

(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2013-525800

(P2013-525800A)

(43) 公表日 平成25年6月20日 (2013. 6. 20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/532 (2006. 01)	GO 1 N 33/532	A
GO 1 N 33/531 (2006. 01)	GO 1 N 33/531	A
GO 1 N 33/542 (2006. 01)	GO 1 N 33/542	B
	GO 1 N 33/542	Z

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 57 頁)

(21) 出願番号 特願2013-508223 (P2013-508223)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月27日 (2011. 4. 27)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月26日 (2012. 12. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/034190
 (87) 国際公開番号 WO2011/139792
 (87) 国際公開日 平成23年11月10日 (2011. 11. 10)
 (31) 優先権主張番号 61/328, 494
 (32) 優先日 平成22年4月27日 (2010. 4. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

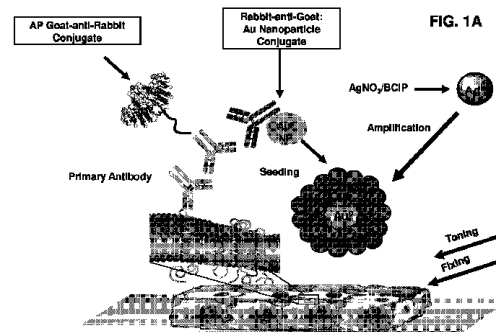
(71) 出願人 511286517
 ヴェンタナ メディカル システムズ,
 インク.
 アメリカ合衆国 アリゾナ 85755,
 ツーソン, イースト イノベーション
 パーク ドライブ 1910
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 アシュワースーシャープ, ジュリア
 アメリカ合衆国 アリゾナ 85737,
 ツーソン, ノース ボールド ヘッド
 プレイス 10321

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体-ナノ粒子コンジュゲート及びかかるコンジュゲートの製造及び使用方法

(57) 【要約】

ここに開示されるものは、金属-チオール結合を通して抗体又はその断片に直接結合されている2つ以上のナノ粒子(例えば金、パラジウム、白金、銀、銅、ニッケル、コバルト、イリジウム、又はその2つ以上の合金)を含む抗体-ナノ粒子コンジュゲートである。ここに開示されている抗体-ナノ粒子コンジュゲートの製造方法は、抗体-ナノ粒子コンジュゲートを生産するためにアリアルホスフィン-ナノ粒子複合体を還元抗体と反応させることを含む。また、ここに開示されるのは、抗体-ナノ粒子コンジュゲート(例えばここに記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート)を使用することを含む、サンプルにおいて標的分子を検出する方法、及びここに開示されている方法を使用して標的分子を検出するためのキットである。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

金属-チオール結合を通して抗体に直接結合されている 2 つ以上のナノ粒子を含んでなる抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 2】

コンジュゲートが 2 ~ 7 つのナノ粒子を含む請求項 1 に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 3】

コンジュゲートが 5 つのナノ粒子を含む請求項 2 に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 4】

金属が抗体のシステイン残基にコンジュゲートされている請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 5】

抗体が抗体又は抗体断片を含む請求項 1 ~ 5 の何れか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 6】

抗体がウサギ、ヤギ、マウス、又は抗ハプテン抗体を含む請求項 5 に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 7】

ナノ粒子が、金、パラジウム、白金、銀、銅、ニッケル、コバルト、イリジウム、又はその 2 つ以上の合金を含む請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 8】

ナノ粒子が約 5 nm 以下の直径である請求項 1 ~ 7 の何れか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 9】

ナノ粒子が約 0.5 ~ 5 nm の直径である請求項 8 に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 10】

アリアルホスフィン-ナノ粒子複合体を抗体と反応させ、それにより抗体-ナノ粒子コンジュゲートを製造することを含んでなる抗体-ナノ粒子コンジュゲートの製造方法。

【請求項 11】

還元抗体を形成することを更に含んでなる請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

還元抗体が、還元抗体を製造するために抗体を還元剤と反応させることによって形成される請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

還元剤がモノ-チオール化合物又はジ-チオール化合物である請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

還元剤がジチオスレイトールである請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

還元抗体に 2 つ以上のナノ粒子をカップリングするために、反応物ストイキオメトリ及び反応持続時間を調整することを更に含んでなる請求項 10 ~ 14 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 16】

抗体-ナノ粒子コンジュゲートが 2 ~ 7 つのナノ粒子を含む請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

抗体-ナノ粒子コンジュゲートが 5 つのナノ粒子を含む請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

アリールホスフィン-ナノ粒子複合体対還元抗体の反応物ストイキオメトリが約 7 : 1 であり、還元抗体にカップリングされるナノ粒子の数が約 5 つである請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

ナノ粒子が約 5 nm 以下の直径である請求項 10 ~ 18 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 20】

ナノ粒子が約 0.5 ~ 約 5 nm の直径である請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

アリールホスフィンが 1 ~ 3 つのスルホニル基を含む請求項 10 ~ 20 の何れか一項に記載の方法。

10

【請求項 22】

アリールホスフィンがビス-(スルホナトフェニル)フェニルホスフィンである請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

抗体がウサギ、ヤギ、マウス、又は抗ハプテン抗体を含む請求項 10 ~ 22 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 24】

抗体がウサギ抗ヤギ免疫グロブリン G 抗体である請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

ナノ粒子が、金、パラジウム、白金、銀、銅、ニッケル、コバルト、イリジウム、又はその 2 つ以上の合金を含む請求項 10 ~ 24 の何れか一項に記載の方法。

20

【請求項 26】

アリールホスフィン-ナノ粒子複合体がアリールホスフィン-金ナノ粒子複合体である請求項 10 ~ 25 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 27】

アリールホスフィン-金ナノ粒子複合体が、

金(III)を金(I)に還元する工程、

金ナノ粒子を製造するために金(I)を水素化ホウ素ナトリウムと反応させる工程、及

び

金ナノ粒子をビス-(スルホナトフェニル)フェニルホスフィンと反応させ、それによりアリールホスフィン-金ナノ粒子複合体を製造する工程を含んでなる方法によって製造される請求項 26 に記載の方法。

30

【請求項 28】

金(III)を金(I)に還元する工程が、金酸をトリフェニルホスフィンと反応させることを含む請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

抗体-ナノ粒子コンジュゲートの製造方法であって、

還元抗体を製造するために、抗体を還元剤と反応させる工程、及び

還元抗体をアリールホスフィン-ナノ粒子複合体と反応させる工程であって、少なくとも 2 つのナノ粒子が抗体に直接コンジュゲートされ、それにより抗体-ナノ粒子複合体が製造される工程

40

を含んでなる方法。

【請求項 30】

抗体-金ナノ粒子コンジュゲートの製造方法であって、

還元ウサギ抗ヤギ IgG 抗体を製造するために、ウサギ抗ヤギ免疫グロブリン G (IgG) 抗体をジチオスレイトールと反応させる工程、及び

還元ウサギ抗ヤギ IgG 抗体をビス-(スルホナトフェニル)フェニルホスフィン(BSPF)-金ナノ粒子複合体と約 1 : 7 の比で反応させる工程を含んでなり、BSPF-金ナノ粒子複合体が、

金酸をトリフェニルホスフィンと反応させ、それによって金酸-トリフェニ

50

ルホスフィン混合物を製造する工程、

金酸-トリフェニルホスフィン混合物を水素化ホウ素ナトリウムと反応させ金ナノ粒子を製造する工程、及び

金ナノ粒子をBSPPと反応させ、それによりBSPP-金ナノ粒子複合体を製造する工程によって製造され、

ここで約5つの金ナノ粒子がウサギ抗ヤギIgG抗体に直接コンジュゲートされ、それによって抗体-金ナノ粒子コンジュゲートが製造される方法。

【請求項31】

請求項10～30の何れか一項に記載の方法によって製造される抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

10

【請求項32】

サンプルにおいて標的分子を検出する方法であって、

サンプルを、標的分子に結合する第一抗体に接触させる工程、

サンプルを、一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている第二抗体と接触させる工程であって、第二抗体は第一抗体に特異的に結合する工程、

サンプルを、2つ以上のナノ粒子にコンジュゲートされている第三抗体と接触させる工程であって、第三抗体は第二抗体に特異的に結合する工程、

サンプルを、酵素の基質及び金属イオンと接触させる工程であって、金属沈殿が形成され、標的分子と共局在する工程、及び

金属沈殿を検出し、それによって標的分子を検出する工程

20

を含んでなる方法。

【請求項33】

サンプルにおいて標的分子を検出する方法であって、

サンプルを、標的分子に結合する第一抗体と接触させる工程であって、第一抗体はハプテンを含む工程、

サンプルを、一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている第二抗体と接触させる工程であって、第二抗体は第一抗体のハプテンに特異的に結合する工程、

サンプルを、2つ以上のナノ粒子にコンジュゲートされている第三抗体と接触させる工程であって、第三抗体は第二抗体に特異的に結合する工程、

サンプルを、酵素の基質及び金属イオンと接触させる工程であって、金属沈殿が形成され、標的分子と共局在する工程、及び

金属沈殿を検出し、それによって標的分子を検出する工程

30

を含んでなる方法。

【請求項34】

第二抗体がハプテンを更に含み、第三抗体が第二抗体のハプテンに特異的に結合する請求項34に記載の方法。

【請求項35】

標的分子が標的分子に特異的に結合するハプテン標識核酸プローブを含み、第一抗体がハプテン標識核酸プローブに特異的に結合する請求項32～34の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項36】

一又は複数のナノ粒子が、金、パラジウム、白金、銀、銅、ニッケル、コバルト、イリジウム、又はその2つ以上の合金を含む請求項32～35の何れか一項に記載の方法。

【請求項37】

金属イオンが銀イオン、金イオン、銅イオン、ニッケルイオン、白金イオン、パラジウムイオン、コバルトイオン、又はイリジウムイオンを含む請求項32～36の何れか一項に記載の方法。

【請求項38】

サンプルをハロゲン化金塩と接触させることを更に含んでなる請求項32～37の何れか一項に記載の方法。

50

- 【請求項 39】
ハロゲン化金塩が塩化金を含む請求項 38 に記載の方法。
- 【請求項 40】
方法がシグナルを増幅することを更に含む請求項 38 又は 39 に記載の方法。
- 【請求項 41】
シグナルを増幅することが、サンプルを銀塩と接触させることを含む請求項 40 に記載の方法。
- 【請求項 42】
銀塩が硝酸銀、酸化銀、酢酸銀、又は過塩素酸銀を含む請求項 41 に記載の方法。
- 【請求項 43】
サンプルを還元剤と接触させることを更に含んでなる請求項 32 ~ 42 の何れか一項に記載の方法。 10
- 【請求項 44】
還元剤がチオ硫酸ナトリウムを含む請求項 43 に記載の方法。
- 【請求項 45】
一又は複数のナノ粒子が約 5 nm 以下の直径である請求項 32 ~ 44 の何れか一項に記載の方法。
- 【請求項 46】
第三抗体が 2 ~ 7 つのナノ粒子にコンジュゲートされている請求項 32 ~ 45 の何れか一項に記載の方法。 20
- 【請求項 47】
第二抗体がヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G 抗体を含む請求項 32 ~ 46 の何れか一項に記載の方法。
- 【請求項 48】
酵素がアルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -ラクタマーゼ、又はエステラーゼを含む請求項 32 ~ 47 の何れか一項に記載の方法。
- 【請求項 49】
酵素がアルカリホスファターゼであり、酵素の基質が 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル ホスフェート、アスコルビン酸ホスフェート、又はヒドロキノンホスフェート誘導体を含む請求項 48 に記載の方法。 30
- 【請求項 50】
第二抗体が 3 つのアルカリホスフェート分子にコンジュゲートされている請求項 49 に記載の方法。
- 【請求項 51】
標的分子が HER2、c-Myc、n-Myc、Ab1、EGFR、IGF1R、c-Met、TOP2A、Bcl2、Bcl6、Rb1、p53、又は MET を含む請求項 32 ~ 50 の何れか一項に記載の方法。
- 【請求項 52】
サンプルにおいて標的分子を検出する方法であって、 40
 サンプルを一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている第一抗体と接触させる工程であって、第一抗体は標的分子に結合する工程、
 サンプルを 2 つ以上のナノ粒子にコンジュゲートされている第二抗体と接触させる工程であって、第二抗体は第一抗体に特異的に結合する工程、
 サンプルを、酵素の基質及び金属イオンと接触させる工程であって、金属沈殿が形成され、標的分子と共同在する工程、及び
 金属沈殿を検出し、それによって標的分子を検出する工程
 を含んでなる方法。
- 【請求項 53】
サンプルにおいて標的分子を検出する方法であって、 50

サンプルを一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている第一抗体と接触させる工程であって、第一抗体は標的分子に結合し、第一抗体はハプテンを含む工程、

サンプルを2つ以上のナノ粒子にコンジュゲートされている第二抗体と接触させる工程であって、第二抗体は第一抗体のハプテンを特異的に結合する抗ハプテン抗体である工程、

サンプルを、酵素の基質及び金属イオンと接触させる工程であって、金属沈殿が形成され、標的分子と共同在する工程、及び

金属沈殿を検出し、それによって標的分子を検出する工程を含んでなる方法。

【請求項54】

10

抗体-ナノ粒子コンジュゲートが請求項10～30の何れか一項に記載の方法によって製造される請求項32～53の何れか一項に記載の方法。

【請求項55】

抗体-ナノ粒子コンジュゲートが請求項1～9の何れか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲートである請求項32～54の何れか一項に記載の方法。

【請求項56】

サンプルにおいて標的分子を検出するためのキットであって、2つ以上のナノ粒子にコンジュゲートされている第一抗体を収容する一又は複数の容器を含んでなるキット。

【請求項57】

一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている第二抗体を更に含んでなり、第一抗体は第二抗体に特異的に結合する請求項56に記載のキット。

20

【請求項58】

該2つ以上のナノ粒子が、金、パラジウム、白金、銀、銅、ニッケル、コバルト、イリジウム、又はその2つ以上の合金を含む請求項56又は57に記載のキット。

【請求項59】

該2つ以上のナノ粒子が約5nm以下の直径である請求項56～58の何れか一項に記載のキット。

【請求項60】

該2つ以上のナノ粒子が約0.5～5nmの直径である請求項59に記載のキット。

【請求項61】

30

第二抗体が2～7つの金ナノ粒子にコンジュゲートされている請求項56～60の何れか一項に記載のキット。

【請求項62】

第二抗体がヤギ抗ウサギ抗体を含む請求項56～61の何れか一項に記載のキット。

【請求項63】

第一抗体がウサギ抗ヤギ抗体である請求項62に記載のキット。

【請求項64】

一又は複数の酵素分子がアルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -ラクタマーゼ、又はエステラーゼを含む請求項56～63の何れか一項に記載のキット。

40

【請求項65】

一又は複数の酵素分子がアルカリホスファターゼである請求項64に記載のキット。

【請求項66】

第二抗体が3つのアルカリホスフェート分子にコンジュゲートされている請求項65に記載のキット。

【請求項67】

キットが、酵素に対する基質及び金属イオンを収容する一又は複数の容器を更に含む請求項56～66の何れか一項に記載のキット。

【請求項68】

金属イオンが銀イオン、金イオン、銅イオン、ニッケルイオン、白金イオン、パラジウ

50

ムイオン、コバルトイオン、又はイリジウムイオンを含む請求項 6 7 に記載のキット。

【請求項 6 9】

酵素の基質が 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル ホスフェート、アスコルビン酸ホスフェート、又はヒドロキノンホスフェート誘導体を含む請求項 6 7 又は請求項 6 8 に記載のキット。

【請求項 7 0】

ハロゲン化金を更に含んでなる請求項 5 6 ~ 6 9 の何れか一項に記載のキット。

【請求項 7 1】

ハロゲン化金が塩化金を含む請求項 7 0 に記載のキット。

【請求項 7 2】

銀塩を更に含んでなる請求項 5 6 ~ 7 1 の何れか一項に記載のキット。

10

【請求項 7 3】

銀塩が硝酸銀、酸化銀、又は塩化銀を含む請求項 7 2 に記載のキット。

【請求項 7 4】

還元剤を更に含んでなる請求項 5 6 ~ 7 3 の何れか一項に記載のキット。

【請求項 7 5】

還元剤がチオ硫酸ナトリウムを含む請求項 7 4 に記載のキット。

【請求項 7 6】

標的分子を特異的に結合する第三抗体を更に含んでなり、第二抗体は第三抗体に特異的に結合する請求項 5 6 ~ 7 5 の何れか一項に記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2010年4月27日に出願された米国仮出願第61/328,494号の優先権を主張するものであり、出典明記によりその全体をここに援用する。

【0002】

(発明の分野)

本開示は、ナノ粒子-抗体コンジュゲート、かかるコンジュゲートの製造方法及びそれらの使用方法に関し、特に標的分子の検出における、例えば免疫組織化学又は *in situ* ハイブリダイゼーション方法における使用に関する。

30

【背景技術】

【0003】

免疫組織化学(IHC)は、組織サンプルに存在しうる興味のある抗原を検出するために、抗体などの特異的結合剤を使用する。IHCは特定の病状又は病態を診断するためなど、臨床及び診断応用において広く使用されている。例えば、特定の癌タイプは、被験体から得られるサンプルにおける特定のマーカー分子の存在に基づいて診断可能である。IHCは、異なる組織パーツにおけるバイオマーカー分布及び局在を理解するために、基礎研究においても広く使用されている。

【0004】

40

生体サンプルはまた、*in situ* ハイブリダイゼーション(IISH)技術、例えば銀 *in situ* ハイブリダイゼーション(SISH)、発色 *in situ* ハイブリダイゼーション(CISH)及び蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)(全体でISHと呼ばれる)を使用して調査可能である。ISHは、ISHが組織切片における核酸を検出し、IHCはタンパク質を検出するという点でIHCと異なる。

【0005】

現在の銀検出システムは、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)技術に基づく。SISH染色応用では、ハプテン標識核酸プローブは、組織の核酸における特定のDNA配列を標的にする。プローブ-標的複合体は、抗ハプテン一次抗体、及び発色酵素として作用するHRPにコンジュゲートされている二次抗体を使用して、組織において暗シグナルとし

50

て可視化される。可視化反応は、酢酸銀、ハイドロキノン、及び過酸化水素の連続的な添加により駆動され、HRPは過酸化水素の還元を、その後のハイドロキノンの酸化と共に触媒する。完全に理解はされていないが、この酵素酸化還元プロセスでは、幾つかの電子が、その後銀金属に還元される銀イオンに運ばれる。銀原子は、酵素の近接して沈殿し、黒点として可視化される大きな析出を形成し、標的分子の存在をシグナル伝達する。

【発明の概要】

【0006】

現在のHRP SISH検出システムは幾つかの不都合を有し、一貫性のない染色、非特異的シーディングを含み、真菌増殖につながる培地環境を提供しうる低pHバッファを必要とする。ここに開示されるのは、標的分子の検出のための、新規な非HRP銀検出システムである(限定するものではないが、IHC又はISHを含む)。方法は、抗体-ナノ粒子コンジュゲート及び抗体-酵素コンジュゲートを利用し、これは適切な基質と使用された場合に金属還元を促進する。理論に束縛されるものではないが、ナノ粒子は標的分子の近傍に金属析出のための核生成部位を提供する。この方法は、標的タンパク質又は核酸分子の検出について改善された感受性及び特異性を提供する。本開示はまた、記載の方法において利用できる新規な抗体-ナノ粒子コンジュゲート及びかかるコンジュゲートの製造方法を提供する。

10

【0007】

ここに開示される抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、金属-チオール結合を通して抗体又はその断片に直接結合されている2つ以上のナノ粒子(例えば金、パラジウム、白金、銀、銅、ニッケル、コバルト、イリジウム、又はその2つ以上の合金)を含む。特定の実施例では、金属ナノ粒子は抗体のシステイン残基にコンジュゲートされている。幾つかの実施例では、コンジュゲートは、抗体に直接結合されている2、3、4、5、6、7又はそれ以上のナノ粒子を含む。更なる実施例では、ナノ粒子は約200nm以下(例えば、約0.5~200nm、約1nm~100nm、約0.5nm~50nm)の直径を有する。特定の実施例では、ナノ粒子の直径は約5nm未満、例えば約0.5nm~5nmである。

20

【0008】

ここに開示されている抗体-ナノ粒子コンジュゲートの製造方法は、抗体-ナノ粒子コンジュゲートを生産するために水溶性アリアルホスフィンキャップナノ粒子複合体を還元抗体と反応させることを含む。幾つかの実施例では、ナノ粒子は、金、パラジウム、白金、銀、銅、ニッケル、コバルト、イリジウム、又はその2つ以上の合金(例えば、金ナノ粒子又は金-パラジウム合金ナノ粒子)である。アリアルホスフィン-ナノ粒子複合体は、スルホン酸アリアルホスフィン(例えば、モノ-、ビス-、又はトリス-スルホン酸アリアルホスフィン、例えばビス-(スルホナトフェニル)フェニルホスフィン))を含みうる。幾つかの実施例では、還元抗体は、還元抗体を生産するために、抗体又はその断片を還元剤(例えば、ジチオスレイトール)と反応させることによって形成される。特定の実施例では、反応物ストイキオメトリ及び/又は反応時間は、還元抗体に2つ以上のナノ粒子(例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上のナノ粒子)をカップリングするために変更される。例えば、還元抗体に対するアリアルホスフィン-ナノ粒子複合体の割合は、抗体に結合されるナノ粒子の数を増加させるために増加される。

30

40

【0009】

またここに開示されるものは、抗体-ナノ粒子コンジュゲート(例えばここに記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート)を使用することを含む、サンプルにおける標的分子の検出方法である。幾つかの実施態様では、方法は、サンプルを、標的分子(例えば、核酸分子に結合された標的タンパク質又はハプテン標識プローブ)に結合する第一抗体と接触させる工程；サンプルを、一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている第二抗体と接触させる工程であり、第二抗体は第一抗体に特異的に結合する工程；サンプルを、一又は複数のナノ粒子にコンジュゲートされている第三抗体と接触させる工程であり、第三抗体は第二抗体に特異的に結合する工程；サンプルを、酵素の基質及び金属イオンと接触させる工程

50

であり、金属沈殿が形成され標的分子と共同在する工程；及び金属沈殿を検出し、それによって標的分子を検出する工程を含む。更なる実施態様では、方法は、サンプルを、一又は複数の酵素分子と接触させる工程であり、第一抗体は標的分子(例えば標的タンパク質又は核酸分子に結合しているハプテン標識プローブ)に結合する工程；サンプルを、一又は複数のナノ粒子にコンジュゲートされている第二抗体と接触させる工程であり、第二抗体は第一抗体に特異的に結合する工程；サンプルを、酵素の基質及び金属イオンと接触させる工程であり、金属沈殿が形成され標的分子と共同在する工程；及び金属沈殿を検出し、それによって標的分子を検出する工程を含む。

【0010】

幾つかの実施態様では、抗体-ナノ粒子コンジュゲートは一又は複数のナノ粒子(例えば、2、3、4、5、6、7、又はそれ以上のナノ粒子)を含み、一又は複数のナノ粒子は、金、パラジウム、白金、銀、銅、ニッケル、コバルト、イリジウム、又はその2つ以上の合金を含む。幾つかの実施例では、方法は、ここに開示される特定の抗体-ナノ粒子コンジュゲートを含む。幾つかの実施例では、一又は複数の酵素分子(例えば、2、3、4、5、又はそれ以上の酵素分子)にコンジュゲートされている抗体は、一又は複数のアルカリホスファターゼ(AP)、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ラクタマーゼ、グルコシダーゼ、又はエステラーゼ分子を含む。特定の実施例では、酵素分子はアルカリホスファターゼであり、酵素基質は5-プロモ-3-クロロ-4-インドリル ホスフェート、アスコルビン酸ホスフェート、又はヒドロキノンホスフェートでありうる。幾つかの実施例では、金属イオンは、金、銀、銅、ニッケル、白金、パラジウム、コバルト、又はイリジウムを含む。

