

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-502871

(P2005-502871A)

(43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(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 7 5	2 G O 4 3
GO 1 N 21/64	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	2 G O 5 4
GO 1 N 21/78	GO 1 N 21/64 C	
GO 1 N 27/447	GO 1 N 21/64 F	
GO 1 N 33/53	GO 1 N 21/78 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-527379 (P2003-527379)	(71) 出願人	591028256
(86) (22) 出願日	平成14年8月27日 (2002. 8. 27)		ベックマン コールター インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月5日 (2004. 3. 5)		BECKMAN COULTER, INCORPORATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/027332		アメリカ合衆国 92834-3100
(87) 国際公開番号	W02003/023353		カリフォルニア州 フラトン ピーオーボックス 3100 ハーパー ブルバード 4300 エヌ
(87) 国際公開日	平成15年3月20日 (2003. 3. 20)		4300N. Harbor Boulevard Fullerton, California 92834-3100 U. S. A.
(31) 優先権主張番号	09/947, 990	(74) 代理人	100070024
(32) 優先日	平成13年9月6日 (2001. 9. 6)		弁理士 松永 宣行
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), JP		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レーザ励起蛍光検出毛管電気泳動法を利用する粒子均一アッセイ法

(57) 【要約】

本発明は、サンプル中の関心のある被検体の濃度を決定するために、毛管電気泳動およびレーザ励起蛍光 (L I F) 検出と協働する粒子増感アッセイ形式を用いる高感度で迅速な均一アッセイを提供する。かかる測定は、かかる信号を発生することができる反応混合液中に存在する種の L I F とともに発生する蛍光信号 (すなわち、電気泳動結果図) を計測することによって行われる。本発明の方法は、分離してから測定されなければならない信号の数を低減させることにより単純化された電気泳動結果図を作成して、サンプル中の標的被検体濃度の検出および / または定量の精度を上昇させる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプルの被検体の濃度のアッセイ方法であって、

- (a) 被検体特異的結合パートナーを含む感作粒子を用意するステップと、
 - (b) 蛍光部分に結合した前記被検体を含む、遊離の蛍光色素標識被検体を用意するステップと、
 - (c) 前記サンプルの被検体に結合した固定化された前記結合パートナーを含む第 1 の複合体、および / または、前記蛍光色素標識被検体に結合した固定化された前記結合パートナーを含む第 2 の複合体の形成を可能にする条件下で、既知量の前記感作粒子および既知量の蛍光色素標識被検体が存在する状態で前記サンプルのインキュベーションをするステップと、
 - (d) 前記ステップ (c) でインキュベーションされた前記サンプルの一部を毛管電気泳動に供するステップと、
 - (e) 前記遊離の蛍光色素標識被検体のレーザ励起蛍光を検出することによって前記被検体の濃度を測定するステップとを含み、
- 前記被検体特異的結合パートナーは前記感作粒子に固定化され、第 2 の複合体の前記蛍光色素部分の蛍光は第 2 の複合体の形成とともに消光し、前記レーザ励起蛍光は、前記サンプル中の前記被検体の濃度に正比例する、サンプルの被検体の濃度のアッセイ方法。

10

【請求項 2】

前記不溶性粒子は蛍光消光剤のコーティングを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

前記蛍光消光剤は、フルオレセイン誘導体、ローダミン誘導体、ヨウ化物、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} および Cr^{3+} からなるグループから選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記被検体は、抗原、ハプテン、抗体、タンパク質、糖タンパク質、糖、免疫グロブリン、レセプター、酵素、ペプチド、アミノ酸、ホルモン、ステロイド類、癌細胞マーカー、組織細胞、ウイルス、ビタミン、薬物、代謝産物、核酸、殺虫剤および毒素からなるグループから選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記結合パートナーは、抗原、抗原断片、レセプター、核酸、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体およびこれらの断片、誘導体および複合体、レクチン、プロテイン A、プロテイン G、ポリペプチド、アビジン、ストレプトアビジン、シクロデキストラン、クラウンエーテル、内因子および葉酸結合タンパク質からなるグループから選択される、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記サンプルは、全血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液、乳汁、水、排泄物、食物、タンパク質および薬物からなるグループから選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記粒子は、オレフィン系不飽和単量体の重合体および共重合体、ガラス、木炭、コロイド金粒子、アクリルアミド、メタクリル酸、ナイロン、金属、金属酸化物およびその誘導体、デキストラン、セルロース、赤血球、花粉、リポソームおよび細菌からなるグループから選択される、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 8】

前記蛍光部分は、フルオレセイン、イソチオシアナート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オフトアルデヒド標識、フルオレスカミン、テトラメチルローダミン、BODIPY、近赤外色素およびランタニド錯体からなるグループから選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ステップ (d) において、前記毛管電気泳動は石英ガラスカラムで実施される、請求

50

項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

サンプルの被検体の濃度のアッセイ方法であって、

- (a) 前記被検体を含む感作粒子を用意するステップと、
- (b) 蛍光部分に結合した被検体特異的結合パートナーを含む遊離の蛍光色素標識結合パートナーを用意するステップと、
- (c) 前記標識結合パートナーに結合した固定化された前記被検体を含む第 1 の複合体、および/または、前記蛍光色素標識結合パートナーに結合した前記サンプルの被検体を含む第 2 の複合体の形成を可能にする条件下で、前記サンプルを前記感作粒子および前記蛍光色素標識結合パートナーとともにインキュベーションするステップと、
- (d) 前記ステップ(c)でインキュベーションされた前記サンプルの一部を毛管電気泳動に供するステップと、
- (e) 第 2 の複合体が、複合体非形成の蛍光色素標識結合パートナーかのレーザ励起蛍光を検出することによって、前記サンプル中の前記被検体の濃度を測定するステップとを含み、

10

前記被検体は前記感作粒子に固定化され、

前記結合パートナーは、前記サンプルの被検体と、前記固定化された被検体とに特異的に結合し、

第 1 の複合体の蛍光色素部分の蛍光は第 1 の複合体の形成とともに消光し、

前記毛管電気泳動は、前記遊離の蛍光色素標識結合パートナーからの第 2 の複合体の分離を可能にする条件下で実施される、サンプルの被検体の濃度のアッセイ方法。

20

【請求項 11】

前記不溶性粒子は蛍光消光剤のコーティングを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記蛍光消光剤は、フルオレセイン誘導體、ローダミン誘導體、ヨウ化物、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} および Cr^{3+} からなるグループから選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記被検体は、抗原、ハプテン、抗体、タンパク質、免疫グロブリン、レセプター、酵素、ペプチド、アミノ酸、ホルモン、ステロイド類、癌細胞マーカー、組織細胞、ウイルス、ビタミン、薬物、代謝産物、核酸、殺虫剤および毒素からなるグループから選択される、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記結合パートナーは、抗原、抗原断片、レセプター、核酸、ポリクローマルおよびモノクローマル抗体およびこれらの断片、誘導體および複合体、レクチン、プロテイン A、プロテイン G、ポリペプチド、アビジン、ストレプトアビジン、シクロデキストラン、クラウンエーテル、内因子および葉酸結合タンパク質からなるグループから選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

前記サンプルは、全血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液、乳汁、水、排泄物、食物、タンパク質および薬物からなるグループから選択される、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 16】

前記粒子は、オレフィン系不飽和単量体の重合体および共重合体、ガラス、木炭、コロイド金粒子、アクリルアミド、メタクリル酸、ナイロン、金属、金属酸化物およびその誘導體、デキストラン、セルロース、赤血球、花粉、リポソームおよび細菌からなるグループから選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 17】

前記蛍光部分は、フルオレセイン、イソチオシアナート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オフトアルデヒド標識、フルオレスカミン、テトラメチルローダミン、BODIPY、近赤外色素およびランタニド錯体からなるグループから選択される、請求項 10 に記載の方法。

50

【請求項 18】

前記ステップ (d) において、前記毛管電気泳動は石英ガラスカラムで実施される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 19】

第 2 の複合体の蛍光が検出され、前記レーザー励起蛍光は前記サンプルの被検体の濃度に正比例する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 20】

前記複合体非形成の蛍光色素標識結合パートナーの蛍光が検出され、前記レーザー励起蛍光は前記サンプルの被検体の濃度に反比例する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 21】

サンプルの被検体の濃度のアッセイ方法であって、

(a) 第 1 の被検体特異的結合パートナーを含む感作粒子を用意するステップと、
(b) 蛍光部分で標識された第 2 の被検体特異的結合パートナーを含む遊離の蛍光色素標識結合パートナーを用意するステップと、

(c) 第 1 の結合パートナーおよび標識結合パートナーに結合した前記被検体を含むサンドイッチ複合体の形成を可能にする条件下で、既知量の前記感作粒子および既知量の前記蛍光色素標識結合パートナーとともに前記サンプルをインキュベーションするステップと、

(d) 前記ステップ (c) でインキュベーションされた前記サンプルの一部を毛管電気泳動に供するステップと、

(e) 前記遊離の蛍光色素標識結合パートナーのレーザー励起蛍光を検出することによって、前記被検体の濃度を測定するステップとを含み、

第 1 の被検体特異的結合パートナーは前記感作粒子に固定化され、前記サンドイッチ複合体の蛍光色素部分の蛍光は該サンドイッチ複合体の形成とともに消光され、前記レーザー励起蛍光は前記サンプルの被検体の濃度に反比例する、サンプルの被検体の濃度のアッセイ方法。

【請求項 22】

前記不溶性粒子は蛍光消光剤のコーティングを含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記蛍光消光剤は、フルオレセイン誘導体、ローダミン誘導体、ヨウ化物、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} および Cr^{3+} からなるグループから選択される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記被検体は、抗原、ハプテン、抗体、タンパク質、糖タンパク質、糖、免疫グロブリン、レセプター、酵素、ペプチド、アミノ酸、ホルモン、ステロイド類、癌細胞マーカー、組織細胞、ウイルス、ビタミン、薬物、代謝産物、核酸、殺虫剤および毒素からなるグループから選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

第 1 の結合パートナーは、抗原、抗原断片、レセプター、核酸、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体およびこれらの断片、誘導体および複合体、レクチン、プロテイン A、プロテイン G、ポリペプチド、アビジン、ストレプトアビジン、シクロデキストラン、クラウンエーテル、内因子および葉酸結合タンパク質からなるグループから選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 26】

第 2 の結合パートナーは、抗原、抗原断片、レセプター、核酸、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体およびこれらの断片、誘導体および複合体からなるグループから選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 27】

前記サンプルは、全血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液、乳汁、水、排泄物、食物、タンパク質および薬物からなるグループから選択される、請求項 21 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

前記粒子は、オレフィン系不飽和単量体の重合体および共重合体、ガラス、アクリルアミド、メタクリル酸、ナイロン、金属、金属酸化物およびその誘導体、デキストラン、セルロース、赤血球、花粉、リポソームおよび細菌からなるグループから選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 29】

前記蛍光部分は、フルオレセイン、イソチオシアナート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オフタルデヒド標識、フルオレスカミン、テトラメチルローダミン、BODIPY、近赤外色素およびランタニド錯体からなるグループから選択される、請求項 21 に記載の方法。

10

【請求項 30】

前記ステップ (d) において、前記毛管電気泳動は石英ガラスで実施される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 31】

不溶性粒子に固定化された化合物の定量方法であって、

(a) 蛍光部分に結合した化合物特異的結合パートナーを含む遊離の蛍光色素標識結合パートナーの既知量とともに前記化合物を固定化した前記粒子の溶液をインキュベーションするステップと、

(b) 前記ステップ (a) でインキュベーションされた前記サンプルの一部を毛管電気泳動に供するステップと、

20

(c) 前記遊離の蛍光色素標識結合パートナーのレーザー励起蛍光を検出することによって、前記粒子に固定化された前記化合物の量を測定するステップとを含み、

前記インキュベーションは固定化された化合物と標識結合パートナーとの複合体の形成を可能にする条件下で行われ、該複合体の蛍光色素部分の蛍光は前記複合体の形成とともに消光し、

前記レーザー励起蛍光は、前記粒子に固定化された化合物の量に反比例する、不溶性粒子に固定化された化合物の定量方法。

【請求項 32】

前記不溶性粒子は、蛍光消光剤のコーティングを含み、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記蛍光消光剤は、フルオレセイン誘導体、ローダミン誘導体、ヨウ化物、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} および Cr^{3+} からなるグループから選択される、請求項 32 に記載の方法。

30

【請求項 34】

前記化合物は、アビジン、ストレプトアビジン、レクチン、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ポリペプチド、プロテイン A、プロテイン G、シクロデキストラン、クラウンエーテル、内因子および葉酸結合タンパク質からなるグループから選択される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 35】

前記化合物はアビジンである、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記結合パートナーは、抗原、抗原断片、レセプター、核酸、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体およびこれらの断片、誘導体および複合体、プロテイン A、プロテイン G、ポリペプチド、アビジン、ストレプトアビジン、シクロデキストラン、クラウンエーテル、内因子および葉酸結合タンパク質からなるグループから選択される、請求項 31 に記載の方法。

40

【請求項 37】

前記結合パートナーはビオチンである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記粒子は、オレフィン系不飽和単量体の重合体および共重合体、ガラス、木炭、コロイド金粒子、アクリルアミド、メタクリル酸、ナイロン、金属、金属酸化物およびその誘導

50

体、デキストラン、セルロース、赤血球、花粉、リポソームおよび細菌からなるグループから選択される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記蛍光部分は、フルオレセイン、イソチオシアナート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オフタルデヒド標識、フルオレスカミン、テトラメチルローダミン、B O D I P Y、近赤外色素およびランタニド錯体からなるグループから選択される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記ステップ (b) において、前記毛管電気泳動は石英ガラスで実施される、請求項 3 1 に記載の方法。

10

【請求項 4 1】

サンプル中の複数の被検体を同時にアッセイする方法であって、

(a) 第 1 の被検体および第 2 の被検体を含むかもしれないサンプルを、

i) 蛍光部分で標識された前記第 1 の被検体の既知量と、

i i) 蛍光部分で標識された前記第 2 の被検体の既知量と、

i i i) 第 1 のサンプル被検体および標識された第 1 の被検体に結合することができる第 1 の結合パートナーと、第 2 のサンプル被検体および標識された第 2 の被検体に結合することができる第 2 の結合パートナーとを固定化した不溶性粒子を含む感作粒子とが存在する状態でインキュベーションするステップと、

(b) 複合体非形成の蛍光色素標識された第 2 の被検体から複合体非形成の蛍光色素標識された第 1 の被検体を分離することができる条件下で、前記ステップ (a) でインキュベーションされた前記サンプルの一部を毛管電気泳動に供するステップと、

20

(c) 前記複合体非形成の蛍光色素標識された第 1 および第 2 の被検体からの第 1 および第 2 のレーザ励起蛍光をそれぞれ検出することによって、第 1 および第 2 の被検体の濃度をアッセイするステップとを含み、

前記インキュベーションは、第 1 の複合体、および/または、第 2 の複合体、および/または、第 3 の複合体、および/または、第 4 の複合体、および/または、第 5 の複合体、および/または、第 6 の複合体、および/または、第 7 の複合体、および/または、第 8 の複合体の形成を可能にする条件下で行われ、

第 1 の複合体は、第 1 の標識被検体および第 2 の標識被検体に結合した感作粒子を含み、第 2 の複合体は、第 1 のサンプル被検体および第 2 の標識被検体に結合した感作粒子を含み、第 3 の複合体は、第 1 の標識被検体および第 2 のサンプル被検体に結合した感作粒子を含み、第 4 の複合体は、第 1 のサンプル被検体および第 2 のサンプル被検体に結合した感作粒子を含み、第 5 の複合体は、第 1 の標識被検体に結合した感作粒子を含み、第 6 の複合体は、第 1 のサンプル被検体に結合した感作粒子を含み、第 7 の複合体は、第 2 の標識被検体に結合した感作粒子を含み、第 8 の複合体は、第 2 のサンプル被検体に結合した感作粒子を含み、

30

第 1 および第 2 の標識被検体に結合した前記蛍光色素部分の蛍光は、第 1 の複合体、および/または、第 2 の複合体、および/または、第 3 の複合体、および/または、第 5 の複合体、および/または、第 7 の複合体の形成とともに消光し、

40

第 1 および第 2 のレーザ励起蛍光は、それぞれサンプル中の第 1 および第 2 の被検体の濃度に正比例する、サンプル中の複数の被検体を同時にアッセイする方法。

【請求項 4 2】

前記不溶性粒子は蛍光消光剤のコーティングを含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記蛍光消光剤は、フルオレセイン誘導体、ローダミン誘導体、ヨウ化物、 $C o^{2+}$ 、 $N i^{2+}$ および $C r^{3+}$ からなるグループから選択される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記封数の被検体の少なくとも 1 つは、抗原、ハプテン、抗体、タンパク質、糖タンパク質、糖、免疫グロブリン、レセプター、酵素、ペプチド、アミノ酸、ホルモン、ステロイ

50

ド類、癌細胞マーカー、組織細胞、ウイルス、ビタミン、薬物、代謝産物、核酸、殺虫剤および毒素からなるグループから選択される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記結合パートナーは、抗原、抗原断片、レセプター、核酸、ポリクローナルおよびモノクローナル抗原およびこれらの断片、誘導体および複合体、レクチン、プロテイン A、プロテイン G、ポリペプチド、アビジン、ストレプトアビジン、シクロデキストラン、クラウンエーテル、内因子および葉酸結合タンパク質からなるグループから選択される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記サンプルは、全血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液、乳汁、水、排泄物、食物、タンパク質および薬物からなるグループから選択される、請求項 4 1 に記載の方法。 10

【請求項 4 7】

前記粒子は、オレフィン系不飽和単量体の重合体および共重合体、ガラス、木炭、コロイド金粒子、アクリルアミド、メタクリル酸、ナイロン、金属、金属酸化物およびこれらの誘導体、デキストラン、セルロース、赤血球、花粉、リポソームおよび細菌からなるグループから選択される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 8】

第 1 および第 2 の蛍光部分は、フルオレセイン、イソチオシアナート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オフトアルデヒド標識、フルオレスカミン、テトラメチルローダミン、B O D I P Y、近赤外色素およびランタニド錯体からなるグループから選択される、請求項 4 1 に記載の方法。 20

【請求項 4 9】

前記ステップ (d) において、前記毛管電気泳動は石英ガラスカラムで実施される、請求項 4 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的にはサンプル中の被検体検出用アッセイ方法に関し、具体的にはレーザー励起蛍光検出毛管電気泳動法を用いる新規な粒子均一アッセイ方法に関する。

【背景技術】

【0002】

薬剤、代謝産物または毒素の濃度を検出および/または定量する能力は、現代の診断および疾病管理の中心課題である。一部のケースでは、かかる被検体はその生物学的活性を検定することにより直接検出できる。しかし、たいていのケースでは、かかる分子を抗体と特異的に結合できる能力または電気泳動での移動度のような物理的特性によって検出するほうがより効率的である。

【0003】

標的被検体の検出アッセイは、サンプル中の関心のある被検体と特異的に結合して該被検体の検出を助ける結合パートナーの使用を伴う。標的被検体の検出アッセイの 1 つのタイプは免疫アッセイである。免疫アッセイは、抗体が特定の標的被検体を特異的に認識し結合する能力を利用する、アッセイシステムである。免疫アッセイの概念は、抗体と、これに対応する抗原との間の特異的な化学反応に基づく。定量は、抗体に結合する抗原を遊離抗原から分離した後、具体的な分析計画に応じて、溶液中の抗体に結合した抗原か、遊離抗原かを検出することを伴う。かかるアッセイは現在の診断学で広く利用される (例えば、以下の非特許文献 1 - 4)。

【非特許文献 1】

Fackrell, J., Clin. Immunoassay, 8 巻, 213 - 219 頁 (1985 年)

【非特許文献 2】

Yolken, R. H., Rev. Infect. Dis., 4 巻, 35 頁 (1982 年) 50

【非特許文献3】

Collins, W. P., 「Alternative Immunoassays (代替的免疫アッセイ法)」, John Wiley & Sons 社刊, NY (1985年)

【非特許文献4】

Ngo, T. T. ら, 「Enzyme Mediated Immunoassay (酵素免疫アッセイ法)」, Plenum Press 社刊, NY (1985年)

【0004】

被検体の検出アッセイには多くの変法があるが、重要なステップは、物理的な分離か識別かのいずれかと、検出とである。物理的な分離を要するアッセイは「不均一アッセイ (heterogeneous assays)」という。これに対し、均一アッセイ (homogeneous assays) は、結合していない種からの結合している種の除去が不必要なように設計される。均一アッセイは、分離のステップを欠いていて、自動化がより簡単なので、大量の患者のスクリーニングを要する用途では不均一アッセイよりも望ましい。

【0005】

10^{-9} M 未満の濃度レベルで存在する被検体は、競合法か直接法かのいずれかを用いてアッセイされる (assayed) のが一般的である。競合法アッセイでは、関心のある抗原が判断される量の抗体に対して標識抗原と競合する。直接法アッセイは、典型的には、抗原の異なる抗原部位に結合する2種類の抗体を伴うサンドイッチアッセイである。ある抗体が、固相材料に結合して、前記抗原を回収するために用いられる。別の抗体が標識されて、結合した前記抗原からの定量的な情報を得るために用いられる (以下の非特許文献5-7)。

【非特許文献5】

Cone, E. J. ら, J. Forens. Sci., 35巻, 786-781頁, (1990年)

【非特許文献6】

Baugh, L. D. ら, J. Forens. Sci., 36巻, 79-85頁, (1991年)

【非特許文献7】

Standefer, J. C. ら, Clin. Chem., 37巻, 733-738頁, (1991年)

【0006】

前記関心のある被検体と、その結合パートナーとの間の結合の検出を促進するために、1または2以上の反応被検体が、(例えば、放射性同位元素か、酵素か、蛍光部分 (fluorescent moiety) か、化学発光部分 (chemiluminescent moiety) か、ビーズ等のような巨視的な標識か) 標識されるのが典型的である (以下の非特許文献8、9を参照せよ。)。放射性同位元素は長い間免疫アッセイ法に利用されてきた。例えば O'Leary, T. D. らは、ジゴキシンの血清濃度のラジオイムノアッセイを説明している (非特許文献10)。かかる危険物質を取り扱う難しさ、放射活性の崩壊の問題とが、これ以外の標識を用いる免疫アッセイ法の開発につながった。

【非特許文献8】

Chard, T. ら, 「Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology (分子生物学の実験技術と生化学)」 (Work, T. S. 編), North Holland Publishing Company 社刊, NY, (1978年)

【非特許文献9】

Kemeny, D. M. ら 編, 「ELISA and Other Solid Phase Immunoassays (ELISAその他の固相免疫アッセイ法)」, Joh 50

n Wiley & Sons 社刊、NY、(1988年)

