

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 502670

(P2003 - 502670A)

(43)公表日 平成15年1月21日(2003.1.21)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/543	575	G 0 1 N 33/543	575 2 G 0 4 5
	521		521 2 G 0 5 4
C 1 2 M 1/34		C 1 2 M 1/34	E 4 B 0 2 4
			Z 4 B 0 2 9
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/66	4 B 0 6 3
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 42数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 505193(P2001 - 505193)

(86)(22)出願日 平成12年6月15日(2000.6.15)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月17日(2001.12.17)

(86)国際出願番号 PCT/CA00/00718

(87)国際公開番号 W000/079276

(87)国際公開日 平成12年12月28日(2000.12.28)

(31)優先権主張番号 60/139,941

(32)優先日 平成11年6月18日(1999.6.18)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 カージオジェニックス, インコーポレイ
テッド
カナダ国 エム8ゼット 1ジェイ7 オンタ
リオ, トロント, エバンズ アベニュー
208, スイート 214

(72)発明者 ガワド, ヤヒア
カナダ国 エル4ダブリュー 2エックス3
オンタリオ, ミシソーガ, ラスパーン
アベニュー 2121, アpartment 11
10

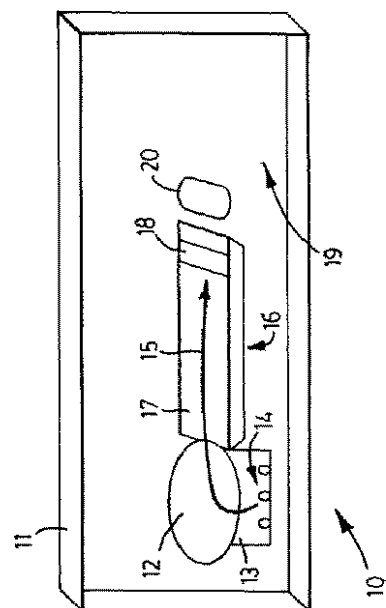
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 化学発光結合アッセイを実施するための方法

(57)【要約】

標的分析物を含むかまたは含むことが疑われる溶液の、
レセプター - リガンド結合反応を実施するための方法。
この方法は、第一の結合パートナーを常磁性粒子の表面
上に結合させる工程、第二の結合パートナーをカルシウ
ム感受性発光化合物に結合体化させる工程；この第一の
結合パートナーおよびこの第二の結合パートナーを試験
される溶液と接触させる工程、ストレプトアビジンおよ
びケージされたカルシウム化合物を含む横断ストライプ
を有する捕獲ストリップに沿って常磁性粒子を固定する
工程、この横断ストライプを紫外線のパルスに露出させ
てケージされたカルシウム化合物からのカルシウムの放
出を引き起こす工程、およびカルシウム感受性発光材料
によって放出された発光を測定する工程を包含する。こ
の方法は、血液試験に使用され得る。装置がまた、開示
される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 溶液中の分析物の存在を検出するための結合アッセイを実施するための方法であって、以下の工程：

(a) 第一の結合パートナーを該溶液と接触させる工程であって、該第一の結合パートナーは、カルシウム感受性化学発光材料に結合体化されている、工程；

(b) ある期間の後に、該第一の結合パートナーを、捕獲ストリップの細長マトリックスの片側に沿う所定の方向で、該第一の結合パートナーが該捕獲ストリップ上に横に配置されたストライプと接触するように移動させる工程であって、該横断ストライプは、第二の結合パートナーを固定し、そしてカルシウムケージング化合物を含む、工程、

(c) 該第一の結合パートナーが該横断ストライプ上に固定された該第二の結合パートナーと接触するに十分な期間を許容する工程、

(d) 該捕獲ストリップの該横断ストライプを、紫外線のパルスに露出させて該ケージされたカルシウム化合物からのカルシウムの放出を引き起こす工程；および

(e) 該カルシウム感受性発光材料によって放出された発光を測定する工程、を包含する、方法。

【請求項2】 溶液中の分析物の存在を検出するための結合アッセイを実施するための、請求項1に記載の方法であって、以下の工程：

(a) 該溶液を結合反応の第一の結合パートナーと接触させる工程であって、該第一の結合パートナーは、固体表面上に固定され、該固体表面は、常磁性粒子であり、そして、該第一の結合パートナーは、カルシウム感受性発光材料に結合体化されている、工程；

(b) ある期間の後に、該常磁性粒子を、捕獲ストリップの細長マトリックスの片側に沿う所定の方向で、該粒子が該捕獲ストリップ上に横に配置された第二の結合パートナーのストライプと接触するように移動させる工程であって、該捕獲ストリップは、該横断ストライプ上に固定された該第二の結合パートナーを有し、該横断ストライプは、カルシウムケージング化合物をさらに含む、工程、

(c) 該常磁性粒子が該横断ストライプ上に固定された該第二の結合パートナ

ーと接触するに十分な期間を許容する工程、

(d) 該捕獲ストリップの該横断ストライプを、紫外線のパルスに露出させて該カルシウムケージング化合物からのカルシウムの放出を引き起こす工程；および

(e) 該カルシウム感受性発光材料によって放出された発光を測定する工程、を包含する、方法。

【請求項3】 請求項2に記載の方法であって、ここで、該方法は、抗原を検出および定量するためのイムノアッセイ、抗体を検出および定量するためのイムノアッセイ、または特定の配列の核酸を検出および定量するための核酸ハイブリダイゼーションアッセイである、方法。

【請求項4】 工程(a)においてカルシウム感受性発光材料と接触させる前に、前記溶液が、前処理される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 前記溶液が、カルシウムを除去するために濾過され、該フィルターが、カルシウム除去のための薬剤を含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 請求項1～5のいずれか1項に記載の方法であって、前記溶液が、全血であり、該全血は、前記カルシウム感受性発光材料と接触させる前に濾過によって前処理される、方法。

【請求項7】 請求項1～6のいずれか1項に記載の方法であって、前記カルシウム感受性発光材料が、エクオリン、オベイン、ニミオブシン、ペロピン、フォラシン、ルシフェラーゼまたは漂泳生物、ウミホタルおよび貝虫亜綱から単離された発光タンパク質である、方法。

【請求項8】 請求項1～7のいずれか1項に記載の方法であって、前記紫外線が、250～400nmの範囲の光の、パルスの形態であり、そして、前記発光が、光電子増倍管によって測定される、方法。

【請求項9】 請求項8に記載の方法であって、ここで、前記カルシウム感受性発光材料がエクオリンであり、そして、前記光電子増倍管が、400～600nmの光を検出しかつ磁場から保護されている、方法。

【請求項10】 請求項1～9のいずれか1項に記載の方法であって、ここで、前記細長捕獲ストリップが、ニトロセルロース、ポリアクリルアミド、また

は任意の他の天然もしくは合成のポリマーから形成される、方法。

【請求項11】 請求項10に記載の方法であって、前記細長捕獲ストリップが、固定された第二の結合パートナーを有する横断ストライプを有し、そして、カルシウムケージング化合物で含浸されている、方法。

【請求項12】 請求項1～11のいずれか1項に記載の方法であって、ここで、前記カルシウムケージング化合物が、前記カルシウム感受性発光材料に対して、過剰な化学量論量のカルシウムでロードされる、方法。

【請求項13】 請求項1～12のいずれか1項に記載の方法であって、ここで、前記カルシウムケージング化合物が、シス-1-(2-ビス(カルボキシメチル)アミノ-5-(1-ヒドロキシ-1-(2-ニトロ-4,5-メチレンジオキシフェニル)メチル)フェノキシ)-2-(2-ビス(カルボキシメチル)アミノ-5-メチルフェノキシ)シクロペンタン、1-[2-アミノ-5-(1-ヒドロキシ-1-[2-ニトロ-4,5-メチレンジオキシフェニル]メチル)フェノキシ]-2-)-2'-アミノ-5'-メチルフェノキシ)エタン-N,N,N',N'-四酢酸、1-(4,5ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-1,2ジアミノエタン-N,N,N',N'-四酢酸、およびニトロフェニル-エチレンビス(オキシエチレンニトリロ)四酢酸からなる群より選択される、方法。

【請求項14】 抗原を検出および定量するためのイムノアッセイである、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】 抗体を検出および定量するためのイムノアッセイである、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】 前記結合アッセイが、特定の配列の核酸を検出および定量するための核酸ハイブリダイゼーションアッセイである、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】 前記カルシウム感受性発光材料がエクオリンである、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】 前記紫外光源が、250～400nmの範囲のパルス光を放出する、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】 前記発光が、光電子増倍管によって測定される、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】 請求項1～19のいずれか1項に記載の方法であって、ここで、前記カルシウム感受性発光材料がエクオリンであり、そして、前記光電子増倍管が、400～600nmの光を検出しかつ磁場から保護されている、方法。

【請求項21】 溶液中の分析物の存在を検出するための結合アッセイを実施するための方法であって、以下の工程：

(a) 結合反応の第一の結合パートナーを固体表面上に固定する工程であって、該固体表面が、常磁性粒子であり、該第一の結合パートナーがビオチン化されている、工程；

(b) 該第一の結合パートナーを該溶液と接触させる工程；

(c) 該溶液を第二の結合パートナーと接触させる工程であって、該第二の結合パートナーは、カルシウム感受性発光材料に結合体化されている、工程；

(d) ある期間の後に、該常磁性粒子を、捕獲ストリップの細長マトリックスの片側に沿う所定の方向で、該粒子が該捕獲ストリップ上に横に配置されたストライプと接触するように移動させる工程であって、該捕獲ストリップは、該横断ストライプ上に固定されたストレプトアビジンを有し、該横断ストライプは、カルシウムケージング化合物をさらに含む、工程、

(e) 該常磁性粒子が該横断ストライプ上に固定された該ストレプトアビジンと接触するに十分な期間を許容する工程、

(f) 該捕獲ストリップの該横断ストライプを、紫外線のパルスに露出させて該カルシウムケージング化合物からのカルシウムの放出を引き起こす工程；および

(g) 該カルシウム感受性発光材料によって放出された発光を測定する工程、を包含する、方法。

【請求項22】 工程(b)および(c)が、同時に実行される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 溶液中の分析物の存在を検出するための結合アッセイを実

施するための方法であって、以下の工程：

(a) 第一の結合パートナーを該溶液と接触させる工程であって、該第一の結合パートナーがビオチン化されている、工程；

(b) ある期間の後に、該溶液を、第二の結合パートナーと接触させる工程であって、該第二の結合パートナーが、カルシウム感受性発光材料と結合体化されている、工程；

(c) さらにある期間の後に、該結合パートナーを、捕獲ストリップの細長マトリックスの片側に沿う所定の方向で、該結合パートナーが該捕獲ストリップ上に横に配置されたストライプと接触するように移動させる工程であって、該捕獲ストリップは、該横断ストライプ上に固定されたストレプトアビジンを有し、該横断ストライプは、カルシウムケージング化合物をさらに含む、工程、

