しており、この刊行物は、その全体が参照により本明細書中で援用される。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献2】米国特許第5,268,486号

【特許文献1】米国特許公開第2011/0312105号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Mujumdar et al. (1993) *Bioconjugate Chemistry*, 4:105-111; Southwick et al. (1990) *Cytometry*, 11:418-430

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

試料の希釈を必要とせず、かつ新しい試薬を用いてアッセイを繰り返す必要なく、広範囲の濃度の分析物を定量化するための方法が必要とされている。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】プローブの検出面から蛍光シグナルを検出するための光検出システムを表す。

【図2】プローブ先端上の化学発光シグナルを検出するための電気化学発光検出システムを表す。

30

【図3】抗原分析物を検出するための本発明の第1の実施形態の免疫アッセイフォーマットを表す。Ab:抗体、Ag:抗原、Sa:ストレプトアビジン、B:ビオチン、F:蛍光標識。

【図4】本発明の第1の実施形態の広範囲プロトコルを表す。

【図5】抗原分析物を検出するための本発明の第2の実施形態の免疫アッセイフォーマットを表す。Ab:抗体、Ag:抗原、F:蛍光標識。

【図6】本発明の実施形態の第2の実施形態の広範囲プロトコルを示す。

【図7】架橋FICOLL(登録商標)400-SPDPの調製のフローチャートを示す。

【発明を実施するための形態】

40

【0012】

定義

特許請求の範囲および明細書で用いられる用語は、以下に定義するものを除いて、当業者によって理解される、当該用語の通常の意味に従って解釈されるべきである。

【0013】

「約」は、本明細書中で用いられる場合、記載される値の±10%以内を指す。

【0014】

「分析物結合分子」は、本明細書中で用いられる場合、分析物分子との特定の結合反応に関与することができる任意の分子を指す。

【0015】

50

形状の「アスペクト比」は、その短い方の寸法に対する長い方の寸法の比を指す。

【0016】

「結合分子」は、対象の別の分子と結合することができる分子を指す。

【0017】

「結合対」は、本明細書中で用いられる場合、互いに引かれ合い、互いに特異的に結合する2つの分子を指す。結合対の例としては、限定するものではないが、抗原およびその抗原に対する抗体、リガンドおよびその受容体、核酸の相補鎖、ビオチンおよびアビジン、ビオチンおよびストレプトアビジン、ビオチンおよびニュートラアビジン（アビジンの脱グリコシル化形）、レクチンおよび炭水化物が挙げられる。好ましい結合対は、ビオチンおよびストレプトアビジン、ビオチンおよびアビジン、ビオチンおよびニュートラアビジン、フルオレセインおよび抗フルオレセイン、ジゴキシゲニン/抗ジゴキシゲニン、DNP（ジニトロフェノール）/抗DNPである。

10

【0018】

「分枝ポリマー」は、本明細書中で用いられる場合、2次元もしくは3次元構造を有する非線形ポリマーを指し、これは天然分枝ポリマー、または合成架橋ポリマーのいずれかであり得る。

【0019】

「化学発光」は、本明細書中で用いられる場合、化学反応の結果として、限定された発光を伴うエネルギー放出を指す。例えば、ルミノールが過酸化水素と好適な触媒の存在下で反応する場合、それは励起状態で3-アミノフタレートを生じ、これはより低いエネルギーレベルへ崩壊する場合に発光する。

20

【0020】

「デンドリマー」は、本明細書中で用いられる場合、反復する有機、分枝分子を指す。デンドリマーは典型的にはコアの周りに対称的であり、多くの場合、球状3次元形態をとる。

【0021】

「電気化学発光」(ECL)は、本明細書中で用いられる場合、溶液中での電気化学反応の間に生じるルミネッセンスを指す。ECLでは、電気化学的に生じた中間体は、高度の発エルゴン反応を受けて、電子的に励起された状態を生じ、次いで発光する。ECL励起は、電気生成種(electrogenerated species)のエネルギー的電子移動(レドックス)反応に起因する。ECLは通常、発光種の溶液を含有する電気化学電池の電極に電位(数ボルト)を適用する間に観察される。

30

【0022】

「固定化」は、本明細書中で用いられる場合、試薬が固体表面に固定されることを指す。試薬が固体表面に固定化される場合、それは表面に非共有結合されるか、または共有結合されるかのいずれかである。

【0023】

「モノリス担体」は、本明細書中で用いられる場合、一片の固体材料を指す。

【0024】

「プローブ」は、本明細書中で用いられる場合、検知面において分析物結合分子の薄膜層でコーティングされた基体を指す。プローブは先端部と基端部とを有する。基端部(本願においてはプローブ先端も指す)は分析物結合分子の薄膜層でコーティングされた検出面を有する。

40

【0025】

「広範囲の濃度」は、本明細書中で用いられる場合、少なくとも500倍、1000倍、2000倍、または5000倍を超える濃度範囲を指す。

【0026】

本発明は、試料の希釈を必要とせず、かつアッセイを繰り返す必要なく、広範囲の濃度の分析物を1つのアッセイで定量化するための方法に関する。本発明の特徴は、それぞれが試料をプローブに結合させること、結合反応、および検出を含む事象のサイクルを2つ

50

有する。一般的に、第1のサイクルのアッセイ条件は、関連する臨床範囲の濃度上限の試料に対して最適化され、第2のサイクルのアッセイ条件は、関連する臨床範囲の濃度の下限に対して最適化される。結合および検出の第1のサイクル後に、プローブを同じ試料容器中に浸漬して、試料容器中のさらなる分析物を、第1のサイクルにおける結合条件よりも有利な結合条件（たとえば、さらに長い反応時間および/または攪拌）でプローブと結合させる。分析物濃度を両サイクルで検出し、合わせた結果から、試料の希釈を必要とせず、かつアッセイを繰り返す必要なく、単一アッセイにおいて広範囲濃度を有する分析物を定量化することができる。本発明の別の利点は、広範囲プロトコルが両サイクルで同じ試料および試薬を使用し、第2のサイクルのためにさらなる試料または試薬を必要としないことである。

10

【0027】

第1の実施形態

第1の実施形態において、本発明の方法は、(a)直径が5mm以下のプローブ先端に第1の抗体が固定化されているプローブを得るステップと、(b)プローブ先端を、分析物を有する試料溶液を含む試料容器中に10秒~2分間浸漬し、試料溶液を試料容器中で横方向に0~500rpm、好ましくは0~200rpmで流動させて、分析物をプローブ先端上の第1の抗体に結合させるステップと、(c)結合対の第1の要素と共役した第2の抗体の試薬を含む試薬溶液を含む試薬容器中にプローブ先端を浸漬して、試薬を分析物に結合させるステップと、(d)洗浄溶液を含む第1の洗浄容器中にプローブ先端を浸漬して、プローブ先端を洗浄するステップと、(e)1以上の発光標識と共役した結合対の第2の要素を含む増幅溶液を含む増幅容器中にプローブ先端を浸漬して、分析物、第1の抗体、第2の抗体、ならびにプローブ先端上の結合対の第1および第2の要素の免疫複合体を形成するステップと、(f)洗浄溶液を含む第2の洗浄容器中にプローブ先端を浸漬して、プローブ先端を洗浄するステップと、(g)プローブ先端上で形成された免疫複合体の発光シグナルを測定することによって第1の結果を得るステップと、(h)プローブ先端を同じ試料容器中に1~30分間浸漬し、試料容器中で0~1200rpm、好ましくは200~1200rpmまたは200~1000rpmで横方向に試料溶液を流動させて、試料中のさらなる分析物をプローブ先端上の第1の抗体に結合させるステップと、(i)ステップ(c)~(f)を1~10回繰り返すステップと、(j)プローブ先端上に形成された最終免疫複合体の発光シグナルを測定することによって第2の結果を得るステップと、(k)2つの結果を組み合わせ、広範囲の分析物濃度を分析するステップとをこの順序で含み、第1の抗体および第2の抗体は分析物に対する抗体である。

