

(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2014-515094

(P2014-515094A)

(43) 公表日 平成26年6月26日 (2014. 6. 26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 D	
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 U	
	GO 1 N 33/543 5 7 5	
	GO 1 N 33/543 5 2 5 E	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

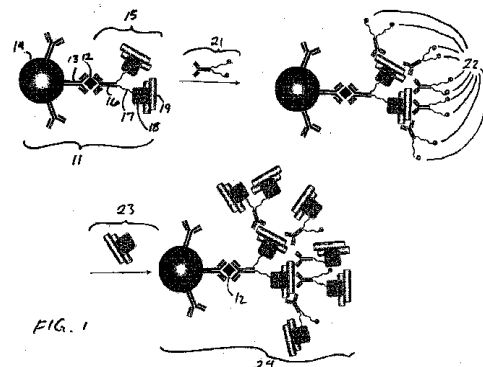
(21) 出願番号	特願2013-556681 (P2013-556681)	(71) 出願人	591099809
(86) (22) 出願日	平成24年3月5日 (2012. 3. 5)		バイオーラッド ラボラトリーズ, インコーポレイティド
(85) 翻訳文提出日	平成25年9月3日 (2013. 9. 3)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 94547, ハーキュルズ, アルフレッド ノーベル ドライブ 1000
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/027764	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開番号	W02012/122121		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日	平成24年9月13日 (2012. 9. 13)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	61/449, 463		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成23年3月4日 (2011. 3. 4)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アビジン-ビオチン結合の利用によるイムノアッセイのためのシグナル増幅

(57) 【要約】

典型的に固相と結合する捕捉抗体及びレポーター基と結合する検出抗体との間でタンパク質分析物を捕捉するサンドイッチ型イムノアッセイにおいて、分析物の各分子と結合するレポーター基の数は、検出抗体上のレポーター基との免疫学的結合、又は複数のビオチン - アビジン型結合部位のようなかかる特徴と併せて、アビジン - ビオチン型結合を用いる様々な方法により増加する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サンプル中の分析物を検出するための方法であって、前記方法が、

(a) 前記サンプルを、固体支持体と結合し、かつ前記分析物に対して選択的結合アフィニティを有する第一の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、前記分析物を前記第一の免疫学的結合メンバーを介して前記固体支持体と結合させ；

(b) このように結合した前記分析物と共に、前記固体支持体を、前記分析物に対するアフィニティを有する第二の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第二の免疫学的結合メンバーの各コピーは、複数のコピーのレポーター基で標識され、前記固体支持体と結合した第一の複合体を形成し、これによりそれぞれの前記第一の複合体が複数のコピーの前記レポーター基を含んでなり；

(c) 前記固体支持体を、これらに結合した前記第一の複合体と共に、前記レポーター基に対するアフィニティを有する第三の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第三の免疫学的結合メンバーは、これらに結合したアビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、及びポリビオチンからなる群から選択される第一のアフィニティ型結合メンバーを有し、複数のコピーの前記第三の免疫学的結合メンバーを前記レポーター基と結合させ、これにより前記第一の複合体を、前記レポーター基のコピーあたり複数のコピーの前記第一のアフィニティ型結合メンバーを含んでなる第二の複合体に変換し；

(d) 前記固体支持体を、これらに結合した前記第二の複合体と共に、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、及びポリビオチンからなる群から選択され、かつ前記第一のアフィニティ型結合メンバーに対して結合アフィニティを有する第二のアフィニティ型結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第二のアフィニティ型結合メンバーは、前記レポーター基で標識され、前記第二の複合体を、前記第一の複合体のレポーター基及び工程(c)により前記第一の複合体に加えられたレポーター基の合計と等しい数のレポーター基を含んでなる第三の複合体に変換し；そして

(e) 前記サンプル中の前記分析物の存在の指標として、前記合計のレポーター基からシグナルを検出することを含む、方法。

【請求項 2】

工程(b)における前記複数のコピーの前記レポーター基のそれぞれが、アビジン - ビオチン型結合を介して前記第二の免疫学的結合メンバーと結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記アビジン - ビオチン型結合が、前記免疫学的結合メンバーと結合するビオチン基と、前記レポーター基と結合するストレプトアビジンとの結合である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第一のアフィニティ型結合メンバーがビオチンであり、複数の前記第一のアフィニティ型結合メンバーが前記第三の免疫学的結合メンバーの各コピーと結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第二のアフィニティ型結合メンバーが、ストレプトアビジンである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記レポーター基がフィコエリトリンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

工程(b)における前記複数のコピーの前記レポーター基のそれぞれが、前記免疫学的結合メンバーと結合したビオチン基と、前記レポーター基と結合したストレプトアビジンとのアビジン - ビオチン型結合を介して前記第二の免疫学的結合メンバーと結合し、ここで前記第一のアフィニティ型結合メンバーはビオチンであり、複数の前記第一のアフィ

10

20

30

40

50

ニティー型結合メンバーは、前記第三の免疫学的結合メンバーのそれぞれのコピーと結合し、前記第二のアフィニティー型結合メンバーは、ストレプトアビジンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

サンプル中の分析物を検出するための方法であって、前記方法が、

(a) 前記サンプルを、固体支持体と結合し、かつ前記分析物に対して選択的結合アフィニティーを有する第一の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、前記分析物を前記第一の免疫学的結合メンバーを介して前記固体支持体と結合させ；

(b) このように結合した前記分析物と共に、前記固体支持体を、前記分析物に対するアフィニティーを有する第二の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第二の免疫学的結合メンバーの各コピーは、アビジン、ストレプトアビジン、及びビオチンからなる群から選択される複数のコピーの第一のアフィニティー型結合メンバーと結合して、前記固体支持体と結合した第一の複合体を形成し、これにより前記第一の複合体のそれぞれが複数のコピーの前記第一のアフィニティー型結合メンバーを含んでなり；

(c) このように結合した前記第一の複合体と共に、前記固体支持体を、アビジン、ストレプトアビジン、及びビオチンからなる群から選択され、かつ前記第一のアフィニティー型結合メンバーに対する結合アフィニティーを有する第二のアフィニティー型結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第二のアフィニティー型結合メンバーは前記レポーター基で標識され、前記第二の複合体が前記複数のコピーの前記第一のアフィニティー型結合メンバーを超える数のレポーター基を含んでなるように、前記第一の複合体を、複数の

(d) 前記サンプル中の前記分析物の存在の指標として、前記レポーター基からシグナルを検出すること

を含む、方法。

【請求項 9】

前記第一のアフィニティー型結合メンバーが、アビジン及びストレプトアビジンからなる群から選択されるメンバーであり、かつ前記第二の免疫学的結合メンバーと直接結合するビオチン基とのアビジン - ビオチン型結合を介して前記第二の免疫学的結合メンバーと結合し、そして前記第一のアフィニティー型結合メンバーは、前記レポーター基で標識され、前記第二の複合体は、前記第一のアフィニティー型結合メンバー上及び前記第二のアフィニティー型結合メンバー上のレポーター基の合計と等しい数のレポーター基を含んでなる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記第二の複合体が、第一のアビジン - ビオチン型結合を介して前記第二の免疫学的結合メンバーと、第二のアビジン - ビオチン型結合を介して前記第二のアフィニティー型結合メンバーの双方と結合したストレプトアビジン基を含んでなることができるように、前記第一のアフィニティー型結合メンバーがストレプトアビジンであり、前記第二の免疫学的結合メンバーと直接的に結合するビオチン基とのアビジン - ビオチン型結合を介して前記第二の免疫学的結合メンバーと結合し、かつ前記第二のアフィニティー型結合メンバーがビオチンである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記第一のアフィニティー型結合メンバーが前記レポーター基で標識され、そして前記第二の複合体が、前記第一のアフィニティー型結合メンバー上及び前記第二のアフィニティー型結合メンバー上のレポーター基の合計と等しい数のレポーター基を含んでなる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記レポーター基がフィコエリトリンである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