【非特許文献10】

O'Leary、T.D.ら、Clin. Chem. 25巻、332-334頁、(1979年)

【0007】

蛍光部分は免疫アッセイ形式での標識として頻繁に利用される(以下の非特許文献11を参照せよ。)。例えば、コカイン用の蛍光偏光免疫アッセイ法形式が説明されている(TDx(登録商標)Abbott Laboratories, Inc.)。前記TDx(登録商標)形式は、アセトアミノフェン(非特許文献12-14)およびジゴキシン(非特許文献14)の血清レベルをアッセイする(assay)ためにも利用されている。 Wong、S.H.Y.らは、自動化(OPUS)分析器を利用して、モノクローナル抗体および蛍光を用いるアッセイ法のプロトコールでジゴキシン濃度を測定することを説明した(非特許文献15)。Lee、D.H.らは、ジゴキシンレベルのアッセイをするための蛍光偏光アッセイおよび化学発光アッセイの形式の利用を開示する(非特許文献16)。

10

【非特許文献11】

Ichinose、N.ら、「Fluorometric Analysis in Biomedical Chemistry(生物医学的化学における蛍光分析)」、10巻、(110頁)、Chemical Analysis(化学分析)、(Winefordner、J.D.ら編)、John Wiley & Sons社刊、NY、(1991年)

20

【非特許文献12】

Koizumi、F.ら、Tohoku J. Exper. Med.、155巻、159頁 - (1988年)

【非特許文献13】

Edinboro、L.E.ら、Clin. Toxicol.、29巻、241頁 - (1991年)

【非特許文献14】

Okurodudu、A.O.ら、Clin. Chem.、38巻、1040頁、(1992年)

30

【非特許文献15】

Wong、S.H.Y.ら、Clin. Chem.、38巻、996頁、(1992年)

【非特許文献16】

Lee、D.H.ら、Clin. Chem.、36巻、1121頁、(1990年)

【0008】

電気泳動法は、標的被検体の検出を促進するのに用いられてきた。かかる方法は、溶液中の分子が固有の電荷を有するという事実を利用する。したがって、電場の存在下では、各分子種は、該分子種の質量対電荷の比率に応じた特徴的な「電気泳動的な」移動度で移動する。存在するさまざまな種の間でこの比率が異なるときには、これらの種は互いに分離する。かかる電場の影響下では、前記変異種の全てが該変異種の電荷と反対の指定された電荷に向かって移動し、低い電気泳動の移動度を有するものは、(比較的)高い電気泳動の移動度を有するものより遅く、かつ、分離して、移動する。

40

【0009】

電気泳動法は混合物の分離および分析に利用されてきた。電気泳動法は、移動度の差に基づく電場中の分子の移動および分離を伴う。自由ゾーン電気泳動法、ゲル電気泳動法、等電点電気泳動法および等速電気泳動法を含む、さまざまな形式の電気泳動法が知られている。免疫アッセイ法の1つのアプローチは、遊離標識と結合標識との分離に毛管電気泳動(CE)法を利用する。一般にCE法は、サンプルを毛管すなわち約2μmから約2000μm(好ましくは約50μm未満、最も好ましくは約25μm以下)の内径を有する管に導入すること、および、該管に電場を適用することを伴う(非特許文献17、18)。

50

前記サンプルの成分のそれぞれが固有の電気泳動の移動度を有するため、移動度の大きい成分は、移動度の遅い成分より速く前記毛管内を移動する。したがって、前記サンプルの成分は、前記毛管内の移動中に、前記管内で別々のゾーンに分離される（非特許文献19および20、F-T.A.、特許文献1、Chen、F-T.A.、特許文献2、Hsieh、Y-Z.、特許文献3）。前記方法は、便利なオンラインでの注入と検出と実時間分析とを提供するため、自動化に非常に適する。毛管電気泳動法は、抗体抗原複合体を、遊離型の前記抗原または前記抗体のいずれかから分離するのに用いられる場合がある。結合同型または遊離型のいずれかの種が、分析および定量される場合がある。Chenに付与された特許文献4の特許明細書は、免疫化学的結合と毛管電気泳動法の分離およびレーザー励起蛍光との組み合わせに基づく、尿中の複数の薬物被検体の同時定量法を開示する。

10

【非特許文献17】

Chen、F-T.A.、J.Chromatogr.、516巻、69-78頁、(1991年)

【非特許文献18】

Chen、F-T.A.ら、J.Chromatogr.、15巻、1143-1161頁、(1992年)

【非特許文献19】

Heegard、N.H.H.ら、Anal.Chem.、64巻、2479-2482頁、(1992年)

【非特許文献20】

Gordon、M.J.、ら、Anal.Chem.、63巻、69-72頁、(1991年)

20

【特許文献1】

米国特許第5,120,413号明細書

【特許文献2】

米国特許第5,145,567号明細書

【特許文献3】

米国特許第5,863,401号明細書

【特許文献4】

米国特許第5,556,959号明細書

30

【0010】

サンドイッチ-特異的結合アッセイ法は競合アッセイ法よりもはるかに高い感度を提供することができるが、標識レセプターおよび抗体の不均一性が毛管電気泳動法の実行を困難にする。これは、非結合型及び結合型のレセプターが不均一に移動するために、電気分離分析において、鮮明で輪郭がはっきりした分布というよりも、ぼんやりして輪郭がはっきりしない分布になることからくる結果である。したがって、従来の電気分離方法は特異的結合アッセイの用途では顕著な利点をもたらすことができない。

【0011】

さまざまなアプローチが生体高分子の不均一性を克服するために開示されてきた。1つのアプローチでは、標識抗体の電気泳動移動度が同一の標識分子に荷電性の官能基を付加することによって修飾される。別のアプローチでは、ある抗体が標識され、別の抗体は、その抗体に付加された、電荷を改変させる部分によって強く荷電している。

40

【0012】

Chenに付与された以下の特許文献5の特許明細書は、オリゴヌクレオチドのように定義の明確な荷電性有機分子を用いた化学的修飾で前記抗原または抗体の電気泳動移動度を改変することによって、CE法で抗原抗体複合体からの抗原または抗体の分離を実現する方法を開示する。

【特許文献5】

米国特許第5,571,680号明細書

【0013】

50

Ullmanらに付与された特許文献6の特許明細書は、CE法で分離されるべきアッセイ反応混合液中の抗体の不均一性をマスクする方法を開示する。前記方法は、不溶性粒子に結合した被検体特異的な標識抗体を含む、標識試薬粒子を用意すること、および、関心のある被検体を含むサンプルを、粒子に結合した前記抗体とともにインキュベーションして(*incubate*)、前記被検体と、粒子に結合した前記標識抗体との間で複合体を形成させることを伴う。反応混合液はCE法によって分離され、標識された前記複合体が前記被検体の濃度を決定するために検出される。しかし、かかる標識試薬粒子の調製においては、前記不溶性の粒子に結合する抗体の量を制御することは不可能であることが周知である。その結果、粒子が違うと、他の粒子と比較して、含まれる固定化抗体の量が異なるので、異なる量の被検体に結合することになる。よって、前記試薬粒子と、前記サンプル中の被検体との間で形成されたさまざまな標識複合体が不均一になるのは当然で、該標識複合体から検出される信号はぼんやりしたものとなるであろう。したがって、前記被検体濃度に正確に関係づけること、および、前記遊離の標識から前記複合体を形成した標識をきれいに分離することはより困難であろう。

10

20

30

40

50

【特許文献6】

米国特許第6,103,537号明細書

【0014】

アビジンでコーティングされたラテックス粒子(ラテックス-アビジン)を含む試薬粒子は、ベックマン・コールター社のSynchron CX(登録商標)、Synchron LX(登録商標)およびImage(登録商標)システム用のラテックス-アビジン-二座配位子試薬の製造における鍵となる中間体である(特許文献7-9)。しかし、信頼できる直接的な方法が利用できないため、前記ラテックス-アビジン中間体の製造途中での試験は存在しない。さらに、現在利用可能な方法は、前記ラテックス粒子にコーティングされたアビジンの濃度を評価するのではなく、溶液中の遊離アビジンを分析するためにのみ適用可能である。アビジンの前記ラテックス粒子への装荷性能(*loading*)と、古いロットとの違い(*consistency*)とがわからないとき、一般的なやり方は、前記ラテックス-アビジン中間体を前記二座配位子試薬と結合させて前記ラテックス-アビジン-二座配位子試薬を作成することによって、次のステップすなわち最後のステップに単に進むことである。前記二座配位子を結合するステップは単純で信頼性のあるステップであるため、前記ラテックス-アビジン-二座配位子試薬製造の失敗は前記ラテックス-アビジン材料が原因とされる。失敗が起こると、前記二座配位子試薬は無駄になり、前記ラテックス-アビジン材料は廃棄しなければならず、大量の洗浄バッファが無駄になるうえに、最も重要なことには、時間が無駄になる。製造途中でラテックス-アビジン中間体を定量するありふれた方法は、少量の前記ラテックス-アビジン材料を少量の前記二座配位子材料に結合させ、得られた標識結合試薬が使い物になるかどうかについてSynchron CX(登録商標)で免疫反応性の評価をすることである。しかし、この方法は、労働集約的で、時間がかかり、結果を得るのに3乃至10日を要する。したがって、ラテックス-アビジン中間体を製造途中で試験する、単純で迅速で信頼できる方法の必要性はいまなお存在する。

【特許文献7】

米国特許第5,747,352号明細書

【特許文献8】

米国特許第5,422,281号明細書

【特許文献9】

米国特許第5,196,351号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

サンプル中の被検体を正確に検出し定量することの重要性を考えると、粒子増感アッセイと毛管電気泳動法と蛍光検出技術との利点を組み合わせてテストサンプル中の標的被検体

を迅速に検出する方法を提供することは望ましい。特に、粒子増感アッセイの手順と毛管電気泳動検出技術とを用いて、関心のある被検体についてサンプルをより正確に分析する方法を提供することが望ましい。

【0016】

発明の概要

本発明は、サンプル中の関心のある被検体の濃度を決定するために、レーザ励起蛍光(LIF)検出および毛管電気泳動法と協働する粒子増感アッセイ形式を利用する、非常に敏感で迅速な均一アッセイを提供する。かかる測定は、蛍光信号、すなわち、かかる信号を発生させることができる反応混合液中の分子種のレーザ励起蛍光で生成される電気泳動結果図(electropherogram)を計測することにより実施される。有利なことに、本発明の方法は、分離後に測定されなければならない信号の数を減らし、標的被検体濃度の検出および/または定量の精度を向上させることによって、単純になった電気泳動結果図を作成する。

10

【課題を解決するための手段】

【0017】

したがって本発明の1つの面は、サンプル中の被検体濃度測定用競合アッセイであって、(a)被検体特異的結合パートナーを含む感作粒子(sensitized particles)を用意するステップと、(b)蛍光部分と結合する前記被検体を含む遊離の蛍光色素標識被検体を用意するステップと、(c)サンプルの前記被検体に結合する前記固定化された結合パートナーを含む第1の複合体、および/または、前記蛍光色素標識被検体に結合する前記固定化された結合パートナーを含む第2の複合体の形成を可能にする条件下で、既知量の前記感作粒子および既知量の蛍光色素標識被検体の存在下で前記サンプルをインキュベーションする(incubate)ステップと、(d)インキュベーションされた前記ステップ(c)に記載のサンプルの一部を毛管電気泳動に供するステップと、(e)前記遊離の蛍光色素標識被検体のレーザ励起蛍光を検出することにより被検体濃度を測定するステップとを含み、前記被検体特異的結合パートナーは前記粒子に固定化され、前記第2の複合体の蛍光色素部分(fluorophore moiety)の蛍光は前記第2の複合体の形成とともに消光し、前記レーザ励起蛍光は前記サンプル中の被検体濃度に正比例する、サンプル中の被検体濃度測定用競合アッセイを提供する。

20

【0018】

本発明の別の面は、サンプル中の被検体濃度測定用の直接サンドイッチアッセイであって、(a)第1の被検体特異的結合パートナーを含む感作粒子を用意するステップと、(b)蛍光部分に結合する第2の被検体特異的結合パートナーを含む遊離の蛍光色素標識結合パートナーを用意するステップと、(c)固定化された第1の結合パートナーおよび前記標識結合パートナーに結合する、前記被検体を含むサンドイッチ複合体の形成を可能にする条件下で、既知量の前記感作粒子および既知量の前記蛍光色素標識結合パートナーと、前記サンプルとをインキュベーションするステップと、(d)インキュベーションされた前記ステップ(c)に記載のサンプルの一部を毛管電気泳動に供するステップと、(e)前記遊離の蛍光色素標識結合パートナーのレーザ励起蛍光を検出することによって前記被検体の濃度を測定するステップとを含み、第1の被検体特異的結合パートナーは前記感作粒子に固定化され、前記サンドイッチ複合体の蛍光色素部分の蛍光は前記複合体の形成とともに消光し、前記レーザ励起蛍光は前記サンプル中の被検体濃度に反比例する、サンプル中の被検体濃度測定用の直接サンドイッチアッセイを提供する。

30

40

【0019】

粒子増感アッセイは、関心のある被検体に特異的に結合する結合パートナーでコーティングされた不溶性粒子を含む、感作粒子の使用を伴うことが一般的である。しかし、かかる感作粒子を感作する工程の途中で、前記粒子に結合する前記結合パートナーの量を制御することは困難である。そこで、前記粒子に固定化される分子の濃度を知ることがしばしば望ましいことではあるが、この濃度は未知であることがよくある。したがって、本発明の別の面は、不溶性粒子に固定化される結合パートナーの濃度を測定するために感作粒子を

50

アッセイする方法であって、(a)第1の結合パートナーを有する前記感作粒子の溶液をインキュベーションするステップと、(b)インキュベーションされた前記ステップ(a)に記載のサンプルの一部を毛管電気泳動に供するステップと、(c)遊離の蛍光色素標識された第2の結合パートナーのレーザー励起蛍光を検出することによって、前記粒子に固定化された第1の結合パートナーの量を測定するステップとを含み、第1の結合パートナーは前記感作粒子に固定化されており、既知量の遊離の蛍光色素標識された第2の結合パートナーが蛍光部分に結合し、前記インキュベーションは、前記固定化された第1の結合パートナーと、前記標識された第2の結合パートナーとの間での複合体の形成を可能にする条件下で行われ、前記複合体の蛍光色素部分は該複合体の形成とともに消光し、前記レーザー励起蛍光は前記粒子に固定化された第1の結合パートナーの量に反比例する、感作粒子のアッセイをする方法に関する。

10

【0020】

本発明の方法はサンプル中の複数の被検体を同時にアッセイするためにも用いられることがある。

【0021】

本発明の方法に従っていったん蛍光の消光が達成されると、前記毛管電気泳動結果図は単純になり、前記感作粒子とともに形成された複合体を検出し分離する必要性がなくなる。これは前記遊離(複合体非形成)の蛍光色素標識の容易な定量を可能にする。

【0022】

本発明のその他の面、利点および新規な特徴は、部分的には以下の説明に列挙され、部分的には以下の明細書の検討により当業者に明らかになるか、本発明の実施によって理解される場合がある。前記発明は、添付する特許請求の範囲にその完全な範囲が定義され、以下の好ましい実施態様に説明される。

20

【0023】

発明の詳細な説明

本発明の方法は、毛管電気泳動およびレーザー励起蛍光検出とともに実行することができる粒子増感均一アッセイ形式を提供することによって、サンプル中の関心のある被検体定量用の改良アッセイを提供する。本発明の改良アッセイは、前記アッセイ反応混合液のレーザー励起蛍光(LIF)で分離および計測をされなければならない信号の数を減らすことによって、上記の従来のアッセイの欠点を克服する。結果として、本発明の方法は、標的被検体の検出および/または定量の精度を上げる。したがって本発明の方法は、CE-LIFの間に得られた電気泳動結果図を単純にする。本発明の方法に従って、前記複合体を形成した種の前記蛍光色素部分の信号を消光することによって、前記複合体非形成の標識種から前記複合体を形成する標識種をCEの際に分離する必要性をなくすることができる。

30

【0024】

簡潔には、本発明の1の面はサンプル中の関心のある被検体の濃度測定用の改良型競合アッセイを提供する。かかる競合アッセイの1の好ましい実施態様は、一般に以下の(1)の数式に示されるように記載できる。

【0025】

数式(1)

40

$$LX - (BP)_x + \text{被検体}^* + \text{被検体}$$

$$LX - (BP)_x - (\text{被検体}^*)_y + LX - BP - (\text{被検体})_z + \text{被検体}^*$$

(1)

【0026】

前記数式において、「 $LX - (BP)_x$ 」は前記被検体と特異的に結合する結合パートナーBPでコーティングされた不溶性粒子LXを含む感作粒子を表し、「 x 」は前記不溶性粒子に固定化された結合パートナーの数を表し、「被検体 * 」は蛍光部分で標識された被検体を表し、「 y 」は前記アッセイの間に前記感作粒子($LX - BP$)に結合することになる蛍光色素で標識された被検体分子の数を表し、「 z 」は前記アッセイの間に前記感作

50

粒子 (L X - B P) に結合することになるサンプルの被検体分子の数を表す。(1) の数式で表されたアッセイでは、標識被検体および感作粒子の数は固定されている。

【 0 0 2 7 】

より具体的には、前記 (1) の数式で表される本発明の競合アッセイの 1 の実施態様は、反応混合液を形成するために、関心のある被検体を含むかもしれないサンプルを、蛍光部分と結合する該被検体を含む既知量の遊離の蛍光色素標識被検体 (被検体^{*}) と、不溶性粒子 (L X) に固定化された複数の被検体特異的結合パートナー (B P) を含む既知量の感作粒子 (L X - B P) と混合することを含む。前記反応混合液は、前記蛍光色素標識被検体に結合する感作粒子を含む第 1 の複合体 (L X - (B P)_x - (被検体^{*})_y) および / または前記サンプルの被検体に結合する感作粒子を含む第 2 の複合体 (L X - B P - (被検体)_z) の形成を可能にする条件下でインキュベーションされる。かかる反応混合液の調製およびインキュベーションの方法は当業者に周知であり、より詳細に説明する必要はない。計測可能な反応が進行したときは、インキュベーションされた前記反応混合液の一部が毛管電気泳動に供される。以下に詳しく説明されるとおり、前記蛍光部分の蛍光は第 1 の複合体の形成とともに消光する。よって前記被検体の濃度は、前記反応混合液中の残りの遊離蛍光色素標識被検体 (被検体^{*}) のレーザ励起蛍光を検出することにより測定される。

10

【 0 0 2 8 】

ここで用いられる「複合体」という用語は、被検体が特異的結合パートナーに結合するとともに形成される複合体を指す。

20

【 0 0 2 9 】

ここで用いられる「結合ペア要素」または「結合要素」という用語は、結合ペア、すなわち、第 1 の分子が化学的または物理的手段によって第 2 の分子に特異的に結合した、2 つの異なる分子を指す。抗原および抗体の結合ペア要素に加えて、他の結合ペアは、ビオチンおよびアビジンと、糖およびレクチンと、相補的なヌクレオチド配列と、相補的なペプチド配列と、ペプチドおよび特異的タンパク質結合剤 (s p e c i f i c p r o t e i n b i n d e r s) と、補酵素および酵素等を例示として含むが、これらに限定されない。

【 0 0 3 0 】

ここで用いられる「複合体を形成する (c o m p l e x e d) 蛍光色素」という用語は、複合体の一部となる化合物 (例えば、被検体または結合パートナー) に結合し、該被検体または該結合パートナーが不溶性粒子に固定化されている、蛍光部分を指す。

30

【 0 0 3 1 】

ここで用いられる「遊離の蛍光色素」という用語は、複合体の一部ではない化合物 (例えば、被検体または結合パートナー) である蛍光部分を指す。

【 0 0 3 2 】

ここで用いられる「感作粒子」という用語は、被検体特異的結合パートナーが関心のある被検体かを固定化した不溶性粒子であって、該結合パートナーまたは該被検体が共有 (化学的) 結合または非共有結合 (例えば物理的吸着) により結合した粒子を指す。前記不溶性粒子は、毛管電気泳動に要求されるように溶液中に懸濁できることを条件として、結合パートナーまたは被検体を固定化することができるいかなる天然または人工合成の材料であってもかまわない。不溶性粒子の例は、ポリスチレン (「ラテックス」ともいう) 、アクリロニトリル、ポリブタジエンのような不飽和オレフィン系単量体の重合体および共重合体と、これらの誘導体および共重合体 (B a n g s , L . B . , 「 U n i f o r m L a t e x P a r t i c l e s (均質なラテックス粒子) 」 (1 9 8 4 年) および米国特許第 4 , 3 0 5 , 9 2 5 号明細書を参照せよ) と、木炭 (c h a r c o a l) と、金コロイド粒子と、ガラスと、アクリルアミドと、メタクリル酸と、ナイロンと、金属と、金属酸化物およびその誘導体と、デキストランと、セルロースと、赤血球、花粉、リボソームおよび細菌のような天然の粒子材料とを含むが、これらに限定されない。別の実施態様では、前記不溶性粒子は、以下に詳しく説明する蛍光消光剤 (f l u o r e s c e n c e

40

50

quencher)をプレコーティングすることを含む。

【0033】

ここで用いられる「結合パートナー」という用語は、関心のある被検体のような特定の分子または物質との特異的な認識および結合を行うが、他の物質との交差反応性は無視できる程度である、分子または物質を指す。被検体とその特異的結合パートナーとの間の結合は、免疫反応、錯化およびアフィニティ結合のような化学的または物理的手段による場合がある。典型的な結合パートナーは、抗原と、抗原断片と、レセプターと、核酸と、ポリクローナルおよびモノクローナルの抗体およびこれらの断片、誘導体および複合体と、シクロデキストランと、クラウンエーテルと、レクチンと、(糖タンパク質に結合する)プロテインAおよびプロテインGのような結合タンパク質と、細菌と、酵素と、アビジンと、ストレプトアビジンと、(例えば、ビタミンB₁₂に結合する)内因子(intrinsic factor)と、葉酸結合タンパク質と、引用によりここに取り込まれ、同時継続し、承継出願人が共通する「安定な粒子-バンコマイシンコンジュゲートと、新規な速度促進剤と、新規な投与量応答改変剤とを用いるバンコマイシンの均一アッセイ」という名称の米国特許出願第09/888,005号明細書に説明されるジアセチル-L-リジン-D-アラニン-D-アラニンのようなポリペプチドとを含むが、これらに限定されない。かかる特定の被検体特異的結合パートナーは、商業的な供給元から入手できる場合があり、あるいは、当業者に周知な標準的な手順に従って調製される場合もある。

