

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-501564

(P2005-501564A)

(43) 公表日 平成17年1月20日(2005.1.20)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I		テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68</b>	C 1 2 Q 1/68	A	4 B O 2 4
<b>G O 1 N 33/53</b>	G O 1 N 33/53	M	4 B O 6 3
<b>G O 1 N 33/566</b>	G O 1 N 33/566		
// <b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 85 頁)

(21) 出願番号	特願2003-525668 (P2003-525668)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成14年8月24日 (2002. 8. 24)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月27日 (2004. 2. 27)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/009496		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02003/020967		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成15年3月13日 (2003. 3. 13)		グレンツアーヘルストラツセ124
(31) 優先権主張番号	01120466.6	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成13年8月28日 (2001. 8. 28)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100077517
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), AU, BR, CN, CZ, JP, KR, MX, PL, SG, US		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複数分析物の測定方法

## (57) 【要約】

本発明は、特異的結合パートナーを用いての少なくとも3種の分析物の決定方法に向けられる。検出可能ラベルの組合せが、個々の結合パートナー分子がわずか1種の検出可能ラベルにより結合されることを確認する結合パートナーに結合される。これは、有用なラベルの範囲を制限しないことによって、使用される異なったラベルよりも多くの異なった分析物の決定を可能にする。本発明はまた、キット、組成物及びそれらの使用にも関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも 3 種の分析物の測定方法であって、

a) 前記少なくとも 3 種の分析物を含むか、又は 1 又は複数の前記分析物を含むののではないかと推測されるサンプル、及び少なくとも 3 種の異なった結合パートナーの混合物を、

前記分析物への前記結合パートナーの特異的結合を可能にする条件下で供給し、ここで

- 前記少なくとも 3 種の結合パートナーの第 1 のパートナーが前記少なくとも 3 種の分析物の第 1 の分析物に対して特異的であり、そして第 1 のラベルに結合され、

- 前記少なくとも 3 種の結合パートナーの第 2 のパートナーが前記少なくとも 3 種の分析物の第 2 の分析物に対して特異的であり、そして第 2 のラベルに結合され、前記ラベルは前記第 1 の結合パートナーに結合されるラベルから別々に検出でき、そして

- 前記少なくとも 3 種の結合パートナーの第 3 のパートナーが前記少なくとも 3 種の分析物の第 3 の分析物に対して特異的であり、それにより、第 1 量の前記第 3 の結合パートナーが前記第 1 の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合され、そして第 2 量の前記第 3 の結合パートナーが前記第 2 の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合され、そして

前記第 1 量の第 3 の結合パートナーが結合第 2 の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合されず、そして前記第 2 量の第 3 の結合パートナーが前記第 1 の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合されず、

b) 前記第 1 及び第 2 のラベルを示すシグナル強度を検出し、

c) 段階 b) において検出される前記シグナル強度を用いて、前記サンプルに存在する分析物を測定する段階を含んで成る、前記分析物が増幅された核酸であることを特徴とする方法。

## 【請求項 2】

前記異なった結合パートナーが、核酸配列特異的プローブであることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

前記核酸が、PCRを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 又は 2 の方法。

## 【請求項 4】

前記ラベルが相同的に検出されることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 5】

前記ラベルが、蛍光エネルギートランスファーを用いて検出されることを特徴とする請求項 4 記載の方法。

## 【請求項 6】

前記第 1、第 2 及び第 3 の結合パートナーの第 1 のパートナーが HIV に対して特異的であり、第 2 の結合パートナーが HCV に対して特異的であり、そして第 3 の結合パートナーが HBV に対して特異的であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 7】

第 1 の結合パートナーが HIV - 1 - M に対して特異的であり、第 2 の結合パートナーが HIV - 1 - O に対して特異的であり、第 3 の結合パートナーが HIV - 2 に対して特異的であり、第 4 の結合パートナーが HCV に対して特異的であり、第 5 の結合パートナーが HBV に対して特異的であり、そして第 6 の結合パートナーが HAV に対して特異的であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 8】

- 第 1 のラベルに結合される第 1 の分析物に対して特異的な第 1 の結合パートナー、

- 前記第 1 の結合パートナーに結合されるラベルから別々に検出できる第 2 のラベルに結合される第 2 の分析物に対して特異的な第 2 の結合パートナー、及び

- 第 3 の分析物に対して特異的な第 3 の結合パートナー（これにより、第 1 量の前記第 3 の結合パートナーが前記第 1 の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合され、そ

して第2量の前記第3の結合パートナーが前記第2の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合され、そして前記第1量の第3の結合パートナーが結合第2の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されず、そして前記第2量の第3の結合パートナーが前記第1の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されない)を含んで成る、前記分析物が増幅された核酸であることを特徴とする組成物。

【請求項9】

- 第1のラベルに結合される第1の分析物に対して特異的な第1の結合パートナー、  
- 前記第1の結合パートナーに結合されるラベルから別々に検出できる第2のラベルに結合される第2の分析物に対して特異的な第2の結合パートナー、及び  
- 第3の分析物に対して特異的な第3の結合パートナー(これにより、第1量の前記第3の結合パートナーが前記第1の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合され、そして第2量の前記第3の結合パートナーが前記第2の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合される)を、1又は複数の容器に含む、増幅された核酸であることを特徴とする少なくとも3種の分析物の測定のためのキット。

10

【請求項10】

前記1つの容器又は1又は複数の追加の容器に、前記分析物に対する前記結合パートナーの特異的結合のための手段をさらに含む請求項9記載のキット。

【請求項11】

前記1つの容器又は1もしくは複数の追加の容器に、核酸増幅のための試薬をさらに含む請求項9又は10記載のキット。

20

【請求項12】

サンプルにおける少なくとも3種の分析物の測定のためへの次の少なくとも3種の結合パートナーの使用であって、ここで前記結合パートナーは、

- 第1のラベルに結合される第1の分析物に対して特異的な第1の結合パートナー、  
- 前記第1の結合パートナーに結合されるラベルから別々に検出できる第2のラベルに結合される第2の分析物に対して特異的な第2の結合パートナー、及び  
- 第3の分析物に対して特異的な第3の結合パートナー(これにより、第1量の前記第3の結合パートナーが前記第1の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合され、そして第2量の前記第3の結合パートナーが前記第2の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合され、そして前記第1量の第3の結合パートナーが結合第2の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されず、そして前記第2量の第3の結合パートナーが前記第1の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されず)を含んで成る、前記分析物が増幅された核酸であることを特徴とする使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分析物特異的結合パートナーを用いての複数分析物の測定方法に向けられ、ここで前記結合パートナーは使用される異なった結合パートナーよりも少ない異なったラベルによりラベルされる。さらに、本発明は、それらの異なったラベルされた結合パートナーを含む組成物、及び複数の分析物の測定及び適切なキットへのそのような組成物の使用に向けられる。

40

【背景技術】

【0002】

サンプルにおける分析物の測定は、特にヘルスケア、栄養学及び生態学の分野において特定の重要性を獲得して来た。分析物に依存して、決定のための異なった方法が使用され得る。小分子、例えば金属イオン、糖モノマー、アミノ酸はしばしば、それらの化学的又は物理的性質により、決定される。タンパク質及び核酸ポリマーのような高分子量を有する分析物はまた、それらへの特異的親和性を有する結合パートナーを用いて決定され得る。有用な結合パートナー対は、抗体-抗原、基質-酵素、核酸-相補的核酸、糖-レクチンである。

50

## 【0003】

抗原性質を示す特定タンパク質を決定することが意図される場合、特異的抗体がその決定のために使用され得る。特定核酸配列の測定に関しては、相補的配列を有する核酸プローブが使用され得る。そのような結合アッセイ及び適切なプロトコールは、当業者において良く知られており、そして文献において十分に説明されている。例えば、Sambrook など、1985, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames and S.J. Higgins, eds. 1984) 及び a series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)を参照のこと。

## 【0004】

特定の結合パートナー - 分析物複合体の検出を可能にするためには、結合パートナーをラベルすることが通常であり、それにより、それらのラベルは、それらのラベルに結合する追加の試薬を用いて（例えば、アビジン - ホースラディッシュペルオキシダーゼ接合体及び検出のための適切な酵素 - 基質反応を用いて検出されるラベルとしてビオチンを用いて）、直接的に又は間接的に検出され得る。適切なラベルは、当業界において知られている。

10

## 【0005】

多くの場合、特に診断分野においては、明確な情報について完全に理解するために複数の分析物を決定することが必要である。例えば、トラコーマクラミジア (*Chlamydia trachomatis*) 感染を有する患者に関しては、医者は通常、トラコーマクラミジアについてのみならず、またネisseria・ゴノルホエア (*Neisseria gonorrhoeae*) 感染について調べるであろう。また、患者のHLAパターンを確立する場合、いくつかの異なったHLA遺伝子座の対立遺伝子を決定する必要がある。

20

## 【0006】

複数の分析物結合アッセイを行う場合、使用されるラベルに注意を払うべきである。第1の場合、同じラベルがすべての異なった結合パートナーのために使用される。この場合、2種の他の形式が分化されるべきである。すべての結合反応が1つの反応において一緒に行われる場合、正の結果は、サンプルに存在する少なくとも1つの分析物が存在することを単に示す。もう1つの手段として、連続的反応を行うか、又は同時の反応形式を用いることによって、個々の結合反応を分離することができる。例えば、適切な形式は、マイクロタイプレート又はドット - プロット - アッセイである。そのような形式を用いる方法は当業界において知られている。そのような形式は、時間がかかり、そして高められた費用及び汚染の危険性をもたらす多くの取扱段階を必要とする。バイオチップを用いてのより高性能の方法は非常に高価であり、そして特に核酸増幅の分野においては、汚染に関して取り扱うことは困難である。

30

## 【0007】

わずか1つの結果及び/又は検出反応内のいくつかの分析物の別々の検出を可能にするためには、異なった特異的結合パートナーが、別々に検出され得る異なったラベルを用いてラベルされ得る。そのようなラベル及び使用できる検出方法は、当業界において良く知られている。例えば、その光学的発光スペクトルにより検出され得るラベルを使用することができ、それにより個々のラベルは異なった発光スペクトルを有する。

40

## 【0008】

しかしながら、高い感受性で且つ十分に安定して、別々に検出できる無限の数の適切なラベルが存在しないので、そのようなアッセイは、少数の分析物のみの決定に実際的には制限されることが示されるべきである。適切な稀土類ラベルの場合、時間 - 解決された蛍光測定法のための高価且つ高い糖度の検出器が必要である。それらの制限は、相同検出方法に関して、特に重要なものである。そのような形成は、通常、複数の検出シグナルを正しく解釈することを困難にする、分析物に特異的に結合されない結合パートナーを排除する洗浄段階の欠乏のために高いシグナルバックグラウンドを有する。

## 【0009】

多くの光学的チャネルを特徴とする検出器に関する複数のラベリングが、多くの研究者に

50

より使用されて来た。例えば、Vetなど。(PNAS 96, 6394-6399 (1999))は、4種の異なった標的物に対して相補的な4種の特定のプローブ(Molecular Beacons)が4種の異なったレポーター色素(それぞれ1つの色素)によりラベルされる方法論を使用する。個々の色素の全蛍光スペクトルがコンピューターに記憶され、そして複雑な複合結果を解釈するために使用される。これは、スペクトル寄与分析を通して同時感染を解決できるような要求に対処するために、非常に精巧なソフトウェアを必要とする。

#### 【0010】

これは、最大の獲得に基づいて個々の特定の色素(光学的チャネル)のためにそれぞれ異なった色素からの蛍光シグナルの標準化、すなわち通常のベースでシグナル分布できるように、参照色素に基づいて異なった光学的チャネルを通さないで、その対応するプラトーに関連するチャネル-特異的成長曲線の標準化を包含する。他の例は、Josephssonなど。(J. Clin. Microbiol. 37/3, 490-496 (1999); アッセイ当たり3個までの標的物に関して3個までの異なってラベルされたMolecular Beacons), 及びMercierなど。(J. Virol. Methods 77, 1-9 (1999); アッセイ当たり2個の標的物に関して2個の異なってラベルされたプローブ)を包含する。

10

#### 【0011】

明確な数のラベルにより検出できる分析物の数を高めるために、また結合パートナーのラベリングの組み合わせが使用され得る。1つの明確なラベルが結合される結合パートナーの他に、また単一のラベルされた結合パートナーにまた結合される同じ種類のラベルを用いて複数のラベルにより結合されるパートナーが使用される。例えば、3種の異なったラベルを用いて、ラベルの7種の組み合わせが可能であり、それによりまた、7種の異なった分析物が検出され得る。類似する原理を用いての現場ハイブリダイゼーション方法は、T. Riedなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89, pp. 1388-1392 (1992)により記載される。

20

#### 【0012】

PCR及び続くプローブハイブリダイゼーションアッセイを用いてのサンプルにおける7種の異なったヒト乳頭腫ウイルス型の決定のための類似する方法が、Samiotakiなど., Analytical Biochemistry Vol. 253, p. 156-161 (1997)により記載される。このためには、オリゴヌクレオチドは、多くのキレート分子により5'-末端で修飾される。続いて、個々のキレート単位は1つの及び同じ種類の稀土類金属、又は3種までの稀土類イオンの調節された混合物のいずれかにより満たされる。従って、複合体化により固定される1以上の種類のイオンの場合、複数の蛍光稀土類キレート("色素混合物")が、1つの及び同じプローブ分子に結合される。そのようなプローブは、合成するのには容易ではなく、そして均質増幅/検出形式においては、良好には適用できない(あったとしても)。

30

#### 【0013】

組み合わせラベリングへの他の多くの技術的アプローチが存在する。Ballardなど.(アメリカ特許第5,759,781号)、Speicherなど.(Nat. Genetics 12, 368-375 (1996))及びRiedなど.(PNAS 89, 1388-1392 (1992))は、アッセイ形式を開発しており、ここで個々の特異的プローブは、所定のプローブのすべてのコピーが組み合わせ態様で1又は複数の明確な蛍光団を担持するので、そのラベリング特徴により知られている。ラベリングは、化学的オリゴヌクレオチド合成よりも、プローブ分子当たりに組み込まれるラベルの数に関して、低い精度であるニックトランスレーションにより行われ、すなわち前記方法は、別々の分布の正確な分析に役に立たない。従って、専門家は、核酸増幅においてそのようなプローブを使用せず、特に均質増幅方法においては使用しない。

40

#### 【0014】

Tongなど.(Nat. Biotechnology 19, 756-759 (2001))により記載される、いわゆるCFETプローブは、適用の主に異なった企画及び態様を有する。1~3個の色素が、散在される正確に調節された数でスペーサー単位を伴って、プローブ分子により5'末端に結合される。オリゴヌクレオチド成分は、3'末端側の最後の色素又はスペーサーの後に続く。Ballardなどによれば、異なったプローブ型の混合物が存在する。スペーサーは、電気泳動移

50

動性及び共鳴強度のためのチューナーとして機能する。後者は特定のプローブの蛍光特徴に影響を与える。

【0015】

プローブは通常の波長で励起し、そして記録されるシグナルは、細管電気泳動図における位置により、及び特定位置での完全な発光スペクトルのオーバーレイ及びデジタル比として直接的に設定されるラベルの成分からの相対的寄与の計算により解明される。再び、反応座標にそって運動学的に補正され、そして標準化されたシグナル自体のシグナル分布分析が存在せず、“同じ/異なったラベル”のオリゴヌクレオチド企画が存在せず、そしてプローブ形状又は構成を変える生化学的反応の結果としてのシグナル生成が存在しない。

【0016】

結合パートナー分子当たり1つよりも多くのラベルによる結合パートナーのラベリングは、いくつかの欠点を生む。そのような複数のラベルされた結合パートナーは、合成においてかなり労力を要し（そして費用がかかる）、そしてラベルの立体的妨害が生じ、これがその分析物への結合パートナーの結合の効力、又は結合されるラベルの検出を低めることができる。また、結合パートナーに結合されるラベル間で、誤った結果を導く相互作用が生じる。これは、光学的ラベルを用いる場合、適切である。例えばTaqManアッセイ（アメリカ特許第5,210,015号、EP0543942号）に使用されるように、蛍光エネルギートランスファーラベルを用いて均質検出方法を行う場合、確かに特に重要なものである。

従って、既知方法の欠点のすべて又は一部を回避する複数分析物の決定のための方法を改良することが本発明の目的である。

【発明の開示】

【0017】

本発明の主要観点は、測定される分析物よりも少ないラベルを用いての複数分析物の測定方法に関する。これは、いくつかの標的物のための特定プローブ分析の全体的集団を特定の色素によりそれぞれラベリングすることによって達成され、ここで他の標的物に関しては、前記特定プローブの集団の1の部分が所定の色素によりラベルされ、そして前記集団の他の部分が異なった色素（混合しての同じ配列/異なったラベルオリゴヌクレオチド）によりラベルされる。好ましくは、均質（溶液 - 相）同時増幅アッセイ（例えば、PCR又はTMAによる）を行い、すべての種類の適切なノイズについて得られるシグナルを補正し、そして対照色素に基づいて異なったラベルからのシグナルを標準化することによって、標的物は多チャンネル検出器において集められた、処理されたシグナルの分布から推定され得る。このためには、ラベルの組み合わせが使用される。

【0018】

例えば、3種の分析物を決定する場合、わずか2種の異なった検出できるラベルが必要である。第1のラベルは、第1の分析物に対して特異的な第1の結合パートナーに結合される。第2のラベルは、第2の分析物に対して特異的な第2の結合パートナーに結合される。第3の分析物に対して特異的な第3の結合パートナーのラベリングに関しては、第1及び第2の結合パートナーに結合されたのと同じ種類のラベルが使用される。1つの量の第3の結合パートナーが第1のラベルにより結合される。3種の分析物の場合、好ましくは、半分の第3の結合パートナーがこの手段でラベルされる。

【0019】

もう1つの部分の第3の結合パートナーは第2のラベルに結合され、3種の分析物の場合、これは第3の結合パートナーの残る半分であろう。従って、この分析物に対して特異的な個々の結合パートナーは、第1又は第2のラベルを含む。これは、わずか1つのラベルよりそれぞれラベルされる結合パートナー分子をもたらす、好ましくは生化学反応に起因するシグナル生成に基づいて複数結果を解決するための多 - 色分析を可能にし、そして従って、検出のための単純なプローブ企画及び計測技術の現状を維持すると共に、動的応答記録のための手段を提供する。対照的に、1つのプローブ分子に複数ラベルを結合しているプローブが文献に記載されている（Samiokaki, M. など., *Analytical Biochemistry* 253, 156-161 (1997)）。そのようなプローブは、本発明の結合パートナーに比較して、合

10

20

30

40

50

成するのがより困難である。

【0020】

第3の結合パートナーに結合される異なったラベルに関して存在する異なった検出効率は、2種の手段で補足され得る。第1のラベルが第2のラベルに比較して、より高いシグナル出力を有する場合、定義される非-1:1比で、第2のラベルに結合される第3の結合パートナーと共に第1のラベルに結合される第3の結合パートナーを混合することによって化学的に、又は標準として選択された所定のラベルに対してのシグナル出力の標準化を通して機械的にこの差異を調節することができる。そのような異なった検出効率は、ラベルの固有の性質、例えば吸収性又は量的収量のためであり得るが、しかしまた、異なった結合効率又は溶媒効果に対する敏感性に起因することができる。後者の場合、結合反応に続いて、異なった量の第3の結合パートナーの混合が、そのような矛盾を適合するための良好な可能性を提供する。

10

【0021】

さらに、複数の検出できるラベルが1つの結合パートナー分子に結合される場合に存在する可能性ある妨害が回避される。従って、本発明の結合パートナーは、蛍光団、及び低濃縮核酸分析物の決定のためのTaqMan方法のような均質検出アッセイに使用され得る従来のForster型ラベル (Styer and Haugland, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 719 (1967)) のような蛍光団の組み合わせをまた包含する広範囲のラベルと適合できる。

【0022】

高められた数の分析物が、2種のラベルについて示されるのと同じ手段で組合せられ得る、3種又はそれ以上のラベルを用いて測定されることがまた、注目されるべきである。3種のラベルを用いる場合、7種までの分析物が測定され得る。15種の分析物が単一及び二重、三重及び四重組合せで適用される場合、4種の異なったラベルを用いて検出され得る。単一又は二重組合せで適用される場合 (実際の観念から好都合である)、10種までの異なった分析物が4種のラベル組により識別され得る。

20

【0023】

従って、本発明は、

a) 前記少なくとも3種の分析物を含むか、又は1又は複数の前記分析物を含むのとはいかと推測されるサンプル、及び少なくとも3種の異なった結合パートナーの混合物を、前記分析物への前記結合パートナーの特異的結合を可能にする条件下で供給し、ここで

- 前記少なくとも3種の結合パートナーの第1のパートナーが前記少なくとも3種の分析物の第1の分析物に対して特異的であり、そして第1のラベルに結合され、
- 前記少なくとも3種の結合パートナーの第2のパートナーが前記少なくとも3種の分析物の第2の分析物に対して特異的であり、そして第2のラベルに結合され、前記ラベルは前記第1の結合パートナーに結合されるラベルから別々に検出でき、そして
- 前記少なくとも3種の結合パートナーの第3のパートナーが前記少なくとも3種の分析物の第3の分析物に対して特異的であり、それにより、第1量の前記第3の結合パートナーが前記第1の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合され、そして第2量の前記第3の結合パートナーが前記第2の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合され、そして

30

40

前記第1量の第3の結合パートナーが結合第2の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されず、そして前記第2量の第3の結合パートナーが前記第1の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されず、

b) 前記第1及び第2のラベルを示すシグナル強度を検出し、

c) 段階b)において検出される前記シグナル強度を用いて、前記サンプルに存在する分析物を測定する段階を含んで成る、少なくとも3種の分析物の測定方法に関する。

【0024】

好ましい分析物は、配列特異的プローブを用いて測定され得る核酸分析物である。そのような核酸分析物はまた、当業者において知られているいくつかの核酸増幅方法、例えばLCR (アメリカ特許第5,185,243号, 第5,679,524号 及び第 5,573,907号; EP 0 320 308 B1;

50

WO 90/01069; WO 89/12696; 及び WO 89/09835)、循環プローブ技法(アメリカ特許第5,011,769号,第5,403,711号,第5,660,988号,及び第4,876,187号,及びPCT公開出願WO 95/05480号,WO 95/1416号,及びWO 95/00667号)、Invader™技法(アメリカ特許第5,846,717号;第5,614,402号;第5,719,028号;第5,541,311号;及び第5,843,669号)、Q-レプリカーゼ技法(アメリカ特許第4,786,600号)、NASBA(アメリカ特許第5,409,818号;EP-0329822号)、TMA(アメリカ特許第5,399,491号,第5,888,779号,第5,705,365号,第5,710,029号)、SDA(アメリカ特許第5,455,166号及び第5,130,238号)及びPCR(アメリカ特許出願第4,683,202号)の1つの方法を用いての増幅された核酸であり得、ここで前記PCR方法が最も好ましい。

**【0025】**

10

本発明はまた、

- 第1のラベルに結合される第1の分析物に対して特異的な第1の結合パートナー、
- 前記第1の結合パートナーに結合されるラベルから別々に検出できる第2のラベルに結合される第2の分析物に対して特異的な第2の結合パートナー、及び
- 第3の分析物に対して特異的な第3の結合パートナー(これにより、第1量の前記第3の結合パートナーが前記第1の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合され、そして第2量の前記第3の結合パートナーが前記第2の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合され、そして前記第1量の第3の結合パートナーが結合第2の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されず、そして前記第2量の第3の結合パートナーが前記第1の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されず)を含んで成る組成物、及びサンプルにおける少なくとも3種の分析物の測定のためへのその使用に関する。

