

(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2005-521410

(P2005-521410A)

(43) 公表日 平成17年7月21日(2005.7.21)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 15/09	G O 1 N 21/78 C	2 G O 5 4
G O 1 N 21/78	G O 1 N 33/53 M	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/543 5 7 5	4 B O 6 3
G O 1 N 33/543	G O 1 N 33/566	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-580830 (P2003-580830)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・9408 0-4990・サウス・サン・フランシス コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(86) (22) 出願日	平成15年3月28日 (2003. 3. 28)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成16年11月29日 (2004. 11. 29)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/009726	(72) 発明者	ステファン, ジーン-フィリップ, エ フ. アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 70, サン カルロス, パーフォード アベニュー 115
(87) 国際公開番号	W02003/083440		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成15年10月9日 (2003. 10. 9)		
(31) 優先権主張番号	60/368, 669		
(32) 優先日	平成14年3月29日 (2002. 3. 29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 核酸分析試料の検出と定量化のための方法及び組成物

## (57) 【要約】

本発明は、新規の液相ハイブリッド形成ベースの、核酸検体を検出し定量するための方法を提供する。新規の捕捉ポリマー及び/又はシグナル伝達システムの使用を含む方法が提供される。これらの新規の捕捉ポリマー及び/又はシグナル伝達システムを使用すると、既存の液相核酸検出及び定量法と比較して、ノイズに対するシグナルの比率、特異性、感度並びに開発及び使用の容易性がかなり改善される。さらに本発明は、本発明の方法を実施するための組成物、キット、及び製造品を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(A)前記サンプルを、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドと、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：

(i)検体結合オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列と、(b)ステムオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(i i)直鎖状ステムオリゴヌクレオチドが(a)検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列と、(b)標識されたオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(i i i)標識されたオリゴヌクレオチドが(a)ステムオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列と、(b)検出可能なシグナルを直接又は間接的に発生可能な標識とを含み；

(i v)捕捉ポリマーが検体と直接又は間接的にハイブリダイズ可能な核酸配列とを含み；

(B)工程(A)の複合体を検出し又は定量し；

工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

## 【請求項 2】

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(A)前記サンプルを、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーと、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：

(i)検体結合オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列と、(b)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(i i)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドが(a)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位と、(b)検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(i i i)捕捉ポリマーが検体と直接又は間接的にハイブリダイズ可能な核酸配列とを含み；

(B)工程(A)の複合体を検出し又は定量し；

工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

## 【請求項 3】

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(A)前記サンプルを、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーと、検体、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：

(i)直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列と、(b)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位とを含み；

(i i)捕捉ポリマーが検体と直接又は間接的にハイブリダイズ可能な核酸配列とを含み；

(B)工程(A)の複合体を検出し又は定量し；

工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

## 【請求項 4】

10

20

30

40

50

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(a)前記サンプルを、検体結合オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーと、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：

(i)検体結合オリゴヌクレオチドが検体とハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(i i)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分、及び核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質を含む第2部分を含み；

(b)工程(a)の複合体を検出し又は定量し；

工程(a)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

10

【請求項5】

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(a)前記サンプルを、検体結合オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーと、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：

(i)検体結合オリゴヌクレオチドが検体とハイブリダイズ可能な配列を含み；

(i i)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な配列を含み、さらに検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み；

(b)工程(a)の複合体を検出し又は定量し；

工程(a)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

20

【請求項6】

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(a)前記サンプルを、検体結合オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーと、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：

(i)検体結合オリゴヌクレオチドが検体とハイブリダイズ可能な配列を含み；

(i i)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分を含み、該第1部分が検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み、さらに該捕捉ポリマーが核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質を含む第2部分も含んでおり；

(b)工程(a)の複合体を検出し又は定量し；

工程(a)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

30

【請求項7】

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(A)前記サンプルを、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドと、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：

(i)検体結合オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列と、(b)ステムオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(i i)直鎖状ステムオリゴヌクレオチドが(a)検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列と、(b)標識されたオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(i i i)標識されたオリゴヌクレオチドが(a)ステムオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列と、(b)検出可能なシグナルを直接又は間接的に発生可能な標識とを含み；

(i v)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分と、核酸と実質的にハイ

40

50

ブリダイズ可能ではない物質を含む第 2 部分とを含み；

(B) 工程 (A) の複合体を検出し又は定量し；

工程 (A) の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

【請求項 8】

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(A) 前記サンプルを、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーと、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：

(i) 検体結合オリゴヌクレオチドが (a) 検体とハイブリダイズ可能な配列と、(b) 直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(i i) 直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドが (a) オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位と、(b) 検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(i i i) 捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第 1 部分と、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質を含む第 2 部分とを含み；

(B) 工程 (A) の複合体を検出し又は定量し；

工程 (A) の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

【請求項 9】

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(A) 前記サンプルを、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーと、検体、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：

(i) 直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドが (a) 検体とハイブリダイズ可能な配列と、(b) オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位とを含み；

(i i) 捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第 1 部分と、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質を含む第 2 部分とを含み；

(B) 工程 (A) の複合体を検出し又は定量し；

工程 (A) の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

【請求項 10】

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(A) 前記サンプルを、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドと、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：

(i) 検体結合オリゴヌクレオチドが (a) 検体とハイブリダイズ可能な配列と、(b) ステムオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(i i) 直鎖状ステムオリゴヌクレオチドが (a) 検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列と、(b) 標識されたオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(i i i) 標識されたオリゴヌクレオチドが (a) ステムオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列と、(b) 検出可能なシグナルを直接又は間接的に発生可能な標識とを含み；

(i v) 捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な核酸配列を含み、さらに検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み；

10

20

30

40

50

(B)工程(A)の複合体を検出し又は定量し；

工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

【請求項11】

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(A)前記サンプルを、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーと、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで；

(i)検体結合オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列と、(b)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(ii)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドが(a)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位と、(b)検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(iii)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な核酸配列を含み、さらに検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み；

(B)工程(A)の複合体を検出し又は定量し；

工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

【請求項12】

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(A)前記サンプルを、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーと、検体、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで；

(i)直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列と、(b)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位とを含み；

(ii)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な核酸配列を含み、さらに検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチド

(B)工程(A)の複合体を検出し又は定量し；

工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

【請求項13】

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(A)前記サンプルを、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドと、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで；

(i)検体結合オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列と、(b)ステムオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(ii)直鎖状ステムオリゴヌクレオチドが(a)検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列と、(b)標識されたオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(iii)標識されたオリゴヌクレオチドが(a)ステムオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列と、(b)検出可能なシグナルを直接又は間接的に発生可能な標識とを含み；

(iv)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分を含み、該第1部分が検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレ

10

20

30

40

50

オチドを含み、さらに該捕捉ポリマーが核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質を含む第2部分も含んでおり；

(B)工程(A)の複合体を検出し又は定量し；

工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

【請求項14】

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(A)前記サンプルを、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーと、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、こ

10

こで；  
(i)検体結合オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列と、(b)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(ii)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドが(a)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位と、(b)検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列とを含み；

(iii)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分を含み、該第1部分が検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み、さらに該捕捉ポリマーが核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質を含む第2部分も含んでおり；

20

(B)工程(A)の複合体を検出し又は定量し；

工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

【請求項15】

サンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法において、

(A)前記サンプルを、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーと、検体、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで；

(i)直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列と、(b)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位とを含み

30

こで；  
(ii)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分を含み、該第1部分が検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み、さらに該捕捉ポリマーが核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質を含む第2部分も含んでおり；

(B)工程(A)の複合体を検出し又は定量し；

工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量が示される方法。

【請求項16】

サンプルをブロッカーオリゴヌクレオチドと接触させることをさらに含む、請求項1ないし15のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項17】

捕捉ポリマーを、固体又は半固体支持体に直接付着したオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる、請求項1ないし15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

捕捉ポリマーが、固体又は半固体支持体に直接付着している、請求項1ないし15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

核酸検体が、RNA、DNA、RNA/DNAハイブリッド、及び核酸-タンパク質複合体からなる群から選択される、請求項1ないし15のいずれか1項に記載の方法。

50

## 【請求項 20】

核酸検体が、成長ホルモン、インシュリン様成長因子、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、副甲状腺ホルモン、チロキシン、インシュリン、プロインシュリン、レラキシン、プロレラキシン、糖タンパク質ホルモン、濾胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、黄体化ホルモン(LH)、造血成長因子、小胞内皮成長因子(VEGF)、肝臓成長因子、線維芽成長因子、プロラクチン、胎盤ラクトゲン、腫瘍壊死因子-アルファ、腫瘍壊死因子-ベータ、ミューラー阻害物質、マウス生殖腺刺激ホルモン関連ペプチド、インヒピン、アクチピン、血管内皮成長因子、インテグリン、神経成長因子(NGFs)、NGF-ベータ、血小板成長因子、トランスフォーミング成長因子(TGFs)、TGF-アルファ、TGF-ベータ、インシュリン様成長因子-I、インシュリン様成長因子-II、エリスロポエチン(EPO)、骨誘発因子、インターフェロン類、インターフェロン-アルファ、インターフェロン-ベータ、インターフェロン-ガンマ、コロニー刺激因子(CSFs)、マクロファージ-CSF(M-CSF)、顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF)、顆粒球-CSF(G-CSF)、トロンボポエチン(TPO)、インターロイキン(ILs)、IL-1、IL-1アルファ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、LIF、SCF、ニューロツリン(NTN)、キットリガンド(KL)、HER2、ヒトFc、ヒト重及び軽鎖(定常領域)、KDR、一酸化窒素シンターゼ(NOS)、及びアンジオテンシン変換酵素(ACE)からなる群から選択されるポリペプチドの一部又は全てをコードする配列を含む、請求項1ないし15のいずれか1項に記載の方法。

10

20

## 【請求項 21】

サンプルが、血液、血清、唾液、尿、精液、脳脊髄液、気管支吸引液、器官組織、細胞溶解物、及び細胞培養培地からなる群から選択される、請求項1ないし15のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 22】

検体とハイブリダイズ可能な検体結合オリゴヌクレオチドの配列が、検体の配列と相補的な配列である、請求項1ないし15のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 23】

直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの2つのタンDEM型標識単位が、少なくとも約1、3又は5のヌクレオチドだけ離間している、請求項2、3、5、6、8、9、11、12、14及び15のいずれか1項に記載の方法。

30

## 【請求項 24】

直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの2つのタンDEM型標識単位が、約1～約12のヌクレオチドだけ離間している、請求項2、3、5、6、8、9、11、12、14及び15のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 25】

直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの2つのタンDEM型標識単位が、約3～約10のヌクレオチドだけ離間している、請求項2、3、5、6、8、9、11、12、14及び15のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 26】

直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの2つのタンDEM型標識単位が、約5～約8のヌクレオチドだけ離間している、請求項2、3、5、6、8、9、11、12、14及び15のいずれか1項に記載の方法。

40

## 【請求項 27】

標識が、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドに共有結合により付着している、請求項2、3、5、6、8、9、11、12、14及び15のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 28】

標識されたオリゴヌクレオチドの標識が、抗原、特異的結合対のメンバー、蛍光染料、及びレポーター-クエンチャー対のメンバーからなる選択される、請求項1ないし15のいずれか1項に記載の方法。

50

## 【請求項 29】

前記抗原が、ジゴキシゲニン、ビオチン及びフルオレセインイソチオシアナートからなる群から選択される、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記特異的結合対が、レセプター-リガンド対及び酵素-基質対からなる群から選択される、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 31】

前記蛍光染料が、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン又はテキサスレッドである、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 32】

レポーター-クエンチャー対が蛍光共鳴エネルギー移動が可能な染料を含む、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 33】

標識されたオリゴヌクレオチドが、標識されたオリゴヌクレオチドを、標識されたオリゴヌクレオチドの標識と結合する化合物に接触させることにより検出され、ここで前記化合物は、検出可能なシグナルを直接又は間接的に発生可能である、請求項 1 ないし 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 34】

捕捉ポリマーがアレイとして提供される、請求項 1 ないし 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 35】

核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質が不活性炭素である、請求項 4、6 ないし 9 及び 13 ないし 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 36】

不活性炭素がエチレングリコールとして提供される、請求項 35 に記載の方法。

## 【請求項 37】

前記エチレングリコールが、18-O-ジメトキシトリチルヘキサエチレングリコール、1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイトの化学構造を有する、請求項 36 に記載の方法。

## 【請求項 38】

捕捉ポリマーがスペーサー成分を含む、請求項 4、6 ないし 9 及び 13 ないし 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 39】

スペーサー成分が少なくとも一の C18 スペーサーを含む、請求項 38 に記載の方法。

## 【請求項 40】

スペーサー成分が少なくとも 3 の C18 スペーサーを含む、請求項 39 に記載の方法。

## 【請求項 41】

スペーサー成分が少なくとも 4 つ C18 スペーサーを含む、請求項 40 に記載の方法。

## 【請求項 42】

スペーサー成分が約 1 ~ 約 8 の C18 スペーサーを含む、請求項 39 に記載の方法。

## 【請求項 43】

スペーサー成分が約 3 ~ 約 6 の C18 スペーサーを含む、請求項 42 に記載の方法。

## 【請求項 44】

スペーサー成分が、捕捉ポリマーの第 2 部分の核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質である、請求項 38 に記載の方法。

## 【請求項 45】

捕捉ポリマーが少なくとも 3 の前記修飾されたヌクレオチドを含む、請求項 5、6 及び 10 ないし 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 46】

捕捉ポリマーが少なくとも 5 の前記修飾されたヌクレオチドを含む、請求項 45 に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 47】

捕捉ポリマー中のヌクレオチドの全数の少なくとも10%が、前記修飾されたヌクレオチドである、請求項5、6及び10ないし15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 48】

捕捉ポリマー中のヌクレオチドの全数の少なくとも20%が、前記修飾されたヌクレオチドである、請求項47に記載の方法。

【請求項 49】

捕捉ポリマー中のヌクレオチドの全数の少なくとも30%が、前記修飾されたヌクレオチドである、請求項48に記載の方法。

10

【請求項 50】

捕捉ポリマー中のヌクレオチドの全数の少なくとも40%が、前記修飾されたヌクレオチドである、請求項49に記載の方法。

【請求項 51】

捕捉ポリマー中のヌクレオチドの全数の少なくとも50%が、前記修飾されたヌクレオチドである、請求項50に記載の方法。

【請求項 52】

捕捉ポリマー中のヌクレオチドの全数の約10%～約50%が、前記修飾されたヌクレオチドである、請求項47に記載の方法。

【請求項 53】

修飾されたヌクレオチドが、2'-O-メトキシ-RNA又はその誘導体である、請求項5、6及び10ないし15のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 54】

少なくとも一の修飾されたヌクレオチドが、検体とハイブリダイズ可能な配列の5'及び3'領域のそれぞれに位置している、請求項5、6及び10ないし15のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

(技術分野)

本発明は、核酸の検出及び定量の分野に関する。より詳細には、本発明は、液相ハイブリダイゼーションベースの核酸検出及び定量のための方法、組成物、キット及び製造品を提供する。

30

【0002】

(背景)

20年前に最初に開発されて以来、核酸ハイブリダイゼーション法は、ウイルス、細菌及び寄生虫等の遺伝子及びそれらの転写物の同定、構造分析及び機能決定といった種々の利用分野において、遺伝子、生物医学的研究及び臨床検査室で幅広く使用されている。直接プロット法及び液相ハイブリダイゼーション(捕捉ベース)法を含む多様なアプローチが開発されている。

40

直接プロット法においては、核酸検体を固体支持体に直接塗布し、続いて標識されたDNA断片にハイブリダイズさせる。これらの方法は、一般的に感度の点で選択される方法であると考えられている。液相ハイブリダイゼーション法は、一般的に固体支持体に固定される合成核酸オリゴヌクレオチドを使用しての標的核酸の捕捉をベースとしている。

プロットベース法は、標的としない核酸配列を多量に含む複合混合物中に存在することが疑われているか又は知られている核酸検体(核酸分析試料)を検出し定量するに適していない。液相捕捉ベースアッセイが一般的にこの目的のために使用される。しかしながら、多量の汚染物質が存在すると、しばしば、捕捉オリゴヌクレオチドと汚染物質とが部分的にハイブリダイゼーションするために、特異的シグナルを有意に損なってしまう。サンプルが、通常タンパク質及び他の生体分子を含んでいるエキソビボ/インビトロ抽出物であ

50

る場合、シグナル特異性は、数多くの望ましくない巨大分子相互作用によってマイナスの影響を受けるおそれがある。

#### 【0003】

液相ハイブリダイゼーションアッセイの一形態は、汎用のオリゴヌクレオチドを介して固体支持体に間接的に付着される捕捉オリゴヌクレオチドを利用する。例えば、Urdeaら、米国特許第5635352号；同5681697号を参照のこと。しかしながら、汎用のオリゴヌクレオチドの使用には、このようなアッセイを、各アレイスポットが一種以上のオリゴヌクレオチドを含むアレイフォーマットに適合させる能力に限界がある。一般に、「汎用」配列を一つだけ各アレイスポットに提供できる。このことは、アッセイのアレイフォーマットへの適合化において厄介な課題をもたらす。

現在の液相ハイブリダイゼーション法では、設計し、合成し及び/又は使用することが煩わしい場合がある成分が必要である。ハイブリダイゼーションベースのアッセイに使用される成分であるオリゴヌクレオチドを改善するための数多くの試みがなされている。例えば、Collinsら、米国特許第5780610号；同5681702号；同5736327号；同5747248号を参照のこと。同様に、これらのアッセイに使用されるシグナル増幅系を開発する試みにより、Urdeaらの「分枝状多量体」等の、種々の構造の増幅オリゴヌクレオチドが得られた。例えば米国特許第5849481号；同5624802号；同5710264号及び同5124246号を参照のこと。分枝状多量体は、それぞれが関心あるポリヌクレオチドに結合可能な単鎖オリゴヌクレオチド単位と側鎖部位を形成する少なくとも15の多官能性ヌクレオチドを有するポリヌクレオチド骨格を含む高度に複合化したポリヌクレオチドである。

#### 【0004】

従来の方法が十分には克服していない核酸検出及び定量に内在する問題は、依然として、設計の柔軟性(例えば、シグナル増幅オリゴヌクレオチド等のアッセイ成分の柔軟性のある設計)、他用途性、及び使用と開発の容易性を保持しながら、適切かつ感度があり信頼できるシグナル/ノイズ比を提供できるアッセイを開発するための大きな障害である。さらに、同定された遺伝子数が増加し、ゲノムスペースの研究と治療的アプローチに対する注目度が増大していることから、アレイ/マイクロアレイの使用やアッセイ法の自動化等を介した高スループットの核酸検出及び定量法を提供できるアッセイ法が求められている。

よって、既存の方法の欠点を克服する改善された液相捕捉ベースの核酸検出及び定量法が必要とされている。ここで提供される発明はこの必要性を満たし、さらなる恩恵をもたらす。

特許出願及び刊行物を含むここで引用される全ての文献は出典明示によりその全体を取り込む。

#### 【0005】

(発明の開示)

本発明は、核酸検体(分析試料)の検出及び定量のための方法及び組成物、並びに該方法の利用法を提供する。

従って、一態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(A)サンプルと、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドを、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)検体結合オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列、及び(b)ステムオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含み；(ii)直鎖状ステムオリゴヌクレオチドが(a)検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列、及び(b)標識されたオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列を含み；(iii)標識されたオリゴヌクレオチドが(a)ステムオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列、及び(b)検出可能なシグナルを直接又は間接的に発生可能

な標識を含み；(i v)捕捉ポリマーが検体と直接又は間接的にハイブリダイズ可能な核酸配列を含み；(B)工程(A)の複合体を検出し又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。一実施態様において、標識されたオリゴヌクレオチドは直鎖状オリゴヌクレオチドである。いくつかの実施態様において、標識されたオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位を含む直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドである。一実施態様において、直鎖状ステムオリゴヌクレオチドは標識されたオリゴヌクレオチドと直接ハイブリダイズ可能な配列を含み、標識されたオリゴヌクレオチドはステムオリゴヌクレオチドと直接ハイブリダイズ可能な配列を含む。

#### 【0006】

他の態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(A)サンプルと、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)検体結合オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列、及び(b)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含み；(i i)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドが(a)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する少なくとも二又はそれ以上の標識単位、及び(b)検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含み；(i i i)捕捉ポリマーが検体と直接又は間接的にハイブリダイズ可能な核酸配列を含み；(B)工程(A)の複合体を検出し又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。

10

20

30

#### 【0007】

さらなる他の態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(A)サンプルと、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを、検体、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列、及び(b)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位を含み；(i i)捕捉ポリマーが検体と直接又は間接的にハイブリダイズ可能な核酸配列を含み；(B)工程(A)の複合体を検出又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。

40

#### 【0008】

他の態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(a)サンプルと、検体結合オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)検体結合オリゴヌクレオチドが検体とハイブリダイズ可能な配列を含み；(i i)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分、及び核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは、必ずしも必要ではない非核酸物質)を含む第2部分を含み；(b)工程(a)の複合体を検出又は定量し；工程(a)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。

40

#### 【0009】

他の態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(a)サンプルと、検体結合オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)検体結合オリゴヌクレオチドが検体とハイブリダイズ可能な配列を含み；(i i)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な配列を含み、さらに検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み；(b)工程(a)の複合体を検出又は定量し；工程(a)の複合体の

50

検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。

【0010】

他の態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(a)サンプルと、検体結合オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)検体結合オリゴヌクレオチドが検体とハイブリダイズ可能な配列を含み；(ii)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分を含み、該第1部分が検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み、さらに該捕捉ポリマーが核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは、必ずしも必要ではない非核酸物質)を含む第2部分も 10  
含んでおり；(b)工程(a)の複合体を検出又は定量し；工程(a)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。

【0011】

一態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(A)サンプルと、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドを、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)検体結合オリゴヌクレオチドが、検体とハイブリダイズ可能な配列、及びステムオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含み；(ii)直鎖状ステムオリゴヌクレオチドが( 20  
(a)検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列、及び(b)標識されたオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列を含み；(iii)標識されたオリゴヌクレオチドが(a)ステムオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列、及び(b)検出可能なシグナルを直接又は間接的に発生可能な標識を含み；(iv)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分、及び核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは、必ずしも必要ではない非核酸物質)を含む第2部分を含み；(B)工程(A)の複合体を検出又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。一実施態様において、標識されたオリゴヌクレオチドは直鎖状オリゴヌクレオチドである。いくつかの実施態様において、標識されたオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する 30  
二又はそれ以上の標識単位を含む直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドである。一実施態様において、直鎖状ステムオリゴヌクレオチドは標識されたオリゴヌクレオチドと直接ハイブリダイズ可能な配列を含み、標識されたオリゴヌクレオチドはステムオリゴヌクレオチドと直接ハイブリダイズ可能な配列を含む。

【0012】

さらなる他の態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(A)サンプルと、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)検体結合オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイ 40  
ブリダイズ可能な配列、及び(b)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含み；(ii)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドが(a)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位、及び(b)検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含み；(iii)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分、及び核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは、必ずしも必要ではない非核酸物質)を含む第2部分を含み；(B)工程(A)の複合体を検出又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。

【0013】

一態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供す 50

るものであり、該方法は；(A)サンプルと、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを、検体、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列、及び(b)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位を含み；(ii)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分、及び核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは、必ずしも必要ではない非核酸物質)を含む第2部分を含み；(B)工程(A)の複合体を検出又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。

#### 【0014】

一態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(A)サンプルと、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドを、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)検体結合オリゴヌクレオチドが、(a)検体とハイブリダイズ可能な配列、及び(b)ステムオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含み；(ii)直鎖状ステムオリゴヌクレオチドが(a)検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列、及び(b)標識されたオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列を含み；(iii)標識されたオリゴヌクレオチドが(a)ステムオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列、及び(b)検出可能なシグナルを直接又は間接的に発生可能な標識を含み；(iv)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な核酸配列を含み、さらに検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み；(B)工程(A)の複合体を検出又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。一実施態様において、標識されたオリゴヌクレオチドは直鎖状オリゴヌクレオチドである。いくつかの実施態様において、標識されたオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位を含む直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドである。一実施態様において、直鎖状ステムオリゴヌクレオチドは標識されたオリゴヌクレオチドと直接ハイブリダイズ可能な配列を含み、標識されたオリゴヌクレオチドはステムオリゴヌクレ

10

20

30

#### 【0015】

一態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(A)サンプルと、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)検体結合オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列、及び(b)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含み；(ii)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドが(a)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位、及び(b)検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含み；(iii)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な核酸配列を含み、さらに検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み；(B)工程(A)の複合体を検出又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。

40

#### 【0016】

一態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(A)サンプルと、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを、検体、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)直鎖状の検体結合標識オ

50

リゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列、及び(b)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位を含み；(i i)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な核酸配列を含み、さらに検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み；(B)工程(A)の複合体を検出又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。

**【0017】**

他の態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(A)サンプルと、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及びステムオリゴヌクレオチドを、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、捕捉ポリマー及び直鎖状ステムオリゴヌクレオチドを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)検体結合オリゴヌクレオチドが、(a)検体とハイブリダイズ可能な配列、及び(b)ステムオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含み；(i i)ステムオリゴヌクレオチドが(a)検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列、及び(b)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列を含み；(i i i)標識されたオリゴヌクレオチドが(a)ステムオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列、及び(b)検出可能なシグナルを直接又は間接的に発生可能な標識を含み；(i v)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分を含み、該第1部分が検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み、さらに該捕捉ポリマーが核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは、必ずしも必要ではない非核酸物質)を含む第2部分も含んでおり；(B)工程(A)の複合体を検出又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。一実施態様では、標識されたオリゴヌクレオチドは直鎖状オリゴヌクレオチドである。いくつかの実施態様において、標識されたオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位を含む直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドである。一実施態様では、直鎖状ステムオリゴヌクレオチドは標識されたオリゴヌクレオチドと直接ハイブリダイズ可能な配列を含み、標識されたオリゴヌクレオチドはステムオリゴヌクレオチドと直接ハイブリダイズ可能な配列を含む。

