

(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2016-520846  
(P2016-520846A)

(43) 公表日 平成28年7月14日(2016.7.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 0 1 J
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 4 1 A
	GO 1 N 33/53	X

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)

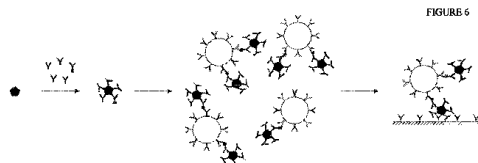
(21) 出願番号	特願2016-517724 (P2016-517724)	(71) 出願人	590000248 コーニンクレッカ フィリップス エヌ ヴェ KONINKLIJKE PHILIPS N. V. オランダ国 5656 アーエー アイン ドーフエン ハイテック キャンパス 5 High Tech Campus 5, NL-5656 AE Eindhove n
(86) (22) 出願日	平成26年6月5日 (2014.6.5)	(74) 代理人	100107766 弁理士 伊東 忠重
(85) 翻訳文提出日	平成27年12月4日 (2015.12.4)	(74) 代理人	100070150 弁理士 伊東 忠彦
(86) 国際出願番号	PCT/IB2014/061986		
(87) 国際公開番号	W02014/195899		
(87) 国際公開日	平成26年12月11日 (2014.12.11)		
(31) 優先権主張番号	13170722.6		
(32) 優先日	平成25年6月6日 (2013.6.6)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多量体の標的分子の検出に対する粒子ベースの試験において凝集を防ぐ試薬、方法及び装置

(57) 【要約】

本発明は、試料内の2つ以上の類似の若しくは同じエピトープを含むマルチエピトープの標的分析物を検出するための、及び/又は、試料内のマルチエピトープの標的分析物の濃度を決定するための試験において検出粒子の凝集を防ぐ方法に関し、当該方法は、マルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる第1の捕獲実体を適用するステップを含み、第1の捕獲実体は、少なくとも1つのエピトープが検出粒子に結合するのを阻止するということを特徴とする。本発明は、さらに、マルチエピトープの標的分析物の検出が第2の捕獲実体の使用を含む方法に関し、第2の捕獲実体は、第1の捕獲実体と同じ又は類似のマルチエピトープの標的分析物のエピトープに特異的に結合することができる。センサ表面を含むシステムにおいて実行される、上記マルチエピトープの標的分析物の検出に対する方法、及び、少なくとも1つのエピトープが磁気検出粒子等の検出粒子に結合するのを阻止する第1の捕獲実体の使用も構想される。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

試料内の 2 つ以上の類似の若しくは同じエピトープを含むマルチエピトープの標的分析物を検出するための、及び / 又は、試料内の前記マルチエピトープの標的分析物の濃度を決定するための試験において検出粒子の凝集を防ぐ方法であって、

前記マルチエピトープの分析物上の少なくとも 1 つのエピトープに特異的に結合することができる第 1 の捕獲実体を適用するステップを含み、前記第 1 の捕獲実体は、前記少なくとも 1 つのエピトープが検出粒子に結合するのを阻止する、方法。

## 【請求項 2】

前記マルチエピトープの標的分析物の検出は、前記第 1 の捕獲実体と同じか又は類似の前記マルチエピトープの標的分析物のエピトープに特異的に結合することができる第 2 の捕獲実体の使用を含み、前記第 2 の捕獲実体は、前記検出粒子に対する前記第 2 の捕獲実体の結合を可能にするラベルを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記マルチエピトープの標的分析物の検出は、前記第 1 の捕獲実体と同じか又は類似の前記マルチエピトープの標的分析物のエピトープに特異的に結合することができる第 2 の捕獲実体の使用を含み、前記第 2 の捕獲実体は、前記検出粒子上に存在する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

試料内のマルチエピトープの標的分析物の検出に対する、及び / 又は、試料内の前記マルチエピトープの標的分析物の濃度の決定に対する方法であって、

- 前記マルチエピトープの分析物上の少なくとも 1 つのエピトープに特異的に結合することができる第 1 の捕獲実体を適用するステップであり、前記第 1 の捕獲実体は、前記少なくとも 1 つのエピトープが検出粒子に結合するのを阻止する、ステップ、

- 前記第 1 の捕獲実体と同じ前記マルチエピトープの標的分析物のエピトープに特異的に結合することができる第 2 の捕獲実体を適用するステップであり、前記第 2 の捕獲実体は、請求項 2 に記載の前記検出粒子に対する第 2 の捕獲実体の結合を可能にするラベルを含む、又は、前記第 2 の捕獲実体は、請求項 3 に記載の前記検出粒子上に存在する、ステップ、及び、

- 前記第 2 の捕獲実体の上に存在する前記ラベルに結合する能力を持つ検出粒子を用いて、又は、前記マルチエピトープの標的分析物の前記エピトープに特異的に結合することができる第 2 の捕獲実体を含む検出粒子を用いて前記マルチエピトープの標的分析物を検出するステップ、  
を含み、

前記検出粒子は、凝集しないように防止される、方法。

## 【請求項 5】

前記試験において使用されることになる前記第 1 の捕獲実体の量及び / 又は前記第 2 の捕獲実体の量は、

( i ) 使用されることになる検出粒子の数、

( i i ) 前記マルチエピトープの標的分析物に対する前記第 2 の捕獲実体の数、

( i i i ) 前記マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数、

( i v ) 測定されることになる前記マルチエピトープの標的分析物の濃度範囲、

( v ) 前記マルチエピトープの標的分析物に対する前記第 1 の捕獲実体の親和性、

( v i ) 前記マルチエピトープの標的分析物に対する前記第 2 の捕獲実体の親和性、及び / 又は、

( v i i ) 前記ラベルに対する前記検出粒子上の結合部位の数、

次第にされる、請求項 2 乃至 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6】

試料内のマルチエピトープの標的分析物を検出するための、及び / 又は、試料内の前記

10

20

30

40

50

マルチエピトープの標的分析物の濃度を決定するための前記試験において使用されることになる前記第1の捕獲実体と前記第2の捕獲実体の割合は、 $n - 1$ 対1であり、 $n$ は、前記マルチエピトープの標的分析物上の同じエピトープの数である、請求項2乃至5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記マルチエピトープの標的分析物を含む前記試料は、前記検出粒子が加えられる前に前記第1の捕獲実体及び/又は前記第2の捕獲実体と接触させられる、請求項2乃至6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記第1の捕獲実体及び/又は前記第2の捕獲実体は、抗体、Fabフラグメント等の抗体断片、DNA分子、RNA分子又は非免疫グロブリンタンパク質である、請求項1乃至7のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項9】

前記非免疫グロブリンタンパク質は、設計アンキリンリピートタンパク質、アフィポディ分子、アドネクチン、アンチカリン、アフィリン、アビマー、ノッチン、フィノマー、フィロマー又はクニッドメインペプチドである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

請求項1乃至9のいずれか一項に記載の方法であって、試料内の前記マルチエピトープの標的分析物の検出及び/又は試料内の前記マルチエピトープの標的分析物の濃度の決定はシステムにおいて行われ、当該方法は、

20

- 前記マルチエピトープの標的分析物を前記検出粒子に結合させるステップ、
  - 前記マルチエピトープの標的分析物に結合した前記検出粒子を、前記システムのセンサ表面に接触させるステップ、
  - 前記システムのセンサ表面上に存在する第3の捕獲実体による、前記マルチエピトープの標的分析物の異なる(同じではない又は類似ではない)エピトープの結合を可能にするステップ、及び、
  - 前記センサ表面にて残る前記粒子を検出するステップ、
- を含む、方法。

【請求項11】

前記検出粒子は磁気粒子である、請求項1乃至10のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項12】

前記試料内のマルチエピトープの標的分析物の検出及び/又は前記試料内のマルチエピトープの標的分析物の濃度の決定は、光磁気システムにおいて行われ、さらに、光学検出は定常性の試料流体において行われる、請求項10又は11に記載の方法。

【請求項13】

検出前に前記磁気粒子を磁氣的に作動させるステップをさらに含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

2つ以上の類似の又は同じエピトープを含むマルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる第1の捕獲実体の使用であって、前記少なくとも1つのエピトープが検出粒子に、好ましくは磁気検出粒子に結合するのを阻止するための使用。

40

【請求項15】

前記マルチエピトープの分析物はCRP又はD-ダイマーである、請求項1乃至13のいずれか一項に記載の方法、又は、請求項14に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料内の2つ以上の類似の若しくは同じエピトープを含むマルチエピトープの標的分析物を検出するための、及び/又は、試料内のマルチエピトープの標的分析物の

50

濃度を決定するための試験において検出粒子の凝集を防ぐ方法に関し、当該方法は、マルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる第1の捕獲実体を適用するステップを含み、第1の捕獲実体は、少なくとも1つのエピトープが検出粒子に結合するのを阻止するということの特徴とする。本発明は、さらに、マルチエピトープの標的分析物の検出が第2の捕獲実体の使用を含む方法に関し、第2の捕獲実体は、第1の捕獲実体と同じ又は類似のマルチエピトープの標的分析物のエピトープに特異的に結合することができる。センサ表面を含むシステムにおいて実行される、上記マルチエピトープの標的分析物の検出に対する方法、及び、少なくとも1つのエピトープが磁気検出粒子等の検出粒子に結合するのを阻止する第1の捕獲実体の使用も構想される。

10

#### 【背景技術】

#### 【0002】

普及力のある効果的な健康管理に対する要求が、*in vitro*での診断の世界を、統合されたランダムアクセス及びポイントオブケアでの解決の方向に動かしている。そのような解決の達成は要求の厳しいものであり、試験が迅速、敏感、定量的且つ正確である必要がある。さらに、試験が行われるプラットフォームは、使用するのが容易で且つコンパクトである必要がある。

#### 【0003】

アフィニティーアッセイは、生物学的分子を使用して、試料から特定の標的分子を捕獲し、さらに、その濃度の決定を可能にする。典型的に、アフィニティー捕獲は、捕獲分子で被覆されたナノ粒子又は微粒子を、試料液内に分散させることによって成し遂げられる（非特許文献1）。典型的な親和性に基づくアッセイは、従って、診断アッセイ、タンパク質、ペプチド及び核酸等の研究における生体分子の検出等、莫大な数の用途において使用され、その結果、特定の生体分子に対する高い結合親和性によって典型的に特徴づけられる例えば抗体等のアフィニティー分子を使用している。原則として、官能性を持った例えば磁気粒子等の粒子はセンサ表面に引きつけられ、そこで粒子は、表面上に印刷された抗体等の捕獲プローブに間接的に、すなわち捕獲された分析物によって、又は、直接的に結合することができる。結合した粒子の数は、試料に存在する標的分子の量に正比例して又は逆比例して関連する。典型的に、そのようなバイオセンサの用途において、粒子は、表面のそばの粒子に感受性のあるいかなる技術も使用して検出することができ、そのような技術は、例えば特許文献2に記載されているように、散乱光又は内部全反射（FTIR）の検出等、光学的検出に基づいていることが多くある。

20

30

#### 【0004】

しかし、そのような従来技術において記載されるアフィニティーアッセイの重要な欠点は、標的分子が多量体の形で存在するか、或いは、多数の又は類似の若しくは同じエピトープを含む場合に、多数の粒子が同じ標的分子に結合する恐れがあり、ビーズ-標的凝集体の形成、すなわちクラスター形成をもたらす恐れがあるという事実である。これは、表面に接触することになり得る例えば磁気粒子等の粒子の数を徹底的に減らす恐れがあり、従って、アッセイの感受性を下げる恐れがある。さらに、そのような凝集プロセスは、再現不可能な様式で発生してもよく、従って、アッセイの不正確な結果をもたらす。

40

#### 【0005】

従って、多量体又はマルチエピトープの標的分子の存在下で粒子のクラスター形成を防ぐ手段及び方法を提供する必要がある。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0006】

【非特許文献1】Luchini et al., 2008, Nano Lett., 8 (1), 350-361

【非特許文献2】Bruls et al., Lab Chip, 2009, 9, 2504-3510

50

- 【非特許文献3】Nielsen, PE, Egholm M (1999), An Introduction to Peptide Nucleic Acid, Curr. Issues Mol. Biol. 1 (2) : 89 - 104
- 【非特許文献4】Binz et al., 2003, J. Mol. Biol. ; 332 (2) : 489 - 503
- 【非特許文献5】Nord et al., 1997, Nat. Biotechnol. ; 15 (8) : 772 - 777
- 【非特許文献6】Koide and Koide, 2007, Methods Mol. Biol. ; 352 : 95 - 109
- 【非特許文献7】Skerra, 2008, FEBS J., 275 (11) : 2677 - 83 10
- 【非特許文献8】Ebersbach et al., 2007 J Mol Biol. ; 372 (1) : 172 - 185
- 【非特許文献9】Hey et al., 2005, Trends Biotechnol. ; 23 (10) : 514 - 522
- 【非特許文献10】Silverman et al., 2005, Nat. Biotechnol. ; 23 (12) : 1556 - 61
- 【非特許文献11】Kimura et al., 2009, Cancer Res., 69 ; 2435
- 【非特許文献12】Grabulovski et al., 2007, Journal of Biological Chemistry, 282 (5) : 3196 - 3204 20
- 【非特許文献13】Watt, 2009, Future Med. Chem., 1 (2) : 257 - 265
- 【非特許文献14】Nixon and Wood, 2006, Curr. Opin. Drug Discov. Devel., 9 (2), 261 - 268
- 【非特許文献15】The Immunoassay Handbook, 4th Edition, Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques, D. Wild, Elsevier Science, 2013 30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、これらのニーズに取り組み、多量体又はマルチエピトープの標的分子の存在下で粒子のクラスター形成を防ぐための手段及び方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記の目的は、特に、試料内の2つ以上の類似の若しくは同じエピトープを含むマルチエピトープの標的分析物を検出するための、及び/又は、試料内の上記マルチエピトープの標的分析物の濃度を決定するための試験において検出粒子の凝集を防ぐ方法によって達成され、当該方法は、上記マルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる第1の捕獲実体を適用するステップを含み、上記第1の捕獲実体は、少なくとも1つのエピトープが検出粒子に結合するのを阻止するという特徴とする。そのような第1の捕獲実体の使用は、標的分析物上の大部分の類似の又は同じエピトープを覆い、且つ、ごく一部若しくは単一のエピトープのみを残す。これらいくつかのエピトープは遊離であり、その後又は同時に、検出粒子と相互作用することができるさらなる捕獲実体によって結合され得る。その結果、さもなければほぼ避けられない検出粒子のクラスター形成が効果的に防止される。これは、アッセイ又は対応する検出方法の感受性をかなり上げ、さらに、アッセイ/検出方法の再現性も改善し、従って、アッセイ/検出方法の精度を上げる。 40

