

【化 2】

オリゴヌクレオチド

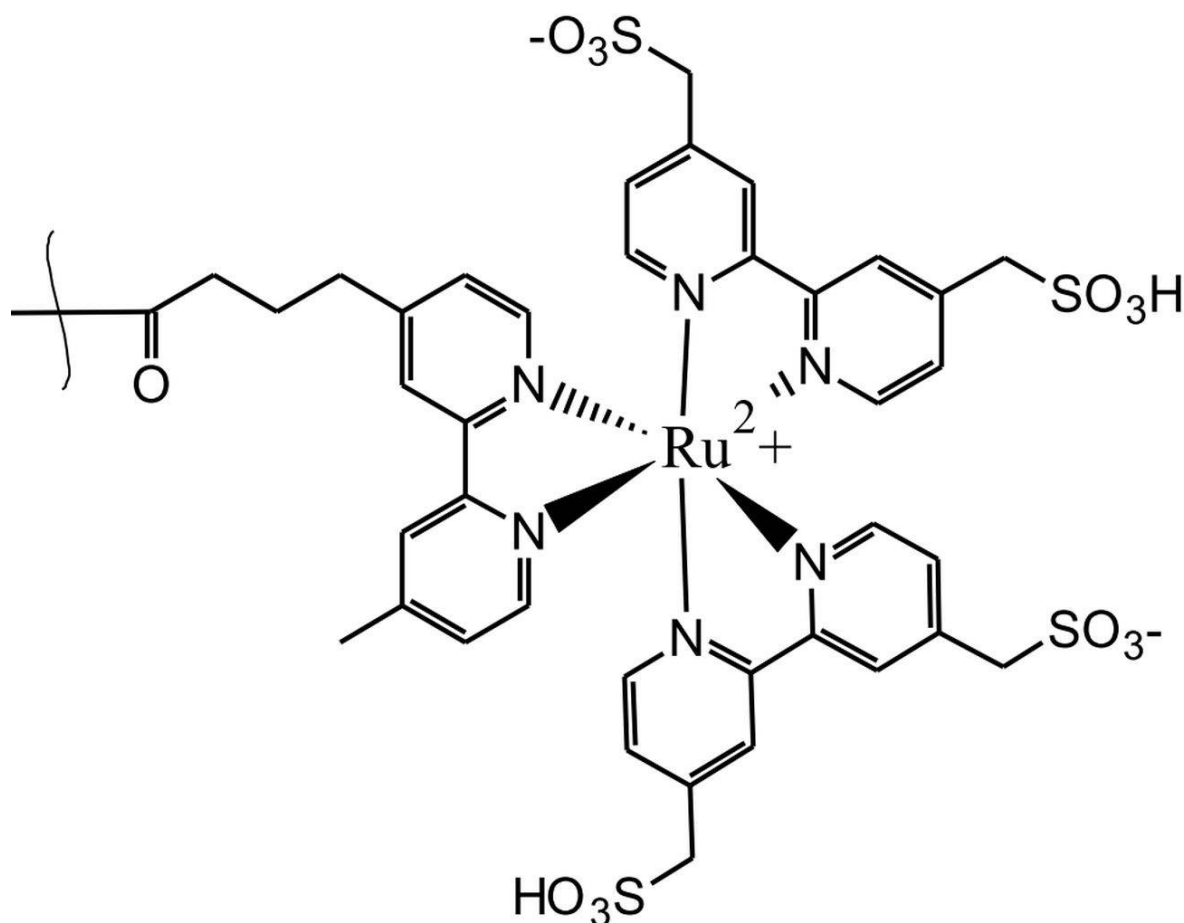
がオリゴヌクレオチドであり、 j が 0 ～ 11 の整数であり、 k が 0 ～ 1 の整数であり、 m が 0 ～ 11 の整数であり、 n が 0 ～ 5 の整数である、標識プローブ。

【請求項 2】

(i) 式 I の R がルテニウム錯体 $R P^1 P^2 P^3$ を含み、 P^1 、 P^2 および P^3 のそれぞれが独立して、ピピリジン、置換ピピリジン、フェナントロリン、または置換フェナントロリンであるか、

(ii) 式 I の R が、

【化 3】



であるか、

(iii) 式 I の B が、ウラシルの 5 位で L^1 に付着したウラシルであるか、

(iv) 式 I の L^1 が、

10

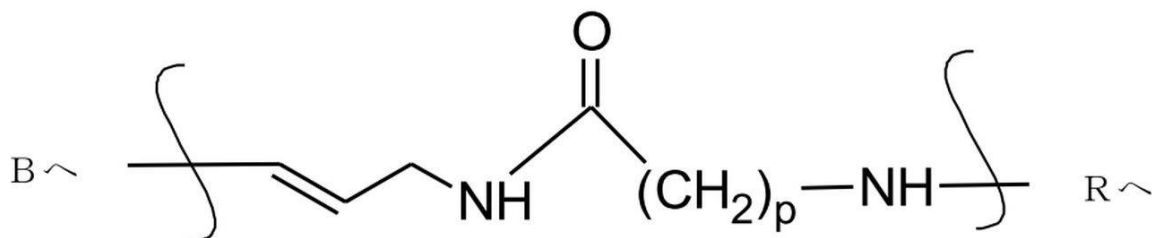
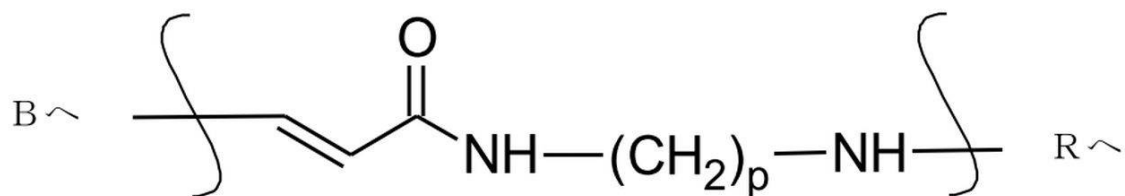
20

30

40

50

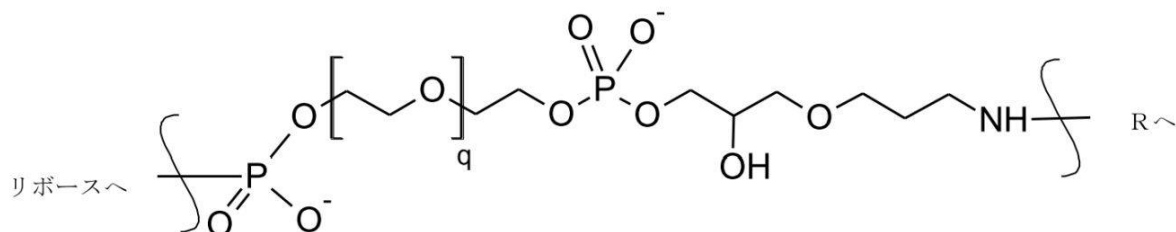
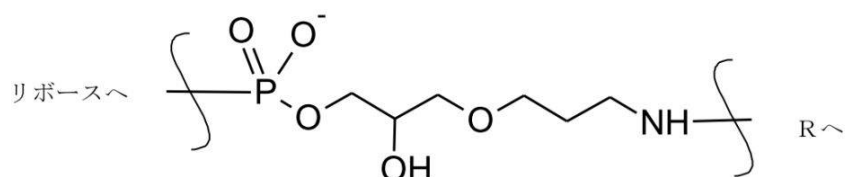
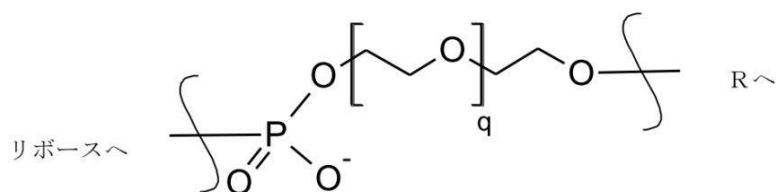
【化 4】



またはそれらの組み合わせを含み、式中、 p が 1 ～ 12 の整数であるか、

(v) 式 I の L^2 が、

【化 5】



またはそれらの組み合わせを含み、式中、 q が 0 ～ 11 の整数であるか、

(vi) j が 0、 k が 0、および n が 5 であるか、

(vii) 式 I の前記オリゴヌクレオチドが、5' - CAGTGAATGCGAGTCCGTCT - 3' (配列番号 31) または 5' - CAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAG - 3' (配列番号 32) に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含むか、または

(viii) (i) ～ (vii) の任意の組み合わせである、

請求項 1 に記載の標識プローブ。

10

20

30

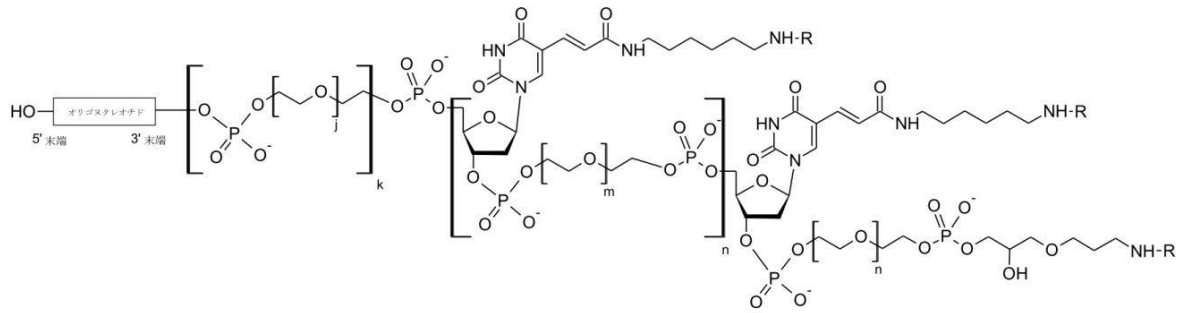
40

50

【請求項 3】

式 I I の標識プローブであって、

【化 6】

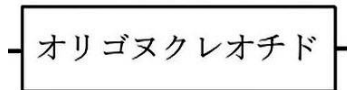


10

式 I I

式中、j は 0 ～ 11 の整数であり、k は 0 ～ 1 の整数であり、m は 0 ～ 11 の整数であり、n は 0 ～ 5 の整数であり、

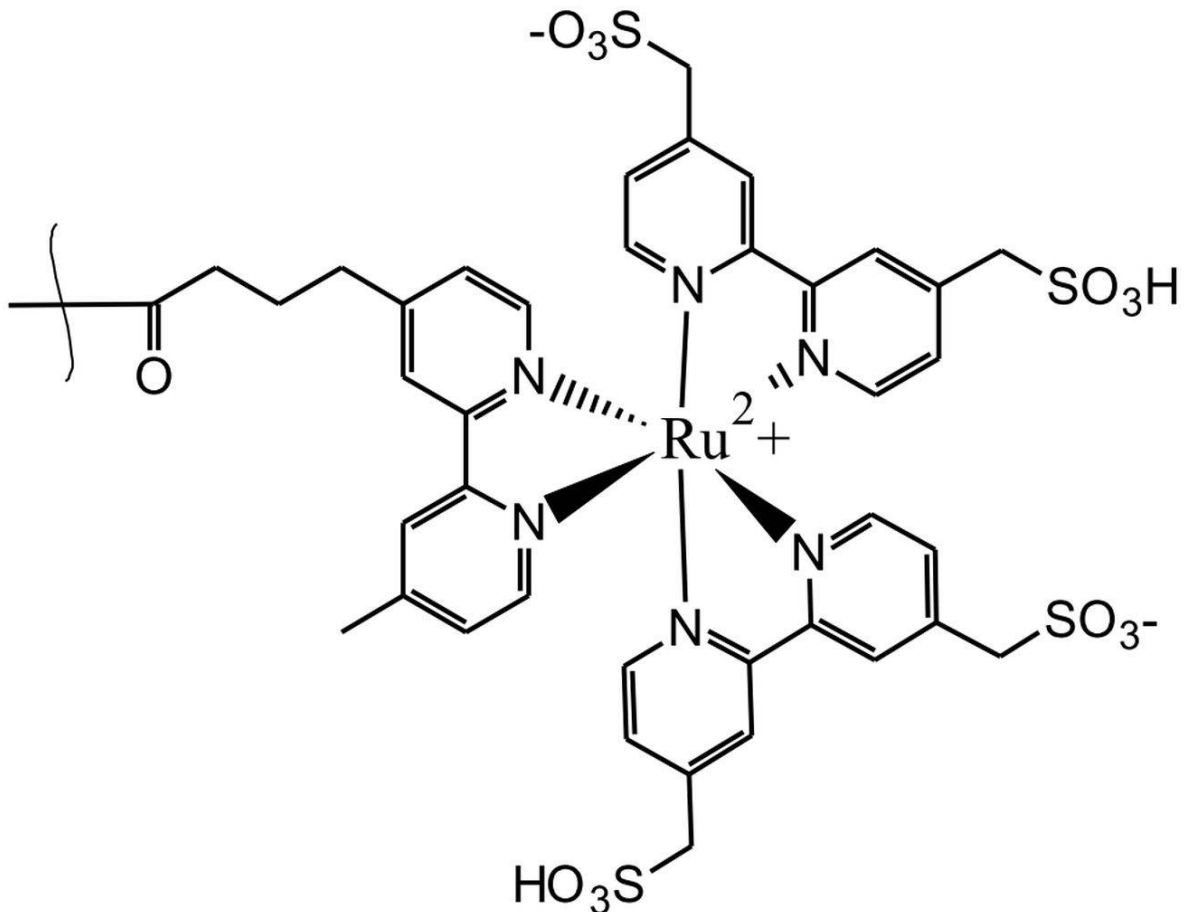
【化 7】



20

がオリゴヌクレオチドであり、R は、電気化学発光標識：

【化 8】



30

40

である、標識プローブ。

50

【請求項 4】

(i) j が 0、 k が 0、および n が 5 であるか、

(ii) 式 I の前記オリゴヌクレオチドが、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) または 5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T A A G - 3' (配列番号 32) に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含むか、または

(iii) (i) ~ (ii) の組み合わせである、

請求項 3 に記載の標識プローブ。

【請求項 5】

電気化学発光を測定する方法であって、

(a) 電極に電位を、前記電極に近接している複合体が電気化学発光を放出する条件下で、印加することであって、前記複合体は、標的オリゴヌクレオチドおよび請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の標識プローブを含み、式 I の前記オリゴヌクレオチドまたは式 I の前記オリゴヌクレオチドは前記標的オリゴヌクレオチドに相補的である、電極に電位を印加することと、

(b) 前記放出された電気化学発光を測定することと、を含む、方法。

【請求項 6】

前記標的オリゴヌクレオチドが、前記電極上に固定される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記複合体が、前記標的オリゴヌクレオチドに結合することができる結合試薬をさらに含み、前記結合試薬が前記電極上に固定される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記標的オリゴヌクレオチドが、固相担体上に固定される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記標的オリゴヌクレオチドに結合することができる結合試薬が、固相担体上に固定され、

前記固相担体が、前記電極に固定される、

請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

前記固相担体が、粒子であり、前記粒子が、重力、遠心分離、濾過、または磁場の印加を使用して、前記電極上に収集される、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 11】

電気化学発光を測定するためのキットであって、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の標識プローブと、

(a) 電極、

(b) ECL 読み取り緩衝液、

(c) 核酸ポリメラーゼ、

(d) 核酸リガーゼ、

(e) アッセイ希釈剤、

(f) 追加の核酸試薬、

(g) アッセイ消耗品、または

(h) それらの組み合わせと、を含む、キット。

【請求項 12】

前記電極が、炭素系電極である、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

前記 ECL 読み取り緩衝液が、トリプロピルアミンおよび／またはブチルジエタノールアミンを含む、請求項 11 又は 12 に記載のキット。

【請求項 14】

アッセイ消耗品が、マルチウェルプレートアッセイ消耗品であり、前記プレートの各ウェルが、カーボンインク電極を含む、請求項 11 ~ 13 のいずれか一項に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

アッセイを実施するためのキットであって、

(a) アンカーオリゴヌクレオチドを含むアンカー試薬と、

(b) 請求項 1～4 のいずれか一項に記載の標識プローブと、

(c) 5'末端ヌクレオチド配列を含むコネクターオリゴヌクレオチド、3'末端ヌクレオチド配列（前記 5'および 3'末端ヌクレオチド配列は核酸プローブにハイブリダイズすることができる）、前記アンカーオリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる第 1 の内部ヌクレオチド配列、および前記標識プローブの検出オリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる第 2 の内部ヌクレオチド配列と、

(d) 核酸リガーゼと、

(e) 核酸ポリメラーゼと、

を含む、キット。

10

【請求項 16】

前記コネクターオリゴヌクレオチドの前記 5'末端配列に相補的な第 1 の配列と、前記コネクターオリゴヌクレオチドの前記 3'末端配列に相補的な隣接する第 2 の配列と、を含む核酸プローブ、をさらに含む、請求項 15 に記載のキット。

【請求項 17】

核酸プローブが、5'－GACAGAACTAGACAC－3'（配列番号 33の14または 15 個の連続したヌクレオチドを含む、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 18】

(i) 前記アンカーオリゴヌクレオチドが、17 または 25 オリゴヌクレオチドの長さであるか、

(ii) 前記アンカーオリゴヌクレオチドが、5'－AAGAGAGTAGTACAGCA－3'（配列番号 35）を含むか、

(iii) 前記コネクターオリゴヌクレオチドが、5'末端ホスフェート基をさらに含むか、

(iv) 前記コネクターオリゴヌクレオチドが、53～61ヌクレオチドの長さであるか、

(v) 前記 5'末端配列が、GTTCTGTCTCであり、前記 3'末端配列が、GTGTCTTAであるか、

20

30

(vi) 前記コネクターオリゴヌクレオチド配列が、5'－GTTCTGTCTCATATTTCAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGAGAGTAGTACAGCAA GAGTGTCTTA－3'（配列番号 36）からなるか、または

(vii) (i)～(vi)の任意の組み合わせである、

請求項 15～17 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 19】

前記アンカーオリゴヌクレオチドが、17 または 25ヌクレオチドの長さである、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

