(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-549350
(P2023-549350A)
(43)公表日　令和5年11月24日(2023.11.24)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 15/11	*(2006.01)*	C12N	15/11	ZZNA　4B063
C12Q 1/68	*(2018.01)*	C12Q	1/68	100Z

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全179頁）

(21)出願番号　特願2023-528060(P2023-528060)
(86)(22)出願日　令和3年11月10日(2021.11.10)
(85)翻訳文提出日　令和5年7月3日(2023.7.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/058851
(87)国際公開番号　WO2022/103887
(87)国際公開日　令和4年5月19日(2022.5.19)
(31)優先権主張番号　63/112,607
(32)優先日　令和2年11月11日(2020.11.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/132,170
(32)優先日　令和2年12月30日(2020.12.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/227,080
最終頁に続く

(71)出願人　520144244
ノーティラス・サブシディアリー・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０２、シアトル、イーストレイク・アベニュー・イースト・２７０１
(74)代理人　110001173
弁理士法人川口國際特許事務所
(72)発明者　アクセル，トゥラル
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０９、シアトル、ポンティウス・アベニュー・４２５、ノース、スイート・２０２
(72)発明者　リンカー，トッリ
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０９、シアトル、ポンティウス・アベニュ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　向上した結合及び検出特徴を有する親和性試薬

(57)【要約】
（ａ）保持成分、例えば、構造化核酸粒子；ならびに（ｂ）（ｉ）保持成分に結合した１つ以上の標識成分、及び（ｉｉ）保持成分に結合した１つ以上の結合成分の一方または両方を有する親和性試薬

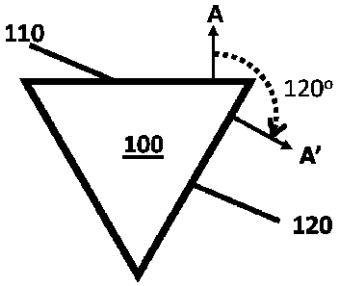


FIG. 1A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
検出可能なプローブであって、
（ａ）保持成分；
（ｂ）標識成分；及び
（ｃ）前記保持成分に結合した２つ以上の結合成分
を含み、
前記検出可能なプローブは、結合パートナーに対する前記２つ以上の結合成分のいずれかの平衡解離定数よりも低い前記結合パートナーに対する平衡解離定数を有し、または前記検出可能なプローブは、結合パートナーに対する前記２つ以上の結合成分のいずれかの解離速度定数よりも低い前記結合パートナーに対する解離速度定数を有する、前記検出可能なプローブ。
【請求項２】
前記標識成分は、前記保持成分にカップリングされている、請求項１に記載の検出可能なプローブ。
【請求項３】
前記保持成分は、核酸を含む、請求項１に記載の検出可能なプローブ。
【請求項４】
前記核酸は、核酸折り紙を含む、請求項３に記載の検出可能なプローブ。
【請求項５】
前記保持成分は、蛍光ナノ粒子を含む、請求項１に記載の検出可能なプローブ。
【請求項６】
前記保持成分にカップリングされた２つ以上の標識成分を含む、請求項１に記載の検出可能なプローブ。
【請求項７】
前記結合パートナーをさらに含み、前記結合パートナーは、前記２つ以上の結合成分の結合成分を介して前記検出可能なプローブに結合されている、請求項１に記載の検出可能なプローブ。
【請求項８】
前記結合パートナーは、固相支持体に結合されている、請求項７に記載の検出可能なプローブ。
【請求項９】
前記結合パートナーは、構造化核酸粒子を介して前記固相支持体に結合されている、請求項８に記載の検出可能なプローブ。
【請求項１０】
前記保持成分は、前記２つ以上の結合成分の第１の結合成分が前記２つ以上の結合成分の第２の結合成分と接触することを制約する、請求項１に記載の検出可能なプローブ。
【請求項１１】
前記保持成分は、第２のサイドからオフセットされた第１のサイドを有する三次元構造を有し、前記２つ以上の結合成分は、前記第１のサイド上に存在するように制約され、前記第２のサイドと接触することが制約される、請求項１に記載の検出可能なプローブ。
【請求項１２】
前記標識成分は、前記第２のサイド上に存在するように制約され、前記第１のサイドと接触することが制約される、請求項１１に記載の検出可能なプローブ。
【請求項１３】
前記検出可能なプローブは、２つ以上の標識成分を含む、請求項１に記載の検出可能なプローブ。
【請求項１４】
前記保持成分は、第２のサイドからオフセットされた第１のサイドを有する三次元構造を有し、前記２つ以上の標識成分は、前記第１のサイド上に存在するように制約され、前

記第２のサイドと接触することが制約される、請求項１３に記載の検出可能なプローブ。
【請求項１５】
前記２つ以上の結合成分は、前記第２のサイド上に存在するように制約され、前記第１のサイドと接触することが制約される、請求項１４に記載の検出可能なプローブ。
【請求項１６】
前記保持成分は、ビーズを含む、請求項１に記載の検出可能なプローブ。
【請求項１７】
前記標識成分は、前記ビーズ内に１つ以上の蛍光部位を含む、請求項１６に記載の検出可能なプローブ。
【請求項１８】
分析物を検出する方法であって、
（ａ）分析物を先行請求項のいずれか１項に記載の検出可能なプローブと接触させることであって、前記分析物は、前記結合パートナーを含む、前記接触させること；及び
（ｂ）前記標識成分からのシグナルを取得し、それにより前記分析物を検出すること
を含む、前記方法。
【請求項１９】
分析物を検出する方法であって、
（ａ）分析物を第１の検出可能なプローブと接触させることであって、前記第１の検出可能なプローブは、
（ｉ）第１の保持成分、
（ｉｉ）標識成分、及び
（ｉｉｉ）前記保持成分に結合した２つ以上の結合成分の第１のセットであって、前記第１のセットにおける前記結合成分のうちの少なくとも１つは、前記分析物における第１のエピトープに結合する、前記第１のセット
を含む、前記接触させること；
（ｂ）前記第１の検出可能なプローブの前記標識成分からのシグナルを取得すること；
（ｃ）前記分析物を第２の検出可能なプローブと接触させることであって、前記第２の検出可能なプローブは、
（ｉ）前記第１の保持成分と実質的に同じ構造を含む第２の保持成分、
（ｉｉ）標識成分、及び
（ｉｉｉ）前記保持成分に結合した２つ以上の結合成分の第２のセットであって、前記第２のセットにおける前記結合成分のうちの少なくとも１つは、前記分析物におけるに第２のエピトープ結合し、前記第２のエピトープは、前記第１のエピトープと比較して異なる化学的組成を有する、前記第２のセット
を含む、前記接触させること；及び
（ｄ）前記第２の検出可能なプローブの前記標識成分からのシグナルを取得し、それにより前記分析物を検出すること
を含む、前記方法。
【請求項２０】
前記第１の保持成分及び前記第２の保持成分は、実質的に同じ構造を有する構造化核酸粒子を含む、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記実質的に同じ構造は、核酸折り紙骨格である、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記第１の検出可能なプローブの前記標識成分は、前記第２の検出可能なプローブの前記標識成分のための構造と実質的に同じ構造を含む、請求項１９に記載の方法。
【請求項２３】
前記第１の検出可能なプローブの前記標識成分は、前記第２の検出可能なプローブの前記標識成分と同じシグナルを生成する、請求項１９に記載の方法。
【請求項２４】

前記第１の検出可能なプローブの前記標識成分は、前記第２の検出可能なプローブの前記標識成分の構造とは異なる構造を含む、請求項１９に記載の方法。
【請求項２５】
前記第１の検出可能なプローブの前記標識成分は、前記第２の検出可能なプローブの前記標識成分とは異なるシグナルを生成する、請求項１９に記載の方法。
【請求項２６】
工程（ｃ）の前に前記分析物から前記第１の検出可能なプローブを除去することをさらに含む、請求項１９に記載の方法。
【請求項２７】
前記分析物から前記第１の検出可能なプローブを除去することは、前記第１の検出可能なプローブを切断することを含む、請求項２７に記載の方法。
【請求項２８】
組成物であって、
（ａ）結合成分に結合した第１の構造化核酸粒子を含むプローブ；及び
（ｂ）前記結合成分に対するエピトープに結合した第２の構造化核酸粒子を含む分析物であって、前記プローブは、前記エピトープへの前記結合成分の結合を介して前記分析物に結合されている、前記分析物
を含む、前記組成物。
【請求項２９】
前記プローブは、前記第１の構造化核酸粒子に結合した標識成分をさらに含む、請求項２８に記載の組成物。
【請求項３０】
前記第２の構造化核酸粒子は、固体支持体にさらに結合されている、請求項２８に記載の組成物。
【請求項３１】
前記第２の構造化核酸粒子は、アレイにおける部位にさらに結合されている、請求項２８に記載の組成物。
【請求項３２】
前記第１の構造化核酸粒子は、核酸折り紙を含む、請求項２８に記載の組成物。
【請求項３３】
前記第２の構造化核酸粒子は、核酸折り紙を含む、請求項３２に記載の組成物。
【請求項３４】
組成物であって、
（ａ）複数の異なるプローブであって、前記異なるプローブの各々は、結合成分に結合した第１の構造化核酸粒子を含み、前記異なるプローブの各々は、異なる結合成分を含む、前記複数の異なるプローブ；及び
（ｂ）複数の異なる分析物であって、前記異なる分析物の各々は、異なる結合成分に対するエピトープに結合した第２の構造化核酸粒子を含み、前記異なるプローブは、前記複数の異なる分析物のエピトープへの前記複数の異なるプローブの異なる結合成分の結合を介して前記異なる分析物に結合されている、前記複数の異なる分析物を含む、
前記組成物。
【請求項３５】
前記第１の構造化核酸粒子は、前記異なるプローブについて実質的に同じである、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３６】
前記第２の構造化核酸粒子は、前記異なる分析物について実質的に同じである、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３７】
前記第１の構造化核酸粒子は、前記第２の構造化核酸粒子と実質的に同じである、請求項３４に記載の組成物。

【請求項３８】
前記第１の構造化核酸粒子は、前記異なるプローブについて異なる、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３９】
前記第１の構造化核酸粒子は、複数のオリゴヌクレオチドにアニーリングされた骨格鎖を有する折り紙を含む、請求項３８に記載の組成物。
【請求項４０】
前記骨格鎖は、前記異なるプローブについて同じであり、前記オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、前記異なるプローブ間で異なる、請求項３８に記載の組成物。
【請求項４１】
前記第２の構造化核酸粒子は、前記異なる分析物について異なる、請求項３４に記載の組成物。
【請求項４２】
前記第２の構造化核酸粒子は、複数のオリゴヌクレオチドにアニーリングされた骨格鎖を有する折り紙を含む、請求項４１に記載の組成物。
【請求項４３】
前記骨格鎖は、前記異なる分析物について同じであり、前記オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、前記異なる分析物間で異なる、請求項４２に記載の組成物。
【請求項４４】
前記第１の構造化核酸粒子は、前記第２の構造化核酸粒子とは異なる、請求項３４に記載の組成物。
【請求項４５】
前記第１及び第２の構造化核酸粒子はそれぞれ、複数のオリゴヌクレオチドにアニーリングされた骨格鎖を有する折り紙を含む、請求項４４に記載の組成物。
【請求項４６】
前記骨格鎖は、前記第１及び第２の構造化核酸粒子について同じであり、前記オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、前記第１及び第２の構造化核酸粒子間で異なる、請求項４５に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
相互参照
本出願は、２０２０年１１月１１日に出願された米国仮出願番号６３／１１２，６０７、２０２０年１２月３０日に出願された米国仮出願番号６３／１３２，１７０、及び２０２１年７月２９日に出願された米国仮出願番号６３／２２７，０８０の優先権の利益を主張し、これらの出願は、参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
親和性試薬には、他の分子と検出可能な相互作用を形成する広いクラスの化学的試薬が含まれる。親和性試薬には、他の分子と一時的または可逆的結合対を形成する結合試薬が含まれ得る。親和性試薬は、生体分子、例えば、ポリペプチド、核酸、及び多糖の構造及び特性を特性化するために利用され得る。親和性試薬には、親和性試薬を可視化する目的で検出可能な標識が含まれ得る。しばしば、これらの検出可能な標識は、蛍光標識である。例えば、単一分子検出のために十分に強く、かつ正確な定量のために十分な信頼性のあるシグナルを含む、強く信頼性のあるシグナルを生成する標識された親和性試薬が必要とされている。また、例えば、単一分子分解能で標的分子の検出をサポートするために十分なアビディティで、標的分子に確実に結合する親和性試薬が必要とされている。
【発明の概要】
【０００３】
本開示は、（ａ）保持成分；及び（ｂ）（ｉ）１つ以上の標識成分、及び（ｉｉ）１つ以上の結合成分の一方または両方を有する親和性試薬を提供する。任意に、標識成分の１

つ以上は、保持成分に結合されている。代替的または追加の選択肢として、結合成分の１つ以上は、保持成分に結合されている。保持成分には、構造化核酸、例えば、核酸折り紙が含まれ得る。

【０００４】

親和性試薬には、（ａ）保持成分；（ｂ）１つ以上の標識成分、及び（ｉｉ）複数の結合成分が含まれ得る。任意に、親和性試薬は、結合パートナーに対する複数の結合成分のいずれか１つの平衡解離定数よりも低い平衡解離定数を有し、または検出可能なプローブは、結合パートナーに対する複数の結合成分のいずれかの解離速度定数よりも低い解離速度定数を有する。

【０００５】

親和性試薬には、（ａ）保持成分；（ｂ）複数の標識成分、及び（ｉｉ）１つ以上の結合成分が含まれ得る。

【０００６】

本開示の親和性試薬は、検出可能なプローブとして構成され得る。検出可能なプローブには、（ａ）保持成分；（ｂ）１つ以上の標識成分；及び（ｃ）保持成分に結合した２つ以上の結合成分が含まれ得、検出可能なプローブは、結合パートナーに対する２つ以上の結合成分のいずれかの平衡解離定数未満である結合パートナーに対する平衡解離定数を有し、または検出可能なプローブは、結合パートナーに対する２つ以上の結合成分のいずれかの解離速度定数未満である結合パートナーに対する解離速度定数を有する。

【０００７】

本開示は、分析物を検出する方法であって、（ａ）分析物を検出可能なプローブと接触させる工程であって、検出可能なプローブは、（ｉ）保持成分；（ｉｉ）１つ以上の標識成分、及び（ｉｉｉ）１つ以上の結合成分を含む、接触させる工程；及び（ｂ）１つ以上の標識成分からのシグナルを取得し、それにより分析物を検出する工程を含む、方法をさらに提供する。

【０００８】

また、分析物を検出する方法であって、（ａ）分析物を第１の検出可能なプローブと接触させる工程であって、第１の検出可能なプローブは、（ｉ）第１の保持成分、（ｉｉ）１つ以上の標識成分、及び（ｉｉｉ）保持成分に結合した２つ以上の結合成分の第１のセットを含み、第１のセットにおける結合成分のうちの少なくとも１つは、分析物における第１のエピトープに結合する、接触させる工程；（ｂ）第１の検出可能なプローブの１つ以上の標識成分からのシグナルを取得する工程；（ｃ）分析物を第２の検出可能なプローブと接触させる工程であって、第２の検出可能なプローブは、（ｉ）第２の保持成分（ｉｉ）１つ以上の標識成分、及び（ｉｉｉ）保持成分に結合した２つ以上の結合成分の第２のセットを含み、第２のセットにおける結合成分のうちの少なくとも１つは、分析物における第２のエピトープに結合し、第２のエピトープは、第１のエピトープと比較して異なる化学的組成を有する、接触させる工程；及び（ｄ）第２の検出可能なプローブの１つ以上の標識成分からのシグナルを取得し、それにより分析物を検出する工程を含む、方法が提供される。任意に、第２の保持成分は、第１の保持成分と実質的に同じ構造を有する。

【０００９】

本開示はまた、組成物であって、（ａ）結合成分に結合した第１の構造化核酸粒子を有するプローブ；及び（ｂ）結合成分に対するエピトープに結合した第２の構造化核酸粒子を含む分析物であって、プローブは、エピトープへの結合成分の結合を介して分析物に結合されている、分析物を含む、組成物を提供する。特定の構成では、構造化核酸粒子の一方または両方には、核酸折り紙が含まれる。

【００１０】

また、組成物であって、（ａ）複数の異なるプローブであって、異なるプローブの各々は、結合成分に結合した第１の構造化核酸粒子を有し、異なるプローブの各々は、異なる結合成分を有する、複数の異なるプローブ；及び（ｂ）複数の異なる分析物であって、異なる分析物の各々は、異なる結合成分に対するエピトープに結合した第２の構造化核酸粒

子を有し、異なるプローブは、複数の異なる分析物のエピトープへの複数の異なるプローブの異なる結合成分の結合を介して異なる分析物に結合されている、複数の異なる分析物を含む、組成物が提供される。任意に、第１の構造化核酸粒子は、異なるプローブについて実質的に同じである。さらなる選択肢として、第２の構造化核酸粒子は、異なる分析物について実質的に同じであり得る。特定の構成では、構造化核酸粒子の一方または両方には、核酸折り紙が含まれる。異なるプローブの核酸折り紙には、ステープル構造が異なるプローブについて同じであるかまたは異なるかにかかわらず、同じ骨格核酸構造が任意に含まれ得る。代替的または付加的に、異なる分析物の核酸折り紙には、ステープル構造が異なる分析物について同じであるかまたは異なるかにかかわらず、同じ骨格核酸構造が任意に含まれ得る。

【００１１】

本明細書には、１つ以上の標識成分（例えば、検出可能な標識）を含む保持成分、及び保持成分にカップリングされた２つ以上の結合成分を含む検出可能なプローブであって、検出可能なプローブは、結合パートナーに対する２つ以上の結合成分のいずれかの解離定数よりも低い結合パートナーに対する解離定数を有する、検出可能なプローブが記載される。

【００１２】

いくつかの構成では、検出可能なプローブの１つ以上の標識成分は、検出可能なプローブの保持成分にカップリングされている。いくつかの実施形態では、保持成分には、閉鎖一本鎖核酸を有する骨格、及び骨格にハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドが含まれる。

【００１３】

いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬における保持成分には、骨格核酸が含まれる。骨格には、ファージゲノムまたはプラスミドからの、例えば、Ｍ１３ファージゲノムからの鎖が含まれ得る。任意に、保持成分には、複数のオリゴヌクレオチドがさらに含まれ得る。オリゴヌクレオチドは、骨格にアニーリングされて、例えば、折り紙構造におけるステープルを形成し得る。いくつかの構成では、複数のオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチドには、少なくとも１つの非天然ヌクレオチドが含まれ得る。任意に、オリゴヌクレオチドにおける非天然ヌクレオチドは、官能基、例えば、生体直交またはクリック反応において使用される官能基を有し得る。いくつかの構成では、１つ、２つまたはそれを超える結合成分は、複数のオリゴヌクレオチドの１つ以上のオリゴヌクレオチドに結合されている。いくつかの構成では、１つ、２つまたはそれを超える標識成分は、複数のオリゴヌクレオチドの１つ以上のオリゴヌクレオチドに結合されている。いくつかの構成では、骨格には、少なくとも１つの非天然ヌクレオチドが含まれ得る。任意に、骨格における非天然ヌクレオチドは、官能基、例えば、生体直交またはクリック反応において使用される官能基を有し得る。いくつかの構成では、１つ、２つまたはそれを超える結合成分は、骨格に結合されている。いくつかの構成では、１つ、２つまたはそれを超える標識成分は、骨格に結合されている。

【００１４】

いくつかの構成では、２つ以上の結合成分を有する検出可能なプローブまたは親和性試薬は、結合パートナーに対する２つ以上の結合成分のいずれかに対する解離定数未満である結合パートナーに対する解離定数を有する。例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、結合パートナーに対する２つ以上の結合成分のいずれかに対する解離定数の５０％、２５％、１０％またはそれ未満よりも低くまたはそれと同等である結合パートナーに対する解離定数を有し得る。いくつかの構成では、結合パートナーに結合される場合の検出可能なプローブまたは親和性試薬のオフ速度は、結合パートナーに結合される場合の２つ以上の結合成分のいずれかに対する個々のオフ速度よりも低い。いくつかの構成では、結合パートナーに対する検出可能なプローブまたは親和性試薬のオン速度は、結合パートナーに対する２つ以上の結合成分のいずれかに対する個々のオン速度よりも高い。

【００１５】

いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、第１のタイプのエピトープに対するゼロではない結合親和性及び第２のタイプのエピトープに対するゼロではない結合親和性を有する。例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、第１のタイプのエピトープに対する第１のゼロではない結合確率及び第２のタイプのエピトープに対する第２のゼロではない結合確率を有し得る。いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬の２つ以上の結合成分の第１の結合成分は、第１のタイプのエピトープに対する第１のゼロではない結合確率を有し、また、第２のタイプの標的部位に対する第２のゼロではない結合確率を有する。他の構成では、２つ以上の結合成分の第１の結合成分には、第１のタイプの標的部位に対する第１のゼロではない結合確率が含まれ、２つ以上の結合成分の第２の結合成分には、第２のタイプの標的部位に対する第２のゼロではない結合確率が含まれる。

【００１６】

いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬における結合成分のうちの少なくとも１つには、抗体またはその機能的断片が含まれ、検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合パートナーは、抗体またはその機能的断片に対するエピトープを有する。いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬における結合成分のうちの少なくとも１つには、アプタマーが含まれ、検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合パートナーは、アプタマーに対するエピトープを有する。

【００１７】

いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、少なくとも１つの結合成分を介して結合パートナーに結合される。任意に、結合パートナーは、２つ以上の結合成分を介して検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合され得る。結合パートナーは、ポリペプチドであり得る。結合成分のうちの少なくとも１つは、ポリペプチドにおけるダイマー、トリマーまたはテトラマーアミノ酸配列を認識するように構成され得る。任意に、ポリペプチドには、例えば、結合成分によって認識されるエピトープ内またはエピトープの外に存在する翻訳後修飾が含まれ得る。いくつかの実施形態では、結合パートナーには、非ポリペプチド物質、例えば、多糖、ポリマー、金属、セラミック、またはそれらの組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態では、非ポリペプチド物質には、多糖、ポリマー、金属、またはセラミックのナノ粒子が含まれる。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、結合パートナーに非共有結合され、または結合パートナーに共有結合され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合した結合パートナーは、溶液相中にあり、または固体支持体に結合され得る。任意に、結合パートナーは、それが結合する検出可能なプローブまたは親和性試薬の成分である構造化核酸粒子以外の構造化核酸粒子に結合され得る。構造化核酸粒子は、例えば、アレイの部位で、固体支持体への結合パートナーの結合を任意に媒介し得る。

【００１８】

２つ以上の結合成分を有する検出可能なプローブまたは親和性試薬の保持成分は、２つ以上の結合成分の第１の結合成分が２つ以上の結合成分の第２の結合成分と接触することを制約するように構成され得る。２つ以上の標識成分を有する検出可能なプローブまたは親和性試薬の保持成分は、２つ以上の標識成分の第１の標識成分が２つ以上の標識成分の第２の標識成分と接触することを制約するように構成され得る。標識成分及び結合成分を有する検出可能なプローブまたは親和性試薬の保持成分は、標識成分が結合成分と接触することを制約するように構成され得る。任意に、保持成分は、２つ以上の成分の第１の成分が２つ以上の成分の第２の成分の特定の距離、例えば、多くとも１ｎｍ、５ｎｍ、１０ｎｍ、２０ｎｍまたはそれを超える距離内に入ることを制約し得る。いくつかの構成では、制約は、角度的オフセットによる。例えば、角度的オフセットは、少なくとも約９０°または１８０°であり得る。いくつかの構成では、制約は、ブロック部位、例えば、保持成分に結合したブロック部位による。例示的なブロック部位には、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリエチレンオキシド（ＰＥＯ）、線状または分岐状アルカン鎖、またはデキストランが含まれるがこれらに限定されない。

【００１９】
検出可能なプローブまたは親和性試薬の保持成分には、第２のサイドからオフセットされた第１のサイドを有する三次元構造が含まれ得る。例えば、第１のサイドは、少なくとも約９０°または１８０°の角度的オフセットである第２のサイドからのオフセットを有し得る。任意に、検出可能なプローブまたは親和性試薬の１つ、いくつかまたはすべての結合成分は、第１のサイド上に存在するように制約され、第２のサイド上に存在することが制約され得る。いくつかの構成では、第１のサイド及び第２のサイドにはそれぞれ、１つ以上の結合成分が含まれ得る。さらなる選択肢として、検出可能なプローブまたは親和性試薬の１つ、いくつかまたはすべての標識成分は、保持成分の第１のサイド上に存在するように制約され、保持成分の第２のサイド上に存在することが制約され得る。いくつかの構成では、第１のサイド及び第２のサイドにはそれぞれ、１つ以上の標識成分が含まれ得る。したがって、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、保持成分の第１のサイド上で結合成分を保持しつつ、保持成分の別のサイド上で標識成分を保持するように構成され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、１つの、いくつかの、またはすべての結合成分が、１つの、いくつかの、またはすべての標識成分が存在する保持成分のサイド上に存在することを制約するように構成され得る。その上、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、１つの、いくつかの、またはすべての標識成分が、１つの、いくつかの、またはすべての結合成分が存在する保持成分のサイド上に存在することを制約するように構成され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の保持成分には、構造化核酸粒子（ＳＮＡＰ）、例えば、核酸ナノボールまたは核酸折り紙が含まれ得る。

【００２０】
検出可能なプローブまたは親和性試薬の１つ以上の標識成分には、例えば、光学的標識（例えば、フルオロフォア、ルミノフォア）、放射性標識、または核酸塩基標識（例えば、配列タグ）を含む多様な標識のいずれかが含まれ得る。いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬の２つ以上の標識成分は、重複するまたは区別できないシグナルを生成し得る。例えば、２つ以上の標識成分は、同じ波長で放射するように構成されたフルオロフォアであり得る。いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬の２つ以上の標識成分は、互いに分解されるシグナルを生成する。例えば、２つ以上の標識成分は、互いに異なる波長で放射するように構成されたフルオロフォアであり得る。

【００２１】
いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬の２つ以上の標識成分には、フェルスター共鳴エネルギー移動メカニズムにおけるドナー及びアクセプターが含まれる。代替的には、検出可能なプローブまたは親和性試薬の２つ以上の標識成分は、消光またはフェルスター共鳴エネルギー移動が起きないようにする距離で互いに分離され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の２つ以上の標識成分は、消光またはフェルスター共鳴エネルギー移動が起きないようにする相対的配向を有し得る。ＳＮＡＰを含む構成のため、第１の蛍光標識は、ＳＮＡＰにおける第１のヌクレオチド位置で結合され得、第２の蛍光標識は、ＳＮＡＰにおける第２のヌクレオチド位置で結合され得、第１のヌクレオチド位置は、構造化核酸粒子の一次配列における少なくとも３、４、５、６、７、８または９ヌクレオチド位置だけ第２のヌクレオチド位置から分離される。代替的または付加的に、第１のヌクレオチド位置は、構造化核酸粒子の一次配列における多くても９、８、７、６、５、４、３、２、または１ヌクレオチド位置だけ第２のヌクレオチド位置から分離され得る。

【００２２】
結合成分または標識成分は、リンカーによって検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合され得る。リンカーは、硬質リンカーまたは柔軟性リンカーであり得る。例示的な柔軟性リンカーには、ＰＥＧ、ＰＥＯ、アルカン鎖、一本鎖核酸、またはそれらの組み合わせが含まれるがこれらに限定されない。二本鎖核酸または分岐状アルカン鎖が硬質リンカーとして使用され得る。

【００２３】

いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬の外径は、それが結合する結合パートナーの外径よりも大きい。任意に、検出可能なプローブまたは親和性試薬の体積は、それが結合する結合パートナーの体積よりも大きい。

【００２４】

特定の構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬には、光学的に検出可能な保持成分が含まれ得る。例えば、１つ、２つまたはそれを超える結合成分が光学的に検出可能な保持成分に結合され得る。そのような構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、標識成分を含む必要はなく、検出は、光学的に検出可能な保持成分によって生成されるシグナルの観察に基づいて行われ得る。特に有用な光学的に検出可能な保持成分には、蛍光ナノ粒子、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）、または量子ドットが含まれるがこれらに限定されない。

【００２５】

別の態様では、本明細書には、光学的に検出可能な保持成分、及び光学的に検出可能な保持成分にカップリングされた２つ以上の結合成分を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬であって、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、結合パートナーに対する２つ以上の結合成分のいずれかの解離定数未満である結合パートナーに対する解離定数を有する、検出可能なプローブまたは親和性試薬が記載される。

【００２６】

別の態様では、本明細書には、光学的に検出可能な保持成分、及び光学的に検出可能な保持成分にカップリングされた２つ以上の結合成分を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬であって、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、結合パートナーに対する２つ以上の結合成分のいずれかの結合オン速度よりも高い結合パートナーに対する結合オン速度を有する、検出可能なプローブまたは親和性試薬が記載される。

【００２７】

別の態様では、本明細書には、光学的に検出可能な保持成分、及び光学的に検出可能な保持成分にカップリングされた２つ以上の結合成分を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬であって、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、結合パートナーに対する２つ以上の結合成分のいずれかの結合オフ速度よりも低い結合パートナーに対する結合オフ速度を有する、検出可能なプローブまたは親和性試薬が記載される。

【００２８】

別の態様では、本明細書には、分析物を検出可能なプローブと接触させることであって、分析物は、検出可能なプローブの結合パートナーである、接触させること、及び検出可能なプローブからのシグナルを取得し、それにより分析物を検出することを含む方法が記載される。方法には、取得されたシグナルから分析物を同定すること、または取得されたシグナルから分析物の化学的組成を決定することがさらに含まれ得る。いくつかの実施形態では、分析物には、ポリペプチドが含まれ、決定される化学的組成には、ポリペプチドの少なくとも一部のアミノ酸配列の存在または非存在、またはポリペプチドにおける翻訳語修飾されたアミノ酸の存在または非存在が含まれる。いくつかの実施形態では、方法には、取得されたシグナルから分析物を定量することがさらに含まれる。いくつかの実施形態では、方法には、取得されたシグナルから固体支持体上の分析物の位置を決定すること、例えば、分析物が存在するアレイにおける部位を同定することがさらに含まれる。いくつかの実施形態では、シグナルは、検出可能なプローブの光学的に検出可能な保持成分から取得される。いくつかの実施形態では、シグナルは、検出可能なプローブの１つ以上の標識成分から取得される。

【００２９】

別の態様では、本明細書には、（ａ）複数の異なる分析物を第１の複数の検出可能なプローブと接触させることであって、第１の複数の検出可能なプローブからの検出可能なプローブは、複数の異なる分析物からの異なる分析物の第１のサブセットに結合する、接触させること、（ｂ）第１の複数の検出可能なプローブからのシグナルを取得すること、（ｃ）複数の異なる分析物を第２の複数の検出可能なプローブと接触させることであって、

第２の複数の検出可能なプローブからの検出可能なプローブは、複数の異なる分析物からの異なる分析物の第２のサブセットに結合し、異なる分析物の第１のサブセットは、分析物の第２のサブセットとは異なる、接触させること、（ｄ）第２の複数の検出可能なプローブからのシグナルを取得すること、及び（ｅ）工程（ｂ）及び工程（ｄ）で取得されたシグナルに基づいて分析物を同定することを含む方法が記載される。任意に、第１の複数の検出可能なプローブには、第２の複数の検出可能なプローブと実質的に同じ２つ以上の結合成分が含まれる。代替的には、第１の複数の検出可能なプローブには、第２の複数の検出可能なプローブの２つ以上の結合成分とは異なる２つ以上の結合成分が含まれ得る。さらなる選択肢として、第１の複数の検出可能なプローブの１つ、いくつかまたはすべてには、保持成分が含まれ得る。任意に、保持成分は、第１の複数の検出可能なプローブのいくつかまたはすべてについての共通の構造を有し得る。例えば、検出可能なプローブのいくつかまたはすべてのための保持成分には、同じ折り紙構造、例えば、骨格フォールディング構造が含まれ得る。同様に、第１の複数の検出可能なプローブの１つ、いくつかまたはすべてのための保持成分は、第２の複数の検出可能なプローブの１つ、いくつかまたはすべてのための保持成分と共通する構造を有し得る。例えば、第１及び第２の複数の検出可能なプローブのいくつかまたはすべてのための保持成分には、同じ折り紙構造、例えば、骨格フォールディング構造が含まれ得る。

【００３０】

いくつかの構成では、上記方法には、工程（ｃ）の前に複数の異なる分析物から第１の複数の検出可能なプローブを除去する工程がさらに含まれ得る。上記方法のいくつかの構成では、第１の複数の検出可能なプローブは、１つ以上の標識成分によって生成されたシグナルとして第２の複数の検出可能なプローブと同じシグナルを生成する。例えば、第１の複数の検出可能なプローブには、第２の複数の検出可能なプローブと同じ１つ以上の標識成分が含まれ得る。上記方法のいくつかの構成では、第１の複数の検出可能なプローブには、第２の複数の検出可能なプローブの１つ以上の標識成分とは異なる１つ以上の標識成分が含まれる。上記方法のいくつかの構成では、第１の複数の検出可能なプローブには、第２の複数の検出可能なプローブと同じ光学的に検出可能な保持成分が含まれる。上記方法のいくつかの構成では、第１の複数の検出可能なプローブには、第２の複数の検出可能なプローブの光学的に検出可能な保持成分とは異なる光学的に検出可能な保持成分が含まれる。

【００３１】

親和性薬剤に結合されるまたは本明細書で示される方法において検出可能なプローブによって検出される１つ以上の異なる分析物は、固体支持体に結合され得る。例えば、複数の異なる分析物の個々の分析物は、固体支持体上のそれぞれの部位で結合され得、これにより固体支持体に分析物のアレイが含まれる。

【００３２】

結合パートナーを見つけ出す方法であって、（ａ）物質における個別の位置で結合パートナーを含む物質（例えば、固体支持体）を提供すること；（ｂ）物質を検出可能なプローブと接触させることであって、検出可能なプローブには、（ｉ）保持成分、（ｉｉ）検出可能なシグナルを生成するように構成された１つ以上の標識成分、及び（ｉｉｉ）保持成分にカップリングされた２つ以上の結合成分が含まれ、保持成分及び２つ以上の結合成分は、検出可能なプローブを形成する、接触させること；（ｃ）１つ以上の標識成分からの検出可能なシグナルを検出すること；及び（ｄ）検出可能なシグナルの個別の位置を同定し、それにより物質における結合パートナーを見つけ出すことを含む、方法が本開示よってさらに提供される。任意に、検出可能なプローブは、結合成分のいずれかへの結合パートナーの結合に対する解離定数よりも低いまたはそれと同等～半分の解離定数で結合パートナーを個々に結合させる。

【００３３】

また、検出可能なプローブまたは親和性試薬を形成する方法であって、（ａ）複数のカップリング基を含む保持成分を提供すること、及び（ｂ）複数のカップリング基のカップ

リング基を複数の結合成分に結合させることを含む、方法が提供される。任意に、方法には、（ｃ）複数のカップリング基のカップリング基を複数の標識成分に結合させることがさらに含まれる。

【００３４】

検出可能なプローブまたは親和性試薬の成分間の結合は、共有結合的または非共有結合的であり得る。核酸は、特に有用なカップリング基を提供する。例えば、上記方法におけるカップリング基には、結合成分及び／または標識成分に結合した相補的核酸にアニーリングする一本鎖核酸部位が含まれ得る。保持成分には、既知の位置で一本鎖核酸部位を配置するように操作された核酸折り紙が含まれ得る。例えば、一本鎖核酸部位は、骨格鎖にアニーリングされるステープル鎖またはオリゴヌクレオチドに含まれ得る。他の有用な非共有結合には、例えば、受容体－リガンド対、例えば、ストレプトアビジン－ビオチン、ＳｐｙＣａｔｃｈｅｒ－ＳｐｙＴａｇ、ＳｄｙＣａｔｃｈｅｒ－ＳｄｙＴａｇ、及びＳｎｏｏｐＣａｔｃｈｅｒ－ＳｎｏｏｐＴａｇによって媒介されるものが含まれる。

【００３５】

多様な官能基のいずれかは、検出可能なプローブまたは親和性試薬の成分を共有結合させるために使用され得る。生体直交反応及びクリック反応は、特に有用である。

【００３６】

検出可能なプローブまたは親和性試薬を作製するための方法は、保持成分上に不動態化層を形成する工程が含まれ得る。保持成分の不動態化は、例えば、官能基（例えば、カップリング基）、標識成分または結合成分を保持成分に結合させる前に行われ得る。任意に、不動態化層には、金属、金属酸化物、有機官能基、またはポリマーが含まれ得る。例えば、金属には、金、銀、銅、チタン、または鉄が含まれ得る。任意に、金属酸化物には、酸化チタン、アルミナ、二酸化ケイ素、または酸化マグネシウムが含まれる。任意に、有機官能基には、ホスフェート、ホスホネート、カルボキシレート、エポキシド、またはシランが含まれる。いくつかの実施形態では、ポリマーには、炭化水素ポリマーまたはバイオポリマーが含まれる。いくつかの実施形態では、炭化水素ポリマーには、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリエチレンオキシド（ＰＥＯ）、またはアルカン鎖が含まれる。いくつかの実施形態では、バイオポリマーには、多糖、ポリヌクレオチド、またはポリペプチドが含まれる。

【００３７】

本開示の検出可能なプローブには、二本鎖領域及びアプタマーが含まれ得；二本鎖領域には、２つ以上の標識成分が含まれ得る。例えば、標識成分は、鎖の一方または両方における蛍光標識されたヌクレオチドであり得る。任意に、蛍光標識されたヌクレオチドは、例えば、少なくとも５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０またはそれを超えるヌクレオチドだけ互いに分離され得る。任意に、二本鎖領域には、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれを超えるフルオロフォアまたは他の標識成分が含まれ得る。検出可能なプローブの２つ以上の標識成分は、互いに同じであり得、または互いに異なり得る。

【００３８】

任意に、検出可能なプローブまたは親和性試薬に含まれるアプタマー、または他の結合成分は、形態αＸβ（Ｘは、所望のエピトープであり、α及びβは、任意のアミノ酸残基である）のいくつかまたはすべての配列を認識し、またはそれに結合し得る。任意に、アプタマーは、形態αＸβの配列の少なくとも１０％、２０％、３０％、５０％、８０％または９０％を認識し、またはそれに結合し得る。

【００３９】

いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬に含まれるアプタマーまたは他の結合成分は、任意の他の３アミノ酸配列に特異的に結合することなく所望の３アミノ酸エピトープを認識し、またはそれに結合し得、所望のエピトープを囲む臨接配列にかかわらず実質的に同様の親和性で所望の３アミノ酸エピトープを結合させる。

【００４０】

別の態様では、本明細書には、ヒトプロテオームにおけるすべてのタンパク質の５％～１０％に結合するスイッチ可能なアプタマーが記載され；スイッチ可能なアプタマーには、２つ以上の蛍光部位が含まれる。

【００４１】

本開示は、蛍光標識されたアプタマーを製造する方法であって、方法は、３’末端でプライマー配列を有するアプタマーを合成すること、鋳型ＤＮＡ鎖をプライマー配列にハイブリダイズさせることであって、鋳型ＤＮＡ鎖には、プライマーに相補的なセグメント及び鋳型領域が含まれる、ハイブリダイズさせること、及びポリメラーゼを使用して鋳型に沿ってアプタマー分子の３’末端を伸長させることを含む、方法をさらに提供する。任意に、ポリメラーゼ反応は、標識されたヌクレオチドを含むヌクレオチドミックスを用いて実施される。例えば、ヌクレオチドの１つ以上の種には、標識が含まれ得る一方で、ヌクレオチドの他の種は、標識を欠く。例えば、ポリメラーゼ反応は、４つのヌクレオチド（アデニン、シトシン、グアニン、及びチミンまたはウラシル）を用いて行われ得、そのうち３つのヌクレオチドは、標識されておらず、４つ目のヌクレオチドは、蛍光標識されており、鋳型は、蛍光標識されたヌクレオチドに相補的な塩基が既定のパターンで生じるように設計される。任意に、蛍光標識されたヌクレオチドに相補的な塩基は、鋳型に沿って２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０番目の位置毎に生じ得る。

【００４２】

別の態様では、本明細書には、上述した蛍光標識されたアプタマーを製造する方法であって、方法は、アプタマーを蛍光標識されたオリゴヌクレオチドにライゲーションすることを含む、方法が記載される。別の構成では、蛍光標識されたアプタマーを製造する方法には、３’末端で伸長配列を有するアプタマーを合成すること、スプリント核酸鎖を伸長配列にハイブリダイズさせること、及び標識されたオリゴヌクレオチドを、標識されたオリゴヌクレオチドの末端が伸長配列の末端に隣接するようにスプリント核酸鎖にハイブリダイズさせること、ならびにリガーゼを使用して標識されたオリゴヌクレオチドを伸長配列を介してアプタマーにライゲーションすることが含まれ得る。

【００４３】

参照による組み込み

本明細書で言及されるすべての刊行物、特許、及び特許出願は、各々の個々の刊行物、特許または特許出願が具体的かつ個別に参照により本明細書に組み込まれることが示されているのと同じ程度に参照により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【００４４】

【図１Ａ】物体の２つの面間の角度的オフセットを有する物体を示している。
【図１Ｂ】物体の２つの面間の角度的オフセットを有する物体を示している。
【図２Ａ】四角形の保持成分のおおよそ二次元の突出を示している。
【図２Ｂ】円形の保持成分のおおよそ二次元の突出を示している。
【図３Ａ】２つの結合成分間の相対的分離を示している。
【図３Ｂ】２つの結合成分間の相対的分離を示している。
【図３Ｃ】２つの結合成分間の相対的分離を示している。
【図４Ａ】２つの結合成分を分離するための構成を示している。
【図４Ｂ】２つの結合成分を分離するための構成を示している。
【図４Ｃ】２つの結合成分を分離するための構成を示している。
【図４Ｄ】２つの結合成分を分離するための構成を示している。
【図５Ａ】保持成分上の標識成分に間隔を空けるための構成を示している。
【図５Ｂ】保持成分上の標識成分に間隔を空けるための構成を示している。
【図６Ａ】保持成分上の結合成分及び標識成分の構成を示している。
【図６Ｂ】保持成分上の結合成分及び標識成分の構成を示している。
【図６Ｃ】保持成分上の結合成分及び標識成分の構成を示している。

【図６Ｄ】保持成分上の結合成分及び標識成分の構成を示している。
【図６Ｅ】保持成分上の結合成分及び標識成分の構成を示している。
【図６Ｆ】保持成分上の結合成分及び標識成分の構成を示している。
【図７Ａ】結合成分のためのリンカーを含む検出可能なプローブの構成を示している。
【図７Ｂ】結合成分のためのリンカーを含む検出可能なプローブの構成を示している。
【図８】追加のアビディティ成分を有する検出可能なプローブの構成を示している。
【図９Ａ】検出可能なプローブのための弱い結合相互作用を生成するためのシステムの構成を示している。
【図９Ｂ】検出可能なプローブのための弱い結合相互作用を生成するためのシステムの構成を示している。
【図１０Ａ】検出可能なプローブのための弱い結合相互作用を生成するための方法を示している。
【図１０Ｂ】検出可能なプローブのための弱い結合相互作用を生成するための方法を示している。
【図１０Ｃ】検出可能なプローブのための弱い結合相互作用を生成するための方法を示している。
【図１１Ａ】２つの検出可能なプローブを用いて弱い結合相互作用を生成するための方法を示している。
【図１１Ｂ】２つの検出可能なプローブを用いて弱い結合相互作用を生成するための方法を示している。
【図１１Ｃ】２つの検出可能なプローブを用いて弱い結合相互作用を生成するための方法を示している。
【図１１Ｄ】２つの検出可能なプローブを用いて弱い結合相互作用を生成するための方法を示している。
【図１１Ｅ】２つの検出可能なプローブを用いて弱い結合相互作用を生成するための方法を示している。
【図１２Ａ】低強度の蛍光標識のためのセンサーピクセルの群についての蛍光強度測定結果を示している。
【図１２Ｂ】高強度の蛍光標識のためのセンサーピクセルの群についての蛍光強度測定結果を示している。
【図１３】結合パートナーとの非常に観察可能な検出可能なプローブの断面図を示している。
【図１４Ａ】保持成分上で蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）対を生成するための構成を示している。
【図１４Ｂ】検出可能なプローブ上で蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）対を生成するための構成を示している。
【図１５Ａ】核酸バーコードを利用する結合相互作用及び弱い二次相互作用を検出するための方法の第１の工程を示している。
【図１５Ｂ】核酸バーコードを利用する結合相互作用及び弱い二次相互作用を検出するための方法の第２の工程を示している。
【図１５Ｃ】核酸バーコードを利用する結合相互作用及び弱い二次相互作用を検出するための方法の第３の工程を示している。
【図１５Ｄ】核酸バーコードを利用する結合相互作用及び弱い二次相互作用を検出するための方法の第４の工程を示している。
【図１６Ａ】結合競合体を含む検出可能なプローブ組成物を示している。
【図１６Ｂ】結合競合体を含む検出可能なプローブ組成物を示している。
【図１７Ａ】捕捉剤として検出可能なプローブまたは親和性試薬を利用する方法を示している。
【図１７Ｂ】捕捉剤として検出可能なプローブまたは親和性試薬を利用する方法を示している。

【図１７Ｃ】ポリペプチドアッセイのための捕捉剤として検出可能なプローブまたは親和性試薬を利用する方法を示している。
【図１８Ａ】結合パートナーへの複数の検出可能なプローブの結合を検出する方法の第１の工程を示している。
【図１８Ｂ】結合パートナーへの複数の検出可能なプローブの結合を検出する方法の第２の工程を示している。
【図１８Ｃ】結合パートナーへの複数の検出可能なプローブの結合を検出する方法の第３の工程を示している。
【図１９Ａ】検出可能なプローブを利用してペプチド配列を決定する方法を示している。
【図１９Ｂ】検出可能なプローブを利用してペプチド配列を決定する方法を示している。
【図１９Ｃ】検出可能なプローブを利用してペプチド配列を決定する方法を示している。
【図１９Ｄ】検出可能なプローブを利用してペプチド配列を決定する方法を示している。
【図２０Ａ】結合競合体を利用して結合相互作用を変化させる方法を示している。
【図２０Ｂ】結合競合体を利用して結合相互作用を変化させる方法を示している。
【図２１Ａ】検出可能なプローブを製造する方法を示している。
【図２１Ｂ】検出可能なプローブを製造する方法を示している。
【図２２】複数の結合パートナーの特性化のための検出可能なプローブの使用を示している。
【図２３】ＤＮＡ折り紙保持成分を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬の簡略化概略図を示している。
【図２４Ａ】量子ドットベースの検出可能なプローブのための結合特性化データを示している。
【図２４Ｂ】量子ドットベースの検出可能なプローブのための結合特性化データを示している。
【図２５】ＤＮＡ折り紙保持成分を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬の簡略化概略図を示している。
【図２６】クリック反応を介して抗体ベースの結合成分を折り紙保持成分に結合させるためのスキームを示している。
【図２７】抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲートを含有するＳＤＳ－Ｐａｇｅゲルの画像を示している。
【図２８Ａ】ポリペプチド標的に対する検出可能なプローブについての結合データを示している。
【図２８Ｂ】ポリペプチド標的に対する検出可能なプローブについての結合データを示している。
【図２８Ｃ】ポリペプチド標的に対する検出可能なプローブについての結合データを示している。
【図２８Ｄ】ポリペプチド標的に対する検出可能なプローブについての結合データを示している。
【図２９Ａ】陰性対照ポリペプチドアレイに対する検出可能なプローブ結合の蛍光顕微鏡画像を示している。
【図２９Ｂ】陰性対照ポリペプチドアレイに対する検出可能なプローブ結合の蛍光顕微鏡画像を示している。
【図２９Ｃ】ポリペプチドアレイに対する検出可能なプローブ結合の蛍光顕微鏡画像を示している。
【図３０】ポリペプチド標的に対する検出可能なプローブについての結合データを示している。
【図３１Ａ】非核酸保持成分の構成を示している。
【図３１Ｂ】非核酸保持成分の構成を示している。
【図３１Ｃ】非核酸保持成分の構成を示している。
【図３１Ｄ】非核酸保持成分の構成を示している。

【図３２Ａ】非核酸保持成分を形成するための方法の第１の工程を示している。
【図３２Ｂ】非核酸保持成分を形成するための方法の第２の工程を示している。
【図３２Ｃ】非核酸保持成分を形成するための方法の第１の工程を示している。
【図３２Ｄ】非核酸保持成分を形成するための方法の第２の工程を示している。
【図３２Ｅ】非核酸保持成分を形成するための方法の第３の工程を示している。
【図３３】非核酸保持成分を形成する方法を示している。
【図３４Ａ】非核酸保持成分を含む検出可能なプローブの構成を示している。
【図３４Ｂ】非核酸保持成分を含む検出可能なプローブの構成を示している。
【図３４Ｃ】非核酸保持成分を含む検出可能なプローブの構成を示している。
【図３５Ａ】複数の検出可能なプローブから形成された多重プローブ複合体を示している。
【図３５Ｂ】複数の検出可能なプローブから形成された多重プローブ複合体を示している。
【図３５Ｃ】複数の検出可能なプローブから形成された多重プローブ複合体を示している。
【図３６Ａ】制御されたコンフォメーションを有する多重プローブ複合体を示している。
【図３６Ｂ】制御されたコンフォメーションを有する多重プローブ複合体を示している。
【図３７Ａ】非核酸保持成分から検出可能なプローブを形成するための方法の第１の工程を示している。
【図３７Ｂ】非核酸保持成分から検出可能なプローブを形成するための方法の第２の工程を示している。
【図３７Ｃ】非核酸保持成分から検出可能なプローブを形成するための方法の第３の工程を示している。
【図３８Ａ】薬物送達のために検出可能なプローブまたは親和性試薬複合体を利用する第１の工程を示している。
【図３８Ｂ】薬物送達のために検出可能なプローブまたは親和性試薬複合体を利用する第２の工程を示している。
【図３８Ｃ】薬物送達のために検出可能なプローブまたは親和性試薬複合体を利用する第３の工程を示している。
【図３８Ｄ】薬物送達のために検出可能なプローブまたは親和性試薬複合体を利用する第４の工程を示している。
【図３９Ａ】二次保持成分を用いて形成された多重プローブ複合体を示している。
【図３９Ｂ】二次保持成分を用いて形成された多重プローブ複合体を示している。
【図４０】捕捉剤として検出可能なプローブまたは親和性試薬を利用するアフィニティークロマトグラフィーシステムを示している。
【図４１】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブを調製するためのスキームを示している。
【図４２Ａ】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての特性化データを示している。
【図４２Ｂ】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての特性化データを示している。
【図４２Ｃ】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての特性化データを示している。
【図４２Ｄ】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての特性化データを示している。
【図４２Ｅ】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての特性化データを示している。
【図４２Ｆ】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての特性化データを示している。
【図４３Ａ】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての結合

特性化データを示している。
【図４３Ｂ】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての結合特性化データを示している。
【図４３Ｃ】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての結合特性化データを示している。
【図４３Ｄ】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての結合特性化データを示している。
【図４４Ａ】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての安定性特性化データを示している。
【図４４Ｂ】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての安定性特性化データを示している。
【図４４Ｃ】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての安定性特性化データを示している。
【図４５Ａ】ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての結合特性化データを示している。
【図４５Ｂ】Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）ベースのアプタマーについての結合特性化データを示している。
【図４５Ｃ】ＡＰＣベースのアプタマーについての結合特性化データを示している。
【図４５Ｄ】ＳｕｒｅＬｉｇｈｔ（商標）ＡＰＣベースのアプタマーについての結合特性化データを示している。
【図４６】異なる量の利用可能な親和性試薬結合部位を有するＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブについての結合データを示している。
【図４７】ｈｉｓタグ化Ｈｅｒ２（オンターゲット）及びミオグロビン（オフターゲット）への直接的結合またはプレアニーリングプロトコルで製造された蛍光ナノ粒子Ｂ１プローブについての結合データを示している。
【図４８】標的を含むペプチドの例示的なリストと共に、親和性試薬の選択のための固定化された標的を示している。
【図４９Ａ】本明細書に記載される標識された親和性試薬の概略図を提供する。
【図４９Ｂ】標識成分を酵素的伸長によって核酸プローブに結合させる方法を示している。
【図５０Ａ】親和性試薬を蛍光標識するためのいくつかの例示的な方法を示している。結合した単一のフルオロフォアを有するアプタマーを示している。
【図５０Ｂ】親和性試薬を蛍光標識するためのいくつかの例示的な方法を示している。二本鎖核酸標識領域を有するアプタマーを示しており、標識領域は、結合した２つのフルオロフォアを有する。
【図５０Ｃ】親和性試薬を蛍光標識するためのいくつかの例示的な方法を示している。鋳型を使用したアプタマーへの複数の規則的に間隔が空けられたフルオロフォアの結合を示している。
【図５１】フルオロフォアを含む核酸の一本鎖にハイブリダイズされた、アプタマーを含む核酸の一本鎖を含む標識されたプローブを示している。
【図５２】二本鎖ＤＮＡを示すために４８８ｎｍで及び組み込まれたフルオロフォアを示すために６４７ｎｍで可視化されたゲルを示している。これらの標識された親和性試薬は、酵素的伸長及びフルオロフォアで修飾されたヌクレオチドの組み込みによって生成された。
【図５３Ａ】二本鎖ＤＮＡを示すために４８８ｎｍで可視化されたゲルを示している。
【図５３Ｂ】組み込まれたフルオロフォアを示すために６４７ｎｍで可視化されたゲルを示している。これらの標識された親和性試薬は、酵素的伸長及び化学的に修飾されたヌクレオチドの組み込みによって生成された。その後、いくつかの実施形態に従って、化学的コンジュゲーションを使用してフルオロフォアを組み込んだ。
【図５４】標識されたアプタマー濃度を示している。

【図５５Ａ】図５４の標識されたアプタマーにおけるフルオロフォア濃度を示している。
【図５５Ｂ】図８Ａにおけるフルオロフォア濃度を決定するために使用されたｄＵＴＰ－６４７標準曲線を示している。
【図５６】図５４及び５５から計算されたフルオロフォア：ＤＮＡ比を示している。
【図５７Ａ】固定化されたペプチドに結合した標識されたアプタマーを示している。
【図５７Ｂ】固定化された標的ペプチドへの標識されたアプタマーの結合を示している。
【図５７Ｃ】固定化された非標的ペプチドへの標識されたアプタマーの結合を示している。
【図５７Ｄ】アミンコーティングされたカバースリップ上の限界希釈での標識されたアプタマーの顕微鏡検査を示している。
【図５８Ａ】検出可能なプローブとＳＮＡＰが結合したポリペプチドとの間の結合反応を示している。
【図５８Ｂ】複数の検出可能なプローブとＳＮＡＰが結合したポリペプチドのアレイとの間の結合反応を示している。
【発明を実施するための形態】
【００４５】
親和性試薬と結合標的との間の相互作用の検出は、物理的システムの空間的及び／または時間的特性化及び／または定量を提供するために有用であり得る。例えば、親和性試薬ベースの方法、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）は、生化学的サンプル内のバイオマーカーの存在及び潜在的には量を決定するために使用され得る。親和性試薬は、複雑な挙動、例えば、予期しないまたは考えにくい標的との相互作用、または予期された標的と相互作用の不良を示し得る。バルクまたは大規模特性化において、親和性試薬は、それらの挙動の複雑な態様が実験誤差内に入り、それにより使用可能な相互作用データを生成する十分な程度まで操作され得る。しかしながら、親和性試薬を利用する単一分子アッセイの場合、複雑な親和性試薬の挙動は、単一分子親和性試薬の相互作用データの解明を複雑にする異例の結果（例えば、偽陰性、偽陽性）を生成し得る。
【００４６】
親和性試薬と結合パートナーとの間の結合相互作用に影響を及ぼす多様な要素により、結合は、一時的であり得る。いくつかの場合では、親和性試薬は、結合パートナーと自由に会合及び解離し得る。他の場合では、親和性試薬は、安定なまたは準安定な複合体を生成するために十分な強度で結合パートナーと相互作用し得る。さらに、いくつかの場合では、親和性試薬は、予期しないまたは考えにくい結合パートナーと会合し得る。
【００４７】
親和性試薬と結合パートナーとの間の相互作用の複雑な特質により、いくつかの親和性試薬相互作用は、従来の二元相互作用フレームワーク（すなわち、単一の結合パートナー、結合または非結合）内に当てはまらない場合がある。例えば、１）親和性試薬が結合パートナーの十分な近接範囲内に入ることができないこと；２）会合の観察が行われる場合に時間間隔中に親和性試薬が結合パートナーと会合したままではないこと；または３）親和性相互作用を遮断または減弱させる環境（例えば、結合パートナーまたは親和性試薬のコンフォメーション的変化）を含む、様々な理由により利用可能な結合パートナーとの相互作用する親和性試薬が観察されない場合がある。同様に、親和性試薬は、１）親和性相互作用を強める環境変化；または２）会合の観察が行われる場合の時間間隔内で生じる一時的会合等の様々な理由により予期しないまたは考えにくい標的への結合が観察され得る。
【００４８】
結果的に、いくつかの親和性試薬相互作用は、確率的または確率論的フレームワーク（例えば、複数の結合パートナー、各標的に結合するゼロではない確率）内で最も良好に説明され得る。親和性試薬結合のための確率的または確率論的モデルは、単一相互作用測定がかならずしも決定的な特性化を提供するわけではない場合がある単一分子アッセイのために特に有用であり得る。そのような状況では、複数のラウンドまたはサイクルの測定は

、測定信頼性を増加させ得る。

【００４９】

親和性試薬は、特定の条件で常に最適に挙動するわけではない場合があるが、親和性試薬は、所定の目的のためにそれらの挙動を増加または改善するために操作され得る。修飾され得る親和性試薬挙動の２つの態様には、アビディティ及び観察可能性が含まれる。

【００５０】

アビディティは、親和性試薬と結合パートナーとの間の複数の、しばしば相乗的な結合相互作用の存在により、親和性試薬が結合パートナーに結合したままとなる傾向として理解され得る。複数の結合相互作用は、例えば、親和性試薬によって認識される複数の異なるエピトープを有する結合パートナーにより、及び／または結合パートナーにおけるエピトープを認識する複数の結合成分を有するプローブにより生じ得る。そのような現象の一般的な例は、抗体のアビディティであり、その場合、アビディティは、しばしば、結合パートナーと抗体上の任意の個々の結合部位との間の結合強度よりも高い見かけの結合強度を生成するために特定の標的への単一の抗体上の複数の結合部位の弱い結合を介して達成される。

【００５１】

観察可能性は、親和性試薬とその結合パートナーとの間の結合相互作用を検出する能力として理解され得る。例えば、観察可能性は、親和性試薬が親和性試薬とその結合パートナーとの間の相互作用中に検出される傾向を指し得る。いくつかの構成では、観察可能性は、親和性試薬が、親和性試薬とその結合パートナーとの間の相互作用後に検出され得るシグナルまたはシグナル生成タグ（例えば、核酸タグ）を生成する傾向を指し得る。観察可能性は、親和性試薬が検出中に十分な時間間隔で相互作用を維持する能力及び相互作用の検出可能なシグナルを減弱させ得るメカニズム（例えば、フォトブリーチング、標識成分の切断）に対する親和性の耐性の両方によって影響を受け得る。

【００５２】

本明細書には、結合パートナーに対する向上したアビディティを有するプローブを含む組成物が記載される。いくつかの構成では、プローブは、検出可能であり、任意に、向上した観察可能性を有する。本明細書に記載の組成物、例えば、親和性試薬及び検出可能なプローブは、例えば、複数のラウンドまたはサイクルの親和性試薬相互作用が測定される構成を含む単一分子特性化アッセイのために特に有用であり得る。組成物は、１つ以上の結合パートナーに対する向上したアビディティの特性を任意に有する一方で、例えば、結合パートナーからの除去を可能として複数のサイクルまたはラウンドの結合測定を可能とするために、可逆的結合のためにも構成される。組成物は、親和性薬剤相互作用が測定されるシステムのバックグラウンドシグナルを十分に超えるシグナルレベルで標識の観察及び測定を可能とする調整可能な検出標識を任意に保有し得る。

【００５３】

いくつかの構成では、本明細書に記載の検出可能なプローブまたは親和性試薬は、複数の結合成分及び複数の標識成分（例えば、検出標識）の一方または両方と会合した保持成分を含むものとして特性化され得る。複数の結合成分は、特定の結合パートナーに対する検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合のための向上したアビディティを可能とする構成で保持成分上に提示され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の親和性は、その特定の結合パートナーに対する個々の結合成分のいずれか１つの親和性を超え得る。いくつかの構成では、結合パートナーに対する検出可能なプローブまたは親和性試薬のアビディティは、結合パートナーに対する複数の結合成分の親和性の合計を超え得る。その上、複数の標識成分は、検出標識によって生成される検出可能なシグナルを向上させる様式で検出可能なプローブまたは親和性試薬の保持成分上で提示され得る。例えば、シグナルは、強度、継続期間または特異性に関して向上し得る。特定の構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、親和性試薬とその結合パートナーとの間の相互作用を破壊するであろう化学種（例えば、界面活性剤、変性剤）の存在下で安定である特性をさらに保有し、それにより検出可能なプローブまたは親和性試薬の構造を損傷または破壊することな

く結合パートナーからの検出可能なプローブまたは親和性試薬の除去を可能とし得る。

【００５４】

いくつかの構成では、記載される検出可能なプローブまたは親和性試薬は、複数の結合成分（例えば、抗体、抗体断片、ミニタンパク質、ＤＡＲＰｉｎ、ＤＮＡアプタマー、ＲＮＡアプタマー等）及び／または複数の標識成分（例えば、フルオロフォア、核酸タグ、量子ドット、蛍光ナノ粒子、蛍光タンパク質）にカップリングされた保持成分として核酸折り紙を用いる。いくつかの構成では、核酸折り紙ベースの保持成分は、既定の位置で複数の結合成分及び／または複数の標識成分の結合を可能とする規則的または対称的形状を保有し得る。例えば、成分は、互いに既定の距離分離され得、成分は、相乗的機能を達成するように配向され得、または成分は、互いの活性の阻害を減少または防止するように配向され得る。間隔及び配向を調節する能力は、所望の検出特性、例えば、フルオロフォア標識間の減少した消光またはフルオロフォア標識間の向上したフェルスター共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）をもたらし得る。代替的または付加的に、間隔及び配向は、１つ以上の結合パートナーに対する親和性試薬の親和性を調整するために調節され得る。

【００５５】

特定の構成では、検出可能なプローブは、光学的に検出可能な粒子を用い得る。粒子は、複数の結合成分が結合され得る修飾可能な修飾可能な表面を有し得る。光学的に検出可能な粒子には、蛍光または発光ナノ粒子（例えば、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）、または量子ドット）が含まれ得る。修飾可能な表面コーティングには、ヒドロゲルまたはポリマーが含まれ得る。そのような構成では、光学的に検出可能な粒子は、検出可能なプローブへの結合成分の結合のための保持成分として及びプローブの検出のための標識成分としての両方として機能し得る。いくつかの構成では、光学的に検出可能な粒子の表面コーティングは、検出可能なプローブへの結合成分の結合のための保持成分として機能し得る。

【００５６】

さらなる構成では、２つ以上の検出可能なプローブは、検出可能なプローブの複合体を形成するために組み合わされ得る。同様の複合体は、２つの親和性試薬間または親和性試薬と検出可能なプローブとの間で作製され得る。プローブ及び／または試薬の複合体は、同様の親和性（例えば、一価プローブまたは試薬）または異なる親和性（例えば、多価プローブ）の結合成分を保有し得る。

【００５７】

いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、競合体親和性試薬と組み合わされ、またはそれにカップリングされる。競合体親和性試薬は、遊離分子として、または検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合した結合成分として構成され得る。競合体親和性試薬は、対象となる結合パートナーに対する低下した親和性または特異性を有し、いくつかの場合では、非競合体親和性試薬よりも高い広域（ｐｒｏｍｉｓｃｕｉｔｙ）レベルをもたらす。競合体親和性試薬の存在は、特定の結合パートナーに対する検出可能なプローブまたは親和性試薬のアビディティを向上させ得る。

【００５８】

本開示は、結合パートナーに対する向上したアビディティ及び向上した観察可能性を有する検出可能なプローブまたは親和性試薬を含む組成物を使用して分析物を検出するための方法を提供する。方法は、ポリペプチドを検出する際に使用するために本明細書で例示される。分析化学アッセイ、生化学アッセイ、分子診断アッセイ、分子法医アッセイ、品質制御アッセイ等によって標的とされるもの等の多様な分析物のいずれかが使用され得ることが理解される。

【００５９】

異種ポリペプチドサンプルの特性化及び定量は、しばしば、多種多様な量のタンパク質及び／またはペプチドの共存によって妨害される。例えば、低コピー数のタンパク質からのシグナルは、定量的特性化アッセイにおいて高コピー数のタンパク質からのシグナルによってかき消され得る。プロテオームレベル（例えば、数万の独自のタンパク質種）で実施されるポリペプチド特性化アッセイの精度は、高感度分析技術及び高信頼性予測技術の

組み合わせから利益を受け得る。

【００６０】

生物学的分析は、生物学的システムの分子の働きを検査するために利用可能なツールにおける進歩から大いに利益を受け得る。ゲノミクス技術、シングルセル分析プラットフォーム、及び高感度化学的分析システムにおける進歩は、生物学的システムがどのように機能するかに対する研究者及び臨床医の観点を大いに改善し、ひいては、疾患及び他のヒト健康状態の理解、処置及び予防を改善し得る。

【００６１】

これらの進歩したツールの多くは、異なる生物学的分子と結合し、またはそうでなければ会合することができる検出可能な試薬の使用から利益を受け、その場合、結合により所与のシステムにおけるそのような分子の存在及び／または定量の同定が可能となり、その存在及び／または量は、システムの機能性に対する洞察を提供する。例として、これらのツールの多くは、支持構造、例えば、固定された基材またはビーズ上の生物学的システムからの異なる分子種、例えば、タンパク質、核酸等の固定化を提供する。親和性試薬とも呼ばれる、異なる分子種に対するあるレベルの結合親和性を有する分子は次いで、生物学的サンプルにおける特定の分子の潜在的存在を示す、親和性試薬が結合するかどうか、どこで結合するか、及び／またはどのぐらいの長さ結合するかを確認するために、その２つを互いに接触させることによって結合した分子を調べるために使用され得る。

【００６２】

結合の検出は、典型的には、親和性試薬の標識成分の検出を介して達成され得る。標識成分は、親和性試薬の内在部分であり得るのに対し、多くの場合、標識成分は、親和性試薬に結合した外因性化学的または構造的部位であり得る。標識成分を有する親和性試薬は、検出可能なプローブとして機能し得る。

【００６３】

例えば、光学的に検出可能な標識、例えば、蛍光色素標識、酵素（例えば、着色試薬または生成物との反応を触媒する酵素）、電気化学的標識、例えば、高度に帯電した標識基、またはさらに核酸増幅プロセス、シーケンシングプロセスまたはハイブリダイゼーションアッセイを介して後に同定され得る核酸バーコード標識等の、後続処理を介して検出される基を含む多様な外因性の検出可能な標識が通常はそのような目的のために有用であり得る。蛍光標識は、親和性試薬と他の分子、例えば、タンパク質またはペプチドとの間の結合相互作用の可視化のために有用である。

【００６４】

親和性試薬または検出可能なプローブが使用される用途に応じて、異なる程度のシグナル強度が所望であり、または必要とさえされ得る。例として、多くの用途において、結合シグナルの増幅は、多くの親和性試薬または検出可能なプローブの結合を介して達成され得る。例えば、サンプルは、単一の検出可能な部位の複数の分子が単一位置に集められ、よって、より容易に観察または検出されるように分離され得る。代替的または付加的に、後に別々の標識成分が結合及び検出され得る複数の追加の結合部位を提示するために二次結合システムが使用され得る。

【００６５】

いくつかの場合では、しかしながら、定量的様式でサンプルにおける単一分子への親和性試薬または検出可能なプローブの単一分子の結合を可視化することが有用であり得る。理解されるように、個々の分子の検出は、検出の観点から多くの課題を提示する。１つのそのような課題は、生のシグナル強度、及びシステムのバックグラウンドノイズの強度に対するシグナル強度の両方の観点から、利用可能な分析的システムによって検出されるための十分なシグナルの強さ（例えば、シグナル強度及び継続期間）を有する単一分子への試薬またはプローブの単一分子の結合からの検出可能なシグナルを提示する能力である。

【００６６】

シグナル強度の課題は、多数のアプローチを介して、単独でまたは組み合わせて対処され得る。例えば、高感度顕微鏡検査技術の使用は、低い強度及び／または短い継続期間を

有する単一分子シグナルを含む、極めて低いレベルのシグナルを検出する能力を向上させ得る。また、シグナル強度は、複数の標識成分（例えば、単一分子、例えば、親和性試薬分子または検出可能なプローブ分子上の複数の標識成分）の組み込みを介して増加して、単一分子に関連するシグナルを有意に増加させ、よって、その検出可能性を改善し得る。この場合もまた、例として、蛍光標識の場合、シグナル強度の増加は、単一の親和性試薬または検出可能なプローブにおいていくつかの蛍光部位を結合させることによって達成され得る。しかしながら、プローブまたは試薬に蛍光色素標識を単純に搭載することは、それ自体の課題のセットを提起し得る。プローブまたは試薬上のある蛍光部位がプローブまたは試薬上の別の蛍光部位を消光しないように、プローブまたは試薬上の蛍光部位の数が制御され得るように、及びこれらの標識基をプローブまたは試薬に結合させる化学がプローブ自体の結合親和性を妨害しないように、プローブまたは試薬を構成するために注意が払われ得る。

【００６７】

特に有用な親和性試薬及び検出可能なプローブは、特定のタンパク質、代謝産物、細胞または細胞界面に結合することができる。そのような親和性試薬及び検出可能なプローブの例には、天然に存在するアミノ酸から構成されるタンパク質ベースのプローブ、小分子プローブ、天然に存在する塩基から構成される核酸ベースのプローブ、ならびに非天然ヌクレオチド及びアミノ酸から構成されるプローブが含まれ得る。試薬は、専ら所与のエピトープまたは他の標的に結合するように構成され得る。

【００６８】

結合の独占性は、しばしば、親和性試薬または検出可能なプローブにおける所望の特質とみなされる。親和性試薬またはプローブが、他の標的への最小の結合を伴って、１つのみの標的種に結合することを確保するために多大な努力がなされている。例えば、標的種は、アミノ酸の特定の配列であり得る。その配列が生物学的サンプルに見られるタンパク質に独自である場合、そのときはその配列に特異的な試薬またはプローブは、サンプルの環境においてタンパク質に特異的となる。このように、試薬またはプローブは、サンプルにおけるタンパク質を同定するために、またはさらに定量するために使用され得る。本明細書でさらに詳細に示されるように、サンプルにおける１つ以上の異なるタンパク質に結合する親和性試薬または検出可能なプローブを有することが有用であり得る特定の使用例が存在する。例えば、有用な親和性試薬または検出可能なプローブは、２つ以上の異なるタンパク質に共通のエピトープに結合し得る。代替的または付加的に、プローブまたは試薬は、２つ以上の異なるエピトープに結合し得、エピトープは、異なるタンパク質にまたは同じタンパク質の異なる領域に存在する。サンプルにおける複数の標的に結合する親和性プローブ及び検出可能なプローブは、本明細書で示される組成物及び方法において有用な効果のために用いられ得る。

【００６９】

本明細書で使用される用語は、別途特定されない限り、関連する技術分野におけるそれらの通常の意味を持つように理解される。本明細書で使用されるいくつかの用語及びそれらの意味が以下に示されている。

【００７０】

本明細書で使用される場合、用語「親和性試薬」は、特異的に、再現的にまたは高い確率を伴って結合パートナーに結合することが可能な分子または他の物質を指す。特異的結合は、結合定数、例えば、10^{-4}Ｍ、10^{-6}Ｍ、10^{-8}Ｍ、10^{-10}Ｍ、10^{-12}Ｍ、10^{-14}Ｍ未満またはそれより低い解離定数（K_D）の観点から特性化され得る。高い確率は、少なくとも０．２５、０．５、０．５１、０．７５、０．９、０．９９またはそれを超える（０～１のスケール）確率として特性化され得る。親和性試薬は、その結合パートナーよりも大きく、それよりも小さく、またはそれと同じサイズであり得る。親和性試薬は、結合パートナーと可逆的または不可逆的相互作用を形成し得る。親和性試薬は、共有結合的または非共有結合的様式で結合パートナーと結合し得る。親和性試薬は、典型的には、非触媒作用性かつ化学的非反応性であり、それにより本明細書で示される

方法においてそれが結合する結合パートナーの化学的構造を永続的に変化させない。代替的には、親和性試薬は、それが結合する結合パートナーにおける検出可能の変化をもたらす化学的修飾（例えば、ライゲーション、切断、連結等）を触媒し、またはそれに関与するように構成され得る。任意に、反応の生成物は、相互作用の検出を可能とし得る。親和性試薬には、反応性親和性試薬（例えば、キナーゼ、リガーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ等）または非反応性親和性試薬（例えば、抗体、抗体断片、アプタマー、ＤＡＲＰｉｎ、ペプタマー等）が含まれ得る。親和性試薬には、結合パートナーとの結合を媒介または容易化する１つ以上の既知の及び／または特性化された結合成分または結合部位（例えば、相補性画定領域）が含まれ得る。したがって、親和性試薬は、一価（例えば、単一の結合成分のみを有する）、二価（例えば、２つの結合成分のみを有する）、三価（例えば、３つの結合成分のみを有する）、四価（例えば、４つの結合成分のみを有する）または多価（例えば、２つ以上の結合成分を有する）であり得る。例示的な親和性試薬には、米国仮出願番号６３／１１２，６０７（参照により本明細書に組み込まれる）に示される検出可能なプローブ及びプローブが含まれる。

【００７１】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、または結合パートナーに特異的に結合するその機能的断片を指す。抗体は、結合パートナー内の１つ以上のエピトープに対する特異性を有し得る。抗体は、天然に存在するもの、操作されているもの、または進化したものであり得る。抗体には、相補性決定領域（ＣＤＲ）断片、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、シングルドメイン抗体、キメラ抗体、ダイアボディ、及びポリペプチドであって、特異的エピトープ結合をそのポリペプチドに付与するために十分な免疫グロブリンの少なくとも一部を含有する、ポリペプチドが含まれ得る。線状抗体もまた、本明細書に記載の目的のために含まれる。例示的な抗体には、免疫グロブリンアイソタイプ、例えば、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＧ、ＩｇＤ、及びＩｇＥが含まれる。例示的な抗体断片には、Ｆ（ａｂ’）２断片、Ｆａｂ’断片、Ｆａｂ断片、Ｆｖ断片、ｓｃＦＶ断片、ｒｌｇＧ断片、及びＦｃ断片が含まれる。

【００７２】

本明細書で使用される場合、用語「おおよそ」は、形状に関連して使用される場合、形状の２つ以上の尺度に関して理想的形状の２０％以内の形状を意味し得る。例えば、図２Ａ～２Ｂは、おおよそ四角形及びおおよそ円形の二次元物体２１０及び２１５をそれぞれ示しており、四角計２２０または円形２２５の理想的境界が破線で示されている。本明細書で使用される場合、用語「おおよそ」は、長さ、面積、または体積に関連して使用される場合、所与の測定の１０％以内の長さ、面積、または体積を意味し得る。例えば、１０ミリメートル（ｍｍ）の長さは、９ｍｍ～１１ｍｍの間の任意の長さを指し得る。

【００７３】

本明細書で使用される場合、用語「アレイ」は、分析物が互いに区別され得るように独自の識別子と会合した分析物（例えば、タンパク質）の集団を指す。独自識別子は、分析物と会合され、アレイにおける他の識別子とは区別される固体支持体（例えば、粒子またはビーズ）、構造化核酸粒子、保持成分、固体支持体上の部位（例えば、空間的場所）、タグ、標識（例えば、ルミノフォア）、またはバーコード（例えば、核酸バーコード）であり得る。分析物は、結合によって、例えば、共有結合的または非共有結合的（例えば、イオン結合、水素結合、ファンデルワールス力、静電気等）結合を介して独自識別子と会合され得る。アレイには、異なる独自識別子にそれぞれ結合した異なる分析物が含まれ得る。アレイには、同じまたは同様の分析物に結合した異なる独自識別子が含まれ得る。アレイには、異なる分析物をそれぞれ保有する別々の固体支持体または別々の場所が含まれ得、異なる分析物は、固体支持体または場所の位置に従って同定され得る。アレイに含まれ得る分析物または他の分子は、例えば、核酸、例えば、ＳＮＡＰ、ポリペプチド、酵素、親和性試薬、結合パートナー、リガンド、または受容体であり得る。

【００７４】

本明細書で使用される場合、用語「結合した」は、２つの物が互いに接続、締結、接着

、接続または結合されている状態を指す。例えば、結合成分は、共有結合的または非共有結合的結合によって保持成分に結合され得る。共有結合は、原子間の電子対の共有によって特性化される。非共有結合は、電子対を共有することを伴わない化学的結合であり、例えば、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力、親水性相互作用及び疎水性相互作用を含み得る。

【００７５】

本明細書で使用される場合、用語「結合親和性」または「親和性」は、親和性試薬と結合パートナー、エピトープまたは標的部位との間の結合の強度または程度を指す。いくつかの場合では、結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対する親和性試薬の結合親和性は、無視できるほど小さくまたは事実上ゼロであり得る。結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対する親和性試薬の親和性試薬の結合親和性は、「高親和性」、「中親和性」、または「低親和性」として適格であり得る。結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対する親和性試薬の結合親和性は、相互作用が約１００ｎＭ未満の平衡解離定数（（K_D）を有する場合の「高親和性」、相互作用が約１００ｎＭ～１ｍＭの解離定数を有する場合の「中親和性」、及び相互作用が約１ｍＭを超える解離定数を有する場合の「低親和性」として定量され得る。結合親和性は、例えば、平衡解離定数、平衡会合定数（K_A）、会合速度定数（k_{on}）、解離速度定数（k_{off}）等の生化学の分野で知られている用語で記載され得る。例えば、Ｓｅｇｅｌ，Ｅｎｚｙｍｅ Ｋｉｎｅｔｉｃｓ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９７５）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【００７６】

本明細書で使用される場合、用語「結合成分」は、親和性試薬の部位であって、その部位は、特異的に、再現的にまたは高い確率を伴って結合パートナーに結合することが可能であるものを指す。例示的な結合成分には、抗体またはその機能的断片（例えば、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ジ－ｓｃＦｖ、トリ－ｓｃＦｖ、マイクロ抗体、イントラボディ、アフィボディ、アフィリン、アフィマー、アフィチン、アルファボディ、アンチカリン、アビマー、ＤＡＲＰｉｎ、クーニッツドメインペプチド、モノボディ、ナノＣＬＡＭＰ、ミニ－ペプチド結合剤等）、レクチンまたはその機能的断片、アビジン、ストレプトアビジン、アプタマー、一本鎖または二本鎖のいずれかである核酸、または本明細書で示されるまたは当該技術分野で知られている他の親和性試薬が含まれるがこれらに限定されない。例示的な結合成分には、米国仮出願番号６３／１１２，６０７（参照により本明細書に組み込まれる）に示されるプローブが含まれる。

【００７７】

本明細書で使用される場合、用語「結合背景」は、親和性試薬－結合パートナー相互作用が観察される環境条件を指す。環境条件には、親和性試薬と結合パートナーとの間の相互作用に影響を及ぼし得る任意の要素、例えば、温度、流体特性（例えば、イオン強度、ｐＨ）、相対濃度、絶対濃度、流体組成、結合パートナーコンフォメーション、親和性試薬コンフォメーション、及びそれらの組み合わせが含まれ得る。環境条件には、エピトープの外にあるが、エピトープと結合試薬との相互作用に影響を及ぼす結合パートナーの構造的特徴が含まれ得る。構造的特徴には、例えば、ポリペプチドの一次、二次、三次または四次構造におけるエピトープに近接したポリペプチドのアミノ酸または領域が含まれ得る。

