



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/536 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2016145600, 23.04.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
23.04.2015

Дата регистрации:  
23.01.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
23.04.2014 JP 2014-089675

(43) Дата публикации заявки: 25.05.2018 Бюл. № 15

(45) Опубликовано: 23.01.2019 Бюл. № 3

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 23.11.2016

(86) Заявка РСТ:  
JP 2015/062423 (23.04.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2015/163424 (29.10.2015)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО  
"Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ОБАЯСИ Хирокадзу (JP),  
ФУДЗИТА Каэко (JP)

(73) Патентообладатель(и):

НИТИРЕЙ БАЙОСАЙЕНСИЗ ИНК. (JP)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO 2010094283 A1, 26.08.2010. WO  
2005054860 A1, 16.06.2005. WO 2006070582  
A1, 06.07.2006.

(54) КОМБИНИРОВАННЫЙ ПРОДУКТ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МАРКЕРА-МИШЕНИ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области детекции маркера-мишени в биологическом образце. Набор для детекции маркера-мишени в биологическом образце в комбинации с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, способной специфически связываться с маркером-мишенью, содержит: первое связывающее средство, содержащее первую связывающую молекулу, способную прямо или косвенно специфически связываться с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, и вещество

мечения; линкерную молекулу, способную специфически связываться с первым связывающим средством; и второе связывающее средство, содержащее вторую связывающую молекулу, способную специфически связываться с указанной линкерной молекулой, и вещество мечения. При этом вещество мечения в первом связывающем средстве и вещество мечения во втором связывающем средстве могут быть одинаковыми или различаться; линкерная молекула способна специфически связываться с

веществом мечения в первом связывающем средстве и веществом мечения во втором связывающем средстве; первое связывающее средство представляет собой структуру, в которой первая связывающая молекула и вещество мечения соединены друг с другом прямо или косвенно посредством носителя, который представляет собой природный или синтетический полимер; второе связывающее средство представляет собой структуру, в которой вторая связывающая молекула и вещество мечения

соединены друг с другом прямо или косвенно посредством носителя, который представляет собой природный или синтетический полимер. Также раскрывается способ детекции маркера-мишени в биологическом образце и применение набора для детекции маркера-мишени в биологическом образце. Группа изобретений обеспечивает улучшение чувствительности обнаружения маркера-мишени. 3 н. и 8 з.п. ф-лы, 11 ил., 7 табл.

RU 2 6 7 8 1 0 8 C 2

RU 2 6 7 8 1 0 8 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*G01N 33/536 (2018.08)*(21)(22) Application: **2016145600, 23.04.2015**(24) Effective date for property rights:  
**23.04.2015**Registration date:  
**23.01.2019**

Priority:

(30) Convention priority:  
**23.04.2014 JP 2014-089675**(43) Application published: **25.05.2018** Bull. № 15(45) Date of publication: **23.01.2019** Bull. № 3(85) Commencement of national phase: **23.11.2016**(86) PCT application:  
**JP 2015/062423 (23.04.2015)**(87) PCT publication:  
**WO 2015/163424 (29.10.2015)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO  
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**OHBAYASHI, Hirokazu (JP),  
FUJITA, Kayoko (JP)**

(73) Proprietor(s):

**NICHIREI BIOSCIENCES INC. (JP)**(54) **COMBINATION FOR TARGET MARKER DETECTION**

(57) Abstract:

FIELD: measurement; testing.

SUBSTANCE: group of inventions relates to detection of target marker in a biological sample. Kit for detecting a target marker in a biological sample in combination with a molecule, binding to the target marker, capable of specific binding to the target marker includes: first binding agent comprising a first binding molecule capable of directly or indirectly specifically binding to the molecule binding to the target marker and the labelling substance; linker molecule capable of specific binding to the first binding agent; and a second binding agent comprising a second binding molecule capable of specific binding to said linker molecule and a target substance. Wherein the labelling substance in

the first binding agent and the labelling substance in the second binding agent may be the same or different; linker molecule is capable of specifically binding to the labelling substance in the first binding agent and the labelling substance in the second binding agent; first binding agent is a structure in which the first binding molecule and the labelling substance are connected to each other directly or indirectly by means of a carrier, which is a natural or synthetic polymer; second binding agent is a structure in which the second binding molecule and the labelling substance are connected to each other directly or indirectly by means of a carrier which is a natural or synthetic polymer. Method for detecting a target marker in a biological sample and the

use of a kit for detecting a target marker in a biological sample are also disclosed.  
EFFECT: group of inventions provides high

detection sensitivity of the target marker.  
11 cl, 11 dwg, 7 tbl

R U 2 6 7 8 1 0 8 C 2

R U 2 6 7 8 1 0 8 C 2

# ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001]

По настоящей патентной заявке испрашивается приоритет по патентной заявке Японии № 2014-89675, зарегистрированной 23 апреля 2014 года, описание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002]

Настоящее изобретение относится к комбинированному продукту для детекции маркера-мишени и способу детекции с его использованием.

## ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003]

В силу недавнего прогресса иммунохимии широко используют иммунологические анализы, обеспечивающие чувствительную детекцию незначительного количества вещества с использованием реакции антиген-антитело. Распространенным иммунологическим анализом являются, например, способы иммуноокрашивания.

[0004]

Способы иммуноокрашивания предназначены для детекции конкретного вещества на клетке или тканевом срезе с использованием, например, антитела, распознающего вещество. Из них, способы с использованием фермента в качестве детектируемого вещества обозначают как иммуноферментные способы. Способы, разработанные в качестве иммуноферментных способов, включают прямые способы с использованием первичного антитела, меченного ферментом, делающим возможной визуализацию антигена, и косвенные способы, включающие мечение вторичного антитела без мечения первичного антитела.

Кроме того, в последние годы необходима дополнительная высокая чувствительность для визуализации небольшого количества антигенного белка, распределенного в тканях и клетках, или для проверки антигенного вещества, антигенность которого в значительной степени нарушена при фиксации формалином или заливке в парафин, и друг за другом разработаны различные способы амплификации, являющиеся модифицированными иммуноферментными способами. Примеры этих способов амплификации включают, в порядке возрастания чувствительности, прямой способ<косвенный способ<способ PAP (с использованием пероксидазы и антитела против пероксидазы)<способ ABC (с использованием комплекса авидина-биотина-пероксидазы)<способ LSAB (с использованием меченного стрептавидина биотина) <полимерный способ<способ CSA (катализируемой амплификации сигнала) (непатентный документ 1).

[0005]

Среди указанных выше способов амплификации к настоящему моменту наиболее популярными, высокочувствительными и простыми способами являются полимерные способы.

Одним из общепринятых полимерных способов является, например, способ, включающий реакцию первичного антитела с маркером-мишенью, таким как антиген, а затем реакцию полимерного реагента (в которой многие ферменты и вторичные антитела связаны с полимером) с продуктом реакции и, таким образом, образование комплекса антигена, первичного антитела, вторичного антитела, полимера и фермента. Проявление окрашивания субстрата с использованием ферментативной активности в этом комплексе делает возможной визуализацию маркера-мишени (непатентный документ 1).

[0006]

Кроме того, другим полимерным способом является, например, способ, включающий реакцию мостикового реагента (также по-разному обозначаемого производителями, например, как линкер, зонд или постпервичное антитело) между первичным антителом и полимерным реагентом в указанном выше общепринятом полимерном способе для амплификации сигнала. Считают, что в результате можно ожидать, что этот способ будет иметь в 2-5 раз более высокую чувствительность, чем указанный выше способ (непатентный документ 1).

[0007]

В последние годы дополнительно разработан новый полимерный способ, включающий реакцию дополнительного полимерного реагента (второго полимерного реагента) с указанным выше полимерным реагентом (первым полимерным реагентом) для амплификации сигнала (патентный документ 1).

[0008]

Однако даже при использовании общепринятого полимерного способа в некоторых случаях нельзя достигнуть желаемого уровня окрашивания из-за крайне малого количества маркера-мишени, сниженной антигенности и т.д. В такой технической ситуации все еще необходимы средства для детекции маркера-мишени, простые и с более высокой чувствительностью.

Документы предшествующего уровня

Непатентный документ

[0009]

Непатентный документ 1: Shingo Kamoshida, Immunostaining technique from basics- How to surely stain-, Histochemistry and Cytochemistry 2012, издание Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry, 2012, p.11-25

Патентный документ

[0010]

Патентный документ 1: JP 2007-513334 T

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011]

Целью настоящего изобретения является простая и высокочувствительная детекция маркера-мишени, экспрессирующегося в биологическом образце.

[0012]

Авторы настоящего изобретения обнаруживали, что при комбинировании множества связывающих средств, меченных веществами мечения, и конкретной линкерной молекулы для детекции маркера-мишени маркер-мишень можно определять просто и с удивительно высокой чувствительностью. Настоящее изобретение основано на таком открытии.

[0013]

Настоящее описание относится к следующим изобретениям.

[1] Комбинированный продукт для детекции маркера-мишени в биологическом образце в комбинации с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, способной специфически связываться с маркером-мишенью, содержащий, по меньшей мере:

(а) первое связывающее средство, содержащее первую связывающую молекулу, способную прямо или косвенно специфически связываться с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, и вещество мечения;

(b) линкерную молекулу, способную специфически связываться с первым связывающим средством, и

(с) второе связывающее средство, способное специфически связываться с линкерной молекулой и содержащее вторую связывающую молекулу и вещество мечения.

[2] Комбинированный продукт по п. [1], где линкерная молекула способна специфически связываться с веществом мечения.

5 [3] Комбинированный продукт по п. [1] или [2], где линкерная молекула является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

[4] Комбинированный продукт по любому из пп. [1]-[3], где вещество мечения является, по меньшей мере, веществом, выбранным из хемилюминесцентной метки, металлической частицы, флуоресцентной метки, ферментной метки, коферментной метки, меченного антитела, красителя, биолюминесцентной метки, гаптена и полимерной частицы.

[5] Комбинированный продукт по любому из пп. [1]-[4], где первое связывающее средство является структурой, в которой первую связывающую молекулу и вещество мечения соединяют друг с другом прямо или косвенно посредством носителя.

15 [6] Комбинированный продукт по любому из пп. [1]-[5], где второе связывающее средство является структурой, в которой вторую связывающую молекулу и вещество мечения соединяют друг с другом прямо или косвенно посредством носителя.

[7] Комбинированный продукт по любому из пп. [1]-[6], где первая связывающая молекула является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

20 [8] Комбинированный продукт по любому из пп. [1]-[7], где вторая связывающая молекула является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

[9] Комбинированный продукт по любому из пп. [1]-[8], который дополнительно комбинируют с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью.

25 [10] Комбинированный продукт по любому из пп. [1]-[9], находящийся в форме набора.

[11] Способ детекции маркера-мишени в биологическом образце, полученном из индивидуума, включающий стадии:

(i) приведения молекулы, связывающейся с маркером-мишенью, заранее специфически связанной с маркером-мишенью, в контакт с первым связывающим средством и, таким образом, получения первого комплекса;

(ii) приведения первого комплекса в контакт с линкерной молекулой и, таким образом, получения второго комплекса; и

(iii) приведения второго комплекса в контакт со вторым связывающим средством и, таким образом, получения третьего комплекса,

35 где первое связывающее средство содержит первую связывающую молекулу, способную прямо или косвенно специфически связываться с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, и вещество мечения;

где линкерная молекула способна специфически связываться с первым связывающим средством; и

40 где второе связывающее средство способно специфически связываться с линкерной молекулой и содержит вторую связывающую молекулу и вещество мечения.

[12] Способ по п. [11], дополнительно включающий этап детекции вещества мечения в третьем комплексе.

45 [13] Способ по п. [11] или [12], где линкерная молекула является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

[14] Способ по любому из пп. [11]-[13], где линкерная молекула способна специфически связываться с веществом мечения.

[15] Способ по любому из пп. [11]-[14], где вещество мечения является по меньшей

мере одним веществом мечения, выбранным из хемилюминесцентной метки, металлической частицы, флуоресцентной метки, ферментной метки, коферментной метки, меченного антитела, красителя, биолюминесцентной метки, гаптена и полимерной частицы.

5 [16] Способ по любому из пп. [11]-[15], где первое связывающее средство является структурой, в которой первую связывающую молекулу и вещество мечения соединяют друг с другом прямо или косвенно посредством носителя.

[17] Способ по любому из пп. [11]-[16], где второе связывающее средство является структурой, в которой вторую связывающую молекулу и вещество мечения соединяют  
10 друг с другом прямо или косвенно посредством носителя.

[18] Способ по любому из пп. [11]-[17], где первая связывающая молекула является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

[19] Способ по любому из пп. [11]-[18], где вторая связывающая молекула является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

15 [20] Применение комбинированного продукта для детекции маркера-мишени в биологическом образце в комбинации с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, способной специфически связываться с маркером-мишенью, содержащего, по меньшей мере:

(а) первое связывающее средство, содержащее первую связывающую молекулу,  
20 способную прямо или косвенно специфически связываться с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, и вещество мечения;

(b) линкерную молекулу, способную специфически связываться с первым связывающим средством; и

(с) второе связывающее средство, способное специфически связываться с линкерной  
25 молекулой и содержащее вторую связывающую молекулу и вещество мечения, где линкерная молекула способна специфически связываться с веществом мечения.

[0014]

По настоящему изобретению маркер-мишень можно определять просто и с удивительно высокой чувствительностью.

30 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0015]

[ФИГ. 1]

Фиг. 1 является схематическим изображением способа определения маркера-мишени по настоящему изобретению.

35 [ФИГ. 2]

На фиг. 2 представлены микрофотографии, на которых изображены результаты иммуногистохимического окрашивания в тестовом примере 1 (сравнительные примеры 1 и 2).

[ФИГ. 3]

40 На фиг. 3 представлены микрофотографии, на которых изображены результаты иммуногистохимического окрашивания в тестовом примере 2 (примеры 1 и 2 и сравнительные примеры 3 и 4).

[ФИГ. 4]

45 На фиг. 4 представлены микрофотографии, на которых изображены результаты иммуногистохимического окрашивания в тестовом примере 3 (примеры 3 до 5 и сравнительные примеры 5 до 7).

