

(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2008-520963

(P2008-520963A)

(43) 公表日 平成20年6月19日(2008.6.19)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/566	(2006.01)	GO 1 N 33/566		2 G O 5 4
GO 1 N 33/553	(2006.01)	GO 1 N 33/553		4 B O 6 3
GO 1 N 37/00	(2006.01)	GO 1 N 37/00	1 O 2	
GO 1 N 33/60	(2006.01)	GO 1 N 33/60	Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 50 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願2007-540459 (P2007-540459)	(71) 出願人	507158651
(86) (22) 出願日	平成17年11月16日 (2005.11.16)		シーナ・キャンサー・ダイアグノスティクス・リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年6月27日 (2007.6.27)		オーストラリア・ビクトリア・3052・パークビル・フレミントン・ロード・30
(86) 国際出願番号	PCT/AU2005/001742		・ビルディング・404・レベル・1・バイオ21・インスティテュート内
(87) 国際公開番号	W02006/053380	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開日	平成18年5月26日 (2006.5.26)		弁理士 志賀 正武
(31) 優先権主張番号	60/627, 947	(74) 代理人	100089037
(32) 優先日	平成16年11月16日 (2004.11.16)		弁理士 渡邊 隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 サンプル中の分析物を検出する方法

(57) 【要約】

本発明は、サンプル中の分析物を検出する方法に関する。その方法は、前記分析物に結合する分子、例えば抗体、に連結するポリヌクレオチド基質上でのポリメラーゼの活性に依存する。前記ポリメラーゼの活性は、適切に標識されたヌクレオチドの取込み、及び/または適切に標識されたハプテンのリガンドに結合し得るハプテン接合ヌクレオチドの取込みにより検出することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法であって、：

- i) 前記サンプルを、前記分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程；
 - ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物 - 第一化合物複合体に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はポリヌクレオチドを含む工程；
 - iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件、またはb) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる工程；並びに、
 - iv) 工程iii) のa) またはb) 部の生成物を検出する工程であって、工程iii) のb) 部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まない工程；
- を含む方法。

10

【請求項 2】

サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法であって、：

- i) 前記サンプルを、前記分析物に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はポリヌクレオチドを含む工程；
 - ii) 前記分析物 - 第二化合物複合体を、前記分析物 - 第二化合物複合体に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程；
 - iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件、またはb) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる工程；並びに、
 - iv) 工程iii) のa) またはb) 部の生成物を検出する工程であって、工程iii) のb) 部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まない工程；
- を含む方法。

20

【請求項 3】

- ポリメラーゼが、一本鎖ポリヌクレオチドまたは部分的に二本鎖ポリヌクレオチドの一本鎖突出部を伸長する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

30

【請求項 4】

- 前記ポリメラーゼが、poly(A) ポリメラーゼ、テロメラーゼ、及びターミナルトランスフェラーゼからなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

- 前記ポリメラーゼがテロメラーゼであり、前記テロメラーゼが前記テロメラーゼを産生する癌細胞を溶解することによって得られる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

- 前記溶解された細胞の他の成分から前記テロメラーゼを分離するための処理を実施しない、請求項 5 に記載の方法。

40

【請求項 7】

- 前記ポリメラーゼが、Taqポリメラーゼ、バクテリオファージT4ポリメラーゼ、バクテリオファージT7ポリメラーゼ、及び大腸菌DNAポリメラーゼI Klenowフラグメントからなる群から選択されるDNAポリメラーゼである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 8】

- 前記第一化合物及び/または第二化合物が固相支持体に貼り付けられている、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

- 前記固相支持体が、磁気ビーズ、バイオセンサーチップ、マイクロタイタープレートのウェル、ディップスティック、及びマイクロアレイスライドからなる群から選択される、

50

請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

工程 iii) が少なくとも 1 つの検出可能なように標識されたヌクレオチドの存在下で実施される、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記検出可能な標識が、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、及び酵素標識からなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

工程 iii) が少なくとも 1 つのハプテン接合ヌクレオチドの存在下で実施され、前記ハプテンがリガンドと結合し得る、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 13】

前記ハプテンが、システイン、リジン、セリン、ピオチン、アビジン、及びストレプトアビジンからなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記リガンドが検出可能なように標識されている、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記検出可能な標識が、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、及び酵素標識からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

工程 iii) がさらに、ポリメラーゼ活性の生成物を前記検出可能なように標識されたりリガンドに接触させる工程を含む、請求項 14 または 15 に記載の方法。

20

【請求項 17】

前記検出可能な標識が酵素である、請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記酵素が、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ノイラミニダーゼ、及びセイヨウワサビペルオキシダーゼからなる群から選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記工程 iii) のポリメラーゼ活性の生成物が、それに取り込まれたハプテン接合ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドを少なくとも含む複合体であり、少なくともいくつかの前記ハプテンが酵素標識されたりリガンドに結合し、且つ工程 iv) が、前記工程 iii) の生成物を前記酵素が検出可能なシグナルを産生し得る条件にさらす工程を含む、請求項 17 または 18 に記載の方法。

30

【請求項 20】

前記検出可能なシグナルが基質と反応する前記酵素によって産生される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記基質がルミノールまたはアクリダンである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記検出可能なシグナルを増強する分子を提供する工程をさらに含む、請求項 20 または 21 に記載の方法。

40

【請求項 23】

前記検出可能なシグナルを増強する分子が p-ヨードフェノールまたは p-フェニルフェノールである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記検出可能なシグナルが発光または蛍光である、請求項 19 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

工程 i) が、前記分析物 - 第一化合物複合体を洗浄し、非結合の第一化合物を除去する

50

工程をさらに含む、請求項 1 または 3 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

工程 i) が、前記分析物 - 第二化合物複合体を洗浄し、非結合の第二化合物を除去する工程をさらに含む、請求項 2 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

工程 ii) が、前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を洗浄し、非結合の第一及び / または第二化合物を除去する工程をさらに含む、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記方法が、取り込まれていない検出可能なように標識されたヌクレオチドを除去する工程をさらに含む、請求項 1 から 9 または 2 5 から 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記方法が、取り込まれていない検出可能なように標識されたりガンドを除去する工程をさらに含む、請求項 1 から 7 または 1 4 から 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記第一化合物がタンパク質である、請求項 1 から 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記第一化合物が抗体である、請求項 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記第二化合物がタンパク質 - ポリヌクレオチド接合体である、請求項 1 から 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記第二化合物が抗体 - ポリヌクレオチド接合体である、請求項 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記第二化合物が前記分析物に結合する、請求項 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記分析物が疾患状態のマーカーである、請求項 1 から 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記疾患状態が、癌及び感染症からなる群から選択される、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記分析物がタンパク質またはペプチドである、請求項 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

i) 当該サンプルを、当該分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程であって、前記第一化合物は固相支持体に貼り付けられている工程；

ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はテロメラーゼによって伸長し得るポリヌクレオチドを含む工程；

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、前記テロメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件下で、少なくとも1つのハプテン接合ヌクレオチドの存在下で、前記テロメラーゼに接触させる工程；

iv) テロメラーゼ活性の生成物を、前記ハプテンがリガンドに結合し得る条件下で、酵素標識された前記リガンドに接触させる工程；

v) 当該ポリヌクレオチド - ハプテン - リガンド - 酵素複合体を、前記酵素の基質の存在下でインキュベートする工程；

vi) 前記基質への前記酵素の活性によって産生された検出可能なシグナルを検出する工程

10

20

30

40

50

;

を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 39】

i) 当該サンプルを、当該分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程であって、前記第一化合物は固相支持体に貼り付けられている工程;

ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はターミナルトランスフェラーゼによって伸長し得るポリヌクレオチドを含む工程;

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、前記ターミナルトランスフェラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件下で、少なくとも1つのハプテン接合ヌクレオチドの存在下で、前記ターミナルトランスフェラーゼに接触させる工程;

iv) 前記ターミナルトランスフェラーゼ活性の生成物を、前記ハプテンがリガンドに結合し得る条件下で、酵素標識された前記リガンドに接触させる工程;

v) 当該ポリヌクレオチド - ハプテン - リガンド - 酵素複合体を、前記酵素の基質の存在下でインキュベートする工程;

vi) 前記基質への前記酵素の活性によって産生された検出可能なシグナルを検出する工程;

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 40】

サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法であって、;

i) 前記サンプルを、前記分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程;

ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物 - 第一化合物複合体に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程;

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、前記第二化合物に結合する第三化合物に接触させる工程であって、前記第三化合物はポリヌクレオチドを含む工程;

iv) 当該分析物 - 第一化合物 - 第二化合物 - 第三化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件、またはb) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる工程;

v) 工程iv) のa) またはb) 部の生成物を検出する工程であって、工程iii) のb) 部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まず、前記第一及び/または第二化合物は固相支持体に貼り付けられている工程;

を含む方法。

【請求項 41】

当該DNAがテロメラーゼに結合し得る、及びテロメラーゼにより伸長され得る配列を含む、タンパク質 - DNA接合体。

【請求項 42】

前記タンパク質が抗体である、請求項 41 に記載のタンパク質 - DNA接合体。

【請求項 43】

請求項 41 または 42 に記載のタンパク質 - DNA接合体を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サンプル中の分析物を検出するための方法に一般的に関する。その方法は、前記分析物に結合する分子、例えば抗体、に連結するポリヌクレオチド基質上でのポリメラーゼの活性に依存する。前記ポリメラーゼの活性は、適切に標識されたヌクレオチドの取込み、及び/または適切に標識されたハプテンのリガンドに結合し得るハプテン接合ヌクレオチドの取込みにより検出することができる。

【背景技術】

【0002】

低いレベルの標的分析物を検出すること、列挙すること、及び同定することは、日常的な医学的、産業的、及び環境上の診断の基礎である。例えば、病原菌、癌細胞、ホルモン、製造夾雑物、汚染物質及び生物テロ行為に用いられた物質から分子を検出するために、サンプルを分析する。

【0003】

そのような検出方法の多くの異なるタイプは、生物医学的研究及び臨床検査室医学に広く用いられている。タンパク質等の特定の高分子種を検出するための方法は、生物学及び医学において、特に健常及び異常組織サンプルの分子組成物を特徴づけするために、非常に価値のある分析技術であることが分かっている。そのような検出方法の例としては、免疫測定法、顕微鏡検査のための免疫化学的染色、蛍光標示式細胞分取（FACS）等がある

【0004】

検出方法は典型的に、特定の標的分析物に結合し、検出可能なシグナルを産生する少なくとも1つの分析用試薬を利用する。これらの分析用試薬は一般的に、以下の2つの成分（構成要素）を有する。（1）プローブ高分子（例えば、高い特異性と親和性で標的分析物に結合し得る抗体）、並びに（2）検出可能な標識（例えば、放射性同位体または共有結合で連結した検出可能な分子等）。一般的に、前記プローブ高分子の結合特性により検出方法の特異性が限定され、前記結合した標識の検出可能性により検出方法の感度が決まる。同様に、前記検出の感度は、利用した標識のタイプと質、及びその標識を検出するために利用可能な設備のタイプの両方に関わる。

【0005】

個人における癌の診断は、依然として達成するのが難しい課題である。血液または組織サンプルから測定可能な診断マーカー、例えば、癌胎児性抗原（Carcinoembryonic Antigen : CEA）、 α -胎児タンパク（Alpha Fetoprotein : AFP）または前立腺特異抗原（Prostate Specific Antigen : PSA）等が利用可能であり、これらのマーカーを用いる測定法は、現在までのところ、他の臨床診断によって証明されているように、これらの個人における癌の存在について著しく高感度及び/または特異的ではない。

【0006】

免疫学的検査または免疫測定法は、医学的診断の中に遍在する。抗体とそれに相当する標的分析物との相互作用に基づいて、免疫測定法はサイズの小さいもの（例えば、濫用薬）から大きいもの（例えば、HIVタンパク質）に及ぶ広範囲の分子を検出するために用いられる。血清学的検査は、抗原を直接的に検査するというよりむしろ、その抗原に以前さらされたことに対する宿主の免疫学的反応を検査する免疫学的測定であり、すなわち、それらは抗原に対する宿主の抗体の存在を検査する。大きな自動化された中央研究室システムから店頭売りの妊娠検査まで多くの免疫測定法が入手可能である。前記検査は、凝集測定法、沈降測定法、酵素連結免疫測定法、直接蛍光測定法、免疫組織学的検査、補体結合検査、血清学的検査、免疫電気泳動測定法、及び迅速な「ストリップ」検査（例えば、側方流動とフロースルー検査）を含む広範囲な形態を含む。多くの免疫学的検査の1つの欠点は、それらが相対的に無反応である点である。とりわけ、多くの免疫測定法、例えば酵素連結免疫測定法（ELISA）は、単一標識成分と当該分析物との結合を生じるだけである。結果として、サンプル中の分析物のレベルが低い場合、そのような方法は、サンプル中の分析物の量の正確な表示を提供するほど十分に強いシグナルを産生せず、従って偽陰性の結果をもたらす傾向がある。

【0007】

免疫測定法の感度を改善するための試みにおいて開発された少なくとも1つの方法が、「免疫-PCR」（Sano et al., 1992 ; Adler et al., 2003 ; Joerger et al., 1995 ; Sperl et al., 1995）である。この方法は、抗体がポリヌクレオチドと接合する部位で分析物-抗体複合体を形成することに依存する。前記ポリヌクレオチドは、その後、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のための鋳型として用いられ、その増幅産物は、検査されたサンプル

中の分析物のレベルのためのインジケータとして用いられる。しかしながら、この方法に関する重大な問題は、標的ヌクレオチドを指数関数的に増幅するPCRの良く知られている欠陥であり、その結果として生じる、サンプル中の分析物のレベルの正確な表示を提供するための感度と正確性との適度なバランスを得ることの難しさである。

【 0 0 0 8 】

免疫測定法の感度を改善するための試みにおいて開発されたもう1つの方法が、Zhang et al. (2001) により記載されている方法である。抗体に連結したポリヌクレオチドのPCR増幅に依存するのではなく、Zhang et al. (2001) はポリヌクレオチドがRNAポリメラーゼ用のプロモーターを含む方法を発明した。RNAポリメラーゼがプロモーターに結合する際に、ポリヌクレオチドに相補的なRNAが転写される。しかしながら、この方法は、その生成物が多く、生物学的サンプルにおいて非常に分解を受けやすいRNAであるという不利な点を有する。

10

【非特許文献 1】Sano et al. (1992) Science 258: 120-122

【非特許文献 2】Adler et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 308: 240-250

【非特許文献 3】Joerger et al. (1995) Clin. Chem. 41: 1371-1377

【非特許文献 4】Sperl et al. (1995) J. Immunol. Meth. 186: 181-194

【非特許文献 5】Zhang et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 5497-5502

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 9 】

20

サンプル中の分析物の検出に用いることができる、さらなる測定方法が必要である。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 0 】

本出願者は、サンプル中の分析物を検出するための測定方法を発明した。本発明の測定方法は、当該分析物と結合する1つより多い標識成分を含む検出可能な複合体の形成を生じる。

【 0 0 1 1 】

第一の特徴点において、本発明は、サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法を提供し、この方法は、：

i) 当該サンプルを、当該分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程；

30

ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物 - 第一化合物複合体に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はポリヌクレオチドを含む工程；

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件、またはb) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる工程；並びに、

iv) 工程iii) のa) またはb) 部の生成物を検出する工程であって、工程iii) のb) 部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まない工程；

40

を含む。

【 0 0 1 2 】

第二の特徴点において、本発明は、サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法を提供し、この方法は、：

i) 当該サンプルを、当該分析物 - 第二化合物複合体に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はポリヌクレオチドを含む工程；

ii) 前記分析物 - 第二化合物複合体を、前記分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程；

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレ

50

オチドを伸長し得る条件、またはb) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる工程；並びに、iv) 工程iii) のa) またはb) 部の生成物を検出する工程であって、工程iii) のb) 部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まない工程；を含む。

【0013】

前記測定法で生成されたポリメラーゼ生成物の検出は、測定下での分析物の存在を示す。前記生成物は定量化することもでき、前記生成物の量を測定された分析物の量と相関させることができる。従って、本発明の方法は、テストサンプル中の分析物を検出すること、または検出し定量化することのために用いることができる。

10

【0014】

特に好ましい実施態様において、前記ポリメラーゼは、一本鎖ポリヌクレオチドまたは部分的に二本鎖ポリヌクレオチドの一本鎖突出部を伸長する。

【0015】

前記の実施態様は、プライマーの添加を必要としないという利点を有するだけでなく、(例えば) 抗体に連結するポリヌクレオチドが比較的短くて良いというさらなる利点がある。従って、さらに好ましい実施態様において、前記ポリヌクレオチドは長さが約100ヌクレオチド未満、より好ましくは長さが約75ヌクレオチド未満、より好ましくは長さが約50ヌクレオチド未満、より好ましくは長さが約40ヌクレオチド未満、より好ましくは長さが約30ヌクレオチド未満、より好ましくは長さが約20ヌクレオチド未満である。

20

【0016】

別の実施態様において、前記方法はポリヌクレオチドにハイブリダイズするプライマーの使用を含まない。

一本鎖ポリヌクレオチドまたは部分的に二本鎖ポリヌクレオチドの一本鎖突出部を伸長するポリメラーゼの例としては、poly(A) ポリメラーゼ、T4 RNAリガーゼ、テロメラーゼ、及びターミナルトランスフェラーゼを含むが、これに制限されない。好ましくは、前記ポリメラーゼは、テロメラーゼまたはターミナルトランスフェラーゼである。