前記 3'および 5'末端配列の長さの合計が、14～19ヌクレオチドの長さである、請求項 18 又は 19 に記載のキット。

40

【請求項 21】

前記 3'および 5'末端配列の長さの合計が、14 または 15ヌクレオチドの長さである、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 22】

分析物を測定する方法であって、

(a) 前記分析物を、(i) 表面上の結合ドメインの捕捉試薬であって、前記結合ドメインが、アンカーオリゴヌクレオチドを含むアンカー試薬をさらに含む、捕捉試薬と、(ii) 検出試薬および核酸プローブを含むコンジュゲートとに結合することにより、前記捕捉試薬、前記分析物、および前記コンジュゲートを含む複合体を前記結合ドメインに形

50

成することと、

(b) 前記コンジュゲートの前記核酸プローブを伸長して、前記アンカーオリゴヌクレオチドに相補的なアンカーオリゴヌクレオチド相補体および標識プローブの検出オリゴヌクレオチドに相補的な検出配列相補体を含む伸長配列を形成することと、

(c) 前記検出オリゴヌクレオチドを含む前記標識プローブを前記伸長配列に結合することと、

(d) 前記結合ドメインに結合した前記標識プローブの量を測定することと、を含み、前記標識プローブは、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の標識プローブである、方法。

【請求項 2 3】

分析物を測定する方法であって、

(a) 前記分析物を、(i) 表面上の結合ドメインの捕捉試薬であって、前記結合ドメインが、アンカーオリゴヌクレオチドを含むアンカー試薬をさらに含む、捕捉試薬と、(ii) 検出試薬、ならびに第 1 のプローブ配列および隣接する第 2 のプローブ配列を有するオリゴヌクレオチドを含む核酸プローブを含むコンジュゲートとに結合することにより、前記捕捉試薬、前記分析物、および前記コンジュゲートを含む複合体を前記結合ドメインに形成することと、

(b) 前記複合体の前記核酸プローブを、コネクタオリゴヌクレオチドであって、前記第 1 のプローブ配列に相補的な 5' 末端配列、前記第 2 のプローブ配列に相補的な 3' 末端配列、前記アンカーオリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる第 1 の内部配列、および標識プローブの検出オリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる第 2 の内部配列を含む、コネクタオリゴヌクレオチドに結合することと、

(c) 前記コネクタオリゴヌクレオチドを連結して環状テンプレートオリゴヌクレオチドを形成することと、

(d) ローリングサークル増幅により前記核酸プローブを伸長して伸長配列を形成することと、

(e) 前記検出オリゴヌクレオチドを含む標識プローブを前記伸長配列に結合することと、

(f) 前記結合ドメインに結合した前記標識プローブの量を測定することと、を含み、前記標識プローブは、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の標識プローブである、方法。

【請求項 2 4】

分析物を測定する方法であって、

(a) 表面上の結合ドメイン内の第 1 の捕捉試薬に前記分析物を結合することであって、前記結合ドメインが、アンカーオリゴヌクレオチドを含むアンカー試薬をさらに含む、第 1 の捕捉試薬に分析物を結合することと、

(b) 検出試薬および核酸プローブを含むコンジュゲートを、前記結合ドメイン内の第 2 の捕捉試薬に結合し、前記第 2 の捕捉試薬および前記コンジュゲートを含む複合体を形成することであって、前記検出試薬が、前記第 1 および第 2 の捕捉試薬に結合するための前記分析物の競合相手である、複合体を形成することと、

(c) 前記複合体中の前記コンジュゲートの前記核酸プローブを伸長して、前記アンカーオリゴヌクレオチドに相補的なアンカーオリゴヌクレオチド相補体および標識プローブの検出オリゴヌクレオチドに相補的な検出配列相補体を含む伸長配列を形成することと、

(d) 前記検出オリゴヌクレオチドを含む前記標識プローブを前記伸長配列に結合することと、

(e) 前記結合ドメインに結合した前記標識プローブの量を測定することと、を含み、前記標識プローブは、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の標識プローブである、方法。

【請求項 2 5】

分析物を測定する方法であって、

(a) 前記分析物を、第 1 の検出試薬および核酸プローブを含む第 1 のコンジュゲートに結合することと、

(b) 表面上の結合ドメインの捕捉試薬を、第2の検出試薬および核酸プローブを含む第2のコンジュゲートに結合して、前記捕捉試薬および前記第2のコンジュゲートを含む複合体を形成することであって、(i) 前記結合ドメインが、アンカーオリゴヌクレオチドを含むアンカー試薬をさらに含み、(ii) 前記捕捉試薬が、前記第1および第2の検出試薬に結合するための前記分析物の競合相手である、複合体を形成することと、

(c) 前記複合体中の前記第2のコンジュゲートの前記核酸プローブを伸長して、前記アンカーオリゴヌクレオチドに相補的なアンカーオリゴヌクレオチド相補体および標識プローブの検出オリゴヌクレオチドに相補的な検出配列相補体を含む伸長配列を形成することと、

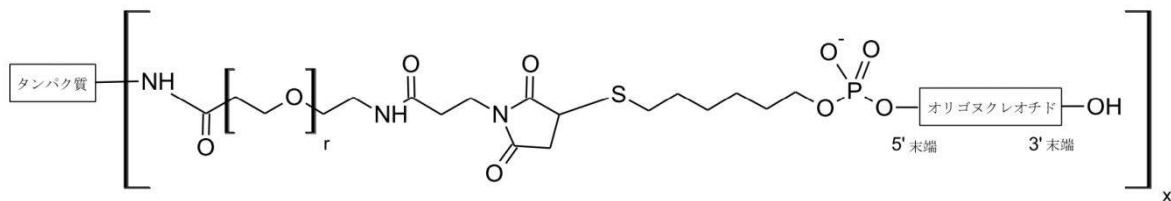
(d) 前記検出オリゴヌクレオチドを含む前記標識プローブを前記伸長配列に結合することと、

(e) 前記結合ドメインに結合した前記標識プローブの量を測定することと、を含み、前記標識プローブは、請求項1～4のいずれか一項に記載の標識プローブである、方法。

【請求項26】

前記コンジュゲートが式V Iの化合物を含み、

【化9】



式V I

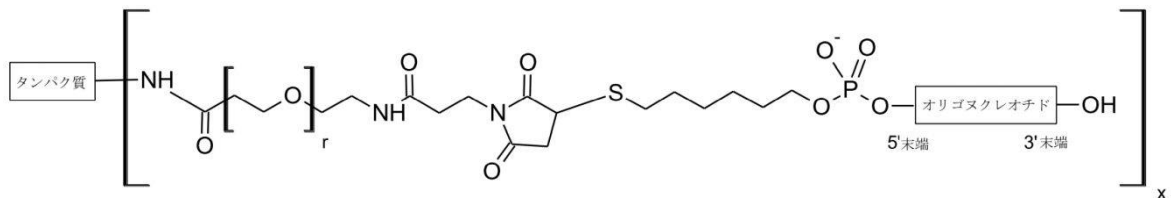
式中、 r が0～24の整数であり、 x が1～20の整数であり、およびタンパク質-NH-が、前記タンパク質に由来するアミノ基のコンジュゲート型である、

請求項22～24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

前記第1のコンジュゲートおよび／または前記第2のコンジュゲートが、式V Iの化合物を含み、

【化10】



式V I

式中、 r が0～24の整数であり、 x が1～20の整数であり、およびタンパク質-NH-が、前記タンパク質に由来するアミノ基のコンジュゲート型である、

請求項25に記載の方法。

【請求項28】

1つ以上の追加の分析物について、前記方法を繰り返すことをさらに含む方法であって、各分析物が、同じ表面または異なる表面上の異なる結合ドメイン内の異なる捕捉試薬に結合する、請求項22～27のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本出願は、A S C I I形式で電子的に提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2020年2月26日に作成されたA S C I Iコピーは、0076-0010WO1__S L . t x tと称され、サイズは12,578バイトである。

【0002】

本発明は、免疫測定を実施するための方法に関する。本方法は、免疫測定のシグナルを増幅し、そこで使用される免疫測定複合体をアンカリングするように設計されている。

【背景技術】

【0003】

試料中の目的の分析物の高感度測定のために、結合反応、例えば、抗原抗体反応、核酸ハイブリダイゼーションおよび受容体-リガンド反応を使用する技術に関して、かなりの数の文献が開発されてきた。多くの生化学的結合システムにおける高度な特異性は、基礎研究、人間および獣医の診断、環境モニタリング、および工業試験を含む様々な市場で多くのアッセイ方法および価値のあるシステムをもたらした。目的の分析物の存在は、結合反応における分析物の関与を直接測定することによって測定することができる。いくつかのアプローチでは、この関与は、1つ以上の結合材料に付着した観察可能な標識の測定によって示される場合がある。

【0004】

サンドイッチ免疫測定形式は多くの適用で優れた感度および特異性を提供するが、一部の分析物は、従来の免疫測定技術による検出では低すぎる濃度で存在する。サンドイッチ免疫測定の性能は、検出抗体の非特異的結合によって、および高オフレート抗体を含むサンドイッチ複合体の不安定性によっても制限される可能性がある。しかしながら、感度および特異性を改良するために従来の免疫測定技術を改変する努力は、多くの場合、アッセイの感度および特異性に大きな影響を与え得る各工程での非効率性によって妨げられる可能性のある、より複雑で労働集約的なプロトコルをもたらす。例えば、複数の結合事象および／または反応を必要とする複雑なアッセイでは、いずれか1つの事象または反応が最適ではない場合、アッセイ全体の感度および特異性が劣る可能性がある。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、以下の特定の実施形態を企図する。本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、当業者によって本明細書に記載の実施形態に様々な改変、追加および変更を行うことができる。そのような改変、追加および変更は、特許請求の範囲内に含まれることを意図している。

【0006】

実施形態(1)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、分析物を、(i)分析物の捕捉試薬およびアンカー試薬を含む表面上の捕捉試薬と、(ii)核酸プローブに連結された分析物の検出試薬とに結合することにより、捕捉試薬、分析物、および検出試薬を含む表面上に複合体を形成することと、プローブを伸長して、アンカー試薬に結合するアンカー領域を含む伸長配列を形成することと、伸長配列をアンカー試薬に結合することと、表面に結合した伸長配列の量を測定することと、を含む、方法。

【0007】

実施形態(1)では、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得る。特定の実施形態では、捕捉試薬は抗体である。検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得、特定の実施形態では、検出試薬は抗体である。実施形態(1)の1つの特定の例では、捕捉試薬および検出試薬は、分析物に対する抗体である。アンカー試薬は、オリゴヌクレオチド配列、アプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミモトープを含み得、任意で、アンカー領域はアプタマーを含み得、アンカー試薬はアプタマーリガンドを含み得る。アンカー領域は核酸配列を含み得、アンカー試薬

はDNA結合タンパク質を含み得る。アンカー領域はオリゴヌクレオチド配列を含み得、アンカー試薬は相補的なオリゴヌクレオチド配列を含み得る。アンカー領域は、一本鎖オリゴヌクレオチド配列または二本鎖オリゴヌクレオチド配列を含み得る。

【0008】

実施形態(1)の結合工程は、アンカー領域とアンカー試薬との間に三重らせんを形成することをさらに含み得る。本方法はまた、結合工程の前にアンカー領域を変性させて一本鎖配列を曝露すること、結合工程の前にアンカー領域をヘリカーゼ活性に曝露すること、および／または結合工程の前にアンカー領域をヌクレアーゼ処理に曝露することも含み得る。この実施形態では、アンカー領域は、1つ以上のハプテン修飾塩基を含み得、アンカー試薬は、ハプテンに特異的な1つ以上の抗体を含み得、かつ／またはアンカー領域は、1つ以上のリガンド修飾塩基を含み得、アンカー試薬は、リガンドに特異的な1つ以上の受容体を含み得る。伸長配列は、1つ以上の検出配列をさらに含み得、測定工程は、伸長配列を、1つ以上の検出配列に相補的な複数の標識プローブと接触させることを含み得、伸長配列は、1つ以上の修飾塩基を含み得、測定工程は、伸長配列を、1つ以上の修飾塩基に結合することができる複数の検出可能な部分と接触させることを含み得、かつ／または伸長配列は、1つ以上の標識塩基を含み得、測定工程は、1つ以上の標識塩基の存在を検出することをさらに含み得る。この実施形態では、1つ以上の修飾塩基は、アプタマー、アプタマールリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミモトープを含み、複数の検出可能な部分は、1つ以上の修飾塩基の結合相手および検出可能な標識をそれぞれ含む。1つ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含み得、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含む、かつ／または1つ以上の修飾塩基はビオチンを含み得、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含む、かつ／または1つ以上の修飾塩基はアビジンを含み得、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含む、かつ／または1つ以上の修飾塩基はアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含む。

【0009】

実施形態(1)の第1の工程は、以下の順序で、分析物を以下の種に結合することを含み得る。(i)表面上の捕捉試薬、および(ii)分析物の検出試薬。または、実施形態(1)の第1の工程は、以下の順序で、分析物を以下の種に結合することを含み得る。(i)分析物の検出試薬、および(ii)表面上の捕捉試薬。および／または第1の工程は、同時にまたは実質的に同時に、分析物を以下の種に結合することを含み得る。(i)表面上の捕捉試薬、および(ii)分析物の検出試薬。

【0010】

実施形態(1)の伸長工程は、プローブを環状核酸に結合し、ローリングサークル増幅によって環状テンプレートを伸長することを含み得る。実施形態(1)の伸長工程は、プローブをテンプレート核酸配列に結合すること、およびポリメラーゼ連鎖反応によってプローブを伸長すること、ならびに／またはプローブをテンプレート核酸配列に結合すること、(例えば、直鎖テンプレートを連結して環を形成することにより)環状核酸テンプレートを形成すること、およびローリングサークル増幅により環状テンプレートを伸長することを含み得る。これらの実施形態では、伸長プローブは、プローブの伸長後、表面上に局在したままであり得る。そのような実施形態では、プローブは、14～24ヌクレオチドの長さのプローブ配列を有する最適化されたプローブであり得、かつ／またはテンプレートは、53～76ヌクレオチドの長さのテンプレート配列を有する最適化されたテンプレートであり得る。したがって、複合体は、伸長工程後も表面に結合したままであり得、例えば、伸長プローブは、表面上の複合体の配置から10～100μm以内の位置でアンカー試薬に結合する。特定の実施形態では、伸長プローブは、表面上の複合体の配置から100μm未満、50μm未満、またはより具体的には10μm未満の位置でアンカー試薬に結合する。

【0011】

実施形態（１）の伸長工程は、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）、LCR（リガーゼ連鎖反応）、SDA（鎖置換増幅）、3SR（自立合成反応）、または等温増幅法を含み得る。一実施形態では、伸長工程は、等温増幅法、例えば、ヘリカーゼ依存性増幅またはローリングサークル増幅（RCA）を含み得る。

【0012】

実施形態（１）で参照される表面は、粒子および／またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の２つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の２つの別個の結合ドメイン上に配置され、かつ／または表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置される。一実施形態では、ウェルは、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、ウェル内の同じ結合ドメイン上に配置される。捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100nm以内にあり得る。表面は電極を含み得、測定工程はさらに、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することを含み得、任意で、本方法は、電極上の粒子を収集することと、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することを含む。

【0013】

実施形態（１）の測定工程は、伸長配列を検出可能な標識を有する検出プローブに結合することと、検出可能な標識を測定することと、測定値を試料中の分析物の量と関連させることとをさらに含み得、検出プローブは、伸長配列の領域に相補的な核酸配列を含む。検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができる。実施形態（１）の特定の例では、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程は、ECLシグナルを測定することを含み得る。検出プローブは、複数のECL標識を有する場合がある。検出プローブは、プローブヌクレオチド構成要素の3'末端での結合を介して、多重ECL標識部分に結合され得る。

【0014】

実施形態（２）：1つ以上のバイアル、容器、または区画に、（a）（i）分析物の捕捉試薬、および（ii）アンカー試薬を含む表面と、（b）核酸プローブに連結された分析物の検出試薬とを含む、試料中の目的の分析物を検出するためのキット。

【0015】

実施形態（２）のアンカー試薬は、オリゴヌクレオチド配列、アプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミモトープを含み得、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得る。特定の実施形態では、捕捉試薬は、抗体を含み得、かつ／または検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得る。キットの特定の実施形態では、検出試薬は抗体である。

【0016】

実施形態（２）のキットの表面は、粒子および／またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の２つの別個の結合ドメイン上に配置される。キットの表面がプレートのウェルである場合、表面は複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の２つの別個の結合ドメイン上に配置され、かつ／または表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置される。キットの特定の例では、表面はウェルであり、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の同じ結合ドメイン上に配置される。捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100nm以内にあり得る。さらに、キットの表面は電極を含み得る。

【0017】

実施形態（3）：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、（a）分析物を、（i）分析物の捕捉試薬およびアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面上の捕捉試薬と、（ii）核酸プローブに連結された分析物の検出試薬とに結合することにより、捕捉試薬、分析物、および検出試薬を含む表面上に複合体を形成することと、（b）プローブを伸長して、アンカー配列に相補的なアンカー配列相補体を含む伸長配列を形成することと、（c）アンカー配列をアンカー配列相補体にハイブリダイズさせることと、（d）表面に結合した伸長配列の量を測定することと、を含む、方法。

【0018】

実施形態（3）では、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得、特定の例では、捕捉試薬は抗体である。同様に、検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、実施形態（3）の特定の例では、検出試薬は抗体である。実施形態（3）の一例では、捕捉試薬および検出試薬は、分析物に対する抗体である。アンカーオリゴヌクレオチド配列は、一本鎖オリゴヌクレオチド配列または二本鎖オリゴヌクレオチド配列を含み得る。伸長配列は、1つ以上の検出配列をさらに含み得、測定工程は、伸長配列を、1つ以上の検出配列に相補的な複数の標識プローブと接触させることをさらに含み得、代替的または追加的に、伸長配列は、1つ以上の修飾塩基をさらに含み得、測定工程は、伸長配列を、1つ以上の修飾塩基に結合することができる複数の検出可能な部分と接触させることをさらに含み得る。特定の例では、伸長配列は、1つ以上の標識塩基をさらに含み得、測定工程は、1つ以上の標識塩基の存在を検出することをさらに含み得る。1つ以上の修飾塩基は、アプタマー、アプタマールリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミモトープを含み、複数の検出可能な部分は、1つ以上の修飾塩基の結合相手および検出可能な標識をそれぞれ含む。1つ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含み得、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含む、1つ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含む、1つ以上の修飾塩基はアビジンを含み、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含む、かつ／または1つ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含む。