[ФИГ. 5]

На фиг. 5 представлены микрофотографии, на которых изображены результаты



иммуногистохимического окрашивания в тестовом примере 4:4-1 (примеры 6 и 7 и сравнительные примеры 8 и 9).

[ФИГ. 6]

На фиг. 6 представлены микрофотографии, на которых изображены результаты иммуногистохимического окрашивания в тестовом примере 4:4-2 (примеры 8 и 9 и сравнительные примеры 10 и 11).

[ФИГ. 7]

ФИГ. 7 представлены микрофотографии, на которых изображены результаты иммуногистохимического окрашивания в тестовом примере 4:4-3 (Примеры 10 до 12 и Сравнительные примеры 12 до 14).

[ФИГ. 8]

На фиг. 8 представлены микрофотографии, на которых изображены результаты иммуногистохимического окрашивания в тестовом примере 5 (примеры 13 до 16 и сравнительные примеры 15 до 22).

[ФИГ. 9]

На Фиг. 9 представлены микрофотографии, на которых изображены результаты иммуногистохимического окрашивания в тестовом примере 6:6-1 (пример 17 и сравнительные примеры 23 и 24).

[ФИГ. 10]

На фиг. 10 представлены микрофотографии, на которых изображены результаты иммуногистохимического окрашивания в тестовом примере 6:6-2 (пример 18 и сравнительные примеры 25 и 26).

[ФИГ. 11]

На фиг. 11 представлены микрофотографии, на которых изображены результаты иммуногистохимического окрашивания в тестовом примере 7: пример 20 осуществляли в отсутствие полиэтиленгликоля и примеры 21 до 24 осуществляли в присутствии полиэтиленгликоля.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0016]

### Комбинированный продукт

Комбинированный продукт по настоящему изобретению предназначен для детекции маркера-мишени в биологическом образце в комбинации с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, способной специфически связываться с маркером-мишенью, отличающийся содержанием, по меньшей мере:

(а) первого связывающего средства, содержащего первую связывающую молекулу, способную прямо или косвенно специфически связываться с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, и вещества мечения;

(б) линкерной молекулой, способной специфически связываться с первым связывающим средством; и

(с) второго связывающего средства, способного специфически связываться с линкерной молекулой и содержащего вторую связывающую молекулу и вещество мечения.

[0017]

Далее в настоящем описании один из вариантов осуществления способа детекции с использованием комбинированного продукта по настоящему изобретению будет объяснен в соответствии с фиг. 1, хотя это конкретно не ограничивает настоящее изобретение.

[0018]

На фиг. 1 маркер-мишень 2, подлежащий детекции, экспрессируется на биологическом образце 1. Для захвата этого маркера-мишени 2 молекулу 3, связывающуюся с маркером-мишенью, заранее специфически связывают с маркером-мишенью 2.

Затем первое связывающее средство 4, линкерную молекулу 5 и второе связывающее средство 6 получают в виде реагентов для детекции маркера-мишени 2.

В этом случае первое связывающее средство 4 состоит из первой связывающей молекулы 7, способной прямо или косвенно специфически связываться с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью 3, вещества мечения 8 и носителя 9 (такого как полимер).

Кроме того, второе связывающее средство 6 является структурой, способной специфически связываться с линкерной молекулой 5. На фиг. 1 второе связывающее средство 6 состоит из второй связывающей молекулы 10, способной специфически связываться с линкерной молекулой 5, вещества мечения 8' и носителя 9' (такого как полимер).

Кроме того, линкерная молекула 5 содержит по меньшей мере три участка связывания, способных специфически связываться с веществом мечения 8, вторую связывающую молекулу 10 и вещество мечения 8'.

[0019]

На фиг. 1 комбинацию заранее полученных реагентов для детекции, как описано выше, можно использовать для детекции маркера-мишени, следуя этапам с первого по третий.

На первом этапе молекулу 3, связывающуюся с маркером-мишенью, связанную с маркером-мишенью 2, приводят в контакт с первым связывающим средством 4 и, таким образом, получают первый комплекс (1-4).

Затем на втором этапе, первый комплекс (1 до 4) приводят в контакт с линкерной молекулой 5 и, таким образом, получают второй комплекс (1-5).

Затем на третьем этапе, второй комплекс (1-5) приводят в контакт со вторым связывающим средством 6 и, таким образом, получают третий комплекс (1-6). В этом случае линкерную молекулу 5 и второе связывающее средство 6 стабильно связывают друг с другом по меньшей мере через два участка связывания, т.е. вторую связывающую молекулу 10 и вещество мечения 8'.

С помощью указанных выше этапов с первого по третий можно метить маркер-мишень 2 с помощью вещества мечения 8 и вещества мечения 8' и определять его с высокой чувствительностью детекции.

[0020]

#### Биологический образец

Биологический образец по настоящему изобретению относится к образцу, полученному из любого из индивидуумов, например, животного (предпочтительно - млекопитающего, более предпочтительно - человека), растения или бактерии. Указанный выше биологический образец может состоять из эукариотической или прокариотической клетки или из ткани или клетки.

[0021]

#### Маркер-мишень

Маркер-мишень в биологическом образце по настоящему изобретению относится к любой молекуле, присутствующей в биологическом образце. Примеры указанного выше маркера-мишени включают белки и их фрагменты, пептиды, нуклеиновые кислоты, липиды, гликолипиды, сахара, полисахариды и крахмал. В этом случае белок включает модифицированные белки, такие как гликопротеины, липопротеины, фосфопротеины

и метилированные белки, и нуклеиновая кислота включает ДНК и РНК. Кроме того, указанный выше маркер-мишень может экспрессироваться на поверхности биологического образца, например, мембраносвязанным, или содержаться в биологическом образце, например, в мембране, цитоплазме или ядре клетки.

[0022]

#### Молекула, связывающаяся с маркером-мишенью

Молекула, связывающаяся с маркером-мишенью по настоящему изобретению, конкретно не ограничена при условии, что она способна специфически связываться с маркером-мишенью в биологическом образце, и ее примеры включают антитела или их фрагменты (включая антигенсвязывающий фрагмент), ДНК, РНК, зонды нуклеиновых кислот, такие как пептид-нуклеиновая кислота (ПНК), лиганды или рецепторы.

[0023]

#### Первое связывающее средство

Первое связывающее средство по настоящему изобретению содержит первую связывающую молекулу, способную прямо или косвенно специфически связываться с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, и вещество мечения. Первую связывающую молекулу и вещество мечения по настоящему изобретению можно напрямую связывать друг с другом в любом участке при условии, что эффект по настоящему изобретению не будет ингибирован. Кроме того, первое связывающее средство может содержать носитель вместе с первой связывающей молекулой и веществом мечения по настоящему изобретению. Кроме того, первое связывающее средство по настоящему изобретению может включать гаптенную метку.

[0024]

#### Первая связывающая молекула

Первая связывающая молекула не ограничена при условии, что она способна прямо или косвенно специфически связываться с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, но предпочтительно является антителом, его антигенсвязывающим фрагментом. В этом случае антитело может иметь любой изотип, т.е. IgG, IgM, IgA, IgD или IgE. Кроме того, примеры фрагмента антитела включают антигенсвязывающие фрагменты, предпочтительно - Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, диатела, триатела, тетратела или однодоменные антитела.

[0025]

Кроме того, фраза о том, что первая связывающая молекула "косвенно" специфически связывается с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, означает, что молекула, такая как мостиковый реагент, расположена между молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, и первой связывающей молекулой таким образом, что первая связывающая молекула способна специфически связываться с молекулой, такой как мостиковый реагент. Мостиковый реагент конкретно не ограничен при условии, что эффект по настоящему изобретению не будет ингибирован, и его примеры включают антитела и антигенсвязывающие фрагменты, такие как Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub>, Fv или scFv. Указанный выше мостиковый реагент может дополнительно включать гаптенную метку или флуоресцентную метку.

[0026]

#### Вещество мечения в первом связывающем средстве

Вещество мечения в первом связывающем средстве по настоящему изобретению конкретно не ограничено при условии, что эффект по настоящему изобретению не будет ингибирован, и его примеры включают хемилюминесцентные метки, металлические

частицы, флуоресцентные метки, ферментные метки, коферментные метки, меченные антитела, красители, биоломинесцентные метки, гаптены и полимерные частицы. Кроме того, указанное выше вещество мечения, более предпочтительно, метят ферментом, применимым в иммуноферментном способе, и примеры таких ферментов включают пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу (AP),  $\beta$ -галактозидазу (GAL), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу,  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазу,  $\beta$ -глюкуронидазу, инвертазу, ксантиноксидазу, люциферазу светлячка и глюкозооксидазу (GO).

[0027]

Кроме того, если в качестве вещества мечения используют фермент, его субстрат не ограничен при условии, что он является веществом, реагирующим с указанным выше веществом мечения с появлением окраски. Примеры общеупотребительных субстратов пероксидазы хрена включают 3,3'-диаминобензидин (DAB), диаминобензидин с усилением никелем, 3-амино-9-этилкарбазол (AEC), бензидин дигидрохлорид (BDHC), реактив Ханкера-Йетса (HYP), индофановый синий (IB), тетраметилбензидин (TMB), 4-хлоро-1-нафтол (CN),  $\alpha$ -нафтолпиронин ( $\alpha$ -NP), о-дианизидин (OD), 5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфат (BCIP), нитросиний тетразолий (NBT), 2-(p-йодофенил)-3-p-нитрофенил-5-фенилтетразолия хлорид (INT), тетранитросиний тетразолий (TNBT), и 5-бromo-4-хлоро-3-индолил- $\beta$ -D-галактозид/ферро-феррицианид (BCIG/FF).

[0028]

Кроме того, примеры общеупотребительных субстратов щелочной фосфатазы включают нафтол-AS-B1-фосфат/прочный красный TR (NABP/FR), нафтол-AS-MX-фосфат/прочный красный TR (NAMP/FR), нафтол-AS-B1-фосфат/прочный красный TR (NABP/FR), нафтол-AS-MX-фосфат/прочный красный TR (NAMP/FR), нафтол-AS-B1-фосфат/новый фуксин (NABP/NF), бромохлороиндолил фосфат/нитросиний тетразолий (BCIP/NBT) и 5-бromo-4-хлоро-3-индолил-b-d-галактопиранозид (BCIG).

[0029]

#### Носитель в первом связывающем средстве

Кроме того, носитель в первом связывающем средстве конкретно не ограничен при условии, что эффект по настоящему изобретению не будет ингибирован, но, предпочтительно, он является природным или синтетическим полимером. Кроме того, молекулярная масса полимера по настоящему изобретению конкретно не ограничена при условии, что эффект по настоящему изобретению не будет ингибирован, но, в качестве одного из предпочтительных примеров, среднюю молекулярную массу ( $M_w$ ) можно определять в диапазоне от 2000 до 500000. Такую среднюю молекулярную массу можно определять, например, с использованием стандартного продукта полимера в качестве показателя, посредством гель-фильтрации (GPC). Однако указанный выше диапазон молекулярной массы является всего лишь руководством, и можно использовать молекулярные массы выше или ниже указанного выше диапазона при условии, что можно достигать цели настоящего изобретения. Подходящие примеры такого полимера включают полиаминокислоты, белки, полинуклеотиды, полисахариды или органические синтетические полимеры. Кроме того, для повышения чувствительности иммунологического анализа желательно связывать многие вещества мечения с носителем по настоящему изобретению.

[0030]

Например, в качестве полиаминокислоты по настоящему изобретению можно использовать пептид, содержащий по меньшей мере две сложные аминокислоты со связывающими свойствами. Примеры полиаминокислоты включают полиаминокислоту, содержащую лизин, аргинин, орнитин, глутамин или любую другую основную

аминокислоту, имеющую  $\alpha$ -аминогруппу,  $\epsilon$ -аминогруппу или любую другую аминокислотную группу. Кроме того, в дополнение к полилизинам, являющимся полимерами лизина, имеющими  $\epsilon$ -аминогруппу, конкретные примеры полиаминокислоты включают различные полиаминокислоты, содержащие лизин и, дополнительно, другие аминокислоты. Примеры последнего пептидного полимера включают статистические сополимеры лизина и глицина, статистические сополимеры лизина и серина и статистические сополимеры лизина и глутаминовой кислоты, и полимеры, имеющие различные молекулярные массы, являются коммерчески доступными.

[0031]

Кроме того, примеры белка по настоящему изобретению включают альбумины, иммуноглобулины или вирусоподобные белки (VLP).

[0032]

Примеры полинуклеотида по настоящему изобретению включают полинуклеотиды, содержащие одну или более составных единиц, выбранных из ДНК, ПНК, ЗНК и т.д.

Кроме того, полинуклеотид по настоящему изобретению может находиться в форме дендримерной конструкции.

[0033]

Кроме того, примеры полисахарида по настоящему изобретению включают декстран, агарозу, декстрин и растворимый крахмал. Кроме того, в качестве такого полисахарида можно использовать полисахарид, в который включена альдегидная группа, аминокислотная группа или любая другая активная группа. Полисахарид, содержащий альдегидную группу, легко можно получать посредством реакции периодата натрия с полисахаридом. Кроме того, аминокислотную группу можно включать в полисахарид известным способом. Например, можно получать декстран, содержащий аминокислотную группу, посредством обработки декстрана периодатом натрия для получения альдегидных групп, затем осуществляя их реакцию с диамином и восстанавливая продукты реакции борогидратом натрия. Кроме того, включение активной группы в полисахарид также можно осуществлять известным способом. Например, декстран, содержащий виниловые группы, получают посредством реакции дивинилсульфона с декстраном. Примеры указанного выше полисахарида включают полисахарид, включая декстран, карбоксиметилдекстран, полиальдегид декстрана, карбоксиметилдекстран лактон и циклодекстрин; пуллулан, шизофиллан, склероглюкан, ксантан, геллан, О-этиламингуаран, хитин и хитозан, такой как 6-О-карбоксиметилхитин и N-карбоксиметилхитозан; дериватизированные целлюлозы, такие как карбоксиметилцеллюлоза, карбоксиметилгидроксиэтилцеллюлоза, гидроксиэтилцеллюлоза, 6-амино-6-дезоксигидроксиэтилцеллюлоза и О-этиламинцеллюлоза; гидроксилированный крахмал, гидроксипропил крахмал, гидроксиэтил крахмал, каррагенан, альгинат и агарозу; синтетические полисахариды, такие как фикоилл и карбоксиметилированный фикоилл.

