

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4434819号
(P4434819)

(45) 発行日 平成22年3月17日(2010.3.17)

(24) 登録日 平成22年1月8日(2010.1.8)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/58	(2006.01)	GO 1 N 33/58		Z
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	GO 1 N 33/58		A
GO 1 N 33/53	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68		A
		GO 1 N 33/53		D
		GO 1 N 33/53		M

請求項の数 62 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2004-110340 (P2004-110340)
 (22) 出願日 平成16年4月2日(2004.4.2)
 (65) 公開番号 特開2004-309486 (P2004-309486A)
 (43) 公開日 平成16年11月4日(2004.11.4)
 審査請求日 平成16年8月5日(2004.8.5)
 (31) 優先権主張番号 10/407818
 (32) 優先日 平成15年4月3日(2003.4.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502237353
 エンゾー ライフ サイエンスズ インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、ニュー ヨーク 117
 35-4716、ファーミングデイル、エグゼキューティブ ブールバード 60
 (74) 代理人 100064012
 弁理士 浜田 治雄
 (72) 発明者 イレーザー ラバニ
 アメリカ合衆国、ニュー ヨーク 100
 03、ニュー ヨーク、フィフス アベニュー 69、アパートメント 19エイ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マルチシグナル標識化試薬及びそれらの標識化方法並びに定量化方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 一つあるいは複数の標識がオリゴマーあるいはポリマーのモノマーサブユニットと化学的に結合する2つ以上の標識された該オリゴマーあるいはポリマーのモノマーサブユニット、

b) 該オリゴマーあるいはポリマーと結合する1つの反応基、及び

c) 一つ以上の荷電基であって、該荷電基は

(i) 該オリゴマーあるいはポリマーに共有結合されるか、あるいは

(i i) 該オリゴマーあるいはポリマーの主鎖の一部に該荷電基を含有するか、あるいは

(i i i) 前記の組合せを含有する該荷電基と

からなるオリゴマーあるいはポリマーを含有する組成物であって、

前記反応基はイソチオシアネート、イソシアネート、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、モノ-あるいはジ-ハロゲン置換ピリジン、モノ-あるいはジ-ハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン化物、酸ハロゲン化物、ヒドロキシスクシンイミドエステル、ヒドロキシルスルホスクシンイミドエステル、イミドエステル、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、アジド、3-(2-ピリジルジチオ)-プロプリオンアミド、グリオキサール、アルデヒド、炭素-炭素間二重結合もしくは水銀塩及び炭素-炭素二重結合、アミン、ヒドロキシル基、スルフヒドリル基およびハロゲンと反応可能な基からなるグルー

10

20

プから選択され、且つ前記反応基はこのオリゴマーあるいはポリマーに対して内在しておらず、且つ前記反応基は前記標識ではないオリゴマーあるいはポリマーを含有する組成物。

【請求項 2】

前記オリゴマーあるいはポリマーはホモポリマー、ヘテロポリマーあるいはキメラである請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

前記オリゴマーあるいはポリマーはアミノ酸、ヌクレオチド、炭水化物、糖類、芳香族化合物、オリゴマーあるいはポリマーのモノマーサブユニットを形成する誘導有機化合物及びそれらのアナログとからなるグループから選択される 1 つ以上のモノマーサブユニットを含有する請求項 1 または 2 記載の組成物。

10

【請求項 4】

一つ以上の前記モノマーサブユニットは修飾される請求項 3 記載の組成物。

【請求項 5】

前記オリゴマーあるいはポリマーは核酸、脱塩基核酸、ペプチド核酸、ポリペプチド、タンパク質、オリゴ糖、多糖類、有機ポリマーあるいはそれらの組合せを含有する請求項 3 または 4 記載の組成物。

【請求項 6】

前記標識は蛍光化合物、燐光化合物、化学発光化合物、キレート化合物、高電子密度化合物、磁気化合物、内位添加化合物及びエネルギー伝達化合物あるいはそれらの組合せからなるグループから選択される請求項 1 記載の組成物。

20

【請求項 7】

前記反応基はリンカーを介してオリゴマーあるいはポリマーに連結される請求項 1 記載の組成物。

【請求項 8】

前記リンカーは 1 つ以上の炭素、窒素、酸素、リンあるいは硫黄原子をいずれかの組合せで含有する請求項 7 記載の組成物。

【請求項 9】

前記リンカーはペプチド結合、アルキル鎖、アルケン基、アルキル基、アリール基、芳香族基、糖類あるいはそれらの誘導体を含有する請求項 8 記載の組成物。

30

【請求項 10】

前記荷電基はホスフェート、カルボン酸、スルホン、アミン及びヒドロキシ基からなるグループから選択される請求項 1 記載の組成物。

【請求項 11】

前記荷電基は負の電荷を有する請求項 1 記載の組成物。

【請求項 12】

前記オリゴマーあるいはポリマーは直鎖かあるいは分岐する請求項 1 記載の組成物。

【請求項 13】

前記オリゴマーあるいはポリマーは 1 つより多いオリゴマーあるいはポリマーから生成される複合体を含有し、前記複合体は 2 つ以上の核酸鎖の塩基対あるいは三重鎖構造を介して生成される請求項 1 記載の組成物。

40

【請求項 14】

少なくとも 1 つの前記核酸鎖は 1 つ以上のヌクレオチドアナログあるいは変性ヌクレオチドを含有する請求項 13 記載の組成物。

【請求項 15】

核酸鎖あるいは 2 つ以上の核酸鎖複合体を含有する組成物であって、前記鎖あるいは複合体は 1 つの反応基と 2 つ以上の標識ヌクレオチドあるいは標識ヌクレオチドアナログを含有する組成物であって、前記反応基はイソチオシアネート、イソシアネート、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、モノ - あるいはジ - ハロゲン置換ピリジン、モノ - あるいはジ - ハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン置換

50

ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン化物、酸ハロゲン化物、ヒドロキシスクシンイミドエステル、ヒドロキシルスルホスクシンイミドエステル、イミドエステル、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、アジド、3 - (2 - ピリジルジチオ) - プロプリオンアミド、グリオキサール、アルデヒド、炭素 - 炭素間二重結合もしくは水銀塩及び炭素 - 炭素二重結合、アミン、ヒドロキシル基、スルフヒドリル基およびハロゲンと反応可能な基からなるグループから選択され、且つ前記反応基はオリゴマーあるいはポリマーに対して内在しておらず、且つ前記反応基は前記標識ではない組成物。

【請求項 1 6】

前記核酸鎖あるいは複合体は 1 つ以上の非標識ヌクレオチドアナログを含有する請求項 1 5 記載の組成物。

10

【請求項 1 7】

前記ヌクレオチドアナログは脱塩基核酸、スペーサ基あるいはペプチド核酸サブユニットからなるグループから選択される請求項 1 5 または 1 6 記載の組成物。

【請求項 1 8】

前記標識は蛍光化合物、燐光化合物、化学発光化合物、キレート化合物、高電子密度化合物、磁気化合物、内位添加化合物及びエネルギー伝達化合物あるいはそれらの組合せからなるグループから選択される請求項 1 5 記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記反応基はリンカーを介して前記鎖あるいは複合体に添加される請求項 1 5 記載の組成物。

20

【請求項 2 0】

前記リンカーはヌクレオチドかあるいは前記鎖あるいは複合体からなるヌクレオチドアナログに添加され且つ前記添加は塩基、糖類、ホスフェートあるいはそれらのアナログを介する請求項 1 9 記載の組成物。

【請求項 2 1】

前記リンカーは 1 つ以上の炭素、窒素、酸素、リンあるいは硫黄原子をいずれかの組合せで含有する請求項 1 9 記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記リンカーは 1 つ以上のペプチド結合、アルキル鎖、アルケン基、アルキル基、アリール基、芳香族基、糖類あるいはそれらの誘導体を含有する請求項 1 9 記載の組成物。

30

【請求項 2 3】

前記核酸鎖は直鎖かあるいは分岐する請求項 1 5 記載の組成物。

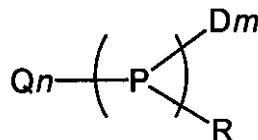
【請求項 2 4】

前記複合体は塩基対あるいは三重鎖構造を介して生成される請求項 1 8 記載の組成物。

【請求項 2 5】

以下の構造を有する化合物であって、

【化 1】



40

ここで Q は非固有荷電基を表し、n は 1 以上の整数を表し、D は標識を表し、m は 2 と等しいかそれ以上の整数を表し、R は 1 つの反応基 を表し、及び P はオリゴマーあるいはポリマーを表す化合物を含有する組成物であって、

前記反応基 R はイソチオシアネート、イソシアネート、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、モノ - あるいはジ - ハロゲン置換ピリジン、モノ - あるいはジ - ハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン化物、酸ハロゲン化物、ヒドロキシスクシンイミドエステル、ヒドロキシルスルホスクシンイミドエステル、イミドエステル、ヒドラジン、アジ

50

ドニトロフェニル、アジド、3-(2-ピリジルジチオ)-プロプリオンアミド、グリオキサール、アルデヒド、炭素-炭素間二重結合もしくは水銀塩及び炭素-炭素二重結合、アミン、ヒドロキシ基、スルフヒドリル基およびハロゲンと反応可能な基からなるグループから選択され、且つ前記反応基はこのオリゴマーあるいはポリマーに対して内在しておらず、且つ前記反応基は前記標識ではない組成物。

【請求項26】

前記非固有荷電基Qはホスフェート、カルボン酸、スルホン、アミン及びヒドロキシ基からなるグループから選択される請求項25記載の組成物。

【請求項27】

前記Qは負の電荷を有する請求項25記載の組成物。

10

【請求項28】

前記標識Dは蛍光化合物、燐光化合物、化学発光化合物、キレート化合物、高電子密度化合物、磁気化合物、内位添加化合物及びエネルギー伝達化合物あるいはそれらの組合せからなるグループから選択される請求項25記載の組成物。