【0017】

前記テロメラーゼは、天然の供給源から単離、または遺伝子組み換えにより生成することができる。さらに、前記テロメラーゼは、テロメラーゼ活性を有するそのような分子、またはそれらのバリエーション/派生物/変異体を生成する生物体から由来することもできる。

30

【0018】

本出願者は、癌細胞、特にヒト癌細胞が本発明の方法における使用のためのテロメラーゼの便利な供給源を提供することを発見した。従って、好ましい実施態様において、前記テロメラーゼは、テロメラーゼを生成する癌細胞を溶解することによって得られる。注目すべきことに、本発明の方法において用いられる前に、前記細胞溶解産物の他の成分からテロメラーゼを精製する必要のないことが確認されている。結果として、溶解した細胞の他の成分からテロメラーゼを分離するための処理を実施しないことが好ましい。

40

【0019】

前記のように、ポリメラーゼは、適切なプライマーの非存在下で、ポリヌクレオチドを伸長する、またはポリヌクレオチドの相補鎖を合成することができることが好ましい。しかしながら、Taqポリメラーゼ等の酵素を利用するいくつかの実施態様においては、当該反応条件下でポリヌクレオチドをハイブリダイズし、相補鎖の合成を開始するように作用する適切なプライマーを含むことを必要とするであろう。適切なプライマーは、ポリヌクレオチドの配列に基づいて容易に設計することができる。そのようなプライマーは、典型的に小さく、長さが少なくとも約12ヌクレオチド、長さが少なくとも約15ヌクレオチド、長さが少なくとも約18ヌクレオチド、長さが少なくとも約21ヌクレオチド、または長さが少なくとも約24ヌクレオチドである。特に好ましい実施態様において、前記プライマーは

50

直鎖状である。別の特に好ましい実施態様において、前記プライマーは環状でない。

【0020】

別の実施態様において、前記ポリメラーゼはDNAポリメラーゼである。適切なDNAポリメラーゼは、Taqポリメラーゼ、バクテリオファージT4ポリメラーゼ、バクテリオファージT7ポリメラーゼ、及び大腸菌DNAポリメラーゼI Klenowフラグメントを含むが、これに制限されない。

【0021】

さらなる実施態様において、前記ポリメラーゼがRNAポリメラーゼであるという例においては、当該ポリヌクレオチドは、RNAポリメラーゼがRNA転写を開始するために用いるプロモーター領域を含まない。

10

【0022】

好ましくは、第一化合物及び/または第二化合物を固相支持体に貼り付ける。当業者に既知のいずれかの適切な固相支持体を用いることができる。例としては、磁気ビーズ、バイオセンサーチップ、マイクロタイタープレートのウェル、ディップスティック、及びマイクロアレイスライドを含むが、これに制限されない。

【0023】

別の実施態様において、工程iii)は、少なくとも1つの検出可能なように標識されたヌクレオチドの存在下で実施される。当業者に既知のいずれかの適切な標識されたヌクレオチドを用いることができる。例としては、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、及び酵素標識を含むが、これに制限されない。

20

【0024】

さらなる実施態様において、工程iii)は、少なくとも1つのハプテン接合ヌクレオチドの存在下で実施され、そのハプテンはリガンドと接合することが可能である。適切なハプテンの例としては、システイン、リジン、セリン、ピオチン、アビジン、及びストレプトアビジンを含むが、これに制限されない。

【0025】

好ましくは、前記リガンドは検出可能なように標識されている。当業者に既知のいずれかの適切な検出可能な標識を用いることができる。例としては、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、及び酵素標識を含むが、これに制限されない。

【0026】

好ましくは、工程iii)はさらに、ポリメラーゼ活性の生成物を検出可能なように標識されたりリガンドに接触させる工程を含む。

30

【0027】

好ましくは、前記検出可能な標識は酵素である。当業者に既知のいずれかの適切な標識された酵素を用いることができる。例としては、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ノイラミニダーゼ、及びセイヨウワサビペルオキシダーゼを含むが、これに制限されない。好ましくは、工程iii)のポリメラーゼ活性の生成物は、それに取り込まれたハプテン接合ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドを少なくとも含む複合体であり、少なくともいくつかの前記ハプテンは酵素標識されたりリガンドに結合し、且つ工程iv)は、工程iii)の生成物を前記酵素が検出可能なシグナルを産生し得る条件にさらす工程を含む。

40

【0028】

好ましくは、前記検出可能なシグナルは基質と反応する酵素によって産生される。本発明の方法における使用に適した基質は、当該技術分野において既知である。例としては、ルミノールまたはアクリダンを含むが、これに制限されない。酵素活性のためのコファクターが必要とされるかもしれないが、例えば、基質としてルミノールを含む反応における過酸化水素の存在である。さらに、検出可能なシグナルを増強する分子を提供することができる。そのような分子は当該技術分野において既知であり、p-ヨードフェノールまたはp-フェニルフェノールを含むが、これに制限されない。

【0029】

50

好ましくは、前記検出可能なシグナルは発光または蛍光である。

【0030】

本発明の各方法は、非結合の分析物、化合物、基質等を除去する工程をおそらく含むであろう。そのような工程の例としては、：

- ・前記第一の特徴点の工程i)が、分析物 - 第一化合物複合体を洗浄し、非結合の第一化合物を除去する工程をさらに含むという工程；
 - ・前記第二の特徴点の工程i)が、分析物 - 第二化合物複合体を洗浄し、非結合の第二化合物を除去する工程をさらに含むという工程；
 - ・工程ii)が、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を洗浄し、非結合の第一及び／または第二化合物を除去する工程をさらに含むという工程；
 - ・導入されていない検出可能なように標識されたヌクレオチドを除去する工程；及び／または、
 - ・導入されていない検出可能なように標識されたりガンドを除去する工程；
- を含むが、これに制限されない。

【0031】

前記第一化合物は、当該サンプル中の分析物に特異的に結合するいずれかの化合物であり得る。好ましい実施態様において、第一化合物はタンパク質である。より好ましくは、第一化合物は抗体である。

【0032】

前記第二化合物は、ポリヌクレオチドを含み、分析物及び／または第一化合物 - 分析物複合体に特異的に結合する。好ましくは、第二化合物はタンパク質 - ポリヌクレオチド接合体である。より好ましくは、第二化合物は抗体 - ポリヌクレオチド接合体である。さらに、第二化合物は当該分析物に結合することが好ましい。

【0033】

好ましい実施態様において、前記分析物は疾患状態のマーカーである。より好ましくは、前記疾患状態は癌及び感染症から選択されるが、これに制限されない。

【0034】

本発明の方法を用いることによって検出し得る適切な分析物は、有機及び無機分子を含み、これは生体分子を含む。好ましい実施態様において、分析物はタンパク質、ペプチド、または小有機分子等の小分子である。

【0035】

ある特に好ましい実施態様において、その方法は、：

- i) 当該サンプルを、当該分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程であって、前記第一化合物は固相支持体に貼り付けられている工程；
 - ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はテロメラーゼによって伸長し得るポリヌクレオチドを含む工程；
 - iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、前記テロメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件下で、少なくとも1つのハプテン接合ヌクレオチドの存在下で、前記テロメラーゼに接触させる工程；
 - iv) 前記テロメラーゼ活性の生成物を、前記ハプテンがリガンドに結合し得る条件下で、酵素標識された前記リガンドに接触させる工程；
 - v) 当該ポリヌクレオチド - ハプテン - リガンド - 酵素複合体を、前記酵素の基質の存在下でインキュベートする工程；
 - vi) 前記基質への前記酵素の活性によって産生された検出可能なシグナルを検出する工程；
- を含む。

【0036】

別の特に好ましい実施態様において、その方法は、：

i) 当該サンプルを、当該分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程であって、前記第一化合物は固相支持体に貼り付けられている工程；

ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はターミナルトランスフェラーゼによって伸長し得るポリヌクレオチドを含む工程；

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、前記ターミナルトランスフェラーゼがポリヌクレオチドを伸長し得る条件下で、少なくとも1つのハプテン接合ヌクレオチドの存在下で、前記ターミナルトランスフェラーゼに接触させる工程；

iv) 前記ターミナルトランスフェラーゼ活性の生成物を、前記ハプテンがリガンドに結合し得る条件下で、酵素標識された前記リガンドに接触させる工程；

v) 当該ポリヌクレオチド - ハプテン - リガンド - 酵素複合体を、前記酵素の基質の存在下でインキュベートする工程；

vi) 前記基質への前記酵素の活性によって産生された検出可能なシグナルを検出する工程；
を含む。

【0037】

さらなる特徴点において、本発明は、サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法を提供し、この方法は、：

i) 当該サンプルを、当該分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程；

ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物 - 第一化合物複合体に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程；

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、前記第二化合物に結合する第三化合物に接触させる工程であって、前記第三化合物はポリヌクレオチドを含む工程；

iv) 当該分析物 - 第一化合物 - 第二化合物 - 第三化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件、またはb) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる工程；
並びに、

v) 工程iv)のa)またはb)部の生成物を検出する工程であって、工程iii)のb)部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まず、且つ前記第一及び/または第二化合物は固相支持体に貼り付けられている工程；
を含む。

【0038】

本発明のこの特徴点において、前記「第三化合物」は、いずれかの分析物の検出のための方法に用いられ得る「普遍的」反応物であるとみなすことができる。この特徴点において、前記第二化合物は抗体であり、前記第三化合物は抗体を含む化合物であり、第二化合物（抗体）は第一の動物種由来であり、第三化合物の抗体は第二化合物（抗体）に結合し、異なる動物種由来であることが好ましい。そのような抗体、及びその生成物のための方法は、当該技術分野において十分既知である。例えば、前記第二化合物（抗体）は当該分析物を用いたマウスの免疫化から得られ、前記第三化合物は抗マウス抗IgGラビット抗体を含む。別の例では、前記第二化合物（抗体）は当該分析物を用いたラビットの免疫化から得られ、前記第三化合物は抗ラビット抗IgGヤギ抗体を含む。

【0039】

「普遍的」反応物を用いた測定法を有することの利点は、異なる分析物の検出のためにポリヌクレオチド接合体を作製する必要がない点である。例えば、既知の癌マーカーCEAとPSAのそれぞれに独立して結合する2つの異なる抗体はマウスから作製され得るが、しかし、同じポリヌクレオチドを接合した抗マウス抗IgGラビット抗体は、これらの分析物の検出のための別々の方法に用いることができる。

【0040】

10

20

30

40

50

前記ポリメラーゼの使用後、合成されたまたは伸長したポリヌクレオチド鎖は当該複合体から分離させて良いが、しかし、本発明のいずれかの特徴点において、前記合成されたまたは伸長したポリヌクレオチド鎖の検出は、分離工程を実施する必要なく容易に続行することができる。

【0041】

主要なファクター（例えば、当該分析物に結合する化合物の濃度、ヌクレオチド前駆体の濃度、非標識のヌクレオチド前駆体に対する標識されたヌクレオチドの比率、ポリメラーゼの量、及び検出方法等）を変更することによって、本発明の方法の感度のある程度調節することができる。特定の測定法は、当該技術分野において既知の方法によって最適化することができる。

10

【0042】

また、タンパク質-DNA接合体も提供され、当該DNAはテロメラーゼに結合し得る、及びテロメラーゼにより伸長され得る配列を含む。そのような接合体は、本発明の方法において用いることができる。好ましくは、前記タンパク質は抗体である。

【0043】

別の特徴点において、本発明は、本発明のタンパク質-DNA接合体を含むキットを提供する。

【0044】

明白であろうものとして、本発明のある特徴点の好ましい特徴及び特性は、本発明の別の特徴点に適用できる。

20

【0045】

この明細書を通して、用語「含む」は、明記された要素、整数若しくは工程、または要素、整数若しくは工程の群の包含を意味するが、他のいずれかの要素、整数若しくは工程、または要素、整数若しくは工程の群の排除を意味するのではないと理解されるであろう。

【0046】

本発明は、下記の非制限の例として、及び添付の図に関して下に記載される。

【0047】

< 一般的技術と定義 >

別に特に定義されていない場合、ここで用いられるすべての技術的及び科学的用語は、当該技術分野で一般的に理解されているものと同じ意味を有すると理解されるであろう（例えば、細胞培養において、分子遺伝学、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学、及び生化学）。

30

【0048】

別に示されていない場合、本発明において用いられるリコンビナントタンパク質、細胞培養、及び免疫学的技術は、当該技術分野において十分既知の標準的な方法である。そのような技術は、例えば、J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons (1984)、J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)、T. A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)、D. M. Glover and B. D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996)、F. M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present)、Ed Harlow and David Lane (editors), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory (1988)、J. E. Coligan et al. (editors), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (including all updates until present)等の資料中の文献を通して記載・説明され、ここに参考文献として組み込む。

40

【0049】

前記「サンプル」は、関心のある分析物を含むと推測される材料を表す。前記サンプル

50

は、当該供給源、または当該供給源から直接的に得られたサンプルからの関心のある分析物を少なくとも部分的に精製するための少なくとも1つの工程、から直接的に得られるそのようなものとして用いることができる。そのようなサンプルは、例えば、ヒト、動物、植物、微生物、または人工サンプルを含むことができる。前記サンプルは、当該測定法を阻害しないいずれかの便利な溶媒中で調製することができる。前記サンプルは典型的に、水溶液または下により詳細に記載されるそのような生物学的液体である。前記サンプルは、生理学的液体等のいずれかの供給源から得ることができ、それは、血液、血清、血漿、唾液、痰、接眼レンズ液、汗、糞、尿、乳、腹水、粘液、滑液、腹膜液、経皮的浸出液、咽頭浸出液、気管支肺胞洗浄液、気管吸引、脳脊髄液、精液、頸管粘液、膣または尿道分泌物、羊水等を含む。ここでは、細胞組織（例えば、髪、皮膚と爪の削り落とされた物、肉抽出物、及び果実と木の皮等）の溶解液も生物学的液体とみなす。前処理は、血液から血漿を調製する工程、粘液を希釈する工程等を含んでも良い。処理方法は、ろ過、蒸留、分離、濃縮、阻害成分の不活性化、及び試薬の添加を含むことができる。生理学的液体に加え、診断測定と同様に、産業的、環境的、または食料生産の測定の実施のための他のサンプル、例えば、水、食料製品、土壌浸出液等を用いることができる。さらに、当該分析物を含むと推測される固形材料を、一度その形を変えて液体溶媒を形成したり、分析物を溶出したりして、テストサンプルとして用いることができる。検査前の生物学的、産業的、及び環境的サンプルの選択と前処理は、当該技術分野において十分既知であり、さらに記載する必要はない。

10

20

【0050】

用語「分析物」は、本発明の方法によって検出または測定される物質を表す。典型的な分析物としては、有機分子、無機分子、タンパク質、ペプチド、細胞、微生物、及びそれらの断片と生成物、またはその付加部位に対する結合要素若しくは受容体（抗体等）を開発し得るいずれかの物質を含んでも良いが、これに制限されない。

【0051】

ここで用いられる「ヌクレオチド」は、塩基 - 糖 - リン酸接合体を表す。ヌクレオチドは、核酸配列（DNAとRNA）のモノマー単位である。用語「ヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオシド三リン酸（dATP、dCTP、dTTP、dUTP、dGTP、dTTP等）、及びそれらの派生物を含む。それらの派生物は、例えば、7-deaza-dGTP及び7-deaza-dATPを含む。本発明によれば、「ヌクレオチド」は十分既知の技術によって標識されない、または検出可能なように標識されても良い。しかし、本発明の方法において用いられる少なくとも1つのヌクレオチドは、検出可能なように標識され、または適切なハプテンに接合しているであろう。

30

【0052】

用語「ハプテン」は、ヌクレオチドに連結でき、ポリメラーゼによりポリヌクレオチド中に組み込まれ得るいずれかの分子を表す。さらに、前記ハプテンは、ここで記載されるそのような適切な検出可能な標識に連結する少なくとも1つの分子（ここでは、一般的に「ハプテン」に対する「リガンド」と表される）に結合できなければならない。当業者が気づくであろうものとして、慣用句「ハプテン」と「リガンド」は、本発明の実施態様を定義するための便利な用語として用いられているだけである。特に、前記ハプテンとリガンドは結合ペアの構成要素であるが、しかし、結合ペアの構成要素が例えばヌクレオチドに連結することはしばしば関連性がない。例えば、ある実施態様において、当該ハプテンはビオチンであり得、また当該リガンドはストレプトアビジンであり得るが、別の実施態様において、当該ハプテンはストレプトアビジンであり得、また当該リガンドはビオチンであり得る。本発明の方法における使用に有用なハプテンとリガンド（「結合ペア」）は、当該技術分野において十分既知である。

40

【0053】

< ポリヌクレオチド接合体 >

本発明の方法は、関心のある標的に結合するポリヌクレオチドと分子（例えば、抗体等のタンパク質）とを含む接合化合物を必要とする。多くの実施態様において、前記関心の

50

ある標的は、検出される分析物である。しかしながら、本発明はまた、当該分析物に直接的に結合する分子（例えば、抗体）に方向づけられた「普遍的」接合化合物の使用を提供する。

【0054】

前記ポリヌクレオチドは、DNA若しくはRNA、またはそれらの組合せであって良い。前記ポリヌクレオチドは、一本鎖若しくは二本鎖、またはそれらの組合せであって良い。

【0055】

ここで用いられる用語「ポリヌクレオチド」はまた、さらに伸長し得る、またはポリヌクレオチド合成のための鑄型としてさらに作用し得る、DNA及び／またはRNA派生物を表す。そのような派生物の例は、ペプチド核酸（PNA）である。リボース-糖骨格を有する代わりに、PNAは典型的に、ペプチド結合で繋がったN-（2-アミノエチル）-グリシンを繰り返す単位から構成される骨格を有する。多様なピリミジン及びプリン塩基が、メチレン-カルボニル結合によって、前記骨格に繋がっている。DNA/DNA二重鎖と比較して、PNAは分解をより受けにくく、DNAとより強固な二重鎖を形成する。