[0034]

Кроме того, примеры органического синтетического полимера по настоящему изобретению, предпочтительно, включают полимеры, состоящие по меньшей мере из одной составной части, выбранной из группы, состоящей из (мет)акриловой кислоты, (мет)акриламида, (мет)акрилового сложного эфира, метилметакрилата, малеиновой кислоты, малеинового ангидрида, винилацетата, винилового спирта, винилхлорацетата, этиленгликоля, пропиленгликоля, глицерина, диизоцианата, стирола, изопрена, аллиламина и этиленимина. Более конкретно, примеры органического синтетического полимера включают виниловые полимеры, включая поли(акриловую кислоту), поли

(акриламид), поли(акриловый сложный эфир), поли(2-гидроксиэтилметакрилат), поли(метилметакрилат), поли(малеиновую кислоту), поли(малеиновый ангидрид), этиловый сополимер винилацетата, поли(метакриловую кислоту), поли(виниловый спирт), сополимер винилового спирта и винилхлорацетата, аминированный поли(виниловый спирт) и его блок-сополимеры; полиэтиленгликоль (PEG), или полипропиленгликоль, или сополимер этиленоксида и пропиленоксида, содержащие главные цепи полимеров, включая линейные, гребенчатые или разветвленные дендримеры; поли(этиленимины); и поли(аллиламины).

[0035]

#### Второе связывающее средство

Второе связывающее средство по настоящему изобретению способно специфически связываться с линкерной молекулой и содержит вторую связывающую молекулу и вещество мечения. Вторую связывающую молекулу и вещество мечения по настоящему изобретению можно напрямую связывать друг с другом в любом участке при условии, что эффект по настоящему изобретению не будет ингибирован. Кроме того, второе связывающее средство может содержать носитель вместе со второй связывающей молекулой и веществом мечения по настоящему изобретению. Кроме того, второе связывающее средство по настоящему изобретению может содержать гаптеновую метку.

[0036]

#### Вторая связывающая молекула

Вторая связывающая молекула не ограничена при условии, что она способна специфически связываться с линкерной молекулой, но предпочтительно является антителом, его фрагментом. В этом случае антитело может иметь любой изотип, т.е. IgG, IgM, IgA, IgD или IgE. Кроме того, примеры фрагмента антитела включают антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, диатела, триатела, тетратела или однодоменные антитела.

[0037]

#### Вещество мечения во втором связывающем средстве

Вещество мечения во втором связывающем средстве по настоящему изобретению конкретно не ограничено при условии, что оно не ингибирует детекцию маркера-мишени, но, например, его можно выбирать из веществ мечения, примеры которых приведены для первого связывающего средства. Таким образом, вещество мечения во втором связывающем средстве может являться тем же, что и в первом связывающем средстве, или отличаться от него, но предпочтительно является тем же веществом мечения. То же вещество мечения является особенно предпочтительным в определении маркера-мишени, простом и с высоким уровнем чувствительности детекции.

[0038]

#### Носитель во втором связывающем средстве

Носитель во втором связывающем средстве конкретно не ограничен при условии, что эффект по настоящему изобретению не будет ингибирован, но, например, его можно выбирать из носителей, примеры которых приведены для первого связывающего средства. Таким образом, носитель во втором связывающем средстве может являться тем же, что и в первом связывающем средстве, или отличаться.

[0039]

#### Линкерная молекула

Линкерная молекула по настоящему изобретению способна специфически связываться с первым связывающим средством, как описано выше. Кроме того, предпочтительно,

линкер по настоящему изобретению способен специфически связываться с первым связывающим средством и вторым связывающим средством, учитывая эффективную детекцию маркера-мишени. Таким образом, по одному из вариантов осуществления настоящего изобретения линкерная молекула способна специфически связываться с

5 первым связывающим средством и вторым связывающим средством. Линкерная молекула по настоящему изобретению может специфически связываться с любыми участками первого связывающего средства и второго связывающего средства при условии, что эффект по настоящему изобретению не будет ингибирован, но, предпочтительно, она способна специфически связываться с веществом мечения в

10 первом связывающем средстве и/или веществом мечения во втором связывающем средстве, и, более предпочтительно, способна специфически связываться с веществом мечения в первом связывающем средстве и веществом мечения во втором связывающем средстве.

[0040]

15 Кроме того, участок, в котором линкерная молекула по настоящему изобретению специфически связывается второй связывающей молекулой во втором связывающем средстве, может отличаться от участка в случае вещества мечения, как показано на фиг. 1. Таким образом, по одному из вариантов осуществления настоящего изобретения линкерная молекула включает по меньшей мере два участка связывания, в котором

20 она способна специфически связываться со вторым связывающим средством.

[0041]

Примеры указанной выше линкерной молекулы включают антитело или его фрагмент. В этом случае антитело может иметь любой изотип, т.е. IgG, IgM, IgA, IgD или IgE. Кроме того, фрагмент антитела включает антигенсвязывающий фрагмент, такой как

25 Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub>, Fv или scFv. Указанная выше линкерная молекула может дополнительно включать гаптенную метку, отличающуюся от иммуногена, используемого в получении линкерной молекулы, или флуоресцентную метку. Кроме того, по одному из вариантов осуществления настоящего изобретения множество антител или их антигенсвязывающих фрагментов, соединенных через носитель, такой как полимер, исключают из указанной

30 выше линкерной молекулы.

[0042]

#### Полиэтиленгликоль

В настоящем изобретении по меньшей мере один реагент из первого связывающего средства, линкерной молекулы и второго связывающего средства, предпочтительно,

35 подвергаются иммунологической реакции в присутствии полиэтиленгликоля при детекции маркера-мишени. Порядок связывания указанного выше реагента с полиэтиленгликолем в случае присутствия конкретно не ограничен в настоящем изобретении. Например, можно начинать иммунологическую реакцию с использованием указанного выше реагента и, в свою очередь, быстро добавлять полиэтиленгликоль или предварительно

40 смешивать указанный выше реагент с полиэтиленгликолем, а затем осуществлять иммунологическую реакцию. Указанному выше реагенту и полиэтиленгликолю предпочтительно позволяют присутствовать одновременно или до инициации иммунологической реакции с точки зрения эффективного усиления иммунологической реакции по настоящему изобретению.

45 [0043]

Молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в настоящем изобретении, конкретно не ограничена при условии, что достигают эффекта по настоящему изобретению, но, в качестве одного подходящего примера, среднюю молекулярную

массу (MW) можно определять в диапазоне от 2000 до 20000. Такую среднюю молекулярную массу можно определять, например, с использованием стандартного продукта полиэтиленгликоля в качестве показателя, посредством гель-фильтрации (GPC).

5 [0044]

#### Комбинированный продукт

Комбинированный продукт по настоящему изобретению содержит в комбинации указанное выше (а) первое связывающее средство, (b) линкерную молекулу и (с) второе связывающее средство для детекции маркера-мишени в биологическом образце в комбинации с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, способной специфически связываться с маркером-мишенью. Вариант осуществления комбинированного продукта по настоящему изобретению конкретно не ограничен при условии, что эффект по настоящему изобретению не будет ингибирован. Например, (а) первое связывающее средство, (b) линкерная молекула и (с) второе связывающее средство, в целом, могут представлять собой композицию или отдельные части, подобные набору для детекции или системе детекции. Таким образом, комбинированный продукт по настоящему изобретению предпочтительно предоставляют в форме композиции или набора. Кроме того, комбинированный продукт по настоящему изобретению может содержать реагенты, иные, чем (а)-(с), при условии, что эффект по настоящему изобретению не будет ингибирован.

Кроме того, по одному из вариантов осуществления настоящего изобретения комбинированный продукт по настоящему изобретению дополнительно содержит в комбинации указанную выше молекулу, связывающуюся с маркером-мишенью, в дополнение к указанным выше (а)-(с).

25 [0045]

#### Способ детекции маркера-мишени в биологическом образце

По настоящему изобретению, как описано выше, (а) первое связывающее средство, (b) линкерную молекулу и (с) второе связывающее средство и молекулу, связывающуюся с маркером-мишенью, используют совместно, таким образом, делая возможной детекцию маркера-мишени в биологическом образце, полученном из индивидуума, просто и с высоким уровнем чувствительности детекции. Таким образом, один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к способу определения маркера-мишени в биологическом образце, полученном из индивидуума, включающему стадии:

(i) приведения молекулы, связывающейся с маркером-мишенью, заранее специфически связанной с маркером-мишенью, в контакт с первым связывающим средством и, таким образом, получения первого комплекса;

(ii) приведения первого комплекса в контакт с линкерной молекулой и, таким образом, получения второго комплекса; и

(iii) приведения второго комплекса в контакт со вторым связывающим средством и, таким образом, получения третьего комплекса,

где указанное выше первое связывающее средство содержит первую связывающую молекулу, способную прямо или косвенно специфически связываться с указанной выше молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, и вещество мечения;

где указанная выше связываемая линкерная молекула способна специфически связываться с первым связывающим средством; и

где второе связывающее средство способно специфически связываться с линкерной молекулой и содержит вторую связывающую молекулу и вещество мечения.

[0046]



На указанных выше соответствующих этапах приведения в контакт (i)-(iii) первый комплекс, второй комплекс и третий комплекс можно получать известным способом, таким как смешивание соответствующих ингредиентов.

[0047]

5 На указанных выше соответствующих этапах приведения в контакт (i)-(iii) первое связывающее средство, линкерную молекулу и второе связывающее средство предпочтительно можно добавлять в виде раствора.

Концентрация первого связывающего средства в указанном выше растворе на этапе (i) конкретно не ограничена, но ее можно определять в диапазоне от 1 до 15 мкг/мл.

10 [0048]

Концентрация линкерной молекулы в указанном выше растворе на этапе (ii) конкретно не ограничена, но ее можно определять в диапазоне от 0,5 до 15 мкг/мл.

[0049]

15 Концентрация второго связывающего средства в указанном выше растворе на этапе (iii) конкретно не ограничена, но ее можно определять в диапазоне от 1 до 15 мкг/мл.

[0050]

20 Кроме того, по меньшей мере один или все соответствующие этапы приведения в контакт (i)-(iii) предпочтительно осуществляют в присутствии полиэтиленгликоля, учитывая повышение чувствительности детекции маркера-мишени. Концентрация полиэтиленгликоля в указанных выше растворах, используемых на этапах (i)-(iii), конкретно не ограничена, но ее можно определять в диапазоне от 0,5 до 20% масс.

[0051]

25 Кроме того, способ по настоящему изобретению может дополнительно включать этап детекции вещества мечения в первом связывающем средстве и вещества мечения во втором связывающем средстве.

[0052]

30 Способ детекции вещества мечения в первом связывающем средстве и вещества мечения во втором связывающем средстве по настоящему изобретению могут соответствующим образом устанавливать специалисты в этой области в соответствии с типами и свойствами веществ мечения. Например, можно использовать различные известные способы детекции, включая иммуноокрашивание, гибридизацию *in situ*, проточную цитометрию, иммуноферментный анализ (EIA), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и вестерн-блоттинг. Предпочтительно, способом детекции является иммуногистохимическое окрашивание или гибридизация *in situ*, такая как хромогенная гибридизация *in situ* (CISH).

35 Подробности условий реакции для соответствующих этапов приведения в контакт (i)-(iii) и детекции веществ мечения по настоящему изобретению могут определять специалисты в этой области известными способами.

## ПРИМЕРЫ

40 [0053]

Далее в настоящем описании настоящее изобретение будет более подробно описано с помощью примеров, но оно не ограничено этими примерами. Подробности о единицах и условиях измерения, используемых в настоящем изобретении, соответствуют норме JIS (Японских промышленных стандартов), если не указано иначе.

45 [0054]

Тестовый пример 1: Исследование высокочувствительного способа окрашивания с использованием только первого связывающего средства и высокочувствительного способа окрашивания с использованием только первого связывающего средства и

второго связывающего средства

В этом тестовом примере реакцию систему с использованием только первого связывающего средства (сравнительный пример 1) и реакцию систему с использованием только первого связывающего средства и второго связывающего средства (сравнительный пример 2) сравнивали в терминах чувствительности детекции маркера-мишени.

[0055]

Получение реагента1. Получение первого связывающего средства

Первое связывающее средство (полимерный реагент) получали в соответствии с описанием в параграфах [0031]-[0040] JP 2001-181299 А.

В частности, полимерный реагент (М), содержащий пероксидазы и фрагменты Fab' Ig против мыши (вид животного: коза), связанные с аминокислотным полимером, и полимерный реагент (R), содержащий пероксидазы и фрагменты Fab' Ig против кролика (вид животного: коза), связанный с аминокислотным полимером, смешивали в количестве по 5 мкг/мл каждого, таким образом, получая смесь полимерного реагента (MULTI).

[0056]

2. Получение второго связывающего средства

Полимерный реагент (G), содержащий пероксидазы и фрагменты Fab' Ig против козы (вид животного: кролик), связанные с аминокислотным полимером, получали в концентрации 7,5 мкг/мл.

[0057]

Иммуногистохимическое окрашивание1. Депарафинизация, блокирование пероксидазы и обработка для демаскирования антигенаА. Получение предметного стекла

Тканевой срез нарежали по 3 мкм и помещали на покрытое MAS предметное стекло. Затем предметное стекло сушили в течение ночи в инкубаторе при 37°C.

В. Депарафинизация(I) Обработка ксиленом (3 раза по 3 минуты)

Стекло погружали в ксилен на 3 минуты. Затем стряхивали избыток жидкости, а затем стекло погружали в другой ксилен на 3 минуты. Затем стряхивали избыток жидкости и стекло погружали в еще один ксилен на 3 минуты.