10

20

【0011】

幾つかの実施態様では、標的分子を検出する方法は金調色(toning)工程を更に含み、例えばサンプルを金ハロゲン塩(例えば、塩化金)と接触させる。更なる実施態様では、方法は増幅工程を更に含み得、例えばサンプルを銀塩(例えば、硝酸銀、酸化銀、又は塩化銀)と接触させる。また更なる実施態様では、方法は固定化工程を含み、サンプルを還元剤(例えば、チオ硫酸ナトリウム)と接触させる。

【0012】

また開示されるのは、ここに開示される方法を使用して標的分子を検出するためのキットである。例えば、キットは、一又は複数の抗体-ナノ粒子コンジュゲート(例えば抗体-金ナノ粒子コンジュゲート)、例えばここに開示される抗体-ナノ粒子コンジュゲートを含む。幾つかの実施例では、キットは、一又は複数の酵素分子(例えば、アルカリホスファターゼ、例えば1~5つのアルカリホスファターゼ分子)にカップリングされた一又は複数の抗体も含みうる。更なる実施例では、キットは、抗体にコンジュゲートされている酵素に対する基質、及び一又は複数の金属イオン(例えば、金、銀、銅、ニッケル、白金、パラジウム、コバルト、又はコバルトイオン)を含む一又は複数の容器も含みうる。キットは場合によっては、更なる工程、例えば金調色、銀増幅、又は固定化のための試薬を含んでいてもよい。

30

【0013】

前述開示及び他の特性は、添付の図の参照と共に以下の詳細な説明からより明瞭となるだろう。

40

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1A】図1Aは、抗体-ナノ粒子コンジュゲート及びここに記載の方法を利用する免疫組織化学の例示的方法を示す概要図である。

【図1B】図1Bは、抗体-ナノ粒子コンジュゲート及びここに記載の方法を利用するインサイトハイブリダイゼーションの例示的方法を示す概要図である。

【図2A】図2Aは、開始材料からの金ナノ粒子(AuNP)-抗体コンジュゲートの精製のサイズ排除クロマトグラフィー追跡である。

【図2B】図2Bは、図2Aに示す精製されたAuNP-抗体コンジュゲートのUV-Vis吸収追跡である。

50

【図3A】図3Aは、様々なモル過剰のMAL-dPEG^{T M}_{1 2}NHSエステルにより合成されたAP-抗体コンジュゲートを評価するために使用された未変性ポリアクリルアミドNovex 4-16% Bis-Trisゲルのデジタル画像である。レーン1: AP; レーン2: ヤギ抗ウサギIgG; レーン3: ヤギ抗ウサギ-APコンジュゲート(先の方法); レーン4: 分子量マーカー; レーン5: ヤギ抗ウサギ-APコンジュゲート(1:3)100X MAL, ロット1; レーン6: ヤギ抗ウサギ-APコンジュゲート(1:3)50X MAL; レーン7: ヤギ抗ウサギ-APコンジュゲート(1:2)100X MAL; レーン8: ヤギ抗ウサギ-APコンジュゲート(1:3)100X MAL, ロット2; レーン9: ヤギ抗ウサギ-APコンジュゲート(1:3)200X MAL。

【図3B】図3Bは、様々なモル過剰のMAL-dPEG^{T M}_{1 2}NHSエステルで合成されたAP-抗体コンジュゲートを評価するために使用されたポリアクリルアミドNuPAGE Novex 3-8% Tris-Acetate SDS還元ゲルのデジタル画像である。レーン1: ヤギ抗ウサギ-APコンジュゲート(1:3)400X MAL; レーン2: ヤギ抗ウサギ-APコンジュゲート(1:3)200X MAL; レーン3: ヤギ抗ウサギ-APコンジュゲート(1:3)100X MAL, lot 2; レーン4: ヤギ抗ウサギ-APコンジュゲート(1:2)100X MAL; レーン5: ヤギ抗ウサギ-APコンジュゲート(1:3)50X MAL; レーン6: ヤギ抗ウサギ-APコンジュゲート(1:3)100X MAL conc.; レーン7: ヤギ抗ウサギ-APコンジュゲート(組換え)(1:3); レーン8: ヤギ抗ウサギ-APコンジュゲート; レーン9: 分子量マーカー。

【図4】図4は、染色体17プローブを使用する乳房腫瘍細胞株異種移植片(BT-474及びMCF7細胞)のISHの一連のデジタル画像である。プローブは、標準的なHRP-SISH(上段パネル)、又は抗体-金ナノ粒子コンジュゲートを使用する開示のAP銀検出方法(下段パネル)によって検出した。

【図5】図5は、染色体17プローブ(左)及びHER2プローブ(右)を用いる乳癌組織のISHの一連のデジタル画像である。プローブは、標準的なHRP-SISH(上段パネル)、又は抗体-金ナノ粒子コンジュゲートを使用する開示のAP銀検出方法(下段パネル)によって検出した。

【図6】図6は、Calu細胞株異種移植片のISHの対のデジタル画像であり、HER2リボプローブを使用し、AP銀検出方法を用い、AuNP-Abコンジュゲート無し(左)又はAuNP-Abコンジュゲート有り(右)で行った。

【図7AB】図7A及びBは、一連の乳癌組織サンプルにおいて「カウボーイ」法を使用した、2の独立したリーダーからの染色体17のコピー数を示す対のグラフである。染色体17プローブは、HRP-SISH、又は抗体-金ナノ粒子コンジュゲートを使用する開示のAP銀検出方法を使用して検出した。

【図8AB】図8A及びBは、一連の乳癌組織サンプルにおいて「カウボーイ」法を使用した、2の独立したリーダーからのHER2のコピー数を示す対のグラフである。HER2プローブは、HRP-SISH、又は抗体-金ナノ粒子コンジュゲートを使用する開示のAP銀検出方法を使用して検出した。

【図9A-F】図9A-Fは、HER2プローブを用いる乳房組織(9A-C)又はZR-75-1乳癌細胞(9D-F)のISHの一連のデジタル画像である。HER2プローブは、100nMのAuNP-抗体コンジュゲート(9A及び9D)、100nMのAuPdNP-抗体コンジュゲート(9B及び9E)、又は50nMのAuPdNP-抗体コンジュゲート(9C及び9F)を使用する開示のAP銀検出方法によって検出した。

【図10】図10は、抗エストロゲン受容体(ER)、抗プロゲステロン受容体(PR)、又は抗Ki67(Ki67)一次抗体を用いる乳癌組織のIHCの一連のデジタル画像である。第一抗体は、抗体-金ナノ粒子コンジュゲートを使用し開示のAP銀IHC法を使用して検出し、金調色及び固定化工程は省略した。

【図11】図11は、抗HER2(HER2)、抗エストロゲン受容体(ER)、抗Ki67(Ki67)、又は抗プロゲステロン受容体(PR)一次抗体を用いる乳癌組織のIHCの一連のデジタル画像である。第一抗体は、抗体-金ナノ粒子コンジュゲートを使用する開示

10

20

30

40

50

の A P 銀 I H C 法を使用して検出し、金調色工程を含んだ。

【図 1 2】図 1 2 は、D A B 検出と開示の抗体-金ナノ粒子コンジュゲート法を使用する A P 銀とを比較する、抗 B c l - 2 を用いる扁桃組織の I H C の一連のデジタル画像である。対比染色の比較も、A P 銀方法と併せて実施した。

【 0 0 1 5 】

(詳細な説明)

I . 略称

A P : アルカリホスファターゼ

A u N P : 金ナノ粒子

A u P d N P : 金-パラジウム合金ナノ粒子

B C I P : 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル ホスフェート

B S P P : ビス-(スルホナトフェニル)フェニルホスフィン

D I G : ジゴキシゲニン

D N P : ジニトロフェニル

D T T : ジチオスレイトール

H R P : 西洋ワサビペルオキシダーゼ

I g G : 免疫グロブリン G

I H C : 免疫組織化学

I S H : i n s i t u ハイブリダイゼーション

N P : ナノ粒子

P d N P : パラジウムナノ粒子

P t N P : 白金ナノ粒子

S I S H : 銀 i n s i t u ハイブリダイゼーション

10

20

【 0 0 1 6 】

I I . 用語

別段の説明がある場合を除き、ここで使用される全ての技術的及び科学的用語は、本開示が属する分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を持つ。単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が明らかに他を示さない限り、複数形を含む。同様に、「又は」は、文脈が明らかに他を示さない限り、「及び」を含むことを意図する。「含んでなる」は「含む」を意味する。したがって、「A 又は B を含んでなる」とは、「A を含む」又は「B を含む」又は「A 及び B を含む」を意味する。

30

【 0 0 1 7 】

開示の方法の実施態様を実施及び/又は試験するための適切な方法及び材料は、以下に記載されている。このような方法及び材料は一例にすぎず、制限することを意図しない。ここに記載のものに類似又は均等な他の方法及び材料が使用されうる。例えば、本開示が関連する当分野において良く知られる一般的な方法は、様々な一般的、またより専門的な文献に記載され、例えば Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, 1992 (and Supplements to 2000); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 4th ed., Wiley & Sons, 1999; Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; and Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 を含む。

40

【 0 0 1 8 】

ここに記載されている全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の引用は、出典明記によりその全体を全ての目的に対して援用する。ここに記載されている GenBank 受入番号に関連する全配列は、出典明記により、2010年4月27日時点の全体を、適用規則及び/又は法律が許容する範囲で本明細書中に援用する。

50

【 0 0 1 9 】

開示の様々な実施態様の考察を容易にするために、特定の用語について以下の説明を提供する：

【 0 0 2 0 】

アルカリホスファターゼ (A P) : 分子からホスフェート基を除去する加水分解酵素。「アルカリホスファターゼ基質」は、アルカリホスファターゼによって除去可能なホスフェートを含む分子である。特定の実施例では、A P基質は、A Pによるホスフェート基の加水分解の後に、金属イオンを金属酸化状態 (0) に還元可能になる分子である。A P基質の例は、限定するものではないが、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート (B C I P)、アスコルビン酸ホスフェート、 α -トコフェロールホスフェート、セサモールホスフェート、及びオイゲノールホスフェートを含む。

10

【 0 0 2 1 】

抗体 : 少なくとも軽鎖又は重鎖免疫グロブリン可変領域を含み、抗原のエピトープを特異的に結合するポリペプチド。抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、又は抗体の断片並びに当分野で知られている他のものを含む。幾つかの実施例では、抗体は別の分子、例えばナノ粒子 (例えば、金ナノ粒子) 又は酵素 (例えば、アルカリホスファターゼ) に結合又はコンジュゲートされている。

【 0 0 2 2 】

抗体は重及び軽鎖から成り、その各々は、可変重 (V H) 領域及び可変軽 (V L) 領域と称される可変領域を有する。共に、V H領域及びV L領域は、抗体により認識される抗原の結合に關与する。これは、インタクトな免疫グロブリン及び当分野でよく知られているそれらの変異体及び部分含み、例えば F a b ' 断片、F (a b) ' 2 断片、単鎖 F v タンパク質 (' s c F v ')、及びジスルフィド安定化 F v タンパク質 (' d s F v ') である。s c F v タンパク質は融合タンパク質であり、免疫グロブリンの軽鎖可変領域と免疫グロブリンの重鎖可変領域とがリンカーによって結合され、一方 d s F v s では、鎖が、ジスルフィド結合を導入し鎖の会合を安定化するために変異されている。用語は、組換え形態、例えばキメラ抗体 (例えば、ヒト化マウス抗体) 及びヘテロコンジュゲート抗体 (例えば、二重特異性抗体) も含む。SePierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, Immunology, 3rd Ed., W.H.Freeman & Co., New York, 1997 も参照のこと。

20

30

【 0 0 2 3 】

「モノクローナル抗体」はBリンパ球の単一クローンによって、又は単一抗体の軽及び重鎖遺伝子がトランスフェクトされた細胞によって産生される抗体である。モノクローナル抗体は、当業者に知られている方法によって産生され、例えば、免疫脾臓細胞との骨髓腫細胞の融合からハイブリッド抗体-形成細胞を生成することによって産生される。これらの融合細胞及びそれらの子孫は「ハイブリドーマ」と呼ばれる。モノクローナル抗体はヒト化モノクローナル抗体を含む。

【 0 0 2 4 】

コンジュゲート又はバイオ-コンジュゲート : 何れかの適切な手段によって直接又は間接的に、別の分子 (例えば、ナノ粒子又は酵素) に効果的にカップリングされた分子 (例えば、抗体などの生体分子) を有する化合物。幾つかの実施例では、分子 (例えば抗体) は、ナノ粒子に直接共有結合されうる (例えば金属-チオール結合によって)。他の実施例では、分子 (例えば抗体) は酵素 (例えばアルカリホスファターゼ) に、例えば「リンカー」分子を使用することによってカップリングされ得、ただし、リンカーは酵素の活性又は生体分子の機能に著しく悪影響を与えないとする。リンカーは好ましくは生体適合である。当分野で知られている一般的な分子リンカーは、マレイミド又はサクシニミド基、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、ピオチン、又は類似な化合物を含む。

40

【 0 0 2 5 】

結合 (Conjugating, joining, bonding 又はlinking) : 第二ユニットへの第一ユニットのカップリング。これは、限定するものではないが、他の分子への一分子の共有結合 (例

50

えば、直接又はリンカー分子を介して)、他への一分子の非共有結合(例えば、静電氣的結合)(例えば、静電氣的コンジュゲーションのための方法を開示する米国特許第6,921,496号を参照のこと)、水素結合による他の分子への一分子の非共有結合、ファンデルワールス力による別の分子への一分子の非共有結合、及びこれらのカップリングの全ての組合せを含む。

【0026】

共局在：同じ又は実質的に同じ場所で生じること。幾つかの実施例では、ここに開示される方法を使用して形成される金属沈殿(例えば、酸化状態0の金属)は、それが標的分子の少なくとも約5 µm内(例えば標的分子の少なくとも約1 µm、500 nm、250 nm、100 nm、50 nm、20 nm、10 nm、5 nm、2 nm、1 nm、又は0.5 nm内)に集積する場合、標的分子と共局在する。

10

【0027】

接触：2つ以上の部分間の会合を可能にする配置であり、特に直接的な物理的会合により、例えば双方固体形態及び/又は液体形態である(例えば、抗体又はプローブと接触する生体サンプル、例えばスライドに取り付けられた生体サンプルの配置)。

【0028】

検出：物質(agent)(例えばシグナル又は特定の標的分子)が、例えばサンプル中に、存在するか又は不在かを決定すること。幾つかの実施例では、これは定量化を更に含む。「検出する」とは、何かが存在するか、又は存在しないか決定する何れかの方法を指し、例えば標的分子が生体サンプル中存在するか否かを決定する。例えば、「検出する」とは、サンプルが特定の特徴を示すか否かを決定するために視覚又は機械装置を使用することを含みうる。特定の実施例では、検出とは視覚的に標的分子に結合した抗体を観察すること、又は標的分子に結合していない抗体を観察することを指す。

20

【0029】

直接結合：介在リンカー無し、2つの分子のカップリング又はコンジュゲーション。幾つかの実施例では、直接結合は、第一の分子(例えば抗体)の原子が第二の分子(例えばナノ粒子)の原子に結合する場合に形成される。幾つかの実施例では、直接結合は共有結合であり、例えば金属-チオール結合(例えば、金-チオール結合)である。

【0030】

ハプテン：典型的には抗体と特異的に結合できる小分子であるが、典型的には担体分子との組合せにおいて以外は、実質的には免疫原とならない分子である。ハプテンの例は、限定するものではないがフルオレセイン、ビオチン、ニトロアリアル(例えば、ジニトロフェニル(DNP))、及びジゴキシゲニンを含む。更なる例であるオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリアル、ベンゾフラザン、triperpene、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン及びシクロリグナンハプテンは、米国特許公開第2008/0268462号に開示されている。

30

【0031】

ハイブリダイゼーション：2鎖のDNA、RNAの相補領域間で、又はDNA及びRNA間で塩基対を形成することであり、それにより二本鎖分子が形成される。特定の度合いのストリンジェンシーをもたらすハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーション方法の性質、ハイブリダイズする核酸配列の組成及び長さに依存して様々であろう。一般的に、ハイブリダイゼーションの温度及びハイブリダイゼーションバッファのイオン強度(例えばNa⁺濃度)は、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定するだろう。特定度合いのストリンジェンシーを得るためのハイブリダイゼーション条件に関する計算は、Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (chapters 9 and 11)において検討されている。

40

【0032】

免疫組織化学(IHC)：抗原と特異的結合物質、例えば抗体との相互作用を検出することにより、サンプル(例えば、組織の一部又は切片)中の抗原の存在又は分布を決定する方法。抗原(例えば標的抗原)を含むサンプルは、抗体-抗原結合を可能にする条件下で抗体

50

を用いてインキュベートされる。抗体-抗原結合は、抗体にコンジュゲートされた検出可能標識によって(直接検出)、又は二次抗体(一次抗体に対して産生される)にコンジュゲートされた検出可能標識によって(例えば、間接的検出)検出されうる。IHCに使用され得る例示的な検出可能標識は、限定するものではないが放射性同位体、蛍光色素(例えばフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、及びローダミン)、及び酵素(例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ)を含む。幾つかの実施例では、抗体-抗原結合は、ここに開示される酵素促進性金属組織学によって検出され得、抗体にコンジュゲートされている酵素は、後に検出されうる溶液中における金属イオンを還元するために電子を供与できる産物への基質の転換を触媒する。

【0033】

In situハイブリダイゼーション(ISH)：組織の一部又は切片において(in situ)、又は組織が十分小さい場合には(例えば、植物の種、ショウジョウバエ胚)全体組織(全載ISH)において、特定のDNA又はRNA配列を局在化するために、標識された相補DNA又はRNA鎖(プローブ)を使用するハイブリダイゼーションのタイプ。これは、組織切片においてタンパク質を局在化する免疫組織化学とは異なる。DNA ISHは染色体の構造を決定するために使用され得、例えば染色体の完全性を評価するために医療診断において使用される。RNA ISH(ハイブリダイゼーション組織化学)は、組織切片又は全載内のmRNA及び他の転写物を測定し局在化するために使用される。

【0034】

ハイブリダイゼーション組織化学では、サンプル細胞及び組織は通常、標的転写物を固定するために、また標的分子へのプローブのアクセスを増加させるために処理される。上記のように、プローブは、標識された相補DNA又は相補RNA(リボプローブ)でありうる。プローブは上昇された温度で標的配列にハイブリダイズし、次いで過剰プローブは洗浄除去される(非ハイブリダイズの過剰RNAプローブの場合は、RNaseを使用する事前加水分解の後に)。溶液パラメーター、例えば温度、塩及び/又は洗剤濃度は、ほとんどの又は全ての非同一相互作用を除去するために操作されうる(例えば、実質的に同一な又は正確に配列一致の配列のみが結合されたままになるだろう)。次いで、放射性-、蛍光-又は抗原-標識された塩基(例えば、DNP又はジゴキシゲニン)などにより、有効に標識された標識プローブは局在化され、それぞれオートラジオグラフィ、蛍光顕微鏡又は免疫組織化学を使用して、組織において潜在的に定量化される。ISHはまた、ハプテンなどの、放射活性又は他の非放射活性標識で標識された、2つ以上のプローブを使用し得、典型的には2つ以上の転写産物を同時に検出するために異なるように標識されている。

【0035】

金属イオン：金属への転換(ゼロ酸化状態)に対し還元及び電子を必要とするカチオン。特定の実施例では、金属イオンは、銀イオン、金イオン、銅イオン、ニッケルイオン、白金イオン、パラジウムイオン、コバルトイオン、又はイリジウムイオンを含む。金属イオンは、金属塩、例えば金属硝酸塩、金属ハロゲン化物、金属酢酸塩、金属酢酸塩、又は金属過塩素酸塩(例えば、硝酸銀、酢酸銀、フッ化銀、又は過塩素酸銀)の溶液の形態であり得る。他の実施例では、金属塩は、金属亜硫酸塩、金属リン酸塩、又は金属炭酸塩を含む。

【0036】

ナノ粒子：ナノメートルで測定されるサイズのナノスケール粒子であり、例えば、少なくとも一次元が約200nm未満であるナノスケール粒子である。ナノ粒子の例は、限定するものではないが例として、常磁性ナノ粒子、超常磁性ナノ粒子、金属ナノ粒子、フラレン様物質、無機ナノチューブ、 dendrimer(例えば共有結合金属キレート)、ナノファイバー、ナノホーン、ナノ-オニオン、ナノロッド、ナノローブ及び量子ドットを含む。特定の実施例では、ナノ粒子は金属ナノ粒子(例えば、金、パラジウム、白金、銀、銅、ニッケル、コバルト、イリジウム、又はその2つ以上の合金のナノ粒子)である。ナノ粒子は、コア-シェルナノ粒子のように、コア又はコア及びシェルを含みうる。

【0037】

10

20

30

40

50

核酸分子：限定するものではないが、cDNA、mRNA、ゲノムDNA、及び合成(例えば化学的に合成された)DNAを含むデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドポリマー。核酸分子は、二本鎖又は一本鎖でありうる。一本鎖の場合は、核酸分子はセンス鎖又はアンチセンス鎖でありうる。更に、核酸分子は環状又は線状でありうる。

【0038】

ポリペプチド又はタンパク質：モノマーがアミド結合によって結合されているアミノ酸残基であるポリマー。アミノ酸がアルファ-アミノ酸である場合は、L-光学異性体又はD-光学異性体のどちらかが使用されうる。「ポリペプチド」、「ペプチド」、又は「タンパク質」なる用語は、ここで使用される場合、何れかのアミノ酸配列を包含し、糖タンパク質などの修飾配列を含むことを意図する。「ポリペプチド」又は「タンパク質」なる用語は、天然に生じるタンパク質、並びに組換え又は合成産生されたものを含むことを具体的に意図する。

10

【0039】

プローブ：検出可能な標識又はレポーター分子、例えば、ハプテンに結合された単離された核酸分子。典型的な標識は、放射性同位体、酵素基質、補因子、リガンド、化学発光又は蛍光剤、ハプテン(限定するものではないが、DNPを含む)、及び酵素を含む。標識の方法及び様々な目的に対する適切な標識の選択におけるガイダンスは、例えばSambrook et al. (In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL, New York, 1989) and Ausubel et al. (In Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences, 1992)に記載されている。

20

【0040】

当業者は、特定のプローブの特異性はその長さと共に増加することを理解するだろう。従って、プローブは、所望の特異性を提供するために選択可能であり、所望のヌクレオチド配列の少なくとも17、20、23、25、30、35、40、45、50又はそれ以上の連続ヌクレオチドを含みうる。特定の実施例では、プローブは、所望のヌクレオチド配列の少なくとも100、250、500、600、1000、又はそれ以上の連続核酸でありうる。

【0041】

還元剤：他の種を還元する要素又は化合物。他の種の還元において、還元剤は酸化され、電子ドナーとなる。特定の実施例では、還元剤は、限定するものではないがジチオスレイトール(DTT)及びチオ硫酸ナトリウムを含む。

