

(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2016-511417

(P2016-511417A)

(43) 公表日 平成28年4月14日(2016.4.14)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------|
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 D | 2 G O 4 5 |
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/53 U | |
| GO 1 N 33/483 (2006.01) | GO 1 N 33/543 5 2 5 U | |
| | GO 1 N 33/543 5 2 5 E | |
| | GO 1 N 33/543 5 2 5 W | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 95 頁) 最終頁に続く | | |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2016-501106 (P2016-501106) | (71) 出願人 | 505243216 |
| (86) (22) 出願日 | 平成26年3月11日 (2014. 3. 11) | | メソ スケール テクノロジーズ エルエルシー |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成27年10月22日 (2015. 10. 22) | | アメリカ合衆国メリーランド州20850 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2014/022948 | | , ロックヴィル, リサーチ・ブールバード |
| (87) 国際公開番号 | W02014/164594 | | 1 6 0 1 |
| (87) 国際公開日 | 平成26年10月9日 (2014. 10. 9) | (74) 代理人 | 100127926 |
| (31) 優先権主張番号 | 61/775, 860 | | 弁理士 結田 純次 |
| (32) 優先日 | 平成25年3月11日 (2013. 3. 11) | (74) 代理人 | 100140132 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 竹林 則幸 |
| (31) 優先権主張番号 | 61/778, 727 | (72) 発明者 | イーライ・エヌ・グレザー |
| (32) 優先日 | 平成25年3月13日 (2013. 3. 13) | | アメリカ合衆国メリーランド州92014 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | . デルマー, ドゥランゴドライブ13746 |
| 最終頁に続く | | | |

(54) 【発明の名称】 多重化アッセイを行うための改良された方法

(57) 【要約】

本発明は、固相结合アッセイを行う方法に関する。1つの例は、非特異的な結合相互作用の存在によって特異性が制限される場合に改良された分析対象物質特異性を有するアッセイ方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の複数の分析対象物質の多重化結合アッセイを行う方法であって、

(a) 1 つまたは複数の工程で、以下の成分を混ぜ合わせる工程：

(i) 対象の第 1 の分析対象物質および対象の第 2 の分析対象物質を含む試料、

(i i) 第 1 の結合ドメイン上に固定化された第 1 の標的物質、

(i i i) 連結剤に接続され、第 1 の標的物質の結合相手である、第 1 の標的物質相補体、

(i v) 補助連結剤に接続され、第 1 の分析対象物質の結合相手である、第 1 の結合試薬、

(v) 第 2 の結合ドメイン上に固定化された第 2 の標的物質、

(v i) 連結剤に接続され、第 2 の標的物質の結合相手である、第 2 の標的物質相補体、

(v i i) 補助連結剤に接続され、第 2 の分析対象物質の結合相手である、第 2 の結合試薬、および

(v i i i) 場合により、架橋剤の少なくとも 2 つのコピー、

ここで、架橋剤が除外される場合には、各連結剤は、補助連結剤の結合相手であり、または

架橋剤が含まれる場合には、架橋剤は、連結剤の 1 つに対する第 1 の結合部位および補助連結剤の 1 つに対するさらなる結合部位を有する；

(b) 以下のものを形成する工程

(i) 第 1 の標的物質、第 1 の標的物質相補体、第 1 の結合試薬および第 1 の分析対象物質を含む第 1 の結合ドメイン上の第 1 の結合複合体、ならびに

(i i) 第 2 の標的物質、第 2 の標的物質相補体、第 2 の結合試薬および第 2 の分析対象物質を含む第 2 の結合ドメイン上の第 2 の結合複合体、

ならびに

(c) それぞれ第 1 および第 2 の結合ドメイン上の第 1 および第 2 の分析対象物質の量を測定する工程

を含む前記方法。

【請求項 2】

試料が対象の 1 つまたは複数のさらなる分析対象物質を含み、対象のそれぞれのさらなる分析対象物質について、混ぜ合わせ工程 (a) が

1 つまたは複数の工程で、(i x) さらなる結合ドメイン上に固定化されたさらなる標的物質、連結剤に接続されたさらなる標的物質相補体、および補助連結剤に接続されたさらなる結合試薬、ならびに (x) さらなる標的物質、さらなる標的物質相補体、さらなる結合試薬およびさらなる分析対象物質を含むさらなる結合ドメイン上のさらなる結合複合体を混ぜ合わせる工程をさらに含み、

形成工程 (b) が (i i i) さらなる標的物質、さらなる標的物質相補体、さらなる結合試薬およびさらなる分析対象物質を含むさらなる結合ドメイン上のさらなる結合複合体を形成する工程をさらに含み、

工程 (c) における測定がさらなる結合ドメイン上のさらなる分析対象物質の量を測定する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

第 1 の標的物質相補体および第 1 の結合試薬を、連結剤と補助連結剤との間の結合相互作用により連結された第 1 の標的物質相補体および第 1 の結合試薬を含む事前に結合させた第 1 の標的複合体として準備し、

第 2 の標的物質相補体および第 2 の結合試薬を、連結剤と補助連結剤との間の結合相互作用により連結された第 2 の標的物質相補体および第 2 の結合試薬を含む事前に結合させた第 2 の標的複合体として準備する、

請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4】

第 1 の標的複合体を第 1 の結合ドメイン上に固定化させた第 1 の標的物質に事前に結合させて準備し、

第 2 の標的複合体を第 2 の結合ドメイン上に固定化させた第 2 の標的物質に事前に結合させて準備する、

請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

工程 (a) が

第 1 の容積の液体中で、前記第 1 の標的物質相補体、前記第 1 の結合試薬および、用いる場合、前記架橋試薬を混ぜ合わせ、前記第 1 の標的物質相補体と前記第 1 の結合試薬をそれらの結合した連結剤を介して連結して、第 1 の標的複合体を形成し、

第 2 の容積の液体中で、前記第 2 の標的物質相補体、前記第 2 の結合試薬および、用いる場合、前記架橋試薬を混ぜ合わせ、前記第 2 の標的物質相補体と前記第 2 の結合試薬をそれらの結合した連結剤を介して連結して、第 2 の標的複合体を形成する

工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (a) が

前記第 1 および第 2 の標的複合体を混ぜ合わせ、

前記第 1 および第 2 の標的複合体の配合物を前記第 1 および第 2 の結合ドメインと接触させ、

前記第 1 の標的複合体を前記第 1 の結合ドメイン上の前記第 1 の標的物質に結合させ、前記第 2 の標的複合体を前記第 2 の結合ドメイン上の前記第 2 の標的物質に結合させる工程をさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

混ぜ合わせ工程 (a) が

第 1 および第 2 の標的複合体を試料と混ぜ合わせて、その混合物を形成し、

第 1 の分析対象物質を第 1 の標的複合体における第 1 の結合試薬と結合させ、第 2 の分析対象物質を第 2 の標的複合体における第 2 の結合試薬と結合させ、

第 1 および第 2 の分析対象物質に結合した第 1 および第 2 の標的複合体をそれぞれ第 1 および第 2 の結合ドメインと接触させ、

第 1 の標的複合体を第 1 の結合ドメイン上の第 1 の標的物質に結合させ、第 2 の標的複合体を第 2 の結合ドメイン上の第 2 の標的物質に結合させる

ことをさらに含む、請求項 3 または 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

第 1 および第 2 の標的複合体を第 1 および第 2 の結合ドメインと接触させる前に第 1 および第 2 の標的複合体を試料と混ぜ合わせる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

第 1 および第 2 の標的複合体を第 1 および第 2 の結合ドメインと接触させた後に第 1 および第 2 の標的複合体を試料と混ぜ合わせる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

第 1 および第 2 の標的複合体を試料と混ぜ合わせ、同時に第 1 および第 2 の結合ドメインと接触させる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

工程 (a) が

前記第 1 および第 2 の結合ドメイン上の前記第 1 および第 2 の標的複合体を前記試料と接触させ、

前記第 1 の分析対象物質を前記第 1 の標的複合体における第 1 の結合試薬に結合させ、前記第 2 の分析対象物質を前記第 2 の標的複合体における前記第 2 の結合試薬に結合させる

工程をさらに含む、請求項 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

架橋剤を除外し、(a)チオール基とマレイミドもしくはヨードアセトアミド基との間；(b)アルデヒドとヒドラジドとの間；または(c)アルキンとアジドとの間の結合相互作用により連結剤を補助連結剤に結合させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

架橋剤を除外し、(a)連結剤がビオチンであり、補助連結剤がストレプトアビジンもしくはアビジンである；(b)連結剤がストレプトアビジンもしくはアビジンであり、補助連結剤がビオチンである；(c)連結剤がペプチドであり、補助連結剤が抗ペプチド抗体である；または(d)連結剤が抗ペプチド抗体であり、補助連結剤がペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

架橋剤を含め、架橋剤がストレプトアビジンまたはアビジンであり、連結剤および補助連結剤がそれぞれビオチンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

第 1 および第 2 の結合試薬がそれぞれ前記第 1 および第 2 の分析対象物質にそれぞれ結合することができる受容体、リガンド、抗体、ハプテン、抗原、エピトープ、ミミトープ、アダマーまたはインターカレーターを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

第 1 および第 2 の結合試薬が抗原である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

第 1 および第 2 の結合試薬が抗体である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 1 8】

サンドイッチ結合アッセイを行うことを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

工程(a)において混ぜ合わされた成分が第 1 の分析対象物質に結合する第 1 の検出試薬および第 2 の分析対象物質に結合する第 2 の検出試薬をさらに含み、工程(b)において形成された第 1 および第 2 の複合体がそれぞれ第 1 および第 2 の検出試薬をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

第 1 および第 2 の検出試薬がそれぞれ検出可能な標識を含む、請求項 1 9 に記載の方法

30

【請求項 2 1】

第 1 および第 2 の結合試薬ならびに第 1 および第 2 の検出試薬が抗体である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

第 1 および第 2 の検出試薬が第 1 または第 2 の分析対象物質に結合することができる、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 3】

第 1 および第 2 の検出試薬がそれぞれ検出可能な標識を含む、請求項 2 2 に記載の方法

40

【請求項 2 4】

第 1 および第 2 の結合試薬が抗原であり、分析対象物質が抗原に対する抗体であり、検出試薬が抗免疫グロブリン抗体、プロテイン A、プロテイン G またはプロテイン L を含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

競合的結合アッセイを行なうことを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

工程(a)において混ぜ合わされた成分が(xvi)第 1 の結合試薬への結合について第 1 の分析対象物質と競合する第 1 の検出試薬および(xvii)第 2 の結合試薬への結合について第 2 の分析対象物質と競合する第 2 の検出試薬をさらに含む、請求項 1 に記載

50

の方法。

【請求項 27】

第 1 および第 2 の検出試薬が検出可能な標識を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

第 1 および第 2 の結合試薬が抗体であり、第 1 および第 2 の検出試薬が分析対象物質の構造類似体である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 29】

測定工程 (c) が吸光度、蛍光、リン光、化学発光、電気化学発光、光散乱または磁気により第 1 および第 2 の検出可能な標識の存在を測定することをさらに含む、請求項 19 または 25 に記載の方法。

10

【請求項 30】

第 1 および第 2 の検出可能な標識が電気化学発光標識であり、測定工程 (c) が電気化学発光シグナルを測定し、シグナルを試料中の第 1 および第 2 の分析対象物質の量と関連させることをさらに含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 31】

第 1 および第 2 の結合ドメインが電極上に配置され、測定工程が電極に電圧波形を印加して、電気化学発光を発生させることをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 32】

第 1 および第 2 の結合ドメインのそれぞれが結合ドメインのアレイの要素である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 33】

アレイが多ウェルプレートのウェル内に配置されている、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

第 1 および第 2 の結合ドメインのそれぞれが 1 つまたは複数のマイクロ粒子の表面上にそれぞれ配置されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 35】

粒子が個別の粒子の特定ならびに第 1 および第 2 の結合ドメイン間の識別を可能にするようにコード化されている、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

(i) 第 1 の標的物質および第 1 の標的物質相補体ならびに (ii) 第 2 の標的物質および第 2 の標的物質相補体がそれぞれ相補的オリゴヌクレオチド対を含む、請求項 1 または 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 37】

第 1 および第 2 の結合試薬がそれぞれ抗体である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

第 1 および第 2 の結合ドメインのそれぞれに配置されている相補的オリゴヌクレオチド対が異なっており、以下から選択される、請求項 36 に記載の方法。

【表 1】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【請求項 39】

少なくとも7個の結合ドメインが存在する、請求項38に記載の方法。

【請求項 40】

少なくとも10個の結合ドメインが存在する、請求項38に記載の方法。

【請求項 41】

少なくとも16個の結合ドメインが存在する、請求項38に記載の方法。

【請求項 42】

少なくとも25個の結合ドメインが存在する、請求項38に記載の方法。

【請求項 43】

第1および第2の相補的標的物質のそれぞれがそれぞれ第1および第2の結合ドメインの1つに選択的に結合する、請求項1または2に記載の方法。

30

【請求項 44】

相補的標的物質の他の結合ドメインへの結合の交差反応性が該結合ドメインの1つへの結合の5%未満である、請求項43に記載の方法。

【請求項 45】

第1および第2の相補的標的物質のそれぞれの第3の結合ドメインへの結合の交差反応性は、該結合ドメインの1つへの結合の1%未満である、請求項43に記載の方法。

【請求項 46】

第1および第2の相補的標的物質のそれぞれの第3の結合ドメインへの結合の交差反応性は、該結合ドメインの1つへの結合の0.5%未満である、請求項43に記載の方法。

40

【請求項 47】

第1および第2の相補的標的物質のそれぞれの第3の結合ドメインへの結合の交差反応性は、該結合ドメインの1つへの結合の0.1%未満である、請求項43に記載の方法。

【請求項 48】

第1および第2の結合試薬が対象の異なる分析対象物質にそれぞれ結合する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 49】

第1および第2の結合試薬が対象の異なる分析対象物質に対してそれぞれ優先的に選択的である、請求項1または2に記載の方法。

50

- 【請求項 5 0】
第 1 および第 2 の結合試薬が対象の異なる分析対象物質に対する親和性および / または選択性が異なる、請求項 1 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 5 1】
第 2 の結合試薬に対する第 1 の分析対象物質の交差反応性が第 1 の結合試薬への結合の 5 % 未満である、請求項 4 3 に記載の方法。
- 【請求項 5 2】
第 2 の結合試薬に対する第 1 の分析対象物質の交差反応性が第 1 の結合試薬への結合の 1 % 未満である、請求項 4 3 に記載の方法。
- 【請求項 5 3】 10
第 2 の結合試薬に対する第 1 の分析対象物質の交差反応性が第 1 の結合試薬への結合の 0 . 5 % 未満である、請求項 4 3 に記載の方法。
- 【請求項 5 4】
第 2 の結合試薬に対する第 1 の分析対象物質の交差反応性が第 1 の結合試薬への結合の 0 . 1 % 未満である、請求項 4 3 に記載の方法。
- 【請求項 5 5】
非特異的結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性が当分析対象物質への結合について選択される結合試薬への結合の 5 % 未満である、請求項 4 3 に記載の方法。
- 【請求項 5 6】 20
非特異的結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性が当分析対象物質への結合について選択される結合試薬への結合の 1 % 未満である、請求項 4 3 に記載の方法。
- 【請求項 5 7】
非特異的結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性が当分析対象物質への結合について選択される結合試薬への結合の 0 . 5 % 未満である、請求項 4 3 に記載の方法。
- 【請求項 5 8】
非特異的結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性が当分析対象物質への結合について選択される結合試薬への結合の 0 . 1 % 未満である、請求項 4 3 に記載の方法。 30
- 【請求項 5 9】
第 1 および第 2 の標的物質ならびに第 1 および第 2 の標的物質相補体を、それぞれ一組の結合試薬を一組の結合ドメインに位置づけるために用い、該組における結合試薬のそれぞれが対象の異なる分析対象物質に結合する、請求項 1 または 2 に記載の方法。
- 【請求項 6 0】
該組における結合試薬のそれぞれが対象の異なる分析対象物質に対して優先的に選択的である、請求項 5 9 に記載の方法。
- 【請求項 6 1】 40
該組における結合試薬のそれぞれが対象の異なる分析対象物質に対する親和性および / または選択性が異なる、請求項 5 9 に記載の方法。
- 【請求項 6 2】
第 2 の結合ドメインに配置されている結合試薬に対する第 1 の分析対象物質の交差反応性が第 1 の結合ドメインに配置されている結合試薬への結合の 5 % 未満である、請求項 4 3 に記載の方法。
- 【請求項 6 3】
第 2 の結合ドメインに配置されている結合試薬に対する第 1 の分析対象物質の交差反応性が第 1 の結合ドメインに配置されている結合試薬への結合の 1 % 未満である、請求項 4 3 に記載の方法。
- 【請求項 6 4】 50

第2の結合ドメインに配置されている結合試薬に対する第1の分析対象物質の交差反応性が第1の結合ドメインに配置されている結合試薬への結合の0.5%未満である、請求項43に記載の方法。

【請求項65】

第2の結合ドメインに配置されている結合試薬に対する第1の分析対象物質の交差反応性が第1の結合ドメインに配置されている結合試薬への結合の0.1%未満である、請求項43に記載の方法。

【請求項66】

非特異的結合ドメインに配置されている結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性が当分析対象物質に割り当てられた結合ドメインにおける結合試薬への結合の5%未満である、請求項43に記載の方法。

10

【請求項67】

非特異的結合ドメインに配置されている結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性が当分析対象物質に割り当てられた結合ドメインにおける結合試薬への結合の1%未満である、請求項43に記載の方法。

【請求項68】

非特異的結合ドメインに配置されている結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性が当分析対象物質に割り当てられた結合ドメインにおける結合試薬への結合の0.5%未満である、請求項43に記載の方法。

【請求項69】

非特異的結合ドメインに配置されている結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性が当分析対象物質に割り当てられた結合ドメインにおける結合試薬への結合の0.1%未満である、請求項43に記載の方法。

20

【請求項70】

以下から選択されるオリゴヌクレオチド。

【表2】

| 配列 | 配列 |
|-----------------------|-----------------------|
| acatcggtagtt (配列番号1) | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| aactaccgatgt (配列番号2) | actctacattcg (配列番号24) |
| agaagaagatcc (配列番号5) | cggtttgagata (配列番号25) |
| ggatcttctct (配列番号6) | tatctcaaacg (配列番号26) |
| atcattaccacc (配列番号11) | gacataaagcga (配列番号31) |
| ggtgtaatgat (配列番号12) | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| attaacgggagc (配列番号13) | gccatagtctct (配列番号33) |
| gctcccgttaat (配列番号14) | agagactatggc (配列番号34) |
| cagaggtcttaa (配列番号15) | gctaattcacca (配列番号35) |
| ttaagacctctg (配列番号16) | tggtgaattagc (配列番号36) |
| caggtgtccatt (配列番号17) | gttgattctgtc (配列番号39) |
| aatggacacctg (配列番号18) | gacagaatcaac (配列番号40) |
| cctacgatatac (配列番号21) | ttccacttaggg (配列番号45) |
| gtatcgttagg (配列番号22) | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | tttcccctgcta (配列番号49) |
| | tagcaagggaaa (配列番号50) |

30

40

【請求項71】

それぞれが以下から選択される異なる配列を含む、別個のバイアル入りの、少なくとも4種のオリゴヌクレオチドを含むキット。

【表 3】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggttgagata (配列番号25) |
| | ggatctcttct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccactaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【請求項 7 2】

少なくとも 7 種のオリゴヌクレオチドを含む、請求項 7 1 に記載のキット。

【請求項 7 3】

少なくとも 10 種のオリゴヌクレオチドを含む、請求項 7 1 に記載のキット。

【請求項 7 4】

少なくとも 16 種のオリゴヌクレオチドを含む、請求項 7 1 に記載のキット。

【請求項 7 5】

少なくとも 25 種のオリゴヌクレオチドを含む、請求項 7 1 に記載のキット。

【請求項 7 6】

オリゴヌクレオチドのそれぞれが、ビオチン、ストレプトアビジン、アビジン、アミノ基、チオール基、アルデヒド基、ヒドラジド基、アジド基、アルキン基、マレイミド基またはヨードアセトアミド基を含む連結剤で修飾されている、請求項 7 1 に記載のキット。

30

【請求項 7 7】

少なくとも 4 種のオリゴヌクレオチドが異なる抗体に結合されている、請求項 7 1 に記載のキット。

【請求項 7 8】

それぞれの異なる配列が少なくとも 4 種のオリゴヌクレオチドのさらなる異なる配列の相補体でない、請求項 7 1 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

それぞれの開示を参照によってその全体として本明細書に組み入れる、それぞれ 2013 年 3 月 11 日に提出した米国特許仮出願第 61 / 775860 号、2013 年 3 月 13 日に提出した第 61 / 778727 号を参照する。

【0002】

連邦政府資金による研究の記載

本発明は、アメリカ国立癌研究所により授与された 5 R C A 1 3 0 3 9 1 - 0 4 のもとに連邦政府の支援により行われた。米国政府は、本発明における特定の権利を有する。

50

【0003】

結合アッセイを実施するための改良された方法および生成物を提供する。これらの方法は、使用者が標準的な一連のアッセイ材料からその必要を満たすアッセイを構成することを可能にする連結剤複合体の使用を含む。本発明の生成物および方法は、アッセイの開発における生産性および柔軟性を著しく増大させる。

【背景技術】

【0004】

試料中の対象の分析対象物質の高感度の測定のための結合反応、例えば、抗原抗体反応、核酸ハイブリダイゼーションおよび受容体リガンド反応を用いる技術に関する実質的な文献の集合が構築された。多くの生化学的結合システムの高度の特異性は、基礎研究、ヒトおよび獣医学診断、環境モニタリングならびに工業試験を含む様々な需要における有用な多くのアッセイ方法およびシステムにつながった。対象の分析対象物質の存在は、結合反応における分析対象物質の関与を直接的に測定することにより測定することができる。いくつかのアプローチにおいて、この関与は、1つまたは複数の結合物質に結合した観測可能な標識の測定により示すことができる。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

市販のアッセイは、使用者にとって唯一の関心事であり得る標的（単数または複数）を評価する柔軟性を使用者にほとんどまたは全く与えない事前にセットされた構成で一般的に供給される。そのような市販のパネルは、ほとんどもしくは全く関心のない標的分析対象物質を含む可能性があり、かつ/または所望の標的分析対象物質を含まない可能性がある。したがって、標準セットのアッセイ材料および方法を用いて使用者により規定される多重化アッセイを構成する柔軟な方法を使用者に提供する必要がある。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、以下の特定の実施形態を企図する。本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本明細書で述べる実施形態に対する様々な修正、追加および変更を当業者が行うことができる。そのような修正、追加および変更は、特許請求の範囲内に入るものとする。

30

【0007】

実施形態（1）：以下の工程を含む対象の複数の分析対象物質の多重化結合アッセイを行う方法：

1つまたは複数の工程で、以下の成分：対象の第1の分析対象物質および対象の第2の分析対象物質を含む試料、第1の結合ドメイン上に固定化された第1の標的物質、連結剤に接続された、第1の標的物質の結合相手である第1の標的物質相補体、補助連結剤に接続された、第1の分析対象物質の結合相手である第1の結合試薬、第2の結合ドメイン上に固定化された第2の標的物質、連結剤に接続された、第2の標的物質の結合相手である第2の標的物質相補体、補助連結剤に接続された、第2の分析対象物質の結合相手である第2の結合試薬ならびに場合により架橋剤の少なくとも2つのコピーを混ぜ合わせる工程であって、架橋剤が除外される場合には、各連結剤が補助連結剤の結合相手であり、架橋剤が含まれる場合には、架橋剤が連結剤の1つに対する第1の結合部位および補助連結剤の1つに対するさらなる結合部位を有する、工程と、

40

第1の標的物質、第1の標的物質相補体、第1の結合試薬および第1の分析対象物質を含む第1の結合ドメイン上の第1の結合複合体ならびに第2の標的物質、第2の標的物質相補体、第2の結合試薬および第2の分析対象物質を含む第2の結合ドメイン上の第2の結合複合体を形成する工程と、

第1および第2の結合ドメイン上の第1および第2の分析対象物質の量をそれぞれ測定する工程。

【0008】

50

実施形態(1)(a)と呼ぶ、実施形態(1)の1つの例において、試料は、対象の1つまたは複数のさらなる分析対象物質を含み、対象のそれぞれのさらなる分析対象物質について、混ぜ合わせ工程は、1つまたは複数の工程で、さらなる結合ドメイン上に固定化されたさらなる標的物質、連結剤に接続されたさらなる標的物質相補体、および補助連結剤に接続されたさらなる結合試薬、ならびにさらなる標的物質、さらなる標的物質相補体、さらなる結合試薬およびさらなる分析対象物質を含むさらなる結合ドメイン上のさらなる結合複合体を混ぜ合わせることをさらに含み；形成工程は、さらなる標的物質、さらなる標的物質相補体、さらなる結合試薬およびさらなる分析対象物質を含むさらなる結合ドメイン上のさらなる結合複合体を形成することをさらに含み；測定は、さらなる結合ドメイン上のさらなる分析対象物質の量を測定することをさらに含む。

10

【0009】

実施形態(1)(b)と呼ぶ、実施形態(1)のさらなる例において、第1の標的物質相補体および第1の結合試薬は、連結剤と補助連結剤との間の結合相互作用により連結された第1の標的物質相補体および第1の結合試薬を含む事前に結合させた第1の標的複合体として準備し；第2の標的物質相補体および第2の結合試薬は、連結剤と補助連結剤との間の結合相互作用により連結された第2の標的物質相補体および第2の結合試薬を含む事前に結合させた第2の標的複合体として準備する。

【0010】

さらに、実施形態(1)(c)と呼ぶ、実施形態(1)の他の例において、第1の標的複合体は、第1の結合ドメイン上に固定化させた第1の標的物質に事前に結合させて準備し；第2の標的複合体は、第2の結合ドメイン上に固定化させた第2の標的物質に事前に結合させて準備する。この例において、混ぜ合わせ工程は、第1および第2の標的複合体を試料と混ぜ合わせて、その混合物を形成し、第1の分析対象物質を第1の標的複合体における第1の結合試薬と結合させ、第2の分析対象物質を第2の標的複合体における第2の結合試薬と結合させ、第1および第2の分析対象物質に結合した第1および第2の標的複合体の混合物をそれぞれ第1および第2の結合ドメインと接触させ；第1の標的複合体を第1の結合ドメイン上の第1の標的物質に結合させ、第2の標的複合体を第2の結合ドメイン上の第2の標的物質に結合させることをさらに含む。

20

【0011】

実施形態(1)(d)と呼ぶ、実施形態(1)の特定の例において、混ぜ合わせ工程は、第1の容積の液体中で、前記第1の標的物質相補体、前記第1の結合試薬および、用いる場合、前記架橋試薬を混ぜ合わせ、前記第1の標的物質相補体と前記第1の結合試薬をそれらの結合した連結剤を介して連結し、第1の標的複合体を形成すること；第2の容積の液体中で、前記第2の標的物質相補体、前記第2の結合試薬および、用いる場合、前記架橋試薬を混ぜ合わせ、前記第2の標的物質相補体と前記第2の結合試薬をそれらの結合した連結剤を介して連結し、第2の標的複合体を形成することをさらに含む。

30

【0012】

実施形態(1)(e)と呼ぶ、実施形態(1)の特定の例において、混ぜ合わせ工程は、前記第1および第2の標的複合体を混ぜ合わせ、前記第1および第2の標的複合体の配合物を前記第1および第2の結合ドメインと接触させ、前記第1の標的複合体を前記第1の結合ドメイン上の前記第1の標的物質に結合させ、前記第2の標的複合体を前記第2の結合ドメイン上の前記第2の標的物質に結合させることをさらに含む。この例において、混ぜ合わせ工程は、第1および第2の標的複合体を試料と混ぜ合わせて、その混合物を形成し、第1の分析対象物質を第1の標的複合体における第1の結合試薬と結合させ、第2の分析対象物質を第2の標的複合体における第2の結合試薬と結合させ、第1および第2の分析対象物質に結合した第1および第2の標的複合体の混合物をそれぞれ第1および第2の結合ドメインと接触させ；第1の標的複合体を第1の結合ドメイン上の第1の標的物質に結合させ、第2の標的複合体を第2の結合ドメイン上の第2の標的物質に結合させることをさらに含む。

40

【0013】

50

実施形態(1)(c)および(1)(e)において、第1および第2の標的複合体を第1および第2の結合ドメインと接触させる前に第1および第2の標的複合体を試料と混ぜ合わせることができる。さらに、これらの特定の実施形態において、第1および第2の標的複合体を第1および第2の結合ドメインと接触させた後に第1および第2の標的複合体を試料と混ぜ合わせることができ；または第1および第2の標的複合体を試料と混ぜ合わせ、同時に第1および第2の結合ドメインと接触させることができる。

