

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】令和2年9月24日(2020.9.24)

【公表番号】特表2019-532275(P2019-532275A)

【公表日】令和1年11月7日(2019.11.7)

【年通号数】公開・登録公報2019-045

【出願番号】特願2019-511411(P2019-511411)

【国際特許分類】

G 0 1 N	33/542	(2006.01)
C 1 2 Q	1/42	(2006.01)
C 1 2 Q	1/28	(2006.01)
C 1 2 N	9/16	(2006.01)
C 1 2 N	9/08	(2006.01)
C 0 7 K	16/28	(2006.01)
C 0 7 K	16/44	(2006.01)

【F I】

G 0 1 N	33/542	B
C 1 2 Q	1/42	
C 1 2 Q	1/28	
C 1 2 N	9/16	B
C 1 2 N	9/08	
C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/44	

【手続補正書】

【提出日】令和2年8月11日(2020.8.11)

【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

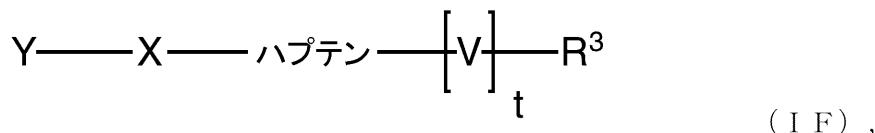
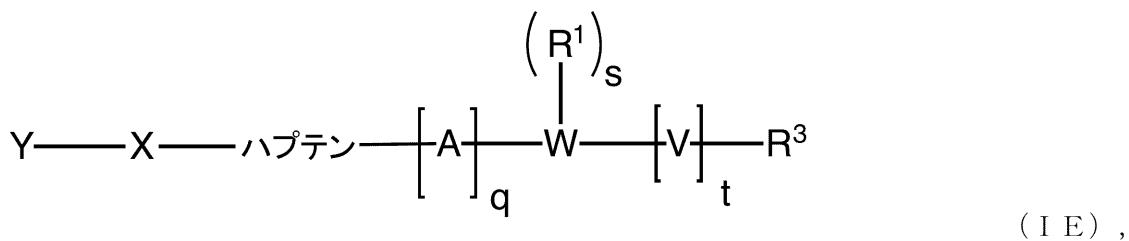
【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(I E)又は(I F)：



[式中、]

「ハプテン」は、ピラゾール類、ニトロフェニル化合物、ベンゾフラザン類、ベンゾフラン類、トリテルペン類、尿素類、チオウレア類、ロテノン及びロテノン誘導体、オキサ

ゾール、チアゾール類、クマリン及びクマリン誘導体、ニトロアリール類、シクロリグナン類、ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、2-ヒドロキシキノキサリン及びジ-ニトロフェノールから選択されるハプテンであり；

Yは、ヒドラジン、ヒドラジン誘導体、アミン、活性エステル、イソチオシアネート類、イソシアネート類、アシリアルジド類、スルホニルクロリド類、アルデヒド類、グリオキサル類、エボキシド類、オキシラン類、カーボネート類、ハロゲン化アリール類、イミドエステル類、無水物、非重合性M i c h a e l受容体、ハロアセチル基、ハロゲン化アルキル、マレイミド類、アジリジン類、アクリロイル基、ビニルスルホン類、ベンゾキノン類、フルオロベンゼン基、及びE l l m a n試薬で活性化されたジスルフィド基又はチオール類から選択され；

Aは、1から15個の炭素原子を有し、O、N、若しくはSからなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり；

Xは、結合であるか、又は、1から30個の炭素原子を有し、O、N、若しくはSからなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり；

Wは、5、6、又は7員の置換又は無置換の芳香族又は複素環式基であり；

各R¹は、H、F、Cl、Br、I、-O-メチル、-O-エチル、-O-n-プロピル、-O-イソプロピル；-O-n-ブチル、-O-sec-ブチル、又は-O-イソ-ブチル；1から4個の炭素原子を有する-S-アルキル基；1から4個の炭素原子を有する-O-アルキル基；1から4個の炭素原子を有する-N(H)-アルキル基；1から6個の炭素原子を有する-N-(アルキル)₂基；1から4個の炭素原子を有し、N又はSで置換されていてもよいアルキル基；シアノ基；及びカルボキシル基から独立して選択され；

Vは、結合、1から4個の炭素原子を有する置換若しくは無置換のアルキル基、又は置換若しくは無置換の-O-アルキル基であり；

R³は酵素基質であり；

qは0又は1であり；

sは0、又は1から4の範囲の整数であり；且つ

tは0又は1である。】

を有するケージドハプテン。

【請求項2】

ハプテンは、7-(ジエチルアミノ)クマリン-3-カルボン酸(DCC)、ビオチン、ニトロピラゾール、チアゾールスルホニアミド、ベンゾフラザン及び2-ヒドロキシキノキサリンからなる群から選択される、請求項1に記載のケージドハプテン。

【請求項3】

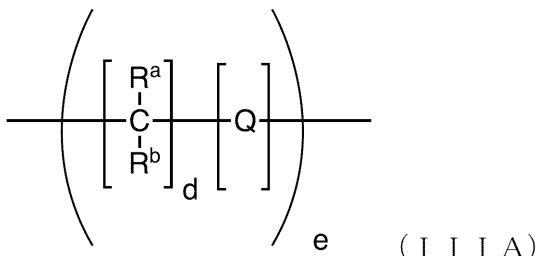
酵素基質が、リン酸基、エステル基、アミド基、硫酸基、グリコシド基、尿素基及びニトロ基からなる群より選択される、請求項1又は2に記載のケージドハプテン。

【請求項4】

各R¹基が異なる、請求項1又は2に記載のケージドハプテン。

【請求項5】

Xが式(I I I A)：



[式中、d及びeは、各々独立して4から18の範囲の整数であり；Qは、結合、O、S又はN(R^c)(R^d)であり；R^a及びR^bは、独立してH、C₁-C₄アルキル基、F、C1又はN(R^c)(R^d)であり；R^c及びR^dは、独立してCH₃又はHである。]の構造を有する、請求項1又は2に記載のケージドハプテン。

