

(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2005-508001

(P2005-508001A)

(43) 公表日 平成17年3月24日(2005.3.24)

(51) Int. Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

GO 1 N 33/543

GO 1 N 33/543 5 8 1 D

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53 U

GO 1 N 33/545

GO 1 N 33/545 B

GO 1 N 33/553

GO 1 N 33/553

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 62 頁)

(21) 出願番号 特願2003-540618 (P2003-540618)
 (86) (22) 出願日 平成14年10月23日 (2002.10.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年5月6日 (2004.5.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/033891
 (87) 国際公開番号 W02003/038397
 (87) 国際公開日 平成15年5月8日 (2003.5.8)
 (31) 優先権主張番号 60/334, 748
 (32) 優先日 平成13年11月1日 (2001.11.1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10/194, 638
 (32) 優先日 平成14年7月12日 (2002.7.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504174630
 リファレンス ディアノスティックス インコーポレーティッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベッドフォード スート30 クロスベイ
 ドライブ 19
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100108774
 弁理士 橋本 一憲
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 チャン テレサ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウエイランド レンドン ロード 23
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アッセイ法

(57) 【要約】

免疫測定法等のアッセイ法および関連物品を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

第一粒子；

分析物に結合可能な第一リガンド；および

第一粒子および第一リガンドからなる群より選択される種に結合しており、第二リガンドの結合パートナーである第三リガンドに対する結合部位を少なくとも2つ有する第二リガンド

を含む、分析物を結合するための物品。

【請求項2】

第二リガンドが第一粒子および第一リガンドの両方には結合していない、請求項1記載の物品。 10

【請求項3】

第二リガンドに結合している第三リガンドをさらに含み、第三リガンドは第二リガンドに対する結合部位を1つのみ有する、請求項1記載の物品。

【請求項4】

第二リガンドおよび第三リガンドがモル当たり少なくとも約 1×10^4 リットルの結合定数を有する、請求項3記載の物品。

【請求項5】

第二リガンドおよび第三リガンドが、第一リガンドおよび分析物の結合定数よりも大きい結合定数を有する、請求項3記載の物品。 20

【請求項6】

第三リガンドに結合している第二粒子をさらに含む、請求項3記載の物品。

【請求項7】

第二粒子に結合している第四リガンドをさらに含み、第四リガンドは分析物に結合可能である、請求項6記載の物品。

【請求項8】

第一リガンドおよび第四リガンドに結合している分析物をさらに含む、請求項7記載の物品。

【請求項9】

第二粒子に結合している第四リガンドをさらに含み、分析物が第一リガンドおよび第四リガンドに結合している、請求項3記載の物品。 30

【請求項10】

分析物が、抗体、ビタミン、殺虫剤、抗原、タンパク質抗原、薬剤、ステロイド、ペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、ホルモン、および毒素からなる群より選択される、請求項8記載の物品。

【請求項11】

第一粒子が、金属粒子、ラテックス粒子、シリカ粒子、ガラス粒子、常磁性粒子、ポリマー粒子、赤血球粒子、およびリポソーム粒子からなる群より選択される、請求項1記載の物品。

【請求項12】

第一粒子がコロイド金粒子を含む、請求項11記載の物品。 40

【請求項13】

第一粒子が重合体粒子を含む、請求項11記載の物品。

【請求項14】

第一リガンドが、抗体、抗原、レクチン、受容体、結合タンパク質、補因子、ビタミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド、金属キレート剤、多糖類、およびそれらの誘導体からなる群より選択される、請求項1記載の物品。

【請求項15】

第二リガンドが、ビオチン結合タンパク質、免疫グロブリン、レクチン、および金属キレート剤からなる群より選択される、請求項1記載の物品。 50

【請求項16】

第二リガンドがビオチン結合タンパク質を含む、請求項15記載の物品。

【請求項17】

第三リガンドが、ビオチン、金属イオン、プロテインA、プロテインG、ハプテン、および糖類からなる群より選択される、請求項3記載の物品。

【請求項18】

第三リガンドがビオチンを含む、請求項17記載の物品。

【請求項19】

第二粒子が、金属粒子、ラテックス粒子、シリカ粒子、ガラス粒子、常磁性粒子、ポリマー粒子、赤血球粒子、およびリポソーム粒子からなる群より選択される、請求項6記載の物品。 10

【請求項20】

第二粒子が重合体粒子を含む、請求項19記載の物品。

【請求項21】

第二粒子がコロイド金粒子を含む、請求項19記載の物品。

【請求項22】

第四リガンドが、抗体、抗原、レクチン、受容体、結合タンパク質、補因子、ビタミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド、金属キレート剤、多糖類、およびそれらの誘導体からなる群より選択される、請求項7記載の物品。

【請求項23】

第一粒子に結合している複数個の第一リガンドをさらに含む、請求項1記載の物品。 20

【請求項24】

複数個の第二リガンドをさらに含み、複数個の第一リガンドの少なくともいくつかに複数個の第二リガンドのうちの1つが結合している、請求項23記載の物品。

【請求項25】

複数個の第二リガンドおよび複数個の第一粒子をさらに含み、複数個の第一粒子の少なくともいくつかに複数個の第二リガンドのうちの1つが結合し、複数個の粒子が凝塊を形成している、請求項23記載の物品。

【請求項26】

複数個の粒子； 30

分析物に結合可能であり、それぞれが粒子に結合している複数個の第一リガンド；

それぞれが複数個の粒子の1つおよび複数個の第一リガンドの1つからなる群より選択される種に結合している、複数個の第二リガンド；ならびに

それぞれが複数個の第二リガンドのうちの1つに結合している、複数個の第三リガンドを含み、

複数個の第二リガンドのそれぞれが第三リガンドに対する結合部位を少なくとも2つ有し、複数個の第三リガンドのそれぞれが第二リガンドに対する結合部位を1つのみ有する、凝塊。

【請求項27】

それぞれの第二リガンドが、複数個の粒子の1つおよび複数個の第一リガンドの1つの両方 40
には結合していない、請求項26記載の凝塊。

【請求項28】

第二リガンドおよび第三リガンドが、モル当たり少なくとも約 1×10^4 リットルの結合定数を有する、請求項26記載の凝塊。

【請求項29】

第二リガンドおよび第三リガンドの結合定数が、第一リガンドと分析物の結合定数よりも大きい、請求項26記載の凝塊。

【請求項30】

複数個の粒子の少なくともいくつかが、金属粒子、ラテックス粒子、シリカ粒子、ガラス粒子、常磁性粒子、ポリマー粒子、赤血球粒子、およびリポソーム粒子からなる群より選 50

択される、請求項26記載の凝塊。

【請求項31】

複数個の第一リガンドの少なくともいくつかは、抗体、抗原、レクチン、受容体、結合タンパク質、補因子、ビタミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド、金属キレート剤、多糖類、およびそれらの誘導体からなる群より選択される、請求項26記載の凝塊。

【請求項32】

複数個の第二リガンドの少なくともいくつかは、ビオチン結合タンパク質、免疫グロブリン、レクチン、および金属キレート剤からなる群より選択される、請求項26記載の凝塊。

【請求項33】

複数個の第三リガンドの少なくともいくつかは、ビオチン、金属イオン、プロテインA、プロテインG、ハプテン、および糖類からなる群より選択される、請求項26記載の凝塊。

10

【請求項34】

複数個の分析物をさらに含み、それぞれの分析物が複数個の第一リガンドのうちの2つに結合している、請求項26記載の凝塊。

【請求項35】

分析物が、抗体、ビタミン、殺虫剤、抗原、タンパク質抗原、薬剤、ステロイド、ペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、ホルモン、および毒素からなる群より選択される、請求項34記載の凝塊。

【請求項36】

複数個の粒子の少なくともいくつかは、複数個の第一リガンドのうちの2個以上が結合している、請求項27記載の凝塊。

20

【請求項37】

複数個の第二粒子に結合している複数個の第四リガンドをさらに含み、分析物が第一リガンドおよび第四リガンドの両方に結合している、請求項27記載の凝塊。

【請求項38】

分析物に結合可能な第一リガンド；
第一リガンドに結合している第二リガンド；および
第二リガンドに結合している第三リガンドを含み、
第二リガンドが第三リガンドに対する結合部位を少なくとも2つ有し、第三リガンドが第二リガンドに対する結合部位を1つのみ有する、
分析物を結合するための物品。

30

【請求項39】

第二リガンドおよび第三リガンドが、モル当たり少なくとも約 1×10^4 リットルの結合定数を有する、請求項38記載の物品。

【請求項40】

第二リガンドおよび第三リガンドが、第一リガンドおよび分析物の結合定数よりも大きい結合定数を有する、請求項38記載の物品。

【請求項41】

第三リガンドに結合している粒子をさらに含む、請求項38記載の物品。

40

【請求項42】

粒子に結合している第四リガンドをさらに含み、第四リガンドが分析物に結合可能である、請求項41記載の物品。

【請求項43】

第一リガンドおよび第四リガンドに結合している分析物をさらに含む、請求項42記載の物品。

【請求項44】

粒子に結合している第四リガンドをさらに含み、分析物が第一リガンドおよび第四リガンドに結合している、請求項38記載の物品。

【請求項45】

50

分析物が、抗体、ビタミン、殺虫剤、抗原、タンパク質抗原、薬剤、ステロイド、ペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、ホルモン、および毒素からなる群より選択される、請求項43記載の物品。

【請求項46】

第一リガンドが、抗体、抗原、レクチン、受容体、結合タンパク質、補因子、ビタミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド、金属キレート剤、多糖類、およびそれらの誘導体からなる群より選択される、請求項38記載の物品。

【請求項47】

第二リガンドが、ビオチン結合タンパク質、免疫グロブリン、レクチン、および金属キレート剤からなる群より選択される、請求項38記載の物品。

10

【請求項48】

第二リガンドがビオチン結合タンパク質である、請求項47記載の物品。

【請求項49】

第三リガンドが、ビオチン、金属イオン、プロテインA、プロテインG、ハプテン、および糖類からなる群より選択される、請求項38記載の物品。

【請求項50】

第三リガンドがビオチンを含む、請求項49記載の物品。

【請求項51】

粒子が、金属粒子、ラテックス粒子、シリカ粒子、ガラス粒子、常磁性粒子、ポリマー粒子、赤血球粒子、およびリポソーム粒子からなる群より選択される、請求項39記載の物品。

20

【請求項52】

粒子が重合体粒子を含む、請求項51記載の物品。

【請求項53】

粒子がコロイド金粒子を含む、請求項51記載の物品。

【請求項54】

第四リガンドが、抗体、抗原、レクチン、受容体、結合タンパク質、補因子、ビタミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド、金属キレート剤、多糖類、およびそれらの誘導体からなる群より選択される、請求項42記載の物品。

【請求項55】

第一粒子に結合している複数個の第一リガンドをさらに含む、請求項38記載の物品。

30

【請求項56】

複数個の第二リガンドをさらに含み、複数個の第一リガンドの少なくともいくつかに複数個の第二リガンドのうちの1つが結合している、請求項55記載の物品。

【請求項57】

複数個の粒子；

分析物に結合可能である複数個の第一リガンド；

それぞれが第一リガンドに結合している複数個の第二リガンド；および

それぞれが複数個の第二リガンドのうちの1つに結合し、それぞれが粒子に結合している、複数個の第三リガンドを含み、

40

複数個の第二リガンドのそれぞれが、第三リガンドに対する結合部位を少なくとも2つ有し、複数個の第三リガンドのそれぞれが、第二リガンドに対する結合部位を1つのみ有する、

凝塊。

【請求項58】

第二リガンドおよび第三リガンドが、モル当たり少なくとも約 1×10^4 リットルの結合定数を有する、請求項57記載の凝塊。

【請求項59】

第二リガンドおよび第三リガンドの結合定数が、第一リガンドおよび分析物の結合定数よりも大きい、請求項57記載の凝塊。

50

【請求項60】

複数個の粒子の少なくともいくつかは、金属粒子、ラテックス粒子、シリカ粒子、ガラス粒子、常磁性粒子、ポリマー粒子、赤血球粒子、およびリポソーム粒子からなる群より選択される、請求項57記載の凝塊。

【請求項61】

複数個の第一リガンドの少なくともいくつかは、抗体、抗原、レクチン、受容体、結合タンパク質、補因子、ビタミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド、金属キレート剤、多糖類、およびそれらの誘導体からなる群より選択される、請求項57記載の凝塊。

【請求項62】

複数個の第二リガンドの少なくともいくつかは、ビオチン結合タンパク質、免疫グロブリン、レクチン、および金属キレート剤からなる群より選択される、請求項57記載の凝塊。 10

【請求項63】

複数個の第三リガンドの少なくともいくつかは、ビオチン、金属イオン、プロテインA、プロテインG、ハプテン、および糖類からなる群より選択される、請求項57記載の凝塊。

【請求項64】

複数個の分析物をさらに含み、それぞれの分析物が複数個の第一リガンドのうちの2つに結合している、請求項57記載の凝塊。

【請求項65】

分析物が、抗体、ビタミン、殺虫剤、抗原、タンパク質抗原、薬剤、ステロイド、ペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、ホルモン、および毒素からなる群より選択される、請求項64記載の凝塊。 20

【請求項66】

複数個の粒子の少なくともいくつかは、複数個の第一リガンドのうちの2個以上が結合している、請求項57記載の凝塊。

【請求項67】

第一リガンドと第二リガンド間の非共有結合を介して第一粒子と第二粒子を結合させる段階を含み、

第一リガンドは第二リガンドに対する結合部位を1つのみ有し、第二リガンドは第一リガンドに対する結合部位を少なくとも2つ有し、第一リガンドは第一粒子に結合しており、第二リガンドは第二粒子および第三リガンドからなる群より選択される種に結合しており、第二リガンドは第二粒子および第三リガンドの両方には結合しておらず、第三リガンドは第二粒子に結合しており、第三リガンドは分析物に結合可能である、分析物のアッセイを行う方法。 30

【請求項68】

第三リガンドを分析物に結合させる段階をさらに含む、請求項67記載の方法。

【請求項69】

第二粒子に第四リガンドが結合しており、第四リガンドが分析物に結合可能である、請求項67記載の方法。

【請求項70】

分析物を第三リガンドおよび第四リガンドに結合させる段階をさらに含む、請求項69記載の方法。 40

【請求項71】

分析物を、第三リガンドおよび第三粒子に付着している第四リガンドの両方に結合させる段階をさらに含む、請求項67記載の方法。

【請求項72】

凝塊が形成される、請求項67記載の方法。

【請求項73】

第二リガンドと第三リガンド間の非共有結合を介して、粒子と第一リガンドを結合させる段階を含み、

第二リガンドは第三リガンドに対する結合部位を1つのみ有し、第三リガンドは第二リガンドに対する結合部位を少なくとも2つ有し、第二リガンドは粒子に結合しており、第三リガンドは第一リガンドに結合しており、第一リガンドは分析物に結合可能である、分析物のアッセイを行う方法。

【請求項74】

第一リガンドを分析物に結合させる段階をさらに含む、請求項73記載の方法。

【請求項75】

第一リガンドが第二粒子に結合している、請求項73記載の方法。

【請求項76】

第一粒子に第四リガンドが結合しており、第四リガンドは分析物に結合可能である、請求項73記載の方法。 10

【請求項77】

分析物を第一リガンドおよび第四リガンドに結合させる段階をさらに含む、請求項76記載の方法。

【請求項78】

凝塊が形成される、請求項73記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

20

本出願は、米国特許法第119条のもと、2001年11月1日に出願された「Assay」という表題である米国特許仮出願第60/334,748号の優先権を主張し、その全体の内容は本明細書によって参照として組み入れられる。