20

**【0026】**

さらに、本発明は、少なくとも3種の分析物の測定のためのキットに関する。

**【発明を実施するための最良の形態】****【0027】**

本発明の分析物は、当業者に知られている結合アッセイにより測定され得る分析物である。それらは好ましくは、医学的診断又は他の生物学的分析のためのサンプル中の成分、すなわち、特に身体成分中の構成成分、例えば抗体、細胞又は核酸である。そのようなアッセイは、感染剤、例えば細菌、例えばクラミジア、ネイセリア及びマイコバクテリア、及びウイルス、例えばHBV、HCV及びHIVの決定のために使用され得る。アッセイの目的に依存して、サンプルに存在する分析物の量を決定することができ、そして分析物、例えば核酸分析物の形状が、その対立遺伝子形について、又は患者が突然変異誘発された形を担持するかどうかについて分析され得る。

30

**【0028】**

本発明のサンプルは、測定されるべき分析物を含む。医学的診断に関しては、ヒト又は動物に由来するサンプルが好ましく、例えば完全な血液、組織断片、尿、唾液、血清、血漿、軟膜及びスミアが使用され得る。分析物及びサンプルに依存して、分析物の決定を可能にするためにサンプルを予備処理する必要があり、例えばほとんどのサンプルに関しては、核酸は第1段階において抽出される必要がある。そのような予備処理されたサンプルはまた、本発明のサンプルである。

40

**【0029】**

本発明によれば、少なくとも3種の分析物が測定される。これは、例えば患者における感染剤、例えば血液銀行における個々の血液サンプルについて試験されるべきウイルスHIV、HBV及びHCVのパターンである。もう1つの例は、いくつかの遺伝子座及び明確な対立遺伝子形成から成る組織適合性遺伝子座抗原パターンの測定であり得る。

**【0030】**

分析物は、特定の結合パターンにより結合される。分析物に依存して、特異的結合パターンを選択すべきである。抗原性を有する分析物は、特定の抗原を用いることによって結合され得る。サンプルにおける抗体は、結合パートナーとしてその特定の抗原を用いるこ

50



とによって決定され得る。核酸分析物が決定されるべきである場合、特定プローブとして、分析物に対して相補的である核酸配列を使用することができる。さらなる特定の結合対、例えば記載される方法においてもまた有用である基質 - 核酸又は糖 - レクチンは、当業界において知られている。

#### 【0031】

核酸分析物は通常、種々の方法の1つによりオリジナルサンプルを処理することによって利用できる形にされる。これは、例えばpHの変化(アルカリ性)、加熱、温度の循環性変化(凍結/融解)、生理学的増殖条件の変化、界面活性剤の使用、カオトロピック塩又は酵素(例えば、プロテアーゼ又はリパーゼ)を、単独で又は組合して含んで成る。例えば、特定の条件下で核酸を結合することができる磁気ガラス粒子を使用することができる。適切な粒子及びプロトコールは、W096/41811号及びW001/37291号に記載される。

10

特定の結合複合体が生じるが、しかし未関係の反応及び高められたバックグラウンドシグナルに導くサンプル成分への結合パートナーの結合を最少にすることを可能にする、分析物への結合パートナーの特異的結合を促進する反応条件を選択することが重要である。そのような反応条件及び適切なプロトコールは、当業界において知られている。

#### 【0032】

核酸分析物又は増幅された核酸分析物の測定のための、プローブとも呼ばれる特定の核酸結合パートナーは、オリゴヌクレオチドであるが、しかし例えば天然のリン酸 - 糖バックグラウンドの代わりにペプチド - 主鎖を有する類似体(PNA, W092/20702号)が使用され得る。分析物へのプローブの特異的結合を可能にするためには、プローブは好ましくは10個よりも長いヌクレオチド、さらにより好ましくは10~40個の長さのヌクレオチドを有する。前記プローブは分析物配列に対して十分に相補的であることがさらに必要とされる。従って、プローブは好ましくは、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%相補的である。最も好ましい場合、プローブは分析物に対して完全に相補的である。相補性及び相同性の正確な決定は、コンピュータープログラム、例えばFast A (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 85, pp. 2444-2448 (88))を用いることによって決定され得る。

20

#### 【0033】

核酸分析物の初期濃度に依存して、分析物の測定を可能にするためにその分析物を増幅することが必要である。このためには、いくつかの増幅方法が当業界において知られている(上記に引用されるように)。特に、プライマーに基づかれる増幅方法を用いる場合、核酸分析物の特異的増幅が可能である。プローブ結合アッセイと組合して、アッセイの高められた特異性が達成され得る。また、分析物の検出を可能にするためのラベルされたプライマーを使用する方法、例えばLCRは、当業界において知られている。また、そのような方法は、本発明に従って改良され得る。

30

#### 【0034】

本発明のプライマーは、核酸鋳型にハイブリダイズされる場合、好ましくは酵素、より好ましくは原核細胞起源のポリメラーゼにより拡張されるか又は修飾され得る分子である。PCR方法を用いる場合、熱安定性ポリメラーゼ、例えばT. アクアチカス(T. aquaticus)又はT. サーモフィラス(T. Thermophilus) DNA - ポリメラーゼが好ましい。それは、前記プライマーの3' - OH - 末端へのモノデオキシリボヌクレオシド三リン酸からのモノヌクレオチド単位を付加することによってプライマーを延長する。プライマーの全体の長さ及び塩基配列は、増幅反応の必要とされる特異性により指図される。

40

#### 【0035】

PCRを行うための好ましいプライマーの長さは、モノヌクレオチド及び/又は核酸類似体モノマーから選択された、10~40、最も好ましくは15~30個の塩基を含むサブユニットである。一般的に、その長さのプライマーはまた、他の増幅方法のためにも有用である。1つよりも多くのプライマーが増幅のために使用される場合、例えばPCRを用いるか、又は1つの反応において複数の標的核酸を増幅する場合、好ましくはプライマーは、5個のよりも多くの連続的な相補的塩基のいずれの拡張も含まないので、お互いに対してハイブリダイ

50

ズできないプライマーが使用される。

【0036】

ラベルは一般的に、検出できるか又は分析物の存在を決定するために検出可能にすることができるグループであるので、当業者に知られている。良く知られているラベルは、蛍光ラベル、例えばフルオレセイン及びランタニドキレート、電気-化学発光ラベル、例えばルテニウム複合体、又はもう1つの分子実在物、例えばハプテンに対して生ぜしめられた抗体により認識され得るハプテン又は固定され得る成分、例えばストレプトタビジン被覆された固相、例えばビーズ又は管に結合され得るビオチンである。特に相同形式に関する最も好ましいラベルは、発色団である。そのような発色団は、単独で又はもう1つの発色団、又は例えば非蛍光消光剤と組合して使用され得る。

10

【0037】

相同検出形成が特に核酸分析物の決定のために使用される場合、いくつかの形式が当業界において知られている。TaqManアッセイ(アメリカ特許第5,210,015号及び第5,487,972号)及びキッキングプローブ-アッセイのような方法は、蛍光色素の蛍光エネルギートランスファー(FET, Styer and Haughland Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 98, pp. 719 (67))に基づかれる。お互いきわめて接近する場合、第1の蛍光団は、第2の蛍光団又は非蛍光消光剤として相互作用することができる。例えば、第1の蛍光色素の電磁発光又は振盪励起が、第2の蛍光色素において共鳴を誘発することができる。

【0038】

使用される形式に依存して、例えば第1の蛍光色素の低下する光発光又は第2の蛍光色素の上昇する光発光を、分析物の存在についての手段として検出することができる。この目的のために使用され得る蛍光色素の組合せは、当業界において知られている。例としては、6-カルボキシフルオレセイン(6-FAM)と組み合わされるペンタメチン-インドジカルボシアニン(Cy5)のようなForester型共鳴エネルギートランスファーのために適切な従来の色素が存在する。

20

【0039】

この状況におけるラベルは、本発明の方法において実際的に検出されるシグナル生成実在物を意味する。記載される相同形式に関しては、お互い共鳴し、そして単一の検出シグナルとしてそれらの方法において検出される蛍光色素対が使用される。2種の明確な分子、例えば2種の蛍光色素が包含されるが、それらは1つのシグナルラベルとして機能する。さらに、用語ラベルとは、明確なラベル中の1つよりも多くのラベル分子が結合パートナー分子に結合されることを意味することが理解されるべきである。

30

【0040】

使用されるラベルに依存して、異なった検出器がラベルのシグナルの測定のために使用されるべきである。他のものと共に、他のものと共に、特に蛍光計がこのために広く使用される。蛍光ラベリングは、酵素的又は化学発光ラベリング技法に比較して、化学的促進試薬はシグナル生成のために添加されるべきではないので、相同PCRと共に最も好都合である。これは、増幅された材料による交差-汚染を回避するための最も効果的な手段である密閉された管方法を可能にする。複数ラベルシグナルを決定する場合、シグナルはお互いから区別されることが重要である。

40

【0041】

そのような漏話を回避するためには、光学的ラベルを用いる場合、個々のラベルが異なった発光及び/又は吸光スペクトルを有することが好ましい。複数分析物検出アッセイに市販のラベルのほとんどを使用したとしても、少なくともいくつかの漏話は回避され得ない。少数の分析物のみを決定する場合、この漏話は、コンピュータープログラムにより測定されたシグナルを処理することによって、又はフィルターに基づく蛍光計の代わりにより高価なスペクトル蛍光計を用いることによって補正され得る。相同形式に関しては、特に蛍光エネルギートランスファーに基づく方法を用いる場合、追加の発色団の必要性が妨害の可能性を高める。従って、実際には、複数アッセイにおいて一緒に使用され得る適切なラベルの数は、制限される。

50

## 【0042】

本発明によれば、使用される少なくとも1つの結合パートナーは、検出可能ラベルの組合せにより結合され、それにより、それらの結合パートナー分子の個々がわずか1つの検出可能ラベルに結合される。対照的に、Samiotakiなど（上記に引用さえるような）により記載されるようなプローブは、複数のラベル（例えば、オリゴヌクレオチド当たり10~20個の結合された5'-末端）によりラベルされる。同じプローブ分子に結合される検出可能ラベルの接近性のために、ラベル間の干渉の危険性が非常に高く、そしてすべてのタイプのラベル、特に蛍光色素が使用され得るとは限らない。

## 【0043】

本発明の方法は、多数の分析物アッセイにおいて高められた数の分析物の決定のために使用され得、そして広範囲のラベルと適合できる。

多重アッセイにおいて必要なラベルの数を低めることによって、外来性ラベルについての必要性が回避され、そしてまた、フィルターに基づく蛍光計のようなより安価な検出器が、より高価であるスペクトル蛍光計の代わりに使用され得る。これはさらに、制限された汚染危険性及びより少ない取扱段階のために、市販の診断アッセイに関して著しく重要なものである相同形式を可能にする。

## 【0044】

上記に示されるように、異なった組合せで組み合わせられる3種のラベルが、6種の異なった分析物の明確な測定を可能にする、7種までの異なった特異的結合パートナーにより結合され得る。これは、下記表において可視化される。Pはパラメーター=分析物を表し、チャンネルは特定の検出できるラベルのシグナルを獲得するよう最適化された検出器の一部として光学路に対応する。表は、化学的に又は機械的に標準化される、すべての3種のチャンネルにわたってのシグナルの予測される%分布率を示す。分析物P1~P7のうち、わずか1つが同時にサンプルに存在する場合は考慮される。

## 【0045】

異なった結合パートナーのラベリングは次の通りである：タイプP1 - ラベル1（チャンネル1におけるシグナル）、P2 - ラベル2（チャンネル2におけるシグナル）、P3 - ラベル3（チャンネル3におけるシグナル）、P4 - 半分の量のラベル1、半分の量のラベル2、P5 - 半分の量のラベル1、半分の量のラベル3、P6 - 半分量のラベル2、半分の量のラベル3及びP7 - 1/3の量のラベル1、1/3の量のラベル2、1/3の量のラベル3。

## 【0046】

## 【表1】

表1

パラメーター	チャンネル		
	1	2	3
P1	100		
P2		100	
P3			100
P4	50	50	
P5	50		50
P6		50	50
P7	33	33	33

10

20

30

40

50

## 【0047】

シグナルが1つのチャンネルにおいて測定され得る場合、パラメーター1, 2又は3の分析物の1つの%についての明白な徴候が与えられる(表を参照のこと)。シグナル5:50の比で2つのチャンネルにおいて生じる場合、表に示されるように、パラメーター4, 5又は6の分析物についての強い徴候が存在する。33:33:33のシグナル比は、P7分析物がサンプルに存在することを示す。しかしながら、これは、理想的な状況に影響を及ぼす。実際のシグナルは、偏向し、そしてしばしば、ラベル、バックグラウンド - 及び漏話 - シグナルの異なった検出効率を補足するために標準化される必要がある。

## 【0048】

結合パートナーに結合される異なったラベルは、結合パートナーの結合効率を変えるべきではなく、これはまた、第1のラベルに結合されるパートナー:第2のラベルに結合される結合パートナーの比を変えることによって調節できる。また異なった検出効率は、この手段により調節され得る。

## 【0049】

50:50のシグナル比はまた、2種の分析物の存在の場合に生じる。しかしながら、それらの発生は、2つのチャンネルへの50:50のシグナル分布を生成する、出発分子の数及び同一の抽出/増幅/検出高価に関して1:1の同時感染、又は力価における差異を正確に平衡化し、そして再び、50:50の分布を生成する抽出/増幅/検出効率と共に異なった数の出発分子のいずれかに存在するので、これはたぶん非常にまれである。従って、単一のラベルされたプローブにより示される2つのパラメーター、例えばP1及びP2の同時感染は、 $>>50: <<50:0$ 又は $<<50: >>50:0$ の不均等な分布をもたらし、そして例えば、50:50:0の均等な分布により示されるP4とは区別できる。しかしながら、そのような結果はまた、2種の剤、例えばP4及びP1により同時感染されたサンプルに由来する。

## 【0050】

測定されたシグナルの解決において不明瞭な結果及び可能性ある誤りの危険性をさらに低めるために、複数のチャンネルに存在するシグナルが例1において説明されるように、サンプルにおける1つの可能性ある分布を評価され得るような手段でパラメーターを配置することが可能である。さらに、サンプルに存在することができる残る可能性ある分析物分布について特に試験する追加のアッセイを行うことができる。そのような連続的方法は第1回の実施においてほとんどのサンプルにおける明確な分析物分布の決定を可能にするので、非常に経済的であり、そして不明瞭サンプルは、低められた数の分析物を伴って複数の分析物アッセイを用いて、第2回目の実施において再評価され得る(明確な1つのラベル - 1つの結合パートナーの組合せが可能であるべきである)。さらに、核酸分析物及び増幅された核酸分析物に関しては、例えば異なった分析物の区別及び確かな結果の獲得を可能にする、分析物 - プローブハイブリダイゼーション複合体又は増幅された核酸の溶融曲線を決定できる。

## 【0051】

少なくとも3種の分析物の測定のためのキットが本発明の目的である。そのようなキットは、

- 第1のラベルに結合される第1の分析物に対して特異的な第1の結合パートナー、
- 前記第1の結合パートナーに結合されるラベルから別々に検出できる第2のラベルに結合される第2の分析物に対して特異的な第2の結合パートナー、及び
- 第3の分析物に対して特異的な第3の結合パートナー(これにより、第1量の前記第3の結合パートナーが前記第1の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合され、そして第2量の前記第3の結合パートナーが前記第2の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合される)を、1又は複数の容器に含む。

## 【0052】

さらに、そのようなキットはまた、緩衝液、ブロッキング試薬、及び当業界において知られている他の反応成分を含むことができる、結合パートナーのそれらの分析物への特異的結合のための手段を含むことができる。核酸分析物の決定のためのキットはまた、上記に

10

20

30

40

50

記載されるように核酸増幅方法のための反応成分も含むことができる。PCR反応キットはまた、ポリメラーゼ、緩衝液、ヌクレオチド三リン酸及び/又はプライマーを含むことができる。

本発明は、次の例により例示される。

【実施例】

【0053】

例 1 .

本発明の多 - 分析を、“従来の”蛍光色素化合物及び“従来の”共鳴エネルギートランスファー原理に基づいて構築する、Roche Cobas Taqman増幅/検出技法及び5' - ヌクレアーゼアッセイ技法（ヨーロッパ特許第0543942号及びアメリカ特許第5,210,015号）を用いて行うことができる。Roche Cobas Taqman装置は、4個のフィルター対により装備される（また、ヨーロッパ特許第0953379号、ヨーロッパ特許第0953837号、アメリカ特許第6,134,000号及びアメリカ特許第6,084,699号を参照のこと）。推定上のインディケーター組は、4個のレポーター及び好ましくは1又は2個の任意には非蛍光性消光剤から成る。Cobas Taqman検出器により設定されるスペクトル範囲、すなわち約420nm～約710nmに及び候補体化合物は、次のものを包含することができる：

10

【0054】

- 赤色において広いバンドの吸収範囲を有する消光剤（Q）色素に関しては、例えばポリメチン - シアニン色素（例えば、 $n=5$ 、すなわちメソメリ - 構造を構築する4個の接合されたオレフィン実在物）、又は接合されたメソメリ - e(-) - システムに関係する不飽和N - 複素環式成分に対称的に融合される側面でのローダミン誘導体（両者とも、好ましくは、非蛍光ニトロフェニル - 誘導体として）、

- レポーター（R）色素蛍光分子に関しては、例えばクマリン色素、フルオレセイン型色素、例えばFAM又は塩素化された誘導体、ローダミン型色素、オキサジン又はbodipy - 型化合物。それらの3種は、パラメーターを標的化するために評価され、1つはICをモニターするためである。

20

【0055】

候補体色素に関する一般的な必要条件是、次のものを包含する：原液における、及びマスターミックス試薬における成分としての使用レベルでの良好な化学的安定性；合成、精製及びキット製造の間、周囲光に暴露される場合の安定性；PCRにおける複数の加熱/冷却サイクル（例えば、 $n=60$ ）に暴露される場合の安定性；対応するPQ共鳴対間での十分なスペクトルオーバーラップ及び効果的なエネルギートランスファー；高い吸光係数（すなわち、吸光度）；及び特にレポーターに関して、水溶液において、及びTaqman - PCRのために使用されるpH範囲（例えば、pH7 - 8.5）における高い定量的収率。

30

【0056】

新規概念は、特定のアッセイパラメーター及び対応するチャンネルを表す、特定の色素の固定された評価を有する代わりに、Cobas Taqmanのその対応する3個の光学チャンネルを通しての3個のレポーター色素及びその二重組合せの漏話 - 及びバックグラウンド - 補正された、標準化されたシグナルの分布の測定を可能にする。この原理は、最大の複雑性が考慮される場合、6 - パラメーター - 複合アッセイにより得られる陽性結果の完全な解決（レポーターR1, R2, R3, R1+2, R1+3, R2+3を通して）を適用する。

40

【0057】

理論的には、シグナル - 使用の場合、それぞれ処理されたシグナルの100%が、所定のチャンネルに見出され；二重ラベル使用の場合、処理されたシグナルは、2個の対応するチャンネルを通して均等に分析される（50% + 50%）。

正/負のプール（ドネーション）の識別は、シグナル - 対 - 時間の曲線の傾斜プロファイルを検知する、限界サイクル（ct値、すなわち蛍光シグナル強度がバックグラウンドレベル以上に有意に上昇する反応座標上の点）の決定のための最適化されたアルゴリズムに基づいて行われる。

【0058】

50

感染の種類（アッセイパラメーター、すなわち検出できる生成物をもたらす病原体の種類）の解決は、シグナル/時間曲線（AUC）下での合計領域、又は全体の標準化されたプラト-シグナル強度へのチャンネル-特異的寄与の分析を通して行われる。しかしながら、血液スクリーニングのために必要とされるような定性的アッセイのために必須でないそれらの基準に関しては、安定した用量-応答相互関係は存在しない。

【0059】

適切な6-パラメーター（P1-P6）多重アッセイは、次のプローブを含んで成る（Q=消光剤、R=レポーター及びN:=4種のヌクレオチドの1つ）：

【0060】

【表2】

10

表2

パラメーター1 - プローブ = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>g</sub>-R1-(N<sub>i</sub>)<sub>h</sub>-3'-PO<sub>4</sub> + 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>g</sub>-R2-(N<sub>i</sub>)<sub>h</sub>-3'-PO<sub>4</sub>

それぞれ5 pモル / 100 μl 反応ミックス

パラメーター2 - プローブ = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>a</sub>-R1-(N<sub>i</sub>)<sub>b</sub>-3'-PO<sub>4</sub> 10pモル / 100 μl

反応ミックス

20

パラメーター3 - プローブ = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>c</sub>-R2-(N<sub>i</sub>)<sub>d</sub>-3'-PO<sub>4</sub> 10pモル / 100 μl

反応ミックス

パラメーター4 - プローブ = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>e</sub>-R3-(N<sub>i</sub>)<sub>f</sub>-3'-PO<sub>4</sub> 10pモル / 100 μl

反応ミックス

パラメーター5 - プローブ = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>k</sub>-R1-(N<sub>i</sub>)<sub>l</sub>-3'-PO<sub>4</sub> + 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>k</sub>-R3-(N<sub>i</sub>)<sub>l</sub>-3'-PO<sub>4</sub>

それぞれ5 pモル / 100 μl 反応ミックス

30

パラメーター6 - プローブ = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>n</sub>-R2-(N<sub>i</sub>)<sub>m</sub>-3'-PO<sub>4</sub> + 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>n</sub>-R3-(N<sub>i</sub>)<sub>m</sub>-3'-PO<sub>4</sub>

それぞれ5 pモル / 100 μl 反応ミックス

【0061】

換言すれば、

2~4の場合、均等にラベルされたプローブ（同じオリゴヌクレオチド/同じレポーター）の約  $1 \cdot 6^{12}$  の分子がパラメーター当たりPCR中に導入され；

40

1, 5及び6の場合、再び、ラベルされたプローブの約  $1 \cdot 6^{12}$  の分子がパラメーター当たりPCR中の導入され、1つの種類の標識と共に約  $1/2 \cdot 6^{12}$  の分子、及び消耗され、統計学的に平衡化される、他の種類の標識（同じオリゴヌクレオチド/異なったレポーター）と共に  $1/2 \cdot 6^{12}$  の分子が導入され；

すべての場合、10pモルのパラメーター-特異的プローブが利用できる。

【0062】

不明瞭な結果の危険性に関しては、及び単一のラベル及び二重組合せの使用に集中して、不明瞭な結果は、それぞれ単一のラベルされたプローブにより示される2つのパラメーター、例えばP2 R1+P4 R3の同時感染の場合、たぶん非常にまれであることを示すことが

50

できる。出発分子の数に関して1:1の同時感染、及び2つのチャンネルへの50:50のシグナル分析を生成する同一の抽出/増幅/検出効率の確立、又は異なった数の出発分子、及び力価における差異を正確に平衡化し、そして再び50:50の分布を生成する抽出/増幅/検出効率の確立は、無視して良いほど低いと思われる。従って、 $>(>)50:<(<)50:0$ 又は $<(<)50:>(>)50:0$ の不均等な分布がもたらされ(ケースI)、そしてその結果、50:0:50の均等な分布により示されるP5 R1R3から区別できる。

【0063】

2種の二重ラベルされたプローブ(ケースII)の1:1混合物により示される2種のパラメーター、例えばP1 R1R2及びP2 R1R3による同時感染は、3個のチャンネルへのシグナル分布(例えば、推定される約50:25:25の比較できる抽出/増幅/検出効率)のために、常に明白であるべきである。

