

(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2004-514907

(P2004-514907A)

(43) 公表日 平成16年5月20日(2004.5.20)

(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 O 1 D
B 8 2 B 1/00	GO 1 N 33/543	5 2 1
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/543	5 2 5 W
GO 1 N 33/545	GO 1 N 33/543	5 7 5
	B 8 2 B 1/00	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 113 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-546217 (P2002-546217)	(71) 出願人	503195193 インノトラック ダイアグノスティクス オサケ ユキチュア フィンランド共和国、フィン-20520 ツルク、カレバンチエ 25
(86) (22) 出願日	平成13年11月26日 (2001.11.26)	(74) 代理人	100065226 弁理士 朝日奈 宗太
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月29日 (2003.5.29)	(74) 代理人	100098257 弁理士 佐木 啓二
(86) 国際出願番号	PCT/FI2001/001024	(74) 代理人	100117112 弁理士 秋山 文男
(87) 国際公開番号	W02002/044725	(74) 代理人	100117123 弁理士 田中 弘
(87) 国際公開日	平成14年6月6日 (2002.6.6)		
(31) 優先権主張番号	20002623		
(32) 優先日	平成12年11月30日 (2000.11.30)		
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物分析的アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、特異的結合反応物からなるナノ粒子であって、該結合反応物にとって特異的な検体または複合体が含有する該検体を測定するのに有用であるナノ粒子に関する。ナノ粒子の特徴は、該ナノ粒子の直径が200nm未満であり；該ナノ粒子が多数の特異的反応結合物で、該反応物に対する該ナノ粒子の親和定数が、該検体に対する遊離の該結合反応物の親和定数を本質的に超え、および/もしくは該ナノ粒子と該検体とのあいだの会合速度定数が、遊離の該結合反応物と該検体とのあいだの会合速度定数を本質的に超える程度にコートされており；ならびに、該ナノ粒子が検出可能な特徴を含むことである。本発明はまた該ナノ粒子を用いる生化学的アッセイに関する。該アッセイはまた、エネルギー供与化合物（ドナー）で標識化された第1群およびエネルギー受容化合物（アクセプター）で標識された第2群からなる近接ベースのホモジニアスアッセイに関し、ここでドナーは発光性であり、また長い励起状態寿命を有し、アクセプターは発光性で、短いまたは長い励起状態寿命を有するか、またはアクセプターは非発光性であり、そして両群のあいだの距離の短縮または延長からそれぞれ生じる、ドナーからアクセプターへのエネルギー移動の増加または減少が測定される。本アッセイの特徴は、ドナーがナノ粒子であることである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

特異的結合反応物を含むナノ粒子であって、該結合反応物にとって特異的な検体または複合体が含有する該検体を測定するために有用なナノ粒子であって、

- a) 該ナノ粒子の直径が 200 nm 未満、好ましくは 120 nm 未満である、
 - b) 該ナノ粒子が多数の該特異的結合反応物でつぎの程度にコートされている、
 - i) 該検体に対する該ナノ粒子の親和定数が、該検体に対する遊離の該結合反応物の親和定数を本質的に超え、および/もしくは
 - ii) 該ナノ粒子と該検体とのあいだの会合速度定数が、遊離の該結合反応物と該検体とのあいだの会合速度定数を本質的に超える；ならびに
 - c) 該ナノ粒子が検出可能な特徴を含む
- ことを特徴とするナノ粒子。

10

【請求項 2】

前記結合反応物が、抗体、抗原、受容体リガンド、特異的結合タンパク質、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、核酸、ペプチド、糖、ハプテン、ウイルス、細菌および細胞からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 記載のナノ粒子。

【請求項 3】

前記検出可能な特徴が発光性標識であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載のナノ粒子。

【請求項 4】

前記発光性標識が、時間分解蛍光標識、アップコンバージョン蛍光標識、急速崩壊蛍光標識、化学発光性標識または生物発光性標識からなる群から選択されることを特徴とする請求項 3 記載のナノ粒子

20

【請求項 5】

前記生物特異的結合反応物が、吸着、共有結合、グラフティング、固相合成または他の生物特異的結合反応物の手段によって、ナノ粒子に結合していることを特徴とする請求項 1、2、3 または 4 記載のナノ粒子。

【請求項 6】

特異的結合反応物にとって特異的な検体または複合体が含有する該検体を測定するためのアッセイであって、該特異的結合反応物を含むナノ粒子を用いるアッセイであって、

30

- a) 該ナノ粒子の直径は 200 nm 未満、好ましくは 120 nm 未満である、
 - b) 該ナノ粒子が、多数の該特異的結合反応物でつぎの程度にコートされている、
 - i) 該検体に対する該ナノ粒子の親和定数が、該検体に対する遊離の該結合反応物の親和定数を本質的に超え、および/もしくは
 - ii) 該ナノ粒子と該検体とのあいだの会合速度定数が、遊離の該結合反応物と該検体とのあいだの会合速度定数を本質的に超える；ならびに
 - c) 該ナノ粒子が検出可能な特徴を含む
- ことを特徴とするアッセイ。

【請求項 7】

前記アッセイがヘテロジニアスであって、非競合的または競合的であることを特徴とする請求項 6 記載のアッセイ。

40

【請求項 8】

前記アッセイがホモジニアスであって、非競合的または競合的であることを特徴とする請求項 6 記載のアッセイ。

【請求項 9】

前記アッセイがヘテロジニアスなアッセイであって、

- a) 固相に結合した第 1 結合反応物（この反応物は検体の第 1 結合部位に対して特異的である）を、該検体を含有する試料と接触させる工程；
- b) 任意に該検体を該第 1 結合反応物と反応させる工程；
- c) 工程 a) で得られた組成物に、第 2 結合反応物（この反応物は該検体の第 2 結合部位

50

に対して特異的である)を含むナノ粒子を添加する工程；

d) 該ナノ粒子の第2結合反応物を、該固相に結合した第1結合反応物に結合した検体と反応させる工程；

e) 該固相(この固相は、該ナノ粒子の第2結合反応物に結合した検体に結合した第1結合反応物に結合している)を洗浄して、本質的に該固相に生物特異的に結合していないナノ粒子をなくす工程；および

f) 該検体の測定を可能とするために、該固相に結合したナノ粒子を検出する工程からなることを特徴とする請求項7記載のアッセイ。

【請求項10】

工程a)およびc)が本質的に同時に実施され、したがって任意の反応工程b)がないことを特徴とする請求項9記載のアッセイ。 10

【請求項11】

任意の反応工程b)を含むことを特徴とする請求項9記載のアッセイ。

【請求項12】

前記アッセイがヘテロジニアスなアッセイであって、

a) 固相に結合した第1結合反応物(この反応物は検体の第1結合部位に対して特異的である)を、該検体を含有する試料と接触させる工程；

b) 工程a)で得られた組成物に、第3結合反応物に結合した第2結合反応物(この第2結合反応物は該検体の第2結合部位に対して特異的である)を添加する工程；

c) 工程b)で得られた組成物に、第4結合反応物(この反応物は該第3結合反応物に対して特異的である)を含むナノ粒子を添加する工程； 20

d) 該ナノ粒子の第4結合反応物を、該固相に結合した第1結合反応物に結合した検体に結合した第2結合反応物に結合した第3結合反応物と反応させる工程；

e) 該固相(この固相は、該ナノ粒子の第4結合反応物に結合した第3結合反応物に結合した第2結合反応物に結合した検体に結合した第1結合反応物に結合している)を洗浄して、本質的に該固相に生物特異的に結合していないナノ粒子をなくす工程；および

f) 該検体の測定を可能とするために、該固相に結合したナノ粒子を検出する工程からなることを特徴とする請求項7記載のアッセイ。

【請求項13】

前記第3結合反応物がピオチンであり、前記第4結合反応物がアビジンまたはストレプトアビジンであることを特徴とする請求項12記載のアッセイ。 30

【請求項14】

前記第3結合反応物がアビジンまたはストレプトアビジンであり、前記第4結合反応物がピオチンであることを特徴とする請求項12記載のアッセイ。

【請求項15】

前記アッセイがヘテロジニアスで競合的なアッセイであって、

a) 固相に結合した第1結合反応物(この反応物は検体の第1結合部位に対して特異的である)を、該検体を含有する試料と接触させ、かつ該ナノ粒子に結合した追加の検体と接触させる工程；

b) 該固相(この固相は、該ナノ粒子に結合した検体に結合した第1結合反応物に結合している)を洗浄して、本質的に固相に結合していないナノ粒子をなくす工程；および 40

c) 該検体の測定を可能とするために、該固相に結合したナノ粒子を検出する工程からなることを特徴とする請求項7または8記載のアッセイ。

【請求項16】

前記アッセイがヘテロジニアスで競合的なアッセイであって、

a) 固相に結合した第1結合反応物(この反応物は検体の第1結合部位に対して特異的である)を、該検体を含有する試料と接触させ、かつ第2結合反応物に結合した追加の検体と接触させる工程；

b) 工程a)で得られた組成物に、第3結合反応物(この反応物は該第2結合反応物に対して特異的である)を含むナノ粒子を添加する工程； 50

c) 該ナノ粒子の第3結合反応物を、該固相に結合した第1結合反応物に結合した追加的検体に結合した第2結合反応物と反応させる工程；

d) 該固相（この固相は、該ナノ粒子の第3結合反応物に結合した第2結合反応物に結合した検体に結合した第1結合反応物に結合している）を洗浄して、本質的に該固相に結合していないナノ粒子をなくす工程；および

e) 該検体の測定を可能にするために、該固相に結合したナノ粒子を検出する工程からなることを特徴とする請求項7または8記載のアッセイ。

【請求項17】

前記の非任意的な反応工程が、本質的に平衡になる前に中止されることを特徴とする請求項9、10、11、12、13、14、15または16記載のアッセイ。

10

【請求項18】

前記固相が本質的に平坦な表面であることを特徴とする請求項9、10、11、12、13、14、15、16または17記載のアッセイ。

【請求項19】

前記の本質的に平坦な表面が、マイクロタイターウェルの表面、スライドの表面、粒子の表面および細片の表面からなる群から選択されることを特徴とする請求項18記載のアッセイ。

【請求項20】

2つの異なる第2結合反応物である第2結合反応物Aおよび第2結合反応物Bが、1つの第2結合反応物の代わりに添加され、両第2結合反応物AおよびBは前記検体の異なる結合部位に対して特異的であると共に、反応物AおよびBの異なる両結合部位が前記第1反応結合物の検体の結合部位とは異なることを特徴とする請求項9、10、11、12、13、14、15、16、17、18または19記載のアッセイ。

20

【請求項21】

エネルギー供与化合物（ドナー）で標識された第1群およびエネルギー受容化合物（アクセプター）で標識された第2群とからなり、

- ドナーは発光性であり、また長い励起状態寿命を有し、アクセプターは発光性で、短いまたは長い励起状態寿命を有するか、またはアクセプターは非発光性であり、そして
- 両群のあいだの距離の短縮または延長からそれぞれ生じる、ドナーからアクセプターへのエネルギー移動の増加または減少それぞれが測定される

30

近接ベースのホモジニアスアッセイであって、該ドナーがナノ粒子であることを特徴とするアッセイ。

【請求項22】

前記アクセプターが発光性で、短いまたは長い励起状態寿命を有し、アクセプターの発光が、ドナーが発光を有しないかまたは本質的に発光を有しない波長で、すなわちドナーの発光がバックグラウンド発光に比べて有意でない波長で測定されることを特徴とする請求項21記載のアッセイ。

【請求項23】

前記アッセイが非競合的であることを特徴とする請求項21または22記載のアッセイ。

【請求項24】

前記アッセイが競合的であることを特徴とする請求項21または22記載のアッセイ。

40

【請求項25】

前記ナノ粒子が請求項1、2、3、4または5記載のナノ粒子であることを特徴とする請求項24記載の近接ベースのホモジニアスアッセイ。

【請求項26】

ドナーがランタニド発光性ナノ粒子であるか、またはエネルギー供給ランタニド発光性化合物が埋め込まれたポリマー性ナノ粒子であることを特徴とする請求項24または25記載の近接ベースのホモジニアスアッセイ。

【請求項27】

ドナーがユーロピウムキレートナノ粒子であることを特徴とする請求項24、25または

50

26記載の近接ベースのホモジニアスアッセイ。

【請求項28】

前記アクセプター発光が640nmを超える、好ましくは700nmを超える波長で測定されることを特徴とする請求項27記載の近接ベースのホモジニアスアッセイ。

【請求項29】

前記アクセプターがナノ粒子、好ましくは請求項1、2、3、4または5記載のナノ粒子であることを特徴とする請求項21、22、23、24、25、26、27または28記載の近接ベースのホモジニアスアッセイ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

[技術分野]

本発明は、生物特異的(biospecific)結合反応物でコートされたナノ粒子を利用する生化学的アッセイにおける改善に関する。本発明はまた、発光の時間分解検出を用いる、近接ベースのホモジニアス(homogeneous)アッセイにおける改善に関する。具体的な改善は、高い特異的活性の適用、エネルギードナーと同様に長い長寿命発光性ナノ粒子、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の強化された動力学的性質の利用、および優れたスペクトル特性を有するエネルギーアクセプターに関する。

【0002】

[発明の背景]

バイオアフィニティー(bioaffinity)または酵素的触媒反応に基づく多くのアッセイが、様々な生物学的サンプル(血清、血液、血漿、唾液、尿、糞、精漿、汗、羊水、羊膜液、組織ホモジネート、腹水など)、環境研究におけるサンプル(排水、土壌サンプル)、工業的生産物(工程溶液、生成物)および化合物ライブラリー(有機化合物、無機化合物、天然産物、生物学的ソースの抽出物、生物学的タンパク質、ペプチドまたはヌクレオチドなどからなるスクリーニングライブラリー)に由来する生物学的に重要な化合物を分析するために開発されてきた。これらのアッセイのいくつかは、特異的なバイオアフィニティー認識反応に依存しており、そこでは一般的な天然生物学的結合成分が、特異的結合アッセイ(抗体、天然ホルモン結合タンパク質、レクチン、酵素、受容体、DNA、RNAなどの生物学的結合成分を用いる)を形成するために用いられており、あるいは遺伝子工学的にまたは化学工学的に得られる抗体、形成された可塑性刷込み(molded plastic imprint)(分子刷込み)、LNA(ロックド核酸(locked nucleic acid))およびPNA(ペプチド核酸)などが用いられている。このようなアッセイは一般的に、認識、結合反応および適当な分離(沈殿および遠心分離などの分離、ろ過、コートされたアッセイチューブ、スライドもしくは微粒などのプラスチック表面へのアフィニティー回収、溶媒抽出、ゲルろ過、または他のクロマトグラフィシステム、など)ののち、形成された複合体を定量するための標識に依存する。遊離のまたは結合した画分中の標識を定量すれば、一般に未知のサンプルと比較される一式の標準を使用することによって、サンプル中の検体を直接的にまたは間接的に計算することが可能となる。

20

30

【0003】

イムノアッセイの原理は、プライス(Price)およびニューマン(Newman)により詳しく概説されている(プライス シーピーおよびニューマン ディージェー、Principles and Practice of Immunoassay, 1997, Macmillan Reference Ltd., London, UK)。生化学的アッセイの感度を改善する戦略としては、強い結合アフィニティー、標識化した反応物の低い非特異的結合、および標識の高い特異的活性を含む。抗体工学および組換え抗体がアフィニティーを改善するために首尾よく採用されているが(ラミンマエキュー(Lammimaeki U)ら、J. Mol. Biol. 1999, 291, 589-602; エリクソン エス(Eriksson S)ら、Clin. Chem. 2000, 46, 658-66)、結合アフィニティーは、たとえば、免疫応答による抗体

40

50

の場合に限られている。非特異的結合は、通常、アッセイ緩衝液中で固相をブロッキングする多量タンパク質 (solid-phase blocking and bulk proteins) を用いて最小限にされる。新しい標識分子およびバックグラウンドノイズの減少を使用して標識の特異的活性を改善するためにも、研究努力がなされてきた (クリッカ エルジェー (Kricka L J.), Pure Appl. Chem. 1996, 68, 1825-30; クリッカ エルジェー, Clin. Chem. 1999, 45, 453-8)。しかしながら、標識の増幅 (エバングリスタ アールエー (Evangalista R A) ら, Anal. Biochem. 1991, 197, 214-24)、多価標識化 (モートン アールシー (Morton R C) およびダイヤモンド イピー (Diamondis E P), Anal. Chem. 1990, 62, 1841-5) または増大した特異的活性 (クウ ワイワイ (Xu Y Y) ら, Analyst 1992, 117, 1061-9) が適用されているものの、ごく限られた感度改善が従来方法に導入されてきているに過ぎない。

10

20

30

40

50

【0004】

広範な理論的研究により、非常に高い特異的活性をもつ標識が入手できる場合には、優れた感度を有する2段階のヘテロジニアスマイクロスポットイムノアッセイ (heterogeneous microspot immunoassay) において、環境検体イムノアッセイの開発が支持されてきた (エキンス アールピー (Ekins R P), Clin. Biochem. Revs. 1987, 8, 12-23)。明らかに、超高感度イムノアッセイの開発は、方法論的進展に加えて、強い結合アフィニティー、低い非特異的結合および高い特異的活性を含む普通の制限的要素の改善を必要とする。ホモジニアスな発光性酸素チャネリングイムノアッセイ (ウルマン イーエフ (Ullman E F) ら, Clin. Chem. 1996, 42, 1518-26) (LOCITM)、ヘテロジニアスな多重検体マイクロスポットイムノアッセイ (エキンス アールピー およびチュウ エフダブリュ (Chu F W), Clin. Chem. 1991, 37, 1955-67; エキンス アールピー およびチュウ エフダブリュ, 1993年 国際公開第9308472号パンフレット) (Microspot (登録商標)) および微粒子蛍光標識イムノアッセイは、標識成分として、ナノ粒子-抗体バイオコンジュゲート (bioconjugate) を利用する。微粒子展開コンジュゲート (particulate developing conjugate) 上の結合部位の表面密度は、マイクロスポットイムノアッセイにおける感度の重要な決定要素を表わしている可能性があると言われている (エキンス アールピー およびチュウ エフダブリュ, 1993年、国際公開第9308472号パンフレット)。効率的なアフィニティーの能力増大は、それが所与のサンプルに適用できたかどうかは述べられていないが、単一抗原の異なるエピトープに向けられた2つ以上の別個の抗体を介した、個々の抗原分子に対する展開結合材料 (developing binding material) の多価結合に由来すると推測された。他方、ウルマン イーエフら (Clin. Chem. 1996, 42, 1518-26) は、一方がジゴキシンでコートされており、他方が抗ジゴキシン抗体でコートされている2つのナノ粒子のあいだの会合速度が、LOCI (登録商標) システムで増大することを示した。しかし、ナノ粒子の相互作用は、ジゴキシンと抗ジゴキシン抗体との多重結合の結果であり、一価結合事象 (1つの抗ジゴキシン抗体に対する1つのジゴキシンの相互作用) の結果ではなかった。微粒子蛍光標識イムノアッセイにおいては、多くの表面に結合したマウス抗体検体に対する、抗マウス抗体でコートされたナノ粒子追跡子の多重結合が、このアッセイ機構の結合活性を高めることを示した (ホール エム (Hall M) ら, Anal. Biochem. 1999, 272, 165-70)。

【0005】

固相イムノアッセイにおける標識としてのコロイド性ナノ粒子の歴史は、ゾル-粒子イムノアッセイ (ロイベリング ジェイエッチダブリュ (Leuvering J H W) ら, J. Immunoassay 1980, 1, 77-91) の開発、およびそれにつづく分散色素 (グリブナウ ティシージェー (Gribnau T C J) ら, J. Chro

matography 1986, 376, 175-89) および蛍光ナノ粒子 (サウンダース ジーシー (Saunders GC) ら、Clin. Chem. 1985, 31, 2020-3) の適応から始まる。ナノ粒子ベースの固相アッセイは、従来の酵素標識および放射性同位元素標識に勝る感度向上を示し、これは現行のアッセイ系におけるナノ粒子-抗体バイオコンジュゲートの機能 (サウンダース ジーシーら、Clin. Chem. 1985, 31, 2020-3; オカノ ケー (Okano K) ら、Anal. Biochem. 1992, 202, 120-5; クビッツシュコ エス (Kubitschko S) ら、Anal. Biochem. 1997, 253, 112-22; ホール エムら、Anal. Biochem. 1999, 272, 165-70) の詳細な検討、ならびに新規方法論および標識の開発 (フランク ディー (Frank D) ら、1981年、米国特許第4283382号明細書; チャン ダブリュシーダブリュ (Chan WCW) およびニー エス (Nie S)、Science 1998, 281, 2016-8; ベベルロー エッチビー (Beverloo H B) ら、Anal. Biochem. 1992, 203, 326-34; ウルマン イーエフら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 5426-30); シュルツ エス (Schultz S) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97, 996-1001; ロバーツ ディー (Roberts D) ら、J. Lumin. 1998, 79, 225-31; ジジ ュルマンズ エッチジェーエムエーエー (Zijlmans HJMAA) ら、Anal. Biochem. 1999, 267, 30-6) に寄与した。オカノ ケーら (Anal. Biochem. 1992, 202, 120-5) により明らかにされているように、ナノ粒子表面に抗体を高度に搭載することにより、ナノ粒子標識の反応性は強化され得る。しかし、高い抗体密度の粒子では、非特異的結合は増大した。観察され、向上された結合アフィニティーは、長いインキュベーション時間により、表面結合検体への大きなバイオコンジュゲートの多価結合として容易に判断され、この長いインキュベーション時間は、表面から溶液への検体の解離を導き、したがって表面への再結合ののち、ナノ粒子の多価結合を増大する。また、ナノ粒子の大きなサイズ、760 nm、は明らかに多価結合に導く。

【0006】

もとの抗体に比べて多価である複合体のアフィニティー向上は、様々なFv断片-IgG (イトー ダブリュ (Ito W) ら、J. Biol. Chem. 1993, 268, 20668-75) および4価のFv断片-コア ストレプトアビジン複合体 (キプ リヤノフ エス (Kipriyanov S) ら、Prot. Eng. 1996, 9, 203-11) を用いて示された。上昇したアフィニティーの少なくとも一部は、上昇した会合速度定数によるものであり、4価scFv: ストレプトアビジン複合体については1価Fvに比べて3.5倍高かった。同様の現象が、24個の同じサブユニットを有するフェリチンタンパク質について以前に記載され、そのタンパク質の1価結合アフィニティーは $1.6 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ であり、一方個々のサブユニットの内在的なアフィニティーは $6.7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ であった (ホッグ ピー (Hogg P) ら、J. Arch. Biochem. Biophys. 1987, 254, 92-101)。

【0007】

アビジン (ストレプトアビジン) コンジュゲートは、様々なイムノアッセイおよび核酸アッセイに長いあいだ使用されてきた (ウィルチェック エム (Wilchek M) およびバイエル イーエム (Bayer EA) 編、In Methods in Enzymol, 1990, 184)。多くの異なる発蛍光団 (fluorophores) および酵素が、アビジン (これはついでピオチン化した生物特異的結合反応物と反応する) とコンジュゲートされた (パパナスタシオウ-ディアマンディ エー (Papanastasiou-Diamandi A) ら、Clin. Chem. 1992, 38, 545-8)。ピオチンのアビジンに対する極めて高いアフィニティー ($\sim 10^{15}$) と特異性のために、このプラットフォームの使用が可能になった (グリーン エヌエム (Green 50

NM)、ウィルチェック エムおよびバイエル イーエー編、Methods in Enzymology 1990, 184, 51-67)。多くの分析で、アビジンを酵素または即時発蛍光団(prompt fluorophores)で標識することにより、ビオチン-アビジン複合体の使用は、優れたアッセイ能力を発揮するに至った。アッセイ能力をさらに改善するために、1回の結合事象あたりの酵素または発蛍光団の数を増加させるために、アビジンをより大きな分子に結合させた。ディアマンディス(Diamondis)らは、ストレプトアビジンを、時間分解蛍光Eu-キレートで予め標識したチログロブリンにコンジュゲートさせた(ディアマンディス イーピー、Clin Chem 1991, 37, 1486-91)。検体を追跡する形成複合体は、複雑であって、またタンパク質、ランタニドイオンおよびキレートの多重結合が首尾よい複合体を形成するのに必要であるので制御が難しいと考えられている。ホールらおよびベナー(Vener)らは、即時発蛍光団を含む大きな追跡子ナノ粒子にストレプトアビジンをコンジュゲートさせた(ホール エムら、Anal. Biochem. 1999, 272, 165-70; ベナー ティーアイら、Anal. Biochem. 1991, 198, 308-11)。ベナーらは、ペトリ皿の膜上でビオチン化した標的DNAをアッセイするために、直径1.8 μmという大きな粒子を使用し、その結果、アッセイ(1時間インキュベーション)の検出感度を、追跡子分子が可溶性のピロニンG標識化ストレプトアビジンであるアッセイに比べて、3オーダーより多く改善した。ホールらは、マウス抗体をアッセイするために2つのアプローチを用いた。ビオチン化された抗マウス抗体を、220 μmのストレプトアビジンナノ粒子と一緒にプレインキュベーションした。この複合体を、マイクロタイターウェルの表面に結合した検体と20時間反応させた。もしストレプトアビジンナノ粒子を、マイクロタイタープレートの表面に結合した複合体、すなわち表面捕捉抗体-検体-ビオチン化抗マウス抗体と反応させることができたのであれば、ホールらはこのようなアッセイの実用性を立証するのに失敗したであろう。

10

20

30

40

50

【0008】

より慣用的なアッセイ形式においては、検体インキュベーション工程のあと、標識化ストレプトアビジンなどの標識分子を添加する前に、洗浄工程が導入されている。洗浄工程は、ビオチン化抗体などのビオチン化生物特異的結合反応物が用いられるこのアッセイ形式において、きわめて重要である。なぜなら、遊離のビオチン化生物特異的結合反応物が溶液中で標識化されたストレプトアビジンと結合するからである。これは溶液中の遊離の標識分子の量を著しく変化させ、アッセイにおける主要な誤差原因となった。マイクロタイターウェル型アッセイシステムにおいて、ベナーらおよびホールらは、ストレプトアビジンナノ粒子を用いる彼らの研究において、ストレプトアビジンでコートされた追跡子粒子を添加する前に、洗浄工程を用いた(ホール エムら、Anal. Biochem. 1999, 272, 165-70; ベナー ティーアイら、Anal. Biochem. 1991, 198, 308-11)。ウルマンらは、ストレプトアビジンナノ粒子を洗浄することなく、あるアッセイにおいてナノ粒子を用いたが、これはヘテロジニアスアッセイとは異なって、洗浄工程を必要としないホモジニアスなLOCI(登録商標)アッセイ方式において実用化された(ウルマン イーエフら、Clin. Chem. 1996, 42, 1518-26)。

【0009】

解離が増強されたランタニド蛍光イムノアッセイ(DELFIA(登録商標))において、ランタニドイオンが、追跡子分子の標識化のために用いられるキレートから解離する。ランタニドイオンは、溶液中で新たな蛍光複合体を形成する(ヘミレ アイ(Hemmi lae I)ら、Anal Biochem. 1984; 137: 335-43)。ランタニドイオンがキレートから開放されない別の方法が、文献に記載されている(ムッカラ ブイ-エム(Mukkala V-M)ら、Helvetica Chim. Acta 1993, 76, 1361-78; ヘルメ エッチ(Haermae H)ら、Anal. Chim. Acta 2000, 410, 85-96)。これらアッセイ方式においては、検体が結合した、固有蛍光性キレート標識化抗体が、洗浄工程後に、その表面

で直接検出される。

【0010】

高感度アッセイがこれらの標識技術を用いて実施され得るが、これらは依然としてシグナルレベルが低いという難点がある。加えて、固有蛍光性キレートおよび一般的な全ての発蛍光団は、環境変化に対して著しく感受性である。環境の影響を低減する1つの手段は、測定条件を厳格に制御することである。一体型イムノアッセイの概念では、制御は、検出前にマイクロタイターウェルを乾燥することにより可能となる(レブグレン ティー (Loevgren T)ら、Clin. Chem. 1996, 42, 1196-201)。水が発光を消すことは知られており、したがって、乾燥はシグナルレベルを増大し、検出変動を減少させる。

10

【0011】

ナノサイズの粒子のコロイド安定性は、凝集していない粒子懸濁液を確保するために重要でない(グリフィン シー (Griffin C)ら、Microparticle Reagent Optimization, A Laboratory reference manual. Seradyn, Particle Technology. インディアナポリス, IN)。ラテックス粒子は、粒子間の疎水性相互作用と反発力欠如のために、容易に凝集することが知られている。凝集傾向を減じるために、粒子上に表面基が導入された。反発力を増すために最も有効な手段の1つは、表面にカルボン酸基を導入することである。これらの基は、中程度のpH領域で脱プロトン化すると、効果的に互いに反発する。凝集試験では、これらの官能基の数は、粒子の所望の凝集が簡単には生じないと

20

【0012】

先行技術で知られている発光の時間分解検出を用いる、近接ベースのホモジニアスアッセイは、たとえば、低分子化合物に適用される蛍光偏光アッセイ、酵素モニターイムノアッセイ(enzyme-monitored immunoassays)(シバ社(Syva Co.))、蛍光を減衰させまたは増強する様々なアッセイ(概説として、たとえば、ヘミレのApplications of Fluorescence in Immunoassays, Wiley, NY, 1991を参照)がある。シグナルを直接発生させる他の手段としては、アッセイ媒体中への放射粒子の短距離浸透および捕捉試薬でコートされた固体シンチレーター(Anal Biochem, (1987) 161, 494)に基づくシンチレーション近接原理(sintillation proximity principle)(アムシャム ファルマシア バイオテック(Amersham Pharmacia Biotech))、ならびに1重項酸素(singlet oxygen)の光増幅形成に基づくALPHAスクリーン(バイオシグナル パッカード(BioSignal Packard))技術があげられ、該1重項酸素は、光増幅剤を含有するナノ粒子から化学発光剤を含有する別のナノ粒子に移動して、遅延型発光放射を生じさせる(Clin. Chem, (1996) 42, 1518)。簡素化されたアッセイ技術の別のカテゴリーは、ホモジニアスアッセイと同じように、分離工程と洗浄工程とを避ける非分離アッセイである。この種の技術の典型的な例は、2光子励起と微粒子固相に基づく微量アッセイ技術(microvolume assay technology)である(Nat. Biotechnol., (2000), 18, 548)。また、他の類似の非分離アッセイ技術が存在している(概説として、たとえば、メサ(Mesa)のDrug Discovery Today, 2000, 1:38-41を参照)。