工程 (b) が、(i) 前記固体支持体を、前記分析物に対するアフィニティーを有し、

かつ複数のコピーのビオチンと結合する前記第二の免疫学的結合メンバーとインキュベートして、前記固体支持体と結合した予備的な複合体を形成し、そして (i i) このように結合した予備的な複合体と共に、前記固体支持体を、アビジン及びストレプトアビジンからなる群から選択され、かつレポーター基で標識されたメンバーとインキュベートし、前記第一の複合体を形成することを含んでなり、そして前記第二の複合体が、前記第一のアフィニティー型結合メンバー上及び前記第二のアフィニティー型結合メンバー上のレポーター基の合計と等しい数のレポーター基を含んでなる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

工程 (i i) が、前記固体支持体を前記レポーター基で標識されたストレプトアビジンとインキュベートすることを含んでなる、請求項 13 に記載の方法。

10

【請求項 15】

前記レポーター基がフィコエリトリンである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記第二の複合体が、複数の前記ビオチン基と結合するそれぞれの複数のコピーの前記第二のアフィニティー型結合メンバーを含んでなり、そして前記第二の複合体が、前記第二の免疫学的結合メンバーのそれぞれのコピーと結合する前記複数のコピーの前記ビオチン基を超える数のレポーター基を含んでなるように、前記第一のアフィニティー型結合メンバーがビオチンであり、前記第二のアフィニティー型結合メンバーが、アビジン及びストレプトアビジンからなる群から選択されるメンバーであり、そして工程 (c) が、前記固体支持体をブリッジングメンバーとインキュベートすることをさらに含んでなり、ここで前記ブリッジングメンバーのそれぞれのコピーが、複数のビオチン基と結合し、これにより、前記第二の免疫学的結合メンバー及び前記ブリッジングメンバーの双方が、前記第一の免疫学的結合メンバー上の前記ビオチン基と比較して過剰である、請求項 8 に記載の方法。

20

【請求項 17】

前記ブリッジングメンバーが、前記第一のアフィニティー型結合メンバーの複数のコピーと結合する前記第二の免疫学的結合メンバーの更なるコピーである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記第二のアフィニティー型結合メンバーが、ストレプトアビジンである、請求項 16 に記載の方法。

30

【請求項 19】

前記レポーター基がフィコエリトリンである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

サンプル中の分析物を検出するための方法であって、前記方法が、

(a) 前記サンプルを、固体支持体と結合し、かつ前記分析物に対して選択的結合アフィニティーを有する第一の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、前記分析物を前記第一の免疫学的結合メンバーを介して前記固体支持体と結合させ；

(b) このように結合した前記分析物と共に、前記固体支持体を、前記分析物に対するアフィニティーを有する第二の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第二の免疫学的結合メンバーは、アビジン、ストレプトアビジン、及びビオチンマルチマーからなる群から選択される第一のアフィニティー型結合メンバーと結合し、前記固体支持体と結合した第一の複合体を形成し；

40

(c) このように結合した前記第一の複合体と共に、前記固体支持体を、アビジン、ストレプトアビジン、及びビオチンマルチマーからなる群から選択される第二のアフィニティー型結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第二のアフィニティー型結合メンバーは、前記第一のアフィニティー型結合メンバーに対する結合アフィニティーを有し、かつ前記レポーター基で標識され、複数のアビジン - ビオチン型結合、及び分析物の分子あたり複数のレポーター基を含んでなる第二の複合体を形成し；そして

(d) 前記サンプル中の前記分析物の存在の指標として、前記レポーター基からシグナ

50

ルを検出すること
を含む、方法。

【請求項 2 1】

前記第一のアフィニティー型結合メンバーが、ビオチンマルチマーであり、前記第二のアフィニティー型結合メンバーが、アビジン及びストレプトアビジンからなる群から選択されるメンバーである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記第一のアフィニティー型結合メンバーが、ビオチンデンドリマーである、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記第二のアフィニティー型結合メンバーが、ストレプトアビジンである、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記レポーター基がフィコエリトリンである、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記第一のアフィニティー型結合メンバーが、アビジン及びストレプトアビジンからなる群から選択されるメンバーであり、前記第二のアフィニティー型結合メンバーが、前記第一のアフィニティー型結合メンバーと結合しやすいビオチン部分、及びアビジン - ビオチン型結合を介して前記第一のアフィニティー型結合メンバーのコピーと結合する複数の更なるビオチン部分を有するビオチンマルチマーである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記第一のアフィニティー型結合メンバーが、ストレプトアビジンである、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記第二のアフィニティー型結合メンバーが、ポリビオチンである、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記第一のアフィニティー型結合メンバーが、ストレプトアビジンであり、かつ前記第二のアフィニティー型結合メンバーが、ポリビオチンである、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記レポーター基がフィコエリトリンである、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 0】

サンプル中の分析物を検出するための方法であって、前記方法が、

(a) 前記サンプルを、固体支持体と結合し、かつ前記分析物に対して選択的結合アフィニティーを有する第一の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、前記分析物を前記第一の免疫学的結合メンバーを介して前記固体支持体と結合させ；

(b) このように結合した前記分析物と共に、前記固体支持体を、前記分析物に対するアフィニティーを有する第二の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、ここでそれぞれのコピーの前記第二の免疫学的結合メンバーはレポーター基で標識されて、前記固体支持体と結合した第一の複合体を形成し、これによりそれぞれの前記第一の複合体は、前記レポーター基を含んでなり；

(c) 前記固体支持体を、これに結合した前記第一の複合体と共に、前記レポーター基に対するアフィニティーを有する第三の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第三の免疫学的結合メンバーは、これらに結合するアビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、及びポリビオチンからなる群から選択される第一のアフィニティー型結合メンバーを有し、複数のコピーの前記第三の免疫学的結合メンバーを前記レポーター基と結合させ、これにより前記第一の複合体を前記レポーター基のコピーあたり複数のコピーの前記第一のアフィニティー型結合メンバーを含んでなる第二の複合体に変換し；

(d) 前記固体支持体を、これらに結合した前記第二の複合体と共に、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、及びポリビオチンからなる群から選択され、かつ前記第一の

10

20

30

40

50

アフィニティー型結合メンバーに対して結合アフィニティーを有する第二のアフィニティー型結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第二のアフィニティー型結合メンバーは、前記レポーター基で標識され、前記第二の複合体を、前記第一の複合体の前記レポーター基及び工程(c)により前記第一の複合体に加えられたレポーター基と等しい数のレポーター基を含んでなる第三の複合体に変換し；そして