20

30

【0028】

ステップ(a)において、プローブは、例えば少なくとも5:1、好ましくは10:1の長さ:幅のアスペクト比を有するロッド、円筒形、円形、正方形、三角形などの任意の形状であり得る。ロッド形状が好ましい。プローブは免疫アッセイの間に試料溶液および1以上のアッセイ溶液中に浸漬されるので、溶液中にプローブ先端を浸漬することができるように少なくとも5:1のアスペクト比を有する細長いプローブを有することが望ましい。蛍光アッセイのために、プローブはモノリス担体であり得る。

【0029】

プローブは、分析物を結合するための小さな先端を有する。先端は、直径5mm以下、好ましくは2mm以下または1mm以下、例えば0.5~2mmでさらに小さな表面積を有する。プローブ先端の小さな表面はいくつかの利点を提供する。第1に、小さな表面は非特異的結合が少なく、したがってバックグラウンドシグナルが低い。第2に、プローブ先端上の試薬または試料キャリアオーバーは、先端の表面積が小さいために非常に小さい。この特徴によってプローブ先端を洗浄しやすくなり、洗浄溶液の方が大きな容積を有するので、洗浄溶液中に生じる汚染がごくわずかとなる。さらに、小さな表面積のプローブ先端は、結合能力が低い。その結果、プローブ先端を試薬溶液中に浸漬する場合、試薬の結合はあまり試薬を消費せず、試薬濃度は事実上変化しない。洗浄溶液の汚染がわずかであり、試薬の消費が少ないことにより、試薬溶液、増幅溶液、および洗浄溶液を多数回、

40

50

例えば、1～10回または3～5回再使用することが可能になる。

【0030】

プローブの検出面を、試料中の分析物と結合する第1の抗体でコーティングする。試薬を固相（プローブ先端の検出面）に固定する方法は、免疫化学で一般的であり、固相と試薬との間の共有結合、疎水結合または静電結合の形成を含む。第1の抗体を検出面上に直接固定化することができる。別法として、第1の抗体を結合対によって検出面上に間接的に固定化することができる。例えば、抗フルオレセインを、固体表面に吸着させることによるか、または固体表面上にコーティングされたアミノプロピルシランに共有結合させることによるかのいずれかでまず固定することができる。次いで、フルオレセインで標識された第1の抗体をフルオレセインと抗フルオレセインとの結合（結合対）によって固体表面に結合させることができる。

10

【0031】

ステップ（b）において、プローブ先端を試料容器中に10秒～2分、好ましくは30秒～1分間浸漬して、分析物をプローブ先端上の第1の抗体と結合させる。

【0032】

ステップ（b）後、プローブを場合によって1～5回、好ましくは1～3回、洗浄溶液を含む洗浄容器中で洗浄する。キャリアオーバーされる溶液の量は結合表面積が狭いため最小であるので、この追加の洗浄ステップは不要であってもよい。洗浄溶液は典型的には、緩衝液およびTween 20などの界面活性剤を含有する。

【0033】

ステップ（c）において、プローブ先端を試薬容器中に20秒～10分間、好ましくは20秒～2分間浸漬して、試薬をプローブ先端上の分析物と結合させる。試薬溶液は、結合対の第1の要素と共役した第2の抗体の試薬を含む。

20

【0034】

結合対は、典型的には、ハプテンおよびその抗体、リガンドおよびその受容体、核酸の相補鎖、またはレクチンおよび炭水化物である。例えば、結合対は、ビオチンおよびストレプトアビジン、ビオチンおよびアビジン、ビオチンおよびニュートラアビジン、フルオレセインおよび抗フルオレセイン、ジゴキシゲニンおよび抗ジゴキシゲニン、ならびにDNP（ジニトロフェノール）および抗DNPである。好ましくは、結合対の第1の要素はビオチンであり、結合対の第2の要素はストレプトアビジンである。

30

【0035】

ステップ（d）において、プローブを1～5回、好ましくは1～3回、洗浄溶液を含む第1の洗浄容器中で洗浄する。洗浄溶液は、典型的には緩衝液とTween 20などの界面活性剤とを含む。

【0036】

ステップ（e）において、プローブを、増幅溶液を含む増幅容器中に20秒～5分間、好ましくは20秒～2分間浸漬して、分析物、第1の抗体、第2の抗体、ならびにプローブ先端上の結合対の第1および第2の要素の免疫複合体を形成する。増幅溶液は、1以上の発光標識と共役した結合対の第2の要素を含む。

【0037】

アッセイの感度を改善するために、増幅溶液は、結合対の第2の要素の少なくとも5つの分子および少なくとも25の発光標識と共役したポリマーを含み得る。ポリマーは、好ましくは分枝および/または架橋している。ポリマーは少なくとも500,000、好ましくは100万ダルトンの分子量を有する。ポリマーは、多糖（たとえば、FICOLL（登録商標）（スクロースおよびエピクロロヒドリンのコポリマー）またはデキストラン）、ポリヌクレオチド、デンドリマー、ポリオール、もしくはポリエチレングリコールであり得る。ポリマーは好ましくは分枝または架橋していて、2次元または3次元構造を有する。ポリマーは、好ましくは5～50または5～100の結合分子および25～100または25～500の発光性分子を含む。

40

【0038】

50

本発明に有用な発光標識は、5,000未満、好ましくは2,000未満、例えば500~2000または100~2000ダルトンの分子量を有する。1つの実施形態において、発光標識は、シアニン、クマリン、キサンテンおよびその誘導体からなる群から選択される蛍光染料である。例えば、蛍光染料は、Cy5(分子量MW792)、Alexa Fluor 647、DyLight 350(MW874)、DyLight 405(MW793)、DyLight 488(MW71011)、DyLight 550(MW982)、DyLight 594(MW1078)、DyLight 633(MW1066)、DyLight 650(MW1008)、DyLight 680(MW950)、DyLight 755(MW1092)、DyLight 800(MW1050)、Oyster蛍光染料、IRDye、またはランタノイド(Eu、Th、Sm、もしくはDy)などの希土類金属とキレート化した複数の環を含む有機化合物である。

10

【0039】

別の実施形態において、発光標識は、ルテニウム(II)トリス-ピピリジン(MW1057)、ルミノール(MW177)、アクリジニウムエステル(9[[4-[3-[(2,5-ジオキソ-1-ピロリジニル)オキシ]-3-オキソプロピル]フェノキシ]カルボニル]-10-メチル-アクリジニウムトリフルオロメタンスルホネート、MW632)、ヘミン(MW652)からなる群から選択される化学発光マーカである。

【0040】

結合分子がポリペプチドまたはタンパク質である場合、発光標識は、化学文献および特許文献に記載されるような通常の共役化学反応を使用して、ジスルフィド、ヒドロキシフェニル、アミノ、カルボキシル、インドール、または他の官能基などの様々な部分によってそれと結合することができる。

20

【0041】

ポリヌクレオチドに対する結合分子の共有結合は、アルデヒド、ケトン、イソチオシアネート、イミデート、イノシン、アシル、およびアルキルなどの様々な部分により、通常の共役化学を使用して実施することができ、一方、ビオチンを用いた誘導体化は多くの文献で教示されている。(Leary et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4045-4049; 国際公開第86/02929号; EP063879; Langer et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6633-6637; ならびにEP2009996)。

30

【0042】

ステップ(b)、(c)、および(e)のそれぞれにおいて、反応は容器中で溶液を攪拌または混合することによって加速することができる。例えば、プローブ先端を横切る溶液の側方流動(環状流動(orbital flow))は、1~500rpm、好ましくは1~200rpmで誘発することができ、これによって固相に固定化されたその結合パートナーによる標的分子の捕捉が加速される。例えば、反応容器をオービタルシェーカーに取り付けることができ、このオービタルシェーカーを少なくとも50rpm、好ましくは少なくとも200rpmの速度で回転させる。場合によって、プローブ先端を0.01~10mm/秒の速度で環状流動の面に対して垂直に上下させて、プローブ先端の上下で溶液のさらなる攪拌を誘導することができる。