【0019】

実施形態（3）の工程（a）は、以下の順序で、分析物を以下の種に結合することを含み得る。（i）表面上の捕捉試薬、および（ii）分析物の検出試薬。代替的に、工程（a）は、以下の順序で分析物を以下の種に結合することを含み得る。（i）分析物の検出試薬、および（ii）表面上の捕捉試薬。さらに別の例では、工程（a）は、同時にまたは実質的に同時に、分析物を以下の種に結合することを含み得る。（i）表面上の捕捉試薬、および（ii）分析物の検出試薬。

【0020】

実施形態（3）の伸長工程は、プローブをテンプレート核酸配列に結合することと、ポリメラーゼ連鎖反応によってプローブを伸長することとを含み得る。代替的に、伸長工程は、プローブをテンプレート環状核酸に結合することと、ローリングサークル増幅によって環状テンプレートを伸長することとを含み得る。代替的に、伸長工程は、プローブをテンプレート核酸配列に結合することと、環状核酸テンプレートを形成することと（例えば、連結による）、ローリングサークル増幅による環状テンプレートを伸長することとを含み得る。そのような実施形態では、プローブは、14～24ヌクレオチドの長さのプローブ配列を有する最適化されたプローブであり得、かつ／またはテンプレートは、53～76ヌクレオチドの長さのテンプレート配列を有する最適化されたテンプレートであり得る。伸長プローブは、プローブ伸長後も表面上に局在したままであり得、例えば、複合体は、伸長工程後も表面に結合したままである。一例では、伸長プローブは、表面上の複合体の配置から10～100 μm以内の位置でアンカー試薬に結合する。特定の一実施形態で

は、伸長プローブは、表面上の複合体の配置から100 μm未満、50 μm未満、またはより具体的には10 μm未満の位置でアンカー試薬に結合する。この特定の実施形態では、伸長工程は、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）、LCR（リガーゼ連鎖反応）、SDA（鎖置換増幅）、3SR（自立合成反応）、または等温増幅法を含み得る。例えば、伸長工程は、等温増幅法、例えば、ヘリカーゼ依存性増幅またはローリングサークル増幅（RCA）を含み得る。

【0021】

実施形態（3）の表面は、粒子および／またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面がプレートのウェルである場合、それは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置される。表面がウェルである場合、それは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の同じ結合ドメイン上に配置される。捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100 nm以内にあり得る。特定の例では、表面は電極を含み得、測定工程はさらに、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することを含み得る。本方法は、電極上の粒子を収集することと、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することを含み得る。測定工程は、伸長配列を検出可能な標識を有する検出プローブに結合することと、検出可能な標識を測定することと、測定値を試料中の分析物の量と相関させることとをさらに含み得、検出プローブは、伸長配列の領域に相補的な核酸配列を含む。この実施形態では、検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定される。例えば、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程は、ECLシグナルを測定することを含み得る。検出プローブは、複数のECL標識を有する場合がある。検出プローブは、プローブヌクレオチド構成要素の3'末端での結合を介して、多重ECL標識部分に結合され得る。

【0022】

実施形態（4）：1つ以上のバイアル、容器、または区画に、（a）（i）分析物の捕捉試薬、および（ii）アンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面と、（b）核酸プローブに連結された分析物の検出試薬とを含む、試料中の目的の分析物を検出するためのキット。

【0023】

実施形態（4）のキットは、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含む捕捉試薬を含む。特定の例では、捕捉試薬は抗体を含み得る。同様に、検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、特に、検出試薬は、抗体を含み得る。

【0024】

実施形態（4）のキットは、粒子および／またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る表面を含む。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置され、例えば、表面がウェルである場合、ウェルは、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、ウェル内の同じ結合ドメインに配置される。例えば、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100 nm以内にある。実施形態（4）の表面は、電極を含み得る。

【0025】

実施形態（５）：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、（a）分析物を、（i）分析物の捕捉試薬およびアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面上の捕捉試薬と、（i i）第１の核酸プローブに連結された分析物の第１の検出試薬と、（i i i）第２の核酸プローブに連結された分析物の第２の検出試薬とに結合することにより、結合試薬、分析物、ならびに第１および第２の検出試薬を含む表面上に複合体を形成することと、（b）第１および第２のプローブが近接することを要する伸長プロセスを使用し、第２のプローブを伸長して、アンカー配列に相補的なアンカー配列相補体を含む伸長配列を形成することと、（c）アンカー配列をアンカー配列相補体にハイブリダイズさせることと、（d）表面に結合した伸長配列の量を測定することと、を含む、方法。
【００２６】

10

実施形態（５）の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得る。特定の例では、捕捉試薬は抗体である。同様に、第１の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、特定の例では、第１の検出試薬は抗体である。第２の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得、特定の例では、第２の検出試薬は抗体である。より具体的には、捕捉試薬ならびに第１および第２の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

【００２７】

実施形態（５）では、アンカーオリゴヌクレオチド配列は、一本鎖オリゴヌクレオチド配列または二本鎖オリゴヌクレオチド配列を含み得る。この実施形態では、伸長配列は、１つ以上の検出配列をさらに含み得、測定工程は、伸長配列を、１つ以上の検出配列に相補的な複数の標識プローブと接触させることをさらに含み得る。伸長配列はまた、１つ以上の修飾塩基を含み得、測定工程は、伸長配列を、１つ以上の修飾塩基に結合することができる複数の検出可能な部分と接触させることをさらに含み得る。伸長配列は、１つ以上の標識塩基をさらに含み得、測定工程は、１つ以上の標識塩基の存在を検出することをさらに含み得る。１つ以上の修飾塩基は、アプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミモトープを含み、複数の検出可能な部分は、１つ以上の修飾塩基の結合相手および検出可能な標識をそれぞれ含み得る。例えば、１つ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含み、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、１つ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、１つ以上の修飾塩基はアビジンを含み、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、かつ／または１つ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含む。

20

30

【００２８】

実施形態（５）の工程（a）は、以下の順序で、分析物を以下の種に結合することを含み得る。（i）表面上の捕捉試薬、および（i i）分析物の検出試薬。代替的に、工程（a）は、以下の順序で、分析物を以下の種に結合することを含み得る。（i）分析物の検出試薬、および（i i）表面上の捕捉試薬。または、工程（a）は、同時にまたは実質的に同時に、分析物を以下の種に結合することを含み得る。（i）表面上の捕捉試薬、および（i i）分析物の検出試薬。

40

【００２９】

実施形態（５）の伸長工程は、プローブをテンプレート核酸配列に結合することと、ポリメラーゼ連鎖反応によってプローブを伸長することとを含み得る。伸長工程は、プローブをテンプレート核酸配列に結合することと、環状核酸テンプレートを形成することと、ローリングサークル増幅による環状テンプレートを伸長することとをさらに含み得る。伸長プローブは、プローブ伸長後も表面上に局在したままであり得、例えば、複合体は、伸長工程後も表面に結合したままである。伸長プローブは、表面上の複合体の配置から１０～１００ μm以内の位置でアンカー試薬に結合し得る。特定の一実施形態では、伸長プロ

50

ープは、表面上の複合体の配置から100 μm未満、50 μm未満、またはより具体的には10 μm未満の位置でアンカー試薬に結合する。伸長工程は、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）、LCR（リガーゼ連鎖反応）、SDA（鎖置換増幅）、3SR（自立合成反応）、または等温増幅法を含み得る。特定の例では、伸長工程は、等温増幅法を含み得、例えば、ヘリカーゼ依存性増幅またはローリングサークル増幅（RCA）である。

【0030】

実施形態（5）の伸長プロセスは、工程（a）で形成された複合体を、（i）第2のプロープに相補的な内部配列および（ii）第1のプロープの非重複領域に相補的な2つの末端配列を含むコネクタ配列と接触させることを含み得る。本方法は、コネクタオリゴヌクレオチドの2つの末端配列を連結して、第1および第2のプロープの両方にハイブリダイズする環状標的配列を形成することをさらに含み得る。代替的に、伸長プロセスは、実施形態（5）の工程（a）で形成された複合体を、第1のプロープの第1の領域および第2のプロープ上の第1の領域に相補的な第1のコネクタプロープ配列を含む第1のコネクタオリゴヌクレオチド配列と、第1のプロープの第2の非重複領域および第2のプロープの第2の非重複領域に相補的な第2のプロープ配列を含む第2のコネクタオリゴヌクレオチドと、に接触させること、および任意で、第1および第2のコネクタオリゴヌクレオチドを連結して、第1および第2のプロープの両方にハイブリダイズする環状標的配列を形成することを含み得る。

【0031】

実施形態（5）の表面は、粒子および／またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面はまた、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置される。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の同じ結合ドメイン上に配置される。捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100 nm以内にあり得る。特定の例では、表面は電極を含み得、測定工程はさらに、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することを含み得、任意で、実施形態（5）の方法は、電極上の粒子を収集することと、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することとをさらに含む。

【0032】

実施形態（5）の測定工程は、伸長配列を検出可能な標識を有する検出プロープに結合することと、検出可能な標識を測定することと、測定値を試料中の分析物の量と関連させることとをさらに含み得、検出プロープは、伸長配列の領域に相補的な核酸配列を含む。検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができる。特定の例では、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程は、ECLシグナルを測定することを含み得る。検出プロープは、複数のECL標識を有する場合がある。検出プロープは、プロープヌクレオチド構成要素の3'末端での結合を介して、多重ECL標識部分に結合され得る。

【0033】

実施形態（6）：1つ以上のバイアル、容器、または区画に、（a）（i）分析物の捕捉試薬、および（ii）アンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面と、（b）第1の核酸プロープに連結された分析物の第1の検出試薬と、（c）第2の核酸プロープに連結された分析物の第2の検出試薬とを含む、試料中の目的の分析物を検出するためのキット。

【0034】

実施形態（6）の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、特定の例では、捕捉試

10

20

30

40

50

薬は、抗体を含み得る。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、特定の例では、第1の検出試薬は、抗体を含み得る。同様に、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、特定の例では、第2の検出試薬は、抗体を含み得る。

【0035】

実施形態(6)の表面は、粒子および／またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置され、および／または表面がウェルである場合、ウェルは、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、ウェル内の同じ結合ドメインに配置される。捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100nm以内にあり得る。特定の例では、表面は電極を含み得る。

【0036】

実施形態(7)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)分析物を、(i)捕捉試薬およびアンカー試薬を含む表面上の分析物の捕捉試薬と、(ii)第1の近接プローブを含む分析物の第1の検出試薬と、(iii)第2の近接プローブを含む分析物の第2の検出試薬とに結合することにより、捕捉試薬、分析物、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に検出複合体を形成することと、(b)(c)で形成される検出複合体を、(i)第2の近接プローブに相補的な内部配列、および(ii)第1の近接プローブの非重複領域に相補的な2つの末端配列を含むコネクタ配列と接触させることと、(c)コネクタ配列を第1および第2の近接プローブにハイブリダイズさせることと、(d)コネクタオリゴヌクレオチドの2つの末端配列を連結して、第1および第2の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状標的配列を形成することと、(e)標的配列のローリングサークル増幅によって第2の近接プローブを伸長して、アンカー試薬に結合する結合ドメインを含むアンプリコンを生成することと、(f)アンプリコンをアンカー試薬に結合することと、(g)表面上のアンプリコンの量を測定することと、を含む、方法。

【0037】

実施形態(8)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)分析物を、(i)捕捉試薬およびアンカー試薬を含む表面上の分析物の捕捉試薬と、(ii)第1の近接プローブを含む分析物の第1の検出試薬と、(iii)第2の近接プローブを含む分析物の第2の検出試薬とに結合することにより、捕捉試薬、分析物、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に検出複合体を形成することと、(b)(c)で形成される検出複合体を、第1のコネクタオリゴヌクレオチドおよび第2のコネクタオリゴヌクレオチドと接触させることとであって、(i)第1のコネクタの第1の末端および第2のコネクタの第1の末端が、第1の近接プローブの2つの非重複領域に相補的であり、(ii)第1のコネクタの第2の末端および第2のコネクタの第2の末端が、第1の近接プローブの2つの非重複領域に相補的である、接触させることと、(c)第1および第2のコネクタオリゴヌクレオチドを第1および第2の近接プローブにハイブリダイズさせることと、(d)第1および第2のコネクタオリゴヌクレオチドを連結して、第1および第2の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状標的配列を形成することと、(e)標的配列のローリングサークル増幅によって第2の近接プローブを伸長して、アンカー試薬に結合する結合ドメインを含むアンプリコンを生成することと、(f)アンプリコンをアンカー試薬に結合することと、(g)表面上のアンプリコンの量を測定することと、を含む、方法。

【0038】

実施形態(7)および(8)の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌ

クレオチド、ハプテン、エпитープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得、特定の例では、捕捉試薬は抗体である。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エпитープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得、例えば、第1の検出試薬は抗体である。さらに、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エпитープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、第2の検出試薬は抗体である。実施形態(7)および(8)の特定の例では、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

【0039】

実施形態(7)および(8)のアンカー試薬は、オリゴヌクレオチド配列、アプタマー、アプタマールリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エпитープ、またはミモトープを含み得る。一例では、結合ドメインはアプタマーを含み得、アンカー試薬はアプタマールリガンドを含み得る。結合ドメインは核酸配列を含み得、アンカー試薬はDNA結合タンパク質を含み得、かつ／またはアンカー試薬はオリゴヌクレオチド配列を含み得、アンプリコンは相補的なオリゴヌクレオチド配列を含み得る。

10

【0040】

実施形態(7)および(8)のアンプリコンは、1つ以上の検出配列をさらに含み得、測定工程は、伸長配列を、1つ以上の検出配列に相補的な複数の標識プローブと接触させることをさらに含み得る。さらに、アンプリコンは、1つ以上の修飾塩基をさらに含み得、測定工程は、伸長配列を、1つ以上の修飾塩基に結合することができる複数の検出可能な部分と接触させることをさらに含み得る。さらに、アンプリコンは、1つ以上の標識塩基をさらに含み得、測定工程は、1つ以上の標識塩基の存在を検出することをさらに含み得る。1つ以上の修飾塩基は、アプタマー、アプタマールリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エпитープ、またはミモトープを含み、複数の検出可能な部分は、1つ以上の修飾塩基の結合相手および検出可能な標識をそれぞれ含み得る。1つ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含み得、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、1つ以上の修飾塩基はビオチンを含み得、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、1つ以上の修飾塩基はアビジンを含み得、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、かつ／または1つ以上の修飾塩基はビオチンを含み得、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含む。

20

30

【0041】

実施形態(7)および(8)の工程(a)は、以下の順序で、分析物を以下の種に結合することを含み得る。(i)表面上の捕捉試薬、ならびに(ii)分析物の第1および第2の検出試薬。代替的に、工程(a)は、以下の順序で、分析物を以下の種に結合することを含み得る。(i)分析物の第1および第2の検出試薬、ならびに(ii)表面上の捕捉試薬。さらに、工程(a)は、同時にまたは実質的に同時に、分析物を以下の種に結合することを含み得る。(i)表面上の捕捉試薬、ならびに(ii)分析物の第1および第2の検出試薬。

【0042】

実施形態(7)および(8)のアンプリコンは、プローブ伸長後も表面上に局在したままであり得る。複合体は、伸長工程後も表面に結合したままであり得る。例えば、アンプリコンは、表面上の複合体の配置から10~100 μm以内の位置でアンカー試薬に結合する。特定の一実施形態では、伸長プローブは、表面上の複合体の配置から100 μm未満、50 μm未満、またはより具体的には10 μm未満の位置でアンカー試薬に結合する。

40

【0043】

実施形態(7)および(8)の表面は、粒子および／またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面は、複数の別個の結合ドメイ

50

ンを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置される。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の同じ結合ドメイン上に配置される。特定の例では、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100nm以内にある。

【0044】

さらに、表面は電極を含み得、測定工程は、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することを含み得る。これらの実施形態（（7）および（8））では、本方法は、電極上の粒子を収集することと、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することとを含み得る。測定工程は、アンプリコンを検出可能な標識を有する検出プローブに結合することと、検出可能な標識を測定することと、測定値を試料中の分析物の量と相関させることとを含み得、検出プローブは、アンプリコンの領域に相補的な核酸配列を含む。検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定される。例えば、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程は、ECLシグナルを測定することを含み得る。検出プローブは、複数のECL標識を有する場合がある。検出プローブは、プローブヌクレオチド構成要素の3'末端での結合を介して、多重ECL標識部分に結合され得る。

【0045】

実施形態（9）：1つ以上のバイアル、容器、または区画に、（a）（i）分析物の捕捉試薬、および（ii）アンカー試薬を含む表面と、（b）第1の近接プローブを含む分析物の第1の検出試薬と、（c）第2の近接プローブを含む分析物の第2の検出試薬と、（d）（i）第2の近接プローブに相補的な内部配列および（ii）第1の近接プローブの非重複領域に相補的な2つの末端配列を含むコネクタ配列と、を含む、試料中の目的の分析物を検出するためのキット。実施形態では、第1および第2の近接プローブは、核酸プローブである。

【0046】

実施形態（10）：1つ以上のバイアル、容器、または区画に、（a）（i）分析物の捕捉試薬、および（ii）アンカー試薬を含む表面と、（b）第1の近接プローブを含む分析物の第1の検出試薬と、（c）第2の近接プローブを含む分析物の第2の検出試薬と、（d）（i）第1のコネクタオリゴヌクレオチドおよび（ii）第2のコネクタオリゴヌクレオチドと、を含む、試料中の目的の分析物を検出するためのキットであって、（x）第1のコネクタの第1の末端および第2のコネクタの第1の末端が、第1の近接プローブの2つの非重複領域に相補的であり、（y）第1のコネクタの第2の末端および第2のコネクタの第2の末端が、第1の近接プローブの2つの非重複領域に相補的である、キット。実施形態では、第1および第2の近接プローブは、核酸プローブである。