(d) 該結合パートナーが該横断ストライプ上に固定された該ストレプトアビジンと接触するに十分な期間を許容する工程、

(e) 該捕獲ストリップの該横断ストライプを、紫外線のパルスに露出させて該カルシウムケージング化合物からのカルシウムの放出を引き起こす工程；および

(f) 該カルシウム感受性発光材料によって放出された発光を測定する工程、を包含する、方法。

【請求項24】 工程(a)および(b)を同時に実行する、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 請求項21～24のいずれか1項に記載の方法であって、前記細長捕獲ストリップが、ストレプトアビジンおよびカルシウムケージング化合物が浸透した横断区分を有する、方法。

【請求項26】 請求項1～25のいずれか1項に記載の方法であって、前記紫外線のパルスおよび前記化学発光の検出が、時間分解様式で実行される、方法。

【請求項27】 請求項1～26のいずれか1項に記載の方法であって、紫外線のパルスの前に、前記溶液が、20ナノモル濃度よりも少ないカルシウムを含む、方法。

【請求項28】 結合アッセイのための細長捕獲ストリップであって、該捕獲ストリップが、ストレプトアビジンおよびカルシウムケーシング化合物が浸透した横断区分を有する、細長捕獲ストリップ。

【請求項29】 請求項28に記載の細長捕獲ストリップであって、ここで、該捕獲ストリップは、ニトロセルロース、ポリアクリルアミド、ポリアミド、または任意の他の合成もしくは天然に存在するポリマーから形成される、細長捕獲ストリップ。

【請求項30】 前記捕獲ストリップが、ハウジング内である、請求項28または29に記載の細長捕獲ストリップ。

【請求項31】 前記捕獲ストリップが、単回使用の試験カートリッジとして支持体内に格納される、請求項30に記載の細長捕獲ストリップ。

【請求項32】 請求項28～31のいずれか1項に記載の細長捕獲ストリップであって、ここで、カルシウムケーシング化合物が、シス-1-(2-ビス(カルボキシメチル)アミノ-5-(1-ヒドロキシ-1-(2-ニトロ-4,5-メチレンジオキシフェニル)メチル)フェノキシ)-2-(2-ビス(カルボキシメチル)アミノ-5-メチルフェノキシ)シクロペンタン、1-[2-アミノ-5-(1-ヒドロキシ-1-[2-ニトロ-4,5-メチレンジオキシフェニル]メチル)フェノキシ]-2-)2'-アミノ-5'メチルフェノキシ)エタン-N,N,N',N'-四酢酸、1-(4,5ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-1,2ジアミノエタン-N,N,N',N'-四酢酸、およびニトロフェニル-エチレンビス(オキシエチレンニトリロ)四酢酸からなる群より選択される、細長捕獲ストリップ。

【請求項33】 溶液中の分析物の存在を検出するための結合アッセイを実施するためのプラスチックカートリッジであって、以下：

サンプルを受けるためのレセプタクルを備えるハウジング、常磁性粒子上に固定されたビオチン化された第一の結合パートナーおよびカルシウム感受性化学発光材料に結合体化された第二の結合パートナーを備えるレザーバ、該ハウジング内でありかつ該レザーバと流体連絡している細長捕獲ストリップを備え、該捕獲ストリップは、カルシウムケーシング化合物およびストレプトアビジンで浸透され

た横断区分を有し、該横断区分は、光バリアで保護されている、プラスチックカートリッジ。

【請求項34】 前記レセプタクルと前記レザーバとの間にフィルターが存在する、請求項33に記載のプラスチックカートリッジ。

【請求項35】 カルシウム除去のための薬剤を含むフィルターが存在する、請求項33に記載のプラスチックカートリッジ。

【請求項36】 請求項33～35のいずれか1項に記載のプラスチックカートリッジであって、ここで、前記カルシウム感受性化学発光材料がエクオリン、オベイン、ニミオブシン、ベロビン、フォラシン、ルシフェラーゼ、または漂泳生物、ウミホタルおよび貝虫亜綱から単離された発光タンパク質である、プラスチックカートリッジ。

【請求項37】 結合アッセイを実施するための装置であって、(a)請求項33～36のいずれか1項に記載のプラスチックカートリッジを受けるための容器；(b)横断ストライプ上の光保護層を除去するための手段；(c)磁場を提供するための電磁石；(e)前記捕獲ストリップの予め選択された部分に光を投射するための紫外光源、および(f)該捕獲ストリップの該予め選択された部分によって放出される光を受けるように配置される光電子増倍管、を含むハウジングを備える、装置。

【請求項38】 前記電磁石が、前記プラスチックカートリッジに沿って複数の磁場を投射する、請求項37に記載の装置。

【請求項39】 前記紫外光源が、250～400nmの範囲の光を提供する、請求項37または38に記載の装置。

【請求項40】 前記光電子増倍管が、400～600nmの範囲の光を検出する、請求項37～39のいずれか1項に記載の装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、結合アッセイを実施するための方法に関し、そして特に、医療の点における(P o i n t O f C a r e)(P O C)デバイスまたは自動分析器において実施され得る、イムノアッセイ法に関する。

【0002】**(発明の背景)**

種々の体液中の生体分子(分析物)を検出および定量することに対する現在進行中の必要性は、異なる分析物の広範囲のスペクトルを測定するために適合され得る、新たな、かつより正確な分析技術の採用をもたらした。これらの検出方法の多くは、近年、臨床的な診断の分野へ導入されてきた。現在、容易にかつ正確に決定され得る種々の分析物、および決定のための方法の両方における、広い拡張が、望まれている。しかし、液体中の低濃度の分析物の存在を検出するため(特に、分析物が体液中に非常に低濃度で存在し得る場合)の、好都合な、信頼できる、危険のない、高感度の、そして技術的にさほど挑戦的ではない方法が、依然として望まれる。

【0003】

流体サンプル中の生物学的起源の材料の検出および定量のためのいくつかの方法が、現在使用されている。生物分析アッセイ(例えば、イムノアッセイおよび核酸ハイブリダイゼーションアッセイ(これらは、リガンドと、特定の結合対の1つ以上のメンバーとの間の特異的な結合に基づく))は、目的の分析物(例えば、サンプルの化学的構成成分または物質)の存在および量を決定するために、広く使用される。特に、イムノアッセイは、臨床試験室において広範に使用される、検出および定量の方法である。

【0004】

サンドイッチイムノアッセイの代表的な手順において、特定の抗原に対する抗体(捕捉抗体として公知)が、固体表面に固定される。調査中のサンプルが、サンプル中の抗原が捕捉抗体に結合することを可能にする条件下で、この固体表面

と接触される。検出抗体として公知である、別の抗体が、添加される。直接的なイムノアッセイ形式においては、検出抗体は、検出抗体の量が定量されることを可能にするシグナル生成機構と直接結合体化される。間接的な形式においては、検出抗体の抗原への結合の後に、検出抗体に対する別の抗体、または検出抗体が関与する別の特異的結合反応が、利用される。このいわゆる抗検出抗体が、シグナル生成機構と直接結合体化される。この結合反応、および従ってサンプル中の抗原レベルは、シグナル生成機構により生じるシグナルを定量することによって、定量される。

【0005】

いくつかの型の標識材料が、レセプター - リガンド結合アッセイにおいて、シグナル生成のために利用されてきた。放射性原子（例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H および ^{14}C ）が、通常、標識として利用された。イムノアッセイのための放射性標識は、感受性であるが、これらは、共通して認識される欠点（安全性、および比較的短い試薬の有効期間を生じるストリンジェントな調節要件が挙げられる）を被る。いくつかの代替の標識方法は、現在、結合バイオアッセイ（比色定量酵素反応、蛍光反応および化学発光反応が挙げられる）において利用されている。標識として通常利用される酵素は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、B - ガラクトシダーゼおよびグルコースオキシダーゼである。酵素は、非常に安定であり、そして特別の設備および計装を必要としない点で、放射性標識より優れた利点を有するが、酵素イムノアッセイは、一般に、より遅く、労力がかかり、そして低感度である。発光標識（蛍光標識および化学発光標識が挙げられる）は、放射性標識または酵素標識の代替として、利用されてきた。なぜなら、発光標識は、放射性標識の利点である使用の容易さと、酵素の利点である試薬安定性とを有するからである。蛍光検出は、より広範な種々の酵素とともに、使用され得る。しかし、特異的シグナルと非特異的シグナルとの間の区別における従来の蛍光検出の困難性、および従って実際のアッセイ検出限界に起因して、蛍光アッセイは、放射性標識または酵素標識のいずれかの感度を欠き、このことは、蛍光アッセイを、研究と臨床的適用との両方に対して、めったに選択されないアッセイ法にしている。

【0006】

シグナル生成の標識としての、化学発光反応は、最も高感度であり、そして数十年間、存在している。DNA技術における近年の進歩は、シグナルジェネレーターとしてのこれらの標識の利用を拡張させてきたが、化学発光生成物を形成する公知の反応の数が制限されているので、発光アッセイ法が、現在、利用されている。また、発光反応は、1つ以上の化学的活性化工程を必要とし、そしてこれらの反応の自動化は困難であるが、必要とされる計装は、蛍光ほどには複雑ではない。種々の形式および大きさの、多数の発光測定器、すなわち照度計が、利用可能である場合でさえも、発光の自動化は複雑であり、そして結合アッセイを実施するために完全に自動化された照度計は、少なくとも簡便な小型の分析器においては、利用可能ではない。

【0007】

結合アッセイにおけるシグナル生成のための標識として利用される、最も通常の発光方法は、化学発光である。これは、発光シグナル、すなわち、化学発光標識および生物発光標識を生じるために利用される方法に従って、分類され得る。生物発光とは、生物学的分子による光の放出をいい、そして真の酵素であり得る生物発光タンパク質を利用する。例は、ルシフェラーゼ（これは、オキシルシフェリンの放出および発光を伴って、ルシフェリンの酸化を触媒する）および発光タンパク質（これは、ルシフェリンの酸化を触媒して光を放出するが、酸化された物質を放出しない）である。

【0008】

カルシウム感受性発光タンパク質（エクオリン、オベイン（Obelin）、ニミオプシン（Mnemioopsin）、ベロビン（Berovinn）、フォラシン（Pholasin）、ルシフェラーゼ、ならびに漂泳生物（Pelagial）、ウミホタルおよび貝虫亜綱から単離された発光タンパク質が挙げられる）は、広く研究され、そして結合アッセイにおいて、使用された。さらに、これらのうちのいくつかの遺伝子がクローニングされ、多量の生成を可能にした。エクオリンは、カルシウム感受性発光タンパク質のこの群の、最も通常に研究され、そして使用される、メンバーである。