【0002】

技術分野

本発明は、免疫測定法等のアッセイ法および関連物品に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

免疫測定法を用いて、血清等の溶液中の抗原の濃度を測定することが可能である。そのようなアッセイ法は、所定のパラメータ（例えば、濁度、吸光度、蛍光、または放射能）を測定する以前に、混合物からある種の化学種を除去するために混合物を洗浄する、1つまたは複数の段階を含むことが多い。 30

【発明の開示】

【0004】

概要

一般に、本発明は、免疫測定法等のアッセイ法および関連物品に関する。典型的に、本アッセイ法は、結合パートナーにより相互接続する粒子のネットワーク（凝塊）を形成する段階を含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の凝塊の形成により、アッセイで関心対象の1つまたは複数の分析物を検出するスピードが上昇し得る、および/または1つまたは複数の分析物に対するアッセイの感度が上昇し得ると考えられる。 40

【0005】

1つの局面において、本発明は分析物（例えば抗原）を結合するための物品を特徴とする。物品には、粒子、ならびに第一リガンドおよび第二リガンド（例えば、それぞれ抗体およびアビジン）が含まれる。第一リガンドは分析物に結合可能であり、第二リガンドは粒子または第一リガンドのどちらかに結合している。第二リガンドは、第二リガンドの結合パートナーである第三リガンド（例えばビオチン）に対する結合部位を少なくとも2つ有する。

【0006】

典型的に、第一リガンド（例えば抗体）は、直接または第二リガンド（例えばアビジン） 50

を介して粒子に結合している。

【0007】

いくつかの態様において、第二リガンドは第一粒子および第一リガンドの両方には結合していない。

【0008】

物品には、第二リガンドに結合している第三リガンドもさらに含まれ得る。第三リガンドは、第二リガンドに対する1つの結合部位のみを有し得る。

【0009】

第二リガンドおよび第三リガンドは、モル当たり少なくとも約 1×10^4 リットルの結合定数を有し得る。

10

【0010】

第二リガンドおよび第三リガンドは、第一リガンドおよび分析物の結合定数よりも大きい結合定数を有し得る。

【0011】

物品には、第三リガンドに結合しているさらなる粒子もさらに含まれ得る。物品には、さらなる粒子に結合している第四リガンドもさらに含まれ得る。第四リガンドは、分析物に結合可能である。物品には、第一リガンドおよび/または第四リガンドに結合している分析物がさらに含まれ得る。

【0012】

物品には、第二粒子に結合している第四リガンドがさらに含まれ得る（例えば、第三リガンドが第二粒子に結合することなく）。分析物は、第一リガンドおよび/または第四リガンドに結合してよい。

20

【0013】

分析物は、例えば、抗体、ビタミン、殺虫剤、抗原、タンパク質抗原、薬剤、ステロイド、ペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、ホルモン、または毒素であってよい。

【0014】

粒子は、例えば、金属粒子、ラテックス粒子、シリカ粒子、ガラス粒子、常磁性粒子、ポリマー粒子、赤血球粒子、またはリポソーム粒子から選択され得る。実施例のように、粒子はコロイド金粒子または重合体粒子から選択され得る。

【0015】

第一リガンドは、例えば、抗体、抗原、レクチン、受容体、結合タンパク質、補因子、ビタミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド、金属キレート剤、多糖類、またはそれらの誘導体から選択され得る。

30

【0016】

第二リガンドは、例えば、ビオチン結合タンパク質、免疫グロブリン、レクチン、または金属キレート剤から選択され得る。例えば、第二リガンドはアビジン等のビオチン結合タンパク質であってよい。

【0017】

第三リガンドは、例えば、ビオチン、金属イオン、プロテインA、プロテインG、ハプテン、および糖類から選択され得る。例えば、第三リガンドはビオチンであってよい。

40

【0018】

第四リガンドは、例えば、抗体、抗原、レクチン、受容体、結合タンパク質、補因子、ビタミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド、金属キレート剤、多糖類、またはそれらの誘導体から選択され得る。

【0019】

物品には、第一粒子に結合している複数個の第一リガンドがさらに含まれ得る。

【0020】

物品には複数個の第二リガンドをさらに含んでもよく、複数個の第一リガンドの少なくともいくつかに複数個の第二リガンドのうちの1つが結合している。

【0021】

50

物品には複数個の第二リガンドおよび複数個の第一粒子をさらに含んでもよく、複数個の第一粒子の少なくともいくつかに複数個の第二リガンドのうちの1つが結合し、複数個の粒子が凝塊を形成している。

【0022】

別の局面において、本発明は、複数個の粒子、複数個の第一リガンド（例えば、複数個の1つまたは複数の抗体）、複数個の第二リガンド（例えば、複数個のアビジン分子）、および複数個の第三リガンド（例えば、複数個のビオチン分子）を含む凝塊を特徴とする。第一リガンドは分析物（例えば抗原）に結合可能であり、複数個の第一リガンドのそれぞれは粒子に結合している。複数個の第二リガンドのそれぞれは、複数個の粒子の1つまたは複数個の第一リガンドの1つに結合している。複数個の第三リガンドのそれぞれは、複数個の第二リガンドのうちの1つに結合している。複数個の第二リガンドのそれぞれは第三リガンドに対する結合部位を少なくとも2つ有し、複数個の第三リガンドのそれぞれは第二リガンドに対する結合部位を1つのみ有する。

10

【0023】

いくつかの態様において、第二リガンドのそれぞれは、複数個の粒子の1つおよび複数個の第一リガンドの1つの両方には結合していない。

【0024】

ある態様において、第二リガンドおよび第三リガンドは、モル当たり少なくとも約 1×10^4 リットルの結合定数を有する。

【0025】

いくつかの態様において、第二リガンドおよび第三リガンドの結合定数は、第一リガンドおよび分析物の結合定数よりも大きい。

20

【0026】

ある態様において、複数個の粒子の少なくともいくつかは、例えば、金属粒子、ラテックス粒子、シリカ粒子、ガラス粒子、常磁性粒子、ポリマー粒子、赤血球粒子、およびリポソーム粒子から選択される。

【0027】

複数個の第一リガンドの少なくともいくつかは、例えば、抗体、抗原、レクチン、受容体、結合タンパク質、補因子、ビタミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド、金属キレート剤、多糖類、またはそれらの誘導体から選択され得る。

30

【0028】

複数個の第二リガンドの少なくともいくつかは、例えば、ビオチン結合タンパク質、免疫グロブリン、レクチン、または金属キレート剤からなる群より選択され得る。

【0029】

複数個の第三リガンドの少なくともいくつかは、例えば、ビオチン、金属イオン、プロテインA、プロテインG、ハプテン、または糖類からなる群より選択され得る。

【0030】

凝塊には複数個の分析物をさらに含んでもよく、それぞれの分析物は複数個の第一リガンドのうちの2つに結合している。

【0031】

分析物は、例えば、抗体、ビタミン、殺虫剤、抗原、タンパク質抗原、薬剤、ステロイド、ペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、ホルモン、または毒素からなる群より選択され得る。

40

【0032】

複数個の粒子の少なくともいくつかには、複数個の第一リガンドのうちの2個以上が結合してよい。

【0033】

凝塊には複数個の第二粒子に結合している複数個の第四リガンドをさらに含んでもよく、分析物は第一リガンドおよび第四リガンドの両方に結合している。

【0034】

50

さらなる局面において、本発明は、分析物に結合可能な第一リガンド（例えば抗体）、第一リガンドに結合している第二リガンド（例えばアビジン）、および第二リガンドに結合している第三リガンド（例えばビオチン）を含む、分析物（例えば抗原）を結合するため物品を特徴とする。第二リガンドは第三リガンドに対する結合部位を少なくとも2つ有し、第三リガンドは第二リガンドに対する結合部位を1つのみ有する。

【0035】

いくつかの態様において、第二リガンドおよび第三リガンドは、モル当たり少なくとも約 1×10^4 リットルの結合定数を有する。

【0036】

ある態様において、第二リガンドおよび第三リガンドは、第一リガンドおよび分析物の結合定数よりも大きい結合定数を有する。 10

【0037】

物品には、第三リガンドに結合している粒子をさらに含んでもよい。

【0038】

物品には粒子に結合している第四リガンドをさらに含んでもよく、第四リガンドは分析物に結合可能である。

【0039】

物品には、第一リガンドおよび第四リガンドに結合している分析物がさらに含まれ得る。

【0040】

分析物は、例えば、抗体、ビタミン、殺虫剤、抗原、タンパク質抗原、薬剤、ステロイド、ペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、ホルモン、または毒素から選択され得る。 20

【0041】

第一リガンドは、例えば、抗体、抗原、レクチン、受容体、結合タンパク質、補因子、ビタミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド、金属キレート剤、多糖類、またはそれらの誘導体から選択され得る。

【0042】

第二リガンドは、例えば、ビオチン結合タンパク質、免疫グロブリン、レクチン、または金属キレート剤であってよい。

【0043】

第三リガンドは、ビオチン、金属イオン、プロテインA、プロテインG、ハプテン、または糖類からなる群より選択され得る。第三リガンドは、例えばビオチンであってよい。 30

【0044】

粒子は、例えば、金属粒子、ラテックス粒子、シリカ粒子、ガラス粒子、常磁性粒子、ポリマー粒子、赤血球粒子、またはリポソーム粒子から選択され得る。実施例のように、粒子は重合体粒子またはコロイド金粒子であってよい。

【0045】

第四リガンドは、例えば、抗体、抗原、レクチン、受容体、結合タンパク質、補因子、ビタミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド、金属キレート剤、多糖類、またはそれらの誘導体から選択され得る。

【0046】

物品には、第一粒子に結合している複数個の第一リガンドがさらに含まれ得る。 40

【0047】

物品には複数個の第二リガンドをさらに含んでもよく、複数個の第一リガンドの少なくともいくつかに複数個の第二リガンドのうちの1つが結合している。

【0048】

1つの局面において、本発明は、複数個の粒子、分析物（例えば抗原）に結合可能な複数個の第一リガンド（例えば、複数個の抗体）、それぞれが第一リガンドに結合している複数個の第二リガンド（例えば、複数個のアビジン分子）、および複数個の第三リガンド（例えば、複数個のビオチン分子）を含む凝塊を特徴とする。複数個の第三リガンドのそれぞれは複数個の第二リガンドのうちの1つに結合しており、複数個の第三リガンドのそれ 50

それは粒子に結合している。複数個の第二リガンドのそれぞれは第三リガンドに対する結合部位を少なくとも2つ有し、複数個の第三リガンドのそれぞれは第二リガンドに対する結合部位を1つのみ有する。

【0049】

いくつかの態様において、第二リガンドおよび第三リガンドは、モル当たり少なくとも約 1×10^4 リットルの結合定数を有する。

【0050】

ある態様において、第二リガンドおよび第三リガンドの結合定数は、第一リガンドおよび分析物の結合定数よりも大きい。

【0051】

複数個の粒子の少なくともいくつかは、例えば、金属粒子、ラテックス粒子、シリカ粒子、ガラス粒子、常磁性粒子、ポリマー粒子、赤血球粒子、またはリポソーム粒子から選択され得る。

10

【0052】

複数個の第一リガンドの少なくともいくつかは、例えば、抗体、抗原、レクチン、受容体、結合タンパク質、補因子、ビタミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド、金属キレート剤、多糖類、またはそれらの誘導体から選択され得る。

【0053】

複数個の第二リガンドの少なくともいくつかは、例えば、ビオチン結合タンパク質、免疫グロブリン、レクチン、または金属キレート剤から選択され得る。

20

【0054】

複数個の第三リガンドの少なくともいくつかは、例えば、ビオチン、金属イオン、プロテインA、プロテインG、ハプテン、または糖類から選択され得る。

【0055】

凝塊には複数の分析物をさらに含んでもよく、それぞれの分析物は複数個の第一リガンドのうちの2つに結合している。

【0056】

分析物は、例えば、抗体、ビタミン、殺虫剤、抗原、タンパク質抗原、薬剤、ステロイド、ペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、ホルモン、または毒素から選択され得る。

【0057】

複数個の粒子の少なくともいくつかには、複数個の第一リガンドのうちの2個以上が結合してよい。

30

【0058】

別の態様において、本発明は、第一リガンドと第二リガンド間の非共有結合を介して（例えば、それぞれビオチンおよびアビジン）第一粒子と第二粒子とを結合させる段階を含む、分析物（例えば抗原）のアッセイを行う方法の特徴とする。第一リガンドは第二リガンドに対して結合部位を1つのみ有し、第二リガンドは第一リガンドに対する結合部位を少なくとも2つ有する。第一リガンドは第一粒子に結合しており、第二リガンドは第二粒子または第三リガンド（例えば抗体）のどちらかに結合している。第二リガンドは、第二粒子および第三リガンドの両方には結合しておらず、第三リガンドは第二粒子に結合しており、第三粒子は分析物に結合可能である。

40

【0059】

方法には、第三リガンドを分析物に結合させる段階がさらに含まれ得る。

【0060】

第二粒子には第四リガンドが結合してよく、第四リガンドは分析物に結合可能である。

【0061】

方法には、分析物を第三リガンドおよび第四リガンドに結合させる段階がさらに含まれ得る。

【0062】

50

方法には、分析物を、第三粒子に付着させてある第三リガンドおよび第四リガンドの両方に結合させる段階がさらに含まれ得る。

【0063】

いくつかの態様において、本方法により凝塊が形成される。

【0064】

別の態様において、本発明は、第二リガンド（例えばビオチン）と第三リガンド（例えばアビジン）間の非共有結合を介して粒子と第一リガンド（例えば抗体）を結合させる段階を含む、分析物（例えば抗原）のアッセイを行う方法の特徴とする。第二リガンドは第三リガンドに対する結合部位を1つのみ有し、第三リガンドは第二リガンドに対する結合部位を少なくとも2つ有する。第二リガンドは粒子に結合しており、第三リガンドは第一リガンドに結合しており、第一リガンドは分析物に結合可能である。

10

【0065】

方法には、第一リガンドを分析物に結合させる段階がさらに含まれ得る。

【0066】

第一リガンドは第二粒子に結合してよい。

【0067】

第一粒子には第四リガンドが結合してよく、第四リガンドは分析物に結合可能である。

【0068】

方法には、分析物を第一リガンドおよび第四リガンドに結合させる段階がさらに含まれ得る。

20

【0069】

いくつかの態様において、本方法により凝塊が形成され得る。

【0070】

詳細な説明

図1は、アッセイを行う方法の略図である。

【0071】

関心対象の分析物（例えば、タンパク質抗原等の抗原）1070を伴う試料（例えば体液）1060を含む容器1050に、第一物品1000および第二物品2000を導入する。物品1000は粒子1100を含み、そこに抗体1200およびアビジン分子1300（例えば、Sigma Chemical社、ミズーリ州セントルイスから入手可能なストレプトアビジン）が結合している。物品2000は粒子2100を含み、そこに抗体2200およびビオチン分子2300が結合している。物品1100および2100はアビジン分子1300とビオチン分子2300間の相互作用（例えば非共有結合）を介して連結され、抗体1200および2200は分析物1070に結合して分析物-抗体複合体を形成する。分析物-抗体複合体の形成は、アビジン-ビオチン相互作用の形成以前、以後、またはそれと同時に起こりうる。次に、分析物-抗体複合体の存在を、光源1080および検出器1090を用いて、例えば光散乱および/または光吸光度等の技法により測定する。他の技法が関連する場合には、例えば蛍光を用いることができる。