**【0018】**

一態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(A)サンプルと、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)検体結合オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列、及び(b)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含み；(i i)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドが(a)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位、及び(b)検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含み；(i i i)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分を含み、該第1部分が検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み、さらに該捕捉ポリマーが核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは、必ずしも必要ではない非核酸物質)を含む第2部分も含んでおり；(B)工程(A)の複合体を検出又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。

**【0019】**

さらなる他の態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(A)サンプルと、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを、検体、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで：(i)直鎖状の検体

結合標識オリゴヌクレオチドが(a)検体とハイブリダイズ可能な配列、及び(b)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位を含み；(i i)捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分を含み、該第1部分が検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み、さらに該捕捉ポリマーが核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは、必ずしも必要ではない非核酸物質)を含む第2部分も含んでおり；(B)工程(A)の複合体を検出又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。

#### 【0020】

他の態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(A)サンプルと捕捉ポリマーを、検体と捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な配列を含み、該配列が検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含んでおり；(B)工程(A)の複合体を検出又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。検体は直接又は間接的に標識されていてもよい。

10

さらなる他の態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(A)サンプルと捕捉ポリマーを、検体と捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分、及び核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは、必ずしも必要ではない非核酸物質)を含む第2部分を含み；(B)工程(A)の複合体を検出又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。検体は直接又は間接的に標識されていてもよい。

20

#### 【0021】

さらなる他の態様では、本発明はサンプル中の核酸検体を検出し又は定量するための方法を提供するものであり、該方法は；(A)サンプルと捕捉ポリマーを、検体と捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で接触させ、ここで捕捉ポリマーが、検体とハイブリダイズ可能な第1部分を含み、該第1部分が検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み、さらに該捕捉ポリマーが核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは、必ずしも必要ではない非核酸物質)を含む第2部分も含んでおり；(B)工程(A)の複合体を検出又は定量し；工程(A)の複合体の検出又は定量により、サンプル中の核酸検体の有無又は量を示すことを含む。検体は直接又は間接的に標識されていてもよい。

30

#### 【0022】

ここに記載した方法のいくつかの実施態様では、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの2つのタンDEM型標識単位は、少なくとも約1、3又は5のヌクレオチドだけ離間している。いくつかの実施態様では、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの2つのタンDEM型標識単位は、約1~12のヌクレオチドだけ離間している。ある実施態様において、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの2つのタンDEM型標識単位は、約3~約10のヌクレオチドだけ離間している。いくつかの実施態様では、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの2つのタンDEM型標識単位は、約5~約8のヌクレオチドだけ離間している。本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの実施態様において、標識は直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドに共有結合している。

40

#### 【0023】

検出可能なシグナルを直接又は間接的に発生可能な任意の多様な標識が使用されてもよい。一実施態様において、標識されたオリゴヌクレオチド上の標識は、抗原、特異的結合対のメンバー、蛍光染料、レポーター-クエンチャー対のメンバーからなる群から選択される。いくつかの実施態様において、抗原標識は、ジゴキシゲニン、ビオチン及びフルオレセインイソチオシアナートからなる群から選択される。いくつかの実施態様において、特異的結合対標識は、レセプター-リガンド対及び酵素-基質対からなる群から選択される

50

。いくつかの実施態様において、蛍光染料標識はフルオレセインイソチオシナート、ローダミン又はテキサスレッド(Texas Red)である。いくつかの実施態様において、レポーター-クエンチャー対は、染料、又は蛍光共鳴エネルギー移動が可能な染料を含む。

**【0024】**

標識されたオリゴヌクレオチドは、標識の種類に適した任意の手段により検出可能である。よって、いくつかの実施態様では、標識されたオリゴヌクレオチド(例えば、本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド)は、標識されたオリゴヌクレオチドの標識に結合する化合物と、標識されたオリゴヌクレオチド(本発明の方法において予期されるような、検体と他のオリゴヌクレオチド/ポリマーを含有する複合体に、一般的に存在するもの)とを接触させることにより検出され、ここで該化合物は検出可能なシグナルを直接又は間接的に発生可能である。

10

**【0025】**

本発明の方法において、検体とハイブリダイズ可能な検体結合オリゴヌクレオチドの配列は、オリゴヌクレオチドと検体との間に、レセプター条件下でハイブリダイゼーションを生じ得る限りは、ハイブリダイズ可能な検体の配列に対して不完全に相補的であっても、又はハイブリダイズ可能な検体の配列に対して完全に相補的であってもよい。よって、いくつかの実施態様において、その配列は、ハイブリダイズ可能な検体に対して、少なくとも50%、少なくとも約60%、少なくとも約75%、少なくとも約85%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%(すなわち完全)に相補的である。

20

**【0026】**

本発明の方法に使用される捕捉ポリマーは、任意の多様な形態で提供されてよい。いくつかの実施態様において、捕捉ポリマーはアレイとして、例えばマイクロウェルプレート(例えば、96-ウェル又は384-ウェルプレート)上にて提供される。いくつかの実施態様において、捕捉ポリマーは、ガラス又はプラスチックスライド等の上での、マイクロアレイとして提供される。

**【0027】**

本発明の方法のいくつかの実施態様では、検体とハイブリダイズ可能な第1部分と、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質を含む第2部分とを含む捕捉ポリマーが使用され、捕捉ポリマーの第2部分は、第1部分以外の捕捉ポリマーの実質的全長を含む。いくつかの実施態様において、捕捉ポリマーの長さの少なくとも10%は、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質である。ある実施態様において、捕捉ポリマーの長さの少なくとも25%は、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質である。いくつかの実施態様において、捕捉ポリマーの長さの少なくとも40%は、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質である。いくつかの実施態様において、捕捉ポリマーの長さの少なくとも50%は、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質である。他の実施態様において、捕捉ポリマーの長さの約5%~約90%は、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質である。さらなる他の実施態様において、捕捉ポリマーの長さの約10%~約70%は、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質である。一実施態様において、捕捉ポリマーの長さの約20%~約50%は、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質である。

30

40

**【0028】**

捕捉ポリマーが核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質を含む実施態様では、該物質は、当該分野で公知であり、及び/又は反応条件下での検体検出及び定量を実質的に妨害せず、この特徴を有することが経験的に示されている任意の物質であってよい。いくつかの実施態様において、前記物質は非核酸物質である。適切な物質は、例えば化学構造18-O-ジメトキシトリチルヘキサエチレングリコール、1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイトを有するエチレングリコールの形態で提供され得る、不活性炭素を含む。

本発明の方法のいずれにおいても、捕捉ポリマーはスペーサー成分を含んでいてもよい

50

。いくつかの実施態様では、スペーサー成分は少なくとも一のC18スペーサーを含む。他の実施態様では、スペーサー成分は少なくとも3のC18スペーサーを含む。他の実施態様では、スペーサー成分は少なくとも4つC18スペーサーを含む。いくつかの実施態様では、スペーサー成分は約1～約8のC18スペーサーを含む。ある実施態様では、スペーサー成分は約3～約6のC18スペーサーを含む。本発明の方法のいくつかの実施態様では、捕捉ポリマーのスペーサー成分は、ここで記載したように(例えば、先のパラグラフ)、捕捉ポリマーの第2部分の核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質である。

#### 【0029】

ハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含む捕捉ポリマーが使用される本発明の方法の一実施態様では、捕捉ポリマーは少なくとも約3の前記修飾されたヌクレオチドを含む。他の実施態様では、捕捉ポリマーは少なくとも約5の前記修飾されたヌクレオチドを含む。一実施態様では、捕捉ポリマー中のヌクレオチドの全数の少なくとも約10%が、前記修飾されたヌクレオチドである。他の実施態様では、捕捉ポリマー中のヌクレオチドの全数の少なくとも約20%が、前記修飾されたヌクレオチドである。さらなる他の実施態様では、捕捉ポリマー中のヌクレオチドの全数の少なくとも約30%が、前記修飾されたヌクレオチドである。他の実施態様において、捕捉ポリマー中のヌクレオチドの全数の少なくとも約40%が、前記修飾されたヌクレオチドである。さらなる他の実施態様では、捕捉ポリマー中のヌクレオチドの全数の少なくとも約50%が、前記修飾されたヌクレオチドである。一実施態様では、捕捉ポリマー中のヌクレオチドの全数の約10%～約50%が、前記修飾されたヌクレオチドである。

#### 【0030】

捕捉ポリマーがハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含む実施態様では、前記修飾されたヌクレオチドは、反応条件下で検体検出及び定量を実質的に妨害しない、当該分野で既知か、及び/又はこの特徴を有することが経験的に示されている任意のものでありうる。このような修飾されたヌクレオチドは、修飾されたリボヌクレオチド、例えば2'-O-メトキシ-RNA又はその誘導體、ペプチド核酸及びロックされた核酸を含む。

捕捉ポリマーがハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含むいくつかの実施態様では、少なくとも一の修飾されたヌクレオチドは、検体とハイブリダイズ可能な配列の5'領域に位置している。他の実施態様では、少なくとも一の修飾されたヌクレオチドは、検体とハイブリダイズ可能な配列の3'領域に位置している。いくつかの実施態様では、少なくとも一の前記修飾されたヌクレオチドは、検体とハイブリダイズ可能な配列の5'及び3'領域にそれぞれ位置している。

#### 【0031】

本発明の方法の捕捉ポリマーは、例えば半固体状又は固体状の物質でありうる支持体に、直接又は間接的に付着してよい。一実施態様では、捕捉ポリマーは支持体に間接的に付着する。一実施態様では、捕捉ポリマーは、支持体に付着した拡張オリゴヌクレオチド(extender oligonucleotide)とハイブリダイズされる。他の実施態様では、捕捉ポリマーは支持体に直接付着する。

ブロッカーオリゴヌクレオチドも、本発明の方法にまた含まれてもよい。従って、いくつかの実施態様では、本発明の方法はブロッカーオリゴヌクレオチドとサンプルとを接触させることをさらに含み、ここでブロッカーオリゴヌクレオチドは非特異的な結合又はハイブリダイゼーション、例えば検体、オリゴヌクレオチド及び/又は捕捉ポリマーとの間の非特異的な結合又はハイブリダイゼーションを低減する配列を含む。捕捉ポリマーが支持体に間接的に付着する本発明の方法の一実施態様では、反応混合物はブロッカーオリゴヌクレオチドを含む。

#### 【0032】

本発明の方法の種々の工程は、同時に、又は連続的に/絶え間なく一連に実施しなければならないという必要はない。例えば、検出又は定量プロセスを、検体と関連のある成分

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチド(類)及び/又はポリマーとの間の複合体形成点まで実施する一方、複合体(すなわち検体)の検出/定量をその後に実施する。本発明の方法のいくつかの実施態様では、検体は、固体又は半固体支持体上に存在する検体を含有する複合体(例えば、上述した種々の方法における工程(A)又は(a)の複合体)を検出し又は定量することにより、検出又は定量される。本発明の方法のいくつかの実施態様では、本方法は、工程(A)又は(a)の後に、検体を含有する複合体(例えば、上述した種々の方法における工程(A)又は(a)の複合体)(固体又は半固体支持体上に存在しているよいもの)を洗浄し、非結合のサンプル及び/又はハイブリダイゼーションしていないオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを除去することを、さらに含んでいてもよい。

#### 【0033】

本発明の方法は、任意の種々の形態の核酸検体を検出及び定量可能である。例えば、核酸検体は、RNA、DNA、RNA/DNAハイブリッド、及び核酸-タンパク質複合体からなる群から選択される任意の形態であってよい。いくつかの実施態様では、核酸検体は、成長ホルモン、インシュリン様成長因子、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、副甲状腺ホルモン、チロキシン、インシュリン、プロインシュリン、レラキシン、プロレラキシン、糖タンパク質ホルモン、濾胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、黄体化ホルモン(LH)、造血成長因子、小胞内皮成長因子(VEGF)、肝臓成長因子、線維芽成長因子、プロラクチン、胎盤ラクトゲン、腫瘍壊死因子-アルファ、腫瘍壊死因子-ベータ、ミューラー阻害物質、マウス生殖腺刺激ホルモン関連ペプチド、インヒピン、アクチピン、血管内皮成長因子、インテグリン、神経成長因子(NGFs)、NGF-ベータ、血小板成長因子、トランスフォーミング成長因子(TGFs)、TGF-アルファ、TGF-ベータ、インシュリン様成長因子-I、インシュリン様成長因子-II、エリスロポエチン(EPO)、骨誘発因子、インターフェロン類、インターフェロン-アルファ、インターフェロン-ベータ、インターフェロン-ガンマ、コロニー刺激因子(CSFs)、マクロファージ-CSF(M-CSF)、顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF)、顆粒球-CSF(G-CSF)、トロンボポエチン(TPO)、インターロイキン(ILs)、IL-1、IL-1アルファ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、LIF、SCF、ニュールツリン(neurturin)(NTN)、キットリガンド(KL)、HER2、ヒトFc、ヒト重及び軽鎖(定常領域)、KDR、一酸化窒素シンターゼ(NOS)、及びアンジオテンシン変換酵素(ACE)からなる群から選択されるポリペプチドの一部又は全てをコードする配列を含む。検体を含むことが疑われる又は含むことが知られているサンプルは、多様な形態の任意の一つ、及び多様な供給源の任意の一つであってよい。一実施態様では、サンプルは血液、血清、唾液、尿、精液、脳脊髄液、気管支吸引液、器官組織、細胞溶解物、及び細胞培養培地からなる群から選択される。

#### 【0034】

また本発明は、ここに記載したオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを提供する。これらのオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーは、任意の形態で提供することができる。例えば本発明の捕捉ポリマーは、種々の核酸捕捉アッセイへの使用に適合させることができる。捕捉ポリマーは、例えば簡便にアレイ又はマイクロアレイとして提供することができる。従って、本発明は固体又は半固体支持体に付着した本発明の捕捉ポリマーのアレイ又はマイクロアレイをさらに提供する。いくつかの実施態様では、アレイは96-ウェルプレート上に提供される捕捉ポリマーを含有する。他の実施態様では、アレイは384-ウェルプレート上に提供される捕捉ポリマーを含有する。一実施態様では、マイクロアレイはガラス又はプラスチックスライド上に提供される捕捉ポリマーを含む。アレイ及びマイクロアレイの詳細をここに提供する。

また本発明は、本発明のオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを、単独で又は任意に組合せて含有する組成物、キット及び製造品を提供する。本発明の方法に関連した反応混合物、反応複合体及び生成物もさらに提供される。これらの組成物、キット及び製造品の詳細をここに提供する。

10

20

30

40

50

## 【0035】

(発明の実施の形態)

本発明は核酸検体を検出し定量するための方法及び組成物を提供する。本方法は、一般に、検体ハイブリダイゼーションの特異性と検体検出の感度を改善することにより、検体の検出及び定量のノイズ対シグナル比を個々に又は組合せて増加させる捕捉ポリマー及び/又は修飾されたシグナル伝達オリゴヌクレオチドを使用することを含む。本発明の方法の成分の設計は、(大なるレベルのノイズのバックグラウンドを越えるようにシグナルを有意に高める必要があるため)複合体である成分に依存する従来の方法とは異なり、少なくとも同等の検体検出/定量特異性及び感度を提供しながら際だって単純である。これらの方法は、一般には方法、より詳細には成分オリゴヌクレオチドの単純な特徴のため、開発及び使用が容易であるといったさらなる利点を有する(例えば、標識されたノシグナル伝達オリゴヌクレオチドの単純な線形の設計に見られるように、所望され又は必要とされる場合に、拡張オリゴヌクレオチドを通してよりも、むしろ支持体に捕捉ポリマーを直接付着させる能力)。さらに、本発明により、マルチ-プローブ直接捕捉系及びマルチ-プローブシグナル伝達系を組合せた任意のハイブリダイゼーションアッセイを素早く開発することが可能になる。

10

## 【0036】

概要をまとめると、本発明の作用は次の通りである：核酸検体を含んでいることが疑われるサンプルを、検体結合オリゴヌクレオチドと捕捉ポリマーを検体にハイブリダイズさせるのに適した条件下で、検体結合オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマー(ここでさらに詳細に記載するもの)と接触させる。本発明は、本発明の方法に使用可能な種々の態様の捕捉ポリマーを提供する。一般的に、捕捉ポリマーは支持体(固体又は半固体物質であってもよい)に直接又は間接的に付着可能であり、これによって捕捉ポリマーを含む任意の複合体が固定される。これらの分子はハイブリダイズされると、当該分野で知られている様々な方法を使用して検出することができる複合体が得られ、その方法のいくつかはここで記載される。本発明の一態様では、複合体の生成は、本発明の方法に、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドを含めることで検出される。直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド(これは以下にさらに詳細に記載する)は、検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能である。よって、捕捉ポリマーが付着した支持体上での直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの検出(例えば、オリゴヌクレオチド上に存在する標識の検出による)は、検体を含む複合体の存在を示し、これが順にサンプル中の検体の存在を示す。当該分野で知られている技術を使用することで、検出される直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの量を、例えば、既知量の検体を含む参照サンプルと比較することにより、定量することができる。

20

30

## 【0037】

一態様では、本発明は固体又は半固体支持体に直接又は間接的に付着した本発明の捕捉ポリマーを含むマイクロアレイを提供する。いくつかの実施態様では、本発明のマイクロアレイは、マイクロアレイ上の各離間スポットに、捕捉ポリマーの単一の種(すなわち、捕捉ポリマーが同一又は実質的に同一の検体結合核酸配列を含む)を含む。他の実施態様では、本発明のマイクロアレイは、マイクロアレイ上の各々離間したスポットに、複数(すなわち、2又はそれ以上)の種の捕捉ポリマーを含む(すなわち、捕捉ポリマーは異なる検体結合核酸配列を含む)。

40

## 【0038】

また本発明の方法は、核酸検体のマルチプレックス分析にも有用である。すなわち、複数の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド(各種のオリゴヌクレオチドが異なる標識を有するもの)を使用することにより、様々な標的核酸配列が、単一の反応混合物中に検出され得る。様々な標的配列は、核酸の単一片の一部であってもよいし、又は単一のテスト用サンプル中存在し得る、種々の核酸標的の特異的な配列を表してもよい。例えば、本発明の方法は、単一の反応混合物中に、単一の生物学的サンプル中の種々の病原体、又は単一のゲノムDNAサンプル中の種々の多形性部位の存在を検出可能である。

50

## 【 0 0 3 9 】

本発明の方法は、そのいくつかはここで記載されている当業者にとって明らかな多くの用途に使用可能である。例えば、それらは、特定の遺伝子検体の発現の検出又は定量、さらには関心ある核酸変異体(例えば一塩基変異多型)の検出といった診断用途に使用することができる。本方法の種々の成分が柔軟性があり単純であるため、本発明の方法は、マイクロアレイ形態での自動化及び適合化に特に適切であり、これはついで大きな高スループットポテンシャルをもたらす。

## 【 0 0 4 0 】

## 一般的技術

特に示さない限り、本発明の実施は、当業者の技量の範囲内にある、分子生物学(組換え技術を含む)、細菌学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の常套的な技術を用いてなされる。このような技術は、文献、例えば「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第2版(Sambrookら, 1989); 「Oligonucleotide Synthesis」(M. J. Gait編, 1984); 「Animal Cell Culture」(R. I. Freshney, ed., 1987); 「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc.); 「Current Protocols in Molecular Biology」(F. M. Ausubelら編, 1987, 及び定期最新版); 「PCR: The Polymerase Chain Reaction」(Mullisら編, 1994); 「A Practical Guide to Molecular Cloning」(Perbal Bernard V., 1988)に十分に説明されている。

本発明に記載され又は使用されているオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド及びポリマーは、当該分野で知られている標準的な技術を使用して生産することができる。

## 【 0 0 4 1 】

## 定義

ここで使用される「検体」は、本発明の方法を使用しての検出及び/又は定量が望まれている核酸配列を意味する。

ここで交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを意味し、限定されるものではないが、DNA及びRNAが含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド又は塩基、及び/又はそれらの類似体(アナログ)、又はDNAもしくはRNAポリメラーゼにより、もしくは合成反応によりポリマー中に取り込み可能な任意の基質とすることができる。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含み得る。存在するならば、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの組み立ての前又は後になされ得る。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分により中断されてもよい。ポリヌクレオチドは合成後に、例えば標識との結合により、さらに修飾されてもよい。他のタイプの修飾には、例えば「キャップ(caps)」、類似体との自然に生じたヌクレオチドの-又は複数の置換、ヌクレオチド間修飾、例えば非荷電連結(例えばホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホアミダート、カルバマート等)及び荷電連結(ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート等)を有するもの、ペンダント部分、例えばタンパク質(例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ply-L-リジン等)を含むもの、インターカレータ(intercalators)を有するもの(例えばアクリジン、ソラレン等)、キレート剤を含むもの(例えば金属、放射性金属、ホウ素、酸化的金属等)、アルキル化剤を含むもの、修飾された連結を含むもの(例えばアルファアノマー核酸等)、並びにポリヌクレオチド(類)の未修飾形態が含まれる。さらに、糖類中に通常存在する任意のヒドロキシル基は、例えばホスホナート基、ホスファート基で置き換えられてもよく、標準的な保護基で保護されてもよく、又は付加的なヌクレオチドへのさらなる連結を調製するように活性化されてもよく、もしくは固体又は半固体支持体に結合していてもよい。5'及び3'末端のOHはホスホリル化可能であり、又は1~20の炭素原子を有するアミン又は有機キャップ基部分で置換することもできる。また他のヒドロキシルは標準的な保護基に誘導体化されてもよい。さらにポリヌクレオチドは当該分野で一般的に知られているリボース又はデオキシリボース糖類の類似形態のものをさらに含み、これらには例えば2'-O-メチル-, 2'-O-アリル-, 2'-フルオロ又は2'-アジド-リボース、炭素環

10

20

30

40

50

式糖の類似体、アルファ-アノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロース類又はリキソース類、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘブツロース、非環式類似体、及び非塩基性ヌクレオシド類似体、例えばメチルリボシドが含まれる。一又は複数のホスホジエステル連結は代替の連結基で置き換えてもよい。これらの代替の連結基には、限定されるものではないが、ホスファートが  $P(O)S$  (「チオアート」)、 $P(S)S$  (「ジチオアート」)、 $(O)NR_2$  (「アミダート」)、 $P(O)R$ 、 $P(O)OR'$ 、 $CO$ 又は $CH_2$  (「ホルムアセタール」)と置き換えられた実施態様のものが含まれ、ここでそれぞれの  $R$  及び  $R'$  は独立して、 $H$  又は、エーテル(-O-)結合を含んでいてもよい置換もしくは未置換のアルキル(1-20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル又はアラルジル(araldyl)である。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。先の記述は、RNA 及び DNA を含むここで引用される全てのポリヌクレオチドに適用される。このパラグラフ及び本明細書の他の箇所に記載されたポリヌクレオチドの形態は、それらが本発明の方法による検体の検出又は定量を実質的に阻害しない限りは適切であることは、当業者にとって明白である。

10

## 【0042】

ここで使用される場合、「オリゴヌクレオチド」とは、短く、一般的に単鎖であり、また必ずしもそうではないが、一般的に約200未満のヌクレオチド長さの、一般的に合成のポリヌクレオチドを意味する。「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」なる用語は、相互に排他的なものではない。ポリヌクレオチドについての上述した記載はオリゴヌクレオチドと等しく、十分に適用可能である。

20

## 【0043】

ここで使用される場合、「ブロッカーオリゴヌクレオチド」とは、反応混合物の成分中で、反応混合物中に存在する場合に非特異的ハイブリダイゼーションを低減させるオリゴヌクレオチドを意味する。好ましくは、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、反応混合物中の他の成分(例えば、捕捉ポリマー、検体結合オリゴヌクレオチド、ステムオリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、リンカー/拡張オリゴヌクレオチド)の何れもハイブリダイズ可能であることを意図していない検体の配列とハイブリダイズ可能な配列を含む。例えば、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、捕捉ポリマー及び/又は検体結合オリゴヌクレオチドが、特に捕捉ポリマーが間接的に支持体に付着している場合(すなわち、リンカーオリゴヌクレオチド/支持体に直接付着するポリマーとハイブリダイズする)、ハイブリダイズ可能であることを意図していない検体中の配列とハイブリダイズさせるために使用することができる。特に捕捉ポリマーが支持体に直接付着していない場合、検体は、しばしばリンカー(拡張)オリゴヌクレオチドをと非特異的に結合可能である。ブロッカーオリゴヌクレオチドを使用すると、例えばこのような非特異的結合に関与し得る検体の配列と結合することにより、バックグラウンドノイズを低減させうる。

30

## 【0044】

ここで使用される場合、「ハイブリダイズ可能な配列」及びその変異体なる語句は、その融点( $T_m$ )、標的配列との塩基相補性、並びに反応条件に依存して、可変強度の二本鎖を形成する配列の能力を意味する。この語句の意味は当業者に知られている。

ここで使用される場合、「実質的にハイブリダイズ可能ではない」なる語句は、配列又は物質が他の核酸配列と二本鎖を形成する能力を欠くことを意味する。例えば一般的に、配列又は物質は、特定の反応条件下で、標識の検出前に、全複合体の好ましくは約5%、好ましくは約3%、好ましくは約1%、好ましくは約0.5%未満が、他の核酸配列と、他の核酸配列と実質的にハイブリダイズ可能ではない配列又は物質を含む場合、他の核酸配列と実質的にハイブリダイズ可能ではない。一般的に、第1及び第2の配列を含む二本鎖が、検出反応の温度条件より好ましくは約10 未満上であるか、又は該温度より5 未満上である融点を有するならば、第1の配列は第2の配列とハイブリダイズ可能ではない。

40

## 【0045】

ここで使用される場合、「非特異的ハイブリダイゼーション」とは、オリゴヌクレオチ

50

ドがハイブリダイズ可能に設計された配列とは異なる核酸配列に対するオリゴヌクレオチドの相互作用を意味する。非特異的ハイブリダイゼーションは、検体の存在又は不存在に相関することなく、アッセイシグナルの増加又は減少により、間違っただ結果を惹起するおそれがある。