30

【0042】

サンプル：「サンプル」なる用語は、その内部又は上部に標的が存在しうる、任意の液体、半固体又は個体物質(又は材料)を指す。特に、サンプルは、生体サンプル又は生体材料から得られたサンプルであり得る。生体サンプルの例は、組織サンプル及び細胞学サンプルを含む。特定の実施例では、生体サンプルは、動物被験体、例えばヒト被験体から得られる。

【0043】

生体サンプルは、限定するものではないが、単細胞生物(例えばその中でもバクテリア、酵母、原生動物、及びアメーバ)及び多細胞生物(例えば植物又は動物であり、健康な又は一見健康なヒト被験体、又は癌などの診断又は検査されるべき状態又は疾患に影響を受けているヒト患者からのサンプルを含む)を含む何れかの生体から得られる、排泄される、又は分泌される何れかの固体又は液体サンプルを含む。例えば、生体サンプルは、例えば、血液、血漿、血清、尿、胆汁、腹水、唾液、脳脊髄液、房水又は硝子体液、又は何れかの体分泌、漏出液、滲出液(例えば、膿瘍、又は何れかの他の感染又は炎症の部位から得られる液)から得られる生体液、又は関節(例えば、正常関節又は疾患に影響された関節)から得られる液体でありうる。生体サンプルはまた、任意の臓器又は組織から得られるサンプル(バイオブシー又オートブシー標本、例えば腫瘍バイオブシー)、異種移植片であり得、又は細胞(一次細胞又は培養細胞の何れか)又は任意の細胞、組織又は臓器によって馴化された培地を含みうる。幾つかの実施例では、生体サンプルは核抽出物である。幾つ

40

50

かの実施例では、生体サンプルは細菌細胞質である。特定の実施例では、サンプルはクオリティコントロールサンプルである。他の実施例では、サンプルは試験サンプルである。例えば、試験サンプルは、被験体から得られる生体サンプルから調整された細胞、組織又は細胞ペレット切片である。一実施例では、被験体は、特定の状態又は疾患の危険性にある、又はそれを有しているものである。

【0044】

特異的な結合：定められた標的に優先的に結合するか、又は実質的にそれのみに結合する物質の結合(例えば、特定の抗原に対する抗体、又は特定の核酸配列に対する核酸プローブ)。抗原に関しては、「特異的に結合する」とは、特定のポリペプチドとの、全体又は一部における、抗体又は他のリガンドの優先的会合を指す。核酸配列に関しては、「特異的に結合する」とは、特定の核酸配列との、全体又は一部における、核酸プローブの優先的会合を指す。

10

【0045】

基質：触媒、例えば酵素(例えば、アルカリホスファターゼ)により作用される分子。一実施例では、基質はアルカリホスファターゼ基質であり、例えば、式 $\text{R-O-PO}_3\text{H}_2$ 又は $\text{R-O-PO}_3^{2-}(\text{Y}^+)_2$ を有するアリールホスフェートであり、Rはアリール基であり、 Y^+ はカチオン(例えば Na^+ 、 K^+ 、又は Li^+)である。特定の実施例では、アルカリホスファターゼ基質はBCIPである。

【0046】

標的分子：存在、位置及び/又は濃度が決定されるか、又は決定可能な何れかの分子。標的分子の例は、タンパク質、核酸及びハプテンを含み、例えばタンパク質又は核酸配列に共有結合したハプテンである。標的分子は典型的には、特異的結合分子と検出可能な標識との一又は複数のコンジュゲートを使用して検出される。

20

【0047】

III. 抗体-ナノ粒子コンジュゲート

ここに開示されるのは抗体-ナノ粒子コンジュゲート、及びかかるコンジュゲートの製造方法である。抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、標的分子(例えば、ハプテン標識プローブに結合したタンパク質又は核酸分子)を検出するための方法、例えばここに提供されている方法において使用されることができる。

【0048】

30

A. コンジュゲート

ここに記載されている抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、ナノ粒子及び抗体(例えば抗体のアミノ酸残基、例えば、システイン残基)上に存在するチオール間の金属-チオール結合を通して抗体に直接結合された2つ以上のナノ粒子(例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上のナノ粒子、例えば、2~10のナノ粒子又は2~7のナノ粒子)を含む。幾つかの実施態様では、開示の抗体-ナノ粒子コンジュゲートは組織化学法(例えばISH又はIHC)において使用され、一般的な方法に対して増加した感受性を提供する。

【0049】

幾つかの実施態様では、開示の抗体-ナノ粒子コンジュゲートにおいて使用されるナノ粒子は、金属ナノ粒子である。幾つかの実施例では、ナノ粒子は金、パラジウム、白金、銀、銅、ニッケル、コバルト、又はイリジウムである。他の実施例では、ナノ粒子はルテニウム、ロジウム、オスミウム、又は鉄である。特定の実施例では、ナノ粒子は金ナノ粒子、パラジウムナノ粒子、又は白金ナノ粒子である。他の実施例では、ナノ粒子は2つ以上の金属(例えば、金、パラジウム、白金、銀、銅、ニッケル、コバルト、又はイリジウムの内2つ以上)の合金である。特定の実施例では、ナノ粒子は金-パラジウム合金ナノ粒子である。他の実施例では、ナノ粒子は、金属コアを、異なる金属のシェルと共に有するコア-シェルナノ粒子である(例えば、金シェルを含む銀ナノ粒子)。幾つかの実施例では、ナノ粒子は、約10-200の原子、例えば、約100-200、100-150、11-100、又は11-70の原子を含む金属コアを有する。

40

50

【0050】

特定の実施例では、ナノ粒子は金ナノ粒子である。幾つかの実施例では、金ナノ粒子は、約10 - 200の金原子、例えば、約100 - 200の金原子、約100 - 150の金原子、約11 - 100の金原子、又は約11 - 70の金原子を含む金属コアを有する。特定の実施例では、金ナノ粒子は、約100 - 150の金原子を含む金属コアを有する。金属ナノ粒子及び金属ナノ粒子の製造方法は、当分野でよく知られている。例えば、Nanoparticles: From Theory to Application, Gunther Schmid, ed., Wiley-BCH, 2004を参照のこと。

【0051】

幾つかの実施例では、抗体にコンジュゲートされる2つ以上のナノ粒子は各々、約0.5 nm ~ 約200 nm (例えば、約1 nm ~ 約100 nm、約2 nm ~ 約50 nm、約2 nm ~ 約10 nm、又は約0.5 nm ~ 約50 nm)の直径を有する。特定の実施例では、ナノ粒子は約5 nm以下(例えば約5 nm、約4.5 nm、約4 nm、約3.5 nm、約3 nm、約2.5 nm、約2 nm、約1.5 nm、約1 nm、又は約0.5 nm以下)の直径を有する。他の実施例では、ナノ粒子は少なくとも約50 nm、例えば約60 nm、約70 nm、約80 nm、約90 nm、約100 nm、約110 nm、約120 nm、約130 nm、約140 nm、約150 nm、約160 nm、約170 nm、約180 nm、約190 nm、約200 nm、又はそれ以上の直径を有する。

【0052】

開示のコンジュゲートは、抗体に結合される2つ以上のナノ粒子を含む。幾つかの実施例では、抗体は、モノクローナル又はポリクローナル抗体、例えばIgA、IgD、IgE、IgG、又はIgM；限定するものではないが、タンパク質分解抗体断片(例えば、当分野で知られているF(ab)₂断片、Fab断片、Fab-SH断片、及びFab断片)、組換え抗体断片(例えばsFv断片、dsFv断片、二重特異性sFv断片、二重特異性dsFv断片、F(ab)'₂断片、単鎖Fvタンパク質(「scFv」)、及びジスルフィド安定化Fvタンパク質(「dsFv」))を含む抗体断片を含む。他の実施例では、抗体は、ダイアボディ、トリアボディ、及びラクダ抗体；遺伝子操作抗体(例えばキメラ抗体、例えば、ヒト化マウス抗体)；ヘテロコンジュゲート抗体(例えば、二重特異性抗体)；及びその組合せを含みうる。特定の実施例では、抗体は、いわゆる「第二抗体」を含み、これは、特定の種(例えばウサギ、ヤギ、マウス、ニワトリ、ヒツジ、ラット、ウシ、ウマ、ロバ、ハムスター、モルモット、又はブタ)からの免疫グロブリン(例えば、IgG、IgA、又はIgM)に対する特異性を有するポリクローナル抗体を含む。幾つかの実施例では、抗体はウサギ抗ヤギIgG、ヤギ抗ウサギIgG、全ヒトIgG、又はマウス又はラット抗体である。ここに開示される一実施例では、抗体はウサギ抗ヤギIgGである。他の実施例では、抗体は、抗ハプテン抗体(例えば抗ジニトロフェニル(DNP)抗体、抗ジゴキシゲニン(DIG)抗体、抗フルオレセイン抗体、抗ビオチン抗体、又は抗ベンゾフラザン抗体)を含む。

【0053】

ここに開示されている抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、抗体とナノ粒子を直接結合する結合(例えば、第一の分子(例えば抗体)の原子が第二の分子(例えばナノ粒子)の原子に結合する場合に形成される結合)を含む。幾つかの実施例では、直接結合は共有結合であり、例えば金属-チオール結合である。幾つかの実施例では、ナノ粒子の金属原子は、抗体に存在するチオール基に共有結合され、ナノ粒子及び抗体間に直接的金属-チオール結合を形成する。幾つかの実施例では、抗体は約1 ~ 10のチオール基(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10のチオール基)を有し、その各々はナノ粒子と金属-チオール結合を形成しうる。特定の実施例では、抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、抗体及びナノ粒子間にリンカーを含まない。

【0054】

一実施例では、抗体又は抗体断片に存在するチオール基は、抗体又は抗体断片のシステインアミノ酸残基(例えば未変性抗体に存在するシステイン残基、又は例えば部位特異的

10

20

30

40

50

変異誘発などの組換え技術を使用して抗体に導入されるシステイン残基)のチオール基である。他の実施例では、チオールは、抗体を、抗体にチオール基を導入する試薬と反応させることによって形成されうる(例えばTrautの試薬(2-イミノチオラン)又は活性化カルボン酸に結合された保護チオールを使用して)。

【0055】

免疫グロブリンは、重鎖の2つの同一なコピー及び軽鎖の2つの同一なコピーから成る四量体タンパク質である。四鎖構造は、強力な非共有結合性相互作用、及び重-軽鎖の対のアミノ末端半分間及び2つの重鎖のカルボキシル末端領域間の共有結合性ジスルフィド架橋によって維持される。抗体は、重及び軽鎖を結合し、また2つの重鎖を結合する鎖間ジスルフィド架橋を含む。抗体はまた、各軽又は重鎖ポリペプチド内に形成される鎖内ジスルフィド架橋を含む。幾つかの実施例では、ナノ粒子は、抗体の鎖内ジスルフィドの還元によって生成されるチオールで抗体にコンジュゲートされる。他の実施例では、ナノ粒子は、抗体の鎖間ジスルフィドの還元によって生成されるチオールで抗体にコンジュゲートされる。

10

【0056】

B. 抗体-ナノ粒子コンジュゲートの製造方法

またここに開示されるのは、記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲートの製造方法である。方法は、抗体に存在するチオール基(例えば、還元天然ジスルフィド結合)を介する、抗体への2つ以上のナノ粒子の直接コンジュゲーションを提供する。方法は、アリアルホスフィン-ナノ粒子複合体(例えば、アリアルホスフィンでキャップされたナノ粒子)を還元抗体と反応させることを含む。アリアルホスフィン、抗体に存在するチール(例えばシステイン残基)にナノ粒子の水溶性及び反応性を付与し、アリアルホスフィンの置換を容易にさせる。アリアルホスフィンの使用はまた、コンジュゲーションのためのナノ粒子活性化のための強力なオキシダントの使用の必要性を排除する。最後に、コンジュゲーションは天然タンパク質における既存ジスルフィド結合の還元を通して生じ得、穏やかな還元及び抗体の構造及び機能の保護を可能にする。抗体にコンジュゲートされるナノ粒子の数は、反応物ストイキオメトリ及び抗体に存在する還元チオールの数によって調整できる。幾つかの実施例では、開示される方法は、抗体あたり約2~7つのナノ粒子、例えば抗体あたり約3~7つ、又は約5つのナノ粒子を含むコンジュゲートを産生する。幾つかの実施例では、ナノ粒子-抗体コンジュゲートの調整は、抗体あたり平均約5つのナノ粒子を含む。

20

30

【0057】

開示される方法は、抗体-ナノ粒子コンジュゲートを生産するためにアリアルホスフィン-ナノ粒子複合体を還元抗体と反応させることを含む。幾つかの実施態様では、ナノ粒子は金属ナノ粒子(例えば、金、パラジウム、白金、銀、銅、ニッケル、コバルト、イリジウム、又はその2つ以上の合金)である。他の実施例では、ナノ粒子はコア-シェルナノ粒子(例えば、金シェルを含む銀ナノ粒子)である。特定の実施例では、ナノ粒子は金ナノ粒子、パラジウムナノ粒子、又は白金ナノ粒子である。他の実施例では、ナノ粒子は金-パラジウム合金ナノ粒子である。幾つかの実施例では、ナノ粒子は、約0.5nm~約200nm(例えば、約1nm~約100nm、約2nm~約50nm、約2nm~約10nm、又は約0.5nm~約5nm)の直径を有する。特定の実施例では、ナノ粒子は、約5nm以下(例えば約5nm、約4.5nm、約4nm、約3.5nm、約3nm、約2.5nm、約2nm、約1.5nm、約1nm、又は約0.5nm)の直径を有する。他の実施例では、ナノ粒子は、少なくとも約50nm、例えば約60nm、約70nm、約80nm、約90nm、約100nm、約110nm、約120nm、約130nm、約140nm、約150nm、約160nm、約170nm、約180nm、約190nm、約200nm、又はそれ以上の直径を有する。

40

【0058】

幾つかの実施態様では、アリアルホスフィン-ナノ粒子複合体は、ナノ粒子をアリアルホスフィン(例えば水溶性を与える置換アリアルホスフィン)と反応させることによって産

50

生される。幾つかの実施例では、アリアルホスフィン、少なくとも 1 mg/ml (例えば少なくとも 2 mg/ml 、 5 mg/ml 、 10 mg/ml 、 15 mg/ml 、 20 mg/ml 、又はそれ以上)の量で水に溶解する。幾つかの実施例では、アリアルホスフィンはスルホン酸ホスフィン(例えば、モノ-、ビス-、又はトリス-スルホン酸ホスフィン)である。特定の実施例では、アリアルホスフィンはビス-(スルホナトフェニル)フェニルホスフィンである。特定の実施例では、アリアルホスフィン-ナノ粒子複合体は、アリアルホスフィン-金ナノ粒子複合体、例えばビス(スルホナトフェニル)フェニルホスフィン-金ナノ粒子複合体である。

【0059】

幾つかの実施態様では、金ナノ粒子は、液体中において、クロロ金酸(HAuCl_4)の還元によって産生される。特定の実施例では、約 $1.5 - 2 \text{ nm}$ サイズの有機溶性金ナノ粒子への、金酸の二相性(トルエン及び水)水素化ホウ素ナトリウム還元が実施されうる。これは、水及びジクロロメタンの溶液中におけるスルホン酸アリアルホスフィンとのリガンド交換が続き得、抗体とのコンジュゲーションのための水溶性ナノ粒子が産生される。当業者は、類似な方法および適切な開始材料を使用して、他のアリアルホスフィン-ナノ粒子複合体(例えば、パラジウムナノ粒子、白金ナノ粒子、又は金-パラジウム合金ナノ粒子複合体)を調整してもよい。

【0060】

開示される方法はまた、抗体-ナノ粒子コンジュゲートを生産するために、還元抗体をアリアルホスフィン-ナノ粒子複合体と反応させることを含む。開示される方法において利用されうる抗体は、上で検討されたもの、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体断片、遺伝子操作された抗体(例えばキメラ抗体、例えば、ヒト化マウス抗体)、ヘテロコンジュゲート抗体(例えば二重特異性抗体)、及びその組合せを含む。幾つかの実施例では、抗体は、いわゆる「第二抗体」を含み、これは、特定の種(例えばウサギ、ヤギ、マウス、ニワトリ、ヒツジ、ラット、ウシ、ウマ、ロバ、ハムスター、モルモット、又はブタ)からの免疫グロブリン(例えば、 IgG 、 IgA 、又は IgM)に対する特異性を有するポリクローナル抗体を含む。ここに開示される一特定の実施例では、抗体はウサギ抗ヤギ IgG である。他の実施例では、抗体は、抗ハプテン抗体(例えば抗 DN P 抗体、抗 DIG 抗体、抗フルオレセイン抗体、抗ビオチン抗体、又は抗ベンゾフラザン抗体)である。抗体は、多くの供給源から商業的に入手可能であり、限定するものではないが、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)、Abcam (Cambridge, MA)、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、Life Technologies/Invitrogen (Carlsbad, CA)、R&D Systems (Minneapolis, MN)、BiosPacific (Emeryville, CA)、及びAbnova (Walnut, CA)を含む。

【0061】

抗体などのタンパク質を還元する方法は、当業者によく知られている。ここに開示される方法における使用のための還元抗体は、還元抗体を産生するために、抗体を還元剤と反応させることによって形成されうる。方法は、還元抗体を産生するのに十分な時間、抗体(例えば抗体又は抗体断片)を還元剤と混合させることを含む。還元抗体は、一又は複数(例えば1、2、3、4、5、6又はそれ以上)の有効チオール基を含む。幾つかの実施例では、有効チオール基は、天然抗体に存在するジスルフィド結合(例えば、一又は複数の鎖内ジスルフィド又は鎖間ジスルフィド)の還元の結果として産生される。特定の実施例では、有効チオール基は、天然抗体に存在する少なくとも一つの鎖内ジスルフィド架橋の還元によって産生される。

【0062】

幾つかの実施例では、還元剤はモノ-又はジチオール還元剤(例えば、2-メルカプトエタノール、2-メルカプトエチルアミン、システイン、還元グルタチオン、ジチオスレイトール、ジチオエリトリトール、グリコールジメルカプトアセテート、又はチオグリコール酸)である。別の実施例では、還元剤はトリアルキルホスフィン還元剤(例えば、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン)である。還元剤の適切な濃度及び反応のための時間は、特定の温度で、特定の濃度の還元剤を用い、任意の時間において産生されるチオールの

数を滴定することによって決定されうる。有効なチオール数は、当業者により決定可能である（例えば、Ellman's assay; Ellman, Arch.Biochem.Biophys.82:70-77, 1959により）。幾つかの実施例では、還元剤の量は約 1 mM ~ 約 1 M (例えば、約 1 mM ~ 500 mM、約 5 mM ~ 100 mM、又は約 10 mM ~ 50 mM) であり、時間は約 10 分 ~ 約 24 時間 (例えば、約 10 分 ~ 2 時間又は約 20 分 ~ 60 分) である。特定の、非限定実施例では、抗体を、還元抗体を産生するために、約 25 分間 4 で、約 0.5 M のジチオスレイトール (DTT) と反応させる。

【0063】

幾つかの実施例では、アリアルホスフィン-ナノ粒子複合体及び還元抗体は、少なくとも約 2 時間 (例えば、2、3、4、5、6、8、10、12、16、18、24、36、48、60、72 時間又はそれ以上) インキュベートされる。更なる実施例では、アリアルホスフィン-ナノ粒子複合体と還元抗体との反応は、約 2 ~ 約 28 (例えば、約 4 ~ 約 25、約 10 ~ 約 22) の温度で実施される。幾つかの実施例では、反応は約 4 で実施される。他の実施例では、反応は室温 (例えば、約 22 ~ 約 26) で実施される。特定の実施例では、反応は約 4 で 48 時間、又は室温で約 24 時間実施される。当業者は、反応時間及び温度が変動しうることを理解するだろう。例えば、抗体へのより少ないナノ粒子コンジュゲーションが、より短い時間 (例えば 24 時間未満) 又はより低い温度 (例えば 4) の反応において生じ得、抗体へのより多いナノ粒子コンジュゲーションが、より長い時間 (例えば 24 時間より大)、又はより高い温度 (例えば室温) の反応において生じうる。

【0064】

幾つかの実施態様では、抗体-ナノ粒子コンジュゲートにおいて抗体にカップリングされるナノ粒子の数は、反応物ストイキオメトリ及び / 又は反応時間を調整することによって制御される。幾つかの実施例では、還元抗体との反応に含まれるアリアルホスフィン-ナノ粒子複合体の量を増加させることによって、抗体にカップリングされる 2 つ以上のナノ粒子 (例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上) を含む複合体が産生されうる。このような実施態様は、抗体に対し非整数比のナノ粒子を有するものを含む。幾つかの実施例では、抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、抗体あたり 2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、又はそれ以上のナノ粒子を含む。他の実施例では、抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、抗体あたり平均約 2 ~ 7 つ (例えば、約 3 ~ 6 つ、又は約 5 つ) のナノ粒子を含む。幾つかの実施例では、アリアルホスフィン-ナノ粒子複合体対還元抗体の反応物ストイキオメトリは、約 2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、又はそれ以上である。一非限定実施例では、反応物ストイキオメトリは、約 1.5 mg の抗体に対して約 5 mg のアリアルホスフィン-ナノ粒子複合体であり、得られる抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、抗体あたり約 3.5 ナノ粒子を含む。別の非限定実施例では、反応物ストイキオメトリは、約 1.5 mg の抗体に対して約 10 mg のアリアルホスフィン-ナノ粒子複合体であり、得られる抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、抗体あたり約 5 ナノ粒子を含む。

【0065】

更なる実施態様では、抗体-ナノ粒子コンジュゲートにおいて抗体にカップリングされるナノ粒子の数は、反応において還元抗体に存在する還元チオールの数を調整することによって制御される。タンパク質の還元を制御する方法は、当業者に知られている。幾つかの実施例では、還元剤のタイプ又は量及び / 又は還元反応の時間が、タンパク質の還元の程度を制御するために調製される。例えば、還元剤の量及び / 又は反応の時間を増加させることによって、タンパク質においてより多くのジスルフィドが還元され、より多くの還元チオールが産生され、単一抗体分子に対するより多くのナノ粒子のコンジュゲーションを可能にする。逆に、還元剤の量及び / 又は反応の時間を低減させることによって、タンパク質においてより少ないジスルフィドが還元され、より少ない還元チオールが産生され、単一抗体分子に対する少ないナノ粒子のコンジュゲーションを可能にする。

【0066】

IV . 抗体-ナノ粒子コンジュゲートの使用方法

ここに開示されるものは、ここに記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲートを含む抗体-ナノ粒子コンジュゲートを利用する、サンプルにおける標的分子の検出方法である。方法は、標的分子の検出方法を含み、例えば組織化学的方法、例えば、免疫組織化学(IHC)及びインサイツハイブリダイゼーション(ISH)法である。抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、一般的な方法に対して、IHC及びISH法の感受性及び/又は特異性を増加させる。

【0067】

ここに記載の方法は、酵素促進金属組織学に関し、核生成中心として抗体-ナノ粒子コンジュゲートを使用する。このプロセスでは、酵素は、後に電子を供与し溶液中の金属イオンを還元する産物への基質の化学転換を触媒する。理論に束縛されるものではないが、ここに開示される方法では、得られる金属原子はナノ粒子表面で核生成し、例えば光学顕微鏡によって可視化できる程度まで、粒子のサイズを増加させると信じられている。抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、金属原子析出の特定点を提供し、低バックグラウンド染色で増加シグナルをもたらす。