【請求項29】

前記反応基Rはリンカーを介して前記オリゴマーあるいはポリマーPに連結される請求項25記載の組成物。

【請求項30】

前記リンカーは1つ以上の炭素、窒素、酸素、リンあるいは硫黄原子をいずれかの組合せで含有する請求項29記載の組成物。

20

【請求項31】

前記リンカーは一つ以上のペプチド結合、アルキル鎖、アルケン基、アルキル基、アリアル基、芳香族基、糖類あるいはそれらの誘導体を含有する請求項29記載の組成物。

【請求項32】

前記オリゴマーあるいはポリマーPはアミノ酸、ヌクレオチド、炭水化物、糖類、芳香族化合物、オリゴマーあるいはポリマーのモノマーサブユニットを形成する誘導有機化合物及びそれらのアナログとからなるグループから選択される1つ以上のモノマーサブユニットを含有する請求項25記載の組成物。

【請求項33】

1つ以上の前記モノマーサブユニットは修飾される請求項32記載の組成物。

30

【請求項34】

前記オリゴマーあるいはポリマーPはホモポリマー、ヘテロポリマーあるいはキメラである請求項25記載の組成物。

【請求項35】

前記オリゴマーあるいはポリマーPは核酸、脱塩基核酸、ペプチド核酸、ポリペプチド、タンパク質、オリゴ糖、多糖類、有機ポリマーあるいはそれらの組合せを含有する請求項25記載の組成物。

【請求項36】

前記オリゴマーあるいはポリマーPは直鎖かあるいは分岐する請求項26記載の組成物。

40

【請求項37】

前記オリゴマーあるいはポリマーPは2つ以上のオリゴマーあるいはポリマーから形成される複合体を含有し、且つ前記複合体は2つ以上の核酸鎖の塩基対あるいは三重鎖構造を介して生成される請求項26記載の組成物。

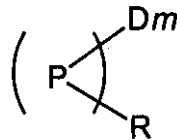
【請求項38】

少なくとも1つの前記核酸鎖は1つ以上のヌクレオチドアナログあるいは変性ヌクレオチドを含有する請求項37記載の組成物。

【請求項39】

以下の構造を有する化合物であって、

【化2】



ここでDは標識を表し、mは2と等しいかそれ以上の整数を表し、Rは1つの反応基を表し、及びPは合成あるいはキメラのオリゴマーあるいはポリマーを表し、更にDあるいはPの少なくとも1つのモノマーユニットは1つ以上の荷電基からなる化合物を含有する組成物であって、

前記反応基Rはイソチオシアネート、イソシアネート、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、モノ-あるいはジ-ハロゲン置換ピリジン、モノ-あるいはジ-ハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン化物、酸ハロゲン化物、ヒドロキシスクシンイミドエステル、ヒドロキシルスルホスクシンイミドエステル、イミドエステル、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、アジド、3-(2-ピリジルジチオ)-プロプリオンアミド、グリオキサール、アルデヒド、炭素-炭素間二重結合もしくは水銀塩及び炭素-炭素二重結合、アミン、ヒドロキシル基、スルフヒドリル基およびハロゲンと反応可能な基からなるグループから選択され、且つ前記反応基はこのオリゴマーあるいはポリマーに対して内在しておらず、且つ前記反応基は前記標識ではない組成物。

【請求項40】

前記標識Dは蛍光化合物、燐光化合物、化学発光化合物、キレート化合物、高電子密度化合物、磁気化合物、内位添加化合物及びエネルギー伝達化合物あるいはそれらの組合せからなるグループから選択される請求項39記載の組成物。

【請求項41】

前記反応基Rはリンカーを介して前記オリゴマーあるいはポリマーPに連結される請求項39記載の組成物。

【請求項42】

前記リンカーは1つ以上の炭素、窒素、酸素、リンあるいは硫黄原子をいずれかの組合せで含有する請求項41記載の組成物。

【請求項43】

前記リンカーは1つ以上のペプチド結合、アルキル鎖、アルケン基、アルキル基、アリール基、芳香族基、糖類あるいはそれらの誘導体を含有する請求項41記載の組成物。

【請求項44】

前記オリゴマーあるいはポリマーPはアミノ酸、ヌクレオチド、炭水化物、糖類、芳香族化合物、オリゴマーあるいはポリマーのモノマーサブユニットを形成する誘導有機化合物及びそれらのアナログとからなるグループから選択される1つ以上のモノマーサブユニットを含有する請求項39記載の組成物。

【請求項45】

1つ以上の前記モノマーサブユニットは修飾される請求項44記載の組成物。

【請求項46】

前記オリゴマーあるいはポリマーPはホモポリマー、ヘテロポリマーあるいはキメラである請求項39記載の組成物。

【請求項47】

前記オリゴマーあるいはポリマーPは核酸、脱塩基核酸、ペプチド核酸、ポリペプチド、タンパク質、オリゴ糖、多糖類、有機ポリマーあるいはそれらの組合せを含有する請求項39記載の組成物。

【請求項48】

前記オリゴマーあるいはポリマーPは直鎖かあるいは分岐する請求項39記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 49】

前記オリゴマーあるいはポリマー P は 2 つ以上のオリゴマーあるいはポリマーから生成される複合体を含有し、且つ前記複合体は 2 つ以上の核酸鎖の塩基対あるいは三重鎖構造を介して生成される請求項 39 記載の組成物。

【請求項 50】

少なくとも 1 つの前記核酸鎖は 1 つ以上のヌクレオチドアナログあるいは変性ヌクレオチドを含有する請求項 49 記載の組成物。

【請求項 51】

請求項 1、15、25 または 39 の組成物を標的に添加あるいは結合する標的の標識化方法。

10

【請求項 52】

前記標的はペプチド、タンパク質、抗体、酵素、酵素基質、リガンド、ホルモン、受容体、抗原、ハプテン、レクチン、アビジン、ストレプトアビジン、トキシン、炭水化物、オリゴ糖、多糖類、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチド及びジデオキシヌクレオチドアナログ、変性デオキシヌクレオチド、変性リボヌクレオチド、変性ジデオキシヌクレオチドオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドからなるグループから選択される請求項 51 記載の方法。

【請求項 53】

組成物を標的に添加あるいは結合する標的の標識化方法において、前記組成物は (i) 2 つ以上の標識ヌクレオチドあるいは標識ヌクレオチドアナログと、(ii) 1 つ以上の結合相手とからなる核酸鎖あるいは 2 つ以上の核酸鎖の複合体を含有する方法。

20

【請求項 54】

前記標的はペプチド、タンパク質、抗体、酵素、酵素基質、リガンド、ホルモン、受容体、抗原、ハプテン、レクチン、アビジン、ストレプトアビジン、トキシン、炭水化物、オリゴ糖、多糖類、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチド及びジデオキシヌクレオチドアナログ、変性デオキシヌクレオチド、変性リボヌクレオチド、変性ジデオキシヌクレオチドオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドからなるグループから選択される請求項 53 記載の方法。

30

【請求項 55】

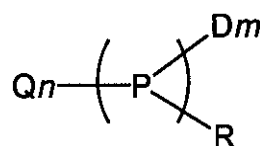
請求項 51 または 53 の方法により標識された標的を含有する組成物であって、該標的はペプチド、タンパク質、抗体、酵素、酵素基質、リガンド、ホルモン、受容体、抗原、ハプテン、レクチン、アビジン、ストレプトアビジン、トキシン、炭水化物、オリゴ糖、多糖、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチド及びジデオキシヌクレオチドアナログ、変性デオキシヌクレオチド、変性リボヌクレオチド、変性ジデオキシヌクレオチドオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドからなるグループから選択される組成物。

【請求項 56】

- (a) (i) 標識される標的、及び、
(ii) 以下の式、

40

【化 3】

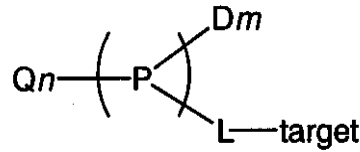


ここで Q は非固有荷電基を表し、n は 1 以上の整数を表し、D は標識を表し、m は 2 と等しいかそれ以上の整数を表し、R は 1 つの反応基を表し、及び P はオリゴマーあるいはポリマーを表す標識化試薬とを提供し、

50

(b) 前記標的 (i) と前記標識化試薬 (ii) とを反応させて組成物を生成し、前記組成物は以下の式

【化 4】



ここで、L は前記オリゴマーあるいはポリマーと前記標的間の連結部あるいはリンカーを示す工程とから構成される標的標識化方法により生成される組成物であって、

前記反応基 R はイソチオシアネート、イソシアネート、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、モノ - あるいはジ - ハロゲン置換ピリジン、モノ - あるいはジ - ハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン化物、酸ハロゲン化物、ヒドロキシスクシンイミドエステル、ヒドロキシルスルホスクシンイミドエステル、イミドエステル、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、アジド、3 - (2 - ピリジルジチオ) - プロプリオンアミド、グリオキサール、アルデヒド、炭素 - 炭素間二重結合もしくは水銀塩及び炭素 - 炭素二重結合、アミン、ヒドロキシル基、スルフヒドリル基およびハロゲンと反応可能な基からなるグループから選択され、且つ前記反応基はこのオリゴマーあるいはポリマーに対して内在しておらず、且つ前記反応基は前記標識ではない組成物。

【請求項 57】

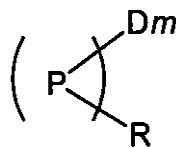
前記標的はペプチド、タンパク質、抗体、酵素、酵素基質、リガンド、ホルモン、受容体、抗原、ハプテン、レクチン、アビジン、ストレプトアビジン、トキシン、炭水化物、オリゴ糖、多糖、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチド及びジデオキシヌクレオチドアナログ、変性デオキシヌクレオチド、変性リボヌクレオチド、変性ジデオキシヌクレオチドオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドからなるグループから選択される請求項 55 記載の組成物。