(II) Обработка этанолом (4 раза по 3 минуты)

Стекло погружали в 100% этанол на 3 минуты. Стряхивали избыток жидкости и стекло погружали в другой 100% этанол на 3 минуты. Эту операцию осуществляли еще два раза.

(III) Промывание

Избыток этанола стряхивали и стекло промывали в PBS (контейнер меняли дважды, соответственно, в течение 3 минут).

С. Обработка посредством демаскирования антигена

Раствор для демаскирования антигена, pH 9, (NICHIREI BIOSCIENCES INC.) использовали для нагревания а автоклаве в течение 20 минут и позволяли отстаиваться при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды.

Д. Блокирование пероксидазы

Блокировали эндогенную пероксидазу. После высушивания стекло погружали в 3

об./об.% раствор пероксида водорода на 10 минут. Затем стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды.

[0058]

## 2. Реакция присоединения первого антитела или отрицательного контроля (дилуэнт первого антитела)

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли первое антитело или дилуэнт первого антитела, чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 30 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. Комбинация ткани и первого антитела, используемая в исследовании, являлась следующей.

Рак желудка/моноклональное антитело против продукта гена p53 человек (DO-7) (NICHIREI BIOSCIENCES INC.), используемое разведенным в 3 раза.

Колоректальный рак/моноклональное антитело кролика против CDX-2 (NICHIREI BIOSCIENCES INC.), используемое таким, как есть.

[0059]

## 3. Реакция с первым связывающим средством

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли смесь полимерного реагента (MULTI), чтобы вызвать реакцию во влажной камере в 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. В частности, эту реакцию осуществляли в сравнительных примерах 1 и 2.

[0060]

## 4. Реакция со вторым связывающим средством

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли полимерный реагент (G), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. В частности, эту реакцию осуществляли только в сравнительном примере 2.

[0061]

## 5. Реакция присоединения в растворе субстрата

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли N-Histofine® DAB-2V (NICHIREI BIOSCIENCES INC.), чтобы вызвать реакцию при комнатной температуре в течение 5 минут. Затем предметное стекло промывали проточной водой в течение 5 минут.

[0062]

## 6. Контрастное окрашивание, дегидратационная очистка, заливка

### А. Контрастное окрашивание

После высушивания предметное стекло погружали в раствор гематоксилина Майера на 30 секунд. Затем предметное стекло промывали проточной водой в течение 5 минут.

### В. Дегидратационная очистка

После высушивания осуществляли дегидратацию с использованием этанола и очистку ксиленом. В этом случае этанол использовали для дегидратации посредством трехкратного пропускания через него и отстаивания в нем один раз в течение 5 минут. Ксилен использовали для очистки посредством однократного пропускания через него и отстаивания в нем дважды по 5 минут.

### С. Заливка

Для заливки использовали Permanent Mounting Media (неводные) (NICHIREI BIOSCIENCES INC.).

[0063]

Результаты указанного выше окрашивания показаны на фиг. 2. В этом случае микрофотографии соответствующих окрашенных тканей на фиг. 2 получали с использованием оптического микроскопа (Olympus Corporation) с линзой окуляра (10×) и линзой объектива (4×).

[0064]

Реакционная система с использованием только первого связывающего средства и второго связывающего средства (сравнительный пример 2) обеспечивала немного улучшенную чувствительность окрашивания по сравнению с реакционной системой с использованием только первого связывающего средства (сравнительный пример 1).

Однако нельзя достичь желаемого уровня чувствительности окрашивания.

При этом не наблюдали фоновое окрашивание в отрицательном контроле.

[0065]

Тестовый пример 2: Исследование высокочувствительного способа окрашивания с использованием первого связывающего средства, линкерной молекулы и второго связывающего средства

Было рассмотрено, можно ли улучшать чувствительность окрашивания с помощью реакционных систем с использованием первого связывающего средства, линкерной молекулы и второго связывающего средства, т.е. реакционных систем, содержащих линкерную молекулу, помещенную между первым связывающим средством и вторым связывающим средством, по сравнению с реакционными системами с использованием только первого связывающего средства или реакционными системами с использованием только первого связывающего средства и второго связывающего средства.

В этом тесте среди таких реакционных систем с использованием первого связывающего средства, линкерной молекулы и второго связывающего средства, реакционную систему с использованием линкерной молекулы (1 мкг/мл антитела против HRP) определяли в качестве примера 1 и реакционную систему с использованием линкерной молекулы (5 мкг/мл антитела против HRP) определяли в качестве примера 2.

Кроме того, реакционную систему с использованием только первого связывающего средства определяли в качестве сравнительного примера 3 и реакционную систему с использованием только первого связывающего средства и второго связывающего средства определяли в качестве сравнительного примера 4.

[0066]

Получение реагента

1. Получение первого связывающего средства

Полимерный реагент (M), содержащий пероксидазы и фрагменты Fab' Ig против мыши (вид животного: коза), связанные с аминокислотным полимером, и полимерный реагент (R), содержащий пероксидазы и фрагменты Fab' Ig против кролика (вид животного: коза), связанные с аминокислотным полимером, смешивали в количестве по 5 мкг/мл каждого, таким образом, получая смесь полимерного реагента (MULTI).

[0067]

2. Получение линкерной молекулы

Антитело козы против HRP (поликлональное) (Pierce) получали в концентрации 1 мкг/мл или 5 мкг/мл.

[0068]

3. Получение второго связывающего средства

Полимерный реагент (G), содержащий пероксидазы и фрагменты Fab' Ig против козы (вид животного: кролик), связанные с аминокислотным полимером, получали в

концентрации 7,5 мкг/мл.

[0069]

#### Иммуногистохимическое окрашивание

1. Депарафинизация, блокирование пероксидазы и обработка для демаскирования антигена

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.

2. Реакция присоединения первого антитела или отрицательного контроля (дильуента первого антитела)

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.

3. Реакция первого связывающего средства

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли смесь полимерного реагента (MULTI), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом, эту реакцию осуществляли в примерах 1 и 2 и сравнительных примерах 3 и 4.

[0070]

4. Реакция с линкерной молекулой

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли антитело козы против HRP, чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли только в примерах 1 и 2.

[0071]

5. Реакция со вторым связывающим средством

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли полимер реагент (G), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли в примерах 1 и 2 и сравнительном примере 4.

[0072]

6. Реакция присоединения в растворе субстрата

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.

7. Контрастное окрашивание, дегидратационная очистка, заливка

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.

[0073]

Результаты показаны на фиг. 3. В этом случае микрофотографии соответствующих окрашенных тканей, представленные на фиг. 3, получали с использованием оптического микроскопа (Olympus Corporation) с линзой окуляра (10x) и линзой объектива (4x).

Реакционные системы (примеры 1 и 2), содержащие линкерную молекулу (антитело против HRP), помещаемую между первым связывающим средством и вторым связывающим средством, обеспечивали значительно улучшенную чувствительность окрашивания по сравнению с реакционной системой с использованием только первого связывающего средства или реакционной системой с использованием только первого связывающего средства и второго связывающего средства.

При этом в отрицательном контроле не наблюдали фоновое окрашивание.

[0074]

Тестовый пример 3: Исследование типа антитела, используемого в качестве линкерной молекула

[0075]

Тест осуществляли с использованием тестового способа, схожего с таковым в тестовом примере 2, с использованием полимерных реагентов и антител против HRP, как указано в следующей таблице 1, при одновременной замене вида иммунизируемого животного (мыши, кролика или козы) для антител против HRP.

[0076]

[Таблица 1]

	Сравнительный пример 5	Пример 3	Сравнительный пример 6	Пример 4	Сравнительный пример 7	Пример 5
Первое связывающее средство	Полимерный реагент (М) 5 мкг/мл+полимерный реагент (R) 5 мкг/мл					
Линкерная молекула	Нет	Антитело мыши против HRP 5 мкг/мл (TFS, клон: HP-03)	Нет	Антитело кролика против HRP 5 мкг/мл (NICHIREI BIOSCIENCES INC., поликлональное)	Нет	Антитело козы против HRP 5 мкг/мл (Pierce, поликлональное)
Второе связывающее средство	Полимерный реагент (М) 7,5 мкг/мл		Полимерный реагент (R) 7,5 мкг/мл		Полимерный реагент (G) 7,5 мкг/мл	

[0077]

Результаты показаны на фиг. 4. В этом случае микрофотографии соответствующих окрашенных тканей, представленные на фиг. 4, получали с использованием оптического микроскопа (Olympus Corporation) с линзой окуляра (10х) и линзой объектива (4х).

Антитело какого бы вида иммунизированного животного не использовали бы в качестве линкерной молекулы, каждая из реакционных систем (примеры 3 до 5) с использованием первого связывающего средства, линкерной молекулы и второго связывающего средства обеспечивала значительно улучшенную чувствительность окрашивания по сравнению с реакционными системами (сравнительные примеры 5 до 7) с использованием только первого связывающего средства и второго связывающего средства. При этом в отрицательном контроле не наблюдали фоновое окрашивание.

[0078]

Тестовый пример 4: Исследование типов первого связывающего средства и второго связывающего средства

4-1: Использование конъюгата целого антитела и декстрана (носителя) (первого связывающего средства и второго связывающего средства)

Полимерный реагент (EnVision Dual Link System-HRP, DAKO), содержащий целые антитела IgG и пероксидазы, связанные с декстраном, использовали в качестве первого связывающего средства и второго связывающего средства и осуществляли сравнительный тест чувствительности окрашивания в соответствии со следующими способами.

При этом реакционную систему с использованием первого связывающего средства, линкерной молекулы (антитела мыши против HRP) и второго связывающего средства определяли в качестве примера 6; реакционную систему с использованием первого связывающего средства, линкерной молекулы (антитела кролика против HRP) и второго связывающего средства определяли в качестве примера 7; реакционную систему с использованием только первого связывающего средства определяли в качестве сравнительного примера 8; и реакционную систему с использованием только первого связывающего средства и второго связывающего средства определяли в качестве сравнительного примера 9.

[0079]

Получение реагента

1. Получение первого связывающего средства

Полимерный реагент, содержащий целые антитела IgG и пероксидазы, связанные с

декстраном (EnVision Dual Link System-HRP, DAKO), использовали так, как они есть. В частности, полимерный реагент является смесью полимерного реагента (М), содержащего пероксидазы и антитела против IgG мыши (вид животного: коза), связанные с декстрановым полимером, и полимерного реагента (R), содержащего пероксидазы и антитела против IgG кролика (вид животного: коза), связанные с декстрановым полимером.

[0080]

## 2. Получение линкерной молекулы

Антитело мыши против HRP (клон: HP-03) (TFS) получали в концентрации 5 мкг/мл.

Антитело кролика против HRP (поликлональное) (NICHIREI BIOSCIENCES INC.) получали в концентрации 5 мкг/мл.

[0081]

## 3. Получение второго связывающего средства

Полимерный реагент, содержащий целые антитела IgG и пероксидазы, связанные с декстраном (EnVision Dual Link System-HRP, DAKO), использовали так, как оно есть.

[0082]

## Иммуногистохимическое окрашивание

1. Депарафинизация, блокирование пероксидазы и обработка для демаскирования антигена

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.

2. Реакция присоединения первого антитела или отрицательного контроля (дильуэнта первого антитела)

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли первое антитело или дильуэнт первого антитела, чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 30 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. Комбинация ткани и молекулы, связывающейся с маркером-мишенью (первым антителом), используемым в исследовании, являлась следующей.

Рак желудка/моноклональное антитело против продукта гена p53 человека (DO-7) (NICHIREI BIOSCIENCES INC.) использовали таким, как есть.

Колоректальный рак/моноклональное антитело кролика против CDX-2 (NICHIREI BIOSCIENCES INC.) использовали таким, как есть.

[0083]

## 3. Реакция первого связывающего средства

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли EnVision Dual Link System-HRP (DAKO), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли в примерах 6 и 7 и сравнительных примерах 8 и 9.

[0084]

## 4. Реакция с линкерной молекулой

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли антитело мыши против HRP (пример 6) или антитело кролика против HRP (пример 7), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли только в примерах 6 и 7.

[0085]

## 5. Реакция со вторым связывающим средством

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли EnVision Dual Link System-HRP (DAKO), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды.

5 Реакцию осуществляли только в примерах 6 и 7 и сравнительном примере 9.  
[0086]

6. Реакция присоединения в растворе субстрата

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.

7. Контрастное окрашивание, дегидратационная очистка, заливка

10 Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.  
[0087]

Результаты показаны на фиг. 5. В этом случае микрофотографии соответствующих окрашенных тканей, показанные на фиг. 5, получали с использованием оптического микроскопа (Olympus Corporation) с линзой окуляра (10×) и линзой объектива (4×).

15 [0088]

Кроме того, если в качестве носителя использовали декстран и в качестве связывающей молекулы использовали целое антитело, реакционные системы с использованием первого связывающего средства, линкерной молекулы и второго связывающего средства (примеры 6 и 7) обеспечивали значительно улучшенную

20 чувствительность детекции по сравнению с реакционной системой (сравнительный пример 8) с использованием только первого связывающего средства и реакционной системы (сравнительный пример 9) с использованием только первого связывающего средства и второго связывающего средства.

При этом в отрицательном контроле не наблюдали фоновое окрашивание.

25 [0089]

4-2: Использование прямого конъюгата целого антитела и HRP (первого связывающего средства и второго связывающего средства)

Реагенты, содержащие целое IgG антитело и поли-HRP, напрямую связанные друг с другом, использовали в качестве первого связывающего средства и второго

30 связывающего средства для исследования эффекта детекции маркера-мишени.