40

【0043】

ステップ(f)において、プローブを1~5回、好ましくは1~3回、第2の洗浄溶液を含む第2の洗浄容器中で洗浄する。洗浄溶液は典型的には緩衝液とTween 20などの界面活性剤とを含有する。第1の洗浄容器と第2の洗浄容器とは、同じ容器でも、異なる容器であってもよい。第1の洗浄溶液と第2の洗浄溶液とは、同じ溶液でも、異なる溶液であってもよい。

【0044】

ステップ(g)において、免疫複合体は、プローブ上の発光シグナルを読み取ることに

50

よって検出される。蛍光標識について、プローブを透明な底のウェル中に入れ、参照により本明細書中で援用される、米国特許出願公開第2011/0312105号に記載されているような検出器(図1)によって読み取る。

【0045】

化学発光標識について、プローブを、共反応物質(co-reactant)を有する測定溶液を含む透明な底のウェル中に入れる。例えば、化学発光標識がルテニウム(II)トリス-ビピリジンである場合、共反応物質はトリプロピルアミンである。化学発光標識がルミノールである場合、共反応物質は過酸化水素および水中水酸化物塩である。放出された光は、光電子増倍管(PMT)によって測定される。

【0046】

電気化学発光(ECL)について、ECL分析器の機構および主成分は、参照により本明細書中で援用される、Blackburn et al(Clin. Chem. 37:1534-1539(1991))によって記載されている。共反応物質を有する測定溶液を含む透明な測定のウェル中にプローブを入れた後、作用電極および対電極に電圧を加え、放出された光をPMTによって測定する。

【0047】

好ましい実施形態において、抗体でコーティングされたプローブはECL分析器の作用電極としての役割を果たす(図2)。Ru(II)/トリプロピルアミンドックス反応は、電極表面で起こるか、または電極表面に非常に近接して起こる必要があるため、これによって、効率的な発光の利点を得られる。

【0048】

ステップ(h)は、第2の事象のサイクルを開始する。ステップ(h)はプローブ先端を同じ試料容器に1~30分ものさらに長時間、好ましくは2~30分、または3~30分再度浸漬し、場合によって攪拌して、プローブ先端上の第1の抗体へのさらなる分析物の結合を増大させる。

【0049】

ステップ(i)は、ステップ(c)~(f)を1~10回、好ましくは1~5回、1~3回、または2~3回繰り返すことによる循環増幅である。増幅溶液が結合対の第2の要素の少なくとも5つの分子および少なくとも25の発光標識と共役したポリマーを含む場合、ステップ(c)~(f)を2~10回繰り返して、アッセイシグナルおよび感度を増大させることができる。各サイクルは、プローブを同じ試薬容器、同じ第1の洗浄容器、同じ増幅容器、同じ第2の洗浄容器に戻すことから構成される。増幅溶液が高分子量ポリマーを含まない場合、ステップ(c)~(f)は典型的には1回だけ繰り返される。

【0050】

ステップ(j)は、プローブ先端上の発光シグナルを測定し、2つの検出結果を組み合わせることで広範囲の分析物濃度を分析することによって形成された最終免疫複合体を検出し、次いで2つの検出結果を組み合わせることで、広範囲の分析物濃度を分析する。

【0051】

図3は、抗原分析物を検出するための本発明の第1の実施形態の免疫アッセイのフォーマットを示す。

【0052】

図4は、本発明の第1の実施形態の広範囲プロトコルにおけるプローブ移動を示す。図4では、広範囲プロトコルは、同じ試料および試薬を用いる2つのアッセイシーケンスから構成される。第1のシーケンスは、抗体(Ab)でコーティングされたプローブを抗原(Ag)試料容器中に浸漬し、続いてビオチニル化抗体(B-AB)試薬容器中に浸漬し、次いで蛍光標識(Cy5-SA)と結合したストレプトアビジンを含む容器中に浸漬することを伴う。シグナルは標識されたストレプトアビジン結合後にプローブの先端部で読み取られる。第2のシーケンスに関して、プローブを次いで同じ試料容器に戻し、ここで結合条件を変えて、さらに強い結合およびさらに高い感度を達成する。典型的には、インキュベーション時間の増加および/またはプローブの環状流動速度の増加は、試料結合の

10

20

30

40

50

感度を改善する。プローブを次いで同じビオチニル化抗体試薬容器に移し、次いで標識されたストレプトアビジン試薬容器に移し、続いて2回目の測定を行う。

【0053】

第2の実施形態

第2の実施形態において、本発明の方法は、(i)直径が5mm以下のプローブ先端に第1の抗体が固定化されているプローブを得るステップと、(ii)プローブ先端を、分析物を有する試料溶液を含む試料容器中に10秒~2分間浸漬し、試料溶液を試料容器中に横方向に0~500rpmで流動させて、分析物をプローブ先端上の第1の抗体と結合させるステップと、(iii)蛍光標識と共役した第2の抗体を含む試薬溶液を含む試薬容器中にプローブ先端を浸漬して、分析物、第1の抗体、および第2の抗体の免疫複合体を形成するステップと、(iv)洗浄溶液を含む洗浄容器中にプローブ先端を浸漬して、プローブ先端を洗浄するステップと、(v)プローブ先端上に形成された第1免疫複合体の発光シグナルを測定することによって第1の結果を得るステップと、(vi)プローブ先端を同じ試料容器中に1~30分間浸漬し、試料溶液を試料容器中横方向に0~1200rpm、好ましくは200~1200rpmまたは200~1000rpmで流動させて、試料中のさらなる分析物をプローブ先端上の第1の抗体と結合させるステップと、(vii)ステップ(ii)および(iv)を繰り返すステップと、(viii)プローブ先端上に形成された最終免疫複合体の発光シグナルを測定することによって第2の結果を得るステップと、(ix)2つの結果を組み合わせ、広範の分析物濃度を分析するステップとをこの順序で含み、第1の抗体および第2の抗体は分析物に対する抗体である。

10

20

【0054】

第2の実施形態のステップ(i)および(ii)は第1の実施形態のステップ(a)および(b)に類似している。

【0055】

ステップ(iii)において、プローブ先端を試薬容器中に20秒~10分間、好ましくは20秒~2分間浸漬して、試薬をプローブ先端上の分析物と結合させる。試薬溶液は、蛍光標識と共役した第2の抗体の試薬を含む。1つの実施形態において、試薬溶液は、第2の抗体の少なくとも5つの分子および少なくとも25の蛍光標識と共役したポリマーを含み、この場合、ポリマーは少なくとも100万ダルトンの分子量を有し、蛍光標識は2,000ダルトン未満の分子量を有する。好適なポリマーは、第1の実施形態で記載されているものと類似している。

30

【0056】

ステップ(iv)、(v)、(vi)、(vii)および(ix)は、それぞれ、第1の実施形態のステップ(d)、(g)、(h)、(j)、および(k)と類似している。

【0057】

図5は、抗原分析物を検出するための本発明の第2の実施形態の免疫アッセイフォーマットを示す。

【0058】

図6は、本発明の第2の実施形態の広範囲プロトコルにおけるプローブ移動を示す。図6において、広範囲プロトコルは、同じ試料および試薬を使用する2つのアッセイシーケンスから構成される。第1のシーケンスは、抗体(Ab)でコーティングされたプローブを抗原(Ag)試料容器中に浸漬し、続いて蛍光標識と共役した抗体(Ab-Cy5)を含む試薬容器中に浸漬することを含む。シグナルを、標識抗体結合後にプローブの先端部で読み取る。第2のシーケンスに関して、プローブを次いで同じ試料容器に戻し、この場合、結合条件を変更して、さらに大きな結合およびさらに高い感度を達成する。典型的には、インキュベーション時間の増加および/またはプローブの環状流動速度の増加によって、試料結合の感度が改善される。プローブを次いで同じ試薬容器に移し、続いて第2の測定を実施する。

40

【0059】

50

一般的に、第1のシーケンスのアッセイ条件は、関連する臨床範囲の濃度上限の試料について最適化され、低濃度試料は検出されない。第2のシーケンスのアッセイ条件は、低濃度臨床試料について最適化され、高濃度試料はプローブの結合能力を飽和状態にする。周期増幅は、いずれかのシーケンスで用いることができるが、第1のシーケンスでは高感度は要求されないのほとんど使用されない。