【0047】

実施形態（9）および（10）の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得る。特定の例では、捕捉試薬は抗体を含み得る。第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、特定の例では、第1の検出試薬は、抗体を含み得る。第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、特定の例では、第2の検出試薬は、抗体を含み得る。

【0048】

実施形態（9）および（10）の表面は、粒子および／またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置され

る。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の同じ結合ドメイン上に配置される。特定の例では、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100nm以内にある。

【0049】

実施形態(9)および(10)の表面は、電極を含み得る。

【0050】

実施形態(11)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)分析物を、(i)捕捉試薬、およびアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面上の分析物の捕捉試薬と、(ii)第1の近接プローブを含む分析物の第1の検出試薬と、(iii)第2の近接プローブを含む分析物の第2の検出試薬とに結合することにより、捕捉試薬、分析物、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に検出複合体を形成することと、(b)(c)で形成される検出複合体を、(i)第2の近接プローブに相補的な内部配列と、(ii)第1の近接プローブの非重複領域に相補的な2つの末端配列と、(iii)アンカー配列と一致する配列と、を含むコネクタ配列と接触させることと、(c)コネクタ配列を第1および第2の近接プローブにハイブリダイズさせることと、(d)コネクタオリゴヌクレオチドの2つの末端配列を連結して、第1および第2の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状標的配列を形成することと、(e)標的配列のローリングサークル増幅によって第2の近接プローブを伸長して、アンカー配列に相補的な複数のアンカー配列相補体を含むアンプリコンを生成することと、(f)アンカー配列をアンカー配列相補体のうちの1つにハイブリダイズさせることと、(g)表面上のアンプリコンの量を測定することと、を含む、方法。実施形態では、第1および第2の近接プローブは、核酸プローブである。

【0051】

実施形態(12)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)分析物を、(i)捕捉試薬、およびアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面上の分析物の捕捉試薬と、(ii)第1の近接プローブを含む分析物の第1の検出試薬と、(iii)第2の近接プローブを含む分析物の第2の検出試薬とに結合することにより、捕捉試薬、分析物、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に検出複合体を形成することと、(b)(a)で形成される検出複合体を、第1のコネクタオリゴヌクレオチドおよび第2のコネクタオリゴヌクレオチドと接触させることであって、(i)第1のコネクタの第1の末端および第2のコネクタの第1の末端が、第1の近接プローブの2つの非重複領域に相補的であり、(ii)第1のコネクタの第2の末端および第2のコネクタの第2の末端が、第1の近接プローブの2つの非重複領域に相補的であり、(iii)第1および/または第2のコネクタがまた、アンカー配列に一致する配列を含む、接触させることと、(c)第1および第2のコネクタオリゴヌクレオチドを第1および第2の近接プローブにハイブリダイズさせることと、(d)第1および第2のコネクタオリゴヌクレオチドを連結して、第1および第2の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状標的配列を形成することと、(e)標的配列のローリングサークル増幅によって第2の近接プローブを伸長して、アンカー配列に相補的な複数のアンカー配列相補体を含むアンプリコンを生成することと、(f)アンカー配列をアンカー配列相補体のうちの1つにハイブリダイズさせることと、(g)表面上のアンプリコンの量を測定することと、を含む、方法。実施形態では、第1および第2の近接プローブは、核酸プローブである。

【0052】

実施形態(11)および(12)の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーである。特定の例では、捕捉試薬は抗体である。第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、特定の例では、第1の検出試薬は抗体である。第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであ

り、特定の例では、第2の検出試薬は抗体である。一例では、第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

【0053】

実施形態(11)および(12)のアンプリコンは、1つ以上の検出配列をさらに含み得、測定工程は、伸長配列を、1つ以上の検出配列に相補的な複数の標識プローブと接触させることを含み得る。さらに、アンプリコンはまた、1つ以上の修飾塩基を含み得、測定工程は、伸長配列を、1つ以上の修飾塩基に結合することができる複数の検出可能な部分と接触させることを含み得る。アンプリコンはさらに、1つ以上の標識塩基を含み、測定工程は、1つ以上の標識塩基の存在を検出することを含み得る。1つ以上の修飾塩基は、アプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミモトープを含み、複数の検出可能な部分は、1つ以上の修飾塩基の結合相手および検出可能な標識をそれぞれ含む。1つ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含み得、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、1つ以上の修飾塩基はビオチンを含み得、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、1つ以上の修飾塩基はアビジンを含み得、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、かつ／または1つ以上の修飾塩基はビオチンを含み得、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含む。

10

【0054】

実施形態(11)および(12)の工程(a)は、以下の順序で、分析物を以下の種に結合することを含み得る。(i)表面上の捕捉試薬、ならびに(ii)分析物の第1および第2の検出試薬。代替的に、工程(a)は、以下の順序で、分析物を以下の種に結合することを含み得る。(i)分析物の第1および第2の検出試薬、ならびに(ii)表面上の捕捉試薬。さらに、工程(a)は、同時にまたは実質的に同時に、分析物を以下の種に結合することを含み得る。(i)表面上の捕捉試薬、ならびに(ii)分析物の第1および第2の検出試薬。

20

【0055】

実施形態(11)および(12)のアンプリコンは、プローブ伸長後も表面上に局在したままであり得、任意で、複合体は、伸長工程後も表面に結合したままである。例えば、アンプリコンは、表面上の複合体の配置から10~100 μm以内の位置でアンカー試薬に結合する。特定の一実施形態では、伸長プローブは、表面上の複合体の配置から100 μm未満、50 μm未満、またはより具体的には10 μm未満の位置でアンカー試薬に結合する。

30

【0056】

実施形態(11)および(12)の表面は、粒子および／またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る。任意で、表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置される。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の同じ結合ドメイン上に配置される。捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10~100 nm以内にあり得る。

40

【0057】

実施形態(11)および(12)の表面は、表面は電極を含み得、測定工程は、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することを含み得る。任意で、実施形態(11)および(12)は、電極上の粒子を収集することと、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することとを含む。測定工程はまた、アンプリコンを検出可能な標識を有する検出プローブに結合することと、検出可能な標識を測定することと、測定値を試料中の分析物の量と相関させることとを含み得、検出プローブは、アンプリコン

50

の領域に相補的な核酸配列を含む。検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができる。一例では、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程は、ECLシグナルを測定することを含み得る。検出プローブは、複数のECL標識を有する場合がある。検出プローブは、プローブヌクレオチド構成要素の3'末端での結合を介して、多重ECL標識部分に結合され得る。

【0058】

実施形態(11)および(12)の試料は、1つ以上の分析物分子を含み得、表面は、表面に位置付けられた複数の分解可能な結合領域に分布する1つ以上の分析物分子に対する複数の捕捉試薬を含み得、本方法は、(x) 1つ以上の分析物分子を、表面上の1つ以上の捕捉試薬に結合することと、(y) 各結合領域における分析物分子の存否を決定することと、(z) 分析物分子を含む結合領域の数および／または分析物分子を含まない分析物ドメインの数を特定することと、を含み得る。測定工程は、表面からの光シグナルを画像化して複数のピクセルを含む画像を作成することを含み得、分解可能な各結合領域は、画像内の1つ以上のピクセルにマッピングされる。分解可能な結合領域は、アレイの要素であり得、かつ／または分解可能な結合領域は、個々の粒子を単離するように構成される。分解可能な各結合領域は、体積が100 nL未満の個々のナノウェルであり得、例えば、結合領域の少なくとも99%は、ゼロまたは1つの分析物分子のいずれかを含み、結合領域の少なくとも約95%は、ゼロまたは1つの分析物分子のいずれかを含み、結合領域の少なくとも約80%は、ゼロまたは1つの分析物分子のいずれかを含み、かつ／または結合領域の少なくとも約50%は、ゼロまたは1つの分析物分子のいずれかを含む。実施形態(11)および(12)における試料中の分析物分子の濃度は、較正曲線、ポアソン分布分析、および／または少なくとも1つまたは1つの分析物分子を含む結合領域の数のガウス分布分析を少なくとも部分的に使用して決定することができる。

【0059】

実施形態(11)および(12)では、試料は、1つ以上の分析物分子を含み得、表面は、分析物分子のための複数の結合試薬をそれぞれ含む複数の粒子を含み得、複数の粒子が複数の分解可能な結合領域に分布し、本方法は、(i) 1つ以上の分析物分子を表面上の1つ以上の結合試薬に結合することと、(ii) 複数の粒子を分解可能な結合領域のアレイ全体に分布させることと、(iii) 分析物分子を含む結合領域の数および／または分析物分子を含まない結合領域の数を特定するために、分解可能な各結合領域における分析物分子の存否を決定することと、を含み得る。

【0060】

実施形態(13)：1つ以上のバイアル、容器、または区画に、(a) (i) 分析物の捕捉試薬、および(ii) アンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面と、(b) 第1の近接プローブを含む分析物の第1の検出試薬と、(c) 第2の近接プローブを含む分析物の第2の検出試薬と、(d) (i) 第2の近接プローブに相補的な内部配列および(ii) 第1の近接プローブの非重複領域に相補的な2つの末端配列を含むコネクタ配列と、を含む、試料中の目的の分析物を検出するためのキット。実施形態では、第1および第2の近接プローブは、核酸プローブである。

【0061】

実施形態(14)：1つ以上のバイアル、容器、または区画に、(a) (i) 分析物の捕捉試薬、および(ii) アンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面と、(b) 第1の近接プローブを含む分析物の第1の検出試薬と、(c) 第2の近接プローブを含む分析物の第2の検出試薬と、(d) (i) 第1のコネクタオリゴヌクレオチドおよび(ii) 第2のコネクタオリゴヌクレオチドと、を含む、試料中の目的の分析物を検出するためのキットであって、(x) 第1のコネクタの第1の末端および第2のコネクタの第1の末端が、第1の近接プローブの2つの非重複領域に相補的であり、(y) 第1のコネクタの第2の末端および第2のコネクタの第2の末端が、第1の近接プローブの2つの非重複領域に相補的である、キット。実施形態では、第1および第2

の近接プローブは、核酸プローブである。

【0062】

実施形態（13）および（14）の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、例えば、捕捉試薬は、抗体を含み得る。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、例えば、第1の検出試薬は、抗体を含み得る。同様に、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、例えば、第2の検出試薬は、抗体を含み得る。

【0063】

実施形態（13）および（14）の表面は、粒子および／またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る。複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置される。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の同じ結合ドメイン上に配置される。捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100nm以内にあり得、任意で、表面は電極を含み得る。

【0064】

実施形態（15）：試料中の分析物を検出する方法であって、本方法は、（a）分析物を、第1および第2の検出試薬に結合して、検出複合体を形成することであって、各検出複合体が、分析物、第1の検出試薬、および第2の検出試薬を含み、第1の検出試薬が第1の検出可能な標識を有し、第2の検出試薬が第2の検出可能な標識を有する、検出複合体を形成することと、（b）反応容器の大部分が1つ以下の分析物を含むように分析物を複数の反応容器に分配することと、（c）第1および第2の検出可能な標識を含む反応容器の数を数えることによって分析物分子の数を検出することと、を含み得る、方法。この実施形態（15）では、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得、例えば、第1の検出試薬は抗体である。同様に、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得、例えば、第2の検出試薬は抗体である。特定の例では、第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

【0065】

実施形態（15）の工程（a）は、該分析物および該検出試薬を含む溶液を形成することをさらに含み得、工程（b）は、同じ容器において未結合の第1の検出試薬および未結合の第2の検出試薬を見出だす可能性が10分の1未満であるように、複数の反応容器にわたって溶液を分配することを含み得る。代替的に、実施形態（15）の工程（a）は、該分析物および該検出試薬を含む溶液を形成することをさらに含み得、工程（b）は、同じ容器において未結合の第1の検出試薬および未結合の第2の検出試薬を見出だす可能性が100分の1未満であるように、複数の反応容器にわたって溶液を分配することを含み得る。さらに、実施形態（15）の工程（a）は、該分析物および該検出試薬を含む溶液を形成することをさらに含み得、工程（b）は、同じ容器において未結合の第1の検出試薬および未結合の第2の検出試薬を見出だす可能性が1000分の1未満であるように、複数の反応容器にわたって溶液を分配することを含み得る。さらに、実施形態（15）の工程（a）は、該分析物および該検出試薬を含む溶液を形成することをさらに含み得、工程（b）は、同じ容器において未結合の第1の検出試薬および未結合の第2の検出試薬を見出だす可能性が10000分の1未満であるように、複数の反応容器にわたって溶液を分配することを含み得る。

【0066】

実施形態（１６）：試料中の分析物を検出する方法であって、本方法は、（ａ）分析物を、捕捉試薬と、第１および第２の検出試薬とに結合して、検出複合体を形成することであって、各検出複合体が、捕捉試薬、分析物、第１の検出試薬、および第２の検出試薬を含み、（ｉ）第１の検出試薬が第１の検出可能な標識を有し、第２の検出試薬が第２の検出可能な標識を有し、（ｉｉ）捕捉試薬が表面上にある、検出複合体を形成することと、（ｂ）反応容器の大部分が１つ以下の分析物を含むように分析物を複数の反応容器に分配することと、（ｃ）第１および第２の検出可能な標識を含む反応容器の数を数えることによって分析物分子の数を検出することと、を含む、方法。この実施形態では、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得、例えば、捕捉試薬は抗体である。同様に、第１の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得、例えば、第１の検出試薬は抗体である。さらに、第２の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得、例えば、第２の検出試薬は抗体である。例えば、捕捉試薬、第１および第２の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

【００６７】

実施形態（１６）の工程（ｂ）は、同じ容器において未結合の第１の検出試薬および未結合の第２の検出試薬を見出す可能性が１０分の１未満であるように、複数の反応容器にわたって溶液を分配することをさらに含み得る。さらに、実施形態（１６）の工程（ｂ）は、同じ容器において未結合の第１の検出試薬および未結合の第２の検出試薬を見出す可能性が１００分の１未満であるように、複数の反応容器にわたって溶液を分配することをさらに含み得る。実施形態（１６）の工程（ｂ）は、同じ容器において未結合の第１の検出試薬および未結合の第２の検出試薬を見出す可能性が１０００分の１未満であるように、複数の反応容器にわたって溶液を分配することをさらに含み得る。さらに、実施形態（１６）の工程（ｂ）は、同じ容器において未結合の第１の検出試薬および未結合の第２の検出試薬を見出す可能性が１００００分の１未満であるように、複数の反応容器にわたって溶液を分配することをさらに含み得る。

【００６８】

実施形態（１６）の検出複合体における捕捉試薬は、捕捉試薬を分析物に結合する前に表面上に存在し得るか、または、検出複合体における捕捉試薬は、捕捉試薬を表面上に固定する前に分析物に結合する。一例では、捕捉試薬は標的部分を含み得、表面は標的部分の相補体を含み得る。標的部分および標的剤結合相手は、以下の結合対から選択される。アビジン－ビオチン、ストレプトアビジン－ビオチン、受容体－リガンド、抗体－抗原、核酸－核酸相補体。

【００６９】

実施形態（１６）の表面は粒子であり、任意で、捕捉試薬は複数の粒子上に固定され、分析物の分配は、分析物を捕捉試薬に結合し、粒子を複数の反応容器に分配することによって達成される。捕捉試薬は、複数の粒子上に固定することができ、分析物の分配は、粒子を複数の反応容器に分配し、次に分析物を捕捉試薬に結合することによって達成される。

【００７０】

実施形態（１６）は、複数の粒子を複数の反応容器に分配することをさらに含み得、複数の粒子は標的部分を含み、捕捉試薬は標的部分の相補体を含み、分析物の分配は、標的部分の相補体を標的部分に結合することによって達成される。実施形態（１６）はまた、分配工程の前および／または分配工程の後に粒子を洗浄することを含み得る。

【００７１】

実施形態（１６）の表面は、反応容器のうちの１つ内の配置であり得る。この実施形態では、捕捉試薬は、複数の反応容器の表面に固定することができ、分析物の分配は、分析物を捕捉試薬に結合することによって達成される。任意で、反応容器は、その上に固定された標的部分を備える表面を有し、捕捉試薬は、標的部分の相補体を含み、分析物の分配は、標的部分の相補体を標的部分に結合することによって達成される。この特定の例では

、本方法は、検出工程の前に反応容器を洗浄することをさらに含み得る。

【0072】

実施形態（16）の複数の反応容器は、ナノウェルのアレイを含み得る。複数の反応容器は、少なくとも10,000個の反応容器を含み得る。一実施形態では、反応容器は、100nL未満の体積を有する。任意で、反応容器の50%未満が検出時に分析物を含み、反応容器の10%未満が検出時に分析物を含み、反応容器の1%未満が検出時に分析物を含み、かつ／または反応容器の0.1%未満が検出時に分析物を含む。

【0073】

実施形態（16）の一態様では、第1の検出可能な標識は、共役酵素反応系の第1の酵素であり、第2の検出可能な標識は、共役酵素反応系の第2の酵素であり、工程（d）は、反応系の1つ以上の基質を加えることと、酵素反応系の産物を産生することと、産物を含む反応容器を計数することと、を含み得る。この実施形態では、産物は、第1の酵素および第2の酵素が近接している場合、例えば、第1および第2の酵素が互いに200nM以内にあるか、または第1および第2の酵素が互いに50nM以内にある場合にのみ産生され得る。例えば、第1の酵素はオキシダーゼであり、第2の酵素はペルオキシダーゼであり、基質は、オキシダーゼ基質および標識されたAmplex Redまたはルミノール誘導体を含む。この実施形態では、オキシダーゼはグルコースオキシダーゼであり得、オキシダーゼ基質はグルコースである。一実施形態では、検出複合体中の第1および第2の酵素によって触媒される反応は、表面上の標識されたAmplex Redまたはルミノールの固定化をもたらし、任意で、本方法は、表面上の標識されたAmplex Redまたはルミノールを測定することを含み得る。標識されたAmplex Redまたはルミノールは任意でビオチン-Amplex Redまたはルミノールであり、本方法は、標識されたストレプトアビジンを加えることと、ストレプトアビジン上の標識を測定することと、を含み得る。