10

【0064】

2種のパラメーター(1つは、1つのレポーターにより表され、そして他の1つは2個のレポーターにより表される)による同時感染は、3個のチャンネルのシグナル分布(約33:33:33(ケースIII、例えばR1R2+R3))のために認識されるべきであり、又は比較できる抽出/増幅/検出効率を仮定して、約75:約25:0パターン(ケースIV、例えばR1R2+R1)を生成する。ケースII及びケースIIIに関しては、共通スル特徴は、特に“ゼロシグナル”を有する標的物に関連する光学チャンネルが存在しないことである。

【0065】

換言すれば、“真のゼロ”に対して区別するための“ゼロ+x”限界が重要であろう。ケースIV、たぶん最も決定的な場合、解決は、得られる分布が50:50の状況とは実質的に異なるか、又は否かを決定するアッセイの全体的な効率に依存する。たぶん、追加の数学的基準が、特に後者の種類の不明瞭性を解決するために考慮されるべきである。好都合には、同時Taqman-PCRは、そのような“ヘルパー算術”を提供する。このトッピングは、いくらかより詳細に下記で対処される。

20

【0066】

不明瞭性のまれな発生、すなわち同時感染から生じる50:50のシグナル-分布の現象はさらに、地理的分布を考慮することによって完結され得る単一のラベルされたプローブに、非常にまれに見出され、そして低い効率で増幅されたパラメーターを評価することによって最少にされる。

30

HIV-1-M、HIV-1-0、HIV-2、HCV、HBV及びHAVの決定のためのレポーター(R=ラベル)及びアッセイの推定上の評価は次の通りである：

【0067】

【表3】

表 3

(増幅及び検出効率)

P1⇔HIV-1-M⇔R1/R2	高い	
P2⇔HIV-1-0⇔R1	低い	10
P3⇔HIV-2 ⇔R2	低い	
R4⇔HCV ⇔R3	高い	
P5⇔HBV ⇔R1/R3	高い	
P6⇔HAV ⇔R2/R3	中位い	
IC (内部対照) ⇔R4		20

## 【 0 0 6 8 】

安全性の理由のために及び特に市販のアッセイに関しては、第4のラベル(R4)に結合されるプローブにより検出され得る内部対照をまた付加することができる。

HIV-1-0及びHIV-2の同時感染はほとんどでありそうもなく、両者は非常にまれであり、そして地理的に十分に分離されており(しかしながら、数年間にわたって変化することができる)、そして全体的な結果は、そのような予測できない現象の場合においてさえ、“HIV陽性”である。

## 【 0 0 6 9 】

他方では、HIV-1-0及びHCV又はHIV-2及びHCVの同時感染は、50:0:50又は0:50:50の均等な分布をもたらすべきではなく、それぞれ、現在の増幅効率(HIV-1-0及びHIV-2に関しては低い)を付与し、そしてHBV又はHAVの単一感染に関しては誤解されない。従って、例えばRoche Cobas TaqMan装置に使用される、別々に検出される内部対照を包含する6-パラメーターアッセイを行うための標準の4チャンネル蛍光計を使用することが可能である。

## 【 0 0 7 0 】

従って、アッセイパラメーターに関しての6パラメーター多重アッセイの完全な解決のためのこの概念は、現在の化学システム及び測定器プラットフォームに比較して適度な追加の努力を必要とする。同時に、より精巧な分析用ソフトウェアに関する必要条件是、下記に示される考慮により示されるように必要な労力を要さない。いくつかの詳細においては、これは、次のものを包含する：

## 【 0 0 7 1 】

- 3種のプローブ(同じオリゴヌクレオチド、異なった蛍光標識)のための二重計算法追跡、
- 単一の標識されたプローブからの個々のレポーターについてのシグナル出力、及び標準化因子の合成を確立するための標準化方法(それぞれのオリゴヌクレオチドにおける配列環境からの衝撃、 $E_m(R/Q)$ 比により示されるような精製の程度、波長依存性エネルギー含有率、及びCTM ASICSのスペクトル感受性を考慮する)、

10

20

30

40

50



- 100% 計数として作用するよう最も信頼できる出力基準又は基準組の生成、及び予測される値についての許容範囲境界の設定、
- 上記に言及されるすべてのパラメーターを組み込む3個の標的チャンネルへの補正され、標準化されたシグナルの分布の分析のためのソフトウェアアルゴリズムの開発。

【0072】

例2.

Roche Cobas TaqMan<sup>TM</sup> 装置のような自動化された試験装置のためのアッセイプロトコールに関しては、適切な工程スキームは下記に与えられる(また、図1を参照のこと)。与えられる新規試薬の利用性、自動化されたアッセイの主要データ収集及びデータ処理スキームは次の通りである：

【0073】

【表4】

表4

ーデータ収集：

		状態：	
1. ダーク平均 (=計測器ノイズ)	DM	すでに行われた	20
2. ダークドリフト (=f(t)のようなドリフト補正因子)	DD	すでに行われた	
3. 漏話及び決定補正因子	XT	すでに行われた	
4. レポーターのためのシグナル出力標準化因子 (=定量的因子、微小環境効果、スペクトル感受性、等を補正するための設定因子)	NF <sub>Ri</sub>	追加の	30
5. バックグラウンド強度 (=混合物の含まれるすべてのプローブから蓄積される化学的ノイズ)	BG	すでに行われた	
6. 時間にわたっての測定された合計シグナル	TFI	すでに行われた	

【0074】

好ましくは、すべての段階は、Cobas Taqman - 計測器上の光学チャンネル1, 2, 3及び4のために別々に行われる。

- データ処理：

- 1) 個々のチャンネルに関して、及びシグナル - 対 - 時間のグラフとして、  

$$\{ TFI_{f(t)} - \{ (DM * DD_{f(t)}) + BG \} \} * XT * NF_{Ri} = NFI$$
 が計算され、すなわちチャンネル - 特異的標準化された、補正された蛍光強度、
- 2) チャンネル1, 2, 3がレポート色素に対応し、そしてチャンネル4がIC色素に対応する場合、 $NFI_4 = 100$  IC応答強度、
- 3) それらのチャンネルを通しての分布により分析される  $NFI_{1+2+3} = 100\%$  標的物応答強度、すなわちチャンネル1におけるx%、チャンネル2におけるy%及びチャンネル3におけるz%。

【0075】

10

20

30

40

50

次に、得られるシグナル分布数を、上記に与えられた予備計算された値に比較し、そして検出される病原体の強度を、光学的チャンネル - 特異的増加及び対応するレポーター色素、並びに補助因子の相互関係から推定する。

従って、換言すれば、アッセイは、標的物力価（すなわち、それは血液銀行における適用をスクリーニングするための適切な陽性/陰性結果を生成する定性的スクリーニングアッセイである）に関して検量されないが、しかし所定の濃度でパラメーター - 特異的プローブのシグナル出力（多重増幅の陽性結合についての原因を同定するための）に関して検量される。

個々のサンプル分析は、図 1 に示されるようにして行われる。

この処理アルゴリズムのロジックを理解するために、根本的なアッセイ原理を考慮すべきである。 10

#### 【0076】

5' - ヌクレアーゼ技法（Taqman - PCR、本明細書に示される本発明のための好ましい態様）においては、それぞれ増幅及び検出反応は密接に編成される。このためには、2種の特定の化学的修飾を有する検出プローブを、PCRマスターミックスに添加する。それらの修飾の1つは、プローブの主鎖に共有結合される蛍光助剤レポーター基（R、例えば、6 - カルボキシ - フルオレセインの誘導体）であり、他の1つはレポーターの蛍光を吸収でき、そしてそれを消光する（消光剤、Q）ことができる色素（例えば、ポリメチン - シアニン誘導体）である。消光剤は典型的には、その5'末端でプローブ主鎖に結合され、そしてレポーターは、多くのヌクレオチド構築ブロックにより消光剤から距離をおいて存在するオリゴ配列内に位置する。 20

#### 【0077】

プローブは、プライマー（逆方向又は前方）の3'末端に隣接する標的核酸（センス又はアンチセンス鎖）に結合する。プライマーが標的物にアリーリングし、そしてDNAポリメラーゼがプライマー：標的物ハイブリッドに結合するとすぐに、延長が開始する。コピー鎖合成と共に、酵素の5' - ヌクレアーゼ活性のために、プローブは、ポリメラーゼプローブ結合部位に達するとすぐに分解され、レポーター及び消光剤が分離され、そして蛍光シグナルが測定できるようになる。この工程は、サイクルごとに反復され、そして蛍光レポーターは、反応の最後での試薬の消耗まで、溶液において蓄積する。その結果、シグナル - 対 - 時間のプロットにおいては、S字形成長曲線が生成される。 30

#### 【0078】

任意の蛍光強度（AFI、相対光単位（RLU）とも呼ばれる）がバックグラウンドシグナルから有意に区別される、時間軸上の点が限界サイクル（ct）と呼ばれる。ctは、分析物力価の尺度であり；ct値が小さいほど、出発分子の数は多く、そして/又は出力又は増幅/検出効率により良好である。ct値は、異なった数学的操作により計算され得る。例えば、カット - オフアプローチ（定数因子により掛け算される平均バックグラウンドシグナル強度が陽性と陰性とを識別するためにカット - オフシグナル強度を生成する）が使用され得るか、又はシグナル - 対 - 時間の曲線の第1又は第2誘導体の最大点の位置（すなわち、急勾配又は傾斜プロファイル）が曲線適合の後、分別されるアプローチが使用され得る。この傾斜プロファイルアプローチは、シグナル限界アプローチに比較して、バックグラウンド強度レベルに実質的に無関係であり、従って反応混合物に存在するすべてのプローブからの累積されたバックグラウンドを有する多重アッセイのために非常に魅力的である。 40

#### 【0079】

それらの原理に基づいて、及び上記に示される処理スキームに従って、一次結果（すなわち、陽性か又は陰性か？）及び二次結果（すなわち、感染の種類がサンプルを陽性にするか？）を生成するために異なった手段を使用する。

#### 【0080】

1つの通常のラベルを用いて多重アッセイを行うのに比較して、いくつかの光学チャンネルへのシグナルの希釈のために感受性における可能性ある損失が存在し、そして従って、特定のチャンネルに低められた特異的シグナル成長曲線が存在する。従って、一次結果を生成 50

するためには、任意には、複合シグナル - 対 - 時間曲線を取り扱うであろう。この手段により、完全な特異的シグナル収率が、1つのシグナル - 対 - 時間曲線に収集され、次にこれは、限界サイクル (ct) 及びサンプルの主要状態 (陽性/陰性) を決定するために使用される。傾斜プロファイルアプローチを用いて、バックグラウンド強度の付加は、有害ではなく、そして特異的シグナルのより明白な成長特徴を区別する可能性ある利点を開発することができる。

#### 【0081】

他方では、二次結果の生成に関しては、標準化されたシグナル (NFI強度) のチャンネル - 特異的分布を言及し、そして上記に与えられるパターンの予備計算されたマトリックスにその得られる分布パターンを比較することによって感染の種類を推定する。さらに、及び識別力を増強するために、また標準化されていない特異的シグナル強度が、標準化されたシグナルの約50:約50又は約75:約25の分布、すなわち真の決定的な分布の分析のために考慮され得る。

#### 【0082】

- プローブの1:1混合物により表される単一感染の場合、標準化されていない、バックグラウンド - 補正されたシグナルR1/R2の得られる比は、全体の増幅/検出工程を通して一定、例えば40/50であろう。これは、等量の精製された色素により得られる標準化因子の値(0, 80)に正確に等しくするべきである。なぜならば、両種類のラベルされたプローブ(同じオリゴヌクレオチド配列!)は同一の割合で分解されるからである。本明細書に示される概念に従っての分解性6 - パラメーター - 多重アッセイにより、個々のチャンネル特異的バックグラウンドが、同じラベルにより標識された3種の異なったプローブのシグナル出力から製造されるので、バックグラウンド(BG) - 補正は必要である。

#### 【0083】

従って、BC強度は、ラベルの光学的特徴の機能であるのみならず、またプローブの構造特徴、すなわち線上又はヘアピン、又は自己 - 相補性の程度(より一般的には)の機能であり、そして二次構造の形状平衡に影響を及ぼす測定の間温度の機能である。その結果、ハイブリダイズされていないプローブの二次構造は、BG強度に関して考慮されるべきであり、そして補助計算が、

$$SFI = TFI_{f(t)} - [(DM * DD_{f(t)}) + BG] * XT_i = AFI - BG$$

により、特異的蛍光強度SFIに基づかれるべきである。

#### 【0084】

対照的に、特異的シグナルは、標的物へのプローブの実質的に完全なハイブリダイゼーション、すなわちプローブオリゴヌクレオチドの線状化に依存して、ポリメラーゼの5' - ヌクレアーゼ活性により生成され、そして従って、プローブ構造には実質的に無関係である。これはまた、Tm(溶融温度)における同時低下のために、標的鎖から分解され、そして解離された後、切断されたプローブに適する。残留プローブオリゴマーにおける短い内部ハイブリッドは、PCRにおけるアニリング/延長のために使用される高温で安定性であるべきでない。定量的収量又は溶媒効果に対する感受性における差異を補足する標準化の後、チャンネル1及び2におけるシグナル分布は、50:50である。予測されるようなNFI及びSFI比の発見は、単一感染のための二重証明である。

#### 【0085】

- それぞれR1及びR2によりラベルされた2種の特異的プローブを通して示される二重感染の場合(ケースI)、シグナル動力学(すなわち、時間の関数として)は、初期分析物力価、又は全体のアッセイ効率のいずれか、又は両者はたぶん異なるので、2種の異なったアッセイに関しては、たぶん異なっているとは思われない。従って、NFIレベルに基づいての>50:<50状況の確立に加えて、また、R1/R2のSFI比は、反応のかなりの初期、中央及び後期相に関して異なるべきであり、すなわちSFI比は変化しやすい。前記比は一定の傾向を有し、そして好ましくは、モデルプローブ(不可逆的微小環境因子、例えばリンカー、局部電荷を考慮して)、例えばその構造形状によりシグナル出力を調節しないT<sub>3</sub> - R - T<sub>16</sub> - オリゴヌクレオチドに結合される精製された色素の均等混合物により得られる、それ

10

20

30

40

50

ぞれの標準化因子とは異なる。

【0086】

- R1+R1R2 (ケースIV) 及び2種のアッセイについて実質的に異なった全体の回収性により表される二重感染の場合、50:50とは非常に異なる標準化されたシグナル分布、例えば55:45がチャンネル1及び2において観察され得る。しかしながら、標準化されていないシグナル強度に関しては、比R1/R2は例えば45/50(0,88)であり、すなわち標準化因子よりも大きいであろう。従って、標準化された及び標準化されていないレベルの両者に基づいて“予測されるよりも大きい”二重バイアスは、二重感染を示すであろう。さらに、例えばAUCを通して追跡される比R1/R2は、たぶん、識別を増強するであろう異なった増幅効率に起因する異なったシグナル運動学のために、全アッセイを通して一定ではない。

10

【0087】

- 二重感染の場合、両アッセイがほぼ等しい効率を有し、そして実質的に異なった又はほぼ等しい分析物力価のいずれかから出発する場合、75:25:0のNFIパターンが、R1+R2又はR1+R1R2ラベリング(ケースI又はケースIV?)のいずれかにより近づけられるか、又は越えられさえする。ケースIVの同時感染と強く片寄せられたケースI型の同時感染との間の識別は、絶対的な特異的シグナル強度(R1強度はケースI状況下でより低くあるべきである)、又はチャンネル特異的な、任意に修正されたSFI値の絶対的差異により達成され得る。結果は、いくつかの場合、また完全には明確でない。

【0088】

この他に、複合AFI/t曲線が曲線形状特徴に関して分析され得る。単一感染の場合、1点の感染を伴っての単一S字形曲線を予測する。しかしながら、二重感染の場合、2種の感染剤から抽出された2種の核酸標的物の個々から生成された2種の成長曲線は、ct(すなわち、曲線が上方に曲がり、そしてバックグラウンド及びドリフトレベル以上に上昇する、時間軸上の点)に関して、形状に関して、及び特定のシグナル強度に関して、たぶん同一ではない。従って、二-S字形曲線形状が、2点の感染を伴って、生成され得る。その結果、一又は二-S字形曲線形状は、調査下でのサンプルに存在する単一又は二-感染を示す。しかしながら、好ましくない場合、複数の曲線の並置は、不明瞭な最大傾斜を有する不規則な形状を誘導し、そしてノイズ(すなわち、曲線の荒さ)が高められる。さらにもう1つの可能性は、2種のほぼ同一の曲線が並置される場合、1点の感染を伴っての複合曲線である。

20

30

【0089】

要約すると、感染におけるタイプに関しての陽性多重アッセイ結果を解決するために利用できる多くの数学的手段が存在する。それらは、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない:

基本的手段 - 標的物に関連する2又は3個の光学チャンネルにおける有意なシグナル強度を有する状況における、参照NFI分布パターン及び偏差の型。参照パターンからの許容できる範囲の偏差は、絶対数、正確なデータに基づいてのそれぞれのNFI値に対する%バンド、又はそれらの組合せにより設定され得る。

【0090】

補助手段 - 通常のパイアスについての特定の光学チャンネルに関連するNFI及びSFI比の分析; 反応座標(定数又は変数)に力学的に沿ってのサイクル数の関数としてのNFI又はSFI比の分析; 調査下の異なった感染剤についての既知のアッセイ特異的な全体の効率(抽出/増幅/検出)を考慮して、いずれかの2種の光学チャンネル(任意には、標準の用量差異に関連づけることによって修正される)間でのNFI比及び対応する絶対SFI値又は絶対SFI差異の関連性; 複合AFI-対-時間の曲線形状(適用できるなら)の分析。  
この組の基準のための推定上の適用モードは、図1及び2に示される。

40

【0091】

さらに、完全な工程をモニターするために、好ましくは天然の標的物により同時抽出され、そして同時増幅される、修飾されたウィルス粒子にパッケージングされる(保護される)、人工核酸構造体をすべてのサンプルに添加する。この内部対照(IC)は、区別できる

50

発光特徴を有する異なったレポーターグループにより標的物特異的プローブとは異なる、IC検出プローブのためのユニークプローブ結合領域を特徴とする。従って、ICシグナルは標的物シグナルから識別され得、そしてICはサンプルに存在することが知られているので、それはモニター剤として機能する。IC応答が存在しない場合、それぞれの反応は有効でないものとして見出され、そして反復されるべきである。

## 【0092】

処理され（すなわち、未知のもの及び外部対照又は検量計の両者）、そしてR4により示される個々の及びあらゆる検体に添加される、同時抽出され/同時増幅され/同時検出された内部対照（IC）の他に、外部陽性対照は、アッセイの一部であろう。“未知のもの”に対抗するものとして、陽性であることが見出されるべきである“既知のもの”が存在し、すべての標的物に関連する光学チャネルにおいてシグナルを生ぜしめる混合された対照サンプルとして企画され得る。ICと組み合わされる場合、完全な光学システムの利用能力が、完全な抽出/増幅/検出工程の機能性の他にモニターされる。血液銀行における核酸に基づくスクリーニング適用に関しては、例えば高い感受性の定性的アッセイが、技術的に実行可能である限り、個々の及びあらゆる正のドネーションを同定するために必要とされる。従って、外部陽性対照の力価は、低濃度範囲で設定される。

10

## 【0093】

## 例3.

例1に与えられるパラメーター列挙に基づいて、下記に示されるシグナル分布を分析する。調査下の6種のパラメーターの個々に関して、標的物検出に評価される3種の光学チャネルを通してのシグナル分布の参照パターンが存在する。次のように個々の参照パターンは、付随する許容される範囲により補足される：

20

## 【0094】

## 【表5】

表5

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	50	50	0
P2	100	0	0
P3	0	100	0
P4	0	0	100
P5	50	0	50
P6	0	50	50

30

40

## 【0095】

NFI参照パターン：

## 【表6】

表 6

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	10	10	9.17
P2	10	1.67	6.25
P3	7.08	10	7.92
P4	4.17	1.67	10
P5	10	4.17	10
P6	5.83	10	10

10

【 0 0 9 6 】

20

100% 及び 50% の平均値に関連する推定上の 10% / 20% オフセットバンド、及び 5X ほぼゼロの値は、参照パターンについての次の許容される範囲を解釈する：

【 0 0 9 7 】

【 表 7 】

表 7

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	40-60	40-60	0-9
P2	90-100	0-2	0-6
P3	0-7	90-100	0-8
P4	0-4	0-2	90-100
P5	40-60	0-8	90-100
P6	0-8	40-60	40-60

30

40

【 0 0 9 8 】

許容される偏差範囲は例えば、% 値 ( % )、絶対数、単純な標準偏差の倍数、又はそれらの組合せとして計算され得る。

個々のサンプル ( パラメーター ) に関しては、チャンネル 1 ( レポーター R1 )、チャンネル 2 ( レポーター R2 ) 及びチャンネル 3 ( レポーター R3 ) におけるシグナル分布が、表 ( 下記 ) 上に示されるように、それぞれ 6 - 倍決定値に基づいて、6 種の同時模倣されたデータ組により与えられる：

50

【 0 0 9 9 】

【 表 8 】

表 8

模倣されたデータ組：

	Ch1	Ch2	Ch3	合計	
P1	52	48	0	100	10
	49	48	3	100	
	47	52	1	100	
	50	46	4	100	
	48	49	3	100	
	50	50	0	100	
P2	98	0	2	100	
	97.5	0	2.5	100	
	99	0	1	100	
	100	0	0	100	
	96	2	2	100	
	100	0	0	100	
P3	1	96	3	100	20
	2	96	2	100	
	2	97	1	100	
	1	99	0	100	
	0	99	0	100	
	2.5	95	2.5	100	
P4	0	0	100	100	30
	0	0	100	100	
	3	1	96	100	
	1	0	99	100	
	0	0	100	100	
	1	1	98	100	
P5	46	6	46	100	
	50	1	49	100	
	45	0	55	100	
	52	0	48	100	
	49	1	50	100	
	47	2	51	100	
P6	0	50	50	100	40
	1	49	50	100	
	1	53	46	100	
	2	47	51	100	
	3	52	45	100	
	0	51	49	100	

【 0 1 0 0 】

シグナルデータを評価するための続く段階が下記に示される：

【 表 9 】

表 9  
模倣された分布

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	49.33	48.83	1.83
P2	98.42	0.33	1.25
P3	1.42	97.00	1.58
P4	0.83	0.33	98.83
P5	48.17	1.67	50.17
P6	1.17	50.33	48.50

10

参照パターンに従っての平均値（算術的）、逸脱された

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	5.25	6.12	5.17
P2	4.69	2.45	3.25
P3	2.75	5.02	3.34
P4	3.51	1.55	4.81
P5	7.92	6.75	7.92
P6	3.51	6.48	7.29

20

参照パターンに従っての限界標準偏差、逸脱された

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	50	50	0
P2	100	0	0
P3	0	100	0
P4	0	0	100
P5	50	0	50
P6	0	50	50

30

NFI参照パターン

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	10.00	10.00	9.17
P2	10.00	1.67	6.25
P3	7.08	10.00	7.92
P4	4.17	1.67	10.00
P5	10.00	8.33	10.00
P6	7.50	10.00	10.00

40

100%及び50%平均値に関連する10%/20%オフセットバンド、及び0%値に関連する5X、すなわち参照パターンについての許容される範囲

【 0 1 0 1 】

P5に関しては、約50 : 0 : 50のCh1 : Ch2 : Ch3の分布が見出され、そして平均値及びばらつきの両者は、許容される範囲内にある。これは、HBVによる単一感染を意味する結果“P5 - 陽性”を導く。