10

【0034】

以下に詳しく説明するとおり、1の実施態様では、複合体を形成する蛍光色素の蛍光は、十分な量の蛍光色素部分が蛍光色素部分どうしの間でエネルギー移動(energy transfer)が発生するほど互いに近接しているとき、自家消光(self-quenched)を起こす。これは、十分な量の標識被検体が、感作粒子に結合して、数式(1)に示される第1の複合体(LX-(BX)_x-(被検体*)_y)を形成するとき発生する状況である。代替的に、蛍光消光は、前記不溶性粒子が蛍光消光剤でプレコーティングされることを含む場合に、複合体の形成とともに発生することがある。前記複合体を形成する蛍光色素の消光の結果、第1の複合体から予想される信号は電気泳動結果図に現れない。よって、LIF検出で得られた電気泳動結果図は、前記遊離蛍光色素標識被検体(被検体*)から発生する蛍光信号だけを実質的に含む。その結果、本発明の方法に従って得られた電気泳動結果図は、従来のCE-LIFアッセイから得られる結果図に比べると、単純になり解釈が容易である。

20

30

【0035】

LIF検出が完了するとき、得られたデータは当業者に周知の方法に従って用意される標準曲線と対比されて、前記テストサンプル中の前記被検体のもとの濃度が決定される。数式1に表されるアッセイでは、前記遊離蛍光色素標識被検体によって発生するレーザ励起蛍光は、前記サンプル中に存在する被検体濃度に正比例する。

【0036】

本発明の方法は、従来の方法よりも時間の節約になるという利点を提供する。第1の複合体(LX-(BX)_x-(被検体*)_y)により発生する蛍光信号が消光され、電気泳動結果図から消去されるため、本発明の方法は、複合体を形成する標識由来のぼんやりした信号からの遊離蛍光色素標識被検体の信号の完全な分離を達成するために、従来のアッセイでは必要とされた、CEのパラメーターを時間をかけて最適化することを回避する。その結果、本発明の方法は、一部の信号がぼんやりして他の信号と重なるような複数の信号の完全な分離が必要な従来の方法と比較して、より正確な被検体濃度の測定と、より短時間の測定とを達成する。

40

【0037】

上記のとおり、本発明の蛍光消光は、以下に説明される条件、すなわち、不溶性粒子を蛍光消光剤でプレコーティングすること、および/または、十分な量の蛍光色素標識種と不溶性粒子との複合体の形成とともに蛍光色素部分が自家消光することの少なくとも1つのために起こる。

50

【0038】

1. プレコーティングされた粒子を用いる蛍光消光

本発明の1の実施態様では、前記不溶性粒子は、該粒子に結合要素を固定化するに先立って、蛍光消光剤でプレコーティングされる。1の実施態様では、前記蛍光消光剤は、蛍光受容体 (fluorescence acceptor) である。蛍光受容体は、アッセイで用いられる特定の蛍光標識の発光波長帯と重複する吸収波長帯を有するいずれかの化合物または種である。前記受容体はフルオレセイン誘導体およびローダミン誘導体を含むがこれらに限定されない、化合物のグループから選択されることがある。蛍光消光剤の他の例は、ヨウ化物のような重い原子と、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} および Cr^{3+} のような金属イオンとを含むがこれらに限定されない。

10

【0039】

その後、前記プレコーティングされた粒子は適当な量の結合要素とともに装荷 (load) される。蛍光消光剤で不溶性粒子をプレコーティングして、その後、プレコーティングされた前記粒子に前記結合要素を装荷する手順は当業者に公知である。

【0040】

固定化された第1の結合要素が、蛍光標識された第2の結合要素と複合体を形成するとき、蛍光標識および蛍光消光剤の両方が同一の粒子に配置されるため、両者は接近した状態に置かれる。前記蛍光標識が照射されるとき、エネルギーが供与体、すなわち、前記蛍光標識の電子励起状態から前記蛍光消光剤へと移動することがある。前記エネルギーの移動がうまくいくとき、蛍光強度は非常に減少するか、完全に消光するかのいずれかになる。前記移動の効率は、(1) 供与体の種と消光剤の種との距離に依存するだけでなく、(2) 前記供与体の蛍光量子収率と、(3) 前記消光剤の吸光係数と、(4) 上記の供与体の発光波長および消光剤の吸光波長のスペクトルの重複部分の積分と、(5) 溶媒の屈折率とも依存する。したがって感作粒子は、前記蛍光供与体および前記消光剤の両方が局在しており、その結果として、蛍光消光が起こるために必要な両者の近接状態のために、蛍光消光が可能になる。

20

【0041】

蛍光供与体 - 受容体システムの周知例は、フルオレセインが供与体でローダミンが消光剤である、フルオレセイン - ローダミンシステムである。このシステムでは、ローダミンはフルオレセインの発光波長帯 (約 520 nm) と重複する吸収波長帯 (約 550 nm) を有する (Methods in Enzymology、74巻、免疫化学的技術、パートC、セクションIA、「蛍光免疫アッセイ法」、Langone および Van Vunakis 編、1981年、Academic Press 社刊、「蛍光分光生物学および医学のための序説 (Fluorescence Spectroscopy. An Introduction for Biology and Medicine) Pesce、Rosen および Pasby 編、1971年、Marcel Dekker Inc. 社刊、New York、Boguslaski、R.C. ら、Appl. Biochem. and Biotechnology、7巻、401 - 414頁、(1982年))。

30

【0042】

蛍光供与体および消光剤の他の例は、フルオレセイン - 4'、5' - ジメトキシ - フルオレセイン - - - フルオレセインの対 (Methods in Enzymology、74巻、免疫化学的技術、パートC、セクションIA) と、土類金属錯体 - - - リアクティブブルー-4の対 (Youn、H.J. ら、Analytical Biochemistry、232巻、24 - 30頁、(1995年)) と、フルオレセイン - B - - フィコエリスリンペアの対と、B - フィコエリスリン - - - テキサスレッドの対 (Gosling、J.P.、Clin. Chem.、36巻、(8号)、1408 - 1427頁、(1990年)) とである。

40

【0043】

2. 不溶性粒子をプレコーティングすること (自家消光) を用いない蛍光

50

蛍光消光は、第1の結合要素の粒子への装荷が高度であって、第1の結合要素の局部濃度が高くなり、固定化された第1の結合要素と標識された第2の結合要素との間の錯化とともに各粒子での標識種の局部濃度が高くなることを条件として、前記不溶性粒子を蛍光消光剤でプレコーティングしなくても起こる。

【0044】

固定化された第1の結合要素と、蛍光標識された第2の結合要素との間で複合体を形成するための結合が起こるとき、前記粒子が第1の結合要素で十分に装荷されていることを条件として、かかる複合体の形成とともに双極子-双極子結合エネルギー移動により蛍光消光が起こる。より具体的には、前記粒子に高度に装荷することは、固定化された第1の結合要素が該粒子表面で互いに近接することを意味する。その結果、蛍光標識された第2の結合要素が、固定化された第1の結合要素と複合体を形成するとき、蛍光色素部分も同様に互いに近接する。理論に拘束されることを望むわけではないが、蛍光色素で標識された種の十分な量が、固定化された第1の結合要素と複合体を形成する場合に、前記蛍光色素部分の蛍光は消光されて、電気泳動結果図でピークが現れない。すなわち、標識された第2の結合要素の十分な数が感作粒子と結合している場合には、LIFの際に励起された前記蛍光部分のエネルギーは、検出器に移動して検出可能な信号を発生させるのではなく、前記固定化された標識の間で移動する(すなわち消光する)。したがって、反応混合液中に残存する、複合体非形成(遊離)の蛍光色素標識種だけがLIFによって検出される。その結果、消光効率は非常に増大する。

10

【0045】

したがって前記粒子に第1の結合要素を高度に装荷することは、(1)局所的な高濃度と、(2)ある標識と、該標識が結合する結合要素との間および隣接する結合要素どうしの間での消光を起こす相互作用と、(3)前記標識と前記粒子の表面との間での消光を起こす相互作用との結果として、複合体を形成した蛍光標識の間での効率的な自家消光相互作用を可能にする。実際に、前記粒子のサイズが前記蛍光色素の波長(例えば500nm)の程度にある場合には、半透明な粒子は、前記蛍光標識が発光することを阻止し、同様に、発光された光が前記検出器に到達することを阻止して、蛍光信号の検出が起こらないようにする。

20

【0046】

したがって本発明の方法が、蛍光消光剤でプレコーティングされた粒子を用いるか、結合要素を高度に装荷した粒子を用いるかにかかわらず、本発明の鍵となる特徴は、LIFで検出されるアッセイ反応混合液中に残存する蛍光色素標識種の数がCEの後で減少することである。さらに、複合体を形成する標識種を、複合体非形成の標識種から分離する必要性が除かれるため、複合体非形成の標識された第2の結合ペア要素の検出が単純になる。

30

【0047】

本発明の競合的なアッセイの代替的な実施態様は、数式2に示すとおり一般的に記載できる。

【0048】

数式(2)

$$LX - (\text{被検体})_x + \text{被検体} + BP^* \quad (2)$$

40

$$LX - (\text{被検体})_x - (BP^*)_y + \text{被検体} - BP^* + BP^* \quad (2)$$

【0049】

上記の数式において、「 $LX - (\text{被検体})_x$ 」は「 x 」個の被検体分子を固定化した感作粒子を表し、「 BP^* 」は蛍光部分で標識された被検体特異的結合パートナーを表し、「 $LX - (\text{被検体})_x - (BP^*)_y$ 」は前記固定化された被検体と「 y 」個の標識結合パートナーとの間で形成される複合体を表し、「 $\text{被検体} - BP^*$ 」は前記サンプルの被検体と標識結合パートナーとの間での結合とともに形成される複合体を表す。数式(2)で表されるアッセイでは、前記標識結合パートナーおよび前記感作粒子の濃度は一定である。

【0050】

50

より具体的には、数式 2 で表される競合的なアッセイでは、関心のある被検体を含むかも知れないサンプルが、不溶性粒子に固定化された前記被検体を含む感作粒子の一定量と、被検体特異的な蛍光色素標識結合パートナー (BP^*) の一定量とともに混合される。この実施態様では、粒子に固定化された被検体 ($LX - (被検体)_x$) は、標識された前記結合パートナー (BP^*) との結合についてサンプルの被検体と競合することができる。反応混合液は、多数の標識された前記結合パートナーと結合する、固定化された前記被検体を含む第 1 の複合体 ($LX - (被検体)_x - (BP^*)_y$)、および/または、前記蛍光色素標識結合パートナーと結合する、前記サンプルの被検体を含む第 2 の複合体 (被検体 - BP^*) の形成を可能にする条件下で、インキュベーションされる。かかる複合体の形成を可能にするいずれの条件が本発明の方法に用いられてもよく、これらは当業者に周知である。

10

【 0 0 5 1 】

いったん計測可能な反応が数式 (2) に示されるとおり進行してきたとき、インキュベーションされた前記反応混合液の一部が毛管電気泳動に供される。数式 (2) で表される前記アッセイの 1 の実施態様では、第 1 の複合体は、前記蛍光色素標識が近接するように十分な量の前記標識結合パートナー (BP^*) を含む。その結果、複合体を形成する前記蛍光色素の蛍光は消光される。数式 (2) で表される前記アッセイの別の実施態様では、前記不溶性粒子は蛍光消光剤でプレコーディングされるが、複合体の形成とともに、該消光剤は複合体を形成した前記蛍光色素標識の蛍光を消光する。いずれの場合でも、L I F 検出で得られる電気泳動結果図は、残存する遊離の蛍光色素標識結合パートナー (BP^*) と、第 2 の複合体 (被検体 - BP^*) とから発生する蛍光信号だけを実質的に含むであろう。

20

【 0 0 5 2 】

好ましくは、数式 2 で表されるアッセイにおいて、サンプル中の被検体濃度は、反応混合液中に存在する第 2 の複合体 (被検体 - BP^*) のレーザ励起蛍光を検出することにより測定されるが、該レーザ励起蛍光は、前記サンプル中の被検体濃度に正比例する。代替的には、被検体濃度は残存する遊離の蛍光色素標識結合パートナー (BP^*) の蛍光を検出することにより測定できるが、ここでは、前記レーザ励起蛍光は前記サンプル中の被検体濃度に反比例する。

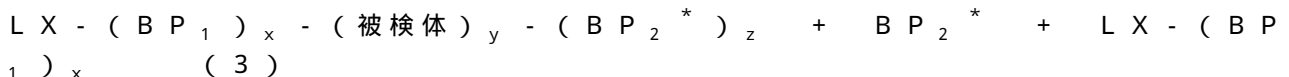
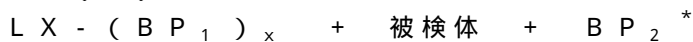
【 0 0 5 3 】

本発明の別の面は、サンプル中の関心のある被検体の濃度を測定するための直接的なアッセイを含む。かかる直接的なアッセイの 1 の実施態様は、一般的に数式 3 に示されるように記載できる。

30

【 0 0 5 4 】

数式 (3)



【 0 0 5 5 】

上記の数式で、「 $LX - (BP_1)_x$ 」は、被検体に特異的に結合する「 x 」個の第 1 の結合パートナー「 BP_1 」でコーディングされた不溶性粒子 LX を表し、「 BP_2^* 」は、蛍光部分で標識された第 2 の被検体特異的結合パートナーを含む遊離の蛍光色素標識結合パートナーを表し、「 $LX - (BP_1)_x - (被検体)_y - (BP_2^*)_z$ 」は、前記被検体と第 1 および第 2 の結合パートナーとの間の結合で形成されたサンドイッチ複合体を表し、「 y 」は第 1 の結合パートナーに結合する被検体の数を表し、「 z 」は前記被検体に結合する蛍光色素標識結合パートナーの数を表す。数式 (3) で表されるアッセイでは、前記標識結合パートナーと感作粒子の濃度は一定である。

40

【 0 0 5 6 】

数式 (3) で表されるアッセイの 1 の実施態様では、第 1 の複合体は、蛍光色素標識が近

50

接するように第2の標識結合パートナー (BP_2^*) の十分な量を含む。その結果、複合体を形成した前記蛍光色素標識の蛍光は消光した。数式(3)で表されるアッセイの別の実施態様では、前記不溶性粒子は蛍光消光剤でプレコーティングされ、複合体の形成とともに、該消光剤は複合体を形成した前記蛍光色素標識の蛍光を消光する。いずれの場合でも、数式(3)で表される直接的アッセイにおいて、電気泳動結果図は、唯一の信号、すなわち、サンプル中の被検体濃度に反比例する、前記遊離の標識結合パートナー (BP_2^*) によって発生する信号のみを実質的に含む。

【0057】

本発明のアッセイを実施するためには、感作粒子を用意する必要がある。1の実施態様では、前記感作粒子は、被検体に特異的結合パートナーか、関心のある被検体かのいずれかを結合する担体粒子を含む。前記結合パートナーまたは前記被検体は、物理的(受動的)吸着、促進された(強制された)吸着および共有結合のような、当業者に周知の標準的な技術に従って、前記粒子に固定化される場合がある。例えば、前記結合パートナーまたは前記被検体は、前記粒子に前記結合パートナーを結合させることができる化学的な官能基で改変することによって、前記粒子の表面に共有結合で結合させられる場合がある。例えば、引用によりここに具体的に取り込まれる米国特許第4,064,080号、第4,181,636号、第4,210,723号、第4,264,766号、第4,521,521号および第4,305,925号の明細書を参照せよ。これらの特許公報に開示された技術は、結合パートナーまたは被検体を前記粒子に結合するために用いられる場合がある。引用によりここに具体的に取り込まれる Seaman, G. V. F. 編、「診断学におけるラテックス関連技術(Latex Based Technology in Diagnostics)」、Health & Science Communications 社刊、ワシントン D. C. 20005、(1990)も参照せよ。望ましい特性および特徴を有する感作粒子は商業的に入手できる場合がある。

10

20

【0058】

別の実施態様では、前記粒子は、その表面に結合パートナーを固定化する前に、まず蛍光消光剤でプレコーティングされる。前記蛍光消光剤が蛍光受容体のときには、該受容体の吸光波長は、前記具体的なアッセイで用いられることになる蛍光標識の発光波長の近傍にある。蛍光受容体は、前記蛍光標識の発光波長帯に重複する吸光波長帯を有する化合物のグループから選択され、フルオレセインおよびローダミンの誘導体を含む。蛍光消光剤の他の例は、ヨウ化物のような重い原子と、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} および Cr^{3+} のような金属イオンとを含むが、これらに限定されない。

30

【0059】

前記プレコーティングされた粒子は、関心のある被検体に対する結合パートナーの適当な量を装荷される。前記消光剤をプレコーティングすることおよびその後前記結合パートナーを装荷することの手順は、当業者に周知である。

【0060】

不溶性粒子に固定化できる結合パートナーの例は、アビジンと、ストレプトアビジンと、レクチン(例えば、糖または糖タンパク質を捕捉するコンカナバリンA)と、ポリクローナル抗体と、モノクローナル抗体と、ポリペプチド(例えば、バンコマイシンを捕捉するジエチル-L-リジン-D-アラニン-D-アラニン)と、(糖タンパク質を捕捉する)プロテインAおよびプロテインGと、(その内腔に低分子を捕捉する)シクロデキストランと、クラウンエーテルと、(ビタミン B_{12} を捕捉する)内因子と、葉酸結合タンパク質とを含む。

40

【0061】

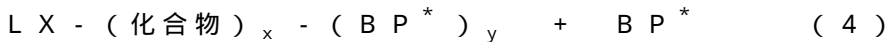
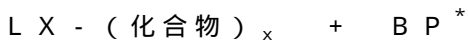
上述のとおり、かかる感作粒子の調製において、前記不溶性粒子に固定化される結合パートナーまたは被検体の量を制御することが不可能であることは周知である。その結果、同一ロットから調製された粒子の多くは、前記固定化された化合物の異なる量を含み、粒子増感アッセイにおいて特異的結合パートナーの異なる量と結合する。しかし、前記不溶性粒子に固定化された化合物の濃度を知ることがしばしば望ましい。そこで、本発明の別の

50

面は、不溶性粒子に結合する分子の量を定量する方法を提供する。かかる方法は一般に数式 4 に示されるように記載できる。

【0062】

数式 (4)



【0063】

上記数式において、「 $LX - (\text{化合物})_x$ 」は、「 x 」個の化合物分子を固定化した感作粒子を表し、「 BP^* 」は、前記化合物に対する蛍光色素標識結合パートナーであり、「 $LX - (\text{化合物})_x - (BP^*)_y$ 」は、前記化合物と前記結合パートナーとの間の結合で形成される複合体である。数式 4 に表される方法では、一定量の前記感作粒子が、反応混合液を形成するために、一定量の前記蛍光色素標識結合パートナーと混合される。前記反応混合液は、前記複合体の形成を可能にする条件下でインキュベーションされる。

10

【0064】

数式 (4) で表されるアッセイの 1 の実施態様では、前記複合体は、前記蛍光色素標識が近接するように、標識結合パートナー (BP^*) の十分な量を含む。その結果、前記複合体を形成した蛍光色素の蛍光は消光される。数式 (4) で表されるアッセイの別の実施態様では、前記不溶性粒子は蛍光消光剤でプレコーティングされるが、複合体の形成とともに、該消光剤は前記複合体を形成する蛍光色素標識の蛍光を消光する。複合体 $LX - (\text{化合物})_x - (BP^*)_y$ の一部である前記標識結合パートナー (BP^*) の蛍光が消光するとき、電気泳動結果図で検出される実質的に唯一の信号は、遊離の標識結合パートナー (BP^*) によって発生する信号である。この方法を用いると、固定化された化合物の定量は、一定の標識濃度 (BP^*) または一定の感作粒子 ($LX - (\text{化合物})_x$) の濃度で決定される場合がある。いずれの場合でも、前記標識の蛍光信号は、前記不溶性粒子に結合する化合物の濃度に反比例する。

20

【0065】

数式 4 で表されるアッセイの 1 つの具体例は、サブミクロン範囲のラテックス粒子に結合するアビジンを含む感作粒子の定量に向けられる。アビジンでコーティングされたラテックス粒子は Synchron CX (登録商標)、Synchron LX (登録商標) および Image (登録商標) 用の二座配位子コンジュゲートの調製のための鍵となる中間体である (引用により具体的にここに取り込まれる米国特許第 5,747,352 号、第 5,422,281 号および第 5,196,351 号の明細書を参照せよ)。これらのラテックス-アビジン粒子を評価するために用いられる現行の方法は、労働集約的で時間がかかる。従来の方法は、前記ラテックス-アビジン粒子を二座配位子と結合させることにより二座配位子コンジュゲートの少量を調製すること、その後、Synchron (登録商標) システムで、受容可能な免疫反応性があるかどうか前記コンジュゲートを評価することを含む。反対に、数式 4 で表される本発明の CE-LIF 法は、前記ラテックス-アビジン粒子を直接テストするので、従来法よりはるかに単純かつ迅速で、テスト時間を 3 から 10 日短縮する。数式 4 による方法は、遊離のビオチン-フルオレセインの既知量と前記ラテックス-アビジン粒子をインキュベーションすること、一部を毛管電気泳動すること、反応混合液中の残存する遊離のビオチン-フルオレセインのレーザ励起蛍光を検出することを伴う。電気泳動結果図は、前記遊離の標識を主に含み、解釈が容易であるが、これは、前記ビオチン-フルオレセインと前記ラテックス-アビジンとの複合体の形成とともに蛍光が高度に消光されるためである。各電気泳動結果図は 3.5 分間未満で得られる。

30

40

【0066】

本発明の方法は、CE とともに粒子増感アッセイ形式を用いてサンプル中の複数の標的被検体を同時に均一に検出するのに適している。本発明の 1 の実施態様に従うと、数式 1 で説明された競合的なアッセイと同様のかかる方法は、一般的に数式 5 に示されるように記

50

載できる。

【0067】

数式(5)

$$\begin{aligned}
 & B P_1 - L X - B P_2 + A N_1 + A N_1^* + A N_2 + A N_2^{**} \\
 & [A N_1^* - (B P_1 - L X - B P_2) - A N_2^{**}] \\
 & + [A N_1 - (B P_1 - L X - B P_2 - A N_2^{**})] \\
 & + [A N_1^* - (B P_1 - L X - B P_2) - A N_2] \\
 & + [A N_1 - (B P_1 - L X - B P_2) - A N_2] \\
 & + [A N_1^* - (B P_1 - L X - B P_2)] \\
 & + [A N_1 - (B P_1 - L X - B P_2)] \\
 & + [(B P_1 - L X - B P_2) - A N_2^{**}] \\
 & + [(B P_1 - L X - B P_2) - A N_2] \\
 & + A N_1^* + A N_2^{**} \quad (5)
 \end{aligned}$$

