

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4559074号  
(P4559074)

(45) 発行日 平成22年10月6日(2010.10.6)

(24) 登録日 平成22年7月30日(2010.7.30)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 Q 1/68	(2006.01) C 12 Q 1/68 A
G 01 N 33/53	(2006.01) G 01 N 33/53 M
G 01 N 33/566	(2006.01) G 01 N 33/566
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 A

請求項の数 3 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2003-525668 (P2003-525668)
(86) (22) 出願日	平成14年8月24日 (2002.8.24)
(65) 公表番号	特表2005-501564 (P2005-501564A)
(43) 公表日	平成17年1月20日 (2005.1.20)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2002/009496
(87) 國際公開番号	W02003/020967
(87) 國際公開日	平成15年3月13日 (2003.3.13)
審査請求日	平成17年5月27日 (2005.5.27)
(31) 優先権主張番号	01120466.6
(32) 優先日	平成13年8月28日 (2001.8.28)
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者	591003013 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCHE E AKTIENGESELLSCHAFT T スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツアーヘルストラツセ124
(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敏
(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】複数分析物の測定方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも 3 種の核酸分析物の測定方法であつて、

a ) 前記少なくとも 3 種の核酸分析物を均質溶液相PCRにより増幅し；

b ) 前記の少なくとも 3 種の増幅された核酸分析物を含むか、又は前記核酸分析物の 1 又は複数を含むのではないかと推測されるサンプル、及び少なくとも 3 種の異なる核酸配列特異的プローブの混合物を、前記増幅された核酸分析物への前記核酸配列特異的プローブの特異的結合を可能にする条件下で供給し、ここで

- 前記少なくとも 3 種の核酸配列特異的プローブの第 1 のプローブが、前記少なくとも 3 種の分析物の第 1 の分析物に対して特異的であり、そして第 1 のラベルに結合されており、

- 前記少なくとも 3 種の核酸配列特異的プローブの第 2 のプローブが、前記少なくとも 3 種の分析物の第 2 の分析物に対して特異的であり、そして第 2 のラベルに結合されており、前記ラベルは前記第 1 の核酸配列特異的プローブに結合されたラベルとは別に検出でき、そして

- 前記少なくとも 3 種の核酸配列特異的プローブの第 3 のプローブが、前記少なくとも 3 種の分析物の第 3 の分析物に対して特異的であり、ここで、前記第 3 の核酸特異的プローブの第 1 の量が、前記第 1 の核酸配列特異的プローブに結合されているのと同じラベルに結合されており、そして前記第 3 の核酸配列特異的プローブの第 2 の量が、前記第 2 の核酸配列特異的プローブに結合されているのと同じラベルに結合されており、そして

10

20

第3の核酸配列特異的プローブの前記第1の量が、前記第2の核酸配列特異的プローブに結合されるのと同じラベルに結合されておらず、そして第3の核酸配列特異的プローブの前記第2の量が、前記第1の核酸配列特異的プローブに結合されているのと同じラベルに結合されておらず、

ここで、前記第1のプローブがHIVに対して特異的であり、前記第2の核酸配列特異的プローブがHCVに対して特異的であり、そして前記第3の核酸配列特異的プローブがHBVに対して特異的であり；

- c ) 前記第1及び第2のラベルを示すシグナル強度を均質相で検出し；
  - d ) 段階c )で検出したシグナル強度間の比率を求め；そして
  - e ) 段階d )において検出される前記シグナル強度の比率を用いて、前記サンプルに存在する増幅された核酸分析物を測定する；
- 段階を含んで成る方法。

#### 【請求項2】

少なくとも3種の核酸分析物の測定方法であって、

- a ) 前記少なくとも3種の核酸分析物を均質溶液相PCRにより増幅し；
- b ) 前記の少なくとも3種の増幅された核酸分析物を含むか、又は前記核酸分析物の1又は複数を含むのではないかと推測されるサンプル、及び少なくとも3種の異なる核酸配列特異的プローブの混合物を、前記増幅された核酸分析物への前記核酸配列特異的プローブの特異的結合を可能にする条件下で供給し、ここで

- 前記少なくとも3種の核酸配列特異的プローブの第1のプローブが、前記少なくとも3種の分析物の第1の分析物に対して特異的であり、そして第1のラベルに結合されており、

- 前記少なくとも3種の核酸配列特異的プローブの第2のプローブが、前記少なくとも3種の分析物の第2の分析物に対して特異的であり、そして第2のラベルに結合されており、前記ラベルは前記第1の核酸配列特異的プローブに結合されたラベルとは別に検出でき、そして

- 前記少なくとも3種の核酸配列特異的プローブの第3のプローブが、前記少なくとも3種の分析物の第3の分析物に対して特異的であり、ここで、前記第3の核酸特異的プローブの第1の量が、前記第1の核酸配列特異的プローブに結合されているのと同じラベルに結合されており、そして前記第3の核酸配列特異的プローブの第2の量が、前記第2の核酸配列特異的プローブに結合されているのと同じラベルに結合されており、そして

第3の核酸配列特異的プローブの前記第1の量が、前記第2の核酸配列特異的プローブに結合されるのと同じラベルに結合されておらず、そして第3の核酸配列特異的プローブの前記第2の量が、前記第1の核酸配列特異的プローブに結合されているのと同じ第1のラベルに結合されておらず、

ここで、前記第1の核酸配列特異的プローブがHIV - 1 - Mに対して特異的であり、前記第2の核酸配列特異的プローブがHIV - 1 - Oに対して特異的であり、そして前記第3の核酸配列特異的プローブがHIV - 2に対して特異的であり、更に第4～第6の核酸配列特異的プローブを用い、第4の核酸配列特異的プローブがHCVに対して特異的であり、第5の核酸配列特異的プローブがHBVに対して特異的であり、そして第6の核酸配列特異的プローブがHAVに対して特異的であり；

- c ) 前記第1及び第2のラベルを示すシグナル強度を均質相で検出し；
  - d ) 段階c )で検出したシグナル強度間の比率を求め；そして
  - e ) 段階d )において検出される前記シグナル強度の比率を用いて、前記サンプルに存在する増幅された核酸分析物を測定する；
- 段階を含んで成る方法。

#### 【請求項3】

前記ラベルが、蛍光エネルギートランസファーを用いて検出されることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

**【技術分野】****【0001】**

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

**【背景技術】****【0002】**

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

**【0003】**

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

**【0004】**

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

**【0005】**

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

**【0006】**

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

10

20

30

40

50

関して取り扱うことは困難である。

【0007】

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

【0008】

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

10

【0009】

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

20

【0010】

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

30

【0011】

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

40

【0012】

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

50

、そして均質増幅/検出形式においては、良好には適用できない（あったとしても）。

#### 【0013】

組合わせラベリングへの他の多くの技術的アプローチが存在する。Ballardなど。（アメリカ特許第5,759,781号）、Speicherなど。（Nat. Genetics 12, 368-375 (1996)）及びRiedなど。（PNAS 89, 1388-1392 (1992)）は、アッセイ形式を開発しており、ここで個々の特異的プローブは、所定のプローブのすべてのコピーが組合わせ態様で1又は複数の明確な蛍光団を担持するので、そのラベリング特徴により知られている。ラベリングは、化学的オリゴヌクレオチド合成よりも、プローブ分子当たりに組み込まれるラベルの数に関して、低い精度であるニックトランスレーションにより行われ、すなわち前記方法は、別々の分布の正確な分析に役に立たない。従って、専門家は、核酸増幅においてそのようなプローブを使用せず、特に均質増幅方法においては使用しない。10