【請求項 58】

(a) (i) 標識される標的、及び、

(ii) 以下の式、

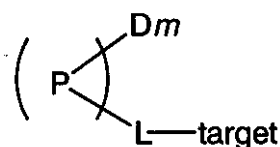
【化 5】



ここで D は標識を表し、m は 2 と等しいかそれ以上の整数を表し、R は 1 つの 反応基を表し、P は合成あるいはキメラのオリゴマーあるいはポリマーを表し、D あるいは P の少なくとも 1 つのモノマーユニットは 1 つ以上の荷電基を含有する標識化試薬とを提供し、

(b) 前記標的 (i) と前記標識化試薬 (ii) とを反応させて組成物を生成し、前記組成物は以下の式

【化 6】



ここで、L は前記オリゴマーあるいはポリマーと前記標的間の連結部あるいはリンカー

を示す工程とから構成される標的標識化方法により生成される組成物であって、

前記反応基 R はイソチオシアネート、イソシアネート、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、モノ - あるいはジ - ハロゲン置換ピリジン、モノ - あるいはジ - ハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン化物、酸ハロゲン化物、ヒドロキシスクシンイミドエステル、ヒドロキシルホスフィンイミドエステル、イミドエステル、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、アジド、3 - (2 - ピリジルジチオ) - プロプリオンアミド、グリオキサール、アルデヒド、炭素 - 炭素間二重結合もしくは水銀塩及び炭素 - 炭素二重結合、アミン、ヒドロキシル基、スルフヒドリル基およびハロゲンと反応可能な基からなるグループから選択され、且つ前記反応基はこのオリゴマーあるいはポリマーに対して内在しておらず、且つ前記反応基は前記標識ではない組成物。

10

【請求項 59】

前記標的はペプチド、タンパク質、抗体、酵素、酵素基質、リガンド、ホルモン、受容体、抗原、ハプテン、レクチン、アビジン、ストレプトアビジン、トキシン、炭水化物、オリゴ糖、多糖類、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチド及びジデオキシヌクレオチドアナログ、変性デオキシヌクレオチド、変性リボヌクレオチド、変性ジデオキシヌクレオチドオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドからなるグループから選択される請求項 58 記載の組成物。

【請求項 60】

i) 前記標的が分析体固有部分である請求項 55, 57 または 59 に記載の組成物を提供し、

ii) 前記組成物は前記分析体含有すると予測される検体と接触させ、更に
iii) 前記検体中の分析体と結合した前記組成物の量を測定し前記分析体を検出あるいは定量化する工程から構成される分析体を検出あるいは定量化する方法。

20

【請求項 61】

前記提供工程 (i) において、請求項 55, 57 または 59 に記載の前記組成物が標識ヌクレオチドあるいは標識ヌクレオチドアナログを含有するオリゴヌクレオチドあるいはポリヌクレオチドからなる場合、非標識ヌクレオチドあるいはポリヌクレオチドを含有する別の組成物が提供され、前記別の組成物は前記接触工程 (ii) の前、その間あるいはその後

30

【請求項 62】

前記非標識オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは前記標識オリゴヌクレオチドあるいはポリヌクレオチドの全体あるいは一部と等しい配列を含有する請求項 61 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マルチシグナル標識化試薬として有効な組成物に関する。より詳しくは、これらの試薬は、シグナルをタンパク質、特に、抗体のような分析体固有部分に添加することを含み、多くの生化学的使用において有効である。これらの試薬は、また、タンパク質配列系で分析しようとするサンプルの標識化において有効である。この種の試薬におけるマルチプルシグナルの添加は、検出感度を増やす際に有効である。

40

【0002】

本出願において引用あるいは記載される全ての特許、特許出願、特許公報、科学文献などは、本発明が関連する技術をより完全に記載するためにそれら全部をここに参考として組込まれる。

【発明の背景】

【0003】

生化学および分子生物学における非放射性ラベルの使用は、近年急激に増加した。非放

50

射性ラベルとして使用されたさまざまな化合物の一つに、蛍光性または発光シグナルを生じる芳香族色素は、特に有効である。この種の化合物の顕著な例として、フルオレセイン、ローダミン、クマリンおよびシアニン染料、例えばCy3およびCy5が含まれる。複合色素は、また、2つの異なる色素を共に溶かすことによって合成された(リーその他、(1992)核酸リサーチ20; 2471-2488; リーその他、米国特許第5,945,526号及びワゴナーその他、米国特許第6,008,373号、これら全てここに参考として組み込まれる)。

【0004】

非放射性標識化方法は、当初、タンパク質上にシグナル発生基を取り付けるために開発された。これは化学基がタンパク質上に天然で存在するアミン、チオールおよびヒドロキシル基と反応できるように、標識を化学基で修飾することによって実施された。このために使われた反応基の例として、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、イソチオシアネートおよび他の化合物などの活性化エステルが含まれる。従って、それが非放射性手段によってヌクレオチドおよび核酸を標識するのに適すると、ヌクレオチド及びポリヌクレオチドをタンパク質に機能的に類似する形に変換する方法が開発された。例えば、米国特許第4,711,955号(ここに引用する)はプリン8-位置、ピリミジン5-位置およびデアザプリンの7-位置にアミンを添加することが開示された。現在標識をタンパク質のアミン基に添加できる方法はここで同様にこれらの変性ヌクレオチドに対して適用される。

【0005】

標識ヌクレオチドは、末端トランスフェラーゼ標識化、ニックトランスレーション、ランダムプライミング、逆転写、RNA転写およびプライマ伸展を含む多くの酵素法におけるDNA及びRNAプローブの合成に使用されてきた。これらヌクレオチドの標識ホスホラミダイト変型は、また、標識オリゴヌクレオチドを生成するために自動化シンセサイザーで使用された。得られた標識プローブはノーザンブロットティング、サザンブロットティング、元来ハイブリッド形成、RNAse保護アッセイ、DNAシークエンス反応、DNAおよびRNAミクロ配列分析および染色体塗装のような標準的処理法において広く使われている。

【0006】

核酸に対して、シグナル部分を核酸に直接にまたは間接的に添加する方法により化学的に修飾することに関する多くの文献が存在する。この分野における最重要関心事として、核酸のどの部位、すなわち糖、塩基またはホスファート類似体などが添加に使用されるか、及び、これらの部位が破壊的であるか非破壊かどうかに関して(たとえば米国特許第4,711,955号および米国特許第5,241,060号の記載を参照、両方とも引用したものとする)、また通常単一の芳香族基(米国特許第4,952,685号及び米国特許第5,013,831号;両方とも引用したものとする)あるいは炭素/炭素脂肪鎖から構成されるスペーサ基をシグナリング部分あるいは反応基に対して連結を可能にし、核酸と反応基の距離あるいはシグナリング部分とOH, NH, SHあるいはシグナリング部分及びシグナリング部分の性質にカップリングできる別の基のようなスペーサの端部における反応基との距離を提供するような添加部位の化学に関する。

【0007】

最近、2002年3月12日に出願された米国特許出願第10/096/075号(ここに引用される)において、マーカーあるいは標識と目的の標的分子との間において炭素-炭素結合を形成できる反応基を含有する新規な標識化試薬が開示された。これは前に記載されている標識化試薬とは対照的に、アミン基、スルフヒドリル基、あるいはヒドロキシル基と適切な反応基との間の結合を形成することを含むタンパク質誘導化学作用を使用する。リンカーアームの存在及び性質はまた標識化標的分子の生物学的あるいは化学的活性を増加させる。核酸におけるシグナル基の適度な距離を提供するのに使用されるリンカーアームはまた本記載においても利用される。

【発明の要旨】

【 0 0 0 8 】

本発明は生化学及びその関連分野におけるマルチシグナル標識化試薬及びその応用に関する。

【 0 0 0 9 】

本発明は以下の成分、a) 1つあるいは複数の標識がオリゴマーあるいはポリマーに化学的に結合する2つ以上の標識成分、b) 1つ以上の反応基、及びc) 1つ以上の荷電基とからなるオリゴマーあるいはポリマーを含有する組成物を提供する。この荷電基は(i) オリゴマーあるいはポリマーに共有結合されるか、あるいは(ii) オリゴマーあるいはポリマーの主鎖の一部を含有するか、あるいは(iii) 前述の組合せを含有する。

【 0 0 1 0 】

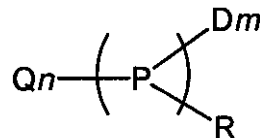
本発明はまた核酸鎖あるいは2つ以上の核酸鎖複合体を含有する組成物であって、前記鎖あるいは複合体は(i) 2つ以上の標識ヌクレオチドあるいは標識ヌクレオチドアナログ及び(ii) 前記標識と異なる1つ以上の結合相手とからなる組成物を提供する。

【 0 0 1 1 】

また、本発明により提供される組成物は、以下の式の構造を有する化合物を含有する組成物からなり、

【 0 0 1 2 】

【 化 1 】



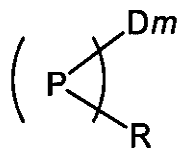
ここで、Qは非固有荷電基を表し、nは1以上の整数を表し、Dは標識を表し、mは2と等しいかそれ以上の整数を表し、Rは少なくとも1つの反応基を表し、及びPはオリゴマーあるいはポリマーを表す。

【 0 0 1 3 】

本発明の更に別の態様として、以下の式の構造を有する化合物を含有する組成物に関する。

【 0 0 1 4 】

【 化 2 】



上記構造において、Dは標識を表し、mは2と等しいかあるいはそれ以上の整数を表し、Rは少なくとも1つの反応基を表し、及びPは合成あるいはキメラのオリゴマーあるいはポリマーを表す。更に構造において、DあるいはPの少なくとも1つのモノマーユニットは1つ以上の荷電基を含有する。

【 0 0 1 5 】

様々な方法が本発明により提供される。ある態様の一つに、本発明は組成物を標的分子に添加あるいは結合することからなる標的分子を標識化する方法を提供する。組成物は核酸鎖あるいは2つ以上の核酸鎖の複合体を含有し前記鎖あるいは複合体は(i) 2つ以上の標識ヌクレオチドあるいは標識ヌクレオチドアナログと(ii) 一つ以上の結合相手とを含有する。