10

【0056】

前記ポリヌクレオチドは、当該技術分野において既知のいずれかの技術によって、関心のある標的と結合する分子と結合する。例としては、ビオチン-アビジン相互作用、ジスルフィド結合の形成、アミンカップリング（例えば、Hendrickson et al., 1995を参照）、チオールカップリング（例えば、Niemeyer et al., 2003を参照）、またはアルデヒド-ヒドラジン相互作用（例えば、Kozlov et al., 2004を参照）を含むが、これに制限されない。当該技術分野において既知の他のカップリング物質としては、m-マレイミドベンゾイルN-ヒドロキシスクシンイミドエステルまたは関連化合物、1-エチル-3-（3-ジエチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）等のカルボジイミド、スクシンイミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）、及びグルタルアルデヒド架橋剤を含む。

20

【0057】

当業者が認めるであろうものとして、1つより多いポリヌクレオチドが一分子（例えば、抗体）に接合できる。これは、当該測定法の感度を増大させるかもしれない。

【0058】

例えば、前記ポリヌクレオチドは、アビジン、好ましくはストレプトアビジンまたはノイトラビジン（neutravidin）に接合させることができ、その後、ビオチン化抗体に連結させることができる。さらに、例えば、Chu et al. (1986) により記載されるものに類似した方法を、ビオチンがジスルフィドリンカーを介して当該ポリヌクレオチドの5'末端に付加し、そのビオチン化ポリヌクレオチドがアビジンに結合してポリヌクレオチド-ビオチン-アビジン付加体を形成し、その後、それがビオチン化抗体に接合し得る場合に用いることができる。アビジンをポリヌクレオチドに付加する他の方法は、当該技術分野において既知であり、例えば、関心のある標的に結合するProtein A (Sano et al., 1992) 分子（例えば、抗体等のタンパク質）を使用する方法等である。

30

【0059】

いくつかの場合において、前記ポリヌクレオチドに関心のある標的に結合する分子（例えば、抗体等のタンパク質）へカップリングすることが立体的障害をもたらし、ポリメラーゼへの接近の減少を生じる、ということを当業者は認めるであろう。これは、Kwon et al. (2004)、Arora et al. (2002)、及びAnsari et al. (2001) において議論されているリンカーを含む文献に以前記載されているそのような適切なリンカーの使用により回避できる。

40

【0060】

<ポリメラーゼ>

一般的に、ポリヌクレオチドを伸長し得る、及び／またはポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得るいずれかのポリメラーゼを本発明の方法において用いることができる。

【0061】

50

本発明の方法における使用のための適切なDNA依存性DNAポリメラーゼの例としては、Tth DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、大腸菌等の細菌由来のDNAポリメラーゼ、Klenowフラグメント、及びT4 DNAポリメラーゼを含むが、これに制限されない。

【0062】

本発明の方法における使用のための適切なRNA依存性DNAポリメラーゼの例としては、AMV逆転写酵素、SuperScript III、及びTthポリメラーゼを含むが、これに制限されない。

【0063】

本発明の方法における使用のための適切なDNA依存性RNAポリメラーゼの例としては、T7 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ、及びT3 RNAポリメラーゼを含むが、これに制限されない。

【0064】

本発明の方法における使用のための適切なRNA依存性RNAポリメラーゼの例としては、Qレプリカーゼ、肝炎C RdRp、水疱性口内炎ウイルスRdRp、かぶら黄色モザイクウイルスレプリカーゼ、及びRNAバクテリオファージphi 6 RNA依存性RNAポリメラーゼを含むが、これに制限されない。

【0065】

特に好ましい実施態様において、前記ポリメラーゼは、一本鎖ポリヌクレオチドまたは部分的に二本鎖ポリヌクレオチドの一本鎖突出部を伸長する。そのようなポリメラーゼの例としては、poly(A)ポリメラーゼ、T4 RNAリガーゼ、テロメラーゼ、及びターミナルトランスフェラーゼを含むが、これに制限されない。

【0066】

テロメラーゼは、本発明の方法における使用のために、不死のヒト細胞から単離できる。テロメラーゼは、低張性バッファーまたは非イオン性界面活性剤のどちらかに抽出することによって精製しても良い。それはまた、DEAEカラムとそれに続く精製技術を通すことによって精製できる。しかしながら、前記テロメラーゼは、いずれかの精製工程を実施する必要なく、適切な細胞を溶解することのみによって得られても良い。テロメラーゼを含む細胞の供給源としては、LIM1215 (Whitehead et al., 1985)、Hela細胞、HEK293細胞 (Graham et al., 1977)、及びT-75細胞 (van Bokhoven et al., 2001)等のヒト腫瘍細胞であろう。

【0067】

テロメラーゼはまた、酵母またはテトラヒメナ (Bryan et al., 1998)等の他の多くの供給源から単離できる。あるいは、テロメラーゼは、当該技術分野において十分既知のリコンビナント方法を用いることによって作製できる。

【0068】

ヒトテロメラーゼによって伸長されるであろう適切なポリヌクレオチド配列の例としては、TTAGGGTTAGGGTTAGGG (SEQ ID番号: 1)、TTTTTTAATCCGTCGAGCAGAGTT (SEQ ID番号: 2)、TTTTTTAATCCGTCGAGCAGAGTTAGGGTTAGGGTTAG (SEQ ID番号: 3)、及びTTTTTTAATCCGTCGAGCAGAGTTAG (SEQ ID番号: 4)を含むが、これに制限されない。当業者が気づくであろうものとして、上のポリヌクレオチドは縮小または伸長されても良く、本発明の方法にさらに有用なものであって良い。

【0069】

テトラヒメナは、5'-TTGGGG-3'のテロメアリピートを合成する (SEQ ID番号: 5)。コード化配列に基づく鋳型を複製し、その配列をヒトテロメアリピート5'-TTAGGG-3' (SEQ ID番号: 6)をコード化するように変更できる。その後、前記テトラヒメナ酵素を、変更されたRNA配列で再構成し、ヒトテロメア配列を合成するテロメラーゼ酵素を生成しても良い。この酵素は、大量のテトラヒメナから得られ、精製され、細胞に添加されることができる。

【0070】

当該技術分野において、テロメラーゼは、癌細胞により典型的に生成されることが知ら

10

20

30

40

50

れている。従って、本発明の方法において、癌分析物を検出する目的のためにテロメラーゼ（特に、哺乳類テロメラーゼ）を用いる場合、当該分析物を、被験者から得られたサンプル中に内在的に含まれるかもしれないいずれかのテロメラーゼから分離することが好ましい。

【0071】

ターミナルトランスフェラーゼは、ポリヌクレオチド基質の3' OH末端への、dNTPからのモノヌクレオチドの反復的付加を触媒するポリメラーゼである。この酵素に対して非常に好ましい基質は3' 突出末端であるが、この酵素はまた、DNA断片の平滑及び3' 陥凹末端へヌクレオチドを付加するであろう。コバルトは、典型的に、この酵素の活性に必要なコファクターであり、一定の条件において当該測定に添加される。ターミナルトランスフェラーゼは哺乳類の酵素であり、リンパ球で発現している。前記酵素は商業的に購入でき、また、通常、大腸菌におけるウシ遺伝子の発現により生成される。商業的な供給源の例としては、Promega社（Madison, Wisconsin, USA）である。

【0072】

ポリ（A）ポリメラーゼは、配列非依存的な形式で、RNAの3' 末端へのアデノシンの付加を触媒する。共通配列AAUAAA（SEQ ID番号：7）は、ポリAサイトの5' 約10-30ヌクレオチド、並びにそのサイトの3' GUに富む及び／またはUに富む要素（配列）について用いられる。前記AAUAAAシグナルが分子の末端から適切な距離に位置する場合、それはポリアダニル化の開始と伸長に典型的に十分である。当業者は、ポリ（A）ポリメラーゼの基質として用いられ得るRNA分子を容易に作製できる。ここで概要を記述するように、前記酵素は、標識されたATPをRNA分子の3' 末端へ付加し、標識されたRNAを作製するために用いることができる。ポリ（A）ポリメラーゼは、遺伝子組換え的に作製され、あるいは、本質的にいずれかの真核細胞からの精製によって得ることができる。本発明の方法に有用なポリ（A）ポリメラーゼの商業的供給源としては、Ambion社（Austin, Texas, USA）、Invitrogen社（Carlsbad, California, USA）、及びUSB社（Cleveland, Ohio, USA）を含む。

【0073】

< ポリヌクレオチド合成とその検出 >

ある実施態様において、当該接合ポリヌクレオチドはポリメラーゼの鋳型として用いられ、相補鎖を合成する。別の実施態様において、当該接合ポリヌクレオチドはポリメラーゼの作用によって伸長する。

【0074】

ある実施態様において、ポリメラーゼ活性は、適切なプライマーが当該接合ポリヌクレオチド領域にアニーリングすることによって刺激される。当該プライマーは、当該ポリヌクレオチド領域に特異的にアニーリングでき得る限り、いずれかの長さまたは塩基組成であることができる。その伸長は、1つ以上のタイプのヌクレオチド三リン酸、及び所望の場合は、補助的結合タンパク質の存在下で実施される。

【0075】

当該dNTPの取込みは、好ましくは、取り込まれたヌクレオチドに結合するハプテンの存在について測定することによって確認される。好ましい実施態様において、合成されたポリヌクレオチド鎖は、特定のdNTPに連結されたビオチン分子の存在を測定することによって検出される。前記ポリヌクレオチド鎖に結合したビオチンの存在は、酵素連結ストレプトアビジンと、例えば、化学発光基質によって明らかにすることができる。

【0076】

ある実施態様において、ハプテン標識されたヌクレオチド（例えば、ビオチン、ジゴキシゲニン）は、当該ポリメラーゼによって、伸長するポリヌクレオチド鎖に取り込まれる。その後、ハプテン結合タンパク質（リガンド）に接合した酵素が、当該ポリヌクレオチドを標識するために添加される。当該酵素に対する化学発光基質（例えば、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、または - ガラクトシダーゼ）が添加され、光を産生する（当該検出器により記録される）。

【 0 0 7 7 】

基質を光へ変換するための適切な酵素としては、ルシフェラーゼ、例えば、昆虫ルシフェラーゼを含む。ルシフェラーゼは、触媒反応の最終生成物として光を産生する。最も知られている発光酵素はホタル、*Photinus pyralis* (甲虫類) (例えば、US-5,618,722を参照)である。さらに、多数のルシフェラーゼ遺伝子が、ジャマイカコメツキムシ科、*Pyroplorus plagiophthalmus* (甲虫類) からクローン化されている。ホタルルシフェラーゼは、ルシフェリン、アデノシン5'-三リン酸(ATP)、マグネシウムイオン、及び酸素の存在下で生物発光を触媒し、0.88の量子収量を生じる。異なるルシフェラーゼは異なる波長の光を産生できることもあり、これにより異なる波長での発光を同時にモニターすることができるかもしれない。

10

【 0 0 7 8 】

ルシフェラーゼは、光量子の付随的放出とともに、dATPを直接的に加水分解できる。その加水分解は、ポリメラーゼ活性による前記dATPの取込みに非依存的に起こるため、偽陽性シグナルを生じる。この問題を回避するために、DNAに取り込まれるdATP類似体、すなわち、DNAの基質であるがルシフェラーゼの基質ではないdATPを用いることができる。そのような類似体の1つが - チオ - dATPである。従って、 - チオ - dATPの使用により、dATPが伸長する核酸鎖に取り込まれずに加水分解される際に起こり得る、偽性の光量子産生を回避する。

【 0 0 7 9 】

商業的に入手可能な酵素の例としては、 - ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ノイラミニダーゼ、及びホースラディッシュペルオキシダーゼを含む。

20

【 0 0 8 0 】

アルカリホスファターゼは、二次的検出反応物として用いられるストレプトアビジン、アビジン、または抗体とよく接合する。これらの検出反応物は、ELISA、並びにノーザン、サザン、及びウエスタンブロット技術を含む多様な適用に広く用いられる。発色性基質(濃青色を生じるBCIP等)、蛍光発生ホスファターゼ基質、及び化学発光基質が入手可能である。アルカリホスファターゼに対する化学発光基質、CDP-Star(登録商標)及びCSPD(登録商標)(Applied Biosystems社より入手可能, Foster City, California, USA)により、アルカリホスファターゼとアルカリホスファターゼ標識された分子を比較的感度良く、迅速に、また容易に検出できる。

30

【 0 0 8 1 】

NA-Star(登録商標)化学発光基質(Applied Biosystems社)により、ノイラミニダーゼ活性を高感度に検出できる。この基質は、広く用いられる蛍光発生基質メチルウンベリフェリルN-アセチルノイラミン酸の非常に高感度の置換体である。1,2-ジオキセタン化学発光基質により、フィルムまたは機器使用により検出される可視光を産生することによって、生体分子を極めて高感度に検出できる。化学発光基質は、酵素誘導による分解の際に可視光を放出し、高強度の光産生に連結した低バックグラウンドの発光を提供する。

【 0 0 8 2 】

ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)に対する化学発光基質は、Alpha Diagnostic International社(San Antonio, Tex)、及びPierce Biotechnology社(Rockford, IL, USA)を含むいくつかのメーカーから入手可能である。Alpha Diagnostic International社製のNu-Glo基質は、安定した2つの構成成分溶液として提供されるルミノール-ペーサの溶液である。過酸化水素の存在下で、HRPはルミノールを励起状態のジアニオンに変換し、それは基底状態へ戻る際に光を放出する。その結果生じたシグナルは、カメラルミノメーターまたはX線フィルムを用いることによって測定でき、永久的な記録を提供する。

40

【 0 0 8 3 】

発光は、ここに記載された装置と同様に、種々の検出装置、例えば、フィルム、光電子倍增管、CCD、CMOS、吸光光度計、ルミノメーター、電荷注入装置(CID)、または他の固定検出器を用いることによって検出及び定量されても良い。ある実施態様において、放出

50

された光量子の定量は、融解光ファイバー束で調整されたCCDカメラの使用によって達成される。別の実施態様において、放出された光量子の定量は、マイクロチャネルプレート増強装置で調整されたCCDカメラの使用によって達成される。感度を増大させるために背部を薄くしたCCDを用いることができる。CCD検出器については、Bronks et al. (1995) により記載されている。

【0084】

代表的なCCDシステムは、Lockheed-Martin LM485 CCDチップと個々のファイバー径が6-8 μm である1-1光ファイバーコネクタ(束)とを備えたSpectral Instruments社(Tucson, Arizona, USA)製のシリーズ600 4-ポートカメラである。このシステムは、1600万より大きい画素を有し、10%から40%未満に及ぶ量子収率を有する。従って、波長に依存して、CCDセンサーに映像された光量子の40%程度が検出可能な電子へ変換される。

10

【0085】

他の実施態様において、蛍光成分を標識として用いることができ、その反応事象の検出は共焦点走査型顕微鏡を用いることによって実施できる。さらに、走査型トンネル顕微鏡と原子間力顕微鏡を用いることができる。

【0086】

放出された光量子により検出し得る他の基質(標識)の例が、本発明の方法において利用できる。酵素をとまなうアクリダン基質の反応は、光を発し得る励起中間体を生じる。使用される酵素はアクリダン分子上に置換された切断可能な成分に依存して変化し得るが、例えば、前記反応はPierce Lumi-Phos WB基質とアルカリホスファターゼとの間にあり得る。ルミノール基質とペルオキシダーゼとの間の反応は、光を放出する不安定な中間体を生じ、3-アミノフタレートジアニオンへ変換される。これは、Pierce SuperSignal(登録商標)ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrateにおいて起こる反応である。さらに、酵素をとまなう1,2-ジオキセタン基質の反応は、分解して2つの生成分子、アダマンタノンと化学的に励起された蛍光物質(後に、光を発し得る)を産生する不安定な中間体を生じる。例えば、その反応は、Lumigen PPDとアルカリホスファターゼとの間にあり得る。使用される酵素は、1,2-ジオキセタン-ベースの基質上に置換された切断可能な成分に依存して変化し得る。

20

【0087】

ほとんどの適用に対して、導入されていない反応物、例えば、導入されていないdNTPを洗浄バッファーで洗い流すことが所望される。当該複合体の形成/安定性、及び/またはその検出を阻害しないいずれかの洗浄バッファーを用いることができる。そのような洗浄バッファーは、当該技術分野において十分既知である。

30

【0088】

< 固相支持体 >

典型的に、本発明の方法において用いられる少なくとも1つの反応物を、適切な固相支持体へ貼り付ける必要があるであろう。特に好ましい実施態様において、第一化合物を固相支持体へ貼り付ける。しかしながら、ある特定の例においては、例えば、タンパク質とポリスチレンとの間の疎水性相互作用等のそのような非特異的な相互作用により、当該支持体と直接的に吸着することによって、分析物は捕獲反応物として作用するかもしれない。

40

【0089】

本発明の方法における使用に適切な固相支持体は、当該技術分野において一般的で十分既知である。種々の可能性のある支持体が考慮される。適切な固定化支持体は、例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリグリシジルメタクリレート、置換ポリスチレン(例えば、アミノ化若しくはカルボキシ化ポリスチレン; ポリアクリルアミド; ポリアミド; ポリ塩化ビニル等)等の合成ポリマー支持体、ガラス、金、アガロース、ニトロセルロース、及びナイロン(登録商標)を含むが、これに制限されない。これらの材料は、フィルム、マイクロタイタープレート、ウェル、ビーズ、スライド、粒子、ピン、釘、試験管、膜、またはバイオセンサーチップとして用いても良い。あるいは、前記支持体は、磁気性