(e) 前記サンプル中の前記分析物の存在の指標として、前記合計のレポーター基からシグナルを検出すること

を含んでなる、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2011年3月4日に出願された米国仮特許出願第61/449,463号の利益を主張する。前述の仮特許出願の内容は、参照によりこの全体において本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

タンパク質の検出のための多くのイムノアッセイは、分析物タンパク質がまず固相に結合している捕捉抗体と結合し、その後、レポーター基、例えば蛍光体、酵素、又は最終的に検出可能なシグナルを得るための他のタンパク質で標識された検出抗体と結合する、よく知られている「サンドイッチ」方式に従う。レポーター基として用いることができる非酵素的結合メンバーの例としては、ビオチン、アビジン、又はストレプトアビジンが挙げられ、これらの場合、レポーター基を有する検出抗体の結合の後、酵素又は蛍光体を有する結合パートナーを含む、ビオチン-アビジン結合におけるその結合パートナーとレポーター基との結合が続く。一般的に、シグナルの大きさはレポーター基により決定され、あるいは二又はそれ以上のレポーター基が検出抗体に結合する場合にはレポーター基の数により決定され、さらに増幅されない。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

30

【0003】

発明の開示

ビオチン-アビジン結合を更に活用するもの、検出抗体上のレポーター基との免疫学的結合に関するもの、及び複数のビオチン-アビジン型結合部位、例えばポリビオチンを含む種類に関するものを含む様々な方法により、検出抗体と結合するものを超えてレポーター基の数を増加させることができることを発見した。

【図面の簡単な説明】

【0004】

【図1】図1は、本発明の一つの方法の一例であるプロトコルの模式図である。

【0005】

40

【図2】図2は、本発明の第二の方法の一例であるプロトコルの模式図である。

【0006】

【図3】図3は、図2の例と同一の方法の一例であるプロトコルの模式図である。

【0007】

【図4】図4は、図2の例と同一の方法の一例であるプロトコルの模式図である。

【0008】

【図5】図5は、本発明の第三の方法の一例であるプロトコルの模式図である。

【0009】

【図6】図6は、図5の実施例と同一の方法の例であるプロトコルの模式図である。

【0010】

50

【図 7】図 7 は、本発明の第四の方法の一例であるプロトコルの模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

選択された実施形態の詳細な説明

これらの方法のそれぞれでは、目的の分析物の存在について分析されるサンプルは、固体支持体と結合する免疫学的結合メンバーと最初にインキュベートされ、前記結合メンバーは、分析物に対して選択的な結合親和性を有するものである。これは、連続する結合反応が、一又は連続した更なる結合反応を介してレポーター基を分析物に結合させるために行なわれる支持体上に分析物を固定化する。

【0012】

方法の一つでは、サンプル中に存在する場合、分析物と直ちに結合する固体支持体は、分析物に対して選択的結合アフィニティを有する第二の免疫学的結合メンバーとインキュベートされ、「サンドイッチ」方式において、分析物と第一の免疫学的結合メンバーとの複合体を形成する。前記第二の免疫学的結合メンバーは、二又はそれ以上のコピーのレポーター基で標識されたものであり、従って、この工程において形成される複合体は、分析物の各分子について二又はそれ以上のレポーター基を含んでなる。一度この「サンドイッチ」複合体が形成されると、前記固相は、前記レポーター基に対して選択的結合アフィニティを有する第三の免疫学的結合メンバーとインキュベートされ、従って、複合体中に既に含まれるレポーター基の各コピーについて、少なくとも一つのコピーの第三の免疫学的結合メンバーをさらに添加することにより、固相上の複合体を拡張する。手順によっては、複数（二又はそれ以上）のコピーの第三の免疫学的結合メンバーは、レポーター基の各コピーと結合する。前記第三の免疫学的結合メンバーはまた、アビジン・ビオチンファミリー内のアフィニティ型結合メンバーと結合するという特徴を有する。このファミリーのメンバーは、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、ポリビオチン、及び前記ファミリーの別のメンバーとのアビジン・ビオチン相互作用に従事する任意の他の種を含む。前記標識は、従って、例えば、連続する結合反応において、アビジン又はストレプトアビジンのいずれかと複合体を形成するビオチンでもよい。この方法の特定の実施形態では、前記第三の免疫学的結合メンバーは、二若しくはそれ以上のアフィニティ型結合メンバー、又はアビジン・ビオチンファミリー内の二若しくはそれ以上の対応物と結合するアフィニティ型結合メンバーのいずれかと結合する。例えば、ポリビオチンは、複数のコピーのアビジン又はストレプトアビジンと結合し、アビジン及びストレプトアビジンは、それぞれ複数のコピーのビオチンと結合する。好ましくは、しかしながら、第三の免疫学的結合メンバーとする前記アフィニティ型結合メンバーはビオチンであり、二又はそれ以上のコピーのビオチンは、各コピーの第三の免疫学的結合メンバーと結合する。

【0013】

この第一の方法における最終的な結合反応は、固相を、先の工程において複合体に加えられた結合メンバーとのアビジン・ビオチン相互作用に従事するアビジン・ビオチンファミリーのアフィニティ型結合メンバーとインキュベーションすることにより行なわれる。この第二のアフィニティ型結合メンバーの各コピーは、レポーター基、好ましくはこの最終的な結合反応の前に、最初のインキュベーションにおいて含まれる同一のレポーター基で標識される。固体支持体上の得られる複合体は、従って、分析物の各分子について、第一のインキュベーションからのものに加えて第二のインキュベーションからのものを含む、複数のコピーのレポーター基を含む。

【0014】

図 1 は、この第一の方法を説明する。複合体 11 は、分析物 12 を、固体支持体 14 と結合する捕捉抗体 13（第一の免疫学的結合メンバー）と最初にインキュベートし、そしてその後、固体支持体（その結合した分析物を一緒に含む）を、第二の抗体 16（第二の免疫学的結合メンバー）、ビオチン 17、ストレプトアビジン 18 及びこの場合においてフィコエリトリンであるレポーター基 19 とのコンジュゲート 15 とインキュベーションすることにより形成される最初のサンドイッチ複合体である。一度サンドイッチ複合体 11 が

形成されると、これは、複合体に複数のビオチン部位を加えるビオチン結合抗フィコエリトリン抗体 2 1 (第三の免疫学的結合メンバー) とインキュベートされる。最後のインキュベーションは、フィコエリトリン標識ストレプトアビジン 2 3 と行なわれ、様々なアフィニティー型及び免疫学的結合を介した単一の分析物 1 2 分子と結合する多数のフィコエリトリン基を含む最終複合体 2 4 を生成する。この場合、第二の抗体 1 6 は、二つのビオチン部分と結合し、これらのそれぞれは、アビジン - ビオチン結合を介して別のフィコエリトリン基を有し、各ビオチン結合抗フィコエリトリン抗体 2 1 は、二つのフィコエリトリン標識を有する。最終複合体における結果は、分析物分子あたり最低限 6 個のフィコエリトリン標識であり、図中の描写は 8 個を示す。