【0014】

実施形態(1)(d)において、混ぜ合わせ工程は、前記第1および第2の結合ドメイン上の前記第1および第2の標的複合体を前記試料と接触させ、前記第1の分析対象物質を前記第1の標的複合体における第1の結合試薬に結合させ、前記第2の分析対象物質を前記第2の標的複合体における前記第2の結合試薬に結合させる工程をさらに含み得る。

10

【0015】

実施形態(1)および(1)(a)~(e)において、架橋剤を除外することができ、(a)チオール基とマレイミドもしくはヨードアセトアミド基との間；(b)アルデヒドとヒドラジドとの間；または(c)アルキンとアジドとの間の結合相互作用により連結剤を補助連結剤に結合させることができる。

【0016】

実施形態(1)および(1)(a)~(e)において、架橋剤を除外することができ、(a)連結剤は、ビオチンであり、補助連結剤は、ストレプトアビジンもしくはアビジンである；(b)連結剤は、ストレプトアビジンもしくはアビジンであり、補助連結剤は、ビオチンである；(c)連結剤は、ペプチドであり、補助連結剤は、抗ペプチド抗体である；または(d)連結剤は、抗ペプチド抗体であり、補助連結剤は、ペプチドである。

20

【0017】

あるいはまたはさらに、実施形態(1)および(1)(a)~(e)において、架橋剤を含めることができ、架橋剤は、ストレプトアビジンもしくはアビジンであり得、連結剤および補助連結剤は、それぞれビオチンを含み得る。

【0018】

実施形態(1)および(1)(a)~(e)において述べた第1および第2の結合試薬はそれぞれ、前記第1および第2の分析対象物質にそれぞれ結合することができる受容体、リガンド、抗体、ハプテン、抗原、エピトープ、ミミトープ、アプタマーまたはインターカラーターを含み得る。例えば、第1および第2の結合試薬は、抗原である。あるいはまたはさらに、第1および第2の結合試薬は、抗体である。

30

【0019】

実施形態(1)および(1)(a)~(e)において、方法はサンドイッチ結合アッセイを行うことを含む。

【0020】

実施形態(1)および(1)(a)~(e)の1つの特定の例において、混ぜ合わせ工程において混ぜ合わされた成分は、第1の分析対象物質に結合する第1の検出試薬および第2の分析対象物質に結合する第2の検出試薬をさらに含み、第2の工程において形成された第1および第2の複合体は、それぞれ第1および第2の検出試薬をさらに含む。例えば、第1および第2の検出試薬は、それぞれ検出可能な標識を含む。この実施形態の他の例において、第1および第2の結合試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、抗体である。さらに、第1および第2の検出試薬は、第1または第2の分析対象物質に結合することができ、場合により、第1および第2の検出試薬は、それぞれ検出可能な標識を含む。特定の例において、第1および第2の結合試薬は、抗原であり、分析対象物質は、抗原に対する抗体であり、検出試薬は、抗免疫グロブリン抗体、プロテインA、プロテインGまたはプロテインLを含む。

40

【0021】

実施形態(1)および(1)(a)~(e)の方法は、競合的結合アッセイを行うことを含む得る。

50

【 0 0 2 2 】

さらに、実施形態(1)および(1)(a)~(e)において混ぜ合わされた成分は、第1の結合試薬への結合について第1の分析対象物質と競合する第1の検出試薬および第2の結合試薬への結合について第2の分析対象物質と競合する第2の検出試薬をさらに含み得る。

【 0 0 2 3 】

実施形態(1)および(1)(a)~(e)において、方法の1つまたは複数の次のさらなる要素が含まれる：第1および第2の検出試薬は、検出可能な標識を含み得る；第1および第2の結合試薬は抗体であり、第1および第2の検出試薬は、分析対象物質の構造類似体である；測定工程は、吸光度、蛍光、リン光、化学発光、電気化学発光、光散乱または磁気により第1および第2の検出可能な標識の存在を測定することを含み得る；第1および第2の検出可能な標識は、電気化学発光標識であり、測定工程は、電気化学発光シグナルを測定し、シグナルを試料中の第1および第2の分析対象物質の量と関連させることをさらに含む；第1および第2の結合ドメインは、電極上に配置され、測定工程は、電極に電圧波形を印加して、電気化学発光を発生させることをさらに含む；第1および第2の結合ドメインのそれぞれは、結合ドメインのアレイの要素であり、場合により、アレイは、多ウエルプレートのウエル内に配置されている；第1および第2の結合ドメインのそれぞれは、1つまたは複数のマイクロ粒子の表面上にそれぞれ配置され、場合により、粒子は、個別の粒子の特定ならびに第1および第2の結合ドメイン間の識別を可能にするようにコード化されている。

10

20

【 0 0 2 4 】

実施形態(1)(f)：実施形態(1)の要素および実施形態(1)(a)~(e)の1つまたは複数のさらなる特徴を含み、ここで、第1の標的物質および第1の標的物質相補体ならびに第2の標的物質および第2の標的物質相補体がそれぞれ相補的オリゴヌクレオチド対を含む。この特定の例において、第1および第2の結合試薬は、それぞれ抗体であり得る。さらに、この特定の例において、第1および第2の結合ドメインのそれぞれに配置されている相補的オリゴヌクレオチド対は、異なっており、以下から選択される：

【 0 0 2 5 】

【表 1】

| 対番号 | 配列(5'→3') | 対番号 | 配列(5'→3') |
|-----|-----------------------|-----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 2 | acgtcccagttg (配列番号3) | 14 | cttacaacgcca (配列番号27) |
| | caactgggacgt (配列番号4) | | tgcggttgaag (配列番号28) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 15 | ctttctcggcac (配列番号29) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | gtccgagaaag (配列番号30) |
| 4 | aggttcagtga (配列番号7) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | tgactgaacct (配列番号8) | | tcgcttatgtc (配列番号32) |
| 5 | atcaggatacgc (配列番号9) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gcgatcctgat (配列番号10) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ggtggaatgat (配列番号12) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 19 | ggtcgtgttca (配列番号37) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 21 | tacccggaataa (配列番号41) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | ttattccgggta (配列番号42) |
| 10 | catccaatccag (配列番号19) | 22 | tgcttgactgg (配列番号43) |
| | ctggattggatg (配列番号20) | | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatcctgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) | 24 | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| | actctacattcg (配列番号24) | | gccgctagacaa (配列番号48) |
| | | 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

【0026】

実施形態(1)(g)：実施形態(1)の要素および実施形態(1)(a)～(e)の1つまたは複数のさらなる特徴を含み、ここで、第1の標的物質および第1の標的物質相補体ならびに第2の標的物質および第2の標的物質相補体がそれぞれ相補的オリゴヌクレオチド対を含む。この特定の例において、第1および第2の結合試薬は、それぞれ抗体であり得る。さらに、この特定の例において、第1および第2の結合ドメインのそれぞれに配置されている相補的オリゴヌクレオチド対は、異なっており、以下から選択される：

【0027】

40

【表 2】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtgtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | ggtgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccactaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【0028】

実施形態(1)(f)および/または(1)(g)において、少なくとも7個の結合ドメイン、または少なくとも10個の結合ドメイン；または少なくとも16個の結合ドメイン；または少なくとも25個の結合ドメインが存在する。

【0029】

実施形態(1)(a)において、第1および第2の相補的標的物質のそれぞれは、それぞれ第1および第2の結合ドメインの1つに選択的に結合することができる。例えば、相補的標的物質の他の結合ドメインへの結合の交差反応性は、結合ドメインの1つへの結合の5%未満である；または第1および第2の相補的標的物質のそれぞれの第3の結合ドメインへの結合の交差反応性は、結合ドメインの1つへの結合の1%未満である；または第1および第2の相補的標的物質のそれぞれの第3の結合ドメインへの結合の交差反応性は、結合ドメインの1つへの結合の0.5%未満である；または第1および第2の相補的標的物質のそれぞれの第3の結合ドメインへの結合の交差反応性は、結合ドメインの1つへの結合の0.1%未満である。

30

【0030】

実施形態(1)および(1)(a)において、第1および第2の結合試薬は、対象の異なる分析対象物質にそれぞれ結合することができる；または第1および第2の結合試薬は、対象の異なる分析対象物質に対してそれぞれ優先的に選択的である。

【0031】

前述の実施形態のいずれか1つの第1および第2の結合試薬は、対象の異なる分析対象物質に対する親和性および/または選択性が異なり得るものであり、例えば、第2の結合試薬に対する第1の分析対象物質の交差反応性は、第1の結合試薬への結合の5%未満である、または第2の結合試薬に対する第1の分析対象物質の交差反応性は、第1の結合試薬への結合の1%未満である、または第2の結合試薬に対する第1の分析対象物質の交差反応性は、第1の結合試薬への結合の0.5%未満である、または第2の結合試薬に対する第1の分析対象物質の交差反応性は、第1の結合試薬への結合の0.1%未満である、または非特異的結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性は、当分析対象物質への結合について選択される結合試薬への結合の5%未満である、または非特異的結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性は、当分析対象物質への

40

50

結合について選択される結合試薬への結合の1%未満である、または非特異的結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性は、当分析対象物質への結合について選択される結合試薬への結合の0.5%未満である、または非特異的結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性は、当分析対象物質への結合について選択される結合試薬への結合の0.1%未満である。さらに前述の実施形態のこの特定の例において、第2の結合ドメインに配置されている結合試薬に対する第1の分析対象物質の交差反応性は、第1の結合ドメインに配置されている結合試薬への結合の5%未満である、または第2の結合ドメインに配置されている結合試薬に対する第1の分析対象物質の交差反応性は、第1の結合ドメインに配置されている結合試薬への結合の1%未満である、または第2の結合ドメインに配置されている結合試薬に対する第1の分析対象物質の交差反応性は、第1の結合ドメインに配置されている結合試薬への結合の0.5%未満である、または第2の結合ドメインに配置されている結合試薬に対する第1の分析対象物質の交差反応性は、第1の結合ドメインに配置されている結合試薬への結合の0.1%未満である、または非特異的結合ドメインに配置されている結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性は、当分析対象物質に割り当てられた結合ドメインにおける結合試薬への結合の5%未満である、または非特異的結合ドメインに配置されている結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性は、当分析対象物質に割り当てられた結合ドメインにおける結合試薬への結合の1%未満である、または非特異的結合ドメインに配置されている結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性は、当分析対象物質に割り当てられた結合ドメインにおける結合試薬への結合の0.5%未満である、または非特異的結合ドメインに配置されている結合試薬に対する対象の分析対象物質の観測される交差反応性は、当分析対象物質に割り当てられた結合ドメインにおける結合試薬への結合の0.1%未満である。

10

20

【0032】

実施形態(1)および(1)(a)において、第1および第2の標的物質ならびに第1および第2の標的物質相補体は、それぞれ一組の結合試薬を一組の結合ドメインに位置づけるために用いることができ、該組における結合試薬のそれぞれは、対象の異なる分析対象物質に結合する。例えば、該組における結合試薬のそれぞれは、対象の異なる分析対象物質に対して優先的に選択的であるか、あるいは該組における結合試薬のそれぞれは、対象の異なる分析対象物質に対する親和性および/または選択性が異なる。

30

【0033】

実施形態(2)：以下から選択されるオリゴヌクレオチド：

【0034】

【表 3】

| | |
|-----------------------|-----------------------|
| acatcggtagtt (配列番号1) | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| aactaccgatgt (配列番号2) | cttacaacgcc (配列番号27) |
| acgtcccagttg (配列番号3) | tggcgttgaag (配列番号28) |
| caactgggacgt (配列番号4) | ctttctcggcac (配列番号29) |
| agaagaagatcc (配列番号5) | gtgccgagaaag (配列番号30) |
| ggatcttctct (配列番号6) | gacataaagcga (配列番号31) |
| aggttcagtgca (配列番号7) | tcgcttatgtc (配列番号32) |
| tgcactgaacct (配列番号8) | gccatagtctct (配列番号33) |
| atcaggatacgc (配列番号9) | agagactatggc (配列番号34) |
| gcgtatcctgat (配列番号10) | gctaattcacca (配列番号35) |
| atcattaccacc (配列番号11) | tggtgaattagc (配列番号36) |
| ggtggaatgat (配列番号12) | ggtcgtgttca (配列番号37) |
| attaacgggagc (配列番号13) | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| gctccgtaat (配列番号14) | gttgattctgtc (配列番号39) |
| cagaggtcttaa (配列番号15) | gacagaatcaac (配列番号40) |
| ttaagacctctg (配列番号16) | taccggaataa (配列番号41) |
| caggtgtccatt (配列番号17) | ttattccgggta (配列番号42) |
| aatggacacctg (配列番号18) | tgcttgacttgg (配列番号43) |
| catccaatccag (配列番号19) | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| ctggattggatg (配列番号20) | ttccacttaggg (配列番号45) |
| cctacgatatac (配列番号21) | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| gtatatcgtagg (配列番号22) | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| cgaatgtagagt (配列番号23) | gccgctagacaa (配列番号48) |
| actctacattcg (配列番号24) | tttccttgcta (配列番号49) |
| cggtttgagata (配列番号25) | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

【 0 0 3 5 】

実施形態 (3) : 以下から選択されるオリゴヌクレオチド :

【 0 0 3 6 】

【表4】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttcttct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggctctaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | ggtgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【0037】

実施形態(4)：それぞれが以下から選択される異なる配列を含む、別個のバイアル入りの、少なくとも4種のオリゴヌクレオチドを含むキット：

【0038】

【表 5】

| | |
|-----------------------|------------------------|
| acatcggtagtt (配列番号1) | tatctcaaccg (配列番号26) |
| aactaccgatgt (配列番号2) | cttacaacgcca (配列番号27) |
| acgtcccagttg (配列番号3) | tggcgttgaag (配列番号28) |
| caactgggacgt (配列番号4) | ctttctcggcac (配列番号29) |
| agaagaagatcc (配列番号5) | gtgccgagaaaag (配列番号30) |
| ggatcttctct (配列番号6) | gacataaagcga (配列番号31) |
| aggttcagtgca (配列番号7) | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| tgcactgaacct (配列番号8) | gccatagtctct (配列番号33) |
| atcaggatacgc (配列番号9) | agagactatggc (配列番号34) |
| gcgatcctgat (配列番号10) | gctaattcacca (配列番号35) |
| atcattaccacc (配列番号11) | tggtgaattagc (配列番号36) |
| ggtggaatgat (配列番号12) | ggtcgtgttca (配列番号37) |
| attaacgggagc (配列番号13) | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| gtcccgttaat (配列番号14) | gttgattctgtc (配列番号39) |
| cagaggtcttaa (配列番号15) | gacagaatcaac (配列番号40) |
| ttaagacctcg (配列番号16) | taccgggaataa (配列番号41) |
| caggtgtccatt (配列番号17) | ttattccgggta (配列番号42) |
| aatggacacctg (配列番号18) | tgcttgactgg (配列番号43) |
| catccaatccag (配列番号19) | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| ctggattggatg (配列番号20) | ttcacttaggg (配列番号45) |
| cctacgatatac (配列番号21) | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| gtatacgtagg (配列番号22) | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| cgaatgtagagt (配列番号23) | gccgctagacaa (配列番号48) |
| actctacattcg (配列番号24) | ttcccttgcta (配列番号49) |
| cggtttgagata (配列番号25) | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

【 0 0 3 9 】

実施形態(5) : それぞれが以下から選択される異なる配列を含む、別個のバイアル入りの、少なくとも4種のオリゴヌクレオチドを含むキット :

【 0 0 4 0 】

【表 6】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|------------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctccgtaaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatacgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【0041】

実施形態(4)および(5)のキットにおいて、キットは、少なくとも7種のオリゴヌクレオチド、または少なくとも10種のオリゴヌクレオチド、または少なくとも16種のオリゴヌクレオチド、または少なくとも25種のオリゴヌクレオチドを含み得る。さらに、これらの特定の実施形態のオリゴヌクレオチドのそれぞれは、ピオチン、ストレプトアビジン、アビジン、アミノ基、チオール基、アルデヒド基、ヒドラジド基、アジド基、アルキン基、マレイミド基またはヨードアセトアミド基を含む連結剤で修飾することができる。実施形態(4)および(5)の他の特定の例において、少なくとも4種のオリゴヌクレオチドのそれぞれを異なる抗体に結合させることができ、場合により、それぞれの異なる配列は、少なくとも4種のオリゴヌクレオチドのさらなる異なる配列の相補体でない。

30

【0042】

実施形態(6)：それぞれが以下から選択される異なる配列を含む、少なくとも4種のオリゴヌクレオチドを含む混合物：

【0043】

【表 7】

| | |
|-----------------------|------------------------|
| acatcggtagtt (配列番号1) | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| aactaccgatgt (配列番号2) | cttacaacgccca (配列番号27) |
| acgtcccagttg (配列番号3) | tggcgttgaag (配列番号28) |
| caactgggacgt (配列番号4) | ctttctcggcac (配列番号29) |
| agaagaagatcc (配列番号5) | gtgccgagaaag (配列番号30) |
| ggatcttcttct (配列番号6) | gacataaagcga (配列番号31) |
| aggttcagtgc (配列番号7) | tcgcttatgtc (配列番号32) |
| tgcactgaacct (配列番号8) | gccatagtctct (配列番号33) |
| atcaggatagcg (配列番号9) | agagactatggc (配列番号34) |
| gcgtatcctgat (配列番号10) | gctaattcacca (配列番号35) |
| atcattaccacc (配列番号11) | tggtgaattagc (配列番号36) |
| ggtggaatgat (配列番号12) | ggctgtgttca (配列番号37) |
| attaacgggagc (配列番号13) | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| gctcccgttaat (配列番号14) | gttgattctgtc (配列番号39) |
| cagaggtcttaa (配列番号15) | gacagaatcaac (配列番号40) |
| ttaagacctctg (配列番号16) | taccggaataa (配列番号41) |
| caggtgtccatt (配列番号17) | ttattccgggta (配列番号42) |
| aatggacacctg (配列番号18) | tgcttgacttgg (配列番号43) |
| catccaatccag (配列番号19) | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| ctggattggatg (配列番号20) | ttccacttaggg (配列番号45) |
| cctacgatatac (配列番号21) | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| gtatatcgtagg (配列番号22) | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| cgaatgtagagt (配列番号23) | gccgctagacaa (配列番号48) |
| actctacattcg (配列番号24) | tttccttgcta (配列番号49) |
| cggtttgagata (配列番号25) | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

ここで、異なる配列のそれぞれが異なる抗体に結合される。

【0044】

実施形態(7)：それぞれが以下から選択される異なる配列を含む、少なくとも4種のオリゴヌクレオチドを含む混合物：

【0045】

【表 8】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttcttct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | ggtgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaaggghaaa (配列番号50) |

10

20

ここで、異なる配列のそれぞれが異なる抗体に結合される。

【0046】

実施形態(6)および(7)において、混合物は、少なくとも7種のオリゴヌクレオチド、または少なくとも10種のオリゴヌクレオチド、または少なくとも16種のオリゴヌクレオチド、または少なくとも25種のオリゴヌクレオチドを含み得る。さらに、実施形態(6)および(7)の特定の例において、それぞれの異なる配列は、少なくとも4種のオリゴヌクレオチドのさらなる異なる配列の相補体でない。

【0047】

実施形態(8)：複数の少なくとも4個の結合ドメインを含むアレイであって、1つまたは複数の、また場合により、それぞれの結合ドメインがその上に固定化された以下から選択される異なるオリゴヌクレオチド配列を有する：

30

【0048】

【表 9】

| | |
|-----------------------|------------------------|
| acatcggtagtt (配列番号1) | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| aactaccgatgt (配列番号2) | cttacaacgcca (配列番号27) |
| acgtcccagttg (配列番号3) | tggcgttgaag (配列番号28) |
| caactgggacgt (配列番号4) | ctttctcggcac (配列番号29) |
| agaagaagatcc (配列番号5) | gtgccgagaaaag (配列番号30) |
| ggatcttctct (配列番号6) | gacataaagcga (配列番号31) |
| aggttcagtga (配列番号7) | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| tgactgaacct (配列番号8) | gccatagtctct (配列番号33) |
| atcaggatagc (配列番号9) | agagactatggc (配列番号34) |
| gcgatcctgat (配列番号10) | gctaattacca (配列番号35) |
| atcattaccacc (配列番号11) | tggtgaattagc (配列番号36) |
| ggtggaatgat (配列番号12) | ggtcgtgttca (配列番号37) |
| attaacgggagc (配列番号13) | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| gctcccgttaat (配列番号14) | gttgattctgtc (配列番号39) |
| cagaggtcttaa (配列番号15) | gacagaatcaac (配列番号40) |
| ttaagacctg (配列番号16) | taccggaataa (配列番号41) |
| caggtgtccatt (配列番号17) | ttattccgggta (配列番号42) |
| aatggacacctg (配列番号18) | tgcttgactgg (配列番号43) |
| catccaatccag (配列番号19) | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| ctggattggatg (配列番号20) | ttccactaggg (配列番号45) |
| cctacgatatac (配列番号21) | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| gtatatcgtagg (配列番号22) | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| cgaatgtagagt (配列番号23) | gccgctagacaa (配列番号48) |
| actctacattcg (配列番号24) | tttcccttgcta (配列番号49) |
| cggttgagata (配列番号25) | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

【0049】

実施形態(9)：複数の少なくとも4個の結合ドメインを含むアレイであって、1つまたは複数の、また場合により、それぞれの結合ドメインがその上に固定化された以下から選択される異なるオリゴヌクレオチド配列を有する：

【0050】

【表 1 0】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttcttct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | gggggtaatgat (配列番号12) | | tcgcttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggctctaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | ggtgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【0051】

実施形態(8)および(9)において、アレイは、少なくとも7個の結合ドメイン、または少なくとも10個の結合ドメイン、または少なくとも16個の結合ドメイン、または少なくとも25個の結合ドメインを含み得、場合により、それぞれの異なる配列は、少なくとも4種のオリゴヌクレオチドのさらなる異なる配列の相補体でない。

【0052】

実施形態(10)：プレートの少なくとも1つのウェル内にオリゴヌクレオチドアレイの1つまたは複数のコピーを有し、アレイが複数の結合ドメイン上に配置されている多ウェルプレートであって、1つまたは複数の、また場合により、少なくとも4個の結合ドメインがその上に固定化された以下から選択される異なるオリゴヌクレオチド配列を有する：

30

【0053】

【表 1 1】

| | |
|-----------------------|-----------------------|
| acatcggtagt (配列番号1) | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| aactaccgatgt (配列番号2) | cttacaacgcca (配列番号27) |
| acgtcccagttg (配列番号3) | tggcgttgaag (配列番号28) |
| caactgggacgt (配列番号4) | ctttctcggcac (配列番号29) |
| agaagaagatcc (配列番号5) | gtgccgagaaag (配列番号30) |
| ggatcttcttct (配列番号6) | gacataaagcga (配列番号31) |
| aggttcagtgca (配列番号7) | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| tgcactgaacct (配列番号8) | gccatagtctct (配列番号33) |
| atcaggatacgc (配列番号9) | agagactatggc (配列番号34) |
| gcgatcctgat (配列番号10) | gctaattcacca (配列番号35) |
| atcattaccacc (配列番号11) | tggtgaattagc (配列番号36) |
| ggtggtaatgat (配列番号12) | ggtcgtgttca (配列番号37) |
| attaacgggagc (配列番号13) | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| gctcccgttaat (配列番号14) | gttgattctgtc (配列番号39) |
| cagaggtcttaa (配列番号15) | gacagaatcaac (配列番号40) |
| ttaagacctctg (配列番号16) | taccggaataa (配列番号41) |
| caggtgtccatt (配列番号17) | ttattccgggta (配列番号42) |
| aatggacacctg (配列番号18) | tgcttgactgg (配列番号43) |
| catccaatccag (配列番号19) | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| ctggattggatg (配列番号20) | ttccacttaggg (配列番号45) |
| cctacgatatac (配列番号21) | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| gtatatcgtagg (配列番号22) | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| cgaatgtagagt (配列番号23) | gccgctagacaa (配列番号48) |
| actctacattcg (配列番号24) | tttccttgcta (配列番号49) |
| cggtttgagata (配列番号25) | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

【0054】

実施形態(11)：プレートの少なくとも1つのウエル内にオリゴヌクレオチドアレイの1つまたは複数のコピーを有し、アレイが複数の結合ドメイン上に配置されている多ウエルプレートであって、1つまたは複数の、また場合により、少なくとも4個の結合ドメインがその上に固定化された以下から選択される異なるオリゴヌクレオチド配列を有する：

【0055】

【表 1 2】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgtaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | cagggtgccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【0056】

実施形態(10)および(11)のプレートは、少なくとも24ウエル、または少なくとも96ウエル、または少なくとも384ウエルを含み得、かつ/または場合により、アレイは、少なくとも7種のオリゴヌクレオチド、または少なくとも10種のオリゴヌクレオチド、または少なくとも16種のオリゴヌクレオチド、または少なくとも25種のオリゴヌクレオチドを含み、ここで、場合により、それぞれの異なる配列は、少なくとも4種のオリゴヌクレオチドのさらなる異なる配列の相補体でない。

【0057】

実施形態(12)：1つまたは複数のバイアル入りの一組の少なくとも4つのマイクロ粒子試薬を含むキットであって、当該組のそれぞれのマイクロ粒子試薬がその上に固定化された以下から選択される異なるオリゴヌクレオチド配列を有するマイクロ粒子を含む：

30

【0058】

【表 1 3】

| | |
|-----------------------|-----------------------|
| acatcggtagtt (配列番号1) | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| aactaccgatgt (配列番号2) | cttacaacgcca (配列番号27) |
| acgtcccagttg (配列番号3) | tgccgttgaag (配列番号28) |
| caactgggacgt (配列番号4) | ctttctcggcac (配列番号29) |
| agaagaagatcc (配列番号5) | gtgccgagaaag (配列番号30) |
| ggatcttctct (配列番号6) | gacataaagcga (配列番号31) |
| aggttcagtgca (配列番号7) | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| tgcaactgaacct (配列番号8) | gccatagtctct (配列番号33) |
| atcaggatacgc (配列番号9) | agagactatggc (配列番号34) |
| gcgtatcctgat (配列番号10) | gctaattcacca (配列番号35) |
| atcattaccacc (配列番号11) | tggtgaattagc (配列番号36) |
| ggtggtaatgat (配列番号12) | ggctcgtgttca (配列番号37) |
| attaacgggagc (配列番号13) | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| gctcccgttaat (配列番号14) | gttgattctgtc (配列番号39) |
| cagaggtcttaa (配列番号15) | gacagaatcaac (配列番号40) |
| ttaagacctctg (配列番号16) | taccgggataa (配列番号41) |
| caggtgtccatt (配列番号17) | ttattccgggta (配列番号42) |
| aatggacacctg (配列番号18) | tgcttgactggg (配列番号43) |
| catccaatccag (配列番号19) | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| ctggattggatg (配列番号20) | ttccacttaggg (配列番号45) |
| cctacgatatac (配列番号21) | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| gtatatcgtagg (配列番号22) | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| cgaatgtagagt (配列番号23) | gccgctagacaa (配列番号48) |
| actctacattcg (配列番号24) | ttcccttgcta (配列番号49) |
| cggtttgagata (配列番号25) | tagcaagggaag (配列番号50) |

10

20

30

【 0 0 5 9 】

実施形態 (1 3) : 1つまたは複数のバイアル入りの一組の少なくとも4つのマイクロ粒子試薬を含むキットであって、当該組のそれぞれのマイクロ粒子試薬がその上に固定化された以下から選択される異なるオリゴヌクレオチド配列を有するマイクロ粒子を含む :

【 0 0 6 0 】

【表 1 4】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtaggt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttcttct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgct (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctccggttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgct (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccactaggg (配列番号45) |
| | gtatatactagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【0061】

実施形態(12)および(13)のキットは、一組の少なくとも7個のマイクロ粒子、または一組の少なくとも少なくとも10個のマイクロ粒子、または一組の少なくとも少なくとも16個のマイクロ粒子、または一組の少なくとも少なくとも25個のマイクロ粒子を含み得、かつ/または場合により、それぞれの異なる配列は、少なくとも4種のオリゴヌクレオチドのさらなる異なる配列の相補体でない。

【0062】

実施形態(12)および(13)のマイクロ粒子は、コード化することができ、異なるマイクロ粒子試薬は、異なる識別コードを有し得る。

【0063】

実施形態(14)：プレートの少なくとも1つのウェル内にオリゴヌクレオチドアレイの1つまたは複数のコピーを有し、アレイが複数の結合ドメイン上に配置されている多ウェルプレートを含むキットであって、1つまたは複数の、また場合により、少なくとも4個の結合ドメインがその上に固定化された以下から選択される異なるオリゴヌクレオチド配列：