【 0 1 0 2 】

50



## 例 4 .

例 1 及び 2 に与えられる主要考慮の間、上記に概略されるように、50 : 50の分布は、単一感染の有効なインジケータであるとは限らない。そのような不明瞭な結果が生じないいくつかの適用が存在することが言及されるべきであるが、多くの他の場合、特に診断適用に関しては、さらなる分布がしばしば所望される。さらなる分布を可能にするためには、均質増幅方法において得られる追加の曲線特徴が使用され得る。これは、図 5 に示されるスキームにおいて表され、ここで追加の曲線特徴、例えばRy色素及びNFI追加特徴（NFI比、定数/変数；最終分布の初期/後期近似値；バイアス $<1/>1$ ；等）の絶対SFIレベルが、感染パラメータを解明するために使用される。

## 【 0 1 0 3 】

解釈は、エンド - ポイント状態のみの考慮の代わりに、反応座標に沿って同時アッセイデータを力学的に分析することによって有意に増強されるべきであることが、それらの例から明らかである。特に、サンプルS4 - S6に関しては、純粋なエンド - ポイント分析は、単一感染の診断の危険性を単に生ぜしめ、そして包括的な分析用具組はより正確な評価を可能にする。S5の場合、エンド - ポイントNFI分布は例 3 におけるようにHBV単一感染を模倣し、そして反応座標に沿ってのNFI分布の力学的分析によれば、誤った評価“HBV単一感染”が容易に拒絶され得、そして効果的に増幅され、そしてR3により表されるHCVが、低い効果で増幅され、そしてR1により表されるHIV - 1 - 0よりも早く特定の蛍光強度（SFI）を生ぜしめるように、正しい評価“同時感染、HIV - 1 - 0 + HCV”により置換され得る。従って、R1/R3グラフは50 : 50の基線以下にすばやく下降し、R1がいくらか遅延を伴って生成され、最終分布に近づくとつれて、正のバイアスを継続する。

## 【 0 1 0 4 】

## 例 5 . HBV単一感染による実験データ

25 ~ 5000コピー/mlの用量で変化するゲノム標的物（HBVサブタイプA）及び内部対照構造体を、PCT/EP00/11459号に記載のようにして、磁気ガラス粒子技法を用いて、血漿サンプルから抽出した。溶出された核酸を、AmpliLink（商標）バージョン2・1（Roche Molecular Systems）下で作動するCOBAS TaqMan<sup>TM</sup>装置に基づいて相同同時Taqman - PCRにおいて特異的に増殖し、そして検出した。本明細書に報告される基本的研究のために、HBV特異的プローブ（コードJW144）を、FAM（ $\lambda_{EX} = \text{約}580\text{nm}$ ； $\lambda_{EM} = \text{約}518\text{nm}$ ）によりラベルされたプローブ100 $\mu\text{l}$ 当たり7.5pモルで、及びJA274（ $\lambda_{EX} = \text{約}580\text{nm}$ ； $\lambda_{EM} = 609\text{nm}$ ）によりラベルされたプローブ100ml当たり7.5pモルで適用した。

## 【 0 1 0 5 】

結果を、本発明に従ってのさらなるデータ分析のためにMS Excel（商標）Version 7.0に移した（反応座標に沿っての特定シグナル獲得、標準化されシグナル強度、NFI比及びNFI及びNFI追跡の有効なサイクル範囲の計算 [SFI>>AFI - BGノイズ]、定数/オフセット/正の傾斜を有する変数/負の傾斜を有する変数へのNFI追跡グラフの分類、及び結果のグラフ表示）。

均質多重PCR反応を、プライマー対、及びHIV - 1 M、HIV - 10、HIV2、HCV及びHBVに対して特異的なプローブを用いて、標準のPCR条件下で行った。

## 【 0 1 0 6 】

図 3 に示されるように、1つの及び同じ生化学反応（すなわち、HBV - DNAの抽出及び増幅から生成されるa-d、FAM及びJA274シグナルは、本発明の概念に従って、結合された状態で挙動し、すなわちSFIレベルがバックグラウンド以上に上昇するとすぐに、50 : 50の分布ラインに揺れる。HBV用量が高いほど、これはより早く達成され、そして反応のエンド - ポイントまで一定に維持される。COBAS TaqMan<sup>TM</sup> は、FAM及びJA274に関して非常に異なり、約11.5 : 1の標準化因子NF（JA274/FAM）をもたらすので、これは最も注目すべきである。

## 【 0 1 0 7 】

これは、FAMにより示される類似する反応に比較して、JA274により示される反応の増強された分析感受性を解釈し、すなわち50 : 50を達成する、検出できるHBV用量の低い端で、N

10

20

30

40

50

FI分布は、色素対を用いて臨界である(“悪い場合のモデル”)。さらに、実験的に確立されたNF(JA274/FAM)を用いてのSFIのNFIへの翻訳に基づいて、通常の生化学反応から生成される手段により結合されるそれらの色素は、著しい精度を伴って50:50の分布を生成する(また、図4bを参照のこと)。

【0108】

例6. 異なった同時感染(タイプI及びタイプIV)に関する実験データ

方法及び試薬組は例5に記載されるとおりであるが、但し同時感染されたサンプルから抽出された標的物に依存して、HBV、HCV又はHIV-1-0に対して特異的なプローブは、増幅/検出反応において消費された。HBVプローブを、等量のFAM-又はJA274ラベルされたオリゴヌクレオチドの混合物として使用し、HCVプローブは、全体的にFAMラベルされたオリゴヌクレオチドであり、そしてHIV-1-0プローブは全体的にJA274ラベルされたオリゴヌクレオチドであった。HBV+HCV陽性血漿サンプル及びHBV+HIV-1-0陽性血漿サンプルは、タイプIVの同時感染物であり、HCV+HIV-1-0陽性サンプルは、タイプIの同時感染物である。注意: HIV-1-0に関しては、力価は培養上清液のX倍希釈溶液で与えられ; すべての他のパラメーターに関しては、正確に定量化され[cp/ml], そして標準化された材料が利用できる。

10

【0109】

図4におけるプロットから見られるように、反応座標に沿ってのNFI分布自体及びNFI追跡は、単一感染に起因するそれらとは非常に異なる。例えば、図4aにおいては、反応番号1-12は、低く、そしておよそ等しい力価のHBV(非常に良く増幅する; 逆転写段階は包含されない)及びHCV(逆転写-PCRを通して、HBVよりもいく分遅く十分に増幅する; HCV標的物は明白な二次構造のために容易には接近しない)を特徴とする。結果的に、特定の反応の開始の後すぐに、 $SFI_{(FAM)}$ 及び $SFI_{(JA274)}$ が相当の量でHBV反応を通して生成され、そして $NFI_{(JA274/FAM)}$ 比が50:50の分布線(=1)に近づく傾向がある。

20

【0110】

しかしながら、サイクリングが進行するにつれて、HCVが、ほとんど遅延しないで反応し、そして追加の $SFI_{(FAM)}$ が生成され、 $NFI_{(JA274/FAM)}$ 比を、負の傾斜を有するグラフを伴って、平衡線以下に押進める。図4における反応番号13-24は、有効なサイクル範囲のより早い開始の方へのシフトをもたらす、低用量HBV感染及び100倍過剰のHCV用量、及び $NFI_{(JA274/FAM)}$ の比を徐々に高める低用量HBV反応からの $SFI_{(FAM)}$ 及び $SFI_{(JA274)}$ の“結合された”生成に先立って、 $SFI_{(FAM)}$ が高い用量のHCV反応から生成されるにつれて、平衡線以下に急激に下降し、そして次に、正の傾斜を伴ってゆっくりと上昇する $NFI_{(JA274/FAM)}$ 比のグラフを特徴とする。

30

【0111】

従って、図1+2に示されるような規則的連続態様で例2(p.25-26)に示される基準への適用によれば、分析は、“同時感染HBV+HCV”を生成する。これは、高い用量HBV及び低い用量HCVの組合せ(高レベルの $SFI_{(FAM)}$ 及び $SFI_{(JA274)}$ +少々の追加の $SFI_{(FAM)}$ ; 図4dを参照のこと)、又は高い用量のHBV及び低い用量のHIV-1-0(高レベルの $SFI_{(FAM)}$ 及び $SFI_{(JA274)}$ +非常に少ない追加の $SFI_{(JA274)}$ ; 図4c、反応番号7-24を参照のこと)からのほとんどの反応に関してさえ真実を維持する。

40

【0112】

少数の場合、特に後者の設定に関しては、視覚的に調べられたNFI曲線の形状及び予備数学的記述子(NFIエンド-ポイント比、NFI追跡特徴、絶対SFIレベル、等)の両者は、単一感染を示すそれらに非常に接近する。しかしながら、これは、化学的手段(ほぼ類似する発光強度、すなわち標的物用量及び付随するレベルの絶対シグナル生成に関係なくより安定するNFI比を有する色素の使用)、数学的手段(それぞれ、一次成長及びNFI曲線の分析に適用されるより精巧な統計学的手段)、及び機械的手段(本明細書に使用されるTCプロフィールに関して急速なサイクリングのために特に企画されたTCブロック及び操作ソフトウェア構成; これは、NFI比追跡グラフを安定化する一次成長曲線を平滑にすることを助ける)により改良され得る。

50

## 【0113】

さらに、図4b(反応番号13-24)及び図4c(反応番号1-6)は、 $SFI_{(FAM)}$ 及び $SFI_{(JA27)}$ の“結合されていない”生成をもたらすタイプI同時感染、すなわちこの場合、HCV+HIV-1-0の例を示す。従って、NFI比追跡グラフは、HCVがHIV-1-0よりも良好に増幅されるので(中でも、プライマー/プローブ結合部位に影響を及ぼす多型現象の結果)、平衡線以下にかなり移動し、そしてとどまる。さらに、HIV-1-0のみから生成されるJA274特異的シグナル強度は、再び理論に従って、HBV単一感染から生成されたそれらよりも相当に低い。これは、単一感染と同時感染とのさらなる識別を助ける。

## 【0114】

一般的に言及すれば、タイプIV同時感染は、特に高い用量のパラメーター5( $R1[Ry]$ 及び $R3[Rx]$ の両者のために高いSFIレベルを生成する)が非常に低い用量のパラメーター2(わずかの追加の $R1$ を生成する)と組合せられる場合、単一感染に対して識別するにはより困難であるが、しかしほとんどの場合、これは、この予備試験システム及び“最悪の場合のモデル”の色素対におけるようになりかなり単純な数学的基準を用いてさえ可能である。タイプIVの同時感染における2種の十分に増幅する標的物、例えばパラメーター5[ $R1+R3$ により示される]及びパラメーター4[ $R3$ により示される]の組合せは、実質的な量の $R3$ 強度が非同時的に及び非対照的に添加される場合、より低い不明瞭性を有する。さらに、比較的多くのパラメーター4-対-パラメーター5が無視できるほどになる場合、類似する解決限界が観察される。

10

## 【0115】

パラメーター2を包含するタイプIV同時感染に比較して(及び予測されるように)、タイプI同時感染は、同じ、生化学的に結合された色素対により示される単一感染に対して非常に容易に識別される。これは、エンド-ポイントNFI比のレベル及び反応座標にそってのNFI追跡、並びにまた $R1[Ry]$ 色素の有意に低いシグナル強度に基づいて明らかになる。これは、実質的な $R3$ 強度が低い用量でさえ、パラメーター4により生成され、そしてパラメーター2-特異的プローブの分解から生成される $R1$ 強度が、主に低く、そして60サイクルの間、かなり後期で生成される事実のためである。その結果、初期力価、又は抽出/溶出/増幅効率のいずれかにおけるほとんど必然的な差異のために、反応を通してシグナルの50:50分布を生成することは、ほとんど見込みない。

20

## 【図面の簡単な説明】

30

## 【0116】

【図1】図1は、記載される決定方法を用いての自動化された多重分析物決定アッセイについての可能なデータ処理スキームを示す。

【図2】図2は、記載される決定方法を用いての自動化された多重分析物決定アッセイについての可能なデータ処理スキームを示す。

【図3a】図3aは、時間の関数としてのNFI比( $Ry/Rx$ )を示す。

【図3b】図3bは、時間の関数としてのNFI比( $Ry/Rx$ )を示す。

【図3c】図3cは、時間の関数としてのNFI比( $Ry/Rx$ )を示す。

【図3d】図3dは、時間の関数としてのNFI比( $Ry/Rx$ )を示す。

【図4a】図4aは、時間の関数としてのNFI比( $Ry/Rx$ )を示す。

40

【図4b】図4bは、時間の関数としてのNFI比( $Ry/Rx$ )を示す。

【図4c】図4cは、時間の関数としてのNFI比( $Ry/Rx$ )を示す。

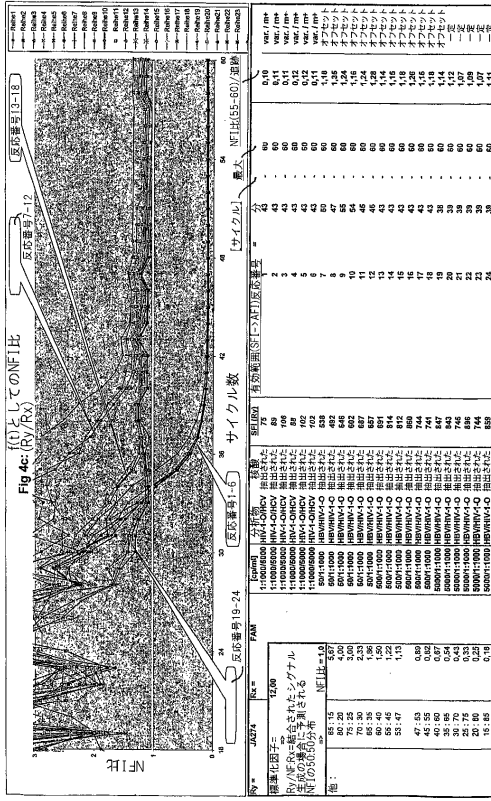
【図4d】図4dは、時間の関数としてのNFI比( $Ry/Rx$ )を示す。

【図5】図5は、潜在的に不明瞭なサンプルの処理を示す。

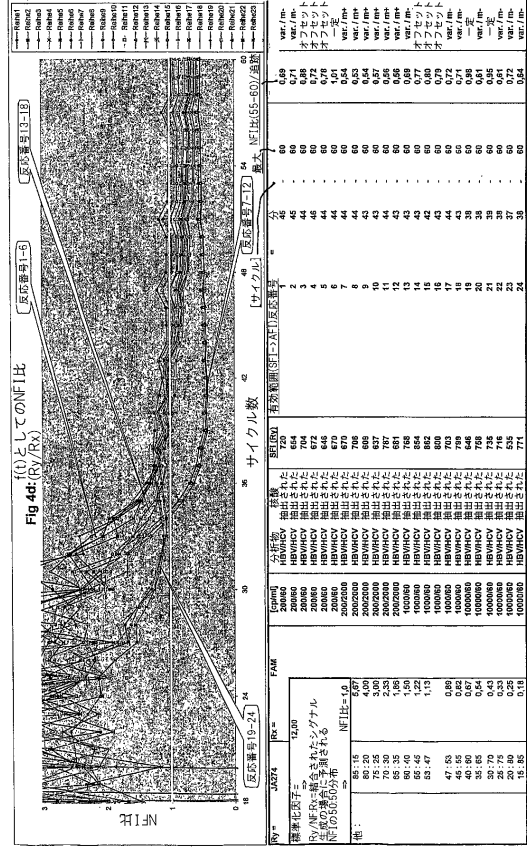




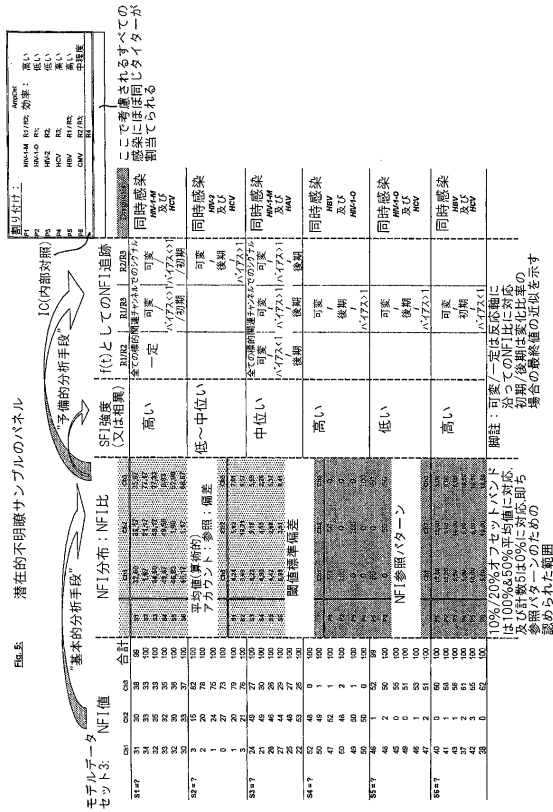
【 図 4 c 】



【 図 4 d 】



【 図 5 】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 03/020967 A1**

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68 [DE/DE]; Fichtenstrasse 3 b, 82407 Wielenbach-Hardt (DE); **KRAISS, Stefan** [DE/US]; 4283 Lucero Ct., Pleasanton, CA 94566 (US); **BERGMANN, Frank** [DE/DL]; Faltengatter 5, 82393 Ifoldorf (DE); **JOSEL, Hans-Peter** [DE/DL]; Ulmenstrasse 28, 82362 Weilheim (DE); **HEINDL, Dieter** [DE/DE]; Waldschmidstrasse 1, 82327 Tutzing (DE).
- (21) International Application Number: PCT/EP02/09496
- (22) International Filing Date: 24 August 2002 (24.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01120466.6 28 August 2001 (28.08.2001) EP
- (71) Applicant (for DE only): **ROCHE DIAGNOSTICS GMBH** [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim (DL).
- (71) Applicant (for all designated States except DE, US): **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG** [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **WEINDEL, Kurt**
- (81) Designated States (national): AU, BR, CN, CZ, JP, KR, MX, PL, SG, US.
- (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- Declaration under Rule 4.17:  
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:  
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/020967 A1

(54) Title: A METHOD FOR THE DETERMINATION OF MULTIPLE ANALYTES

(57) Abstract: The present invention is directed to a method for the determination of at least 3 analytes using specific binding partners. Combinations of detectable labels are coupled to the binding partners assuring that each binding partner molecule is coupled with only one detectable label. This allows the determination of more different analytes than different labels is used by not limiting the range of useable labels. The present invention is also related to kits, composition of matters and their use.

#### A method for the determination of multiple analytes

5 This invention is directed to methods for the determination of multiple analytes using analyte specific binding partners wherein the binding partners are labeled with less different labels than different binding partners used. Additionally, this invention is directed to compositions of matter containing these differently labeled binding partners and the use of such compositions for the determination of multiple analytes as well as suitable kits.

#### 10 Background of the invention

The determination of an analyte in a sample has acquired especial importance particularly in the field of health care, nutrition and ecology. Depending on the analyte different methods for determination can be used. Small molecules like metal ions, sugar monomers, amino acids often are determined by their chemical or physical properties.

15 Analytes having a higher molecular weight like proteins and nucleic acid polymers can also be determined using binding partners having a specific affinity to them. Useful pairs of binding partners are antibody - antigen, substrate - enzyme, nucleic acid - complementary nucleic acid, sugar - lectin. In case it is intended to determine a specific protein for which one knows that it exhibits antigenic properties a specific antibody can be used for the determination. For the determination of a specific nucleic acid sequence

20 a nucleic acid probe having a complementary sequence can be used. Such binding assays and suitable protocols are well known in the art and are fully explained in the literature, see for example Sambrook et al., 1985, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames and S.J. Higgins, eds. 1984) and a series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.).

25

In order to allow the detection of the specific binding partner - analyte complexes it is very common to label the binding partners, whereby these labels can be detected directly or indirectly using additional reagents which bind to these labels (for example

30 using biotin as a label, which can be detected using a avidin - horseradich peroxidase



conjugate and a suitable enzyme – substrate reaction for detection). Suitable labels are known in the art.

For many cases, especially in the diagnostic field it is necessary to determine two or more analytes in order to get a complete picture about a distinct situation. For example  
5 regarding a patient who might have a Chlamydia trachomatis infection, a doctor normally will not only check for a Chlamydia trachomatis but also for a Neisseria gonorrhoeae infection. Also when establishing the HLA pattern of a patient one need to determine the alleles of several different HLA loci.

When conducting a multiple analyte binding assay one has to pay attention to the labels  
10 used. In a first case the same label is used for all different binding partners. In this case two alternative formats have to be differentiated. If all binding reactions are conducted together in one reaction a positive result does only show that there is at least one analyte present in the sample, but not which one it is. As an alternative one can separate each binding reaction by conducting sequential reactions or using parallel reaction formats.  
15 Suitable formats are for example microtiterplate- or dot-blot-assays. Methods using such formats are known in the art. Such formats are time consuming and require a lot of handling steps, which could result in increased costs and contamination risks. More sophisticated methods using biochips are very expensive and are difficult to handle with regard to contaminations especially in the field of nucleic acid amplification.

In order to allow the discrete detection of several analytes within only one binding and/  
20 or detection reaction the different specific binding partners can be labeled using different labels, which can be separately detected. Such labels and useable detection methods are well known in the art. For example one can use labels which can be detected by its optical emission spectrum, whereby each of the label has a different  
25 emission spectrum. Although, it has to be noted that such assays are in reality limited to the determination of only a few analytes, because there is not an unlimited number of suitable labels which are detectable separately with high sensitivity, and sufficiently stable. In case of suitable rare earth labels, expensive and highly sophisticated detectors for time-resolved fluorimetry are necessary. These limitations are of special importance  
30 with regard to homogeneous detection methods. Such formats normally suffer from a higher signal background due to missing washing steps to eliminate binding partners which are not specifically bound to an analyte, which makes it difficult to interpret the multiple detection signals properly.

Multilabelling in conjunction with detectors featuring a plurality of optical channels has been used by many investigators. For instance, Vet et al. (PNAS 96, 6394-6399 (1999)) use methodology, in which 4 specific probes (Molecular Beacons) complementary to 4 different targets are labelled with 4 different reporter dyes, 1 dye each. The entire  
5 fluorescence spectrum of each dye is stored in the computer and used to interpret complex multiplex results. This entails need for quite sophisticated software in order to cope with the demand to be able to resolve co-infections via spectral contribution analysis. This includes normalisation of fluorescent signals from different dyes individually for each particular dye (optical channel) on maximum gain, i.e.  
10 normalisation of channel-specific growth curves pertinent to the corresponding plateau, not across different optical channels on a reference dye in order to be able to analyse signal distribution on a common basis. Other examples include Josephsson et al. (J. Clin. Microbiol. 373, 490-496 (1999); up to 3 differently labelled Molecular Beacons for up to 3 targets per assay) and Mercier et al. (J. Virol. Methods 77, 1-9 (1999); 2  
15 differently labelled probes for 2 targets per assay).