【0060】

小表面積プローブを使用する広範囲プロトコルは、同じ試料および試薬を使用して免疫アッセイの分析範囲を拡大する2つのアッセイシーケンスを特徴とする。本発明は、抗原を迅速に捕捉できる比較的高い表面積を有するので、固相として通常用いられる、マイクロウェル、磁性粒子、またはビーズなどの他の異種免疫アッセイフォーマットよりも優れた予想外の利点を有する。それらのプロトコルは、試料および試薬を添加し、インキュベーション期間後に、それらを固相から取り出すことを含む。各試薬を固相に添加する間に、洗浄シーケンスを実施する。洗浄シーケンスも、洗浄試薬を添加し、次いで固相から取り出すことから構成される。それによって、アッセイ実施の複雑さが増し、試料および試薬の再使用を可能にするために追加のピペティングシステムを有する。第2に、他のプロトコルにおける固相の高表面積は、試薬を消耗させるか、または洗浄サイクルにおけるキャリーオーバーの原因となる可能性があり、これはアッセイ性能を低減する可能性がある。

10

【0061】

本発明を以下の実施例でさらに説明し、この実施例は、本発明の範囲をその中で記載される特定の手順に限定すると解釈されるべきではない。

20

【実施例】

【0062】

実施例1：第1の抗体が固定化されたプローブの調製

塩基性ナトリウム利尿ペプチド (Basic natriuretic peptide: BNP) は、心筋細胞の過度の伸張に应答して心臓の心室によって分泌される32のアミノ酸ポリペプチドである。脳ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP) のN末端プロホルモンは76アミノ酸N末端フラグメントである。血液中のBNPおよびNT-proBNPレベルはどちらも、急性うっ血性心不全のスクリーニング、診断に有用であり、心不全における予後の確立に有用であり得る。

30

【0063】

プロカルシトニン (PCT) は、ホルモンカルシトニンのペプチド前駆体であり、後者はカルシウムホメオスタシスに参与する。それは116のアミノ酸で構成され、甲状腺の傍濾胞細胞ならびに肺および腸の神経内分泌細胞によって産生される。

【0064】

直径1mm、長さ2cmの石英プローブを、製造業者のプロトコルに従って化学蒸着プロセス (Yield Engineering Systems, 1224P) を使用してアミノプロピルシランでコーティングした。プローブ先端を次いでネズミモノクローナル抗フルオレセイン (Biospecific Inc.)、10µg/mlのpH7.4のPBS (リン酸緩衝食塩水) 中溶液中に浸漬した。抗体をプローブに20分間吸着させた後、プローブ先端をPBS中で洗浄した。

40

【0065】

BNP、NT-proBNPおよびPCTの捕捉抗体 (HyTest, Finland) を標準的方法によってフルオレセインで標識した。典型的には、抗体あたり約4のフルオレセイン置換があった。抗フルオレセインでコーティングされたプローブをフルオレセイン標識捕捉抗体溶液 (5µg/ml) 中に5分間浸漬し、続いてPBS中で洗浄した。

【0066】

実施例2：ビオチニル化抗体の調製

抗BNP、抗NT-proBNPおよび抗PCT抗体を標準的方法によってビオチンで

50

標識した。例えば、ピオチニル化 - NHS を約 15 : 1 のモル比で PBS (pH 7) 中で 1 時間抗体と室温で反応させた。ピオチニル化抗体を Sephadex G - 25 カラムによって精製した。典型的には、抗体あたり約 3 ~ 6 のピオチンが存在していた。

【 0067 】

実施例 3 : 架橋 F I C O L L (登録商標) 400 - S P D P の調製

架橋 F I C O L L (登録商標) 400 - 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、Invitrogen) を、参照により本明細書中で援用される米国特許出願公開第 2011 / 0312105 号の実施例 1 に従って調製した。図 7 はその調製のフローチャートを示す。

【 0068 】

実施例 4 : Cy5 - ストレプトアビジンの調製

DMF 中 5 mg / ml の 32 μ L の Cy5 - NHS (GE Healthcare) を、1 ml のストレプトアビジン (Scripps Labs) と 2.4 mg / ml の 0.1 M の炭酸ナトリウム緩衝液 pH 9.5 で 40 分間 30 で反応させた。混合物を PD10 カラム (Pharmacia) にかけて、非結合 Cy5 を除去した。スペクトル分析によってストレプトアビジン 1 分子あたり 2.8 の Cy5 が結合することが示された。

【 0069 】

実施例 4 a : Cy5 - 抗体の調製

ストレプトアビジンを抗体と置換することにより、実施例 4 に従って Cy5 - 抗体を調製する。

【 0070 】

実施例 5 : Cy5 - ストレプトアビジン架橋 F I C O L L (登録商標) の調製

5.8 μ の SMCC (スクシンイミジル 4 - [N - マレミドメチル] シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、Pierce Chemical) を DMF 中 10 mg / ml で、1 ml の PBS (pH 7.4) 中 2 mg の Cy5 - ストレプトアビジン (実施例 4) と 1 時間室温で反応させた。混合物を PD10 カラムにかけることによって非結合 SMCC を除去した。

【 0071 】

架橋 F I C O L L (登録商標) 400 - S P D P 上のチオールを、30 μ L の DTT を 38 mg / ml で 1 ml の PBS 中の 1 mg の架橋 F I C O L L (登録商標) 400 - S P D P に添加し、1 時間室温で反応させることによって保護し、続いて PD10 カラムによって架橋 F I C O L L (登録商標) を精製した。

【 0072 】

Cy5 - ストレプトアビジン - SMCC を架橋 F I C O L L (登録商標) 400 - S H と混合し、一晚室温で反応させた。10 μ L の NEM (Aldrich) を次いで 12.5 mg / ml で添加し、半時間室温で反応させた。複合体を次いで Sepharose 4 B CL カラム上で精製した。複合体は Ficoll (登録商標) (200 万ダルトン) あたり約 20 ~ 30 のストレプトアビジンを有し、ストレプトアビジンあたり 2 ~ 3 の Cy5 を有すると推定された。

【 0073 】

実施例 5 a : Cy5 - ストレプトアビジン - 架橋 F I C O L L (登録商標) の調製

ストレプトアビジンを抗体と置換することにより、実施例 5 に従って Cy5 - 抗体 - 架橋 F I C O L L (登録商標) を調製する。

【 0074 】

実施例 6 : BNP の広範囲プロトコル

広範アッセイの第 1 のシーケンスのために、BNP 校正器 (Hytest) を正常なプールされたヒト血漿中にスパイクし、次いで 5 mg / ml の BSA および 0.05 % の Tween 20 (アッセイ緩衝液) を含む PBS 中で 1 ~ 3 倍に希釈した。プローブ先端を BNP 試料ウェル中に浸漬し、試料ウェルを 50 rpm で環状運動 (直径 1 mm のストローク) させつつ室温で 1 分間インキュベートした。プローブを静置した。プローブを P

10

20

30

40

50

BS、0.05%のTween 20中で10秒間3回洗浄した。洗浄シーケンス後、ビオチニル化抗BNPをアッセイ緩衝液中10ug/mlで含有する試薬溶液中にプローブを浸漬し、続いて500rpmで0.5分インキュベートし、次いで3回洗浄シーケンスを実施した。プローブを次いで増幅溶液Cy5-ストレプトアビジン-Cx FICOLL (登録商標)に移した。500rpmで0.5分インキュベーション後、プローブを洗浄シーケンスによって採取した。プローブの先端部での蛍光を次いで測定し、結果を表1中1st Readの下欄に示す。

【0075】

第2のシーケンスは、プローブを同じ試料ウェルに戻すことから構成され、周期増幅手順でアッセイを実施した。プローブを試料中で5分間、750rpmでインキュベートし、続いて洗浄シーケンスを実施した。3サイクルを次いで実施し、この場合、各サイクルについて、プローブを同じビオチニル化抗BNP溶液中に2分間500rpmで浸漬し、続いて洗浄シーケンスを実施し、同じCy5-ストレプトアビジン-Cx FICOLL (登録商標)溶液中に1分間500rpmで浸漬し、続いて洗浄シーケンスを実施した。第1のサイクル(Amp1)および第3サイクル(Amp3)後、プローブ先端上の蛍光を測定した。データを表1に示す。各データポイントは重複試験の平均である。「Sat」は飽和シグナルを指す。