ここで使用される場合、「非特異的結合」とは、特異的ハイブリダイゼーションに関与しない他の分子(例えば固体又は半固体支持体)に対する分子(例えば核酸又はペプチド構造体)の直接又は間接的な結合を意味する。非特異的結合は、検体の存在又は不存在に相関することなく、アッセイシグナルの増加又は減少により、間違っただ結果を惹起するおそれがある。当業者には明らかである所定の文脈においては、「非特異的結合」と「非特異的ハイブリダイゼーション」なる語句は互いに交換可能である。

10

**【0046】**

検体又は非検体の配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、他の核酸分子(例えば、干渉するおそれのある非検体)の配列のヌクレオチドと同一である、検体中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegaAlign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができ。しかしながら、ここでの目的のためには、%核酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2(Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA)を用いて得られる。

20

**【0047】**

「阻害する」とは、標準物と比較した場合に、活性、機能、及び/又は量を低減又は減少させることである。

「複合体」は、成分の集合体である。複合体は安定していてもいなくてもよく、また直接又は間接的に検出されうる。例えば、ここに記載されているように、反応のある種の成分と反応生成物の種類が与えられると、複合体の存在を推察することができる。

ここで交換可能に使用される、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの「部分」又は「領域」は、2又はそれ以上の塩基の連続した配列のことである。他の実施態様では、領域又は部分は少なくとも3、5、10、15、20、25の連続ヌクレオチドの任意のものである。

30

**【0048】**

一般的に「3'」なる用語は、同一のポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドにおいて、他の領域又は位置から3'(下流)のポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの領域又は位置を意味する。

一般的に「5'」なる用語は、同一のポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドにおいて、他の領域又は位置から5'(上流)のポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの領域又は位置を意味する。

40

**【0049】**

「反応混合物」は、適切な条件下、反応して複合体(中間生成物であってよい)及び/又は生成物(群)を生成する成分の集合である。

「A」、「an」及び「the」等は特に明記しない限り複数形を含む。

「含有する」は含むを意味する。

**【0050】**

ハイブリダイゼーション、検出、複合体生成等の事象の発生を「可能にする」条件又は事象の発生に「適切である」条件、すなわち「適切な」条件とは、このような事象の発生を妨げない条件のことである。よって、これらの条件は、事象を可能にし、高め、容易にし、及び/又は誘導する。当該分野で既知であり、ここに記載されるこのような条件は、

50

例えばヌクレオチド配列の種類、温度、及びバッファー条件に依存する。またこれらの条件は、ハイブリダイゼーション、検出又は定量等、何の事象が所望されるのかにも依存する。

ここで交換可能に使用される場合、「マイクロアレイ」及び「アレイ」は、中央位置にヌクレオチド配列の収集体を配列させたものを意味する。アレイは固体基体、例えばガラス又はプラスチックスライド、又はマイクロタイプレート(例えば96、384、1536-ウェルプレート)、又は半固体基体、例えばニトロセルロース膜上に存在可能である。ヌクレオチド配列はDNA、RNA、又はそれらの任意の置換体とすることができる。

「検出」には、直接及び間接的検出を含む任意の検出手段が含まれる。検出技術は当該分野で知られており、そのいくつかをここに記載する。 10

#### 【0051】

##### 本発明の方法

次は、本発明の検出及び定量方法の例である。上の一般的記述が与えられると、種々の他の実施態様を実施することができることが理解される。また、検出と定量は別個の最終目的でありうるということが理解される。例えば、ある場合には、実施者は、検体を定量しないで、サンプル中の検体の有無を検出することのみを所望しているかもしれない。本発明の方法はこれらの場合のいずれかにおいて使用することができる。

#### 【0052】

##### ステムオリゴヌクレオチドを使用する検出及び定量方法 20

一態様では、本発明は、ステムオリゴヌクレオチドが、検体、ステムオリゴヌクレオチド(好ましくは直鎖状)、捕捉ポリマー及び検体結合オリゴヌクレオチドを含有する複合体に、直接又は間接的にシグナル伝達系を連結させる検出及び定量方法を提供する。ステムオリゴヌクレオチドを介し、複合体に直接又は間接的シグナル伝達システムを結合させることで、複合体の生成を検出する手段が提供される。複合体の生成はサンプル中での検体の存在(及び量)を示すものである。図1にその一例が示された一実施態様では、検体結合オリゴヌクレオチドは、(a)検体とハイブリダイズ可能な配列、及び(b)ステムオリゴヌクレオチド(好ましくは直鎖状オリゴヌクレオチド)と直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列を含む。ステムオリゴヌクレオチド(好ましくは直鎖状)は、(a)検体結合オリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列、及び(b)標識されたオリゴ 30  
ヌクレオチド(例えば、本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド)と直接又は間接的にハイブリダイゼーションな配列を含む。本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは、(a)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位、及び(b)ステムオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列を含む。捕捉ポリマーは、検体と直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列を含む。核酸検体を含むことが疑われるサンプルは、検体がサンプル中に存在するならば、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、ステムオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で、検体結合オリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド、ステムオリゴヌクレオチド(好ましくは直鎖状)、及び捕捉ポリマーと接触させられる。一般的に、捕捉ポリマーは固体又は半固体物質からなる支持体に 40  
、直接又は間接的に付着させられる。支持体への捕捉ポリマーの付着は、関心ある複合体が生成される反応の前、反応中又は反応後になされ得る。生成される関心ある複合体は、未結合のサンプル及び/又は成分(すなわち、検体結合オリゴヌクレオチド、ステムオリゴヌクレオチド、標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマー)が洗い流された場合も、支持体表面に残存していよう。

#### 【0053】

支持体上に残存する複合体は、任意の多くの方法で検出することができる。好ましくは、複合体は、標識されたオリゴヌクレオチド上の標識と結合する標識-検出化合物と接触させるが、ここで標識-検出化合物は、検出可能なシグナルを直接又は間接的に発生することができる。一例では、標識は、例えばレセプター-リガンド対又は抗体-抗原対のよう 50

な特異的な結合対のメンバーでありうる。例えば、標識が抗原(例えばジゴキシゲニン)である場合、抗原に対して特異的な抗体を使用することができる。抗体は、例えば抗体に付着したシグナル生成部分を介して、それ自体で検出可能なシグナルを発することができる。また抗体は、例えばそこに付着した酵素により、間接的に検出可能なシグナルを発することができる。その酵素は基質と接触したときに反応を触媒して検出可能なシグナルを生成することができる。適切な酵素には、限定されるものではないが、lacZ、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼが含まれる。他の特異的な結合対は、例えばビオチン、チロキシン及びコルチゾール等の天然の抗リガンドを有するリガンド類のように、当該分野で知られている。種々のシグナル発生部分及び組合せは、当該分野でよく知られており、そのいくつかはここに記載する。シグナルの増幅が所望されない例においては、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド上の標識は、標識-検出化合物とまず接触することなく、検出可能なシグナルを発生可能な部分とすることができる。このような標識の例には、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、テキサスレッド、放射性同位体(例えば<sup>3</sup>H、<sup>35</sup>S、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、<sup>125</sup>I、<sup>14</sup>C)及び比色分析標識(例えばコロイド状の金、有色ガラス又はプラスチック(例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等)ビーズ類)が含まれる。

10

**【0054】**

本発明の方法に使用される捕捉ポリマーは固体又は半固体支持体に直接又は間接的に付着し得る。固体物質には、例えばガラス及びプラスチックが含まれる。半固体物質には、例えばゼラチン化合物及びニトロセルロース膜が含まれる。捕捉ポリマーが固体又は半固体支持体に直接付着している場合、必ずというわけではないが、付着は好ましくは共有結合による。ポリマー、例えばポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの固体又は半固体物質への付着方法は、当該分野でよく知られている。例えば、EXIQON(Vedbaek Denmark)からのDNAイモビライザー<sup>T M</sup>として商業的に入手可能なキノン光化学物質を使用することができる。キノン光化学物質は、DNAベースの捕捉ポリマーを、プラスチック等の固体ポリマー物質に共有的に付着させるのに特に有用である。他の例では、ビオチン化した捕捉ポリマーを、ストレプトアビジンで被覆されたプラスチック又はガラス表面(例えば、Pierceから商業的に入手可能なプレート(カタログ番号15118))に付着させることができる。また捕捉ポリマーは、支持体に直接付着する拡張オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを介して、支持体に間接的に付着してもよい。捕捉ポリマーの間接的付着は、例えば米国特許第5635352号に記載されているように、当該分野においてよく知られている技術である。

20

30

**【0055】**

本発明の方法は、異なる配列を含有する二又はそれ以上の検体が単一の反応混合物中で検出又は定量される検体のマルチプレックス分析に使用することができる。これらの実施態様においては、複数種の検体結合オリゴヌクレオチド及び標識されたオリゴヌクレオチドが使用される。複数種の検体結合オリゴヌクレオチドは、二又はそれ以上の種の検体結合オリゴヌクレオチドを含んでおり、それぞれの種は、(a)特定の検体と特異的にハイブリダイゼーションする配列、及び(b)一種のステムオリゴヌクレオチドと、直接又は間接的にハイブリダイゼーションする配列を含む。複数種の標識されたオリゴヌクレオチドは、二又はそれ以上の種の標識されたオリゴヌクレオチドを含んでおり、それぞれは(その複数のものの他の種の標識されたオリゴヌクレオチドに対して)異なる標識を含有する。その複数のものにおけるそれぞれの種の標識されたオリゴヌクレオチドは、検体結合オリゴヌクレオチドの種に特異的なステムオリゴヌクレオチドの種と、直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列をさらに含む。よって、それぞれの種の標識されたオリゴヌクレオチドは、一種の検体結合オリゴヌクレオチド(及び、よって一特定の検体)に対応する。よって、特定の種の標識されたオリゴヌクレオチドと結合した標識の検出は、対応する検体の存在を示す。

40

**【0056】**

単一の検体は、単一の反応混合物中の一種の捕捉ポリマー又は複数の捕捉ポリマーを利

50

用する本発明の方法により検出可能である。一種の捕捉ポリマーは、検体とハイブリダイズ可能な特定の核酸配列を含有する捕捉ポリマーである。よって、複数種の捕捉ポリマーとは、二又はそれ以上の種の捕捉ポリマーを意味し、それぞれは異なる検体結合核酸配列を含む。いくつかの実施態様では、複数の捕捉ポリマーのそれぞれの種は異なる検体結合核酸配列を含み、それぞれの検体結合配列は、同一の検体とハイブリダイズ可能である。これらの実施態様では、単一の検体は、単一の反応混合物中に、好ましくは少なくとも約1種、より好ましくは少なくとも約3種、さらに好ましくは少なくとも約5種、またさらに好ましくは少なくとも約6種の捕捉ポリマーを使用して、検出又は定量されうる。いくつかの実施態様では、単一の検体は、単一の反応混合物中に、好ましくは約1～約10種、より好ましくは約3～約8種、さらに好ましくは約5～約7種の捕捉ポリマーを使用して検出又は定量される。他の実施態様では、複数の捕捉ポリマーのそれぞれの種は異なる検体結合核酸配列を含み、それぞれの検体結合配列は、異なる検体(すなわち、非同一の核酸配列を有する二又はそれ以上の検体)とハイブリダイズ可能である。これらの実施態様は、例えば検体のマルチプレックス検出又は定量において特に有用である。

10

20

30

40

50

**【0057】**

本発明の方法は広範囲の濃度でサンプル中に存在する検体を検出及び定量可能である。いくつかの実施態様では、本発明の方法で検出及び定量可能な検体濃度は、好ましくは少なくとも約0.01 pg/mL、好ましくは少なくとも約70 pg/mL、好ましくは少なくとも約200 pg/mL、好ましくは少なくとも約2000 pg/mL、好ましくは少なくとも約5000 pg/mL、好ましくは少なくとも約20000 pg/mL、及び好ましくは少なくとも約50000 pg/mLである。他の実施態様では、本発明の方法で検出及び定量可能な検体濃度は、好ましくは約50000 pg/mL以下、好ましくは約20000 pg/mL以下、好ましくは約5000 pg/mL以下、好ましくは約2000 pg/mL以下、好ましくは約70 pg/mL以下、及び好ましくは約0.01 pg/mL以下である。さらなる他の実施態様では、本発明の方法で定量及び検出可能な検出濃度は、好ましくは約0.01～約100000 pg/mL、好ましくは約50～約75000 pg/mL、好ましくは約200～約50000 pg/mL、好ましくは約1000～約35000 pg/mL、及び好ましくは約2000～約20000 pg/mLである。

**【0058】**

本発明の方法は、核酸検体の検出の高度の特異性をもたらす。いくつかの実施態様では、検体は、非検体核酸分子が反応混合物中に存在している場合、検体に対して高度なヌクレオチド配列同一性を有する非検体核酸分子と、好ましくは約5%未満、好ましくは約2%未満、好ましくは約1%未満、好ましくは約0.5%未満、及び好ましくは約0.1%の干渉度で検出される。干渉パーセントは当該分野で知られている技術により測定され得る。例えば、検体に対し、配列において高度に相同な(同一ではない)核酸は、検体の検出に対して特異的なオリゴヌクレオチドを含むアッセイを使用して定量することができる。相同な核酸が検体に特異的なオリゴヌクレオチドを用いて「検出される」場合、検体に対するものと同様の反応条件下で得られるシグナルのパーセンテージとして表される場合に得られる「シグナル」の量が、干渉パーセンテージを構成する。いくつかの実施態様では、高度なヌクレオチド配列同一性を有する非検体核酸分子は、検体に対し、好ましくは85%以下、好ましくは80%以下、好ましくは70%以下、好ましくは60%以下の配列同一性を有する。ある実施態様では、高度なヌクレオチド配列同一性を有する非検体核酸分子は、検体に対して、好ましくは60%以上、好ましくは70%以上、好ましくは80%以上、好ましくは82%以上、好ましくは90%以上の配列同一性を有する。他の実施態様では、高度なヌクレオチド配列相同性を有する非検体核酸分子は、検体に対して、好ましくは約50%～約90%、好ましくは約60%～約85%、好ましくは約70%～約85%の配列同一性を有する。

**【0059】**

ステムオリゴヌクレオチドを使用せず直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドを使用する

## 検出及び定量方法

一態様では、本発明は、本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドが、検体、捕捉ポリマー及び検体結合オリゴヌクレオチドの複合体生成を検出する手段を提供するために使用される検出及び定量方法を提供する。図2にその一例が示された一実施態様では、検体結合オリゴヌクレオチドは、(a)検体とハイブリダイズ可能な配列、及び(b)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列を含む。この実施態様では、本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは、(a)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位、及び(b)検体結合オリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列を含む。捕捉ポリマーは、検体と直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列を含む。核酸検体を含むことが疑われるサンプルは、検体がサンプル中に存在するならば、検体、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド、及び捕捉ポリマーと接触させる。一般的に、捕捉ポリマーは固体又は半固体物質からなる支持体に、直接又は間接的に付着している。支持体への捕捉ポリマーの付着は、関心ある複合体が生成される反応の前、反応中又は反応後になされ得る。生成される関心ある複合体は、未結合のサンプル及び/又は成分(すなわち、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマー)が洗い流された場合も、支持体表面に残存している。

10

## 【0060】

支持体に残存している複合体は、多くの方法の任意のもので検出することができる。好ましくは、複合体は、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド上の標識と結合する標識-検出化合物と接触せしめ、ここで標識-検出化合物は、検出可能なシグナルを直接又は間接的に発生することができる。一例では、標識は、例えばレセプター-リガンド対又は抗体-抗原対のような特異的な結合対のメンバーであってよい。例えば、標識が抗原(例えばジゴキシゲニン)であるならば、抗原に対する抗体特異性を使用することができる。抗体は、例えば抗体に付着したシグナル生成部分を介して、それ自体で検出可能なシグナルを発することができる。また抗体は、例えばそこに付着した酵素により、間接的に検出可能なシグナルを発生することができ、ここで該酵素は検出可能なシグナルを生成する基質と接触したときに、反応を触媒可能である。適切な酵素には、限定されるものではないが、lacZ、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼが含まれる。他の特異的な結合対は、例えばビオチン、チロキシン及びコルチゾール等の天然の抗リガンドを有するリガンド類のように、当該分野で公知のものである。種々のシグナル発生部分及び組合せは、当該分野でよく知られており、そのいくつかをここに記載する。シグナルの増幅を所望しない例においては、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの標識は、標識-検出化合物とまず接触することなく、検出可能なシグナルを発生可能な部分とすることができる。このような標識の例には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、テキサスレッド、放射性同位体(例えば $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ )及び比色分析標識(例えばコロイド状の金、有色ガラス又はプラスチック(例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等)ビーズ類)が含まれる。

20

30

40

## 【0061】

本発明の方法に使用される捕捉ポリマーは固体又は半固体支持体に直接又は間接的に付着し得る。固体状物質には、例えばガラス及びプラスチックが含まれる。半固体状物質には、例えばゼラチン化合物及びニトロセルロース膜が含まれる。捕捉ポリマーが固体又は半固体支持体に直接付着している場合、必ずというわけではないが、付着は好ましくは共有結合による。ポリマー、例えばポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの固体又は半固体物質への付着方法は、当該分野でよく知られている。例えば、EXIQON(Vedbaek Denmark)からのDNAイモビライザー<sup>T M</sup>として商業的に入手可能なキノン光化学物質を使用することができる。キノン光化学物質は、特にDNAベースの捕捉ポリマーを、プラスチック等の固体状ポリマー物質に共有的に付着させるのに有用である。他の例では、ビオ

50

チン化した捕捉ポリマーを、ストレプトアビジンで被覆されたプラスチック又はガラス表面に付着させることができる。また捕捉ポリマーは、支持体に直接付着する拡張オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを介して、支持体に間接的に付着してもよい。捕捉ポリマーの間接的付着は、例えば米国特許第5635352号に記載されているように、当該分野においてよく知られている技術である。

#### 【0062】

本発明の方法は、異なる配列を含む二又はそれ以上の検体が単一の反応混合物中で検出又は定量される、検体のマルチプレックス分析に使用することができる。これらの実施態様では、複数の種の検体結合オリゴヌクレオチド及び直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドが使用される。複数の種の検体結合オリゴヌクレオチドは、二又はそれ以上の種の検体結合オリゴヌクレオチドを含んでおり、それぞれの種は、(a)特定の検体と特異的にハイブリダイゼーションする配列、及び(b)一種の直鎖状で標識化されたオリゴヌクレオチドと、直接又は間接的にハイブリダイゼーションする配列を含む。複数の種の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは、二又はそれ以上の種の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドを含んでおり、それぞれは(複数のものの他の種の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドに対して)異なる標識を含有する。複数のものにおけるそれぞれの種の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは、検体結合オリゴヌクレオチドの種と、直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列をさらに含む。よって、それぞれの種の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは、一種の検体結合オリゴヌクレオチド(よって一特定の検体)に対応する。よって、特定の種の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドと結合した標識の検出は、対応する検体の存在を示す。

10

20

#### 【0063】

単一の検体は、単一の反応混合物中に一種の捕捉ポリマー又は複数の捕捉ポリマーを利用する本発明の方法により検出可能である。一種の捕捉ポリマーは、検体とハイブリダイズ可能な特定の核酸配列を含有する捕捉ポリマーである。よって、複数の捕捉ポリマーとは、二又はそれ以上の種の捕捉ポリマーを意味し、それぞれは異なる検体結合核酸配列を含む。いくつかの実施態様では、複数の捕捉ポリマーのそれぞれの種は異なる検体結合核酸配列を含み、それぞれの検体結合配列は、同一の検体とハイブリダイズ可能である。これらの実施態様では、単一の検体は、単一の反応混合物中に、好ましくは少なくとも約1種、より好ましくは少なくとも約3種、さらに好ましくは少なくとも約5種、またさらに好ましくは少なくとも約6種の捕捉ポリマーを使用して、検出又は定量されてもよい。いくつかの実施態様では、単一の検体は、単一の反応混合物中、好ましくは約1~約10種、より好ましくは約3~約8種、さらに好ましくは約5~約7種の捕捉ポリマーを使用して検出又は定量される。他の実施態様では、複数の捕捉ポリマーのそれぞれの種は異なる検体結合核酸配列を含み、それぞれの検体結合配列は、異なる検体(すなわち、非同一の核酸配列を有する二又はそれ以上の検体)とハイブリダイズ可能である。これらの実施態様は、例えば検体のマルチプレックス検出又は定量において特に有用である。

30

#### 【0064】

本発明の方法は広範囲の濃度でサンプル中に存在する検体を検出及び定量可能である。いくつかの実施態様では、本発明の方法で検出及び定量可能な検体濃度は、好ましくは少なくとも約0.01 pg/mL、好ましくは少なくとも約70 pg/mL、好ましくは少なくとも約200 pg/mL、好ましくは少なくとも約2000 pg/mL、好ましくは少なくとも約5000 pg/mL、好ましくは少なくとも約20000 pg/mL、及び好ましくは少なくとも約50000 pg/mLである。他の実施態様では、本発明の方法で検出及び定量可能な検体濃度は、好ましくは約50000 pg/mL以下、好ましくは約20000 pg/mL以下、好ましくは約5000 pg/mL以下、好ましくは約2000 pg/mL以下、好ましくは約70 pg/mL以下、及び好ましくは約0.01 pg/mL以下である。さらなる他の実施態様では、本発明の方法で定量及び検出可能な検出濃度は、好ましくは約0.01~約100000 pg/mL、好ましくは約50~約75000 pg/mL、好ましくは約200~約500

40

50

00 pg/mL、好ましくは約1000~約35000 pg/mL、及び好ましくは約2000~約20000 pg/mLである。

#### 【0065】

本発明の方法は、核酸検体の検出の高度の特異性をもたらす。いくつかの実施態様では、検体は、非検体核酸分子が反応混合物中に存在している場合、検体に対して高度なヌクレオチド配列同一性を有する非検体核酸分子と、好ましくは約5%未満、好ましくは約2%未満、好ましくは約1%未満、好ましくは約0.5%未満、及び好ましくは約0.1%の干渉度で検出される。いくつかの実施態様では、高度なヌクレオチド配列同一性を有する非検体核酸分子は、検体に対し、好ましくは85%以下、好ましくは80%以下、好ましくは70%以下、好ましくは60%以下の配列同一性を有する。ある実施態様では、高度なヌクレオチド配列同一性を有する非検体核酸分子は、検体に対して好ましくは60%以上、好ましくは70%以上、好ましくは80%以上、好ましくは82%以上、好ましくは90%以上の配列同一性を有する。他の実施態様では、高度なヌクレオチド配列相同性を有する非検体核酸分子は、検体に対して、好ましくは約50%~約90%、好ましくは約60%~約85%、好ましくは約70%~約85%の配列同一性を有する。

10

#### 【0066】

直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドを使用する検出及び定量方法

さらなる他の態様では、本発明は、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドが、検体、捕捉ポリマー及び直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドの複合体生成を検出する手段を提供するために使用される検出及び定量方法を提供する。一例が図3に示される一実施態様では、本発明の直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドは、(a)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上の標識単位、及び(b)検体とハイブリダイズ可能な配列を含む。捕捉ポリマーは、検体と直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列を含む。核酸検体を含むと思われるサンプルは、検体がサンプル中に存在するならば、検体、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを含有する複合体が生成される条件下で、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーと接触させる。一般的に、捕捉ポリマーは、一般に固体又は半固体物質からなる支持体に、直接又は間接的に付着している。支持体への捕捉ポリマーの付着は、関心ある複合体が生成される反応の前、反応中又は反応後になされ得る。生成される関心ある複合体は、未結合のサンプル及び/又は成分(すなわち、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマー)が洗い流された場合も、支持体表面に残存している。

20

30

#### 【0067】

支持体に残存している複合体は、多数の方法の任意のもので検出することができる。好ましくは、複合体は、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド上の標識と結合する標識-検出化合物と接触せしめ、ここで標識-検出化合物は、検出可能なシグナルを直接又は間接的に発生することができる。一例では、標識は、例えばレセプター-リガンド対又は抗体-抗原対のような特異的な結合対のメンバーであってよい。例えば、標識が抗原(例えばジゴキシゲニン)であるならば、抗原に対する抗体特異性を使用することができる。抗体は、例えば抗体に付着したシグナル生成部分を介して、それ自体で検出可能なシグナルを発することができる。また抗体は、例えばそこに付着した酵素により、間接的に検出可能なシグナルを発することができる。ここで該酵素は検出可能なシグナルを生成する基質と接触したときに、反応を触媒可能である。適切な酵素には、限定されるものではないが、lacZ、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼが含まれる。他の特異的な結合対は、例えばビオチン、チロキシン及びコルチゾール等の天然の抗リガンドを有するリガンド類のように、当該分野で公知のものである。種々のシグナル発生部分及び組合せは、当該分野でよく知られており、そのいくつかをここに記載する。シグナルの増幅が所望されない場合には、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの標識は、標識-検出化合物とまず接触することなく、検出可能なシグナルを発生可能な部分とすることができる。このような標識の例には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、テキサスレッド、放射性同位体(例えば<sup>3</sup>H、<sup>35</sup>S、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、<sup>125</sup>I、<sup>14</sup>C)及び比色

40

50

分析標識(例えばコロイド状の金、有色ガラス又はプラスチック(例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等)ビーズ類)が含まれる。

【0068】

本発明の方法に使用される捕捉ポリマーは固体又は半固体支持体に直接(例えば図4を参照)又は間接的に付着し得る。固体状物質には、例えばガラス及びプラスチックが含まれる。半固体状物質には、例えばゼラチン化合物及びニトロセルロース膜が含まれる。捕捉ポリマーが固体又は半固体支持体に直接付着している場合、必ずというわけではないが、付着は好ましくは共有結合による。ポリマー、例えばポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの固体又は半固体物質への付着方法は、当該分野でよく知られている。例えば、EXIQON(Vedbaek Denmark)からのDNAイモビライザー<sup>T M</sup>として商業的に入手可能なキノン光化学物質を使用することができる。キノン光化学物質は、特にDNAベースの捕捉ポリマーを、プラスチック等の固体状ポリマー物質に共有的に付着させるのに有用である。他の例では、ビオチン化した捕捉ポリマーを、ストレプトアビジンで被覆されたプラスチック又はガラス表面に付着させることができる。また捕捉ポリマーは、支持体に直接付着する拡張オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを介して、支持体に間接的に付着してもよい。捕捉ポリマーの間接的付着は、例えば米国特許第5635352号に記載されているように、当該分野においてよく知られている技術である。