30

【0064】

【表 15】

| | |
|-----------------------|-----------------------|
| acatcgtagt (配列番号1) | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| aactaccgatg (配列番号2) | cttacaacgcca (配列番号27) |
| acgtcccagtg (配列番号3) | tggcgttgtaag (配列番号28) |
| caactgggacgt (配列番号4) | ctttctcggcac (配列番号29) |
| agaagaagatcc (配列番号5) | gtgccgagaaag (配列番号30) |
| ggatcttctct (配列番号6) | gacataaagcga (配列番号31) |
| aggttcagtga (配列番号7) | tcgcttatgtc (配列番号32) |
| tgcactgaacct (配列番号8) | gccatagtctct (配列番号33) |
| atcaggatcacg (配列番号9) | agagactatggc (配列番号34) |
| gcgtatcctgat (配列番号10) | gctaattcacca (配列番号35) |
| atcattaccacc (配列番号11) | tggtgaattagc (配列番号36) |
| ggtggaatgat (配列番号12) | ggctcgtgttca (配列番号37) |
| attaacgggagc (配列番号13) | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| gctcccgttaat (配列番号14) | gttgattctgtc (配列番号39) |
| cagaggtcttaa (配列番号15) | gacagaatcaac (配列番号40) |
| ttaagacctctg (配列番号16) | taccggaataa (配列番号41) |
| caggtgtccatt (配列番号17) | ttattccgggta (配列番号42) |
| aatggacacctg (配列番号18) | tgcttgactgg (配列番号43) |
| catccaatccag (配列番号19) | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| ctggattggatg (配列番号20) | ttccacttaggg (配列番号45) |
| cctacgatatac (配列番号21) | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| gtatatcgtagg (配列番号22) | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| cgaatgtagagt (配列番号23) | gccgctagacaa (配列番号48) |
| actctacattcg (配列番号24) | ttcccttgcta (配列番号49) |
| cggtttgagata (配列番号25) | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

および

(i) 以下から選択される 2 つ以上のオリゴヌクレオチドからなる一組のオリゴヌクレオチドを有し :

【 0 0 6 5 】

【表 16】

| | |
|-----------------------|------------------------|
| acatcggtagtt (配列番号1) | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| aactaccgatgt (配列番号2) | cttacaacgcca (配列番号27) |
| acgtcccagttg (配列番号3) | tggcgttgaag (配列番号28) |
| caactgggacgt (配列番号4) | ctttctcggcac (配列番号29) |
| agaagaagatcc (配列番号5) | gtgccgagaaaag (配列番号30) |
| ggatcttcttct (配列番号6) | gacataaagcga (配列番号31) |
| aggttcagtgca (配列番号7) | tcgtttatgtc (配列番号32) |
| tgcactgaacct (配列番号8) | gccatagtctct (配列番号33) |
| atcaggatacgc (配列番号9) | agagactatggc (配列番号34) |
| gcgatcctgat (配列番号10) | gctaattacca (配列番号35) |
| atcattaccacc (配列番号11) | tggtgaattagc (配列番号36) |
| ggtggaatgat (配列番号12) | ggtcgtgtttca (配列番号37) |
| attaacgggagc (配列番号13) | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| gctcccgttaat (配列番号14) | gttgattctgtc (配列番号39) |
| cagaggtcttaa (配列番号15) | gacagaatcaac (配列番号40) |
| ttaagacctctg (配列番号16) | taccggaataa (配列番号41) |
| caggtgtccatt (配列番号17) | ttattccgggta (配列番号42) |
| aatggacacctg (配列番号18) | tgcttgacttgg (配列番号43) |
| catccaatccag (配列番号19) | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| ctggattggatg (配列番号20) | ttccacttaggg (配列番号45) |
| cctacgatatac (配列番号21) | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| gtatatcgtagg (配列番号22) | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| cgaatgtagagt (配列番号23) | gccgctagacaa (配列番号48) |
| actctacattcg (配列番号24) | tttcccttgcta (配列番号49) |
| cggtttgagata (配列番号25) | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

ここで、成分 (i i) におけるオリゴヌクレオチドが成分 (i) におけるオリゴヌクレオチドと相補的である。

【 0 0 6 6 】

実施形態 (1 5) : プレートの少なくとも1つのウェル内にオリゴヌクレオチドアレイの1つまたは複数のコピーを有し、アレイが複数の結合ドメイン上に配置されている多ウェルプレートを含むキットであって、1つまたは複数の、また場合により、少なくとも4個の結合ドメインがその上に固定化された以下から選択される異なるオリゴヌクレオチド配列 :

【 0 0 6 7 】

【表 17】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|------------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttcttct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtgtaatatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggctctaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

および

(i) 以下から選択される2つ以上のオリゴヌクレオチドからなる一組のオリゴヌクレオチドを有し：

【0068】

【表 18】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|------------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttcttct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtgtaatatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggctctaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

30

40

ここで、成分(i i)におけるオリゴヌクレオチドが成分(i)におけるオリゴヌクレオチドと相補的である。

【0069】

実施形態(16)：以下の工程を含む複数の分析対象物質の結合アッセイを行う方法：
(a) 試料を、それぞれが複数の分析対象物質のうちのそれぞれ第1および第2の分析対象物質に結合する少なくとも第1および第2の結合試薬に連結された2つ以上の結合ドメ

50

インと接触させて、第1の結合試薬に結合した第1の分析対象物質および第2の結合試薬に結合した第2の分析対象物質を含む複合体を形成する工程であって、(x)第1の結合ドメインが、(i)第1の結合ドメインおよび第1の標的物質相補体に結合した第1の標的物質ならびに(ii)連結複合体を介して第1の標的物質相補体に結合した第1の結合試薬を含む第1の結合試薬複合体を含み、(y)第2の結合ドメインが、(i)第2の結合ドメインおよび第2の標的物質相補体に結合した第2の標的物質ならびに(ii)連結複合体を介して第2の標的物質相補体に結合した第2の結合試薬を含む第2の結合試薬複合体を含む、工程と、

(b)第1および第2の結合試薬複合体を、第1の分析対象物質または第1の分析対象物質を含む複合体に結合する第1の検出試薬および第2の分析対象物質または第2の分析対象物質を含む複合体に結合する第2の検出試薬を含む複数の検出試薬と接触させる工程と、(c)2つ以上の結合ドメインに結合した第1および第2の分析対象物質の量を測定する工程。

【0070】

実施形態(16)において、1つまたは複数の以下の特徴を採用することができる：第1および第2の結合試薬はそれぞれ、第1および第2の分析対象物質にそれぞれ結合することができる受容体、リガンド、抗体、ハプテン、抗原、エピトープ、ミミトープ、アプタマーまたはインターカレーターを含む、例えば、第1および第2の結合試薬はそれぞれ、第1および第2の分析対象物質にそれぞれ結合することができる抗体を含む；第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチド、受容体-リガンド対、抗原-抗体対、ハプテン-抗体対、エピトープ-抗体対、ミミトープ-抗体対、アプタマー-標的分子対、ハイブリダイゼーションパートナーまたはインターカレーター-標的分子対を含む；第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチド、受容体-リガンド対、抗原-抗体対、ハプテン-抗体対、エピトープ-抗体対、ミミトープ-抗体対、アプタマー-標的分子対、ハイブリダイゼーションパートナーまたはインターカレーター-標的分子対を含む；第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、それぞれオリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチドを含む；第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、それぞれオリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチドを含む；連結複合体は、連結剤およびそれに接続された補助連結剤を含み、例えば、連結複合体は、(a)チオール基とマレイミドもしくはヨードアセトアミドとの間；(b)アルデヒドとヒドラジドとの間；または(c)アルキンとアジドとの間の結合相互作用により形成される；あるいは(a)連結剤は、ピオチンであり、補助連結剤は、ストレプトアビジンもしくはアビジンである；(b)連結剤は、ストレプトアビジンもしくはアビジンであり、補助連結剤は、ピオチンである；(c)連結剤は、ペプチドであり、補助連結剤は、抗ペプチド抗体である；または(d)連結剤は、抗ペプチド抗体であり、補助連結剤は、ペプチドである。

【0071】

さらに、実施形態(16)は、1つまたは複数の以下の特徴を場合により含み得る：複数の検出試薬のそれぞれは、検出可能な標識を含む；複数の検出試薬のサブセットは、検出可能な標識を含む；測定工程は、吸光度、蛍光、リン光、化学発光、電気化学発光、光散乱または磁気により試料中の検出可能な標識の存在を測定することを含む；検出可能な標識は、電気化学発光標識であり、測定工程は、電気化学発光シグナルを測定し、シグナルを試料中の分析対象物質の量と関連させることを含み、例えば、2つ以上の結合ドメインが電極上に配置され、測定工程は、電極に電圧波形を印加して、電気化学発光を発生させることをさらに含み、場合により、2つ以上の結合ドメインが多ウエルプレートの1つまたは複数のウエル内に配置されている。

【0072】

実施形態(16)は、サンドイッチ免疫測定法または競合的免疫測定法を実施することを含み得る。

【0073】

10

20

30

40

50

実施形態(16)において、第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み得、該対は、以下から選択される：

【0074】

【表19】

| 対番号 | 配列(5'→3') | 対番号 | 配列(5'→3') |
|-----|-----------------------|-----|------------------------|
| 1 | acatcggtagt (配列番号1) | 13 | cggttgagata (配列番号25) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 2 | acgtcccagttg (配列番号3) | 14 | cttacaacgccca (配列番号27) |
| | caactgggacgt (配列番号4) | | tggcgttgtaag (配列番号28) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 15 | ctttctcggcac (配列番号29) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | gtgccgagaaag (配列番号30) |
| 4 | aggttcagtgca (配列番号7) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | tgcactgaacct (配列番号8) | | tcgcttatgtc (配列番号32) |
| 5 | atcaggatagc (配列番号9) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gcgtatctgat (配列番号10) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 18 | gctaattacca (配列番号35) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 19 | ggctgtgttca (配列番号37) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 21 | tacccggaataa (配列番号41) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | ttattccgggta (配列番号42) |
| 10 | catccaatccag (配列番号19) | 22 | tgcttgacttgg (配列番号43) |
| | ctggattggatg (配列番号20) | | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) | 24 | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| | actctacattcg (配列番号24) | | gccgctagacaa (配列番号48) |
| | | 25 | tttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

【0075】

さらに、実施形態(16)において、第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み得、該対は、以下から選択される：

【0076】

【表 20】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgtaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggctctaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【0077】

実施形態(16)の1つの例において、第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み得、該対は、以下から選択される：

【0078】

【表 2 1】

| 対番号 | 配列(5'→3') | 対番号 | 配列(5'→3') |
|-----|-----------------------|-----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 2 | acgtcccagttg (配列番号3) | 14 | cttacaacgcca (配列番号27) |
| | caactgggacgt (配列番号4) | | tggcgttgaag (配列番号28) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 15 | ctttctcggcac (配列番号29) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | gtgccgagaaag (配列番号30) |
| 4 | aggttcagtgca (配列番号7) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | tgcactgaacct (配列番号8) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 5 | atcaggatacgc (配列番号9) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gcgtatcctgat (配列番号10) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 19 | ggtcgtgttca (配列番号37) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 9 | cagtggtccatt (配列番号17) | 21 | taccggaataa (配列番号41) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | ttattccgggta (配列番号42) |
| 10 | catccaatccag (配列番号19) | 22 | tgcttgacttgg (配列番号43) |
| | ctggattggatg (配列番号20) | | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttcacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) | 24 | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| | actctacattcg (配列番号24) | | gccgctagacaa (配列番号48) |
| | | 25 | tttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

【0079】

実施形態(16)の1つの例において、第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み得、該対は、以下から選択される：

【0080】

【表 2 2】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgtaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtgga (配列番号46) |
| | | 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaaggga (配列番号50) |

10

20

【0081】

実施形態(16)は、1つまたは複数の以下の要素を含み得る：第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、それぞれ第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドを含み、第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、約10～50塩基を含む；第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、それぞれ第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドを含み、第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、約10～25塩基を含む；第1の結合試薬は、ピオチン分子を含む抗体であり、第1の標的物質は、ストレプトアビジン分子を含む第1のオリゴヌクレオチドであり、連結複合体は、ピオチン分子とストレプトアビジン分子との間の反応により形成され；かつ/または第2の結合試薬は、さらなるピオチン分子を含む抗体であり、第2の標的物質は、さらなるストレプトアビジン分子を含む第2のオリゴヌクレオチドであり、連結複合体は、さらなるピオチン分子とさらなるストレプトアビジン分子との間の反応により形成される。

30

【0082】

実施形態(17)：以下の工程を含む複数の分析対象物質の結合アッセイを行う方法：(a)複数の分析対象物質における第1の分析対象物質に対して特異的な第1の結合試薬および第1の標的物質を含む第1の結合試薬複合体を形成する工程であって、第1の結合試薬が連結剤に結合し、第1の標的物質が補助連結剤に結合しており、第1の結合試薬複合体が連結剤と補助連結剤との間の反応により形成される、工程と、(b)複数の分析対象物質における第2の分析対象物質に対して特異的な第2の結合試薬および第2の標的物質を含む第2の結合試薬複合体を形成する工程であって、第2の結合試薬が第2の連結剤に結合し、第2の標的物質が第2の連結剤相補体に結合しており、第2の結合試薬複合体が第2の連結剤と第2の連結剤相補体との間の反応により形成される、工程と、(c)第1の標的物質を第1の標的物質相補体に、第2の標的物質を第2の標的物質相補体に結合させるのに十分な条件下で、第1および第2の結合試薬複合体を、それぞれがそれぞれ第1の標的物質相補体および第2の標的物質相補体に連結された2つ以上の結合ドメインと混合する工程と、(d)複数の分析対象物質を含む試料を工程(c)で形成された混合物と混合する工程と、(e)複数のさらなる結合試薬を工程(d)で形成された混合物に加える工程であって、複数のさらなる結合試薬が(i)第1の分析対象物質および/または第1の結合試薬-第1の分析対象物質複合体に対して特異的な第1の検出試薬ならびに(

40

50

i i) 第2の分析対象物質および/または第2の結合試薬 - 第2の分析対象物質複合体に対して特異的な第2の検出試薬を含む、工程と、(f) 結合ドメインに結合した第1および第2の分析対象物質の量を測定する工程。

【0083】

実施形態(17)は、1つまたは複数の以下の特徴を含むことができる：第1および第2の結合試薬はそれぞれ、第1および第2の分析対象物質にそれぞれ結合することができる受容体、リガンド、抗体、ハプテン、抗原、エピトープ、ミミトープ、アプタマーまたはインターカレーターを含む、例えば、第1および第2の結合試薬はそれぞれ、第1および第2の分析対象物質にそれぞれ結合することができる抗体を含む；第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチド、受容体 - リガンド対、抗原 - 抗体対、ハプテン - 抗体対、抗原 - 抗体対、エピトープ - 抗体対、ミミトープ - 抗体対、アプタマー - 標的分子対、ハイブリダイゼーションパートナーまたはインターカレーター - 標的分子対を含む；第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチド、受容体 - リガンド対、抗原 - 抗体対、ハプテン - 抗体対、抗原 - 抗体対、エピトープ - 抗体対、ミミトープ - 抗体対、アプタマー - 標的分子対、ハイブリダイゼーションパートナーまたはインターカレーター - 標的分子対を含む；第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチドを含む；第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチドを含む；連結複合体は、連結剤およびそれに接続された補助連結剤を含み、例えば、連結複合体は、(a) チオール基とマレイミドもしくはヨードアセトアミド基との間；(b) アルデヒドとヒドラジドとの間；または(c) アルキンとアジドとの間の結合相互作用により形成される；(a) 連結剤は、ピオチンであり、補助連結剤は、ストレプトアビジンもしくはアビジンである；(b) 連結剤は、ストレプトアビジンもしくはアビジンであり、補助連結剤は、ピオチンである；(c) 連結剤は、ペプチドであり、補助連結剤は、抗ペプチド抗体である；または(d) 連結剤は、抗ペプチド抗体であり、補助連結剤は、ペプチドである。

10

20

【0084】

さらに、実施形態(17)は、1つまたは複数の以下の特徴をさらに含み得る：複数の検出試薬のそれぞれは、検出可能な標識を含み、例えば、複数の検出試薬のサブセットは、検出可能な標識を含む；測定工程は、吸光度、蛍光、リン光、化学発光、電気化学発光、光散乱または磁気により試料中の検出可能な標識の存在を測定することを含む；検出可能な標識は、電気化学発光標識であり、測定工程は、電気化学発光シグナルを測定し、シグナルを試料中の分析対象物質の量と関連させることを含む；2つ以上の結合ドメインが電極上に配置され、測定工程は、電極に電圧波形を印加して、電気化学発光を発生させることをさらに含み、例えば、2つ以上の結合ドメインが多ウエルプレートの1つまたは複数のウエル内に配置されている。

30

【0085】

実施形態(17)は、サンドイッチ免疫測定法または競合的免疫測定法を実施することを含み得る。

【0086】

実施形態(17)において、第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み、該対は、以下から選択される：

40

【0087】

【表 2 3】

| 対番号 | 配列(5'→3') | 対番号 | 配列(5'→3') |
|-----|-----------------------|-----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 2 | acgtcccagttg (配列番号3) | 14 | cttacaacgcca (配列番号27) |
| | caactgggacgt (配列番号4) | | tggcgttgaag (配列番号28) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 15 | ctttctcggcac (配列番号29) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | gtgccgagaaag (配列番号30) |
| 4 | aggttcagtgca (配列番号7) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | tgactgaacct (配列番号8) | | tcgcttatgtc (配列番号32) |
| 5 | atcaggatacgc (配列番号9) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gcgtatcctgat (配列番号10) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ggtggaatgat (配列番号12) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 19 | ggtcgtgttca (配列番号37) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 21 | taccggaataa (配列番号41) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | ttattccgggta (配列番号42) |
| 10 | catccaatccag (配列番号19) | 22 | tgcttgacttgg (配列番号43) |
| | ctggattggatg (配列番号20) | | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) | 24 | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| | actctacattcg (配列番号24) | | gccgctagacaa (配列番号48) |
| | | 25 | tttccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

【0088】

実施形態(17)の特定の例において、第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み、該対は、以下から選択される：

【0089】

【表 2 4】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttcttct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | cagggtgccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | tttccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【0090】

実施形態(17)のさらなる例において、第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み、該対は、以下から選択される：

【0091】

【表 2 5】

| 対番号 | 配列(5'→3') | 対番号 | 配列(5'→3') |
|-----|-----------------------|-----|------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 2 | acgtcccagttg (配列番号3) | 14 | cttacaacgcca (配列番号27) |
| | caactgggacgt (配列番号4) | | tggcgttgaag (配列番号28) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 15 | ctttctcggcac (配列番号29) |
| | ggatcttcttct (配列番号6) | | gtgccgagaaaag (配列番号30) |
| 4 | aggttcagtgc (配列番号7) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | tgcactgaacct (配列番号8) | | tcgcttatgtc (配列番号32) |
| 5 | atcaggatagc (配列番号9) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gcgtatcctgat (配列番号10) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ggtggaatgat (配列番号12) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 19 | ggtcgtgttca (配列番号37) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 21 | taccggaataa (配列番号41) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | ttattccgggta (配列番号42) |
| 10 | catccaatccag (配列番号19) | 22 | tgcttgacttgg (配列番号43) |
| | ctggattggatg (配列番号20) | | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) | 24 | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| | actctacattcg (配列番号24) | | gccgctagacaa (配列番号48) |
| | | 25 | tttccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaaggga (配列番号50) |

10

20

30

【 0 0 9 2 】

実施形態(17)のさらなる例において、第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み、該対は、以下から選択される：

【 0 0 9 3 】

【表 2 6】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttcttct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【0094】

実施形態(17)は、1つまたは複数の以下の要素を含み得る：第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、それぞれ第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドを含み、第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、約10～50塩基を含む；第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、それぞれ第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドを含み、第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、約10～25塩基を含む；第1の結合試薬は、ビオチン分子を含む抗体であり、第1の標的物質は、ストレプトアビジン分子を含む第1のオリゴヌクレオチドを含み、連結複合体は、ビオチン分子とストレプトアビジン分子との間の反応により形成される；第2の結合試薬は、さらなるビオチン分子を含む抗体であり、第2の標的物質は、さらなるストレプトアビジン分子を含む第2のオリゴヌクレオチドを含み、連結複合体は、さらなるビオチン分子とさらなるストレプトアビジン分子との間の反応により形成される；第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、それぞれ第2のオリゴヌクレオチドおよび第2の相補的オリゴヌクレオチドを含み、第2のオリゴヌクレオチドおよび第2の相補的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、約10～50塩基を含む；第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、それぞれ第2のオリゴヌクレオチドおよび第2の相補的オリゴヌクレオチドを含み、第2のオリゴヌクレオチドおよび第2の相補的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、約10～25塩基を含む；第2の結合試薬は、ビオチン分子を含む抗体であり、第2の標的物質は、ストレプトアビジン分子を含む第2のオリゴヌクレオチドを含み、連結複合体は、ビオチン分子とストレプトアビジン分子との間の反応により形成される；かつ/または方法は、混合工程(d)の前に工程(c)で形成された混合物を洗浄する工程をさらに含む。

30

40

【0095】

実施形態(18)：以下の工程を含む試料中で複数の分析対象物質の結合アッセイを行う方法：(a)複数の分析対象物質における第1の分析対象物質に対して特異的な第1の結合試薬および第1の標的物質を含む第1の結合試薬複合体を形成する工程であって、第1の結合試薬が連結剤に結合し、第1の標的物質が補助連結剤に結合しており、第1の結合試薬複合体が連結剤と補助連結剤との間の反応により形成される、工程と、(b)複数の分析対象物質における第2の分析対象物質に対して特異的な第2の結合試薬および第2

50

の標的物質を含む第2の結合試薬複合体を形成する工程であって、第2の結合試薬が第2の連結剤に結合し、第2の標的物質が第2の連結剤相補体に結合しており、第2の結合試薬複合体が第2の連結剤と第2の連結剤相補体との間の反応により形成される、工程と、(c)第1の標的物質を第1の標的物質相補体に、第2の標的物質を第2の標的物質相補体に結合させるのに十分な条件下で、第1および第2の結合試薬複合体と試料を、それぞれがそれぞれ第1の標的物質相補体および第2の標的物質相補体に連結された2つ以上の結合ドメインと混合する工程と、(d)複数のさらなる結合試薬を工程(c)で形成された混合物に加える工程であって、複数のさらなる結合試薬が(i)第1の分析対象物質および/または第1の結合試薬-第1の分析対象物質複合体に対して特異的な第1の検出試薬ならびに(ii)第2の分析対象物質および/または第2の結合試薬-第2の分析対象物質複合体に対して特異的な第2の検出試薬を含む、工程と、(e)結合ドメインに結合した第1および第2の分析対象物質の量を測定する工程。

10

【0096】

さらに、実施形態(18)は、1つまたは複数の以下の特徴を含むことができる：第1および第2の結合試薬はそれぞれ、第1および第2の分析対象物質にそれぞれ結合することができる受容体、リガンド、抗体、ハプテン、抗原、エピトープ、ミミトープ、アプタマーまたはインターカレーターを含む；第1および第2の結合試薬はそれぞれ、第1および第2の分析対象物質にそれぞれ結合することができる抗体を含む；第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチド、受容体-リガンド対、抗原-抗体対、ハプテン-抗体対、抗原-抗体対、エピトープ-抗体対、ミミトープ-抗体対、アプタマー-標的分子対、ハイブリダイゼーションパートナーまたはインターカレーター-標的分子対を含む；第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチド、受容体-リガンド対、抗原-抗体対、ハプテン-抗体対、抗原-抗体対、エピトープ-抗体対、ミミトープ-抗体対、アプタマー-標的分子対、ハイブリダイゼーションパートナーまたはインターカレーター-標的分子対を含む；第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチドを含む；第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチドを含む；連結複合体は、連結剤およびそれに接続された補助連結剤を含み、例えば、連結複合体は、(a)チオール基とマレイミドもしくはヨードアセトアミドとの間；(b)アルデヒドとヒドラジドとの間；または(c)アルキンとアジドとの間の結合相互作用により形成される；例えば(a)連結剤は、ピオチンであり、補助連結剤は、ストレプトアビジンもしくはアビジンである；(b)連結剤は、ストレプトアビジンもしくはアビジンであり、補助連結剤は、ピオチンである；(c)連結剤は、ペプチドであり、補助連結剤は、抗ペプチド抗体である；または(d)連結剤は、抗ペプチド抗体であり、補助連結剤は、ペプチドである。

20

30

【0097】

さらに、実施形態(18)は、1つまたは複数の以下の要素を含み得る：複数の検出試薬のそれぞれは、検出可能な標識を含む；複数の検出試薬は、検出可能な標識を含む；測定工程は、吸光度、蛍光、リン光、化学発光、電気化学発光、光散乱または磁気により試料中の検出可能な標識の存在を測定することを含む；検出可能な標識は、電気化学発光標識であり、測定工程は、電気化学発光シグナルを測定し、シグナルを試料中の分析対象物質の量と関連させることを含む；2つ以上の結合ドメインが電極上に配置され、測定工程は、電極に電圧波形を印加して、電気化学発光を発生させることをさらに含む；および/または2つ以上の結合ドメインが多ウエルプレートの1つまたは複数のウエル内に配置されている。

40

【0098】

実施形態(18)は、サンドイッチ免疫測定法または競合的免疫測定法を実施することを含み得る。

【0099】

実施形態(18)の特定の例において、第1の標的物質および第1の標的物質相補体は

50

、オリゴヌクレオチドの対を含み、該対は、以下から選択される：

【0100】

【表27】

| 対番号 | 配列(5'→3') | 対番号 | 配列(5'→3') |
|-----|-----------------------|-----|------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 2 | acgtcccagttg (配列番号3) | 14 | cttacaacgccca (配列番号27) |
| | caactgggacgt (配列番号4) | | tggcgttgaag (配列番号28) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 15 | ctttctcggcac (配列番号29) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | gtgccgagaaag (配列番号30) |
| 4 | aggttcagtga (配列番号7) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | tgcactgaacct (配列番号8) | | tcgcttatgtc (配列番号32) |
| 5 | atcaggatacgc (配列番号9) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gcgtatcctgat (配列番号10) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 18 | gctaattacca (配列番号35) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 19 | ggtcgtgttca (配列番号37) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | tgaacacgacc (配列番号38) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 21 | taccggaataa (配列番号41) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | ttattccgggta (配列番号42) |
| 10 | catccaatccag (配列番号19) | 22 | tgcttgactgg (配列番号43) |
| | ctggattggatg (配列番号20) | | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) | 24 | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| | actctacattcg (配列番号24) | | gccgctagacaa (配列番号48) |
| | | 25 | tttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

【0101】

実施形態(18)の他の例において、第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み、該対は、以下から選択される：

【0102】

【表 2 8】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttcacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【0103】

実施形態(18)の他の例において、第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み、該対は、以下から選択される：

【0104】

【表 29】

| 対番号 | 配列(5'→3') | 対番号 | 配列(5'→3') |
|-----|-----------------------|-----|-----------------------|
| 1 | acatcgtagtt (配列番号1) | 13 | cggttgagata (配列番号25) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 2 | acgtcccagttg (配列番号3) | 14 | cttacaacgcca (配列番号27) |
| | caactgggacgt (配列番号4) | | tggcgttgaag (配列番号28) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 15 | ctttctcggcac (配列番号29) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | gtccgagaaag (配列番号30) |
| 4 | aggttcagtgca (配列番号7) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | tgcactgaacct (配列番号8) | | tcgcttatgtc (配列番号32) |
| 5 | atcaggatacgc (配列番号9) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gcgtatcctgat (配列番号10) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ggtgtaaatgat (配列番号12) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 19 | ggtcgtgttca (配列番号37) |
| | gtccccgtaat (配列番号14) | | tgaacaacgacc (配列番号38) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 21 | taccggaataa (配列番号41) |
| | aatggcacctg (配列番号18) | | ttattccgggta (配列番号42) |
| 10 | catccaatccag (配列番号19) | 22 | tgettgacttg (配列番号43) |
| | ctggattggatg (配列番号20) | | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatcgttagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) | 24 | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| | actctacattcg (配列番号24) | | gccgctagacaa (配列番号48) |
| | | 25 | ttccctgtcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

【0105】

実施形態(18)のさらなる例において、第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み、該対は、以下から選択される：

【0106】

【表 3 0】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcgtaggt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | ggtgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【0107】