【 0 0 1 6 】

更に、本発明は(a) (i) 標識化のための標的、および(ii) 以下の式、

【 0 0 1 7 】

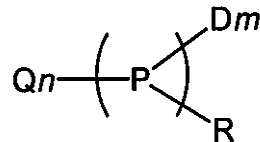
10

20

30

40

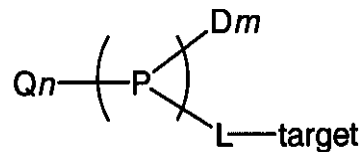
【化3】



上記式において、Qは非固有荷電基を表し、nは1以上の整数を表し、Dは標識を表し、mは2と等しいかそれ以上の整数を表し、Rは少なくとも1つの反応基を表し、Pはオリゴマーあるいはポリマーを表す式を有する標識化試薬とを提供し、;(b)標的(i)と前記標識化試薬(ii)を反応させて組成物を生成し、ここで組成物は以下の式、

【0018】

【化4】



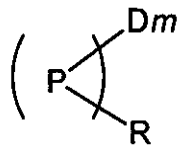
ここでLはオリゴマーあるいはポリマーと標的間の結合あるいはリンカーを表す式を有する組成物を生成する工程から構成される標的標識化方法により生成された組成物を提供する。

【0019】

本発明により提供される別の組成物は、(a)(i)標識化のための標的と、(ii)以下の式、

【0020】

【化5】

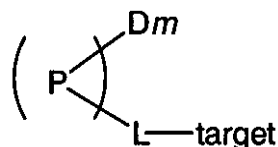


上記式において、Dは標識を表し、mは2と等しいかそれ以上の整数を表し、Rは少なくとも1つの反応基を表し、Pは合成あるいはキメラのオリゴマーあるいはポリマーを表し、DあるいはPの少なくとも1つのモノマーユニットは1以上の荷電基からなる式を有する標識試薬とを提供し;

(b)前記標的(i)と前記標識化試薬(ii)とを反応させて以下の式、

【0021】

【化6】



ここで、Lは前記オリゴマーあるいはポリマーと前記標的間の結合あるいはリンカーを表す式を有する組成物を生成する工程とから構成される標的標識化方法により生成される。

【0022】

本発明の多くの別の態様あるいは実施例は以下にさらに詳細に説明する。

【発明の詳細な説明】

【0023】

本発明は従来技術に比較して感受性及び溶解度を上昇させた標識標的、標識分析体及び標識分析体固有部分を生成する方法及び組成物に関する。本発明で使用される分析体固有

10

20

30

40

50

部分の実施例として、核酸、タンパク質、抗体、抗原、リガンド、受容体、ホルモン及び合成化合物が含まれるがそれに限定されない。本発明の一態様として、新規な標識化試薬は、a) 1つあるいは複数の標識がオリゴマーあるいはポリマーと化学的に結合する2つ以上の標識成分、b) 1つ以上の反応基、c) (i) オリゴマーあるいはポリマーと化学的に結合するか、(ii) オリゴマーあるいはポリマーの主鎖の一部を含有するか、(iii) 前記のいずれかの組合せを含有する1つ以上の荷電基とを含有するオリゴマーあるいはポリマーからなることを開示する。新規な標識組成物あるいは試薬は固有な分析体を検出する化合物を標識することに使用される際に、オリゴマーあるいはポリマーは分析体に固有な親和性を実質的になくすべきである。

【0024】

マルチプル標識基は分析体固有部分に添加されるシグナル量を増加させ、すなわち反応基の存在によりマルチプル標識基が目的の標的に添加され、また荷電基の存在により溶解度を維持あるいは増加させる。標識あるいは荷電基をオリゴマーあるいはポリマーに結合させるのに有効な化学結合の例として、共有結合、非共有結合、イオン結合、リガンド、受容体及び複合体を含むがこれに限定されない。標識あるいはマーカーの例として、蛍光化合物、燐光化合物、化学発光化合物、キレート化合物、高電子密度化合物、磁気化合物、内位添加化合物及びエネルギー伝達化合物が含まれるがこれに限定されない。溶解度に関して、標識として使用される多くの蛍光化合物は高い芳香性あるいは疎水性を有し、また本発明の1つあるいは複数の荷電基はこの特性を補償する。溶解性を提供するのに利用される荷電基の例として、ホスフェート基、カルボン酸基、スルホン基、アミン基、ヒドロキシ基が含まれるがこれに限定されない。荷電基はオリゴマーあるいはポリマーの固有部分となるかあるいは人為的に導入される非固有改質となりえる。新規な標識分析体固有部分は核酸、タンパク質、抗体、抗原、リガンド、受容体、ホルモンあるいは薬剤を含むいずれかの分析体を検出するのに使用されるがこれに限定されない。

【0025】

オリゴマーあるいはポリマーの各モノマーユニットはマーカーを含有するかあるいはオリゴマーあるいはポリマーは標識及び非標識モノマーユニットの混合物を含有する。標識モノマーユニットは単一標識あるいは1つ以上の標識を含有しえる。1つ以上の標識がモノマーユニットに含まれる場合、モノマー上の同じ部位あるいは別々の部位に添加される。1つの部位にある1つ以上の標識を有するモノマーユニットの例として、ローダミン部分に結合されるフルオレセイン部分のような複合染料を有するヌクレオチドである。一方、ここに引例として参照される2002年3月12日付提出願の米国特許出願第10/096,076号に記載される複合染料を生成するための同様な方法が同じ染料のタンデム二量体、三量体等の合成に適用できる。このように、使用者はモノマーユニットの数、標識モノマーユニットの割合、モノマー当りの標識の数を直接導ける。

【0026】

オリゴマーあるいはポリマー標識試薬を生成するのに利用可能なモノマーユニットの例として、アミノ酸、ヌクレオチド、炭水化物、糖類、芳香族化合物あるいはオリゴマーあるいはポリマー部分を生成できるよう誘導されるいずれかの有機化合物が含まれるがこれに限定されない。いずれかのモノマーユニットの変性種あるいは変性アナログも使用可能である。本発明に使用されるアナログの例として、以下全て参照として引用されるが、自在あるいは変質塩基を含むヌクレオチドアナログ(レビュード イン ロックハート 2001、核酸研究 29; 2437-2447)、ペプチド核酸モノマー(ニールセン他、1991、サイエンス 254; 1497)、非ヌクレオチドスパーサ基(米国特許第5,696,251号)、糖類アナログ(オノ他、1997 核酸研究 25; 4581-4588)、メチルホスホンアミダイト(ロシュナー及びエンゲルス 1988 核酸研究 7; 729)及びホスホロチオエート(ステック他、1984 ジェイ エーエム ケム ソサイエティ 106; 6077)等が含まれるがこれに限定されない。

【0027】

10

20

30

40

50

このようなモノマーユニットから生成されるオリゴマーあるいはポリマーの例として核酸、脱塩基核酸、ペプチド核酸、ポリペプチド、タンパク質、オリゴ糖、多糖類あるいは有機ポリマーが含まれるがこれに限定されない。本発明に使用されるオリゴマーあるいはポリマーは生物源から単離されるかあるいは合成的または試験管内で生成される。オリゴマーあるいはポリマーに化学的に結合する標識および/あるいは反応基はこのオリゴマーあるいはポリマーに内在していないものが好ましい。このオリゴマーあるいはポリマーは、ホモポリマーでありたった1つの特有の特定型のモノマーユニットの複合体から構成されるか、あるいはそれらはヘテロポリマーまたはキメラであり異なるモノマーユニットを含有する。例えば、キメラのオリゴマーあるいはポリマーは、正常な核酸セグメントとペプチド核酸セグメントの両方を含有する核酸構成体か、ヌクレオチドとアミノ酸の組合せ、あるいは脱塩基核酸セグメントとペプチド核酸からなるセグメントとの組合せとなり得る。本発明の標識化試薬がオリゴマーあるいはポリマー標的分子を標識するのに使用される際の特別な方法を発見し、ここで標識化試薬のモノマーユニットはオリゴマーあるいはポリマー標的のモノマーユニットとは別の特徴を有する。この例として、オリゴマーあるいはポリマー部分は標識ヌクレオチドあるいはヌクレオチドアナログ及び少なくとも1つの反応基を含有する核酸構成体であり、これによりマルチプル標識を標的タンパク質を生成する1つ以上のアミノ酸に添加することができる。従来文献に記載されるマーカー、リンカー、及び反応基のいずれも本発明の具体的な実施態様において使用される。

10

【0028】

更に、オリゴマーあるいはポリマーのモノマーユニットが類似の特徴を有する場合さえ、それらが同じ場合もあれば異なる場合もある。例えば、核酸ポリマーは単一塩基の反復からなるホモポリマーかあるいは多様なヌクレオチドを有するヘテロポリマーとなり得る。ポリペプチドはホモポリマーであり単一アミノ酸の複合体を含有するかあるいはヘテロポリマーであり異なるアミノ酸を含有しえる。オリゴマーあるいはポリマー標識化試薬の標識は同一か異なる場合もあり得る。例えば、ポリヌクレオチド上に不連続間隔で添加される2つの異なる染料を含有する標識化試薬はシグナル生成へのエネルギー伝達に關与する。