【0074】

実施形態（16）の工程（d）は、第1および第2の検出可能な標識が同じ分析物分子に結合した場合に生成される（generated）近位依存性シグナルを測定することと、近位依存性シグナルを生成する（produce）反応容器の数を計数することとを含み得、例えば、近位依存性シグナルはPLA-RCAによって生成される。例えば、第1の検出可能な標識はFRETドナーであり得、検出可能な標識はFRETアクセプターであり、近位依存性シグナルは、FRETドナーを励起し、FRETアクセプターからの放出を測定することによって測定される。一例では、第1および第2の検出可能な標識は、独立して、測定することができる。任意で、第1および第2の検出可能な標識は、スペクトル特性に関して互いに異なる発光標識である。一例では、第1の検出可能な標識は、第1の基質と反応して第1のシグナルを生成する第1の酵素であり、第2の検出可能な標識は、第2の基質と反応して異なる第2のシグナルを生成する第2の酵素であり、実施形態（16）の工程（d）は、第1の酵素基質および第2の酵素基質を加えることと、第1および第2のシグナルが生成される反応容器の数を計数することとを含み得る。第1および第2のシグナルは、異なるスペクトル特性を有する光学吸光度の変化であり得る。任意で、第1および第2のシグナルは、異なるスペクトル特性を有する発光シグナルである。第1および第2の酵素は、例えば、ホスファターゼ、スルファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、またはそれらの組み合わせから選択される加水分解酵素であり得、第1および第2の基質は、ホスフェート、サルフェート、ガラクトシドおよびグルクロニド修飾安定化ジオキセタン、4-メチルウンベリフェリル、フルオレセイン、またはそれらの組み合わせから選択される。特定の例では、第1および第2の酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ベータガラクトシダーゼ、およびアルカリホスファターゼから選択される。実施形態（16）の検出工程は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、発光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせによる検出を含み得る。

【0075】

実施形態（17）：試料中の分析物を検出するためのキットであって、キットは、1つ

以上のバイアル、容器、または区画に、(a) 第1の検出可能な標識を含む第1の検出試薬と、(b) 第2の検出可能な標識を含む第2の検出試薬と、(c) 1つ以下の分析物分子を含むように構成された複数の反応容器と、を含む、キット。

【0076】

実施形態(18)：試料中の分析物を検出するためのキットであって、キットは、1つ以上のバイアル、容器、または区画に、(a) 第1の検出可能な標識を含む第1の検出試薬と、(b) 第2の検出可能な標識を含む第2の検出試薬と、(c) 捕捉試薬を含む表面と、(d) 1つ以下の分析物分子を含むように構成された複数の反応容器と、を含む、キット。

【0077】

実施形態(17)および(18)の第1および第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、アプタマー、またはそれらの組み合わせを含み得る。一例では、第1および第2の検出試薬は抗体を含む。捕捉抗体は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、例えば、捕捉抗体は、抗体を含み得る。一例では、捕捉試薬は標的部分を含み得、表面は標的部分の相補体を含み得、例えば、標的部分および標的剤結合相手は、以下の結合対から選択される。アビジン-ビオチン、ストレプトアビジン-ビオチン、受容体-リガンド、抗体-抗原、核酸-核酸相補体。

【0078】

実施形態(17)および(18)の表面は粒子であり得、例えば、捕捉試薬は複数の粒子上に固定される。代替的に、表面は、反応容器のうちの1つ内の配置であり、例えば、捕捉試薬は、複数の反応容器の表面上に固定されている。任意で、反応容器は、その上に固定された標的部分を備える表面を有し、捕捉試薬は、標的部分の相補体を含む。複数の反応容器は、油中水型乳濁液に分散されたナノウェルまたは水滴のアレイを含み得る。複数の反応容器は、少なくとも10,000個の反応容器を含み得、任意で、複数の反応容器は、100nL未満の体積を有する。

【0079】

実施形態(17)および(18)のキットにおいて、第1の検出可能な標識は、共役酵素反応系の第1の酵素であり得、第2の検出可能な標識は、共役酵素反応系の第2の酵素であり、キットは、1つ以上の追加のバイアル、容器、または区画に、反応系の1つ以上の基質を含み得る。例えば、第1の酵素はオキシダーゼであり、第2の酵素はペルオキシダーゼであり、基質は、オキシダーゼ基質および標識されたAmplex Redまたはルミノール誘導体を含む。特定の実施形態では、オキシダーゼはグルコースオキシダーゼであり、オキシダーゼ基質はグルコースである。第1および第2の検出可能な標識は、近位依存性系の構成要素であり得、例えば、第1の検出可能な標識は、FRETドナーであり、検出可能な標識は、FRETアクセプターである。第1および第2の検出可能な標識は、独立して、測定することができる。任意で、第1および第2の検出可能な標識は、スペクトル特性に関して互いに異なる発光標識である。

【0080】

実施形態(17)および(18)のキットにおいて、第1の検出可能な標識は、第1の基質と反応して第1のシグナルを生成する第1の酵素であり、第2の検出可能な標識は、第2の基質と反応して異なる第2のシグナルを生成する第2の酵素であり、キットは、1つ以上のバイアル、容器、または区画に、第1の酵素基質および第2の酵素基質を含み得る。任意で、第1および第2のシグナルは、異なるスペクトル特性を有する光学吸光度の変化である。一例では、第1および第2のシグナルは、異なるスペクトル特性を有する発光シグナルである。第1および第2の酵素は、加水分解酵素であり得る。一例では、第1および第2の酵素は、ホスファターゼ、スルファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、またはそれらの組み合わせから選択される。第1および第2の基質は、ホスフェート、サルフェート、ガラクトシドおよびグルクロニド修飾安定化ジオキセタン、4-メチルウンベリフェリル、フルオレセイン、またはそれらの組み合わせから選択することが

10

20

30

40

50

できる。任意で、第1および第2の酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ベータガラクトシダーゼ、およびアルカリホスファターゼから選択される。

【0081】

実施形態(19)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)分析物を捕捉試薬、第1の検出可能な標識を有する第1の検出試薬、および第2の検出可能な標識を有する第2の検出試薬に結合し、複合体を形成することであって、複合体中の捕捉試薬が表面上に固定されている、複合体を形成することと、(b)第1および第2の検出試薬を架橋して、架橋産物を形成することと、(c)架橋産物を表面から溶離液に放出することと、(d)第1および第2の検出可能な標識の両方を含む溶離液中の個々の架橋産物を計数することと、を含む、方法。この実施例(19)では、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、特定の例では、捕捉試薬は抗体である。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得、特定の例では、第1の検出試薬は抗体である。さらに、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、具体的には、第2の検出試薬は抗体であり得る。1つの特定の例において、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

10

【0082】

実施形態(19)は、架橋剤を加えて、第1および第2の検出試薬を架橋することをさらに含み得、例えば、第1および第2の検出試薬は反応性部分を含み、架橋剤は、反応性部分と連結する多官能性架橋剤である。例えば、反応性部分は、アミン、チオール、ヒドラジド、アルデヒド、エステル、ヨードアセトアミド、マレイミド、クリック化学試薬、およびそれらの組み合わせを含む。架橋剤は、アミン、チオール、ヒドラジド、アルデヒド、エステル、ヨードアセトアミド、マレイミド、クリック化学試薬、およびそれらの組み合わせを含む。第1および第2の検出試薬は、結合部分を含み得、架橋剤は、結合部分の多価結合相手である。一例では、第1および第2の検出試薬は動物種の抗体であり、架橋剤は動物種の抗体を標的とする多価抗種抗体である。第1および第2の検出試薬はビオチンを含み得、架橋剤はストレプトアビジンであり、第1および第2の検出試薬はストレプトアビジンを含み、架橋剤はビオチンであり、第1および第2の検出試薬はストレプトアビジンに連結されており、架橋剤は複数のビオチン分子を含むポリマーであり、かつ／または第1および第2の検出試薬は、第1および第2の核酸プローブをそれぞれ含み、架橋剤は、第1の核酸プローブに相補的な配列および第2の核酸プローブに相補的な別個の配列を含み得るオリゴヌクレオチドである。

20

30

【0083】

実施形態(19)の表面は、粒子、反応容器、例えば、チューブまたはアンブルを含み得、かつ／または表面は、マルチウェルプレートのウェルを含み得る。実施形態(19)の方法は、粒子を収集することと、粒子を洗浄して不純物を除去することと、をさらに含み得、任意で、第1および第2の検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定される。特定の例では、第1および第2の検出可能な標識は、ECL標識を含み、計数工程は、ECLシグナルの測定を含み得る。

40

【0084】

実施形態(20)：試料中の目的の分析物を検出するためのキットであって、1つ以上のバイアル、容器、または区画に、(a)固定された捕捉試薬を含む表面と、(b)第1の検出可能な標識を有する第1の検出試薬と、(c)第2の検出可能な標識を有する第2の検出試薬と、(d)第1および第2の検出試薬と反応性のある架橋剤と、を含む、キット。

【0085】

実施形態(20)の第1および第2の検出試薬は、反応性部分を含み得、架橋剤は、反

50

応性部分に連結する多官能性架橋剤である。反応性部分は、アミン、チオール、ヒドラジド、アルデヒド、エステル、ヨードアセトアミド、マレイミド、クリック化学試薬、およびそれらの組み合わせを含み得、架橋剤は、アミン、チオール、ヒドラジド、アルデヒド、エステル、ヨードアセトアミド、マレイミド、クリック化学試薬、およびそれらの組み合わせを含み得る。実施形態（20）の第1および第2の検出試薬は、結合部分を含み得、架橋剤は、結合部分の多価結合相手であり、例えば、第1および第2の検出試薬は、動物種の抗体であり、架橋剤は、動物種の抗体を標的とする多価抗種抗体であり、第1および第2の検出試薬はビオチンを含み、架橋剤はストレプトアビジンであり、第1および第2の検出試薬はストレプトアビジンを含み、架橋剤はビオチンであり、第1および第2の検出試薬はストレプトアビジンに連結されており、架橋剤は複数のビオチン分子を含むポリマーであり、かつ／または第1および第2の検出試薬は、第1および第2の核酸プローブをそれぞれ含み、架橋剤は、第1の核酸プローブに相補的な配列および第2の核酸プローブに相補的な別個の配列を含み得るオリゴヌクレオチドである。

【0086】

実施形態（20）の表面は、粒子、マルチウェルプレートのウェル、または反応容器、例えば、チューブまたはアンプルを含み得る。さらに、表面は複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬は表面上の別個の結合ドメイン上に配置される。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬はウェル内の別個の結合ドメイン上に配置される。表面はまた、電極を含み得る。

【0087】

実施形態（21）：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、（a）分析物を捕捉試薬、第1の検出試薬、および第2の検出試薬に結合して複合体を形成することであって、第1の検出試薬は、第1の検出可能な標識および第1の核酸プローブを含み得、第2の検出試薬は、第2の検出可能な標識および第2の核酸プローブを含み得、複合体中の捕捉試薬は、表面上に固定される、複合体を形成することと、（b）（i）第1のプローブを第2のプローブにハイブリダイズし、（ii）第1および第2のプローブを第1および第2のプローブに相補的な領域を有する第3の核酸にハイブリダイズし、または（iii）第1および第2のプローブを連結することにより、第1および第2の検出試薬を架橋することと、（c）架橋産物を表面から溶離液に放出することと、（d）第1および第2の検出可能な標識の両方を含む溶離液中の個々の架橋産物を計数することと、を含む、方法。

【0088】

実施形態（21）の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得、例えば、捕捉試薬は抗体である。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、第1の検出試薬は抗体であり、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得、例えば、第2の検出試薬は抗体である。特定の例では、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

【0089】

実施形態（21）の表面は、粒子、反応容器、例えば、チューブまたはアンプル、またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る。実施形態（21）の方法は、粒子を収集することと、粒子を洗浄して不純物を除去することとをさらに含み得る。第1および第2の検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができる。特定の例では、第1および第2の検出可能な標識は、ECL標識を含み、計数工程は、ECLシグナルの測定を含み得る。

【0090】

実施形態（22）：試料中の目的の分析物を検出するためのキットであって、1つ以上のバイアル、容器、または区画に、（a）固定された捕捉試薬を含む表面と、（b）第1

の検出可能な標識および第 1 の核酸プローブを有する第 1 の検出試薬と、(c) 第 2 の検出可能な標識および第 2 の核酸プローブを有する第 2 の検出試薬と、(d) 第 1 および第 2 の核酸プローブに相補的な領域を有する第 3 の核酸とを含む、キット。

【0091】

実施形態(22)の表面は、粒子、マルチウェルプレートのウェル、または反応容器、例えば、チューブまたはアンプルを含み得る。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬は、表面上の別個の結合ドメイン上に配置され、表面がウェルである場合、ウェルは、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬は、ウェル内の別個の結合ドメイン上に配置される。表面は、任意で、電極を含み得る。

【0092】

実施形態(23)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a) 分析物を捕捉試薬、第 1 の検出試薬、および第 2 の検出試薬に結合して複合体を形成することであって、第 1 の検出試薬は第 1 の核酸プローブを含み得、第 2 の検出試薬は第 2 の核酸プローブを含み得、複合体中の捕捉試薬は表面上に固定される、複合体を形成することと、(b) 第 2 の核酸プローブを伸長して、検出可能な標識を含む伸長配列を形成することであって、伸長は、複合体における第 1 および第 2 の核酸プローブの共局在化に依存する、伸長配列を形成することと、(c) 伸長配列を表面から溶離液に放出することと、(d) 溶離液中の個々の伸長配列を計数することと、を含む、方法。この実施形態では、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーである。特定の例では、捕捉試薬は抗体である。同様に、第 1 の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、特定の例では、第 1 の検出試薬は抗体である。第 2 の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、具体的には、第 2 の検出試薬は抗体である。特定の例では、捕捉試薬ならびに第 1 および第 2 の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

【0093】

実施形態(23)の表面は、粒子、反応容器、例えば、チューブまたはアンプル、またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る。実施形態(23)の方法は、粒子を収集することと、粒子を洗浄して不純物を除去することとをさらに含み得る。

【0094】

実施形態(23)の標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができる。特定の例では、標識は、ECL 標識を含み得、計数工程は、ECL シグナルの測定を含み得る。

【0095】

実施形態(23)の伸長工程は、プローブをテンプレート核酸配列に結合することと、ポリメラーゼ連鎖反応によってプローブを伸長することとを含み得る。伸長工程はまた、第 1 のプローブをテンプレート核酸配列に結合することと、環状核酸テンプレートを形成することと、ローリングサークル増幅による環状テンプレートを伸長することとを含み得る。伸長工程は、第 1 のプローブをテンプレート核酸配列に結合することと、第 2 のプローブをテンプレート配列に結合することと、第 1 および第 2 のプローブを連結することと、を含み得る。任意で、標識は蛍光標識であり、個々の伸長配列の計数は、単一分子蛍光の検出を含み得、例えば、蛍光相関分光法および／または蛍光相互相関分光法を含み得る。単一分子蛍光の検出は、キャピラリーを通して溶離液を流すことと、キャピラリー内の体積に光源を集束させて照合(interrogation)ゾーンを作り出すことと、光検出器で照合ゾーンを観察して照合ゾーンを通る蛍光分子の通過を検出することと、を含み得る。単一分子蛍光の検出はまた、キャピラリーを通して溶離液を流すことと、キャピラリー内の体積に光源を集束させて照合(interrogation)ゾーンを作り出すことと、光検出器で照合ゾーンを観察して照合ゾーンを通る蛍光分子の通過を検出す

ることと、を含み得る。

【0096】

実施形態(24)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)分析物を捕捉試薬、第1の検出可能な標識を有する第1の検出試薬、および第2の検出可能な標識を有する第2の検出試薬に結合し、複合体を形成することであって、複合体中の捕捉試薬が表面上に固定されている、複合体を形成することと、(b)固定された捕捉試薬を表面から溶離液に解離させることによって、形成された複合体を表面から放出することと、(c)第1および第2の検出可能な標識の両方を含む溶離液中の個々の産物を計数することと、を含む、方法。この実施形態では、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、捕捉試薬は抗体であり、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、第1の検出試薬は抗体であり、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、第2の検出試薬は抗体であり、特定の例では、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

【0097】

実施形態(24)の表面は、粒子、反応容器、例えば、チューブまたはアンプル、および／またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る。実施形態(24)の方法は、粒子を収集することと、粒子を洗浄して不純物を除去することとを含み得る。第1および第2の検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができ、特定の実施形態では、第1および第2の検出可能な標識はECL標識を含み、計数工程は、ECLシグナルの測定を含み得る。

【0098】

実施形態(25)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)分析物を、(i)分析物の捕捉試薬を含む表面上の捕捉試薬と、(ii)第1の核酸プローブに連結された分析物の第1の検出試薬と、(iii)第2の核酸プローブに連結された分析物の第2の検出試薬とに結合することにより、結合試薬、分析物、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に複合体を形成することと、(b)第1および第2のプローブが近接することを要する伸長プロセスを使用し、第2のプローブを伸長して、伸長配列を形成することと、(c)表面に結合した伸長配列の量を測定することと、を含む、方法。この実施形態では、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、捕捉試薬は抗体であり、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、第1の検出試薬は抗体であり、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、第2の検出試薬は抗体であり、特定の例では、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

【0099】

実施形態(25)の伸長配列は、1つ以上の検出配列を含み得、測定工程は、伸長配列を、1つ以上の検出配列に相補的な複数の標識プローブと接触させることを含み得、伸長配列は、1つ以上の修飾塩基を含み得、測定工程は、伸長配列を、1つ以上の修飾塩基に結合することができる複数の検出可能な部分と接触させることを含み得、かつ／または伸長配列は、1つ以上の標識塩基を含み得、測定工程は、1つ以上の標識塩基の存在を検出することを含み得る。1つ以上の修飾塩基は、アプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミモトープを含み、複数の検出可能な部分は、1つ以上の修飾塩基の結合相手および検出可能な標識をそれぞれ含む。1つ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含み得、複数の検出可能な部分はビオチンおよ

び検出可能な標識をそれぞれ含み、1つ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、1つ以上の修飾塩基はアビジンを含み、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、かつ／または1つ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含む。