【請求項6】

tが1であり、Vが-CH₂-であるか、

tが1であり、Vが-O-CH₂-であるか、

tが1であり、Vが-C(R³)₂ [式中、R³はC₁-C₄アルキル基である。]であるか、又は

tが1であり、Vが-O-C(R³)₂ [式中、R³はC₁-C₄アルキル基である。]である、

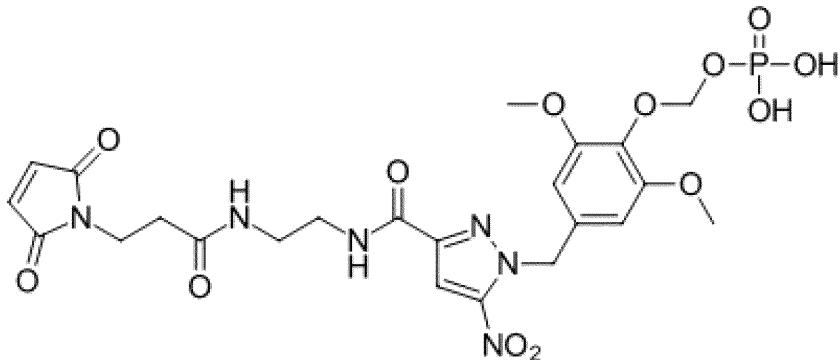
請求項1又は2に記載のケージドハプテン。

【請求項7】

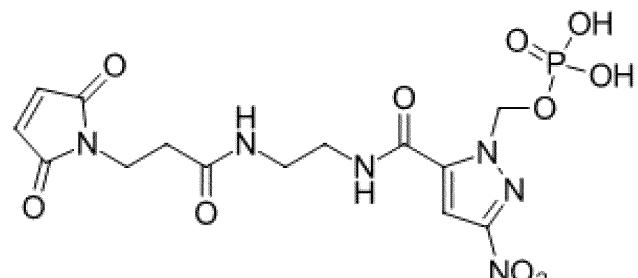
sが2であり、R¹が-O-CH₃-であり、tが1であり、Vが-CH₂-である、
請求項1又は2に記載のケージドハプテン。

【請求項8】

ケージドハプテンが



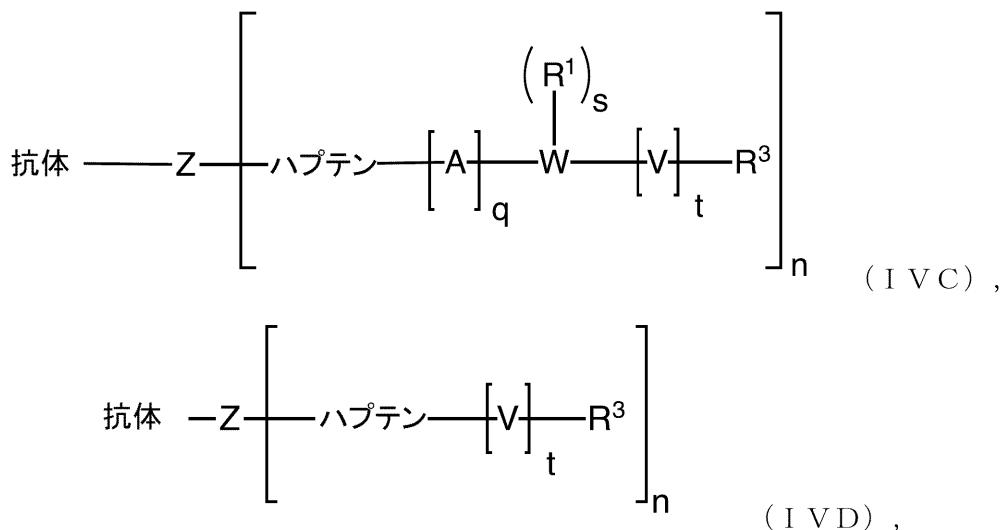
又は



である、請求項1に記載のケージドハプテン。

【請求項9】

式(IVC)又は(IVD)：



[式中、

「抗体」は抗体であり；

「ハプテン」はハプテンであり；

Aは、1から15個の炭素原子を有し、O、N、若しくはSからなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり；

Wは、5、6、又は7員の置換又は無置換の芳香族又は複素環式基であり；

Zは、結合であるか、又は、1から30個の炭素原子を有し、O、N、若しくはSからなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり、

各R¹は、H、F、C1、Br、I、-O-メチル、-O-エチル、-O-n-プロピル、-O-イソプロピル；-O-n-ブチル、-O-sec-ブチル、又は-O-イソ-ブチル；1から4個の炭素原子を有する-S-アルキル基；1から4個の炭素原子を有する-O-アルキル基；1から4個の炭素原子を有する-N(H)-アルキル基；1から6個の炭素原子を有する-N-(アルキル)₂基；1から4個の炭素原子を有し、N又はSで置換されていてもよいアルキル基；シアノ基；及びカルボキシル基から独立して選択され；

Vは、結合、1から4個の炭素原子を有する置換若しくは無置換のアルキル基、又は置換若しくは無置換の-O-アルキル基であり；

R³は酵素基質であり；

nは1から25の範囲の整数であり；

qは0又は1であり；

sは1から4の範囲の整数であり；且つ

tは0又は1である。】

の構造を有する、ケージドハプテン-抗体コンジュゲート。

【請求項10】

ハプテンは、7-(ジエチルアミノ)クマリン-3-カルボン酸(DCC)、ビオチン、ニトロピラゾール、チアゾールスルホニアミド、ベンゾフラザン及び2-ヒドロキシキノキサリンからなる群から選択される、請求項9に記載のケージドハプテン。