20

【0029】

本発明のオリゴマーあるいはポリマーはモノマーユニット同士を結合する単一鎖を含有するかあるいは一つ以上の鎖を含有する。例えば、分岐した、二重鎖のあるいは三重鎖の核酸は全て本発明に利用可能である。このような多鎖構造は有効な特性を提供する。例えば、二重鎖核酸は一本鎖核酸よりも固定される。二重鎖構造を使用すると標識部分の分布あるいは間隔をより制御しやすくし、近接性の必要な場合あるいは必要でない場合も可能である。例えば、エネルギー伝達を利用した効果的なシグナル生成は供与体部分と受容体部分の近接性に依存し、従ってこれらの部分間の近接の実現は有利である。一方で、単一染料種がシグナル生成剤として利用される場合、いくつかの染料分子の近接性は自己発光抑制(クエンチング)現象を導き、これら染料の位置を分散させることが有利である。一つ以上の鎖を利用するとシグナル生成量を増加させたり荷電数を増加させるなどの別の有利な特性を導く。マルチプル鎖はまたその系に適応性をもたらす。例えば、第一の核酸鎖は反応基を含有し、相補配列を有する第二の核酸鎖はシグナル基を含有する。これらの鎖間の相補塩基対により複合体は反応基とシグナル基を含有するよう生成される。これらの点を更に説明するために、マルチプル鎖を利用した様々な種を図1に示す。本発明の新規な標識化試薬にマルチプル鎖を利用すると平行して使用できる試薬あるいは標識部分を生成することに広がりをもたらす。例えば、反応基を含有する第一鎖は2つの第二鎖のどちらかと混合して、同じ反応基を利用し且つ互いに異なる標識からなる2つの異なる化合物を生成できる。本発明のオリゴマー及びポリマーはまた同様に非ポリマー成分を含有する。例えば、延長したマルチプル荷電基を有する末端あるいは延長鎖を構成する。有効な追加の特性を提供する別の基も本発明において利用される。

30

40

【0030】

従来技術にタンパク質用の標識化試薬として核酸の利用が記載される(米国特許出願第

50

08/479, 995、1995年6月7日出願、ヨーロッパ特許庁により発行/登録されたヨーロッパ特許第0128332号)。しかしながら、この引例の方法は、標的に非標識ポリヌクレオチドを添加させた後に標識相補ヌクレオチドの交雑を実施することが記載される。対照的に、本発明においては、2つ以上のオリゴヌクレオチドあるいはポリヌクレオチドを含有する複合体はマルチプルシグナルを伝達することに利用される際に、予め生成された試薬が利用され、それはシグナルと一つ以上の反応基を含有する。この方法において、標的は交雑反応を介さない。この方法論はまた標的に添加する前に複合体を精製することができ、これにより反応基を有する複合体中に最大量の標識ヌクレオチド鎖が存在するよう保証する。核酸を標識することに関心が広がったため、この分野において核酸と非核酸とを結合する広範で多様な技術が知られる。この方法の実施例は、ジャブロンスキ他、1986年核酸リサーチ 14; 6115-6128、米国特許出願第08/479, 995号(1995年6月7日出願)、米国特許出願第09/896, 897号(2001年6月30日出願)及び非アイソトーププローブ、プロット及びシーケンス、第2版、ラリー ジェイ クリカ著、1995年、アカデミックプレス社、サンディエゴ、シーエーにおける「核酸の非放射性標識の方法」クリストファーケスラー pp 42-109などに記載され、全てここに引用される。

10

【0031】

本発明の更に別の態様として、オリゴマーあるいはポリマーが核酸である場合、反応基は結合相手に置換される。すなわち、標識化試薬の結合相手と標的分子上における結合相手の片方との相互作用により標的分子に標識が添加できる。結合相手の対の例として、リガンド/受容体、ホルモン/受容体、ピオチン/アビジン及び抗原/抗体の対が含まれるがこれに限定されない。

20

【0032】

従って、本発明のこの態様において、新規な標識化試薬は核酸鎖、あるいは2つ以上の標識と一つ以上の結合相手を含むし且つ結合相手が標識と異なるかあるいは同一であるような核酸鎖複合体を含有する。本発明のこの態様は標識核酸鎖あるいは複合体が結合相手により非核酸標的と結合するような特別な利用が可能である。すなわち、従来技術は標識タンパク質を結合することにより核酸を標識できることが記載されているが、本発明のこの態様では標識核酸を結合することによりタンパク質を標識できることを開示する。

30

【0033】

本発明の更に別の態様において、新規なオリゴマーあるいはポリマーユニットが1つ以上の反応基Rを含有し、これは炭素、窒素、酸素、硫黄のいずれかの組合せおよび別の可能な原子を含有する所定の長さを含む原子鎖であるリンカーアームLにより結合される。この連結鎖は飽和状態か、非飽和状態か芳香環を含み、また結合鎖は柔軟性があるか固定的である。連結鎖は更にいずれかの固定ユニットを含み、米国特許出願第10/096, 075号(2002年3月12日出願)に記載され、ここに引用される。本発明のこの態様において、反応基の例として、活性エステル、炭素-炭素結合を形成できる基およびO, N, Sと化学結合できる基を含むがこれに限定されない。このような基の例として、イソチオシアネート、イソシアネート、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、モノ-あるいはジ-ハロゲン置換ピリジン、モノ-あるいはジ-ハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン化物、酸ハロゲン化物、ヒドロキシスクシンイミドエステル、ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル、イミドエステル、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、アジド、3-(2-ピリジルジチオ)-プロプリオンアミド、グリオキサール、アルデヒド、炭素-炭素間二重結合、水銀塩及び炭素-炭素二重結合、アミン、ヒドロキシル基、スルフヒドリル基およびハロゲンと反応可能な基を含むがこれに限定されない。反応基はまた、Rがリガンドあるいは金属を含有する際に配位結合の形成に関与する。反応基Rは上述したリンカーアームLを介してオリゴマーあるいはポリマー部分に添加されるかあるいは必要であればリンカーアームを使用せずに直接添加される。更に本発明の別の態様において、反応基は末端、側鎖あるいはオリゴマーまたはポリマー部分の内部位で新規な

40

50

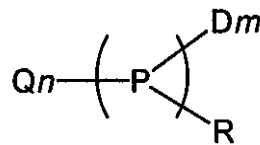
標識化試薬と化学的に結合しえる。更に、記載した新規なポリマー組成物はまた主鎖上に追加のアルキル基、アリアル基および/または極性基あるいは荷電基、リンカーアームあるいは染料あるいは標識を含む。極性基あるいは荷電基はハロゲン、飽和または不飽和アルキルまたはアリアル基、飽和または不飽和アルキル基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミノ基、アミド基およびカルボキシ基、および硝酸塩のような極性基、スルホネート、スルフヒドリル基、亜硝酸塩、カルボン酸、ホスフェートあるいはこの類の別の基あるいは置換基などが含まれるがこれに限定されない。

【0034】

本発明の別の態様において、新規なオリゴマーあるいはポリマー標識化試薬は以下の式7として表される。

【0035】

【化7】



【0036】

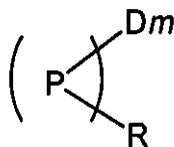
この略図において、Qは荷電基を示し、nは1あるいはそれ以上の整数に等しく、Dは染料あるいは別の適切な試薬を示し、mは2と等しいかそれ以上であり、Rは適切な標的に対して標識化試薬を結合させるのに使用される少なくとも1つの反応基を示し、更にPはオリゴマーあるいはポリマーを示す。荷電基および染料はPを含有するモノマーユニットそれぞれに添加されるかあるいはいくつかのモノマーユニットのみがこれらの基を含有する。

【0037】

本発明の別の態様において、新規なオリゴマーあるいはポリマー標識化試薬は以下の式8として表される。

【0038】

【化8】



【0039】

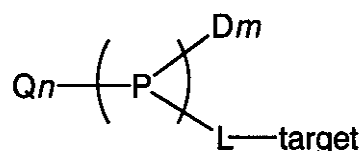
上記略図において、Dは染料あるいは別の適切な標識を示し、mは2と等しいかそれ以上であり、Rは少なくとも1つの反応基を示し、Pはオリゴマーあるいはポリマーを示し更に、ここでDあるいはPのモノマーユニットの1つは1つ以上の荷電基を含有する。染料はPを含有するモノマーユニットのそれぞれに添加し得るかあるいはいくつかのモノマーユニットのみがこれらの基を含有する。

【0040】

本発明の別の態様において、以下に示す式9の新規な組成物として、本発明の新規なオリゴマーあるいはポリマー標識化試薬は適切な標的分子を標識するために使用される。

【0041】

【化9】



10

20

30

40

50

【 0 0 4 2 】

上記の略図において、Qは荷電基を示し、nは1の整数と等しいかそれ以上であり、Dは染料かあるいはべつの適切な標識を示し、mは2と等しいかそれ以上であり、Pはオリゴマーあるいはポリマーを示し、Lは標的分子に標識化試薬を結合させる連結部である。荷電基および染料はPを構成するモノマーユニットのそれぞれに添加されるかあるいはいくつものモノマーユニットのみがこれらの基を含有する。Lは上述したなんらかの連結アームを構成するかあるいは反応基と標的分子上の適切な化学基との間を形成する連結部を含有する。標的はペプチド、タンパク質、抗体、酵素、酵素基質、リガンド、ホルモン、受容体、抗原、ハプテン、レクチン、アビジン、ストレプトアビジン、トキシン、炭水化物、オリゴ糖、多糖、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチドアナログ、リボヌクレオチド及びジデオキシヌクレオチド、変性デオキシヌクレオチド、変性リボヌクレオチド、変性ジデオキシヌクレオチドオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、及び反応基Rと連結部を形成できる別の分析体固有部分を含むがこれに限定されない。

10

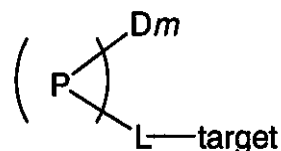
【 0 0 4 3 】

本発明の別の態様において、以下に示す式10の新規な組成物として、本発明の新規なオリゴマーあるいはポリマー標識化試薬は適切な標的分子を標識するのに使用されることを開示する。

【 0 0 4 4 】

【 化 1 0 】

20



【 0 0 4 5 】

上記略図において、Dは染料あるいは別の適切な標識を示し、mは2と等しいかそれ以上であり、Pはオリゴマーあるいはポリマーを示し、Lは標識試薬を標的分子に結合させる連結部を示し、ここでDあるいはPのモノマーユニットの内の1つは1つ以上の荷電基を含有する。染料はPを含有するモノマーユニットそれぞれに添加されるかあるいはいくつものモノマーユニットのみがこれらの基を含有する。Lは上述したなんらかの連結アームを含有するかあるいは反応基Rと標的分子上の適切な化学基間を形成する連結部を含有する。標的は上述した基のいずれかから選択される。

