

【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】平成21年1月22日(2009.1.22)

【公表番号】特表2008-522170(P2008-522170A)

【公表日】平成20年6月26日(2008.6.26)

【年通号数】公開・登録公報2008-025

【出願番号】特願2007-543736(P2007-543736)

【国際特許分類】

G 0 1 N 33/543 (2006.01)

G 0 1 N 33/545 (2006.01)

G 0 1 N 33/552 (2006.01)

G 0 1 N 33/553 (2006.01)

G 0 1 N 33/544 (2006.01)

G 0 1 N 33/554 (2006.01)

G 0 1 N 33/577 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 33/543 5 2 1

G 0 1 N 33/543 5 0 1 F

G 0 1 N 33/545 A

G 0 1 N 33/552

G 0 1 N 33/553

G 0 1 N 33/544 A

G 0 1 N 33/554

G 0 1 N 33/543 5 2 5 C

G 0 1 N 33/577 B

G 0 1 N 33/543 5 7 5

G 0 1 N 33/543 5 4 1 A

G 0 1 N 33/543 5 4 1 B

G 0 1 N 33/543 5 4 1 Z

G 0 1 N 33/53 X

G 0 1 N 33/53 N

【手続補正書】

【提出日】平成20年11月25日(2008.11.25)

【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】

(a) 分析物に特異的に結合する結合物質が付着している粒子を含む第一の結合成分を、多孔性表面に加える工程；

(b) 試料を該多孔性表面に加える工程；

(c) 検出できるように標識された粒子を含む第二の結合成分を、該多孔性表面に加える工程；ならびに

(d) 該多孔性表面上の検出できるように標識された粒子によって生成される、該試料中にある分析物の存在および / または量を示す信号を検出する工程

を含む、試料中の分析物の存在または量を検出するための方法であって、

ここで、該多孔性表面は、格子またはグリルであり、

該多孔性表面は、該第二の結合成分の該表面の通過を許すが、該第一の結合成分は通過させず、

該第一の結合成分と該分析物は互いに結合して第一の結合複合体を形成し、

該第二の結合成分と該第一の結合複合体が互いに結合して第二の結合複合体を形成するように、該検出できるように標識された粒子には、該分析物または該第一の結合成分および該分析物に特異的に結合する結合物質が付着しており、かつ

第一の結合複合体および / または第二の結合複合体は多孔性表面上に保持される、前記方法。

【請求項 2】

試料と第一の結合成分を表面に加える前に互いに接触させる、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

工程(a)が工程(b)の前に行われる、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

試料、第一の結合成分、および第二の結合成分を、多孔性表面に加える前に互いに接触させる、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

多孔性表面を通過することができる洗浄液を、工程(d)の前に該表面に加える工程をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

第二の結合成分が、分析物に特異的に結合する結合物質が付着している、検出できるように標識された粒子を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

多孔性表面が、(a) 金属、プラスチック、セラミック、ガラスまたはシリコン、および / または (b) 分離装置を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

多孔性表面が、二次元および三次元形式の両方を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

第一の結合成分または第二の結合成分の粒子が、

(a) 合成ポリマー、プラスチック、ガラス、金属もしくはセルロースを含むか；または

(b) リポゾーム、細胞もしくは微生物である、
前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

第一の結合成分の粒子が第二の結合成分の粒子よりも大きな平均直径をもつ、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

(a) 第一の結合成分の粒子が0.1 μmから200 μmの平均直径をもつ、および / または (b) 第二の結合成分の粒子が1nmから1000nmの平均直径をもつ、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

多孔性表面が、二つの平行な側面をもち、平行な側面間の距離が第一の結合成分の粒子の平均直径よりも小さな、開口 / 孔を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

粒子を実質的にコーティングするのに十分な量の結合物質が、吸着または共有結合によって該粒子に結合している、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 14】

結合物質が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、またはそのF(ab')もしくはF(

ab')2フラグメントを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

粒子が、発光性、放射標識性、発色性、または磁性の材料を用いて検出できるように標識される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 16】

分析物が抗原であり、該抗原が任意でC反応性タンパク質（CRP）または性ホルモン結合グロブリン（SHBG）である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

多孔性表面が、複合体の回収において能動的な役割をもち、任意で信号の発生および／または伝達ならびに非結合標識の除去において能動的な役割を有する、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 18】

（a）多孔性表面；

（b）分析物に特異的に結合して第一の結合複合体を形成する結合物質が付着している粒子を含む、第一の結合成分；および

（c）第二の結合成分と該第一の結合複合体が互いに結合して第二の結合複合体を形成するように、該分析物または該第一の結合成分および該分析物に特異的に結合する結合物質が付着している、検出できるように標識された粒子を含む、第二の結合成分を含む、試料中の分析物の存在および／または量を検出するためのキットであって、該多孔性表面は、格子またはグリルであり、第一の結合複合体および／または第二の結合複合体は、多孔性表面上に保持されうる、キット。

【請求項 19】

多孔性表面が、複合体の回収において能動的な役割をもち、任意で信号の発生および／または伝達ならびに非結合標識の除去において能動的な役割を有する、請求項18記載のキット。