10

【0069】

本発明の方法は、異なる配列を含有する二又はそれ以上の検体が単一の反応混合物中で検出又は定量される検体のマルチプレックス分析に使用することができる。これらの実施態様では、複数の種の直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドが使用される。複数の種の直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドは、二又はそれ以上の種の直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドを含んでおり、それぞれの種は、(a)特定の検体と特異的にハイブリダイゼーションする配列、及び(b)(他の種の直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドの多くに対して)異なる標識を含有する。よって、それぞれの種の直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドは一の特定の検体に対応する。よって、特定の種の直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドと結合した標識の検出は対応する検体の存在を示す。

20

【0070】

単一の検体は、単一の反応混合物中に一種の捕捉ポリマー又は複数の捕捉ポリマーを利用する本発明の方法により検出可能である。一種の捕捉ポリマーは、検体とハイブリダイズ可能な特定の核酸配列を含有する捕捉ポリマーである。よって、複数の捕捉ポリマーとは、二又はそれ以上の種の捕捉ポリマーを称し、それぞれは異なる検体結合核酸配列を含む。いくつかの実施態様では、複数の捕捉ポリマーのそれぞれの種は異なる検体結合核酸配列を含み、それぞれの検体結合配列は、同一の検体とハイブリダイズ可能である。これらの実施態様では、単一の検体は、単一の反応混合物中に、好ましくは少なくとも約1種、より好ましくは少なくとも約3種、さらに好ましくは少なくとも約5種、またさらに好ましくは少なくとも約6種の捕捉ポリマーを使用して、検出又は定量されてもよい。いくつかの実施態様では、単一の検体は、単一の反応混合物中に、好ましくは約1~約10種、より好ましくは約3~約8種、さらに好ましくは約5~約7種の捕捉ポリマーを使用して検出又は定量される。他の実施態様では、複数の捕捉ポリマーのそれぞれの種は異なる検体結合核酸配列を含み、それぞれの検体結合配列は、異なる検体(すなわち、非同一の核酸配列を有する二又はそれ以上の検体)とハイブリダイズ可能である。これらの実施態様は、例えば検体のマルチプレックス検出又は定量において特に有用である。

30

40

【0071】

本発明の方法は広範囲の濃度でサンプル中に存在する検体を検出及び定量可能である。いくつかの実施態様では、本発明の方法で検出及び定量可能な検体濃度は、好ましくは少なくとも約0.01pg/mL、好ましくは少なくとも約70pg/mL、好ましくは少なくとも約200pg/mL、好ましくは少なくとも約2000pg/mL、好ましくは少なくとも約5000pg/mL、好ましくは少なくとも約20000pg/mL、及び好ましくは少なくとも約50000pg/mLである。他の実施態様では、本発明の方法

50

で検出及び定量可能な検体濃度は、好ましくは約50000 pg/mL以下、好ましくは約20000 pg/mL以下、好ましくは約5000 pg/mL以下、好ましくは約2000 pg/mL以下、好ましくは約200 pg/mL以下、好ましくは約70 pg/mL以下、及び好ましくは約0.01 pg/mL以下である。さらなる他の実施態様では、本発明の方法で定量及び検出可能な検出濃度は、好ましくは約0.01~約100000 pg/mL、好ましくは約50~約75000 pg/mL、好ましくは約200~約50000 pg/mL、好ましくは約1000~約35000 pg/mL、及び好ましくは約2000~約20000 pg/mLである。

#### 【0072】

本発明の方法は、核酸検体の検出の高度の特異性をもたらす。いくつかの実施態様では、検体は、非検体核酸分子が反応混合物中に存在している場合、検体に対して高度なヌクレオチド配列同一性を有する非検体核酸分子と、好ましくは約5%未満、好ましくは約2%未満、好ましくは約1%未満、好ましくは約0.5%未満、及び好ましくは約0.1%の干渉度で検出される。いくつかの実施態様では、高度なヌクレオチド配列同一性を有する非検体核酸分子は、検体に対し、好ましくは85%以下、好ましくは80%以下、好ましくは70%以下、好ましくは60%以下の配列同一性を有する。ある実施態様では、高度なヌクレオチド配列同一性を有する非検体核酸分子は、検体に対して好ましくは60%以上、好ましくは70%以上、好ましくは80%以上、好ましくは82%以上、好ましくは90%以上の配列同一性を有する。他の実施態様では、高度なヌクレオチド配列同一性を有する非検体核酸分子は、検体に対して、好ましくは約50%~約90%、好ましくは約60%~約85%、好ましくは約70%~約85%の配列同一性を有する。

#### 【0073】

本発明の捕捉ポリマーを使用する検出及び定量方法

一態様では、本発明は、核酸検体を捕捉するために使用される捕捉ポリマーが、捕捉ポリマーに対する検体の特異的結合を実質的に減少させることなく、捕捉ポリマーに対する検体の非特異的結合が低減するように修飾されている検出及び定量方法を提供する。その一例が図5に示されている一態様では、捕捉ポリマーは検体とハイブリダイズ可能な第1部分、及び核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは、必ずしも必要ではない非核酸物質)を含む第2部分を含む。他の態様では、捕捉ポリマーは、検体と直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列を含み、さらに検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含む。図6に一例が示されたさらなる他の態様では、捕捉ポリマーは検体とハイブリダイズ可能な第1部分を含み、該第1部分が検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み、さらに該捕捉ポリマーが核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは、必ずしも必要ではない非核酸物質)を含む第2部分も含んでいる。これらの方法に使用される捕捉ポリマーは、以下にさらに詳細に記載される。

#### 【0074】

核酸検体を含むことが疑われるサンプルは、検体がサンプル中に存在するならば、検体、捕捉ポリマー及び検体結合オリゴヌクレオチドを含有する複合体が生成される条件下で、捕捉ポリマー及び検体結合オリゴヌクレオチドと接触させる。

一般的に、捕捉ポリマーは固体又は半固体物質から一般になる支持体に、直接又は間接的に付着している。支持体への捕捉ポリマーの付着は、関心ある複合体が生成される反応の前、反応中又は反応後になされ得る。生成された関心ある複合体は、未結合のサンプル及び/又は成分(捕捉ポリマー及び検体結合オリゴヌクレオチドを含み得る)が洗い流された場合も、支持体表面に残存している。

#### 【0075】

支持体に残存している複合体は、多くの方法の任意のもので検出することができる。一般的に、検体結合オリゴヌクレオチドと検体を含有する複合体が(本発明の捕捉ポリマーと錯化することにより)支持体に結合していることの表示を提供する任意の技術が使用可

能である。これらの技術にはここに記載されたものが含まれる。例えば、一実施態様では、検体結合オリゴヌクレオチドは、(a)検体にハイブリダイズ可能な配列、及び(b)オリゴヌクレオチドにそれぞれ直接付着する二又はそれ以上のシグナル伝達標識単位の双方を含む。他の実施態様では、上述した本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド、及びシステムオリゴヌクレオチド(好ましくは直鎖状)の組合せ物は、検体結合オリゴヌクレオチド及び検体を含有する複合体を検出するのに使用される。さらなる他の実施態様では、上述した検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含む本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは、検体結合オリゴヌクレオチド及び検体を含有する複合体を検出するのに使用される。検体結合オリゴヌクレオチド及び検体を含有する複合体を検出する他の方法は、例えば米国特許第5849481号；同5629153号；同5624802号；同5672475号；同5710264号及び同5124246号に記載されているように、当該分野において公知である。

10

**【0076】**

本発明の方法に使用される捕捉ポリマーは固体又は半固体支持体に直接(例えば図4-6を参照)又は間接的に付着し得る。固体状物質には、例えばガラス及びプラスチックが含まれる。半固体状物質には、例えばゼラチン化合物及びニトロセルロース膜が含まれる。捕捉ポリマーが固体又は半固体支持体に直接付着している場合、必ずというわけではないが、付着は好ましくは共有結合による。ポリマー、例えばポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの固体又は半固体物質への付着方法は、当該分野でよく知られている。例えば、EXIQON(Vedbaek Denmark)からのDNAイモビライザー<sup>T M</sup>として商業的に入手可能なキノン光化学物質を使用することができる。キノン光化学物質は、特にDNAベースの捕捉ポリマーを、プラスチック等の固体状ポリマー物質に共有的に付着させるのに有用である。他の例では、ビオチン化した捕捉ポリマーを、ストレプトアビジンで被覆されたプラスチック又はガラス表面に付着させることができる。また捕捉ポリマーは、支持体に直接付着する拡張オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを介して、支持体に間接的に付着してもよい。捕捉ポリマーの間接的付着は、例えば米国特許第5635352号に記載されているように、当該分野においてよく知られている技術である。

20

**【0077】**

単一の検体は、単一の反応混合物中に一種の捕捉ポリマー又は複数の捕捉ポリマーを利用する本発明の方法により検出可能である。一種の捕捉ポリマーは、具体的な(特定の)検体とハイブリダイズ可能な核酸配列を含有する捕捉ポリマーである。よって、複数の捕捉ポリマーとは、二又はそれ以上の種の捕捉ポリマーを意味し、それぞれは異なる検体結合核酸配列を含む。いくつかの実施態様では、複数の捕捉ポリマーのそれぞれの種は異なる検体結合核酸配列を含み、それぞれの検体結合配列は、同一の検体とハイブリダイズ可能である。これらの実施態様では、単一の検体は、単一の反応混合物中に、好ましくは少なくとも約1種、より好ましくは少なくとも約3種、さらに好ましくは少なくとも約5種、またさらに好ましくは少なくとも約6種の捕捉ポリマーを使用して、検出又は定量されてもよい。いくつかの実施態様では、単一の検体は、単一の反応混合物中に、好ましくは約1~約10種、より好ましくは約3~約8種、さらに好ましくは約5~約7種の捕捉ポリマーを使用して検出又は定量される。他の実施態様では、複数の捕捉ポリマーのそれぞれの種は異なる検体結合核酸配列を含み、それぞれの検体結合配列は、異なる検体(すなわち、非同一の核酸配列を有する二又はそれ以上の検体)とハイブリダイズ可能である。これらの実施態様は、例えば検体のマルチプレックス検出又は定量において特に有用である。

30

40

**【0078】**

本発明の方法は広範囲の濃度でサンプル中に存在する検体を検出及び定量可能である。いくつかの実施態様では、本発明の方法で検出及び定量可能な検体濃度は、好ましくは少なくとも約0.01 pg/mL、好ましくは少なくとも約70 pg/mL、好ましくは少なくとも約200 pg/mL、好ましくは少なくとも約2000 pg/mL、好ましくは少なくとも約5000 pg/mL、好ましくは少なくとも約20000 pg/mL、及び

50

好ましくは少なくとも約 50000 pg/mL である。他の実施態様では、本発明の方法で検出及び定量可能な検体濃度は、好ましくは約 50000 pg/mL 以下、好ましくは約 20000 pg/mL 以下、好ましくは約 5000 pg/mL 以下、好ましくは約 2000 pg/mL 以下、好ましくは約 700 pg/mL 以下、及び好ましくは約 0.01 pg/mL 以下である。さらなる他の実施態様では、本発明の方法で定量及び検出可能な検出濃度は、好ましくは約 0.01 ~ 約 100000 pg/mL、好ましくは約 50 ~ 約 75000 pg/mL、好ましくは約 200 ~ 約 50000 pg/mL、好ましくは約 1000 ~ 約 35000 pg/mL、及び好ましくは約 2000 ~ 約 20000 pg/mL である。

#### 【0079】

本発明の方法は、核酸検体の検出の高度な特異性をもたらす。いくつかの実施態様では、検体は、非検体核酸分子が反応混合物中に存在している場合、検体に対して高度なヌクレオチド配列同一性を有する非検体核酸分子と、好ましくは約 5% 未満、好ましくは約 2% 未満、好ましくは約 1% 未満、好ましくは約 0.5% 未満、及び好ましくは約 0.1% の干渉度で検出される。いくつかの実施態様では、高度なヌクレオチド配列同一性を有する非検体核酸分子は、検体に対し、好ましくは 85% 以下、好ましくは 80% 以下、好ましくは 70% 以下、好ましくは 60% 以下の配列同一性を有する。ある実施態様では、高度なヌクレオチド配列同一性を有する非検体核酸分子は、検体に対して好ましくは 60% 以上、好ましくは 70% 以上、好ましくは 80% 以上、好ましくは 82% 以上、好ましくは 90% 以上の配列同一性を有する。他の実施態様では、高度なヌクレオチド配列相同性を有する非検体核酸分子は、検体に対して、好ましくは約 50% ~ 約 90%、好ましくは約 60% ~ 約 85%、好ましくは約 70% ~ 約 85% の配列同一性を有する。

#### 【0080】

特定の反応における捕捉ポリマーの種数は、検出感度及び/又は特異性に影響を及ぼす可能性がある。理論に縛られるわけではないが、捕捉ポリマーのハイブリダイゼーションの協力性、柔軟性及び安定性は、核酸検体の検出の感度及び/又は特異性に影響を与え得る。複数の種の捕捉ポリマー(それぞれの種は特定の検体における異なる領域とハイブリダイゼーションする配列を含む)が関与すると、複数の捕捉事象が生じる可能性が高まり、よってより強い捕捉が促進される。また捕捉プロセスにおける協力性は、特定の標的配列のみが最適数の捕捉配列により捕捉されるために、検出特異性の測定においては重要である。従来の核酸アレイ及びマイクロアレイ捕捉システムは、一般的にスポット毎に唯一種の捕捉ポリマーを含む。「汎用の」オリゴヌクレオチド(当該分野の方法において必要)を使用すると、アレイ及びマイクロアレイにおける多種の捕捉ヌクレオチドの付着が不可能になる。対照的に、支持体への捕捉ポリマーの直接付着を許容する本発明の方法は、複数の種の捕捉ポリマーが、それぞれのアレイ及びマイクロアレイのスポットに提供され、よって、本発明の方法を、アレイ及びマイクロアレイフォーマットへの適合に特に適したものにしている。このようなアレイ及びマイクロアレイは、本発明の方法をベースにした又はこれに従って設計したアッセイ等の、液相ハイブリダイゼーションアッセイにおける検体の検出及び定量の感度及び特異性を有意に改善する。

いくつかの例では、例えば直接付着した捕捉ポリマーの柔軟性及び/又は協力性が失われるため、支持体への捕捉ポリマーの直接付着は、ハイブリダイゼーションベースのアッセイの性能にマイナスの影響を及ぼす可能性がある。本発明は、アッセイの性能におけるあらゆる損失を補償するための捕捉ポリマーの修飾方法を提供するもので、これは、支持体へ捕捉ポリマーが間接的ではなく直接的に付着するためであると思われる。

#### 【0081】

本発明の方法に使用される成分及び反応条件

検体(分析試料)

ここで称される核酸検体は様々な供給源、例えば生体液又は固形物、食料品、環境物質からのものであってよい。生体液には、血清、唾液、尿、精液、脳脊髄液、気管支吸引液、器官組織、細胞溶解物、及び細胞培養培地が含まれる。検体は種々の方法、例えばプロ

10

20

30

40

50

テイナーゼK / S D S、カオトロピック塩等による、ハイブリダイゼーション分析用に調製されてもよい。いくつかの例では、検体の平均的大きさは、酵素的、物理的又は化学的方法、例えば制限酵素、超音波、化学分解(例えば金属イオン)等を使用することにより低減しうる。断片は0.1 kbと小さく、通常は少なくとも約0.5 kbであってよく、また1 kb又はそれ以上であってよい。検体は少なくとも部分的に単鎖であり、好ましくは完全に単鎖であるべきである。もし自然な単鎖でなければ、まず変性させるべきである。変性は当該分野で公知の種々の方法、例えばアルカリ、ホルムアミド、塩、熱、酵素又はそれらの組合せにより実施することができる。

核酸検体は、塩基対水素結合を介して核酸二本鎖を形成可能な任意の形態の核酸であってよい。よって、核酸検体はRNA、DNA、RNA-DNAハイブリッド、修飾されたRNA及び/又はDNA(当該分野で公知であり、ここに記載)及びタンパク質様物質と複合化された核酸であってよい。

10

#### 【0082】

本発明の方法は、成長ホルモン、インシュリン様成長因子、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、副甲状腺ホルモン、チロキシン、インシュリン、プロインシュリン、レラキシン、プロレラキシン、糖タンパク質ホルモン、濾胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、黄体化ホルモン(LH)、造血成長因子、小胞内皮成長因子(VEGF)、肝臓成長因子、線維芽成長因子、プロラクチン、胎盤ラクトゲン、腫瘍壊死因子-アルファ、腫瘍壊死因子-ベータ、ミューラー阻害物質、マウス生殖腺刺激ホルモン関連ペプチド、インヒピン、アクチピン、血管内皮成長因子、インテグリン、神経成長因子(NGF)、NGF-ベータ、血小板成長因子、トランスフォーミング成長因子(TGF)、TGF-アルファ、TGF-ベータ、インシュリン様成長因子-I、インシュリン様成長因子-II、エリスロポエチン(EPO)、骨誘発因子、インターフェロン類、インターフェロン-アルファ、インターフェロン-ベータ、インターフェロン-ガンマ、コロニー刺激因子(CSFs)、マクロファージ-CSF(M-CSF)、顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF)、顆粒球-CSF(G-CSF)、トロンボポエチン(TPO)、インターロイキン(ILs)、IL-1、IL-1アルファ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、LIF、SCF、ニュールツリン(neurturin)(NTN)、キットリガンド(KL)、HER2、ヒトFc、ヒト重及び軽鎖(定常領域)、KDR、一酸化窒素シンターゼ(NOS)、アンジオテンシン変換酵素(ACE)を含む任意のポリペプチドの一部又は全てをコードする配列を含む核酸検体を検出及び/又は定量するのに利用可能である。

20

30

#### 【0083】

ステムオリゴヌクレオチド

ステムオリゴヌクレオチドは検出可能シグナルを直接又は間接的に発生可能なシグナル伝達オリゴヌクレオチド及び検体結合オリゴヌクレオチドに連結しているリンカーオリゴヌクレオチドとして有用である。本発明のステムオリゴヌクレオチドは、好ましくは直鎖状であり、すなわち分枝状ではない。直鎖状ステムオリゴヌクレオチドは構造が単純であるため、開発及び使用が容易で、さらに、例えば本発明の方法が使用される場合は、検体検出及び定量において良好な特異性及び感度が提供される。よって、例えば本発明の(ここで記載されたような)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド、ステムオリゴヌクレオチドは、(a)特定の反応混合物中で使用される検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列；及び(b)直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列を含む。一般的に、これら2つの配列は、それらがハイブリダイゼーションされることを意図しており、さらには特定の反応混合物に存在する他の配列と実質的にハイブリダイズ可能ではない配列に対して実質的に相補的、好ましくは完全に相補的であるように選択される。例えば、検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能なステムオリゴヌクレオチドの配列は、検体結合オリゴヌクレオチドの配列と実質的に相補的、好ましくは完全に相補的である。ステムオリゴヌクレオチドの配列が、標識されたオリゴヌクレオチドと「間接的に」ハイブリダイズ可能である場合、それ自体が標識さ

40

50

れたオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能であってもよい中間(すなわち架橋)オリゴヌクレオチド中の配列に対して、該配列が実質的に相補的、好ましくは完全に相補的であることを意図している。ステムオリゴヌクレオチドの配列が、標識されたオリゴヌクレオチドと「直接」ハイブリダイズ可能である場合、該配列が標識されたオリゴヌクレオチド中の配列と実質的に相補的、好ましくは完全に相補的であることを意図している。互いに実質的にハイブリダイズ可能な又はハイブリダイズしない配列を選択する技術は、当該分野においてよく知られている。2つの配列が実質的にハイブリダイズ可能であるかどうかは、経験的に決定することができ、当業者であれば、核酸ハイブリダイゼーションが、配列相補性、イオン強度、温度、干渉物質の存在等の反応条件を含む種々の要因に依存することを認識している。

10

#### 【0084】

いくつかの実施態様では、本発明の直鎖状ステムオリゴヌクレオチドは、検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列の一回繰り返しを含む。他の実施態様では、本発明の直鎖状ステムオリゴヌクレオチドは、検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列の二回又はそれ以上の繰り返しを含む。いくつかの実施態様では、本発明のそれぞれの直鎖状ステムオリゴヌクレオチドは、検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な単一の配列(又は、一もしくは一以上の配列の繰り返し)を含む。他の実施態様では、本発明のそれぞれの直鎖状ステムオリゴヌクレオチドは、検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な二又はそれ以上の異なる配列(一もしくは一以上のそれぞれ異なる配列の繰り返しを伴う)を含む。

20

ステムオリゴヌクレオチドと検体結合又はシグナル伝達オリゴヌクレオチドとの間でハイブリダイズ可能な配列は、それぞれ、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約95%、好ましくは100%(完全な)相補性である。ステムオリゴヌクレオチドと検体結合又はシグナル伝達オリゴヌクレオチド(又は上述したような中間/架橋オリゴヌクレオチド)との間でハイブリダイズ可能な配列は、好ましくは少なくとも約5ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約10オリゴヌクレオチド、好ましくは少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約20オリゴヌクレオチド、好ましくは約25オリゴヌクレオチド長である。

本発明の直鎖状ステムオリゴヌクレオチドは、好ましくは少なくとも約5ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約25ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約30ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約45ヌクレオチド長である。

30

#### 【0085】

##### 直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド

本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは、本発明の方法における検体結合オリゴヌクレオチド及び検体を含む複合体の生成を検出するために使用され得る。これらの直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは単純で、開発及び使用が容易であり、よってオリゴヌクレオチド検出のための簡便な形態を提供する。オリゴヌクレオチドは、該オリゴヌクレオチドに直接付着する少なくとも一の標識単位を含む。好ましくは、オリゴヌクレオチドは二又はそれ以上の標識単位を含み、それぞれの標識はオリゴヌクレオチドに直接付着している。「それぞれの標識が直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドに直接付着する」なる語句は、オリゴヌクレオチドの標識が、本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドと順にハイブリダイズする他のポリヌクレオチド/オリゴヌクレオチド上に付着していないことを意味する。標識は、オリゴヌクレオチド中のヌクレオチドに(好ましくは共有結合により)付着した一又はそれ以上の中間分子を介して、又はオリゴヌクレオチド中のヌクレオチドに直接結合することにより、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドに「直接」付着可能である。一実施態様では、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドはステムオリゴヌクレオチドと組合せて使用される。また、この実施態様では、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは、ステムオリゴヌクレオチドに直接又は間接的にハイ

40

50

ブリダイズ可能な配列を含む。他の実施態様では、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは、ステムオリゴヌクレオチドではなく、検体結合オリゴヌクレオチドと組合せて使用され、この場合、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含む。さらなる他の実施態様では、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは、検体と直接ハイブリダイゼーションさせるために使用され、この場合、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは検体とハイブリダイズ可能な配列を含む。

【0086】

直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの標識は、必ずしも必要ではないが、好ましくはオリゴヌクレオチドの骨格に共有的に付着している。ヌクレオチドに標識を付着させる方法は、当該分野でよく知られている。例えばジゴキシゲニン(DIG)標識されたオリゴヌクレオチドは、デオキシヌクレオチド-トリホスファート(dNTP)及びDIG-dUTPの混合物をテンプレート独立性反応に混入することにより、ターミナルトランスフェラーゼを用い、オリゴヌクレオチドの3'末端で酵素的に標識する、ジゴキシゲニン追跡キット(Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA)を使用して生成することができる。他の例では、標識されたヌクレオチドはオリゴヌクレオチドの合成に使用可能で、ここで標識されたヌクレオチドはオリゴヌクレオチドに混入される。FITC及びピオチン標識されたオリゴヌクレオチドは、標準的なホスファラミジト(phosphoramidite)化学を使用し、ABI DNA/RNAシンセサイザーで合成することができる。

【0087】

本発明のそれぞれの直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは、任意の数(好ましくは少なくとも約2)の標識単位を有してよい。当業者に理解されているように、標識単位の適切な数の決定は、例えば検出に必要な検出可能なシグナルの量、使用される標識の種類等を含む、当該分野で知られている様々な要因に依存する。いくつかの実施態様では、標識単位の数は、好ましくは少なくとも約2、好ましくは少なくとも約4、好ましくは少なくとも約8、好ましくは少なくとも約12、好ましくは少なくとも約15、好ましくは少なくとも約25である。いくつかの実施態様では、標識単位の数は、好ましくは約2~約50、好ましくは約8~約35、好ましくは約12~約25、好ましくは約15~約20である。ここで使用される場合、標識単位は、特定の種類の個々の標識部分の数を意味する。例えば、2つのジゴキシゲニン標識単位は、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドにそれぞれ付着する2つのジゴキシゲニン分子を意味する。標識は、個々の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドに、均一な又は不均一な間隔を開けて付着してよい。間隔を開けるには、2つのタンDEM型標識単位(すなわち、直鎖状オリゴヌクレオチドの骨格に沿って、互いに最も近接した2つの標識単位)が、好ましくは少なくとも1~3又は5のヌクレオチドだけ離間するようにしてなすことができる。いくつかの実施態様では、2つのタンDEM型標識単位は、約1~約12、好ましくは約3~約10、好ましくは約5~約8のヌクレオチドだけ離間している。標識されたヌクレオチド間の間隔にある標識されていないヌクレオチドは、例えば一種又は複数種のヌクレオチドの繰り返し等、任意の種類であってよい。いくつかの実施態様では、標識されたヌクレオチド間の配列は、例えば好ましくは約1~約12のアデニン、好ましくは約3~約10のアデニン、好ましくは約5~約8のアデニンの、アデニン繰り返しを含む。

【0088】

当該分野で知られている様々な標識の任意のものを使用してよく、そのいくつかをここに記載する。限定されるものではないが、これらの標識には、抗原、特異的結合対のメンバー、染料(例えば蛍光染料、中でもフルオレセインイソチオシナート、ローダミン、テキサスレッド)、放射性同位体、及びレポーター-クエンチャー対のメンバーが含まれる。

【0089】

一般的に、他のオリゴヌクレオチド上の配列とハイブリダイズ可能な直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの配列は、それらがハイブリダイズされることを意図しており、さらには特定の反応混合物に存在する他の配列と実質的にハイブリダイズ可能ではない配列に対して実質的に相補的、好ましくは完全に相補的であるように選択される。直鎖状の標