【0076】

【表1】

[BNP] (ng/ml)	1 st Read	2 nd Read	
		Amp 1	Amp 3
50	5.2	12.6	Sat
25	3.5	10.2	Sat
12	2.1	7.3	Sat
6	1.4	6.6	Sat
3	0.7	3.7	14.3
1	0.27	1.85	8.43
0.3	0.1	0.83	3.93
0.1	0.004	0.3	1.13
0.05	0.01		0.43
0.012	0.01		0.28
0	0.01	0	0.09

【0077】

表1の結果は、第1のシーケンスの定量化範囲(1st Read)が約1~50ng/mlであり、1増幅サイクル(Amp 1)の第2のシーケンスについては0.3~25ng/mlであり、3増幅サイクル(Amp 3)の第2のシーケンスについては0.012~3ng/mlであることを示す。第1のシーケンスと第2のシーケンスとの結果を組み合わせることによって、1つのシーケンスによるよりもはるかに広い全範囲(0.01~50ng/mL、5000倍)が得られる。

【0078】

実施例7: NT-proBNPの広範囲プロトコル

NT-proBNP校正器をフィンランドのハイテスト(Hytest)から入手した。2増幅サイクル(Amp 2)を第2のシーケンスで実施した以外は、実施例5と同様にアッセイを実施した。

【0079】

データを表2に示す。

【0080】

10

20

30

40

【表 2】

NTProBNP ng/ml	1 st Read	2 nd Read Amp 2
135	7.25	20
45.3	4.66	20
15.1	2.01	20
5.04	0.81	16.4
1.67	0.23	9.29
0.56	0.12	5.25
0.18	0.07	2.25
0.06	0.05	0.94
0	0.06	0.13

10

【0081】

表 2 の結果は、第 1 のシーケンスの定量化範囲 (1 s t R e a d) が約 0 . 5 6 ~ 1 3 5 n g / m l であり、2 増幅サイクル (A m p 2) での第 2 のシーケンスについては 0 . 0 6 ~ 5 . 0 4 n g / m l である。第 1 のシーケンスと第 2 のシーケンスとの結果を組み合わせることによって、1 つのシーケンスによるよりもはるかに広い全範囲 (0 . 0 6 ~ 1 3 5 n g / m L 、 2 2 5 0 倍) が得られることを示す。

【0082】

20

工業規格と比較して、Roche Cobas NTproBNP アッセイ範囲は 0 . 0 6 ~ 3 5 n g / m L (5 8 3 倍) である。Roche の定量化範囲は本発明のものよりも約 4 倍低い。

【0083】

実施例 8 : P C T 用の広範囲プロトコル

P C T 校正器をフィンランドのハイテスト (H y t e s t) から入手した。2 増幅サイクル (A m p 2) を第 2 のシーケンスで実施した以外は、実施例 5 と同様にしてアッセイを実施した。

【0084】

データを表 3 に示す。

30

【0085】

【表 3】

[PCT], ng/ml ng/ml	1 st Read	2 nd Read Amp 2
400	5.84	20
133	2.11	20
44	0.81	20
14.8	0.28	20
4.9	0.11	11.82
1.64	0.07	4.54
0.54	0.04	1.68
0.18	0.04	0.83
0.06	0.04	0.54
0	0.04	0.38

40

【0086】

表 3 の結果は、第 1 のシーケンスの定量化範囲 (1 s t R e a d) は約 4 . 9 ~ 4 0 0 n g / m l であり、2 増幅サイクル (A m p 2) の第 2 のシーケンスについては 0 . 0 6 ~ 1 4 . 8 n g / m l であることを示す。第 1 のシーケンスと第 2 のシーケンスとの

50

結果を組み合わせることによって、1つのシーケンスによるよりもはるかに高い全範囲（ $0.06 \sim 400 \text{ ng/mL}$ 、6667倍）が得られる。

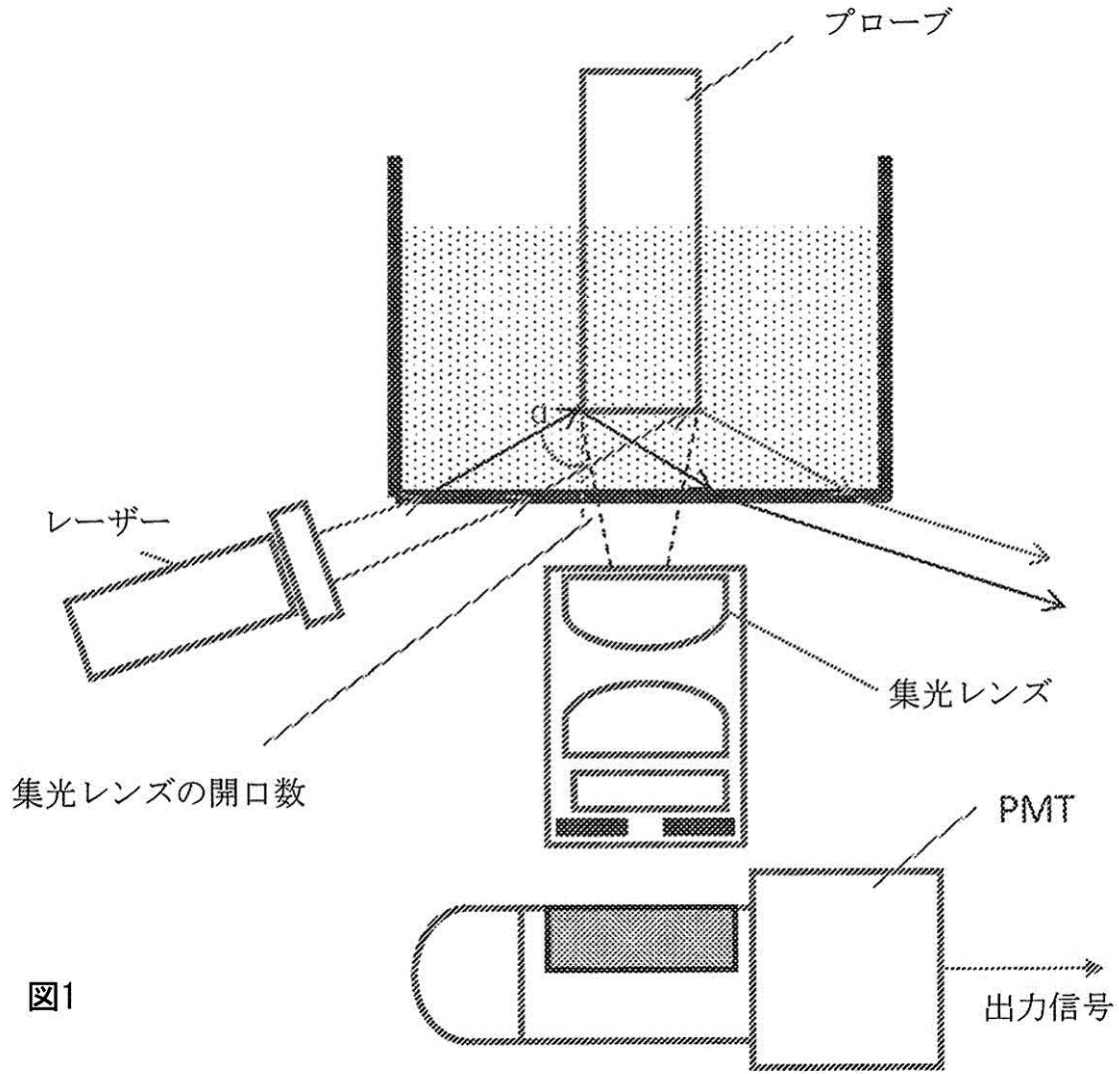
【0087】

工業規格と比較して、Roche Cobas PCTアッセイ範囲は $0.06 \sim 100 \text{ ng/mL}$ （1667倍）である。Rocheの定量化範囲は本発明のものよりも約4倍低い。