#### 【0014】

Tongなど。（Nat. Biotechnology 19, 756-759 (2001)）により記載される、いわゆるCFETプローブは、適用の主に異なった企画及び態様を有する。1～3個の色素が、散在される正確に調節された数でスペーサー単位を伴って、プローブ分子により5'末端に結合される。オリゴヌクレオチド成分は、3'末端側の最後の色素又はスペーサーの後に続く。Ballardなどによれば、異なったプローブ型の混合物が存在する。スペーサーは、電気泳動移動性及び共鳴強度のためのチューナーとして機能する。後者は特定のプローブの蛍光特徴に影響を与える。20

#### 【0015】

プローブは通常の波長で励起し、そして記録されるシグナルは、細管電気泳動図における位置により、及び特定位置での完全な発光スペクトルのオーバーレイ及びデジタル比として直接的に設定されるラベルの成分からの相対的寄与の計算により解明される。再び、反応座標にそって運動学的に補正され、そして標準化されたシグナル自体のシグナル分布分析が存在せず、“同じ/異なったラベル”的オリゴヌクレオチド企画が存在せず、そしてプローブ形状又は構成を変える生化学的反応の結果としてのシグナル生成が存在しない。20

#### 【0016】

結合パートナー分子当たり1つよりも多くのラベルによる結合パートナーのラベリングは、いくつかの欠点を生む。そのような複数のラベルされた結合パートナーは、合成においてかなり労力を要し（そして費用がかかる）、そしてラベルの立体的妨害が生じ、これがその分析物への結合パートナーの結合の効力、又は結合されるラベルの検出を低めることができる。また、結合パートナーに結合されるラベル間で、誤った結果を導く相互作用が生じる。これは、光学的ラベルを用いる場合、適切である。例えばTaqManアッセイ（アメリカ特許第5,210,015号、EP0543942号）に使用されるように、蛍光エネルギー転送ファーラベルを用いて均質検出方法を行う場合、確かに特に重要なものである。30

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

#### 【発明の開示】

#### 【0017】

本発明の主要観点は、測定される分析物よりも少ないラベルを用いての複数分析物の測定方法に関する。これは、いくつかの標的物のための特定プローブ分析の全体的集団を特定の色素によりそれぞれラベリングすることによって達成され、ここで他の標的物に関しては、前記特定プローブの集団の1の部分が所定の色素によりラベルされ、そして前記集団の他の部分が異なった色素（混合しての同じ配列/異なったラベルオリゴヌクレオチド）によりラベルされる。好ましくは、均質（溶液-相）同時増幅アッセイ（例えば、PCR又はTMAによる）を行い、すべての種類の適切なノイズについて得られるシグナルを補正し、そして対照色素に基づいて異なったラベルからのシグナルを標準化することによって、標的物は多チャネル検出器において集められた、処理されたシグナルの分布から推定され得る。このためには、ラベルの組み合わせが使用される。4050

## 【0018】

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

## 【0019】

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

## 【0020】

第3の結合パートナーに結合される異なったラベルに関して存在する異なった検出効率は、2種の手段で補足され得る。第1のラベルが第2のラベルに比較して、より高いシグナル出力を有する場合、定義される非-1 : 1比で、第2のラベルに結合される第3の結合パートナーと共に第1のラベルに結合される第3の結合パートナーを混合することによって化学的に、又は標準として選択された所定のラベルに対してのシグナル出力の標準化を通して機械的にこの差異を調節することができる。そのような異なった検出効率は、ラベルの固有の性質、例えば吸収性又は量的収量のためであり得るが、しかしながら、異なった結合効率又は溶媒効果に対する敏感性に起因することができる。後者の場合、結合反応に統一して、異なった量の第3の結合パートナーの混合が、そのような矛盾を適合するための良好な可能性を提供する。

## 【0021】

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

## 【0022】

高められた数の分析物が、2種のラベルについて示されるのと同じ手段で組合され得る、3種又はそれ以上のラベルを用いて測定され得ることがまた、注目されるべきである。3種のラベルを用いる場合、7種までの分析物が測定され得る。15種の分析物が單一及び二重、三重及び四重組合せで適用される場合、4種の異なったラベルを用いて検出され得る。單一又は二重組合せで適用される場合(実際的な観点から好都合である)、10種までの異なる分析物が4種のラベル組により識別され得る。

## 【0023】

従って、本発明は、

a ) 前記少なくとも3種の分析物を含むか、又は1又は複数の前記分析物を含むのではないかと推測されるサンプル、及び少なくとも3種の異なる結合パートナーの混合物を、前記分析物への前記結合パートナーの特異的結合を可能にする条件下で供給し、ここで  
- 前記少なくとも3種の結合パートナーの第1のパートナーが前記少なくとも3種の分析物の第1の分析物に対して特異的であり、そして第1のラベルに結合され、

10

20

30

40

50

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

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

前記第 1 量の第 3 の結合パートナーが結合第 2 の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されず、そして前記第 2 量の第 3 の結合パートナーが前記第 1 の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されず。 10

b ) 前記第 1 及び第 2 のラベルを示すシグナル強度を検出し、

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

#### 【 0 0 2 4 】

好ましい分析物は、配列特異的プローブを用いて測定され得る核酸分析物である。そのような核酸分析物はまた、当業者において知られているいくつかの核酸增幅方法、例えば LCR ( アメリカ特許第 5,185,243 号、第 5,679,524 号 及び 第 5,573,907 号; EP 0 320 308 B 1; WO 90/01069; WO 89/12696; 及び WO 89/09835 ) 、循環プローブ技法 ( アメリカ特許第 5,011,769 号、第 5,403,711 号、第 5,660,988 号、及び第 4,876,187 号、及び PCT 公開出願 WO 95/05480 号、WO 95/1416 号、及び WO 95/00667 号 ) 、 Invader TM 技法 ( アメリカ特許第 5,846,717 号; 第 5,614,402 号; 第 5,719,028 号; 第 5,541,311 号; 及び第 5,843,669 号 ) 、 Q - レプリカーゼ技法 ( アメリカ特許第 4,786,600 号 ) 、 NASBA ( アメリカ特許第 5,409,818 号; EP - 0329822 号 ) 、 TMA ( アメリカ特許第 5,399,491 号、第 5,888,779 号、第 5,705,365 号、第 5,710,029 号 ) 、 SDA ( アメリカ特許第 5,455,166 号及び第 5,130,238 号 ) 及び PCR ( アメリカ特許出願第 4,683,202 号 ) の 1 つの方法を用いての増幅された核酸であり得、ここで前記 PCR 方法が最も好ましい。