【 0 0 1 5 】

本発明の第二の一般的方法では、最初の分析物固定化工程において第一の免疫学的結合メンバーを介して分析物と結合を形成した固体支持体は、分析物に対して選択的結合アフィニティーを有する第二の免疫学的結合メンバーとインキュベートされ、第一の方法においてのように、「サンドイッチ」方式において分析物と第一の免疫学的結合メンバーとの複合体を形成する。前記第二の免疫学的結合メンバーは、得られる複合体が分析物の各分子に対する二又はそれ以上のコピーのアフィニティー型結合メンバーを含むことができるように、アビジン - ビオチンファミリーの二又はそれ以上のコピーの第一のアフィニティー型結合メンバーで標識されるものである。対応物であるアフィニティー型結合メンバー及びレポーター基は、二つの方法： (1) 第一のアフィニティー型結合メンバーは、すでに (インキュベーションの前に) レポーター基で標識された対応物であるアフィニティー型結合メンバーと結合する方法、あるいは (2) 標識された対応物であるアフィニティー型結合メンバーが、続いて起こるインキュベーションにより、インキュベーション後に結合する方法のうちの一つの方法で複合体に加えられる。いずれの場合も、固相上の得られる複合体は、アビジン - ビオチン複合体を介して一つの分析物分子とそれぞれ結合した二又はそれ以上のレポーター基を含む。前記固相は、その後、先のインキュベーションで用いられたアフィニティー結合メンバーと対になるアビジン - ビオチンファミリーのメンバーとインキュベートされ、この後者のメンバーは、レポーター基で標識され、あるいは免疫学的結合メンバーと結合する。後者の場合、前記免疫学的結合メンバーは、レポーター基の更なる付属物のための橋渡しとして役割を果たす二又はそれ以上のアフィニティー結合メンバーと結合する。従って、最終的な複合体中のアフィニティー結合メンバーは、一つのアビジン (又はストレプトアビジン) 部分と結合する二又はそれ以上のビオチン部分、及び分析物の各分子と結合する比較的多数のレポーター基を含む結合を形成する。

【 0 0 1 6 】

図 2 ~ 4 は、第二の方法によるプロトコールの図説である。図 2 のプロトコールでは、複合体 3 1 は、分析物 1 2 を、固体支持体 1 4 と結合する捕捉抗体 1 3 (第一の免疫学的結合メンバー) と最初にインキュベートし、そしてその後、固体支持体 (この結合した分析物を一緒に含む) を、図 1 の例に用いられる同一のコンジュゲート 1 5 とのインキュベートすることにより形成される最初のサンドイッチ複合体である。この例における連続する結合反応は、サンドイッチ複合体 3 1 と、ビオチン 3 3 及びフィコエリトリン 3 4 のコンジュゲート 3 2 とである。前記コンジュゲートのビオチン部分 3 3 は、ストレプトアビジン部分 1 8 上の占められていない結合部位と結合を形成し、これによりストレプトアビジン部分に多くのコピーのフィコエリトリン標識を加える。この結果は、最後の二つのインキュベーションに用いられるフィコエリトリン部分の合計と等しいフィコエリトリン部分の合計数を含む最終的な複合体である。この場合、第二の抗体 1 6 は、二つのビオチン部分と結合し、これらのそれぞれは、アビジン - ビオチン結合を介してこれら自身の別々のフィコエリトリン標識を有し、そして前記最終的な複合体は、合計 4 個のフィコエリトリン標識を含んでなる。

【 0 0 1 7 】

図 3 のプロトコールでは、複合体 4 1 は、分析物 1 2 を、固体支持体 1 4 と結合する捕捉抗体 1 3 (第一の免疫学的結合メンバー) と最初にインキュベートし、そしてその後、

10

20

30

40

50

固体支持体（この結合した分析物を一緒に含む）を、分析物に対する特異的な結合アフィニティーを有するビオチン結合抗体 4 2（第三の免疫学的結合メンバー）とインキュベートすることにより形成される最初のサンドイッチ複合体である。これに、フィコエリトリン及びストレプトアビジンのコンジュゲート 2 3 とのインキュベーションが続き、ビオチン結合抗体 4 2 に含まれる各ビオチン部分についての別々のフィコエリトリン標識 4 5 を含んでなる複合体 4 4 を形成する。この例における最終的な結合反応は、拡張された複合体 4 4 と、ビオチン 3 3 及びフィコエリトリン 3 4 のコンジュゲート 3 2 である。コンジュゲートのビオチン部分 3 3 は、フィコエリトリン - アビジン複合体 2 3 のアビジン部分上の占められていない結合部位と結合を形成し、これによりストレプトアビジン部分に多くのコピーのフィコエリトリン標識を加える。この結果は、ここでまた、最後の二つのインキュベーションにおいて導入されるフィコエリトリン部分の合計と等しいフィコエリトリン部分の合計数を含む最終的な複合体 4 6 である。この場合、第二の抗体 4 2 は、二つのビオチン部分と結合し、これらのそれぞれは、アビジン - ビオチン結合を介して拡張された複合体 4 4 においてこれら自身の別々のフィコエリトリン標識を有し、そして十分な数のフィコエリトリン - ビオチンコンジュゲート 3 2 が、最後のインキュベーションに用いられ、各アビジン部分に加えられる二つの更なるビオチン部分をもたらす。前記最終的な複合体は、合計 6 個のフィコエリトリン標識を含んでなる。

10

20

30

40

50

【0018】

図 4 のプロトコールでは、最初のサンドイッチ複合体 4 1 は、図 3 のプロトコールのものと同じであるが、一度形成されたサンドイッチ複合体は、その後過剰量のフィコエリトリン標識ストレプトアビジン 2 3 及び各抗体が少なくとも二つのビオチン部分で標識されたビオチン化抗体 5 2 の双方とインキュベートされる。このインキュベーションでは、フィコエリトリン標識ストレプトアビジン 2 3 の一部が、最初のサンドイッチ複合体 4 1 の外側部分を形成するビオチン結合抗体 4 2 上のビオチン部分と結合する一方で、ビオチン化抗体 5 2 は、最初のサンドイッチ複合体の一部であるフィコエリトリン標識ストレプトアビジン 2 3 と、第二のインキュベーションで含まれる更なるフィコエリトリン標識ストレプトアビジン 2 3 との橋渡しとしての役割を果たす。従って、前記抗体の抗体結合機能自体は用いられない。この結果は、各分析物分子について複数の標識を含んでなる最終的な複合体 5 3 である。

【0019】

本発明による第三の一般的方法では、最初の分析物固定化工程において、分析物が第一の免疫学的結合メンバーを介して結合を形成した固体支持体は、連続するインキュベーション工程の一つにおいてビオチンマルチマーとインキュベートされ、マルチマー上の数個又はそれ以上のビオチン部位は、レポーター基で標識されたアビジン又はストレプトアビジンと最終的に結合する。前記最終複合体は、従って、ビオチンマルチマー上のアビジン - ビオチン型結合を介して固相に結合した各分析物分子と結合した複数のコピーのレポーター基を含んでなる。ビオチンマルチマーの例としては、ビオチンデンドリマー及び他のポリビオチンである。この方法の一つの実施は、「サンドイッチ」複合体を完成させる第二の免疫学的結合メンバーと直接的に結合するビオチンマルチマーを使用することである。この場合におけるビオチンマルチマーは、従って、分析物が固相により最初に捕捉された後、最初のインキュベーションの一部となる。別の実施は、「サンドイッチ」複合体を完成させる免疫学的結合メンバーとしてアビジン又はストレプトアビジンと結合する免疫学的結合メンバーを使用すること、及びアビジン又はストレプトアビジン標識サンドイッチ複合体をそれぞれがレポーター基で標識された二又はそれ以上のアビジン又はストレプトアビジン部分と結合するビオチンマルチマーからなる複合体とインキュベートすることである。