【0009】

天然のエクオリン（クラゲ（*Aequorea*）から単離される）は、精製され、そして種々のモニタリングシステムにおいて、標識として利用されてきた。天然のエクオリンは、MW 21,000ダルトンの単一のポリペプチド鎖（アポエクオリンと呼ばれる）からなり、堅固に結合した、1モルずつの腔腸動物ルシフェリンおよび酸素を含む。この複合体は、カルシウムイオンの非存在下で安定である。エクオリンはまた、例えば、Cormier, M. J.、米国特許第5,162,227号およびZenno, S.ら、米国特許第5,288,623号により議論されるように、組換えDNA技術によって生成され得る。さらに、増強された生物発光特性を有する、エクオリンの修飾された形態はまた、Prasher, D.、米国特許第5,360,728号により開示されるように、組換えDNA手順によって、生成された。

【0010】

エクオリンの光子放出の機構は、十分に理解されている。エクオリンは、カルシウムイオンに対する高い親和性を有する。過剰のカルシウムイオンの存在下では、エクオリンは、増殖型の「フラッシュ反応」（これは、比較的高い量子収量で、約10秒間持続する）の発生を伴う単一の代謝回転事象で、ルシフェリンのオキシルシフェリンへの酸化を触媒する。ピーク光の発光は、1モルのエクオリンあたり3モルのカルシウムイオンの結合の際に開始されるが、少量の遊離カルシウムとのエクオリンの結合は、セレンテラジン（*coelenterazine*）の部分的な酸化を生じ、そしてアポエクオリン、セレンテラミド（*coelenteramide*）、COおよび光を生じる。

【0011】

エクオリンは、アトモルのレベルで検出され得、そしてその発光の波長は非常に狭く、そして市販の照度計を使用して検出され得るので、エクオリンの発光は、速度、高感度、および低いバックグラウンドを伴う正確さを含む、多くの利点を示す。従って、エクオリンは、結合アッセイにおいて標識として有用であることが示された。さらに、エクオリンの、種々の結合剤（例えば、レセプター、ホルモン、レクチン、抗体、抗原、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、および

糖タンパク質)との安定な結合体が開発されており、そして多数のこのような結合体は、市販されている。

【0012】

ストレプトアビジンと組み合わせて利用される場合に、エクオリンのビオチン化誘導体は、マイクロタイタープレートのウェルまたはニトロセルロース膜に固定された、ナノグラム～ナノグラム未満の量の標的分析物(タンパク質およびDNAが挙げられる)を検出する能力を示す。エクオリンを使用する、市販の照度計は、特定の時点でカルシウムを注入するためのインジェクターを備えて設計される。エクオリンを利用するいくつかの臨床試験アッセイが採用されているが、照度計は自動化されておらず、そしてカルシウムの溶液のタンクが備えられなければならない。このことによって、これらの照度計は、専門ではない人物による使用に対して不都合となる。エクオリンおよび全血を利用する、発光結合アッセイは、Pankratzら、米国特許第5,876,935号により開示される。

【0013】

生物の細胞において、カルシウム(Ca)は、広範な種々のプロセス(筋収縮、神経伝達物質放出、イオンチャンネルゲーティング、およびエキソサイトーシスのような、生理学的重要性、生化学的重要性および病態生理学的重要性を有するプロセス)のための、重要な細胞内二次メッセンジャーである。細胞内カルシウムの迅速な変化および放出を理解および測定する試みは、カルシウムケーシング化合物と呼ばれる、あるクラスのカルシウム感受性の化合物の導入を生じた。カルシウムケーシング化合物は、カルシウムでロードされる能力、および刺激の際にこれらのカルシウムをアンロードする能力を有する。ケーシングされたカルシウムのアンローディングは、いくつかの方法によって誘導され得、これらの方法の1つは、光への曝露を介するものである。ケーシング化合物からの、カルシウムの、光により刺激される放出(光分解と呼ばれる)は、通常、代表的にはUVの350～400nmの領域のスペクトルのレーザーパルスを用いて、1秒より短い時間にわたる照射によって、なされる。2つの異なるクラスのCaケーシング化合物が、採用された; nitr-5およびnitr-7のような、BAPTA

誘導体、ならびにDM-ニトロフェンおよびニトロフェニル-EGTAのような、EDTAまたはEGTAの誘導体。BAPTAとは、1,2-ビス(オルト-アミノフェノキシ)エタン-N,N,N',N'-四酢酸である。nitr-7とは、シス-1-(2-ビス(カルボキシメチル)アミノ-5-(1-ヒドロキシ-1-(2-ニトロ-4,5-メチレンジオキシフェニル)メチル)フェノキシ)-2-(2-ビス(カルボキシメチル)アミノ-5-メチルフェノキシ)シクロペンタンである。nitr-5とは、1-[2-アミノ-5-(1-ヒドロキシ-1-[2-ニトロ-4,5-メチレンジオキシフェニル]メチル)フェノキシ]-2-)-2'-アミノ-5'-メチルフェノキシ)エタン-N,N,N',N'-四酢酸である。DM-ニトロフェンとは、1-(4,5ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-1,2ジアミノエタン-N,N,N',N'-四酢酸であり、そしてニトロフェニル-EGTAとはすなわち、ニトロフェニルエチレンビス(オキシエチレンニトリロ)四酢酸である。後者のクラスは、カルシウムに対する既知の高い親和性を有するキレート剤の、感光性誘導体を生成するために、設計された。米国特許第5,446,186号および米国特許第4,981,985号を参照のこと。DM-ニトロフェンおよびニトロフェニル-EGTAのカルシウムケージング化合物は、カルシウム選択性という利点を示す。照射の際に、キレートされたカルシウムは、切断され、ここでその後の切断された残りのものは、放出されたカルシウムに対してかなりより低い親和性を有する。従って、多量のカルシウムが、迅速に放出される。これらの感光性カルシウムケージング化合物は、市販されている。

【0014】

感光性カルシウムケージング化合物を利用する結合アッセイ(例えば、イムノアッセイまたは核酸結合アッセイ)は、有用である。

【0015】

(発明の要旨)

カルシウムケージング化合物およびカルシウム感受性発光化合物を利用する、レセプター-リガンド結合アッセイを実施するための方法が、ここで見出された。

【0016】

従って、本発明の1つの局面は、溶液中の分析物の存在を検出するための、結合アッセイを実施するための方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：

(a) 第一の結合パートナーをこの溶液と接触させる工程であって、この第一の結合パートナーは、カルシウム感受性化学発光材料と結合体化している、工程；

(b) ある期間の後に、この第一の結合パートナーを、捕獲ストリップの細長マトリックスの片側に沿って所定の方法に移動させる工程であって、これによって、この第一の結合パートナーを、この捕獲ストリップ上に横断するよう位置するストライプと接触させ、この横断ストライプには、第二の結合パートナーが固定され、そしてカルシウムケージング化合物を含む、工程；

(c) この第一の結合パートナーがこの横断ストライプ上に固定された第二の結合パートナーと接触するに十分な期間を許容する工程；

(d) この捕獲ストリップの横断ストライプを、紫外線のパルスに露出して、カルシウムケージング化合物からのカルシウムの放出を引き起こす工程；ならびに

(e) このカルシウム感受性発光材料により放出された発光を測定する工程。

【0017】

本発明の別の局面は、溶液中の分析物の存在を検出するための、結合アッセイを実施するための方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：

(a) この溶液を、結合反応の第一の結合パートナーと接触させる工程であって、この第一の結合パートナーは、固体表面上に固定されており、この固体表面は、常磁性粒子であり、そしてこの第一の結合パートナーは、カルシウム感受性発光材料と結合体化している、工程；

(b) ある期間の後に、この常磁性粒子を、捕獲ストリップの細長マトリックスの片側に沿って所定の方法に移動させる工程であって、これによって、この粒子を、この捕獲ストリップ上に横切って位置する第二の結合パートナーのストライプに接触させ、この捕獲ストリップは、この横断ストライプ上に固定された第

二の結合パートナーを有し、この横断ストライプは、カルシウムケージング化合物をさらに含む、工程；

(c) この常磁性粒子がこの横断ストライプ上に固定された第二の結合パートナーと接触するに十分な期間を、許容する工程；

(d) この捕獲ストリップの横断ストライプを紫外線のパルスに曝露して、カルシウムケージング化合物からのカルシウムの放出を引き起こす工程；ならびに

(e) このカルシウム感受性発光材料により放出される発光を測定する工程。

【0018】

本発明の好ましい実施形態において、この方法は、抗原を検出および定量するためのイムノアッセイ、抗体を検出および定量するためのイムノアッセイ、または特定の配列の核酸を検出および定量するための核酸ハイブリダイゼーションアッセイである。

【0019】

別の実施形態において、この溶液は、工程(a)においてカルシウム感受性の化学発光材料と接触される前に、前処理される。特に、カルシウムを除去するために濾過され、このフィルターは、カルシウムの除去のための薬剤を含む。

【0020】

別の実施形態において、この溶液は、全血であり、この全血は、常磁性粒子と接触させる前に、濾過によって前処理される。

【0021】

さらなる実施形態では、発光材料は、カルシウム感受性発光材料、特に、エクオリン、Obelin、Mnemiopsis、Berovins、Pholasin、ルシフェラーゼまたはPelagia、Cypridinaおよび貝虫亜綱から単離された発光タンパク質である。

【0022】

なおさらなる実施形態では、紫外線は、250～400nmの範囲の光のパルスの形態であり、そして発光は、光電子増倍管により測定される。特に、カルシウム感受性発光材料は、エクオリンであり、そして光電子増倍管は、400～600nmの光を検出し、かつ磁界から保護される。

【0023】

他の実施形態では、細長い捕捉ストリップは、ニトロセルロース、ポリアクリルアミドまたは他の天然ポリマーまたは合成ポリマーから形成され、そして固定された第2の結合パートナーを有しかつカルシウムケーシング化合物が染み込んだ横断ストライプを有する。

【0024】

さらなる実施形態では、このカルシウムケーシング化合物は、上記カルシウム感受性発光材料に対して過剰な化学量論のカルシウムが装填される。好ましくは、このカルシウムケーシング化合物は、nitro-5、nitro-7、DM-ニトロフェンまたはニトロフェニル-EGTAである。

【0025】

本発明のさらなる局面は、溶液中の被検物の存在を検出するための結合アッセイを行うための方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：

(a) 固体表面上に結合反応の第1の結合パートナーを固定する工程であって、上記固体表面は、常磁性粒子であり、上記第1の結合パートナーがビオチン化されている、工程；

(b) 上記第1の結合パートナーを上記溶液と接触させる工程；

(c) 第2の結合パートナーと溶液とを接触させる工程であって、上記第2の結合パートナーは、カルシウム感受性発光材料と結合体化されている、工程；

(d) ある期間の後に、上記捕捉ストリップ上を横切って位置するストライプと粒子とを接触させるために、捕捉ストリップの細長いマトリックスの片側に沿う所定の方向に常磁性粒子を固定する工程であって、上記捕捉ストリップは、上記横断ストライプ上に固定されたストレプトアビジンを有し、上記横断ストライプは、カルシウムケーシング化合物をさらに含む、工程、