【請求項11】

酵素基質が、リン酸基、エステル基、アミド基、硫酸基、グリコシド基、尿素基及び二トロ基からなる群より選択される、請求項9又は10に記載のケージドハプテン。

【請求項12】

抗体が、請求項1から8のいずれか一項に記載のケージドハプテンにコンジュゲートされている、請求項9に記載のケージドハプテン-抗体コンジュゲート。

【請求項 1 3】

第一の標的が第二の標的に近接しているかを決定するために試料を分析するための方法であって、

(a) 試料を、第一の標的に特異的である、請求項 9 から 1 2 のいずれか一項に記載のケージドハプテン - 抗体コンジュゲートと接触させ、第一の標的 - ケージドハプテン - 抗体コンジュゲート複合体を形成すること；

(b) 試料を第二の標的に特異的な非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲートと接触させ、第二の標的 - 非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲート複合体を形成することであって、非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲートの非マスキング酵素がケージドハプテン - 抗体コンジュゲートの酵素基質部分と反応することができるよう選択され、第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体コンジュゲート複合体を形成する、試料を第二の標的に特異的な非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲートと接触させ、第二の標的 - 非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲート複合体を形成すること；

(c) 試料を第一の検出試薬と接触させ、第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体コンジュゲート複合体又は第一の標的を標識すること；及び

(d) 標識された第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体コンジュゲート複合体又は標識された第一の標的を検出すること

を含む、方法。

【請求項 1 4】

非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲートの非マスキング酵素が、アルカリホスファターゼ、B - グルコシダーゼ、B - ガラクトシダーゼ、B - グルクロニダーゼ、リパーゼ、スルファターゼ、アミダーゼ、プロテアーゼ、ニトロレダクターゼ、ベータ - ラクタマーゼ & ノイラミニダーゼ、及びウレアーゼからなる群より選択される、請求項1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

第一の検出試薬が (i) 第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体複合体を第一の酵素で標識するように第一の酵素にコンジュゲートしている二次抗体であって、第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体複合体の非マスク化ハプテンに特異的な二次抗体；及び (i i) 第一の発色性基質又は蛍光性基質を含む、請求項1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

第一の酵素が非マスキング酵素とは異なる、請求項1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

第一の酵素がペルオキシダーゼである、請求項1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

第一の発色性基質が、3 , 3' - ジアミノベンジン (DAB) 、3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール (AEC) 、H R P - S i l v e r 及びチラミド - 色素原からなる群より選択される、請求項1 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

試料を第二の標的 - 非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲート複合体の非マスキング酵素に特異的な第二の発色性基質又は蛍光性基質と接触させることをさらに含み、第一の発色性基質と第二の発色性基質が異なる、請求項1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

第一の検出試薬が、第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体コンジュゲート複合体に導入される標識の数を増幅させるための成分を含む、請求項1 3 に記載の方法。

【請求項 2 1】

第一の標的が P D - 1 又は P D - L 1 の一方であり、第二の標的が P D - 1 又は P D - L 1 のもう一方である、請求項1 3 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 2】

いくつかの実施態様では、反応基Yはカルボニル - 反応基である。適切なカルボニル - 反応基は、ヒドラジン、ヒドラジン誘導体、及びアミンを含む。他の実施態様では、反応基Yはアミン - 反応基である。適切なアミン - 反応基は、活性エステル、例えばNHS又はスルホ - NHS、イソチオシアネート類、イソシアネート類、アシルアジド類、スルホニルクロリド類、アルデヒド類、グリオキサル類、エポキシド類、オキシラン類、カーボネート類、アリールハロゲン化物、イミドエステル類、無水物等を含む。さらなる実施態様では、反応基Yはチオール - 反応基である。適切なチオール - 反応基は、非重合性Michele受容体、ハロアセチル基（例えばヨードアセチル）、ハロゲン化アルキル、マレイミド類、アジリジン類、アクリロイル基、ビニルスルホン類、ベンゾキノン類、フルオロベンゼン基のような求核置換を受けることができる芳香族基、並びにEllman試薬で活性化された、ピリジルジスルフィド基等のジスルフィド基及びチオール類を含む。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 2 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 2 8】

本開示は数多くの例示的な実施態様を参照して記載してきたが、多くの他の修正及び実施態様が、本開示の原理の精神及び範囲内となる当該技術分野の当業者によって考案され得ることを理解されたい。より具体的には、合理的な変更及び修正は、本開示の精神から逸脱することなく、先述の開示、図面及び添付の特許請求の範囲の範囲内で、主題の組み合わせ構成の構成要素部分及び／又は配置において可能である。構成要素部分及び／又は構成における変更及び修正に加えて、代替的な使用もまた当業者には明らかであろう。

<さらなる実施態様>

[実施態様1]

第一の標的が第二の標的に近接しているかを決定するために試料を分析するための方法であって、

(a) 試料を第二の非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲートと接触させ、第二の標的 - 非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲート複合体を形成すること；