#### 【 0 0 2 5 】

本発明はまた、

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

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

- 第 3 の分析物に対して特異的な第 3 の結合パートナー ( これにより、第 1 量の前記第 3 の結合パートナーが前記第 1 の結合パートナーに結合されると同じラベルに結合され、そして第 2 量の前記第 3 の結合パートナーが前記第 2 の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合され、そして前記第 1 量の第 3 の結合パートナーが結合第 2 の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されず、そして前記第 2 量の第 3 の結合パートナーが前記第 1 の結合パートナーに結合されるのと同じラベルに結合されず ) を含んで成る組成物、及びサンプルにおける少なくとも 3 種の分析物の測定のためへのその使用に関する。 40

#### 【 0 0 2 6 】

さらに、本発明は、少なくとも 3 種の分析物の測定のためのキットに関する。

#### 【 発明を実施するための最良の形態 】

#### 【 0 0 2 7 】

本発明の分析物は、当業者に知られている結合アッセイにより測定され得る分析物である。それらは好ましくは、医学的診断又は他の生物学的分析のためのサンプル中の成分、すなわち、特に身体成分中の構成成分、例えば抗体、細胞又は核酸である。そのようなアッセイは、感染剤、例えば細菌、例えばクラミジア、ネイセリア及びマイコバクテリア、及びウィルス、例えば HBV、HCV 及び HIV の決定のために使用され得る。アッセイの目的に依存して、サンプルに存在する分析物の量を決定することができ、そして分析物、例えば

核酸分析物の形状が、その対立遺伝子形について、又は患者が突然変異誘発された形を担持するかどうかについて分析され得る。

#### 【0028】

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

#### 【0029】

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

#### 【0030】

分析物は、特定の結合パターンにより結合される。分析物に依存して、特異的結合パターンを選択すべきである。抗原性質を有する分析物は、特定の抗原を用いることによって結合され得る。サンプルにおける抗体は、結合パートナーとしてその特定の抗原を用いることによって決定され得る。核酸分析物が決定されるべきである場合、特定プローブとして、分析物に対して相補的である核酸配列を使用することができる。さらなる特定の結合対、例えば記載される方法においてもまた有用である基質 - 核酸又は糖 - レクチンは、当業界において知られている。

#### 【0031】

核酸分析物は通常、種々の方法の1つによりオリジナルサンプルを処理することによって利用できる形にされる。これは、例えばpHの変化（アルカリ性）、加熱、温度の循環性変化（凍結/融解）、生理学的増殖条件の変化、界面活性剤の使用、カオトロピック塩又は酵素（例えば、プロテアーゼ又はリパーゼ）を、単独で又は組合して含んで成る。例えば、特定の条件下で核酸を結合することができる磁気ガラス粒子を使用することができる。適切な粒子及びプロトコールは、WO96/41811号及びWO01/37291号に記載される。

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

#### 【0032】

核酸分析物又は増幅された核酸分析物の測定のための、プローブとも呼ばれる特定の核酸結合パートナーは、オリゴヌクレオチドであるが、しかし例えば天然のリン酸 - 糖バックグラウンドの代わりにペプチド - 主鎖を有する類似体（PNA、WO92/20702号）が使用され得る。分析物へのプローブの特異的結合を可能にするためには、プローブは好ましくは10個よりも長いヌクレオチド、さらにより好ましくは10~40個の長さのヌクレオチドを有する。前記プローブは分析物配列に対して十分に相補的であることがさらに必要とされる。従って、プローブは好ましくは、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%相補的である。最も好ましい場合、プローブは分析物に対して完全に相補的である。相補性及び相同性の正確な決定は、コンピュータープログラム、例えばFast A (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 85, pp. 2444-2448 (88)) を用いることによって決定され得る。

#### 【0033】

核酸分析物の初期濃度に依存して、分析物の測定を可能にするためにその分析物を増幅することが必要である。このためには、いくつかの増幅方法が当業界において知られている（上記に引用されるように）。特に、プライマーに基づかれる増幅方法を用いる場合、核酸分析物の特異的増幅が可能である。プローブ結合アッセイと組合して、アッセイの高

10

20

30

40

50

められた特異性が達成され得る。また、分析物の検出を可能にするためのラベルされたプライマーを使用する方法、例えばLCRは、当業界において知られている。また、そのような方法は、本発明に従って改良され得る。

#### 【0034】

本発明のプライマーは、核酸錆型にハイブリダイズされる場合、好ましくは酵素、より好ましくは原核細胞起源のポリメラーゼにより拡張されるか又は修飾され得る分子である。PCR方法を用いる場合、熱安定性ポリメラーゼ、例えばT. アクアチカス (*T. aquaticus*) 又はT. サーモフィラス (*T. Thermophilus*) DNA - ポリメラーゼが好ましい。それは、前記プライマーの3' - OH - 末端へのモノデオキシリボヌクレオシド三リン酸からのモノヌクレオチド単位を附加することによってプライマーを延長する。プライマーの全体の長さ及び塩基配列は、增幅反応の必要とされる特異性により指図される。10

#### 【0035】

PCRを行うための好ましいプライマーの長さは、モノヌクレオチド及び/又は核酸類似体モノマーから選択された、10~40、最も好ましくは15~30個の塩基を含むサブユニットである。一般的に、その長さのプライマーはまた、他の增幅方法のためにも有用である。1つよりも多くのプライマーが増幅のために使用される場合、例えばPCRを用いるか、又は1つの反応において複数の標的核酸を増幅する場合、好ましくはプライマーは、5個のよりも多くの連続的な相補的塩基のいずの拡張も含まないので、お互いに対してハイブリダイズできないプライマーが使用される。20

#### 【0036】

ラベルは一般的に、検出できるか又は分析物の存在を決定するために検出可能にすることができるグループであるので、当業者に知られている。良く知られているラベルは、蛍光ラベル、例えばフルオレセイン及びランタニドキレート、電気 - 化学発光ラベル、例えばルテニウム複合体、又はもう1つの分子実在物、例えばハプテンに対して生ぜしめられた抗体により認識され得るハプテン又は固定され得る成分、例えばストレプタビシン被覆された固相、例えばビーズ又は管に結合され得るビオチンである。特に相同形式に関する最も好ましいラベルは、発色団である。そのような発色団は、単独で又はもう1つの発色団、又は例えば非蛍光消光剤と組合して使用され得る。20

#### 【0037】

相同検出形成が特に核酸分析物の決定のために使用される場合、いくつかの形式が当業界において知られている。TaqManアッセイ（アメリカ特許第5,210,015号及び第5,487,972号）及びキッシングプローブ - アッセイのような方法は、蛍光色素の蛍光エネルギートランスファー (FET, Styer and Haughland Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 98, pp. 719 (67)) に基づかれる。お互いきわめて接近する場合、第1の蛍光団は、第2の蛍光団又は非蛍光消光剤として相互作用することができる。例えば、第1の蛍光色素の電磁発光又は振盪励起が、第2の蛍光色素において共鳴を誘発することができる。30

#### 【0038】

使用される形式に依存して、例えば第1の蛍光色素の低下する光発光又は第2の蛍光色素の上昇する光発光を、分析物の存在についての手段として検出することができる。この目的のために使用され得る蛍光色素の組合せは、当業界において知られている。例としては、6 - カルボキシフルオレセイン (6 - FAM) と組み合わされるペントメチン - インドジカルボシアニン (Cy5) のようなForester型共鳴エネルギートランスファーのために適切な従来の色素が存在する。40