50

## 【0009】

好ましい実施形態において、上述のマルチエピトープの標的分析物の検出は、従って、第1の捕獲実体と同じ又は類似のマルチエピトープの標的分析物のエピトープに特異的に結合することができる第2の捕獲実体の使用を含み、第2の捕獲実体は、検出粒子への第2の捕獲実体の結合を可能にするラベルを含む。

## 【0010】

本発明のさらに別の好ましい実施形態において、マルチエピトープの標的分析物の検出は、第1の捕獲実体と同じ又は類似のマルチエピトープの標的分析物のエピトープに特異的に結合することができる第2の捕獲実体の使用を含み、第2の捕獲実体は、検出粒子上に存在する。

10

## 【0011】

さらなる態様において、本発明は、試料内のマルチエピトープの標的分析物の検出に対する、及び/又は、試料内のマルチエピトープの標的分析物の濃度の決定に対する方法に関し、当該方法は：

- マルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる第1の捕獲実体を適用するステップであって、第1の捕獲実体は、少なくとも1つのエピトープが検出粒子に結合するのを阻止することを特徴とするステップ；
- 第1の捕獲実体と同じマルチエピトープの標的分析物のエピトープに特異的に結合することができる第2の捕獲実体を適用するステップであって、第2の捕獲実体は、本明細書において先に定められた検出粒子への第2の捕獲実体の結合を可能にするラベルを含む、又は、第2の捕獲実体は、本明細書において先に定められた検出粒子の上に存在する、ステップ；及び、
- 第2の捕獲実体の上に存在するラベルに結合する能力を持つ検出粒子を用いて、又は、マルチエピトープの標的分析物のエピトープに特異的に結合することができる第2の捕獲実体を含む検出粒子を用いてマルチエピトープの標的分析物を検出するステップ；

20

上記検出粒子は、凝集しないように防止される。

## 【0012】

上記の方法の好ましい実施形態において、試験において使用されることになる第1の捕獲実体の量及び/又は第2の捕獲実体の量は、

30

- (i) 使用されることになる検出粒子の数；
- (ii) マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の数；
- (iii) マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数；
- (iv) 測定されることになるマルチエピトープの標的分析物の濃度範囲；
- (v) マルチエピトープの標的分析物に対する第1の捕獲実体の親和性；
- (vi) マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の親和性；及び/又は、
- (vii) ラベルに対する検出粒子上の結合部位の数；

次第にされる。

## 【0013】

本明細書において先に定められた第1及び第2の捕獲実体を使用する方法のさらに別の好ましい実施形態において、試料内のマルチエピトープの標的分析物を検出するための、及び/又は、試料内のマルチエピトープの標的分析物の濃度を決定するための試験において使用されることになる第1の捕獲実体と第2の捕獲実体の割合は、 $n - 1$ 対1であり、 $n$ は、マルチエピトープの標的分析物上の同じエピトープの数である。

40

## 【0014】

当該方法のさらなる好ましい実施形態において、マルチエピトープの標的分析物を含む試料は、検出粒子が加えられる前に第1及び/又は第2の捕獲実体と接触させられる。

## 【0015】

本発明の別の好ましい実施形態において、第1の捕獲実体及び/又は第2の捕獲実体は、抗体、Fabフラグメント等の抗体断片、DNA分子、RNA分子又は非免疫グロブリ

50

ンタンパク質である。

【0016】

さらなる好ましい実施形態において、非免疫グロブリンタンパク質は、設計アンキリンリピートタンパク質(DARPin)、アフィボディ分子、アドネクチン、アンチカリン、アフィリン、アビマー、ノッチン、フィノマー、フィロマー又はクニツドメインペプチドである。

【0017】

さらに別の好ましい実施形態において、上記の試料内のマルチエピトープの標的分析物の検出及び/又は試料内のマルチエピトープの標的分析物の濃度の決定はシステムにおいて行われ：

- マルチエピトープの標的分析物を検出粒子に結合させるステップ、
- マルチエピトープの標的分析物に結合した検出粒子を、システムのセンサ表面に接触させるステップ；
- システムのセンサ表面上に存在する第3の捕獲実体による、マルチエピトープの標的分析物の異なる(同じではない又は類似ではない)エピトープの結合を可能にするステップ；及び、
- センサ表面にて残る粒子を検出するステップ；

を含む。

【0018】

特に好ましい実施形態において、検出粒子は磁気粒子である。

【0019】

さらなる好ましい実施形態において、試料内のマルチエピトープの標的分析物の検出及び/又は試料内のマルチエピトープの標的分析物の濃度の決定は光磁気システムにおいて行われ、さらに、光学検出は定常性の試料流体において行われる。

【0020】

好ましい実施形態において、本明細書において先に定められた方法は、検出前に磁気粒子を磁氣的に作動させるステップをさらに含む。

【0021】

さらなる態様において、本発明は、2つ以上の類似の又は同じエピトープを含むマルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる第1の捕獲実体の使用であって、その少なくとも1つのエピトープが検出粒子に結合するのを阻止するための使用に関する。検出粒子は磁気検出粒子であるということが特に好ましい。

【0022】

本明細書において先に定められた方法又は使用の特に好ましい実施形態において、マルチエピトープの分析物はCRP又はD-ダイマーである。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】FTIR検出の原理を示した図である。光源からの光がカートリッジに入り、カートリッジ/流体インターフェースから反射され、さらに、検出器上で画像化される。このインターフェース上に生じるエバネッセント場において粒子が存在する場合、反射光の強度は低下する。

【図2】Magnotech技術を使用したサンドイッチイムノアッセイを示した図である。パネル(1)において、標的に対して作られた一次抗体で被覆された磁気粒子が試料液体内で分散し、標的に結合する。パネル(2)において、上部及び底部のコイルが、パルスの様式で磁気粒子を作動させ、センサ表面への結合を生じ、該センサ表面では、二次抗体が、結合した標的分子に結合することができる。パネル(3)において、結合していない粒子がセンサ表面から除去され、さらに、エバネッセント場を使用して、結合した粒子が検出される。

【図3】磁気粒子サンドイッチアッセイに対する反応スキームを示した図である。2つの

10

20

30

40

50

(異なる濃淡のレベルで示された)異なる捕獲分子は、標的分子上の異なるエピトープに結合することができる。

【図4】五量体の標的分子(例えばCRP等)の概略図である。黒い半円は、(磁気粒子上を被覆する)第1の捕獲分子に対する結合部位を描いており、灰色の半円は、(センサ表面上を被覆する)第2の捕獲分子に対する結合部位を表している。

【図5】同じ標的分子/複合体上の、磁気粒子上の捕獲分子に対する多数の結合部位の存在によって引き起こされるクラスター形成プロセスの概略図である。

【図6】反応スキームを描いた図であり、多量体の標的(黒い五量体)に対するサンドイッチイムノアッセイを記載している。標的は、捕獲分子の混合物と反応させられ、その捕獲分子の一部は、独特な(四角の)ラベルを担持している。形成された複合体は、次に、ラベルに結合することができる捕獲分子で官能性を持たされた磁気粒子と反応させられる。最後に、捕獲された標的分子を有する磁気粒子はセンサ表面と接触させられ、センサ表面では、(薄い灰色の)別の捕獲分子が標的分子上の異なるエピトープに結合することができる。

【図7】使い捨てのカートリッジにおけるイムノアッセイに対して生じる異なるプロセスのスキームを示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明は、多量体又はマルチエピトープの標的分子の存在下で粒子のクラスター形成を防止するための手段及び方法に関する。

【0025】

本発明は特定の実施形態に関して記載されるけれども、この記載は、限定的な意味で解釈されることはない。

【0026】

本発明の例証的な実施形態を詳細に記載する前に、本発明を理解するのに重要な定義が与えられる。

【0027】

本明細書及び付随の特許請求の範囲において使用される場合、不定冠詞を有する単数形は、その前後で何か他に明確に指示していない限り、それぞれの複数形も含む。

【0028】

本発明と関連して、「約」及び「ほぼ」という用語は、くだんの特徴の技術的効果を依然として保証すると当業者が理解するであろう正確さの差を示している。この用語は、典型的に、 $\pm 20\%$ 、好ましくは $\pm 15\%$ 、より好ましくは $\pm 10\%$ 、及び、さらにより好ましくは $\pm 5\%$ の示された数値からの偏差を示している。

【0029】

「含む」という用語は限定的ではないということが理解されたい。本発明の解釈上、「から成る(c o n s i s t i n g o f)」という用語は、「で構成される(c o m p r i s i n g o f)」という用語の好ましい具体化であると考慮される。以後、群が少なくとも特定数の具体化を含むよう規定される場合、これは、好ましくはこれらの具体化から成る群のみを包含するとも意味する。

【0030】

さらに、本明細書及び特許請求の範囲において「第1」、「第2」、「第3」、又は、「(a)」、「(b)」、「(c)」、「(d)」等の用語は、類似の要素を区別するために使用され、必ずしも順番又は時系列順を記述するために使用されているのではない。そのように使用されている用語は、適切な状況下で交換可能であり、本明細書において記述されている本発明の実施形態は、本明細書に記述又は例示された順序以外の順序で操作できるということが理解されたい。

【0031】

「第1」、「第2」、「第3」、又は、「(a)」、「(b)」、「(c)」、「(d)」、「i」、「ii」等の用語が方法又は使用又はアッセイのステップに関する場合、

10

20

30

40

50

ステップ間の時間又は時間間隔の一貫性はなく、すなわち、ステップは、同時に実行することができるか、又は、本明細書において上記又は下記に定められたように本願において示されていない限り、そのようなステップ間には秒、分、時、日、週、月、若しくは年さえの時間間隔があってもよい。

#### 【0032】

本発明は、本明細書において記載される特定の方法論、プロトコル、試薬等は変わり得るためこれらに限定されないということが理解されたい。本明細書において使用される用語法は特定の実施形態を記載する目的のみにあり、付随の特許請求の範囲によってのみ限定されることになる本発明の範囲を限定すると意図されないということも理解されたい。他に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術的及び科学的用語は、当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

10

#### 【0033】

先に提示されてきたように、本発明は、一態様において、試料内の2つ以上の類似の若しくは同じエピトープを含むマルチエピトープの標的分析物を検出するための、及び/又は、試料内の上記マルチエピトープの標的分析物の濃度を決定するための試験において検出粒子の凝集を防止する方法に関し、当該方法は、上記マルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる第1の捕獲実体を適用するステップを含み、上記第1の捕獲実体は、少なくとも1つのエピトープが検出粒子に結合するのを阻止するという特徴とする。

#### 【0034】

本明細書において使用される場合「検出粒子」という用語は、体積又は質量等の物理的特性に基づき得る小さい局在した物体を意味する。本発明に関連して、検出粒子は、当業者には既知のいかなる適した材料も含むか又は該材料から成り、例えば検出粒子は、無機若しくは有機材料を含むか、又は、該材料から成る若しくは該材料から本質的に成ってもよい。典型的に、検出粒子は、金属若しくは金属の合金又は有機材料を含むか、又は、それから成る若しくはそれから本質的に成ってもよく、或いは、炭水化物要素を含むか、又は、該要素から成る若しくは該要素から本質的に成ってもよい。構想される材料の例として、アガロース、ポリスチレン、ラテックス、ポリビニルアルコール、シリカ、及び、強磁性金属、合金、又は、組成材料が挙げられる。特に好ましいのは、磁性若しくは強磁性の金属、合金又は組成物である。本発明に有用な特に好ましい検出粒子は、超常磁性の粒子である。本明細書において使用される場合「超常磁性」という用語は、小さい強磁性又は強磁性のナノ粒子に現れる磁性の形を記載している。十分に小さいナノ粒子において、温度の影響下で磁化が無作為に向きを反転することは当技術分野において既知である。2つの反転間の時間は、ネール緩和時間と呼ばれる。外部磁場の非存在下で、ナノ粒子の磁化を測定するために使用される時間がネール緩和時間よりもはるかに長い場合、磁化は、平均ゼロである、すなわち、常磁性状態にあるように見える。そのような状態において、外部磁場は、常磁性体と同様にナノ粒子を磁化することができる。しかし、磁化率は、常磁性体の磁化率よりもはるかに大きい。

20

30

#### 【0035】

本発明の特定の実施形態において、磁気粒子は、磁気粒子を含有する鉄であってもよい。他の実施形態において、磁気粒子は、 $Fe_3O_4$ 若しくは $Fe_2O_3$ 等の酸化鉄又は鉄白金を含んでもよい。Ni、Co及びCu又はこれらの元素を含む粒子を有した合金も構想される。さらなる実施形態において、磁気粒子は、例えば10重量%、20重量%、30重量%、40重量%、50重量%、60重量%、70重量%、80重量%、90重量%、又は、90重量%を超える等、特定の量の超常磁性のビーズを含んでもよい。そのようなビーズは、例えば、ポリマーコーティングを用いた封入を含んでもよく、従って、約200から300nmのサイズのビーズを提供してもよい。好ましい実施形態において、磁気粒子に含まれる材料は、可能な限り高い体積当たりの飽和モーメントを有してもよく、従って、グラディエント関連力(gradient related force)を最大にするのを可能にしてもよい。

