

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4140524号  
(P4140524)

(45) 発行日 平成20年8月27日(2008.8.27)

(24) 登録日 平成20年6月20日(2008.6.20)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 D
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 7
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/545 B
	GO 1 N 33/553

請求項の数 78 (全 21 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)  
 (65) 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)  
 (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)  
 審査請求日 平成17年5月16日(2005.5.16)  
 (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)

(73) 特許権者 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 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) 【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 $1 \times 10^4$ 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。

10

## 【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。

20

## 【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。

30

## 【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。

40

## 【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】

50

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。

【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；

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 $1 \times 10^4$ 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。

【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

10

20

30

40

50

、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に、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。

【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。

10

【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 $1 \times 10^4$ 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。

20

【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。

【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。

30

【請求項45】

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。

40

【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】

50

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。

【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。

10

【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。

【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、

20

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 $1 \times 10^4$ 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。

30

【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。

40

【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。

【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

50

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。

【請求項66】

複数個の粒子の少なくともいくつかに、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。

【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。

【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。

【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】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

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】

10

## 【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。

## 【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。

20

## 【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

30

## 【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）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。

40

## 【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 $1 \times 10^4$ リットルの結合定数を有し得る。

## 【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

50

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。

【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。

10

【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。

【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。

20

【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。

【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。

30

【0021】

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。

40

【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】

50

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 $1 \times 10^4$ 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。

【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體から選択され得る。

【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。

【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】

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 $1 \times 10^4$ 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。

【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】

10

20

30

40

50

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。

【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。

10

【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。

【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。

20

【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。

【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。

30

【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 $1 \times 10^4$ リットルの結合定数を有する。

40

【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。

【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

50

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。

【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。

【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。

【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】

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。

【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】

10

20

30

40

50

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る。

【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。

【0072】

図2は、アッセイを行う方法の略図である。

【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が結合してよい。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が結合してよい。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

10

20

30

40

50

度が増加し、アッセイの感度が上昇し得ると考えられる。

【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）。

【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。

【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。

【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 $1 \times 10^4$ 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 $1 \times 10^5$ リットル、モル当たり少なくとも約 $1 \times 10^6$ 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。

【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

10

20

30

40

50

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することが可能である。

【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）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、ツィーン、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。

【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

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

10

20

30

40

50

ミド (Sigma Chemical社) で活性化し、ポリクロールヤギ抗hCRP抗体 (Good Biotech社) を粒子に添加して4 で一晚反応させ、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。

【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 で一晚反応させることにより作製した。

【0094】

ホローファイバー交差流る過カートリッジ (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。

【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 µL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 µL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 µL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。

【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 で一晚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、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 µL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 µL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 µL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。

【0102】

結果を図7に示す。

10

20

30

40

50

## 【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。

## 【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。

## 【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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ Lを添加するように、分析装置をプログラムした。次に、37 $^{\circ}$ C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。

## 【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（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 $\mu$ Lを金コロイド溶液75 $\mu$ Lに添加し、その後デキストラン-ビオチン接合体溶液75 $\mu$ L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。

## 【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る過（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。

10

#### 【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る過（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る過（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る過（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る過（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 Conceots）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る過（A/G Technologies社）により粒子を室温で洗浄した。

20

30

#### 【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抗体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。

40

#### 【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

50

った。hLHの標準物質溶液10 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 で一晚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 で一晚反応させた。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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