30

【 0 0 4 6 】

マルチプルシグナルを提供する本発明の様々な態様は高感度な標識化組成物の合成を実施できる。酵素的組み込みのような標識試薬を生成するために使用される従来の方法において、染料ユニットの数は酵素による染料の組み込みが乏しいため限られていた。更に、酵素的組み込みの後に2つ以上の染料ユニットが互いに隣接して配置されるため、度々シグナルの発光抑制(クエンチング)が生じる。本発明の長所の一つに、染料の配置が特異的に調節されるため、染料ユニットの望ましい数及びそれらの間隙が最適なシグナル用に設計できる。このことは隣接するユニットに対して最小のクエンチングを有する最大のシグナル量を生成できる標識ユニットを有する標識化試薬となり得る。本発明の新規な標識化試薬はシグナル強度の増加が有益であるような広範囲の目的に使用可能である。

40

【 0 0 4 7 】

本発明の別の目的は、本発明、あるいは別の標識化試薬あるいは標識材料と協同して利用可能な非標識試薬を提供することである。例えば、化合物が標的固有部分あるいは標識を含有する際に、ノイズに対するシグナル(S/N)の最大値は、結合が標的固有部分の媒介を介し且つ標識自体、あるいは標識を標的固有部分に結合させるのに使用される成分を介さない時に生じる。明らかに、標的固有でない化合物の部分がかどこか識別不可能であり、更に非標的分子に対するこのような部分の結合はバックグラウンドシグナル生成の上

50

昇を引き起こし、続いてS/N比の低下を引き起こす可能性がある。そのため、本発明において、標的固有部分を標識するのに使用される標識オリゴマーあるいはポリマー部分と類似する非標識オリゴマーあるいはポリマー化合物が、非標識オリゴマーあるいはポリマーが標識化合物のオリゴマーあるいはポリマー成分による非特異的結合を抑制できるような特定の分析体の存在あるいは量を検出するアッセイに使用できることを開示する。

【0048】

本発明の具体的な例として、マルチプルフルオレセイン部分を含有するオリゴヌクレオチドにより標識された抗体は検出試薬として利用される。非標識オリゴヌクレオチドはこの試薬の非特異的な結合を阻害するのに利用できる。この阻害試薬は抗体検出試薬に対して検体を作用させる前あるいは間のいずれかに使用可能である。核酸は配列の非均質なコレクシオンとなりえる。例えば、サケの精子あるいは子ウシの胸腺DNAは通常標識DNAプローブと共にアッセイに使用され、核酸の非特異的結合を除外する。逆に、抗体を標識するのに使用される核酸の配列は阻害剤、すなわち離散的配列などにも利用可能である。離散的、ランダム、置換、不均一核酸の組合せあるいは混合物がこの目的に利用される。

10

【0049】

以下の実施例は図示することにより説明されるが本発明はこれに限定されるものではない。

【好適な実施態様の説明】

【0050】

本出願における実施例は以下に列挙される。

- 実施例 1 5'末端に反応基を有するマルチシグナル試薬
- 実施例 2 タンパク質のSH基を有するマルチシグナル試薬の使用
- 実施例 3 マルチシグナル試薬に使用されるタンパク質の変性
- 実施例 4 マルチシグナル試薬の5'末端に対するプロモアセチル基の添加
- 実施例 5 糖タンパク質に使用されるマルチシグナル標識試薬
- 実施例 6 3'末端に反応基を有するマルチシグナル試薬
- 実施例 7 TdTによるマルチシグナル試薬の合成
- 実施例 8 第二水銀塩類を使用するマルチシグナル標識試薬の合成
- 実施例 9 二重鎖マルチシグナル試薬
- 実施例 10 タンパク質配列に使用されるマルチシグナル試薬
- 実施例 11 末端シグナル試薬を有するマルチシグナル試薬
- 実施例 12 ビオチンを使用する二重鎖マルチシグナル試薬で標識された抗体
- 実施例 13 マイクロアレイチップ用ノイズ・サブレッサ及びビオチンを利用した単一鎖マルチシグナル試薬
- 実施例 14 相補核酸を使用するマイクロアレイチップ用マルチシグナル試薬
- 実施例 15 エネルギー伝達を利用するマイクロアレイチップ用マルチシグナル試薬

30

【実施例1】

【0051】

マルチシグナル標識化試薬

a) 以下の構造を有する33-マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0052】

【化11】



ここで、5'末端はホスフェート基を有し、オリゴヌクレオチドはアリアルアミン変性ウリジン(U*として記される)を含有する。

【0053】

b) 2002年3月12日付付出願米国特許出願第10,096,075号、スタブリアノポロスにより開示されるアフェニリックテキサスレッドアナログの活性エステルはオ

50

リゴヌクレオチド中のアリアルアミン部分と反応し、アフェニリックテキサスレッドアナログをアリアルアミン変性 d U T P に添加させた上記引例に記載される方法を使用して標識オリゴヌクレオチドを生成する。

【 0 0 5 4 】

c) 標識オリゴヌクレオチドの 5' ホスフェートはハロランとパーカー (1 9 6 6 , ジェイ 免疫 9 6 ; 3 7 3) に記載される方法により第一アルキルアミンと反応させて標識オリゴヌクレオチドを 5' アミン基を有するマルチシグナル標識化試薬に変換させる。

【 0 0 5 5 】

d) 5' 末端の第一アミンはその後室温で 4 5 分間、p H 7 . 8、2 0 倍モル過剰のスクシニルマレイン酸活性エステルと反応させマレイミド基を 5' 末端につなぐ。p H は濃酢酸を添加してすぐに p H 4 - 5 へ調整し更にマレイミド誘導オリゴヌクレオチドはエタノールにより沈殿させる。次に L i A c バッファ (p H 4) 中に再懸濁させて再び沈殿させる。使用前に、マレイミド誘導オリゴヌクレオチドは酢酸エステルバッファ (p H 5 . 5) 中に溶解させる。この方法は 6 テキサスレッド染料部分と目的の標的に添加するためのシグナル反応基を含有するマルチシグナル標識化試薬を生成する。

【実施例 2】

【 0 0 5 6 】

タンパク質を有するマルチシグナル標識化試薬の使用

実施例 1 からえた試薬は有効スルフヒドリル基を有するタンパク質を標識するのに直接使用される。例えば、B S A は p H 5 . 5 のマレイミド誘導試薬と共に反応させて室温にて標識できる。

【実施例 3】

【 0 0 5 7 】

マルチシグナル標識化試薬と共に使用されるタンパク質の変性

有効スルフヒドリル基の欠如したタンパク質も実施例 1 の試薬と共に利用可能である。例えば、抗体は p H 9 の N - アセチル - ホモシステインチオラクトンと反応させてスルフヒドリル基を導入することにより実施例 2 に記載したマレイミド誘導試薬で標識化できる。N - アセチル - ホモシステインチオラクトンの濃度及び反応時間を変化させてタンパク質に導入されるスルフヒドリル基の数を調節できる。生物活性を維持するために、抗体はおよそ 2 - 3 スルフヒドリル基で変性されることが好適である。

【実施例 4】

【 0 0 5 8 】

マルチシグナル標識化試薬の変性

実施例 1 の工程 c) に記載されるマルチシグナル標識化試薬はプロモ酢酸 N H S エステルと反応させて 5' 末端にプロモアセチル基をつなぐ。この基は第一アミンに非常に反応し且つ p H 9 でタンパク質あるいは第一アミンあるいはチオール基を含む別の所望の基を標識するのに使用される。前述のようにこれらの基は標的分子に固有であるかあるいは導入される。

【実施例 5】

【 0 0 5 9 】

糖タンパク質に利用されるマルチシグナル標識化試薬

前述したアミン基及びスルフヒドリル基に加えて、哺乳類細胞から単離される多くのタンパク質はグリコシル化されることにより添加に使用できる追加の標的基を提供する。このようなタンパク質の著名な例として抗体がある。I g G の酸化は暗室で 4、2 0 分間の間 p H 4 - 5 の 1 0 m M 過ヨウ素酸塩により実施され、抗体にアルデヒド基を導入する。過剰な過ヨウ素酸塩は G 5 0 遠心分離によりその後取り除かれる。変性試薬はシスタチオンをエルマン試薬で反応させることにより生成し、従ってチオール分子を除去可能基で阻害する。抗体のグリコン部のアルデヒド基は次に p H 6 の 4 0 倍過剰の変性試薬で室温にて 1 時間反応させる。p H は次に p H 9 まで上昇させ、溶液は冷却し更にシッフ塩基は N a B H ₄ で還元する。これはシッフ塩基をアミンに還元しチオールを遊離させる。過

10

20

30

40

50

剰 NaBH_4 はアセテートバッファ (pH 4) を加えて消失させる。チオール標識 IgG は実施例 1 のマレイミド誘導試薬かあるいは実施例 4 のプロモアセチル変性試薬と結合するのに有効である。この方法はグリコシル化が生じる部位にのみ生じるため、非常に調節された量の標識化となる。例えば、本実施例において使用される抗体は不変領域においてグリコシル化される。このように、標識化試薬の添加はその標的の抗原に対して抗体を結合する抗体の部分である可変領域に干渉されない。

【実施例 6】

【0060】

3' 末端に反応基を有するマルチシグナル試薬

以下の構造を有する 29 - マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0061】

【化 12】



ここで、オリゴヌクレオチドは 3' 第一アミンとフルオレセイン標識を有するウリジン (U^F と記す) を含有する。これらの変性でオリゴヌクレオチドを生成するためのホスホラミダイト及び CPG は市販されている。あるいは、オリゴヌクレオチドを 5' 末端の第一アミンで合成するホスホラミダイトは、類似の標識オリゴヌクレオチドを合成するのに使用されてきた。この製品は 5 フルオレセン部分及び一つのアミン基を含有する。この試薬は実施例 1、2、3、4 及び 5 において記載した同じ方法で使用される。

