

(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2005-536983

(P2005-536983A)

(43) 公表日 平成17年12月8日(2005.12.8)

(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	4 B O 2 4
// <b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
<b>G O 1 N 33/53</b>	G O 1 N 33/53 Z N A M	
<b>G O 1 N 37/00</b>	G O 1 N 37/00 1 O 2	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2003-547646 (P2003-547646)	(71) 出願人	504207097
(86) (22) 出願日	平成14年11月25日 (2002.11.25)		フォーカスゲノミクス ゲーエムベーパー
(85) 翻訳文提出日	平成16年7月12日 (2004.7.12)		ドイツ連邦共和国, 1 4 5 1 3 テルトー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/013215		, ポッツダマー シュトラッセ 1 8 エー
(87) 国際公開番号	W02003/046215	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開日	平成15年6月5日 (2003.6.5)		弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	101 58 516.0	(74) 代理人	100095360
(32) 優先日	平成13年11月29日 (2001.11.29)		弁理士 片山 英二
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100093676
			弁理士 小林 純子
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(72) 発明者	チャーレ, クリストフ
			ドイツ連邦共和国, 1 0 7 7 7 ベルリン
			, バンバーガー シュトラッセ 9
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸におけるハイブリダイゼーション事象を検出するための方法

## (57) 【要約】

標的核酸をハイブリダイゼーションによって検出するための方法が開示される。この方法では、a) ハイブリダイゼーションが、固相に一方の端部によって結合している少なくとも1つのプローブ核酸を用いて行われ、この場合、プローブ核酸は、短い核酸配列の3'末端で、そして前記核酸配列に対して相補的である核酸配列の5'末端で接する標的核酸配列またはそれに対する相補的な配列を含み、これにより、DNA二本鎖、および二本鎖特異的ヌクレアーゼにより切断され得る切断モジュールを形成し、かつ、プローブ核酸はその反対側の末端にマーカを有する；b) 少なくとも1つの二本鎖特異的ヌクレアーゼを用いた少なくとも1つの処理が行われる；そしてc) 工程b) に従って固相に結合しているマーカの量が測定される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

標的核酸をハイブリダイゼーションによって検出するための方法であって、該方法において、

a) ハイブリダイゼーションが、固相にその末端の一方によって結合している少なくとも 1 つのプローブ核酸を使用して行われ、この場合、プローブ核酸は、その 3' 末端で短い核酸配列が隣接し、かつ、その 5' 末端で、この核酸に対して相補的である核酸配列が隣接する標的核酸配列、またはそれに対して相補的である配列を有し、そのような核酸配列により、DNA 二本鎖が形成され、それにより、二本鎖特異的ヌクレアーゼによって切断され得る切断モジュールが形成され、そして、このプローブ核酸はその反対側の末端に標識を有するものであり；

b) 少なくとも 1 つの二本鎖特異的ヌクレアーゼを用いた少なくとも 1 つの処理が行われ；そして

c) 工程 b) の後で固相に結合している標識の割合が測定されることを特徴とする方法。

**【請求項 2】**

1 つの方法論的設定において、互いに異なる標的配列を含有する複数のプローブ核酸が同時に使用されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

1 つの手法において、互いに異なる切断モジュールであって、異なる二本鎖特異的ヌクレアーゼによって切断され得るものを有する複数のプローブ核酸が使用されることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

プローブ核酸配列が、互いに異なる複数の標識を有することを特徴とする、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 5】**

標識が蛍光基 (fluorophores) および / または結合対の一方であることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

標的核酸とのハイブリダイゼーションを検出するためのキットであって、該キットは、固相にその末端の一方によって結合している少なくとも 1 つのプローブ核酸を使用して少なくとも 1 つのハイブリダイゼーションを行うために使用され、この場合、プローブ核酸は、その 3' 末端で短い核酸配列が隣接し、かつ、その 5' 末端で、この核酸に対して相補的である核酸配列が隣接する標的核酸配列を有し、そのような核酸配列は、DNA 二本鎖およびそれにより切断モジュールを形成することができ、かつ、二本鎖特異的ヌクレアーゼによって切断されることが可能であり、そしてプローブ核酸はその反対側の末端に標識を有することを特徴とするキット。

**【請求項 7】**

請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載される方法を実行するために好適であることを特徴とする、請求項 6 に記載のキット。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、特に、固相に結合している標識されたオリゴヌクレオチド（これは下記ではプローブ核酸と称される）を使用して、RNA 分子または DNA 分子（これらは下記では標的核酸と称される）を配列特異的な様式で検出するための方法に関する。

**【0002】**

その塩基配列における相補的領域のために、本発明のプローブ核酸（これは DNA または DNA / PNA キメラであり得る）は、二本鎖領域を含有する分子内二次構造を形成することができる。これらの二本鎖領域は、二本鎖特異的ヌクレアーゼ（制限エンドヌクレ

10

20

30

40

50

アーゼ)によって認識および切断され得る配列モチーフ(これは本明細書では切断モジュールと称される)を含有する。プローブ核酸内における分子内切断モジュールの形成は、プローブ核酸が、試験されるサンプルにおける相補的な標的核酸とハイブリダイゼーションすることによって妨げられ、その結果、ハイブリダイゼーションしたプローブ核酸が、二本鎖特異的ヌクレアーゼによる切断の後、ハイブリダイゼーションしていないプローブヌクレアーゼから区別され得るようになる。

#### 【0003】

好ましい実施形態において、この方法は、特定の位置または規定された区域にすべてが固定化されている異なるように標識されたプローブ核酸を使用して、その塩基配列が同一でない種々の標的核酸を特異的に検出することを含む。非常に小さい区域における多くのそのような核酸の小型化された装置がバイオチップ技術から広く知られている。

#### 【背景技術】

#### 【0004】

DNAアレイを調製するための定法的な方法では、非標識のプローブ核酸が、in situ オリゴヌクレオチド合成[Fodor, S. P. A.ら、「大規模固定化ポリマー合成」、米国特許第5,424,186号]または印刷法[Cheung, V. G.ら、「マイクロアレイの作製および読み取り」、Nature Genetics、第21巻、1999年1月; Bowtell, D. D. L.、「マイクロアレイによって発現データを得るための選択可能な選択肢 - 始めから終わりまで」、Nature Genetics、第21巻、1999年]によって固体マトリックスに付けられ、このマトリックスに共有結合的に連結される。プローブ核酸は、スポットと呼ばれる何らかの形態でDNAアレイの表面に体系化される。ハイブリダイゼーション実験の前では、固体マトリックスに固定化されている核酸の量を明らかにすることは不可能である。標識されたサンプル核酸および第2の標識されたサンプル核酸(これは内部標準として役立つ)とのDNAアレイのハイブリダイゼーション(二重標識、Wang, B.、「定量的マイクロアレイハイブリダイゼーションアッセイ」、米国特許第6,004,755号)によってのみ、固体マトリックスに固定化されている非標識プローブ核酸の量の違いを計算によって補償することが可能である。

#### 【0005】

別の方法では、ヌクレアーゼ保護試験の原理[Sambrook, J.ら、「Molecular Cloning」、2001年、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory]が、一本鎖特異的ヌクレアーゼを使用して、ハイブリダイゼーションしていない(すなわち、一本鎖の)標識されたプローブ核酸を分解するために使用されている[Kumar, R.ら、「ヌクレアーゼ保護アッセイ」、米国特許第5,770,370号]。この方法の精密性は、特に、プローブ核酸および標的核酸から構成される二重鎖の安定性に、そして用いられる一本鎖特異的ヌクレアーゼの特異性に依存する。DNA/DNA、DNA/RNA、DNA/PNA、RNA/RNA、RNA/PNAまたはPNA/RNAの二重鎖であり得る所与の核酸二重鎖の安定性は、水素結合により媒介される相補的な鎖の間でのワトソン-クリック塩基対形成の数および強さによって規定される[Lewin, B.、「Gene VI」、1997年、Oxford University Press; (および分子生物学の他の現在の教科書)]。その末端領域において、核酸二重鎖は、相補的な鎖の間における水素結合を弱める周囲の媒体(すなわち、H<sub>2</sub>O)の影響にさらされている。このため、二重鎖の末端領域は、一本鎖特異的ヌクレアーゼの反応を促進させる条件(30 ~ 37)のもとでは部分的に一本鎖になり、ヌクレアーゼによって切断され得る。この方法の別の欠点は、一本鎖特異的ヌクレアーゼ、例えば、S1ヌクレアーゼ、マングベーンヌクレアーゼ、RNase A、RNase T1、エキソヌクレアーゼVII、Bal31ヌクレアーゼ、ミクロコッカスヌクレアーゼまたはヌクレアーゼP1は、反応混合物における核酸およびヌクレアーゼの量比が精密に設定されていない場合、核酸を配列特異的な様式で切断せず、二本鎖領域を非常に容易に分解するということである[Sambrook, J.ら、「Molecular Cloning」、2001年、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory]。