(e) 常磁性粒子を上記横断ストライプ上に固定された上記ストレプトアビジンと十分な時間接触させる工程、

(f) 上記捕捉ストリップの上記横断ストライプを紫外線のパルスに露出し、カルシウムケーシング化合物からのカルシウムの放出を行う工程；および

(g) カルシウム感受性発光材料により放出される発光を測定する工程。

【0026】

1つの実施形態において、工程（b）および（c）は、同時に行われる。

【0027】

本発明のなお別の局面は、溶液中の被検物の存在を検出するために結合アッセイを行うための方法を提供し、この方法は以下の工程を包含する：

（a）上記溶液と第1の結合パートナーとを接触させる工程であって、上記第1の結合パートナーは、ビオチン化されている、工程；

（b）ある期間の後に、第2の結合パートナーと上記溶液とを接触させる工程であって、上記第2の結合パートナーは、カルシウム感受性発光材料と結合体化している、工程；

（c）さらにある期間の後に、上記捕捉ストリップ上を横切って位置するストライプと結合パートナーとを接触させるために、捕捉ストリップの細長いマトリックスの片側に沿う所定の方向で結合パートナーを固定する工程であって、上記捕捉ストリップは、上記横断ストライプ上に固定されたストレプトアビジンを有し、上記横断ストライプは、カルシウムケージング化合物をさらに含む、工程、

（d）結合パートナーを上記横断ストライプ上に固定された上記ストレプトアビジンと十分な時間接触させる工程、

（e）上記捕捉ストリップの上記横断ストライプを紫外線のパルスに露出し、上記カルシウムケージング化合物からのカルシウムの放出を行う工程、および

（f）カルシウム感受性発光材料により放出される発光を測定する工程。

【0028】

1つの実施形態では、工程（a）および（b）は、同時に行われる。

【0029】

さらなる実施形態では、細長い捕捉ストリップは、ストレプトアビジンおよびカルシウムケージング化合物を染み込ませた横断ストライプを有する。

【0030】

なおさらなる局面では、本発明は、結合アッセイのための細長い捕捉ストリップを提供し、このストリップは、結合パートナーおよびケージされたカルシウム化合物を染み込ませたこのストリップの横断区分を有する。

【 0 0 3 1 】

好ましい実施形態では、この捕捉ストリップは、ニトロセルロース、ポリアクリルアミド、ポリアミドまたは任意のほかの合成ポリマーまたは天然に存在するポリマーから形成される。

【 0 0 3 2 】

別の実施形態では、この捕捉ストリップは、ハウジング、特に、単回使用試験カートリッジとしての支持体内に存在する。

【 0 0 3 3 】

さらなる実施形態では、結合パートナーは、ストレプトアビジンである。

【 0 0 3 4 】

本発明のさらなる実施形態は、プラスチックカートリッジを提供し、このカートリッジは、以下を含む：

ハウジングであって、このハウジングは、サンプルを受けるための1つのレセプタクル、常磁性粒子上に固定されたビオチン化された第1の結合パートナーおよびカルシウム感受性化学発光材料と結合体した第2の結合パートナーを含むリザーバ、ハウジング内にありかつリザーバに流体連絡する細長い捕捉ストリップを含むリザーバを有し、上記捕捉ストリップは、ストレプトアビジンおよびカルシウムケージング化合物を染み込ませたストリップの横断区分を有し、上記横断区分は、光バリアで保護されている、ハウジング。

【 0 0 3 5 】

好ましい実施形態では、レセプタクルとリザーバとの間のフィルター、特に、カルシウムの除去のための薬剤を含むフィルターが存在する。

【 0 0 3 6 】

さらなる実施形態は、以下を備えるハウジングを含む、結合アッセイを行うための装置を提供する：(a) 上記プラスチックカートリッジを受けるためのレセプタクル；(b) 横断ストライプ上の光保護層を除去するための手段；(c) 磁界を提供するための電磁石；(e) 捕捉ストリップの予め選択された部分上に光を照射するための紫外光源、および(f) 捕捉ストリップの予め選択された部分により放出された光を受けるために配置された光電子増倍管。

【0037】

(発明の詳細な説明)

本発明は、結合反応の結合パートナーの検出および定量化のために使用され得るが、本明細書中では、好ましいビオチン - ストレプトアビジン反応および常磁性粒子をさらに使用する抗原の検出および定量化のためのサンドイッチ免疫アッセイを特に参照して記載される。

【0038】

図1は、概して1により示される捕捉ストリップを示す。捕捉ストリップ1は、細長いマトリックス2を有する。細長いマトリックス2は、それらの上の結合した免疫複合体を有する常磁性粒子を、磁界の影響かで捕捉ストリップに沿って通過させる、マトリックス組成物から形成される。このマトリックス化合物の例としては、ニトロセルロース、ポリアクリルアミド、ポリアミドまたは他の合成ポリマーまたは天然に存在するポリマーが挙げられる。別の実施形態では、このマトリックスは、微小流体チャネル、特に捕捉ストリップ中にエッチングされたチャネルの形態である。この実施形態では、マトリックス組成物は、必要ではない。捕捉ストリップは、特に横断ストライプ3の位置では、光の通過を可能にするために、クリアな物質から形成されなければならない。このような物質の例としては、アクリルポリマー、ポリスチレン、アクリロニトリル - ブタジエン - スチレン (ABS)、ポリカーボネートおよび他の透明なポリマーが挙げられる。

【0039】

細長いマトリックス2は、1つの端部に向かって位置付けられる横断ストライプ3を有し、このような端部は入口端部4に対して反対側にある。横断ストライプ3は、ストレプトアビジンとカルシウム装填されたカルシウムケーシング化合物5または本明細書中に開示されるような他の化合物との両方を含む。

【0040】

図2は、概して10により示される免疫アッセイ反応を行うためのプラスチックカートリッジを示す。プラスチックカートリッジ10は、カートリッジハウジング11を有する。カートリッジハウジング11は、フィルター12を含むサンプル受容レセプタクル、常磁性粒子14およびそれらの上の第2の結合パートナ

ーを収納するためのリザーバ13ならびに粒子経路15を有する。粒子経路15は、リザーバ13に流体連絡しており、そしてリザーバ13から捕捉ストリップ16へ誘導し、ここでは、経路15は、捕捉ストリップ16の細長い経路17に沿って、横断ストライプ18へ延びる。フィルター12、リザーバ13および捕捉ストリップ16は、全て、プラスチックカートリッジ10の一部を形成するホルダー19内に位置付けられる。使用の前、すなわち光源からの光に曝される前に、少なくとも横断ストライプ18が、取り除かれる、横断ストライプ18上の剥離可能な保護光バリアを有することは理解される。さらに、細長い捕捉ストリップは、横断ストライプ18から通過する試薬を受けるためのサンプル受容レセプタクルの反対の端部で、排出リザーバ20と連絡している。

【0041】

図3は、概して30により示される試験台装置を示す。試験台装置30は、ハウジング31を有する。ハウジング31内には、プラスチックカートリッジ32、電磁石33、紫外光源34および光電子増倍管35が存在する。プラスチックカートリッジ32は、前に記載されており、そして台装置30のハウジング31のレセプタクル内に設置され得る。電磁石33は、プラスチックカートリッジ32の長さにならって延びる。電磁石33は、好ましくは、捕捉ストリップ16への細長い経路17に沿った常磁性ビーズ（粒子）の移動を促進する部分的な所定の磁界から構成される。紫外光源34は、前に記載されたプラスチックカートリッジ32に、そして特に、プラスチックカートリッジ32の横断ストライプ18に、方向付けられる。光電子増倍管35もまた、横断ストライプ18に方向付けられる。

【0042】

試験台装置30は、ディスプレイ36（これは、代表的には、LCDディスプレイである）をさらに有する。ハウジング31はまた、適切なコントロールならびに関連のコンピューターハードウェアおよび得られる結果の適切な解釈を可能にするソフトウェアを含む。

【0043】

使用に際して、抗原を含むサンプル（たとえば、血液）が、フィルター12の

上に置かれる。標的被検物を含む液体が、リザーバ13中へフィルター12を通過し、ここでは、このサンプルは、その上に固定されたビオチン化された第1の結合パートナー（捕捉パートナー）およびカルシウム感受性発光標識と結合体化した第2の結合パートナー（検出パートナー）を有する常磁性粒子と接触する。さらに、カートリッジが抗原を検出しそして定量するように設計される場合、第1および第2の結合パートナーが抗体であることは理解される。他方、カートリッジが抗体を検出するために設計される場合、第1の結合パートナーは、抗原であり、一方、第2の結合パートナーは抗体である。

【0044】

次いで、プラスチックチックカートリッジ10、32がまだ台内に配置されていない場合、このカートリッジは、試験台30に置かれる。プラスチックカートリッジ10の捕捉ストリップ16のうち少なくとも横断ストライプ18が光から保護される必要があることは理解される。このような保護は、光を通さない様式で、試験台30内で取り除かれる。このような除去は、自動であり得る。

【0045】

結合反応のための適切な期間の経過後、電磁石33を使用して磁界が適用される。次いで、常磁性粒子および付着した免疫複合体は、粒子経路15に沿って移動しそして捕捉ストリップ16に入る。次いで、この粒子は、横断ストライプ18に達するまで、捕捉ストリップ16に沿って通過する。その時、粒子は、既に横断ストライプ18に配置されたストレプトアビジンに、粒子上に固定されたビオチン化された結合パートナーを介して結合する。横断ストライプ18は、さらにカルシウムケージング化合物を含む。

【0046】

適切な時間経過後（これは、特に捕捉ストリップ16の寸法に依存するが、好都合には、4～6分であり得る）、紫外光源34を起動し、そして光のパルスを横断ストライプ18上に送る。この光は、カルシウム装填されたカルシウムケージング化合物からのカルシウムの放出（これは、必然的に直ちに生じる）を引き起こす。このカルシウムは、カルシウム感受性化学発光材料に接触し、次いでこれは、4～10秒の範囲の短時間、輝く。放出される光は、光電子増倍管35に

より検出され、そして放出された光の量は、解釈されそしてディスプレイ36に表示される。光の放出の速度は、紫外光源のエネルギーに依存する。高エネルギーレベルは、高い放出の速度、すなわち放出された光の鋭いピークを引き起こすが、放出された光が幅広なバンドであるように、低エネルギーレベルが使用されることが好ましい。これは、本明細書中に記載されるように、特にゼロまたはヌル(nul l)点に対する光電子増倍管の再設定の完了の前に光の放出が開始された場合、光電子増倍管による光の量のより正確な記録を導く。

【0047】

本発明の方法に供される、標的被検物を含むかまたは含む恐れのある溶液の供給源のいくつかの例は、血液または血液製品、唾液、または任意の他の体液である。他の溶液は、試験され得る。