【実施例 7】

【0062】

マルチシグナル標識化試薬を合成する末端トランスフェラーゼの利用

a) 以下の構造を有する 27 - マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0063】

【化 13】



ここで、オリゴヌクレオチドはアリールアミン変性ウリジンを含有する。(U* と記す)。アレクサフルオール 555 (分子プローブ、インク、ユージン、OR) の活性エステルの添加は実施例 1 に記載される方法で実施できる。

【0064】

b) 標識オリゴヌクレオチドは更に末端トランスフェラーゼによるジデオキシ変型のアリールアミン dUTP の追加により反応する。この工程は単一アミン基をオリゴヌクレオチドの 3' 末端に導入することにより 5 アレクサ染料及び単一アミン基を有する標識化試薬を生成できる。この標識化試薬は前述のように使用できる。

【実施例 8】

【0065】

第二水銀塩類を使用するマルチシグナル標識化試薬の合成

以下の構造を有する 57 - マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0066】

【化 14】



ここで 3' 末端はアミン基を有する。オリゴヌクレオチドは 5 時間 65 °C で酢酸エステルバッファ (pH 4.0) 中に 3 倍モル到達の酢酸水銀 II で処理しオリゴヌクレオチドのウリジン環の 5 位を水銀で化合する。この水銀処理オリゴヌクレオチドは次ぎにエタノールで沈殿され必要となるまで -20 °C で保存される。オリゴヌクレオチドは次ぎに米国特許出願第 10,096,075 号、出願日 2002 年 3 月 12 日、ストラブリアノポロスに記載されここに引用される末端二重結合反応基を含有する Cy 染料で反応させる。この合

10

20

30

40

50

成されたオリゴヌクレオチドは3'末端に単一アミン反応基とUが存在していた8部位それぞれのCy染料とを含有する。この標識化試薬は前述のように使用される。

【実施例9】

【0067】

核酸の二重鎖により標識されたタンパク質

a) 以下の構造を有する12-マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0068】

【化15】



10

ここでオリゴヌクレオチドはアルリアミン変性ウリジン(U*により記す)を含む。

【0069】

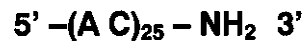
b) 実施例1で使用されるアフェニリック テキサス レッド アナログの活性エステルはオリゴヌクレオチドのアリアルアミン部分と反応し前述した同様な方法によりシグナルオリゴヌクレオチドを生成する。

【0070】

c) 以下の構造を有する50-マー 添加オリゴヌクレオチドが合成される。

【0071】

【化16】



20

【0072】

d) テキサスレッド標識シグナルオリゴヌクレオチドは添加オリゴヌクレオチドにアニーリングされマルチシグナル標識化試薬を生成する。ジヌクレオチドの繰り返しが過剰であるために交雑が速い反応速度で行われる。シグナルオリゴヌクレオチドは添加オリゴヌクレオチドよりも小さく、マルチシグナル標識化試薬の各添加オリゴヌクレオチドに結合するために4つほどのシグナルオリゴヌクレオチドの空間が存在する。このことはマルチシグナル標識化試薬のアミン基を介して結合される1つの標的の全ての部位に対して12このシグナル部分が潜在的に添加されることになる。A/T塩基対あたり2、G/C塩基対あたり4の規定を使用してシグナルオリゴヌクレオチドの理論Tmはおおよそ36

30

である。従って、マルチシグナル標識化試薬複合体は室温で完全に安定しなければならない。なお、添加オリゴヌクレオチドの隣接部位にある2つのシグナルオリゴヌクレオチドが交雑することにより各オリゴヌクレオチドの温度安定化を提供する相互作用を段階的にするため、より高いTm値もおそらく実現可能である。

【0073】

e) マルチシグナル標識化試薬は上述のようにアミン基を介してタンパク質に添加されてタンパク質上の各添加部位にマルチシグナルを含有する標識タンパク質を生成させる。

【実施例10】

【0074】

タンパク質配列のためのサンプルの精製

40

a) 以下の構造を有する15-マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0075】

【化17】



ここでオリゴヌクレオチドはアリアルアミン変性ウリジン(U*で記される)を含有する。

【0076】

b) アルフェニリックテキサスレッドアナログの活性エステルはオリゴヌクレオチド中のアリアルアミン部分と反応し実施例1に記載される方法によりシグナルオリゴヌクレオ

50

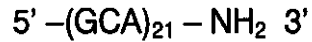
チド # 1 を生成する。このオリゴヌクレオチドの T_m 値はおよそ 50 である。

【 0 0 7 7 】

c) 以下の構造を有する添加オリゴヌクレオチド # 1 (63 - マー) が合成される。

【 0 0 7 8 】

【 化 1 8 】



【 0 0 7 9 】

d) シグナルオリゴヌクレオチド # 1 は添加オリゴヌクレオチド # 2 にアニーリングされ飽和値で 3' NH_2 基あたり 8 このテキサスレッド部分の結合を有するマルチシグナル標識化試薬 # 1 を生成する。

10

【 0 0 8 0 】

e) 以下の構造を有する 15 - マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【 0 0 8 1 】

【 化 1 9 】



ここでオリゴヌクレオチドはアリアルアミン変性ウリジン (U^* で記す) を含有する。

【 0 0 8 2 】

f) 工程 (b) と同様な方法を使用して、アレクサフルオール 647 (分子プローブ、インク、ユージン、OR) の活性エステルはオリゴヌクレオチド中のアリアルアミン部分と反応しマルチシグナルオリゴヌクレオチド # 2 を生成する。このオリゴヌクレオチドの T_m 値もおよそ 50 である。

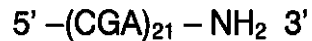
20

【 0 0 8 3 】

g) 以下の構造を有する添加オリゴヌクレオチド # 2 (63 - マー) が合成される。

【 0 0 8 4 】

【 化 2 0 】



【 0 0 8 5 】

h) シグナルオリゴヌクレオチド # 2 は添加オリゴヌクレオチド # 2 にアニーリングされて飽和値で 3' NH_2 基あたり 8 このアレクサ部分の結合を有するマルチシグナル標識化試薬 # 2 を生成する。

30

【 0 0 8 6 】

i) 上述の実施例の方法を利用して、タンパク質サンプル # 1 は工程 (d) から得たマルチシグナル標識化試薬 # 1 と反応しタンパク質サンプル # 2 は工程 (h) から得たマルチシグナル標識化試薬 # 2 と反応する。

【 0 0 8 7 】

これらのサンプルは、タンパク質配列に利用されるために準備され、ここでタンパク質サンプル # 1 (テキサスレッド) から得たシグナルがタンパク質サンプル # 2 (アレクサ) から得たシグナルと識別可能である。前述したように、本発明のこの実施例におけるマルチシグナル標識化試薬を連結すると、一つの染料を利用して得られるシグナル部分の量の 8 倍が 1 つのアミノ基と結合可能となる。

40

【 実施例 1 1 】

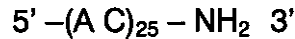
【 0 0 8 8 】

単一鎖末端を有するマルチシグナル標識化試薬

a) 以下の構造を有する 50 - マー 添加オリゴヌクレオチドが合成される。

【 0 0 8 9 】

【化21】

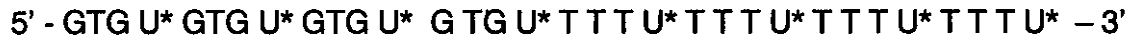


【0090】

b) 以下の構造を有する32-マー シグナルオリゴヌクレオチドが合成される。

【0091】

【化22】



ここでオリゴヌクレオチドはアリアルアミン変性ウリジン (U* で記す) を含有する。

10

【0092】

c) アフェニリックテキサスレッドアナログの活性エステルはオリゴヌクレオチド中のアリアルアミン部分と反応し末端シグナルオリゴヌクレオチドを生成する。シグナルオリゴヌクレオチドの5'末端にある16この塩基セグメントは工程(a)の添加オリゴヌクレオチドと相補的でありかつ8G'sおよび8T/U'sに基づくおよそ48のTmを有する。T'sおよびU*'sから構成されるシグナルオリゴヌクレオチドの16この塩基3'末端セグメントはシグナルを提供するが添加オリゴヌクレオチドへの結合には関与しない。

【0093】

d) 添加オリゴヌクレオチドへのシグナルオリゴヌクレオチドの交雑はマルチシグナル標識化試薬を生成し、これは8このシグナル部分をそれぞれ有した3つのシグナルオリゴヌクレオチドを、マルチシグナル試薬の添加オリゴヌクレオチド部がタンパク質標的に結合される各部位に対して潜在的に結合される正味総24このシグナル部分に提供される。

20

【0094】

マルチシグナル試薬の非標識添加オリゴヌクレオチド部分は上述のアミン基を介するタンパク質への結合に利用され1つ以上のマルチシグナル標識化試薬を含有する標識標的を生成する。

【実施例12】

【0095】

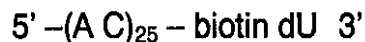
結合相手としてのビオチンを有する二重鎖マルチシグナル標識化試薬

30

a) 以下の構造を有する50-マー ビオチニル化添加オリゴヌクレオチドが合成される。

【0096】

【化23】



3'ビオチン標識ヌクレオチド用のホスホラミダイトは非常に多くの化学源から容易に適用できる。

【0097】

b) 実施例9の工程(c)から得た末端シグナルオリゴヌクレオチドはビオチリニル化添加オリゴヌクレオチドと交雑しビオチニル化マルチシグナル標識化試薬を生成する。前述のようにこの複合体はたった一つのビオチン添加部分と24シグナル部分を含有する。