【0068】

幾つかの実施態様では、ここに開示される方法は、サンプルを、標的分子に結合する第一抗体と接触させる工程；サンプルを、一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている第二抗体と接触させる工程であり、第二抗体は第一抗体に特異的に結合する工程；サンプルを、一又は複数のナノ粒子にコンジュゲートされている第三抗体(例えば、ここに開示されている抗体-ナノ粒子コンジュゲート)と接触させる工程であり、第三抗体は第二抗体に特異的に結合する工程；サンプルを、酵素の基質及び金属イオンと接触させる工程であり、金属沈殿が形成され標的分子と共同在する工程；及び金属沈殿を検出する工程を含む。図1は、抗体-ナノ粒子コンジュゲートを利用するIHC(図1A)及びISH(図1B)を実施するための、ここに記載の例示的、非限定的方法の概要図を示す。

【0069】

他の実施態様では、開示される方法において使用される一又は複数の抗体はハプテン(例えばDNP、DIG、フルオレセイン、ビオチン、又はベンゾフラザン)を含み得、抗体に特異的に結合する抗体は抗ハプテン抗体である。一実施例では、方法は、サンプルを、標的分子に結合する第一抗体と接触させる工程であり、第一抗体はハプテンを含む工程；サンプルを、一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている第二抗体と接触させる工程であり、第二抗体は第一抗体のハプテンを特異的に結合する工程；サンプルを、一又は複数のナノ粒子にコンジュゲートされている第三抗体と接触させる工程であり、第三抗体は第二抗体に特異的に結合する工程；サンプルを、酵素の基質及び金属イオンと接触させる工程であり、金属沈殿が形成され標的分子と共同在する工程；及び金属沈殿を検出する工程を含む。他の実施例では、一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされる抗体(例えば、第二抗体)はハプテンを含み、一又は複数のナノ粒子にコンジュゲートされる抗体は、第二抗体のハプテンを特異的に結合する抗ハプテン抗体である。幾つかの実施態様では、一次及び/又は第二抗体はハプテンを含み、二次及び/又は第三抗体は抗ハプテン抗体である。幾つかの実施例では、開示の方法において使用される一以上の抗体がハプテンである場合は、ハプテンは異なるハプテンである。

【0070】

他の実施態様では、ここに開示される方法は、サンプルを、一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている第一抗体と接触させる工程であり、第一抗体は標的分子に結合する工程；サンプルを、一又は複数のナノ粒子にコンジュゲートされている第二抗体(例えばここに開示される抗体-ナノ粒子コンジュゲート)と接触させる工程であって、第二抗体は第一抗体を特異的に結合する工程；サンプルを、酵素の基質及び金属イオンと接触させる工程であり、金属沈殿が形成され標的分子と共同在する工程；及び金属沈殿を検出する工程を含む。更なる実施態様では、方法は、サンプルを、一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている第一抗体と接触させる工程であり、第一抗体は標的分子に結合し、第一抗体はハプテン(例えばDNP、DIG、フルオレセイン、ビオチン、又はベンゾフラ

10

20

30

40

50

ザン)を含む工程；サンプルを、一又は複数のナノ粒子にコンジュゲートされている第二抗体に接触させる工程であり、第二抗体は第一抗体のハプテンを特異的に結合する抗ハプテン抗体である工程；サンプルを、酵素の基質及び金属イオンと接触させる工程であり、金属沈殿が形成され標的分子と共同在する工程；及び金属沈殿を検出する工程を含む。

【0071】

幾つかの実施例では、ここに記載の方法を使用して形成される金属沈殿(例えば、酸化状態0の金属)は、標的分子と共同在する。例えば、金属沈殿は、標的分子の少なくとも約5µm内(例えば標的分子の少なくとも約1µm、500nm、250nm、100nm、50nm、20nm、10nm、5nm、2nm、1nm、又は0.5nm内)に集積する。

10

【0072】

幾つかの実施例では、開示の方法は、タンパク質である標的分子を検出する方法であり(例えば、IHC法)、標的分子に結合する抗体は、標的タンパク質における一又は複数のエピトープを特異的に結合する抗体(時に、「一次」抗体と呼ばれる)である。他の実施例では、開示の方法は、核酸分子である標的分子を検出する方法であり(例えば、ISH法)、標的分子に結合する抗体は、ハプテン標識核酸プローブを特異的に結合する抗ハプテン抗体であり、これは標的核酸分子を特異的に結合する。標的分子は、下のセクションVIにおいて検討されている。

【0073】

更なる実施態様では、ここに開示される方法は、更なる標的分子を検出するために、非金属組織検出法(例えば比色又は蛍光検出法)と組み合わせて使用されうる。幾つかの実施例では、サンプルにおける複数の標的の検出を可能にするマルチプレックスアッセイを提供するために、別々に検出されうる複数の検出可能標識が、異なる標的を特異的に結合する異なる特異的結合分子(例えば抗体)にコンジュゲートされうる。例えば、ここに開示される方法は、サンプルにおいて標的分子(例えば標的タンパク質又は核酸分子)を検出するために使用されうる。サンプルはまた、比色法に課されて得、例えば適切な基質と使用された場合に色素原を産生する酵素(例えば3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)を有するHRP又はBCIP/ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)を有するAP)とコンジュゲートされた抗体を使用して、二次又はその後の標的分子を検出する。サンプルはまた、蛍光検出方法に課され得、例えば蛍光分子(例えばフルオレセイン、発光団、クマリン、BODIPY色素、レゾルフィン、ローダミン、又は量子ドット)にコンジュゲートされた抗体を使用して、二次又はその後の標的分子を検出する。あるいは、サンプルは、一又は複数の標的分子を検出するために比色及び/又は蛍光検出法で処理し、その後更に更なる標的分子を検出するためにここに開示される方法を行ってもよい。

20

30

【0074】

マルチプレックスの適切な順(例えば、ほとんどの場合、ISHの前にIHC)は、常法を使用して当業者によって決定できる。

【0075】

ここに記載される方法は、金属沈殿(例えば、酸化状態ゼロの金属)、例えば開示の方法に含まれる抗体-ナノ粒子コンジュゲートにおけるナノ粒子の表面で核生成される金属沈殿を検出することを含む。金属沈殿は、明視野顕微鏡などによって視覚的に検出されうる。幾つかの実施例では、抗体-ナノ粒子コンジュゲートの使用は、検出されるべき低コピー数の核酸分子(例えば、細胞あたり約1-3のコピーで存在する核酸分子)又は低含量のタンパク質の検出及び定量化を、一般的なシグナル増幅工程(例えば、典型的に必要なとされるチラミドシグナル増幅)無しで可能にする。

40

【0076】

当業者は、一又は複数の標的分子の検出のためのここに開示される方法の実施態様が、自動化されてもよいことを理解するだろう。Ventana Medical Systems, Inc. is the assignee of a number of United States patents disclosing systems and methods for performing automated analyses, including U.S. Patent Nos. 5,650,327; 5,654,200; 6,

50

296,809; 6,352,861; 6,827,901; and 6,943,029, and U.S. published application Nos . 2003/0211630 and 2004/0052685

【 0 0 7 7 】

A . 抗体-酵素コンジュゲート

開示の方法は、一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている抗体を含む。幾つかの実施例では、一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている抗体は、次に標的分子に結合する抗体に特異的に結合する抗体である(時に、「二次抗体」と呼ばれる)。他の実施例では、一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている抗体は、標的分子、又は標的核酸分子に結合されたハプテン標識核酸プローブに結合する抗体である(時に、「一次抗体」と呼ばれる)。また更なる実施例では、一又は複数の酵素分子は抗ハプテン抗体(例えば抗DNP抗体、抗DIG抗体、抗フルオレセイン抗体、抗ビオチン抗体、又は抗ベンゾフラザン抗体)にコンジュゲートされている。

10

【 0 0 7 8 】

開示の方法において、抗体にコンジュゲートされる酵素は、金属イオンをゼロ酸化状態の金属に還元可能な少なくとも一つの産物を産生するために、酸化還元の不活性な酵素基質を転換可能な酵素である。幾つかの実施例では、酵素は、アルカリホスファターゼ(AP)、酸性ホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ラクタマーゼ(例えばセファロスポリナーゼ又はペニシリナーゼ)、グルコシダーゼ(例えば α -又は β -グルコシダーゼ)、又はエステラーゼでありうる。酵素-抗体コンジュゲートは一又は複数の酵素分子(例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上の酵素分子)を含む。幾つかの実施例では、酵素-抗体コンジュゲートは約2 - 10の酵素分子、例えば約2 - 8の酵素分子、例えば3 - 5の酵素分子を含む。特定の非限定的例では、酵素-抗体コンジュゲートは2又は3つの酵素分子を含む。抗体-酵素コンジュゲート及びかかるコンジュゲートの製造方法は当分野でよく知られている。幾つかの実施例では、酵素は、還元抗体(例えば、少なくとも一つのフリーチオール、例えば少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上のフリーチオールを有する抗体)とのマレイミド-酵素分子の反応により、リンカー分子(例えばマレイミドリンカー)で抗体にコンジュゲートされる。

20

【 0 0 7 9 】

ここに記載される特定の実施態様では、酵素はAPである。幾つかの実施例では、APは未変性AP(例えば、子ウシ腸APなどの腸AP又は腎臓AP)である。未変性APは、当分野でよく知られている方法を使用して精製されてもよく、また限定するものではないが、BioZyme (BBI Enzymes, Madison, WI)、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、Worthington Biochemical (Lakewood, NJ)、及びUS Biological (Swampscott, MA)を含む多くの供給源からも商業的に入手可能である。他の実施例では、APは組換えAPであり、例えば微生物(例えば、Escherichia coli 又はPischia pastoris)において発現され精製される組換えAPである。組換えAPを発現させ精製する方法は当分野でよく知られている。組換えAPはまた、例えばRoche Applied Science (Indianapolis, IN)、Worthington Biochemical (Lakewood, NJ)、及びSigma-Aldrich (St. Louis, MO)から商業的に入手可能である。特定の実施例では、APは、マレイミド-APを産生するためにMAL-dPEG^T_{M 1 2}NHS (Quanta Biodesign; Powell, OH)で修飾され、抗体(例えばヤギ抗マウスIgG又はヤギ抗ウサギIgG)は、チオレート抗体を産生するためにDTTで還元される。マレイミド-AP及びチオレート抗体を反応させてAP-抗体コンジュゲートを産生し、これが精製されて、開示の方法においてされうる。

30

40

【 0 0 8 0 】

開示の方法は、サンプルを、酵素基質及び金属イオンと接触させ、金属沈殿を形成させることを含む。特定の実施例では、サンプルを、酵素基質及び金属イオンと同時に接触させる。特定の実施例では、サンプルを、酵素基質及び金属イオンと逐次に接触させる。上で検討したように、抗体-酵素コンジュゲートにおいて使用される酵素は、金属イオンをゼロ酸化状態の金属に還元可能な少なくとも一つの酸化還元活性な種を産生するために、酸化還元の不活性な酵素基質を転換可能な酵素である。酵素基質は従って、抗体-酵素コ

50

ンジュゲートに含まれている特定の酵素によって転換できる基質である。幾つかの実施例では、酵素はAPであり、酵素基質はアルカリホスファターゼによって除去できるホスフェートを含む分子であり、金属イオンをゼロ酸化状態の金属に還元できる酸化還元活性な種が生成される。AP基質の例は、限定するものではないが、インドリルホスフェート(例えば、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート(BCIP))、アスコルビン酸ホスフェート、 α -トコフェロールホスフェート、セサモールホスフェート、オイゲノールホスフェート、及びヒドロキノン誘導体(例えば、ヒドロキノンホスフェート、ナフトヒドロキノン、及びアントラヒドロキノン)を含む。更なるAP基質は、当分野で知られている(例えば、米国特許第7,632,652号及び第7,642,064号参照のこと; 出典明記によりここに援用する)。幾つかの実施例では、サンプルを約0.1

10

【0081】

他の酵素についても同様に、基質は、酵素によって金属イオンをゼロ酸化状態の金属に還元可能な少なくとも一つの酸化還元活性な種に転換できる、酸化還元不活性な酵素基質である。例えば、酵素が β -ガラクトシダーゼである場合、基質はモノ-又はジ-ガラクトシド化合物(例えば、ジガラクトシルヒドロキノン)でありうる。酵素が β -ラクタマーゼである場合、基質は β -ラクタム(例えばC3 β -ラクタム、例えば、セファロsporin)でありうる。酵素がグルコシダーゼである場合、基質はモノ-又はジ-グルコシドであり得、酵素がエステラーゼである場合、基質はモノ-又はジ-エステルでありうる。ここに記載される方法に適切な酵素基質の特定の例は、当分野で知られている(例えば米国特許第7,632,652号及び同第7,642,064号を参照)。当業者は、特定の酵素のための基質を決定し、酸化還元活性な種を産生する特定の基質を選択できる。

20

【0082】

上記のように、開示の方法は酵素-抗体コンジュゲートを含み、酵素は基質を、金属イオンをゼロ酸化状態の金属に還元可能な酸化還元活性な種に転換する。理論に束縛されるものではないが、還元金属は、抗体-ナノ粒子コンジュゲートの形態においてサンプルに存在するナノ粒子の表面で核生成する沈殿を形成すると信じられている。金属原子の沈殿又は析出はナノ粒子のサイズを増加し、これは次いで、例えば光学顕微鏡を使用して検出される。ここに記載される方法に適した金属イオンは、銀イオン、金イオン、銅イオン、ニッケルイオン、白金イオン、パラジウムイオン、コバルトイオン、又はイリジウムイオンを含む。ここに記載される方法では、サンプルを金属イオンと接触させ、これは溶液中でありうる。特定の実施例では、金属塩は溶液に溶存する。金属塩は、金属ハロゲン化物(例えば金属塩化物又は金属フッ化物)、金属硝酸塩、金属酢酸塩、又は金属過塩素酸塩を含みうる。他の実施例では、金属塩は、金属亜硫酸塩、金属リン酸塩、金属炭酸塩を含みうる。特定の実施例では、金属塩は硝酸銀である。

30

【0083】

特定の実施例では、ここに開示される方法は、金ナノ粒子を含む抗体-ナノ粒子コンジュゲートを使用し、また、銀原子に還元され金ナノ粒子で析出される銀イオンを使用する。幾つかの実施例では、銀イオンは銀化合物(例えば、酢酸銀、硝酸銀、フッ化銀、又は過塩素酸銀)からである。幾つかの実施例では、サンプルを、約2分~90分(例えば約2分~60分、約4分~60分、又は約10分~約30分)間、約10mM~約1M(例えば約20mM~500mM、又は約50mM~1000mM)の一又は複数の銀化合物を含む溶液と接触させる。特定の実施例では、サンプルを、約20分間、約50mMの硝酸銀と接触させる。

40

【0084】

B. 抗体-ナノ粒子コンジュゲート

ここに記載される方法は、一又は複数のナノ粒子(例えば1、2、3、4、5、6、7

50

、8、9、10又はそれ以上のナノ粒子)にコンジュゲートされている抗体を使用する。幾つかの実施例では、抗体-ナノ粒子コンジュゲートはここに記載されるものであり、抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、金属-チオール結合を通して抗体に直接結合されている2つ以上のナノ粒子を含む。特定の実施例では、抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、抗体あたり2~5つの金粒子、例えば5つの金ナノ粒子を含むコンジュゲートである。他の実施例では、抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、当業者に知られている何れかの抗体-ナノ粒子コンジュゲートである。例えば、米国特許第5,360,895号;米国特許公開第2006/0246524号を参照のこと。

【0085】

上で検討したように、幾つかの実施例では、ナノ粒子は金属ナノ粒子(例えば、金、パラジウム、白金、銀、銅、ニッケル、コバルト、イリジウム、又はその2つ以上の合金)である。幾つかの実施例では、抗体にコンジュゲートされているナノ粒子は、約0.5nm~約200nm(例えば、約1nm~約100nm、約2nm~約50nm、約2nm~約10nm、又は約1nm~約5nm)の直径を有する。特定の実施例では、ナノ粒子は、約5nm以下(例えば約5nm、約4.5nm、約4nm、約3.5nm、約3nm、約2.5nm、約2nm、約1.5nm、約1nm、又は約0.5nm)の直径を有する。ここに記載される方法の幾つかの実施例では、サンプルを、約4分~60分(例えば約8分~40分、又は約16分~32分)間、約10nM~2μMの抗体-ナノ粒子コンジュゲート(例えば約20nM~1.5μM、約50nM~1μM、又は約100nM~500nM)と接触させる。特定の実施例では、サンプルを、約32分間、100nMの抗体-金ナノ粒子コンジュゲートと接触させる。

【0086】

C. 調色、増幅、及び固定

ここに開示されている方法は、場合によっては、サンプルをハロゲン化金(例えば塩化金)と接触させることを含む「調色」工程を含む。金調色は歴史的に、銀層を保護するための、塩化金によるサンプルの処理をさす(例えば銀増強免疫電子顕微鏡法)。例えば、Pohl and Stierhof, *Microsc.Res.Tech.*42:59-65, 1998; Sawada and Esaki, *J. Histochem.Cytochem.*48:493-498, 2000を参照のこと。

【0087】

開示される方法の特定の実施例では、サンプルを酵素基質及び金属イオンと接触させた後に、サンプルをハロゲン化金(例えば塩化金)と接触させる。例えば米国特許第7,632,652号及び同第7,642,064号を参照のこと(出典明記によりここに援用する)。理論に束縛されるものではないが、金は還元され、抗体-ナノ粒子コンジュゲート(例えば金ナノ粒子)のナノ粒子の表面で析出される還元金属原子(例えば銀)の幾つかを酸化し、暗点を生成する(例えば、コントラスト及び/又はシグナルのサイズを増加させる)。幾つかの実施例では、方法は、サンプルを、約2分~約90分(例えば約2分~60分、約4分~60分、又は約10分~約30分)間、約0.05%~約1%(例えば、約0.1%~0.8%、約0.1%~0.5%、又は約0.1%~0.2%)の塩化金と接触させることを含む。特定の実施例では、サンプルを約4分間、0.2%の塩化金と接触させる。

【0088】

幾つかの実施態様では、開示の方法は、場合によっては増幅工程も含む。増幅は、サンプルを更なる金属イオンと接触させることを含み得、酸化状態ゼロの金属への還元により多くの金属イオンを提供し、検出されうる金属沈殿を増加させる。幾つかの実施例では、方法は、サンプルを、サンプルと酵素基質及び金属イオンとの接触において使用したのと同じ金属イオンと接触させることを含む。幾つかの実施例では、金属イオンは、溶液に溶存する金属塩の形態である。金属塩は金属ハロゲン化物(例えば、金属塩化物又は金属フッ化物)又は金属硝酸塩を含みうる。特定の実施例では、金属イオンは銀であり(例えば、サンプルがそれまでに酵素基質及び銀イオンと接触している場合)、例えば一又は複数の銀化合物(例えば硝酸銀)の形態である。幾つかの実施例では、サンプルを、約2分~90

10

20

30

40

50

分(例えば約2分~60分、約4分~60分、又は約10分~約30分)間、約10mM~約1M(例えば約20mM~500mM、又は約50mM~100mM)の一又は複数の銀化合物を含む溶液と接触させる。特定の実施例では、サンプルを、約4分間、約50mMの硝酸銀と接触させる。

【0089】

更なる実施態様では、ここに開示されている方法は場合によっては固定化工程を含み、これは、金属還元反応を停止させ、何れかの非還元金属イオンをサンプルから除去する。幾つかの実施例では、固定化は、サンプルを還元剤と接触させることを含む。幾つかの実施例では、方法は、サンプルを、約2分~90分(例えば約2分~60分、約4分~60分、又は約10分~約30分)間、約0.01%~約5%のチオ硫酸ナトリウム(例えば、約0.0625%~4%、約0.1%~3%、又は約0.5%~2%)と接触させることを含む。特定の実施例では、固定化は、サンプルを約2%のチオ硫酸ナトリウムと約4分間接触させることを含む。

【0090】

V. キット

ここに開示されるのはキットであり、開示される方法の様々な実施態様を実施するために使用されうる。幾つかの実施例では、キットは、一又は複数のナノ粒子(例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上のナノ粒子)にコンジュゲートされている第一抗体、例えばここに開示される抗体-ナノ粒子コンジュゲートを含む。特定の実施例では、第一抗体は、一又は複数の金ナノ粒子、一又は複数のパラジウムナノ粒子、一又は複数の白金ナノ粒子、又は一又は複数の金-パラジウム合金ナノ粒子にコンジュゲートされている。幾つかの実施例では、キットはまた、一又は複数の酵素分子(例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上の酵素分子)にコンジュゲートされている第二抗体を含み、第一抗体は第二抗体に特異的に結合する。幾つかの実施例では、第一抗体及び/又は第二抗体は抗ハプテン抗体である。幾つかの実施例では、一又は複数のナノ粒子にコンジュゲートされている抗体は、ここに開示の抗体-ナノ粒子コンジュゲートであり、例えば、金属-チオール結合によって抗体に直接結合されている2つ以上のナノ粒子(例えば金ナノ粒子)を含む抗体-ナノ粒子コンジュゲートである。特定の実施例では、抗体は別々の容器に含まれている。

【0091】

幾つかの特定の実施例では、キットは、一又は複数のナノ粒子(例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上のナノ粒子)にコンジュゲートされている第一抗体、及び一又は複数のAP分子(例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上、例えば3AP分子)にコンジュゲートされている第二抗体を含み、第一抗体は第二抗体に特異的に結合する。幾つかの実施例では、第二抗体は、標的分子(例えば標的タンパク質又はハプテン、ハプテン標識プローブは標的核酸分子に結合されている)に特異的に結合する「一次抗体」である。他の実施例では、第二抗体は、一次抗体(例えば、標的タンパク質又はハプテンを特異的に認識する抗体、ハプテン標識プローブは標的核酸分子に結合されている)に特異的に結合する「二次抗体」である。

【0092】

キットは場合によっては、更なる要素、例えば酵素のための基質(例えば、酵素がAPの場合、BCIP)又は金属イオン(例えば銀イオン、金イオン、銅イオン、ニッケルイオン、白金イオン、パラジウムイオン、コバルトイオン、又はイリジウムイオン)を含む溶液を含みうる。更に、キットは、上記試薬以外の更なる要素を含み得、限定するものではないが、開示の方法の更なる工程のための試薬、例えば金調色のための試薬(例えば、塩化金)、銀増幅(例えば、硝酸銀)、及び/又は固定化(例えば、チオ硫酸ナトリウム)を含む。キットはまた、抗体(例えば一又は複数の一次抗体)、ハプテン標識プローブ、又はここに開示されている方法によってIHC及び/又はISHを実施するのに必要な他の試薬を含みうる。開示したキットの各要素は、別々の容器において提供されうる。幾つかの実施例では、キットはまた、コントロールサンプル、例えば一又は複数のポジティブコント

10

20

30

40

50

ロールサンプル(for example, a sample known to express a particular target or to express a known amount or have a known gene copy number of a particular target)、又は一又は複数のネガティブコントロールサンプル(例えば、特定の標的を発現しないことが分かっているサンプル)を含みうる。特定の実施例では、ここに開示されているキットは、癌又は感染などの疾患又は疾病を有すると疑われている哺乳類からのサンプルにおいて、標的を検出するために使用されうる。

【0093】

VI. サンプル及び標的

サンプルは生物学的要素を含み、一般的に一又は複数の興味の標的分子を含むことが疑われている(又は含むことが知られている)。標的分子は細胞の表面上であり得、細胞は懸濁液中、又は組織切片中(例えば、パラフィン包埋組織切片)でありうる。また、標的分子は細胞内であり得、細胞溶解、又はプローブ又は抗体による細胞の貫入により検出されうる。当業者は、サンプルにおける標的分子の検出方法が、サンプルのタイプ及び使用されているプローブ又は抗体に依存して異なるであろうことを理解するだろう。サンプルを収集し、調整する方法は当分野で知られている。

【0094】

ここに記載の方法において使用されるサンプル、例えば組織又は他の生体サンプルは、当分野で知られている何れかの方法を使用して調整されうる。サンプルは、限定するものではなが、単細胞生物、例えばその中でもバクテリア、酵母、原生動物、及びアメーバ、多細胞生物(例えば植物又は動物)を含む何れかの生体から得られる、排泄される、又は分泌される何れかの固体又は液体サンプルを含む。例えば、生体サンプルは、例えば、血液、血漿、血清、尿、胆汁、腹水、唾液、脳脊髄液、房水又は硝子体液、又は何れかの体分泌、漏出液、滲出液(例えば、膿瘍、又は何れかの他の感染又は炎症の部位から得られる液)から得られる生体液、又は関節(例えば、正常関節又は疾患に影響された関節)から得られる液体でありうる。生体サンプルはまた、任意の臓器又は組織から得られるサンプル(バイオプシー又オートプシー標本、例えば腫瘍バイオプシー)、異種移植片であり得、又は細胞(一次細胞又は培養細胞の何れか)又は任意の細胞、組織又は臓器によって馴化された培地を含みうる。特定の実施態様では、生体サンプルは、組織切片(例えばバイオプシーから得られる)又は細胞学サンプル(例えばPapスメア又は血液スメア等)を含む。

【0095】

The samples can be obtained from subjects for routine screening or from subjects that are suspected of having a disorder, such as an infection, a genetic abnormality or a neoplasia. The described methods can also be applied to samples that do not have genetic abnormalities, diseases, disorders, etc., referred to as "normal" samples. Such normal samples are useful, among other things, as controls for comparison to other samples. The samples can be analyzed for many different purposes. For example, the samples can be used in a scientific study or for the diagnosis of a suspected malady.