実施形態(18)は、1つまたは複数の以下の特徴を含み得る：第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、それぞれ第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドを含み、第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、約10～50塩基を含む；第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、それぞれ第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドを含み、第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、約10～25塩基を含む；第1の結合試薬は、ビオチン分子を含む抗体であり、第1の標的物質は、ストレプトアビジン分子を含む第1のオリゴヌクレオチドを含み、連結複合体は、ビオチン分子とストレプトアビジン分子との間の反応により形成される；第2の結合試薬は、さらなるビオチン分子を含む抗体であり、第2の標的物質は、さらなるストレプトアビジン分子を含む第2のオリゴヌクレオチドを含み、連結複合体は、さらなるビオチン分子とさらなるストレプトアビジン分子との間の反応により形成される；第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、それぞれ第2のオリゴヌクレオチドおよび第2の相補的オリゴヌクレオチドを含み、第2のオリゴヌクレオチドおよび第2の相補的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、約10～50塩基を含む；第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、それぞれ第2のオリゴヌクレオチドおよび第2の相補的オリゴヌクレオチドを含み、第2のオリゴヌクレオチドおよび第2の相補的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、約10～25塩基を含む；第2の結合試薬は、ビオチン分子を含む抗体であり、第2の標的物質は、ストレプトアビジン分子を含む第2のオリゴヌクレオチドを含み、連結複合体は、ビオチン分子とストレプトアビジン分子との間の反応により形成される；かつ/または方法は、混合工程(d)の前に工程(c)で形成された混合物を洗浄する工程をさらに含む。

30

40

【0108】

実施形態(19)：以下を含むキット：(a)それぞれがそれぞれ第1および第2のオリゴヌクレオチドを含む複数の別個の結合ドメインを含む多ウエルプレート；(b)別個のバイアル、容器またはコンパートメント入りの、連結剤に結合した第1のオリゴヌクレオチド相補体および第2の連結剤に結合した第2のオリゴヌクレオチド相補体を含む一組の標的試薬、ここで、(i)第1のオリゴヌクレオチドおよび第1のオリゴヌクレオチド相補体は、オリゴヌクレオチドの第1の対を含み、(ii)第2のオリゴヌクレオチドお

50

よび第2のオリゴヌクレオチド相補体は、オリゴヌクレオチドの第2の対を含み、オリゴヌクレオチドの第1および第2の対は、それぞれ以下から選択される：

【0109】

【表31】

| 対番号 | 配列(5'→3') | 対番号 | 配列(5'→3') |
|-----|-----------------------|-----|-----------------------|
| 1 | acatcgtagtg (配列番号1) | 13 | cggttgagata (配列番号25) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 2 | acgtcccagttg (配列番号3) | 14 | cttacaacgcca (配列番号27) |
| | caactgggacgt (配列番号4) | | tggcgttgaag (配列番号28) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 15 | ctttctcggcac (配列番号29) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | gtgccgagaaag (配列番号30) |
| 4 | aggttcagtga (配列番号7) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | tgcactgaacct (配列番号8) | | tcgcttatgtc (配列番号32) |
| 5 | atcaggatacgc (配列番号9) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gcgtatcctgat (配列番号10) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ggtggaatgat (配列番号12) | | tggggaattagc (配列番号36) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 19 | ggcgtgtttca (配列番号37) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 21 | taccgggaataa (配列番号41) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | ttattccgggta (配列番号42) |
| 10 | catccaatccag (配列番号19) | 22 | tgcttgacttgg (配列番号43) |
| | ctggattggatg (配列番号20) | | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttcacttaggg (配列番号45) |
| | gtatctgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) | 24 | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| | actctacattcg (配列番号24) | | gccgctagacaa (配列番号48) |
| | | 25 | tttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

40

【0110】

実施形態(20)：以下を含むキット：(a)それぞれがそれぞれ第1および第2のオリゴヌクレオチドを含む複数の別個の結合ドメインを含む多ウエルプレート；(b)別個のバイアル、容器またはコンパートメント入りの、連結剤に結合した第1のオリゴヌクレオチド相補体および第2の連結剤に結合した第2のオリゴヌクレオチド相補体を含む一組の標的試薬、ここで、(i)第1のオリゴヌクレオチドおよび第1のオリゴヌクレオチド相補体は、オリゴヌクレオチドの第1の対を含み、(ii)第2のオリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチド相補体は、オリゴヌクレオチドの第2の対を含み、オリゴヌクレオチドの第1および第2の対は、それぞれ以下から選択される：

【0111】

【表 3 2】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttcttct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccactaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | tttccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【0112】

実施形態(19)および(20)は、(b)以下のものを含む1つまたは複数のさらなる容器、器またはコンパートメントをさらに含み得る：(i)第1の結合試薬が試料中の第1の分析対象物質に対して特異的である、連結剤を含む第1の結合試薬、(ii)別個の容器、器もしくはコンパートメント入りでまたは(b)(i)の成分として提供される、補助連結剤を含む第1の標的物質相補体、(iii)第2の結合試薬が試料中の第2の分析対象物質に対して特異的である、第2の連結剤を含む第2の結合試薬、および(iv)別個の容器、器もしくはコンパートメント入りでまたは(b)(iii)の成分として提供される、第2の補助連結剤を含む第2の標的物質相補体。

30

【0113】

実施形態(21)：試料中の複数の異なる分析対象物質を測定するためのキットであって、キットは以下のものを含む：(a)固体担体の第1の領域に固定化された第1の標的物質および固体担体の第2の領域に固定化された第2の標的物質を固体担体上を含む容器、器またはコンパートメント；ならびに(b)以下のものを含む1つまたは複数のさらなる容器、器またはコンパートメント：(i)第1の結合試薬が試料中の第1の分析対象物質に対して特異的である、連結剤を含む第1の結合試薬、(ii)別個の容器、器もしくはコンパートメント入りでまたは(b)(i)の成分として提供される、補助連結剤を含む第1の標的物質相補体、(iii)第2の結合試薬が試料中の第2の分析対象物質に対して特異的である、第2の連結剤を含む第2の結合試薬、および(iv)別個の容器、器もしくはコンパートメント入りでまたは(b)(iii)の成分として提供される、第2の連結剤相補体を含む第2の標的物質相補体。

40

【0114】

実施形態(22)：試料中の複数の異なる分析対象物質を測定するためのキットであって、キットは以下のものを含む：(a)固体担体の第1の領域に固定化された第1の標的物質および固体担体の第2の領域に固定化された第2の標的物質を固体担体上を含む容器、器またはコンパートメント；ならびに(b)以下のものを含む4つ以上のさらなる容器、器またはコンパートメント：(i)第1の結合試薬が試料中の第1の分析対象物質に対して特異的である、第1の連結剤を含む第1の結合試薬を含む第1の容器、(ii)別個の容器、器もしくはコンパートメント入りで提供される、補助連結剤を含む第1の標的物

50

質相補体を含む第2の容器、(iii)第2の結合試薬が試料中の第2の分析対象物質に対して特異的である、第2の連結剤を含む第2の結合試薬を含む第3の容器、および(iv)別個の容器、器もしくはコンパートメント入りで提供される、第2の連結剤相補体を含む第2の標的物質相補体を含む第4の容器。

【0115】

実施形態(23)：試料中の複数の異なる分析対象物質を測定するためのキットであって、キットは以下のものを含む：固体担体の第1の領域に固定化された第1の標的物質および固体担体の第2の領域に固定化された第2の標的物質を固体担体上に含む容器、器またはコンパートメント；ならびに(b)以下のものを含む2つ以上のさらなる容器、器またはコンパートメント：(i)第1の結合試薬が試料中の第1の分析対象物質に対して特異的である、第1の連結剤を含む第1の結合試薬、および第1の連結剤相補体を含む第1の標的物質相補体を含む第1の容器、ならびに(ii)第2の結合試薬が試料中の第2の分析対象物質に対して特異的である、第2の連結剤を含む第2の結合試薬、および第2の連結剤相補体を含む第2の標的物質相補体を含む第2の容器。

10

【0116】

実施形態(24)：(a)それぞれがそれぞれ第1および第2のオリゴヌクレオチドを含む複数の別個の結合ドメインを含む多ウエルプレートを含み、第1および第2のオリゴヌクレオチドのそれぞれが以下から選択される、キット：

【0117】

【表 3 3】

| 配列(5'→3') | |
|-----------------------|----|
| acatcggtagtt (配列番号1) | |
| aactaccgatgt (配列番号2) | |
| acgtcccagttg (配列番号3) | |
| caactgggacgt (配列番号4) | |
| agaagaagatcc (配列番号5) | |
| ggatcttcttct (配列番号6) | |
| aggttcagtgca (配列番号7) | 10 |
| tgcactgaacct (配列番号8) | |
| atcaggatacgc (配列番号9) | |
| gcgtatcctgat (配列番号10) | |
| atcattaccacc (配列番号11) | |
| ggtgtaatgat (配列番号12) | |
| attaacgggagc (配列番号13) | |
| gctcccgttaat (配列番号14) | |
| cagaggtcttaa (配列番号15) | |
| ttaagacctctg (配列番号16) | 20 |
| caggtgtccatt (配列番号17) | |
| aatggacacctg (配列番号18) | |
| catccaatccag (配列番号19) | |
| ctggattggatg (配列番号20) | |
| cctacgatatac (配列番号21) | |
| gtatatcgtagg (配列番号22) | |
| cgaatgtagagt (配列番号23) | |
| actctacattcg (配列番号24) | |
| cggtttgagata (配列番号25) | 30 |
| tatctcaaaccg (配列番号26) | |
| cttacaacgcca (配列番号27) | |
| tggcgttgaag (配列番号28) | |
| ctttctcggcac (配列番号29) | |
| gtgccgagaaag (配列番号30) | |
| gacataaagcga (配列番号31) | |
| tcgctttatgtc (配列番号32) | |
| gccatagtctct (配列番号33) | |
| agagactatggc (配列番号34) | 40 |
| gctaattcacca (配列番号35) | |
| tggtgaattagc (配列番号36) | |
| ggtcgtgttca (配列番号37) | |
| tgaaacacgacc (配列番号38) | |

【表 3 4】

| |
|-----------------------|
| gttgattctgtc (配列番号39) |
| gacagaatcaac (配列番号40) |
| tacccggaataa (配列番号41) |
| ttattccgggta (配列番号42) |
| tgcttgacttgg (配列番号43) |
| ccaagtcagca (配列番号44) |
| ttccacttaggg (配列番号45) |
| ccctaagtggaa (配列番号46) |
| ttgtctagcggc (配列番号47) |
| gccgctagacaa (配列番号48) |
| ttcccttgcta (配列番号49) |
| tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

【 0 1 1 9 】

実施形態 (2 4) のキットは、1つまたは複数の以下の配列を含み得る：

【 0 1 2 0 】

【表 3 5】

20

| 配列 | 配列 |
|-----------------------|-----------------------|
| acatcggtagtt (配列番号1) | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| aactaccgatgt (配列番号2) | actctacattcg (配列番号24) |
| agaagaagatcc (配列番号5) | cggtttgagata (配列番号25) |
| ggatcttctct (配列番号6) | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| atcattaccacc (配列番号11) | gacataaagcga (配列番号31) |
| ggtggaatgat (配列番号12) | tcgcttatgtc (配列番号32) |
| attaacgggagc (配列番号13) | gccatagtctct (配列番号33) |
| gctcccgttaat (配列番号14) | agagactatggc (配列番号34) |
| cagaggtcttaa (配列番号15) | gctaattcacca (配列番号35) |
| ttaagacctctg (配列番号16) | tggtgaattagc (配列番号36) |
| caggtgtccatt (配列番号17) | gttgattctgtc (配列番号39) |
| aatggcacctg (配列番号18) | gacagaatcaac (配列番号40) |
| cctacgatatac (配列番号21) | ttccacttaggg (配列番号45) |
| gtatatcgtagg (配列番号22) | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | tagcaagggaaa (配列番号50) |

30

40

【 0 1 2 1 】

実施形態 (2 4) は、複数の分析対象物質の結合アッセイを行う方法における多ウエルプレートの使用説明書をさらに含み得、該方法は、以下の工程を含む：(a) 複数の分析対象物質における第 1 の分析対象物質に対して特異的な第 1 の結合試薬および第 1 のオリゴヌクレオチドを含む第 1 の結合試薬複合体を形成する工程であって、第 1 の結合試薬が連結剤に結合し、第 1 のオリゴヌクレオチドが補助連結剤に結合し、第 1 の結合試薬複合体が連結剤と補助連結剤との間の反応により形成される、工程と、(b) 複数の分析対象物質における第 2 の分析対象物質に対して特異的な第 2 の結合試薬および第 2 のオリゴヌクレオチドを含む第 2 の結合試薬複合体を形成する工程であって、第 2 の結合試薬が第 2 の連結剤に結合し、第 2 のオリゴヌクレオチドが第 2 の連結剤相補体に結合し、第 2 の結

50

合試薬複合体が第2の連結剤と第2の連結剤相補体との間の反応により形成される、工程と、(c)第1および第2の結合試薬複合体を、それぞれがそれぞれ第1のオリゴヌクレオチド相補体および第2のオリゴヌクレオチド相補体に連結された2つ以上の結合ドメインと、第1のオリゴヌクレオチドを第1のオリゴヌクレオチド相補体に、第2のオリゴヌクレオチドを第2のオリゴヌクレオチド相補体に結合させるのに十分な条件下で、混合する工程と、(d)複数の分析対象物質を含む試料を工程(c)で形成された混合物と混合する工程と、(e)複数のさらなる結合試薬を工程(d)で形成された混合物に加える工程であって、複数のさらなる結合試薬が(i)第1の分析対象物質および/または第1の結合試薬-第1の分析対象物質複合体に対して特異的な第1の検出試薬ならびに(ii)第2の分析対象物質および/または第2の結合試薬-第2の分析対象物質複合体に対して特異的な第2の検出試薬を含む、工程と、(f)結合ドメインに結合した第1および第2の分析対象物質の量を測定する工程。

10

【0122】

さらに、実施形態(24)は、1つまたは複数の以下の要素を含むことができる：第1および第2の結合試薬はそれぞれ、第1および第2の分析対象物質にそれぞれ結合することができる受容体、リガンド、抗体、ハプテン、抗原、エピトープ、ミミトープ、アプタマーまたはインターカレーターを含み、例えば、第1および第2の結合試薬はそれぞれ、第1および第2の分析対象物質にそれぞれ結合することができる抗体を含む；第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチド、受容体-リガンド対、抗原-抗体対、ハプテン-抗体対、抗原-抗体対、エピトープ-抗体対、ミミトープ-抗体対、アプタマー-標的分子対、ハイブリダイゼーションパートナーまたはインターカレーター-標的分子対を含む；第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチド、受容体-リガンド対、抗原-抗体対、ハプテン-抗体対、抗原-抗体対、エピトープ-抗体対、ミミトープ-抗体対、アプタマー-標的分子対、ハイブリダイゼーションパートナーまたはインターカレーター-標的分子対を含む；第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチドを含む；第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチドを含む；連結複合体は、連結剤およびそれに接続された補助連結剤を含み、例えば、連結複合体は、(a)チオール基とマレイミドもしくはヨードアセトアミドとの間；(b)アルデヒドとヒドラジドとの間；または(c)アルキンとアジドとの間の結合相互作用により形成される；あるいは(a)連結剤は、ピオチンであり、補助連結剤は、ストレプトアビジンもしくはアビジンである；(b)連結剤は、ストレプトアビジンもしくはアビジンであり、補助連結剤は、ピオチンである；(c)連結剤は、ペプチドであり、補助連結剤は、抗ペプチド抗体である；または(d)連結剤は、抗ペプチド抗体であり、補助連結剤は、ペプチドである。

20

30

【0123】

さらに、実施形態(24)は、別個のバイアル、容器またはコンパートメント入りの、複数の検出試薬をさらに含み得る。例えば、複数の検出試薬は、検出可能な標識を含み得る。例えば、複数の検出試薬のサブセットが検出可能な標識を含む。1つの例において、検出可能な標識は、電気化学発光標識である。2つ以上の結合ドメインを電極上に配置することができる。場合により、2つ以上の結合ドメインが多ウエルプレートの1つまたは複数のウエル内に配置されている。

40

【0124】

実施形態(24)の特定の例において、第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み、該対は、以下から選択される：

【0125】

【表 3 6】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttcttct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttcacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【0126】

実施形態(24)において、第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み、該対は、以下から選択される：

【0127】

【表 3 7】

| 対番号 | 配列(5'→3') |
|-----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) |
| 2 | acgtcccagttg (配列番号3) |
| | caactgggacgt (配列番号4) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) |
| | ggatcttctct (配列番号6) |
| 4 | aggttcagtgca (配列番号7) |
| | tgcactgaacct (配列番号8) |
| 5 | atcaggatacgc (配列番号9) |
| | gcgtatcctgat (配列番号10) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) |
| | ggtgtaatgat (配列番号12) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) |
| | aatggacacctg (配列番号18) |
| 10 | catccaatccag (配列番号19) |
| | ctggattggatg (配列番号20) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) |
| 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | actctacattcg (配列番号24) |
| 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 14 | cttacaacgcca (配列番号27) |
| | tggcgttgaag (配列番号28) |
| 15 | ctttctcggcac (配列番号29) |
| | gtgccgagaaag (配列番号30) |
| 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | agagactatggc (配列番号34) |
| 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 19 | ggtcgtgttca (配列番号37) |
| | tgaaacacgacc (配列番号38) |

10

20

30

40

【表 3 8】

| | |
|----|-----------------------|
| 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 21 | tacccggaataa (配列番号41) |
| | ttattccgggta (配列番号42) |
| 22 | tgcttgacttgg (配列番号43) |
| | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| 24 | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| | gccgctagacaa (配列番号48) |
| 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

【0129】

実施形態(24)の他の特定の例において、第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み、該対は、以下から選択される：

【0130】

20

【表 3 9】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagt (配列番号1) | 12 | cgatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

30

40

【0131】

実施形態(24)はまた、1つまたは複数の以下の要素を含み得る：第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、それぞれ第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドを含み、第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、約10～50塩基を含む；第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、それぞれ第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドを含み、第1のオリゴヌクレオチドおよび第1の相補的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、約10～25塩基を含む；第1の結合試薬は、ビオチン分子を含む抗体であり、第1の標的物質は、ストレプトアビジン分子を含む第1のオリゴヌクレオチドを含み、連結複合体は、ビオ

50

チン分子とストレプトアビジン分子との間の反応により形成される；第2の結合試薬は、さらなるビオチン分子を含む抗体であり、第2の標的物質は、さらなるストレプトアビジン分子を含む第2のオリゴヌクレオチドを含み、連結複合体は、さらなるビオチン分子とさらなるストレプトアビジン分子との間の反応により形成される；第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、それぞれ第2のオリゴヌクレオチドおよび第2の相補的オリゴヌクレオチドを含み、第2のオリゴヌクレオチドおよび第2の相補的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、約10～50塩基を含む；第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、それぞれ第2のオリゴヌクレオチドおよび第2の相補的オリゴヌクレオチドを含み、第2のオリゴヌクレオチドおよび第2の相補的オリゴヌクレオチドはそれぞれ、約10～25塩基を含む；および/または第2の結合試薬は、ビオチン分子を含む抗体であり、第2の標的物質は、ストレプトアビジン分子を含む第2のオリゴヌクレオチドを含み、連結複合体は、ビオチン分子とストレプトアビジン分子との間の反応により形成される。

10

【0132】

いずれか1つまたは複数の先行する実施形態において、第2の結合ドメイン上の第1の結合試薬の量は、第1の結合ドメイン上の第1の結合試薬の量の1%未満であり得る。

【0133】

実施形態(25)：以下のものを含むキット：プレートの少なくとも1つのウェル内にオリゴヌクレオチドアレイの1つまたは複数のコピーを有し、アレイが複数の結合ドメイン上に配置されている多ウェルプレートであって、少なくとも4つの結合ドメインが、その上に固定化された以下から選択される異なるオリゴヌクレオチド配列を有する：

20

【0134】

【表 4 0】

| | |
|-----------------------|-----------------------|
| acatcggtagtt (配列番号1) | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| aactaccgatgt (配列番号2) | cttacaacgcca (配列番号27) |
| acgtcccagttg (配列番号3) | tggcgttgtaag (配列番号28) |
| caactgggacgt (配列番号4) | cittctcggcac (配列番号29) |
| agaagaagatcc (配列番号5) | gtgccgagaaag (配列番号30) |
| ggatcttcttct (配列番号6) | gacataaagcga (配列番号31) |
| aggttcagtgca (配列番号7) | tcgcttatgtc (配列番号32) |
| tgcactgaacct (配列番号8) | gccatagtctct (配列番号33) |
| atcaggatacgc (配列番号9) | agagactatggc (配列番号34) |
| gcgtatctgat (配列番号10) | gctaattcacca (配列番号35) |
| atcattaccacc (配列番号11) | tggtgaattagc (配列番号36) |
| ggtggtaatgat (配列番号12) | ggtcgtgttca (配列番号37) |
| attaacgggagc (配列番号13) | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| gctcccgttaat (配列番号14) | gttgattctgtc (配列番号39) |
| cagaggtcttaa (配列番号15) | gacagaatcaac (配列番号40) |
| ttaagacctctg (配列番号16) | taccggaataa (配列番号41) |
| caggtgtccatt (配列番号17) | ttattccgggta (配列番号42) |
| aatggacacctg (配列番号18) | tgcttgactgg (配列番号43) |
| catccaatccag (配列番号19) | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| ctggattggatg (配列番号20) | ttccacttaggg (配列番号45) |
| cctacgatatac (配列番号21) | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| gtatatcgtagg (配列番号22) | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| cgaatgtagagt (配列番号23) | gccgctagacaa (配列番号48) |
| actctacattcg (配列番号24) | ttcccttgcta (配列番号49) |
| cggtttgagata (配列番号25) | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

ここで、異なるオリゴヌクレオチド配列のそれぞれが連結剤により修飾される。

【0135】

実施形態(26)：以下のものを含むキット：プレートの少なくとも1つのウエル内にオリゴヌクレオチドアレイの1つまたは複数のコピーを有し、アレイが複数の結合ドメイン上に配置されている多ウエルプレートであって、少なくとも4つの結合ドメインが、その上に固定化された以下から選択される異なるオリゴヌクレオチド配列を有する：

【0136】

【表 4 1】

| 対 | 配列 | 対 | 配列 |
|----|-----------------------|----|------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | actctacattcg (配列番号24) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | ggtggtaatgat (配列番号12) | | tcgctttatgtc (配列番号32) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 17 | gccatagctctct (配列番号33) |
| | gctcccgttaat (配列番号14) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 8 | cagaggcttaa (配列番号15) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

【0137】

実施形態(25)および(26)は、1つまたは複数の以下の要素を含み得る：連結剤は、ピオチン、ストレプトアビジン、アビジン、アミノ基、チオール基、アルデヒド基、ヒドラジド基、アジド基、アルキン基、マレイミド基またはヨードアセトアミド基を含む；連結剤は、ストレプトアビジンである；キットは、1つまたは複数の別個のバイアル、容器またはコンパートメント入りの、(a)一組の結合試薬対を含み、該組の各結合試薬は、複数の分析対象物質を含む試料中の分析対象物質に対して特異的であり、場合により、組内の結合試薬対は、補助連結剤を含む第1の結合試薬を含み、さらに場合により、キットは、1つまたは複数の別個のバイアル、容器またはコンパートメント入りの、補助連結剤をさらに含む。1つの例において、結合試薬は、抗体である。

30

【0138】

先行する実施形態、例えば、実施形態(25)および(26)のキットは、1つまたは複数の別個のバイアル、容器またはコンパートメント入りの、ラベリングキットならびにアッセイ緩衝液、希釈剤、読み取り緩衝液またはそれらの組合せを含む1つまたは複数のさらなる試薬をさらに含み得る。ラベリングキットは、1つまたは複数の別個のバイアル、容器またはコンパートメント入りの、SULFO-TAG(商標)NHSエステル、LC-ピオチンNHSエステル、スピンカラム、ラベリング緩衝液、ECL読み取り緩衝液、アッセイおよび抗体緩衝液、アッセイおよび抗体希釈剤またはそれらの組合せを含み得る。

40

【0139】

実施形態(25)および(26)において、アレイは、少なくとも7個の結合ドメイン、または少なくとも10個の結合ドメイン、または少なくとも16個の結合ドメイン、または少なくとも25個の結合ドメインを含む。さらに、プレートは、少なくとも24個のウェル、または96個のウェル、または384個のウェルを含み得る。アレイは、少なくとも10種のオリゴヌクレオチド、または少なくとも16種のオリゴヌクレオチド、または少なくとも25種のオリゴヌクレオチドも含み得る。

【0140】

いずれか1つの先行する実施形態の特定の例において、当該組における結合試薬対の数は、アレイにおける結合ドメインの数と同等であるか、または当該組における結合試薬対

50

の数は、アレイにおける結合ドメインの数よりも少ない。

【0141】

添付図面は、本発明の範囲を限定するのではなく、例示するために収載する。

【図面の簡単な説明】

【0142】

【図1-1】(a)~(d)それぞれ標的物質A'、B'およびC'と標的物質相補体A''、B''およびC''との間の反応によるそれぞれ複数の結合ドメインX、YおよびZへの結合試薬A'、B'およびC'の直接的コンジュゲーションを含むアッセイ方式を示す図である。標的物質が一連の結合ドメインX、YおよびZ上で結合試薬A'、B'およびC'に結合して、それぞれ結合試薬複合体A_{RC}、B_{RC}およびC_{RC}を形成し(パネル(b))、これがそれぞれ分析対象物質A、BおよびCと反応する。固体担体上の分析対象物質A、BおよびCの存在は、それぞれ分析対象物質A、BおよびCと反応する、標識検出試薬A*、B*およびC*の添加により検出される(パネル(c))。図1(d)は、それぞれ結合ドメインX、YおよびZ上に形成された結合試薬複合体、結合試薬複合体A_{RC}、B_{RC}およびC_{RC}の拡大図である。

10

【図1-2】図1-1の続き。

【図2-1】(a)~(d)それぞれオリゴヌクレオチド標的物質A'、B'およびC'とオリゴヌクレオチド標的物質相補体A''、B''およびC''との間の反応によるそれぞれ複数の結合ドメインX、YおよびZへの結合試薬、例えば、抗体A'、B'およびC'の直接的コンジュゲーションを含むアッセイ方式を示す図である。オリゴヌクレオチド標的物質が一連の結合ドメインX、YおよびZ上で結合試薬A'、B'およびC'に結合して、それぞれ結合試薬複合体A_{RC}、B_{RC}およびC_{RC}を形成し(パネル(b))、これがそれぞれ分析対象物質A、BおよびCと反応する。固体担体上の分析対象物質A、BおよびCの存在は、それぞれ分析対象物質A、BおよびCと反応する、標識検出試薬A*、B*およびC*の添加により検出される(パネル(c))。図2(d)は、それぞれ結合ドメインX、YおよびZ上に形成された結合試薬複合体、結合試薬複合体A_{RC}、B_{RC}およびC_{RC}の拡大図である。

20

【図2-2】図2-1の続き。

【図3-1】(a)~(e)一連の連結複合体を介するそれぞれ複数の結合ドメインX、YおよびZへの複数の結合試薬A'、B'およびC'のコンジュゲーションを含むアッセイ方式を示す図である。パネル(a)に示すように、結合試薬A'、B'およびC'は、連結剤L_A、L_BおよびL_Cに結合しているが、標的物質A'、B'およびC'は、それぞれ補助連結剤L_A'、L_B'およびL_C'に結合している。結合試薬A'、B'およびC'を標的物質と混合して、それぞれ結合試薬複合体A_{RC}、B_{RC}およびC_{RC}を形成する。パネル(a)で形成された結合試薬複合体を、標的物質相補体A''、B''およびC''が結合している複数の結合ドメインX、YおよびZと混合して(パネル(b))、結合試薬複合体を結合ドメインに接着させる(パネル(c)参照)。分析対象物質A、BおよびCを含む試料を混合物に加え、同時または連続的に、一組の検出試薬A*、B*およびC*も加えて、結合ドメインに結合した分析対象物質を検出する。図3(e)は、それぞれ結合ドメインX、YおよびZ上に形成された結合試薬複合体、結合試薬複合体A_{RC}、B_{RC}およびC_{RC}の拡大図である。

30

40

【図3-2】図3-1の続き。

【図4-1】(a)~(e)一連の連結複合体を介するそれぞれ複数の結合ドメインX、YおよびZへの複数の結合試薬A'、B'およびC'のコンジュゲーションを含むアッセイ方式を示す図である。パネル(a)に示すように、結合試薬A'、B'およびC'は、連結剤L_A、L_BおよびL_Cに結合しているが、オリゴヌクレオチド標的物質A'、B'およびC'は、それぞれ補助連結剤L_A'、L_B'およびL_C'に結合している。結合試薬A'、B'およびC'をオリゴヌクレオチド標的物質と混合して、それぞれ結合試薬複合体A_{RC}、B_{RC}およびC_{RC}を形成する。パネル(a)で形成された結合試薬複合体を、オリゴヌクレオチド標的物質相補体A''、B''およびC''が結

50

合している複数の結合ドメイン X、Y および Z と混合して（パネル（b））、結合試薬複合体を結合ドメインに接着させる（パネル（c）参照）。分析対象物質 A、B および C を含む試料を混合物に加え、同時または連続的に、一組の検出試薬 A*、B* および C* も加えて、結合ドメインに結合した分析対象物質を検出する。図 4（e）は、それぞれ結合ドメイン X、Y および Z 上に形成された結合試薬複合体、結合試薬複合体 A_{R C}、B_{R C} および C_{R C} の拡大図である。