【００７８】

本明細書で使用される場合、用語「結合パートナー」は、親和性試薬または結合成分によって認識される分子または他の物質を指す。親和性試薬は、サンプルにおける他の分子または物質に対して特定の結合パートナーを特異的にまたは再現的に認識し得る。代替的には、親和性試薬は、サンプルにおける複数の異なる結合パートナーを認識し得、例えば、異なるポリペプチドのより大きなセット中で異なるポリペプチド配列のサブセットに広域に結合する。結合パートナーは、そのような相互作用が生じるかどうかにかかわらず、親和性試薬と相互作用を形成することが可能であり得る。結合パートナーには、１つ以上

のエピトープが含まれ得る。結合パートナーは、硬質構造、例えば、ナノ粒子またはマイクロ粒子を有し得る。結合パートナーは、融解または動的構造（例えば、球状タンパク質、球状ポリマー）を有し得る。結合パートナーは、溶液相または固相であり得る。例えば、結合パートナーは、親和性試薬を含有する溶液内で遊離している場合があり、または親和性試薬が接近し得る表面または界面で局在化され得る。結合パートナーは、構造化核酸粒子（例えば、核酸折り紙）または保持成分に結合され得る。

【００７９】

本明細書で使用される場合、用語「結合確率」は、親和性試薬が、例えば、固定された結合背景内の結合パートナー及び／またはエピトープと相互作用することが観察され得る確率を指す。結合確率は、別々の数字（例えば、０．４または４０％）として、個別の数字のマトリックスとして、または数学的モデル（例えば、理論的または例証的モデル）として表され得る。結合確率には、結合特異性、標的エピトープを見つけ出す可能性、または結合相互作用が検出されるために十分な時間結合する可能性を含む１つ以上の要素が含まれ得る。全体的結合確率には、すべての要素が結合背景に対して重みが加えられた場合の結合確率が含まれ得る。

【００８０】

本明細書で使用される場合、用語「結合特異性」は、他の結合パートナーまたはエピトープに対して結合パートナーまたはエピトープと優先的に相互作用する親和性試薬の傾向を指す。親和性試薬は、任意の可能性のある結合パートナーまたはエピトープに対する計算された、観察された、知られている、または予測された結合特異性を有し得る。結合特異性は、サンプルにおけるすべての、いくつかのまたは少なくとも１つの他の分析物を上回るサンプルにおける単一の結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対する選択性を指し得る。その上、結合特異性は、サンプルにおける少なくとも１つの他の分析物を上回るサンプルにおける結合パートナー、エピトープ、または標的部位のサブセットに対する選択性を指し得る。

【００８１】

本明細書で使用される場合、用語「生体直交反応」は、生物学的システムのいくつかのまたはすべての天然生物学的プロセス、機能、または活性を妨害することなく生物学的システム（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及び／またはｉｎ　ｖｉｖｏ）内で生じ得る化学反応を指す。生体直交反応は、生体直交反応によって標的とされるもの以外の生物学的システムの成分に対して不活性であるものとしてさらに特性化され得る。生体直交反応には、クリック反応が含まれ得る。生体直交またはクリック反応には、シュタウディンガーライゲーション、銅フリークリック反応、ニトロン双極子環化付加、ノルボルネン環化付加オキサノボルナジエン環化付加、テトラジンライゲーション、［４＋１］環化付加、テトラゾールフォトクリック反応、またはクアドリシクランライゲーションが含まれ得る。生体直交反応は、ソルターゼ、リガーゼ、またはスブチリガーゼ等の酵素による、第１の分子と第２の分子との間の結合等の酵素的アプローチを利用し得る。生体直交反応は、不可逆的ペプチド捕捉システム、例えば、ＳｐｙＣａｔｃｈｅｒ／ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＣａｔｃｈｅｒ／ＳｎｏｏｐＴａｇ、またはＳｄｙＣａｔｃｈｅｒ／ＳｄｙＴａｇを利用し得る。

【００８２】

本明細書で使用される場合、用語「クリック反応」は、生体適合性試薬を利用する単一工程の熱力学的に好ましいコンジュゲーション反応を指す。クリック反応は、毒性のまたは生物学的に不適合性の試薬（例えば、酸、塩基、重金属）を利用しないようにまたは毒性のまたは生物学的に不適合性の副生成物を生成しないように構成され得る。クリック反応は、水性溶媒または緩衝液（例えば、リン酸緩衝溶液、トリス緩衝液、生理食塩水緩衝液、ＭＯＰＳ等）を利用し得る。クリック反応は、それが負の反応のギブス自由エネルギー、例えば、約－５キロジュール／モル（ｋＪ／ｍｏｌ）、－１０ｋＪ／ｍｏｌ、－２５ｋＪ／ｍｏｌ、－５０ｋＪ／ｍｏｌ、－１００ｋＪ／ｍｏｌ、－２００ｋＪ／ｍｏｌ、－３００ｋＪ／ｍｏｌ、－４００ｋＪ／ｍｏｌ未満、または－５００ｋＪ／ｍｏｌ未満の反応のギブス自由エネルギーを有する場合に熱力学的に好ましい場合がある。例示的な生体

直交及びクリック反応は、ＷＯ２０１９／１９５６３３Ａ１（参照により本明細書に組み込まれる）に詳細に記載されている。

【００８３】

用語「含む」は、記述された要素を含むだけでなく、任意の追加の要素をさらに包含するオープンエンドであることが本明細書で意図されている。

【００８４】

本明細書で使用される場合、用語「それぞれ」は、項目の集合体に関して使用される場合、集合体における個々の項目を特定し、かならずしも集合体におけるすべての項目を指すわけではないことが意図される。明示的な開示または文脈が明らかにそうでないことを示している場合は例外が生じ得る。

【００８５】

本明細書で使用される場合、用語「エピトープ」は、親和性試薬によって認識されるまたはそれに特異的に結合する分子または分子の部分を指す。エピトープには、ポリペプチドの二次、三次または四次構造において構造的に隣接するポリペプチドまたはアミノ酸の一次構造において連続して隣接するアミノ酸配列が含まれ得る。エピトープは任意に、抗体によって認識され、またはそれに結合され得る。しかしながら、エピトープは、かならずしも任意の抗体によって認識されることを必要とするわけではなく、例えば、代わりにアプタマー、ミニタンパク質または他の親和性薬剤によって認識される。エピトープは、免疫反応を誘発するために抗体に任意に結合し得る。しかしながら、エピトープは、かならずしも免疫反応に関与するわけではなく、免疫反応を誘発することが可能であるわけでもない。用語「親和性標的」は、用語「エピトープ」と本明細書で同義的に使用される。

【００８６】

本明細書で使用される場合、用語「外因性」は、分子の部位に関して使用される場合、分子の天然アナログに存在しない部位を意味する。例えば、アミノ酸の外因性標識は、天然に存在するアミノ酸に存在しない標識である。同様に、抗体に存在する外因性標識は、その天然環境では抗体に見られない。

【００８７】

本明細書で使用される場合、用語「官能基」は、化学的特性、例えば、反応性、極性、疎水性、親水性、溶解性、結合親和性等を分子に付与する分子中の原子の部位または群を指す。官能基には、有機部位が含まれ得、または無機原子が含まれ得る。例示的な官能基には、生体直交反応物、クリック反応物、アルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、ハロゲン化物、ヒドロキシル、カルボニル、アルデヒド、アシルハロゲン化物、エステル、カルボキシレート、カルボキシル、カルボアルコキシ、メトキシ、ヒドロペルオキシ、エーテル、ヘミアセタール、ヘミケタール、アセタール、ケタール、オルトエステル、エポキシド、無水カルボン酸、カルボキサミド、アミン、ケチミン、アルジミン、イミド、アジド、アゾ、シアネート、イソシアネート、ナイトレート、ニトリル、イソニトリル、ニトロソキシ、ニトロ、ニトロソ、オキシム、ピリジル、カルバメート、スルフヒドリル、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルフィノム、スルホ、チオシアネート、イソチオシアネート、カルボノチオイル、チオエステル、チノエステル、ホスフィノ、ホスホノ、ホスホネート、ホスフェート、ボロノ、ボロネート、及びボリネート官能基が含まれ得る。

【００８８】

本明細書で使用される場合、用語「標識」は、検出可能な特徴を提供する分子、またはその部位を指す。検出可能な特徴は、例えば、光学的シグナル、例えば、放射線の吸光度、発光放出、発光寿命、発光偏光、蛍光放出、蛍光寿命、蛍光偏光等；レイリー及び／またはミー散乱；リガンドまたは受容体に対する結合親和性；磁性特性；電気的特性；電荷；質量；放射能等であり得る。例示的な標識には、限定されないが、フルオロフォア、ルミノフォア、発色団、ナノ粒子（例えば、金、銀、炭素ナノチューブ）、重原子、放射性同位体、質量標識、電荷標識、スピン標識、受容体、リガンド等が含まれる。標識は、リアルタイムで検出されるシグナル（例えば、蛍光、発光、放射能）を生成し得る。標識成

分は、オフライン（例えば、核酸バーコード）または時間分解様式（例えば、時間分解蛍光）で検出されるシグナルを生成し得る。標識成分は、特徴的な頻度、強度、偏光、継続期間、波長、配列、またはフィンガープリントを有するシグナルを生成し得る。

【００８９】

本明細書で使用される場合、用語「標識成分」は、検出可能な特徴を提供する親和性試薬または他の物質の部位を指す。検出可能な特徴は、例えば、標識との関連で本明細書で示されるもののいずれかであり得る。標識成分は、別の分子または物質に結合され得、またはそれに結合することが可能であり得る。標識成分に結合され得る例示的な分子には、親和性試薬または結合パートナーが含まれる。

【００９０】

本明細書で使用される場合、用語「核酸ナノボール」は、球状または球状核酸構造を指す。核酸ナノボールには、球状構造で配列する配列領域のコンカテマーが含まれ得る。核酸ナノボールには、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡ、修飾されたまたは非天然の核酸、またはそれらの組み合わせが含まれ得る。

【００９１】

本明細書で使用される場合、用語「核酸折り紙」は、核酸（複数可）の天然に存在するらせん形構造に加えて操作された三次または四次構造を含む核酸コンストラクトを指す。核酸折り紙には、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡ、修飾されたまたは非天然の核酸、またはそれらの組み合わせが含まれ得る。核酸折り紙には、折り紙粒子の操作された構造化をもたらすために配列相補性を介してハイブリダイズする複数のオリゴヌクレオチドが含まれ得る。核酸折り紙には、一本鎖もしくは二本鎖核酸、またはそれらの組み合わせ区域が含まれ得る。例示的な核酸折り紙構造には、ナノチューブ、ナノワイヤ、ケージ、タイル、ナノスフィア、ブロック、及びそれらの組み合わせが含まれ得る。核酸折り紙には、複数のより小さな核酸がハイブリダイズする相対的に長い骨格核酸が任意に含まれ、それにより操作された構造を生成する骨格において折り畳み及び屈曲を生成し得る。骨格核酸は、環状または線状であり得る。骨格核酸は、一本鎖であり得るが、より小さな核酸に対するハイブリダイゼーションのためのものであり得る。より小さな核酸（時に「ステープル」と称される）は、骨格の２つの領域にハイブリダイズし得、骨格の２つの領域は、より小さな核酸にハイブリダイズしない介在領域によって分離されている。

【００９２】

本明細書で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、ホスホジエステル結合によって接続された２つ以上のヌクレオチドを含む分子を指す。オリゴヌクレオチドには、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡ、修飾されたヌクレオチド、非天然ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせが含まれ得る。オリゴヌクレオチドには、例えば、約２００、１９０、１８０、１７０、１６０、１５０、１４０、１３０、１２０、１１０、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４０、３０、２５、２０、１５、１０未満、または５ヌクレオチド未満等の制限された数のヌクレオチドサブユニットが含まれ得る。

【００９３】

本明細書で使用される場合、用語「オフセット」は、分子構造に関して使用される場合、２つの線（二次元）または２つの平面（三次元）間の空間的相違を指す。平面は、おおよそ、分子構造の表面、例えば、折り紙タイルの面であり得る。オフセットには、距離オフセット及び／または角度的オフセットが含まれ得る。図１Ａ及び１Ｂは、異なる二次元形状（三次元構造の二次元突出であり得る）についての角度的オフセットの例を示している。図１Ａの二等辺三角形１００は、第１の面１１０と第２の面１２０との間の１２０°の角度的オフセットを有し、その相対的配向は直交ベクターＡ及びＡ’によって示されている。図１Ｂの長方形１３０は、第１の面１１０と第２の面１２０との間の１８０°の角度的オフセットを有し、その相対的配向は直交ベクターＡ及びＡ’によって示されている。

【００９４】

本明細書で使用される場合、用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合によって接続された２つ以上のアミノ酸を含む分子を指す。ポリペプチドはまた、タンパク質、オリゴペプ

チドまたはペプチドと称され得る。用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」及び「ペプチド」は、分子のアミノ酸配列組成または長さ、量、起源等の異なる特徴を有する分子を指すために任意に使用され得るが、その用語は、すべての文脈においてそのような区別を本質的に含むことは意図されていない。ポリペプチドは、天然に存在する分子、または合成分子であり得る。ポリペプチドには、１つ以上の非天然アミノ酸、修飾されたアミノ酸、または非アミノ酸リンカーが含まれ得る。ポリペプチドは、Ｄ－アミノ酸エナンチオマー、Ｌ－アミノ酸エナンチオマーまたはその両方を含有し得る。ポリペプチドのアミノ酸は、天然にまたは合成的に、例えば、翻訳後修飾によって修飾され得る。

【００９５】

本明細書で使用される場合、用語「広域」は、親和性試薬に関して使用される場合、２つ以上の異なる結合パートナーに結合する、または結合する能力を有する結合剤を指す。例えば、広域結合剤は、１）異なる結合パートナーの構造内の共通エピトープの存在により複数の異なる結合パートナーに結合し；または２）複数の異なるエピトープに結合し；または３）両方の特性の組み合わせであり得る。広域結合剤は、エピトープまたは標的部位の結合背景にかかわらず、特定のエピトープまたは標的部位の存在により複数の結合パートナーに結合し得る。結合背景には、例えば、エピトープまたは標的部位を囲む局所的化学的環境、例えば、臨接する、隣接する、または近接する化学的実体（例えば、ポリペプチドエピトープの場合、エピトープに対して臨接するアミノ酸配列、または隣接するもしくは近接する非連続アミノ酸配列）が含まれ得る。広域親和性試薬が結合する複数の異なるエピトープには、それでもなお異なるアミノ酸含有量を有する構造的または化学的に関連するエピトープが含まれ得る。例えば、親和性試薬は、形態ＷＸＫ（Ｘは、任意の可能性のあるアミノ酸である）を有するトリマーペプチド配列に対する結合親和性を保有する場合、広域とみなされ得る。結合広域性に関する追加の概念は、ＷＯ２０２０／１０６８８９Ａ１（参照により本明細書に組み込まれる）に論述されている。

【００９６】

本明細書で使用される場合、用語「保持成分」は、少なくとも２つの他の成分を連結させる親和性試薬、検出可能なプローブまたは他の物質の部位を指す。保持成分は、互いに特定の距離内で２つの他の成分を維持し得る。例えば、２つの他の成分は、多くとも１０００ｎｍ、５００ｎｍ、１００ｎｍ、５０ｎｍ、１０ｎｍ、５ｎｍ、１ｎｍまたはそれ未満の距離で維持され得る。代替的または付加的に、保持成分は、互いに最小の距離で２つの他の部位を分離し得る。例えば、２つの他の成分は、少なくとも１ｎｍ、５ｎｍ、１０ｎｍ、５０ｎｍ、１００ｎｍ、５００ｎｍ、１０００ｎｍまたはそれを超える距離で維持され得る。保持成分には、例えば、構造化核酸粒子、核酸ナノボール、核酸折り紙、タンパク質核酸、ポリペプチド、合成ポリマー、多糖、有機粒子、無機粒子、ゲル、ヒドロゲル、コーティングされた粒子等が含まれ得る。保持成分は、ポリマー性構造を任意に有し得る。代替的には、保持成分は、ポリマー性構造を有する必要はない。いくつかの実施形態では、保持成分は、それが結合する他の成分と同様の組成を有する。例えば、ポリペプチド物質から構成される複数の結合成分は、ポリペプチド保持成分に結合され得る。代替的には、保持成分は、それが結合する他の成分とは実質的に異なる組成を有し得る。例えば、ポリペプチド物質から構成される複数の結合成分は、ポリペプチド以外の物質、例えば、核酸物質、または有機または無機ナノ粒子（例えば、炭素ナノスフィア、二酸化ケイ素ナノスフィア等）から部分的にまたは全体的に構成される保持成分に結合され得る。保持成分には、保持成分への別の成分、例えば、標識成分または結合成分の結合を可能とする１つ以上の結合部位が含まれ得る。結合部位には、結合成分、標識成分、または他の検出可能なプローブ成分への共有結合的または非共有結合的結合を形成することが可能な官能基、活性部位、結合リガンド、結合受容体、核酸配列、または任意の他の実体が含まれ得る。保持成分には、有機または無機粒子またはナノ粒子が含まれ得る。骨格には、例えば、ポリマーが被覆されたＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）またはポリマーが被覆された量子ドットにおいて生じるように、別の成分の結合を可能とするコーティングまたは表面層

が含まれ得る。保持成分の例には、米国仮出願番号６３／１１２，６０７（参照により本明細書に組み込まれる）に示される骨格が含まれる。

【００９７】

本明細書で使用される場合、用語「部位」は、アレイに関して使用される場合、特定の分子または分析物、例えば、ポリペプチド、核酸、構造化核酸または官能基によって占有された、またはそれによって占有されるように構成されたアレイにおける位置を意味する。部位は、単一分子のみを含有し得、またはそれは、同じ種のいくつかの分子の集団（すなわち、分子の集合体）を含有し得る。代替的には、部位には、異なる種である分子の集団が含まれ得る。アレイの部位は、典型的には別々である。別々の部位は、連続的であり得、またはそれらは、互いに隙間のある空間を有し得る。本明細書において有用なアレイは、例えば、１００ミクロン、１０ミクロン、１ミクロン、または０．５ミクロン、０．１ミクロン、０．０１ミクロン未満またはそれ以下分離された部位を有し得る。代替的または付加的に、アレイは、少なくとも０．０１ミクロン、０．１ミクロン、０．５ミクロン、１ミクロン、１０ミクロン、１００ミクロンまたはそれを超えて分離された部位を有し得る。部位はそれぞれ、１平方ミリメートル、５００平方ミクロン、１００平方ミクロン、２５平方ミクロン、１平方ミクロン未満またはそれ以下の面積を有し得る。アレイには、少なくとも約1×10^4、1×10^5、1×10^6、1×10^7、1×10^8、1×10^9、1×10^{10}、1×10^{11}、1×10^{12}、またはそれを超える部位が含まれ得る。

【００９８】

本明細書で使用される場合、用語「固体支持体」は、水性液体中で不溶性である硬質基材を指す。基材は、非多孔質または多孔質であり得る。基材は、任意に液体を吸収することが可能（例えば、多孔性による）であり得るが、典型的には、基材が液体を吸収する場合に実質的に膨張せず、液体が乾燥によって除去される場合に実質的に縮小しないように十分に硬質である。非多孔質固体支持体は通常、液体または気体に対して不透過性である。例示的な固体支持体には、ガラス及び修飾または官能化されたガラス、プラスチック（アクリル類、ポリスチレンならびにスチレン及び他の物質のコポリマー、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタン、Ｔｅｆｌｏｎ（商標）、環状オレフィン、ポリイミド等を含む）、ナイロン、セラミックス、樹脂、Ｚｅｏｎｏｒ（商標）、ケイ素及び修飾されたケイ素を含むシリカまたはシリカベースの物質、炭素、金属、無機ガラス、光ファイバー束、及びポリマーが含まれるがこれらに限定されない。

【００９９】

本明細書で使用される場合、用語「種」は、同じ化学的構造を共有する分子または部位を特定するために使用される。例えば、同じアミノ酸配列を有する個々のエピトープ部位は、同じ種のエピトープである一方で、異なる配列を有するエピトープ部位は、異なる種のエピトープである。同じ遺伝子から発現したタンパク質は、同じ種の遺伝子産物であり、同じ遺伝子から発現し、かつ同じ翻訳後修飾を有するタンパク質は、同じプロテオフォームまたはアイソフォームである。２つのタンパク質は、同じ遺伝子から発現されるが、異なるタンパク質修飾を有し得、その場合、２つのタンパク質は、同じ種の遺伝子産物であるが、異なるプロテオフォームまたはアイソフォームである。

【０１００】

本明細書で使用される場合、用語「構造化核酸粒子」（または「ＳＮＡＰ」）は、コンパクト化された三次元構造を有する一本鎖または多重鎖ポリヌクレオチド分子を指す。コンパクト化された三次元構造は、ＳＮＡＰと同じ配列長さを有する核酸についてのランダムコイルまたは他の非構造化状態に対するＳＮＡＰの流体力学的半径またはストークス半径の観点から特性化され得る。コンパクト化された三次元構造は、三次構造に関して任意に特性化され得る。例えば、ＳＮＡＰは、ランダムコイルまたは他の非構造化状態における同じ核酸分子と比較して、ポリヌクレオチド鎖の領域間の増加した数の内部結合相互作用、領域間のより短い距離、鎖における増加した数の屈曲、及び／または鎖におけるより鋭い屈曲を有するように構成され得る。代替的または付加的に、コンパクト化された三次

元構造は、四次構造に関して任意に特性化され得る。例えば、ＳＮＡＰは、ランダムコイルまたは他の非構造化状態における同じ核酸分子と比較して、ポリヌクレオチド鎖間の増加した数の相互作用または鎖間のより短い距離を有するように構成され得る。いくつかの構成では、ＳＮＡＰの二次構造（すなわち、ポリヌクレオチド鎖のらせん形ツイストまたは方向）は、ランダムコイルまたは他の非構造化状態における同じ核酸分子よりも密になるように構成され得る。ＳＮＡＰは、ＳＮＡＰへの追加の分子の結合を可能とするように任意に修飾され得る。ＳＮＡＰは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡ、修飾もしくは非天然核酸、またはそれらの組み合わせを含み得る。ＳＮＡＰには、ＳＮＡＰ構造を形成するようにハイブリダイズする複数のオリゴヌクレオチドが含まれ得る。ＳＮＡＰにおける複数のオリゴヌクレオチドには、他の分子（例えば、親和性試薬、結合パートナー、官能基、または検出可能な標識）に結合した、または他の分子に（例えば、官能基によって）結合されるように構成されたオリゴヌクレオチドが含まれ得る。ＳＮＡＰには、操作されたまたは合理的に設計された構造、例えば、核酸折り紙が含まれ得る。

【０１０１】

本明細書で使用される場合、用語「実質的に同じ」は、２つ以上の構造に関して使用される場合、同じ結果を得るために実質的に同じ方法で実質的に同じ機能を発揮する、または発揮することが可能な構造を指す。例えば、実質的に同じ２つの構造化核酸粒子は、同じ一次構造を有し得る。任意に、それらは、三次または四次構造が異ならない限り、一次構造が異なり得る。任意に、それらは、本明細書で示される方法において同じ結果を得るために実質的に同じ方法で同じ機能を実質的に発揮する限り、一次、二次、三次または四次構造の１つ以上が異なり得る。

【０１０２】

本明細書で使用される場合、用語「標的部位」は、結合相互作用を媒介または容易化するエピトープ内の特定の化学的構造を指す。標的部位には、特性化可能な構造を有する官能基、側鎖、活性部位、または他の化学的実体が含まれ得る。例えば、標的部位は、ポリペプチドエピトープの一部を形成する１つ以上のアミノ酸、またはその側鎖（複数可）であり得る。標的部位は、親和性試薬の結合部位と特異的に相互作用して、結合パートナーに対する親和性試薬の結合を引き起こす相互作用を容易化または媒介し得る。

【０１０３】

本明細書で使用される場合、用語「調整可能」は、保持成分、骨格または分子の構造における成分または結合部位の特定の、正確な、及び／または合理的な位置の調節可能性を指す。調整可能な保持成分は、保持成分構造の特定の部位でまたは特定の領域内で他の成分を結合させる、または保持成分構造の特定の部位または特定の領域で他の成分を結合させるための結合部位を生成する能力を指し得る。本明細書で使用される場合、「調整可能性」は、調整可能な構造または構造を有するプローブまたは保持成分の特性を指す。

【０１０４】

実施例以外で、または別段示される箇所において、本明細書で使用される成分または反応条件の量を表すすべての数は、用語「約」によってすべての例において修飾されるものとして理解されるべきである。本明細書で使用される場合、用語「約」は、パーセンテージに関連して使用される場合、言及される値の平均±５％であり得る。例えば、約９０％は、８５％～９５％を意味するであろう。

【０１０５】

本明細書で使用される場合、用語「二次元突出」は、実質的な幾何的または空間的ゆがみを伴わずに平面二次元表面上への三次元構造の突出によって占有されるであろう領域または形状を指す。例えば、平面二次元表面上へのスフィアの二次元突出は、スフィアの径と同等の径を有する表面上の環状領域を生成するであろう。二次元突出は、三次元構造の任意の表面に対して直交する基準枠を含む、任意の基準枠から形成され得る。

【０１０６】

検出可能なプローブ及び親和性試薬の構造及び機能

本明細書には、結合パートナーに対する増加した結合アビディティ、増加した観察可能

性またはその両方を有する検出可能なプローブまたは親和性試薬が記載される。検出可能なプローブについて本明細書で例示される構造的及び機能的特徴は、他の親和性試薬に存在し得る。逆に、親和性試薬について本明細書で例示される構造的及び機能的特徴は、検出可能なプローブに存在し得る。したがって、検出可能なプローブとの関連で本明細書で示される組成物、構造及び方法は、他の親和性試薬に適用され得、その逆もあり得る。

【０１０７】

検出可能なプローブまたは親和性試薬には、検出可能なプローブまたは親和性試薬構造内に含まれる複数の結合成分の任意の個々の結合成分と比較して、結合パートナーに対するプローブの全体的結合親和性を集合的に増加させる複数の結合成分が含まれ得る。当該技術分野で知られているまたは本明細書で示される多様な親和性試薬のいずれかは、本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合した場合、結合成分として機能し得る。本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬には、検出可能なプローブ（または親和性試薬）と結合パートナーとの間の結合相互作用の観察を可能とする１つ以上の標識成分がさらに含まれ得る。当該技術分野で知られているまたは本明細書で示される多様な検出可能な標識のいずれかは、本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合した場合、標識成分として機能し得る。

【０１０８】

本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬には、（ａ）保持成分；（ｂ）標識成分、及び（ｃ）保持成分に結合した１つ、２つまたはそれを超える結合成分が含まれ得る。保持成分であって、それに結合される他の成分の正確な、既定の及び／または合理的な提示を提供するために空間的及び／または配向的に調整可能である、保持成分が特に対象となる。例えば、結合成分は、検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合アビディティ及び／または観察可能性を増加させる構成で結合され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬には、少なくとも１つの結合成分及び／または少なくとも１つの標識成分を結合させるために十分な部位を提供する保持成分が含まれ得る。いくつかの構成では、保持成分は、保持成分への他の分子の結合を可能とする複数の官能基、反応性部位、核酸、または官能基を含む天然、人工、または合成粒子であり得る。保持成分は、非晶質、球状、または不規則構造（例えば、ＤＮＡナノボール、蛍光ナノ粒子、例えば、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）または量子ドット）を有し得る。保持成分は、規則的または対称的構造（例えば、炭素ナノスフィア、炭素ナノチューブ、金属ナノチューブ、セラミックナノ粒子）を有し得る。保持成分には、鋳型粒子、例えば、粒子またはナノ粒子によって形成されるシェルまたは骨格が含まれ得る。いくつかの構成では、鋳型粒子には、標識成分、例えば、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）または量子ドットが含まれ得る。保持成分には、ポリマー、金属、半導体、セラミックス、ガラス、及び生体分子（例えば、核酸、例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ、タンパク質、多糖）を含むがこれらに限定されない任意の適切な物質が含まれ得る。

【０１０９】

いくつかの場合では、保持成分には、部分的にまたは実質的に完全に二本鎖の核酸が含まれ得る。二本鎖核酸は、標識成分間のより良好な間隔を提供するために、保持成分に追加の構造的硬質性を付与し得る。そのような場合では、標識成分は、二本鎖核酸の一方または両方の鎖にカップリングされ得る。保持成分には、構造化粒子または合理的に設計された粒子が含まれ得る。保持成分には、１つ以上の結合成分及び／または１つ以上の標識成分を結合させるように構成された構造化核酸粒子（ＳＮＡＰ）が含まれ得る。いくつかの構成では、ＳＮＡＰには、ＤＮＡ折り紙粒子またはＤＮＡナノボールが含まれ得る。

【０１１０】

保持成分には、他の成分（例えば、結合成分、標識成分または別の保持成分）を結合させるための複数の部位が含まれ得る。保持成分には、結合成分及び／または標識成分をカップリングさせるための独自のまたは専用の部位が含まれ得る。例えば、保持成分には、結合成分にカップリングされた核酸と相補的な第１の配列を有する核酸が含まれ得、また、標識成分にカップリングされた核酸と相補的な第２の配列を有する核酸がさらに含まれ

得る。第１の配列は、異なるタイプの成分がカップリング部位のサブセットに適切に仕向けられるように第２の配列とは異なり得る。代替的には、第１及び第２の配列は、同じであり得る。任意に、保持成分には、結合成分にカップリングされた官能基と共有結合を形成するように構成された１つ以上の第１の官能基が含まれ得、また、標識成分にカップリングされた官能基と共有結合を形成するように構成された１つ以上の第２の官能基がさらに含まれる。第１の官能基（複数可）は、異なるタイプの成分がカップリング部位のサブセットに適切に仕向けられるように第２の官能基（複数可）とは異なり得る。例えば、第１の複数の官能基は、第２の複数の官能基が関与する結合形成反応と直交する結合形成反応に関与し得る。代替的には、第１及び第２の官能基は、同じであり得る。いくつかの構成では、保持成分には、核酸及び官能基等の結合部位タイプの混合物であって、結合部位の各タイプが、異なるタイプの成分を結合させるように構成されている、混合物が含まれ得る。

【０１１１】

保持成分には、保持成分に結合した１つ以上の他の成分（例えば、結合成分、標識成分または別の保持成分）が含まれ得る。保持成分は、共有結合（例えば、クリック反応を介して）、配位結合（例えば、ケイ素ナノ粒子に対するシランリンカー）、または非共有結合（例えば、核酸ハイブリダイゼーション）によって別の成分に結合され得る。保持成分は、保持成分上の官能基と他の成分上の官能基との間の共有結合を形成する化学反応によって別の成分に結合され得る。反応は、求核置換、求電子置換、及び脱離反応を含む任意の好適な方法によって行われ得る。いくつかの構成では、保持成分と別の成分との間の共有結合は、生体直交またはクリック反応によって形成され得る。保持成分及び／または他の成分は、生体直交またはクリック反応に関与するように構成された官能基を含むように修飾され得る。保持成分を１つ以上の他の成分に結合させるために使用され得る例示的な官能基及び連結は、例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬の作製との関連で、本明細書でさらに詳細に示される。

【０１１２】

いくつかの構成では、保持成分には、核酸構造、例えば、ＳＮＡＰが含まれ得る。いくつかの場合では、核酸構造には、保持成分への他の成分（例えば、結合成分、標識成分または別の保持成分）の結合のための標的化された部位特異的ハイブリダイゼーション部位を提供する一本鎖核酸の領域が含まれ得る。そのような構成では、相補的オリゴヌクレオチドに結合される他の成分は、保持成分上の標的化部位で結合を形成するために保持成分上の一本鎖配列にアニーリングされ得る。他の構成では、官能基を含むオリゴヌクレオチドは、保持成分にアニーリングされ得、それによりその後のオリゴヌクレオチド上の官能基と他の成分上の官能基との間の化学反応（例えば、クリック反応）を介する別の成分の結合を可能とする。

【０１１３】

検出可能なプローブまたは親和性試薬には、複数の結合成分に結合した保持成分が含まれ得る。保持成分に結合した複数の結合成分は、検出可能なプローブまたは親和性試薬のアビディティを増加させるように選択され得る。いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、種に関して同種の複数の結合成分（例えば、抗体のみ、アプタマーのみ、ナノボディのみ、ミニ－ペプチド結合剤のみ、ＤＡＲＰｉｎのみ等）を含有し得る。他の構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、種に関して異種の複数の結合成分（例えば、抗体、ナノボディ、ミニ－タンパク質結合剤、ＤＡＲＰｉｎ及び／またはアプタマーの混合物）を含有し得る。いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、特定の結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対して本質的に同じ結合特異性を有する複数の結合成分を含有し得る。他の構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、特定の結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対する結合特異性の混合を有する複数の結合成分を含有し得る。

【０１１４】

検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合した結合成分の量及び／または多様性は、

検出可能なプローブまたは親和性試薬のアビディティを増加させるように選択され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、互いに異なる（例えば、結合成分の異種混合物）か、または同じ（例えば、結合成分の同種のセット）であるかにかかわらず、少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、またはそれを超える合計を有し得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、互いに異なる（例えば、結合成分の異種混合物）か、または同じ（例えば、結合成分の同種セット）であるかにかかわらず、多くとも約１００、９５、９０、８５、８０、７５、７０、６５、６０、５５、５０、４９、４８、４７、４６、４５、４４、４３、４２、４１、４０、３９、３８、３７、３６、３５、３４、３３、３２、３１、３０、２９、２８、２７、２６、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、またはそれ未満の合計を有し得る。

【０１１５】

検出可能なプローブまたは親和性試薬には、選択された比で結合成分の異種混合物が含まれ得、異種性は、結合成分種及び／または結合特異性に基づく。例えば、特定のエピトープに対する検出可能なプローブまたは親和性試薬には、モル濃度ベースで約３：１の比で高特異性結合成分及び中特異性結合成分が含まれ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬には、少なくとも約１：１、１．５：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、２５：１、５０：１、１００：１、２５０：１、５００：１、１０００：１、２５００：１、５０００：１、１００００：１、２５０００：１、５００００：１、１０００００：１、２５００００：１、５０００００：１、１０００００００：１、またはそれを超える比で第１の結合成分及び異なる第２の結合成分が含まれ得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブまたは親和性試薬には、多くとも約１０００００００：１、５０００００：１、２５００００：１、１０００００：１、５００００：１、２５０００：１、１００００：１、５０００：１、２５００：１、１０００：１、５００：１、２５０：１、１００：１、５０：１、２５：１、１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１．５：１、またはそれ未満の比で第１の結合成分及び異なる第２の結合成分が含まれ得る。

【０１１６】

本開示の親和性試薬、プローブまたは結合成分は、結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対する特性化された結合確率を有し得る。例えば、親和性試薬、プローブまたは結合成分は、所定のポリペプチドエピトープに結合することが知られている場合があり、高い結合確率（例えば、１００回の観察毎に１回、結合の証拠を示さない）を示すことが知られている場合がある。別の例では、親和性試薬、プローブまたは結合成分は、低いがゼロではない結合確率（例えば、所与の観察について０．０００００１％の結合機会）で所定のエピトープに結合するものとして特性化され得る。確率的特性化には、結合確率に関する２つの態様：１）結合パートナー、エピトープ、または標的部位に結合する構造依存的可能性；及び２）結合パートナー、エピトープ、または標的部位に結合する環境依存的可能性が含まれ得る。

【０１１７】

結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対する親和性試薬、プローブまたは結合成分の結合確率は、非ポリペプチドまたは異種システム（例えば、土壌、粗細胞ライセート、体液）を含むようにポリペプチドを超えて拡張され得る。例えば、親和性試薬、プローブまたは結合成分は、複合体の成分（例えば、ポリマーマトリックスに埋め込まれた金属ナノ粒子）に対する特性化された結合確率を有し得、または多糖（例えば、グリコシル化物、ヘミセルロース、セルロース、リグニン、ペクチン等）内の構造的サブユニットに優先的に結合し得る。当業者は、非ポリペプチドまたは異種システムについて意図され

た親和性試薬、プローブまたは結合成分が、親和性試薬、プローブまたは結合成分が低い結合親和性を保有する非ポリペプチド結合パートナー、エピトープ、または標的部位に結合するゼロではない確率を保有する類似した特性を示し得ることを本開示から認識する。

【０１１８】

親和性試薬、プローブまたは結合成分の結合親和性または結合広域性は、ポリペプチドの一次、二次、三次、または四次構造（すなわち、アミノ酸配列）が結合時に有する効果に関連し得る。例えば、親和性試薬、プローブまたは結合成分は、特定のポリペプチドエピトープ配列（例えば、アミノ酸トリマー、テトラマー、ペンタマー等）に対する増加したまたは低下した優先性で結合するものとして特性化され得る。エピトープに結合する親和性試薬、プローブまたは結合成分の構造依存的可能性はまた、配列背景（例えば、ペプチドエピトープのアミノ末端及び／またはカルボニル末端に臨接するアミノ酸；ポリペプチドの二次または三次構造におけるペプチドエピトープに近接するアミノ酸残基、ペプチドエピトープにおけるまたはその周りの翻訳後修飾の存在または非存在等）によって影響を受け得る。本開示の親和性試薬、プローブまたは結合成分は、アミノ酸エピトープのファミリー（例えば、ＡＸＡ（Ａは、アラニンを表し、Ｘは、２０種の天然に存在するアミノ酸のいずれかを表す）に対する実質的な親和性または広域性を有し得る。結合の構造依存的可能性は、例えば、結合確率の例証的結合モデルまたはデータベースによって、ポリペプチド特性化のために使用される各親和性試薬、プローブまたは結合成分のために計算され得る。親和性試薬、プローブまたは結合成分は、少なくとも約０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、９９．９％、９９．９９％、９９．９９９％、９９．９９９９％、９９．９９９９９％、９９．９９９９９９％またはそれを超える結合パートナー、エピトープ、または標的部位に結合する配列特異的可能性を有し得る。代替的または付加的に、親和性試薬、プローブまたは結合成分は、多くとも約９９．９９９９９９％、９９．９９９９９％、９９．９９９９％、９９．９９９％、９９．９９％、９９．９％、９９．５％、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．１％、０．０１％、０．００１％、０．０００１％、０．００００１％、０．０００００１％、またはそれ未満の結合パートナー、エピトープ、または標的部位に結合する配列特異的可能性を有し得る。

【０１１９】

親和性試薬、プローブまたは結合成分をポリペプチドにおけるエピトープに結合させる環境依存的可能性は、結合時のエピトープ及び／またはポリペプチドの構造以外の可変要素の効果に関連し得る。例えば、特定のエピトープへの親和性試薬、プローブまたは結合成分の結合は、溶媒化学的組成（例えば、溶媒同一性、溶媒極性、溶媒のイオン強度、緩衝液濃度、ｐＨ、界面活性剤または変性剤の存在等）に基づいて変わり得る。他の非ポリペプチド可変要素には、結合の継続期間；親和性試薬、プローブまたは結合成分の濃度；結合パートナー、エピトープまたは標的部位の濃度；及び外部から適用されるフィールド、例えば、熱、電場、磁場、及び流速フィールドの存在が含まれ得る。親和性試薬、プローブまたは結合成分は、少なくとも約０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、９９．９％、９９．９９％、９９．９９９％、９９．９９９９％、９９．９９９９９％、９９．９９９９９９％またはそれを超える結合パートナー、エピトープ、または標的部位に結合する環境依存的可能性を有し得る。代替的または付加的に、親和性試薬、プローブまたは結合成分は、多くとも約９９．９９９９９９％

、９９．９９９９９％、９９．９９９９％、９９．９９９％、９９．９９％、９９．９％、９９．５％、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．１％、０．０１％、０．００１％、０．０００１％、０．００００１％、０．０００００１％、またはそれ未満の結合パートナー、エピトープ、または標的部位に結合する環境依存的可能性を有し得る。

【０１２０】

いくつかの構成では、構造依存的結合可能性及び環境依存的結合可能性は、結合パートナー、エピトープ、または標的部位に結合する親和性試薬、プローブまたは結合成分の全体的可能性または確率を決定するために組み合わされ得る。全体的可能性または確率は、親和性試薬、プローブまたは結合成分に対する確率的結合プロファイルを生成するためにいくつかまたはすべての既知の結合パートナー、エピトープ、または標的部位について蓄積され得る。いくつかの構成では、親和性薬剤、プローブまたは結合成分は、少なくとも約２０％の全体的結合確率でＮ個の結合パートナー、エピトープ、または標的部位のセットに、及び多くとも０．１％の全体的結合確率でＭ個の結合パートナー、エピトープ、または標的部位のセットに結合するものとして特性化され得る（Ｎ≧１、Ｍ≧１、及びＭ≧１０Ｎ）。親和性試薬、プローブまたは結合成分は、少なくとも約０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、９９．９％、９９．９９％、９９．９９９％、９９．９９９９％、９９．９９９９９％、９９．９９９９９９％またはそれを超える結合パートナー、エピトープ、または標的部位に結合する全体的可能性または確率を有し得る。代替的または付加的に、親和性試薬、プローブまたは結合成分は、多くとも約９９．９９９９９９％、９９．９９９９９％、９９．９９９９％、９９．９９９％、９９．９９％、９９．９％、９９．５％、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．１％、０．０１％、０．００１％、０．０００１％、０．００００１％、０．０００００１％、またはそれ未満の結合パートナー、エピトープ、または標的部位に結合する全体的可能性または確率を有し得る。

【０１２１】

保持成分には、保持成分と会合した１つ以上の標識成分が含まれ得る。いくつかの構成では、１つ以上の標識成分は、検出可能なプローブまたは親和性試薬の保持成分に結合され得る。いくつかの構成では、１つ以上の標識成分は、検出可能なプローブ（例えば、核酸インターカレーション色素）または親和性試薬に非共有結合的と会合され得る。いくつかの構成では、保持成分は、標識成分を囲み、または封入し得る（例えば、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）または量子ドット上のポリマーコーティング）。標識成分は、共有結合（例えば、クリック反応を介して）、配位結合（例えば、ケイ素ナノ粒子に対するシランリンカー）、または非共有結合（例えば、核酸ハイブリダイゼーション）によって保持成分に結合され得る。標識成分は、保持成分上の官能基と標識成分上の官能基との間に共有結合を形成する化学的反応によって保持成分に結合され得る。反応は、本明細書に示されるまたは当該技術分野で知られているものを含む、任意の好適な方法によって行われ得る。

【０１２２】

保持成分には、他の成分（例えば、結合成分、標識成分または別の保持成分）のための１つ以上の結合部位を提供する粒子（例えば、マイクロ粒子またはナノ粒子）が含まれ得る。いくつかの構成では、粒子には、官能化されている、官能化され得る、またはそうでなければ他の成分のための結合部位を提供するために修飾可能である表面が含まれ得る。

いくつかの構成では、粒子は、成分のための結合部位を含有するまたは含有するように修飾され得るシェルまたはコーティング（例えば、ポリマーまたはヒドロゲルコーティング）のための鋳型を提供し得る。いくつかの構成では、保持成分は、標識成分（例えば、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）または量子ドット）として有効に機能し得る。粒子には、成分の結合のための結合部位または修飾可能部位を提供する周囲のまたは同心的なシェル、層、またはコーティングが含まれ得る。シェル、コーティング、または層には、粒子表面に共有結合的または非共有結合的に接続されたポリマーまたはヒドロゲルが含まれ得る。シェル、コーティング、または層には、共有結合を形成し得、または別の分子と共有結合を形成するように修飾され得る複数の官能基が含まれ得る。シェル、コーティング、または層は、結合部位を提供し、またはそうでなければ表面を修飾する（例えば、表面のＰＥＧ化によって立体障害を提供する）追加の基で修飾され得る。

【０１２３】

多様な検出可能な部位のいずれかは、本明細書に記載の親和性試薬または検出可能なプローブのための標識成分として使用され得る。例えば、いくつかの場合では、標識は、電気化学的標識であり得、電気化学的検出によって検出され得る。これらは、帯電した部位、例えば、大きな核酸、ポリリジン、及び他の高度に帯電した化学的構造であり得、検出領域は、ＣｈｅｍＦＥＴ型センサーであり得る。代替的または付加的に、いくつかの場合では、検出可能な部位は、光学的に検出可能な部位であり得、すなわち、標識から来る異なる光エネルギーの観察に基づいて検出可能であり得る。

【０１２４】

検出可能なプローブには、１つ以上の標識成分に結合した１つ以上の保持成分が含まれ得る。保持成分に結合した１つ以上の標識成分は、検出可能なプローブの観察可能性を増加させるために選択され得る。いくつかの構成では、検出可能なプローブは、標識の種に関して同種である複数の標識成分を含有し得る（例えば、単一タイプのフルオロフォア、同種の核酸バーコード等）。他の構成では、検出可能なプローブは、異種の複数の標識成分種を含有し得る（例えば、異なる放射波長を有するフルオロフォアの混合物、フルオロフォア及び核酸バーコードの混合物）。任意に、検出可能なプローブは、重複シグナルまたは本明細書で示される方法または装置で検出される場合に区別不可能なシグナルを生成する複数の標識成分を含有し得る。例えば、検出可能なプローブに存在する複数のフルオロフォアは、フルオロフォアが互いに同じ波長または互いに異なる波長で励起されるかどうかにかかわらず共通の波長で蛍光を放射し得る。代替的には、検出可能なプローブは、互いに異なるシグナル、例えば、本明細書で示される方法または装置において検出される場合に区別可能なまたは区別されるシグナルを生成する複数の標識成分を含有し得る。

【０１２５】

検出可能な標識または標識成分は、親和性試薬（例えば、検出可能なプローブ）と結合パートナー、エピトープ、または標的部位との間の相互作用の同定を可能とする検出可能なシグナルを生成し得る。検出可能な標識または標識成分は、空間的情報を提供するように、例えば、空間的分解位置で検出可能なシグナルを提供するように構成され得る。検出可能な標識または標識成分は、時間的情報を提供するように、例えば、任意に空間的分解位置で、一過性のまたは減衰するシグナルを提供するように構成され得る。検出可能な標識または標識成分は、励起源（例えば、放射線、熱、化学的基質）の存在下で検出可能なシグナルを放射し得る。検出可能な標識または標識成分は、励起源（例えば、放射性標識または化学発光標識）の非存在下で検出可能なシグナルを放射し得る。検出可能な標識または標識成分は、コードされたシグナル、例えば、核酸またはポリペプチドバーコードを含有し得る。

【０１２６】

いくつかの構成では、標識成分には、検出可能な化学的シグナルを生成する結合した酵素、タンパク質、または酵素の配列が含まれ得る。例示的な酵素には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）またはアルカリホスファターゼが含まれ得る。基質分子を検出可能な分子（例えば、蛍光化合物）に変換する、または後に酵素またはタンパク質に

おいて蛍光または発光効果を生成する基質分子を結合させる酵素またはタンパク質が選択され得る。例えば、ＨＲＰは、基質分子、例えば、ＡＢＴＳ、ＯＰＤ、ＡｍｐｌｅｘＲｅｄ、ＤＡＢ、ＡＥＣ、ＴＭＢ、ホモバニリン酸、またはルミノールを蛍光または発光分子に変換し得る。いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、基質分子の存在下で結合パートナー、エピトープ、または標的部位と相互作用して、検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合相互作用の位置の空間的シグナルを提供する沈着した蛍光または発光分子を生成し得る。代替的構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合相互作用は、基質分子の反応の連続を介して検出可能なシグナルを生成する反応経路または反応配列によって検出され得る。例えば、酵素、例えば、ＨＲＰまたはアルカリホスファターゼは、結合パートナー、エピトープ、または標的部位と共局在化され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬には、共局在化した酵素によって処理または変化することができない基質からの基質分子を、共局在化した酵素の基質である産物に変換する１つ以上の酵素が含まれ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬には、検出可能な生成物に基質を変換する複数の異なる酵素または酵素複合体（例えば、ポリケチドシンターゼ）が含まれ得る。

【０１２７】

検出可能な標識または標識成分は、選択された標識種のために適切であるようなシグナル検出源によって検出され得る。光学的標識及び光学的検出器が特に有用である。本明細書で使用され得る光学的検出装置及びその部品の例には、核酸シーケンシングのために市販されているもの、例えば、Ｉｌｌｕｍｉｎａ（商標），Ｉｎｃ．によって提供されるもの（例えば、ＨｉＳｅｑ（商標）、ＭｉＳｅｑ（商標）、ＮｅｘｔＳｅｑ（商標）、またはＮｏｖａＳｅｑ（商標）システム）、Ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（商標）によって提供されるもの（例えば、ＡＢＩ ＰＲＩＳＭ（商標）、またはＳＯＬｉＤ（商標）システム）、Ｐａｃｉｆｉｃ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓによって提供されるもの（例えば、ＳＭＲＴ（商標）技術を使用したシステム、例えば、Ｓｅｑｕｅｌ（商標）またはＲＳ ＩＩ（商標）システム）、またはＱｉａｇｅｎによって提供されるもの（例えば、Ｇｅｎｅｒｅａｄｅｒ（商標）システム）または米国特許出願公開番号２０１０／０１１１７６８Ａ１または米国特許番号７，３２９，８６０；８，９５１，７８１または９，１９３，９９６（これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものが含まれる。他の有用な検出器は、米国特許番号５，８８８，７３７；６，１７５，００２；５，６９５，９３４；６，１４０，４８９；または５，８６３，７２２；または米国特許公開番号２００７／００７９９１Ａ１、２００９／０２４７４１４Ａ１、または２０１０／０１１１７６８；またはＷＯ２００７／１２３７４４（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０１２８】

本明細書で示される方法において使用され得る他の検出技術には、例えば、質量を把握するために使用され得る質量分析；表面への結合を把握するために使用され得る表面プラズモン共鳴；標識が吸収するエネルギーの波長を把握するために使用され得る吸光度；標識の存在による温度の変化を把握するために使用され得る熱量測定；標識の電気的特性を把握するために使用され得る電気伝導度またはインピーダンス、または他の既知の分析技術が含まれる。例えば、帯電した標識は、電子的検出器、例えば、プロトンまたはピロホスフェートの検出のために使用されるｃｈｅｍＦＥＴ検出器（例えば、米国特許出願公開番号２００９／００２６０８２Ａ１；２００９／０１２７５８９Ａ１；２０１０／０１３７１４３Ａ１；または２０１０／０２８２６１７Ａ１（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、またはＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，Ｍａｓｓ．から市販されているＩｏｎ Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）システムで商業化された検出器を参照されたい）を使用して検出され得る。米国特許出願公開番号２０１７／０２４０９６２Ａ１、２０１８／００５１３１６Ａ１、２０１８／０１１２２６５Ａ１、２０１８／０１５５７７３Ａ１もしくは２０１８／０３０５７２７Ａ１；または米国特許番号９，１６４，０５３、９，８２９，４５６、１０，０３６，０６４、もしくは１０，１２

５，３９１（これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものの１つ以上等のＦＥＴ検出器が使用され得る。

【０１２９】

標識成分には、発光性である部位または分子（例えば、ルミノフォアまたはフルオロフォア）が含まれ得る。別の波長の光による励起に反応して１つの波長の光を放射するルミノフォアは、容易に検出可能な光シグナルを提供するそれらの能力、及び多様な異なる励起及び放射光スペクトルに調整されるそれらの能力を考慮すると光学的に検出可能な標識として特に有用であり、それらの開発及び使用における大きな柔軟性を提供する。

【０１３０】

多様なルミノフォアのいずれかが本明細書で使用され得る。いくつかの場合では、ルミノフォアは、小分子であり得る。いくつかの場合では、ルミノフォアは、タンパク質であり得る。ルミノフォアには、紫外スペクトル、可視スペクトル、または赤外スペクトルで放射する標識が含まれ得る。いくつかの場合では、ルミノフォアは、ＦＩＴＣ、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）３５０、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）４０５、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）４８８、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）５３２、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）５４６、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）５５５、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）５６８、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）５９４、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）６４７、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）６８０、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）７５０、パシフィックブルー、クマリン、ＢＯＤＩＰＹＦＬ、パシフィックグリーン、オレゴングリーン、Ｃｙ３、Ｃｙ５、パシフィックオレンジ、ＴＲＩＴＣ、テキサスレッド、Ｒ－フィコエリトリン、アロフィコシアニン（ＡＰＣ）からなる群から選択され得る。いくつかの場合では、標識は、Ａｔｔｏ色素、例えばＡｔｔｏ３９０、Ａｔｔｏ４２５、Ａｔｔｏ４３０、Ａｔｔｏ４６５、Ａｔｔｏ４８８、Ａｔｔｏ４９０、Ａｔｔｏ４９５、Ａｔｔｏ５１４、Ａｔｔｏ５２０、Ａｔｔｏ５３２、Ａｔｔｏ５４０、Ａｔｔｏ５５０、Ａｔｔｏ５６５、Ａｔｔｏ５８０、Ａｔｔｏ５９０、Ａｔｔｏ５９４、Ａｔｔｏ６１０、Ａｔｔｏ６１１、Ａｔｔｏ６１２、Ａｔｔｏ６２０、Ａｔｔｏ６３３、Ａｔｔｏ６３５、Ａｔｔｏ６４７、Ａｔｔｏ６５５、Ａｔｔｏ６８０、Ａｔｔｏ７００、Ａｔｔｏ７２５、Ａｔｔｏ７４０、Ａｔｔｏ　ＭＢ２、Ａｔｔｏ　Ｏｘａ１２、Ａｔｔｏ　Ｒｈｏ１０１、Ａｔｔｏ　Ｒｈｏ１２、Ａｔｔｏ　Ｒｈｏ１３、Ａｔｔｏ　Ｒｈｏ１４、Ａｔｔｏ　Ｒｈｏ３Ｂ、Ａｔｔｏ　Ｒｈｏ６Ｇ、またはＡｔｔｏ　Ｔｈｉｏ１２であり得る。いくつかの場合では、ルミノフォアは、蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）、青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）、橙色蛍光タンパク質（ＯＦＰ）、及び黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）からなる群から選択される蛍光タンパク質であり得る。広範囲の有効なルミノフォアが、例えば、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　ＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃのＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ部門から市販されており、及び／またはＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ　Ｈａｎｄｂｏｏｋ（１１ｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ）（参照により本明細書に組み込まれる）において一般的に記載されている。標識成分にはまた、インターカレーション色素、例えば、臭化エチジウム、臭化プロピジウム、クリスタルバイオレット、４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ）、７－アミノアクチノマイシンＤ（７－ＡＡＤ）、Ｈｏｅｓｃｈｔ３３２５８、Ｈｏｅｓｃｈｔ３３３４２、Ｈｏｅｓｃｈｔ３４５８０、ＹＯＹＯ－１、ＤｉＹＯ－１、ＴＯＴＯ－１、ＤｉＴＯ－１、またはそれらの組み合わせが含まれ得る。

【０１３１】

特定の蛍光標識または他のルミノフォアは、所望の用途に応じて選択され、いくつかの場合では、例えば、多重検出を最適化するために、それらの吸収／放射スペクトルに基づいて選択され得る。同様に、いくつかの場合では、ルミノフォアには、有利な蛍光特性を提供するために相互作用する蛍光色素の対が含まれ得る。例えば、対合した色素は、フェルスター共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）対として機能し得、その対の一方のメンバー（すなわち、「ドナー」）の励起は、他のメンバー（すなわち、「アクセプター」）を励起

する、またはそれに移動させられるエネルギー移動をもたらす。アクセプターは次いで、ドナーから単独で生じたであろう放射からシフトした波長で発光を放射する。

【０１３２】

いくつかの場合では、光学的に検出可能な標識には、他のタイプの検出可能な部位が含まれ得る。例えば、いくつかの場合では、発光粒子（例えば、マイクロ粒子またはナノ粒子）、例えば、半導体ナノ粒子、「量子ドット」、またはＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）粒子が標識成分として含まれ得る。

【０１３３】

ルミノフォアは、特徴的な励起または吸光波長によって特性化され得る。励起源には、ルミノフォアの特徴的な励起または吸光波長に調整される光源が含まれ得る。ルミノフォアは、ピーク波長で生じる光の最大吸光度を伴って、所定範囲の波長にわたって光を吸収し得る。ルミノフォアは、励起ピークでまたはその近くで励起され得る。本明細書で示される方法の特定の構成では、ルミノフォアは、スペクトルの紫外（ＵＶ）、可視（ＶＩＳ）または赤外（ＩＲ）領域における放射線によって励起され得る。ＶＩＳ領域における励起は、スペクトルの赤色、橙色、黄色、緑色、青色または紫色領域のうちの１つ以上で生じ得る。ルミノフォアは、特徴的な放射波長によって特性化され得る。ルミノフォアは、ピーク波長で生じる光の最大発光を伴って、所定範囲の波長にわたって光を放射し得る。ルミノフォアは、放射ピークでまたはその近くで検出され得る。本明細書で示される方法の特定の構成では、ルミノフォアからの放射は、スペクトルの紫外（ＵＶ）、可視（ＶＩＳ）または赤外（ＩＲ）領域で検出され得る。ＶＩＳ領域における検出は、スペクトルの赤色、橙色、黄色、緑色、青色または紫色領域のうちの１つ以上で生じ得る。

【０１３４】

検出可能なプローブにおける複数の標識成分の存在は、例えば、１）検出の可能性を増加させることによって；２）標識喪失（例えば、標識のフォトブリーチング、化学的損傷、切断等）の場合の余剰性を提供することによって；及び／または３）検出可能なプローブによって生成されるシグナル強度を増加させることによって、検出可能なプローブの観察可能性を増加させ得る。検出可能なプローブと会合した標識成分の量は、プローブサイズ、所望の標識間隔、シグナル強度、測定長さ、測定環境、及び標識サイズを含む、様々な要素によって決定され得る。

【０１３５】

検出可能なプローブは、選択された数の会合した標識成分を有し得る。検出可能なプローブは、互いに異なる（例えば、本明細書で示される方法または装置において互いに区別可能なシグナルを生成する標識の異種混合物）か、または同じ（例えば、本明細書で示される方法または装置において互いに区別不可能なシグナルを生成する標識の混合物）であるかにかかわらず、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、またはそれ超を有し得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブは、互いに異なる（例えば、本明細書で示される方法または装置において互いに区別可能なシグナルを生成する標識の異種混合物）か、または同じ（例えば、本明細書で示される方法または装置において互いに区別不可能なシグナルを生成する標識の混合物）であるかにかかわらず、多くとも約１００、９５、９０、８５、８０、７５、７０、６５、６０、５５、５０、４９、４８、４７、４６、４５、４４、４３、４２、４１、４０、３９、３８、３７、３６、３５、３４、３３、３２、３１、３０、２９、２８、２７、２６、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、またはそれ未満を有し得る。

【０１３６】

検出可能なプローブ上の標識成分の選択された多様性または量は、バックグラウンドシ

グナルを超えるシグナルを提供し得る。例えば、蛍光によって検出されるプローブは、例えば、自己蛍光、シグナルクロストーク、及び衝突外部源等の源からの既存のバックグラウンドを超える蛍光シグナルを生成し得る。検出可能なプローブには、シグナルバックグラウンド強度（例えば、最大、最小、または平均）を少なくとも２ｘ、５ｘ、１０ｘ、２５ｘ、５０ｘ、１００ｘ、またはそれを超えて上回る検出可能なシグナル強度を生成するように構成された標識成分の多様性または量が含まれ得る。追加的にまたは代替的に、検出可能なプローブには、シグナルバックグラウンド強度（例えば、最大、最小、または平均）を多くとも約１００ｘ、５０ｘ、２５ｘ、１０ｘ、５ｘ、２ｘ、またはそれ未満上回る検出可能なシグナル強度を生成するように構成された標識成分の量が含まれ得る。

【０１３７】

検出可能なプローブには、複数のタイプ及び／または種の標識成分が含まれ得る。例えば、検出可能なプローブには、少なくとも１つのルミノフォア及び少なくとも１つの核酸バーコード配列が含まれ得る。別の例では、検出可能なプローブには、２つ以上の異なるルミノフォア（例えば、Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８及びＡｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７）が含まれ得る。異なるルミノフォアは、１つ以上のシグナル特性、例えば、それらの励起スペクトル、放射スペクトル、発光寿命、または発光偏光に関して異なり得る。いくつかの構成では、異なるルミノフォアは、１つ以上のシグナル特性に関して同様であり得る。例えば、２つのルミノフォアは、同じ波長で励起され得るが、異なる波長で放射し得る。このように、単一の励起源は、それでもなおそれらの放射特性の相違に基づいて区別される２つの異なるルミノフォアを励起するために使用され得る。検出可能なプローブには、独自のシグナルフィンガープリントを生成することを含む様々な目的のために複数のタイプ及び／または種の標識成分が含まれ得、多重標識検出方法（例えば、ＦＲＥＴまたは発光消光）を可能とし、及び／または偽陽性または偽陰性検出を減少させるためにシグナル余剰性を生成する。

【０１３８】

検出可能なプローブには、標識タイプ及び／または種に基づいて、標識成分の異種混合物が含まれ得る。検出可能なプローブは、互いに同じであるかまたは互いに異なるかにかかわらず、少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、またはそれを超える標識成分を有し得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブは、互いに同じであるかまたは互いに異なるかにかかわらず、多くとも約１００、９５、９０、８５、８０、７５、７０、６５、６０、５５、５０、４９、４８、４７、４６、４５、４４、４３、４２、４１、４０、３９、３８、３７、３６、３５、３４、３３、３２、３１、３０、２９、２８、２７、２６、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、またはそれ未満の標識成分を有し得る。

【０１３９】

検出可能なプローブには、検出可能な標識種に基づいて、選択された比で標識成分の異種混合物が含まれ得る。例えば、特定のエピトープのための検出可能なプローブには、それぞれ、モル濃度ベースで約３：１の比でＡｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８及びＡｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）－６４７色素が含まれ得る。検出可能なプローブには、少なくとも約１：１、１．５：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、２５：１、５０：１、１００：１、２５０：１、５００：１、１０００：１、２５００：１、５０００：１、１００００：１、２５０００：１、５００００：１、１０００００：１、２５００００：１、５０００００：１、１０００００００：１、またはそれを超える比で第１の標識成分及び異なる第２の標識成分が含まれ得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブには、多くとも約１０００００００：１、５０００００：１、２５００００：１、１０００００：１、５００００：１、２５００

０：１、１００００：１、５０００：１、２５００：１、１０００：１、５００：１、２５０：１、１００：１、５０：１、２５：１、１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１．５：１、またはそれ未満の比で第１の標識成分及び異なる第２の標識成分が含まれ得る。

【０１４０】

図４９Ａは、検出可能なプローブの概略図を提供する。各検出可能なプローブは、２つの部分：標識された親和性プローブ（２００）及び鋳型（２０１）からなる。示されるように、標識された親和性プローブ２００には、結合成分２００ａ、保持成分を提供するアニーリング領域２００ｂ、及び酵素的に伸長した標識成分２００ｃが含まれる。鋳型２０１には、アニーリング領域２００ｂに相補的な配列である２０１ａ、及び２００ｃの酵素的伸長のための鋳型である２０１ｂが含まれる。図４９Ｂは、標識成分を形成するためのアプタマープローブの酵素的伸長の段階的な例示を示している。

【０１４１】

いくつかの場合では、標識成分は、保持成分（例えば、米国仮出願番号６３／１１２，６０７に示される骨格）を含み、またはそれに結合され得る。複数の標識成分は、保持成分に沿ってランダムに間隔が空けられて提供され得、またはいくつかの場合では、保持成分の長さにそって規則的または半規則的な間隔で配置され得る。他の場合では、単一の標識成分は、保持成分に、例えば、核酸の５’末端で結合され得る。図５０Ａを参照されたい。さらに他の場合では、保持成分の核酸は、アニーリング領域を含むように設計され得、アニーリング領域の末端で単一の標識成分（例えば、フルオロフォア）を有し得る。追加の単一のフルオロフォアを有する核酸の第２の鎖は、この領域にアニーリングされ得る。図５０Ｂを参照されたい。

【０１４２】

本開示の親和性試薬は、任意の標識成分を含む必要はないことが理解される。したがって、親和性試薬は、本明細書で示される標識成分の１つ以上の標識成分または種を省略するまたは欠くように構成され得る。その上、１つ以上の標識成分を有する本明細書で示される例示的な親和性試薬または検出可能なプローブは、例示された標識成分の１つ以上を省略するように構成され得る。本開示の親和性試薬または検出可能なプローブは、本明細書で示される結合成分の１つ以上の結合成分または種を省略するまたは欠くように構成され得ることも理解される。

【０１４３】

保持成分は、検出可能なプローブまたは親和性試薬の中心的構造的要素を形成し得る。いくつかの構成では、保持成分は、他の成分、例えば、結合成分、標識成分または他の保持成分の物理的配置の制約または制御を提供するように構造化され得る。例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬には、結合成分間の接触または交差反応性を防止するために保持成分上の十分に間隔が空けられた位置で結合した結合成分が含まれ得る。別の例では、検出可能なプローブには、隣接するルミノフォア間の消光を減少または防止するために保持成分上の十分に間隔が空けられた位置で結合したルミノフォアが含まれ得る。第３の例では、検出可能なプローブには、ＦＲＥＴを容易化するように間隔が空けられ、配向された保持成分上の位置で結合したルミノフォアが含まれ得る。保持成分は、それに結合した成分の位置及び／または配置を制御するように操作され、または合理的に設計され得る。保持成分の設計に影響を及ぼし得る要素には、１）隣接する成分間の可能性のある相互作用の特質；２）隣接する成分間の相互作用の可能性；３）隣接する成分間の可能性のある相互作用のための重要なスケール（例えば、距離、体積、時間）；４）保持成分の物理的特性（例えば、形状、コンフォメーション、サイズ、硬質性等）；５）結合したプローブ成分の物理的特性（形状、コンフォメーション、サイズ、流体力学的半径等）；６）成分を保持成分に結合させる任意のリンカーの特質及び特性；及び７）検出可能なプローブまたは親和性試薬と結合パートナーとの間の可能性のある相互作用の特質が含まれる。

【０１４４】

いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬には、１つ以上の核酸を含

む保持成分が含まれ得る。例えば、保持成分を形成する１つ以上の核酸は、核酸折り紙構造、核酸ナノボール構造または他の構造化核酸粒子の形態をとり得る。核酸保持成分は、単一の核酸鎖または複数の核酸鎖、例えば、複数のオリゴヌクレオチド鎖を含有し得る。複数の核酸鎖を含む保持成分は、天然らせん形構造を超える増加した構造的複雑性を有する核酸構造を形成するために複数の鎖の間でハイブリダイゼーションによって形成され得る。核酸には、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡ、またはそれらの組み合わせ等の核酸が含まれ得る。核酸には、非天然ヌクレオチド、例えば、発光的に修飾されたヌクレオチドが含まれ得る。核酸には、光切断性リンカー（例えば、ニトロベンジル、カルボニル、またはベンジルベースの光切断性リンカー）等のそれらの構造内の非ヌクレオチド残基が含まれ得る。核酸を含む保持成分は、所定の条件下で崩壊または不安定化するように構造化され得る。保持成分は、結合パートナーからの検出可能なプローブまたは親和性試薬の除去を容易にするために、切断または不安定化され得る。核酸を含む保持成分には、制限酵素によって切断され、それにより核酸保持成分の崩壊または不安定化を容易化し得る複数の制限部位が含まれ得る。核酸を含む保持成分には、複数の光切断性、化学的切断性またはそうでなければ反応性の結合が含まれ得、それにより保持成分の崩壊または不安定化を容易化する。

【０１４５】

保持成分には、核酸ナノボールが含まれ得る。ナノボールは、コンパクトな構造を形成するためにそれ自体でフォールディングする核酸の一本鎖を含有し得る。任意に、ナノボールは、ナノボールを比較的コンパクトな構造に制約するために架橋され得る。例示的な架橋には、一本鎖の異なる領域にハイブリダイズするソラレンまたはオリゴヌクレオチド等の化学的架橋が含まれる。核酸ナノボールは、コンカテマーにおける配列の各単位が環状鋳型と相補的な配列を有するコンカテマー増幅産物を生成するために環状鋳型の回転環状増幅によって生成され得る。核酸ナノボールに組み込まれ得る例示的な配列要素には、ナノボールに関する情報、例えば、その源または使用履歴を提供するタグ配列、鎖内架橋剤として使用されるオリゴヌクレオチドと相補的な配列、官能基または成分、例えば、結合成分または標識成分に結合したオリゴヌクレオチドと相補的な配列等が含まれる。例示的な核酸ナノボールならびにそれらの製造及び使用のための方法は、米国特許番号８，４４５，１９４（参照により本明細書に組み込まれる）に示されている。

【０１４６】

核酸ナノボールは、繰り返されるコンカテマー単位の回転環状増幅（ＲＣＡ）またはライゲーション等の方法によって形成され得る。核酸ナノボールには、特定の数の繰り返されるコンカテマー単位が含まれ得る。核酸ナノボールには、少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００またはそれを超えるコンカテマー単位が含まれ得る。代替的または付加的に、核酸ナノボールには、多くとも約１０００、９００、８００、７００、６００、５００、４５０、４００、３５０、３００、２５０、２００、１９０、１８０、１７０、１６０、１５０、１４０、１３０、１２０、１１０、１００、９５、９０、８５、８０、７５、７０、６５、６０、５５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、またはそれ未満のコンカテマー単位が含まれ得る。核酸ナノボールにおけるコンカテマー単位は、少なくとも約２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、またはそれを超えるヌクレオチドのヌクレオチド配列長さを有し得る。代替的または付加的に、核酸ナノボールにおけるコンカテマー単位は、多くとも約２００、１９０、１８０、１７０、１６０、１５０、１４０、１３０、１２０、１１０、１００、９５、９０、８５、８０、７５、７０、６

５、６０、５５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、またはそれ未満のヌクレオチドのヌクレオチド配列長さを有し得る。

【０１４７】

保持成分には、核酸折り紙が含まれ得る。したがって、保持成分には、三次または四次構造、例えば、スフィア、ケージ、チューブ、ボックス、タイル、ブロック、木、ピラミッド、ホイール、それらの組み合わせ、及び任意の他の可能性のある構造を有する１つ以上の核酸が含まれ得る。ＤＮＡ折り紙で形成されたそのような構造の例は、Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．Ｎａｎｏ Ｌｅｔｔ．１１，２９９７－３００２（２０１１）（参照により本明細書に組み込まれる）に示されている。いくつかの構成では、核酸折り紙には、骨格及び複数のステープルが含まれ得、骨格は、核酸の単一連続鎖であり、ステープルは、全体的にまたは部分的に、骨格核酸とハイブリダイズするように構成されたオリゴヌクレオチドである。連続骨格鎖及びいくつかのステープル鎖を使用して形成された核酸折り紙構造の例は、Ｒｏｔｈｅｍｕｎｄ Ｎａｔｕｒｅ ４４０：２９７－３０２（２００６）または米国特許番号８，５０１，９２３または９，３４０，４１６（これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）に示されている。１つ以上の核酸（例えば、折り紙またはナノボール構造に見られる）を含む保持成分には、一本鎖核酸の領域、二本鎖核酸の領域、またはそれらの組み合わせが含まれ得る。

【０１４８】

いくつかの実施形態では、核酸折り紙には、閉鎖核酸鎖を有する骨格、及び骨格にハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドが含まれる。核酸骨格には、相補的オリゴヌクレオチドがないときは、環状または接続鎖（すなわち、５’または３’末端がない）である核酸の連続鎖が含まれ得る。いくつかの構成では、核酸骨格は、天然源、例えば、ウイルスゲノムまたは細菌プラスミドに由来する。他の構成では、核酸骨格は、操作されたもの、合理的に設計されたもの、または合成であり得る。骨格には、１つ以上の修飾されたヌクレオチドが含まれ得る。修飾されたヌクレオチドは、検出可能なプローブまたは親和性試薬の構築の前、間、または後に追加の成分（例えば、結合成分、標識成分または別の保持成分）を結合させるための官能基または結合部位を提供し得る。修飾されたヌクレオチドには、連結基または官能基（例えば、クリック反応を実施するように構成された官能基）が含まれ得る。いくつかの構成では、核酸骨格には、Ｍ１３ウイルスゲノムの一本鎖が含まれ得る。核酸骨格のサイズは、保持成分の所望のサイズに応じて変わり得る。核酸骨格には、少なくとも約１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、またはそれを超えるヌクレオチドが含まれ得る。代替的または付加的に、核酸骨格には、多くとも約１００００、９０００、８０００、７０００、６０００、５０００、４０００、３０００、２０００、１０００またはそれ未満のヌクレオチドが含まれ得る。

【０１４９】

保持成分、例えば、核酸折り紙には、複数のオリゴヌクレオチド（例えば、ステープル）が含まれ得る。ステープルには、核酸骨格、他のステープル、またはそれらの組み合わせとハイブリダイズするように構成されたオリゴヌクレオチドが含まれ得る。ステープルには、１つ以上の修飾されたヌクレオチドが含まれ得る。ステープルは、追加の化学的実体、例えば、結合成分、標識成分、化学的反応性基（例えば、官能基またはハンドル）、または他の基（例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部位）を含むように修飾され得る。ステープルには、線状または環状核酸が含まれ得る。ステープルには、一本鎖核酸、二本鎖核酸、またはそれらの組み合わせの領域が含まれ得る。ステープルは、相補的塩基対ハイブリダイゼーションまたはライゲーションによって他の核酸と結合するように構成され得る。ステープルは、相補的核酸鎖のためのプライマーとして作用するように構成され得、プライミングステープルは、二本鎖核酸の伸長した領域を形成するために酵素（例えば、ポリメラーゼ、例えば、鋳型指向ポリメラーゼまたは非鋳型指向ポリメラーゼ、例えば、ターミナルトランスフェラーゼ）によって伸長され得る。

【０１５０】

ステープルは、保持成分の設計に応じて任意の長さであり得る。ステープルは、ソフトウエアパッケージ、例えば、ＣＡＤＮＡＮＯ、ＡＴＨＥＮＡ、またはＤＡＥＤＡＬＵＳによって設計され得る。ステープルは、少なくとも約１０、２５、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、２５００、３０００、３５００、４０００、４５００、５０００、またはそれを超えるヌクレオチドの長さを有し得る。代替的または付加的に、ステープルは、多くとも約５０００、４５００、４０００、３５００、３０００、２５００、２０００、１９００、１８００、１７００、１６００、１５００、１４００、１３００、１２００、１１００、１０００、９５０、９００、８５０、８００、７５０、７００、６５０、６００、５５０、５００、４５０、４００、３５０、３００、２５０、２００、１５０、１００、５０、２５、１０、またはそれ未満のヌクレオチドの長さを有し得る。

【０１５１】

ステープルには、１つ以上の修飾されたヌクレオチドが含まれ得る。修飾されたヌクレオチドは、追加の成分、例えば、結合成分または標識成分を結合させるための結合部位を提供し得る。修飾されたヌクレオチドは、検出可能なプローブまたは親和性試薬の構築の前、間、または後に追加の成分のための結合部位として利用され得る。ステープルには、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、７５、１００またはそれを超える修飾されたヌクレオチドが含まれ得る。代替的または付加的に、ステープルには、多くとも約１００、７５、５０、４０、３０、２０、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、または１つの修飾されたヌクレオチドが含まれ得る。

【０１５２】

ステープルは、検出可能なプローブ、親和性試薬または核酸折り紙の所望の安定性を達成するように設計または修飾され得る。安定性は、構築された折り紙からの個々のオリゴヌクレオチドの解離によって影響を受け得る。オリゴヌクレオチドの喪失は、検出可能なプローブまたは親和性試薬のための機能性の喪失（例えば、成分結合部位の喪失、結合成分の喪失、標識成分の喪失等）または二次もしくは三次構造の不安定化を含む様々な不安定化効果を有し得、それにより他のオリゴヌクレオチドのさらなる不安定化を促進する。核酸保持成分における骨格またはステープルには、核酸保持成分の安定性を促進する共有結合的または非共有結合的結合を形成するように構成された１つ以上の修飾されたヌクレオチドが含まれ得る。例えば、オリゴヌクレオチドには、他のオリゴヌクレオチドにおけるまたは骨格鎖における修飾されたヌクレオチドと共有結合または架橋を形成する１つ以上の修飾されたヌクレオチドが含まれ得る。代替的または付加的に、オリゴヌクレオチドは、解離の可能性を低下させるために最小のハイブリダイゼーション長さまたは最小融解温度を有するように設計され得る。

【０１５３】

検出可能なプローブまたは親和性試薬におけるオリゴヌクレオチドは、別のオリゴヌクレオチドまたは骨格鎖とハイブリダイズし、特定数の塩基対を形成し得る。オリゴヌクレオチドは、少なくとも約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、またはそれを超える連続または総塩基対のハイブリダイゼーション領域を形成し得る。代替的または付加的に、オリゴヌクレオチドは、多くとも約５０、４９、４８、４７、４６、４５、４４、４３、４２、４１、４０、３９、３８、３７、３６、３５、３４、３３、３２、３１、３０、２９、２８、２７、２６、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、またはそれ未満の連続または総塩基対のハイブリダイゼーション領域を形成し得る。

【０１５４】

検出可能なプローブ、親和性試薬または核酸折り紙におけるオリゴヌクレオチドは、特性化された融解温度を有し得る。融解温度は、ヌクレオチド塩基対結合相互作用が遮断され、それによりオリゴヌクレオチドの解離を引き起こす温度を指し得る。核酸保持成分におけるオリゴヌクレオチドは、少なくとも約５０°Ｃ、５１°Ｃ、５２°Ｃ、５３°Ｃ、５４°Ｃ、５５°Ｃ、５６°Ｃ、５７°Ｃ、５８°Ｃ、５９°Ｃ、６０°Ｃ、６１°Ｃ、６２°Ｃ、６３°Ｃ、６４°Ｃ、６５°Ｃ、６６°Ｃ、６７°Ｃ、６８°Ｃ、６９°Ｃ、７０°Ｃ、７１°Ｃ、７２°Ｃ、７３°Ｃ、７４°Ｃ、７５°Ｃ、７６°Ｃ、７７°Ｃ、７８°Ｃ、７９°Ｃ、８０°Ｃ、８１°Ｃ、８２°Ｃ、８３°Ｃ、８４°Ｃ、８５°Ｃ、８６°Ｃ、８７°Ｃ、８８°Ｃ、８９°Ｃ、９０°Ｃ、またはそれを超える特性化された融解温度を有し得る。代替的または付加的に、核酸保持成分におけるオリゴヌクレオチドは、多くとも約９０°Ｃ、８９°Ｃ、８８°Ｃ、８７°Ｃ、８６°Ｃ、８５°Ｃ、８４°Ｃ、８３°Ｃ、８２°Ｃ、８１°Ｃ、８０°Ｃ、７９°Ｃ、７８°Ｃ、７７°Ｃ、７６°Ｃ、７５°Ｃ、７４°Ｃ、７３°Ｃ、７２°Ｃ、７１°Ｃ、７０°Ｃ、６９°Ｃ、６８°Ｃ、６７°Ｃ、６６°Ｃ、６５°Ｃ、６４°Ｃ、６３°Ｃ、６２°Ｃ、６１°Ｃ、６０°Ｃ、５９°Ｃ、５８°Ｃ、５７°Ｃ、５６°Ｃ、５５°Ｃ、５４°Ｃ、５３°Ｃ、５２°Ｃ、５１°Ｃ、５０°Ｃ、またはそれ未満の特性化された融解温度を有し得る。

【０１５５】

検出可能なプローブまたは親和性試薬には、保持成分上の特定の位置で複数の結合成分を配置するように構成された保持成分が含まれ得る。相対的配置は、隣接する結合成分間の正のまたは負の相互作用についての潜在性によって部分的に決定され得る。例えば、いくつかの隣接する結合成分（例えば、アプタマー、ペプタマー）は、結合成分の特定の種と近接した場合にミスフォールディングまたはコンフォメーション的変化をする傾向があり得る。そのような結合成分は、そのような負の相互作用の可能性を最小化するために十分な分離から利益を受け得る。別の例では、いくつかの結合成分は、複数の結合成分が近接した場合にアビディティの増加を経験し得る。いくつかの構成では、保持成分上の特定の位置での結合成分の配置は、正のアビディティ効果と負の親和性試薬間相互作用との間のバランスを最適化することによって決定され得る。

【０１５６】

検出可能なプローブまたは親和性試薬上の結合成分の配置は、全体的にまたは部分的に、保持成分の構造的特性によって決定され得る。いくつかの構成では、保持成分には、特定の組成物または方法において、例えば、溶液中または固体支持体上で使用される場合に変形する傾向がない本質的に硬質、非弾性、または非変形性の物質（例えば、炭素または金属ナノ粒子）が含まれ得る。他の構成では、保持成分には、いくらかの程度の変形、例えば、伸張、圧縮、または屈曲（例えば、ねじりまたは側屈）をする傾向がある柔軟性のまたは変形可能な物質（例えば、ポリマー、核酸等）が含まれ得る。保持成分の自然変形は、保持成分に結合した隣接する結合成分の相対的近接性を増加または低下させるコンフォメーション的変化を生成し得る。