В следующем эксперименте реакционную систему с использованием первого связывающего средства (прямого конъюгата антитела против мыши и поли-HRP), линкерной молекулы (антитела мыши против HRP) и второго связывающего средства (прямого конъюгата антитела против мыши и поли-HRP) определяли в качестве примера

35 8 (биологический образец: p53/рак желудка); и реакционную систему с использованием первого связывающего средства (прямого конъюгата антитела против кролика и поли-HRP), линкерной молекулы (антитела кролика против HRP) и второго связывающего средства (прямого конъюгата антитела против кролика и поли-HRP) определяли в качестве примера 9 (биологический образец: CDX-2/колоректальный рак). Кроме того,

40 реакционную систему с использованием только первого связывающего средства (прямого конъюгата антитела против мыши и поли-HRP) и второго связывающего средства (прямого конъюгата антитела против мыши и поли-HRP) определяли в качестве сравнительного примера 10 (биологический образец: p53/рак желудка); и реакционную систему с использованием только первого связывающего средства (прямого конъюгата

45 антитела против кролика и поли-HRP) и второго связывающего средства (прямого конъюгата антитела против кролика и поли-HRP) определяли в качестве сравнительного примера 11 (биологический образец: CDX-2/колоректальный рак).

[0090]



Получение реагента1. Получение первого связывающего средства

Реагент, содержащий целое антитело IgG, напрямую меченное поли-HRP (антитело козы против мыши с поли-HRP, Pierce) разводили в 10 раз.

5 Реагент, содержащий целое антитело IgG, напрямую меченное поли-HRP (антитело козы против кролика с поли-HRP, Pierce) разводили в 10 раз.

[0091]

2. Получение линкерной молекулы

Антитело мыши против HRP (клон: HP-03, TFS) получали в концентрации 5 мкг/мл.

10 Антитело кролика против HRP (поликлональное) (NICHIREI BIOSCIENCES INC.) получали в концентрации 5 мкг/мл.

[0092]

3. Получение второго связывающего средства

15 Реагент, содержащий целое антитело IgG, напрямую меченное поли-HRP (антитело козы против мыши с поли-HRP, Pierce), разводили в 10 раз.

Реагент, содержащий целое антитело IgG, напрямую меченное поли-HRP (антитело козы против кролика с поли-HRP, Pierce), разводили в 10 раз.

[0093]

Иммуногистохимическое окрашивание

20 1. Депарафинизация, блокирование пероксидазы и обработка для демаскирования антигена

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.

2. Реакция присоединения первого антитела или отрицательного контроля (дилуэнта первого антитела)

25 Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 4-1.

[0094]

3. Реакция с первым связывающим средством

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли антитело козы против мыши с поли-HRP (Pierce) (пример 8 и сравнительный  
30 пример 10) или антитело козы против кролика с поли-HRP (Pierce) (пример 9 и сравнительный пример 11), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли в примерах 8 и 9 и сравнительных примерах 10 и 11.

35 [0095]

4. Реакция с линкерной молекулой

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли антитело мыши против HRP (пример 8) или антитело кролика против HRP (пример 9), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут.  
40 Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли в примерах 8 и 9.

[0096]

5. Реакция со вторым связывающим средством

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли антитело козы против мыши с поли-HRP (Pierce) (пример 8 и сравнительный  
45 пример 10) или антитело козы против кролика с поли-HRP (Pierce) (пример 9 и сравнительный пример 11), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды.

При этом эту реакцию осуществляли в примерах 8 и 9 и сравнительных примерах 10 и 11.

[0097]

#### 6. Реакция присоединения в растворе субстрата

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.

#### 7. Контрастное окрашивание, дегидратационная очистка, заливка

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.

[0098]

Результаты показаны на фиг. 6. В этом случае микрофотографии соответствующих окрашенных тканей, показанные на фиг. 6, получали с использованием оптического микроскопа (Olympus Corporation) с линзой окуляра (10×) и линзой объектива (4×).

Кроме того, при использовании прямых конъюгатов целого антитела и вещества мечения (поли-HRP) в качестве первого связывающего средства и второго связывающего средства реакционные системы (примеры 8 и 9) с использованием каждого из первого связывающего средства, линкерной молекулы и второго связывающего средства обеспечивали значительно улучшенную чувствительность детекции по сравнению с реакционными системами (сравнительные примеры 10 и 11) с использованием только первого связывающего средства и второго связывающего средства.

При этом, в примерах 8 и 9 наблюдали фоновое окрашивание в отрицательных контролях, но, в основном, оно возникало в цитоплазме и едва возникало в ядре клетки. С помощью антитела против p53 и CDX-2 окрашивали ядро клетки, и, таким образом, они были едва затронуты фоновым окрашиванием на момент оценки.

[0099]

#### 4-3: Использование ферментных микрополимеров (первое связывающее средство и второе связывающее средство)

Ферментные микрополимеры, содержащие ферменты с высокой активностью и высокой плотностью и антитело, связанные друг с другом (реагент ImmPRESS UNIVERSAL, антитело против Ig мыши/кролика или реагент ImmPRESS, антитело против Ig козы; VECTOR LABORATORIES) использовали в качестве первого связывающего средства и второго связывающего средства для сравнительного теста на чувствительность окрашивания в соответствии со следующими способами.

При этом реакционную систему с использованием первого связывающего средства (реагента ImmPRESS UNIVERSAL, антитела против Ig мыши/кролика), линкерной молекулы (антитела мыши против HRP) и второго связывающего средства (реагента ImmPRESS UNIVERSAL, антитела против Ig мыши/кролика) определяли в качестве примера 10; реакционную систему с использованием первого связывающего средства (реагента ImmPRESS UNIVERSAL, антитела против Ig мыши/кролика), линкерной молекулы (антитела кролика против HRP) и второго связывающего средства (реагента ImmPRESS UNIVERSAL, антитела против Ig мыши/кролика) определяли в качестве примера 11; и реакционную систему с использованием первого связывающего средства (реагента ImmPRESS UNIVERSAL, антитела против Ig мыши/кролика), линкерной молекулы (антитела козы против HRP) и второго связывающего средства (реагента ImmPRESS, антитела против Ig козы) определяли в качестве примера 12.

Кроме того, реакционную систему с использованием только первого связывающего средства (реагента ImmPRESS UNIVERSAL, антитела против Ig мыши/кролика) определяли в качестве сравнительного примера 12; реакционную систему с использованием только первого связывающего средства (реагента ImmPRESS UNIVERSAL, антитела против Ig мыши/кролика) и второго связывающего средства

(реагента ImmPRESS UNIVERSAL, антитела против Ig мыши/кролика) определяли в качестве сравнительного примера 13; и реакционную систему с использованием только первого связывающего средства (реагента ImmPRESS UNIVERSAL, антитела против Ig мыши/кролика) и второго связывающего средства (реагента ImmPRESS, антитела против Ig козы) определяли в качестве сравнительного примера 14.

[0100]

#### Получение реагента

##### 1. Получение первого связывающего средства

Ферментные микрополимеры, содержащие ферменты с высокой активностью и высокой плотностью и антитело, связанные друг с другом (реагент ImmPRESS UNIVERSAL, антитело против Ig мыши/кролика, VECTOR LABORATORIES), использовали, как они есть.

[0101]

##### 2. Получение линкерной молекулы

Антитело мыши против HRP (клон: HP-03, TFS) получали в концентрации 5 мкг/мл. Антитело кролика против HRP (поликлональное) (NICHIREI BIOSCIENCES INC.) получали в концентрации 5 мкг/мл.

Антитело козы против HRP (поликлональное) (Pierce) получали в концентрации 5 мкг/мл.

[0102]

##### 3. Получение второго связывающего средства

Ферментные микрополимеры, содержащие ферменты с высокой активностью и высокой плотностью и антитело, связанные друг с другом (реагент ImmPRESS UNIVERSAL, антитело против Ig мыши/кролика, VECTOR LABORATORIES), использовали, как они есть.

Кроме того, другие ферментные микрополимеры, содержащие ферменты с высокой активностью и высокой плотностью и антитело, связанные друг с другом (реагент ImmPRESS, антитело против Ig козы, VECTOR LABORATORIES), использовали, как они есть.

[0103]

#### Иммуногистохимическое окрашивание

##### 1. Депарафинизация, блокирование пероксидазы и обработка для демаскирования антигена

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.

##### 2. Реакция присоединения первого антитела или отрицательного контроля (дилуэнта первого антитела)

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 4-1.

[0104]

##### 3. Реакция с первым связывающим средством

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли реагент ImmPRESS UNIVERSAL, антитело против Ig мыши/кролика (VECTOR LABORATORIES), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли в примерах 10 до 12 и сравнительных примерах 12 до 14.

[0105]

##### 4. Реакция с линкерной молекулой

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли антитело мыши против HRP (Пример 10), антитело кролика против HRP

(Пример 11) или антитело козы против HRP (пример 12), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли только в примерах 10-12.

[0106]

#### 5. Реакция со вторым связывающим средством

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли реагент ImmPRESS UNIVERSAL, антитело против Ig мыши/кролика (VECTOR LABORATORIES) (примеры 10 и 11 и сравнительный пример 13) или реагент ImmPRESS, антитело против Ig козы (VECTOR LABORATORIES) (пример 12 и сравнительный пример 14), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли в примерах 10-12 и сравнительных примерах 13 и 14.

[0107]

#### 6. Реакция присоединения в растворе субстрата

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.

#### 7. Контрастное окрашивание, дегидратационная очистка, заливка

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.

[0108]

Результаты показаны на фиг. 7. В этом случае микрофотографии соответствующих окрашенных тканей, показанные на фиг. 7, получали с использованием оптического микроскопа (Olympus Corporation) с линзой окуляра (10x) и линзой объектива (4x).

Кроме того, при использовании ферментных микрополимеров, содержащих ферменты с высокой активностью и высокой плотностью и антитело, связанные друг с другом, в качестве первого связывающего средства и второго связывающего средства реакционные системы (примеры 10-12) с использованием каждого из первого связывающего средства, линкерной молекулы и второго связывающего средства обеспечивали значительно улучшенную чувствительность детекции по сравнению с реакционной системой (сравнительный пример 12) с использованием только первого связывающего средства и реакционными системами (сравнительные примеры 13 и 14) с использованием только первого связывающего средства и второго связывающего средства.

При этом наблюдали фоновое окрашивание в отрицательном контроле в примерах 10-12, но, в основном, оно возникало в цитоплазме и едва возникало в ядре клетки. С помощью антител против p53 и CDX-2 окрашивают ядро клетки, и, таким образом, они были едва затронуты фоновым окрашиванием на момент оценки.

[0109]

#### Тестовый пример 5: Исследование наличия или отсутствия полимерных носителей в первом связывающем средстве и втором связывающем средстве и молекулярные массы полимерных носителей

Как показано в следующих таблицах 2-5, в качестве первого связывающего средства и второго связывающего средства выбирали полимерные реагенты, содержащие полимерные носители, отличающиеся по молекулярной массе или реагенту типа поли-HRP, не имеющему полимерного носителя. Осуществляли тест, аналогичный тесту в тестовом примере 2, для сравнения чувствительности детекции маркера-мишени, за исключением того, что только ткань рака желудка использовали в качестве биологического образца, и что использовали молекулу, связывающуюся с маркером-мишенью (первое антитело: моноклональное антитело против продукта гена p53

человека (DO-7) (NICHIREI BIOSCIENCES INC.)), разведенную в 2 раза.

[0110]

[Таблица 2]

5		Сравнительный пример 15	Сравнительный пример 16	Пример 13
	Первое связывающее средство	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 2700)	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 2700)	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 2700)
	Линкерная молекула	Нет	Нет	Антитело мыши против HRP
	Второе связывающее средство	Нет	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 2700)	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 2700)

10 [0111]

[Таблица 3]

		Сравнительный пример 17	Сравнительный пример 18	Пример 14
	Первое связывающее средство	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 7500)	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 7500)	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 7500)
15	Линкерная молекула	Нет	Нет	Антитело мыши против HRP
	Второе связывающее средство	Нет	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 7500)	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 7500)

[0112]

[Таблица 4]

20		Сравнительный пример 19	Сравнительный пример 20	Пример 15
	Первое связывающее средство	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 9200)	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 9200)	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 9200)
	Линкерная молекула	Нет	Нет	Антитело мыши против HRP
25	Второе связывающее средство	Нет	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 9200)	Полимерный реагент (М) (молекулярная масса: 9200)

[0113]

[Таблица 5]

30		Сравнительный пример 21	Сравнительный пример 22	Пример 16
	Первое связывающее средство	Реагент типа поли-HRP (М) (без полимерного носителя)	Реагент типа поли-HRP (М) (без полимерного носителя)	Реагент типа поли-HRP (М) (без полимерного носителя)
	Линкерная молекула	Нет	Нет	Антитело мыши против HRP
	Второе связывающее средство	Нет	Реагент типа поли-HRP (М) (без полимерного носителя)	Реагент типа поли-HRP (М) (без полимерного носителя)

[0114]

35 Получение реагента

1. Получение первого связывающего средства

Первые связывающие средства (полимерные реагенты) получали согласно описанию в параграфах [0031]-[0040] JP 2001-181299 А.

40 В частности, полимерные реагенты получали аналогично полимерному реагенту (М) в тестовом примере 1, за исключением того, что средние молекулярные массы полимерных носителей определяли как 2700, 7500 и 9200, соответственно. Полимерные реагенты получали в концентрации 5 мкг/мл. При этом полимерный носитель полимерного реагента (М), используемый в тестовом примере 1, имеет среднюю молекулярную массу 9200.

45 Кроме того, что касается реагента типа поли-HRP, не имеющего полимерного носителя, реагент (М), содержащий Fab' антитела против Ig мыши (вид животного: коза) и поли-HRP, связанные друг с другом, получали в концентрации 5 мкг/мл.

2. Получение линкерной молекулы

Антитело мыши против HRP (клон: HP-03, TFS) получали в концентрации 5 мкг/мл.

### 3. Получение второго связывающего средства

Указанные выше первые связывающие средства получали в концентрации 7,5 мкг/мл.

[0115]

Результаты показаны на фиг. 8. В этом случае микрофотографии соответствующих окрашенных тканей, показанные на фиг. 8, получали с использованием оптического микроскопа (Olympus Corporation) с линзой окуляра (10×) и линзой объектива (4×).