【0020】

図 5 及び 6 は、第三の方法によるプロトコールの図説である。図 5 のプロトコールでは、最初の複合体 6 1 は、分析物 1 2 を、固体支持体 1 4 と結合する捕捉抗体 1 3（第一の免疫学的結合メンバー）と最初にインキュベートし、そしてその後、固体支持体（この結

合した分析物を一緒に含む)を、分析物に対する特異的な結合アフィニティを有する抗体63及び少なくとも一つのビオチンマルチマー64のコンジュゲート62とインキュベートすることにより形成される。示される例では、二つのビオチンペンタマーは、一つの抗体分子と結合する。連続する工程では、前記複合体は、各マルチマー上の二又はそれ以上のビオチン部位において生じるアビジン-ビオチン型結合を引き起すのに十分な量のフィコエリトリン標識ストレプトアビジン23とインキュベートされる。最終的な複合体66上の標識の数は、最後のインキュベーションにおいて結合を形成したマルチマー上のビオチン部位の数と等しく;この場合において、示される合計は、分析物の各分子について6個のフィコエリトリン部分である。

【0021】

図6のプロトコールでは、最初のサンドイッチ複合体71は、上述のプロトコールの全てにおいてのように、分析物12を、固体支持体14と結合する捕捉抗体13(第一の免疫学的結合メンバー)と最初にインキュベートし、そしてその後の固体支持体及び結合した分析物を、分析物に対して特異的な結合アフィニティを有する抗体73とストレプトアビジン74のコンジュゲート72とインキュベートすることにより形成される。ビオチンマルチマーは、連続するインキュベーションに用いられ、ここで最初のサンドイッチ複合体71は、ビオチンマルチマー76及びフィコエリトリン標識ストレプトアビジン77の複合体75とインキュベートされる。このインキュベーションは、ビオチンマルチマーを介した各分析物分子と結合した複数のフィコエリトリン標識を含んでなる最終複合体78をもたらす、これは、示される例において、デンドリマーである。

【0022】

本発明による第四の一般的方法では、最初の分析物固定化工程において、分析物を第一の免疫学的結合メンバーを介して結合を形成した固体支持体は、分析物に対して選択的結合アフィニティを有する第二の免疫学的結合メンバー最初にインキュベートし、「サンドイッチ」方式において、分析物及び第一の免疫学的結合メンバーと共に複合体を形成する。前記第二の免疫学的結合メンバーは、レポーター基の一つのコピーで標識されるものである。一度この「サンドイッチ」複合体が形成されると、前記固相は、レポーター基に対して選択的結合アフィニティを有する複数のコピーの第三の免疫学的結合メンバーとインキュベートされ、これにより、複合体にすでに含まれるレポーター基の各コピーについての第三の免疫学的結合メンバーの少なくとも複数のコピーをさらに加えることにより、固相上の複合体を拡張され、ここで第三の免疫学的結合メンバー自体はビオチンと結合する。固相は、その後、レポーター基で標識されたアビジン又はストレプトアビジンとインキュベートされ、分析物の各分子について複数のコピーのレポーター基を含んでなる最終複合体を生成する。

【0023】

この方法は、図7において図説され、ここで、最初のサンドイッチ複合体81は、上述のプロトコールにおいてのように、分析物12を、固体支持体14と結合する捕捉抗体13(第一の免疫学的結合メンバー)と最初のインキュベートし、そしてその後、固体支持体及び結合した分析物を、分析物に対して特異的な結合アフィニティを有しフィコエリトリン84で標識された抗体83のコンジュゲート82とインキュベートすることにより形成される。得られた複合体を、その後、フィコエリトリン84に対して特異的なアフィニティを有する過剰量のビオチン結合抗体85とインキュベートし、固相の各粒子と結合を形成した複数のコピーのビオチン結合抗体85を含んでなる複合体86をもたらす。この複合体86を、その後、フィコエリトリン標識ストレプトアビジン87とインキュベートし、分析物12の一つの分子及び複数のコピーのフィコエリトリンを含んでなる最終的な複合体88を形成する。

【0024】

フィコエリトリンが上記の例においてレポーター基である一方で、イムノアッセイにおける使用について知られている任意のレポーター基を用いることができる。他の蛍光体としては、アクリジン、アクリジンイソチオシアネート、5-(2'-アミノエチル)アミ

10

20

30

40

50

ノナフタレン - 1 - スルホン酸 (EDANS)、4 - アミノ - N - [3 - ビニルスルホニル]フェニル]ナフタリイミド - 3, 5ジスルホネート、N - (4 - アニリノ - 1 - ナフチル)マレイミド、アントラニルアミド、BODIPY、クマリン、シアニン色素、シアノシン、4', 6 - ジアミニジノ - 2 - フェニルインドール (DAPI)、5', 5'' - ジブロモピロガロール - スルホナフタレン、5 - [ジメチルアミノ]ナフタレン - 1 - スルホニルクロリド (DNS)、4 - (4' - ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸 (DABCYL)、4 - ジメチルアミノフェニルアゾフェニル - 4' - イソチオシアネート (DABITC)、エオシン、5 - カルボキシフルオレセイン (FAM)、5 - (4, 6 - ジクロロトリアジン - 2 - イル)アミノフルオレセイン (DTAF)、2', 7' - ジメトキシ - 4', 5' - ジクロロ - 6 - カルボキシフルオレセイン (JOE)、6 - カルボキシ - X - ローダミン (ROX)、ローダミンB、及びN, N, N', N' - テトラメチル - 6 - カルボキシローダミン (TAMRA)が挙げられる。他のレポーター基は、放射性標識及び酵素である。酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 β - ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びルシフェラーゼが挙げられる。前記固体支持体は、アッセイにおいて反応に不活性であり、かつ、アッセイにおいて液体と分離することができる任意の材料でもよい。ビーズ、マイクロビーズは、一般的な例であるが、平らな固体表面、又は容器の壁を用いることもできる。最終的に、例において抗体が免疫学的結合メンバーとして用いられるが、抗体フラグメントも用いることができる。上記で説明される様々な特徴及び構成要素の他の置き換え及び変形は、当業者に理解される。