10

【0068】

上記の数式で、「 $B P_1 - L X - B P_2$ 」は、第1のサンプル被検体に特異的な第1の結合パートナー($B P_1$)と、第2のサンプル被検体に特異的な第2の結合パートナー($B P_2$)との両方でコーティングされた不溶性粒子を表し、「 $A N_1$ 」は第1のサンプル被検体で、「 $A N_1^*$ 」は蛍光部分で標識された第1のサンプル被検体で、「 $A N_2$ 」は第2のサンプル被検体で、「 $A N_2^{**}$ 」は蛍光部分で標識された第2のサンプル被検体である。数式(4)で表されるアッセイでは、前記標識サンプル被検体および前記感作粒子の濃度は一定である。

20

【0069】

複数被検体のアッセイは、競合的なアッセイについて上述したやり方と同様のやり方で実施される。したがって、反応混合液は、第1の標識被検体と第2の標識被検体とに結合する感作粒子を含む第1の複合体 $[A N_1^* - (B P_1 - L X - B P_2) - A N_2^{**}]$ 、および/または、第1のサンプル被検体と第2の標識被検体とに結合する感作粒子を含む第2の複合体 $[A N_1 - (B P_1 - L X - B P_2 - A N_2^{**})$ 、および/または、第1の標識被検体と第2のサンプル被検体とに結合する感作粒子を含む第3の複合体 $[A N_1^* - (B P_1 - L X - B P_2) - A N_2]$ 、および/または、第1のサンプル被検体と第2のサンプル被検体とに結合する感作粒子を含む第4の複合体 $[A N_1 - (B P_1 - L X - B P_2) - A N_2]$ 、および/または、第1の標識被検体に結合する感作粒子を含む第5の複合体 $[A N_1^* - (B P_1 - L X - B P_2)]$ 、および/または、第1のサンプル被検体に結合する感作粒子を含む第6の複合体 $[A N_1 - (B P_1 - L X - B P_2)]$ 、および/または、第2の標識被検体に結合する感作粒子を含む第7の複合体 $[(B P_1 - L X - B P_2) - A N_2^{**}]$ 、および/または、第2のサンプル被検体に結合する感作粒子を含む第8の複合体 $[(B P_1 - L X - B P_2) - A N_2]$ の形成を可能にする条件下でインキュベーションされる。前記反応混合液は、CEに供され、LIFにより分析される。前記反応混合液は複数の産物を含むが、第1および第2の標識被検体のさまざまな複合体の形態の全て(すなわち、第1、第2、第3、第5、および第7の複合体)の蛍光が前記複合体の形成とともに消光するために、電気泳動結果図は、たった2個の信号、すなわち、遊離の第1および第2の標識被検体 $A N_1^*$ および $A N_2^{**}$ からの信号しか含まない。かかる消光は、上述のとおり、前記複合体を形成する蛍光色素が近接している場合か、前記粒子が蛍光消光分子でプレコーティングされている場合かのときに起こる。

30

40

【0070】

前記遊離の第1および第2の標識被検体のそれぞれ $A N_1^*$ および $A N_2^{**}$ をCEの際に分離することが可能である場合には、第1および第2の被検体は同一の蛍光部分で標識される場合がある。しかし、前記遊離の第1および第2の標識被検体由来の信号が十分に近接している場合には、それぞれの被検体は異なる蛍光部分で標識されることが好ましい。

50

【0071】

本発明の方法は、既知の手順とは根本的に異なる。CE-LIF法を被検体の定量手段として用いる従来のアッセイでは、アッセイ反応混合液中の全ての標識種からの信号は、電気泳動結果図でさまざまな該信号を正確に計測するために、十分に分離されていなければならない。しかし、粒子増感アッセイ形式を用いる従来のアッセイであっても、十分な分離と、被検体濃度の正確な測定とを達成することができない。これは、感作粒子の調製の際に、不溶性粒子に固定化される分子の濃度を制御することが困難であるという事実による。さまざまな濃度の分子でコーティングされた感作粒子を用いて粒子増感アッセイの際に形成された複合体は、CEの際にさまざまな速度で移動するので、分別困難であり、電気泳動結果図において1または2以上の他のピークとしばしば重複するぼんやりしたピークが電気泳動結果図に描かれる。本発明の方法は、複合体を形成する蛍光色素標識部分から生じる前記ぼんやりしたピークを消光させることによりこの問題を回避して、よりきれいで単純な電気泳動結果図を作成するので、結果的に被検体濃度のより正確な測定を提供する。

10

【0072】

本発明の方法は、さまざまなサンプル中の関心のある被検体濃度の測定に適する。典型的なサンプルは、全血液、乳汁、血清、血漿、尿、脳脊髄液等のような臨床サンプルと、水と、排泄物と、食物と、タンパク質と、精製された薬物等のような薬物とを含むが、これらに限定されない。

【0073】

非常に多様な被検体のうち、どれが本発明の方法によって評価されてもかまわない。ここで用いられる「被検体」は、サンプル中の存在および/または濃度が決定されるべき物質を指す。「被検体」という用語は、特異的結合パートナーが存在するか、特異的結合パートナーが調製できるいずれかの物質であって、アッセイにおいて前記特異的結合パートナーに結合する物質を指す。代表的な被検体は、抗原と、ハプテンと、抗体と、(免疫グロブリン、レセプター、酵素等のような)タンパク質と、ペプチドと、アミノ酸と、ホルモンと、ステロイド類と、糖タンパク質と、糖と、癌細胞マーカーと、組織細胞と、ウイルスと、ビタミンと、薬物と、代謝産物と、核酸と、殺虫剤(pesticide)と、(コカイン、カナビノイド、あへん剤等のような)乱用物質と、毒物と、薬剤等とを含むが、これらに限定されない。本発明の方法は、タンパク質、薬物その他の薬剤を分析するのみに特に適する。

20

30

【0074】

ここで用いられる「抗体」という用語は、外来物質の検出に応答して産生される免疫グロブリンを指し、無傷の分子とともに、Fab、F(ab')₂およびFvのような機能的断片を含む。最も好ましくは、用いられる抗体分子は精製されたモノクローナル抗体で、親和常数が10⁹以上であることが好ましい。かかる抗体分子のかわりに、ポリクローナル抗体か、FabまたはF(ab)₂断片か、単鎖抗体か、可溶化レセプターまたはレセプターリガンドかを用いることがある。

【0075】

上記の実施態様とともに用いられる蛍光色素標識は蛍光部分である。適当な蛍光色素は、フルオレセイン、イソチオシアナート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オプタルデヒド(ophthaldehyde)標識、フルオレスカミン、テトラメチルローダミン、BODIPY(登録商標、Molecular Probes Inc.社)、近赤外色素、ランタニド錯体、または、かかる蛍光部分を有する被検体を含むが、これらに限定されない。抗体の標識が望ましい場合には、フルオレセイン標識を用いることが好ましい。かかる標識抗体は、約10⁻¹⁰モルの濃度で存在するタンパク質種の直接的免疫アッセイに用いられる場合がある。当業者に知られたいずれかの適当な方法が、本発明の結合パートナーの被検体を直接標識するのに用いられてもかまわない。

40

【0076】

50

いったん前記アッセイの反応が起こると、反応物および生成物が、複合体非形成（遊離）の標識種を分別するには十分であるが、前記複合体を形成する蛍光色素標識種を分別するために最適化される必要はない条件下で、CEに供される。タンパク質のCE技術は、固体支持体を使用することなく前記遊離の標識種を分離する手段を提供する。これらの分離技術をレーザー励起蛍光検出とともに適用することは、引用によりここに具体的に取込まれる米国特許第5,571,080号明細書に説明されるように、 10^{-9} から 10^{-10} モルの範囲の濃度の種の均一的な免疫化学的測定を可能にする。

【0077】

一般に、正常のCE法は毛管カラムの内容物にもとづいて2つのカテゴリーに分類できる。「固定ゲル」CE法では、毛管は適当なゲル、例えば、ポリアクリルアミドゲルで満たされ、サンプル成分の分離は該成分のサイズおよび荷電によって予測される。分析の速さにもかかわらず、固定ゲルCE法は複数の欠点、特に、予測が不可能である欠点と、前記ゲルの材料の寿命が短い欠点とを有する。これらの因子が、多数の分析作業を実施する状況では固定ゲルCE法を受け入れがたいものにする。

10

【0078】

CE法の第2の形態（すなわち開放CE法）では、毛管は導電性バッファー溶液で満たされる（Kim、J.W.ら、Clin. Chem.、39巻、689-692頁、（1993年））。前記バッファーは150mM ホウ酸、pH10.00±0.25が最も好ましいが、約70mMと約400mMとの間の濃度でも実施可能である。前記バッファーのモル濃度が高くなると、前記カラム内の温度は上昇するので、前記成分への温度の影響が問題となる状況では、低濃度のバッファーが用いられるべきである。しかし開示されたプロトコールは、コーティングされたカラムまたはコーティングされないカラムを使うタンパク質の材料の分離に関して用いられるいずれかの分離バッファーを用いて達成できる。

20

【0079】

つぎに、前記毛管はマイナスの電荷でイオン化される。かかるイオン化は毛管壁をマイナスに荷電するので、前記バッファーから陽イオンを引きつける。前記溶液の電気的な中性は保たなければならないため、前記毛管壁に向かう陽イオンのいずれかの流れは、前記バッファー溶液および前記サンプル成分の同様の運動を伴う。この電気浸透流は、中性の種と、荷電の正負にかかわらず電離する種との両方を陰極方向に駆動する固定する速度成分を提供する。「開放CE法」におけるバッファーは導電性および拡散に対して安定である。したがって、ゲルによる電気泳動で得られる分離と同様の分離が「開放CE法」においても達成できる。

30

【0080】

開放CE法は、以下のように、例えば臨床サンプルの分析に向けた望ましい性質をたくさん有する。（1）前記分析はゲルを充填したカラムを伴わないため、いずれの特定のゲルを充填したカラムについても存在する、実行可能な分析回数の固有の限界が回避される。（2）毛管カラムが未処理のとき、コーティングされたカラムにつきまとうことがある予測不可能性が回避される。サンプルのサイズが小さい（通常希釈サンプルの5から200μLの程度）。（3）サンプル分析時間が早い、すなわち、約20分間未満である。（4）前記プロトコールは自動化に向いており、効率的かつ効果的なサンプル分析に要する労働熟練度を低下させる。前記毛管カラムは、取り扱いを容易にするために（例えばポリイミド材料を用いて）外側をコーティングする場合がある。

40

【0081】

本発明の方法は未処理カラムとコーティングされたカラムとのいずれでも使うことができるが、カラムは未処理が好ましい。未処理の毛管カラムが用いられるとき、分離バッファーは引用によりここに取込まれる米国特許第5,120,413号明細書に開示されるとおりであることが好ましい。適当なカラムは、引用によりここに取込まれるGuttman、A.の米国特許第5,213,669号明細書と、Burolla、V.P.の米国特許第5,198,091号明細書と、Shieh、C.-H.の米国特許第5,0

50

98, 539号明細書とも開示されている。

【0082】

前記標識の存在は、自動式または半自動式的手段で決定されることが好ましい。好ましい実施態様では、検出はレーザ励起蛍光(LIF)検出器を用いて行われる。代表的な検出器は、前記蛍光色素を励起するのに適した1-3ミリワットのヘリウムネオンレーザ(543.5nm)を含む。適当な2.5ミリワットの543.5nmの緑色の光を発光するヘリウム-ネオンレーザは、Particle Measuring Systems、コロラド州、ボールダーから入手可能である。前記レーザの出力は、レーザラインフィルターを用いてフィルター処理され、分離毛管の検出領域に集束されることが好ましい。好ましい実施態様では検出システムは、LIF検出器付きのP/ACE(登録商標)システム用の標準のSMA-905ファイバーコネクタへのレーザヘッドカプラー(カナダ、オンタリオ州のOZ Opticsから入手可能)を用いて、P/ACE(登録商標)システム(Beckman Instruments、Inc.社)の中に一体化される。蛍光発光は、前記毛管を焦点にあわせた放物面反射器を用いて集光されコリメートされるのが好ましく、散乱光マスクが前記放物面反射器の正面の強いレーザ散乱光の面に配置されることが好ましい。コリメートされた発光はまずノッチフィルター(阻止波長543.5nm)を通過し、つぎに580nmを中心とする9nmのバンドパスフィルターを通過する(かかるフィルターはマサチューセッツ州、WestfordのBarr Associates社と、コネチカット州、StratfordのOriell社とから入手可能である)。検出は、ハママツのR374のようなエンドオン(end on)タイプの光電増倍管を使って達成されることが好ましい。

【0083】

本発明とともに使用できる毛管電気泳動装置システムは周知である。特に好ましい装置は、少なくとも2個の異なるサンプルの分注を同時に評価することができるマルチチャンネル装置であり、前記装置は、複数の電気泳動結果図の取得および比較が可能なように、複数の分注を同時に分析する能力を有することがより好ましい。特に好ましい毛管電気泳動システムは、引用によりここに取り込まれる米国特許第5,413,686号明細書に開示される。

【0084】

特に好ましい毛管電気泳動システムは、P/ACE(登録商標)高性能毛管電気泳動システム(Beckman Instruments Inc.社)である(全て引用によりここに取り込まれる、Chen、F.-T.A.、Clin.Chem.、38巻、1651-1953頁、(1992年)、Chen、F.-T.A.、J.Chromatogr.、559巻、445-453頁、(1991年)、Fu、P.C.ら、Clin.Chem.、37巻、970頁、(1991年)、Chen、F.-T.A.、Clin.Chem.37巻、1061頁、(199)、Gordon、M.J.ら、Anal.Chem.、63巻、69-72頁、(1991年))。かかる装置は、システム・ゴールド(登録商標)ソフトウェア(米国カリフォルニア州、Fullerton、Beckman Instruments、Inc.社)のようなオンボード搭載(on board)コンピュータソフトウェアを通じて達成できる点で、最も好ましい。

【0085】

CE法の評価は視覚によることが典型的である、すなわち、サンプルの電気泳動結果図がピークの存在を決定するために評価される。ピーク部分の面積はアッセイされた被検体濃度に対応する。典型的には、電気泳動結果図は、蛍光のような検出単位を縦軸に、成分が検出領域までカラムを移動する時間を横軸にプロットすることによって得られる。結果はある単位の数値として得られる場合があり、個々のピークで仕切られた面積から得られることが典型的である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0086】

実施例

10

20

30

40

50

以下の実施例では、商業的に入手可能なビオチン - フルオレセインが検出標識として用いられたが、現在でも商業的に入手可能である。ラテックス粒子は、カルボン酸修飾タイプで、約60nmの直径があった。方法は、前記ビオチン - フルオレセイン標識をラテックス - アビジンと混合すること、その後、励起光488nmおよび発光520nmのLIF検出器を装備したベックマンP/A C E (登録商標)システムで遊離標識の蛍光信号を監視することを伴った。インプロセス (in process) 試験全体は2時間未満で完了できる。それぞれの電気泳動結果図は、3.5時間未満で得られ、主に前記遊離標識からなる。結合した前記ビオチン - フルオレセインの強力な蛍光消光作用のため、ラテックス - アビジン - ビオチンフルオレセインは、高濃度の場合を除いて、ほとんど検出できなかった。この方法を用いると、機能的なアビジンの定量は、一定の標識濃度、または、一定のラテックス - アビジン濃度で決定できた。いずれの場合でも、前記標識の蛍光信号は、アビジンの飽和点以下ではラテックスに固定化されたアビジンの濃度に反比例した。前記アビジン飽和点では、前記ラテックス粒子のビオチン結合能についての機能的なアビジン量は、ビオチン - フルオレセイン標識の既知量から求めることができた。

10

20

30

40

50

【0087】

下記の実施例は、(1)アビジンのカルボン酸修飾ラテックス粒子に対する反応物重量比(以下、「A/C比」という。)0.35を用いるロットM602100のラテックス - アビジン材料と、(2)ロット365RおよびKP1という異なる2つのバッチのラテックス粒子および同じバッチのアビジンをA/C比0.15で用いるラテックス - アビジン材料とから前記機能的なアビジン濃度を定量する、本発明のCE - LIF法を例示する。結果に示されるとおり、A/C比が高いほど、予想通りアビジンの装荷量が多くなる。しかし、第2および第3のロットを調製するために用いられた前記2種類の適格なラテックス標識は、同一のアビジン材料が用いられたときであっても、アビジン装荷量に60%もの相違が生じた。

【0088】

試薬およびバッファー

ラテックス - アビジン材料(A/C比0.35)と、ロットM602100(A/C比0.35)と、ロット365RおよびKP1(A/C比0.15)は自社内で調製された。

【0089】

ビオチン - フルオレセイン、5 - ((N - (5 - (N - (6 - (ビオチノイル)アミノ)ヘキサノイル)アミノ)ペンチル)チオウレイジルフルオレセインは、Molecular Probe社から購入された。同一のロットの2本の異なるバイアルが購入された。1本のバイアルが自社内で調製された前記ラテックス - アビジン材料を評価するのに用いられた。使用前に、前記ビオチン - フルオレセインは、既知量のストレプトアビジンについてCE - LIFで標準化されたが、該ストレプトアビジンは、DU - 70でHABAで定量された。もう1本のバイアルは、標準化することなく、残りのラテックス - アビジン材料の試験に用いられた。

【0090】

GTSバッファー：GTSはCEのランニングバッファーであり、pH8.3、192mMグリシン、25mM TRISおよび50mM塩化ナトリウムからなるものであった。

【0091】

GTBバッファー：GTBバッファーは、前記ラテックス材料と、ビオチン - フルオレセイン標識との希釈液として用いられた。pH8.3、192mMグリシン、25mM TRISおよび0.15% BSAを含むように調合された。

【0092】

LIF検出を用いる毛管電気泳動

毛管電気泳動実験は、LIF検出を装備したP/A C E (登録商標)システムで実施された。励起波長は490nmで、発光波長は520nmであった。分析は、50μmの寸法と20cmの分離長(全長27cm)の未コーティングの石英ガラス毛管で実施された。

加圧された電圧は10 kVであった。サンプル注入時間は2秒であった。GTSが分離バッファとして用いられた。観察された電流は45から55 μ Aの範囲であった。

【0093】

アッセイプロトコール

ラテックス - アビジンおよびビオチン - フルオレセイン試薬は、以下のプロトコールに従って混合され、すなわち、GTBバッファ100 μ Lと、GTBバッファで希釈されたラテックス - アビジン100 μ Lまたは基準としてのGTBバッファ100 μ Lと、GTBバッファ中に 3×10^{-7} Mまたは 3.68×10^{-8} Mのビオチン - フルオレセイン100 μ Lとが調製され、少なくとも2分間インキュベーションされて、CE-LIFによって分析された。

10

【0094】

結果

3×10^{-7} Mで一定のビオチン - フルオレセインを用いた、ラテックス - アビジン (ロットM602100、A/C比0.35) の定量

さまざまな希釈率 (dilution) のラテックス - アビジンのサンプルが調製され、 3×10^{-7} Mのビオチン - フルオレセインと反応させられた。図1に示されるとおり、約1:12.5に希釈されたラテックス - アビジンが前記ビオチン標識の全てを使いきるために必要であった。この量は、未希釈のラテックス - アビジン材料のビオチン結合能 $1 \times 12.5 \times 3 \times 10^{-7}$ M、すなわち、 3.75×10^{-6} Mに相当した。

20

【0095】

希釈率が1:100で一定のラテックス - アビジン (ロットM602100、A/C比0.35) の定量

図2は、一定の濃度 (1:100) のラテックス - アビジンと、 9×10^{-9} Mから 3×10^{-7} Mまでの範囲の濃度のビオチン - フルオレセインとの間の反応の結果の概要である。前記結果に示されるとおり、アビジンの飽和点は約 0.35×10^{-7} Mのビオチン - フルオレセイン濃度で達成される。これは、未希釈のラテックス - アビジン材料のビオチン結合部位の $100 \times 0.35 \times 10^{-7}$ M、すなわち、 3.5×10^{-7} Mに相当する機能的アビジン濃度であり、一定量のビオチン - フルオレセインを用いる上記のとおり決定された結果とよく一致した。

30

【0096】

3.68×10^{-8} Mのビオチン - フルオレセインを用いた2つのロットのラテックス - アビジン (ロット365RおよびロットKP1、A/C比0.15) の比較

新しいロットのラテックス粒子を用いてラテックス - アビジン - 二座配位子試薬を製造する際に、コンジュゲート試薬が、以前のロットのラテックスを用いて調製された基準試薬と比べて非常に低い免疫反応性をSynchronで示すことがわかった。本発明で示されるCE法を確認するために、我々は前記2種類のラテックス - アビジン中間体を得て評価した。

【0097】

結果は図3に提示される。古いほうのラテックスのロット (KP1) に固定化された機能的なアビジンの量は、アビジンの飽和点での1:60の力価、すなわち、未希釈のラテックス - アビジン材料について $60 \times 3.68 \times 10^{-8}$ M、または、 2.2×10^{-6} Mのビオチンに相当した。この量は、新しいほうのラテックスのロット (ロット365R) から生成される材料より1.7倍大きく、1:35の力価、すなわち、 $35 \times 3.68 \times 10^{-8}$ M、または、 1.3×10^{-6} Mのビオチンに相当した。上述のCE-LIFの結果は前記免疫アッセイから得られた結果と符合したが、該免疫アッセイは、Synchron CX (登録商標) システムで評価されたそれぞれのラテックス - アビジン - 二座配位子コンジュゲートからの免疫反応性の60%の差を示した。

40

【0098】

50

本発明は、その本質的な特徴から逸脱することなく、他の具体的な態様で具体化される場合がある。説明された実施態様は、全ての点で、制限的ではなく、例示としてのみ考慮されるべきである。実際、当業者は、ここに示された内容に基づいて過度の実験を伴わずに、さらなる実施態様を容易に想到し作成することができる。したがって本発明の範囲は、上記の説明によってではなく、添付する特許請求の範囲によって示される。前記特許請求の範囲の均等の意味および範囲内に該当する全ての変更は、前記特許請求の範囲の中に含まれるものとする。