50

及び非磁気性粒子を含む。好ましい磁気粒子は、DynaI Biotech社 (Oslo, Norway)、Polymer Labs Lodestar ビーズ (Shropshire社, UK)、またはMillipore CPGビーズ (Millipore社, Lane Cove, Australia) から入手可能なそのような磁気ビーズである。

【0090】

種々の金属、ガラス、プラスチック等へ種々の分子を貼り付けるための多くの方法、及びリンカー分子、支持体が当該技術分野において十分既知である (例えば、H Weetall, Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides, Marcell Dekker Inc., New York (1975) と同様に、EP-188,256; US-4,671,958; US-4,659,839; US-4,414,148; US-4,699,784; US-4,680,338; US-4,569,789; 及びUS-4,589,071を参照)。例えば、「リンカー」は、固相支持体へ適切な分子を貼り付けるために用いることができる。当該技術分野で十分既知の適切なリンカーは、直鎖状または分枝鎖の炭素リンカー、複素環の炭素リンカー、またはペプチドリナーを含むが、これに制限されない。

【0091】

表面上の基と反応する一方の官能基と、所望の分子 (例えば、第一化合物) と反応するもう一方の官能基とを有する二官能価のリンカーを必要とされる接合体を形成するために用いても良い。あるいは、誘導体化は化学的処理を含んでも良い。例えば、官能基を作製するために、シリカまたはガラス支持体をシラン処理できる。同様に、タンパク質または糖タンパク質を誘導体化、例えば、当該タンパク質抗体へ貼り付けられた糖成分を過ヨウ素酸でグリコール切断することにより、遊離型アルデヒド基を生成することができる。当該抗体またはタンパク質、または糖タンパク質上の遊離型アルデヒド基は、当該表面上の遊離型アミンまたはヒドラジン基と反応し、それに結合するパートナーに結合するかもしれない (US-4,671,958を参照)。抗体または抗体断片等のポリペプチド上の遊離型スルフィドリル基の生成のための方法が既知である (US-4,659,839を参照)。

【0092】

水性環境における平行する共通反応の分離を実施するためにアレイを用いることができる。前記アレイは、反応物と反応し得る開始材料を含む少なくとも1,000の別個の反応チャンパーを有する支持体を有することができ、少なくとも1つの反応物を含む1つ以上の流体が各反応チャンパーへ供給され、前記反応物が当該ウェルから拡散するための拡散時間が、前記開始材料が反応物と反応し生成物を生成するのに必要とされる時間を超えるそのような場合には、前記各反応チャンパーは特定の寸法に合わせられる。前記反応チャンパーは、当該支持体上に多数の空洞を作ることによって形成できる。前記多数の空洞は、溶蝕、成形、または微細機械加工によって支持体中に形成できる。前記空洞は、平面底または凹面底を有することができる。好ましい実施態様において、当該支持体は光ファイバー束である。さらなる実施態様において、当該反応チャンパーは、平らな表面に別個のパッチを作ることにより形成される。前記パッチは、周囲の平らな表面とは異なる表面化学を有することができる。

【0093】

< 抗体 >

本発明の目的のために、用語「抗体」は、反対の物に特定されずに、標的分析物に対する結合活性を維持する完全長の抗体の断片を含む。そのような断片は、一本鎖抗体 (scFv) だけでなく、Fv、F(ab')、F(ab')₂、及びdAb断片を含む。さらに、前記抗体及びその断片は、例えばEP-A-239,400に記載されているそのようなヒト化抗体であって良い。

【0094】

本発明の方法に有用な抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであって良い。しかしながら、バックグラウンドシグナルに関するいずれかの問題を低減するために、当該抗体はモノクローナルであることが好ましい。

【0095】

用語「特異的に結合する」は、当該サンプル中の他の分子、及び/または非標的分析物ではなく、特定の分析物に結合する抗体の性能を表す。

【0096】

ポリクローナル抗体が所望される場合、選択された哺乳類（例えば、マウス、ラビット、ヤギ、ウマ等）が関心のある分析物（免疫原性のポリペプチド等）を免疫される。免疫化された動物由来の血清を、既知の方法に従って、回収及び処理する。ポリクローナル抗体を含む血清が他の抗原に対する抗体を含む場合、当該ポリクローナル抗体は免疫アフィニティークロマトグラフィーによって精製できる。ポリクローナル抗血清を作製及び処理するための技術が、当該技術分野において既知である。

【0097】

関心のある分析物に対するモノクローナル抗体もまた、当該技術分野における技術によって容易に作製できる。ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の作製のための一般的な方法論が既知である。不死化抗体産生細胞株は、細胞融合、及びその他の技術（例えば、Bリンパ球への発癌性DNAの直接的トランスフォーメーション、またはエプスタインバルウイルスでのトランスフェクション等）によって作製できる。作製されたモノクローナル抗体のパネルは、種々の性質、すなわちアイソタイプ及びエピトープ親和性に対して選別され得る。

10

【0098】

代替的な技術は、例えば、ファージが多様な相補性決定領域（CDR）を備えた被膜の表面にscFv断片を発現する、選別ファージディスプレイライブラリーを含む。この技術は当該技術分野において十分既知である。

【0099】

< 使用 >

20

本発明の方法を用いて検出され得る適切な分析物は、生体分子を含んだ有機的及び無機分子を含む。好ましい実施態様において、当該分析物は、環境汚染物質（農薬、殺虫剤、毒素等を含む）；化学物質（溶媒、有機材料等を含む）；治療分子（治療用及び乱用薬、抗生物質等を含む）；生体分子（ホルモン、サイトカイン、タンパク質、脂質、炭水化物、細胞膜抗原及び受容体（神経性、ホルモン性、栄養性、及び細胞表面受容体）、またはそれらのリガンド等）；全細胞（原核（病原菌等）、及び哺乳類腫瘍細胞を含む真核細胞を含む）；ウイルス（レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス等を含む）；生物テロ行為に用いられ得る物質（炭疽菌）、並びに孢子等であって良い。特に好ましい分析物は、環境汚染物質；核酸；タンパク質（酵素、抗体、抗原、成長因子、サイトカイン等を含む）；治療用及び乱用薬；細胞；並びにウイルスである。

30

【0100】

特に好ましい標的分析物は、タンパク質と核酸とを含む。ここで用いられるそのような「タンパク質」は、タンパク質、ポリペプチド、及びペプチドを含む。前記タンパク質は、自然に生じるアミノ酸とペプチド結合から、または合成模倣ペプチド構造から形成されて良い。当該側鎖は、（R）または（S）配置のどちらかであって良い。

【0101】

検出されるべき分析物は、成長ホルモン、インシュリン、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、黄体形成ホルモン（LH）、及びグリセンチン等の消化管ホルモン等のホルモン；上皮成長因子（EGF）、VEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、及びVEGF-E等の血管内皮成長因子、神経成長因子（NGF）、血小板由来成長因子（PDGF）及び関連分子、繊維芽細胞成長因子（FGF）、インシュリン様成長因子（IGF）、並びに肝細胞成長因子等の成長因子；細菌毒素；細菌代謝産物とそれに対する抗体；エクソスポリウム成分；ウイルスキャプシド成分；アルカリホスファターゼ（ALP）、グルタミン酸 - オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT）、グルタミン酸 - ピルビン酸トランスアミナーゼ（GPT）、乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）、血液凝固因子等の酵素；超低密度リポタンパク質（VLDL）、高密度リポタンパク質（HDL）、及び低密度リポタンパク質（LDL）等のリポタンパク質；ホルモン受容体（例えば、インシュリン受容体、成長ホルモン受容体、EGF受容体）、及び神経受容体（例えば、アセチルコリン受容体）等の受容体；下に記載するような癌マーカー；組織適合性抗原等の細胞表面抗原；自己抗体；C-反応性タンパク質；及びペプチド酵素インヒビター等の他の生理活性物質（例えば、マクログロブリン）；並び

40

50

にキャリアタンパク質、IGF結合タンパク質、及びトランスフェリン等の補足物を含む。

【0102】

本発明は、サンプル中の腫瘍抗原（分析物）の存在を検出するために用いることができる。本発明の方法を用いることによって検出され得る腫瘍抗原の例としては、AFP（肝癌と胚細胞腫瘍に対するマーカー）、CA 15-3（乳癌を含む多数の癌に対するマーカー）、CA 19-9（膵癌と胆道腫瘍を含む多数の癌に対するマーカー）、CA 125（卵巣癌を含む種々の癌に対するマーカー）、カルシトニン（甲状腺髄様癌を含む種々の癌に対するマーカー）、カテコールアミンと代謝産物（褐色細胞腫）、CEA（大腸癌と他の消化管癌を含む種々の癌に対するマーカー）、上皮成長因子（EGF）及び／または上皮成長因子受容体（EGFR）（両方とも大腸癌を含む上皮癌類に関連する）、A33大腸上皮抗原（大腸癌）、hCG / beta hCG（胚細胞腫瘍と絨毛癌を含む種々の癌に対するマーカー）、尿中の5HIAA（カルチノイド症候群）、PSA（前立腺癌）、セロトニン（カルチノイド症候群）、チログロブリン（甲状腺癌）、並びにNY-ESO-1等のCT抗原（Scanlan et al., 2002）（食道及び膀胱癌及び黒色腫のマーカー）、LAGE、MAGE（多くの肝臓癌及び黒色腫に関連する）、GAGE（肝臓癌）、SSX（肉腫）、分化抗原（Melan A / MART1、GP100、及びチロシナーゼ等）、変異抗原（CDK4、 - カテニン等）、増幅抗原（p53、Her2等）、並びにスプライスパリアント抗原（ING1等）を含むが、これに制限されない。

【0103】

本発明は、サンプル中の微生物、及び／またはそれにより生成される分析物の存在を検出するために用いることができる。当該標的は、ウイルス、細菌、真菌、または原生動物であって良いが、それに制限されない。本発明を適切に適用し得る微生物の特定の非制限例としては、細菌（*Mycobacteria tuberculosis*、*Rickettsia rickettsii*、*Borrelia burgdorferi*、*Yersinia pestis*、*Treponema pallidum*、*Chlamydia trachomatis*、*Chlamydia pneumoniae*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Mycoplasma sp.*、*Legionella pneumophila*、*Legionella dumoffii*、*Mycoplasma fermentans*、*Ehrlichia sp.*、*Haemophilus influenzae*、*Neisseria meningitidis*、*Streptococcus pneumoniae*、*S. agalactiae*、及び*Listeria monocytogenes*等）；ウイルス（ヒト免疫不全症ウイルスタイプ1（HIV-1）、ヒトT細胞リンパ増殖性ウイルスタイプ1（HTLV-1）、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、単純ヘルペス、ヘルペスウイルス6、ヘルペスウイルス7、エプスタインバルウイルス、サイトメガロウイルス、パリセラゾスターウイルス、JCウイルス、パルボウイルスB19、インフルエンザA、B、及びC型、ロタウイルス、ヒトアデノウイルス、風疹ウイルス、ヒトエンテロウイルス、ヒト生殖乳頭腫ウイルス（HPV）、並びにハンタウイルス等）；真菌（*Cryptococcus neoformans*、*Pneumocystis carinii*、*Histoplasma capsulatum*、*Blastomyces dermatitidis*、*Coccidioides immitis*、及び*Trichophyton rubrum*等）；並びに原生動物（*Trypanosoma cruzi*、*Leishmania sp.*、*Plasmodium sp.*、*Entamoeba histolytica*、*Babesia microti*、*Giardia lamblia*、*Cyclospora sp.*、及び*Eimeria sp.*等）を含む。本発明の方法は、*Cryptosporidium sp.*接合子嚢の検出；細菌毒素（*Vibrio cholerae* 01、毒素原性大腸菌、*Shigella sp.*、大腸菌、*Helicobacter pylori*、毒素産生性*Clostridium difficile*、*Staphylococcus aureus*、及び*Streptococcus pyogenes*菌体外毒素由来の毒素遺伝子等）の検出に用いられても良い。

【0104】

<キット>

開示された検出方法に必要とされる材料と反応物の少なくともいくつかは、キット中にも収集されて良い。本開示のキットは、一般的に、目的たる方法を実施するために必要な少なくともポリメラーゼとヌクレオチドとを含むであろう。好ましい実施態様において、前記キットは、タンパク質-DNA接合体を含み、ここで当該DNAはテロメラーゼと結合し得る、及びヒトテロメラーゼにより伸長され得る配列を含む。別の好ましい実施態様において、前記キットは、サンプル中の分析物を検出するための使用説明書も含むであろう。

【0105】

10

20

30

40

50

前記キットは、使用者が適切なスタンダード曲線を作成できるように様々な濃度で提供される対照サンプルを含んでも良い。例えば、NY-ESO-1の検出のためのキットは、25、50、100、250、及び500 ng/mlの濃度で提供されるリコンビナントNY-ESO-1を含んでも良い。

【0106】

それぞれの場合において、当該キットは、好ましくは、各個別の反応物とポリメラーゼに対して別個の容器を有するであろう。各生物学的物質は、一般的に、各容器に適切に分注されるであろう。当該キットの容器方法は、一般的に、少なくとも1つのバイアルまたは試験管を含むであろう。当該反応物が入られる、または分注されるフラスコ、瓶、及び他の容器方法もまた可能である。当該キットの個別の容器は、好ましくは、商業的な販売のために密封状態で維持されるであろう。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0107】

(実施例)

< 実施例 1 : 2つの抗NY-ESO-1抗体 (ES121とE978) へのNY-ESO-1の同時結合 >

マウス - 抗ヒト - NY-ESO-1 mAb ES121 (Jungbluth et al., 2001) を、CM5 BIACore表面プラズモン共鳴 (SPR) バイオセンサー表面上にアミンカップリング化学反応を介して固定化した。リコンビナント抗原NY-ESO-1 (40mM尿素 / 滅菌水中に150 µg/mL) (Murphy et al., 2005) を、ES121を固定化した表面上に流速5 µL/minで注入した。流速5 µL/minでの抗体ES121の注入は、非特異的な結合がないことを確認するために実施され、その後、マウス - 抗ヒト - NY-ESO-1 mAb E978 (Jungbluth et al., 2001) (Invitrogen社, Carlsbad, California, USA) を当該表面上へ注入した。

20

【0108】

結果は、前記抗原NY-ESO-1が固定化されたES121 mAb表面に比較的高いアフィニティで結合すること、及び当該抗体 - 抗原表面上に別のES121 mAbの注入をした場合、非特異的な結合がほとんど確認されなかったことを示す (図 2)。mAb E978の最後の注入は、それが当該表面に捕獲されたNY-ESO-1を認識し得ること、及び高いアフィニティと特異性で結合し得ることを示す。この実験は、抗体結合について逆の順序で実施され、同様の結果を有した (データは示さず)。

【0109】

< 実施例 2 : 一次抗体カップリング、及び特徴づけ >

30

M270 Carboxylic Acid Dynal (登録商標) ビーズを、抗NY-ESO-1抗体 (E978) または抗EGFR抗体へ結合させた。各抗体 (25mM MES、pH5) を、メーカーの使用説明書に従い、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) / N-ヒドロキシスシンイミド (NHS) 反応物を用いることによるアミンカップリング化学反応を介して、M270カルボン酸ビーズへ共有結合で結合させた。カップリング効率は、Superose 12カラム (10/30) を用いたゲルろ過クロマトグラフィー (SEC) によりモニターした。

【0110】

成功したmAbカップリングを確認するために、また前記mAbが依然として生物学的に活性があるかを確認するために、自動化ビーズベースのサンドイッチELISA測定法を開発した。当該磁気ビーズに結合した抗体 (結合ビーズの300 µg/mL) を、その各抗原 (細胞溶解液または精製タンパク質のどちらか) とインキュベートし、その後、この複合体をビオチン化しておいた抗NY-ESO-1または抗EGFR抗体 (PBS / 3% BSAバッファー中に2 µg/mL) のどちらか1つとインキュベートした。ビオチン化は、ECL Protein Biotinylation Module Kit (Amersham Bioscience社) によって示されたとおり実施した。その後、検出のために、それを最終的な化学発光の読み出しのための基質であるストレプトアビジン - HRP (1 µg/mL KPL) とインキュベートした。ルミノール50 µLとペルオキシド50 µL (Supersignal ELISA Femto基質, Pierce社) の添加の際に、化学発光が産生した。

40

【0111】

結果は、前記磁気ビーズへのカップリングが両実施例に対して成功したこと、及び前記抗体は各抗原の結合を許容し得る位置に結合したことを示した (図 3 と 4)。

50

【 0 1 1 2 】

< 実施例 3 : オリゴヌクレオチド - 抗体カップリング >

2つの抗体（抗NY-ESO-1（ES121）と抗EGFR）は、当該テロメラーゼ認識オリゴヌクレオチド（5'-TTTTTTAATCCGTCGAGCAGAGTTAGGGTTAGGGTTAG-3'-SEQ ID番号：3）に上手く接合した。この配列は、5'チオール修飾を含み、NHS-エステル-マレイミド架橋剤N-[マレイミドブチリルオキシ]スルホスクシンイミドエステル（sulfo-GMBS, Pierce社）（Schweitzer et al., 2000）を用いることにより、チオールカップリング化学反応を介したカップリングを許容し得る。前記カップリングと純度を、HPLC、SDS-PAGEゲル電気泳動、及びTBE-アガロース電気泳動を用いることによってモニターした（図5-9）。定量化と化学量論的組成は、BCA（Pierce社）とOligreen（Pierce社）測定法（下記を参照）を用いることによって分光光度的に得られた。絶対的なタンパク質濃度は、定量的アミノ酸分析により得られた。