## 【0006】

標識されていないサンプル核酸のハイブリダイゼーションを検出するために使用され得る別のシステムでは、分子ビーコンと呼ばれるもの [Tyagi, S. ら、「検出可能に標識された二重立体配座オリゴヌクレオチドプローブ、アッセイおよびキット」、米国特許第 5,925,517 号] が、ガラスのマイクロ粒子またはナノ粒子に共有結合的に結合したプローブ核酸として使用される [Steemers, F. J. ら、「ランダム配向の光ファイバー遺伝子アレイを用いた非標識 DNA 標的のスクリーニング」、2000、Nature Biotech.、第 18 巻]。分子ビーコンは、分子内二次構造を形成することができるプローブ核酸で、その両端が、分子内二次構造の結果として互いに非常に空間的に接近する異なる蛍光基に共有結合的に連結されているプローブ核酸である。2つの蛍光基の一方（消光基）により、もう一方の蛍光基（放射体）によって放射される光子が吸収される。分子ビーコンが標的核酸とハイブリダイゼーションすると、分子内二次構造が解離し、従って、励起された蛍光基（放射体）により放射される光は、消光基によってもはや吸収され得ない。この方法は、シグナル/バックグラウンド比が約 25:1 であるという重大な欠点を有している [Steemers, F. J. ら、「ランダム配向の光ファイバー遺伝子アレイを用いた非標識 DNA 標的のスクリーニング」、2000、Nature Biotech.、第 18 巻]。種々の遺伝子の転写比における差は分子ビーコンのシグナル/バックグラウンド比よりも実質的に大きくなり得るので、電子共鳴エネルギー転移または蛍光共鳴エネルギー転移に基づいて作動するシステムは、もっぱら、標的配列を増幅することにより標的核酸を定量的に測定する領域 [Gelfand, D. H. ら、「Thermus aquaticus の DNA ポリメラーゼの、5' から 3' へのエキソヌクレアーゼ活性を利用することによる特異的ポリメラーゼ連鎖反応生成物の検出」、1991、Proc. Natl. Acad. Sci.、第 88 巻および米国特許第 5,210,015 号 (1993)；Tyagi, S. ら、「分子ビーコン：ハイブリダイゼーション時に蛍光を発するプローブ」、1996、Nature Biotech.、第 14 巻]、または非定量的な様式で核酸を測定する状況 [Steemers, F. J. ら、「ランダム配向の光ファイバー遺伝子アレイを用いた非標識 DNA 標的のスクリーニング」、2000、Nature Biotech.、第 18 巻]においてである。

10

20

## 【0007】

現在、 $1\text{ cm}^2$ あたり 10000 個を超えるスポット、すなわち、 $1\text{ cm}^2$ あたり 10000 個を超える異なる核酸プローブを DNA アレイに固定化することが可能である [Bottle, D. D. L.、「マイクロアレイによって発現データを得るための選択可能な選択肢 - 始めから終わりまで」、Nature Genetics、第 21 巻、1999 年 1 月]。互いに識別され得るサンプル点（スポット）の最大数は、達成することが技術的に可能である最小のスポットサイズによって規定される。ナノリットル規模での液体の量が、アレイを調製するときには移されるので、これは、移された液体の粘度および表面張力などの物理的特性に依存する。より低い限界をサンプルスポットのサイズに設定する別のパラメータは、光学顕微鏡の光学的分解能である。これは、蛍光、発光またはリン光を検出するための装置はすべてが、光学顕微鏡（共焦点レーザー走査顕微鏡）の光学システムに対応する光学的システムとともに作動するからである。従って、無制限の数のサンプルスポットを DNA アレイに固定することは不可能である。

30

40

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0008】

従って、本発明は、標的核酸をハイブリダイゼーションによって検出するための方法に関する。この場合、この方法では、

a) ハイブリダイゼーションが、固相に一方の端部によって結合している少なくとも 1 つのプローブ核酸を使用して行われる。それぞれのプローブ核酸は、その 3' 末端で短い核酸配列が隣接し、かつ、その 5' 末端で、これに対して相補的である核酸配列が隣接する標的核酸配列を有し、そのような配列により、短い DNA 二本鎖が形成され得る。この二本鎖は、二本鎖特異的ヌクレアーゼ（制限エンドヌクレアーゼ）によって切断されるこ

50

とが可能であり、それにより、切断モジュールを形成する。また、プローブ核酸は、固相に結合していない反対側の末端に標識を示す。

b) 少なくとも1つの二本鎖特異的ヌクレアーゼを用いた少なくとも1つの処理が行われる。ヌクレアーゼによる消化は、二本鎖を形成している切断モジュールを切断するだけである。標的核酸が検出される核酸とハイブリダイゼーションしたために、二本鎖を形成することができない場合、二本鎖の切断モジュールは形成されず、核酸は切断されない。

c) 最後に、工程b)の後で固相に結合している標識の量が測定される。

#### 【0009】

好ましい実施形態において、複数の異なるプローブ核酸（これらは異なる標的核酸を含有する）が1つの方法論的方法で使用される。

10

#### 【0010】

1つの方法では、異なる二本鎖特異的ヌクレアーゼによってその後に切断され得る異なる切断モジュールを有する複数のプローブ核酸を使用することもまた好ましい。同様に、プローブ核酸が異なる標識を有することもまた可能であり、この場合、標識は蛍光基および/または結合対の一方である。

#### 【0011】

本発明による方法の利点の1つは、本発明に従って使用されるプローブ核酸が種々の変数を含むということである。一方で、標的配列を変化させることが可能であり、その結果として、試験されるサンプルにおいて非常に種々の核酸配列を検出することが可能である。他方で、切断分子は、様々な制限エンドヌクレアーゼに対する認識配列を含有することができ、その結果として、プローブ核酸は、同時または順次のいずれかで、種々の制限エンドヌクレアーゼにより消化することができる。最後に、プローブ核酸はまた、異なる標識を有することができる。その場合、対応するDNAアレイを、課題の性質とは無関係に設計することができ、そして、いくつかの異なる処理工程および評価工程を同時または順次のいずれかで行うことができ、これにより、最大量の情報を得ることが可能になる。

20

#### 【0012】

本発明はまた、標的核酸とのハイブリダイゼーションを検出するためのキットに関し、本発明に従って使用される少なくとも1つのプローブ核酸との少なくとも1つのハイブリダイゼーションを行うために本発明のキットを使用することが可能である。