#### 【0039】

この情況におけるラベルは、本発明の方法において実際的に検出されるシグナル生成実在物を意味する。記載される相同形式に関しては、お互い共鳴し、そして単一の検出シグナルとしてそれらの方法において検出される蛍光色素対が使用される。2種の明確な分子、例えば2種の蛍光色素が包含されるが、それらは1つのシグナルラベルとして機能する。さらに、用語ラベルとは、明確なラベル中の1つよりも多くのラベル分子が結合パートナー分子に結合されることを意味することが理解されるべきである。50

**【 0 0 4 0 】**

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

**【 0 0 4 1 】**

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

10

**【 0 0 4 2 】**

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

20

**【 0 0 4 3 】**

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

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

30

**【 0 0 4 4 】**

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

40

**【 0 0 4 5 】**

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

**【 0 0 4 6 】**

## 【表1】

表1

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

## 【0047】

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

## 【0048】

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

## 【0049】

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

## 【0050】

測定されたシグナルの解決において不明瞭な結果及び可能性ある誤りの危険性をさらに低めるために、複数のチャンネルに存在するシグナルが例1において説明されるように、サンプルにおける1つの可能性ある分布を評価され得るような手段でパラメーターを配置することが可能である。さらに、サンプルに存在することができる残る可能性ある分析物分布について特に試験する追加のアッセイを行うことができる。そのような連続的方法は第1回の実施においてほとんどのサンプルにおける明確な分析物分布の決定を可能にするので、非常に経済的であり、そして不明瞭サンプルは、低められた数の分析物を伴って複数の分析物アッセイを用いて、第2回目の実施において再評価され得る（明確な1つのラ

10

20

30

40

50

ベル - 1つの結合パートナーの組合せが可能であるべきである）。さらに、核酸分析物及び増幅された核酸分析物に関しては、例えば異なった分析物の区別及び確かな結果の獲得を可能にする、分析物 - プローブハイブリダイゼーション複合体又は増幅された核酸の溶融曲線を決定できる。

#### 【0051】

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

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

#### 【0052】

さらに、そのようなキットはまた、緩衝液、ブロッキング試薬、及び当業界において知られている他の反応成分を含むことができる、結合パートナーのそれらの分析物への特異的結合のための手段を含むことができる。核酸分析物の決定のためのキットはまた、上記に記載されるように核酸増幅方法のための反応成分も含むことができる。PCR反応キットはまた、ポリメラーゼ、緩衝液、ヌクレオチド三リン酸及び/又はプライマーを含むことができる。

本発明は、次の例により例示される。

#### 【実施例】

#### 【0053】

##### 例1.

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

#### 【0054】

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

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

#### 【0055】

候補体色素に関する一般的な必要条件は、次のものを包含する：原液における、及びマスター - ミックス試薬における成分としての使用レベルでの良好な化学的安定性；合成、精製及びキット製造の間、周囲光に暴露される場合の安定性；PCRにおける複数の加熱/冷却サイクル（例えば、n = 60）に暴露される場合の安定性；対応するPQ共鳴対間での十分なスペクトルオーバーラップ及び効果的なエネルギー - ランスファー；高い吸光係数（すな

10

20

30

40

50

わち、吸光度) ; 及び特にレポーターに関して、水溶液において、及びTaqman - PCRのために使用されるpH範囲(例えば、pH 7 - 8.5)における高い定量的収率。

【0056】

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

【0057】

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

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

【0058】

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

【0059】

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

【0060】

10

20

【表2】

表2

パラメーター1 - プローブ =  $5' -Q-(N_i)_g-R1-(N_i)_h-3' -PO_4 + 5' -Q-(N_i)_g-R2-(N_i)_h-3' -PO_4$

それぞれ5 pモル / 100  $\mu$ l 反応ミックス

パラメーター2 - プローブ =  $5' -Q-(N_i)_a-R1-(N_i)_b-3' -PO_4$  10pモル / 100  $\mu$ l

10

反応ミックス

パラメーター3 - プローブ =  $5' -Q-(N_i)_c-R2-(N_i)_d-3' -PO_4$  10pモル / 100  $\mu$ l

反応ミックス

パラメーター4 - プローブ =  $5' -Q-(N_i)_e-R3-(N_i)_f-3' -PO_4$  10pモル / 100  $\mu$ l

反応ミックス

パラメーター5 - プローブ =  $5' -Q-(N_i)_k-R1-(N_i)_l-3' -PO_4 + 5' -Q-(N_i)_k-R3-(N_i)_l-3' -PO_4$

20

それぞれ5 pモル / 100  $\mu$ l 反応ミックス

パラメーター6 - プローブ =  $5' -Q-(N_i)_n-R2-(N_i)_m-3' -PO_4 + 5' -Q-(N_i)_n-R3-(N_i)_m-3' -PO_4$

それぞれ5 pモル / 100  $\mu$ l 反応ミックス

## 【0061】

換言すれば、

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

30

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

すべての場合、10pモルのパラメーター - 特異的プローブが利用できる。

## 【0062】

不明瞭な結果の危険性に関しては、及び単一のラベル及び二重組合せの使用に集中して、不明瞭な結果は、それぞれ単一のラベルされたプローブにより示される2つのパラメーター、例えばP2 R1 + P4 R3の同時感染の場合、たぶん非常にまれであることを示すことができる。出発分子の数に関して 1 : 1 の同時感染、及び2つのチャンネルへの50 : 50のシグナル分析を生成する同一の抽出/增幅/検出効率の確立、又は異なった数の出発分子、及び力価における差異を正確に平衡化し、そして再び50 : 50の分布を生成する抽出/增幅/検出効率の確立は、無視して良いほど低いと思われる。従って、 $>(>)50:<(<)50:0$ 又は $<(<)50:>(>)50:0$ の不均等な分布がもたらされ（ケースI）、そしてその結果、50 : 0 : 50の均等な分布により示されるP5 R1R3から区別できる。

40

## 【0063】

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

50

## 【0064】

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

## 【0065】

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

10

## 【0066】

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

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

20

## 【0067】

## 【表3】

表3

(増幅及び検出効率)

30

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

40

## 【0068】

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

HIV - 1 - O及びHIV - 2の同時感染はほとんどありそうもなく、両者は非常にまれであり、そして地理的に十分に分離されており（しかしながら、数年間にわたって変化するこ

50

とができる)、そして全体的な結果は、そのような予測できない現象の場合においてさえ、“HIV陽性”である。

#### 【0069】

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

#### 【0070】

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

#### 【0071】

- 3種のプローブ(同じオリゴヌクレオチド、異なった蛍光標識)のための二重計算法追跡、

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

- 100%計数として作用するよう最も信頼できる出力基準又は基準組の生成、及び予測される値についての許容範囲境界の設定、

- 上記に言及されるすべてのパラメーターを組み込む3個の標的チャネルへの補正され、標準化されたシグナルの分布の分析のためのソフトウェアアルゴリズムの開発。

#### 【0072】

##### 例2.

Roche Cobas TaqMan<sup>TM</sup>装置のような自動化された試験装置のためのアッセイプロトコールに関しては、適切な工程スキームは下記に与えられる(また、図1を参照のこと)。