30

40

【0013】

今日までに公開された数多くのホモジニアスアッセイ設計(概説として、ウルマンの1999, J. Chem. Ed. 76:781-788を参照)にもかかわらず、汎用性

50

と感度が、良好な分離アッセイのそれらに匹敵するような方法はない。その理由は多様であり、たとえば、ヘテロジニアスアッセイに対して、ホモジニアスアッセイが最適化されなければならない異なる方法、低いアフィニティー非特異的結合の制御、および現存するほとんどのホモジニアスアッセイ技術の適用限界などに関連する。くわえて、従来のホモジニアスな蛍光光度アッセイは、試料中の様々な成分に由来するバックグラウンド干渉を非常に受けやすい。蛍光偏光アッセイは低いアフィニティー非特異的結合（たとえばアルブミンに結合するプローブ）および試料の自己蛍光により干渉される。

【0014】

時間分解 (TR) 蛍光光度分析 (マイクロ秒またはミリ秒範囲での時間領域における時間分解) は、ホモジニアスアッセイのための完全な測定方式である。なぜなら、有機化合物に由来するバックグラウンド蛍光を完全に区別できるからである。十分に長い遅延時間 (パルス化された励起と放射記録の開始のあいだの時間) が用いられる場合には、すべてのバックグラウンド干渉が除かれ得る (概説として、たとえば、ヘミレ (1991); グジン ディキンソン (Gudgin Dickinson) ら (1995) *J Phot Chem Photobiol* 27, 3 を参照)。分離を基礎とするアッセイに加えて、数々のホモジニアスな時間分解蛍光アッセイもまた記載され、特許を受けているが (マチス (Mathis) (1995) *Clin Chem*, 41, 1391; セルビン (Selvin) ら、(1994) *Proc Natl Acad Sci, USA*, 91, 10024、ヘミレら、(1996, 1999)、国際公開第98/15830号パンフレットおよび欧州特許出願公開第0973036号明細書)、それらには限界と欠点がある。

10

20

【0015】

開発された錯体化合物 (キレート) は、様々な型の多座配位錯体、すなわちキレートに関連している。様々な研究によると、これらは様々な名称が与えられているが、それらの全てが、キレート化されたランタノイドイオンおよび多座配位配位子に由来する有機金属錯体に基づいている。名称としては、超分子化合物 (supramolecular compounds)、錯体、キレート、コンプレクソン、クリプテート、クラウンエーテル錯体、カリキサレン (calixarenes)、混合配位子錯体などがあげられる。

【0016】

非常に多くの安定した蛍光キレートがあり、それらは特許および文献に記載されており、また時間分解 FRET アッセイで使用され得るものであり、このようなものとして、たとえば米国特許第4,761,481; 5,032,677; 5,055,578; 5,106,957; 5,116,989; 4,761,481; 4,801,722; 4,794,191; 4,637,988; 4,670,572; 4,837,169 および 4,859,777 号明細書で述べられているものがあげられる。好ましいキレートは、テルピリジン (terpyridine) (欧州特許出願公開第403593号明細書; 米国特許第5,324,825号明細書; 米国特許第5,202,423号明細書; 米国特許第5,316,909号明細書) または1もしくは2個の5員環 (たとえば、ピラゾール、チアゾール、トリアジン) を有するテルピリジン類似体 (欧州特許出願公開第077061041号明細書および国際公開第93/11433号パンフレット) などの非多座配位キレーティング配位子から構成される。非常に適したキレートはまた、つぎの論文に記載されている: タカロ (Takalo) ら、(1994) *Bioconjugate Chem*, 5, 278; ムッカラ (Mukkala) ら、(1993) *Helv Chim Acta*, 76, 1361; レムイナン (Remuinnan) ら、(1993) *J Chem Soc Perkin Trans*, 2, 1099; ムッカラら、(1996) *Helv Chim Acta*, 79, 295; タカロら、(1996) *Helv Chim Acta*, 79)。

30

40

【0017】

くわえて、蛍光キレートを含有する蛍光ラテックス粒子が、標識として記載されている (フランク (Frank) およびサンドベルグ (Sundberg)、1978年、米国特

50

許第4283382号明細書、1979年、米国特許第425313号明細書；シェファ- (Schaeffer)ら、1985年、米国特許第4735907号明細書、1987年、米国特許第4784912号明細書、ブルディック (Burdick) およびダニエルソン (Danielson)、1989年、米国特許第4801504号明細書、ならびに調製方法として、スットン (Sutton)ら、1992年、米国特許第5234841号明細書)。粒子内のポリマーは蛍光キレートを安定化し、またランタニド蛍光に対する環境的影響を防止する。この方法はまた、コンジュゲートできないか、またはそうでなければ望ましくないキレートを、標識として使用することを可能とする。蛍光ラテックスは、ランタニドキレートが高濃度では自己消光 (self quenching) をもたないので、該キレートを非常に高密度に詰め込むことができる。最も優れていると思われる発光特性を有するキレートを選択することにより、優れた蛍光特性も可能となる。アクセプターの放射波長での長寿命の蛍光バックグラウンドが相対的に増大し、利点が明らかに得られないため、FRETアッセイにおいて蛍光ラテックス粒子の適用は存在しない。同じ問題が蛍光ユーロピウムキレートを含有するリポソーム標識にも当てはまる (たとえば、ドナーとしてのユーロピウムリポソームおよびアクセプターとしてのアロフィコシアニン、オカバヤヒ (Okabayahi) およびイケウチ (Ikeuchi)、1998, Analyst 123:1329-1332を参照)。

10

【0018】

大きくて制御可能なストークシフト (Stoke's shift) を有し、共鳴エネルギー移動アクセプターに非常に適した、微粒子の蛍光化合物が発表された。ポリマーマトリックスに埋め込まれた多重蛍光化合物を用いることによる粒子中の分子内エネルギー移動により、所望のスペクトル特性を有する新規標識の製造が可能になる (ブエックラー (Buechler)ら、1998年、米国特許第5763189号明細書；シンガー (Singer) およびハウグランド (Haugland)、1996年、米国特許第5573909号明細書；ロバーツ (Roberts)ら、1998, J. Luminescence 79:225-231)。通常の赤外線発色団は、通常、低い溶解性を有しているが、可溶性の表面を有するポリマーマトリックスへの埋め込みにより、それらの使用が可能になるであろう。別のクラスの微粒子蛍光化合物、セミコンダクターナノクリスタル (semiconductor nanocrystals) (ブルチェズ (Bruchez)ら、1998, Science 281:2013-2015参照) は、放射波長を調整できるサイズを有し、放射ピークよりも短い波長で効率的に励起される。量子ドット (quantum dots) としても知られているこれらのナノクリスタルは、励起波長に関係なく、同じ特徴的な狭い、対称性の放射スペクトルを有し、放射波長は可視光から赤外線まで調整され得る (たとえば、ベイレイ (Bailey)、チャン (Chan) およびニー (Nie)、2000, Near-Infrared-Emitting nanocrystals as biological labels, Abstract, Pittcon 2000 Symposium: Emerging Nanotechnologies for Chemical Analysis 参照)。近赤外線放射は、生物学的マトリックスにおける比較的低いバックグラウンドと低い吸収のため、分析への適用に対してとくに有利である (たとえば、パトネイ (Patonay)ら、2000, Near infrared absorption and fluorescence spectroscopy in analytical chemistry: moving to longer wavelengths, Abstract, Pittcon 2000 参照)。量子ドットは、それらが高い発光性があり (1量子ドット = 20有機色素分子)、放射ピークよりも短い波長で励起され得るので、効率的なドナーとして使用されてきた (ジェイン (Jain)ら、2000, Semiconductor Quantum dots for ultrasensitive FRET, Abstract, Pittcon 2000 参照)。原則として、この現象は、もし量子ドットが時間分解なしに共鳴エネルギー移動においてアクセプターとして使用されるのであれば、重大な問題を引き起こす。

20

30

40

50

【0019】

長寿命ドナーと短寿命放射アクセプター分子のあいだの特定のエネルギー移動に基づく、時間分解ホモジニアスアッセイの原理は、図1に要約されている。複合体において、ドナーとアクセプター標識が近接している場合、短い光パルス(A)により励起されたドナーエネルギー(D)は、共鳴エネルギー移動によりアクセプターへ移動する。エネルギー移動で励起されたアクセプター放射(AE)は、光増幅管(photomultiplier tube)からのカウントが記録されない遅延時間(d)を適用することにより、光パルス(A)により直接励起されるアクセプター放射(B)と区別することができる。ドナーからの遅延放射(D)は、感作された(エネルギー移動で励起された)アクセプター放射(AE)とは異なった波長を有しており、そのことがスペクトルとシグナルの時間分離との組み合わせを可能にする。したがって、ホモジニアスパイオアフィニティーアッセイ(受容体-リガンド結合、ハイブリダイゼーション反応、免疫結合、酵素-基質結合など)において、ドナー-アクセプター対の会合または解離は、エネルギー移動で励起されたアクセプターからのシグナルの増加または減少をそれぞれ測定することにより、追跡することができる。

10

【0020】

[発明の目的と要約]

本発明の目的は、検体を測定するアッセイに有用なナノ粒子を提供することである。

【0021】

本発明の他の目的は、該ナノ粒子を用いて検体を測定するための改善されたアッセイを提供することである。

20

【0022】

本発明のさらに他の目的は、改善された近接ベースのホモジニアスアッセイを提供することである。

【0023】

しかして、本発明は、特異的結合反応物(specific binding reactant)を含むナノ粒子であって、該結合反応物にとって特異的な検体または複合体が含む該検体を測定するために有用であるナノ粒子を提供するものである。ナノ粒子はつぎの特性を有する：

30

- a) 該ナノ粒子の直径が200nm未満、好ましくは120nm未満である、
- b) 該ナノ粒子が多数の該特異的結合反応物でつぎの程度にコートされている、
- i) 該検体に対する該ナノ粒子の親和定数が、該検体に対する遊離の該結合反応物の親和定数を本質的に超え、および/もしくは
- ii) 該ナノ粒子と該検体とのあいだの会合速度定数が、遊離の該結合反応物と該検体とのあいだの会合速度定数を本質的に超える；ならびに
- c) 該ナノ粒子が検出可能な特徴を含む。

【0024】

本発明はさらに、特異的結合反応物を含むナノ粒子を使用するアッセイであって、該結合反応物にとって特異的な検体または複合体が含有する該検体を測定するためのアッセイを提供するものである。使用されるナノ粒子は、つぎの特性を有する：

40

- a) 該ナノ粒子の直径は200nm未満、好ましくは120nm未満である、
- b) 該ナノ粒子が、多数の該特異的結合反応物でつぎの程度にコートされている、
- i) 該検体に対する該ナノ粒子の親和定数が、該検体に対する遊離の該結合反応物の親和定数を本質的に超え、および/もしくは
- ii) 該ナノ粒子と該検体とのあいだの会合速度定数が、遊離の該結合反応物と該検体とのあいだの会合速度定数を本質的に超える；ならびに
- c) 該ナノ粒子が検出可能な特徴を含む。

【0025】

本発明はまた、エネルギー供与化合物(ドナー)で標識化された第1群およびエネルギー受容化合物(アクセプター)で標識された第2群からなる近接ベースのホモジニアスアッ

50

セイを提供するものであり、ここで

- ドナーは発光性であり、また長い励起状態寿命を有し、そしてアクセプターは発光性で、短いまたは長い励起状態寿命を有するか、またはアクセプターは非発光性であり、そして

- 両群のあいだの距離の短縮または延長からそれぞれ生じる、ドナーからアクセプターへのエネルギー移動の増加または減少が測定される。

【0026】

本アッセイの特徴は、ドナーがナノ粒子であることである。

【0027】

[詳細な説明および好ましい態様]

本出願に関連して、「ナノ粒子」という用語は、平均直径がナノメートル範囲にある、すなわち1 μmまでの平均直径を有するあらゆる粒子をさす。

【0028】

本出願に関連して、「特異的結合反応物」という用語は、言及される状況下で関連性がある化合物に対して特異的であると考えられ得るあらゆる反応物をさす。特異的結合反応物としては、たとえば、抗体、抗原、受容体リガンド、特異的結合タンパク質、プロテインA、プロテインG、アビジン、アビジン誘導体、ストレプトアビジン、ビオチン、DNA、RNA、LNA（ロックド核酸）およびPNA（ペプチド核酸）などの核酸、ペプチド、糖、ハプテン、ウイルス、バクテリアならびに細胞があげられる。

【0029】

本出願に関連して、「検出可能な特徴」という用語は、既知の方法により定性的にまたは定量的に、直接または間接的に検出できる「検出可能な特徴」からなる単体 (e n t i t y) をなすあらゆる特徴をさす。検出可能な特徴は、したがって、たとえば、発光標識などの標識である。

【0030】

「ヘテロジニアスアッセイ」という表現は、分離または洗浄工程を必要とするアッセイに関する。「ホモジニアスアッセイ」という表現は、分離または洗浄工程を必要としないアッセイに関する。

【0031】

「第1群」および「第2群」という用語は、バイオアフィニティー認識成分（群の間の距離が減少する反応において、たとえばバイオアフィニティー反応において）または分子もしくは基質の一部（たとえば、ペプチド分子の開裂により2つの標識された群が互いに分離される該ペプチド分子の遠心端 (d i s t a l e n d s)) などのあらゆる成分を含むと理解されるべきである。

【0032】

「ドナー」という用語は、可視光または赤外線波長で長い寿命放射をともなう微粒子状（直径400 nm以下、好ましくは50 nm未満）発光化合物として定義される。ドナーは、長い励起状態寿命を有する、たとえば無機蛍りん光体 (i n o r g a n i c p h o s p h o r) などのランタニド発光性ナノ粒子、あるいは、長い励起状態寿命を有する、たとえばランタニドキレートなどの、エネルギー供与ランタニド発光性化合物が埋め込まれたポリマー性ナノ粒子であり得る。これはまた、ランタニド蛍りん光体およびアップコンバーティング蛍りん光体 (u p c o n v e r t i n g p h o s p h o r s) を含む。

【0033】

「ランタニド」という用語は、可視光または近赤外線または赤外線の波長での発光放射および長い蛍光崩壊を有する発光性ランタニドイオンとして定義され、たとえば、ユーロピウム (I I I) 、テルビウム (I I I) 、サマリウム (I I I) 、ジスプロシウム (I I I) 、イッテルビウム (I I I) 、エルビウム (I I I) およびネオジウム (I I I) である。また、白金 (I I I) およびパラジウム (I I I) も、フォルフィリン (p h o r p h y r i n s) と複合体を形成すると、同様のスペクトル特性と時間特性 (t e m p o r a l p r o p e r t i e s) を有することは注目されるべきである。

10

20

30

40

50

【0034】

「キレート」という用語は、中心のイオンが単一のリガンド（多座配位リガンド）に対して少なくとも2つの配位結合で配位されている配位錯体として定義される。これらは異なる原則で命名されることができ、キレート、超分子化合物、錯体、コンプレクソンなどの名称が使用される。典型的なキレートのタイプとしては、大環状錯体（macrocylic complexes）、クラウンエーテル、クリプテート、カリキサレン、フォルフィリンなどがあげられる。

【0035】

ナノ粒子の好ましい大きさは、直径1～200nmの範囲である。使用されるナノ粒子は、ポリマー、金、銀、炭素、シリカ、CdSeまたはCdSなどの有機または無機の物質から製造され得る。

10

【0036】

ナノ粒子は、ナノ粒子の励起もしくは散乱により、または電氣的パルスもしくは化学反応により生じる光を放射し得る。たとえば特定の検体の発光（蛍光、時間分解蛍光、りん光、化学発光、生物発光）検出を用いる、イムノアッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイ、受容体-結合アッセイおよび細胞結合アッセイなどの特異的バイオアフィニティーアッセイに使用されるナノ粒子上の、生物特異的結合反応物のアフィニティーは、標識化された可溶性の単一の生物特異的結合反応物のアフィニティーを超える。ナノ粒子は、発光分子、または以下の発光分子もしくは発光放射に至る分子の1つ以上を用いることによりナノ粒子内もしくはナノ粒子の表面上で発光放射に至る分子を、1つ以上担持してもよく、担持していなくてもよい。

20

【0037】

時間分解蛍光標識、たとえば

Eu(III)、Tb(III)、Sm(III)、Dy(III)キレート、すなわちランタニドキレート、

PtおよびPdホルフィリン標識、

ランタニド蛍りん光体；

アップコンバーティング蛍光標識、たとえば

(Y・Yb・Er)₂O₃S

(Y・Yb・Tm)₂O₃S

30

急速崩壊蛍光標識、たとえば

フルオレセインおよびフルオレセイン誘導体、ローダミンおよびローダミン誘導体、

CdSおよびCdSeナノクリスタル、

緑色蛍光タンパク質および緑色蛍光タンパク質誘導体；

化学発光標識、たとえば

ジオキセタン誘導体、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ；および

生物発光標識

アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ

【0038】

生物特異的結合反応物は、次の手段の1つ以上によりナノ粒子に結合させる：

40

吸着、共有結合、グラフティング（grafting）、固相合成、または他の生物特異的反応物。好ましい方法は吸着および共有結合である。

【0039】

ナノ粒子は、任意に、その表面に1つ以上の官能基を含有する。そのような官能基としては、カルボキシル（COOH）、アミノ（NH₂、NHR、NR₁R₂、NR₁R₁）、アルデヒドまたはケトン（CHO、CO）、ヒドロキシル（OH）またはチオール（SH）があげられる。

【0040】

本発明は、いくつかの生物特異的結合反応物をナノ粒子上に導入することにより、同じ単一の可溶性生物特異的結合物のアフィニティーを超えるアフィニティーの生物特異的結合

50

反応物を用いて、生物特異的アッセイを可能にする。生物特異的結合反応物のアフィニティーが増大するにつれて、該生物特異的アッセイのキネティクスおよび感度が、可溶性の標識化した生物特異的結合反応物を用いる同様のアッセイに比べて、顕著に改善される。生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子は、ヘテロジニアスアッセイ方式においても、ホモジニアスアッセイ方式においても使用され得る。これらのアッセイは、非競合的であっても、競合的であってもよい。ナノ粒子を用いるアッセイは、各検体に対して特異的なナノ粒子により検出される２つ以上の検体を同時に測定するために使用され得る。

【 0 0 4 1 】

本発明にしたがったヘテロジニアスアッセイは、つぎの工程からなっている：

- a) 固相に結合した第 1 結合反応物（この反応物は検体の第 1 結合部位に対して特異的である）を、該検体を含有する試料と接触させる工程； 10
- b) 任意に該検体を該第 1 結合反応物と反応させる工程；
- c) 工程 a) で得られた組成物に、第 2 結合反応物（この反応物は該検体の第 2 結合部位に対して特異的である）を含むナノ粒子を添加する工程；
- d) 該ナノ粒子の第 2 結合反応物を、該固相に結合した第 1 結合反応物に結合した検体と反応させる工程；
- e) 該固相（この固相は、該ナノ粒子の第 2 結合反応物に結合した検体に結合した第 1 結合反応物に結合している）を洗浄して、本質的に該固相に生物特異的に結合していないナノ粒子をなくす工程；および
- f) 該検体の測定を可能とするために、該固相に結合したナノ粒子を検出する工程。 20

【 0 0 4 2 】

任意反応工程 b) が実施されなければ、工程 a) および c) は本質的に同時に実施される。

【 0 0 4 3 】

本発明にしたがった別のヘテロジニアスアッセイは、つぎの工程からなっている：

- a) 固相に結合した第 1 結合反応物（この反応物は検体の第 1 結合部位に対して特異的である）を、該検体を含有する試料と接触させる工程；
- b) 工程 a) で得られた組成物に、第 3 結合反応物に結合した第 2 結合反応物（この第 2 結合反応物は該検体の第 2 結合部位に対して特異的である）を添加する工程；
- c) 工程 b) で得られた組成物に、第 4 結合反応物（この反応物は該第 3 結合反応物に対して特異的である）を含むナノ粒子を添加する工程； 30
- d) 該ナノ粒子の第 4 結合反応物を、該固相に結合した第 1 結合反応物に結合した検体に結合した第 2 結合反応物に結合した第 3 結合反応物と反応させる工程；
- e) 該固相（この固相は、該ナノ粒子の第 4 結合反応物に結合した第 3 結合反応物に結合した第 2 結合反応物に結合した検体に結合した第 1 結合反応物に結合している）を洗浄して、本質的に該固相に生物特異的に結合していないナノ粒子をなくす工程；および
- f) 該検体の測定を可能とするために、該固相に結合したナノ粒子を検出する工程。

【 0 0 4 4 】

このアッセイで、第 2 および第 3 結合反応物は、１つの結合部位が検体に対して向けられており、他の結合部位がナノ粒子に結合した第 4 結合反応物に対して向けられている、２つの結合部位を有する同一の単体、たとえば抗体であり得る。 40

【 0 0 4 5 】

このアッセイで、第 3 結合反応物は好ましくはビオチンであり、第 4 結合反応物は好ましくはアビジンまたはストレプトアビジンである。あるいは、好ましい第 3 結合反応物は、アビジンまたはストレプトアビジンであり、好ましい第 4 結合反応物はビオチンであり得る。好ましい選択は、工程 c) で言及されている粒子であって、かつ本件出願の特許請求の範囲により規定されているナノ粒子であるけれども、前記 a) ~ f) からなるアッセイは、いかなるナノ粒子を用いても適用可能でありまた効率的であることにも留意すべきである。

【 0 0 4 6 】

本発明にしたがった、さらに別のヘテロジニアスで競合的なアッセイは、つぎの工程からなり得る：

- a) 固相に結合した第1結合反応物(この反応物は検体の第1結合部位に対して特異的である)を、該検体を含有する試料と接触させ、かつナノ粒子に結合した追加の該検体と接触させる工程；
- b) 該固相(この固相は、該ナノ粒子に結合した検体に結合した第1結合反応物に結合している)を洗浄して、本質的に該固相に結合していないナノ粒子をなくす工程；および
- c) 該検体の測定を可能とするために、該固相に結合したナノ粒子を検出する工程。

【0047】

本発明にしたがった、ヘテロジニアスで競合的な別のアッセイは、つぎの工程からなる：

- a) 固相に結合した第1結合反応物(この反応物は検体の第1結合部位に対して特異的である)を、該検体を含有する試料と接触させ、かつ第2結合反応物に結合した追加の該検体と接触させる工程；
- b) 工程a)で得られた組成物に、第3結合反応物(この反応物は該第2結合反応物に特異的である)を含むナノ粒子を添加する工程；
- c) 該ナノ粒子の第3結合反応物を、該固相に結合した第1結合反応物に結合した追加的検体に結合した第2結合反応物と反応させる工程；
- d) 該固相(この固相は、該ナノ粒子の第3結合反応物に結合した第2結合反応物に結合した検体に結合した第1結合反応物に結合している)を洗浄して、本質的に該固相に結合していないナノ粒子をなくす工程；および
- e) 該検体の測定を可能にするために、該固相に結合したナノ粒子を検出する工程。

10

20

【0048】

第1の非競合的でヘテロジニアスな方式において、検体は固相に添加される。洗浄工程後、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子は、固相表面に結合した検体と共にインキュベーションされる。最後の洗浄工程後、発光シグナルは、乾燥後またはシグナル増強後またはシグナル増幅後に、固相表面から直接読み取られる。

【0049】

第2の非競合的でヘテロジニアスな方式において、検体は、固相表面に結合した捕捉分子上で、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子と共に、一工程でインキュベーションされる。洗浄後、発光シグナルは、乾燥後、シグナル増強後またはシグナル増幅後に、固相表面から直接読み取られる。

30

【0050】

第3の非競合的でヘテロジニアスな方式において、検体は、固相表面に結合した捕捉分子上で、第3結合反応物に任意に結合した第2検体特異的結合反応物と一緒にまたは個別に、一または二工程でインキュベーションされる。

【0051】

洗浄工程後、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子は、固相表面に結合した検体と共にインキュベーションされる。さらなる洗浄工程後、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子は、固相表面に結合した検体と共にインキュベーションされる。最後の洗浄工程後、発光シグナルは、乾燥後、シグナル増強後またはシグナル増幅後に、固相表面から直接読み取られる。

40

【0052】

第4の非競合的でヘテロジニアスな方式において、検体は、固相表面に結合した捕捉分子上で、第3結合反応物に任意に結合した第2検体特異的結合反応物と一緒にまたは個別に、一または二工程でインキュベーションされる。検体インキュベーション後、洗浄工程は、第2検体特異的結合分子の数および反応におけるナノ粒子上の利用可能な生物特異的結合反応物の数のために、省略される。このようなアッセイにおいて、第2検体特異的結合分子の数は、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の表面上の生物特異的結合反応物の数を超えない。ナノ粒子に結合した生物特異的結合反応物が過剰の場合には、検体に結合していない第2検体特異的結合分子は、生物特異的結合反応物でコートされたナノ

50

粒子の反応前に、溶液中に存在する生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子と反応するかもしれないが、本アッセイは、溶液中に存在する遊離の第2検体特異的結合分子により、干渉されないことがわかった。最終の洗浄工程後、発光シグナルは、乾燥後、シグナル増強後またはシグナル増幅後に、固相表面から直接読み取られる。

【0053】

第5の非競合的ヘテロジニアスな方式において、検体は、固相表面に結合した捕捉分子上で、第3結合反応物に任意に結合した第2検体特異的結合反応物の2つ以上と一緒にまたは個別に、一または二工程でインキュベーションされる。2つ以上の第2検体特異的結合分子を用いると、該第2検体特異的結合分子または該生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の解離は減少し、偽似平衡状態が得られる。検体のインキュベーション後、固相を洗浄することができる。最終洗浄工程後、発光シグナルは、乾燥後、シグナル増強後またはシグナル増幅後に、固相表面から直接読み取られる。

10

【0054】

第3のアッセイ方式を利用する非競合的アッセイにおいては、該アッセイのダイナミックレンジ(dynamic range)は、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の数を基礎にして調整され得る。すなわち、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の数が多ければ多いほど、ダイナミックレンジは大きくなる。なぜならば、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の数が増加する場合は、アッセイの非特異的結合は増加しないからである。

【0055】

第2または第3の方式を用いる、好ましい非競合的ヘテロジニアスアッセイの設計概念において、第2生物特異的結合反応物分子の数は、第1のアッセイ方式においてナノ粒子上に生物特異的結合反応物を固定化するために用いられるよりも、少ない。第3、第4および第5のアッセイ設計概念は、アッセイで必要とされる第2生物特異的結合反応物の量を著しく減少させる。

20

【0056】

第2および第3のヘテロジニアスアッセイ方式において、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子のインキュベーション工程は、非平衡または平衡のいずれのときでも実施される。典型的な第2および第3のアッセイ方式においては、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子のインキュベーション工程は、非平衡のときならいつでも実施され、より典型的には2時間未満で、好ましくは1時間未満で実施される。

30

【0057】

第1の競合的ヘテロジニアスアッセイにおいて、検体は、競合する標識化検体誘導体と一緒に、または別々に、固相に添加される。標識は、たとえば、つぎのうちの1つである。

ビオチン、ストレプトアビジン、アビジンまたはアビジン誘導体、
抗体、プロテインA、プロテインGまたは抗原

【0058】

任意の洗浄工程ののち、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子は、固相表面に結合した標識化検体と一緒にインキュベーションされる。最後の洗浄工程ののち、発光シグナルは、固相表面から直接、または乾燥後またはシグナル増強後またはシグナル増幅後に、読み取られる。

40

【0059】

第2の競合的ヘテロジニアスアッセイ方式において、検体インキュベーション工程において競合する要素は、検体または検体誘導体分子(analyte derivative molecules)でコートされたナノ粒子である。このアッセイ方式において、ナノ粒子の表面上の競合する検体または検体誘導体分子の数は、制御することができ、これによりアッセイに対する制御が著しく改善される。

【0060】

前記で例示した本発明にしたがったアッセイにおいて、非任意的な反応工程は、典型的に

50

は、平衡になる前に本質的に中止される。この非任意的な反応工程の時間は、典型的には2時間未満、好ましくは1時間未満である。

【0061】

前記で例示した本発明にしたがったアッセイにおいて、固相は、典型的には本質的に平坦な表面、たとえばマイクロタイターウェルの表面、スライドの表面、粒子の表面または細片 (s t r i p) の表面である。

【0062】

前記で例示した本発明にしたがったアッセイにおいて、アッセイすべき個々の試料あたりにつき添加されるナノ粒子の量は、アッセイ量および粒子のサイズに依存する。

【0063】

しかして、本発明にしたがったヘテロジニアスアッセイは、検体およびビオチン化抗体もしくは抗マウス抗体などの第2生物特異的結合反応物をインキュベーションしたのち、該生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子を添加する前に、固相が洗浄されないアッセイを包含する。本発明にしたがったヘテロジニアスアッセイは、検体および固相上の第2生物特異的結合反応物が、非平衡状態または平衡状態のいずれのときでも、該生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子で追跡されるアッセイも包含する。

10

【0064】

本発明はまた、ドナー粒子からのエネルギーが、1つ以上のアクセプター分子に、または1つ以上のアクセプター分子を含有する1つ以上の粒子に移動するホモジニアスアッセイも包含する(該アクセプター分子は同一または異なるタイプである)。

20

【0065】

好ましいアクセプター分子は：

急速崩壊発蛍光団、たとえばAPC、Cy5、Cy7、NN-382、FluoSpheres

半導体材料、たとえばCdSeナノクリスタルズ(すなわち、量子ドット)