30

【0072】

図2は、アッセイを行う方法の略図である。

40

【0073】

第一段階では、分析物1070を伴う試料1060を含む容器1050に、複数個の第一物品1000および複数個の第二物品2000を導入する。物品1000および2000は、アビジン-ビオチン相互作用（例えば非共有結合）と少なくとも1つの分析物-抗体相互作用の組み合わせを介して凝塊3000を形成する。分析物-抗体複合体の形成は、アビジン-ビオチン相互作用の形成以前、以後、またはそれと同時に起こりうる。次に、分析物-抗体複合体の存在を、例えば光散乱および/または光吸光度等の技法により測定する。他の技法が関連する場合には、例えば蛍光を用いることができる。

【0074】

理論に縛られることは望まないが、本明細書に記載する方法による凝塊の形成により、試

50

料のアッセイにおいて感度が上昇する（例えば、時間、存在、および/または量に関して）と考えられる。具体的には、本明細書に記載する方法によって凝塊を形成することにより、一定濃度の分析物に相当するシグナルが、ある他のアッセイ技法と比較して増加すると考えられる。これにより、ある他のアッセイ技法と比較してより少量の分析物を検出することが可能となり、かつ/またはある他のアッセイ技法と比較してより迅速に一定量の分析物を検出することが可能となると考えられる。

【0075】

前述の考察は、そこに単一のビオチンまたは単一のアビジン分子が結合している粒子に関するものであったが、本発明はそのように限られているわけではない。例えば図3に示すように、1つまたは複数の粒子5000には、複数個のビオチン分子2300が結合している。他の例としては図4に示すように、1つまたは複数の粒子6000には、複数個のアビジン分子1300が結合している。理論に縛られることは望まないが、多数のアビジン分子が1つまたは複数の粒子に結合しているために、および/または多数のビオチン分子が1つまたは複数の粒子に結合しているために、凝塊の大きさおよび/または凝塊が形成される速度が増加し、アッセイの感度が上昇し得ると考えられる。

10

【0076】

さらに、前述の考察は粒子に結合しているビオチン分子に関するものであったが、本発明はそのように限られているわけではない。例えば、いくつかまたはすべてのビオチンは最初是非結合の状態であってよい（例えば、粒子に結合されずに試料に導入される）。同様に、アビジン分子も粒子に結合させる必要はない。例えば、抗体もアビジンも粒子に結合させずに、アビジン分子を抗体に結合させてよい。いくつかの態様において、アビジンは粒子および抗体の両方に結合している（例えば、アビジンは上記のように粒子に結合しており、抗体は粒子に直接結合せずにアビジンに結合している）。

20

【0077】

さらに、前述の考察は粒子に抗体およびビオチン分子の両方が結合している方法および凝塊に関するものであったが、本発明はそのように限られているわけではない。例えば、図5は複数個の第一物品1000および複数個の第二物品5500を用いたアッセイを行う方法の略図を示すが、それぞれの物品5500は、2つのビオチン分子2300が結合しているが抗体は結合していない粒子5600を含む。ある態様において、アッセイを行う方法は、アビジン-ビオチン相互作用（例えば非共有結合）と少なくとも1つの分析物-抗体相互作用の組み合わせを介した物品1000および5500を含む凝塊5700を形成する段階を含む。分析物-抗体複合体の形成は、アビジン-ビオチン相互作用の形成以前、以後、またはそれと同時に起こりうる。次に、分析物-抗体複合体の存在を、例えば光散乱および/または光吸光度等の技法により測定する。他の技法が関連する場合には、例えば蛍光を用いることができる。

30

【0078】

前述の考察はアビジンおよびビオチンに関するものであったが、他の結合対を使用することも可能である。より一般的には、例えば、他のリガンド（結合パートナー）に対する結合部位を少なくとも2つ有する任意のリガンドを使用することができる。アビジンの代わりに使用可能なリガンドの例には、他のビオチン結合タンパク質、免疫グロブリン、レクチン、および金属キレート剤が含まれる。これらのリガンドを組み合わせ使用することができる。同様に、ビオチンの代わりに、アビジン（またはアビジン代替物）に結合する任意のリガンドを使用することが可能である。そのようなリガンドの例には、プロテインA、プロテインG、ハプテン、糖類、および金属イオンが含まれる。これらのリガンドを組み合わせ使用することができる。

40

【0079】

いくつかの態様において、結合対（例えばビオチン-アビジン）を形成するリガンドはモル当たり少なくとも約 1×10^4 リットルの結合定数を有する（例えば、モル当たり少なくとも約 1×10^5 リットル、モル当たり少なくとも約 1×10^6 リットル）。本明細書で用いる「結合定数」という用語は、結合速度の解離速度に対する比を意味する。例えば、アビジン-ビオチン結合の結合定数は、アビジン-ビオチン複合体の結合速度のアビジン-ビオチン複

50

合体の解離速度に対する比である。結合定数は、当技術分野で周知の方法によって測定することができる。例えば、結合定数は以下のように測定することができる。リガンドを混合し、結合した成分と遊離の成分を2つの区画に分離する透析を行う。平衡状態に達した時点で、1つまたは複数の標準的な技法により（例えば、成分の1つを標識することにより）濃度を測定する。

【0080】

ある態様において、結合対（例えばビオチン-アビジン）を形成するリガンドは、抗体-分析物複合体の結合定数よりも大きい結合定数を有する。

【0081】

態様において、用いられる抗体は同じものであっても別のものであってもよい。

10

【0082】

前述の考察は抗体に関するものであったが、他のリガンドを使用することもできる。そのようなリガンドには、例えば、抗原、レクチン、受容体、結合タンパク質、補因子、ビタミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド、金属キレート剤、多糖類、およびそれらの誘導体が含まれる。これらのリガンドを組み合わせて使用することができる。

【0083】

さらに、本発明は分析物として抗原に限定されるわけではない。より一般的には、例えば、分析物は、抗体、ビタミン、殺虫剤、薬剤、ステロイド、ペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、ホルモン、および毒素から選択され得る。分析物の組み合わせをアッセイ

20

【0084】

試料を形成し得る体液の例には、血清、尿、血液、糞便、汗、唾液、および/または組織ホモジネートが含まれる。

【0085】

粒子（例えば固相粒子）の例には、金属粒子、ラテックス粒子、シリカ粒子、ガラス粒子、常磁性粒子、ポリマー粒子、赤血球粒子、およびリポソーム粒子が含まれる。いくつかの態様においては、ラテックス粒子が用いられる。ある態様においては、コロイド金属粒子（例えばコロイド金粒子）が用いられる。粒子を組み合わせて使用することができる。

【0086】

本方法は、約4 ~ 約50 の温度（例えば、約25 ~ 約50 、約35 ~ 約38 、約37 ）

30

で行われる。

【0087】

試料は1つまたは複数の緩衝液を含み得る。緩衝液の例には、MOPS、MES、HEPES、HEPPS、TES、ADA、トリシン、ビス-トリシン、グリシン、グリシルグリシン、トリス、リン酸塩、炭酸塩、フタル酸塩、バルピタール、ホウ酸塩、およびそれらの組み合わせが含まれる。

【0088】

試料は1つまたは複数の界面活性剤を含み得る。緩衝液の例には、アルキルポリオキシエチレン（例えば、ツイーン、brij）、アルキルフェニルポリオキシエチレン（例えば、トリトン、NP-40）、サーフィノール、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンのブロック共重合体（例えば、プルロニック、テトロニック）、アルキルグルコシド、胆汁酸誘導体、スルホベタイン、zwittergent、スルホサクシネート、glucamide、およびそれらの組み合わせが含まれる。

40

【0089】

試料は1つまたは複数の促進剤を含み得る。促進剤の例には、ポリエチレングリコール、多糖類、糖、PVP、無機塩、およびそれらの組み合わせが含まれる。

【0090】

以下の実施例は一例に過ぎず、限定することを意図するものではない。

【0091】

実施例1

50

本実施例では、NeutrAvidin(登録商標)、ヤギ抗hCRP抗体コーティング粒子およびビオチンコーティング粒子を用いた、ヒトC反応性タンパク質(hCRP)のアッセイ法について説明する。

【0092】

直径140 nmのカルボキシル化修飾ラテックス(CML)粒子(Interfacial Dynamics社)を、50ミリモル濃度MES緩衝液、pH 5.5中の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(Sigma Chemical社)およびN-ヒドロキシスクシニミド(Pierce Endogen社)を用いて室温で15分間活性化した後、5倍量の50ミリモル濃度MES緩衝液、pH 5.5を用いて、ホローファイバー交差流ろ過(A/G Technologies社)により室温で洗浄した。次に、活性化したCML粒子にNeutravidinを添加した。200ミリモル濃度HEPES緩衝液、pH 8.2を添加してpHをpH 7.0に調整し、続いて室温で3時間反応させた。5倍量の50ミリモル濃度MES緩衝液、pH 5.5を用いて、ホローファイバー交差流ろ過(A/G Technologies社)により粒子を洗浄した。次にこれらの粒子を1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(Sigma Chemical社)で活性化し、ポリクローナルヤギ抗hCRP抗体(Good Biotech社)を粒子に添加して4で一晩反応させ、その後50ミリモル濃度トリス、150ミリモル濃度塩化ナトリウム、0.05% w/vアジ化ナトリウム、pH 7.5を用いて13,000 Gで遠心分離することにより3回洗浄した。

10

【0093】

第二群の粒子は、50ミリモル濃度リン酸ナトリウム、0.9% w/v塩化ナトリウム、および0.05% w/vアジ化ナトリウム、pH 7.5中で、スルホ-N-ヒドロキシスクシニミドLCビオチン(Pierce-Endogen社)を220 nm脂肪族アミン誘導体化ラテックス粒子(Interfacial Dynamics社)と4で一晩反応させることにより作製した。

20

【0094】

ホローファイバー交差流ろ過カートリッジ(A/G Technologies社)を用いて、5倍量の50ミリモル濃度リン酸ナトリウム、0.9% w/v塩化ナトリウム、0.05% w/vアジ化ナトリウム、pH 7.5により、粒子を室温で洗浄した。

【0095】

様々な量のhCRP(Cortex Biochem)を、50ミリモル濃度リン酸ナトリウム、0.9% w/v塩化ナトリウム、0.05% w/vアジ化ナトリウム、pH 7.5中の5% w/vウシ血清アルブミンの一定分量に添加し、hCRPの標準物質溶液を作製した。

30

【0096】

アッセイは、以下のようにRoche Cobas MIRA(登録商標)自動化臨床化学分析装置で行った。hCRPの標準物質溶液5 μ LならびにNeutrAvidin(登録商標)およびヤギ抗CRPコーティング粒子溶液50 μ Lをピペットで移し、その後ビオチンコーティング粒子溶液50 μ Lを添加するように、分析装置をプログラムした。次に、37で500秒間、自動化様式で25秒ごとに600 nmの吸光度測定値を取得した。

【0097】

結果を図6に示す。

【0098】

実施例II

本実施例では、NeutrAvidin(登録商標)、ヤギ抗hCRP抗体コーティング粒子およびビオチン-デキストラン接合体を用いた、hCRPのアッセイ法について説明する。

40

【0099】

NeutrAvidin(登録商標)およびヤギ抗hCRP抗体コーティング粒子は、実施例Iに記載したように作製した。ビオチン-デキストラン接合体は、以下のように合成した。2,000,000 MWデキストラン(Sigma Chemical社)を過ヨウ素酸ナトリウムと4で一晩反応させることにより酸化してポリアルデヒド化した後、水に対して4で3回透析した。次に、ビオチンヒドラジン(Pierce Chemical社)を60 mmリン酸緩衝液、pH 7.5に添加し、室温で2時間反応させた。次に、10,000 MWカットオフ透析チューブ(Pierce Endogen社)中で、50ミリモル濃度リン酸ナトリウム、0.9% w/v塩化ナトリウム、0.05% w/vアジ化ナトリウム

50

、pH 7.5に対して4 で3回透析することにより、接合体を精製した。

【0100】

様々な量のhCRP (Cortex Biochem) を、50ミリモル濃度リン酸ナトリウム、0.9% w/v塩化ナトリウム、0.05% w/vアジ化ナトリウム、pH 7.5中の5% w/vウシ血清アルブミンの一定分量に添加し、hCRPの標準物質溶液を作製した。

【0101】

アッセイは、以下のようにRoche Cobas MIRA (登録商標) 自動化臨床化学分析装置で行った。hCRPの標準物質溶液5 μ LならびにNeutrAvidin (登録商標) およびヤギ抗CRPコーティング粒子溶液50 μ Lをピペットで移し、その後ビオチン-デキストラン接合体溶液50 μ Lを添加するように、分析装置をプログラムした。次に、37 で500秒間、自動化様式で25秒ごとに600 nmの吸光度測定値を取得した。

10

【0102】

結果を図7に示す。

【0103】

実施例 III

本実施例では、NeutrAvidin (登録商標)、モノクローナル抗フェリチン抗体コーティング粒子およびビオチンコーティング粒子またはビオチン-デキストラン接合体を用いた、ヒトフェリチン (hフェリチン) のアッセイ法について説明する。

【0104】

それぞれの溶液において粒子上に異なるマウスモノクローナル抗hフェリチン抗体 (OEM Concepts, Inc.) を固定化してある、NeutrAvidin (登録商標) およびマウス抗hフェリチン抗体コーティング粒子の2つの個々の溶液は実施例Iに記載したように作製した。

20

【0105】

第三の粒子溶液であるビオチンコーティング粒子は、実施例Iに記載したように作製した。ビオチン-デキストラン接合体は、実施例IIに記載したように作製した。

【0106】

第一と第二のNeutrAvidin (登録商標) およびマウスモノクローナル抗hフェリチン抗体コーティング粒子溶液を、ともに1:1比に希釈した。次にこの試薬を免疫測定法に用いたが、まず最初に第一と第二のNeutrAvidin (登録商標) およびマウスモノクローナル抗hフェリチン抗体コーティング粒子溶液の混合物を添加し、二番目にビオチンコーティング粒子を添加した。別の実験では、ビオチンコーティング粒子溶液の代わりにビオチン-デキストラン接合体を使用した。様々な量のヒトフェリチン (Cortex Biochem) を、50ミリモル濃度リン酸ナトリウム、0.9% w/v塩化ナトリウム、0.05% w/vアジ化ナトリウム、pH 7.5中の5% w/vウシ血清アルブミンの一定分量に添加し、ヒトフェリチンの標準物質溶液を作製した。

30

【0107】

アッセイは、以下のようにRoche Cobas MIRA (登録商標) 自動化臨床化学分析装置で行った。hフェリチンの標準物質溶液5 μ LならびにNeutravidinおよびマウスモノクローナル抗hフェリチン抗体コーティング粒子溶液50 μ Lをピペットで移し、その後ビオチンコーティング粒子、または別の実験においてはビオチン-デキストラン接合体溶液50 μ Lを添加するように、分析装置をプログラムした。次に、37 で500秒間、自動化様式で25秒ごとに600 nmの吸光度測定値を取得した。