30

#### 【0013】

他の核酸検出法から知られている技術もまた、本発明による方法に関連して使用することができる。ノーザンブロット、サザンブロットまたはヌクレアーゼ保護アッセイなどの方法では、標的核酸（これはDNAまたはRNAであり得る）の配列特異的な検出が、標的核酸および標識されたプローブ核酸（これはDNA、RNAまたはPNAであり得る）から構成されるハイブリッド（二重鎖）の形成を検出することによって行われる。DNAアレイの場合、非標識のプローブ核酸が固体マトリックスに結合させられ、標識されたcDNAまたはcRNA（これらは下記ではサンプル核酸と称される）とハイブリダイゼーションさせられる。一般に、核酸におけるハイブリダイゼーション事象は、蛍光、化学発光、化学蛍光または放射能を検出することによって検出される [Sambrook, J. 40  
ら、*「Molecular Cloning」*、2001年、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory]。多数の蛍光基、例えば、フルオレセイン、リサミン、フィコエリトリン、ローダミン (Perkin Elmer Cetus)、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7およびフルオルX (Amersham) などを、例えば、サンプル核酸および/またはプローブ核酸を蛍光標識するために使用することができる [Kricka, L.、*「Non isotopic DNA probe techniques」*、1992年、Academic Press, San Diego]。本明細書に列挙される蛍光基に加えて、本明細書において言及されていない他の蛍光基を、核酸を標識するために使用することもまた可能である。これらの蛍光基には、核酸に共有結合的に連結することができ、かつその励起極大および放射極大が赤外スペクトル領域または可視スペクトル領 50

域またはUVスペクトル領域にある蛍光基のすべてが含まれる。サンプル核酸またはプローブ核酸が結合対の一方（例えば、ビオチン、ジゴキシゲニンまたは他のハプテンなど）で標識されている場合、検出可能な標識とコンジュゲート化されている結合対の第2の部分（ストレプトアビジオンまたは抗ジゴキシゲニンAb）が、ハイブリダイゼーション後の二重鎖とインキュベーションさせられる。結合対の第2の部分の検出可能な標識は蛍光基であり得るか、または、光の放射（化学発光または化学蛍光）を伴って基質を変換する酵素（なかでも、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ）であり得る[「Fluorescent and Luminescent Probes for biological activity」、1999年、第2版、Mason, W. T. 編]。

#### 【0014】

核酸は、そのヌクレオチド塩基が、蛍光基、結合対の一方（例えば、ビオチン、ジゴキシゲニンまたは他のハプテン）、あるいは反応基（ $\text{NH}_2$ または $\text{SH}$ ）に共有結合的に連結されているヌクレオチド三リン酸の存在下でDNAまたはRNAの酵素触媒合成を行うことによって非放射能的に標識される。DNAポリメラーゼまたはRNAポリメラーゼ（AMV逆転写酵素、MMLV逆転写酵素、T7RNAポリメラーゼ、T3RNAポリメラーゼ、SP6RNAポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、クレノウフラグメント、DNAポリメラーゼなど）により触媒される合成の過程で、これらの修飾されたヌクレオチド三リン酸は、新しく形成されつつある核酸に取り込まれる[Sambrook, J.ら、「Molecular Cloning」、2001年、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory]。標識されたサンプル核酸を合成するためのテンプレートとして使用されるmRNAの完全性は、この点に関して非常に重要である。プローブ核酸（これは、逆転写酵素によってRNAから合成され、そして、PCRまたはインビトロ転写によってDNAから合成される）の長さは、その塩基組成とともに、標識効率のためには基本的に重要である。標識される核酸が短いほど、少数の、検出可能な基で標識されたヌクレオチド三リン酸（dNTPまたはrNTP）が合成時に取り込まれる。mRNA集団がRNaseによって分解される場合、このRNA集団から合成されたサンプル核酸は、一方では、非常に弱く標識されるだけであり、他方では、調べられる細胞タイプ、組織または器官において優勢である転写状態を表さない。代表するサンプル核酸は、完全に無傷なmRNAから合成され得るだけである。その塩基が上記の基で標識されているヌクレオチド三リン酸は、すべての知られているDNAポリメラーゼおよびRNAポリメラーゼによって取り込まれるが、この場合、DNAポリメラーゼおよびRNAポリメラーゼは、非修飾のヌクレオチド三リン酸が取り込まれるよりも実質的に低い効率で、それぞれ、DNAおよびRNAの合成を触媒する[Molecular Dynamics Inc.、「PCRによる蛍光性DNA標識」、1999年、Molecular Dynamics Application Note#62]。従って、標識されたプローブ核酸の収率は、放射能システムと比較して低く、そして、合成後の精製工程から生じるサンプル物質の喪失が非常に大きい。

#### 【0015】

このため、分析されるmRNAが単離される比較的多量のサンプル材料（例えば、培養細胞または組織サンプル）を、例えば、DNAアレイをハイブリダイゼーションさせるために使用される非放射能的に標識された核酸を合成するために使用しなければならない。このため、DNAアレイは、分析のために得ることができるサンプル材料の量が制限される臨床診断などの領域では、限られた程度で使用され得るだけである。さらに、核酸は、汚れた粒子の表面に付着する傾向を有する。このため、汚れた粒子は、標識された核酸とのハイブリダイゼーションによって、固相に結合している非標識核酸の、特にDNAアレイ上の検出をひどく損なうことがあり、この点で、偽陽性の結果をもたらし得る。

#### 【0016】

生物工学の分野、および特に臨床診断または産業での活発な化合物研究などの分野は、大きいサンプル処理能を確実にするための自動化された方法に依存しているので、これらの分野では、測定の結果が、何らかの複雑な校正測定を行うことなく標準化されることを可能にする発現分析を実行するための方法が求められている。核酸におけるハイブリダイ

10

20

30

40

50

ゼーション事象を検出するためのシステムで、先行技術に従い、かつ発現分析の分野で使用されているシステムは、調べられることになるmRNAで、サンプル核酸として使用されるmRNA、またはサンプル核酸を合成するためのテンプレートとして使用されるmRNAの完全性に大きく依存している。特に、ハイブリダイゼーションに供される、固相に結合していない核酸（サンプル核酸）が標識されるために、これらのシステムは、測定全体をゆがめ得る誤った解釈を受けやすい。

#### 【0017】

本発明による方法は、非標識の標的核酸と固相結合のプローブとの配列特異的なハイブリダイゼーションが、サンプル核酸の完全性にもかかわらず定量的に測定され得る発現分析のために使用することができる。表面において検出され得る異なるプローブ核酸の最大数は光学系およびマイクロ流体工学の領域における物理的制限によって制限されるが、本発明は、光学系およびマイクロ流体工学の領域における物理的制限によって制限されない一方で、規定された区域において検出され得るプローブ核酸の量が、先行技術に従っているシステムと比較して、顕著に増大し得るシステムを使用するDNAアレイを開示する。

10

#### 【0018】

好ましい実施形態により、固相結合のプローブ核酸に対するハイブリダイゼーション事象を検出するための方法が開示され、この場合、そのような方法は、固相に結合している標識されたプローブを使用することによって、測定結果を標準化すること、標識されていないサンプル核酸または標的核酸を使用すること、そして、規定されたスポットにおいて種々の標的核酸の発現を同時に分析することを可能にする。本発明による固相結合のプローブ核酸は、DNAまたはDNA/PNAキメラ[Finn, P. J. ら、「DNA-PNAキメラオリゴマーの合成および性質」、1996、Nuc.Acids.Res.、第24巻(17): Raitila, T. ら、「DNAに対するPNAの配列特異的な結合の熱力学」、2000、Biochemistry、第39巻: van der Laan, A. C. ら、「PNA-(5')-DNAキメラの結合特性の最適化」、1998、Bioorg.Med.Chem.Lett.、第8巻]であり得るが、二本鎖特異的エンドヌクレアーゼによって認識および切断され得る分子内二次構造を、その配列のために形成する。分子内二次構造を形成することの結果として二本鎖である本発明によるプローブ核酸の成分は、二本鎖特異的エンドヌクレアーゼに対する接近性を確実にするために、主としてDNAである。