蛍光エネルギー移動錯体、たとえばTransFluoSpheres、Cy7-APC
タンデム色素、および

時間分解発蛍光団、たとえばイッテルビウムキレート、無機蛍りん光体。

【0066】

1つ以上の同一または異なるタイプのアクセプター分子が生物特異的結合反応物に結合され得る。

30

【0067】

1つ以上のタイプのアクセプター分子および1つ以上のタイプのアクセプター分子が、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の表面に結合されてもよく、または該生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の中に埋め込まれてもよい。

【0068】

アクセプター粒子の好ましいサイズは、直径が1nm~1mmの範囲である。

【0069】

好ましいヘテロジニアスアッセイ方式において、アッセイ性能の改善は、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の一価アフィニティー (m o n o - v a l e n t a f f i n i t y) を用いて達成される。本アッセイにおいて、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の一価アフィニティーは、可溶性の生物特異的結合反応物の一価アフィニティーを超える。これは、ナノ粒子の表面上の生物特異的結合反応物の結合部位の数を増加させることにより達成される。このアフィニティーの改善は、主として会合速度の増加から、また部分的に生化学的検体の解離速度の減少から生じていることが立証された。会合速度は、ほぼ直線的に増加することが示された。一価の検体分子に加えて、細胞全体 (w h o l e c e l l s) 、細菌、ウイルスおよび多量体タンパク質などの複数の結合部位を有する検体は、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子標識の使用によって利益を得る。なぜなら、該生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子のアフィニティーは、複数の結合部位を有する検体の表面における複数結合部位に対して、より高いからである

40

50

。アフィニティーの改善は、主に解離速度の減少から、また部分的には会合速度の向上から生じる。

【0070】

非競合的なまた競合的なアッセイ形式において、検体に特異的な捕捉分子は、固相の表面に直接的にまたは間接的に固定化される。

【0071】

本アッセイシステムは、単一のナノ粒子または凝集したナノ粒子のいずれを用いても、十分に機能する。凝集していないナノ粒子が好ましい。

【0072】

ホモジニアスアッセイにおいて、検体は、第1生物特異的結合反応物でコートされたドナーナノ粒子、および第2生物特異的結合反応物に結合したアクセプター分子、もしくは第2生物特異的結合反応物でコートされ、アクセプター分子を含む粒子と一緒にインキュベーションされる。発光シグナルは溶液から直接読み取られる。

10

【0073】

好ましいホモジニアスアッセイ形式において、アッセイ性能の改善は、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の一価アフィニティーを用いて達成される。本アッセイにおいて、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の一価アフィニティーは、可溶性の生物特異的結合反応物の一価アフィニティーを超える。これは、ナノ粒子の表面における生物特異的結合反応物の結合部位の数を増加させることにより達成される。

【0074】

本発明はまた、発光の時間分解検出を利用する、近接ベースのホモジニアスアッセイの改善に関する。具体的な改善は、ナノ粒子ドナーの特異的活性の向上、エネルギー吸収（励起）と発光放射との大きなスペクトル分離を有するアクセプター化合物を用いることによる、アクセプターの放射波長における長寿命の発光バックグラウンドの減少、ならびにナノ粒子でラベル化した生物特異的結合反応物の向上した会合速度定数および親和定数の利用に関する。会合と解離、すなわち標識間距離の短縮と延長が引き続いて起きるアッセイにおいて、長寿命ナノ粒子ドナーの高い特異的活性およびアクセプターの大きなストークシフトの組み合わせは、発光の時間分解検出を用いる、以前に記載されたホモジニアス方法で見込まれるよりも、より少ない数の複合体の検出を可能にする。

20

【0075】

すべての先行技術の方法においてドナーが選択されていた方法とは反対に、本発明で使用されるドナーは、共鳴エネルギー移転ドナーである、高い特異的活性を有する粒状化合物を含有する光放射ランタニドであって、そこではアクセプターは、該アクセプターの放射波長においてドナーからの長寿命蛍光バックグラウンド全てを実質的に避けるために、エネルギー吸収とエネルギー放射との間に非常に広いストークシフトをもつものが選択される。改善された近接ベースのホモジニアスな時間分解発光アッセイは、長い励起状態寿命を有するエネルギー供与発光性ナノ粒子（ドナー）または長い励起状態寿命を有するエネルギー供与発光性化合物が埋め込まれたナノ粒子（ドナー）で標識化された1つの群、および短いもしくは長い励起状態寿命を有するエネルギー受容発光性化合物（アクセプター）で標識化されているかまたは非発光性化合物で標識化されたもう1つ別の群とからなる

30

40

【0076】

本発明の特徴は、本改善のために、少量のアッセイされる群または活性の存在にตอบสนองして、前記両群間の距離の短縮または延長それぞれから生じる、ドナーからアクセプターへのエネルギー移動の増加または減少の検出が可能になることである。アクセプターは典型的には発光性であり、そのアクセプターの発光は、ドナーが発光を有しないかまたは本質的に発光を有しない波長で、すなわちドナーの発光がバックグラウンド発光に比べて有意でない波長で、好適に測定される。

【0077】

ランタニド類は、放射において様々な遷移を生じる幾つかの基底状態を有する。放射が鋭

50

くかつ充分特徴づけられているという事実にかかわらず、アクセプターが測定される波長ではマイナーなバックグラウンドが常に存在する傾向にある。しかしながら、相対的なバックグラウンドは長波長では問題が少なく、たとえばEuに関しては、Euが700および800nmの間では非常にマイナーなバックグラウンドを有しているが、800nmを超える波長ではいかなる直接的な放射も出さないという領域がある。Tbに関しては、波長範囲の延長により、700nmを超える波長で放射するアクセプターを使用し得る可能性が生じており、そこでは、Tbがいかなるバックグラウンドをも生じない。重複しない波長領域を選択することにより、長寿命の蛍光バックグラウンドは低いので、感度および時間分解蛍光エネルギー移動のダイナミックレンジを改善することができる。ドナーは、エネルギー移動ののちに検出可能なアクセプター放射を生じるだけの高い特異的活性を有していなければならず、たとえば蛍光キレートなどの従来の時間分解発蛍光団を用いても、感度の改善は達成されないかもしれない。

10

【0078】

会合が測定され、また発光性で短い崩壊時間のアクセプターおよび長い崩壊時間のドナーが使用されるアッセイにおいて、アクセプターの直接発光の干渉（アクセプターの直接励起からの放射）を避けるために、アクセプター分子の放射につづき、崩壊時間、すなわち時間分解蛍光光度法を用いる。アクセプター分子が過剰にあり（時間分解モードでは、それらの干渉は無視できる）、かつドナーとアクセプターとのあいだのエネルギー移動がシグナルの増強を生じ得るような方法で、本アッセイを構築するのが好ましい。

【0079】

エネルギー移動をベースとするアッセイの感度は、得られるシグナルの強度レベルと全バックグラウンドの両方に依存する。特定のアッセイにおけるシグナルレベルは、錯体において使用されるキレート、励起状態の全個体数および持続時間に依存する。励起状態の個体数は、キレートの発光特性、すなわちモル吸収性（molar absorptivity）（e）、量子収量（quantum yield）（f）および崩壊時間（t）の一次関数である。したがって、好ましいドナーは、非常に高い発光収量（先行文献、国際公開第98/15830号パンフレットにとくに記載されているよりも著しく高い）および長い励起状態寿命（好ましくは1msより長い）を有していなければならない。

20

【0080】

会合アッセイのための好ましいアクセプター分子は、高い発光性（できる限り1ユニットに近い量子収量を有する）を有し、ドナー放射波長で高いモル吸収係数（好ましくは、10000より大きい）を有するものである。アクセプターは高い量子収量を有し、使用されるランタニドが無視し得るバックグラウンドを有する波長で、光を放射することが重要である。

30

【0081】

アッセイ混合物中に希釈された試料の吸収を追跡すると同時に、試料吸収による励起もしくは放射の消失にしたがって放射の読み取りを補正することによって、試料が引き起こし得る励起消失を、装置が自動的に補正するのが好ましい。

【0082】

本発明は、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子を用いるアッセイ能力の改善に関する。具体的な改善は、会合速度の増大、したがって生物特異的結合反応物のアフィニティーの増大に関し、このとき、複数の生物特異的結合反応物がナノ粒子上にコートされて、結合部位の数が増大する。くわえて、具体的な改善は、生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子を用いて生物特異的アッセイを実施する手段に関する。

40

【0083】

本発明にしたがったアッセイの利点は、つぎの通りである。

【0084】

可溶性の特異的結合反応物のアフィニティーが、十分な量の前記特異的結合反応物をナノ粒子上に導入することにより、著しく改善される。

【0085】

50

特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の会合速度が、可溶性の特異的結合反応物の会合速度に匹敵するかまたはそれを越える。

【0086】

特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の解離速度が、可溶性の特異的結合反応物の解離速度より低い。

【0087】

ナノ粒子が、多量の発光標識を含有し、非常に高い特異的活性を有する。

【0088】

急速に崩壊する発蛍光団とは反対に、ナノ粒子内の時間分解蛍光標識は、非常に高濃度でも減衰効果 (quenching effect) を有しない。

10

【0089】

ナノ粒子は、水、消光剤または酸素により引き起こされる環境的影響に対して、非常に非感受性である。

【0090】

ナノ粒子は、前記環境的影響を取り除かなくても、表面上で直接検出され得る。

【0091】

ナノ粒子は、非常に感度のよい生物特異的アッセイを可能にする。

【0092】

ナノ粒子は、単一分子を検出するのに使用し得る。

【0093】

検体および第2生物特異的結合反応物が、第3生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子を添加する前に、第1の固相表面結合キャプチャー生物特異的結合反応物と反応するアッセイでは、より少ない第2生物特異的結合反応物がアッセイで使用され、ナノ粒子ベースのアッセイで必要とされる第2生物特異的結合反応物の量を著しく減少させる。

20

【0094】

検体および第1生物特異的結合反応物が、第2生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子を添加する前に、固相表面結合キャプチャー生物特異的結合反応物と反応する場合には、第2生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の非常に迅速な、すなわち5分未満のインキュベーション工程が使用され得る。

【0095】

検体および第1生物特異的結合反応物が、第2生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子を添加する前に、固相表面結合キャプチャー生物特異的結合反応物と反応するアッセイにおいて、該アッセイのダイナミックレンジは、第2生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の固相表面への非特異的結合に影響することなく、第2生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の量に基づいて調整され得る。

30

【0096】

ナノ粒子はサイズが小さく、したがって容易に沈降しない。

【0097】

ナノ粒子はその表面に官能基を含有することができ、該官能基を介して特異的結合反応物がナノ粒子上で共有結合で結合し得る。

40

【0098】

特異的結合反応物でコートされたナノ粒子は、標識のためには潜在的に優れた解決策である。なぜならば、従来 of 標識化 (一般に、分子当たり5個より多い標識) タンパク質は、タンパク質の結合アフィニティーおよび非特異的結合に著しく干渉するが、大きな表面面積のために、結合部位の実質的な数が検体の結合に利用されることが保証されているナノ粒子ベースの標識の場合には、そうではないからである。この影響はとくに、位置特異的にバイオチン化された抗体フラグメントなどの第3特異的結合反応物を用いることにより、最小限にされる。

【0099】

固相表面が、コーティング処理前に変性工程または部分的変性工程を用いることなく抗体

50

でコートされる場合は、該生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子の、コートされた固相表面への非特異的結合は、著しく減少される。

【0100】

抗体のより小さいフラグメントがナノ粒子上にコートされる場合には、結合部位数は増加し、トレーサー分子のアフィニティーはさらに改善され得る。

【0101】

アッセイにおける生物特異的結合反応物の量は、より多くの生物特異的結合反応物をナノ粒子上にコーティングすることにより増大させ得るが、標識分子の数は、標識された可溶性の生物特異的結合反応物が用いられる典型的な先行技術の生物特異的アッセイとは反対に、同じままである。なぜならば、先行技術では、標識された可溶性の生物特異的結合反応物の数を増加させることにより、標識の数量もそれにしたがって増加するからである。

10

【0102】

ナノ粒子は、ホモジニアスアッセイでドナー分子として使用され得る。

【0103】

ドナーたるナノ粒子は、エネルギー移動方法において使用されるとき、通常、高いバックグラウンドシグナルを生じる。これは、適当なアクセプター分子またはアクセプター分子を含む粒子を用いて十分なエネルギーを移動させることにより回避することができる。

【0104】

非常に広い吸収スペクトルのために、急速に崩壊する色素が使用されるときには、量子ドットはアクセプター分子としては適当でない。その理由は、量子ドットがドナー分子と同時に励起されて、特異的なエネルギー移動が起きないからであり、これに対して、非常に長い励起状態寿命を有するドナー色素を用いると、アクセプター量子ドットへの特異的なエネルギー移動が検出され得る。

20

【0105】

標識としてのナノ粒子は、標識分子のサイズを制御するための利点を与え、したがって、ストレプトアビジン - チログロブリンをベースとする標識などのコンジュゲートされた分子とは反対に、使用される標識成分を均質にする。

【0106】

ストレプトアビジンでコートされたナノ粒子がアッセイに使用されるとき、標識分子（ナノ粒子）の数が遊離のビオチン化生物特異的結合反応物により影響を受けないので、洗浄工程を必要としない。遊離のビオチン化生物特異的結合反応物はストレプトアビジンでコートされたナノ粒子に結合するけれども、利用できるストレプトアビジン結合部位の数が多いため、アッセイ能力の不利益な喪失なしにアッセイを実施することが依然可能である。

30

【0107】

アミノ基を介したタンパク質の標識化は、一般に、タンパク質当たりの標識の数を制御できない状態に導く不規則過程 (random process) である。ディアマンディスらにより立証されているように、分子当たりの標識の数を増加させる方策においては、不規則性という同じ問題に遭遇する (ディアマンディス イーピー、Clin Chem 1991, 37, 1486-91)。しかしながら、標識化の程度は、発蛍光団を粒子中に埋め込むときには、より容易に制御される。

40

【0108】

ナノ粒子上のタンパク質の数は、アッセイでトレーサー分子として最も好ましくふるまうナノ粒子を取得するために、制御されるべきである。より大きなタンパク質 / 標識 - 複合体を形成する場合には、タンパク質と標識との同時制御は非常に難しい。しかしながら、ナノ粒子を用いると、タンパク質の数および標識の量を制御することができる。さらに、COOHなどの表面 - 活性基 (surface - active groups) が存在する場合、タンパク質の数の制御は、ナノ粒子の表面上の活性化された部位を制御することによりなし得る。限られた数の表面基のみを活性化することにより、より多くの反発的な基 (repulsive groups) が表面上に残されて、粒子のゼータ電位が上昇

50

し、したがって、非特異的結合も減少する。

【0109】

実験の部

ナノ粒子 - 抗体およびナノ粒子 - ストレプトアビジンのバイオコンジュゲート

モノクローナル抗体、Mab5A10またはストレプトアビジンを、2段階EDAC(N - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N - エチルカルボジイミド、フルカ(Fluka)、ブッチス(Buchs)、スイス)およびスルホ - NHS(N - ヒドロキシスルホスクシンイミド、フルカ、ブッチス、スイス)カップリング化学を使用し、主として第1級アミン基により、活性化されたナノ粒子に共有結合させた。ナノ粒子を、500kDポリエーテルスルホン限外ろ過膜(ミリポア(Millipore)、ベドフォード(Bedford)、MA)を備えたAmicon限外ろ過攪拌セル(ミリポア)を使用して、25mmol l⁻¹リン酸緩衝液、pH7.0であらかじめ洗浄し、Labsonic U(ビー ブラウン(B. Braun)、メルスungen(Melsungen)、ドイツ)チップ ソニケーター(10秒、80W電力レベル)を用いてリン酸緩衝液に再懸濁した。2mmol l⁻¹EDACおよび100mmol l⁻¹スルホ - NHSを含有するリン酸緩衝液中、15分間、ナノ粒子をインキュベーションして、カルボキシル基を活性化した。活性化されたナノ粒子を25mmol l⁻¹炭酸緩衝液、pH8.5で洗浄し、Mab5A10またはストレプトアビジンを含有する炭酸緩衝液に混合した。カップリング反応におけるナノ粒子の濃度は、0.4w/v%であった。Mab5A10の濃度は5~0.078g l⁻¹で変化させ、ストレプトアビジン濃度は0.9 mg l⁻¹であった。カップリング反応はゆっくりと振とうしながら2時間インキュベーションし、そのうち、1%ウシ血清アルブミンを添加し、15分間残存する活性基をブロッキングした。ナノ粒子 - 抗体バイオコンジュゲートを、0.01%Tween40および50mmol l⁻¹サリチル酸を含有する2mmol l⁻¹Tris - HCl、pH8.0で6回洗浄し、最後に0.1%ゼラチンおよび0.1%Tween85をさらに含有する同緩衝液に再懸濁した。懸濁液を2500gで5分間、2回遠心分離して非コロイド凝集体を単分散懸濁液から分離し、+4 で保存した。

【0110】

結合部位数

Tb(III) - N1 - ITCで標識化したPSA(前立腺特異抗原)を用い、粒子と結合した標識化PSAからのテルビウム(III)蛍光とナノ粒子からのユーロピウム(III)蛍光との間の比率を測定することにより、単一のナノ粒子 - 抗体バイオコンジュゲート上で共有結合で結合しているMab5A10の活性結合部位の数を決定した。ナノ粒子(6・10¹⁰psc ml⁻¹)を、3.3mg l⁻¹ Tb(III) - N1 - ITC標識化PSA、0.0005w/v%ミルクパウダーおよび0.005w/v%Tween85を含有するアッセイ緩衝液(パーキンエルマー ライフ サイエンス(Parkinson Elmer Life Sciences)、ワラック オイ(Wallac Oy)、ツルク(Turku)、フィンランド)中で、ゆっくり振とうしながら、1時間インキュベーションした。セファロース6B(ファルマシア アマシャム(Pharmacia Amer sham)、ウプサラ(Uppsala)、スウェーデン)マトリックスならびに、0.9% NaClおよび0.01% Tween20を含有する10mmol l⁻¹ Tris - HCl緩衝液、pH7.8を用いて、サイズ排除クロマトグラフィーにより、非結合標識化PSAからナノ粒子および粒子結合標識化PSAを分離した。ナノ粒子 - 抗体バイオコンジュゲート画分をDELFA(登録商標)増強溶液で希釈し、ユーロピウム(III)蛍光を、ナノ粒子標準と比較してナノ粒子濃度を計算した。同じ画分からのテルビウム(III)蛍光とテルビウム(III)標準溶液からのそれを、DELFA(登録商標)増強溶液と共に追加のインキュベーションをしたのちに測定し、そして活性結合部位の数を、PSAの標識化度合いで割ったナノ粒子あたりのテルビウム(III)イオンの数から計算した。標識化したPSAの非特異的結合は、ウシ血清アルブミンでブロッキングした、コートされていないナノ粒子を用いて制御した。ユーロピ

ウム (I I I) 蛍光およびテルビウム (I I I) 蛍光の両者を、時間分解モードの V i c t o r ^{T M} 1 4 2 0 を用いて、狭い放射開口 (n a r r o w e m i s s i o n a p e r t u r e) をもつ 6 1 3 n m、および 5 4 5 n m でそれぞれ測定した。

【 0 1 1 1 】

単一のナノ粒子上のストレプトアビジン分子の数を、部位特異的にビオチン化した F a b - 5 A 1 0 フラグメントおよび T b (I I I) - N 1 - I T C 標識化 P S A を用いて決定した。ナノ粒子 (3 3 p m o l l ⁻¹) を、 3 3 n m o l l ⁻¹ のビオチン化 F a b - 5 A 1 0 および 1 5 0 n m o l l ⁻¹ の T b (I I I) - N 1 - I T C 標識化 P S A と共に、 1 0 0 μ l のアッセイ緩衝液中で、 1 時間室温でインキュベーションした。その後、ナノ粒子を非結合の T b (I I I) - N 1 - I T C 標識化 P S A から分離し、前記したように M a b 5 A 1 0 に関して測定した。結局、ストレプトアビジン分子の数は、 1 つの T b - P S A が 1 つの F a b - 5 A 1 0 フラグメントと反応し、これがさらに 1 つのストレプトアビジン分子に対応したと仮定して計算した。

10

【 0 1 1 2 】

M a b - 5 A 1 0 のビオチン化

M a b - 5 A 1 0 (4 0 0 m g l ⁻¹) を、 5 0 m m o l l ⁻¹ 炭酸緩衝液、 p H 9 . 8 中、 3 5 0 m m o l l ⁻¹ のビオチン - P E G - C O 2 - N H S (シェアーウォーター ポリマーズ (S h e a r w a t e r P o l y m e r s)、ハンツビレ (H u n t s v i l l e)、A L) を用いて、室温、 2 時間、ビオチン化した。ビオチン化された M a b を、 N A P - 5 および N A P - 1 0 カラム (フアルマシア アマシャム バイオテク (P h a r m a c i a A m e r s h a m B i o t e c h)) を用いて、結合していないビオチン試薬から精製した。溶出は、 1 5 0 m m o l l ⁻¹ の N a C l を含有する 5 0 m m o l l ⁻¹ T r i s 緩衝液、 p H 7 を用いて、実施した。

20

【 0 1 1 3 】

実施例

表 1 は、 E u ^{3 +} の発光遷移 (l u m i n e s c e n c e t r a n s i t i o n s) を示す。励起状態 ⁵ D₁ はリガンドからイオンへのエネルギー移動に関与し、 ⁵ D₀ は主たる放射レベルである。 ⁵ D₁ からの直接遷移は、短寿命でありかつかなり弱い。ランタニドイオンは、放射に種々の遷移をもたらすいくつかの基底状態を有する。放射が鋭くかつ十分に特徴づけられているという事実にもかかわらず、アクセプターが測定される波長でマイナーな相対的バックグラウンド放射が存在する傾向が常にある。 E u ^{3 +} イオンは 7 1 0 n m を超える波長では非常に弱い放射を有し、 8 2 0 n m を超える波長では、検出可能な発光放射を有さない。 T b ^{3 +} イオンの場合は、 7 0 0 n m を超える波長では発光放射は存在しない。

30

【 0 1 1 4 】

表 2 は、ナノ粒子 - 抗体バイオコンジュゲートの結合部位の数の増大により、会合速度定数とともに親和定数が増大する例を示している。この実施例では、結合部位の数が 1 2 から 1 9 に増加するとき、その親和定数が標識化された抗体の親和定数を超えるのに対し、会合速度定数は、結合部位の数が 4 6 から 7 6 へ増加するとき、標識化された抗体の会合速度定数を超える。

40

【 0 1 1 5 】

【表 1】

表 1

ユーロピウム (III) 発光遷移

遷移	放射波長 (nm)	相対強度
$^5D_1 \rightarrow ^7F_0$	526	非常に弱い
$^5D_1 \rightarrow ^7F_1$	537	非常に弱い
$^5D_1 \rightarrow ^7F_2$	558-560	非常に弱い
$^5D_0 \rightarrow ^7F_0$	578-580	弱い
$^5D_0 \rightarrow ^7F_1$	585-600	強い
$^5D_0 \rightarrow ^7F_2$	610-630	最も強い
$^5D_0 \rightarrow ^7F_3$	645-660	弱い
$^5D_0 \rightarrow ^7F_4$	680-705	中程度
$^5D_0 \rightarrow ^7F_5$	751	非常に弱い
$^5D_0 \rightarrow ^7F_6$	815	非常に弱い

10

20

【 0 1 1 6 】

【 表 2 】

表 2

標識化合物のアフィニティーおよび反応速度定数				
標識化合物	1価親和定数 $K_a (M^{-1} / 1E9)^a$	会合速度定数 $k_a (M^{-1} s^{-1} / 1E5)^{a,c}$	解離速度定数 $k_d (s^{-1} / 1E-5)^a$	親和定数 $K_d (M^{-1} / 1E9)^b$
Eu(III)-N1-ITC 標識化抗体				
Mab5A10	6.6 ± 0.3	12.6 ± 0.7	17.6 ± 0.8	7.2
ナノ粒子-抗体バイオコンジュゲートの結合部位の数				
130	53.8 ± 7.9	24.8 ± 1.6	3.7 ± 0.9	67.8
76	35.1 ± 5.7	15.3 ± 0.9	3.9 ± 1.5	39.4
46	22.6 ± 3.0	11.8 ± 0.6	4.5 ± 1.4	25.9
30	13.3 ± 1.7	8.3 ± 0.3	6.0 ± 1.3	13.9
19	9.3 ± 0.7	6.1 ± 0.3	6.1 ± 1.4	10.0
12	4.1 ± 0.9	4.1 ± 0.1	5.3 ± 1.0	7.8
8	1.6 ± 0.5	2.8 ± 0.1	6.9 ± 0.9	4.0

a 平均±SD

b 反応速度定数から計算された親和定数

c Mab5A10の $k_d = 2E-4 s^{-1}$ およびナノ粒子-抗体バイオコンジュゲートの $8E-5 s^{-1}$ を用いて計算された会合速度定数

10

20

30

40

【0117】

図2～14は本発明にしたがったアッセイを例示すると共に、これらアッセイの特徴を示す。

【0118】

図2は、検体および第2生物特異的結合反応物が第1の固相表面結合キャプチャー生物特異的結合反応物と反応し、その後第3生物特異的結合反応物でコートされたナノ粒子が第2生物特異的結合反応物と反応するアッセイ反応のシミュレーションを示す：見かけ上の曲線

【外1】

(■)

、ナノ粒子と第2生物特異的結合反応物との会合

【外2】

(▲)

および表面に結合した検体からの第2生物特異的結合反応物の解離()。

【0119】

図3は、PSA ($5 \mu\text{l}$ 、 $1 \mu\text{g l}^{-1}$) およびビオチン化抗PSA抗体5A10 (0.6 nmol l^{-1}) を、全量 $30 \mu\text{l}$ 中、マイクロタイターウェルの表面に結合した抗PSA抗体H117と15分間反応させ、その後、ストレプトアビジンでコートされたナノ粒子を全量 $40 \mu\text{l}$ 中、ビオチン化抗PSA抗体5A10と反応させたPSAアッセイの反応速度曲線 (kinetic curve) を示す。曲線は、表面に捕捉された抗PSA抗体H117に結合した検体に結合したビオチン化抗PSA 5A10抗体とストレプトアビジンでコートされたナノ粒子との時間依存的反応を表わす。ストレプトアビジンでコートされたナノ粒子の数は変動した：反応あたり、

10

【外3】

$3.5 \cdot 10^8$ (▲)、 $5 \cdot 10^8$ (●)、 $1 \cdot 10^9$ (■) および $3 \cdot 10^9$ (▼)

ナノ粒子。Victor 1420 (パーキン エルマー ライフ サイエンス、ワラック オイ) 時間分解蛍光光度計を用いて、マイクロタイターウェルの表面上でPSAを直接検出した。

20

【0120】

図4は、PSA ($5 \mu\text{l}$) およびビオチン化抗PSA抗体 (0.6 nmol l^{-1}) を、全量 $30 \mu\text{l}$ 中で、マイクロタイターウェルの表面に結合した抗PSA抗体と15分間反応させ、その後、洗浄工程ののち、ストレプトアビジンでコートされた $3 \cdot 10^9$ Eu (III) - 標識化ナノ粒子

【外4】

(■)

30

または $5 \cdot 10^{11}$ の Eu (III) 標識化ストレプトアビジン (Eu (III) - N1 - ITCキレート、パーキン エルマー ライフ サイエンス、ワラック オイ)

【外5】

(▲)

をビオチン化抗PSA抗体と、あるいは洗浄工程なしで、ストレプトアビジンでコートされた $3 \cdot 10^9$ Eu (III) - 標識化ナノ粒子()をビオチン化抗体PSA抗体と、全量 $40 \mu\text{l}$ 中、5分間反応させたPSAアッセイの検量線を示す。Eu (III) 標識化ストレプトアビジンのインキュベーション後、Eu (III) イオンをキレートから市販の増強溶液 (パーキン エルマー ライフ サイエンス、ワラック オイ) へと解離させた。Victor 1420 (パーキン エルマー ライフ サイエンス、ワラック オイ) 時間分解蛍光光度計を用いて、マイクロタイターウェルの表面上でPSA結合ストレプトアビジンナノ粒子を直接検出し、また溶液中PSA結合Eu (III) 標識化ストレプトアビジンを検出した。

40

【0121】

図5は、PSA ($5 \mu\text{l}$) およびビオチン化抗PSA抗体 (0.6 nmol l^{-1}) を、マイクロタイターウェルの表面に結合した抗PSA抗体と、全量 $30 \mu\text{l}$ 中で15分間反応させ、その後、ストレプトアビジンでコートされたEu (III) 標識化ナノ粒子をビオチン化抗PSA抗体と全量 $40 \mu\text{l}$ 中6分間反応させたPSAアッセイの検量線を示す。ストレプトアビジンでコートされたナノ粒子の数は変動した：反応につき、

50

【外 6】

 $5 \cdot 10^8$ (●)、 $1 \cdot 10^9$ (▲)、 $3 \cdot 10^9$ (○) および $6 \cdot 10^9$ (■)

ナノ粒子。Victor 1420 (パーキン エルマー ライフ サイエンス、ワラック オイ) 時間分解蛍光光度計を用いて、マイクロタイターウェルの表面上で P S A 結合ストレプトアビジンナノ粒子を直接検出した。

【0122】

図6は、ビオチン化抗 P S A 抗体 (0.6 nmol l^{-1}) を、マイクロタイターウェルの表面に結合した抗 P S A 抗体と、全量 $30 \mu\text{l}$ 中、10 分間、非特異的に反応させ、その後、ストレプトアビジンでコートされた Eu (III) 標識化ナノ粒子をビオチン化抗 P S A 抗体およびマイクロタイターウェルの表面に結合した P S A 抗 P S A 抗体と、全量 $40 \mu\text{l}$ 中、10 分間非特異的に反応させたアッセイにおいて、ストレプトアビジンナノ粒子の数に対する P S A ($5 \mu\text{l}$) のゼロ濃度レベルシグナル (zero concentration level signals) を示す。Victor 1420 (パーキン エルマー ライフ サイエンス、ワラック オイ) 時間分解蛍光光度計を用いて、マイクロタイターウェルの表面上でストレプトアビジンナノ粒子を直接検出した。