10

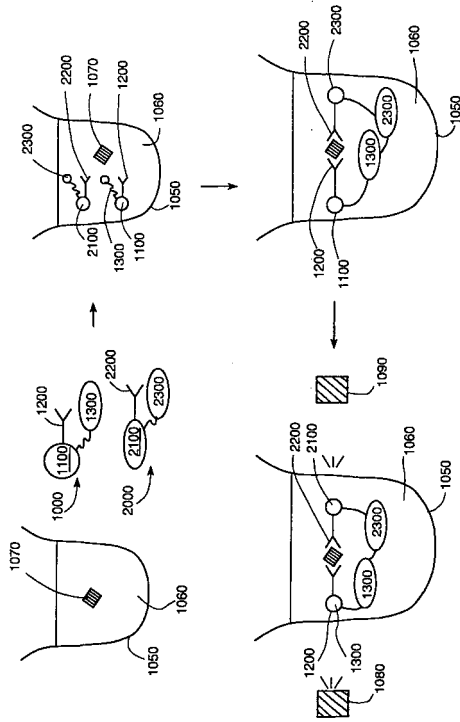
20

30

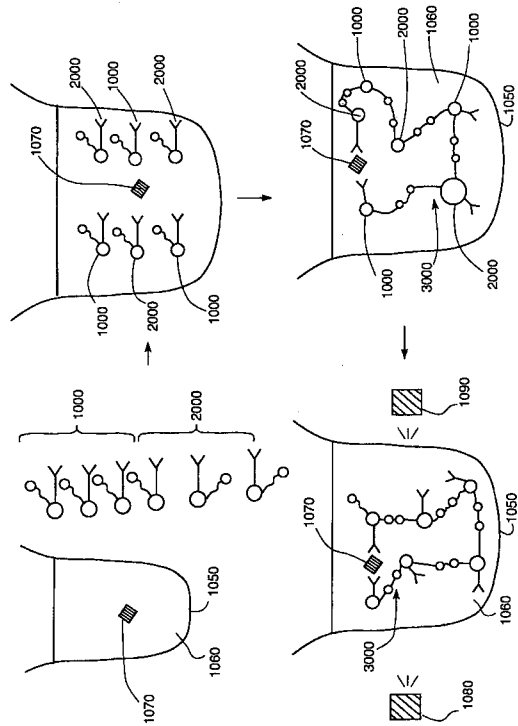
40

50

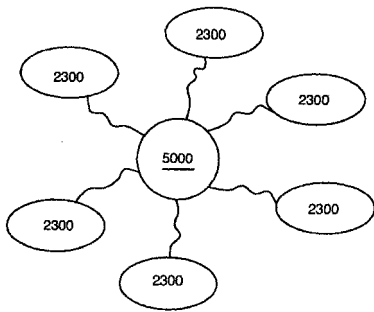
【 図 1 】



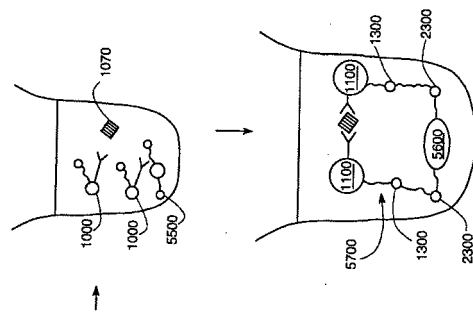
【 図 2 】



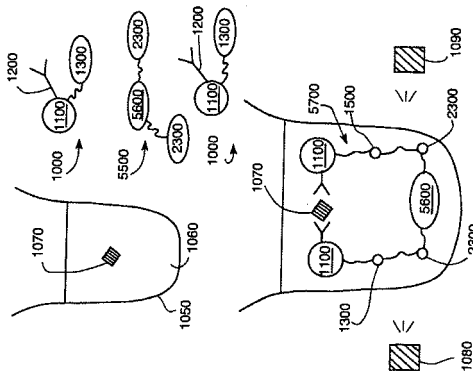
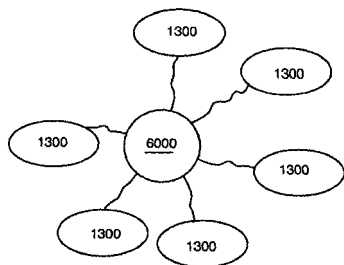
【 図 3 】



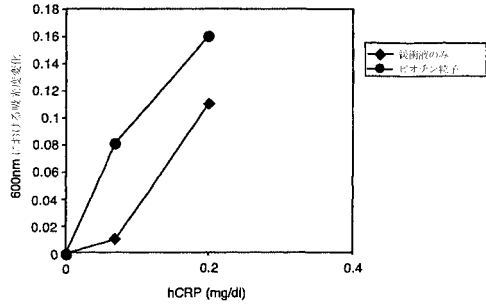
【 図 5 】



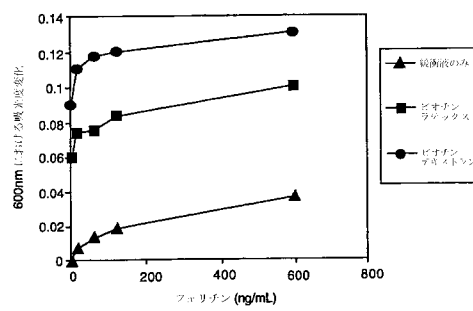
【 図 4 】



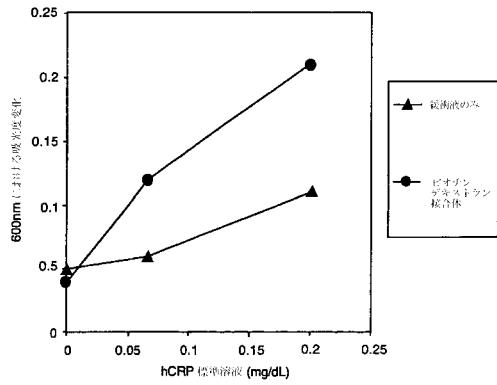
【 図 6 】



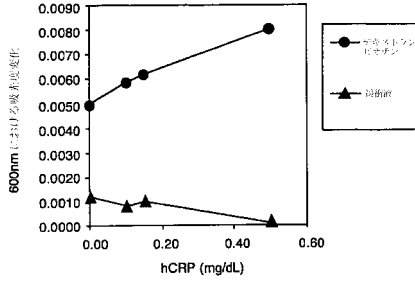
【 図 8 】



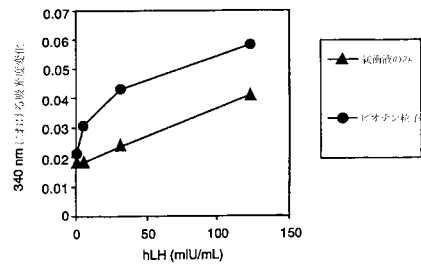
【 図 7 】



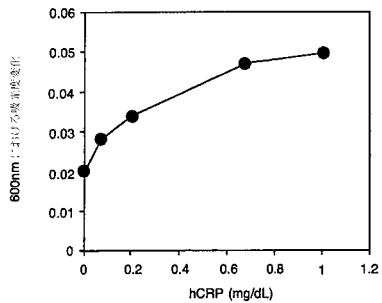
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



## フロントページの続き

- (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 ドーバー ドネリー ドライブ 8

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 特開平10-300752(JP,A)  
特表平05-502098(JP,A)  
特表平10-506184(JP,A)  
国際公開第02/088733(WO,A1)  
特開平10-031021(JP,A)

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

专利名称(译)	分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4140524B2</a>	公开(公告)日	2008-08-27
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		
当前申请(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 ディー.		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/545 G01N33/553		
CPC分类号	G01N33/54346 G01N33/54306 Y10T428/12014		
FI分类号	G01N33/543.581.D G01N33/543.587 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	JP2005508001A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了诸如免疫测定和相关文章的测定。