20

#### 【0019】

本発明による固相結合のプローブ標的核酸が検出される核酸とハイブリダイゼーションする結果として、分子内二次構造、従って、二本鎖領域は解離し、二本鎖特異的エンドヌクレアーゼによってもはや認識および切断され得ない。ハイブリダイゼーションしていない固相結合のプローブヌクレオチドは酵素により切断される。本発明によるプローブ核酸の標識されている成分は酵素切断によって表面から分離し、周囲の媒体に拡散して、適する場合には洗い流され得る。ハイブリダイゼーションしていないプローブ核酸が酵素的に分解された後、酵素的に短縮化されていないハイブリダイゼーションしたプローブ核酸の蛍光が測定される。この方法のシグナル/バックグラウンド比は、用いられる二本鎖特異的エンドヌクレアーゼの特性に、そして、ハイブリダイゼーションしていないプローブ核酸が分離される完全度に依存するだけであり、放射能標識された核酸とのハイブリダイゼーションのシグナル/バックグラウンド比に対応する。

30

40

#### 【0020】

標識されるのは、特定のサンプル核酸または標的核酸ではなく、固相に結合しているプローブ核酸であるので、その励起極大または放射極大に関して分光的に識別され得る蛍光基が存在するのと同じくらい多くの、配列特異性が異なるプローブ核酸を、表面上の規定された区域またはスポットに固定化することができる。プローブ核酸に共有結合的に連結される蛍光基の数は、本方法の感度を所望するように増大させるために使用することができる。

#### 【0021】

知られている蛍光基に加えて、固相に結合しているプローブを標識するために結合対の

50

一方（例えば、ジゴキシゲニン、ビオチンまたは他のハプテンなど）を使用することもまた可能である。異なるハプテンと特異的に結合する分子（免疫グロブリン、ストレプトアビジン）が、種々の基質特異性を有する酵素に共有結合的に連結される。これらの酵素は、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、酸性ホスファターゼなどであり得る。従って、利用可能な異なるハプテンの数および利用可能な異なる酵素コンジュゲートの数に依存して所望されるのと同じくらい多くの、配列特異性が異なるプローブ核酸を、表面上の規定された区域またはスポットに固定化することが可能である。

#### 【0022】

固定化されたプローブ核酸とハイブリダイゼーションさせるために使用されるサンプル核酸または標的核酸は、標識されていないDNA、cDNA、cRNAまたはmRNAであり得る。従来のシステムとは対照的に、本システムではプローブ核酸が標識されるので、ハイブリダイゼーションのために使用されなければならないプローブ核酸の検出モジュールに対して相補的であるのは、標的核酸またはサンプル核酸の一部だけである。記載されたシステムの別の利点は、検出感度が、サンプル核酸が標識される効率に依存せず、しかし、その代わり、プローブ核酸の標識化にだけ依存するという点である。しかしながら、後者は、非常にはるかに一層精密に決定することができる。

#### 【0023】

本発明によるプローブ核酸が図1Aに概略的に表される。典型的なプローブ核酸は下記の成分を有する：

- ・固相に結合するための少なくとも1つの官能基（1）、例えば、アミノ基（NH<sub>2</sub>）もしくはチオール基（SH）、または結合対の一方、例えば、ビオチンもしくはジゴキシゲニン。 20
- ・スペーサーモジュール（2）、これは、好ましくは、長さが11個以上のC2結合であり、その末端の一方が官能基に共有結合的に連結される。
- ・配列セグメント（認識および切断のためのモジュール）、これは、好ましくは、長さが5ヌクレオチド～12ヌクレオチドであり、DNAからなり、その3'末端が、固相に連結されているスペーサーモジュールの末端に共有結合的に連結される。配列セグメントは、制限エンドヌクレアーゼに対する認識配列を含有する。
- ・配列セグメント（検出モジュール）、これは、好ましくは、長さが12ヌクレオチド～30ヌクレオチドであり、その3'末端が、配列セグメント（認識および切断のためのモジュール）の5'末端に共有結合的に連結される。これは、DNA、RNAまたはPNAであり得る。配列セグメントは、検出される標的核酸とのヘテロ二重鎖を、好適な反応条件のもとでプローブとして形成することができる分子の一部を構成する。配列セグメントのヌクレオチドおよび/または糖リン酸骨格またはプソイドペプチド(pseudopeptide)骨格が蛍光基に共有結合的に連結され得る。 30
- ・配列セグメント'（認識および切断のためのモジュール）、これはDNAからなり、その3'末端が配列セグメントの5'末端に共有結合的に連結される。セグメント'の配列はセグメントの配列に対して相補的である。
- ・スペーサーモジュール（3）、これは、好ましくは、長さが11個以上のC2結合であり、配列セグメント'の5'末端に共有結合的に連結される。 40
- ・適する場合には、分岐用モジュール[Newcome, G. R.ら、「Dendritic Molecules: Concepts, Synthesis, Perspective」、1996年、VCH Publishers]（表されず）、これは、配列セグメント'の5'末端に連結されていない、スペーサーモジュール（3）の端部に共有結合的に連結される。n個までのさらなる分岐用モジュールをこの分岐用モジュールの個々の端部に結合させることができ、それにより、最大数で3<sup>n</sup>個の数の末端を生じさせることができる。そして
- ・蛍光基（4）または結合対の一方（ビオチンまたはジゴキシゲニン）、これはそれぞれの端部に結合する。

#### 【0024】

プローブはエレメント（1）によって固体マトリックスに結合する。この固体表面は、 50



なかでも、平面表面（これはまた凸状または凹状であり得る）、無機材料もしくは有機材料から構成されるファイバーまたはマイクロ粒子またはナノ粒子であり得る。そのような固体マトリックスに結合する本発明によるプローブ核酸は、下記ではDNAアレイと称される。配列セグメント および配列セグメント ' は互いに相補的であり、好適な条件のもとでは、二本鎖領域、すなわち、二重鎖 - ' を形成することができる（図1Bを参照のこと）。この分子の場合、分子内の二重鎖形成によるヘアピン構造の形成が一本鎖の立体配座よりも熱力学的に有利である。従って、配列セグメント または配列セグメント ' の平衡融解温度  $T_m$  よりも低い温度では、この分子は、配列特異的な様式で制限エンドヌクレアーゼによって切断され得る分子内二重鎖 - ' を含有するヘアピン構造としてもっぱら存在する。

10

#### 【0025】

制限エンドヌクレアーゼによる切断後、エレメント（1）およびエレメント（2）、そして適する場合にはエレメント（ ）の数ヌクレオチドが固相に結合したままである。プローブの標識されたエレメントは周囲の媒体に拡散し、そして、適する場合には洗浄によって除かれる。

#### 【0026】

RNAまたはDNAであり得る標的核酸で、その配列が配列セグメント の配列に対して相補的である標的核酸とハイブリダイゼーションした結果として、プローブは、部分的には、サンプル核酸との二重鎖として存在する。この場合、配列セグメント および配列セグメント ' は一本鎖として存在し、制限エンドヌクレアーゼまたは他の二重鎖特異的ヌクレアーゼによって切断され得ない。分子内二重鎖 - ' と比較して、サンプル核酸および配列セグメント から構成されるヘテロ二重鎖の十分な安定性を確実にするためには、配列セグメント の平衡融解温度（ $T_m$ （ ））は、配列セグメント または配列セグメント ' の平衡融解温度よりも高くなければならない；すなわち、 $T_m$ （ ） $> T_m$ （ ） [ Bonnet , G . ら、' 構造化DNAプローブの高まった特異性の熱力学的基礎'、1999、Proc.Natl.Acad.Sci.、第96巻 ]。理想的には、サンプル核酸および配列セグメント から形成されるヘテロ二重鎖の平衡融解温度  $T_m$ （ ）は、分子内二重鎖 - ' の平衡融解温度  $T_m$ （ ）よりも10 ~ 25 の間で高い。二次構造を形成することができるプローブ核酸は、同じ標的核酸に関して、線状のプローブ核酸が有するよりも大きい配列特異性を有する。塩基の誤った対形成を全く含有しないプローブ/標的核酸二重鎖と、1塩基の誤った対形成を含有するプローブ/標的核酸二重鎖との間における平衡融解温度の差（すなわち、 $T_m$ ）は、二次構造を形成することができるプローブ核酸の場合には、線状のプローブ核酸の場合の約2倍大きい [ Bonnet , G . ら、' 構造化DNAプローブの高まった特異性の熱力学的基礎'、1999、Proc.Natl.Acad.Sci.、第96巻 ]。