【0048】

シグナル生成標識としてカルシウム感受性発光材料を使用する結合アッセイにおいて、カルシウム感受性発光結合体と接触する溶液は、光の放出を生成する瞬間の前は、カルシウムを有さないべきである。溶液中のカルシウムは、カルシウム感受性発光結合体と反応する。特に、その溶液は、20ナノモラー未満のカルシウムを含むべきである。さらに、目的が、全血中の被検物の存在を決定することである場合、血液のサンプルは、結合アッセイの特定のシグナルに干渉し得る細胞成分およびヘモグロビンを除去するために、通常、前処理されなければならない。カルシウムキレート剤中に浸漬されたフィルターは、細胞成分の除去の機能、および標的被検物を含む溶液からのカルシウムの除去の機能の両方を達成する。

【0049】

本明細書中に開示される本発明の方法は、結合アッセイにおいてシグナルを生成するための任意のカルシウム感受性発光材料を利用し、これには、エクオリン、ミトロコミン(mitrocomin)、クリチン(clytin)、オベイン、ニミオプシン、ペロビン、ハリストウリン(halistaurin)およびフィアリジン(phi alidin)が挙げられるが、これらに限定されない。エクオチン以外のカルシウム感受性発光性の発光タンパク質をを使用する場合

、エクオリンシグナルを検出するための最適の波長である469 nm以外は、光電子増倍管の最適な波長は、それに応じて適応されなければならない。例えば、波長は、400 ~ 600 nmであり得る。

【0050】

カルシウムケージング化合物の光分解は、波長が250 ~ 400 nm内の光を発生する多くの光源によって達成され得る。そのような光源は、本明細書中において紫外光源としていわれる。1つのそのような光源は、レーザー光源であり、これは、300 ~ 350 nmの波長において1ミリ秒未満で光を正確に伝達するために好都合な供給源である。光が誘発する場合にカルシウムがケージング化合物から放出される際および1モルのエクオリンあたりに3モルのカルシウムが結合する際、発光は、約10秒間持続する青色光のフラッシュで開始される。次いで、生成された光は、ピーク光および全光子計数の両方として、適切な光電子増倍管を用いて測定され得る。

【0051】

本発明の方法は、好ましくは時間分解機構、特に時間分解化学発光を利用する。本方法において、紫外光源によって放出されるフラッシュとカルシウム感受性発光材料による発光との間の短い期間が存在する。カルシウム感受性発光材料は、そのような期間を得るように選択される。光電子増倍管は、紫外光源からのフラッシュ、続くゼロ期間または実質的にゼロの光の後の、迷走光を記録し、次いでこれは、発光が続く。ゼロの光の期間の後、光電子増倍管上の読取りは、ゼロまたはヌルの点にリセットされ得、これによって、発光のより正確な読み取りを可能にする。光のパルスおよび発光との間の期間は短い、そのような時間は、光電子増倍管をゼロのベースラインへリセットするのに十分である。

【0052】

紫外光源は、一般的に、捕獲ストリップから遮蔽されるべきであり、その光は、例えば、コートされた石英レンズを用いて横断ストライプ上に集中される。本明細書中に議論されるように、光源の強度は、変化され得るが、1つの実施形態では、少なくとも150 mJである。

【0053】

ネイティブなカルシウム感受性発光性の発光タンパク質は、結合アッセイの実施に関する本発明の方法における標識として、特に有用である。再生能力またはカルシウムに対するより高い親和性のいずれかに起因して、増強された発光を有するこれらの発光タンパク質の、他の改変された組換えDNA由来形態がまた、本発明の方法に適合している。

【0054】

エンケーシング (encasing) 化合物 (例えば、光感受性リポソーム) が大規模に研究されているが、陽イオン特異的ケーシング化合物の最近の導入は、本発明の方法を実行する際に特に有用である。最近導入された2つのクラスのカルシウムケーシング化合物 (これは、キレート剤の誘導体である) が、特に有用である。なぜなら、これらは、より安定であり、そしてこれらの誘発機構は十分に規定されているからである。特に、EDTA (エチレンジトリロ四酢酸二ナトリウム塩) およびニトロフェニル - EGTA (エチレンビス (オキシメチレントリロ) 四酢酸) のDMニトロフェン誘導体の分解誘導体は、一旦光誘発されると、カルシウムに対して非常に低い親和性を有する。また、切断化合物の蛍光波長は、カルシウム感受性発光性の発光タンパク質の波長よりも、かなり異なり、そして非常に短期間続く。これらの光感受性カルシウムケーシング化合物は、市販される。

【0055】

横断ストライプ上の検出材料は、ガラスビーズ上に配置されて固定され得、これは、これは広い表面積の検出材料を提供する。

【0056】

高親和性のビオチン / ストレプトアビジン反応の開発に、アトモルレベルで検出され得るエクオリンを組み合わせることは、ナノグラム以下の検出レベルで分析物を測定するための、本発明の方法の非常に高い感度を提供する。さらに、ストレプトアビジンの改変形態はまた、本発明の方法に適合性であり、そしてストレプトアビジンおよびその誘導体の両方は、捕獲マトリックスストリップの側方の横断ストリップ上に容易に固定され得る。

【0057】

結合アッセイを実施するために本発明の方法に従って、結合物 (bound) の遊離発光標識からの分離は、磁場を適用することによって引起される。磁場に供された浮遊した磁気粒子に対する力が、この粒子がより強い場の領域、代表的には磁石の極に向かって移動するよう促すこと、そして、この力の強さが、場の勾配および場による粒子中に誘導された磁気の両方に依存することが認識される。従って、迅速な分離のために、強力な分離器およびより高く磁化可能な粒子が、好ましいようである。さらに、電磁石は、所定の最適化された方向で、いくつかの場の勾配を生成し得る。

【0058】

0.7 ~ 1.5 ミクロンの範囲の微視的磁気粒子は、本発明の方法に適合性であり、そして、これらはタンパク質でコートするための広い表面積を提供する場合、使用され得る (例えば、米国特許第3,970,518号; 同第4,018,886号; 同第4,230,685号; 同第4,267,234号; 同第4,452,773号; 同第4,554,088号; および同第4,659,678号に開示される)。しかし、米国特許第5,736,349号に記載されるように、0.03 ~ 1.0、特に、0.5 ~ 1.0 μm のサイズのより小さいサイズの常磁気性粒子が、より適している。なぜなら、大きいサイズの磁気材料の粒子は、磁場を取り除いた後に、残存磁気に起因して互いに付着する傾向があるからである。適切な磁気材料としては、強磁性材料、フェリ磁性材料および超常磁性材料が挙げられる。他の適切な磁気材料としては、フェライト、灰チタン石、クロマイト、および磁鉛鉱のような酸化物が挙げられる。ニッケル粒子もまた、使用され得る。

【0059】

標的分析物保有磁気粒子を試験媒体から分離するために使用される、磁気分離装置 / 方法は、磁気粒子の性質およびサイズに依存する。本発明に適したミクロンサイズの粒子は、市販の磁気分離デバイスの手段によって、溶液から容易に除去される。これらのデバイスは、試験媒体を保持する容器に対して外側に配置された、単一の比較的安価な永久磁石を使用する。そのような磁気分離器の例は、Serono Diagnostics, Norwell, Mass. によって

製造されるM A I A Magnetic Separator、DYNAL, Inc., Great Neck, N.Y.によって製造されるDYNAL MPC-1、Advanced Magnetics, Inc., Cambridge, Massによって製造されるBioMag Separatorである。本発明のために好ましい磁気分離器は、いくつかの整列された場の勾配を有する。特に、複数の磁石を使用して、常磁性粒子の攪拌を引起し、次いで、捕獲ストリップ上または捕獲ストリップに沿ってこの粒子を容器から連続的に移動させ得る。この磁石は、独立して操作され得るか、および/または、攪拌、次いで所定の経路に沿った移動（例えば、捕獲ストリップへ、次いで横断ストライプへ）をもたらすように調整された順序で操作され得る。磁気粒子の攪拌における磁石の使用の例は、米国特許第5,835,329号に開示される。

【0060】

バイオアッセイを開発する際に、臨床研究室における価値を獲得するために、このアッセイについて考慮する点が多く存在する。第一つの考慮する点は、分析物の濃度における変化に対する、シグナル応答である。第二の考慮する点は、このアッセイに関するプロトコールが容易に実行され得ることである。第3の考慮は、サンプルからサンプルへの干渉における変化である。また、試薬の調製および精製の容易さ、装置の有効性、自動化の容易さ、および目的の材料との相互作用は、有用なアッセイを開発する際のさならる考慮する点のうちのいくつかである。

【0061】

結合アッセイを実行するための本発明の方法は、そのような考慮する点に改善を与える。本発明は、高感度の発光、カルシウム感受性発光材料（特に、エクリオン）の有効性、感受性および高い量子収量、手動でカルシウムを注入することなく、カルシウムにおける変化に対して応答するようなカルシウム感受性発光材料の物理的特性、磁場から干渉されることなく、生成された光子を検出し得る光電子増倍管を用いた市販のルミノメーターの有効性、および注意深い試験という点を簡便にする固体クロマトグラフィーの捕獲マトリックスの開発を提供する。より重要なのは、ケージされたカルシウムを励起する波長（240～400nm

）と生成された光子を測定するための波長（450～500nm）における大きな差異が、紫外光源からの入射光からの干渉を伴わずにか、または、媒体の蛍光に起因して、発光の検出を容易にすることである。従って、本明細書中に記載されるような時間分解化学発光が、使用される。

【0062】

カルシウム感受性化学発光標識を利用するレセプター - リガンド結合反応を保有する本発明は、表面上に固定されたビオチン化された第一の結合パートナーを有する常磁性粒子、第二の結合パートナーと結合体化された化学発光材料、および本方法の好ましい実施形態のように抗原を検出および定量するための完全なサンドイッチイムノアッセイを実行するためのストレプトアビジンと関連するカルシウムケージング化合物に関して本明細書中に記載される。しかし、本発明の方法が、レセプター - リガンド結合反応の標的分析物の場合と同様に、抗体および核酸を検出する場合に同等に有益であることが、理解される。また、本発明の方法は、カルシウム感受性発光材料に結合体化され、常磁性粒子上に固定された第一の結合パートナー、およびカルシウムケージング化合物と共に捕獲ストリップの横断ストライプに固定された第二の結合パートナーを用いて実行され得ることが、理解される。

【0063】

本発明は、以下の実施例によって示される。

【0064】

（実施例Ⅰ）

10 μ l 中の5 μ g のエクオリンを、塩化カルシウムを含む緩衝化された1 - (4, 5ジメトキシー - 2 - ニトロフェニル) - 1, 2ジアミノエタン - N, N, N', N' - 四酢酸 (DM - NP) の200 μ l 溶液に添加した。この溶液は、80mMの4 - モルホリンプロパンスルホン酸 (MOP S) 緩衝液および20mMのKClを含み、溶液のpHを、7.2に調整した。DM - NPを、カルシウムを用いて75%までロードした（すなわち、2mM DM - NP + 1.5mM CaCl_2 ）。

【0065】

溶液からの光電子放出を、470 nmの波長で30秒間モニターした。得られた結果を図4に示し、これは、最小の発光を示した。次いで、溶液を、347 nmの波長の紫外線を用いて光分解させた。光のパルスは、100 mJであった。