【0096】

ここに記載されるサンプルは、当分野において現在知られているか又はこれから開発される何れかの方法を使用して調製されうる。一般的に、組織サンプルは、培地に組織を固定化し包埋することによって調製される。他の実施例では、サンプルは、例えば細胞を個体支持体上でスメアするか遠心分離することによって個体支持体上(例えばガラススライド)に単層として調製される細胞懸濁液を含む。更なる実施例では、新鮮凍結(例えば、非固定化)組織切片が、ここに開示の方法において使用されうる。

【0097】

幾つかの実施例では、包埋培地が使用される。包埋培地は不活性物質であり、そこに組織及び/又は細胞が包埋され、将来の分析に対しそれらを保護することを補助する。包埋はまた、組織サンプルが薄片にスライスされることを可能にする。包埋培地は、パラフィン、セロイジン、OCTTM化合物、寒天、プラスチック、又はアクリルを含む。

【0098】

多くの包埋培地は疎水性であり、従って、不活性物質は、主に疎水性試薬を使用する組織学的又は細胞学的分析の前に除去される必要がありうる。脱パラフィン化又は脱ろうはここでは広義に使用され、生体サンプルからの何れかのタイプの包埋培地の部分的な又は完全な除去を指す。例えば、パラフィン-包埋組織切片は、有機溶媒、例えばトルエン、キシレン、リモネン、又は他の適切な溶媒を通過させることによって脱ろうされる。

【0099】

サンプルの固定化の方法は様々である。組織サンプルの固定化は細胞及び組織成分を、生-様状態に可能な限り近く保護し、著しい変化させることなくそれらを調製手順で処理することを可能にする。固定化は自己融解及び細胞死により開始する細菌分解プロセスを停止させ、細胞及び組織成分を安定化させ、それらに、その後の組織処理の工程、例えばIHC又はISHを持ちこたえさせる。

10

【0100】

組織は何れかの適切な方法によって固定化され得、灌流又は固定液へ沈めることを含む。固定液は、架橋剤(例えば、アルデヒド、例えば、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド及びグルタルアルデヒド、並びに非-アルデヒド架橋剤)、酸化剤(例えば、金属イオン及び錯体、例えば四酸化オスミウム及びクロム酸)、タンパク質-変性剤(例えば、酢酸、メタノール、及びエタノール)、未知メカニズムの固定液(例えば、塩化水銀、アセトン、及びピクリン酸)、組合せ試薬(例えば、Carnoy's fixative、methacarn、Bouin's fluid、B5 fixative、Rossman's fluid、及びGendre's fluid)、マイクロ波、及び種々の固定液(例えば、excluded volume fixation及びvapor fixation)として分類される。添加物がまた固定液に含まれ得、例えばバッファー、洗剤、タンニン酸、フェノール、金属塩(例えば塩化亜鉛、硫酸亜鉛、及びリチウム塩)、及びランタンである。

20

【0101】

IHCのためのサンプルの調整において最も一般的に使用される固定液は、ホルムアルデヒドであり、一般的にはホルマリン溶液の形態である(バッファー溶液中に4%のホルムアルデヒド、10%緩衝ホルマリンと呼ばれる)。一実施例では、固定液は10%中性緩衝ホルマリンである。

【0102】

サンプルは、プローブ又は抗体又は受容体分子によって特異的に結合されうる複数の標的を含みうる。標的は核酸分子又はタンパク質でありうる。この開示を通して、標的タンパク質について言及する場合は、そのタンパク質に関連する核酸分子も標的として使用できることが理解される。幾つかの実施例では、標的は、病原体、例えばウイルス、細菌、又は細胞内寄生虫(例えばウィルスゲノムから)からのタンパク質又は核酸分子である。例えば、標的タンパク質は、疾患と関連する(例えば、相関する、原因として関係する等)標的核酸配列から産生されうる。

30

【0103】

標的核酸分子は、サイズにおいて実質的に様々でありうる。限定するものではないが、核酸分子は、様々な数の核酸残基を有しうる。例えば、標的核酸分子は、少なくとも約10の核酸残基、又は少なくとも約20、30、50、100、150、500、1000又はそれ以上の残基を有しうる。幾つかの実施例では、標的核酸分子は「短」核酸分子であり、例えば約1 kb ~ 約20 kb(例えば、約1 kb ~ 約15 kb、約5 kb ~ 約20 kb、又は約5 kb ~ 約10 kb)である。特定の実施例では、「短」標的核酸分子は、HPV又は肝炎ウイルス等のウィルスゲノム配列を含む。他の実施例では、標的核酸分子は「長」核酸分子であり、例えば約20 kb ~ 500 kb(例えば、約20 kb ~ 約300 kb、約50 kb ~ 約200 kb、又は約100 kb ~ 約200 kb)又はそれ以上である。特定の実施例では、「長」標的核酸分子は、腫瘍性形質転換に関係する遺伝子、例えばEGFR、HER2、C-MYC、ABL、C-MET、TOP2A、BCL、p53、又はRB1を含む。プローブ(例えばハプテン標的プローブ)は、標的核酸分子に結合し、検出可能シグナルを提供できる。

40

50

【0104】

標的核酸分子は、コピー数においても実質的に様々でありうる。限定するものではないが、核酸分子は、特定のサンプルに様々な数のコピー数で存在しうる。例えば標的核酸分子はサンプルに、約1コピー又は少なくとも約2、3、4、5、10、20、30、50、100、150、500、1000又はそれ以上のコピーで存在しうる。幾つかの実施例では、標的核酸分子は「低コピー数」核酸分子であり、例えば、サンプルにおいて細胞あたり約1～100コピー、例えば約1～50コピー、約1～20コピー、約1～10コピー、又は約1～3コピーで存在する核酸である。特定の実施例では、低コピー数核酸分子はHER2及びHPVを含む。幾つかの実施例では、標的核酸配列は、「短」核酸配列及び低コピー数核酸の双方である(例えばHPV)。

10

【0105】

同様に、標的タンパク質又はポリペプチドは、サイズにおいて実質的に様々でありうる。限定するものではないが、標的タンパク質又はポリペプチドは、プローブ又は抗体に結合する少なくとも一つのエピトープを含むだろう。幾つかの実施態様では、タンパク質又はポリペプチドは、プローブ又は抗体に結合する少なくとも2つのエピトープを含みうる。プローブ又は抗体はエピトープに結合し、検出可能なシグナルを提供しうる。

【0106】

特定の、非限定的実施例では、標的核酸分子又は標的タンパク質(例えば、標的核酸(例えばゲノム標的核酸)によって産生されるタンパク質)は、新生物(例えば、癌)に関連する。多くの染色体異常(転座及び他の再配置、倍加又は欠失)が、新生物細胞、特に癌細胞、例えばB細胞及びT細胞白血病、リンパ腫、乳癌、結腸癌、神経性癌及び同様なものにおいて同定されている。従って、幾つかの実施例では、標的分子の少なくとも一部は、少なくともサンプルにおける細胞のサブセットにおいて倍加又は欠失される核酸分子(例えば、ゲノム標的核酸)によって産生される核酸分子又はタンパク質である。

20

【0107】

癌遺伝子は、幾つかのヒト悪性腫瘍に関与することが知られている。例えば、染色体18q11.2の切断領域に位置するSYT遺伝子を含む染色体再配置は、滑膜肉腫軟部組織腫瘍間で一般的である。t(18q11.2)転座は、例えば、異なる標識を持つプローブを使用して、同定することができる：第一のプローブは、SYT遺伝子から遠位方向に伸びる標的核酸配列から生成される核酸分子を含み、第二のプローブは3'又はSYT遺伝子の近位に伸びる標的核酸配列から生成される核酸が含まれる。これらの標的核酸配列(例えば、ゲノムの標的核酸配列)が、インサイツハイブリダイゼーションの方法で使用される場合、SYT遺伝子領域でt(18q11.2)を欠く正常細胞は、SYTの2つのインタクトなコピーを反映する、2つの融合(近接する2つの標識により作成された)シグナルを示す。t(18q11.2)を持つ異常な細胞は単一の融合シグナルを示す。

30

【0108】

他の実施例では、標的核酸又は標的タンパク質(例えば、標的核酸(例えばゲノム標的核酸)によって産生されるタンパク質)は、悪性細胞において欠失している(失われている)腫瘍抑制遺伝子から選択される。例えば、染色体9p2上に位置するp16領域(D9S1749、D9S1747、p16(INK4A)、p14(ARF)、D9S1748、p15(INK4B)、及びD9S1752を含む)は、特定の膀胱癌において欠失されている。染色体1の短腕の遠位領域(例えば、SHGC57243、TP73、EGFL3、ABL2、ANGPTL1、及びSHGC-1322を包含する)、及び染色体19の動原体周囲領域(例えば、19p13-19q13)(例えば、MAN2B1、ZNF443、ZNF44、CRX、GLTSCR2、及びGLTSCR1)を含む染色体欠失は、中枢神経系の特定タイプの固形腫瘍の特徴的分子特徴である。

40

【0109】

上述の例は説明目的のためのみに提供され、限定することを意図しない。新生物性形質転換及び/又は増殖と相関する多くの他の細胞遺伝学的異常が、当業者に知られている。

50

新生物性形質転換と関連され、開示の方法において有用な、標的核酸又は標的タンパク質(例えば、標的核酸(例えば、ゲノム標的核酸)によって産生されるタンパク質)はまた、EGFR遺伝子(7p12; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000007, 又クレオチド55054219-55242525)、C-MYC遺伝子(8q24.21; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000008, 又クレオチド128817498-128822856)、D5S271(5p15.2)、リボタンパク質リパーゼ(LPL)遺伝子(8p22; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000008, 又クレオチド19841058-19869049)、RB1(13q14; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000013, 又クレオチド47775912-47954023)、p53(17p13.1; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000017, 相補体, 又クレオチド7512464-7531642)), N-MYC(2p24; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000002, 相補体, 又クレオチド151835231-151854620)、CHOP(12q13; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000012, 相補体, 又クレオチド56196638-56200567)、FUS(16p11.2; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000016, 又クレオチド31098954-31110601)、FKHR(13p14; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000013, 相補体, 又クレオチド40027817-40138734)、並びに、例えば: ALK(2p23; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000002, 相補体, 又クレオチド29269144-29997936)、Ig重鎖, CCND1(11q13; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000011, 又クレオチド69165054-69178423)、BCL2(18q21.3; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000018, 相補体, 又クレオチド58941559-59137593)、BCL6(3q27; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000003, 相補体, 又クレオチド188921859-188946169)、MALF1, AP1(1p32-p31; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000001, 相補体, 又クレオチド59019051-59022373)、TOP2A(17q21-q22; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000017, 相補体, 又クレオチド35798321-35827695)、TMPRSS(21q22.3; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000021, 相補体, 又クレオチド41758351-41801948)、ERG(21q22.3; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000021, 相補体, 又クレオチド38675671-38955488); ETV1(7p21.3; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000007, 相補体, 又クレオチド13897379-13995289)、EWS(22q12.2; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000022, 又クレオチド27994271-28026505); FLI1(11q24.1-q24.3; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000011, 又クレオチド128069199-128187521)、PAX3(2q35-q37; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000002, 相補体, 又クレオチド222772851-222871944)、PAX7(1p36.2-p36.12; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000001, 又クレオチド18830087-18935219)、PTEN(10q23.3; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000010, 又クレオチド89613175-89716382)、AKT2(19q13.1-q13.2; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000019, 相補体, 又クレオチド45431556-45483036)、MYCL1(1p34.2; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000001, 相補体, 又クレオチド40133685-40140274)、REL(2p13-p12; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000002, 又クレオチド60962256-61003682)及びCSF1R(5q33-q35; 例えば、GENBANKTM受入番号NC_000005, 相補体, 又クレオチド149413051-149473128)を含む。

【0110】

10

20

30

40

50

他の実施例では、標的核酸又は標的タンパク質は、疾患又は状態に関連するウイルス又は他の微生物から選択される。細胞又は組織サンプルにおける、ウイルス-又は微生物-由来標的核酸(例えば、ゲノム標的核酸)又は標的タンパク質の検出は、生物の存在を示す。例えば、標的核酸、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質は、発癌性又は病原性ウイルス、細菌又は細胞内寄生虫(例えばPlasmodium falciparum 及び他のPlasmodium species, Leishmania (sp.), Cryptosporidium parvum, Entamoeba histolytica, 及びGiardia lamblia, 並びにToxoplasma, Eimeria, Theileria, and Babesia species)のゲノムから選択されうる。

【0111】

幾つかの実施例では、標的核酸又は標的タンパク質(例えば、標的核酸(例えばゲノム標的核酸)によって産生されるタンパク質)は、ウイルスゲノムである。例示的なウイルスおよび相当するゲノム配列(GENBANKTM 括弧内に参照配列受入番号記載)は、ヒトアデノウイルスA(NC_001460), ヒトアデノウイルスB(NC_004001), ヒトアデノウイルスC(NC_001405), ヒトアデノウイルスD(NC_002067), ヒトアデノウイルスE(NC_003266), ヒトアデノウイルスF(NC_001454), ヒトアストロウイルス(NC_001943), ヒトBKポリオーマウイルス(V01109; GI: 60851)ヒトボカウイルス(NC_007455), ヒトコロナウイルス229E(NC_002645), ヒトコロナウイルスHKU1(NC_006577), ヒトコロナウイルスNL63(NC_005831), ヒトコロナウイルスOC43(NC_005147), ヒトエンテロウイルスA(NC_001612), ヒトエンテロウイルスB(NC_001472), ヒトエンテロウイルスC(NC_001428), ヒトエンテロウイルスD(NC_001430), ヒトエリスロウイルスV9(NC_004295), ヒト泡沫状ウイルス(NC_001736), ヒトヘルペスウイルス1(単純ヘルペスウイルス1型)(NC_001806), ヒトヘルペスウイルス2(単純ヘルペスウイルス2型)(NC_001798), ヒトヘルペスウイルス3(水痘帯状疱疹ウイルス)(NC_001348), ヒトヘルペスウイルス4の1型(エプスタインバーウイルス1型)(NC_007605), ヒトヘルペスウイルス4の2型(エプスタインバーウイルス2型)(NC_009334), ヒトヘルペスウイルス5病原菌AD169(NC_001347), ヒトヘルペスウイルス5病原菌Merlin Strain(NC_006273), ヒトヘルペスウイルス6A(NC_001664), ヒトヘルペスウイルス6B(NC_000898), ヒトヘルペスウイルス7(NC_001716), ヒトヘルペスウイルス8のM型(NC_003409), ヒトヘルペスウイルス8のP型(NC_009333), ヒト免疫不全ウイルス1(NC_001802), ヒト免疫不全ウイルス1(NC_001722), ヒトメタ肺炎ウイルス(NC_004148), ヒトパピロマウイルス-1(NC_001356), ヒトパピロマウイルス-18(NC_001357), ヒトパピロマウイルス-2(NC_001352), ヒトパピロマウイルス54(NC_001676), ヒトパピロマウイルス61(NC_001694), ヒトパピロマウイルス-cand90(NC_004104), ヒトパピロマウイルスRTRX7(NC_004761), ヒトパピロマウイルス10型(NC_001576), ヒトパピロマウイルス101型(NC_008189), ヒトパピロマウイルス103型(NC_008188), ヒトパピロマウイルス107型(NC_009239), ヒトパピロマウイルス16型(NC_001526), ヒトパピロマウイルス24型(NC_001683), ヒトパピロマウイルス26型(NC_001583), ヒトパピロマウイルス32型(NC_001586), ヒトパピロマウイルス34型(NC_001587), ヒトパピロマウイルス4型(NC_001457), ヒトパピロマウイルス41型(NC_001354), ヒトパピロマウイルス48型(NC_001690), ヒトパピロマウイルス49型(NC_001591), ヒトパピロマウイルス5型(NC_001531), ヒトパピロマウイルス50型(NC_001691), ヒトパピロマウイルス53型(NC_001593), ヒトパピロマウイルス60型(NC_001693), ヒトパピロマウイルス63型(NC_001458), ヒトパピロマウイルス6b型(NC_001355), ヒトパピロマウイルス7型(NC_001595), ヒトパピロマウイルス71型(NC_002644), ヒトパピロマウイルス9型(NC_0

10

20

30

40

50

01596), ヒトパピロウイルス92型(NC_004500), ヒトパピロウイルス96型(NC_005134), ヒトパラインフルエンザウイルス1(NC_003461), ヒトパラインフルエンザウイルス2(NC_003443), ヒトパラインフルエンザウイルス3(NC_001796), ヒトパレコウイルス(NC_001897), ヒトパレコウイルス4(NC_007018), ヒトパレコウイルスB19(NC_000883), 呼吸系発疹ウイルス(NC_001781), ヒトライノウイルスA(NC_001617), ヒトライノウイルスB(NC_001490), ヒトスプマウイルス(NC_001795), ヒトT-リンパ向性ウイルス1(NC_001436), ヒトT-リンパ向性ウイルス2(NC_001488)を含有する。

【0112】

特定の実施例では、標的核酸又は標的タンパク質(例えば、標的核酸(例えば、ゲノム標的核酸)によって産生されるタンパク質)は、発癌性ウイルス、例えばエプスタイン・バー・ウイルス(EBV)又はヒトパピロウイルス(HPV、例えば、HPV16、HPV18)からである。他の実施例では、核酸配列(例えば、ゲノム標的核酸配列)から産生される標的タンパク質は、病原性ウイルス、例えばRSウイルス、肝炎ウイルス(例えば、肝炎Cウイルス)、コロナウイルス(例えば、SARSウイルス)、アデノウイルス、ポリオウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、又は単純ヘルペスウイルス(HSV)からである。

【0113】

本開示は、以下の非限定的実施例によって更に説明される。

【0114】

実施例

実施例1

金ナノ粒子-抗体コンジュゲートの合成

AuNP合成

N₂スパーキング水(30ml)を、大きい楕円攪拌子及び窒素を具備する500mlの丸底フラスコに入れた。次いで0.5g(1.27mmol)のHAuCl₄を反応フラスコに加え、全ての塩が可溶化するまで攪拌した。次に、30mlのN₂スパーキングトルエンを加え;次いで0.700gの相移動剤、テトラオクチルアンモニウムブロミド(TOABr)を加えた。混合物を、金酸が水相から有機相に移動するまで攪拌した。一旦金酸の相移動が完了したら、1.15gのトリフェニルホスフィン(TPP)を加え、白色懸濁が現れるまで勢いよく攪拌し、その時点で攪拌を10-15分間継続した。全ての攪拌は水性及び有機層を混合する早さで行った。

【0115】

別の容器において、5mlの水中に0.72gのNaBH₄を調製し、全ての還元剤が溶解するまで穏やかに攪拌した。NaBH₄溶液を反応フラスコに素早く加え、3時間急速に攪拌した。この反応において産生されたガスを抜くため、システムをバブラーでセプタ閉鎖(septa closed)した。

【0116】

反応の終わりに、反応混合物を分液漏斗に移し、水層を除去した。有機層を100mlの水で3回、又は水層が透明になるまで洗浄した。エマルジョンが形成された場合、それを破壊するためにブライン又はクエン酸三ナトリウムを加えた。

【0117】

トルエンを、黒色固体が残るまで減圧下で蒸発させた(ロータリーエバポレーター)。物質をヘキサンに再懸濁させ(大きい凝集を破壊する)、真空三角フラスコにおける250~500mlの微細又は中程度焼結ガラスフリットに移した。ヘキサンを沈殿物から濾過除去し、100mlのヘキサンで3回洗浄した。沈殿物を次いで100mlの2:1の水:メタノールで5回、100mlの水で5回、100mlの3:2の水:メタノールで5回、そして100mlの水で5回洗浄した。100mlのヘキサンでの5回の最終洗浄をおこなった。更なる精製のために、固体をフラスコに移し、20mlのジクロロメタンに再

10

20

30

40

50

溶媒和させた。これを5分間超音波処理し、次いでヘキサンを溶液が混濁するまでゆっくり加えた。溶液を遠心分離管に移し、固体を2500rpmで収集した。必要であれば、この溶媒和及び沈殿を、物質を更に精製するために更に実施した。

【0118】

UV-Vis吸収スペクトルを250-750nmで測定した。520nmでの吸収を、SPRバンドがあるか決定するために検査した。これは、約1.5nm~2nmのナノ粒子を示した。460nmでの吸収を測定し、 $64,000(\text{cm}^{-1})(\text{M}^{-1})$ の消衰係数を使用して、溶液中のサンプルの濃度及び量を決定した。

【0119】

水溶性ナノ粒子へのAuNPの転換

AuNP(50mg)を、大きい楕円攪拌子及び窒素管を具備する250mlの丸底フラスコに入れた。次いで、20mlのジクロロメタンを加え、AuNPが溶液に入るまで攪拌した。次に、30mlのN₂パーキング水を反応フラスコに加え、その後50mgのビス-(スルホナトフェニル)フェニルホスフィン(BSPF)を加え；反応物を少なくとも24時間勢いよく攪拌した。物質が水相に完全に移動していない場合、更に50mgのBSPFを加え、更に24時間攪拌した。

【0120】

物質が水相に送達された後、反応の内容物を分液漏斗に移し、有機層を除去した。水相を20mlのジクロロメタンで洗浄し、次いで0.2μmフィルターを通して濾過した。水を減圧下で除去し、ナノ物質を-20℃で保管した。