20

30

#### 【0027】

本発明による方法は、好ましくは、多重分析のために用いることができる。この場合、配列セグメント において、そして蛍光基の励起スペクトルおよび放射スペクトル [ Vet , J . A . M . ら、' 分子ビーコンを使用する4つの病原性レトロウイルスの多重検出'、1999、Proc.Natl.Acad.Sci.、第96巻；Marras , S . A . E . ら、' 分子ビーコンを使用する単一ヌクレオチド変化の多重検出'、1999、Genetic Analysis : Biomolecular Engineering、第14巻 ] において、そして適する場合には、配列セグメント および配列セグメント ' に存在する制限エンドヌクレアーゼに対する認識配列に関して互いに異なる  $n$  個の異なるプローブ核酸が同じ区域に固定化される。印刷法が、等モル量のこれらの  $n$  個の異なるプローブ核酸を含有する水溶液を固体表面に置き、固定化するために使用される [ Cheung , V . G . ら、' マイクロアレイの作製および読み取り'、Nature Genetics、第21巻、1999年1月；Bowtell , D . D . L .、' マイクロアレイによって発現データを得るための選択可能な選択肢 - 始めから終わりまで'、Nature Genetics、第21巻、1999年1月 ]。この区域は、DNAアレイにおけるスポットであり得るか、またはマイクロ粒子もしくはナノ粒子の表面におけるスポ

40

50

ットであり得る。

#### 【0028】

このようにして、配列が異なる  $n$  個の異なる標的核酸と、その配列セグメント および配列セグメント ' が制限エンドヌクレアーゼに対する同じ認識配列を含有する  $n$  個の異なるプローブ核酸とのハイブリダイゼーションを同時に分析することが可能である。プローブ核酸の配列セグメント および配列セグメント ' が、 $n$  個の異なる制限エンドヌクレアーゼに対する  $n$  個の異なる認識配列を含有する場合、配列が異なる  $n$  個の異なる標的核酸と、 $n$  個の異なるプローブ核酸とのハイブリダイゼーションを同時に、または好ましくは連続的に分析することが可能である。

#### 【0029】

本発明による方法は、プローブ核酸と標的核酸またはサンプル核酸とのハイブリダイゼーションに関して多重分析を実行する目的のために下記の方法で行うことができる。

#### 【0030】

固体マトリックスに結合している本発明による 1 つまたは複数のプローブ核酸から構成される DNA アレイが、下記に示される好ましい条件のもと、RNA または DNA であり得る標識されていないサンプル核酸と接触させられる。DNA アレイは、45 で、10 分間 ~ 20 分間、そして、ハイブリダイゼーションさせられる表面に従って、20  $\mu$ l ~ 200  $\mu$ l の好適なハイブリダイゼーション緩衝液とインキュベーションされる。

#### 【0031】

0.1  $\mu$ g ~ 50  $\mu$ g の標識されていないサンプル核酸が 300  $\mu$ l の好適なハイブリダイゼーション溶液に溶解され、DNA アレイとのハイブリダイゼーションに先立って、この溶液は約 99 で 5 分間加熱され、その後、約 45 に 5 分間かけて冷却される。ハイブリダイゼーション緩衝液が DNA アレイから除かれ、サンプル核酸を含有するハイブリダイゼーション溶液で置き換えられる。DNA アレイはサンプル核酸と 45 ~ 60 で 16 時間インキュベーションされる。サンプル核酸溶液が除かれた後、DNA アレイは、50 ~ 65 で、それぞれの場合において種々のイオン強度の洗浄緩衝液で洗浄される。好適なハイブリダイゼーション条件および洗浄条件の選択は、サンプル核酸の性質 (DNA または RNA) およびその長さに、そしてまた、固定化されているプローブ核酸の性質 (DNA、RNA または PNA) およびその長さに依存する [Anderson, M. L. M. ら、「Nucleic acid Hybridization」、1998 年、Springer-Verlag Te los; Schena, M.、「DNA-Microarrays: A practical approach」、1999 年、Oxford University Press]。

#### 【0032】

- ' 二重鎖の領域における制限エンドヌクレアーゼによる非ハイブリダイゼーションプローブ核酸の切断が、好ましくは、製造者によって推奨される反応条件のもと、25 ~ 37 で行われる。制限エンドヌクレアーゼの活性は、脂質を反応混合物に添加することによって 34 倍まで増大させることができる [Kinnunen ら、「制限エンドヌクレアーゼを使用して DNA または RNA を消化するための材料および方法」、米国特許第 5,879,950 号]。洗浄工程の後、DNA アレイは、25 ~ 37 で 20 分間 ~ 60 分間、そして、ハイブリダイゼーションさせられる表面に従って、製造者により推奨される反応緩衝液の 20  $\mu$ l ~ 200  $\mu$ l とともに、- ' 二重鎖の領域においてプローブ核酸を切断する制限エンドヌクレアーゼの 0.5 U ~ 5 U を含有する緩衝液とインキュベーションされる。切断されたプローブ核酸、標識、および制限エンドヌクレアーゼは、室温で 1  $\times$  TE 緩衝液による洗浄によって DNA アレイの表面から除かれる。

#### 【0033】

本発明による方法によって得られるシグナルおよびデータは、好ましくは、下記の方法で検出および分析される：

印刷法 [Cheung, V. G. ら、「マイクロアレイの作製および読み取り」、Nature Genetics、第 21 巻、1999 年 1 月；Bowtell, D. D. L.、「マイクロアレイによって発現データを得るための選択可能な選択肢 - 始めから終わりまで」、Natu

10

20

30

40

50

re Genetics、第21巻、1999年1月]を使用して標識プローブを固体表面に移し、標識プローブを固体表面に固定化する前に、それぞれのプローブ核酸の標識化の程度が決定される。核酸の濃度が、260nmの波長における核酸水溶液の吸収を測定し、ランベルト-ベールの法則 ( $A_{260} = \epsilon \times d \times c$ 、式中、 $A_{260}$ は260nmにおける吸収であり、 $\epsilon$ は核酸のモル吸光係数 [ $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ] であり(この係数は、調べられる核酸の塩基配列および長さに依存する)、 $d$ は、用いられたキュベットの路長であり、 $c$ は核酸の濃度 [ $\text{M}$ ] である)を使用することによって決定される。

#### 【0034】

プローブ核酸とコンジュゲート化されている蛍光基の濃度は、蛍光基の吸収極大に対応する波長 ( $\lambda_{\text{max}}$ ) において標識プローブ核酸の水溶液の吸収を測定し、ランベルト-ベールの法則を使用することによって決定される。蛍光基とコンジュゲート化されている核酸の濃度を精密に決定することができるためには、ほとんどの蛍光基が、260nmの波長を有する光を吸収するという事実を考慮しなければならない。蛍光基によりもたらされる寄与(これは、その吸収極大に対応する波長 ( $\lambda_{\text{max}}$ ) における蛍光基の吸収と、補正係数  $CF_{260}$  との積である)が、260nmにおける総吸収から差し引かれる(すなわち、 $A_{\text{核酸}} = A_{260} - (A_{\lambda_{\text{max}}} \times CF_{260})$ )。種々の蛍光基のモル吸光係数、および260nmにおける吸収に対する補正係数  $CF_{260}$  をこれらの蛍光基の製造者 (Molecular Probes、BioRadなど) から得ることができる。

#### 【0035】

プローブ核酸とコンジュゲート化されている蛍光基の濃度と、プローブ核酸の濃度との比は、プローブ核酸とコンジュゲート化されている蛍光基の量に等しい。標識されたプローブ核酸の特異的な蛍光を決定するために、これらのプローブ核酸の規定された量の蛍光が測定される。その後、特異的な蛍光は、固体マトリックスに結合しているプローブ核酸分子の数を、標的核酸またはサンプル核酸とのハイブリダイゼーションの前に精密に決定するために使用することができる。このようにして、固定化されているプローブ核酸の量の変動(そのような変動は標的核酸またはサンプル核酸とのハイブリダイゼーションに影響を及ぼす)を考慮に入れ、計算により補正することができる。従って、標的核酸またはサンプル核酸を本発明によるプローブ核酸とハイブリダイゼーションさせることに基づいて行われる測定を標準化することが可能である。