40

【0108】

結果を図8に示す。

【0109】

実施例 IV

本実施例では、NeutrAvidin (登録商標)、ヤギ抗hCRP抗体コーティング金コロイド粒子およびビオチン-デキストラン接合体を用いた、hCRPのアッセイ法について説明する。

【0110】

NeutrAvidin (登録商標) (Pierce Chemical社) およびポリクローナルヤギ抗hCRP抗体 (

50

Good Biotech社)は、pH 8.6の10 mMホウ酸緩衝液中で30分間混合することにより、40 nm金コロイド上に受動的に吸収させた。次にコロイド表面を2% w/vウシ血清アルブミンでブロッキングし、室温で25分間2000 Gで遠心分離することにより3回洗浄した。

【0111】

ビオチン-デキストラン接合体は、実施例IIに記載したように合成した。

【0112】

アッセイは、以下の方法をプログラムすることにより、Roche Cobas MIRA(登録商標)自動化臨床化学分析装置で行った：hCRPの標準物質溶液7.5 µLを金コロイド溶液75 µLに添加し、その後デキストラン-ビオチン接合体溶液75 µLを添加する。次に、自動化様式で25秒ごとに600 nmの吸光度測定値を300秒間取得した。

10

【0113】

結果を図9に示す。

【0114】

実施例V

本実施例では、NeutrAvidin(登録商標)およびポリクローナル抗hLH抗体コーティング粒子、モノクローナル抗hLH抗体コーティング粒子、ならびにビオチンコーティング粒子を用いた、ヒト黄体形成ホルモン(hLH)のアッセイ法について説明する。

【0115】

直径340 nmのカルボキシル化修飾ラテックス(CML)粒子(Interfacial Dynamics社)を、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(Sigma Chemical社)およびN-ヒドロキシスクシニミド(Pierce Endogen)を用いて活性化し、2倍量の50ミリモル濃度MES緩衝液、pH 5.5を用いて、ホローファイバー交差流ろ過(A/G Technologies社)により室温で洗浄した。次に、活性化したCML粒子にNeutrAvidin(登録商標)を添加した。続いて200ミリモル濃度HEPES緩衝液、pH 8.2を添加してpHをpH 7.0に調整し、室温で3時間反応させた。別に、ポリクローナル抗hLH抗体(Cortex Biochem)をスルホ-N-ヒドロキシスクシニミドLCビオチン(Pierce-Endogen社)と反応させ、その後透析して遊離のビオチンを除去した。次に、粒子上のneutravidinへのビオチンの結合を介して、neutravidinコーティングラテックス粒子にビオチン化抗体を付着させた。

20

【0116】

第二粒子溶液は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(Sigma Chemical社)およびN-ヒドロキシスクシニミド(Pierce Endogen)を用いて340 nmカルボキシル化修飾ラテックス粒子(Interfacial Dynamics社)を活性化し、2倍量の50ミリモル濃度MES緩衝液、pH 5.5を用いて、ホローファイバー交差流ろ過(A/G Technologies社)により室温で洗浄することにより、作製した。次に、活性化したCML粒子にウシ血清アルブミン(Sigma Chemical社)を添加した。続いて200ミリモル濃度HEPES緩衝液、pH 8.2を添加してpHをpH 7.0に調整し、室温で3時間反応させた。次に、5倍量の50ミリモル濃度リン酸ナトリウム、0.9% w/v塩化ナトリウム、および0.05% w/vアジ化ナトリウム、pH 7.5を用いて、ホローファイバー交差流ろ過(A/G Technologies社)により粒子を室温で洗浄した。最終濃度10ミリモル濃度になるように、BSA粒子懸濁液にEDTAを添加した。このBSA粒子懸濁液に、DMSO中のm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Pierce Endogen)を添加した。反応は4で一晩行った。次に、5倍量の50ミリモル濃度MES緩衝液、pH 5.5を用いて、ホローファイバー交差流ろ過(A/G Technologies社)により粒子を洗浄した。これを1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(Sigma Chemical社)およびN-ヒドロキシスクシニミド(Pierce Endogen)と室温で15分間反応させた後、2倍量の50ミリモル濃度MES緩衝液、pH 5.5を用いて、ホローファイバー交差流ろ過(A/G Technologies社)により室温で洗浄した。マウスモノクローナル抗hLH抗体(OEM Concepts)を添加した後、200ミリモル濃度HEPES緩衝液、pH 8.2を添加してpHをpH 7.0に調整し、室温で3時間反応させた。次に、5倍量の50ミリモル濃度トリス緩衝液、150ミリモル濃度塩化ナトリウム、0.05%アジ化ナトリウム、pH 7.5を用いて、ホローファイバー交差流ろ過(A/G Technologies社)により粒子を室温で洗浄した。

30

40

50

【0117】

ビオチンコーティング粒子は、実施例Iに記載した方法により作製した。

【0118】

NeutrAvidin(登録商標)およびポリクローナル抗hLH抗体コーティング粒子溶液とマウスモノクローナル抗hLH抗体コーティング粒子溶液を、ともに1:1比に希釈した。次にこの試薬を免疫測定法に用いたが、まず最初にNeutrAvidin(登録商標)およびポリクローナル抗hLH抗体コーティング粒子溶液とモノクローナル抗hLHコーティング粒子の混合物を添加し、二番目にビオチンコーティング粒子を添加した。様々な量のヒト黄体ホルモン(Cortex Biochem)を、50ミリモル濃度トリス緩衝液、150ミリモル濃度の塩化ナトリウム溶液、および0.05%アジ化ナトリウム中の1% w/vウシ血清アルブミンの一定分量に添加し、hLHの標準物質溶液を作製した。

【0119】

アッセイは、以下のようにRoche Cobas MIRA(登録商標)自動化臨床化学分析装置で行った。hLHの標準物質溶液10 μ LならびにポリクローナルおよびNeutrAvidin(登録商標)コーティング粒子とモノクローナルコーティング粒子の混合物75 μ Lをピペットで移し、その後ビオチンコーティング粒子懸濁液75 μ Lを添加するように、分析装置をプログラムした。次に、自動化様式で25秒ごとに340nmの吸光度測定値を1250秒間取得した。

【0120】

結果を図10に示す。

【0121】

実施例VI

本実施例では、NeutrAvidin(登録商標)、ヤギ抗hCRPデキストラン接合体およびビオチン粒子を用いた、hCRPのアッセイ法について説明する。

【0122】

NeutrAvidin(登録商標)(Pierce Endogen社)およびヤギ抗hCRPデキストラン接合体は、以下のように合成した。2,000,000 MWデキストラン(Sigma Chemical社)を過ヨウ素酸ナトリウムと4 で一晩反応させることにより酸化してポリアルデヒド化した後、水に対して4 で3回透析した。次に、NeutrAvidin(登録商標)、市販のヤギ抗hCRP(Good Biotech社)、およびデキストランポリアルデヒドを質量で0.5:1:1の比で混合し、4 で一晩反応させた。次に産物を、300,000 MWカットオフ酢酸セルロース透析チューブ(Spectrum Medical Industries, Inc.)中で、50ミリモル濃度トリス緩衝液、150ミリモル濃度塩化ナトリウム、および0.05% w/vアジ化ナトリウム、pH 7.5に対して4 で3回透析した。

【0123】

ビオチンコーティング粒子は、実施例Iに記載した方法により作製した。アッセイは、以下のようにRoche Cobas MIRA(登録商標)自動化臨床化学分析装置で行った。hCRPの標準物質溶液5 μ LならびにNeutravidinおよび抗CRP抗体-デキストラン接合体の混合物50 μ Lをピペットで移し、その後ビオチンコーティング粒子50 μ Lを添加するように、分析装置をプログラムした。次に、37 で500秒間、自動化様式で25秒ごとに600 nmの吸光度測定値を取得した。

【0124】

結果を図11に示す。

【0125】

他の態様は特許請求の範囲に示す。

【図面の簡単な説明】

【0126】

【図1】方法の態様の略図である。

【図2】方法の態様の略図である。

【図3】粒子の態様の略図である。

【図4】粒子の態様の略図である。

【図5】方法の態様の略図である。

【図6】ビオチン誘導体化粒子の添加の有無における、ヒトC反応性タンパク質（hCRP）濃度対600 nmでの吸光度変化を示すプロットである。

【図7】ビオチン-デキストラン接合体の添加の有無における、hCRP濃度対600 nmでの吸光度変化の比較を示すプロットである。

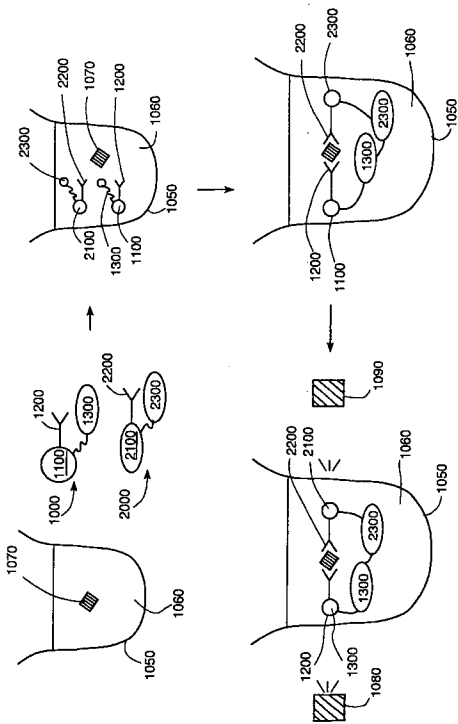
【図8】ビオチン誘導体化粒子またはビオチンデキストラン接合体の添加有無における、フェリチン濃度対600 nmでの吸光度変化の比較を示すプロットである。

【図9】ビオチン-デキストラン接合体の添加の有無における、hCRP濃度対600 nmでの吸光度変化の比較を示すプロットである。

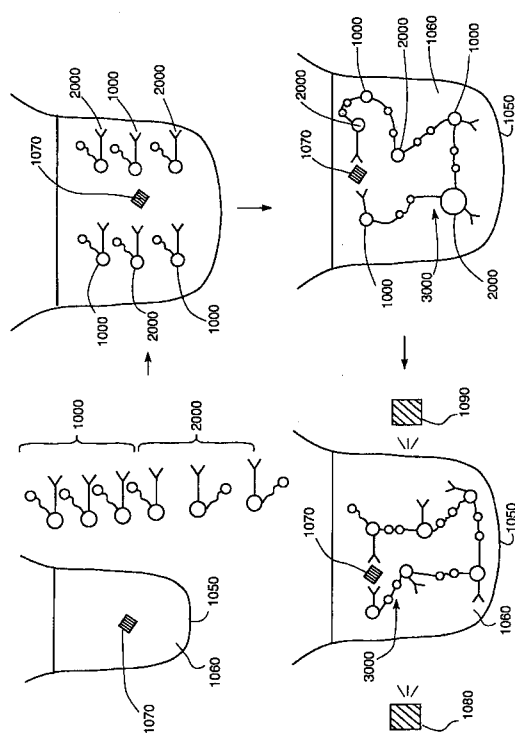
【図10】ビオチン誘導体化粒子の添加の有無における、ヒト黄体ホルモン（hLH）濃度対340 nmでの吸光度変化の比較を示すプロットである。

【図11】NeutrAvidin（登録商標）およびヤギ抗hCRPデキストラン接合体ならびにビオチン粒子を用いてアッセイした場合の、hCRP濃度対600 nmでの吸光度変化の比較を示すプロットである。

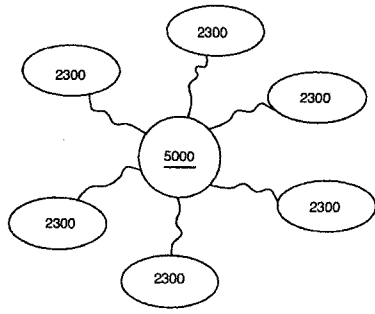
【図1】



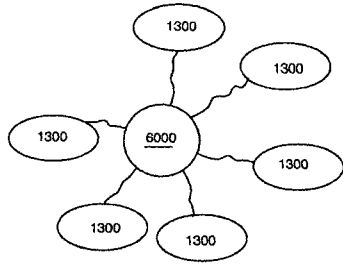
【図2】



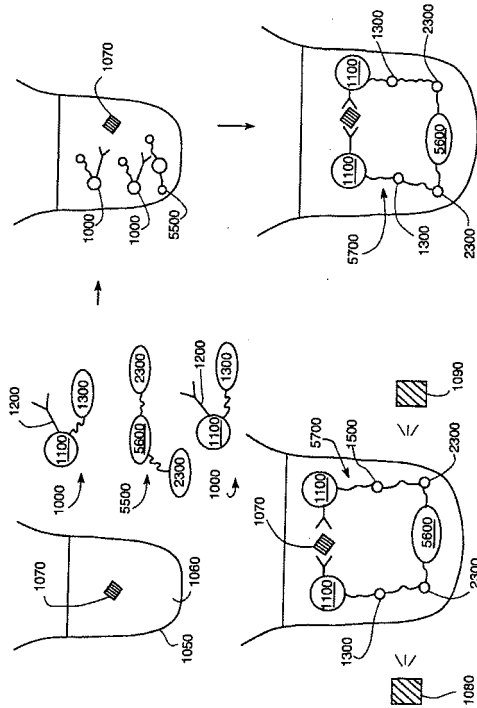
【 図 3 】



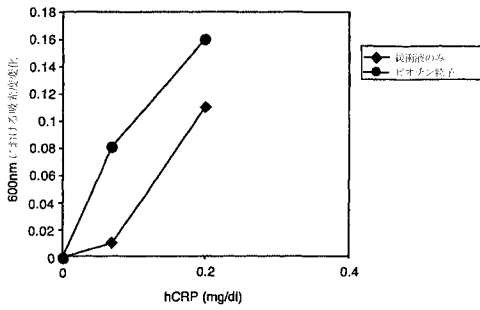
【 図 4 】



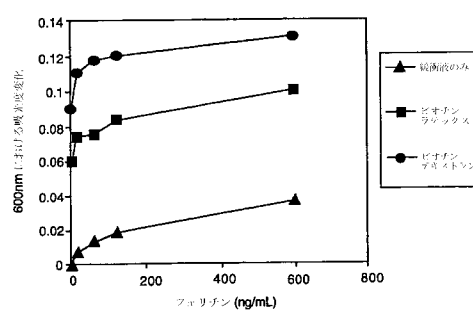
【 図 5 】



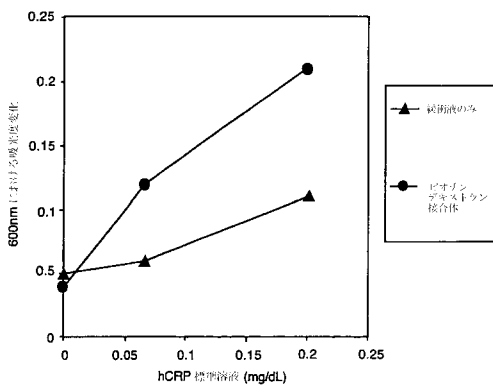
【 図 6 】



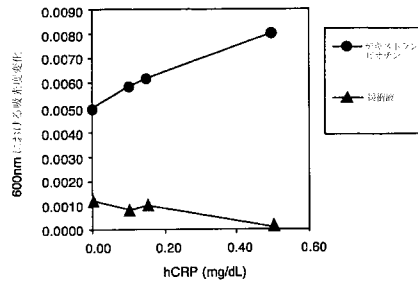
【 図 8 】



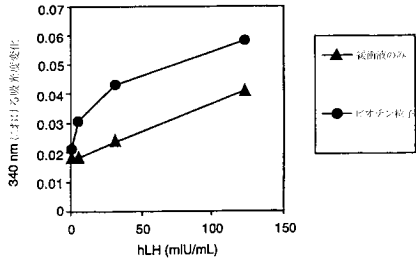
【 図 7 】



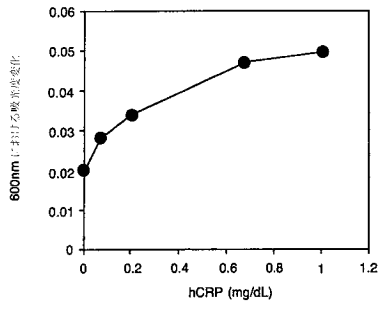
【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
8 May 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/038397 A2