(b) 試料を第一のケージドハプテン - 抗体コンジュゲートと接触させ、第一の標的 - ケージドハプテン - 抗体コンジュゲート複合体を形成すること；

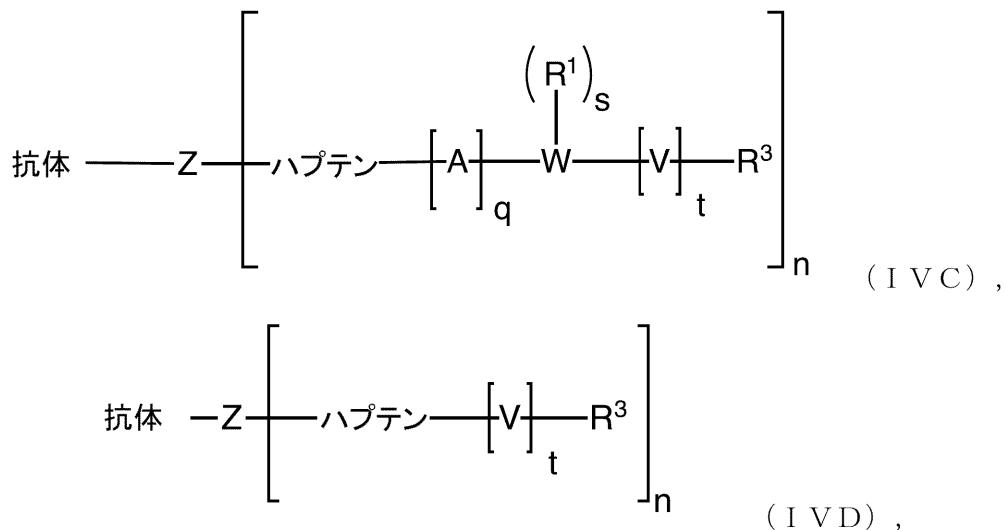
(c) 第一の標的 - ケージドハプテン - 抗体コンジュゲート複合体のケージドハプテンを非マスク化し、第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体コンジュゲート複合体を形成すること；

(d) 試料を第一の検出試薬と接触させ、第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体コンジュゲート複合体又は第一の標的を標識すること；及び

(e) 標識された第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体コンジュゲート複合体又は標識された第一の標的を検出すること

を含み、

第一のケージドハプテン - 抗体コンジュゲートが、式(IVC)又は(IVD)：

[式中、]「抗体」は抗体であり；「ハプテン」はハプテンであり；Aは、1から15個の炭素原子を有し、O、N、若しくはSからなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり；Wは、5、6、又は7員の置換又は無置換の芳香族又は複素環式基であり；Zは、結合であるか、又は、1から30個の炭素原子を有し、O、N、若しくはSからなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり、各R¹は、H、F、Cl、Br、I、-O-メチル、-O--エチル、-O-n-プロピル、-O--イソプロピル；-O-n-ブチル、-O-sec-ブチル、又は-O-イソ-ブチル；1から4個の炭素原子を有する-S-アルキル基；1から4個の炭素原子を有する-O-アルキル基；1から4個の炭素原子を有する-N(H)-アルキル基；1から6個の炭素原子を有する-N-(アルキル)₂基；1から4個の炭素原子を有し、N又はSで置換されていてもよいアルキル基；シアノ基；及びカルボキシル基から独立して選択され；Vは、結合、1から4個の炭素原子を有する置換若しくは無置換のアルキル基、又は置換若しくは無置換の-O-アルキル基であり；R³は酵素基質であり；nは1から25の範囲の整数であり；qは0又は1であり；sは1から4の範囲の整数であり；且つtは0又は1である。]の構造を有する、方法。[実施態様2]第一の検出試薬が(i)第一の標的-非マスク化ハプテン-抗体複合体を第一の酵素で標識するように第一の酵素にコンジュゲートしている二次抗体であって、第一の標的-非マスク化ハプテン-抗体複合体の非マスク化ハプテンに特異的な二次抗体；及び(ii)第一の酵素の第一の基質を含む、実施態様1に記載の方法。[実施態様3]第一の基質が発色性基質又は蛍光性基質である、実施態様2に記載の方法。[実施態様4]第一の検出試薬が、第一の標的-非マスク化ハプテン-抗体コンジュゲート複合体の非マスク化酵素を複数の第一のレポーター部分で標識するための増幅成分を含む、実施態様

1に記載の方法。

[実施態様5]

複数の第一のレポーター部分がハプテンである、実施態様4に記載の方法。

[実施態様6]

第一の検出試薬が、それぞれ第二のレポーター部分にコンジュゲートしている二次抗体であって、複数の第一のレポーター部分に特異的な二次抗体をさらに含む、実施態様5に記載の方法。

[実施態様7]

第二のレポーター部分が増幅酵素又はフルオロフォアからなる群より選択される、実施態様5に記載の方法。

[実施態様8]

第二のレポーター部分が増幅酵素であり、第一の検出試薬が増幅酵素の第一の発色性基質又は蛍光性基質をさらに含む、実施態様7に記載の方法。

[実施態様9]

試料を第二の標的 - 非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲート複合体の非マスキング酵素に特異的な第二の基質と接触させることと、第二の基質と非マスキング酵素との間の反応の生成物に相当するシグナルを検出することとをさらに含む、実施態様1に記載の方法。

[実施態様10]

第一の標的が第二の標的に近接しているかを決定するために試料を分析するための方法であって、

(a) 試料を第二の非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲートと接触させ、第二の標的 - 非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲート複合体を形成すること；

(b) 試料を第一のケージドハプテン - 抗体コンジュゲートと接触させ、第一の標的 - ケージドハプテン - 抗体コンジュゲート複合体を形成すること；

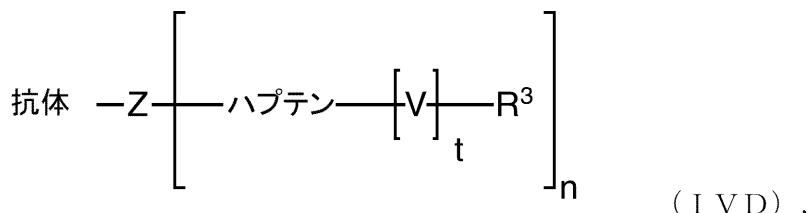
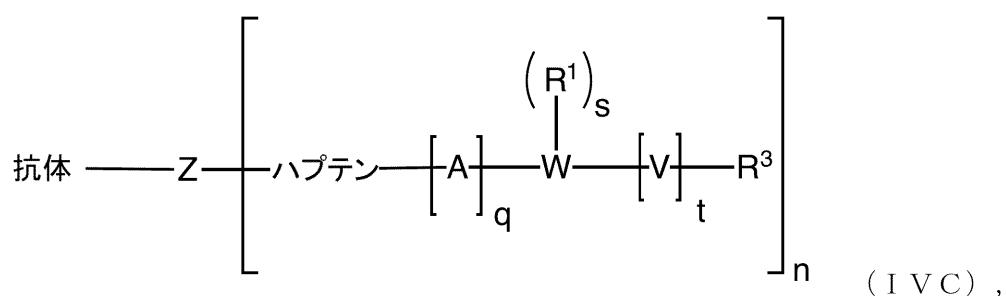
(c) 第一の標的 - ケージドハプテン - 抗体コンジュゲート複合体のケージドハプテンを非マスク化し、第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体コンジュゲート複合体を形成すること；