40

50

## 【0036】

さらなる好ましい実施形態において、粒子材料は、特定の特性を有してもよい。材料は、例えば、疎水性又は親水性であってもよい。さらなる特定の実施形態において、粒子は、プラスチック粒子である。プラスチック検出粒子の例として、例えば精製に一般的に使用されるもの等、ラテックス又はポリスチレンビーズが挙げられる。さらに別の実施形態において、粒子は、例えば生物学的システムに存在するか、又は、生物学的システム若しくは生物学的システムの一部の形及び/又は機能を有する生物学的若しくは半生物学的構造体を有する細胞様検出粒子であってもよい。

## 【0037】

さらに、検出粒子は、その輸送及び特性の観点から全ユニット(whole unit)として本質的に振る舞い得る。粒子は、従って、対称的な、球状、本質的に球状若しくは球形のものであってもよく、又は、不規則な非対称の形状若しくは形のものであってもよい。

10

## 【0038】

本発明によって構想される検出粒子のサイズは、50 nmから50  $\mu$ mに及び得る。好ましいのは、ナノメートルから数マイクロメートルまでのマイクロメートルの範囲の検出粒子である。さらなる好ましい実施形態において、検出粒子の直径は100 nmよりも大きい。本明細書において使用される場合「直径」という用語は、粒子の中心を通り且つその端点が検出粒子表面上にあるいかなる直線の部分も意味する。非球形又は半球形の検出粒子の場合、直径は、粒子の中心を通り且つその端点が検出粒子表面上にある最大及び最短の直線部分の平均直径として理解される。特に好ましいのは、例えば、約100 nmから10マイクロメートル、より好ましくは100 nmから3  $\mu$ m、さらにより好ましくは、例えば300 nm、310 nm、320 nm、330 nm、340 nm、350 nm、360 nm、370 nm、380 nm、390 nm、400 nm、410 nm、420 nm、430 nm、440 nm、450 nm、460 nm、470 nm、480 nm、490 nm、500 nm、510 nm、520 nm、530 nm、540 nm、550 nm、560 nm、570 nm、580 nm、590 nm、600 nm、620 nm、650 nm、670 nm、700 nm、720 nm、750 nm、770 nm、800 nm、820 nm、850 nm、870 nm、900 nm、920 nm、950 nm、970 nm、1000 nm又はこれらの間のいかなる値等、300 nmから1000 nmの直径の検出粒子等の検出ナノ粒子である。さらにより好ましいのは、約500 nmの直径を有する検出ナノ粒子である。特に好ましい実施形態において、検出粒子の材料は磁気材料である。さらなる特に好ましい実施形態において、検出粒子は磁気ナノ粒子である。本発明の特に好ましい実施形態において、材料又は例えばナノ粒子等の粒子は、例えば水溶液において分散され得る超常磁性の検出粒子であってもよい。

20

30

## 【0039】

好ましい実施形態において、検出粒子はその表面に、本明細書において定められる標的分析物を直接又は間接的に検出するのを可能にする実体を含んでもよい。例えば、検出粒子は、本明細書において定められる標的分析物に特異的に結合する能力を持つ1つ又は複数の捕獲又は結合実体を含んでもよい。検出粒子が、本明細書において定められる標的分析物に結合する能力を持つか、又は、例えばさらなる相互作用物質又は中間連結分子等を介して間接的に結合する1つ又は複数の結合実体を含む可能性も構想される。そのような検出粒子上のさらなる結合実体は、本発明に関連して第3の捕獲実体として理解することができ、本明細書において以下にさらに定められる。特定の実施形態において、検出粒子は、例えば第3の捕獲実体等の捕獲実体の被覆、例えば抗体若しくは抗体断片の、又は、類似の結合分子、好ましくは、本明細書において以下に詳細に定められる要素の被覆を含んでもよい。特定の実施形態において、検出粒子は、アビジン若しくはストレプトアビジン相互作用物質で被覆されるか若しくは該相互作用物質によって覆われてもよく、又は、ビオチン相互作用物質によって覆われてもよい。そのような分子は、従って、例えばビオチン若しくはアビジンがラベルされた抗体又はいかなる他のビオチン若しくはアビジンが

40

50

ラベルされた捕獲実体の以前の結合を介して、標的分析物上に存在し得るビオチン若しくはアビジン分子との相互作用を可能にする。相互作用物質分子として有用な相互作用結合のさらなる好ましい例は、ビオチン/アビジン、例えば抗FITC、FITC、抗テキサスレッド/テキサスレッド、抗ジゴキシゲニン/ジゴキシゲニン等のいかなる抗体/抗原結合、及び、核酸相補鎖である。核酸相補鎖の使用は、高度な多重化及びほぼ無制限の特異的組み合わせのため有利である。当業者には既知のいかなる適した相互作用結合がさらに構想される。

#### 【0040】

検出粒子に関連して使用される「凝集」という用語は、2つ以上の検出粒子が相互接続されるようになり、さらに、粒子の凝集を形成し、関与している粒子の自由な動き及び解離を妨げるということの意味する。凝集は、本質的に全ての粒子が単一層又は一次元で提供される平らな又は二次元の凝集であってもよく、又は、粒子が集合して粒子のブロック又はクラスターを構築する三次元の凝集であってもよい。凝集は、例えば、同時に2つ以上の検出粒子と相互作用する能力を持つマルチエピトープの標的分析物、又は、いかなる他の連結実体若しくは結合分子の存在によって引き起こされてもよい。凝集の実例が、限定的であると解釈されることはないが、図5において提供されている。

10

#### 【0041】

本明細書において使用される場合「マルチエピトープの標的分析物」という用語は、2つ以上の類似の又は同じエピトープを含む、例えば本発明の方法に従って捕獲する及びもしかすると単離することができる等、検出又は測定することができる、試料内に存在するいかなる物質も意味する。標的分析物は、従って、例えばバクテリア細胞若しくは古細菌細胞を含む原核細胞、又は、真菌、植物、動物、哺乳類及びヒトの細胞を含む真核細胞等の細胞；例えば受容体、リガンド、増殖因子、酵素、転写因子若しくはこれらのうちいずれかの断片等のタンパク質；ペプチド；ウイルス；ホルモン；例えばDNA分子若しくはRNA分子等の核酸；又は、当業者には既知の、2つ以上の類似の又は同じエピトープを含むいかなる他の適した生物学的実体；等の生物学的な標的であってもよい。特定の実施形態において、標的分析物は、病原性細菌、グラム陽性菌又はグラム陰性菌であってもよい。標的分析物として捕獲することができる細菌の例は、大腸菌、マイコバクテリア、赤痢菌、ボレリア、サルモネラ菌、腸球菌、ブドウ球菌、連鎖球菌又は肺炎球菌である。標的は、さらに、小分子又は薬物分子等の化学的な標的分析物であってもよい。典型的な実施形態において、標的分析物は、例えばホモダイマー、トリマー又はマルチマー等のダイマーとして存在するタンパク質であってもよく、さらに典型的には、同じタンパク質の2つ以上のコピーから成るタンパク質複合体であってもよく、又は、サブユニットの2つ以上の反復を含有するタンパク質を含んでもよい。そのような標的分析物の例は、IgG、IgM等のような免疫グロブリン、又は、同じ配列の多数の反復配列を含有する核酸配列等である。

20

30

#### 【0042】

本明細書において使用される場合「類似の又は同じエピトープ」という用語は、第1の捕獲実体によって認識することができる標的分析物上の抗原決定基の存在を意味する。

#### 【0043】

標的分析物上に存在する抗原決定基又はエピトープは、立体構造的なエピトープ又は直線的なエピトープであってもよい。立体構造的なエピトープは、例えばタンパク質等の実体の三次構造に基づき、規定された3D構造又は形状を有してもよく、すなわち、例えばタンパク質等の分子の一次配列の異なるセクターを含んでもよい。直線的なエピトープは、例えば約8から11アミノ酸、又は、約13から17アミノ酸等、特定の長さの連続しているタンパク質配列であってもよい。抗原決定基は、従って、配列及び/又は構造の点からさらに類似であってもよい。これに関連して類似性は、エピトープが、分析物上の他のエピトープと同じ結合又は捕獲実体によって、すなわち、本明細書において定められる第1の捕獲実体によって認識可能であるということの意味する。好ましい実施形態において、類似のエピトープは、同じ抗体、好ましくは同じモノクローナル抗体によって認識す

40

50

ることができる。類似のエピトープは、例えば、約 8 から 11 アミノ酸、又は、約 13 から 17 アミノ酸等、特定の長さの連続しているタンパク質配列であってもよく、1、2又は3つのアミノ酸が交換されるか又は変更される。同じエピトープは、例えば、約 8 から 11 アミノ酸、又は、約 13 から 17 アミノ酸等、特定の長さの連続しているタンパク質配列であってもよく、完全な配列相同性を示す。類似のエピトープは、さらに、三次構造に基づき 3D 構造及び/又は形状を有する立体構造的なエピトープであってもよく、例えばさらなるエピトープの 3D 構造及び/又は形状に対する 85%、90%又は95%を超える類似性等、さらなるエピトープの 3D 構造及び/又は形状に対して高い類似性を示す。同じエピトープは、三次構造に基づき 3D 構造及び/又は形状を有する立体構造的なエピトープであってもよく、さらなるエピトープの 3D 構造及び/又は形状と同じである。

10

#### 【0044】

標的分析物は、そのような類似又は同じエピトープのうち少なくとも2つ以上のエピトープを含んでもよい。例えば、分析物は、上記類似の又は同じエピトープのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、50、100、150等又はそれ以上のエピトープを含んでもよい。従って、これらのエピトープのうち全てが、例えば抗体等の免疫システムの要素等の第1の捕獲実体によって、或いは、抗体の相互作用表面若しくは部分を含む実体、又は、その実体若しくはいかなるサブフォーム若しくは誘導体を含む抗体によって、或いは、本明細書において述べられる分子構造若しくはエピトープに特異的に結合する能力を持つさらなる分子によって認識可能であり得る。標的分析物は、特定の実施形態において、例えば2つの同じ

エピトープ並びに該2つの同じエピトープに（及び互いにも）類似の1、2、3、4、5つのエピトープ等、類似のエピトープ並びに同じエピトープをさらに含んでもよい。加えて、標的分析物は、先に定められたマルチエピトープと同じ又は類似ではない1つ又は複数のさらなるエピトープを含んでもよい。従って、そのような第二のエピトープは、例えば同じ抗体若しくは複数の実体を含む抗体によって、又は、抗体の相互作用表面若しくは部分を含む実体によって、又は、分子構造体に特異的に結合する能力を持つさらなる分子によって等、本明細書において定められる第1の捕獲実体によって特異的に検出可能でなくともよい。好ましくは、標的分析物の類似の又は同じエピトープに結合する能力を持つ捕獲実体と、上述の1つ又は複数の第二の類似していないエピトープとの間に、又は、上述の1つ又は複数の第二の類似していないエピトープに結合する能力を持つ捕獲実体と、

上述の標的分析物の類似の又は同じエピトープとの間に交差反応性はないか又は低い特異性・結合がある。

20

30

#### 【0045】

本明細書において使用される場合「第1の捕獲実体」という用語は、例えば抗体若しくは実体を含む抗体、或いは、例えば、所与の抗体の抗原特異性を決定する高頻度可変性ループ又は抗体の1、2、3、4、5若しくは6のCDR又はいかなるサブフォーム又はその誘導体等の抗体の相互作用表面若しくは部分を含む実体等、免疫システムの要素を意味するか、或いは、分子構造体又はエピトープに特異的に結合する能力を持ついかなるさらなる分子にも関する。第1の捕獲実体は、さらに、免疫グロブリン分子又は抗体に関連していなくてもよいが、異なる代わりとなる機構によってその特異的結合能力を提供することができる。

40

#### 【0046】

好ましい実施形態において、上記第1の捕獲実体は、抗体、例えばFabフラグメント等の抗体断片、核酸又は非免疫グロブリンタンパク質である。

#### 【0047】

本発明に関連して使用される場合「抗体」は、免疫グロブリン分子、及び、免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分を意味し、すなわち、抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子を意味する。本発明の免疫グロブリン分子は、（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY等）いかなるタイプ、（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2等）クラス、又は、サブクラス

50

の免疫グロブリン分子でもあり得る。本発明の抗体は、認識又は特異的に結合する、例えば本発明のポリペプチド等の標的遺伝子の1つ又は複数のエピトープ若しくはタンパク質の観点から記載又は特定してもよい。特異的なエピトープ及びその抗体との相互作用は、当業者には既知であるだろう。本明細書において使用される場合「特異的に結合する」という用語は、免疫特異的な検出、及び、抗原エピトープに対する抗体の結合を意味する。

「特異的に結合する」という用語は、本質的に非特異的な結合を除くが、他の抗原、特に、存在する抗体によって検出される同じ抗原エピトープを含む抗原との交差反応性を必ずしも除くというわけではない。言い換えると、異なるエピトープとの交差反応性は除くべきである一方、類似の又はほぼ同じエピトープへの結合は、本発明による特異的に結合する抗体によって構想されるであろう。