40

【0098】

c) ビオチニル化抗体は多くの市販源から容易に適用可能である。ビオチニル化抗体は組織片検体中の適切な標的抗原に対して結合可能であり、抗原の存在を増幅させる検出は最初にストレプトアビジンと結合させ次に工程(b)から得られたビオチニル化マルチシグナル標識化試薬と結合させることによりシグナル生成を実施することで可能となる。

【実施例13】

【0099】

結合相手としてのビオチンを有する単一鎖マルチシグナル試薬とノイズサプレッサの添加

50

a) 以下の構造を有する 61 - マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0100】

【化24】

5' Biotin U- (U*GTGTGTGTGTG)₅-3'

ここで 5' 末端はビオチニル化 U を有し且つオリゴヌクレオチドはアリアルアミン変性ウリジン部分 (U* として記す) を含有する。

【0101】

b) Cy3 染料 (アメルシャム バイオサイエンス、ピスカタウェイ、ニュージャージー) の活性エステルが Cy3 標識ビオチニル化マルチシグナル試薬を生成するために前述と同様の方法を使用してオリゴヌクレオチド中のアリアルアミン部分と反応する。

10

【0102】

c) 以下の配列を有する 20 - マー オリゴヌクレオチドが標識あるいはビオチンを欠いた状態で合成され、ノイズサプレッサを提供する。

【0103】

【化25】

5'-(TG)₁₀-3'

【0104】

d) ポリ A mRNA はラバニ他、米国特許出願第 09 / 896 , 897 号、出願日 2001 年 6 月 30 日 (ここに引用される) に記載される方法に従って増幅され、ここでビオチンが二重鎖 cDNA コレクションの試験管内転写の間取り込まれて標識アンチセンス RNA を生成される。

20

【0105】

e) ビオチニル化 RNA は高密度マイクロアレイチップに切断され更に交雑されて製造者用指示書 (アフィメトリックス、インク、サンタクララ、カナダ) に従ってアフィメトリックスを生成する。

【0106】

f) そのチップはアフィメトリックス指示書に従ってストレプトアビジンと培養される。

30

【0107】

g) アフィメトリックス指示書に記載されるビオチニル化フィコエリトリンを使用する代わりに、チップを工程 (b) で得た Cy3 標識ビオチニル化マルチシグナル試薬と工程 (c) で得たノイズサプレッサとの混合物と培養する。

【0108】

h) 適切な洗浄の後、各遺伝子座からのシグナル生成を測定する。

【実施例 14】

【0109】

結合相手としてのビオチンを有する単一鎖マルチシグナル標識化試薬及び非標識補体の追加

40

a) 以下の構造を有する 61 - マー オリゴヌクレオチドを合成する。

【0110】

【化26】

5' Biotin U- (U*GTGTGTGTGTG)₅-3'

5' 末端はビオチニル化 U を有し更にオリゴヌクレオチドはアリアルアミン変性ウリジン成分 (U* として記す) を含有する。

【0111】

b) Cy3 染料 (アメルシャム バイオサイエンス、ピスカタウェイ、ニュージャージー) の活性エステルは上述と同様の方法を使用してオリゴヌクレオチド中のアリアルアミ

50

ン部分と反応し、Cy3標識ビオチニル化マルチシグナル標識化試薬を生成する。

【0112】

c) 以下の構造を有する20-マー オリゴヌクレオチドが標識あるいはビオチンなしで合成され、マルチシグナル試薬補体を生成する。このオリゴヌクレオチドのT_m値は10 C' sおよび10 A' sに基づきおよそ60 となる。

【0113】

【化27】

5'-(AC)₁₀-3'

【0114】

d) ポリA mRNAはENZ61中に記載される方法に従って増幅され、これはビオチンが二重鎖cDNAコレクションの試験管内転写の間取り込まれ標識アンチセンスRNAを生成する。

【0115】

e) ビオチニル化RNAは製造者指示書(アフィメトリックス、インク、サンタクララ、カナダ)に従ってアフィメトリックスから高密度マイクロアレイチップに切断され交雑される。

【0116】

f) このチップはアフィメトリックス指示書に従ってストレプトアビジンで培養される。

【0117】

g) アフィメトリックス指示書に記載されるビオチニル化フィコエリトリンを使用する代わりに、そのチップを工程(b)で得たCy3標識ビオチニル化マルチシグナル試薬と工程(c)で得たマルチシグナル試薬補体との混合物で培養される。マルチシグナル試薬補体とCy3標識ビオチニル化マルチシグナル試薬との交雑はこの工程の間行われるかあるいは必要であればこれらはチップに添加される前に共に予め培養される。Cy3標識ビオチニル化マルチシグナル試薬に二重鎖形質を供与することによりCy3部分の相互作用により生じるクエンチングが減少できる。また必要であれば、実施例11の工程(c)から得たノイズサブレッサを含む。

【0118】

h) 適切な洗浄の後、各遺伝子座からのシグナル生成を測定する。

【実施例15】

【0119】

ビオチンを有するマルチシグナル標識化試薬とエネルギー伝達

a) 以下の構造を有する61-マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0120】

【化28】

5' Biotin U- (C^F A C A C A C A C A C A)₅-3'

ここで、5'末端はビオチニル化Uを有しオリゴヌクレオチドはフルオレセン変性シチジン部分(C^Fとして記す)を含有しエネルギー供与マルチシグナル標識化試薬を生成する。

【0121】

b) 以下の構造を有する20-マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0122】

【化29】

5'-TGTGU*GTGTGTGTG U*GTGTG-3'

ここで5'末端はビオチニル化Uを有しオリゴヌクレオチドはアリアルアミン変性ウリジン部分(U*として記す)を含有する。このオリゴヌクレオチドのT_m値は10 G' sお

10

20

30

40

50

よび10T/U'sに基づきおよそ60である。

【0123】

c) アフェニリックテキサスレッドの活性エステルは上述に記載した方法を利用してオリゴヌクレオチド中のアリールアミン部分と反応しエネルギー受容マルチシグナル標識化試薬を生成する。

【0124】

d) 工程(a)からのエネルギー供与マルチシグナル試薬と工程(c)からのエネルギー受容マルチシグナル標識化試薬は共に交雑されて1つのビオチンと5個供与体及び6個受容体とを含有するエネルギー伝達マルチシグナル標識化試薬を生成する。

【0125】

e) エネルギー伝達マルチシグナル標識化試薬は上述のように使用される。

【0126】

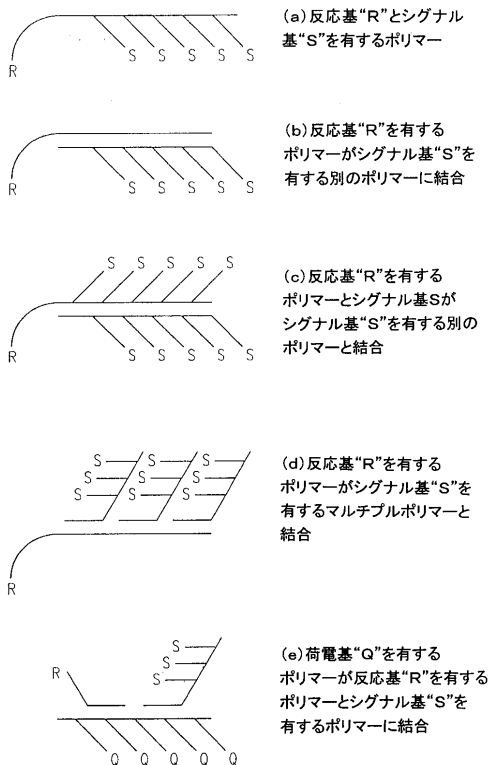
本発明の前述した記載及び実施例を考慮して、当業者は疑いなく多くの明白な多様性が示唆される。すべてのこのような多様性は後に記載の請求項においてより特徴的に定義される発明の範囲及び主旨において完全に包含される。

【図面の簡単な説明】

【0127】

【図1】 図1は単一鎖あるいは二本鎖核酸マルチシグナル標識化試薬の多様な配列を示す。

【図1】



ポリマー中のR、SおよびQの配列の実施例

フロントページの続き

- (72)発明者 ジャニス ジー スタブリアノボロス
アメリカ合衆国、ニュー ヨーク 11706、ベイショアー、サウス クリントン アベニュー
99、アパートメント 10シー
- (72)発明者 ジェームズ ジェイ ドネガン
アメリカ合衆国、ニュー ヨーク 11561、ロング ビーチ、イースト ブロードウェイ 2
10、アパートメント 4イー

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 特表平11-510709(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/58

专利名称(译)	多信号标记试剂，其标记方法和定量方法		
公开(公告)号	JP4434819B2	公开(公告)日	2010-03-17
申请号	JP2004110340	申请日	2004-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	恩佐生命科学公司说		
申请(专利权)人(译)	恩佐生命Saiensezu公司		
当前申请(专利权)人(译)	恩佐生命Saiensezu公司		
[标]发明人	イレーザーラバニ ジャニスジースタブリアノポロス ジェームズジェイドネガン		
发明人	イレーザー ラバニ ジャニス ジー スタブリアノポロス ジェームズ ジェイ ドネガン		
IPC分类号	G01N33/58 C12Q1/68 G01N33/53 C07H C07H21/04 G01N33/566		
CPC分类号	C07H21/04		
FI分类号	G01N33/58.Z G01N33/58.A C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/BA11 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB11 2G045/JA01 4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR38 4B063/QR56 4B063/QS02 4B063/QS03 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
优先权	10/407818 2003-04-03 US		
其他公开文献	JP2004309486A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供多信号标记试剂，其对许多生物化学用途有效，例如生物分子探针的生产和分析物特异性部分的检测或扩增。 解决方案：本发明涉及以下组分：a) 两种或更多种标记组分，其中一种或多种标记化学键合至低聚物或聚合物，b) 一种或多种反应性基团，和c) 一种或者更多的充电组和充电组的总量。该带电基团 (i) 与低聚物或聚合物共价键合，或 (ii) 含有低聚物或聚合物的主链的一部分，或 (iii) 含有上述组合。 点域1