【0088】

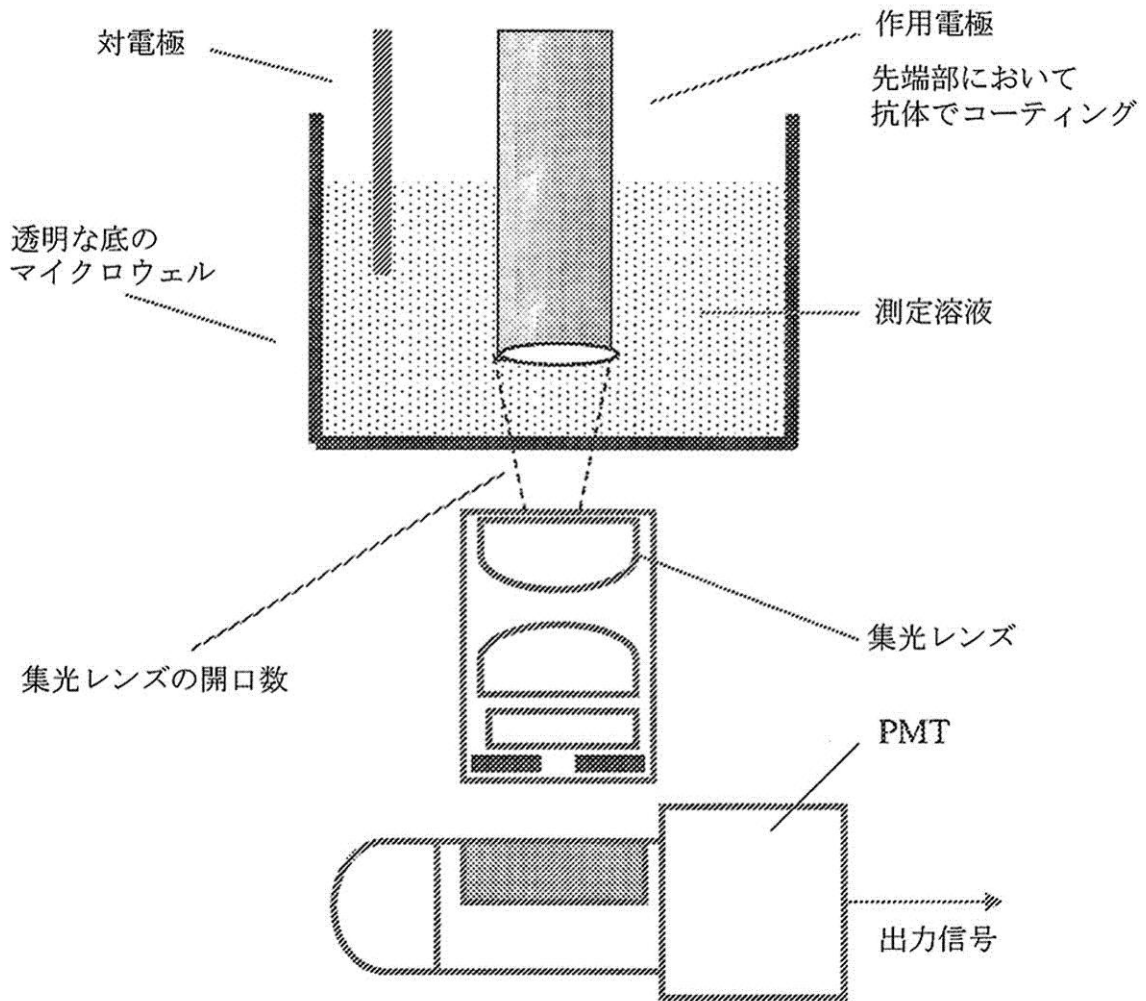
本発明、ならびにそれを作製および使用方法およびプロセスを、本発明の関連する分野の当業者がこれを作製し、使用することが可能になるように、完全、明確、簡潔かつ正確な文言で記載した。上記の内容は、本発明の好ましい実施形態を記載すること、ならびに特許請求の範囲に記載される本発明の範囲から逸脱することなく変更することができることと理解されるべきである。