【図 4 - 2】図 4 - 1 の続き。

【図 5 - 1】（a）～（d）本発明のアッセイ方式に用いることができる試薬の様々な組合せを示す図である。図 5（a）では、すべての試薬を単一段階で試料と混合するのに対して、図 5（b）では、すべての試薬を混合し、次に表面に加え、5（c）では、修飾結合試薬および修飾標的物質相補体を混合し、それぞれが標的物質を含む複数の結合ドメインを有する表面に加え、表面 - 混合物を試料および検出試薬と 1 段階または 2 段階で混合する（試料および検出試薬の 1 段階添加を図 5（c）に示し、試料および検出試薬の連続的添加を図 5（d）に示す）。

10

【図 5 - 2】図 5 - 1 の続き。

【図 5 - 3】図 5 - 2 の続き。

【図 5 - 4】図 5 - 3 の続き。

【図 6 - 1】（a）～（f）本発明のアッセイ方式に用いることができる複数の結合ドメインを有する様々な修飾表面、例えば、粒子および基材を示す図である。

【図 6 - 2】図 6 - 1 の続き。

20

【図 7】オリゴヌクレオチド上のチオール基を介してオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができるマレイミド活性化抗体を得るためにスルホ - S M C C で抗体を化学修飾する手順を示す図である。

【図 8】（a）～（g）7 プレックスケモカインパネルおよび 10 プレック T H 1 / T H 2 パネルに関する直接アッセイ方式の結果を示す図である。

【図 9】（a）～（c）ストレプトアビジン分子で修飾したオリゴヌクレオチドを有するビオチニル化捕捉抗体を用いた間接アッセイ方式における多ウエルアッセイプレートの製造および使用の手順を示す図である。

【図 10】（a）～（c）ビオチニル化捕捉抗体、ニート（neat）ストレプトアビジンおよびビオチニル化オリゴヌクレオチドを用いた間接アッセイ方式における多ウエルアッセイプレートの製造および使用の手順を示す図である。

30

【図 11】（a）～（g）サイトカイン B パネルの 3 種のオリゴヌクレオチド媒介アッセイ方式における L O D 値の比較を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0143】

本明細書で別途定義しない限り、本発明に関連して用いた科学技術用語は、当業者により一般的に理解されている意味を有するものとする。さらに、文脈上他の意味に解釈すべき場合を除いて、単数形の用語は、複数を含むものとし、複数形の用語は、単数を含むものとする。冠詞「a」および「an」は、1 つまたは複数（すなわち、少なくとも 1 つ）の冠詞の文法上の目的語を意味するように本明細書で用いる。例として、「an element」は、1 つの要素または複数の要素を意味する。

40

【0144】

本発明は、使用者または製造業者が特定の使用者の要求に基づいてアッセイを構成することを可能にする柔軟な固相結合アッセイ方式を提供する。本明細書で述べる方法およびキットは、複数の標的分析対象物質の多重化結合アッセイを構築するための柔軟なプラットフォームを提供する。一連の一般的な標的物質相補体を有する複数の結合ドメインを含む担体により、あらゆる組の分析対象物質の多重化アッセイを構成することが可能である。1 つの唯一の必要なことは、どの結合ドメインにおけるどの分析対象物質を評価するかを選択し、適切な結合試薬および標的物質を選択した結合ドメインとひと組にすることである。このプラットフォームを用いて、使用者は、個別のアッセイパネルを構築すること

50

ができる。

【0145】

そのような柔軟な多重化アッセイ方式は、本明細書で開示する方法および生成物を用いて実現することができる。例えば、対象の複数の分析対象物質の多重化結合アッセイを行う方法は、以下の工程を用いて実施することができる：

(a) 1つまたは複数の工程で、以下の成分を混ぜ合わせる工程：

(i) 対象の第1の分析対象物質および対象の第2の分析対象物質を含む試料、

(ii) 第1の結合ドメイン上に固定化された第1の標的物質、

(iii) 連結剤に接続され、第1の標的物質の結合相手である、第1の標的物質相補体、

(iv) 補助連結剤に接続され、第1の分析対象物質の結合相手である、第1の結合試薬、

(v) 第2の結合ドメイン上に固定化された第2の標的物質、

(vi) 連結剤に接続され、第2の標的物質の結合相手である、第2の標的物質相補体、

、

(vii) 補助連結剤に接続され、第2の分析対象物質の結合相手である、第2の結合試薬、および

(viii) 場合により、架橋剤の少なくとも2つのコピー、ここで、架橋剤が除外される場合には、各連結剤は、補助連結剤の結合相手であり、または架橋剤が含まれる場合には、架橋剤は、連結剤の1つに対する第1の結合部位および補助連結剤の1つに対するさらなる結合部位を有する；

(b) 以下のものを形成する工程

(i) 第1の標的物質、第1の標的物質相補体、第1の結合試薬および第1の分析対象物質を含む第1の結合ドメイン上の第1の結合複合体、ならびに

(ii) 第2の標的物質、第2の標的物質相補体、第2の結合試薬および第2の分析対象物質を含む第2の結合ドメイン上の第2の結合複合体、

ならびに

(c) それぞれ第1および第2の結合ドメイン上の第1および第2の分析対象物質の量を測定する工程。

【0146】

1つの実施形態において、架橋剤を用いない場合、該方法は、(a) 1つまたは複数の工程で成分(i) ~ (vii)を混ぜ合わせる工程、(b) それぞれ第1および第2の結合ドメイン上に第1および第2の結合複合体を形成する工程、ならびに(c) それぞれ第1および第2の結合ドメイン上の第1および第2の分析対象物質の量を測定する工程を含む。例えば、第1の標的物質相補体および第1の結合試薬は、連結剤と補助連結剤との間の結合相互作用により連結された第1の標的物質相補体および第1の結合試薬を含む事前に結合させた第1の標的複合体として準備することができ、同様に、第2の標的物質相補体および第2の結合試薬は、連結剤と補助連結剤との間の結合相互作用により連結された第2の標的物質相補体および第2の結合試薬を含む事前に結合させた第2の標的複合体として準備することができる。この実施形態において、第1の標的複合体は、第1の結合ドメイン上に固定化された第1の標的物質に事前に結合させて準備することができ、同様に、第2の標的複合体は、第2の結合ドメイン上に固定化された第2の標的物質に事前に結合させて準備することができる。第1および第2の結合試薬を事前に結合させた標的複合体として準備する場合、混ぜ合わせ工程は、第1および第2の標的複合体を試料と混ぜ合わせて、その混合物を形成し、第1の分析対象物質を第1の標的複合体における第1の結合試薬に結合させ、第2の分析対象物質を第2の標的複合体における第2の結合試薬に結合させ、それぞれ第1および第2の分析対象物質に結合した第1および第2の標的複合体の混合物を第1および第2の結合ドメインと接触させることをさらに含み得る。第1および第2の結合ドメイン上の結合複合体は、それにより、第1の標的複合体を第1の結合ドメイン上の第1の標的物質に結合させ、第2の標的複合体を第2の結合ドメイン上の第2

10

20

30

40

50

の標的物質に結合させることにより形成される。さらに、混ぜ合わせ工程は、第1および第2の標的複合体を試料と混ぜ合わせ、第1の分析対象物質を第1の標的複合体における第1の結合試薬に結合させ、第2の分析対象物質を第2の標的複合体における第2の結合試薬に結合させることをさらに含み得る。

【0147】

他の代替実施形態において、混ぜ合わせ工程(a)は、第1の容積の液体中で、前記第1の標的物質相補体、前記第1の結合試薬および、用いる場合には、前記架橋剤を混ぜ合わせ、前記第1の標的物質相補体と前記第1の結合試薬を、それらの結合した連結剤を介して連結して、第1の標的複合体を形成し；第2の容積の液体中で、前記第2の標的物質相補体、前記第2の結合試薬および、用いる場合には、前記架橋剤を混ぜ合わせ、前記第2の標的物質相補体と前記第2の結合試薬を、それらの結合した連結剤を介して連結して、第2の標的複合体を形成する工程を含む。この実施形態において、混ぜ合わせ工程(a)はまた、前記第1および第2の標的複合体を混ぜ合わせ、前記第1および第2の標的複合体の配合物を前記第1および第2の結合ドメインと接触させ、前記第1の標的複合体を前記第1の結合ドメイン上の前記第1の標的物質に結合させ、前記第2の標的複合体を前記第2の結合ドメイン上の前記第2の標的物質に結合させる工程を含み得る。この実施形態において、混ぜ合わせ工程は、第1および第2の標的複合体の組合せを試料と混ぜ合わせ、第1の分析対象物質を第1の標的複合体における第1の結合試薬に結合させ、第2の分析対象物質を第2の標的複合体における第2の結合試薬に結合させることをさらに含む。第1および第2の標的複合体は、第1および第2の標的複合体を第1および第2の結合ドメインと接触させる前に、試料と混ぜ合わせることができ；第1および第2の標的複合体は、第1および第2の標的複合体を第1および第2の結合ドメインと接触させた後に、試料と混ぜ合わせることができ；または第1および第2の標的複合体は、試料と混ぜ合わせ、同時に第1および第2の結合ドメインと接触させることができる。

10

20

【0148】

架橋剤を該方法に含める場合、連結剤および補助連結剤は、それぞれ架橋剤に結合し、したがって、混ぜ合わせ工程は、それらの要素が連結剤および補助連結剤と一緒に結合した状態にする。例えば、混ぜ合わせ工程(a)は、第1の容積の液体中で、(x i)第1の標的物質相補体、第1の結合試薬および架橋剤を混ぜ合わせる工程を含み、補助連結剤が結合している架橋剤に結合した連結剤を含む架橋複合体を介して第1の標的物質相補体と第1の結合試薬を連結することによって第1の標的複合体を形成する工程をさらに含む。混ぜ合わせ工程(a)はまた、第2の容積の液体中で、(x i i)第2の標的物質相補体、第2の結合試薬および架橋剤を混ぜ合わせる工程を含み、補助連結剤が結合している架橋剤に結合した連結剤を含む架橋複合体を介して第2の標的物質相補体と第2の結合試薬を連結することによって第2の標的複合体を形成する工程をさらに含む。この実施形態において、混ぜ合わせ工程(a)はまた、(x i i i)第1および第2の標的複合体を混ぜ合わせ、第1および第2の標的複合体の配合物を第1および第2の結合ドメインと混ぜ合わせ、第1の標的複合体を第1の結合ドメイン上に結合させ、第2の標的複合体を第2の結合ドメイン上に結合させることも含み得る。この実施形態において、混ぜ合わせ工程は、(x i v)第1および第2の標的複合体を試料と混ぜ合わせ、第1の分析対象物質を第1の標的複合体における第1の結合試薬に結合させ、第2の分析対象物質を第2の標的複合体における第2の結合試薬に結合させることをさらに含む。第1および第2の標的複合体は、第1および第2の標的複合体を第1および第2の結合ドメインと接触させる前に、試料と混ぜ合わせることができ；第1および第2の標的複合体は、第1および第2の標的複合体を第1および第2の結合ドメインと接触させた後に、試料と混ぜ合わせることができ；または第1および第2の標的複合体は、試料と混ぜ合わせ、同時に第1および第2の結合ドメインと接触させることができる。

30

40

【0149】

本明細書で述べた方法は、試料中の対象の複数の分析対象物質を多重化するために用いることができる。この点については、試料は、対象の1つまたは複数のさらなる分析対象

50

物質を含み、対象のそれぞれのさらなる分析対象物質について、混ぜ合わせ工程（a）は、1つまたは複数の工程で、（ix）さらなる結合ドメイン上に固定化されたさらなる標的物質、連結剤に接続されたさらなる標的物質相補体、および補助連結剤に接続されたさらなる結合試薬、ならびに（x）さらなる標的物質、さらなる標的物質相補体、さらなる結合試薬およびさらなる分析対象物質を含むさらなる結合ドメイン上のさらなる結合複合体を混ぜ合わせる工程をさらに含み；形成工程（b）は、（iii）さらなる標的物質、さらなる標的物質相補体、さらなる結合試薬およびさらなる分析対象物質を含むさらなる結合ドメイン上のさらなる結合複合体を形成する工程をさらに含み；工程（c）における測定は、さらなる結合ドメイン上のさらなる分析対象物質の量を測定する工程をさらに含む。

10

【0150】

特定の実施形態において、本発明は、（a）試料をそれぞれが複数の分析対象物質のうちのそれぞれ第1および第2の分析対象物質に結合する少なくとも第1および第2の結合試薬に連結された2つ以上の結合ドメインと接触させて、第1の結合試薬に結合した第1の分析対象物質および第2の結合試薬に結合した第2の分析対象物質を含む複合体を形成する工程であって、（x）第1の結合ドメインが、（i）第1の結合ドメインおよび第1の標的物質相補体に結合した第1の標的物質ならびに（ii）連結複合体を介して第1の標的物質相補体に結合した第1の結合試薬を含む第1の結合試薬複合体を含み、（y）第2の結合ドメインが、（i）第2の結合ドメインおよび第2の標的物質相補体に結合した第2の標的物質ならびに（ii）連結複合体を介して第2の標的物質相補体に結合した第2の結合試薬を含む第2の結合試薬複合体を含む、工程と、（b）第1および第2の結合試薬複合体を、第1の分析対象物質または第1の分析対象物質を含む複合体に結合する第1の検出試薬および第2の分析対象物質または第2の分析対象物質を含む複合体に結合する第2の検出試薬を含む複数の検出試薬と接触させる工程と、（c）2つ以上の結合ドメインに結合した第1および第2の分析対象物質の量を測定する工程とを含む複数の分析対象物質の結合アッセイを行う方法を含む。

20

【0151】

他の特定の実施形態において、以下の工程を含む方法：（a）複数の分析対象物質における第1の分析対象物質に対して特異的な第1の結合試薬および第1の標的物質を含む第1の結合試薬複合体を形成する工程であって、第1の結合試薬が連結剤に結合し、第1の標的物質が補助連結剤に結合しており、第1の結合試薬複合体が連結剤と補助連結剤との間の反応により形成される、工程と、（b）複数の分析対象物質における第2の分析対象物質に対して特異的な第2の結合試薬および第2の標的物質を含む第2の結合試薬複合体を形成する工程であって、第2の結合試薬が第2の連結剤に結合し、第2の標的物質が第2の連結剤相補体に結合しており、第2の結合試薬複合体が第2の連結剤と第2の連結剤相補体との間の反応により形成される、工程と、（c）第1の標的物質を第1の標的物質相補体に、第2の標的物質を第2の標的物質相補体に結合させるのに十分な条件下で、第1および第2の結合試薬複合体を、それぞれがそれぞれ第1の標的物質相補体および第2の標的物質相補体に連結された2つ以上の結合ドメインと混合する工程と、（d）複数の分析対象物質を含む試料を工程（c）で形成された混合物と混合する工程と、（e）複数のさらなる結合試薬を工程（d）で形成された混合物に加える工程であって、複数のさらなる結合試薬が（i）第1の分析対象物質および/または第1の結合試薬-第1の分析対象物質複合体に対して特異的な第1の検出試薬ならびに（ii）第2の分析対象物質および/または第2の結合試薬-第2の分析対象物質複合体に対して特異的な第2の検出試薬を含む、工程と、（f）結合ドメインに結合した第1および第2の分析対象物質の量を測定する工程。

30

40

【0152】

さらなる特定の実施形態は以下の工程を含む：（a）複数の分析対象物質における第1の分析対象物質に対して特異的な第1の結合試薬および第1の標的物質を含む第1の結合試薬複合体を形成する工程であって、第1の結合試薬が連結剤に結合し、第1の標的物質

50

が補助連結剤に結合しており、第1の結合試薬複合体が連結剤と補助連結剤との間の反応により形成される、工程と、(b)複数の分析対象物質における第2の分析対象物質に対して特異的な第2の結合試薬および第2の標的物質を含む第2の結合試薬複合体を形成する工程であって、第2の結合試薬が第2の連結剤に結合し、第2の標的物質が第2の連結剤相補体に結合しており、第2の結合試薬複合体が第2の連結剤と第2の連結剤相補体との間の反応により形成される、工程と、(c)第1の標的物質を第1の標的物質相補体に、第2の標的物質を第2の標的物質相補体に結合させるのに十分な条件下で、第1および第2の結合試薬複合体と試料を、それぞれがそれぞれ第1の標的物質相補体および第2の標的物質相補体に連結された2つ以上の結合ドメインと混合する工程と、(d)複数のさらなる結合試薬を工程(c)で形成された混合物に加える工程であって、複数のさらなる結合試薬が(i)第1の分析対象物質および/または第1の結合試薬-第1の分析対象物質複合体に対して特異的な第1の検出試薬ならびに(ii)第2の分析対象物質および/または第2の結合試薬-第2の分析対象物質複合体に対して特異的な第2の検出試薬を含む、工程と、(e)結合ドメインに結合した第1および第2の分析対象物質の量を測定する工程。

10

20

30

40

50

【0153】

本発明の方法の特定の実施形態を図3~6に例示する。図1および2に連結複合体を含まない直接アッセイ方法を例示する。これらの図は、比較の目的のために収載する。図1に分析対象物質A、BおよびCの直接多重化アッセイを例示する。これらの分析対象物質に対して特異的な結合試薬であるそれぞれA'、B'およびC'を標的物質A''、B''およびC''に結合させる。それらの対応する標的物質に結合したこれらの結合試薬を含む溶液を、標的物質相補体A''、B''およびC''がそれぞれ一連の別個の結合ドメインに結合している固相と混合する。結合試薬は、表面に吸着されて、それぞれの結合試薬が標的物質相補体を介して表面上の別個の結合ドメインに結合した結合試薬複合体A_{RC}、B_{RC}およびC_{RC}を形成する。表面を分析対象物質A、BおよびCを含む試料ならびにそれぞれ分析対象物質A、BおよびCおよび/またはそれらの分析対象物質を含む複合体に結合することができる検出結合試薬A*、B*およびC*と接触させる。検出結合試薬は、検出可能な標識を含む。あるいは、表面を複数の分析対象物質を含む試料と接触させ、その後、検出結合試薬の混合物と接触させる。検出結合試薬を表面に結合させ、場合により、表面を洗浄して、非結合試薬を除去したならば、各分析対象物質の存在をそれぞれの別個の結合ドメインに結合した検出試薬により検出する。図2に結合試薬としての抗体および標的物質/標的物質相補体対としてのオリゴヌクレオチド/相補的オリゴヌクレオチド対の使用を含む図1の特定の実施形態を例示する。図1および2に示す直接法が使用者によって構成することができないことは、当業者には明らかであろう。それぞれの個別の結合ドメインは、単一の結合試薬-標的物質のみがアレイにおける単一の結合ドメインに結合することができるように、既定の標的物質相補体を含む。

【0154】

図3~4に使用者により規定されるアッセイ構成における最適な柔軟性を使用者にもたらす本発明の特定の実施形態を例示する。図3に使用者がアッセイを使用者の必要に適応させることを可能にする一連の連結複合体を組み込んだ、分析対象物質A、BおよびCに対する間接的結合方式を例示する。図3(a)~(b)に本発明の標的複合体を調製するための一般的なアプローチを示し、連結剤(それぞれL_A、L_BおよびL_C)に結合した結合試薬(A'、B'およびC')の1つを含む一連の溶液を調製する。溶液は、補助連結剤(それぞれL_A'、L_B'およびL_C')に結合した対応する標的物質(A'に対するA'', B'に対するB''およびC'に対するC'')も含む。溶液を混合して、パネル(b)に示す結合試薬-連結複合体-標的物質複合体の混合物を形成する。このアプローチの利点は、それが、各標的複合体が非交差反応性であるための連結試薬を必要としないことであり、実際、連結剤を各標的複合体に用いることを可能にすることである(すなわち、L_A=L_B=L_CおよびL_A'=L_B'=L_C')。図3(c)~(e)に示す実施形態において、結合試薬-連結複合体-標的物質複合体の混合物を標的物質相補体A

、 、 、 B 、 および C が結合している複数の別個の結合ドメインを含む表面と混合する。結合試薬 - 連結複合体 - 標的物質複合体を、パネル (c) に示すように吸着させて、結合試薬複合体 A_{RC} 、 B_{RC} および C_{RC} を形成する。結合試薬複合体の拡大図を図 3 (e) に示す。表面を、分析対象物質 A、B および C を含む試料、ならびにそれぞれ分析対象物質 A、B および C、および / またはそれらの分析対象物質を含む複合体に結合することができる検出結合試薬 A^* 、 B^* および C^* と接触させる。検出結合試薬は、検出可能な標識を含む。あるいは、表面を複数の分析対象物質を含む試料と接触させ、その後、検出結合試薬の混合物と接触させる。検出結合試薬を表面に結合させ、場合により、表面を洗浄して、非結合試薬を除去したならば、各分析対象物質の存在をそれぞれの別個のドメインに結合した検出試薬により検出する (パネル 3 (d))。図 4 に結合試薬としての抗体および標的物質 / 標的物質相補体対としてのオリゴヌクレオチド - 相補的オリゴヌクレオチド対の使用を含む図 3 の特定の実施形態を例示する。図 3 について述べたように、各結合試薬に対する連結剤は、同じであってもよく、各標的物質に対する連結剤相補体は、同じであってもよい。

10

【 0 1 5 5 】

当業者は、図 3 ~ 4 に示したアッセイ方式の様々な並べ替えが可能であることを容易に理解するであろう。特定の好ましい実施形態を図 5 (a) ~ (c) に示す。例えば、すべての試薬、すなわち、補助連結剤により修飾された結合試薬、連結剤により修飾された標的物質相補体、検出試薬および試料を標的物質修飾結合ドメインを有する表面と一緒に単一工程で混合して、図 3 (d) および 4 (d) に示す複合体を形成し、場合により洗浄し、表面に結合した分析対象物質 A、B および C の存在について分析する (図 5 (a))。あるいは、補助連結剤により修飾された結合試薬および連結剤により修飾された標的物質相補体を単一工程で混合し、標的物質修飾結合ドメインを有する表面にその後の工程で加え、試料および検出試薬を加え、最終工程で分析することができる (図 5 (b))。他の実施形態において、補助連結剤により修飾された結合試薬および連結剤により修飾された標的物質相補体を混合し、別個の結合ドメインにおいて標的物質を有する表面に加え、試料と混合し、次いで検出試薬を加える (図 5 (c))。個々の分析対象物質溶液は、単一混合物中の各結合ドメインに連続的または同時に加えることができ、同様に、個々の検出試薬は、単一混合物中の各結合ドメインに連続的または同時に加えることができる。表面結合工程には、次の工程に進む前にアッセイの非結合成分を除去するための洗浄工程を場合により後続させることができる。

20

30

【 0 1 5 6 】

本発明はまた、本明細書で述べた方法を実施するために用いることができるキット、成分および消耗品を提供する。以下の材料 / 方法を本発明で用いる。

【 0 1 5 7 】

(i) 試料 / 分析対象物質

本発明の方法により分析することができる試料の例は、食物試料 (食物抽出物、食物ホモジネート、飲料等を含む)、環境試料 (例えば、土壌試料、環境汚泥、収集環境エアゾール、環境ワイプ、ろ過水等)、工業試料 (例えば、出発物質、工業生産工程からの製品または中間体)、ヒト臨床試料、獣医学試料および生体起源の他の試料を含むが、これらに限定されない。分析することができる生体試料は、糞便、粘膜スワブ、生理液および / または細胞の懸濁液を含む試料を含むが、これらに限定されない。生体試料の特定の例は、血液、血清、血漿、糞便、粘膜スワブ、組織吸引物、組織ホモジネート、細胞培養および細胞培養上清 (真核および原核細胞の培養を含む)、尿、唾液、痰ならびに脳脊髄液を含む。

40

【 0 1 5 8 】

本発明の方法を用いて測定することができる分析対象物質は、タンパク質、毒素、核酸、微生物、ウイルス、細胞、真菌、孢子、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖、薬物、ホルモン、ステロイド、栄養素、代謝物および上記の分子の修飾誘導体、または 1 つもしくは複数の上記の分子を含む複合体またはそれらの組合せを含むが、こ

50

れらに限定されない。試料中の対象の分析対象物質のレベルは、疾患もしくは疾患状態を示すものである可能性があるか、または患者が当分析対象物質に曝露したかどうかを単に示すものである可能性がある。

【0159】

本発明のアッセイは、試料中の1つまたは複数、例えば、2つ以上の分析対象物質の濃度を決定するために用いることができる。したがって、2つ以上の分析対象物質を同じ試料で測定することができる。同じ試料で測定することができる分析対象物質のパネルは、例えば、疾患状態または生理状態に関連する分析対象物質または活性のアッセイのパネルを含む。特定のそのようなパネルは、サイトカインおよび/またはそれらの受容体（例えば、TNF-アルファ、TNF-ベータ、IL1-アルファ、IL1-ベータ、IL2、IL4、IL6、IL-10、IL-12、IFN- γ 等のうちの1つまたは複数のもの）、成長因子および/またはそれらの受容体（例えば、EGF、VGF、TGF、VEGF等のうちの1つまたは複数のもの）、乱用の薬物、治療薬、ビタミン、病原体特異抗体、自己抗体（例えば、Sm、RNP、SS-A、SS-アルファ、J0-1およびSc1-70抗原に対する1つまたは複数の抗体）、アレルゲン特異抗体、腫瘍マーカー（例えば、CEA、PSA、CA-125、CA15-3、CA19-9、CA72-4、CYFRA21-1、NSE、AFP等のうちの1つまたは複数のもの）、うっ血性心疾患および/または急性心筋梗塞を含む心疾患のマーカー（トロポニンT、トロポニンI、ミオグロビン、CKMB、ミエロペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ナトリウム利尿タンパク質（BNP）、ナトリウム利尿タンパク質（ANP）、エンドセリン、アルドステロン、C反応性タンパク質（CRP）等）、止血に関連するマーカー（例えば、フィブリンモノマー、Dダイマー、トロンビン抗トロンビン複合体、プロトロンビン画分1および2、抗Xa因子等のうちの1つまたは複数のもの）、急性ウイルス性肝炎感染のマーカー（例えば、A型肝炎ウイルスに対するIgM抗体、B型肝炎コア抗原に対するIgM抗体、B型肝炎表面抗原、C型肝炎ウイルスに対する抗体等のうちの1つまたは複数のもの）、アルツハイマー病のマーカー（例えば、アルファ-アミロイド、ベータ-アミロイド、A₄₂、A₄₀、A₃₈、A₃₉、A₃₇、A₃₄、タウタンパク質等）、骨粗鬆症のマーカー（例えば、架橋ノルCテレペプチド、総デオキシピリジノリン、遊離デオキシピリジノリン、オステオカルシン、アルカリホスファターゼ、I型コラーゲンのC末端プロペプチド、骨特異アルカリホスファターゼ等のうちの1つまたは複数のもの）、受胎能状態または受胎能関連障害のマーカー（例えば、エストラジオール、プロゲステロン、卵胞刺激ホルモン（FSH）、黄体化ホルモン（LH）、プロラクチン、hCG、テストステロン等のうちの1つまたは複数のもの）、甲状腺障害のマーカー（例えば、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、総T3、遊離型T3、総T4、遊離型T4および逆T3のうちの1つまたは複数のもの）ならびに前立腺癌のマーカー（例えば、総PSA、遊離型PSA、結合型PSA、前立腺酸性ホスファターゼ、クレアチンキナーゼ等のうちの1つまたは複数のもの）を含む。本発明の特定の実施形態は、特定の疾患状態または生理状態に関連する例えば、1つもしくは複数、2つ以上、4つ以上または10以上の分析対象物質を測定することを含む（例えば、上に列挙したようなパネルにグループ分けした分析対象物質；例えば、甲状腺障害の診断に有用なパネルは、例えば、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、総T3、遊離型T3、総T4、遊離型T4および逆T3のうちの1つまたは複数のものを含み得る）。

【0160】

本発明の方法は、上述のような、多種多様な生物学的および生化学的物質の検出を可能にするように計画されている。1つの実施形態において、該方法は、血液、痰、糞便、フィルター、スワブ等を含み、制限のない、様々な関連する臨床および環境マトリックスにおける生物兵器剤（「BWA's」）を含む病原性および/または潜在的に病原性のウイルス、細菌および毒素を検出するために用いることができる。本発明の方法を用いて分析することができる（単独または組み合わせて）病原体および毒素の非限定的なリストは、炭疽菌（*Bacillus anthracis*）（炭疽）、ペスト菌（*Yersinia*