#### 【0048】

抗体は、例えばタンパク質構造体、細胞若しくはウイルスの表面構造体、化学的分子若しくは薬物、酵素又は本明細書において述べられるいかなる他の標的等、標的分析物に特異的に結合する抗体であってもよい。抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多選択性抗体、ヒト抗体、ヒト化若しくはキメラ抗体、単鎖抗体であってもよく、又は、Fabフラグメント、Fab<sub>2</sub>フラグメント、Fab発現ライブラリによって生成される断片、F(ab)<sub>2</sub>、Fv、ジスルフィド結合Fv、ミニボディ(minibody)、二重特異性抗体、scFv、sc(Fv)<sub>2</sub>、完全長免疫グロブリン分子、小モジュラー免疫薬(SMIP)、結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化(camelized)抗体、V<sub>HH</sub>含有抗体、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、及び、上記のうちいずれかの1つ又は複数のいかなるエピトープ結合断片を構成してもよい。好ましいのは、モノクローナル抗体である。抗体は、さらに、ヒト抗原結合抗体断片であってもよく、Fab、Fab<sub>2</sub>及びF(ab)<sub>2</sub>、Fv、単鎖Fvs(scFv)、sc(Fv)<sub>2</sub>、単鎖抗体、ジスルフィド結合Fvs(sdFv)、並びに、VL又はVHドメインを含む断片を含んでもよい。

#### 【0049】

本発明による抗体は、鳥類及び哺乳類を含むいかなる動物由来であってもよい。好ましくは、抗体は、ヒト、ネズミ(例えばマウス及びラット)、ロバ、サル、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ又はニワトリの抗体である。

#### 【0050】

本発明による抗体は、好ましくは、単一特異性の抗体である。

#### 【0051】

核酸分子は、例えば、DNA若しくはRNA、又は、PNA、CNA、HNA、LNA若しくはANA分子、或いは、いかなるその混合若しくは組み合わせ、又は、他のラベル若しくはエピトープとのいかなる混合若しくは組み合わせであってもよい。「PNA」という用語は、ペプチド核酸、すなわち、生物学的研究及び医療処置において使用されるが、自然に発生するとは知られていないDNA又はRNAに類似した人工的に合成されたポリマーに関する。PNAバックボーンは、典型的に、ペプチド結合によって連結される反復N-(2-アミノエチル)-グリシン単位で構成される。種々のプリン及びピリミジン塩基は、メチレンカルボニル結合によってバックボーンに連結される。PNAは、一般的に、ペプチドのように描かれ、第1(左)位置にてN末端、及び、右にてC末端を有している。DNA及びRNAはデオキシリボース及びリボース糖バックボーンをそれぞれ有しているけれども、PNAバックボーンは、ペプチド結合によって連結される反復N-(2-アミノエチル)-グリシン単位で構成される。PNAオリゴマーも、相補DNAに結合することにおいてより高い特異性を示すということが当技術分野において既知である。さらなる詳細を、例えば非特許文献3等のいかなる適した文献資料又はテキストからも得ることができる。「CNA」という用語は、アミノシクロヘキシルエタン酸核酸に関する。さらに、当該用語は、シクロペンタン核酸、すなわち、例えば、2-デオキシカルバグアノシンを含む核酸分子に関する。「HNA」という用語は、ヘキシトール核酸、すなわち、標準的な核酸塩基及びリン酸化1,5-アンヒドロヘキシトールバックボーンから構

10

20

30

40

50

築されるDNA類似体に関する。「LNA」という用語は、ロックド核酸に関する。典型的には、ロックド核酸は、修飾された、従って、近づきにくいRNAヌクレオチドである。LNAヌクレオチドのリボース部分は、2 及び4 炭素を接続する特別の橋 ( e x t r a b r i d g e ) で修飾することができる。そのような橋は、3 - エンド配座構造でリボースをロックする。ロックドリボース構造は、塩基スタッキング及びバックボーン前組織化を高める。これは、熱安定性、すなわちオリゴヌクレオチドの融解温度を有意に増すことができる。「ANA」という用語は、アラビノ核酸又はその誘導体に関する。本発明に関連して好ましいANA誘導体は、2 - デオキシ-2 - フルオローベータ - D - アラビノヌクレオシド ( 2 - F - A N A ) である。

**【0052】**

本明細書において使用される場合「非免疫グロブリンタンパク質」という用語は、リボソームタンパク質等の標的分子に特異的に結合する能力を持つが、免疫グロブリンドメイン又は要素を含まない非常に擬似のタンパク質 ( h i g h l y a f f i n e p r o t e i n ) の群を意味する。非免疫グロブリンタンパク質は、いくつかの異なる結合機構を提供することができ、好ましくは、抗体として、本明細書において先に定められたリボソームタンパク質等の標的構造体に対して類似の親和性を有する。

**【0053】**

本発明に関連して使用することができる非免疫グロブリンタンパク質の好ましい例として、アンキリンリピートを含むタンパク質構造体が挙げられる。典型的には、設計アンキリンリピートタンパク質 ( D A R P i n ) において、3つ、4つ又は好ましくは5つのリピートアンキリンモチーフが存在する。これらは、大きな潜在的な標的相互作用表面を有する安定したタンパク質ドメインを形成することができる。さらなる詳細は、例えば非特許文献4から得ることができる。

**【0054】**

非常に擬似の非免疫グロブリンタンパク質のさらなる好ましい例は、アフィボディ分子、すなわち、タンパク質AのZドメイン (免疫グロブリンG結合ドメイン) に基づくタンパク質である。抗体とは対照的に、アフィボディ分子は、典型的には、アルファヘリックスで構成され且つジスルフィド架橋を欠いている。アフィボディ分子は、種々の宿主細胞において可溶でタンパク分解性に安定した形で発現されてもよい。アフィボディ分子は、さらに、他のタンパク質と融合させてもよい。さらなる詳細は、例えば非特許文献5から得ることができる。

**【0055】**

本発明による非常に擬似の非免疫グロブリンタンパク質の群はアドネクチンも含む。アドネクチンは、ヒトフィブロネクチン、特に、抗体可変ドメインに類似の構造を有するその細胞外タイプI E I ドメインの構造に基づき、パレルを形成する7つのベータシート、及び、3つの相補性決定領域に対応する3つの曝露されたループを各側に含む。アドネクチンは、典型的には、金属イオンに対する結合部位及び中心的なジスルフィド結合を欠いており、I g G タイプの抗体の15分の1ほどの大きさであり、さらに、抗体の1つの可変ドメインのサイズに匹敵する。アドネクチンをカスタマイズし、第2のベータシートと第3のベータシートとの間、及び、第6のシートと第7のシートとの間のループを改変することによって、標的分析物に対する特異性をもたらす及び/又は増やしてもよい。さらなる詳細は、例えば非特許文献6から得ることができる。

**【0056】**

さらなる好ましい例は、ヒトリポカリンから得られる抗体擬態性アンチカリンである。アンチカリンは、典型的には、タンパク質抗原並びに小分子抗原に結合する特性を有し、ループ及び付属的なアルファヘリックスによって接続される8つの逆平行ベータシートによって形成されるパレル構造体で構成される。結合部位でのアミノ酸の変異誘発は、分子の親和性及び選択性の変更を可能にし得る。さらなる詳細は、例えば非特許文献7から得ることができる。

**【0057】**

別の好ましい例は、アフィリン、すなわち、抗原に選択的に結合する能力を有する遺伝子改変タンパク質であり、ガンマ - B クリスタリンから又はユビキチンから構造的に得られる。アフィリンは、典型的には、ガンマ - B クリスタリン又はユビキチンの表面近くのアミノ酸の改変によって構築され、さらに、ファージディスプレイ等のディスプレイ技術によって単離される。クリスタリン及びユビキチンベースのアフィリンの分子質量は、典型的には、それぞれ I g G 抗体の約 8 分の 1 又は 1 6 分の 1 である。これは、90 までの熱安定性、並びに、酸及び塩基に対する改善された安定性をもたらす。さらなる詳細は、例えば非特許文献 8 から又は非特許文献 9 から得ることができる。

#### 【0058】

非常に擬似の非免疫グロブリンタンパク質の群は、アビマー、すなわち、多数の結合部位を介して特定の抗原に特異的に結合することができる人工的なタンパク質も含む。典型的には、個々のアビマー配列は、種々の膜受容体の A ドメインから得られ、さらに、ジスルフィド結合及びカルシウムによって安定化される強固な構造を有する。各 A ドメインは、標的分子の特定のエピトープに結合することができる。同じ標的分子の異なるエピトープに結合するドメインの組合せは、この標的に対する親和性を高めることができる。さらなる詳細は、例えば非特許文献 10 から得ることができる。

10

#### 【0059】

さらなる好ましい例として、ノッチン、すなわち、ジスルフィドノットを介した特別なジスルフィドによって特徴づけられる小ジスルフィドリッチタンパク質が挙げられる。この結び目は、典型的には、1つのジスルフィド架橋が、2つの他のジスルフィド及び相互接続バックボーンによって形成される大環状分子まで渡る（ジスルフィド I I I - V I がジスルフィド I - I V 及び I I - V を通り抜ける）場合に得られる。ノッチンペプチドは、（約 10 から 30 n m o l / L の）高い親和性を有してインテグリン受容体に結合するとして示され得る。ノッチン足場は、従って、本発明による検出部分に結合することができる非常に擬似の分子の設計に使用することができる。さらなる詳細は、例えば非特許文献 11 から得ることができる。

20

#### 【0060】

非常に擬似の非免疫グロブリンタンパク質の群は、フィノマー、すなわち、F y n S H 3 - 誘導タンパク質をさらに含む。F y n は、チロシンキナーゼの S r c ファミリーの 59 - k D a メンバーである。F y n S H 3 ドメインは 63 残基を含み、さらに、そのアミノ酸配列は、ヒト、マウス、ラット及びサルの間で完全に保たれている。フィノマーは、典型的には、2つの逆平行ベータシートで構成され、さらに、2つの可動性ループ（R T 及び n - S r c ループ）を含有して、他のタンパク質又は標的と相互作用する。さらなる詳細は、例えば非特許文献 12 から得ることができる。

30

#### 【0061】

非常に擬似の非免疫グロブリン分子のさらに別の好ましい例は、フィロマーペプチドである。フィロマーペプチドは、極限の環境に部分的に由来し且つ何十億年にもわたって進化してきたであろう進化上の多種多様な微生物のゲノムにおいてコードされる自然発生のタンパク質の生理活性断片であり、生物学的分子に結合する能力を持つ多数の異なる且つ安定した構造体を提供する。さらなる詳細は、例えば非特許文献 13 から得ることができる。

40

#### 【0062】

好ましい非常に擬似の非免疫グロブリン分子の群は、クニツドメインペプチドも含む。クニツドメインは、クニツタイプのプロテアーゼインヒビターの活性ドメインであり、典型的には、約 50 から 60 アミノ酸の長さ、及び、6 k D a の分子量を有する。クニツタイプのプロテアーゼインヒビターの例は、アプロチニン、アルツハイマー病のアミロイド前駆体タンパク質（A P P）、及び、組織因子経路インヒビター（T F P I）である。クニツドメインは、独立型のペプチドとして安定しており、さらに、タンパク質構造体等の特異的標的を認識することができる。従って、本発明による検出部分に結合することができる非常に擬似の分子の設計に使用することができる。さらなる詳細は、例えば

50

非特許文献 14 から得ることができる。

【0063】

第1の捕獲実体は、上記の設計アンキリンリピートタンパク質(DARPin)、アフィボディ分子、アドネクチン、アンチカリン、アフィリン、アビマー、ノッチン、フィノマー、フィロマー又はクニツドメインペプチドであるということが好ましい。

【0064】

第1の捕獲実体は、上記マルチエピトープの標的分析物の少なくとも1つのエピトープをブロックするように適応する。ブロックされるエピトープは、好ましくは、標的分析物上に2つ以上のコピーにおいて類似の又は同じ形で存在するエピトープである。本明細書において使用される場合「ブロックする/ブロックング」という用語は、エピトープが、さらなる捕獲実体と相互作用する能力をもはや持たないように、第1の捕獲実体に結合される及び/又は該捕獲実体によって覆われるということの意味する。ブロックングによって、好ましくは、検出粒子上に存在する捕獲実体の、本明細書において定められる標的分析物との結合が回避される。本発明は、しかし、ブロックングが検出粒子との直接的な相互作用を含まなくてもよいさらなるシナリオも構想する。

10

【0065】

ブロックングは、好ましくは、標的分析物上の類似又は同じエピトープの部分的なブロックングであってもよい。例えば、第1の捕獲実体は、標的分析物上に存在する類似の又は同じエピトープのうち約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は、これらの値の間のいかなる値に結合してもよい。残りのエピトープは、ブロックングステップの後、自由に利用可能であってもよい。試料内の全ての標的分析物のサブポーションにおける全てのエピトープの完全なブロックング、及び、試料内の残りの標的分析物の部分的なブロックングをもたらずブロックングも構想される。

20

【0066】

ブロックングは、永久ブロックング又は可逆ブロックングであってもよい。永久ブロックングは、例えば、架橋又はUV処理等のさらなる固定化ステップを含んでもよい。可逆ブロックングは、第1の捕獲実体の濃度を変えることによって、標的分析物への捕獲実体の結合に影響を及ぼす化学物質を適用することによって、又は、例えば標的分析物を攪拌することによって等、機械力を適用することによって克服することができるブロックングであってもよい。

30

【0067】

本明細書において使用される場合「試料」は、本明細書において定められる標的分析物を含むいかなる試料も意味する。そのような試料は、例えば体液試料を含んでもよい。例えば、体液は、便、全血、血清、血漿、涙、唾液、鼻からの液体、痰、耳からの液体、生殖器液、乳房からの液体、母乳、初乳、胎盤からの液体、羊水、汗(perspirate)、滑液、腹水、脳脊髄液、胆汁、胃液、房水、硝子体液、胃腸液、滲出液、漏出液、胸水、心膜液、精液、上気道液、腹水、免疫応答の部位から収集した液体、プールされた回収部位から収集した液体、気管支肺胞洗浄液、尿、例えば肺、筋肉、脳、肝臓、皮膚、膵臓、胃等、例えば全ての適した臓器からの生検材料、有核細胞試料、粘膜表面、髪、若しくは皮膚と付随する液体から得ることができるか又はそれらを含む。加えて、例えば水の試料、肉又は家禽の試料、土壌試料、あり得る汚染源からの試料等、環境源由来の試料、生物学的試料、食物試料、農業試料を使用してもよい。