【0123】

図7は、Eu (III) 標識化抗 P S A 抗体 (星印) ならびに 130 個 (四角形)、76 個 (丸)、46 個 (上向き三角形)、30 個 (下向き三角形)、19 個 (ひし形)、12 個 (左向き三角形) および 8 個 (右向き三角形) の活性結合部位を有する Eu (III) 標識化ナノ粒子 - 抗体バイオコンジュゲートの会合速度定数の測定を示す。実線は、定数 $k_d = 8 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ を用いるバイオコンジュゲートに関するあてはめ曲線 (fitted curve) であり、一点破線は最初の 4 つのデータ点と $k_d = 2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ に基づく抗体に関するものである。ナノ粒子 - 抗体バイオコンジュゲートまたは標識化抗体のほんの数パーセントだけが結合するように検体分子の数を調節して、遊離のバイオコンジュゲートおよび抗体の濃度に対する固定値を与える。最初に、 $5 \mu\text{l}$ のブランクまたは遊離 P S A 標準品 (バイオコンジュゲートに対しては $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ 、抗体に対しては $2.5 \mu\text{g l}^{-1}$) および $25 \mu\text{l}$ / ウェルのアッセイ緩衝液を、抗 P S A 抗体でコートされたマイクロタイターウェルに添加した。ウェルを 45 分間インキュベーションし、そして $1.5 \cdot 10^9 \text{ pcs}$ / ウェルのナノ粒子 - 抗体バイオコンジュゲートまたは 2 ng / ウェルの標識化抗体を $40 \mu\text{l}$ / ウェルのアッセイ緩衝液に添加する前に洗浄した。個々のウェルを 10 ~ 480 分間インキュベーションし、表面結合ナノ粒子または抗体画分の測定前に、洗浄した。ナノ粒子 - 抗体バイオコンジュゲートからの時間分解ユーロピウム (III) 蛍光は、VictorTM 1420 蛍光光度計を用い、狭い放射開口と低い焦点レベルを有する 613 nm で、ウェルの底から直接検出した。ユーロピウム (III) 標識化抗体からの蛍光は、DELTA (登録商標) 増強溶液中、 613 nm で測定した。全結合から非特異的結合を差し引いたのちに得られる蛍光シグナルは、蛍光対時間でプロットした。ナノ粒子 - 抗体バイオコンジュゲートおよび抗体に対する全検体濃度 (R_{max}) と同等の、個々の蛍光シグナルは、実験データを反応速度式の統合式 (integrated form) に合わせる際に、採用された (オーシャネッシー

$$R_1 = C k_a R_{\text{max}} \{ 1 - \exp \{ - (C k_a + k_d) t \} \} / (C k_a + k_d)$$

等式において、

C = バイオコンジュゲートまたは抗体の濃度 (M)

R_1 = 蛍光シグナル (cts)

t = 時間 (s)

k_a = 会合速度定数 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) および

k_d = 解離速度定数 (s^{-1})

【0124】

10

20

30

40

50

差し込み図は、あてはめた会合速度定数とバイオコンジュゲート上の結合部位数との依存性を示す。抗体に関する計算された会合速度定数は、 $1.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。エラーバーは3つのレプリカの $\pm \text{SD}$ を反映している。

【0125】

図8は、Eu(III)標識化抗PSA抗体(星印)ならびに130個(四角形)、76個(丸)、46個(上向き三角形)、30個(下向き三角形)、19個(ひし形)、12個(左向き三角形)および8個(右向き三角形)の活性結合部位を有するEu(III)標識化ナノ粒子-抗体バイオコンジュゲートの解離速度論(dissociation kinetics)を示す。バックグラウンドを差し引いた相対蛍光は、時間の関数としてプロットされており、線は決定された速度定数から計算された解離を表わす。最後の時間点は速度定数決定からは除外した。抗体に関して計算された解離速度定数は、 $1.8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ である。最初に、5 μl のブランクまたは遊離のPSA標準品(バイオコンジュゲートに対しては0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ 、抗体に対しては48 $\mu\text{g l}^{-1}$)および25 μl /ウェルのアッセイ緩衝液を、抗PSA抗体でコートされたマイクロタイターウェルに添加した。ウェルを45分間インキュベーションし、そして $1.5 \cdot 10^9 \text{ pcs}$ /ウェルのナノ粒子-抗体バイオコンジュゲートまたは75 ng /ウェルの標識化抗体を40 μl /ウェルのアッセイ緩衝液に添加する前に洗浄した。ウェルを2時間インキュベーションし、洗浄した。解離は、アッセイ緩衝液(50 μl /ウェル)中800 ng /ウェルの非標識化抗体を添加することにより、開始させた。ウェルを0~160分間インキュベーションし、表面結合ナノ粒子または抗体の画分を測定する前に、洗浄した。全結合から非特異的結合を差し引いたのちに得られる蛍光シグナルを、 $\ln(\text{蛍光}(\text{時間}=0)/\text{蛍光}(\text{時間}))$ 対時間でプロットした。傾斜は、速度等式 $\ln(R_0/R_n) = k_d(t_n - t_0)$ (式中、 R_0 は時間 t_0 における応答であり R_n は t_n における応答である)の統合式に基づく、純粋な解離相反応(pure dissociation phase reaction)の解離速度定数を表わしている。差し込み図は、あてはめた解離速度定数とナノ粒子-抗体バイオコンジュゲート上の結合部位数との依存性を示す。エラーバーは3つのレプリカの $\pm \text{SD}$ を反映している。

【0126】

図9は、Eu(III)標識化抗PSA抗体(星印)ならびに130個(四角形)、76個(丸)、46個(上向き三角形)、30個(下向き三角形)、19個(ひし形)、12個(左向き三角形)および8個(右向き三角形)の活性結合部位を有するEu(III)標識化ナノ粒子-抗体バイオコンジュゲートのアフィニティー決定を示す。バックグラウンドを差し引いたデータが、アフィニティーの直接比較を可能にする標準化スキャッチャード表示でプロットされている。最初に、5 μl のブランクまたは遊離のPSA標準品(バイオコンジュゲートに対しては1.0 $\mu\text{g l}^{-1}$ 、抗体に対しては48 $\mu\text{g l}^{-1}$)および25 μl /ウェルのアッセイ緩衝液を、抗PSA抗体でコートされたマイクロタイターウェルに添加した。ウェルを45分間インキュベーションし、8種の濃度の、 $4.0 \cdot 10^9 \sim 3.1 \cdot 10^7 \text{ pcs}$ /ウェルのナノ粒子-抗体バイオコンジュゲートまたは50~0.39 ng /ウェルの標識化抗体を40 μl /ウェルのアッセイ緩衝液に別々のウェルに添加する前に、洗浄した。個々のナノ粒子と抗体の濃度に対して、個別のブランクを含めた。ウェルを、16時間または4時間、ナノ粒子および抗体細片に関して、それぞれインキュベーションし、表面結合バイオコンジュゲートまたは抗体画分の測定の前に、洗浄した。バイオコンジュゲートおよび抗体の結合濃度(bound concentration)を、全結合から非特異的結合を差し引いたのちに得られる蛍光シグナルから計算した。ナノ粒子-抗体バイオコンジュゲートおよび標識化抗体に対する親和定数は、結合/遊離比率対結合濃度によりプロットされたデータを用いて計算した。差し込み図は、あてはめた親和定数とナノ粒子-抗体バイオコンジュゲート上の結合部位数との依存性を示す。最も低い結合/最大結合比を有する4つのデータポイントは、より良好な一価の結合アフィニティーを表わす値を得るために、各々の直線回帰分析から省いた。抗体に対して計算された親和定数は、 $6.6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった。エラーバーは3つのレ

ブリカの $\pm S D$ を反映している。

【0127】

図10は、 $5 \mu l$ (実線) および $30 \mu l$ (破線) の試料を用いる、2段階で非競合的な遊離PSAのイムノアッセイに基づいた、バイオコンジュゲート(214個の結合部位、四角) および標識化抗体(抗体あたり8個のユーロピウム(III)イオン、星印)のための標準曲線を示す。標識化された水平線および垂直線は、ブランク試料の $2 \times S D$ およびアッセイの分析感度をそれぞれ表わす。実線は、試料 $30 \mu l$ 、破線は試料 $5 \mu l$ についてのものであり、上方の線はバイオコンジュゲート、下方の線は標識化抗体についてのものである。最初に、 $5 \mu l$ / ウェルの標準品および $25 \mu l$ / ウェルのアッセイ緩衝液、または $30 ml$ / ウェルの標準品のみを、抗PSAマイクロタイターウェルに添加し、ウェルを洗浄する前に45分間インキュベーションした。ついで、 $1 \cdot 10^9$ p c s / ウェルのEu(III)標識化ナノ粒子-抗体バイオコンジュゲートまたは $75 ng$ / ウェルの標識化抗体を、 $40 \mu l$ / ウェル量のアッセイ緩衝液に添加した。インキュベーションを2時間実施し、ウェルを表面結合蛍光の測定前に洗浄した。ナノ粒子-抗体バイオコンジュゲートからのユーロピウム(III)蛍光は、非特異的結合であるが減衰した放射開口を有するセクションなどで検出した。標識化抗体からのシグナルは、 $200 \mu l$ / ウェルのDELFLIA(登録商標)増強溶液と共にさらにインキュベーションしたのち、標準プロトコルにしたがって、 $613 nm$ で測定した。ナノ粒子関連蛍光は、減衰した放射開口を有する表面から測定されるので、絶対的な特異的シグナルはバイオコンジュゲートと標識化抗体とのあいだでは直接比較できない。エラーバーは3つのレプリカの $\pm S D$ を反映している。

【0128】

図11は、PSAアッセイの反応速度曲線を示し、該アッセイでは、PSA ($5 \mu l$ 、 $1 \mu g l^{-1}$) およびビオチン化抗PSA抗体5A10 ($0.6 nmol l^{-1}$) ()、またはPSA ($5 \mu l$ 、 $1 \mu g l^{-1}$) およびビオチン化抗PSA抗体5A10 ($0.6 nmol l^{-1}$) およびビオチン化抗PSA抗体H50 ($0.6 nmol l^{-1}$)

【外7】

(■)

(これらはPSA分子の異なる部位で反応する)を、マイクロタイターウェル表面結合抗PSA抗体と、全量 $30 \mu l$ で15分間反応させ、その後、ストレプトアビジンでコートされた $1 \cdot 10^9$ 個のナノ粒子がビオチン化抗PSA抗体と全量 $40 \mu l$ で反応させた。本曲線は、ストレプトアビジンでコートされたナノ粒子と、表面捕捉された抗PSA抗体H117に結合した検体に結合したビオチン化抗PSA5A10抗体(PSA分子あたり2個の抗体)との時間依存性反応を示す。Victor1420(パーキン エルマー ライフ サイエンシズ、ワラック オイ)時間分解蛍光光度計を用いて、マイクロタイターウェルの表面上でPSAを直接検出した。

【0129】

図12a(対数スケール)および図12b(直線スケール)は、蛍光ラテックス(Fluoro-Max、直径 $10^7 nm$ 、セラジン(Seradyne)、IN)を含有するユーロピウムキレート的时间解放射スペクトルを示す。12aの差し込み図は、 $700 nm$ を超える波長での正確な放射プロファイルを示す。有意でない(バックグラウンドと区別できない)、直接的で長寿命のユーロピウム放射が、 $710 nm$ を超える波長で存在する。 0.1% トリトンX-100中の 0.1% ナノ粒子溶液のユーロピウム(III)蛍光は、 $340 nm$ 励起、励起閃光後 $150 ms$ 遅延、および $500 ms$ 測定窓の時間分解蛍光モード(Hamamatsu PMT R2949)で測定した。

【0130】

図13は、多重色素(multiple dye)含有(エネルギー移動)微粒子(Transfluorespheres 760、TFS-760、直径 $2 \mu m$ 、モレキュラ

ー プロブズ (Molecular Probes)、オランダ) の励起および放射スペクトル、ならびにユーロピウムキレート含有蛍光ラテックス (Fluoro-Max、直径 10^7 nm、セラジン、IN) の放射スペクトルを示す。TFS-760 粒子は例外的に大きなストークシフト、すなわち励起波長と放射波長との差異を有する。バックグラウンドは非常に低く、直線スケールには示されない。0.1% トリトン X-100 中に 40,000 粒子/ml を含有する溶液からの蛍光は、放射スペクトルのために 615 nm の励起波長を、励起スペクトルのために 760 nm の放射波長を用いて、(迅速) 蛍光方式で測定した (Hamamatsu PMT R2949)。TFS-760 粒子はユーロピウム (III) 発光の放射最大の波長で効果的に励起され、ユーロピウム (III) が非常に弱いバックグラウンドを有する 760 nm で強い放射を有する。TransFluoSheres もユーロピウムナノ粒子の励起波長 (340 nm) で励起されるので、時間の分解 (temporal resolution) が、エネルギー移動で励起される放射を分離するために必要である。

【0131】

図 14 は、遊離の前立腺特異抗原 (PSA) の真のホモジニアスな免疫アッセイの検量線を示す。非競合的サンドイッチ免疫アッセイは、サンドイッチペアの第 1 抗体 (Mab 5A10) でコートされた、ユーロピウムキレート含有蛍光ラテックス (Fluoro-Max、直径 107 nm、セラジン、IN) をエネルギードナーとして、およびサンドイッチペアの第 2 抗体 (Mab H117) でコートされた多重色素含有 (エネルギー移動) 微粒子 (Transfluorespheres 760、直径 2 μm、モレキュラープロブズ、オランダ) をエネルギーアクセプターとして用いて実施した。溶液中の遊離 PSA が 0.001 nM 未満の検出限界が、非最適化 (non-optimized) 測定装置を用いる実験で達成された。ウェル表面が非特異的結合するのをブロックするために、ウシ血清アルブミンでコートされたマイクロタイターウェル中の、全量 150 mL のアッセイ緩衝液 (0.9 w/v % NaCl、0.05 w/v % NaN_3 、0.5 w/v % ウシ血清アルブミン、0.01 w/v % Tween 40、0.05 w/v % ウシグロブリン、20 mM DTPA を含有する 50 mM トリス-HCl、pH 7.8) に、第 1 抗体 ($5 \cdot 10^9$ pcs) でコートされたユーロピウム (III) ナノ粒子および第 2 抗体 ($1.4 \cdot 10^9$ pcs) でコートされた TFS-760 粒子を添加した。ついで、50 mL の様々な PSA 標準品を個別のウェルに添加し、振とうしながら、反応を室温で 2 時間インキュベーションした。赤色感受性 (red-sensitive) の PMT およびロングパス (long pass) 放射フィルター (> 725 nm、725 nm で T% 50、710 nm で T% 5) を備えた、時間分解モード (340 nm での励起、遅延時間 80 ms、測定窓 500 ms、サイクル時間 4000 ms) の Victor 多重標識カウンターを用いて、エネルギー移動で励起した TFS-760 の蛍光を測定した。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、時間分解ホモジニアスアッセイの原理を示す。

【図 2】

図 2 は、反応時間の関数としてアッセイに関連した会合、解離および複合体濃度を表わすアッセイのシミュレーションを示す。

【図 3】

図 3 は、様々な数のナノ粒子を用いた前立腺特異抗原 (PSA) アッセイの反応速度曲線を表わす。

【図 4】

図 4 は、洗浄工程あり、および洗浄工程なしでの PSA アッセイの検量線を示す。

【図 5】

図 5 は、様々な数のナノ粒子を用いた PSA アッセイに対する検量線を示す。

【図 6】

図 6 は、様々な数のナノ粒子を用いた PSA アッセイのバックグラウンド蛍光を示す。

【 図 7 】

図 7 は、ナノ粒子なしの、およびナノ粒子当たり様々な数の活性結合部位を有するナノ粒子を有するナノ粒子を用いた、P S Aアッセイの会合速度定数の測定を示す。

【 図 8 】

図 8 は、ナノ粒子なしの、および様々な結合部位数を有するナノ粒子を用いる、バイオコンジュゲートの解離キネティクスを示す。

【 図 9 】

図 9 は、ナノ粒子なしの、および様々な結合部位数を有するナノ粒子を用いる、バイオコンジュゲートのアフィニティーの測定を示す。

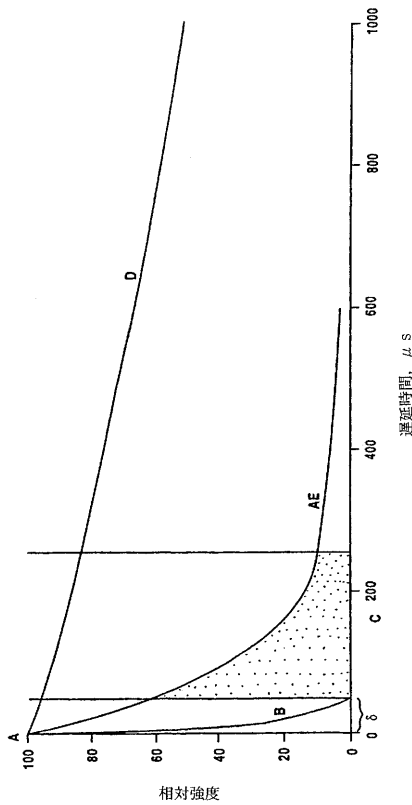
【 図 1 0 】

図 1 0 は、バイオコンジュゲートおよび標識化抗体ベースの 2 段階で非競合的な遊離 P S A イムノアッセイの標準曲線を示す。

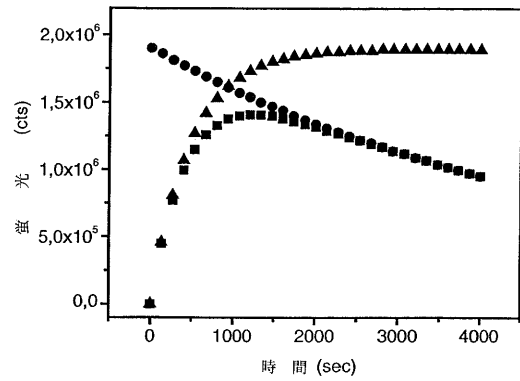
【 図 1 1 】

図 1 1 は、P S A アッセイの反応速度曲線に対する、1 種ビオチン化抗体の代わりに、2 種ビオチン化抗体を用いることによる効果を示す。

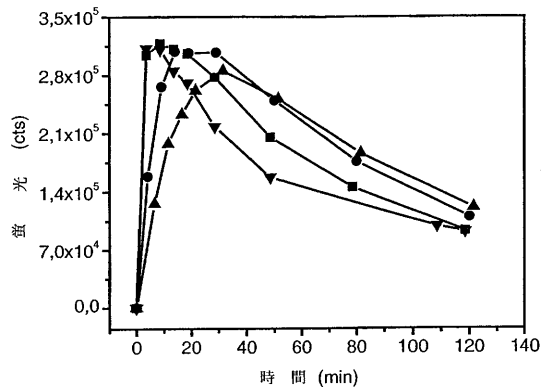
【 図 1 】



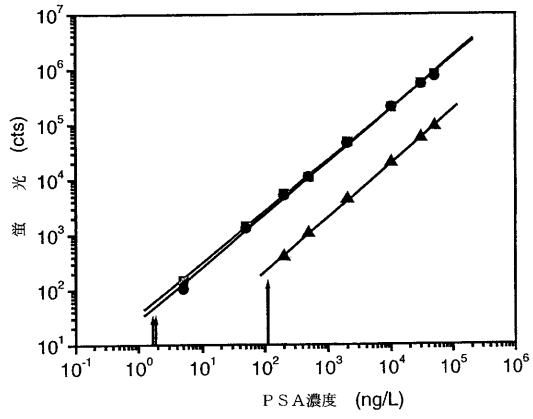
【 図 2 】



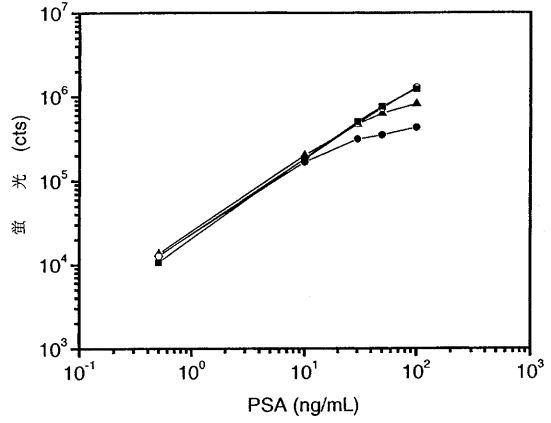
【 図 3 】



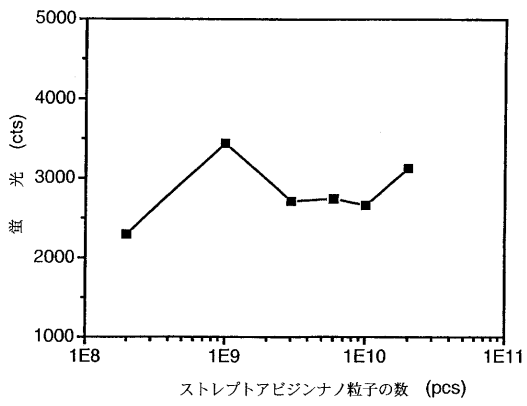
【 図 4 】



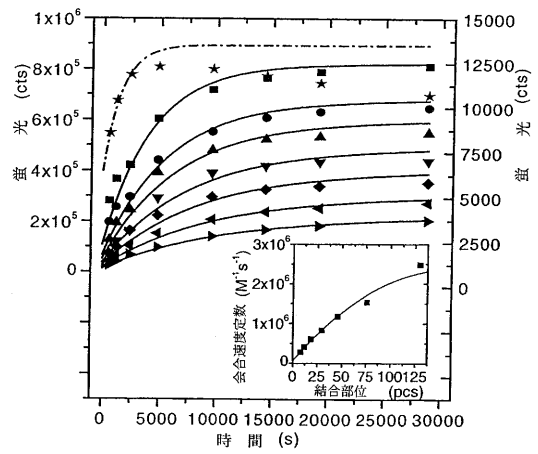
【 図 5 】



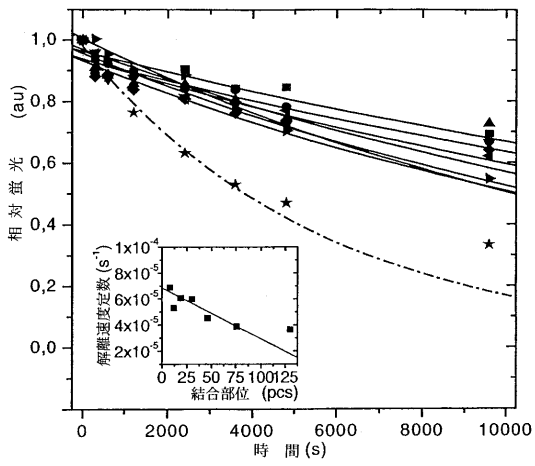
【 図 6 】



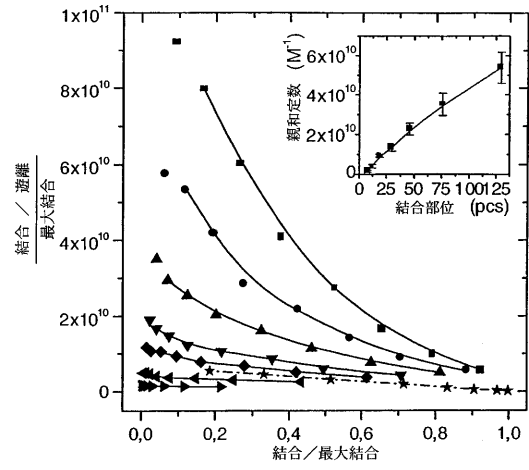
【 図 7 】



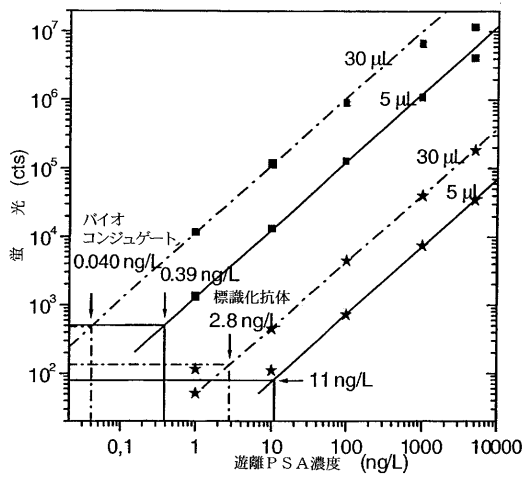
【 図 8 】



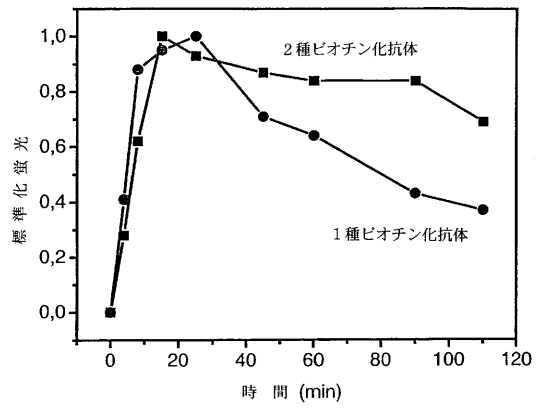
【 図 9 】



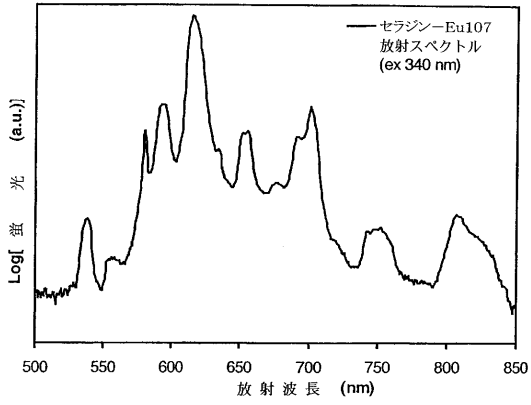
【 図 1 0 】



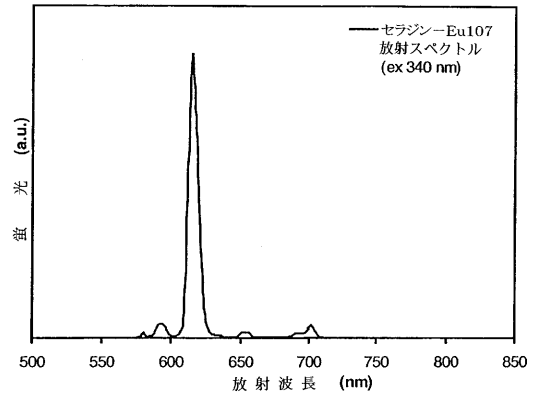
【 図 1 1 】



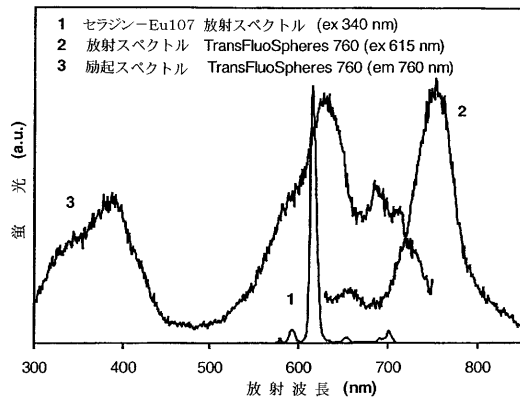
【 図 1 2 a 】



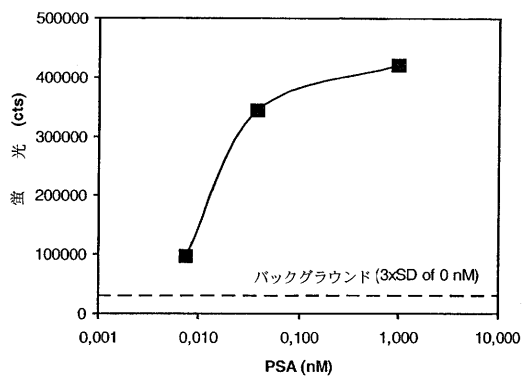
【 図 1 2 b 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【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
6 June 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/44725 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/543
- (21) International Application Number: PCT/FI01/01024
- (22) International Filing Date:
26 November 2001 (26.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
20002623 30 November 2000 (30.11.2000) FI
- (71) Applicant (for all designated States except US): INNO-TRAC DIAGNOSTICS OY [FI/FI], Kalevantie 25, FIN-20520 Turku (FI).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): PETERSSON, Kim [FI/FI], Tiihenkijäinkatu 14 E 20, FIN-20810 Turku (FI).
- (74) Agent: TURUN PATENTTI-TOIMISTO OY; P.O. Box 99, FIN-20521 Turku (FI).
- (81) Designated States (national): 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, 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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- 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.

(54) Title: BIOANALYTICAL ASSAY

WO 02/44725 A1

(57) Abstract: The present invention relates to a nanoparticle comprising a specific binding reactant, said nanoparticle being useful for determining an analyte to which analyte or complex comprising said analyte said binding reactant is specific. Characteristic for the nanoparticle is that the diameter of said nanoparticle is less than 200 nm, said nanoparticle is coated with multiple said specific binding reactants to the extent that the affinity constant of said nanoparticle towards said analyte essentially exceeds that of free said binding reactant towards said analyte and/or the association rate constant between said nanoparticle and said analyte essentially exceeds the association rate constant between free said binding reactant and said analyte, and said nanoparticle comprises a detectable feature. The invention also relates to biochemical assays using said nanoparticle. The assay further relates to a proximity based homogenous assay comprising a first group labeled with an energy donating compound (donor) and a second group labeled with an energy accepting compound (acceptor), wherein the donor is luminescent and has a long excited state lifetime and the acceptor is luminescent having a short or long excited state lifetime or the acceptor is non-luminescent, and the increase or decrease, respectively, in the energy transfer from the donor to the acceptor resulting from shortening or lengthening, respectively, of the distance between said groups, is measured. Characteristic for the assay is that the donor is a nanoparticle.