In order to increase the number of analytes detectable with a distinct number of labels also combinations of labels for labeling of binding partners can be used. In addition to binding partners having one distinct label attached also binding partners are used which are coupled with two or more labels using the same kind of labels also coupled to the  
20 single-labeled binding partners. Using for example 3 different labels 7 combinations of labels are possible by which also 7 different analytes can be detected. An in-situ-hybridization method using a similar principle is described by T. Ried et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, Vol. 89, pp. 1388 - 1392 (1992). A similar method for determination of 7 different Human Papilloma Virus types in a sample using PCR and a subsequent  
25 probe hybridization assay are described by Samiotaki et al., Analytical Biochemistry Vol. 253, p. 156 - 161 (1997). For this purpose, oligonucleotides are 5'-terminally modified by a plurality of chelator moieties. The individual chelate units are subsequently filled with either one and the same sort of rare earth ion, or a precisely adjusted mixture of up to 3 rare earth ions. Thus, in case of > 1 sort of ion being fixed by complexation,  
30 multiple fluorescent rare earth chelates ("dye mixtures") are coupled to one and the same probe molecule. Such probes are not easy to synthesise, and poorly applicable (if at all) in homogeneous amplification/detection formats.

There are a number of other technological approaches to combinatorial labelling. Ballard et al. (US 5,759,781), Speicher et al. (Nat. Genetics 12, 368-375 (1996)) and Ried

et al. (PNAS 89, 1388-1392 (1992)) have developed assay formats, in which each specific probe is known by its labelling signature, as all copies of a given probe carry 1 or more distinct fluorophors in a combinatorial fashion. Labelling is done by means of nick translations, which is less precise in terms of number of labels incorporated per probe molecule than chemical oligonucleotide synthesis, i.e. the method doesn't lend itself well to accurately analysing discrete distributions. Therefore an expert would not use such probes in nucleic acid amplification methods, especially not in homogeneous amplification methods.

The so-called CFET probes described by Tong et al. (Nat. Biotechnology 19, 756-759 (2001)) have a principally different design and mode of application. 1 to 3 dyes are coupled 5'-terminal per probe molecule, with spacer units in precisely adjusted number interspersed. The oligonucleotide moiety follows after the last dye or spacer towards the 3'-end. Thus, there is a mixture of different probe types as with Ballard et al. The spacers function as tuners for electrophoretic mobility, and for resonance intensity as well. The latter affects the fluorescent signature of the particular probe. Probes are excited at a common wavelength, and the recorded signal is resolved by the position in the capillary electropherogram *and* by overlay of the complete emission spectra at the particular position and calculation of relative contributions from components of the label set directly as digital ratios. Again, there is no signal distribution analysis of corrected & normalised signals *per se*, nor dynamically along the reaction coordinate, no "same sequence / different label" oligonucleotide design, and no signal generation as a consequence of a biochemical reaction altering probe configuration or ~ constitution.

The labeling of binding partners with more than one label per binding partner molecule bears some disadvantages. Such multiple labeled binding partners are rather demanding (and costly) in synthesis and steric hindering of the labels can occur which might decrease the efficiency of the binding of the binding partner to its analyte or the detection of the attached labels. Also interactions between the labels attached to the binding partner might occur, which could lead to wrong results. This could be relevant for example when using optical labels. It is certainly of especial importance when conducting homogeneous detection methods using fluorescence energy transfer labels as for example used in TaqMan assays (US 5210015, EP 0543942).

Therefore, it is an object of the present invention to improve the methods for determination of multiple analytes avoiding all or a part of the disadvantages of the known methods.

#### Summary of the invention

The main aspect of the present invention is related to a method for determination of multiple analytes using less labels than analytes determined. This is achieved by labelling the whole ensemble of specific probe molecules for some targets with a particular dye  
5 each, while for other targets one part of the ensemble of specific probes is labelled with a given dye, while another part of the ensemble is labelled with a different dye (same sequence / different label oligonucleotides in admixture). Preferably by performing homogeneous (solution-phase) real-time amplification assays (for example by PCR or TMA), correcting the resulting signal for all kind of relevant noise, and normalising the  
10 signal from different labels on a reference dye, targets can be deduced from the distribution of processed signal collected in a multi-channel detector. For this purpose combinations of labels are used.

For example when determining 3 analytes only two different detectable labels are necessary. A first label is attached to a first binding partner specific for the first analyte.  
15 A second label is attached to a second binding partner specific for the second analyte. For labeling of the third binding partner specific for the third analyte the same kind of labels as has been coupled to the first and second binding partners are used. One amount of the third binding partner is coupled with the first label. In case of three analytes preferably one half of the third binding partner is labeled this way. Another  
20 part of the third binding partner is coupled to the second label, which would be in case of three analytes preferably the remaining half of the third binding partner. Therefore each binding partner specific for this analyte contains a first label or a second label. This results in binding partner molecules each labeled with only one label, preferably enabling multi-colour analysis for resolving multiplex results based on signal generation  
25 which is derived from a biochemical reaction and thus provides means for kinetic response recording, while maintaining simple probe designs and state-of-the-art instrumentation for detection. In contrast thereto probes are described in the literature that have bound multiple labels to one probe molecule (Samiotaki, M. et al., *Analytical Biochemistry* 253, 156 – 161 (1997)). Such probes are more difficult to synthesize  
30 compared with the binding partners according to the present invention.

Different detection efficiencies which may occur for the different labels attached to the third binding partner, can be compensated for in 2 ways. In case a first label has a higher signal output compared to a second label, one can adjust this difference either chemically by mixing the third binding partner coupled to the first label with the third

binding partner coupled to the second label in a defined non-1:1 ratio, or mathematically via normalization of signal output to a given label selected as standard. Such different detection efficiencies may be due to the intrinsic properties of the labels, such as absorptivity or quantum yield, but can also result from different coupling efficiencies, or susceptibility to solvent effects. In the latter case the mixing of the different amounts of the third binding partner following the coupling reaction provides a good possibility to adapt such discrepancies.

In addition possible interference which may occur when two or more detectable label are attached to one binding partner molecule is avoided. Therefore, binding partners according to the present invention are compatible with broad spectrum of labels, which also encompass fluorophores and combinations of fluorophores, like classical Förster type labels (Styer and Haugland, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 719 (1967)) which can be used for example in homogeneous detection assays like the TaqMan-method for determination of low concentrated nucleic acid analytes.

It should be noted that also an increased number of analytes may be determined using three or even more labels which can be combined in the same way as shown for the two labels. When using three labels up to seven analytes may be determined. Using four different labels even 15 analytes can be detected if applied singular as well as in dual, triplicate and quadruplicate combinations. If applied singular or in dual combinations only (which might be advantageous from a practical point of view), up to 10 different analytes can be differentiated with a set of 4 labels.

Therefore the present invention is related to a method for the determination of at least 3 analytes comprising the steps:

- a) Providing a mixture of a sample containing said at least 3 analytes or suspected of containing one or more of said analytes and at least 3 different binding partners under conditions allowing the specific binding of said binding partners to said analytes, wherein
  - a first of said at least 3 binding partners is specific for a first of said at least 3 analytes and is coupled to a first label,
  - a second of said at least 3 binding partners is specific for a second of said at least 3 analytes and is coupled to a second label, which label is separately detectable from the label coupled to said first binding partner, and

WO 03/020967

7

PCT/EP02/09496

- 5 - a third of said at least 3 binding partners specific for a third of said at least 3 analytes whereby a first amount of said third binding partner is coupled to the same label as coupled to said first binding partner and a second amount of said third binding partner is coupled to the same label as the second binding partner and said first amount of said third binding partner is not coupled to the same label as coupled to the second binding partner and said second amount of said third binding partner is not coupled to the same label as coupled to the first binding partner,
- 10 b) Detecting the signal intensities indicative for said first and second label,  
c) Determining the analytes present in said sample using said signal intensities detected in step b).

15 Preferred analytes are nucleic acid analytes which can be determined using sequence specific probes. Such nucleic acid analytes can also be amplified nucleic acids using one of several nucleic acid amplification method known in the art, like LCR (U.S. Patent Nos. 5,185,243, 5,679,524 and 5,573,907; EP 0 320 308 B1; WO 90/01069; WO 89/12696; and WO 89/09835), cycling probe technology (U.S. Patent Nos. 5,011,769, 5,403,711, 5,660,988, and 4,876,187, and PCT published applications WO 95/05480, WO 95/1416, and WO 95/00667), Invader TM technology (U.S. Patent Nos. 5,846,717; 5,614, 402; 20 5,719,028; 5,541,311; and 5,843,669), Q-Beta replicase technology (U.S. Patent No. 4,786,600), NASBA (U.S. Patent No. 5,409,818; EP-0 329 822), TMA (U.S. Patent Nos. 5,399,491, 5,888,779, 5,705,365, 5,710,029), SDA (U.S. Patent Nos. 5, 455,166 and 5,130,238) and PCR (US-A-4,683,202), whereas the PCR method is most preferred.

The invention is also related to a composition of matter comprising

- 25 - a first binding partner specific for a first analyte coupled to a first label,  
- a second binding partner specific for a second analyte coupled to a second label, which label is separately detectable from the label coupled to said first binding partner, and  
- a third binding partner specific for a third analyte whereby a first amount of  
30 said third binding partner is coupled to the same label as coupled to said first binding partner and a second amount of said third binding partner is coupled to the same label as the second binding partner and said first amount of said third binding partner is not coupled to the same label as

coupled to the second binding partner and said second amount of said third binding partner is not coupled to the same label as coupled to the first binding partner.

and its use for the determination of at least three analytes in a sample.

5 Furthermore the invention is related to kits for determination of at least three analytes.

#### Brief description of the drawings

Fig. 1 shows a possible data processing scheme for an automated multiple analyte determination assay using the determination methods described. See also example 2.

#### Detailed description of the invention

10 Analytes according to the present invention are analytes which can be determined by binding assays known in the art. These are preferably components of samples for medical diagnostics or other biological analytics, i.e. in particular ingredients of body components such as antigens, antibodies, cells or nucleic acids. Such assays can be used for example for determination of infectious agents like bacteria e.g. chlamydia, neisseria  
15 and mycobacteria and viruses like HBV, HCV and HIV. Depending on the aim of an assay one can determine the amount of an analyte present in a sample as well as the configuration of an analyte, for example a nucleic acid analyte can be analysed for its allelic form or whether a patient carries a mutated form.

A sample according to the present invention contains the analyte to be determined.

20 With regard to medical diagnostics samples derived from human or animal are preferred, e.g. whole blood, tissue sections, urine, sputum, serum, plasma, buffy coat and smears can be used. Depending on the analyte and the sample it might be necessary to pre-process the sample in order to allow determination of the analyte, for example for most samples nucleic acids need to be extracted in a first step. Such pre-processed  
25 samples are also samples according to the present invention.

According to the present invention at least three analytes are determined. This could be for example a pattern of infectious agents in a patient, like the viruses HIV, HBV and HCV, which have to be tested for each blood sample in blood banks. Another example could be the determination of the histocompatibility locus antigene pattern, which  
30 consists of several loci and distinct allelic forms.

The analytes are bound by specific binding partners. Depending on the analyte one has to choose specific binding partners. Analytes having antigenic properties can be bound

by using specific antibodies. Antibodies in a sample can be determined by using the specific antigens as binding partners. If a nucleic acid analyte should be determined one can use a nucleic acid sequence being complementary to the analyte as specific probe. Further specific binding pairs like substrate – enzyme or sugar – lectin are known in the art, which might also be useful in the described methods.

5 A nucleic acid analyte is usually brought into available form by processing the original sample with one of various methods. This comprises for example change of pH (alkaline), heating, cyclic changes of temperature (freezing/thawing), change of the physiological growing conditions, use of detergents, chaotropic salts or enzymes (for  
10 example proteases or lipases), alone or in combination. For example one can use magnetic glass particles which are able to bind nucleic acid under specific conditions. Suitable particles and protocols are described in WO 96/41811 and WO 01/37291.

It is important to choose reaction conditions which promote the specific binding of the binding partners to the analytes which allows that the specific binding complexes occur  
15 but minimize the binding of the binding partners to unrelated reaction and sample components leading to an increased background signal. Such reaction conditions and suitable protocols are known in the art.

A specific nucleic acid binding partner, also called probe, for determination of a nucleic acid analyte or an amplified nucleic acid analyte preferably is an oligonucleotide, but  
20 also analogues having for example a peptide-backbone instead of the natural phosphate-sugar backbone (PNA, WO 92/20702) can be used. In order to allow a specific binding of the probe to the analyte the probes are preferably longer than 10 nucleotides, even more preferred have a length of 10 to 40 nucleotides. It is further required that the probe is sufficiently complementary to the analyte sequence. Therefore probes are  
25 preferably at least 80 % complementary, more preferred are at least 90 % complementary. In the most preferred case the probes are fully complementary to the analyte. The exact determination of complementarity and homology can be determined by using computer programs such as FastA (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 85, pp. 2444 – 2448 (88)).

30 Depending on the initial concentration of a nucleic acid analyte it might be necessary to amplify the analyte in order to allow its determination. For this purpose several amplification methods are known in the art (as referenced above). Especially when using primer based amplification methods a specific amplification of a nucleic acid analyte is possible. In combination with a probe binding assay an increased specificity of



an assay can be achieved. Also methods are known in the art, like LCR, which use labeled primers in order to allow the detection of an analyte. Also such methods can be modified according to the present invention.

5 A primer according to the present invention is a molecule capable of being extended or modified preferably by enzymes, more preferably by a polymerase of for instance pro-  
caryotic origin, when hybridized to a nucleic acid template. When using PCR  
methodology thermostable polymerases like *T. aquaticus* or *T. thermophilus* DNA-  
polymerase are preferred. These extend primers by adding mononucleotide units from  
monodesoxyribonucleosidetriphosphates to the 3'-OH-terminal end of said primers.  
10 The overall length and base sequence of a primer is dictated by the required specificity of the amplification reaction. Preferred primer lengths for performing PCR are from 10 to 40, most preferred from 15 to 30 base containing subunits, selected from mononucleotides and/or nucleic acid analog monomers. In general primers of that length are also useful for other amplification methods. If more than one primer is used  
15 for amplification, for example when using PCR or amplifying multiple target nucleic acids in one reaction, preferably primers are used which cannot hybridize to each other, because they do not contain any stretch of more than 5 consecutive complementary bases.

Labels are generally known to those skilled in the art as being a group which is  
20 detectable or can be made detectable for determination the presence of an analyte. Well-known labels are fluorescent labels, like fluoresceine and lanthanide chelates, electro-chemiluminescent labels, like ruthenium complexes, or moieties that can be recognized by another molecular entity, like haptens which can be recognized by an antibody raised against this hapten or moieties that can be immobilized, like biotin which can be bound  
25 for example to streptavidin coated solid phases, like beads or tubes. Most preferred labels especially with regard to homogenous formats are chromophores. Such chromophores can be used alone or in combination with another chromophore or for example with a non-fluorescent quencher.

In case homogeneous detection formats are used, especially for determination of nucleic  
30 acid analytes several formats are known in the art. Method like the TaqMan assay (US Nos. 5,210,015 and 5,487,972) and the kissing probe- assay are based on fluorescent energy transfer of fluorescent dyes (FET, Styer and Haughland Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 98, pp. 719- (67)). When brought in close proximity with each other a first fluorophor can interact with a second fluorophor or a non-fluorescent quencher. For

example, the electromagnetic emission or vibrational excitation of a first fluorescent dye can induce resonance in a second fluorescent dye. Depending on the format used one can for example detect a decreasing light emission of the first fluorescent dye or an increasing light emission of the second fluorescent dye as a mean for the presence of an

5 analyte. Combinations of fluorescent dyes, which can be used for this purpose, are known in the art. Examples are classical dyes suitable for Förster-type Resonance Energy Transfer like Pentamethin-indodicarbocyanin (Cy5) combined with 6-Carboxyfluorescein (6-FAM).

Label in this context means a signal generating entity, which is actually detected in the method of the present invention. With regard to the homogeneous formats described, pairs of fluorochromes are used, which get into resonance with each other and which are detected in these methods as a single detection signal. Although two distinct molecules, for example two fluorochromes, are involved, they function as one single

10 label. In addition, the term label has to be understood that it could also mean that more than one label molecule of a distinct label is coupled to a binding partner molecule.

Depending on the labels used different detectors have to be used for measuring of the signals of the labels. Beside others, especially fluorimeters are widely used for this purpose. Fluorescent labelling is most advantageous in conjunction with homogeneous PCR, as no chemical trigger reagent has to be added for signal generation, in contrast to enzymatic or chemiluminescent labelling techniques. This allows for a closed tube procedure, the most effective way to avoid cross-contamination with amplified material.

When determining multiple label signals it is important that the signals are distinguishable from each other. In order to avoid such cross-talk it is preferred when using optical labels that each label has a different emission and/ or extinction-

25 spectrum. Although when using most of the commercially available labels in multiple analyte detection assay at least some cross-talk cannot be avoided. When determining only a few analytes this cross-talk can be compensated by processing the measured signals with computer programs or using more expensive spectral fluorimeters instead of filter based fluorimeters. With regard to homogenous formats especially when using

30 fluorescence energy transfer-based methods the need of additional chromophores even increases the possibilities of interferences. Therefore in reality the number of suitable labels which can be used together in a multiple assay is limited.

According to the present invention at least one of the binding partners used is coupled with a combination of detectable labels, whereby each of these binding partner

molecules is coupled to only one detectable label. In contrast probes as described by Samiotaki et al (as referenced above) are labeled with multiple labels (e.g. 10-20 coupled 5'-terminal per oligonucleotide). Due to the proximity of the detectable labels coupled to the same probe molecule the risk of interference between the labels is very high and not all types of labels especially fluorescent dyes can be used.

The methods according to the present invention can be used for determination of an increased number of analytes in a multiple analyte assay and are compatible with a broad range of labels.

By decreasing the number of labels necessary in a multiplex assay the need for exotic labels is avoided and also cheaper detectors like filter based fluorimeters can be used instead of spectral fluorimeters which are much more expensive. This further allows for homogeneous formats, which are of outstanding importance with regard to commercial diagnostic assays due to the limited contamination risks and fewer handling steps.

As indicated above, three labels combined in different combinations can be coupled with up to seven different specific binding partners allowing the distinct determination of six different analytes. This is visualized in the table below. P stands for Parameter = analyte, a channel corresponds to an optical tract as part of a detector optimised to capture the signal of a particular detectable label. The table shows the expected percentage distribution of signal over all three channels, being normalized either chemically or mathematically. Considered is the case that of the analytes P1 to P7 only one at a time would be present in a sample. The labeling of the different binding partners are: type P1 - Label1 (signal in channel 1, P2 - Label 2 (signal in channel 2), P3 - label 3 (signal in channel 3), P4 - half amount label 1, half amount label 2, P5 - half amount label 1, half amount label 3, P6 - half amount label 2, half amount label 3 and P7 - 1/3 amount label 1, 1/3 amount label 2, 1/3 amount label 3.

Parameter	Channel		
	1	2	3
P1	100		
P2		100	
P3			100
P4	50	50	
P5	50		50
P6		50	50
P7	33	33	33

If a signal can be only measured in one channel a clear indication for the presence of one of the analytes of parameter 1, 2 or 3 is given (see table). If signals occur in two channels in a 50:50 ratio there is a strong indication for an analyte of parameter 4, 5 or 6 as indicated in the table. A signal ratio of 33:33:33 would indicate that a P7 analyte is present in the sample. However this reflects an idealized situation. Real signals may deviate and often need to be normalized in order to compensate for example different detection efficiencies of the labels, background- and cross talk-signals.

The different labels coupled to the binding partners should not change the binding efficiency of a binding partner, which might also be adjustable by varying the ratios of binding partner bound to the first label: binding partner bound to the second label. Also different detection efficiencies can be adjusted by this way.

A 50:50 signal ratio might also occur in case of the presence of two analytes. However this would probably be extremely rare, since their occurrence would depend on either a 1:1 co-infection in terms of number of starting molecules and identical extraction / amplification / detection efficiencies yielding a 50:50 signal distribution into 2 channels, or on different numbers of starting molecules in conjunction with extraction / amplification / detection efficiencies that precisely counter-balance the differences in titer and again yield a 50:50 distribution. Thus, co-infections of 2 parameters indicated by single labeled probe, respectively, e.g. P1 and P2, should result in an uneven distribution of >>50: <<50: 0 or <<50: >>50: 0 and so be distinguishable from e.g. P4

indicated by an even distribution of 50: 50: 0. However such results could also derived from samples co-infected with two agents for example P4 and P1.

In order to further decrease the risk of ambiguous results and possible errors in interpretation of the measured signals it is possible to arrange the parameters in a way that signals occurring in two or more channel can be clearly assigned to one possible analyte distribution in the sample as explained in example 1. In addition one can run an additional assay especially testing for the remaining possible analyte distributions which may be present in the sample. Such a sequential method is very economical as it allows to determine a distinct analyte distribution in most samples in a first run, whereas ambiguous samples can be re-evaluated in a second run using for example a multiple analyte assay with a reduced number of analytes (for which an unambiguous one label – one binding partner combination should be possible). Furthermore regarding nucleic acid analytes and amplified nucleic acid analytes one could for example determine the melting curve of the analyte-probe hybridization complexes or of the amplified nucleic acid, which allows distinguishing the different analytes and coming to an unambiguous result.

Also kits for determination of at least three analytes are subject of the present invention. Such kits containing in one or more containers

- a first binding partner specific for a first analyte coupled to a first label,
- a second binding partner specific for a second analyte coupled to a second label, which label is separately detectable from the label coupled to said first binding partner, and
- a third binding partner specific for a third analyte, whereby a first amount of said third binding partner is coupled to the same label as coupled to said first binding partner and a second amount of said third binding partner coupled to the same label as said second binding partner and said first amount of said third binding partner is not coupled to the same label as coupled to the second binding partner and said second amount of said third binding partner is not coupled to the same label as coupled to the first binding partner.

In addition such kits can also contain means for specific binding of the binding partners to their analytes, which may include buffers, blocking reagents and other reaction components known in the art. Kits for determination of nucleic acid analytes may also

contain reaction components for nucleic acid amplification methods as described above. A PCR reaction kit could for example also contain a polymerase, buffers, nucleotide triphosphates and/ or primers.

The present invention is exemplified by the following examples:

**Examples***Example 1*

Multi-color analysis according to the present invention can be done using the Roche Cobas Taqman amplification/ detection technology and 5'-nuclease assay technology (EP 0543942 and US 5210015) building on "classical" fluorochrome compounds and "classical" resonance energy transfer principles. A Roche Cobas Taqman instrument is equipped with up to 4 filter pairs (see also EP 0953379, EP 0953837, US 6134000 and US 6084669). A putative indicator set could consist of 4 reporters and preferentially 1 or 2, optionally non-fluorescent, quenchers. Candidate compounds that span the spectral range set by the Cobas Taqman detector, i.e. ca. 420 nm - ca. 710 nm, may include:

- for quencher (Q) dyes with broad-banded absorption range in the red, for instance polymethin-cyanine dyes (e.g. n = 5, i.e. 4 conjugated olefinic entities building the mesomeric structure), or rhodamin derivatives at the flanks symmetrically fused to unsaturated N-heterocyclic moieties that participate in the conjugated mesomeric  $\pi$ -e<sup>-</sup> system, both preferentially as non-fluorescent nitrophenyl-derivatives

- for reporter (R) dyes fluorescent molecules like coumarine dyes, fluorescein-type dyes like FAM or chlorinated derivatives, rhodamin-type dyes, oxazines or bodipy-type compounds. Three of these would be assigned to target parameters, one for monitoring IC.

General requirements pertinent to candidate dyes include: good chemical stability in stock solution and also at use level as ingredients in mastermix reagents; stable when exposed to ambient light during synthesis, purification and kit manufacture; stable when exposed to multiple heating /cooling cycles (e.g. n = 60) in PCR; sufficient spectral overlap and efficient energy transfer between corresponding RQ resonance pairs; high extinction coefficients (i.e. absorptivity); and especially for reporters high quantum yield in aqueous solutions and in the pH range employed for Taqman-PCR (e.g. pH 7-8,5).