#### 【0036】

DNAアレイにおけるそれぞれのサンプルスポットの蛍光放射は、好ましくは、共焦点レーザー走査顕微鏡によって測定される。小さい区域における蛍光放射を測定するための様々な装置が、数多くの製造者によって販売されており、生物工学の分野における実験室標準品になっている [Cheung, V. G. ら、「マイクロアレイの作製および読み取り」、Nature Genetics、第21巻、1999年1月; Bowtell, D. D. L.、「マイクロアレイによって発現データを得るための選択可能な選択肢-始めから終わりまで」、Nature Genetics、第21巻、1999年1月]。測定結果を標準化するために、固定化されているプローブ核酸の蛍光がハイブリダイゼーションの前に測定される。特定の配列特異性を有し、かつ特定の蛍光基で標識されているプローブ核酸がアレイのそれぞれのサンプルスポットに固定化されている場合、蛍光が、この蛍光基の吸収極大に対応する波長 ( $\lambda_{\text{abs. max}}$ ) の光によって励起され、放射極大に対応する波長 ( $\lambda_{\text{em. max}}$ ) で検出される。 $n$ 個の異なるプローブ核酸(これらは、異なる配列特異性を有し、 $n$ 個の異なる分光的に識別可能な蛍光基で標識されている)がDNAアレイのそれぞれのサンプルスポットに固定化されている場合、 $n$ 個の異なる蛍光基の蛍光が、これらの蛍光基の吸収極大に対応する波長 ( $\lambda_{\text{abs. max}}$ ) の光によって励起され、放射極大に対応する波長 ( $\lambda_{\text{em. max}}$ ) で検出される。用いられた装置に依存して、様々な蛍光基の蛍光を同時に、または連続して測定することができる。

#### 【0037】

本発明は下記の実施例によって明瞭にされる。

#### 【実施例1】

10

20

30

40

50

## 【0038】

二重に修飾されたオリゴデオキシヌクレオチド（その5'末端および3'末端が、それぞれの場合、C22スパーサーによって、フルオレセインイソチオシアナート（FITC）に、そして、それぞれ、アミノ基（NH<sub>2</sub>）（配列A：FITC-<sup>5'</sup>gccccgcgcAATAGGGATGGCTCAACAgcgcgggc<sub>3</sub>-(C22)NH<sub>2</sub>および配列B：FITC-<sup>5'</sup>gccccgcgcTTAGAGTGC AAAATGAAAGCGCCgcgcgggc<sub>3</sub>-(C22)NH<sub>2</sub>）に共有結合的に連結されている）を100μlのカップリング緩衝液（500mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH8.5、1mM EDTA）に溶解した（濃度：500pmol/ml）。それぞれの場合、100μlのオリゴヌクレオチド溶液をマイクロタイタープレート（Thermowell M PCRプレート、Corning® Surface Technologies）のウエルにおいてRT（室温）で30分間インキュベーションすることによって、表1に示されるように、オリゴヌクレオチドをウエルの表面に共有結合的に結合させた：

10

【表1】

表1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	.	.	.	A	.	.	.	A	.	.	.
B	.	.	B	.	.	.	B	.	.	.	B	.
C	A	.	.	.	A	.	.	.	A	.	.	.
D	.	.	B	.	.	.	B	.	.	.	B	.
E	A	.	.	.	A	.	.	.	A	.	.	.
F	.	.	B	.	.	.	B	.	.	.	B	.
G	A	.	.	.	A	.	.	.	A	.	.	.
H	.	.	B	.	.	.	B	.	.	.	B	.

表1：マイクロタイタープレートにおけるサンプル核酸A及びBの位置

20

## 【0039】

その後、マイクロタイタープレートのウエルを200μlの10mM Tris（pH8.0）、150mM NaClで5回洗浄した。マイクロタイタープレートのウエルに結合しているオリゴヌクレオチドの蛍光強度を、励起波長<sub>abs.max</sub> = 490nmおよび放射波長<sub>em.max</sub> = 520nmにおいて分光蛍光計（Molecular Devices：Spectramax Gemini XS）で測定した。データが表3に列挙され、図2（ダイアグラム1）に示される。

30

【表2】

表3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	352	0	0	0	348	0	0	0	351	0	0	0
B	0	0	351	0	0	0	356	0	0	0	351	0
C	356	0	0	0	355	0	0	0	348	0	0	0
D	0	0	350	0	0	0	353	0	0	0	349	0
E	348	0	0	0	350	0	0	0	356	0	0	0
F	0	0	356	0	0	0	354	0	0	0	352	0
G	351	0	0	0	352	0	0	0	352	0	0	0
H	0	0	353	0	0	0	351	0	0	0	358	0

表3：マイクロタイタープレートのウエルに共有結合的に結合したオリゴヌクレオチドの蛍光強度（×1000）

40

## 【0040】

マイクロタイタープレートのウエルを、それぞれの場合、0.1mg/mlの剪断されたサケ精子DNA（Gibco BRL/Life Technologies）；0.

50

5 mg / ml のアセチル化 BSA (Gibco BRL / Life Technologies) ; 1 × MES (100 mM MES、1.0 M NaCl、20 mM EDTA、0.01 % ツィーン 20) を含有する 125 μl のハイブリダイゼーション溶液と 60 で 4 時間プレハイブリダイゼーションした。

プレハイブリダイゼーション溶液を除いた後、125 μl のハイブリダイゼーション溶液 (これは、1 nmol のサンプル RNA オリゴヌクレオチド (配列 A' = 5' UGUUGAGCCAUCCCUAUU<sub>3</sub>、そして、それぞれ、配列 B' = 5' GGCGCUUUC AUUUUGCACUCUA A<sub>3</sub>) を、0.1 mg / ml の切断されたサケ精子 DNA (Gibco BRL / Life Technologies) ; 0.5 mg / ml のアセチル化 BSA (Gibco BRL / Life Technologies) ; 1 × MES (100 mM MES、1.0 M NaCl、20 mM EDTA、0.01 % ツィーン 20) に含有する) をマイクロタイタープレートのウェルに加えた。設定を表 2 に示す：

10

【表 3】

表 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A'	A'	A'	A'	B'	B'	B'	B'	-	-	-	-
B	A'	A'	A'	A'	B'	B'	B'	B'	-	-	-	-
C	A'	A'	A'	A'	B'	B'	B'	B'	-	-	-	-
D	A'	A'	A'	A'	B'	B'	B'	B'	-	-	-	-
E	A'	A'	A'	A'	B'	B'	B'	B'	-	-	-	-
F	A'	A'	A'	A'	B'	B'	B'	B'	-	-	-	-
G	A'	A'	A'	A'	B'	B'	B'	B'	-	-	-	-
H	A'	A'	A'	A'	B'	B'	B'	B'	-	-	-	-

20

表 2 : A'、B' 及び - と表されるマイクロタイタープレートの部分は、サンプル核酸 A' 及びサンプル核酸 B' ならびにプレハイブリダイゼーション溶液とそれぞれハイブリダイゼーションさせられた。

## 【0041】

設定物は 95 で 20 分間加熱され、1 時間かけて 60 に冷却されて、60 で 16 時間ハイブリダイゼーションさせられる。

## 【0042】

30

サンプル核酸溶液を除いた後、マイクロタイタープレートのウェルを、「非ストリンジェント」な洗浄緩衝液 (6 × SSPE ; 0.01 % ツィーン 20) で、25 で 5 分間、10 回洗浄し、その後、「ストリンジェント」な洗浄緩衝液 (100 mM MES ; 0.1 M NaCl ; 0.01 % ツィーン 20) で、55 で 5 分間、5 回洗浄した。

