

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-524087

(P2007-524087A)

(43) 公表日 平成19年8月23日(2007.8.23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	2 G O 4 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	2 G O 5 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	2 G O 5 9
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 2 4
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 21/78 Z	4 B O 6 3
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-547605 (P2006-547605)
 (86) (22) 出願日 平成16年12月28日 (2004.12.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年8月16日 (2006.8.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/044091
 (87) 国際公開番号 W02005/066373
 (87) 国際公開日 平成17年7月21日 (2005.7.21)
 (31) 優先権主張番号 10/750,301
 (32) 優先日 平成15年12月30日 (2003.12.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

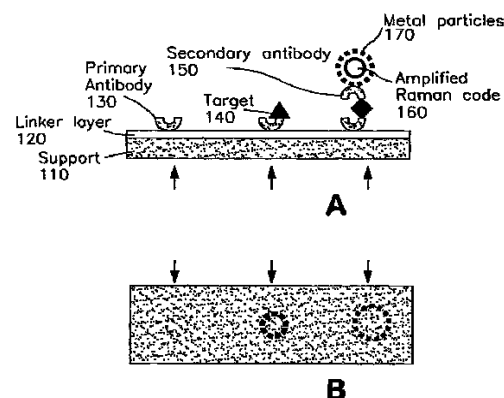
(71) 出願人 591003943
 インテル・コーポレーション
 アメリカ合衆国 95052 カリフォル
 ニア州・サンタクララ・ミッション カレ
 ッジ ブレーバード・2200
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 バーリン アンドリュウ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン
 ノゼ ダルトン ブレイス 1789

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体試料をアッセイするためにラマン活性プローブ構築物を使用するための方法および装置

(57) 【要約】

体液中のタンパク質含有分析物などの生体試料中の分析物を検出するためのラマン活性またはSERS活性プローブ構築物を使用する種々の方法が提供される。本発明の方法が、試料中のタンパク質含有分析物または断片のアミノ酸組成についての情報を提供できるように、ラマン活性構築物におけるプローブ部分は、生体試料中の特定の公知の分析物に結合し、同定するように選択されるか、またはプローブ部分は、一定のアミノ酸に共通に見いだされる官能基と化学的に相互作用するようにデザインされる。患者試料のタンパク質プロファイルを作製できるように、場合によっては、ラマン活性またはSERS活性プローブ構築物は、本発明の方法に使用したときに、特定のタンパク質含有分析物またはこのような分析物の型を同定することができる。ラマンのデータベースまたは正常な試料のSERSスペクトルと比較したときに、開示された方法を使用して患者の疾病状態を同定することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

固体ゲルおよび、分析物に特異的に結合する付着されたプローブを持つ1つまたは複数のSERS増強ナノ粒子とを含む固体ゲルマトリックス。

【請求項 2】

複数の特有の光学的サインを提供するための複数のナノ粒子を含む、請求項1記載のゲルマトリックス。

【請求項 3】

SERS増強ナノ粒子が、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、塩基類似体、蛍光色素、ペプチド、アミノ酸、修飾されたアミノ酸、有機部分、量子ドット、炭素ナノチューブ、フラーレン、金属ナノ粒子、電子高密度粒子、および結晶質粒子からなる群より独立して選択される1つまたは複数のラマン活性タグを含む、請求項2記載のゲルマトリックス。

10

【請求項 4】

ナノ粒子の少なくとも1つが有効電荷を有する、請求項1記載のゲルマトリックス。

【請求項 5】

ナノ粒子がそれぞれ、ナノ粒子プローブの結合特異性と関連がある特有のSERSシグナルを提供する、請求項1記載のゲルマトリックス。

【請求項 6】

ラマン活性タグが、アデニンまたはこれらの類似体を含む、請求項1記載のゲルマトリックス。

20

【請求項 7】

ナノ粒子が、コアおよび表面とを含む複合体有機-無機ナノ粒子(COIN)であり、かつコアが第一の金属およびラマン活性有機化合物とを含む金属コロイドを含む、請求項1記載のゲルマトリックス。

【請求項 8】

COINが、ナノ粒子の表面を覆う層を形成する第一の金属と異なる第二の金属をさらに含む、請求項7記載のゲルマトリックス。

【請求項 9】

COINが金属層を覆う有機層であって、プローブを含む有機層をさらに含む、請求項8記載のゲルマトリックス。

30

【請求項 10】

プローブが抗体、抗原、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、受容体、およびリガンドから選択される、請求項1記載のゲルマトリックス。

【請求項 11】

プローブがポリヌクレオチドを含む、請求項10記載のゲルマトリックス。

【請求項 12】

少なくともいくつかのナノ粒子が、光学的サインに寄与する蛍光標識をさらに含む、請求項1記載のゲルマトリックス。

【請求項 13】

40

以下の工程を含むゲルマトリックスを製造するための方法：

- a) 適切な液体中にゲル形成粒子を含むゲル形成液体および、複数の特有の光学的サイン、および分析物に結合するための付着されたプローブを有する複数のラマン増強ナノ粒子とを共に混合することによって液体組成物を形成する工程；
- b) 液体組成物から固体ゲルマトリックスを得る工程。

【請求項 14】

ゲルマトリックスが、それぞれ公知の分析物に特異的に結合して複合体を形成する付着されたプローブを有する複数のSERS増強ナノ粒子を含む、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

SERS増強ナノ粒子がCOINである、請求項14記載の方法。

50

【請求項 16】

以下の工程を含む試料中の分析物を検出するための方法：

分析物に対してプローブを結合させて複合体を形成することができる条件下で、分析物を含む試料を請求項1記載のゲルマトリックスと接触させる工程；

電気泳動法または磁気泳動法（magnetophoresis）によって複合体をその他の試料含有物から分離する工程；

ゲルの内の種々の位置に分離された複合体によって放射されるSERSシグナルであって、特定の複合体によって放射されるSERSシグナルが特定の分析物の存在と関連づけられているSERSシグナルを検出する工程。

【請求項 17】

10

ゲルマトリックスが2つ以上の複合体を含み、かつ2つ以上の複合体からのシグナルが2つ以上の異なる分析物の存在を指し示す、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

特定の複合体からのSERSシグナルが分析物の化学構造に関する情報を提供する、請求項16記載の方法。

【請求項 19】

ゲルマトリックスがポリアクリルアミドゲルであり、かつ分析物が抗原、ポリペプチド、タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、およびこれらの組み合わせから選択される、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

20

ナノ粒子のうちの少なくとも2つが異なる有効電荷を有する金属含有SERS増強ナノ粒子である、請求項16記載の方法。

【請求項 21】

SERS増強ナノ粒子がCOINである、請求項20記載の方法。

【請求項 22】

分析物が生体試料に含まれる、請求項16記載の方法。

【請求項 23】

関連づけが、分析物に対するプローブの結合によって生じる移動度変化を決定する段階を含む、請求項16記載の方法。

【請求項 24】

30

分離が電気泳動法を含む、請求項16記載の方法。

【請求項 25】

検出する工程の前に、または後に、分析物をクロマトグラフィーまたは等電点電気泳動に供する工程をさらに含む、請求項16記載の方法。

【請求項 26】

電気泳動法が非変性条件下での一次元または二次元の電気泳動法である、請求項24記載の方法。

【請求項 27】

検出する工程の前に、ゲルを化学的エンハンサー溶液中に浸漬する工程およびゲルを乾燥させて試料を濃縮する工程をさらに含む、請求項16記載の方法。

40

【請求項 28】

試料が、実質的に同じサイズおよび/または同じ電荷密度を有する1つまたは複数のさらなる分析物を含み、かつ試料中の実質的に同じサイズおよび/または同じ電荷密度を有するさらなる分析物のものと比較して、ゲル中の複合体の変更された移動度に基づいて少なくとも1つの分析物の同一性と光学的シグナルを関連づけることを含む、請求項16記載の方法。

【請求項 29】

シグナルがSERSスペクトルであり、かつスペクトルが、結合した分析物を同定するための複数の分析物のSERSスペクトルを含むSERSデータベースと比較される、請求項28記載の方法。

50

【請求項 3 0】

試料中の1つまたは複数の分析物のSERSスペクトルが、公知の生物学的表現型または疾患と関連づけられている相違を決定するために、一まとまりのSERSスペクトルと比較される、請求項29記載の方法。

【請求項 3 1】

試料が体液である、請求項16記載の方法。

【請求項 3 2】

試料が血清である、請求項31記載の方法。

【請求項 3 3】

以下を含む試料中の分析物を検出するための系：

請求項1記載のゲルマトリックス；

少なくとも1つの分析物を含む試料；および

ナノ粒子からのSERSシグナルを検出するための適切な光学的検出系。

10

【請求項 3 4】

試料から得られるSERSシグナルの解析のためのアルゴリズムを含むコンピュータをさらに含む、請求項33記載の系。

【請求項 3 5】

以下の工程を含む試料中の標的分子の多重検出のための方法：

試料中の標的分子を、試料中の分析物の複合体形成をさせるために適した条件下で、それぞれの構築物が、少なくとも1つのSERS活性ヌクレオチドを含み、かつ電気泳動法において特有の移動度と特有の光学的サインの両方を有する光学活性核酸バーコードと抱合された非核酸プローブを含む一組のプローブ構築物と接触させる工程；

20

電気泳動法によって複合体を分離する工程；

適切な検出装置で、多重様式で特有の光学的サインを検出する工程；および

構築物からの個々の光学的サインを試料中の対応する分析物の同一性と関連づける工程。

【請求項 3 6】

特有の移動度がバーコード内の様々な数のヌクレオチドを有するセットの構築物から生じる、請求項35記載の方法。

【請求項 3 7】

少なくともいくつかの構築物が有効電荷を有する、請求項35記載の方法。

30

【請求項 3 8】

電気泳動法により、遊離の標的および/または遊離の結合していないプローブ構築物を複合体から分離する工程をさらに含む、請求項35記載の方法。

【請求項 3 9】

非核酸プローブが、公知のタンパク質含有標的に対して特異的に結合する抗体である、請求項35記載の方法。

【請求項 4 0】

分離された複合体が、吸着、反射、分極、屈折、蛍光、ラマンスペクトル、SERS、共鳴光散乱、格子結合表面プラスモン共鳴 (grating-coupled surface plasmon resonance)、およびこれらの組み合わせから選択される光学的技術によって検出される、請求項35記載の方法。

40

【請求項 4 1】

以下の工程を含む非ラマン活性分析物を検出するための活性ラマン分子コードのセットを作製するための方法：

それぞれが、バックボーンに沿って2つ以上の化学的に反応性の位置を含む有機重合体を含む分子バックボーンのセットを得る工程；

少なくとも1つの小分子ラマン活性タグを、化学的に反応性の位置にてセット内のそれぞれのバックボーンに付着する工程であって、セットのメンバーのバックボーンに沿ったラマン活性タグの型、数、および相対的位置が、セットのそれぞれのメンバーについて特

50

有のラマンシグナルを生じさせるように多様に組み合わせられている工程；および
セット内のバックボーンに対して、それぞれの活性基が公知の分析物に対して特異的に
結合する活性基を抱合する工程。

【請求項 4 2】

分子バックボーンが、天然に存在するか、または合成の多糖体、タンパク質、アミノ酸、
もしくはこれらの組み合わせを含む、請求項41記載の方法。

【請求項 4 3】

バックボーンがラマン活性タグの化学的付着のために修飾された少なくとも1つの残基
を含む一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチド断片である、請求項42記載の方法。

【請求項 4 4】

修飾された残基が2-アミノプリンである、請求項43記載の方法。

【請求項 4 5】

バックボーンが標準的ホスホロアミダイト化学によって合成される、請求項43記載の方
法。

【請求項 4 6】

ラマン活性タグが色素または天然に存在するラマン活性アミノ酸もしくは核酸から選択
される、請求項41記載の方法。

【請求項 4 7】

ラマン活性タグが一連の連続した核酸であり、かつタグが標準的ホスホロアミダイト化
学によってバックボーン上にタグを合成することによって、重合体バックボーンに直鎖状
に付着されている、請求項41記載の方法。

【請求項 4 8】

バックボーンが2～1000ヌクレオチドを含む、請求項45記載の方法。

【請求項 4 9】

セットのメンバーが共通のバックボーンを有する、請求項41記載の方法。

【請求項 5 0】

ラマン活性タグがラマン活性色素、アミノ酸、ヌクレオチド、またはこれらの組み合わ
せから選択される、請求項49記載の方法。

【請求項 5 1】

ラマン活性アミノ酸がアルギニン、メチオニン、システイン、およびこれらの組み合わ
せから選択される、請求項50記載の方法。

【請求項 5 2】

ラマン活性ヌクレオチドがアデニン、グアニン、およびこれらの誘導体から選択される
、請求項50記載の方法。

【請求項 5 3】

セットの少なくとも1つのメンバーがラマン活性タグに結合されたエンハンサー部分ま
たは特有のラマンシグナルの強度を押し上げるためのラマン活性バックボーンをさらに含む
、請求項41記載の方法。

【請求項 5 4】

ラマン活性タグがポリ（G）であり、かつエンハンサーがアミン基またはAmC6である、
請求項41記載の方法。

【請求項 5 5】

活性基がアクリダイト（acrydite）（商標）、アミン、およびチオール基から選択され
る反応性官能基である、請求項41記載の方法。

【請求項 5 6】

活性基が公知の標的に対して特異的に結合し、かつ抗体、受容体、レクチン、またはフ
ァージディスプレイされたペプチドから選択される、請求項41記載の方法。

【請求項 5 7】

生物学的分析物がタンパク質含有分析物である、請求項41記載の方法。

【請求項 5 8】

10

20

30

40

50

タンパク質含有分析物が抗原、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、およびタンパク質含有分析物を含む複合体から選択される、請求項57記載の方法。

【請求項59】

バックボーンがポリヌクレオチドであり、タグがラマン活性ヌクレオチドであり、および方法が、標準的ホスホロアミダイト化学によってバックボーンに対して直鎖状にタグを付着することをさらに含む、請求項41記載の方法。

【請求項60】

ラマンシグナルが、試料中の公知の生物学的分析物の存在を指し示す以下の工程を含む、試料中の生物学的分析物を識別するための方法：

試料中に存在する分析物に対してその中のプローブを特異的に結合させて複合体を形成するために適した条件下で、複数の生物学的分析物を含む試料を、活性ラマン分子コードのセットと接触させる工程；

結合した複合体を分離する工程；

結合した複合体における活性ラマン分子コードによって放射されるラマンシグナルを検出する工程。

【請求項61】

所望の生物学的分析物が複数の異なるタンパク質含有分析物であり、かつセット内のプローブが、それぞれの抗体が異なる公知の生物学的分析物に対して特異的に結合する抗体である、請求項60記載の方法。

【請求項62】

ラマンシグナルが、試料のタンパク質プロフィールを提供するために収集される、請求項60記載の方法。

【請求項63】

以下の工程を含む生体試料をアッセイするための方法：

固体支持体上の試料の分析物を分離する工程；

試料中の1つまたは複数のタンパク質含有分析物に対して活性ラマン分子コードを特異的に結合させて複合体を形成することができるように、分離された分析物を請求項41記載の活性ラマン分子コードの一次セットと接触させる工程；

複合体中の活性ラマン分子コードによって生じたラマンシグナルを増幅するために、複合体を二次ラマンコード複合体と接触させる工程；

二次ラマンコードによって生じる増幅されたラマンシグナルを検出する工程；および

検出された増幅されたラマンシグナルを、活性ラマン分子コードの活性薬剤が特異的に結合する分析物の試料中に存在することと関連づける工程。

【請求項64】

分離された複合体から増幅されたラマンスペクトルを収集して、試料のタンパク質プロフィールを形成する工程をさらに含む、請求項63記載の方法。

【請求項65】

二次ラマン複合体を接触させる工程が、活性ラマン分子コードのセットの結合したメンバーとラマンシグナルを増幅するための二次ラマンコードにおけるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドとの間の化学的会合を含む、請求項63記載の方法。

【請求項66】

活性ラマン分子コードのセットのメンバーが、ラマン活性オリゴヌクレオチド・バックボーンを含み、かつ二次ラマン複合体が、バックボーンにハイブリダイズする相補的オリゴヌクレオチドを含み、かつ方法が、ラマン活性オリゴヌクレオチド・バックボーンを増幅する工程をさらに含む、請求項65記載の方法。

【請求項67】

ハイブリダイズする工程が、ハイブリダイズされた相補的オリゴヌクレオチドをライゲーションして直鎖状または分枝のラマン活性複合体を形成し、ラマンシグナルを増幅する工程を伴う、請求項66記載の方法。

【請求項68】

10

20

30

40

50

活性ラマン分子コードのセットの結合したメンバーが、これらの3'末端に遊離のヒドロキシル基を持つラマン活性ポリヌクレオチド・バックボーンを含み、かつ方法が、結合した複合体を末端転移酵素の存在下においてdNTPに曝露して、長さが何百ものヌクレオチドの一本鎖ラマン活性分子を形成して、バックボーンのラマンシグナルを増幅する工程をさらに含む、請求項65記載の方法。

【請求項69】

活性ラマン分子コードのセットの結合したメンバーが、直鎖状のラマン活性核酸タグおよびこれらの3'末端に遊離のヒドロキシル基を持つポリヌクレオチド・バックボーンとを含み、かつ方法が、結合した複合体を末端転移酵素の存在下においてdNTPに曝露して、長さが何千ものヌクレオチドの一本鎖ラマン活性分子を形成して、バックボーンのラマンシグナルを増幅する工程をさらに含む、請求項65記載の方法。

10

【請求項70】

方法が、種々の結合した複合体の一本鎖ラマン活性分子を増幅するために使用されるdNTPを変化させ、増幅されたラマンシグナルをさらに変化させる工程を含む、請求項68記載の方法。

【請求項71】

増幅技術がローリングサークル(rolling circle)増幅である、請求項69または70記載の方法。

【請求項72】

二次ラマン複合体が、ポリヌクレオチドにハイブリダイズする金属ナノ粒子に付着された相補ポリヌクレオチドを含み、かつ増幅されるラマンシグナルがSERSシグナルである、請求項65記載の方法。

20

【請求項73】

金属ナノ粒子が、銀、金、銅、およびアルミニウムから選択される、請求項72記載の方法。

【請求項74】

二次ラマン複合体が、付着されたラマン活性タグを持つ相補ポリヌクレオチドを含み、かつ方法が二次ラマン複合体からデンドリマーを作製する工程と、ポリヌクレオチド・バックボーンにデンドリマーをハイブリダイズしてラマンシグナルを増幅する工程をさらに含む、請求項65記載の方法。

30

【請求項75】

生体試料が体液を含む、請求項63記載の方法。

【請求項76】

増幅されたラマンシグナルから増幅されたラマンスペクトルを収集して、生体試料のタンパク質プロフィールを得る工程をさらに含む、請求項75記載の方法。

【請求項77】

以下の工程を含む分析物のプールにおける分析物の存在を決定するための方法：

a) 分析物のプールを固体支持体上の別々の部位に付着されたプローブの第一のセットと接触させて、別々の部位にてプローブ/分析物複合体を形成する工程；

b) プローブ/分析物複合体を、それぞれの第二のセットが活性な薬剤として第一のセットのプローブのサブセットを利用する活性ラマン分子コードの複数の第二のセットと接触させて、ラマンコード含有複合体を形成する工程；