BIOANALYTICAL ASSAY**FIELD OF THE INVENTION**

The present invention relates to improvements in biochemical assays utilizing biospecific binding reactant -coated nanoparticles. The present invention also relates to improvements in proximity based homogeneous assays, which use time resolved detection of luminescence. The specific improvements relate to the adaptation of the high specific activity, long lifetime luminescent nanoparticles long as energy donors, utilization of the enhanced kinetical properties of the nanoparticles coated with biospecific binding reactant and the energy acceptors with exceptional spectral characteristics.

BACKGROUND OF THE INVENTION

A number of assays based on bioaffinity or enzymatically catalyzed reactions have been developed to analyze biologically important compounds from various biological samples (such as serum, blood, plasma, saliva, urine, feces, seminal plasma, sweat, liquor, amniotic fluid, tissue homogenate, ascites, etc.), samples in environmental studies (waste water, soil samples), industrial processes (process solutions, products) and compound libraries (screening libraries which may comprise organic compounds, inorganic compounds, natural products, extracts of biological sources, biological proteins, peptides, or nucleotides, etc.). Some of these assays rely on specific bioaffinity recognition reactions, where generally natural biological binding components are used to form the specific binding assay (with biological binding components such as antibodies, natural hormone binding proteins, lectins, enzymes, receptors, DNA, RNA) or artificially produced binding compounds like genetically or chemically engineered antibodies, molded plastic

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

2

- imprint (molecular imprinting), LNA (locked nucleic acid) and PNA (peptide nucleic acid) etc. Such assays generally rely on a label to quantitate the formed complexes after recognition, a binding reaction and suitable separation (separations like precipitation and centrifugation, filtration, affinity collection to e.g. plastic surfaces such as coated assay tubes, slides or microparticles, solvent extraction, gel filtration, or other chromatographic systems, and so on). The quantitation of the label in a free or bound fraction enables the calculation of the analyte in the sample directly or indirectly, generally through use of a set of standards to which unknown samples are compared.
- 10 The principles of immunoassays have been thoroughly reviewed by Price and Newman (Price CP and Newman DJ, Principles and Practice of Immunoassay, 1997, Macmillan Reference Ltd., London, UK). Strategies to improve the sensitivity of biochemical assays have included strong binding affinity, low non-specific binding of the labeled reactant and high specific-activity of the label. Binding affinities are
- 15 limited e.g. in the case of antibodies by the immune response although antibody engineering and recombinant antibodies have been successfully employed to improve the affinity (Lamminmäki U *et al.* J. Mol. Biol. 1999, 291, 589-602; Eriksson S *et al.* Clin. Chem. 2000, 46, 658-66). Non-specific binding is commonly minimized using solid-phase blocking and bulk proteins in the assay buffer.
- 20 Research efforts have also been directed to improve the specific-activity of the label using new label molecules and background noise reduction (Kricka LJ. Pure Appl. Chem. 1996, 68, 1825-30; Kricka LJ. Clin. Chem. 1999, 45, 453-8). However, only limited improvements in sensitivity have been introduced to conventional assays although amplifying labels (Evangelista RA *et al.* Anal. Biochem. 1991, 197, 214-
- 25 24), multiple labeling (Morton RC and Diamandis EP. Anal. Chem. 1990, 62, 1841-5) or enhanced specific-activity (Xu YY *et al.* Analyst 1992, 117, 1061-9), have been applied.

Extensive theoretical studies have supported the development of an ambient analyte immunoassay in a two-step heterogeneous microspot immunoassay with superior sensitivity, if labels with a very high specific-activity are available (Ekins RP. Clin. Biochem. Revs. 1987, 8, 12-23). Obviously, the development of supersensitive immunoassays requires, in addition to the methodological advances, improvements in the ordinary limiting factors, including strong binding affinity, low non-specific binding and high specific-activity. Homogeneous, luminescent oxygen channeling immunoassays (Ullman EF *et al.* Clin. Chem. 1996, 42, 1518-26) (LOCI™), heterogeneous, multianalyte microspot immunoassays (Ekins RP and Chu FW. Clin. Chem. 1991, 37, 1955-67; Ekins RP and Chu FW. PCT Int. Appl. 1993, WO 9308472 A1) (Microspot®) and particulate fluorescent-label immunoassays utilize nanoparticle-antibody bioconjugates as a labeled component. It has been stated, that the surface density of binding sites on the particulate developing conjugate is likely to represent an important determinant of the sensitivity in the microspot immunoassay (Ekins RP and Chu FW PCT Int. Appl. 1993, WO 9308472 A1). The potential increase in the effective affinity was speculated to originate from multivalent binding of the developing binding material to an individual antigen molecule via two or more separate antibodies directed to different epitopes of a single antigen, although it was not stated whether that was applicable to given examples. On the other hand, Ullman EF *et al.* (Clin. Chem. 1996, 42, 1518-26) has shown that the association rate between two nanoparticles from which one is coated with digoxins and the other with anti-digoxin antibodies, increases in the LOCI® system. However, the interaction of the nanoparticles was a result of multiple binding of digoxin and anti-digoxin and not a result of a single-valent binding event (an interaction of one digoxin to one anti-digoxin antibody). In the particulate fluorescent-label immunoassay the multiple binding of the anti-mouse antibody coated nanoparticle tracer to many surface bound mouse antibody analytes has shown to increase the avidity of this assay set-up (Hall M *et al.* Anal. Biochem 1999, 272, 165-70.).

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

4

The history of colloidal nanoparticles as labels in solid-phase immunoassays originates from the development of sol-particle immunoassays (Leuvering JHW *et al.* J. Immunoassay 1980, 1, 77-91) and subsequent adaptation of disperse dye (Gribnau TCJ *et al.* J. Chromatography 1986, 376, 175-89) and fluorescent nanoparticles (Saunders GC *et al.* Clin. Chem. 1985, 31, 2020-3). Nanoparticle based solid-phase assays have demonstrated sensitivity enhancements over conventional enzyme and radiolabels, contributing to detailed studies of the function of the nanoparticle-antibody bioconjugates in existing assay systems (Saunders GC *et al.* Clin. Chem. 1985, 31, 2020-3; Okano K *et al.* Anal. Biochem. 1992, 202, 120-5; Kubitschko S *et al.* Anal. Biochem. 1997, 253, 112-22; Hall M *et al.* Anal. Biochem. 1999, 272, 165-70) and development of new methodologies and labels (Frank D *et al.* U.S. patent 1981, US4283382; Chan WCW and Nie S. Science 1998, 281, 2016-8; Beverloo HB *et al.* Anal. Biochem. 1992, 203, 326-34; Ullman EF *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 5426-30; Schultz S *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97, 996-1001; Roberts D *et al.* J. Lumin. 1998, 79, 225-31; Zijlmans HJMAA *et al.* Anal. Biochem. 1999, 267, 30-6). Reactivity of the nanoparticle labels can be enhanced by higher antibody loading on the nanoparticle surface as demonstrated by Okano K *et al.* (Anal. Biochem. 1992, 202, 120-5). However, non-specific binding was increased with high antibody-density particles. The observed, enhanced binding affinity could readily be interpreted as multivalent binding of the large bioconjugates to the surface-bound analytes due to the long incubation time which leads to the dissociation of the analyte from the surface to the solution and hence after rebinding to the surface increases multivalent binding of the nanoparticle. Also the large size of the nanoparticle, 760 nm, apparently leads to multivalent binding.

Affinity enhancement of complexes with multiple valences compared to the original antibodies have been shown using various Fv fragment-IgG (Ito W *et al.* J. Biol. Chem. 1993, 268, 20668-75) and tetravalent Fv fragment-core streptavidin complexes (Kipriyanov S *et al.* Prot. Eng. 1996, 9, 203-11). At least a part of the

increased affinity was due to an increased association rate constant, 3.5 fold higher for tetravalent scFv:streptavidin complex compared to monovalent Fv. A similar phenomenon has been described earlier for the ferritin protein with 24 identical subunits: single-valent binding affinity of the protein was $1.6 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$, while the intrinsic affinity of an individual subunit was $6.7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Hogg, P *et al.* J. Arch. Biochem. Biophys. 1987, 254, 92-101).

Avidin (streptavidin) conjugates have long been used in various immuno- and nucleic acid assays (Wilchek M and Bayer EA, editors. In *Methods in Enzymol.* 1990, 184). A number of different fluorophores and enzymes have been conjugated to avidin, which then reacts with a biotinylated biospecific binding reactant (Papanastasiou-Diamandi A *et al.* Clin. Chem. 1992, 38, 545-8). The extremely high affinity ($\sim 10^{15}$) and specificity of biotin towards avidin has made possible the use of this platform (Green NM. In: Wilchek M and Bayer EA, editors. *Methods in Enzymology* 1990, 184, 51-67). In a number of analysis the use of biotin-avidin complex has led to a good assay performance when avidin has been labeled with enzymes or prompt fluorophores. To further improve the assay performance avidin has been coupled to larger molecules in order to increase the number of enzymes or fluorophores per a single binding event. Diamandis *et al.* have conjugated streptavidin to thyroglobulin, which was labeled previously with time-resolved fluorescent Eu-chelates (Diamandis EP. Clin Chem 1991, 37, 1486-91). The formed complex tracing the analyte is considered to be complicated and difficult to control because multiple binding of proteins, lanthanide ions and chelates are required to form the successful complex. Hall *et al.* and Vener *et al.* have conjugated streptavidin to a large tracer nanoparticle containing prompt fluorophores (Hall M *et al.* Anal. Biochem. 1999, 272, 165-70; Vener TI *et al.* Anal. Biochem. 1991, 198, 308-11). Vener *et al.* used large particles, 1.8 μm in diameter, to assay biotinylated target DNA on membranes in a petri dish improving the detection sensitivity of the assay (one hour incubation) more than three orders of magnitude compared to the assay where the tracer molecule was soluble pyronine G-labeled streptavidin. Hall *et*

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

6

al. used two approaches to assay mouse antibodies. The biotinylated anti-mouse antibody was preincubated with 220- μ m streptavidin nanoparticles. This complex was allowed to react with microtiter well surface-bound analyte for 20 hours. If the streptavidin nanoparticle was allowed to react with the microtiter-plate surface-bound complex: surface-capture antibody|analyte|biotinylated anti-mouse antibody, Hall *et al.* failed to demonstrate the feasibility of such an assay.

In a more conventional assay format, after the analyte incubation step, a washing step is introduced prior to the adding of the label molecule such as labeled streptavidin. The washing step is crucial in this assay format in which a biotinylated biospecific binding reactant such as a biotinylated antibody is used because the free biotinylated biospecific binding reactants bind to labeled streptavidin in solution. This would vary significantly the amount of free label molecule in solution causing a major error source in the assay. In microtiter well type assay systems Vener *et al.* and Hall *et al.* used in their study with streptavidin nanoparticles a washing step prior to adding of the streptavidin-coated tracer particles (Hall M *et al.* Anal. Biochem. 1999, 272, 165-70; Vener TI *et al.* Anal. Biochem. 1991, 198, 308-11). Ullman *et al.* have used streptavidin nanoparticles in an assay without subjecting the nanoparticles to washing but this was realized in the homogenous LOCI[®] assay format where no washing steps are required contrary to heterogeneous assays (Ullman EF *et al.* Clin. Chem. 1996, 42, 1518-26).

In a dissociation enhanced lanthanide fluoroimmunoassay (DELFI[®]) lanthanide ions are dissociated from the chelate used for labeling of the tracer molecules. The lanthanide ions form in the solution a new fluorescent complex (Hemmilä I *et al.* Anal. Biochem. 1984; 137:335-43). Alternative methods are described in literature where the lanthanide ions are not released from the chelate (Mukkala V-M *et al.* Helvetica Chim. Acta 1993, 76, 1361-78; Härmä H *et al.* Anal. Chim. Acta 2000, 410, 85-96). In these assay formats the analyte-bound intrinsically fluorescent chelate-labeled antibody is detected directly on the surface after a wash step.

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

7

Although sensitive assays can be run using these label techniques they still suffer from low signal levels. In addition, the intrinsically fluorescent chelates and generally all fluorophores are extremely sensitive to environmental changes. A means of decreasing the environmental effects is to have strict control over measurement conditions. In the All-In-One immunoassay concept controlling is made possible by drying the microtiter wells prior to detection (Lövgren T *et al.* Clin. Chem. 1996, 42, 1196-201). Water is known to quench luminescence and hence drying increases the signal level and reduces detection variations.

Colloidal stability of nanosized particles is of utmost importance to ensure non-aggregated particle suspensions (Griffin C *et al.* Microparticle Reagent Optimization, A laboratory reference manual. Seradyn, Particle Technology, Indianapolis, IN). Latex particles are known to flocculate easily due to hydrophobic interaction in-between particles and lacking of repulsive forces. Surface groups have been introduced on the particles to decrease a tendency to flocculate. One of the most effective means to increase repulsive forces is the introduction of carboxyl acid groups on the surface. These groups effectively repel one another when deprotonated in a moderate pH range. In an agglutination test the number of these functional groups may not be high due to the fact that the desired agglutination of the particle would not occur readily. However, when an agglutination test is not of interest and the aim is to have a nanosized particle react with a solid-phase surface-bound analyte, a higher repulsive force is preferred. This can be accomplished for example by introducing many functional groups on the nanoparticle and, hence, reducing apparent agglutination and also nonspecific binding to the solid-phase.

Proximity based homogeneous assays, which use time resolved detection of luminescence known to prior art are e.g. fluorescence polarization assays applied for small molecular compounds, enzyme-monitored immunoassays (Syva Co.), various fluorescence quenching or enhancing assays (for a review see e.g. Hemmilä, Applications of Fluorescence in Immunoassays, Wiley, NY, 1991). Other means to

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

8

produce signal directly include the scintillation proximity principle (Amersham Pharmacia Biotech), which is based on short distance penetration of radiation particles in assay medium and a solid scintillator coated with catching reagents (Anal Biochem, (1987) 161, 494) and ALPHAscreen (BioSignal Packard) technology based on photosensitized formation of singlet oxygen, which migrates from a nanoparticle containing photosensitizer to an another nanoparticle containing chemiluminescer and generates delayed luminescence emission (Clin. Chem, (1996) 42, 1518). Another category of simplified assay technologies is the nonseparation assays, which, similarly to homogenous assays, avoid separation and washing steps. A true example of this kind of technology is microvolume assay technology based on two photon excitation and microparticle solid phase (Nat. Biotechnol., (2000), 18, 548). Also other similar nonseparation assay technologies exists (for a review see e.g. Mesa, Drug Discovery Today, 2000, 1:38-41).

Regardless of a great number of homogeneous assay designs published to day (for a review, see Ullmann, 1999, J. Chem. Ed. 76:781-788), there are no assays, where the versatility and sensitivity would match those of a good separation assay. The reason to that is manifold relating to e.g. the different way a homogeneous, versus heterogeneous, assay has to be optimized, the control of low affinity nonspecific bindings, and the limitations of applicability of most of the existing homogenous assay techniques. In addition, the conventional homogeneous fluorometric assays are very vulnerable to background interferences derived from various components in the samples. Fluorescence polarizations assays are interfered by low affinity nonspecific bindings (e.g. probe binding to albumin) and autofluorescence of samples.

Time-resolved (TR) fluorometry (time resolution in time-domain at micro- or millisecond range) is a perfect measuring regime for homogeneous assays, because it can totally discriminate the background fluorescence derived from organic compounds. When long enough delay times (time between pulsed excitation and

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

9

starting of emission recording) can be used, all background interferences can be eliminated (for a review see. e.g. Hemmilä (1991); Gudgin Dickinson et al, (1995) *J Photochem Photobiol* 27, 3). In addition to separation based assays, also a number of homogeneous time resolved fluorometric assays have been described and patented (Mathis (1995) *Clin Chem*, 41, 1391; Selvin et al. (1994) *Proc Natl Acad Sci, USA*, 91, 10024, Hemmilä et. al (1996, 1999) WO 98/15830 and EP 0973 036 A2) with their limitations and drawbacks.

The complex compounds (chelates) developed relate to various types of multidentate complexes, i.e. chelates. According to various researches they have got different names, but all are based on organometallic complexes derived from a chelated lanthanide ion and a multidentate ligand. The names include supramolecular compounds, complexes, chelates, complexones, cryptates, crown-ether complexes, calixarenes, mixed-ligand complexes and so on.

There are a great number of stable fluorescent chelates, described in patents and articles, which could be used in time-resolved FRET assays, for example those mentioned in the following US patents: 4,761,481; 5,032,677; 5,055,578; 5,106,957; 5,116,989; 4,761,481; 4,801,722; 4,794,191; 4,637,988; 4,670,572; 4,837,169 and 4,859,777. The preferred chelate is composed of a nona-dentate chelating ligand, such as terpyridine (EP-A 403593; US 5,324,825; US 5,202,423; US 5,316,909) or a terpyridine analogue with one or two five-membered rings (e.g. pyrazole, thiazole, triazine) (EP 077061041 and WO 93/11433). Very well suited chelates are also mentioned in the following articles: Takalo et al (1994) *Bioconjugate Chem*, 5, 278; Mikkala et al (1993) *Helv Chim Acta*, 76, 1361; Remuinnan et al (1993) *J Chem Soc Perkin Trans*, 2, 1099; Mikkala et al (1996) *Helv Chim Acta*, 79, 295; Takalo et al (1996) *Helv Chim Acta*, 79.

In addition fluorescent latex particles, containing fluorescent chelates, have been described as labels (Frank and Sundberg, 1978, US4283382, 1979, US425313; Schaeffer et. al., 1985, US4735907, 1987, US4784912, Burdick and Danielson,

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

10

1989, US4801504, also method to prepare as Sutton et al., 1992, US5234841). The polymer inside particle stabilizes fluorescent chelates and prevents environmental effect to lanthanide fluorescence. This method also enables the use of unconjugateable or otherwise unsuitable chelates as labels. Fluorescent latex can be very densely packed with lanthanide chelates as they do not have any self quenching in high concentrations. The selection of chelates with best possible luminescent properties enables also superior fluorescent properties. No applications of fluorescent latex particles in FRET assays exists, since the long lifetime fluorescent background at the emission wavelength of the acceptor also increases relatively and apparently no advantage can be achieved. The same problem applies also to liposome labels containing fluorescent europium chelate (for example of europium liposome as donor and allophycocyanin as acceptor, see Okabayahi and Ikeuchi, 1998, Analyst 123:1329-1332).

Particulate fluorescent compounds with large and controllable Stoke's shift, very suitable to resonance energy transfer acceptor, have been introduced. Intramolecular energy transfer in particles using multiple fluorescent compounds embedded in polymeric matrix enables production of novel labels with desired spectral properties (see Buechler et al, 1998, US5763189; Singer and Haugland, 1996, US5573909; Roberts et al, 1998, J. Luminescence 79:225-231). Normal infrared chromophores have usually low solubility but embedding in polymeric matrix with soluble surface will enable also their use. Another class of particulate fluorescent compounds, semiconductor nanocrystals (see e.g. Bruchez et. al., 1998, Science 281:2013-2015), have size tunable emission wavelength and are excited efficiently at any wavelength shorter than the emission peak. These nanocrystals, also known as quantum dots, have same characteristic narrow, symmetric emission spectrum regardless of the excitation wavelength and emission wavelengths can be tuned from visible up to infrared (see e.g. Bailey, Chan and Nie, 2000, Near-Infrared-Emitting nanocrystals as biological labels, Abstract, Pittcon 2000 Symposium: Emerging Nanotechnologies for Chemical Analysis). Near-infrared emission is especially

advantageous for analytical applications due to relatively low background and low absorbance in biological matrix (see e.g. Patonay et al., 2000, Near infrared absorption and fluorescence spectroscopy in analytical chemistry: moving to longer wavelengths, Abstract, Pittcon 2000). Quantum dots have been used as efficient
5 donors because they are highly luminescent (1 quantum dot = 20 organic dye molecules) and can be excited at any wavelength shorter than the emission peak (see Jain et al, 2000, Semiconductor Quantum dots for ultrasensitive FRET, Abstract, Pittcon 2000). In principle this phenomenon causes serious problems if quantum dots are used as acceptors in resonance energy transfer without temporal
10 resolution.

The principle of a time-resolved homogeneous assay based on a specific energy transfer between a long lifetime donor and a short lifetime emitting acceptor molecule is summarized in Figure 1. In the complex, when donor and acceptor labels are in proximity, the donor energy (D) excited by a short light pulse (A) is
15 transferred by resonance energy transfer to acceptor. The energy transfer excited acceptor emission (AE) can be distinguished from the acceptor emission (B) excited directly by the light pulse (A) by applying a delay time (d) during which the counts from the photomultiplier tube are not recorded. Delayed emission from the donor (D) has a different wavelength than the sensitized (energy transfer excited) emission
20 of the acceptor (AE), which enables a combination of spectral and temporal separation of signals. Hence, in homogenous bioaffinity assays (receptor-ligand binding, hybridization reaction, immunobinding, enzyme substrate binding etc.) the association or dissociation of donor-acceptor pairs can be followed by measuring the increase or decrease, respectively, in the signal from the energy transfer excited
25 acceptor.

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

12

OBJECTS AND SUMMARY OF THE INVENTION

An object of the present invention is to provide a nanoparticle useful for an assay to determine an analyte.

Another object of the present invention is to provide an improved assay for determining an analyte using said nanoparticle.

Yet another object of the present invention is to provide an improved proximity based homogenous assay.

Thus the present invention provides a nanoparticle comprising a specific binding reactant, said nanoparticle being useful for determining an analyte to which analyte or complex comprising said analyte said binding reactant is specific. The nanoparticle has the following characteristics:

- a) the diameter of said nanoparticle is less than 200 nm, preferably less than 120 nm,
- b) said nanoparticle is coated with multiple said specific binding reactants to the extent that
 - i) the affinity constant of said nanoparticle towards said analyte essentially exceeds that of free said binding reactant towards said analyte, and/or
 - ii) the association rate constant between said nanoparticle and said analyte essentially exceeds the association rate constant between free said binding reactant and said analyte; and
- c) said nanoparticle comprises a detectable feature.

The present invention further provides an assay for determining an analyte to which analyte or complex comprising said analyte a binding reactant is specific wherein said assay utilizes a nanoparticle comprising said specific binding reactant. The nanoparticle utilized has the following characteristics:

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

13

- a) the diameter of said nanoparticle is less than 200 nm, preferably less than 120 nm,
- b) said nanoparticle is coated with multiple said specific binding reactants to the extent that
- 5 i) the affinity constant of said nanoparticle towards said analyte essentially exceeds that of free said binding reactant towards said analyte, and/or
- ii) the association rate constant between said nanoparticle and said analyte essentially exceeds the association rate constant between free said binding reactant and said analyte; and
- 10 c) said nanoparticle comprises a detectable feature.

The present invention also provides a proximity based homogenous assay comprising a first group labeled with an energy donating compound (donor) and a second group labeled with an energy accepting compound (acceptor), wherein

- the donor is luminescent and has a long excited state lifetime and the acceptor is
15 luminescent having a short or long excited state lifetime or the acceptor is non-luminescent, and
- the increase or decrease, respectively, in the energy transfer from the donor to the acceptor resulting from shortening or lengthening, respectively, of the distance between said groups, is measured.
- 20 Characteristic for the assay is that the donor is a nanoparticle.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the principle of a time-resolved homogeneous assay.

Figure 2 shows a simulation of an assay demonstrating association, dissociation and complex concentration relevant to the assay as a function of reaction time.

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

14

Figure 3 shows kinetic curves of a prostate-specific antigen (PSA) assay using varying numbers of nanoparticles.

Figure 4 shows calibration curves of a PSA assay with and without a wash step.

Figure 5 shows calibration curves for a PSA assay using varying numbers of
5 nanoparticles.

Figure 6 shows background fluorescence of a PSA assay using varying numbers of nanoparticles.

Figure 7 shows determination of association rate constants of a PSA assay without
10 nanoparticles and using nanoparticles with varying numbers of active binding sites per nanoparticle.

Figure 8 shows dissociation kinetics for bioconjugates without nanoparticles and with nanoparticles with varying numbers of binding sites.

Figure 9 shows determination of affinity of bioconjugates without nanoparticles and with nanoparticles with varying numbers of binding sites.

15 Figure 10 shows standard curves for bioconjugate and labeled antibody based two-step, non-competitive immunoassays of free PSA.

Figure 11 shows the effect of using two biotinylated antibodies instead of one on the kinetic curves of a PSA assay.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

20 In the context of this application the term "nanoparticle" refers to any particle the average diameter of which is in the nanometer range, i.e. having an average diameter up to 1 μm .

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

15

In the context of this application the term specific binding reactant refers to any reactant that can be considered to be specific to any compound of relevance in the circumstances referred to. Specific binding reactants are e.g. an antibody, an antigen, a receptor ligand, a specific binding protein, protein A, protein G, avidin, 5 avidin derivative, streptavidin, biotin, a nucleic acid, such as DNA, RNA, LNA (locked nucleic acid) and PNA (peptide nucleic acid), a peptide, a sugar, a hapten a virus a bacteria and a cell.

In the context of this application the term "detectable feature" refers to any feature making the entity comprising said "detectable feature" directly or indirectly 10 qualitatively or quantitatively detectable by any known means. A detectable feature is thus e.g. a label such as a luminescent label.

The expression "heterogenous assay" relates to an assay in which a separation or a washing step is required. The expression "homogenous assay" relates to an assay in which a separation or a washing step is not required.

15 The terms "first group" and "second group" shall be understood to include any component such as a bioaffinity recognition component (in reactions where the distance between the groups decreases, e.g. in bioaffinity reactions) or a part of a molecule or substrate (e.g. the distal ends of a peptide molecule the cleavage of which will separate the two labeled groups from each other).

20 The term "donor" is defined as a particulate (diameter 400 nm or below, preferential below 50 nm) luminescent compound with long lifetime emission at visible or infrared wavelengths. The donor can be a lanthanide luminescent nanoparticle, e.g. inorganic phosphor, having a long excited state lifetime or polymeric nanoparticle embedded with an energy donating lanthanide luminescent compound, e.g. 25 lanthanide chelate, having a long excited state lifetime. This includes also lanthanide phosphors and upconverting phosphors.

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

16

The term "lanthanide" is defined as luminescent lanthanide ion with luminescence emission in visible or near-infrared or infrared wavelengths and long fluorescence decay, e.g. europium(III), terbium(III), samarium(III), dysprosium(III), ytterbium(III), erbium(III) and neodymium(III). Also platinum(III) and
5 palladium(III) should be noted have similar spectral and temporal properties when complexed to porphyrins.

The term "chelate" is defined as a coordination complex where the central ion is coordinated with at least two coordination bonds to a single ligand (multidentate ligand). These may be named by different principles, and names like chelates,
10 supramolecular compounds, complexes, complexones etc. are used. Special types of chelates include macrocyclic complexes, crown ethers, cryptates, calixarenes, porphyrins and so on.

The preferred size of the nanoparticle ranges from 1 to 200 nm in diameter. The nanoparticle used can be made of organic or inorganic matter such as any polymer,
15 gold, silver, carbon, silica, CdSe or CdS.

The nanoparticle can emit light originating from excitation of the nanoparticle or scattering or through electric pulse or chemical reaction. The affinity of the biospecific binding reactants on the nanoparticle, which is used in specific bioaffinity assays such as immunoassays, hybridization assays, receptor-binding
20 assays and cellular binding assays, e.g. utilizing luminescence (fluorescence, time-resolved fluorescence, phosphorescence, chemi-luminescence, bioluminescence) detection of the specific analyte, exceeds the affinity of said labeled soluble single biospecific binding reactant. Nanoparticles may or may not carry one or more luminescent molecules or molecules leading to luminescent emission inside the
25 nanoparticle or on the surface of the nanoparticle using one or more of the following luminescent molecules or molecules leading to luminescent emission:

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

17

Time-resolved fluorescent labels e.g.

Eu(III), Tb(III), Sm(III), Dy(III) chelates, i.e. lanthanide chelates,
Pt and Pd porphyrin labels,
lanthanide phosphors;

5 Upconverting fluorescent labels e.g.

(Y.Yb.Er)₂O₃S
(Y.Yb.Tm)₂O₃S

Rapidly decaying fluorescent labels e.g.

10 fluorescein and fluorescein derivatives, rhodamine and rhodamine
derivatives,
CdS and CdSe nanocrystals
green fluorescent protein and green fluorescent protein derivatives;

chemiluminescent labels e.g.

dioxetane derivatives, alkaline phosphatase, β -galactosidase; and

15 bioluminescent labels

alkaline phosphatase, β -galactosidase.

The biospecific binding reactant is attached to the nanoparticle through one or more
of the following means: adsorption, covalent coupling, grafting, solid phase
synthesis or another biospecific binding reactant. The preferred method is
20 adsorption and covalent coupling.

The nanoparticle optionally contains one or more of functional groups on the
surface. Such functional groups may include but not be limited to carboxyl (COOH),
amino (NH₂, NHR, NR₁R₂, NR₁R₁), aldehyde or ketone (CHO, CO), hydroxyl
(OH) or thiol (SH).

25 The present invention enables performing biospecific assays with a biospecific
binding reactant whose affinity exceeds the affinity of the same single, soluble

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

18

biospecific binding reactant by introducing a number of biospecific binding reactants onto a nanoparticle. As the affinity of the biospecific binding reactant is increased kinetics and sensitivity of said biospecific assays are significantly improved compared to the same assay using a soluble labeled biospecific binding reactant. The nanoparticle coated with biospecific binding reactants can be used in heterogeneous as well as in homogenous assay formats. These assays can be either non-competitive or competitive. Assays utilizing nanoparticles can be used for simultaneous measurement of two or more analytes detected by a specific nanoparticle towards each analyte.

- 10 A heterogeneous assay according to the invention can comprise the steps of
- a) contacting a first binding reactant bound to a solid phase, which reactant is specific to a first binding site of said analyte, with a sample comprising said analyte;
 - b) optionally reacting said analyte with said first binding reactant;
 - c) adding to the composition obtained in step a) said nanoparticles comprising a second binding reactant, which reactant is specific to a second binding site of said analyte;
 - d) reacting second binding reactant of said nanoparticles with said analyte bound to first binding reactant bound to said solid phase;
 - e) washing said solid phase, which solid phase binds a first binding reactant bound to said analyte bound to second binding reactant of nanoparticles, essentially free of nanoparticles not biospecifically bound to said solid phase; and
 - f) detecting said nanoparticles bound to said solid phase to enable determination of said analyte.