洗浄後、マイクロタイタープレートのウェルを、37 で 10 分間、150 μl の 1 × 反応緩衝液 (NEB 緩衝液 3) で平衡化し、その後、それぞれの場合、2 ユニットの制限エンドヌクレアーゼ Aci 1 (New England Biolabs) を含有する 100 μl の 1 × 反応緩衝液と 37 で 1 時間インキュベーションした。反応を、1 / 5 量の停止溶液 (0.5 % w / v SDS、50 mM EDTA) を加え、マイクロタイタープレートを 75 に加熱することによって停止させた。その後、マイクロタイタープレートのウェルを、それぞれの場合、150 μl の 1 × TE 緩衝液 (10 mM Tris、1 mM EDTA、pH = 8.0) で、室温で 6 回洗浄した。室温で行われていないインキュベーションはすべてが、蓋加熱による Biometra UNO (商標) サーモブロックで行われた。マイクロタイタープレートの個々のウェルにおける蛍光強度を、励起波長  $\lambda_{\text{abs. max}} = 490 \text{ nm}$  および放射波長  $\lambda_{\text{em. max}} = 520 \text{ nm}$  において分光蛍光計 (Molecular Devices : Spectramax Gemini XS) で測定した。データが表 4 に列挙され、ダイアグラム 1 (図 2) に示される。

40

【表 4】

表 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	308	0	0	0	2.06	0	0	0	2.11	0	0	0
B	0	0	2.11	0	0	0	309	0	0	0	2.11	0
C	309	0	0	0	2.16	0	0	0	2.01	0	0	0
D	0	0	2.14	0	0	0	308	0	0	0	2.1	0
E	306	0	0	0	2.01	0	0	0	2.14	0	0	0
F	0	0	2.14	0	0	0	354	0	0	0	2.12	0
G	307	0	0	0	2.15	0	0	0	2.12	0	0	0
H	0	0	2.12	0	0	0	351	0	0	0	2.13	0

表 4：マイクロタイタープレートのウェルに共有結合的に結合しているオリゴヌクレオチドの、ハイブリダイゼーション及び制限消化の後における蛍光強度 ( $\times 1000$ )

10

## 【0043】

2A ~ 2H、4A ~ 4H、6A ~ 6H、8A ~ 8H、10A ~ 10H、12A ~ 12H、1B、1D、1F、1H、3A、3C、3E、3G、5B、5D、5F、5H、7A、7C、7E、7G、9B、9D、9F、9H、11B、11D、11Eおよび11Gのウェルの領域において検出可能であったシグナルは、このシステムのバックグラウンド蛍光

20

## 【実施例 2】

## 【0044】

配列：

A：FITC - 5' g c c c g c g c A A T A G G G A T G G C T C A A C A g c g c g g c g c<sub>3</sub>、

B：FITC - 5' g c c c g c g c T T A G A G T G C A A A A T G A A A G C G C C g c g c g g g c<sub>3</sub>、および

C：FITC - 5' g c c c g c g c G T T T T T T T T T T T T T T G G T T T T T T T T T T T T C - g c g c g g g c<sub>3</sub>、

30

(コントロール：バックグラウンド蛍光の測定)

を有するフルオレセインイソチオシアナート (FITC) 標識のサンプル核酸 (これらは固体マトリックスにおいて種々のサンプルスポットに固定化されている) を、25 pM のコントロール RNA、0.1 mg/ml の切断されたサケ精子 DNA (Gibco BRL/Life Technologies)；0.5 mg/ml のアセチル化 BSA (Gibco BRL/Life Technologies)；1xMES (100 mM MES、1.0 M NaCl、20 mM EDTA、0.01% ツィーン 20) において、5 μg のサンプル RNA (これは K562 細胞から単離された) と 55 で 16 時間ハイブリダイゼーションさせる。サンプル核酸溶液を除いた後、DNA アレイを、「非ストリンジェント」な洗浄緩衝液 (6xSSPE；0.01% ツィーン 20) で、25 で 5 分間、10 回洗浄し、その後、「ストリンジェント」な洗浄緩衝液 (100 mM MES；0.1 M NaCl；0.01% ツィーン 20) で、55 で 5 分間、5 回洗浄する。

40

## 【0045】

洗浄後、DNA アレイを、37 で 10 分間、1x反応緩衝液で平衡化する。その後、DNA アレイを、2 ユニットの制限エンドヌクレアーゼ AciI を含有する 100 μl の 1x反応緩衝液において 37 で 1 時間インキュベーションする。反応を、1/5 量の停止溶液 (0.5% w/v SDS、50 mM EDTA) を加え、DNA アレイを 75 に加熱することによって停止させる。その後、DNA アレイを、1xTE (10 mM Tris、1 mM EDTA、pH = 8.0) で、室温で 4 回 ~ 8 回洗浄する。DNA アレ

50

イに残っているハイブリダイゼーションしたプローブの蛍光を、波長  $_{abs,max} = 490$  nmの光によって励起させ、放射される光を波長  $_{em,max} = 520$  nmで検出する。サンプル核酸Cの領域において検出され得るシグナルは、このシステムのバックグラウンド蛍光に対応し、サンプル核酸Aおよびサンプル核酸Bの領域において検出されるシグナルから差し引かれる。

### 【実施例3】

#### 【0046】

配列：

A：(FITC) -  $^{5'}$  g c c c g c g c A A T A G G G A T G G C T C A A C A - g c g c g g g c  $_{3'}$ 、

10

B：(カスケードブルー) -  $^{5'}$  g c c c g c g c T T A G A G T G C A A A A T G A A A G C G C C g c g c g g g c  $_{3'}$ 、および

C：(BODIPY TR14) -  $^{5'}$  g c c c g c g c T T T C T C T A C C T C C T C A C A T T G T G g c g c g g g c  $_{3'}$ 、

を有するサンプル核酸は、FITC ( $_{abs,max} = 490$  nm、 $_{Em,max} = 520$  nm)、カスケードブルー ( $_{abs,max} = 400$  nm、 $_{Em,max} = 420$  nm) および BODIPY TR14 ( $_{abs,max} = 595$  nm、 $_{Em,max} = 625$  nm) の蛍光基で標識されており、規定された区域A (サンプルスポットA) に一緒に固定化される。プローブ核酸：

D：(FITC) -  $^{5'}$  g c c c g c g c G T T T T T T T T T T T T T T G G T T T T T T T T T T T C - g c g c g g g c  $_{3'}$ 、

20

E：(カスケードブルー) -  $^{5'}$  g c c c g c g c G T T T T T T T T T T T T T T G G T T T T T T T T T T T C - g c g c g g g c  $_{3'}$ 、および

F：(BODIPY TR14) -  $^{5'}$  g c c c g c g c G T T T T T T T T T T T T T T G G T T T T T T T T T T T C - g c g c g g g c  $_{3'}$ 、

は、バックグラウンド蛍光を測定するためのコントロールとして使用されるが、別の規定された区域B (サンプルスポットD) に一緒に固定化される。DNAアレイを、55 で16時間、25 pMのコントロールRNA、0.1 mg/mlの剪断されたサケ精子DNA (Gibco BRL/Life Technologies)；0.5 mg/mlのアセチル化BSA (Gibco BRL/Life Technologies)；1 × MES (100 mM MES、1.0 M NaCl、20 mM EDTA、0.01% ツイーン20) において、0.1 μgのサンプルRNA (cRNA) (これは、配列D' =  $^{5'}$  U G U U G A G C C A U C C C U A U U  $_{3'}$ 、配列E' =  $^{5'}$  G G C G C U U U C A U U U U G C A C U C U A A  $_{3'}$ 、および配列F' =  $^{5'}$  C A C A A U G U G A G G A G G U A G A G A A  $_{3'}$  を含有する) とハイブリダイゼーションさせる。サンプル核酸溶液を除いた後、DNAアレイを、「非ストリンジェント」な洗浄緩衝液 (6 × SSPE；0.01% ツイーン20) で、25 で5分間、10回洗浄し、その後、「ストリンジェント」な洗浄緩衝液 (100 mM MES；0.1 M NaCl；0.01% ツイーン20) で、50 で5分間、5回洗浄する。