【0066】

得られた結果を、図5に示し、そして図4および図5の結果を、図6において組み合わせた。

【0067】

紫外線のパルスが、エクオリンからの光電子放出を誘発するに十分なカルシウムの放出を引き起こすことが、この結果によって示される。紫外線のパルス前に(図4)、ケージされたカルシウムは、エクオリンからの発光を誘発しなかった。発光は、30秒以内で完了した。

【0068】

(実施例II)

実施例Iの手順を、5 μ gのエクオリンの溶液を用いて繰り返した。個々の実験において、1 mMのCaCl₂および500 μ MのCaCl₂を添加した。紫外線のパルスの後の全光子計数を、470 nmで30秒間モニターした。

【0069】

結果を、それぞれ、図7および8に示す。ピークの高さは異なるが、放出された光子の全量は、同じである。従って、光子の全量を使用して、この反応をモニターし得る。より制御された条件下で(すなわち、手動添加のこれらの実施例ではない)、ピーク強度もまた、使用され得る。

【0070】

標的分析物を含むかまたは含むことが疑われる溶液の、レセプター-リガンド結合反応を実施するための方法。この方法は、第一の結合パートナーを常磁性粒子の表面上に結合させる工程、第二の結合パートナーをカルシウム感受性発光化合物に結合体化させる工程；この第一の結合パートナーおよびこの第二の結合パートナーを試験される溶液と接触させる工程、ストレプトアビジンおよびケージされたカルシウム化合物を含む横断ストライプを有する捕獲ストリップに沿って常磁性粒子を固定する工程、この横断ストライプを紫外線のパルスに露出させて

ケージされたカルシウム化合物からのカルシウムの放出を引き起こす工程、およびカルシウム感受性発光材料によって放出された発光を測定する工程を包含する。この方法は、血液試験に使用され得る。装置がまた、開示される。

【0071】

本発明は、以下の図面において示される実施形態により例示される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明の捕捉ストリップの概略図である。