If the optional reacting step b) is not carried out steps a) and c) are carried out essentially simultaneously.

Another heterogeneous assay according to the invention can comprise the steps of

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

19

- a) contacting a first binding reactant bound to a solid phase, which reactant is specific to a first binding site of said analyte, with a sample comprising said analyte;
- b) adding to the composition obtained in step a) a second binding reactant bound to a third binding reactant, which second binding reactant is specific to a second binding site of said analyte;
- 5 c) adding to the composition obtained in step b) said nanoparticles comprising a fourth binding reactant, which reactant is specific to said third binding reactant;
- d) reacting said fourth binding reactant of said nanoparticles with third binding reactant bound to second binding reactant bound to said analyte bound to said first binding reactant bound to said solid phase;
- 10 e) washing said solid phase, which solid phase binds first binding reactant bound to analyte bound to second binding reactant bound to third binding reactant bound to fourth binding reactant of said nanoparticles, essentially free of nanoparticles not biospecifically bound to said solid phase; and
- 15 f) detecting said nanoparticles bound to said solid phase to enable determination of said analyte.

In this assay the second and third binding reactant can be the same entity, e.g. an antibody, having two different binding sites of which one is directed towards the analyte and the other towards the fourth binding reactant bound to the nanoparticle.

- 20 In this assay said third binding reactant is preferably biotin and said fourth binding reactant is preferably avidin or streptavidin. Alternatively preferred third binding reactant could be avidin or streptavidin and preferred fourth binding reactant biotin. It should also be noted that an assay comprising steps a) to f) above could also be applicable and efficient using any nanoparticle although the preferable choice would be a nanoparticle as referred to in step c) and defined by the claims of this application.
- 25

Yet another heterogeneous and competitive assay according to the invention could comprise the steps of

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

20

- a) contacting a first binding reactant bound to a solid phase, which reactant is specific to a first binding site of said analyte, with a sample comprising said analyte, and with additional said analyte bound to said nanoparticles,
- b) washing said solid phase, which solid phase binds first binding reactant bound to analyte bound to said nanoparticle, essentially free of nanoparticles not bound to said solid phase; and
- 5 c) detecting nanoparticles bound to said solid phase to enable determination of said analyte.

An alternative heterogeneous and competitive assay according to the invention could comprise the steps of

10

- a) contacting a first binding reactant bound to a solid phase, which reactant is specific to a first binding site of said analyte, with a sample comprising said analyte, and with additional said analyte bound to a second binding reactant
- b) adding to the composition obtained in step a) said nanoparticles comprising a
- 15 third binding reactant, which reactant is specific to said second binding reactant,
- c) reacting said third binding reactant of said nanoparticles with said second binding reactant bound to said additional analyte bound to first binding reactant bound to said solid phase;
- d) washing said solid phase, which solid phase binds first binding reactant, bound
- 20 to analyte bound to second binding reactant bound to third binding reactant of said nanoparticles, essentially free of nanoparticles not bound to said solid phase; and
- e) detecting nanoparticles bound to said solid phase to enable determination of said analyte.

In a first non-competitive heterogeneous approach the analyte is added to a solid-

25 phase. After a washing step, the nanoparticle coated with said biospecific binding reactants is incubated with the analyte bound on said solid-phase surface. After the

final washing step, the luminescent signal is read directly from said solid-phase surface or after drying or after signal enhancement or after signal amplification.

In a second non-competitive heterogeneous approach the analyte is incubated together with the nanoparticle coated with said biospecific binding reactants in one-
5 step onto said solid-phase surface-bound capture molecule. After the washing step, the luminescent signal is read directly from said solid-phase surface, after drying, after signal enhancement, or after signal amplification.

In a third non-competitive heterogeneous approach the analyte is incubated separately or together in one or two steps with a second analyte-specific binding
10 reactant, optionally bound to a third binding reactant, onto said solid-phase surface-bound capture molecule.

After the washing step, the nanoparticle coated with said biospecific binding reactants is incubated with the analyte bound on said solid-phase surface. After another washing step, the nanoparticle coated with said biospecific binding reactant
15 is incubated with the analyte bound on said solid-phase surface. After the final washing step, the luminescent signal is read directly from said solid-phase surface, after drying, after signal enhancement, or after signal amplification.

In a fourth non-competitive heterogeneous approach the analyte is incubated separately or together in one or two steps with said second analyte-specific binding
20 reactant, optionally bound to a third binding reactant, onto said solid-phase surface-bound capture molecule. After analyte incubation, the washing step is omitted due to the number of said second analyte-specific binding molecules and the number of available said biospecific binding reactants on the nanoparticle in the reaction. In such an assay the number of said second analyte-specific binding molecules does
25 not exceed the number of said biospecific binding reactant molecules on the surface of the nanoparticle coated with said biospecific binding reactant. In the excess of said nanoparticle-bound biospecific binding reactant the assay has proven not to be

interfered by free said second analyte-specific binding molecule in solution although said non-analyte bound second analyte specific binding molecules may react with the nanoparticle coated with said biospecific binding reactant in solution prior to the reaction of the nanoparticle coated with said biospecific binding reactant. After the
5 final washing step, the luminescent signal is read directly from said solid-phase surface, after drying, after signal enhancement, or after signal amplification.

In a fifth non-competitive heterogeneous approach the analyte is incubated separately or together in one or two steps with two or more said second analyte specific binding reactant, optionally bound to a third binding reactant, onto said
10 solid-phase surface-bound capture molecule. Using more than one said second analyte specific binding molecule the dissociation of the said second analyte specific binding molecule or the nanoparticles coated with said biospecific binding reactant is reduced and a pseudo-equilibrium state is achieved. After analyte incubation, said solid-phase can be washed. After the final washing step, the luminescent signal is
15 read directly from said solid-phase surface, after drying, after signal enhancement, or after signal amplification.

In a non-competitive assay utilizing said third assay approach, the dynamic range of said assay can be adjusted on the basis of the number of the nanoparticles coated with said biospecific binding reactants: the higher the number of the nanoparticles
20 coated with said biospecific binding reactant the larger the dynamic range is, because the nonspecific binding of the assay is not increased when the number of nanoparticle coated with said biospecific binding reactants is increased.

In a preferred non-competitive heterogeneous assay concept utilizing the second or the third approach, the number of said second biospecific binding reactant molecules is lower than used to immobilize said biospecific binding reactant onto
25 the nanoparticle in the first assay approach. The third, fourth and fifth assay concept significantly decreases the amount of the second biospecific binding reactant required in the assays.

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

23

In the second and third heterogeneous assay approach the incubation step of the nanoparticles coated with said biospecific binding reactants is carried out any time during non-equilibrium or equilibrium. In a typical second and third assay approach the incubation step of the nanoparticles coated with said biospecific binding reactant
5 is carried out any time during non-equilibrium, more typically in less than two hours and preferable in less than one hour.

In a first competitive heterogeneous assay the analyte is added to said solid-phase together with a competing labeled analyte derivative or separately. The label is e.g. one of the following:

- 10 biotin, streptavidin, avidin or avidin derivative,
 an antibody, protein A, protein G or an antigen.

After an optional washing step, the nanoparticles coated with said biospecific binding reactants are incubated with said labeled analyte bound on said solid-phase surface. After the final washing step, the luminescent signal is read directly from
15 said solid-phase surface or after drying or after signal enhancement or after signal amplification.

In the second competitive heterogeneous assay format, the competing element in the analyte incubation step is the nanoparticle coated with an analyte or analyte-derivative molecules. In the assay format the number of the competing analyte or
20 analyte-derivative molecules on the surface of the nanoparticle can be controlled which significantly improves the control over the assay.

In assays according to the invention exemplified above the non-optional reacting step is typically discontinued essentially before equilibrium. The duration of said non-optional reacting step is typically less than 2 h and preferably less than 1 h.

In assays according to the invention exemplified above the solid phase is typically a essentially flat surface of e.g. a microtiter well, the surface of a slide, the surface of a particle or the surface of a strip.

In assays according to the invention exemplified above the amount of nanoparticles
5 added per each individual sample to be assayed is dependent on the assay volume and the size of the particle.

Heterogeneous assay according to the invention can thus include assays where, after incubation of the analyte and a second biospecific binding reactant such as a biotinylated antibody or anti-mouse antibody, the solid phase is not washed prior to
10 adding the nanoparticle coated with said biospecific binding reactant. Heterogeneous assay according to the invention also include assays where the analyte and a second biospecific binding reactant on the solid phase are traced with a nanoparticle coated with said biospecific binding reactant at any time during non-equilibrium and equilibrium state.

15 The invention also includes homogenous assays in which energy from a donor particle is transferred to one or more acceptor molecules or to one or more particles containing one or more acceptor molecules of the same or different types of acceptor molecules.

Preferred acceptor molecules are:

20 rapidly decaying fluorophores, e.g. APC, Cy5, Cy7, NN-382, FluoSpheres
semiconducting materials, e.g. CdSe nanocrystals (i.e. Quantum Dots)
fluorescent energy transfer complexes, e.g. TransFluoSpheres,
Cy7-APC tandem dye, and
time-resolved fluorophores, e.g. ytterbium chelates, inorganic phosphors.

25 One or more of the same or different types of the said acceptor molecules may be attached to a biospecific binding reactant.

One or more type of the said acceptor molecules and one or more of the types of said acceptor molecules may be attached onto the surface of the nanoparticle coated with said biospecific binding reactant or embedded into the nanoparticle coated with said biospecific binding reactants.

- 5 The preferred size of the acceptor particle ranges from 1 nm to 1 mm in diameter.

In a preferred heterogeneous assay arrangement an improved assay performance is obtained using the mono-valent affinity of the nanoparticle coated with said biospecific binding reactants. In the assay the mono-valent affinity of the nanoparticle coated with said biospecific binding reactants exceed the mono-valent affinity of the soluble biospecific binding reactant. That is achieved by increasing
10 the number of the binding sites of said biospecific binding reactants on the surface of the nanoparticle. This improvement in affinity has been proved to originate mainly from the increase in the rate of association and partially from the decrease in the rate of dissociation of biochemical analysis. The association rate has shown to
15 increase nearly in a linear manner. In addition to the mono-valent analyte molecules, analytes with multiple binding sites, such as whole cells, bacteria, viruses and multimeric proteins, benefit from the use of nanoparticle label coated with said biospecific binding reactants because the affinity of nanoparticle coated with said biospecific binding reactants is higher towards multiple binding sites on the surface
20 of the multi-binding site analytes. The improved affinity originates mainly from the reduced dissociation rate and partially from the improved association rate.

In the non-competitive or competitive assay format the analyte-specific capture molecule can be immobilized either directly onto the surface of a solid-phase or indirectly.

- 25 The assay system is fully functional whether single or aggregated nanoparticles are being used. Non-aggregated nanoparticles are preferred.

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

26

In a homogenous assay the analyte is incubated together with the donor nanoparticle coated with a first biospecific binding reactant and the acceptor molecule attached to a second biospecific binding reactant or a second biospecific binding reactant coated particle containing acceptor molecules. The luminescent signal is read directly from solution.

In a preferred homogenous assay arrangement an improved assay performance is obtained using the mono-valent affinity of the nanoparticle coated with said biospecific binding reactants. In the assay the mono-valent affinity of the nanoparticle coated with said biospecific binding reactants exceeds the mono-valent affinity of the soluble biospecific binding reactant. This is achieved by increasing the number of binding sites of said biospecific binding reactant on the surface of the nanoparticle.

The present invention also relates to improvement in proximity-based homogeneous assays, which use time-resolved detection of luminescence. The specific improvements relate to the increased specific activity of the nanoparticle donor, reduction of the long lifetime luminescent background at the emission wavelength of the acceptor using acceptor compounds with a large spectral separation of energy absorption (excitation) and luminescence emission, and utilization of the enhanced association rate constant and the affinity constant of the nanoparticle labeled biospecific binding reactant. The combination of high-specific activity of the long lifetime nanoparticle donor and large Stoke's shift of acceptor allows detection of lower number of complexes in assays where association or dissociation is to be followed, i.e. label pari distance shortening or lengthening, than has been possible with earlier described homogeneous methods using time-resolved detection of luminescence.

On the contrary to the way the donor has been chosen in all prior art methods, the donor used in the present invention is a resonance energy transfer donor, a light emitting lanthanide containing particulate compound with high specific activity

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

27

wherein the acceptor is selected to have exceptionally wide Stokes's shift between energy absorption and energy emission to avoid practically all long lifetime fluorescent background from donor at the emission wavelength of the acceptor. The improved proximity-based homogeneous time-resolved luminescence assay
5 comprises one group labeled with a energy donating luminescent nanoparticle (donor) having a long excited state lifetime or nanoparticle embedded with an energy donating luminescent compound (donor) having a long excited state lifetime and an another group labeled with an energy accepting luminescent compound (acceptor) having either a short or long excited state lifetime or with a non-
10 luminescent compound.

Characteristic for the invention is that the improvements enable detection of the increase or decrease in the energy transfer from the donor to the acceptor resulting from shortening or lengthening, respectively, of the distance between said groups in response to presence of a minor quantity of assayed group or activity. The acceptor
15 is typically luminescent and the luminescence of the acceptor is preferably measured at a wavelength where the donor has no luminescence or essentially no luminescence, i.e. the luminescence of the donor is not significant compared to background luminescence.

The lanthanides have several ground states giving rise to numerous transitions in their emissions. Regardless of the fact that emissions are sharp and well defined,
20 there always tends to be a minor background at the wavelength acceptors are measured. The relative background is, however, less a problem at longer wavelengths. e.g. with Eu there are areas where Eu has a very minor background between 700 and 800 nm and at over 800 nm Eu does not emit any direct emission.
25 With Tb the extended wavelength range gives the possibility to use acceptors emitting at over 700 nm, where Tb does not create any background. By choosing a non-overlapping wavelength area, the sensitivity and dynamic range of time resolved fluorescence energy transfer can be improved since the long life-time fluorescence background is low. The donor has to have high specific activity to

produce detectable acceptor emission after energy transfer and using conventional time-resolved fluorophores, e.g. fluorescent chelates, improved sensitivity may not be achieved.

In assays where association is to be measured and a luminescent, short decay time acceptor and a long decay time donor are used, the emission of acceptor molecules is followed using a delay time i.e. time-resolved fluorometry to avoid the interference of the acceptors direct luminescence (emanating from direct excitation of acceptor). It is desirable to construct the assay in such a way that acceptor molecules are in excess (with time-resolved mode, their interference is negligible) and the energy transfer between donor and acceptor creates an increase in signal.

The sensitivity of any energy transfer based assay depends on both the intensity level of the obtained signal and on the total background. The signal level in a particular assay depends on the used chelate, its total excited state population and duration in the complex. The excited state population is a direct function of luminescent properties of the chelate, i.e. molar absorptivity (ϵ), quantum yield (f) and decay time (t). Accordingly a preferred donor has to have very high luminescence yield (significantly higher than particularly expressed in prior art, WO/98/15830) and long excited state lifetime (preferably over 1 ms).

A preferred acceptor molecule for association assays is highly luminescent (with quantum yield as near unity (1) as possible) with a high molar absorption coefficient (preferably over 100 000) at donor emission wavelength. It is important that the acceptor has a high quantum yield, and emits light at wavelength where the used lanthanide has a negligible background.

Preferably, the instrument automatically corrects any attenuation of excitation the sample may cause by simultaneously following the absorbance of the samples diluted into assay mixture and correcting the emission readings according to excitation or emission attenuation by sample absorption.

The present invention relates to improvements in assay performance using a nanoparticle coated with a biospecific binding reactant. The specific improvement relates to the increment in association rate and thus in affinity of said biospecific binding reactant when multiple said biospecific binding reactants are coated on the nanoparticle increasing the number of binding sites. In addition, the specific improvement relates to the means of performing said biospecific assays using the nanoparticle coated with said biospecific binding reactant.

Advantages of assays according to the invention are:

The affinity of said soluble specific binding reactant can be improved significantly by introducing a sufficient amount of said specific binding reactant onto a nanoparticle.

The association rate of the nanoparticle coated with said specific binding reactant reaches or exceeds that of said soluble specific binding reactant.

The dissociation rate of the nanoparticle coated with said specific binding reactant is lower than that of said soluble specific binding reactant.

The nanoparticle contains a high amount of luminescent label and has a very high specific activity.

The time-resolved fluorescent label inside the nanoparticle has no quenching effect even in very high concentration contrary to the rapidly decaying fluorophores.

The nanoparticle is highly insensitive to environmental effects caused by water, quenchers or oxygen.

The nanoparticle can be detected directly on a surface without elimination of said environmental effects.

The nanoparticle makes very sensitive biospecific assays possible.

The nanoparticle can be used to detect single molecules.

In an assay where an analyte and a second biospecific binding reactant react with a first solid-phase surface-bound capture biospecific binding reactant prior to the addition of the nanoparticles coated with a third biospecific binding reactant less of second biospecific binding reactant can be used in the assay reducing drastically the amount of the second biospecific binding reactant required in the nanoparticle based assay.

When an analyte and a first biospecific binding reactant react with a solid-phase surface bound capture biospecific binding reactant prior to the addition of nanoparticles coated with a second biospecific binding reactant a very rapid, less than 5 minutes, incubation step of the nanoparticle coated with second biospecific binding reactant can be used.

In an assay where an analyte and a first biospecific binding reactant react with a solid-phase surface bound capture biospecific binding reactant prior to the addition of nanoparticles coated with a second biospecific binding reactant the dynamic range of the assay can be adjusted on based on the amount of the nanoparticles coated with second biospecific binding reactant without affecting non-specific binding of the nanoparticles coated with second biospecific binding reactant to the solid-phase surface.

The nanoparticle is small in size and thus does not settle readily.

The nanoparticle can contain functional groups on the surface through which specific binding reactants can be coupled covalently on the nanoparticle.

The nanoparticle coated with said specific binding reactant is potentially a better solution for a label because a conventionally labeled (generally more than 5 labels per molecule) protein can significantly interfere with binding affinity and non-specific binding of the protein which is not the case with the nanoparticle based label where the large surface area ensures that a substantial number of binding sites are available for binding of the analyte. This effect is especially minimized using a

third specific binding reactant such as a site-specifically biotinylated antibody fragment.

When a solid-phase surface is coated with an antibody without using any denaturing step or partially denaturing step prior to the coating procedure
5 nonspecific binding of the nanoparticles coated with said biospecific binding reactant to the coated solid-phase surface is significantly reduced.

If smaller fragments of antibodies are coated on nanoparticles the number of binding sites can be increased and the affinity of the tracer molecule can be further improved.

10 The amount of biospecific binding reactants in an assays can be increased by coating more said biospecific binding reactant onto a nanoparticle whereas the number of label molecules remain the same which is contrary to typical prior art biospecific assays where labeled, soluble said biospecific binding reactants are used
15 because by increasing the number of labeled, soluble said biospecific binding reactants the amount of label is increased accordingly.

The nanoparticle can be used as a donor molecule in a homogenous assay.

The donor nanoparticle typically yields a high background signal when used in an energy transfer process. This can be circumvented by transferring the energy far enough by using suitable acceptor molecules or particles containing acceptor
20 molecules.

Due to the very broad absorption spectrum quantum dots are not suitable as acceptor molecules when rapidly decaying dyes are used since quantum dots are excited simultaneously with donor molecules and no specific energy transfer occurs whereas using donor dyes with a very long excited state lifetime specific energy transfer to
25 acceptor quantum dots can be detected.

Nanoparticles as labels offer an advantage to control the size of the label molecule and hence homogenize the used label component contrary to conjugated molecules such as a streptavidin-thyroglobulin -based label.

When streptavidin-coated nanoparticles are used in the assay, a washing step is not
5 required since the number of label molecules (nanoparticles) is not affected by the free biotinylated biospecific binding reactant. Although the free biotinylated biospecific binding reactant binds to the streptavidin-coated nanoparticle the high number of available streptavidin binding sites still enables to carry out of the assay without detrimental loss in assay performance.

10 Labeling of proteins through amino groups is generally a random process, which leads to an uncontrolled number of labels per protein. In approaches where the number of labels per molecules have been increased such as demonstrated by Diamandis et al., the same problem of randomness is encountered (Diamandis EP. Clin Chem 1991, 37, 1486-91). The degree of labeling is, however, more readily
15 controlled when fluorophores are embedded into a particle.

The number of proteins on nanoparticles should be controlled to obtain a nanoparticle that behaves optimally as a tracer molecule in an assay. Simultaneous control of proteins and labels when a larger protein/label -complex is formed is very difficult. However, using a nanoparticle the number of proteins and the amount of
20 labels can be controlled. Moreover, when surface-active groups are present such as COOH, controlling of the number of proteins can be done by controlling the activated sites on the surface of a nanoparticle. By activating only a limited number of surface groups more repulsive groups are left on the surface to increase the zeta potential of the particle and hence also nonspecific binding is decreased.

Experimental sectionNanoparticle-antibody and nanoparticle-streptavidin bioconjugates

Monoclonal antibody, Mab5A10 or streptavidin was covalently coupled to activated nanoparticles mainly by primary amine groups using two-step EDAC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, Fluka, Buchs, Switzerland) and sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide, Fluka, Buchs, Switzerland) coupling chemistry. Nanoparticles were pre-washed with 25 mmol l⁻¹ phosphate buffer, pH 7.0, using Amicon ultrafiltration stirred cell (Millipore, Bedford, MA) equipped with 500 kD polyethersulfone ultrafiltration membrane (Millipore) and resuspended in phosphate buffer using Labsonic U (B.Braun, Melsungen, Germany) tip sonicator (10 seconds, 80 W power level). Carboxyl groups were activated by incubating nanoparticles 15 min in phosphate buffer containing 2 mmol l⁻¹ EDAC and 100 mmol l⁻¹ sulfo-NHS. Activated nanoparticles were washed with 25 mmol l⁻¹ carbonate buffer, pH 8.5, and mixed to carbonate buffer containing Mab5A10 or streptavidin. Nanoparticle concentration in coupling reaction was 0.4 w/v %. Mab5A10 concentrations varied from 5 to 0.078 g l⁻¹ and the streptavidin concentration was 0.9 mg l⁻¹. Coupling reaction was incubated for 2 h with slow shaking, and thereafter 1 % bovine serum albumin was added to block remaining active groups for 15 min. Nanoparticle-antibody bioconjugates were washed six times with 2 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, containing 0.01 % Tween 40 and 50 mmol l⁻¹ salicylic acid, and finally resuspended to same buffer containing additionally 0.1 % gelatin and 0.1 % Tween 85. The suspension was centrifuged twice at 2500 g for 5 min to separate non-colloidal aggregates from monodisperse suspension and stored at +4 °C.

Binding site number

25 The number of active binding sites of covalently coupled Mab5A10 on a single nanoparticle-antibody bioconjugate was determined using Tb(III)-N1-ITC labeled PSA (Prostate-Specific Antigen) and measuring the ratio between terbium(III)

- fluorescence from particle-bound labeled PSA and europium(III) fluorescence from nanoparticles. Nanoparticles ($6 \cdot 10^{10}$ pcs ml^{-1}) were incubated for 1 h with slow shaking in the assay buffer (PerkinElmer Life Sciences, Wallac Oy, Turku, Finland) containing 3.3 mg l^{-1} Tb(III)-N1-ITC labeled PSA, 0.0005 w/v % milk powder and
- 5 0.005 w/v % Tween 85. Nanoparticles and particle bound labeled PSA were separated from unbound labeled PSA by size-exclusion chromatography using Sepharose 6B (Pharmacia Amersham, Uppsala, Sweden) matrix and 10 mmol l^{-1} Tris-HCl buffer, pH 7.8, containing 0.9 % NaCl and 0.01 % Tween 20. Nanoparticle-antibody bioconjugate fractions were diluted to DELFIA®
- 10 enhancement solution and europium(III) fluorescence was compared to nanoparticle standard to calculate nanoparticle concentrations. Terbium(III) fluorescence from the same fractions and terbium(III) standard solution were measured after additional incubation with DELFIA® enhancer, and the number of active binding sites was calculated from the number of terbium(III) ions per nanoparticle divided by the
- 15 labeling degree of PSA. Non-specific binding of the labeled PSA was controlled using non-coated nanoparticles blocked with bovine serum albumin. Both europium(III) and terbium(III) fluorescence were measured using a Victor™ 1420 fluorometer in time-resolved mode, at 613 nm with narrow emission aperture and at 545 nm, respectively.
- 20 The number of streptavidin molecules on a single nanoparticle was determined using site-specifically biotinylated Fab-5A10 fragment and Tb(III)-N1-ITC labeled PSA. Nanoparticles (33 pmol l^{-1}) were incubated with 33 nmol l^{-1} of biotinylated Fab-5A10 and 150 nmol l^{-1} of Tb(III)-N1-ITC labeled PSA in $100 \mu\text{l}$ of assay buffer for 1 h at room temperature. Thereafter the nanoparticles were separated from
- 25 unbound Tb(III)-N1-ITC labeled PSA and measured as indicated above for Mab5A10. Eventually, the number of streptavidin molecules was calculated assuming that one Tb-PSA reacted with one Fab-5A10 fragment, which, in turn, corresponded to one streptavidin molecule.

Biotinylation of Mab-5A10

Mab-5A10 (400 mg l⁻¹) was biotinylated with 350 mmol l⁻¹ of biotin-PEG-CO₂-NHS (Shearwater Polymers, Huntsville, AL) in 50 mmol l⁻¹ carbonate buffer, pH 9.8, for 2 h at room temperature. The biotinylated Mab was purified from unbound
5 biotin reagent with NAP-5 and NAP-10 columns (Pharmacia Amersham Biotech). The elution was carried out with 50 mmol l⁻¹ Tris buffer, pH 7, including 150 mmol l⁻¹ of NaCl.

Examples

Table 1 shows luminescence transitions of Eu³⁺. Excited state ⁵D₁ takes part in
10 energy transfer from ligand to ion, and ⁵D₀ is the major emissive level. Direct transitions from ⁵D₁ are short-lived and much weaker. The lanthanide ions have several ground states giving rise to numerous transitions in their emission. Regardless of the fact that the emissions are sharp and well defined, there always tends to be a minor relative background emission at the wavelength acceptor being
15 measured. An Eu³⁺ ion has only very weak emission above 710 nm and no detectable luminescence emission above 820 nm. In the case of Tb³⁺ ion no luminescence emission above 700 nm exists.

Table 2 shows an example in which the increase of the number of binding sites of a
nanoparticle-antibody bioconjugate increases the affinity constant as well as the
20 association rate constant. In this example the affinity constant exceeds that of the labeled antibody when the number of binding sites increases from 12 to 19 whereas the association rate constant exceeds that of the labeled antibody when the number of binding sites increases from 46 to 76.

Table 1

Europium(III) luminescence transitions		
Transition	Emission wavelength (nm)	Relative intensity
$^5D_1 \rightarrow ^7F_0$	526	very weak
$^5D_1 \rightarrow ^7F_1$	537	very weak
$^5D_1 \rightarrow ^7F_2$	558-560	very weak
$^5D_0 \rightarrow ^7F_0$	578-580	weak
$^5D_0 \rightarrow ^7F_1$	585-600	strong
$^5D_0 \rightarrow ^7F_2$	610-630	strongest
$^5D_0 \rightarrow ^7F_3$	645-660	weak
$^5D_0 \rightarrow ^7F_4$	680-705	medium
$^5D_0 \rightarrow ^7F_5$	751	very weak
$^5D_0 \rightarrow ^7F_6$	815	very weak

Table 2

Affinity and kinetic rate constants for the labeled compounds.				
labeled compound	mono-valent affinity constant $K_a (M^{-1} / 1E9)^a$	association rate constant $k_a (M^{-1} s^{-1} / 1E5)^{b,c}$	dissociation rate constant $k_d (s^{-1} / 1E-5)^a$	affinity constant $K_d (M^{-1} / 1E9)^b$
<i>Eu(III)-NTC labeled antibody</i>				
Mab5A10	6.6 ± 0.3	12.6 ± 0.7	17.6 ± 0.8	7.2
<i>number of binding sites for the nanoparticle-antibody bioconjugates</i>				
130	53.8 ± 7.9	24.8 ± 1.6	3.7 ± 0.9	67.8
76	35.1 ± 5.7	15.3 ± 0.9	3.9 ± 1.5	39.4
46	22.6 ± 3.0	11.8 ± 0.6	4.5 ± 1.4	25.9
30	13.3 ± 1.7	8.3 ± 0.3	6.0 ± 1.3	13.9
19	9.3 ± 0.7	6.1 ± 0.3	6.1 ± 1.4	10.0
12	4.1 ± 0.9	4.1 ± 0.1	5.3 ± 1.0	7.8
8	1.6 ± 0.5	2.8 ± 0.1	6.9 ± 0.9	4.0

^a Mean ± SD^b Affinity constant calculated from the kinetic rate constants.^c Association rate constants calculated using $k_d = 2E-4 s^{-1}$ for Mab5A10 and $8E-5 s^{-1}$ for the nanoparticle-antibody bioconjugates.

Figures 2 to 14 exemplify assays according to the invention as well as demonstrate the features of these assays.

Figure 2 shows a simulation of an assay reaction where analyte and a second biospecific binding reactant react with a first solid-phase surface-bound capture biospecific binding reactant and thereafter the nanoparticles coated with a third biospecific binding reactant react with the second biospecific binding reactant: apparent curve (■), the association of the nanoparticles with the second biospecific binding reactant (▲) and the dissociation of the second biospecific binding reactant from the analyte bound on the surface (●).