【0121】

ウサギ抗ヤギIgGへのAuNPのコンジュゲーション

AuNP物質をフリーザーから取り出し、室温にした。5mgを2ml Eppendorf(登録商標)管に入れ、1mlの20mMのホスフェートバッファー(PB)、pH7.4に再懸濁させた。物質を2-3分間超音波処理し、0.2μmシリンジフィルターを通して穏やかに濾過して大きい凝集を除去した。溶出された溶液をPD-10サイズ排除-脱塩カラム(20mMのPB pH7.4に平衡化)を通過させ、小分子及び塩を除去した。

【0122】

ジチオスレイトール(DTT)溶液を、100μlの水に7.7mgのDTTを加えることによって調製した。次いで1.5mgのウサギ抗ヤギ抗体を2ml Eppendorf(登録商標)管に入れ、43.8μlのDTT溶液を加え、4℃で25分間混合させた。還元タンパク質をPD-10サイズ排除-脱塩カラム(20mMのPB pH7.4で平衡化)を使用して、過剰DTT溶液から分離させた。10の500μl画分を収集し、各画分をタンパク質含有量についてUV-Vis吸収によって280nmで測定した。タンパク質を含有する画分をプールし、AuNP溶液に加えた。溶液を4℃で48時間穏やかに混合させた。

【0123】

コンジュゲーション反応物を0.2μmシリンジフィルターを通して穏やかに濾過するプレ精製工程を、20mMのPB pH7.4を使用するGE Superdex(登録商標)200カラムを使用するAKTASEC精製装置において為される最終精製の前に行った。クロマトグラムを280nm及び460nmで吸収を測定するように設定し、500μlの画分を収集した。主要ピーク下の画分を収集した(図2A)。画分をプールした後、最終精製工程のために、0.2μmシリンジフィルターを通す最終濾過を行った。UV-Vis吸収を行い、280nm及び460nmで特徴付けし、タンパク質及びAuNP比及び最終コンジュゲート濃度を定量化した(図2B)。得られた抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、抗体あたり約3.5ナノ粒子を含んだ。

【0124】

実施例2

更なるナノ粒子-抗体コンジュゲートの合成

10

20

30

40

50

白金ナノ粒子(PtNP)を、 HAuCl_4 の代わりにテトラクロロ白金酸カリウムを用いる以外は、AuNPについて実施例1に記載した通りに合成した。パラジウムナノ粒子(PdNP)をまた、 HAuCl_4 の代わりにテトラクロロパラジウム酸ナトリウムを用いる以外は、AuNPについて実施例1に記載した通りに合成した。最後に、金-パラジウム合金ナノ粒子(AuPdNP)を、 HAuCl_4 の代わりに0.25g(0.64mmol)の HAuCl_4 及び0.19g(0.64mmol)の Na_2PdCl_4 を用いる以外は、AuNPについて実施例1に記載した通りに合成した。各々、精製、リガンド交換、及び抗体へのコンジュゲートは実施例1に記載した通りであった。

【0125】

実施例3

アルカリホスファターゼ-抗体コンジュゲートの合成及び特徴付け

AP-抗体コンジュゲートを、マレイミド-APを還元抗体と反応させることによって産生した。酵素あたりのAP分子の数は、反応における抗体に対するAPの比を調節することにより様々であった。

【0126】

AP(BBI Enzymes, Madison, WI)を、APバッファー1(0.1Mの Na_3PO_4 , 0.1Mの NaCl , 1mMの MgCl_2 , 0.1mMの ZnCl_2 , pH7.5)で平衡化したカラムを通してバッファー交換し、Trisバッファーを除去した。APを次いで、周囲温度で(23-25)60分間、50-100倍モル過剰のMAL-dPEGTM₁₂NHSエステル(1-マレイニミド-3-オキソ-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-ドデカオキサ-4-アザトリテトラコンタン-43-オイック酸サクシニミジルエステル; Quanta Biodesign, Powell, OH)での処理により、コンジュゲーションのために活性化させた。APバッファー2(0.1M Tris-HCl, 1mM MgCl_2 , 0.1mM ZnCl_2 , pH7.5)で平衡化させたSuperdex(登録商標)200 10/300 GLカラムを使用したサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により、精製マレイミド-APを得た。

【0127】

抗マウスIgG、抗ウサギIgG、マウス抗ベンゾフラザン、又はマウス抗DNP抗体を、周囲温度(23-25)で25分間、25mMのDTTを用いてインキュベートした。PD-10脱塩カラム(0.1M NaOAc, pH5.0)を通す精製後、4~8のフリーオールを有する無DTT抗体を得た。

【0128】

精製されたチオレート抗体を、精製マレイミド-APと、3倍モル過剰のマレイミド-APで結合させた。混合物を、周囲温度で(23-25)16-18時間インキュベートした。APバッファー2で平衡化したSuperdex(登録商標)200 10/300 GLカラムを使用したSECにより、精製AP-抗体コンジュゲートを得た。

【0129】

形成されたコンジュゲートのタイプを調査するために、AP-IgGコンジュゲートを異なるストイキオメトリで合成した。1 IgG : 1 AP ~ 1 IgG : 5 APの比を合成において使用した。1 IgG : 1 APコンジュゲートは完全に凝集し;沈殿が観察された。上清をSECによって分析した場合、カラムによって分離されていない大きいサイズの物質に対応するピークが観察された。1 IgG : 2 AP及び1 IgG : 3 APは、いくつかの凝集物質を生じたが、単離された場合第二ピークを示し、組織染色において特に優れた性能を示した。これらのコンジュゲートは、1 IgG : 1 AP比であるコントロールAPコンジュゲート(Ventana Medical Systems, Part No. 253-4327)と同等か又はそれ以上の性能を示した。1 IgG : 3 AP ~ 1 IgG : 5 APはより多くの未反応アルカリホスファターゼを呈し、組織において試験した場合、1 IgG : 2 APコンジュゲートと同等な性能を示した。

【0130】

AP及びIgG間のストイキオメトリのバリエーションに加え、コンジュゲートを、A

10

20

30

40

50

P及びMAL-dPEG^{T M}_{1 2} NHSエステル(Mal)間の異なるストイキオメトリで合成した。一旦還元IgGで反応させ、反応をSECによって調査した。IgG:3 AP 50X及び100X Mal反応はより良い解像を提供し、より少ないフリーAP-Mal開始材料をもたらした。他の比は増加レベルの凝集及び未反応AP-Mal複合体を示した。機能的組織染色では、IgG:3 AP 50X及び100X Malコンジュゲートは、200X及び400X過剰Malより良い性能を示した。

【0131】

IgG-APコンジュゲートの流体力学的サイズを、動的光散乱によって分析した。コンジュゲートのサイズ分布が表1に示されている。これは、1:3ストイキオメトリで生成されたIgG-APコンジュゲートが、コントロールAPコンジュゲートより大きく、より多いAPを有することを示す。

10

【0132】

比較酵素活性アッセイを3つの異なるIgG-APコンジュゲート(2つの異なるIgG:3 APのバッチ及び一つのIgG:2 APのバッチ)及びコントロールIgG-APコンジュゲート(1 IgG:1 AP)で実施した。酵素活性を、基質として4-ニトロフェニルホスフェートを用い、Beckman DU-530 UV/VIS分光光度計を使用して405nmで測定した(例えば、ThermoScientific Cat.No. TR11103を参照)。IgG:3 APコンジュゲートは、コントロールコンジュゲートより2.3倍大きい酵素活性を有した。IgG:2 APコンジュゲートはコントロールコンジュゲートより高い活性を有したが、IgG:3 APの半分のみであった(表2)。2つのIgG:3 APバッチは同等の性能を示した。

20

表2. 酵素活性アッセイ

サンプル	酵素活性(U/ml)
コントロールIgG-APコンジュゲート(1 IgG:1 AP)	4464
ヤギ抗ウサギ:3 AP (バッチ1)	10,414
ヤギ抗ウサギ:3 AP (バッチ2)	10,354
ヤギ抗ウサギ:2 AP	5908

30

【0133】

天然ウシ腸APのパフォーマンスを、Pischia pastoris (Roche Diagnostics, Cat.No. 03 359 123 001)において産生された組換えAPと比較した。組換えAPは、天然APと比較して少ないアイソエンザイム及び若干異なるN-グリコシル化を有した。天然及び組換えAP双方をMAL-dPEG^{T M}_{1 2} NHSリンカーで処理し、SECによって精製した。クロマトグラムは類似した保持及び溶離特性を示した。リンカー修飾APを次いで、DTT還元ヤギ抗ウサギIgGにカップリングさせた。AP-抗体コンジュゲートをSECによって精製し、天然及び組換えコンジュゲート双方の溶離特性は類似した。ISH及びIHC染色による組換えAP-抗体コンジュゲートの更なる評価は、天然AP-抗体コンジュゲートと比較すると類似したシグナル強度及び特異性を示した。これは、組換えAPが、一般的な天然APの代替として使用できることを示す。

40

【0134】

IgG-APコンジュゲートを未変性及び還元SDS-PAGEによって分析した。コントロールIgG-APコンジュゲートはNovex 4-16% Bis-Trisゲル(Invitrogen, Cat.No. BN2111BX10)において2つのメジャーバンド(約290kDa及び530kDa)として移動し、一方、上記のように生成したIgG-APコンジュゲートはよりゆっくり移動し、少なくとも2つのメジャーバンド(約450kDa及び570kDa)及び約500kDaでマイナーバンドを有した(図3A)。異なるモル過剰のMAL-dPEG^{T M}_{1 2} NHSエステルで合成されたコンジュゲートの電気泳動特性は類似であった。2モル過剰のA

50

Pで合成されたコンジュゲートは、溶液において凝集し、3モル過剰のAPで合成されたコンジュゲートと異なった(図3A)。これは、SECデータ(上)と一致した。

【0135】

コンジュゲートをNuPAGE Novex 3-8% Tris-acetate SDS還元ゲルにおいても分析した。ネイティブPAGEの結果と類似して、コントロールIgG-APコンジュゲートは、新しいAPコンジュゲートより早く移動した。本方法によって合成されたIgG-APコンジュゲートは、約430~710kDaの範囲の分子量を有する3つのメジャーバンドによって表され、1IgG:2AP(約430kDa)、1IgG:3AP(約570kDa)、及び1IgG:4AP(約710kDa)のコンジュゲーションストイキオメトリと一致する(図3B)。様々なモル過剰のMAL-dPEGTM_{1,2}NHSEステルで合成されたコンジュゲートの電気泳動プロファイルは類似であった。組換えAPで合成されたコンジュゲートは、約710kDaで一つのメジャーバンドによって表された。この差は、組換えAPの異なるマンノース分枝パターンに起因し得、これは抗体あたりのより多いAP分子のコンジュゲーションを容易にし得、及び/又は非常に安定した二次構造を作成し得る。

10

【0136】

AP-抗体コンジュゲートにおける抗体あたりのAP分子の数は、蛍光マーカを用いて抗体を標識することによって決定した。20mMのホスフェートバッファ(pH 7.4)中のヤギ抗ウサギIgGをDMISOにおいてAlexa Fluor(登録商標)610 NHS-ester(Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad, CA)と組合せ、周囲温度で12-15時間回転させた。得られたコンジュゲートを、20mMのホスフェートバッファ(pH 7.4)で平衡化したSuperdex(登録商標)200 10/300 GLサイズ排除カラムを使用して精製した。産物をホスフェートバッファにおいて段階希釈し、UV読みとりを280及び610nmで行った。抗体あたりのAlexa Fluor(登録商標)610分子の数を算出した。ヤギ抗ウサギAlexa Fluor(登録商標)コンジュゲートの合成を2回実施し;抗体あたりのAPの平均の数を3.15と算出した。

20

【0137】

APへの蛍光標識抗体のコンジュゲーションを、1:2又は1:3の抗体:APの比を使用して上記の通りに実施した。コンジュゲートをSuperdex(登録商標)200 10/300 GLカラムを使用して精製し、抗体あたりのAPの数を算出した。比1:2の抗体:APで合成したコンジュゲートは、抗体あたり1.67APを有した。比1:3の抗体:APで合成したコンジュゲートは、抗体あたり2.6APを有した。これは、複数のAP分子が抗体にコンジュゲートでき、その数は反応物のストイキオメトリを変化させることによって調整できることを裏付ける。

30

【0138】

実施例4

抗体-金ナノ粒子コンジュゲートを使用したインサイツハイブリダイゼーション

新規AP-銀検出キット対HRP検出システムの評価を、異種移植細胞株において染色体17プローブを使用して実施した。スライド染色を、HER2 3-in-1 xenograft slides(VMSI #783-4332)を使用して、自動BenchMark(登録商標)XT Instrument (Ventana Medical Systems, Inc. (VMSI))において実施した。簡単には、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織スライドを、75℃に4分間加熱し、EZ PrepTM (10X, VMSI #950-102)で2回処理し、液体カバースリップ(VMSI #650-010)を使用してカバースリップをした。カバースリップをした後、組織スライドを76℃に4分間加熱し、EZ PrepTMですすぎ、液体カバースリップを組織脱パラフィン化のために再適用した。スライドを37℃に冷却し、4分間インキュベートし、反応バッファ(10X, VMSI #950-300)ですすいだ。

40

【0139】

一旦反応バッファですすいだら、組織スライドを95℃に加熱し、8、12及び8分のサイクルに対してCell Conditioning Solution #1 (CC1, VMSI #950-124)で前処理し、

50

ここで液体カバースリップを各CC1/サイクル適用間に適用した。CC1でのサイクル後、スライドを37°Cに加熱し、4分間インキュベートし、反応バッファで一度すすいだ。組織サンプルを4分間ISH-プロテアーゼ3(VMSI #780-4149)の適用によりプロテアーゼ処理し、プロテアーゼを除去するために反応バッファですすぎ、最後にSSC(10X, VMSI #950-110)ですすいだ。

【0140】

銀*in situ*ハイブリダイゼーション検出溶液(VMSI, ultraViewTM SISH Detection Kit #780-001)をプロテアーゼ処理した組織スライドに加え、スライドを4分間インキュベートし、HER2 DNP標識されたDNAプローブ(VMSI #780-4332)又は染色体17(Chr17)プローブ(VMSI #780-4331)を適切なスライドに適用した。プローブ適用後、スライドを4分間インキュベートし、その後、95°Cで12分間核酸変性を行った。液体カバースリップをその後スライドに適用し、ハイブリダイゼーションを52°Cで2時間(HER2プローブ)又は44°Cで2時間(Chr17プローブ)生じさせた。

10

【0141】

ハイブリダイゼーション後、スライドをSSCにおいてすすぎ、2X SSCを使用して72°Cで各8分間3回洗浄し、この時点でスライド加熱を止め、スライドを冷却させた。一旦冷却されたら、スライドを反応バッファにおいてすすぎ、37°Cに4分間温め、その後ウサギ抗DNP(VMSI #780-4335)を適用し、スライドを液体カバースリップでカバースリップし、37°Cで20分間インキュベートした。インキュベーション後、スライドを反応バッファで2回洗浄し、15 µg/mlのヤギ抗ウサギ組換えアルカリホスファターゼコンジュゲート(実施例3)を適用し、スライドを更に32分間37°Cでインキュベートした。インキュベーション後、スライドを反応バッファで4回洗浄した。次いで、100 nMのウサギ抗ヤギ金ナノ粒子コンジュゲート(実施例1)を適用し、スライドを37°Cで更に32分間インキュベートしてから、0.1 MのTris酢酸溶液(pH 9.0)で3回洗浄した。

20

【0142】

プローブ/標的ハイブリダイゼーションイベントを検出するために、50 mMの硝酸銀及び1.3 mMのBCIPをスライドに適用し、スライドを液体カバースリップでカバースリップした後、37°Cで20分間インキュベートした。金調色を、スライドをTrisバッファ中において2回すすぎ、およそ100 µlの0.2%塩化金溶液を適用し、カバースリップし、スライドを4分間37°Cでインキュベーションすることにより実施した。スライドをTrisバッファ中において2回洗浄し、硝酸銀を再度適用し、液体カバースリップを適用し、スライドを更に4分間インキュベートし、シグナル増幅を行った。更なるTrisバッファでの洗浄後、検出シグナル析出をスライドへのチオ硫酸ナトリウムの適用により固定化した。チオ硫酸ナトリウムでの4分のインキュベーション後、スライドを反応バッファにおいてすすぎ、4分間、ヘマトキシリンII(VMSI #790-2208)及び液体カバースリップを適用しインキュベーションすることによって対比染色した。ヘマトキシリンII/液体カバースリップをスライドから洗浄除去した後、ブルーイング試薬(VMSI #760-2037)を加え、更なる4分のインキュベーション後、対比染色を完了した。

30

【0143】

一旦染色及び対比染色が完了すると、スライドを器機から外し、洗浄剤で洗浄し、段階的なアルコール及びキシレン溶液を通して脱水させ、固体カバースリップをスリップに適用し、スライドを明視野顕微鏡を通してよく観察した。

40

【0144】

染色されたスライドをバックグラウンド/非特異的染色、シグナル強度、及び感受性に対して判定した。どちらの場合においても、実施例1の通りに合成された抗体-金ナノ粒子コンジュゲート、及び実施例3の通りに合成されたIgG-APコンジュゲートを利用する銀検出は、より強いシグナル強度を示し、バックグラウンドは一般的なHRP検出システムと同等なレベルであった(図4)。2つのシステムをまた、染色体17及びHER2プローブを用いて乳癌組織を使用して比較した。染色体17プローブでは、異種移植片の

50

場合のように、類似な質の高い検出、シグナル強度、及び明瞭さが乳癌において観察された。HER2プローブについては、新規な方法は、一般的なHRP検出システムより優れ、より多い数の細胞が検出され、より大きいシグナル強度が、感知可能なバックグラウンドなく示された(図5)。

【0145】

組織染色における抗体-ナノ粒子コンジュゲートの効果を決定するために、Calu異種移植片を、AP-SISHシステムにおいて抗体-ナノ粒子コンジュゲートの有無においてHER2リボ核酸プローブについて染色した。スライド染色を、自動BenchMark(登録商標)XT Instrumentにおいて実施した。簡単には、FFPE Calu-3組織を有するスライドを75℃に4分間加熱し、EZPrepTMで2回処理し、液体カバースリップの適用によりカバースリップした。カバースリップをした後、組織スライドを75℃で16分間インキュベートし、EZPrepTMですすぎ、液体カバースリップを組織脱パラフィン化のために再適用した。スライドを37℃まで冷却し、4分間インキュベートし、SSCですすいだ。一滴(および100μl)のRiboPrepTM試薬(VMSI, RiboMap(登録商標)キット #760-102)をスライドに適用し、液体カバースリップを適用し、スライドを32分間37℃でインキュベートした。インキュベーション後、スライドをEZPrepTMにおいてですすぎ、RiboClearTM(およそ100μl、RiboMap(登録商標)キットの一部)を適用し、液体カバースリップの適用後、スライドを更に12分間37℃でインキュベートした。

10

【0146】

反応バッファーを使用してスライドを2回ですすぎ、液体カバースリップを再度適用し、スライドを90℃で8分間インキュベートし、その後、スライドをですすぎ、温度が37℃まで冷却された後、ISH-プロテアーゼ3を適用し、スライドを4分間インキュベートした。プロテアーゼ消化の後、スライドを反応バッファーで3回ですすぎ、SISH検出ハイブリダイゼーション溶液と併せて、100μlのHER2-DNP標識RNAプローブをスライドに適用し、スライドを12分間80℃でインキュベートし、液体カバースリップを適用し、ハイブリダイゼーションを6時間65℃で進行させた。ハイブリダイゼーション後、スライドをEZPrepTMですすぎ、0.1X SSCの3回のストリンジェント洗浄を、75℃で、洗浄あたり8分で行った。洗浄後、スライドをEZPrepTMにおいてですすぎ、およそ100μlのRiboFixTM(RiboMap(登録商標)キットの一部)を適用し、液体カバースリップを適用し、スライドを37℃で32分間インキュベートした。

20

30

【0147】

およそ100μl(1滴)のウサギ抗DNP、次いで液体カバースリップをスライドに適用し、これを37℃で更に20分間インキュベートし、この時点でスライドを反応バッファーにおいて2回洗浄し、15μg/mlのヤギ抗ウサギ組換えアルカリホスファターゼコンジュゲート(実施例3)を適用し、スライドを液体カバースリップで覆い、インキュベーションを37℃で32分間実施した。スライドを反応バッファーにおいて3回洗浄した後、100nMのウサギ抗ヤギ金ナノ粒子コンジュゲート(実施例1)を適用し、インキュベーションを更に32分間行った。スライドを0.1MのTrisバッファー(pH9.0)において洗浄し、硝酸銀及びBCIPを適用し、液体カバースリップを適用し、インキュベーションを32分間行った。スライドをTrisバッファーで洗浄した後、塩化金及び液体カバースリップを適用し、その後4分のインキュベーションを行った。Trisバッファーの2回の洗浄後、硝酸銀並びに液体カバースリップを再度適用し、スライドを更に4分間インキュベートし、その後Trisバッファー洗浄を行った。チオ硫酸ナトリウム及び液体カバースリップを適用し、スライドを4分間インキュベートし、反応バッファーで洗浄し、ヘマトキシリンIIで対比染色し、洗浄し、明視野顕微鏡下での最終検査のためにカバースリップした。

40

【0148】

組織染色は、抗体-ナノ粒子コンジュゲートが検出システムに不在である場合、シグナ

50

ルが拡散し、茶色色相を有し、シグナルを観察するのをより困難にすることを示した。シグナルを観察するのに高倍率が必要となり、抗体-ナノ粒子コンジュゲート無しの染色は、組織における全ての陽性シグナルは検出しなかった。しかしながら、抗体-ナノ粒子コンジュゲートを検出システムに含んだ場合、シグナルはシャープ且つ黒色になった。より多くの細胞が陽性であり、黒色シグナルによりもたらされるシャープなコントラストに基づき、又は増加した感受性から生成されるシグナルから区別が容易であった(図6)。このように、抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、AP-ベース検出システムの感受性を著しく改善し、システムをリボプローブを検出するのに使用できた。

【0149】

HER2プローブを用いた過去の実験は、細胞の核にバックグラウンドの存在を示した(「ダスティング」と呼ばれる)。このバックグラウンドがHER2プローブ又はAP銀検出システムによるものか決定するために、洗浄温度のストリンジェンシーを増加させ、68 ~ 77、82 及び87 に変化させた。洗浄の温度を増加させると、ダスティングは消散し、HER2プローブが多量のDNP標識非特異的配列を有した(これがDNAにアニーリングし、バックグラウンドを生じさせた)ことを意味する。これは更に、AP銀検出システムの感受性の増加を裏付ける。AP銀検出システムは、非特異的結合であるこれらの小ハプテン化配列を検出できた。温度の増加は観察されるダスティングの量を修正したが、幾つかの特異的結合プローブをその標的配列から分離させた。このようにストリンジェンシー洗浄中の温度の増加はバックグラウンド及び非特異的染色を軽減するが、特異的シグナルも減少させる。

【0150】

実施例5

抗体-ナノ粒子SISHとHRPベースISHの生物統計学的比較

30の異なる乳癌ケースを使用し、開示のAP銀検出システムを現在のHRP-SISHキットと比較した。各ケースからの連続切片を、実施例4に記載のようにAP銀検出システム及びHRP-SISH検出キットを使用して、HER2及び染色体17(Chr17)双方について評価した。一旦スライドを染色しカバースリップしたら、それらを2人の異なる有資格スライドリーダーによって盲検的に評価した。リーダーは、「カウボーイ法」によりHER2及びChr17のコピー数を数えるよう指示され、これは、彼らが観察している各プローブの平均コピー数を推定することをリーダーに要求する。これらの数を記録し、分析のために使用した。シグナルが低密度すぎるか又は観察される組織が数えるのが不可能である場合、組織染色を不適當と見なした。