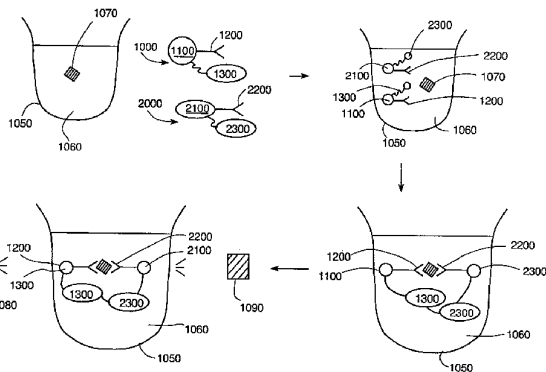
- (51) International Patent Classification: G01N
- (21) International Application Number: PCT/US02/33891
- (22) International Filing Date: 23 October 2002 (23.10.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/334,748 1 November 2001 (01.11.2001) US
10/194,638 12 July 2002 (12.07.2002) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 10/194,638 (CON)
Filed on 12 July 2002 (12.07.2002)
- (71) Applicant (for all designated States except US): REFERENCE DIAGNOSTICS INC. [US/US]; 19 Crushy Drive, Suite 30, Bedford, MA 01730 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): CHAN, Teresa [US/US]; 25 Lengdon Road, Wayland, MA 01778 (US).
- (74) Agent: DALEY, Sean, P. Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02110 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, NI, SN, TD, YG).

[Continued on next page]

(54) Title: ASSAY



WO 03/038397 A2



(57) Abstract: Assays, such as immunoassays, and related articles are disclosed.

WO 03/038397 A2 

Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

ASSAY

Cross-Reference to Related Application

This application claims priority under 35 U.S.C. §119 to U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/334,748, filed on November 1, 2001, and entitled "Assay,"
5 the entire contents of which are hereby incorporated by reference.

Technical Field

The invention relates to assays, such as immunoassays, and related articles.

Background

Immunoassays can be used to measure the concentration of antigens in a
10 solution, such as serum. Often, such assays involve one or more steps in which a mixture is washed so that certain chemical species are removed from the mixture prior to measuring a predetermined parameter (e.g., turbidity, absorbance, fluorescence or radioactivity).

Summary

15 In general, the invention relates to assays, such as immunoassays, and related articles. Typically, the assays involve forming a network of particles that are interconnected by binding partners (an agglomeration). It is believed that, in some embodiments, the formation of one or more agglomerations can increase the speed with which the assay detects one or more analytes of interest and/or increase the sensitivity
20 of the assay toward one or more analytes.

In one aspect, the invention features an article for binding an analyte (e.g., an antigen). The article includes a particle, and first and second ligands (e.g., an antibody and avidin, respectively). The first ligand is capable of binding to the analyte, and the second ligand is bound to either the particle or the first ligand. The second ligand has
25 at least two binding sites for a third ligand (e.g., biotin) that is a binding partner with the second ligand.

Typically, the first ligand (e.g., an antibody) is bound to the particle directly or via the second ligand (e.g., avidin).

30 In some embodiments, the second ligand is not bound to both the first particle and the first ligand.

The article can further include the third ligand bound to the second ligand. The third ligand can have only one binding site for the second ligand.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

The second and third ligands can have an affinity constant of at least about 1×10^4 liters per mole.

The second and third ligands can have an affinity constant that is greater than an affinity constant of the first ligand and the analyte.

5 The article can further include an additional particle bound to the third ligand. The article can further include a fourth ligand bound to the additional particle. The fourth ligand can be capable of binding to the analyte. The article can further include an analyte bound to the first and/or fourth ligands.

10 The article can further include a fourth ligand bound to a second particle (e.g., without having a third ligand bound to the second particle). The analyte can be bound to the first and/or fourth ligand.

The analyte can be, for example, an antibody, a vitamin, a pesticide, an antigen, a protein antigen, a drug, a steroid, a peptide, an oligonucleotide, an oligosaccharide, a hormone or a toxin.

15 The particle(s) can be, for example, selected from a metal particle, a latex particle, a silica particle, a glass particle, a paramagnetic particle, a polymer particle, an erythrocyte particle or a liposome particle. As examples, the particle(s) can be selected from a colloidal gold particle or a polymeric particle.

20 The first ligand can be, for example, selected from antibodies, antigens, lectins, receptors, binding proteins, co-factors, vitamins, peptides, oligonucleotides, metal chelating agents, polysaccharides or derivatives thereof.

The second ligand can be, for example, selected from a biotin-binding protein, an immunoglobulin, lectin, or a metal chelating agent. For example, the second ligand can be a biotin binding protein, such as avidin.

25 The third ligand can be, for example, selected from biotin, metal ions, protein A, protein G, haptens and saccharides. For example, the third ligand can be biotin.

The fourth ligand can be, for example, selected from antibodies, antigens, lectins, receptors, binding proteins, co-factors, vitamins, peptides, oligonucleotides, metal chelating agents, polysaccharides or derivatives thereof.

30 The article can further include a plurality of the first ligands bound to the first particle.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

The article can further include a plurality of the second ligands with at least some of the plurality of the first ligands having one of the plurality of the second ligands bound thereto.

5 The article can further include a plurality of the second ligands and a plurality of the first particles with at least some of the plurality of the first particles having one of the plurality of the second ligands bound thereto, the plurality of particles forming an agglomeration.

10 In another aspect, the invention features an agglomeration that includes a plurality of particles, a plurality of first ligands (e.g., a plurality of one or more antibodies), a plurality of second ligands (e.g., a plurality of avidin molecules) and a plurality of third ligands (e.g., a plurality of biotin molecules). The first ligands are capable of binding to an analyte (e.g., an antigen), and each of the plurality of first ligands is bound to a particle. Each of the plurality of second ligands is bound to one of the plurality of particles or one of the plurality of first ligands. Each of the plurality of 15 third ligands is bound to one of the plurality of second ligands. Each of the plurality of second ligands has at least two binding sites for the third ligand, and each of the plurality of third ligands has only one binding site for the second ligand.

In some embodiments, each of the second ligands is not bound to both one of the plurality of particles and one of the plurality of first ligands.

20 In certain embodiments, the second and third ligands have an affinity constant of at least about 1×10^4 liters per mole.

In some embodiments, an affinity constant of the second and third ligands is greater than an affinity constant of the first ligand and the analyte.

25 In certain embodiments, at least some of the plurality of particles are selected from, for example, metal particles, latex particles, silica particles, glass particles, paramagnetic particles, polymer particles, erythrocyte particles and liposome particles.

At least some of the plurality of first ligands can be, for example, selected from antibodies, antigens, lectins, receptors, binding proteins, co-factors, vitamins, peptides, oligonucleotides, metal chelating agents, polysaccharides or derivatives thereof.

30 At least some of the plurality of second ligands can be, for example, selected from the group consisting of a biotin-binding protein, an immunoglobulin, lectin, or a metal chelating agent.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

At least some of the plurality of third ligands can be, for example, selected from the group consisting of biotin, metal ions, protein A, protein G, haptens or saccharides.

The agglomeration can further include a plurality of analytes with each analyte being bound to two of the plurality of first ligands.

5 The analyte can be, for example, selected from the group consisting of antibodies, vitamins, pesticides, antigens, protein antigens, drugs, steroids, peptides, oligonucleotides, oligosaccharides, hormones or toxins.

At least some of the plurality of particles can have more than one of the plurality of first ligands bound thereto.

10 The agglomeration can further include a plurality of fourth ligands bound to a plurality of second particles with an analyte bound to both the first ligand and the fourth ligand.

In a further aspect, the invention features an article for binding an analyte (e.g., an antigen) that includes a first ligand (e.g., an antibody) capable of binding to the
15 analyte, a second ligand (e.g., avidin) bound to the first ligand, and a third ligand bound (e.g., biotin) to the second ligand. The second ligand has at least two binding sites for the third ligand, and the third ligand has only one binding site for the second ligand.

In some embodiments, the second and third ligands have an affinity constant of at least about 1×10^4 liters per mole.

20 In certain embodiments, the second and third ligands have an affinity constant that is greater than an affinity constant of the first ligand and the analyte.

The article can further include a particle bound to the third ligand.

The article can further include a fourth ligand bound to the particle with the fourth ligand being capable of binding to the analyte.

25 The article can further include an analyte bound to the first and fourth ligands.

The analyte can be, for example, selected from antibodies, vitamins, pesticides, antigens, protein antigens, drugs, steroids, peptides, oligonucleotides, oligosaccharides, hormones or toxins.

The first ligand can be, for example, selected from antibodies, antigens, lectins,
30 receptors, binding proteins, co-factors, vitamins, peptides, oligonucleotides, metal chelating agents, polysaccharides or derivatives thereof.

The second ligand can be, for example, a biotin-binding protein, an immunoglobulin, lectin, or a metal chelating agent.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

The third ligand can be selected from the group consisting of biotin, metal ions, protein A, protein G, haptens or saccharides. The third ligand can be, for example, biotin.

The particle can be, for example, selected from metal particles, latex particles, silica particles, glass particles, paramagnetic particles, polymer particles, erythrocyte particles or liposome particles. As an example, the particle can be a polymeric particle or a colloidal gold particle.

The fourth ligand can be, for example, selected from antibodies, antigens, lectins, receptors, binding proteins, co-factors, vitamins, peptides, oligonucleotides, metal chelating agents, polysaccharides or derivatives thereof.

The article can further include a plurality of the first ligands bound to the first particle.

The article can further include a plurality of the second ligands with at least some of the plurality of the first ligands having one of the plurality of the second ligands bound thereto.

In one aspect, the invention features an agglomeration that includes a plurality of particles, a plurality of first ligands (e.g., a plurality of antibodies) capable of binding to an analyte (e.g., an antigen), a plurality of second ligands (e.g., a plurality of avidin molecules) with each of the plurality of second ligands being bound to a first ligand, and a plurality of third ligands (e.g., a plurality of biotin molecules). Each of the plurality of third ligands being bound to one of the plurality of second ligands, each of the plurality of third ligands being bound to a particle. Each of the plurality of second ligands has at least two binding sites for the third ligand, and each of the plurality of third ligands has only binding site for the second ligand.

In some embodiments, the second and third ligands have an affinity constant of at least about 1×10^4 liters per mole.

In certain embodiments, an affinity constant of the second and third ligands is greater than an affinity constant of the first ligand and the analyte.

At least some of the plurality of particles can be, for example, selected from metal particles, latex particles, silica particles, glass particles, paramagnetic particles, polymer particles, erythrocyte particles or liposome particles.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

At least some of the plurality of first ligands can be, for example, selected from antibodies, antigens, lectins, receptors, binding proteins, co-factors, vitamins, peptides, oligonucleotides, metal chelating agents, polysaccharides or derivatives thereof.

5 At least some of the plurality of second ligands can be, for example, selected from a biotin-binding protein, an immunoglobulin, lectin, or a metal chelating agent.

At least some of the plurality of third ligands can be, for example, selected from biotin, metal ions, protein A, protein G, haptens or saccharides.

The agglomeration can further include a plurality of analytes with each analyte being bound to two of the plurality of first ligands.

10 The analyte can be, for example, selected from antibodies, vitamins, pesticides, antigens, protein antigens, drugs, steroids, peptides, oligonucleotides hormones or toxins.

At least some of the plurality of particles can have more than one of the plurality of first ligands bound thereto.

15 In another aspect, the invention features a method of performing an assay for an analyte (e.g., an antigen) that includes linking first and second particles via a non-covalent bond between first and second ligands (e.g., biotin and avidin, respectively). The first ligand has only one binding site for the second ligand, and the second ligand has at least two binding sites for the first ligand. The first ligand is bound to the first
20 particle, and the second ligand is bound to either the second particle or a third ligand (e.g., an antibody). The second ligand is not bound to both the second particle and the third ligand, the third ligand is bound to the second particle, and the third ligand is capable of binding to the analyte.

The method can further include binding the third ligand to the analyte.

25 The second particle can have a fourth ligand bound thereto with the fourth ligand being capable of binding to the analyte.

The method can further include binding the analyte to the third and fourth ligands.

30 The method can further include binding the analyte to both the third ligand and to a fourth ligand attached to a third particle.

In some embodiments, the method forms an agglomeration.

In another aspect, the invention features a method of performing an assay for an analyte (e.g., an antigen) that includes linking a particle and a first ligand (e.g., an

WO 03/038397

PCT/US02/33891

antibody) via a non-covalent bond between a second ligand (e.g., biotin) and a third ligand (e.g., avidin). The second ligand has only one binding site for the third ligand, and the third ligand has at least two binding sites for the second ligand. The second ligand is bound to the particle, the third ligand is bound to the first ligand, and the first
5 ligand is capable of binding to the analyte.

The method can further include binding the first ligand to the analyte.

The first ligand can be bound to a second particle.

The first particle can have a fourth ligand bound thereto with the fourth ligand being capable of binding to the analyte.

10 The method can further include binding the analyte to the first and fourth ligands.

In some embodiments, the method can form an agglomeration.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a schematic representation of an embodiment of a method;

15 Fig. 2 is a schematic representation of an embodiment of a method;

Fig. 3 is a schematic representation of an embodiment of a particle;

Fig. 4 is a schematic representation of an embodiment of a particle;

Fig. 5 is a schematic representation of an embodiment of a method;

Fig. 6 is a plot showing human C-reactive protein (hCRP) concentration versus
20 absorbance change at 600 nm with and without addition of the biotin derivitized particles;

Fig. 7 is a plot showing a comparison of hCRP concentration versus absorbance change at 600 nm with and without addition of the biotin-dextran conjugate;

Fig. 8 is a plot showing a comparison of ferritin concentration versus
25 absorbance change at 600 nm with and without addition of the biotin derivitized particles or biotin dextran conjugate;

Fig. 9 is a plot showing a comparison of hCRP concentration versus absorbance change at 600 nm with and without addition of the biotin-dextran conjugate;

Fig. 10 is a plot showing a comparison of human luteinizing hormone (hLH)
30 concentration versus absorbance change at 340 nm with and without addition of the biotin derivitized particles; and

WO 03/038397

PCT/US02/33891

Fig. 11 is a plot showing a comparison of hCRP concentration versus absorbance change at 600 nm when assayed using NeutrAvidin[®] and goat anti-hCRP dextran conjugates and biotin particles.