【図1】

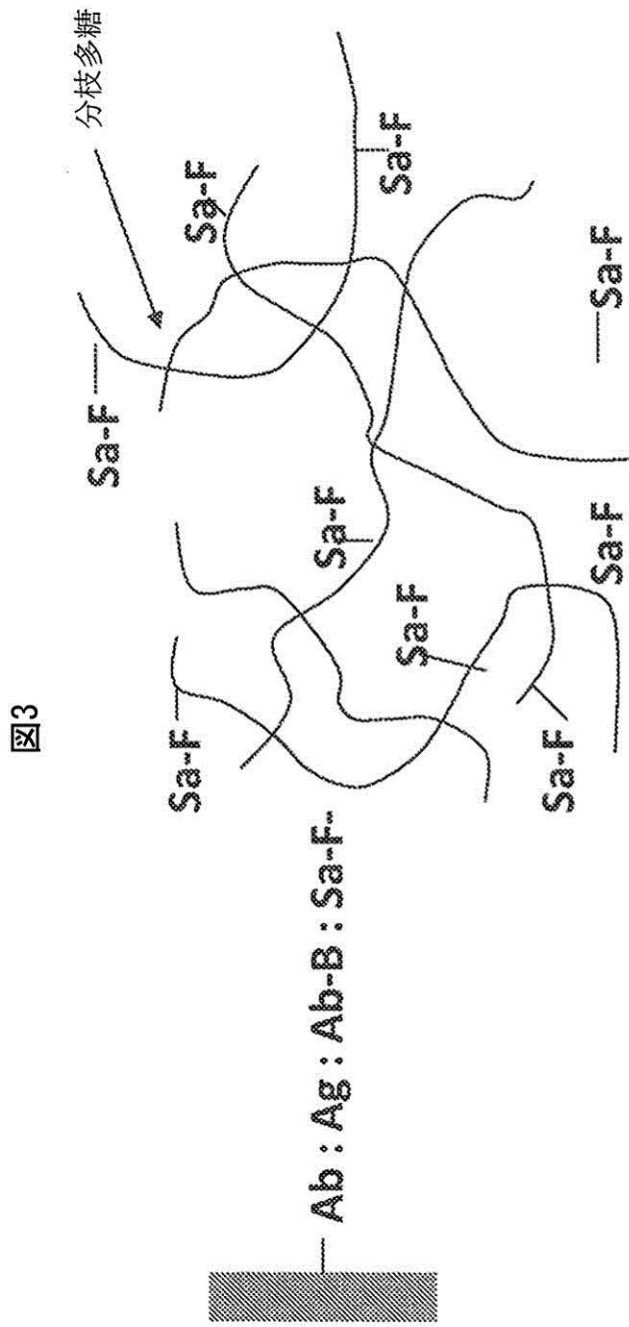


【図2】

図2

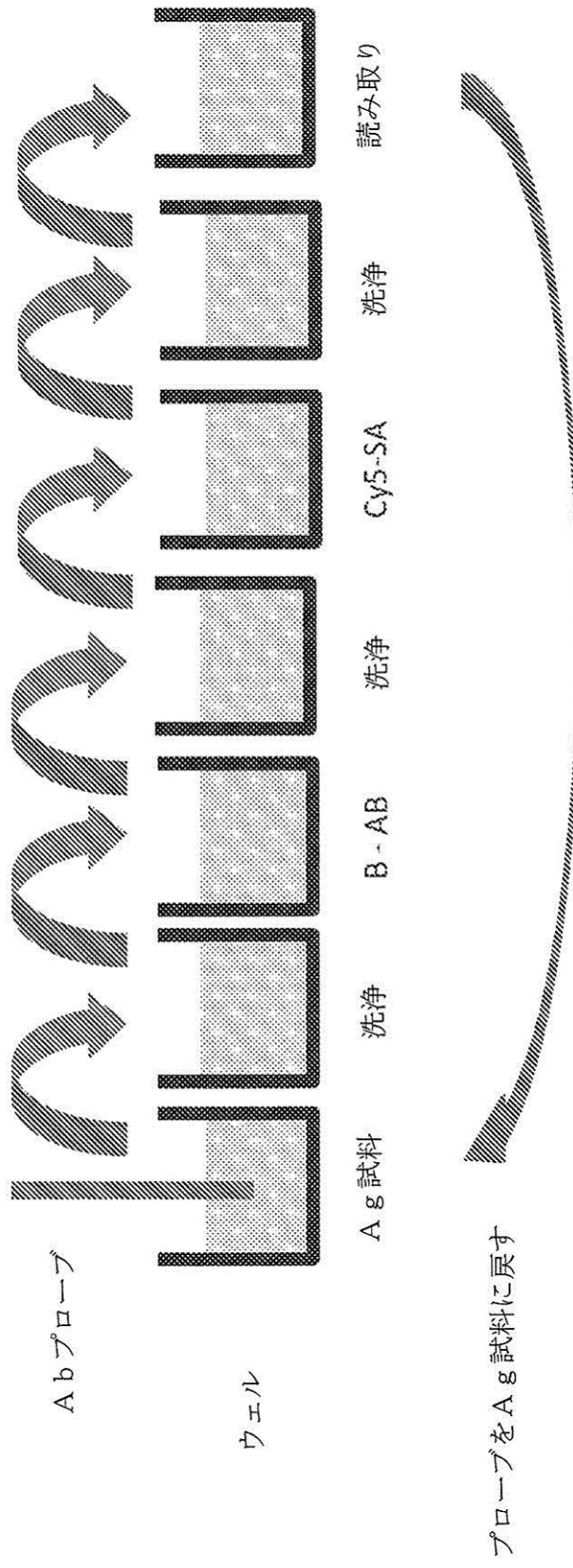


【 図 3 】



【 図 4 】

広範囲プロトコル ● 2プローブ移動シーケンス

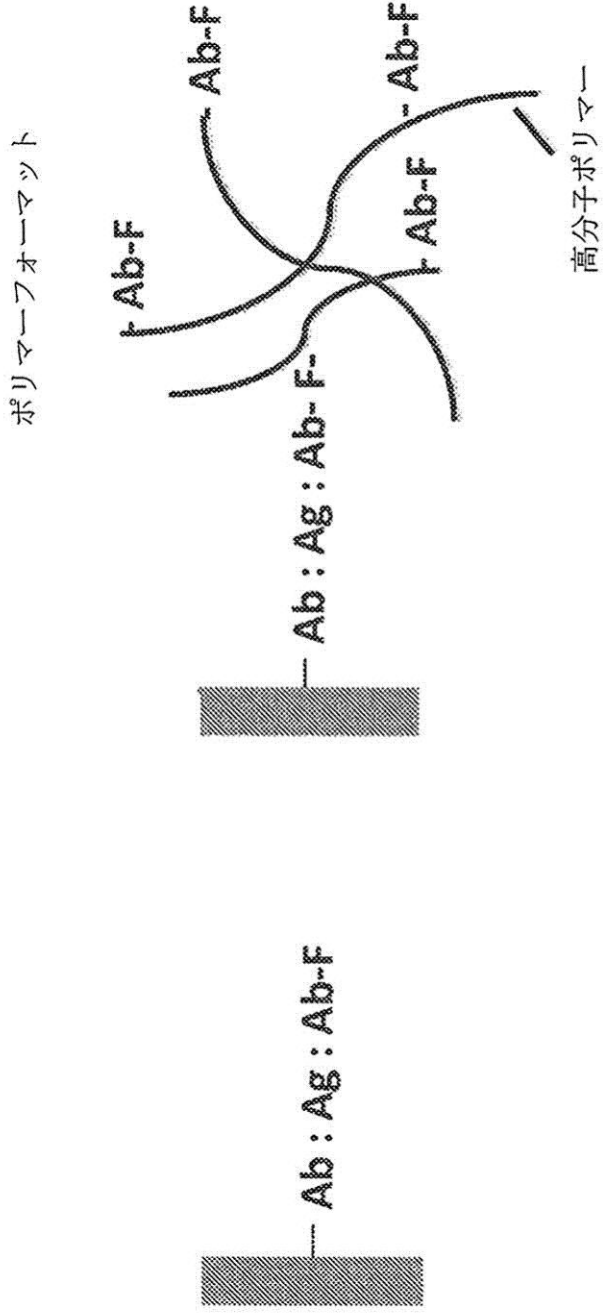


第2シーケンス

図4

【 図 5 】

図5



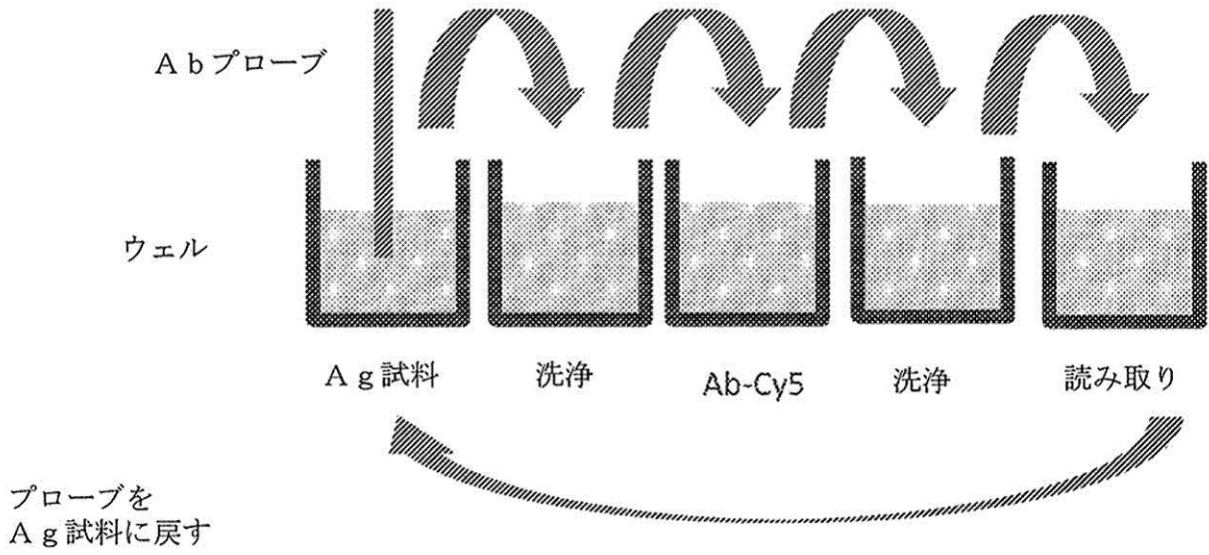
F: 蛍光標識

Ab: 抗体

Ag: 抗原分析物

【 図 6 】

広範囲プロトコル : 2プローブ移動シーケンス



第 2 シーケンス

図6

【 図 7 】

架橋 F i c o l l - S P D P 調製

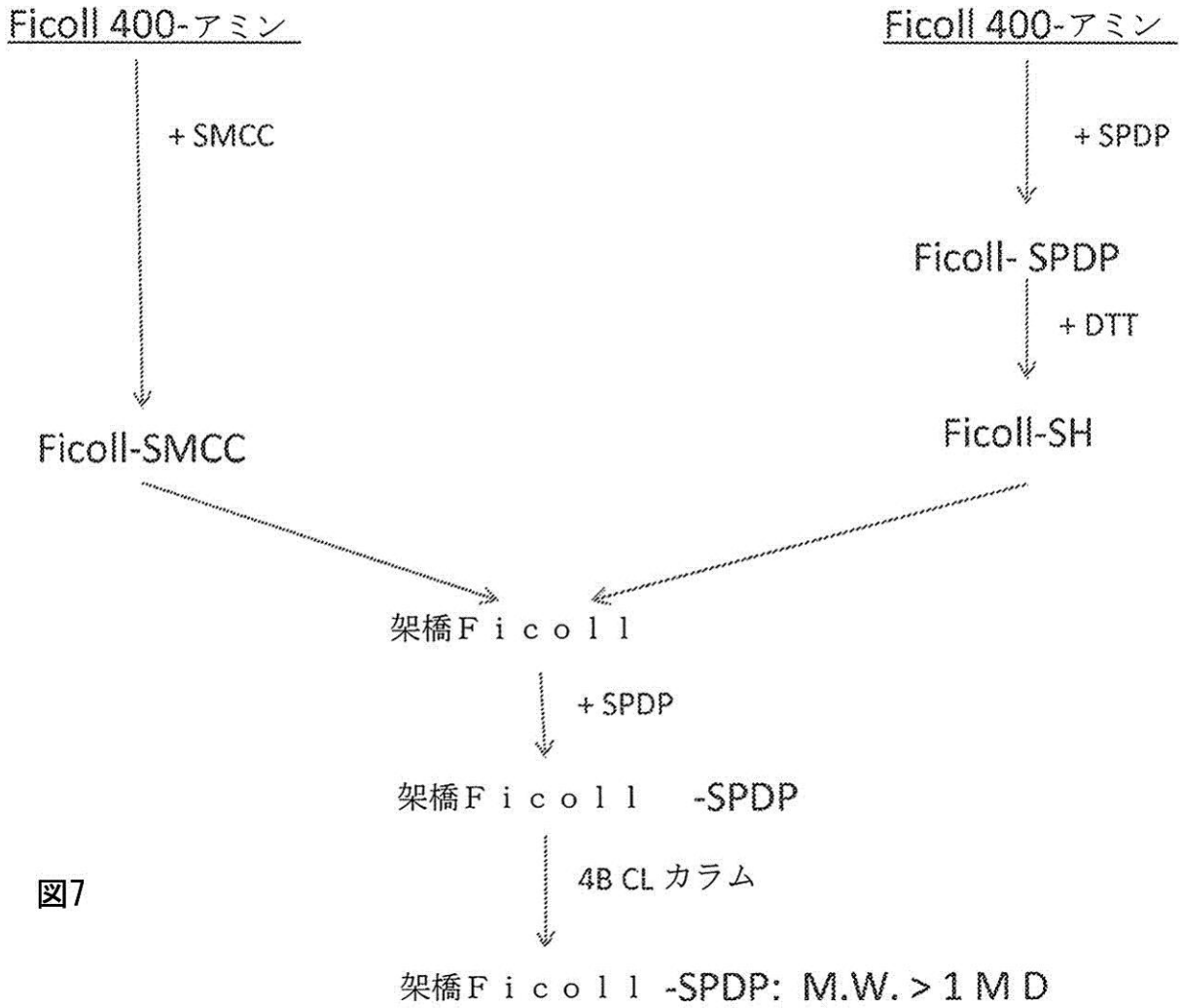




図7

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/036389
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/532(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/53; C07K 14/36; C12M 1/33; G01N 21/64; C12Q 1/70; G01N 33/58; G01N 33/543; C12Q 1/68; C12M 1/42; G01N 33/532		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: analyte detection, luminescent immunoassay		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011-0312105 A1 (TAN et al.) 22 December 2011 See the abstract, claims 13-15, and paragraphs [0073]-[0075].	1-18
A	WO 2011-014946 A1 (TALEBPOUR et al.) 10 February 2011 See abstract, and claims 94-102.	1-18
A	US 2008-0182235 A1 (HEARN et al.) 31 July 2008 See abstract, and claims 1-22.	1-18
A	EP 1879030 B1 (THE SECRETARY OF STATE FOR DEFENCE DSTL) 29 April 2009 See abstract, and claims 9-12, 16.	1-18
A	HAGAN et al., "Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays" Analytical & Bioanalytical Chemistry, Vol.400, No.9, pp.2847-2864 (11 May 2011) See abstract.	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 12 July 2013 (12.07.2013)		Date of mailing of the international search report 12 July 2013 (12.07.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer KIM Seung Beom Telephone No. +82-42-481-3371 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2013/036389

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011-0312105 A1	22/12/2011	CN 102341696 A	01/02/2012
		EP 2404162 A2	11/01/2012
		EP 2404162 A4	29/08/2012
		JP 2012-519850 A	30/08/2012
		US 2013-041141 A1	14/02/2013
		US 2013-052081 A1	28/02/2013
		US 8309369 B2	13/11/2012
		US 8415172 B2	09/04/2013
		WO 2010-101931 A2	10/09/2010
		WO 2010-101931 A3	06/01/2011
WO 2011-014946 A1	10/02/2011	CA 2769320 A1	10/02/2011
		EP 2459696 A1	06/06/2012
		EP 2459696 A4	01/05/2013
		US 2012-190040 A1	26/07/2012
US 2008-0182235 A1	31/07/2008	WO 2008-094273 A2	07/08/2008
		WO 2008-094273 A3	04/12/2008