10 Figure 3 shows kinetic curves of PSA assays where PSA ($5 \mu\text{l}$, $1 \mu\text{g l}^{-1}$) and a biotinylated anti-PSA antibody 5A10 (0.6 nmol l^{-1}) reacted with a microtiter well surface-bound anti-PSA antibody H117 in a total volume of $30 \mu\text{l}$ for 15 min and thereafter the nanoparticles coated with streptavidin reacted with the biotinylated anti-PSA antibody 5A10 in a total volume of $40 \mu\text{l}$. The curves represent the time
15 dependent reaction of streptavidin-coated nanoparticles with the biotinylated anti-PSA 5A10 antibody bound to analyte bound to the surface-captured anti-PSA antibody H117. The number of streptavidin-coated nanoparticles was varied: $3.5 \cdot 10^8$ (▲), $5 \cdot 10^8$ (●), $1 \cdot 10^9$ (■), and $3 \cdot 10^9$ (▼) nanoparticles per reaction. A Victor 1420 (Perkin Elmer Life Sciences, Wallac Oy) time-resolved fluorometer
20 was used to detect PSA directly on the surface of the microtiter well.

Figure 4 shows calibration curves of PSA assays where PSA ($5 \mu\text{l}$) and a biotinylated anti-PSA antibody (0.6 nmol l^{-1}) reacted with a microtiter well surface-bound anti-PSA antibody in a total volume of $30 \mu\text{l}$ for 15 min and thereafter after a wash step $3 \cdot 10^9$ Eu(III)-labeled nanoparticles coated with streptavidin (■) or $5 \cdot 10^{11}$
25 of Eu(III)-labeled streptavidin (Eu(III)-N1-ITC chelate, Perkin Elmer Life Sciences, Wallac Oy) (▲) reacted or thereafter without the wash step $3 \cdot 10^9$ Eu(III)-labeled nanoparticles coated with streptavidin (●) reacted with the biotinylated anti-PSA antibody in a total volume of $40 \mu\text{l}$ for 5 min. After the Eu(III)-labeled streptavidin

incubation, Eu(III) ions were dissociated from the chelate to a commercial enhancement solution (Perkin Elmer Life Sciences, Wallac Oy). A Victor 1420 (Perkin Elmer Life Sciences, Wallac Oy) time-resolved fluorometer was used to detect the PSA-bound streptavidin nanoparticles directly on the surface of the microtiter well and PSA-bound Eu(III)-labeled streptavidin in solution.

Figure 5 shows calibration curves of PSA assays where PSA (5 μl) and a biotinylated anti-PSA antibody (0.6 nmol l^{-1}) reacted with a microtiter well surface-bound anti-PSA antibody in a total volume of 30 μl for 15 min and thereafter Eu(III)-labeled nanoparticles coated with streptavidin reacted with the biotinylated anti-PSA antibody in a total volume of 40 μl for 6 min. The number of streptavidin-coated nanoparticles was varied: $5 \cdot 10^8$ (\bullet), $1 \cdot 10^9$ (\blacktriangle), $3 \cdot 10^9$ (O), and $6 \cdot 10^9$ (\blacksquare) nanoparticles per reaction. A Victor 1420 (Perkin Elmer Life Sciences, Wallac Oy) time-resolved fluorometer was used to detect the PSA-bound streptavidin nanoparticles directly on the surface of the microtiter well.

Figure 6 shows zero concentration level signals of PSA (5 μl) vs. the number of streptavidin nanoparticles in the assays where a biotinylated anti-PSA antibody (0.6 nmol l^{-1}) reacted with a microtiter well surface-bound anti-PSA antibody non-specifically in a total volume of 30 μl for 10 min and thereafter Eu(III)-labeled nanoparticles coated with streptavidin reacted with the biotinylated anti-PSA antibody and microtiter well surface-bound anti-PSA antibody non-specifically in a total volume of 40 μl for 10 min. A Victor 1420 (Perkin Elmer Life Sciences, Wallac Oy) time-resolved fluorometer was used to detect the streptavidin nanoparticles directly on the surface of the microtiter well.

Figure 7 shows determination of association rate constants of the Eu(III) labeled anti-PSA antibody (asterisk) and Eu(III)-labeled nanoparticle-antibody bioconjugates with 130 (square), 76 (circle), 46 (triangle pointing up), 30 (triangle pointing down), 19 (diamond), 12 (triangle pointing left) and 8 (triangle pointing right) active binding sites. Solid lines are fitted curves for the bioconjugates using

constant $k_d = 8 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ and dashed line is for the antibody based on the first four data points and $k_d = 2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. The number of analyte molecules were adjusted so that only a few percent of nanoparticle-antibody bioconjugates or labeled antibodies were bound, allowing a fixed value for free bioconjugate and antibody concentration. First, 5 μl of blanks or free PSA standards ($0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ for bioconjugates, $2.5 \mu\text{g l}^{-1}$ for antibody) and 25 μl /well of assay buffer were added to anti-PSA antibody coated microtiter wells. The wells were incubated for 45 min and washed before $1.5 \cdot 10^9$ pcs/well nanoparticle-antibody bioconjugates or 2 ng/well labeled antibody were added to 40 μl /well of assay buffer. Separate wells were incubated for 10–480 min and washed before measurement of the surface bound nanoparticle or antibody fraction. Time-resolved europium(III) fluorescence from the nanoparticle-antibody bioconjugates was detected directly from the bottom of the well using a Victor™ 1420 fluorometer, at 613 nm with a narrow emission aperture and lowered focus level. Fluorescence from the europium(III) labeled antibody was measured in the DELFIA® enhancement solution, at 613 nm. The fluorescence signals obtained after subtracting the non-specific binding from the total binding were plotted by *fluorescence vs. time*. Separate fluorescence signals, equal to the total analyte concentration (R_{max}) for nanoparticle-antibody bioconjugates and antibodies, were employed in fitting the experimental data to an integrated form of the kinetic rate equation (O'Shannessy DJ *et al.* Anal. Biochem. 1993, 212, 457-68):

$$R_t = C k_a R_{\text{max}} \{1 - \exp[-(C k_a + k_d) t]\} / (C k_a + k_d)$$

In the equation

- C = bioconjugate or antibody concentration (M),
- R_t = fluorescence signal (cts),
- t = time (s),
- k_a = association rate constant ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) and
- k_d = dissociation rate constant (s^{-1}).

The inset shows the dependence of the fitted association rate constants and the number of binding sites on the bioconjugates. The calculated association rate constant for the antibody was $1.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The error bars reflect the \pm SD of three replicas.

- 5 Figure 8 shows dissociation kinetics for the Eu(III) labeled anti-PSA antibody (asterisk) and the Eu(III) labeled nanoparticle-antibody bioconjugates with 130 (square), 76 (circle), 46 (triangle pointing up), 30 (triangle pointing down), 19 (diamond), 12 (triangle pointing left) and 8 (triangle pointing right) active binding sites. The relative background subtracted fluorescence is plotted as a function of
- 10 time and the lines represent dissociation calculated from determined rate constants. The last time points were discarded from rate constant determination. The calculated dissociation rate constant for the antibody is $1.8 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$. First, 5 μl of blanks or free PSA standards ($0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ for bioconjugates, $48 \mu\text{g l}^{-1}$ for antibody) and 25 μl /well of assay buffer were added to anti-PSA antibody coated microtiter wells.
- 15 The wells were incubated for 45 min and washed before $1.5 \cdot 10^9$ pcs/well nanoparticle-antibody bioconjugates or 75 ng/well labeled antibody were added to 40 μl /well of assay buffer. The wells were incubated for 2 h and washed. The dissociation was initiated by adding 800 ng/well of non-labeled antibody in assay buffer (50 μl /well). The wells were incubated for 0-160 min and washed, before the
- 20 measurement of the surface bound nanoparticle or antibody fraction. The fluorescence signals obtained after subtracting the non-specific binding from the total binding were plotted by $\ln(\text{fluorescence}(\text{time}=0) / \text{fluorescence}(\text{time}))$ vs. time. The slope represented the dissociation rate constant of pure dissociation phase reaction, based on an integrated form of the rate equation $\ln(R_0 / R_n) = k_d (t_n - t_0)$, where R_0 was a response at time t_0 and R_n response at t_n . The inset shows the dependence of the fitted dissociation rate constants of the number of binding sites on the nanoparticle-antibody bioconjugates. The error bars reflect the \pm SD of three replicas.
- 25

Figure 9 shows affinity determination of the Eu(III) labeled anti-PSA antibody (asterisk) and the Eu(III) labeled nanoparticle-antibody bioconjugates with 130 (square), 76 (circle), 46 (triangle pointing up), 30 (triangle pointing down), 19 (diamond), 12 (triangle pointing left) and 8 (triangle pointing right) active binding sites. The background subtracted data is plotted to normalized Scatchard presentation enabling the direct comparison of affinities. First, 5 μl of blanks or free PSA standards ($1.0 \mu\text{g l}^{-1}$ for bioconjugates, $48 \mu\text{g l}^{-1}$ for antibody) and 25 μl /well of assay buffer were added to anti-PSA antibody coated microtiter wells. The wells were incubated for 45 min and washed before eight concentrations, $4.0 \cdot 10^9$ – $3.1 \cdot 10^7$ pcs/well nanoparticle-antibody bioconjugates or 50–0.39 ng/well labeled antibody were added to 40 μl /well of assay buffer to different wells. Separate blanks were included for each nanoparticle and antibody concentration. Wells were incubated for 16 h or 4 h, for nanoparticle and antibody strips, respectively, and washed, before the measurement of the surface bound bioconjugate or antibody fraction. The bound concentrations of bioconjugates and antibodies were calculated from the fluorescence signals obtained after subtracting the non-specific binding from the total binding. Affinity constants for nanoparticle-antibody bioconjugates and labeled antibody were calculated using data plotted by *bound/free ratio vs. bound* concentration. The inset shows the dependence of the fitted affinity constants and the number of binding sites on the nanoparticle-antibody bioconjugates. The four data points with the lowest bound / bound_{max} ratios were omitted from each linear regression analysis to obtain a value representing better monovalent binding affinity. The calculated affinity constant for the antibody was $6.6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. The error bars reflect the $\pm\text{SD}$ of three replicas.

Figure 10 shows standard curves for bioconjugate (214 active binding sites, square) and labeled antibody (8 europium(III) ions per antibody, asterisk) based two-step, non-competitive immunoassays of free PSA using 5 μl (solid line) and 30 μl (broken line) of sample. The labeled horizontal and vertical lines represent 2xSD of the blank sample and the analytical sensitivity of the assay, respectively. The solid

lines are for 30 μ l and broken lines for 5 μ l of sample, the upper lines for bioconjugate and the lower lines for labeled antibody. First, 5 μ l/well of standard and 25 μ l/well of the assay buffer or only 30 μ l/well standard were added into anti-PSA microtiter well and incubated for 45 min before the wells were washed.

5 Subsequently, $1 \cdot 10^9$ pcs/well of Eu(III) labeled nanoparticle-antibody bioconjugates or 75 ng/well of labeled antibody was added in 40 μ l/well volume of assay buffer. Incubation was carried out for 2 h and the wells were washed before measurement of surface-bound fluorescence. Europium(III) fluorescence from the nanoparticle-antibody bioconjugates was detected as in the section *non-specific*

10 *binding* but with damped emission aperture. The signal from the labeled antibody was measured at 613 nm with standard protocol after an additional incubation with 200 μ l/well of the DELFIA[®] enhancement solution. The absolute specific signals cannot be directly compared between the bioconjugate and the labeled antibody since the nanoparticle associated fluorescence is measured from the surface with

15 damped emission aperture. The error bars reflect the \pm SD of three replicas.

Figure 11 shows kinetic curves of PSA assays where PSA (5 μ l, 1 μ g l⁻¹) and a biotinylated anti-PSA antibody 5A10 (0.6 nmol l⁻¹) (●) or PSA (5 μ l, 1 μ g l⁻¹) and a biotinylated anti-PSA antibody 5A10 (0.6 nmol l⁻¹) and a biotinylated anti-PSA antibody H50 (0.6 nmol l⁻¹) (■) both reacting on different sites of PSA molecule

20 reacted with a microtiter well surface-bound anti-PSA antibody in a total volume of 30 μ l for 15 min and thereafter $1 \cdot 10^9$ nanoparticles coated with streptavidin reacted with the biotinylated anti-PSA antibodies in a total volume of 40 μ l. The curves represent the time dependent reaction of streptavidin-coated nanoparticles with the biotinylated anti-PSA 5A10 antibodies (two antibodies per PSA molecule)

25 bound to a analyte bound to the surface-captured anti-PSA antibody H117. A Victor 1420 (Perkin Elmer Life Sciences, Wallac Oy) time-resolved fluorometer was used to detect PSA directly on the surface of the microtiter well.

Figure 12a (logarithmic) and 12b (linear scale) shows time-resolved emission spectrum of europium chelate containing fluorescent latex (Fluoro-Max, diameter 10^7 nm, Seradyn, IN). The inset of 12a shows precise emission profile above 700 nm. Only insignificant (cannot be distinguished from the background) direct, long lifetime emission of europium exists above 710 nm. Europium(III) fluorescence of 0.1 % nanoparticle solution in 0.1% Triton X-100 was measured (Hamamatsu PMT R2949) in time-resolved fluorescence mode 340 nm excitation, 150 ms delay after excitation flash and 500 ms measurement window.

Figure 13 shows excitation and emission spectra of multiple dye containing (energy transfer) microparticles (Transfluospheres 760, TFS-760, diameter 2 μ m, Molecular Probes, Netherlands) and emission spectra of europium chelate containing fluorescent latex (Fluoro-Max, diameter 10^7 nm, Seradyn, IN). TFS-760 particles have exceptionally large Stoke's shift, difference between excitation and emission wavelengths. Background is too low to be shown on linear scale. Fluorescence from solution containing 40'000 particles/ml in 0.1% Triton X-100 was measured (Hamamatsu PMT R2949) in (prompt) fluorescence mode using excitation wavelength of 615 nm for emission spectra and emission wavelength of 760 nm for excitation spectra. TFS-760 particles can be efficiently excited at the wavelength of emission maximum of europium(III) luminescence and they have strong emission at 760 nm where europium(III) has a very weak background. Temporal resolution is required to separate energy transfer excited emission since, TransFluoSpheres are also excited at the excitation wavelength of europium nanoparticles (340 nm).

Figure 14 shows a calibration curve of a real homogeneous immunoassay of free prostate specific antigen (PSA). A non-competitive sandwich immunoassay was performed using europium chelate containing fluorescent latex (Fluoro-Max, diameter 107 nm, Seradyn, IN) as energy donor, coated with the first antibody of the sandwich-pair (Mab5A10), and multiple dye containing (energy transfer) microparticles (Transfluospheres 760, diameter 2 μ m, Molecular Probes,

Nederlands) as energy acceptor, coated with the second antibody of sandwich pair (MabH117). Detection limit below 0.01 nM of free PSA in solution was achieved in the experiment using non-optimized measurement instrument. Europium(III) nanoparticles coated with first antibody ($5 \cdot 10^9$ pcs) and TFS-760 particles coated with second antibody ($1.4 \cdot 10^9$ pcs) were added in 150 mL total volume of assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, containing 0.9 w/v % NaCl, 0.05 w/v % NaN₃, 0.5 w/v % bovine serum albumin, 0.01 w/v % Tween 40, 0.05 w/v % bovine g-globulin, 20 mM DTPA) to microtiter well coated with bovine serum albumin to block well surface from non-specific binding. Subsequently, 50 mL of different PSA standards were added to separate wells and reaction was incubated for 2 h in room temperature with shaking. Energy transfer excited fluorescence of TFS-760 was measured using Victor multilabel counter in time-resolved mode (excitation at 340 nm, delay time 80 ms, measurement window 500 ms, cycle time 4000 ms) equipped with red-sensitive PMT and longpass emission filter (>725 nm, T% 50 at 725 nm, T% 5 at 710 nm).

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

45

CLAIMS

1. A nanoparticle comprising a specific binding reactant, said nanoparticle being useful for determining an analyte to which analyte or complex comprising said analyte said binding reactant is specific, **characterized** in that
- 5 a) the diameter of said nanoparticle is less than 200 nm, preferably less than 120 nm,
- b) said nanoparticle is coated with multiple said specific binding reactants to the extent that
- 10 i) the affinity constant of said nanoparticle towards said analyte essentially exceeds that of free said binding reactant towards said analyte, and/or
- ii) the association rate constant between said nanoparticle and said analyte essentially exceeds the association rate constant between free said binding reactant and said analyte; and
- c) said nanoparticle comprises a detectable feature.
- 15 2. A nanoparticle according to claim 1 **characterized** in that said binding reactant is selected from a group consisting of an antibody, an antigen, a receptor ligand, a specific binding protein, avidin, streptavidin, biotin, a nucleic acid, a peptide, a sugar, a hapten, a virus, a bacteria and a cell.
3. A nanoparticle according to claim 1 or 2 **characterized** in that said detectable
- 20 feature is a luminescent label.
4. A nanoparticle according to claim 3 **characterized** in that said luminescent label is selected from a group consisting of time-resolved fluorescent labels, upconverting fluorescent labels, rapidly decaying fluorescent labels, chemiluminescent labels or bioluminescent labels.

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

46

5. A nanoparticle according to any of claims 1 to 4 **characterized** in that said biospecific binding reagent is attached to said nanoparticle by means of adsorption, covalent coupling, grafting, solid phase synthesis, or another biospecific binding reactant.
- 5 6. An assay for determining an analyte to which analyte or complex comprising said analyte a binding reactant is specific wherein said assay utilizes a nanoparticle comprising said specific binding reactant **characterized** in that
- a) the diameter of said nanoparticle is less than 200 nm, preferably less than 120 nm,
- 10 b) said nanoparticle is coated with multiple said specific binding reactants to the extent that
- i) the affinity constant of said nanoparticle towards said analyte essentially exceeds that of free said binding reactant towards said analyte, and/or
- ii) the association rate constant between said nanoparticle and said analyte
- 15 essentially exceeds the association rate constant between free said binding reactant and said analyte; and
- c) said nanoparticle comprises a detectable feature.
7. An assay according to claim 6 **characterized** in that said assay is heterogeneous and either non-competitive or competitive.
- 20 8. An assay according to claim 6 **characterized** in that said assay is homogeneous and either non-competitive or competitive.
9. An assay according to claim 7 **characterized** in that said assay is heterogenous and comprises the steps of
- a) contacting a first binding reactant bound to a solid phase, which reactant is
- 25 specific to a first binding site of said analyte, with a sample comprising said analyte;

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

47

- b) optionally reacting said analyte with said first binding reactant;
 - c) adding to the composition obtained in step a) said nanoparticles comprising a second binding reactant, which reactant is specific to a second binding site of said analyte;
 - 5 d) reacting second binding reactant of said nanoparticles with said analyte bound to first binding reactant bound to said solid phase;
 - e) washing said solid phase, which solid phase binds a first binding reactant bound to said analyte bound to second binding reactant of nanoparticles, essentially free of nanoparticles not biospecifically bound to said solid phase; and
 - 10 f) detecting said nanoparticles bound to said solid phase to enable determination of said analyte.
10. An assay according to claim 9, **characterized** in that steps a) and c) are carried out essentially simultaneously thus omitting the optional reacting step b).
11. An assay according to claim 9 **characterized** in that it comprises said optional
- 15 reacting step b).
12. An assay according to claim 7 **characterized** in that said assay is heterogeneous and comprises the steps of
- a) contacting a first binding reactant bound to a solid phase, which reactant is specific to a first binding site of said analyte, with a sample comprising said analyte;
 - 20 b) adding to the composition obtained in step a) a second binding reactant bound to a third binding reactant, which second binding reactant is specific to a second binding site of said analyte;
 - c) adding to the composition obtained in step b) said nanoparticles comprising a fourth binding reactant, which reactant is specific to said third binding reactant;

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

48

- d) reacting said fourth binding reactant of said nanoparticles with third binding reactant bound to second binding reactant bound to said analyte bound to said first binding reactant bound to said solid phase;
- e) washing said solid phase, which solid phase binds first binding reactant bound to analyte bound to second binding reactant bound to third binding reactant bound to fourth binding reactant of said nanoparticles, essentially free of nanoparticles not biospecifically bound to said solid phase; and
- f) detecting said nanoparticles bound to said solid phase to enable determination of said analyte.
- 10 13. An assay according to claim 12 **characterized** in that said third binding reactant is biotin and said fourth binding reactant is avidin or streptavidin.
14. An assay according to claim 12 **characterized** in that said third binding reactant is avidin or streptavidin and said fourth binding reactant is biotin.
15. An assay according to claim 7 or 8 **characterized** in that said assay is heterogeneous and competitive and comprises the steps of
- a) contacting a first binding reactant bound to a solid phase, which reactant is specific to a first binding site of said analyte, with a sample comprising said analyte, and with additional said analyte bound to said nanoparticles,
- b) washing said solid phase, which solid phase binds first binding reactant bound to analyte bound to said nanoparticle, essentially free of nanoparticles not bound to said solid phase biospecifically or not; and
- c) detecting nanoparticles bound to said solid phase to enable determination of said analyte.
16. An assay according to claim 7 or 8 **characterized** in that said assay is heterogeneous and competitive and comprises the steps of
- 25

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

49

- a) contacting a first binding reactant bound to a solid phase, which reactant is specific to a first binding site of said analyte, with a sample comprising said analyte, and with additional said analyte bound to a second binding reactant
- b) adding to the composition obtained in step a) said nanoparticles comprising a third binding reactant, which reactant is specific to said second binding reactant,
- 5 c) reacting said third binding reactant of said nanoparticles with said second binding reactant bound to said additional analyte bound to first binding reactant bound to said solid phase;
- d) washing said solid phase, which solid phase binds first binding reactant, bound to analyte bound to second binding reactant bound to third binding reactant of said nanoparticles, essentially free of nanoparticles not bound to said solid phase; and
- 10 e) detecting nanoparticles bound to said solid phase to enable determination of said analyte.
17. An assay according to any of claims 9 to 16 **characterized** in that said non-optional reacting step is discontinued essentially before equilibrium.
- 15 18. An assay according to any of claims 9 to 17 **characterized** in that said solid phase is an essentially flat surface.
19. An assay according to claim 18, **characterized** in that said essentially flat surface is selected from a group consisting of the surface of a microtiter well, the surface of a slide, the surface of a particle and the surface of a strip.
- 20 20. An assay according to any of claims 9 to 19 **characterized** in that two different second binding reactants, second binding reactant A and second binding reactant B, are added in stead of one second binding reactant, both second binding reactants A and B being specific to different binding sites of said analyte as well as

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

50

both different binding sites of reactants A and B being different from the binding site of the analyte of said first binding reagent.

21. A proximity based homogenous assay comprising a first group labeled with an energy donating compound (donor) and a second group labeled with an energy accepting compound (acceptor), wherein

- the donor is luminescent and has a long excited state lifetime and the acceptor is luminescent having a short or long excited state lifetime or the acceptor is non-luminescent, and
- the increase or decrease, respectively, in the energy transfer from the donor to the acceptor resulting from shortening or lengthening, respectively, of the distance between said groups, is measured

characterized in that the donor is a nanoparticle.

22. An assay according to claim 21 **characterized** in that said acceptor is luminescent having a short or long excited state lifetime and the luminescence of the acceptor is measured at a wavelength where the donor has no luminescence or essentially no luminescence, i.e. the luminescence of the donor is not significant compared to background luminescence.

23. An assay according to claim 21 or 22 **characterized** in that said assay is non-competitive.

24. An assay according to claim 21 or 22 **characterized** in that said assay is competitive.

25. A proximity based homogenous assay according to claim 24 **characterized** in that said nanoparticle is according to any of claims 1 to 5.

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

51

26. A proximity based homogenous assay according to claim 24 or 25 **characterized** in that the donor is a lanthanide luminescent nanoparticle or a polymeric nanoparticle embedded with an energy donating lanthanide luminescent compound.
- 5 27. A proximity based homogenous assay according to claim 24, 25 or 26 **characterized** in that the donor is a europium chelate nanoparticle.
28. A proximity based homogenous assay according to claim 27 **characterized** in that said acceptor luminescence is measured at a wavelength above 640 nm, preferably 700 nm.
- 10 29. A proximity based homogenous assay according to any of claims 21 to 28 characterized in that said acceptor is a nanoparticle, preferably a nanoparticle according to any of claims 1 to 5.