【０１５７】

結合成分は、親和性試薬が重複する有効占有体積を有しないように他の結合成分に対して十分な分離を伴って保持成分上に配置され得る。図３Ａは、保持成分３００に結合した第１の結合成分３１０及び第２の結合成分３２０の概略図を示している。第１の結合成分３１０は、有効占有体積３１５を有し、第２の結合成分３２０は、有効占有体積３２５を有する。第１の結合成分３１０及び第２の結合成分３２０は、有効占有体積３１５及び３２５が重複しないことを確保するために必要な最小距離である分離距離Δｓで保持成分３００に結合されている。

【０１５８】

いくつかの構成では、結合成分は、結合成分が分離ギャップを有するように他の結合成分に対して十分な分離を伴って保持成分上に配置され得る。図３Ｂは、分離ギャップΔｓで保持成分３００に結合した第１の結合成分３１０及び第２の結合成分３２０の概略図を示している。第１の結合成分３１０は、有効占有体積３１５を有し、第２の結合成分３２

０は、有効占有体積３２５を有する。第１の結合成分３１０及び第２の結合成分３２０は、有効占有体積３１５及び３２５が長さΔｇの分離ギャップを有することを確保するために必要な最小距離である分離距離Δｓで保持成分３００に結合されている。

【０１５９】

いくつかの構成では、結合成分は、結合成分が重複する有効占有体積を有するように他の結合成分に対して分離を伴って保持成分上に配置され得る。図３Ｃは、保持成分３００に結合した第１の結合成分３１０及び第２の結合成分３２０の概略図を示している。第１の結合成分３１０は、有効占有体積３１５を有し、第２の結合成分３２０は、有効占有体積３２５を有する。第１の結合成分３１０及び第２の結合成分３２０は、有効占有体積３１５及び３２５が重複することを引き起こし、それにより重複体積ΔＶを生成する分離距離Δｓで保持成分３００に結合されている。

【０１６０】

検出可能なプローブまたは親和性試薬上の結合成分の配置は、全体的にまたは部分的に、結合成分を保持成分に接続させる任意のリンカーの構造的特性によって決定され得る。リンカーは、保持成分と結合成分との間の分離を提供すること、結合成分を配置すること、他の化学的実体のための結合部位を提供すること、不要な保持成分－結合成分相互作用の可能性を最小化すること、または保持成分と結合成分との間の所望の化学的特性（例えば、疎水性）を生成すること等の様々な目的のために使用され得る。リンカーには、硬質または立体配置的に制約された化学基（例えば、アルケン、アルキン、環式化合物）が含まれ得る。リンカーには、柔軟性、動的、または可動化学基（例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリエチレンオキシド（ＰＥＯ）、またはアルカン鎖）が含まれ得る。リンカーには、ポリヌクレオチドであって、それが存在する方法または装置に存在する他の核酸に結合するように構成されていない、ポリヌクレオチドが含まれ得る。核酸（例えば、ＲＮＡ、ＤＮＡ、ＰＮＡ）を含むリンカーには、それ自体で二次構造（例えば、ヘアピン、ステム及び／またはループ構造）の領域を形成するポリヌクレオチドが含まれ得る。リンカーは、保持成分に結合した結合成分の移動のための自由度を追加的に提供し得る。

【０１６１】

図４Ａ～４Ｄは、結合成分がリンカーによって保持成分に結合した場合に占有し得る体積を制御する例示的な方法を示している。図４Ａは、それぞれリンカー４２０及び４２２によって実質的に平坦な保持成分表面４００に結合した第１の結合成分４１０及び第２の結合成分４１２の概略図を示している。第１の結合成分４１０及び第２の結合成分４１２は、それぞれ、静的有効占有体積４１５及び４１７を有する（静的有効占有体積は、リンカーによって引き起こされる動作がない場合に結合成分によって占有される最大体積である）。リンカー４２０及び４２２は、第１の結合成分４１０及び第２の結合成分４１２が移動するための追加の自由度を提供し、それにより動的有効占有体積４２５及び４２７をそれぞれ生成する。第１の結合成分４１０及び第２の結合成分４１２は、動的有効占有体積４２５及び４２７間の分離ギャップΔg_1を生成する距離Δs_1で分離された平坦な保持成分表面４００上の位置でリンカー４２０及び４２２によって結合されており、結合成分が互いに接触または相互作用することができないことを確保している。代替的には、図４Ｂは、２つの隣接する結合成分間の相互作用を遮断するための中間化学的部位の使用を示している。図４Ｂは、第１の結合成分４１０及び第２の結合成分４１２、ならびにリンカー４２０、及び４２２によってそれぞれ実質的に平坦な保持成分表面４００に結合した中間化学的部位またはブロック基４３０（例えば、ＰＥＧ、ＰＥＯ、アルカン鎖、デキストラン）の概略図を示している。第１の結合成分４１０、第２の結合成分４１２、及びブロック基４３０は、それぞれ、静的有効占有体積４１５、４１７、及び４３５を有する（静的有効占有体積は、リンカーによって引き起こされる動作がない場合に結合成分によって占有される最大体積である）。リンカー４２０及び４２２は、第１の結合成分４１０及び第２の結合成分４１２が移動するための追加の自由度を提供し、それにより動的有効占有体積４２５及び４２７をそれぞれ生成する。第１の結合成分４１０及び第２の結合成分

４１２は、距離Δｓ$_2$で分離された平坦な保持成分表面４００上の位置でリンカー４２０及び４２２によって結合されており、有効な分離ギャップΔｇ$_2$が、中間化学的部位またはブロック基４３０による（例えば、立体反発）による妨害により、動的有効占有体積４２５及び４２７間に生成されている。中間化学的部位またはブロック基４３０の使用は、結合成分間相互作用のブロックにより実質的に平坦な表面上で結合成分間の必要な距離Δｓ$_2$を減少させ得る。

【０１６２】

図４Ｃは、保持成分のコンフォメーションを変化させることによって結合成分相互作用を最小化する概略図を示している。図４Ｃは、リンカー４２０及び４２２によって非平坦保持成分表面４５０にそれぞれ結合した第１の結合成分４１０及び第２の結合成分４１２の概略図を示している。第１の結合成分４１０及び第２の結合成分４１２は、それぞれ、静的有効占有体積４１５及び４１７を有する（静的有効占有体積は、リンカーによって引き起こされる動作がない場合に結合成分によって占有される最大体積である）。リンカー４２０及び４２２は、第１の結合成分４１０及び第２の結合成分４１２が移動するための追加の自由度を提供し、それにより動的有効占有体積４２５及び４２７をそれぞれ生成する。第１の結合成分４１０及び第２の結合成分４１２は、動的有効占有体積４２５及び４２７間の分離ギャップΔｇ$_3$を生成する距離Δｓ$_3$で分離された非平坦保持成分表面４５０上の位置でリンカー４２０及び４２２によって結合されており、結合成分が互いに接触または相互作用することができないことを確保している。代替的には、図４Ｄは、２つの隣接する結合成分間の相互作用を遮断するための中間化学的部位の使用を示している。図４Ｄは、リンカー４２０及び４２２によってそれぞれ非平坦保持成分表面４５０に結合した第１の結合成分４１０及び第２の結合成分４１２、ならびに中間化学的部位またはブロック基４３０（例えば、ＰＥＧ）の概略図を示している。第１の結合成分４１０、第２の結合成分４１２、及び中間化学的部位またはブロック基４３０は、それぞれ、静的有効占有体積４１５、４１７、及び４３５を有する（静的有効占有体積は、リンカーによって引き起こされる動作がない場合に結合成分によって占有される最大体積である）。リンカー４２０及び４２２は、第１の結合成分４１０及び第２の結合成分４１２が移動するための追加の自由度を提供し、それにより動的有効占有体積４２５及び４２７をそれぞれ生成する。第１の結合成分４１０及び第２の結合成分４１２は、距離Δｓ$_4$で分離された平坦な保持成分表面４５０上の位置でリンカー４２０及び４２２によって結合されており、有効な分離ギャップΔｇ$_4$が、中間化学的部位４３０による（例えば、立体反発）による妨害により、動的有効占有体積４２５及び４２７間に生成されている。中間化学的部位またはブロック基４３０の使用は、結合成分間相互作用のブロックにより非平坦表面上で結合成分間の必要な距離Δｓを減少させ得る。

【０１６３】

図５Ａ及び５Ｂは、核酸を含む保持成分上の標識成分の相対的位置及び／または配向を制御するための代替的構成を示している。図５Ａは、連続骨格鎖５１０とより短いステープルオリゴヌクレオチド（例えば、オリゴヌクレオチド５２０及び５２２）との間のハイブリダイゼーションによって形成されるらせん形核酸の短い領域を示している。オリゴヌクレオチドは、場合により、短い鎖破断５２５によって遮断される。ステープルオリゴヌクレオチド５２０及び５２２には、それぞれフルオロフォア５３０及び５３２がさらに含まれる。フルオロフォア５３０及び５３２が結合したオリゴヌクレオチド５２０及び５２２上の位置により、フルオロフォア５３０及び５３２は、分離距離Δｓｆ$_1$で保持成分の同じサイドに配置される。分離距離は、フルオロフォア５３０及び５３２の結合位置を変更することによって、またはフルオロフォアが結合するオリゴヌクレオチドを変更することによって必要に応じて増加または減少させられ得る。代替的には、図５Ｂは、連続骨格鎖５１０とより短いステープルオリゴヌクレオチド（例えば、オリゴヌクレオチド５２０及び５２２）との間のハイブリダイゼーションによって形成されるらせん形核酸の短い領域を示している。オリゴヌクレオチドは、場合により、短い鎖破断５２５によって遮断される。ステープルオリゴヌクレオチド５２０及び５２２には、それぞれフルオロフォア５

３０及び５３２がさらに含まれる。フルオロフォア５３０及び５３２が結合したオリゴヌクレオチド５２０及び５２２上の位置により、フルオロフォア５３０及び５３２は、分離距離Δs_{f2}で保持成分の反対のサイドに配置される。図５Ａ及び５Ｂは、標識成分間の同様の分離距離が異なる標識配向によってどのように達成され得るかを実証する。

【０１６４】

本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬は、結合成分及び／または標識成分を提示するための非常に調整可能なプラットフォームを提供するように構成され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の調整可能性は、プローブのアビディティ及び／または生成される検出可能なシグナルの強度をカスタマイズ及び／または最適化する能力として現れ得る。調整可能性は、プローブ上の特定の位置で１つ以上の結合成分に結合され、及び／または１つ以上の標識成分に結合され得るカスタマイズ可能な保持成分から生じ得る。

【０１６５】

本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬は、顕著に増加したアビディティを有するものとして特性化され得る。理論に縛られることを望むものではなく、検出可能なプローブまたは親和性試薬の増加したアビディティは、結合パートナーからの検出可能なプローブまたは親和性試薬のオン速度を集合的に増加させ（例えば、増加した解離速度定数k_{on}によって示される）、オフ速度を低下させ（例えば、増加した解離速度定数k_{off}によって示される）、または結合成分が結合パートナーに再結合し得る前にプローブが結合パートナーから離れて拡散する可能性を低下させる複数の結合成分の存在に由来し得る。驚くべきことに、本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物は、解離定数または結合オン速度もしくはオフ速度によって特性化される場合、プローブに結合した複数の結合成分からの任意の単一の結合成分の親和性よりも少なくとも１桁高い結合パートナーに対する親和性を示し得ることが判明した。

【０１６６】

検出可能なプローブまたは親和性試薬の調整可能な特質は、プローブの保持成分への結合成分の結合をカスタマイズする能力に部分的に由来し得る。１）結合成分の総数；２）結合成分の位置及び／または配向；３）結合成分の面積または体積密度；４）複数の結合成分の親和性；５）保持成分の構造；及び６）検出可能なプローブまたは親和性試薬の全体的サイズを含むいくつかの要素は、アビディティ効果の強度に影響を及ぼし得る。その上、記載されるプローブ構造の設計柔軟性は、検出可能なプローブまたは親和性試薬を結合パートナーの近くに一時的に局在させる他の隣接する実体と弱く相互作用し得るペンダント尾部等の、アビディティを増加させ得る追加の成分の包含を可能とし得る。

【０１６７】

検出可能なプローブまたは親和性試薬についてのアビディティ及び／または観察可能性は、その中の保持成分の設計柔軟性を利用することによって調整され得る。保持成分は、１）結合成分提示のための広範囲の潜在的位置及び配向を提供する三次元構造；及び２）高い特異性で所望の位置で三次元構造に結合成分を結合させる能力を提供する場合に選択され得る。結合成分（及び標識成分）のための正確に配置された結合位置を有する複雑な三次元構造を生成するために核酸ハイブリダイゼーションの特異性を活用する核酸を含む保持成分が特に対象となる。

【０１６８】

いくつかの構成では、核酸構造（例えば、ＤＮＡナノボールまたは核酸折り紙）は、保持成分として利用され得る。核酸構造は、保持成分に付加される成分の位置及び配向にわたって高い程度の空間的制御を提供するという利点を生み出し得る。核酸構造は、典型的には、らせん形構造のターン当たり約１０～１１個の塩基対を有し得、これは二本鎖核酸内の各独自の物理的位置が、関連する配向角度を有することを意味する。この核酸の特性は、プローブ成分、例えば、結合成分及び／または標識成分の間の分離の量をカスタマイズするために位置及び配向の豊富なバリエーションを提供することによって核酸ベースの保持成分構造の調整可能性を容易化する。

【０１６９】

他の構成では、保持成分は、保持成分構造及び／または化学の合理的な制御または修飾によってプローブ成分の制御された空間的及び／または配向制御を有し得る。非核酸保持成分は、制御されたまたは変化したプローブ成分位置及び／または配向を有する保持成分を生成するように操作または修飾され得る。いくつかの場合では、プローブ成分の位置または配向は、非核酸粒子、ナノ粒子、または物体の形状またはコンフォメーションによって制御され得る。例えば、シェル様構造またはプレート様構造は、標識成分に対して結合成分の異なる位置を可能とする変化した特性を有する複数の表面を提供し得る。その上、非核酸保持成分は、コーティングを伴って提供され、または空間的に制御された様式で複合体に形成され得、それにより結合位置及び配向にわたって増加した制御を可能とする。

【０１７０】

図６Ａ～６Ｆは、三次元保持成分構造（例えば、ＤＮＡ折り紙、炭素ナノ粒子、ケイ素ナノ粒子等）によって生成される配置の柔軟性を実証するための検出可能なプローブ組成物の様々な簡略化された構成を示している。図６Ａは、長方形またはタイル形状の検出可能なプローブの上面図を示している。プローブは、幅及び高さならびに厚さ（示されていない）を有し、上面（示されている）、ならびに側面及び底面（示されていない）を作り出す保持成分６１０を含有する。複数の結合成分６２０が保持成分６１０に結合されており、結合成分は、保持成分のサイドに沿って特定の位置にある。標識成分６３０は、検出可能なプローブの上面（及び任意に底面）上の特定の位置に位置している。図６Ｂは、図６Ａに示されるプローブとは逆の結合スキームを有する長方形またはタイル形状のプローブの上面図を示している。プローブは、幅及び高さならびに厚さ（示されていない）を有し、上面（示されている）、ならびに側面及び底面（示されていない）を作り出す保持成分６１０を含有する。複数の結合成分６２０が、検出可能なプローブの上面（及び任意に底面）上の特定の位置で保持成分６１０に結合されている。標識成分６３０は、保持成分のサイドに沿って特定の位置に位置している。図６Ａに示されるプローブ構成は、大面積上面上の標識のための位置の増加のため、強い検出シグナルまたはより大きな面積または体積にわたって分布した検出シグナルを必要とするシステムのために好ましい場合がある。図６Ｂに示されるプローブ構成は、大面積上面上の結合成分の密度を増加させる潜在性のため、検出可能なプローブまたは親和性試薬のプローブアビディティを増加させるために好ましい場合がある。

【０１７１】

図６Ｃ及び６Ｄは、長方形またはタイル形状の検出可能なプローブの側面構成を示しており、プローブのより薄い厚さ寸法に対するプローブ成分の配向を示している。図６Ｃは、側面、ならびに上面及び底面（示されていない）を作り出す幅及び高さ（示されていない）ならびに厚さを有する保持成分６１０を含有する検出可能なプローブを示している。複数の結合成分６２０が保持成分６１０に結合されており、結合成分は、検出可能なプローブの上面上の特定の位置で結合されている。標識成分６３０は、検出可能なプローブの底面上の特定の位置に位置している。図６Ｄは、側面、ならびに上面及び底面（示されていない）を作り出す幅及び高さ（示されていない）ならびに厚さを有する保持成分６１０を含有する検出可能なプローブを示している。複数の結合成分６２０及び標識成分６３０が保持成分６１０に結合されており、結合成分は、検出可能なプローブの上面及び底面上の特定の位置で結合されている。図６Ｃにおけるプローブ構成は、大きなプローブが結合パートナーのいくつかまたはすべてが標識成分と相互作用することを遮断し、それにより結合パートナーまたはその近接環境による標識の任意の消光を場合により減少または軽減するので、蛍光検出システムのために有利であり得る。図６Ｄにおけるプローブ構成は、検出可能なプローブを結合パートナーと接触させる可能性を増加させることによって検出可能なプローブまたは親和性試薬のために存在する結合成分の量を最大化するために有用であり得る。

【０１７２】

図６Ｅ及び６Ｆは、代替的保持成分形状を示している。図６Ｅは、円形または球状構成を含む検出可能なプローブを示している。プローブは、プローブ成分の結合のための追加

の位置を提供する内部構造を任意に含む保持成分６１０を含有する。複数の結合成分６２０が保持成分６１０の外周または表面に結合されている。保持成分６１０の内部領域は、複数の標識成分６３０を含有する。図６Ｅに示される構成は、保持成分６１０上の結合成分６２０の高い被覆率のため、結合パートナーを見つけ出すプローブの可能性を増加させ得、保持成分６１０の内部空間において複数の標識成分６３０を濃縮する潜在性のため、高い検出可能なシグナルをさらに提供し得る。図６Ｆは、１つ以上の面上の角度的オフセットを特徴とする保持成分６１０を有するプローブの側面図または断面図を示している。保持成分６１０の一方のサイドは、結合した結合成分６２０を含有する。保持成分６１０の反対のサイドは、結合した標識成分６３０を含有する。図６Ｆに示される構成は、保持成分６１０の底面に結合した結合成分６２０の増加した体積密度のため、アビディティを増加させるために遊離であり得る。より複雑な形状は、結合成分６２０と結合パートナーとの接触を増加させ、結合パートナーから離れてプローブが拡散することに対する耐性を増加させ得る。当業者は、図６Ａ～６Ｆに記載の形状の無数のバリエーションが、保持成分の多数の潜在的設計を考慮して存在し得ることを認識する。

【０１７３】

保持成分には、主に核酸から構成されない物体（例えば、粒子、ナノ粒子、またはマイクロ粒子）が含まれ得る。保持成分は、製造または合成された物体、例えば、ケイ素またはシリカナノ粒子、炭素ナノ粒子、セルロースナノビーズ、ＰＥＧナノビーズ、ポリマー性ナノ粒子（例えば、ポリアクリレート粒子、ポリスチレンベースの粒子、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）等）、または量子ドットである保持成分を利用して形成され得る。粒子、ナノ粒子、または物体には、固体物質及びシェル様物質（例えば、炭素ナノスフィア、酸化ケイ素ナノシェル、酸化鉄ナノスフィア、ポリメチルメタクリレートナノスフィア等）が含まれ得る。粒子、ナノ粒子、または物体を含む保持成分には、区別できる表面、例えば、プレートまたはシェルが含まれ得る。いくつかの構成では、保持成分上の区別できる表面は、成分（例えば、第１の表面上の結合成分、第２の表面上の標識成分）を隔離するために利用され得る。保持成分には、成分の結合を可能とするように直接的に官能化または修飾（例えば、ケイ素または二酸化ケイ素ナノ粒子のシラン化）され得る物質が含まれ得る。保持成分には、市販の粒子、ナノ粒子、または物体が含まれ得る。保持成分は、市販の粒子、ナノ粒子、または物体を修飾することによって調製され得る。粒子及びナノ粒子等の構造を修飾するための方法及び化学は、当該技術分野において広範に記載されている。

【０１７４】

図３１Ａ～３１Ｄは、粒子またはナノ粒子から保持成分を形成するための様々な構成を示している。図３１Ａは、複数の結合部位３１２０を伴って直接的に官能化された表面を有する固体球状粒子３１１０を示している。結合部位は、検出可能なプローブ成分、例えば、結合成分及び／または標識成分への共有結合的または非共有結合的結合を形成するように構成され得る。図３１Ｂは、異種の複数の第１の結合部位３１２０及び第２の結合部位３１２５を含む固体球状粒子３１１０を示している。いくつかの構成では、等しい数の第１の結合部位３１２０及び第２の結合部位３１２５が存在し得る。他の構成では、異なる数の第１の結合部位３１２０及び第２の結合部位３１２５が存在し得る。第１の結合部位３１２０及び／または第２の結合部位３１２５は、検出可能なプローブ成分、例えば、結合成分及び／または標識成分への共有結合的または非共有結合的結合を形成するように構成され得る。図３１Ａ及び３１Ｂの固体球状粒子は、中空粒子で容易に置換され得る。中空粒子は、内部表面上に結合部位３１２０または３１２５を伴って提供され得る。いくつかの構成では、中空粒子には、異なる表面への検出可能なプローブ成分の隔離を可能とするために外部表面上の第１の複数の結合部位３１２０及び内部表面上の第２の複数の結合部位３１２５が含まれ得る。

【０１７５】

図３１Ｃ及び３１Ｄは、表面コーティング、シェル、または層（例えば、官能基のポリマー、ヒドロゲルコーティング、または単層）を含む固体球状粒子から形成された保持成

分を示している。図３１Ｃは、表面コーティングまたは層３１３０を含む固体球状粒子３１１０を示している。コーティングまたは層３１３０は、複数の結合部位３１２０を伴って提供される。結合部位は、検出可能なプローブ成分、例えば、結合成分及び／または標識成分への共有結合的または非共有結合的結合を形成するように構成され得る。図３１Ｄは、表面コーティング３１３０を含む球状の検出可能な粒子３１１５（例えば、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）、量子ドット）を示している。コーティングまたは層３１３０は、複数の結合部位３１２０を伴って提供される。結合部位は、検出可能なプローブ成分、例えば、結合成分及び／または標識成分への共有結合的または非共有結合的結合を形成するように構成され得る。コーティングまたは層は、粒子、ナノ粒子、または物体への結合成分または他の成分の結合を可能とする骨格として機能し得る。当業者は、記載される保持成分が、非球状粒子、ナノ粒子、または物体、例えば、ナノチューブ、プレート、ボウル、棒、及び錐体に容易に適応され得ることを容易に認識する。

【０１７６】

図３４Ａ～３４Ｃは、空間的に制御または隔離されたプローブ成分を有する非核酸保持成分の様々な構成を示している。図３４Ａは、空間的に隔離された結合成分３４２０及び標識成分３４３０を有する球状粒子、ナノ粒子、または物体３４１０を示している。図３４Ｂは、外部に結合した結合成分３４２０から標識成分３４３０を隔離するために粒子または物体３４１２の中空内部領域を利用する中空またはシェル様粒子または物体３４１２を示している。図３４Ｃは、おおよそ１８０°の角度的オフセットを伴う２つの区別できる表面を有するプレート様粒子または物体３４１４を示している。上側表面は、複数の標識成分３４３０を結合させるために使用され得るのに対し、下表面は、複数の結合成分３４２０を結合させるために使用され得る。

【０１７７】

２つの結合成分は、それらがそれらの相対的位置の観点から角度的オフセットを有するような様式で保持成分に結合され得る。例えば、保持成分の平坦面に結合した２つの結合成分は、約０度（°）の角度的オフセットを有するであろう。別の例では、立方体様保持成分の反対のサイドに結合した２つの結合成分は、約１８０°の角度的オフセットを有するであろう。角度的オフセットは、隣接する結合成分間の接触または他の相互作用を制約するために利用され得る。２つの結合成分は、少なくとも約０°、５°、１０°、１５°、２０°、２５°、３０°、３５°、４０°、４５°、５０°、５５°、６０°、６５°、７０°、７５°、８０°、８５°、９０°、９５°、１００°、１０５°、１１０°、１１５°、１２０°、１２５°、１３０°、１３５°、１４０°、１４５°、１５０°、１５５°、１６０°、１６５°、１７０°、１７５°、またはそれを超える相対的角度的オフセットを有し得る。代替的または付加的に、２つの結合成分は、多くとも約１８０°、１７５°、１７０°、１６５°、１６０°、１５５°、１５０°、１４５°、１４０°、１３５°、１３０°、１２５°、１２０°、１１５°、１１０°、１０５°、１００°、９５°、９０°、８５°、８０°、７５°、７０°、６５°、６０°、５５°、５０°、４５°、４０°、３５°、３０°、２５°、２０°、１５°、１０°、５°、またはそれ未満の相対的角度的オフセットを有し得る。

【０１７８】

検出可能なプローブまたは親和性試薬は、プローブの全体的アビディティを増加させるようにさらに修飾され得る。図７Ａ及び７Ｂは、結合成分の提示のための空間的自由度を増加させるためのリンカーの使用を示している。図７Ａは、複数の結合した結合成分７２０及び複数の標識成分７３０を有する保持成分７１０を含む検出可能なプローブを示している。複数の結合成分７２０のサブセットは、結合成分７２０のサブセットが保持成分７１０から離れて伸長することを可能とするリンカー７４０（例えば、ＰＥＧ、ＰＥＯ、アルカン鎖等）によって保持成分７１０に結合されている。図７Ｂは、図７Ａと同様のプローブ構成を示しているが、プローブには、結合成分の２つの異なる種が含まれる。プローブは、複数の結合した標識成分７３０を有する保持成分７１０を含有する。プローブには、リンカー７４０によって保持成分７１０に結合した第１の複数の結合した結合成分７２

０（例えば、抗体または抗体断片）及び第２の複数の結合した結合成分７２２（例えば、アプタマー）がさらに含まれる。リンカーは、時間単位当たりのより大きな体積領域にわたって結合パートナー、エピトープ、または標的部位の増加した感知を容易化することによってプローブアビディティを増加させるために有利であり得る。その上、リンカーは、成分の柔軟性または分離を提供し得、これは、結合パートナー、エピトープ、または標的部位へのプローブの結合を加速させ、可能性のある結合パートナー、エピトープ、または標的部位からのプローブの拡散を減速させ得る。

【０１７９】

検出可能なプローブまたは親和性試薬のサイズは、意図された使用態様に合うように構成され得る。使用態様（例えば、ポリペプチド特性化、非ポリペプチド特性化、治療、診断）は、検出可能なプローブまたは親和性試薬のためのアビディティ及び／または観察可能性のレベルを示し得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、意図された使用態様のために十分な数の結合成分及び／または標識成分の結合を可能とするために十分にサイズ調整され得る。いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬のサイズは、保持成分のおおよその長さ、面積、または体積を指し得る。保持成分に結合した成分（例えば、結合成分、標識成分、リンカー、ブロック基）は、それらの長さ、面積サイズ、または体積サイズの特性化をより困難とする増加した空間的自由度を有し得る。保持成分は、より規則的なまたはより可変性が低いサイズを有することで、保持成分のサイズを、検出可能なプローブまたは親和性試薬のサイズのための実行可能な代用物とするように構成され得る。

【０１８０】

検出可能なプローブ、親和性試薬またはその保持成分は、特徴的長さを有し得る。特徴的長さには、幅、高さ、半径、直径、外周、または他の寸法についての最大、平均または最小長さが含まれ得る。検出可能なプローブ、親和性試薬またはその保持成分は、少なくとも約５ｎｍ、１０ｎｍ、１５ｎｍ、２０ｎｍ、２５ｎｍ、３０ｎｍ、３５ｎｍ、４０ｎｍ、４５ｎｍ、５０ｎｍ、５５ｎｍ、６０ｎｍ、６５ｎｍ、７０ｎｍ、７５ｎｍ、８０ｎｍ、８５ｎｍ、９０ｎｍ、９５ｎｍ、１００ｎｍ、１２０ｎｍ、１４０ｎｍ、１６０ｎｍ、１８０ｎｍ、２００ｎｍ、２５０ｎｍ、３００ｎｍ、３５０ｎｍ、４００ｎｍ、４５０ｎｍ、５００ｎｍ、６００ｎｍ、７００ｎｍ、８００ｎｍ、９００ｎｍ、１０００ｎｍ、またはそれを超える特徴的長さを有し得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブ、親和性試薬またはその保持成分は、多くとも約１０００ｎｍ、９００ｎｍ、８００ｎｍ、７００ｎｍ、６００ｎｍ、５００ｎｍ、４５０ｎｍ、４００ｎｍ、３５０ｎｍ、３００ｎｍ、２５０ｎｍ、２００ｎｍ、１８０ｎｍ、１６０ｎｍ、１４０ｎｍ、１２０ｎｍ、１００ｎｍ、９５ｎｍ、９０ｎｍ、８５ｎｍ、８０ｎｍ、７５ｎｍ、７０ｎｍ、６５ｎｍ、６０ｎｍ、５５ｎｍ、５０ｎｍ、４５ｎｍ、４０ｎｍ、３５ｎｍ、３０ｎｍ、２５ｎｍ、２０ｎｍ、１５ｎｍ、１０ｎｍ、５ｎｍ、またはそれ未満の特徴的長さを有し得る。

【０１８１】

検出可能なプローブ、親和性試薬またはその保持成分は、特徴的フットプリント（例えば、表面上の占有された面積）を有し得る。フットプリントは、検出可能なプローブ、親和性試薬またはその保持成分の二次元突出が平面表面上で作られるであろう面積を構成し得る。二次元突出は、規則的な形状またはおおよそ規則的な形状、例えば、三角形、四角形、長方形、円形、五角形、六角形、八角形、または楕円を有し得る。図２Ａ～２Ｂは、破線として示される理想的形状（それぞれ２２０及び２２５）を伴って、おおよその形状を有する保持成分２１０または２１５のための二次元突出の例を示している。検出可能なプローブ、親和性試薬またはその保持成分は、少なくとも約２５ｎｍ^2、１００ｎｍ^2、５００ｎｍ^2、１０００ｎｍ^2、２０００ｎｍ^2、３０００ｎｍ^2、４０００ｎｍ^2、５０００ｎｍ^2、５５００ｎｍ^2、６０００ｎｍ^2、６５００ｎｍ^2、７０００ｎｍ^2、７５００ｎｍ^2、８０００ｎｍ^2、８５００ｎｍ^2、９０００ｎｍ^2、１００００ｎｍ^2、１５０００ｎｍ^2、２００００ｎｍ^2、２５０００ｎｍ^2、５００００ｎｍ^2、１０００００ｎｍ^2、１０００００００ｎｍ^2、またはそれを超える専有面積を有し得る。代替的ま

たは付加的に、検出可能なプローブ、親和性試薬またはその保持成分は、多くとも約１００００００ｎｍ^2、１０００００ｎｍ^2、５００００ｎｍ^2、２５０００ｎｍ^2、２００００ｎｍ^2、１５０００ｎｍ^2、１００００ｎｍ^2、９０００ｎｍ^2、８５００ｎｍ^2、８０００ｎｍ^2、７５００ｎｍ^2、７０００ｎｍ^2、６５００ｎｍ^2、６０００ｎｍ^2、５５００ｎｍ^2、５０００ｎｍ^2、４０００ｎｍ^2、３０００ｎｍ^2、２０００ｎｍ^2、１０００ｎｍ^2、５００ｎｍ^2、１００ｎｍ^2、２５ｎｍ^2、またはそれ未満の専有面積を有し得る。専有面積についての上記範囲は、所望により、検出可能なプローブ、親和性試薬またはその保持成分のすべての面についての平均；検出可能なプローブ、親和性試薬またはその保持成分の最も小さな面；または検出可能なプローブ、親和性試薬またはその保持成分の最も大きな面を指し得る。

【０１８２】

保持成分は、所望のまたは最適な間隔で結合した他の成分（例えば、結合成分、標識成分または他の保持成分）を有するように構成され得る。結合成分の間隔は、不要なまたは有害な相互作用（例えば、アプタマーミスフォールディング；フルオロフォア自己消光）を減少または排除するために最小間隔に基づく場合がある。結合成分の間隔は、所望の特徴、例えば、アビディティまたは検出可能なシグナル強度を達成するために最大間隔に基づく場合がある。リンカーまたは他の柔軟性のある結合方法によって保持成分に接続される成分（すなわち、動作のための追加の自由度を有する成分）のため、結合した成分の間隔は、保持成分上の結合部位間の間隔として測定され得る。２つの隣接する結合した成分（例えば、結合成分、標識成分、ブロック基）は、少なくとも約０．１ｎｍ、０．２ｎｍ、０．３ｎｍ、０．４ｎｍ、０．５ｎｍ、０．６ｎｍ、０．７ｎｍ、０．８ｎｍ、０．９ｎｍ、１．０ｎｍ、１．１ｎｍ、１．２ｎｍ、１．３ｎｍ、１．４ｎｍ、１．５ｎｍ、１．６ｎｍ、１．７ｎｍ、１．８ｎｍ、１．９ｎｍ、２ｎｍ、３ｎｍ、４ｎｍ、５ｎｍ、６ｎｍ、７ｎｍ、８ｎｍ、９ｎｍ、１０ｎｍ、１１ｎｍ、１２ｎｍ、１３ｎｍ、１４ｎｍ、１５ｎｍ、１６ｎｍ、１７ｎｍ、１８ｎｍ、１９ｎｍ、２０ｎｍ、２１ｎｍ、２２ｎｍ、２３ｎｍ、２４ｎｍ、２５ｎｍ、２６ｎｍ、２７ｎｍ、２８ｎｍ、２９ｎｍ、３０ｎｍ、３５ｎｍ、４０ｎｍ、またはそれを超える特徴的間隔を有し得る。代替的または付加的に、２つの隣接する結合した成分は、多くとも約４０ｎｍ、３５ｎｍ、３０ｎｍ、２９ｎｍ、２８ｎｍ、２７ｎｍ、２６ｎｍ、２５ｎｍ、２４ｎｍ、２３ｎｍ、２２ｎｍ、２１ｎｍ、２０ｎｍ、１９ｎｍ、１８ｎｍ、１７ｎｍ、１６ｎｍ、１５ｎｍ、１４ｎｍ、１３ｎｍ、１２ｎｍ、１１ｎｍ、１０ｎｍ、９ｎｍ、８ｎｍ、７ｎｍ、６ｎｍ、５ｎｍ、４ｎｍ、３ｎｍ、２ｎｍ、１．９ｎｍ、１．８ｎｍ、１．７ｎｍ、１．６ｎｍ、１．５ｎｍ、１．４ｎｍ、１．３ｎｍ、１．２ｎｍ、１．１ｎｍ、１．０ｎｍ、０．９ｎｍ、０．８ｎｍ、０．７ｎｍ、０．６ｎｍ、０．５ｎｍ、０．４ｎｍ、０．３ｎｍ、０．２ｎｍ、０．１ｎｍ、またはそれ未満の特徴的間隔を有し得る。

【０１８３】

検出可能なプローブまたは親和性試薬には、保持成分の表面または面に結合した複数の結合成分が含まれ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の表面上に提示される結合成分の数は、アビディティを増加させ、または結合成分に十分に間隔を空けて不要な相互作用を避けるように構成され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の表面上の結合成分の数は、平均数密度（表面当たりの数）または面積密度（面積当たりの数）として特性化され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の２つの異なる表面または面は、異なる数または面積密度の結合成分を有し得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、表面当たり少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、またはそれを超える平均結合成分数密度を有し得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、多くとも約５０、４９、４８、４７、４６、４５、４４、４３、４２、４１、４０、３９、３８、３７、３６、３５、３４、３３、３２、３１、３０、２９、２８、

２７、２６、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、またはそれ未満の平均結合成分数密度を有し得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、ｎｍ^{2}当たり少なくとも約０．０００００１、０．０００１、０．００１、０．００２、０．００３、０．００４、０．００５、０．００６、０．００７、０．００８、０．００９、０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、またはそれを超える平均結合成分面積密度を有し得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、ｎｍ^{2}当たり多くとも約１、０．９、０．８、０．７、０．６、０．５、０．４、０．３、０．２、０．１、０．０９、０．０８、０．０７、０．０６、０．０５、０．０４、０．０３、０．０２、０．０１、０．００９、０．００８、０．００７、０．００６、０．００５、０．００４、０．００３、０．００２、０．００１、０．０００１、０．００００１、またはそれ未満の平均結合成分面積密度を有し得る。

【０１８４】

検出可能なプローブまたは親和性試薬には、保持成分の表面または面に結合した複数の標識成分が含まれ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の表面上に提示される標識成分の数は、観察可能性を増加させ、または標識成分に十分に間隔を空けて不要な相互作用を避けるように最適化され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の表面上の標識成分の数は、平均数密度（表面当たりの数）または面積密度（面積当たりの数）として特性化され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の２つの異なる表面または面は、異なる数または面積密度の標識成分を有し得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、表面当たり少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、またはそれを超える平均標識成分数密度を有し得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、表面当たり多くとも約５０、４９、４８、４７、４６、４５、４４、４３、４２、４１、４０、３９、３８、３７、３６、３５、３４、３３、３２、３１、３０、２９、２８、２７、２６、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、または２未満の平均標識成分数密度を有し得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、ｎｍ^{2}当たり少なくとも約０．０００００１、０．０００１、０．００１、０．００２、０．００３、０．００４、０．００５、０．００６、０．００７、０．００８、０．００９、０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、またはそれを超える平均標識成分面積密度を有し得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、ｎｍ^{2}当たり多くとも約１、０．９、０．８、０．７、０．６、０．５、０．４、０．３、０．２、０．１、０．０９、０．０８、０．０７、０．０６、０．０５、０．０４、０．０３、０．０２、０．０１、０．００９、０．００８、０．００７、０．００６、０．００５、０．００４、０．００３、０．００２、０．００１、０．０００１、０．００００１、またはそれ未満の平均標識成分面積密度を有し得る。

【０１８５】

検出可能なプローブまたは親和性試薬には、結合成分の異種混合物が含まれ得る。結合成分の異種混合物には、異なるタイプ及び／または種の結合成分の混合物が含まれ得る。例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬には、結合パートナーに対する異なる親和性の抗体の混合物が含まれ得る。別の例では、検出可能なプローブまたは親和性試薬には、同じ結合パートナーに対する親和性を保有する抗体及びアプタマーの混合物が含まれ得る。別の例では、検出可能なプローブまたは親和性試薬には、同じ結合パートナーに対する親和性を有する抗体及び抗体断片の混合物が含まれ得る。結合成分の異種混合物は、検

出可能なプローブまたは親和性試薬のアビディティを制御するために有利であり得る。異なる結合親和性を有する結合成分の混合物は、特定の結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対して検出可能なプローブまたは親和性試薬結合オン速度及び／または結合オフ速度の最適化を容易化し得る。

【０１８６】

いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬には、結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対する親和性を有する複数の第１の結合成分、及び第２の複数の競合体結合成分が含まれ得る。競合体結合成分は、増加した解離速度（例えば、多くの標的に結合するが、標的から容易に解離する結合成分）で低下した親和性（例えば、複数の異なる結合パートナー、エピトープ、または標的部位を結合させる増加した結合広域性を有する）を有するものとして特性化され得る。理論に縛られることを望むものではなく、競合体結合成分は、別の結合成分による転移がエネルギー的に及び／またはエントロピー的に好ましい結合成分として同定され得る。例えば、複数の小さな低親和性のアプタマーまたはミニ－ペプチド結合剤は、大きな高親和性の抗体によって容易に転移され得、それにより、複数の結合成分を置換させるエントロピー的増加のため、抗体結合を優先する。競合体結合成分は、第１の複数の結合成分が親和性を欠く標的部位との簡素な弱い相互作用を形成することによって検出可能なプローブまたは親和性試薬のアビディティをさらに増加させ得る。そのような簡素な弱い相互作用は、検出可能なプローブまたは親和性試薬と結合パートナー、エピトープ、または標的部位との間の会合の継続期間の増加を容易化し得る。

【０１８７】

検出可能なプローブまたは親和性試薬は、所定の環境条件下で構造的に安定であり得る。結合したプローブを結合パートナーから除去することが意図された条件下で構造的に安定である検出可能なプローブまたは親和性試薬が特に対象となる。例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、熱または分子間相互作用を遮断する化学的組成物、例えば、界面活性剤または変性剤の存在下で安定であり得る。構造的安定性は、その十分な組成、任意に、その形状またはコンフォメーション、すなわち、結合成分、標識成分、または他の成分の喪失がないこと；成分の喪失または分解（例えば、ＤＮＡ折り紙保持成分からの核酸の脱ハイブリダイゼーション）がないことを維持する検出可能なプローブまたは親和性試薬を指し得る。

【０１８８】

検出可能なプローブまたは親和性試薬は、所与の温度で構造的に安定であり得る。温度は、検出可能なプローブまたは親和性試薬を利用するプロセス中に変化し得る。例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬を結合させる、観察する、及び除去する各工程は、独自の及び／または最適な温度で行われ得る。その上、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、所与の保存温度で構造的に安定であり得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、少なくとも約－１００℃、－９０℃、－８０℃、－７０℃、－６０℃、－５０℃、－４０℃、－３０℃、－２０℃、－１０℃、－５℃、０℃、４℃、１０℃、１５℃、２０℃、２５℃、３０℃、３５℃、４０℃、４５℃、５０℃、５５℃、６０℃、６５℃、７０℃、７５℃、８０℃、９０℃、またはそれを超える温度で構造的に安定であり得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、多くとも約９０℃、８０℃、７５℃、７０℃、６５℃、６０℃、５５℃、５０℃、４５℃、４０℃、３５℃、３０℃、２５℃、２０℃、１５℃、１０℃、４℃、０℃、－１０℃、－２０℃、－３０℃、－４０℃、－５０℃、－６０℃、－７０℃、－８０℃、－９０℃、－１００℃、またはそれ未満の温度で構造的に安定であり得る。

【０１８９】

検出可能なプローブまたは親和性試薬は、特定の溶液または溶媒の存在下で構造的に安定であり得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、検出可能なプローブまたは親和性試薬のための使用態様に応じて１つ以上の溶液または溶媒と接触させられ得る。溶液ま

たは溶媒は、検出可能なプローブまたは親和性試薬のための使用態様に応じて様々な組成を有し得る。溶液または溶媒は、プローブ製剤、プローブ保存、プローブ－パートナー結合、洗浄、濯ぎ、相互作用検出、プローブ－パートナー分離、プローブ捕捉（例えば、利用後のプローブの回収）、及びプローブ分析（例えば、核酸バーコードのプロセス後シーケンシング）等のプロセスのために使用され得る。溶液または溶媒は、検出可能なプローブまたは親和性試薬構造の安定性を維持するために製剤化され得る。溶液または溶媒は、検出可能なプローブまたは親和性試薬の安定性を確保するために化学的組成、ｐＨ、及びイオン強度に関して製剤化され得る。核酸を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬は、核酸を安定化するためにマグネシウム塩を含む溶液または溶媒に存在し得る。

【０１９０】

検出可能なプローブまたは親和性試薬と接触させられる溶液または溶媒には、溶液または懸濁液中の１つ以上の検出可能なプローブまたは親和性試薬が含まれ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬と接触させられる溶液または溶媒は、均質な液体媒体となるように製剤化され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬と接触させられる溶液または溶媒は、単一相の液体媒体となるように製剤化され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬と接触させられる溶液または溶媒は、多相の液体媒体、例えば、水中油エマルションまたは油中水エマルションとなるように製剤化され得る。

【０１９１】

検出可能なプローブまたは親和性試薬と接触させられる溶液または溶媒には、溶媒種、ｐＨ緩衝種、カチオン性種、アニオン性種、界面活性剤種、変性種、またはそれらの組み合わせが含まれ得る。溶媒種には、水、酢酸、メタノール、エタノール、ｎ－プロパノール、イソプロピルアルコール、ｎ－ブタノール、ギ酸、アンモニア、炭酸プロピレン、ニトロメタン、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、アセトン、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジメチルエーテル、ジエチルエーテル、１－４，ジオキサン、トルエン、ベンゼン、シクロヘキサン、ヘキサン、シクロペンタン、ペンタン、またはそれらの組み合わせが含まれ得る。溶媒または溶液には、ＭＥＳ、トリス、ビス－トリス、ビス－トリスプロパン、ＡＤＡ、ＡＣＥＳ、ＰＩＰＥＳ、ＭＯＰＳＯ、ＭＯＰＳ、ＢＥＳ、ＴＥＳ、ＨＥＰＥＳ、ＨＥＰＢＳ、ＨＥＰＰＳＯ、ＤＩＰＳＯ、ＭＯＢＳ、ＴＡＰＳＯ、ＴＡＰＳ、ＴＡＢＳ、ＰＯＰＳＯ、ＴＥＡ、ＥＰＰＳ、トリシン、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、ビシン、ＡＭＰＤ、ＡＭＰＳＯ、ＡＭＰ、ＣＨＥＳ、ＣＡＰＳＯ、ＣＡＰＳ、及びＣＡＢＳを含むがこれらに限定されない緩衝種が含まれ得る。溶媒または溶液には、カチオン性種、例えば、Na^{+}、K^{+}、Ag^{+}、Cu^{+}、NH_4^{+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Cd^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{2+}、Co^{2+}、Ni^{2+}、Cr^{2+}、Mn^{2+}、Ge^{2+}、Sn^{2+}、Al^{3+}、Cr^{3+}、Fe^{3+}、Co^{3+}、Ni^{3+}、Ti^{3+}、Mn^{3+}、Si^{4+}、V^{4+}、Ti^{4+}、Mn^{4+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、V^{5+}、Mn^{5+}、Mn^{6+}、Se^{6+}、及びそれらの組み合わせが含まれ得る。溶媒または溶液には、アニオン性種、例えば、F^{-}、Cl^{-}、Br^{-}、ClO_3^{-}、$H_2PO_4^{-}$、HCO_3^{-}、HSO_4^{-}、OH^{-}、I^{-}、NO_3^{-}、NO_2^{-}、MnO_4^{-}、SCN^{-}、CO_3^{2-}、CrO_4^{2-}、$Cr_2O_7^{2-}$、HPO_4^{2-}、SO_4^{2-}、SO_3^{2-}、PO_4^{3-}、及びそれらの組み合わせが含まれ得る。溶媒または溶液には、ステアリン酸、ラウリン酸、オレイン酸、ドデシル硫酸ナトリウム、ナトリウムドデシルベンゼンスルホネート、ドデシルアミン塩酸塩、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、ポリエチレンオキシド、ノニルフェニルエトキシレート、ＴｒｉｔｏｎＸ、ペンタプロピレングリコールモノドデシルエーテル、オクタプロピレングリコールモノドデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノドデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノドデシルエーテル、ラウラミドモノエチルアミン、ラウラミドジエチルアミン、オクチルグルコシド、デシルグルコシド、ラウリルグルコシド、Ｔｗｅｅｎ２０、Ｔｗｅｅｎ８０、ｎ－ドデシル－β－Ｄ－マルトシド、ノノキシノール９、グリセロールモノラウレート、ポリエトキシル化獣脂アミン、ポロキサマー、ジギトニン、ゾニルＦＳＯ、２，５－ジメチル－３－ヘキシン－２，５－ジオール、Ｉｇｅｐａｌ　ＣＡ６３０、エアロゾル－

ＯＴ、トリエチルアミン塩酸塩、臭化セトリモニウム、塩化ベンゼトニウム、オクテニジン二塩酸塩、塩化セチルピリジニウム、アドゲン、塩化ジメチルジオクタデシルアンモニウム、ＣＨＡＰＳ、ＣＨＡＰＳＯ、コカミドプロピルベタイン、アミドスルホベタイン－１６、ラウリル－Ｎ，Ｎ－（ジメチルアンモニオ）ブチレート、ラウリル－Ｎ，Ｎ－（ジメチル）－グリシンベタイン、ヘキサデシルホスホコリン、ラウリルジメチルアミンＮ－オキシド、ラウリル－Ｎ，Ｎ－（ジメチル）－プロパンスルホネート、３－（１－ピリジニオ）－１－プロパンスルホネート、３－（４－ｔｅｒｔ－ブチル－１－ピリジニオ）－１－プロパンスルホネート、Ｎ－ラウリルサルコシン、及びそれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない界面活性剤種が含まれ得る。溶媒または溶液には、酢酸、トリクロロ酢酸、スルホサリチル酸、重炭酸ナトリウム、エタノール、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、尿素、塩化グアニジニウム、過塩素酸リチウム、ドデシル硫酸ナトリウム、２－メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、及びトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）を含むがこれらに限定されない変性種が含まれ得る。

【０１９２】

ｐＨ緩衝種は、任意の量で溶媒または溶液中で製剤化され得る。ｐＨ緩衝種は、少なくとも約０．０００１Ｍ、０．００１Ｍ、０．０１Ｍ、０．０２Ｍ、０．０３Ｍ、０．０４Ｍ、０．０５Ｍ、０．０６Ｍ、０．０７Ｍ、０．０８Ｍ、０．０９Ｍ、０．１Ｍ、０．２Ｍ、０．３Ｍ、０．４Ｍ、０．５Ｍ、０．６Ｍ、０．７Ｍ、０．８Ｍ、０．９Ｍ、１Ｍ、１．１Ｍ、１．２Ｍ、１．３Ｍ、１．４Ｍ、１．５Ｍ、１．６Ｍ、１．７Ｍ、１．８Ｍ、１．９Ｍ、２Ｍ、２．１Ｍ、２．２Ｍ、２．３Ｍ、２．４Ｍ、２．５Ｍ、２．６Ｍ、２．７Ｍ、２．８Ｍ、２．９Ｍ、３Ｍ、３．１Ｍ、３．２Ｍ、３．３Ｍ、３．４Ｍ、３．５Ｍ、３．６Ｍ、３．７Ｍ、３．８Ｍ、３．９Ｍ、４Ｍ、４．１Ｍ、４．２Ｍ、４．３Ｍ、４．４Ｍ、４．５Ｍ、４．６Ｍ、４．７Ｍ、４．８Ｍ、４．９Ｍ、５Ｍ、５．１Ｍ、５．２Ｍ、５．３Ｍ、５．４Ｍ、５．５Ｍ、５．６Ｍ、５．７Ｍ、５．８Ｍ、５．９Ｍ、６Ｍ、７Ｍ、８Ｍ、９Ｍまたはそれを超える濃度で検出可能なプローブまたは親和性試薬溶媒組成物に存在し得る。代替的または付加的に、ｐＨ緩衝種は、多くとも約１０Ｍ、９Ｍ、８Ｍ、７Ｍ、６Ｍ、５．９Ｍ、５．８Ｍ、５．７Ｍ、５．６Ｍ、５．５Ｍ、５．４Ｍ、５．３Ｍ、５．２Ｍ、５．１Ｍ、５．０Ｍ、４．９Ｍ、４．８Ｍ、４．７Ｍ、４．６Ｍ、４．５Ｍ、４．４Ｍ、４．３Ｍ、４．２Ｍ、４．１Ｍ、４．０Ｍ、３．９Ｍ、３．８Ｍ、３．７Ｍ、３．６Ｍ、３．５Ｍ、３．４Ｍ、３．３Ｍ、３．２Ｍ、３．１Ｍ、３．０Ｍ、２．９Ｍ、２．８Ｍ、２．７Ｍ、２．６Ｍ、２．５Ｍ、２．４Ｍ、２．３Ｍ、２．２Ｍ、２．１Ｍ、２．０Ｍ、１．９Ｍ、１．８Ｍ、１．７Ｍ、１．６Ｍ、１．５Ｍ、１．４Ｍ、１．３Ｍ、１．２Ｍ、１．１Ｍ、１．０Ｍ、０．９Ｍ、０．８Ｍ、０．７Ｍ、０．６Ｍ、０．５Ｍ、０．４Ｍ、０．３Ｍ、０．２Ｍ、０．１Ｍ、０．０９Ｍ、０．０８Ｍ、０．０７Ｍ、０．０６Ｍ、０．０５Ｍ、０．０４Ｍ、０．０３Ｍ、０．０２Ｍ、０．０１Ｍ、０．００１Ｍ、０．０００１Ｍ、またはそれ未満の濃度で溶媒または溶液に存在し得る。

【０１９３】

カチオン性種は、任意の量で溶媒または溶液中で製剤化され得る。カチオン性種は、少なくとも約０．０００１Ｍ、０．００１Ｍ、０．０１Ｍ、０．０２Ｍ、０．０３Ｍ、０．０４Ｍ、０．０５Ｍ、０．０６Ｍ、０．０７Ｍ、０．０８Ｍ、０．０９Ｍ、０．１Ｍ、０．２Ｍ、０．３Ｍ、０．４Ｍ、０．５Ｍ、０．６Ｍ、０．７Ｍ、０．８Ｍ、０．９Ｍ、１Ｍ、１．１Ｍ、１．２Ｍ、１．３Ｍ、１．４Ｍ、１．５Ｍ、１．６Ｍ、１．７Ｍ、１．８Ｍ、１．９Ｍ、２Ｍ、２．１Ｍ、２．２Ｍ、２．３Ｍ、２．４Ｍ、２．５Ｍ、２．６Ｍ、２．７Ｍ、２．８Ｍ、２．９Ｍ、３Ｍ、３．１Ｍ、３．２Ｍ、３．３Ｍ、３．４Ｍ、３．５Ｍ、３．６Ｍ、３．７Ｍ、３．８Ｍ、３．９Ｍ、４Ｍ、４．１Ｍ、４．２Ｍ、４．３Ｍ、４．４Ｍ、４．５Ｍ、４．６Ｍ、４．７Ｍ、４．８Ｍ、４．９Ｍ、５Ｍ、５．１Ｍ、５．２Ｍ、５．３Ｍ、５．４Ｍ、５．５Ｍ、５．６Ｍ、５．７Ｍ、５．８Ｍ、５．９Ｍ、６Ｍ、７Ｍ、８Ｍ、９Ｍまたはそれを超える濃度で検出可能なプローブまたは親和性試薬溶媒組成物に存在し得る。代替的または付加的に、カチオン性種は、多くとも約１０Ｍ、９Ｍ、８Ｍ、７Ｍ、６Ｍ、５．９Ｍ、５．８Ｍ、５．７Ｍ、５．６Ｍ、５．５Ｍ、５．４Ｍ

、５．３Ｍ、５．２Ｍ、５．１Ｍ、５．０Ｍ、４．９Ｍ、４．８Ｍ、４．７Ｍ、４．６Ｍ、４．５Ｍ、４．４Ｍ、４．３Ｍ、４．２Ｍ、４．１Ｍ、４．０Ｍ、３．９Ｍ、３．８Ｍ、３．７Ｍ、３．６Ｍ、３．５Ｍ、３．４Ｍ、３．３Ｍ、３．２Ｍ、３．１Ｍ、３．０Ｍ、２．９Ｍ、２．８Ｍ、２．７Ｍ、２．６Ｍ、２．５Ｍ、２．４Ｍ、２．３Ｍ、２．２Ｍ、２．１Ｍ、２．０Ｍ、１．９Ｍ、１．８Ｍ、１．７Ｍ、１．６Ｍ、１．５Ｍ、１．４Ｍ、１．３Ｍ、１．２Ｍ、１．１Ｍ、１．０Ｍ、０．９Ｍ、０．８Ｍ、０．７Ｍ、０．６Ｍ、０．５Ｍ、０．４Ｍ、０．３Ｍ、０．２Ｍ、０．１Ｍ、０．０９Ｍ、０．０８Ｍ、０．０７Ｍ、０．０６Ｍ、０．０５Ｍ、０．００１Ｍ、０．００１Ｍ、またはそれ未満の濃度で溶媒または溶液に存在し得る。

【０１９４】

アニオン性種は、任意の量で溶媒または溶液中で製剤化され得る。アニオン性種は、少なくとも約０．０００１Ｍ、０．００１Ｍ、０．０１Ｍ、０．０２Ｍ、０．０３Ｍ、０．０４Ｍ、０．０５Ｍ、０．０６Ｍ、０．０７Ｍ、０．０８Ｍ、０．０９Ｍ、０．１Ｍ、０．２Ｍ、０．３Ｍ、０．４Ｍ、０．５Ｍ、０．６Ｍ、０．７Ｍ、０．８Ｍ、０．９Ｍ、１Ｍ、１．１Ｍ、１．２Ｍ、１．３Ｍ、１．４Ｍ、１．５Ｍ、１．６Ｍ、１．７Ｍ、１．８Ｍ、１．９Ｍ、２Ｍ、２．１Ｍ、２．２Ｍ、２．３Ｍ、２．４Ｍ、２．５Ｍ、２．６Ｍ、２．７Ｍ、２．８Ｍ、２．９Ｍ、３Ｍ、３．１Ｍ、３．２Ｍ、３．３Ｍ、３．４Ｍ、３．５Ｍ、３．６Ｍ、３．７Ｍ、３．８Ｍ、３．９Ｍ、４Ｍ、４．１Ｍ、４．２Ｍ、４．３Ｍ、４．４Ｍ、４．５Ｍ、４．６Ｍ、４．７Ｍ、４．８Ｍ、４．９Ｍ、５Ｍ、５．１Ｍ、５．２Ｍ、５．３Ｍ、５．４Ｍ、５．５Ｍ、５．６Ｍ、５．７Ｍ、５．８Ｍ、５．９Ｍ、６Ｍ、７Ｍ、８Ｍ、９Ｍまたはそれを超える濃度で溶媒または溶液に存在し得る。代替的または付加的に、アニオン性種は、多くとも約１０Ｍ、９Ｍ、８Ｍ、７Ｍ、６Ｍ、５．９Ｍ、５．８Ｍ、５．７Ｍ、５．６Ｍ、５．５Ｍ、５．４Ｍ、５．３Ｍ、５．２Ｍ、５．１Ｍ、５．０Ｍ、４．９Ｍ、４．８Ｍ、４．７Ｍ、４．６Ｍ、４．５Ｍ、４．４Ｍ、４．３Ｍ、４．２Ｍ、４．１Ｍ、４．０Ｍ、３．９Ｍ、３．８Ｍ、３．７Ｍ、３．６Ｍ、３．５Ｍ、３．４Ｍ、３．３Ｍ、３．２Ｍ、３．１Ｍ、３．０Ｍ、２．９Ｍ、２．８Ｍ、２．７Ｍ、２．６Ｍ、２．５Ｍ、２．４Ｍ、２．３Ｍ、２．２Ｍ、２．１Ｍ、２．０Ｍ、１．９Ｍ、１．８Ｍ、１．７Ｍ、１．６Ｍ、１．５Ｍ、１．４Ｍ、１．３Ｍ、１．２Ｍ、１．１Ｍ、１．０Ｍ、０．９Ｍ、０．８Ｍ、０．７Ｍ、０．６Ｍ、０．５Ｍ、０．４Ｍ、０．３Ｍ、０．２Ｍ、０．１Ｍ、０．０９Ｍ、０．０８Ｍ、０．０７Ｍ、０．０６Ｍ、０．０５Ｍ、０．０４Ｍ、０．０３Ｍ、０．０２Ｍ、０．０１Ｍ、０．００１Ｍ、０．００１Ｍ、またはそれ未満の濃度で溶媒または溶液に存在し得る。

【０１９５】

界面活性剤種は、任意の量で溶媒または溶液中で製剤化され得る。界面活性剤種は、少なくとも約０．０００１Ｍ、０．００１Ｍ、０．０１Ｍ、０．０２Ｍ、０．０３Ｍ、０．０４Ｍ、０．０５Ｍ、０．０６Ｍ、０．０７Ｍ、０．０８Ｍ、０．０９Ｍ、０．１Ｍ、０．２Ｍ、０．３Ｍ、０．４Ｍ、０．５Ｍ、０．６Ｍ、０．７Ｍ、０．８Ｍ、０．９Ｍ、１Ｍ、１．１Ｍ、１．２Ｍ、１．３Ｍ、１．４Ｍ、１．５Ｍ、１．６Ｍ、１．７Ｍ、１．８Ｍ、１．９Ｍ、２Ｍ、２．１Ｍ、２．２Ｍ、２．３Ｍ、２．４Ｍ、２．５Ｍ、２．６Ｍ、２．７Ｍ、２．８Ｍ、２．９Ｍ、３Ｍ、３．１Ｍ、３．２Ｍ、３．３Ｍ、３．４Ｍ、３．５Ｍ、３．６Ｍ、３．７Ｍ、３．８Ｍ、３．９Ｍ、４Ｍ、４．１Ｍ、４．２Ｍ、４．３Ｍ、４．４Ｍ、４．５Ｍ、４．６Ｍ、４．７Ｍ、４．８Ｍ、４．９Ｍ、５Ｍ、５．１Ｍ、５．２Ｍ、５．３Ｍ、５．４Ｍ、５．５Ｍ、５．６Ｍ、５．７Ｍ、５．８Ｍ、５．９Ｍ、６Ｍ、７Ｍ、８Ｍ、９Ｍまたはそれを超える濃度で溶媒または溶液に存在し得る。代替的または付加的に、界面活性剤種は、多くとも約１０Ｍ、９Ｍ、８Ｍ、７Ｍ、６Ｍ、５．９Ｍ、５．８Ｍ、５．７Ｍ、５．６Ｍ、５．５Ｍ、５．４Ｍ、５．３Ｍ、５．２Ｍ、５．１Ｍ、５．０Ｍ、４．９Ｍ、４．８Ｍ、４．７Ｍ、４．６Ｍ、４．５Ｍ、４．４Ｍ、４．３Ｍ、４．２Ｍ、４．１Ｍ、４．０Ｍ、３．９Ｍ、３．８Ｍ、３．７Ｍ、３．６Ｍ、３．５Ｍ、３．４Ｍ、３．３Ｍ、３．２Ｍ、３．１Ｍ、３．０Ｍ、２．９Ｍ、２．８Ｍ、２．７Ｍ、２．６Ｍ、２．５Ｍ、２．４Ｍ、２．３Ｍ、２．２Ｍ、２．１Ｍ、２．０Ｍ、１．９Ｍ

、１．８Ｍ、１．７Ｍ、１．６Ｍ、１．５Ｍ、１．４Ｍ、１．３Ｍ、１．２Ｍ、１．１Ｍ、１．０Ｍ、０．９Ｍ、０．８Ｍ、０．７Ｍ、０．６Ｍ、０．５Ｍ、０．４Ｍ、０．３Ｍ、０．２Ｍ、０．１Ｍ、０．０９Ｍ、０．０８Ｍ、０．０７Ｍ、０．０６Ｍ、０．０５Ｍ、０．０４Ｍ、０．０３Ｍ、０．０２Ｍ、０．０１Ｍ、０．００１Ｍ、０．００１Ｍ、またはそれ未満の濃度で溶媒または溶液に存在し得る。

【０１９６】

変性種は、任意の量で溶媒または溶液中で製剤化され得る。変性種は、少なくとも約０．０００１Ｍ、０．００１Ｍ、０．０１Ｍ、０．０２Ｍ、０．０３Ｍ、０．０４Ｍ、０．０５Ｍ、０．０６Ｍ、０．０７Ｍ、０．０８Ｍ、０．０９Ｍ、０．１Ｍ、０．２Ｍ、０．３Ｍ、０．４Ｍ、０．５Ｍ、０．６Ｍ、０．７Ｍ、０．８Ｍ、０．９Ｍ、１Ｍ、１．１Ｍ、１．２Ｍ、１．３Ｍ、１．４Ｍ、１．５Ｍ、１．６Ｍ、１．７Ｍ、１．８Ｍ、１．９Ｍ、２Ｍ、２．１Ｍ、２．２Ｍ、２．３Ｍ、２．４Ｍ、２．５Ｍ、２．６Ｍ、２．７Ｍ、２．８Ｍ、２．９Ｍ、３Ｍ、３．１Ｍ、３．２Ｍ、３．３Ｍ、３．４Ｍ、３．５Ｍ、３．６Ｍ、３．７Ｍ、３．８Ｍ、３．９Ｍ、４Ｍ、４．１Ｍ、４．２Ｍ、４．３Ｍ、４．４Ｍ、４．５Ｍ、４．６Ｍ、４．７Ｍ、４．８Ｍ、４．９Ｍ、５Ｍ、５．１Ｍ、５．２Ｍ、５．３Ｍ、５．４Ｍ、５．５Ｍ、５．６Ｍ、５．７Ｍ、５．８Ｍ、５．９Ｍ、６Ｍ、７Ｍ、８Ｍ、９Ｍまたはそれを超える濃度で溶媒または溶液に存在し得る。変性種は、多くとも約１０Ｍ、９Ｍ、８Ｍ、７Ｍ、６Ｍ、５．９Ｍ、５．８Ｍ、５．７Ｍ、５．６Ｍ、５．５Ｍ、５．４Ｍ、５．３Ｍ、５．２Ｍ、５．１Ｍ、５．０Ｍ、４．９Ｍ、４．８Ｍ、４．７Ｍ、４．６Ｍ、４．５Ｍ、４．４Ｍ、４．３Ｍ、４．２Ｍ、４．１Ｍ、４．０Ｍ、３．９Ｍ、３．８Ｍ、３．７Ｍ、３．６Ｍ、３．５Ｍ、３．４Ｍ、３．３Ｍ、３．２Ｍ、３．１Ｍ、３．０Ｍ、２．９Ｍ、２．８Ｍ、２．７Ｍ、２．６Ｍ、２．５Ｍ、２．４Ｍ、２．３Ｍ、２．２Ｍ、２．１Ｍ、２．０Ｍ、１．９Ｍ、１．８Ｍ、１．７Ｍ、１．６Ｍ、１．５Ｍ、１．４Ｍ、１．３Ｍ、１．２Ｍ、１．１Ｍ、１．０Ｍ、０．９Ｍ、０．８Ｍ、０．７Ｍ、０．６Ｍ、０．５Ｍ、０．４Ｍ、０．３Ｍ、０．２Ｍ、０．１Ｍ、０．０９Ｍ、０．０８Ｍ、０．０７Ｍ、０．０６Ｍ、０．０５Ｍ、０．０４Ｍ、０．０３Ｍ、０．０２Ｍ、０．０１Ｍ、０．００１Ｍ、０．００１Ｍ、またはそれ未満の濃度で溶媒または溶液に存在し得る。

【０１９７】

溶媒または溶液は、ある値またはある値の範囲内でｐＨを有するように製剤化され得る。溶媒または溶液は、少なくとも約０、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３．０、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５．０、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５、８．６、８．７、８．８、８．９、９．０、９．１、９．２、９．３、９．４、９．５、９．６、９．７、９．８、９．９、１０．０、１０．１、１０．２、１０．３、１０．４、１０．５、１０．６、１０．７、１０．８、１０．９、１１．０、１１．１、１１．２、１１．３、１１．４、１１．５、１１．６、１１．７、１１．８、１１．９、１２．０、１２．１、１２．２、１２．３、１２．４、１２．５、１２．６、１２．７、１２．８、１２．９、１３．０、１３．１、１３．２、１３．３、１３．４、１３．５、１３．６、１３．７、１３．８、１３．９、１４．０またはそれを超えるｐＨを有し得る。代替的または付加的に、溶媒または溶液は、多くとも約１４．０、１３．９、１３．８、１３．７、１３．６、１３．５、１３．４、１３．３、１３．２、１３．１、１３．０、１２．９、１２．８、１２．７、１２．６、１２．５、１２．４、１２．３、１２．２、１２．１、

１２．０、１１．９、１１．８、１１．７、１１．６、１１．５、１１．４、１１．３、１１．２、１１．１、１１．０、１０．９、１０．８、１０．７、１０．６、１０．５、１０．４、１０．３、１０．２、１０．１、１０．０、９．９、９．８、９．７、９．６、９．５、９．４、９．３、９．２、９．１、９．０、８．９、８．８、８．７、８．６、８．５、８．４、８．３、８．２、８．１、８．０、７．９、７．８、７．７、７．６、７．５、７．４、７．３、７．２、７．１、７．０、６．９、６．８、６．７、６．６、６．５、６．４、６．３、６．２、６．１、６．０、５．９、５．８、５．７、５．６、５．５、５．４、５．３、５．２、５．１、５．０、４．９、４．８、４．７、４．６、４．５、４．４、４．３、４．２、４．１、４．０、３．９、３．８、３．７、３．６、３．５、３．４、３．３、３．２、３．１、３．０、２．９、２．８、２．７、２．６、２．５、２．４、２．３、２．２、２．１、２．０、１．９、１．８、１．７、１．６、１．５、１．４、１．３、１．２、１．１、１．０、０．９、０．８、０．７、０．６、０．５、０．４、０．３、０．２、０．１、０、またはそれ未満のｐＨを有し得る。

【０１９８】

検出可能なプローブまたは親和性試薬には、１つ以上の追加の修飾基が含まれ得る。修飾基は、検出可能なプローブまたは親和性試薬の化学的または物理的特性を変化させるために含まれ得る。修飾基は、特性、例えば、疎水性、親水性、両親媒性、電荷、磁性感受性、または任意の他の物理的特性を変化させるために検出可能なプローブまたは親和性試薬上に含まれ得る。いくつかの場合では、修飾基は、検出可能なプローブまたは親和性試薬の溶解性または溶液安定性を増加、低下、または変化させるために使用され得る。いくつかの場合では、修飾基は、電気的反発または立体閉塞等のメカニズムによって検出可能なプローブまたは親和性試薬の分離を維持するために使用され得る。いくつかの場合では、修飾基は、粒子間の引力を増加させるために使用され得る。例えば、修飾基は、プローブの凝集または沈降を引き起こすことなく多重プローブ複合体を生成するために検出可能なプローブ及び／または親和性試薬間の簡易な引力相互作用を形成し得る。

【０１９９】

保持成分の表面には、１つ以上の修飾基が含まれ得る。修飾基は、検出可能なプローブまたは親和性試薬と表面または界面との間の会合を媒介しつつ、表面の特徴を変化させるために表面に付加され得る。例えば、疎水性修飾基は、プローブを水中油エマルション中の油滴と相互作用させるために検出可能なプローブまたは親和性試薬に付加され得る。修飾基は、共有結合的または非共有結合的に結合され得る。修飾基は、保持成分構築の前、間、または後に保持成分にカップリングされ得る。表面修飾基には、帯電した部位、磁性部位、立体部位、両親媒性部位、疎水性部位、及び親水性部位が含まれ得る。帯電した部位には、固有の正または負電荷を保有し得る、または解離条件下で電荷を保有し得る官能基（例えば、カルボン酸、ナイトレート、スルホン、ホスフェート、ホスホネート等）が含まれ得る。磁性部位には、常磁性、反磁性、及び強磁性粒子、例えば、ナノ粒子（例えば、ガドリニウム、マンガン、酸化鉄、ビスマス、金、銀、コバルトナノ粒子等）が含まれ得る。立体部位には、ポリマー及びバイオポリマー（例えば、ＰＥＧ、ＰＥＯ、アルカン鎖、デキストラン、せん断された（ｓｈｅａｒｅｄ）核酸）が含まれ得る。両親媒性部位には、リン脂質（例えば、ホスファチジン酸、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルイノシトールホスフェート、ホスファチジルイノシトールビホスフェート、ホスファチジルイノシトールトリホスフェート、セラミドホスホリルコリン、セラミドホホリルエタノールアミン、セラミドホスホリルリピド）、糖脂質（例えば、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、ラムノリピド等）、及びステロール（例えば、コレステロール、カンペステロール、シトステロール、スチグマステロール、エルゴステロール等）が含まれ得る。疎水性部位には、ステロイド（例えば、コレステロール）、飽和脂肪酸（例えば、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、セロチン酸等）、及び不飽和脂肪酸（例えば、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、リ

ノール酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、エルカ酸、ドコサヘキサエン酸等）が含まれ得る。親水性化合物には、帯電分子及び極性分子（例えば、グリコール、シクロデキストリン、セルロース、ポリアクリルアミド等）が含まれ得る。

【０２００】

検出可能なプローブまたは親和性試薬の表面には、１つ以上の修飾基が含まれ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の表面には、少なくとも約１０、５０、１００、５００、１０００、５０００、１００００、５００００、１０００００、５０００００、１０００００００、またはそれを超える修飾基が含まれ得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブまたは親和性試薬の表面には、多くとも約１０００００００、５０００００、１００００００、５００００、１００００、５０００、１０００、５００、１００、５０、１０、またはそれ未満の修飾基が含まれ得る。

【０２０１】

複数の検出可能なプローブ、親和性試薬またはその両方は、多重プローブ複合体に構築され得る。多重プローブ複合体には、例えば、複数の検出可能なプローブ、複数の親和性試薬、親和性試薬及び検出可能なプローブ、親和性試薬及び複数の検出可能なプローブ、または複数の親和性試薬及び検出可能なプローブが含まれ得る。多重プローブ複合体は、検出可能なプローブまたは親和性試薬の所望の特性、例えば、向上したアビディティ及び／または向上した観察可能性をさらに向上させるために調製され得る。いくつかの構成では、多重プローブ複合体には、単一の複合体に形成される同様のまたは同一の構成を有する複数の検出可能なプローブ、親和性試薬またはその両方が含まれ得る。複数の同様のまたは同一のプローブを含む多重プローブ複合体は、結合パートナーと相互作用する場合、プローブの全体的輝度を増加させるように形成され得、または唯一の検出可能なプローブまたは親和性試薬によって観察されるアビディティよりもアビディティを増加させるために増加した数の親和性試薬を提供し得る。他の構成では、多重プローブ複合体には、単一の複合体に結合した異なるまたは同様ではない構成を有する複数の検出可能なプローブ、親和性試薬またはその両方が含まれ得る。多重プローブ複合体には、複数の結合パートナー、エピトープ、または標的部位に同時に結合するように、または検出可能なプローブまたは親和性試薬が認識し得る結合パートナー、エピトープ、または標的部位の数を増加させることによって結合相互作用を形成する可能性を増加させるように形成され得る異なるまたは同様ではない構成を有する複数の検出可能なプローブ、親和性試薬またはその両方が含まれ得る。多重プローブ複合体は、一価複合体（例えば、結合パートナー、エピトープ、または標的部位の単一種にのみ結合するように構成されている）または多価複合体（例えば、多様な異なる結合パートナー、エピトープ、または標的部位に結合するように構成されている）として挙動し得る。多重プローブ複合体は、共有結合的または非共有結合的相互作用によって結合され得る。２つの検出可能なプローブ間、２つの親和性試薬間またはプローブと試薬との間の共有結合は、例えば、クリック反応によって形成され得る。プローブ及び／または試薬の間の非共有結合性相互作用は、例えば、核酸ハイブリダイゼーションまたはストレプトアビジン－ビオチンカップリングによって形成され得る。

【０２０２】

多重プローブ複合体は、２つ以上の検出可能なプローブ、親和性試薬またはその両方を一緒にカップリングさせることによって形成され得る。多重プローブ複合体は、検出可能なプローブ（複数可）及び／または親和性試薬（複数可）の直接的結合によって（例えば、核酸ハイブリダイゼーション、架橋等によって）形成され得る。いくつかの構成では、多重プローブ複合体は、１つ以上の二次保持成分、例えば、構造化核酸粒子またはナノ粒子間の結合によって形成され得る。二次保持成分は、それらが検出可能なプローブまたは親和性試薬の調整可能な位置及び／または配向を提供する場合、特に対象となり得る。いくつかの構成では、二次保持成分には、追加の成分、例えば、修飾基、結合成分または標識成分が含まれ得る。図３９Ａ～３９Ｂは、二次保持成分を含む多重プローブ複合体の例示的な構成を示している。図３９Ａは、内方配向で結合した２つ以上の結合した検出可能なプローブ３９２０を含む二次保持成分３９１０（例えば、構造化核酸粒子、ナノ粒子）

を示している。二次保持成分３９１０には、複数の結合した標識成分３９３０がさらに含まれる。図３９Ｂは、内方に配向した結合成分の複数のポケットを形成するようにカップリングされた複数の検出可能なプローブ３９２０を含む２つ以上の別々の粒子３９１０（例えば、ＳＮＡＰ、ナノ粒子）を含む二次保持成分を示している。２つ以上の粒子３９１０を含む二次保持成分には、二次保持成分に結合した複数の標識成分３９３０がさらに含まれる。他の構成では、多重プローブ複合体は、複数の検出可能なプローブまたは親和性試薬を非構造化物質または基、例えば、ポリマー、金属、セラミック、半導体、ガラス、繊維、樹脂、またはそれらの組み合わせにカップリングまたは結合させることによって形成され得る。非構造化物質は、非晶質、球状、多孔質、またはそれらのいくつかの組み合わせであり得る。非構造化物質には、複数の検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合を可能とする複数の結合部位が含まれ得る。

【０２０３】

図３５Ａ～３５Ｃは、多重プローブ複合体の様々な構成を示している。図３５Ａは、連結基３５２０（例えば、共有結合的または非共有結合的連結基）によって接続された２つの同一のまたは同様のタイル形状の核酸の検出可能なプローブ３５１０を示している。検出可能なプローブ３５１０は、単一標的または標的の群（例えば、結合パートナー、エピトープ、または標的部位）に対する親和性を有し得る。図３５Ｂは、連結基３５２０（例えば、共有結合的または非共有結合的連結基）によってアプタマー結合成分を有する第２のタイル形状の検出可能なプローブ３５１５に接続された抗体結合成分を有する第１のタイル形状の核酸検出可能なプローブ３５１０を示している。検出可能なプローブ３５１０及び３５１５は、異なる親和性を有し、それにより検出可能なプローブは、複数の結合パートナー、エピトープ、または標的部位に同時に結合することが可能となり得る。図３５Ｃは、非共有結合性引力相互作用、例えば、静電気性または磁性相互作用によって接続された非核酸ベースの検出可能なプローブ３５３０（例えば、粒子、ナノ粒子等）の対を示している。非核酸ベースの検出可能なプローブ３５３０には、同様のまたは同様ではない結合パートナー、エピトープ、または標的部位との結合成分が含まれ得る。

【０２０４】

いくつかの構成では、多重プローブ複合体は、制御された形状を有する複合体を形成するように構成され得る。制御された形状は、増加したアビディティのためにより好ましく結合成分を配向させるために用いられ得る。多重プローブ複合体は、結合パートナー、エピトープ、または標的部位との結合相互作用を形成する際に形状またはコンフォメーションを変化させるように構成され得る。多重プローブ複合体は、結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対する結合成分の接触または近接性を増加させるために形状またはコンフォメーションに対する変化に対抗するように構成され得る。多重プローブ複合体に含まれる個々のプローブまたは試薬は、複合体内のプローブの相対的配向に影響を及ぼす多重プローブ複合体における他のプローブまたは試薬との相互作用を形成する修飾基を有し得る。図３６Ａ～３６Ｂは、設計されたまたは構造化された形状を有する検出可能なプローブの構成を示している。図３６Ａは、リンカー３６２０によって接続された２つのタイル形状の核酸検出可能なプローブ３６１０を示している。各プローブ３６１０には、リンカー３６２０の自由動作に対する反発または妨害を生成する１つ以上の修飾基３６３０（例えば、同じ電荷、同じ磁性極性、立体基等）が含まれる。修飾基３６３０は、プローブの内方配向を引き起こし、プローブ複合体の結合成分密度を増加させる。図３６Ｂは、リンカー３６２０によって接続された２つのタイル形状の核酸検出可能なプローブ３６１０を示している。各プローブ３６１０には、プローブ３６１０の内方配向を生成し、プローブ複合体の結合成分密度を増加させるプローブ間の引力を生成する１つ以上の修飾基３６４０（例えば、疎水性基、親水性基等）が含まれる。これらの構成は、結合パートナーとの結合相互作用中の複合体の変形に対抗し得る。

【０２０５】

多重複合体には、単一の複合体に結合した２つ以上の検出可能なプローブ及び／または親和性試薬が含まれ得る。多重プローブ複合体には、少なくとも約２、３、４、５、６、

７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、またはそれを超える検出可能なプローブ及び／または親和性試薬が含まれ得る。代替的または付加的に、多重プローブ複合体には、多くとも約１００、９５、９０、８５、８０、７５、７０、６５、６０、５５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、またはそれ未満の検出可能なプローブ及び／または親和性試薬が含まれ得る。