10

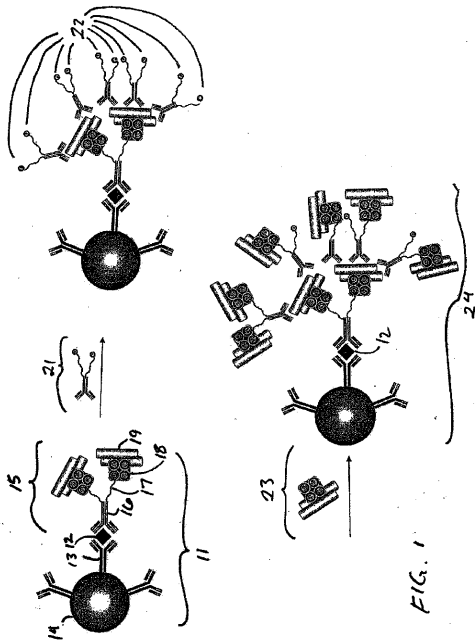
20

【0025】

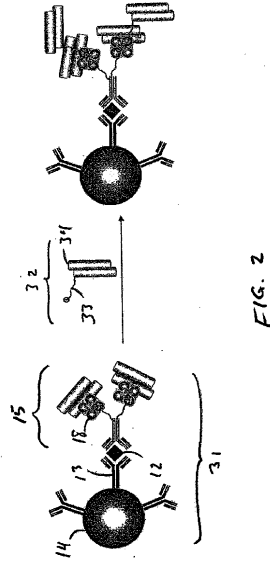
本明細書に添付の特許請求の範囲において、用語「一つの(a)」又は「一つの(an)」は、「一又は複数」を意味することを意図する。用語「含む(comprise)」及びこれらのバリエーション、例えば「含む(comprises)」及び「含むこと(comprising)」は、工程又は要素の列举に先立つ場合、更なる工程又は要素の付加が任意であり、排除されないことを意味することを意図する。全ての特許、特許出願、及び本明細書において引用される他の公開されている参照材料は、これによりこれらの全体において参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に引用される任意の参照材料又は一般的な任意の先行技術と、本明細書の明示的な教示との間の任意の矛盾は、この明細書の教示を尊重して解決されることを意図する。これは、語又は語句の当該技術分野で理解されている定義と、同一の語又は語句の明細書で明示的に提供される定義との間の任意の矛盾を含む。

30

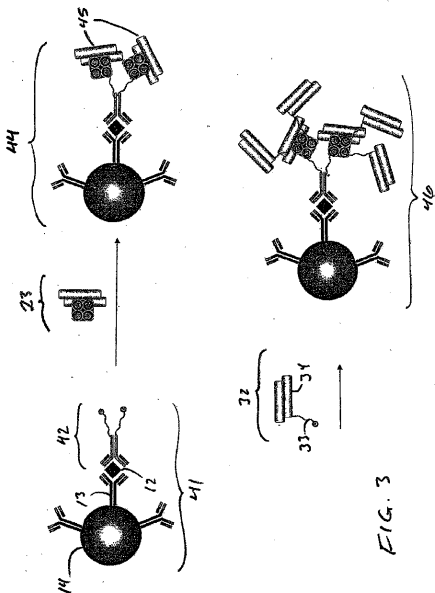
【図 1】



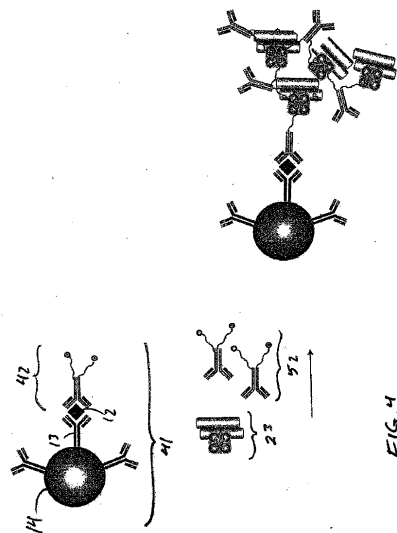
【図 2】



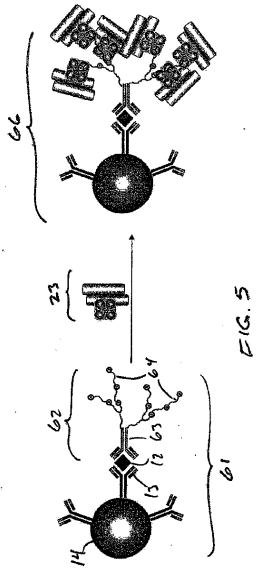
【図 3】



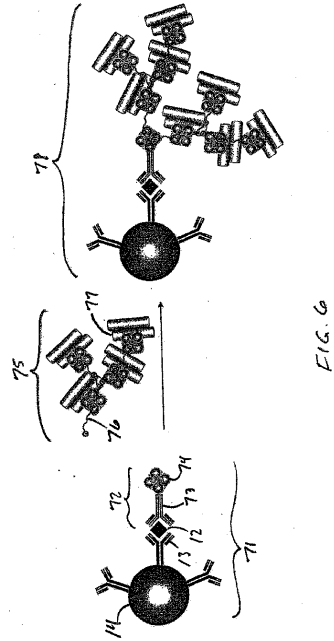
【図 4】



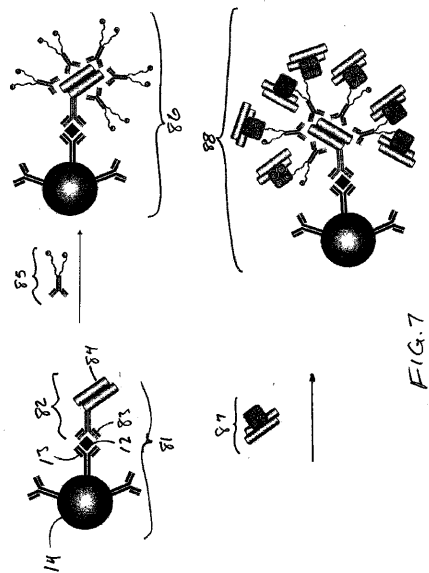
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【手続補正書】

【提出日】平成25年9月5日(2013.9.5)

【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】

サンプル中の分析物を検出するための方法であって、前記方法が、

(a) 前記サンプルを、固体支持体と結合し、かつ前記分析物に対して選択的結合アフィニティを有する第一の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、前記分析物を前記第一の免疫学的結合メンバーを介して前記固体支持体と結合させ；

(b) このように結合した前記分析物と共に、前記固体支持体を、前記分析物に対するアフィニティを有する第二の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第二の免疫学的結合メンバーの各コピーは、アビジン、ストレプトアビジン、及びビオチンからなる群から選択される複数のコピーの第一のアフィニティ型結合メンバーと結合して、前記固体支持体と結合した第一の複合体を形成し、これにより前記第一の複合体のそれぞれが複数のコピーの前記第一のアフィニティ型結合メンバーを含んでなり；

(c) このように結合した前記第一の複合体と共に、前記固体支持体を、アビジン、ストレプトアビジン、及びビオチンからなる群から選択され、かつ前記第一のアフィニティ型結合メンバーに対する結合アフィニティを有する第二のアフィニティ型結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第二のアフィニティ型結合メンバーは前記レポーター基で標識され、前記第二の複合体が前記複数のコピーの前記第一のアフィニティ型結合メンバーを超える数のレポーター基を含んでなるように、前記第一の複合体を、複数のビオチン基が一つのアビジン又はストレプトアビジン基と結合するアビジン - ビオチン型結合を含んでなる第二の複合体に変換し；そして