与えられる新規試薬の利用性、自動化されたアッセイの主要データ収集及びデータ処理スキームは次の通りである：

#### 【0073】

10

20

30

## 【表4】

表4

-データ収集:

			状態 :	
1. ダーク平均 (=計測器ノイズ)	DM	すでに行われた	10	
2. ダークドリフト ( $=f(t)$ のようなドリフト補正因子)	DD	すでに行われた		
3. 漏話及び決定補正因子	XT	すでに行われた		
4. レポーターのためのシグナル出力標準化因子 (=定量的因子、微小環境効果、スペクトル感受性、等を補正するための設定因子)	$NF_{R_i}$	追加の		
5. バックグラウンド強度 (=混合物の含まれるすべてのプローブから蓄積される化学的ノイズ)	BG	すでに行われた	20	
6. 時間にわたっての測定された合計シグナル	TFI	すでに行われた		

## 【0074】

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

- データ処理 :

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

## 【0075】

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

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

個々のサンプル分析は、図 1 に示されるようにして行われる。

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

## 【0076】

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

## 【0077】

10

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

## 【0078】

20

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

30

## 【0079】

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

## 【0080】

40

1つの通常のラベルを用いて多重アッセイを行うのに比較して、いくつかの光学チャネルへのシグナルの希釈のために感受性における可能性ある損失が存在し、そして従って、特定のチャネルに低められた特異的シグナル成長曲線が存在する。従って、一次結果を生成するためには、任意には、複合シグナル - 対 - 時間曲線を取り扱うであろう。この手段により、完全な特異的シグナル収率が、1つのシグナル - 対 - 時間曲線に収集され、次にこれは、限界サイクル (ct) 及びサンプルの主要状態 (陽性/陰性) を決定するために使用される。傾斜プロフィールアプローチを用いて、バックグラウンド強度の付加は、有害ではなく、そして特異的シグナルのより明白な成長特徴を区別する可能性ある利点を開発することができる。

## 【0081】

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

50

に考慮され得る。

【0082】

- プローブの1:1混合物により表される单一感染の場合、標準化されていない、バックグラウンド - 補正されたシグナルR1/R2の得られる比は、全体の増幅/検出工程を通して一定、例えば40/50であろう。これは、等量の精製された色素により得られる標準化因子の値(0, 80)に正確に等しくするべきである。なぜならば、両種類のラベルされたプローブ(同じオリゴヌクレオチド配列!)は同一の割合で分解されるからである。本明細書に示される概念に従っての分解性6 - パラメーター - 多重アッセイにより、個々のチャネル特異的バックグラウンドが、同じラベルにより標識された3種の異なったプローブのシグナル出力から製造されるので、バックグラウンド(BG) - 補正は必要である。

10

【0083】

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

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

により、特異的蛍光強度SFIに基づかれるべきである。

【0084】

対照的に、特異的シグナルは、標的物へのプローブの実質的に完全なハイブリダイゼーション、すなわちプローブオリゴヌクレオチドの線状化に依存して、ポリメラーゼの5' - ヌクレアーゼ活性により生成され、そして従って、プローブ構造には実質的に無関係である。これはまた、Tm(溶融温度)における同時低下のために、標的鎖から分解され、そして解離された後、切断されたプローブに適する。残留プローブオリゴマーにおける短い内部ハイブリッドは、PCRにおけるアニーリング/延長のために使用される高温で安定性であるべきでない。定量的収量又は溶媒効果に対する感受性における差異を補足する標準化の後、チャネル1及び2におけるシグナル分布は、50:50である。予測されるようなNFI及びSFI比の発見は、单一感染のための二重証明である。

20

【0085】

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

30

【0086】

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

40

【0087】

50

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

#### 【0088】

この他に、複合AFI/t曲線が曲線形状特徴に関して分析され得る。単一感染の場合、1点の感染を伴っての单一S字形曲線を予測する。しかしながら、二重感染の場合、2種の感染剤から抽出された2種の核酸標的物の個々から生成された2種の成長曲線は、ct（すなわち、曲線が上方に曲がり、そしてバックグラウンド及びドリフトレベル以上に上昇する、時間軸上の点）に関して、形状に関して、及び特定のシグナル強度に関して、たぶん同一ではない。従って、二-S字形曲線形状が、2点の感染を伴って、生成され得る。その結果、一又は二-S字形曲線形状は、調査下でのサンプルに存在する单一又は二感染を示す。しかしながら、好ましくない場合、複数の曲線の並置は、不明瞭な最大傾斜を有する不規則な形状を誘導し、そしてノイズ（すなわち、曲線の荒さ）が高められる。さらにもう1つの可能性は、2種のほぼ同一の曲線が並置される場合、1点の感染を伴っての複合曲線である。

#### 【0089】

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

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

#### 【0090】

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

この組の基準のための推定上の適用モードは、図1及び2に示される。

#### 【0091】

さらに、完全な工程をモニターするために、好ましくは天然の標的物により同時抽出され、そして同時増幅される、修飾されたウィルス粒子にパッケージングされる（保護される）、人工核酸構造体をすべてのサンプルに添加する。この内部対照（IC）は、区別できる発光特徴を有する異なったレポーターグループにより標的物特異的プローブとは異なる、IC検出プローブのためのユニークプローブ結合領域を特徴とする。従って、ICシグナルは標的物シグナルから識別され得、そしてICはサンプルに存在することが知られているので、それはモニター剤として機能する。IC応答が存在しない場合、それぞれの反応は有効でないものとして見出され、そして反復されるべきである。

#### 【0092】

処理され（すなわち、未知のもの及び外部対照又は検量計の両者）、そしてR4により示される個々の及びあらゆる検体に添加される、同時抽出され/同時増幅され/同時検出された内部対照（IC）の他に、外部陽性対照は、アッセイの一部であろう。“未知のもの”に対抗するものとして、陽性であることが見出されるべきである“既知のもの”が存在し、すべての標的物に関する光学チャネルにおいてシグナルを生ぜしめる混合された対照サ

10

20

30

40

50

ンプルとして企画され得る。ICと組み合わされる場合、完全な光学システムの利用能力が、完全な抽出/増幅/検出工程の機能性の他にモニターされる。血液銀行における核酸に基づくスクリーニング適用に関しては、例えば高い感受性の定性的アッセイが、技術的に実行可能である限り、個々の及びあらゆる正のドネーションを同定するために必要とされる。従って、外部陽性対照の力価は、低濃度範囲で設定される。

## 【0093】

例3 .

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

## 【0094】

## 【表5】

10

20

30

表5

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

## 【0095】

NFI参照パターン：

【表6】

表6

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

10

【0096】

20

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

【0097】

【表7】

表7

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

30

【0098】

40

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

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

【0099】

50

【表8】

表8

模倣されたデータ組：

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

【0100】

シグナルデータを評価するための続く段階が下記に示される：

【表9】

表9  
模倣された分布

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

参照パターンに従っての平均値（算術的）、逸脱された

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

参照パターンに従っての限界標準偏差、逸脱された

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

NFI参照パターン

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

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

【0101】

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

【0102】

例4.