【0151】

各リーダーの組織サンプルスコアを図7A及びB(Chr17)及び図8A及びB(HER2)に示す。これらの結果を使用して、HER2/Chr17コピー比を算出した。コピー比が2以上である場合、サンプルはHER2陽性とされた。HER2又はChr17サンプルのどちらかが不適當と見なされた場合、比も不適當と見なした。結果を表にし、2人のリーダーによって決定されたHER2ステータスの分布を示す(表3及び4)。

表3. リーダー1からの結果のコンコードランス表

		AP 銀検出			
		不適當	陰性	陽性	全体
HRP-SISH	不適當	10	4	3	17
	陰性	1	4	0	5
	陽性	1	0	7	8
	全体	12	8	10	30

【0152】

表3はリーダー1が、HRP-SISHキットで染色された時には不適當と見なされた、AP銀検出システムで染色されたサンプルを読み取ることができたことを示す。HRP

- S I S Hで不適當であった7つのケースがA P 銀検出システムでスコア付けされたが、A P 銀検出システムで不適當であった2つのケースのみがH R P - S I S Hキットでスコア付けされた。

【 0 1 5 3 】

表 4. リーダー 2 からの結果のコンコーダンス表

		AP 銀検出 n			
		不適當	陰性	陽性	全体
HRP-SISH	不適當	13	1	0	14
	陰性	1	7	2	10
	陽性	0	0	6	6
	全体	14	8	8	30

10

表 4 は、H R P - S I S Hでは陰性とスコア付けされたがA P 銀検出システムでは陽性とされた2つのケース以外は、リーダー 2 は、各システムで染色されたスライドをほぼ同一であるとスコア付けしたことを示す。各ケースにおいて、不一致は、リーダーがスライドを読むように指示された「カウボーイ」法に起因しうる。この方法は、リーダーに、彼又は彼女の頭の中において数を算出させることによって平均コピー数を算出する、よりリベラルなアプローチに頼る。更に、リーダーがスコアを付けている時に、彼らが正確に同じ領域を参照しているかについて保証がない。

20

【 0 1 5 4 】

各検出システムに対して各リーダーによって出されたスコアを次いで、2人の異なるリーダー間の結果の再現性を検査するために表にした。表 5 は、H R P - S I S Hで染色した組織サンプルを観察する場合、リーダー間に不一致があったことを示す($\kappa=0.5213$)。A P 銀検出システムを使用した場合に、彼らのスコアはより一致した(表6, $\kappa=0.6429$)。

表 5. リーダー間の HRP-SISH スコアの比較

		リーダー 2			
		不適當	陰性	陽性	全体
リーダー 1	不適當	12	3	2	17
	陰性	0	5	0	5
	陽性	2	2	4	8
	全体	14	10	6	30

30

表 6. リーダー間の AP 銀検出の比較

		リーダー 2			
		不適當	陰性	陽性	全体
リーダー 1	不適當	10	2	0	12
	陰性	1	6	1	8
	陽性	3	0	7	10
	全体	14	8	8	30

40

【 0 1 5 5 】

実施例 6

抗体-金-パラジウム合金ナノ粒子コンジュゲートを使用する I n s i t u ハイブリダイゼーション

50

HER2 in situハイブリダイゼーションを、乳房組織又はZR-75-1乳癌細胞株サンプルを100 nMのAuNP-抗体コンジュゲート、100 nMのAuPdNP-抗体コンジュゲート、又は50 nMのAuPdNP-抗体コンジュゲートでインキュベートした以外は、実施例4の通りに実施した。AuPdNP-抗体コンジュゲートを使用したHER2染色は特異的であったが、AuNP-抗体コンジュゲートを使用して得られたものより弱かった(図9A-F)。

【0156】

実施例7

抗体-金ナノ粒子コンジュゲートを使用する免疫組織化学

新規AP-銀検出システム対HRP検出システムの評価を、様々なタンパク質バイオマーカーを使用して乳癌組織において実施した。評価を乳房浸潤腺癌組織サンプルにおいて実施した。抗エストロゲン受容体(ER)、抗Ki-67、及び抗プロゲステロン受容体(PR)を、プロトコルにおいて一次抗体として使用し、金調色は行わなかった。

【0157】

スライド染色を、以下の変更を除き、実施例4に記載の通りに自動BenchMark(登録商標)XT Instrumentにおいて実施した。脱パラフィン後、スライドを次のようにCC1を用いて標準的な細胞処理をした：スライドを100 で一連のCC1/液体カバースリップの13の再適用で処理し、その後、スライドを3分間冷却させ、反応バッファーにおいて3回すすいだ。タンパク質標的の同定のために、一次抗体を適切なスライドに加えた；乳房組織サンプルにウサギ抗Ki67(VMSI #790-4286)、ウサギ抗ER(SP1; VMSI #790-4325)、ウサギ抗PR(1E2, VMSI #790-4296)、ウサギ抗HER2(4B5, VMSI #790-2991)、扁桃組織にウサギ抗BCL2(VMSI #760-4240)を加え、液体カバースリップの適用後、スライドを16分間37 でインキュベートした。

【0158】

スライドを反応バッファーで2回洗浄した後、15 µg/mlのヤギ抗ウサギ組換えアルカリホスファターゼ(実施例3)をスライドに加え、その後、液体カバースリップで覆い、16分間37 でインキュベートした。次いで100 nMのウサギ抗ヤギ金ナノ粒子コンジュゲート(実施例1)を実施例4の通りに適用した。その後スライドを0.1 MのTris酢酸バッファー(pH 9.0)において2回洗浄し、次いで硝酸銀及びBCIPを適用し、液体カバースリップを再度適用し、スライドを更に16分インキュベートした。スライドを洗浄し、塩化金で金調色し、チオ硫酸ナトリウムで固定し(実施例10に示すサンプルを除く)、前述のようにヘマトキシリンIIで対比染色した。赤対比染色のために、nuclear Fast Red (VMSI #280-2119)を、適切なスライドに4分間インキュベートした。スライドを脱水し、カバースリップし、明視野顕微鏡による観察のために調整した。

【0159】

全てのサンプルは高質のシグナルを示したが、幾らかのバックグラウンドヘイズがあった(図10)。抗HER-2/neu、抗ER、抗Ki-67、及び抗PRをプロトコルにおいて一次抗体として使用し、金調色及び固定化工程を含んだ。特異的シグナルが、全ての一次抗体について観察された(図11)。金調色工程は、バックグラウンドヘイズを取り除き、シグナルを増強することによって、染色の質を著しく改善させた。

【0160】

新規なAP-銀検出システムをまた、低発現のPRを有する乳癌組織において評価した。新規なシステムを、一次抗体として抗PR(16)を使用して、iView^{T M} DAB検出キット(VMSI Cat. No. 760-091)と比較した。新規なシステムは、感知可能なバックグラウンド無く、より良い感受性を示した。

【0161】

最後に、新規なAP-銀検出システムを扁桃組織において評価した。新規なシステムを、一次抗体として抗Bcl-2を使用して、iView^{T M} DAB検出キットと比較した(図12)。Fast Red及びブルーイング/ヘマトキシリン対比染色の双方を、AP-銀検出システムと共に使用した。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 2 】

実施例 8

抗体-金-パラジウム合金ナノ粒子コンジュゲートを使用する免疫組織化学

免疫組織化学を、組織サンプルを 100 nM の AuNP-ウサギ抗ヤギ抗体コンジュゲート、100 nM の AuPdNP-ウサギ抗ヤギ抗体コンジュゲート、又は 50 nM の AuPdNP-ウサギ抗ヤギ抗体コンジュゲート、又は 10 nM の AuPdNP-ウサギ抗ヤギ抗体コンジュゲートでインキュベートした以外は実施例 7 の通りに実施した。100 nM 又は 50 nM の AuPdNP-抗体コンジュゲートを使用した染色は検出可能であったが、AuNP-抗体コンジュゲートを使用して得られたものほど強くなかった。検出可能な染色は、10 nM の AuPdNP-抗体コンジュゲートの使用では得られたなかった

10

【 0 1 6 3 】

実施例 9

例示的な免疫組織化学方法

この実施例は、抗体-ナノ粒子コンジュゲートの使用を含む開示の方法を使用する IHC の例示的な方法を提供する。方法の概要を図 1 A に示す。しかしながら、当業者は、これらの特定の方法から逸脱する方法も、抗体-ナノ粒子コンジュゲートを使用する IHC 方法を成功裏に実施するために使用できることを理解するだろう。

【 0 1 6 4 】

組織サンプルが IHC のために調整され、脱パラフィン及び抗原回復及び / 又はプロテアーゼ消化を含み、一般的な方法を使用する。サンプルを、標的タンパク質(例えば、HER2/neu)を特異的に結合する一次抗体、その後アルカリホスファターゼ(AP)コンジュゲート二次抗体(例えば、3つのAP分子にコンジュゲートされている二次抗体)に接触させる。サンプルを次いで、一又は複数の金ナノ粒子にコンジュゲートされている抗体と接触させる；抗体は二次抗体を特異的に結合するものである。サンプルを次いで、AP基質(例えばBCIP)、その後銀化合物(例えば、硝酸銀)と接触させる。サンプルを次いで、金調色(例えば、塩化金での処理)、その後還元剤(例えばチオ硫酸ナトリウム)でのシグナルの固定化で処理した。標的タンパク質は、金ナノ粒子の部位での銀原子の析出により形成される金属沈殿を検出することによって検出可能である。金属沈殿は、例えば、明視野顕微鏡によって検出可能であり、それは黒点として表れる。

20

【 0 1 6 5 】

実施例 10

例示的な In Situ ハイブリダイゼーション方法

この実施例は、抗体-ナノ粒子コンジュゲートの使用を含む開示の方法を使用する ISH の例示的な方法を提供する。方法の概要を図 1 B に示す。しかしながら、当業者は、これらの特定の方法から逸脱する方法も、抗体-ナノ粒子コンジュゲートを使用する ISH 方法を成功裏に実施するために使用できることを理解するだろう。

30

【 0 1 6 6 】

組織サンプルが ISH のために調整され、脱パラフィン及びプロテアーゼ消化を含み、一般的な方法を使用する。サンプルを、標的核酸分子(例えば、HER2/neu)を特異的に結合するハプテン標識プローブと接触させ、その後、適切なストリンジェンシー洗浄を行う。サンプルを次いで、ハプテン(例えば、ジニトロフェニル)を特異的に結合する一次抗体と接触させ、その後、アルカリホスファターゼ(AP)-コンジュゲート二次抗体(例えば、3つのAP分子にコンジュゲートされている二次抗体)と接触させる。サンプルを次に、一又は複数の金ナノ粒子にコンジュゲートされている抗体と接触させる；抗体は二次抗体に特異的に結合するものである。サンプルを次いで、AP基質(例えばBCIP)、その後銀化合物(例えば、硝酸銀)と接触させる。

40

【 0 1 6 7 】

サンプルを次いで、金調色(例えば、塩化金での処理)、次いでシグナルの増幅(例えば、銀化合物、例えば硝酸銀での処理によって)、そして還元剤(例えばチオ硫酸ナトリウム)でのシグナルの固定化に課した。標的核酸分子は、金ナノ粒子の部位での銀原子の析出

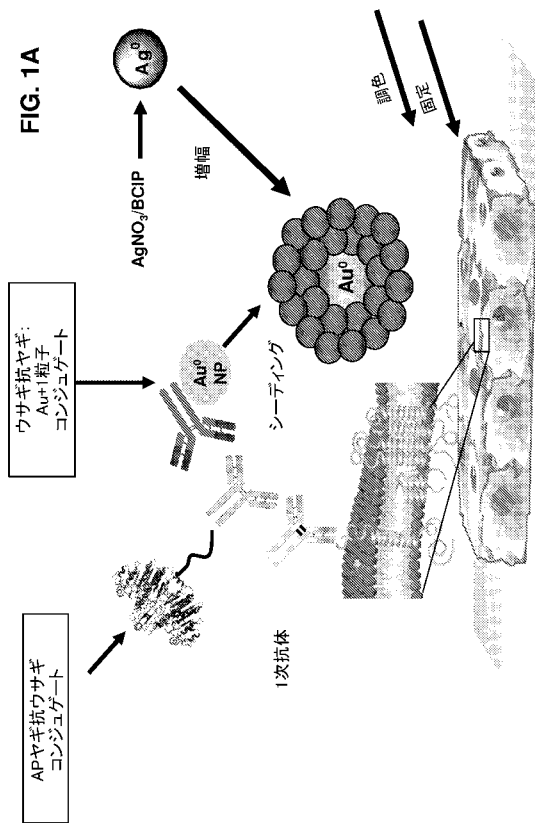
50

により形成される金属沈殿を検出することによって検出される。金属沈殿は、例えば、明視野顕微鏡によって検出可能であり、それは黒点として表れる。

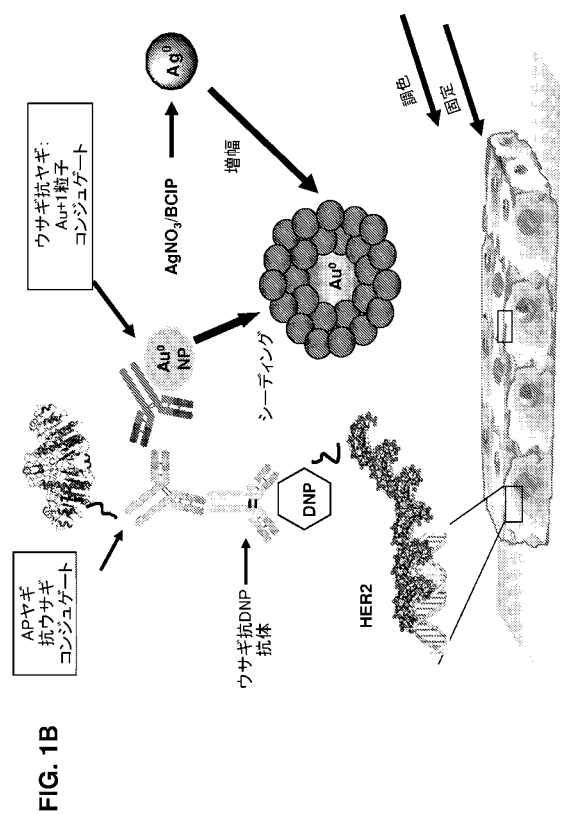
【0168】

開示の原理が適用されうる多くの可能な実施態様を考慮すると、説明した実施態様は例にすぎず、発明の範囲を制限するものとしてみなされるべきではないことが理解されるべきである。更に、発明の範囲は以下の請求の範囲によって定義される。我々はしたがって、これらの請求の範囲及び精神に該当する全てを、我々の発明として主張する。