【請求項 20】

免疫複合体または他の生体分子複合体の形成された後に、該複合体を非結合材料から分離するための分離装置であって、該装置に取り付けられた多孔性表面を備え、該多孔性表面は、格子またはグリルである、分離装置。

【請求項 21】

多孔性表面が、前記複合体の回収において能動的な役割をもち、任意で信号の発生および／または伝達ならびに非結合標識の除去において能動的な役割を有する、請求項20記載の分離装置。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

発明の分野

本発明は、形成された免疫複合体または任意の生体分子複合体を、結合されていない物質から、格子またはグリルであって、使用する粒子と互いに適合性のある孔／開口を含む多孔性の表面上で分離することに関する。本発明は、試料中の分析物の検出と定量化のための、粒子の大きさや異なる性質を利用する二粒子アッセイ形式で実施される不均一系の免疫アッセイを開示する。本方法では、試料のなかから分析物を捕らえ、体液からその分析物を分離し、区別するために大きい粒子を使用する一方、標識手段として小さな粒子を使用する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

本発明は前記粒子を利用し、格子またはグリルである多孔性の表面、すなわち分離手段の使用に依存する。先行技術とは異なり、本発明は試料中の分析物に特異的な結合物質が結合している捕捉粒子の使用を利用する。生成される複合体は、多孔性の表面に加えられたとき、そこに保持される。よって、第一の結合成分-分析物-第二の結合成分からなる複合体や第一の結合成分-分析物からなる複合体は、分離手段の表面上で、非結合材料から分離される。従って、この過程は分析物の分離と濃縮にも使用できる。このように濃縮された分析物はそれから、更なる工程や研究に使用され得る。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

特に本発明は、以下の工程を含む、試料中の分析物の存在または量を検出する方法を提供する：a) 多孔性の表面に、分析物に特異的に結合する結合物質が付着している粒子を含む、第一の結合成分を加える工程；b) 該試料を該多孔性表面に加える工程；c) 検出できるように標識された粒子を含む第二の結合成分を該多孔性表面に加える工程；および d) 該試料中の該分析物の存在および/または量を示す、該多孔性表面上の検出できるように標識された該粒子より生成される信号を検出する工程であって、ここで該多孔性表面は、格子またはグリルであって、該第二の結合成分は通過させるが、該第一の結合成分は通過させず；該第一の結合成分および該分析物は互いに結合して第一の結合複合体を形成し；検出できるように標識された該粒子には、該分析物または該第一の結合成分および該分析物に特異的に結合する結合物質が付着しており、該第二の結合成分と該第一の結合複合体は互いに結合して、第二の結合複合体を形成し；第一の結合複合体および/または第二の結合複合体は、多孔性表面上に保持される。一つの様態では、試料と第一の結合成分は、表面に加えられる前に、互いに接触させられる。別の様態では工程a) が工程b) の前に実施される。さらに別の様態では、試料、第一の結合成分、および第二の結合成分は、表面に加えられる前に、互いに接触させられる。さらに別の様態では、工程b) が工程a) の前に実施される。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0031】

本発明はまた、

a) 多孔性表面；

b) 該分析物と特異的に結合して第一の結合複合体を形成する結合物質が付着している粒子を含む、第一の結合成分；および

c) 第二の結合成分と該第一の結合複合体が互いに結合して第二の結合複合体を形成するように、該分析物または該第一の結合成分および該分析物に特異的に結合する結合物質が付着している、検出できるように標識された粒子を含む第二の結合成分を含む、試料に含まれる分析物の存在および/または量を検出するためのキットをも提供し、ここで該多孔性表面は、格子またはグリルであり、第一の結合複合体および/または第二の結合複合体は多孔性表面上に保持されうる。

本発明はさらに、免疫複合体または他の生体分子複合体の形成された後に、該複合体を非結合材料から分離するための分離装置であって、該装置に取り付けられた多孔性表面

を備え、該多孔性表面は、格子またはグリルである、分離装置を提供する。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

使用語句の定義

本発明で使用され、本明細書において説明される概念は以下のような応用された意味を持つ：

・結合物質

特定の分子の独特な部位（例えばエピトープや抗原決定基）を認識し、そこに結合することができる任意の分子、リガンドもしくは抗リガンド、化合物、またはそれらの組み合わせ；

・リガンドまたは抗リガンド

免疫アッセイで使用される抗原や抗体のような、他の分子と複合体を形成する分子；

・第一の結合物質

捕捉粒子にコーティングされている、またはコーティングされる結合物質；

・第二の結合物質

標識粒子にコーティングされている、またはコーティングされる結合物質；

・捕捉粒子

高分子、プラスチック、ガラス、金属、セルロースなどからなる、結合物質の担体や固相として使われる固体粒子であって、不溶性にされているもの；または、リボゾーム、細胞、ウイルスを含む微生物のような、異なる非固体（弾性の）材料も捕捉粒子として機能することができる；