【0100】

実施形態(25)の工程(a)は、分析物を、(i)表面上の捕捉試薬および(ii)分析物の検出試薬の順序で、下記の種に結合することと、分析物を、(i)分析物の検出試薬および(ii)表面上の捕捉試薬の順序で、下記の種に結合することと、または同時にもしくは実質的に同時に、分析物を、(i)表面上の捕捉試薬および(ii)分析物の検出試薬の種に結合することと、を含み得る。伸長工程は、プローブをテンプレート核酸配列に結合すること、ポリメラーゼ連鎖反応によってプローブを伸長すること、またはプローブをテンプレート核酸配列に結合すること、環状核酸テンプレートを形成すること、およびローリングサークル増幅により環状テンプレートを伸長することを含み得る。この実施形態では、伸長プローブは、プローブ伸長後も表面上に局在したままであり得、例えば、複合体は、伸長工程後も表面に結合したままである。伸長工程は、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)、LCR(リガーゼ連鎖反応)、SDA(鎖置換増幅)、3SR(自立合成反応)、または等温増幅法を含み得る。特定の例では、伸長工程は、等温増幅法、例えば、ヘリカーゼ依存性増幅またはローリングサークル増幅(RCA)を含み得る。

【0101】

実施形態(25)の伸長プロセスは、工程(a)で形成された複合体を、(i)第2のプローブに相補的な内部配列および(ii)第1のプローブの非重複領域に相補的な2つの末端配列を含むコネクタ配列と接触させることを含み得る。本プロセスは、コネクタオリゴヌクレオチドの2つの末端配列を連結して、第1および第2のプローブの両方にハイブリダイズする環状標的配列を形成することをさらに含み得る。実施形態(25)の伸長プロセスはまた、工程(a)で形成された複合体を、第1のプローブの第1の領域および第2のプローブ上の第1の領域に相補的な第1のコネクタプローブ配列を含む第1のコネクタオリゴヌクレオチド配列と、第1のプローブの第2の非重複領域および第2のプローブの第2の非重複領域に相補的な第2のプローブ配列を含む第2のコネクタオリゴヌクレオチドとに接触させることを含み得る。本プロセスはまた、第1および第2のコネクタオリゴヌクレオチドを連結して、第1および第2のプローブの両方にハイブリダイズする環状標的配列を形成することを含み得る。

【0102】

実施形態(25)の表面は、マルチウェルプレートの粒子またはウェルを含み得る。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬は、表面上の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬はウェル内の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置され、表面がウェルである場合、ウェルは、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬は、ウェル内の同じ結合ドメインに配置される。表面は電極を含み得、測定工程は、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することを含み得る。本方法は、任意で、電極上の粒子を収集することと、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することとを含む。測定工程は、伸長配列を検出可能な標識を有する検出プローブに結合することと、検出可能な標識を測定することと、測定値を試料中の分析物の量と関連させることをさらに含み得、検出プローブは、伸長配列の領域に相補的な核酸配列を含む。検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができる。特定の例では、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程は、ECLシグナルを測定することを含み得る。検出プローブは、複数のECL標識を有する場合がある。検出プローブは、プローブヌクレオチド構成要素の3'末端での結合を介して、多重ECL標識部分に

10

20

30

40

50

結合され得る。

【0103】

実施形態(26)：1つ以上のバイアル、容器、または区画に、(a)分析物の捕捉試薬を含む表面と、(b)第1の核酸プローブに連結された分析物の第1の検出試薬と、(c)第2の核酸プローブに連結された分析物の第2の検出試薬とを含む、試料中の目的の分析物を検出するためのキット。

【0104】

実施形態(26)の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、例えば、捕捉試薬は抗体を含み得、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、例えば、第1の検出試薬は抗体を含み得、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、例えば、第2の検出試薬は抗体を含み得、表面は、粒子および／またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬は、表面上の2つの別個の結合ドメイン上に配置され、表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬はウェル内の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。任意で、表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置され、表面がウェルである場合、ウェルは、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬は、ウェル内の同じ結合ドメインに配置される。表面は電極を含み得る。

【0105】

実施形態1～26の表面は、アッセイ容器、例えば、試験管、キュベット、フローセル、FACSセルソーター、カートリッジ、またはマルチウェルプレートのウェルの内面を含み得る。表面はまた、スライド、アッセイチップ、またはアッセイアレイ、ピン、プローブ、ビーズ、または濾過媒体、ラテラルフロー媒体、例えば、濾過膜を含み得る。

【0106】

実施形態(27)：1つ以上の分析物分子を含む試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)試料を、表面上に位置付けられた複数の分解可能な結合領域を含む表面と接触させることであって、分解可能な各結合領域が、試料中の1つ以上の分析物分子のための複数の捕捉試薬を含む、表面と試料を接触させることと、(b)1つ以上の分析物分子を、(i)表面上の1つ以上の捕捉試薬、(i i)第1の検出可能な標識を含む分析物の第1の検出試薬、および(i i i)第2の検出可能な標識を含む分析物の第2の検出試薬と結合することにより、捕捉試薬、分析物、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上の分解可能な結合ドメイン上に検出複合体を形成することであって、第1および第2の検出可能な標識が、異なる標識化合物である、検出複合体を形成することと、(c)各結合領域における分析物分子の存否を決定することと、(d)分析物分子を含む結合領域の数および／または分析物分子を含まない結合領域の数を特定することと、を含む、方法。特定工程は、表面からの光シグナルを画像化して複数のピクセルを含む画像を作成することを含み得、分解可能な各結合領域は、画像内の1つ以上のピクセルにマッピングされる。分解可能な結合領域は、アレイの要素であり得、かつ／または個々の粒子を単離するように構成され得る。分解可能な各結合領域は、体積が100 nL未満の個々のナノウェルであり得、かつ／または結合領域の少なくとも99%は、ゼロまたは1つの分析物分子のいずれかを含み、結合領域の少なくとも約95%は、ゼロまたは1つの分析物分子のいずれかを含み、結合領域の少なくとも約80%は、ゼロまたは1つの分析物分子のいずれかを含み、または結合領域の少なくとも約50%は、ゼロまたは1つの分析物分子のいずれかを含む。試料中の分析物分子の濃度は、校正曲線、ポアソン分布分析、および／または少なくとも1つまたは1つの分析物分子を含む結合領域の数のガウス分布分析を少なくとも部分的に使用して決定することができる。

【0107】

実施形態(27)の表面は、分析物分子のための複数の捕捉試薬をそれぞれが含む複数

の粒子を含み得、複数の粒子は、複数の分解可能な結合領域に分布し、本方法は、(i) 1つ以上の分析物分子を、表面上の1つ以上の捕捉試薬、ならびに1つ以上の分析物分子のそれぞれに対する第1および第2の検出試薬に結合することであって、第1および第2の検出試薬が、第1および第2の検出可能な標識をそれぞれ含む、1つ以上の分析物分子を結合することと、(ii) 複数の粒子を分解可能な結合領域のアレイ全体に分布させることと、(iii) 分析物分子を含む結合領域の数および／または分析物分子を含まない結合領域の数を特定するために、分解可能な各結合領域における分析物分子の存否を決定することと、を含み、任意で、分解可能な各結合領域は、体積が100 nL未満の個々のナノウェルであり、かつ／または結合領域の少なくとも99%は、ゼロまたは1つの分析物分子のいずれかを含み、結合領域の少なくとも約95%は、ゼロまたは1つの分析物分子のいずれかを含み、結合領域の少なくとも約80%は、ゼロまたは1つの分析物分子のいずれかを含み、かつ／または結合領域の少なくとも約50%は、ゼロまたは1つの分析物分子のいずれかを含む。

10

【0108】

実施形態(27)における捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、捕捉試薬は抗体であり、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、第1の検出試薬は抗体であり、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、第2の検出試薬は抗体である。特定の例では、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

20

【0109】

実施形態(27)の工程(a)は、分析物を、(i) 表面上の捕捉試薬および(ii) 分析物の第1および第2の検出試薬の順序で、下記の種に結合することと、分析物を、(i) 分析物の第1および第2の検出試薬および(ii) 表面上の捕捉試薬の順序で、下記の種に結合することと、または同時にもしくは実質的に同時に、分析物を、(i) 表面上の捕捉試薬および(ii) 分析物の第1および第2の検出試薬の種に結合することと、を含み得る。

【0110】

実施形態(27)の表面は、マルチウェルプレートの粒子またはウェルを含み得る。特定の例では、表面は電極を含み得、特定工程は、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することを含み得る。実施形態(27)の方法は、電極上の粒子を収集することと、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することとを含み得る。第1の検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定され、および／または第2の検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定される。第1および第2の検出可能な標識は、独立して、測定することができ、一例では、第1および第2の検出可能な標識は、スペクトル特性に関して互いに異なる発光標識である。

30

40

【0111】

実施形態(27)の表面は、アッセイ容器、例えば、試験管、キュベット、フローセル、FACSセルソーター、カートリッジ、またはマルチウェルプレートのウェルの内面を含み得る。表面はまた、スライド、アッセイチップ、またはアッセイアレイ、ピン、プローブ、ビーズ、または濾過媒体、ラテラルフロー媒体、例えば、濾過膜を含み得る。

【0112】

実施形態(28)：1つ以上の分析物分子を含む試料中の目的の分析物を検出するためのキットであって、(a) 表面上に位置付けられた複数の分解可能な結合領域を含む表面であって、各分解可能な結合が、試料中の1つ以上の分析物分子のための複数の捕捉試薬

50

を含む、表面と、(b) 第1の検出可能な標識を含む分析物の第1の検出試薬と(c) 第2の検出可能な標識を含む分析物の第2の検出試薬とを含むキットであって、第1および第2の検出可能な標識が、異なる標識化合物である、キット。

【0113】

実施形態(28)の分解可能な結合領域は、アレイの要素であり得、かつ／または個々の粒子を単離するように構成され得る。分解可能な各結合領域は、任意で、体積が100 nL未満の個々のナノウェルである。表面は、分析物分子のための複数の捕捉試薬をそれぞれが含む複数の粒子を含み得、複数の粒子は、複数の分解可能な結合領域に分布し、キットは、1つ以上の分析物分子のそれぞれに対する第1および第2の検出試薬を含み得、第1および第2の検出試薬は、第1および第2の検出可能な標識をそれぞれ含む。

10

【0114】

実施形態(28)における捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、捕捉試薬は抗体であり、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、第1の検出試薬は抗体であり、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、第2の検出試薬は抗体である。特定の例では、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

【0115】

20

実施形態(28)の表面は、マルチウェルプレートの粒子またはウェルを含み得る。特定の例では、表面は電極を含み得、特定工程は、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することを含み得る。第1の検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定され、および／または第2の検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定される。第1および第2の検出可能な標識は、独立して、測定することができ、一例では、第1および第2の検出可能な標識は、スペクトル特性に関して互いに異なる発光標識である。

【0116】

30

実施形態(28)の表面は、アッセイ容器、例えば、試験管、キュベット、フローセル、FACSセルソーター、カートリッジ、またはマルチウェルプレートのウェルの内面を含み得る。表面はまた、スライド、アッセイチップ、またはアッセイアレイ、ピン、プローブ、ビーズ、または濾過媒体、ラテラルフロー媒体、例えば、濾過膜を含み得る。

【0117】

実施形態(29)：試料中のHIV p24を検出する方法であって、(a) HIV p24を、(i) HIV p24の捕捉試薬とアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬とを含む表面上の捕捉試薬と、(ii) 第1の核酸プローブに連結されたHIV p24の第1の検出試薬と、(iii) 第2の核酸プローブに連結されたHIV p24の第2の検出試薬とに結合することにより、結合試薬、HIV p24、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に複合体を形成することと、(b) 第1および第2のプローブが近接することを要する伸長プロセスを使用し、第2のプローブを伸長して、アンカー配列に相補的なアンカー配列相補体を含む伸長配列を形成することと、(c) アンカー配列をアンカー配列相補体にハイブリダイズさせることと、(d) 表面に結合した伸長配列の量を測定することと、を含む、方法。

40

【0118】

実施形態(29)の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得る。特定の例では、捕捉試薬は抗体である。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、特定の

50

例では、第1の検出試薬は抗体である。第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得、特定の例では、第2の検出試薬は抗体である。より具体的には、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、HIV p24に対する抗体である。

【0119】

実施形態(29)では、アンカーオリゴヌクレオチド配列は、一本鎖オリゴヌクレオチド配列または二本鎖オリゴヌクレオチド配列を含み得る。この実施形態では、伸長配列は、1つ以上の検出配列を含み得、測定工程は、伸長配列を、1つ以上の検出配列に相補的な複数の標識プローブと接触させることを含み得る。伸長配列はまた、1つ以上の修飾塩基を含み得、測定工程は、伸長配列を、1つ以上の修飾塩基に結合することができる複数の検出可能な部分と接触させることを含み得る。伸長配列は、1つ以上の標識塩基をさらに含み得、測定工程は、1つ以上の標識塩基の存在を検出することを含み得る。1つ以上の修飾塩基は、アプタマー、アプタマールリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミモトープを含み、複数の検出可能な部分は、1つ以上の修飾塩基の結合相手および検出可能な標識をそれぞれ含み得る。例えば、1つ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含み、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、1つ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、1つ以上の修飾塩基はアビジンを含み、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、かつ／または1つ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含む。

【0120】

実施形態(29)の工程(a)は、以下の順序で、HIV p24を以下の種に結合することを含み得る。(i)表面上の捕捉試薬、および(ii)HIV p24の検出試薬。代替的に、工程(a)は、以下の順序で、HIV p24を以下の種に結合することを含み得る。(i)HIV p24の検出試薬、および(ii)表面上の捕捉試薬。または、工程(a)は、同時にまたは実質的に同時に、HIV p24を以下の種に結合することを含み得る。(i)表面上の捕捉試薬、および(ii)HIV p24の検出試薬。

【0121】

実施形態(29)の伸長工程は、プローブをテンプレート核酸配列に結合することと、ポリメラーゼ連鎖反応によってプローブを伸長することとを含み得る。伸長工程は、プローブをテンプレート核酸配列に結合することと、環状核酸テンプレートを形成することと、ローリングサークル増幅による環状テンプレートを伸長することとをさらに含み得る。伸長プローブは、プローブ伸長後も表面上に局在したままであり得、例えば、複合体は、伸長工程後も表面に結合したままである。伸長プローブは、表面上の複合体の配置から10~100μm以内の位置でアンカー試薬に結合し得る。特定の一実施形態では、伸長プローブは、表面上の複合体の配置から100μm未満、50μm未満、またはより具体的には10μm未満の位置でアンカー試薬に結合する。伸長工程は、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)、LCR(リガーゼ連鎖反応)、SDA(鎖置換増幅)、3SR(自立合成反応)、または等温増幅法を含み得る。特定の例では、伸長工程は、等温増幅法を含み得、例えば、ヘリカーゼ依存性増幅またはローリングサークル増幅(RCA)である。

【0122】

実施形態(29)の伸長プロセスは、工程(a)で形成された複合体を、(i)第2のプローブに相補的な内部配列および(ii)第1のプローブの非重複領域に相補的な2つの末端配列を含むコネクタ配列と接触させることを含み得る。本方法は、コネクタオリゴヌクレオチドの2つの末端配列を連結して、第1および第2のプローブの両方にハイブリダイズする環状標的配列を形成することをさらに含み得る。代替的に、伸長プロセスは、実施形態(29)の工程(a)で形成された複合体を、第1のプローブの第1の領域および第2のプローブ上の第1の領域に相補的な第1のコネクタプローブ配列を含む第1のコネクタオリゴヌクレオチド配列と、第1のプローブの第2の非重複領域および第

2のプローブの第2の非重複領域に相補的な第2のプローブ配列を含む第2のコネクターオリゴヌクレオチドとに接触させること、および任意で、第1および第2のコネクターオリゴヌクレオチドを連結して、第1および第2のプローブの両方にハイブリダイズする環状標的配列を形成することを含み得る。

【0123】

実施形態(29)の表面は、マルチウェルプレートの粒子および／またはウェルを含み得る。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面はまた、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置される。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の同じ結合ドメイン上に配置される。捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100nm以内にあり得る。特定の例では、表面は電極を含み得、測定工程は、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することを含み得、任意で、実施形態(29)の方法は、電極上の粒子を収集することと、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することとをさらに含む。

【0124】

実施形態(29)の測定工程は、伸長配列を検出可能な標識を有する検出プローブに結合することと、検出可能な標識を測定することと、測定値を試料中のp24の量と相関させることとを含み得、検出プローブは、伸長配列の領域に相補的な核酸配列を含む。検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができる。特定の例では、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程は、ECLシグナルを測定することを含み得る。検出プローブは、複数のECL標識を有する場合がある。検出プローブは、プローブヌクレオチド構成要素の3'末端での結合を介して、多重ECL標識部分に結合され得る。

【0125】

実施形態(30)：1つ以上のバイアル、容器、または区画に、(a)(i) HIV p24の捕捉試薬、および(ii)アンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面と、(b)第1の核酸プローブに連結されたHIV p24の第1の検出試薬と、(c)第2の核酸プローブに連結されたHIV p24の第2の検出試薬とを含む、試料中のHIV p24を検出するためのキット。

【0126】

実施形態(30)の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、特定の例では、捕捉試薬は、抗体を含み得る。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、特定の例では、第1の検出試薬は、抗体を含み得る。同様に、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを含み得、特定の例では、第2の検出試薬は、抗体を含み得る。

【0127】

実施形態(30)の表面は、マルチウェルプレートの粒子および／またはウェルを含み得る。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置され、および／または表面がウェルである場合、ウェルは、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、ウェル内の同じ結合ドメインに配置される。捕捉試薬およびアンカー試薬は

、表面上で10～100nm以内にあり得る。特定の例では、表面は電極を含み得る。

【0128】

実施形態(31)：試料中のHIV p24を検出する方法であって、(a) HIV p24を、(i) 捕捉試薬およびアンカー試薬を含む表面上のHIV p24の捕捉試薬と、(ii) 第1の近接プローブを含むHIV p24の第1の検出試薬と、(iii) 第2の近接プローブを含むHIV p24の第2の検出試薬とに結合することにより、捕捉試薬、HIV p24、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に検出複合体を形成することと、(b) (c) で形成される検出複合体を、(i) 第2の近接プローブに相補的な内部配列、および(ii) 第1の近接プローブの非重複領域に相補的な2つの末端配列を含むコネクタ配列と接触させることと、(c) コネクタ配列を第1および第2の近接プローブにハイブリダイズさせることと、(d) コネクタオリゴヌクレオチドの2つの末端配列を連結して、第1および第2の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状標的配列を形成することと、(e) 標的配列のローリングサークル増幅によって第2の近接プローブを伸長して、アンカー試薬に結合する結合ドメインを含むアンプリコンを生成することと、(f) アンプリコンをアンカー試薬に結合することと、(g) 表面上のアンプリコンの量を測定することと、を含む、方法。