【０２０６】

本明細書に記載の親和性試薬または検出可能なプローブには、それが会合する（または会合しない）ポリペプチドまたは他の分析物の同定を容易化するためにそのような結合を解明することが可能な様式でポリペプチド、または他の分析物と結合または会合することが可能な結合成分（結合成分またはプローブ成分とも称される）が含まれ得る。親和性試薬または検出可能なプローブにはまた、親和性試薬または検出可能なプローブと標的分析物、例えば、ポリペプチドまたは他の分析物との結合または会合の観察または検出を可能とする標識成分が含まれ得る。標識成分は、例えば、標識成分が、合成リンカーまたは結合部位を介して結合した外因性標識である場合、プローブ成分から分離可能であり得る。代替的には、標識成分は、プローブの固有の特徴、例えば、検出可能な質量、電荷、または光学的特徴であり得る。どの親和性試薬または検出可能なプローブがサンプル内の異なるポリペプチドまたは他の分析物に結合するかを同定することによって、そのサンプル内のそのようなタンパク質またはポリペプチドの存在、及び潜在的量を同定し得る。

【０２０７】

いくつかの実施形態では、標的アミノ酸配列を同定することに仕向けられた親和性試薬または検出可能なプローブには、実際には、本明細書に記載の方法において使用される場合に互いに差別化または区別可能されない異なる成分の基が含まれ得る。特に、同じ標的アミノ酸配列を同定するために使用され得る異なる成分は、同じ標的アミノ酸配列を同定するために同じ標識部位を使用し得る。例えば、臨接配列にかかわらずトリマーアミノ酸配列（ＡＡＡ）を結合させる親和性試薬または検出可能なプローブには、臨接配列からの任意の作用を伴わずにトリマーＡＡＡ配列を結合させる単一の結合成分、または結合成分の群（例えば、４００個の結合成分）であって、その各々が形態αＡＡＡβ（α及びβは、任意のアミノ酸であり得る）の異なる５アミノ酸エピトープに結合する、結合成分の群のいずれかが含まれ得る。第２の場合の例では、結合成分は、組み合わされた効果を有し得る。

【０２０８】

結合及びアビディティ

単一の一価親和性試薬について、親和性試薬と結合標的（例えば、結合パートナー、エピトープ、または標的部位）との間の結合相互作用の強度は、親和性によって特性化され得る。親和性は、解離定数または会合定数の形態で定量的に表され得る。理論に縛られることを望むものではなく、解離定数K_Dは、結合した複合体ＡＢを形成するための親和性試薬Ａと結合パートナーＢとの間の結合の平衡分析から生じ得る。ＡとＢとの間の会合及び解離の速度は、それぞれ［Ａ］、［Ｂ］、及び［ＡＢ］として表されるＡ、Ｂ及びＡＢの相対的濃度に依存する。会合の速度（またはオン速度）r_{on}は、

【数１】

$$r_{on} = k_{on}[A][B] \quad (1)$$

【０２０９】

（式中、k_{on}は、結合のための速度定数である）として表され得る。解離の速度（またはオフ速度）r_{off}は、

【数２】

$$r_{off} = k_{off}[AB] \quad (2)$$

【０２１０】

（式中、k_{off}は、解離のための速度定数である）として表され得る。オン速度（１）とオフ速度（２）との間の平衡に基づいて、解離定数は、

【数３】

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (3)$$

として計算され得る。

【０２１１】

所与の親和性試薬について、K_Dのより小さな値は、より強い結合を示し、より高い値は、より弱い結合を示す。

【０２１２】

見かけの解離定数は、複数の結合成分を有する検出可能なプローブまたは親和性試薬について決定され得る。見かけの解離定数は、一価親和性試薬についての解離定数と類似的に計算され得る。理論に縛られることを望むものではなく、見かけの解離定数$K_{D,a}$は、結合した複合体ＰＢを形成するための検出可能なプローブ（または親和性試薬）Ｐと結合パートナーＢとの間の平衡分析から生じ得る。ＰとＢとの間の会合及び解離の見かけの速度は、それぞれ［Ｐ］、［Ｂ］、及び［ＰＢ］として表されるＰ、Ｂ及びＰＢの相対的濃度に依存し得る。見かけの会合の速度（または見かけのオン速度）$r_{on,a}$は、

【数４】

$$r_{on,a} = k_{on,a}[P][B] \quad (4)$$

（式中、$k_{on,a}$は、結合のための見かけの速度定数である）として表され得る。見かけの解離の速度（または見かけのオフ速度）$r_{off,a}$は、

【０２１３】

【数５】

$$r_{off,a} = k_{off,a}[PB] \quad (5)$$

（式中、$k_{off,a}$は、解離のための見かけの速度定数である）として表され得る。

見かけのオン速度（１）と見かけのオフ速度（２）との間の平衡に基づいて、見かけの解離定数は、

【０２１４】

【数６】

$$K_{D,a} = \frac{k_{off,a}}{k_{on,a}} \qquad (6)$$

として計算され得る。

【０２１５】

多価の検出可能なプローブまたは多価親和性試薬について、$K_{D,a}$のより小さな値は、より強い結合を示し、より高い値は、より弱い結合を示す。

【０２１６】

検出可能なプローブまたは親和性試薬のアビディティは通常、その構成的結合成分の解離定数に対するプローブについての見かけの解離定数の減少として表現され得る。例えば、Ｎ個の結合成分を含むプローブについて、各々の個々の結合成分は、上記方程式１～３によって記載されている個々の解離定数、例えば、$\{K_{D,1}、K_{D,2}、\cdots K_{D,N}\}$を有し得る。Ｎ個の結合成分を有する検出可能なプローブまたは親和性試薬は、全体としての検出可能なプローブまたは親和性試薬についての見かけの解離定数$K_{D,a}$が、Ｎ個の結合成分の各々についてのそれぞれの解離定数よりも低い、例えば、$K_{D,a} < \{K_{D,1}、K_{D,2}、\cdots K_{D,N}\}$の場合、増加したアビディティを有するとみなされ得る。解離定数が単純にK_Dである同一タイプ及び種の複数のＮ個の結合成分が検出可能なプローブまたは親和性試薬に含まれる場合（すなわち、$K_{D,1} = K_{D,2} = \cdots = K_{D,N} = K_D$）、そのときはアビディティは、$K_{D,a} < K_D$として単純に定義され得る。解離定数が$\{K_{D,1}、K_{D,2}、\cdots K_{D,N}\}$であり、最も強い結合剤が$K_{D,min}$である異なるタイプ及び／または種の複数のＮ個の結合成分が検出可能なプローブまたは親和性試薬に含まれる場合、そのときはアビディティは、$K_{D,a} < K_{D,min}$として単純に定義され得る。

【０２１７】

本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬は、それが$K_{D,min}$よりも有意に低い$K_{D,a}$、例えば、$K_{D,a} < K_{D,min}$（差が約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０桁、または１０桁を超える）を示す場合、好ましい場合がある。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、$K_{D,a} < K_{D,min}$（差が少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０桁、または１０桁を超える）である場合、特定の結合標的のために選択され得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、$K_{D,a} < K_{D,min}$（差が多くとも約１０、９、８、７、６、５、４、３、２、１桁または１桁未満）である場合、特定の結合標的のために選択され得る検出可能なプローブまたは親和性試薬は、極めて低いオフ速度によって示される過剰結合を示し得るときに$K_{D,a} < K_{D,min}$の差が過度に大きな量である場合、あまり好ましくない場合がある。

【０２１８】

検出可能なプローブ、親和性試薬またはその結合成分の解離定数は、少なくとも約０．１ｎＭ、０．５ｎＭ、１ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、１５ｎＭ、２０ｎＭ、２５ｎＭ、３０ｎＭ、３５ｎＭ、４０ｎＭ、４５ｎＭ、５０ｎＭ、５５ｎＭ、６０ｎＭ、６５ｎＭ、７０ｎＭ、７５ｎＭ、８０ｎＭ、８５ｎＭ、９０ｎＭ、９５ｎＭ、１００ｎＭ、１５０ｎＭ、２００ｎＭ、２５０ｎＭ、３００ｎＭ、３５０ｎＭ、４００ｎＭ、４５０ｎＭ、５００ｎＭ、５５０ｎＭ、６００ｎＭ、６５０ｎＭ、７００ｎＭ、７５０ｎＭ、８００ｎＭ、８５０ｎＭ、９００ｎＭ、９５０ｎＭ、１μＭ、２μＭ、３μＭ、４μＭ、５μＭ、６μＭ、

７μＭ、８μＭ、９μＭ、１０μＭ、またはそれを超え得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブ、親和性試薬またはその結合成分の解離定数は、多くとも約１０μＭ、９μＭ、８μＭ、７μＭ、６μＭ、５μＭ、４μＭ、３μＭ、２μＭ、１μＭ、９５０ｎＭ、９００ｎＭ、８５０ｎＭ、８００ｎＭ、７５０ｎＭ、７００ｎＭ、６５０ｎＭ、６００ｎＭ、５５０ｎＭ、５００ｎＭ、４５０ｎＭ、４００ｎＭ、３５０ｎＭ、３００ｎＭ、２５０ｎＭ、２００ｎＭ、１５０ｎＭ、１００ｎＭ、９５ｎＭ、９０ｎＭ、８５ｎＭ、８０ｎＭ、７５ｎＭ、７０ｎＭ、６５ｎＭ、６０ｎＭ、５５ｎＭ、５０ｎＭ、４５ｎＭ、４０ｎＭ、３５ｎＭ、３０ｎＭ、２５ｎＭ、２０ｎＭ、１５ｎＭ、１０ｎＭ、５ｎＭ、１ｎＭ、０．５ｎＭ、０．１ｎＭ、またはそれ未満であり得る。

【０２１９】

検出可能なプローブまたは親和性試薬は、検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合した結合成分に対する解離定数よりも低い見かけのまたは測定された解離定数を有し得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬に対するより低い解離定数は、増加した結合オン速度、増加したk_{on}、低下した結合オフ速度、低下したk_{off}、またはそれらの組み合わせに起因し得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合した複数の結合成分の任意の結合成分に対する検出可能なプローブまたは親和性試薬の見かけのまたは測定された解離定数の低下は、Ｎ倍の低下（すなわち、$K_{D,プローブ}=(1/N)K_{D,結合成分}$）であり得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合した複数の結合成分の任意の結合成分に対する検出可能なプローブまたは親和性試薬の見かけのまたは測定された解離速度定数の低下は、少なくとも約２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、５０倍、１００倍、２５０倍、５００倍、１０００倍、またはそれを超え得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合した複数の結合成分の任意の結合成分に対する検出可能なプローブまたは親和性試薬の見かけのまたは測定された解離定数の低下は、多くとも約１０００倍、５００倍、２５０倍、１００倍、５０倍、２５倍、２０倍、１５倍、１０倍、９倍、８倍、７倍、６倍、５倍、４倍、３倍、２倍、またはそれ未満であり得る。

【０２２０】

いくつかの場合では、アビディティを定量的に記載することが有用であり得る。結合標的に対する最も強い結合剤が解離定数$K_{D,min}$を有するＮ個の結合成分のセットについて、アビディティA_Nは、

【数７】

$$A_N = \frac{K_{D,min}}{K_{D,a}} \qquad (7)$$

として定義され得る。

【０２２１】

式中、$K_{D,a}$は、Ｎ個の結合成分のセットを含む検出可能なプローブまたは親和性試薬の見かけの解離定数である。いくつかの構成では、本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬は、１を超えるA_Nを有し得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬のA_Nは、少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１２５、１５０、２００、２５０、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２５００、５０００、１００００、２５０００、５００００、１０００００、１０００００００、１０００００００、１０００００００００、１０００００００００、またはそれを超え得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブまたは親和性試薬のA_Nは、多くとも約１０００００００００００、１０００００００００、１０００００００、１００００００、１０００００、１００００

０、５００００、２５０００、１００００、５０００、２５００、１０００、９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２５０、２００、１５０、１２５、１００、９５、９０、８５、８０、７５、７０、６５、６０、５５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、またはそれ未満であり得る。

【０２２２】

試薬またはプローブが結合パートナーと結合相互作用を形成するための複数の経路を有する場合、アビディティは、親和性試薬または検出可能なプローブが、結合パートナーに対する変化した見かけの親和性を示す能力を指し得る。例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬に１０個の結合成分が含まれ、各結合成分が結合標的Ｘに対する親和性を有する場合、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、標的Ｘと結合相互作用を形成するための１０個の可能性のある経路を有する。アビディティは、増幅された効果であり得、その場合、結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対する複数の結合成分を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬の見かけの親和性は、複数の結合成分の任意の結合成分の親和性よりも強い場合があり得る。例えば、１０個の結合成分を有する検出可能なプローブまたは親和性試薬は、検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合した最も強い結合成分が８００ｎＭの解離定数しか有しない場合、５０ナノモル（ｎＭ）の測定された解離定数を有し得る。

【０２２３】

アビディティは、先行する結合相互作用が複数の結合成分の存在下で破壊された後にすぐ新たな結合相互作用が形成する傾向により生じ得る。結果的に、検出可能なプローブ（または親和性試薬）と結合パートナーとの間の結合相互作用は、単一の結合成分と結合パートナーとの間の観察された結合相互作用よりも長い時間スケールにわたって生じることが観察され得る。理論に縛られることを望むものではなく、検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合は、プローブの熱力学的、動態的、及び／または物質移動特徴を変化させるためにプローブ設計のバリエーションによって調整可能であり得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬のアビディティは、１）プローブ上の結合成分密度；２）プローブ上の結合成分の総数；３）結合成分のタイプ及び／または種；４）結合成分の結合熱力学；６）結合成分の結合動態；５）プローブサイズ及び／または重量；６）プローブ形状及び／またはコンフォメーション；及び７）二次結合相互作用メディエーターを含む、結合相互作用の可能性を変化させる要素によって影響を受け得る。

【０２２４】

検出可能なプローブまたは親和性試薬のプールの熱力学的及び動態的結合挙動に応じて、検出可能なプローブまたは親和性試薬の増加した濃度は、結合パートナー、エピトープ、または標的部位への検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合を促進し得る。結合アッセイにおいて利用される検出可能なプローブまたは親和性試薬の効果的なまたは標的とされた濃度は、プローブ自体に関して、プローブ上の結合成分の総数に関して、または、異種結合成分混合物を有するプローブの場合、結合成分の特定の種の数に関して計算され得る。例えば、１：１の抗体／アプタマー比でプローブ当たり２０個の総結合成分を含有するように製造された０．１モル／リットル（Ｍ）の検出可能なプローブまたは親和性試薬で提供された溶液は、２Ｍの結合成分の総濃度または１Ｍのアプタマーまたは抗体の濃度を有するであろう。検出可能なプローブまたは親和性試薬の効果的なまたは標的とされた濃度は、質量またはモル濃度ベースで決定され得る。検出可能なプローブ、親和性試薬またはその結合成分は、好ましい濃度（例えば、アビディティを最適化する濃度）で意図された目的のために提供され得る。

【０２２５】

検出可能なプローブ、親和性試薬またはその結合成分は、少なくとも約1×10^{-15}Ｍ、5×10^{-15}Ｍ、1×10^{-14}Ｍ、5×10^{-14}Ｍ、1×10^{-13}Ｍ、5×10^{-13}Ｍ、1×10^{-12}Ｍ、5×10^{-12}Ｍ、1×10^{-11}Ｍ、5×10^{-11}Ｍ、1×10^{-10}Ｍ、5×10^{-10}Ｍ、1×10^{-9}Ｍ、5×10^{-9}Ｍ、1×10^{-8}

Ｍ、５ｘ１０－８Ｍ、１ｘ１０－７Ｍ、５ｘ１０－７Ｍ、１ｘ１０－６Ｍ、５ｘ１０－６Ｍ、１ｘ１０－５Ｍ、５ｘ１０－５Ｍ、１ｘ１０－４Ｍ、５ｘ１０－４Ｍ、１ｘ１０－３Ｍ、５ｘ１０－３Ｍ、１ｘ１０－２Ｍ、５ｘ１０－２Ｍ、１ｘ１０－１Ｍ、５ｘ１０－１Ｍ、１Ｍ、またはそれを超える濃度で提供され得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブ、親和性試薬またはその結合成分は、多くとも約１Ｍ、５ｘ１０－１Ｍ、１ｘ１０－１Ｍ、５ｘ１０－２Ｍ、１ｘ１０－２Ｍ、５ｘ１０－３Ｍ、１ｘ１０－３Ｍ、５ｘ１０－４Ｍ、１ｘ１０－４Ｍ、５ｘ１０－５Ｍ、１ｘ１０－５Ｍ、５ｘ１０－６Ｍ、１ｘ１０－６Ｍ、５ｘ１０－７Ｍ、１ｘ１０－７Ｍ、５ｘ１０－８Ｍ、１ｘ１０－８Ｍ、５ｘ１０－９Ｍ、１ｘ１０－９Ｍ、５ｘ１０－１０Ｍ、１ｘ１０－１０Ｍ、５ｘ１０－１１Ｍ、１ｘ１０－１１Ｍ、５ｘ１０－１２Ｍ、１ｘ１０－１２Ｍ、５ｘ１０－１３Ｍ、１ｘ１０－１３Ｍ、５ｘ１０－１４Ｍ、１ｘ１０－１４Ｍ、５ｘ１０－１５Ｍ、１ｘ１０－１５Ｍ、またはそれ未満の濃度で提供され得る。

【０２２６】

プローブのサイズは、検出可能なプローブまたは親和性試薬のアビディティ特性に対する効果を有し得る。理論に縛られることを望むものではなく、検出可能なプローブまたは親和性試薬の物質移動特性は、プローブのサイズ及び／または重量によって影響を受け得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の物質移動物理的特性（例えば、拡散係数）は、プローブのサイズ及び／または重量に依存する物質移動物理的特性についての拡縮関係性を有し得る。例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、プローブ分子量に対してベキ乗則の関係性（すなわち、Ｄ～ＭＷ－２）で拡縮する水中の単一成分拡散係数を有し得る。より大きな及び／またはより重い親和性試薬または検出可能なプローブは、溶液または溶媒における拡散速度の低下を経験し得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の低下した拡散速度は、プローブが結合パートナー、エピトープ、または標的部位から離れて拡散し得る前に生じる結合相互作用の増加した可能性のため、検出可能なプローブまたは親和性試薬の見かけのアビディティの低下として観察され得る。

【０２２７】

プローブは、少なくとも約１ｋＤａ、１０ｋＤａ、５０ｋＤａ、１００ｋＤａ、５００ｋＤａ、１０００ｋＤａ、１５００ｋＤａ、２０００ｋＤａ、２５００ｋＤａ、３０００ｋＤａ、３５００ｋＤａ、４０００ｋＤａ、４５００ｋＤａ、５０００ｋＤａ、５５００ｋＤａ、６０００ｋＤａ、６５００ｋＤａ、７０００ｋＤａ、７５００ｋＤａ、８０００ｋＤａ、８５００ｋＤａ、９０００ｋＤａ、９５００ｋＤａ、１００００ｋＤａ、またはそれを超える特性化された分子量を有し得る。代替的または付加的に、プローブは、多くとも約１００００ｋＤａ、９５００ｋＤａ、９０００ｋＤａ、８５００ｋＤａ、８０００ｋＤａ、７５００ｋＤａ、７０００ｋＤａ、６５００ｋＤａ、６０００ｋＤａ、５５００ｋＤａ、５０００ｋＤａ、４５００ｋＤａ、４０００ｋＤａ、３５００ｋＤａ、３０００ｋＤａ、２５００ｋＤａ、２０００ｋＤａ、１５００ｋＤａ、１０００ｋＤａ、５００ｋＤａ、１００ｋＤａ、５０ｋＤａ、１０ｋＤａ、１ｋＤａ、またはそれ未満の特性化された分子量を有し得る。

【０２２８】

いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬のアビディティは、二次結合相互作用によって影響を受け得る。二次結合相互作用は、検出可能なプローブまたは親和性試薬が有するように設計された二次分子を伴う弱いまたは短期間の相互作用であり得る。二次結合相互作用には、結合パートナー、エピトープ、または標的部位から離れて検出可能なプローブまたは親和性試薬が拡散する見かけの速度を低下させる二次分子を伴う弱いまたは短期間の相互作用が含まれ得る。二次結合相互作用は、検出可能なプローブまたは親和性試薬が親和性を有する結合パートナーと会合して検出可能なプローブまたは親和性試薬が観察される可能性を増加させ得る。いくつかの構成では、二次分子には、検出可能なプローブまたは親和性試薬上の相補的リガンド及び／または部位と弱い相互作用を形成し得る１つ以上のリガンド及び／または部位が含まれ得る。例えば、二次分子は、検出可能なプローブまたは親和性試薬における核酸配列と少なくとも部分的に相補的な核酸

配列を有し得る。このように、二次分子及びプローブは、２つの配列のハイブリダイゼーションを介して弱い相互作用を形成するように構成され得る。例えば、弱い相互作用は、不完全または非連続ハイブリダイゼーション、例えば、検出可能なプローブもしくは親和性試薬または二次分子の配列におけるヘアピンまたはループ構造の使用、検出可能なプローブ（または親和性試薬）及び二次分子の他の相補的領域におけるミスマッチヌクレオチド、またはより弱い塩基対結合を生成する検出可能なプローブ（または親和性試薬）または二次分子における修飾もしくは非天然ヌクレオチドに起因する相互作用に起因し得る。他の構成では、二次分子には、結合パートナーと弱い相互作用を形成し得る１つ以上のリガンド及び／または部位が含まれ得る。いくつかの構成では、検出可能なプローブ（または親和性試薬）または二次分子には、弱い結合相互作用を形成するように構成された複数の分子が含まれ得る。

【０２２９】

いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬と相互作用する二次分子は、固体支持体に結合され得る。例えば、二次分子は、固体支持体に結合したＳＮＡＰ、例えば、核酸折り紙または核酸ナノボールであり得る。ＳＮＡＰは、検出可能なプローブまたは親和性試薬の１つ以上の結合成分に対する結合パートナーに任意に結合され得る。したがって、二次分子は、結合パートナーへの１つ以上の結合成分の結合を介して検出可能なプローブまたは親和性試薬と固体支持体との会合を媒介し得、会合は、二次分子とＳＮＡＰとの間の弱い相互作用によって向上し得る。いくつかの構成では、複数のＳＮＡＰが、アレイの形態の固体支持体に結合される。アレイにおける各部位は、空間的に分解された結合パートナーに結合したＳＮＡＰを有し得、結合パートナーの各々は、１つ以上の検出可能なプローブまたは親和性試薬によって認識され得る。本開示の組成物または方法において有用に適用され得る例示的なＳＮＡＰ及び固体支持体は、米国特許出願整理番号１７／０６２，４０５（米国特許出願公開番号２０２１／０１０１９３０Ａ１として公開）及びＷＯ２０１９／１９５６３３Ａ１（これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）に示されている。

【０２３０】

図８は、結合パートナー８３０または結合パートナー８３０内のエピトープまたは標的部位と相互作用を形成するように構成された検出可能なプローブ８１０を示している。検出可能なプローブには、相互作用領域８６０で相補的分子８５０と弱い相互作用を形成するように構成されたペンダントリガンド８２０（例えば、核酸）がさらに含まれる。いくつかの構成では、二次分子８５０は、アンカー基８４０、結合パートナー８３０、または固体支持体８７０と結合または会合され得る。いくつかの構成では、相互作用領域８６０でのペンダントリガンド８２０と相補的分子８５０との間の相互作用は、自然に不安定であり、結合パートナー８３０からの検出可能なプローブ８１０の最終的解離を容易化し得る。他の構成では、相互作用領域８６０でのペンダントリガンド８２０と相補的分子８５０との間の相互作用は、（例えば、変性剤の存在下で）破壊されるように構成され得る。

【０２３１】

図９Ａ～９Ｂは、相補的核酸の対を利用して検出可能なプローブと二次分子との間の弱い相互作用を形成するための可能性のある構成を示している。図９Ａは、検出可能なプローブまたは二次分子にカップリングされ得る第１の核酸９１０及び検出可能なプローブ－二次分子対の反対の分子にカップリングされ得る第２の核酸９２０を示している。第１の核酸９１０は、不完全または非連続的様式で第２の核酸９２０にハイブリダイズし、それにより弱い相互作用領域９３０を形成するように構成され得る。いくつかの構成では、不完全または非連続ハイブリダイゼーションには、ヘアピンもしくはループ構造、ミスマッチしたヌクレオチド、またはより弱い塩基対結合を生成する修飾もしくは非天然ヌクレオチドが含まれ得る。図９Ｂは、短いハイブリダイゼーション領域によって２つの核酸間に形成された検出可能なプローブと二次分子との間の弱い相互作用を示している。検出可能なプローブ９４０には、第２の核酸９２０とハイブリダイズするように構成された第１の核酸９１０が含まれ得る。第１の核酸９１０及び第２の核酸９２０は、塩基対結合がある

程度の可逆性または解離を有するように制限された数の結合した塩基対を含有する弱い相互作用領域９３０でハイブリダイズする。弱い相互作用領域には、例えば、多くとも約１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、または約２未満のヌクレオチドの制限された数のヌクレオチドが含まれ得る。弱い塩基対合相互作用領域は、核酸の末端部分または核酸配列の内部部分に位置し得る。

【０２３２】

いくつかの実施形態では、検出可能なプローブには、一本鎖領域を有する部分的にハイブリダイズしない核酸がさらに含まれる。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、結合パートナーと会合した相補的核酸に結合される。いくつかの実施形態では、一本鎖領域には、相補的プライマー配列に結合するように構成されたプライマー配列が含まれる。いくつかの実施形態では、プライマー配列は、トーホールド転移（ｔｏｅｈｏｌｄ　ｄｉｓｐｌａｃｅｍｅｎｔ）反応を引き起こすように構成される。いくつかの実施形態では、プライマー配列は、相補的プライマー配列に結合した場合にヘアピンまたはループ構造を形成するように構成される。

【０２３３】

図１０Ａ～１０Ｃは、二次分子と検出可能なプローブとの間で弱い結合相互作用を形成するためのトーホールド転移ストラテジーを示している。図１０Ａは、トーホールド転移反応の第１の工程を示している。第１の核酸１０２０を含む検出可能なプローブ１０１０は、二次分子と会合した第２の核酸１０５０に近づく。第１の核酸分子１０２０には、トーホールド配列１０３０及びプライミング配列１０４０を含有するハイブリダイゼーション配列が含まれる。第２の核酸１０５０には、相補的トーホールド配列１０６０及び相補的プライミング配列１０７０を含む相補的ハイブリダイゼーション配列が含まれる。第２の核酸１０５０は、ハイブリダイゼーション配列の相補的トーホールド配列１０６０にのみハイブリダイズするトーホールドプライマー１０８０にハイブリダイズされ得る。第１の核酸１０２０のプライミング配列１０４０は、第２の核酸１０５０の相補的プライミング配列１０７０にハイブリダイズし、それにより検出可能なプローブ１０１０と二次分子との間の初期の弱い結合相互作用を形成し得る。検出可能なプローブ１０１０と二次分子との間の弱い結合相互作用は、ある程度の可逆性または解離を有し得る。図１０Ｂは、トーホールド転移反応の第２の工程を示している。第１の核酸１０２０のトーホールド配列１０３０は、トーホールドプライマー１０８０を転移させ、トーホールド配列は、第２の核酸１０５０の相補的トーホールド配列１０６０とのハイブリダイゼーションを完了することが可能となる。弱い結合相互作用に隣接する溶液または溶媒におけるトーホールドプライマー１０８０の継続した存在は、トーホールドプライマー１０８０による第２の核酸１０５０から第１の核酸１０２０の転移によってトーホールド転移反応の逆転を引き起こし得る。

【０２３４】

図１０Ｃは、検出可能なプローブと二次分子との間の弱い結合相互作用を形成するための代替的アプローチを示している。検出可能なプローブ１０１０には、第２の核酸鎖１０５０上の相補的プライミング配列１０７０に結合するプライミング配列１０４０を含有する第１の核酸鎖１０２０が含まれる。第２の核酸鎖１０５０はまた、第１の核酸１０２０の配列と相補的ではない相補的トーホールド配列１０６０を含有する。検出可能なプローブ－二次分子複合体は、トーホールド配列１０３０及びプライミング配列１０４０を含むトーホールドプライマーを含む溶液または溶媒と接触させられ得る。トーホールドプライマーは、プライミング配列１０４０と相補的プライミング配列１０７０との塩基対結合を破壊することによって第１の核酸鎖１０２０を可逆的に転移させ得る。いくつかの構成では、検出可能なプローブの結合と転移との間の平衡は、トーホールド転移反応物（例えば、トーホールドプライマー、検出可能なプローブ）の１つ以上の濃度を調節することによって制御され得る。

【０２３５】

検出可能なプローブまたは親和性試薬のアビディティはまた、異なる親和性を有する別

の結合分子を利用することによって増加し得る。いくつかの構成では、親和性試薬には、１つ以上の結合成分、例えば、複数の結合成分に結合した保持成分が含まれ得る。いくつかの構成では、親和性試薬は、単一の結合成分を有する。いくつかの構成では、結合分子は、検出可能なプローブまたは親和性試薬である。結合分子は、検出可能なプローブまたは親和性試薬よりも低い親和性及び／またはアビディティで結合パートナー、エピトープ、または標的部分に結合する特性を有し得る。結合分子は、結合分子に対する検出可能なプローブまたは親和性試薬の同時結合が、検出可能なプローブまたは親和性試薬の観察されたアビディティまたは親和性の見かけの増加を生み出すように検出可能なプローブまたは親和性試薬にカップリングされ得る。

【０２３６】

図１１Ａ～１１Ｃは、結合分子の二次結合相互作用を使用して検出可能なプローブのアビディティを増加させるためのシステムを示している。図１１Ａに示されているように、検出可能なプローブ１１１０は、リンカー１１９０（例えば、共有結合性ヘテロ二官能性リンカー、ハイブリダイズした核酸等）によって結合分子１１３０（例えば、第２の検出可能なプローブ）に接続される。リンカーは、柔軟性であり得、例えば、検出可能なプローブ１１１０が結合分子１１３０と直接的に相互作用することを可能とする。代替的には、リンカーは、比較的硬質であり得、例えば、検出可能なプローブ１１１０が結合分子１１３０と直接的に相互作用することを制約する。検出可能なプローブ１１１０には、第１の複数の結合成分１１２０が含まれ、結合分子１１３０には、第２の複数の結合成分１１４０が含まれる。検出可能なプローブ１１１０及び結合分子１１３０を接続させることによって形成される複合体を含む組成物は、エピトープまたは標的部位１１６０、及び二次結合部位１１７０を含有する結合パートナー１１５０と接触させられる。図１１Ｂに示されているように、結合相互作用は、第１の複数の結合成分１１２０の結合成分とエピトープまたは標的部位１１６０との初期結合によって開始され得る。初期結合の時に、結合分子は、結合パートナー１１５０と二次相互作用をまだ形成していない場合がある。図１１Ｃに示されているように、結合プロセスは、第２の複数の結合成分１１４０の結合成分が二次結合部位１１７０と二次結合相互作用を形成し、それにより検出可能なプローブ１１１０及び結合分子１１３０を結合パートナー１１５０に結合させる場合に完了し得る。結合分子１１３０と二次結合標的１１７０との間の弱い二次結合相互作用は、検出可能なプローブ１１１０が結合パートナー１１５０に結合されているものとして観察される可能性を増加させ得る。当業者は、結合複合体の結合順序が逆転され得、例えば、最初に結合分子１１３０が二次結合部位１１７０に結合し、続いて検出可能なプローブ１１１０がエピトープまたは標的部位１１６０に結合することを容易に認識する。

【０２３７】

図１１Ｄ～１１Ｅは、結合分子の二次結合相互作用を使用して検出可能なプローブのアビディティを増加させるための代替的システムを示している。図１１Ｄに示されているように、第１の複数の結合成分１１２０及び連結領域１１９２を含む第１の連結基１１９１を含む検出可能なプローブ１１１０は、結合パートナー１１５０のエピトープまたは標的部位１１６０に結合される。第２の複数の結合成分１１４０及び相補的連結領域１１９４を含む第２の連結基１１９３を含む未結合結合分子１１３０は、結合パートナー１１５０と接触させられる。図１１Ｅに示されているように、複数の結合成分１１４０の結合成分は、結合分子１１３０を結合パートナーの二次結合部位１１７０に結合させ、それにより弱い二次結合相互作用を形成する。結合分子１１３０の結合の後、連結領域１１９２及び相補的連結領域１１９４は接続され得、それにより検出可能なプローブ１１１０と結合分子１１３０との間のリンカーを形成する。結合分子１１３０と二次結合標的１１７０との間の弱い二次結合相互作用は、検出可能なプローブ１１１０が結合パートナー１１５０に結合されているものとして観察される可能性を増加させ得る。当業者は、結合複合体の結合順序が逆転され得、例えば、最初に結合分子１１３０が二次結合部位１１７０に結合し、続いて検出可能なプローブ１１１０がエピトープまたは標的部位１１６０に結合することを容易に認識する。第１の連結基１１９１及び第２の連結基１１９３は、共有結合的ま

たは非共有結合的相互作用を形成するように構成され得る。例えば、第１の連結基１１９１には、核酸連結領域１１９２が含まれ得、第２の連結基１１９３には、核酸連結領域１１９２とハイブリダイズするように構成された相補的核酸連結領域１１９４が含まれ得る。別の例では、連結領域１１９２には、（例えば、クリック反応によって）相補的連結領域１１９４における官能基に化学的に結合されるように構成された官能基（例えば、クリック反応基）が含まれ得る。

【０２３８】

多くの場合、親和性試薬、検出可能なプローブまたはその結合成分は、選択された結合パートナー（例えば、より大きなポリペプチド構造内のポリペプチド分子またはアミノ酸エピトープ）に結合する非ランダム確率を有し得、これはそれが、所与のエピトープまたはエピトープのセットについての他のものを上回って上昇した親和性（「特異性」とも称される）のある程度のレベルを示すことを意味する。多くの場合、特異性は、二元ではない場合があり、これは、親和性試薬または検出可能なプローブが、時に向上した特異性を示した所与のエピトープに結合するようではない場合があり、また、時に実証された特異性を有しないエピトープに結合するようである場合があることを意味する。多くの場合、所与の親和性試薬または検出可能なプローブが上述したように所与のエピトープまたは結合パートナーに特異的であるかどうかは、結合アッセイの条件下で所与のエピトープまたは結合パートナーに結合するその親和性試薬または検出可能なプローブの確率と相関する。例えば、親和性試薬または検出可能なプローブは、結合の確率が確率閾値よりも高い場合に特定のエピトープまたは結合パートナーに特異的とみなされ得る。確率閾値は、結合アッセイを実施する前に知られている場合があり（すなわち、閾値は既定されている）またはそれは結合アッセイ自体から決定され得る（すなわち、閾値は例証的に決定される）。いくつかの場合では、特異的結合と相関する確率閾値は、多くとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％またはそれを超え得る。いくつかの場合では、特異的結合と相関する確率閾値は、１％、５％、１０％、２０％、３０％、または４０％を超え得る。逆に、所与の親和性試薬または検出可能なプローブが所与の状況のセット下で所与のエピトープまたは結合パートナーを結合させない（例えば、偽陰性の結合結果を提供する）確率は、いくつかの場合では、１％未満から９９％を超える範囲であり得、これはそれらの相補的エピトープまたはポリペプチドに結合しない親和性試薬または検出可能なプローブの有意な可能性が存在し得るということを意味する。さらにいくつかの場合では、非特異性または非結合と相関する確率閾値は、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％未満、またはそれ未満である。いくつかの場合では、非特異性または非結合と相関する確率閾値は、６０％、７０％、８０％、９０％、または９５％未満であり得る。

【０２３９】

いくつかの実施形態では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、以下の特性の１つ以上を有し得る：特定のアミノ酸種に特異的に結合し得る、及び１９種を超える他のアミノ酸種に結合しない場合がある。例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、２０種の必須アミノ酸のうちの１つに結合するが、他の１９種の必須アミノ酸には結合しない場合がある。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、形態αＸβ（Ｘは、所望のエピトープであり、α及びβは、任意のアミノ酸残基である）の配列の少なくとも１０％を結合させ得る。いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、形態αＸβの配列の少なくとも０．２５％、０．５％、０．７５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、７５％、または９０％を結合させ得る。いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、ランダム配列のプールに対する検出可能なプローブまたは親和性試薬の平均K_D値よりも少なくとも１０倍低いK_D値で形態αＸβの配列の少なくとも１０％に結合し得る。いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、ランダム配列のプールに対する検出可能なプローブまたは親和性試薬の平均K_D値よりも少なくとも１００倍低いK_D値で形態αＸβの配列の少なくとも１０％に結合し得る。いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、ランダム配列

のプールに対する検出可能なプローブまたは親和性試薬の平均K_D値よりも少なくとも１０００倍低いK_D値で形態αXβの配列の少なくとも１０％に結合し得る。

【０２４０】

いくつかの実施形態では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、以下の特性の１つ以上を有し得る：特定の３アミノ酸配列を有する所望のエピトープを特異的に結合させ得る、任意の他の３アミノ酸配列を結合させない場合がある、及び所望のエピトープを囲む臨接配列にかかわらず実質的に同様の親和性で所望のエピトープを結合させ得る。いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、これらの特性のいくつか、より多く、またはすべてを有し得る。いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、エピトープのサブセットを結合させない場合がある。本開示の別の態様は、３アミノ酸エピトープの既知のセットを優先的に結合させ得る検出可能なプローブまたは親和性試薬であって、他のエピトープに対する、また、臨接するアミノ酸残基の影響下にあるこれらのエピトープに対する優先性が決定されている、検出可能なプローブまたは親和性試薬を提供する。

【０２４１】

いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬には、ヒトプロテオームにおけるすべてのタンパク質の５％～１０％に結合するスイッチ可能なアプタマーが含まれ得る。いくつかの場合では、スイッチ可能なアプタマーには、２つ以上の蛍光部位が含まれ得る。スイッチ可能なアプタマーは、本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合成分であり得る。

【０２４２】

いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、ランダム配列を有するタンパク質のプールについての検出可能なプローブまたは親和性試薬の平均K_D値よりも少なくとも１０、１００、または１０００倍低い、検出可能なプローブまたは親和性試薬及び所与の配列についてのK_D値で所与の配列に結合するように構成される。

【０２４３】

いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、１つ以上の構造的背景にある所望のエピトープに結合する能力を有し得る。いくつかの実施形態では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、エピトープを有するポリペプチドが、変性背景、天然背景、またはその両方にある場合、所望のエピトープに結合し得る。いくつかの実施形態では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、フォールディングしたまたはフォールディングしていない背景内のポリペプチドにおける所望のエピトープに結合する能力を有し得る。いくつかの実施形態では、変性されたポリペプチドは、ポリペプチド内に１つ以上のマイクロフォールド領域を含有または生成し得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、変性された後にフォールディングすることが可能とされたポリペプチドにおける所望のエピトープに結合するように設計され得る。得られたポリペプチドは、その活性なフォールディング状態に復元され、部分的に再フォールディングされ、または異なる状態にフォールディングされ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、変性された及び／または変性された状態からフォールディングすることが可能とされたポリペプチドのフォールディングされたまたはフォールディングされていない領域におけるエピトープに結合し得る。

【０２４４】

いくつかの実施形態では、所望のエピトープ配列（例えば、ＡＡＡ）を認識する検出可能なプローブまたは親和性試薬は、そのエピトープ配列を含有するすべてのポリペプチドに同等に良好に、またはほぼ同等に良好に結合し得る。いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、エピトープの配列背景における相違に従って異なる親和性で所望のエピトープに結合し得る。いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、配列背景にかかわらず、いくつかの異なるエピトープに結合し得る。いくつかの場合では、本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬は、配列背景に応じて異なる親和性でいくつかの異なるエピトープに結合し得る。そのような特性を有する検出可能な

プローブまたは親和性試薬は、検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合特徴を決定するためにスクリーニング法の組み合わせによって同定され得る。例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、共通のコア配列（例えば、形態αＡＡＡβ（ＡＡＡは、共通のコア配列であり、α及びβは、任意のアミノ酸であり得る）のアミノ酸エピトープ）を除き、互いに異なるポリペプチド配列のセットに結合する能力についてスクリーニングされ得る。

【０２４５】

いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬の所望のエピトープは、ペプチド配列であり得る。いくつかの場合では、いくつかの異なるエピトープが所望であり得る。この場合、複数の所望のエピトープに結合する検出可能なプローブまたは親和性試薬が選択され得る。いくつかの場合では、所望の１つのエピトープまたは複数のエピトープは、Ｘと称され得る。いくつかの場合では、エピトープには、非連続アミノ酸配列が含まれる。例えば、エピトープには、ポリペプチドの一次配列の領域における２つ目、３つ目または４つ目のアミノ酸残基毎に特定のアミノ酸が含まれ得る。エピトープには、３アミノ酸の配列であって、２つの特定のアミノ酸が可変アミノ酸によって分離されている、３アミノ酸の配列（例えば、ＡαＡ（Ａは、アラニンであり、αは、任意のアミノ酸である））、４アミノ酸の配列であって、２つのアミノ酸が２つの可変アミノ酸によって分離されている、４アミノ酸の配列（例えば、ＡαβＡ（Ａは、アラニンであり、α及びβは、任意のアミノ酸である））、５アミノ酸の配列であって、２つの特定のアミノ酸が３つの可変アミノ酸によって分離されている、５アミノ酸の配列等が含まれ得る。いくつかの実施形態では、エピトープには、非連続エピトープの２つ以上の配列が含まれ得る。別の例では、エピトープには、残基がタンパク質配列において近接していない（すなわち、タンパク質の一次構造において近接していない）場合であっても、タンパク質二次または三次構造において互いに近接して配置されているいくつかのアミノ酸残基が含まれ得る。いくつかの場合では、エピトープには、特定のアミノ酸の連続配列が含まれる。いくつかの実施形態では、所望のエピトープＸは、２、３、４、５、６または７アミノ酸の短いアミノ酸配列である。いくつかの場合では、Ｘには、いくつかの異なる短いアミノ酸配列が含まれる。いくつかの実施形態では、所望のエピトープＸは、３アミノ酸配列$X_1X_2X_3$である。多様な配列背景においてこの所望のエピトープに結合する検出可能なプローブまたは親和性試薬は、所望のエピトープを含む標的ポリペプチドへの結合についてスクリーニングによって同定され得る。

【０２４６】

標的には、所望の配列Ｘを含む複数のポリペプチドが含まれ得る。複数のポリペプチドは、多様な構成、例えば、溶液相中のポリペプチドのプール、固体支持体上、容器内、固体支持体上、複数のポリペプチドの１つ以上をそれぞれ含有する容器の集合物の中のポリペプチドのアレイ等のいずれかを有し得る。いくつかの場合では、標的は、配列Ｘの複数のポリペプチドすべてである。いくつかの実施形態では、標的には、配列αＸβ（Ｘは、所望のエピトープであり、α及びβは、０、１、または複数のアミノ酸の任意の配列であり得る）の複数のポリペプチドが含まれ得る。例えば、所望のエピトープＸがＡＡＡである場合、そのときは標的ポリペプチドで見られ得る配列の例には、ＡＡＡＡＡ、ＡＡＡＡＣ、ＣＡＡＡＡ、ＣＡＡＡＣ、及びＣＡＡＡＤが含まれ得る。いくつかの場合では、α及びβはそれぞれ、任意の単一のアミノ酸であり得る。αについてのアミノ酸は、βについてのアミノ酸と同じであり、または異なる場合がある。いくつかの場合では、α及びβのうちの少なくとも１つは、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれを超えるアミノ酸であり得る。αについての配列は、βについての配列と同じであり、または異なる場合がある。いくつかの場合では、α及びβのうちの少なくとも１つには、リンカーまたはスペーサーが含まれ得る。リンカーまたはスペーサーは、本明細書で示されるまたは当該技術分野で知られている任意のリンカーまたはスペーサーであり得る。いくつかの場合では、リンカーは、ペプチド骨格を有し、例えば、アミノ酸リンカーである。いくつかの場合では、リンカーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはＰＥＧポリマー鎖で

ある。ＰＥＧ鎖は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０またはそれを超えるエチレングリコールモノマーからなり得る。いくつかの場合では、リンカーは、炭素鎖であり得る。ポリペプチドにはまた、Ｎ末端またはＣ末端修飾、例えば、キャッピングが含まれ得る。いくつかの場合では、ポリペプチドは、電荷を除去するように修飾、例えば、末端アミド化（Ｃ末端）またはアセチル化（Ｎ末端）され得る。いくつかの場合では、αＸβペプチドは、天然に存在しないアミノ酸を含有し得る。いくつかの場合では、αＸβペプチドは、リンカー及び官能基を用いて修飾され得る。例えば、分子は、構造Ｆ－Ｌ－αＸβ（Ｆは、官能基であり、Ｌは、リンカーである）のものであり得る。他の場合では、分子は、構造αＸβ－Ｌ－Ｆ（Ｆは、官能基であり、Ｌは、リンカーである）のものであり得る。官能基Ｆは任意に、反応性部位と共有結合を形成するまたは受容体に結合することが可能であり得る。いくつかの場合では、α及びβはそれぞれ、グリシンであり得、または１つ以上のグリシン残基であり得る。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、それらのアプタマー原性を変化させるように修飾され得る。例えば、残基は、正電荷を付加すること；負電荷を付加すること；疎水性基を付加すること；糖を付加するための修飾；または化学的多様性を増加させるための他の修飾によって変化させられ得る。

【０２４７】

ポリペプチドは、当該技術分野で知られている任意の方法を使用して合成され得る。いくつかの商業的プラットフォーム、例えば、ＭｕｌｔｉＰｅｐ ＲＳｉ ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ（Ｉｎｔａｖｉｓ，Ｇｅｒｍａｎｙ）がポリペプチド合成のために存在する。ポリペプチドは、液相または固相法を使用して合成され得る。合成されたポリペプチドは、ポリペプチド分析のための任意の既知の方法を使用して検証され得る。例えば、ポリペプチドは、質量分析、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化飛行時間質量分析（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化、ＡＭＳ（加速器質量分析）、ガスクロマトグラフィー－ＭＳ、液体クロマトグラフィー－ＭＳ、誘導結合プラズマ－質量分析（ＩＣＰ－ＭＳ）、同位体比質量分析（ＩＲＭＳ）、イオンモビリティー分析－ＭＳ、タンデムＭＳ、熱イオン化－質量分析（ＴＩＭＳ）、またはスパーク源質量分析（ＳＳＭＳ）を使用して検証され得る。合成されたペプチドの濃度もまた、分光法によって評価され得る。

【０２４８】

図４８は、標的を含むポリペプチドの例示的なリストと共に、検出可能なプローブまたは親和性試薬の選択または特性化のための固定化された標的を示している。図４８の例において、所望のエピトープは、ＡＡＡであり、標的のポリペプチドには、配列αＡＡＡβ（α及びβはそれぞれ、単一のアミノ酸である）が含まれる。この例において、標的には、αＡＡＡβ（α及びβはそれぞれ、単一のアミノ酸である）の各々の可能性のある配列）を表す４００種の異なるポリペプチドが含まれる。

【０２４９】

このように、任意の所与の３－ｍｅｒエピトープについて、５－ｍｅｒのプールを含む標的は、４００種の異なる配列（αについて２０種の可能性及びβについて２０種の可能性（α及びβの各々は、単一のアミノ酸である））を含有し得る。いくつかの場合では、標的には、５アミノ酸よりも長いポリペプチド（α及びβの各々または両方には、２つ以上のアミノ酸が含まれ得る）のプールが含まれ得る。いくつかの場合では、α及びβの一方には、０個のアミノ酸が含まれ得、αまたはβの他方には、１つ以上のアミノ酸が含まれ得る。いくつかの場合では、標的には、追加のアミノ酸を有しない配列Ｘのポリペプチドが含まれ得る。

【０２５０】

いくつかの場合では、標的配列Ｘは、より長い配列に埋め込まれ得る。例えば、標的配列Ｘは、１５－ｍｅｒポリペプチド分子に埋め込まれた１５アミノ酸よりも少ないコア配列であり得る。標的配列Ｘは、１５－ｍｅｒ内の任意の位置で埋め込まれ得、例えば、３

アミノ酸標的配列Ｘの場合、標的配列Ｘは、１５－ｍｅｒの位置１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、または１３で開始し得る。埋め込まれた標的配列を含むポリペプチドは、溶液中で合成され得、または例えば、ＰＥＰｐｅｒＰＲＩＮＴチップまたは他のペプチドアレイ等のチップ上で合成され得る。いくつかの実施形態では、埋め込まれた標的配列を含むポリペプチドは、単一分子タンパク質アレイ上に結合または合成され得る。二次構造を形成するように、または二次構造を欠くようにより長い配列が選択され得る。そのような二次構造の例には、アルファヘリックス、ベータシート、プロリン屈曲、ターン、ループ、及びシステイン架橋が含まれる。いくつかの場合では、より長い配列には、天然に存在しないアミノ酸、または他の基が含まれ得る。

【０２５１】

初期選択工程には、所望のエピトープを含む標的に対する親和性試薬または検出可能なプローブのライブラリをスクリーニングすることが含まれ得る。親和性試薬または検出可能なプローブまたはプローブライブラリには、ランダム配列を有する、または既知のタンパク質結合アプタマーのものと同様の配列を有するＤＮＡ、ＲＮＡ、またはペプチドアプタマーが含まれ得る。

【０２５２】

いくつかの場合では、ライブラリは、アプタマーライブラリであり得る。いくつかの場合では、アプタマーライブラリは、市販のライブラリであり得る。いくつかの場合では、アプタマーライブラリは、研究所、大学、アカデミックセンター、または研究センターから利用可能であり得る。いくつかの場合では、ライブラリには、ビーズまたは他の粒子に結合したアプタマーのライブラリが含まれ得る。いくつかの場合では、アプタマーライブラリは、既知の配列のライブラリから、またはランダム配列から生成され得る。いくつかの場合では、アプタマーライブラリには、例えば、ステムループライブラリ等の特定の構造を有するアプタマーが含まれ得る。いくつかの場合では、アプタマーライブラリには、２つのコンフォメーション間でスイッチされ得るスイッチ可能なアプタマー－アプタマーが含まれ得る。例えば、アプタマーは、金属イオン補因子の存在下で第１のコンフォメーションを形成し、補因子の非存在下で第２のコンフォメーションを形成し得る。したがって、キレート剤、例えば、ＥＤＴＡ、またはＥＧＴＡの添加は、金属イオンを隔離し、アプタマーを異なるコンフォメーションに適応させる。アプタマースイッチを誘導するために使用され得る他の要素には、光、ｐＨ、温度、磁場、及び電流が含まれる。

【０２５３】

標的に対するアプタマーライブラリのスクリーニングは、当該技術分野で知られている任意の方法によって実施され得る。一態様では、標的は、固体支持体上に固定化され得、アプタマーは、低い特異性でアプタマーの結合を可能とする条件下で加えられ得る。未結合アプタマーは、ストリンジェンシーを増加させる一連の洗浄で標的から洗浄され得る。洗浄工程を介して標的に結合されたままであるアプタマーは、さらなるラウンドの選択のためにシーケンシング及び増幅され、または高い配列類似性を有する追加のアプタマーの設計のために使用され得る。いくつかのラウンドの標的結合、洗浄、シーケンシング及び増幅、または新たなアプタマーの設計は、所望の特異性及び結合親和性のアプタマーが生成されるまで繰り返され得る。アプタマーライブラリはまた、ビーズ（各々には、複数コピーのアプタマーが含まれる）を利用するビーズベースのアプローチを使用してスクリーニングされ得る。アプタマーライブラリはまた、例えば、ライブラリの各アプタマーの複数のコピーをアレイ上にスポッティングし、次いで標的が結合するスポットを評価することによって、アレイベースのアプローチを使用してスクリーニングされ得る。アプタマーライブラリはまた、粒子提示アプローチを使用してスクリーニングされ得る。例えば、アプタマーに結合したビーズまたは他の粒子は、アレイを形成するために支持体上でアレイ化され得る。いくつかの実施形態では、アプタマーライブラリは、単一分子タンパク質アレイを使用してスクリーニングされ得る。

【０２５４】

いくつかの場合では、同定された検出可能なプローブまたは親和性試薬が結合する標的

の画分またはパーセンテージは、例えば、結合したプローブのコピー数を結合に利用可能なポリペプチドの数と比較することによって測定され得る。いくつかの実施形態では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、標的を含むポリペプチドの少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％またはそれ超に結合し得る。また、特定の検出可能なプローブまたは親和性試薬が同定及び検出されると、それは検証され得る。いくつかの実施形態では、選択された検出可能なプローブまたは親和性試薬は、検出可能なプローブまたは親和性試薬が結合しているものとして特性化されるエピトープを含有する複数の配列に対して検証され得る。いくつかの実施形態では、選択された検出可能なプローブまたは親和性試薬は、単一分子タンパク質アレイ上の複数のタンパク質配列に対する選択された検出可能なプローブまたは親和性試薬を評価することによって検証され得る。

【０２５５】

検出可能なプローブまたは親和性試薬は、選択及び特性化工程の前または後に検出可能な標識に結合され得る。いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、初期選択工程の前に標識（複数可）に結合され得る。いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、初期選択工程の前及び特性化工程の後に標識（複数可）に結合され得る。いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、選択及び特性化工程の後に標識（複数可）に結合され得る。いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、選択工程のための第１の標識に結合され、特性化工程のための第２の標識に結合され得る。第２の標識は、第１の標識と共に、または第１の標識の代わりに付加され得る。いくつかの場合では、第１の標識は、選択及び特性化工程のために使用され得、第２の標識は、最終の親和性試薬または検出可能なプローブを生成するために使用され得る。

【０２５６】

検出及び観察可能性

本開示の検出可能なプローブは、観察可能性をプローブに付与する検出可能なシグナルを提供するように構成され得る。観察可能性は、検出システムのバックグラウンドまたはノイズを超えるレベルで検出デバイスによって容易に感知され得る物理的シグナルを生成する特性を指し得る。例えば、蛍光プローブは、例えば、１０％、５０％、１００％、２ｘ、３ｘ、４ｘ、５ｘ、またはそれを超える閾値量でバックグラウンド蛍光シグナル強度を超える蛍光シグナル強度を生成する場合、観察可能とみなされ得る。別の例では、核酸バーコードシグナルは、１０ラウンドのシグナル増幅の後に、増幅を伴ってまたは伴わずに配列カウント（例えば、次世代シーケンシングまたはアレイベースのハイブリダイゼーションによる）の閾値数、例えば、１０００以上の配列カウントを生成する場合、観察可能とみなされ得る。通常、観察可能性は、１）標的を結合させる検出可能なプローブの可能性；２）バックグラウンドシグナルの強度；及び３）シグナル減衰メカニズムを含む、いくつかの要素によって影響を受け得る。標的に結合する検出可能なプローブの可能性に影響を及ぼし得る要素には、上記に示されるものが含まれ得る。

【０２５７】

バックグラウンドシグナルは、所望のシグナルと比較して同じまたは同様の特徴を有する検出可能なシグナルを指し得る。例えば、蛍光標識システムでは、バックグラウンドシグナルには、蛍光標識からの予想された蛍光シグナルと同じ波長でまたは放射線波長範囲内で検出された放射線が含まれ得、例えば、バックグラウンド蛍光シグナルは、Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８色素を観察することを試みる場合に４８５ｎｍと４９５ｎｍとの間で検出され得る。放射性シグナルについて、バックグラウンドシグナルは、物質の天然蛍光、天然発光、もしくは自己蛍光、検出波長での外部放射線の透過、反射、もしくは屈折、または先行する検出プロセスからの蛍光プローブによって残された残留シグナルにより生じ得る。

【０２５８】

バックグラウンド放射性シグナルは、空間的に均一または空間的に不均一であり得る。

いくつかの特性化アッセイのため、放射性バックグラウンドシグナルは、アッセイの前、間、又な後に測定され得る。例えば、物質の空間的組成は、１つ以上の検出可能なプローブを物質に適用する複数のサイクルによって特性化され得る。連続サイクルにわたって、残留する検出可能なプローブは、物質上にランダムに残され得、連続検出サイクル中に不均一なバックグラウンドシグナルを生成する。残留する検出可能なプローブは、最終的に解離し得、これはバックグラウンドシグナルが空間的及び時間的不均一性を有し得ることを意味する。別の例では、同じ上述した物質特性化アッセイは、光学的に密閉されていない検出システムにおいて行われ得、いくらかの外部放射線がシステムにおいて検出されることを可能とする。外部放射線は、物質にわたって均一な分布を有さず、バックグラウンドシグナルにおける放射線の非均一勾配または分布の検出をもたらす。外部放射線は、経時的に変化しない場合があり、空間的に不均一であるが時間的に均一なバックグラウンドを引き起こす。

【０２５９】

検出可能なプローブは、バックグラウンドシグナル閾値を超える検出可能なシグナルを生成するものとして特性化され得る。発光標識された検出可能なプローブは、バックグラウンド蛍光シグナルを超える蛍光シグナル（または他のタイプの発光シグナル）を有するものとして特性化され得る。発光シグナルは、バックグラウンドシグナルまたは検出されたプローブシグナルを得るために、例えば、固定期間にわたる総光子カウントによって定量され得る。定量された発光シグナルは、点、位置、もしくは場所で、または複数の点、位置、または場所を含む領域にわたって測定され得る。検出可能なプローブは、全体領域にわたる平均シグナルまたは領域内の最大シグナル等の閾値バックグラウンドシグナルレベルを超える検出可能なシグナルを有するように構成され得る。検出可能なプローブからのシグナルの全体的強度は、検出可能なプローブに結合したシグナル伝達標識（例えば、フルオロフォア）の総数によって制御され得る。プローブの空間的強度（すなわち、特定の位置でのシグナル強度）は、プローブに結合したシグナル伝達標識（例えば、フルオロフォア）の密度によって制御され得る。

【０２６０】

検出可能なプローブは、予期されたまたは観察されたバックグラウンドシグナルを超える検出可能なシグナルを生成するように構成され得る。例えば、物質にまたは物質上の結合パートナーに結合するように構成された検出可能なプローブは、物質によって生成される測定されたバックグラウンドシグナルを超える検出可能なシグナルを生成し得る。検出可能なプローブは、バックグラウンドシグナルを特定の量超える検出可能なシグナルを生成し得る。逆に、検出可能なプローブは、シグナル感知の態様に応じて検出可能な限度未満の検出可能なシグナルを生成し得る。検出可能なプローブは、少なくとも約１．５ｘ、２ｘ、３ｘ、４ｘ、５ｘ、６ｘ、７ｘ、８ｘ、９ｘ、１０ｘ、１１ｘ、１２ｘ、１３ｘ、１４ｘ、１５ｘ、１６ｘ、１７ｘ、１８ｘ、１９ｘ、２０ｘ、２５ｘ、３０ｘ、４０ｘ、５０ｘ、７５ｘ、１００ｘ、またはそれを超えてバックグラウンドシグナル強度を超える検出可能なシグナル強度を生成し得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブは、多くとも約１００ｘ、７５ｘ、５０ｘ、４０ｘ、３０ｘ、２５ｘ、２０ｘ、１９ｘ、１８ｘ、１７ｘ、１６ｘ、１５ｘ、１４ｘ、１３ｘ、１２ｘ、１１ｘ、１０ｘ、９ｘ、８ｘ、７ｘ、６ｘ、５ｘ、４ｘ、３ｘ、２ｘ、１．５ｘ、またはそれ未満、バックグラウンドシグナル強度を超える検出可能なシグナル強度を有し得る。

【０２６１】

放射性シグナル（例えば、蛍光）について、シグナル減衰は、放射性シグナルを除去するまたは妨害する１つ以上のメカニズムにより生じ得る。例示的なシグナル減衰メカニズムには、消光、自己消光、フォトブリーチング、及び標識喪失が含まれ得る。消光は、光子の放射を阻害するまたは放射された光子を吸収する化学種の存在により生じ得る。特性化システムにおけるいくつかの種は、放射された光子を本質的に吸収し得、放射性シグナルの減少または消光をもたらす。いくつかの構成では、特定の種は、放射性シグナルを消光し得る種の形成を阻害する検出システムに加えられ得る（例えば、酸素スカベンジャー

、例えば、アスコルベート）。消光の特定の形態は、ルミノフォアからの発光シグナルが同じまたは同様の種の第２のルミノフォアによって消光され得る自己消光である。自己消光は、標識間構成、例えば、隣接するルミノフォア間の間隔及びルミノフォアの相対的配向に関連し得る。いくつかの構成では、発光シグナルは、隣接するルミノフォア間の間隔が減少するにつれて減少し得る。他の構成では、発光シグナルは、隣接するルミノフォア間の間隔が減少するにつれて増加し得る（例えば、フェルスター共鳴エネルギー移動）。

【０２６２】

消光、自己消光、及び関連する光学的現象は、有効量子収率によって特性化され得る。個々のフルオロフォアは、特徴的なまたは測定された量子収率を有し得る。複数のフルオロフォアを含む検出可能なプローブ組成物の有効量子収率は、アッセイ条件下で測定または特性化された量子収率であり得る。検出可能なプローブ組成物は、少なくとも約０．１、０．１５、０．２、０．２５、０．３、０．３５、０．４、０．４５、０．５、０．５１、０．５２、０．５３、０．５４、０．５５、０．５６、０．５７、０．５８、０．５９、０．６０、０．６１、０．６２、０．６３、０．６４、０．６５、０．６６、０．６７、０．６８、０．６９、０．７０、０．７１、０．７２、０．７３、０．７４、０．７５、０．７６、０．７７、０．７８、０．７９、０．８０、０．８１、０．８２、０．８３、０．８４、０．８５、０．８６、０．８７、０．８８、０．８９、０．９０、０．９１、０．９２、０．９３、０．９４、０．９５、０．９６、０．９７、０．９８、０．９９、またはそれを超える有効量子収率を有し得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブ組成物は、多くとも約０．９９、０．９８、０．９７、０．９６、０．９５、０．９４、０．９３、０．９２、０．９１、０．９０、０．８９、０．８８、０．８７、０．８６、０．８５、０．８４、０．８３、０．８２、０．８１、０．８０、０．７９、０．７８、０．７７、０．７６、０．７５、０．７４、０．７３、０．７２、０．７１、０．７０、０．６９、０．６８、０．６７、０．６６、０．６５、０．６４、０．６３、０．６２、０．６１、０．６０、０．５９、０．５８、０．５７、０．５６、０．５５、０．５４、０．５３、０．５２、０．５１、０．５０、０．４５、０．４、０．３５、０．３、０．２５、０．２、０．１５、０．１、またはそれ未満の有効量子収率を有し得る。

【０２６３】

放射性シグナルはまた、化学的メカニズム、例えば、フォトブリーチングまたは標識喪失によって減衰され、またはそうでなければ減弱され得る。理論に縛られることを望むものではなく、フォトブリーチングは、標識、例えば、蛍光標識に対する不可逆的化学的変化により生じ得る。フォトブリーチングは、光子とフルオロフォアとの相互作用、光子とフルオロフォアを損傷させ得る種（例えば、フリーラジカル、例えば、三重項酸素）との相互作用、及びフルオロフォアを変化または損傷させる化学種とフルオロフォアとの間の相互作用を含む、任意の既知のメカニズムに起因し得る。フォトブリーチング及び他の形態のシグナル減衰は、一時的または時間に関連する現象であり得る。例えば、照射によるフォトブリーチングは、総時間または総照射時間に比例して増加し得る。同様に、破壊的化学的修飾種の総量または濃度は、フォトブリーチングの速度に影響を及ぼし得る。例えば、フォトブリーチング重度は、増加した光子カウントまたは光子密度と共に増加し得る。フォトブリーチングまたは別の化学的メカニズムによるシグナル喪失率は、一定であり、または時間と共に可変（例えば、指数関数的、対数的）であり得る。

【０２６４】

検出可能なプローブ組成物は、消光、自己消光、フォトブリーチング、標識喪失、または他のメカニズムにより経時的にシグナルの可変性または増加性喪失を経験し得る。検出可能なプローブ組成物は、少なくとも約０．００１％／分、０．０１％／分、０．１％／分、０．５％／分、１％／分、２％／分、３％／分、４％／分、５％／分、６％／分、７％／分、８％／分、９％／分、１０％／分、１５％／分、２０％／分、２５％／分、３０％／分、３５％／分、４０％／分、４５％／分、５０％／分、５５％／分、６０％／分、６５％／分、７０％／分、７５％／分、８０％／分、８５％／分、９０％／分、９５％／分、またはそれを超えるシグナル喪失率を有し得る。代替的または付加的に、検出可能な

プローブ組成物は、多くとも約９５％／分、９０％／分、８５％／分、８０％／分、７５％／分、７０％／分、６５％／分、６０％／分、５５％／分、５０％／分、４５％／分、４０％／分、３５％／分、３０％／分、２５％／分、２０％／分、１５％／分、１０％／分、９％／分、８％／分、７％／分、６％／分、５％／分、４％／分、３％／分、２％／分、１％／分、０．５％／分、０．１％／分、０．０１％／分、０．００１％／分、またはそれ未満のシグナル喪失率を有し得る。

【０２６５】

検出可能なプローブは、例えば、バックグラウンドシグナルを超える強度を有するまたはバックグラウンドシグナルから分解される検出可能な特徴を有することによって、バックグラウンドから区別可能な検出可能なシグナルを生成し得る。検出可能なプローブは、シグナル分解メカニズム、例えば、フォトブリーチング及び標識喪失にもかかわらず、所与の時間バックグラウンドシグナルを超えるシグナル強度を生成するものとして特性化され得る。例えば、蛍光検出可能なプローブは、少なくとも１０分の連続または非連続励起でバックグラウンド蛍光シグナルを超える蛍光シグナルを有し得る。観察可能時間は、検出可能なプローブが局所的または平均バックグラウンドシグナルから区別可能な検出可能なシグナルを生成する時間の最短長さとして定義され得る。いくつかの構成では、観察可能時間は、検出可能なプローブ上の標識成分の総数を増加させることによって増加し得る。観察可能時間は、検出可能なプローブに結合した標識成分の数に比例して拡縮し得る。検出可能なプローブの観察可能時間は、アッセイにわたって検出可能性を確保するために増加し、またはさらに最大化され得る。検出可能なプローブの観察可能時間は、フォトブリーチング等による意図されたシグナル除去を可能とするために所定の値内に制限され得る。検出可能なプローブは、少なくとも約１秒、１５秒、３０秒、１分、２分、３分、４分、５分、６分、７分、８分、９分、１０分、１５分、２０分、３０分、４５分、６０分、９０分、１２０分、またはそれを超える観察可能時間観察され、またはその観察可能時間を有し得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブは、多くとも約１２０分、９０分、６０分、４５分、３０分、２０分、１５分、１０分、９分、８分、７分、６分、５分、４分、３分、２分、１分、３０秒、１５秒、１秒、またはそれ未満の観察可能時間観察され、またはその観察可能時間を有し得る。

【０２６６】

検出可能なプローブは、バックグラウンドシグナルを十分に上回る検出可能なシグナルを生成することによって結合相互作用の観察可能性を改善し得る。その上、検出可能なプローブは、検出可能なシグナルの空間的分解能を改善することによって結合相互作用の観察可能性を増加させ得る。検出可能なプローブは、１）光学的に密度の高いシグナル源を生成するための保持成分の小さな領域内の標識の濃度；２）光学的に均一なシグナル源を生成するための保持成分の大きな領域にわたる標識の分布；または３）光学的に密度が高く均一なシグナル源を生成するための保持成分のすべてのまたは多くの画分にわたる標識の濃度を含むいくつかの方法で検出可能なシグナルの空間的分解能を提供するように構成され得る。図１２Ａ～１２Ｂは、検出可能なプローブを利用する発光シグナル（例えば、蛍光シグナル）空間的分解能の例を示している。図１２Ａは、複数のフルオロフォアを含む単一の結合成分が領域の中央における結合パートナーに結合した場合のバックグラウンド蛍光カウントを含む、領域（例えば、物質の表面）上の蛍光カウントデータを示している。領域は、各副領域が蛍光について個別に定量され得る９つの副領域に均一に分割され得る（例えば、各副領域は、センサーピクセルに対応し得る）。親和性試薬に結合したフルオロフォアの数は、親和性試薬の構造及び親和性により制限され得る。図１２Ａにおける蛍光カウントは、おそらく親和性試薬と結合パートナーとの間の結合相互作用により、中央の副領域の蛍光カウントの穏やかな増加を示しているが、結合相互作用が生じたという結論を下すには８個の周囲の副領域のバックグラウンドカウントを十分に上回っていない可能性がある。図１２Ｂは、図１２Ａについて記載された親和性試薬よりも有意に多い数のフルオロフォアを含む検出可能なプローブを伴うこと以外は、図１２Ａと同様の状況を示している。中央副領域において観察された有意に増加した蛍光シグナルは、周囲の副

領域からのシグナルの増加と共に（おそらく中央副領域からのシグナルクロストークによる）、観察されたシグナルが検出可能なプローブと結合パートナーとの結合相互作用に起因するという信頼性を増加させる。

【０２６７】

検出可能なプローブは、固体支持体、表面または視野の領域にわたって検出可能なシグナルを提供するようにサイズ調整され得る。検出可能なプローブがシグナルを提供する領域のサイズは、領域内の特徴のサイズによって決定され得る。例えば、検出可能なプローブは、結合パートナー（例えば、ポリペプチド）によって占有される面積よりも大きな面積にわたってシグナルを提供するようにサイズ調整され得る。検出可能なプローブは、例えば、結合パートナーまたは結合パートナーに隣接する物質からの自己蛍光を減少させることによって、バックグラウンドシグナルを減少させるために結合パートナーよりも大きくなるように設計され得る。代替的には、検出可能なプローブは、検出可能なプローブからの検出可能なシグナルの空間的分解能を増加させるために結合パートナーよりも小さくなるように設計され得る。

【０２６８】

いくつかの構成では、検出可能なプローブ組成物は、検出可能なプローブが結合し得る、または親和性を有し得る結合パートナーよりも大きな固体支持体、表面または視野の面積にわたって検出可能なシグナルを生成するように設計され得る。特定の面積上のプローブの観察可能性は、検出可能なプローブの表面上の標識成分の分布及び／または濃度を増加させることによって改善され得る。プローブは、検出可能なプローブによって提供される検出可能なシグナルを向上させる追加の検出分子を含めることによって相対的に大きな面積にわたって検出可能なシグナルを生成し得る。図１３は、検出可能なプローブ組成物が認識する結合パートナーによって占有される面積に対して大きな面積にわたって検出可能なシグナルを生成するための検出可能なプローブ組成物を示している。検出可能なプローブ１３１０は、任意にアンカー基１３４０（例えば、核酸、例えば、構造化核酸粒子または官能基連結）によって、表面または固体支持体１３７０に固定された結合パートナー１３３０（例えば、ポリペプチド）に結合する。検出可能なプローブ１３１０によって生成される検出可能なシグナルの面積は、検出可能なプローブ１３１０を追加の検出分子１３２０と接続させることによって増加する。検出分子１３２０には、保持成分及び複数の標識成分（例えば、フルオロフォア）が含まれ得る。検出分子１３２０の保持成分は、結合成分に結合される必要はない。しかしながら、検出分子１３２０の保持成分は、検出可能なプローブ１３１０に存在するもの以外の結合成分に結合され得る。検出分子１３２０は、リンカー１３２５によって検出可能なプローブ１３１０に接続されている。リンカー１３２５は、永続的リンカー（例えば、ヘテロ二官能性リンカー、クリック反応生成物、ストレプトアビジン－ビオチン連結）であり得、または非永続的リンカー（例えば、ハイブリダイズした核酸）であり得る。リンカーは、柔軟性であり得、例えば、検出分子１３２０と検出可能なプローブ１３１０との間の直接的相互作用を可能とする；またはリンカーは、硬質であり得、例えば、検出分子１３２０が検出可能なプローブ１３１０と相互作用することを制約する。検出可能なプローブ１３１０及び検出分子１３２０によって形成される複合体は、結合パートナー１３３０への検出可能なプローブ１３１０の結合の前に形成され得、または検出可能なプローブの結合と、それに続く検出分子１３２０と検出可能なプローブ１３１０との接触によって形成され得る。

【０２６９】

結合パートナーと結合するように構成された検出可能なプローブは、ポリペプチドのサイズに対してより小さくまたはより大きくサイズ調整され得る。サイズは、体積、分子量、最長寸法、有効径、回転半径、流体力学的半径、突出（例えば、フットプリント）等として測定され得る。代替的には、部位（例えば、ポリペプチドのアレイにおける部位）で結合パートナーと結合するように構成された検出可能なプローブは、部位のサイズに対してより小さくまたはより大きくサイズ調整され得る。検出可能なプローブまたは検出可能なプローブを含む複合体は、結合パートナーまたは部位のサイズと比較して少なくとも約

１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１７５％、２００％、２５０％、３００％、４００％、５００％、６００％、７００％、８００％、９００％、１０００％、またはそれを超えるようにサイズ調整され得る。代替的または付加的に、検出可能なプローブまたは検出可能なプローブを含む複合体は、結合パートナーまたは部位のサイズと比較して多くとも約１０００％、９００％、８００％、７００％、６００％、５００％、４００％、３００％、２５０％、２００％、１７５％、１５０％、１４０％、１３０％、１２０％、１１０％、１００％、９５％、９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、１％、またはそれ未満となるようにサイズ調整され得る。

【０２７０】

検出可能なプローブの標識成分は、検出可能なプローブ上の複数のタイプまたは種の標識成分の包含によって多重検出のために構成され得る。複数の結合成分を検出可能なプローブに結合させる能力は、多重化のための検出可能なプローブの動的柔軟性を増大させる。検出可能なプローブは、検出可能なプローブのための独自のフィンガープリントまたはシグネチャーを構成する標識成分の独自の組み合わせを有し得る。結合プールは、観察される特異的結合相互作用がシグネチャーまたはフィンガープリントの観察を介して決定され得るように、特定のプローブシグネチャーまたはフィンガープリントによって示される異なる結合特異性を有する検出可能なプローブの混合物から生成され得る。シグネチャーまたはフィンガープリントは、結合成分のタイプまたは種の数ならびに検出可能なプローブに結合した標識成分の比を変化させることによって生成され得る。検出可能なプローブには、少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれを超える異なる種の標識成分が含まれ得る。代替的または付加的に、多重化組成物のための検出可能なプローブには、多くとも約１０、９、８、７、６、５、４、３、またはそれ未満の異なる種の標識成分が含まれ得る。標識成分の第２の種に対する標識成分の第１の種の比は、少なくとも約１．５：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、またはそれを超え得る。代替的または付加的に、標識成分の第２の種に対する標識成分の第１の種の比は、多くとも約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１．１：１、またはそれ未満であり得る。

【０２７１】

多重化プローブ組成物には、異なる結合親和性を有する複数の検出可能なプローブが含まれ得、任意の所与の検出可能なプローブの結合親和性は、検出可能なプローブ上の標識成分の独自のフィンガープリントまたはシグネチャーによって決定され得る。多重化プローブ組成物における検出可能なプローブの独自のタイプの数は、プローブシグネチャーまたはフィンガープリントにおける相違を区別するために検出システムの結合相互作用及び感度を観察するために使用される検出システムのタイプによって決定され得る。蛍光標識のため、蛍光検出システムは、検出可能なプローブ上のフルオロフォアの蛍光波長に基づいて制限された数の検出チャネルを有し得る。各検出チャネル内の検出範囲はまた、検出可能なプローブに付加される各フルオロフォアの量を制約し得る。

【０２７２】

多重化プローブ組成物には、少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、またはそれを超える独自のタイプの検出可能なプローブが含まれ得る。代替的または付加的に、多重化プローブ組成物には、多くとも約５０、４９、４８、４７、４６、４５、４４、４３、４２、４１、４０、３９、３８、３７、３６、３５、３４、３３、３２、３１、３０、２９、２８、２７、２６、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、または

それ未満の独自のタイプの検出可能なプローブが含まれ得る。独自性は、検出可能なプローブに存在する成分の数または多様性、例えば、プローブに存在する結合成分の数または多様性、プローブに存在する標識成分の数または多様性、プローブに存在する保持成分の数または多様性及び／またはプローブに存在するタグまたはバーコードの数または多様性で明らかであり得る。

【０２７３】

検出可能なプローブは、フェルスター共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）によって検出されるように構成され得る。いくつかの構成では、検出可能なプローブは、ＦＲＥＴメカニズムによって検出されるように構成された結合したフルオロフォア対を含有し得る。理論に縛られることを望むものではなく、効率的なＦＲＥＴ検出は、エネルギーがフルオロフォア間で効率的に移動することを可能とするのに十分な距離内で配置された吸収体フルオロフォア及び放射体フルオロフォアを利用し得る。いくつかの構成では、ＦＲＥＴは、所与の励起源を使用して互いに区別され得るプローブの数を増加させるという利点を提供し得る。例えば、第１のプローブには、励起源によって励起された場合に第１の波長で放射するフルオロフォア成分Ｄが含まれ得る。第２のプローブには、フルオロフォア成分Ｄ及びフルオロフォア成分Ａが含まれ得、励起源によるフルオロフォア成分Ｄの励起は、フルオロフォア成分Ａへのエネルギー移動を引き起こし、それはひいては第２の波長で放射する。２つの放射波長は、２つのプローブを互いに区別するために標準的な光学を使用して分解され得る。

【０２７４】

図１４Ａ～１４Ｂは、ＦＲＥＴメカニズムによって検出され得る検出可能なプローブのための様々な構成を示している。図１４Ａは、ドナーフルオロフォア及びアクセプターフルオロフォアを重要な対合距離Δｓ$_{FRET}$で配置するために核酸のらせん形構造を利用してＦＲＥＴフルオロフォア対を生成するための構成を示している。保持成分には、連続核酸鎖１４１０が含まれ得る。オリゴヌクレオチド１４２０は、連続核酸鎖１４１０にハイブリダイズされ得、二本鎖核酸及び一本鎖核酸１４２５の領域を生成する。オリゴヌクレオチドには、ＦＲＥＴフルオロフォア対をΔｓ$_{FRET}$の適切な間隔で生成するために交互パターンのドナーフルオロフォア１４３０またはアクセプターフルオロフォア１４３２が含まれ得る。図１４Ｂは、検出可能なプローブにハイブリダイズするように構成された結合分子を利用してＦＲＥＴフルオロフォア対を生成する代替的方法を示している。検出可能なプローブ１４４０には、結合分子１４４５と結合するように構成された検出可能なプローブ１４４０の一部に沿って複数のドナーフルオロフォア１４３０が含まれ得る。結合分子１４４５には、検出可能なプローブ１４４０と結合する結合分子１４４５の端に沿って整列された複数のアクセプターフルオロフォア１４３２が含まれる。検出可能なプローブ１４４０を結合分子１４４５と接触させることは、結合領域１４５０の形成を引き起こし得、ドナーフルオロフォア１４３０及びアクセプターフルオロフォア１４３２を整列させて、Δｓ$_{FRET}$の適切なＦＲＥＴ間隔内のＦＲＥＴフルオロフォア対を形成する。いくつかの構成では、結合分子１４４５は、結合パートナーまたは結合パートナーが配置される位置にカップリングされ得、それにより、検出可能なプローブ１４４０が結合パートナーに結合し、次いで結合分子１４４５が検出可能なプローブ１４４０を結合させた場合にＦＲＥＴ相互作用が生じることが可能となる。いくつかの構成では、結合分子１４４５は、検出可能なプローブ１４４０に結合した１つ以上の結合成分に対する結合パートナーに結合したＳＮＡＰまたは他の物質であり得る。したがって、結合パートナーへのプローブの結合は、ドナーフルオロフォア１４３０とアクセプターフルオロフォア１４３２との間の観察に基づいて決定され得る。

【０２７５】

検出可能なプローブ組成物には、ドナー及びアクセプタールミノフォアのカップリングされた対が含まれ得る。許容可能なドナー／アクセプター対には、Ｃｙ２／Ｃｙ３、Ｃｙ３／Ｃｙ５、ＦＩＴＣ／ＴＲＩＴＣ、ＰＥ／ＡＰＣ、Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８／Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５１４、Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録

商標）４８８／Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５３２、Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８／Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５４６、Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８／Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６１０、Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７／Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６８０、Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７／Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）７００、Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７／Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）７５０、Ｃｙａｎ　ＦＰ／ＹＦＰ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ　ＦＰ／ＹＦＰ、ＧＦＰ／ＹＦＰ、ＧＦＰ／ｍＲＦＰ、またはそれらの組み合わせが含まれ得る。