40

【0068】

標的分子は、本明細書において先に記載された試料から直接得ることができる。他の状況において、試料は、例えば、結合パートナーに対して標的分子をより利用できるようにする部分精製を含む、例えば標準的なプロトコルに基づく試料調製技術を受けさせてもよい。例えば、血液試料を遠心分離して、血清から細胞全体又は膜を含む分画を分けることができ、便試料を区分して、生理学的に受け入れられる緩衝液及び界面活性剤でホモジナイズすることができ、痰試料を液化及び分画することができる。さらに、抗生物質又は殺

50

菌剤を試料に加えて、存在するいかなる生物のさらなる成長も防ぐことができる。細胞全体を除去することもでき、又は、溶解してその内容物を放出することができる。他の実施形態において、試料を、適した緩衝液においてホモジナイズする及び/又は再懸濁することができる。そのような適した緩衝液における均質化及び再懸濁は、例えば固体の糞便試料内の非液体の便試料の場合に利用することもできる。さらなる実施形態において、本明細書において先に述べられた体液又は試料材料は、化学的又は生物学的反応物を加えることによって処理されてもよい。これは、試料材料を安定化するため、試料成分を除去するため、又は、試料内の相互作用を回避するために行ってもよい。例えば、EDTA又はヘパリンを使用して、血液試料を安定化することができる。血液、すなわち全血若しくは血漿、又は、尿若しくは唾液試料を使用することが好ましい。

10

**【0069】**

凝集が有利に防止されるべきである「マルチエピトープの標的分析物を検出するための試験」は、当業者には既知のいかなる適した分子アッセイ又は分子試験であってもよい。試験は、例えば、イムノアッセイ、ELISAアッセイ、光学及び/又は磁気要素を含むアッセイ、DNA又はRNA実体に基づく試験等であってもよい。好ましくは、試験は、光磁気原理に基づく免疫学的試験である。試験は、例えば分析物は試料内に存在しているか否かという質問に対する答えをもたらす定性的試験であってもよく、又は、例えばどのくらいの分析物が試料内に存在しているかという質問に対する答えを提供する定量的試験であってもよい。

20

**【0070】**

同様に、凝集が防止されるべきである「マルチエピトープの標的分析物の濃度を決定するための試験」は、当業者には既知のいかなる適した濃度測定アプローチであってもよい。そのようなアプローチは、例えばイムノアッセイ、ELISAアッセイ、光学及び/又は磁気要素を含むアッセイ、DNA又はRNA実体に基づく試験等、上記の試験に基づき得る。好ましくは、濃度測定は、光磁気原理に基づいた免疫学的試験に基づく。

**【0071】**

典型的な実施形態において、エピトープをブロックするステップを含む当該方法は、本明細書において先に定められたマルチエピトープの分析物の検出を可能にするさらなるステップによって拡張させられる。このさらなるステップは、第2の捕獲実体の利用を含む。この第2の捕獲実体は、好ましくは、本明細書において先に定められた第1の捕獲実体と同じ又は類似のエピトープに特異的に結合する能力を持つ。本明細書において使用される場合「第2の捕獲実体」という用語は(第1の捕獲実体のように)、例えば抗体若しくは実体を含む抗体、或いは、例えば、所与の抗体の抗原特異性を決定する高頻度可変性ループ又は抗体の1、2、3、4、5若しくは6のCDR又はいかなるサブフォーム又はその誘導体等の抗体の相互作用表面若しくは部分を含む実体等、免疫システムの要素を意味するか、或いは、分子構造体又はエピトープに特異的に結合する能力を持ついかなるさらなる分子にも関する。

30

**【0072】**

好ましい実施形態において、上記第2の捕獲実体は、抗体、例えばFabフラグメント等の抗体断片である。第2の捕獲実体は、さらに、免疫グロブリン分子又は抗体に関連していてもよいが、異なる代わりとなる機構によってその特異的結合能力を提供することができる。第2の捕獲実体は、例えば、核酸又は非免疫グロブリンタンパク質であってもよい。

40

**【0073】**

第2の捕獲実体は、本明細書において先に定められた抗体若しくはその断片、又は、本明細書において先に定められたDNA若しくはRNA等の核酸であるということが好ましい。

**【0074】**

第2の捕獲実体は、上記の設計アンキリンリピートタンパク質(DARPin)、アフィボディ分子、アドネクチン、アンチカリン、アフィリン、アビマー、ノッチン、フィノ

50

マー、フィロマー又はクニッドメインペプチド等の非免疫グロブリンタンパク質であるということがさらに好ましい。

【0075】

第2の捕獲実体は、第1の捕獲実体と機能的及び/又は構造的に同じ又は類似であってもよく、或いは、上記の標的分析物のマルチエピトープに対して同じ特異的結合特性を提供するけれども、第1の捕獲実体とは機能的及び/又は構造的に異なってもよい。

【0076】

好ましい実施形態において、第2の捕獲実体は、第1の捕獲実体と機能的及び/又は構造的に同じであってもよく、さらに、ラベルを含んでもよい。本明細書において使用される場合「ラベル」という用語は、エピトープ又は相互作用物質ドメイン等の認識可能な実体を意味し、ラベル(及び、ラベルを含む捕獲実体)とさらなる捕獲実体との特異的結合を可能にする。好ましくは、ラベルは、本明細書において定められる検出粒子によって認識可能であってもよい。例えば、上記検出粒子上に存在する捕獲実体は、上記ラベルと特異的に相互作用するか又は上記ラベルに特異的に結合する能力を持っていてもよい。その結果、検出粒子に対する標的分析物の結合が、標的分析物の多数の類似の又は同じエピトープのうちの一つに結合する能力を持つ、且つ、同時に、検出粒子に対する相互作用若しくは結合を可能にするセクター又は部分(ラベル)を提供する第2の捕獲実体の相互作用を介して達成可能である。特定の実施形態において、ラベルされていない捕獲実体は、例えば、ウサギ抗体又はIgGであってもよい一方、ラベルされた捕獲実体は、マウスIgGであってもよい。これらの捕獲実体のうちどちらも、同じ標的分析物、すなわち、本明細書において記載される標的物の同じエピトープに対して親和性を有し得る。このシナリオにおいて、検出粒子は、抗マウス抗体又はIgGを含んでもよく、従って、マウス抗体又はIgGにのみ特異的に結合することができる。他の生物等から得られる抗体又はIgGの組合せ等、記載される相互作用の変異形も構想される。

【0077】

適したラベルの構想される例として、アビジン、アビジン関連タンパク質、タマビジン1及び2、ブラダビジン、ニュートラアビジン若しくはストレプトアビジン等のアビジン様実体、又は、その誘導體若しくは相同体が挙げられる。これらのタンパク質は、典型的には、特定の様式において、例えばビオチンを含む構造体に等、ビオチンに結合する。さらなる実施形態において、ラベルは、アビジン、アビジン関連タンパク質、タマビジン1及び2、ブラダビジン、ニュートラアビジン若しくはストレプトアビジン等のアビジン様実体、又は、その誘導體若しくは相同体と相互作用し得るビオチンであってもよい。ラベルのさらなる好ましい例は、抗体若しくはその一部によって結合され得るか又はそれらに結合することができるいかなる抗原又はエピトープでもある。抗FITC捕獲分子によって認識することができるFITC、抗テキサスレッド分子によって認識することができるテキサスレッド、例えば、抗体等の抗ジゴキシゲニン分子によって認識することができる抗体又はジゴキシゲニン等のラベルも構想される。ラベルとしての核酸分子、好ましくは一本鎖の核酸分子の使用がさらに構想される。これらの分子は、相補的な核酸分子によって、又は、その核酸分子の構造若しくは配列を特異的に認識することができる抗体若しくはいかなる他の分子によって認識されてもよい。核酸分子は、従って、本明細書において先に定められたDNA若しくはRNA、又は、PNA、CNA、HNA、LNA若しくはANA分子、或いは、いかなるその混合若しくは組み合わせ、又は、他のラベル若しくはエピトープとのいかなる混合若しくは組み合わせであってもよい。

【0078】

この実施形態の特定の変異形において、上述の検出粒子は、標的分析物に直接結合する能力を持ついかなる捕獲実体も含んでいなくてもよい。代わりに、検出粒子は、本明細書において先に定められたラベルに特異的に結合する能力を持つ捕獲実体を含んでもよく、又は、該捕獲実体で覆われるか若しくは被覆されてもよい。その結果、ラベルとその同族の認識パートナーとの相互作用を可能にすることによって試験の感受性を安定化しながら、検出粒子のクラスター形成は防止される。本発明を限定するとして解釈されることには

10

20

30

40

50

ならない実例が、図6において提供されている。

【0079】

さらなる好ましい実施形態において、第2の捕獲実体は、第1の捕獲実体と機能的及び/又は構造的に同じであってもよく、さらに、本明細書において定められる検出粒子上に存在していてもよい。図5において描かれている状況に似ているこのシナリオにおいて、第1の捕獲実体のブロッキングは有さないが、相互作用パートナーが検出粒子自体によって提供されるため、ラベルの使用は要求されない。

【0080】

本発明による「第3の捕獲実体」は、例えば第1及び第2の捕獲実体に関連して本明細書において先に記載された捕獲実体に関する。第3の捕獲実体は、上記の検出粒子上に存在し、さらに、好ましくは、ラベルを含む第2の捕獲実体に結合してもよい。特に好ましいのは、検出粒子に関連して本明細書において先に定められた第2の捕獲実体と第3の捕獲実体との相互作用結合である。

【0081】

標的分析物の類似又は同じ多数のエピトープの適した割合又は適した量が、第1の捕獲実体によってブロックされる一方で、上記多数のエピトープの適した割合又は適した量が、第1の捕獲実体によってブロックされず、従って、第2の捕獲実体によって認識され且つ結合され得るように、第2の捕獲実体は第1の捕獲実体と共に使用されてもよい。「適した割合」又は「適した量」は、当該方法の要素のいくつかの特徴次第であってもよく、さらに、原則としては、予備試験、校正に従い又は文献知識に基づき当業者によって決定することができる。例えば、そのような予備試験又は校正のアプローチは、当該方法において存在する第1の捕獲実体の量を変えてもよく、さらに、異なる量ごとに、所望の範囲における既知の濃度の標的分析物を用いて当該方法を行ってもよい。当該方法が、例えば最も感受性がある等、最高の成果を表示する第1の捕獲実体の量を選択することができる。或いは、固定量の第1の捕獲実体を用いた類似の試験を使用することができ、さらに、第2の捕獲実体の量を変えることができる。さらなる代わりとなる案において、粒子の量を変えることができる類似の試験を行うことができる。さらに別の代わりとなる案において、上記のパラメータのうち全てのパラメータの組合せが変えられ且つ試験される類似の試験を行うことができる。そのような試験のさらなる詳細及び特徴は、当業者には既知であるか、又は、適した文献資料から得ることができる。

【0082】

典型的には、本発明による試験又は他の適用において使用されることになる第1及び/又は第2の捕獲実体の適した割合又は量は、試験において使用されることになる検出粒子の数次第であり得る。検出粒子がほとんどない場合、凝集の可能性はあまりはっきりしない場合があり、さらに、試験は、例えば多くの結合部位がブロックされる場合等、標的分析物の非結合のため非感受性の傾向があり得る。従って、このシナリオにおいて、第1の捕獲実体を介した多数の類似の又は同じエピトープのブロッキングは、標的分析物上の利用可能な多数の類似の又は同じエピトープの約60から80%を覆うべきである。これは、試料内に標的分析物よりも検出粒子があるため、多数の分析物が同じ粒子に結合する確率が減るというシナリオを用いて平衡が保たれるべきである。これによって、標的分析物上の類似の又は同じエピトープは異なって覆われ得る。適した割合及び量の計算は、どちらの状況も考慮に入れるべきであり、さらに、例えば構想される感受性等、本明細書において記載されるさらなる因子に依存して変わり得る。

【0083】

従って、特定の実施形態において、本発明に関連して使用されることになる第1の捕獲実体の量及び第2の捕獲実体の量は、使用されることになる検出粒子の数次第にされてもよい。従って、第1及び第2の捕獲実体は、特定の実施形態において、本質的に全ての標的分析物が少なくとも一度第2の捕獲実体によって結合され得るように利用可能にされてもよい。さらなる実施形態において、特定の割合の標的分析物に結合しないように、すなわち、全ての標的分析物が結合されるか又は覆われるわけではない量で第1の捕獲実体及

10

20

30

40

50

び第2の捕獲実体を提供するように或いは構想されてもよい。これを利用して、必要性が生じるはずである試験の再現性を改善することができる、又は、クラスター形成の事象を減らすことができる。

#### 【0084】

さらに、本発明による試験又は他の適用において使用されることになる第1及び/又は第2の捕獲実体の適した割合又は量は、標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数次第であり得る。割合は、例えば、標的分析物上に存在するエピトープの化学量論的な計算で大まかに方向づけられてもよい。この情報は、適した文献資料又はデータベースから導き出せるものであってもよく、又は、例えば要求される特定の試験条件下で、標的分析物及び捕獲実体を用いて実行される定量的予備試験に基づき決定されてもよい。一例において、適した割合は、既定の数のエピトープを除いて全てのエピトープがブロックされるようになるように選ばれてもよい。これは、1つの標的分析物あたりブロックされていない1つのエピトープ、2つのエピトープ、3、4、5、6、7、8、9、10等のエピトープであり得る。特定の実施形態において、第1及び第2の捕獲実体は、仮定された試料内の標的分子の最大数又は仮定された測定されることになる標的分析物の濃度範囲の上限が掛けられた標的分析物上のエピトープの数を超過して提供される。その結果、第1の捕獲実体と第2の捕獲実体との化学量論的な比を達成することができる。捕獲実体の総数が、試料内の全ての標的分析物上の利用可能なエピトープの数よりも少ない場合、試料内の本質的に全て又はほぼ全ての標的分析物を捕獲することができないため、不定比性の結合が発生し得るか、又は、試験は非感受性になり得る。