10

20

30

40

50

識されたオリゴヌクレオチドの配列が、ステムオリゴヌクレオチドと「間接的に」ハイブリダイズ可能である場合、それ自体がステムオリゴヌクレオチドと直接又は間接的にハイブリダイズ可能であってもよい中間(すなわち架橋)オリゴヌクレオチド中の配列に対して、該配列が実質的に相補的、好ましくは完全に相補的であることを意図している。直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの配列が、ステムオリゴヌクレオチドと「直接」ハイブリダイズ可能である場合、該配列がステムオリゴヌクレオチド中の配列と実質的に相補的、好ましくは完全に相補的であることを意図している。互いに実質的にハイブリダイズ可能な又はハイブリダイズしない配列を選択する技術は、当該分野においてよく知られている。2つの配列が実質的にハイブリダイズ可能であるかどうかは、経験的に決定することができ、当業者であれば、核酸ハイブリダイゼーションが、配列相補性、イオン強度、温度、干渉物質の存在等の反応条件を含む種々の要因に依存することを認識している。

10

20

30

40

50

#### 【0090】

直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドと検体結合でステム又は中間(架橋)オリゴヌクレオチドとの間でハイブリダイズ可能な配列は、それぞれ、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約95%、好ましくは100%(完全な)相補性である。直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドと他のオリゴヌクレオチドとの間でハイブリダイズ可能な配列は、好ましくは少なくとも約5ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約10オリゴヌクレオチド、好ましくは少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約20オリゴヌクレオチド、好ましくは約25オリゴヌクレオチド長である。

本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは、好ましくは少なくとも約5ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約25ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約30ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約45ヌクレオチド長である。

#### 【0091】

##### 検体結合オリゴヌクレオチド

本発明の方法に使用される検体結合オリゴヌクレオチドは、検体とハイブリダイズ可能な配列を含むオリゴヌクレオチドである。検体結合オリゴヌクレオチドが標識されていない場合、標識されたオリゴヌクレオチドに直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列をさらに含む。例えば、ステムオリゴヌクレオチド及び標識されたオリゴヌクレオチド(本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドを含む任意の形態であってよいもの)の組合せに使用され、ステムオリゴヌクレオチドがハイブリダイズ可能である場合、検体結合オリゴヌクレオチドは、ステムオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列をさらに含む。他の例において、ステムオリゴヌクレオチドではなく、標識されたオリゴヌクレオチド(本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドを含む任意の形態であってよいもの)との組合せに使用される場合、検体結合オリゴヌクレオチドは、標識されたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列をさらに含む。本発明のいくつかの実施態様では、検体結合オリゴヌクレオチドは、例えば、検体とハイブリダイズ可能な配列をさらに含む、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドの形態において、それ自体が標識されている。検体結合オリゴヌクレオチドの検体への結合性は、検体結合オリゴヌクレオチドと結合した標識を検出することにより検出される。このような標識を検出する方法は当該分野でよく知られており、そのいくつかをここに記載する。

#### 【0092】

検体とハイブリダイズ可能な検体結合オリゴヌクレオチドの配列を適切に選択することにより、特定の核酸検体の検出及び/又は定量に使用することができる。検体にハイブリダイズ可能な検体結合オリゴヌクレオチドの配列は、ハイブリダイゼーションされることを意図している検体配列に対して、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約85%、好ましくは少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約95%、好ましくは100%相補性である。いくつかの実施態様では、パーセント相補性は、好ましくは約60%~約100%、好ましくは約70%~約95%、

好ましくは約80%～約99%、好ましくは約90%～約98%である。検体結合オリゴヌクレオチド及び検体との間でハイブリダイズ可能な配列は、好ましくは少なくとも約5ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約10オリゴヌクレオチド、好ましくは少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約20オリゴヌクレオチド、好ましくは約25オリゴヌクレオチド長である。

#### 【0093】

一般的に、検体とハイブリダイズ可能な検体結合オリゴヌクレオチドの配列、又は他のオリゴヌクレオチド上の配列は、ハイブリダイゼーションが意図されているが、特定の反応混合物に存在する他の配列と実質的にハイブリダイズ可能ではない配列に対して実質的に相補的、好ましくは完全に相補的であるように選択される。互いに実質的にハイブリダイズ可能な又はハイブリダイズしない配列を選択する技術は、当該分野においてよく知られている。2つの配列が実質的にハイブリダイズ可能であるかどうかは、経験的に決定することができ、当業者であれば、核酸ハイブリダイゼーションが、配列相補性、イオン強度、温度、干渉物質の存在等の反応条件を含む種々の要因に依存することを認識している。

10

#### 【0094】

検体結合オリゴヌクレオチドと他のオリゴヌクレオチドとの間でハイブリダイズ可能な配列は、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、好ましくは約90%、好ましくは少なくとも約95%、好ましくは100%相補性である。検体結合オリゴヌクレオチドと他のオリゴヌクレオチドとの間でハイブリダイズ可能な配列は、好ましくは少なくとも約5ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約10オリゴヌクレオチド、好ましくは少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約20オリゴヌクレオチド、好ましくは約25オリゴヌクレオチド長である。

20

検体結合オリゴヌクレオチドは、好ましくは少なくとも約5ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約25ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約30ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約45ヌクレオチド長である。

#### 【0095】

##### 捕捉ポリマー

本発明の捕捉ポリマーは、検体と直接又は間接的にハイブリダイズ可能な配列を含む。配列は、好ましくは検体と直接ハイブリダイズ可能であり、すなわち反応条件下で検体とハイブリダイズ可能なように、検体配列と十分な程度の相補性を有する。捕捉ポリマーが検体と間接的にハイブリダイズ可能な実施態様においては、検体に捕捉ポリマーを連結させるリンカーオリゴヌクレオチドが使用され得る。本発明の方法で使用される捕捉ポリマーは、検体と捕捉ポリマーの複合体が生成される時に、検体を固定するものである。例えば捕捉ポリマー-検体複合体において検体に検体結合オリゴヌクレオチドを結合させることで複合体が検出されると、それはサンプル中での検体の存在又は量を示す。

30

本発明の捕捉ポリマーを含む、上述した特徴を有する任意の形態の捕捉ポリマーが使用され得る。一実施態様では、本発明は検体とハイブリダイズ可能な第1部分、及び核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは、必ずしも必要ではない非核酸物質)を含む第2部分を含む捕捉ポリマーを提供する。これらの実施態様のいくつかの例では、捕捉ポリマーは、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(類)(一般的に、必ずしも必要ではないが非核酸物質)及びヌクレオチドの組合せからなる。本発明の方法に使用される核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない適切な物質の例は、当該分野において知られており、経験的に決定することができる。例えば、適切な物質は、例えば化学構造18-O-ジメトキシトリチルヘキサエチレングリコール、1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイトを有するエチレングリコールを含む、多くの分子形態で提供可能な不活性炭素である。いくつかの実施態様では、捕捉ポリマーの長さの好ましくは少なくとも約10%、好ましくは少なくとも約25%、好ましくは少なくとも約40%、好ましくは50%が、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質である。他の実施態様では、捕捉ポリマーの長さの好ましくは約5%～約90%、好ましくは

40

50

約10%～約70%、好ましくは約20%～約50%が、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質である。これらのパーセンテージは、捕捉ポリマーの骨格鎖内の分子の全数のパーセンテージの関数として、捕捉ポリマーの骨格鎖中、核酸分子と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質の分子の数として算出することができる。

【0096】

捕捉ポリマーと検体との間でハイブリダイズ可能な配列は、好ましくは少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約95%、好ましくは100%相補性である。捕捉ポリマーと検体との間でハイブリダイズ可能な配列は、好ましくは少なくとも約5ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約10ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約20ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約25ヌクレオチド長である。

10

いくつかの実施態様では、捕捉ポリマーは好ましくは少なくとも約5ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約25ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約30ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約45ヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、捕捉ポリマーは、好ましくは約10～約60ヌクレオチド、好ましくは約15～約50ヌクレオチド、好ましくは約20～約40ヌクレオチドを含む。

【0097】

いくつかの実施態様では、本発明は、検体とハイブリダイズ可能な配列、及び検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含む捕捉ポリマーを提供する。検体と第1の捕捉ポリマー(修飾されたヌクレオチドを有するもの)を含有する複合体が、検体と第2の捕捉ポリマー(該修飾されたヌクレオチドを有さないもの)を含有する複合体より安定している場合に、修飾されたヌクレオチドは、検体への捕捉ポリマーの「ハイブリダイゼーション強度を高める」ものであり、ここで第1及び第2の捕捉ポリマーはその他の点では同一である。複合体の安定性は、当該分野でよく知られている方法により測定することができる。例えば、捕捉ポリマーが修飾されたヌクレオチドを含有しているかどうかを除き、同一の成分及び条件を用いた2つの併発反応が実施され、検体及び捕捉ポリマーを含有する複合体の量は、反応の終わりに測定される(例えば、複合体中で唯一の検出可能な配列の存在において、ベースとされた複合体の大きさ及び/又は独特の特徴による)。

20

30

【0098】

適切に修飾されたヌクレオチドは当該分野で公知であり、経験的に決定することができる。限定されるものではないが、適切に修飾されたヌクレオチドには、ロックされた核酸、ペプチド核酸、及び2'-O-メトキシ-デオキシリボヌクレオチドが含まれる。修飾されたヌクレオチドは、検体(又はリンカーオリゴヌクレオチド)にハイブリダイズ可能な捕捉ポリマーの配列(以後、「結合配列」とも称される)中の任意の位置に所在可能である。いくつかの実施態様では、修飾されたヌクレオチドは、捕捉ポリマーの結合配列の3'部分内に位置している。いくつかの実施態様では、修飾されたヌクレオチドは、捕捉ポリマーの結合配列5'部分内に位置している。他の実施態様では、修飾されたヌクレオチドは、捕捉ポリマーの結合配列の中心方向に位置している。いくつかの実施態様では、修飾されたヌクレオチドは、これらの部分の任意の組合せに位置している。

40

【0099】

検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含む捕捉ポリマーのいくつかの実施態様では、捕捉ポリマーは少なくとも約1、好ましくは少なくとも約3、好ましくは少なくとも約5、好ましくは少なくとも約7のこのような修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、捕捉ポリマーにおけるヌクレオチドの全数の好ましくは少なくとも約10%、好ましくは少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、好ましくは少なくとも約40%、好ましくは少なくとも約50%が、このような修飾されたヌクレオチドである。他の実施態様では、捕捉ポリマーにおけるヌクレオチドの全数の好ましくは約10～約50%、好ましくは約20

50

～約40%、好ましくは約30～約35%が、このような修飾されたヌクレオチドである。

#### 【0100】

また本発明は、検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み、検体とハイブリダイズ可能な第1部分、及び核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは、必ずしも必要ではない非核酸物質)を含む第2部分を含む捕捉ポリマーを提供する。第1部分と第2部分の特徴は、上述したものの任意の組合せであってよい。

ここに記載された捕捉ポリマーのいくつかの実施態様では、捕捉ポリマーは、捕捉ポリマーが付着している支持体の表面から離間して、捕捉ポリマーの伸長に有用なスペーサ成分を含む。いくつかの実施態様では、スペーサ成分は、例えば核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない第2部分の物質である。よって、スペーサ成分は、例えば18-O-ジメトキシトリチルヘキサエチレングリコール、1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジソプロピル)]-ホスホラミダイトの化学構造を有するエチレングリコールを含む、多数の分子形態で提供可能な不活性炭素を含み得る。いくつかの実施態様では、スペーサ成分は、好ましくは少なくとも1、好ましくは少なくとも2、好ましくは少なくとも3、好ましくは少なくとも4のC18スペーサ(この化学構造がここで記載され、当該分野で公知である)を含む。いくつかの実施態様では、スペーサ成分は好ましくは約1～約12、好ましくは約1～約8、好ましくは約3～約6のC18スペーサを含む。

#### 【0101】

反応条件及び検出

本発明の方法に適した反応条件は当該分野においてよく知られ、例えば米国特許第5849481号；同5629153号；同5624802号；同5672475号；同5710264号及び同5124246号、及び以下の実施例に記載されたものにおいてよく知られている。特定の環境に特異的な適切な条件(例えばサンプルの供給源/種類、バッファー等)を設定するための基準は、例えば核酸サンドイッチアッセイにおいてよく知られており、経験的には常套的に決定することができる。

一般的に、検体の予想モル数に対する種々のヌクレオチド/反応のポリマー成分の比は、それぞれ少なくとも化学量論的であり、好ましくは過度である。この比は、必ずしもというわけではないが、好ましくは1.5:1、より好ましくは2:1である。一般的に、2:1～ $10^6$ 又は $10^7$ :1の範囲にあるであろう。それぞれのヌクレオチド又は捕捉ポリマーの濃度は、サンプルの検体濃度が $10^{-2.2}$ ～ $10^{-1.2}$ Mで変化する場合に、一般的には約 $10^{-4}$ ～ $10^{-1.0}$ Mの範囲にあるであろう。ハイブリダイゼーション工程は約2分～約24時間かかる可能性があり、多くの場合は約1時間以下で完了する。当該分野で公知の方法と比較して、本発明の方法に係る成分及び工程の数が減少することで、アッセイ時間を大幅に低減することができる。ハイブリダイゼーションは、反応における種々の核酸配列のハイブリダイゼーションのための融点により、少なくとも部分的に測定された任意の適切な温度で実施することができる。限定されるものではないが、例示的温度は約20～約80、より一般的には約35～約70、特に53を含む。

#### 【0102】

ハイブリダイゼーション反応は、一般的に水性媒体、例えば種々の添加物を含んでいるよいバッファー溶液中で実施される。適切な水性媒体は当該分野で公知であり、以下の実施例に記載するようなものが含まれる。使用され得る添加剤には、低濃度の洗浄剤(例えば0.1～1%のSDS)、塩類(例えば、例示的濃度が0.017～0.17Mの範囲にあるクエン酸ナトリウム)、サケ精子DNA(例えば、50ug/mlの濃度)、及びブロック液(例えば10%濃度で使用されるBoehringer Mannheim(Indianapolis, IN, USA)から商業的に入手可能な阻止液)が含まれる。

ハイブリダイゼーション媒体のストリンジェンシーは、例えば温度、塩分濃度、溶媒系等、当該分野で知られている種々の要因を変えることにより制御することができる。ストリンジェンシーは、例えばハイブリダイズ可能な配列の長さ及び性質に応じて変化し得る

10

20

30

40

50

。特異的な標識タイプの検出のための条件は当該分野でよく知られている。

#### 【0103】

検体を含むことが疑われるサンプルは、種々のオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーの成分と、同時に又は別々のハイブリダイゼーション工程(所望の複合体及びその検出/定量が達成される限りは、任意の配列で可能)において接触させることができる。例えば、まずサンプルを捕捉ポリマーと接触させ、続いて、未結合のサンプルを除去するための洗浄工程を行い(捕捉ポリマーが既に支持体に付着している場合)、さらに捕捉ポリマー-検体複合体を検体結合オリゴヌクレオチドと接触させてもよい。標識されたオリゴヌクレオチドを、検体結合オリゴヌクレオチド、検体、及び捕捉ポリマーを含む複合体生成の検出に使用するならば、標識されたオリゴヌクレオチドを、検体結合オリゴヌクレオチドと捕捉ポリマー-検体複合体との接触時又は接触に続いて添加してもよい(必ずしも必要ではない)。同様に、ステムオリゴヌクレオチドが使用される場合も、これを、検体結合オリゴヌクレオチドと捕捉ポリマー-検体複合体との接触時又は接触に続いて添加してもよい(必ずしも必要ではない)。反応条件が許容するならば、本発明の方法で記載したように使用される全てのオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーの成分は、同時にサンプルと接触させてもよい。一般的に、標識を検出する前に、検体、捕捉ポリマー及び検体結合オリゴヌクレオチド(必要に応じて、ステムオリゴヌクレオチド及び/又は標識されたオリゴヌクレオチド)を含有する複合体を洗浄して、未結合のサンプルを除去するか、及び/又はハイブリダイゼーションしていないオリゴヌクレオチド及び/又は捕捉ポリマーを除去する。

10

20

#### 【0104】

本発明の捕捉ポリマーを含むマイクロアレイ

上述したように、本発明の捕捉ポリマーは、本発明の方法で使用される固体又は半固体支持体に直接付着させることができる。これにより、本発明の捕捉ポリマーは、マイクロアレイの形態での提供に特に適したものとなる。マイクロアレイは種々の用途においての使用が見いだされており、自動化、高スループット検体分析を可能にする等、かなりの簡便性をもたらすことが可能で、使用準備が整った包装形態で提供することもできる。これらのマイクロアレイは、本発明の方法の捕捉ポリマーの供給源としての使用に特に適している。

本発明の捕捉ポリマーは、例えばガラス、プラスチック(例えばポリプロピレン、ナイロン)、ポリアクリルアミド、ニトロセルロース、又は他の物質から作製されていてもよい固体又は半固体支持体又は表面に付着させることができる。

30

ガラススライド等の固体支持体に捕捉ポリマーを付着させるためのいくつかの技術は、当該分野でよく知られている。一方法では、アミン基、アミン基又は正電荷を有する他の基の誘導体等、固体状基質に付着可能な部分を含む修飾塩基又は類似体が、捕捉ポリマー中に導入される。ついで、捕捉ポリマー上にある反応基と共有結合を形成するであろうアルデヒド又は他の反応基で被覆された、ガラススライド等の固体状基質と捕捉ポリマーとを接触させ、ガラススライドに共有的に付着させる。アミノプロピルシリカン表面化学を使用する等の他の方法も、例えば<http://www.cmt.corning.com>及び<http://cmgm.Stanford.edu/pbrown1>に開示されているように、当該分野でよく知られている。キノン光化学に基づく方法をここでは記載する。

40

マイクロアレイのそれぞれの離散スポットは、上述したような、一種の捕捉ポリマー又は複数の種の捕捉ポリマーを含み得る。

#### 【0105】

キット及び組成物

また本発明は、ここに記載された方法で使用される組成物、キット及び製造品を提供する。組成物は、ここに記載された任意の成分(類)、反応混合物及び/又は中間生成物、並びに任意の組合せであってよい。例えば、本発明は捕捉ポリマーを含む組成物を提供するものであり、ここで捕捉ポリマーは検体とハイブリダイズ可能な第1部分、及び核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは非核酸物質)を含む第2部分を含有す

50

る。さらに本発明は、検体とハイブリダイズ可能な配列を含み、検体への捕捉ポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドをさらに含む捕捉ポリマーを含有する組成物を提供する。これらの組成物の任意のものにおいて、修飾されたヌクレオチドはここで記載された特徴(例えば、修飾の種類、修飾されたヌクレオチドの位置等)の一つ又は任意の組合せを有し得る。また本発明は、検体へのポリマーのハイブリダイゼーション強度を高める少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含み、検体とハイブリダイズ可能な第1部分、及び核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは非核酸物質)を含む第2部分を含有する捕捉ポリマーを含む組成物を提供する。いくつかの実施態様では、捕捉ポリマーはスパーサー成分をさらに含み、いくつかの実施態様では、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは非核酸物質)を含む。いくつかの実施態様では、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(好ましくは非核酸物質)は不活性炭素であり、それはいくつかの実施態様ではエチレングリコールとして提供される。

10

**【0106】**

さらに本発明は、本発明の直鎖状ステムオリゴヌクレオチド、検体結合オリゴヌクレオチド、及び直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドを個々に又はそれらを任意の組合せで含有する組成物を提供する。これらのオリゴヌクレオチドは、ここで記載された特徴の任意の一つ又は組合せで有し得る。いくつかの実施態様では、組成物は、これらのオリゴヌクレオチド及び本発明の捕捉ポリマーの一つ又は組合せを含有する。

組成物は、一般的に適切な媒体中のものであるが、凍結乾燥された形態にすることもできる。限定されるものではないが、適切な媒体には水性媒体(純水又はバッファー)が含まれる。

20

**【0107】**

また本発明は、検体を伴うか又は伴わない、本発明の任意のオリゴヌクレオチド及び/又は捕捉ポリマーを含有する反応混合物(又は反応混合物を含有する組成物)を提供する。さらに本発明は、本発明の方法を実施することにより得られる反応中間生成物を提供する。よって、一例では、本発明は、検体、捕捉ポリマー、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状ステムオリゴヌクレオチド及び標識されたオリゴヌクレオチド(好ましくは本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド)を含有する複合体を提供する。他の例では、本発明は、検体、捕捉ポリマー、検体結合オリゴヌクレオチド、及び標識されたオリゴヌクレオチド(好ましくは本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド)を含有する複合体を提供する。さらなる他の例では、本発明は、検体、捕捉ポリマー、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドを含有する複合体を提供する。またさらなる他の例では、本発明は捕捉ポリマーと検体を含有する複合体を提供する。他の例では、本発明は検体、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状ステムオリゴヌクレオチド及び標識されたオリゴヌクレオチド(好ましくは直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド)を含有する複合体を提供する。一例では、本発明は、検体、検体結合オリゴヌクレオチド及び標識されたオリゴヌクレオチド(好ましくは直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド)を含有する複合体を提供する。さらなる他の例では、本発明は、検体及び直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドを含有する複合体を提供する。

30

40

**【0108】**

さらに本発明は、本発明の方法を実施するためのキット及び製造品を提供する。従って、種々のキット及び製造品が適切に包装されて提供される。キット及び製造品は、ここで記載された用途及び方法の任意の一つ又はそれ以上に対して使用されてよく、従って、これらの用途及び方法の任意の一つ又はそれ以上のための使用説明書を含み得る。

本発明のキット及び製造品は、ここで記載されたオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーの任意の組合せを収容する一又は複数の容器を具備する。キット又は製造品は、ここで記載された任意の捕捉ポリマーを含み得る。いくつかの実施態様では、キット又は製造品は2又はそれ以上の種類の捕捉ポリマーを含み、それらは別々に包装されていても、そうでなくてもよい。捕捉ポリマーは固体又は半固体支持体に付着していてもよい。いくつかの実

50

施態様では、キット又は製造品は、捕捉ポリマー及び検体結合オリゴヌクレオチドを含む。キット又は製造品は、直鎖状ステムオリゴヌクレオチド及び/又は標識されたオリゴヌクレオチド(好ましくは本発明の直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド)を含んでいてよい。キット又は製造品は、シグナルの発生及び/又は検出に必要な試薬、及び/又は標識検出化合物を含んでいてよい。キット及び製造品は一又は複数の適切なバッファー(上述したもの)を含んでいてよい。キット又は製造品における一又は複数の試薬は、賦形剤を含み、一般的には凍結乾燥された乾燥パウダーとして提供可能で、溶解させると、ここで記載された任意の方法を実施するのに適切な濃度を有する試薬溶液が提供される。各成分は別々の容器に収容することができ、又は交差反応性及び保管期間が許容されるいくつかの成分は一つの容器において組合せることも可能である。

10

## 【0109】

本発明の方法の成分の使用に関し、本発明のキット及び製造品は、場合によっては一組の使用説明書、一般的には文書の使用説明書を含んでいてよいが、使用説明書を含む電子記憶媒体(例えば、磁気ディスク又は光学ディスク)も許容可能である。使用説明書は、一般的に本発明の方法を実施するために必要な試薬(キットに含まれようと含まれまいと)に関する情報、キットの使用方法及び/又は適切な反応条件についての説明書を含む。いくつかの実施態様では、キットには、本発明の方法に使用されるオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを設計するために、ここで記載されたものの一つなどのアルゴリズムを含んでいてよい。このようなアルゴリズムは、ここで記載されたキットと共に又は別個に、文書形態、又は記憶装置(例えばディスク及びコンパクトディスク)の一部として提供されてもよい。

20

キット又は製造品の成分(類)は、任意の簡便で適切なパッケージに包装することができる。成分は別々に、又は一又は複数の組合せとして包装することができる。キット及び製造品中での種々の成分の相対量は、本発明の方法を実施し始めるのに必要な反応を実質的に最適化する、及び/又はさらに任意の方法の感度を最適化するような試薬の濃度とするために、広範囲で変化させることができる。

次の実施例を例証のために提供するが、本発明を限定するものではない。

## 【実施例】

## 【0110】

実施例1：固体支持体に間接的に付着した捕捉ポリマー、検体結合オリゴヌクレオチド、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド、直鎖状ステムオリゴヌクレオチドを使用する検体の検出及び定量

30

反応バッファーは以下に記載するようなものである：

溶菌用バッファー(1 L 当たり)

1 M の H E P E S、p H 8 . 0	7 8 m l
1 0 % のラウリル硫酸リチウム	1 0 0 m l
0 . 2 5 M の E D T A	3 2 m l
5 M の塩化リチウム	1 0 0 m l
プロテイナーゼ K (Boehringer Mannheim)	6 0 0 m g
マイクロ-プロテクト(Boehringer Mannheim)	5 m l
S Q 水	全体を 1 L にする量