【０２７６】

ＦＲＥＴ色素対は、構造化核酸粒子の一部を形成するオリゴヌクレオチドまたは骨格鎖等の核酸にカップリングされ得る。ＦＲＥＴ色素対を含有する核酸は、色素がＦＲＥＴ相互作用を生じさせるのに十分に間隔が空けられて結合した修飾されたヌクレオチドを有し得る。適切な間隔は、オリゴヌクレオチドが骨格鎖にハイブリダイズする場合に自然に生じるらせん形構造によって決定され得る。ＦＲＥＴ対における２つの隣接する色素は、少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、またはそれを超えるヌクレオチド離して間隔が空けられ得る。代替的または付加的に、ＦＲＥＴ対における２つの隣接する色素は、多くとも約２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、またはそれ未満のヌクレオチド離して間隔が空けられ得る。

【０２７７】

検出可能なプローブを伴う結合相互作用は、フルオロフォア以外の標識成分を使用して観察され得る。検出可能なプローブには、バーコード標識成分（例えば、核酸バーコード）が含まれ得る。バーコード標識成分には、復号された場合に検出可能なプローブ種を同定する情報を提供する独自の配列（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、アミノ酸）が含まれ得る。例えば、複数の同一の検出可能なプローブはそれぞれ、同じ種のバーコード（すなわち、同じ配列を有するバーコード）で標識され得、それによりその特定の検出可能なプローブについての結合相互作用の均一かつ単一のシグナルを提供する。バーコードシグナルは、次世代シーケンシング等の方法によって検出及び復号されて、検出可能なプローブと結合パートナー、エピトープ、または標的部位との間の相互作用の観察が得られ得る。

【０２７８】

図１５Ａ～１５Ｄは、検出可能なプローブと結合パートナー、エピトープ、または標的部位との間の結合相互作用を記録するために核酸バーコードを利用するためのシステムを示している。図１５Ａは、リンカー１５２０によって検出可能なプローブ１５１０に接続された核酸バーコード配列を含む検出可能なプローブ１５１０を含有するシステムを示している。核酸バーコード配列には、２つのプライミング配列１５２２及び２つのプライミング配列１５２２間の同定配列１５２５が含まれる。検出可能なプローブ１５１０は、固体支持体１５７０に任意に結合された結合パートナー、エピトープ、または標的部位１５３０に結合する。結合パートナー、エピトープ、または標的部位１５３０は、アンカー基１５４０（例えば、ＳＮＡＰまたは化学的リンカー）によって固体支持体１５７０に結合され得る。結合パートナー、エピトープ、または標的部位１５３０は、会合したリンカー１５５０（例えば、固体支持体１５７０、アンカー基１５４０、または結合パートナー、エピトープ、または標的部位１５３０に結合されている）を有し得る。会合したリンカー１５５０は、検出可能なプローブ１５１０の核酸バーコードのプライミング配列１５２２とハイブリダイズした結合を形成する相補的プライミング配列１５５２で終結され得る。検出可能なプローブ１５１０及び結合パートナー、エピトープ、または標的部位１５３０によって形成される複合体は、核酸を結合させるように構成されたポリメラーゼ酵素１５６０と接触させられる。図１５Ｂは、伸長反応を開始させるためにプライミング配列１５２２及び相補的プライミング配列１５５２を接続することによって形成されたハイブリダイズした核酸配列へのポリメラーゼ１５６０の結合を示している。図１５Ｃは、伸長反応の最終工程を示している。同定配列１５２５及びプライミング配列１５２２は、相補的同

定配列１５５５及び追加の相補的プライミング配列１５５２を付加するために、会合したリンカー１５５０の末端配列への伸長によって付加されている。図１５Ｄは、複数のサイクルの検出可能なプローブ１５１０の結合及びプライマー伸長の後の結合パートナー、エピトープ、または標的部位１５３０を示している。各プローブは、独自の同定配列（例えば、１５５５、１５５６、１５５７）をリンカー１５５０の末端における配列に付加する。各同定配列（１５５５、１５５６、１５５７）の末端での相補的プライミング配列１５５２の付加は、後の検出可能なプローブへのリンカー１５５０の結合を可能とする。検出可能なプローブ１５１０は、任意の複数の標識成分と共に示されている（６つの指定された星として示されている）。検出可能なプローブは、例えば、同定配列が復号されて標的部位１５３０についての結合履歴を決定する構成において、標識を含む必要はないことが理解される。したがって、親和性試薬は、図１５Ａ～１５Ｄに例示されているように構成または使用され得る。

【０２７９】

例えば、ポリペプチドを検出、シーケンシングまたは定量するためのアッセイにおいて、本開示の親和性試薬に結合され得るタグの他の例ならびにタグを使用及び検出するための方法は、米国特許出願公開番号２０２０／０３４８３０８Ａ１、２０２０／０３４８３０７Ａ１、または２０１９／０１４５９８２Ａ１（これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）に示されている。

【０２８０】

検出可能なプローブ及び親和性試薬を製造する方法

本開示に記載される検出可能なプローブまたは親和性試薬は、好適な方法によって製造され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の製造には、以下の工程の１つ以上が含まれ得る：１）複数の結合成分及び／または複数の標識成分を結合させるように構成された保持成分を生成すること；２）１つ以上の結合成分を保持成分に結合させること；３）１つ以上の標識成分を保持成分に結合させること；及び４）追加の成分を保持成分に結合させること。

【０２８１】

保持成分は、製造プロセスを介して得られ得る。非核酸保持成分（例えば、ポリマー、金属、セラミック、炭素、または半導体ナノ粒子）は、バルク製造及び／または精製プロセスを介して製造され得る。非核酸保持成分の生成後、１つ以上の表面官能性を保持成分に加えるために１つ以上の処理工程が行われ得る。官能性は、保持成分の溶媒溶解特性を改善するまたは結合成分及び／または標識成分のための結合部位を提供する目的のために加えられ得る。表面官能性には、結合成分及び／または標識成分を結合させるように構成された官能基（例えば、クリック反応を受けるように構成された官能基）、または結合した結合成分及び／または標識成分を含有する相補的核酸とハイブリダイズするように構成された核酸が含まれ得る。例えば、ケイ素または二酸化ケイ素ナノ粒子を含む保持成分は、複数の官能性を粒子のケイ素含有表面に共有結合的に加えるためにシラン化化合物で官能化され得る。非核酸保持成分の官能化の後、任意の好適な技術、例えば、クリック反応または核酸ハイブリダイゼーションによって親和性基が保持成分に接続され得る。

【０２８２】

核酸保持成分（例えば、核酸折り紙、核酸ナノボール）の製造は、従来の技術によって形成され得る。核酸ナノボールは、複数の結合成分及び／または標識成分を結合させるようにさらに修飾され得る骨格鎖を生成するために回転環状増幅等の方法によって製造され得る。核酸ナノボールを作製するための例示的な方法は、例えば、米国特許番号８，４４５，１９４（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。核酸折り紙を含む核酸保持成分は、例えば、Ｒｏｔｈｅｍｕｎｄ，Ｎａｔｕｒｅ　４４０：２９７－３０２（２００６）ならびに米国特許番号８，５０１，９２３及び９，３４０，４１６（これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載の技術を使用して製造され得る。

【０２８３】

図２１Ａは、核酸保持成分を有する検出可能なプローブを形成するための第１の経路を

示している。保持成分が構築される前に、結合した結合成分２１２０を有するオリゴヌクレオチド及び結合した標識成分２１３０を有するオリゴヌクレオチドが調製される。結合した結合成分２１２０を有するオリゴヌクレオチド及び結合した標識成分２１３０を有するオリゴヌクレオチドは、一本鎖骨格２１１０（例えば、Ｍ１３ファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ）及び追加の構造的核酸２１４０と接触させられる。核酸は、上昇した温度（例えば、少なくとも約５０°Ｃ、６０°Ｃ、７０°Ｃ、８０°Ｃ、または９０°Ｃ）で好適なＤＮＡ緩衝液中で接触させられ、次いで冷却される。オリゴヌクレオチドは、適切な配列依存的位置で骨格鎖２１１０にハイブリダイズして検出可能なプローブ２１５０を形成する。

【０２８４】

図２１Ｂは、核酸保持成分を有する検出可能なプローブを形成するための代替的経路を示している。保持成分が構築される前に、結合成分２１２５を結合させるように構成されたハンドルを有するオリゴヌクレオチド及び標識成分２１３５を結合させるように構成されたハンドルを有するオリゴヌクレオチドが調製される。結合成分２１２５を結合させるように構成されたハンドルを有するオリゴヌクレオチド及び標識成分２１３５を結合させるように構成されたハンドルを有するオリゴヌクレオチドは、一本鎖骨格２１１０（例えば、Ｍ１３ファージＤＮＡ、またはプラスミドＤＮＡ）及び追加の構造的核酸２１４０と接触させられる。核酸は、上昇した温度（例えば、少なくとも約５０°Ｃ、６０°Ｃ、７０°Ｃ、８０°Ｃ、または９０°Ｃ）で好適な緩衝液中で接触させられ、次いで冷却される。冷却後、複数の結合成分及び／または標識成分を結合させるように構成された保持成分２１５５が形成される。保持成分２１５５は、好適な結合緩衝液中で保持成分２１５５上のハンドルと相補的なハンドルを有する複数の結合成分２１２８及び／または標識成分２１３８と接触させられる。複数の結合成分２１２８及び／または複数の標識成分２１３８の結合後、検出可能なプローブ２１５０が形成される。

【０２８５】

いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、別の分子または基と結合を形成するように構成された官能基の反応、例えば、生体直交反応またはクリック化学（例えば、米国特許番号６，７３７，２３６及び７，４２７，６７８（その全体が参照により本明細書にそれぞれ組み込まれる）を参照されたい）；銅触媒を使用するアジドアルキンフーズゲン環化付加反応（例えば、米国特許番号７，３７５，２３４及び７，７６３，７３６（その全体が参照により本明細書にそれぞれ組み込まれる）を参照されたい）；アルデヒド部位に連結させ得る歪んだアルキンまたはトリアジン－ヒドラジン部位を使用する銅フリーフーズゲン反応（「金属フリークリック」）（例えば、米国特許番号７，２５９，２５８（参照により組み込まれる）を参照されたい）；アミン部位に連結させ得る塩化トリアジン部位；ＥＤＣ等のカップリング試薬を使用してアミン部位に連結させ得るカルボン酸部位；チオール部位に連結させ得るチオール部位；ディールス・アルダー反応を介してカップリングされたジアルケン部位に連結させ得るアルケン部位；及びチオホスフェート部位に連結させ得る臭化アセチル部位（例えば、ＷＯ２００５／０６５８１４（参照による組み込まれる）を参照されたい）による結合成分及び／または標識成分の結合によって形成され得る。官能基は、クリック反応（例えば、金属触媒アジド－アルキン環化付加、歪み促進型アジド－アルキン環化付加、歪み促進型アジド－ニトロン環化付加、歪みアルケン反応、チオール－エン反応、ディールス・アルダー反応、逆電子要請型ディールス・アルダー反応、［３＋２］環化付加、［４＋１］環化付加、求核置換、ジヒドロキシル化、チオール－イン反応、フォトクリック、ニトロン双極子環化付加、ノルボルネン環化付加、オキサノボルナジエン環化付加、テトラジンライゲーション、テトラゾールフォトクリック反応）を介して反応するように構成され得る。例示的なシラン誘導体クリック反応物には、アルケン、アルキン、アジド、エポキシド、アミン、チオール、ニトロン、イソニトリル、イソシアニド、アジリジン、活性化エステル、及びテトラジン（例えば、ジベンゾシクロオクチン－アジド、メチルテトラジン－トランスシクロオクチレン、エポキシド－チオール等）が含まれ得る。クリック反応は、穏やかな条件（例えば、室温

、水性溶媒）下で結合を急速に形成する有利な方法を提供し得る。

【０２８６】

いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬の保持成分または他の成分には、異なる種の官能基が含まれ得る。異なる官能基の使用は、検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合される異なる成分の数及び位置にわたってあるレベルの制御を提供し得る。特定の構成では、異なる官能基は直交反応性を実証し、これにより第１の成分は、プローブ上の第１の官能基に対して反応性であるが、プローブ上の第２の官能基とは実質的に反応性ではない部位を有し、第２の成分は、第２の官能基に対して反応性であるが、第１の官能基に対して反応性ではない部位を有する。したがって、異なる結合成分の数及びそれらの位置は、検出可能なプローブまたは親和性試薬上の直交官能基の適切な使用によって調節され得、または異なる標識成分の数及びそれらの位置は、検出可能なプローブまたは親和性試薬上の直交官能基の適切な使用によって調節され得る。その上、結合成分は、検出可能なプローブまたは親和性試薬上の直交官能基それぞれの適切な使用によって検出可能なプローブまたは親和性試薬上で標識成分とは異なるように配置され得る。

【０２８７】

非核酸を含む保持成分は、適切な方法によって形成され得る。プローブ構築中に結合成分、標識成分、または他の成分を保持成分に結合させる際にある程度の空間的制御を可能とする方法が特に対象となる。空間的制御には、プローブ成分を分離または隔離する能力、またはプローブ成分の配向を変化させる能力が含まれ得る。例えば、空間的制御には、結合成分及び／または標識成分を、隣接するまたは近接する結合成分及び／または標識成分から分離することが含まれ得る。別の例では、空間的制御には、結合した結合成分の領域を結合した標識成分の領域から隔離することが含まれ得る。さらに別の例では、空間的制御には、結合成分及び／または標識成分の相対的分散または分布を制御すること、例えば、結合成分及び標識成分を保持成分の領域において１０：１の比で提供することが含まれ得る。

【０２８８】

図３２Ａ～３２Ｂは、非核酸保持成分を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬の構築中にプローブ成分位置を制御するためのスキームを示している。図３２Ａは、界面３２２０、例えば、多相境界（例えば、空気／液体界面、油／水界面）と会合するように構成された複数の粒子３２１０（例えば、ナノ粒子、ナノビーズ、ナノスフィア等）を示している。界面３２２０は、第１の流体媒体３２２２と第２の流体媒体３２２４との間に形成される。複数の粒子３２１０の各粒子の位置は、第１の液体媒体３２２２または第２の液体媒体３２２４への曝露に応じて異なる修飾化学に曝露される。第１の液体媒体３２２２に曝露された複数の粒子３２１０の各粒子の位置は、粒子の表面上に第１の複数の官能基３２３５を形成する。第２の液体媒体３２２４に曝露された複数の粒子３２１０の各粒子の位置は、粒子の表面上に第２の複数の官能基３２３０を形成する。第１の複数の官能基３２３５は、第１のタイプのプローブ成分（例えば、結合成分）のための結合部位を提供し得、第２の複数の官能基３２３０は、第２のタイプのプローブ成分（例えば、標識成分）のための結合部位を提供し得る。

【０２８９】

図３２Ｃ～３２Ｅは、非核酸保持成分を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬の構築中にプローブ成分位置を制御するためのスキームを示している。図３２Ｃは、媒体３２２６内に部分的に埋め込まれたまたは固定された複数の粒子３２１０（例えば、ナノ粒子、ナノビーズ、ナノスフィア等）を示している。コーティングまたは層３２４０（例えば、金属、金属酸化物、ポリマー、またはヒドロゲル）が、複数の粒子３２１０の各粒子の曝露された位置に適用される。図３２Ｄに示されているように、コーティングまたは層３２４０が複数の粒子３２１０に適用された後、媒体３２２６が除去され、それにより部分的コーティングまたは層３２４０を有する複数の粒子３２１０を提供し得る。図３２Ｅに示されているように、複数の粒子３２１０のコーディングされていない及びコーディングされた部分の異なる表面化学は、部分的コーティングまたは層３２４０を有する複数の粒

子３２１０を異なるように官能化するために使用され得る。コーティングまたは層３２４０は、第１のタイプのプローブ成分（例えば、結合成分）のための結合部位を提供し得る第１の複数の官能基３２３５を伴って提供され得る。各粒子のコーディングされていない部分は、第２のタイプのプローブ成分（例えば、結合成分）のための結合部位を提供し得る第２の複数の官能基３２３０を伴って提供され得る。

【０２９０】

非核酸保持成分上の結合成分及び／または標識成分の位置または配置はまた、非核酸保持成分の表面上の結合部位の空間的または表面密度を制御することによって制御され得る。図３３は、粒子またはナノ粒子保持基のための調製プロセスを示している。粒子またはナノ粒子３３１０は、粒子またはナノ粒子３３１０表面に結合される部位、例えば、結合成分結合部位３３２０、標識成分結合部位３３３０、または修飾基３３４０の混合物と組み合わされる。部位の混合物内の成分の比は、粒子またはナノ粒子３３１０表面の比例的修飾を確保するようにバランスが取られる。最終的結果は、部位の混合物における成分濃度に基づいて粒子またはナノ粒子３３１０表面にわたって各成分の均一なまたはほぼ均一な分布を有する保持成分である。代替的には、成分は、第１のタイプの結合部位及びブロック基からなる２成分混合物を最初に加えることによって順次に付加され得る。表面官能化の後、ブロック基は、他のタイプの結合部位を結合させるための表面部位を提供するために完全にまたは部分的に除去され得る。

【０２９１】

複数の親和性試薬、複数の検出可能なプローブ、または少なくとも１つの親和性試薬及び少なくとも１つの検出可能なプローブの組み合わせが、多重プローブ複合体を形成するためにコンジュゲートされ得る。同様に、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、１つ以上の他の試薬またはプローブへの試薬またはプローブの結合を可能とする１つ以上のカップリング基を伴って構成され得る。カップリング基は、共有結合性相互作用、非共有結合性相互作用、静電気性相互作用、磁性相互作用、または検出可能なプローブ親和性試薬またはその両方の間の会合を形成する任意の他の相互作用を形成するように構成され得る。多重プローブ複合体における２つ以上のプローブ間の会合は、弱い、一時的である、または可逆的である場合がある。多重プローブ複合体における２つ以上のプローブ間の会合は、強い、永続的である、または不可逆的である場合がある。いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、相補的核酸鎖またはストレプトアビジン－ビオチンカップリング基のハイブリダイゼーションによってカップリングされ得る。他の場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、例えば、クリック反応または架橋（例えば、化学的または光開始架橋）によって共有結合的にカップリングされ得る。

【０２９２】

多重プローブ複合体は、プローブ合成プロセスの一部として形成され得る。プローブまたは保持成分の形成は、プローブ成分、例えば、結合成分及び／または標識成分の位置、配向、及び結合を容易化し得る。図３７Ａ～３７Ｃは、非核酸保持成分上の結合成分の位置を調整するために複合体を利用するためプロセスを示している。図３７Ａは、第１の媒体３７２２と第２の媒体３７２４との間に形成された相境界３７２０との会合を形成する２つの粒子保持成分３７１０（例えば、ナノ粒子）を示している。保持成分３７１０は、粒子間の引力相互作用（例えば、静電気性または磁性引力、混和性表面官能性等）によって複合体を形成するように構成される。保持成分３７１０は、粒子３７１０上の結合部位に結合するように構成された第２の媒体３７２４内の複数の結合成分３７３０と接触させられる。図３７Ｂは、複数の結合成分３７３０が第２の媒体３７２４内の粒子表面に結合した後の複合体化した粒子３７１０を示している。結合成分３７３０は、第１の媒体３７２２の排除及び粒子間会合領域の近くの表面の排除により、粒子３７１０表面の所定の領域に制限されている。図３７Ｃは、粒子間の相互作用が破壊され、個々の検出可能なプローブ３７４０を放出する任意のプロセスを示している。他の構成では、粒子は、多重プローブ複合体として保持され得る。

【０２９３】

核酸ベースの保持成分（例えば、米国仮出願番号６３／１１２，６０７に示される骨格）は、標準的な核酸合成化学を介して合成され得、例えば、事前標識されたヌクレオチドの組み込みを介して、または後に付加される標識基のための結合部位を提供することによって、例えば、官能性側基、及び結合成分へのカップリングのための１つ以上の部位を提供することによって、特定の標識基を伴って提供され得る。同様に、ＰＥＧ骨格は、結合成分または標識成分のいずれか、またはその両方の結合を可能とする官能基を伴って合成及び官能化され得る。別の例では、プローブ成分または標識成分のいずれか、またはその両方の結合を可能とする基を含むポリペプチド骨格が合成され得る。いくつかの場合では、保持成分は、それが結合した標識よりも大幅に大きい場合がある。他の場合では、保持成分は、それが結合した標識成分と同様のサイズのものであり得る。他の場合では、標識成分は、それが結合した保持成分よりも大きい場合がある。

【０２９４】

いくつかの場合では、保持成分、例えば、核酸骨格は、結合成分上に直接的に合成され得る。例えば、保持成分の合成のために使用される試薬には、結合成分が含まれ得る。いくつかの場合では、保持成分、例えば、核酸骨格は、結合成分に結合されるリンカー分子上に直接的に合成され得る。例えば、保持成分の合成のために使用される試薬には、リンカーが含まれ得る。いくつかの実施形態では、保持成分は、組み込まれるヌクレオチドのいくつかまたはすべてが標識または標識成分を結合させるための官能性部位を有するヌクレオチドミックスを使用して鋳型媒介ポリメラーゼ伸長反応によって生成され得る。例えば、伸長中にポリメラーゼによって使用される３つのヌクレオチド種は、標識されていない場合があり（及び／または官能基を欠き得る）、４つ目のヌクレオチド種は、蛍光部位または他の標識部位で標識されている場合がある（または４つ目のヌクレオチドは、官能基を有し得る）。この例では、４つ目のヌクレオチドの相補的塩基が、鋳型において既定のパターンで生じ得る。例えば、４つ目のヌクレオチドの相補的塩基が、本明細書の他の箇所に示されるヌクレオチド間隔で生じ得る。

【０２９５】

図４９Ａに示されているように、核酸アプタマーとしてここで示される結合成分には、一方の末端、例えば、３’末端でプライマー配列が含まれ得る。次いで、例えば、上述したように、プライマー配列と相補的な配列セグメントを含む鋳型核酸は、結合成分のプライマーセグメントにハイブリダイズされ得る（図４９Ｂ、工程１を参照されたい）。例えば、上述したように、標識されていない及び標識されたヌクレオチドの存在下での結合成分上でのプライマー配列のポリメラーゼ媒介鋳型ベースの伸長は次いで、組み込まれた標識を有する保持成分の核酸（標識されたヌクレオチドを用いたポリメラーゼ反応の伸長産物（図４９Ｂ、工程２を参照されたい））を含む標識成分と共に、結合成分（例えば、アプタマー）を含む親和性プローブをもたらす。いくつかの場合では、鋳型には、所望の間隔でまたは所望の位置において特定のヌクレオチド種、例えば、グアノシンヌクレオチドが含まれ得るのに対し、伸長反応は、標識されていないアデノシン、チミジン及びグアノシントリホスフェート、及び標識されたシトシントリホスフェートの存在下で行われる。これは、伸長産物骨格への標識されたシトシンヌクレオチドの周期的組み込みをもたらす。例えば、鋳型における３、４、５番目等の位置毎にグアノシンヌクレオチドを有する鋳型を含めることにより、保持成分の３、４、５番目等の位置毎に標識されたシトシンの組み込みが可能となり得る。理解されるように、特定の標識されたヌクレオチドまたは組み込まれた標識の周期性は、分析の特定の必要性に応じて選択され得る。いくつかの場合では、この合成の後、鋳型核酸は、所定の位置に留まって、例えば、本明細書の他の箇所に示される親和性プローブの二本鎖標識部分を提供し得る。

【０２９６】

いくつかの場合では、骨格のための鋳型には、環状核酸が含まれ得、その場合、プライマー配列の伸長は、例えば、回転環状増幅を介して、二重配列セグメントを有する伸長コンカテマーを生成する。任意の形式では、結合成分にカップリングされた鋳型配列が提供され得る。上述した標識基を含む第２の会合した鎖を生成するために、プライマーは、鋳

型にハイブリダイズされ、標識された及び標識されていないヌクレオチドの存在下での重合によって伸長され得る。

【０２９７】

いくつかの場合では、親和性試薬または検出可能なプローブは、最終産物標識プローブのより標的化された調整を可能とするモジュール形式を使用して構築され得る。例えば、いくつかの場合では、結合成分、例えば、アプタマーまたは抗体は、標識されていないライブラリとして生成及び維持され得る。そのような場合では、これらの結合成分は、所与の実験のための所望の標識プロトコルに従って、標識成分を結合成分にカップリングさせるための結合領域を伴って維持され得る。そのような結合領域には、化学的カップリング部位、例えば、ＮＨＳエステル、「クリック」化学成分（例えば、Ｈ．Ｃ．Ｋｏｌｂ；Ｍ．Ｇ．Ｆｉｎｎ；Ｋ．Ｂ．Ｓｈａｒｐｌｅｓｓ（２００１），“Ｃｌｉｃｋ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：Ｄｉｖｅｒｓｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｆｒｏｍ ａ Ｆｅｗ Ｇｏｏｄ Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ”Ａｎｇｅｗａｎｄｔｅ Ｃｈｅｍｉｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｅｄｉｔｉｏｎ．４０（１１）：２００４－２０２１を参照されたい）、及び標識成分が任意の必要な相補的カップリング部位を含む他の慣用の化学的カップリングアプローチが含まれ得る。このモジュール方式の利点は、多様な異なる検出可能なプローブまたは親和性試薬が、同じまたは同様の保持成分を使用して容易に形成され得ることである。したがって、複数の異なる検出可能なプローブまたは親和性試薬は、共通の構造的特徴を共有する保持成分を有しながら、標識成分の数、標識成分の多様性、結合成分の数、及び結合成分の多様性の１つ以上に関して異なり得る。共通の構造的特徴は、例えば、保持成分のサイズ、保持成分の形状、保持成分の化学的組成、保持成分の核酸配列、保持成分における折り紙の三次元構造、保持成分における折り紙における骨格の三次元構造等であり得る。いくつかの構成では、複数の異なる検出可能なプローブは、折り紙構造においてアニーリングされたステープルオリゴヌクレオチドの数、１つ以上のステープルオリゴヌクレオチドが折り紙構造における骨格鎖にアニーリングされる位置、折り紙構造における骨格鎖にアニーリングされた１つ以上のステープルオリゴヌクレオチドの長さ、折り紙構造における骨格鎖にアニーリングされた１つ以上のステープルオリゴヌクレオチドの配列、または折り紙構造における官能基の数、タイプまたは位置に関して異なり得る。

【０２９８】

いくつかの場合では、結合成分には、結合またはカップリング対の１つのメンバー（例えば、受容体）が含まれ得るのに対し、標識成分には、結合またはカップリング対の相補的メンバー（例えば、受容体に対するリガンド）が含まれる。例えば、いくつかの場合では、結合成分は、一本鎖核酸配列にカップリングされ得るのに対し、標識成分は、その一本鎖と相補的な配列を有する第２の鎖にカップリングされ得る。そのような場合では、カップリングは、結合成分に結合した核酸鎖への標識に結合した核酸鎖のハイブリダイゼーションを介して行われ得る。理解されるように、アプタマー結合成分の場合、アプタマー及び標識カップリング成分の生成は、例えば、一本鎖プローブ及び標識カップリング成分のＰＣＲ増幅と、それに続く標識成分のハイブリダイゼーションの前の相補鎖の除去を使用して生成され得る。

【０２９９】

上記文脈のいずれかにおいて、標識成分及び保持成分は、結合した標識基を伴って、または標識成分がその後、結合成分へのカップリングの前または後に結合され得る官能化保持成分として、結合成分とは別々に合成され得る。核酸ベースの保持成分の場合、そのような構造は通常、既知のヌクレオチドがポリヌクレオチド構造を構築するために連続して付加されるよく知られている固相核酸合成技術を介して、または骨格配列のポリメラーゼ連鎖反応増幅を介して合成され得る。記述したように、そのようなプロセスは、所望の形態で多重標識されたプローブを構築するために、合成中に標識されたヌクレオチドの周期的導入を用い得る。代替的には、合成後に標識成分の容易な付加を可能とする修飾されたヌクレオチドが合成中に組み込まれ得る。

【０３００】
別々に合成された保持成分の別の成分（例えば、結合成分、標識成分または別の保持成分）への共有結合は、化学的または生化学的アプローチを介して、例えば、既知の化学的カップリング技術、例えば、クリック化学を使用する結合成分への核酸骨格の化学的カップリングを介して、または生化学的方法、例えば、結合成分の核酸成分への核酸骨格のライゲーションを介して達成され得る。代替的には、保持成分は、結合成分にすでにカップリングされた相補的核酸成分へのハイブリダイゼーションを介して結合成分に非共有結合的に結合され得る。そのような結合の例が図５１に概略的に示されている。示されるように、結合成分４００には、それに結合した核酸プローブ配列４００ｂが含まれる。プローブ配列４００ｂと相補的な配列を有する別々に合成された標識された核酸保持成分４０１は次いで、結合成分にハイブリダイズされて、標識された親和性プローブを提供する。

【０３０１】
多様な共有結合的または非共有結合的化学のいずれかは、本明細書で示される検出可能なプローブまたは親和性試薬の成分を結合させるためまたは接続するために使用され得る。保持成分を他の成分に結合させることとの関連で本明細書で示される化学及び方法はまた、検出可能なプローブまたは親和性試薬を他の物質、例えば、結合パートナー（例えば、ポリペプチド）、表面、固体支持体、アレイの部位、または粒子に結合させるために使用され得る。その上、その化学及び方法は、保持成分、結合成分または標識成分を合成するために、または官能基またはリンカーをそのような成分に付加するために使用され得る。

【０３０２】
ポリペプチドベースの結合成分、例えば、抗体または抗体断片を用いるいくつかの構成では、カップリングアプローチは、所与のポリペプチドへの単一のカップリング基の組み込みを介して、単一の結合成分への単一の標識成分のみのカップリングのために用いられ得る。特に、結合成分、例えば、抗体または抗体断片は、第１のカップリングハンドルまたは官能基を伴って提供され得るのに対し、別々の標識成分（または容易に標識され得る成分）は、第１のカップリング部位と反応または結合して結合成分と標識成分との間の結合を達成する第２のカップリングハンドルまたは官能基を伴って提供され得る。

【０３０３】
そのようなアプローチの１つの例は、標識するためのＳｐｙＴａｇ／ＳｐｙＣａｔｃｈｅｒアプローチ（例えば、Ｚａｋｅｒｉ Ｂ，Ｆｉｅｒｅｒ ＪＯ，Ｃｅｌｉｋ Ｅ，Ｃｈｉｔｔｏｃｋ ＥＣ，Ｓｃｈｗａｒｚ－Ｌｉｎｅｋ Ｕ，Ｍｏｙ ＶＴ，Ｈｏｗａｒｔｈ Ｍ（Ｍａｒｃｈ ２０１２）．“Ｐｅｐｔｉｄｅ ｔａｇ ｆｏｒｍｉｎｇ ａ ｒａｐｉｄ ｃｏｖａｌｅｎｔ ｂｏｎｄ ｔｏ ａ ｐｒｏｔｅｉｎ，ｔｈｒｏｕｇｈ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ａ ｂａｃｔｅｒｉａｌ ａｄｈｅｓｉｎ”．Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ．１０９（１２）：Ｅ６９０－７を参照されたい）である。このアプローチでは、１３アミノ酸タグポリペプチド（ＳｐｙＣａｔｃｈｅｒ）は、他のカップリングハンドルを形成する１２．３ｋＤａタンパク質（Ｓｐｙ Ｔａｇ）を伴って、第１のカップリングハンドルを形成する。例として、Ｓｐｙ Ｃａｔｃｈｅｒは、組換え融合タンパク質として第１の成分（例えば、結合成分または標識成分）に統合され得る。Ｓｐｙ Ｃａｔｃｈｅｒ成分は、イソペプチド結合を介してＳｐｙ Ｔａｇに不可逆的に結合し、これは検出のために蛍光的にまたは別の方法で標識され得る。理解されるように、そのＴａｇまたはＣａｔｃｈｅｒのいずれかは、第１の成分と統合され得る。

【０３０４】
いくつかの場合では、異なる成分が、クリック化学を使用して互いに結合され得る。核酸部位を有する成分の場合、これらは、ライゲーション及びまたはハイブリダイゼーションを使用して結合され得る。いくつかの場合では、リンカーは、結合のために使用される。リンカーの例には、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、または様々な分子量のポリエチレン

グリコールが含まれる。リンカーにはまた、バイオコンジュゲーションを可能とする官能基が含まれ得る。

【０３０５】

いくつかの場合では、結合は、化学的コンジュゲーション、バイオコンジュゲーション、酵素的コンジュゲーション、光コンジュゲーション、熱コンジュゲーション、またはそれらの組み合わせを用い得る（Ｓｐｉｃｅｒ，Ｃ．Ｄ．，Ｐａｓｈｕｃｋ，Ｅ．Ｔ．，＆Ｓｔｅｖｅｎｓ，Ｍ．Ｍ．，Ａｃｈｉｅｖｉｎｇ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌｅ－Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌ Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ．Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ．，２０１８，１１８，Ｐｇｓ．７７０２－７７４３、及びＧｒｅｇ Ｔ．Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，“Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ”，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；３ｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，２０１３（本開示のために参照により本明細書に組み込まれる））。例えば、バイオコンジュゲーションは、２つの分子（そのうちの少なくとも１つは生体分子である）間で共有結合を形成するために使用され得る。いくつかの場合では、互いに結合される検出可能なプローブまたは親和性試薬の２つの成分は、官能化され得る。両方のパートナーを官能化することは、結合（例えば、コンジュゲーション）反応の効率または速度を改善し得る。例えば、アプタマー、生物学的、または化学的実体の化学的に活性な部位のスルフヒドリル基（－ＳＨ）またはアミン（－NH_2）は、結合反応のより高い反応性または効率を可能とするために官能化され得る。多様なスルフヒドリル－反応性（またはチオール－反応性）またはアミンコンジュゲーション化学のいずれかが、化学的部位をスルフヒドリルまたはアミン基にカップリングさせるために使用され得る。例には、ハロアセチル、マレイミド、アジリジン、アクリロイル、アリール化剤、ビニルスルホン、ピリジルジスルフィド、ＴＮＢ－チオール及び／または他のスルフヒドリル－反応性／アミン－反応性／チオール－反応性剤の使用が含まれるがこれらに限定されない。これらの基の多くは、アルキル化（例えば、チオエーテルまたはアミン結合の形成による）またはジスルフィド交換（例えば、ジスルフィド結合の形成による）のいずれかを介してスルフヒドリル基に結合する。バイオコンジュゲーションのための反応に関するより多くのストラテジー及び詳細が以下に記載されており、他の適切な分子に拡張され得る。

【０３０６】

結合は、化学的部位またはリンカー分子と生体分子または他の物質上の化学的に活性な部位との化学的反応によって部分的に達成され得る。化学的コンジュゲーションは、アミド形成反応、還元的アミノ化反応、Ｎ末端修飾、チオールマイケル付加反応、ジスルフィド形成反応、銅（Ｉ）触媒アルキン－アジド環化付加（ＣｕＡＡＣ）反応、歪み促進型アルキン－アジド環化付加反応（ＳＰＡＡＣ）、歪み促進型アルキン－ニトロン環化付加（ＳＰＡＮＣ）、逆電子要請型ディールス・アルダー（ＩＥＤＤＡ）反応、オキシム／ヒドラゾン形成反応、フリーラジカル重合反応、またはそれらの組み合わせを介して進行し得る。酵素媒介コンジュゲーションは、トランスグルタミナーゼ、ペルオキシダーゼ、ソルターゼ、ＳｐｙＴａｇ－ＳｐｙＣａｔｃｈｅｒ、またはそれらの組み合わせを介して進行し得る。光コンジュゲーション及び活性化は、光アクリレート架橋反応、光チオール－エン反応、光チオール－イン反応、またはそれらの組み合わせを介して進行し得る。いくつかの場合では、結合またはコンジュゲーションは、非共有結合性相互作用を介して進行し得、これらは、自己構築ペプチド、結合配列、ホスト－ゲスト化学、核酸、またはそれらの組み合わせを介するものであり得る。

【０３０７】

いくつかの場合では、部位選択的方法が、検出可能なプローブ、親和性試薬またはその成分の反応部位を修飾して結合効率、使用の容易性、及び／または再現性を増加させるために用いられ得る。３つの一般的なストラテジーが部位選択的結合のために用いられ得る。（ｉ）包括的な官能基または部位を標的とするのではなく、多くのものの中で単一のモチーフを選択し得る修飾ストラテジー。これは、周囲配列、局所環境、または反応性のわずかな相違によって決定され得る。酵素がタンパク質配列内の特定のアミノ酸またはグリ

カンを単一の位置で修飾する能力が特に有名である。タンパク質Ｎ末端またはグリカンのアノマー位置の独自の反応性を標的とするもの等の精巧な化学選択性を示す反応もまた、このカテゴリに入る。（ｉｉ）天然生合成経路を乗っ取ることによる非天然官能性の部位特異的組み込みが利用され得る。（ｉｉｉ）化学的合成を介する独自の反応性の導入が利用され得る。ポリペプチド及びオリゴヌクレオチドの完全または部分的合成は、特に固相アプローチを使用して普及している。これらの技術により、正確な位置的制御で多様な官能化モノマーを導入する能力を用いて、最大で１００アミノ酸または２００ヌクレオチドの配列が利用可能となる。

【０３０８】

いくつかの場合では、化学的コンジュゲーション技術は、結合した種、例えば、生体物質－生体分子コンジュゲートを生成するために適用され得る。結合のために使用される官能基は、修飾される物質（例えば、修飾される生体分子）に対して天然であり得、または合成的に組み込まれ得る。以下の例示では、Ｒ及びＲ’は、生体分子（例えば、限定されないが、ＳＮＡＰ、タンパク質、核酸、例えば、核酸折り紙または核酸ナノボール、炭水化物、脂質、代謝産物、小分子、モノマー、オリゴマー、ポリマー）、親和性試薬、検出可能なプローブ、結合成分、標識成分、保持成分、及び／または固体支持体であり得る。

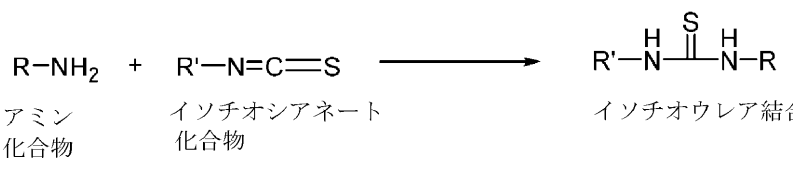
【０３０９】

いくつかの場合では、還元的アミノ化は、結合、例えば、バイオコンジュゲーションを介する結合のために利用され得る。アミンは、アルデヒドと可逆的に反応して、付随する水の脱離を伴って、一時的なイミン部位を形成し得る。この反応は、急速平衡で行われ、コンジュゲートされていない出発物質は、高濃度の水のため水性条件で強く優先される。しかしながら、第２の工程において、不安定なイミンは、シアノ水素化ホウ素ナトリウムでの処置を介して対応するアミンに不可逆的に還元され得る。このマイルドな還元試薬により、未反応アルデヒドの存在下であってもイミンの選択的還元が可能となる。結果として、第２の物質、例えば、対象となる生体物質への生体分子または他の物質の不可逆的コンジュゲーションが通常、徐々に生じ得る。対照的に、より強い還元剤、例えば、水素化ホウ素ナトリウムもまた、アルデヒドを還元することができる。この２工程還元的アミノ化プロセスはまた、ケトンの修飾のために利用され得る。そのため、例えば、還元的アミノ化は、過ヨウ素酸ナトリウム処置アルギネート及びキトサン骨格の修飾のために主に使用されている。反応性の順序はまた、開鎖形態で生成された末端アルデヒド／ケトンを利用することによって、還元糖の結合のために逆転され得る。このストラテジーは、例えば、マルトース及びラクトースのそれぞれの還元的アミノ化を介して、ＥＣＭにおける天然コラーゲンのグルコシル化及びガラクトシル化パターンを模倣するために利用され得る。

【０３１０】

いくつかの場合では、イソチオシアネートは、物質を互いに結合させるために使用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のイソチオシアネートは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。イソチオシアネート部位は、求核剤、例えば、アミン、スルフヒドリル、チロシン側鎖のフェノラートイオンまたは他の分子に反応して、２つの分子間で安定な結合を形成し得る。

【化１】

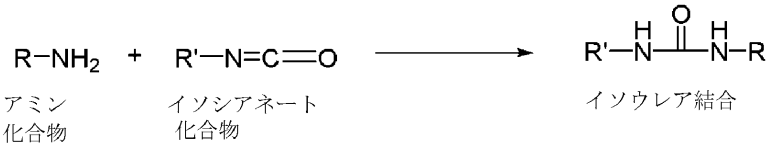


【０３１１】

いくつかの場合では、イソシアネートは、２つの物質の結合のために利用され得る。例

えば、生体分子または固体支持体のイソシアネートは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、イソシアネートは、アミン含有分子と反応して安定なイソウレア結合を形成し得る。

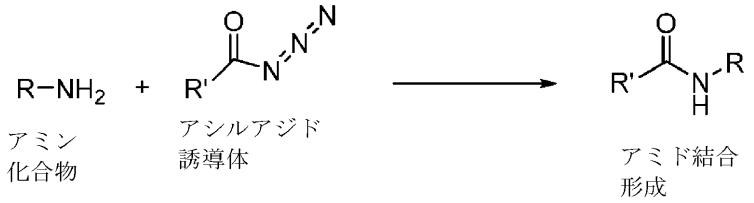
【化２】



【０３１２】

いくつかの場合では、アシルアジドは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のアシルアジドは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、アシルアジドは、第一級アミンと反応してアミド結合を形成し得る活性化カルボキシレート基である。

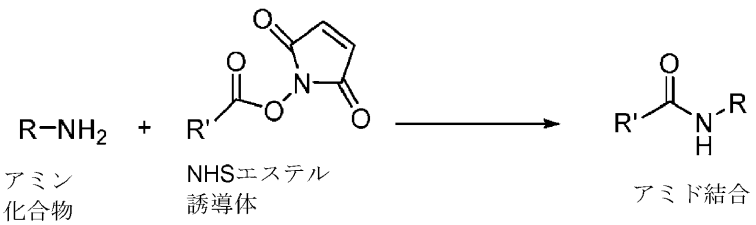
【化３】



【０３１３】

いくつかの場合では、アミドは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のアミドは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、反応性Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステルの使用は、特に普及している。ＮＨＳ－エステルは事前形成され得る一方で、しばしばそれらは、代わりにＮ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－Ｎ′－エチルカルボジイミド（ＥＤＣ）カップリング化学の使用を介してｉｎ　ｓｉｔｕで生成され、対象となる種に直接的にカップリングされる。活性化ＮＨＳ－エステルの形成は、弱酸性条件（ｐＨ約５）下で優先されるが、後のアミドカップリングは、アミンカップリングパートナーがプロトン化されないより高いｐＨで加速され得る。約６．５の中間ｐＨでの１工程修飾が可能である。結合は、典型的には、最初にｐＨ５で活性ＮＨＳ－エステルを形成してから、ｐＨを約８まで上昇させ、アミンカップリングパートナーを２工程手順で加えることによって行われる。いくつかの場合では、水溶性誘導体スルホ－ＮＨＳが代替手段として利用され得る。いくつかの場合では、生体分子または他の物質のＮＨＳエステルは、Ｎ末端α－アミン及びリジン側鎖ε－アミンとは対照的にチロシン、セリン、及びトレオニン－ＯＨ基と反応及びカップリングし得る。

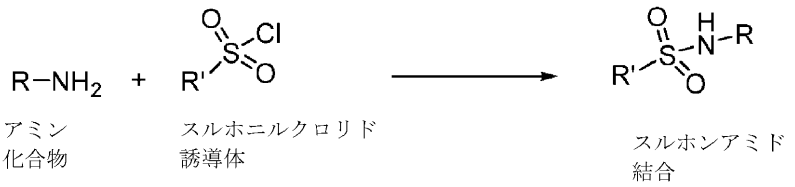
【化４】



【０３１４】

いくつかの場合では、スルホニルクロリドは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のスルホニルクロリドは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、スルホニルクロリド化合物と第一級アミン含有分子との反応は、塩素原子の喪失及びスルホンアミド結合の形成を進行させる。

【化５】



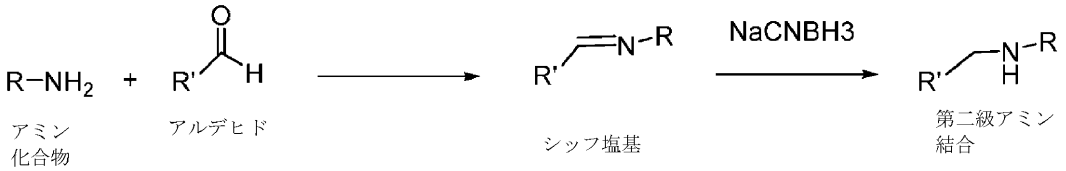
【０３１５】

いくつかの場合では、トシル酸エステルは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のトシル酸エステルは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、トシル酸エステルを含む官能基は、スルホニルエステル誘導体を生成するために４－トルエンスルホニルクロリド（トシル塩化物またはＴｓＣｌとも呼ばれる）とヒドロキシル基との反応から形成され得る。スルホニルエステルは、求核剤とカップリングして共有結合を生成し得、第一級アミンとの第二級アミン結合、スルフ－ヒドリル基とのチオエーテル結合、またはヒドロキシルとのエーテル結合をもたらし得る。

【０３１６】

いくつかの場合では、カルボニルは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のカルボニルは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、カルボニル基、例えば、アルデヒド、ケトン、及びグリオキサールは、アミンと反応してシッフ塩基中間体（それらの遊離形態と平衡である）を形成し得る。いくつかの場合では、水素化ホウ素ナトリウムまたはシアノ水素化ホウ素ナトリウムの、アルデヒド化合物及びアミン含有分子を含有する反応媒体への添加は、シッフ塩基中間体の還元及び共有結合形成をもたらし、２つの分子間の第二級アミン結合を生成する。

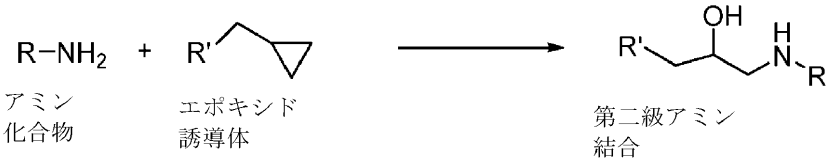
【化６】



【０３１７】

いくつかの場合では、エポキシドまたはオキシランは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のエポキシドまたはオキシランは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、エポキシドまたはオキシラン基は、開環プロセスにおいて求核剤と反応し得る。反応は、第一級アミン、スルフヒドリル、またはヒドロキシル基を用いて行われて、それぞれ第二級アミン、チオエーテル、またはエーテル結合を形成し得る。

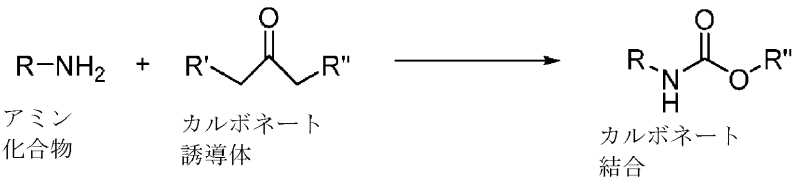
【化７】



【０３１８】

いくつかの場合では、カルボネートは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のカルボネートは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、カルボネートは、求核剤と反応してカルバメート結合を形成し得、ジスクシンイミジルカルボネートは、ヒドロキシル含有分子を活性化してアミン反応性スクシンイミジルカルボネート中間体を形成するために使用され得る。いくつかの場合では、このカルボネート活性化手順は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）をタンパク質及び他のアミン含有分子にカップリングさせる際に使用され得る。いくつかの場合では、求核剤、例えば、タンパク質の第一級アミノ基は、スクシンイミジルカルボネート官能基と反応して安定なカルバメート（脂肪族ウレタン）結合を形成し得る。

【化８】

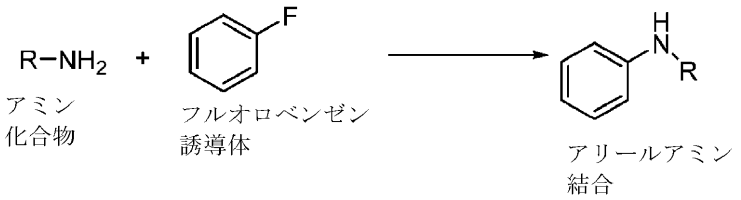


【０３１９】

いくつかの場合では、ハロゲン化アリールは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のハロゲン化アリールは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、ハロゲン化アリール化合物、例えば、フルオロベンゼン誘導体は、タンパク質のようなアミン含有分子との共有結合を形成するために使用され

得る。他の求核剤、例えば、チオール、イミダゾリル、及びフェノラート基も反応して、安定な結合を形成し得る。いくつかの場合では、フルオロベンゼン型化合物は、ホモ二官能性架橋剤において官能基として使用されている。例えば、それらのアミンとの反応は、アミン誘導体でのフッ素原子の求核置換を伴い、置換されたアリールアミン結合を生成する。

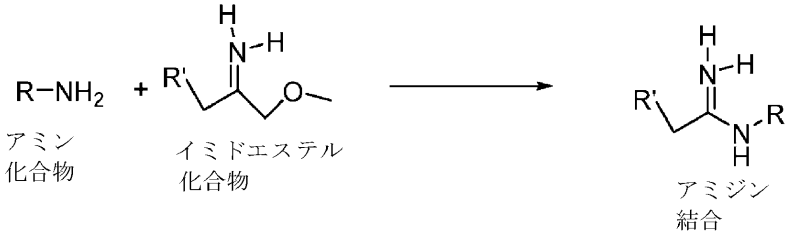
【化９】



【０３２０】

いくつかの場合では、イミドエステルは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のイミドエステルは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、タンパク質のα－アミン及びε－アミンが標的とされ、ホモ二官能性イミドエステルと反応させることによって架橋され得る。いくつかの場合では、２つのタンパク質を二官能性イミドエステル架橋剤とコンジュゲートさせた後、余剰のイミドエステル官能基は、エタノールアミンでブロックされ得る。

【化１０】



【０３２１】

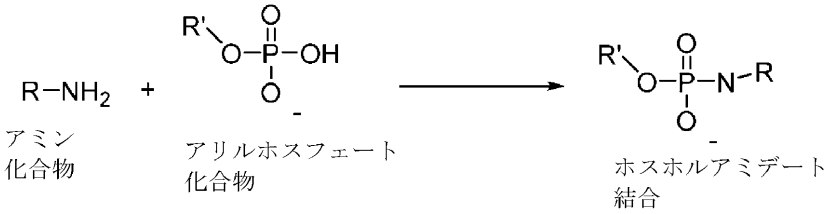
いくつかの場合では、カルボジイミドは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、カルボジイミドは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。通常、カルボジイミドは、カルボキシレート基とアミンとの間またはホスフェートとアミンとの間のそれぞれのアミドまたはホスホルアミデート結合の形成を媒介するために使用され得る長さゼロの架橋剤である。これらの結合の形成において追加の化学的構造はコンジュゲート分子間に導入されないので、カルボジイミドは長さゼロの試薬である。いくつかの場合では、Ｎ置換カルボジイミドは、カルボン酸と反応して非常に反応性のＯ－アシルイソウレア誘導体を形成し得る。次いでこの活性種は、求核剤、例えば、第一級アミンと反応してアミド結合を形成し得る。いくつかの場合では、スルフヒドリル基は、活性種を攻撃し、チオエステル結合を形成し得る。いくつかの場合では、ヒドラジド含有化合物もまた、カルボジイミド媒介反応を使用してカルボキシレート基にカップリングされ得る。二官能性ヒドラジド試薬を使用して、カルボキシレートは、他のカルボニル化合物とコンジュゲートすることができる末端ヒドラジド基を保有するように修飾され得る。

【０３２２】

いくつかの場合では、ホスフェートは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、リン酸基、例えば、オリゴヌクレオチドの５′ホスフェートまたはポリペプチドのリ

ン酸化されたアミノ酸を含有する生体分子はまた、カルボジイミド媒介反応を使用することによってアミン含有分子にコンジュゲートされ得る。例えば、生体分子のカルボジイミドは、ホスフェートを、そのカルボキシレートとの反応と同様に中間体ホスフェートエステルに活性化し得る。アミンの存在下で、そのエステルが反応して安定なホスホルアミデート結合を形成する。

【化１１】



【０３２３】

いくつかの場合では、酸無水物は、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体の酸無水物は、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。無水物は、求核剤に対して非常に反応性であり、タンパク質及び他の分子の多数の重要な官能基をアシル化することができる。例えば、無水物と反応することができるタンパク質官能基には、Ｎ末端におけるα－アミン、リジン側鎖のε－アミン、システインスルフヒドリル基、チロシン残基のフェノラートイオン、及びヒスチジンのイミド－アゾリル環が含まれるがこれらに限定されない。いくつかの場合では、タンパク質分子における無水物に対する反応性の部位は、任意の結合した炭水化物鎖の修飾である。いくつかの場合では、ポリペプチド鎖におけるアミノ基修飾に加えて、糖タンパク質は、それらの多糖ヒドロキシル基で修飾されてエステル化誘導体を形成し得る。

【０３２４】

いくつかの場合では、フルオロフェニルエステルは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のフルオロフェニルエステルは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。フルオロフェニルエステルは、アミンと反応し得る別のタイプのカルボン酸誘導体であり得、フルオロフェノール化合物のエステルからなり、これはタンパク質及び他の分子とアミド結合を形成することが可能な基を生成する。いくつかの場合では、フルオロフェニルエステルは、ペンタフルオロフェニル（ＰＦＰ）エステル、テトラフルオロフェニル（ＴＦＰ）エステル、またはスルホ－テトラフルオロ－フェニル（ＳＴＰ）エステルであり得る。いくつかの場合では、フルオロフェニルエステルは、わずかにアルカリ性のｐＨ値でアミン含有分子と反応して、ＮＨＳエステルと同じアミド結合連結を得る。

【０３２５】

いくつかの場合では、ヒドロキシメチルホスフィンは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のヒドロキシメチルホスフィンは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。ヒドロキシメチル基置換を有するホスフィン誘導体は、カップリングまたは架橋目的のための結合剤として作用し得る。例えば、トリス（ヒドロキシメチル）ホスフィン（ＴＨＰ）及びβ－［トリス（ヒドロキシメチル）ホス－フィノ］プロピオン酸（ＴＨＰＰ）は、自発的に求核剤、例えば、アミンと反応して共有結合を形成する小さな三官能性化合物である。

【０３２６】

いくつかの場合では、チオールは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のチオール反応性は、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、システインのチオール基は、２０種のタンパク質構成アミノ酸の中で見られる最も求核性の官能基である。ｐＨの注意深い制御により、他の求核性アミノ酸残

基、例えば、リジンを上回る選択的修飾が容易に達成され得る。別の例であるオリゴヌクレオチドのチオール修飾は、誘導体化を可能とするために使用され得るが、向上した化学的直交性を有する代替的官能基が導入され得る容易性は、生体物質－コンジュゲーションのための使用を制限している。さらに、マイケル付加としても知られている、α，β－不飽和カルボニルへのチオールのコンジュゲート付加は、組織操作、機能性物質、及びタンパク質修飾の分野でポリペプチドコンジュゲートを形成するために使用され得る。通常、反応速度及びコンジュゲーション効率は、３つの要素によって主に制御され、必要に応じて修飾され得る：（ｉ）チオールのｐＫａ；（ｉｉ）マイケルアクセプターの求電子性；（ｉｉｉ）触媒の選択。（ｉ）に関して、チオレートアニオンは、マイケル付加中の活性求核剤であり、チオールが脱プロトン化を受ける傾向は、チオレート濃度、及びよって、反応速度を決定し得る。例えば、芳香族チオールの、それらの脂肪族対応物と比較の場合のより低いｐＫａは、弱塩基を使用して触媒するより高い反応速度をもたらす。結果として、局所構造は、特にポリペプチド基質についてのコンジュゲーション効率を有意に変化させ得る。システイン含有ペプチドのｐＫａ及び反応性は、周囲のアミノ酸の合理的な選択を介して有意に変化し得、正に荷電したアミノ酸、例えば、リジン及びアルギニンの存在は、チオールｐＫａを低下させるように作用し、よって、反応性を向上させる。（ｉｉ）に関して、マイケルアクセプターは、求核攻撃に対してより活性化されるより電子不足となり、よって、反応速度が増加する。生体物質分野で最も広く利用されるアクセプター内で、反応性の傾向は、マレイミド＞ビニルスルホン＞アクリレート＞アクリルアミド＞メタクリレートとして一般化され得る。（ｉｉｉ）に関して、マイケル付加は、塩基性または求核触媒作用によって加速され得る（しかし、いずれも活性チオレートの濃度を増加させることによって作用する）。

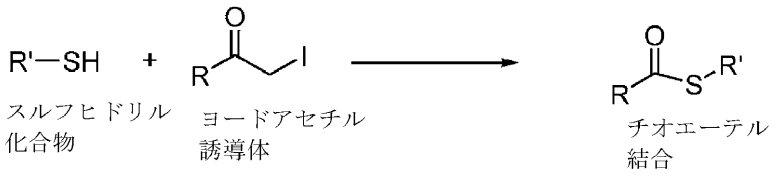
【０３２７】

いくつかの場合では、チオールの独自の求核性は、有効かつ選択的結合を達成することが可能となる、多数の代替的求電子剤との選択的反応のために利用され得る。例えば、１つのそのような基には、α－ハロカルボニルが含まれ、ヨードアセトアミドベースの試薬は、特定の実用性を見出す。より高いチオール選択性は、より低い求電子性のブロモ－及びさらにクロロ－誘導体を使用して達成され得るが、反応性も劇的に減少する。より最近では、メチルスルホニルヘテロ芳香族誘導体が、チオール特異的コンジュゲーションのための有望な試薬として出現した。他の場合では、代替的チオール－官能基、例えば、ジスルフィド－架橋ピリダジンジオン、カルボニルアクリル試薬、及びシクロプロペニルケトンがバイオコンジュゲーションのために利用され得る。

【０３２８】

いくつかの場合では、スルフヒドリルは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のスルフヒドリルは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。いくつかの場合では、３つの形態の活性化ハロゲン誘導体が、スルフヒドリル反応性化合物：ハロアセチル、ハロゲン化ベンジル、及びハロゲン化アルキルを生成するために使用され得る。これらの化合物の各々において、ハロゲン基は、求核物質を攻撃して、ＨＸ（Ｘはハロゲンであり、水素は求核剤に由来する）の喪失を伴ってアルキル化誘導体を形成することによって容易に転移され得る。ハロアセチル化合物及びハロゲン化ベンジルは典型的には、ヨウ素または臭素誘導体である一方で、ハロ－マスタードは主に、塩素及び臭素形態を採用する。ヨードアセチル基はまた、親和性リガンドをクロマトグラフィー支持体にカップリングさせるために成功裏に使用されてきた。

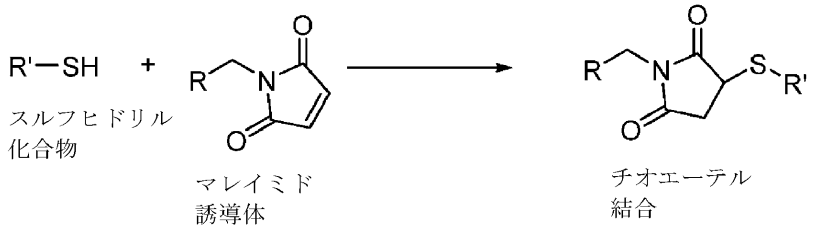
【化１２】



【０３２９】

いくつかの場合では、マレイミドは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のマレイミドは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。マレイミドの二重結合は、スルフヒドリル基とのアルキル化反応を受けて安定なチオエーテル結合を形成し得る。

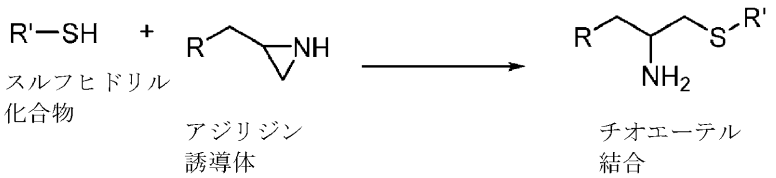
【化１３】



【０３３０】

いくつかの場合では、アジリジンは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のアジリジンは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。この複素環式環の高いヒンダード特質は、それに求核剤に対する強い反応性を与える。例えば、スルフヒドリルは、開環プロセスにおいてアジリジン含有試薬と反応し、チオエーテル結合を形成し得る。最も単純なアジリジン化合物であるエチレンイミンは、利用可能なスルフヒドリル基をアミンに変換するために使用され得る。いくつかの場合では、置換アジリジンは、ホモ二官能性及び三官能性架橋剤を形成するために使用され得る。

【化１４】



【０３３１】

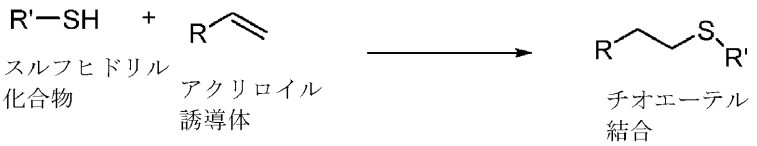
いくつかの場合では、チオール－マレイミド反応は、低濃度でまたは生体分子基質の値により極端に高い効率を必要とする場合に、コンジュゲーションを受けるために特に有用である。結合のためのマレイミドの使用は、二官能性試薬スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（一般的にその略語ＳＭＣＣで称される）でのアミンの就職を介して、広範囲の物質に導入され得る容易性によってさらに向上する。例えば、この試薬は、最初に選択された生体物質上にマレイミド官能基を導

入し、次いでペプチド及び成長因子の両方の結合を可能として生物活性骨格を生成するために広く使用されている。

【０３３２】

いくつかの場合では、アクリロイルは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のアクリロイルは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。反応性二重結合は、スルフヒドリル基との追加の反応を受けることが可能である。いくつかの場合では、アクリロイル化合物とスルフヒドリル基との反応は、安定なチオエーテル結合の生成を伴って生じる。いくつかの場合では、アクリロイルは、スルフヒドリル反応性蛍光プローブである６－アクリロイル－２－ジメチルアミノナフタレンの設計において利用されている。

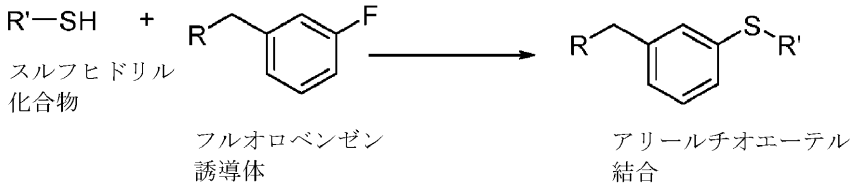
【化１５】



【０３３３】

いくつかの場合では、アリール基は、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のアリール基は、スルフヒドリル基とのバイオコンジュゲーションのために利用され得る。ハロゲン化アリールは、アミン含有分子を修飾してアリールアミン誘導体を形成するために一般的に使用されているが、それらはまた、スルフヒドリル基と非常に容易に反応し得る。例えば、フルオロベンゼン型化合物は、ホモ二官能性架橋剤において官能基として使用されている。それらの求核剤との反応は、二分子求核置換を伴い、フッ素原子のスルフヒドリル誘導体での置き換えを引き起こし、置換アリール結合を生成する。スルフヒドリル基を用いて形成されたコンジュゲートは、余剰のチオール（例えば、ＤＴＴ）で切断することによって可逆的であり得る。

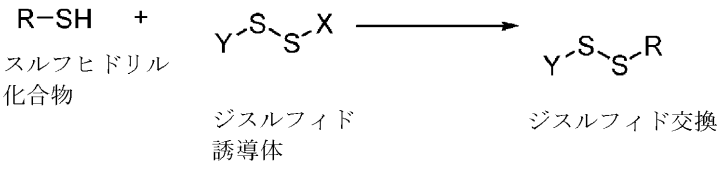
【化１６】



【０３３４】

いくつかの場合では、ジスルフィドは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のジスルフィド基は、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。いくつかの場合では、ジスルフィド基を含有する化合物は、別のチオールとのジスルフィド交換反応に関与することができる。ジスルフィド交換（交換とも呼ばれる）プロセスは、ジスルフィドにおけるチオールの攻撃を伴い、－Ｓ－Ｓ－結合を切断し、その後、元のジスルフィド化合物の一部を含む新たな混合ジスルフィドが形成される。チオール含有還元剤を使用するタンパク質におけるスルフヒドリルへのジスルフィド基の還元は、混合ジスルフィドの中間体形成を介して進行する。いくつかの場合では、架橋または修飾反応は、スルフヒドリル含有分子とジスルフィド結合を形成するためにジスルフィド交換プロセスを使用し得る。

【化１７】



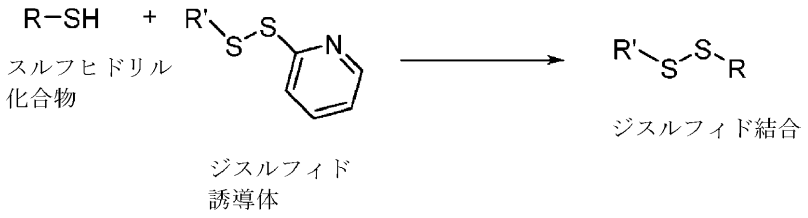
【０３３５】

いくつかの場合では、ジスルフィド結合は、バイオコンジュゲーション等の結合のために利用され得る。例えば、ジスルフィド交換反応の使用は、対象となるポリペプチドを修飾するために好ましい場合がある。組織操作において最も一般的に使用される試薬は、反応性ピリジルチオ－ジスルフィドに基づくものであり、これは、急速チオール交換を受けて、求核性が低い分光的に活性な２－メルカプトピリジンを放出する。また、ジスルフィド結合形成の可逆的特質のため、切断は、還元剤、例えば、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）またはグルタチオンの添加によって時間的に正確に制御され得る。

【０３３６】

いくつかの場合では、ピリジルジチオールは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、ピリジルジチオール官能基は、バイオコンジュゲーションのための架橋剤または修飾試薬の構築において使用され得る。ピリジルジスルフィドは、タンデムの２－イミノチオランと４，４′－ジピリジルジスルフィドとの反応を介して分子上の利用可能な第一級アミンから生成され得る。例えば、タンパク質または他の分子、２－イミノチオラン、及び４，４′－ジピリ－ジルジスルフィドの間の同時反応は、単一の工程において修飾を含有する反応性ピリジルジスルフィド基を生成する。ピリジルジスルフィドは、遊離スルフヒドリルとの交換反応を容易に受けて、単一の混合されたジスルフィド生成物を生成する。

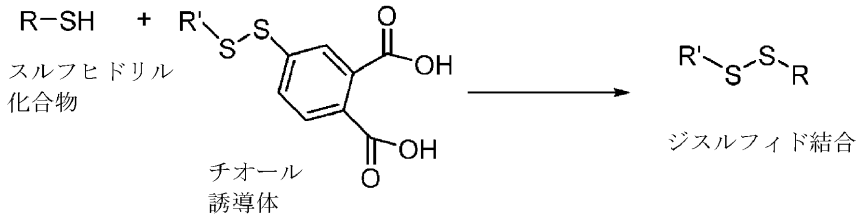
【化１８】



【０３３７】

いくつかの場合では、脱離基５－チオ－２－ニトロ安息香酸で活性化されたスルフヒドリル基は、本明細書に記載されるように、ピリジルジスルフィドと同様のジスルフィド交換によって遊離チオールをカップリングさせるために使用され得る。エルマン試薬のジスルフィドは、遊離スルフヒドリルとのジスルフィド交換を容易に受けて、１分子の５－チオ－２－ニトロ安息香酸（ＴＮＢ）とも呼ばれる発色物質５－スルフィド２－ニトロベン－ゾエートの付随放出を伴って、混合されたジスルフィドを形成する。ＴＮＢ－チオール基は、スルフヒドリル含有標的分子との交換を再び受けて、ジスルフィド架橋を生成し得る。スルフヒドリル化合物とカップリングすると、ＴＮＢ基が放出される。

【化１９】



スルフヒドリル化合物

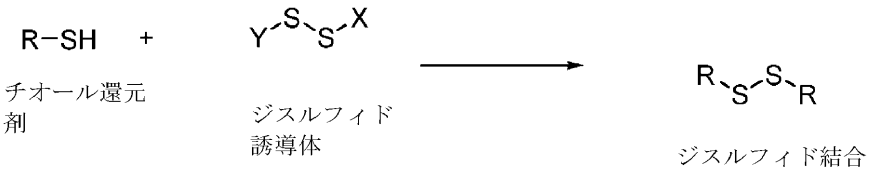
チオール誘導体

ジスルフィド結合

【０３３８】

いくつかの場合では、ジスルフィド還元は、チオール含有化合物、例えば、ＴＣＥＰ、ＤＴＴ、２－メルカプトエタノール、または２－メルカプトエチルアミンを使用して実施され得る。

【化２０】



チオール還元剤

ジスルフィド誘導体

ジスルフィド結合

【０３３９】

いくつかの場合では、ビニルスルホンは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のビニルスルホン基は、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、生体分子－物質コンジュゲートを形成するための活性化ビニルスルホンへのチオールのマイケル付加は、システインキャップペプチドが、ビニル－スルホン官能化多重アームＰＥＧを架橋してプロテアーゼ反応性ヒドロゲルを形成し、組織成長中に細胞浸潤を可能とすることを実証するために使用されている。いくつかの場合では、チオールに加えて、ビニルスルホン基が、より高いｐＨ条件下でアミン及びヒドロキシルと反応し得る。チオールとビニルスルホンとの反応の生成物は、単一の立体異性体構造を与える。また、ビニルスルホンを含有する架橋剤及び修飾試薬は、チオール反応性基を含有するように表面または分子を活性化するために使用され得る。

【化２１】



スルフヒドリル化合物

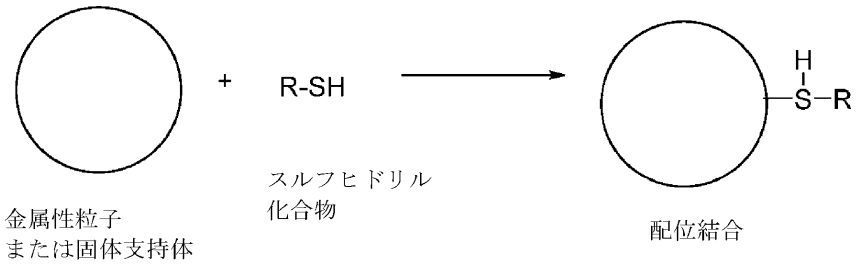
ビニルスルホン誘導体

ベータ-チオスルホニル結合

【０３４０】

いくつかの場合では、チオール含有分子は、金属イオン及び金属表面と相互作用して、バイオコンジュゲーションのための配位結合を形成し得る。いくつかの場合では、酸素及び窒素含有有機または生体分子は、例えば、様々なランタニドキレート、二官能性金属キレート化合物、及びＦｅＢＡＢＥにおいて金属イオンをキレートするために使用され得る。また、タンパク質におけるアミノ酸側鎖及び補欠分子族は、活性中心の一部として金属イオンに配位することによって生物無機モチーフを頻繁に形成する。

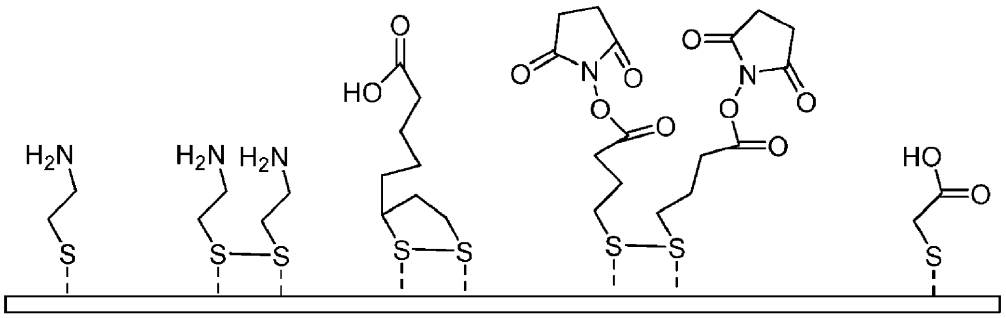
【化２２】



【０３４１】

いくつかの場合では、チオール有機化合物は、金属性表面または粒子をコーティングして生体適合性層を形成し、または生体分子等の物質のさらなるコンジュゲーションのための官能基を生成するために慣用的に使用され得る。例えば、チオール含有脂肪族／ＰＥＧリンカーは、平面金表面及び粒子上に自己構築単層（ＳＡＭ）を形成するために使用されている。

【化２３】



【０３４２】

いくつかの場合では、多数の代替的カップリングシステムが、物質間の結合または生体分子官能化のために使用され得る。これらには、アミドではなくアミン架橋カルバメート結合を形成するためのＯ－ニトロフェニルエステル（水性条件で減少した安定性を保有する）または１，１′－カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）の使用が含まれる。ヒドラジンもまた、ＥＤＣ／ＮＨＳ媒介カップリング中にアミンの代わりに使用され得る。ヒドラジン官能化ペプチドは、ｐＨ５～６で単一工程で生体物質にカップリングされ得る。それを行う際に、存在するリジン残基にわたってある程度の部位選択性が達成され得る。

【０３４３】

いくつかの場合では、生体分子のＮ末端修飾が、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、２－ピリジンカルボキシアルデヒド修飾アクリルアミドヒドロゲルは、ＥＣＭタンパク質のＮ末端と特異的に反応し得、隣接するアミド結合と環状イミダゾリジノン生成物を形成し、これらの重要な生物指示性モチーフの配向した提示を可能とする。

【０３４４】

いくつかの場合では、生体分子または固体支持体等の物質のアクリレート、アクリルアミド、及びメタクリレートは、結合のために利用され得る。いくつかの場合では、生体分子または固体支持体等の物質のチオールインは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。

【０３４５】

いくつかの場合では、チオール反応性コンジュゲーション、例えば、天然化学的ライゲ

ーション（ＮＣＬ）は、ペプチド結合形成を介して物質を結合させるために、例えば、ペプチド及びタンパク質を生体物質骨格に結合させるために利用され得る。例えば、Ｃ末端チオエステルを有するペプチドは、別のペプチドにおけるＮ末端システイン残基と反応してｔｒａｎｓ－チオエステル化反応を受け、これは、システインチオールを有する中間体チオエステルの形成をもたらす。

【０３４６】

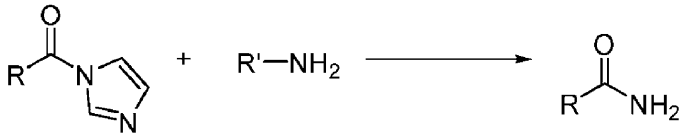
いくつかの場合では、小分子ビオチンへの（ストレプト）アビジンの強い結合は、結合のために使用され得る。いくつかの場合では、（ストレプト）アビジンは、第１の物質に結合され得、ビオチンは、第２の物質に結合され得、これにより物質は、ビオチンへの（ストレプト）アビジンの結合を介して結合され得る。いくつかの場合では、修飾試薬は、官能性ビオチン基をタンパク質、核酸、及び他の分子に付加し得る。いくつかの場合では、ビオチン化化合物に存在する官能性に応じて、抗体または他のタンパク質上の特定の官能基は、（ストレプト）アビジン結合部位を生成するために修飾され得る。アミン、カルボキシレート、スルフヒドリル、及び炭水化物基は、ビオチン誘導体の適切な選択を介してビオチン化のために特に標的とされ得る。いくつかの場合では、光反応性ビオチン化試薬は、修飾のための好都合な官能基を含有しない分子にビオチン基を非選択的に付加するために使用される。いくつかの場合では、ビオチン結合タンパク質は、ビオチン化分子をカップリングさせる際に使用するための表面、クロマトグラフィー支持体、マイクロ粒子、及びナノ粒子上に固定化され得る。いくつかの場合では、一連の（ストレプト）アビジン－ビオチン相互作用は、各テトラマー（ストレプト）アビジン分子の多価特質を利用し、標的に対する検出能力を向上させるために互いに対して構築され得る。いくつかの場合では、ビオチンの吉草酸側鎖から離れて官能基を含有し得るアミン反応性ビオチン化試薬は、タンパク質及び他の分子における第一級アミンと共有結合を形成することができる。いくつかの場合では、ＮＨＳエステルは、アミンと自発的に反応してアミド結合を形成する一方で、カルボキシレート含有ビオチン化合物は、ＥＤＣを使用してカルボジイミド媒介反応を介してアミンにカップリングされ得る。いくつかの場合では、ＮＨＳ－イミノビオチンは、アミン含有分子をイミノビオチンタグで標識するために使用され得、アビジンまたはストレプトアビジンとの可逆的結合潜在性を提供する。いくつかの場合では、スルホ－ＮＨＳ－ＳＳ－ビオチン（ＮＨＳ－ＳＳ－ビオチンとしても知られている）は、アミン含有タンパク質及び他の分子を修飾するために使用され得る長鎖の切断可能なビオチン化試薬であるスルホスクシンイミジル－２－（ビオチンアミド）エチル－１，３－ジチオプロピオネートである。いくつかの場合では、伸長スペーサーアームの末端でマレイミド基を含有するビオチン化試薬である１－ビオチンアミド－４－［４′－（マレイミドメチル）シクロヘキサン－カルボキサミド］ブタンは、タンパク質及び他の分子におけるスルフヒドリル基と反応して安定なチオエーテル結合を形成する。いくつかの場合では、Ｎ－［６－（ビオチンアミド）ヘキシル］－３′－（２′－ピリジルジチオ）プロピオンアミドであって、この試薬は、ビオチンの吉草酸側鎖に結合した１，６－ジアミノヘキサンスペーサー基を含有し、スペーサーの末端アミノ基は、末端のスルフヒドリル反応性基を生成するためにＳＰＤＰの酸前駆体とのアミド結合を介してさらに修飾され得る。ビオチン－ＨＰＤＰのピリジルジスルフィド末端は、タンパク質及び他の分子における遊離チオール基と反応して、ピリジン－２－チオンの喪失を伴ってジスルフィド結合を形成し得る。

【０３４７】

いくつかの場合では、カルボキシレートは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のカルボキシレートは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。いくつかの場合では、ジアゾメタン及び他のジアゾアルキル誘導体は、カルボキシレート基を標識するために使用され得る。いくつかの場合では、Ｎ，Ｎ′－カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）は、非水性条件下でカルボン酸と反応して高い反応性のＮ－アシルイミダゾールを形成するために使用され得る。次いで活性カルボキシレートは、アミド結合を形成するためのアミンまたはエステル結合を形成するためのヒドロキシル基と反応し得る。また、ＣＤＩでのスチレン／４－ビニル安息香酸コポリマーの活

性化は、酵素リゾチームまたは他の分子を、その利用可能なアミノ基を介してマトリックス上のカルボキシル基に固定化するために使用され得る。

【化２４】



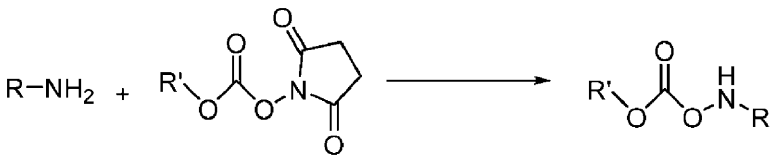
【０３４８】

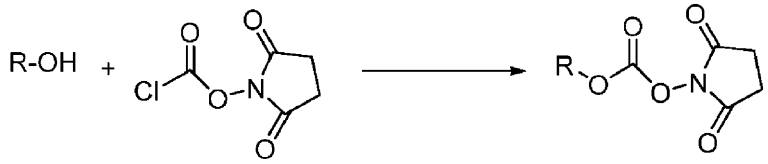
いくつかの場合では、カルボジイミドは、結合のためにアミン含有化合物とのカップリングのためにカルボキシレート基を活性化することが可能な長さゼロの架橋剤として機能する。いくつかの場合では、カルボジイミドは、カルボキシレートとアミンまたはホスフェートとアミンとの間のアミドまたはホスホルアミデート結合の形成を媒介するために使用される。

【０３４９】

いくつかの場合では、Ｎ，Ｎ′－ジスクシンイミジルカルボネートまたはＮ－ヒドロキシスクシンイミジルクロロホルメートは、例えば、バイオコンジュゲーションを介して種を結合させるために利用され得る。Ｎ，Ｎ′－ジスクシンイミジルカルボネート（ＤＳＣ）は、カルボニル基を含有する本質的に２つのＮＨＳエステルからなる。化合物は、求核剤に対して非常に反応性である。水溶液中で、ＤＳＣは加水分解して１分子のCO_2の放出を伴って２分子のＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）を形成する。非水性環境では、試薬は、ヒドロキシル基をスクシンイミジルカルボネート誘導体に活性化するために使用され得る。ＤＳＣで活性化したヒドロキシル性化合物は、アミン含有分子とコンジュゲートするために使用されて、安定な架橋した生成物を形成し得る。