(d) シグナル増幅工程を実施し、第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体コンジュゲート複合体を複数のレポーター部分で標識すること；及び

(e) 複数のレポーター部分を検出すること

を含み、

第一のケージドハプテン - 抗体コンジュゲートが、式(IVC)又は(IVD)：



[式中、

「抗体」は抗体であり；

「ハプテン」はハプテンであり；

Aは、1から15個の炭素原子を有し、O、N、若しくはSからなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり；

Wは、5、6、又は7員の置換又は無置換の芳香族又は複素環式基であり；

Zは、結合であるか、又は、1から30個の炭素原子を有し、O、N、若しくはSからなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり、

各R¹は、H、F、C1、Br、I、-O-メチル、-O--エチル、-O-n-プロピル、-O--イソプロピル；-O-n-ブチル、-O-sec-ブチル、又は-O-イソ-ブチル；1から4個の炭素原子を有する-S-アルキル基；1から4個の炭素原子を有する-O-アルキル基；1から4個の炭素原子を有する-N(H)-アルキル基；1から6個の炭素原子を有する-N-(アルキル)基；1から4個の炭素原子を有し、N又はSで置換されていてもよいアルキル基；シアノ基；及びカルボキシル基から独立して選択され；

Vは、結合、1から4個の炭素原子を有する置換若しくは無置換のアルキル基、又は置換若しくは無置換の-O-アルキル基であり；

R³は酵素基質であり；

nは1から25の範囲の整数であり；

qは0又は1であり；

sは1から4の範囲の整数であり；且つ

tは0又は1である。]

の構造を有する、方法。

[実施態様11]

複数のレポーター部分がハプテンであり、それぞれ第二のレポーター部分にコンジュゲートしている二次抗体であって、複数の第一のレポーター部分に特異的な二次抗体を導入することをさらに含む、実施態様10に記載の方法。

[実施態様12]

第二のレポーター部分が增幅酵素であり、增幅酵素の発色性基質又は蛍光性基質を導入することをさらに含む、実施態様11に記載の方法。

[実施態様13]

試料中の標的の総量を検出することをさらに含む、実施態様10に記載の方法。

[実施態様14]

第一の標的が第二の標的に近接しているかを決定するために試料を分析するための方法であって、

(a) 試料を第二の非マスキング酵素-抗体コンジュゲートと接触させ、第二の標的-非マスキング酵素-抗体コンジュゲート複合体を形成すること；

(b) 試料を第一のケージドハプテン-抗体コンジュゲートと接触させ、第一の標的-ケージドハプテン-抗体コンジュゲート複合体を形成すること；

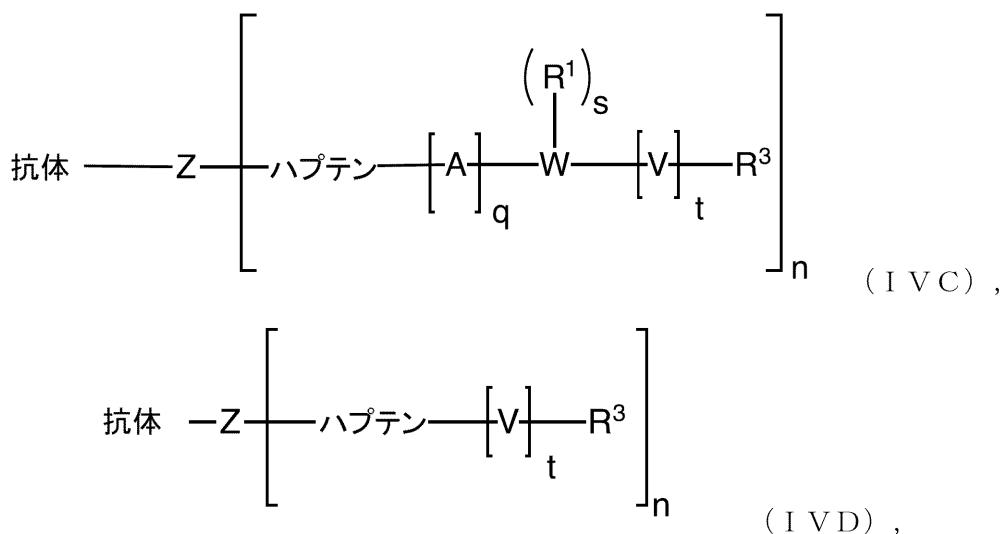
(c) 第二の標的-非マスキング酵素-抗体コンジュゲート複合体の非マスキング酵素が第一の標的-ケージドハプテン-抗体コンジュゲート複合体の酵素基質部分と反応するよう、脱ケージ化工程を実施し、第一の標的-非マスク化ハプテン-抗体コンジュゲート複合体を形成すること；