10

20

30

40

50

pestis) (ペスト)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、野兔病菌 (*Francisella tularensis*) (野兔病)、ブルセラ属種 (ブルセラ症)、コクシエラ・ブルネッティ (*Coxiella burnetii*) (Q熱)、リステリア菌、サルモネラ菌、赤痢菌、コレラ菌、トラコーマクラミジア (*Chlamydia trachomatis*)、類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、痘瘡ウイルス (痘瘡) を含むオルトボックスウイルス、ウイルス性脳炎、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEE)、ウエスタンウマ脳炎ウイルス (WEE)、イースタンウマ脳炎ウイルス (EEE)、アルファウイルス属 (*Alphavirus*)、ウイルス性出血熱、アレナウイルス属 (*Arenaviridae*)、ブンヤウイルス属 (*Bunyaviridae*)、フィロウイルス属 (*Filoviridae*)、フラビウイルス属 (*Flaviviridae*)、エボラウイルス、ブドウ球菌腸内毒素、リシン、ボツリヌス毒素 (A、B、C)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、マイコトキシン、フザリウム属 (*Fusarium*)、ミロテシウム属 (*Myrothecium*)、セファロスポリウム属 (*Cephalosporium*)、トリコデルマ属 (*Trichoderma*)、ベルチシモノスポリウム属 (*Verticillium*)、スタキボトリス属 (*Stachybotrys*)、鼻疽、コムギカビ、バシラス・グロビギイ (*Bacillus globigii*)、霊菌 (*Serratia marcescens*)、黄色い雨、トリコテシンマイコトキシン、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、アフラトキシン、インドネズミノミ (*Xenopsylla cheopis*)、ディアマヌス・モンタヌス (*Diamanus montanus*)、小痘瘡、サル痘、アレナウイルス、ハンタウイルス、ラッサ熱、アルゼンチン出血熱、ポリビア出血熱、リフトバレー熱ウイルス、クリミア - コンゴウイルス、ハンタウイルス、マールブルグ出血熱、黄熱ウイルス、デング熱ウイルス、インフルエンザ (H5N1 鳥インフルエンザを含むヒトおよび動物株、A 型インフルエンザ、H1 特異的 A 型インフルエンザ、H3 特異的 A 型インフルエンザ、H5 特異的 A 型インフルエンザ、2009 - H1N1 特異的 A 型インフルエンザ、B 型インフルエンザを含む)、RSV、ヒト免疫不全ウイルス I および II (HIV I および II)、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、肝炎 (非 A、B または C)、エンテロウイルス、エプスタイン - バーウイルス、サイトメガロウイルス、単純疱疹ウイルス、トラコーマクラミジア、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、膻トリコモナス (*Trichomonas vaginalis*)、ヒト乳頭ウイルス、梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borellia burgdorferi*)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*)、肺炎クラミジア (*Chlamydia pneumoniae*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、ブドウ球菌エンテロトキシン B (SEB)、アブリン、志賀毒素 1、志賀毒素 2、モクセラ・カタラーリス、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、A 群連鎖球菌 (Group A streptococcus)、大腸菌 (*E. coli*) O157、コロナウイルス、コクサッキー A 群ウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸系発疹ウイルス (RSV)、メタニューモウイルス、ワクシニアおよびアデノウイルスである。

【0161】

(ii) 結合試薬

結合アッセイの分野の技術者は、本発明の方法に用いることができる結合剤および随伴 (companion) 結合相手の範囲を容易に理解するであろう。そのような対の非限定的なり

10

20

30

40

50

ストは、(いずれかの順序で)オリゴヌクレオチドおよび相補体、受容体/リガンド対、抗体/抗原、天然または合成受容体/リガンド対、アミンおよびカルボニル化合物(すなわち、シッフ塩基の形成による結合)、ハプテン/抗体対、抗原/抗体対、エピトープ/抗体対、ミニトープ/抗体対、アプタマー/標的分子対、ハイブリダイゼーションパートナーおよびインターカレーター/標的分子対を含む。

【0162】

好ましい実施形態において、本発明の方法の結合アッセイは、抗体または他の受容体タンパク質を結合試薬として用いる。「抗体」という用語は、完全な抗体分子(抗体サブユニットの *in vitro* での再結合により組み立てられたハイブリッド抗体を含む)、抗体断片および抗体の抗原結合ドメインを含む組換えタンパク質構築物(例えば、Porter R. R. および Weir R. C. *J. Cell Physiol.*, 67 (Suppl); 51~64頁(1966)ならびに Hochman I. Inbar D. および Givol D. *Biochemistry* 12:1130頁(1973)に記載されているような)ならびに例えば、検出可能な標識の導入により化学的に修飾された抗体構築物を含む。

10

【0163】

(iii) 標的物質、連結剤および架橋剤

結合試薬は、直接的または間接的に、互いおよび/または固相へのそれらの結合を可能にする成分に連結される。これらの成分は、本明細書では標的物質および連結剤と呼ぶ。本明細書で用いているように、標的物質およびそれらの相補体は、結合試薬を表面または担体に接着するために用いられるが、連結剤および補助連結剤は、もし架橋剤を用いる場合には架橋剤を介して直接的または間接的に、結合試薬を標的物質に結合させるために用いられる。

20

【0164】

1つの実施形態において、標的物質およびその相補体は、第1のオリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチド、受容体-リガンド対、抗原-抗体対、ハプテン-抗体対、エピトープ-抗体対、ミニトープ-抗体対、アプタマー-標的分子対、ハイブリダイゼーションパートナーまたはインターカレーター-標的分子対を含む。アッセイに用いる標的物質および相補体は、アッセイにより測定される分析対象物質(例えば、第1の分析対象物質)に対する結合試薬と関連する標的物質および相補体がアッセイにより測定される他の分析対象物質(例えば、第2の分析対象物質)に対する結合試薬と関連する標的物質および相補体と実質的に非交差反応性であるように選択する。したがって、本発明のアッセイにおいて、結合試薬のその関連結合ドメインへの結合(その関連する標的物質および標的物質相補体を介する)は、他の分析対象物質と関連する結合ドメイン(および存在する異なる標的物質相補体)へのその結合よりも実質的に大きいものであるべきである。好ましくは、適正な結合ドメインへの結合と比較した他の分析対象物質と関連する結合ドメインへの分析対象物質に対する結合試薬の結合の交差反応性は、1%未満、より好ましくは0.1%未満、より好ましくは0.01%未満である。好ましい実施形態において、標的物質/標的物質相補体は、相補的配列を含むオリゴヌクレオチドの対を含み、標的物質とその相補体を、標的物質をその相補体にハイブリダイズするのに十分な条件下で接触させる。

30

40

【0165】

好ましい長さは、約5~100塩基、好ましくは約10~50塩基、より好ましくは約10~25塩基である。さらに、標的オリゴヌクレオチド配列は、長さが同じである必要がなく、特定の実施形態において、その結合相手より例えば、最大25塩基、または最大15塩基、または最大10塩基長い1つの標的オリゴヌクレオチド配列を準備することが有益であり得る。オリゴヌクレオチド配列およびそれらの相補体は、同様の結合エネルギー(または溶融温度)および低い対間交差反応性を有する相補的オリゴヌクレオチドの対を作製するための当技術分野で公知の技術(例えば、多重化核酸アッセイ用のプローブまたはプライマーを選択するための商業または公共ソフトウェア)により作製することがで

50

きる。オリゴヌクレオチド配列は、天然に存在する核酸塩基ならびに天然に存在しない塩基および/または修飾塩基を含み得る。例えば、オリゴヌクレオチド配列は、Era Gen Biosciences, Inc (www.era-gen.com) から入手できるそれぞれシトシンおよびグアニンの化学的変異体である、Iso-dCおよび/またはIso-dGを含み得る。そのような修飾塩基のオリゴヌクレオチド配列への組み込みは、遺伝情報を拡大し、高い特異性と低いミスマッチハイブリダイゼーションの可能性を有するオリゴヌクレオチドの合成を可能にするものである。例えば、Iso-dCを含むオリゴヌクレオチドは、Iso-dCを含む相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするが、天然に存在する核酸配列にはハイブリダイズしないように設計することができる。

【0166】

1つのアプローチにおいて、コンピュータアルゴリズムを用いて、以下の規則の1つまたは複数、好ましくはすべてに基づくオリゴヌクレオチド配列対を作製することができる：
(i) 約40~60%、例えば、40~50%のGC含量；
(ii) 3つ以下の配列における塩基反復配列の最大ストリング(maximum string of base repeats)；
(iii) 異なる対における配列間の塩基対マッチの最大数が6で、列におけるマッチが4以下；
(iv) ステム領域に4以上の塩基対マッチを有する場合、2~5オリゴヌクレオチドの予測ヘアピンループサイズを有する配列の棄却(6以上のループサイズが保持されている)；
および
(v) 40~60%または40~50%のGC含量に起因する特異的相互作用のより高い自由エネルギー(G°) (G° は、温度および塩濃度に依存し、23および200mMの一価カチオン、pH7.0において、 G° は、好ましくは-15 kcal/molを超える)。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドの選択に際して、上で特定した1つまたは複数の規則とともに、少なくとも関連するGC含量および G° を考慮する。1つの実施形態において、非特異的結合を最小限にするオリゴヌクレオチド配列を設計することが有利である可能性があり、これは、様々な方法により達成することができる。例えば、アッセイに用いる他のオリゴヌクレオチドとの3以下の連続G/C対を形成するオリゴヌクレオチド/オリゴヌクレオチド対を設計することができる。あるいはまたはさらに、1つまたは複数の以下の構造を避けることができる：アッセイに用いる他のオリゴヌクレオチドと対合させる場合、G/Cに富む配列間に位置する単一ヌクレオチドループまたは単一ヌクレオチドミスマッチの形成。

【0167】

1つの実施形態において、標的物質および標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み、該対は、表1(a)における以下の配列対の1つから選択される：

【0168】

10

20

30

【表 4 2】

| 対番号 | 配列(5'→3') | 対番号 | 配列(5'→3') |
|-----|-----------------------|-----|-----------------------|
| 1 | acatcggtagtt (配列番号1) | 13 | cggtttgagata (配列番号25) |
| | aactaccgatgt (配列番号2) | | tatctcaaccg (配列番号26) |
| 2 | acgtcccagttg (配列番号3) | 14 | cttacaacgcca (配列番号27) |
| | caactgggacgt (配列番号4) | | tggcgttgaag (配列番号28) |
| 3 | agaagaagatcc (配列番号5) | 15 | ctttctcggcac (配列番号29) |
| | ggatcttctct (配列番号6) | | gtgccgagaaag (配列番号30) |
| 4 | aggttcagtga (配列番号7) | 16 | gacataaagcga (配列番号31) |
| | tgactgaacct (配列番号8) | | tcgctttatgac (配列番号32) |
| 5 | atcaggatagc (配列番号9) | 17 | gccatagtctct (配列番号33) |
| | gcgtatcctgat (配列番号10) | | agagactatggc (配列番号34) |
| 6 | atcattaccacc (配列番号11) | 18 | gctaattcacca (配列番号35) |
| | ggtggaatgat (配列番号12) | | tggggaattagc (配列番号36) |
| 7 | attaacgggagc (配列番号13) | 19 | ggcgtgtttca (配列番号37) |
| | gtccccgtaat (配列番号14) | | tgaaacacgacc (配列番号38) |
| 8 | cagaggtcttaa (配列番号15) | 20 | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | ttaagacctctg (配列番号16) | | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 9 | caggtgtccatt (配列番号17) | 21 | taccgggaataa (配列番号41) |
| | aatggacacctg (配列番号18) | | ttattccgggta (配列番号42) |
| 10 | catccaatccag (配列番号19) | 22 | tgcttgactgg (配列番号43) |
| | ctggattggatg (配列番号20) | | ccaagtcaagca (配列番号44) |
| 11 | cctacgatatac (配列番号21) | 23 | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | gtatatcgtagg (配列番号22) | | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| 12 | cgaatgtagagt (配列番号23) | 24 | ttgtctagcggc (配列番号47) |
| | actctacattcg (配列番号24) | | gccgctagacaa (配列番号48) |
| | | 25 | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | | | tagcaaggaaaa (配列番号50) |

10

20

30

【0169】

特定の実施形態において、標的物質および標的物質相補体は、オリゴヌクレオチドの対を含み、該対は、表1(b)における以下の配列対の1つから選択される：

【0170】

【表 4 3】

| 対 | 名称 | 修飾 | 配列 |
|----|-----------------|-------------|-----------------------|
| 1 | 3'チオールオリゴ12b-1 | 3'-チオールC3SS | acatcggtagtt (配列番号1) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-1 | 3'ビオチン | aactaccgatgt (配列番号2) |
| 3 | 3'チオールオリゴ12b-5 | 3'-チオールC3SS | agaagaagatcc (配列番号5) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-5 | 3'ビオチン | ggatctctct (配列番号6) |
| 6 | 3'チオールオリゴ12b-12 | 3'-チオールC3SS | atcattaccacc (配列番号11) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-12 | 3'ビオチン | ggtgtaatgat (配列番号12) |
| 7 | 3'チオールオリゴ12b-14 | 3'-チオールC3SS | attaacgggagc (配列番号13) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-14 | 3'ビオチン | gctccgtaat (配列番号14) |
| 8 | 3'チオールオリゴ12b-17 | 3'-チオールC3SS | cagaggtcttaa (配列番号15) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-17 | 3'ビオチン | ttaagacctctg (配列番号16) |
| 9 | 3'チオールオリゴ12b-18 | 3'-チオールC3SS | caggtgccatt (配列番号17) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-18 | 3'ビオチン | aatggacacctg (配列番号18) |
| 11 | 3'チオールオリゴ12b-20 | 3'-チオールC3SS | cctacgatatac (配列番号21) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-20 | 3'ビオチン | gtatatogtagg (配列番号22) |
| 12 | 3'チオールオリゴ12b-21 | 3'-チオールC3SS | cgaatgtagagt (配列番号23) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-21 | 3'ビオチン | actctacattog (配列番号24) |
| 13 | 3'チオールオリゴ12b-22 | 3'-チオールC3SS | cggttgagata (配列番号25) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-22 | 3'ビオチン | tatctcaaaccg (配列番号26) |
| 16 | 3'チオールオリゴ12b-26 | 3'-チオールC3SS | gacataaagcga (配列番号31) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-26 | 3'ビオチン | tcgcttatgtc (配列番号32) |
| 17 | 3'チオールオリゴ12b-28 | 3'-チオールC3SS | gccatagtctct (配列番号33) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-28 | 3'ビオチン | agagactatggc (配列番号34) |
| 18 | 3'チオールオリゴ12b-30 | 3'-チオールC3SS | gctaattacca (配列番号35) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-30 | 3'ビオチン | tggtgaattagc (配列番号36) |
| 20 | 3'チオールオリゴ12b-33 | 3'-チオールC3SS | gttgattctgtc (配列番号39) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-33 | 3'ビオチン | gacagaatcaac (配列番号40) |
| 23 | 3'チオールオリゴ12b-41 | 3'-チオールC3SS | ttccacttaggg (配列番号45) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-41 | 3'ビオチン | ccctaagtggaa (配列番号46) |
| 25 | 3'チオールオリゴ12b-43 | 3'-チオールC3SS | ttcccttgcta (配列番号49) |
| | 3'ビオチンオリゴ12b-43 | 3'ビオチン | tagcaagggaaa (配列番号50) |

10

20

30

【0171】

標的物質および標的物質相補体は、1 : 1の比で存在し得る。あるいは、標的物質がその相補体に結合する可能性を増大させるために、標的物質は、過剰に、例えば、標的物質の標的物質相補体に対する2 : 1の比で存在し得る。

【0172】

1つの実施形態において、適切な連結剤および補助連結剤は、反応して連結複合体を形成する化学的構成部分を含む。例えば、連結複合体は、連結剤および補助連結剤に存在する化学的構成部分の間、例えば、チオール基とマレイミドもしくはヨードアセトアミド基の間；アルデヒドとヒドラジドとの間；またはアルキンとアジドとの間の結合相互作用により形成される。

40

【0173】

あるいは、連結複合体は、連結剤と補助連結剤との間のタンパク質 - タンパク質結合反応に形成され得る。例えば、タンパク質 - タンパク質結合反応は、受容体 / リガンド対、ハプテン / 抗体対、抗原 / 抗体対、エピトープ / 抗体対、ミミトープ / 抗体対、アプタマー / 標的分子対、ハイブリダイゼーションパートナーおよびインターカレーター / 標的分子

50

子対の間の結合により構成され得る。1つの実施形態において、連結剤がビオチンであり、補助連結剤がストレプトアビジンもしくはアビジンである（または逆）；または連結剤がペプチドであり、補助連結剤が抗ペプチド抗体である（または逆）。

【0174】

本明細書で述べた特定の実施形態は、補助連結剤に直接結合する連結剤を用いる。これらおよび他のそのような実施形態において、互いに結合する連結および補助連結剤は、架橋剤に同時に結合し得る連結および補助連結剤により置換することができる。これらの代替実施形態において、標的複合体を形成する場合、架橋剤を連結剤および補助連結剤の混合物に含める。架橋剤は、用いられる場合、連結剤および補助連結剤に結合する。例えば、架橋剤は、連結剤に対する結合部位および補助連結剤に対する結合部位を含み、3つの成分、すなわち、架橋剤、連結剤および補助連結剤の組合せは、架橋複合体を含む。1つの実施形態において、架橋剤は、ストレプトアビジンまたはアビジン（それらのそれぞれがビオチンに対する4つの独立した結合部位を有するテトラマーである）であり、連結剤および補助連結剤は、架橋複合体が（ビオチン - （ストレプトアビジン（またはアビジン）） - ビオチン）を含むように、それぞれビオチンである。

10

【0175】

好ましい実施形態において、連結複合体は、連結剤 L_A と補助連結剤 L_A' との間の結合反応により形成される。多重アッセイ方式は、分析対象物質 A、B および C を検出するように構成することができ、したがって、それらの個々の分析対象物質と相互作用するように設計された試薬複合体は、 L_A および L_A' 、 L_B および L_B' ならびに L_C および L_C' から選択される連結剤および補助連結剤を含み得る。結合複合体を構築するために用いる連結剤 / 補助連結剤対のそれぞれは、同じまたは異なってもよい。好ましい実施形態において、連結剤 / 補助連結剤対のそれぞれは、同じ一組の試薬を含む。特に好ましい実施形態において、連結剤 / 補助連結剤対のそれぞれは、例えば、結合試薬上の連結剤としてのビオチン分子および補助連結剤としての標的物質上のストレプトアビジンもしくはアビジン分子を含む（または逆もまた同様に）。さらに、連結複合体は、結合試薬上のビオチン分子と標的物質上のストレプトアビジンもしくはアビジンとの間の結合反応によっても形成させることができ、ストレプトアビジンもしくはアビジン分子が、標的物質上のビオチン分子（架橋剤として作用する）との反応により標的物質に結合する。好ましい実施形態において、連結複合体がそれぞれ結合試薬および標的物質上のビオチン分子とストレプトアビジン分子との間（または逆もまた同様に）に形成されたならば、溶液中で化合し得るさらなる結合試薬と標的物質との間の交差反応性を防ぐために、過剰な遊離ビオチン分子を加えることができる。

20

30

【0176】

(iv) 固相

多種多様な固相が、結合アッセイの分野の通常の実施形態を含む本発明の方法に用いるのに適している。固相は、ポリマー（例えば、ポリスチレンおよびポリプロピレン）、セラミック、ガラス、複合材料（例えば、炭素ベースのインクのような炭素 - ポリマー複合材料）を含む多種の材料により製造することができる。適切な固相は、アッセイ容器（例えば、試験管、キュベット、フローセル、カートリッジ、多ウエルプレートにおけるウエル等）の内面、スライド、アッセイチップ（遺伝子またはタンパク質チップ測定に用いられるものなど）などの巨視的物体の表面、ピンまたはプローブ、ビーズ、ろ過媒体、側方流動媒体（例えば、側方流動試験ストリップに用いられるろ過膜）等を含む。

40

【0177】

適切な固相は、他の種類の粒子ベースのアッセイに一般的に用いられる粒子（コロイドまたはビーズを含むが、これらに限定されない）、例えば、磁気、ポリプロピレンおよびラテックス粒子、固相合成に一般的に用いられる材料、例えば、ポリスチレンおよびポリアクリルアミド粒子、ならびにクロマトグラフ応用分野で一般的に用いられる材料、例えば、シリカ、アルミナ、ポリアクリルアミド、ポリスチレンも含む。材料は、炭素小繊維であってもよい。マイクロ粒子は、無生物であってもよく、あるいは、細胞、ウイルス、細

50

菌などのような有生の生物学的存在を含み得る。本発明の方法に用いる粒子は、1つまたは複数の結合試薬への結合に適し、例えば、遠心分離、重力、ろ過または磁気収集により収集することができる材料からなり得る。結合試薬に接着させることができる様々な異なる種類の粒子が結合アッセイ用に市販されている。これらは、非磁性粒子ならびに粒子を磁場により収集することを可能にする磁化できる材料を含む粒子を含む。1つの実施形態において、粒子は、導電性および/または半導電性物質、例えば、コロイド金粒子からなる。マイクロ粒子は、様々なサイズおよび形状を有し得る。例として、また制限なしに、マイクロ粒子は、5 nmから100 μmまでのサイズであり得る。好ましくはマイクロ粒子は、20 nmから10 μmまでのサイズを有する。粒子は、球形、楕円形、棒状等であってもよく、または形状が不規則であってもよい。

10

【0178】

図6(a)~(c)に本発明に用いることができる様々な組の粒子を示す。図6(a)にそれぞれが異なる標的物質により修飾されている、1つまたは複数のバイアル、容器またはコンパートメント入りで提供される、一組の粒子を示す。あるいは、図6(b)に示すように、結合試薬が、粒子の表面上の標的物質に結合している標的物質相補体との結合試薬を含む標的複合体(補助連結剤を連結することによる)で粒子に接着している、それぞれが異なる結合試薬により修飾されている、一組の粒子を1つまたは複数のバイアル、容器またはコンパートメント入りで提供することができる。さらに、図6(c)に、サブセットがそれぞれが異なる結合試薬により修飾されている(図6(b)に示すように)粒子を含み、サブセットがそれぞれが異なる標的物質により修飾されている(図6(a)に示すように)粒子を含む、一組の混合粒子を提供する他の実施形態を示す。図6(c)に示す粒子は、事前に定められた一組の分析対象物質に対する結合試薬によりあらかじめ構成された粒子のサブセットおよびさらなる一組の分析対象物質に対するさらなる一組の結合試薬を接着させるように使用者により、すなわち、さらなる結合試薬を含むさらなる一組の標的複合体に粒子を結合させることにより修飾することができる構成されていない粒子のサブセットを含む。これらのさらなる試薬は、使用者により準備することができ、それにより、使用者が使用者により規定される一組のアッセイを事前に規定された一組のアッセイを加えることを可能にする。

20

【0179】

本発明の方法に用いる粒子は、粒子の混合物中の特定の粒子または粒子の副次集団の識別を可能にするためにコード化することができる。そのようなコード化粒子の使用は、結合アッセイ用の固相担体として粒子を用いるアッセイの多重化を可能にするために用いられている。1つのアプローチにおいて、粒子を1つまたは複数の蛍光染料を含むように製造し、粒子の特定の集団を1つまたは複数の波長の蛍光発光の強度および/または相対強度に基づいて識別する。このアプローチは、Luminex xMAPシステム(例えば、米国特許第6,939,720号参照)およびBecton Dickinson Cytometric Bead Arrayシステムに用いられている。あるいは、粒子は、サイズ、形状、組み込まれた光学的パターンなどのような他の物理的特性の差によりコード化することができる。図6(a)~(c)における粒子の平行線模様により示されているように、粒子の混合物または組で準備される1つまたは複数の粒子は、粒子の光学的特性、サイズ、形状、組み込まれた光学的パターンなどにより混合物中の他の粒子と識別されるようにコード化することができる。

30

40

【0180】

あるいはまたはさらに、別個のアッセイシグナルが各結合ドメイン上で発生し、したがって、それらのドメインに結合した異なる分析対象物質を独立に測定することができるように、結合試薬は、結合アッセイにおけるように、結合試薬複合体を介して1つまたは複数の固相上の異なる別個の結合ドメインに結合させることができる。そのような実施形態の1つの例において、結合ドメインは、個々のドメイン上に構築された結合試薬複合体を介して、対象の分析対象物質に結合するように構成されている標的物質の別個のドメインを、1つまたは複数の表面上に固定化することによって準備する。場合により、表面(単

50

数または複数)は、試料を保持しているまたは試料が通過する容器(例えば、フローセル、ウエル、キュベット等)の1つまたは複数の境界を一部定義し得る。好ましい実施形態において、個々の結合ドメインは、電気化学または電気化学発光アッセイに用いる電極上に形成させる。電気化学発光を用いた複数の結合ドメインを含む表面上の分析対象物質の多重化測定は、Meso Scale Diagnostics、LLC、MULT-ARRAY(登録商標)およびSECTOR(登録商標)イメージャーラインおよび製品において用いられている(その開示を参照によってその全体として本明細書に組み入れる、例えば、米国特許第7,842,246号および第6,977,722号参照)。

【0181】

図6(d)~(f)に本発明に用いることができる異なる結合ドメインを含む様々な代替プレート方式を例示する。図6(d)にそれぞれが異なる標的物質で修飾されている複数の結合ドメインを有する表面を示す。あるいは、図6(e)に示すように、結合試薬が、結合ドメイン上の標的物質に結合している標的物質相補体に対する結合試薬(補助連結剤を連結することによる)を含む標的複合体における結合ドメインに結合している、それぞれが異なる結合試薬で修飾されている複数の結合ドメインを有する表面を準備することができる。さらに、図6(f)に、サブセットが、それぞれが異なる結合試薬で修飾されている(図6(e)におけるように)結合ドメインを含み、サブセットが、それぞれが異なる標的物質で修飾されている(図6(d)におけるように)結合ドメインを含む、表面上の混合された一組の結合ドメインを準備する他の実施形態を示す。図6(f)に示す結合ドメインは、事前に定められた一組の分析対象物質に対する結合試薬を用いて事前に構成された結合ドメインのサブセットと、さらなる一組の分析対象物質に対するさらなる一組の結合試薬を結合するように、すなわち、これらの構成されていない結合ドメインをさらなる結合試薬を含むさらなる一組の標的複合体に結合させることによって、使用者により修飾することができる構成されていない結合ドメインのサブセットとを含む。これらのさらなる試薬は、使用者により準備され、それにより、使用者が事前に規定されたアッセイに一組の使用者により規定されるアッセイを加えることを可能にし得る。

【0182】

試薬、すなわち、標的物質は、公知の方法、例えば、粒子を修飾するためのまたはアッセイを構成するための確立された方法により表面に結合させることができる。表面にタンパク質またはオリゴヌクレオチドを接着させる方法の1つの非限定的な例を図7に示す。この方法は、十分に確立されたヘテロ二官能性架橋剤である、スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)を使用する。SMCCのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)基の牛血清アルブミン(BSA)との反応は、BSAをチオール反応性マレイミド基で標識する。マレイミド基は、次に、チオール修飾オリゴヌクレオチドと反応して、安定なチオエーテル基を介して連結しているBSA-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを形成する。これらの試薬のアレイは、タンパク質(BSAなどの)を吸着するまたはそれと反応し、それにより関連オリゴヌクレオチドのパターン化されたアレイを発生させる、表面上の試薬の印刷パターンにより形成することができる。1つの特定の例において、アレイは、黒鉛状炭素表面、好ましくはスクリーン印刷カーボンインク電極上にBSA-オリゴヌクレオチドコンジュゲートのアレイを印刷することにより形成する。驚くべきことに、我々は、チオール修飾オリゴヌクレオチドを含むチオール修飾試薬がスクリーン印刷カーボンインク電極を含む黒鉛状炭素表面と不可逆的に反応すること(BSAなどのタンパク質にコンジュゲートされていない場合でさえ)を見いだした。したがって、チオール修飾試薬(チオール修飾オリゴヌクレオチドおよびペプチドを含む)は、炭素表面を試薬を含む溶液とともにインキュベートし、試薬を表面と不可逆的に反応させることによって炭素表面上に固定化することができる。さらに、そのようなチオール修飾試薬のアレイ(チオール修飾オリゴヌクレオチドおよび/またはペプチドを含むアレイを含む)は、これらの試薬を含む溶液を炭素表面上に印刷し、表面上のパターン化溶液をインキュベートし、試薬を表面と不可逆的に反応させることによって形成することができる。