40

c) 結合したラマンコードを含む複合体を金属イオンとインサイチューで接触させて、ラマンコード含有複合体を金属の薄層で被覆する工程；

d) 固体支持体上の別々の部位にて、結合したラマンコード含有複合体を光源で同時に照射することによって生じるSERSシグナルを検出する工程；および

e) 1つまたは複数のSERSスペクトルを試料中の特定の分析物の存在と関連させる工程。

【請求項78】

金属の層が、金属カチオンのコロイド溶液を還元条件に供して、インサイチューで結合した複合体を含む金属ナノ粒子を形成することによって形成される、請求項77記載の方法

50

。

【請求項 79】

c) の前に、固体支持体上の結合したラマンコード含有複合体中のポリヌクレオチド・バックボーンの増幅を行う工程をさらに含む、請求項77記載の方法。

【請求項 80】

増幅がPCR3またはローリングサークル増幅である、請求項78記載の方法。

【請求項 81】

関連させる工程が、別々の部位におけるそれぞれのシグナル位置からのSERSシグナルを計数して、同じサインを持つシグナル点の数を決定する工程を含む、請求項77記載の方法

10

【請求項 82】

関連させる工程が、ラマンコード・デザインに従ってSERSスペクトルを分類するために複合解析を行う工程をさらに含む、請求項81記載の方法。

【請求項 83】

結合剤が、抗体、ファージディスプレイされたペプチド、受容体、核酸、リガンド、レクチン、およびこれらの組み合わせから選択される、請求項77記載の方法。

【請求項 84】

分析物が、タンパク質、グルコタンパク質、脂質タンパク質、核酸、ウイルス粒子、多糖体、ステロイド、およびこれらの組み合わせから選択される、請求項77記載の方法。

【請求項 85】

分析物のプールが疾患を有することが知られているか、または疑いがある患者の体液の試料を含む、請求項77記載の方法。

20

【請求項 86】

方法が、分析物のプールが正常対照患者の対応する試料を含むことを除いて繰り返され、かつ方法が患者の分析物から得られるSERSスペクトルを正常対照患者の分析物から得られるSERSスペクトルと比較して相違を同定する工程をさらに含み、相違が、疾患を有することが知られているか、または疑いがある患者の試料中の疾患マーカーの存在を示す、請求項85記載の方法。

【請求項 87】

第一のセットのプローブが、複数の第二のセット内の活性薬剤を得るためにランダムに分けられ、単一の第二のセット内のそれぞれのラマンコードが、単一の第二のセットのメンバーに対して特有であり、かつ第二のセットのそれぞれが、ラマンコードの同じセットを含む、請求項77記載の方法。

30

【請求項 88】

以下の工程を含む生体試料のタンパク質含有量をアッセイするための方法：

a) 活性薬剤として官能基を含む活性分子ラマンコードのセットを得る工程；

b) 試料を、試料中のタンパク質含有分析物にタンパク質官能基を持つセットのメンバーを化学的に付着させて、コード/タンパク質複合体を形成するように、ラマン活性分子コードのセットと接触させる工程；

c) コード/タンパク質複合体を分離する工程；

d) 分離されたコード/タンパク質複合体によって生じるSERSシグナルを検出する工程；および

40

e) SERSシグナルを試料中の特定のタンパク質含有分析物と関連づける工程。

【請求項 89】

セットが、3つのラマン活性分子コードのセットであり、セットのそれぞれのメンバーが、アミノ基、カルボキシル基、およびチオール基から選択される3つの活性基の1つを有し、かつオリゴヌクレオチド・バックボーンがセットに特有のラマン・サインを提供する、請求項88記載の方法。

【請求項 90】

セットのそれぞれのメンバーが、ポリ(dA)、ポリ(dG)、およびポリ(dAG)から選

50

択される3つのラマン活性分子コードのうちの1つを含む、請求項89記載の方法。

【請求項91】

方法が、b)の前に、副次試料へと試料を分ける工程、それぞれの副次試料についてb)、c)、およびd)を繰り返す工程、並びにe)の前の全ての副次試料におけるそれぞれのシグナル点からのラマンシグナルを計数する工程とをさらに含む、請求項88記載の方法。

【請求項92】

試料が、活性分子ラマンコードと接触する前に消化される、請求項88記載の方法。

【請求項93】

ラマンスペクトルから得られる情報を使用して、試料のタンパク質プロファイルを編集する工程をさらに含む、請求項92記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、一般に、試料中の分析物の存在を同定するために有用な方法および装置に、より具体的には生体試料をアッセイするためにラマン活性プローブ構築物を使用するための方法および装置に関する。

【背景技術】

【0002】

背景情報

20

ゲノムレベルDNAシーケンシングの著しい成功は、25年前には想像も及ばなかった知識の境地に我々を置いた。このデータの転換点を、ヒト疾患を診断し、段階を決め(staging)、理解し、治療する際に有用であるという知識に変換するためには、推定>30,000のヒトタンパク質の配列を知っているだけでなく、我々が、疾患の発症が差し迫っていることを予告するタンパク質発現の鍵となる変化を同定し、正確に分子レベルで疾患サブタイプを分類すること、並びに、疾患プロセスに密接に関与するタンパク質の機能、相互作用、および活性を調整する方法を理解することが必要である。タンパク質機能を理解するための最も基本的なアプローチのうちの1つは、増殖条件、細胞周期段階、疾病状態、外部刺激、その他のタンパク質の発現レベル、およびその他の変数の関数として、発現レベル変化を相関させることである。DNAマイクロアレイ解析は、ゲノム全体のmRNA発現解析

30

【0003】

加えて、このようなマイクロアレイ解析では、調節タンパク質機能において重要な役割を果たすことが多い翻訳後タンパク質修飾を検出し、同定し、または定量化することができない。タンパク質発現解析は、これが単なるそのメッセージではなく、生物学的エフェクタータンパク質分子のレベルを測定するという点で潜在的に大きな利点を提供する。現時点では、マイクロアレイ解析が25,000以上の遺伝子のmRNA発現の相対的レベルを同時に

40

【0004】

したがって、種々の生物学的および有機的環境における分析物の低濃度の検出および解析に対して払われる注目は、いっそう増大しつつある。このような分析物の定性分析は、一般により高濃度レベルに制限されており、一方、定量分析は、通常、放射性同位元素または蛍光試薬での標識が必要である。このような手順は、一般に時間がかかり、および不便である。

【0005】

固体センサーおよび特にバイオセンサーは、これらが化学的、生物学的、および薬学的

50

研究、並びに疾患診断法における有用性が増大しているために、最近かなりの注目を受けている。一般に、バイオセンサーは、2つの成分：高度に特異的な認識エレメントと分子認識イベントを定量化可能なシグナルに変換する変換構造とからなる。バイオセンサーは、オリゴヌクレオチド対、抗体-抗原、ホルモン-受容体、酵素-基質、およびレクチン-糖タンパク質相互作用を含む種々の生体分子の複合体を検出するために開発された。シグナル伝達は、一般に電気化学的、電界効果トランジスター、光学的吸収、蛍光、または干渉観測装置で達成される。

【0006】

多孔性シリコン膜の可視反射率変化の強度を、小分子の予測される検出、同定、および数量化のための単純な生物学的センサーに利用することができることが公知である。このような生物学的センサーは、確実に有用であるが、一方で、反射率変化の検出では、1つまたは複数の定義される鋭い発光のピークではなくむしろ、幅広いピークが存在することにより複雑となる。

10

【0007】

また、ラマン分光法または表面プラズモン共鳴は、生体試料からの個々の分子の、感受性の高く、かつ正確な検出または同定という目標を達成するための探求に使用されてきた。光が関心対象の媒体を通過するときに、一定量の光が、散乱として公知の現象において、その本来の方向から発散される。また、一部の散乱光は、光の吸収およびより高いエネルギー状態への電子の励起、続く異なる波長における発光により、本来の励起 (excitatory) 光とは周波数が異なる。吸収される光と放射される光のエネルギーとのエネルギーの相違は、媒体の振動エネルギーに対応する。この現象は、ラマン散乱として公知であり、ラマン散乱光で関心対象の媒体または分子を特徴づけ、および解析するための方法は、ラマン分光法と呼ばれる。ラマン発光スペクトルの波長は、試料中の化学組成物およびラマン散乱分子の構造の特徴であり、一方で、ラマン散乱光の強度は、試料中の分子の濃度に依存する。

20

【0008】

ラマンスペクトルは、赤外スペクトルと同様に、解析される試料 (分析物) に特異的な分子振動に対応するバンドの波長分布からなる。ラマン分光法の実施の際には、光源 (一般にレーザー) からのビームを試料に対して焦点を合わせ、これにより非弾性的に散乱放射線を生じさせ、これを光学的に収集して、波長分散型分光器に向け、その中で、検出器が衝突光子のエネルギーを電気信号強度に変換する。

30

【0009】

歴史的に、入射光の非弾性散乱放射線への変換が非常に低いことにより、ラマン分光法は、水溶液の解析などの赤外線スペクトル法によって行うことが困難であった適用に限定された。しかし、ざらざらにした銀電極の付近の分子をラマン励起源に供されるときに、生じるシグナルの強度は、6桁も増大されることが発見された。

【0010】

この散乱効率の多大な増大を担うメカニズムについては、現在、かなりの研究の対象であるが、以下の3つの条件が満たされた場合に現象が生じることが、一般に認められている：(1) 金属の遊離電子吸収を、好ましくはレーザー光線の形態で、250~2500ナノメートル (nm) の間の波長の光によって励起することができること；(2) 使用される金属が、適切なサイズ (通常、5nm~1000nm直径粒子、または同等の形態の表面) であり、かつ表面プラズモン場を生じるために必要な光学的性質を有すること；および(3) 分析物分子が、プラズモン場にカップリングするための、効率的にマッチする光学特性 (吸収) を有すること。

40

【0011】

特に、金、銀、銅、および一定のその他の金属のナノ粒子は、電磁放射線の局在化効果を増強するように機能し得る。このような粒子の近くに位置する分子は、ラマン分光分析法に対して非常に高い感受性を示す。SERSは、関心対象の生体分子を特徴づけ、解析するために、この表面励起ラマン散乱効果を利用する技術である。

50

【 0 0 1 2 】

塩化ナトリウムおよび塩化リチウムは、関心対象の分子が導入される前に、またはその後、金属ナノ粒子または金属皮膜表面に適用されたときに、SERSシグナルを増強する化学薬品として同定された。しかし、これらの化学的エンハンサーを使用する技術では、単一のヌクレオチドまたはタンパク質などの低濃度の分析物分子を確実に検出するほど十分に感受性であることが証明されておらず、その結果、SERSは、血漿などの複雑な生体試料のタンパク質含有量を解析するためには適していなかった。

【 0 0 1 3 】

したがって、当技術分野において、結合した分析物の特徴に関する詳細な情報を提供する分析物検出方法のための、並びにラマン分光学的解析手法を使用して確実に個々の分析物を検出および/または同定するための需要が存在する。加えて、当技術分野において、低濃度レベルにて生体分子を定性的および定量的に検出する迅速かつ単純な手段に対する需要もある。

【 発明の開示 】

【 0 0 1 4 】

発明の詳細な説明

本発明の種々の態様は、体液中のタンパク質含有分析物などの、生体試料中の分析物を検出するためのラマン活性またはSERS活性プローブ構築物の使用に関する。ある態様において、ラマン活性構築物におけるプローブ部分は、生体試料中の特定の公知の分析物に結合し、それ故、その存在を同定するように選択される。その他の態様において、ラマン活性構築物のプローブ部分は、一定のアミノ酸に共通に見いだされる官能基と化学的に相互作用するようにデザインされ、その結果、本発明の方法は、試料中のタンパク質含有分析物またはこれらの断片のアミノ酸組成についての情報を提供する。

【 0 0 1 5 】

以下の詳細な説明は、本発明の開示された態様のより完全な理解をもたらすために、多くの具体的詳細を含む。しかし、本態様は、これらの具体的詳細の範囲を超えて実施することができることが、当業者には明らかであろう。他の例では、当技術分野に周知である装置、方法、手順、および個々の構成要素を本明細書に詳述しなかった。

【 0 0 1 6 】

図1において図示される本発明の一つの態様は、分析物200に特異的に結合するために付着されたプローブと共に、個体ゲル100と1つまたは複数のSERS増強ナノ粒子とを含む固体ゲルマトリックス300を提供する。また、複数の特有の光学的サインを提供する複数のナノ粒子をゲルマトリックスに組み込むことができる。SERS増強ナノ粒子は、本明細書に記載されている1つまたは複数のラマン活性タグと、タンパク質含有分析物などの公知の分析物に特異的に結合するプローブとを含む。一つの局面において、ゲルマトリックスに含まれるナノ粒子の少なくとも1つは、電気泳動法の間に分析物の分離を補助するために有効電荷を有することができる。もう一つの態様において、ナノ粒子は、それぞれ、ナノ粒子のプローブの結合特異性と相関された特有のSERS-シグナルを提供することができる。

【 0 0 1 7 】

ラマン光源は、ゲルを通して投射することができるので、試料中の分析物の存在は、ゲルから分離された分析物を除去する必要なく検出することができる。

【 0 0 1 8 】

一つの局面において、本発明のゲルマトリックスは、コアおよび表面を含む複合体有機-無機ナノ粒子(COIN)を組み込み、コアは、第一の金属とラマン活性有機化合物とを含む金属コロイドを含む。COINおよびCOINを作製する方法は、本明細書において下記に詳述してある。

【 0 0 1 9 】

生体試料などの試料中のタンパク質を分離し、検出するための使用については、本発明のゲルマトリックスは、本明細書に記載されているように、タンパク質含有分析物のタンパク質部分と特異的に結合するプローブを有するSERS活性ナノ粒子を含む。このようなブ

10

20

30

40

50

ローブは、抗体、抗原、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、受容体、リガンド等を含む。

【0020】

発明のゲルマトリックスに使用するいずれのナノ粒子も、ナノ粒子の光学的サインに寄与する蛍光標識をさらに含んでいてもよい。

【0021】

もう一つの態様において、本発明は、1つまたは複数のSERS増強ナノ粒子内で分析物に対してプローブを結合させて複合体を形成することに適している条件下で、分析物を含む試料を、発明のゲルマトリックスなどの分離ゲルと接触させる工程と；電気泳動法または磁気泳動法によって複合体をその他の試料含有物から分離する工程と；ゲル内の種々の位置に分離された複合体によって放射されるSERSシグナルを検出する（すなわち、ゲルからの複合体の除去の有無にかかわらず）工程とを含む試料中の分析物を検出するための方法を提供する。特定の複合体によって放射されるSERSシグナルは、特定の分析物の存在と関連する。試料は、タンパク質またはタンパク質含有分析物の混合物を含む複合体生体試料であることができ、この場合、ゲルマトリックスは、種々の分析物（これに対して、ナノ粒子中のプローブが特異的に結合する）が試料中に存在することを示すための複数の種々のSERS増強ナノ粒子を含む。分離される生物学的標的を含む試料は、分離のためにゲル内に混合物を導入するよりも前に、SERS増強ナノ粒子と接触されるか、または試料は、その中にすでに組み込まれたSERS活性ナノ粒子を有する発明のゲルに導入される。

10

【0022】

もう一つの態様において、ゲルマトリックスおよびゲル分別法に使用されるナノ粒子中のプローブの特異性は、未知であり、特定の結合した複合体からのSERSシグナルが、これが結合した分析物の化学構造に関する情報を提供する。結合した分析物についてのさらなる情報は、使用した特定の分離媒体（たとえば、ゲルの型、分離の電氣的または磁気条件）中での複合体の挙動の解析によって得られ、この情報により、ラマンシグナルの解析から得られた情報を編集することができ、補充すると考えられる。検出された分析物の全てについてのこのような情報の編集により、試料のタンパク質プロフィールを作製するために使用することができる。

20

【0023】

ゲルマトリックス内での複合体の分離は、電気泳動法もしくは磁気泳動法、または2つの組み合わせによって達成され、特に、ナノ粒子が、金属酸化物などの磁性体を含む場合には後者が使用される。複合体は、分離が分析物それ自体の相違に依存するのではなく、むしろ分析物/SERS増強ナノ粒子複合体の、正味の電荷、重量等の相違に依存すると考えられることを除いて、通常ゲル分離技術に関連する任意の要素に基づいて分離することができる。したがって、ナノ粒子の1つまたは複数に対する分析物の結合は、分析物に対するプローブの結合によって生じる分析物の移動度変化を決定することによって検出することができる。ある態様において、ナノ粒子のうちの少なくとも2つが、電気泳動法の間に分析物分離に影響を及ぼすように、異なる有効電荷を有する。

30

【0024】

関心対象の分析物がタンパク質含有分析物である場合、ポリアクリルアミドゲルマトリックスを使用することができ、関心対象の分析物は、抗原、ポリペプチド、タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、およびこれらの組み合わせから選択することができる。使用される電気泳動技術は、たとえば非変性条件下での一次元または二次元電気泳動法のいずれかであることができる。任意に、本発明のゲル分別法は、分離された分析物からさらにSERSシグナルを増強するために、LiClまたはNaClの溶液などの化学的エンハンサー溶液にゲルを浸漬することをさらに含むことができる。さらに、化学的エンハンサーの溶液が適用されたゲルを乾燥することによって、検出前に試料が濃縮される。

40

【0025】

分析物からのSERSシグナルがゲルから分析物を除去せずに検出される本発明のゲル分別法は、試料が実質的に同じサイズおよび/または同じ電荷密度を有する2つ以上の分析物

50

を含むときに、個々の分析物間を識別するために特に有用である。2つが同じ化学式を有する場合であっても、レーザーによる照射によって2つ以上の分析物によって生じるSERSシグナルは、2つ以上の分析物間を識別し、分析物間の相違に関する構造的情報を提供するために使用することができる。加えて、得られたSERSシグナルは、実質的に試料中の同じサイズおよび/または同じ電荷密度を有する分析物間を識別することができる。

【0026】

一つの局面において、本発明の分別法は、SERSシグナルの検出の前に、または後に、分析物をクロマトグラフィーまたは等電点電気泳動に供することをさらに含むことができる。SERS解析によって得られた情報は、試料中の特定のタンパク質、またはタンパク質プロファイルについての情報をさらに増強するために、等電点電気泳動および/またはクロマトグラフィーによって得られた情報と比較し、および/またはと共に編集することができる。

10

【0027】

本発明の分別法の一つの態様において、SERS増強ナノ粒子は、本明細書に記載されているように、COINである。

【0028】

さらにもう一つの態様において、本発明は、適切な液体中のゲル形成粒子を含むゲル形成性液と、複数のラマン増強ナノ粒子とを共に混合することによって液体組成物を形成する工程を含む、発明のゲルマトリックスを作製するための方法を提供する。ラマン増強ナノ粒子は、複数の特有の光学的サインを有し、それぞれの分析物に対して結合するためのプローブを含む。固体ゲルマトリックスは、当技術分野において公知の方法を使用して液体組成物から得られる。分離ゲルを作製する際に一般に使用される任意の型のゲル形成粒子を本発明の方法に使用することができるが、化学的および生物学的分子を分離するためには、ポリアクリルアミドおよびアガロースゲルが一般に使用される。複合体生体試料をスクリーニングするための本発明の方法に使用するためには、それぞれが、本明細書に記載されているCOINなどの、複数の異なる分析物のうちの1つで複合体を形成するために特異的な、付着されたプローブを有する複数のSERS増強ナノ粒子をゲルに組み込むことができる。

20

【0029】

電気泳動法に使用される最も一般的な安定化媒体であるポリアクリルアミドおよびアガロースゲルを作製する際に当業者によって適用される原理は、以下を含む。アガロースおよびアクリルアミドゲルの広範囲にわたる使用は、これらのマトリックスが電気泳動の間に「分子ふるい」としても作用し、これらのサイズおよび構造に従って生体分子の移動を制限するという事実由来している。アガロースおよびポリアクリルアミドゲルは、架橋されたスポンジ様の構造である。これらは、99.5%までが水であるが、これらのゲルの孔のサイズは、多くのタンパク質および核酸のものと同じである。分子を印加電圧によってゲルを通過させるにつれて、より大きな分子ほど、ゲルにより、より小さな分子よりも遅れる程度が大きくなる。任意の特定のゲルに関して、マトリックスで決定されたサイズよりも小さい分子は、全く遅れず；これらは、ほとんど自由溶液中のように移動する。その他の極端な場合には、マトリックスで決定されたサイズよりも大きな分子は、全くゲルに入ることができない。したがって、当業者は、マトリックス濃度の適切な選択によって、所望のサイズ範囲の分子をふるい分けるようにゲルを調整する。ゲルの平均孔サイズは、ゲルにおける固体の割合によって、およびポリアクリルアミドのためには、同様に架橋剤の量によって決定される。