(d) 試料を第一の検出試薬と接触させ、第一の標的-非マスク化ハプテン-抗体コンジュゲート複合体又は第一の標的を標識すること；及び

(e) 標識された第一の標的-非マスク化ハプテン-抗体コンジュゲート複合体又は標識された第一の標的を検出すること

を含み、

第一のケージドハプテン-抗体コンジュゲートが、式(IVC)又は(IVD)：

[式中、]「抗体」は抗体であり；「ハプテン」はハプテンであり；Aは、1から15個の炭素原子を有し、O、N、若しくはSからなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり；Wは、5、6、又は7員の置換又は無置換の芳香族又は複素環式基であり；Zは、結合であるか、又は、1から30個の炭素原子を有し、O、N、若しくはSからなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり、各R¹は、H、F、Cl、Br、I、-O-メチル、-O--エチル、-O-n-プロピル、-O--イソプロピル；-O-n-ブチル、-O-sec-ブチル、又は-O-イソ-ブチル；1から4個の炭素原子を有する-S-アルキル基；1から4個の炭素原子を有する-O-アルキル基；1から4個の炭素原子を有する-N(H)-アルキル基；1から6個の炭素原子を有する-N-(アルキル)₂基；1から4個の炭素原子を有し、N又はSで置換されていてもよいアルキル基；シアノ基；及びカルボキシル基から独立して選択され；Vは、結合、1から4個の炭素原子を有する置換若しくは無置換のアルキル基、又は置換若しくは無置換の-O-アルキル基であり；R³は酵素基質であり；nは1から25の範囲の整数であり；qは0又は1であり；sは1から4の範囲の整数であり；且つtは0又は1である。】の構造を有する、方法。[実施態様15]脱ケージ化工程が試料の温度を変化させることを含む、実施態様14に記載の方法。[実施態様16]脱ケージ化工程が試料のpHを変更することを含む、実施態様14に記載の方法。[実施態様17]脱ケージ化工程が一又は複数の洗浄工程を導入することを含む、実施態様14に記載の方法。[実施態様18]脱ケージ化工程が非マスキング酵素の補助因子を添加することを含む、実施態様14に記載の方法。

[実施態様 19]

試料中の標的の総量を検出することをさらに含む、実施態様 14 に記載の方法。

[実施態様 20]

第一の標的が第二の標的に近接しているかを決定するために試料を分析するための方法であって、

(a) 試料を第一の標的に特異的なケージドハプテン - 抗体コンジュゲートと接触させ、第一の標的 - ケージドハプテン - 抗体コンジュゲート複合体を形成すること；

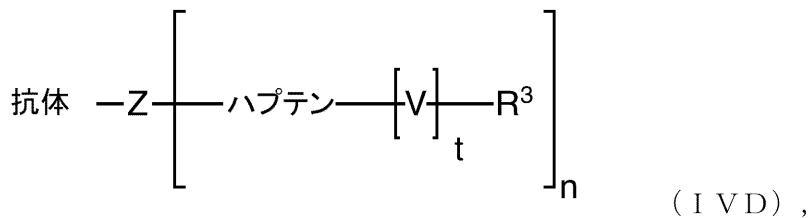
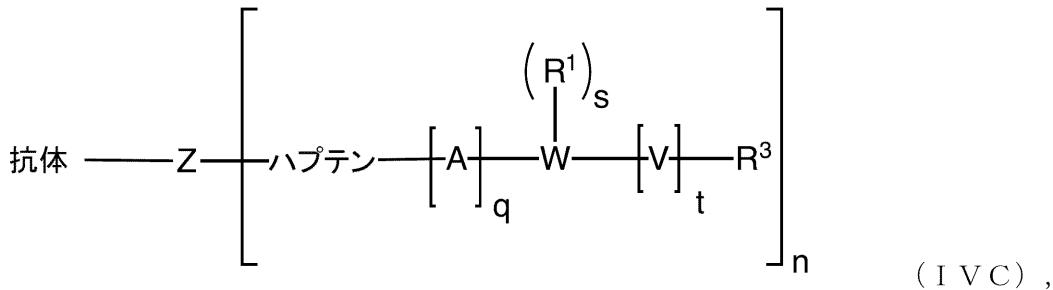
(b) 試料を第二の標的に特異的な非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲートと接触させ、第二の標的 - 非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲート複合体を形成することであって、非マスキング酵素 - 抗体コンジュゲートの非マスキング酵素がケージドハプテン - 抗体コンジュゲートの酵素基質部分と反応することができるよう選択され、第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体コンジュゲート複合体を形成すること；

(c) 試料を第一の検出試薬と接触させ、第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体コンジュゲート複合体又は第一の標的を標識すること；及び

(d) 標識された第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体コンジュゲート複合体又は標識された第一の標的を検出すること

を含み、

第一のケージドハプテン - 抗体コンジュゲートが、式 (IVC) 又は (IVD) :



[式中、

「抗体」は抗体であり；

「ハプテン」はハプテンであり；

A は、1 から 15 個の炭素原子を有し、O、N、若しくはS からなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり；

W は、5、6、又は 7 員の置換又は無置換の芳香族又は複素環式基であり；

Z は、結合であるか、又は、1 から 30 個の炭素原子を有し、O、N、若しくはS からなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり、

各 R¹ は、H、F、C1、Br、I、-O-メチル、-O--エチル、-O-n-プロピル、-O--イソプロピル；-O-n-ブチル、-O-sec-ブチル、又は-O-イソ-ブチル；1 から 4 個の炭素原子を有する-S-アルキル基；1 から 4 個の炭素原子を有する-O-アルキル基；1 から 4 個の炭素原子を有する-N(H)-アルキル基；1 から 6 個の炭素原子を有する-N-(アルキル)基；1 から 4 個の炭素原子を有し、N 又は S で置換されていてもよいアルキル基；シアノ基；及びカルボキシル基から独立して選択され；

Vは、結合、1から4個の炭素原子を有する置換若しくは無置換のアルキル基、又は置換若しくは無置換の-O-アルキル基であり；

R³は酵素基質であり；

nは1から25の範囲の整数であり；

qは0又は1であり；

sは1から4の範囲の整数であり；且つ

tは0又は1である。]

の構造を有する、方法。

[実施態様21]

ケージドハプテン-抗体コンジュゲートのケージドハプテン部分が、DCC、ビオチン、ニトロピラゾール、チアゾールスルホンアミド、ベンゾフラザン、及び2-ヒドロキシキノキサリンからなる群より選択されるハプテンに由来する、実施態様20に記載の方法。

[実施態様22]