10

20

30

40

50

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

#### 【 0 1 0 3 】

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

10

#### 【 0 1 0 4 】

##### 例 5 . HBV 単一感染による実験データ

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

30

#### 【 0 1 0 5 】

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

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

#### 【 0 1 0 6 】

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

40

#### 【 0 1 0 7 】

これは、FAM により示される類似する反応に比較して、JA274 により示される反応の増強された分析感受性を解釈し、すなわち 50 : 50 を達成する、検出できる HBV 用量の低い端で、NFI 分布は、色素対を用いて臨界である (“悪い場合のモデル”)。さらに、実験的に

50

確立されたNF ( JA274/FAM ) を用いてのSFIのNFIへの翻訳に基づいて、通常の生化学反応から生成される手段により結合されるそれらの色素は、著しい精度を伴って50 : 50の分布を生成する（また、図4bを参照のこと）。

#### 【 0 1 0 8 】

##### 例 6 . 異なった同時感染（タイプI及びタイプIV）に関する実験データ

方法及び試薬組は例 5 に記載されるとおりであるが、但し同時感染されたサンプルから抽出された標的物に依存して、HBV、HCV又はHIV - 1 - 0に対して特異的なプローブは、増幅/検出反応において消費された。HBVプローブを、等量のFAM - 又はJA274ラベルされたオリゴヌクレオチドの混合物として使用し、HCVプローブは、全体的にFAMラベルされたオリゴヌクレオチドであり、そしてHIV - 1 - 0プローブは全体的にJA274ラベルされたオリゴヌクレオチドであった。HBV + HCV陽性血漿サンプル及びHBV + HIV - 1 - 0陽性血漿サンプルは、タイプIVの同時感染物であり、HCV + HIV - 1 - 0陽性サンプルは、タイプIの同時感染物である。注意：HIV - 1 - 0に関しては、力価は培養上清液のX倍希釈溶液で与えられ；すべての他のパラメーターに関しては、正確に定量化され[cp/ml]，そして標準化された材料が利用できる。10

#### 【 0 1 0 9 】

図 4 におけるプロットから見られるように、反応座標に沿ってのNFI分布自体及びNFI追跡は、単一感染に起因するそれらとは非常に異なる。例えば、図4aにおいては、反応番号 1 - 12は、低く、そしておよそ等しい力価のHBV（非常に良く増幅する；逆転写段階は包含されない）及びHCV（逆転写 - PCRを通して、HBVよりもいく分遅く十分に増幅する；HCV標的物は明白な二次構造のために容易には接近しない）を特徴とする。結果的に、特定の反応の開始の後すぐに、SFI<sub>(FAM)</sub> 及びSFI<sub>(A274)</sub> が相当の量でHBV反応を通して生成され、そしてNFI<sub>(JA274/FAM)</sub> 比が50 : 50の分布線（= 1）に近づく傾向がある。20

#### 【 0 1 1 0 】

しかしながら、サイクリングが進行するにつれて、HCVが、ほとんど遅延しないで反応し、そして追加のSFI<sub>(FAM)</sub> が生成され、NFI<sub>(JA274/FAM)</sub> 比を、負の傾斜を有するグラフを伴って、平衡線以下に押進める。図 4 における反応番号13 - 24は、有効なサイクル範囲のより早い開始の方へのシフトをもたらす、低用量HBV感染及び100倍過剰のHCV用量、及びNFI<sub>(JA274/FAM)</sub> の比を徐々に高める低用量HBV反応からのSFI<sub>(FAM)</sub> 及びSFI<sub>(JA274)</sub> の“結合された”生成に先立って、SFI<sub>(FAM)</sub> が高い用量のHCV反応から生成されるにつれて、平衡線以下に急激に下降し、そして次に、正の傾斜を伴ってゆっくりと上昇するNFI<sub>(JA274/FAM)</sub> 比のグラフを特徴とする。30

#### 【 0 1 1 1 】

従って、図 1 + 2 に示されるような規則的連続態様で例 2 ( p.25-26 ) に示される基準への適用によれば、分析は、“同時感染HBV + HCV”を生成する。これは、高い用量HBV及び低い用量HCVの組合せ（高レベルのSFI<sub>(FAM)</sub> 及びSFI<sub>(JA274)</sub> + 少々の追加のSFI<sub>(FAM)</sub> ; 図4dを参照のこと）、又は高い用量のHBV及び低い用量のHIV - 1 - 0（高レベルのSFI<sub>(FAM)</sub> 及びSFI<sub>(JA274)</sub> + 非常に少ない追加のSFI<sub>(JA274)</sub> ; 図4c、反応番号 7 - 24を参照のこと）からのほとんどの反応に関してさえ真実を維持する。40

#### 【 0 1 1 2 】

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

#### 【 0 1 1 3 】

10

20

30

40

50

さらに、図4b（反応番号13 - 24）及び図4c（反応番号1 - 6）は、SFI<sub>(FAM)</sub>及びSFI<sub>(JA 274)</sub>の“結合されていない”生成をもたらすタイプI同時感染、すなわちこの場合、HCV+HIV-1-0の例を示す。従って、NFI比追跡グラフは、HCVがHIV-1-0よりも良好に増幅されるので（中でも、プライマー/プローブ結合部位に影響を及ぼす多型現象の結果）、平衡線以下にかなり移動し、そしてとどまる。さらに、HIV-1-0のみから生成されるJA 274特異的シグナル強度は、再び理論に従って、HBV単一感染から生成されたそれよりも相当に低い。これは、単一感染と同時感染とのさらなる識別を助ける。