40

バッファーを濾過する。

コーティング用バッファー

1 0 0 m M の炭酸ナトリウム、p H 9 . 6

コーティング洗浄用バッファー

2 X S S C / 0 . 1 % の Tween-20

捕捉ハイブリダイゼーション用バッファー

6 X S S C ( 2 0 X ) 1 5 0 m l

0 . 1 % の S D S ( 2 0 % ) 2 . 5 m l

5 0 u g / m l のサケ精子 D N A ( 1 0 m g / m l ) 2 . 5 m l

50

S Q 水	5 0 0 m l	
ステム / 標識されたオリゴヌクレオチド用バッファー		
6 X S S C ( 2 0 X )	1 5 0 m l	
1 0 % の Boehringer Mannheim Block	5 0 m l	
S Q 水	3 0 0 m l	
【 0 1 1 1 】		
抗体希釈液 : Boehringer Mannheim Block		
マレイン酸 (Boehringer Mannheim)	2 5 m l	
ブロックバッファー (Boehringer Mannheim)	2 5 m l	
S Q 水	2 0 0 m l	10
洗浄用バッファー 1		
0 . 1 X S S C / 0 . 1 % の S D S		
洗浄用バッファー 2		
0 . 1 X S S C		
抗標識抗体		
アルカリホスファターゼ-結合抗-ジゴキシゲニン		
アルカリホスファターゼ-結合抗-F I T C		
アルカリホスファターゼ-結合抗-ストレプトアビジン		
【 0 1 1 2 】		
反応条件及び工程は以下の通りである :		20
コーティング		
- コーティング用バッファーで 0 . 1 $\mu$ m まで $NH_2$ -オリゴヌクレオチドを希釈。		
- 1 0 0 $\mu$ l / ウェル添加し、攪拌下、暗所で 2 時間、室温でインキュベート。		
第 1 回目のハイブリダイゼーション		
- 捕捉ポリマー及び検体結合オリゴヌクレオチドを、溶菌用バッファーに希釈。		
- 溶菌用バッファーにてサンプルを調製。		
- コーティング洗浄用バッファーでプレートを洗浄 ( 3 回 ) 。		
- 5 0 $\mu$ l / ウェルの捕捉ハイブリダイゼーション用バッファー及び溶菌用バッファー中の 5 0 $\mu$ l / ウェルのサンプルを充填。		
- ゆっくりと混合し、暗所、5 3 で一晩インキュベート。		30
第 2 回目のハイブリダイゼーション		
- 室温で 1 0 分間、プレートを冷却。		
- ステム / 標識されたオリゴヌクレオチド用バッファー中でステムオリゴヌクレオチドを調製。		
- 洗浄用バッファー 1 でプレートを洗浄 ( 2 回 ) 。		
- 5 0 $\mu$ l / ウェルのステムオリゴヌクレオチド溶液を充填。		
- 5 3 で 3 0 分間インキュベート。		
第 3 回目のハイブリダイゼーション		
- 室温で 1 0 分間、プレートを冷却。		
- ステム / 標識オリゴヌクレオチド用バッファー中で標識オリゴヌクレオチドを調製。		40
- 洗浄用バッファー 1 でプレートを洗浄 ( 2 回 ) 。		
- 5 0 $\mu$ l / ウェルの標識オリゴヌクレオチド溶液を充填。		
- 5 3 で 3 0 分間インキュベート。		
標識検出		
- 洗浄用バッファー 1 で洗浄 ( 2 回 ) する前に、室温で 1 0 分間、プレートを冷却。		
- 希釈液中で抗標識抗体を調製し、5 0 $\mu$ l / ウェルを充填。		
- 攪拌下、室温で 3 0 分間インキュベートし、洗浄用バッファー 1 ( 2 回 ) 及び 2 ( 3 回 ) で洗浄。		
- 5 0 $\mu$ l / ウェルの基質溶液を添加し、ケミルミネサンスを読み取る前に 3 7 で 1 時間インキュベート。		50

## 【0113】

検体は、例えば不死化DB細胞(造血幹細胞)の溶解物等の、細胞溶解物からのRNAとして提供される、ヒト胎児及び成人のヘモグロビンであってよい。ヒト胎児ヘモグロビンの検出に使用され得る捕捉ポリマー、検体結合オリゴヌクレオチド及びブロッカーオリゴヌクレオチドの配列は、図7Aに表されている。

ヒトベータ(成人)、イプシロン及びデルタのヘモグロビンに使用され得る捕捉ポリマー、検体結合オリゴヌクレオチド及びブロッカーオリゴヌクレオチドの配列は、それぞれ図7B、C及びDに表されている。

種々のオリゴヌクレオチド(拡張オリゴヌクレオチド以外)及び捕捉ポリマーの配列は、ProbeDesignerソフトウェア(Chiron, Emeryville, CA, USA)を使用して設計することができる。オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーは、例えば製造者の仕様書に従い、ABI DNA/RNAシンセサイザーにおいて、標準的なホスファラミジト化学を使用して合成される。

## 【0114】

直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドは、ジゴキシゲニン、フルオレセインイソチオシアナート(FITC)又はビオチンで標識される。ジゴキシゲニン標識されたオリゴヌクレオチドは、製造者の使用説明書に従い、ジゴキシゲニンオリゴヌクレオチド追跡キット(Roche Molecular Biochemicals, カタログ番号1-417-231, Indianapolis, IN, USA)を使用して生成される。FITC及びビオチン標識されたオリゴヌクレオチドは、標準的なホスファラミジ化学を使用し、ABI DNA/RNAシンセサイザーで生成される。標識は、特定の反応に使用される直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド上の標識に対して適切な、ジゴキシゲニン又はFITCに対するアルカリホスファターゼ結合抗体、又はアルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジンを使用して検出される。検出可能なシグナルはMLKマイクロプレート照度計(Dynex, Chantilly, VA, USA)において読み取られる。

一末端にNH<sub>2</sub>基を有する拡張オリゴヌクレオチドは、上述したコーティング工程により、EXIQONイモビライザーDNAプレートに付着している。拡張オリゴヌクレオチドはそれらの遊離末端に、捕捉ポリマー中の配列に対して相補的な配列を含む。

## 【0115】

本発明の方法で生成される、ノイズ対シグナル比として表されるデータを、Urdeaら(例えば米国特許第5635352号に記載されている)の方法等、従来の方法を使用して作製されたデータと比較することができる。

本発明の方法による検体の検出及び定量の特異性は、ガンマヒトヘモグロビンアッセイにおいて、ベータ、イプシロン又はデルタヒトヘモグロビンRNAのいずれかに対して得られるシグナルを分析することにより測定することができる。ヘモグロビン遺伝子の間には、高い相同性(82%以上)がある。ガンマヘモグロビンアッセイで検出されるガンマヒトヘモグロビンRNAの量のパーセンテージとして表される、ガンマヒトヘモグロビンアッセイで検出されるベータ、イプシロン又はデルタヒトヘモグロビンRNAのいずれかの量は、非特異的配列(群)による干渉パーセンテージを示し、よって検体の検出及び定量の特異性が示される。

## 【0116】

本方法が検体の検出及び定量に使用可能な濃度のダイナミックレンジを測定するために、検体濃度の範囲にわたる検出を実施することができる。シグナル値が線形である範囲が、ダイナミック濃度レンジを表す。

直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドに使用される標識の選択の効果がある場合、それを測定するためには、ジゴキシゲニン標識された及びFITC標識された直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドのシグナル伝達性能を比較することができる。直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドのタンデム型標識単位間の間隔の効果がある場合、その効果を測定するために、それぞれのオリゴヌクレオチド中のFITCとビオチン間の間隔は、オリゴヌクレオチド合成中に調節することができる。標識間隔は、例えば3~8のアデニン分子で満たすことができる。

10

20

30

40

50

上述したアッセイ方法は、拡張オリゴヌクレオチドにより間接的というよりは、むしろプレートへの捕捉ポリマーの直接的付着を利用できる。反応成分(拡張オリゴヌクレオチドを含む)及び条件は、上述したものに従うことができる。捕捉ポリマーの一端にはNH<sub>2</sub>基があり、DNAイモビライザーアッセイプレート(EXIGON)に直接付着させることができる。

#### 【0117】

実施例2：固体支持体に直接付着した捕捉ポリマーを使用する検出及び定量

反応バッファーは実施例1に記載したものであった。

固体支持体に対する捕捉ポリマーの直接付着の効果

反応条件及び工程は以下の以下の通りである：

コーティング

- コーティング用バッファー中で、0.1 μmまでNH<sub>2</sub>-捕捉ポリマーを希釈。
- 100 μl / ウェル添加し、攪拌下、暗所で2時間、室温でインキュベート。

第1回目のハイブリダイゼーション

- 検体結合オリゴヌクレオチドを溶菌用バッファーに希釈。
- 溶菌用バッファーにてサンプルを調製。
- コーティング洗浄用バッファーでプレートを洗浄(3回)。
- 50 μl / ウェルの捕捉ハイブリダイゼーション用バッファー及び溶菌用バッファー中の50 μl / ウェルのサンプルを充填。
- ゆっくりと混合し、暗所、53 °Cで一晩インキュベート。

第2回目のハイブリダイゼーション

- 室温で10分間、プレートを冷却。
- ステム / 標識オリゴヌクレオチド用バッファー中で標識オリゴヌクレオチドを調製。
- 洗浄用バッファー1でプレートを洗浄(2回)。
- 50 μl / ウェルの標識されたオリゴヌクレオチド溶液を充填。
- 53 °Cで30分間インキュベート。

標識検出

- 洗浄用バッファー1で洗浄(2回)する前に、室温で10分間、プレートを冷却。
- 希釈液中で抗標識抗体を調製し、50 μl / ウェルを充填。
- 攪拌下、室温で30分間インキュベートし、洗浄用バッファー1(2回)及び2(3回)で洗浄。
- 50 μl / ウェルの基質溶液を添加し、ケミルミネサンスを読み取る前に37 °Cで1時間インキュベート。

#### 【0118】

検体は、合成RNAとして提供されたヒト胎児ヘモグロビンであった。合成された胎児ヘモグロビンRNAを、MegascriptT7キット(カタログ番号1334, Ambion, Austin, TX, USA)を使用し、インビトロでの転写により作製した。要するに、クローンされたヘモグロビンDNAを、cRNAの作製のためにインビトロで転写する前に、Bluscriptプラスミド(Stratagene, La Jolla, CA, USA)に挿入した。捕捉ポリマー及び検体結合標識オリゴヌクレオチド配列は、実施例1に記載されたものである。

製造者の使用説明書に従いDNAイモビライザー<sup>T M</sup>(Vedbaek, Denmark)プレートをし、上述(コーティング工程)したプロトコルに従い、捕捉ポリマーをアッセイプレートに直接付着させた。3'末端にアミノ基を有する捕捉ポリマーを作製し、DNAイモビライザーマイクロプレートのウェルに共有的に付着させた。

#### 【0119】

図8Hに示すように、捕捉ポリマーがアッセイプレートに直接付着している場合、捕捉ポリマーがアッセイプレートに間接的に付着している方法と比較して、シグナル/ノイズの絶対値が低減していたとしても、検体は検出及び定量可能であった。非常に単純化した性質の直接付着法ではあるが、顕著な利点を構成する。

単一反応中に一種以上の捕捉ポリマーを含ませることの検出及び定量能力に対する効果

10

20

30

40

50

をテストするために、各アッセイウェルに1～6種の捕捉ポリマーを利用するアッセイを実施した。図8Hに示すように、各アッセイウェルにおける捕捉ポリマー種数が漸進的に減少すると、シグナル/ノイズ比の値が直線的に低減する結果になった。しかしながら、捕捉ポリマーがたとえ一種になったとしても、検体を検出及び定量可能であったことを記しておくべきである。データは、本方法の柔軟性を実証している。

#### 【0120】

##### C18スペーサーで修飾された捕捉ポリマーの使用

また、捕捉ポリマーを修飾して、検体と直接ハイブリダイズしなかった領域を除去した。4つのC18スペーサー(Glen Research, Sterling, VA, USA)を捕捉ポリマーに導入し、検体とのハイブリダイゼーションを意図しない配列のほとんどを除去した。これらの捕捉ポリマーとの結合に使用される直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドと共に、これらの捕捉ポリマーの配列を、図10に記載する。これらのオリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを、次のアルゴリズムを使用して設計した：

#### 【0121】

##### 初期設定：

- 5又はそれ以上、もしくは3GCの場合は4の正確な繰り返し全てを見いだし
- 潜在的相補領域を見いだし
- 1mis又は1indel内(双方が7より長いならば2mis)である場合に、繰り返しを統合し
- 40の $T_m$ を有するものを保持し
- 相補領域を $T_m < 40$ の2つの領域に分割できないならば、任意の保持された相補領域を開裂させるように当初の境界を選択し、ウィンドウを拒絶する

##### 第1パス：

- 他のプライマーのためのウィンドウに空間を設けつつ
- 長さ及び $T_m$ を満足させる最小プライマーを見いだし
- プライマーの長さだけジャンプする

##### 第2パス：

- 塩基を残しつつ
- 最も短いものの長さを増加させ、下流の $T_m$ を再計算する

##### 第3パス

- 全ての問題領域をチェックし
- 二量化を最小にするように境界を操作する

#### 【0122】

3'-エチレングリコール足場と、その3'末端に付着してアミノ基を有する捕捉ポリマーを、上述したようにして、アッセイプレートに共有的に結合させた。

検体の検出及び定量を、次の反応条件に従い、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドと結合したC18修飾された捕捉ポリマーを使用して実施した：

##### コーティング

- コーティング用バッファー中で、0.1 $\mu$ mまでNH<sub>2</sub>-捕捉ポリマーを希釈。
- 100 $\mu$ l/ウェル添加し、攪拌下、暗所で2時間、室温でインキュベート。

##### 第1回目のハイブリダイゼーション

- 標識された直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドを溶菌用バッファーに希釈。
- 溶菌用バッファーにてサンプルを調製。
- コーティング洗浄用バッファーでプレートを洗浄(3回)。
- 50 $\mu$ l/ウェルの捕捉ハイブリダイゼーション用バッファー及び溶菌用バッファー中の50 $\mu$ l/ウェルのサンプルを充填。
- ゆっくりと混合し、暗所、53℃で一晩インキュベート。

##### 標識検出

- 洗浄用バッファー1で洗浄(2回)する前に、室温で10分間、プレートを冷却。
- 希釈液中で抗-標識抗体を調製し、50 $\mu$ l/ウェルを充填。

10

20

30

40

50

- 攪拌下、室温で30分間インキュベートし、洗浄用バッファ-1(2回)及び2(3回)で洗浄。

- 50 µl / ウェルの基質溶液を添加し、ケミルミネサンスを読み取る前に37 °C で1時間インキュベート。

#### 【0123】

図9に示されるように、捕捉ポリマーにC18(3'エチレングリコール)足場を導入すると、検出及び定量の感度が大幅に増加するという結果が得られた(図9B及び9Cと比較)。生データ(図示せず)に基づく、修飾された捕捉ポリマーを使用した場合には、特異的シグナルに実質的に影響を与えることなく、アッセイバックグラウンド(「ノイズ」)が有意に低減した結果になったと思われた。

10

#### 【0124】

##### 2'-O-メトキシ-RNAで修飾された捕捉ポリマーの使用

検体とハイブリダイズ可能な捕捉ポリマーの領域に2'-O-メトキシ-RNAを導入することにより、C18修飾捕捉ポリマーをさらに修飾した。2'-O-メトキシ-RNAはGlen Research(Sterling, VA, USA)から入手可能であり、ABI DNA/RNAシンセサイザーを使用し、標準的なホスファラミジト化学法により捕捉ポリマー中に導入された。捕捉ポリマーは、太字のオリゴヌクレオチドが、dNTPよりはむしろ2'-O-メトキシ-RNAである、図10に記載された配列/配置で作製された。2'-O-メトキシ-RNAヌクレオチドを、C-18スパーサー足場領域の5'である捕捉ポリマーの3'領域に導入した。

20

「C18スパーサーで修飾された捕捉ポリマーの使用」と題したセクションにおいて上述した反応条件に従い、直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドと関連して2'-O-メトキシ-RNA-修飾捕捉ポリマーを使用して、検体の検出及び定量を行った。図11Dに示すように、2'-O-メトキシ-RNAを導入すると、未修飾の捕捉ポリマー(図11B)及びC18修飾された捕捉ポリマー(図11C)と比較して、シグナル/ノイズ比が実質的に増加するという結果になった。実際、C-18-及び2'-O-メトキシ-RNA-修飾捕捉ポリマーを使用する方法により、アッセイプレートに間接的に付着した捕捉ポリマーを利用する方法よりも著しく良好な結果が得られた。

#### 【0125】

実施例3：C18-及び2'-O-メトキシ-RNA-修飾捕捉ポリマー及び直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドを使用する検体の検出及び定量

30

直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び検体結合オリゴヌクレオチドと結合した未修飾の捕捉ポリマーを使用するアッセイ(図3に示す-この実施例では「間接的及び未修飾の方法」と称す)と並行して、直接標識された検体結合オリゴヌクレオチド及びC18-及び2'-O-メトキシ-RNA-修飾捕捉ポリマーを使用する(図6に示す-この実施例では「直接及び修飾方法」と称す)ことにより、ヒト胎児ヘモグロビンRNAの検出及び定量を実施した。

直接及び修飾方法においては、ヒト胎児ヘモグロビンRNA上の種々の隣接領域を標識とする検体結合オリゴヌクレオチド及び捕捉ポリマーを、実施例2のアルゴリズムを使用して設計した。これらのヌクレオチドの配列を図10に記載する。

40

実施例2に記載されたプロトコルに従い、DNAイモビライザー<sup>T M</sup>マイクロプレート(96又は384ウェル)で、修飾された捕捉ポリマーに共有的にコーティングした。反応条件及び成分は実施例2に記載したものである。

実施例1に記載した反応条件に従い、間接的及び未修飾アッセイを実施した。種々の成分の配列は、実施例1に記載されたものである。

標識されたオリゴヌクレオチドをジゴキシゲニン、FITC又はビオチンで標識し、上に記載された反応条件に従い、対応するアルカリホスファターゼ結合抗体で検出した。

#### 【0126】

標識検出及びシグナル発生のためのアルカリホスファターゼ基質の供給源の効果の測定

検出可能なシグナルを発生させるために、種々の供給源からのアルカリホスファターゼ

50

基質を、製造者の使用説明書に従いテストした。図 1 2 A 1 及び B 1 に示すように、Bold 540 (Intergen, Purchase, NY, USA) 又は CDP-Star (InnoGenex, San Ramon, CA, USA) 基質を使用して発生させたシグナル / ノイズ比は、広範囲の検体濃度にわたって比較可能であった。しかしながら、CDP-Star を使用して発生させた値は、Bold 540 を使用して発生させたものと比較してより高いようであることは注目に値する (ある場合においては約 50 % 高い)。また、直接及び修飾方法の感度は、間接的及び未修飾の方法よりも平均してより良好であった。

#### 【 0 1 2 7 】

アッセイ性能に対するシグナルリーダーの効果の測定

シグナル (プレート) リーダーの選択の効果がある場合、その効果を測定するために、2 つの異なるリーダーをテストし、発生した発光性シグナルを読み取った。図 1 2 A 2 及び B 2 に示すように、検出及び定量は Dynex MLX マイクロプレート照度計 (Dynex, Chantilly, VA, USA) 又は Victor 2V, 1420 Multilabel HTS 計測器 (Wallac/Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) のいずれかを使用して実施した。しかしながら、Dynex リーダーを使用して発生された値は、一般的に Wallac リーダーで発生されたものと比較してより高いことは注目に値する。また、直接及び修飾方法の感度は、間接的及び未修飾の方法よりも平均してより良好であった。

#### 【 0 1 2 8 】

アッセイ性能に対するプレートフォーマットの効果の測定

3 8 4 - ウェル及び 9 6 - ウェルの双方においてアッセイを実施した。図 1 2 A 3 及び B 3 に示すように、いずれかのプレートフォーマットを使用した場合に、検出及び定量が達成された。実際、9 6 - ウェルフォーマットを使用すると、0 . 0 3 p g / m l 未満の検体を用いたノイズと比較してシグナルは 1 0 倍増加しており、3 8 4 - ウェルフォーマットを使用すると、0 . 0 3 p g / m l 未満の検体を用いたノイズと比較してシグナルは 4 倍を超えて増加した。また、直接及び修飾方法の感度は、間接的及び未修飾の方法よりも平均してより良好であった。

#### 【 0 1 2 9 】

実施例 4 : ヒト F c m R N A の検出及び定量

直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより間接的に標識された検体結合オリゴヌクレオチドと C 1 8 - 及び 2 ' - O - メトキシ - R N A - 修飾捕捉ポリマーを使用するか (この実施例では「方法 1」と称す)、又は直接標識された検体結合オリゴヌクレオチドと C 1 8 - 及び 2 ' - O - メトキシ - R N A - 修飾捕捉ポリマーを使用する (この実施例では「方法 2」と称す) ことにより、ヒト F c m R N A の検出及び定量を実施した。

使用したオリゴヌクレオチドの配列を図 1 3 A 及び B に記載する。1 0 種の捕捉ポリマーを各アッセイウェルに提供した。

実施例 2 に記載したプロトコルに従い、DNA イモビライザー T M マイクロプレート (9 6 ウェル) で捕捉ポリマーを共有的にコーティングした。反応条件及び成分は実施例 2 に記載したものである。

#### 【 0 1 3 0 】

標識されたオリゴヌクレオチド (検体結合標識オリゴヌクレオチドであれ、検体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドであれ) はビオチン標識されており、上に記載の反応条件に従い、ビオチン化アルカリホスファターゼ - 結合抗体を用いて検出した。

図 1 4 に示すように、類似の検出及び定量性能が、双方の方法 (1 及び 2) で観察された。このように、本発明の方法は配列非依存的に (すなわち、丁度一つの遺伝子 / 配列に特異的ではない) 検出及び定量可能である。さらに、検体結合オリゴヌクレオチドは、アッセイ感度を実質的に何ら損なうことなく、実務者に所望されるように、直接又は間接的に標識することができる。

#### 【 0 1 3 1 】

#### 実施例 5 : アレイ系での直接付着した捕捉ポリマーフォーマットの用途

捕捉ポリマーが固体支持体に直接付着している本発明の方法を使用して検体を検出及び定量する能力により、アレイフォーマットに本方法を適合させるのに有利な柔軟性がもたらされる。この知見をテストするために、図 10 に記載した配列を有する C 1 8 -及び 2' -O -メトキシ-R N A -修飾捕捉ポリマーを使用した。これらの捕捉ポリマーは、検体とハイブリダイズ可能な配列の 3' 及び 5' 領域に 2' -O -メトキシ-R N A、及び 3' -末端アミノ基、及び捕捉ポリマーの 3' 領域に C 1 8 エチレングリコール足場を有する。捕捉ポリマーは実施例 2 - 4 において上述したプレートに直接付着させた。

#### 【 0 1 3 2 】

製造者の使用説明書に従い、ジゴキシゲニンオリゴヌクレオチド追跡キット (Roche Molecular Biochemicals, カタログ番号 1-417-231, Indianapolis, IN, USA) を使用し、ヒト胎児ヘモグロビン c D N A をジゴキシゲニンで直接標識した。ついで、種々の量の標識された c D N A を、コーティングされた 9 6 -ウェルプレート上にハイブリダイズさせた。反応バッファーは実施例 1 に記載したものである。反応条件は以下の通りであった：

#### コーティング

- コーティング用バッファー中で、0 . 1  $\mu$  m まで N H <sub>2</sub> -捕捉ポリマーを希釈。
- 1 0 0  $\mu$  l / ウェル添加し、攪拌下、暗所で 2 時間、室温でインキュベート。

#### アレイ適用

#### 第 1 回目のハイブリダイゼーション

- コーティング洗浄用バッファーでプレートを洗浄 (3 回)。
- 5 0  $\mu$  l / ウェルの捕捉ハイブリダイゼーション用バッファー及び 5 0  $\mu$  l / ウェルの D I G -標識されたサンプルを充填。
- ゆっくりと混合し、暗所、5 3 で一晩インキュベート。

#### 標識検出

- 洗浄用バッファー 1 で洗浄 (2 回) する前に、室温で 1 0 分間、プレートを冷却。
- 希釈液中で抗標識抗体を調製し、5 0  $\mu$  l / ウェルを充填。
- 攪拌下、室温で 3 0 分間インキュベートし、洗浄用バッファー 1 (2 回) 及び 2 (3 回) で洗浄。
- 5 0  $\mu$  l / ウェルの基質溶液を添加し、ケミルミネサンスを読み取る前に 3 7 で 1 時間インキュベート。

上述した実施例 3 に記載したように、CDP-Star 基質を使用してアルカリホスファターゼに結合された抗ジゴキシゲニン抗体と共に形成される複合体と接触させることで、捕捉された c D N A を検出した。M L X マイクロプレート照度計 (Dynex, Chantilly, VA, USA) を用い、シグナルを測定した。

図 1 5 に示すように、線形のシグナルが、この D N A アレイフォーマットを用い、0 及び 5 n g / m l のヒト胎児ヘモグロビン c D N A で得られた。また、2 倍のバックグラウンドシグナルが 6 . 8 p g / m l の c D N A で観察され、アレイ感度もまたは良好なようであった。

#### 【 0 1 3 3 】

#### 実施例 6 : 高スループットでの細胞クローン選択プロセスにおける本発明の方法の使用

高い特異性及び生産性を有する株化細胞の生産は、限られたスループットでの大きな労力を有するプロセスである。このプロセスの一部として、ヒト F c イムノアッセイ及び細胞計数データを使用し、特異的生产性のために、数百のクローンがスクリーニングされる。しかしながら、複数の細胞プレートをセットし、これらのプレートから複数のサンプルの希釈を実施する必要性が、この伝統的な方法のスループットを顕著に低減させる。m R N A レベルが特異的生产性と相関しているため、細胞クローン選択プロセスを能率的にするために本発明の方法を使用することを吟味した。

我々の結果では、本発明の方法によるヒト F c の検出及び定量が、複数のサンプリング日数及び R N A 抽出を必要とすることなく、何千ものクローンを生産のために迅速にスクリーニングすることを可能にする、高スループットのクローンスクリーニングを支援する

のに使用可能であることが示された。以下に記載するように、本発明は、クローンのスクリーニングに伝統的に使用されている特異的生産性アッセイと本発明の方法との間の線形の相関関係を用い、異なった組換え抗体を発現する株化細胞においてFc mRNAレベルを分析するために使用することができる。さらに、特異的生産性アッセイとは異なり、本発明の方法は、単一のサンプリング時点を使用して、クローンの正確なランキングの提供を可能にする。データは、本発明の方法が、市販の生産株化細胞の発育中に、高スループットでのクローンのスクリーニングを支援可能であることが実証されている。

#### 【0134】

図16は株化細胞発育プロセスの実施態様を概略的に示している。生産株化細胞の発育中、数百のクローンが特異的生産性のためにスクリーニングされ、高度に特異的な容量生産性を有する株化細胞が選択される。これらの株化細胞の発育中、最も好ましい生産体を選択するために、複数の測定が実施される。典型的には、生産される組換えタンパク質のレベルは、特異的イムノアッセイ及び細胞計数データを使用し、条件培地において評価される。このアプローチの中程度のスループットは、培養の異なる日に分析するために複数の培養プレートをセットし、数回のサンプル希釈を実施する必要性から生じる。特異的生産性とmRNAレベルとの間の良好な相関関係を考慮して、我々は、クローンのスクリーニング能力を増大させるという最終目的で、クローンの選択に本発明の方法を使用することを研究することを決めた。