10

【 0 1 1 3 】

リジン残基を介した複数のタグのカップリングによる異成分についてのさらなる分析を、Mono-Qクロマトグラフィーを用いることによって実施した（図10）。第17-22画分にわたって回収したピークは、SDS-PAGE（データは示さず）と1.5%アガロースゲルによって分析し、異なるオリゴヌクレオチド - 抗体アイソフォームが生成されたことを示した（図11）。

【 0 1 1 4 】

< 実施例 4 : オリゴヌクレオチド - 抗体特徴づけ >

実施例3に記載されたオリゴヌクレオチド - 抗体を、ビーズベースの伸長測定法で分析し、そのオリゴヌクレオチド - 抗体は依然として生物学的に活性があること、NY-ESO-1またはEGFRにそれぞれ結合し得ることを確認した。この測定法は、当該オリゴヌクレオチド認識配列が酵素（テロメラーゼ）により伸長され得ることも示している。

20

【 0 1 1 5 】

Dynal（登録商標）M270アミン磁気ビーズを、アミンカップリング化学反応を介して、抗アフィニティー型の可溶性EGFRと結合させた（カップリングプロトコールは、Dynalパッケージ挿入紙に従った）。この測定法は、Kingfisher粒子プロセッサで自動化された。ウェルにつき6μLのEGFRを結合したビーズをブロッキングバッファー（PBS / 1% BSA）でブロックし、その後、室温で30分間、オリゴヌクレオチド - 抗EGFR抗体とともに、または非増幅測定法のための抗EGFR抗体 - ビオチンとインキュベートした。ビオチン化は、ECL Protein Biotinylation Module Kit（Amersham Bioscience社）によって示されたとおり実施した。その後、増幅のために、当該サンプルを20mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、63mM KCl、1mM EGTA、1mM EDTA、150mM NaCl、0.005% Tween 20、12.5μM ビオチン-21-dUTP、18.75μM dAdG、1μLテロメラーゼ、及び10⁶細胞個からのLIM1215溶解液（Ludwig Institute Melbourne細胞株1215 - Whitehead et al., 1985）を含む反応混合液とインキュベートした。熱失活させたテロメラーゼ（95℃、20分間）を対照として含んだ。前記増幅工程の後、多数回の洗浄を行い、その後、当該サンプルを室温で30分間、0.5μg/mLストレプトアビジン - HRPとインキュベートした。このインキュベーションの後、当該サンプルをワーキングバッファー（0.1M Tris、0.1M KCl、pH7.4）で洗浄し、最終容量50μLのワーキングバッファーで再懸濁した。その後、当該サンプルを白色発光96ウェルプレートへ移し、ルミノール50μLとペルオキシド50μL（Supersignal ELISA Femto基質, Pierce社）の添加の際に、BMG Fluorostarルミノメーター中の発光を読み取った。

30

40

【 0 1 1 6 】

結果（n=2）は、前記増幅測定法からのシグナルが、前記熱失活させた対照、及び前記非増幅のELISAシグナルよりも有意に高いことを示す（図12）。

【 0 1 1 7 】

< 実施例 5 : オリゴヌクレオチド - 抗体定量化 >

当該オリゴヌクレオチド容量を、ssDNAを検出する蛍光ベースの測定法であるOligreen（Pierce社）測定法により定量化した。オリゴヌクレオチド - 抗体の定量化は、非修飾オ

50

リゴヌクレオチドで作成されたスタンダード曲線に基づく。

【0118】

当該抗体濃度は標準的BCA測定法で決定した。これにより、当該オリゴヌクレオチドへのシグナル寄与を阻害することなく、タンパク質容量の正確な見積りが可能である。当該吸光度は550nmで読まれる。

【0119】

<実施例6：テロメラーゼを用いたNY-ESO-1の検出>

E978mAb (180 µg) に結合させた磁気ビーズを、メラノーマ細胞株LAR41から単離したNY-ESO-1ポジティブの細胞質抽出液 (0.5 × 10⁷ 細胞個、室温で60分間) とインキュベートした。前記LAR (Ludwig Austin Repatriation) シリーズのメラノーマ細胞株は、Ludwig Instituteで患者生検サンプルから得られ、確立前に各患者から同意を得た。

10

【0120】

当該抗原の結合後に、前記ビーズを、テロメラーゼに対するオリゴヌクレオチド認識配列 (5' -TTTTTTAATCCGTCGAGCAGAGTTAGGGTTAGGTTAG-3' - SEQ ID番号: 3) を標識したES121 mAb (16 µg/mL、室温で60分間) とインキュベートした。この配列は、5' チオール修飾を含み、NHS-エステル-マレイミド架橋剤N-[-マレイミドブチリルオキシ] スルホスクシンイミドエステル (GMBS) (上に記載) を用いることにより、チオールカップリング化学反応を介したカップリングを許容し得る。

【0121】

HEK293 (ヒト胚性腎) 細胞から単離したテロメラーゼ酵素を、反応混合液バッファー (20mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、63mM KCl、1mM EGTA、1mM EDTA、150mM NaCl、0.005% Tween 20、12.5 µM ビオチン-21-dUTP、18.75 µM dAdG) の存在下でオリゴヌクレオチド (37で60分間) を伸長させるために用いた。この工程は、前記酵素がそれを伸長させる際に、当該DNA配列に沿って多数のビオチン残基を付加する。その後、その複合体をストレプトアビジン - HRP (0.5 µg/mL、室温で30分間) とインキュベートした。このインキュベーションの後、当該サンプルをワーキングバッファー (0.1M Tris、0.1M KCl、pH7.4) で洗浄し、最終容量50 µLのワーキングバッファーで再懸濁した。その後、当該サンプルを白色発光96ウェルプレートへ移し、ルミノール50 µLとペルオキシド50 µL (Supersignal ELISA Femto基質, Pierce社) の添加の際に、BMG Fluorostarルミノメーター中の発光を読み取った。

20

30

【0122】

当該測定法は、自動化のためにKingfisher粒子プロセッサを用いて組み立てられた。結果 (n=3) は、ルミノール50 µLとペルオキシド50 µL (Pierce社) の添加の際に、強力な発光シグナルを示した (図13)。

【0123】

<実施例7：ターミナルトランスフェラーゼを用いることによる、磁気ビーズに結合したオリゴヌクレオチド鑄型の伸長>

磁気性dynalビーズを、一本鎖DNAオリゴヌクレオチド (TTTTTTAATCCGTCGAGCAGAGTTAGGGTTAGGGTTAG - SEQ ID番号: 3) と結合させた。この場合において、それは前記テロメラーゼ酵素によって用いられたものと同じの配列であり、ターミナルトランスフェラーゼは、テロメラーゼのように特異的な配列を好ましく伸長させない。この酵素のために伸長条件を修正し、用いられた伸長バッファーは、50mM酢酸カリウム、20mM Tris酢酸塩、10mM酢酸マグネシウム、0.25mM塩化コバルト、12.5 µM ビオチン-21-dUTP、18.75 µM dAdG、10Uターミナルトランスフェラーゼ、(pH7.9) であった。ターミナルトランスフェラーゼを、37で30分間、オリゴを結合した磁気ビーズ (30mg/mL) の各ウェルに伸長バッファー100 µLとともに添加した。その後、伸長した磁気ビーズをワーキングバッファー (0.1M Tris、0.1M塩化カリウム) で3回洗浄した。その後、前記ビーズを、室温で30分間、0.5 µg/mLのストレプトアビジン - HRPとインキュベートし、その後、ワーキングバッファーで3回の洗浄し、最終容量50 µLのワーキングバッファーで再懸濁した。その後、当該サンプルを白色発光96ウェルプレートへ移し、ルミノール50 µLとペルオキシド50 µL (Pierce

40

50

社)の添加後、BMG Fluorostarルミノメーター中の発光を読み取った。実験は2回実施し、当該ターミナルトランスフェラーゼを95℃で20分間加熱することにより不活性化させた熱失活の対照を含む。

【0124】

結果は、前記熱失活させた対照よりも有意に高い発光シグナルを示し、この方法において、ターミナルトランスフェラーゼでテロメラーゼを代用し得ることを示す(図14)。

【0125】

<実施例8：ターミナルトランスフェラーゼを用いることによる、抗体に結合したオリゴヌクレオチド鑄型の伸長>

トシル-活性化DynaIビーズ(15mg)を、37℃、0.1Mホウ酸塩(pH9.6)中で、オーバーナイトのインキュベーションにより、300µgの501FC(抗体Fc領域に連結したEGF受容体のリガンド結合ドメイン)と結合させる。カップリング後、前記ビーズを十分に洗浄し、37℃で4時間、0.2M Tris / 0.1% BSAでインキュベーションすることにより未反応基にキャップをかぶせた。その後、前記ビーズを洗浄し、PBS / 0.1% BSA中で保存した。

【0126】

前記抗EGFR抗体LMH42を、以前記載された(Kozlov et al., 2004)ようなヒドラジン化学反応を用いることによって、テロメラーゼに対する認識配列(TTTTTTAATCCGTCGAGCAGAGTTAGGGTTAGGGTTAG)(SEQ ID番号:3)を含む標的ヌクレオチドで機能化する。その結果生じた接合体は、流速1mL/min、カラム温度25℃で、PBSバッファーを用いたSuperose 12 10/300カラム(GE Amersham社)によるゲルろ過HPLCを用いて残存反応物から精製される。

【0127】

10µL容量の501FC接合ビーズを、室温で60分間、テロメラーゼ認識配列で機能化された前記LMH42抗体の存在下でインキュベートし、その後、徹底的に洗浄した。その後、ビーズ-501FC-抗体複合体を1% BSAで処理し、非特異的なバックグラウンドシグナルを低減させた。さらなる洗浄後、複合体を、37℃で60分間、50µLの反応バッファー(50mM酢酸カリウム、20mM Tris酢酸塩、10mM酢酸マグネシウム、0.25mM塩化コバルト、12.5µM 蛍光-dUTP、18.75µM dAdG、pH7.9)と0.5µLのターミナルトランスフェラーゼ(10Uの酵素)の存在下でインキュベートした。当該伸長した磁気ビーズを、ワーキングバッファー(0.1M Tris、0.1M塩化カリウム)中で3回洗浄し、その後、室温で30分間、1µg/mLの抗蛍光-HRPとインキュベートした。この後、前記ビーズをワーキングバッファーで3回洗浄し、最終容量50µLのワーキングバッファーで再懸濁した。その後、当該サンプルを白色発光96ウェルプレートへ移し、ルミノール50µLとペルオキシド50µL(Pierce社)の添加後、BMG Fluorostarルミノメーター中の発光を読み取った。処理は2回実施し、当該ターミナルトランスフェラーゼを95℃で30分間加熱することにより不活性化させた熱失活の対照を含む。

【0128】

当該結果は、前記ターミナルトランスフェラーゼが当該オリゴヌクレオチド基質を伸長させ得ること、及び標識されたヌクレオチドを取り込み得ることを示す(図15)。従って、ターミナルトランスフェラーゼは、本発明の方法に明らかに有用である。

【0129】

<実施例9：ターミナルトランスフェラーゼと蛍光-dUTPを用いることによる、EGFR抗原の特異的検出>

トシル-活性化DynaIビーズ(15mg)を、37℃、0.1Mホウ酸バッファー(pH9.6)中で、オーバーナイトのインキュベーションにより、300µgのLMH41抗EGFR mAbと結合させた。カップリング後、前記ビーズを徹底的に洗浄し、37℃で4時間、0.2M Tris / 0.1% BSAでインキュベーションすることにより未反応基にキャップをかぶせた。その後、前記ビーズを洗浄し、PBS / 0.1% BSA中で保存した。

【0130】

前記抗EGFR抗体LMH42を、以前記載された(Kozlov et al., 2004)ようなヒドラジン化

学反応を用いることによって、テロメラーゼに対する認識配列 (TTTTTTAATCCGTCGAGCAGAGTTAGGGTTAGGGTTAG) (SEQ ID番号: 3) を含む標的ヌクレオチドで機能化する。その結果生じた接合体は、流速1mL/min、カラム温度25℃で、PBSバッファーを用いたSuperose 12 10/300カラム (GE Amersham社) によるゲルろ過HPLCを用いて残存反応物から精製される。

【0131】

10 µL容量のLMH41接合ビーズを、室温で60分間、異なる濃度のEGFR抗原 (sEGFR 1-621、Domagala et al., 2000) の存在下でインキュベートした。多数回の洗浄工程の後、当該抗原 - 抗体 - ビーズ複合体を、室温で60分間、前記テロメラーゼ認識配列で機能化したLMH42抗体とインキュベートし、その後、徹底的に洗浄した。その後、ビーズ複合体を洗浄し、その後、ビーズ複合体を、37℃で60分間、50 µLの反応バッファー (50mM酢酸カリウム、20mM Tris酢酸塩、10mM酢酸マグネシウム、0.25mM塩化コバルト、12.5 µM 蛍光-dUTP、18.75 µM dAdG、pH7.9) と0.5 µLのターミナルトランスフェラーゼ (10Uの酵素) の存在下でインキュベートした。当該伸長した磁気ビーズを、ワーキングバッファー (0.1M Tris、0.1M塩化カリウム) 中で3回洗浄し、その後、室温で30分間、1 µg/mLの抗蛍光 - HRPとインキュベートした。この後、前記ビーズをワーキングバッファーで3回洗浄し、最終容量50 µLのワーキングバッファーで再懸濁した。その後、当該サンプルを白色発光96ウェルプレートへ移し、ルミノール50 µLとペルオキシド50 µL (Pierce社) の添加後、BMG Fluorostarルミノメーター中の発光を読み取った。処理は2回実施し、当該ターミナルトランスフェラーゼを95℃で30分間加熱することにより不活性化させた熱失活の対照を含む。

10

20

【0132】

当該結果は、前記ターミナルトランスフェラーゼが当該オリゴヌクレオチド基質を伸長させ得ること、及び標識されたヌクレオチドを取り込み得ることを示す (図16)。この伸長は、抗体と複合体を形成するオリゴヌクレオチドで起こり、これは次に抗原と結合し、次に抗体と接合した磁気ビーズに結合する。従って、この実施例において、前記測定法により当該標的分析物 (EGFR) を検出できる。

【0133】

< 実施例10: 未精製及びプレクリア抽出物中のテロメラーゼ活性の比較 >

LAR41細胞を含むコンフルエントの10cmディッシュを、PBS 10mLでin situで2回洗浄した。細胞をPBS 1mLでプレートから剥がし、1.5mLチューブに移した。細胞カウントを行い、当該細胞を5分間、13,000回転で遠心分離した。当該上清を除去し、当該細胞 (200 µL / 1×10^6 細胞個) にRIPA溶解バッファー (50mM Tris、150mM NaCl、1mM EDTA、1% Triton X-100、1%デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、プロテアーゼインヒビター錠 (Roche社)) を添加した。当該細胞を何回も上下にピペティングして溶解し、その後、氷上で30分間、インキュベートした。この後、当該抽出物を4℃、25分間、13,000回転で遠心分離した。当該上清を新しい1.5mLチューブへ移し、テロメラーゼ活性を分析した。

30

【0134】

アミンカップリング化学反応 (前記を参照) を用いて、当該テロメラーゼ認識配列を接合させておいた磁気ビーズを、37℃で30分間、反応バッファー (20mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、63mM KCl、1mM EGTA、1mM EDTA、150mM NaCl、0.005% Tween 20、12.5 µM ビオチン-21-dUTP、18.75 µM dAdG) と膀胱癌細胞株 (LAR41) 由来の抽出物1 µLの存在下でインキュベートした。この抽出物は、未精製 (細胞溶解後、当該抽出物のさらなる操作なし)、または、25分間、13,000回転 (Sorvall Heraeus Fresco Biofuge、ローター514400) で当該抽出物を遠心分離することによるプレクリアのどちらかである。遠心分離後の上清 (プレクリア抽出物) を、未精製抽出物との並行テロメラーゼ伸長反応に用いた。

40

【0135】

当該結果は、図17に提供される。対照として、熱失活させた (HI) サンプルも示す。テロメラーゼを発現する未精製の溶解細胞を、本発明の方法のためのこの酵素の供給源として用い得ることが明らかである。

50

【 0 1 3 6 】

< 実施例 1 1 : CT抗原NY-ESO-1の検出のための増幅タンパク質発光 (APL) 測定法 >

トシル - 活性化DynaIビーズを、標準的なアミンカップリング化学反応 (pH8.3でオーバーナイトカップリング) を用いて、抗NY-ESO-1 mAb E978 (Sugita et al., 2004) に結合させる。カップリング後、前記ビーズを十分に洗浄し、PBS中で保存する。

【 0 1 3 7 】

抗NY-ESO-1抗体ES121 (Chitale et al., 2004) を、以前記載された (Kozlov et al., 2004) ようなヒドラジン化学反応を用いることによって、テロメラーゼに対する認識配列 (TTTTTTAATCCGTCGAGCAGAGTTAGGGTTAGGGTTAG) を含む標的ヌクレオチドで機能化する。その結果生じた接合体は、流速1mL/min、カラム温度25 で、PBSバッファを用いたSuperose 12 10/300カラム (GE Amersham社) によるゲルろ過HPLCを用いて残存反応物から精製される。 10

【 0 1 3 8 】

NY-ESO-1に同時に結合するこれら2つの抗体の性能を、NHS/EDC化学反応を用いてセンサー表面に固定化されたmAb ES978を備えたBIAcore 3000光学バイオセンサー、及びサンドイッチELISAを用いることによって確認した。