【図面の簡単な説明】

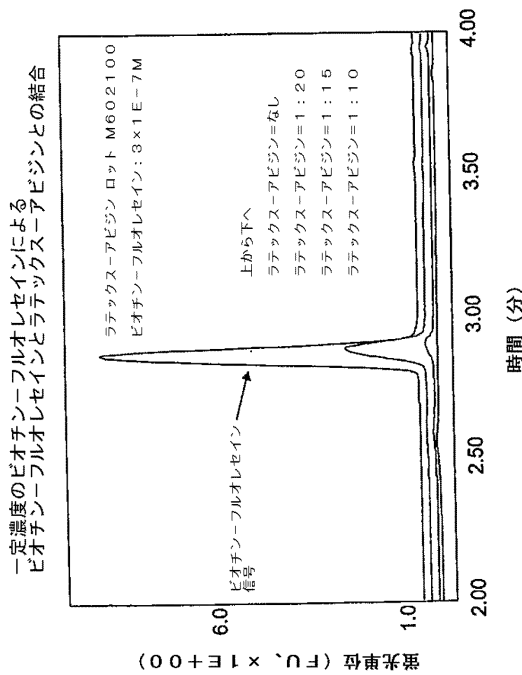
【0099】

【図1】一定濃度のビオチン-フルオレセインにおける、アビジンでコーティングされたラテックス粒子の第1のロットの定量を示す、前記粒子のさまざまな希釈率でのCE-LIF法による電気泳動結果図。

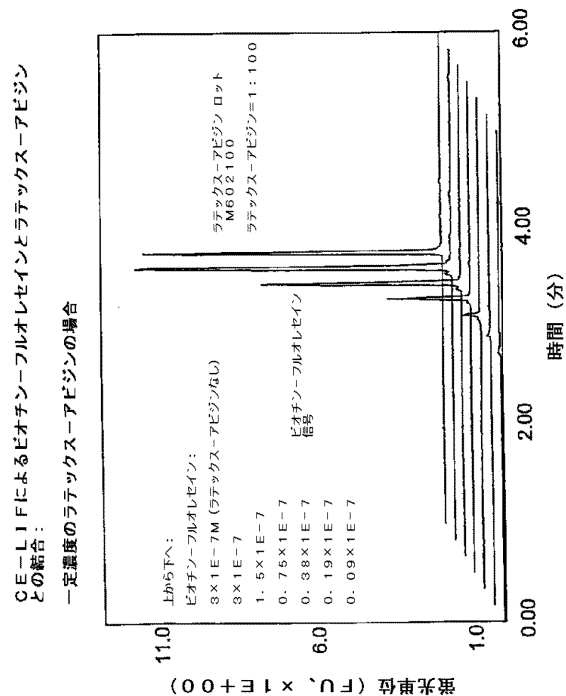
【図2】2種類の濃度のビオチン-フルオレセインにおける、アビジンでコーティングされたラテックス粒子の第1のロットの定量を示す、CE-LIF法による電気泳動結果図。

【図3】一定濃度のビオチン-フルオレセインにおける、アビジンでコーティングされたラテックス粒子の2種類の異なるロットの定量を示す、前記粒子のさまざまな希釈率でのCE-LIF法による電気泳動結果図。

【図1】

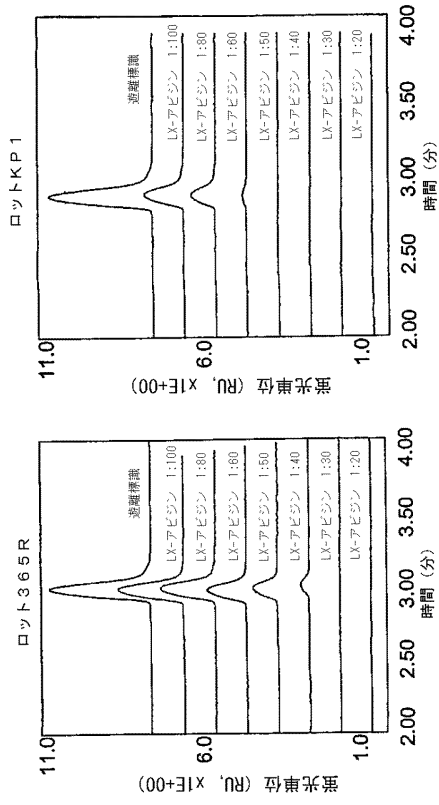


【図2】



【 図 3 】

ラテックス-アビジン (LX-アビジン) のロット365RおよびKPIを用いる
QE-LIFによるラテックスに固定化されたアビジンの定量と比較



【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
20 March 2003 (20.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/023353 A2

- (51) International Patent Classification: **G01N** 17455, Anaheim, CA 92817 (US). **KIM, Julie S.**; 736 San Juan Lane, Placentia, CA 92870 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/27332
- (22) International Filing Date: 27 August 2002 (27.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/947,990 6 September 2001 (06.09.2001) US
- (71) Applicant: **BECKMAN COULTER, INC.** [US/US]; Box 3100, 4300 N. Harbor Blvd., Fullerton, CA 92834-3100 (US).
- (74) Agents: **MAY, William, H.** et al.; BECKMAN COULTER, INC., 4300 N. Harbor Blvd., Box 3100, Fullerton, CA 92834-3100 (US).
- (81) Designated State (*national*): JP.
- (84) Designated States (*regional*): European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SI, SK, TR).
- Published:**
without international search report and to be republished upon receipt of that report

- (72) Inventors: **OH, Chan S.**; 15962 Equilme Dr., Chino Hills, CA 91709 (US). **CHENG, Anthony**; P.O. Box
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 03/023353 A2

(54) Title: PARTICLE BASED HOMOGENEOUS ASSAYS USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH LASER-INDUCED FLUORESCENCE DETECTION

(57) Abstract: The invention provides highly sensitive and rapid homogeneous assays which employ particle-enhanced assay formats in concert with capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence (LIF) detection to determine the concentration of an analyte of interest in a sample. Such a determination is made by measuring fluorescent signal(s) (i.e., an electropherogram) produced upon LIF of species present in the reaction mixture that are capable of producing such signals. The method of this invention produces simplified electropherograms by reducing the number of signals that must be separated and subsequently measured, and therefore increases the accuracy of the detection and/or quantification of target analyte concentration in a sample.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

**Particle Based Homogeneous Assays Using Capillary Electrophoresis
with Laser-Induced Fluorescence Detection**

Field of the Invention

The invention relates generally to assays for the detection of analytes in a sample, and specifically to a novel particle-based homogeneous assays using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.

Background of the Invention

The ability to detect and/or quantitate the concentration of a pharmacological agent, metabolite, or toxin is a central aspect of modern diagnosis and management of disease. In some cases, such analytes can be detected directly by assaying their biological activities. In most cases, however, it is more efficient to detect such molecules by virtue of their capacity to specifically bind to antibodies, or by their physical characteristics, such as electrophoretic mobility.

Assays for the detection of target analytes involve the use of a binding partner which specifically binds to the analyte of interest in a sample to aid in the detection of the analyte. One type of assay for the detection of a target analytes are immunoassays. Immunoassays are assay systems that exploit the ability of an antibody to specifically recognize and bind to a particular target analyte. The concept of immunoassays is based on a specific chemical reaction between an antibody and its corresponding antigen. Quantitation involves the separation of an antibody-bound antigen from the free antigen followed by the detection of an antibody-bound antigen or free antigen in solution, depending upon the specific analytical scheme. Such assays are used extensively in modern diagnostics (*e.g.*, Fackrell, J., *Clin. Immunoassay* 8:213-219 (1985); Yolken, R. H., *Rev. Infect. Dis.* 4:35 (1982); Collins, W. P., In: *Alternative Immunoassays*, John Wiley & Sons, NY (1985); Ngo, T. T., et al., In: *Enzyme Mediated Immunoassay*, Plenum Press, NY (1985)).

There are many variations of assays for the detection of analytes, and the critical steps are either physical separation or discrimination and detection. Assays that require physical separation are termed "heterogeneous assays." In contrast, *homogeneous assays* are designed such that the removal of bound from unbound species is unnecessary. Because homogeneous assays lack a separation step and are more easily automated, they are more desirable than heterogeneous assays in applications that entail the screening of large numbers of patients.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

Analytes present at concentration levels below 10^{-9} M are generally assayed using either a competitive method or a direct method. In a competitive assay, the antigen of interest competes with a labeled antigen for a judicious amount of antibody. A direct assay is typically a sandwich assay involving two antibodies binding to different antigenic sites of an antigen. One antibody is bound to a solid phase material and is employed to harvest the antigen. The other antibody is labeled and used to generate quantitative information from the bound antigen (Cone, E. J., et al., *J. Forens. Sci.* 35:786-781 (1990); Baugh, L. D., et al., *J. Forens. Sci.* 36:79-85 (1991); Standefer, J. C., et al., *Clin. Chem.* 37:733-738 (1991)).

In order to facilitate the detection of binding between the analyte of interest and its binding partner, one or more reaction analytes is typically labeled (e.g., with a radioisotope, an enzyme, a fluorescent moiety, a chemiluminescent moiety, or a macroscopic label, such as a bead, etc.) (See Chard, T. et al., In: *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology* (Work, T. S., Ed.), North Holland Publishing Company, NY (1978); Kemeny, D. M. et al. (Eds.), *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays*, John Wiley & Sons, NY (1988)). Radioisotopes have long been used in immunoassays. O'Leary, T. D. et al., for example, describe a radioimmunoassay for digoxin serum concentrations (O'Leary, T. D. et al., *Clin. Chem.* 25:332-334 (1979)). The difficulty of handling such hazardous materials and the problem of radioactive decay have led to the development of immunoassays that use other labels.

Fluorescent moieties are frequently used as labels in immunoassay formats (See Ichinose, N. et al., In: *Fluorometric Analysis in Biomedical Chemistry*, Vol. 10 (110), *Chemical Analysis* (Winefordner, J. D. et al., Eds.) John Wiley & Sons, NY (1991)). For example, a fluorescence polarization immunoassay format for cocaine has been described (TDx[®], Abbott Laboratories, Inc.) The TDx[®] format has also been used to assay acetaminophen serum levels (Koizumi, F. et al., *Tohoku J. Exper. Med.* 155:159-(1988); Edinboro, L. E. et al., *Clin. Toxicol.* 29:241-(1991); Okurodudu, A. O. et al., *Clin. Chem.* 38:1040 (1992)), and serum digoxin levels (Okarodudu, A. O. et al., *Clin. Chem.* 38:1040 (1992)). Wong, S. H. Y. et al., have described the use of an automated (OPUS) analyzer to measure the digoxin concentration in a monoclonal antibody mediated, fluorescence-based assay protocol (Wong, S. H. Y. et al., *Clin. Chem.* 38:996 (1992)). Lee, D. H. et al. also disclose the use of a fluorescence polarization assay and a chemiluminescent assay format to assay digoxin levels (Lee, D. H. et al., *Clin. Chem.* 36:1121 (1990)).

WO 03/023353

PCT/US02/27332

Electrophoretic methods have also been used to facilitate the detection of target analytes. Such methods exploit the fact that molecules in solution have an intrinsic electrical charge. Thus, in the presence of an electric field, each molecular species migrates with a characteristic "electrophoretic" mobility which is dependent upon the mass to charge ratio of the molecular species. When this ratio is different from among the various species present, they separate from one another. Under the influence of such a field, all of the variants will move toward a designated charge opposite to the charge of the variants; those having a lower electrophoretic mobility will move slower than, and hence be separated from, those having a (relative) higher electrophoretic mobility.

Electrophoresis has been used for the separation and analysis of mixtures. Electrophoresis involves the migration and separation of molecules in an electric field based on differences in mobility. Various forms of electrophoresis are known, including free zone electrophoresis, gel electrophoresis, isoelectric focusing, and isotachopheresis. One approach to immunoassays employs capillary electrophoresis (CE) for the separation of free and bound label. In general, CE involves introducing a sample into a capillary tube, *i.e.*, a tube having an internal diameter of from about 2 μm to about 2000 μm (preferably, less than about 50 μm ; most preferably, about 25 μm or less) and applying an electric field to the tube (Chen, F-T. A., *J. Chromatogr.* 516:69-78 (1991); Chen, F-T. A., et al., *J. Chromatogr.* 15:1143-1161 (1992)). Since each of the sample constituents has its own individual electrophoretic mobility, those having greater mobility travel through the capillary tube faster than those with slower mobility. Hence, the constituents of the sample are resolved into discrete zones in the capillary tube during their migration through the tube. (Heegard, N. H. H., et al., *Anal. Chem.* 64:2479-2482 (1992); Gordon, M. J., et al., *Anal. Chem.* 63:69-72 (1991); F-T. A., U.S. Patent No. 5,202,006; Chen, F-T. A., U.S. Pat. No. 5,120,413; Hsieh, Y-Z., et al., U.S. Patent No. 5,145,567). The method is well suited to automation, since it provides convenient on-line injection, detection, and real-time data analysis. Capillary electrophoresis may be used to separate an antibody-antigen complex from either the unbound form of the antigen or the antibody. Either the bound or free species may be analyzed and quantitated. U.S. Patent No. 5,863,401 to Chen discloses a method for the simultaneous quantification of multiple drug analytes in urine, based on combining immunochemical binding with capillary electrophoretic separation and laser-induced fluorescence.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

Although sandwich-specific binding assays can provide a much higher sensitivity than competitive assays, the heterogeneity of labeled receptors and antibodies makes the capillary electroseparation difficult to carry out. This results because the unbound and complexed form of the receptor migrates non-uniformly, thus producing broad, poorly defined, rather than sharp, well-defined, distributions upon electroseparation analysis. Thus, conventional electroseparation methods may not offer significant advantages for specific binding assay applications.

Various approaches have been disclosed to overcome the inhomogeneity of large biomolecules. In one approach, the electrophoretic mobility of a labeled antibody is tailored by attaching charged groups to the same labeled molecule. In another approach, one antibody is labeled and the other is highly charged by means of a charge modifying moiety attached to the antibody.

U.S. Patent No. 5,571,680 to Chen discloses a method of effecting the separation of an antigen or antibody from an antigen-antibody complex by CE by modulating the electrophoretic mobility of the antigen or antibody by chemical modification with well-defined charge-bearing organic molecules, such as oligonucleotides.

U.S. Patent No. 6,103,537 to Ullman et al. discloses a method for masking inhomogeneity of an antibody in assay mixtures that are to be separated by CE. The method involves preparing labeled reagent particles comprising a labeled analyte-specific antibody bound to insoluble particles, and incubating the sample containing an analyte of interest with the particle-bound antibodies to form a complex between the analyte and the labeled particle-bound antibody. The reaction mixture is separated by CE, and the labeled complex is detected to determine the concentration of the analyte. However, it is well known that in the preparation of such labeled reagent particles, it is impossible to control the amount of antibody that becomes bound to the insoluble particle. As a result, different particles will contain different amounts of immobilized antibody relative to the other particles and will therefore bind to different amounts of analyte. Consequently, the various labeled complexes formed between the reagent particles and the analyte in the sample will naturally be inhomogeneous and the signal detected from the labeled complexes will be broad. Therefore, it will be more difficult to accurately correlate with the concentration of the analyte, as well as to cleanly separate the complexed label from the free label.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

Reagent particles comprising latex particles coated with avidin (latex-avidin) are key intermediates in the manufacturing of latex-avidin-bidentate reagents for the Synchron CX[®], Synchron LX[®], and Image[®] systems of Beckman Coulter (U.S. Patent Nos. 5,747,352; 5,422,281; and 5,196,351). However, there exists no in-process testing of the latex-avidin intermediate, because reliable direct methods are not available. Further, currently available methods are only applicable for analyzing free avidin in solution rather than assessing the concentration of avidin that is coated on the latex particle. Without knowledge of the avidin loading on the latex particles and consistency with previous lots, a general practice is to simply proceed to the next and final step by coupling the latex-avidin intermediate with the bidentate reagent to produce the latex-avidin-bidentate reagent. Since the bidentate coupling step is a simple and reliable one, failure in manufacturing the latex-avidin-bidentate reagent is then attributed to the latex-avidin material. When failure occurs, the bidentate reagent is wasted, the latex-avidin material has to be disposed of, a large amount of washing buffer is consumed, and most importantly, time is wasted. A common method to qualify the in-process latex-avidin intermediate is to couple a small amount of the latex-avidin material to a small quantity of the bidentate material, followed by immunoreactivity assessment of the resulting conjugate reagent on Synchron CX[®] for its acceptability. This method, however, is labor intensive and time-consuming, requiring three to ten days to obtain the results. Thus, there is still a need for a simple, fast, and reliable method for the in-process testing of latex-avidin intermediates.

In view of the importance of accurately detecting and quantitating analytes in samples, it would be desirable to provide processes which combine the advantages of particle-enhanced assays, capillary electrophoresis, and fluorescent detection techniques to rapidly detect target analytes in a test sample. In particular, it would be desirable to provide processes for more accurately analyzing samples for analytes of interest using particle-enhanced assay procedures and capillary electrophoresis detection techniques. The present invention provides such methods.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides highly sensitive and rapid homogeneous assays which employ particle-enhanced assay formats in concert with capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence (LIF) detection to determine the concentration of an analyte of interest in a sample. Such a determination is made by measuring fluorescent signal(s), *i.e.*, an

WO 03/023353

PCT/US02/27332

electropherogram, produced upon the laser-induced fluorescence of species in the reaction mixture that is capable of producing such signals. Advantageously, the methods of this invention produce simplified electropherograms by reducing the number of signals that must be separated and subsequently measured, thus increasing the accuracy of the detection and/or

5 quantification of target analyte concentration.

Accordingly, one aspect of this invention provides a competitive assay for determining the concentration of an analyte in a sample which comprises:

(a) providing sensitized particles comprising an analyte-specific binding partner immobilized thereon;

10 (b) providing a free fluorophore-labeled analyte comprising the analyte attached to a fluorescent moiety;

(c) incubating the sample in the presence of a known amount of the sensitized particles and a known amount of fluorophore-labeled analyte under conditions that allow the formation of a first complex comprising the immobilized binding partner bound to the sample analyte and/or a second complex comprising the immobilized binding partner bound to the fluorophore-labeled analyte, whereby the fluorescence of the fluorophore moiety of the second complex is quenched upon the formation of the second complex;

(d) subjecting an amount of the incubated sample of step (c) to capillary electrophoresis; and

20 (e) determining the concentration of an analyte by detecting a laser-induced fluorescence of the free fluorophore-labeled analyte, wherein the laser-induced fluorescence is directly proportional to the concentration of the analyte in the sample.

Another aspect of this invention provides a direct sandwich assay for determining the concentration of an analyte in a sample which comprises:

25 (a) providing sensitized particles comprising a first analyte-specific binding partner immobilized thereon;

(b) providing a free fluorophore-labeled binding partner comprising a second analyte-specific binding partner attached to a fluorescent moiety;

30 (c) incubating the sample with a known amount of the sensitized particles and a known amount of the fluorophore-labeled binding partner under conditions that allow the formation of a sandwich complex comprising the analyte bound to the immobilized first

WO 03/023353

PCT/US02/27332

binding partner and to the labeled binding partner, whereby the fluorescence of the fluorophore moiety of the sandwich complex is quenched upon the formation of the complex;

(d) subjecting an amount of the incubated sample of step (c) to capillary electrophoresis; and

5 (e) determining the concentration of the analyte by detecting a laser-induced fluorescence of the free fluorophore-labeled binding partner, wherein the laser-induced fluorescence is inversely proportional to the concentration of the analyte in the sample.

Particle-enhanced assays generally involve the use of sensitized particles comprising insoluble particles coated with a binding partner that specifically binds the analyte of interest.

10 However, during the process of synthesizing such sensitized particles, it is difficult to control the amount of the binding partner that becomes bound to the particle. Therefore, while it is often desirable to know the concentration of the molecules that are immobilized on the particle, this concentration is often unknown. Accordingly, another aspect of this invention concerns a method of assaying sensitized particles to determine the concentration of a binding partner that is immobilized on an insoluble particle, comprising:

15 (a) incubating a solution of the sensitized particles having a first binding partner immobilized thereon with a known amount of a free fluorophore-labeled second binding partner attached to a fluorescent moiety, wherein the incubation is conducted under conditions that allow a complex formation between the immobilized first binding partner and the labeled second binding partner, whereby the fluorescence of the fluorophore moiety of the complex becomes quenched upon the formation of the complex;

20 (b) subjecting an amount of the incubated sample of step (a) to capillary electrophoresis; and

25 (c) determining the amount of the first binding partner that is immobilized on the particle by detecting a laser-induced fluorescence of the free fluorophore-labeled second binding partner, wherein the laser-induced fluorescence is inversely proportional to the amount of first binding partner immobilized on the particle.

The methods of this invention can also be employed for simultaneously assaying a plurality of analytes in a sample.

30 Once fluorescence quenching is achieved according to the methods of this invention, the capillary electropherogram is simplified, thus eliminating the need to detect and separate

WO 03/023353

PCT/US02/27332

the complex formed with the sensitized particles. This allows for the easy quantitation of the free (uncomplexed) fluorophore label.

Additional aspects, advantages and novel features of this invention shall be set forth in part in the description that follows, and in part, will become apparent to those skilled in the art upon examination of the following specification or may be learned by the practice of the invention. The invention is defined in its fullest scope in the appended claims and is described below in its preferred embodiments.

DESCRIPTION OF THE FIGURES

The accompanying drawings, which are incorporated herein and form a part of the specification, illustrate preferred embodiments of the present invention, and together with the description, serve to explain the principles of the invention.

In the Figures:

Figure 1 shows a series of electropherograms showing the quantitation of a first lot of avidin-coated latex particles at a fixed biotin-fluorescein concentration by CE-LIF with various dilutions of the particles.

Figure 2 shows a series of electropherograms showing the quantitation of a first lot of avidin-coated latex particles at two biotin-fluorescein concentrations by CE-LIF.

Figure 3 shows a series of electropherograms for two different lots of avidin-coated latex particles at a fixed biotin-fluorescein concentration by CE-LIF with various dilutions of the particles.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

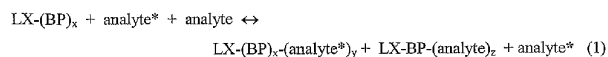
The method of this invention provides improved assays for the quantitation of an analyte of interest in a sample by providing particle-enhanced homogeneous assay formats that can be performed in conjunction with capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. The improved assays of this invention overcome the shortcomings of conventional assays described above by reducing the number of signals that must be separated and measured upon laser-induced fluorescence (LIF) of the assay reaction mixture. Consequently, the methods of this invention increase the accuracy of the detection and/or quantification of target analytes. The methods of this invention thus simplify the electropherograms obtained during CE-LIF. In accordance with the methods of this invention, it is possible to eliminate the need to separate the complexed labeled species from

WO 03/023353

PCT/US02/27332

the uncomplexed labeled species during CE by quenching the signal of the fluorophore moiety on the complexed species.