【化２５】





【０３５０】

いくつかの場合では、過ヨウ素酸ナトリウムは、隣接炭素原子上のヒドロキシル基を酸化するために使用され得、例えば、バイオコンジュゲーションを介して、結合のためのアミンまたはヒドラジド含有分子とのカップリングに好適な反応性アルデヒド部位を形成する。例えば、これらの反応は、後の還元的アミノ化によるアミン含有分子のコンジュゲーションのための炭水化物または糖タンパク質における架橋部位を生成するために使用され得る。

【０３５１】

いくつかの場合では、ヒドロキシル含有炭水化物を酸化してバイオコンジュゲーション

のためのアルデヒド基を生成するために酵素が使用され得る。例えば、末端ガラクトースまたはＮ－アセチル－ｄ－ガラクトース部位に対するガラクトースオキシダーゼの反応が進行して多糖鎖上にＣ－６アルデヒド基を形成させる。次いでこれらの基は、アミンまたはヒドラジド含有分子とのコンジュゲーション反応のために使用され得る。

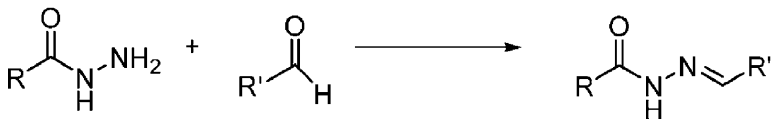
【０３５２】

いくつかの場合では、反応性アルキルハロゲン化合物は、結合のために炭水化物、ポリマー、及び他の物質におけるヒドロキシル基を特異的に修飾するために使用され得る。

【０３５３】

いくつかの場合では、アルデヒドまたはケトンは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のアルデヒドまたはケトンは、バイオコンジュゲーションのために使用され得る。例えば、ヒドラジンの誘導体、特にカルボキシレート基から形成されたヒドラジド化合物は、標的分子におけるアルデヒドまたはケトン官能基と特異的に反応し得る。ヒドラジドとアルデヒドとの間の結合をさらに安定化するために、ヒドラゾンは、シアノ水素化ホウ素ナトリウムと反応させられて、二重結合を減少させ、頑丈な共有結合を形成し得る。

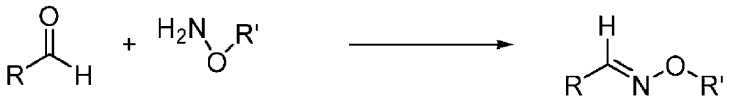
【化２６】



【０３５４】

いくつかの場合では、アミノオキシは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、生体分子または固体支持体のアミノオキシ基は、バイオコンジュゲーションのために使用され得る。例えば、アルデヒド基とアミノオキシ基との間に生じる化学選択的ライゲーション反応は、多くのバイオコンジュゲーション反応において、及び表面を含む不溶性支持体へのリガンドのカップリングにおいて使用されているオキシム結合（アルドキシム）を生成する。この反応はまた、ケトンで非常に効率的であり、ケトキシムと呼ばれるオキシムを形成する。

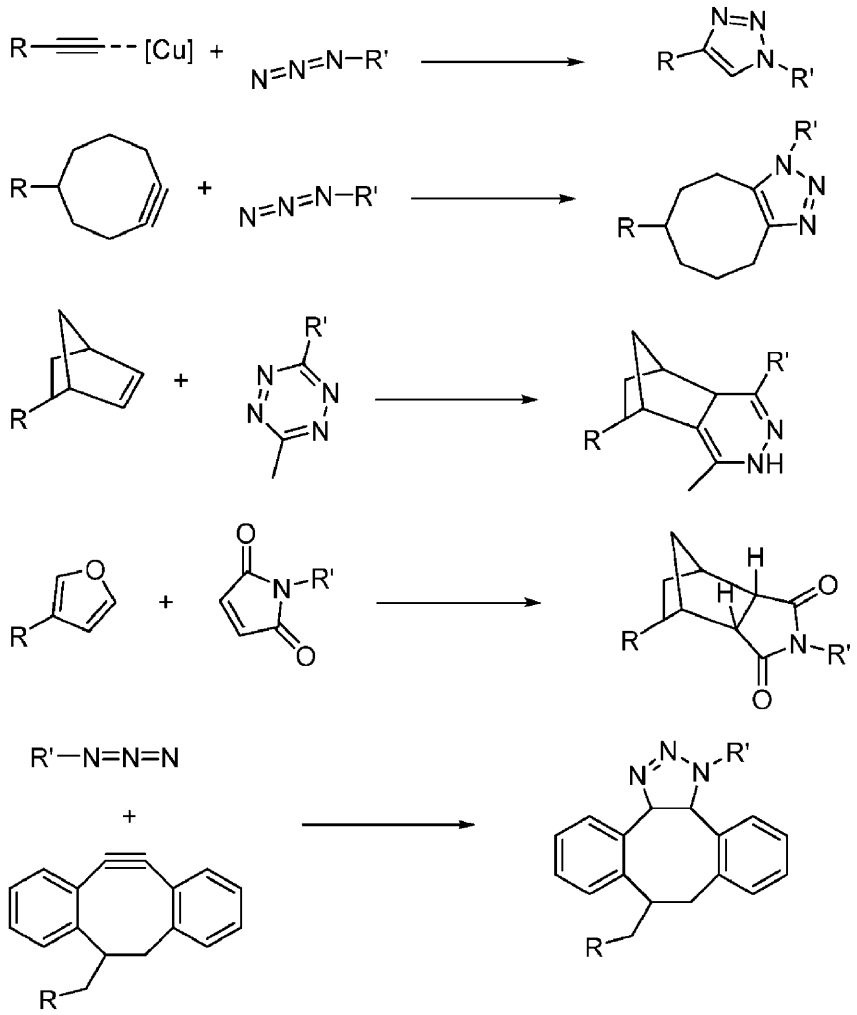
【化２７】



【０３５５】

いくつかの場合では、環化付加反応は、結合、例えば、バイオコンジュゲーションを介する結合のために利用され得る。環化付加反応では、２つ以上の不飽和分子が一緒になって不飽和度の減少を伴って環状生成物を形成し、これらの反応パートナーは、典型的には、自然系には存在しないので、コンジュゲーションのための環化付加の使用は、カップリングパートナー内の非天然官能性の導入を利用する。

【化２８】



【０３５６】

いくつかの場合では、銅触媒アジド－アルキン環化付加（ＣｕＡＡＣ）は、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、ＣｕＡＡＣは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。いくつかの場合では、アジドとアルキンとの間の（３＋２）環化付加は、高温で（＞９０℃）自発的に進行し、２つのトリアゾール異性体の混合物を生成する。いくつかの場合では、この反応は、室温、周囲、酸素化、及び／または水性環境で進行する。いくつかの場合では、例えば、アジド官能化ＰＥＧを有するヒドロゲルを形成するためにアルキンでキャップされたペプチドを使用する、ＣｕＡＡＣによるペプチド－物質コンジュゲートの形成。いくつかの場合では、ＣｕＡＡＣを介したコンジュゲーションを達成するために、銅（Ｉ）触媒は、直接的に加えられ、または最も一般的にはアスコルビン酸を使用して、初期の銅（ＩＩ）複合体の還元によってｉｎ　ｓｉｔｕで生成され得る。還元剤の添加は、酸素に対するＣｕＡＡＣライゲーションの感度をさらに減少させる。トリアゾール形成のために追加のリガンドは必要ではないが、第三級アミンベースのリガンドの添加が使用され得る。

【０３５７】

いくつかの場合では、歪み促進型アジド－アルキン環化付加（ＳＰＡＡＣ）は、２つの物質の結合のために利用され得る。ＳＰＡＡＣは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。いくつかの場合では、高度に歪んだシクロオクチンは、任意の加えられる触媒を必要とすることなく、生理的条件下でアジドと容易に反応してトリアゾールを形成する。いくつかの場合では、ペプチドコンジュゲーションのためのＳＰＡＡＣの使用に加え

て、多数の有名な報告は、タンパク質カップリングパートナーへの非天然アジドモチーフの導入を介してタンパク質基質をシクロオクチン官能化生体物質に結合させるためにＳＰＡＡＣを使用している。いくつかの場合では、例えば、これは、ＩＦＮ－γの酵素媒介Ｎ末端修飾を介して、または多数のタンパク質基質における非天然アミノ酸４－アジドフェニルアラニンでのコドン再配置を介して、骨形態形成タンパク質－２（ＢＭＰ－２）に存在する天然システインのマレイミド官能化を含めることによって達成される。いくつかの場合では、超分子ホスト－ゲスト相互作用もまた、アジド－アルキン環化付加を促進するために使用され得る。例えば、２つの反応性パートナーをククルビット［６］ウリルホストのキャビティ内に近接させることによって、効率的な環化付加がタンパク質の表面上で達成され得、このストラテジーは、他の適切な分子に拡張され得る。

【０３５８】

いくつかの場合では、逆電子要請型ディールス・アルダー反応（ＩＥＤＤＡ）は、結合、例えば、バイオコンジュゲーションを介する結合のために利用され得る。例えば、１，２，４，５－テトラジンと歪んだアルケンまたはアルキンとの間のＩＥＤＤＡ反応が用いられ得る。分子コンジュゲーションを受けるための広範囲の好適な誘導体が報告されており、例えば、一連の次第に歪んだ（よって、反応性の）ｔｒａｎｓ－シクロオクテンが利用され得る。いくつかの場合では、官能化ノルボルネン誘導体は、ＩＥＤＤＡ反応を受けるために利用され得る。いくつかの場合では、トリアジンが利用され得る。いくつかの場合では、スピロヘキセンが利用され得る。これらのストラテジーは、他の適切な分子に拡張され得る。いくつかの場合では、マレイミド及びフランのヘテロ・ディールス・アルダー環化付加は、結合のために利用され得る。例えば、マレイミド官能化ＰＥＧ－ヒドロゲルへのフラン官能化ＲＧＤＳペプチドのカップリングが利用され得、このストラテジーは、他の適切な分子に拡張され得る。いくつかの場合では、フラン官能化ヒアルロン酸ヒドロゲルは、ディールス・アルダー環化付加を介してジマレイミド官能化ペプチドと架橋され得る。

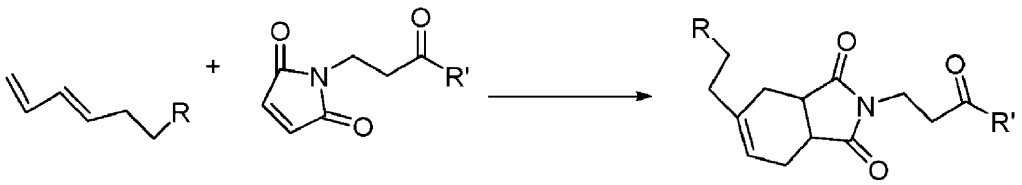
【０３５９】

いくつかの場合では、オキシム及びヒドラゾンは、２つの物質の結合のために利用され得る。例えば、オキシム及びヒドラゾン形成は、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。いくつかの場合では、ヒドラゾン形成を介する生体物質へのペプチド及びＤＮＡの安定な結合は、二官能性架橋を介して達成され得、このストラテジーは、他の適切な分子に拡張され得る。例えば、タンパク質架橋ヒドロゲルは、タンパク質のＮ及びＣ末端の両方でオキシム修飾を介して生成され得る。

【０３６０】

いくつかの場合では、ディールス・アルダー反応は、結合のための６員環複合体を形成するためのジエンとアルケンとの共有結合性カップリングからなる。

【化２９】

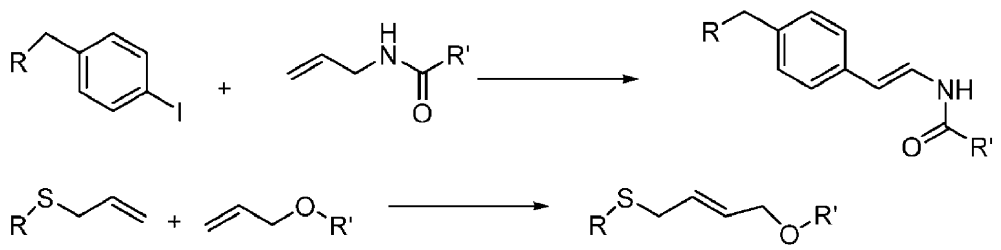


【０３６１】

いくつかの場合では、遷移金属複合体は、結合、例えば、バイオコンジュゲーションを介する結合のために利用され得る。後期遷移金属の特質は、遷移金属複合体を、不飽和及び分極性官能基（オレフィン、アルキン、ヨウ化アリール、アリールボロン酸等）の操作に良好に適したものとし得る。例えば、Ｐｄ（０）官能化固体支持体は、細胞質におけるアリルカルバメート脱保護及び鈴木・宮浦クロスカップリングを媒介し得る。他の例では

、ルテニウム触媒は、生存細胞内のケージングされたフルオロフォアのアリルカルバメート脱保護を媒介するために使用され得る。いくつかの場合では、細胞培養におけるパラジウムベースの用途の用途には、銅フリー薗頭カップリング、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞の表面上の細胞外鈴木カップリング、及びチオール基とアリルセレノ硫酸塩とのコンジュゲーションが含まれる。いくつかの場合では、オレフィンメタセシスは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、ルテニウム複合体を用いて、Ｓ－アリルシステインは、デヒドロアラニンへのアリルチオールのコンジュゲート付加、システインの直接的アリル化、アリルジスルフィドの脱硫、またはメチオニン栄養要求性Ｅ．ｃｏｌｉにおけるメチオニン代用物としての代謝組み込みを含む多様な方法によってタンパク質に容易に導入され得る。

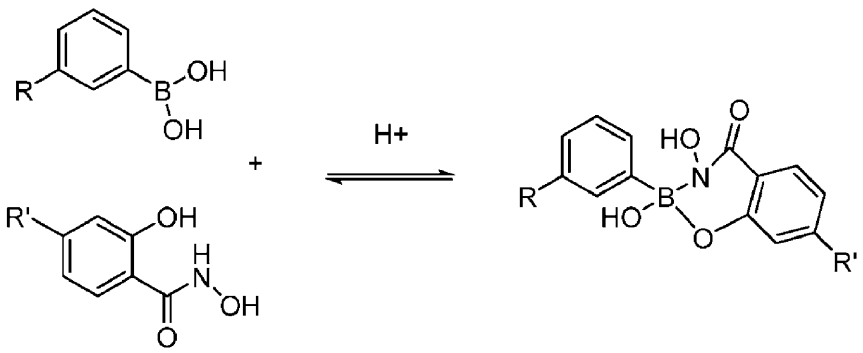
【化３０】



【０３６２】

いくつかの場合では、ボロン酸誘導体との複合体形成は、例えば、バイオコンジュゲーションを介して、物質の結合のために使用され得る。例えば、ボロン酸誘導体は、１，２－または１，３－ジオール、１，２－または１，３－ヒドロキシ酸、１，２－または１，３－ヒドロキシルアミン、１－２－または１，３－ヒドロキシアミド、１，２－または１，３－ヒドロキシオキシムからなる近接官能基を有する他の分子、ならびにこれらの種を含有する様々な糖類または生体分子と環構造を形成することができる。

【化３１】



【０３６３】

いくつかの場合では、酵素媒介コンジュゲーションは、物質を結合させるために利用され得る。例えば、トランスグルタミナーゼ酵素ファミリーは、リジン側鎖の第一級アミンと相補的グルタミン残基のアミド結合との間のイソペプチド結合の形成を触媒し、このストラテジーは、他の適切な分子に拡張され得る。他の場合では、ペルオキシダーゼ媒介コンジュゲーションは、コンジュゲーションのために利用され得る。例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）は、広範囲の有機基質、例えば、チロシンのフェノール基を酸化して、自発的ダイマー化を受ける非常に反応性のラジカルまたはキノン中間体を生成し、２つのチロシン残基間のオルト炭素－炭素結合の形成をもたらすために利用さ

れ得、このストラテジーは、他の適切な分子に拡張され得る。いくつかの場合では、短いペプチドタグは、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。これらのペプチドタグは、５アミノ酸長ほどの短さであり得、ポリペプチドに附属され得、これはそれらの後の修飾を可能とする。

【０３６４】

いくつかの場合では、低分子量モノマーの重合は、例えば、バイオコンジュゲーションを介して、物質の結合のために利用され得る。重合は、２つのメカニズムのうちの１つ、すなわち、鎖成長または逐次重合のいずれかを介して進行するものとして分類され得る。鎖成長重合中に、モノマーは、成長するポリマー鎖の「活性」末端で付加され、低い変換率であっても高分子量物質の形成をもたらす。逐次成長重合中に、短いオリゴマー鎖はカップリングしてポリマー種を形成し、高分子量に達するために高い変換率を必要とする。両方の技術は、生体分子－ポリマーコンジュゲート等のコンジュゲートを形成するために使用され得る。アクリレート及びメタクリレートモノマーの重合は、特に良い結果をもたらすことが証明されている。例えば、アクリレート及びメタクリレート修飾タンパク質は、容易に重合され得る。同様に、合成オリゴヌクレオチドホスホロアミダイト構築ブロック「アクリダイト（Ａｃｒｙｄｉｔｅ）」、フリーラジカル重合の利用可能性は、ＤＮＡ及びＲＮＡ官能化物質を形成する最も一般的な方法の１つであり続けている。コモノマーの存在下で重合を受けることによって、分子提示の密度は容易に調整され得、立体障害からの潜在的困難性を克服することが可能となる。重合の開始は、熱、ＵＶ及び可視光、酸化還元反応、ならびに電気化学を含む多数の手段によって誘発され得る。アクリレート修飾タンパク質はまた、生物学的活性を保持しながら、重合を受けて官能性物質を生成し得る。いくつかの場合では、リビングラジカル重合（ＬＲＰ）が、バイオコンジュゲーションのために利用され得る。例えば、バイオコンジュゲートの形成のために最も一般的に使用されるＬＲＰには、原子移動ラジカル重合（ＡＴＲＰ）、可逆的付加開裂連鎖移動（ＲＡＦＴ）重合、及びニトロキシド媒介重合（ＮＭＰ）が含まれる。

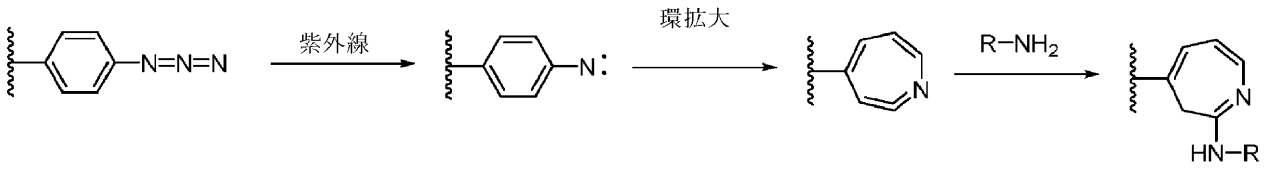
【０３６５】

いくつかの場合では、フォトコンジュゲーションは、例えば、バイオコンジュゲーションを介して、物質の結合のために利用され得る。いくつかの場合では、重合は、ラジカル種の生成によって開始し、次いで結合形成を介して伝搬して活性ポリマー鎖を生成する。開始工程は、多数の刺激を介して誘導され得、その中で開始種の熱分解、酸化還元活性化、及び電気化学的イオン化が最も一般的である。代替的には、多くの開始剤が、光誘導光分解結合破断（Ｉ型）または共開始剤からのプロトンの光活性化抽出（ＩＩ型）を介して活性化され得る。光開始は、使用される開始剤に依存する狭く調整可能な活性化波長、急速に生成するラジカル、及び光源を除去することによって重合を制御する能力を使用して、広い温度範囲にわたって適用可能であるという利益を提供する。重要なことに、酸素に対する重合の耐性は大幅に向上し、細胞及び組織の存在下で重合が可能となる。光重合中のアクリレート官能化ペプチド及びタンパク質の組み込みは、生体物質コンジュゲートを生成するための方法として使用され得る。代替的には、事前形成された物質上のペンダントビニル基へのポリペプチドの光開始結合も広く報告されており、より最近では２光子励起を介して３Ｄパターン化のために使用されている。広範囲の光開始剤が、フォトコンジュゲーションのコンジュゲーションにおいて使用され得る。例えば、限定されないが、エオシンＹ、２，２－ジメトキシ－２－フェニル－アセトフェノン、Ｉｇｒａｃｕｒｅ　Ｄ２９５９、リチウムフェニル－２，４，６－トリメチルベンゾイルホスフィネート、及びリボフラビンは、光開始剤として使用され得る。光開始剤は通常、光反応プロセスを開始させるために光を吸収する。いくつかの場合では、フォトコンジュゲーションは、光チオール－エン反応を利用し得る。チオールはまた、フリーラジカルメカニズムを介してアルケンと反応し得る。チオールラジカルはまず、アルケンと反応して炭素中心ラジカルを生成し、これは次いで別のチオールからプロトンを抽出し、よって反応を伝搬し得る。光チオール－エン反応は、電子に富むアルケンによって加速され得、これは、チオール－水素を急速に抽出することができる不安定な炭素－ラジカル中間体を生成する。この規則の例

外は、反応性がチオール付加の際の環歪みの放出によって代わりに誘導されるノルボルネン誘導体である。これは、ノルボルネン＞ビニルエーテル＞プロペニル＞アリルエーテル＞アクリレート＞マレイミドの反応性の一般的傾向をもたらす。ノルボルネン及びアリルオキシカルボニル（アロック基）は、連鎖移動のほぼ無視できる寄与及びペプチド合成中のそれらの導入の容易性によりそれぞれ、ペプチド／タンパク質－生体物質官能化のために特に広く使用されている。例えば、固相ペプチド合成中に直交リジン保護基として典型的に使用されるアロック基は、効率的な光チオール－エン官能基である。他の例では、ノルボルネン光チオール－エン反応は、生物活性ペプチド及び成長因子タンパク質の拘束及び空間的パターン化のために使用され得る。最も一般的に使用されるアロック及びノルボルネン官能基に加えて、他のアルケンはまた、生体物質官能化のために使用されている。例えば、コドン再配置は、アリル－システイン残基をタンパク質に部位特異的に組み込み、これはその後、光チオール－エン反応の使用を介してコンジュゲーションを受け得る。代替的には、アクリレートは、システインキャップペプチドの存在下で混合態様の光重合を受け得るのに対し、アリルジスルフィド構造は、最近では、コンジュゲートされたチオールの可逆的な制御された交換を受けることが示されている。

いくつかの場合では、アリールアジドまたはハロゲン化アリールアジドは、物質を結合させるために使用され得る。

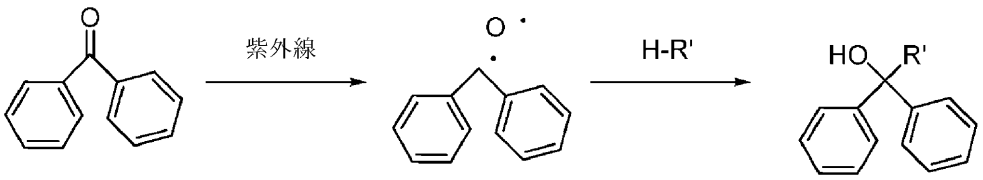
【化３２】



【０３６６】

いくつかの場合では、光反応性基、例えば、ベンゾフェノンは、物質の結合のために利用され得る。

【化３３】



【０３６７】

いくつかの場合では、光反応性基アントラキノンは、バイオコンジュゲーションを介する結合等の物質の結合のために利用され得る。いくつかの場合では、光チオール－イン反応は、バイオコンジュゲーションを介する結合等の物質の結合のために利用され得る。光チオール－イン反応のほとんどの例は、単純なプロパルギル－エーテルまたは－アミン官能基を利用している。

【０３６８】

いくつかの場合では、反応性官能性のフォトケージング及び活性化は、バイオコンジュゲーションを介する結合等の物質の結合のために利用され得る。通常、一時的反応性種は、それがアクリレートまたはチオール由来ラジカルであるかどうかにかかわらず形成される。いくつかの場合では、フォトケージングは、官能基をマスクまたは保護するために、それが曝露されるのに所望となるまで使用され得る。いくつかの場合では、最も広く利用

されるケージは、ｏ－ニトロベンジル及びクマリン発色団に基づく。例えば、ニトロベンジルでキャップされたシステイン残基は、３２５ｎｍのＵＶ光での照射によってケージングされ得、放出されたチオールは次いで、マイケル付加を介してマレイミド官能化ペプチドと反応して、細胞遊走をガイドすることが可能なパターン化ヒドロゲルを生成し得る。いくつかの場合では、６－ブロモ－ヒドロキシクマリンは、チオールケージングのために使用され得る。いくつかの場合では、光親和性プローブは、バイオコンジュゲーションのために利用され得、その場合、照射すると非常に反応性の中間体は次いで、高い空間的正確性で最も近接可能な官能基と急速に反応し得る。いくつかの場合では、フェニルアジド、ベンゾフェノン、及びフェニル－ジアジリンが最も一般的に使用される。いくつかの場合では、フォトケージングされた環化付加が使用され得る。例えば、テトラゾールのＵＶ照射は、電子欠損アルケン、例えば、アクリレートまたはアクリルアミドとの急速環化付加を受け得る反応性ニトリル－イミン中間体を生成することが示されている。いくつかの場合では、チオールとのニトリル－イミン副反応性は、テトラゾール官能化表面へのシステイン含有タンパク質の部位特異的コンジュゲーションのために利用され得る。

【０３６９】

いくつかの場合では、非共有結合性相互作用は、バイオコンジュゲーションを介する結合等の物質の結合のために利用され得る。いくつかの場合では、対象となる生体分子に対する結合親和性を示す非共有結合性配列は、製造後修飾または生物学的サンプル内の環境から天然生体分子を単純に隔離することを可能とする。有用な結合配列は、長さが７～２０アミノ酸の短いペプチドであり、これは、ｉｎ　ｖｉｖｏに存在する既知のタンパク質結合ドメインを含む多様な源に由来し、またはファージディスプレイ等の技術を介して決定される。いくつかの場合では、アプタマーもまた、サイトカインである血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）及び血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、ならびに細胞表面タンパク質、例えば、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）を含む、多様なタンパク質基質に結合するために使用され得る。いくつかの場合では、結合配列はまた、天然バイオポリマー、例えば、ヘパリンに対する親和性を有する生体物質に導入され得る。いくつかの場合では、最初にバイオポリマー結合を誘導することにより、次いで生体物質骨格への加えられたまたは内因性の成長因子またはシグナル伝達タンパク質の吸着が制御され得る。いくつかの場合では、アミノ酸レベルでの結合親和性もまた、所定の生体物質基質へのペプチド及びタンパク質コンジュゲーションを可能とするために利用され得る。例えば、非天然カテコールベースのアミノ酸の結合は、金属酸化物を含有するバイオガラス及び金属性埋込物への結合を誘導するために使用され得、これらの重要な技術の生物活性を向上させることが可能となる。

【０３７０】

いくつかの場合では、自己構築ペプチドは、バイオコンジュゲーションを介する結合等の物質の結合のために利用され得る。例えば、天然ペプチド及びタンパク質は、β－シート及びα－ヘリックスを含む一連の二次構造を採用し、これは、個々の配列を安定化し、かつタンパク質間凝集を制御し得る。いくつかの場合では、自己構築ペプチドは、ヒドロゲル及び繊維性物質を構築するために広範に使用されている。これらの構造の多くでは、生物学的エピトープまたは官能基は、所望の生物活性をシステムに付加するために、ペプチド合成中にペプチド構築ブロックのいくつかまたはすべてに附属され得る。単純な接着モチーフからラミニン由来エピトープ、及び成長因子模倣体に及ぶ範囲のペプチド－リガンドがすべて、自己構築したフィブリルの表面上で提示された。代替的には、糖ペプチドは、細胞外シグナル伝達タンパク質及び成長因子を動員するために、ヒアルロン酸内のグリコシル化パターンを模倣するために、またはグリコサミノグリカン骨格における最適なスルホン化比を調べるために構築され得る。いくつかの場合では、自己構築ドメインはまた、完全長タンパク質に付加され得、ヒドロゲル形成中にペンダント官能性の組み込みをもたらす。いくつかの場合では、ペプチドが二次構造を形成する傾向もまた、非自己構築骨格内で利用されている。これは、非相互作用性ポリマー、例えば、ＰＥＧの相互貫通性ネットワークまたは、例えば、正に荷電したペプチドと負に荷電したアルギネートゲルと

の間の追加の電荷相互作用が最終コンストラクトをさらに安定化するシステムから構成される共有結合性ヒドロゲルに自己構築ペプチドを混合することによって達成され得る。代替手段として、ペンダントらせん形基は、共有結合性物質に結合され、コイルドコイル三重ヘリックスへの自己構築を介して成長因子等の生物活性基の非共有結合を誘導するために使用され得る。

【０３７１】

いくつかの場合では、ホスト－ゲスト化学は、バイオコンジュゲーションを介する結合等の物質の結合のために利用され得る。例えば、β－シクロデキストリン修飾アルギネート骨格の接着特性は、ゲストであるナフチル官能化ＲＧＤＳペプチドの添加を介してｉｎｓｉｔｕで制御され得、その後、より高いホスト結合定数で非細胞接着性アダマンタン－ＲＧＥＳペプチドを導入することによって、線維芽細胞結合の動的調節が可能となった。シクロデキストリンとナフチルまたはアダマンタン官能化ペプチドとの間のホスト－ゲスト相互作用は、アルギネート官能化を可能とし、これは他の適切な分子に適用され得る。

【０３７２】

いくつかの場合では、核酸は、バイオコンジュゲーションを介する結合等の物質の結合のために利用され得る。いくつかの場合では、自己構築ペプチドと類似する様式で、核酸もまた、構築された物質自体を形成して、分子の提示のための調整可能なプラットフォームを生成し得る。いくつかの場合では、ＤＮＡタグ化ポリペプチドは、好適に官能化された物質にコンジュゲートされ得る。

【０３７３】

一般に、官能基を組み込むことは、物質の結合のために利用され得る。例えば、独自反応性のモチーフを分子に導入することは、単一部位選択性または特異性を達成することを可能とする化学的「タグ」を提供する。いくつかの場合では、ポリペプチドまたは核酸は、固相合成（ＳＰＳ）を介して生成され得る。有機合成の多用途性は、本明細書に記載されるように利用可能な広範囲の好適に官能化されたアミノ酸及びヌクレオチドを用いて、官能基組み込みにおける困難性を克服することを可能とする。いくつかの場合では、代替的アプローチは、所望の官能基を保有する非天然アミノ酸（ＵＡＡ）を導入することである。これは、アミン反応性誘導体でのリジン残基の修飾を介して達成され得る。いくつかの場合では、特定のアミノ酸を生合成することが不可能であり、よって、成長培地からの取り込みを必要とする栄養要求性細菌株の使用。天然アミノ酸の細菌を飢餓状態とし、構造的に関連する非天然アナログをそれに補充することによって、細菌細胞は、翻訳中にＵＡＡを組み込むために誘導され得る。この技術は、メチオニンのアジド及びアルキンベースの模倣体を導入するために使用され得、ＣｕＡＡＣ及びＳＰＡＡＣ反応を受けるための官能基の導入をもたらす。いくつかの場合では、翻訳中にＵＡＡを選択的に認識し、投入する直交ｔＲＮＡ及びｔＲＮＡシンテターゼ対を使用するコドン再配置の使用。いくつかの場合では、これは、ｔＲＮＡ$_{CUA}$／ｔＲＮＡシンテターゼ対を別の界から宿主細胞に組み込むことによって、アンバー終始コドンＵＡＧを再配置することによって達成され得る。この対は、内因性細胞機構には有効に不可視でありながら、所望のＵＡＡを導入することができる。結果として、部位特異的変異誘発は、コードＤＮＡの所望の位置で単一のＴＡＧコドンを導入するために使用され得、高い特異性及び選択性でのＵＡＡの単一導入をもたらす。

【０３７４】

組成物及びキット

本開示に記載される検出可能なプローブまたは親和性試薬を含む組成物またはキットが形成され得る。いくつかの構成が組成物との関連で以下に示されている。キットは、同様に構成され得ることが理解される。組成物には、溶液または溶媒、及び他の構成的成分と共に１つ以上の検出可能なプローブまたは親和性試薬が含まれ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物の特定の組成物は、検出可能なプローブまたは親和性試薬の意図された使用及び組成物における検出可能なプローブまたは親和性試薬の特定の組成に依存し得る。組成物は、１）検出可能なプローブまたは親和性試薬のための安定性及び保存要

件；２）検出可能なプローブまたは親和性試薬の特性及び／または特徴；及び３）検出可能なプローブまたは親和性試薬のための使用態様を含むいくつかの要素に基づいて製剤化され得る。安定性及び／または保存の考慮事項には、保持成分、結合成分、及びまたは標識成分の安定性を維持するための条件が含まれ得る。特性または特徴の考慮事項には、親和性及び／またはアビディティ特徴、プローブ解離、及び標識成分特徴が含まれ得る。使用態様の考慮事項には、検出方法、多重化、及び二次結合相互作用が含まれ得る。

【０３７５】

通常、組成物には、液体媒体に１つ以上の検出可能なプローブまたは親和性試薬が含まれ得る。いくつかの構成では、液体媒体は、水性であり得、またはそうでなければ、水が含まれる。いくつかの構成では、液体媒体には、非水性溶媒、例えば、極性溶媒または非極性溶媒が含まれ得る。液体媒体には、ｐＨ緩衝液が含まれ得る。ｐＨ緩衝液は、所望の範囲内の溶液ｐＨを維持するために、例えば、保持成分または結合成分の安定性を維持するために、または結合成分の結合相互作用の強度を媒介するために製剤化され得る。液体媒体には、１つ以上の塩がさらに含まれ得る。液体媒体における塩は、液体媒体のイオン強度を変化させるために加えられ得る。イオン強度は、保持成分または結合成分の安定性を維持するために、または結合成分の結合相互作用の強度を媒介するために調節され得る。プローブ組成物には、エマルションまたはコロイド状懸濁液、例えば、油中水エマルションまたは水中油エマルションが含まれ得る。

【０３７６】

核酸（例えば、ＤＮＡ折り紙、ＤＮＡナノボール、アプタマー）を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬は、核酸安定性を維持するために具体的に製剤化された組成物中で提供され得る。いくつかの構成では、核酸を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬は、マグネシウム塩（例えば、$MgCl_2$）を含む液体媒体中で提供され得る。マグネシウム塩は、核酸安定性（例えば、塩基対結合、らせん形構造等）を維持するために十分な濃度で提供され得る。マグネシウム塩は、少なくとも約１０ｍＭ、５０ｍＭ、１００ｍＭ、１２０ｍＭ、１４０ｍＭ、１６０ｍＭ、１８０ｍＭ、２００ｍＭ、２２０ｍＭ、２４０ｍＭ、２６０ｍＭ、２８０ｍＭ、３００ｍＭ、３５０ｍＭ、４００ｍＭ、５００ｍＭ、またはそれを超える濃度を有し得る。代替的または付加的に、マグネシウム塩は、多くとも約５００ｍＭ、４００ｍＭ、３５０ｍＭ、３００ｍＭ、２８０ｍＭ、２６０ｍＭ、２４０ｍＭ、２２０ｍＭ、２００ｍＭ、１８０ｍＭ、１６０ｍＭ、１４０ｍＭ、１２０ｍＭ、１００ｍＭ、５０ｍＭ、１０ｍＭ、またはそれ未満の濃度を有し得る。

【０３７７】

検出可能なプローブまたは親和性試薬を含む液体媒体には、スカベンジャー種がさらに含まれ得る。スカベンジャーには、化学的有害または損傷種、例えば、フリーラジカルスカベンジャー、酸素スカベンジャー、及び金属－キレート剤を除去することが意図された任意の化学種が含まれ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物における可能性のあるスカベンジャーには、ヒドラジン、アスコルビン酸、トコフェロール、ナリンゲニン、グルタチオン、スタンネン、及びＥＤＴＡ等の種が含まれ得る。スカベンジャーは、アッセイまたは他の使用態様の前の検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物の保存のために意図された液体媒体に含まれ得る。

【０３７８】

いくつかの構成では、液体媒体を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物は、多相液体、例えば、油中水エマルションまたは水中油エマルションとして製剤化され得る。多相液体媒体は、使用態様の前または間に検出可能なプローブまたは親和性試薬の局在化及び／または拘束を可能とし得る。例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬の放出は、エマルションの崩壊によって制御され得、それによりエマルション内に拘束されたプローブを放出する。また、多相製剤は、混合された化学的特徴（例えば、疎水性及び親水性成分）または水性化学に対する感度（例えば、加水分解に対する感受性）を有する検出可能なプローブまたは親和性試薬の安定性を増加させ得る。

【０３７９】

いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物は、競合体種を含むように製剤化され得る。競合体種には、結合パートナー、エピトープ、または標的部位に結合するように構成された親和性試薬または他の分子が含まれ得る。競合体種は、結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対する低い親和性によって特性化され得る。いくつかの構成では、競合体種は、検出可能なプローブまたは親和性試薬についての結合パートナー、エピトープ、または標的部位と同一の結合パートナー、エピトープまたは標的部位に対する低い親和性によって特性化され得る。他の構成では、競合体種は、複数の結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対する低い親和性（例えば、減少した結合特異性）によって特性化され得る。理論に縛られることを望むものではなく、競合体種には、結合パートナー、エピトープ、または標的部位からの転移が結合のギブス自由エネルギーの増加によって誘導される結合種が含まれ得る。例えば、競合体種は、検出可能なプローブまたは親和性試薬よりも結合パートナーに対するより大きな結合エンタルピーを有し得るので、それは、競合体を転移させ、プローブを結合させるためにエネルギー的に好ましい。同様に、競合体種は、検出可能なプローブまたは親和性試薬を優先して結合パートナーから解離することによってシステムのエントロピーを増加させ得る。競合体種は、検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物における調整可能なアビディティを生成するために有利であり得、その理由は、１）競合体種が、結合パートナー、エピトープ、または標的部位への検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合を熱力学的に促進し得、２）競合体種が、結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対する濃度依存的競合を提供することによってプローブ結合の動態に影響を及ぼし得るからである。図２０Ａ～２０Ｂは、結合を促進するために結合競合体を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬競合の使用を示している。図２０Ａは、エピトープまたは標的部位２０２０を含む結合パートナー２０１０と検出可能なプローブ２０４０との接触を示している。結合パートナー２０１０の表面は、非特異的に表面に結合する複数の競合体親和性試薬２０３０と結合され得る。図２０Ｂは、エピトープまたは標的部位２０２０への検出可能なプローブ２０４０の結合によって転移した遊離競合体親和性試薬２０３５を示している。競合体親和性試薬の転移は、結合パートナー２０１０への検出可能なプローブの結合をエネルギー的にまたはエントロピー的に促進し得る。

【０３８０】

競合体種には、親和性試薬、例えば、アプタマー、ペプタマー、設計されたアンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）、抗体、または抗体断片が含まれ得る。競合体種は、検出可能なプローブまたは親和性試薬の成分としてまたは任意の検出可能なプローブまたは親和性試薬から分離した種として提供され得る。図１６Ａ～１６Ｂは、競合体種を含む検出可能なプローブ組成物を示している。図１６Ａは、遊離溶液に競合体種を含む検出可能なプローブ組成物を示している。組成物には、複数の結合した結合成分１６２０（例えば、抗体または抗体断片）を含有する検出可能なプローブ１６１０が含まれる。組成物には、プローブ１６１０から分離しているため、溶液中で遊離している競合体親和性試薬１６３０（例えば、アプタマー）がさらに含まれる。競合体種１６３０は、結合パートナー、エピトープまたは標的部位と自由に会合することができるが、競合体種は、分離可能であり、結合パートナー、エピトープ、または標的部位から解離し得る。図１６Ｂは、検出可能なプローブに結合した競合体成分を含む検出可能なプローブ組成物を示している。検出可能なプローブ１６１０には、複数の結合した結合成分１６２０（例えば、抗体または抗体断片）及び複数の結合した競合体成分１６３０（例えば、アプタマー）が含まれる。結合した競合体成分を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物は、任意の所与の時間で標的に結合されている最も強い結合剤の可能性の正味の低下により、遅いオフ速度で結合した親和性試薬の解離を容易化するために有利であり得る。

【０３８１】

代替的には、競合体種には、検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合するために結合パートナー、エピトープ、または標的部位と競合する種が含まれ得る。例えば、競合体種は、溶液中で遊離している標的配列を含有する短いペプチド配列（例えば、２～１５ア

ミノ酸残基）であり得る。遊離ペプチドは、検出可能なプローブまたは親和性試薬と競合的に結合することができ、それにより結合パートナー、エピトープ、または標的部位との結合相互作用について競合体と類似する様式で検出可能なプローブまたは親和性試薬の見かけのアビディティを変化させ得る。

【０３８２】

競合体種は、検出可能なプローブまたは親和性試薬が結合パートナー、エピトープ、または標的部位と接触させられる場合に存在し得る。競合体種は、検出可能なプローブまたは親和性試薬が結合パートナー、エピトープ、または標的部位と接触する前または後に導入され得る。組成物における競合体種に対する検出可能なプローブまたは親和性試薬の比は、組成物のアビディティ特徴を調整するように調節され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物は、所望のレベルのアビディティを達成するために、結合特徴、例えば、プローブオン速度またはオフ速度を調整するように調節され得る。競合体種は、質量またはモル濃度ベースで、検出可能なプローブまたは親和性試薬に対して少なくとも約１：１０００００００、１：１０００００、１：１００００、１：１０００、１：１００、１：１０、１：５、１：２、１：１、２：１、５：１、１０：１、１００：１、１０００：１、１００００：１、１０００００：１、１００００００：１またはそれを超える比で存在し得る。代替的または付加的に、競合体種は、質量またはモル濃度ベースで、検出可能なプローブまたは親和性試薬に対して多くとも約１００００００：１、１０００００：１、１００００：１、１０００：１、１００：１、１０：１、５：１、２：１、１：１、１：２、１：５、１：１０、１：１００、１：１０００、１：１００００、１：１０００００、１：１００００００またはそれ未満の比で存在し得る。

【０３８３】

検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物における、例えば、競合体成分の形態の競合体種の存在は、検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合または親和性特徴に影響を及ぼし得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物における、例えば、競合体成分の形態の競合体種の存在は、検出可能なプローブまたは親和性試薬のオフ速度、オン速度、解離定数、またはアビディティに影響を及ぼし得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物における、例えば、競合体成分の形態の競合体種の存在は、検出可能なプローブまたは親和性試薬のオフ速度、オン速度、解離定数、またはアビディティを増加させ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物における、例えば、競合体成分の形態の競合体種の存在は、検出可能なプローブまたは親和性試薬のオフ速度、オン速度、解離定数、またはアビディティを低下させ得る。例えば、競合体成分の形態の競合体種の存在は、検出可能なプローブまたは親和性試薬のオフ速度、オン速度、解離定数、またはアビディティを少なくとも約２、５、１０、２５、５０、１００、２５０、５００、１０００、５０００、１００００、５００００、１０００００、５０００００、１００００００、またはそれを超える倍率で増加または低下させ得る。代替的または付加的に、例えば、競合体成分の形態の競合体種の存在は、検出可能なプローブまたは親和性試薬のオフ速度、オン速度、解離定数、またはアビディティを多くとも約１００００００、５０００００、１０００００、５００００、１００００、５０００、１０００、５００、２５０、１００、５０、２５、１０、５、２、またはそれ未満の倍率で増加または低下させ得る。

【０３８４】

検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物には、検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合特徴を変化させるように構成された１つ以上の成分が含まれ得る。成分は、検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物のオン速度、オフ速度、解離定数、及び／またはアビディティを増加させるために検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物に加えられ得る。成分は、検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物のオン速度、オフ速度、解離定数、及び／またはアビディティを低下させるために検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物に加えられ得る。成分は、検出可能なプローブまたは親和性試薬と結合パートナー、エピトープ、または標的部位との間の結合相互作用を化学的に変化させること（例えば、結合成分のコンフォメーションを変化させること、結合成分と結合パートナーとの間

の静電気性相互作用を弱めること）によって検出可能なプローブまたは親和性試薬の親和性またはアビディティに影響を及ぼし得る。成分は、検出可能なプローブまたは親和性試薬との弱い二次結合相互作用を生成することによって検出可能なプローブまたは親和性試薬の親和性またはアビディティに影響を及ぼし得る。

【０３８５】

成分は、検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物と結合パートナー、エピトープ、または標的部位との間の結合相互作用を変化させるために検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物に加えられ得る。加えられる成分は、結合パートナー、エピトープ、または標的部位を変化させること、検出可能なプローブまたは親和性試薬を変化させることによって、または検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物と結合パートナー、エピトープ、または標的部位との間の結合相互作用を変化させることによって結合相互作用を変化させ得る。加えられる成分は、結合相互作用の可能性及び／または強度を増加または低下させる、検出可能なプローブまたは親和性試薬、結合成分、及び／または結合パートナー、エピトープ、または標的部位のコンフォメーション的変化を引き起こし得る。加えられる成分は、例えば、結合相互作用を静電気的にスクリーニングすることまたは競合して結合相互作用を形成することによって、結合相互作用を変化させ得る。

【０３８６】

検出可能なプローブまたは親和性試薬と結合パートナー、エピトープ、または標的部位との間の結合相互作用を変化させるために検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物に変性剤、界面活性剤、またはカオトロピック剤が加えられ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合特徴、例えば、オン速度、オフ速度、解離定数、またはアビディティを変化させるために検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物に変性剤、界面活性剤、またはカオトロピック剤が加えられ得る。変性剤、界面活性剤、またはカオトロピック剤は、結合パートナー、エピトープ、または標的部位からの検出可能なプローブまたは親和性試薬の除去を容易化し得る。変性剤、界面活性剤、またはカオトロピック剤は、結合パートナー、エピトープ、または標的部位からの検出可能なプローブまたは親和性試薬の除去を容易化するためにプローブ結合後に検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物に導入され得る。変性剤、界面活性剤、またはカオトロピック剤の存在下での検出可能なプローブまたは親和性試薬の結合は、結合パートナー、エピトープ、または標的部位に結合する場合に検出可能なプローブまたは親和性試薬のオン速度を減少させ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物における変性剤、界面活性剤、またはカオトロピック剤の濃度は、検出可能なプローブまたは親和性試薬の親和性特徴を調整するように調節され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物における変性剤、界面活性剤、またはカオトロピック剤の濃度は、検出可能なプローブもしくは親和性試薬または検出可能なプローブもしくは親和性試薬の成分（例えば、ＤＮＡ折り紙成分）の不安定化を回避するために制限され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物における変性剤、界面活性剤、またはカオトロピック剤は、結合パートナー、エピトープ、または標的部位からの検出可能なプローブまたは親和性試薬の除去を容易化するために熱と組み合わされ得る。

【０３８７】

検出可能なプローブまたは親和性試薬と結合パートナー、エピトープ、または標的部位との間の結合相互作用を変化させるために検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物に塩、例えば、金属塩が加えられ得る。塩、または塩を含むイオン性種は、検出可能なプローブまたは親和性試薬と結合パートナー、エピトープ、または標的部位との間の結合相互作用の化学を変化させる検出可能なプローブもしくは親和性試薬または結合パートナー、エピトープ、もしくは標的部位との相互作用を形成し得る。塩、または塩を含むイオン性種は、検出可能なプローブまたは親和性試薬と結合パートナー、エピトープ、または標的部位との間の結合相互作用の化学を破壊し得る。塩、または塩を含むイオン性種は、検出可能なプローブまたは親和性試薬と結合パートナー、エピトープ、または標的部位との間の結合相互作用を容易化し得る。いくつかの構成では、塩は、結合パートナー、エピトープ、または標的部位からの検出可能なプローブまたは親和性試薬の除去を容易化するため

に検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物に加えられ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物における塩は、結合パートナー、エピトープ、または標的部位からの検出可能なプローブまたは親和性試薬の除去を容易化するために熱と組み合わされ得る。塩は、検出可能なプローブまたは親和性試薬と結合パートナー、エピトープ、または標的部位との間の結合相互作用を変化させるために（例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬を除去するために）プローブ結合後に検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物に導入され得る。

【０３８８】

検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物には、検出可能なプローブまたは親和性試薬のアビディティ及び／または観察可能性を変化させる結合分子がさらに含まれ得る。結合分子には、検出可能なプローブまたは親和性試薬と可逆的または不可逆的結合相互作用を形成するように構成された分子が含まれ得る。結合分子は、結合パートナー、エピトープ、標的部位、または検出可能なプローブもしくは親和性試薬と弱い結合相互作用を形成して、検出可能なプローブまたは親和性試薬を可能性のある標的の近くで維持し、それにより結合相互作用が生じ得る可能性を増加させ得る。結合分子には、結合相互作用が生じる場合に生成されるシグナルを増加させる追加の標識成分が含まれ得る。例示的な結合分子は、本明細書の他の箇所に記載されている。結合分子は、検出可能なプローブまたは親和性試薬が結合パートナー、エピトープ、または標的部位と接触する前、接触している間、または接触した後に検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物に提供され得る。

【０３８９】

本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物は、所望の場合、好適な包装物質を含むキット形態で提供され得る。一実施形態では、例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物には、例えば、溶液または懸濁液中で提供される、複数の検出可能なプローブまたは親和性試薬が含まれ得る。別の実施形態では、例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物には、例えば、固体、例えば、結晶または凍結乾燥した固体として提供される、複数の検出可能なプローブまたは親和性試薬が含まれ得る。したがって、本開示の方法において有用な試薬または成分の任意の組み合わせ、例えば、特定の方法に関して先に本明細書で示されるものは、本開示によって提供されるキットに含まれ得る。限定されないが、それらの試薬または成分には、緩衝液、塩、安定化剤、保持成分、結合成分、標識成分、及び競合体親和性試薬が含まれ得る。例えば、キットには、界面活性剤及び酸素スカベンジャーを含有する保存緩衝液中で提供される複数の検出可能なプローブまたは親和性試薬が含まれ得る。

【０３９０】

本明細書で使用される場合、語句「包装物質」は、キットの含有物、例えば、検出可能なプローブ、親和性試薬等を収納するために使用される１つ以上の物理的構造を指す。包装物質は、好ましくは無菌の混入物質非含有環境を提供するために、よく知られている方法によって構築され得る。本明細書で用いられる包装物質には、例えば、親和性試薬システムにおいて習慣的に利用されるものが含まれ得る。例示的な包装物質には、限定されないが、検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物等の本開示の方法において有用な成分を固定限度内で保持することが可能なガラス、プラスチック、紙、ホイル等が含まれる。

【０３９１】

包装物質には、検出可能なプローブまたは親和性試薬が特定の方法のために使用され得ることを示すラベルが含まれ得る。例えば、ラベルは、キットが特定の結合パートナー、エピトープ、または標的部位を検出し、それによりポリペプチドアッセイ中に特性化を提供するために有用であることを示し得る。別の例では、ラベルは、キットが治療または診断目的のために有用であることを示し得る。

【０３９２】

包装された試薬または成分の使用のための指示書もまた、典型的には、本開示のキットに含まれる。「使用のための指示書」には、典型的には、試薬もしくは成分濃度または少なくとも１つのアッセイ方法のパラメータ、例えば、混合されるキット成分及びサンプル

の相対量、試薬／サンプル混合物のための維持期間、温度、緩衝液条件等を記載する有体の表現が含まれる。

【０３９３】

キットまたは組成物には、それに結合した結合成分（複数可）の数またはタイプに関して異なる複数の異なる検出可能なプローブ及び／または異なる親和性試薬が含まれ得る。代替的または付加的に、キットまたは組成物には、異なる標識成分にそれぞれ結合した複数の異なる検出可能なプローブ及び／または異なる親和性試薬が含まれ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、結合成分の数またはタイプに関してまたは標識成分の数またはタイプに関して異なるが、それでもなお、実質的に同じタイプの保持成分を有し得る。例えば、複数の異なる検出可能なプローブ及び／または異なる親和性試薬は、核酸折り紙ベースの保持成分を含有し得、折り紙の構造または折り紙における骨格の構造は、異なるプローブ及び／または薬剤のすべてについて同じである。複数の異なる検出可能なプローブ及び／または異なる親和性試薬には、少なくとも約２、３、４、５、１０、２５、５０、１００、２５０、５００、１０００またはそれを超える異なる検出可能なプローブ及び／または異なる親和性試薬が含まれ得る。代替的または付加的に、複数の異なる検出可能なプローブ及び／または異なる親和性試薬には、多くとも約１０００、５００、２５０、１００、５０、２５、１０、５、４、３、２またはそれ未満の検出可能なプローブ及び／または異なる親和性試薬が含まれ得る。

【０３９４】

使用方法

本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬は、結合アッセイを含む広範囲の使用のために利用され得る。通常、検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物の利用は、１）検出可能なプローブまたは親和性試薬を、検出可能なプローブまたは親和性試薬に対する結合パートナーを有する溶液及び／または固体支持体と接触させる工程；２）検出可能なプローブまたは親和性試薬を溶液中または固体支持体上の結合パートナーと接触させる工程；３）溶液及び／または固体支持体から未結合プローブを濯ぐ工程；４）溶液及び／または固体支持体を観察して１つ以上の検出可能なプローブまたは親和性試薬からのシグナルを検出する工程；５）結合パートナーから１つ以上の結合したプローブまたは試薬を除去する工程；６）工程１）～５）の１つ以上を任意に繰り返す工程；及び７）１つ以上のプローブまたは試薬からのシグナルの存在及び／または非存在を使用して、溶液中及び／または固体支持体上の結合パートナーの存在及び／または非存在を予測する工程の１つ以上を伴い得る。

【０３９５】

検出可能なプローブまたは親和性試薬と結合パートナーとの間の結合相互作用を観察する方法は、多様な特性化のいずれかのために利用され得る。いくつかの場合では、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、ポリペプチド特性化アッセイを容易化するために利用され得る。アッセイは、１つ以上のポリペプチドについての１つ以上の特徴（例えば、サイズ、同一性、アイソタイプ等）を決定または予測するように構成され得る。代替的または付加的に、アッセイは、サンプルにおける１つ以上のポリペプチドの量を決定または予測するように構成されたアッセイあり得る。ポリペプチド特性化アッセイまたは定量アッセイは、１つ以上のポリペプチド分子が個々に分解される単一分子検出のために構成され得る。例えば、多重形式では、１つ以上の特徴及び／または量は、ポリペプチドの検出に基づいて複数のポリペプチドの各ポリペプチドについて個々に予測または決定され得る。いくつかの構成では、ポリペプチドアッセイには、複数のポリペプチドにおける１つ以上のエピトープ（例えば、ダイマー、トリマー、またはテトラマーアミノ酸配列；翻訳後修飾等）の存在を決定するためのポリペプチドの単一分子特性化または定量が含まれ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、結合標的に対するそれらの強いアビディティ及びそれらの強いシグナルアウトプットによりポリペプチド特性化アッセイのために有利であり、それにより高い信頼性の結合相互作用データを提供し得る。

【０３９６】

ポリペプチドまたは他の分析物は、親和性試薬または検出可能なプローブに結合される場合に構造化核酸粒子（ＳＮＡＰ）に結合され得る。図５８Ａは、ＳＮＡＰ５８５０に結合したポリペプチド５８４０を示している。ポリペプチド５８４０は、例示的な分析物であり、対象となる他の分析物で置き換えられ得る。ＳＮＡＰ５８５０は、ポリペプチド５８４０のための保持成分として機能し、親和性試薬及び検出可能なプローブとの関連で本明細書で示される保持成分で置き換えられ、または修飾され得る。例えば、ＳＮＡＰ５８５０は、核酸折り紙であり得、または蛍光粒子で置き換えられ得る。ポリペプチド５８４０は、ＳＮＡＰ５８５０に共有結合的または非共有結合的に結合され得る。ポリペプチド５８４０は、ＳＮＡＰベースの保持成分５８１０、１つ以上の標識成分５８２０及び１つ以上の結合成分５８３０を有する検出可能なプローブと接触させられ得る。任意に、ＳＮＡＰ５８１０は、親和性試薬及び検出可能なプローブとの関連で本明細書で示される保持成分で置き換えられ、または修飾され得る。例えば、ＳＮＡＰ５８１０は、核酸折り紙であり得、または蛍光粒子で置き換えられ得る。ポリペプチド５８４０は、１つ以上の結合成分５８３０に対する結合パートナーであるため、複合体が形成される。複合体には、ポリペプチド５８４０に結合したＳＮＡＰ５８５０及び１つ以上の結合成分５８３０（そのうち少なくとも１つは、ポリペプチド５８４０に結合されている）に結合したＳＮＡＰ５８１０が含まれ、ＳＮＡＰ５８１０はまた、少なくとも１つの標識成分５８２０に結合されている。任意に、ＳＮＡＰ５８５０は、固体支持体、例えば、アレイ上の部位に結合され得る。ＳＮＡＰは、親和性試薬または検出可能なプローブの成分を互いに結合させることとの関連で本明細書で示されるものを含むがこれらに限定されない多様な共有結合的または非共有結合的化学のいずれかを使用して固体支持体に結合され得る。

【０３９７】

いくつかの構成では、ポリペプチドアッセイには、検出可能なプローブまたは親和性試薬を複数のポリペプチドと接触させることが含まれ得、その場合、複数のポリペプチドの各ポリペプチドは、独自の光学的に観察可能な空間的位置、例えば、ポリペプチドのアレイにおける部位で固体支持体に結合されている。所与の空間的位置でのシグナルの検出は、検出可能なプローブまたは親和性試薬がその空間的位置でポリペプチドに結合されており、それにより空間的位置でのポリペプチドにおける特定のエピトープまたは標的部位の存在を示唆する。１つ以上のエピトープまたは標的部位の予測または決定された存在または非存在は、所与の空間的位置で結合したポリペプチドについての特徴を予測または決定し得る。その上、サンプルにおける特定のポリペプチドの量は、所与の空間的位置からのシグナルの強度に基づいて及び／または特定のプローブ（またはプローブのシリーズ）が結合したことを示すシグナルを生成するアレイにおける部位の数に基づいて予測または決定され得る。

【０３９８】

多重結合反応が図５８Ｂに示されている。反応は、ポリペプチド分析物のために例示されているが、当該技術分野で知られているまたは本明細書で示される他の分析物で実施され得る。ポリペプチドアレイ５８００には、４つの異なるポリペプチド５８４１～５８４４が含まれる。ポリペプチドの各々は、ＳＮＡＰ５８５１に結合されている。結合は、共有結合的または非共有結合的であり得る。アレイ５８００は、複数の検出可能なプローブと接触させられる。プローブの各々には、少なくとも１つの標識成分及び少なくとも１つの結合成分に結合したＳＮＡＰベースの保持成分５８１１が含まれる。少なくとも１つの標識部位５８２１及び少なくとも１つの結合部位５８３１に結合したＳＮＡＰ５８１１を有する第１のプローブ、少なくとも１つの標識部位５８２２及び少なくとも１つの結合部位５８３２に結合したＳＮＡＰ５８１１を有する第２のプローブ、ならびに少なくとも１つの標識部位５８２３及び少なくとも１つの結合部位５８３３に結合したＳＮＡＰ５８１１を有する第３のプローブを含む３つの異なる検出可能なプローブが示されている。結合反応の生成物は、アレイ５８００上のそれぞれのポリペプチドへの第１のプローブ及び第３のプローブの結合である。ポリペプチド５８４１は、１つ以上の結合成分５８３１に対する結合パートナーであるため、第１の複合体が形成される。第１の複合体には、ポリペ

プチド５８４１に結合したＳＮＡＰ５８５１及び１つ以上の結合成分５８３１（そのうち少なくとも１つは、ポリペプチド５８４１に結合されている）に結合したＳＮＡＰ５８１１が含まれ、ＳＮＡＰ５８１１はまた、少なくとも１つの標識成分５８２１に結合されている。ポリペプチド５８４３は、１つ以上の結合成分５８３３に対する結合パートナーであるため、第２の複合体がアレイ５８００上に形成される。第１の複合体には、ポリペプチド５８４３に結合したＳＮＡＰ５８５１及び１つ以上の結合成分５８３３（そのうち少なくとも１つは、ポリペプチド５８４３に結合されている）に結合したＳＮＡＰ５８１１が含まれ、ＳＮＡＰ５８１１はまた、少なくとも１つの標識成分５８２３に結合されている。この例では、ポリペプチド５８４２及び５８４４は、検出可能なプローブのいずれかとの結合パートナーではないので未結合のままである。また、少なくとも１つの結合成分５８３２及び少なくとも１つの標識成分５８２２に結合したＳＮＡＰ５８１１を含む第３の検出可能なプローブは、アレイ５８００上に結合パートナーを有さず、未結合のままである。第１及び第２の検出可能なプローブは、アレイ上で検出され得、その場合、それらは空間的に分解され、また、それらは、それらの異なる標識タイプに基づいてさらに区別及び同定され得る。したがって、アレイ部位から検出されたシグナルは、各検出可能なプローブ及び各検出可能なプローブと会合した標識タイプについての結合特性の知識に基づいてポリペプチドを同定するために使用され得る。

【０３９９】

図５８Ｂの例では、ポリペプチドは、アレイ５８００上の個々の部位に分離されるが、共通の構造を有するＳＮＡＰに結合されている。例えば、ＳＮＡＰ５８５１は、核酸折り紙であり得、ポリペプチドは、互いに同じ骨格フォールドを有する折り紙に結合され得る。折り紙における１つ以上のステープルのサブセットは、例えば、異なるポリペプチドの結合を提供するために、折り紙間で異なり得る。共通のＳＮＡＰ構造、またはそのための他の保持成分の使用は、アレイ上のポリペプチドの好都合な搭載を提供し得る。例えば、アレイは、アレイへのポリペプチドの結合を達成するためにＳＮＡＰの均一な構造的要素と相互作用する均一な部位を有するように構成され得る。共通の保持成分構造はまた、複数の異なる検出可能なプローブまたは複数の異なる親和性試薬のために使用され得る。図５８Ｂに例示されるように、３つの検出可能なプローブは、ＳＮＡＰ５８１１に結合した標識成分及び結合成分に関して異なる。しかしながら、３つの親和性プローブは、実質的に同じＳＮＡＰ構造を有する。例えば、ＳＮＡＰ５８１１は、３つの検出可能なプローブの各々について同じ骨格フォールドを有する核酸折り紙であり得る。折り紙における１つ以上のステープルのサブセットは、例えば、異なる標識成分または異なる結合成分の結合を提供するために、異なる検出可能なプローブ間で異なり得る。図５８Ｂは、異なる分析物に結合した共通のＳＮＡＰ及び異なる検出可能なプローブに結合した共通のＳＮＡＰで例示されているが、ＳＮＡＰは、代わりに、構造が異なり得ることが理解される。その上、ＳＮＡＰには、ある検出可能なプローブから別の検出可能なプローブまで異なる、またはあるポリペプチドから別のポリペプチドまで異なる配列タグが含まれ得る。タグは、混合物における個々のプローブを同定するためにまたはアレイにおける個々のポリペプチドを同定するために使用され得る。

【０４００】

アレイは、分析物の多重処理のために使用され得、これにより複数の異なるタイプの分析物が並行に操作または検出される。特に有用な分析物には、本明細書で示される親和性試薬に対する結合パートナー、例えば、ポリペプチド、核酸等が含まれるがこれらに限定されない。本明細書で示される方法の１つ以上の工程を使用して異なるタイプの分析物を順次処理することも可能であるが、並行処理は、コスト節約、時間節約及び条件の均一性を提供し得る。アレイには、少なくとも２、１０、１００、１０００、1×10^4、1×10^5、1×10^6、1×10^7、1×10^8、1×10^9、またはそれを超える異なる分析物部位が含まれ得る。代替的または付加的に、アレイには、多くとも1×10^9、1×10^8、1×10^7、1×10^6、1×10^5、1×10^4、１０００、１００、１０、２またはそれ未満の異なる分析物部位が含まれ得る。異なる分析物は、共通の構造を有

する構造化核酸粒子または保持成分を介してその部位に任意に結合され得る。このように、アレイの部位は、互いに実質的に同じ構造を有する構造化核酸粒子または保持成分に結合され得、アレイにおける構造化核酸粒子または保持成分の各々は、異なる分析物に結合され得る。

【０４０１】

アレイは、フローセル壁の内部表面またはフローセルの内部の固体支持体に結合され得る。フローセルまたは固体支持体は、分析的生化学のために使用される多様な物質のいずれかから作製され得る。好適な物質には、ガラス、ポリマー性物質、ケイ素、石英（フューズドシリカ）、ボロフロートガラス、シリカ、シリカベースの物質、炭素、金属、光ファイバーまたは光ファイバーの束、サファイア、またはプラスチック物質が含まれ得る。物質は、特定の使用のために所望の特性に基づいて選択され得る。例えば、放射線の所望の波長に対して透過性の物質は、その波長で放射線を利用する分析的技術のために有用である。逆に、所定の波長の放射線を通過しない物質（例えば、不透明、吸収性または反射性）を選択することが所望であり得る。利用され得る物質の他の特性は、本明細書で示されるもの等の下流プロセスにおいて使用される所定の試薬に対する不活性または反応性、または操作の容易性、または低い製造コストである。

【０４０２】

ポリペプチドまたは他の分析物は、単一分子レベルでの検出を提供するように支持体に結合され得る。例えば、複数の異なるポリペプチドは、支持体上の個々のポリペプチド部位に結合する個々の検出可能なプローブまたは親和性試薬が、近接部位が検出可能なプローブまたは親和性試薬に結合する場合であってもアレイ上のすべての近接部位から区別され得るように固体支持体に結合され得る。このように、１つ以上の異なるポリペプチド（または本明細書で示される検出可能なプローブまたは親和性試薬に対する他の結合パートナー）は、単一分子が固体支持体上のすべての他の分子から分解されるように各々の単一のポリペプチド分子が物理的に単離及び検出される形式で固体支持体に結合され得る。代替的には、本開示の方法は、１つ以上の集合体のために行われ得、集合体は、実質的に同じタイプの分析物の集団、例えば、共通の配列を有する核酸またはポリペプチドの集団である。

【０４０３】

図２２は、ポリペプチドアッセイの構成を示している。複数のポリペプチドは、任意にアンカー基２２３０（例えば、ＳＮＡＰまたは化学的リンカー）によって、固体支持体２２１０に結合される。検出可能なプローブ２２４０は、複数のポリペプチドと接触させられ、検出可能なプローブ２２４０が利用可能な結合標的と結合することを可能とする。接触の後、検出可能なプローブ２２４０は、第１のポリペプチド２２２１及び第４のポリペプチド２２２４に結合されており、第２のポリペプチド２２２２または第３のポリペプチド２２２３には結合されていない。適切な検出システム、例えば、蛍光顕微鏡によって観察される場合、検出可能なシグナルは、第１のポリペプチド２２２１及び第４のポリペプチド２２２４の位置に対応する固体支持体２２１０上の空間的位置で観察され得る。

【０４０４】

ポリペプチドは、天然または合成起源のものであり得る。ポリペプチドは、１つ以上の翻訳後修飾を含有し得る。代替的または付加的に、１つ以上の翻訳後修飾は、ポリペプチドに存在しない場合がある。いくつかの場合では、ポリペプチドは、翻訳後修飾を除去、逆転または変化させるために処置され得る。例えば、本明細書で示されるポリペプチドアッセイは、翻訳後修飾を除去、逆転または変化させる前または後に１つ以上のポリペプチドを検出するために実施され得る。前及び後の結果の比較は、ポリペプチドについての翻訳後修飾の数またはタイプを同定する際に増加した信頼性等の利益を提供し得る。いくつかの場合では、ポリペプチドは、翻訳後修飾を生成するために処置され得る。例えば、本明細書で示されるポリペプチドアッセイは、翻訳後修飾をする前及び後に１つ以上のポリペプチドを検出するために実施され得る。逆に、本明細書で示されるポリペプチドアッセイは、翻訳後修飾を除去する前及び後に１つ以上のポリペプチドを検出するために実施さ

れ得る。前及び後の結果の比較は、ポリペプチドが感受性である翻訳後修飾または合成後修飾の数またはタイプを同定すること等の利益を提供し得る。いくつかの場合では、ポリペプチドは、ポリペプチドの少なくとも一部を除去するようにタンパク分解され得る。例えば、本明細書で示されるポリペプチドアッセイは、タンパク質分解の前及び後に１つ以上のポリペプチドを検出するために実施され得る。前及び後の結果の比較は、ポリペプチドにおけるタンパク質分解部位の位置に対してポリペプチドにおけるエピトープまたは標的部位を見つけ出すこと等の利益を提供し得る。前及び後の結果を比較するさらなる利益は、タンパク質分解に感受性のあるポリペプチドにおける翻訳後修飾の数またはタイプのより容易な同定であり得る。

【０４０５】

翻訳後修飾には、ミリストイル化、パルミトイル化、イソプレニル化、プレニル化、ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化、リポイル化、フラビン部位結合、ヘムＣ結合、ホスホパンテテイニル化、レチニリデンシッフ塩基形成、ジプタミド形成、エタノールアミンホスホグリセロール結合、ヒプシン、ベーターリジン付加、アシル化、アセチル化、脱アセチル化、ホルミル化、アルキル化、メチル化、Ｃ末端アミド化、アルギニル化、ポリグルタミル化、ポリグリシル化、ブチリル化、ガンマーカルボキシル化、グリコシル化、糖化、ポリシアル化、マロニル化、ヒドロキシル化、ヨード化、ヌクレオチド付加、ホスホエートエステル形成、ホスホルアミデート形成、リン酸化、アデニリル化、ウリジリル化、プロピオニル化、ピログルタメート形成、Ｓ－グルタチオン化、Ｓ－ニトロシル化、Ｓ－スルフェニル化、Ｓ－スルフィニル化、Ｓ－スルホニル化、スクシニル化、硫酸化、糖化、カルバミル化、カルボニル化、イソペプチド結合形成、ビオチン化、カルバミル化、酸化、還元、ＰＥＧ化、ＩＳＧ化、ＳＵＭＯ化、ユビキチン化、ネジル化、プピル化、シトルリン化、脱アミド化、エルミニル化、ジスルフィド架橋形成、タンパク質分解切断、イソアスパルテート形成、ラセミ化、及びタンパク質スプライシングが含まれ得る。特に対象となる有用な翻訳後修飾は、部位特異的（すなわち、特定のアミノ酸残基またはアミノ酸配列で生じる）または非部位特異的であり得るタンパク質分解である。翻訳後修飾は、生物学的酵素、化学的薬剤、または物理的操作、例えば、当業者に知られているものを使用してポリペプチドから逆行または除去され得る。ポリペプチドは、生物学的酵素、化学的薬剤、または物理的操作、例えば、当業者に知られているものを使用して翻訳後に修飾され得る。

【０４０６】

特性化されるポリペプチドは、特定のサイズのものであり得る。ポリペプチドは、少なくとも約０．１ダルトン（Ｄａ）、０．５Ｄａ、１Ｄａ、５Ｄａ、１０Ｄａ、５０Ｄａ、１００Ｄａ、２００Ｄａ、３００Ｄａ、４００Ｄａ、５００Ｄａ、６００Ｄａ、７００Ｄａ、８００Ｄａ、９００Ｄａ、１キロダルトン（ｋＤａ）、１．５ｋＤａ、２ｋＤａ、２．５ｋＤａ、３ｋＤａ、３．５ｋＤａ、４ｋＤａ、４．５ｋＤａ、５ｋＤａ、６ｋＤａ、７ｋＤａ、８ｋＤａ、９ｋＤａ、１０ｋＤａ、１５ｋＤａ、２０ｋＤａ、２５ｋＤａ、３０ｋＤａ、４０ｋＤａ、５０ｋＤａ、６０ｋＤａ、７０ｋＤａ、８０ｋＤａ、９０ｋＤａ、１００ｋＤａ、２００ｋＤａ、３００ｋＤａ、４００ｋＤａ、５００ｋＤａ、６００ｋＤａ、７００ｋＤａ、８００ｋＤａ、９００ｋＤａ、１０００ｋＤａ、１２００ｋＤａ、１４００ｋＤａ、１６００ｋＤａ、１８００ｋＤａ、２０００ｋＤａ、２５００ｋＤａ、３０００ｋＤａ、３５００ｋＤａ、４０００ｋＤａ、またはそれを超え得る。代替的または付加的に、ポリペプチドは、多くとも約４０００ｋＤａ、３５００ｋＤａ、３０００ｋＤａ、２５００ｋＤａ、２０００ｋＤａ、１８００ｋＤａ、１６００ｋＤａ、１４００ｋＤａ、１２００ｋＤａ、１０００ｋＤａ、９００ｋＤａ、８００ｋＤａ、７００ｋＤａ、６００ｋＤａ、５００ｋＤａ、４００ｋＤａ、３００ｋＤａ、２００ｋＤａ、１００ｋＤａ、９０ｋＤａ、８０ｋＤａ、７０ｋＤａ、６０ｋＤａ、５０ｋＤａ、４０ｋＤａ、３０ｋＤａ、２５ｋＤａ、２０ｋＤａ、１５ｋＤａ、１０ｋＤａ、９ｋＤａ、８ｋＤａ、７ｋＤａ、６ｋＤａ、５ｋＤａ、４．５ｋＤａ、４ｋＤａ、３．５ｋＤａ、３ｋＤａ、２．５ｋＤａ、２ｋＤａ、１．５ｋＤａ、１ｋＤａ、９００Ｄａ、８００Ｄａ、７００Ｄａ、６

００Ｄａ、５００Ｄａ、４００Ｄａ、３００Ｄａ、２００Ｄａ、１００Ｄａ、５０Ｄａ、１０Ｄａ、５Ｄａ、１Ｄａ、０．５Ｄａ、またはそれ未満であり得る。ポリペプチドは、最小または最大数のアミノ酸残基を含有し得る。ポリペプチドは、少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２５、１５０、２００、２５０、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１５００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、１５０００、２００００、３００００、４００００またはそれを超えるアミノ酸残基を含有し得る。代替的または付加的に、ポリペプチドは、多くとも約４００００、３００００、２００００、１５０００、１００００、９０００、８０００、７０００、６０００、５０００、４０００、３０００、２０００、１５００、１０００、９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２００、２５０、２００、１５０、１２５、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１０、９、８、７、６、５、４、３、またはそれ未満のアミノ酸残基を含有し得る。

【０４０７】

ポリペプチドアッセイは、検出可能なプローブまたは親和性試薬を含有する流体、及び検出可能なプローブまたは親和性試薬を伴う結合相互作用を媒介する流体（例えば、濯ぎ流体、除去試薬）を含む、１つ以上の流体移動操作を伴い得る。流体移動操作は、流体がフローセルまたはチップ等の流体デバイスの中にまたは外に移動させられる場合に行われ得る。ポリペプチド特性化アッセイは、固体支持体に結合した複数のポリペプチドがすべての時間で流体媒体と接触させられることを必要とし得る。流体移動操作は、すべての時間で複数のポリペプチドを含む固体支持体と接触した流体の存在を確保するためにフローセルから第１の流体媒体を転移させるために第２の流体媒体を利用し得る。

【０４０８】

サンプルは、ポリペプチド検出システムまたは方法に提供され得る。サンプルは、例えば、複数のポリペプチドまたは他の分析物を含む画分として提供され得る。サンプルは、複数のポリペプチドコンジュゲートまたは他の分析物コンジュゲートを含む画分として提供され得る。分析物コンジュゲートには、リンカー部位、例えば、構造化核酸粒子、ポリマー、またはタンパク質部位を介して直接的に固体支持体に結合した分析物（例えば、ポリペプチド分析物）が含まれ得る。サンプルは、液体媒体（例えば、水性のｐＨ緩衝媒体）において検出システムまたは方法に提供され得る。サンプルは、固体（例えば、凍結乾燥した、沈殿した、または結晶化したサンプル）として検出システムまたは方法に提供され得る。固体は、検出システムまたは方法に加えられる前、間または後に液体媒体に溶解または懸濁され得る。サンプルは、検出システムに提供された後にシステムにおいて保存され得る。

【０４０９】

ポリペプチドまたは他の分析物を含むサンプルは、流体デバイスにおいて固体支持体に結合され得る。サンプルを含む流体は、流体工学デバイス内の固体支持体を含む、フローセルまたはウェル等の検出チャンバーに流体工学システムを介して圧送または流動させられ得る。サンプルを含む流体は、分析物を固体支持体に結合させるために十分な時間、固体支持体に接触させられ得る。任意に分析物は、固体支持体への分析物の結合を媒介する構造化核酸粒子等の物質にコンジュゲートされ得る。いくつかの場合では、追加の流体は、固体支持体への分析物の結合を容易化するためにサンプル流体と混合され得る。サンプルがポリペプチドを含む場合、固体支持体は最初に、固体支持体の表面上にポリペプチド連結基を沈着させるために十分な時間、ポリペプチド連結基（例えば、構造化核酸粒子、ポリマー、タンパク質）を含む流体と接触させられ得る。固体支持体にポリペプチド連結基が沈着した後、サンプルを含む流体媒体は、流体デバイスにおける固体支持体を含有する検出チャンバーに圧送または流動され得る。ポリペプチドとポリペプチド連結基との間の結合反応は、ポリペプチドを連結基に結合させるために十分な時間、行うことが可能であり得る。ポリペプチド結合反応を容易化するために流体デバイスに１つ以上の試薬、例

えば、反応物及び／または触媒が加えられ得る。いくつかの場合では、ポリペプチド及びポリペプチド連結基は、自発的結合反応、例えば、「クリック」反応を介して反応するように構成され得る。いくつかの場合では、ポリペプチドは、例えば、ポリペプチド上の官能基と固体支持体上の官能基との間の結合によって固体支持体に直接的に結合され得る。結合反応後、固体支持体には、固体支持体に結合した１つ以上のポリペプチドが含まれる。

【０４１０】

分析物（例えば、ポリペプチド）が、例えば、流体デバイス内の固体支持体に結合した後、流体デバイスの検出チャンバーは、１回以上濯がれ得る。濯ぎプロセスは、流体デバイスに一緒にまたは連続して圧送または流動される１つ以上の洗浄または濯ぎ試薬を利用し得る。流体デバイスに提供される濯ぎ流体の体積は、固体支持体を含む検出チャンバーの総体積を超え得る。濯ぎ工程は、いくつかまたはすべての未結合のポリペプチド、ポリペプチドコンジュゲート、または他の試薬を除去し得る。流体デバイスへの濯ぎ流体の流速は、固体支持体からの結合した分析物の除去を防止するために制限され得る。

【０４１１】

任意に、結合した分析物（例えば、コンジュゲートされたポリペプチド）は、分析物の構造を変化させる１つ以上のプロセスに供され得る。例えば、ポリペプチド分析物は、例えば、流体デバイスへの変性流体の添加によって、部分的にまたは十分に変性され得る。変性流体は、ポリペプチドの十分な変性を促進するために十分な時間、固体支持体に接触させられ得、またはポリペプチドの部分的変性を引き起こすために固体支持体に簡潔に接触させられ得る。ポリペプチドはまた、固体支持体への改変試薬、例えば、酵素（リガーゼ、キナーゼ、グリコシラーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ等）、酸化剤、または還元剤の適用によって変化させられ得る。流体デバイスは、構造を変化させる試薬の添加の後に濯ぎプロセスを受け得、それにより流体デバイスから残留試薬を除去する。いくつかの場合では、固体支持体は、親和性試薬が流体デバイスに導入されるまで変化剤（例えば、変性剤）と接触したまま保持され得る。いくつかの場合では、ポリペプチドは、構造を変化させるプロセスの後に部分的にまたは十分に再フォールディングされ得る。

【０４１２】

親和性試薬は、例えば、流体デバイスにおける複数のポリペプチド（例えば、ポリペプチドのアレイ）または他の分析を含む固体支持体と接触させられ得る。いくつかの構成では、親和性試薬は、検出可能なプローブまたは親和性試薬として提供され得る。親和性試薬、例えば、検出可能なプローブは、流体デバイスに圧送または流動させられる液体媒体中で提供され得る。流体媒体には、単一種の親和性試薬または検出可能なプローブが含まれ得、または異なる種の親和性試薬または検出可能なプローブの混合物が含まれ得る。例えば、流体媒体には、異なるエピトープ結合特異性を有する少なくとも２つの検出可能なプローブまたは親和性試薬が含まれ得る。または、流体媒体には、異なるタイプの検出可能なプローブまたは親和性試薬、例えば、１つのアプタマープローブ及び１つの抗体プローブである少なくとも２つの検出可能なプローブまたは親和性試薬が含まれ得る。親和性試薬または検出可能なプローブは、少なくとも１つの分析物に存在するエピトープまたは標的部位（例えば、ポリペプチドにおけるアミノ酸配列エピトープ）への親和性試薬または検出可能なプローブの結合を促進するために十分な時間、流体デバイスにおいて固体支持体に接触させられ得る。