EP 1879030 B1	29/04/2009	AT 369565 T	15/08/2007
		AT 430316 T	15/05/2009
		AT 515701 T	15/07/2011
		AU 2004-217724 A1	16/09/2004
		AU 217724 B2	19/02/2009
		CA 2518036 A1	16/09/2004
		CN 100504394 C	24/06/2009
		CN 1784603 A	07/06/2006
		DE 602004008043 D1	20/09/2007
		DE 602004008043 T2	30/04/2008
		DE 602004020941 D1	10/06/2009
		EP 1599731 A1	30/11/2005
		EP 1599731 B1	08/08/2007
		EP 1879030 A2	16/01/2008
		EP 1879030 A3	19/03/2008
		EP 2105741 A2	30/09/2009
		EP 2105741 A3	17/02/2010
		EP 2105741 B1	06/07/2011
		ES 2291857 T3	01/03/2008
		GB 0304832 D0	09/04/2003
		HK 1091540 A1	23/10/2009
		JP 05038712 B2	03/10/2012
		JP 2006-520592 A	14/09/2006
US 2006-0216694 A1	28/09/2006		
WO 2004-079369 A1	16/09/2004		

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
	G 0 1 N 21/64	F
	G 0 1 N 21/76	
	G 0 1 N 21/78	C

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74) 代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一

(74) 代理人 100141977
弁理士 中島 勝

(74) 代理人 100138210
弁理士 池田 達則

(72) 発明者 ロバート エフ . ズク
アメリカ合衆国, カルフォルニア 9 4 3 0 3 , パロ アルト , エンバカデロ ウエイ 2 4 5 4
F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA03 DA01 EA01 HA01 KA02 KA05 KA09 LA02
2G054 AA07 AB04 AB05 BB05 BB10 BB13 CA23 CE02 EA01 EA03
FA12 FA17 GA03 GA04 GA05

专利名称(译)	广泛的发光免疫分析		
公开(公告)号	JP2015514992A	公开(公告)日	2015-05-21
申请号	JP2015507071	申请日	2013-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	万迈医疗仪器有限公司		
申请(专利权)人(译)	进入医疗系统, Rimitido		
[标]发明人	ロバートエフズク		
发明人	ロバート エフ.ズク		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N21/64 G01N21/76 G01N21/78		
FI分类号	G01N33/543.501.B G01N33/543.501.D G01N33/53.J G01N33/53.U G01N33/543.575 G01N21/64.F G01N21/76 G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/CA03 2G043/DA01 2G043/EA01 2G043/HA01 2G043/KA02 2G043/KA05 2G043/KA09 2G043/LA02 2G054/AA07 2G054/AB04 2G054/AB05 2G054/BB05 2G054/BB10 2G054/BB13 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EA03 2G054/FA12 2G054/FA17 2G054/GA03 2G054/GA04 2G054/GA05		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中岛胜 池田 达则		
优先权	61/624924 2012-04-16 US 13/794080 2013-03-11 US		
其他公开文献	JP6251244B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种在单次测定中定量具有宽范围浓度的分析物的方法，而不必稀释样品并重复测定。本发明的关键特征是具有两个循环的事件，包括样品与探针的结合，结合反应和检测。在结合和检测的第一个循环之后，将探针浸入相同的样品容器中以在比第一个循环中的条件更有利于结合的条件下结合样品容器中的另外的分析物。

Wide Range Protocol: Two Probe Transfer Sequenc