Detailed Description

5 Fig. 1 shows a schematic representation of a method of performing an assay.

A first article 1000 and a second article 2000 are introduced into a container 1050 containing a sample (e.g., a body fluid) 1060 with an analyte (e.g., an antigen, such as a protein antigen) of interest 1070. Article 1000 includes a particle 1100 having bonded thereto an antibody 1200 and an avidin molecule 1300 (e.g.,
10 Streptavidin, available from Sigma Chemical Co. St.Louis, MO. Article 2000 includes a particle 2100 having bonded thereto an antibody 2200 and a biotin molecule 2300. Articles 1100 and 2100 are linked via an interaction (e.g., a non-covalent bond) between avidin molecule 1300 and biotin molecule 2300, and antibodies 1200 and 2200 bond to analyte 1070 to form an analyte-antibody complex. Formation of the analyte-
15 antibody complex can occur before, after or simultaneously with formation of the avidin-biotin interaction. The presence of the analyte-antibody complex is then determined using techniques such as, for example, light scattering and/or light absorbance using a light source 1080 and a detector 1090. Other techniques involving, for example, fluorescence can be used.

20 Fig. 2 shows a schematic representation of a method of performing an assay.

In a first step, a plurality of first articles 1000 and a plurality of second articles 2000 are introduced into container 1050 containing sample 1060 with analyte 1070. Articles 1000 and 2000 form an agglomeration 3000 via a combination of avidin-biotin interactions (e.g., non-covalent bond) and at least one analyte-antibody interaction.
25 Formation of the analyte-antibody complex can occur before, after or simultaneously with formation of the avidin-biotin interaction. The presence of the analyte-antibody complex is then determined using techniques such as, for example, light scattering and/or light absorbance. Other techniques involving, for example, fluorescence can be used.

30 Without wishing to be bound by theory, it is believed formation of the agglomeration according to the methods disclosed herein results in an increased sensitivity (e.g., with respect to time, presence and/or amount) in assaying the sample. In particular, it is believed that, by using the methods disclosed herein to form an

WO 03/038397

PCT/US02/33891

agglomeration, the signal corresponding to a given concentration of analyte is increased relative to certain other assay techniques. It is believed that this can result in the ability to detect smaller amounts of analyte relative to certain other assay techniques, and/or the ability to detect a given amount of analyte faster relative to certain other assay techniques.

5 While the foregoing discussion has been with respect to particles having a single biotin or a single avidin molecule bonded thereto, the invention is not so limited. For example, as shown in Fig. 3, one or more particles 5000 can have a plurality of biotin molecules 2300 bonded thereto. As another example, as shown in
10 Fig. 4, one or more particles 6000 can have a plurality of avidin molecules bonded thereto 1300. Without wishing to be bound by theory, it is believed that having multiple avidin molecules bonded to one or more particles and/or multiple biotin molecules bonded to one or more particles can increase the sensitivity of the assay by increasing the size of the agglomeration and/or the speed with which the agglomeration
15 is formed.

Moreover, while the foregoing discussion has been with respect to a biotin molecule bonded to a particle, the invention is not so limited. For example, some or all of the biotin may initially in an unbound state (e.g., introduced into the sample without being bonded to a particle). Similarly, the avidin molecule need not be bound to a
20 particle. For example, the avidin molecule can be bound to an antibody with neither the antibody nor the avidin bound to a particle. In some embodiments, the avidin is bound to both a particle and an antibody (e.g., the avidin is bound to the particle as described above, and the antibody is bound to the avidin rather than being directly bound to the particle).

25 Furthermore, while the foregoing discussion has been with respect to methods and agglomerations in which a particle has both an antibody and a biotin molecule bound thereto, the invention is not so limited. For example, Fig. 5 shows a schematic representation of a method of performing an assay using a plurality of first articles 1000 and a plurality of second articles 5500, with each article 5500 including a particle 5600
30 having two biotin molecules 2300 bound thereto and no antibodies bound thereto. In certain embodiments, the method of performing the assay involves forming an agglomeration 5700 including articles 1000 and 5500 via a combination of avidin-biotin interactions (e.g., non-covalent bond) and at least one analyte-antibody

WO 03/038397

PCT/US02/33891

interaction. Formation of the analyte-antibody complex can occur before, after or simultaneously with formation of the avidin-biotin interaction. The presence of the analyte-antibody complex is then determined using techniques such as, for example, light scattering and/or light absorbance. Other techniques involving, for example, fluorescence can be used.

Although the foregoing discussion has been with respect to avidin and biotin, other binding pairs can also be used. More generally, for example, any ligand having at least two binding sites for another ligand (binding partner) can be used. Examples of ligands that can be used instead of avidin include other biotin-binding proteins, immunoglobulins, lectin, and metal chelating agents. Combinations of these ligands can be used. Likewise, any ligand that binds with avidin (or the avidin substitute) can be used instead of biotin. Examples of such ligands include protein A, protein G, haptens, saccharides and metal ions. Combinations of these ligands can be used.

In some embodiments, the ligands that form the binding pair (e.g., biotin-avidin) have an affinity constant of at least about 1×10^4 liters per mole (e.g., at least about 1×10^5 liters per mole, at least about 1×10^6 liters per mole). As used herein, the term "affinity constant" refers to the ratio of the association rate to the dissociation rate. For example, the affinity constant of the avidin-biotin binding is the ratio of the association rate of the avidin-biotin complex to the dissociation rate of the avidin-biotin complex. The affinity constant can be measured by methods known to those skilled in the art. For example, the affinity constant can be measured as follows. The ligands are mixed and a dialysis is performed that separates bound and free components into two compartments. When equilibrium is attained the concentrations are then determined using one or more standard techniques (e.g., by labeling one of the components).

In certain embodiments, the ligands that form the binding pair (e.g., biotin-avidin) have an affinity constant that is greater than the affinity constant of the antibody-analyte complex.

In embodiments, the antibodies used can be the same or different.

While the foregoing discussion has been with respect to antibodies, other ligands can be used. Such ligands include, for example, antigens, lectins, receptors, binding proteins, co-factors, vitamins, peptides, oligonucleotides, metal chelating agents, polysaccharides and derivatives thereof. Combinations of these ligands can be used.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

Furthermore, the invention is not limited to antigens as the analyte. More generally, for example, the analyte can be selected from antibodies, vitamins, pesticides, drugs, steroids, peptides, oligonucleotides, oligosaccharides, hormones and toxins. Combinations of analytes can be assayed.

5 Examples of bodily fluids that can form the sample include serum, urine, blood, feces, sweat, saliva and/or tissue homogenates.

 Examples of particles (e.g., solid phase particles) include metal particles, latex particles, silica particles, glass particles, paramagnetic particles, polymer particles, erythrocyte particles and liposome particles. In some embodiments, a latex particle is
10 used. In certain embodiments, a colloidal metal particle (e.g., colloidal gold particle) is used. Combinations of particles can be used.

 The method performed at a temperature of from about 4°C to about 50°C (e.g., from about 25°C to about 50°C, from about 35°C to about 38°C, about 37°C).

 The sample can contain one or more buffers. Examples of buffers include
15 MOPS, MES, HEPES, HEPPS, TES, ADA, tricine, bis-tricine, glycine, glycyl-glycine, tris, phosphate, carbonate, phthalate, barbitol, borate and combinations thereof.

 The sample can contain one or more surfactants. Examples of surfactants include alkyl polyoxyethylenes (e.g. tweens, brij's), alkyl phenyl polyoxyethylenes (e.g. tritons, NP-40), surfynols, block copolymers of polyoxyethylene-polyoxypropylenes
20 (e.g pluronics, tetronics), alkyl glucosides, bile acid derivatives, sulfobetaines, zwittergents, sulfosuccinates, glucamides and combinations thereof.

 The sample can contain one or more accelerators. Examples of accelerators include polyethylene glycol, polysaccharides, sugars, PVP, inorganic salts and combinations thereof.

25 The following examples are illustrative only and not intended to be limiting.

Example I

 This example describes an assay of human C-reactive protein (hCRP) using NeutrAvidin[®], goat anti-hCRP antibody coated particles and biotin coated particles.

 140 nm diameter Carboxylate modified latex (CML) particles (Interfacial
30 Dynamics Corp.) were activated using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (Sigma Chemical Co.) and N-hydroxysuccinimide (Pierce Endogen Co.) in 50 millimolar MES buffer, pH 5.5 at room temperature for 15 minutes, and then washed by hollow fiber crossflow-filtration (A/G Technologies Corp.) with 5 volumes of 50

WO 03/038397

PCT/US02/33891

millimolar MES buffer, pH 5.5 at room temperature. Then Neutravidin was added to the activated CML particles. The pH was adjusted to pH 7.0 by addition of 200 millimolar HEPES buffer pH 8.2, and then reacted for 3 hours at room temperature. The particles were washed by hollow fiber crossflow-filtration (A/G Technologies Corp.) with five volumes of 50 millimolar MES buffer, pH 5.5. These particles were then activated with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (Sigma Chemical Co.) and a polyclonal goat anti-hCRP antibody (Good Biotech Corp.) was added to the particles and reacted at 4°C overnight and then washed by centrifugation at 13,000 G three times with 50 millimolar Tris, 150 millimolar sodium chloride, 0.05% w/v sodium azide, pH 7.5.

A second group of particles was made by reacting sulfo-N-hydroxysuccinimide LC biotin (Pierce-Endogen Co.) with 220 nm aliphatic amine derivitized latex particles (Interfacial Dynamics Corp.) in 50 millimolar sodium phosphate, 0.9% w/v sodium chloride, and 0.05% w/v sodium azide pH 7.5 at 4°C overnight.

The particles were washed using a hollow fiber crossflow-filtration cartridge (A/G Technologies Corp.), with 5 volumes of 50 millimolar sodium phosphate, 0.9% w/v sodium chloride, 0.05% w/v sodium azide, pH 7.5 at room temperature.

Calibrator solutions of hCRP were made by addition of varying amounts of hCRP (Cortex Biochem) to aliquots of 5% w/v Bovine serum albumin in 50 millimolar sodium phosphate, 0.9% w/v sodium chloride, 0.05% w/v sodium azide, pH 7.5.

The assay was run on a Roche Cobas MIRA[®] automated clinical chemistry analyzer as follows. The analyzer was programmed to pipette 5 µL of calibrator solution of hCRP and 50 µL of the NeutrAvidin[®] and goat anti-hCRP coated particle solution followed by the addition of 50 µL of the biotin coated particle solution. Absorbance readings were then taken in an automated fashion every 25 sec for 500 sec at 600 nm at 37°C.

The results are shown in Fig. 6.

Example II

This example describes an assay of hCRP using NeutrAvidin[®], goat anti-hCRP antibody coated particles and biotin-dextran conjugates.

NeutrAvidin[®] and goat anti-hCRP antibody coated particles were made as described in Example I. Biotin-dextran conjugate was synthesized as follows.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

2,000,000 MW dextran (Sigma Chemical Co.) was oxidized to polyaldehyde by reaction with sodium periodate overnight at 4°C then dialyzed against three changes of water at 4°C. Biotin hydrazine (Pierce Chemical Co.) was then added in 60 mM Phosphate buffer pH 7.5 and reacted for 2 hours at room temperature. The conjugate
5 was then purified by dialysis against three changes of 50 millimolar sodium phosphate, 0.9% w/v sodium chloride, 0.05% w/v sodium azide, pH 7.5 at 4°C in 10,000 MW cut-off dialysis tubing (Pierce Endogen Co.).

Calibrator solutions of hCRP were made by addition of varying amounts of hCRP (Cortex Biochem, Inc.) to aliquots of 5% w/v Bovine serum albumin in 50
10 millimolar sodium phosphate, 0.9% w/v sodium chloride, 0.05% w/v sodium azide, pH 7.5.

The assay was run on a Roche Cobas MIRA[®] automated clinical chemistry analyzer as follows. The analyzer was programmed to pipette 5 µL of calibrator solution of hCRP and 50 µL of the NeutrAvidin[®] and goat anti-hCRP coated Particle
15 solution followed by the addition of 50 µL of the biotin-dextran conjugate solution. Absorbance readings were then taken in an automated fashion every 25 sec for 500 sec at 600 nm at 37°C.

The results are shown in Fig. 7.

Example III

20 This example describes an assay of human ferritin (hFerritin) using NeutrAvidin[®], monoclonal anti-ferritin antibody coated particles and biotin coated particles or biotin-dextran conjugates.

Two separate solutions of NeutrAvidin[®] and mouse monoclonal anti-hFerritin antibody coated particles were made as described in Example I, each solution having a
25 different mouse monoclonal anti-hFerritin antibody (OEM Concepts, Inc.) immobilized on the particles.

A third particle solution of biotin coated particles were made as described in Example I. The biotin-dextran conjugate was made as described in Example II

The first and second NeutrAvidin[®] and mouse monoclonal anti-hFerritin
30 antibody coated particles solutions were diluted together in a 1:1 ratio. This reagent was then used in immunoassays in which the mixture of the first and second NeutrAvidin[®] and mouse monoclonal anti-hFerritin antibody coated particles solutions were added first and the biotin coated particles second. In separate experiments the

WO 03/038397

PCT/US02/33891

biotin-dextran conjugate solution was used instead of the biotin coated particle solution. Calibrator solutions of human ferritin were made by addition of varying amounts of human ferritin (Cortex Biochem,) to aliquots of 5% w/v Bovine serum albumin in 50 millimolar sodium phosphate, 0.9% w/v sodium chloride, 0.05% w/v sodium azide, pH

5 7.5.

The assay was run on a Roche Cobas MIRA[®] automated clinical chemistry analyzer as follows. The analyzer was programmed to pipette 5 μ L of calibrator solution of hFerritin and 50 μ L of the mixture of Neutravidin and mouse monoclonal anti-hFerritin antibody coated particle solutions followed by the addition of 50 μ L of the biotin-coated particles or in separate experiments the biotin-dextran conjugate solution. Absorbance readings were then taken in an automated fashion every 25 sec for 500 sec at 600 nm at 37°C.

The results are shown in Fig. 8.

Example IV

15 This example describes an assay of hCRP using NeutrAvidin[®], goat anti-hCRP antibody coated gold colloid particles and biotin-dextran conjugates.

NeutrAvidin[®] (Pierce Chemical Co.) and polyclonal goat anti-hCRP antibody (Good Biotech Corp.) were passively adsorbed onto the 40 nm gold colloid in 10 mM Borate buffer at pH 8.6 by mixing for 30 minutes. The colloid surface was then

20 blocked with 2% w/v bovine serum albumin and washed by three centrifugations at 2000 G for twenty-five minutes at room temperature.

Biotin-dextran conjugate was synthesized as described in example II.

The assay was run on a Roche Cobas MIRA[™] automated clinical chemistry analyzer by programming the following method, 7.5 μ L calibrator solution of hCRP

25 was added to 75 μ L of the gold colloid solution followed by the addition of 75 μ L of the dextran-biotin conjugate solution. Absorbance readings were then taken in an automated fashion every 25 sec for 300 sec at 600 nm.

The results are shown in Fig. 9.