【０４１３】

結合アッセイにおいて利用され得る親和性試薬または結合成分は、それらの結合特異性の特質によって区別され得る。特に、親和性試薬は、確率的様式で特性化されたエピトープ結合特異性を有し得る。二元様式（例えば、親和性試薬Ａは、エピトープＸに結合し、エピトープＹに結合しない）で特性化されるよりも、本開示の親和性試薬は、複数の結合確率によって特性化され得る。例えば、８０００種の可能性のあるトリマーアミノ酸配列（２０ｘ２０ｘ２０）にわたって、親和性試薬についてのゼロではない結合確率が、８０００種の配列のいくつかまたはすべてについて知られており、測定され、または推定され

る場合がある。いくつかの場合では、親和性試薬は、第１のエピトープに対する高い知られている、測定された、または推定された結合確率（例えば、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、９９．９％、９９．９９％、９９．９９９％超またはそれよりも高い結合確率）、及び第２のエピトープに対する低い知られている、測定された、または推定された結合確率（例えば、１％、０．１％、０．０１％、０．００１％、０．０００１％、０．００００１％、０．０００００１％未満またはそれよりも低い結合確率）を有する場合、本開示にとって有用であり得る。いくつかの場合では、親和性試薬には、エピトープのファミリーに対する高い知られている、測定された、または推定された結合確率（例えば、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、９９．９％、９９．９９％、９９．９９９％超またはそれよりも高い結合確率）、及び他のエピトープに対する低い知られている、測定された、または推定された結合確率（例えば、１％、０．１％、０．０１％、０．００１％、０．０００１％、０．００００１％、０．０００００１％未満またはそれよりも低い結合確率）が含まれ得る。エピトープのファミリーには、アミノ酸配列（例えば、アミノ酸配列ＡＸＡ（Ａは、アラニンであり、Ｘは、任意のアミノ酸である）；アミノ酸配列αＡＡＡβ（α及びβは、独立して、任意の可能性のあるアミノ酸臨接配列である））によって関連付けられたエピトープが含まれ得、または化学的特性（例えば、非極性、極性、正荷電、負荷電、翻訳後修飾等）によって関連付けられ得る。

【０４１４】

親和性試薬、例えば、検出可能なプローブが流体デバイスにおいて分析物（例えば、ポリペプチド分析物）に結合するために十分な時間与えられた後、デバイスの検出チャンバーは、任意の未結合親和性試薬を除去するために１回以上の洗浄または濯ぎを受け得る。ポリペプチド特性化アッセイは、分析物－親和性試薬相互作用が破壊される可能性を最小化するために親和性試薬結合の後に単一の濯ぎ工程のみを利用し得る。親和性試薬濯ぎ流体は、物理的測定を実施するように構成されたその媒体、例えば、光学的画像化緩衝液による濯ぎプロセスの後に流体デバイスから転移され得る。

【０４１５】

分析物：親和性試薬または分析物：プローブ相互作用は、親和性試薬または検出可能なプローブが固体支持体に結合した複数の分析物と接触した後に測定され得る。検出可能なプローブの標識成分の検出等の物理的測定が静止流体条件下で行われ得る。流体は、すべての入口及び出口ポートを隔離することによって、例えば、バルブを閉じることによって、流体中で静的のまま保持され得る。流体は、１つ、いくつかまたはすべての独自の光学的に観察可能な空間的位置の画像化を可能とするために十分な時間、流体デバイスにおいて保持され得る。

【０４１６】

分析物：親和性試薬または分析物：プローブ相互作用の結合及び／または物理的測定が行われた後、結合した親和性試薬または検出可能なプローブは、破壊媒体を流体デバイスに添加することによって分析物から剥ぎ取られ得る。破壊媒体には、分析物：親和性試薬または分析物：プローブ相互作用を破壊する可能性が高い変性剤、カオトロピック剤、または他の化学的実体が含まれ得る。破壊媒体は、静止または流動条件下で分析物と接触させられ得る。破壊媒体が分析物と接触した後、流体デバイスは、流体デバイスから任意の未結合親和性試薬または未結合検出可能なプローブを除去するために濯ぎ媒体で１回以上濯がれ、または洗浄され得る。

【０４１７】

いくつかの場合では、分析物（例えば、ポリペプチド分析物）は、結合測定中または後に固体支持体の表面から除去され得る。例えば、複数のポリペプチドは、どのポリペプチドがグリコシル化されているのかを決定するために特性化され、続いてすべての非グリコシル化ポリペプチドの固体支持体から放出され得る。いくつかの場合では、すべての分析物は、特性化アッセイが完了して流体デバイスの再使用が可能となった後に固体支持体から放出され得る。分析物または分析物－コンジュゲートは、剥ぎ取り流体の添加によって

固体支持体から放出され得る。剥ぎ取り流体は、固体支持体からの分析物の転移を引き起こすように、特性化アッセイ中に利用される他の濯ぎ媒体よりもストリンジェントな洗浄を提供し得る。固体支持体からの分析物の転移はまた、例えば、分析物と固体支持体との間の光活性化性リンカーを切断することによって、物理的状態、例えば、熱または光を利用し得る。

【０４１８】

固体支持体からの分析物の転移中または後に、濯ぎ媒体は、転移した分析物を除去するために流体デバイスを流動し得る。固体支持体はその後、表面からの分析物の転移を決定または確認するために物理的測定方法によって観察され得る。

【０４１９】

上述した特異性にかかわらず、いくつかの場合では、そのタンパク質に結合するまたは結合しない異なるプローブの観察のシリーズに基づいて特定のポリペプチド分析物を同定し得る。そのようなシリーズは、所与のシリーズが所与のタンパク質またはポリペプチドを同定する確率を評価するために確率的モデリングを利用するソフトウエアアルゴリズムを使用して評価され得る。多重化構成では、複数の異なるポリペプチドは、結合及び非結合のパターンについて観察され得る。例えば、タンパク質は、アレイにおいて提示され得、アレイは、個々に分解可能な部位から構成され、各部位は、そのポリペプチドのうちの１つを有する。観察のシリーズは、異なるプローブが結合するか、または結合しないかに関して各部位について行われ得る。各部位でのポリペプチドの同一性は、各部位での観察のシリーズから決定され得る。各部位での観察のシリーズのための全体的パターンは、アレイにわたって複数のポリペプチドを同定するために有用であり得る。タンパク質を同定するために有用なソフトウエアアルゴリズム、方法及び組成物の例は、例えば、公開された国際特許出願番号ＷＯ２０１９／１３３８９２、米国特許番号１０，４７３，６５４、または米国特許出願公開番号２０２０／０２８６５８４Ａ１（これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０４２０】

いくつかの場合では、ポリペプチドの検出、同定または特性化は、本明細書で示される親和性試薬を利用し得る。本開示の親和性試薬は、サンプルにおける複数のポリペプチドと相互作用する（例えば、結合する）可能性を有する広域的なまたは広いスペクトルの親和性試薬であり得る。いくつかの場合では、親和性試薬は、サンプルにおける２つ以上の独自の構造的に同様ではないタンパク質と相互作用する可能性を有し得る。例えば、親和性試薬は、他の同様ではないタンパク質内の構造的類似性の領域に基づいて特定の膜タンパク質及び特定の細胞質性タンパク質とほぼ同等の確率で結合し得る。いくつかの場合では、結合親和性試薬は、配列背景（例えば、エピトープからのアミノ酸配列上流鎖及び／または下流鎖）にかかわらず、特定のアミノ酸エピトープまたはエピトープのファミリーに結合する可能性を保有し得る。

【０４２１】

本開示の親和性試薬は、それが同定された、決定された、または評価された確率ベースの結合プロファイルを有するように特性化され得る。親和性試薬は、約５０％を超える（例えば、少なくとも約５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、９９．９％、９９．９９％、９９．９９９％または約９９．９９９％を超える）同定された、決定された、または評価された結合確率で第１のポリペプチドに結合し、約５０％未満（例えば、多くとも約５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％、１％、０．１％、０．０１％、０．００１％または約０．００１％未満）の同定された、決定された、または評価された結合確率で第２の構造的に非同一のポリペプチドに結合する特性を有し得る。特定の場合では、第１及び第２のポリペプチドへの親和性試薬の観察された結合確率の相違は、第１または第２のポリペプチドのいずれかにおける特定のエピトープまたはエピトープのファミリーの存在、非存在、または利用不可能性に起因し得る。確率的親和性試薬結合プロファイルは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ測定またはｉｎ　ｓｉｌｉｃｏ予測によって決定または同定され得る。

【０４２２】
代替的な及び追加の実施形態及び例
当業者は、例えば、それらの調整可能なアビディティ及び観察可能性特徴を含む、本開示の検出可能なプローブ及び親和性試薬の有用性を容易に認識する。本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬組成物は、マイクロスケール及び単一分子システム及び背景において高分解能の空間的特性化を提供するために有用であり得る。記載される検出可能なプローブまたは親和性試薬はまた、生物学的背景、例えば、診断的及び治療的用途のための有用な特徴を提供し得る。
【０４２３】
本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬は、細胞及び組織構造の解明等の目的のために免疫組織化学を容易化し得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、特定の細胞成分（例えば、表面バイオマーカー、多糖、構造タンパク質、細胞小器官タンパク質等）に対する高い特異性で複数の結合成分に結合され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、細胞（例えば、微生物）または組織サンプル（例えば、組織切片、凍結された組織サンプル、ホルマリン固定パラフィン包埋サンプル）と直接的に接触させられ、検出可能なプローブまたは親和性試薬と細胞または組織関連標的との間の結合相互作用を可能とするために十分な時間インキュベートされて、処置された細胞または組織サンプルを形成し得る。処置された細胞または組織サンプルは、任意の好適な方法（プローブ依存性、例えば、蛍光顕微鏡検査、シンチレーションカウント等）によって直接的に観察され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、検出可能なプローブまたは親和性試薬の高い結合アビディティ及び高い観察可能性のため、免疫組織化学用途のために有利であり得る。結合データの分析は、細胞及び／または組織サンプルにおけるバイオマーカーまたは生体分子量及び分布に対する高分解能の空間的データを提供し得る。
【０４２４】
検出可能なプローブまたは親和性試薬は、プルダウンまたは捕捉試薬として利用され得る。高い結合アビディティは、種の異種混合物からの標的種の捕捉及び保持を容易化し得る。親和性試薬は、溶液中で遊離している場合があり、または結合パートナーへの結合中または後に固体支持体（例えば、ビーズ、チップまたはクロマトグラフィー樹脂）に結合され得る。親和性試薬と結合パートナーを含み得る異種混合物との接触は、混合物の少なくとも１つの他の成分からの結合パートナーの分離を可能とし得る。例えば、固体支持体に結合した親和性試薬は、結合パートナーを親和性試薬を介して固体支持体に結合させることが可能となるようにサンプルと接触させられ得、固体支持体は、サンプルから分離され得、固体支持体は、固体支持体から残留サンプル成分を除去するために任意に洗浄され得る。別の例では、親和性試薬は、結合パートナーを親和性試薬に結合させることが可能となるようにサンプルと接触させられ得、得られた親和性試薬－結合パートナー複合体は、固体支持体に結合され得、固体支持体は、サンプルから分離され得、固体支持体は、固体支持体から残留サンプルを除去するために任意に洗浄され得る。いずれの例でも、その後の親和性試薬の収集及び単離または結合パートナーの放出は、サンプル（例えば、異種混合物）からの結合パートナーの分離をもたらし得る。任意に、上記方法によって捕捉された１つ以上の結合パートナーは次いで、本明細書の他の箇所に示される検出アッセイにおいて検出され得る。例えば、異なるポリペプチドのサブセットは、サンプルからの他のポリペプチドが除去されるようにサンプルから捕捉され得、次いでポリペプチドの副画分は、本明細書で示されるポリペプチドアッセイを使用して定量または特性化され得る。
【０４２５】
検出可能なプローブまたは親和性試薬は、分離システム、例えば、アフィニティークロマトグラフィーカラム内の成分として利用され得る。アフィニティークロマトグラフィーシステムは、多孔質マトリックスまたは樹脂内の１つ以上の結合パートナー、エピトープ、または標的部位に対する特定の親和性で複数の検出可能なプローブまたは親和性試薬を結合させるように製剤化され得る。ポリペプチドを例示的な分析物として挙げると、ポリペプチドを含む混合物（例えば、細胞ライセート、合成タンパク質またはペプチドのサン

プル、可能性のある生物学的混入物質を含有する非生物学的サンプル等）は、標的化ポリペプチド（例えば、結合パートナー、エピトープ、または標的部位を含むもの）と非標的化ポリペプチドとの間の分離に影響を及ぼすための検出可能なプローブまたは親和性試薬を含むカラムに適用され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬アフィニティークロマトグラフィーシステムには、検出可能なプローブまたは親和性試薬を樹脂またはマトリックスに永続的にまたは不可逆的にコンジュゲートする樹脂またはマトリックスが含まれ、それによりシステムの再使用を可能とし得る。捕捉されたポリペプチドは、混合物の非標的化画分がカラムを通過して出た後にカラムから溶出され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬アフィニティークロマトグラフィーシステムには、検出可能なプローブまたは親和性試薬を樹脂またはマトリックスに可逆的に結合させる樹脂またはマトリックスが含まれ、それによりシステムからの捕捉された標的を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬の放出を可能とし得る。いくつかの場合では、アフィニティークロマトグラフィーシステムには、プローブがシステムから溶出するときに検出可能なプローブまたは親和性試薬からのシグナルの検出を可能とする検出システム（例えば、蛍光測定、ＩＲ、ＵＶ）が含まれ得る。検出システムは、樹脂もしくはマトリックスからの検出可能なプローブまたは親和性試薬のバックグラウンドまたは意図されていない放出の測定、及びマトリックスまたは樹脂からの検出可能なプローブまたは親和性試薬の意図された放出のモニタリングを可能とし得る。混合物からの標的ポリペプチドの捕捉の後、ポリペプチドは、検出可能なプローブまたは親和性試薬の放出によってシステムから溶出され得る。いくつかの場合では、放出された検出可能なプローブ－ポリペプチド複合体（または親和性試薬－ポリペプチド複合体）は収集され、次いでポリペプチドアッセイ、例えば、ポリペプチド特性化アッセイまたは結合リガンドアッセイのための固体支持体上に沈着され得る。

【０４２６】

図１７Ａ～１７Ｃは、捕捉剤として親和性試薬を利用するためのスキームを示している。図１７Ａに示されているように、親和性試薬が捕捉ハンドル１７２０及び標的結合パートナー１７３０に対する高い結合特異性を有する複数の結合成分を含む親和性試薬１７１０が提供される。捕捉ハンドルには、任意の好適なハンドル、例えば、捕捉タグ（例えば、ビオチン）、核酸、または官能基（例えば、クリック官能基）が含まれ得る。親和性試薬１７１０は、標的結合パートナー１７３０及び複数の非標的種１７３５を含む異種混合物と接触させられ、それにより標的結合パートナー１７３０への親和性試薬１７１０の結合を容易化し得る。任意に、捕捉ハンドル１７２０と結合するように構成された捕捉部位１７４０を含む固体支持体１７５０が存在し得る。捕捉部位は、固体支持体、例えば、パターン化アレイまたはランダムアレイ上で生成され得る。図１７Ｂに示されているように、異種混合物は、親和性試薬１７１０－標的結合パートナー１７３０複合体から分離される。固体支持体１７５０が存在する場合、親和性試薬１７１０及び標的結合パートナー１７３０は、捕捉部位１７４０で捕捉ハンドル１７２０の結合によって生成されたアンカー点１７４５で固体支持体に結合され得る。固体支持体１７５０上の親和性試薬１７１０及び標的結合パートナー１７３０の沈着は、捕捉された標的結合パートナー（例えば、標的ポリペプチド）のランダムまたはパターン化アレイを生成し得る。代替的には、親和性試薬１７１０－標的結合パートナー１７３０複合体は、分離方法、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、重力沈降、濾過、磁性捕捉（磁性または常磁性固体支持体のもの）または遠心分離によって遊離溶液から分離され得る。

【０４２７】

図１７Ｃは、任意の最終工程を示している。捕捉された標的結合パートナー１７３０は、アッセイ試薬として検出可能なプローブ１７６０を利用する特性化または定量アッセイに供され得る。１つ以上の検出可能なプローブ１７６０は、標的結合パートナー１７３０と検出可能なプローブ１７６０との間の結合相互作用の存在または非存在を特性化するために、捕捉された標的結合パートナー１７６０と接触させられ得る。検出可能なプローブ１７６０からの検出可能なシグナルの存在または非存在の観察は、結合パートナー、エピトープ、または標的部位が固体支持体１７５０上の観察された位置に存在する確率を示し

得る。

【０４２８】

検出可能なプローブまたは親和性試薬は、共結合アッセイのために利用され得る。共結合アッセイは、複数の親和性試薬及び／または検出可能なプローブが結合パートナー、エピトープ、または標的部位と同時に接触させられて、結合標的における２つ以上の特徴（例えば、エピトープ）の存在を同時に決定する任意のアッセイを指し得る。共結合アッセイは、例えば、ポリペプチドにおける２つの区別できるエピトープの同時存在を決定し、それによりポリペプチド同一性の高信頼性予測をもたらすために利用され得る。

【０４２９】

検出可能なプローブまたは親和性試薬は、２つ以上の独自の種の検出可能なプローブまたは親和性試薬を組み合わせることによって共結合アッセイのために製剤化され得、各々は、独自の検出シグネチャーまたはフィンガープリントによって区別される（例えば、第１のプローブはＡｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８を使用し、第２のプローブはＡｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７蛍光色素を使用する）。空間的位置での独自のシグネチャーまたはフィンガープリントの同時検出（またはその欠如）は、１つ以上の検出可能なプローブまたは親和性試薬が空間的位置で結合パートナー、エピトープ、または標的部位を結合させたかどうかの証拠を提供し得る。

【０４３０】

代替的には、検出可能なプローブまたは親和性試薬を利用する共結合アッセイは、核酸バーコードを含む検出可能なプローブまたは親和性試薬を用いて実施され得る。図１８Ａ～１８Ｃは、バーコード検出シグナルを利用する共結合アッセイを実施するためのスキームを示している。図１８Ａは、第１の検出可能なプローブ１８１０及び第２の検出可能なプローブ１８４０と接触した結合パートナー１８９０を示している。第１の検出可能なプローブ１８１０は、第１のエピトープまたは標的部位１８７０と結合するように構成され、バーコード配列１８３８及び末端プライミング配列１８３０を有する第１のリンカー１８２０を含む。第２の検出可能なプローブ１８４０は、第２のエピトープまたは標的部位１８８０と結合するように構成され、末端相補的プライミング配列１８６０を有する第２のリンカー１８５０を含む。結合相互作用が第１の検出可能なプローブ１８１０と第１のエピトープまたは標的部位１８７０との間に生じ、結合相互作用が第２の検出可能なプローブ１８４０と第２のエピトープまたは標的部位１８８０との間に生じる場合、末端プライミング配列１８３０及び相補的プライミング配列１８６０は、核酸塩基対合によってハイブリダイズするように十分に近接している場合がある。図１８Ｂに示されているように、接触したポリメラーゼ酵素１８６５は、プライミング配列でハイブリダイズした核酸に結合し得、伸長反応が行われることを可能とし得る。図１８Ｃに示されているように、伸長反応後、第２の検出可能なプローブ１８４０は、相補的バーコード配列１８６８が相補的プライミング配列１８６０に付加された後に結合パートナー１８９０から解離され得る。次の検出可能なプローブバーコードの分析は、転写されたバーコードを検出し、それにより２つの検出可能なプローブが結合パートナー１８９０を同時に結合させたことを示す。

【０４３１】

本開示の検出可能なプローブまたは親和性試薬は、医学的診断目的、例えば、診断アッセイのために有用であり得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏシステムの両方において適用可能であり得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、一般的なｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイ、例えば、ウエスタンブロット及びＥＬＩＳＡに適応され得、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、そのようなアッセイにおいて通常使用される抗体の代わりになる。検出可能なプローブまたは親和性試薬はまた、流体または他の生物学的サンプルからタンパク質または他のバイオマーカーを見つけ出すための捕捉またはプルダウン試薬として利用され得る。例えば、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、血液媒介性バイオマーカーを単離するために血液または血漿と接触させられ得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、ｉｎ　ｖｉｖｏアッセイ、

例えば、ＰＥＴスキャンのために利用され得る。いくつかの構成では、ｉｎ　ｖｉｖｏ検出可能なプローブまたは親和性試薬は、検出可能なプローブまたは親和性試薬を放射性トレーサーとして利用可能とするために放射性標識（例えば、^{15}Ｏ、^{18}Ｆ、^{68}Ｇａ、^{89}Ｚｒ、^{82}Ｒｂ）に結合され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、検出可能なプローブまたは親和性試薬が高いアビディティを有するように構成されたバイオマーカーを提示する組織の観察のための高分解能の高シグナルデータを提供し得る。同様に、検出可能なプローブまたは親和性試薬は、医学的手順のためのリアルタイム予測法または診断法として適用され得る。例えば、腫瘍表面バイオマーカーに対する高いアビディティを有する検出可能なプローブまたは親和性試薬は、リアルタイムで放射線または外科的処置をモニタリングするために利用され得る。表面バイオマーカーの存在に関する高分解能蛍光データは、切除縁からのがんマーカーのクリアランス及び放射線または外科的処置の進行に対するフィードバックを執刀医に提供し得る（蛍光消失は、残留腫瘍組織の破壊と相関するであろう）。

【０４３２】

親和性試薬または検出可能なプローブは、医学的用途のための治療剤として利用され得る。高いアビディティの親和性試薬またはプローブは、ｉｎ　ｖｉｖｏシグナル伝達及び／または結合プロセスの論理的破壊剤または促進剤を構成し得る。親和性試薬または検出可能なプローブは、ｉｎ　ｖｉｖｏシグナル伝達または結合システムとの相互作用を促進するために、複数の結合リガンド（例えば、ホルモン、サイトカイン等）または結合標的（例えば、表面受容体）に結合され得る。高いアビディティの親和性試薬または検出可能なプローブは、シグナル伝達または結合受容体システムを部分的にまたは十分にブロックするために十分な量でｉｎ　ｖｉｖｏシステムに提供され、それにより細胞反応を減少または増加させ得る。高いアビディティの親和性試薬または検出可能なプローブは、１つ以上のシグナル伝達または結合リガンドを部分的にまたは十分に捕捉するために十分な量でｉｎ　ｖｉｖｏシステムに提供され、それにより生物学的反応を減少または増加させ得る。高いアビディティの親和性試薬または検出可能なプローブは、抗微生物または抗ウイルス組成物として有用であり得る。例えば、親和性試薬または検出可能なプローブは、微生物またはウイルスによって利用される受容体システムを結合させてその増殖サイクルを開始させるように構成され得る。または、親和性試薬または検出可能なプローブは、微生物またはウイルスを（例えば、ウイルススパイクタンパク質によって）結合させるように構成され得、それにより微生物またはウイルスが細胞標的と結合する能力を阻害する。

【０４３３】

代替的結合成分を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬は、治療法、診断法、または薬物発見のために有用であり得る。複数の結合した親和性試薬キメラを含む検出可能なプローブまたは親和性試薬は、治療法または薬物発見目的のために有用であり得る。親和性試薬キメラには、二次分子、例えば、小分子、核酸、ペプチド、またはタンパク質にカップリングした親和性試薬を含む任意の複合体が含まれ得る。キメラには、特定の生物学的機能を有する二次分子、例えば、アンチセンス核酸、エクソン、イントロン、転写リプレッサー、転写プロモーター、受容体結合リガンド、酵素結合リガンド、酵素基質等が含まれ得る。親和性試薬キメラには、アプタマー－ｓｉＲＮＡキメラ、抗体－ｓｉＲＮＡキメラ、アプタマー－リガンドキメラ、または抗体－リガンドキメラが含まれ得る。親和性試薬キメラを含む検出可能なプローブまたは親和性試薬は、例えば、標的分子にアンチセンスＲＮＡを送達するために標的分子を結合させる、二次分子に対する標的を見つけ出すために利用され得る。いくつかの構成では、検出可能なプローブまたは親和性試薬には、プローブにカップリングした複数の親和性試薬、及び検出可能なプローブまたは親和性試薬にカップリングした追加の複数の二次分子が含まれ得る。

【０４３４】

検出可能なプローブまたは親和性試薬は、薬物送達プラットフォームとして利用され得る。本明細書で提供される検出可能なプローブまたは親和性試薬の増加した結合アビディティは、膜受容体または細胞取り込みのための他の標的可能なシステムへの高い程度の結

合を可能とするであろう。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、薬物送達製剤、例えば、コロイド状粒子またはコーティングされた薬学的製剤と会合され得る。図３８Ａ～３８Ｄは、細胞薬物送達のための検出可能なプローブまたは親和性試薬の使用を示している。図３８Ａは、疎水性表面修飾基３８１０を含む検出可能なプローブまたは親和性試薬と薬物製剤３８３０を含むコロイド状薬物粒子３８２０との組み合わせを示している。図３８Ｂに示されているように、コロイド状粒子３８２０と検出可能なプローブまたは親和性試薬３８１０の疎水性修飾基との間の疎水性相互作用は、標的化薬物送達複合体を形成する。図３８Ｃは、膜関連タンパク質３８４５と標的化薬物送達複合体との間の結合相互作用による、細胞３８４０の細胞膜３８４２内に埋め込まれた膜関連タンパク質３８４５（例えば、細胞受容体）と標的化薬物送達複合体との間の相互作用を示している。図３８Ｄは、標的化薬物送達複合体が標的化膜関連タンパク質３８４５と相互作用した後に細胞３８４０内に薬物製剤３８３０を取り込み、それにより薬物製剤３８３０を細胞３８４０内に放出することを示している。検出可能なプローブまたは親和性試薬３８１０は、コロイド状粒子３８２０の取り込み中に細胞内に放出または吸収され得る。

【０４３５】

検出可能なプローブまたは親和性試薬は、非生物学的物質を特性化するために有用であり得る。高いアビディティの試薬またはプローブは、非生物学的標的（例えば、ナノ粒子、ポリマー構造等）と結合するように構成され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、非生物学的物質における構造の高分解能画像化を可能とし得る。例えば、所定のナノ粒子構造に対するアビディティを有する検出可能なプローブまたは親和性試薬は、複合体触媒物質の構造、分解、及び被毒プロセスを研究するために利用され得る。同様に、所定の帯電表面活性部位に対するアビディティを有する検出可能なプローブまたは親和性試薬は、物質表面上の反応性部位の分布及び利用可能性に対する高分解能データを提供するために使用され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、ポリマーシステム、例えば、合成及び天然テキスタイルにおけるマイクロスケールの分解及び／または損傷を標的とし、見つけ出すために利用され得る。高いアビディティのプローブによって提供される分解能は、多様な物質において通常の光学的検査プロセスには明らかではない特徴の同定を可能とし得る。

【０４３６】

検出可能なプローブまたは親和性試薬は、追加のポリペプチド特性化方法に適用され得る。検出可能なプローブまたは親和性試薬は、単一分子検出エドマン分解技術を可能とするように構成され得る。通常、エドマン分解は、各ペプチドからの単一のアミノ酸残基の段階的除去及び検出によって複数のペプチドについての配列リードを生成し得る。エドマン分解に対する単一分子アプローチは、末端アミノ酸または末端アミノ酸配列を検出するための検出可能なプローブまたは親和性試薬の使用によって容易化され得る。図１９Ａ～１９Ｄは、各配列リードのシグナル強度を増加させるために検出可能なプローブを利用するエドマン分解に対する可能性のあるアプローチを示している。図１９Ａは、固体支持体１９１０に結合した複数のポリペプチドを有する固体支持体１９１０を示している。第１のポリペプチド１９２０は、側鎖Ｒ１を有する末端アミノ酸残基を有し、第２のポリペプチド１９３０は、側鎖Ｒ２を有する末端アミノ酸残基を有する。図１９Ｂは、複数のペプチドを、各天然末端アミノ酸残基に対する高い結合特異性を有する複数のプローブ種（例えば、少なくとも２０個の独自のプローブ種を含む）を含む検出可能なプローブ組成物と接触させることを示している。第１のポリペプチド１９２０は、側鎖Ｒ１に対する結合特異性を有するように構成された検出可能なプローブ１９４０によって結合される。第２のポリペプチド１９３０は、側鎖Ｒ２に対する結合特異性を有するように構成された検出可能なプローブ１９５０によって結合される。検出可能なプローブ組成物の各検出可能なプローブは、独自の検出シグネチャーまたはフィンガープリントを有し、各結合事象を独自に同定することを可能とする。図１９Ｃは、複数のポリペプチドの各ペプチドがイソチオシアネート化合物と反応して切断可能な生成物を形成した後のエドマン分解プロセスにおける典型的な中間工程を示している。第１のポリペプチド１９２５は、側鎖Ｒ１を有する

修飾された末端アミノ酸残基を有し、第２のポリペプチド１９３５は、側鎖Ｒ２を有する修飾された末端アミノ酸残基を有する。図１９Ｄは、複数の修飾されたペプチドを、各々の修飾された天然末端アミノ酸残基に対する高い結合特異性を有する複数のプローブ種（例えば、少なくとも２０個の独自のプローブ種を含む）を含む検出可能なプローブ組成物と接触させることを示している。第１の修飾されたポリペプチド１９２５は、側鎖Ｒ１に対する結合特異性を有するように構成された検出可能なプローブ１９４５によって結合される。第２の修飾されたポリペプチド１９３５は、側鎖Ｒ２に対する結合特異性を有するように構成された検出可能なプローブ１９５５によって結合される。検出可能なプローブ組成物の各検出可能なプローブは、独自の検出シグネチャーまたはフィンガープリントを有し、各結合事象を独自に同定することを可能とする。いくつかの構成では、検出可能なプローブ組成物は、配列リードの信頼性を増加させるために末端アミノ酸残基を修飾する前及び後に検出可能なプローブ組成物と接触させられ得る。

【０４３７】

当業者は、論述される実施形態の多くが、上記で論述された他の技術、例えば、図１５Ａ～１５Ｄに示される連結されたバーコードの使用、または図８、９Ａ、及び９Ｂに示されるもののような弱い二次結合相互作用を形成するための方法を利用するように容易に構成され得ることを容易に認識する。

【実施例】

【０４３８】

実施例１：保持成分として折り紙タイルを有する親和性試薬の設計及び合成

折り紙タイルベースの親和性試薬を、付属するインハウスｐｙｔｈｏｎスクリプトを用いてＣＡＤＮＡＮＯソフトウエアを利用して設計した。単一層を有するおおよそ四角形の形状を有する核酸折り紙としてタイルを設計した。タイルの上面上に２０個のＤＮＡアプタマー結合部位、及びタイル分子の辺に沿って均一に分布した４４個の色素分子結合部位を有するようにタイルを設計した。図２３は、タイルベースの親和性試薬２３１０の概略図を示しており、ドット２３３０は、アプタマー結合位置を表し、丸２３２０は、色素結合位置を表す。おおよそ８３ナノメートル（ｎｍ）の辺長さを有するようにタイルを設計した。

【０４３９】

７２４９ヌクレオチドを含有するＭ１３一本鎖環状ＤＮＡ鎖の骨格鎖を使用して折り紙タイルを調製した。２１７個の一本鎖オリゴヌクレオチドを、タイルベースの親和性試薬の構築を可能とするために「ステープル」としての骨格鎖とのハイブリダイゼーションのために設計及び合成した。

【０４４０】

骨格鎖を２１７個のオリゴヌクレオチドと組み合わせることによって折り紙タイルを構築した。ＤＮＡ鎖を、ｐＨ８．０の５ｍＭトリス－ＨＣｌ、５ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、１２．５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$を含有する緩衝液中で９０°Ｃで組み合わせた。ＤＮＡ鎖混合物を２０°Ｃの温度に冷却し、１．５時間アニーリングさせた。

【０４４１】

アニーリングされたタイルベースの親和性試薬を、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィーまたは１００ｋＤａサイズカットオフスピンフィルターを介して精製した。タイルベースの親和性試薬を、ｐＨ８．０の５ｍＭトリス－ＨＣｌ、２００ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、１１ｍＭのＭｇＣｌ$_2$を含有する緩衝液に再懸濁し、４°Ｃで保存した。

【０４４２】

実施例２：折り紙タイルの画像分析

折り紙タイルベースの親和性試薬を実施例１に記載のように調製した。タイルプローブを透過電子顕微鏡法（ＴＥＭ）により画像化して、構築方法の成功を確認した。タイルプローブ溶液をグロー放電された炭素沈着銅グリッド上にスポッティングし、ギ酸ウラニルを使用して陰性染色した。

【０４４３】

タイルプローブを１２０キロボルト（ｋＶ）の加速電圧下で３０，０００ｘの倍率でＦＥＩ　Ｔｅｃｎａｉ　Ｔ１２透過型電子顕微鏡で画像化した。タイルプローブは、予測されたように、約８３ｎｍの辺長を有するおおよそ四角形の形状を有するようである。

【０４４４】

実施例３：抗体ベースの結合成分を有するタイルベースの親和性試薬の設計及び合成

抗体タイル検出可能なプローブを、付属するインハウスｐｙｔｈｏｎスクリプトを用いてＣＡＤＮＡＮＯソフトウエアを利用して設計した。単一層を有するおおよそ四角形の形状を有するように折り紙タイルを設計した。６個の抗体結合部位（上面上に２個及びタイルの各辺に沿って１個）及びタイル分子の辺に沿って均一に分布した４０個の色素分子結合部位を有するようにタイルを設計した。図２５は、それぞれの結合位置での抗体成分２５２０及び標識成分のための結合位置を表す丸２５３０を有する、タイルベースの親和性試薬２５１０の概略図を示している。おおよそ８３ナノメートル（ｎｍ）の辺長さを有するようにタイルを設計した。

【０４４５】

７２４９ヌクレオチドを含有するＭ１３一本鎖環状ＤＮＡ鎖の骨格鎖を使用して折り紙タイルを調製した。２１７個の一本鎖オリゴヌクレオチドを、タイルプローブの構築を可能とするために骨格鎖とのハイブリダイゼーションのために設計及び合成した。そのオリゴヌクレオチドのうち６個は、クリック反応を介する抗体成分の結合を可能とするためにトランスシクロオクテンで修飾されたヌクレオチドを用いて合成した。

【０４４６】

骨格鎖を２１７個のオリゴヌクレオチドと組み合わせることによってタイルを構築した。ＤＮＡ鎖を、ｐＨ８．０の５ｍＭトリス－ＨＣｌ、５ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、１２．５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$を含有する緩衝液中で９０°Ｃで組み合わせた。ＤＮＡ鎖混合物を２０°Ｃの温度に冷却し、１．５時間アニーリングさせた。

【０４４７】

アニーリングされたタイルを、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィーまたは１００ｋＤａサイズカットオフスピンフィルターを介して精製した。精製されたタイルを、ｐＨ８．０の５ｍＭトリス－ＨＣｌ、２００ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、１１ｍＭのＭｇＣｌ$_2$を含有する緩衝液に再懸濁した。抗体を、トランスシクロオクテン（ＴＣＯ）－メチルテトラジン（ｍＴｚ）クリック反応を介してタイルに結合させた。図２６は、折り紙タイルへの抗体（または他の結合成分）の結合のための例示的な反応スキームを示している。ＴＣＯ修飾ヌクレオチドを有する精製されたタイルローブを２０°Ｃの温度でｍＴｚ修飾１０ｘ抗Ｈｉｓタグ抗体と組み合わせ、６～１０時間反応させた。クリック反応の後、タイルプローブをＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィーを介して精製した。

【０４４８】

図２７は、ＴＣＯ－ｍＴｚクリック反応を介して生成された精製された抗体－ＤＮＡオリゴコンジュゲートについてのＳＤＳ－ｐａｇｅゲルを示している。レーンＡは、抗体－ＤＮＡオリゴコンジュゲートを含有する。レーンＢは、ｍＴｚ修飾抗体陰性対照を含有する。レーンＣは、非修飾抗体対照を含有する。最も上の暗いバンドが観察され、ＤＮＡオリゴへの抗体の成功裏の結合を確認している。

【０４４９】

実施例４：アプタマーベースの結合成分を有するタイルベースの親和性試薬の結合

４つの異なる種のアプタマータイルプローブを実施例１の方法に従って調製した。タイルベースの親和性試薬の各種は、末端ヒスチジンタグに対する様々な結合親和性を有する異なるアプタマーを含有していた。使用した４つのアプタマーは、Ｂ１（最も高い親和性）、Ａ１（中程度の親和性）、Ｄ１（低い親和性）、及びＳＣ２（親和性なし）であった。各タイルベースの親和性試薬を２０個のアプタマー及び４０個のＡｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７色素分子を用いて構築した。

【０４５０】

各アプタマーをｈｉｓタグ化ユビキチンの単一分子アレイに対する結合についてスクリ

ーニングした。タンパク質アレイを、ユビキチンコンジュゲート（構造化核酸粒子に結合したユビキチン）の１０ナノグラム／マイクロリットル溶液を流体チップ上に沈着させることによってた調製した。各流体チップは、３つのレーンを含有し、各レーンは、３－アミノプロピルトリエトキシシラン（ＡＰＴＭＳ）のブランケットコーティングを有するガラス表面を有していた。各チップ上のレーン当たり１つで、３つの異なるタイプのタンパク質アレイを調製した：ｈｉｓタグ化ユビキチン；ｆｌａｇタグ化ユビキチン（陰性対照）；及び非タグ化ユビキチン（陰性対照）。各々の沈着したタンパク質コンジュゲートは、Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８色素分子を含有していた。アレイにおけるタンパク質コンジュゲート位置を４８８ｎｍの励起で蛍光顕微鏡検査を介して測定した。親和性試薬結合の前に、流体チップを１％ＢＳＡ、２ｎＭの標識されていないＤＮＡタイル、及び含有する緩衝液中の１００ｍｇ／ｍｌの硫酸デキストランを含有する溶液で６０分間ブロッキングした。

【０４５１】

結合を試験するために、１５μｌの２０ｎＭ親和性試薬溶液を流体チップ内に流動させた。プローブを１０分間結合させた。親和性試薬結合の後、流体チップを濯ぎ溶液で濯いだ。２０ｘの倍率及び６４７ｎｍの励起でＴｈｏｒＬａｂ　Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｅを使用して結合を表面上で画像化した。６４７ｎｍでの顕微鏡画像を４８８ｎｍでの画像と比較して、適用された親和性試薬が結合したタンパク質の画分を決定した。４つすべての親和性試薬種を３つのアレイの各々に対して試験した。１２回の実験の各セットを重複して行った。

【０４５２】

図２８Ａ～２８Ｄは、結合についての占有率を示している。既知のタンパク質コンジュゲートを有する総位置に対する検出された結合を有する観察された位置の比として占有率を決定した。図２８Ａは、Ａ１アプタマー試薬についての占有率に対するＢ１アプタマー試薬についての占有率を示している。より低い結合親和性にもかかわらず、Ａ１アプタマー試薬は、Ｂ１アプタマー試薬とほぼ同じ高さの占有率を有することが示されている。図２８Ｂは、Ｄ１アプタマー試薬についての占有率に対するＢ１アプタマー試薬についての占有率を示している。図２８Ｃ及び２８Ｄは、Ｂ１対ＳＣ２及びＤ１対ＳＣ２についての占有をそれぞれ比較している。図２８Ｂ及び２８Ｄに示されているように、ｈｉｓ－タグ化タンパク質に対するその低い結合親和性にもかかわらず、Ｄ１アプタマー試薬の占有率は、Ｂ１アプタマー試薬のものとくらべてほぼ半分であり、陰性対照ＳＣ２アプタマー試薬のものよりも著しく高いことが観察され、検出可能なプローブは、アビディティ効果を介して弱い結合アプタマーの観察された結合親和性を有意に改善し得ることを示唆している。

【０４５３】

実施例５．抗体ベースの結合成分を有するタイルベースの親和性試薬の結合

抗体ベースの結合成分を有するタイルベースの親和性試薬を実施例２及び３に従って調製した。６個の１０ｘ抗Ｈｉｓ抗体及び４０個のＡｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７色素分子を用いて各親和性試薬を調製した。０．５ｎＭプローブ溶液を利用して、実施例４に記載の方法により結合を試験した。

【０４５４】

図２９Ａ～２９Ｃは、試薬の結合についての蛍光顕微鏡検査画像を示している。図２９Ａ及び２９Ｂは、非タグ化及びｆｌａｇタグ化ユビキチンアレイへ試薬の結合をそれぞれ示している。図２９Ｃは、ｈｉｓタグ化ユビキチンアレイへの試薬の結合を示している。ｈｉｓタグ化アレイに結合するより高いレベルのプローブが観察された。

【０４５５】

図３０は、６つの異なるチップ上の３つの異なるタンパク質アレイに対する親和性試薬についての占有率を示している。ｈｉｓタグ化タンパク質アレイ上の高い占有率が、６つすべてのチップについて観察されるのに対し、はるかに低い占有率が、各流体チップ上の他の非ｈｉｓタグ化タンパク質について観察される。

【０４５６】

実施例６．多重結合アッセイ

１または２つのタイプのフルオロフォアを含む検出可能な親和性試薬を構築する。利用可能なフルオロフォアは、赤色、黄色、緑色、または青色波長（Ｒ、Ｙ、Ｇ、Ｂ）で放射を有する。各フルオロフォアは、検出可能なプローブ上の各フルオロフォアの総数を示すように命名される。例えば、１０個の赤色フルオロフォア及び１０個の黄色フルオロフォアを有する検出可能な親和性試薬は、「Ｒ１０Ｙ１０」と命名されるであろう。独自のフルオロフォアの組み合わせを有する各親和性試薬を、標的部位に対する独自の結合特異性を有する独自の種の結合成分に結合させる。以下の表１に列挙される各プールの組成を用いて、フルオロフォアの２つの独自のプールを生成する。

【表１】

プール1	プール2
R10Y10	R20Y10
R20Y20	R10Y20
B10G10	B10G20
G20B20	B20G10
B10	B10
G10	G10
R10	R10
Y10	Y10

表1

【０４５７】

親和性試薬のプールを第１の結合パートナーに接触させる。蛍光強度を、４つの可能性のあるフルオロフォアに対応する波長で測定する。測定された蛍光強度は、フルオロフォアの可能性のある利用可能な数と相関する。表２は、蛍光強度に基づいて測定されるフルオロフォアカウント、及び観察される蛍光強度の独自の組み合わせを生じさせるであろう各プールからの結合したプローブの組み合わせを示している。

【表２】

観察された結合強度 (フルオロフォア)			
R	Y	G	B
40	30	0	10
可能性のある観察されたプローブ組み合わせ			
プール1：R10Y10, R20Y20, R10, B10			
プール2：R10Y20, R20Y10, R10, B10			

表2

【０４５８】

観察される蛍光強度に基づいて、利用可能な標的部位が結合パートナーについて予測され得る。

【０４５９】
親和性試薬のプールを第２の結合パートナーに接触させる。蛍光強度を、４つの可能性のあるフルオロフォアに対応する波長で測定する。測定された蛍光強度は、フルオロフォアの可能性のある利用可能な数と相関する。表３は、蛍光強度に基づいて測定されるフルオロフォアカウント、及び観察される蛍光強度の独自の組み合わせを生じさせるであろう各プールからの結合した親和性試薬の組み合わせを示している。
【表３】

観察された結合強度			
(フルオロフォア)			
R	Y	G	B
30	10	20	10
可能性のある観察されたプローブ組み合わせ			
プール1: R10Y10, R10, R10, B10G10, G10			
プール2: R20Y10, R10, B10G20			

表3

【０４６０】
観察される蛍光強度に基づいて、利用可能な標的部位が結合パートナーについて予測され得る。検出可能な親和性試薬の多重プールの合理的な操作は、同時に結合パートナー内の複数の標的部位の存在を予測する独自の結合シグネチャーを生じさせ得る。
【０４６１】
実施例７．アフィニティークロマトグラフィー
３つのアフィニティークロマトグラフィーカラムを調製する。第１のクロマトグラフィーカラムには、樹脂に共有結合的に結合した親和性試薬を含む第１のクロマトグラフィー樹脂が含まれる。第１のカラムにおける親和性試薬は、アミノ酸配列にかかわらず、ポリペプチドに対する通常の結合親和性を有する。第２のクロマトグラフィーカラムには、樹脂に共有結合的に結合した親和性試薬を含む第２のクロマトグラフィー樹脂が含まれる。第２のカラムにおける親和性試薬は、リジン－アルギニン－アラニン（ＫＲＡ）アミノ酸トリマー配列をそれらのアミノ酸配列内に含むポリペプチドに対する結合親和性を有する。第３のクロマトグラフィーカラムには、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによって樹脂にカップリングした親和性試薬を含む第３のクロマトグラフィー樹脂が含まれる。第３のカラムにおける親和性試薬は、リジン－グルタミン酸－アスパラギン（ＫＥＮ）アミノ酸トリマー配列をそれらのアミノ酸配列内に含むポリペプチドに対する結合親和性を有する。
【０４６２】
３つのアフィニティークロマトグラフィーカラムを順次配置する。粗細胞ライセートを第１の一般的分離カラムに適用する。ポリペプチドは、粗細胞ライセートから捕捉されるのに対し、ライセートの非ポリペプチド画分は、カラムを通過し、廃棄される。ライセートの非ポリペプチドを廃棄した後、ポリペプチド画分を第１のカラムへの溶出緩衝液の適用によって溶出させる。溶出した画分を捕捉し、第２のＫＲＡ特異的クロマトグラフィーカラムに適用する。ポリペプチドの第１の画分は、ＫＲＡ特異的樹脂上で捕捉されるのに対し、第２の画分は、カラムを通過し、捕捉される。カラムの端部からの第２の画分の収集後、ポリペプチドの第１の画分を溶出緩衝液によってカラムから溶出させ、カラム端部で収集する。
【０４６３】
ＫＲＡ特異的クロマトグラフィーカラムからの第１の収集されたポリペプチド画分を第

３のＫＥＮ特異的クロマトグラフィーカラムに加える。ポリペプチドの第１の画分は、ＫＥＮ特異的樹脂上で捕捉されるのに対し、第２の画分は、カラムを通過し、捕捉される。カラムの端部からの第２の画分の収集後、ポリペプチドの第１の画分を、カラムを加熱してオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを融解することによって溶出させ、それによりカラムから検出可能なプローブを放出させる。

【０４６４】

ＫＥＮ特異的カラムを、第１の画分の分離から放出された親和性試薬を補給するためにＫＥＮ特異的な検出可能な親和性試薬の新たなバッチで再生する。次いで分離をＫＲＡ特異的カラムからの第２の収集画分について繰り返す。第１の通過画分を収集し、続いて第２の捕捉された画分を収集する。ＫＲＡ特異的カラムからの両方の画分の分離後、合計で４つの画分が形成される。図４０は、初期の細胞ライセートから最終的な４つのポリペプチド画分までのクロマトグラフィープロセスの概略図を示しており、４つの画分の予備的に決定された特徴が下部に列挙されている。４つの画分の予備的特性化は、各画分のクロマトグラフィー挙動に基づいて評価される。特性化は、偽陰性または偽陽性捕捉相互作用の可能性により予備的とみなされる。

【０４６５】

ＫＥＮ特異的カラムに捕捉されたポリペプチドの２つの画分は、親和性試薬－ポリペプチド複合体として収集される。親和性試薬が結合したポリペプチド画分の各々は、複数の結合部位を含むパターン化ケイ素固体支持体に順次に適用され、各部位は、親和性試薬を捕捉し、結合させるように構成されている。各親和性試薬結合画分をチップに適用し、蛍光顕微鏡検査を使用して固体支持体上の各々の占有結合部位の位置を測定し、記録する。

【０４６６】

ＫＥＮ特異的カラムからの２つの非捕捉画分を構造化核酸粒子に結合させる。各非捕捉画分をケイ素固体支持体に適用し、捕捉画分と同様に蛍光顕微鏡検査によって占有結合部位を観察する。４つすべての画分が固体支持体に結合した後、ポリペプチドのパターン化アレイをポリペプチドアッセイのために生成した。

【０４６７】

実施例８．ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬の合成

修飾可能な表面化学を含む高蛍光有機ナノ粒子を使用して検出可能な親和性試薬を調製した。図４１は、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースのプローブの調製のためのスキームを示している。４０ｎｍまたは２００ｎｍのカルボキシレート官能化ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）をポリエチレングリコール部位で修飾して、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）粒子を囲む不動態化層を形成した。ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）をＰＥＧ基での官能化前にＮＨＳ－ＥＤＣ活性化によって活性化した。カルボキシレート官能化ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）をNH_2－ＰＥＧ及びNH_2－ＰＥＧ－アジドの９５：５の混合物と組み合わせて、アジド官能性を含有するＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）の周りのＰＥＧ化表面コーティングを形成した。ＰＥＧ化ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）を３’－ジベンゾシクロオクテン（ＤＢＣＯ）末端オリゴヌクレオチドとインキュベートして、そのオリゴヌクレオチドをＰＥＧ化層の表面上のアジド末端ＰＥＧ部位に共有結合させた。リン酸緩衝溶液（ｐＨ７．４）中で約２４℃で一晩インキュベートを行った。

【０４６８】

ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）へのオリゴヌクレオチドの結合後、結合部位を親和性試薬のカップリングのために提供した。オリゴ官能化ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）を、官能化オリゴハンドルに対する相補的配列を含むオリゴヌクレオチドと組み合わせた。混合物を９５℃に５分間加熱し、次いで７０℃で１０分間アニーリングさせてから、室温に冷却した。代替的には、相補的オリゴヌクレオチドをＤＢＣＯ官能化オリゴヌクレオチドにアニーリングさせてからＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）に結合させ得る。オリゴヌクレオチドのための配列が表４に列挙されている。

【表４】

オリゴ名	配列
DBCO末端オリゴ	3’-DBCO-GTTCGTCTTCTGCCGTATGCTCTA-5’
相補的オリゴ	5’-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT CAT GCT TCC CCA GGG AGA TGG TTT GCC GGT GGG CAG GTT TAG GGT CTG CTC GGG ATT GCG GAG GAA CAT GCG TCG CAA ACG TGT AGA TCT CGG TGG TCG CCG TAT CAT T-3’

表４．オリゴヌクレオチド結合ハンドル配列

【０４６９】

実施例９．量子ドットベースの親和性試薬の合成

修飾可能な表面化学を含む高蛍光無機ナノ粒子を使用して検出可能な親和性試薬を調製した。１５ｎｍのカルボキシル化量子ドット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）をポリエチレングリコール部位で修飾して、量子ドット粒子を囲む非接着層を形成した。量子ドットをNH_2－ＰＥＧ及びNH_2－ＰＥＧ－アジドの７５：２５の混合物と組み合わせて、アジド官能性を含有する量子ドットの周りのＰＥＧ化表面コーティングを形成した。ＰＥＧ化量子ドットを３’－ジベンゾシクロオクテン（ＤＢＣＯ）末端オリゴヌクレオチドとインキュベートして、そのオリゴヌクレオチドをＰＥＧ化層の表面上のアジド末端ＰＥＧ部位に共有結合させた。リン酸緩衝溶液（ｐＨ７．４）中で約２４℃で一晩インキュベートを行った。

【０４７０】

量子ドットへのオリゴヌクレオチドの結合後、結合部位を親和性試薬のカップリングのために提供した。オリゴ官能化量子ドットを、官能化オリゴハンドルに対する相補的配列を含むオリゴヌクレオチドと組み合わせた。混合物を９５℃に５分間加熱し、次いで７０℃で１０分間アニーリングさせてから、室温に冷却した。代替的には、相補的オリゴヌクレオチドをＤＢＣＯ官能化オリゴヌクレオチドにアニーリングさせてから量子ドットに結合させ得る。オリゴヌクレオチドのための配列が表４に列挙されている。

【０４７１】

実施例１０．ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬の最適化

ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能な親和性試薬の様々な構成を試験して、最適なＰＥＧ化ストラテジーを決定した。カルボキシル化ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）を実施例８に記載の方法に従ってＰＥＧ化した。試験された可変要素には、ＰＥＧサイズ、ＰＥＧタイプ、及びＰＥＧ表面密度が含まれていた。

【０４７２】

ＰＥＧ化ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）をゼータ電位の測定によって特性化して、表面不動態化の程度を決定した。ゼータ電位の測定は、２％リン酸緩衝溶液（ＰＢＳ）中で行った。図４２Ａは、ＰＥＧ－NH_2、ＰＥＧ－ＯＨでＰＥＧ化されたＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）、及びＮＨＳ－活性化ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）についての測定されたゼータ電位を示している。ＰＥＧ－NH_2と反応した場合のゼータ電位の大きさの減少は、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）表面の成功裏のＰＥＧ化及び不動態化を実証する。図４２Ｂは、ＰＥＧ基の推定表面密度に応じたゼータ電位を示している。０．５ｍＭ、５．９ｍＭまたは５９ｍＭのＰＥＧ－NH_2の変化したＰＥＧ－NH_2濃度で実施例８の方法によってＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）を調製した。ゼータ電位は、推定ＰＥＧ表面

密度が増加するにつれて大きさが低下することが示されている。

【０４７３】

ＰＥＧ化ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）をオリゴヌクレオチドにカップリングして、結合成分をカップリングさせるための結合部位を提供した。結合部位を提供するためのストラテジーは、実施例８に記載されている。図４２Ｃは、オリゴヌクレオチド及び結合オリゴヌクレオチドがＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）に付加された場合のＰＥＧ化ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）についての測定されたゼータ電位を示している。ゼータ電位は、核酸が付加された場合に大きさが増加することが分かり、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）へのオリゴヌクレオチドの成功裏のカップリングを確認する。図４２Ｄは、オリゴがカップリングされたＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）へのアプタマー成分のカップリングを示している。ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）をポリ－Ｔオリゴヌクレオチドとカップリングさせて、ポリ－Ａアニーリング配列を提示するアプタマー成分をカップリングさせるように構成された結合部位を形成した。アニーリングされたオリゴヌクレオチドの平均総数を、アプタマー成分のアニーリング後にｑＰＣＲによって計算した。図４２Ｄは、ポリ－Ａ含有アプタマー成分の成功裏のカップリングを示しており、ポリ－Ｔ含有アプタマーの結合はほとんど観察されなかった。

【０４７４】

ＰＥＧ化ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）を異なるサイズのＰＥＧ基を用いて調製した。図４２Ｅは、ｍＰＥＧ－１２、ｍＰＥＧ－２４、ｍＰＥＧ－３６、ｍＰＥＧ－４５、またはｍＰＥＧ－１１２でＰＥＧ化されたＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）についての測定されたゼータ電位を示している。ゼータ電位は、ＰＥＧ基のサイズが増加するにつれて大きさが低下することが分かる。図４２Ｆは、ＰＥＧサイズに応じたＰＥＧ化ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）についての多分散指数（ＰＤＩ）を示している。ＰＤＩは、動的光散乱によって測定した。ｍＰＥＧ－３６のＰＥＧサイズを超えると、ＰＤＩは増加することが観察され、低下したコロイド状安定性を示唆している。

【０４７５】

実施例１１．ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬の結合特性化

ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬の結合を試験して、それらの標的－結合特徴を評価した。ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの保持成分を実施例８に記載の方法によって調製した。アプタマーを９５°Ｃで５分間結合オリゴヌクレオチドとプレアニーリングし、次いでＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）にカップリングした。ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）を以下のアプタマーを用いて調製した：Ｐ７－Ｂ１－Ｐ５（標的ヒスチジンタグ）、Ｐ７－Ｈ３Ｔ－Ｐ５（標的ヒスチジンタグ）及びＰ７－ＶＥＧＦアプタマー８９（標的ＶＥＧＦ）。

【０４７６】

ビオチン化トリマーアミノ酸配列をストレプトアビジンがコーティングされたプレートに固定することによって結合研究のためのペプチド標的を調製した。図４３Ａは、様々なペプチドトリマー標的に対する様々なアプタマー製剤（オンターゲット：Ｐ７－Ｂ１－Ｐ５－ＦＳは、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）プローブであり、Ｐ７－Ｂ１－Ｐ５－ｓｔｒｅｐは、ストレプトアビジン－Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７で標識されている；オフターゲット：Ｈｅｒ２－ＦＳは、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）プローブであり、Ｈｅｒ２－ｓｔｒｅｐは、ストレプトアビジンＡｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７で標識されている）の結合を示している。Ｐ７－Ｂ１－Ｐ５を含有するＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）プローブは、Ｐ７－Ｂ１－Ｐ５－Ｓｔｒｅｐと同様の結合プロファイル及びＨｅｒ２特異的和性試薬と同様ではない結合プロファイルを有することが観察される。

【０４７７】

解離定数を様々な標的に対してＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬について測定した。ビオチン化標的（タンパク質またはペプチド）をストレプトアビジンプレートにカップリングさせることによって標的を調製した。図４３Ｂは、ヒスチジンタグ化

Ｈｅｒ２タンパク質標的に対するＰ７－Ｂ１－Ｐ５アプタマー含有ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）親和性試薬についての結合測定結果を示している。ＥＣ５０は６．５ｎＭであることが測定され、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースのＰ７－Ｂ１－Ｐ５親和性試薬は、Ｈｅｒ２－Ｈｉｓコンジュゲートのヒスチジンタグを成功裏に結合させることが可能であることを示唆している。図４３Ｃは、ＨＨＨトリマーペプチドに対するＰ７－Ｈ３Ｔ－Ｐ５アプタマーについての結合測定結果を示している。測定されたＥＣ５０は３．４ｎＭであり、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬は、トリマー標的に結合することが可能であることを示唆している。図４３Ｄは、ＶＥＧＦ標的（オンターゲット）及びミオグロビン（オフターゲット）に対するＰ７－ＶＥＧＦ－アプタマー８９ベースのＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）親和性試薬についてのプローブ濃度に応じた測定された結合を示している。ＶＥＧＦとの結合について親和性試薬濃度に応じてはるかに高い蛍光強度が測定され、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースのプローブは、その意図された標的に対する結合親和性を有することを示唆している。

【０４７８】

実施例１２．ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬の安定性特性化

調製されたＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能な親和性試薬の安定性を試験して、ＰＢＳ緩衝液における４℃での延長保存後の親和性試薬の結合活性を決定した。検出可能な親和性試薬を実施例８に記載の方法によって調製した。検出可能な親和性試薬をＰ７－Ｂ１－Ｐ５アプタマー（標的ヒスチジンタグ）を用いて調製した。安定性測定をまた、市販の蛍光標識ストレプトアビジン－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７コンジュゲート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）及びストレプトアビジン－ＡＰＣ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）にカップリングした単一のＰ７－Ｂ１－Ｐ５アプタマーについて実施した。図４４Ａ～４４Ｃは、示された時点での各検出可能な親和性試薬についての親和性測定結果を示している。各時間間隔で、検出可能な親和性試薬の親和性を実施例１１に記載されているように評価した。ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能な親和性試薬は、ストレプトアビジンコンジュゲートよりも長い期間、標的に対する強い親和性を示した。驚くべきことに、Ｐ７－Ｂ１－Ｐ５　ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能なプローブは、市販の蛍光代替手段と比較して実質的に改善された安定性を有する。

【０４７９】

実施例１３．ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬の結合特性化

Ｐ７－Ｂ１－Ｐ５がカップリングされたＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬の結合親和性を、単一アプタマーＰ７－Ｂ１－Ｐ５－フルオロフォアコンジュゲートの結合親和性と比較して測定した。Ｐ７－Ｂ１－Ｐ５がカップリングされたＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの検出可能な親和性試薬を実施例８の方法に従って調製した。単一アプタマーＰ７－Ｂ１－Ｐ５コンジュゲートを以下のフルオロフォア：ストレプトアビジン－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）、ストレプトアビジン－ＡＰＣ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）、及びＳｕｒｅＬｉｇｈｔ（商標）ＡＰＣ（Ｃｏｌｕｍｂｉａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）についても調製した。様々な濃度のプローブまたはアプタマーを使用してヒスチジン（ＨＨＨ）ペプチドに対して結合曲線を測定した。解離定数（ＥＣ５０）を結合測定データから誘導した。

【０４８０】

図４５Ａ～４５Ｄは、ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）アプタマー、ＡＰＣアプタマー、及びＳｕｒｅＬｉｇｈｔ（商標）ＡＰＣアプタマーについての解離定数のプロットをそれぞれ示している。ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬は、約２．２ｎＭのＥＣ５０を有することが測定され、Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ（登録商標）及びＡＰＣアプタマーは、２８．０ｎＭ及び２９．９ｎＭのＥＣ５０測定結果をそれぞれ有していた。ＳｕｒｅＬｉｇｈｔ（商標）ＡＰＣアプタマーは、２．３ｎＭの測定されたＥＣ５０を有していた。ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬は、利用される正確な検出可能なプローブシステムに応じて

、ヒスチジンペプチド標的を同等にまたはより良好に結合させるようであった。

【０４８１】

実施例１４．量子ドットベースの親和性試薬の結合特性化

保持成分としての量子ドットフルオロフォアを含有する検出可能な親和性試薬を実施例９の方法に従って調製した。量子ドットベースの親和性試薬をＰ７－Ｂ１－Ｐ５アプタマー（標的ヒスチジンタグ）とカップリングさせた。量子ドットベースの親和性試薬の結合特性を決定するために結合測定を行った。

【０４８２】

図２４Ａ及び２４Ｂは、Ｐ７－Ｂ１－Ｐ５－量子ドットベースの親和性試薬についての結合測定データを示している。図２４Ａは、ｈｉｓタグ化Ｈｅｒ２タンパク質（オンターゲット結合）及びミオグロビン（オフターゲット対照）と接触させた量子ドットベースのＰ７－Ｂ１－Ｐ５親和性試薬についての蛍光測定結果を示している。蛍光シグナルは、Ｈｅｒ２－ｈｉｓ標的に対する親和性試薬濃度を増加させると増加することが観察される。親和性試薬がミオグロビン対照と接触した場合に蛍光シグナルにおいて観察された変化がほとんどなく、量子ドットベースのＰ７－Ｂ１－Ｐ５アプタマーは、それらの意図された標的を区別し、それに結合することが可能であることを示唆している。図２４Ｂは、量子ドットベースのＰ７－Ｂ１－Ｐ５親和性試薬についてのＨＨＨペプチドに対するＥＣ５０測定データを示している。ＥＣ５０は、６０ｎＭであることが測定され、量子ドットベースの親和性試薬がそれらの意図された標的と結合することを示唆している。

【０４８３】

実施例１５．ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬の合成

非官能化基に対する官能化基の様々な比を有するＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬を調製した。ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬の結合を試験して、親和性試薬表面上の官能化基の官能化量の最適な量を評価した。９５：５、９９．５：０．５、９９．９５：０．０５、及び９９．９９５：０．００５のｍＰＥＧ－アミン：アミン－ＰＥＧ－アジドの比を有するＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬を製造した。製造後、親和性試薬を実施例８に記載されているようにＢ１アプタマーに結合させ、プレートベースの結合研究において評価した。９５：５の比は、９９．５：０．５の比よりも約１．５倍高いシグナルを示した（図４６を参照されたい）。利用可能なアジド基（アプタマーがアニーリングされたオリゴヌクレオチドの結合のための結合基）の量の増加は、十分に製造された場合に親和性試薬のオンターゲット結合の量を増加させる。

【０４８４】

実施例１６．ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬に対する親和性試薬の直接的コンジュゲーション

ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬を、官能化ナノ粒子への結合成分の直接的コンジュゲーションを介して調製した。５’－ＤＢＣＯ官能基を含有するＢ１アプタマーを、表面に提示されたｍＰＥＧ－アジド基を含有する官能化ＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅｓ（商標）と接触させた。検出可能な親和性試薬を、アジド部位とＤＢＣＯ部位との反応によって形成した。直接的コンジュゲーションストラテジーによって調製されたＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬及びオリゴヌクレオチドアニーリングを介して調製されたＦｌｕｏＳｐｈｅｒｅ（商標）ベースの親和性試薬（実施例８を参照されたい）の結合をＨｅｒ２－ｈｉｓタグ標的に対して比較した。図４７は、直接的にコンジュゲートされた親和性試薬及びアニーリングされた親和性試薬についてのオンターゲットＨｅｒ２－ｈｉｓ結合データ、及びミオグロビン（オフターゲット）対照に対する両方の親和性試薬タイプについての結合を示している。直接的にコンジュゲートされた親和性試薬の観察された結合は、アニーリングされた親和性試薬のものよりも低いことが観察されたが、陰性対照に対して確認された結合を実質的に超えた。

【０４８５】

実施例１７．蛍光ｄＵＴＰヌクレオチドの酵素的組み込み

ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ－６４７ｄＵＴＰヌクレオチドを図４９Ｂに記載されているようにアプタマーの３’末端領域に酵素的に組み込んだ。アプタマーに組み込まれたフルオロフォアは、フルオロフォアの成功裏の組み込みを示す図５２に示されるように６４７ｎｍで可視化された。

【０４８６】

実施例１８．アミノアリルｄＵＴＰへのＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ－６４７ＮＨＳエステルコンジュゲーション

ＡＡｄＵＴＰヌクレオチドを図４９Ｂに記載の方法を使用してアプタマーに組み込んだ。得られた標識されたアプタマーをフルオロフォアに化学的にコンジュゲートし、ゲルに流し、ＳＹＢＲで処置し、二重鎖ＤＮＡを示すために４８８ｎｍで（図５３Ａ）、フルオロフォアの存在を示すために６４７ｎｍで（図５３Ｂ）可視化した。

【０４８７】

実施例１９．ｄｓＤＮＡ－６４７で標識されたアプタマー濃度測定

ｄｓＤＮＡ－６４７で標識されたアプタマー濃度を２６０ｎｍの吸光度を使用して測定し、結果が図５４に示されている。アプタマーへのＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ－６４７のコンジュゲーション効率を試験するために、フルオロフォア標準曲線を使用して（図５５Ａ）、フルオロフォア濃度を決定した（図５５Ｂ）。フルオロフォア濃度測定を使用して、図５６に示されているように、標識の程度を推定するフルオロフォア：ＤＮＡ比を決定した。

【０４８８】

実施例２０．ｄｓＤＮＡ－６４７オンターゲット結合及び画像化

標識されたアプタマーの標的結合及び画像化を評価するために、エピトープＨＨＨに特異的なｄｓＤＮＡ－６４７標識アプタマーを使用して実験を行った。図５７Ａに示されているように、ＨＨＨペプチドをマイクロプレート表面上に固定化し、標識されたアプタマーに曝露した。図５７Ｂは、ＨＨＨペプチドへの標識されたアプタマーの結合を示しており、図５７Ｃは、陰性対照ペプチドＭｅｔＧｌｕＴｈｒへの結合の欠如を示している。

【０４８９】

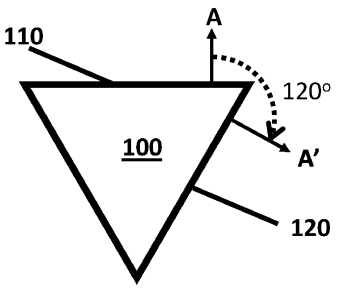
画像化を評価するために、標識されたアプタマーを、図５７Ｄに示されているように、様々な濃度でカスタム２０ｘ対物レンズ落射蛍光顕微鏡で可視化した。

【０４９０】

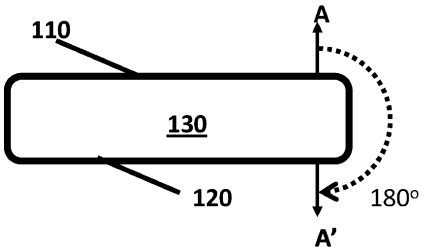
本発明の好ましい実施形態が本明細書で示されており、記載されているが、そのような実施形態は、ほんの一例として提供されることが当業者に明らかになる。本発明は、明細書内で提供された特定の例によって限定されることは意図されていない。本発明は、上記の明細書を参照して記載されているが、本明細書における実施形態の記載及び図説は、限定的な意味で解釈されることを意味していない。多数のバリエーション、変更、及び置換が本発明から逸脱することなく今では当業者の心に浮かぶであろう。さらに、本発明のすべての態様は、多様な条件及び可変要素に依存する本明細書に示される特定の描写、構成または相対的割合に限定されないことが理解されるべきである。本明細書に記載の発明の実施形態に対する様々な代替手段が、本発明を実施する際に用いられ得ることが理解されるべきである。そのため、本発明は、任意のそのような代替手段、修飾、バリエーションまたは均等物を包含するべきであることが企図される。以下の請求項は、本発明の範囲を定義すること及びこれらの請求項の範囲内の方法及び構造ならびにそれらの均等物は、それにより包含されることが意図される。