Briefly, one aspect of the present invention provides improved competitive assays for determining the concentration of an analyte of interest in a sample. One preferred embodiment of such a competitive assay can be written generally, as shown in Equation 1:



where “LX-(BP)_x” represents a sensitized particle comprising an insoluble particle LX coated with a binding partner BP that specifically binds the analyte, “x” represents the number of binding partners immobilized on the insoluble particle, “analyte*” represents an analyte labeled with a fluorescent moiety, “y” represents the number of fluorophore-labeled analyte molecules that become bound to the sensitized particles (LX-BP) during the assay, and “z” represents the number of sample analyte molecules that become bound to the sensitized particles (LX-BP) during the assay. In the assay represented by Equation (1), the concentrations of the labeled analyte and the sensitized particles are fixed.

More specifically, one embodiment of a competitive assay of this invention as represented by Equation 1 comprises combining a sample which may contain the analyte of interest with a known amount of a free fluorophore-labeled analyte (analyte*) comprising the analyte attached to a fluorescent moiety and a known amount of sensitized particles (LX-BP) comprising a plurality of analyte-specific binding partners (BP) immobilized on an insoluble particle (LX) to form a reaction mixture. The reaction mixture is incubated under conditions that allow the formation of a first complex (LX-(BP)_x-(analyte*)_y) comprising a sensitized particle bound to the fluorophore-labeled analyte, and/or a second complex (LX-BP-(analyte)_z) comprising a sensitized particle bound to the sample analyte. Methods of preparing and incubating such reaction mixtures are well known to those skilled in the art and need not be described in further detail. Once a measurable reaction has proceeded, an amount of the incubated reaction mixture is then subjected to capillary electrophoresis. As described below in detail, the fluorescence of the fluorescent moiety becomes quenched upon the formation of the first complex. The concentration of the analyte is thus determined by

WO 03/023353

PCT/US02/27332

detecting a laser-induced fluorescence of the remaining free fluorophore-labeled analyte (analyte*) present in the reaction mixture.

As used herein, the term "complex" refers to a complex that is formed upon the binding of an analyte with its specific binding partner.

5 As used herein, "binding pair member" or "binding member" refers to a member of a binding pair, *i.e.*, two different molecules wherein one of the molecules specifically binds to the second molecule through a chemical or physical means. In addition to antigen and antibody binding pair members, other binding pairs include, as examples without limitation, biotin and avidin, carbohydrates and lectins, complementary nucleotide sequences,
10 complementary peptide sequences, peptides and specific protein binders, enzyme cofactors and enzymes, and the like.

As used herein, the term "complexed fluorophore" refers to a fluorescent moiety that is attached to a compound (*e.g.*, an analyte or a binding partner) that is part of a complex, wherein either the analyte or the binding partner is immobilized on an insoluble particle.

15 As used herein, the term "free fluorophore" refers to a fluorescent moiety that is attached to a compound (*e.g.*, an analyte or a binding partner) that is not part of a complex.

As used herein, the term "sensitized particle" refers to an insoluble particle having either an analyte-specific binding partner or the analyte of interest immobilized thereon, where the binding partner or analyte is attached to the particle by covalent (chemical) bonds
20 or by non-covalent bonds (*e.g.*, physical adsorption). The insoluble particles may be any natural or synthetic material capable of having a binding partner or analyte immobilized thereon, provided that the particles can be suspended in solution as required for capillary electrophoresis. Examples of insoluble particles include, but are not limited to, polymers and copolymers of olefinically unsaturated monomers, such as polystyrene (also referred to as
25 "latex"), acrylonitrile, polybutadiene, and derivatives and copolymers thereof (*see*, for example, Bangs, L.B., *Uniform Latex Particles*, (1984) and U.S. Patent No. 4,305,925), charcoal, colloidal gold particles, glass, acrylamide, methacrylate, nylon, metals, metal oxides and their derivatives, dextran, cellulose and natural particle material, such as red blood cells, pollens, liposomes, and bacteria. In another embodiment, the insoluble particle may comprise
30 a pre-coating of a fluorescence quencher, as discussed below in detail.

The term "binding partner," as used herein, refers to a molecule or substance that specifically recognizes and binds to a particular molecule or substance, such as an analyte of

WO 03/023353

PCT/US02/27332

interest, and exhibits negligible cross-reactivity with other substances. Binding between an analyte and its specific binding partner may be via a chemical or physical means, such as by immunoreaction, complexation, and affinity binding. Typical binding partners include, but are not limited to, antigens, antigen fragments, receptors, nucleic acids, polyclonal and monoclonal antibodies and fragments, derivatives and complexes thereof, cyclodextrans, crown ethers, lectins, binding proteins, such as protein A and protein G (to bind glycoproteins), bacteria, enzymes, avidin, streptavidin, intrinsic factor (*e.g.*, to bind vitamin B₁₂), folate-binding protein, and polypeptides, such as diacetyl-L-lysine-D-alanine-D-alanine, as described in copending and commonly assigned U.S. Patent Application Serial No. 09/888,005 entitled "Homogeneous Assay of Vancomycin Using a Stable Particle-Vancomycin Conjugate, a Novel Rate Enhancer, and a Novel Dose Response Modulator", which is specifically incorporated herein by reference. Such binding partners specific for a given analyte may be obtained from commercial sources or may be prepared in accordance with standard procedures well known to those skilled in the art.

As will be discussed below in detail, in one embodiment, the fluorescence of a complexed fluorophore becomes self-quenched when a sufficient amount of the fluorophore moieties are close enough in proximity to each other such that energy transfer occurs between the fluorophore moieties. This is the situation that occurs when a sufficient amount of labeled analytes bind to sensitized particles to form the first complex (LX-(BP)_n-(analyte*)_m), as shown in Equation (1). Alternatively, fluorescence quenching can occur upon complex formation if the insoluble particle comprises a pre-coating of fluorescence quenchers. As a result of the quenching of the complexed fluorophore, the signal expected from the first complex does not appear in the electropherogram. Thus, the electropherogram obtained upon LIF detection contains substantially only the fluorescent signal produced from the free fluorophore-labeled analyte (analyte*). As a result, the electropherograms produced according to the methods of this invention are simplified and are easier to interpret compared to those obtained from conventional CE-LIF assays.

When the LIF detection is completed, the data obtained is compared with a standard curve prepared according to methods known to those skilled in the art to determine the original concentration of the analyte in the test sample. In the assay represented by Equation 1, the laser-induced fluorescence produced by the free fluorophore-labeled analyte is directly proportional to the concentration of the analyte present in the sample.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

The method of the present invention also provides a time-saving advantage over conventional methods. That is, since the fluorescent signal produced by the first complex (LX-(BP)_n-(analyte⁶)) is quenched and therefore eliminated from the electropherogram, the method of this invention avoids the time-consuming optimization of CE parameters as required in conventional assays in order to achieve the complete separation of the free fluorophore-labeled analyte signal from the broad signal from the complexed label. Consequently, the method of this invention achieves a more accurate measurement of the analyte concentration and in a much shorter period of time as compared to conventional methods in which the complete separation of multiple signals, some of which are broad and overlap other signals, is necessary.

As stated above, fluorescence quenching according to this invention occurs due to at least one of the following conditions described below, *i.e.*, by pre-coating the insoluble particle with fluorescence quenchers and/or self-quenching of the fluorophore moieties upon the complexation of a sufficient amount of fluorophore-labeled species to an insoluble particle.

1. Fluorescence Quenching Employing a Pre-Coated Particle.

In one embodiment of this invention, the insoluble particle is pre-coated with a fluorescence quencher prior to immobilizing a binding member onto the particle. In one embodiment, the fluorescence quencher is a fluorescence acceptor. A fluorescence acceptor is any compound or species which has an absorption band that overlaps with the emission band of the particular fluorescent label to be used in an assay. The acceptor can be selected from a group of compounds including, but not limited to, fluorescein derivatives and rhodamine derivatives. Other examples of fluorescent quenchers include, but are not limited to, heavy atoms, such as iodide, and metallic ions, such as Co²⁺, Ni²⁺, and Cr³⁺.

The pre-coated particle is then loaded with an appropriate amount of a binding member. The procedures of pre-coating insoluble particles with fluorescence quenchers and the subsequent loading of the binding member onto the pre-coated particles are known to those skilled in the art.

When the immobilized first binding member complexes with the fluorescent-labeled second binding member, both the fluorescent label and the fluorescence quencher are brought into close proximity, since both species are now on the same particle. When the fluorescent label is irradiated, the energy can be transferred from the electronically excited state of the

WO 03/023353

PCT/US02/27332

donor, *i.e.*, the fluorescent label, to the fluorescence quencher. When the energy transfer is successful, the fluorescence intensity is either greatly diminished or completely quenched. The transfer efficiency depends not only on (1) the distance of the donor and quencher species, but also on (2) the fluorescence quantum yields of the donor, (3) the absorptivity of the quencher, (4) the integrated spectral overlap of the donor emission and quencher absorption as described above, and (5) the refractive index of the medium. The sensitized particle thus localizes both the fluorescence donor and quencher, and consequently renders fluorescence quenching possible because of their close proximity, which is necessary in order for fluorescence quenching to occur.

10 A well-known example of the fluorescence donor-acceptor system is the fluorescein-rhodamine system, in which the fluorescein is the donor and the rhodamine is the quencher. In this system, rhodamine has an absorption band (about 550 nm) which overlaps with the emission band of fluorescein (about 520 nm) (*Methods in Enzymology*, Vol. 74, Immunochemical Techniques, Part C, Section IA. "Fluorescence Immunoassay Methods", 15 Langone and Van Vunakis, eds. 1981, Academic Press; *Fluorescence Spectroscopy. An Introduction for Biology and Medicine*. Pesce, Rosen and Pasby, eds., 1971, Marcel Dekker Inc., New York; Boguslaski, R.C. et al., *Appl. Biochem. and Biotechnology*, 7:401-414 (1982)).

Other examples of fluorescence donor and quenchers are the fluorescein-4',5'-dimethoxy-fluorescein---fluorescein pair (*Methods in Enzymology*, Vol. 74, Immunochemical Techniques, Part C, Section IA), earth metal chelate---Reactive Blue 4 pair (Youn, H. J., et. al., *Analytical Biochemistry*, 232:24-30 (1995)), the fluorescein-B---phycoerythrin pair and the B-phycoerythrin---Texas Red pair (Gosling, J.P., *Clin. Chem.* 36(8): 1408-1427 (1990)).

25 2. Fluorescence Quenching Without Pre-Coating the Insoluble Particle ("Self-Quenching").

Fluorescence quenching can also occur even without pre-coating the insoluble particle with a fluorescence quencher, provided that the loading of first binding members onto the particle is high, thus resulting in a high local concentration of the first binding member and hence a high local concentration of the labeled species onto each particle upon the 30 complexation between the immobilized first binding member and the labeled second binding member.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

When binding occurs between an immobilized first binding member and a fluorescent-labeled second binding member to form a complex, fluorescence quenching can occur upon such complex formation via dipole-dipole coupled energy transfer, provided that the particle is sufficiently loaded with first binding members. More specifically, a high loading on the particle means that the immobilized first binding members are in close proximity to each other on the particle. Consequently, when fluorescent-labeled second binding members become complexed to the immobilized first binding members, the fluorophore moieties are likewise in close proximity to each other. While not wanting to be bound by theory, it has been observed that if a sufficient amount of a fluorophore-labeled species complexes with an immobilized first binding member, the fluorescence of the fluorophore moiety becomes quenched and thus does not produce a peak in the electropherogram. That is, if a sufficient number of labeled second binding members are bound to a sensitized particle, the energy of the fluorescent moieties induced during LIF gets transferred between the immobilized labels (i.e., quenched) rather than to the detector to produce a detectable signal. Consequently, only the uncomplexed ("free") fluorophore-labeled species remaining in the reaction mixture produce a signal that is detected by LIF. As a result, the quenching efficiency is greatly enhanced.

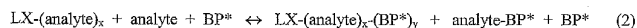
The high loading of first binding members on the particles thus allows efficient self-quenching interactions between the complexed fluorescent labels as a result of (1) their high local concentration, (2) quenching interaction between a given label and the binding member to which it is bound as well as between the neighboring binding members, and (3) quenching interactions between the label and the surface of the particle. In fact, if the particle size is in the order of the wavelength of the fluorescent dye (e.g., 500 nm), the opaque particle can block the fluorescent label from the excitation light and similarly block the emitted light from reaching the detector, resulting in no detection of the fluorescence signal.

Accordingly, whether the methods of this invention utilize particles pre-coated with fluorescence quenchers or particles having a high loading of a binding member, a key feature of this invention is that the number of fluorophore-labeled species remaining in the assay reaction mixture that are detected by LIF after CE is reduced. Further, the detection of the uncomplexed labeled second binding pair member is simplified since the need to separate the complexed labeled species from the uncomplexed labeled species is eliminated.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

An alternative embodiment of a competitive assay of this invention can be written generally, as shown in Equation 2:



5

where "LX-(analyte)_x" represents a sensitized particle having "x" number of analyte molecules immobilized thereon, "BP*" represents an analyte-specific binding partner labeled with a fluorescent moiety; "LX-(analyte)_x-(BP*)_y" represents the complex formed upon binding between the immobilized analyte with "y" number of labeled binding partners, and
 10 "analyte-BP*" represents the complexed formed upon binding between the sample analyte and the labeled binding partner. In the assay represented by Equation (2), the concentrations of the labeled binding partner and the sensitized particles are fixed.

More specifically, in a competitive assay as represented by Equation 2, a sample which may contain the analyte of interest is combined with a fixed amount of sensitized
 15 particles comprising the analyte immobilized on insoluble particles and a fixed amount of an analyte-specific fluorophore-labeled binding partner (BP*). In this embodiment, a particle-immobilized analyte (LX-(analyte)_x) is allowed to compete with the sample analyte for binding to the labeled binding partner (BP*). The reaction mixture is incubated under conditions that allow the formation of a first complex (LX-(analyte)_x-(BP*)_y) comprising the
 20 immobilized analyte bound to a number of the labeled binding partners, and/or formation of a second complex (analyte-BP*) comprising the sample analyte bound to the fluorophore-labeled binding partner. Any conditions that will allow the formation of such complexes may be used in the methods of this invention and are well known to those skilled in the art.

Once a measurable reaction has proceeded as shown in Equation (2), an amount of the
 25 incubated reaction mixture is then subjected to capillary electrophoresis. In one embodiment of the assay, represented by Equation (2), the first complex comprises a sufficient amount of the labeled binding partner (BP*) such that the fluorophore labels are in close proximity. As a result, the fluorescence of the complexed fluorophore becomes quenched. In another embodiment of the assay, represented by Equation (2), the insoluble particle is pre-coated
 30 with a fluorescence quencher which quenches the fluorescence of the complexed fluorophore labels upon complex formation. In either case, the electropherogram obtained upon LIF

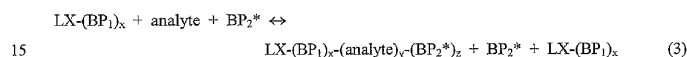
WO 03/023353

PCT/US02/27332

detection will contain substantially only the fluorescent signals produced from the remaining free fluorophore-labeled binding partner (BP*) and the second complex (analyte-BP*).

Preferably, in the assay represented by Equation 2, the concentration of the analyte in the sample is determined by detecting a laser-induced fluorescence of the second complex (analyte-BP*) present in the reaction mixture, wherein the laser-induced fluorescence is directly proportional to the concentration of the analyte in the sample. Alternatively, the analyte concentration can be determined by detecting the fluorescence of the remaining free fluorophore-labeled binding partner (BP*), wherein the laser-induced fluorescence is inversely proportional to the concentration of the analyte in the sample.

Another aspect of this invention comprises a direct assay for determining the concentration of an analyte of interest in a sample. One embodiment of such a direct assay can be written generally, as shown in Equation 3:



where "LX-(BP₁)_x" represents a sensitized particle comprising an insoluble particle LX coated with "x" number of first binding partners "BP₁" that specifically bind the analyte, "BP₂^{*}" represents a free fluorophore-labeled binding partner comprising a second analyte-specific binding partner labeled with a fluorescent moiety, "LX-(BP₁)_x-(analyte)_y-(BP₂^{*})_z" represents a sandwich complex formed upon binding between the analyte and the first and second binding partners, "y" represents the number of analytes bound to the first binding partner, and "z" represents the number of fluorophore-labeled binding partners bound to the analyte. In the assay represented by Equation (3), the concentrations of the labeled binding partner and the sensitized particles are fixed.

In one embodiment of the assay represented by Equation (3), the first complex comprises a sufficient amount of the second labeled binding partner (BP₂^{*}), such that the fluorophore labels are in close proximity. As a result, the fluorescence of the complexed fluorophore label becomes quenched. In another embodiment of the assay represented by Equation (3), the insoluble particle is pre-coated with a fluorescence quencher which quenches the fluorescence of the complexed fluorophore labels upon complex formation. In either case, in the direct assay represented by Equation (3), the electropherogram contains

WO 03/023353

PCT/US02/27332

substantially only one signal, *i.e.*, that produced by the free labeled binding partner (BP₂*), which is inversely proportional to the concentration of analyte in the sample.

To conduct the assays of the present invention, it is necessary to provide the sensitized particles. In one embodiment, the sensitized particles comprise carrier particles having bound thereto either a specific binding partner for the analyte or the analyte of interest. The binding partner or the analyte may be immobilized on the particles in accordance with standard techniques that are well known to those skilled in the art, such as physical (passive) absorption, facilitated (forced) absorption, and covalent coupling. For example, the binding partner or analyte may be covalently attached to the particle surface by modification with chemical functional groups capable of attaching the binding partner to the particle. See, for example, U.S. Patent Nos. 4,064,080, 4,181,636, 4,210,723, 4,264,766, 4,521,521 and 4,305,925, all of which are specifically incorporated herein by reference. The techniques disclosed in these patents may be used to attach binding partners or analytes to the particles. See also Seaman, G. V. F., ed., *Latex Based Technology in Diagnostics, Health & Science Communications*, Washington, D.C. 20005 (1990), which is specifically incorporated herein by reference. Sensitized particles having the desired properties and characteristics may also be obtained commercially.

In another embodiment, the particle is first pre-coated with a fluorescence quencher prior to immobilizing the binding partner on its surface. When the fluorescence quencher is a fluorescence acceptor, the absorption wavelength of the acceptor is close to the emission wavelength of the fluorescent label to be utilized in the particular assay. The fluorescence acceptor is selected from a group of compounds having absorption bands overlapping with the emission band of the fluorescence label (donor) and includes fluorescein and rhodamine derivatives. Other examples of fluorescent quenchers include, but are not limited to, heavy atoms, such as iodide, and metallic ions, such as Co²⁺, Ni²⁺, and Cr³⁺.

The pre-coated particle is then loaded with an appropriate amount of the binding partner for the analyte of interest. The procedures of pre-coating the quencher and the subsequent loading of the binding partner are known to those skilled in this art.

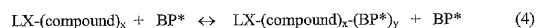
Examples of binding partners that can be immobilized on insoluble particles include avidin, streptavidin, lectins (*e.g.*, concanavalin A to capture carbohydrates or glycoproteins), polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, polypeptides (*e.g.*, diacetyl-L-lysine-D-alanine-D-alanine to capture vancomycin), protein A and protein G (to capture glycoprotein),

WO 03/023353

PCT/US02/27332

cyclodextrans (to capture small molecules into its cavity), crown ethers, intrinsic factor (to capture vitamin B₁₂), and folate-binding protein.

As discussed above, it is well known that in the preparation of such sensitized particles, it is impossible to control the amount of binding partner or analyte that becomes immobilized onto the insoluble particle. As a result, many of the particles prepared from the same lot will contain different amounts of the immobilized compound and will therefore bind to differing amounts of a specific binding partner in a particle-enhanced assay. However, it is often desirable to know the concentration of the compound that is immobilized on the insoluble particles. Accordingly, another aspect of this invention provides a method for quantitating the amount of molecules bound to insoluble particles. Such a method can be written generally, as shown in Equation 4:



where "LX-(compound)_x" represents a sensitized particle having "x" number of compound molecules immobilized thereon, "BP*" is a fluorophore-labeled binding partner for the compound, and "LX-(compound)_x-(BP*)_y" is the complex formed upon binding between the compound and the binding partner. In the method represented by Equation 4, a fixed amount of the sensitized particles are combined with a fixed amount of the fluorophore-labeled binding partner to form a reaction mixture. The reaction mixture is incubated under conditions that allow the formation of the complex.

In one embodiment of the assay represented by Equation (4), the complex comprises a sufficient amount of the labeled binding partner (BP*), such that the fluorophore labels are in close proximity. As a result, the fluorescence of the complexed fluorophore becomes quenched. In another embodiment of the assay represented by Equation (4), the insoluble particle is pre-coated with a fluorescence quencher which quenches the fluorescence of the complexed fluorophore labels upon complex formation. When the fluorescence of the labeled binding partner (BP*) that is part of the complex LX-(compound)_x-(BP*)_y becomes quenched, the only signal substantially detected in the electropherogram is that produced by the free labeled binding partner (BP*). With this method, the quantitation of immobilized compound may be determined at a fixed label concentration (BP*) or at a fixed sensitized particle (LX-(compound)_x) concentration. In either case, the fluorescence signal of the label

WO 03/023353

PCT/US02/27332

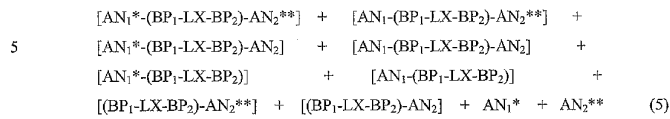
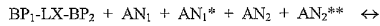
is inversely proportional to the concentration of the compound bound to the insoluble particles.

One specific example of the assay represented by Equation 4 is directed towards the quantitation of sensitized particles comprising avidin bound to latex particles of sub-micron range. Avidin-coated latex particles are a key intermediate for the preparation of bidentate conjugates for the Synchron CX[®], Synchron LX[®], and Image[®] (see U.S. Patent Nos. 5,747,352, 5,422,281, and 5,196,351, which are specifically incorporated herein by reference). Current methods used for evaluating these latex-avidin particles are labor intensive and time-consuming. Conventional methods include the preparation of a small amount of a bidentate conjugate by coupling the latex-avidin particles with a bidentate, followed by the evaluation of the conjugate for acceptable immunoreactivity on a Synchron[®] system. In contrast, the CE-LIF method of the present invention as represented by Equation 4 directly tests the latex-avidin particles, and therefore is much simpler and faster than conventional methods, thus reducing the testing time by 3 to 10 days. The method according to Equation 4 involves incubating the latex-avidin particles with a known amount of free biotin-fluorescein, performing CE on an aliquot, and detecting laser-induced fluorescence of remaining free biotin-fluorescein in the reaction mixture. The electropherogram is easy to interpret and contains mainly the free label, since fluorescence is highly quenched upon the complexation of the biotin-fluorescein with the latex-avidin. Each electropherogram can be obtained in less than 3.5 minutes.