В каждом из примеров 13-16 с использованием линкерной молекулы подтверждали обеспечение значительно улучшенной чувствительности детекции, независимо от различий в молекулярных массах в первом связывающем средстве и втором связывающем средстве или наличия или отсутствия полимерного носителя (поли-L-лизин (PLL)), по сравнению со сравнительными примерами 15-22 без использования линкерной молекулы. При этом в отрицательном контроле не наблюдали фоновое окрашивание.

[0116]

Тестовый пример 6: Исследование вещества мечения

6-1: Реакционная система с использованием вещества мечения (щелочной фосфатазы: AP) и линкерной молекулы (антитела мыши против AP)

Реакционную систему с использованием щелочной фосфатазы (AP) вместо пероксидазы хрена (HRP) в качестве вещества мечения и линкерной молекулы (антитела мыши против AP) исследовали в терминах чувствительности детекции маркера-мишени.

При этом в следующем тесте реакционную систему с использованием первого связывающего средства и второго связывающего средства (аминокислотного полимера с использованием щелочной фосфатазы (AP) в качестве вещества мечения: полимерный реагент с AP (M)) и линкерной молекулы (антитела мыши против AP) определяли в качестве примера 17; реакционную систему с использованием только первого связывающего средства (полимерный реагент с AP (M)) определяли в качестве сравнительного примера 23; и реакционную систему с использованием только первого связывающего средства и второго связывающего средства (полимерного реагента с AP (M)) определяли в качестве сравнительного примера 24.

[0117]

Получение реагента

#### 1. Получение первого связывающего средства

Полимерный реагент с AP (M), содержащий щелочные фосфатазы (AP) и фрагменты Fab' антитела против Ig мыши (вид животного: коза), связанные с аминокислотным полимером, получали в концентрации 10 мкг/мл.

#### 2. Получение линкерной молекулы

Антитело мыши против AP (клон: AP1B9, NOVUS BIOLOGICALS, LLC) получали в концентрации 5 мкг/мл.

#### 3. Получение второго связывающего средства

Полимерный реагент с AP (M) (NICHIREI BIOSCIENCES INC.) получали в концентрации 10 мкг/мл.

[0118]

Иммуногистохимическое окрашивание

1. Депарафинизация, блокирование пероксидазы и обработка для демаскирования антигена

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.

## 2. Реакция присоединения первого антитела или отрицательного контроля (дилуента первого антитела)

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли первое антитело или дилуент первого антитела, чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 30 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. Комбинация ткани и первого антитела, используемая в исследовании, являлась следующей.

Рак желудка/моноклональное антитело против продукта гена p53 человека (DO-7) (NICHIREI BIOSCIENCES INC.) использовали таким как есть.

[0119]

## 3. Реакция с первым связывающим средством

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли полимерный реагент с AP (М), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли в примере 17 и сравнительных примерах 23 и 24.

[0120]

## 4. Реакция с линкерной молекулой

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли антитело мыши против AP, чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли в примере 17 только.

[0121]

## 5. Реакция со вторым связывающим средством

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли полимерный реагент с AP (М), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли только в примере 17 и сравнительном примере 24.

[0122]

## 6. Реакция присоединения в растворе субстрата

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли набор субстрата Fast-Red II (NICHIREI BIOSCIENCES INC.), чтобы вызвать реакцию при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали проточной водой в течение 5 минут.

## 7. Контрастное окрашивание, дегидратационная очистка, заливка

### А. Контрастное окрашивание

После высушивания предметное стекло погружали в раствор гематоксилина Майера на 30 секунд. Затем предметное стекло промывали проточной водой в течение 5 минут.

### В. Сушка воздухом

После высушивания осуществляли сушку воздухом с использованием сушильного устройства.

### С. Заливка

Предметное стекло медленно погружали в ксилен, а затем для заливки использовали Permanent Mounting Media (неводные) (NICHIREI BIOSCIENCES INC.).

[0123]

Результаты показаны на фиг. 9. В этом случае микрофотографии соответствующих окрашенных тканей, показанные на фиг. 9, получали с использованием оптического

микроскопа (Olympus Corporation) с линзой окуляра (10х) и линзой объектива (4х).

При использовании щелочной фосфатазы (AP) в качестве вещества мечения с помощью примера 17 с использованием первого связывающего средства, линкерной молекулы и второго связывающего средства обеспечивали значительно улучшенную чувствительность детекции по сравнению со сравнительным примером 23 с использованием только первого связывающего средства и сравнительным примером 24 с использованием только первого связывающего средства и второго связывающего средства.

При этом в отрицательном контроле не наблюдали фоновое окрашивание.

[0124]

Тестовый пример 6-2: Реакционная система с использованием вещества мечения (щелочная фосфатаза: AP) и линкерной молекулы (антитело кролика против AP)

Реакционную систему с использованием щелочной фосфатазы (AP) вместо пероксидазы хрена (HRP) в качестве вещества мечения и линкерной молекулы (антитела кролика против AP) исследовали в терминах чувствительности детекции маркера-мишени.

В следующем тесте реакционную систему с использованием первого связывающего средства и второго связывающего средства (аминокислотного полимера с использованием щелочной фосфатазы (AP) в качестве вещества мечения: полимерного реагента с AP (R)) и линкерной молекулы (антитела кролика против AP) определяли в качестве примера 18; реакционную систему с использованием только первого связывающего средства (полимерного реагента с AP (R)) определяли в качестве сравнительного примера 25; и реакционную систему с использованием только первого связывающего средства и второго связывающего средства (полимерного реагента с AP (R)) определяли в качестве сравнительного примера 26.

[0125]

Получение реагента

1. Получение первого связывающего средства

AP полимерный реагент (R), содержащий щелочные фосфатазы (AP) и фрагменты Fab' антитела против Ig кролика (вид животного: коза), связанные с аминокислотным полимером, получали в концентрации 10 мкг/мл.

2. Получение линкерной молекулы

Антитело кролика против AP (поликлональное, NOVUS BIOLOGICALS, LLC) получали в концентрации 5 мкг/мл.

3. Получение второго связывающего средства

AP полимерный реагент (R) получали в концентрации 10 мкг/мл.

[0126]

Иммуногистохимическое окрашивание

1. Депарафинизация, блокирование пероксидазы и обработка для демаскирования антигена

Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 1.

2. Реакция присоединения первого антитела или отрицательного контроля (дильуэнта первого антитела)

На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли первое антитело или дильуэнт первого антитела, чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 30 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. Комбинация ткани и первого антитела, используемая в исследовании, являлась следующей.



Колоректальный рак/моноклональное антитело кролика против CDX-2 (NICHIREI BIOSCIENCES INC.) использовали таким как есть.

[0127]

### 3. Реакция с первым связывающим средством

- 5 На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли полимерный реагент с AP (R), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли в примере 18 и сравнительных примерах 25 и 26.

10 [0128]

### 4. Реакция с линкерной молекулой

- На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли антитело кролика против AP, чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли только в примере 18.

[0129]

### 5. Реакция со вторым связывающим средством

- На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли полимерный реагент с AP (R), чтобы вызвать реакцию во влажной камере при 25°C в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS в течение 3 минут дважды. При этом эту реакцию осуществляли только в примере 18 и сравнительном примере 26.

[0130]

### 6. Реакция присоединения в растворе субстрата

- 25 На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли набор субстрата Fast-Red II (NICHIREI BIOSCIENCES INC.), чтобы вызвать реакцию при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем предметное стекло промывали проточной водой в течение 5 минут.

### 7. Контрастное окрашивание, дегидратационная очистка, заливка

- 30 Эти способы осуществляли аналогично тестовому примеру 6-1.

[0131]

Результаты показаны на фиг. 10. В этом случае микрофотографии соответствующих окрашенных тканей, показанные на фиг. 10, получали с использованием оптического микроскопа (Olympus Corporation) с линзой окуляра (10×) и линзой объектива (4×).

- 35 При использовании щелочной фосфатазы (AP) в качестве вещества мечения с помощью примера 18 с использованием первого связывающего средства, линкерной молекулы и второго связывающего средства обеспечивали значительно улучшенную чувствительность детекции по сравнению со сравнительным примером 25 с использованием только первого связывающего средства и сравнительным примером 40 26 с использованием только первого связывающего средства и второго связывающего средства.

При этом в отрицательном контроле не наблюдали фоновое окрашивание.

[0132]

- 45 Тестовый пример 7: Исследование высокочувствительного способа окрашивания способом CISH

В этом тесте в соответствии со следующими способами рассматривали, может ли настоящее изобретение быть применимым к способу CISH (хромогенной гибридизации *in situ*: гибридизации *in situ* (ISH), включающей детекцию ДНК и мРНК на образце ткани

с использованием красителя, такого как 3,3'-диаминобензидин (DAB)). В качестве молекулы, связывающейся с маркером-мишенью, использовали зонд, меченный дигоксигенином (DIG), к образцу ткани. После блокирования зонд определяли с использованием реагента для детекции, способного напрямую связываться с DIG.

В этом тесте использовали зонд HER2 в качестве молекулы, связывающейся с маркером-мишенью.

Затем в примере 19 в качестве реагента для детекции выбирали реакционную систему с использованием первого связывающего средства (полимерного реагента с антителом козы против DIG-HRP (NICHIREI BIOSCIENCES INC.)), линкерной молекулы (антитела кролика против HRP (поликлонального) (NICHIREI BIOSCIENCES INC.)) и второго связывающего средства (Histofine® Simple Stain® MAX-PO (R), (NICHIREI BIOSCIENCES INC.)).

Кроме того, в сравнительном примере 27 в качестве реагента для детекции выбирали реакционную систему с использованием только первого связывающего средства (полимерного реагента с антителом козы против DIG-HRP). Кроме того, в сравнительном примере 28 в качестве реагента для детекции выбирали реакционную систему с использованием первого связывающего средства (антитела козы против DIG) и второго связывающего средства (Histofine® Simple Stain® MAX-PO (G) (NICHIREI BIOSCIENCES INC.)).

[0133]

#### CISH

1. Депарафинизация, блокирование пероксидазы и обработка для демаскирования антигена, дегидратационная сушка воздухом

А. Получение предметного стекла

Тканевой срез нарезали по 5 мкм и помещали на покрытое MAS предметное стекло. Затем предметное стекло сушили в течение ночи в инкубаторе при 37°C.

В. Депарафинизация, блокирование пероксидазы и обработка для демаскирования антигена, дегидратационная сушка воздухом

(I) Обработка ксиленом (3 раза по 3 минуты)

Стекло погружали в ксилен на 3 минуты. Затем стряхивали избыток жидкости, а затем стекло погружали в другой ксилен на 3 минуты. Затем стряхивали избыток жидкости и стекло погружали в еще один ксилен на 3 минуты.

(II) Обработка этанолом (4 раза по 3 минуты)

Стекло погружали в 100% этанол на 3 минуты. Стряхивали избыток жидкости и стекло погружали в другой 100% этанол в течение 3 минут. Эту операцию осуществляли еще дважды.

(III) Блокирование пероксидазы

Блокировали эндогенную пероксидазу. После высушивания стекло погружали в 3 об./об.% раствор пероксида водорода на 5 минут.

(IV) Промывание

Стекло промывали в PBS (дважды, соответственно, по 1 минуте).

(V) Обработка для демаскирования антигена

В качестве предварительной обработки раствор для демаскирования антигена (10 mM буфер цитрата натрия (pH 6,0)) использовали для термической обработки при 98°C в течение 30 минут.

(VI) Промывание

Стекло промывали в PBS (дважды, соответственно, по 2 минуты).

(VII) Обработка для демаскирования антигена

Обработку протеазой осуществляли во влажной камере при комнатной температуре в течение 3 минут.

(VIII) Промывание

Стекло промывали в PBS.

(IX) Дегидратация

Стекло погружали в 70% этанол, 90% этанол и 100% этанол, соответственно, на 1 минуту, а затем сушили воздухом.

[0134]

Денатурация и гибридизация

(I) Зонд HER2 центрифугировали на центрифуге типа вортекс и наносили на стекло.

(II) Покровное стекло помещали на стекло, избегая появления пузырей, и закрывали по периметру с помощью бумажной ленты.

(III) Нагревательную плитку использовали для денатурации при 82°C в течение 5 минут.

(IV) Стекло помещали во влажную камеру для гибридизации при 37°C в течение ночи.

[0135]

Пост-гибридизация и детекция

(I) После осторожного открепления бумажной ленты стекло промывали в 2-кратном SSC при комнатной температуре в течение 5 минут. Затем удаляли покрывное стекло.

(II) Стекло промывали в 2-кратном SSC при 72°C в течение 5 минут.

(III) Стекло промывали в PBS дважды, соответственно, по 1 минуте.

(IV) Как указано в таблице 6, реакции осуществляли в примере 19 и сравнительных примерах 27 и 28. В этом случае все реакции осуществляли при 25°C. Между соответствующими этапами стекло промывали в PBS три раза, соответственно, по 1 минуте.

[0136]

[Таблица 6]

	Сравнительный пример 27		Сравнительный пример 28		Пример 19	
	Реагент	Время реакции	Реагент	Время реакции	Реагент	Время реакции
Первое связывающее средство	Полимер антитела козы против DIG-HRP	30 минут	Антитело козы против DIG	15 минут	Полимерантитела козы против DIG-HRP	15 минут
Линкерное средство	Нет		Нет		Антитело кролика против HRP	15 минут
Второе связывающее средство	Нет		MAX-PO (G)	15 минут	MAX-PO (R)	15 минут

[0137]

(V) Стекло промывали в PBS три раза, соответственно, по 1 минуте. Затем хорошо сушили PBS.

(VI) На предметное стекло, с которого стряхивали избыток жидкости, по каплям добавляли N-Histofine® DAB-2V (NICHIREI BIOSCIENCES INC.), чтобы вызвать реакцию при комнатной температуре в течение 5 минут.

(VII) Предметное стекло промывали проточной водой в течение 5 минут.

(VIII) После высушивания предметное стекло погружали в раствор гематоксилина Майера на 15 секунд для контрастного окрашивания.

(IX) Предметное стекло промывали проточной водой в течение 5 минут.

(X) После высушивания осуществляли дегидратацию с использованием 100% этанола в течение 3 минут.