30

40

【0030】

アガロースおよびポリアクリルアミドで可能なゲル密度の範囲に実用限界はあるが、これらの2つのマトリックスにより、長さがほんの数塩基対だけのオリゴヌクレオチド～数100万塩基対の長さと同じ大きさの染色体または染色体断片までのどのDNA鎖の電気泳動分離も可能である。小さな孔のゲルを作るポリアクリルアミドは、5塩基より少ない～約2,000塩基対のサイズのポリヌクレオチドを分離するために使用される。アガロースゲルは、

50

これらの大きな細孔径により、50～30,000塩基対、およびパルスフィールド（pulsed-field）技術では、染色体～同様の大きさの 5×10^6 塩基対の長さより大きい断片までの核酸を分離するために使用することができる。

【0031】

本発明のゲルおよびこれらを使用する方法の重要な特徴の1つは、分離された分析物（すなわち、分離されたタンパク質含有分析物）の検出をゲルから分析物を除去することを必要とせずに行うことができることである。検出は、当技術分野において公知の任意のSERS技術を使用して、ゲル内の分離された分析物の照射によって達成することができる。加えて、SERS解析のすぐれた感受性のために、微量の生物試料中の関心対象の分離された分析物を検出し、定量的に決定することができる。

10

【0032】

さらにもう一つの態様において、本発明は、本発明のゲル分離法および検出法を実行するために使用することができる発明のゲルマトリックスを含む系を提供する。このような系は、少なくとも1つの分析物を含む試料；およびナノ粒子からのSERSシグナルを検出するために適した光学的検出系をさらに含む。発明のゲルマトリックスを使用する本発明の系は、試料から得られるSERSシグナルの解析のためのアルゴリズムを含むコンピュータをさらに含んでもよい。

【0033】

さらにもう一つの態様において、本発明は、試料中の分析物をプローブ構築物のセットと、複合体を形成するために適した条件下で接触することによって、試料中の分析物の多重検出のための方法を提供する。それぞれのプローブ構築物は、特有の光学的サインを提供するために、本明細書に記載されているとおりの、少なくとも1つのSERS活性ヌクレオチドを含む光学活性ポリヌクレオチド・バーコードと抱合された非核酸プローブを含む。特有の光学的サインは、特有のSERSサインであることができる。加えて、セットのそれぞれのプローブ構築物は、選ばれた電気泳動培地において特有の移動度を有するように特異的に設計される。こうして形成された複合体を電気泳動法によって分離する。分離後、分離ゲル内で、または分離媒体から取り出した後に、適切な検出装置を持つ複合様式で、特有の光学的サインを検出する。適切な検出装置は、光学活性バーコードの光学的性質に依存する。それぞれの特異的に結合するプローブは、SERSシグナルなどの、識別可能な光学的サインを放射する公知のバーコードに抱合されているので、したがって、構築物から検出される個々の光学的サインは、試料中の公知の分析物の存在と関連する。

20

30

【0034】

ポリヌクレオチドの電気泳動度は、少なくとも部分的には、ポリヌクレオチドの核酸の数に依存するので、セットの個々のプローブ構築物の特有の移動度は、セットの個々のメンバーのバーコードのヌクレオチドが様々な数を有することによって達成することができる。同様に、セットのメンバーの有効電荷の多様性は、ポリヌクレオチド・バーコードの核酸の選択によって達成することができる。複合体の移動度は、電気泳動における全体の複合体の電荷密度によって決定されるので、使用したプローブ構築物のセットのメンバーの特有の移動度特性のために、プローブ構築物のセットの異なるメンバーに結合したときに単一の試料から同時に、多くの同様の分析物を、分離し、次いで検出することができる。

40

【0035】

加えて、遊離の標的および/または結合していないプローブ構築物の電気泳動特性は、結合した複合体のものとは異なり、たとえば結合した複合体の検出の前に、遊離の標的および/または結合していないプローブ構築物を電気泳動法によって複合体から除去することは簡単な問題である。一つの局面において、プローブ構築物のセットの非核酸プローブは、生体試料中の公知のタンパク質含有標的と特異的に結合する抗体のセットであることができる。この場合、標的分析物は、本明細書に記載されているようなタンパク質含有分析物である。または、患者試料中のタンパク質含有分子または複合体に対する非核酸プローブ（たとえば、抗体、受容体など）の結合優先度（preferences）が本アッセイ法の目

50

的であってもよいので、プローブ構築物の非核酸プローブは、検出される真の分析物であってもよい。

【0036】

本発明の本態様で分離される複合体は、一次元（たとえば、クロマトグラフィーまたは電気泳動法）または二次元（たとえば、最初にクロマトグラフィーまたは等電点電気泳動によって、次いで電気泳動法によって）であることができる。標的分子のサイズ、表面特性、および電荷密度は、プローブされる複合体の形成後に変化し得るので、2つの異なる分離原理を使用することにより、結合していない成分からの複合体の分離を補助する。

【0037】

使用される光学的検出手順または光学的検出手順の組み合わせは、分析物、分離装置、またはマトリックスの性質に、並びにプローブ構築物の構造および特質に依存する。分離された複合体は、本明細書に記載されている技術および当技術分野において公知である技術を使用して、吸着、反射、分極、屈折、蛍光、ラマンスペクトル、SERS、共鳴光散乱、格子結合表面プラスモン共鳴（grating-coupled surface plasmon resonance）から選択される光学技術の1つまたは組み合わせによって検出することができる。

【0038】

さらにもう一つの態様において、本発明は、分子複合体を構築するための十分に確立されたDNA/ペプチド化学を使用して合成されるようにデザインされた活性ラマン分子コードのセットを作製するための方法を提供する。活性ラマン分子コードは、それ自体がラマン活性であるか、または化学組成を変更することなく異なるラマン・サインを得るために、組み込みの官能基を経て種々の位置にてバックボーンに化学的に付着されたラマン・タグを有するポリまたはオリゴヌクレオチド・バックボーンを特徴とする。ラマン活性分子コードとして使用されるそれぞれの分子複合体は、生物学的分析物のアミノ酸に固有の官能基に対して、またはタンパク質含有標的に対して、直接かつ特異的に付着する活性基（たとえば、プローブ）を有する。

【0039】

本発明の活性ラマン分子コードは、それぞれが、バックボーンに沿った種々の位置に2つ以上の化学的反応性部分を持つ有機重合体を含む分子バックボーンのセットを得る工程；および2つ以上の小分子ラマン活性タグを、化学的反応性部分にてセットのそれぞれのバックボーンに付着する工程によって作製され、セットのメンバーのバックボーンに沿ったラマン活性タグの型、数、および相対的位置は、セットのそれぞれのメンバーに特有のラマンシグナルを生じるように、さまざまに組み合わせられる。

【0040】

また、活性基は、セットのバックボーンに抱合され、それぞれの活性基は、タンパク質含有分析物に固有の種々の型の官能基と特異的に結合する。たとえば、活性基は、生物学的タンパク質含有分子のアミノ酸に固有の化学的部分に反応性の化学的官能基であることができる。または、活性基は、公知のタンパク質含有分子と特異的に結合する、本明細書に記載されているようなプローブであることができる。

【0041】

分子バックボーンは、公知の化学技術によって合成することができる任意の有機重合体を含むことができる。これは、天然に存在するか、もしくは合成の多糖体、タンパク質、アミノ酸、またはこれらの組み合わせなどの生体重合体の特質を持つ構造であることができる。また、バックボーンは、ラマン活性一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチド断片であることができ、そのいずれもが、標準的ホスホロアミダイト化学によって容易に合成される。バックボーンは、ラマン活性タグの化学的付着に適応するように化学修飾されたヌクレオチド類似体を含む。化学修飾されたヌクレオチド類似体の重合体のバックボーンにおける位置を変更して、ラマン活性タグの位置を変更する。この目的のためにバックボーンに導入することができるものの例は、2-アミノプリンを含む。種々の局面において、バックボーンは、2～約1000ヌクレオチド、約50～約400、または約10～約100ヌクレオチドを含むことができる。バックボーンは、構造および化学組成に応じて、3つまでの機能：ラ

10

20

30

40

50

マン活性タグのための補助、ラマンシグナルの供与源、およびラマン活性タグのためのエンハンサーを有する。

【0042】

セットのメンバーが、ラマン活性タグのための付着位置として使用される化学修飾されたヌクレオチド類似体の位置を除く、共通のオリゴヌクレオチド・バックボーンを有するときに、バックボーンの合成には特に便利である。この場合、それぞれが、体液中の何千もの異なる分析物を同定するために有用であろう特有のラマン・サインを持つ活性分子ラマンコードのセットを作製することがなおも可能である。

【0043】

本発明の活性分子ラマンコードに組み込まれるラマン活性タグは、ラマンシグナルを生じる際に高度に活性であり、かつ典型的には1kDa未満の分子量を有する小分子である。これらの要求を満たすラマン活性タグは、色素（たとえば、R6G、Tamra、Rox）、アミノ酸（たとえば、アルギニン、メチオニン、システイン）、核酸塩基（たとえば、アデニンまたはグアニン）、またはこれらの任意の組み合わせを含む。また、適切な分子量およびラマン特徴などの、上記の特徴を有する天然に存在するか、または合成の化合物を使用することもできる。ラマン活性タグは、分子バックボーンに沿って任意の位置に配置することができ、単一バックボーンが、1つよりも多くのそのようなタグを有することができる。セットのメンバーのラマン・サインは、分子ラマンコードの合成の間に、バックボーンに沿ってラマン活性タグの型、数、および相対的位置を変えることによって調整することができる。

10

20

【0044】

一つの局面において、本発明の活性分子ラマンコードの活性基は、特定のアミノ酸残基に見いだされるその他の官能基（たとえば、本明細書において図8A~8Iで示した、アミン、カルボキシル、チオール、アルデヒド、またはヒドロキシル基）に反応性である官能基（たとえば、アクリダイト3、アミン、またはチオール基）である。たとえば、アミノ基は、活性基として使用されるときに、分析物中のLysと化学的に化合し、および同定し；活性基として使用されるスルフヒドリル基は、チオール基またはCysを含むアミノ酸に結合し、および同定し；カルボン酸活性基は、AspまたはGluに結合し、および同定し；並びにアルデヒド活性基は、図8A~8Iに示した化学を使用して、糖タンパク質の糖残基に結合し、および同定する。タンパク質官能基と特異的に反応することができるその他の試薬は、活性分子ラマンコードを作製する本発明の方法に使用することができる。使用の際に、活性基がこの種の官能基であるときは、単一タンパク質またはタンパク質断片が、それぞれが異なるラマンシグナルを生じる複数の活性分子ラマンコードの標的であってもよく、これらとの複合体を形成してもよい。この場合、単一の分析物と結合する分子ラマンコードの組み合わせにより、分析物のアミノ酸組成の局面に関する情報を提供する。

30

【0045】

本発明の活性分子ラマンコードに使用される活性基の第二の型は、公知のタンパク質含有分析物もしくはこれらの断片と特異的に結合する抗体、受容体、レクチン、またはフェージディスプレイされたペプチドのようなプローブである。重合体バックボーンに付着することができるプローブ分子のさらなる例は、オリゴヌクレオチド、核酸、抗体、抗体断片、結合タンパク質、受容体タンパク質、ペプチド、レクチン、基質、阻害剤、活性化因子、リガンド、ホルモン、サイトカイン等を含んでもよいが、これらに限定されるわけではない。このタイプの活性基は、プローブを、その標的分子を標識または認識するために使用する（たとえば、結合のための立体障害を回避する）ことができるように、公知の化学、たとえばDNA/タンパク質化学を使用してバックボーンに抱合される。

40

【0046】

本発明の活性分子ラマンコードに使用されるラマン活性タグは、ラマン活性色素、アミノ酸、ヌクレオチド、またはこれらの組み合わせから選択される。ラマン活性タグへ組み込むために適したラマン活性アミノ酸の例は、アルギニン、メチオニン、システイン、およびこれらの組み合わせを含む。ラマン活性タグへ組み込むために適したラマン活性ヌク

50

レオチドの例は、アデニン、グアニン、およびこれらの誘導体を含む。

【0047】

本発明の活性分子ラマンコードのセットの少なくとも1つのメンバーは、特有のラマンスペクトルの強度を押し上げるラマン活性バックボーンまたはタグに結合されたエンハンサー部分をさらに含んでもよい。たとえば、ポリ(dT)バックボーンは、dAタグのためのバックボーンおよびエンハンサーの両方として役立ち、ポリ(G)ラマン・タグに付着されるアミン基は、タグのためのエンハンサー部分として機能する。

【0048】

もう一つの態様において、本発明は、上記方法によって作製された活性分子ラマンコードおよびこれらのセットを提供する。本発明の活性分子ラマンコードは、本明細書に記載されている方法のいくつかにおいて、生体試料をアッセイするために有用である。

10

【0049】

さらにもう一つの態様において、本発明は、本明細書に記載されたような、本発明の活性分子ラマンコードの使用によって生体試料をアッセイするための方法を提供する。本発明の活性分子ラマンコードを使用してタンパク質プロフィールを構築するために、以下の例示的手順を行うことができる。当業者であれば、本明細書に提供される詳細な指針を使用して、活性基、分子バックボーン、およびラマン・タグの種々の組み合わせを利用することによってバリエーションを考案することができる。本態様において、タンパク質試料は、最初に、任意に、たとえばトリプシンまたは多様な当技術分野において公知の配列特異的プロテアーゼで消化してもよい。種々のプロテアーゼ消化および種々の付着化学の組み合わせにより、本来の試料から多数の副次試料を生成することができる。

20

【0050】

この例示的方法において、本発明の活性な分子ラマンコード・セットのいずれを使用することもできるが、それぞれが3つの活性基（すなわち、アミノ基、カルボキシル基、およびチオール基）のうちの1つを含み、かつ異なるラマン活性バックボーン、たとえばポリ(dA)、ポリ(dG)およびpolyd(AG)から選択されるバックボーン（図9）に付着された、3つのコードのセットが使用される。タンパク質全体または消化されたタンパク質の試料（または、別々に副次試料）を結合のために3つのラマンコードと接触させる。次いで、結合した複合体を、任意の適切な分離機構（たとえば、電気泳動法（たとえば、ゲルマトリックス内で）、サイズ排除クロマトグラフィー、親和性結合、イオン交換、等電点電気泳動、等）を使用して分離する。電気泳動法が使用されるときは、複合体の移動度（SDSの非存在下で）は、全体のサイズおよび正味の負電荷に依存する。キャピラリー電気泳動法は、少量の個々の分析物を検出するための好ましい分別法である。それぞれの試料または副次試料は、そのそれぞれのチャンネルまたはゲルマトリックスレーン内で分離される。ラマンコード/タンパク質複合体の分離された複体のラマン（SERS）シグナルは、マトリックス内で、またはSERS検出の前にマトリックスから移して、いずれかで検出される。SERS検出、およびラマンコード情報とSERSスペクトルの相関の後、試料のタンパク質含有量に関して、大量の情報を編集することができ、これがタンパク質プロファイリングにとって重要である。

30

【0051】

さらにもう一つの態様において、本発明は、SERS検出のために、カスケード結合がラマン活性プローブ構築物と組み合わせて使用される、試料中の分析物の存在を決定するための方法を提供する。生物学および化学系の複雑さのために、不完全（変性された）反応または結合は、まれではない。変性された結合イベントを研究することにより、有用な薬物または疾患マーカーの同定を補助することができる。現在、広範な薬剤および生体分子に対する何十万もの抗体を利用することができ、薬物スクリーニング、疾患マーカー同定等のための極めて有益なツールとなり得る。したがって、本態様において、本発明の方法は、分析物含有試料を、固体支持体上の別々の部位に付着された、抗体または受容体などのプローブの第一のセットと接触させ、別々の部位にプローブ/分析物複合体を形成させる工程を含む。次いで、プローブ/分析物複合体を、発明の活性分子ラマンコードの少

40

50

なくとも1つの第二のセット（第一のセットのプロープのサブセット（たとえば、抗体または受容体）が、プロープ構築物（すなわち、発明の活性な分子ラマンコード）の第二のセットの活性薬剤として使用される）と接触させる。

【0052】

本発明の方法は、以下の仮定に基づく：1）受容体プールがあり、プール内の受容体は、実質的に同じ濃度であり、かつプールのそれぞれの受容体は、不完全な（変性した）結合が可能なときに、試料中の2つ以上の分析物を結合する可能性が高い。2）存在量が異なるリガンドを含む試料がある。それぞれのリガンドについて、おそらく、変性された結合ができるときに利用可能な2つ以上の受容体がある。これらの仮定は、受容体が抗体であり、かつリガンドがタンパク質である生物系に、通常あてはまる。

10

【0053】

変性した結合のために、第一の結合によって形成されるいくつかの複合体は、プロープ構築物に結合する可能性が高い（すなわち、分析物は、同じ抗体によって、または分析物もしくは分析物含有複合体上の2つのエピトープに結合する2つの異なる抗体によって2回認識される）。これらの「ポジティブなもの」だけが、ラマン活性コードでタグが付けられる。第一の結合イベントにおいて結合したタンパク質は、第二の結合イベントに関して、比較的濃縮され得るので（試料中のその濃度と比較して）、ポジティブに同定された分析物は、試料中の存在量が低い分析物であり得る。

【0054】

次いで、ラマン活性コードを含む結合した複合体を、インサイチューで本明細書に記載されているように金属薄層で覆い、ラマン活性プロープ構築物からのラマンシグナルを増強させる。分析物の付近にある金属層は、SERSシグナルを生じ、固体支持体全体を単一光源で照射することができ、一方、SERSシグナルは、たとえばSERS走査によって固体支持体上の別々の部位に結合したラマンコード含有複合体から収集される。別々の部位から得られる1つまたは複数のSERSスペクトルは、プロープ部分を試料中の特定の分析物の存在と関連づけるか、またはプロープ部分を試料中の分子または複合体に対して親和性を有する（たとえば、これまで未知のもの）として同定する。

20

【0055】

一つの局面において、ラマン活性プロープ構築物が、オリゴヌクレオチド・バックボーン、特にラマン活性オリゴヌクレオチド・バックボーンを含む場合、本方法は、金属層の沈着の前に固体支持体上の結合したラマンコード含有複合体のバックボーンの増幅をさらに含むことができる。たとえば、ラマン活性バックボーンを増幅するために、当技術分野において公知の技術を使用して、PCR3または末端転移酵素反応増幅を使用することができる。末端転移酵素反応では、本明細書に記載されているように、使用されるdNTP混合物は、任意に1つもしくは複数のラマン・タグを付けたヌクレオチドまたはラマン活性ヌクレオチドを含む。

30

【0056】

増幅されたラマンコードを覆う金属の薄層の沈着は、増幅されたラマンコードを組み込むために、インサイチューで形成された金属ナノ粒子の形態であることができる。図10A～Bに関して記載してあるが、固体支持体110は、一次抗体130を付着するためのリンカー層120でコーティングされている。試料と接触することにより、一次抗体130は、標的140を固定した。ラマンコードが付着された二次抗体150は、固定された抗原140を有する一次抗体130に特異的に結合し、ラマンコードを任意の上記した技術を使用して増幅される。金属カチオンは、還元剤と接触することによってコロイド溶液から沈殿して金属ナノ粒子170を形成し、これを増幅されたラマンコード160に組み込む。