・標識

視覚または機器により検出または測定され得る信号を発生する、または発生するようにさせることができる物質；

・標識粒子

検出できるように標識された、任意の種類の高分子、プラスチック、ガラス、金属、セルロースなどからなる固体の粒子；またはリボゾーム、細胞、ウイルスを含む微生物のような、異なる非固体（弾性の）材料も標識粒子として機能することができる；

・第一の結合成分

第一の結合物質でコーティングされた捕捉粒子を含む成分；

・第二の結合成分

第二の結合物質でコーティングされた標識粒子を含む成分；

・結合成分

第一の結合成分および／または第二の結合成分を意味する；

・第一の結合複合体

分析物と第一の結合成分との複合体を意味する；

・第二の結合複合体

第一の結合複合体（第一の結合成分と分析物）と第二の結合成分の複合体を意味する；

・第三の結合複合体

分析物と第二の結合成分との複合体を意味する；

・免疫複合体または他の生体分子複合体

第一の、第二の、または第三の結合複合体を意味する；

・分析物

試料溶液中の存在が定量的または定性的に評価される化合物や物質であって、結合物質によって認識されて結合され得る、特異的な空間的または極性的配置を少なくとも一つは含むもの；分析物は溶液中で遊離（分離）していてもよく、または例えば細胞膜に結合し

ていてもよい；

- ・分離装置

多孔性の表面が装備された、多孔性表面を囲む装置；

- ・多孔性表面

第二の結合成分や他の結合していない材料は通過させるが、第一の結合成分は通過させない、非結合材料から免疫複合体または他の生体分子複合体を分離するために使用される表面；多孔性表面は第一の結合複合体も第二の結合複合体も通過させない；多孔性表面は孔や開口を含む；

- ・孔または開口

これらの用語は本明細書において互換的に使用される；孔/開口は、第二の結成分や他の非結合材料が多孔性表面を通過する手段である；

- ・孔/開口の大きさ

粒子や材料が通過する能力を制限する孔/開口の寸法を意味する；大きさとは、例えば孔/開口の平均直径を意味することもある；孔/開口の平行する側面間の距離を意味することもある；

- ・粒子の大きさ

孔/開口を通過する能力を制限する粒子の寸法を意味する；大きさとは、例えば球状の粒子の平均直径を指し得る；

- ・分離手段または台

多孔性表面と同じ意で使用される；

- ・格子、グリル

粒子の大きさに比例した寸法の孔や開口のある多孔性表面である；

- ・二次元形式

物質は、表面を通過できないために、多孔性表面上を水平に移動する；多孔性表面の孔/開口よりも大きな粒子は二次元的に分離される；第一の結合成分、第一の結合複合体および第二の結合複合体は二次元分離される；

- ・三次元形式

物質は、表面を通過できるので、多孔性表面上を水平に移動し、かつ多孔性表面を通して垂直に移動する；多孔性表面の孔/開口よりも小さな粒子は三次元的に分離される；第二の結合成分は三次元分離される。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

発明の詳細な説明

本発明は免疫複合体、または他の生体分子複合体を、該複合体が生成された後、非結合材料から分離する手段として、格子またはグリルである多孔性表面を使用する。複合体の分離は厳密に、多孔性表面（分離手段）上で起こる。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0047

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0047】

本発明により、a) 分析物に特異的に結合する結合物質が付着している粒子を含む、第一の結合成分を多孔性表面に加える工程；b) 該試料を該多孔性表面に加える工程；c) 該多孔性表面に、検出できるように標識された粒子を含む第二の結合成分を加える工程；および d) 該多孔性表面上の、検出できるように標識された該粒子によって生成される、

試料中の分析物の存在および／または量を示す信号を検出する工程、を含む、試料中の分析物の存在または量を検出する方法が提供され、ここで多孔性表面は、格子またはグリルであり、第二の結合成分の、該表面の通過は許すが、第一の結合成分は通過させず；該第一の結合成分と該分析物は互いに結合して、第一の結合複合体を形成し；該第二の結合成分と該第一の結合複合体は互いに結合して第二の結合複合体を形成するように、検出できるように標識された粒子に、該分析物または該第一の結合成分および該分析物に特異的に結合する結合物質が付着しており；かつ第一の結合複合体および／または第二の結合複合体は多孔性表面上に保持される。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0060

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0060】

第二の結合複合体中の標識粒子からの信号の存在は、試料中の分析物の存在と相関する。得られる信号の大きさは、生成された免疫／生体分子（第二の結合）複合体の量と相関し、従って試料中に存在する分析物の量に相関する。本発明は、分子または任意の固体形状での標識の使用をも保持する。信号のレベルは蛍光光度計、ルミノメーター、放射活性カウンタ、磁力計、および分光光度計のような、適切な装置で測定され得る。検出できるように標識された粒子には、第一の結合複合体に特異的に結合する結合物質が付着している。結合物質は、他の複合体や物質と比較して、優先的な親和性を有する第一の結合複合体に結合する場合、第一の結合複合体に「特異的に結合する」。結合物質は分析物または第一の結合成分および分析物に特異的に結合し得る。結合物質は好ましくは分析物に特異的に結合する。