(XI) Стекло очищали ксиленом дважды, соответственно, по 5 минут.

(XII) Для заливки использовали Permanent Mounting Media (безводные) (NICHIREI BIOSCIENCES INC.).

[0138]

Интенсивность окрашивания при CISH определяли визуально с учетом сигнала сравнительного примера 27, определяемого как 1+, с использованием оптического микроскопа (Olympus Corporation) (с линзой окуляра (10×) и линзой объектива (×100)), и в результате она являлась такой, как указано в следующей таблице 7. С помощью примера 19 обеспечивали значительно улучшенную чувствительность детекции по сравнению со сравнительными примерами 27 и 28.

[Таблица 7]

	Сравнительный пример 27	Сравнительный пример 28	Пример 19
Сигнал	1+	1,5+	3+
Фоновое окрашивание	Нет	Нет	Нет

[0139]

Тестовый пример 8: Исследование усиления иммунологической реакции

Использование полиэтиленгликоля

Осуществляли сравнительный тест для рассмотрения того, как варьировалась чувствительность детекции маркера-мишени, если любую из трехэтапных иммунологических реакций по настоящему изобретению осуществляли в присутствии полиэтиленгликоля.

В частности, в примере 20 трехэтапные иммунологические реакции осуществляли с использованием первого связывающего средства, линкерной молекулы и второго связывающего средства в отсутствие полиэтиленгликоля.

В примере 21 иммунологическую реакцию первого этапа осуществляли в присутствии полиэтиленгликоля и первого связывающего средства, а затем, соответственно, осуществляли иммунологические реакции второго и третьего этапа с использованием линкерной молекулы и второго связывающего средства.

В примере 23 иммунологическую реакцию первого этапа осуществляли с использованием первого связывающего средства; иммунологическую реакцию второго этапа осуществляли в присутствии полиэтиленгликоля и линкерной молекулы; а затем иммунологическую реакцию третьего этапа осуществляли с использованием второго связывающего средства.

В примере 22 иммунологическую реакцию первого этапа осуществляли с использованием первого связывающего средства; иммунологическую реакцию второго этапа осуществляли с использованием линкерной молекулы; а затем иммунологическую реакцию третьего этапа осуществляли в присутствии полиэтиленгликоля и второго связывающего средства.

В примере 24 все трехэтапные иммунологические реакции осуществляли с использованием первого связывающего средства, линкерной молекулы и второго связывающего средства в присутствии полиэтиленгликоля.

При этом конкретные способы осуществляли в соответствии с тестовым примером 2, за исключением того, что в качестве биологического образца использовали только ткань колоректального рака, и что молекулу, связывающуюся с маркером-мишенью (первое антитело: моноклональное антитело кролика против CDX-2 (NICHIREI BIOSCIENCES INC.)), разводили в 5 раз.

[0140]

Получение реагента1. Получение первого связывающего средства

Полимерный реагент (М), содержащий пероксидазы и фрагменты Fab' антитела против Ig мыши (вид животного: коза), связанные с аминокислотным полимером, и полимерный реагент (R), содержащий пероксидазы и фрагменты Fab' антитела против Ig кролика (вид животного: коза), связанные с аминокислотным полимером, смешивали в количестве 5 мкг/мл каждого, таким образом, получая смесь полимерных реагентов (MULTI).

[0141]

2. Получение линкерной молекулы

Антитело мыши против HRP (клон: HP-03) (TFS) и антитело мыши против HRP (клон: 2H11) (Novus Biologicals, LLC) смешивали в количестве 2,5 мкг/мл каждого, таким образом, получая линкерную молекулу.

[0142]

3. Получение второго связывающего средства

Полимерный реагент (М), содержащий пероксидазы и фрагменты Fab' антитела против Ig мыши (вид животного: коза), связанные с аминокислотным полимером, получали в концентрации 5 мкг/мл.

[0143]

4. Полиэтиленгликоль

В примерах 21-24 полиэтиленгликоль (средняя молекулярная масса (MW): 8000, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) растворяли в количестве 2,5% масс. в любых водных растворах, составляющих первое связывающее средство, линкерную молекулу и второе связывающее средство.

[0144]

Результаты показаны на фиг. 11. В этом случае микрофотографии соответствующих окрашенных тканей, показанные на фиг. 11, получали с использованием оптического микроскопа (Olympus Corporation) с линзой окуляра (10х) и линзой объектива (4х).

[0145]

С помощью примеров 21-24 в присутствии полиэтиленгликоля в любой из иммунологических реакций обеспечивали улучшенную чувствительность детекции по сравнению с примером 20 без полиэтиленгликоля в любой из иммунологических реакций. В частности, с помощью примера 24 в присутствии полиэтиленгликоля на всех этапах (с первого по третий) обеспечивали значительно улучшенную чувствительность детекции по сравнению с примером 20.

## (57) Формула изобретения

1. Набор для детекции маркера-мишени в биологическом образце в комбинации с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, способной специфически связываться с маркером-мишенью, содержащий по меньшей мере:

(а) первое связывающее средство, содержащее первую связывающую молекулу, способную прямо или косвенно специфически связываться с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, и вещество мечения;

(б) линкерную молекулу, способную специфически связываться с первым связывающим средством; и

(с) второе связывающее средство, содержащее вторую связывающую молекулу, способную специфически связываться с указанной линкерной молекулой, и вещество мечения,

где вещество мечения в первом связывающем средстве и вещество мечения во втором связывающем средстве могут быть одинаковыми или различаться;

где линкерная молекула способна специфически связываться с веществом мечения в первом связывающем средстве и веществом мечения во втором связывающем средстве;

5 где первое связывающее средство представляет собой структуру, в которой первая связывающая молекула и вещество мечения соединены друг с другом прямо или косвенно посредством носителя, который представляет собой природный или синтетический полимер;

10 где второе связывающее средство представляет собой структуру, в которой вторая связывающая молекула и вещество мечения соединены друг с другом прямо или косвенно посредством носителя, который представляет собой природный или синтетический полимер.

2. Набор по п. 1, где линкерная молекула представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

15 3. Набор по п. 1 или 2, где вещество мечения представляет собой по меньшей мере одно выбранное из хемилюминесцентной метки, металлической частицы, флуоресцентной метки, ферментной метки, коферментной метки, меченого антитела, красителя, биолоуминесцентной метки, гаптена и полимерной частицы.

4. Набор по п. 1 или 2, где первая связывающая молекула представляет собой 20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

5. Набор по п. 1 или 2, где вторая связывающая молекула представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

6. Способ детекции маркера-мишени в биологическом образце, полученном из индивидуума, включающий стадии:

25 (i) приведения молекулы, связывающейся с маркером-мишенью, заранее специфически связанной с маркером-мишенью, в контакт с первым связывающим средством и, таким образом, получения первого комплекса;

(ii) приведения первого комплекса в контакт с линкерной молекулой и, таким образом, получения второго комплекса; и

30 (iii) приведения второго комплекса в контакт со вторым связывающим средством и, таким образом, получения третьего комплекса;

(iv) детекции вещества мечения в третьем комплексе,

35 где первое связывающее средство содержит первую связывающую молекулу, способную прямо или косвенно специфически связываться с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, и вещество мечения;

где линкерная молекула способна специфически связываться с первым связывающим средством; и

40 где второе связывающее средство содержит вторую связывающую молекулу, способную специфически связываться с указанной линкерной молекулой, и вещество мечения;

где вещество мечения в первом связывающем средстве и вещество мечения во втором связывающем средстве могут быть одинаковыми или различаться;

где линкерная молекула способна специфически связываться с веществом мечения в первом связывающем средстве и веществом мечения во втором связывающем средстве;

45 где первое связывающее средство представляет собой структуру, в которой первая связывающая молекула и вещество мечения соединены друг с другом прямо или косвенно посредством носителя, который представляет собой природный или синтетический полимер;

где второе связывающее средство представляет собой структуру, в которой вторая связывающая молекула и вещество мечения соединены друг с другом прямо или косвенно посредством носителя, который представляет собой природный или синтетический полимер.

7. Способ по п. 6, где линкерная молекула представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

8. Способ по п. 6 или 7, где вещество мечения является по меньшей мере одним веществом мечения, выбранным из хемилюминесцентной метки, металлической частицы, флуоресцентной метки, ферментной метки, коферментной метки, меченого антитела, красителя, биолюминесцентной метки, гаптена и полимерной частицы.

9. Способ по п. 6 или 7, где первая связывающая молекула представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

10. Способ по п. 6 или 7, где вторая связывающая молекула представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

11. Применение набора для детекции маркера-мишени в биологическом образце в комбинации с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, способной специфически связываться с маркером-мишенью, содержащего по меньшей мере:

(а) первое связывающее средство, содержащее первую связывающую молекулу, способную прямо или косвенно специфически связываться с молекулой, связывающейся с маркером-мишенью, и вещество мечения;

(б) линкерную молекулу, способную специфически связываться с первым связывающим средством; и

(с) второе связывающее средство, содержащее вторую связывающую молекулу, способную специфически связываться с указанной линкерной молекулой, и вещество мечения,

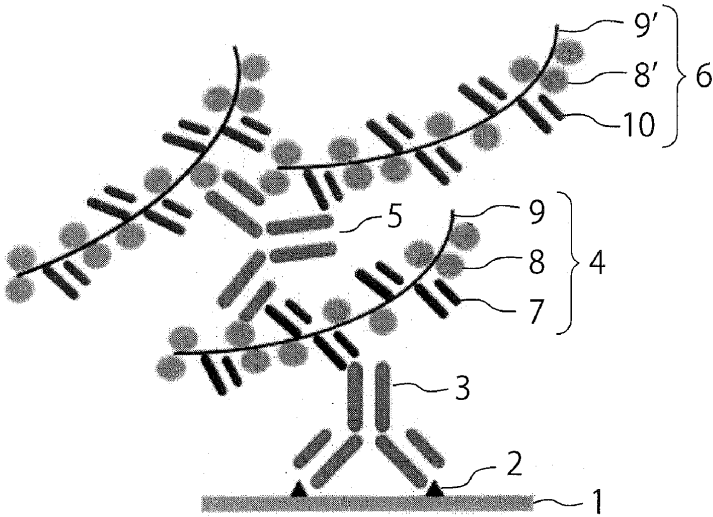
где линкерная молекула способна специфически связываться с веществом мечения;

где вещество мечения в первом связывающем средстве и вещество мечения во втором связывающем средстве могут быть одинаковыми или различаться;

где линкерная молекула способна специфически связываться с веществом мечения в первом связывающем средстве и веществом мечения во втором связывающем средстве;

где первое связывающее средство представляет собой структуру, в которой первая связывающая молекула и вещество мечения соединены друг с другом прямо или косвенно посредством носителя, который представляет собой природный или синтетический полимер;



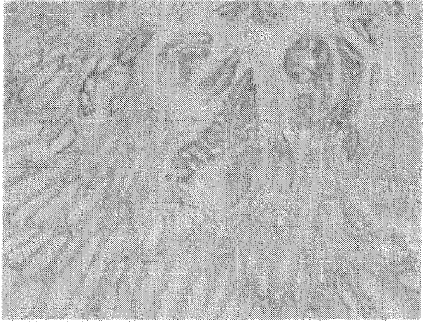
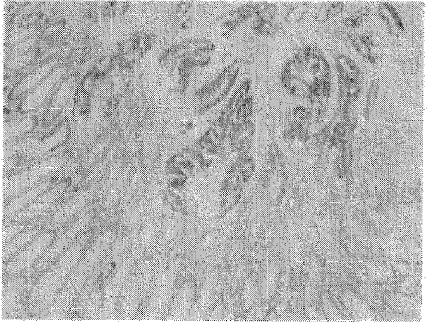
где второе связывающее средство представляет собой структуру, в которой вторая связывающая молекула и вещество мечения соединены друг с другом прямо или косвенно посредством носителя, который представляет собой природный или синтетический полимер.



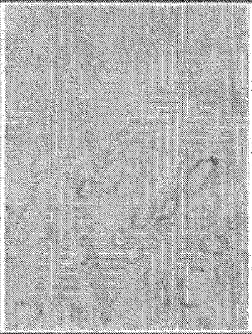
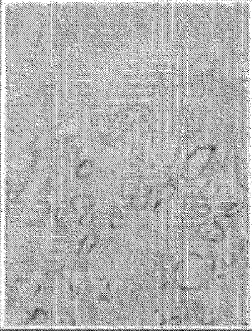
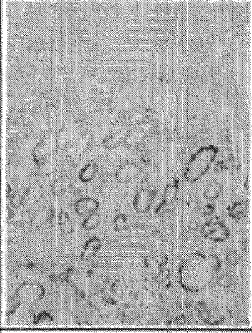
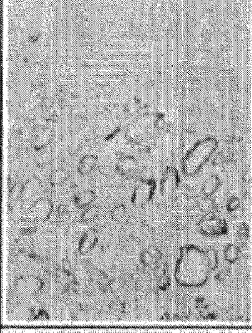
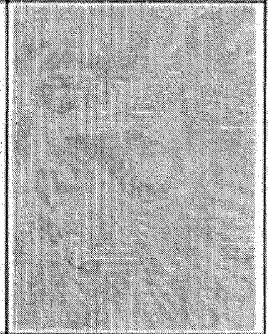
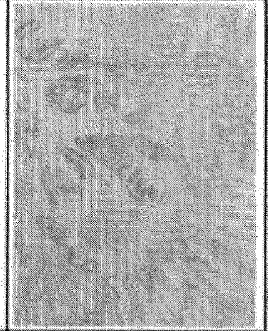


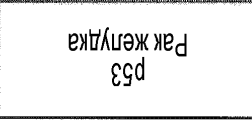
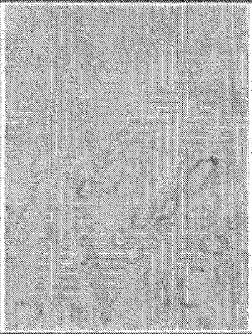
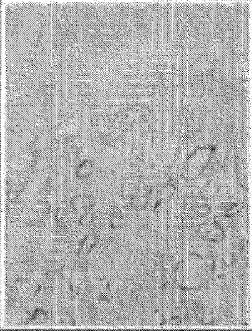
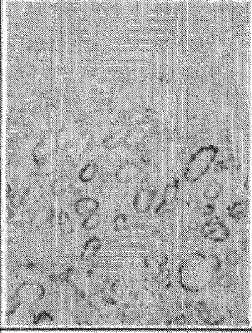