#### 【0114】

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

#### 【0115】

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

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0116】

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

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

【図3 a】図3 aは、時間の関数としてのNFI比(Ry/Rx)を示す。

【図3 b】図3 bは、時間の関数としてのNFI比(Ry/Rx)を示す。

【図3 c】図3 cは、時間の関数としてのNFI比(Ry/Rx)を示す。

【図3 d】図3 dは、時間の関数としてのNFI比(Ry/Rx)を示す。

【図4 a】図4 aは、時間の関数としてのNFI比(Ry/Rx)を示す。

【図4 b】図4 bは、時間の関数としてのNFI比(Ry/Rx)を示す。

【図4 c】図4 cは、時間の関数としてのNFI比(Ry/Rx)を示す。

【図4 d】図4 dは、時間の関数としてのNFI比(Ry/Rx)を示す。

【図5】図5は、潜在的に不明瞭なサンプルの処理を示す。

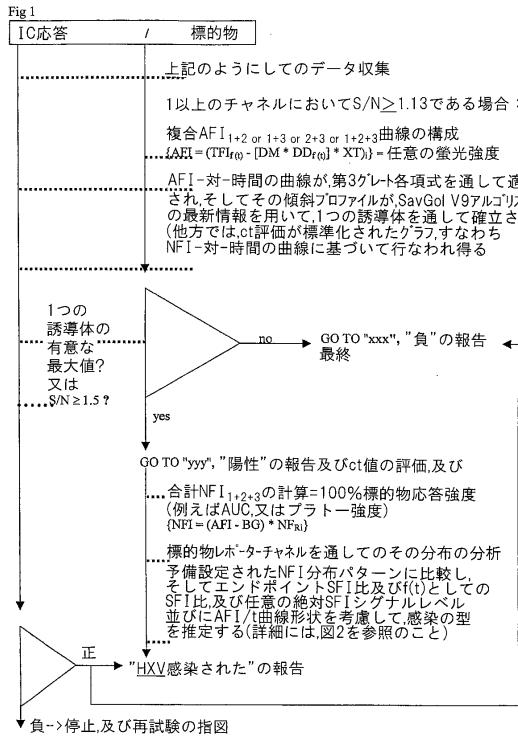
10

20

30

40

【図1】



【図2】

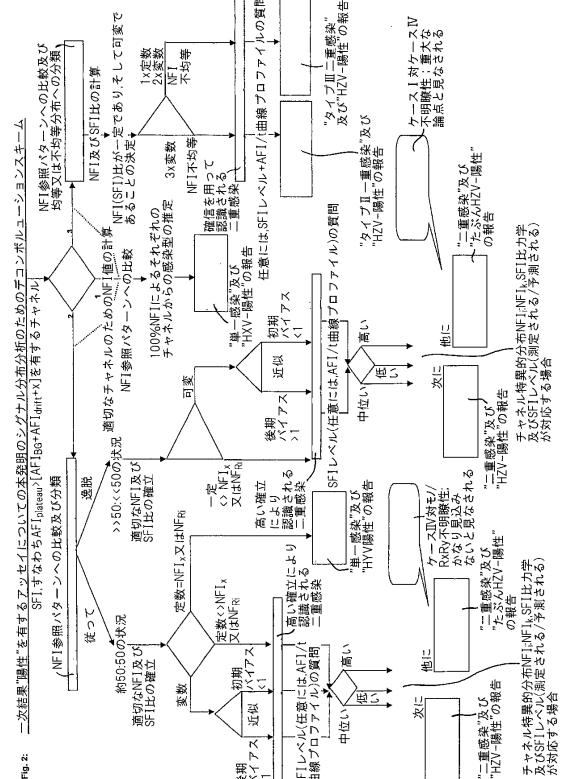
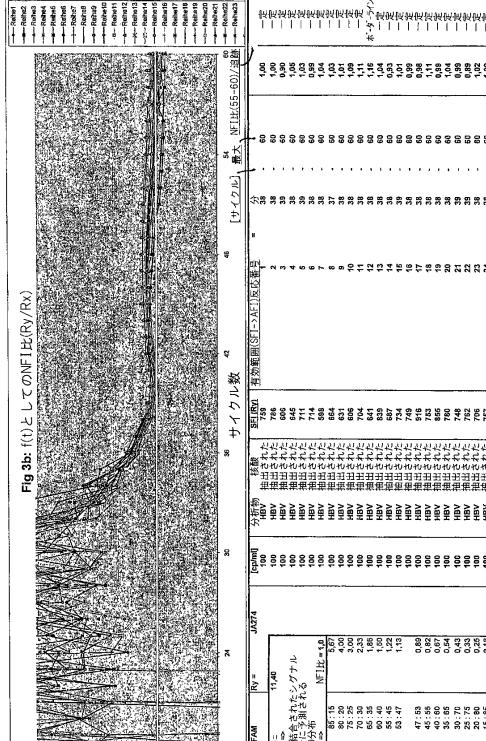
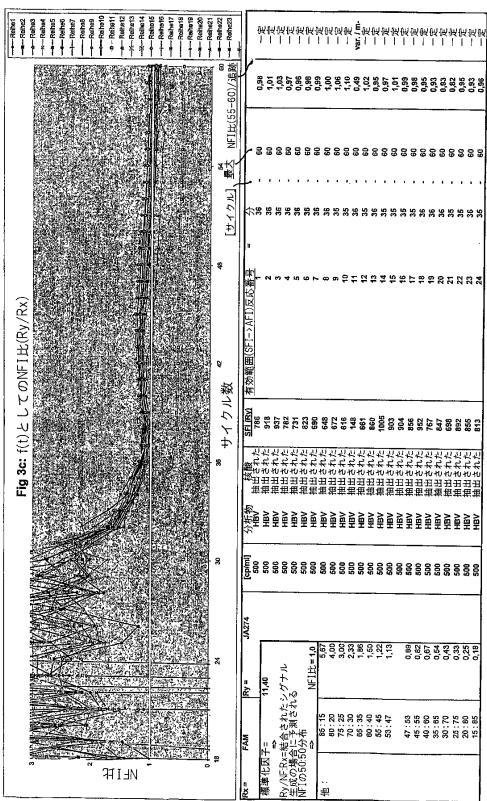


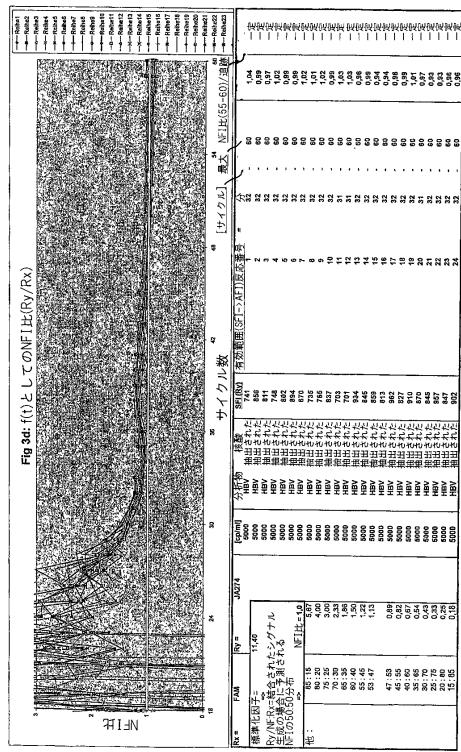
Fig 3a: f(t)としてのNFI比(Rv/Rx)