【図面】

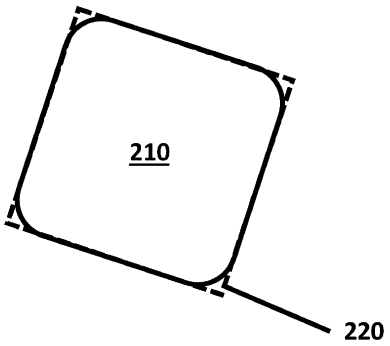
【図１Ａ】



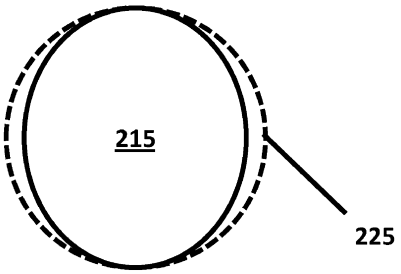
【図１Ｂ】



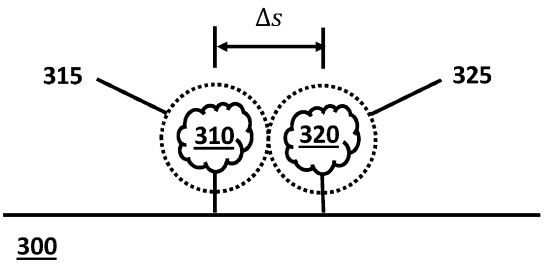
【図２Ａ】



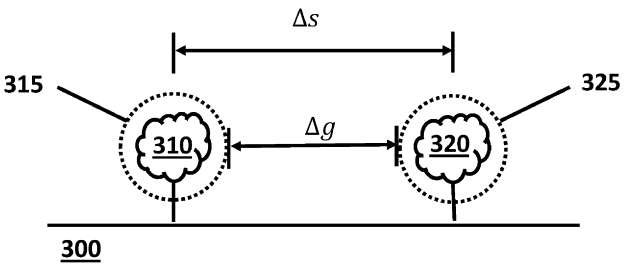
【図２Ｂ】



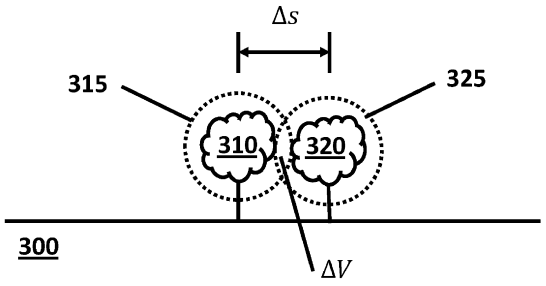
【図３Ａ】



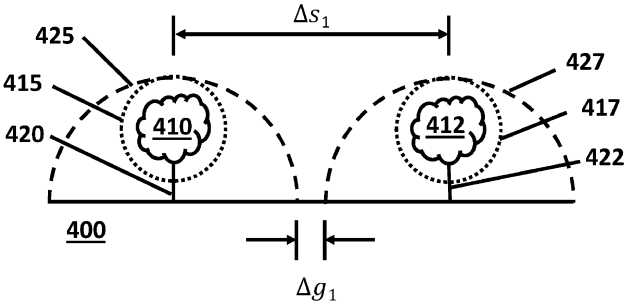
【図３Ｂ】



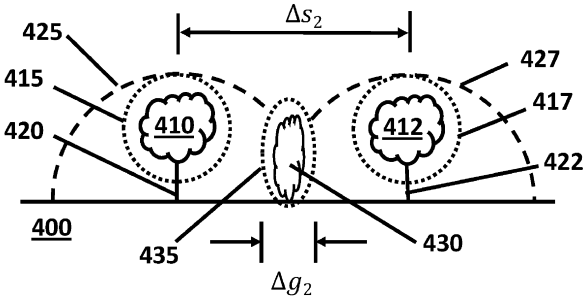
【図３Ｃ】



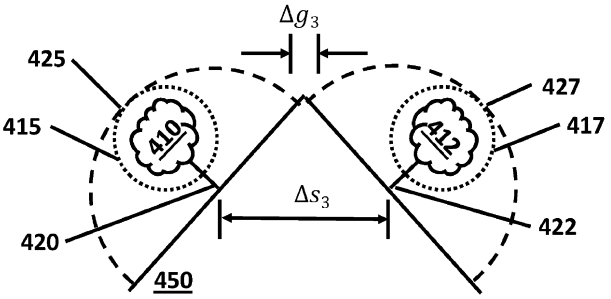
【図４Ａ】



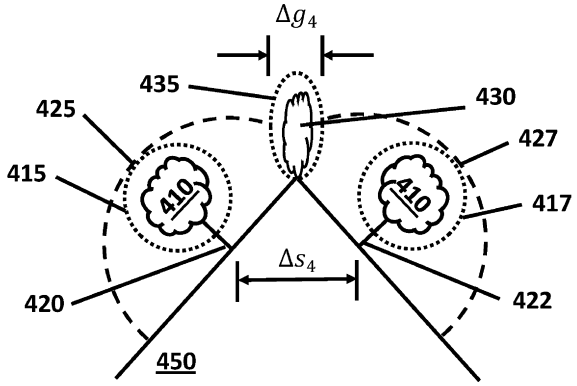
【図４Ｂ】



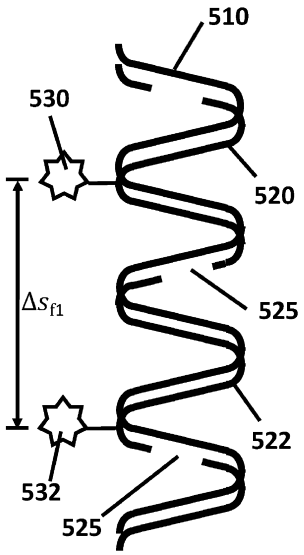
【図４Ｃ】



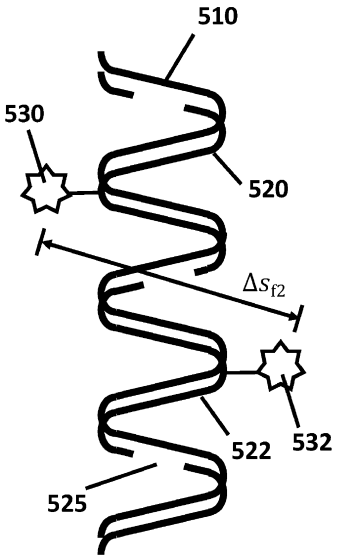
【図４Ｄ】



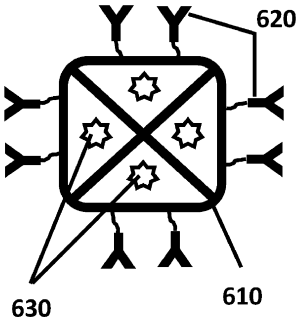
【図５Ａ】



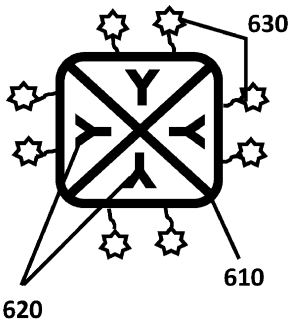
【図５Ｂ】



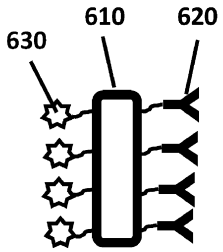
【図６Ａ】



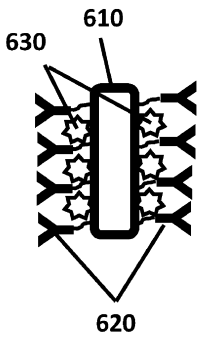
【図６Ｂ】



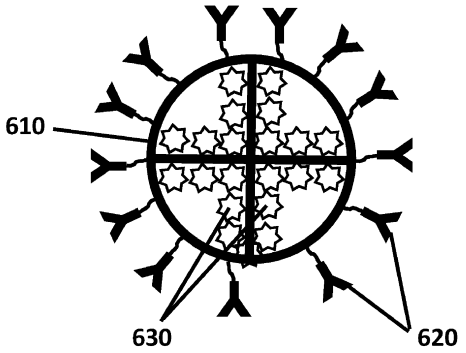
【図６Ｃ】



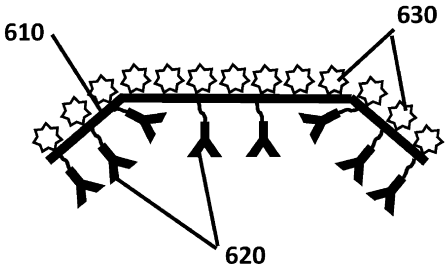
【図６Ｄ】



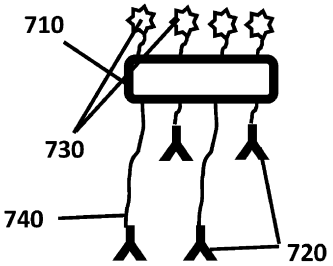
【図６Ｅ】



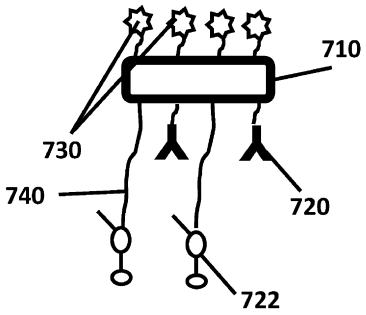
【図６Ｆ】



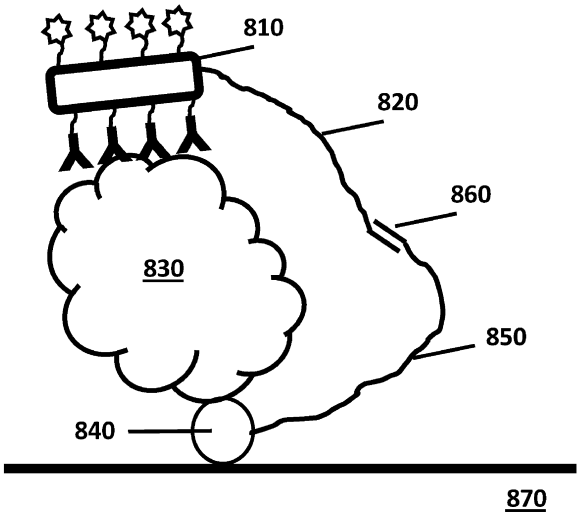
【図７Ａ】



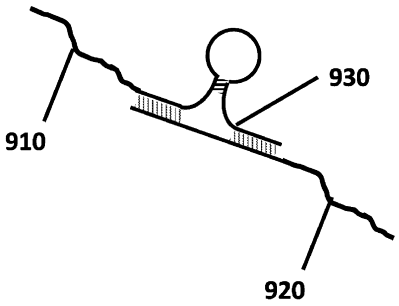
【図７Ｂ】



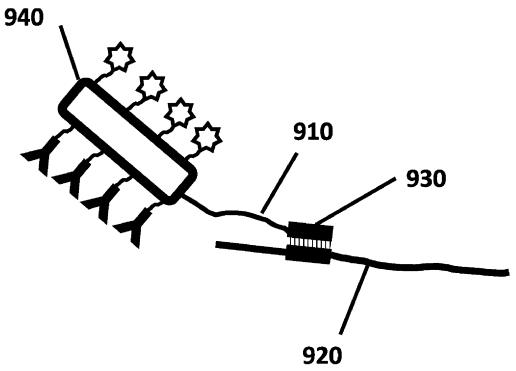
【図８】



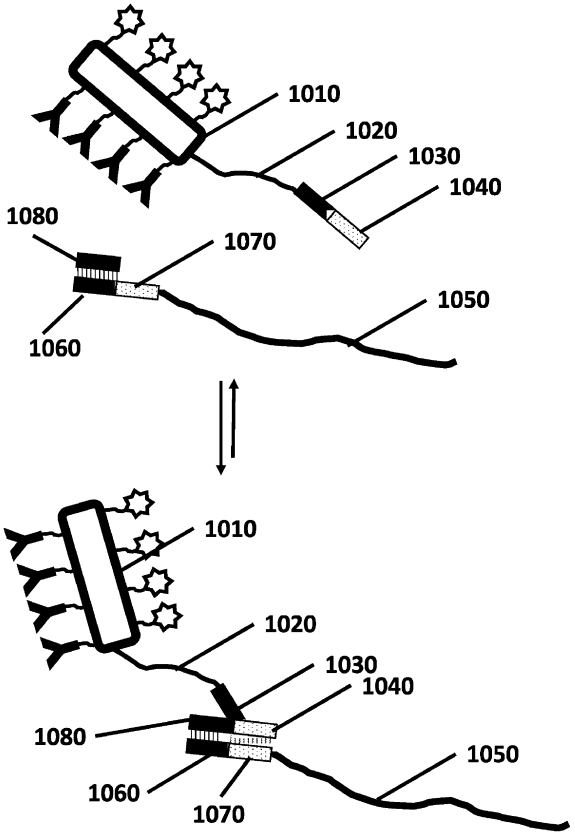
【図９Ａ】



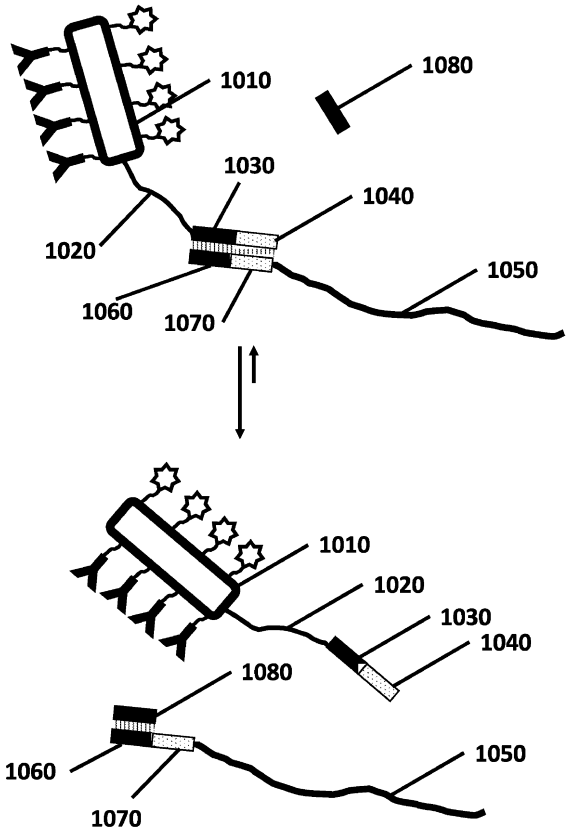
【図９Ｂ】



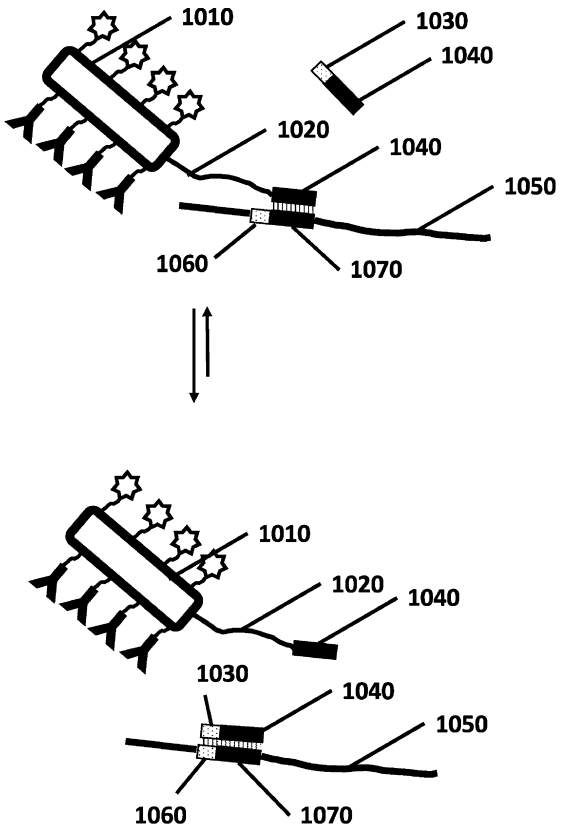
【図１０Ａ】



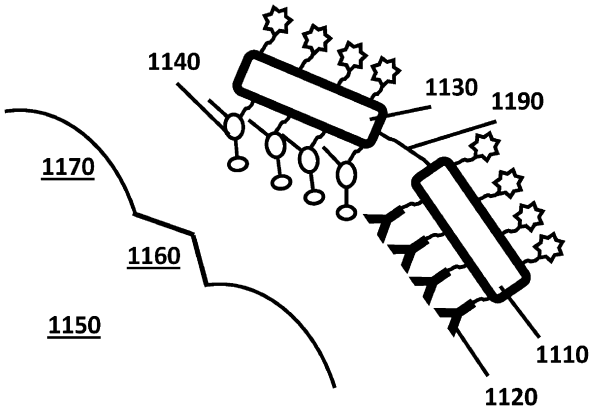
【図１０Ｂ】



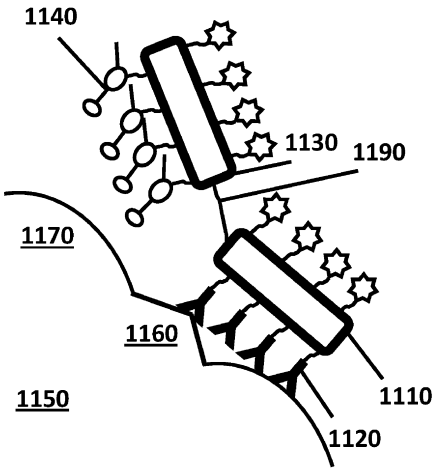
【図１０Ｃ】



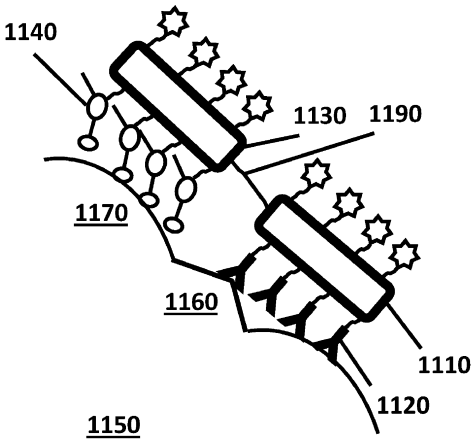
【図１１Ａ】



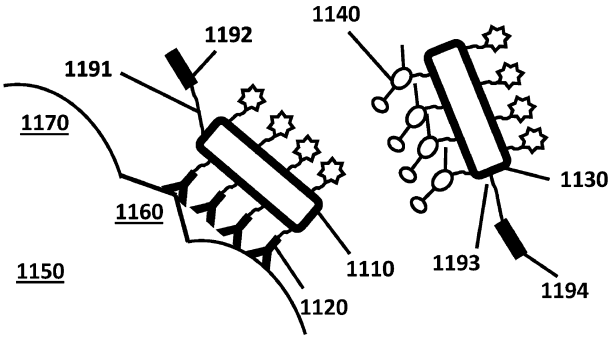
【図１１Ｂ】



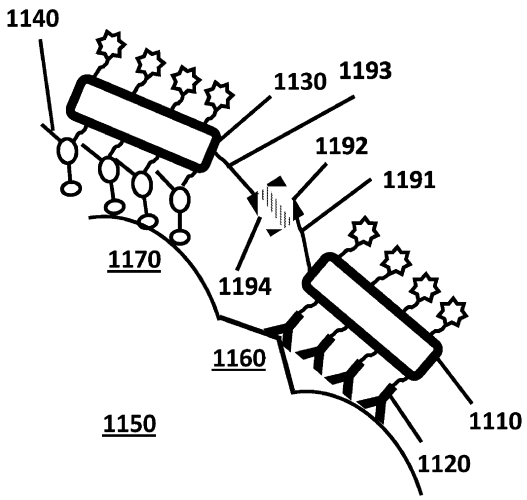
【図１１Ｃ】



【図１１Ｄ】



【図１１Ｅ】



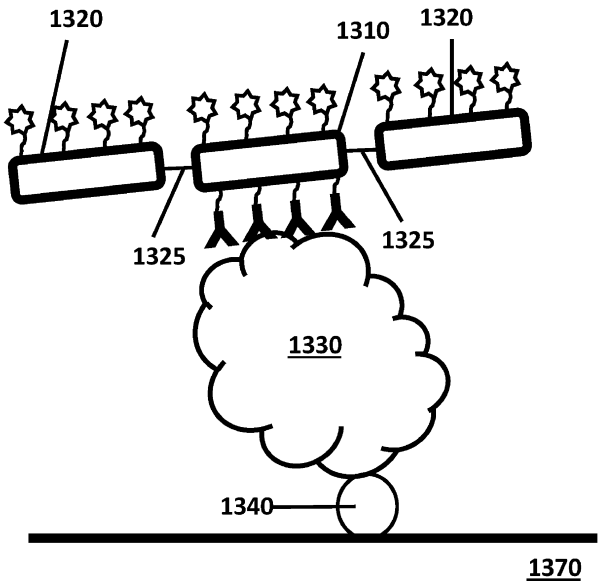
【図１２Ａ】

20	26	23
22	36	15
22	18	27

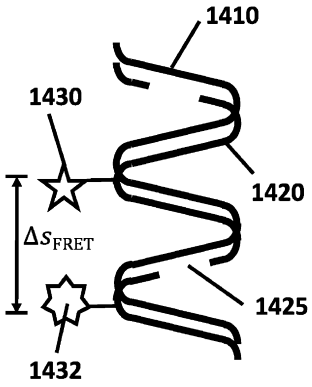
【図１２Ｂ】

64	83	68
73	225	59
66	78	67

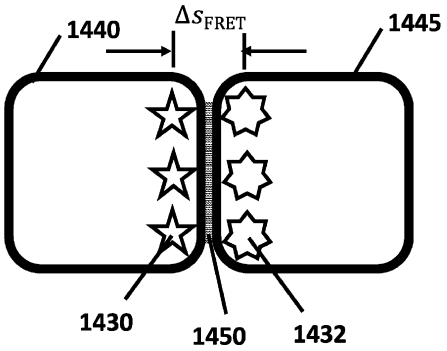
【図１３】



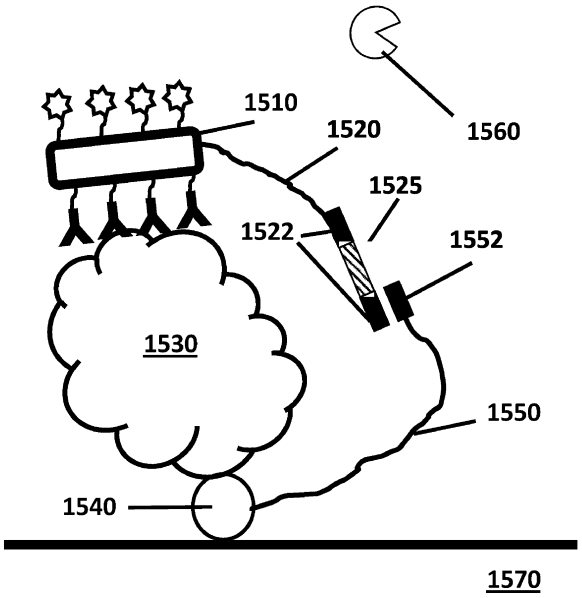
【図１４Ａ】



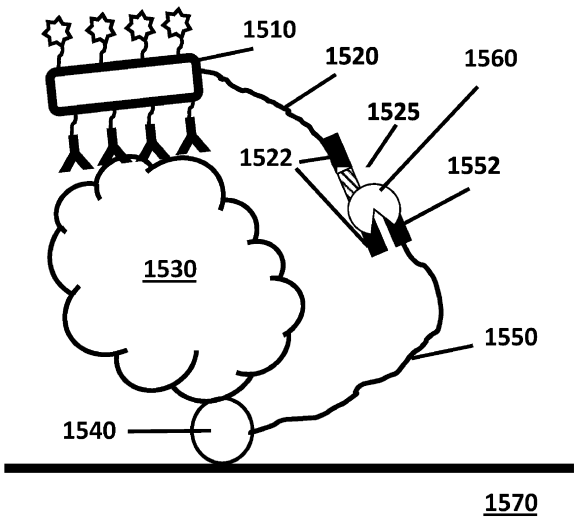
【図１４Ｂ】



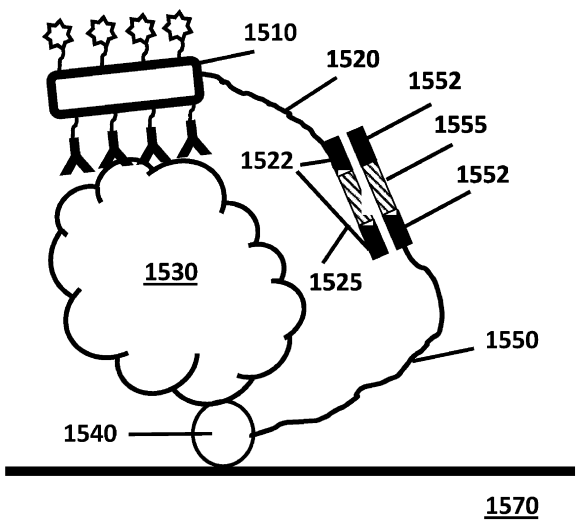
【図１５Ａ】



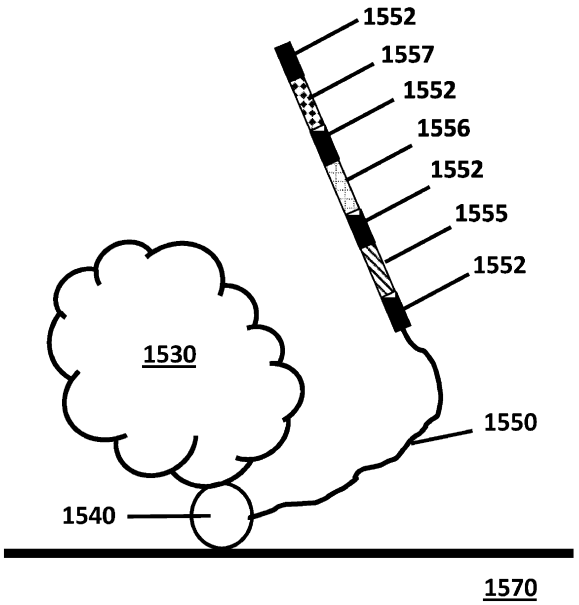
【図１５Ｂ】



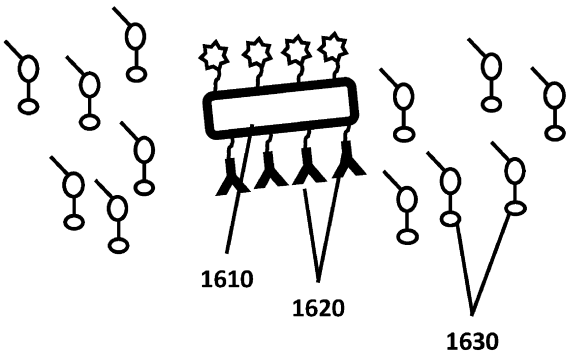
【図１５Ｃ】



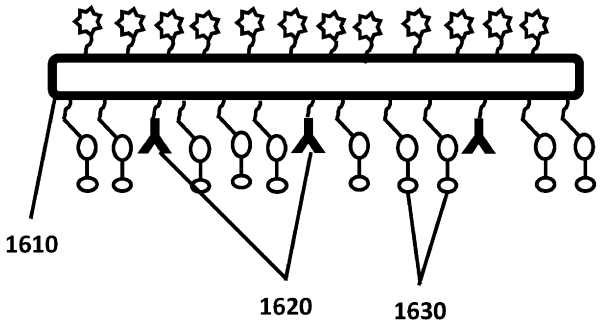
【図１５Ｄ】



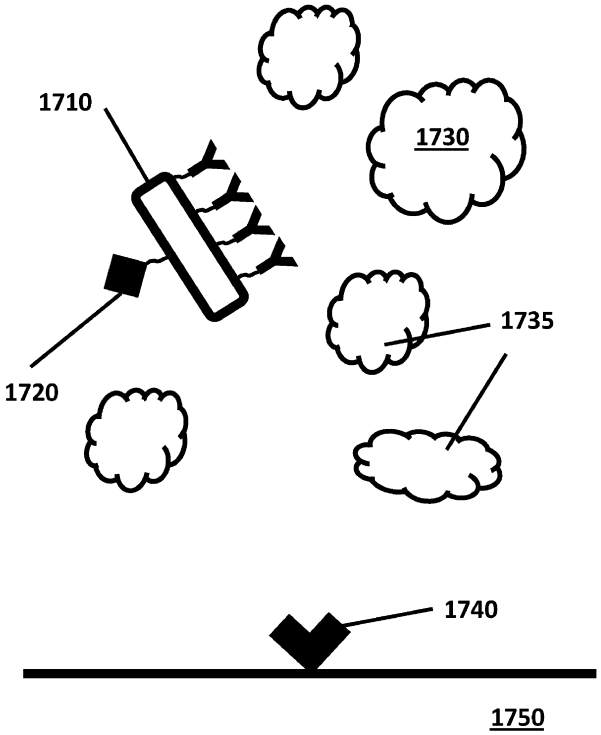
【図１６Ａ】



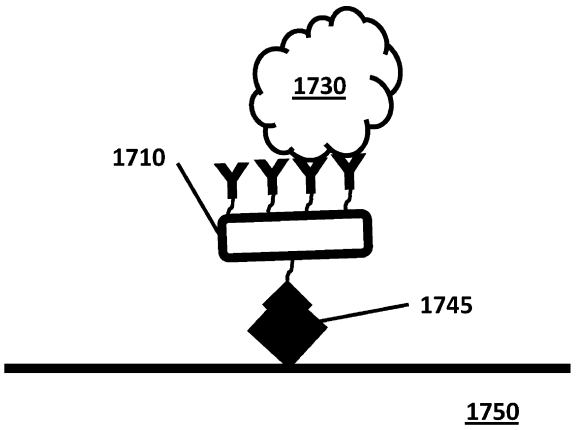
【図１６Ｂ】



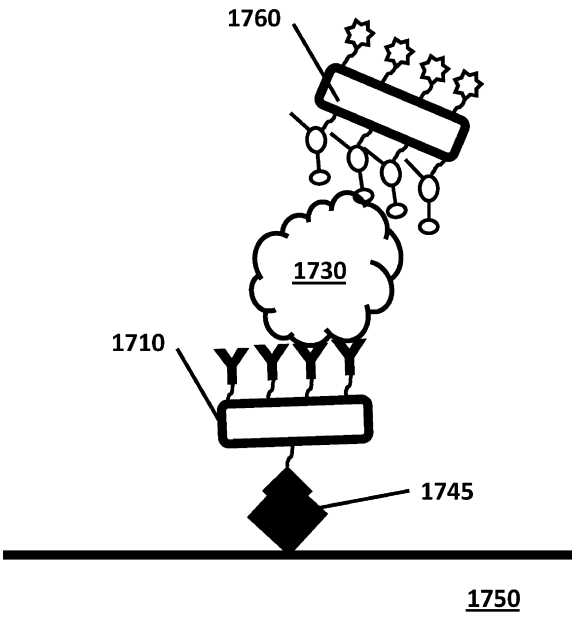
【図１７Ａ】



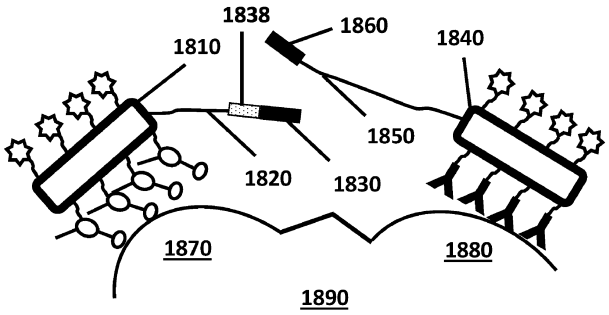
【図１７Ｂ】



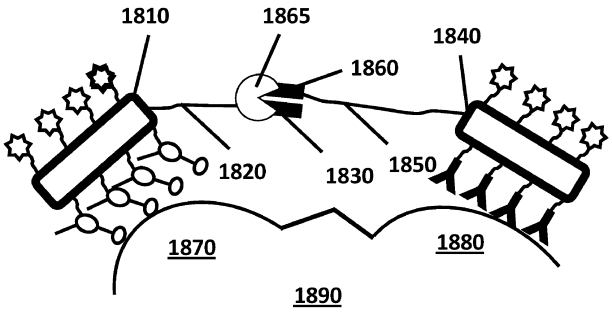
【図１７Ｃ】



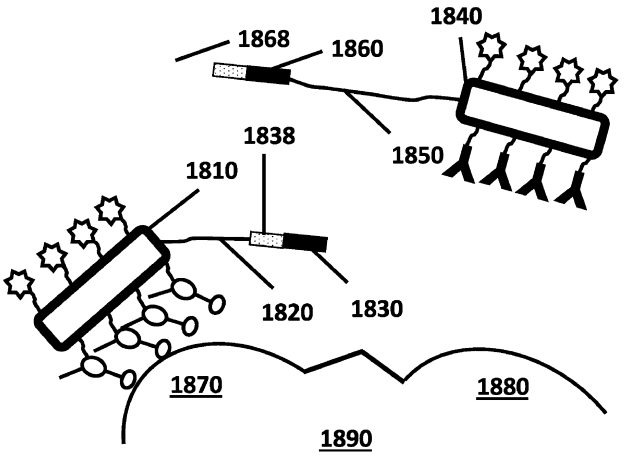
【図１８Ａ】



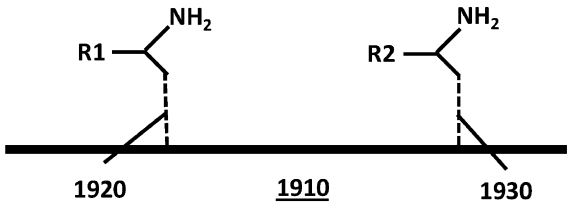
【図１８Ｂ】



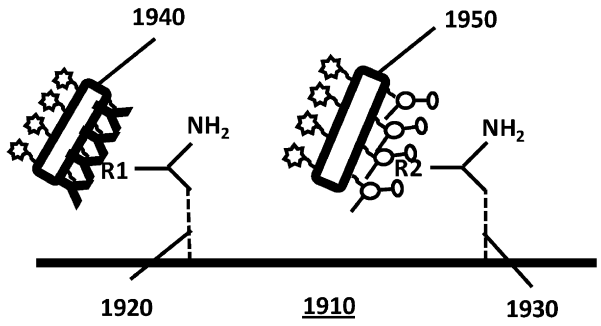
【図１８Ｃ】



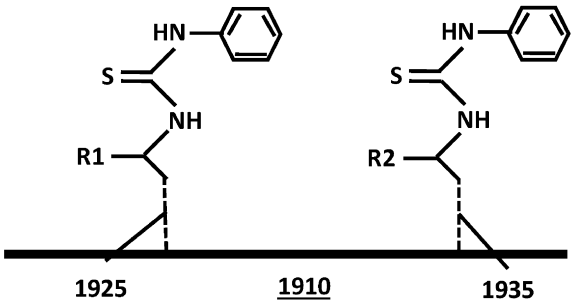
【図１９Ａ】



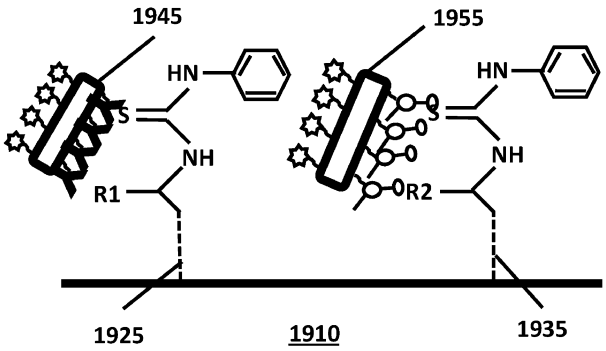
【図１９Ｂ】



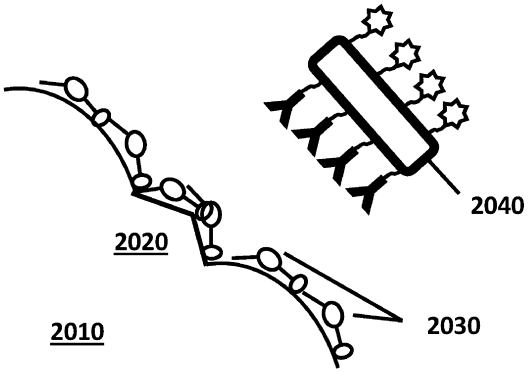
【図１９Ｃ】



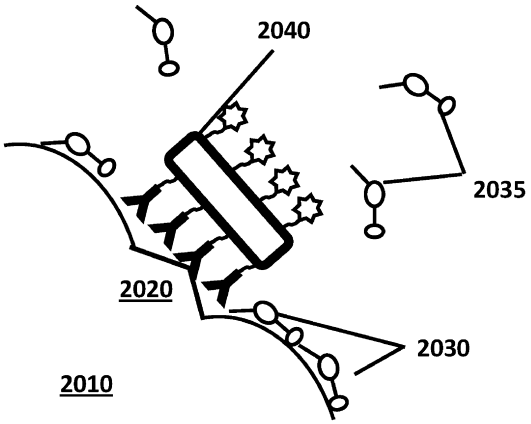
【図１９Ｄ】



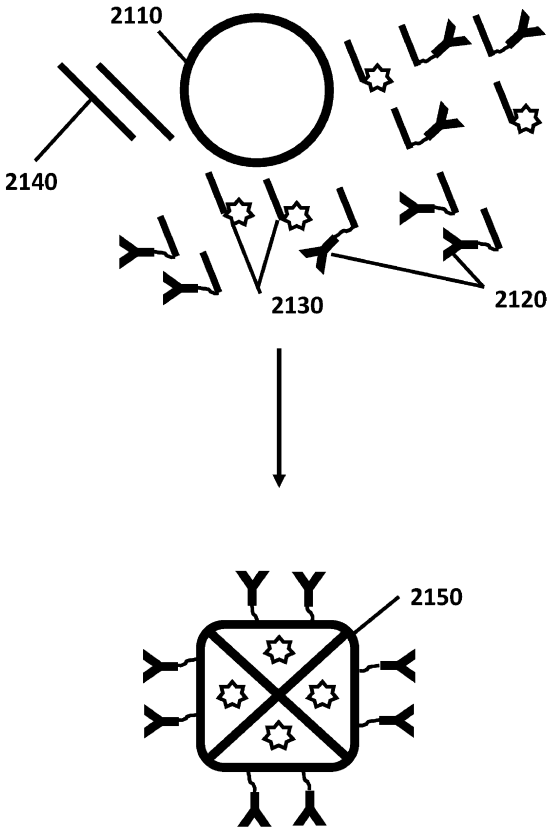
【図２０Ａ】



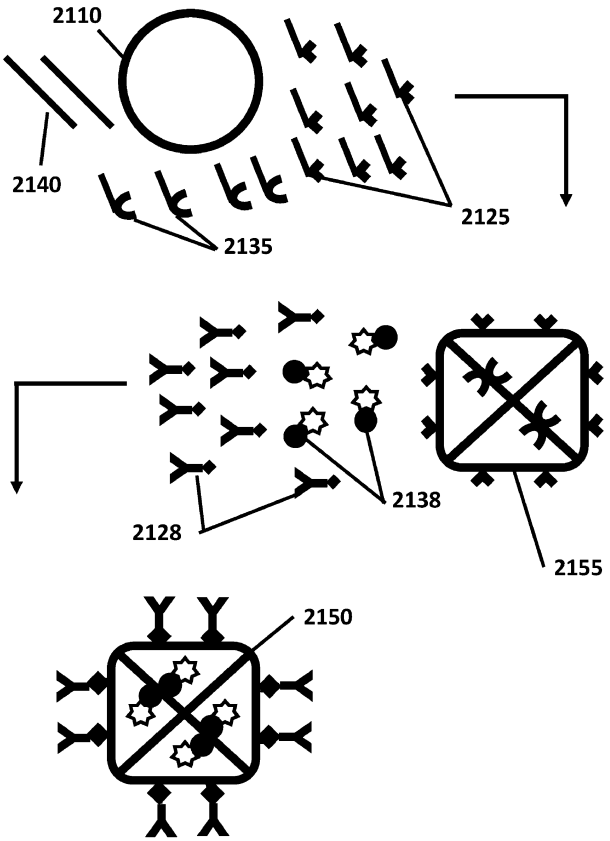
【図２０Ｂ】



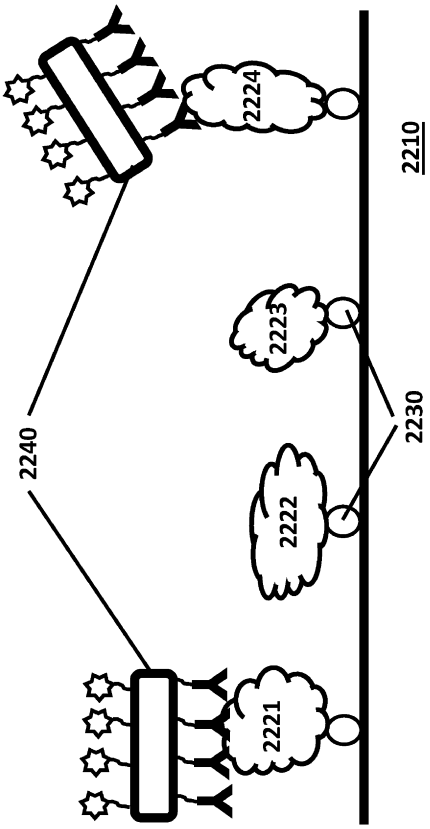
【図２１Ａ】



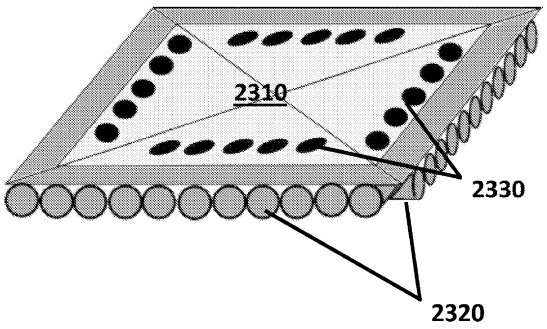
【図２１Ｂ】



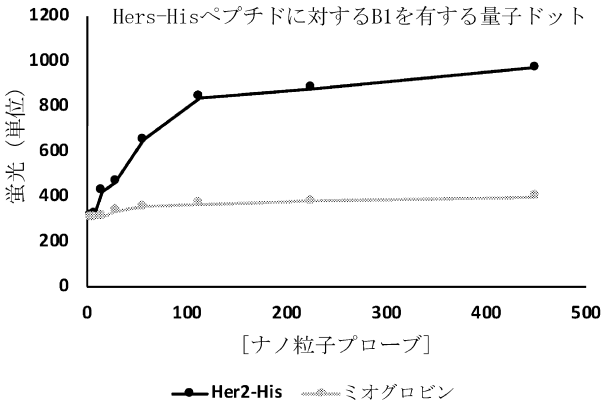
【図２２】



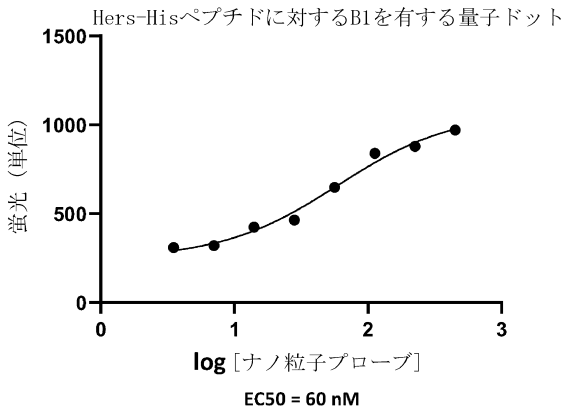
【図２３】



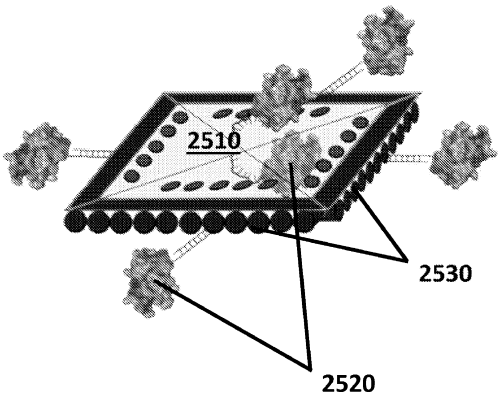
【図２４Ａ】



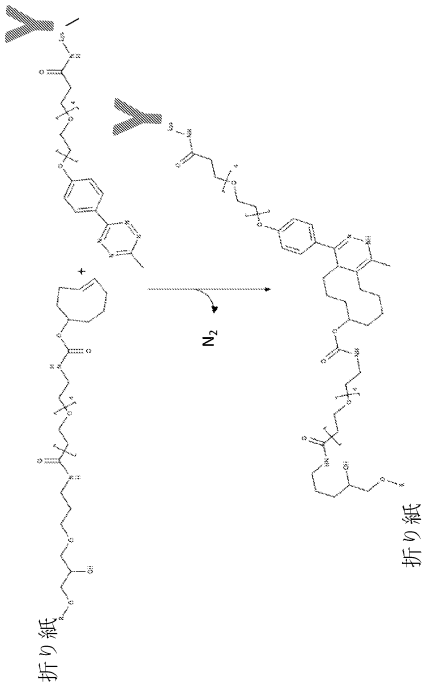
【図２４Ｂ】



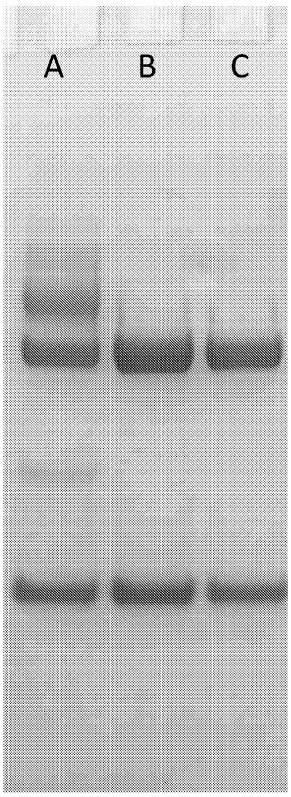
【図２５】



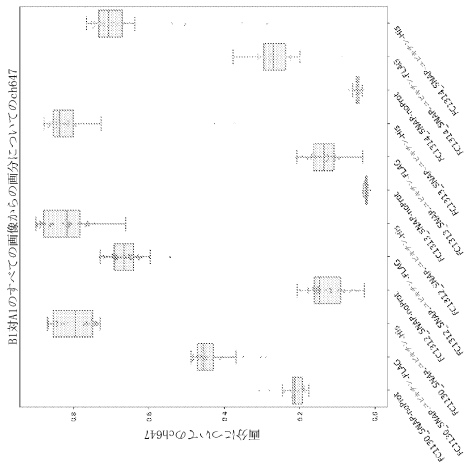
【図２６】



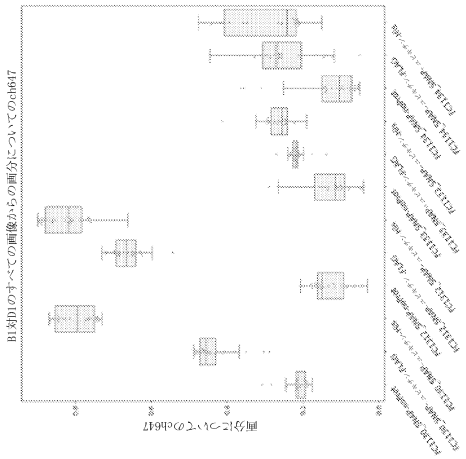
【図２７】



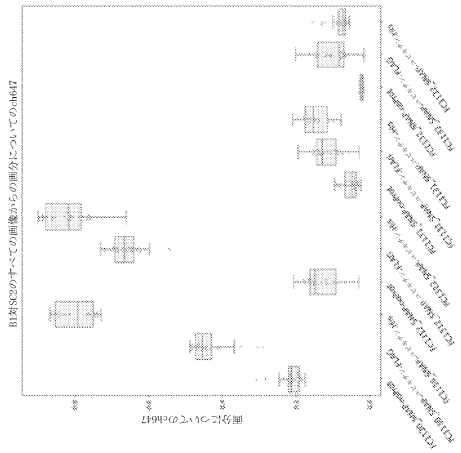
【図２８Ａ】



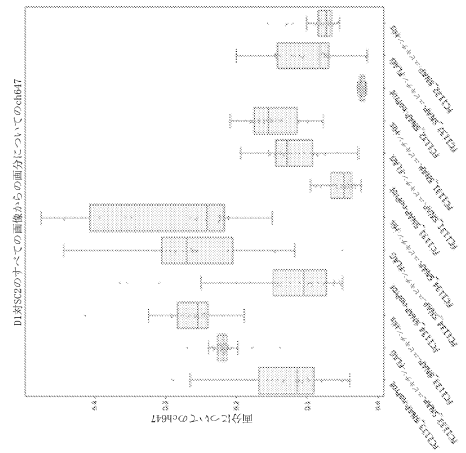
【図２８Ｂ】



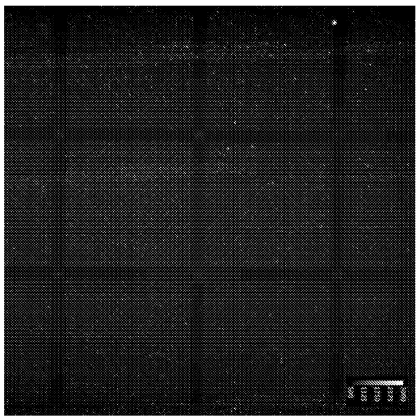
【図２８Ｃ】



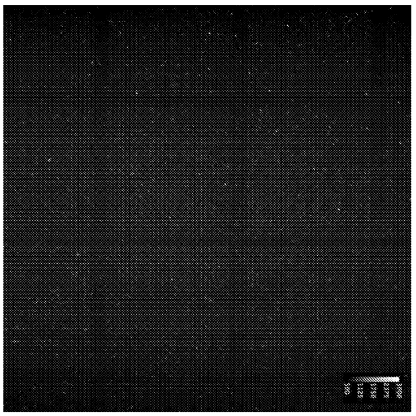
【図２８Ｄ】



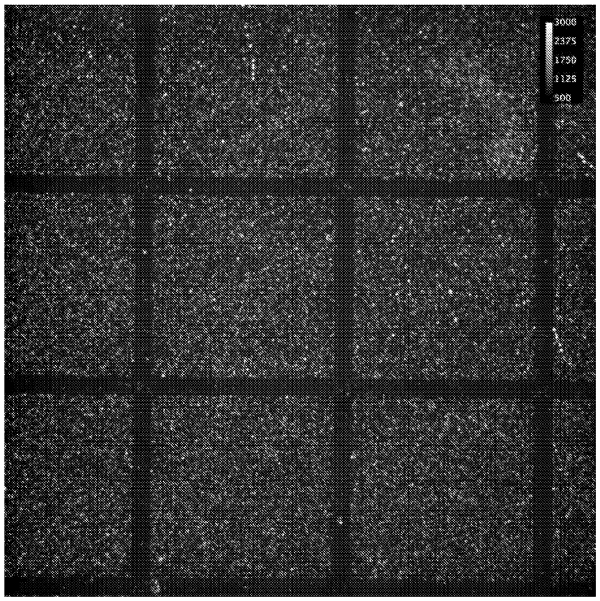
【図２９Ａ】



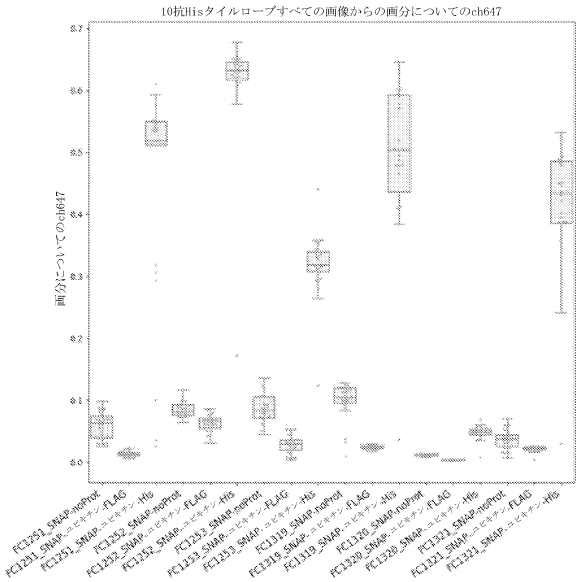
【図２９Ｂ】



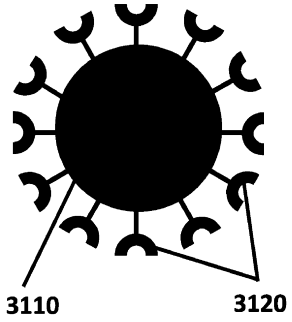
【図２９Ｃ】



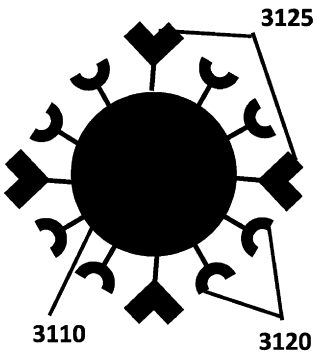
【図３０】



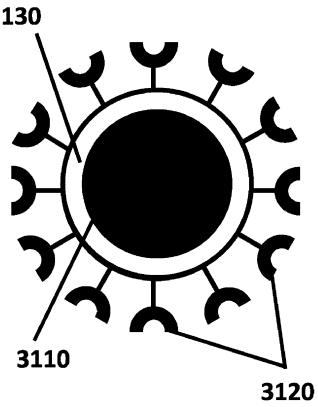
【図３１Ａ】



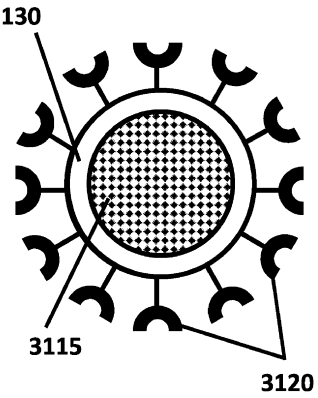
【図３１Ｂ】



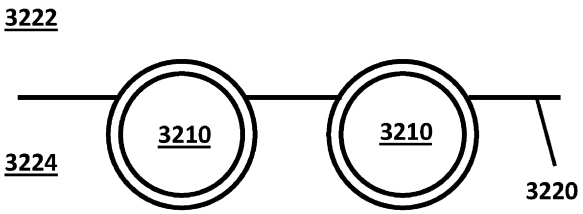
【図３１Ｃ】



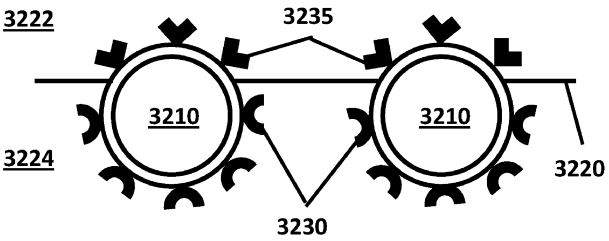
【図３１Ｄ】



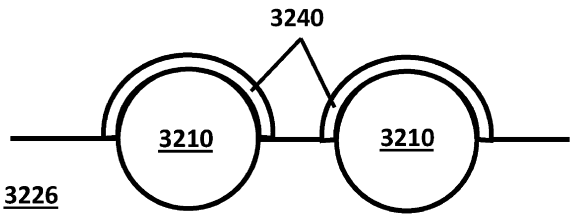
【図３２Ａ】



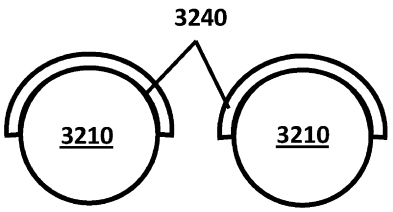
【図３２Ｂ】



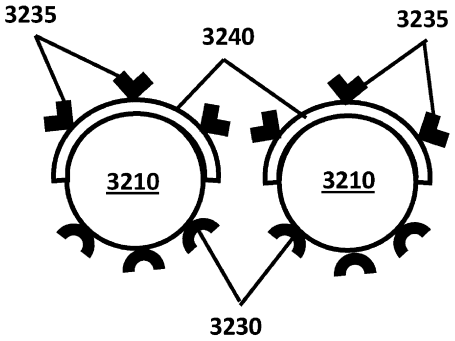
【図３２Ｃ】



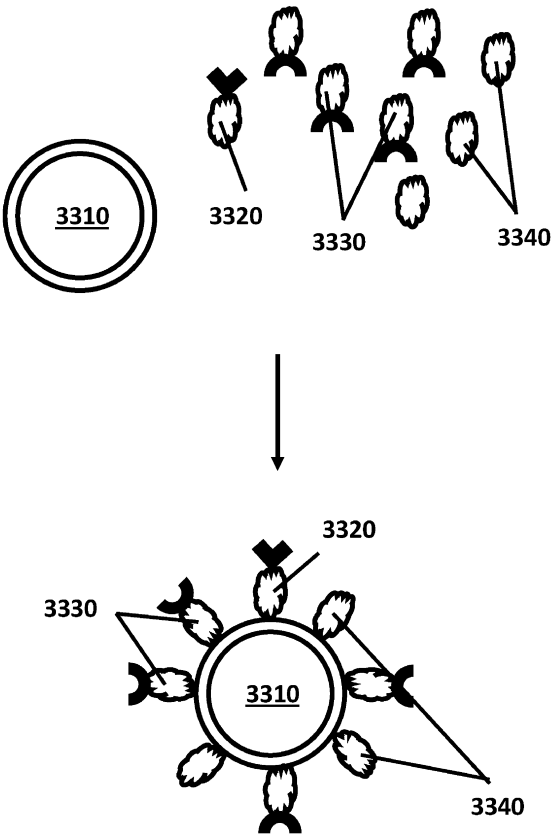
【図３２Ｄ】



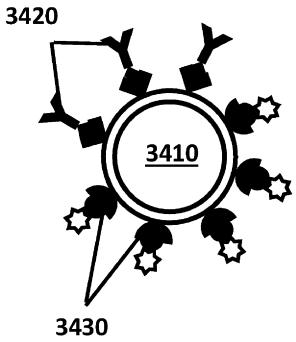
【図３２Ｅ】



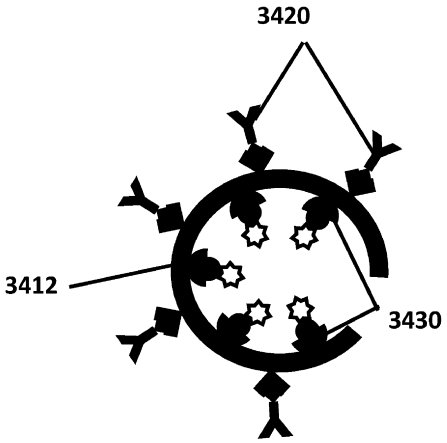
【図３３】



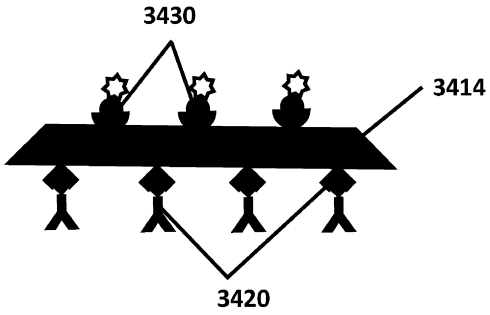
【図３４Ａ】



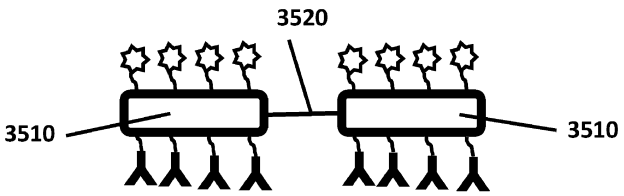
【図３４Ｂ】



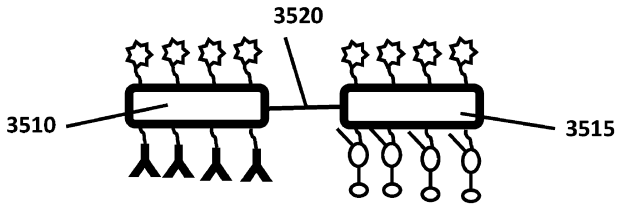
【図３４Ｃ】



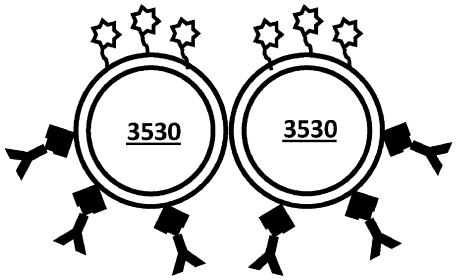
【図３５Ａ】



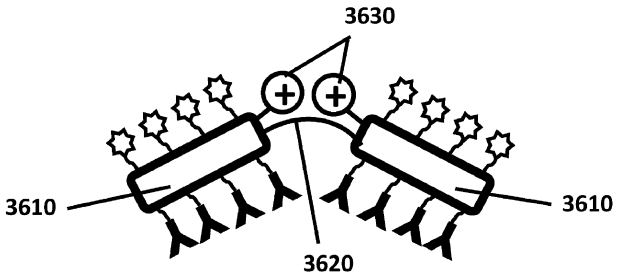
【図３５Ｂ】



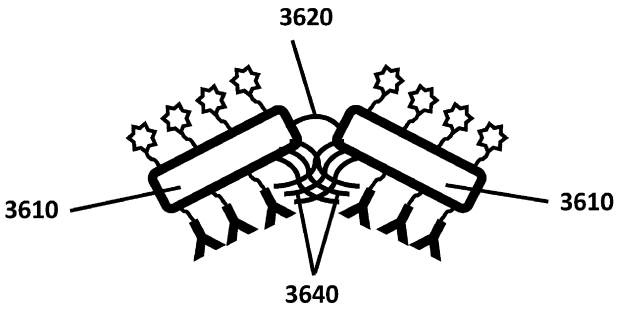
【図３５Ｃ】



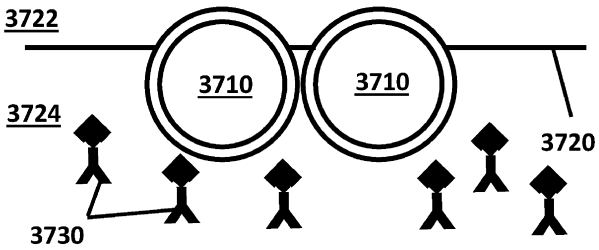
【図３６Ａ】



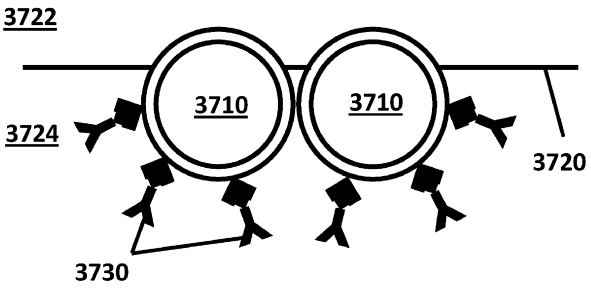
【図３６Ｂ】



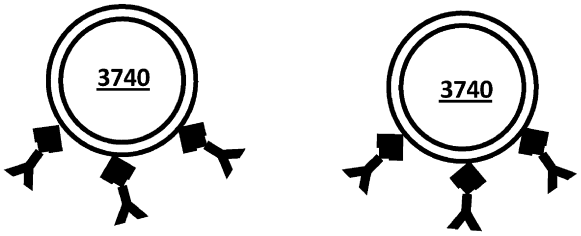
【図３７Ａ】



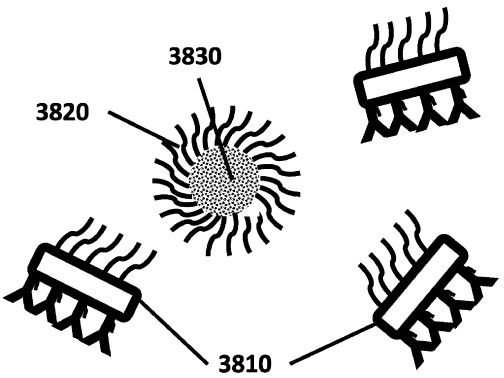
【図３７Ｂ】



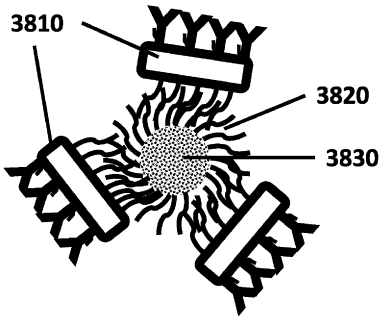
【図３７Ｃ】



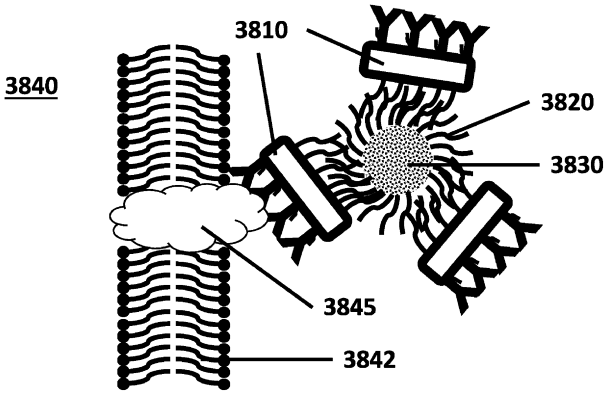
【図３８Ａ】



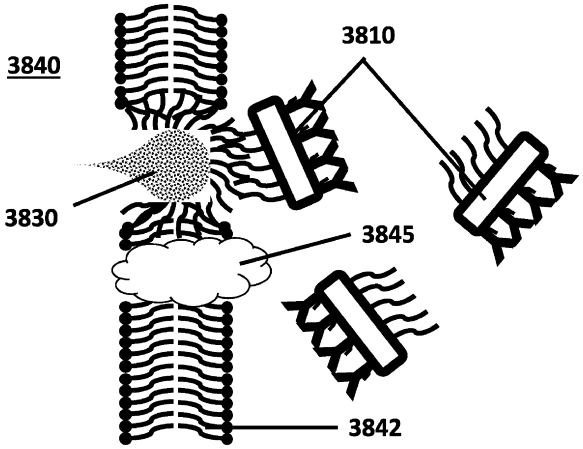
【図３８Ｂ】



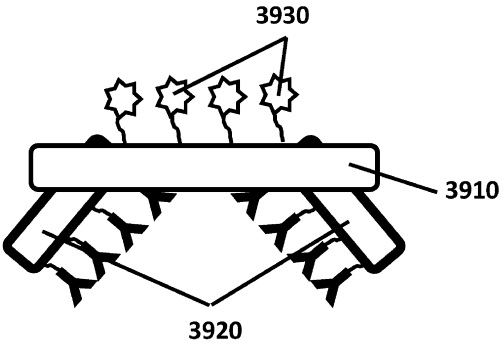
【図３８Ｃ】



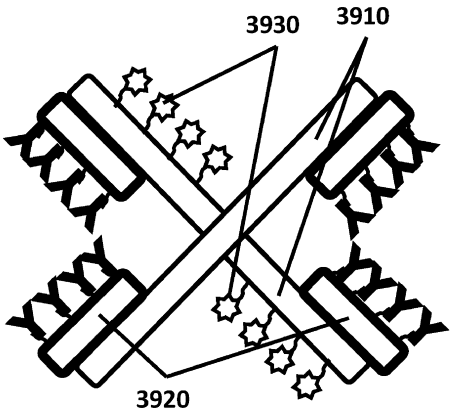
【図３８Ｄ】



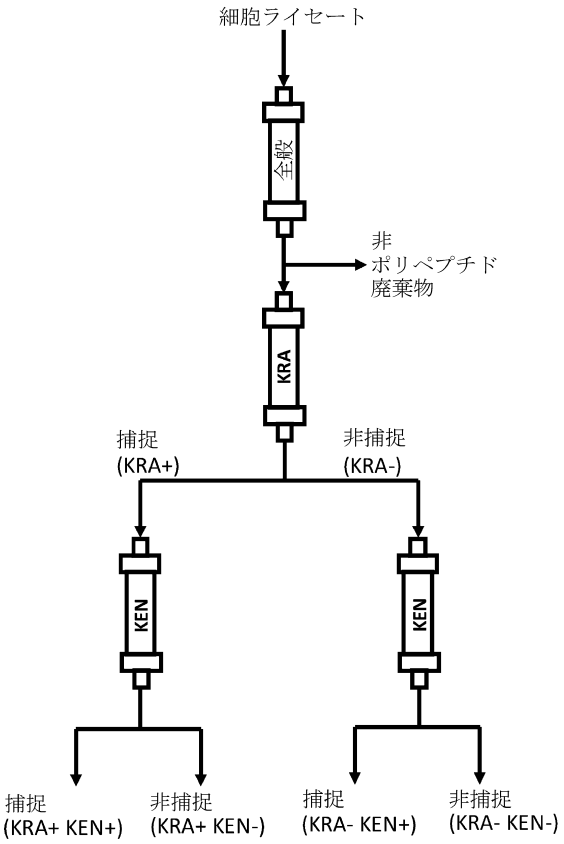
【図３９Ａ】



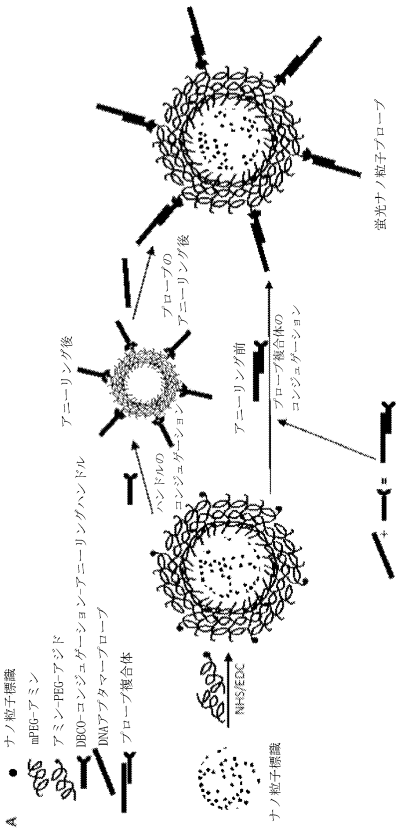
【図３９Ｂ】



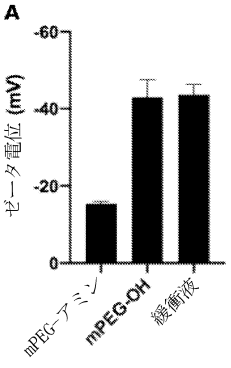
【図４０】



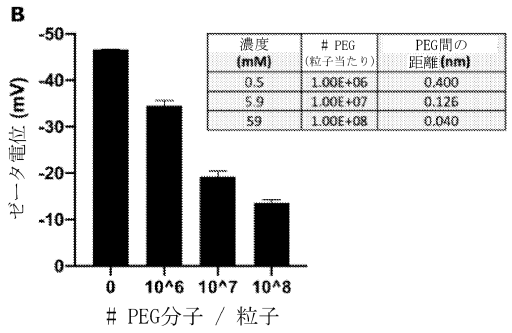
【図４１】



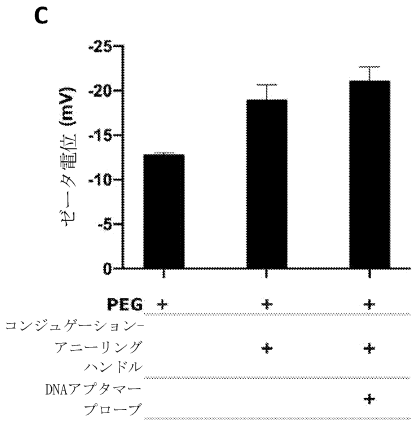
【図４２Ａ】



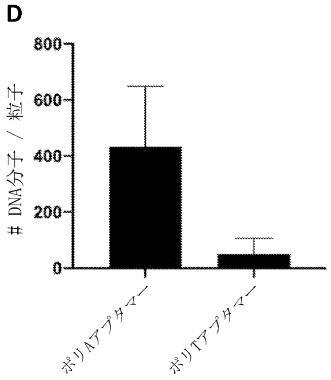
【図４２Ｂ】



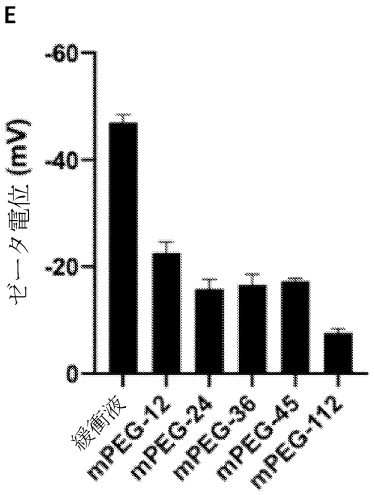
【図４２Ｃ】



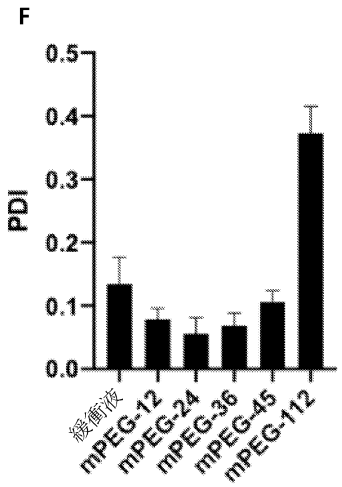
【図４２Ｄ】



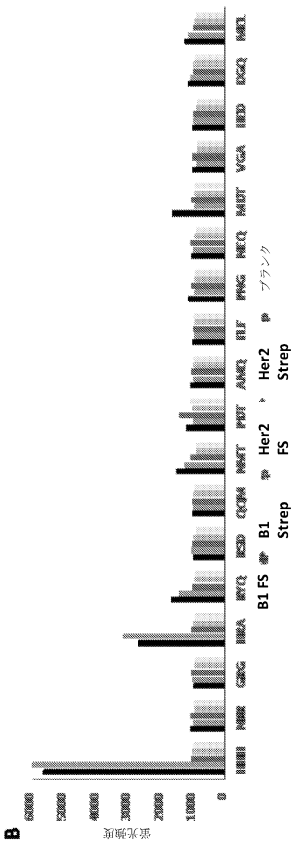
【図４２Ｅ】



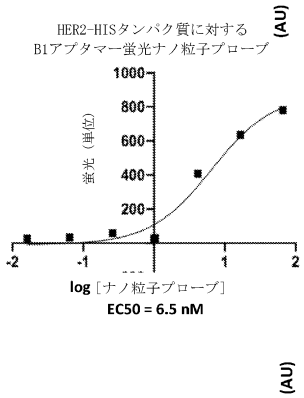
【図４２Ｆ】



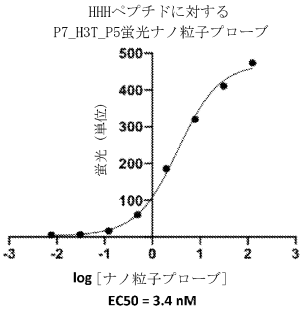
【図４３Ａ】



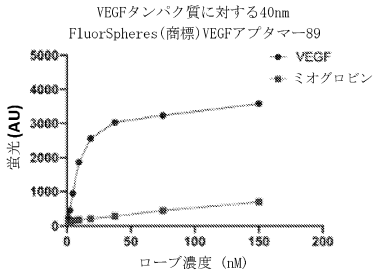
【図４３Ｂ】



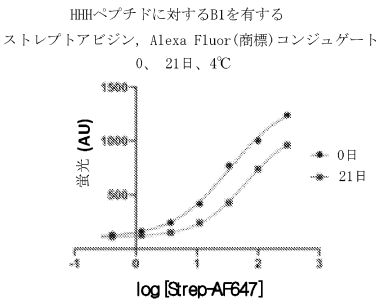
【図４３Ｃ】



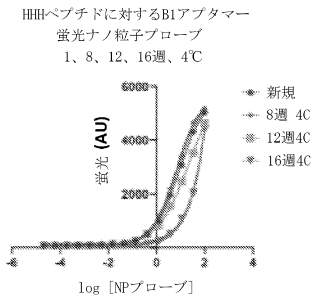
【図４３Ｄ】



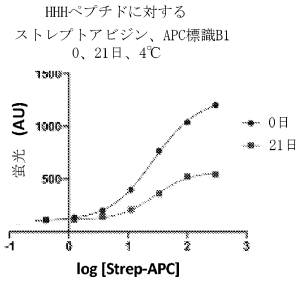
【図４４Ａ】



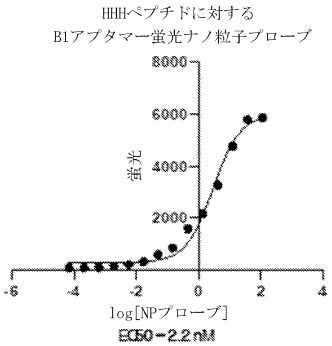
【図４４Ｂ】



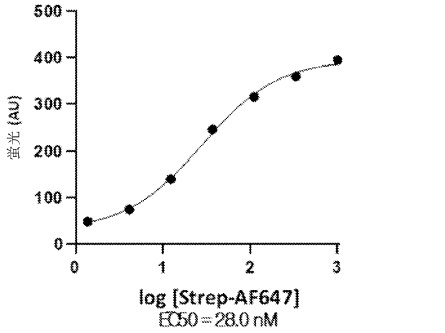
【図４４Ｃ】



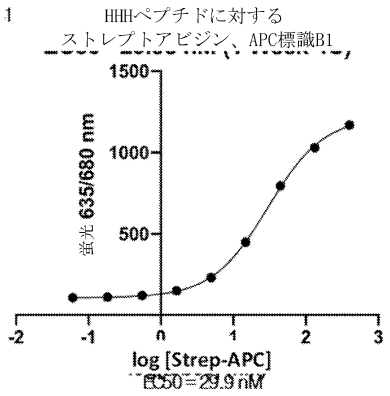
【図４５Ａ】



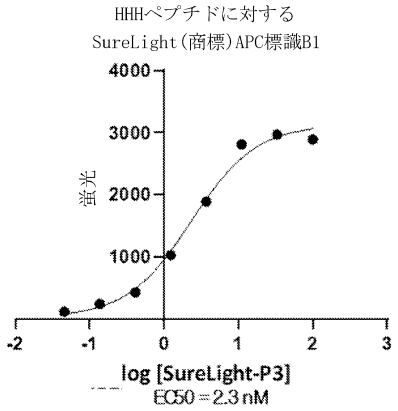
【図４５Ｂ】



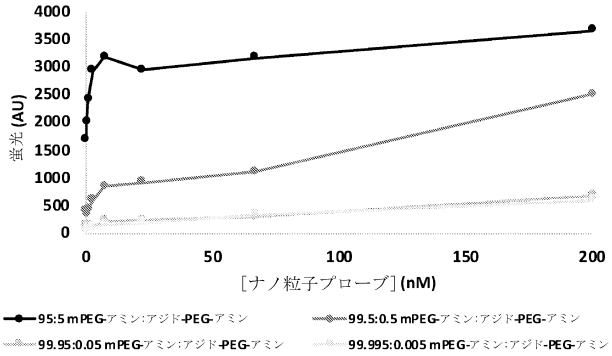
【図４５Ｃ】



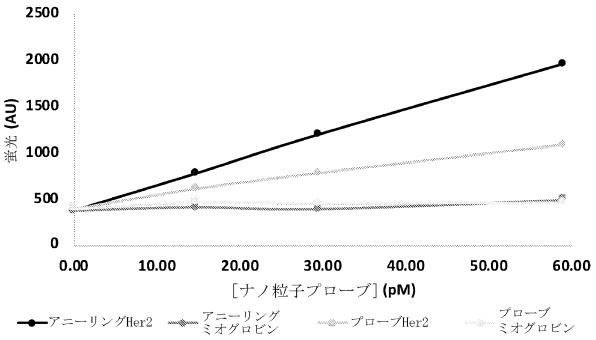
【図４５Ｄ】



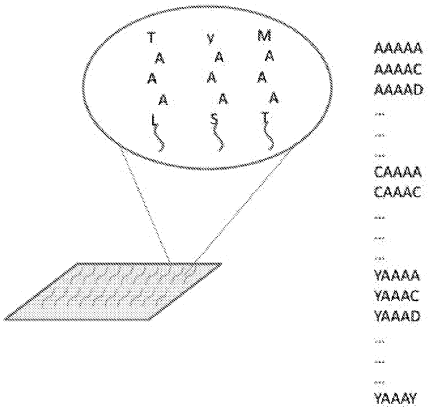
【図４６】



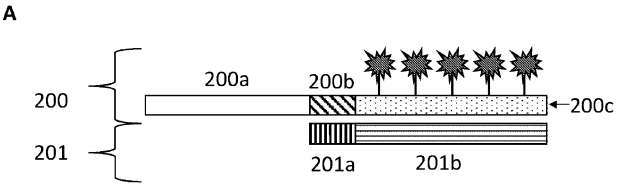
【図４７】



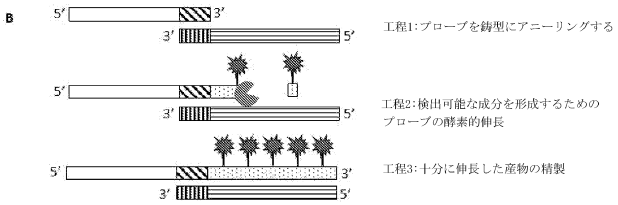
【図４８】



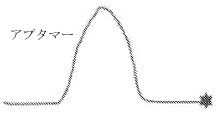
【図４９Ａ】



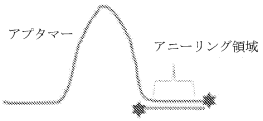
【図４９Ｂ】



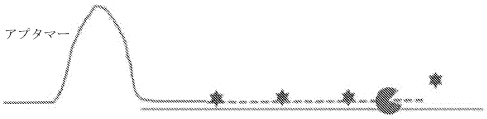
【図５０Ａ】



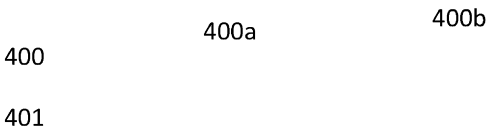
【図５０Ｂ】



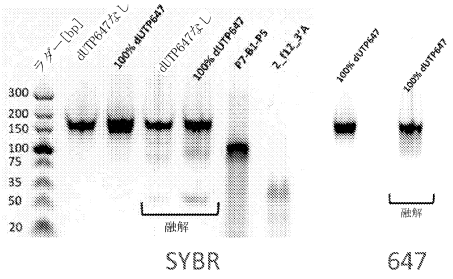
【図５０Ｃ】



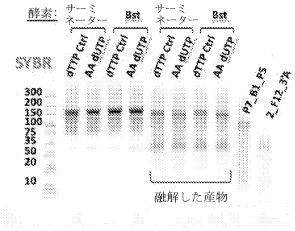
【図５１】



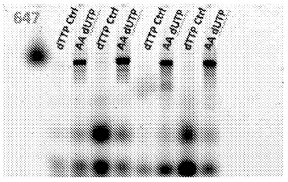
【図５２】



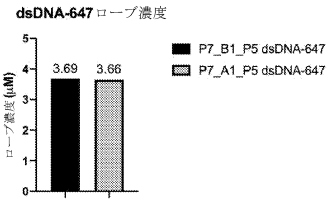
【図５３Ａ】



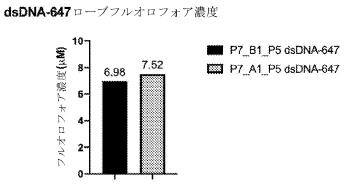
【図５３Ｂ】



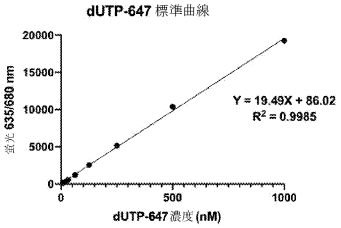
【図５４】



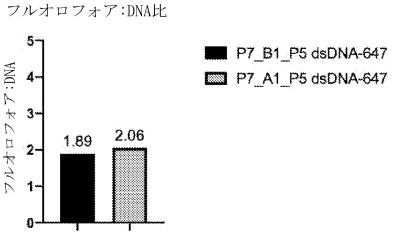
【図５５Ａ】



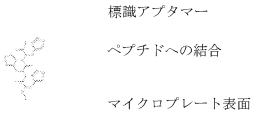
【図５５Ｂ】



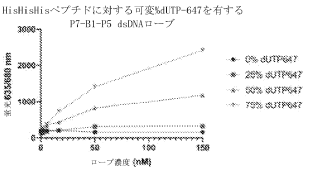
【図５６】



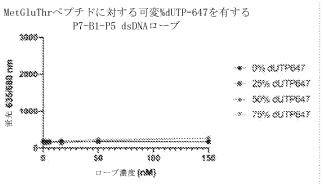
【図５７Ａ】



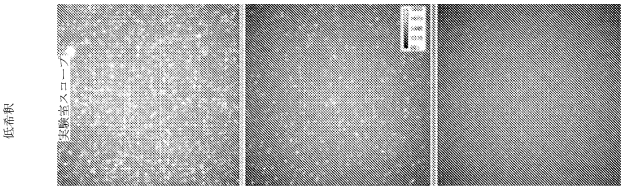
【図５７Ｂ】



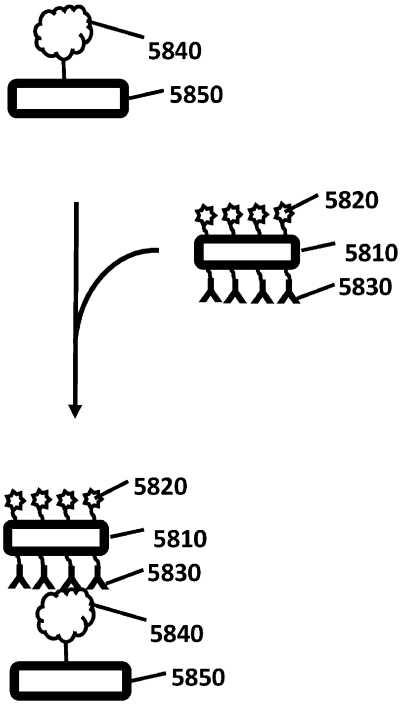
【図５７Ｃ】



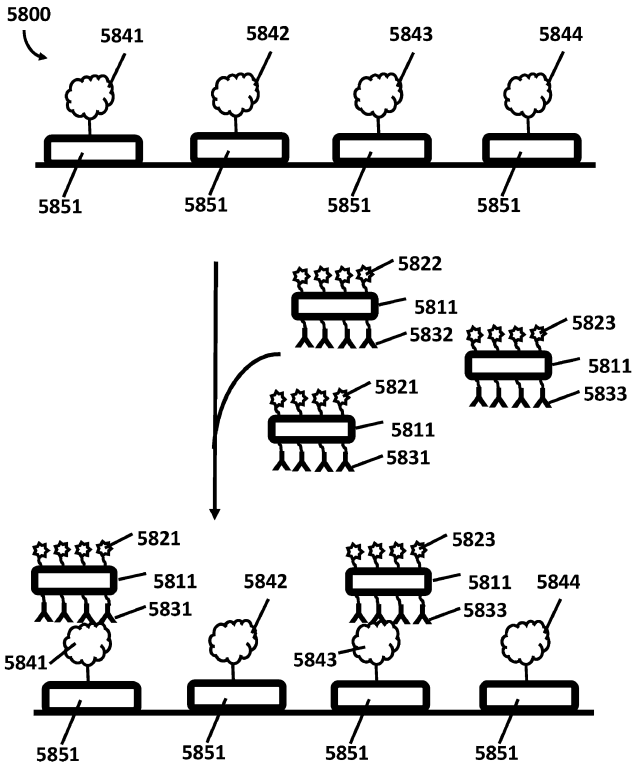
【図５７Ｄ】



【図５８Ａ】



【図５８Ｂ】



【配列表】

2023549350000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/058851

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6811
ADD.

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)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI WEIPING ET AL: "Multiplex electrochemical origami immunodevice based on cuboid silver-paper electrode and metal ions tagged nanoporous silver-chitosan", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, vol. 56, 1 June 2014 (2014-06-01), pages 167-173, XP055894161, Amsterdam , NL ISSN: 0956-5663, DOI: 10.1016/j.bios.2014.01.011 page 169; Scheme 2	1,2,6-8, 10,13,18
X,P	WO 2021/074087 A1 (ILLUMINA INC [US]; ILLUMINA SINGAPORE PTE LTD [SG] ET AL.) 22 April 2021 (2021-04-22) claims; [0218]	1-10, 16-18

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 February 2022	04/03/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hennard, Christophe

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/058851

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/058851

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YOUNGEUN CHOI ET AL: "A new reporter design based on DNA origami nanostructures for quantification of short oligonucleotides using microbeads", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 9, no. 1, 18 March 2019 (2019-03-18), XP055728379, DOI: 10.1038/s41598-019-41136-x figures; abstract	1-15,18, 28-31, 33-46
X Y	WO 2019/059961 A1 (CALIFORNIA INST OF TECHN [US]) 28 March 2019 (2019-03-28) figures; [0071]	1-18, 28-46 19-27
Y	WO 2008/016644 A1 (APPLERA CORP [US]; SHANNON MARK E [US]; RUFF DAVID W [US]) 7 February 2008 (2008-02-07) claims	19-27

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/058851

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021074087 A1	22-04-2021	TW 202130817 A	16-08-2021
		WO 2021074087 A1	22-04-2021
WO 2019059961 A1	28-03-2019	US 2019323002 A1	24-10-2019
		WO 2019059961 A1	28-03-2019
WO 2008016644 A1	07-02-2008	AU 2007281535 A1	07-02-2008
		BR PI0715346 A2	26-11-2013
		CA 2659632 A1	07-02-2008
		CN 101558167 A	14-10-2009
		EP 2049688 A1	22-04-2009
		EP 2484781 A2	08-08-2012
		EP 3305915 A1	11-04-2018
		JP 2009545317 A	24-12-2009
		US 2008032310 A1	07-02-2008
		US 2011287436 A1	24-11-2011
		US 2015361480 A1	17-12-2015
		US 2020102592 A1	02-04-2020
		WO 2008016644 A1	07-02-2008

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(32)優先日　令和3年7月29日(2021.7.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ
２．ＰＹＴＨＯＮ
３．ＩＧＥＰＡＬ

ー・４２５、ノース、スイート・２０２
(72)発明者　バーンズ，マルクス
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０９、シアトル、ポンティウス・アベニュー・４２５、ノース、スイート・２０２
(72)発明者　ドーワート，マイケル
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０９、シアトル、ポンティウス・アベニュー・４２５、ノース、スイート・２０２
(72)発明者　ガリミディ，レイチェル
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０９、シアトル、ポンティウス・アベニュー・４２５、ノース、スイート・２０２
(72)発明者　グレマイヤチンスキー，ドミトリー
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０９、シアトル、ポンティウス・アベニュー・４２５、ノース、スイート・２０２
(72)発明者　ヘンドリックス，スティーブン
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０９、シアトル、ポンティウス・アベニュー・４２５、ノース、スイート・２０２
(72)発明者　イクワ，エルビス
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０９、シアトル、ポンティウス・アベニュー・４２５、ノース、スイート・２０２
(72)発明者　カップ，グレゴリー
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０９、シアトル、ポンティウス・アベニュー・４２５、ノース、スイート・２０２
(72)発明者　クライン，ジョシュア
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０９、シアトル、ポンティウス・アベニュー・４２５、ノース、スイート・２０２
(72)発明者　ロビンソン，ジュリア
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０９、シアトル、ポンティウス・アベニュー・４２５、ノース、スイート・２０２
(72)発明者　スタウィッキ，カッサンドラ
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０９、シアトル、ポンティウス・アベニュー・４２５、ノース、スイート・２０２
(72)発明者　トナピ，ソナル
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０９、シアトル、ポンティウス・アベニュー・４２５、ノー

ス、スイート・２０２
(72)発明者　マリック，パラグ
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０９、シアトル、ポンティウス・アベニュー・４２５、ノース、スイート・２０２
Ｆターム（参考）　4B063　QA01 QA18 QA20 QQ01 QR31 QR55 QR82 QS40 QX10