非マスキング酵素-抗体コンジュゲートの非マスキング酵素が、アルカリホスファターゼ、B-グルコシダーゼ、B-ガラクトシダーゼ、B-グルクロニダーゼ、リパーゼ、スルファターゼ、アミダーゼ、プロテアーゼ、ニトロレダクターゼ、ベータ-ラクタマーゼ&ノイラミニダーゼ、及びウレアーゼからなる群より選択される、実施態様20に記載の方法。

[実施態様23]

第一の検出試薬が(i)第一の標的-非マスク化ハプテン-抗体複合体を第一の酵素で標識するように第一の酵素にコンジュゲートしている二次抗体であって、第一の標的-非マスク化ハプテン-抗体複合体の非マスク化ハプテンに特異的な二次抗体；及び(ii)第一の発色性基質又は蛍光性基質を含む、実施態様20に記載の方法。

[実施態様24]

第一の酵素が非マスキング酵素とは異なる、実施態様23に記載の方法。

[実施態様25]

第一の酵素がペルオキシダーゼである、実施態様24に記載の方法。

[実施態様26]

第一の発色性基質が、3,3'-ジアミノベンジン(DAB)、3-アミノ-9-エチルカルバゾール(AEC)、HRP-Silver、及びチラミド-色素原からなる群より選択される、実施態様23に記載の方法。

[実施態様27]

試料を第二の標的-非マスキング酵素-抗体コンジュゲート複合体の非マスキング酵素に特異的な第二の発色性基質又は蛍光性基質と接触させることをさらに含み、第一の発色性基質と第二の発色性基質が異なる、実施態様26に記載の方法。

[実施態様28]

第一の検出試薬が、第一の標的-非マスク化ハプテン-抗体コンジュゲート複合体に導入される標識の数を増幅させるための成分を含む、実施態様20に記載の方法。

[実施態様29]

第一の標的がPD-1又はPD-L1の一方であり、第二の標的がPD-1又はPD-L1のもう一方である、実施態様20に記載の方法。

[実施態様30]

第一の標的が第二の標的に近接しているかを決定するために試料を分析するための方法であって、

(a)試料をケージドハプテン-抗体コンジュゲート又は非マスキング酵素-抗体コンジュゲートの一方を含む第一の検出プローブと接触させること；

(b)試料をケージドハプテン-抗体コンジュゲート又は非マスキング酵素-抗体コンジュゲートのもう一方を含む第二の検出プローブと接触させること；

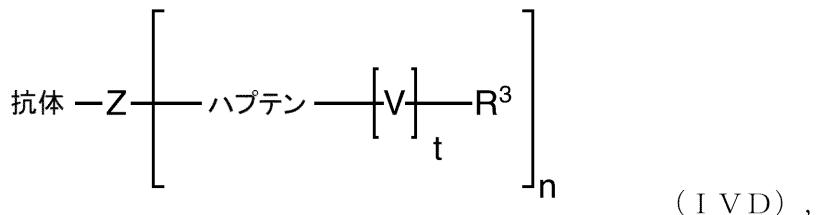
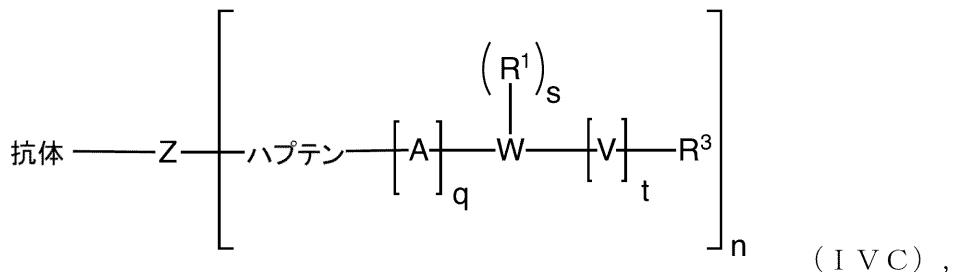
(c)試料を少なくとも第一の検出試薬と接触させ、形成された非マスク化ハプテン-抗

体コンジュゲート標的複合体を標識すること；及び

(d) 標識された非マスク化ハプテン - 抗体コンジュゲート標的複合体からシグナルを検出すること

を含み、

第一のケージドハプテン - 抗体コンジュゲートが、式 (IVC) 又は (IVD) :



[式中、

「抗体」は抗体であり；

「ハプテン」はハプテンであり；

Aは、1から15個の炭素原子を有し、O、N、若しくはSからなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり；

Wは、5、6、又は7員の置換又は無置換の芳香族又は複素環式基であり；

Zは、結合であるか、又は、1から30個の炭素原子を有し、O、N、若しくはSからなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり、

各R¹は、H、F、C1、Br、I、-O-メチル、-O--エチル、-O-n-プロピル、-O--イソプロピル；-O-n-ブチル、-O-sec-ブチル、又は-O-イソ-ブチル；1から4個の炭素原子を有する-S-アルキル基；1から4個の炭素原子を有する-O-アルキル基；1から4個の炭素原子を有する-N(H)-アルキル基；1から6個の炭素原子を有する-N-(アルキル)₂基；1から4個の炭素原子を有し、N又はSで置換されていてもよいアルキル基；シアノ基；及びカルボキシル基から独立して選択され；

Vは、結合、1から4個の炭素原子を有する置換若しくは無置換のアルキル基、又は置換若しくは無置換の-O-アルキル基であり；

R³は酵素基質であり；

nは1から25の範囲の整数であり；

qは0又は1であり；

sは1から4の範囲の整数であり；且つ

tは0又は1である。]

の構造を有する、方法。

[実施態様31]

試料中の標的の総量を検出する工程をさらに含む、実施態様30に記載の方法。

[実施態様32]

第一の検出試薬が、第一の標的 - 非マスク化ハプテン - 抗体コンジュゲート複合体の非マスク化酵素を複数の第一のレポーター部分で標識するための増幅成分を含む、実施態様

3 0 に記載の方法。[実施態様 3 3]

複数の第一のレポーター部分がハプテンである、実施態様 3 2 に記載の方法。

[実施態様 3 4]