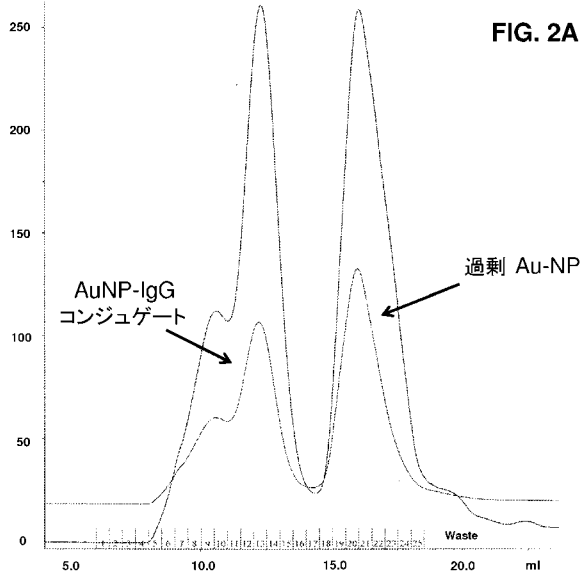
【図1A】



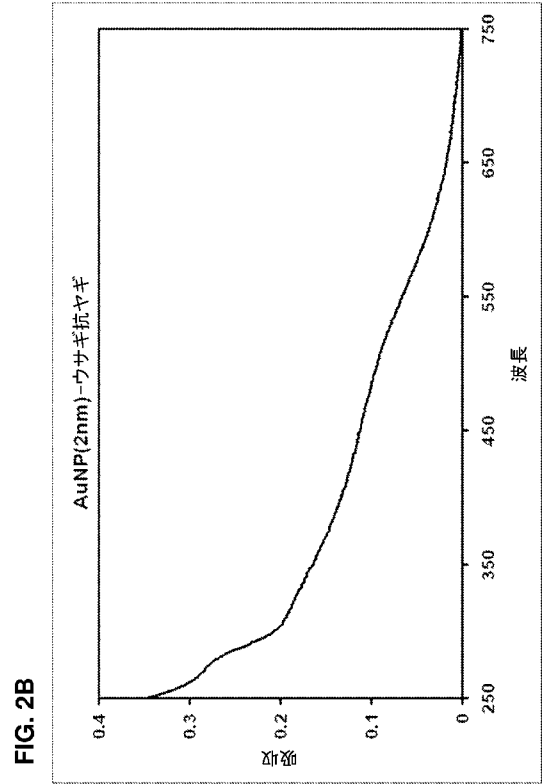
【図1B】



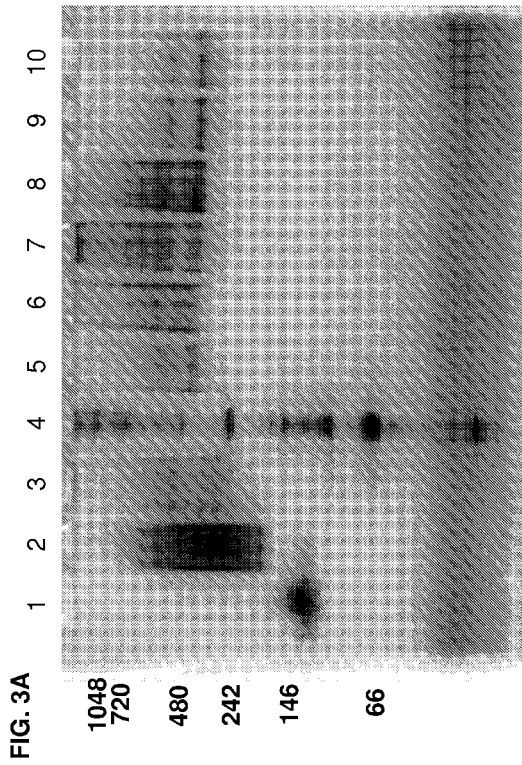
【 図 2 A 】



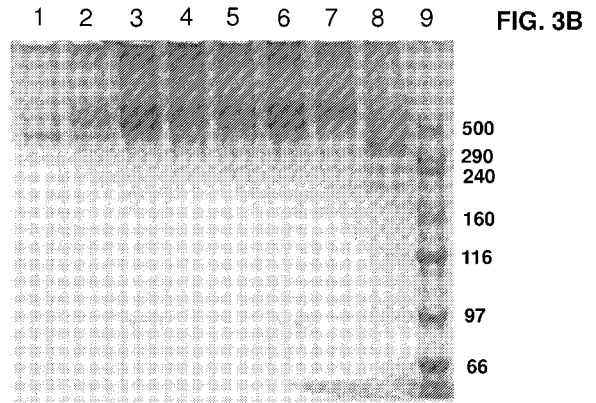
【 図 2 B 】



【 図 3 A 】



【 図 3 B 】



【 図 4 】

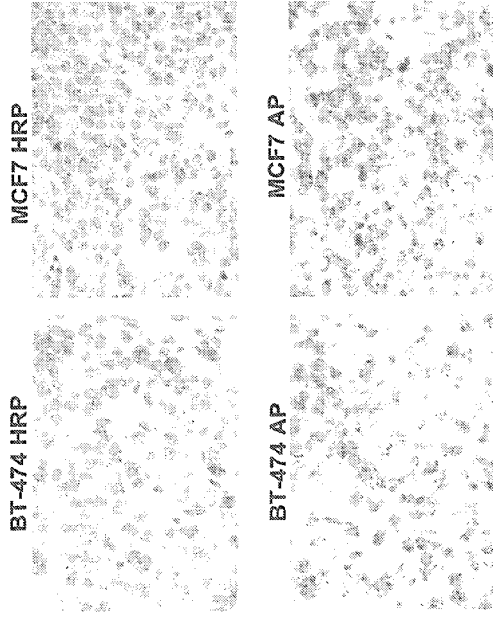


FIG. 4

【 図 5 】

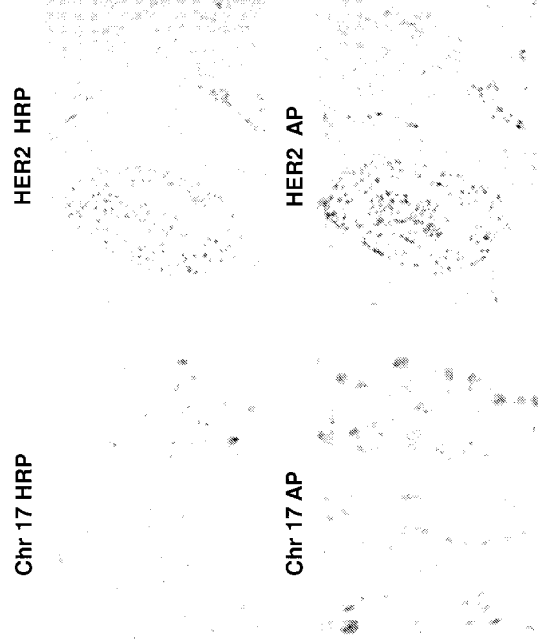


FIG. 5

【 図 6 】

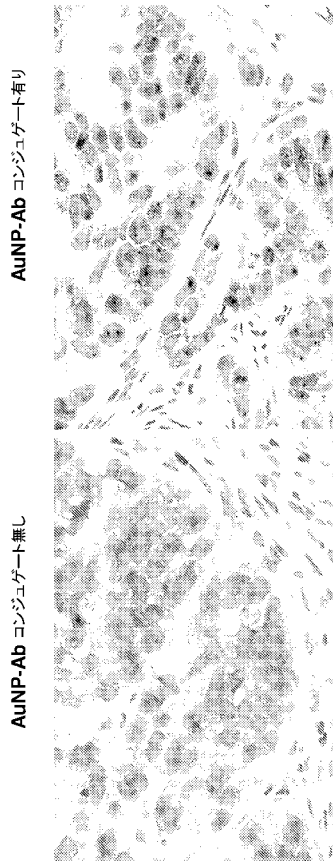


FIG. 6

【 図 7 A 】

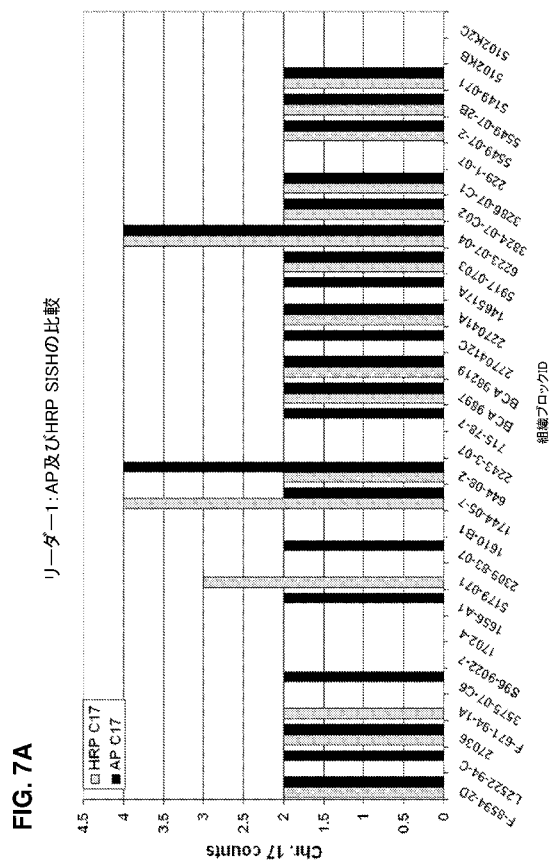
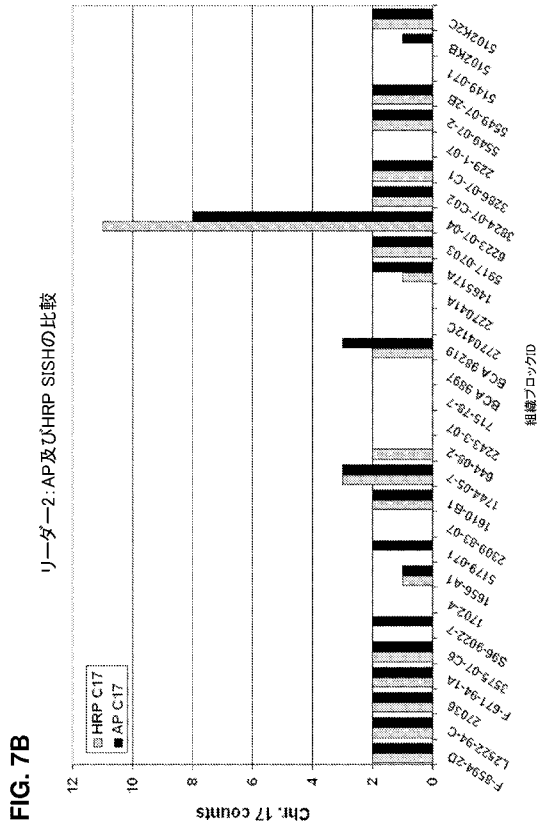
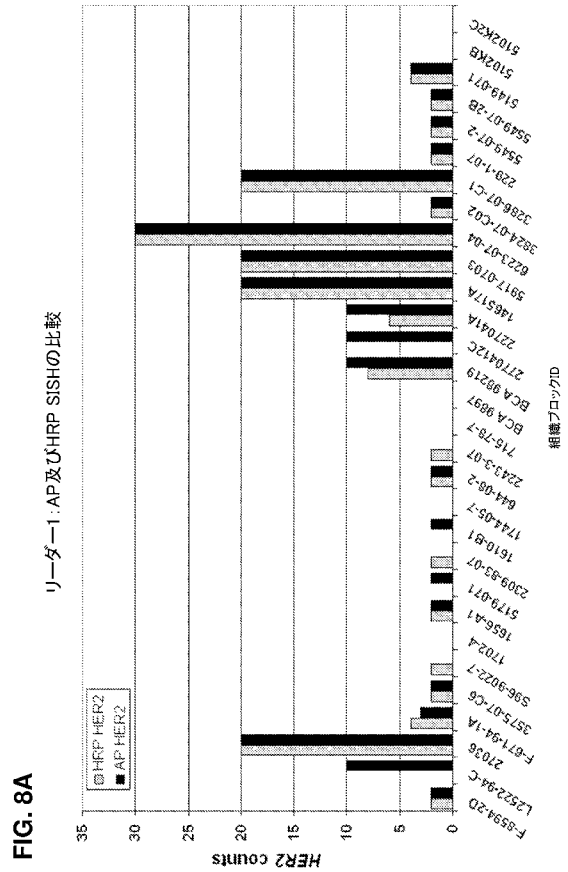


FIG. 7A

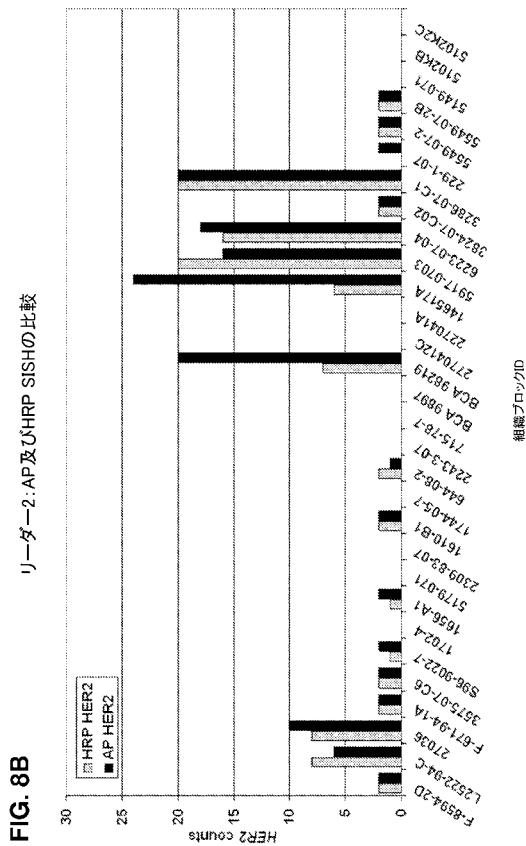
【 図 7 B 】



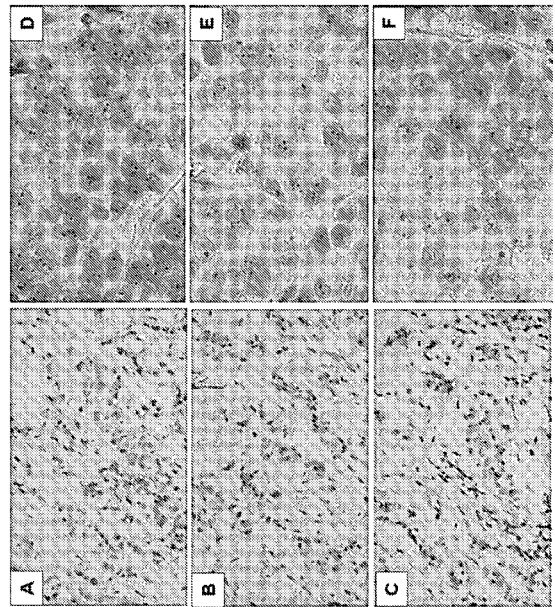
【 図 8 A 】



【 図 8 B 】



【 図 6 】



【 図 1 0 】



FIG. 10

【 図 1 1 】

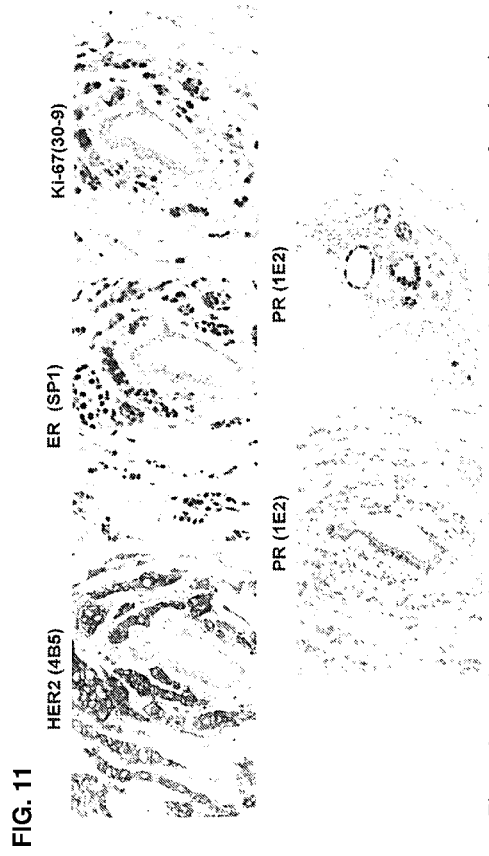
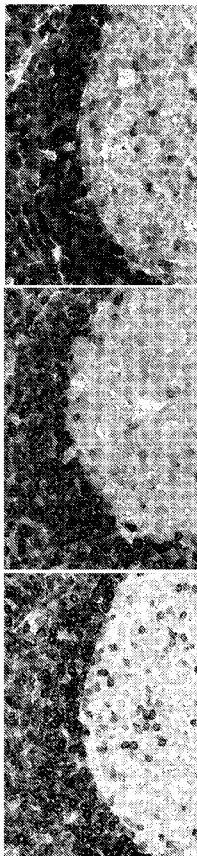


FIG. 11

【 図 1 2 】

FIG. 12



Bcl-2を用いる乳腺組織
 におけるUltraView/DAB
 (対比染色としてフルーイング
 及びヘマトキシリン)

Bcl-2を用いる乳腺組織
 におけるAP-銀
 (対比染色として
 Nuclear Fast Red)

Bcl-2を用いる乳腺組織
 におけるAP-銀
 (対比染色としてフルーイング
 及びヘマトキシリン)

【手続補正書】

【提出日】平成25年1月22日(2013.1.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

金属-チオール結合により抗体に直接結合されている2つ以上のナノ粒子を含んでなる抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項2】

コンジュゲートが2～7つのナノ粒子を含み、場合によってはコンジュゲートが5つのナノ粒子を含む請求項1に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項3】

金属-チオール結合の金属が、抗体のシステイン残基にコンジュゲートされている請求項1又は2に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項4】

抗体が抗体又は抗体断片を含む請求項1～3の何れか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項5】

抗体が、ウサギ、ヤギ、マウス、又は抗ハプテン抗体を含む請求項1～4の何れか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項6】

ナノ粒子が、金、パラジウム、白金、銀、銅、ニッケル、コバルト、イリジウム、又はその2つ以上の合金を含む請求項1～5の何れか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項7】

ナノ粒子が約5nm以下の直径であり、場合によってはナノ粒子が約0.5～5nmの直径である請求項1～6の何れか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項8】

サンプル中における標的分子を検出する方法であって、
サンプルを、標的分子に結合する第一抗体と接触させる工程、
サンプルを、一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている第二抗体と接触させる工程であって、酵素分子が、金属イオンをゼロ酸化状態の金属に還元可能な少なくとも一つの産物を産生可能であり、第二抗体が第一抗体に特異的に結合する工程、
サンプルを、第三抗体と接触させる工程であって、第三抗体が請求項1～7の何れか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲートであり、第二抗体に特異的に結合する工程、
サンプルを、酵素分子の基質及び金属イオンと接触させる工程であって、金属沈殿物が形成され、標的分子と共局在する工程、及び
金属沈殿物を検出し、それによって標的分子を検出する工程
を含んでなる方法。

【請求項9】

第二抗体がハプテンを更に含み、第三抗体が第二抗体のハプテンに特異的に結合する請求項8に記載の方法。

【請求項10】

標的分子が、標的分子に特異的に結合するハプテン標識核酸プローブを含み、第一抗体がハプテン標識核酸プローブを特異的に結合する請求項8又は9に記載の方法。

【請求項11】

金属イオンが銀イオン、金イオン、銅イオン、ニッケルイオン、白金イオン、パラジウ

ムイオン、コバルトイオン、又はイリジウムイオンを含む請求項 8 ~ 10 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 12】

サンプルをハロゲン化金塩と接触させることを含んでなり、場合によってはハロゲン化金塩が塩化金を含む請求項 8 ~ 11 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 13】

方法が、シグナルを増幅させる工程を更に含み、シグナルを増幅させる工程が、サンプルを銀塩と接触させる工程を含み、場合によっては銀塩が硝酸銀、酸化銀、酢酸銀、又は過塩素酸銀を含む請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

サンプルを還元剤に接触させる工程を更に含んでなり、場合によっては還元剤チオ硫酸ナトリウムを含む請求項 8 ~ 13 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 15】

第二抗体がヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G 抗体を含むか、3つのアルカリホスフェート分子にコンジュゲートされている請求項 8 ~ 14 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 16】

酵素がアルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -ラクタマーゼ、又はエステラーゼを含み、場合によっては酵素がアルカリホスファターゼであり、酵素の基質が5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート、アスコルビン酸ホスフェート、又はヒドロキノンホスフェート誘導体を含む請求項 8 ~ 15 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 17】

サンプル中における標的分子を検出する方法であって、

サンプルを、一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている第一抗体と接触される工程であって、酵素分子が、金属イオンをゼロ酸化状態の金属に還元可能な少なくとも一つの産物を産生可能であり、第一抗体が標的分子に結合する工程、

サンプルを、第二抗体と接触させる工程であって、第二抗体が、請求項 1 ~ 7 の何れか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲートであり、第一抗体に特異的に結合する工程

、
サンプルを酵素分子の基質及び金属イオンと接触させる工程であって、金属沈殿物が形成され、標的分子と共局在する工程、及び

金属沈殿物を検出し、それによって標的分子を検出する工程を含んでなる方法。

【請求項 18】

第一抗体がハプテンを含み、第二抗体が第一抗体のハプテンを特異的に結合する抗ハプテン抗体である請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

サンプル中における標的分子を検出するためのキットであって、

請求項 1 ~ 7 の何れか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲートである第一抗体、
一又は複数の酵素分子にコンジュゲートされている第二抗体であって、酵素分子が、金属イオンをゼロ酸化状態の金属に還元可能な少なくとも一つの産物を産生可能であり、第一抗体が第二抗体に特異的に結合する第二抗体、及び

一又は複数の酵素分子の基質及び金属イオンを含んでなる一又は複数の容器を含んでなるキット。

【請求項 20】

ハロゲン化金を更に含んでなり、場合によってはハロゲン化金が塩化金を含む請求項 19 に記載のキット。

【請求項 21】

銀塩を更に含んでなり、場合によっては銀塩が硝酸銀、酸化銀、又は塩化銀を含む請求項 19 又は 20 に記載のキット。

【請求項 2 2】

還元剤を更に含んでなり、場合によっては還元剤がチオ硫酸ナトリウムを含む請求項 1 9 ~ 2 1 の何れか一項に記載のキット。

【請求項 2 3】

標的分子を特異的に結合する第三抗体を更に含んでなり、第二抗体が第三抗体に特異的に結合する請求項 1 9 ~ 2 2 の何れか一項に記載のキット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2011/034190

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	G01N33/531	G01N33/68
	C07F1/00	C07F9/12
		G01N33/58
		C07F9/50
		C07F9/572
		C07F9/655
		G01N33/543
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
G01N C07F		
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 practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 360 895 A (HAINFELD JAMES F [US] ET AL) 1 November 1994 (1994-11-01)	1-20,23,25,26,29,31
Y	figures 1,3-4; examples 2,7,9,10,8,13	54,55
X	WO 03/075961 A2 (HAINFELD JAMES [US]; SLATKIN DANIEL [US]) 18 September 2003 (2003-09-18) page 17, line 20 - page 18, line 8; example 4	1-9,18,31
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but 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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
2 February 2012		17/02/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vadot-Van Geldre, E

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/034190**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/034190

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	I-IM S LIM ET AL: "Gold and magnetic oxide/gold core/shell nanoparticles as bio-functional nanoprobos", NANOTECHNOLOGY, IOP, BRISTOL, GB, vol. 19, no. 30, 30 July 2008 (2008-07-30), page 305102, XP020136775, ISSN: 0957-4484 figure 5 -----	1-9,18,31
X	WO 2004/002508 A1 (OREGON STATE [US]; HUTCHISON JAMES E [US]) 8 January 2004 (2004-01-08) page 20, lines 4-27 page 30, lines 7-20 -----	1-9,18,31
X	EP 1 741 717 A1 (IMEC INTER UNI MICRO ELECTR [BE]) 10 January 2007 (2007-01-10) paragraphs [0046] - [0047]; claim 2; examples 1-3 -----	1-12,15,18-22,25-29,31
X	US 2007/269594 A1 (ACKERSON CHRISTOPHER J [US] ET AL) 22 November 2007 (2007-11-22) paragraphs [0027], [0052]; claim 9 -----	1-9,31
X	WO 02/07846 A1 (HAINFELD JAMES F [US]) 31 January 2002 (2002-01-31) example 5 -----	1-7,31
Y	YANG X Y ET AL: "Ultrasensitive enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of alpha-fetoprotein amplified by double-codified gold nanoparticles labels", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 24, no. 8, 15 April 2009 (2009-04-15), pages 2707-2711, XP026031427, ISSN: 0956-5663, DOI: 10.1016/J.BIOS.2008.12.009 [retrieved on 2008-12-11] figure 1 -----	54,55
X	US 2004/265922 A1 (BIENIARZ CHRISTOPHER [US] ET AL) 30 December 2004 (2004-12-30) paragraphs [0075], [0082], [0084] ----- -/--	32,34,36-43,48-50,52,56-58,64,65,67-74,76

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/034190

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>QU B ET AL: "A novel electrochemical immunosensor based on colabeled silica nanoparticles for determination of total prostate specific antigen in human serum", TALANTA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 76, no. 4, 15 August 2008 (2008-08-15), pages 785-790, XP023178156, ISSN: 0039-9140, DOI: 10.1016/J.TALANTA.2008.04.026 [retrieved on 2008-04-20] abstract scheme 1 ; pg 787, para 2.5</p> <p>-----</p>	<p>32,36, 37, 39-43, 48-50, 52, 56-58, 64-69, 72-74,76</p>
X	<p>CAO CUONG ET AL: "Signal enhancement of surface plasmon resonance immunoassay using enzyme precipitation-functionalized gold nanoparticles: A femto molar level measurement of anti-glutamic acid decarboxylase antibody", April 2007 (2007-04), BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, VOL. 22, NR. 9-10, PAGE(S) 1874-1880, XP002668674, ISSN: 0956-5663 abstract; figure 4 pg 1875, col 1, para bridging col 2 ; pg 1876, col 2, para bridging pg 1877 ; pg 1877, col 2, para 3.1</p> <p>-----</p>	<p>32,36, 37,40, 43,45, 48,52, 56-60, 64,67, 68,74</p>
X	<p>US 2008/318249 A1 (POWELL RICHARD D [US] ET AL) 25 December 2008 (2008-12-25) paragraphs [0004], [0006], [0036], [0042] - [0044]; claims 1,6-7,11; figures</p> <p>-----</p>	<p>32-53, 56-76</p>
A	<p>POWELL ET AL: "Metallographic in situ hybridization", HUMAN PATHOLOGY, SAUNDERS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 38, no. 8, 16 July 2007 (2007-07-16), pages 1145-1159, XP022154435, ISSN: 0046-8177, DOI: 10.1016/J.HUMPATH.2007.05.004 abstract</p> <p>-----</p>	<p>32-53, 56-76</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/034190

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5360895	A	01-11-1994	NONE	
WO 03075961	A2	18-09-2003	AU 2002351240 A1 WO 03075961 A2	22-09-2003 18-09-2003
WO 2004002508	A1	08-01-2004	AU 2003258972 A1 WO 2004002508 A1	19-01-2004 08-01-2004
EP 1741717	A1	10-01-2007	AT 421968 T EP 1741717 A1	15-02-2009 10-01-2007
US 2007269594	A1	22-11-2007	US 2007269594 A1 WO 2008054471 A2	22-11-2007 08-05-2008
WO 0207846	A1	31-01-2002	CA 2416526 A1 EP 1301126 A1 JP 2004504363 A WO 0207846 A1	31-01-2002 16-04-2003 12-02-2004 31-01-2002
US 2004265922	A1	30-12-2004	US 2004265922 A1 US 2005100976 A1 US 2010105566 A1	30-12-2004 12-05-2005 29-04-2010
US 2008318249	A1	25-12-2008	EP 2269065 A2 US 2008318249 A1 WO 2009134327 A2	05-01-2011 25-12-2008 05-11-2009

International Application No. PCT/ US2011/ 034190

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-31, 54, 55

antibody-nanoparticle conjugates wherein the nanoparticle is directly bound to the antibody through a metal-thiol bond, as well as their use

2. claims: 32-53, 56-76

method for detecting target molecules in a sample comprising the use of an antibody-nanoparticle conjugate, an antibody-enzyme conjugate (eg. alkaline phosphatase) and detecting a metal precipitate.

フロントページの続き

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

(72) 発明者 ユン, チョル, スティーヴン
アメリカ合衆国 アリゾナ 85739, ツーソン, ノース カプリオール ドライヴ 14
890

(72) 発明者 ジリナ, ジャンナ
アメリカ合衆国 アリゾナ 85743, ツーソン, ウェスト クリア キャニオン ドライ
ブ 7286

(72) 発明者 ムリーリョ, エイドリアン, イー.
アメリカ合衆国 アリゾナ 85739, ツーソン, サウス ファーロン コート 3894
3

(72) 発明者 ジョンソン, ドナルド, ディー.
アメリカ合衆国 アリゾナ 85755, オロ ヴァレー, ウェスト ブルー クレスト ド
ライブ 1004

(72) 発明者 ファレル, マイケル
アメリカ合衆国 アリゾナ 85704, ツーソン, ブラシータ デル カード 8662

(72) 発明者 コスメダー, ジェローム, ダブリュ.
アメリカ合衆国 アリゾナ 85750, ツーソン, ノース モカシン トレイル 5330

(72) 発明者 ビーニアツ, クリストファー
アメリカ合衆国 アリゾナ 85718, ツーソン, イースト クワイエット キャニオン
ドライブ 2663

专利名称(译)	抗体 - 纳米颗粒缀合物和制备和使用此类缀合物的方法		
公开(公告)号	JP2013525800A	公开(公告)日	2013-06-20
申请号	JP2013508223	申请日	2011-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	文塔纳医疗系统公司		
申请(专利权)人(译)	本塔纳医疗系统, 墨水.		
[标]发明人	アシュワースシャープジュリア ユン Chol スティーヴン ジリナジャンナ ムリーリオエイドリアンイー ジョンソンドナルドディー ファレルマイケル コスメダージェロームダブリュ ビーニアーツクリストファー		
发明人	アシュワース-シャープ, ジュリア ユン, チョル, スティーヴン ジリナ, ジャンナ ムリーリオ, エイドリアン, イー. ジョンソン, ドナルド, ディー. ファレル, マイケル コスメダー, ジェローム, ダブリュ. ビーニアーツ, クリストファー		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/531 G01N33/542		
CPC分类号	G01N33/54346 C07F9/12 C07F9/5004 C07F9/5022 C07F9/5045 C07F9/5728 C07F9/65515 C07F9/65517 C07F9/65522 G01N33/531 G01N33/553 G01N33/587 G01N33/6854 G01N2333/916		
FI分类号	G01N33/532.A G01N33/531.A G01N33/542.B G01N33/542.Z		
优先权	61/328494 2010-04-27 US		
其他公开文献	JP5619274B2 JP2013525800A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了抗体 - 纳米颗粒缀合物, 其包含与抗体或其片段直接连接的两种或更多种纳米颗粒 (例如金, 钯, 铂, 银, 铜, 镍, 钴, 铀或其两种或更多种的合金)。金属硫醇键。制备本文公开的抗体 - 纳米颗粒缀合物的方法包括使芳基膦 - 纳米颗粒复合物与还原的抗体反应以产生抗体 - 纳米颗粒缀合物。本文还公开了用于检测样品中的靶分子的方法, 其包括使用抗体 - 纳米颗粒缀合物 (例如本文所述的抗体 - 纳米颗粒缀合物) 和利用本文公开的方法检测靶分子的试剂盒。