Example V

30 This example describes an assay of human luteinizing hormone (hLH) using NeutrAvidin[®] and polyclonal anti-hLH antibody coated particles, monoclonal anti-hLH coated particles and biotin-coated particles.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

340 nm diameter Carboxylate modified latex (CML) particles (Interfacial Dynamics Corp.) were activated using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (Sigma Chemical Co.) and N-hydroxysuccinimide (Pierce Endogen) and washed by hollow fiber crossflow-filtration (A/G Technologies Corp.) with two volumes of 50 millimolar MES buffer, pH 5.5 at room temperature. Then NeutrAvidin[®] was added to the activated CML particles. The pH was then adjusted to pH 7.0 by addition of 200 millimolar HEPES buffer pH 8.2 and reacted for 3 hours at room temperature. Separately polyclonal anti-hLH antibody (Cortex Biochem) was reacted with sulfo-N-hydroxysuccinimide LC biotin (Pierce-Endogen Co.) and then dialyzed to remove free biotin. The biotinylated antibody was then attached to the neutravidin coated latex particles through the binding of biotin to neutravidin on the particles .

A second particle solution was made by activating 340 nm Carboxylate modified latex particles (Interfacial Dynamics Corp.) using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (Sigma Chemical Co.) and N-hydroxysuccinimide (Pierce Endogen) washing the particles by hollow fiber crossflow-filtration (A/G Technologies Corp.) using two volumes of 50 millimolar MES buffer, pH 5.5 at room temperature. Then Bovine serum albumin (Sigma Chemical Co.) was added to the activated CML particles. The pH was then adjusted to pH 7.0 by addition of 200 millimolar HEPES buffer pH 8.2 and reacted for 3 hours at room temperature. The particles were then washed by hollow fiber crossflow-filtration (A/G Technologies Corp.) using 5 volumes of 50 millimolar sodium phosphate, 0.9% w/v sodium chloride, and 0.05% w/v sodium azide, pH 7.5 at room temperature. EDTA was added to the BSA particle suspension, to a final concentration of 10 millimolar. To this suspension of BSA particles was added m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (Pierce Endogen) in DMSO. The reaction proceeded overnight at 4°C. The particles were then washed by hollow fiber cross-filtration (A/G Technologies Corp.) with five volumes of 50 millimolar MES buffer, pH 5.5. This was reacted with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (Sigma Chemical Co.) and N-hydroxysuccinimide (Pierce Endogen) for 15 minutes at room temperature, then washed by hollow fiber crossflow-filtration (A/G Technologies Corp.) with two volumes of 50 millimolar MES buffer, pH 5.5 at room temperature. A mouse monoclonal anti-hLH antibody (OEM Concepts) was added and the pH was then

WO 03/038397

PCT/US02/33891

adjusted to pH 7.0 by addition of 200 millimolar HEPES buffer pH 8.2 and reacted for 3 hours at room temperature. The particles were then washed by hollow fiber crossflow-filtration (A/G Technologies Corp.) using 5 volumes of 50 millimolar Tris buffer, 150 millimolar sodium chloride, 0.05% sodium azide, pH 7.5 at room

5 temperature

A biotin coated particle was made by the method described in Example I.

The NeutrAvidin[®] and polyclonal anti-hLH antibody coated particle solution and the mouse monoclonal anti-hLH antibody coated particle solution were diluted together in a 1:1 ratio. This reagent was then used in immunoassays in which the

10 mixture of the NeutrAvidin[®] and polyclonal anti-hLH antibody coated particle solution and monoclonal anti-hLH coated particles were added first and the biotin coated particles second. . Calibrator solutions of hLH were made by addition of varying amounts of human Luteinizing hormone (Cortex Biochem) to aliquots of 1% w/v

15 Bovine serum albumin in 50 millimolar tris buffer, 150 millimolar solution of sodium chloride, and 0.05% sodium azide.

The assay was run on a Roche Cobas MIRA[®] automated clinical chemistry analyzer as follows. The analyzer was programmed to pipette 10 μ L of calibrator solution of hLH and 75 μ L polyclonal and Neutravidin[®] coated particle and monoclonal coated particle mixture followed by the addition of 75 μ L of the biotin coated particles

20 suspension. Absorbance readings were then taken in an automated fashion every 25 sec for 1250 sec at 340 nm.

The results are shown in Fig. 10.

Example VI

25

This example describes an assay of hCRP using NeutrAvidin[®], goat anti-hCRP dextran conjugates and biotin particles.

NeutrAvidin[®] (Pierce Endogen Co.) and goat anti-hCRP dextran conjugate was synthesized as follows. 2,000,000 MW dextran (Sigma Chemical Co.) was oxidized to

30 polyaldehyde by reaction with sodium periodate overnight at 4°C then dialyzed against three changes of water at 4°C. Neutravidin[®] (Pierce Endogen Co.), commercially available goat anti-hCRP (Good Biotech Corp.) and dextran polyaldehyde were then mixed in a 0.5:1:1 ratio by mass and reacted overnight at 4°C. The product was then

WO 03/038397

PCT/US02/33891

dialyzed against three changes of 50 millimolar Tris buffer, 150 millimolar sodium chloride and 0.05% w/v sodium azide pH 7.5 in 300,000 MW cut-off cellulose acetate dialysis tubing (Spectrum Medical Industries, Inc.) at 4°C.

The biotin coated particle was made by the method described in Example I. The
5 assay was run on a Roche Cobas MIRA[®] automated clinical chemistry analyzer as follows. The analyzer was programmed to pipette 5 µL of calibrator solution of hCRP and 50 µL of the mixture of Neutravidin and anti-hCRP antibody – dextran conjugate followed by the addition of 50 µL of the biotin-coated particles. Absorbance readings were then taken in an automated fashion every 25 sec for 500 sec at 600 nm at 37°C.

10 The results are shown in Fig. 11.

Other embodiments are in the claims.

What is claimed is:

WO 03/038397

PCT/US02/33891

CLAIMS

1. An article for binding an analyte, comprising:
a first particle;
a first ligand capable of binding to the analyte; and
5 a second ligand bound to a species selected from the group consisting of the first particle and the first ligand, the second ligand having at least two binding sites for a third ligand that is a binding partner with the second ligand.
- 10 2. The article of claim 1, wherein the second ligand is not bound to both the first particle and the first ligand.
3. The article of claim 1, further comprising the third ligand bound to the second ligand, wherein the third ligand has only one binding site for the second ligand.
- 15 4. The article of claim 3, wherein the second and third ligands have an affinity constant of at least about 1×10^4 liters per mole.
5. The article of claim 3, wherein the second and third ligands have an affinity constant that is greater than an affinity constant of the first ligand and the analyte.
20
6. The article of claim 3, further comprising a second particle bound to the third ligand.
7. The article of claim 6, further comprising a fourth ligand bound to the second
25 particle, the fourth ligand being capable of binding to the analyte.
8. The article of claim 7, further comprising an analyte bound to the first and fourth ligands.
- 30 9. The article of claim 3, further comprising a fourth ligand bound to a second particle wherein an analyte is bound to the first and fourth ligand.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

10. The article of claim 8, wherein the analyte is selected from the group consisting of antibodies, vitamins, pesticides, antigens, protein antigens, drugs, steroids, peptides, oligonucleotides, oligosaccharides, hormones and toxins.
- 5 11. The article of a claim 1, wherein the first particle is selected from the group consisting of metal particles, latex particles, silica particles, glass particles, paramagnetic particles, polymer particles, erythrocyte particles and liposome particles.
12. The article of claim 11, wherein the first particle comprises a colloidal gold
10 particle.
13. The article of claim 11, wherein the first particle comprises a polymeric particle.
14. The article of claim 1, wherein the first ligand is selected from the group
15 consisting of antibodies, antigens, lectins, receptors, binding proteins, co-factors, vitamins, peptides, oligonucleotides, metal chelating agents, polysaccharides and derivatives thereof.
15. The article of claim 1, wherein the second ligand is selected from the group
20 consisting of a biotin-binding protein, an immunoglobulin, lectin, and a metal chelating agent.
16. The article of claim 15, wherein the second ligand comprises a biotin binding
25 protein.
17. The article of claim 3, wherein the third ligand is selected from the group consisting of biotin, metal ions, protein A, protein G, haptens and saccharides.
18. The article of claim 17, wherein the third ligand comprises biotin.
30
19. The article of claim 6, wherein the second particle is selected from the group consisting of metal particles, latex particles, silica particles, glass particles, paramagnetic particles, polymer particles, erythrocyte particles and liposome particles.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

20. The article of claim 19, wherein the second particle comprises a polymeric particle.
21. The article of claim 19, wherein the second particle comprises a colloidal gold
5 particle.
22. The article of claim 7, wherein the fourth ligand is selected from the group consisting of antibodies, antigens, lectins, receptors, binding proteins, co-factors, vitamins, peptides, oligonucleotides, metal chelating agents, polysaccharides and
10 derivatives thereof.
23. The article of claim 1, further comprising a plurality of the first ligands bound to the first particle.
- 15 24. The article of claim 23, further comprising a plurality of the second ligands, wherein at least some of the plurality of the first ligands have one of the plurality of the second ligands bound thereto.
25. The article of claim 23, further comprising a plurality of the second ligands and
20 a plurality of the first particles, wherein at least some of the plurality of the first particles have one of the plurality of the second ligands bound thereto, the plurality of particles forming an agglomeration.
26. An agglomeration, comprising:
25 a plurality of particles;
a plurality of first ligands capable of binding to an analyte, each of the plurality of first ligands being bound to a particle;
a plurality of second ligands, each of the plurality of second ligands being
bound to a species selected from the group consisting of one of the plurality of particles
30 and one of the plurality of first ligands; and
a plurality of third ligands, each of the plurality of third ligands being bound to one of the plurality of second ligands,

WO 03/038397

PCT/US02/33891

wherein each of the plurality of second ligands has at least two binding sites for the third ligand, and each of the plurality of third ligands has only one binding site for the second ligand.

- 5 27. The agglomeration of claim 26, wherein each of the second ligands is not bound to both one of the plurality of particles and one of the plurality of first ligands.
28. The agglomeration of claim 26, wherein the second and third ligands have an affinity constant of at least about 1×10^4 liters per mole.
- 10 29. The agglomeration of claim 26, wherein an affinity constant of the second and third ligands is greater than an affinity constant of the first ligand and the analyte.
30. The agglomeration of claim 26, wherein at least some of the plurality of
15 particles are selected from the group consisting of metal particles, latex particles, silica particles, glass particles, paramagnetic particles, polymer particles, erythrocyte particles and liposome particles.
31. The agglomeration of claim 26, wherein at least some of the plurality of first
20 ligands are selected from the group consisting of antibodies, antigens, lectins, receptors, binding proteins, co-factors, vitamins, peptides, oligonucleotides, metal chelating agents, polysaccharides and derivatives thereof.
32. The agglomeration of claim 26, wherein at least some of the plurality of second
25 ligands are selected from the group consisting of a biotin-binding protein, an immunoglobulin, lectin, and a metal chelating agent.
33. The agglomeration of claim 26, wherein at least some of the plurality of third
30 ligands are selected from the group consisting of biotin, metal ions, protein A, protein G, haptens and saccharides.
34. The agglomeration of claim 26, further comprising a plurality of analytes, each analyte being bound to two of the plurality of first ligands.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

35. The agglomeration of claim 34, wherein the analyte is selected from the group consisting of antibodies, vitamins, pesticides, antigens, protein antigens, drugs, steroids, peptides, oligonucleotides, oligosaccharides, hormones and toxins.
- 5 36. The agglomeration of claim 27, wherein at least some of the plurality of particles have more than one of the plurality of first ligands bound thereto.
37. The agglomeration of claim 27, further comprising a plurality of fourth ligands bound to a plurality of second particles, wherein an analyte is bound to both the first
10 ligand and the fourth ligand.
38. An article for binding an analyte, comprising:
a first ligand capable of binding to the analyte;
a second ligand bound to the first ligand; and
15 a third ligand bound to the second ligand,
wherein the second ligand has at least two binding sites for the third ligand, and the third ligand has only one binding site for the second ligand.
39. The article of claim 38, wherein the second and third ligands have an affinity
20 constant of at least about 1×10^4 liters per mole.
40. The article of claim 38, wherein the second and third ligands have an affinity constant that is greater than an affinity constant of the first ligand and the analyte.
- 25 41. The article of claim 38, further comprising a particle bound to the third ligand.
42. The article of claim 41, further comprising a fourth ligand bound to the particle, the fourth ligand being capable of binding to the analyte.
- 30 43. The article of claim 42, further comprising an analyte bound to the first and fourth ligands.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

44. The article of claim 38, further comprising a fourth ligand bound to a particle wherein an analyte is bound to the first and fourth ligand.
45. The article of claim 43, wherein the analyte is selected from the group
5 consisting of antibodies, vitamins, pesticides, antigens, protein antigens, drugs, steroids, peptides, oligonucleotides, oligosaccharides, hormones and toxins.
46. The article of claim 38, wherein the first ligand is selected from the group consisting of antibodies, antigens, lectins, receptors, binding proteins, co-factors,
10 vitamins, peptides, oligonucleotides, metal chelating agents, polysaccharides and derivatives thereof.
47. The article of claim 38, wherein the second ligand is selected from the group consisting of a biotin-binding protein, an immunoglobulin, lectin, a metal chelating
15 agent.
48. The article of claim 47, wherein the second ligand is a biotin binding protein.
49. The article of claim 38, wherein the third ligand is selected from the group
20 consisting of biotin, metal ions, protein A, protein G, haptens and saccharides.
50. The article of claim 49, wherein the third ligand comprises biotin.
51. The article of claim 39, wherein the particle is selected from the group
25 consisting of metal particles, latex particles, silica particles, glass particles, paramagnetic particles, polymer particles, erythrocyte particles and liposome particles.
52. The article of claim 51, wherein the particle comprises a polymeric particle.
- 30 53. The article of claim 51, wherein the particle comprises a colloidal gold particle.
54. The article of claim 42, wherein the fourth ligand is selected from the group consisting of antibodies, antigens, lectins, receptors, binding proteins, co-factors,

WO 03/038397

PCT/US02/33891

vitamins, peptides, oligonucleotides, metal chelating agents, polysaccharides and derivatives thereof.

55. The article of claim 38, further comprising a plurality of the first ligands bound
5 to the first particle.

56. The article of claim 55, further comprising a plurality of the second ligands,
wherein at least some of the plurality of the first ligands have one of the plurality of the
second ligands bound thereto.

10

57. An agglomeration, comprising:
a plurality of particles;
a plurality of first ligands capable of binding to an analyte;
a plurality of second ligands, each of the plurality of second ligands being

15 bound to a first ligand; and

a plurality of third ligands, each of the plurality of third ligands being bound to
one of the plurality of second ligands, each of the plurality of third ligands being bound
to a particle,

20 wherein each of the plurality of second ligands has at least two binding sites for
the third ligand, and each of the plurality of third ligands has only binding site for the
second ligand.

58. The agglomeration of claim 57, wherein the second and third ligands have an
affinity constant of at least about 1×10^4 liters per mole.

25

59. The agglomeration of claim 57, wherein an affinity constant of the second and
third ligands is greater than an affinity constant of the first ligand and the analyte.