第一の検出試薬が、それぞれ第二のレポーター部分にコンジュゲートしている二次抗体であって、複数の第一のレポーター部分に特異的な二次抗体をさらに含む、実施態様 3 3 に記載の方法。

[実施態様 3 5]

第二のレポーター部分が増幅酵素又はフルオロフォアからなる群より選択される、実施態様 3 4 に記載の方法。

[実施態様 3 6]

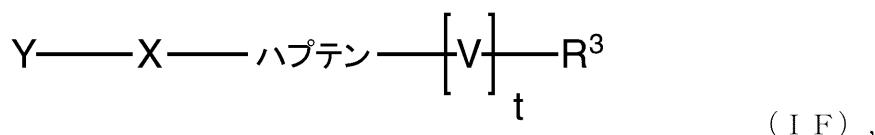
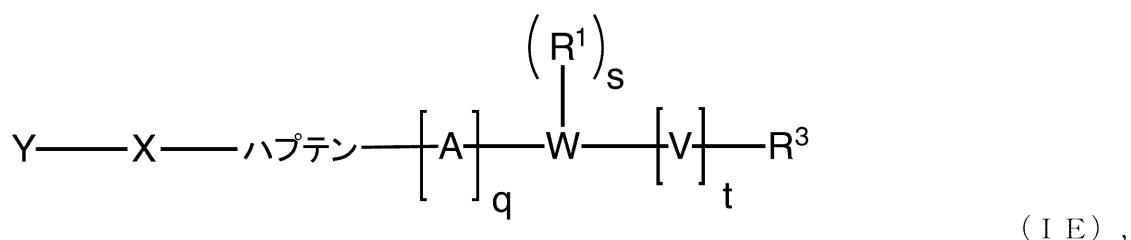
第二のレポーター部分が増幅酵素であり、第一の検出試薬が増幅酵素の第一の発色性基質又は蛍光性基質をさらに含む、実施態様 3 4 に記載の方法。

[実施態様 3 7]

脱ケージ化工程をさらに含む、実施態様 3 0 に記載の方法。

[実施態様 3 8]

式 (I E) 又は (I F) :

[式中、

「ハプテン」はハプテンであり；

Yは、カルボニル反応基、アミン反応基又はチオール反応基から選択され；

Aは、1から15個の炭素原子を有し、O、N、若しくはSからなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり；

Xは、結合であるか、又は、1から30個の炭素原子を有し、O、N、若しくはSからなる群より選択される一又は複数のヘテロ原子を有してもよい、分岐又は非分岐状で置換又は無置換の飽和又は不飽和脂肪族基を含む基であり；

Wは、5、6、又は7員の置換又は無置換の芳香族又は複素環式基であり；

各R¹は、H、F、C1、Br、I、-O-メチル、-O--エチル、-O-n-プロピル、-O--イソプロピル；-O-n-ブチル、-O-sec-ブチル、又は-O-イソ-ブチル；1から4個の炭素原子を有する-S-アルキル基；1から4個の炭素原子を有する-O-アルキル基；1から4個の炭素原子を有する-N(H)-アルキル基；1から6個の炭素原子を有する-N-(アルキル)₂基；1から4個の炭素原子を有し、N又はSで置換されていてもよいアルキル基；シアノ基；及びカルボキシル基から独立して選択され；

Vは、結合、1から4個の炭素原子を有する置換若しくは無置換のアルキル基、又は置換若しくは無置換の-O-アルキル基であり；

R³は酵素基質であり；

qは0又は1であり；

s は 0、又は 1 から 4 の範囲の整数であり；且つ
t は 0 又は 1 である。】
を有するケージドハプテン。

[実施 様 3 9]

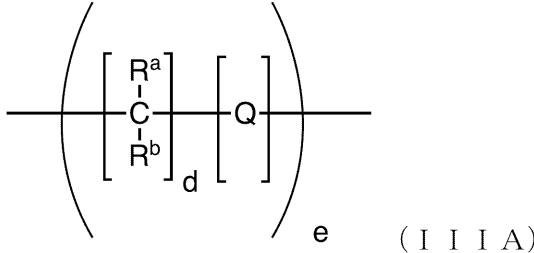
酵素基質が、リン酸基、エステル基、アミド基、硫酸基、グリコシド基、尿素基及び二
トロ基からなる群より選択される、実施 様 3 8 に記載のケージドハプテン。

[実施 様 4 0]

各 R¹ 基が異なる、実施 様 3 8 に記載のケージドハプテン。

[実施 様 4 1]

X が式 (I I I A) :



[式中、d 及び e は、各々独立して 4 から 1 8 の範囲の整数であり；Q は、結合、O、
S 又は N (R^c) (R^d) であり；R^a 及び R^b は、独立して H、C₁ - C₄ アルキル基
、F、C₁ 又は N (R^c) (R^d) であり；R^c 及び R^d は、独立して C H₃ 又は H ある。] の構造を有する、実施 様 3 8 に記載のケージドハプテン。いくつかの実施 様 では、d 及び e は、各々独立して 1 から 2 4 の範囲の整数である。

[実施 様 4 2]

t が 1 あり、V が - C H₂ - である、実施 様 3 8 に記載のケージドハプテン。

[実施 様 4 3]

t が 1 あり、V が - O - C H₂ - である、実施 様 3 8 に記載のケージドハプテン。

[実施 様 4 4]

t が 1 あり、V が - C (R³)₂ [式中、R³ は C₁ - C₄ アルキル基である。] で
ある、実施 様 3 8 に記載のケージドハプテン。

[実施 様 4 5]

t が 1 あり、V が - O - C (R³)₂ [式中、R³ は C₁ - C₄ アルキル基である。
] である、実施 様 3 8 に記載のケージドハプテン。

[実施 様 4 6]

s が 2 あり、R¹ が - O - C H₃ - あり、t が 1 あり、V が - C H₂ - である、
実施 様 3 8 に記載のケージドハプテン。