10

20

#### 【0085】

特定のシナリオにおいて、必ずしも過剰量の捕獲実体を有しているというわけではない。そのようなシナリオにおいては、標的分析物を超過しない第1及び/又は第2の捕獲実体を提供することが好ましい。例えば、第2の捕獲実体の数に接近しようとしている非常に高い分析物濃度の場合、粒子上の全ての第2の捕獲実体は、1つの標的分析物のみを大まかに捕獲することができる。この状況において、検出粒子間のクラスター形成は、もはや問題ではなく、又は、あまりはつきりしない。これは、さらなる特定の実施形態において、例えば、試料内の標的分析物の濃度の範囲を予め分析することによって決定することができる。

#### 【0086】

本発明のさらなる特定の実施形態において、本明細書において先に定められた第2の捕獲実体は、本明細書において先に定められたラベルを含んでもよい。上記ラベルは、本明細書において先に定められた検出粒子上の第3の捕獲実体によって結合され得る。この特定の実施形態において、第1及び/又は第2の捕獲実体の適した割合又は量は、第3の捕獲実体の量、及び/又は、該第3の捕獲実体の親和性次第であってもよい。特に、(ラベルと有する)第2の実体の量が(粒子上の)第3の実体の量よりも多いという状況は、標的分析物の一部のみを検出することができることになるため、回避されるべきであるということが好ましい。従って、第3の捕獲実体の量は、例えば10%、15%、20%、25%、50%、75%、100%、200%、500%、1000%又はそれ以上の分だけ、第2の捕獲実体の量を超えるということが好ましい。

30

40

#### 【0087】

別の例において、本発明による試験又は他の適用において使用されることになる第1及び/又は第2の捕獲実体の適した割合又は量は、測定されることになる標的分析物の濃度範囲次第であり得る。標的分子の正確な濃度は不明であるため、試料内の標的分析物の濃度範囲に対するいくつかの仮定を有することは本発明に関連して有用である。そのような濃度範囲は、類似の試料又は試料タイプを用いた歴史的値又は以前の測定から推定することができる。或いは、濃度範囲は、例えば試料のサブポーションを用いた予備試験又は較正試験に基づき決定することができる。仮定される濃度範囲は、制御又は微調整のない標的分析物の濃度の大きな推定であってもよい。その濃度範囲を使用して、例えば仮定された濃度の上限を、標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数と掛けることによって

50

、試料内に存在する、全ての潜在的に存在する同じか又は類似のエピトープを覆うための捕獲実体の総数を定めることができる。その結果、捕獲実体の最大数又は超過数を決定することができる。その後、第1の捕獲実体と第2の捕獲実体の割合を、この数に基づき、及び、1つの標的分析物あたりの同じ又は類似のエピトープの数に基づき計算することができる。

**【0088】**

さらなる代わりとなる実施形態において、異なる濃度を用いた試験が、例えば異なるチャンバ又は装置において同時に行われてもよく、次に、組み合わせられた結果に基づき、最も適切な1つが選ばれてもよく、又は、標的分析物の濃度が決定されてもよい。例えば、異なる濃度若しくは量の第1の捕獲実体、第2の捕獲実体及び/若しくは第3の捕獲実体又は検出粒子上の結合部位を用いた、並びに/或いは、異なる濃度若しくは量の検出粒子を用いた、並びに/或いは、マルチエピトープの標的分析物に対して異なる親和性を有する第1、第2、及び/若しくは第3の捕獲実体を用いた試験が、例えば異なるチャンバ又は装置において行われてもよく、次に、最も適切な濃度若しくは量の上述の要素、及び、最も適切な組合せ若しくは割合の実体が選ばれてもよい。この情報は、その後、標的分析物濃度の決定のために使用することができる。

10

**【0089】**

さらなる特定の実施形態において、本発明に関連して使用されることになる第1の捕獲実体の量及び第2の捕獲実体の量は、測定されることになるマルチエピトープの標的分析物の濃度範囲次第にされてもよい。上記のように計算又は推定することができる濃度範囲は、使用されることになる捕獲実体の総量に関して指標を与えることができる。この実施形態及び類似の実施形態の後ろにある意図は、標的分析物上の類似の又は同じエピトープのブロッキングを提供し、検出粒子の凝集を効果的に減らすのを可能にすることである。そのようなブロッキングは、少数ではあるが一定数の同じ類似の又は同じエピトープをブロッキング捕獲実体(第1の捕獲実体)から免れて維持してこれらのエピトープへの第2の捕獲実体の結合を可能にしながらの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの著しいブロッキングであってもよい。しかし、他の可能性及びブロッキングの比も構想される。これは、例えば標的分析物の濃度の範囲等、本明細書において定められるさらなるパラメータ又は因子次第であり得る。

20

**【0090】**

このように、アプローチは、測定されることになる標的分析物の濃度範囲の大まかな推定が少なくともある場合に、さもなければ不十分な数の捕獲実体を使用され得るため、促進されてもよい。多過ぎる捕獲実体を使用することは、コストを節約するため、並びに、根底にある試験の精度及び感受性を危険にさらし得る第1の捕獲実体と第2の捕獲実体との相互の作用を回避するためにさらに防止されるべきである。

30

**【0091】**

さらに、本発明による試験又は他の適用において使用されることになる第1及び/又は第2の捕獲実体の適した割合又は量は、第2及び/又は第1の捕獲実体の親和性次第であり得る。例えば、第1の捕獲実体(ブロッキング実体)が第2の捕獲実体(検出実体)よりも、標的分析物の類似の又は同じ多数のエピトープに対して低い親和性を有する場合、上記第2の捕獲実体に対する上記第1の捕獲実体の割合は、第2の捕獲実体(検出実体)が第1の捕獲実体(ブロッキング実体)よりも、標的分析物の類似の又は同じ多数のエピトープに対して低い親和性を有する反対の場合よりも高くあるべきである。捕獲実体の親和性を決定する又は計算することができ、さらに、使用されることになる捕獲実体の適した又は最適な割合に関して全計算に因子として入力することができる。適した試験が、本明細書において先に記載されてきた。捕獲実体の親和性を決定するためのさらなる適した試験は、当業者には既知であるか、又は、非特許文献15等の適した文献資料から得ることができる。

40

**【0092】**

さらなる特定の実施形態において、本発明による試験又は他の適用において使用される

50

ことになる第1の捕獲実体の量は、マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の数次第にされてもよい。この実施形態において、第1の捕獲実体の数は、第2の捕獲実体よりも多い量で存在するように選ばれ得る。これは、さらに、標的分析物上の潜在的な同じ又は類似のエピトープの量又は結合部位の量次第にされてもよい。第1の捕獲実体と第2の捕獲実体の割合は、対応する化学量論に従い得る。

【0093】

さらなる特定の実施形態において、本発明による試験又は他の適用において使用されることになる第2の捕獲実体の量は、マルチエピトープの標的分析物に対する第1の捕獲実体の数次第にされてもよい。この実施形態において、第2の捕獲実体の数は、第1の捕獲実体よりも少ない量で存在するように選ばれ得る。これは、さらに、標的分析物上の潜在的な同じ又は類似のエピトープの量又は結合部位の量次第にされてもよい。第1の捕獲実体と第2の捕獲実体の割合は、対応する化学量論に従い得る。

10

【0094】

検出粒子上に第3の捕獲実体が存在する場合、ラベルされた第2の捕獲実体に対する第3の捕獲実体の数、及び/又は、ラベルされた第2の捕獲実体に対する第3の捕獲実体の親和性は、第1及び/又は第2の捕獲実体の数次第にされてもよく、或いは、逆もまた同様であり、すなわち、第1及び/又は第2の捕獲実体の数は、第3の捕獲実体の数次第に、特に、検出粒子上の第3の捕獲実体の数次第にされてもよい。従って、特定の実施形態において、本発明による試験において使用されることになる第1の捕獲実体の量及び/又は第2の捕獲実体の量は、ラベルに対する検出粒子上の結合部位の数次第にされてもよい。その結合部位は、本明細書において先に定められた第3の捕獲実体によって本質的に提供されるということが好ましい。さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び/又は第2の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の数次第にされてもよい。

20

【0095】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び/又は第2の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数；及び、マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数；次第にされてもよい。

【0096】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び/又は第2の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数；及び、測定されることになるマルチエピトープの標的分析物の濃度範囲；次第にされてもよい。

30

【0097】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び/又は第2の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数；及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第1の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

【0098】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び/又は第2の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数；及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

40

【0099】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び/又は第2の捕獲実体の量は：マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の数；及び、マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数；次第にされてもよい。

【0100】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び/又は第2の捕獲実体の量は：マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の数；及び、測定されることになるマルチエピトープの標的分析物の濃度範囲；次第にされてもよい。

【0101】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び/又は第2の捕獲実体の量は：マ

50

ルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の数；及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第1の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

【0102】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び／又は第2の捕獲実体の量は：マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の数；及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

【0103】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び／又は第2の捕獲実体の量は：マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数；及び、測定されることになるマルチエピトープの標的分析物の濃度範囲；次第にされてもよい。

10

【0104】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び／又は第2の捕獲実体の量は：マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数；及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第1の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

【0105】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び／又は第2の捕獲実体の量は：マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数；及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

【0106】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び／又は第2の捕獲実体の量は：測定されることになるマルチエピトープの標的分析物の濃度範囲；及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第1の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

20

【0107】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び／又は第2の捕獲実体の量は：測定されることになるマルチエピトープの標的分析物の濃度範囲；及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

【0108】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び／又は第2の捕獲実体の量は：マルチエピトープの標的分析物に対する第1の捕獲実体；及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

30

【0109】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び／又は第2の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の数；並びに、マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数；次第にされてもよい。

【0110】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び／又は第2の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の数；並びに、測定されることになるマルチエピトープの標的分析物の濃度範囲；次第にされてもよい。

40

【0111】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び／又は第2の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の数；並びに、マルチエピトープの標的分析物に対する第1の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

【0112】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体の量及び／又は第2の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の数；並びに、マルチエピトープの標的分析物に対する第2の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

50

## 【 0 1 1 3 】

さらなる実施形態において、第 1 の捕獲実体の量及び / 又は第 2 の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第 2 の捕獲実体の数；並びに、マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数、及び、測定されることになるマルチエピトープの標的分析物の濃度範囲；次第にされてもよい。

## 【 0 1 1 4 】

さらなる実施形態において、第 1 の捕獲実体の量及び / 又は第 2 の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第 2 の捕獲実体の数；並びに、マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第 1 の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

10

## 【 0 1 1 5 】

さらなる実施形態において、第 1 の捕獲実体の量及び / 又は第 2 の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第 2 の捕獲実体の数；並びに、マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第 2 の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

## 【 0 1 1 6 】

さらなる実施形態において、第 1 の捕獲実体の量及び / 又は第 2 の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第 2 の捕獲実体の数；並びに、マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数、及び、測定されることになるマルチエピトープの標的分析物の濃度範囲、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第 1 の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

20

## 【 0 1 1 7 】

さらなる実施形態において、第 1 の捕獲実体の量及び / 又は第 2 の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第 2 の捕獲実体の数；並びに、マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数、及び、測定されることになるマルチエピトープの標的分析物の濃度範囲、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第 2 の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

30

## 【 0 1 1 8 】

さらなる実施形態において、第 1 の捕獲実体の量及び / 又は第 2 の捕獲実体の量は：使用されることになる検出粒子の数、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第 2 の捕獲実体の数；並びに、マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数、及び、測定されることになるマルチエピトープの標的分析物の濃度範囲、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第 1 の捕獲実体の親和性、及び、マルチエピトープの標的分析物に対する第 2 の捕獲実体の親和性；次第にされてもよい。

## 【 0 1 1 9 】

以下の特徴、すなわち

- ( i ) 使用されることになる検出粒子の数；
- ( i i ) マルチエピトープの標的分析物に対する第 2 の捕獲実体の数；
- ( i i i ) マルチエピトープの標的分析物上の類似の又は同じエピトープの数；
- ( i v ) 測定されることになるマルチエピトープの標的分析物の濃度範囲；
- ( v ) マルチエピトープの標的分析物に対する第 1 の捕獲実体の親和性；
- ( v i ) マルチエピトープの標的分析物に対する第 2 の捕獲実体の親和性；
- ( v i i ) ラベルされた第 2 の捕獲実体に対する第 3 の捕獲実体の数；及び
- ( v i i i ) ラベルされた第 2 の捕獲実体に対する第 3 の捕獲実体の親和性；又は
- ( i x ) 例えば第 2 の捕獲実体上に存在するラベル等のラベルに対する検出粒子上の結合部位の数；

40

のいずれか 1 つのさらなる組合せに対する、第 1 の捕獲実体の量及び / 又は第 2 の捕獲実

50

体の量の依存性も構想される。

【0120】

特に好ましい実施形態において、本発明による試験又は他の適用において使用されることになる第1の捕獲実体と第2の捕獲実体の割合は $n - 1$ 対1であってもよく、 $n$ は、上記マルチエピトープの標的分析物上の同じエピトープの数である。さらなる実施形態において、例えば $n - 2$ 対1、 $n - 3$ 対1、 $n - 4$ 対1、 $n - 5$ 対1、 $n - 6$ 対1等、異なる割合も構想され、 $n$ は、上記マルチエピトープの標的分析物上の同じエピトープの数である。割合は、標的分析物上の同じ又は類似のエピトープの総数、並びに、例えば標的分析物に対する第1及び第2の捕獲実体の類似の親和性の場合に、標的分析物の性質又は構造に従って選ばれてもよい。