60. The agglomeration of claim 57, wherein at least some of the plurality of
30 particles are selected from the group consisting of metal particles, latex particles, silica
particles, glass particles, paramagnetic particles, polymer particles, erythrocyte particles
and liposome particles.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

61. The agglomeration of claim 57, wherein at least some of the plurality of first ligands are selected from the group consisting of antibodies, antigens, lectins, receptors, binding proteins, co-factors, vitamins, peptides, oligonucleotides, metal chelating agents, polysaccharides and derivatives thereof.
- 5
62. The agglomeration of claim 57, wherein at least some of the plurality of second ligands are selected from the group consisting of a biotin-binding protein, an immunoglobulin, lectin, a metal chelating agent.
- 10
63. The agglomeration of claim 57, wherein at least some of the plurality of third ligands are selected from the group consisting of biotin, metal ions, protein A, protein G, haptens and saccharides.
- 15
64. The agglomeration of claim 57, further comprising a plurality of analytes, each analyte being bound to two of the plurality of first ligands.
- 20
65. The agglomeration of claim 64, wherein the analyte is selected from the group consisting of antibodies, vitamins, pesticides, antigens, protein antigens, drugs, steroids, peptides, oligonucleotides hormones and toxins.
- 25
66. The agglomeration of claim 57, wherein at least some of the plurality of particles have more than one of the plurality of first ligands bound thereto.
- 30
67. A method of performing an assay for an analyte, comprising:
linking a first and second particles via a non-covalent bond between first and second ligands,
wherein the first ligand has only one binding site for the second ligand, the second ligand has at least two binding sites for the first ligand, the first ligand is bound to the first particle, the second ligand is bound to a species selected from the group consisting of the second particle and a third ligand, the second ligand is not bound to both the second particle and the third ligand, the third ligand is bound to the second particle, and the third ligand is capable of binding to the analyte.

WO 03/038397

PCT/US02/33891

68. The method of claim 67, further comprising binding the third ligand to the analyte.
69. The method of claim 67, wherein the second particle has a fourth ligand bound thereto, the fourth ligand being capable of binding to the analyte.
70. The method of claim 69, further comprising binding the analyte to the third and fourth ligands.
71. The method of claim 67, further comprising binding the analyte to both the third ligand and to a fourth ligand attached to a third particle.
72. The method claim 67, wherein the method forms an agglomeration.
73. A method of performing an assay for an analyte, comprising:
linking a particle and a first ligand via a non-covalent bond between a second ligand and a third ligand,
wherein the second ligand has only one binding site for the third ligand, the third ligand has at least two binding sites for the second ligand, the second ligand is bound to the particle, the third ligand is bound to the first ligand, and the first ligand is capable of binding to the analyte.
74. The method of claim 73, further comprising binding the first ligand to the analyte.
75. The method of claim 73, wherein the first ligand is bound to a second particle.
76. The method of claim 73, wherein the first particle has a fourth ligand bound thereto, the fourth ligand being capable of binding to the analyte.
77. The method of claim 76, further comprising binding the analyte to the first and fourth ligands.

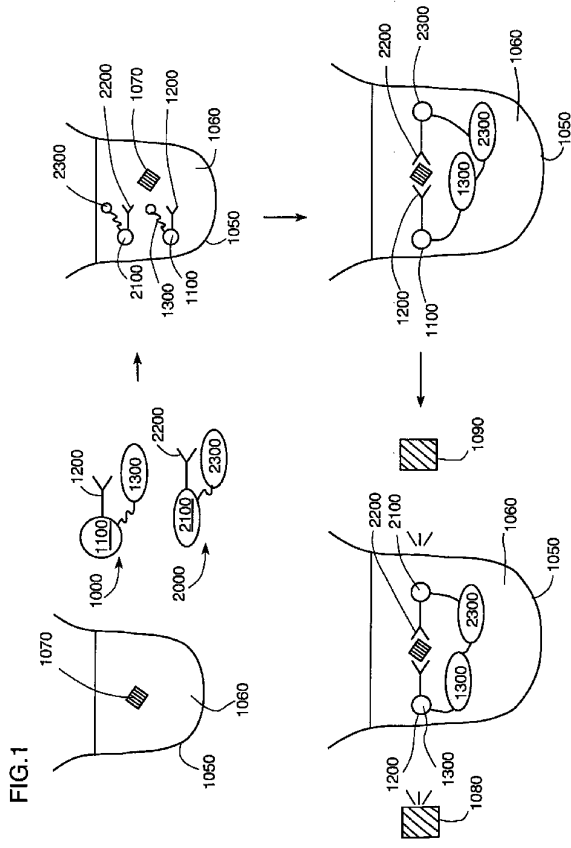
WO 03/038397

PCT/US02/33891

78. The method of claim 73, wherein the method forms an agglomeration.

WO 03/038397

PCT/US02/33891



WO 03/038397

PCT/US02/33891

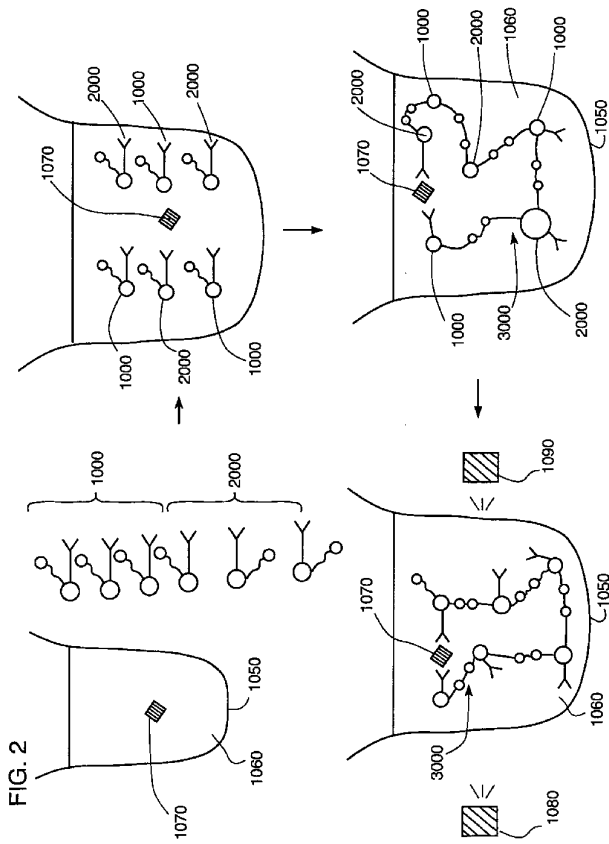


FIG. 4

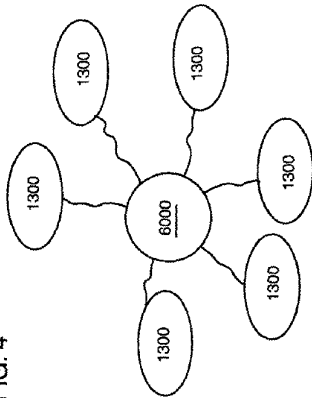


FIG. 3

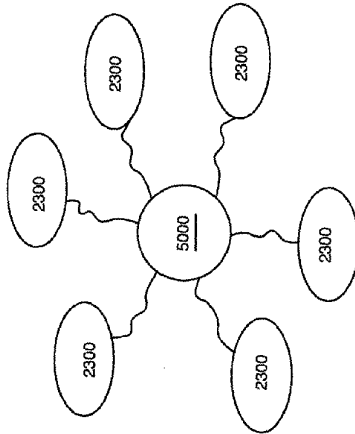


FIG. 6

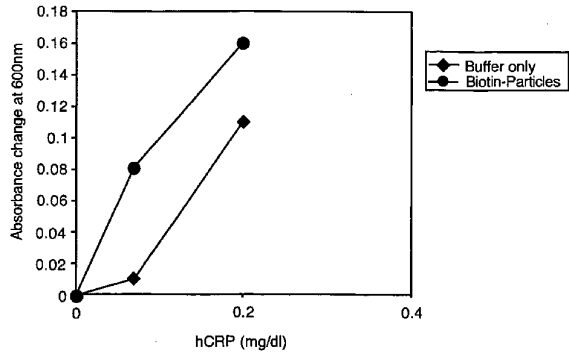


FIG. 7

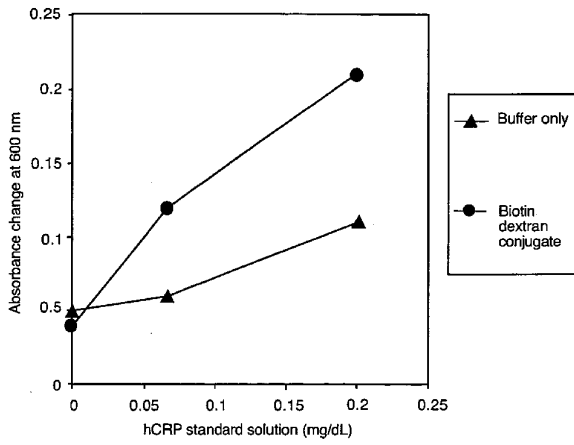


FIG. 8

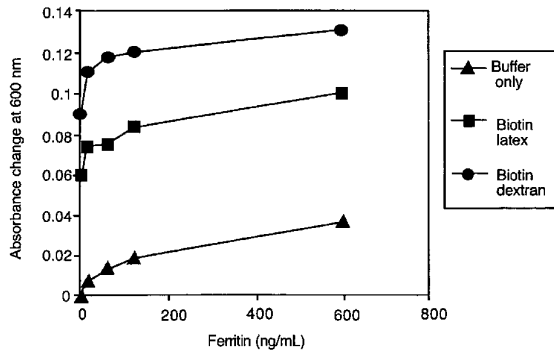


FIG. 9

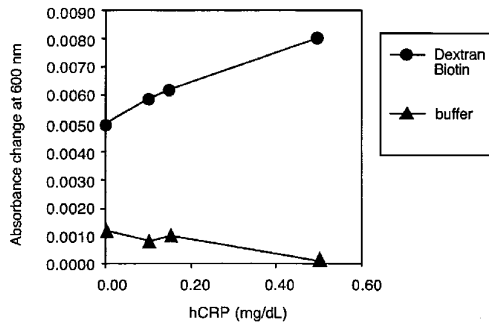


FIG. 10

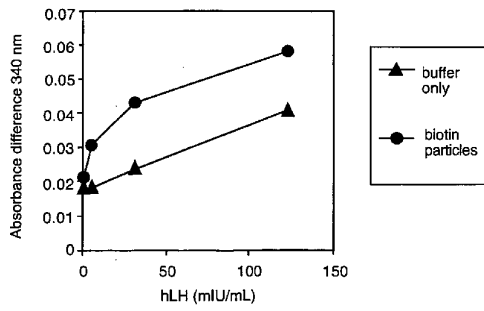
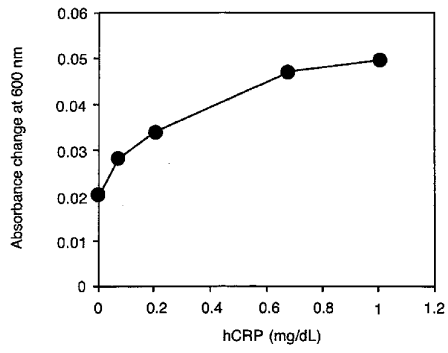


FIG. 11



【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
8 May 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/038397 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/543, 33/544, 33/553, 33/545, 33/549, 33/546, 33/536, 33/541
- (21) International Application Number: PCT/US02/33891
- (22) International Filing Date: 23 October 2002 (23.10.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/334,748 1 November 2001 (01.11.2001) US
10/194,638 12 July 2002 (12.07.2002) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 10/194,638 (CON)
Filed on 12 July 2002 (12.07.2002)
- (71) Applicant (for all designated States except US): REFERENCE DIAGNOSTICS INC. [US/US]; 19 Crosby Drive, Suite 30, Bedford, MA 01730 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): CHAN, Teresa [US/US]; 23 Lengdon Road, Wayland, MA 01778 (US).
LAWLOR, Joseph, F. [US/US]; 163 Woodside Lane, Arlington, MA 02474 (US).
SIEK, Gordon, C. [US/US]; 187 Highland Avenue #2, Somerville, MA 02143 (US).
- CHASE, Arleen [US/US]; 378 Treble Cove Road, Billerica, MA 01862 (US).
MUSTO, Joseph, D. [US/US]; 8 Donnelly Drive, Dover, MA 02030 (US).
- (74) Agent: DALEY, Sean, P. Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02110 (US).
- (81) Designated States (national): AR, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BI, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
27 November 2003

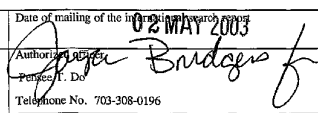


WO 03/038397 A3

(54) Title: ASSAY

(57) Abstract: Assays, such as immunoassays, and related articles are disclosed.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/33891																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER																				
IPC(7) : G01N 33/543, 33/544, 33/553, 33/545, 33/549, 33/546, 33/536, 33/541. US CL : 436/501, 518, 519, 523, 526, 530, 531, 533, 535, 536, 540 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) U.S. : 436/501, 518, 519, 523, 526, 530, 531, 533, 535, 536, 540																				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE																				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PALM, EAST, WEST																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
A	US 5,583,054 A (ITO et al.) 10 December 1996, col. 2, line 60-col. 3, line 40.	1-78																		
A	US 5,693,214 A (ABE et al.) 02 December 1997, col. 1, line 50-col. 2, line 33.	1-78																		
A	US 5,695,901 A (SELIM) 09 December 1997, col. 2, line 31-col. 3, line 35.	1-78																		
A	US 5,736,349 A (SASAKI et al.) 07 April 1998, col. 2, lines 31-60.	1-78																		
A	US 5,693,784 A (EKENBERG) 02 December 1997, col. 2, line 35-col. 4, line 5.	1-78																		
A	US 6,087,188 A (JOHANSEN et al.) 11 July 2000, col. 2, line 54-col. 3, line 2.	1-78																		
A	US 6,096,563 A (HAJIZADEH et al.) 01 August 2000, col. 6, line 10-col. 8, line 12.	1-78																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="0"> <tr> <td colspan="2">Special categories of cited documents:</td> <td>"I" later documents 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.</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"&" documents member of the same patent family</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			Special categories of cited documents:		"I" later documents 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.	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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		"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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		"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" documents member of the same patent family		"O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			"P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Special categories of cited documents:		"I" later documents 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.																		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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																			
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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																			
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" documents member of the same patent family																			
"O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																				
"P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 10 December 2002 (10.12.2002)	Date of mailing of the international search report 02 MAY 2003																			
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authority of the ISA/US  Peter T. Do Telephone No. 703-308-0196																			

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ラウロー ジョセフ エフ .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 アーリントン ウッドサイド レーン 163

(72) 発明者 シーク ゴードン シー .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 サマービル ハイランド アベニュー #2 187

(72) 発明者 チェイス アーリーン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ビルリカ トレブル コープ ロード 378

(72) 発明者 ムスト ジョセフ ディー .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ドーパー ドネリー ドライブ 8

专利名称(译)	分析方法		
公开(公告)号	JP2005508001A	公开(公告)日	2005-03-24
申请号	JP2003540618	申请日	2002-10-23
[标]申请(专利权)人(译)	参考迪亚诺斯泰克斯股份有限公司Retiddo		
申请(专利权)人(译)	参考迪亚诺斯泰克斯股份有限公司Retiddo		
[标]发明人	チャンテレサ ラウロージョセフエフ シークゴードンシー チェイスアーリーン ムストジョセフディー		
发明人	チャン テレサ ラウロー ジョセフ エフ. シーク ゴードン シー. チェイス アーリーン ムスト ジョセフ デイー.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/553		
CPC分类号	G01N33/54346 G01N33/54306 Y10T428/12014		
FI分类号	G01N33/543.581.D G01N33/53.U G01N33/545.B G01N33/553		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/334748 2001-11-01 US 10/194638 2002-07-12 US		
其他公开文献	JP4140524B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

诸如免疫测定和相关物品的测定被公开。