#### 【0135】

生産株化細胞のクローンの選択に対する有用で優れた定量手段としての本発明の方法の確認

組換えヒトモノクローナル抗体を生産する14の異なるCHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞のクローンを、100 u lの培養培地と共に、 $1 \times 10^3 \sim 80 \times 10^3$ 細胞/ウェルの密度で、96ウェルプレートに播種した。播種前に、Z2細胞計測器(Beckman Coulter)を使用し、また培養後にアラマーブルー(Biosource International, Inc., Camarillo, California, USA)又はカルセイン(Calcein)-AM(Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA)を使用して蛍光を読み取り、細胞数を評価した。条件培地を収集し、無傷のIgGイムノアッセイを使用して、ヒトIgGの濃度を測定し、ついで、溶菌用バッファー(1MのHEPES、pH 8.0; 10%のラウリル硫酸リチウム; 0.25MのEDTA; 5Mの塩化リチウム; 600 mg/リットルのプロテイナーゼK; マイクロプロテクト(Boehringer Mannheim))を使用して細胞を溶菌させた。以下のようにして検出及び定量を実施した: 上の実施例に記載したようにして、96ウェルDNAイモビライザー<sup>T M</sup>プレート(Exiqon)に共有的にカップリングさせるため、拡張オリゴヌクレオチド(図7に提供された配列)を、3'末端においてアミノ基と合成した。ヒトFc mRNA特異的捕捉ポリマー(図13Aに提供された配列)及び検体結合オリゴヌクレオチド(図13Aに提供された配列)を、捕捉ハイブリダイゼーション用バッファー(6X SSCバッファー(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム); 0.1%のSDS; 50 mg/mlのサケ精子DNA)と混合する前に、形質移入されたCHO細胞溶解物(1/3及び1/9の希釈液)に添加し、コーティングされたDNAイモビライザー<sup>T M</sup>プレート上に充填した。暗所、53℃で一晩、ハイブリダイズさせた。次の日、プレートを室温まで冷却し、洗浄用バッファー(0.1X SSCバッファー; 0.1%のSDS)で洗浄した。ついで、53℃で30分インキュベートする前に、標識用バッファー(6X SSC; 10%のBMブロック(Boehringer Mannheim))中で希釈されたステムオリゴヌクレオチド(図7に提供された配列)(実施例1に記載された条件)を添加した。再度、室温まで冷却した後、ジゴキシゲニン標識されたオリゴヌクレオチド(図7に記載された配列)を添加する前に、洗浄用バッファーでプレートを洗浄した。さらに53℃で30分インキュベートした後、プレートを室温まで冷却した。ついで、プレートを洗浄用バッファーで洗浄し、アルカリホスファターゼに結合した抗ジゴキシゲニン抗体の存在下、室温で30分インキュベートした。最後に、プレートをアルカリホスファターゼ基質(CDP-Star(InnoGenex, San Ramon, CA, USA)又はBold540; Intergen, Purchase, NY, USA)で処理し、37℃で15 - 30分イン

10

20

30

40

50

キュベートした。MLXマイクロプレート照度計(Dynex)を使用し、ケミルミネセンスを読み取った。また、ヒトFc特異的なプライマー及びプローブのセットを使用し、細胞溶解物において定量RT-PCR Taqman分析を継続した。さらにGAPDHに特異的なプライマー及びプローブを使用して、サンプルを分析し、Fcデータの正規化のための参照データを提供した。RT-PCR条件は次の通りであった；48 30分で1サイクル、続いて95 10分で1サイクル、続いて95 (20秒)及び60 (60秒)を交互で40サイクル、25 (2分)で1サイクルで終了。プライマー及びプローブ配列を図17において説明した。

#### 【0136】

次のような材料及び方法を用い、無傷IgG ELISAを実施した：

10

#### 材料

1. 固体支持体：Nuncイムノプレート(Nuncカタログ番号.4-39454)
2. コーティング用バッファー：0.05Mのカルボナート/ピカルボナート、pH9.6
3. 洗浄用バッファー：PBS+0.05%のTween20
4. ブロック用バッファー：PBS+0.5%のBSA+0.01%のチメロサル、pH7.4
5. アッセイ用バッファー：PBS+0.5%のBSA+0.05%のTween20+10ppmのProclin、pH7.4
6. コート抗体：ヤギ抗ヒトIgG Fab  
供給源：Cappelカタログ番号109-005-097；1.8mg/mL
7. 標準体：rhUMA b HER2(保存濃度=10ug/mg)(Genentech, South San Francisco)
8. 結合抗体：ヤギ抗hu IgG Fc-HRP Cappelカタログ番号55253
9. 基質：TMB(Moss, Pasadena, MD, USA；製造番号TMBE1000)
10. 停止液：1Mのリン酸

20

#### 【0137】

#### 手順

#### コーティング

- 1) コートの希釈

30

#### 【表1】

抗体	濃度(mg/ml)	最終濃度	必要とされる希釈1:
Gt-抗hu IgG Fab	1.8	2ug/ml	900

- 2) 各ウェルに(1)の希釈された抗体100µlを添加し、4で一晩コーティングした。
- 3) (2)から抗体を廃棄し、各ウェルにブロック用バッファー150µlを添加した。
- 4) ゆっくりと攪拌しつつ、室温で1時間インキュベートした。

#### 【0138】

40

#### アッセイ

- 1) 標準体の調製：

- 1:50の希釈液を使用し、10ug/mlの保存物から200ng/mlの標準体を調製。

- 1:2.5連続希釈して、200ng/mlから0.33ng/mlにした。
- 2) 適切なウェルに100ulの標準体及びサンプル(上述した条件培養培地)を添加。
- 3) 室温(RT)で1時間インキュベート。
- 4) 洗浄用バッファーでプレートを3回洗浄。
- 5) 結合抗体を調製(アッセイ濃度175pg/mL)。
- 6) 洗浄用バッファーでプレートを3回洗浄。

50

- 7) 各ウェルに100 u lの結合抗体を添加。  
 8) 室温で1時間インキュベート。  
 洗浄用バッファーでプレートを3回洗浄。

#### 【0139】

図18には、次のことを証明している結果が示されている：

- 図18A：1/3と1/9に希釈された細胞溶解物のサンプルにおいて、上述した本発明の方法を使用した定量によるヒトFcのデータ。1/3希釈されたデータは1/9に希釈された細胞溶解物を使用して得られたデータと相関関係があり、これらの条件での本発明の方法の線形性が実証されている。
- 図18B：上述した本発明の方法により得られたデータは、無傷のヒトIgGイムノアッセイデータと良好な相関関係があり、特異的生産性とmRNAレベルとの間の相関関係が確認された。この結果、生産細胞クローンをスクリーニングするための信頼性のある手段として、本発明の方法を有効なものとした。
- 図18C：RT-PCR Taqmanにより測定されたヒトFc mRNAレベルは、無傷のIgGイムノアッセイを使用して測定されたヒトIgGタンパク質の量と、良好な相関関係がある。
- 図18D：上述した本発明の方法により得られたヒトFcデータは、無傷のIgGイムノアッセイデータ(図18C)に類似したTaqmanデータと相関関係がある。これは、十分に確立された遺伝子発現分析法(RT-PCR Taqman)をベースにしたスクリーニング方法と比較して、生産株化細胞のクローンをスクリーニングする目的に対して、本発明の方法を使用するアプローチを有効なものとした。

#### 【0140】

異なる細胞培養のサンプリング時点におけるヒトFcの検出/定量のための本発明の方法とIgG ELISAとの比較

組換えヒトモノクローナル抗体を生産する種々のCHOクローンを、上述した本発明の方法、並びに無傷のIgGイムノアッセイ(また上述したもの)を使用して分析した。従来の無傷のIgGイムノアッセイには、いくつかのサンプル希釈点、並びに異なるクローンの正確なランキングを確実にするための複数のサンプリング時点が必要である。この分析において、抗体生産の検出を、培養2及び3日後に収集された細胞溶解物及び条件培地において、上述した本発明の方法を使用することで評価した。双方の時点において、上述した本発明の方法で得られたデータは、上述した無傷のIgG ELISA(図示しない)により評価された特異的生産性( $r > 0.97$ )と高度な相関関係があった。これは、従来のイムノアッセイ法とは異なり、単一の時点を、本発明の方法を使用してクローンを正確にランク付けるために使用可能であることを実証している。よって、本発明の方法により、生産細胞クローンのスクリーニング方法のスループットレベルを有意に改善可能であるといった優れた利点が提供される。

#### 【0141】

多様な株化細胞の細胞クローンをスクリーニングするための本発明の方法の利用性

本発明の方法で得られたデータと無傷のIgGイムノアッセイデータとの間の相関関係を、種々の株化細胞及び細胞クローンにわたって評価した。これら2つの方法で得られたデータの間に良好な相関関係が観察され( $r > 0.8$ )、多様な組換え抗体を発現する株化細胞の多数のクローンをスクリーニングするための、本発明の方法の利用性を実証している。

よって、上述したデータが示しているように、mRNAレベル(本発明の方法を使用して測定)と特異的生産性(ELISAを使用して測定されたタンパク質レベル)の間には、良好な相関関係がある。細胞により生産される特定の抗体に依存しない形で、多数の細胞クローンを効果的にスクリーニングするための用途に対して、本発明の方法は明らかに信頼性があり、有用で優れている。本発明の方法を使用すると、ごく少数の希釈点しか必要なく、単一のサンプリング時点のみが必要で、よって従来では大きな労力を要し、非効率で、コストがかかっていた方法において、自動化と高スループット化が可能になる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0142】

【図1】本発明の方法の一実施態様の概略図であり、ここでは直鎖状ステムオリゴヌクレオチド、検体結合オリゴヌクレオチド及び標識されたオリゴヌクレオチドが使用される。

【図2】本発明の方法の一実施態様の概略図であり、ここでは直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチド及び検体結合オリゴヌクレオチドが使用される。

【図3】本発明の方法の一実施態様の概略図であり、ここでは直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドが使用され、捕捉ポリマーは支持体に間接的に付着している。

【図4】本発明の方法の一実施態様の概略図であり、ここでは検体結合標識オリゴヌクレオチドが使用され、捕捉ポリマーは支持体に直接付着している。

【図5】本発明の方法の一実施態様の概略図であり、ここでは核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(3'-エチレングリコール足場として表す)を含有する捕捉ポリマーが使用される。

【図6】本発明の方法の一実施態様の概略図であり、ここでは、(a)核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質(3'-エチレングリコール足場として表す)、及び(b)ハイブリダイゼーション強度を高める修飾されたヌクレオチドを含有する捕捉ポリマーが使用される。

【図7A】ヒト胎児(ガンマ)ヘモグロビンRNAを検出するために、実施例1で使用される捕捉ポリマー及び成分オリゴヌクレオチド(検体結合オリゴヌクレオチドを含む)の配列を表す。

【図7B】成人(ベータ)ヘモグロビンRNAを検出するために、実施例1で使用される捕捉ポリマー及び成分オリゴヌクレオチド(検体結合オリゴヌクレオチドを含む)の配列を表す。

【図7C】イブシロンヘモグロビンRNAを検出するために、実施例1で使用される捕捉ポリマー及び成分オリゴヌクレオチド(検体結合オリゴヌクレオチドを含む)の配列を表す。

【図7D】デルタヘモグロビンRNAを検出するために、実施例1で使用される捕捉ポリマー及び成分オリゴヌクレオチド(検体結合オリゴヌクレオチドを含む)の配列を表す。

【図8】一反応当たり複数種の捕捉ポリマーを使用する効果を測定するための実験の設計、及びその実験で得られたデータを表す。

【図9】捕捉ポリマーの直接/間接的付着の効果と、捕捉ポリマーの修飾効果を示すデータを表す。

【図10】ヒト胎児(ガンマ)ヘモグロビンRNAを検出するために、実施例2及び3で使用される捕捉ポリマー及び直鎖状の検体結合標識オリゴヌクレオチドの配列を表す。

【図11】ハイブリダイゼーション強度を高める修飾されたヌクレオチドと、核酸と実質的にハイブリダイズ可能ではない物質を含む捕捉ポリマーの修飾効果を示すデータを表す。これらの修飾された捕捉ポリマーを使用するシグナル/ノイズ比を、支持体に直接又は間接的に付着した未修飾の捕捉ポリマーで得られるものと比較する。

【図12】アルカリホスファターゼ基質(A1及びB1)の供給源;シグナルリーダーの選択(A2及びB2);及びマイクロプレートフォーマット(A3及びB3)の効果を示すデータを表す。薄色バーは「間接的で未修飾」の方法により得られたデータを表す(実施例3を参照)。暗色バーは「直接的で修飾された」方法により得られたデータを表す(実施例3を参照)。

【図13A】実施例4においてヒトFc m RNAを検出するために使用される、捕捉ポリマー、検体結合オリゴヌクレオチド及び標識されたオリゴヌクレオチドの配列を表す。

【図13B】実施例4においてヒトFc m RNAを検出するために使用される、捕捉ポリマー、検体結合オリゴヌクレオチド及び標識されたオリゴヌクレオチドの配列を表す。

【図14】実施例4のデータを表す。薄色バーは、直鎖状の標識されたオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより、間接的に標識された抗体結合オリゴヌクレオチドを用いて得られたデータを表す。暗色バーは直接標識された検体結合オリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

で得られたデータを表す。

【図15】DNAアレイフォーマットで、標識されたヒト胎児ヘモグロビンのcDNAを検出し定量したデータを表す。

【図16】株化細胞発育プロセスの実施態様を模式的に示す。

【図17】実施例6に記載された、ヒトFc及びGAPDH(対照として)のTaqman分析に使用したプライマー及びプローブの配列を示す。

【図18A】本発明の方法により得られた定量データを、従来のアッセイで得られたデータと比較することにより、生産細胞クローンのスクリーニングへの本発明の方法の適用性を実証するデータを表す。図中「NACA」なる用語は、実施例6に記載された本発明の方法を意味する。

【図18B】本発明の方法により得られた定量データを、従来のアッセイで得られたデータと比較することにより、生産細胞クローンのスクリーニングへの本発明の方法の適用性を実証するデータを表す。図中「NACA」なる用語は、実施例6に記載された本発明の方法を意味する。

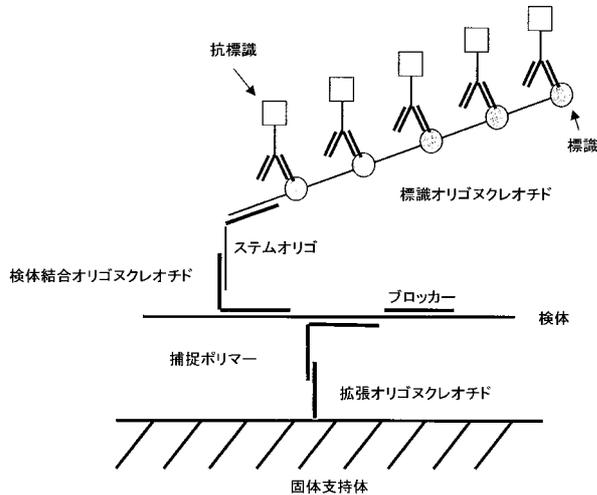
【図18C】本発明の方法により得られた定量データを、従来のアッセイで得られたデータと比較することにより、生産細胞クローンのスクリーニングへの本発明の方法の適用性を実証するデータを表す。図中「NACA」なる用語は、実施例6に記載された本発明の方法を意味する。

【図18D】本発明の方法により得られた定量データを、従来のアッセイで得られたデータと比較することにより、生産細胞クローンのスクリーニングへの本発明の方法の適用性を実証するデータを表す。図中「NACA」なる用語は、実施例6に記載された本発明の方法を意味する。

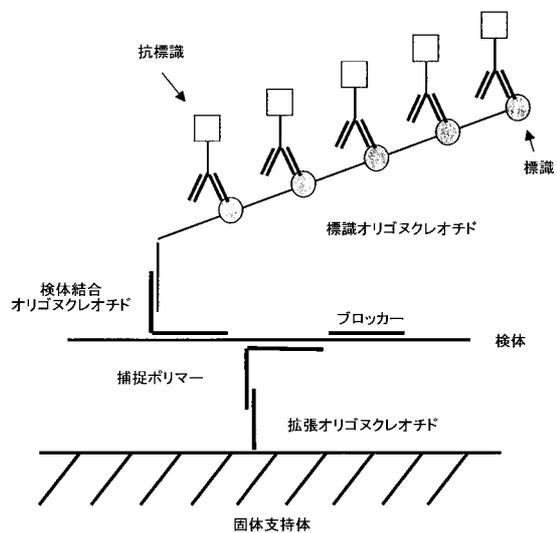
10

20

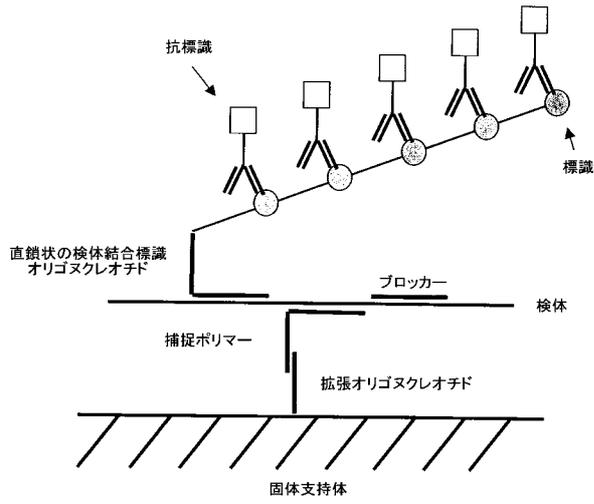
【図1】



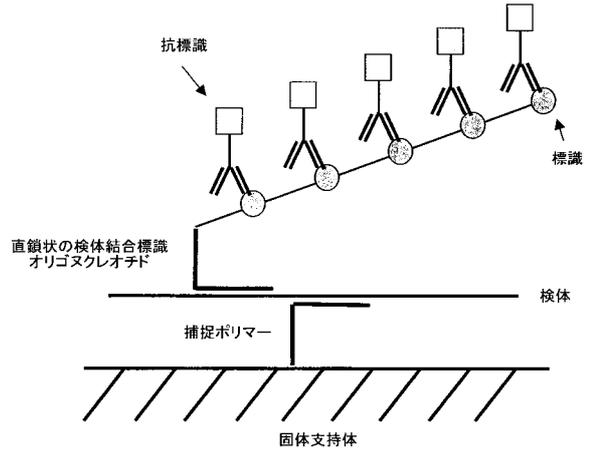
【図2】



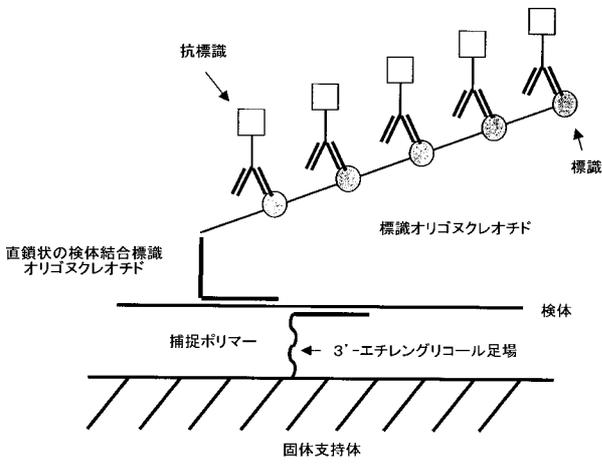
【 図 3 】



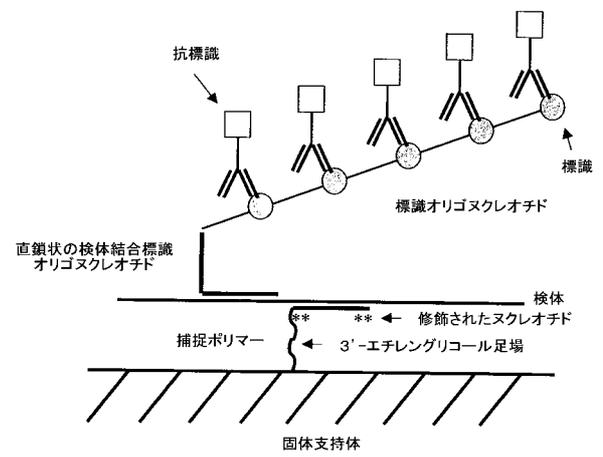
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 A 】

ヒト胎児ヘモグロビン(ガンマ)捕捉ポリマーと  
検体結合オリゴヌクレオチド

機能	配列
捕捉	ttgccgaaatggattgccaaa TTTTctcttggaaagaagt (配列番号: 1)
	gcacctcaggggtgaattct TTTTctcttggaaagaagt (配列番号: 2)
	tctctgccaggaagcct TTTTctcttggaaagaagt (配列番号: 3)
	gcctatccttgaagctctg TTTTctcttggaaagaagt (配列番号: 4)
	atttgattcttgcagaataaa TTTTctcttggaaagaagt (配列番号: 5)
	tgatcttagcagaatagattatt TTTTctcttggaaagaagt (配列番号: 6)
	gccttgacttgggggtgccatgatg TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 7)
	tcagcaccttctgccatgt TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 8)
	ttatggcatctccaaggaag TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 9)
	gcccttgatcatccagggtct TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 10)
	tgagttcaactagctgggcaaaggt TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 11)
	acggtccaccagcacatttccagg TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 12)
	ccagtcaccatctctgccca TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 13)
	ggacagggcactggccact TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 14)
ブロック	cacatgcagctgtcacag (配列番号: 15)
	agctgaagtctcaggatc (配列番号: 16)
	catcatggcagtgagctcagtgatctgga (配列番号: 17)

拡張 cac ttc act ttc ttt cca aga g (配列番号: 18)

ステム gatgtggttgcgtacttgcgtagtgactgtttttttttgacacgggtcctatgcct (配列番号: 19)

標識 tac gca agt acg aca acc aca tct t LLLLLLLLLL (配列番号: 20)

L=標識(FITC、ビオチン又はDIG)

【 図 7 B 】

ヒト成人ヘモグロビン(ベータ)捕捉ポリマーと  
検体結合オリゴヌクレオチド

機能	配列		
捕捉	ttgtccaggtgagccaggc TTTTctcttggaaagaagt (配列番号: 21)		
	actggtgggtgaattctttgccaaag TTTTctcttggaaagaagt (配列番号: 22)		
	aagaaagcgagcttagtgatactgt TTTTctcttggaaagaagt (配列番号: 23)		
	aaggccctcaataatccc TTTTctcttggaaagaagt (配列番号: 24)		
	検体結合オリゴ	ttaggggtgccataactgcacac TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 25)	
		cacttcttccatgagcctcacc TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 26)	
		catcactaaaggcaccgag TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 27)	
		accagcaggtgccaggagcc TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 28)	
		tgatggccagcacacag TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 29)	
		ccaccattctgatagctgcctgc TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 30)	
		ccagtttagttagtggactagggga TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 31)	
		aggcagaatccagatgctc TTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 32)	
		ブロック	tggtccaaaggtgcccttagg (配列番号: 33)
			agctgtcacagtcagctcactcag (配列番号: 34)
tgaagtctcaggatccagctgc (配列番号: 35)			
gggcccaggcattagccacaccag (配列番号: 36)			
acaaaggaaccttaatagaattggacagc (配列番号: 37)			

拡張 cac ttc act ttc ttt cca aga g (配列番号: 18)

ステム gatgtggttgcgtacttgcgtagtgactgtttttttttgacacgggtcctatgcct (配列番号: 19)

標識 tac gca agt acg aca acc aca tct t LLLLLLLLLL (配列番号: 20)

L=標識(FITC、ビオチン又はDIG)

【 図 7 C 】

ヒトエプシロンヘモグロビン捕捉ポリマーと  
検体結合オリゴヌクレオチド

機能	配列
捕捉	gcacttcaggggtgaactccctcttggaaagaagt (配列番号: 38)
	gcttctgccagggcagcctctcttggaaagaagt (配列番号: 39)
	catgtgcagaaggaggggtctcttggaaagaagt (配列番号: 40)
	ttattaacagaaggcttctctcttggaaagaagt (配列番号: 41)
検体結合オリゴ	aggcttcacctccagccttagcataggaccctgtct (配列番号: 42)
	aacaacgaggagctgcccaaggcataggaccctgtct (配列番号: 43)
	aaactctctgggtccagggtaaggcataggaccctgtct (配列番号: 44)
	gggagacgacaggttccaaggcataggaccctgtct (配列番号: 45)
	tggggtgccaggatggcagaaggcataggaccctgtct (配列番号: 46)
	ttgccatggccttgacctagcataggaccctgtct (配列番号: 47)
	gcttgaggtgtccatgttttaataggcataggaccctgtct (配列番号: 48)
	gcagctcactcagcttagcaaggcggagcataggaccctgtct (配列番号: 49)
	tcacatgcagcttgcacagtaggcataggaccctgtct (配列番号: 50)
	tcaccatcacggtaccaggaaggcataggaccctgtct (配列番号: 51)
	atggcgacagcagacaccaaggcataggaccctgtct (配列番号: 52)
	ggctactatggccagggaaggcataggaccctgtct (配列番号: 53)
	cagggtcacaggaaccctgcaggcataggaccctgtct (配列番号: 54)
	aaggccaagcccagtcaggcataggaccctgtct (配列番号: 55)
ブロック	aagctgtcaaa (配列番号: 56)
	agcatctccaaaggaagtcagcaccttc (配列番号: 57)
	gcttgaagtctcaggaa (配列番号: 58)
	aaactggaagagaactcagt (配列番号: 59)

拡張 cac ttc act ttc ttt cca aga g (配列番号: 18)

ステム gatgtggttgcgtacttgcgtagtgactgtttttttttgacacgggtcctatgcct (配列番号: 19)

標識 tac gca agt acg aca acc aca tct t LLLLLLLLLL (配列番号: 20)

L=標識(FITC、ビオチン又はDIG)