40

【0057】

結果を検出するためには、SERSシグナルは、基体上のそれぞれの別々の位置（たとえば、「抗体スポット」）から放射される個々の分子結合イベントまたはシグナル点を計数する。図11に示したように、基体上に一次抗体が固定された基体210は、複数の別々の位置（「すなわち、抗体スポット」）を有する。単一の抗体点の引き延ばしした図では、別々

50

の位置220にて一次抗体によって固定された分析物に対して少なくとも1つの活性分子ラマンコードが結合することにより、SERSシグナルが検出されているシグナル点230を図示する。この手順によって得られた結果の多重解析には、ラマンコード・デザインに従ったSERSサインの分類を含む。個々のシグナル点は、図12の流れ図に示したように、マイクロメータースケールのSERS走査およびサイン解析を行うことによって解決することができる。

【0058】

抗体および受容体は、固体支持体上の別々の位置に付着されるプローブの非限定の例であり、ラマン活性プローブ構築物の第二のセットに組み込まれる。また、ファージディスプレイされたペプチド、核酸、アプタマー、リガンド、レクチン、およびこれらの組み合わせは、本発明の方法のプローブとして使用することができる。試料は、必ずしも体液であるわけではなく、タンパク質、グルコタンパク質、脂質タンパク質、核酸、ウイルス粒子、多糖体、ステロイド、およびこれらの組み合わせを含む、分析物の任意の混合されたプールであってもよく、しかし含むことができる。一つの局面において、試料は、特定の疾患を有することが知られているか、または疑いがある患者の体液のプールを含む。

10

【0059】

本発明の方法を使用する疾患マーカーの検出のためには、疾患を表す患者試料の代わりに、分析物プールを正常対照患者から得られた対応する試料（たとえば、同型の体液）から構成されたことを除いて、本方法が繰り返される。次いで、本方法は、相違を同定するために正常な対照患者の試料から得られるSERSスペクトルと患者試料から得られるSERSスペクトルを比較する工程をさらに含み、相違は、疾患を有することが知られているか、または疑いがある患者の試料中に疾患マーカーが存在することを示す（図12）。

20

【0060】

一つの局面において、プローブの第一のセット（たとえば、抗体の完全なセット）は、第二のセットのうちの1つに使用するためのプローブの複数のサブセット（たとえば、活性分子ラマンコードにおけるプローブとして）を得るために、ランダムに分けられる。または、プローブの第一のセットは、同等数のプローブを含むサブセットに分けることができる。後者の場合、本来のプローブセットのサブセットのそれぞれのプローブは、活性分子ラマンコードの単一の第二のセットにおける活性薬剤として使用され、単一のサブセットのそれぞれのラマンコードは、単一のメンバーのサブセットに特有であるが、第二のセットのそれぞれのラマンコードの同じセットを含む。

30

【0061】

生体試料をアッセイするための本発明の方法のさらにもう一つの態様において、試料中の分析物を、本明細書に記載されているか、または当技術分野において公知の任意の方法を使用して固体支持体上で分離させて、試料中のタンパク質含有分析物の1つまたは複数の活性ラマン分子コードが特異的に結合して複合体を形成することができるよう、分離された分析物を活性ラマン分子コードの一次セットと接触させる。次いで、複合体内の活性ラマン分子コードによって生じるラマンシグナルを増幅するために、こうして形成された複合体を二次ラマンコード複合体と接触させる。二次ラマンコードによって生じる増幅されたラマンシグナルを検出し、活性ラマン分子コードの活性薬剤が特異的に結合する分析物の試料中における存在と関連づける。

40

【0062】

一つの局面において、二次ラマン複合体の接触は、活性ラマン分子コードのセットの結合したメンバーとラマンシグナルを増幅するための二次ラマンコードのポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドとの間の化学的会合を含む。たとえば、活性ラマン分子コードのセットのメンバーがオリゴヌクレオチド・バックボーン（任意にラマン活性）を含み、かつ二次ラマン複合体が、相補的オリゴヌクレオチドを含む場合は、2つの間の選択的ハイブリダイゼーション反応は、ラマンシグナルを増幅するための増幅反応によって行われる。もう一つの局面において、選択的ハイブリダイゼーション後に、ハイブリダイズされた二本鎖セグメントのライゲーションを生じさせるために適した条件が導入されて、直鎖状または分枝のラマン活性複合体が形成され、これがラマンシグナルを増幅する（図7C）

50

。

【0063】

もう一つの局面において、活性ラマン分子コードのセットの結合したメンバーが、これらの3'末端に遊離のヒドロキシル基を持つラマン活性ポリヌクレオチド・バックボーンを含む場合、本方法は、末端転移酵素の存在下において適切な条件下で結合した複合体をdNTPに曝露して、バックボーンのラマンシグナルを増幅するための、何百または何千の長さのヌクレオチドの一本鎖ラマン活性分子を形成する工程をさらに含む。このような技術は、一般的に「ローリングサークル増幅」として公知である。増幅されたラマンシグナルをさらに変えるために、結合した複合体で種々の一本鎖DNAバックボーンを増幅するために使用したdNTPの組成を変えることができる。任意に、ラマン・タグを付けたヌクレオチドを使用したdNTPに付加することができる（図7D）。 10

【0064】

さらにもう一つの局面において、二次ラマン複合体は、本明細書に記載されている方法を使用して、金属ナノ粒子に付着されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含むことができる（図7A）。二次ラマン配列の核酸配列は、活性分子ラマンコードのバックボーンポリヌクレオチドの少なくとも一部に対して相補的であるように選択される。ラマン活性分子バックボーンに対する相補的核酸配列の選択的ハイブリダイゼーションにより、照射によって生じるラマンシグナルを増幅する。この場合、ナノ粒子が分析物に近い場合、増幅されるラマンシグナルはSERSシグナルである。さらにもう一つ局面において、二次ラマン複合体が、付着されたラマン活性タグを持つ相補的オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含む場合、二次ラマン複合体は、本明細書に記載されており、および当技術分野において公知のように、相補的オリゴヌクレオチドから作製されたデンドリマーである（図7B）。デンドリマーの1つまたは複数における相補的オリゴヌクレオチドは、種々の活性ラマン分子コードのポリヌクレオチド・バックボーンに対して選択的にハイブリダイズして、ラマンシグナルを増幅する。 20

【0065】

DNAは、 1×10^4 倍（ローリングサークル増幅）程度～ 1×10^6 倍（PCR3）程度まで増幅することができることが公知である。したがって、DNA増幅およびSERS増幅の組み合わせにより、 1×10^{14} 倍の増強因子を生じ得る。このような増強因子により、単一分子の検出が可能になる。典型的には、タンパク質分子またはDNA断片は、10nm～100nmの寸法を有する。増幅の後に、シグナルが、 $1 \mu\text{m}^2$ の領域から産生される場合、 1cm^2 のチップには、 1×10^8 個のタンパク質またはDNA断片分析物を保持することができるであろう。レーザー光線スポットは、 $1 \mu\text{m}$ 程度またはそれよりも小さくすることができ、かつ血清中の大部分のサイトカインの濃度は、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{10}$ 分子/ μl の範囲であり（Nature Biotechnology, April 2002 20: 359-356）、本明細書に記載されているような多くの定性的アッセイ法のためには、微量の試料で十分である。 30

【0066】

さらにもう一つの態様において、本発明は、分析物のプールを、固体支持体上の別々の部位に付着された公知の結合特異性のプローブの第一のセットと接触させて、別々の部位にプローブ/分析物複合体を形成する工程を含む、分析物のプールにおける分析物の存在を決定するための方法を提供する。次いで、こうして形成されたプローブ/分析物複合体は、発明の活性ラマン分子コードの複数の第二のセット（それぞれの第二のセットが、活性薬剤として第一のセットのプローブのサブセットを利用する）と連続して接触させ、ラマンコード含有複合体を形成させる。次いで、結合したラマンコード含有複合体をインサイチューで金属イオンと接触させ、本明細書に記載されているように、金属の薄層でラマンコード含有複合体を覆い、複合体を照射することによってSERSシグナルを生じさせる。固体支持体上の別々の部位にて結合したラマンコード含有複合体を同時に照射することによって生じるSERSシグナルを検出し、検出された1つまたは複数のSERSスペクトルを試料からの別々の部位における特定の分析物の存在と関連づける。任意に、ラマンコード含有複合体のポリヌクレオチド・バックボーンを増幅は、たとえば上記のようなPCR3または口 40 50

ーリングサークル増幅によって、SERSシグナルを増強するための金属層の形成の前に行うことができる。一つの局面において、SERSシグナルは、SERS走査技術を使用して検出し、ラマンコード・デザインに従ってSERSスペクトルを分類することによって複合解析を行うことができる。本態様において、使用することができる例示的プローブは、抗体、ファージディスプレイされたペプチド、受容体、核酸、リガンド、レクチン等を含み、検出することができる例示的分析物は、タンパク質、グルコタンパク質、脂質タンパク質、核酸、ウイルス粒子、多糖体、ステロイド等を含む。好ましくは、分析物のプールは、疾患を有することが知られているか、または疑いがある患者の体液試料を含む。一つの局面において、分析物のプールが、正常対照患者の対応する試料を含むこと、および本方法が相違を同定するために正常対照患者の分析物のプールから得られるSERSスペクトルと分析物の患者のプールから得られるSERSスペクトルを比較する工程をさらに含むことを除いて、本方法が繰り返され、相違は、疾患を有することが知られているか、または疑いがある患者の試料中の疾患マーカーの存在を示す。

10

【0067】

本明細書に記載されている種々の発明の方法は、健康な個体、並びに特定の疾病状態を有すると同定された個体の生体試料の特定の型と関連づけられたラマンまたはSERSスペクトルのライブラリーを編集するために使用することができる。同様のライブラリーを種々の生体試料および種々の疾病状態について構築することができる。次いで、このようなライブラリーのラマンまたはSERSスペクトルを、これらの個々のスペクトルに基づいて、個体が特定の生物学的表現型もしくは疾患を有するか、または有する可能性が高いかどうかを診断する際に補助するために、発明の方法および装置を使用して任意の個体について得られた結果と比較することができる（図12を参照されたい）。本明細書に記載されているような任意の生体試料は、このような目的のために使用することができ、特に適切な生体試料は、血液、たとえば血清である。

20

【0068】

以下のパラグラフは、種々の概念について論議し、本発明の種々の態様を理解する際に有用な用語である。

【0069】

「ポリヌクレオチド」という用語は、ホスホジエステル結合によって共に連結された一連のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを意味するために、本明細書において広く使用される。便宜のために、「オリゴヌクレオチド」という用語は、本明細書において、プライマーまたはプローブとして使用されるポリヌクレオチドをいうために使用される。一般に、選択されたヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするプローブまたはプライマーとして有用なオリゴヌクレオチドは、少なくとも約10ヌクレオチドの長さ、通常少なくとも約15ヌクレオチドの長さ、たとえば約15～約50ヌクレオチドの間の長さである。

30

【0070】

ポリヌクレオチドは、RNAであることができ、またはDNAであることができ、これらは遺伝子またはこれらの一部、cDNA、合成ポリデオキシリボ核酸配列等であることができ、一本鎖または二本鎖、並びにDNA/RNAハイブリッドであることができる。種々の態様において、オリゴヌクレオチド（たとえば、プローブまたはプライマー）を含むポリヌクレオチドは、ホスホジエステル結合以外のヌクレオチドもしくはヌクレオチド類似体、またはバックボーン結合を含むことができる。一般に、ポリヌクレオチドを含むヌクレオチドは、天然に存在する、2'-デオキシリボースに連結されたアデニン、シトシン、グアニン、もしくはチミンなどのデオキシリボヌクレオチド、またはリボースに連結されたアデニン、シトシン、グアニン、もしくはウラシルなどのリボヌクレオチドである。しかし、天然に存在しない合成ヌクレオチドまたは修飾された天然に存在するヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド類似体も含むことができる。このようなヌクレオチド類似体は、当技術分野において周知であり、市販されており、このようなヌクレオチド類似体を含むポリヌクレオチドも同様ある（Lin et al., Nucl. Acid

40

50

s Res. 22: 5220-5234 (1994); Jellinek et al., Biochemistry 34: 11363-11372 (1995); Pagratis et al., Nature Biotechnol. 15: 68-73 (1997))。

【0071】

ポリヌクレオチドのヌクレオチドを連結する共有結合は、一般にホスホジエステル結合である。しかし、共有結合はまた、チオジエステル結合、ホスホロチオエート結合、ペプチド様結合、または合成ポリヌクレオチドを産生するためにヌクレオチドを連結するために有用な、当業者に公知の任意のその他の結合を含む、多数のその他の結合であることもできる(たとえば、Tam et al., Nucl. Acids Res. 22: 977-986 (1994); Ecker and Crooke Biotechnology 13: 351360 (1995)を参照されたい)。ポリヌクレオチドが、たとえば組織培養培地か、または生物被検体に投与することによるものを含むヌクレオ溶解活性を含み得る環境に曝露される場合、天然に存在しないヌクレオチド類似体またはヌクレオチドもしくは類似体を連結する結合を組み込むことにより、修飾されたポリヌクレオチドが分解に対する感受性をより少なくすることができるので、特に有用であり得る。

【0072】

本明細書で使用される「選択的ハイブリダイゼーション」または「選択的にハイブリダイズする」という用語は、ヌクレオチド配列が、選択したヌクレオチド配列を同定する際に十分に広範な程度に有用なように、無関係なヌクレオチド配列以上に、選択したヌクレオチド配列と優先して結合するような、中程度にストリンジェントか、または高度にストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションをいう。いくらかの量の非特異的ハイブリダイゼーションを避けることはできないが、しかし、標的ヌクレオチド配列に対するハイブリダイゼーションが、たとえば標的分子以外の核酸分子、特に標的核酸分子以外の実質的に類似の(すなわち、相同的)核酸分子と比較して、標的核酸分子と結合する標識化オリゴヌクレオチドの量によって決定すると、これを非特異的クロスハイブリダイゼーション以上に識別することができるよう十分に選択的、たとえば少なくとも約2倍以上選択的、一般に少なくとも約3倍以上選択的、通常少なくとも約5倍以上選択的、および特に少なくとも約10倍選択的であることを条件として、これも許容されることが認識される。選択的ハイブリダイゼーションを可能にする条件は、経験的に決定することができ、またはたとえばハイブリダイズするオリゴヌクレオチドおよびそれがハイブリダイズする配列の相対的GC:AT含量、ハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの長さ、およびもしあれば、オリゴヌクレオチドとそれがハイブリダイズする配列との間のミスマッチの数に基づいて推定することができる(たとえば、Sambrook et al., 「Molecular Cloning: A laboratory manual」(Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)を参照されたい)。

【0073】

漸進的に、高いストリンジェンシー条件の例は、以下のとおりである: 室温にて2×SSC/0.1% SDS(ハイブリダイゼーション条件); 室温にて0.2×SSC/0.1% SDS(低ストリンジェンシー条件); 約42ECにて0.2×SSC/0.1% SDS(中程度ストリンジェンシー条件); および約68ECにて0.1×SSC(高いストリンジェンシー条件)。洗浄は、これらの条件のうちの1つだけ、たとえば高いストリンジェンシー条件を使用することにより行うことができ、またはそれぞれの条件を、たとえば、それぞれ10分~15分間、上記で列記した順に、列記した工程のいずれかまたは全てを繰り返して、使用することができる。しかし、上述したように、最適条件は、含まれる特定のハイブリダイゼーション反応に応じて変更し、経験的に決定することができる。

【0074】

本明細書に使用される用語として「デンドリマー」は、単純な分枝モノマー単位から段階的様式で調製される合成三次元分子であり、その性質および官能性は、容易に制御することができる。デンドリマーの形成は、アドレスalmaden.ibm.com/st/projects/dendrimerにて、ワールド・ワイド・ウェブ上に記載されている。

【0075】

開示された方法および組成物は、使用されるプローブの型に関して制限はなく、当技術分野において公知のプローブ部分の任意の型をバーコードまたは分子バックボーンに付着

すること、および開示された方法に使用することができる。したがって、本明細書に使用される「プローブ部分」または「プローブ」は、分析物または分析物の型に対する特異的結合パートナーである分子または構築物を意味する。このようなプローブは、抗体断片、アフィボディ（affibodies）、キメラ抗体、一本鎖抗体、リガンド、結合タンパク質、受容体、阻害剤、基質などを含むが、これらに限定されるわけではない。

【0076】

一部の態様において、本発明の方法に使用されるラマン活性またはSERS活性構築物は、抗体プローブを含む。本明細書に使用される「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、並びにこのような抗体の抗原結合断片を含むように最も広義に使用される。本発明の方法に有用な抗体またはこれらの抗原結合断片は、たとえば分析物のエピトープに特異的な結合活性を有することによって特徴づけられる。または、後述するように、分析物は、プローブ抗体であることができ、特に抗体がプローブとして使用される本発明の方法の態様（たとえば、活性薬剤）では、抗体のセットを候補薬としての有用性についてスクリーニングするために体液に曝露される。

10

【0077】

抗体は、たとえば天然に存在する抗体、並びにたとえば一本鎖抗体、キメラ抗体、二機能性抗体、およびヒト化抗体、並びにこれらの抗原結合断片を含む天然に存在しない抗体を含む。このような天然に存在しない抗体は、固相ペプチド合成を使用して構築することができ、組換えで産生することができ、またはたとえば、重鎖可変部および軽鎖可変部からなるコンビナトリアル・ライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる（Huse et al., Science 246: 1275-1281 (1989)を参照されたい）。たとえば、キメラ抗体、ヒト化抗体、CDRグラフト化抗体、一本鎖抗体、および二機能性抗体を作製するこれらのおよび他の方法は、当業者に周知である（Winter and Harris, Immunol. Today 14: 243-246, 1993; Ward et al., Nature 341: 544-546, 1989; Harlow and Lane, Antibodies: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Hillyard et al., Protein Engineering: A practical approach (IRL Press 1992); Borrabeck, Antibody Engineering, 2d ed. (Oxford University Press 1995)）。また、プローブとして使用するために適したモノクローナル抗体は、多数の市販の供与源から得てもよい。このような市販の抗体は、多種多様な標的に対して利用できる。抗体プローブは、後述するように、標準的化学を使用して分子バックボーンに抱合することができる。

20

30

【0078】

「特異的に結合する」または「特異的結合活性」という用語は、抗体に関して使用されるときは、抗体と特定のエピトープとの相互作用が、少なくとも約 1×10^{-6} 、一般に少なくとも約 1×10^{-7} 、通常少なくとも約 1×10^{-8} 、および特に少なくとも約 1×10^{-9} または 1×10^{-10} もしくはそれ以下の解離定数を有することを意味する。したがって、抗原のエピトープに対して特異的結合活性を保持する抗体のFab、F(ab')₂、Fd、およびFv断片は、抗体の定義に含まれる。

【0079】

本発明の状況において、「リガンド」という用語は、天然に存在する、受容体の特異的結合パートナー、合成の受容体の特異的結合パートナー、または天然もしくは合成のリガンドの適切な誘導体を意味する。リガンドの決定および単離は、当技術分野において周知である（Lerner, Trends Neurosci. 17: 142-146, 1994）。当業者であれば認識するとおり、分子（または、巨大分子複合体）は、受容体およびリガンドの両方であることができる。一般に、より小さな分子量を有する結合パートナーは、リガンドと称し、およびより大きな分子量を有する結合パートナーは、受容体と称する。