10

【0129】

実施形態(32)：試料中のHIV p24を検出する方法であって、(a) HIV p24を、(i) 捕捉試薬およびアンカー試薬を含む表面上のHIV p24の捕捉試薬と、(ii) 第1の近接プローブを含むHIV p24の第1の検出試薬と、(iii) 第2の近接プローブを含むHIV p24の第2の検出試薬とに結合することにより、捕捉試薬、HIV p24、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に検出複合体を形成することと、(b) (c) で形成される検出複合体を、第1のコネクタオリゴヌクレオチドおよび第2のコネクタオリゴヌクレオチドと接触させることであって、(i) 第1のコネクタの第1の末端および第2のコネクタの第1の末端が、第1の近接プローブの2つの非重複領域に相補的であり、(ii) 第1のコネクタの第2の末端および第2のコネクタの第2の末端が、第1の近接プローブの2つの非重複領域に相補的である、接触させることと、(c) 第1および第2のコネクタオリゴヌクレオチドを第1および第2の近接プローブにハイブリダイズさせることと、(d) 第1および第2のコネクタオリゴヌクレオチドを連結して、第1および第2の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状標的配列を形成することと、(e) 標的配列のローリングサークル増幅によって第2の近接プローブを伸長して、アンカー試薬に結合する結合ドメインを含むアンプリコンを生成することと、(f) アンプリコンをアンカー試薬に結合することと、(g) 表面上のアンプリコンの量を測定することと、を含む、方法。

20

30

【0130】

実施形態(31)および(32)の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、特定の例では、捕捉試薬は抗体である。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、第1の検出試薬は抗体である。さらに、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり、例えば、第2の検出試薬は抗体である。実施形態(31)および(32)の特定の例では、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、HIV p24に対する抗体である。

40

【0131】

実施形態(31)および(32)のアンカー試薬は、オリゴヌクレオチド配列、アプタマー、アプタマールリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミモトープを含み得る。一例では、結合ドメインはアプタマーを含み得、アンカー試薬はアプタマールリガンドを含み得る。結合ドメインは核酸配列を含み得、アンカー試薬はDNA結合タンパク質を含み得、かつ／またはアンカー試薬はオリゴヌクレオチド配列を

50

含み得、アンプリコンは相補的なオリゴヌクレオチド配列を含み得る。

【0132】

実施形態(31)および(32)のアンプリコンは、1つ以上の検出配列を含み得、測定工程は、伸長配列を、1つ以上の検出配列に相補的な複数の標識プローブと接触させることを含み得る。さらに、アンプリコンは、1つ以上の修飾塩基をさらに含み得、測定工程は、伸長配列を、1つ以上の修飾塩基に結合することができる複数の検出可能な部分と接触させることを含み得る。さらに、アンプリコンは、1つ以上の標識塩基をさらに含み得、測定工程は、1つ以上の標識塩基の存在を検出することを含み得る。1つ以上の修飾塩基は、アプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミモトープを含み、複数の検出可能な部分は、1つ以上の修飾塩基の結合相手および検出可能な標識をそれぞれ含み得る。1つ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含み得、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、1つ以上の修飾塩基はビオチンを含み得、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、1つ以上の修飾塩基はアビジンを含み得、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識をそれぞれ含み、かつ／または1つ以上の修飾塩基はビオチンを含み得、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識をそれぞれ含む。

10

【0133】

実施形態(31)および(32)の工程(a)は、HIV p24を以下の順序で以下の種に結合することを含み得る。(i)表面上の捕捉試薬、ならびに(ii)HIV p24の第1および第2の検出試薬。代替的に、工程(a)は、以下の順序で、HIV p24を以下の種に結合することを含み得る。(i)HIV p24の第1および第2の検出試薬、ならびに(ii)表面上の捕捉試薬。さらに、工程(a)は、同時にまたは実質的に同時に、HIV p24を以下の種に結合することを含み得る。(i)表面上の捕捉試薬、および(ii)HIV p24の第1および第2の検出試薬。

20

【0134】

実施形態(31)および(32)のアンプリコンは、プローブ伸長後も表面上に局在したままである。複合体は、伸長工程後も表面に結合したままであり得る。例えば、アンプリコンは、表面上の複合体の配置から10~100 μm以内の位置でアンカー試薬に結合する。特定の一実施形態では、伸長プローブは、表面上の複合体の配置から100 μm未満、50 μm未満、またはより具体的には10 μm未満の位置でアンカー試薬に結合する。

30

【0135】

実施形態(31)および(32)の表面は、粒子および／またはマルチウェルプレートのウェルを含み得る。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の2つの別個の結合ドメイン上に配置される。表面は、複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上の同じ結合ドメイン上に配置される。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み得、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の同じ結合ドメイン上に配置される。特定の例では、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10~100 nm以内にある。

40

【0136】

さらに、表面は電極を含み得、測定工程は、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することを含み得る。これらの実施形態((31)および(32))では、この方法は、電極上で粒子を収集し、電極に電圧波形を印加して電気化学発光シグナルを生成することをさらに含み得る。測定工程は、アンプリコンを検出可能な標識を有する検出プローブに結合することと、検出可能な標識を測定することと、測定値を試料中の分析物の量と関連させることを含み得、検出プローブは、アンプリコンの領域に相補的な核酸配列を含む。検出可能な標識は、光散乱、光学吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光、生物発光、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定され

50

る。例えば、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程は、ECLシグナルを測定することを含み得る。検出プローブは、複数のECL標識を有する場合がある。検出プローブは、プローブヌクレオチド構成要素の3'末端での結合を介して、多重ECL標識部分に結合され得る。

【0137】

実施形態(33)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)第1の検出試薬に結合した分析物を含む分析物複合体を形成するのに十分な条件下で試料を濃縮することであって、第1検出試薬は第1の核酸プローブに連結している、試料を濃縮すること、(b)工程(a)で形成された分析物複合体を、(i)分析物の捕捉試薬、およびアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面上の捕捉試薬、ならびに(i i)第2の核酸プローブに連結された分析物の第2の検出試薬に結合することにより、捕捉試薬、分析物、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に複合体を形成すること、(c)第1および第2のプローブが近接していることを必要とする伸長プロセスを使用し、第2のプローブを伸長して、アンカー配列に相補的なアンカー配列相補体を含む伸長配列を形成すること、(d)アンカー配列をアンカー配列相補体にハイブリダイズさせること、(e)表面に結合した伸長配列の量を測定すること、を含む、方法。濃縮工程(a)は、(i)分析物を含む試料を、第1の核酸プローブの少なくとも一部に相補的な標的剤に連結した固相と接触させることにより、第1の核酸プローブと標的剤との間の結合反応を介した固相に結合した分析物を含む濃縮複合体を形成すること、(i i)濃縮複合体を収集すること、(i i i)試料の非結合構成要素を濃縮複合体から分離すること、(i v)濃縮複合体を放出して、固相を分析物から分離して、分析物複合体を形成すること、をさらに含み得る。

【0138】

実施形態(34)：1つ以上のバイアル、容器、または区画に、(a)(i)分析物の捕捉試薬、および(i i)アンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面と、(b)第1の核酸プローブに連結された分析物の第1の検出試薬と、(c)第2の核酸プローブに連結された分析物の第2の検出試薬と、(d)第1の核酸プローブの少なくとも一部に相補的な標的剤を含む固相と、を含む試料中の目的の分析物を検出するためのキット。

【0139】

実施形態(35)：試料中のエキソソームを検出する方法であって、(a)エキソソームを、(i)エキソソームの捕捉試薬とアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬とを含む表面上の捕捉試薬と、(i i)第1の核酸プローブに連結されたエキソソームの第1の検出試薬と、(i i i)第2の核酸プローブに連結されたエキソソームの第2の検出試薬とに結合することにより、結合試薬、エキソソーム、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に複合体を形成すること、(b)第1および第2のプローブが近接することを要する伸長プロセスを使用し、第2のプローブを伸長して、アンカー配列に相補的なアンカー配列相補体を含む伸長配列を形成すること、(c)アンカー配列をアンカー配列相補体にハイブリダイズさせること、(d)表面に結合した伸長配列の量を測定すること、を含む、方法。

【0140】

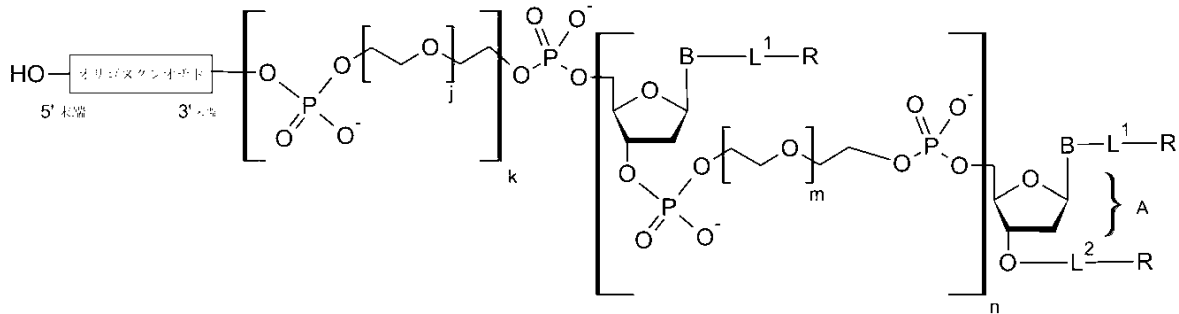
実施形態(36)：1つ以上のバイアル、容器、または区画に、(a)(i)エキソソームの捕捉試薬、および(i i)アンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面と、(b)第1の核酸プローブに連結されたエキソソームの第1の検出試薬と、(c)第2の核酸プローブに連結されたエキソソームの第2の検出試薬とを含む、試料中の目的のエキソソームを検出するためのキット。

【0141】

実施形態(37)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、分析物を、(i)分析物の捕捉試薬およびアンカー配列を含むアンカー試薬を含む表面上の捕捉試薬と、(i i)第1の核酸プローブに連結された分析物の第1の検出試薬と、(i i i)第2の核

酸プローブに連結された分析物の第2の検出試薬とに結合することにより、結合試薬、分析物、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に複合体を形成することと、(b)第1および第2の核酸プローブを伸長して、アンカー配列に相補的なアンカー配列相補体を含む伸長配列を形成することと、(c)アンカー配列をアンカー配列相補体にハイブリダイズさせることと、(d)式Iの標識プローブを使用して表面に結合した伸長配列の量を測定することと、を含む、方法。

【化1】



式 I

式中、Bはヌクレオチド塩基であり、Rは電気化学発光標識であり、 L^1 は連結基であり、 L^2 は連結基であり、jは0～11の整数であり、kは0～1の整数であり、mは0～11の整数であり、nは0～5の整数である。

【0142】

実施形態(38)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、分析物を、(i)分析物の捕捉試薬およびアンカー配列を含むアンカー試薬を含む表面上の捕捉試薬と、(ii)核酸プローブに連結された分析物の検出試薬とに結合することにより、結合試薬、分析物、および検出試薬を含む表面上に複合体を形成することと、(b)核酸プローブを伸長して、アンカー配列に相補的なアンカー配列相補体を含む伸長配列を形成することと、(c)アンカー配列をアンカー配列相補体にハイブリダイズさせることと、(d)式Iの標識プローブを使用して表面に結合した伸長配列の量を測定することと、を含む、方法。

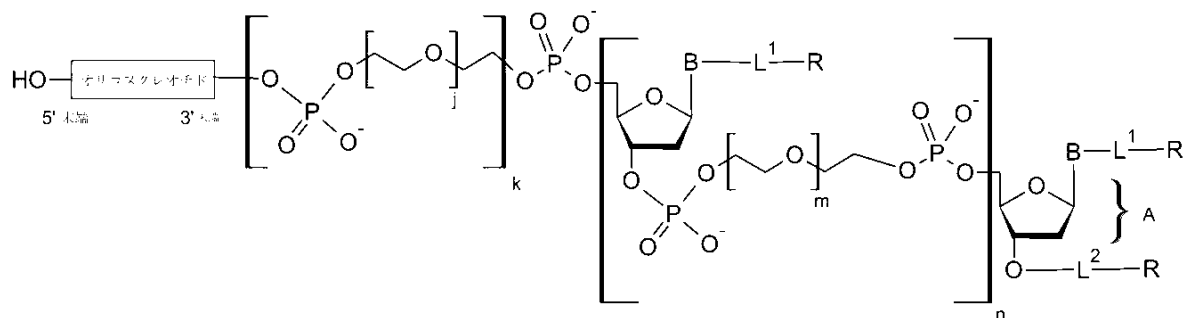
【0143】

上記の実施形態(1)～(38)のいずれにおいても、アンカー試薬は、分析物を捕捉試薬に結合する前、結合中、または結合した後に表面に付着する。キットを含む実施形態では、アンカー試薬は、表面とは別個に提供され、次いで表面に固定され、捕捉試薬は、表面に固定される。キットを含む実施形態では、アンカー試薬および捕捉試薬は、表面に固定されたものとして提供される。

【0144】

上記の実施形態(1)～(38)のいずれも、式Iの標識プローブを含み得、

【化2】



式 I

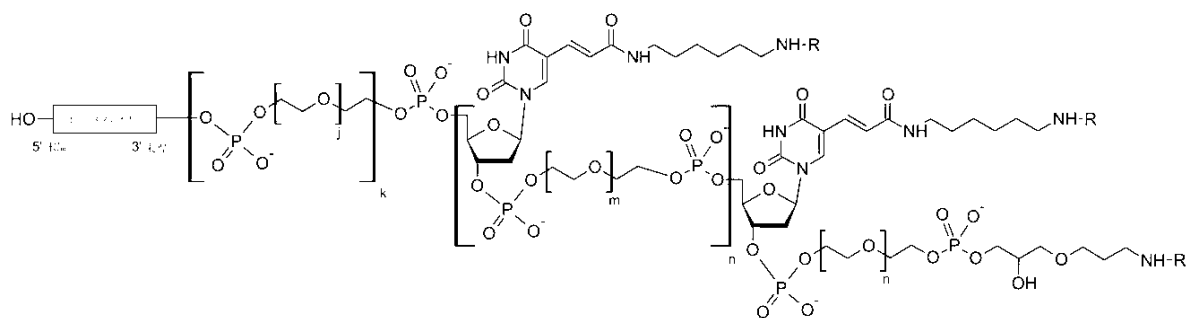
式中、Bはヌクレオチド塩基であり、Rは電気化学発光標識であり、 L^1 は連結基であ

り、 L^2 は連結基であり、 j は0～11の整数であり、 k は0～1の整数であり、 m は0～11の整数であり、 n は0～5の整数である。

【0145】

上記の実施形態(1)～(38)のいずれも、式IIの標識プローブを含み得、

【化3】

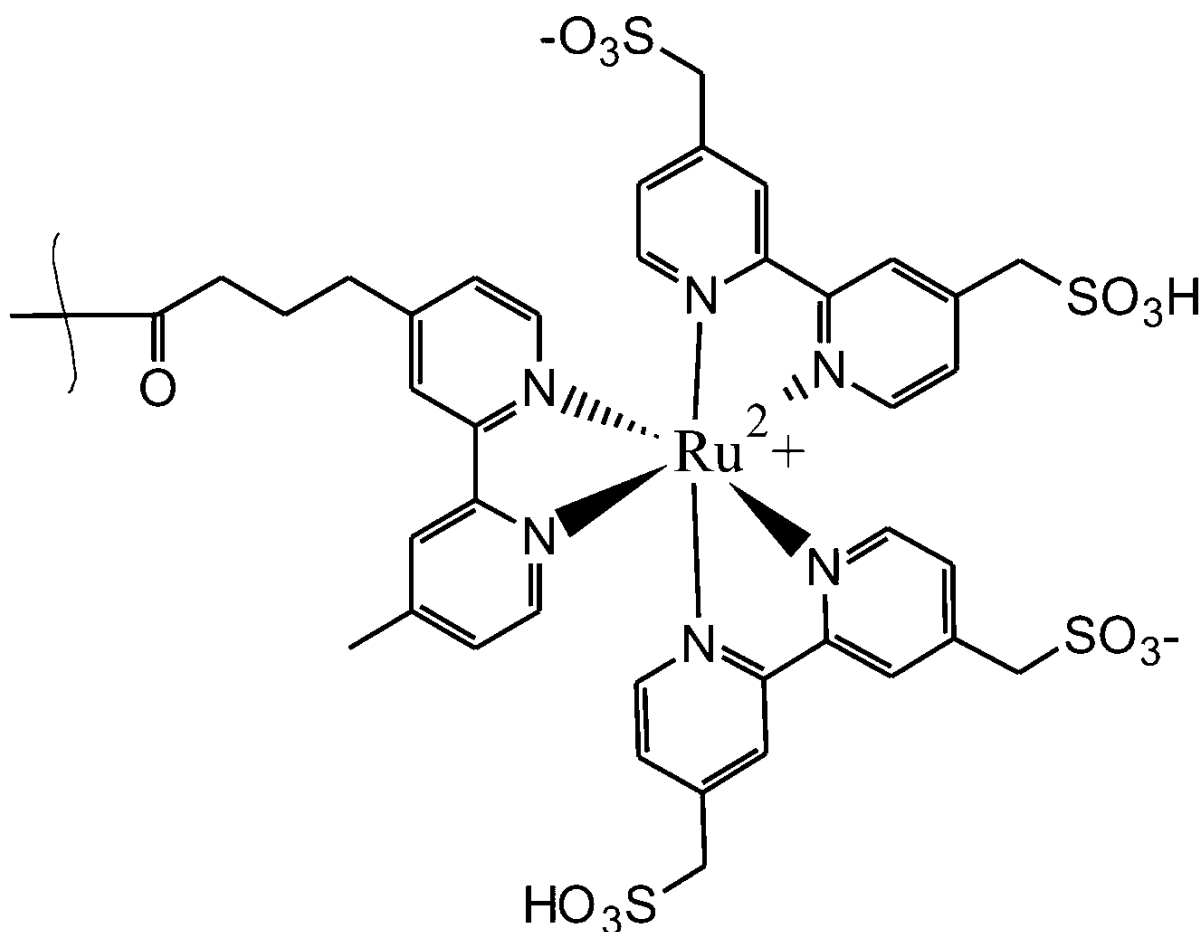


10

式II

式中、 j は0～11の整数であり、 k は0～1の整数であり、 m は0～11の整数であり、 n は0～5の整数であり、 R は、電気化学発光標識：

【化4】



20

30

40

である。

【0146】

本明細書の実施形態に記載される方法のいずれも、電気化学発光を測定する方法であって、(a)電極に近接している複合体が電気化学発光を放出する条件下で、電極に電位を印加することであって、複合体が、本明細書で提供される標的オリゴヌクレオチドおよび