The method of this invention is also suitable for the simultaneous and homogeneous detection of multiple target analytes in a sample utilizing a particle-enhanced assay format in conjunction with CE. In accordance with one embodiment of the present invention, such a method, which is similar to the competitive assay described in Equation 1, can be written generally, as shown in Equation 5:

WO 03/023353

PCT/US02/27332



where “BP₁-LX-BP₂” represents an insoluble particle coated with both a first binding partner
 10 “BP₁” specific for a first sample analyte and a second binding partner “BP₂” specific for a
 second sample analyte, “AN₁” is the first sample analyte, “AN₁*” is a first sample analyte
 labeled with a fluorescent moiety, “AN₂” is the second sample analyte, and “AN₂**” is a
 second sample analyte labeled with a fluorescent moiety. In the assay represented by
 Equation (4), the concentrations of the labeled sample analytes and the sensitized particles are
 15 fixed.

The multiple analyte assay is performed in a manner similar to that described above
 for competitive assays. Thus, the reaction mixture is incubated under conditions that allow
 the formation of a first complex [AN₁*-(BP₁-LX-BP₂)-AN₂**] comprising the sensitized
 particles bound to the first labeled analyte and the second labeled analyte, and/or a second
 20 complex [AN₁-(BP₁-LX-BP₂)-AN₂**] comprising the sensitized particles bound to the first
 sample analyte and the second labeled analyte, and/or a third complex [AN₁*-(BP₁-LX-BP₂)-
 AN₂] comprising the sensitized particles bound to the first labeled analyte and the second
 sample analyte, and/or a fourth complex [AN₁-(BP₁-LX-BP₂)-AN₂] comprising the sensitized
 particle bound to the first sample analyte and the second sample analyte, and/or a fifth
 25 complex [AN₁*-(BP₁-LX-BP₂)] comprising the sensitized particles bound to the first labeled
 analyte, and/or a sixth complex [AN₁-(BP₁-LX-BP₂)] comprising the sensitized particles
 bound to the first sample analyte, and/or a seventh complex [(BP₁-LX-BP₂)-AN₂**]
 comprising the sensitized particle bound to the second labeled analyte, and/or an eight
 30 complex [(BP₁-LX-BP₂)-AN₂] comprising the sensitized particles bound to the second
 sample analyte. The reaction mixture is then subjected to CE and analyzed by LIF. Even
 though the reaction mixture contains multiple products, the electropherogram still contains
 only two signals, *i.e.*, from the free first and second labeled analytes AN₁* and AN₂**, since

WO 03/023353

PCT/US02/27332

the fluorescence of all of the various complexed forms of the first and second labeled analytes (i.e., the first, second, third, fifth, and seventh complexes) is quenched upon the formation of the complexes. Such quenching will occur if the complexed fluorophores are in close proximity, or if the particle is pre-coated with fluorescence quenching molecules, as described
5 above.

If it is possible to separate the free first and second labeled analytes AN_1^* and AN_2^{**} , respectively, during CE, the first and second analytes may be labeled with the sample fluorescent moiety. However, if the signals from the free first and second labeled analytes are fairly close, it is preferred that each analyte be labeled with a different fluorescent moiety.

10 The methods of the present invention are fundamentally different from known procedures. In conventional assays employing CE-LIF as a means of analyte quantitation, signals from all of the labeled species in the assay reaction mixture must be sufficiently separated in order to accurately measure the various signals in the electropherogram. However, even conventional assays employing particle-enhanced assay formats are not able
15 to achieve sufficient separation and, thus, accurate measurement of analyte concentration. This is due to the fact that it is difficult to control the concentration of the molecules that become immobilized on the insoluble particle during the preparation of sensitized particles. Complexes formed during particle-enhanced assays using sensitized particles that are coated with varying concentrations of molecules will migrate at varying rates during CE, thus
20 producing a broad peak in the electropherogram which is difficult to resolve and which often overlaps with one or more other peaks in the electropherogram. The methods of this invention alleviate this problem by causing the broad peak produced from complexed fluorophore-labeled moieties to become quenched, thus producing a cleaner and simpler electropherogram, which consequently provides a more accurate determination of analyte
25 concentration.

The methods of this invention are suitable for determining the concentration of an analyte of interest in a variety of samples. Typical samples include, but are not limited to, clinical samples, such as whole blood, milk, serum, plasma, urine, cerebrospinal fluid, etc., water, waste, foodstuffs, proteins, and drug substances, such as purified drugs, etc.

30 Any of a wide variety of analytes may be evaluated in accordance with the methods of the present invention. As used herein, an "analyte" refers to the substance whose presence and/or concentration in a sample is to be determined. The term "analyte" refers to any

WO 03/023353

PCT/US02/27332

substance for which there exists a specific binding partner, or for which a specific binding member can be prepared, and which will bind the specific binding member in an assay. Representative analytes include, but are not limited to, antigens, haptens, antibodies, proteins (such as immunoglobulins, receptors, enzymes, etc.), peptides, amino acids, hormones, steroids, glycoproteins, carbohydrates, cancer cell markers, tissue cells, viruses, vitamins, drugs, metabolites, nucleic acids, and pesticides, substances of abuse (such as cocaine, cannabinoids, opiates, etc.), toxins, pharmacological agents, etc.). The methods of the present invention are particularly suitable for analyzing proteins, drugs and other pharmacological agents.

The term "antibody," as used herein, refers to immunoglobulins that are produced in response to the detection of a foreign substance, and includes intact molecules as well as functional fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, and Fv. Most preferably, the antibody molecules used will be purified monoclonal antibodies, preferably with affinity constants of 10⁹ or more. In lieu of such antibody molecules, polyclonal antibodies, Fab or F(ab)₂ fragments, single chain antibodies, or solubilized receptors or receptor ligands can be employed.

The fluorophore label used in conjunction with the above embodiments is a fluorescent moiety. Suitable fluorophores include, but are not limited to, fluorescein, isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, ophthaldehyde label, fluorescamine, tetramethylrhodamine, BODIPY[®] (Molecular Probes, Inc.), near infrared dyes, lanthanide chelates, or analytes bearing such fluorescent moieties. Where the labeling of an antibody is desired, fluorescein labels may preferably be used. Such a labeled antibody may be used in direct immunoassays for protein species present at concentrations of approximately 10⁻¹⁰ molar. Any suitable method known to those skilled in the art may be used to directly label the analytes of binding partners of the present invention.

Once the assay reaction has occurred, the reactants and products are subjected to CE under conditions sufficient to resolve uncomplexed ("free") labeled species but which need not be optimized to resolve the complexed fluorophore-labeled species. The CE separation technique for proteins provides a means to separate the free labeled species without the use of a solid support. The application of these separation techniques in conjunction with laser-induced fluorescence detection make possible the homogeneous immunochemical

WO 03/023353

PCT/US02/27332

measurement of species at concentrations in the range of 10^{-9} to 10^{-10} molar, as described in U.S. Patent No. 5,571,080, which is specifically incorporated herein by reference.

Normal CE can be separated generally into two categories based upon the contents of the capillary columns. In "fixed gel" CE, the capillary tube is filled with a suitable gel, *e.g.*, polyacrylamide gel, and the separation of the constituents of the sample is thus predicated by both the size and the charge of the constituents. Despite the speed of analysis, fixed gel CE has several disadvantages, notably, the unpredictability and non-durable nature of the gel material. These factors make fixed gel CE unacceptable in any setting where numerous analytical runs are conducted.

In the second form of CE (*i.e.*, "open" CE), the capillary tube is filled with an electrically conductive buffer solution (Kim, J. W. et al., *Clin. Chem.* 39:689-692 (1993)). Most preferably, the buffer is 150 mM borate, pH 10.00 +/- 0.25; concentrations between about 70 mM and about 400 mM are, however, viable. As the molarity of the buffer increases, the temperature inside the column can increase, and thus, in situations where temperature effects upon the constituents are a factor, lower concentrations of the buffer should be utilized. However, it is to be understood that the disclosed protocol can be accomplished with any separation buffer used in conjunction with the separation of proteinaceous materials using coated or untreated columns.

The capillary tube is then ionized with a negative charge. Such ionization causes the capillary wall to become negatively charged, thereby attracting positive ions from the buffer. Because the electroneutrality of the solution must be maintained, any flow of positive ions towards the capillary wall will be accompanied by a similar movement of the buffer solution and the constituents of the sample. This electroosmotic flow provides a fixed velocity component which drives both neutral species and ionic species, regardless of charge, towards the cathode. The buffer in "open CE" is stable against conduction and diffusion. Accordingly, separations can be obtained in "open CE" that are quite similar to those obtained in gel-based electrophoresis.

Open CE has many desirable qualities for, *e.g.*, clinical sample analysis, such as: (1) since the analysis does not involve a gel-filled column, the inherent limitations on the number of analytical runs that can be conducted with any particular gel-filled column are avoided; (2) when the capillary column is untreated, the aura of unpredictability which can be associated with coated columns is avoided; the sample size is small (usually on the order of 5

WO 03/023353

PCT/US02/27332

to 200 μ L of diluted sample); (3) sample analysis time is fast, *i.e.*, less than about 20 minutes; and (4) the protocol lends itself to automation, thus decreasing the labor skills necessary for efficient and effective sample analysis. The capillary column may be coated on the outside (using, *e.g.*, a polyimide material) for ease of handling.

5 While the methods of the present invention can use either untreated or coated columns, it is preferred that the columns be untreated. When untreated capillary columns are utilized, preferably the separation buffer is as disclosed in U.S. Patent No. 5,120,413, herein incorporated by reference. Suitable columns are further disclosed by Guttman, A., U.S. Patent No. 5,213,669; Burolla, V. P., U.S. Patent No. 5,198,091; Shieh, C- H., U.S. Patent
10 No. 5,098,539; each of which is incorporated herein by reference.

The presence of the label is preferably determined by automated or semi-automated means. In the preferred embodiment, the detection is mediated using a laser-induced fluorescence ("LIF") detector. An exemplary detector would contain a 1-3 milliwatt helium
15 neon laser (543.5 nm) suitable for exciting the fluorophore. A suitable 2.5 milliwatt green helium-neon laser emitting at 543.5 nm is available from Particle Measuring Systems, Boulder, CO. The laser output is preferably filtered using a laser line filter and is focused into the detection region of the separation capillary. In a preferred embodiment, the detection system will be integrated into the P/ACE[®] system (Beckman Instruments, Inc.) using a laser head coupler to a standard SMA-905 fiber connector to the P/ACE[®] system with LIF detector
20 (available from OZ Optics, Ontario, Canada). The fluorescent emission is preferably collected and collimated using a parabolic reflector which holds the capillary at its focus, and a scatter mask is preferably placed across the front of the parabola in the plane of intense laser scatter. The collimated emission is passed first through a notch filter (543.5 nm blocking), then through a 9 nm band pass filter centered at 580 nm (such filters are available from Barr
25 Associates, Westford, Mass. and from Oriel, Stratford, Conn.). Detection is preferably accomplished using an end-on type photomultiplier tube, such as R374, Hamamatsu.

Capillary electrophoresis instrumentation systems that can be used in conjunction with the present invention are well known. A particularly preferred instrument is a multi-channel
30 apparatus that allows the simultaneous evaluation of at least two different aliquots of sample; more preferably, the apparatus has the capability of analyzing several aliquots simultaneously such that multiple electropherograms can be obtained and compared. A particularly preferred

WO 03/023353

PCT/US02/27332

capillary electrophoretic system is disclosed in U.S. Patent No. 5,413,686, which is incorporated herein by reference.

5 A particularly preferred capillary electrophoretic system is the P/ACE[®] high performance capillary electrophoresis system (Beckman Instruments, Inc.) (Chen, F.-T. A., *Clin. Chem.* 38:1651-1953 (1992); Chen, F.-T. A., *J. Chromatogr.* 559:445-453 (1991); Fu, P. C. et al., *Clin. Chem.* 37:970 (1991); Chen, F.-T. A., *Clin. Chem.* 37:1061 (1991); Gordon, M. J. et al., *Anal. Chem.* 63:69-72 (1991), all incorporated herein by reference). Such instruments are most preferred in that normalization of the electropherograms can be accomplished via on-board computer software, such as System Gold[®] software (Beckman
10 Instruments, Inc., Fullerton, Calif., USA).

The evaluation of CE is typically visually oriented, *i.e.*, the electropherograms of samples are evaluated to determine the presence of peaks. The areas beneath a peak correspond to the concentration of the analyte being assayed. Typically, the electropherogram is derived by plotting detection units, such as fluorescence, on the vertical axis, and the time
15 of constituent traversal through the column to a detection region on the horizontal axis. Results can also be derived in terms of a unit value, typically derived from the areas bounded by the individual peaks.

EXAMPLES

In the examples below, commercially available biotin-fluorescein was used as the
20 detection label, and is commercially available. Latex particle was of the carboxylate-modified type and had a diameter of about 60 nm. The methods involved mixing the biotin-fluorescein label with latex-avidin, followed by monitoring the fluorescence signal of the free label on a Beckman P/ACE[®] system, which was equipped with a LIF detector with the excitation at 488 nm and the emission at 520 nm. The entire in-process testing can be
25 completed in less than two hours. Each electropherogram was obtained in less than 3.5 minutes, and consisted mainly of the free label. Because of extensive fluorescence quenching of the bound biotin-fluorescein, latex-avidin-biotin fluorescein was hardly visible, except at high concentrations. With this method, functional avidin quantitation could be determined at a fixed label concentration or a fixed latex-avidin concentration. In either case, the
30 fluorescence signal of the label was inversely proportional to the concentration of the latex-immobilized avidin below the avidin saturation point. At the avidin saturation point, the

WO 03/023353

PCT/US02/27332

functional amount of avidin in terms of biotin-binding capacity on the latex particle could be derived from a known concentration of biotin-fluorescein label.

The examples below illustrate a CE-LIF method of this invention for quantifying the functional avidin concentration from the following latex-avidin materials: (1) Lot M602100, using reactant weight ratio of 0.35 for avidin to carboxylate-modified latex particle (or an A/C ratio of 0.35), and (2) Lots 365R and KP1, employing two different batches of latex particles and the same batch of avidin, and using an A/C ratio of 0.15. As shown by the results, a higher A/C ratio led to higher avidin loading as anticipated. However, the two qualified latex particles used to prepare the second and third lots were observed to result in as much as a 60% difference in avidin loading, even when the same avidin material was used.

Reagents and Buffers:

Latex-avidin materials (A/C ratio 0.35), Lot M602100 (A/C ratio 0.35), and Lots 365R and KP1 (A/C ratio 0.15) were prepared in-house.

Biotin-fluorescein, 5-(N-(5-(N-(6-(biotinoyl)amino)hexanoyl)amino)pentyl) thioureidyl fluorescein, was purchased from Molecular Probe. Two different vials of the same lot were purchased. One vial was utilized to assess the in-house latex-avidin material. Before use, the biotin-fluorescein was standardized by CE-LIF against a known concentration of streptavidin, which, in turn, was quantitated with HABA on DU-70. Another vial was employed without standardization in the testing of the remaining latex-avidin materials.

GTS buffer: GTS was the CE running buffer, and consisted of 192 mM glycine, 25 mM TRIS, and 50 mM sodium chloride at pH 8.3.

GTB buffer: GTB buffer was used as the diluent for the latex materials, as well as the biotin-fluorescein label. It was formulated to contain 192 mM glycine, 25 mM TRIS, and 0.15% BSA at pH 8.3.

Capillary Electrophoresis Using LIF Detection:

Capillary electrophoresis experiments were conducted on a P/ACE® system equipped with LIF detection. The excitation wavelength was 490 nm, and the emission wavelength was 520 nm. Analysis was performed on an uncoated fused-silica capillary with a dimension of 50 µm i.d. and a 20 cm separation length (27 cm total length). The applied voltage was 10 kV. The sample injection time was 2 seconds. GTS was used as the separation buffer. Current observed ranged from 45 to 55 µA.

Assay Protocol:

WO 03/023353

PCT/US02/27332

Latex-avidin and biotin-fluorescein reagents were mixed according to the following protocol, allowed to incubate for at least 2 minutes, and analyzed by CE-LIF: 100 μ L GTB buffer, 100 μ L latex-avidin diluted in GTB buffer, or 100 μ L GTB buffer only as reference, and 100 μ L biotin-fluorescein at 3×10^{-7} M or 3.68×10^{-8} M in GTB buffer.

5 **Results:**

Quantitation of Latex-Avidin (Lot M602100, A/C Ratio 0.35) Using Fixed Biotin-Fluorescein at 3×10^{-7} M

10 Samples of latex-avidin at various dilutions were prepared and allowed to react with biotin-fluorescein at 3×10^{-7} M. As shown in Figure 1, a latex-avidin dilution of about 1:12.5 was required to consume all the biotin label. This amount was equivalent to $1 \times 12.5 \times 3 \times 10^{-7}$ M, or 3.75×10^{-6} M, biotin-binding capacity in the undiluted latex-avidin material.

Quantitation of Latex-Avidin (Lot M602100, A/C Ratio 0.35) at Fixed Latex-Avidin Dilution of 1:100

15 Figure 2 summarizes the results of the reaction between latex-avidin at a fixed concentration (1:100) and biotin-fluorescein at concentrations ranging from 9×10^{-9} M to 3×10^{-7} M. As the results indicated, a saturation point for avidin was reached at a biotin-fluorescein concentration of about 0.35×10^{-7} M. This translated into a functional avidin concentration equivalent to $100 \times 0.35 \times 10^{-7}$ M, or 3.5×10^{-7} M, biotin-binding sites for the undiluted latex-avidin material, in close agreement with the results determined above using a fixed amount of biotin-fluorescein.

Comparison of Two Lots of Latex-Avidin (Lot 365R and Lot KP1, A/C Ratio 0.15) Using Biotin-Fluorescein at 3.68×10^{-8} M

20 In the manufacturing of latex-avidin-bidentate reagent using a new lot of latex particle, it was found that the conjugate reagent exhibited much lower immunoreactivity on the Synchron as compared to a reference reagent prepared using a previous lot of latex. To validate the CE method disclosed in this invention, we obtained and evaluated the two latex-avidin intermediates.

25 Results are presented in Figure 3. The amount of functional avidin immobilized on the old latex lot (KP1) corresponded to 1:60 titer at the avidin saturation point, *i.e.*, $60 \times 3.68 \times 10^{-8}$ M, or 2.2×10^{-6} M, equivalent of biotin for the undiluted latex-avidin material. This amount was 1.7 times higher than the material generated from the new latex lot (Lot 365R), which exhibited a corresponding titer of only 1:35, or $35 \times 3.68 \times 10^{-8}$ M, or 1.3×10^{-6} M,

WO 03/023353

PCT/US02/27332

equivalent of biotin. The CE-LIF results were consistent with those obtained from immunoassays, which indicated a difference of 60% in immunoreactivity from the respective latex-avidin-bidentate conjugates evaluated on the Synchron CX[®] system.

5 The invention may be embodied in other specific forms without departing from its essential characteristics. The described embodiments are to be considered in all respects only as illustrative and not as restrictive. Indeed, those skilled in the art can readily envision and produce further embodiments, based on the teachings herein, without undue experimentation. The scope of the invention is, therefore, indicated by the appended claims rather than by the foregoing description. All changes that come within the meaning and range of the
10 equivalence of the claims are to be embraced within their scope.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

What is claimed is:

1. A method of assaying the concentration of an analyte in a sample, comprising:
 - (a) providing sensitized particles comprising an analyte-specific binding partner
5 immobilized thereon;
 - (b) providing a free fluorophore-labeled analyte comprising said analyte attached
to a fluorescent moiety;
 - (c) incubating said sample in the presence of a known amount of said sensitized
particles and a known amount of fluorophore-labeled analyte under conditions that allow the
10 formation of a first complex comprising said immobilized binding partner bound to said
sample analyte and/or a second complex comprising said immobilized binding partner bound
to said fluorophore labeled analyte, whereby the fluorescence of said fluorophore moiety of
said second complex is quenched upon formation of said second complex;
 - (d) subjecting an amount of said incubated sample of step (c) to capillary
15 electrophoresis; and
 - (e) determining said concentration of analyte by detecting a laser-induced
fluorescence of said free fluorophore-labeled analyte, wherein said laser-induced fluorescence
is directly proportional to the concentration of said analyte in said sample.
2. The method of claim 1, wherein said insoluble particle further comprises a coating of
20 fluorescence quenchers.
3. The method of claim 2, wherein said fluorescence quenchers are selected from the
group consisting of fluorescein derivatives, rhodamine derivatives, iodide, Co^{2+} , Ni^{2+} , and
 Cr^{3+} .
4. The method of claim 1, wherein said analyte is selected from the group consisting of
25 antigens, haptens, antibodies, proteins, glycoproteins, carbohydrates, immunoglobulins,
receptors, enzymes, peptides, amino acids, hormones, steroids, cancer cell markers, tissue
cells, viruses, vitamins, drugs, metabolites, nucleic acids, pesticides and toxins.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

5. The method of claim 1, wherein said binding partner is selected from the group consisting of antigens, antigen fragments, receptors, nucleic acids, and polyclonal and monoclonal antibodies and fragments, derivatives and complexes thereof, lectins, protein A, protein G, polypeptides, avidin, streptavidin, cyclodextrans, and crown ethers, intrinsic factor, and folate-binding protein.
6. The method of claim 1, wherein said sample is selected from the group consisting of whole blood, serum, plasma, urine, cerebrospinal fluid, milk, water, waste, foodstuffs, proteins, and drug.
7. The method of claim 1, wherein said particle is selected from the group consisting of polymers and copolymers of olefinically unsaturated monomers, glass, charcoal, colloidal gold particles, acrylamide, methacrylate, nylon, metals, metal oxides and their derivatives, dextran, cellulose, red blood cells, pollens, liposomes, and bacteria.
8. The method of claim 1, wherein said fluorescent moiety is selected from the group consisting of fluorescein, isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, ophthaldehyde label, fluorescamine, tetramethylrhodamine, BODIPY, near infrared dyes, and lanthanide chelates.
9. The method of claim 1, wherein in step (d), said capillary electrophoresis is conducted in a fused silica column.
10. A method of assaying the concentration of an analyte in a sample, comprising:
- (a) providing sensitized particles comprising said analyte immobilized thereon;
 - (b) providing a free fluorophore-labeled binding partner comprising an analyte-specific binding partner attached to a fluorescent moiety, wherein said binding partner specifically binds to said sample analyte and to said immobilized analyte;
 - (c) incubating said sample with said sensitized particles and said fluorophore-labeled binding partner under conditions that allow the formation of a first complex comprising said immobilized analyte bound to said labeled binding partner and/or a second complex comprising said sample analyte bound to said fluorophore-labeled binding partner,

WO 03/023353

PCT/US02/27332

whereby the fluorescence of said fluorophore moiety of said first complex is quenched upon formation of said first complex;

5 (d) subjecting an amount of said incubated sample of step (c) to capillary electrophoresis, wherein said capillary electrophoresis is conducted under conditions that allow separation of said second complex from said free fluorophore-labeled binding partner; and

(e) determining the concentration of said analyte in said sample by detecting a laser-induced fluorescence of said second complex or said uncomplexed fluorophore-labeled binding partner.