40

【0080】

一定の局面において、本発明は、試料中の分析物を検出するための方法に属する。「分析物」は、プローブが見いだすことができる任意の分子または化合物を意味する。分析物は、固相、液相、気相、または蒸気相であることができる。「気相または蒸気相分析物」は、たとえば液体のヘッドスペースに、大気中に、呼吸試料中に、ガス中に、もしくは前

50

述のいずれかの混入物として存在する分子または化合物を意味する。気相または蒸気相の物理的状態は、圧力、温度によって、並びに塩その他の存在または添加により、液体の表面張力に影響を及ぼすことによって変化させることができることが認識される。

【0081】

上記のように、本発明の方法は、一定の局面において、ラマン活性プローブに対する分析物の結合を検出する。分析物は、特異的結合対 (sbp) のメンバーから構成することができ、一価の (モノエピトープの) または多価の (ポリエピトープの)、通常抗原性またはハプテン性であり、および単一の化合物または少なくとも1つの共通のエピトープ部位もしくは決定因子部位を共有する複数の化合物であるリガンドであることができる。分析物は、A、B、D、その他などの血液群抗原を有する細菌もしくは細胞、またはHLA抗原もしくは微生物、たとえば、細菌、真菌、原生動物、もしくはウイルスなどの細胞の一部であることができる。本発明の一定の態様において、分析物は、荷電している。

10

【0082】

特異的結合対のメンバー (「sbpメンバー」) は、表面上に、または空洞に、その他の分子の特定の空間および対極をなす組織と特異的に結合し、かつこれにより相補的であると定義される領域を有する、2つの異なる分子のうちの1つである。特異的結合対のメンバーは、リガンドおよび受容体 (抗リガンド) または分析物およびプローブとも称される。したがって、プローブは、分析物に特異的に結合する分子である。これらは、通常抗原-抗体などの免疫学的対のメンバーであり、一方、ビオチン-アビジン、ホルモン-ホルモン受容体、核酸二重鎖、IgG-プロテインA、DNA-DNA、DNA-RNAなどのポリヌクレオチド対などのその他の特異的結合対は、免疫学的対ではないが、本発明およびsbpメンバーの定義に含まれる。

20

【0083】

特異的結合は、実質的にその他の分子の認識がないことと比較して、2つの異なる分子のうちの1つが他方を特異的に認識することである。一般に、分子は、これらの表面上に、または空洞に、2つの分子間の特異的認識を生じさせる領域を有する。抗体-抗原相互作用、酵素-基質相互作用、ポリヌクレオチド相互作用、その他は、特異的結合の例示である。

【0084】

非特異的結合は、特異的表層構造とは比較的無関係の分子間の非共有結合である。非特異的結合は、分子間の疎水性相互作用を含むいくつかの要因によって生じ得る。

30

【0085】

本発明の方法に使用される、本明細書に記載されたラマン活性プローブ構築物は、特定の標的分析物、たとえば核酸、オリゴヌクレオチド、タンパク質、酵素、抗体、または抗原の存在を検出するために使用することができる。また、特定の標的に結合するため、または汚染物質のような物質を検出するための生理活性薬 (すなわち、候補薬) をスクリーニングするために、ナノ粒子を使用してもよい。上で議論したように、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、またはアプタマーなどのプローブ部分をデザインすることができる任意の分析物を、開示したラマン活性構築物にプローブを組み込むことによって本発明の方法で検出することができる。

40

【0086】

多価リガンド分析物は、通常ポリ (アミノ酸)、すなわち、ポリペプチドおよびタンパク質、多糖体、核酸、およびこれらの組み合わせである。このような組み合わせは、細菌、ウイルス、染色体、遺伝子、ミトコンドリア、核、細胞膜などの成分を含む。

【0087】

ほとんどの場合、本発明を適用することができるポリエピトープリガンド分析物は、少なくとも約5,000、より通常では少なくとも約10,000の分子量を有する。ポリ (アミノ酸) カテゴリーにおいて、関心対象のポリ (アミノ酸) は、一般に約5,000~5,000,000分子量、より通常では約20,000~1,000,000分子量である; 関心対象のホルモンの中では、分子量は、通常約5,000~60,000分子量までの範囲である。

50

【0088】

モノエピトープリガンド分析物は、一般に約100～2,000分子量、より通常では125～1,000分子量である。分析物は、薬物、代謝産物、農薬、汚染物質等を含む。アルカロイドは、関心対象の薬物に含まれる。アルカロイドには、モルヒネ、コデイン、ヘロイン、デキストロメトルファン、これらの誘導体、および代謝産物を含むモルフィンアルカロイド；コカインおよびベンジルエクゴニン、これらの誘導体、並びに代謝産物を含むコカインアルカロイド；リゼルギン酸のジエチルアミドを含む麦角アルカロイド；ステロイドアルカロイド；イミナゾイル(iminazoyl)アルカロイド；キナゾリンアルカロイド；イソキノリンアルカロイド；キニーネおよびキニジンを含むキノリンアルカロイド；ジテルペンアルカロイド、これらの誘導体、および代謝産物がある。

10

【0089】

分析物という用語は、下記に定義したポリヌクレオチドなどのポリヌクレオチド分析物をさらに含む。これらは、mRNA、rRNA、tRNA、DNA、DNA-RNA二重鎖などを含む。また、分析物という用語は、ポリヌクレオチド結合剤、たとえば制限酵素、活性化因子、リプレッサー、ヌクレアーゼ、ポリメラーゼ、ヒストン、修復酵素、化学療法薬等である受容体を含む。

【0090】

分析物は、宿主由来の体液などの試料に直接見いだされる分子であることができる。試料は、直接調べることができるか、またはより容易に検出可能な分析物を与えるように前処理することができる。さらにまた、関心対象の分析物は、関心対象の分析物に対して相補的な特異的結合対メンバーなどの、関心対象の分析物の証拠となる薬剤（関心対象の分析物が試料中に存在する場合にのみ、その存在が検出される）を検出することによって決定することができる。したがって、分析物の証拠となる薬剤は、アッセイ法で検出される分析物になる。体液は、たとえば、尿、血液、血漿、血清、唾液、精液、糞便、痰、大脳髄液、涙、粘液等であることができる。

20

【0091】

本明細書に使用される「コロイド」という用語は、液体（通常水）に懸濁された金属イオンをいう。発明の金属コロイドに使用するための、およびナノ粒子から想定される典型的な金属は、透明な金属、たとえば銀、金、白金、アルミニウム等を含む。

【0092】

ラマン活性プローブによって生じるラマンスペクトルを増強するために、本発明の方法の一定の態様において、分析物または分析物を含む複合体に対するラマン活性プローブの結合後に、インサイチューでラマン活性プローブをSERS活性プローブに変換することが想定される。この目的のためには、層がざらざらの表面を有する透明な金属の薄層を、基体および/またはその上の結合した複合体の上層を覆って沈着させる。ざらざらであるという特徴は、何十ナノメートルの桁であり；投射励起放射の波長と比較して小さい。小さな粒子サイズにより、金属粒子の表面プラスモンの励起を粒子上に局在化させることができる。金属表面の金属がざらざらであるという特徴は、多数の方法；たとえば；金属粒子の蒸着またはバイオセンサーの上層に対する金属コロイドの適用で発生させることができる。金属の表面電子は、サイズが小さい粒子に限定されるので、プラスモン励起も、ざらざらした特徴に限定される。結果として生じるプラスモンの電磁場は非常に強く、ラマンシグナルと比較して、非常にSERSシグナルを増強する。

30

40

【0093】

10分子の分析物分子のうちの1分子だけが、ラマン分光法において非弾性的に散乱すると推定した。しかし、散乱分子からのラマンシグナルの強度が、SERS条件下で非常に増強される本発明の方法の態様では、低濃度のラマン活性分析物を、ピコおよびフェムトモル濃度程度の低い濃度で検出することができる。いくつかの環境において、本発明の方法は、ラマン標識を含む結合した複合体と接触されるように、透明な金属の薄層を沈着させることによって、血清などの複合体生体試料中の単一の分析物分子の存在を検出するために使用することができる。金、銀、銅、およびアルミニウムは、この技術のための最も有用

50

な透明な金属である。

【0094】

ざらざらした金属表面は、いくつかの方法のうちの1つを使用して製造することができる。本明細書に使用される「薄い金属層」という用語は、結合したラマン標識含有複合体を覆って化学蒸着によって沈着された金属層を意味する。または、薄い金属層は、金属カチオンのコロイド溶液を還元条件に供して、インサイチューで、金属ナノ粒子を形成させることによって形成されるナノ粒子の層を意味する。一部の態様において、ナノ粒子は、結合した複合体を含む。または、たとえばラマンコードに付着された種粒子により、金属コロイド溶液からナノ粒子を沈殿形成させることができる。また、金属原子は、プローブ構築物に付着された、たとえばプローブ構築物の分子バックボーンまたはバーコードに付着された酵素タグを使用して、金属カチオン溶液の還元を触媒することによって、活性分子ラマンコードに沈着させることができる。この状況において、「薄い」は、SERSの利益を達成するために照射する光源（通常、レーザー）の波長の約半分、たとえば約15nm～約500nm、約100nm～約200nmなどの厚みを有することを意味する。

10

【0095】

その他の態様において、本発明の方法のいくつかにおいて有用な光学プローブ構築物またはラマン活性プローブ構築物は、プローブおよび光学活性タグが付着される「バックボーン」を含むものとして記載されている。一つの局面において、ラマンコード・バックボーンは、核酸、ペプチド、多糖体、および/または化学的に誘導された重合体配列の任意の組み合わせを含む、有機構造を含む重合体鎖から形成することができる。ある態様において、バックボーンは、一本鎖または二本鎖核酸を含むことができる。一部の態様において、バックボーンは、オリゴヌクレオチド、抗体、またはアプタマーなどのプローブ部分に付着することができる。オリゴヌクレオチド模倣物を、有機バックボーンを作製するために組み込むことができる。ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合、すなわちバックボーンは両方とも、新規の基で置換することができる。

20

【0096】

もう一つの局面において、分子プローブは、適切な核酸標的化合物とハイブリダイズするために使用することができる。優れたハイブリダイゼーション特質を有することが示されたオリゴマー化合物またはオリゴヌクレオチド模倣物の1つの例は、ペプチド核酸（PNA）と称される。PNA化合物では、オリゴヌクレオチドの糖バックボーンが、アミド含有バックボーン、たとえばアミノエチルグリシンバックボーンで置換されている。この例では、核酸塩基は、バックボーンのアミド部分のアザ窒素原子に直接または間接的に保持され、および結合される。PNA化合物の調製を開示するいくつかの米国特許は、たとえば米国特許第5,539,082号；第5,714,331号；および第5,719,262号を含む。加えて、PNA化合物は、Nielsen et al. (Science, 1991, 254, 1497-15) に開示されている。

30

【0097】

1つの活性分子ラマンコードをもう一つから識別するためには、タグをバックボーンに直接付加することができる。タグは、イメージング様式、たとえば蛍光顕微鏡検査法、FTIR（フーリエ変換赤外）分光法、ラマン分光法、電子顕微鏡法、および表面プラズモン共鳴法によって読むことができる。タグの形態学的、組織分布的、化学的、および/または電気的特質を検出するために、伝導率、トンネル電流、容量性電流、その他を含む（しかし、これらに限定されるわけではない）、イメージングの種々の変形が公知である。使用するイメージング様式は、タグ部分の性質および生じる産生シグナルに依存する。蛍光、ラマン、ナノ粒子、ナノチューブ、フラーレン、および量子ドット・タグを含む（しかし、これらに限定されるわけではない）、公知の種々の型のタグを、これらの組織分布的、化学的、光学的、および/または電気的特質によってラマンコードを同定するために使用することができる。このような特質は、使用するタグ部分の型とバックボーン上のタグの相対的位置の両方の関数として変化し、それぞれのバーコードに対して生じるシグナルが識別可能になる。

40

【0098】

50

タグは、たとえば、本明細書に記載したような、ラマン活性タグまたは蛍光タグを含んでいてもよい。隣接したタグは、たとえば蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) またはその他のメカニズムによって、互いに相互作用し得るので、タグ部分の同一セットから得られるシグナルは、タグ間位置および距離によって変化し得る。したがって、類似か、または同一のバックボーンを持つ活性分子ラマンコードを識別がつくように標識することができる。本発明の一定の態様において、活性分子ラマンコードのバックボーンは、ホスホジエステル結合、ペプチド結合、および/またはグリコシド結合で形成することができる。たとえば、DNA鎖を含むバックボーンを作製するために、標準的ホスホロアミダイト化学を使用することができる。ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR (商標)) 増幅などの、リン酸ジエステル連結されたバックボーンを作製するためのその他の方法も公知である。バックボーンの末端は、異なる官能基、たとえばビオチン、アミノ基、アルデヒド基、またはチオール基を有していてもよい。官能基は、プローブ部分に結合するために、またはタグの付着のために使用することができる。検出を容易にするために、タグをさらに修飾して、異なるサイズ、電気的、または化学的特質を得ることができる。たとえば、ジゴキシゲニンまたはフルオレセインタグと結合するために抗体を使用することができる。ビオチンタグと結合するためにストレプトアビジンを使用することができる。

10

【0099】

バックボーンがペプチド部分、または1つもしくは複数のアミノ酸部分を含むタグを含む場合は、ペプチドをタグ修飾のために、またはタグとの化学反応のためにリン酸化することができる。

20

【0100】

本発明の一定の態様において、ラマン活性タグが化学的に付着されている重合体バックボーンが作製される。バックボーン部分は、ヌクレオチド、アミノ酸、単糖、またはビニル、スチレン、カルボナート、アセテート、エチレン、アクリルアミド、その他などの任意の種々の公知のプラスチック単量体を含む (しかし、これらに限定されるわけではない)、重合のために適した任意の型の単量体から構成することができる。重合体バックボーンは、オリゴヌクレオチド、抗体、レクチン、またはアプタマープローブなどのプローブ部分に付着することができる。重合体バックボーンがヌクレオチド単量体で構成されている場合、抗体プローブに対する付着は、プローブおよびバックボーン成分の両方が異なる標的分子に結合する可能性を最小限にするであろう。または、バックボーンのためにヌクレオチド単量体を使用する本発明の一定の態様において、ヌクレオチドに基づいたバックボーンは、それ自体が付着したラマン活性タグの検出を潜在的に妨害し得るラマン発光スペクトルを生じるため、ほとんどまたは全くラマン発光シグナルを生じないバックボーンを使用して、シグナル検出を最適化し、および信号対雑音比を最小にすることができる。

30

【0101】

プローブ標識化および検出のための現法は、種々の不利な点を示す。たとえば、有機蛍光タグに付着されたプローブは、高検出感度を提供するが、低いマルチプレックス検出能力を有する。蛍光タグは、幅広い発光ピークを示し、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) は、単一のプローブ分子に付着することができる異なる蛍光タグの数を制限し、その一方で、自己消光が、蛍光シグナルの量子収量を減少させる。プローブが複数の型の発色団を含む場合、蛍光タグは、複数の励起源を必要とする。また、これらは、光退色のために不安定である。潜在的プローブ・タグのもう一つの型は、量子ドットである。量子ドット・タグは、複数の層を持つ比較的大きな構造である。製造するのが複雑であることに加えて、量子ドットをコーティングすると、蛍光発光を妨害し、量子ドット・タグを使用して作製することができる識別可能なシグナルの数に上限がある。プローブ標識の第3の型は、色素含浸させたビーズからなる。これらは、大きさが非常に大きい傾向があり、プローブ分子のサイズ範囲よりも大きいことが多い。色素含浸させたビーズの検出は、定性的で、定量的ではない。

40

【0102】

対照的に、「ラマン活性タグ」は、鋭いスペクトルのピークを生じる利点を提供し、よ

50

り多数の識別可能標識をプローブに付着することができる。表面増強ラマン分光法 (SERS) または同様の技術の使用により、蛍光タグと同等の検出感度が可能である。本発明の種々の態様において、検出および/または同定を容易にするために、1つまたは複数のラマン活性タグ部分がプローブ構築物に (たとえば、その中の分子バックボーンに) 付着される。有用なラマン活性タグの非限定の例は、TRIT (テトラメチルローダミンイソチオール)、NBD (7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール)、テキサスレッド色素、フタル酸、テレフタル酸、イソフタル酸、クレシルファストバイオレット、クレシルブルーバイオレット、プリリアントクレシルブルー、パラアミノ安息香酸、エリスロシン、ビオチン、ジゴキシゲニン、5-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン、TET (6-カルボキシ-2',4,7,7'-テトラクロロフルオレセイン)、HEX (6-カルボキシ-2',4,4',5',7,7'-ヘキサクロロフルオレセイン)、Joe (6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン) 5-カルボキシ-2',4',5',7'-テトラクロロフルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン、5-カルボキシローダミン、Tamra (テトラメチルローダミン)、6-カルボキシローダミン、Rox (カルボキシ-X-ローダミン)、R6G (ローダミン6G)、フタロシアニン、アゾメチン、シアニン (たとえば、Cy3、Cy3.5、Cy5)、キサンチン、スクシニルフルオレセイン、N,N-ジエチル-4-(5'-アゾベンゾトリアゾリル)-フェニルアミン、およびアミノアクリジンを含む。これらの、および他のラマン活性タグは、市販の供与源 (たとえば、Molecular Probes, Eugene, OR) から得ることができる。

【0103】

一般に、ラマン活性タグが1つまたは複数の二重結合、たとえば窒素に対する炭素二重結合を含んでいてもよいことが想定される。また、ラマン活性タグは、一般に多環芳香族化合物などの、環構造に付着された側鎖を持つ環構造を含んでいてもよいことが想定される。ラマン強度を増大する側鎖を持つ化合物は、プリン、アクリジン、ローダミン色素、およびシアニン色素などの環構造が抱合された化合物を含む。重合体の活性分子ラマンコードの全体の極性は、親水性であることが想定されるが、疎水性側鎖を含むこともできる。有用であり得るその他のタグは、シアニ化物、チオール、塩素、臭素、メチル、リン、および硫黄を含む。

【0104】

ある態様において、本発明の方法および構築物に使用されるラマン活性タグは、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、塩基類似体、蛍光色素、ペプチド、アミノ酸、修飾されたアミノ酸、有機部分、量子ドット、炭素ナノチューブ、フラーレン、金属ナノ粒子、電子高密度粒子、および結晶質粒子からなる群、またはこれらの任意の2つ以上の組み合わせから独立して選択することができる。

【0105】

ラマン活性タグは、分子バックボーンもしくは発明のラマン活性プローブ構築物を作製するために使用したその他の有機部分に直接付着することができ、または種々のリンカー化合物を経て付着することができる。ラマン活性タグに共有結合で付着されたヌクレオチドは、標準的な市販の供与源から入手可能である (たとえば、Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN; Promega Corp., Madison, WI; Ambion, Inc., Austin, TX; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)。その他の分子、たとえばヌクレオチドまたはアミノ酸と共有結合性に反応するようにデザインされた反応基を含むラマン活性タグが市販されている (たとえば、Molecular Probes, Eugene, OR)。

【0106】

一つの局面において、当業者であれば、有用なラマン活性タグが、本明細書に開示したものに限定されず、しかし、バックボーンまたはプローブ構築物に付着し、検出することができる任意の公知のラマン活性タグを含み得ることを理解するであろう。このようなラマン活性なタグの多くが当技術分野において公知である。