10

【0121】

本発明の特定の実施形態において、試験の間の事象の時間系列、すなわち、第1及び/若しくは第2の捕獲実体、並びに/又は、検出粒子の提供の順序が特定されてもよい。例えば、一実施形態において、第1及び第2の捕獲実体並びに検出粒子は、同時に提供されてもよい。

【0122】

さらなる実施形態において、第1及び第2の捕獲実体が第一に提供されてもよく、すなわち、標的分析物と接触させられてもよい。検出粒子は、このステップの間には存在せず、例えば、最初の接触から数秒後、又は、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30分若しくはそれ以上の後等、後の段階にて、第1及び第2の捕獲実体と標的分析物との混合物に加えられてもよい。この実施形態において、第2の捕獲実体には、好ましくは、上記のラベルが提供される。どちらも、すなわちラベルを有する第2の捕獲実体も検出粒子も相互作用し得るため、第1の接触ステップにおける検出粒子の非存在は、ラベルされた第2の捕獲実体と検出粒子との直接の相互作用を回避することができる。両者を一時的に離すことによって、検出粒子からの干渉を有することなく、標的分析物に対する第1及び第2の捕獲実体の比例的な結合を達成することが可能である。さらなる実施形態において、第1の捕獲実体が第一に提供されてもよい一方で、第2の捕獲実体及び検出粒子は、例えば、最初の接触から数秒後、又は、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30分若しくはそれ以上の後等、後に提供されてもよい。

20

30

【0123】

さらに別の実施形態において、第1の捕獲実体及び検出粒子が第一に提供されてもよい一方で、第2の捕獲実体は、例えば、最初の接触から数秒後、又は、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30分若しくはそれ以上の後等、後に提供されてもよい。

【0124】

さらなる態様において、本発明は、試料内の、本明細書において先に定められたマルチエピトープの標的分析物の検出に対する、及び/又は、試料内の上記マルチエピトープの標的分析物の濃度の決定に対する方法に関し、当該方法は：

- 上記マルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる、本明細書において先に定められた第1の捕獲実体を適用するステップであって、上記第1の捕獲実体は、少なくとも1つのエピトープが検出粒子に結合するのを阻止することを特徴とするステップ；
- 第1の捕獲実体と同じ上記マルチエピトープの標的分析物のエピトープに特異的に結合することができる、本明細書において先に定められた第2の捕獲実体を適用するステップであって、第2の捕獲実体は、上記の検出粒子への第2の捕獲実体の結合を可能にするラベルを含む、又は、第2の捕獲実体は、上記の検出粒子の上に存在する、ステップ；及び
- 上記第2の捕獲実体の上に存在する上記ラベルに結合する能力を持つ、本明細書において先に定められた検出粒子を用いて、又は、上記マルチエピトープの標的分析物の上記

40

50

エピトープに特異的に結合することができる第2の捕獲実体を含む検出粒子を用いて上記マルチエピトープの標的分析物を検出するステップ；

を含み、

上記検出粒子は、凝集しないように防止される。

【0125】

当該方法は、本明細書において先に提供された第1及び第2の捕獲実体の量及び/又は割合に対する決定の観察下で実行されてもよい。

【0126】

さらに、当該方法は、上記の異なる時間系列に基づき実行されてもよい。例えば、一実施形態において、第1及び第2の捕獲実体並びに検出粒子は、当該方法の間に同時に提供することができる。

10

【0127】

さらなる実施形態において、第1及び第2の捕獲実体が当該方法の間に第一に提供されてもよく、すなわち、標的分析物と接触させられてもよい。検出粒子は、このステップの間には存在せず、例えば、当該方法の最初の接触ステップから数秒後、又は、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30分若しくはそれ以上の後等、後の段階にて、第1及び第2の捕獲実体と標的分析物との混合物に加えられてもよい。この実施形態において、第2の捕獲実体には、好ましくは、上記のラベルが提供される。どちらも、すなわちラベルを有する第2の捕獲実体も検出粒子も相互作用し得るため、当該方法の間の第1の接触ステップにおける検出粒子の非存在は、ラベルされた第2の捕獲実体と検出粒子との直接の相互作用を回避することができる。当該方法の間に両者を一時的に離すことによって、検出粒子からの干渉を有することなく、標的分析物に対する第1及び第2の捕獲実体の比例的な結合を達成することが可能である。

20

【0128】

さらなる実施形態において、第1の捕獲実体が当該方法の間に第一に提供されてもよい一方で、第2の捕獲実体及び検出粒子は、例えば、最初の接触から数秒後、又は、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30分若しくはそれ以上の後等、後に提供されてもよい。

【0129】

さらに別の実施形態において、第1の捕獲実体及び検出粒子が当該方法の間に第一に提供されてもよい一方で、第2の捕獲実体は、例えば、最初の接触から数秒後、又は、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30分若しくはそれ以上の後等、後に提供されてもよい。

30

【0130】

検出ステップは、いかなる種類の適した読取り方法とさらに組み合わせられてもよく、例えば、検出粒子の量は、いかなる適した光学又は磁気方法論を用いて決定されてもよい。

【0131】

上記のように、マルチエピトープの標的の検出の間に、検出粒子の凝集が防止されるということが上記の方法にとって不可欠である。これは、関与する粒子の分子構造及び形が原因である(例えば、図6の例示を参照されたい)。

40

【0132】

競合相手又は標的類似体の存在を典型的には要求する競合的アプローチに基づくアッセイ又は方法の形式も構想される。本明細書において使用される場合「標的類似体分子」という用語は、本明細書において定められる第1又は第2の捕獲実体への結合に対して標的分析物と競合するいかなる分子も意味する。このような場合、標的分析物は、標的類似体分子への第1又は第2の捕獲実体の結合を妨害することができる。

【0133】

第1又は第2の捕獲実体が、センサ表面に付着した標的類似体分子に結合することができる競合又は阻害のアッセイ又は方法の形式も本発明によって構想される。この結合は、本明細書において記載される標的分析物が、試料内に存在する場合、及び、この標的分析

50

物が第一に第1又は第2の捕獲実体に結合する場合に防止することができる。例えば、小さい薬物分子を、その薬物分子の類似体が例えばフラットセンサ表面に固定化される場合に、構想される方法を使用して検出することができる。薬物分子が試料内に存在しない場合には、標的分析物を認識する捕獲実体を有する全ての粒子が、センサ表面上の標的類似体分子に結合することができる。しかし、この結合を妨害する薬物(標的)分析物の存在下では、抗薬物捕獲実体は、センサ表面上の標的類似体に結合することができないか、又は、そこに結合する数はより少ない。このような場合、センサ表面上の粒子の量は、標的分析物の量に逆相関している。

#### 【0134】

特に好ましい実施形態において、本明細書において先に定められた方法の検出ステップ、すなわち、本明細書において先に定められた試料内の上記マルチエピトープの標的分析物の検出、及び/又は、試料内の上記マルチエピトープの標的分析物の濃度の決定は、適したシステムにおいて行われてもよい。このシステムは、例えば、本明細書において記載される検出粒子の検出に適応してもよい。例えば、このシステムは、以下のステップ、すなわち：

- マルチエピトープの標的分析物を、本明細書において先に記載された検出粒子に、すなわち本明細書において定められる第2の捕獲実体を介して結合させるステップ；
  - マルチエピトープの標的分析物に結合した検出粒子を、システムのセンサ表面に接触させるステップ；
  - 上記システムのセンサ表面上に存在する第3の捕獲実体による、マルチエピトープの標的分析物の異なる(同じではない又は類似ではない)エピトープの結合を可能にするステップ；及び、
  - 上記センサ表面にて残る粒子を検出するステップ；
- を可能にするか又は行うように適応してもよい。

#### 【0135】

一実施形態において、本発明は、例えばバイオセンサシステム等、本明細書において定められるシステムの提供も構想する。そのようなバイオセンサシステムは、例えば、試料容器を含むバイオセンサカートリッジ、粒子を感知するセンサ装置、検出システム、及び、任意で磁場発生装置を含んでもよい。このシステムは、さらなる実施形態において、例えばスクリーン又はプリンタ等の読取りシステム、データベース又はコンピュータシステムに対するインターフェース、校正ユニット、高処理装置との直接又は間接的な相互通信能力等、1つ又は複数のさらなる機能的ユニットを含んでもよい。本発明による方法を実行するのに必要なアッセイの形式又は成分を含むカートリッジを挿入することができる、迅速且つ即座の分析に対するハンドヘルドの装置が本発明によって特に構想される。典型的には、そのような装置は、好ましくは充電式電池の形の電源、ディスプレイ、迅速なデータベースアクセス、又は、研究所情報システムへのアクセスに対するWLAN等の無線の相互通信能力を含む。

#### 【0136】

「センサ表面」は、検出粒子と相互作用する能力を持つ平らな表面であってもよい。センサ表面は、典型的には、捕獲実体、又は、例えば阻害アッセイ若しくは対応する方法の場合には標的類似体等の他の官能性要素で官能性を持たせてもよい。本明細書において使用される場合「相互作用する」という用語は、検出粒子が表面に結合され得る、好ましくは可逆的に結合され得るということの意味する。センサ表面は、検出粒子に対するさらなる活動を行うのを可能にする下流の電子機器又は光学若しくは磁気装置等にさらに接続されてもよい。

#### 【0137】

本明細書において使用される場合「異なるエピトープ」という用語は、上記の標的分析物上の多数のエピトープと同じではなく且つ類似していないエピトープを意味する。このエピトープは、上記の第1若しくは第2の捕獲実体によって本質的には認識されなくてもよく、又は、上記の第1若しくは第2の捕獲実体によって本質的には結合されなくてもよ

10

20

30

40

50

い。さらに、上記第1又は第2の捕獲実体と、上記の異なる（同じではない又は類似ではない）エピトープとの交差反応性は本質的にはなくてもよい。この余分なエピトープ又は結合部位は、さらに、マルチエピトープの標的分析物上に存在してもよい。しかし、このエピトープは、一度又は二度のみ存在してもよく、すなわち、上記の決定による多数のエピトープとして認定しなくてもよい。特定の実施形態において、エピトープは、より多くの数で存在することもでき、すなわち、標的分析物上に3つ以上の同じ又は類似のコピーを有するマルチエピトープとして提供することもできるが、しかし、これらのコピーは、第1及び第2の捕獲分析物が結合することができるエピトープとは同じ又は類似ではない。

#### 【0138】

上記の異なるエピトープは、第3の捕獲実体によって認識され且つ結合され得るということが好ましい。第3の捕獲実体は、好ましくは、センサ表面上又は検出表面上等に存在し得る。第3の捕獲実体は、例えば本明細書において先に定められた抗体、その断片、DNA、RNA、非免疫グロブリンタンパク質等、第1及び第2の捕獲実体と同じ材料で構成されても又は該材料を含んでもよい。第3の捕獲実体は、センサ表面上に固定化されるモノクローナル抗体であるということが好ましい。例示的ではあるが限定的ではない、どのようにしてそのようなセンサ表面での相互作用を行うことができるかという例が、図6において提供されている。ここで、標的分析物は、センサ表面上に存在する第3の捕獲実体を介してセンサ表面に直接結合される。

#### 【0139】

さらなる特定の実施形態において、センサ表面への結合は、センサ表面上の第3の捕獲実体と、標的分析物が検出粒子に結合した場合にのみ利用可能になる検出粒子上の同族のエピトープ又はラベルとの相互作用を介して行うこともできる。例えば、抗体等のセンサ表面上の捕獲実体は、例えば抗体等の粒子上の捕獲実体と標的分析物との界面を認識することができる。その界面は、標的分析物が結合した場合にのみ利用可能になる新たなエピトープに相当していてもよい。

#### 【0140】

標的分析物の（検出粒子を介した）検出は、最終的には、センサ表面にて残る複合体の検出に基づき得る。これは、非特異的に結合した検出粒子を取り除くためにセンサ表面を「洗浄」する以前の活動を含んでもよい。そのような活動は、当業者には相当可能な検出粒子に対するいかなる除去活動を含んでもよい。上記除去活動は、本明細書において先に定められた磁気粒子である検出粒子の磁気作動ということが好ましい。

#### 【0141】

分析手順を促進することができるように磁場を加えることによって作動させることができる本明細書において先に定められた磁気粒子の特定の使用が、本発明によって特に構想される。磁場の使用は、非特異的に結合した粒子の除去によりバックグラウンド信号を減らすことができるということも、本発明によって構想される。本発明による検出の方法に適した例証的な光磁気システムが、図1において描かれている。このように、本発明による方法は、本明細書において先に定められた磁気検出粒子を検出前に磁氣的に作動させるさらなるステップも含む。

#### 【0142】

本発明の一実施形態において、磁場が、粒子をセンサ表面の近くに導くために加えられる。

#### 【0143】

本発明の別の好ましい実施形態において、例えば磁気粒子等の結合した粒子の検出は、表面付近の上記結合した粒子からの内部全反射（FTIR）を介して、若しくは、散乱光の測定を介して、又は、クラスター形成の光学的検出を介して発生する。特に好ましいのは、本明細書において先に定められた粒子、特に磁気粒子の光学的検出に基づくセンシング装置である。対応する詳細は、図1において例示されている例証的な装置から得ることができ、該装置は、光源及び光検出装置を含み、さらに、本発明による特定の実施形態を

10

20

30

40

50

構成している。検出に対して使用される光学的方法は、典型的には、光信号における変化、すなわち、磁気粒子から反射され且つ光学的手段によって検出することができる光における差を測定する。

【0144】

例えば、そのような方法は、散乱光の検出、又は、全反射（TIR）若しくは内部全反射（FTIR）に基づく検出等の技術を含んでもよい。好ましくは、光信号における変化は、センサ表面への第3の捕獲実体の結合によって結合されている磁気粒子のみを指す。詳細は、当業者には既知であるか、又は、非特許文献2等の適した参照文献から得ることができる。