10

20

30

40

50

【0183】

(v) アッセイ装置および補助試薬

本発明の方法は、様々なアッセイ装置および/または方式に用いることができる。アッセイ装置は、例えば、アッセイが進行するときに加えられるまたはアッセイモジュールのウェル、チャンパーもしくはアッセイ領域に事前に装入されるアッセイ試薬（標的物質または他の結合試薬を含み得る）を有するアッセイプレート、カートリッジ、多ウェルプレート、反応容器、試験管、キュベット、フローセル、アッセイチップ、側方流動装置等のようなアッセイモジュールを含み得る。これらの装置は、特異的結合アッセイ、例えば、免疫測定法または免疫クロマトグラフ測定法の様々なアッセイ方式を用い得る。例示のアッセイ装置および方式が、本明細書において以下で述べられる。特定の実施形態において、本発明の方法は、乾燥状態で保存されているアッセイ試薬を用い得るものであり、アッセイ装置/キットは、アッセイ試薬を乾燥状態に維持するための乾燥材料をさらに含みまたは乾燥材料とともに供給され得る。アッセイ試薬を事前に装入したアッセイ装置は、保存中の優れた安定性を維持すると同時にアッセイ測定の迅速性を著しく改良し、その複雑さを低減し得る。乾燥アッセイ試薬は、乾燥し、アッセイに使用する前に再構成することができる。これらは、結合アッセイに有用な結合試薬、酵素、酵素基質、指示染料および対象の分析対象物質を検出するために用いることができる他の反応性化合物を含むが、これらに限定されていない。アッセイ試薬はまた、ブロッキング剤、安定化剤、洗剤、塩、pH緩衝剤、保存剤等を含むが、これらに限定されない、検出の機構に直接関与しないが、アッセイにおいて補助的役割を果たす物質を含み得る。試薬は、遊離形で、あるいはアッセイモジュールにおけるコンパートメント（例えば、チャンパー、チャンネル、フローセル、ウェル等）の表面またはコロイド、ビーズもしくは他の粒子状担体の表面を含む固相上に担持されて存在し得る。

10

20

【0184】

(vi) 測定方法

本発明の方法は、分析対象物質の量を測定する、特に、固相に結合した分析対象物質の量を測定する様々な方法とともに用いることができる。用いることができる技術は、培養ベースのアッセイ、結合アッセイ（凝集試験、免疫測定法、核酸ハイブリダイゼーションアッセイ等を含む）、酵素アッセイ、比色分析等のような当技術分野で公知の技術を含むが、これらに限定されない。他の適切な技術は、当技術分野の平均的技術者には直ちに明らかであろう。一部の測定技術は、測定を目視検査により行うことを可能にし、他の測定技術は、測定を行うための機器を必要としまたはその使用が有効であり得る。

30

【0185】

分析対象物質の量を測定する方法は、i) 表面への分析対象物質の結合の後の表面における質量または屈折率の変化を測定する技術（例えば、弾性表面波技術、表面プラズモン共鳴センサー、偏光技術等）、ii) 質量分析技術（表面上の分析対象物質を測定することができるMALDI、SELDI等のような技術を含む）、iii) クロマトグラフまたは電気泳動技術、iv) 蛍光技術（分析対象物質の固有蛍光に基づき得る）等を含むが、これらに限定されない、標識を用いない技術を含む。

40

【0186】

分析対象物質の量を測定する方法は、分析対象物質に直接または間接的に付着させることができる（例えば、分析対象物質の標識付き結合相手の使用により）標識の検出により分析対象物質を測定する技術も含む。適切な標識は、直接的に視覚化することができる標識（例えば、視覚的に見ることができる粒子ならびに光散乱、吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、放射能、磁場等のような測定可能なシグナルを発生する標識）を含む。用いることができる標識は、光散乱、吸光度、蛍光等のような測定可能なシグナルをもたらず化学活性を有する酵素または他の化学的に反応性の種も含む。標識としての酵素の使用は、ELISAs、酵素免疫測定法またはEIAsとも呼ばれている、酵素結合免疫吸着測定法において十分に確立されている。ELISA方式において、未知量の抗原を表面に付着させ、次いで、特異抗体が抗原に結合し得るように特異抗体を表面上に流す。この抗

50

体を酵素に結合させ、最終工程において、酵素が、検出可能なシグナルの変化をもたらす生成物に変換する物質を加える。生成物の形成は、例えば、吸光度、蛍光、化学発光、光散乱等のような測定可能な特性の基質と比較した差により検出することができる。本発明による固相結合法とともに用いることができる特定の（ただし、すべてではない）測定方法は、固相から非結合成分（例えば、標識）を除去するための洗浄工程が有効または必要である。したがって、本発明の方法は、そのような洗浄工程を含み得る。

【0187】

1つの実施形態において、試料中の対象の分析対象物質（単数または複数）は、電気化学発光ベースのアッセイ方式、例えば、電気化学発光（ECL）ベースの免疫測定法を用いて測定することができる。ECLの高い感度、広いダイナミックレンジおよび選択性は、医学診断の重要な因子である。市販のECL機器は、例外的な性能を示し、それらの優れた感度、ダイナミックレンジ、精度および複雑試料マトリクスの耐性を含む理由のために広く用いられるようになった。ECLを放射するように誘導することができる種（ECL活性種）は、ECL標識として用いられており、例えば、i) 金属が例えば、トリスピリジルルテニウム（RuBpy）部分のようなRu含有およびOs含有有貴金属化合物を含むVII族の金属に属する有機金属化合物ならびにii) ルミノールおよび関連化合物などである。ECL標識とともにECL過程に関与する種は、本明細書でECL共反応物と呼ぶ。一般的に用いられる共反応物は、RuBpyからのECL用の第三級アミン（例えば、米国特許第5,846,485号参照）、シュウ酸塩および過硫酸塩ならびにルミノールからのECL用の過酸化水素（例えば、米国特許第5,240,863号参照）を含む。ECL標識により発生する光は、診断処置におけるリポーターシグナルとして用いることができる（例えば、参照によって本明細書に組み入れる、Bardら、米国特許第5,238,808号）。例えば、ECL標識は、抗体、核酸プローブ、受容体またはリガンドのような結合試薬に共有結合させることができ、結合相互作用における結合試薬の関与は、ECL標識から放射されるECLを測定することによりモニターすることができる。あるいは、ECL活性化化合物からのECLシグナルは、化学的環境を示すものであり得る（例えば、ECL共反応物の形成または破壊をモニターするECLアッセイを記載している、米国特許第5,641,623号参照）。ECL、ECL標識、ECLアッセイに関するさらなる背景およびECLアッセイを行うための器具類については、すべてを参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第5,093,268号、第5,147,806号、第5,324,457号、第5,591,581号、第5,597,910号、第5,641,623号、第5,643,713号、第5,679,519号、第5,705,402号、第5,846,485号、第5,866,434号、第5,786,141号、第5,731,147号、第6,066,448号、第6,136,268号、第5,776,672号、第5,308,754号、第5,240,863号、第6,207,369号、第6,214,552号および第5,589,136号ならびにPCT国際公開特許番号WO99/63347、WO00/03233、WO99/98962、WO99/32662、WO99/14599、WO98/12539、WO97/36931およびWO98/57154を参照のこと。

【0188】

本発明の方法は、シングルプレックス方式または複数のアッセイ測定が単一試料において実施されるマルチプレックス方式に適用することができる。本発明により用いることができるマルチプレックス測定は、i) 複数のセンサーの使用を必要とする；ii) 表面上の位置に基づいて識別することができる表面上の個別のアッセイドメイン（例えば、アレイ）を用いる；iii) サイズ、形状、色等のような粒子特性に基づいて識別することができる粒子上に被覆された試薬の使用を必要とする；iv) 光学的特性に基づいて識別することができるアッセイシグナル（例えば、吸光度または発光スペクトル）をもたらすまたはv) アッセイシグナルの時間的特性（例えば、シグナルの時間、周波数または位相）に基づくマルチプレックス測定を含むが、これらに限定されない。

【0189】

10

20

30

40

50

(vii) キット

1つの実施形態において、本発明は、それぞれが第1および第2の標的物質、例えば、第1および第2のオリゴヌクレオチドを含む複数の別個の結合ドメインを含む、表面、例えば、多ウエルプレートまたは複数の粒子ならびに別個のバイアル、容器またはコンパートメント入りの、連結剤に結合した第1のオリゴヌクレオチド相補体および第2の連結剤に結合した第2のオリゴヌクレオチド相補体を含むキットを提供する。好ましい実施形態において、(i)第1の標的物質および第1の標的物質相補体は、標的物質の第1の対を構成し、(ii)第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、標的物質の第2の対を構成する。好ましくは、標的物質の第1および第2の対は、表1に示す配列の対から選択される、それぞれオリゴヌクレオチドの第1および第2の対を含む。

10

【0190】

キットは、表1(a)および/または表1(b)に示す配列から選択される異なる配列を含む少なくとも4種のオリゴヌクレオチドを、別個のバイアル、容器またはコンパートメント入りで、さらに含む。これらの配列は、異なる対から選択される4種の配列を含み得るまたは対の複数のメンバーを含み得る。

【0191】

キットは、少なくとも7、10、16または25種の表面結合オリゴヌクレオチドおよび対応するオリゴヌクレオチド相補体を含み得る。標的物質相補体として使用するために構成されたオリゴヌクレオチドは、抗体などの結合試薬に事前に結合された状態で準備することができまたは使用者による結合試薬への結合のために連結剤で修飾された状態で準備することができる。場合により、キットにおけるそれぞれのオリゴヌクレオチド相補体を異なる結合試薬、例えば、抗体に結合させる。表面結合オリゴヌクレオチドは、異なるオリゴヌクレオチド配列が別個の結合ドメインに固定化されるように各結合ドメインに固定化された複数の少なくとも5種(7、10、16または25種)のオリゴヌクレオチドを含むアレイに組み込むことができる。特定の実施形態において、多ウエルプレートは、プレートの少なくとも1つのウエル内に本明細書で述べたオリゴヌクレオチドアレイの1つまたは複数のコピーを含み得る。ここで、該アレイは、複数の結合ドメインに配置されている。プレートは、少なくとも24、96または384ウエルを含み得、アレイは、少なくとも7種のオリゴヌクレオチド、または少なくとも10、16もしくは25種のオリゴヌクレオチドを含み得る。

20

30

【0192】

特定の実施形態において、キットは、プレートの少なくとも1つのウエル内にオリゴヌクレオチドアレイの1つまたは複数のコピーを有する多ウエルプレートを含み、アレイは、複数の結合ドメイン上に配置され、ここで、1つまたは複数、場合により、少なくとも4つの結合ドメインがその上に固定化された表1(a)に示す一連の配列対からの異なる配列対から選択される異なるオリゴヌクレオチド配列を有する。特定の実施形態において、キットは、プレートの少なくとも1つのウエル内にオリゴヌクレオチドアレイの1つまたは複数のコピーを有する多ウエルプレートを含み、アレイは、複数の結合ドメイン上に配置され、ここで、1つまたは複数、場合により、少なくとも4つの結合ドメインは、その上に固定化された表1(a)に示す配列対の組からの異なる配列対から選択される異なるオリゴヌクレオチド配列を有する。キットは、表1(a)、特定の実施形態において表1(b)における配列対の組から選択される2つ以上のオリゴヌクレオチドからなるさらなる組のオリゴヌクレオチドをさらに含み得る。ここで、さらなるオリゴヌクレオチドは、固定化されたオリゴヌクレオチドに対して相補的である。

40

【0193】

キットは、以下のものを含む1つまたは複数のさらなる容器、器またはコンパートメントをさらに含む：(i)第1の結合試薬が試料中の第1の分析対象物質に対して特異的である、第1の連結剤を含む第1の結合試薬、(ii)別個の容器、器もしくはコンパートメント入りでまたは(i)の成分として提供される、補助連結剤を含む第1の標的物質相補体、(iii)第2の結合試薬が試料中の第2の分析対象物質に対して特異的である、

50

第2の連結剤を含む第2の結合試薬、および(i v)別個の容器、器もしくはコンパートメント入りでまたは(i i i)の成分として提供される、第2の補助連結剤を含む第2の標的物質相補体。

【0194】

あるいは、本発明は、試料中の複数の異なる分析対象物質を測定するためのキットを提供するものであって、キットは以下のものを含む：(a)固体担体の第1の領域に固定化された第1の標的物質および前記固体担体の第2の領域に固定化された第2の標的物質を含む固体担体を含む容器、器またはコンパートメント；ならびに(b)以下のものを含む1つまたは複数のさらなる容器、器またはコンパートメント：(i)第1の連結剤を含む第1の結合試薬で、前記第1の結合試薬が前記試料中の第1の分析対象物質に対して特異的である、(i i)別個の容器、器もしくはコンパートメント入りでまたは(b)(i)の成分として提供される、補助連結剤を含む第1の標的物質相補体、(i i i)第2の連結剤を含む第2の結合試薬であって、前記第2の結合試薬が前記試料中の第2の分析対象物質に対して特異的である、および(i v)別個の容器、器もしくはコンパートメント入りでまたは(b)(i i i)の成分として提供される、第2の連結剤相補体を含む第2の標的物質相補体。

10

【0195】

本発明はまた、試料中の複数の異なる分析対象物質を測定するためのキットを企図するものであって、キットは以下のものを含む：(a)前記固体担体の第1の領域に固定化された第1の標的物質および前記固体担体の第2の領域に固定化された第2の標的物質を固体担体上に含む容器、器またはコンパートメント；ならびに(b)以下のものを含む4つ以上のさらなる容器、器またはコンパートメント：(i)第1の連結剤を含む第1の結合試薬を含む第1の容器で、前記第1の結合試薬が前記試料中の第1の分析対象物質に対して特異的である、(i i)別個の容器、器もしくはコンパートメント入りで提供される、補助連結剤を含む第1の標的物質相補体を含む第2の容器、(i i i)第2の連結剤を含む第2の結合試薬を含む第3の容器で、前記第2の結合試薬が前記試料中の第2の分析対象物質に対して特異的である、および(i v)別個の容器、器もしくはコンパートメント入りで提供される、第2の補助連結剤を含む第2の標的物質相補体を含む第4の容器。

20

【0196】

さらに、本発明は、試料中の複数の異なる分析対象物質を測定するためのキットを提供するものであって、キットは以下のものを含む：(a)固体担体の第1の領域に固定化された第1の標的物質および固体担体の第2の領域に固定化された第2の標的物質を固体担体上に含む容器、器またはコンパートメント；ならびに(b)以下のものを含む2つ以上のさらなる容器、器またはコンパートメント：(i)第1の結合試薬が試料中の第1の分析対象物質に対して特異的である、第1の連結剤を含む第1の結合試薬、および補助連結剤を含む第1の標的物質相補体を含む第1の容器、ならびに(i i)第2の結合試薬が前記試料中の第2の分析対象物質に対して特異的である、第2の連結剤を含む第2の結合試薬、および第2の補助連結剤を含む第2の標的物質相補体を含む第2の容器。

30

【0197】

特定の実施形態において、本発明は、以下のものを含むキットを提供する：それぞれが第1および第2のオリゴヌクレオチドをそれぞれ含む複数の別個の結合ドメインを含む多ウエルプレートで、前記第1および第2のオリゴヌクレオチドが表1(a)および/または(b)に示す配列からなる群から選択される。

40

【0198】

キットは、複数の分析対象物質の結合アッセイを行う方法における多ウエルプレートの使用説明書も含み得るものであって、前記方法は、以下の工程を含む：

(a)前記複数の分析対象物質における第1の分析対象物質に対して特異的な第1の結合試薬および前記第1のオリゴヌクレオチドを含む第1の結合試薬複合体を形成する工程であって、前記第1の結合試薬が連結剤に結合し、前記第1のオリゴヌクレオチドが補助連結剤に結合し、前記第1の結合試薬複合体が前記連結剤と前記補助連結剤との間の反応

50

により形成される、工程と、

(b) 前記複数の分析対象物質における第1の分析対象物質に対して特異的な第2の結合試薬および前記第2のオリゴヌクレオチドを含む第2の結合試薬複合体を形成する工程であって、前記第2の結合試薬が第2の連結剤に結合し、前記第2のオリゴヌクレオチドが第2の補助連結剤に結合し、前記第2の結合試薬複合体が前記第2の連結剤と前記第2の補助連結剤との間の反応により形成される、工程と、

(c) 第1および第2の結合試薬複合体を、それぞれがそれぞれ第1のオリゴヌクレオチド相補体および第2のオリゴヌクレオチド相補体に連結された2つ以上の結合ドメインと、前記第1のオリゴヌクレオチドを前記第1のオリゴヌクレオチド相補体に、前記第2のオリゴヌクレオチドを前記第2のオリゴヌクレオチド相補体に結合させるのに十分な条件下で、混合する工程と、

(d) 前記複数の分析対象物質を含む試料を工程(c)で形成された混合物と混合する工程と、

(e) 複数のさらなる結合試薬を工程(d)で形成された混合物に加える工程であって、前記複数のさらなる結合試薬が(i)第1の分析対象物質および/または第1の結合試薬-第1の分析対象物質複合体に対して特異的な第1の検出試薬ならびに(ii)第2の分析対象物質および/または第2の結合試薬-第2の分析対象物質複合体に対して特異的な第2の検出試薬を含む、工程と、

(f) 前記結合ドメインに結合した第1および第2の分析対象物質の量を測定する工程

【0199】

1つの特定の実施形態において、多ウエルアッセイプレートは、最終使用者開発アッセイパネル、すなわち、プレートを用いるアッセイを行うために最終使用者の結合試薬を用いて最終使用者により構築されるアッセイパネルを構成するために用いることができる。この実施形態において、最終使用者は、どの結合試薬を各結合ドメインに結合させるかを指定する。第1の標的物質を含む第1の結合ドメインおよび第2の標的物質を含む第2の結合ドメインならびに、場合により、さらなる標的物質を含むさらなる結合ドメインを含む複数の別個の結合ドメインを含む多ウエルアッセイプレートを提供する。結合ドメインのそれぞれは、本明細書で述べたように、結合試薬複合体により複数の結合ドメインのそれぞれに結合する個々の結合試薬を選択することにより使用者により機能的にされる。別個のバイアル、容器またはコンパートメント入りで、第1の標的物質相補体、第2の標的物質相補体および場合によりさらなる標的物質相補体を含む一組の標的試薬(それぞれが連結剤に結合した)を提供する。第1の標的物質および第1の標的物質相補体ならびに第2の標的物質および第2の標的物質相補体は、それぞれ標的物質の第1および第2の対を構成する。同様に、あらゆるさらなる標的物質相補体は、結合ドメイン上の種々の標的物質と対を構成する。1つの好ましい実施形態において、標的物質および標的物質相補体は、オリゴヌクレオチド(すなわち、オリゴヌクレオチドおよびその相補体)である。この実施形態において、標的物質の第1および第2の対ならびに標的物質のさらなる対は、表1(a)および/または表1(b)に記載した配列のリストから選択される。

【0200】

したがって、使用者は、どの標的物質/標的物質相補体がそれぞれの特定の結合ドメインに結合するかを選択する。使用者はまた、どの結合試薬がそれぞれの特定の結合ドメインに結合し、指定の結合ドメインに結合した標的物質の標的物質相補体を含む結合試薬複合体を形成するかを選択する。

【0201】

キットは、使用者が補助連結剤を使用者の結合試薬に結合させるための試薬を備え得る。ビオチンが補助連結剤である場合、キットは、NHSエステルまたはヒドラジドまたはマレイミドのような反応性官能基で修飾されたビオチンを含み得る。プレートおよび/または標的試薬の組は、検出可能な標識を検出試薬のようなアッセイ成分に結合させるためのラベリングキットをさらに含み得る。例えば、多ウエルアッセイプレートが電気化学発

10

20

30

40

50

光反応を行うように構成されている場合、ラベリングキットは、S U L F O - T A G（商標）N H Sエステル、L C - ビオチンN H Sエステル、場合よるスピンカラムおよび場合よるラベリング緩衝液を含み得る。さらにE C L読み取り緩衝液ならびに場合よるアッセイおよび抗体希釈剤を提供することができる。

【0202】

標的試薬の組は、好ましくは多ウエルプレートに存在する結合ドメインの数に見合う量の標的試薬を含む。例えば、多ウエルプレートが10個の別個の結合ドメインを含む場合、10種の標的試薬の一组を当該多ウエルプレートについて使用する。

【0203】

標的物質は、補助連結剤に直接結合する連結剤、例えば、補助連結剤がビオチンである場合には、ストレプトアビジンまたはアビジンとともに提供することができる。連結剤および補助連結剤が架橋剤を介して連結されるように構成されている場合（例えば、連結および補助連結剤の両方がビオチンである場合）、キットは、結合試薬を標的物質相補体に結合させるために用いることができる架橋試薬溶液（例えば、ストレプトアビジンまたはアビジンの溶液）も備え得る。キットは、連結/架橋反応の適切な条件をもたらす反応緩衝液および反応停止溶液も備え得る。1つまたは複数の連結試薬がビオチンである場合、停止溶液は、連結剤、補助連結剤または架橋剤として存在するストレプトアビジンまたはアビジンにおける未使用のビオチン結合部位をブロックするための遊離のビオチンを含み得る。

10

【0204】

この実施形態において、使用者は、結合試薬、例えば、捕捉および検出抗体を供給し、どの結合試薬が結合ドメインのそれぞれに結合するかを指定する。結合試薬、例えば、捕捉抗体を、選択された連結剤、例えば、ビオチンにより標識し、補助連結剤、例えば、ストレプトアビジンを介して標的物質対のメンバーに結合させる。その間に、標的物質を選択された結合ドメインに結合させることによってプレートを準備する。修飾結合試薬は、表面に接触して、結合試薬により認識される分析対象物質のその後の結合アッセイに用いることができる表面に結合した結合試薬複合体を形成する。対象の分析対象物質は、結合ドメインを標識結合試薬と接触させ、当該結合ドメインに存在する標識の存在を測定することによって検出される。

20

【0205】

あるいは、多ウエルアッセイプレートを、例えば、入手可能な多重化アッセイパネルのカタログからの使用者の仕様に基づいて構成することができ、かつ/または使用者が一组の分析対象物質を選択して、当該一组の分析対象物質の使用者向けにカスタマイズされた多重化アッセイを構成することができる。多重化アッセイパネルは、個々のアッセイがともに十分に機能するように、選択し、最適化すべきである。例えば、試料は、アッセイする前に希釈を必要とし得る。試料マトリックス効果を最小限にし、パネルにおけるすべての分析対象物質がアッセイのダイナミックレンジ内にある可能性を最大限にするために、対象の特定の試料マトリックスの試料希釈度を所定のパネルについて最適化する。好ましい実施形態において、パネルにおけるすべての分析対象物質を少なくとも1つの試料型について同じ試料希釈度を用いて分析する。他の好ましい実施形態において、パネルにおけるすべての分析対象物質をほとんどの試料型について同じ希釈度を用いて測定する。

30

40

【0206】

所定の免疫測定法について、検出抗体の濃度および検出抗体のタンパク質当たりの検出可能な標識の数（L/P比）は、すべての分析対象物質の予想されるレベルを同じ試料希釈度での定量可能な範囲に入れるように調整する。所定の分析対象物質の定量可能な範囲の上限を増加させることを望む場合、L/P比を低下させ、かつ/または検出抗体濃度を低下させることができる。他方で、定量可能な範囲の下限を増加させることを望む場合、L/Pを増加させることができ、検出抗体濃度は、飽和レベルでなく、かつ/またはバックグラウンドシグナルを低下させることができる場合、増加させることができる。

【0207】

50

アッセイパネルとともに用いる校正標準は、パネルの推奨試料希釈度に対する適切な定量可能範囲を得るように選択する。校正標準は、パネルにおける既知濃度の1つまたは複数の分析対象物質を有する。未知試料中の分析対象物質の濃度は、これらの標準との比較により決定される。1つの実施形態において、校正標準は、アッセイパネルにより測定される異なる分析対象物質の混合物を含む。好ましくは、合成キャリブレータ (combined calibrator) 中の分析対象物質レベルは、各分析対象物質のアッセイシグナルが同等、例えば、2倍、5倍または10倍以内であるように選択する。他の実施形態において、校正標準は、複数の異なるアッセイパネルからの分析対象物質の混合物を含む。

【0208】

校正曲線は、例えば、直線当てはめ、4パラメーターロジスティック (4-PL) および5パラメーター (5-PL) 当てはめのような当該技術分野で公知の曲線当てはめを用いて校正標準とともに測定したアッセイシグナルに当てはめることができる。そのような当てはめを用いて、測定アッセイシグナルを計算当てはめにバックフィットすることにより未知試料中の分析対象物質の濃度を決定することができる。校正標準を用いた測定は、検出限界 (LOD)、定量限界 (LOQ)、ダイナミックレンジおよび直線性限界 (LOL) のようなアッセイ特性を決定するためにも用いることができる。

【0209】

多重化パネルの開発の一部として、キャリブレータおよび検出抗体の非特異的結合を低減するためにアッセイを最適化する。サンドイッチ免疫測定法において、特異性は、主として捕捉抗体結合によってもたらされる。多重化パネルを評価するためのいくつかの考慮すべき事項は、以下の事項を含む：(a) 捕捉抗体への検出抗体の非特異的結合をパネルにおけるアッセイのより低いバックグラウンドまで減少させる、これは、検出抗体の濃度およびL/Pを調整することによって達成することができる；(b) パネルにおける他のキャリブレータへの検出抗体の非特異的結合も望ましくなく、最小限にすべきである；(c) パネルにおける他のキャリブレータおよび他の関連分析対象物質の非特異的結合を最小限にすべきである；キャリブレータの非特異的結合が存在する場合、それは、パネルにおけるアッセイの全般的特異性を低下させることがあり得、また捕捉抗体に結合するキャリブレータの競合があるので、信頼できない結果ももたらし得る。

【0210】

1つの特定の実施形態において、キットは、アッセイプロトコルの適正な工程が順守されることを保証するための1つまたは複数の試薬をさらに含む。さらに、アッセイ工程の変動は、アッセイに無関係に測定することができる。この実施形態において、アッセイを行うために用いられる希釈剤で希釈された一連の相補的オリゴヌクレオチドがキットに備えられている。適正な工程が実施されているとき、種々の希釈剤中のオリゴヌクレオチドは、結合して、鎖を伸長させる。最終希釈剤は、アッセイの成功した処理の検出可能な指標となるリポーターまたは標識付きの最終の相補的オリゴヌクレオチドを含み得る。例えば、多ウエルプレートの第1の結合ドメインが配列Aを有するBSA-オリゴヌクレオチドで被覆されている。アッセイ希釈剤は、配列Aに相補的なオリゴヌクレオチド配列A' およびさらなる配列Bを含む。AとBは、互いに相互作用せず、それらの相補体とのみ特異的に相互作用する。最終希釈剤は、オリゴヌクレオチドBの相補体B' を含む補助オリゴヌクレオチドおよび検出可能な標識を含む。したがって、第1の結合ドメインからの検出可能なシグナルは、試料が加えられたことまたは検出部分が加えられたことを確認するために用いることができる。発生したシグナルは、適正な容積および濃度の試薬が加えられたかどうか、ならびに試料の取り扱い手順および/または装置の変動が存在したかどうかを検出するためにも用いることができる。方法に用いられるオリゴヌクレオチド鎖は、複数の重複配列を含み得る。

【0211】

パネルにおける異なるアッセイが異なるインキュベーション時間および最適な機能達成能力のための試料取り扱い要件を必要とし得る。したがって、目標は、パネルにおける大部分のアッセイについて最適化されているプロトコルを選択することである。アッセイプ

10

20

30

40

50

ロトコールの最適化は、1つまたは複数の以下のプロトコールパラメータを調節することを含むが、これに限定されない：タイミング（各工程のインキュベーション時間）、調製手順（キャリブレーション、試料、対照等）および洗浄工程の数。

【実施例】

【0212】

本発明のこれらおよび他の実施形態は、以下の非限定的な実施例で例示する。

【実施例1】

【0213】

直接アッセイ方式

直接アッセイ用の多ウエルプレートの調製および使用の手順を図2に例示する。実験レイアウト、すなわち、どのオリゴヌクレオチド配列を多ウエルアッセイプレートのどの結合ドメインに配置したかを示した。多ウエルアッセイプレートは、Meso Scale Diagnostics, LLC (Rockville, MD)の一部門であるMeso Scale Discoveryから入手した。それぞれの個別のオリゴヌクレオチド配列相補体の希釈標準溶液(550 μL)は、配列相補体の保存溶液をDiluent 100で約50倍希釈することによって調製した(オリゴヌクレオチド配列相補体の保存溶液およびDiluent 100は、Meso Scale Discoveryから入手できる)。

10

【0214】

各捕捉抗体は、図5(d)に示すように二官能性カップリング試薬(スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)-1-シクロヘキサンカルボキシレート(「SMCC」)および通常のカップリングプロトコールを用いて末端チオール基を有するオリゴヌクレオチドにより標識した。例えば、タンパク質をSMCCにおけるNHS-エステルと反応させて、タンパク質を標識し、得られた複合体をSMCCにおけるマレイミド基と反応するチオール化オリゴヌクレオチドと反応させる。次いで、一組の抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートのプールした溶液(50 μL)を多ウエルプレートの各ウエルのハイブリダイゼーション緩衝液に室温で1時間加えて、相補的オリゴヌクレオチド配列をハイブリダイズし、それにより、捕捉抗体を多ウエルプレートに固定化して、複数の結合試薬複合体を形成した。