The new concept allows the measuring of the distribution of crosstalk- and background-corrected normalized signals of 3 reporter dyes and dual combinations thereof across the corresponding 3 optical channels of Cobas Taqman instead of having a fixed assignment of a particular dye, representing a particular assay parameter, and a corresponding channel. The principle would provide for a complete resolution (via

WO 03/020967

17

PCT/EP02/09496

reporter R1, R2, R3, R1+2, R1+3, R2+3) of a positive result obtained with a 6-parameter-multiplex assay, the maximum complexity taken into consideration.

Theoretically, in cases of single-label use, 100% of the respective processed signal is found in a given channel; in cases of dual label use, processed signals would be distributed evenly across 2 corresponding channels (50% + 50%).

Discrimination of positive / negative pools (donations) could be done based on an optimized algorithm for determination of threshold cycles (ct values, i.e. the point on the reaction coordinate, where the fluorescent signal intensity rises significantly above background level), sensing the slope profile of signal-over-time curves.

- 10 Resolution of the kind of infection (assay parameter, i.e. kind of pathogen, yielding detectable product) could be done via analysis of channel-specific contributions to the total area under the signal/time curves (AUC), or to the total normalized plateau signal intensity. There is no firm dose-response correlation for criteria like these which, however, is not mandatory for qualitative assays as needed for blood screening.

- 15 A suitable 6-parameter (P1 to P6) multiplex assay could comprise the following probes (Q= quencher, R= reporter and N<sub>i</sub>= one of the four nucleotides):

parameter 1 - probe = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>g</sub>-R1-(N<sub>i</sub>)<sub>h</sub>-3'-PO<sub>4</sub> + 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>g</sub>-R2-(N<sub>i</sub>)<sub>h</sub>-3'-PO<sub>4</sub>  
5 pmol each / 100 µl reaction mix

- 20 parameter 2 - probe = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>g</sub>-R1-(N<sub>i</sub>)<sub>h</sub>-3'-PO<sub>4</sub>  
10 pmol / 100 µl reaction mix

- 25 parameter 3 - probe = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>g</sub>-R2-(N<sub>i</sub>)<sub>h</sub>-3'-PO<sub>4</sub>  
10 pmol / 100 µl reaction mix

parameter 4 - probe = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>g</sub>-R3-(N<sub>i</sub>)<sub>h</sub>-3'-PO<sub>4</sub>  
10 pmol / 100 µl reaction mix

- 30 parameter 5 - probe = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>g</sub>-R1-(N<sub>i</sub>)<sub>h</sub>-3'-PO<sub>4</sub> + 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>g</sub>-R3-(N<sub>i</sub>)<sub>h</sub>-3'-PO<sub>4</sub>  
5 pmol each / 100 µl reaction mix

parameter 6 - probe = 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>g</sub>-R2-(N<sub>i</sub>)<sub>h</sub>-3'-PO<sub>4</sub> + 5'-Q-(N<sub>i</sub>)<sub>g</sub>-R3-(N<sub>i</sub>)<sub>h</sub>-3'-PO<sub>4</sub>  
5 pmol each / 100 µl reaction mix

- 35 In other words:

in cases 2 - 4, ca. 1\*6<sup>12</sup> molecules of uniformly labelled probe (same oligonucleotide / same reporter) would be introduced into PCR per parameter;



- in cases 1, 5 and 6, again ca.  $1 \times 6^{12}$  molecules of labeled probe would be introduced into PCR per parameter, ca.  $\frac{1}{2} \times 6^{12}$  molecules with one sort of tag, and  $\frac{1}{2} \times 6^{12}$  molecules with the other sort of tag (same oligonucleotide / different reporters), which would be consumed statistically balanced;
- 5 in all case, 10 pmol of parameter-specific probe would be available.
- Regarding the risk of ambiguous results, and focusing on the use of singular labels and dual combinations only, one may argue that ambiguous results would probably be extremely rare in the case of co-infections of 2 parameters indicated by single labeled probe, respectively, e.g.  $P2 \Leftrightarrow R1 + P4 \Leftrightarrow R3$ . The probability of either a 1:1 co-
- 10 infection in terms of number of starting molecules and identical extraction / amplification / detection efficiencies yielding a 50:50 signal distribution into 2 channels, or of different numbers of starting molecules in conjunction with extraction / amplification / detection efficiencies that precisely counter-balance the differences in titre and again yield a 50:50 distribution, is considered negligibly low. Thus, an uneven
- 15 distribution of  $>(>)50 : <(<)50 : 0$  or  $<(<)50 : >(>)50 : 0$  would result (*case I*), and so be distinguishable from e.g.  $P5 \Leftrightarrow R1R3$  indicated by an even distribution of  $50 : 0 : 50$ .
- Co-infection by 2 parameters indicated by 1:1 mixtures of 2 dual labeled probes (*case II*), e.g.  $P1 \Leftrightarrow R1R2$  and  $P5 \Leftrightarrow R1R3$ , should always be evident due to signal distribution into 3 channels (e.g. ca.  $50 : 25 : 25$ , comparable extraction / amplification / detection
- 20 efficiencies assumed).
- Co-infection by 2 parameters, one represented by 1 reporter and the other by two, should be recognized due to signal distribution into 3 channels,  $\approx 33 : 33 : 33$  (*case III*, e.g.  $R1R2 + R3$ ), or yield a  $\approx 75 : \approx 25 : 0$  pattern (*case IV*, e.g.  $R1R2 + R1$ ), again assuming comparable extraction / amplification / detection efficiencies. For case II and
- 25 III, the common feature would that there is no optical channel related to target with essentially "zero signal". In other words, the "zero+x" threshold to discriminate against "true zero" will be important. In *case IV*, probably the most critical one, resolution does depend on the overall efficiency of the assay, which determines whether the resulting distribution is substantially different from a 50 : 50 situation, or not. Most probably,
- 30 additional mathematical criteria have to be taken into view in order to resolve ambiguities, especially of the latter kind. Advantageously, real-time Taqman-PCR offers such "helper arithmetics". This topic is dealt with below in some more detail.

The rare occurrences of ambiguity, i.e. the event of a 50 : 50 signal - distribution occurring from co-infection can further minimized by assigning extreme rarely found, and less efficiently amplified parameters to single labeled probes, which might be complemented by considering geographical distributions.

- 5 A putative assignment of reporters (R = Label) and assays for the determination of HIV-1-M, HIV-1-O, HIV-2, HCV, HBV and HAV could be as follows:

	P1	⇔	HIV-1-M	⇔	R1 / R2	Amplification and	high
	P2	⇔	HIV-1-O	⇔	R1	detection efficiency:	low
10	P3	⇔	HIV-2	⇔	R2		low
	P4	⇔	HCV	⇔	R3		high
	P5	⇔	HBV	⇔	R1 / R3		high
	P6	⇔	HAV	⇔	R2 / R3		medium

- 15 IC (internal control) ⇔ R4.

For safety reasons and especially with regard to a commercial assay one can also add an internal control, which for example may be detected by a probe coupled to a fourth label (R4).

- 20 Here, co-infection of HIV-1-O and HIV-2 should be very unlikely, both being very rare and geographically well separated (which, however, may change over the years), and the overall result would be "HIV positive" even in case of such an unexpected event.

- 25 On the other hand, co-infections of HIV-1-O and HCV or HIV-2 and HCV should not result in an even distribution of 50 : 0 : 50 or 0 : 50 : 50, given the current amplification efficiencies (low for HIV-1-O and HIV-2), and not be mistaken for HBV or HAV single infections, respectively. Thus it is possible to use a standard four channel fluorimeter for conducting a six-parameter assay including an internal control being separately detected, which is for example used in a Roche Cobas TaqMan-instrument.

- 30 Thus, this concept for complete resolution of a 6 parameter multiplex assay in terms of assay parameter would necessitate moderate additional efforts compared to the present chemical system and instrument platform. Likewise, the requirements in terms of a

more sophisticated analytical software are not very demanding, as shown by the considerations depicted below. In some detail, this will include:

- double logistic tracking for 3 probes (same oligonucleotide, different fluorescent tags)
- 5 - standardized procedure to establish signal outputs for individual reporters from single tagged probes and elaboration of normalization factors (taking into account impact from the sequence environment in the respective oligonucleotides, degree of purification as indicated by e.g. Em(R/Q) ratios, wavelength dependent energy contents and spectral sensitivity of CTM ASICS)
- 10 - elaboration of the most reliable output criterion or set of criteria to serve as 100% count, determination of the variance of distribution patterns, and setting of acceptance range borders for expected values
- development of a software algorithm for analysis of distribution of corrected normalized signals into 3 target channels that incorporates all the parameters
- 15 mentioned above

#### Example 2

With regard to an assay protocol for automated test devices like the Roche Cobas TaqMan™ instrument a suitable process scheme is given below (see also Figure 1).

- 20 The availability of new reagents given, the principal data collecting and data processing scheme of an automated assay could be as follows:
- | - data collection:   | status:                     |
|--|-----------------------------|
| 1. dark mean (= instrument noise)  | DM already done             |
| 25 2. dark drift (= drift correction factor as f(t))   | DD already done             |
| 3. cross-talk and preset correction factors  | XT already done             |
| 4. signal output normalization factors for reporters<br>(= preset factors to correct for quantum yield,<br>micro-environmental effects, spectral sensitivity, ...) | NF <sub>RI</sub> additional |
| 30 5. background intensity (= chemical noise,<br>accumulated from for all probes contained in the mix)   | BG already done             |
| 6. measured total signal over time   | TFI already done            |
- 35 Preferably all steps are done separately for the optical channels 1, 2, 3, and 4 on the Cobas Taqman- instrument.

- data processing:
- 5 1) for each channel, and as a signal-over-time graph,  
 $\{TFI_{f(t)} - \{ (DM * DD_{f(t)} + BG) \} * XT * NF_{RI} = NFI$  is calculated, i.e.  
channel-specific normalized corrected fluorescence intensities
  - 10 2) if channels 1, 2, 3 correspond to reporter dyes, and channel 4 to IC dye, then  
 $NFI_4 = 100\%$  IC response intensity
  - 15  $NFI_{1+2+3} = 100\%$  target response intensity,  
3) which is to be analyzed in terms of distribution across these channels, i.e. x % in  
channel 1, y % in channel 2, and z % in channel 3.
  - 20 The resulting signal distribution numbers are then compared to the pre-calculated  
values given above, and the identity of the pathogen detected is deduced from the  
correlation of optical channel-specific gain and corresponding reporter dyes, plus  
auxiliary factors.
  - 25 Thus, in other words, the assay is not calibrated with respect to target titre (i.e. it is still  
a qualitative screening assay, yielding a pos/neg result as appropriate e.g. for screening  
applications in blood banks), but with respect to signal output of parameter-specific  
probes at a given concentration (to identify the cause for the positive result of a  
multiplex amplification).
  - 30 The individual sample analysis could proceed as indicated in Figure 1.  
To comprehend the logic of this processing algorithm, let's consider the underlying  
assay principles.  
In 5'-nuclease technology (Taqman-PCR, the preferred embodiment for the invention  
set forth here) amplification and detection reactions, respectively, are closely  
35 interwoven. To this end, detection probes with 2 particular chemical modification are  
added to the PCR mastermix. One of these modifications is a fluorogenic reporter  
group (R, for instance a derivative of 6-carboxy-fluorescein) covalently attached to the  
backbone of the probe, the other one is a dye (for instance a polymethine-cyanine  
derivative) capable of absorbing the fluorescent light of the reporter and to quench it  
40 (quencher, Q). The quencher is typically attached to the probe backbone at the 5'-end,

whereas the reporter is located within the oligo sequence, spaced from the quencher by a number of nucleotide building blocks. Probes bind to target nucleic acids (sense or anti-sense strand) close to the 3'-end of a primer (reverse or forward). As soon as primer has annealed to the target and DNA-polymerase gets bound to the primer :  
5 target hybrid, elongation starts. Due to the 5'-nuclease activity of the enzyme, simultaneously with copy strand synthesis the probe is cleaved as soon as the polymerase reaches the probe binding site, reporter and quencher get separated, and the fluorescent signal becomes measurable. This process is repeated with every cycle, and more and more fluorescent reporter is accumulated in solution until reagent depletion  
10 at the end of the reaction. So, in a signal-over-time plot, sigmoidal growth curves are generated. The point on the time axis, where the arbitrary fluorescent intensity (AFI, also called relative light units, RLU) can be significantly distinguished from background signal is called threshold cycle (ct). ct is a measure of analyte titre: the smaller the ct-value, the higher the number of starting molecules and/or the better the extraction or  
15 amplification/detection efficiency. ct values can be calculated by means of different mathematical operations. For example, cut-off approaches (average background signal intensity multiplied by a constant factor yields a cut-off signal intensity to discern negative from positive) can be used, or approaches where the location of the maximum of the first or second derivative of the signal-over-time curve (i.e. the steepness or slope  
20 profile) is sensed after curve fitting. The slope profile approach is, in contrast to the signal threshold approach, essentially independent of the background intensity level and, thus highly attractive for multiplex assays with cumulated background from all probes present in the reaction mixture.

Based on these principles, and according to the processing scheme depicted above, one  
25 would employ different means to generate the primary result (i.e. positive or negative?), and the secondary result (i.e. which kind of infection renders the sample positive?).

Compared to performing a multiplex assay with one common label, there is potential loss in sensitivity due to dilution of signal into several optical channels and, thus, reduced specific signal growth curves in particular channels. Therefore, in order to  
30 generate the primary result, one would optionally work with composite signal-over-time curves. By this means, the entire specific signal yield is collected into one signal-over-time curve which then is used to determine the threshold cycle (ct) and the principal status of the sample (pos. / neg.). Using the slope profile approach, the addition of background intensity would not be detrimental, and one could exploit the

potential advantage of sensing the more pronounced growth characteristics of the specific signal gain.

On the other hand, for generation of secondary results, one would refer to the channel-specific distribution of normalized signal (NFI intensities), and deduce the kind of infection by comparing the resulting distribution patterns to the pre-calculated matrix of patterns given above. In addition, and in order to enhance the discriminatory power, also non-normalized *specific* signal intensities may be considered for analysis of ca. 50 : ca. 50 or ca. 75 : ca. 25 distributions of normalized signal, i.e. the really critical ones.

- In case of a *mono-infection* represented by a 1:1 mixture of probes, the resulting ratio of non-normalized, yet background-corrected signals R1 / R2 would be constant throughout the entire amplification/detection process, for instance 40 / 50. This must be precisely equivalent to the value of the normalization factor (0,80) obtained with equal amounts of purified dye, because both sorts of labelled probe (same oligonucleotide sequence!) would be cleaved at identical rates. Background (BG)-correction is necessary, since with a resolving 6-parameter-multiplex assay according to the concept presented here, each channel-specific background is made up from the signal output of 3 different probes tagged with the same label. Therefore, BG intensity is not only a function of the optical features of the label, but also of the structural features of the probe, i.e. linear or hairpin, or (more generally) by the degree of self-complementarity, and of the temperature during measurements which affects conformational equilibria of secondary structures. So, secondary structures of unhybridized probe must be taken into view with respect to BG intensity, and auxiliary calculations have to be based on *specific* fluorescence intensities, SFI, with

$$SFI = TFI_{f(t)} - [(DM * DD_{f(t)} + BG] * XT_1 = AFI - BG.$$

*Specific* signal, by contrast, is generated by way of 5'-nuclease activity of the polymerase depending on essentially perfect hybridization of probe to target, i.e. linearization of the probe oligonucleotide and, thus, essentially independent of probe structure. This pertains also to the truncated probe after having been cleaved and dissociated from the target strand due to the concomitant drop in Tm (melting temperature). Short internal hybrids in the residual probe oligomer should not be stable at the elevated temperatures used for annealing / elongation in PCR. After normalization, which compensates for differences in quantum yield or susceptibility to solvent effects, signal distribution in

channel 1 and 2 would be 50 : 50. Finding NFI *and* SFI ratios as expected is double proof for mono-infection.

- In case of a *double infection* indicated via 2 specific probes labelled R1 and R2 (*case I*), respectively, it is very likely that the signal dynamics (i.e. growth as a function of time) is different for the 2 different assays, as either initial analyte titre, or overall assay efficiency, or both will probably be different. Thus, in addition to the probability of a > 50 : < 50 situation on the NFI level, also the SFI ratio of R1 / R2 must be different for rather early, central, and late phases of the reaction, i.e. the SFI ratio will be variable. The ratios will have a certain trend, and be different from the respective normalization factor obtained with equivalent mixtures of purified dye, preferably coupled to a model probe (to account for inevitable microenvironmental factors, e.g. linker, local charges), e.g. a T<sub>3</sub>-R-T<sub>16</sub>-oligonucleotide, which does not modulate signal output by its structural configuration.

- In case of a *double infection* represented by R1 + R1R2 (*case IV*) and substantially different overall recoveries for the 2 assays, a normalized signal distribution not very different from 50 : 50, e.g. 55 : 45, might be observed in channel 1 and 2. In terms of non-normalized signal intensities, however, the ratio R1 / R2 would be e.g. 44 / 50 (0,88), i.e. greater than the normalization factor. Thus, the double bias of "greater than expected" on both the normalized and non-normalized level, would indicate double infection. What is more, the ratio R1 / R2, e.g. traced e.g. via AUC, would most probably not be constant throughout the entire assay due to differing signal dynamics resulting from different amplification efficiencies, which will enhance discrimination.

- If, in case of double infection, both assays have ca. equal efficiency and start from either substantially different or ca. equal analyte titres, a 75 : 25 : 0 NFI pattern would be approximated, or even exceeded, with either a R1 + R2 or a R1 + R1R2 labelling (*case I OR case IV?*). Here, discrimination between a *case IV* and a strongly *biased case I*-type co-infection may be achieved by means of absolute *specific* signal intensities (R1 intensity should be much lower in a *case I* situation) or absolute differences of channel-specific, optionally rectified, SFI values. Results might not completely unambiguous in some cases, yet.

In addition to this, composite AFI/t curves may be analysed concerning curve shape characteristics. In case of a mono-infection, one does expect a mono-sigmoidal curve

with 1 point of inflection. In case of a double infection, however, it is most likely that the 2 growth curves generated from each of the 2 kind of nucleic acid targets extracted from the 2 infectious agents are not identical in terms of  $ct$  (i.e. point on the time axis where the curve bends upward and rises above background and drift level), in terms of shape, and specific signal intensity. Thus, a bi-sigmoidal curve shape may be generated, with 2 points of inflection. So, mono- or bi-sigmoidal curve shapes might be indicative of mono- or bi-infections present in the sample under inspection. In unfavourable cases, however, superposition of 2 or more curves may lead to irregular shapes with no clearcut maximum of slope, and with noise (i.e. the roughness of the curve) being increased. Still another possibility is a composite curve with 1 point of inflection, when 2 nearly identical curves are superposed.

To sum up, there are a number of mathematical means available to achieve resolution of a positive multiplex assay result in terms of the type in infection. These include, but are not limited to:

- 15 Basic means – reference NFI distribution patterns, and
- type of deviation, either in situations with significant signal intensity in 2, or in 3, optical channels related to target. The accepted range of deviations from the reference pattern can be set by absolute numbers, % bands relative to the respective NFI value, based on precision data, or a combination of these.
- 20 Auxiliary means – analysis of NFI and SFI ratios pertinent to particular optical channels for common bias;
- analysis of NFI or SFI ratios as a function of cycle number, i.e. dynamically along the reaction coordinate (constant or variable);
  - relationship of NFI ratios and corresponding absolute SFI values, or absolute SFI differences between any 2 optical channels (optionally rectified by relating to a standard dose difference), taking into account known assay-specific overall efficiencies (extraction / amplification / detection) for the different infectious agents under inspection;
  - analysis of composite AFI-over-time curve shapes (if applicable)

A putative application mode for this set of criteria is illustrated in Fig. 1 + 2.



What is more, in order to monitor the whole process, an artificial nucleic acid construct may be added to all samples, preferably packaged (armoured) in a modified virus particle, which is co-extracted and co-amplified with the natural target. This internal control (IC) features a unique probe binding region for an IC detection probe, which  
5 differs from target-specific probes by a different reporter group with distinguishable emission characteristics. Thus, IC signal can be discerned from target signal, and as the IC is known to be present in the sample, it functions as a monitoring agent. If there is no IC response, the respective reaction has to be considered invalid, and repeated.

10

Additional to the co-extracted/-amplified/-detected internal control (IC), added to each and every specimen to be processed (i.e. both unknowns and external controls or calibrators) and indicated by R4, external positive controls will be part of the assay. These are „knowns“ which must be found positive, as opposed to „unknowns“, and may  
15 be designed as mixed control samples that give rise to signal in all target related optical channels. Combined with the IC, utility of the entire optical system would be monitored then in addition to the functionality of the complete extraction/amplification/detection process. For nucleic acid-based screening applications in blood banks, for instance, a highly sensitive, yet qualitative assay is required to identify each and every positive  
20 donation, as far as technically feasible. Therefore, titres of external positive controls would be set in the lower range of concentration

#### *Example 3*

Based on the parameter list given in example 1 the signal distribution shown below is  
25 analyzed. For each of the 6 parameters under inspection, there is a reference pattern of signal distribution across the 3 optical channels assigned to target detection. Each reference pattern is complemented by a concomitant accepted range, for instance

30

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	50	50	0
P2	100	0	0
P3	0	100	0
P4	0	0	100
P5	50	0	50
P6	0	50	50

NFI reference pattern

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	10	10	9,17
P2	10	1,67	6,25
P3	7,08	10	7,92
P4	4,17	1,67	10
P5	10	4,17	10
P6	5,83	10	10

Putative 10% / 20% off-set bands pertinent to 100% and 50% mean values, and 5 X multiples of near zero values, which translates into the following accepted ranges for the reference pattern

	Ch1	Ch2	Ch3
P1	40-60	40-60	0-9
P2	90-100	0-2	0-6
P3	0-7	90-100	0-8
P4	0-4	0-2	90-100
P5	40-60	0-8	40-60
P6	0-8	40-60	40-60

- 5 Accepted ranges of deviation may be calculated, for example, as percent values (%), absolute numbers, multiples of simple standard deviation, or combinations thereof.

For each sample (parameter) the signal distribution in Channel 1 (reporter R1), Channel 2 (reporter R2) and Channel 3 (reporter R3) is given by 6 parallel simulated data sets based on 6-fold determinations each, as shown on the table (right side). On the

- 10 left side the subsequent steps for evaluating the signal data are shown.