【図2】

図2は、本発明のカートリッジの概略図である。

【図3】

図3は、本発明の装置の概略図である。

【図4】

図4は、実施例Iにおけるサンプルからの光電子放出のグラフである。

【図5】

図5は、紫外線での光分解後の、実施例Iにおけるサンプルからの光電子放出のグラフである。

【図6】

図6は、図5および6におけるグラフの、組み合わされたグラフである。

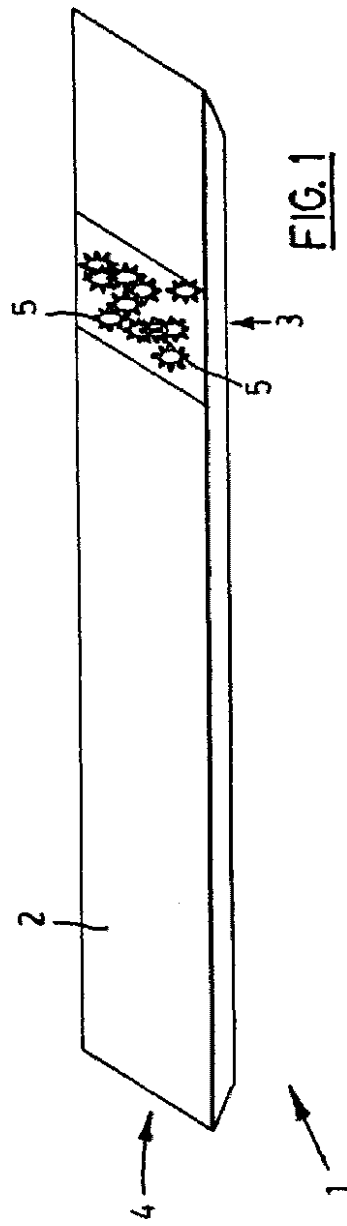
【図7】

図7は、実施例IIにおけるサンプルからの光電子放出のグラフである。

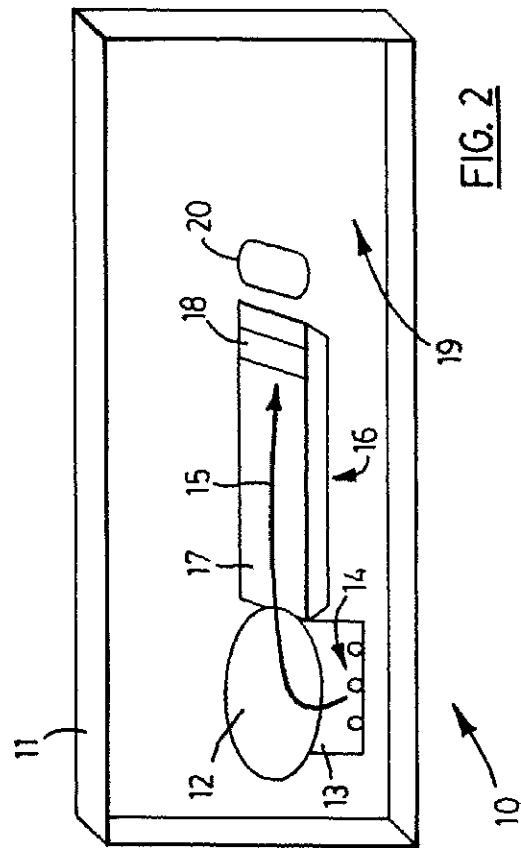
【図8】

図8は、実施例IIにおけるサンプルからの光電子放出のグラフである。

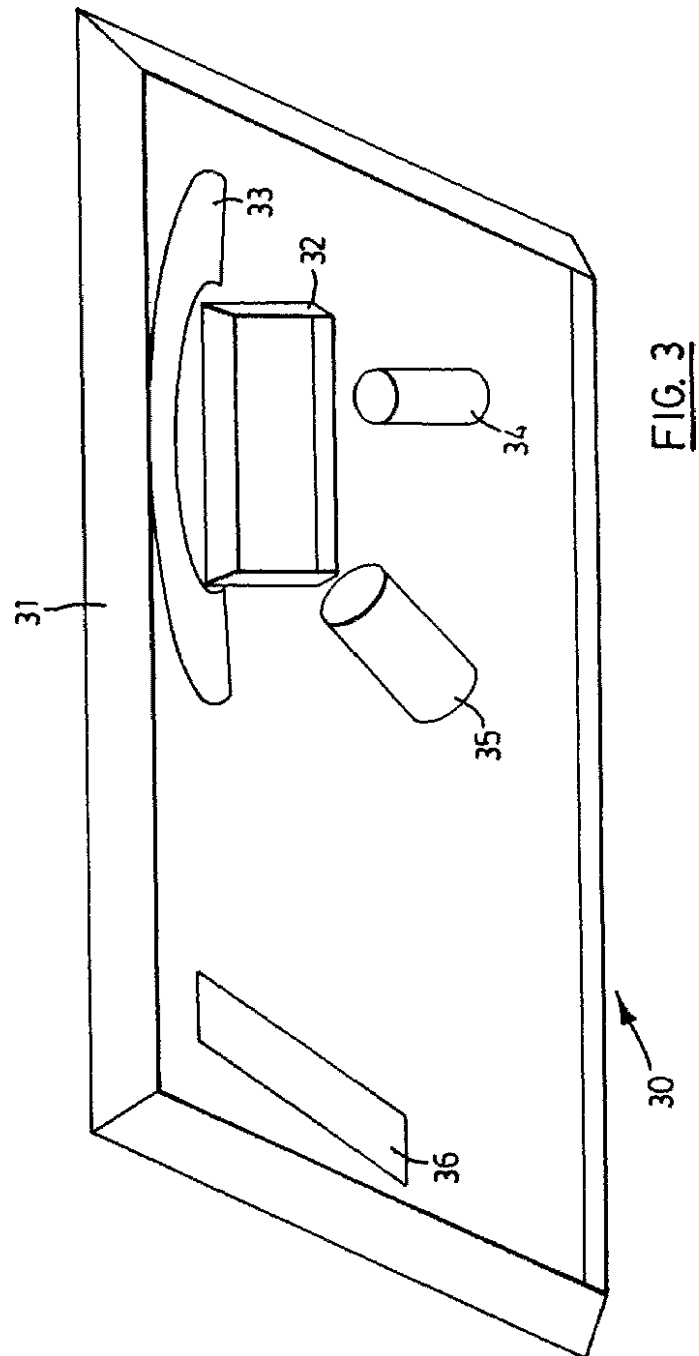
【図1】



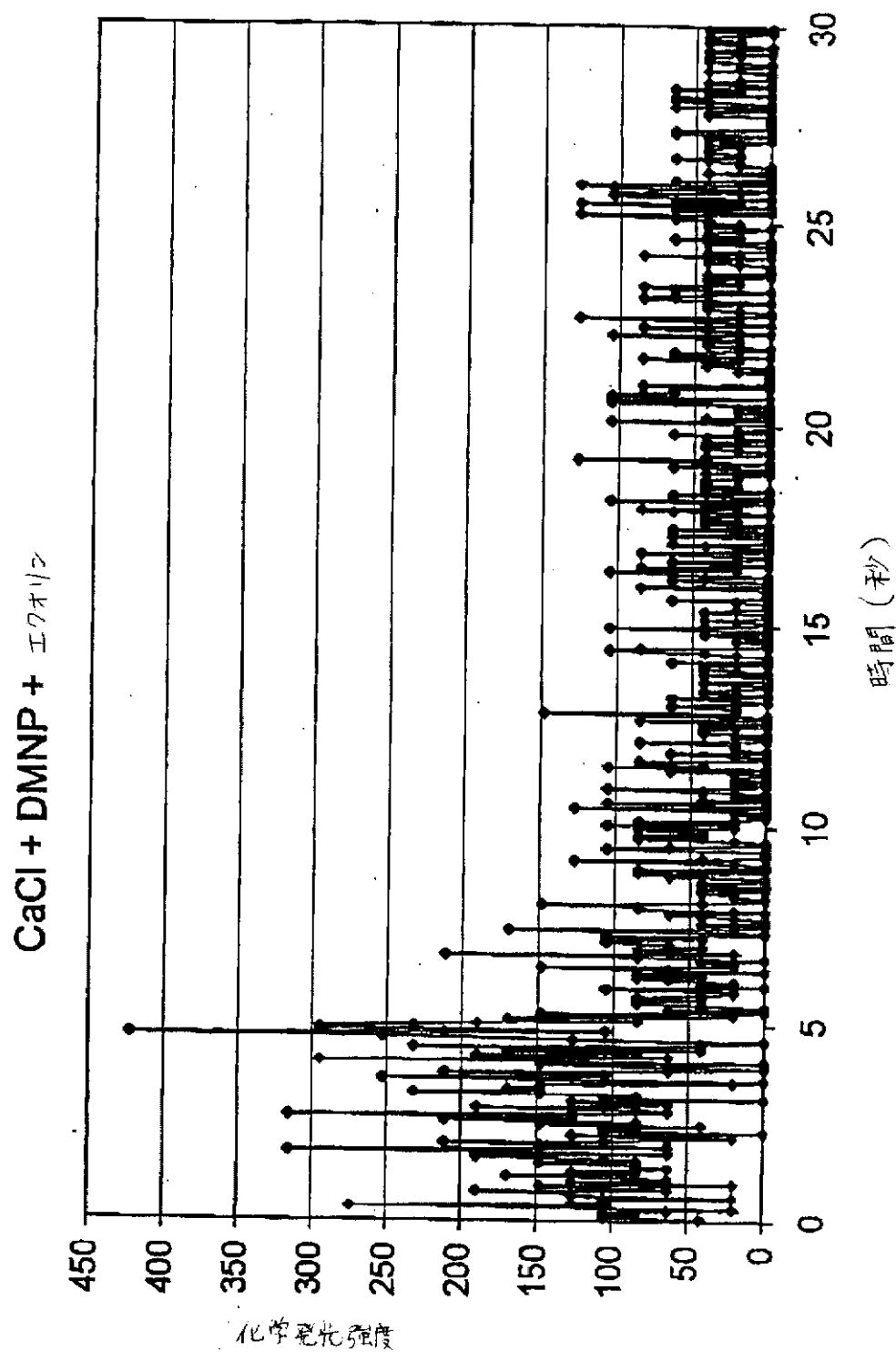
【図2】



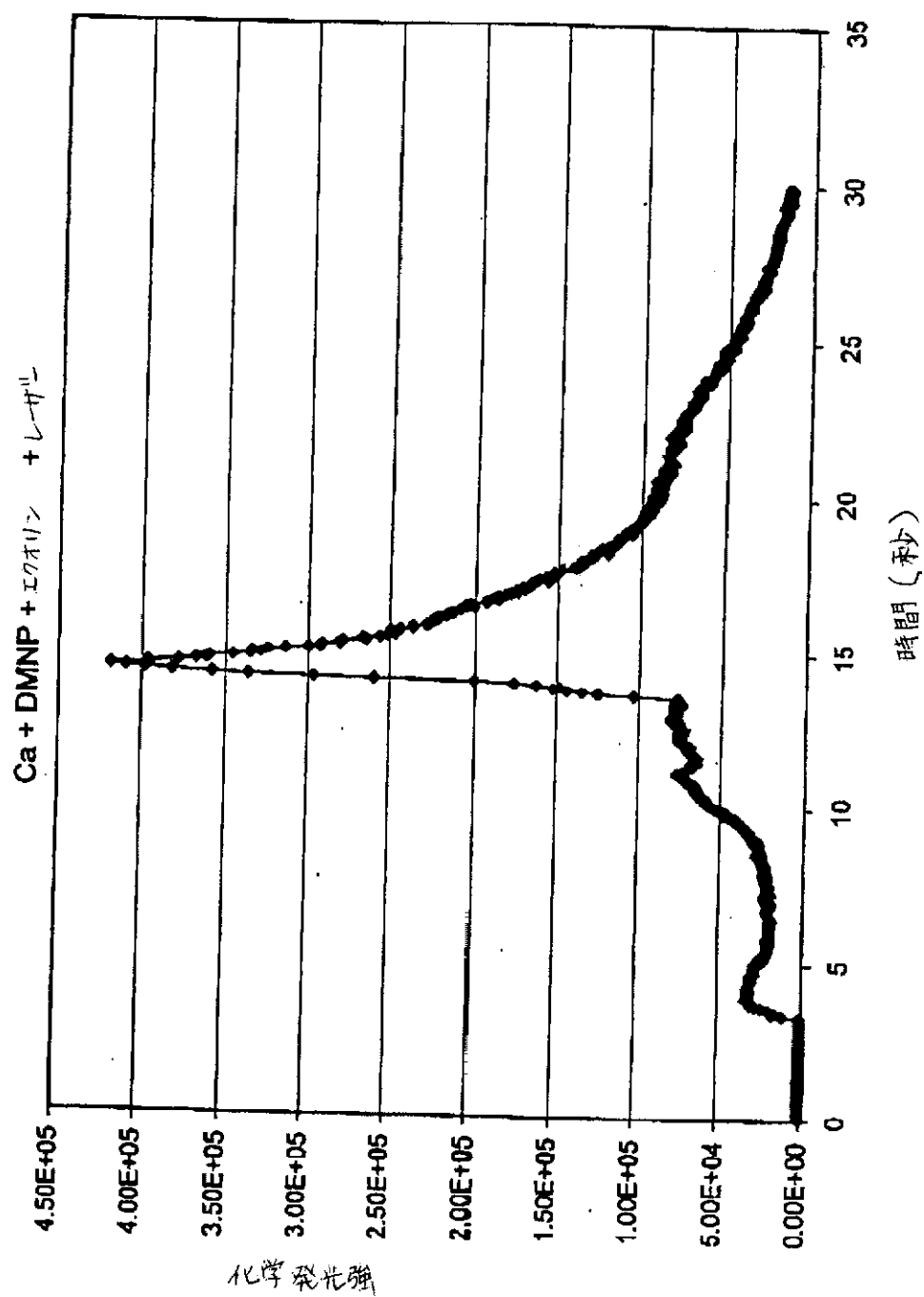
【図3】



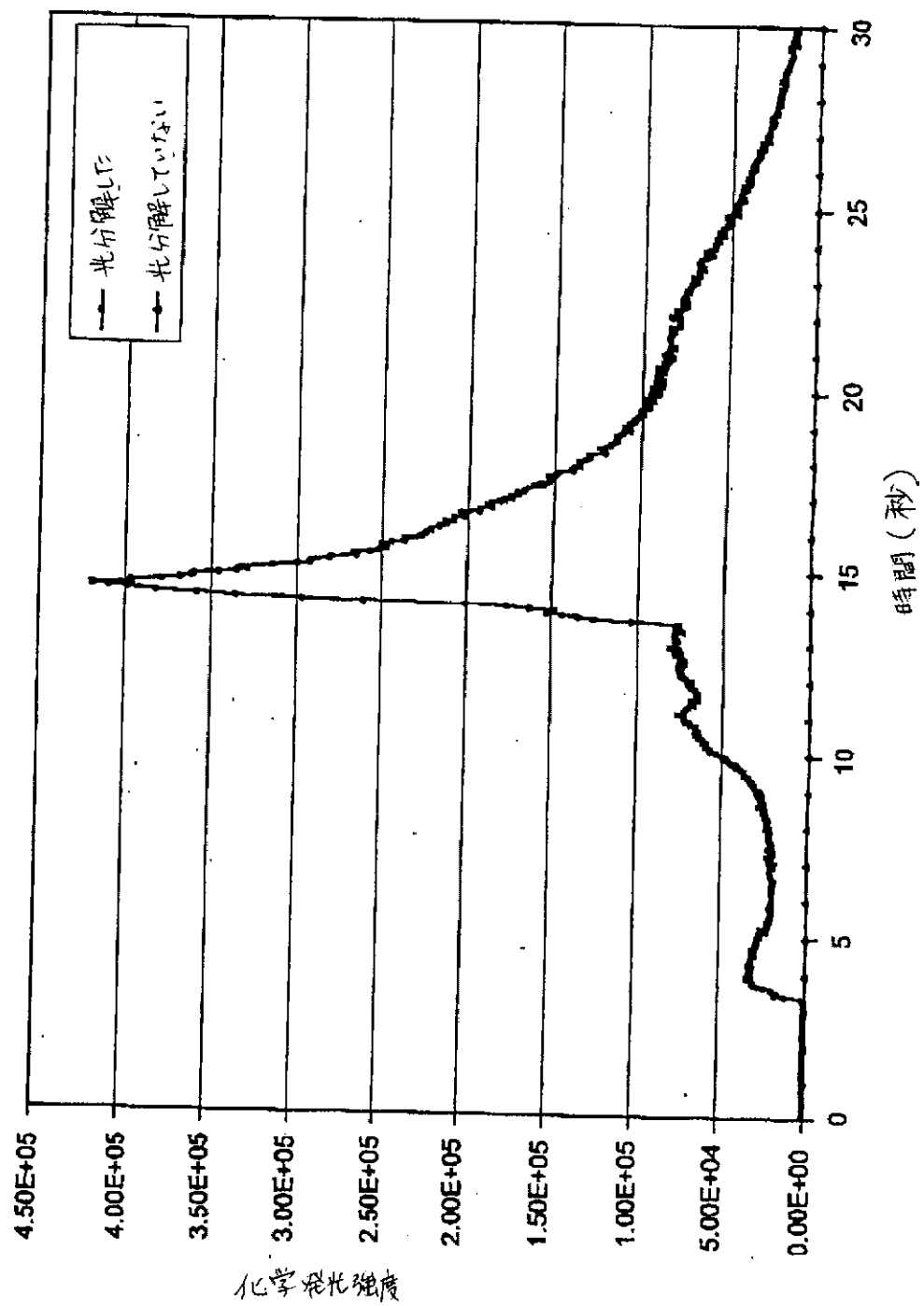
【図4】



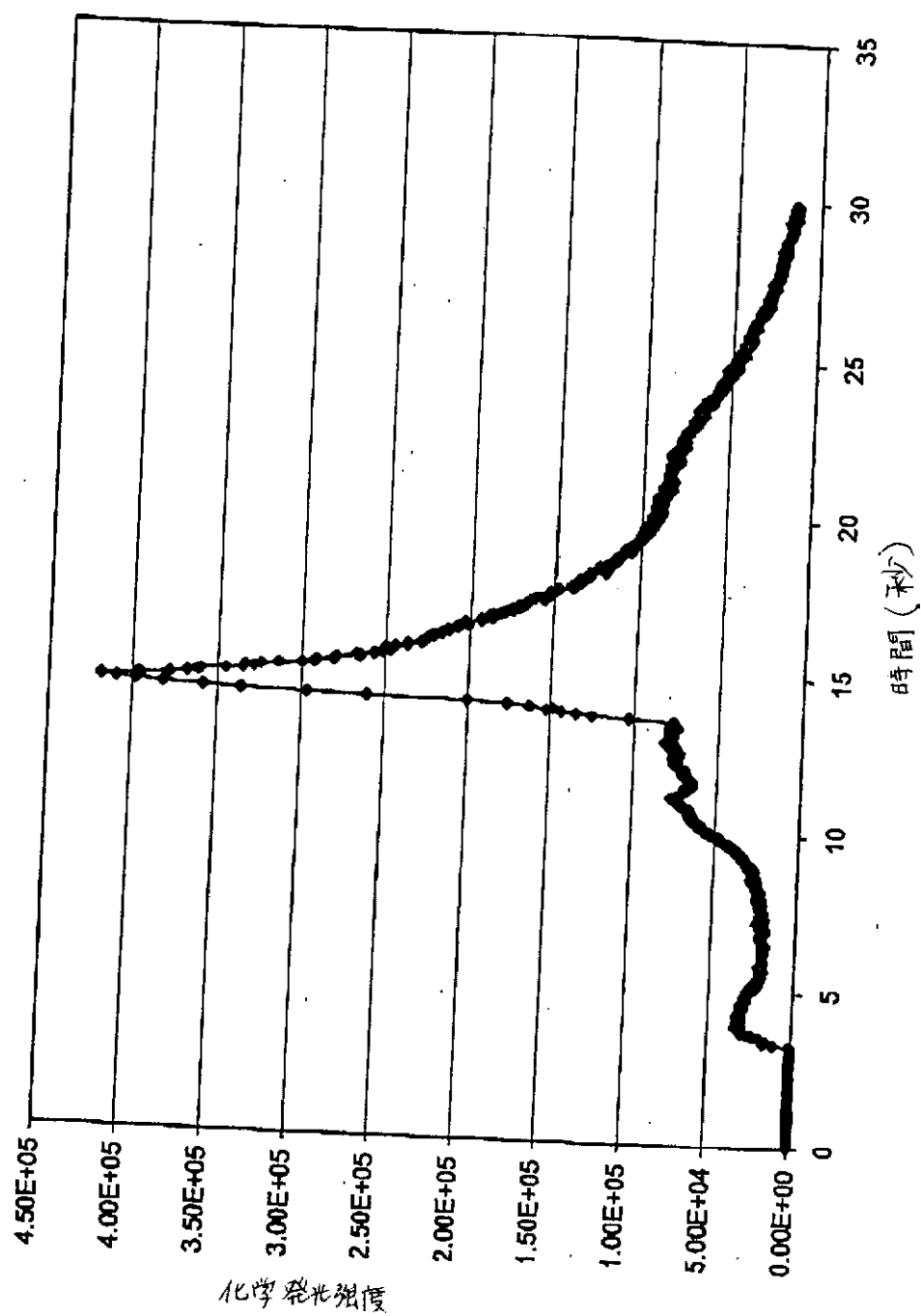
【図5】



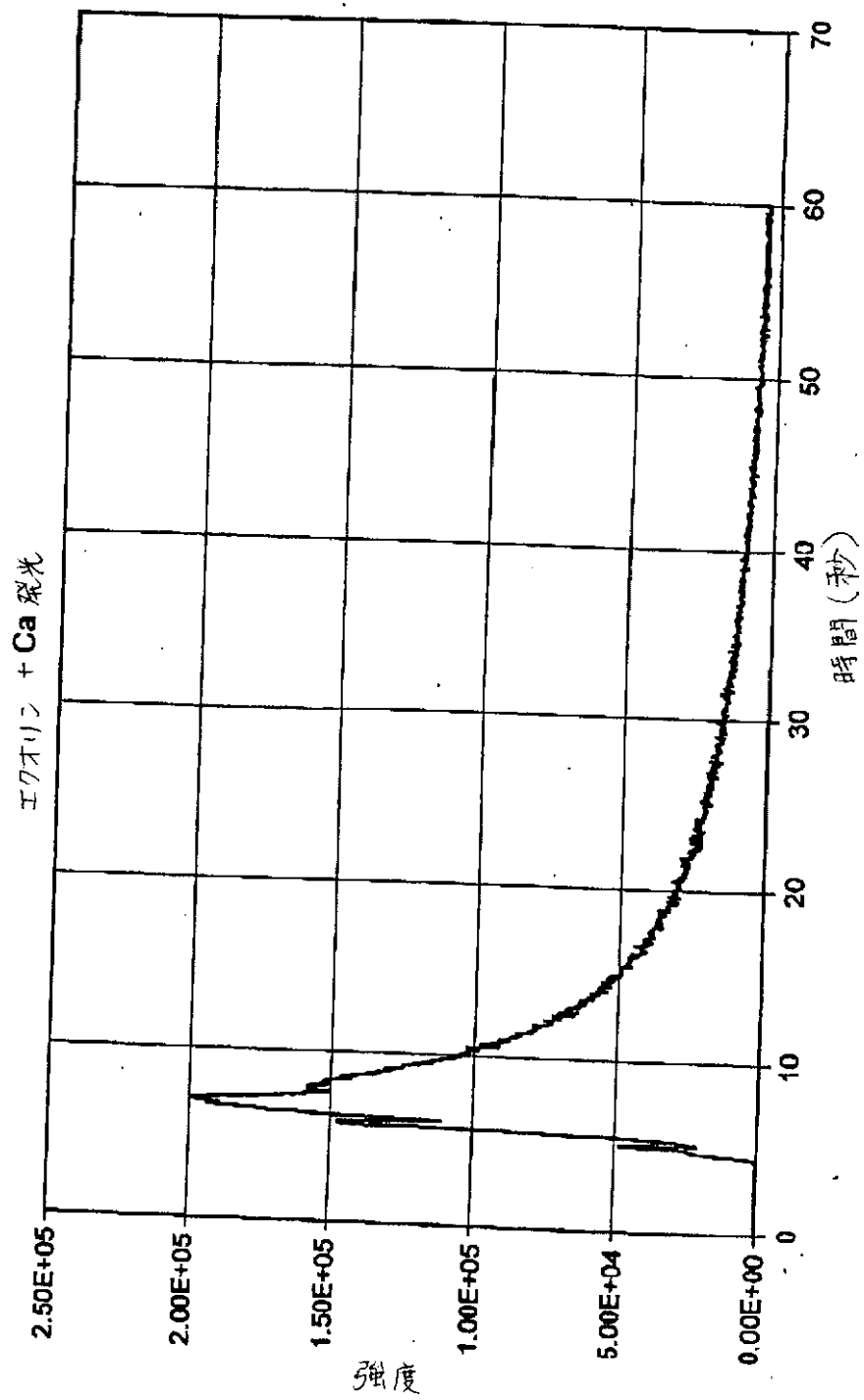
【図6】



【図7】



【図8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.
PCT/CA 00/00718

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/533 G01N33/58		
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) IPC 7 G01N C12Q		
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, PAJ, FSTA, INSPEC, COMPENDEX, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 30908 A (DADE BEHRING INC) 16 July 1998 (1998-07-16) page 3, line 30 -page 4, line 23 page 6, line 26 -page 9, line 21 examples 1,2 ---	1-8,10, 14-19, 21-24, 26,33-40
X	EP 0 437 013 A (ELA TECHNOLOGIES INC) 17 July 1991 (1991-07-17) column 1, line 29 - line 56 column 4, line 12 - line 47 column 7, line 32 - line 58 claims 1-7 --- -/--	1,4-8, 10,14-19
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in 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. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 October 2000		19/10/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Menidjel, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Interna I Application No
 PCT/CA 00/00718

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KENDALL J M ET AL: "Aequorea victoria bioluminescence moves into an exciting new era" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY,GB,ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, vol. 16, no. 5, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 216-224, XP004117786 ISSN: 0167-7799 page 216, right-hand column, paragraph 4 -page 217, right-hand column, paragraph 2 -----	1,3-8, 10,11, 13-19, 33-40
A	US 5 486 455 A (STULTS NANCY L) 23 January 1996 (1996-01-23) column 2, line 41 - line 64 column 4, line 1 - line 44 -----	21-32
P,X	WO 99 38999 A (PACKARD INSTRUMENT CO INC) 5 August 1999 (1999-08-05) abstract page 3, line 16 -page 5, line 2 -----	1,3,4, 6-8, 10-16, 18,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/CA 00/00718