20

【0215】

複数の分析対象物質を含む溶液(25 μLのMSD Diluent 2とMSD Diluent 2の25 μLキャリブレーション溶液)を調製済みプレートの各ウエルに加え、室温で1時間インキュベートし、PBSで3回洗浄し、一組の標識検出抗体(50 μLのMSD Diluent 3)を多ウエルプレートの各ウエルに加えた。プレートを振とうしながらインキュベートし、ウエルをPBSで3回洗浄し、150 μLのRead Buffer T(Meso Scale Discovery)を満たし、SECTOR(登録商標)Imager装置で分析した。

30

【0216】

このプロトコールを用いて、7プレックスケモカインパネルについてアッセイを行い、結果を図8(a)~(g)に示す。この実験でアッセイした分析対象物質は、エオタキシン、MIP-1b、TARC、IL-8、MCP-4、IP-10およびMCP-1(すべてがヒト分析対象物質)であった。さらに、このプロトコールを用いて、IFNg、IL-1b、IL-2、IL-4、IL-5、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-13およびINFα(すべてがヒト分析対象物質)を含む10プレックスTH1/TH2パネルについてアッセイを行った。両アッセイの結果をオリゴヌクレオチドリンカーが存在しない標準直接免疫測定法と比較した。

40

【実施例2】

【0217】

オリゴヌクレオチド-SAコンジュゲートを用いた間接アッセイ方式

オリゴヌクレオチド-SAコンジュゲートを用いた間接アッセイ用の多ウエルプレート

50

の調製および使用の手順を図9(a)~(c)に例示する。多ウエルアッセイプレートの実験レイアウトを実施例1と同様に示した。ストレプトアビジン(SA)に結合したそれぞれの個別のオリゴヌクレオチド配列相補体の希釈標準溶液(550 μ L)は、配列相補体の保存溶液をDiluent 100で約50倍希釈することによって調製した(オリゴヌクレオチド配列相補体の保存溶液およびDiluent 100は、Meso Scale Discoveryから入手できる)。ビオチニル化抗体の溶液をオリゴヌクレオチド配列相補体の所望の希釈標準溶液に加えて、一組の個別のビオチニル化捕捉抗体/オリゴヌクレオチド-SA混合物を調製した。混合物中のビオチニル化抗体の濃度は、約5~30 μ g/mLの範囲にあった。混合物を室温で30~45分間緩やかに混合した。50 μ Lのビオチン溶液(Meso Scale Discovery)(約3倍過剰のビオチン)をそれぞれの個別のビオチニル化抗体/オリゴヌクレオチド相補体混合物に加え、この混合物を室温で10~15分間緩やかに混合した。等量(550 μ L)の個別のビオチニル化抗体/オリゴヌクレオチド相補体を混ぜ合わせ、溶液の総容積を、コンジュゲーション緩衝液(pH7.4の0.1M EDTAを含むPBS)の添加により5500 μ Lに調整した。

【0218】

多ウエルプレートを室温まで加温した(約10分)。50 μ Lのビオチニル化抗体/オリゴヌクレオチド相補体をプレートの各ウエルに加えた。プレートを接着シールで覆い、プレート振とう機上で室温で1時間インキュベートした。各ウエルをリン酸緩衝生理食塩水(PBS、3X)で洗浄した。

【0219】

複数の分析対象物質を含む溶液(25 μ LのMSD Diluent 2とMSD Diluent 2の25 μ Lキャリブレーション溶液)を調製済みプレートの各ウエルに加え、室温で1時間インキュベートし、PBSで3回洗浄し、一組の標識検出抗体(50 μ LのMSD Diluent 3)を多ウエルプレートの各ウエルに加えた。プレートを振とうしながらインキュベートし、ウエルをPBSで3回洗浄し、150 μ LのRead Buffer T(Meso Scale Discovery)を満たし、SECTOR(登録商標)Imager装置で分析した。

【実施例3】

【0220】

ニートSA/ビオチニル化オリゴヌクレオチドを用いた間接アッセイ方式

ビオチニル化捕捉抗体、ニートストレプトアビジンおよびビオチニル化オリゴヌクレオチドを用いた間接アッセイ用の多ウエルプレートの調製および使用の手順を図10(a)~(c)に例示する。多ウエルアッセイプレートの実験レイアウトを実施例1と同様に示した。ストレプトアビジン(SA)に結合したそれぞれの個別のオリゴヌクレオチド配列相補体の過剰の希釈標準溶液(550 μ L)は、配列相補体の保存溶液をDiluent 100で約50倍希釈することによって調製した(オリゴヌクレオチド配列相補体の保存溶液およびDiluent 100は、Meso Scale Discoveryから入手できる)。ビオチニル化抗体の溶液をオリゴヌクレオチド配列相補体の所望の希釈標準溶液に加えて、一組の個別のビオチニル化捕捉抗体/オリゴヌクレオチド-SA混合物を調製した。混合物中のビオチニル化抗体の濃度は、約5~30 μ g/mLの範囲にあった。混合物を室温で30~45分間緩やかに混合した。50 μ Lのビオチン溶液(Meso Scale Discovery)(約3倍過剰のビオチン)をそれぞれの個別のビオチニル化抗体/オリゴヌクレオチド相補体混合物に加え、この混合物を室温で10~15分間緩やかに混合した。等量(550 μ L)の個別のビオチニル化抗体/オリゴヌクレオチド相補体を混ぜ合わせ、溶液の総容積を、コンジュゲーション緩衝液(Meso Scale Discoveryから入手できる)の添加により5500 μ Lに調整した。

【0221】

多ウエルプレートを室温まで加温した(約10分)。50 μ Lのビオチニル化抗体/オ

リゴヌクレオチド相補体をプレートの各ウエルに加えた。プレートを接着シールで覆い、プレート振とう機上で室温で1時間インキュベートした。各ウエルをリン酸緩衝生理食塩水(PBS、3X)で洗浄した。

【0222】

複数の分析対象物質を含む溶液(25 μ LのMSD Diluent 2とMSD Diluent 2の25 μ Lキャリブレーション溶液)を調製済みプレートの各ウエルに加え、室温で1時間インキュベートし、PBSで3回洗浄し、一組の標識検出抗体(50 μ LのMSD Diluent 3)を多ウエルプレートの各ウエルに加えた。プレートを振とうしながらインキュベートし、ウエルをPBSで3回洗浄し、150 μ LのRead Buffer T(Meso Scale Discovery)を満たし、SECTOR(登録商標)Imager装置で分析した。

10

【実施例4】

【0223】

7プレックスサイトカインBパネルを用いた3種のアッセイ方式の比較結果

7プレックスサイトカインBパネル(IL-8、hTNF-a、hEotaxin-3、h-Eotaxin、hMCP-1、HIP-10およびhMIP-1a)を実施例1、2および3で述べたアッセイ方式、すなわち、直接、オリゴヌクレオチド-SAコンジュゲートを用いた間接およびニートSA/ビオチニル化オリゴヌクレオチドを用いた間接アッセイ方式で試験した。アッセイのLOD値は、25標準偏差を仮定する8ポイント校正曲線から推定した。結果を図11(a)~(g)に示す。直接および間接アッセイ方式のLOD値を、すべての試験したアッセイについて標準受動吸着および免疫測定法で観測されたLOD値と比較している。ニートSAを用いた間接アプローチは、LOD値のかなりの広がりを示し、一部のアッセイIL-8およびHIP-10は、残りのアッセイ方式と比較してより高いLOD値を示したが、エオタキシンMIP-10は、より低いLOD値を示した。

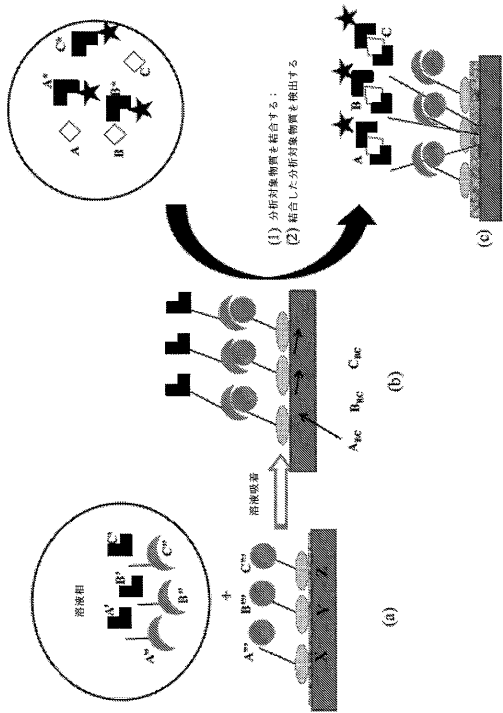
20

【0224】

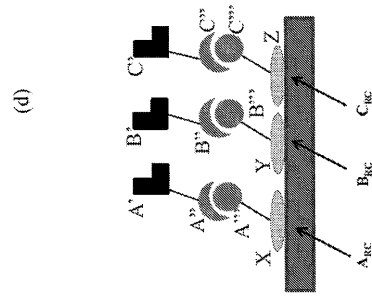
本発明は、本明細書で述べた特定の実施形態による範囲に限定されるものではない。実際、前述の説明および添付図面から、本明細書で述べたものに加えて、方法の様々な修正が当業者には明らかになるであろう。そのような修正は、特許請求の範囲内に入るものとする。様々な刊行物が本明細書において引用されており、その開示は、参照によってその全体として組み入れる。

30

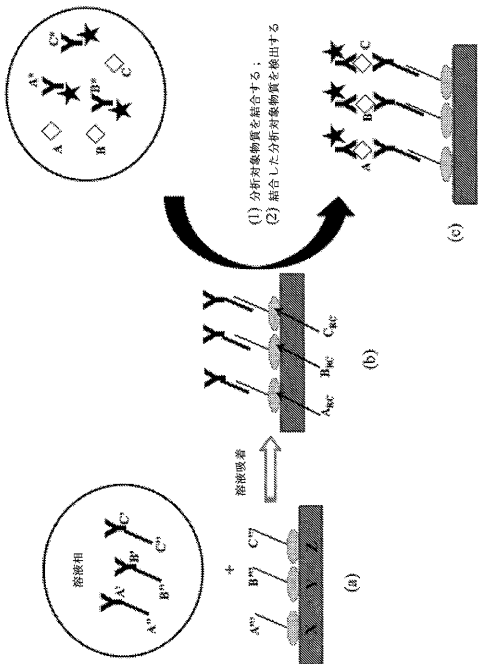
【 図 1 - 1 】



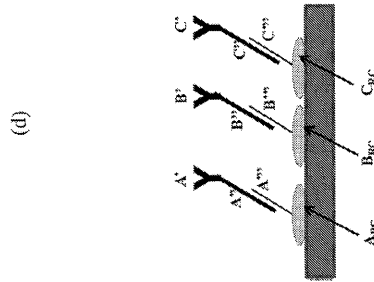
【 図 1 - 2 】



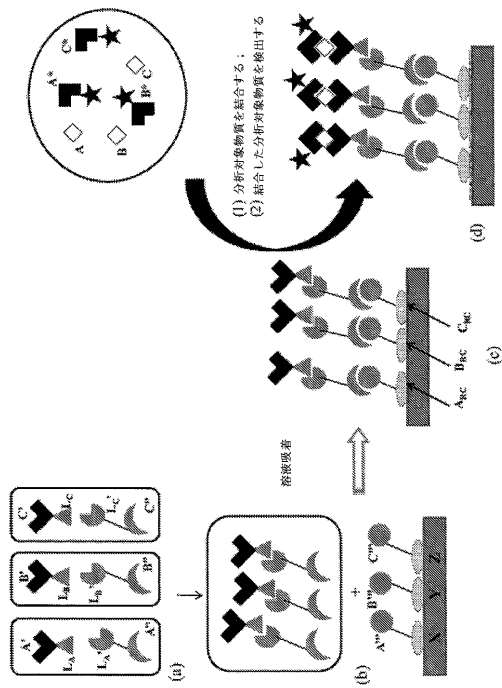
【 図 2 - 1 】



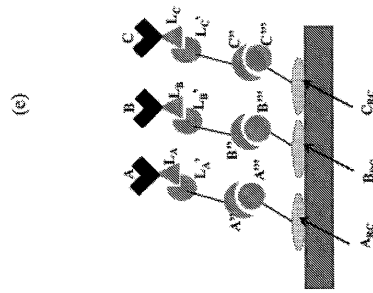
【 図 2 - 2 】



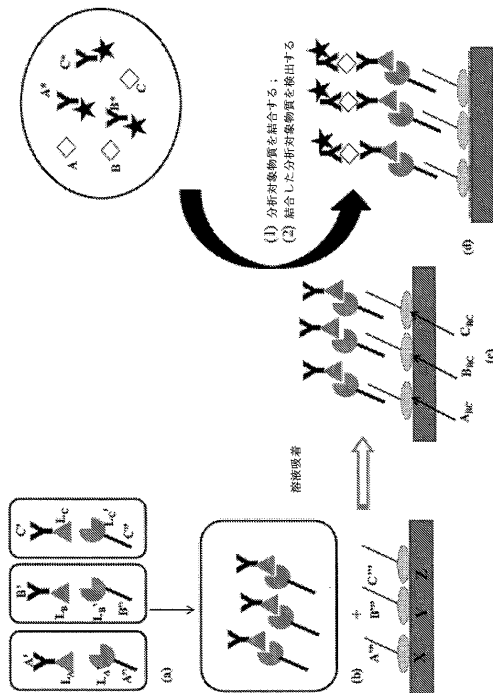
【 図 3 - 1 】



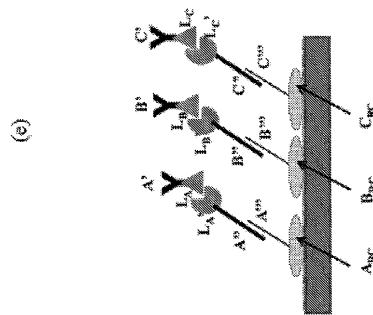
【 図 3 - 2 】



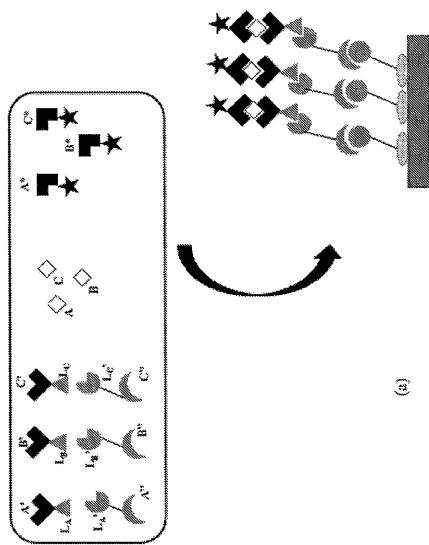
【 図 4 - 1 】



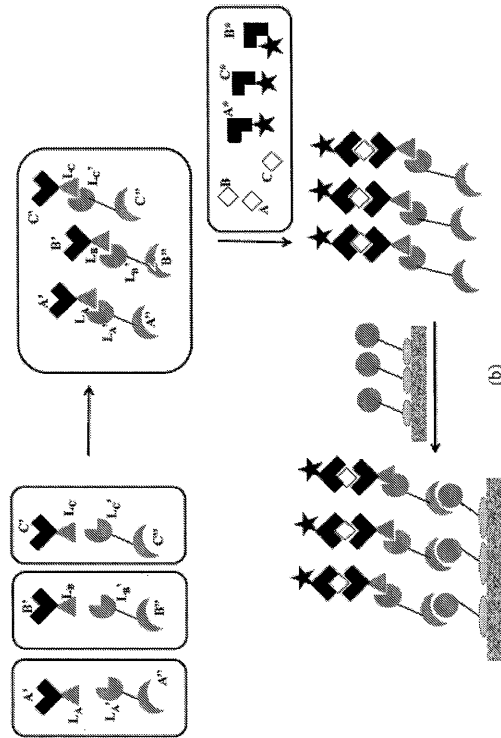
【 図 4 - 2 】



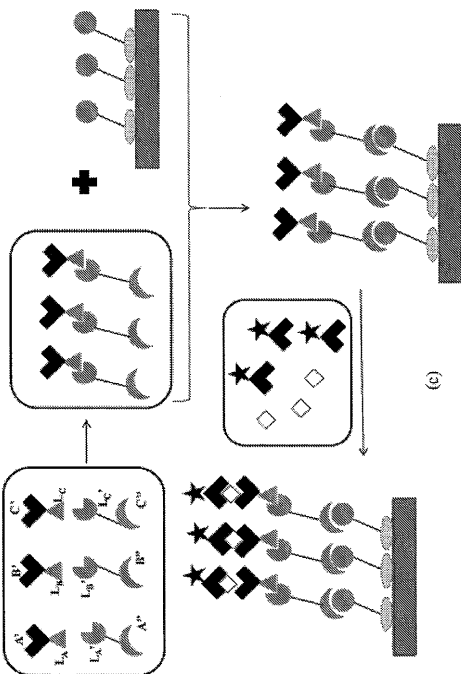
【 図 5 - 1 】



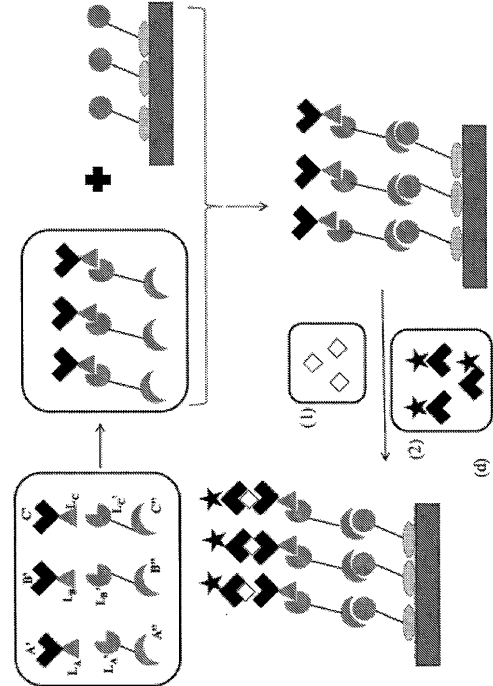
【 図 5 - 2 】



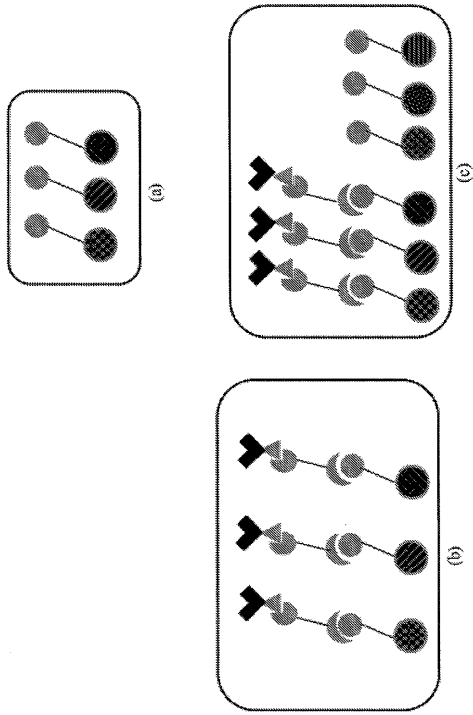
【 図 5 - 3 】



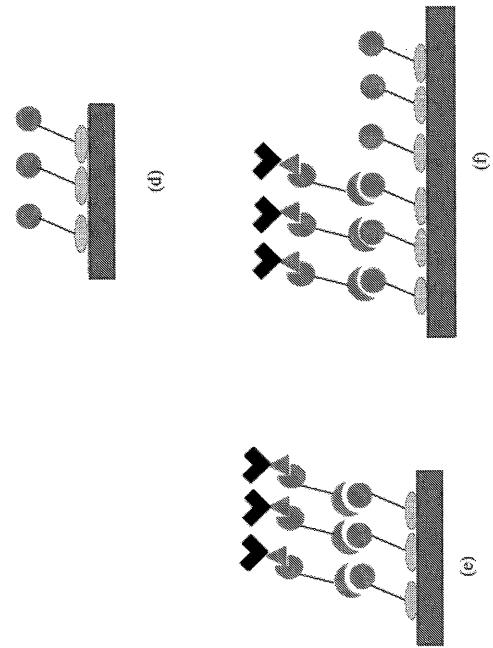
【 図 5 - 4 】



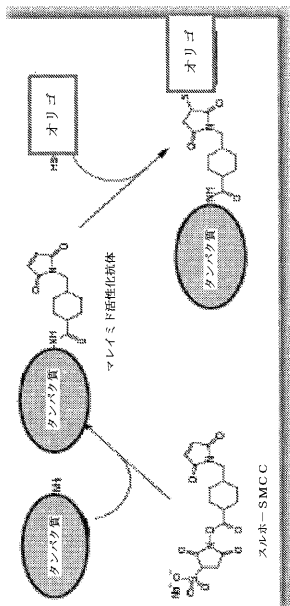
【 図 6 - 1 】



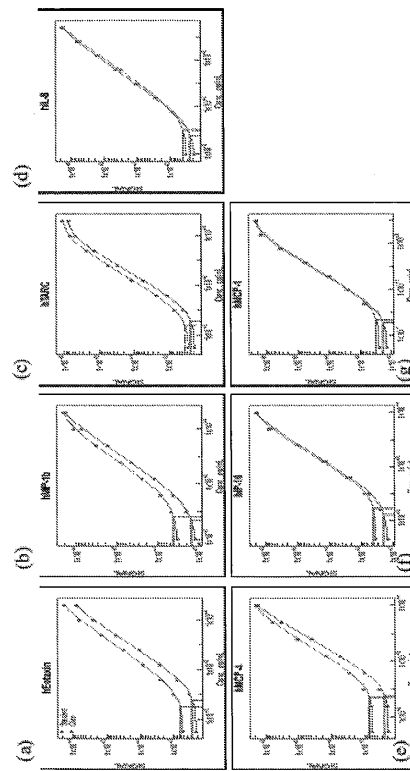
【 図 6 - 2 】



【 図 7 】



【 図 8 】





10プレックス TH1 / TH2 の推定 LOD 値

| LOD, pg/mL | hIFNG | hIL-1b | hIL-2 | hIL-4 | hIL-5 | hIL-6 | hIL-10 | hIL-12p70 | hIL-13 | hTNFa |
|----------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------|--------|-------|
| 標準 | 0.18 | 0.54 | 0.50 | 0.71 | 0.15 | 0.081 | 0.39 | 1.1 | 2.4 | 0.12 |
| 10プレックスオリゴ発現吸着 | 0.37 | 0.43 | 0.58 | 0.22 | 0.17 | 0.062 | 0.35 | 0.63 | 4.2 | 0.24 |

【配列表】

2016511417000001.app

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US2014/022948 |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/483(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/53; G01N 33/537; G01N 27/26; G01N 33/543; C07K 17/00; C12Q 1/68; C40B 30/04; G01N 33/483; C12N 15/11 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: multiplexed binding assay, user-defined, linking agent | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | NCBI, GenBank accession no. BP608643.1 (09 February 2011) See the whole sequence. | 70 |
| Y | | 71-78 |
| A | | 1-49, 51-69 |
| X | NCBI, GenBank accession no. DN155865.1 (30 December 2010) See the whole sequence. | 70 |
| Y | | 71-78 |
| X | NCBI, GenBank accession no. CP000925.1 (10 March 2008) See the whole sequence. | 70 |
| Y | | 71-78 |
| X | NCBI, Reference sequence no. XM_002283694.2 (07 December 2011) See the whole sequence. | 70 |
| Y | | 71-78 |
| A | US 2010-0261292 A1 (GLEZER et al.) 14 October 2010 See the whole document. | 1-49, 51-78 |
| A | US 2006-0134712 A1 (STROMGREN et al.) 22 June 2006 See the whole document. | 1-49, 51-78 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search 05 August 2014 (05.08.2014) | | Date of mailing of the international search report 11 August 2014 (11.08.2014) |
| Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140 | | Authorized officer KIM, Seung Beom Telephone No. +82-42-481-3371  |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/022948

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims 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. Claims Nos.: 50
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

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 fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
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.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/022948

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | US 7422855 B2 (DICESARE) 09 September 2008 See the whole document. | 1-49, 51-78 |
| A | US 2011-0306511 A1 (LEA) 15 December 2011 See the whole document. | 1-49, 51-78 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2014/022948

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|--|--|
| US 2010-0261292 A1 | 14/10/2010 | EP 2417455 A2 EP 2417455 A4 WO 2010-118411 A2 WO 2010-118411 A3 | 15/02/2012 03/10/2012 14/10/2010 31/03/2011 |
| US 2006-0134712 A1 | 22/06/2006 | US 2010-0159490 A1 US 7704730 B2 US 8236555 B2 US 8530230 B2 | 24/06/2010 27/04/2010 07/08/2012 10/09/2013 |
| US 7422855 B2 | 09/09/2008 | CA 2565967 A1 EP 1774033 A2 EP 1774033 A4 US 2006-003366 A1 WO 2005-123959 A2 WO 2005-123959 A3 | 29/12/2005 18/04/2007 23/04/2008 05/01/2006 29/12/2005 24/05/2007 |
| US 2011-0306511 A1 | 15/12/2011 | AU 2009-335612 A1 CA 2647953 A1 CA 2748707 A1 CN 102388306 A EP 2382468 A1 EP 2382468 A4 JP 2012-514184 A US 2013-0165335 A1 WO 2010-075632 A1 | 08/07/2010 29/06/2010 08/07/2010 21/03/2012 02/11/2011 11/07/2012 21/06/2012 27/06/2013 08/07/2010 |

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)

| | | |
|---------|--------|---------|
| G 0 1 N | 33/543 | 5 1 1 A |
| G 0 1 N | 33/543 | 5 7 5 |
| G 0 1 N | 33/543 | 5 4 1 A |
| G 0 1 N | 33/483 | F |

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

(72) 発明者 サディーブ・クマ
 アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 8 6 . ゲイザースパーク . アイビーブリッジコート 2 0 4 2 7

(72) 発明者 パンカジ・オベロイ
 アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 5 0 . ロックビル . ツリーモントウェイ 3 0 6

(72) 発明者 ジョージ・シーガル
 アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 5 3 . ロックビル . トレイルウェイドライブ 5 3 3 3

(72) 発明者 マイケル・ツイオンスキー
 アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 5 5 . ダーウッド . レインズドライブ 1 9 0 3 7

F ターム(参考) 2G045 AA25 FB05 FB13 GC15

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于进行多重测定的改进方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2016511417A | 公开(公告)日 | 2016-04-14 |
| 申请号 | JP2016501106 | 申请日 | 2014-03-11 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 梅索磅秤技术有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 尺度科技有限责任公司 | | |
| [标]发明人 | イーライエヌグレザー サディー・クマ パンカジオペロイ ジョージシーガル マイケルツイオンスキー | | |
| 发明人 | イーライ・エヌ・グレザー サディー・クマ パンカジ・オペロイ ジョージ・シーガル マイケル・ツイオンスキー | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/543 G01N33/483 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/6816 G01N33/54306 G01N33/54353 C12Q2563/131 B01L3/50853 B01L2300/021 B01L2300/043 B01L2300/0609 B01L2300/0829 C12Q1/6804 C12Q1/6876 G01N33/6845 G01N2458/10 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.D G01N33/53.U G01N33/543.525.U G01N33/543.525.E G01N33/543.525.W G01N33/543.511.A G01N33/543.575 G01N33/543.541.A G01N33/483.F | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA25 2G045/FB05 2G045/FB13 2G045/GC15 | | |
| 優先権 | 61/775860 2013-03-11 US 61/778727 2013-03-13 US | | |
| 其他公开文献 | JP2016511417A5 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

| | | | | |
|--|------------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------|
| 摘要(译) 本发明涉及进行固相结合测定的方法。一个实例是具有改进的分析物特异性的测定方法，其中特异性受到非特异性结合相互作用的限制。 | (21) 出願番号 | 特願2016-501106 (P2016-501106) | (71) 出願人 | 505243216 |
| | (86) (22) 出願日 | 平成26年3月11日 (2014.3.11) | | メソ スケール テクノロジーズ エルエルシー |
| | (85) 翻訳文提出日 | 平成27年10月22日 (2015.10.22) | | アメリカ合衆国メリーランド州20850 |
| | (86) 国際出願番号 | PCT/US2014/022948 | | , ロックビル, リサーチ・ブルバード |
| | (87) 国際公開番号 | W02014/164594 | | 1601 |
| | (87) 国際公開日 | 平成26年10月9日 (2014.10.9) | | (74) 代理人 100127926 |
| | (31) 優先権主張番号 | 61/775,860 | | 弁理士 結田 純次 |
| | (32) 優先日 | 平成25年3月11日 (2013.3.11) | | (74) 代理人 100140132 |
| | (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 竹林 則幸 |
| | (31) 優先権主張番号 | 61/778,727 | | (72) 発明者 |
| (32) 優先日 | 平成25年3月13日 (2013.3.13) | | イーライ・エヌ・グレザー | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | アメリカ合衆国メリーランド州92014 | |
| | | | , デルマー, ドゥランゴドライブ1374 | |
| | | | 6 | |