(d) 前記サンプル中の前記分析物の存在の指標として、前記レポーター基からシグナルを検出することを含む、方法。

【請求項 2】

前記第一のアフィニティ型結合メンバーが、アビジン及びストレプトアビジンからなる群から選択されるメンバーであり、かつ前記第二の免疫学的結合メンバーと直接結合するビオチン基とのアビジン - ビオチン型結合を介して前記第二の免疫学的結合メンバーと結合し、そして前記第一のアフィニティ型結合メンバーは、前記レポーター基で標識され、前記第二の複合体は、前記第一のアフィニティ型結合メンバー上及び前記第二のアフィニティ型結合メンバー上のレポーター基の合計と等しい数のレポーター基を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第二の複合体が、第一のアビジン - ビオチン型結合を介して前記第二の免疫学的結合メンバーと、第二のアビジン - ビオチン型結合を介して前記第二のアフィニティ型結合メンバーとの双方と結合したストレプトアビジン基を含んでなることができるように、前記第一のアフィニティ型結合メンバーがストレプトアビジンであり、前記第二の免疫学的結合メンバーと直接的に結合するビオチン基とのアビジン - ビオチン型結合を介して前記第二の免疫学的結合メンバーと結合し、かつ前記第二のアフィニティ型結合メンバーがビオチンである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第一のアフィニティ型結合メンバーが前記レポーター基で標識され、そして前記第二の複合体が、前記第一のアフィニティ型結合メンバー上及び前記第二のアフィニティ型結合メンバー上のレポーター基の合計と等しい数のレポーター基を含んでなる、請

求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記レポーター基がフィコエリトリンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (b) が、(i) 前記固体支持体を、前記分析物に対するアフィニティを有し、かつ複数のコピーのビオチンと結合する前記第二の免疫学的結合メンバーとインキュベートして、前記固体支持体と結合した予備的な複合体を形成し、そして (ii) このように結合した予備的な複合体と共に、前記固体支持体を、アビジン及びストレプトアビジンからなる群から選択され、かつレポーター基で標識されたメンバーとインキュベートし、前記第一の複合体を形成することを含んでなり、そして前記第二の複合体が、前記第一のアフィニティ型結合メンバー上及び前記第二のアフィニティ型結合メンバー上のレポーター基の合計と等しい数のレポーター基を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

工程 (ii) が、前記固体支持体を前記レポーター基で標識されたストレプトアビジンとインキュベートすることを含んでなる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記レポーター基がフィコエリトリンである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記第二の複合体が、複数の前記ビオチン基と結合するそれぞれの複数のコピーの前記第二のアフィニティ型結合メンバーを含んでなり、そして前記第二の複合体が、前記第二の免疫学的結合メンバーのそれぞれのコピーと結合する前記複数のコピーの前記ビオチン基を超える数のレポーター基を含んでなるように、前記第一のアフィニティ型結合メンバーがビオチンであり、前記第二のアフィニティ型結合メンバーが、アビジン及びストレプトアビジンからなる群から選択されるメンバーであり、そして工程 (c) が、前記固体支持体をブリッジングメンバーとインキュベートすることをさらに含んでなり、ここで前記ブリッジングメンバーのそれぞれのコピーが、複数のビオチン基と結合し、これにより、前記第二の アフィニティ型結合メンバー 及び前記ブリッジングメンバーの双方が、前記第二の免疫学的結合メンバー上の前記ビオチン基と比較して過剰である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ブリッジングメンバーが、前記第一のアフィニティ型結合メンバーの複数のコピーと結合する前記第二の免疫学的結合メンバーの更なるコピーである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記第二のアフィニティ型結合メンバーが、ストレプトアビジンである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記レポーター基がフィコエリトリンである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

サンプル中の分析物を検出するための方法であって、前記方法が、

(a) 前記サンプルを、固体支持体と結合し、かつ前記分析物に対して選択的結合アフィニティを有する第一の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、前記分析物を前記第一の免疫学的結合メンバーを介して前記固体支持体と結合させ；

(b) このように結合した前記分析物と共に、前記固体支持体を、前記分析物に対するアフィニティを有する第二の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第二の免疫学的結合メンバーの各コピーは、複数のコピーのレポーター基で標識され、前記固体支持体と結合した第一の複合体を形成し、これによりそれぞれの前記第一の複合体が複数のコピーの前記レポーター基を含んでなり；

(c) 前記固体支持体を、これらに結合した前記第一の複合体と共に、前記レポーター基に対するアフィニティを有する第三の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、こ

ここで前記第三の免疫学的結合メンバーは、これらに結合したアビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、及びポリビオチンからなる群から選択される第一のアフィニティー型結合メンバーを有し、複数のコピーの前記第三の免疫学的結合メンバーを、前記第二の免疫学的結合メンバーを標識する前記レポーター基と結合させ、これにより前記第一の複合体を、前記レポーター基のコピーあたり複数のコピーの前記第一のアフィニティー型結合メンバーを含んでなる第二の複合体に変換し；

(d) 前記固体支持体を、これらに結合した前記第二の複合体と共に、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、及びポリビオチンからなる群から選択され、かつ前記第一のアフィニティー型結合メンバーに対して結合アフィニティーを有する第二のアフィニティー型結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第二のアフィニティー型結合メンバーは、前記レポーター基で標識され、前記第二の複合体を、前記第一の複合体のレポーター基及び工程(d)により前記第二の複合体に加えられたレポーター基の合計と等しい数のレポーター基を含んでなる第三の複合体に変換し；そして

(e) 前記サンプル中の前記分析物の存在の指標として、前記合計のレポーター基からシグナルを検出することを含む、方法。

【請求項14】

工程(b)における前記複数のコピーの前記レポーター基のそれぞれが、アビジン・ビオチン型結合を介して前記第二の免疫学的結合メンバーと結合する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記第二の免疫学的結合メンバーと前記レポーター基の間の前記アビジン・ビオチン型結合が、前記第二の免疫学的結合メンバーと結合するビオチン基と、前記レポーター基と結合するアビジン又はストレプトアビジンとの結合である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記第一のアフィニティー結合メンバーがビオチンであり、複数の前記第一のアフィニティー型結合メンバーが前記第三の免疫学的結合メンバーの各コピーと結合する、請求項13に記載の方法。

【請求項17】

前記第二のアフィニティー型結合メンバーが、ストレプトアビジンである、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記レポーター基がフィコエリトリンである、請求項13に記載の方法。

【請求項19】

工程(b)における前記複数のコピーの前記レポーター基のそれぞれが、前記第二の免疫学的結合メンバーと結合したビオチン基と、前記レポーター基と結合したストレプトアビジンとのアビジン・ビオチン型結合を介して前記第二の免疫学的結合メンバーと結合し、ここで前記第一のアフィニティー型結合メンバーはビオチンであり、複数の前記第一のアフィニティー型結合メンバーは、前記第三の免疫学的結合メンバーのそれぞれのコピーと結合し、前記第二のアフィニティー型結合メンバーは、ストレプトアビジンである、請求項13に記載の方法。

【請求項20】

サンプル中の分析物を検出するための方法であって、前記方法が、

(a) 前記サンプルを、固体支持体と結合し、かつ前記分析物に対して選択的結合アフィニティーを有する第一の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、前記分析物を前記第一の免疫学的結合メンバーを介して前記固体支持体と結合させ；