【 0 1 3 9 】

活性のあるテロメラーゼの調製は、0.5%グリセロールとプロテアーゼインヒビター (MiniProtease, Roche社) を含む0.5% CHAPS、10mM Tris-HCl、1mM MgCl₂、及び1mM EGTA (pH7.5) 中でLIM1215細胞 (10⁷細胞個/mL) を溶解することにより生じた。当該活性は、TRAP測定法 (Chemicon社) によって確認し、タンパク質レベルはBCA分析により決定した。試料の一部を、前記APL測定法におけるテロメラーゼオリゴヌクレオチド標的の活性化のために-70 で保存した。 20

【 0 1 4 0 】

前記APL測定法を、リコンビナントNY-ESO-1 (Davis et al., 2004) を用いることによって確認する。NY-ESOの校正標準は、TC溶媒で段階希釈により作成された。

【 0 1 4 1 】

当該mAb E978 - DynaIビーズ (約10⁷ビーズ) を、1.5mLエッペンドルフチューブ中にNY-ESO-1スタンダードを含む組織培養液 (1mLまで) 添加する。当該NY-ESO-1を、25 で1時間、攪拌することによって結合DynaIビーズ上に選択的に再び覆う。その後、前記ビーズを磁気粒子濃縮器によりブルダウンし、PBSで洗浄する。洗浄後、前記ビーズを、オリゴヌクレオチドで機能化されたmAb ES121とNY-ESO-1で形成された複合体とを含むPBSバッファ200 µLに再懸濁した。これらは、25 で1時間、さらに攪拌することにより前記DynaIビーズに捕捉させておく。その後、前記ビーズをブルダウンし、伸長バッファ (0.005% Tween 20を含む、20mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、63mM KCl、1mM EGTA) (Xu et al., 2002) で洗浄し、その後、dATPとdGTPとピオチン化dUTPとを含む伸長バッファ (200 µL) に再懸濁する。その後、LIM1215細胞 (1 µL、前記を参照) からのテロメラーゼ抽出物を添加し、当該チューブを32 で30分間攪拌しながらインキュベートする。その後、当該ビーズを1×伸長バッファで洗浄し、さらなる洗浄後、NaCl濃度、0.1M NaOHを増やし、pHを下げる。または低濃度の界面活性剤を用いる等により、バックグラウンドシグナルを除き、その後、ストレプトアビジン - HRP (150 µL、PBS中に2 µg/mL) を添加し、32 で30分間インキュベートする。その後、前記ビーズを0.1M KCl (pH8.5) を含む5×0.1M Tris-HClで洗浄し、その後、96ウェルLumiNuncプレートへ移すためのバッファと同じバッファ25 µLに再懸濁する。 30 40

【 0 1 4 2 】

前記LumiNuncプレートをBMG Fluorostarルミノメーターへ移し、当該機器の自動化配給ポンプを用いて、増強剤を備えるルミノール50 µLとH₂O₂ 50 µL (SuperSignal, Pierce Biotechnology社) を添加し、発光シグナルを記録する。

【 0 1 4 3 】

< 実施例 1 2 : 抗CT抗原抗体の検出のための増幅タンパク質発光 (APL) 測定法 >

トシル - 活性化DynaI ビーズを、標準的なアミンカップリング化学反応 (pH8.3でオーバーナイトカップリング) を用いて、リコンビナントNY-ESO-1 (Davis et al., 2004) に結合させる。カップリング後、前記ビーズを十分に洗浄し、PBS中で保存する。

【0144】

抗ヒト抗IgGヤギ抗体 (Bio-Rad社) を、以前記載された (Kozlov et al., 2004) ようなヒドラジン化学反応を用いることによって、ターミナルトランスフェラーゼに対する標的ヌクレオチド配列で機能化した。その結果生じた接合体は、流速1mL/min、カラム温度25 で、PBSバッファを用いたSuperose 12 10/300カラム (GE Amersham社) によるゲルろ過HPLCを用いて残存反応物から精製される。

【0145】

可能性のある抗NY-ESO-1抗体を含む尿サンプル (100 μ L) を、NY-ESO-1-DynaI ビーズ (約 10^7 ビーズ) を含む白色Nunc96ウェルプレートへ添加した。当該抗NY-ESO-1抗体を、25 で1時間、攪拌すること (10,000回転) によってDynaI ビーズ上に選択的に再び覆う。その後、前記ビーズを磁気引力により当該プレートの表面へブルダウンし、PBSで十分に洗浄する。洗浄後、前記ビーズを、オリゴヌクレオチドで機能化された抗ヒト抗IgGヤギ抗体と抗NY-ESO-1抗体で形成された複合体とを含むPBSバッファ-150 μ Lに再懸濁した。これらは、25 で1時間、さらに攪拌すること (10,000回転) により前記DynaI ビーズに捕捉させておく。その後、前記ビーズを当該プレート表面へブルダウンし、ターミナルトランスフェラーゼ伸長バッファ (Genesearch反応バッファ-2.5mM塩化コバルト) で洗浄し、その後、dATPとdGTPとビオチン化dUTPとを含む伸長バッファ (50 μ L) に再懸濁する。その後、ターミナルトランスフェラーゼ (1 μ L, Genesearch社, Australia) を添加し、当該チューブを、32 で30分間、攪拌しながら (10,000回転) インキュベートする。その後、当該ビーズを1 \times 伸長バッファで洗浄し、さらなる洗浄後、NaCl濃度、0.1M NaOHを増やし、pHを下げ、または低濃度の界面活性剤を用いる等により、バックグラウンドシグナルを除き、その後、ストレプトアビジン - HRP (150 μ L, PBS中に2 μ g/mL) を添加し、32 で30分間インキュベートする。その後、前記ビーズを0.1M KCl (pH8.5) を含む5 \times 0.1M Tris-HClで洗浄し、その後、96ウェルLumiNuncプレートへ移すためのバッファ-と同じバッファ-25 μ Lに再懸濁する。

【0146】

前記LumiNuncプレートをBMG Fluorostarルミノメーターへ移し、当該機器の自動化配給ポンプを用いて、増強剤を備えるルミノール50 μ LとH₂O₂ 50 μ L (SuperSignal, Pierce Biotechnology社) を添加し、発光シグナルを記録する。

【0147】

広範囲に記載されているような本発明の精神または視野から離れることなく、特定の実施態様に示されるような本発明に対して、多くの変更及び/または修正がなされても良いことが当業者に理解されるであろう。従って、本実施態様は、すべての点において、説明的であり、制限的なものでないといみなされる。

【0148】

前述のすべての文献をここに完全な形で組み込む。

【0149】

本明細書に含まれている文献、行為、材料、装置、商品等についてのいずれかの議論は、本発明のための状況を提供する目的のためだけのものである。それは、これらの事柄のいずれかまたはすべてが先行技術の基礎の一部を形成している、または本出願の各請求項の優先日前に存在していたような本発明に関連する分野における共通の一般的知識であったということを承認するものとして理解されるべきでない。

【0150】

(参考文献)

10

20

30

40

- Adler et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308:240-250.
 Ansari et al. (2001) *Chem. Biol.* 8:583-592.
- 5 Arora et al. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:13067-13071.
 Bronks et al. (1995) *Anal. Chem.* 65:2750-2757.
 Bryan et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8479-8484.
 Chitale et al. (2004) *Mod Pathol.* 23 July [Epub ahead of print].
 Chu et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:5591-5603.
- 10 Davis et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:10697-10702. 10
 Domagala et al. (2000) *Growth Factors* 18:11-29.
 Graham et al. (1977) *J. Gen Virol* 36: 59-72.
 Hendrickson et al. (1995) *Nucl. Acids Res.* 23:522-529.
 Joeger (1995) *Clin. Chem.* 41:1371-1377.
- 15 Jungbluth et al. (2001) *Int. J. Cancer*: 92:856-860.
 Kozlov et al. (2004) *Biopolymers* 73:621-630.
 Kwon et al. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* 126:15940-15941.
 Murphy et al. (2005) *Prep. Biochem. Biotech.* 35:119-134. 20
 Niemeyer et al. (2003) *Nucl. Acids Res.* 31:e90.
- 20 Sano et al. (1992) *Science* 258:120-122.
 Scanlan et al. (2002) *Immunol. Rev.* 188:22-32.
 Schweitzer et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:10113-10119.
 Sperl et al. (1995) *J. Immunol. Meth.* 186:181-194.
 Sugita et al. (2004) *Cancer Res.* 64:2199-2204.
- 25 Whitehead et al. (1985) *J Natl Cancer Inst.* 74:759-765.
 Xu et al. (2002) *Clinical Chem.* 48:1016-1020.
 Zhang et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:5497-5502. 30

【図面の簡単な説明】

【 0 1 5 1 】

【図 1】図 1 - 本発明の第一の特徴点である方法の実施態様の図式的表現。この例において、第一化合物は磁気ビーズに結合する抗体である。磁気濃縮機を用いた洗浄工程の間に、前記磁気ビーズによって、そこに形成された複合体を非結合の成分から容易に分離することができる。当該分析物を含むサンプルを第一化合物とインキュベートし、分析物をそれに結合させ、その後、第二化合物とのインキュベーション工程が続く。この例において、第二化合物は、第一化合物とは異なる位置で前記分析物に結合する抗体 - DNA接合体である。当該ポリヌクレオチドは、ヒトテロメラーゼと結合し得る、及びヒトテロメラーゼにより伸長され得る配列を含む。その後、ビオチン標識されたdUTPを含む適切なヌクレオチド前駆体の存在下で、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体をヒトテロメラーゼとインキュベートする。その後、当該伸長したポリヌクレオチドに組み込まれたビオチン標識されたdUTPをアビジン標識されたホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) とインキュベートする。その後、過酸化水素、ルミノール、及びヨードフェノールの存在下で、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物 - ビオチンdUTP - アビジンHRP複合体をインキュベートし、ルミノメーター中で発光シグナルを検出することによって、HRP活性を当該サンプル中の当該分析物の量のインジケータとして用いる。 40

【図 2】図 2 - 2つの抗NY-ESO-1抗体 (ES121とE978) とのNY-ESO-1の同時結合についてのBIAcore分析。 50

【図 3】図 3 - 抗NY-ESO-1抗体結合ビーズと、抗原としてNY-ESO-1ポジティブのメラノーマ細胞株を用いたビーズベースのサンドイッチELISAは、メラノーマ細胞数との直接的な比較において直線的反応を示している。

【図 4】図 4 - 抗EGFR抗体結合ビーズと、抗原として精製EGFRを用いたビーズベースのサンドイッチELISAは、リコンビナントタンパク質との直接的な比較において直線的反応を示している。

【図 5】図 5 - Superdex 75カラム (Amersham Bioscience社) を用いた、架橋剤により修飾された抗体の非修飾抗体からの分離は、当該カップリング反応が2つの抗体を用いることにより成功していること、及びこれらの反応物が明白な分子サイズに基づいて精製し得ることを示している。

10

【図 6】図 6 - 還元型オリゴヌクレオチドとの接合後の1.5%アガロースゲル。これらのデータは、前記オリゴヌクレオチドに結合する抗体がエチジウムブロマイドで染色した際に強いバンドを生じることにより、図 5 で報告された観察結果を確認している。

【図 7】図 7 - Superose 12カラム (30/10) (Amersham Bioscience社) によるゲルろ過クロマトグラフィーを用いた、接合した抗体の過剰オリゴヌクレオチドからの分離プロファイル。これらのデータは、オリゴに結合した抗体の精製が標準的なクロマトグラフィーを用いることによって達成され得るという、図 5 でなされた予測を支持している。

【図 8】図 8 - Superose 12カラム (30/10) (Amersham Bioscience社) によるゲルろ過クロマトグラフィーを用いた精製後のオリゴヌクレオチドに接合した抗体を示す1.5%アガロースゲル。各抗体に対する、最大の溶出画分8、9、10を示している。

20

【図 9】図 9 - 接合前の抗体 (レーン 1 と 3) 及び精製された接合抗体 (レーン 2 と 4) のSDS-PAGE (3-8%トリス - 酢酸塩) は、オリゴ結合抗体複合体が適切で予測される分子量であることを示している。

【図 10】図 10 - Superose 12クロマトグラフィー後の接合抗体のMono Q溶出プロファイル。ピークの異種性は、複数のオリゴヌクレオチドが抗体と結合し、反応伸長のためのさらなる状況を提供し、従って、本発明の測定法における検出能を増大させるということを暗示している。

【図 11】図 11 - イオン交換クロマトグラフィー (Mono Qカラム) による分離後のオリゴヌクレオチド接合抗体の1.5%アガロースゲル。オリゴ接合抗体のいくつかは、付加した複数の核酸成分を有しているという独立した証明。

30

【図 12】図 12 - テロメラーゼを用いることによる、抗体に結合するオリゴヌクレオチドの伸長。発光の増大は、テロメラーゼの存在下で、ビオチン化されたUTPの取込みの増加があることを示している。

【図 13】図 13 - 増幅された発光によるNY-ESO-1検出のための測定結果 (n=3)。

【図 14】図 14 - ターミナルトランスフェラーゼを用いたシグナル増幅後の、磁気ビーズ結合オリゴヌクレオチドの検出。

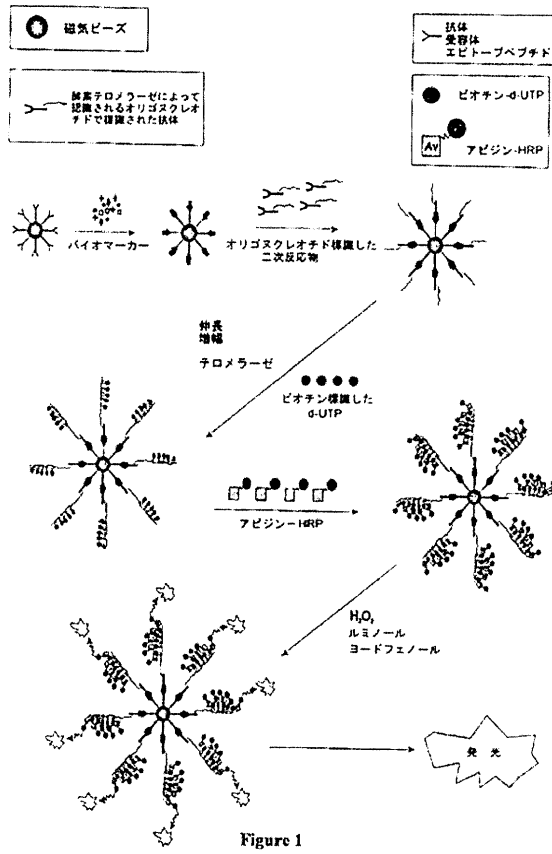
【図 15】図 15 - ビーズベースの測定法は、抗体に結合するテロメラーゼ認識配列の伸長を示している。ターミナルトランスフェラーゼは、基質としてのフルオレセインdUTPとの伸長反応のために用いられた。HI=熱失活させた。

【図 16】図 16 - 増幅されたタンパク質発光測定法は、ターミナルトランスフェラーゼとフルオレセインdUTPの存在下で、LMH42 - オリゴヌクレオチド接合体による、可溶性EGFR (1-621残基) の特異的な検出を示している。

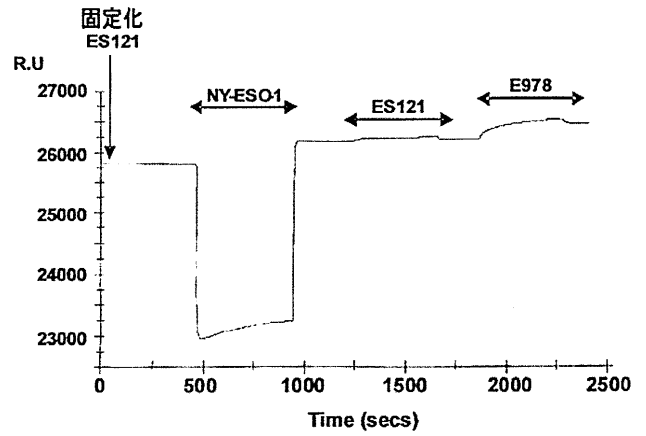
40

【図 17】図 17 - ビーズベースのテロメラーゼ測定法は、膀胱癌細胞株 (LAR41) から由来する未精製及びプレクリア抽出物中の当該酵素の活性を示している。

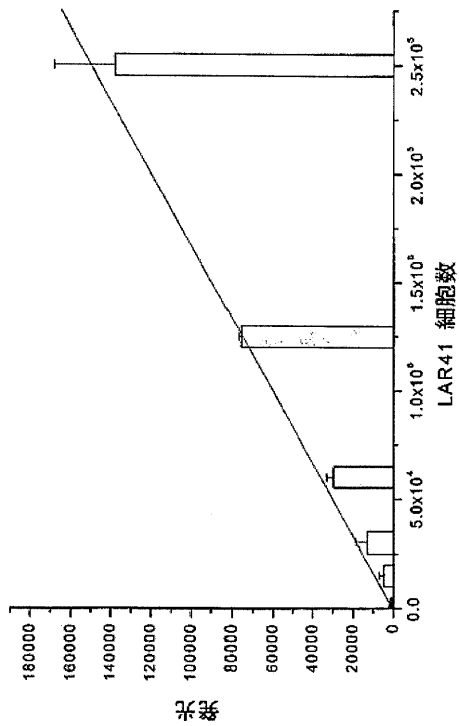
【図 1】



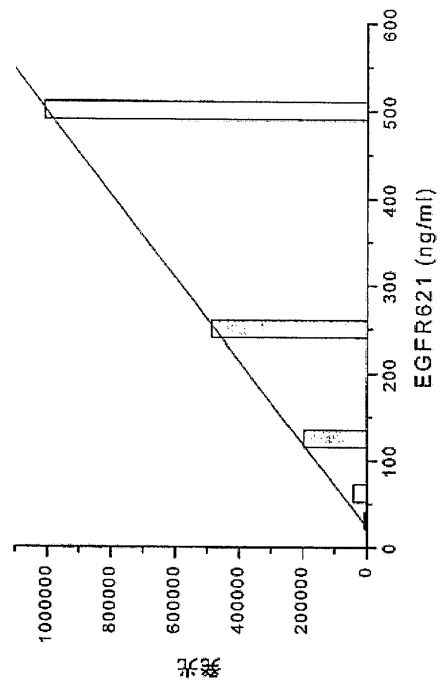
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【 図 5 】