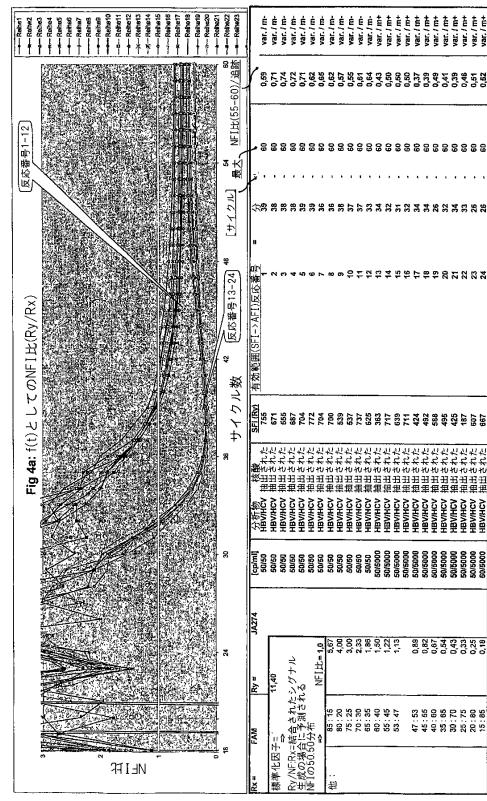
【図3c】



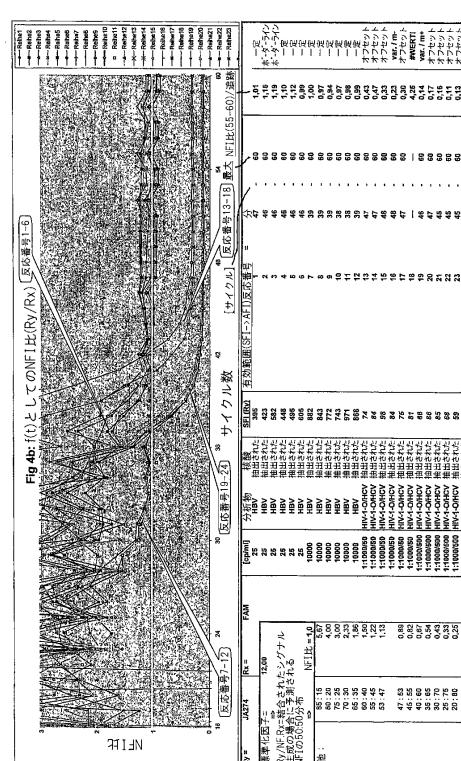
【図3d】



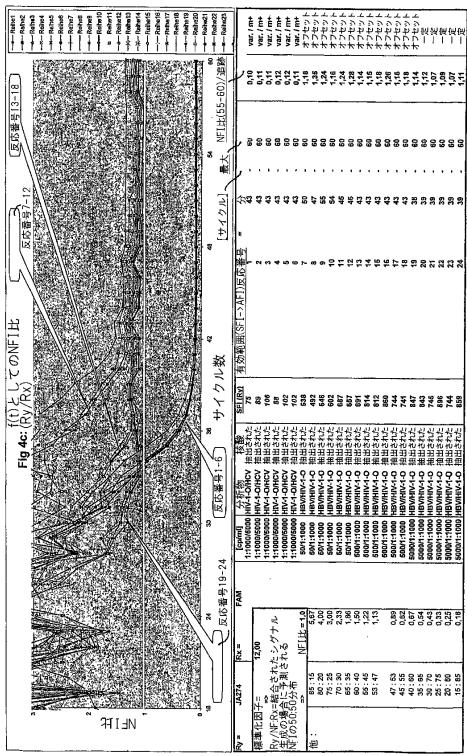
【図4a】



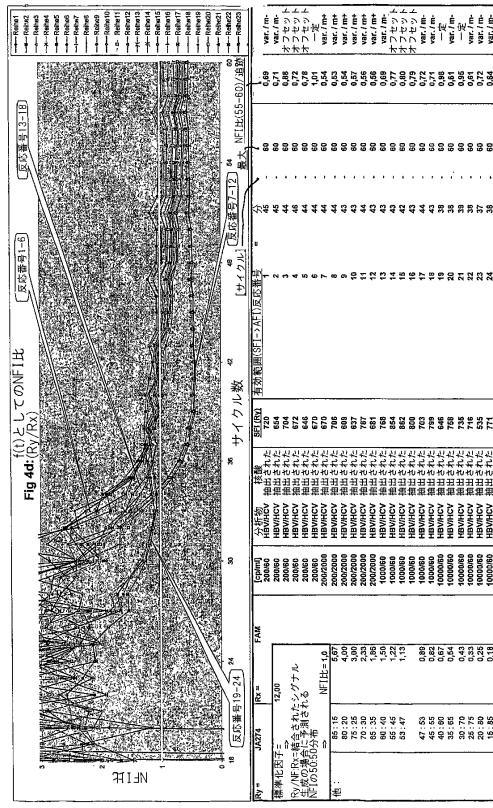
【図4b】



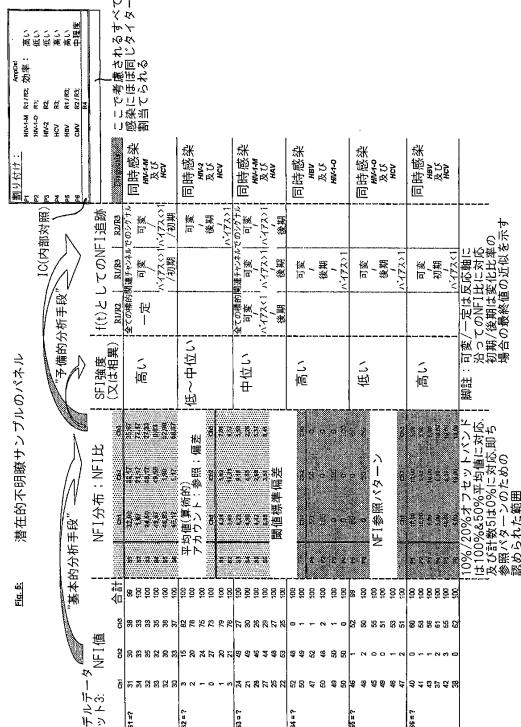
【図4c】



【図4d】



【図5】



---

フロントページの続き

(74)代理人 100108903  
弁理士 中村 和広  
(74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一  
(74)代理人 100141977  
弁理士 中島 勝  
(72)発明者 バインデル, クルト  
ドイツ連邦共和国, 8 2 4 0 7 ビーレンバッハ - ハルト, フィヒテンシュトラーセ 3 ベー  
(72)発明者 クライス, シュテファン  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 6 6 , プレザントン, ルセロ コート 4 2 8 3  
(72)発明者 ベルクマン, フランク  
ドイツ連邦共和国, 8 2 3 9 3 イッフェルドルフ, ファルテルガター 5  
(72)発明者 ヨーゼル, ハンス - ペーター  
ドイツ連邦共和国, 8 2 3 6 2 バイルハイム, ウルメンシュトラーセ 2 8  
(72)発明者 ハインドル, ディーター  
ドイツ連邦共和国, 8 2 3 2 7 トゥートツィンク, バルトシュミットシュトラーセ 1

審査官 横田 倫子

(56)参考文献 特表2 0 0 0 - 5 0 7 8 0 9 (JP, A)  
特開平1 0 - 3 3 2 6 9 6 (JP, A)  
特表2 0 0 2 - 5 1 7 1 8 3 (JP, A)  
Proc Natl Acad Sci USA., 96 (1999) p.6394-6399  
J Virol Methods., 89 (2000) p.97-108  
J Dermatol., 26 (1996) p.434-441  
臨床病理, 45[3] (1997) p.229-233  
J Virol Meth., 70 (1998) p.119-127  
J Virol Meth., 56 (1996) p.125-137  
J Virol Meth., 35 (1991) p.297-304  
日本輸血学会雑誌, 45[5] (1999) p.623-628  
Nat Gen., 12 (1996) p.368-375  
J Virol Methods., 89 (2000) p.177-181  
Nat Immunol., 19 (2001 Aug) p.756-759  
J Clin Microbiol., 39[8] (2001 Aug) p.2937-2945

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68  
C12N 15/00-15/90  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
PubMed  
BIOSIS/WPI(DIALOG)