Simulated distribution				Simulated data-set:				
	Ch1	Ch2	Ch3		Ch1	Ch2	Ch3	Total
P1	<b>49,33</b>	<b>48,83</b>	1,83	P1	52	48	0	100
P2	<b>98,42</b>	0,33	1,25		49	48	3	100
P3	1,42	<b>97,00</b>	1,58		47	52	1	100
P4	0,83	0,33	<b>98,83</b>		50	46	4	100
P5	<b>48,17</b>	1,67	<b>50,17</b>		48	49	3	100
P6	1,17	<b>50,33</b>	<b>48,50</b>		50	50	0	100
mean values (arithmetic)				P2	98	0	2	100
According to reference pattern, <i>deviated</i>					97,5	0	2,5	100
					99	0	1	100
					100	0	0	100
P1	<b>5,25</b>	<b>6,12</b>	5,17		96	2	2	100
P2	<b>4,69</b>	2,45	3,25		100	0	0	100
P3	2,75	<b>5,02</b>	3,34	P3	1	96	3	100
P4	3,51	1,55	<b>4,81</b>		2	96	2	100
P5	<b>7,92</b>	6,75	<b>7,92</b>		2	97	1	100
P6	3,51	<b>6,48</b>	<b>7,29</b>		1	99	0	100
threefold standard deviation					0	99	0	100
according to reference pattern, <i>deviated</i>					2,5	95	2,5	100
				P4	0	0	100	100
					0	0	100	100
P1	<b>50</b>	<b>50</b>	0		3	1	96	100
P2	<b>100</b>	0	0		1	0	99	100
P3	0	<b>100</b>	0		0	0	100	100
P4	0	0	<b>100</b>		1	1	98	100
P5	<b>50</b>	0	<b>50</b>	P5	46	6	48	100
P6	0	<b>50</b>	<b>50</b>		50	1	49	100
NFI reference pattern					45	0	55	100
					52	0	48	100
					49	1	50	100
					47	2	51	100
P1	<b>10,00</b>	<b>10,00</b>	<b>9,17</b>	P6	0	50	50	100
P2	<b>10,00</b>	1,67	<b>6,25</b>		1	49	50	100
P3	<b>7,08</b>	<b>10,00</b>	<b>7,92</b>		1	53	46	100
P4	<b>4,17</b>	1,67	<b>10,00</b>		2	47	51	100
P5	<b>10,00</b>	<b>8,33</b>	<b>10,00</b>		3	52	45	100
P6	<b>7,50</b>	<b>10,00</b>	<b>10,00</b>		0	51	49	100

10% / 20%-off-set bands pertinent to 100% and 50%-mean values, and factor 5 pertinent to 0% values i.e. accepted ranges for reference pattern

With regard to P5 a distribution of Ch1:Ch2:Ch3 of approximately 50:0:50 is found, with both mean values and scatter being within the accepted ranges. This would lead to the result "P5-positiv", which means mono-infection with HBV.

5 *Example 4*

As outlined above in the course of the principal considerations given in Examples 1 and 2, 50 : 50 distributions may not always be a valid indicator of mono-infections.

Although it has to be mentioned that there are several applications where such ambiguous results do not occur, in many other cases especially for diagnostic

- 10 applications a further analysis often is desired. In order to allow a further analysis for example additional curve characteristics obtained in homogeneous amplification methods can be used. This is reflected in the scheme shown in Fig. 5, where additional curve characteristics like absolute SFI levels of the Ry dye and NFI trace features (NFI ratios constant / variable; early / late approximation of final distribution; bias <1 / > 1;
- 15 etc.) are employed to resolve the infecting parameter(s).

It is evident from these examples that resolution should be significantly enhanced by analysing the real-time assay data dynamically along the reaction coordinate, instead of considering end-point conditions only. Especially for the samples S4 – S6, pure end-

- 20 point analysis only would engender the risk of diagnosing mono-infections, while the comprehensive set of analytical tools allows for more precise assignments. In case of S5, for instance, the end-point NFI distribution mimicks HBV mono-infection as in Example 3, whereas by way of analysis of NFI distributions dynamically along the reaction coordinate, the false assignment „HBV mono-infection“ can be rejected easily, and replaced by the correct assignment „Co-Infection, HIV-1-O + HCV“, as HCV being
- 25 amplified efficiently and represented by R3, gives rise to specific fluorescence intensity (SFI) much earlier than HIV-1-O, being amplified less efficiently, and represented by R1. Thus, the R1/R3 graph falls below the 50 : 50 baseline quickly, continues with positive bias, as R1 is produced with some delay, approximating the final distribution.

*Example 5*Experimental data with HBV mono-infections

Genomic target (HBV subtype A), varying in dose from 25 – 5000 copies /ml, and  
5 internal control constructs were extracted from plasma samples using magnetic glass  
particle technology as described in PCT/EP00/11459. Eluted nucleic acids were  
specifically amplified and detected in homogeneous real-time Taqman-PCR on a  
COBAS TaqMan™ instrument operating under AmpliLink® version 2.1 (Roche  
Molecular Systems). For the basic studies reported here, HBV specific probe (code  
10 JW144) was applied @ 7,5 pmol/100 µl labelled with FAM ( $\lambda_{EX} \approx 494$  nm;  $\lambda_{EM} \approx 518$   
nm), and @ 7,5 pmol/100 µl labelled with JA274 ( $\lambda_{EX} \approx 580$  nm;  $\lambda_{EM} \approx 609$  nm).  
Results were exported to MS Excel® Version 7.0 for further data analysis according to  
the present invention (e.g. calculation of valid cycle range [SFI >> AFI-BG noise], of  
specific signal gain, normalised signal intensities, NFI ratios and NFI traces along the  
15 reaction coordinate, classification of NFI trace graphs into constant / offset / variable  
with positive slope / variable with negative slope, and for graphical representation of the  
results as well).

Homogeneous multiplex PCR reactions were performed under standard PCR conditions  
20 using primer pairs and probes specific for HIV-1M, HIV-1O, HIV2, HCV and HBV.

As shown in Fig. 3, a-d, FAM and JA274 signals generated from one and the same  
biochemical reaction (i.e. extraction and amplification of HBV-DNA) behave in a  
coupled manner according to the concept of the present invention, i.e. swing in to the  
25 50:50 distribution line as soon as SFI levels rise significantly above background. The  
higher the HBV dose, the earlier this is achieved, and remains constant until the end-  
point of the reaction. This is most noteworthy, since signal output as measured on the  
COBAS TaqMan™ is very different for FAM and JA274, resulting in a normalisation  
factor  $NF_{(JA274/FAM)}$  of ca. 11,5 : 1. This in turn translates into enhanced analytical  
30 sensitivity of reactions indicated by JA274 compared with similar reaction indicated by  
FAM, i.e. at the lower end of detectable HBV doses, attaining to a 50 : 50 NFI  
distribution is critical using this dye pair („worst case model“)! Yet, upon translation of

SFI into NFI using the experimentally established  $NFI_{(JA274/FAM)}$ , these dyes – coupled by way of being generated from a common biochemical reaction - yield 50:50 distributions with remarkable precision (see also Fig. 4, b).

5 *Example 6*

Experimental data with different co-infections (type I & type IV)

Procedures and reagent sets were as described for Example 5, except that here, dependent on the targets extracted from co-infected samples, the probes specific for  
10 HBV, HCV, or HIV-1-O were consumed in the amplification / detection reaction. HBV probe was employed as a mixture of equal amounts of FAM- or JA274 labelled oligonucleotides, HCV probe was FAM labelled in total, and HIV-1-O probe was JA274 labelled in total. HBV + HCV positive plasma samples and HBV + HIV-1-O positive plasma samples are type IV co-infections, HCV + HIV-1-O positive is a type I co-  
15 infection. Note: for HIV-1-O, titres are given in X-fold dilutions of a culture supernatant; for all other parameters, precisely quantitated [cp/ml] and standardised material was available.

As can be seen from the plots in Fig. 4, a-d, NFI distribution *per se*, and NFI traces  
20 along the reaction coordinate are very different from those resulting from mono-infections. For instance, in Fig. 4, a, the reactions # 1-12 feature low and approximately equivalent titres of HBV (amplifying very well; no reverse transcription step involved) and HCV (amplifying well, yet somewhat slower than HBV, via reverse transcription-PCR; HCV targets being not easy to access due to pronounced secondary structures).  
25 Consequently, soon after the on-set of the specific reaction  $SFI_{(FAM)}$  and  $SFI_{(JA274)}$  are produced via HBV reaction in considerable amounts, and  $NFI_{(JA274/FAM)}$  ratios tend to approach the 50.50 distribution line (=1). As cycling progresses, however, HCV reacts with little delay, and additional  $SFI_{(FAM)}$  is generated, pushing the  $NFI_{(JA274/FAM)}$  ratio below the equity line with the graph having a negative slope. Reactions # 13-24 in Fig.  
30 4, a feature low dose HBV infection plus a 100-fold excess of HCV dose, resulting in a shift of the valid cycle range towards earlier kick-off, an  $NFI_{(JA274/FAM)}$  ratio graph that rushes down far below the equity line and then rises slowly with a positive slope as

$SFI_{(FAM)}$  is generated from the high dose HCV reaction in advance of the „coupled“ generation of  $SFI_{(FAM)}$  and  $SFI_{(JA274)}$  from the low dose HBV reaction, which gradually increases the ratio of  $NFI_{(JA274/FAM)}$ .

- 5 Thus, applying the criteria set forth in Example 2 (p. 25-26) in an ordered sequential manner as depicted in Fig. 1+2, the analysis would yield „Co-infection HBV + HCV“. This holds true even for most reactions with a combination of high dose HBV and low dose HCV (high levels of  $SFI_{(FAM)}$  and  $SFI_{(JA274)}$  plus little additional  $SFI_{(FAM)}$  alone, see Fig. 4, d) or from of high dose HBV and low dose HIV-1-O (high levels of  $SFI_{(FAM)}$  and
- 10  $SFI_{(JA274)}$  plus very little additional  $SFI_{(JA274)}$  alone, see Fig. 4, c; reactions # 7-24). In a few cases, especially with the latter setting, both the shapes of NFI curves inspected visually and preliminary mathematical descriptors (NFI end-point ratios, NFI trace characteristics, absolute SFI levels, etc.) are quite close to those indicating mono-infection. This, however, can be improved by way of chemical (use of dyes with ca.
- 15 similar emission intensities, i.e. NFI ratios more stable independent of target dose and concomitant level of absolute signal generation), mathematical (more sophisticated statistical tools applied to the analysis of primary growth and secondary NFI curves, respectively), as well as technical means (TC block and operations software configuration designed specifically for rapid cycling as with the TC profile used here; this helps
- 20 to smooth the primary growth curves which in turn stabilises NFI ratio trace graphs).

- What is more, Fig. 4, b (reactions # 13-24) and Fig. 4, c (reactions # 1-6) show examples of type-I co-infection, i.e. HCV plus HIV-1-O in this case, which results in a „non-coupled“ generation of  $SFI_{(FAM)}$  and  $SFI_{(JA274)}$ . Consequently, the NFI ratio trace
- 25 graph runs, and remains, far below the equity line since HCV is amplified much better than HIV-1-O (a consequence, inter alia, of polymorphisms affecting the primer / probe binding sites). Moreover, also JA274 specific signal intensity generated from HIV-1-O alone are considerably lower than those generated from HBV mono-infections, which again is according to theory. This helps to further discriminate co-infection from mono-
- 30 infection.

Generally speaking, type IV co-infections are more difficult to discriminate against mono-infections, especially when high doses of parameter 5 (generating high SFI levels for both R1 [Ry] and R3 [Rx]) is combined with very low doses of parameter 2 (generating only little additional R1), but in most cases, this is possible even using rather simple mathematical criteria as in this preliminary test system, and a „worst case model“ dye pair. Combining 2 well amplifying targets in a type IV co-infection, e.g. parameter 5 [indicated by R1 + R3] and parameter 4 [indicated by R3] poses much less ambiguity, as substantial amounts of R3 intensity is added asynchronously and asymmetrically. Yet, if the relative abundance of parameter 4 versus parameter 5 becomes negligible, similar limits of resolution are observed. In contrast to type IV co-infection involving parameter 2 (and as expected), type I co-infections are discriminated quite easily against mono-infections indicated by the same, yet biochemically coupled dye pair. This becomes evident on the level of end-point NFI ratios and the NFI traces along the reaction coordinate as well, and also the significantly lower signal intensities of the R1 [Ry] dye. This is due to the fact that substantial R3 intensity is generated by parameter 4 even at low doses, while R1 intensity produced from cleavage of parameter 2-specific probes is principally low and generated rather late during the course of 60 cycles. So, due to almost inevitable differences in either initial titre, or extraction / elution / amplification efficiency, it is most unlikely to yield a 50:50 distribution of signal throughout the reaction.



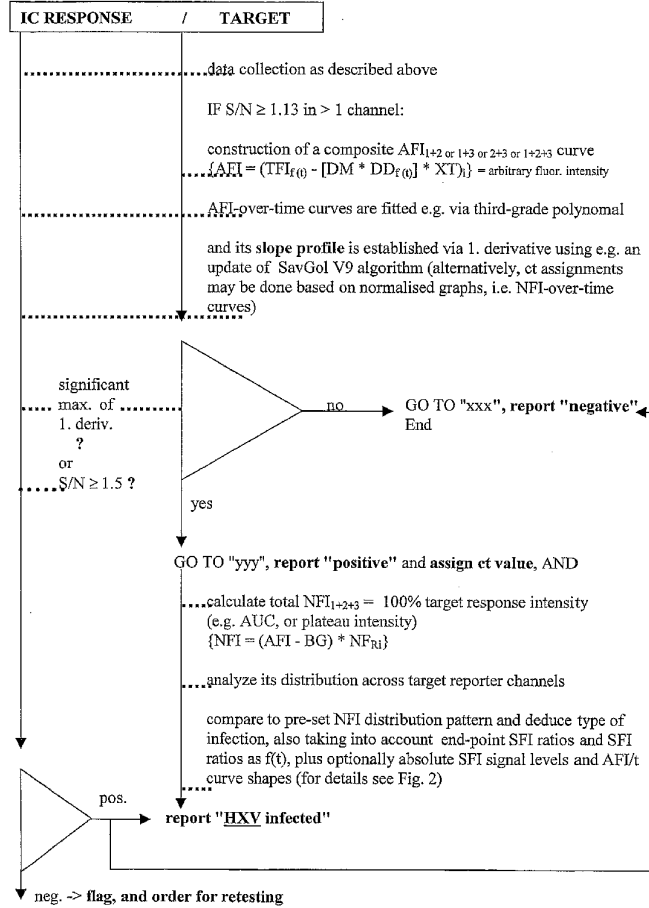
## Claims

- 1) A method for the determination of at least 3 analytes comprising the steps:
- 5 a) Providing a mixture of a sample containing said at least 3 analytes or suspected of containing one or more of said analytes and at least 3 different binding partners under conditions allowing the specific binding of said binding partners to said analytes, wherein
- 10 - a first of said at least 3 binding partners is specific for a first of said at least 3 analytes and is coupled to a first label,
- a second of said at least 3 binding partners is specific for a second of said at least 3 analytes and is coupled to a second label, which label is separately detectable from the label coupled to said first binding partner, and
- 15 - a third of said at least 3 binding partners specific for a third of said at least 3 analytes whereby a first amount of said third binding partner is coupled to the same label as coupled to said first binding partner and a second amount of said third binding partner is coupled to the same label as the second binding partner and
- 20 said first amount of said third binding partner is not coupled to the same label as coupled to the second binding partner and said second amount of said third binding partner is not coupled to the same label as coupled to the first binding partner,
- b) Detecting the signal intensities indicative for said first and second label,
- c) Determining the analytes present in said sample using said signal intensities detected in step b),
- 25 characterized in that said analytes are amplified nucleic acids.
- 2) Method of claim 1 characterized in that the different binding partners are nucleic acid sequence specific probes.
- 3) Method of claim 1 or 2 characterized in that said nucleic acids were amplified using PCR.
- 30 4) Method of any of claims 1 to 3 characterized in that said labels were detected homogeneously.

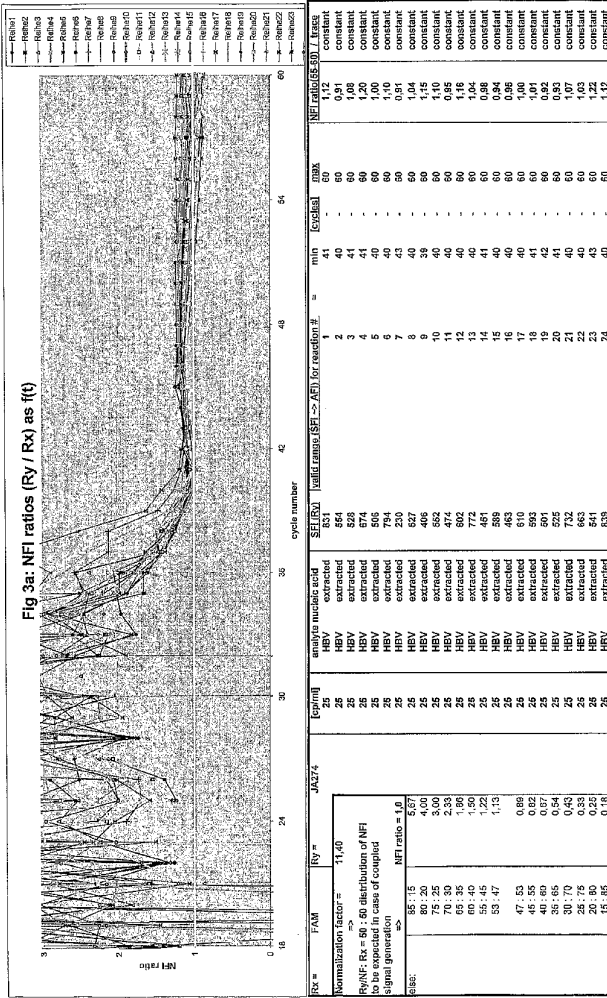
- 5) Method of claim 4 characterized in that said labels were detected using fluorescence energy transfer.
- 6) Method of any of claims 1 to 5 characterized in that a first of said first, second and third binding partners is specific for HIV, a second binding partner is specific for HCV and a third binding partner is specific for HBV.
- 7) Method of any of claims 1 to 5 characterized in that a first binding partners is specific for HIV-1-M, a second binding partner is specific for HIV-1-O, a third binding partner is specific for HIV-2, a fourth binding partner is specific for HCV, a fifth binding partner is specific for HBV and a sixth binding partner is specific for HAV.
- 8) A composition of matter comprising
- a first binding partner specific for a first analyte coupled to a first label,
  - a second binding partner specific for a second analyte coupled to a second label, which label is separately detectable from the label coupled to said first binding partner, and
  - a third binding partner specific for a third analyte whereby a first amount of said third binding partner is coupled to the same label as coupled to said first binding partner and a second amount of said third binding partner is coupled to the same label as the second binding partner and said first amount of said third binding partner is not coupled to the same label as coupled to the second binding partner and said second amount of said third binding partner is not coupled to the same label as coupled to the first binding partner,
- characterized in that said analytes are amplified nucleic acids.
- 9) A kit for the determination of at least 3 analytes containing in one or more containers
- a first binding partner specific for a first analyte coupled to a first label,
  - a second binding partner specific for a second analyte coupled to a second label, which label is separately detectable from the label coupled to said first binding partner, and
  - a third binding partner specific for a third analyte, whereby a first amount of said third binding partner is coupled to the same label as coupled to said first

- binding partner and a second amount of said third binding partner coupled to the same label as said second binding partner,  
characterized in that said analytes are amplified nucleic acids.
- 10) Kit of claim 9 further containing means for specific binding of said binding  
5 partners to said analytes in said one container or in one or more further containers.
- 11) Kit of claim 9 or 10 further containing reagents for nucleic acid amplification in said one container or in one or more further containers.
- 12) Use of at least 3 binding partners for the determination of at least 3 analytes in a  
10 sample, wherein
- a first binding partner specific for a first analyte is coupled to a first label,
  - a second binding partner specific for a second analyte is coupled to a second label, which label is separately detectable from the label coupled to said first binding partner, and
  - 15 - a third binding partner specific for a third analyte, whereby a first amount of said third binding partner is coupled to the same label as coupled to said first binding partner and a second amount of said third binding partner is coupled to the same label as said second binding partner and  
said first amount of said third binding partner is not coupled to the same label as  
20 coupled to the second binding partner and said second amount of said third binding partner is not coupled to the same label as coupled to the first binding partner,
- characterized in that said analytes are amplified nucleic acids.

Fig 1

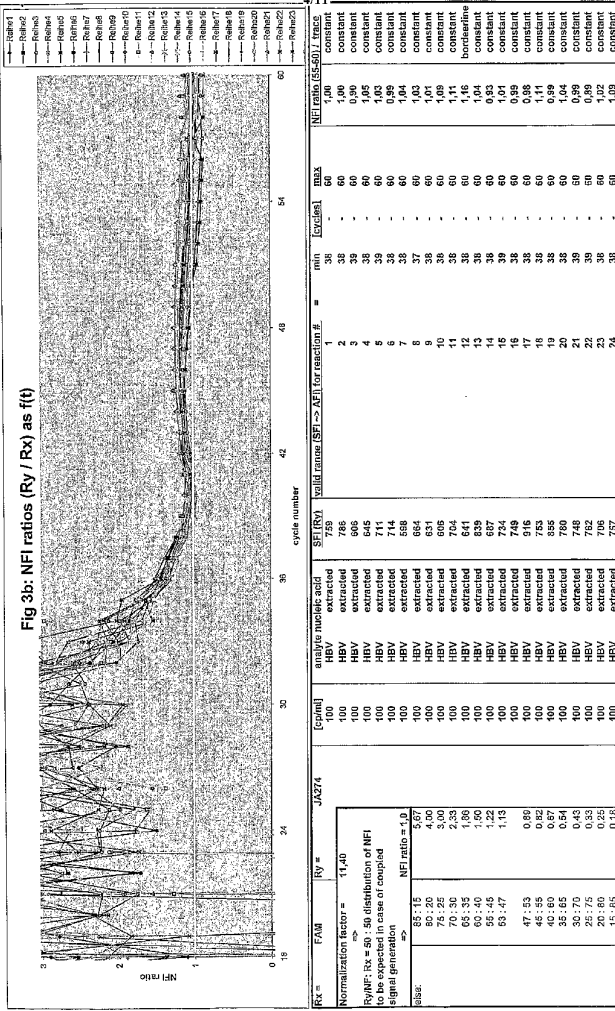






WO 03/020967

PCT/EP02/09496



WO 03/020967

PCT/EP02/09496

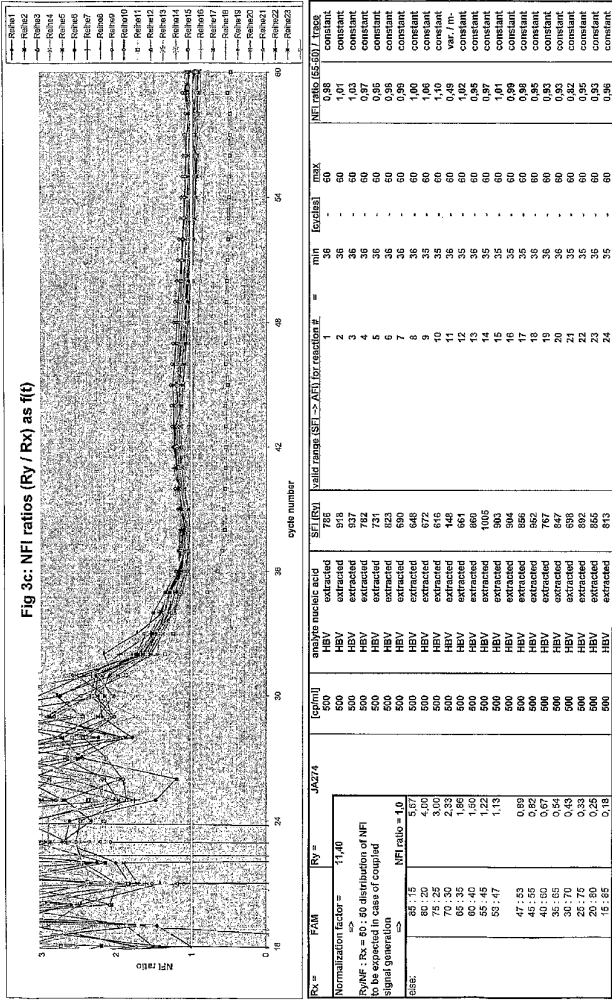
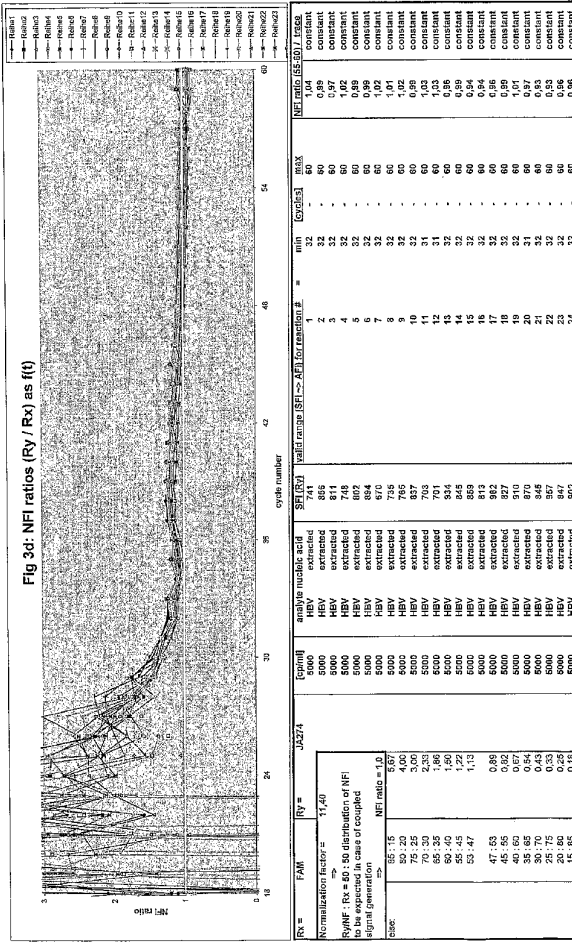