【0107】

重合体ラマン・タグを作製するための例示的方法は、多孔質ガラスビーズ、プラスチック (アクリル、ポリスチレン、スチレンおよびその他の材料の共重合体、ポリプロピレン

、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタン類、テフロンJ、その他を含むが、これらに限定されるわけではない)、多糖体、ナイロン、ニトロセルロース、複合材料、セラミックス、プラスチック用樹脂、シリカ、シリカに基づいた材料、シリコン、修飾されたシリコン、炭素、金属、無機のガラス、光ファイバーバンドル、または任意のその他の型の公知の固体支持体などの固体支持体に対して、成長する重合体ラマン・タグをアンカーする工程を含む。1つまたは複数のリンカー分子(炭素原子鎖など)を支持体に付着することができる。リンカー分子の長さは、変更してもよい。たとえば、リンカーは、2~50原子の長さであることができる。重合体の化学合成のための方法は、当技術分野において公知であり、たとえば、オリゴヌクレオチドのホスホラミダイト合成および/またはペプチドの固相合成を含んでもよい。また、官能基を保護し、および脱保護する方法は、オリゴヌクレオチドまたはペプチド合成の技術と同様に、当技術分野において周知である。 10

【0108】

単一の重合体バックボーンに付着された個々のラマン活性タグは、それぞれ異なる。または、重合体ラマン標識は、同じラマン活性タグの2つ以上のコピーを含んでもよい。識別可能な活性分子ラマンコードの数を最大にするためには、複数のラマン活性タグが単一の重合体バックボーンに組み込まれている場合は、これらは一般に異なっているか、または重合体バックボーン上の異なる位置にあることが想定される。単一の重合体バックボーンに付着された複数のラマン活性タグの使用により、非常に多くの識別可能な活性分子ラマンコードを製作することができる。4merの平均サイズのラマン標識は、約4000ダルトンであると考えられる。したがって、重合体ラマン標識は、ほとんど立体障害なくプロ 20

【0109】

重合体バックボーンは、有機構造、たとえば核酸、ペプチド、多糖体、および/または化学的に誘導された重合体の任意の組み合わせから形成することができる。重合体ラマン標識のバックボーンは、ホスホジエステル結合、ペプチド結合、および/またはグリコシド結合によって形成することができる。たとえば、DNA鎖を含むバックボーンを作製するために標準的ホスホロアミダイト化学を使用することができる。ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR(商標))増幅などの、リン酸ジエステル連結されたバックボーンを作製するためのその他の方法が公知である。バックボーンの末端は、異なる官能基、たとえばビオチン、アミノ基、アルデヒド基、またはチオール基を有していてもよい。これらの官能性をも 30

たせた基は、重合体の2つ以上のサブユニットを共に連結するために使用することができる。一旦重合体バックボーンが所望の長さに合成されれば、2つ以上の異なるラマン活性タグを連続して、または同時に導入して、修飾される残基に含まれる反応性の官能基と結合することができる。その他のタグ、たとえば蛍光、ナノ粒子、ナノチューブ、フラーレン、または量子ドット・タグを、当技術分野において公知の方法を使用して、および本明細書に記載されているように、バックボーンに沿って1つまたは複数の位置に付着して、活性分子ラマンコードのセットによって生じるラマンシグナルをさらに多様化することができる。

【0110】

ナノ粒子に対して分子を架橋するための種々の方法は、当技術分野において公知であり 40

、このような公知の方法のいずれを使用することもできる。たとえば、EDAC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)の存在下において、アミン基でカルボキシル基を架橋することによって、複数のポリヌクレオチドを単一のナノ粒子に付着することができる。

【0111】

シーケンスされる核酸分子は、任意の標準的技術によって調製することができる。一つの態様において、核酸は、天然に存在するDNAまたはRNA分子であることができる。RNAが使用される場合、RNAを相補的cDNAに変換することが望まれ得る。実質的に、染色体DNA、ミトコンドリアDNA、もしくは葉緑体DNA、またはメッセンジャーRNA、異種核RNA、リボソームRNA、またはトランスファーRNAを含む(しかし、限定されるわけではない)任意の天 50

然に存在する核酸を本発明の方法によって調製し、シーケンスすることができる。種々の形態の細胞の核酸を調製し、単離するための方法が公知である（たとえば、「Guide to Molecular Cloning Techniques」, eds. Berger and Kimmel, Academic Press, New York, NY, 1987; 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, 2nd Ed., eds. Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989）。また、天然に存在しない核酸を開示された方法および組成物を使用してシーケンスしてもよい。たとえば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR（商標））増幅などの標準的増幅技術によって調製された核酸を本発明の範囲内でシーケンスすることができる。核酸増幅の方法は、当技術分野において周知である。

【0112】

10

核酸は、ウイルス、細菌、真核生物、哺乳動物、およびヒト、プラスミド、M13、λファージ、P1人工染色体（PAC）、細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）、並びにその他のクローニングベクターを含むが、これらに限定されるわけではない多種多様な供与源から単離することができる。

【0113】

タンパク質またはペプチドは、標準的分子生物学的技術を介したタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドの発現、天然の供与源からのタンパク質もしくはペプチドの単離、またはタンパク質もしくはペプチドの化学合成を含む当業者に公知の任意の技術によって作製することができる。種々の遺伝子に対応する、ヌクレオチドおよびタンパク質、ポリペプチド、並びにペプチド配列は、以前に開示され、および当業者に公知のコンピュータ化されたデータベースにて見つけることができる。このようなデータベースには、National Center for Biotechnology InformationのGenbankおよびGenPeptデータベースがあり、ワールド・ワイド・ウェブ上で利用できる。公知の遺伝子のためのコード領域は、本明細書に開示されたか、または当業者に公知の技術を使用して増幅および／または発現することができる。または、タンパク質、ポリペプチド、およびペプチドの種々の市販の標品が当業者に公知である。

20

【0114】

本発明によるポリペプチドの調製のためのもう一つの技術は、モノクローナル抗体産生のためのペプチド模倣物の使用である。模倣物は、タンパク質二次構造のエレメントを模倣するペプチド含有分子である。たとえばJohnson et al., 「Peptide Turn Mimetics」 in Biotechnology And Pharmacy, Pezzuto et al., Eds., Chapman and Hall, New York (1993)を参照されたい。ペプチド模倣物の使用の根底にある合理的背景は、タンパク質のペプチドバックボーンが、主に、抗体および抗原などの分子相互作用を促進するような方法でアミノ酸側鎖を順応させるために存在するということである。ペプチド模倣物は、分子相互作用を天然の分子と同様にさせることが予想される。これらの原理を使用して、本明細書に開示したターゲティング・ペプチドの天然の特質の多くを有するが、しかし変更され、かつ改善された特徴を持つ第二世代の分子を設計するために使用することができる。

30

【0115】

本発明のその他の態様では、融合タンパク質を使用してもよい。これらの分子は、一般に、第二のポリペプチドもしくはタンパク質の全てまたは一部に対して、NまたはC末端にて連結された、ターゲティング・ペプチドの全てまたは実質部分を有する。たとえば、融合には、異種の宿主におけるタンパク質の組換え発現を可能にするために、その他の種由来のリーダー配列を使用してもよい。もう一つの有用な融合には、融合タンパク質の精製を容易にするための、抗体エピトープなどの免疫学的に活性なドメインの付加を含む。融合接合部に、またはその近くに切断部位を含めることにより、精製後の外来ポリペプチドの除去が容易になる。その他の有用な融合は、酵素由来の活性部位、グリコシル化ドメイン、細胞のターゲティング・シグナル、または膜貫通領域などの機能的ドメインの連結を含む。実質的に、いずれのタンパク質またはペプチドを、プローブペプチドを含む融合タンパク質に取り込むことができることが、本発明の範囲内と想定される。融合タンパク質

40

50

を作製する方法は、当業者に周知である。このようなタンパク質は、たとえば二官能性の架橋試薬を使用して化学的付着によって、完全な融合タンパク質のデノボ合成によって、または第二のペプチドもしくはタンパク質をコードするDNA配列にターゲティング・ペプチドをコードするDNA配列を付着し、続いて無処置の融合タンパク質を発現することによって産生することができる。

【0116】

本発明の方法および構築物に使用されるペプチドおよびポリペプチドは、合成で産生することができる。種々の自動合成機が市販されており、公知のプロトコルに従って使用することができる。たとえば、Stewart and Young, (1984); Tam et al., (1983); Merrifield, (1986); および Barany and Merrifield (1979)を参照されたい。短いペプチド配列、通常約6～約35～50までのアミノ酸は、このような方法によって容易に合成することができる。または、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列が発現ベクターに挿入されている組換えDNA技術を使用し、適切な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクトして、発現のために適した条件下で培養することができる。

【0117】

本明細書に使用される「分析物」という用語は、特異的プローブを調製することができる核酸、タンパク質、ペプチド、脂質、炭水化物、糖脂質、糖タンパク質、または任意のその他の潜在的標的を含む。上記で議論したように、抗体またはアプタマープローブは、本発明の活性分子ラマンコードに組み込むことができ、アプタマまたは抗体を調製することができる任意の標的を同定するために使用することができる。セットのそれぞれのメンバーは、識別可能に標識し、検出することができるので、試料中の複数の分析物の存在は、同時にアッセイすることができる。分析物の定量化は、分光分析において周知の標準的技術によって行うことができる。たとえば、発明のラマンプローブ構築物に対して結合した分析物の量は、生じたシグナルの強度を測定し、既知量の同様のラマンプローブ構築物標準から調製した検量線に対して比較することによって決定することができる。このような定量化法は、十分に、当技術分野における通常の技術の範囲内である。

【0118】

「基体」または「固体支持体」は、分析物の付着または会合のために適した別々の個々の部位を含むように修飾することができ、少なくとも1つの検査法に受け入れられる任意の材料を意味する。一般に、基体は、その上で使用することが想定される光学的検査法が可能か、または増強し、シグナル発光を目に見えるほど妨害しないように選択される。

【0119】

本明細書に使用される「基体」という用語は、チップまたはマイクロタイタープレートなどの周知の装置を含み、本明細書に記載したように処置し、個々の分析物または分析物の型に結合することができる個別に別々の部位を含むパターン化された表面を含んでいてもよい。または、プローブラマン構築物が基体に付着された態様において、特定の部位に位置するラマンコードまたはプローブを持つアレイ上の個々の部位の位置の間の相関を行うことができる。

【0120】

アレイ組成物は、複数の別々の基体部位を持つ少なくとも1つの表面を含んでいてもよい。アレイのサイズは、アレイの最終用途に依存する。約2から何百万もの異なる別々の基体部位を含むアレイを作製することができる。一般に、アレイは、表面のサイズに応じて、2～1,000,000,000以上程度のこのような部位を含む。したがって、超高密度、高密度、中程度密度、低密度、または超低密度のアレイを作製することができる。超高密度アレイのためのいくつかの範囲は、アレイあたり約10,000,000～約2,000,000,000部位である。高密度アレイは、約100,000～約10,000,000部位の範囲である。中程度密度アレイは、約10,000～約50,000部位の範囲である。低密度アレイは、一般に10,000部位よりも少ない。超低密度アレイは、1,000部位よりも少ない。

【0121】

部位は、パターン、すなわち規則的デザインもしくは配置を含むか、またはランダムに

分配することができる。部位をX-Y座標面において対象にすることができるような、部位の規則的パターンを使用することができる。基体の表面は、個々の部位において分析物を付着できるように修飾することができる。したがって、基体の表面は、別々の部位を形成するように修飾することができる。一つの態様において、基体の表面は、窪み（すなわち、基体の表面のへこみ）を含むように修飾することができる。これは、フォトリソグラフィ、スタンピング技術、型技術、および微小エッチング技術を含む（しかし、これらに限定されるわけではない）種々の公知の技術を使用して行うことができる。当業者に理解されるように、使用される技術は、組成物および基体の形状に依存する。または、基体の表面は、分析物またはプローブを基体上の別々の位置に付着するために使用することができる化学的に由来する部位を含むように修飾することができる。アミノ基、カルボキシ基、オキソ基、およびチオール基などの化学的官能基のパターンの付加を使用して、対応する反応性官能基またはリンカー分子を含む分子を共有結合性に付着することができる。

10

【0122】

生物学的「分析物」は、天然に存在するタンパク質または天然に存在するタンパク質の断片を含んでもよい。したがって、たとえば、タンパク質を含む細胞抽出物、またはタンパク様の細胞抽出物のランダムもしくは誘導された消化物を使用することができる。このような方法で、原核生物および真核生物タンパク質のライブラリーを、本明細書に記載されている系をスクリーニングするために作製することができる。たとえば、細菌、真菌、ウイルス、および哺乳動物タンパク質のライブラリーをスクリーニング目的のために作製することができる。

20

【0123】

生物学的分析物は、約5～約30アミノ酸、または約5～約15アミノ酸のペプチドであることができる。ペプチドは、天然に存在するタンパク質またはランダムペプチドの消化物であることができる。一般に、ランダムペプチド（または、ランダム核酸）は、化学的に合成されているので、これらには、任意の位置に任意のヌクレオチドまたはアミノ酸を組み込んでもよい。合成過程は、ランダム化されたタンパク質または核酸を作製して、配列の長さを通じて全ての、または大部分の可能な組み合わせを形成させ、したがって、本発明の方法および構築物を使用してスクリーニングするためのランダム化された生物学的分析物のライブラリーを形成するようにデザインすることができる。

30

【0124】

または、生物学的分析物は、核酸であることができる。核酸は、一本鎖もしくは二本鎖、またはこれらの混合物であることができる。核酸は、DNA、ゲノムDNA、cDNA、RNA、またはハイブリッドであることができ、核酸は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドの任意の組み合わせ、並びにウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサントニン（xanthanine）、ヒポキサントニン（hypoxanthanine）、イソシトシン、イソグアニン、並びにニトロピロールおよびニトロインドールなどの塩基対類似体を含む、塩基の任意の組み合わせを含む。

【0125】

オリゴヌクレオチド合成のための方法は、当技術分野において周知であり、このような任意の公知の方法を使用することができる。たとえば、オリゴヌクレオチドは、市販のオリゴヌクレオチド合成機（たとえば、Applied Biosystems, Foster City, CA）を使用して調製することができる。種々のタグに付着されたヌクレオチド前駆体は、商業的に得ることができる（たとえば、Molecular Probes, Eugene, OR）、およびオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドに組み込むことができる。または、ヌクレオチド前駆体は、ピオチン、ジゴキシゲニン、スルフヒドリル、アミノ、またはカルボキシル基などの種々の反応基を含むものを購入することができる。オリゴヌクレオチド合成の後、標準的化学を使用してタグを付着することができる。また、任意の所望の配列のオリゴヌクレオチドは、タグ付着のための反応基の有無にかかわらず、多種多様な供与源（たとえば、Midland Certified Reagents, Midland, TX）から購入してもよい。

40

【0126】

50

アプタマープローブ

「アプタマー」は、SELEXと呼ばれるインビトロでの進化プロセスに由来するオリゴヌクレオチドである（たとえば、Brody and Gold, Molecular Biotechnology 74: 5-13, 2000）。SELEX（登録商標）プロセスは、標的に対して潜在的アプタマー（核酸リガンド）を曝露する工程、結合を生じさせる工程、遊離の核酸リガンドから結合したものを分離する工程、結合したリガンドを増幅する工程、および結合プロセスを繰り返す工程の反復サイクルを含む。多数のサイクルの後、実質的に生物学的標的の任意の型に対して高親和性および特異性を示すアプタマーを調製することができる。これらの小さなサイズ、相対的安定性、および調製の容易さのため、アプタマーは、プローブとして使用するために十分に適し得る。アプタマーは、オリゴヌクレオチドで構成されるので、これらは、核酸型バックボーンに容易に組み込むことができる。アプタマーの産生のための方法は、周知である（たとえば、米国特許第5,270,163号；第5,567,588号；第5,670,637号；第5,696,249号；第5,843,653号）。または、特定の標的に対する種々のアプタマーを市販の供与源（たとえば、Somalogic, Boulder, CO）から得ることができる。アプタマーは、約7kDa～50kDaの比較的小さな分子である。

10

【0127】

本明細書に使用される「COIN」という用語は、本発明のゲルマトリックスに組み込まれ、かつ本明細書に記載されている一定のその他の分析物分離技術に使用されるSERS活性ナノ粒子をいう。COINは、複合体有機-無機ナノ粒子である。これらのSERS活性プローブ構築物は、コアおよび表面を含み、コアは、第一の金属とラマン活性有機化合物を含む金属コロイドとを含む。COINは、第一の金属とは異なる、ナノ粒子の表面を覆う層を形成する第二の金属をさらに含むことができる。COINは、プローブを含む、金属層を覆う有機層をさらに含むことができる。SERS活性ナノ粒子の表面に対する付着のために適したプローブは、抗体、抗原、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、受容体、リガンド等を含むが、これらに限定されるわけではない。

20

【0128】

適切なSERSシグナルを達成するために必要とされる金属はCOINに固有であり、多種多様なラマン活性有機化合物を粒子に組み込むことができる。実際に、異なる構造、混合物、および比率のラマン活性有機化合物を含むナノ粒子を使用することによって、多数の特有のラマン・サインを作製することができる。したがって、COINを使用する本明細書に記載された本方法は、体液の「プロフィール」の内容の迅速な定性解析をじる試料中の多くの分析物の同時検出のために有用である。加えて、多くのCOINを単一のナノ粒子に組み込むことができるので、単一のCOIN粒子からのSERSシグナルは、COINとして本明細書に記載されているナノ粒子を含まないラマン活性材料から得られるSERSシグナルと比較して強力である。この状況では、COINを利用しないラマン技術と比較して、感受性の増大を生じる。

30

【0129】

COINは、標準的金属コロイド化学を使用して本発明の方法に使用するために容易に調製される。また、COINの調製は、有機化合物を吸着するために金属の能力を利用する。実際は、ラマン活性有機化合物は、金属コロイドの形成の間に金属に吸着されるので、多くのラマン活性有機化合物を、特別な付着化学を必要とせずにCOINに組み込むことができる。

40

【0130】

一般に、本発明の方法に使用されるCOINは、以下のとおりに調製される。適切な金属カチオン、還元剤、および少なくとも1つの適切なラマン活性有機化合物を含む水溶液を調製する。次いで、溶液の成分を、金属カチオンを還元する条件に供し、中性のコロイド状金属粒子を形成させる。金属コロイドの形成は、適切なラマン活性有機化合物の存在下において生じるので、ラマン活性有機化合物は、コロイド形成の間に金属に容易に吸着される。COINのこの単純な型は、I型COINと称する。I型COINは、典型的には膜分離によって分離することができる。加えて、異なるサイズのCOINを遠心分離によって濃縮することができる。

50

【0131】

代わりの態様では、COINは、ナノ粒子の表面を覆う層を形成する、第一の金属とは異なる第二の金属を含むことができる。この種のSERS活性ナノ粒子を調製するためには、I型COINを適切な第二の金属カチオンと還元剤とを含む水溶液に置く。次いで、溶液の成分を、第二の金属カチオンを還元する条件に供し、ナノ粒子の表面を覆う金属層を形成させる。ある態様において、第二の金属層は、たとえば銀、金、白金、アルミニウム等の金属を含む。このタイプのCOINは、II型COINと称する。II型COINは、I型COINと同様に単離し、または濃縮することができる。典型的には、I型およびII型COINは、実質的に球形であり、かつ約20nm～60nmのサイズの範囲である。ナノ粒子のサイズは、検出の間にCOINを照射するために使用される光の波長の約半分であるように選択される。

10

【0132】

典型的には、有機化合物は、有機化合物を金属層の表面に共有結合で付着することによって、II型COINの第二の金属の層に付着される。金属層に対する有機層の共有結合性付着は、たとえばチオール-金属結合などを介して、当業者に周知の多様な方法で達成することができる。代わりの態様では、金属層に付着される有機分子を架橋して、分子網を形成することができる。

【0133】

本発明の方法に使用されるCOINは、たとえば、酸化鉄等などの磁性材料を含むコアを含むことができる。磁気COINは、一般に入手できる磁性粒子を扱っている系を使用して、遠心分離することなく扱うことができる。実際に、磁気は、特定の生物学的プローブでタグを付けた磁気COIN粒子に付着される生物学的標的を分離するための機構として使用することができる。