(b) このように結合した前記分析物と共に、前記固体支持体を、前記分析物に対するアフィニティーを有する第二の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第二の免疫学的結合メンバーは、アビジン、ストレプトアビジン、及びビオチンマルチマーからなる群から選択される第一のアフィニティー型結合メンバーと結合して、前記固体支

持体と結合した第一の複合体を形成し；

(c) このように結合した前記第一の複合体と共に、前記固体支持体を、アビジン、ストレプトアビジン、及びビオチンマルチマーからなる群から選択される第二のアフィニティー型結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第二のアフィニティー型結合メンバーは、前記第一のアフィニティー型結合メンバーに対する結合アフィニティーを有し、かつ前記レポーター基で標識され、複数のアビジン・ビオチン型結合、及び分析物の分子あたり複数のレポーター基を含んでなる第二の複合体を形成し；そして

(d) 前記サンプル中の前記分析物の存在の指標として、前記レポーター基からシグナルを検出することを含む、方法。

【請求項 21】

前記第一のアフィニティー型結合メンバーが、ビオチンマルチマーであり、前記第二のアフィニティー型結合メンバーが、アビジン及びストレプトアビジンからなる群から選択されるメンバーである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記第一のアフィニティー型結合メンバーが、ビオチンデンドリマーである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記第二のアフィニティー型結合メンバーが、ストレプトアビジンである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

前記レポーター基がフィコエリトリンである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

前記第一のアフィニティー型結合メンバーが、アビジン及びストレプトアビジンからなる群から選択されるメンバーであり、前記第二のアフィニティー型結合メンバーが、前記第一のアフィニティー型結合メンバーと結合しやすいビオチン部分、及びアビジン・ビオチン型結合を介して前記第一のアフィニティー型結合メンバーのコピーと結合する複数の更なるビオチン部分を有するビオチンマルチマーである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 26】

前記第一のアフィニティー型結合メンバーが、ストレプトアビジンである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記第二のアフィニティー型結合メンバーが、ポリビオチンである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記第一のアフィニティー型結合メンバーが、ストレプトアビジンであり、かつ前記第二のアフィニティー型結合メンバーが、ポリビオチンである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 29】

前記レポーター基がフィコエリトリンである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 30】

サンプル中の分析物を検出するための方法であって、前記方法が、

(a) 前記サンプルを、固体支持体と結合し、かつ前記分析物に対して選択的結合アフィニティーを有する第一の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、前記分析物を前記第一の免疫学的結合メンバーを介して前記固体支持体と結合させ；

(b) このように結合した前記分析物と共に、前記固体支持体を、前記分析物に対するアフィニティーを有する第二の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、ここでそれぞれのコピーの前記第二の免疫学的結合メンバーはレポーター基で標識されて、前記固体支持体と結合した第一の複合体を形成し、これによりそれぞれの前記第一の複合体は、前記レポーター基を含んでなり；

(c) 前記固体支持体を、これに結合した前記第一の複合体と共に、前記レポーター基

に対するアフィニティーを有する第三の免疫学的結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第三の免疫学的結合メンバーは、これらに結合するアビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、及びポリビオチンからなる群から選択される第一のアフィニティー型結合メンバーを有し、複数のコピーの前記第三の免疫学的結合メンバーを前記レポーター基と結合させ、これにより前記第一の複合体を、前記レポーター基のコピーあたり複数のコピーの前記第一のアフィニティー型結合メンバーを含んでなる第二の複合体に変換し；

(d) 前記固体支持体を、これらに結合した前記第二の複合体と共に、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、及びポリビオチンからなる群から選択され、かつ前記第一のアフィニティー型結合メンバーに対して結合アフィニティーを有する第二のアフィニティー型結合メンバーとインキュベートし、ここで前記第二のアフィニティー型結合メンバーは、前記レポーター基で標識され、前記第二の複合体を、前記第一の複合体の前記レポーター基及び工程(c)により前記第一の複合体に加えられたレポーター基と等しい数のレポーター基を含んでなる第三の複合体に変換し；そして

(e) 前記サンプル中の前記分析物の存在の指標として、前記合計のレポーター基からシグナルを検出すること
を含んでなる、方法。

【国際調査報告】

61400200026



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/US 12/27764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(B) - G01N 33/543, G01N 33/532 (2012.01)
USPC - 436/518, 436/63, 435/7.5
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)
USPC - 436/518, 436/63, 435/7.5
IPC(B): G01N 33/543, G01N 33/532 (2012.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 436/527, 436/524, 436/528, 435/7.1

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST - PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; Dialog Classic Files - 654, 652, 349, 348, 340, 35, 65, 155; USPTO Web Page; Google Scholar; Search terms - analyte detection, immobilized antibody, multiplex analysis, sandwich immunoassay, biotin, biotin dendrimer, streptavidin, bridging linkers, reporters, phycoerythrin, conjugates

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2001/0049111 A1 (WINDHAB et al.) 06 December 2001 (05.12.2001) para [0021], [0022], [0026], [0028], [0030], [0033], [0046]-[0051], [0053], [0055], [0065], [0069], [0076], [0078]-[0084], [0108], [0113], [0131], Fig 5-7	1-30
Y	US 2006/0228325 A1 (WILBUR et al.) 12 October 2006 (12.10.2006) para [0086], [0087], [0147]	1-30
Y	US 2005/0089890 A1 (CUBICCIOTTI) 28 April 2005 (28.04.2005) para [0032], [0131], [0450], [0451]	3, 7, 9-11, 13-15
Y	US 2007/0077599 A1 (KRUTZIK) 05 April 2007 (05.04.2007) para [0092], [0098], [0113], [0122]	16-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* 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 application or patent 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
20 May 2012 (20.05.2012)

Date of mailing of the international search report

07 JUN 2012

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:
Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

28.3.2014

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 ウェイ タン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 4 7, ハーキュリーズ, モンテゴ ドライブ 1 0 3

(72)発明者 ノブオ モンジ
アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 1 5, シアトル, ノースイースト ナインティーエイトス
ストリート 3 5 4 5

(72)発明者 ビニータ グブタ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 0 6, ダンビル, トロウブリッジ ウェイ 1 1 3 8

(72)発明者 キャンディス レイエス
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 3 0, エル セリート, アシュバリー アベニュー 8 1
1

专利名称(译)	通过利用抗生物素蛋白 - 生物素结合进行免疫测定的信号放大		
公开(公告)号	JP2014515094A	公开(公告)日	2014-06-26
申请号	JP2013556681	申请日	2012-03-05
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-雷德实验室股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物 - Rad实验室, Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	ウェイタン ノブオモンジ ビニータグプタ キャンディスレイエス		
发明人	ウェイ タン ノブオ モンジ ビニータ グプタ キャンディス レイエス		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N33/542		
FI分类号	G01N33/543.501.D G01N33/53.U G01N33/543.575 G01N33/543.525.E		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎		
优先权	61/449463 2011-03-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在夹心型免疫测定中，捕获通常与固相结合捕获抗体和与报告基团偶联的检测抗体之间的蛋白质分析物，与每个分析物分子相关的报告基团的数量通过多种增加利用抗生物素蛋白 - 生物素类型结合的方法，以及检测抗体或多个生物素 - 抗生物素蛋白型结合位点上的报告基团的免疫结合等特征相结合的方法。