【 図 7 D 】

ヒトデルタヘモグロビン捕捉ポリマーと  
検体結合オリゴヌクレオチド

機能	配列	
捕捉	gggtaattccttccaaagTTTTctcttggaaagaagt (配列番号: 60)	
	ggcagcctgatttggTTTTctcttggaaagaagt (配列番号: 61)	
	glcttcttattggttaccaggaacTTTTctcttggaaagaagt (配列番号: 62)	
検体結合オリゴ	ccataacagcatcaggagaggcTTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 63)	
	tgagcctcaccctagggttgcTTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 64)	
	aaggcaactagcaccttctgcaTTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 65)	
	ggtagccagggcaccatcactTTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 66)	
	gtgccctgaggttgcTTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 67)	
	gttccagatccagctgcagctgtcacagTTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 68)	
	ccagcattgcccaagagcctgaaTTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 69)	
	ttgcgggagcagcacacaTTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 70)	
	accagccaccactctgataTTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 71)	
	tgagccaggcatagccacTTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 72)	
	agtcaggatctcaatggtactgTTTTtagcataggaccctgtct (配列番号: 73)	
	ブロック	tcagctcactcagctgagaaaaa (配列番号: 74)

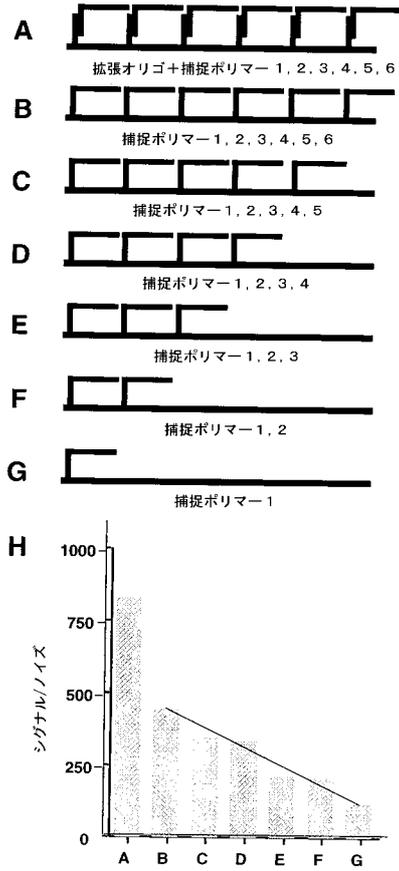
拡張 cac ttc act ttc ttt cca aga g (配列番号: 18)

ステム gatgtggttgcgtacttgcgtagtgactgtttttttttgacacgggtcctatgcct (配列番号: 19)

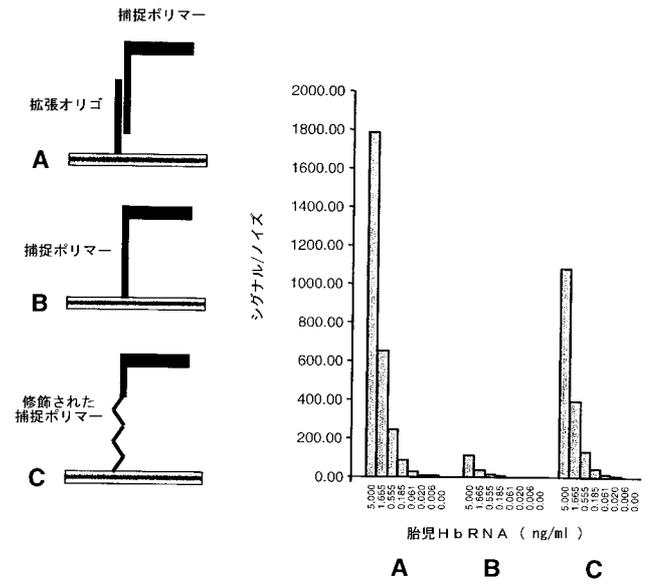
標識 tac gca agt acg aca acc aca tct t LLLLLLLLLL (配列番号: 20)

L=標識(FITC、ビオチン又はDIG)

【 図 8 】



【 図 9 】

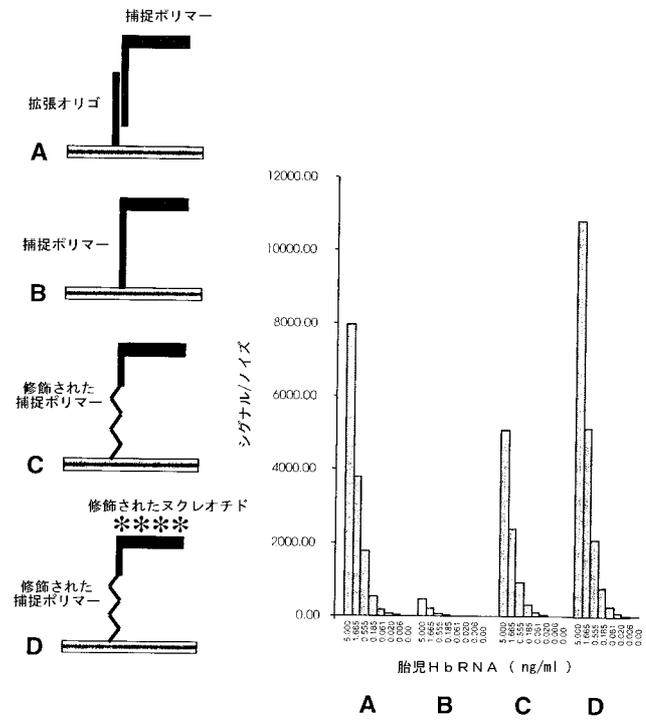


【 図 10 】

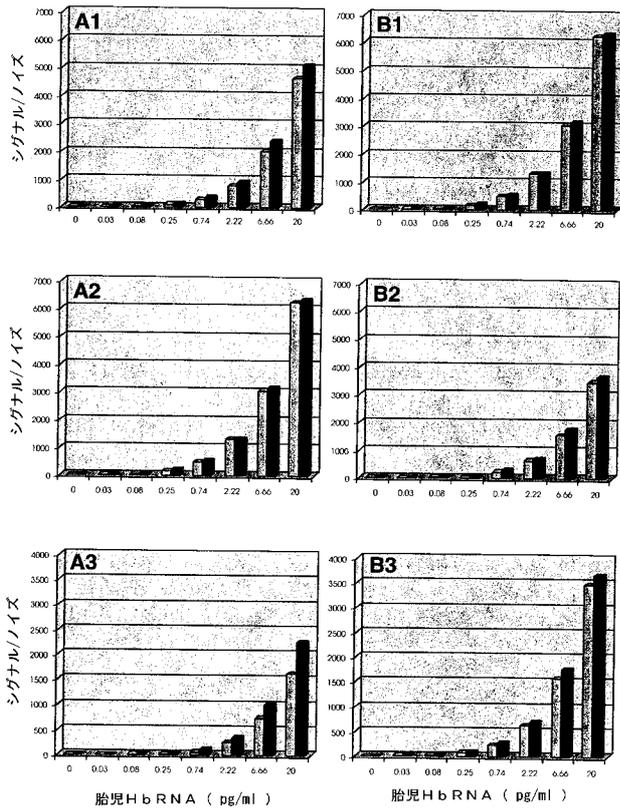
機能	配列	
捕捉	GCCAA AACGGTCAC CAGCA TTTTctctggaaaXY (配列番号: 75)	
	TGAAT TCITTTGCCGAAAT GGATT TTTTctctggaaaXY (配列番号: 76)	
	AAGCC TGCACCTC AGGGG TTTTctctggaaaXY (配列番号: 77)	
	TTCTG CCATCTTCTG CCAGG TTTTctctggaaaXY (配列番号: 78)	
	CATCA TGGGCAGTGAGC TCAGT TTTTctctggaaaXY (配列番号: 79)	
	AGAAT AAAGCCTATCCTTGAAGCTCTG TTTTctctggaaaXY (配列番号: 80)	
	AGCAG AATAGATTATATTGTATTG CTTGC TTTTctctggaaaXY (配列番号: 81)	
	直鎖状の検体結合標識オリゴ	CCCA AGGAAGTCAGCACCTCTTTTBBBBB (配列番号: 82)
		CATCCAGGTGCTTTATGGCATCT TTTTBBBBB (配列番号: 83)
		GGCAAAGGTGCCCTTGAGAT TTTTBBBBB (配列番号: 84)
TCACAGTGCAGTTCAGTCTG TTTTBBBBB (配列番号: 85)		
TCAGGATCCACATGCAGCTTG TTTTBBBBB (配列番号: 86)		
CATT TCCCAGGAGCTTGAAGTTC TTTTBBBBB (配列番号: 87)		
TGGCCATCCAGTCCACATC TTTTBBBBB (配列番号: 88)		
GGTATCTGGAGGACAGGCAC TTTTBBBBB (配列番号: 89)		

X = C18スベーターX4  
 Y = 3'アミノ化CPG-支持体  
 太文字 = Ome RNA  
 B = ビオチン

【 図 11 】



【図 1 2】



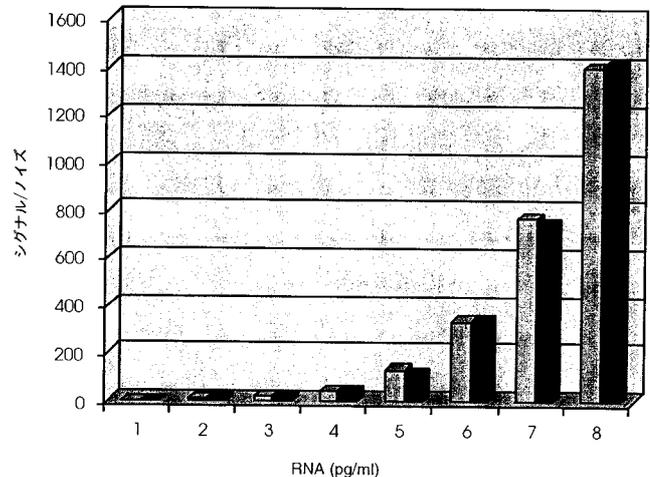
【図 1 3 A】

機能	配列	
捕捉	GGAGTTCAGGTGCTGGGCACtttttttYX (配列番号: 90)	
	CGTCCACGTACCAGTTGAACCTGtttttttYX (配列番号: 91)	
	GGCATTATGCACCTCCACGCtttttttYX (配列番号: 92)	
	GGAGGGCTTTGTTGGAGACCTTttttttYX (配列番号: 93)	
	GGTTTTCTCGATGGGGGCTGtttttttYX (配列番号: 94)	
	CAGGCAGGTCAGGCTGACCTtttttttYX (配列番号: 95)	
	CGCTGGGATAGAAGCCTTTGACtttttttYX (配列番号: 96)	
	CCCACTCCACGGCGATGtttttttYX (配列番号: 97)	
	CCGGCTGCCCATTTGCTCTtttttttYX (配列番号: 98)	
	CGTCGGAGTCCAGCACGGtttttttYX (配列番号: 99)	
	検体結合オリゴ	AGACTGACGGTCCCCCATTTTT (配列番号: 100)
		GGTTTTGGGGGAAGAGGATTTTT (配列番号: 101)
		GGAGATCATGAGGGTGCCTTGTTTTT (配列番号: 102)
		TGTGACCTCAGGGTCCGTTTTT (配列番号: 103)
		ACCTCAGGGTCTTCGTGGCTTTTTT (配列番号: 104)
CTCCCGGGCTTTGTCTTTTTT (配列番号: 105)		
CGGTACGTGCTGTTGTACTGCTCTTTTT (配列番号: 106)		
GGTGAGGACGCTGACCACATTTTT (配列番号: 107)		
GCCAGTCTGGTGCAGGATTTTT (配列番号: 108)		
GCACTTGTACTCCTTGCCATTCATTTTT (配列番号: 109)		
TGCCCTTGGCTTTGGAGATTTTTT (配列番号: 110)		
ACCTGTGGTTCTCGGGGCTTTTT (配列番号: 111)		
GGATGGGGCAGGGTGTACTTTTT (配列番号: 112)		
GGTCTTGGTCATCTTCCCGTTTTT (配列番号: 113)		
GAGGCGTGGTCTTGTAGTTGTTCTTTTT (配列番号: 114)		
GCTTGCTGTAGAGGAAGAAGGAGCTTTTT (配列番号: 115)		
標識	AAAAABBBBB (配列番号: 116)	

【図 1 3 B】

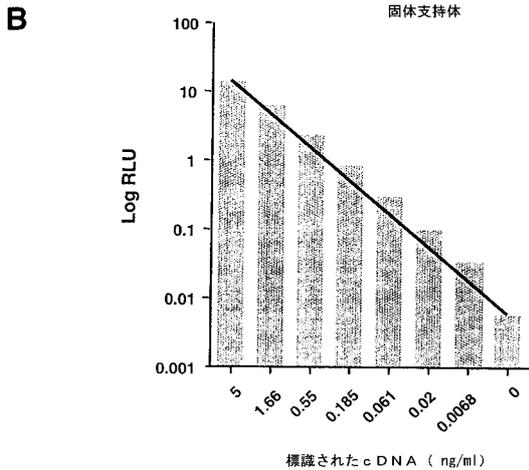
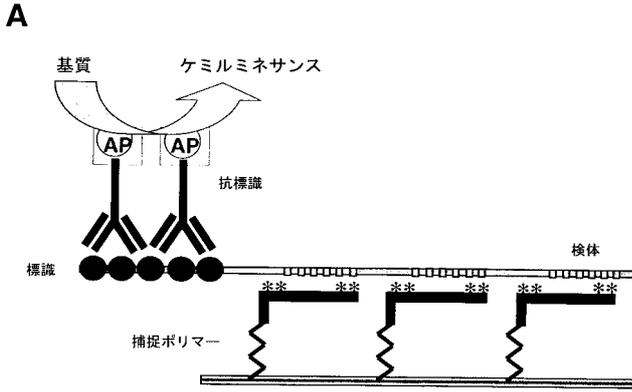
機能	配列
捕捉	GGAGTTCAGGTGCTGGGCACtttttttYX (配列番号: 90)
	CGTCCACGTACCAGTTGAACCTGtttttttYX (配列番号: 91)
	GGCATTATGCACCTCCACGCtttttttYX (配列番号: 92)
	GGAGGGCTTTGTTGGAGACCTTttttttYX (配列番号: 93)
	GGTTTTCTCGATGGGGGCTGtttttttYX (配列番号: 94)
	CAGGCAGGTCAGGCTGACCTtttttttYX (配列番号: 95)
	CGCTGGGATAGAAGCCTTTGACtttttttYX (配列番号: 96)
	CCCACTCCACGGCGATGtttttttYX (配列番号: 97)
	CCGGCTGCCCATTTGCTCTtttttttYX (配列番号: 98)
	CGTCGGAGTCCAGCACGGtttttttYX (配列番号: 99)
直鎖状の検体結合標識オリゴ	AGACTGACGGTCCCCCAAAAAABBBBB (配列番号: 117)
	GGTTTTGGGGGAAGAGAAAAABBBBB (配列番号: 118)
	GGAGATCATGAGGGTGCCTTGAAAAABBBBB (配列番号: 119)
	TGTGACCTCAGGGTCCGAAAAABBBBB (配列番号: 120)
	ACCTCAGGGTCTTCGTGGCTAAAAABBBBB (配列番号: 121)
	CTCCCGGGCTTTGTCTAAAAABBBBB (配列番号: 122)
	CGGTACGTGCTGTTGTACTGCTCAAAAAABBBBB (配列番号: 123)
	GGTGAGGACGCTGACCACAAAAABBBBB (配列番号: 124)
	GCCAGTCTGGTGCAGGACAAAAABBBBB (配列番号: 125)
	GCACTTGTACTCCTTGCCATTCAAAAABBBBB (配列番号: 126)
	TGCCCTTGGCTTTGGAGATAAAAAABBBBB (配列番号: 127)
	ACCTGTGGTTCTCGGGCAAAAAABBBBB (配列番号: 128)
GGATGGGGCAGGGGTACAAAAABBBBB (配列番号: 129)	
GGTCTTGGTCATCTTCCGAAAAABBBBB (配列番号: 130)	
GAGGCGTGGTCTTGTAGTTGTTCAAAAAABBBBB (配列番号: 131)	
GCTTGCTGTAGAGGAAGAAGGAGCAAAAAABBBBB (配列番号: 132)	

【図 1 4】



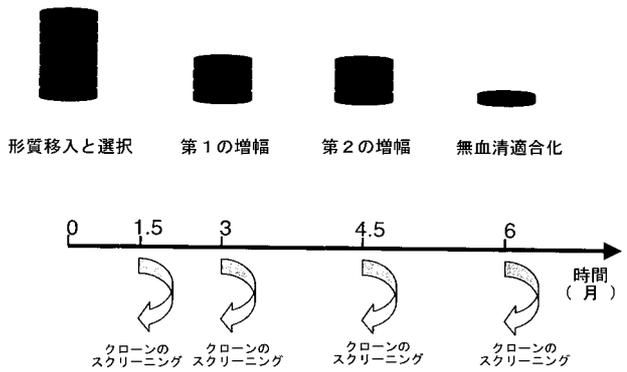
X = C18スプレーサー X4 Y = 3'アミノ化CPG-支持体 太文字 = Ome RNA B = ビオチン

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

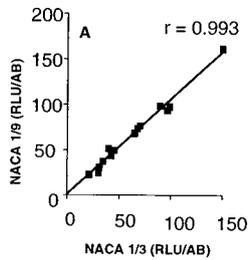
株化細胞発育



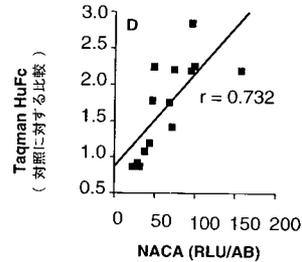
【 図 1 7 】

ヒト、F.c. 正	GCG TGG AGG TGC ATA ATG C	( 配列番号 : 133 )
ヒト、F.c. 逆	CCA CAC GGT ACG TGC TGT TG	( 配列番号 : 134 )
ヒト、F.c. プローブ	CTG CTC CTC CCG CGG CTT TGT	( 配列番号 : 135 )
CHO、GAPDH、正	CAAAGGCACAGTCAAGGCTGAGAA	( 配列番号 : 136 )
CHO、GAPDH、逆	TGGTGAAGACGCCAGTAGATTCCA	( 配列番号 : 137 )
CHO、GAPDH、プローブ	AGATCCCGCCAACATCAAATGGGGTGAT	( 配列番号 : 138 )

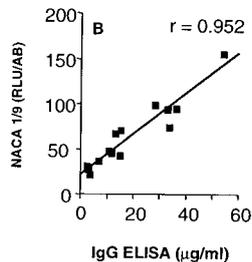
【 図 1 8 A 】



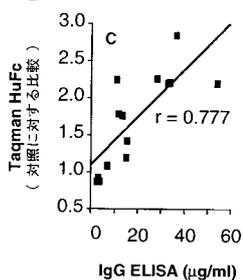
【 図 1 8 D 】



【 図 1 8 B 】



【 図 1 8 C 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/09726
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : C12Q 1/68; US CL : 435/6, 91.1; 536/23.1, 23.5, 24.3, 24.33 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 91.1; 536/23.1, 23.5, 24.3, 24.33		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 5,681,697A (URDEA et al.) 28 October 1997 (28.10.1997), see whole document, especially Figures 1-11 and columns 2-4, 7-8, 10-11 and 53-58.	1-3, 16-19 and 21-34 ----- 20
X --- Y	US 5,780,610A (COLLINS et al.) 14 July 1998 (14.07.1998), see whole document, especially Figures 1-3 and columns 3-11.	1-3, 16-19 and 21-34 ----- 20
X --- Y	COLLINS et al. A Branched DNA Signal Amplification Assay for Quantification of Nucleic Acid Targets Below 100 molecules/ml. Nucleic Acids Research. 1997, Vol. 25, No. 15, pages 2979-2984, especially pages 2980-2983.	1-3, 16-19 and 21-34 ----- 20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"S" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 22 February 2004 (22.02.2004)	Date of mailing of the international search report 22 JUN 2004	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Alexander H. Spiegler <i>Janice Ford</i> Telephone No. (703) 308-0196 <i>for</i>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/09726

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claim Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claim Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
Please See Continuation Sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3 and 16-34 (wherein the nucleic acid analyte encodes a growth hormone)

- Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

PCT/US03/09726

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups 1-72, claim(s) 1-3 and 16-34 (in part), drawn to methods for detecting or quantifying a nucleic acid analyte in a sample, wherein a capture polymer comprises a nucleic acid sequence that is directly or indirectly hybridizable to the analyte. Group 1 is drawn to the nucleic acid analyte comprises a sequence encoding part or all of a polypeptide consisting of growth hormone, Group 2 wherein the analyte is insulin-like growth factors, Group 3 wherein the analyte is human growth hormone, etc.

Groups 73-144, claim(s) 4, 7-9 and 16-44 (in part), drawn to methods for detecting or quantifying a nucleic acid analyte in a sample, wherein a capture polymer comprises a first portion that is hybridizable to the analyte and a second portion comprising a material that is not substantially hybridizable to nucleic acid. Group 73 is drawn to the nucleic acid analyte comprises a sequence encoding part or all of a polypeptide consisting of growth hormone, Group 74 wherein the analyte is insulin-like growth factors, Group 75 wherein the analyte is human growth hormone, etc.

Groups 145-216, claim(s) 5, 10-12, 16-34 (in part) and 45-54 (in part), drawn to methods for detecting or quantifying a nucleic acid analyte in a sample, wherein a capture polymer comprises a sequence that is hybridizable to the analyte and further comprises at least one modified nucleotide that enhances strength of hybridization of the polymer to the analyte. Group 145 is drawn to the nucleic acid analyte comprises a sequence encoding part or all of a polypeptide consisting of growth hormone, Group 146 wherein the analyte is insulin-like growth factors, Group 147 wherein the analyte is human growth hormone, etc.

Groups 217-288, claim(s) 6 and 13-54 (in part), drawn to methods for detecting or quantifying a nucleic acid analyte in a sample, wherein a capture polymer comprises a first portion that is hybridizable to the analyte, said first portion comprising at least one modified nucleotide that enhances strength of hybridization of the polymer to the analyte, and a second portion comprising a material that is not substantially hybridizable to nucleic acid. Group 217 is drawn to the nucleic acid analyte comprises a sequence encoding part or all of a polypeptide consisting of growth hormone, Group 218 wherein the analyte is insulin-like growth factors, Group 219 wherein the analyte is human growth hormone, etc.

The inventions listed as Groups 1-288 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of Groups 1-72 is a method for detecting or quantifying, wherein a capture polymer comprises a nucleic acid sequence that is directly or indirectly hybridizable to the analyte, whereas the special technical feature of Groups 73-144 is a method for detecting or quantifying, wherein a capture polymer comprises a first portion that is hybridizable to the analyte and a second portion comprising a material that is not substantially hybridizable to nucleic acid, whereas the special technical feature of Groups 145-216 is a method for detecting or quantifying, wherein a capture polymer comprises a sequence that is hybridizable to the analyte and further comprises at least one modified nucleotide that enhances strength of hybridization of the polymer to the analyte, whereas the special technical feature of Groups 217-288 is a method for detecting or quantifying, wherein a capture polymer comprises a first portion that is hybridizable to the analyte, said first portion comprising at least one modified nucleotide that enhances strength of hybridization of the polymer to the analyte, and a second portion comprising a material that is not substantially hybridizable to nucleic acid. Each of these groups having differing reagents, which will require differing reaction conditions and method steps. Specifically, the capture polymer of Groups 1-72, Groups 73-144, Groups 145-216 and Groups 217-288 have capture polymers that lack the same or corresponding technical feature because each capture polymer has a different structure from one another. Additionally, it is noted that each group is drawn to a specific nucleic acid analyte comprising a sequence encoding part or all of a polypeptide. Each nucleic acid is different from one another, and thus lacks the same or corresponding special technical feature, as each nucleic acid has a different structure (nucleic acid sequence), and function (encodes a polypeptide having a different activity). Accordingly, Groups 1-288 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/09726

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

Databases: USPAT, US PG PUB, EPO, JPO, Derwent, Medline, Biosis, Embase, CaPlus, Biotechds

Search Terms: oligonucleotide, probe, capture, hybridize, labeled, stem, analyte, sandwich assay, extender

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/58	A
G 0 1 N 33/58	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IT, LU, MC, NL, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ツァイ, シャオ ピン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サン フランシスコ, オレンジ ア  
 ベニュー 5 1 9

(72) 発明者 ウォン, ワイ リー タン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 2, ロス アルトス, アリック レーン 2 6 3  
 3 3

(72) 発明者 ビレシ, トッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 6 5, ピッツバーグ, コロンビア ストリート 1  
 3 4 5

F ターム(参考) 2G045 AA35 CB01 DA13 DA14 FB02 FB12 GC15  
 2G054 AA08 CA22 CE02 EA03  
 4B024 AA11 AA19 CA01 CA04 CA06 CA09 CA12 HA12 HA13  
 4B063 QA01 QQ42 QQ53 QQ79 QR32 QR41 QR51 QR56 QR62 QR66  
 QR82 QS25 QS34 QS36 QX01

专利名称(译)	用于检测和定量核酸分析样品的方法和组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005521410A</a>	公开(公告)日	2005-07-21
申请号	JP2003580830	申请日	2003-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ステファンジーンフィリップエフ ツアイシャオピン ウォンワイリータン ビレシトッド		
发明人	ステファン, ジーン-フィリップ, エフ. ツアイ, シャオ ピン ウォン, ワイ リー タン ビレシ, トッド		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 C40B40/02 C40B50/06 G01N21/78 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/58 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6837 C12Q1/682		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N21/78.C G01N33/53.M G01N33/543.575 G01N33/566 G01N33/58.A G01N37/00.102 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/FB02 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA08 2G054/CA22 2G054/CE02 2G054/EA03 4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA12 4B024/HA13 4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR51 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01		
优先权	60/368669 2002-03-29 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测和定量核酸分析物的新型基于液相杂交的方法。提供了涉及使用新型捕获聚合物和/或信号系统的方法。与现有的液相核酸检测和定量方法相比，这些新型捕获聚合物和/或信号系统的使用显著提高了信噪比，特异性，灵敏度和易于开发以及易用性。是的。此外，本发明提供了用于实施本发明方法的组合物，试剂盒和制品。

抗体	濃度 (mg/ml)	最終濃度	必要とされる希釈1:
Gt-抗 hu IgG Fab	1.8	2ug/ml	900