30

#### 【0047】

40

洗浄後、DNAアレイを、37 で10分間、1 × 反応緩衝液で平衡化する。その後、DNAアレイを、2ユニットの制限エンドヌクレアーゼAci1を含有する100 μlの1 × 反応緩衝液において37 で1時間インキュベーションする。反応を、1/5量の停止溶液 (0.5% w/v SDS、50 mM EDTA) を加え、DNAアレイを75 に加熱することによって停止させる。その後、DNAアレイを、1 × TE (10 mM Tris、1 mM EDTA、pH = 8.0) で、室温で4回～8回洗浄する。DNAアレイに残留し、FITC、カスケードブルーまたはBODIPY TR14で標識されているハイブリダイゼーションしたプローブの蛍光を、 $_{Abs,max} = 490$  nm、 $_{Abs,max} = 400$  nmおよび  $_{Abs,max} = 595$  nmの波長の光によってそれぞれ励起させ、 $_{Em,max} = 520$  nm、 $_{Em,max} = 420$  nmおよび  $_{Em,max} = 625$  nmの各波長で放射され

50

る光でそれぞれ検出する。サンプルスポット B の領域において検出され得るシグナルは、このシステムのバックグラウンド蛍光に対応し、サンプルスポット A の領域において検出されるシグナルから差し引かれる。

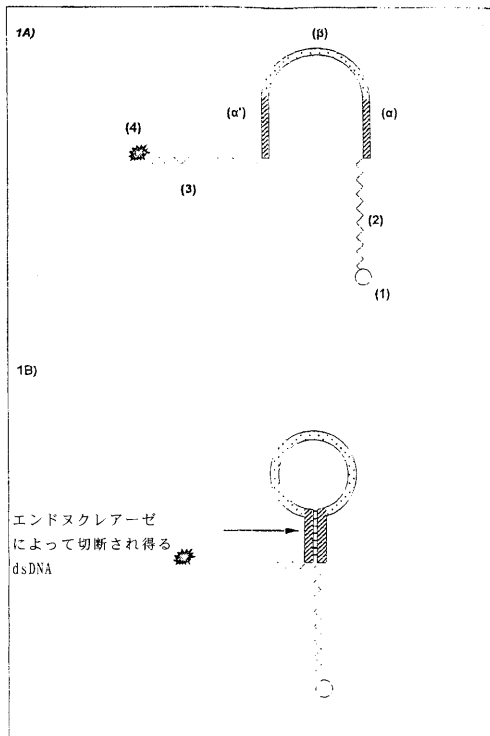
【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 8 】

【図 1】本発明によるプローブ核酸の概略図である。

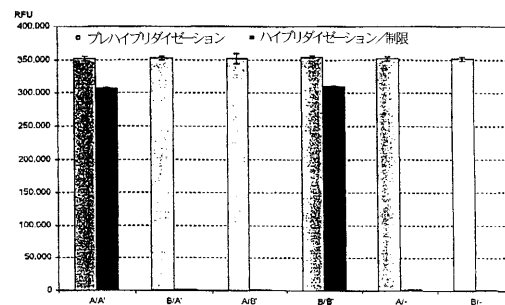
【図 2】マイクロタイタープレートのウェルに共有結合的に結合しているオリゴヌクレオチドの、ハイブリダイゼーションおよび制限消化の後における蛍光強度 (  $\times 1000$  ) を示す。

【図 1】



【図 2】

ダイアグラム 1





## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/13215

**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, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ, BIOSIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 925 517 A (LIZARDI PAUL M ET AL) 20 July 1999 (1999-07-20) cited in the application column 20, line 23 -column 21, line 58 example 9 figure 10 claims 46,58,72,73	1-5
A	TYAGI S ET AL: "MOLECULAR BEACONS: PROBES THAT FLUORESCCE UPON HYBRIDIZATION" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 14, 1 March 1996 (1996-03-01), pages 303-308, XP000196024 ISSN: 1087-0156 cited in the application the whole document	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 April 2003

Date of mailing of the international search report

23/04/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5518 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3010

Authorized officer

Uibrecht, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

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

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

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

**6 and 7**

2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

**See supplemental sheet for further details**

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

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Continuation of I.2

Claims: 6 and 7

The current Claims 6 and 7 relate to a product defined by a desirable characteristic or property, namely

- that the kit is suitable for detecting hybridizations with target nucleic acids and for carrying out at least one hybridization indicated in Claim 6,
- that the kit is suitable for putting into practice a method according to one of Claims 1-5 (Claim 7).

The claims therefore encompass all products that have this characteristic or property, but the application provides support by the description (PCT Article 5) for only a limited number of such products, etc. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Moreover, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the product in terms of the desired result. This lack of clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire scope of protection sought.

In addition, said claims do not contain any technical features (PCT Article 6) and the description does not disclose any features that characterize the claimed kit, and so the subjects of Claims 6 and 7 were not searched.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/13215

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5925517	A	20-07-1999	AU 702598 B2	25-02-1999
			AU 5232496 A	21-11-1996
			CA 2176266 A1	13-11-1996
			EP 0745690 A2	04-12-1996
			JP 9107996 A	28-04-1997
			US 6103476 A	15-08-2000
			AU 697841 B2	15-10-1998
			AU 1292195 A	29-05-1995
			CA 2176348 A1	18-05-1995
			EP 0728218 A1	28-08-1996
			JP 9504950 T	20-05-1997
			WO 9513399 A1	18-05-1995

## INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/13215

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ, BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 925 517 A (LIZARDI PAUL M ET AL) 20. Juli 1999 (1999-07-20) in der Anmeldung erwähnt Spalte 20, Zeile 23 -Spalte 21, Zeile 58 Beispiel 9 Abbildung 10 Ansprüche 46,58,72,73 ----	1-5
A	TYAGI S ET AL: "MOLECULAR BEACONS: PROBES THAT FLUORESCCE UPON HYBRIDIZATION" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, Bd. 14, 1. März 1996 (1996-03-01), Seiten 303-308, XP000196024 ISSN: 1087-0156 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-5

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nützlich ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. April 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23/04/2003


Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ulbrecht, M

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 02/13215

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2. ☒ Ansprüche Nr. 6 und 7  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
  
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 02 /3215

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 6 und 7

Die geltenden Patentansprüche 6 und 7 beziehen sich auf Produkte, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich

- dass der Kit zum Nachweis von Hybridisierungen mit Zielnukleinsäuren geeignet ist und mit ihm wenigstens eine der in Anspruch 6 genannten Hybridisierung durchgeführt werden kann (Anspruch 6),
- dass der Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1-5 geeignet ist (Anspruch 7).

Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT für kein solches Produkt liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, dass eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint.

Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht.

Da besagte Ansprüche darüber hinaus keine technischen Merkmale beinhalten (Art. 6 PCT) und die Beschreibung keine Merkmale offenbart, die die beanspruchten Kits charakterisieren, wurden die Gegenstände der Ansprüche 6 und 7 nicht recherchiert.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/13215

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5925517 A	20-07-1999	AU 702598 B2	25-02-1999
		AU 5232496 A	21-11-1996
		CA 2176266 A1	13-11-1996
		EP 0745690 A2	04-12-1996
		JP 9107996 A	28-04-1997
		US 6103476 A	15-08-2000
		AU 697841 B2	15-10-1998
		AU 1292195 A	29-05-1995
		CA 2176348 A1	18-05-1995
		EP 0728218 A1	28-08-1996
		JP 9504950 T	20-05-1997
		WO 9513399 A1	18-05-1995



---

フロントページの続き

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

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 CA11 HA08 HA12 HA14  
4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR14 QR32 QR35 QR56 QR66 QR82  
QS12 QS34 QS36 QX02