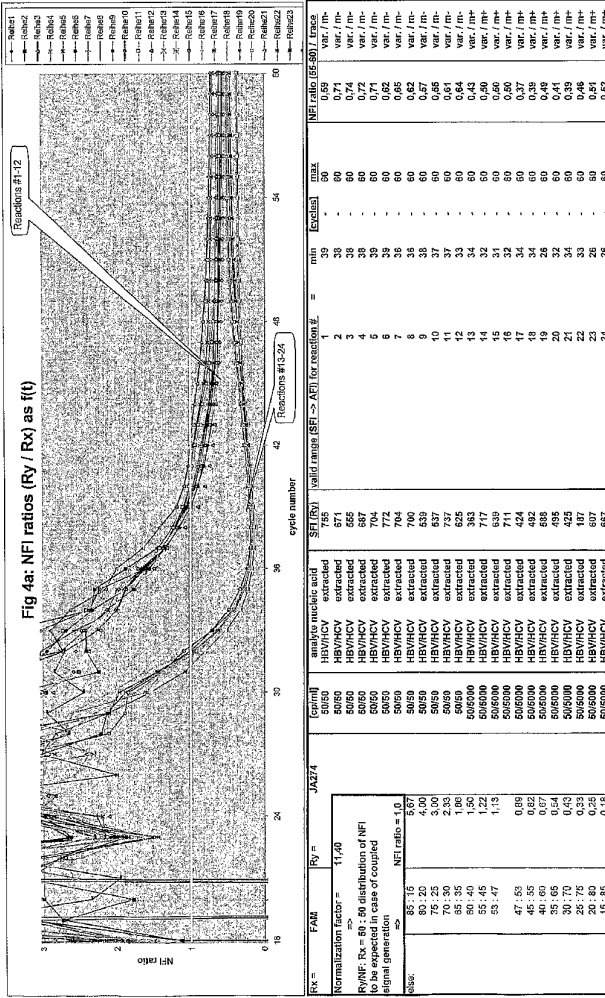
Fig 3c: NFI ratios (Ry / Rx) as fit)

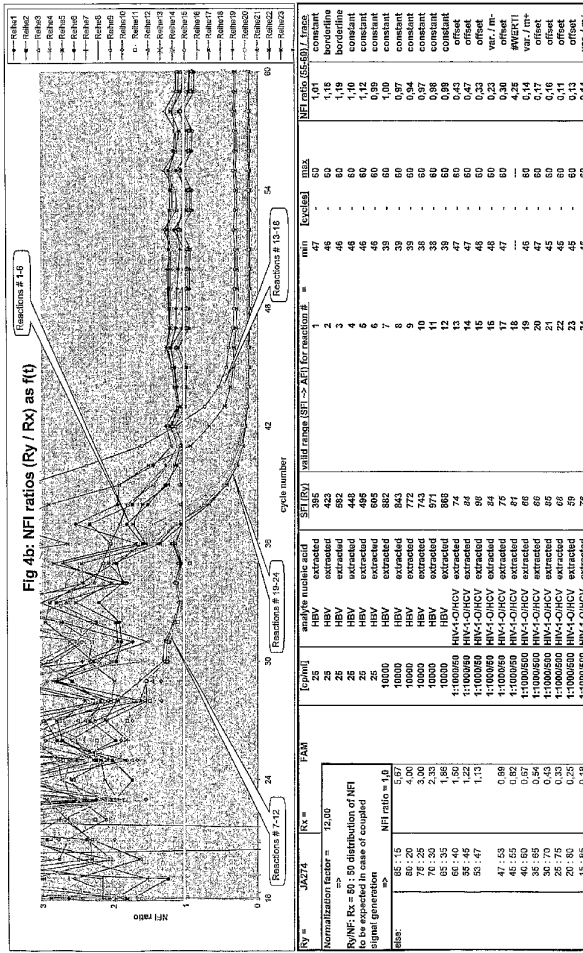
Rxn #	FAM	Ry #	JAZZ/4	(gpm)	analyte nucleic acid	SFI (RQ)	valid range (SFI >= NFI) for reaction #	min	length	max	NFI ratio (Ry/Rx) / track
1	11,40	1	4,00	500	HBV extracted	788	1	38	-	60	constant
2	78-25	2	3,00	500	HBV extracted	518	2	38	-	60	constant
3	45-35	3	2,50	500	HBV extracted	727	3	38	-	60	constant
4	65-30	4	1,86	500	HBV extracted	732	4	38	-	60	constant
5	65-40	5	1,60	500	HBV extracted	721	5	36	-	60	constant
6	55-45	6	1,22	500	HBV extracted	823	6	36	-	60	constant
7	55-47	7	1,13	500	HBV extracted	830	7	36	-	60	constant
8	47-53	8	0,99	500	HBV extracted	672	8	35	-	60	constant
9	45-35	9	0,82	500	HBV extracted	616	9	35	-	60	constant
10	36-50	10	0,57	500	HBV extracted	448	10	38	-	60	var./m-
11	36-50	11	0,57	500	HBV extracted	548	11	38	-	60	constant
12	30-70	12	0,43	500	HBV extracted	864	12	35	-	60	constant
13	25-80	13	0,25	500	HBV extracted	860	13	35	-	60	constant
14	18-85	14	0,19	500	HBV extracted	1005	14	35	-	60	constant
15	18-85	15	0,19	500	HBV extracted	900	15	35	-	60	constant
16	47-53	16	0,99	500	HBV extracted	866	16	35	-	60	constant
17	45-35	17	0,82	500	HBV extracted	962	17	35	-	60	constant
18	36-50	18	0,57	500	HBV extracted	787	18	36	-	60	constant
19	36-50	19	0,57	500	HBV extracted	874	19	36	-	60	constant
20	30-70	20	0,43	500	HBV extracted	835	20	35	-	60	constant
21	25-80	21	0,25	500	HBV extracted	892	21	35	-	60	constant
22	18-85	22	0,19	500	HBV extracted	856	22	35	-	60	constant
23	18-85	23	0,19	500	HBV extracted	873	23	35	-	60	constant
24	18-85	24	0,19	500	HBV extracted	873	24	35	-	60	constant

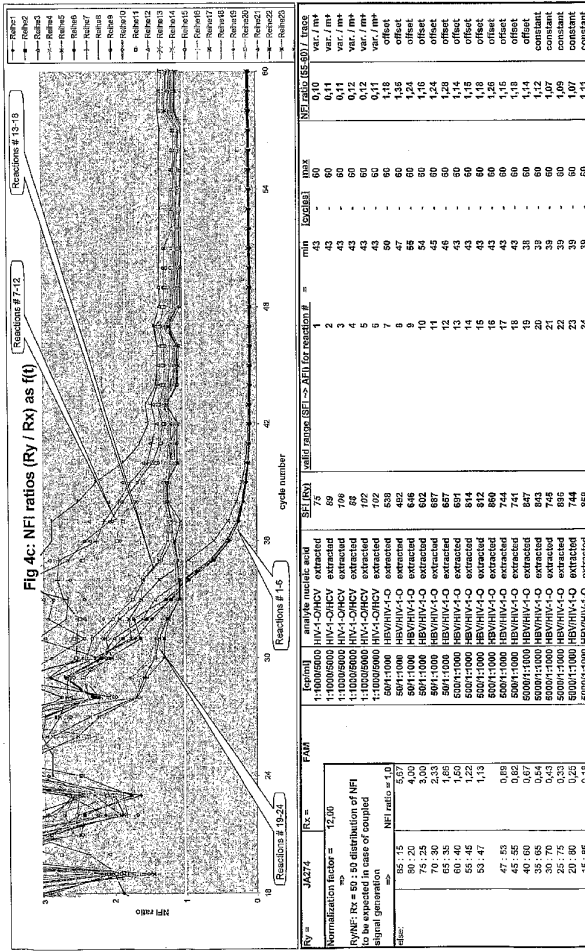
5/11





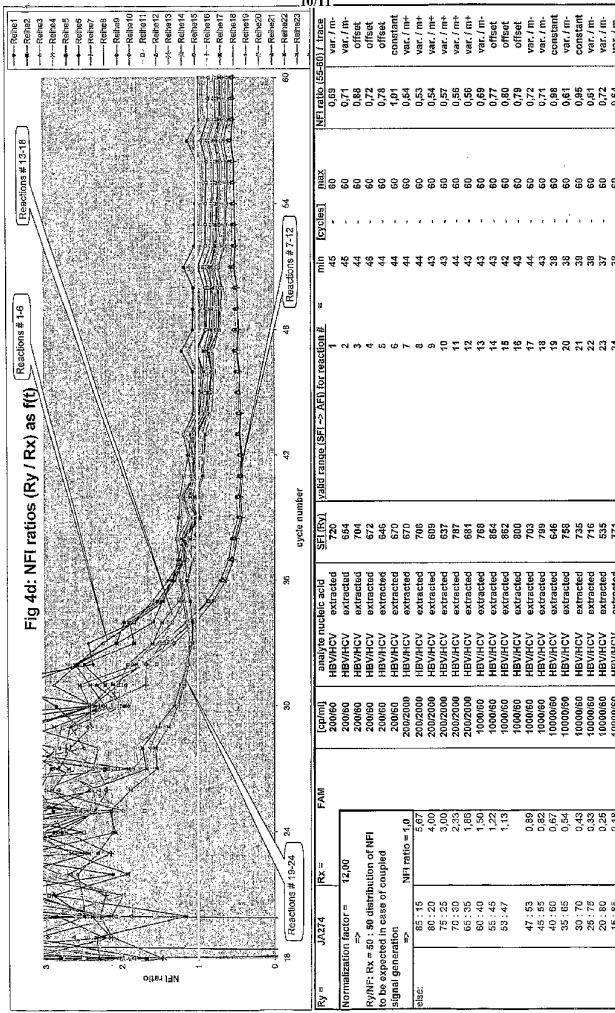






WO 03/020967

PCT/EP02/09496



**Fig. 5:** We consider a panel of potentially ambiguous samples

“back analytical process”

“secondary analytical process”

“back analytical process”

method	NFI values		NFI distribution; NFI ratios		SFI Intensities (for differences)		NFI traces as (U)		Conjunction
	CM	CHS	CM	CHS	RM/R2	RM/R3	RM/R2	RM/R3	
S1 = 7	31	33	38	39	3.2	3.2	constant	variable	Conjunction RM-FM and MCV
	34	33	33	33	3.2	3.2	variable	variable	
	35	33	33	33	3.2	3.2	variable	variable	
	36	32	38	38	3.2	3.2	variable	variable	
	37	32	38	38	3.2	3.2	variable	variable	
S2 = 7	38	35	37	37	3.2	3.2	low-intensity	variable	Conjunction RM-FM and MCV
	39	35	37	37	3.2	3.2	low-intensity	variable	
	40	35	37	37	3.2	3.2	low-intensity	variable	
	41	35	37	37	3.2	3.2	low-intensity	variable	
	42	35	37	37	3.2	3.2	low-intensity	variable	
S3 = 7	43	48	27	103	3.2	3.2	medium	variable	Conjunction RM-FM and MCV
	44	48	27	103	3.2	3.2	medium	variable	
	45	48	27	103	3.2	3.2	medium	variable	
	46	48	27	103	3.2	3.2	medium	variable	
	47	48	27	103	3.2	3.2	medium	variable	
S4 = 7	48	52	48	0	103	103	high	variable	Conjunction RM-FM and MCV
	49	52	48	0	103	103	high	variable	
	50	52	48	0	103	103	high	variable	
	51	52	48	0	103	103	high	variable	
	52	52	48	0	103	103	high	variable	
S5 = 7	53	48	1	52	88	88	low	variable	Conjunction RM-FM and MCV
	54	48	1	52	88	88	low	variable	
	55	48	1	52	88	88	low	variable	
	56	48	1	52	88	88	low	variable	
	57	48	1	52	88	88	low	variable	
S6 = 7	60	40	0	60	103	103	high	variable	Conjunction RM-FM and MCV
	61	40	0	60	103	103	high	variable	
	62	40	0	60	103	103	high	variable	
	63	40	0	60	103	103	high	variable	
	64	40	0	60	103	103	high	variable	

Notes: - variable/constant indicates the nature of the signal in all high-intensity channels  
- RM/R2/RM/R3 indicates the approximation of the SFI trace as a sum of RM, CM and CHS  
- RM/R2/RM/R3 indicates the approximation of the SFI trace as a sum of RM, CM and CHS

Fig. 5: We consider a panel of potentially ambiguous samples



“back analytical process”

“secondary analytical process”

“back analytical process”

## 【手続補正書】

【提出日】平成15年9月23日(2003.9.23)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも3種の分析物の測定方法であって、

a) 前記少なくとも3種の分析物を含むか、又は1又は複数の前記分析物を含むのではないかと推測されるサンプル、及び少なくとも3種の異なる結合パートナーの混合物を、

前記分析物への前記結合パートナーの特異的結合を可能にする条件下で供給し、ここで

- 前記少なくとも3種の結合パートナーの第1のパートナーが前記少なくとも3種の分析物の第1の分析物に対して特異的であり、そして第1のラベルに結合され、

- 前記少なくとも3種の結合パートナーの第2のパートナーが前記少なくとも3種の分析物の第2の分析物に対して特異的であり、そして第2のラベルに結合され、前記ラベルは前記第1の結合パートナーに結合されるラベルから別々に検出でき、そして

- 前記少なくとも3種の結合パートナーの第3のパートナーが前記少なくとも3種の分析物の第3の分析物に対して特異的であり、それにより、第1量の前記第3の結合パートナーが前記第1の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合され、そして第2量の前記第3の結合パートナーが前記第2の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合され、そして

前記第1量の第3の結合パートナーが結合第2の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合されず、そして前記第2量の第3の結合パートナーが前記第1の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合されず、

b) 前記第1及び第2のラベルを示すシグナル強度を検出し、

c) 段階b)において検出される前記シグナル強度、及び前記シグナル強度の比を用いて、前記サンプルに存在する分析物を測定する段階を含んで成る、前記分析物が増幅された核酸であることを特徴とする方法。

【請求項2】

前記異なる結合パートナーが、核酸配列特異的プローブであることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記核酸が、PCRを用いて増幅されることを特徴とする請求項1又は2の方法。

【請求項4】

前記ラベルが相同的に検出されることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項5】

前記ラベルが、蛍光エネルギートランスファーを用いて検出されることを特徴とする請求項4記載の方法。

【請求項6】

前記第1、第2及び第3の結合パートナーの第1のパートナーがHIVに対して特異的であり、第2の結合パートナーがHCVに対して特異的であり、そして第3の結合パートナーがHBVに対して特異的であることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

【請求項7】

第1の結合パートナーがHIV-1-Mに対して特異的であり、第2の結合パートナーがHIV-1-Oに対して特異的であり、第3の結合パートナーがHIV-2に対して特異的であり、第4の結合パートナーがHCVに対して特異的であり、第5の結合パートナーがHBVに対して特異的であり、そして第6の結合パートナーがHAVに対して特異的であることを特徴とす

る請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

- 第 1 のラベルに結合される第 1 の分析物に対して特異的な第 1 の結合パートナー、
- 前記第 1 の結合パートナーに結合されるラベルから別々に検出できる第 2 のラベルに結合される第 2 の分析物に対して特異的な第 2 の結合パートナー、及び
- 第 3 の分析物に対して特異的な第 3 の結合パートナー（これにより、第 1 量の前記第 3 の結合パートナーが前記第 1 の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合され、そして第 2 量の前記第 3 の結合パートナーが前記第 2 の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合され、そして前記第 1 量の第 3 の結合パートナーが結合第 2 の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されず、そして前記第 2 量の第 3 の結合パートナーが前記第 1 の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されない）を含んで成る、前記分析物が増幅された核酸であることを特徴とする組成物。

【請求項 9】

- 第 1 のラベルに結合される第 1 の分析物に対して特異的な第 1 の結合パートナー、
- 前記第 1 の結合パートナーに結合されるラベルから別々に検出できる第 2 のラベルに結合される第 2 の分析物に対して特異的な第 2 の結合パートナー、及び
- 第 3 の分析物に対して特異的な第 3 の結合パートナー（これにより、第 1 量の前記第 3 の結合パートナーが前記第 1 の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合され、そして第 2 量の前記第 3 の結合パートナーが前記第 2 の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合される）を、1 又は複数の容器に含む、増幅された核酸であることを特徴とする少なくとも 3 種の分析物の測定のためのキット。

【請求項 10】

前記 1 つの容器又は 1 もしくは複数の追加の容器に、核酸増幅のための試薬をさらに含む請求項 9 記載のキット。

【請求項 11】

サンプルにおける少なくとも 3 種の分析物の測定のためへの次の少なくとも 3 種の結合パートナーの使用であって、ここで前記結合パートナーは、

- 第 1 のラベルに結合される第 1 の分析物に対して特異的な第 1 の結合パートナー、
- 前記第 1 の結合パートナーに結合されるラベルから別々に検出できる第 2 のラベルに結合される第 2 の分析物に対して特異的な第 2 の結合パートナー、及び
- 第 3 の分析物に対して特異的な第 3 の結合パートナー（これにより、第 1 量の前記第 3 の結合パートナーが前記第 1 の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合され、そして第 2 量の前記第 3 の結合パートナーが前記第 2 の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合され、そして前記第 1 量の第 3 の結合パートナーが結合第 2 の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されず、そして前記第 2 量の第 3 の結合パートナーが前記第 1 の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されず）を含んで成る、前記分析物が増幅された核酸であることを特徴とする使用。



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/09496
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 759 781 A (BALLARD STEPHEN GWYNN ET AL) 2 June 1998 (1998-06-02)	1, 2, 4, 8-10, 12
Y	column 2, line 1 -column 8, line 39; example 1	3, 5-7, 11
X	SPEICHER M R ET AL: "KARYOTYPING HUMAN CHROMOSOMES BY COMBINATORIAL MULTI-FLUOR FISH" NATURE GENETICS, NEW YORK, NY, US, vol. 12, April 1996 (1996-04), pages 368-375, XP000930084 ISSN: 1061-4036	1, 2, 4, 8-10, 12
Y	* Methods * page 368, column 1 -page 370, column 2; table 2	3, 5-7, 11
--- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*E* earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*I* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		**Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*8* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 30 October 2002		Date of mailing of the international search report 07/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040; Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Aguilera, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/09496
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VET J A M ET AL: "Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 96, 1999, pages 6394-6399, XP002145609 ISSN: 0027-8424 * Abstract; Materials and Methods * ---	5-7,11
Y	MERCIER BERNARD ET AL: "Simultaneous screening for HBV DNA and HCV RNA genomes in blood donations using a novel TaqMan PCR assay." JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 77, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 1-9, XP002193782 ISSN: 0166-0934 * whole document * ---	5-7,11
Y	TONG ANTHONY K ET AL: "Combinatorial fluorescence energy transfer tags for multiplex biological assays." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 19, no. 8, August 2001 (2001-08), pages 756-759, XP002193783 August, 2001 ISSN: 1087-0156 page 756, column 1, paragraph 2 -column 2, paragraph 1; figure 1 ---	5
A	MENG Q ET AL: "Automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis B virus DNA, hepatitis C virus RNA, and human immunodeficiency virus type 1 RNA." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 39, no. 8, August 2001 (2001-08), pages 2937-2945, XP002193784 ISSN: 0095-1137 page 2938, column 2, paragraph 1 ---	1-12
A	SAMIOTAKI M ET AL: "SEVEN-COLOR TIME-RESOLVED FLUORESCENCE HYBRIDIZATION ANALYSIS OF HUMAN PAPILLOMA VIRUS TYPES" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 253, no. 2, 15 November 1997 (1997-11-15), pages 156-161, XP000721248 ISSN: 0003-2697 cited in the application * whole document * --- -/--	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		national Application No PCT/EP 02/09496
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOSEFSSON AGNETHA ET AL: "Detection and quantitation of human papillomavirus by using the fluorescent 5' exonuclease assay."</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 37, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 490-496, XP002193785 ISSN: 0095-1137 * whole document * -----</p>	1-12
A	<p>RIED T ET AL: "SIMULTANEOUS VISUALIZATION OF SEVEN DIFFERENT DNA PROBES BY IN SITU HYBRIDIZATION USING COMBINATORIAL FLUORESCENCE AND DIGITAL IMAGING MICROSCOPY"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 89, 1 February 1992 (1992-02-01), pages 1388-1392, XP002073155 ISSN: 0027-8424 cited in the application * whole document * -----</p>	1-12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 02/09496

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
US 5759781 A	02-06-1998	AU 724912 B2	05-10-2000		
		AU 1423597 A	17-07-1997		
		CA 2241148 A1	03-07-1997		
		EP 0874912 A1	04-11-1998		
		JP 2000507809 T	27-06-2000		
		US 6007994 A	28-12-1999		
		WO 9723648 A1	03-07-1997		
		CA 2241364 A1	03-07-1997		
		EP 0879297 A1	25-11-1998		
		JP 11510707 T	21-09-1999		
		WO 9723649 A1	03-07-1997		

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## フロントページの続き

- (74)代理人 100082898  
弁理士 西山 雅也
- (72)発明者 バインデル, クルト  
ドイツ連邦共和国, 8 2 4 0 7 ビーレンバッハ - ハルト, フィヒテンシュトラッセ 3 ベー
- (72)発明者 クライス, シュテファン  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 6 6, プレザントン, ルセロ コート 4 2 8 3
- (72)発明者 ベルクマン, フランク  
ドイツ連邦共和国, 8 2 3 9 3 イッフェルドルフ, ファルテルガター 5
- (72)発明者 ヨーゼル, ハンス - ペーター  
ドイツ連邦共和国, 8 2 3 6 2 バイルハイム, ウルメンシュトラッセ 2 8
- (72)発明者 ハインドル, ディーター  
ドイツ連邦共和国, 8 2 3 2 7 トゥートツィンク, バルトシュミットシュトラッセ 1
- Fターム(参考) 4B024 AA11 CA09 CA20 HA12  
4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ10 QQ42 QR41 QR56 QR62  
QS25 QX01