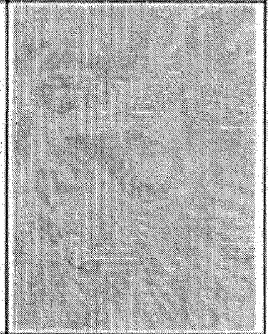
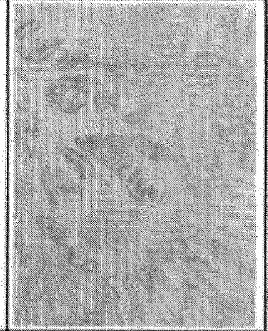

ФИГ.1



2/11

	Сравнительный пример 1	Сравнительный пример 2
Первое связыв. средство	(M)5 мкг/мл + (R)5 мкг/мл	(M)5 мкг/мл + (R)5 мкг/мл
Второе связыв. средство	Нет	(G) 7.5 мкг/мл
p53 Рак желудка		
CDX-2 Колоректальный рак		

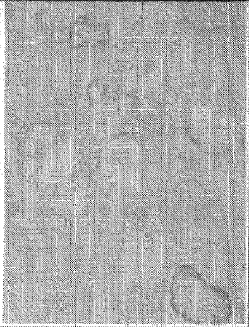
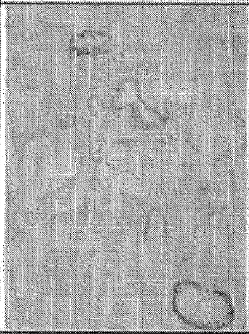

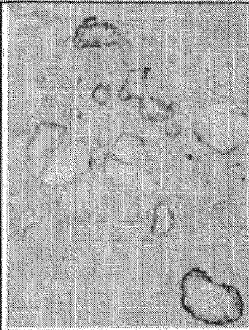
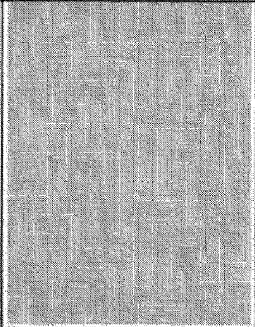
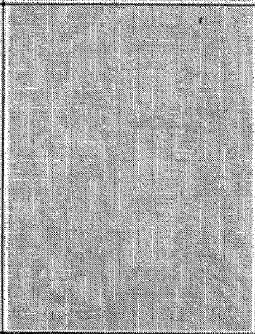
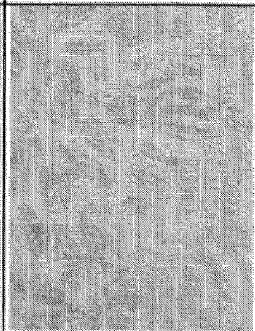
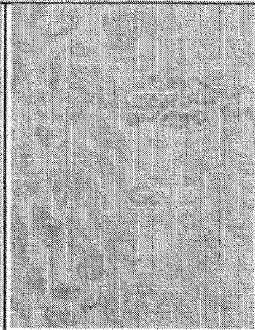
ФИГ.2

	Сравнительный пример 3	Сравнительный пример 4	Пример 1	Пример 2
Первое связыв. средство	(M)5 мкг/мл + (R)5 мкг/мл	(M)5 мкг/мл + (R)5 мкг/мл	(M)5 мкг/мл + (R)5 мкг/мл	(M)5 мкг/мл + (R)5 мкг/мл
Линкерная молекула	Нет	Нет	Ат козы против HRP 1 мкг/мл	Ат козы против HRP 5 мкг/мл
Второе связыв. средство	Нет	(G)7.5 мкг/мл	(G)7.5 мкг/мл	(G)7.5 мкг/мл
p53 Рак желудка				
				
CDX-2 Колоректальный рак				
				

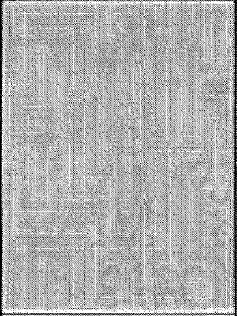
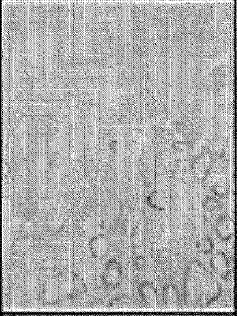
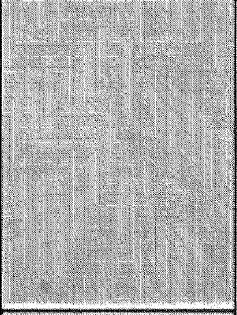
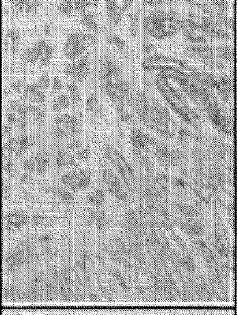
ФИГ.3

	Сравн. пример 5	Пример 3	Сравн. пример 6	Пример 4	Сравн. пример 7	Пример 5
Первое связыв. средство	(M)5 + (R)5	(M)5 + (R)5	(M)5 + (R)5	(M)5 + (R)5	(M)5 + (R)5	(M)5 + (R)5
Линкерная молекула	Нет	Ат мыши против HRP 5 мкг/мл	Нет	Ат кролика против HRP 5 мкг/мл	Нет	Ат козы против HRP 5 мкг/мл
Второе связыв. средство	(M)7.5	(M)7.5	(R)7.5	(R)7.5	(G)7.5	(G)7.5
CDX-2 Колоректальный рак p53 Рак желудка						

ФИГ.4

	Сравнительный пример 8	Сравнительный пример 9	Пример 6	Пример 7
Первое связывающее средство Линкерная молекула	Dako EnVision™ + Dual Link System-HRP	Dako EnVision™ + Dual Link System-HRP	Dako EnVision™ + Dual Link System-HRP	Dako EnVision™ + Dual Link System-HRP
	Нет	Нет	Ат мыши против HRP 5 мкг/мл	Ат кролика против HRP 5 мкг/мл
Второе связывающее средство	Нет	Dako EnVision™ + Dual Link System-HRP	Dako EnVision™ + Dual Link System-HRP	Dako EnVision™ + Dual Link System-HRP
p53 Рак желудка				
CDX-2 Колоректальный рак				

ФИГ.5

	Сравнительный пример 8	Пример 8	Сравнительный пример 11	Пример 9
Биологич. образец	p53 Рак желудка	p53 Рак желудка	CDX-2 Колоректальный рак	CDX-2 Колоректальный рак
Первое связывающее средство	Ат против мыши с поли-HRP × 1/10	Ат против мыши с поли-HRP × 1/10	Ат против кролика с поли-HRP × 1/10	Ат против кролика с поли-HRP × 1/10
Линкерная молекула	Нет	Ат мыши против HRP 5 мкг/мл	Нет	Ат кролика против HRP 5 мкг/мл
Второе связывающее средство	Ат против мыши с поли-HRP × 1/10	Ат против мыши с поли-HRP × 1/10	Ат против кролика с поли-HRP × 1/10	Ат против кролика с поли-HRP × 1/10
Микро-фотография				

ФИГ.6

7/11

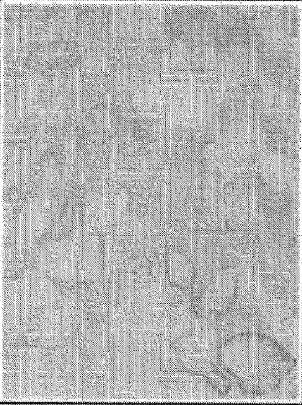
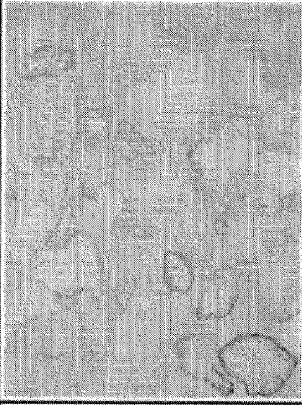
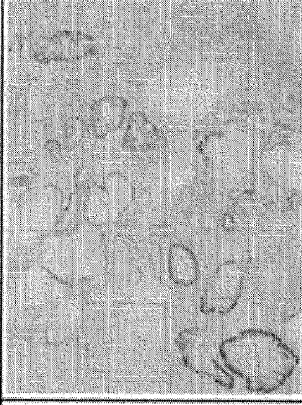
	Сравн. пример 12	Сравн. пример 13	Пример 10	Пример 11	Пример 12	Сравн. пример 14
Первое связывающее средство	ImmPRESS UNIVERSAL	ImmPRESS UNIVERSAL	ImmPRESS UNIVERSAL	ImmPRESS UNIVERSAL	ImmPRESS UNIVERSAL	ImmPRESS UNIVERSAL
Линкерная молекула	Нет	Нет	Ат мыши против HRP 5 мкг/мл	Ат кролика против HRP 5 мкг/мл	Ат козы против HRP 5 мкг/мл	Нет
Второе связывающее средство	Нет	ImmPRESS UNIVERSAL	ImmPRESS UNIVERSAL	ImmPRESS UNIVERSAL	ImmPRESS Anti-Goat Ig	ImmPRESS Anti-Goat Ig
p53 Рак желудка						
CDX-2 Коронавирусный рак						

ФИГ.7



	Сравн. пример 15	Сравн. пример 16	Пример 13	Сравн. пример 17	Сравн. пример 18	Пример 14
Первое связывающее средство	5 мкг/мл PLL MW 2700	5 мкг/мл PLL MW 2700	5 мкг/мл PLL MW 2700	5 мкг/мл PLL MW 7500	5 мкг/мл PLL MW 7500	5 мкг/мл PLL MW 7500
Линкерная молекула	Нет	Нет	Ат мыши против HRP 5 мкг/мл	Нет	Нет	Ат мыши против HRP 5 мкг/мл
Второе связывающее средство	Нет	7.5 мкг/мл PLL MW 2700	7.5 мкг/мл PLL MW 2700	Нет	7.5 мкг/мл PLL MW 7500	7.5 мкг/мл PLL MW 7500
p53 Рак желудка						
	Сравн. пример 19	Сравн. пример 20	Пример 15	Сравн. пример 21	Сравн. пример 22	Пример 16
Первое связывающее средство	5 мкг/мл PLL MW 9200	5 мкг/мл PLL MW 9200	5 мкг/мл PLL MW 9200	5 мкг/мл Полимер POD без PLL	5 мкг/мл Полимер POD без PLL	5 мкг/мл Полимер POD без PLL
Линкерная молекула	Нет	Нет	Ат мыши против HRP 5 мкг/мл	Нет	Нет	Ат мыши против HRP 5 мкг/мл
Второе связывающее средство	Нет	7.5 мкг/мл PLL MW 9200	7.5 мкг/мл PLL MW 9200	Нет	7.5 мкг/мл Полимер POD без PLL	7.5 мкг/мл Полимер POD без PLL
p53 Рак желудка						

ФИГ.8

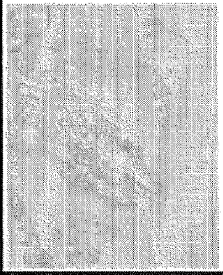
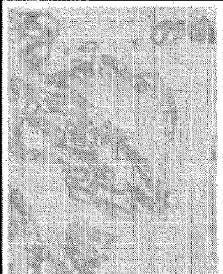
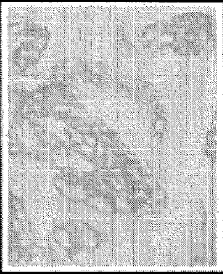
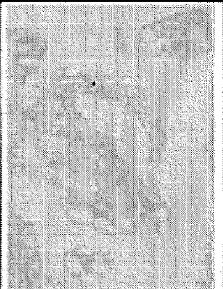

	Сравнительный пример 23	Сравнительный пример 24	Пример 17
Первое связывающее средство	АР-М 10 мкг/мл 10 мин	АР-М 10 мкг/мл 10 мин	АР-М 10 мкг/мл 10 мин
Линкерная молекула	Нет	Нет	Ат мыши против АР 5 мкг/мл 10 мин
Второе связывающее средство	Нет	АР-М 10 мкг/мл 10 мин	АР-М 10 мкг/мл 10 мин
p53 Рак желудка			

ФИГ.9



	Сравнительный пример 25	Сравнительный пример 26	Пример 18
Первое связывающее средство	AP-R 10 мкг/мл 10 мин	AP-R 10 мкг/мл 10 мин	AP-R 10 мкг/мл 10 мин
Линкерная молекула	Нет	Нет	Ат кролика против AP 5 мкг/мл 10 мин
Второе связывающее средство	Нет	AP-R 10 мкг/мл 10 мин	AP-R 10 мкг/мл 10 мин
CDX-2 Колоректальный рак			

ФИГ.10

	Пример 20	Пример 21	Пример 22	Пример 23	Пример 24
Первое связыв. ср-во	(M)5+(R)5, 10 мин	(M)5+(R)5+PEG, 10 мин	(M)5+(R)5, 10 мин	(M)5+(R)5, 10 мин	(M)5+(R)5+PEG, 10 мин
Линкерная молекула	(HP-03)2.5+(2Н11)2.5, 10 мин	(HP-03)2.5+(2Н11)2.5, 10 мин	(HP-03)2.5+(2Н11)2.5, 10 мин	(HP-03)2.5+(2Н11)2.5+PEG, 10 мин	(HP-03)2.5+(2Н11)2.5+PEG, 10 мин
Второе связыв. ср-во	(M)5, 10 мин	(M)5, 10 мин	(M)5+PEG, 10 мин	(M)5, 10 мин	(M)5+PEG, 10 мин
CDX-2 коррелятивный рак					

ФИГ.11