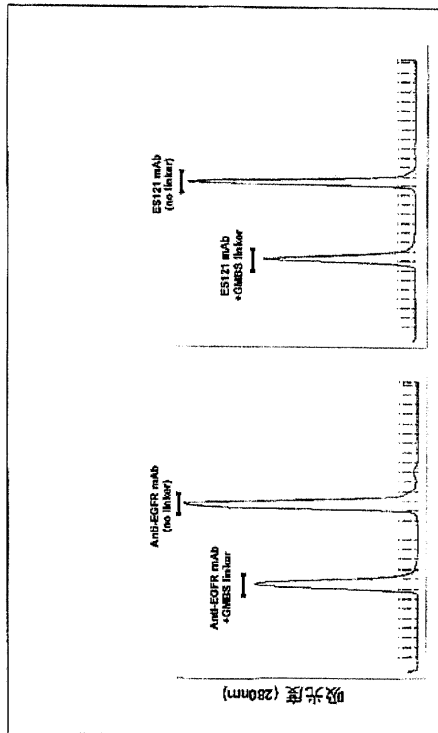


Figure 5

【 図 6 】

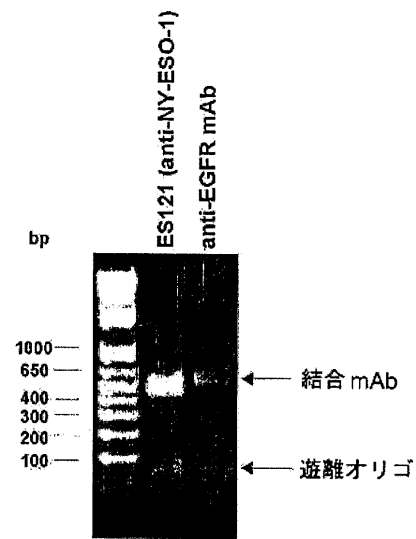


Figure 6

【 図 7 】

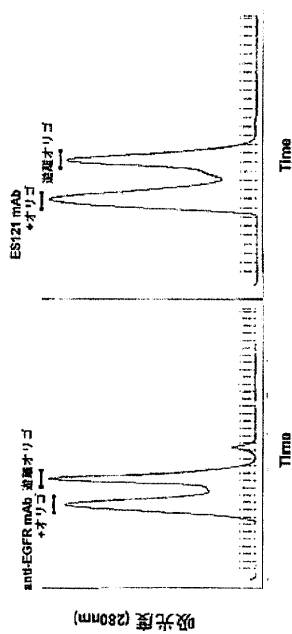


Figure 7

【 図 8 】

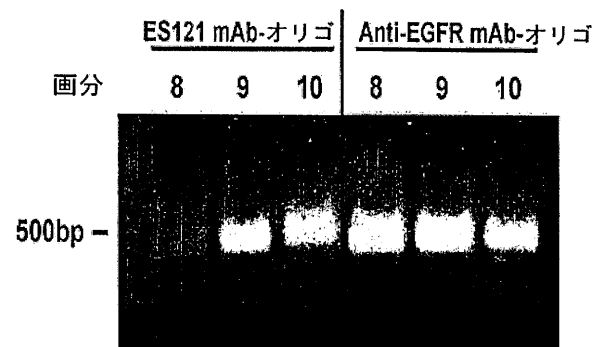


Figure 8

【 図 9 】

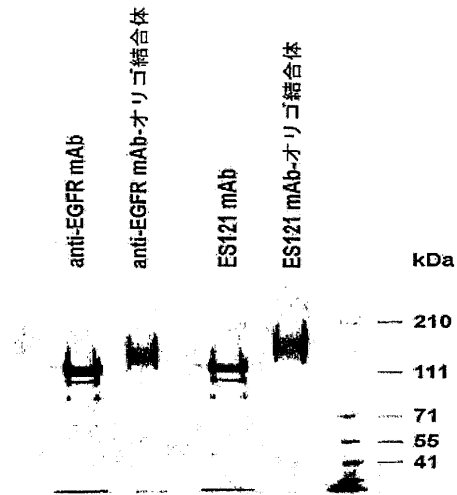


Figure 9

【 図 10 】

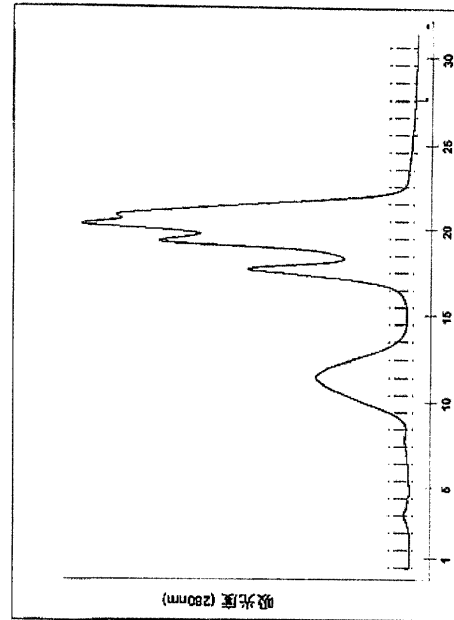


Figure 10

【 図 11 】

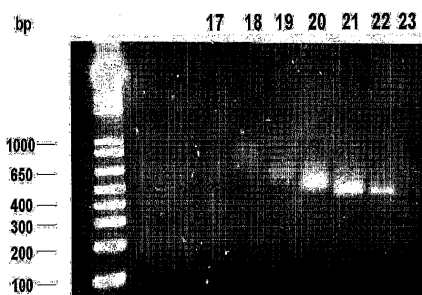


Figure 11

【 図 12 】

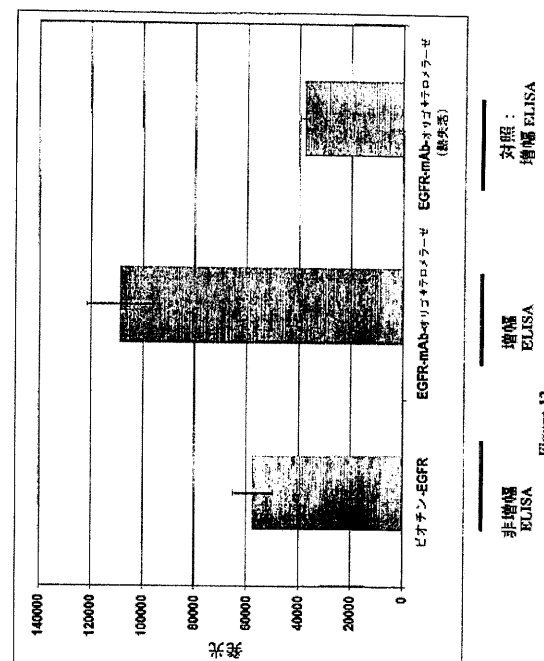


Figure 12

【 図 1 4 】

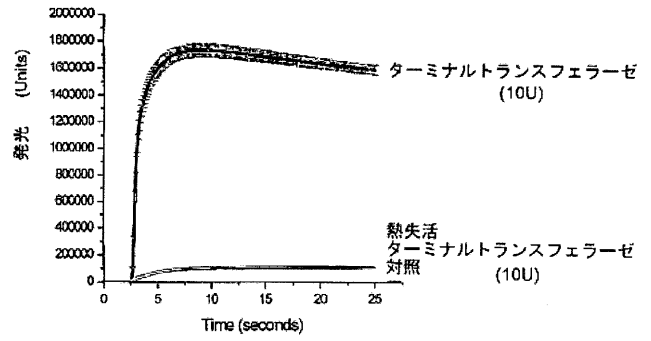


Figure 14

【 図 1 5 】

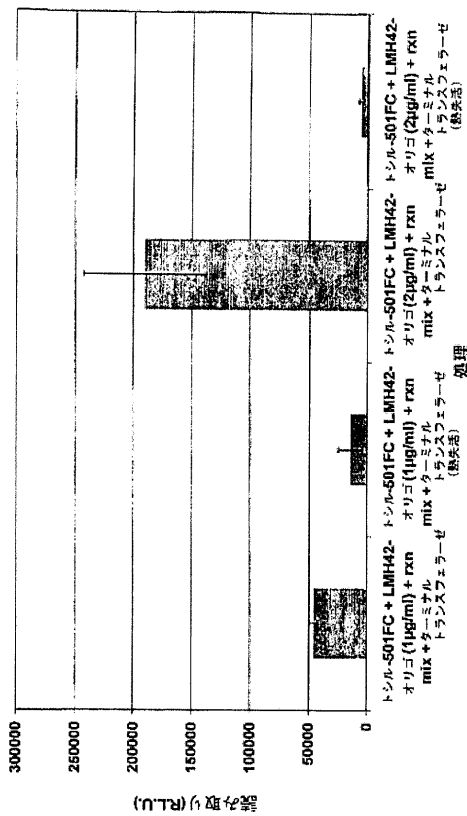


Figure 15

【 図 1 6 】

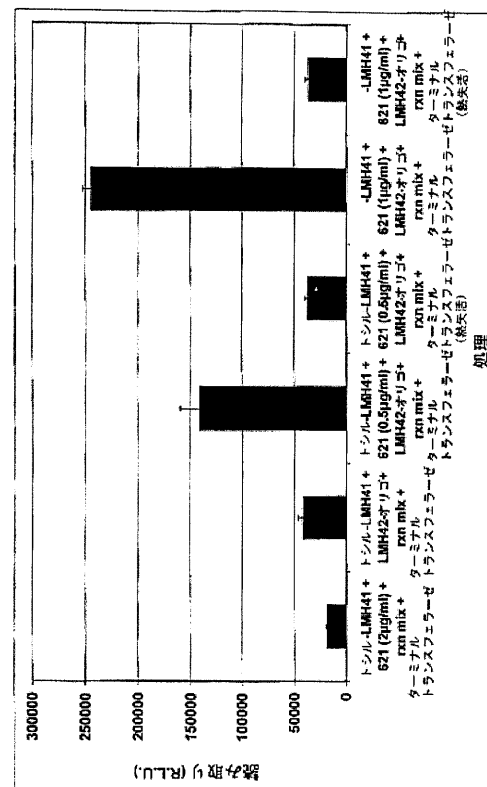


Figure 16

【図 17】

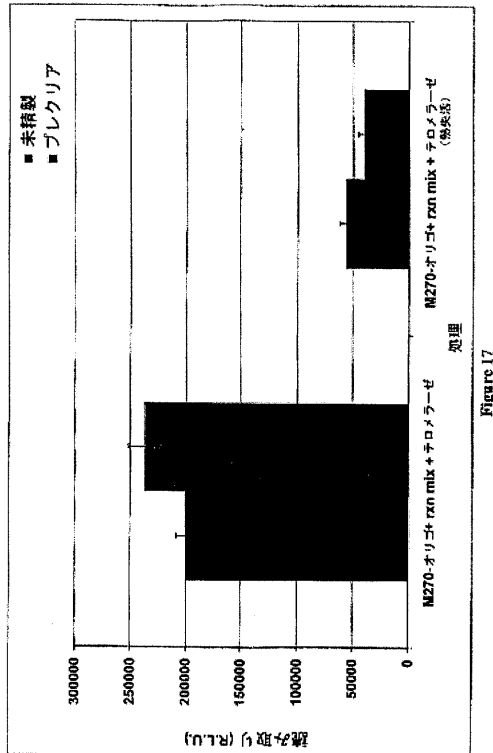


Figure 17

【配列表】

2008520963000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成18年4月19日(2006.4.19)

【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】

サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法であって、：

- i) 前記サンプルを、前記分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程；
 - ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物 - 第一化合物複合体に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はポリヌクレオチドを含む工程；
 - iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件、及び / または b) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる工程；並びに、
 - iv) 工程 iii) の a) または b) 部の生成物を検出する工程であって、工程 iii) の b) 部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まない工程；
- を含む方法。

【請求項 2】

サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法であって、：

- i) 前記サンプルを、前記分析物に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はポリヌクレオチドを含む工程；
- ii) 前記分析物 - 第二化合物複合体を、前記分析物 - 第二化合物複合体に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程；
- iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件、及び / または b) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる工程；並びに、
- iv) 工程 iii) の a) または b) 部の生成物を検出する工程であって、工程 iii) の b) 部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まない工程；

を含む方法。

【請求項 3】

前記ポリメラーゼが、一本鎖ポリヌクレオチドまたは部分的に二本鎖ポリヌクレオチドの一本鎖突出部を伸長する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ポリメラーゼが、poly (A) ポリメラーゼ、テロメラーゼ、及びターミナルトランスフェラーゼからなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ポリメラーゼがテロメラーゼであり、前記テロメラーゼが前記テロメラーゼを産生する癌細胞を溶解することによって得られる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記溶解された細胞の他の成分から前記テロメラーゼを分離するための処理を実施しない、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ポリメラーゼが、Taqポリメラーゼ、バクテリオファージT4ポリメラーゼ、バクテリオファージT7ポリメラーゼ、及び大腸菌DNAポリメラーゼI Klenowフラグメントからなる群から選択されるDNAポリメラーゼである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記第一化合物及び / または第二化合物が固相支持体に貼り付けられている、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記固相支持体が、磁気ビーズ、バイオセンサーチップ、マイクロタイタープレートのウェル、ディップスティック、及びマイクロアレイスライドからなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

工程 iii) が少なくとも1つの検出可能なように標識されたヌクレオチドの存在下で実施される、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記検出可能な標識が、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、及び酵素標識からなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

工程 iii) が少なくとも1つのハプテン接合ヌクレオチドの存在下で実施され、前記ハプテンがリガンドと結合し得る、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記ハプテンが、システイン、リジン、セリン、ビオチン、アビジン、及びストレプトアビジンからなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記リガンドが検出可能なように標識されている、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記検出可能な標識が、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、及び酵素標識からなる群から選択される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

工程 iii) がさらに、ポリメラーゼ活性の生成物を前記検出可能なように標識されたりリガンドに接触させる工程を含む、請求項 1 4 または 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記検出可能な標識が酵素である、請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記酵素が、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ノイラミニダーゼ、及びセイヨウワサビペルオキシダーゼからなる群から選択される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記工程 iii) のポリメラーゼ活性の生成物が、それに取り込まれたハプテン接合ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドを少なくとも含む複合体であり、少なくともいくつかの前記ハプテンが酵素標識されたりリガンドに結合し、且つ工程 iv) が、前記工程 iii) の生成物を前記酵素が検出可能なシグナルを産生し得る条件にさらす工程を含む、請求項 1 7 または 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記検出可能なシグナルが基質と反応する前記酵素によって産生される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記基質がルミノールまたはアクリダンである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記検出可能なシグナルを増強する分子を提供する工程をさらに含む、請求項 2 0 または 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記検出可能なシグナルを増強する分子が p-ヨードフェノールまたは p-フェニルフェノールである、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記検出可能なシグナルが発光または蛍光である、請求項 1 9 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

工程 i) が、前記分析物 - 第一化合物複合体を洗浄し、非結合の第一化合物を除去する工程をさらに含む、請求項 1 または 3 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

工程 i) が、前記分析物 - 第二化合物複合体を洗浄し、非結合の第二化合物を除去する工程をさらに含む、請求項 2 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

工程 ii) が、前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を洗浄し、非結合の第一及び/または第二化合物を除去する工程をさらに含む、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記方法が、取り込まれていない検出可能なように標識されたヌクレオチドを除去する工程をさらに含む、請求項 1 から 9 または 2 5 から 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記方法が、取り込まれていない検出可能なように標識されたりリガンドを除去する工程をさらに含む、請求項 1 から 7 または 1 4 から 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記第一化合物がタンパク質である、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記第一化合物が抗体である、請求項 1 から 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記第二化合物がタンパク質 - ポリヌクレオチド接合体である、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記第二化合物が抗体 - ポリヌクレオチド接合体である、請求項 1 から 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記第二化合物が前記分析物に結合する、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記分析物が疾患状態のマーカーである、請求項 1 から 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記疾患状態が、癌及び感染症からなる群から選択される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記分析物がタンパク質またはペプチドである、請求項 1 から 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

i) 当該サンプルを、当該分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程であって、前記第一化合物は固相支持体に貼り付けられている工程；

ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はテロメラーゼによって伸長し得るポリヌクレオチドを含む工程；

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、前記テロメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件下で、少なくとも1つのハプテン接合ヌクレオチドの存在下で、前記テロメラーゼに接触させる工程；

iv) テロメラーゼ活性の生成物を、前記ハプテンがリガンドに結合し得る条件下で、酵素標識された前記リガンドに接触させる工程；

v) 当該ポリヌクレオチド - ハプテン - リガンド - 酵素複合体を、前記酵素の基質の存在下でインキュベートする工程；

vi) 前記基質への前記酵素の活性によって産生された検出可能なシグナルを検出する工程；

を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 39】

i) 当該サンプルを、当該分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程であって、前記第一化合物は固相支持体に貼り付けられている工程；

ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はターミナルトランスフェラーゼによって伸長し得るポリヌクレオチドを含む工程；

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、前記ターミナルトランスフェラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件下で、少なくとも1つのハプテン接合ヌクレオチドの存在下で、前記ターミナルトランスフェラーゼに接触させる工程；

iv) 前記ターミナルトランスフェラーゼ活性の生成物を、前記ハプテンがリガンドに結合し得る条件下で、酵素標識された前記リガンドに接触させる工程；

v) 当該ポリヌクレオチド - ハプテン - リガンド - 酵素複合体を、前記酵素の基質の存在下でインキュベートする工程；
 vi) 前記基質への前記酵素の活性によって産生された検出可能なシグナルを検出する工程；
 を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 40】

サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法であって、以下の工程：

i) 前記サンプルを、前記分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程；
 ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物 - 第一化合物複合体に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程；
 iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、前記第二化合物に結合する第三化合物に接触させる工程であって、前記第三化合物はポリヌクレオチドを含む工程；
 iv) 当該分析物 - 第一化合物 - 第二化合物 - 第三化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件、またはb) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる工程；
 並びに、
 v) 工程iv) のa) またはb) 部の生成物を検出する工程であって、工程iii) のb) 部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まず、前記第一及び/または第二化合物は固相支持体に貼り付けられている工程；
 を含む方法。

【請求項 41】

当該DNAがテロメラーゼに結合し得る、及びテロメラーゼにより伸長され得る配列を含む、タンパク質 - DNA接合体。

【請求項 42】

前記タンパク質が抗体である、請求項 41 に記載のタンパク質 - DNA接合体。

【請求項 43】

請求項 41 または 42 に記載のタンパク質 - DNA接合体を含むキット。

【請求項 44】

ポリメラーゼと同一分析物に結合する少なくとも2つの化合物とを含むキットであって、前記化合物の1つはポリヌクレオチドを含み、前記ポリメラーゼは一本鎖ポリヌクレオチドまたは部分的に二本鎖ポリヌクレオチドの一本鎖突出部を伸長するキット。

【請求項 45】

前記化合物の一方または両方が抗体である、請求項 44 に記載のキット。

【請求項 46】

前記ポリメラーゼがテロメラーゼまたはターミナルトランスフェラーゼである、請求項 44 または 45 に記載のキット。

【請求項 47】

前記化合物の少なくとも1つが固相支持体に貼り付けられている、請求項 44 から 46 のいずれか一項に記載のキット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

第一の特徴点において、本発明は、サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法を提供し、この方法は、：

i) 当該サンプルを、当該分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物

複合体を形成する工程；

ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物 - 第一化合物複合体に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はポリヌクレオチドを含む工程；

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件、及び / または b) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる工程；並びに

iv) 工程 iii) の a) または b) 部の生成物を検出する工程であって、工程 iii) の b) 部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まない工程；

を含む。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

第二の特徴点において、本発明は、サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法を提供し、この方法は、：

i) 当該サンプルを、当該分析物 - 第二化合物複合体に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はポリヌクレオチドを含む工程；

ii) 前記分析物 - 第二化合物複合体を、前記分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程；

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件、及び / または b) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる工程；並びに

iv) 工程 iii) の a) または b) 部の生成物を検出する工程であって、工程 iii) の b) 部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まない工程；

を含む。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

さらなる特徴点において、本発明は、サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法を提供し、この方法は、：

i) 当該サンプルを、当該分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程；

ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物 - 第一化合物複合体に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程；

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、前記第二化合物に結合する第三化合物に接触させる工程であって、前記第三化合物はポリヌクレオチドを含む工程；

iv) 当該分析物 - 第一化合物 - 第二化合物 - 第三化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件、及び / または b) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる

工程；並びに、

v) 工程iv) のa) またはb) 部の生成物を検出する工程であって、工程iii) のb) 部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まず、前記第一及び/または第二化合物は固相支持体に貼り付けられている工程；を含む。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

また、タンパク質-DNA接合体も提供され、当該DNAはテロメラーゼに結合し得る、及びテロメラーゼにより伸長され得る配列を含み、当該タンパク質は前記DNAと共有結合で付加している。そのような接合体は、本発明の方法において用いることができる。好ましくは、前記タンパク質は抗体である。

【手続補正書】

【提出日】平成19年1月16日(2007.1.16)

【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】

サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法であって、：

i) 前記サンプルを、前記分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物-第一化合物複合体を形成する工程；

ii) 前記分析物-第一化合物複合体を、前記分析物-第一化合物複合体に結合する第二化合物に接触させ、分析物-第一化合物-第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はポリヌクレオチドを含む工程；

iii) 前記分析物-第一化合物-第二化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件、及び/またはb) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる工程；並びに、

iv) 工程iii) のa) またはb) 部の生成物を検出する工程であって、工程iii) のb) 部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まない工程；

を含む方法。

【請求項2】

サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法であって、：

i) 前記サンプルを、前記分析物に結合する第二化合物に接触させ、分析物-第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はポリヌクレオチドを含む工程；

ii) 前記分析物-第二化合物複合体を、前記分析物-第二化合物複合体に結合する第一化合物に接触させ、分析物-第一化合物-第二化合物複合体を形成する工程；

iii) 前記分析物-第一化合物-第二化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件、及び/またはb) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる工程；並びに、

iv) 工程iii) のa) またはb) 部の生成物を検出する工程であって、工程iii) のb) 部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まない

工程；

を含む方法。

【請求項 3】

前記ポリメラーゼが、一本鎖ポリヌクレオチドまたは部分的に二本鎖ポリヌクレオチドの一本鎖突出部を伸長する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ポリメラーゼが、poly(A)ポリメラーゼ、テロメラーゼ、及びターミナルトランスフェラーゼからなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ポリメラーゼがテロメラーゼであり、前記テロメラーゼが前記テロメラーゼを産生する癌細胞を溶解することによって得られる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記溶解された細胞の他の成分から前記テロメラーゼを分離するための処理を実施しない、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ポリメラーゼが、Taqポリメラーゼ、バクテリオファージT4ポリメラーゼ、バクテリオファージT7ポリメラーゼ、及び大腸菌DNAポリメラーゼI Klenowフラグメントからなる群から選択されるDNAポリメラーゼである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記第一化合物及び/または第二化合物が固相支持体に貼り付けられている、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記固相支持体が、磁気ビーズ、バイオセンサーチップ、マイクロタイタープレートのウェル、ディップスティック、及びマイクロアレイスライドからなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

工程iii)が少なくとも1つの検出可能なように標識されたヌクレオチドの存在下で実施される、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記検出可能な標識が、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、及び酵素標識からなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

工程iii)が少なくとも1つのハプテン接合ヌクレオチドの存在下で実施され、前記ハプテンがリガンドと結合し得る、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記ハプテンが、システイン、リジン、セリン、ピオチン、アビジン、及びストレプトアビジンからなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記リガンドが検出可能なように標識されている、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記検出可能な標識が、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、及び酵素標識からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

工程iii)がさらに、ポリメラーゼ活性の生成物を前記検出可能なように標識されたりリガンドに接触させる工程を含む、請求項 14 または 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記検出可能な標識が酵素である、請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記酵素が、 - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ノイ

ラミニダーゼ、及びセイヨウワサビペルオキシダーゼからなる群から選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記工程 iii) のポリメラーゼ活性の生成物が、それに取り込まれたハプテン接合ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドを少なくとも含む複合体であり、少なくともいくつかの前記ハプテンが酵素標識されたりガンドに結合し、且つ工程 iv) が、前記工程 iii) の生成物を前記酵素が検出可能なシグナルを産生し得る条件にさらす工程を含む、請求項 17 または 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記検出可能なシグナルが基質と反応する前記酵素によって産生される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記基質がルミノールまたはアクリダンである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記検出可能なシグナルを増強する分子を提供する工程をさらに含む、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記検出可能なシグナルを増強する分子が p-ヨードフェノールまたは p-フェニルフェノールである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記検出可能なシグナルが発光または蛍光である、請求項 19 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

工程 i) が、前記分析物 - 第一化合物複合体を洗浄し、非結合の第一化合物を除去する工程をさらに含む、請求項 1 または 3 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

工程 i) が、前記分析物 - 第二化合物複合体を洗浄し、非結合の第二化合物を除去する工程をさらに含む、請求項 2 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

工程 ii) が、前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を洗浄し、非結合の第一及び / または第二化合物を除去する工程をさらに含む、請求項 1 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記方法が、取り込まれていない検出可能なように標識されたヌクレオチドを除去する工程をさらに含む、請求項 1 から 9 または 25 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記方法が、取り込まれていない検出可能なように標識されたりガンドを除去する工程をさらに含む、請求項 1 から 7 または 14 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記第一化合物がタンパク質である、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記第一化合物が抗体である、請求項 1 から 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記第二化合物がタンパク質 - ポリヌクレオチド接合体である、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記第二化合物が抗体 - ポリヌクレオチド接合体である、請求項 1 から 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記第二化合物が前記分析物に結合する、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の方

法。

【請求項 35】

前記分析物が疾患状態のマーカーである、請求項 1 から 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記疾患状態が、癌及び感染症からなる群から選択される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記分析物がタンパク質またはペプチドである、請求項 1 から 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

i) 当該サンプルを、当該分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程であって、前記第一化合物は固相支持体に貼り付けられている工程；

ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はテロメラーゼによって伸長し得るポリヌクレオチドを含む工程；

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、前記テロメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件下で、少なくとも1つのハプテン接合ヌクレオチドの存在下で、前記テロメラーゼに接触させる工程；

iv) テロメラーゼ活性の生成物を、前記ハプテンがリガンドに結合し得る条件下で、酵素標識された前記リガンドに接触させる工程；

v) 当該ポリヌクレオチド - ハプテン - リガンド - 酵素複合体を、前記酵素の基質の存在下でインキュベートする工程；

vi) 前記基質への前記酵素の活性によって産生された検出可能なシグナルを検出する工程；
を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 39】

i) 当該サンプルを、当該分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程であって、前記第一化合物は固相支持体に貼り付けられている工程；

ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程であって、前記第二化合物はターミナルトランスフェラーゼによって伸長し得るポリヌクレオチドを含む工程；

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、前記ターミナルトランスフェラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件下で、少なくとも1つのハプテン接合ヌクレオチドの存在下で、前記ターミナルトランスフェラーゼに接触させる工程；

iv) 前記ターミナルトランスフェラーゼ活性の生成物を、前記ハプテンがリガンドに結合し得る条件下で、酵素標識された前記リガンドに接触させる工程；

v) 当該ポリヌクレオチド - ハプテン - リガンド - 酵素複合体を、前記酵素の基質の存在下でインキュベートする工程；

vi) 前記基質への前記酵素の活性によって産生された検出可能なシグナルを検出する工程；
を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 40】

サンプル中の分析物の存在または非存在に対するスクリーニングの方法であって、以下の工程：

i) 前記サンプルを、前記分析物に結合する第一化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物複合体を形成する工程；

ii) 前記分析物 - 第一化合物複合体を、前記分析物 - 第一化合物複合体に結合する第二化合物に接触させ、分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を形成する工程；

iii) 前記分析物 - 第一化合物 - 第二化合物複合体を、前記第二化合物に結合する第三化合物に接触させる工程であって、前記第三化合物はポリヌクレオチドを含む工程；
iv) 当該分析物 - 第一化合物 - 第二化合物 - 第三化合物複合体を、a) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドを伸長し得る条件、及び / または b) ポリメラーゼが前記ポリヌクレオチドの相補鎖を合成し得る条件のどちらかの条件下で、前記ポリメラーゼに接触させる工程；並びに、
v) 工程iv) のa) またはb) 部の生成物を検出する工程であって、工程iv) のb) 部は、前記相補鎖をさらなるポリヌクレオチド合成のための鋳型として用いる工程を含まず、前記第一及び / または第二化合物は固相支持体に貼り付けられている工程；
を含む方法。

【請求項 4 1】

当該DNAがテロメラーゼに結合し得る、及びテロメラーゼにより伸長され得る配列を含み、またタンパク質が前記DNAに共有結合で付加している、タンパク質 - DNA接合体。

【請求項 4 2】

前記タンパク質が抗体である、請求項 4 1 に記載のタンパク質 - DNA接合体。

【請求項 4 3】

請求項 4 1 または 4 2 に記載のタンパク質 - DNA接合体を含むキット。

【請求項 4 4】

ポリメラーゼと同一分析物に結合する少なくとも2つの化合物とを含むキットであって、前記化合物の1つはポリヌクレオチドを含み、前記ポリメラーゼは一本鎖ポリヌクレオチドまたは部分的に二本鎖ポリヌクレオチドの一本鎖突出部を伸長するキット。

【請求項 4 5】

前記化合物の一方または両方が抗体である、請求項 4 4 に記載のキット。

【請求項 4 6】

前記ポリメラーゼがテロメラーゼまたはターミナルトランスフェラーゼである、請求項 4 4 または 4 5 に記載のキット。

【請求項 4 7】

前記化合物の少なくとも1つが固相支持体に貼り付けられている、請求項 4 4 から 4 6 のいずれか一項に記載のキット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2005/001742

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl.		
<i>C12Q 1/48</i> (2006.01) <i>C12N 9/10</i> (2006.01) <i>C07K 16/46</i> (2006.01) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01)		
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)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPIDS, CAPLUS, MEDLINE Keywords: IMMUNOASSAY, IMMUNO PCR, DNA LABELED ANTIBODY, PCR, POLY(A)POLYMERASE, TELOMERASE, TERMINAL TRANSFERASE, OLIGNONUCLEOTIDE ANTIBODY CONJUGATE, DNA, NUCLEOTIDE, PROTEIN, PEPTIDE, ANTIBODY, COMPLEX, CONJUGATE, ANALYTE, AMPLIF, TELOMERASE RECOGNITION SEQUENCE, ASSAY, TELOMERASE REPEAT, DETECT, SCREEN, SAMPLE,		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Sano T <i>et al</i> "Immuno-PCR: Very Sensitive Antigen Detection by Means of Specific Antibody-DNA Conjugates". Science, 2 October 1992, 258(5079), pg 120-122 (Abstract; Page 122, References and Notes, 11; Page 122, first paragraph)	1, 2, 7-37, 40
X	Kozlov I A <i>et al</i> "Efficient Strategies for the Conjugation of Oligonucleotides to Antibodies Enabling Highly Sensitive Protein Detection". Biopolymers, 5 April 2004, 73(5), pg 621-30 (Abstract; Page 629, Introduction of Hydrazine or Aldehyde onto Monoclonal Antibodies and DNA Conjugation; Characterization of DNA-Antibody Conjugates; Page 630, DLISA; Page 630, Characterization of DNA-Antibody Conjugates)	1, 2, 7-37, 40
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "E" earlier application or patent 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 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "&" 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 20 January 2006		Date of mailing of the international search report 02 FEB 2006
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer Philippa Wyrdean Telephone No : (02) 6283 2554

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2005/001742

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Hendrickson E R <i>et al</i> "High sensitivity multianalyte immunoassay using covalent DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction". Nucleic Acids Research, February 1995, 23(3), pg 522-529 (Abstract; Materials and Methods, Reagents; Figure 1)	1-3, 7-9, 25-27, 30-37, 41-43
X	Maesawa C <i>et al</i> "A rapid biosensor chip assay for measuring of telomerase activity using surface plasmon resonance". Nucleic Acids Research, January 2003, 31(2), E4-4 (Abstract)	41, 43
X	Kha H <i>et al</i> "A telomerase enzymatic assay that does not use polymerase chain reaction, radioactivity, or electrophoresis". Analytical Biochemistry, 15 August 2004, 331(2), pg 230-234 (Abstract)	41, 43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2005/001742

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

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

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

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

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

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

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

See Supplemental Box

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2005/001742

Supplemental Box

(To be used when the space in any of Boxes I to VIII is not sufficient)

Continuation of Box No: III

The international application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Note that Rule 13.2 states that where a group of inventions is claimed in one and the same international application, the requirement of unity of invention referred to in Rule 13.1 shall be fulfilled only where there is a technical relationship among those inventions involving one or more of the same corresponding special technical features. The expression "special technical features" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

The ISA has identified 2 separate inventions.

Claims 1-40 are directed to methods of screening for the presence or absence of an analyte in a sample involving a compound comprising a polynucleotide. Claims 41-43 are directed to protein-DNA conjugates. Although all the claims share the feature of a compound such as a protein bound to or comprising a polynucleotide, this does not represent a special technical feature as this feature is not novel.

This feature is disclosed on page 2, lines 21-30 of the description. The method of "Immuno-PCR" (Sano et al., 1992; Alder et al., 2003; Joerger et al., 1995; Sperl et al., 1995) relies on forming an analyte-antibody complex where the antibody is conjugated to a polynucleotide.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/78 (2006.01)		G 0 1 N 21/78	C	
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	J	
		G 0 1 N 33/53	U	
		C 1 2 Q 1/48	Z	

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

(72)発明者 コリンズ・エドワード・ナイス
オーストラリア・ビクトリア・3 0 0 8・ドックランズ・リバー・エスブラネーデ・3 0 1 / 9 8

(72)発明者 ジュリー・アン・ローサッカー
オーストラリア・ビクトリア・3 0 7 8・フェアフィールド・ラスマインズ・ストリート・1 7
8 B

F ターム(参考) 2G045 AA25 DA36
2G054 AB05 EA03
4B063 QA01 QQ41 QQ91 QR08 QR56 QR82 QS26 QS28