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9830908 A	16-07-1998	US 5876935 A	02-03-1999
		AU 5816798 A	03-08-1998
		BR 9805892 A	24-08-1999
		CN 1216112 A	05-05-1999
		CN 1216112 T	05-05-1999
		EP 0956507 A	17-11-1999
		JP 2000508075 T	27-06-2000
EP 0437013 A	17-07-1991	CN 1046605 A	31-10-1990
		JP 3067156 A	22-03-1991
		NO 901613 A	11-10-1990
		ZA 9002711 A	24-12-1991
US 5486455 A	23-01-1996	US 5648218 A	15-07-1997
		AU 6171894 A	29-08-1994
		EP 0683822 A	29-11-1995
		IL 108607 A	06-12-1998
		JP 8506897 T	23-07-1996
		MX 9401112 A	31-08-1994
		WO 9418342 A	18-08-1994
WO 9938999 A	05-08-1999	AU 2323399 A	16-08-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 1 2 Q	1/66	C 1 2 Q	1/68	A
	1/68	G 0 1 N	21/78	C
G 0 1 N	21/78		33/533	
	33/533		33/558	
	33/558		33/58	Z
	33/58	C 1 2 N	15/00	A
(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W				
Fターム(参考) 2G045 AA13 CA25 CA26 CB07 FA12 FA26 FA27 FA29 FB03 FB07 FB13 GC15 HA10 HA14 2G054 AA07 AB04 CA21 EA02 4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 HA11 HA14 4B029 AA07 AA21 AA23 BB15 BB16 BB17 BB20 CC01 CC03 CC08 CC11 CC13 FA12 FA15 4B063 QA05 QQ21 QQ41 QQ61 QQ79 QQ89 QR02 QR48 QR56 QR66 QS32 QS34 QX02				

专利名称(译)	进行化学发光结合测定的方法		
公开(公告)号	JP2003502670A	公开(公告)日	2003-01-21
申请号	JP2001505193	申请日	2000-06-15
[标]申请(专利权)人(译)	心动转基因扫描公司		
申请(专利权)人(译)	心电图扫描转基因公司		
[标]发明人	ガワドヤヒア		
发明人	ガワド, ヤヒア		
IPC分类号	C12M1/34 C12N15/09 C12Q1/66 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/54326 G01N33/582		
FI分类号	G01N33/543.575 G01N33/543.521 C12M1/34.E C12M1/34.Z C12Q1/66 C12Q1/68.A G01N21/78.C G01N33/533 G01N33/558 G01N33/58.Z C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB07 2G045/FA12 2G045/FA26 2G045/FA27 2G045/FA29 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB13 2G045/GC15 2G045/HA10 2G045/HA14 2G054/AA07 2G054/AB04 2G054/CA21 2G054/EA02 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA11 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB15 4B029/BB16 4B029/BB17 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/CC11 4B029/CC13 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA05 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR02 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR66 4B063/QS32 4B063/QS34 4B063/QX02		
优先权	60/139941 1999-06-18 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种用于对含有或怀疑含有目标分析物的溶液进行受体-配体结合反应的方法。该方法包括以下步骤：将第一结合伴侣结合到顺磁性颗粒的表面上，将第二结合伴侣与钙敏感的发光化合物结合；该第一结合伴侣和第二结合。使配偶与要测试的溶液接触，将顺磁性颗粒沿着捕获条固定，该捕获条具有包含链霉亲和素和笼状钙化合物的横向条，使横向条暴露于紫外光脉冲和笼中。使钙从释放的钙化合物中释放出来，并测量钙敏感发光材料发出的发射。此方法可用于血液检查。还公开了一种设备。