20

【0134】

本明細書に使用される「ラマン活性有機化合物」は、レーザーによる励起に応答して特有のSERSサインを生じる有機分子をいう。種々のラマン活性有機化合物が、COINの成分として使用されることが想定される。ある態様において、ラマン活性有機化合物は、多環芳香族またはヘテロ芳香族化合物である。典型的には、ラマン活性有機化合物は、約300ダルトン未満の分子量を有する。

【0135】

COINに有用なラマン活性有機化合物のさらなる非限定の例は、TRIT(テトラメチルローダミンイソチオール)、NBD(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール)、テキサスレッド色素、フタル酸、テレフタル酸、イソフタル酸、クレシルファストバイオレット、クレシルブルーバイオレット、ブリリアントクレシルブルー、パラアミノ安息香酸、エリスロシン、ピオチン、ジゴキシゲニン、5-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン、5-カルボキシ-2',4',5',7'-テトラクロロフルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン、5-カルボキシローダミン、6-カルボキシローダミン、6-カルボキテトラメチルアミノフタロシアニン、アゾメチン、シアニン、キサンチン、スクシニルフルオレセイン、アミノアクリジン等を含む。これらの、および他のラマン有機化合物は、市販の供与源(たとえば、Molecular Probes, Eugene, OR)から得ることができる。

30

【0136】

ある態様において、ラマン活性化合物は、アデニン、アデニン、4-アミノ-ピラゾロ(3,4-d)ピリミジン、2-フルオロアデニン、N6-ベンゾリアデニン、キネチン、ジメチル-アリル-アミノ-アデニン、ゼアチン、プロモ-アデニン、8-アザ-アデニン、8-アザグアニン、6-メルカプトプリン、4-アミノ-6-メルカプトピラゾロ(3,4-d)ピリミジン、8-メルカプトアデニン、または9-アミノ-アクリジン4-アミノピラゾロ(3,4-d)ピリミジン、または2-フルオロアデニンである。一つの態様において、ラマン活性化合物は、アデニンである。

40

【0137】

「蛍光化合物」が、COINに組み込まれるときに、蛍光化合物は、色素、本質的に蛍光性のタンパク質、ランタニドリン光体等を含むことができるが、これらに限定されるわけで

50

はない。COINに組み込むために有用な色素は、たとえばテキサスレッド、ROX(6-カルボキシ-X-ローダミン)、ローダミン-NHS、およびTAMRA(5/6-カルボキシテトラメチルローダミンNHS)などのローダミン並びに誘導体；5-プロモメチルフルオレセインおよびFAM(5'-カルボキシフルオレセインNHS)などのフルオレセイン並びに誘導体、ルシファアーイエロー、IAEDANS、7-Me₂、N-クマリン-4-アセテート、7-OH-4-CH₃-クマリン-3-アセテート、7-NH₂-4CH₃-クマリン-3-アセテート(AMCA)、モノプロモビマン、カスケードブルーなどのピレントリスルホナート、およびモノプロモトリメチル-アンモニオビマンを含む。

【0138】

以下の段落は、ラマン活性プローブ含有構築物(たとえば、ラマンバーコード、活性分子ラマンコード、および複合体有機-無機ナノ粒子(COIN))の例示的な適用に関するさらなる詳細を含む。このようなラマン活性プローブ構築物を利用する適用の多数のさらなる具体例を、本明細書の教示を使用して同定することができることが理解される。当業者であれば、ポリペプチドとこれらの標的分子との間の多くの相互作用を、プローブとしてポリペプチドを有する一定の開示されたラマン活性プローブ構築物を使用して検出することができることを認識するであろう。例示的な適用の一つの群において、溶液中か、または固体支持体上のいずれかの抗原とラマン活性抗体標識された構築物の相互作用を検出するために、プローブ部分として抗体を有するこのようなラマン活性構築物が使用される。このような免疫アッセイ法は、たとえば、ELISAアッセイ法、ウエスタンブロット法、またはタンパクアレイに使用されるものなどの公知の方法を使用して、プローブとして抗体を有し、かつ酵素もしくは放射性化合物で標識された一次または二次抗体の代わりに、一次または二次抗体として作用するラマン活性プローブ構築物を利用して行うことができることが理解される。もう一つの例において、ラマン活性プローブ構築物は、基質と酵素の相互作用を検出するために使用するための酵素プローブに付着される。

10

20

【0139】

例示的な方法のもう一つの群では、標的核酸を検出するために本明細書に記載されているラマン活性構築物を使用する。このような方法は、たとえば臨床試料内の感染因子の検出、ゲノムDNAもしくはRNAもしくはメッセージRNAに由来する増幅産物の検出、またはクローム内の遺伝子(cDNA)挿入断片の検出のために有用である。標的ポリヌクレオチドの検出を目的とする一定の方法のためには、当技術分野において公知の方法を使用してオリゴヌクレオチドプローブが合成される。次いで、オリゴヌクレオチドを使用してラマン活性構築物に官能性をもたせる。ラマン活性プローブ構築物の特異的なラマン標識の検出は、オリゴヌクレオチドプローブのヌクレオチド配列を同定し、次に標的ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列に関する情報を提供する。

30

【0140】

本発明の実施の際には、ラマン分光計は、ラマン分光法による本発明のラマンシグナルを検出して、定量化するようにデザインした検出ユニットの一部であることができる。ラマン分光法を使用して、ラマン標識された分析物、たとえばヌクレオチドを検出するための方法は、当技術分野において公知である。(米国特許第5,306,403号；第6,002,471号；および第6,174,677号を参照されたい)。表面増強ラマン分光法(SERS)、表面増強された共鳴ラマン分光法(SERRS)、およびコヒーレント反ストークスラマン分光法(CARS)のバリエーションが開示されている。

40

【0141】

ラマン検出ユニットの非限定の例は、米国特許第6,002,471号に開示されている。励起光線は、532nm波長の振動数2倍のNd:YAGレーザーまたは365nm波長の振動数2倍のTi:サファイヤ・レーザーのいずれかによって発生させた。パルスレーザー光線または連続レーザー光線を使用することもできる。励起光線は、共焦点オプティクスおよび顕微鏡対物レンズを通過し、流路および/またはフロースルーセルに焦点が合わせられる。ラマン標識された構築物からのラマン発光光は、顕微鏡対物レンズおよび共焦点オプティクスによって収集され、スペクトルの分離のためにモノクロメーターに結合される。共焦点オプティクスは、バックグラウンドシグナルを減少させるための二色性フィルター、バリアーフィ

50

ルター、共焦点ピンホール、レンズ、および鏡の組み合わせを含む。標準的な完全視野オブティクス、並びに共焦点オブティクスを使用することができる。ラマン発光シグナルは、シグナルの計数およびデジタル化のためにコンピュータにインターフェイスを付けたアバランシェフォトダイオードを含むラマン検出器によって検出される。

【0142】

ラマン検出ユニットのもう一つの例は、米国特許第5,306,403号に開示されており、単一光子計数モードで操作されるガリウム-砒化物光電増倍管を持つSpex Model 1403二重格子分光光度計(RCA Model C31034またはBurle Industries Model C3103402)を含む。励起光源は、SpectraPhysics, Model 166からの514.5nm系アルゴンイオンレーザー、およびクリプトンイオンレーザー(Innova 70, Coherent)の647.1nm系を含む。

10

【0143】

代替の励起光源は、337nmの窒素レーザー(Laser Science Inc.)および325nmのヘリウム-カドミウムレーザー(Liconox)(米国特許第6,174,677号)、発光ダイオード、Nd:YLFレーザー、および/または種々のイオンレーザーおよび/または色素レーザーを含む。励起ビームは、バンドパスフィルター(Corion)を持つスペクトル的に精製することができ、6×対物レンズ(Newport, Model L6X)を使用して、流路および/またはフローセルに焦点を合わせることができる。対物レンズは、励起ビームおよび放射されたラマンシグナルに対して直角形状を生じるようにホログラフィック・ビームスプリッター(Kaiser Optical Systems, Inc., Model HB 647-26N18)を使用することにより、ラマン活性プローブ構築物を励起するため、およびラマンシグナルを収集するための両方に使用することができる。レイリー散乱放射線を減少させるために、ホログラフィック・ノッチフィルター(Kaiser Optical Systems, Inc.)を使用することができる。代替のラマン検出器は、赤色増強が強化された電荷結合素子(RE-ICCD)を持つ検出系(Princeton Instruments)を備えたISA HR-320スペクトルグラフを含む。フーリエ変換スペクトルグラフ(マイケルソン干渉計に基づく)、荷電されたインジェクション装置、フォトダイオードアレイ、InGaAs検出器、電子増加CCD、強化CCD、および/またはフォトリソグラフィスタ・アレイなどの、その他の型の検出器を使用することができる。

20

【0144】

ラマン分光法もしくは当技術分野において公知の関連した技術の任意の適切な形態または配置は、正常なラマン散乱、共鳴ラマン散乱、表面励起ラマン散乱、表面増強共鳴ラマン散乱、コヒーレント反ストークスラマン分光法(CARS)、誘導ラマン散乱、逆位(inverse)ラマン分光法、誘導ゲイン(stimulated gain)ラマン分光法、過剰ラマン散乱、分子光学レーザー検査器(MOLE)、またはラマンマイクロプローブもしくはラマン顕微鏡検査もしくは共焦点ラマン顕微分光法、三次元もしくは走査ラマン、ラマンサチュレーション分光法、時間分解共鳴ラマン、ラマン分離分光法、またはUV-ラマン顕微鏡検査を含むが、これらに限定されない本発明のラマン活性プローブ構築物の検出のために使用することができる。

30

【0145】

本発明の一定の局面において、本発明のラマン活性プローブ構築物を検出するためのシステムは、情報処理システムを含む。例示的な情報処理システムは、情報通信用のバスおよびプロセッシング情報用のプロセッサを含むコンピュータを組み込んでもよい。本発明の一つの態様において、プロセッサは、限定されるわけではないが、Intel Corp.(Santa Clara, Calif.)から入手可能なプロセッサのPentium(登録商標)IIファミリー、Pentium(登録商標)IIIファミリー、およびPentium(登録商標)4ファミリーを含むPentium(登録商標)ファミリーのプロセッサから選択される。本発明の別の態様において、プロセッサは、Celeron(登録商標)、Itanium(登録商標)またはPentium Xeon(登録商標)プロセッサ(Intel Corp., Santa Clara, Calif.)であることができる。本発明の種々のその他の態様において、プロセッサは、Intel(登録商標)IA-32またはIntel(登録商標)IA-64などのIntel(登録商標)アーキテクチャに基づくことができる。または、その他のプロセッサを使用することができる。情報処理系および調節系は、メモ

40

50

リ、ディスプレイ、キーボードおよび/またはその他の装置などの当技術分野において公知の任意の周辺装置をさらに含んでもよい。

【0146】

特定の例において、検出ユニットは、情報処理システムに作動可能に結合することができる。検出ユニットからのデータは、プロセッサによって処理することができ、データをメモリに記憶することができる。また、種々のラマン標識またはコードに関する発光プロフィールについてのデータもメモリに記憶させてもよい。プロセッサにより、流路および/またはフロースルーセルにおけるラマン活性プローブ構築物からの発光スペクトルを比較して、プローブ構築物のラマン活性部分を同定してもよい。プロセッサにより、たとえば検出ユニットからのデータを解析して、本発明のラマン活性プローブ構築物のプローブに結合したポリペプチドの配列を決定してもよい。また、情報処理システムにより、バックグラウンドシグナルの減算または異なる試料からのシグナルの比較などの標準的手順を行ってもよい。

10

【0147】

本発明の一定の方法は、プログラムされたプロセッサの制御下で行うことができるが、本発明の別の態様において、本方法は、完全にもしくは部分的に、フィールドプログラム可能ゲートアレイ (Field Programmable Gate Arrays (FPGA))、TTL論理、もしくはアプリケーション特異的集積回路 (Application Specific Integrated Circuits (ASIC)) などの任意のプログラム可能な、またはハードコードされた論理によって実行することができる。加えて、開示された方法は、プログラムされた汎用コンピュータ構成要素および/またはカスタム・ハードウェア構成要素の任意の組み合わせによって行うことができる。

20

【0148】

データを集める操作に続いて、データは、典型的にはデータ分析操作に伝えられる。解析操作を容易にするために、検出ユニットによって得られたデータは、典型的には、上記されているものなどのデジタルコンピュータを使用して解析される。典型的には、コンピュータは、検出ユニットからデータを受け取り、貯蔵するため、並びに集まったデータの解析および報告のために適切にプログラムされると考えられる。

【0149】

本発明の一定の態様において、カスタム・デザインされたソフトウェア・パッケージを検出ユニットから得られるデータを解析するために使用することができる。本発明の別の態様において、データ分析は、情報処理システムおよび公的に利用できるソフトウェア・パッケージを使用して行うことができる。

30

【0150】

以下の実施例は、本発明を例示することが企図されるものであり、限定するものではない。

【0151】

実施例1

癌関連生物マーカーを同定するために、患者試料および対照試料を収集する。スクリーニング効率を増大するために、複数の患者試料をプールして相違を規準化する。同様の手順を対照試料に対しても使用する。1000個のモノクローナル抗体のプールを得て、200群 (それぞれ5メンバーで) の第一のセットに分ける。5つの抗体アレイ (それぞれ、抗体を固定するように処置された200個の別々の位置を有する) を調製する。次いで、同じ1000個の抗体をランダムな順に分類して、活性分子ラマンコードの合成に使用するための40個のサブセット (それぞれ、25メンバーで) の第二のセットを形成する。40個のサブセットのそれぞれ全25個のメンバーを合計40個のラマンコードを用いて同じ分子ラマンコードに付着して、活性分子ラマンコードの合成を完了する。その後、40個のメンバーのそれぞれが異なるラマンコードを有する、活性分子ラマンコードの25 40-メンバー群を抗体に基づいて形成する。

40

【0152】

50

次いで、25群の活性分子ラマンコードを使用して、第一の結合において別の位置で捕獲され、および固定された分析物を検出する。遊離のラマンコードの除去後、アレイ上で結合したラマンコードを増幅し、SERS走査を使用して抗体アレイのそれぞれの別々の位置内の（スポットの）全てのシグナル点からラマン・サインを収集する。同じサインを持つシグナル点の数を決定する。全25個のラマンコード群が試験されるまで、同じ手順を繰り返す。最後に、患者試料と対照試料との間の相違を解析して、患者試料中の相違を検出する。このような検出により、癌マーカーである一次候補を得る。

【0153】

本発明は、上記実施例に関して記載したが、修正および変更が、本発明の精神および範囲内に包含されることが理解される。したがって、本発明は、特許請求の範囲のみによって限定される。

10

【図面の簡単な説明】

【0154】

【図1】銀ナノ粒子（下段）を含浸させた発明のゲルと共に、従来技術の重合体ゲル（上段）を描いている模型図である。

【図2】付着された抗体プローブと共に、発明の光学的バーコードの調製および分離を図示する模式的流れ図である。種々の標的分子と接触したときに、光学的バーコード構築物の抗体が、特異的に異なる分析物と結合する。こうして形成されたプローブ複合体は、分離された複合体の照明によって生じる、ラマンシグナルなどの光学的信号の検出に備えて二次元の分離に供されたことを示す。

20

【図3】本発明の活性分子ラマンコードの4つの機能役割が、どのようにプローブ構築物の4つの構造ドメインと相互関係を有するかを図示する模式図である。

【図4】同じ長さ（21残基）の単鎖オリゴヌクレオチド・バックボーン上のラマン活性タグの数、および位置を変更することによって得られる発明の活性分子ラマンコードからのラマンシグナルに対する効果を図示する3つのラマンSERSスペクトルのグラフである。RF1は、オリゴヌクレオチド・バックボーンの反対側に位置するが、アミノ基エンハンサーを欠いている2つのラマン・タグ、ROXおよびFAMを有する構築物のラマンシグナルである。AT3、AT11、およびAT19は、共通のバックボーンと5'アミノ基エンハンサーとを共有する3つの構築物のラマンスペクトルであるが、同じラマン・タグのTAMRAは、バックボーンに沿って3つの異なる位置に位置する。

30

【図5】発明の活性分子ラマンコードにおけるエンハンサーの効果を図示する2つのラマンSERSスペクトルのグラフである。PGPTおよびNPGPTの両方のスペクトルを生じた構築物は、10残基のポリ（dG）ラマン・タグを持つ直鎖状単鎖のポリ（dT）バックボーンを有する。PGPTは、エンハンサー基を欠いているが、一方、NPGPTは、ポリ（dG）ラマン・タグによって提供されるラマンシグナルを増強するためのポリ（dG）ラマン・タグに付着されたエンハンサー部分（AmC6）を有する。

【図6】図6A～Bは、発明の活性分子ラマンコードにおける機能／構造ドメインのクロスオーバー効果を図示するラマンSERSスペクトルのグラフである。図6Aに示したSPTAスペクトルは、ThiSS活性基、ポリ（dT）バックボーン、および5'末端の単一dAタグを有する分子構築物によって生じる。スペクトルは、ラマン活性部分が分子バックボーンを持つ単一dA残基であることにより、わずかなエンハンサー機能を提供することを示す。図6Bに示したACRGAMスペクトルは、5Acrd活性基、ポリ（dG）バックボーン、および5'末端エンハンサー基としての単一AmC7を有する分子構築物によって生じる。ラマンスペクトルは、主に、シグナルを増幅するエンハンサーを持つラマン活性ポリ（dG）バックボーンによって生じる。

40

【図7】図7A～Dは、固定された分析物からのラマンシグナルを増強するためにカスケード結合を使用するための発明の方法の4つの異なる態様を図示する一連の模式的流れ図である。それぞれの態様において、一次抗体およびDNAバックボーンを持つ活性分子ラマンコードは、基体上に分析物を固定する。図7A、7B、7C、および7Dは、それぞれ、ラマンシグナルを増強するための、以下の4つの異なる型の二次ラマン複合体のラマン活性核酸に

50

対するハイブリダイゼーションを図示する：化学的に付着された相補的オリゴヌクレオチドと金属ナノ粒子；相補的オリゴヌクレオチドから形成されたデンドリマー；ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドのライゲーションによって形成された二本鎖DNA；並びにdNTPおよびラマン・タグを付けたオリゴヌクレオチドを使用した末端転移酵素反応に対する分子バックボーンの従属。

【図8】図8A～Iは、DNAラマン活性バックボーンおよびタンパク質含有分子におけるアミノ酸残基の官能基と特異的に結合するための活性基としての官能基を持つ発明の活性分子ラマンコードの使用を図示する一連の化学合成図である。

【図9】タンパク質含有試料のタンパク質プロフィールを得るための発明の方法を図示する模式的流れ図である。アミノ酸のアミノ、スルフヒドリル、およびカルボキシル官能基に特異的な3つの活性分子ラマンコードが使用される。

【図10】図10Aは、分子ラマンコードのカスケード結合および増幅（図7A～Dに示したとおり）が、インサイチューで金属ナノ粒子を形成して、SERSシグナルを生じることによって行われる発明の方法を図示する。図10Bは、ラマンシグナルの強度が、SERS活性構築物の合成における3つの点で生じることを見せる。

【図11】別々の位置に分配された抗体のプールがあるチップを図示する。引き延ばしした図は、活性分子ラマンコードにおいて抗体のサブセットを使用する縮重カスケード結合後の単一の別々の位置を示す。

【図12】ラマンコード・デザインに従ってSERSサインの分類によるアッセイ結果の多重解析を図示する模式的流れ図である。個々のシグナル点（図11）は、図12の流れ図で示すように、マイクロメータースケールSERS走査およびサイン解析を行うことによって分解することができる。対照および試験試料から得られた結果の比較により、試験（患者の）試料中の異常を決定する。