【0145】

本明細書において使用される場合「全反射」という用語は、1つの材料に、特定の角度よりも大きい入射の角度で、より高い屈折率を有した別の材料から光が入る場合に特定の材料において存在する状態を表している。これが発生する特定の角度は、両方の材料の屈折率次第であり、臨界角とも呼ばれ、さらに、数学的に計算することができる（スネルの法則、屈折の法則）。例えば磁気粒子等の粒子を欠く場合は、屈折は発生せず、光源からの光ビームは完全に反射される。例えば磁気粒子等の粒子が、表面の近くにあるか、又は、センサ表面と接触している場合、光線は、粒子によって阻まれていると言われ、そのポイントでの反射は、もはや全反射ではない。全反射の信号の減少として定められ得る信号を計算することができる。

【0146】

その信号は、表面上の粒子の濃度（表面密度

$\tilde{n}$

）にほぼ線形従属している。信号は、

【0147】

【数1】

$$S = \beta \tilde{n}$$

として表すことができ、ここで、Sは、%で表される測定された信号変化であり、さらに、 $\beta$ は、表面密度から信号変化への変換係数である。

【0148】

本発明の好ましい実施形態において、例えば磁気粒子等の結合した粒子の検出は、表面付近の上記結合した粒子からの内部全反射（FTIR）を介して、又は、散乱光の測定を介して発生する。

【0149】

検出は、特に好ましい実施形態において、光磁気システムにおいて行われてもよく、上記粒子は、磁氣的に作動させられ且つ定常性の試料流体において光学的に検出される磁気粒子である。

【0150】

さらなる態様において、本発明は、2つ以上の類似の又は同じエピトープを含むマルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する、本明細書において先に定められた第1の捕獲実体の使用であって、前記少なくとも1つのエピトープのブロッキングのための使用に関する。ブロッキングは、特に、本明細書において定められる検出粒子への標的分析物の結合を阻止することであってもよい。粒子は、好ましくは、本明細書において定められる磁気粒子であってもよい。さらに、磁気粒子は、好ましくは、本明細書において定められる光磁気システムにおいて使用されてもよい。ブロッキングは、代わりとなる実施形態において、いかなる他の粒子又は相互作用実体への結合を阻止することでもあり得る。

【0151】

本発明の特に好ましい実施形態において、検出されるか又は測定されることになるマル

10

20

30

40

50

チエピトープの標的分析物は、少なくとも3つ以上の類似の又は同じエピトープを含む標的である。最も好ましい標的分析物は、CRP及びD-ダイマーである。2つ以上の類似の又は同じエピトープを有するさらなる標的分析物も、本発明の範囲内に包含される。

【0152】

実施形態のさらなる群において、本発明は、好ましくは本明細書において先に定められたマルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる第1の捕獲実体を少なくとも含む部品のキットに関する。特定の実施形態において、部品のキットは、好ましくは本明細書において先に定められたマルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる1つの捕獲実体を含む。さらなる特定の実施形態において、部品のキットは、好ましくは本明細書において先に定められたマルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる第1の捕獲実体；及び、第1の捕獲実体と同じ、好ましくは本明細書において先に定められたマルチエピトープの標的分析物のエピトープに特異的に結合することができる第2の捕獲実体；を含む。

10

【0153】

上記マルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる上記第1の捕獲実体は、特定の実施形態において、その少なくとも1つのエピトープが検出粒子に結合するのを阻止する能力を持っていてもよい。上記第2の捕獲実体は、特定の実施形態において、検出粒子への第2の捕獲実体の結合を可能にするラベルを含んでもよい。さらなる特定の実施形態において、部品のキットは第3の捕獲実体をさらに含んでもよく、第3の捕獲実体は、好ましくは、例えばセンサ表面等、センサ上に固定化されるモノクローナル抗体である。従って、部品のキットは、例えばセンサ表面等の表面の形で提供されてもよく、又は、該表面に基づいてもよい。センサは、特定の実施形態においてキットの一部品として、又は、キットと共に使用することができる外部要素として考慮することができる。

20

【0154】

さらなる実施形態において、部品のキットは、任意で又は加えて、検出粒子、すなわち、当業者には既知のいかなる適した材料を含むか又は該材料から成る粒子を含んでもよく、例えば、検出粒子は、無機若しくは有機材料を含んでもよく、又は、該材料から成っても若しくは本質的に成ってもよく、より好ましくは、本明細書において先に定められた磁気粒子である。

30

【0155】

特定の実施形態において、本発明による部品のキットは、捕獲実体として、本明細書において先に定められた抗体、その断片、DNA、RNA、非免疫グロブリンタンパク質等を含んでもよい。

【0156】

典型的には、本発明によるキットは、緩衝液、ブロッキング試薬、例えば二価カチオン又は一価カチオン等のイオン、キャリブレーションタンパク質 (calibration protein)、二次抗体、検出色素等の検出試薬、及び、当業者には既知のタンパク質検出に基づくものの実行に必要ないかなる他の適した化合物又は液体等の副成分を含んでもよい。そのような成分は、当業者には既知であり、さらに、実行される検出方法に応じて変わり得る。加えて、キットは、指示リーフレットを含んでもよく、及び/又は、得られた結果の関連性に関する情報を提供してもよい。

40

【0157】

実施形態のさらなる群において、本発明は、好ましくは本明細書において先に定められたマルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる第1の捕獲実体を少なくとも含むカートリッジに関する。特定の実施形態において、カートリッジは、好ましくは本明細書において先に定められたマルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる1つの捕獲実体を含む。さらなる特定の実施形態において、カートリッジは、好ましくは本明細書において先

50

に定められたマルチエピトープの分析物上の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合することができる第1の捕獲実体；及び、第1の捕獲実体と同じ、好ましくは本明細書において先に定められたマルチエピトープの標的分析物のエピトープに特異的に結合することができる第2の捕獲実体；を含む。

【0158】

さらなる特定の実施形態において、カートリッジは、好ましくはモノクローナル抗体である第3の捕獲実体をさらに含んでもよい。

【0159】

さらなる特定の実施形態において、カートリッジは、捕獲実体として、本明細書において先に定められた抗体、その断片、DNA、RNA、非免疫グロブリンタンパク質等を含んでもよい。

10

【0160】

本明細書において使用される場合「カートリッジ」は、ガラス、いかなる透明なプラスチック又は半導体のようないかなる適した材料からも作製される容器様の構造体を意味し、その中で試料が測定される。特定の実施形態において、カートリッジは、本明細書において先に定められた捕獲実体等を含む単一の容器又はチャンバを含んでもよい。代わりとなる実施形態において、カートリッジは、例えば2、3、4、5若しくはそれ以上の異なるチャンバ又は容器等、本明細書において先に定められた捕獲実体等を含む2つ以上の容器又はチャンバを含んでもよい。これらのチャンバ又は容器は、好ましくは、互いに又はリンス若しくは流体輸送システムと流体連通している。本発明による捕獲実体及び検出粒子は、好ましくは、全てのチャンバにおいて同様に提供されてもよい。任意の実施形態において、特定のチャンバが、捕獲実体のサブセット及び検出粒子のみを含んでもよく、又は、他のチャンバと比較してより少ない若しくはより多い量を含んでもよい。

20

【0161】

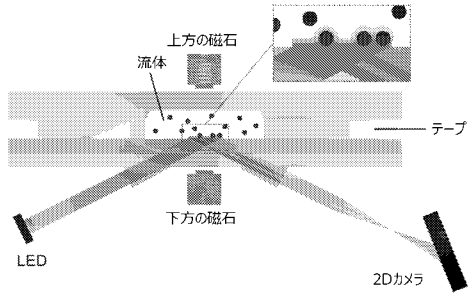
本明細書において記載される例えば磁気粒子等の粒子は、試料が導入される時、例えば1つ以上のチャンバにおいて等、カートリッジにおいてすでに存在していてもよく、試料と共に導入されてもよく、又は、試料が試料容器内に注入された後で導入されてもよい。カートリッジは、例えば本明細書において先に定められたセンサ表面をさらに含んでもよい。好ましくは、センサ表面は、カートリッジの底部に位置している。特定の実施形態において、カートリッジは、例えばセンサ装置からは離れた独立型の要素において、交換可能な実体として提供することができる。試料によるあり得る汚染のため、カートリッジは、好ましくは、例えば射出成形によりプラスチックから作製される使い捨てのアイテムであってもよい。例えば洗浄するか若しくは滅菌することができるカートリッジ又はカートリッジの部品等、再生利用可能なカートリッジ又は再生利用可能なカートリッジの部品も構想される。

30

【0162】

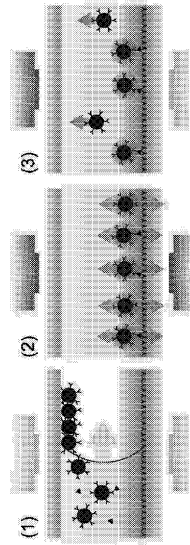
添付の図は、例示目的で提供される。従って、図は限定的であるとして解釈されることはないということが理解される。当業者は、本明細書において展開される原理のさらなる修正を明確に構想することができるようになる。

【 図 1 】



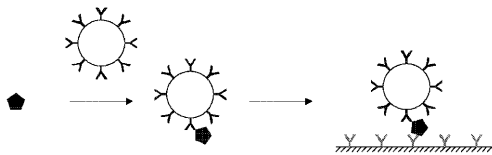
【 図 2 】

FIGURE 2



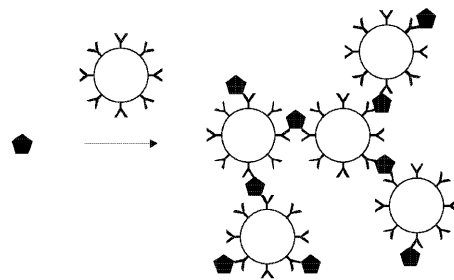
【 図 3 】

FIGURE 3



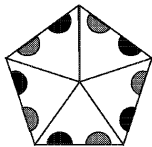
【 図 5 】

FIGURE 5



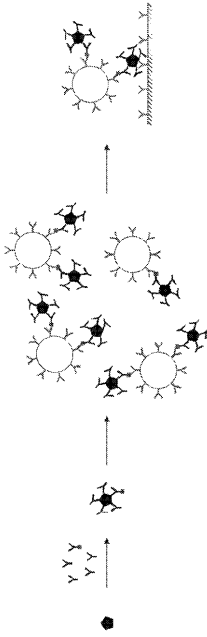
【 図 4 】

FIGURE 4



【 図 6 】

FIGURE 6



【 図 7 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2014/061986

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/543 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/087822 A2 (RESPONSE BIOMEDICAL CORP [CA]; FONG WHALLEY K [CA]) 23 October 2003 (2003-10-23) page 7, last paragraph claims 1,5-7 -----	1-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*E* earlier application or patent but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 20 August 2014		Date of mailing of the international search report 24/11/2014
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 Gundlach, Björn

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2014/061986

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03087822	A2	23-10-2003	
		AU 2003218584 A1	27-10-2003
		CA 2480833 A1	23-10-2003
		CN 1646913 A	27-07-2005
		EP 1493029 A2	05-01-2005
		JP 4532121 B2	25-08-2010
		JP 2005522698 A	28-07-2005
		US 2007148717 A1	28-06-2007
		WO 03087822 A2	23-10-2003
-----			

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/IB2014/061986**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.:

1-3

**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 Application No. PCT/ IB2014/ 061986

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

1. claims: 1-3

Method of detecting an analyte in a sample with the help of detection particles using blocking antibodies to prevent aggregation of particles.

---

2. claims: 4-15

Use of competing antibodies to block epitopes bound by detection particles in methods of detecting an analyte in a sample.

---

## 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, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100091214

弁理士 大貫 進介

(72)発明者 エフェルス, トーン ヘンドリック

オランダ国, 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン, ハイ・テク・キャンパス・ビルディング  
5

(72)発明者 プリンス, メンノ ウィレム ヨゼ

オランダ国, 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン, ハイ・テク・キャンパス・ビルディング  
5

(72)発明者 ニーウェンハイス, イェルーン ハンス

オランダ国, 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン, ハイ・テク・キャンパス・ビルディング  
5

专利名称(译)	用于在多个目标分子的检测中基于颗粒的测试中防止聚集的试剂，方法和设备		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016520846A</a>	公开(公告)日	2016-07-14
申请号	JP2016517724	申请日	2014-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦NV哥德堡		
[标]发明人	エフェルストーンヘンドリク プリンスメンノウィレムヨゼ ニーウエンハイスイエールンハンス		
发明人	エフェルス, トーン ヘンドリク プリンス, メンノ ウィレム ヨゼ ニーウエンハイス, イエールン ハンス		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/54333 G01N33/5306 G01N2446/00		
FI分类号	G01N33/543.501.J G01N33/543.541.A G01N33/53.X		
代理人(译)	伊藤忠彦		
优先权	2013170722 2013-06-06 EP		
其他公开文献	JP2016520846A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明用于检测样品中含有两个或更多个相似或相同表位的多表位靶分析物和/或用于确定样品中多表位靶分析物的浓度。一种防止测试中检测颗粒凝集的方法，该方法包括施加能够与多表位分析物特异性结合至少一个表位的第一捕获实体，该方法包括：捕获实体的特征在于阻断至少一个表位与检测颗粒的结合。本发明进一步涉及一种方法，其中多表位目标分析物的检测包括使用第二捕获实体，其中第二捕获实体是与第一捕获实体相同或相似的多表位目标分析物。可以特异性结合表位。在包括传感器表面的系统中执行的用于检测多表位目标分析物的方法，以及使用第一捕获实体的方法，该捕获实体可阻止至少一个表位与检测颗粒（如磁性检测颗粒）的结合。也可以预见。