10 11. The method of claim 10, wherein said insoluble particle further comprises a coating of fluorescence quenchers.

12. The method of claim 11, wherein said fluorescence quenchers are selected from the group consisting of fluorescein derivatives, rhodamine derivatives, iodide, Co^{2+} , Ni^{2+} , and Cr^{3+} .

15 13. The method of claim 10, wherein said analyte is selected from the group consisting of antigens, haptens, antibodies, proteins, immunoglobulins, receptors, enzymes, peptides, amino acids, hormones, steroids, cancer cell markers, tissue cells, viruses, vitamins, drugs, metabolites, nucleic acids, pesticides, and toxins.

20 14. The method of claim 10, wherein said binding partner is selected from the group consisting of antigens, antigen fragments, receptors, nucleic acids, and polyclonal and monoclonal antibodies and fragments, derivatives and complexes thereof, lectins, protein A, protein G, polypeptides, avidin, streptavidin, cyclodextrans, and crown ethers, intrinsic factor, and folate-binding protein.

25 15. The method of claim 10, wherein said sample is selected from the group consisting of whole blood, serum, plasma, urine, cerebrospinal fluid, milk, water, waste, foodstuffs, proteins, and drugs.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

16. The method of claim 10, wherein said particle is selected from the group consisting of polymers and copolymers of olefinically unsaturated monomers, glass, charcoal, colloidal gold particles, acrylamide, methacrylate, nylon, metals, metal oxides and their derivatives, dextran, cellulose, red blood cells, pollens, liposomes, and bacteria.
- 5 17. The method of claim 10, wherein said fluorescent moiety is selected from the group consisting of fluorescein, isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, ophthaldehyde label, fluorescamine, tetramethylrhodamine, BODIPY, near infrared dyes, and lanthanide chelates.
18. The method of claim 10, wherein in step (d), said capillary electrophoresis is
10 conducted in a fused silica column.
19. The method of claim 10, wherein the fluorescence of said second complex is detected, wherein said laser-induced fluorescence is directly proportional to the concentration of said analyte in said sample.
20. The method of claim 10, wherein the fluorescence of said uncomplexed fluorophore-
15 labeled binding partner is detected, wherein said laser-induced fluorescence is inversely proportional to the concentration of said analyte in said sample.
21. A method of assaying the concentration of an analyte in a sample, comprising:
- (a) providing sensitized particles comprising a first analyte-specific binding partner immobilized thereon;
- 20 (b) providing a free fluorophore-labeled binding partner comprising a second analyte-specific binding partner labeled with a fluorescent moiety;
- (c) incubating said sample with a known amount of said sensitized particles and a known amount of said fluorophore-labeled binding partner under conditions that allow the formation of a sandwich complex comprising said analyte bound to said immobilized first
25 binding partner and to said labeled binding partner, whereby the fluorescence of said fluorophore moiety of said sandwich complex is quenched upon the formation of said sandwich complex;

WO 03/023353

PCT/US02/27332

(d) subjecting an amount of said incubated sample of step (c) to capillary electrophoresis; and

(e) determining the concentration of said analyte by detecting a laser-induced fluorescence of said free fluorophore-labeled binding partner, wherein said laser-induced
5 fluorescence is inversely proportional to the concentration of said analyte in said sample.

22. The method of claim 21, wherein said insoluble particle further comprises a coating of fluorescence quenchers.

23. The method of claim 22, wherein said fluorescence quenchers are selected from the group consisting of fluorescein derivatives, rhodamine derivatives, iodide, Co^{2+} , Ni^{2+} , and
10 Cr^{3+} .

24. The method of claim 21, wherein said analyte is selected from the group consisting of antigens, haptens, antibodies, proteins, glycoproteins, carbohydrates, immunoglobulins, receptors, enzymes, peptides, amino acids, hormones, steroids, cancer cell markers, tissue cells, viruses, vitamins, drugs, metabolites, nucleic acids, pesticides, and toxins.

15 25. The method of claim 21, wherein said first binding partner is selected from the group consisting of antigens, antigen fragments, receptors, nucleic acids, and polyclonal and monoclonal antibodies and fragments, derivatives and complexes thereof, lectins, protein A, protein G, polypeptides, avidin, streptavidin, cyclodextrans, and crown ethers, intrinsic factor, and folate-binding protein.

20 26. The method of claim 21, wherein said second binding partner is selected from the group consisting of antigens, antigen fragments, receptors, nucleic acids, and polyclonal and monoclonal antibodies and fragments, derivatives, and complexes thereof.

27. The method of claim 21, wherein said sample is selected from the group consisting of whole blood, serum, plasma, urine, cerebrospinal fluid, milk, water, waste, foodstuffs,
25 proteins, and drugs.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

28. The method of claim 21, wherein said particle is selected from the group consisting of polymers and copolymers of olefinically unsaturated monomers, glass, acrylamide, methacrylate, nylon, metals, metal oxides and their derivatives, dextran, cellulose, red blood cells, pollens, liposomes, and bacteria.
- 5 29. The method of claim 21, wherein said fluorescent moiety is selected from the group consisting of fluorescein, isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, ophthaldehyde label, fluorescamine, tetramethylrhodamine, BODIPY, near infrared dyes, and lanthanide chelates.
30. The method of claim 21, wherein in step (d), said capillary electrophoresis is
10 conducted in a fused silica column.
31. A method of quantitating the amount of a compound that is immobilized on an insoluble particle, comprising:
- (a) incubating a solution of said particles having said compound immobilized thereon with a known amount of a free fluorophore-labeled binding partner comprising a
15 compound-specific binding partner attached to a fluorescent moiety, wherein said incubation is conducted under conditions that allow formation of an immobilized compound-labeled binding partner complex, whereby the fluorescence of said fluorophore moiety of said complex is quenched upon formation of said complex;
- (b) subjecting an amount of said incubated sample of step (a) to capillary
20 electrophoresis; and
- (c) determining the amount of said compound immobilized on said particle by detecting a laser-induced fluorescence of said free fluorophore-labeled binding partner, wherein said laser-induced fluorescence is inversely proportional to the amount of compound immobilized on said particle.
- 25 32. The method of claim 31, wherein said insoluble particle further comprises a coating of fluorescence quenchers.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

33. The method of claim 32, wherein said fluorescence quenchers are selected from the group consisting of fluorescein derivatives, rhodamine derivatives, iodide, Co^{2+} , Ni^{2+} , and Cr^{3+} .
34. The method of claim 31, wherein said compound is selected from the group consisting of avidin, streptavidin, lectins, polyclonal antibody, monoclonal antibody, polypeptide, protein A, protein G, cyclodextrans, crown ethers, intrinsic factor, and folate-binding protein.
35. The method of claim 34, wherein said compound is avidin.
36. The method of claim 31, wherein said binding partner is selected from the group consisting of antigens, antigen fragments, receptors, nucleic acids, and polyclonal and monoclonal antibodies and fragments, derivatives and complexes thereof; protein A, protein G, polypeptides, avidin, streptavidin, cyclodextrans, crown ethers, intrinsic factor, and folate-binding protein.
37. The method of claim 36, wherein said binding partner is biotin.
38. The method of claim 31, wherein said particle is selected from the group consisting of polymers and copolymers of olefinically unsaturated monomers, glass, charcoal, colloidal gold particles, acrylamide, methacrylate, nylon, metals, metal oxides and their derivatives, dextran, cellulose, red blood cells, pollens, liposomes, and bacteria.
39. The method of claim 31, wherein said fluorescent moiety is selected from the group consisting of fluorescein, isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, ophthaldehyde label, fluorescamine, tetramethylrhodamine, BODIPY, near infrared dyes, and lanthanide chelates.
40. The method of claim 31, wherein in step (b), said capillary electrophoresis is conducted in a fused silica column.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

41. A method for simultaneously assaying a plurality of analytes in a sample, comprising:

(a) incubating said sample potentially containing a first analyte and a second analyte in the presence of

i) a known amount of said first analyte labeled with a fluorescent moiety,

5 ii) a known amount of said second analyte labeled with a fluorescent moiety,

10 iii) sensitized particles comprising insoluble particles having immobilized thereon a first binding partner capable of binding to said first sample analyte and to said labeled first analyte and a second binding partner capable of binding to said second sample analyte and to said labeled second analyte, wherein said incubation is conducted under conditions that allow formation of a first complex comprising said sensitized particles bound to said first labeled analyte and said second labeled analyte, and/or a second complex comprising said sensitized particles bound to said first sample analyte and said second labeled analyte, and/or a third complex comprising said sensitized particles bound to said first labeled analyte and said second sample analyte, and/or a fourth complex comprising said sensitized particle bound to said first sample analyte and said second sample analyte, and/or a fifth complex comprising said sensitized particles bound to said first labeled analyte, and/or a sixth complex comprising said sensitized particles bound to said first sample analyte, and/or a seventh complex comprising said sensitized particle bound to said second labeled analyte, and/or an eighth complex comprising said sensitized particles bound to said second sample analyte, whereby the fluorescence of said fluorophore moieties attached to said first and second labeled analytes is quenched upon the formation of said first complex, and/or said second complex, and/or said third complex, and/or said fifth complex, and/or said seventh complex;

25 (b) subjecting an amount of said incubated sample of step (a) to capillary electrophoresis, wherein said capillary electrophoresis is conducted under conditions that allow the separation of uncomplexed fluorophore-labeled first analyte from uncomplexed fluorophore-labeled second analyte; and

30 (c) assaying said concentration of said first and second analyte by detecting a first and second laser-induced fluorescence of said uncomplexed fluorophore labeled first analyte

WO 03/023353

PCT/US02/27332

and said uncomplexed fluorophore-labeled second analyte, respectively, wherein said first and second laser-induced fluorescence are directly proportional to the concentration of said first and second analyte, respectively, in said sample.

42. The method of claim 41, wherein said insoluble particles further comprise a coating of
5 fluorescence quencher.

43. The method of claim 42, wherein said fluorescence quenchers are selected from the group consisting of fluorescein derivatives, rhodamine derivatives, iodide, Co^{2+} , Ni^{2+} , and Cr^{3+} .

44. The method of claim 41, wherein at least one of the plurality of analytes is selected
10 from the group consisting of antigens, haptens, antibodies, proteins, glycoproteins, carbohydrates, immunoglobulins, receptors, enzymes, peptides, amino acids, hormones, steroids, cancer cell markers, tissue cells, viruses, vitamins, drugs, metabolites, nucleic acids, pesticides, and toxins.

45. The method of claim 41, wherein said binding partners are selected from the group
15 antigens, antigen fragments, receptors, nucleic acids, and polyclonal and monoclonal antibodies and fragments, derivatives and complexes thereof, lectins, protein A, protein G, polypeptides, avidin, streptavidin, cyclodextrans, and crown ethers, intrinsic factor, and folate-binding protein.

46. The method of claim 41, wherein said sample is selected from the group consisting of
20 whole blood, serum, plasma, urine, cerebrospinal fluid, milk, water, waste, foodstuffs, proteins, and drugs.

47. The method of claim 41, wherein said particle is selected from the group consisting of
25 polymers and copolymers of olefinically unsaturated monomers, glass, charcoal, colloidal particles, acrylamide, methacrylate, nylon, metals, metal oxides and their derivatives, dextran, cellulose, red blood cells, pollens, liposomes, and bacteria.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

48. The method of claim 41, wherein said first and second fluorescent moieties are selected from the group consisting of fluorescein, isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, ophthaldehyde label, fluorescamine, tetramethylrhodamine, BODIPY, near infrared dyes, and lanthanide chelates.
- 5 49. The method of claim 41, wherein in step (d), said capillary electrophoresis is conducted in a fused silica column.

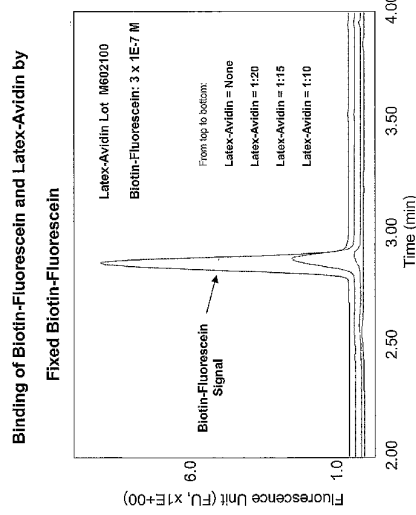


Figure 1. Quantitation of avidin on latex particle at fixed biotin-fluorescein concentration by CE-LIF: latex:avidin A/C ratio 0.35; biotin-fluorescein, 3×10^{-7} M; latex:avidin dilutions from top to 1:20.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

Binding of Biotin-Fluorescein and Latex-Avidin by CE-LIF:

Fixed Latex-Avidin Concentration

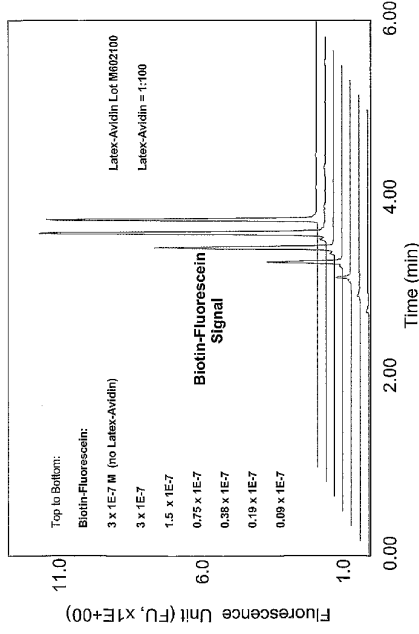


Figure 2. Quantitation of avidin on latex particle at fixed latex-avidin concentration by CE-LIF: latex-avidin A/C ratio 0.35; latex-avidin dilution 1:100; biotin-fluorescein concentrations: 3×10^{-7} M to 3×10^{-8} M.

WO 03/023353

PCT/US02/27332

Quantitation and Comparison of Latex-Immobilized Avidin By CE-LIF Using Latex-Avidin Lot 365R Vs.

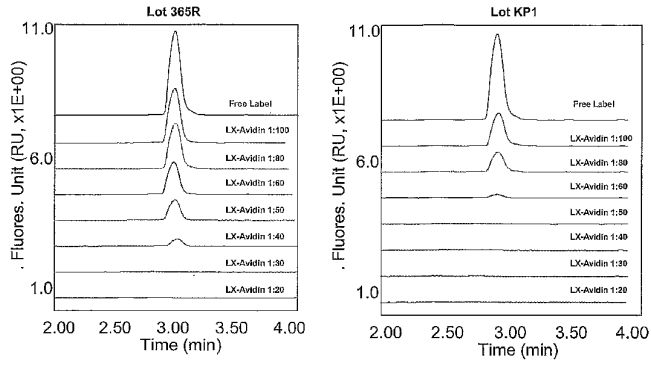


Figure 3. Quantitation and comparison of two latex-avidin lots by CE-LIF: latex-avidin A/C ratio 0.15; latex-avidin lots, 365R and KP1; latex-avidin dilutions, 1:20 to 1:100; biotin-fluorescein 3.68×10^{-6} M.

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 March 2003 (20.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/023353 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/536, 33/543, 33/546, 33/553, 33/554, 33/569 17455, Anaheim, CA 92817 (US). KIM, Julie S.; 736 San Juan Lane, Placentia, CA 92870 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US2002/027332 (74) Agents: MAY, William, H. et al.; BECKMAN COULTER, INC., 4300 N. Harbor Blvd., Box 3100, Fullerton, CA 92834-3100 (US).
- (22) International Filing Date: 27 August 2002 (27.08.2002) (81) Designated State (national): JP.
- (25) Filing Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/947,990 6 September 2001 (06.09.2001) US Published: with international search report
- (71) Applicant: BECKMAN COULTER, INC. [US/US]; Box 3100, 4300 N. Harbor Blvd., Fullerton, CA 92834-3100 (US). (88) Date of publication of the international search report: 31 December 2003
- (72) Inventors: OH, Chan S.; 15962 Equilime Dr., Chino Hills, CA 91709 (US). CHENG, Anthony; P.O. Box
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 2003/023353 A3

(54) Title: PARTICLE BASED HOMOGENEOUS ASSAYS USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH LASER-INDUCED FLUORESCENCE DETECTION

(57) Abstract: The invention provides highly sensitive and rapid homogeneous assays which employ particle-enhanced assay formats in concert with capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence (LIF) detection to determine the concentration of an analyte of interest in a sample. Such a determination is made by measuring fluorescent signal(s) (i.e., an electropherogram) produced upon LIF of species present in the reaction mixture that are capable of producing such signals. The method of this invention produces simplified electropherograms by reducing the number of signals that must be separated and subsequently measured, and therefore increases the accuracy of the detection and/or quantification of target analyte concentration in a sample.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/27332
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/536, 33/543, 33/546, 33/553, 33/554, 33/569 US CL : 435/7.1, 7.2, 7.32, 7.35, 7.5, 7.8, 7.92, 7.93, 7.94; 436/518, 519, 524, 526, 533, 541, 806, 824 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1, 7.2, 7.32, 7.35, 7.5, 7.8, 7.92, 7.93, 7.94; 436/518, 519, 524, 526, 533, 541, 806, 824 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y, P	US 6,348,318 B1 (VALKIRS) 19 February 2002, especially abstract and figure 1.	1-49
Y	US 6,136,545 A (HOSEL et al.) 24 October 2000, especially abstract and figure 1.	1-49
Y	CHOI, J. Comparison of capillary electrophoresis-based immunoassay with fluorescence polarization immunoassay for the immuno-determination of methamphetamine using various methamphetamine antibodies. Electrophoresis, 1998, Vol. 19, pages 2950-2955. See entire document.	1-49
Y	CHEN, F.A. Characterization of proteins by capillary electrophoresis in fused-silica columns: Review on serum protein analysis and application to immunoassays. Electrophoresis, 1994, Vol. 15, pages 13-21. See entire document.	1-49
Y	US 5,981,180 A (CHANDLER et al.) 09 November 1999, see entire document.	1-49
Y	US 6,268,222 B1 (CHANDLER et al.) 31 July 2001, see entire document.	1-49
Y	US 5,585,241 A (LINDMO) 17 December 1996, see entire document.	1-49
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 *B* earlier application or patent published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *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 *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 *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 *A* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 February 2003 (21.02.2003)		Date of mailing of the international search report 11 JUL 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Lisa V. Daniels-Cook Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/27332

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
STN-biosis, caplus, embase, medline, cancerlit, japio
EAST and WEST patent database

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	U
	G 0 1 N 27/26	3 1 5 K
	G 0 1 N 27/26	3 3 1 E
	G 0 1 N 27/26	3 2 5 A
(74)代理人 100125081		
弁理士 小合 宗一		
(74)代理人 100125092		
弁理士 佐藤 玲太郎		
(72)発明者 オー、 チャン エス		
アメリカ合衆国 9 1 7 0 9	カリフォルニア州	チノ ヒルズ エクイライム ドライヴ 1 5 9 6 2
(72)発明者 チェン、 アンソニー		
アメリカ合衆国 9 2 8 1 7	カリフォルニア州	アナハイム ピーオー ボックス 1 7 4 5 5
(72)発明者 キム、 ジュリー エス		
アメリカ合衆国 9 2 8 7 0	カリフォルニア州	ブラセンティア サン ジュアン レイン 7 3 6
F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 DA02 EA01 EA19 GA25 GB28 JA02 KA02 KA09		
LA02		
2G054 BB03 BB13 CB02 CE02 EA03 EA07 GA04 GB02		

专利名称(译)	激光诱导荧光检测毛细管电泳进行颗粒均相测定		
公开(公告)号	JP2005502871A	公开(公告)日	2005-01-27
申请号	JP2003527379	申请日	2002-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	贝克曼考尔特公司		
申请(专利权)人(译)	ベックマンコールターインコーポレイテッド		
[标]发明人	オーチャンエス チェンアンソニー キムジュリーエス		
发明人	オー、チャン エス チェン、アンソニー キム、ジュリー エス		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N21/64 G01N21/78 G01N27/447 G01N33/53 G01N33/542 G01N33/543		
CPC分类号	G01N27/44721 C12Q1/6818 G01N21/6402 G01N33/542 G01N33/54346		
FI分类号	G01N33/543.575 G01N33/543.525.U G01N21/64.C G01N21/64.F G01N21/78.C G01N33/53.U G01N27/26.315.K G01N27/26.331.E G01N27/26.325.A		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/EA19 2G043/GA25 2G043/GB28 2G043/JA02 2G043/KA02 2G043/KA09 2G043/LA02 2G054/BB03 2G054/BB13 2G054/CB02 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EA07 2G054/GA04 2G054/GB02		
代理人(译)	松永信行 佐藤 玲太郎		
优先权	09/947990 2001-09-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了使用颗粒致敏化验形式的灵敏且快速的均质化验，该形式与毛细管电泳和激光诱导荧光(LIF)检测一起工作，以确定样品中目标分析物的浓度。提供。通过测量与存在于能够产生这样的信号的反应混合物中的物质的LIF一起产生的荧光信号(即，电泳结果图)来进行这种测量。本发明的方法通过减少必须分离然后测量以检测和/或定量样品中目标分析物的浓度的信号的数量来产生简化的电泳图谱。提高准确性。

		特表2005- (P2005-5 (4) 公表日 平成17年1月27日(2005)
(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参)
G01N 33/543	G01N 33/543 575	2G043
G01N 21/64	G01N 33/543 525U	2G054
G01N 21/78	G01N 21/64 C	
G01N 27/447	G01N 21/64 F	
G01N 33/53	G01N 21/78 C	
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終
(21) 出願番号	特願2003-527379(P2003-527379)	(71) 出願人
(86) (2) 出願日	平成14年8月27日(2002.8.27)	ベックマン コールター インコーポレートド
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月5日(2004.3.5)	BECKMAN COULTER, INCORPORATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/027332	アメリカ合衆国 92834-31
(87) 国際公開番号	W02003/023353	カリフォルニア州 フラトン ビーボックス 3100 ハーバー フロド 4300 エヌ 4300N Harbor Boulevard Fullerton, California 92834-3100 S. A.
(87) 国際公開日	平成15年3月20日(2003.3.20)	
(31) 優先権主張番号	09/947,990	(74) 代理人
(32) 優先日	平成13年9月6日(2001.9.6)	弁理士 松永 宣行
(33) 優先権主張国	米国(US)	
(81) 指定国	EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), JP	最終頁に