1/15

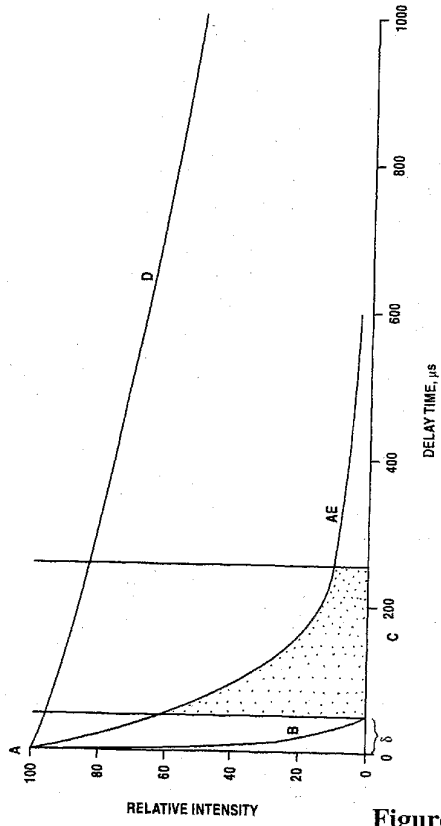


Figure 1

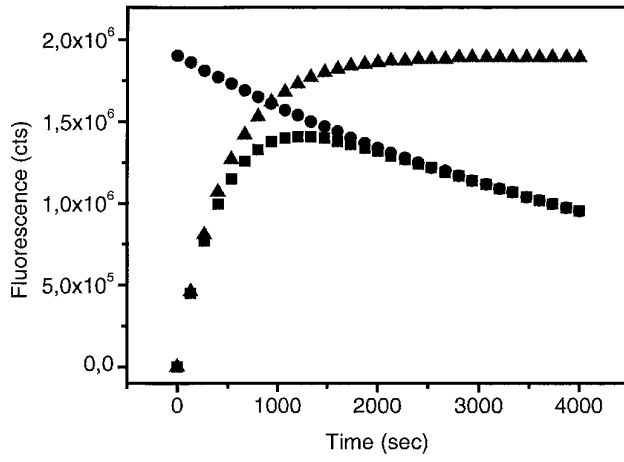


Figure 2

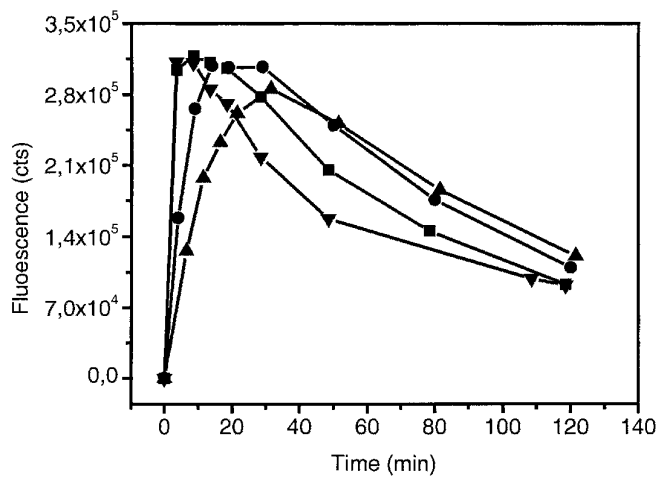


Figure 3

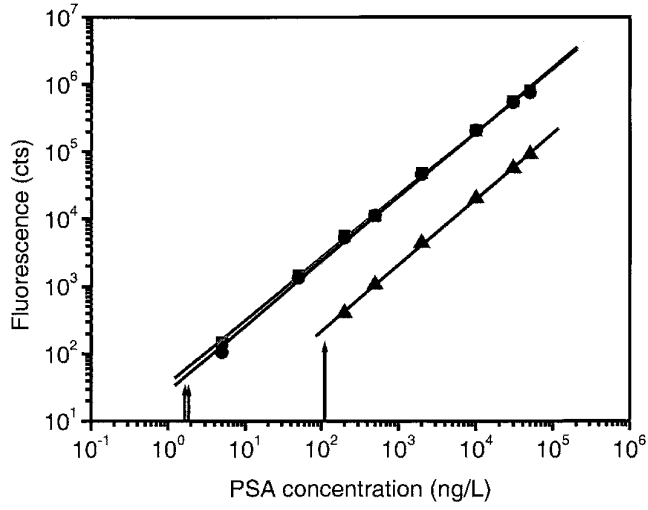


Figure 4

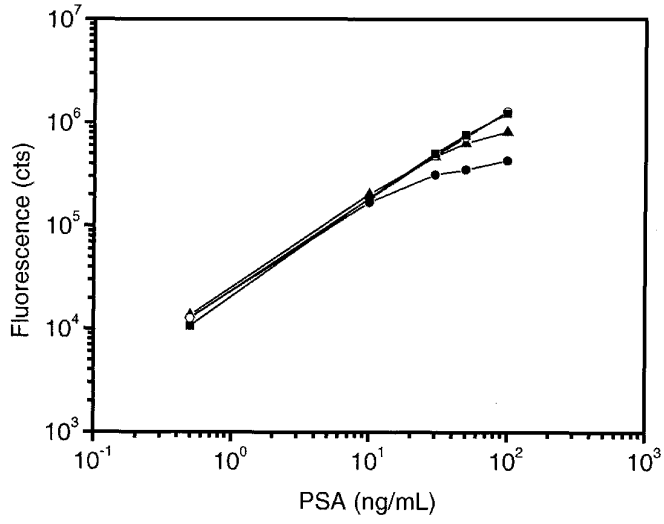


Figure 5

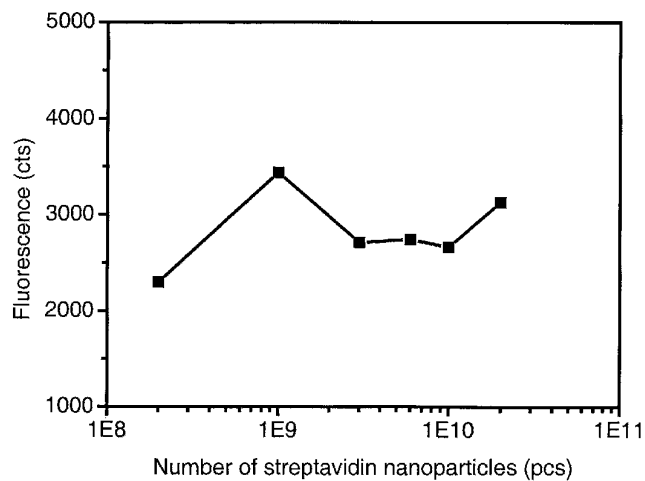


Figure 6

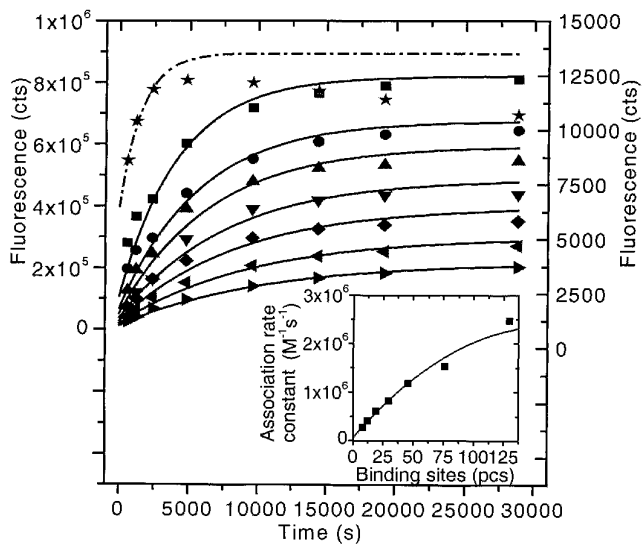


Figure 7

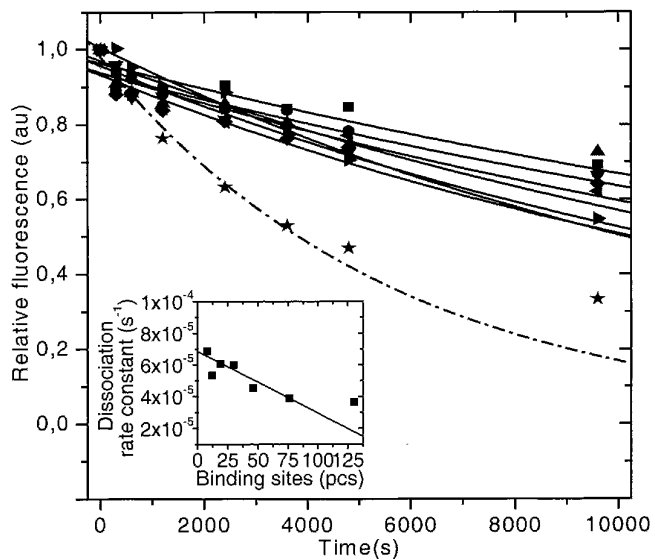


Figure 8

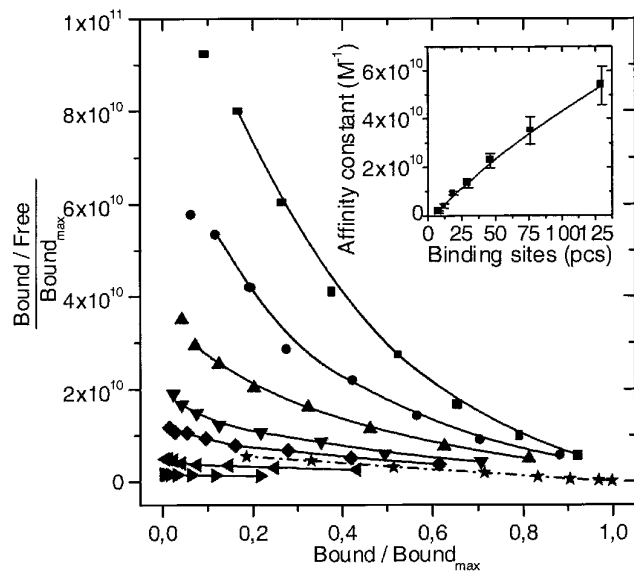


Figure 9

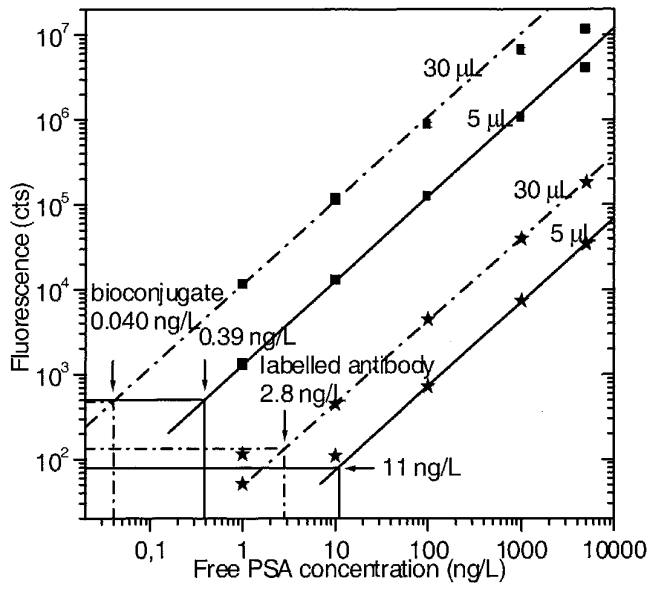


Figure 10

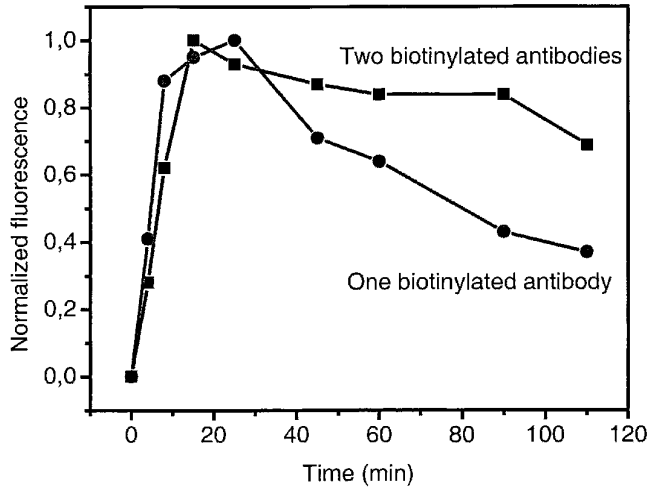


Figure 11

WO 02/44725

PCT/FI01/01024

12/15

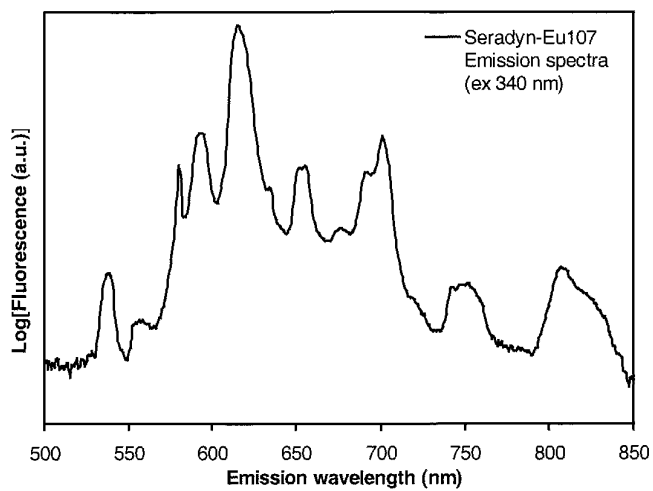


Figure 12a

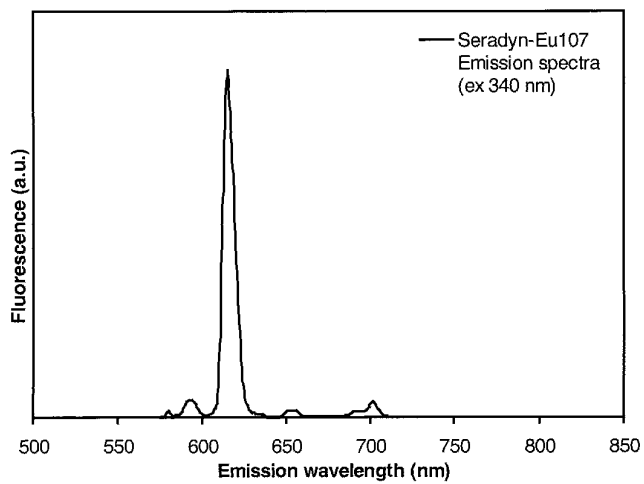


Figure 12b

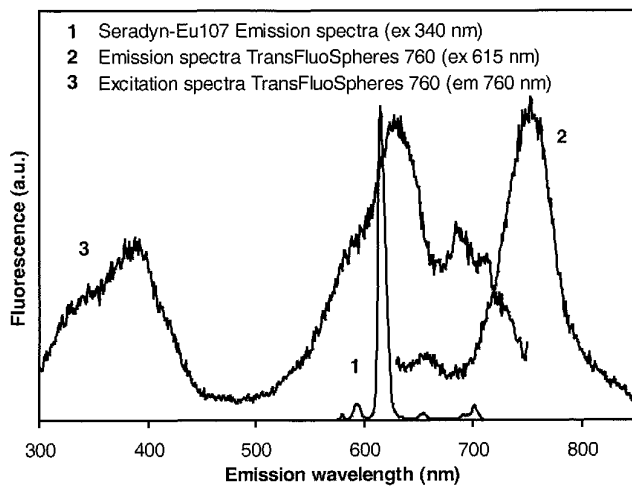


Figure 13

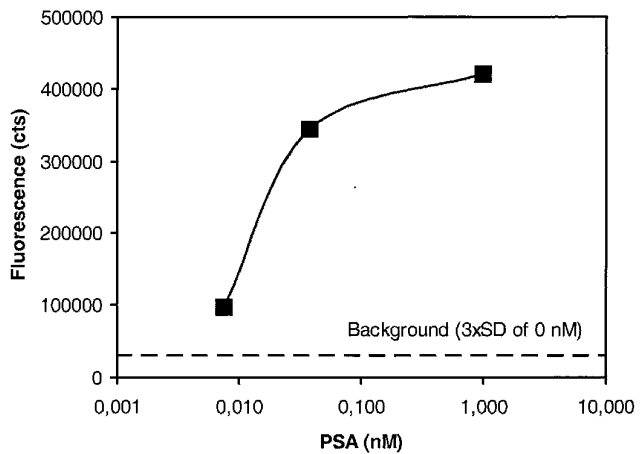


Figure 14

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

REVISED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 June 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/044725 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/543
- (21) International Application Number: PCT/FI01/01024
- (22) International Filing Date:
26 November 2001 (26.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
20002623 30 November 2000 (30.11.2000) FI
- (71) Applicant (for all designated States except US): INNO-TRAC DIAGNOSTICS OY [FI/FI]; Kalevantie 25, FIN-20520 Turku (FI).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): PETERSSON, Kim [FI/FI]; Tilentekijänkatu 14 B 20, FIN-20810 Turku (FI).
- (74) Agent: TURUN PATENTTI-TOIMISTO OY; P.O. Box 99, FIN-20521 Turku (FI).
- (81) Designated States (national): 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, KZ, LC, LK, LR, LS, 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, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, 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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, PL, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the revised international search report: 17 October 2002
- (15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 42/2002 of 17 October 2002, Section II
- 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.*

(54) Title: BIOANALYTICAL ASSAY

(57) Abstract: The present invention relates to a nanoparticle comprising a specific binding reactant, said nanoparticle being useful for determining an analyte to which analyte or complex comprising said analyte said binding reactant is specific. Characteristic for the nanoparticle is that the diameter of said nanoparticle is less than 200 nm, said nanoparticle is coated with multiple said specific binding reactants to the extent that the affinity constant of said nanoparticle towards said analyte essentially exceeds that of free said binding reactant towards said analyte and/or the association rate constant between said nanoparticle and said analyte essentially exceeds the association rate constant between free said binding reactant and said analyte; and said nanoparticle comprises a detectable feature. The invention also relates to biochemical assays using said nanoparticle. The assay further relates to a proximity based homogenous assay comprising a first group labeled with an energy donating compound (donor) and a second group labeled with an energy accepting compound (acceptor), wherein the donor is luminescent and has a long excited state lifetime and the acceptor is luminescent having a short or long excited state lifetime or the acceptor is non-luminescent, and the increase or decrease, respectively, in the energy transfer from the donor to the acceptor resulting from shortening or lengthening, respectively, of the distance between said groups, is measured. Characteristic for the assay is that the donor is a nanoparticle.

WO 02/044725 A1

【手続補正書】

【提出日】平成15年1月31日(2003.1.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

特異的結合反応物を含むナノ粒子であって、該結合反応物にとって特異的な検体または複合体が含有する該検体を測定するために有用なナノ粒子であって、

- a) 該ナノ粒子の直径が200nm未満、好ましくは120nm未満である、
 - b) 該ナノ粒子が多数の該特異的結合反応物でつぎの程度にコートされている、
 - i) 該検体に対する該ナノ粒子の親和定数が、該検体に対する遊離の該結合反応物の親和定数を本質的に超え、および/もしくは
 - ii) 該ナノ粒子と該検体とのあいだの会合速度定数が、遊離の該結合反応物と該検体とのあいだの会合速度定数を本質的に超える；ならびに
 - c) 該ナノ粒子が検出可能な特徴を含む
- ことを特徴とするナノ粒子。

【請求項2】

前記結合反応物が、抗体、抗原、受容体リガンド、特異的結合タンパク質、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、核酸、ペプチド、糖、ハプテン、ウイルス、細菌および細胞からなる群から選択されることを特徴とする請求項1記載のナノ粒子。

【請求項3】

前記検出可能な特徴が発光性標識であることを特徴とする請求項1または2記載のナノ粒子。

【請求項4】

前記発光性標識が、時間分解蛍光標識、アップコンバーティング蛍光標識、急速崩壊蛍光標識、化学発光性標識または生物発光性標識からなる群から選択されることを特徴とする請求項3記載のナノ粒子

【請求項5】

前記生物特異的結合反応物が、吸着、共有結合、グラフティング、固相合成または他の生物特異的結合反応物の手段によって、ナノ粒子に結合していることを特徴とする請求項1、2、3または4記載のナノ粒子。

【請求項6】

特異的結合反応物にとって特異的な検体または複合体が含有する該検体を測定するためのアッセイであって、該特異的結合反応物を含むナノ粒子を用いるアッセイであって、

- a) 該ナノ粒子の直径は200nm未満、好ましくは120nm未満である、
 - b) 該ナノ粒子が、多数の該特異的結合反応物でつぎの程度にコートされている、
 - i) 該検体に対する該ナノ粒子の親和定数が、該検体に対する遊離の該結合反応物の親和定数を本質的に超え、および/もしくは
 - ii) 該ナノ粒子と該検体とのあいだの会合速度定数が、遊離の該結合反応物と該検体とのあいだの会合速度定数を本質的に超える；ならびに
 - c) 該ナノ粒子が検出可能な特徴を含む
- ことを特徴とするアッセイ。

【請求項7】

前記アッセイがヘテロジニアスであって、非競合的または競合的であることを特徴とする請求項6記載のアッセイ。

【請求項8】

前記アッセイがホモジニアスであって、非競合的または競合的であることを特徴とする請

求項 6 記載のアッセイ。

【請求項 9】

前記アッセイがヘテロジニアスなアッセイであって、

- a) 固相に結合した第 1 結合反応物 (この反応物は検体の第 1 結合部位に対して特異的である) を、該検体を含有する試料と接触させる工程；
- b) 任意に該検体を該第 1 結合反応物と反応させる工程；
- c) 工程 a) で得られた組成物に、第 2 結合反応物 (この反応物は該検体の第 2 結合部位に対して特異的である) を含むナノ粒子を添加する工程；
- d) 該ナノ粒子の第 2 結合反応物を、該固相に結合した第 1 結合反応物に結合した検体と反応させる工程；
- e) 該固相 (この固相は、該ナノ粒子の第 2 結合反応物に結合した検体に結合した第 1 結合反応物に結合している) を洗浄して、本質的に該固相に生物特異的に結合していないナノ粒子をなくす工程；および
- f) 該検体の測定を可能とするために、該固相に結合したナノ粒子を検出する工程からなることを特徴とする請求項 7 記載のアッセイ。

【請求項 10】

工程 a) および c) が本質的に同時に実施され、したがって任意の反応工程 b) がないことを特徴とする請求項 9 記載のアッセイ。

【請求項 11】

任意の反応工程 b) を含むことを特徴とする請求項 9 記載のアッセイ。

【請求項 12】

前記アッセイがヘテロジニアスなアッセイであって、

- a) 固相に結合した第 1 結合反応物 (この反応物は検体の第 1 結合部位に対して特異的である) を、該検体を含有する試料と接触させる工程；
- b) 工程 a) で得られた組成物に、第 3 結合反応物に結合した第 2 結合反応物 (この第 2 結合反応物は該検体の第 2 結合部位に対して特異的である) を添加する工程；
- c) 工程 b) で得られた組成物に、第 4 結合反応物 (この反応物は該第 3 結合反応物に対して特異的である) を含むナノ粒子を添加する工程；
- d) 該ナノ粒子の第 4 結合反応物を、該固相に結合した第 1 結合反応物に結合した検体に結合した第 2 結合反応物に結合した第 3 結合反応物と反応させる工程；
- e) 該固相 (この固相は、該ナノ粒子の第 4 結合反応物に結合した第 3 結合反応物に結合した第 2 結合反応物に結合した検体に結合した第 1 結合反応物に結合している) を洗浄して、本質的に該固相に生物特異的に結合していないナノ粒子をなくす工程；および
- f) 該検体の測定を可能とするために、該固相に結合したナノ粒子を検出する工程からなることを特徴とする請求項 7 記載のアッセイ。

【請求項 13】

前記第 3 結合反応物がビオチンであり、前記第 4 結合反応物がアビジンまたはストレプトアビジンであることを特徴とする請求項 12 記載のアッセイ。

【請求項 14】

前記第 3 結合反応物がアビジンまたはストレプトアビジンであり、前記第 4 結合反応物がビオチンであることを特徴とする請求項 12 記載のアッセイ。

【請求項 15】

前記アッセイがヘテロジニアスで競合的なアッセイであって、

- a) 固相に結合した第 1 結合反応物 (この反応物は検体の第 1 結合部位に対して特異的である) を、該検体を含有する試料と接触させ、かつ該ナノ粒子に結合した追加の検体と接触させる工程；
- b) 該固相 (この固相は、該ナノ粒子に結合した検体に結合した第 1 結合反応物に結合している) を洗浄して、本質的に固相に結合していないナノ粒子をなくす工程；および
- c) 該検体の測定を可能とするために、該固相に結合したナノ粒子を検出する工程からなることを特徴とする請求項 7 または 8 記載のアッセイ。

【請求項 16】

前記アッセイがヘテロジニアスで競合的なアッセイであって、

a) 固相に結合した第 1 結合反応物 (この反応物は検体の第 1 結合部位に対して特異的である) を、該検体を含有する試料と接触させ、かつ第 2 結合反応物に結合した追加の検体と接触させる工程;

b) 工程 a) で得られた組成物に、第 3 結合反応物 (この反応物は該第 2 結合反応物に対して特異的である) を含むナノ粒子を添加する工程;

c) 該ナノ粒子の第 3 結合反応物を、該固相に結合した第 1 結合反応物に結合した追加的検体に結合した第 2 結合反応物と反応させる工程;

d) 該固相 (この固相は、該ナノ粒子の第 3 結合反応物に結合した第 2 結合反応物に結合した検体に結合した第 1 結合反応物に結合している) を洗浄して、本質的に該固相に結合していないナノ粒子をなくす工程; および

e) 該検体の測定を可能にするために、該固相に結合したナノ粒子を検出する工程からなることを特徴とする請求項 7 または 8 記載のアッセイ。

【請求項 17】

前記の非任意的な反応工程が、本質的に平衡になる前に中止されることを特徴とする請求項 9、10、11、12、13、14、15 または 16 記載のアッセイ。

【請求項 18】

前記固相が本質的に平坦な表面であることを特徴とする請求項 9、10、11、12、13、14、15、16 または 17 記載のアッセイ。

【請求項 19】

前記の本質的に平坦な表面が、マイクロタイターウェルの表面、スライドの表面、粒子の表面および細片の表面からなる群から選択されることを特徴とする請求項 18 記載のアッセイ。

【請求項 20】

2 つの異なる第 2 結合反応物である第 2 結合反応物 A および第 2 結合反応物 B が、1 つの第 2 結合反応物の代わりに添加され、両第 2 結合反応物 A および B は前記検体の異なる結合部位に対して特異的であると共に、反応物 A および B の異なる両結合部位が前記第 1 反応結合物の検体の結合部位とは異なることを特徴とする請求項 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18 または 19 記載のアッセイ。

【請求項 21】

エネルギー供与化合物 (ドナー) で標識された第 1 群およびエネルギー受容化合物 (アクセプター) で標識された第 2 群とからなり、

- ドナーは発光性であり、また長い励起状態寿命を有し、アクセプターは発光性で、短いまたは長い励起状態寿命を有するか、またはアクセプターは非発光性であり、そして

- 両群のあいだの距離の短縮または延長からそれぞれ生じる、ドナーからアクセプターへのエネルギー移動の増加または減少それぞれが測定される

近接ベースのホモジニアスアッセイ法であって、該ドナーが 請求項 1、2、3、4 または 5 記載のナノ粒子であることを特徴とするアッセイ法。

【請求項 22】

前記アクセプターが発光性で、短いまたは長い励起状態寿命を有し、アクセプターの発光が、ドナーが発光を有しないかまたは本質的に発光を有しない波長で、すなわちドナーの発光がバックグラウンド発光に較べて有意でない波長で測定されることを特徴とする請求項 21 記載のアッセイ法。

【請求項 23】

前記アッセイが非競合的であることを特徴とする請求項 21 または 22 記載のアッセイ法。

【請求項 24】

前記アッセイが競合的であることを特徴とする請求項 21 または 22 記載のアッセイ法。

【請求項 25】

ドナーがランタニド発光性ナノ粒子であるか、またはエネルギー供給ランタニド発光性化合物が埋め込まれたポリマー性ナノ粒子であることを特徴とする請求項 24 記載の近接ベースのホモジニアスアッセイ法。

【請求項 26】

ドナーがユーロピウムキレートナノ粒子であることを特徴とする請求項 24 または 25 記載の近接ベースのホモジニアスアッセイ法。

【請求項 27】

前記アクセプター発光が 640 nm を超える、好ましくは 700 nm を超える波長で測定されることを特徴とする請求項 26 記載の近接ベースのホモジニアスアッセイ法。

【請求項 28】

前記アクセプターがナノ粒子、好ましくは請求項 1、2、3、4 または 5 記載のナノ粒子であることを特徴とする請求項 21、22、23、24、25、26 または 27 記載の近接ベースのホモジニアスアッセイ法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI 01/01024
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: G01N 33/543 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)		
IPC7: G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPD-INTERNAL, WPI DATA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WD 0033079 A1 (NANOSPHERE LLC), 8 June 2000 (08.06.00) --	1-20
X	Science, Volume 281, September 1998, Warren C. W. Chan et al: "Quantum Dot Bioconjugates for Ultra-sensitive Nonisotopic Detection", pages 2016-2018 --	1-20
X	WD 9833070 A1 (HANSEN, W. PETER), 30 July 1998 (30.07.98) --	1-20
X	WD 9821587 A1 (NOAB IMMUNOASSAY INC.), 22 May 1998 (22.05.98), page 12, line 19 - page 14, line 16, and the whole document --	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier application or patent but published on or after the international filing date		*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
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)		*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
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
24 April 2002	29-04-2002	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Patrick Andersson/BS Telephone No. +46 8 782 25 00	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI 01/01024
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 0046839 A2 (UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE), 10 August 2000 (10.08.00), claim 33 --	1-20
X	Luminescence, Volume 15, 2000, Harri Härmä, et al: "Zeptomole detection and sensitivity of prostate-specific antigen in a rapid microtitre plate assay using time-resolved fluorescence", pages 351-355 --	1-20
X	Journal of Biomolecular Screening, Volume 5, No 4, 2000, Sabine Schaertl et al: "A Novel and Robust Homogeneous Fluorescence-Based Assay Using Nanoparticles for Pharmaceutical Screening and Diagnostics", pages 227-237 --	1-20
X	Anal. Chem, Volume 72, 2000, Jason R. Taylor et al: "Probing Specific Sequences on Single DNA Molecules with Bioconjugated Fluorescent Nanoparticles", pages 1979-1986 --	1-20
A	EP 0789242 A2 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH), 13 August 1997 (13.08.97) -- -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI01/01024
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: claims 1-20 (Partially) because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: see next sheet*
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: see next sheet**		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

Intern application No.
PCT/PT01/01024

*
Claims 1 and 6 B) defines the nanoparticle by the result achieved, without giving any technical feature. The search of said claims, and dependant claims, regarding said nanoparticle has been limited to the technical feature given in the specification, ie increasing the number of binding sites.

**
According to Article 34(3)(a-c) and Rule 13.2, an international application shall relate to one invention only or to a group of inventions linked by one or more of the same or corresponding "special technical features", i.e. features that define a contribution which each of the inventions makes over the prior art.

The claimed invention relates to a nanoparticle with certain technical feature, an assay using said nanoparticles and a proximity based homogenous assay using a nanoparticle. Since Ullman et al, Clin Chem, 1996, vol 42 page 1512 medline abstract acc no 8787723, cited in the description shows a proximity based homogenous assay using a nanoparticle, no unifying technical feature can be found.

The following invention were found:
Invention 1, claims 1-20, nanoparticle having certain binding affinities towards an analyte and related assay.
Invention 2 claims 21-29 proximity based homogenous assay using a nanoparticle.

Invention 1 has been searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No.		
Information on patent family members				PCT/FI 01/01024		
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO	0033079	A1	08/06/00	AU	1928600 A	19/06/00
				CN	1328641 T	26/12/01
				EP	1135682 A	26/09/01
				US	5941484 A	24/08/99
WO	9833070	A1	30/07/98	EP	0928420 A	14/07/99
				US	5939021 A	17/08/99
WO	9821587	A1	22/05/98	AU	4859797 A	03/06/98
				US	5922537 A	13/07/99
WO	0046839	A2	10/08/00	AU	4324900 A	25/08/00
				EP	1161490 A	12/12/01
EP	0789242	A2	13/08/97	AU	703477 B	25/03/99
				AU	6995496 A	03/07/97
				DE	69603505 D,T	10/02/00
				EP	0865538 A,B	23/09/98
				GB	9602323 D	00/00/00
				JP	9325149 A	16/12/97
				NZ	318469 A	23/12/98
				US	5830762 A	03/11/98
				US	6053376 A	25/04/00

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
	G 0 1 N 33/53	Z N M U
	G 0 1 N 33/545	Z

(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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ペッテルソン、キム
 フィンランド共和国、フィン - 2 0 8 1 0 ツルク、チーレンテキエンカツ 1 4 エー 2 0

专利名称(译)	生物分析测定		
公开(公告)号	JP2004514907A	公开(公告)日	2004-05-20
申请号	JP2002546217	申请日	2001-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	酒店卢武铉跟踪诊断Osake蔡雪		
申请(专利权)人(译)	酒店卢武铉跟踪诊断Osake Yukichua		
[标]发明人	ペッテルソンキム		
发明人	ペッテルソン、キム		
IPC分类号	B82B1/00 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545		
CPC分类号	G01N33/54346 Y10T428/2982		
FI分类号	G01N33/543.501.D G01N33/543.521 G01N33/543.525.W G01N33/543.575 B82B1/00 G01N33/53.ZNM.U G01N33/545.Z		
代理人(译)	秋山文雄 田中 弘		
优先权	2000002623 2000-11-30 FI		
其他公开文献	JP3890019B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及包含特异性结合反应物的纳米颗粒，其可用于测量分析物中包含的分析物或结合反应物特异性的复合物。纳米颗粒的特征，直径所述纳米颗粒是小于200纳米；与所述纳米颗粒是一些特定反应的粘合剂，所述纳米颗粒的反应产物的亲和常数的是免费向试样中的结合反应的实质上超过所述物体的所述纳米颗粒之间的亲和常数，和/或缔合速率常数，所述分析物是比在所述结合反应物之间的缔合速率常数较高，并且所述游离分析物基本上并且纳米颗粒含有可检测的特征。本发明还涉及使用所述纳米颗粒的生物化学测定。该测定法还可以是能量供体化合物（供体）关于标记的第一组和能量受体化合物基于接近性标记（受体）的第二基团，其中所述供体是发射的均相测定，也有很长的激发态寿命，受体在发光的，或具有短的或长激发态寿命，或受体是一个非发光，并且从每个缩短或两个基团之间的距离的延伸效果，测量从供体到受体的能量转移的增加或减少。该测定的特征是供体是纳米颗粒。

標識化合物の7-ニチン酸の反応速度定数			
標識化合物	上置換定数 k_1 (M ⁻¹ s ⁻¹) ^a	会合速度定数 k_2 (M ⁻¹ s ⁻¹) ^a	解離速度定数 k_3 (s ⁻¹) ^a
EtOH/ANの標識化合物	6.6 ± 0.3	12.6 ± 0.7	17.6 ± 0.8
NbSFA10	6.6 ± 0.3	12.6 ± 0.7	17.6 ± 0.8
ナノ粒子-標識化合物コンjugateの結合定数			
130	33.8 ± 7.9	24.8 ± 1.6	3.7 ± 0.9
76	35.1 ± 5.7	15.3 ± 0.9	3.9 ± 1.5
46	22.6 ± 3.0	11.8 ± 0.6	4.5 ± 1.4
30	33.3 ± 1.7	8.3 ± 0.3	6.0 ± 1.3
19	9.2 ± 0.7	6.1 ± 0.3	6.1 ± 1.4
12	4.1 ± 0.9	4.1 ± 0.1	5.3 ± 1.0
8	1.6 ± 0.5	2.8 ± 0.1	6.9 ± 0.9

^a 平均 ± SD

^b 反応速度定数から計算された値

^c Molecular Weight = 25-45 kDa のナノ粒子-標識化合物コンjugate-10000-50³ を用いて計算された値