【図1】

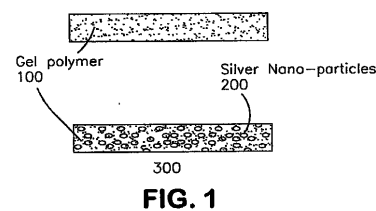


FIG. 1

【図2】

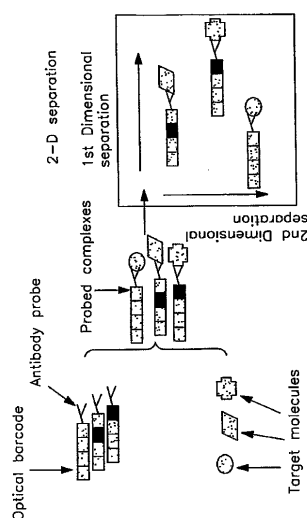


FIG. 2

【図3】

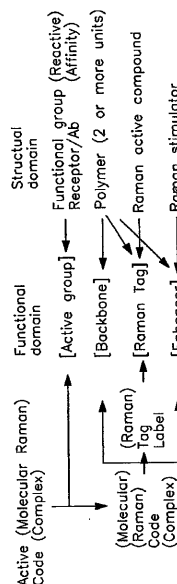


FIG. 3

【 図 4 】

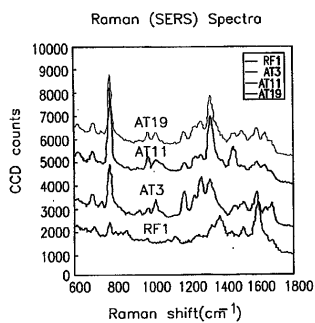


FIG. 4

【 図 5 】

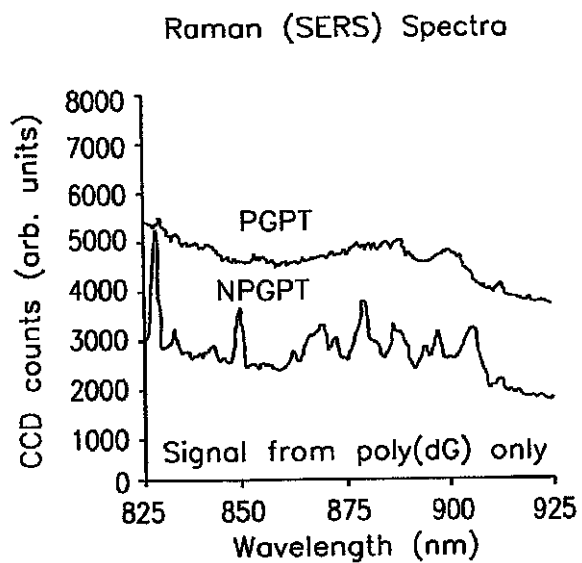


FIG. 5

【 図 6 A 】

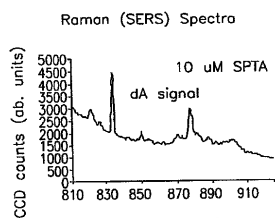


FIG. 6A

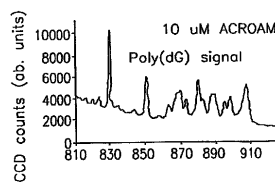


FIG. 6B

【 図 6 B 】

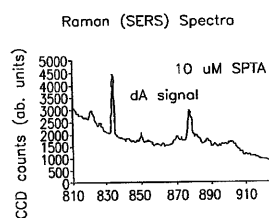


FIG. 6A

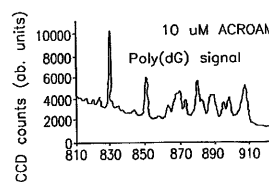


FIG. 6B

【 図 7 A 】

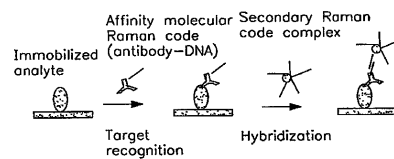


FIG. 7A

【 図 7 B 】

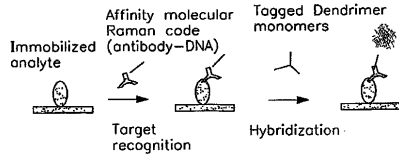


FIG. 7B

【 図 7 C 】

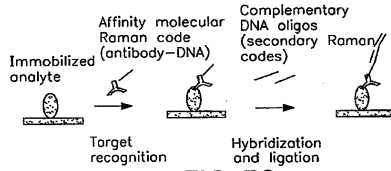


FIG. 7C

【 図 7 D 】

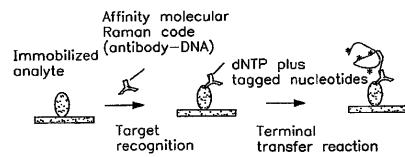


FIG. 7D

【 図 8 D 】

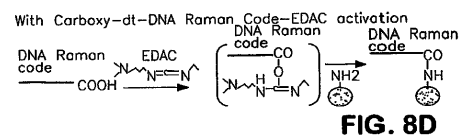


FIG. 8D

【 図 8 E 】

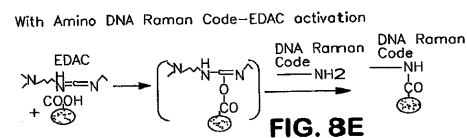


FIG. 8E

【 図 8 F 】

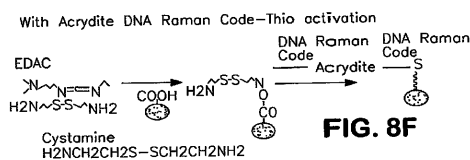


FIG. 8F

【 図 8 G 】

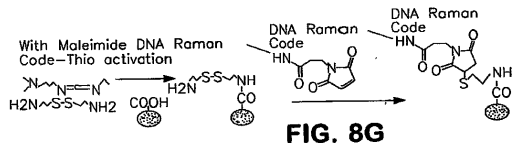


FIG. 8G

【 図 8 A 】

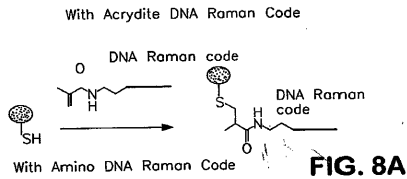


FIG. 8A

【 図 8 B 】

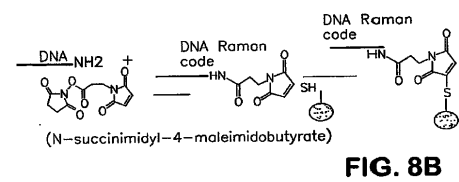


FIG. 8B

【 図 8 C 】

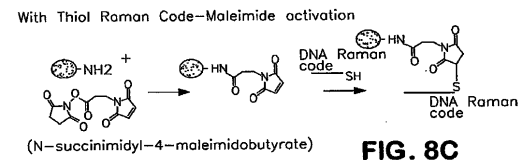


FIG. 8C

【 図 8 H 】

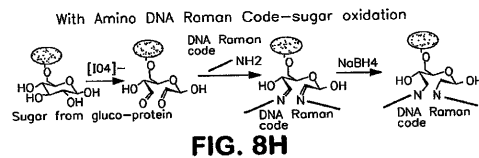


FIG. 8H

【 図 8 I 】

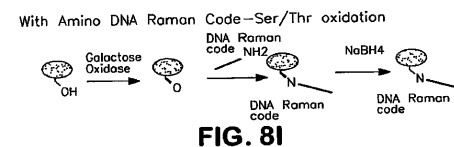


FIG. 8I

【 図 9 】

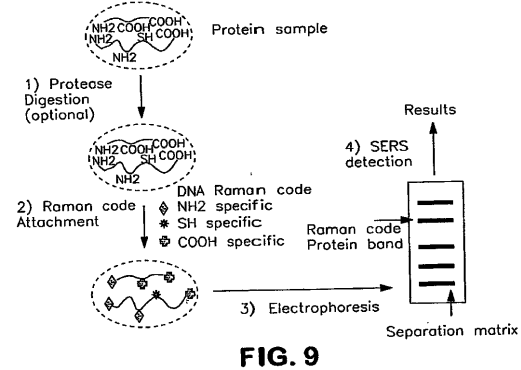
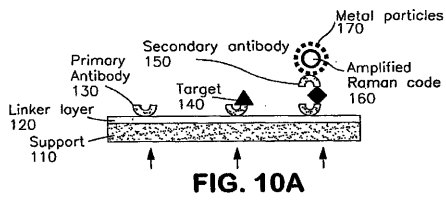
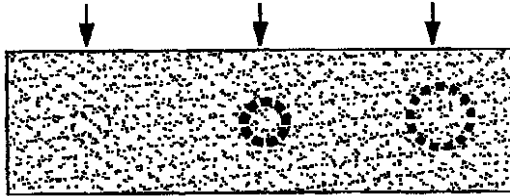


FIG. 9

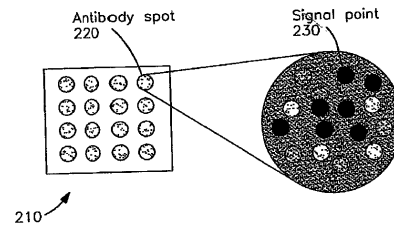
【 10 A 】



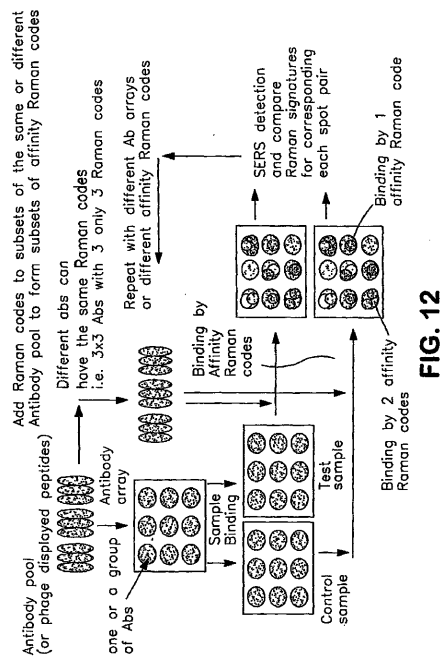
【 10 B 】



【 11 】



【 12 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US2004/044091
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N21/55 G01N21/65 G01N33/553 G01J3/44		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q G01J		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/058799 A1 (YAMAKAWA MINEO ET AL) 27 March 2003 (2003-03-27) paragraphs '0057!, '0064!, '0068!, '0072! - '0076!	1-93
X	US 2003/186240 A1 (SU XING ET AL) 2 October 2003 (2003-10-02) the whole document	1-93
X	US 2003/231304 A1 (CHAN SELENA ET AL) 18 December 2003 (2003-12-18) paragraph '0034! - paragraph '0041! paragraph '0051! - paragraph '0059! paragraph '0076! - paragraph '0077!	1-93
-/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 April 2005		Date of mailing of the international search report 06/05/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Consalvo, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/US2004/044091

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 567 628 A (TARCHA ET AL) 22 October 1996 (1996-10-22) column 4, line 12 - column 6, line 49 column 8, line 18 - column 10, line 49 examples 1,9,10	1-93
X	CHAN S ET AL: "Surface-Enhanced Raman Scattering of Small Molecules from Silver-Coated Silicon Nanopores" ADVANCED MATERIALS, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE, vol. 15, no. 19, 2 October 2003 (2003-10-02), pages 1595-1598, XP002296359 ISSN: 0935-9648 the whole document	1-93
X	VO-DINH T: "Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures" TRAC, TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, ANALYTICAL CHEMISTRY. CAMBRIDGE, GB, vol. 17, no. 8-9, 9 August 1998 (1998-08-09), pages 557-582, XP004146617 ISSN: 0165-9936 paragraph '04.6! - paragraph '005.!	1-93
X	CHRISTY L. HAYNES, AMANDA J. HAES, AND RICHARD P. VAN DUYN: "Nanosphere Lithography: Synthesis and Application of Nanoparticles With Inherently Anisotropic Structures and Surface Chemistry" MAT.RES.SOC.SYMP.PROCEEDINGS, 'Online! vol. 635, 2001, pages C6.3.1-C6.3.6, XP002324693 Retrieved from the Internet: URL: http://www.mrs.org/cgi-bin/check_membership_access/proceedings/fall2000/c/C6_3.pdf df> 'retrieved on 2005-04-26! page C6.3.4, line 28 - page C6.3.6, line 12; figure 3	1-93

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/044091

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003058799 A1	27-03-2003	CN 1556861 A	22-12-2004
		EP 1430149 A2	23-06-2004
		JP 2005504282 T	10-02-2005
		WO 03027326 A2	03-04-2003
		US 2004126790 A1	01-07-2004
US 2003186240 A1	02-10-2003	AU 2003223269 A1	29-09-2003
		CA 2478881 A1	25-09-2003
		EP 1488002 A2	22-12-2004
		WO 03078649 A2	25-09-2003
		US 2004126790 A1	01-07-2004
US 2003231304 A1	18-12-2003	AU 2003232139 A1	31-12-2003
		EP 1511980 A1	09-03-2005
		WO 03106943 A1	24-12-2003
		US 2004135997 A1	15-07-2004
US 5567628 A	22-10-1996	US 5376556 A	27-12-1994
		US 5266498 A	30-11-1993
		AT 176727 T	15-02-1999
		AU 4625993 A	17-03-1994
		CA 2105782 A1	12-03-1994
		DE 69323459 D1	25-03-1999
		DE 69323459 T2	02-09-1999
		DK 587008 T3	20-09-1999
		EP 0587008 A1	16-03-1994
		ES 2129474 T3	16-06-1999
		GR 3029912 T3	30-07-1999
		JP 3444630 B2	08-09-2003
		JP 6174723 A	24-06-1994
		US 5445972 A	29-08-1995

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 27/26	3 1 5 F
G 0 1 N 21/65 (2006.01)	G 0 1 N 27/26	3 1 5 H
G 0 1 N 21/27 (2006.01)	G 0 1 N 27/26	3 2 5 A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 27/26	3 1 5 G
	G 0 1 N 21/64	Z
	G 0 1 N 21/65	
	G 0 1 N 21/27	C
	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

(72) 発明者 スー シン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 クパチーノ グラナダ アベニュー 2 1 8 1 1

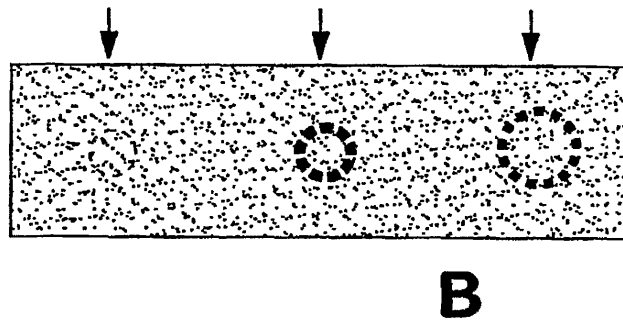
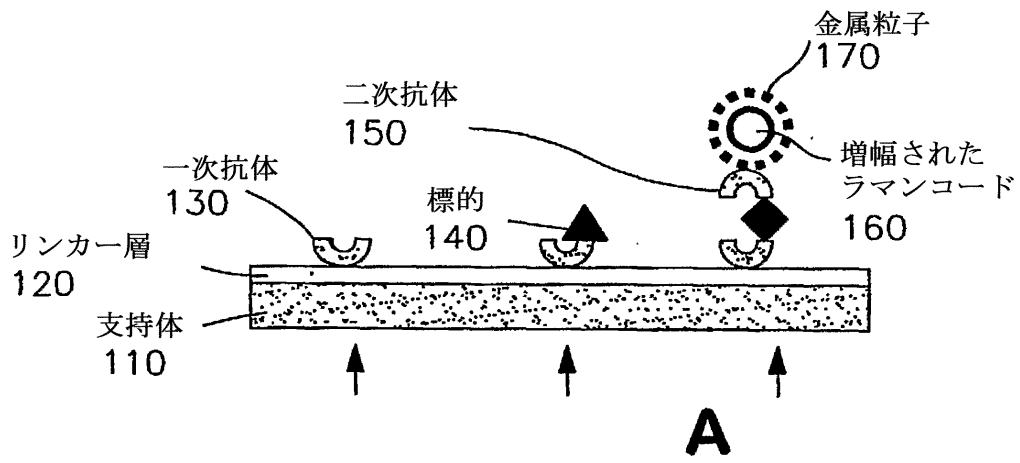
(72) 発明者 チャン セレナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン ノゼ リオ ロブルス イースト 6 5 # 3 3 1 1

(72) 発明者 クー テ - ウン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 クパチーノ メンハート レーン 1 0 3 9 6

(72) 発明者 サン レイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタ クララ チーニー ストリート 4 6 0 4

F ターム(参考) 2G043 BA16 DA02 EA01 EA03 FA02 HA01 JA02 KA01 KA02 KA03
KA05 KA08 KA09 LA01 LA03
2G054 AA06 CA22 CA23 EA10
2G059 BB12 EE01 EE02 EE03 EE04 EE07 EE10 FF03 FF12 HH01
4B024 AA11 CA09 HA13
4B063 QA01 QA18 QQ42 QR08 QR32 QR42 QR55 QR62 QS25 QX01

【要約の続き】



专利名称(译)	使用拉曼活性探针构建体测定生物样品的方法和装置		
公开(公告)号	JP2007524087A	公开(公告)日	2007-08-23
申请号	JP2006547605	申请日	2004-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	英特尔公司		
申请(专利权)人(译)	英特尔公司		
[标]发明人	バーリンアンドリユー スーシン チャンセレナ クーテウン サンレイ		
发明人	バーリン アンドリユー スー シン チャン セレナ クー テ-ウン サン レイ		
IPC分类号	G01N33/543 C12Q1/68 G01N33/53 G01N21/78 G01N27/447 G01N21/64 G01N21/65 G01N21/27 C12N15/09 G01J3/44 G01N21/55 G01N33/553 G01N33/68		
CPC分类号	G01N21/658 B82Y5/00 B82Y10/00 B82Y20/00 C12Q1/6816 C12Q1/6834 G01N33/543 G01N33/68 G01N33/6818 G01N2021/653 G01N2021/655 G01N2021/656		
FI分类号	G01N33/543.541.Z C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/53.D G01N21/78.Z G01N27/26.315.F G01N27/ /26.315.H G01N27/26.325.A G01N27/26.315.G G01N21/64.Z G01N21/65 G01N21/27.C C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G043/BA16 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/EA03 2G043/FA02 2G043/HA01 2G043/JA02 2G043/ /KA01 2G043/KA02 2G043/KA03 2G043/KA05 2G043/KA08 2G043/KA09 2G043/LA01 2G043/LA03 2G054/AA06 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/EA10 2G059/BB12 2G059/EE01 2G059/EE02 2G059/ /EE03 2G059/EE04 2G059/EE07 2G059/EE10 2G059/FF03 2G059/FF12 2G059/HH01 4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/HA13 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/ /QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QX01		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	10/750301 2003-12-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了使用拉曼活性或SERS活性探针构建体的各种方法，用于检测生物样品中的分析物，例如体液中含蛋白质的分析物。拉曼活性构建体中的探针部分与生物样品中的特定已知分析物结合并通过鉴定鉴定，使得本发明的方法可提供样品中含蛋白质的分析物或片段的氨基酸组成的信息。或者选择探针部分以具有在某些氨基酸中常见的官能团它旨在化学相互作用。在本发明的方法中使用的特定的含蛋白质的分析物或这样的分析物的情况下，能够产生一个患者样品的蛋白质谱，在某些情况下，拉曼活性或SERS活性探针构建，可以识别类型。当与拉曼数据库或正常样品的SERS光谱比较时，可以使用所公开的方法鉴定患者的疾病状态。