50

標識プローブを含み、標識プローブが、標的オリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドを含む、電極に電位を印加することと、(b) 放出された電気化学発光を測定することと、を含む方法を含み得る。

【0147】

実施形態(1)～(38)のいずれかに記載される、例えば検出試薬に連結された核酸プローブは、オリゴヌクレオチドを含み得、オリゴヌクレオチドは、14～24ヌクレオチドの長さであり、5'-GACAGAACTAGACAC-3' (配列番号33)の14または15個の連続したヌクレオチドを含む。実施形態では、本発明は、核酸プローブを非核酸検出試薬にコンジュゲートしてコンジュゲートを形成する方法を提供し、本方法は、検出試薬が架橋剤の第1の反応基と反応し、核酸が架橋剤の第2の反応基と反応する条件下で、検出試薬および核酸プローブを、ヘテロニ官能性架橋剤と接触させてコンジュゲートを形成することを含み、ヘテロニ官能性架橋剤は、(i) 検出試薬と反応して架橋剤を検出試薬に付着させることができる第1の反応基と、(ii) 検出試薬に対して実質的に非反応性でありながら、核酸プローブと反応して架橋剤を核酸プローブに付着させることができる第2の反応基と、を含み、本方法は、架橋剤と核酸プローブとの反応前に、検出試薬と架橋剤との反応産物を精製することを含まない。

10

【0148】

実施形態では、本発明は、核酸プローブを非核酸検出試薬にコンジュゲートしてコンジュゲートを形成する方法を提供し、本方法は、(a) 検出試薬が架橋剤の第1の反応基と反応する条件下で、検出試薬を、ヘテロニ官能性架橋剤と接触させて第1の組成物を形成することであって、ヘテロニ官能性架橋剤が、(i) 検出試薬と反応して架橋剤を検出試薬に付着させることができる第1の反応基、および(ii) 検出試薬に対して実質的に非反応性でありながら、核酸プローブと反応して架橋剤を核酸プローブに付着させることができる第2の反応基を含む、第1の組成物を形成することと、(b) 架橋剤の第2の反応基が核酸プローブと反応する条件下で、第1の組成物を核酸プローブと接触させてコンジュゲートを形成することと、を含み、本方法は、架橋剤と核酸プローブとの反応前に、検出試薬と架橋剤との反応産物を精製することを含まない。

20

【0149】

実施形態では、本発明は、核酸プローブを非核酸検出試薬にコンジュゲートしてコンジュゲートを形成するためのキットを提供し、キットは、(a) (i) 検出試薬と反応して架橋剤を検出試薬に付着させることができる第1の反応基、および(ii) 検出試薬に対して実質的に非反応性でありながら、核酸プローブと反応して架橋剤を核酸プローブに付着させることができる第2の反応基を含むヘテロニ官能性架橋剤と、(b) コンジュゲートを未反応の核酸プローブから分離することができる第1のサイズ分離デバイスと、(c) 核酸結合フルオロフォアと、を含み、フルオロフォアが核酸に結合するとフルオロフォアの蛍光強度は増加する。実施形態では、本発明は、核酸プローブを非核酸検出試薬にコンジュゲートしてコンジュゲートを形成するための方法を提供し、本方法は、(a) 検出試薬および核酸プローブを反応させてコンジュゲートを形成することと、(b) サイズ分離デバイスを使用して、コンジュゲートを未反応の核酸プローブから分離し、精製されたコンジュゲートを形成することと、(c) 精製されたコンジュゲートの試料、およびフルオロフォアが核酸に結合すると増加する蛍光強度を有するように選択された核酸結合フルオロフォアを含む試験組成物を形成することと、(d) 試験組成物の蛍光を測定して、精製されたコンジュゲート中の核酸プローブの量を決定することと、を含む。

30

40

【図面の簡単な説明】

【0150】

【図1(a)～(c)】免疫測定法におけるアンカー試薬の使用を示す。図1(a)は、捕捉試薬、目的的分析物、および核酸プローブを含む検出試薬を含む検出複合体に結合して安定化するためのアンカー試薬の使用を示す。核酸プローブは、伸長してアンカー試薬に結合する。図1(b)において、アンカー試薬は、検出試薬上に形成される伸長配列の一部に相補的な領域を含むオリゴヌクレオチド配列を含む。図1(c)は、2つの検出試

50

薬が分析物を結合するために使用される特定の実施形態を示し、それぞれが核酸プローブを含む。検出試薬のプローブは、アンカーオリゴヌクレオチド配列に対する1つの伸長プローブのハイブリダイゼーションを可能にする増幅プロセスに供される。

【図2(a)】アンカー試薬を有する表面上に形成された免疫複合体をPLA-RCAPプロセスに供して、免疫複合体に付着した伸長配列に複数の検出可能な種を組み込む特定の実施形態を示す。

【図2(b) - 2(c)】本発明の方法で使用することができる接続オリゴヌクレオチドの2つの代替立体配置である。

【図3】オリゴヌクレオチドをタンパク質に付着させる1つの方法を示す。

【図4(a)】捕捉試薬、分析物、および2つの検出試薬の間に表面結合複合体が形成される本発明の好ましい実施形態を示し、各々第1および第2の近接プローブにそれぞれ付着し、プローブはコネクタプローブに連結されてローリングサークル増幅によって増幅される環状DNAテンプレートを形成する。図4(a)はまた、アッセイ法が進行するにつれて形成されるアンプリコンの配列に相補的なアンカーオリゴヌクレオチド配列を含む増幅試薬も含む。

【図4(b)】第1の環状DNAテンプレートCirc-1、検出オリゴヌクレオチド配列、アンプリコンの不活性領域、および第2の近接プローブにハイブリダイズするように設計された部分PP2の例示的な配列を示す。代替の実施形態を図4(c)に示す。

【図5】ローリングサークル増幅で増幅することができるアンプリコンを生成する代替方法を示す。

【図6(a) - (b)】ローリングサークル増幅で増幅することができるアンプリコンを生成する代替方法を示す。

【図7】サンドイッチ複合体の各近接プローブの一部が、各セグメントにハイブリダイズしたRNAの短鎖によって一時的に保護される代替の実施形態を示す。これらの鎖は酵素で除去され、近接プローブが互いにハイブリダイズし、鎖が伸長することを可能にする。

【図8】図8を参照して上記のように、近接プローブが捕捉試薬および検出試薬に付着し、各近接プローブの一部が、それにハイブリダイズしたRNAの短鎖によって一時的に保護されるさらなる実施形態を示す。

【図9】実施例1に記載の方法を使用して実施したIL-10アッセイの較正曲線を示す。

【図10(a) - (b)】アンカー試薬を使用した場合(a)と使用しない場合(b)の蛍光顕微鏡画像を示す。

【図11(a)】連結部位1または2のいずれかを含む単一の直鎖コネクタオリゴヌクレオチド配列の立体配置、および本発明のアッセイにおけるこれらのコネクタの使用を示す。

【図11(b)】Circ-1およびCirc-2の組み合わせと、連結部位1を含む単一の直鎖コネクタオリゴヌクレオチド配列または連結部位2を含む単一の直鎖コネクタオリゴヌクレオチド配列のいずれかと、を使用したアッセイの比較性能データを示す。

【図12】実施例1および6に記載の方法を使用して実施されたHIV p24アッセイの較正曲線を示す。

【図13】実施例1および6に記載の方法を使用した血清転換パネルの分析結果を示す。

【図14(a) - (c)】分析物濃縮工程を含むHIV p24のアッセイ結果を示す。

【図15】分析物濃度工程を含むHIV p24アッセイの較正曲線を示す。

【図16】分析物濃縮工程を含む、本明細書に記載のアッセイ方法の概略図である。

【図17】捕捉試薬および／またはアンカー試薬を介して表面に結合する前にアンプリコンが溶液中で形成される、本明細書に記載のアッセイ方法の概略図である。

【図18】複数のステーブル配列を使用してアンプリコンに接着させることにより、表面上によりコンパクトな構造を形成するアッセイ法の概略図である。

【図19】3AB PLA-RCAP技術、ならびに捕捉試薬を表面に結合するための標的部分およびその相補体の使用を組み込んだ架橋免疫測定形式の概略図である。

【図20(a) - (b)】テンプレート形成のための生合成法の概略図である。

10

20

30

40

50

【図 2 1】試料マルチプレックス化の概略図である。

【図 2 2】本明細書に記載の方法を使用したりポタンパク質複合体の検出の概略図である。

【図 2 3】(a) 蛍光色素法およびゲル電気泳動により測定された抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートのタンパク質当たりの平均標識 (L/P) 比の比較、ならびに (b) 遊離オリゴヌクレオチドおよび抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲート中のオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド濃度の関数として蛍光色素法により測定されたシグナルを示す。

【図 2 4】ストレプトアビジンで被覆された表面で実施された 2 抗体増幅 ECL 免疫測定法の概略図を示す。

【図 2 5】(a) 抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲーション反応の粗産物の G-100 Superfine カラムからの溶出プロファイルと、非コンジュゲート抗体、非コンジュゲートオリゴヌクレオチドおよび精製コンジュゲートのプロファイル、(b) IL-6 検出抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの溶出プロファイルおよび収集画分と、(c) G-100 精製 IL-6 検出抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを使用した増幅 ECL 免疫測定の較正曲線と、コンジュゲートを遠心限外濾過によって精製した場合の結果を示す。

【図 2 6】(a) 6 種類の核酸感受性蛍光色素について、遊離オリゴヌクレオチド対抗体にコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドに結合した後の相対的蛍光シグナル (左)、色素とタンパク質の相互作用に関連する抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートからのシグナルのパーセント (中央)、および 100 ng のコンジュゲートの測定中に得られたシグナル対バックグラウンド比 (右)、ならびに (b) オリゴヌクレオチド濃度の関数としての 3 つの抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートについての SYBR Green I 色素を使用して測定された蛍光シグナル (およびこれらのシグナルと非コンジュゲートオリゴヌクレオチドで得られたシグナルとの比較) を示す。

【図 2 7】(a) 逐次および (b) 同時のアッセイ形式での 3 つの異なる分析物についての増幅 ECL アッセイにおける 4 つの異なる標識検出オリゴヌクレオチド構築物の性能を比較する。

【図 2 8】逐次および同時のアッセイ形式での 3 つの異なる分析物についての増幅 ECL アッセイにおける 2 つの異なる標識検出オリゴヌクレオチド構築物の性能を比較する。

【図 2 9】抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの生成および性能に及ぼす架橋剤チャレンジ比およびコンジュゲーションプロトコルの効果を示し、(a) 増幅 ECL アッセイにおけるタンパク質当たりの標識 (L/P) および性能、ならびに (b) ゲル電気泳動によるコンジュゲート形成の特性評価を提供する。

【図 3 0】2 つの分析物についての増幅 ECL アッセイにおける異なるビオチン-アンカーオリゴヌクレオチド構築物の性能を比較する。

【図 3 1】(a) コンジュゲートを使用したアッセイで得られたシグナル、バックグラウンド、および検出限界に及ぼす検出抗体-オリゴヌクレオチドプローブコンジュゲートのプローブの長さの効果、ならびに (b) 様々な温度へのアッセイにおける連結工程の感度に及ぼすプローブの GC 含量の効果を示す。

【図 3 2】分析物についての増幅 ECL アッセイにおける異なる Circ オリゴヌクレオチド構築物の性能を比較する。

【図 3 3】増幅 ECL アッセイを実行するための試薬の最適化中に行われた改良の概略図である。

【図 3 4】(a) 従来形式および増幅形式で得られたシグナルを比較する 3 つの分析物のアッセイについての較正曲線、ならびに (b) 異なる分析物を標的とする 4 つの異なるアッセイについて 2 つの形式で得られた検出限界の比較を示す。

【発明を実施するための形態】

【0151】

本明細書で別途定義されない限り、本発明に関して使用される科学のおよび技術的用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈上別段の必

10

20

30

40

50

要がない限り、単数形には複数形が含まれ、複数形には単数形が含まれるものとする。冠詞「a」および「an」は、本明細書では、冠詞の文法的目的語の1つ以上（すなわち、少なくとも1つ）を指すために使用される。例として、「要素」は、1つの要素または複数の要素を意味する。

【0152】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、値が、デバイス、または値を決定するために使用される方法についての誤差の固有変動を含むことを示すために使用される。

【0153】

本明細書で使用される場合、「間」は、範囲の終わりを含む範囲である。例えば、xとyの間の数には、xおよびyの数、ならびにxとyの範囲内にある任意の数が含まれる。

10

【0154】

本明細書で使用される場合、「キット」とは、例えば、組成物を作製するために、デバイスを製造するために、または方法を実行するために提供されてまたは集められて一緒に使用される、一組の構成要素を指す。キットは、1つ以上の構成要素を含み得る。キットの構成要素は、1つのパッケージまたは複数のパッケージで提供され得、各パッケージは、1つ以上の構成要素を含み得る。次に、キットの列挙される構成要素は、単一の物理的な部品として、またはキットの使用のために組み合わされる複数の部品として提供される場合もある。例えば、キットの機器構成要素は、完全に組み立てられた状態で、または使用前に組み立てられる複数の機器部品として提供され得る。同様に、キットの液体試薬構成要素は、容器内の完全な液体製剤として、完全な液体製剤を提供するために組み合わされる1つ以上の乾燥試薬および1つ以上の液体希釈剤として、または完全な液体製剤を提供するために組み合わせる2つ以上の液体溶液として提供され得る。当技術分野で知られているように、アッセイ用のキット構成要素は、例えば、4℃対-70℃の保管温度といった異なる保管ニーズを有するために、別個に出荷および保管されることが多い。

20

【0155】

アッセイで測定される分析物、またはアッセイで使用される試薬の等級の文脈において、「複数性」という用語は、分析物または試薬の単なる複数のコピーではなく（例えば、捕捉抗体Aおよび捕捉抗体Aの別のコピー）、複数の構造的および／または機能的に異なる分析物または試薬（例えば、捕捉抗体Aおよび捕捉抗体B）を意味する。例えば、「複数の固定化抗原」という用語は、複数の構造的または機能的に異なる抗原が固定されることを意味し、単一の抗原のみの複数のコピーが存在する状況を説明するものではない。しかしながら、この文脈における「複数」という用語の使用は、複数の分析物または試薬のいずれかの複数のコピーが存在する可能性を排除するものではない。例えば、複数の固定化抗原は、抗原Aの1つ以上のコピーおよび抗原Bの1つ以上のコピーを含む固定化抗原を指し得る。

30

【0156】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、単一の「ポリペプチド」ならびに複数の「ポリペプチド」を包含することを意図し、アミド結合（すなわち、ペプチド結合）によって直線的に連結されたモノマー（アミノ酸）から構成される分子を指す。「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸の任意の鎖または複数の鎖を指し、特定の長さの産物を指すものではない。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、またはアミノ酸の鎖もしくは複数の鎖を指すために使用される他の用語は、「ポリペプチド」の定義に含まれ、「ポリペプチド」という用語は、これらの用語のいずれかの代わりに、またはこれらの用語のいずれかと同義で使用することができる。「ポリペプチド」という用語はまた、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護基／遮断基による誘導体化、タンパク質分解切断、または非天然アミノ酸による修飾を含むが、これらに限定されない、ポリペプチドの発現後修飾の産物を指すことも意図する。ポリペプチドは、天然の生物学的起源に由来し得るか、または組換え技術によって産生され得るが、必ずしも指定された核酸配列から翻訳

40

50

されるとは限らない。ポリペプチドは、化学合成を含む任意の様式で生成され得る。ポリペプチドの文脈において、「直鎖配列」または「配列」とは、配列で互いに隣接する残基が、ポリペプチドの一次構造で近接している、アミノからカルボキシル末端方向のポリペプチドにおけるアミノ酸の順序である。

【0157】

「結合試薬」または「結合物質」とは、別の物質（「結合相手」と呼ばれることがある）に結合する能力を特徴とする試薬または物質を指す。本発明の結合試薬、結合物質および結合相手には、「抗原結合物質」、すなわち、抗体、抗体断片、抗体誘導体、抗体類似体、抗体変異体、操作された抗体、および抗体に類似する様式で抗原に結合する他の物質を指す用語が含まれる。抗原結合物質には、抗体の少なくとも1つの重鎖または軽鎖の相補性決定領域（CDR）を含む物質が含まれる。抗原結合物質には、1つ以上の抗体からの少なくとも2つのCDRを含む物質が含まれる。抗原結合物質には、1つ以上の抗体からの少なくとも3つのCDRを含む物質が含まれる。抗原結合物質には、1つ以上の抗体からの少なくとも4つのCDRを含む物質が含まれる。抗原結合物質には、1つ以上の抗体からの少なくとも5つのCDRを含む物質が含まれる。抗原結合物質には、1つ以上の抗体からの少なくとも6つのCDRを含む物質が含まれる。

【0158】

抗体または他の抗原結合物質に由来する抗原結合物質には、抗体配列に1つ以上の抗体を追加、除去、または置換して、その所望の標的に対する抗体の親和性および／または特異性を改良すること（例えば、抗体の「親和性成熟」のための確立された方法の使用による）、および／または試薬の他の特性を改良すること（例えば、安定性を改良すること、または相補体、リウマチ因子または抗種抗体などの試料中の潜在的に干渉する構成要素との相互作用を低減すること）などが含まれ得る。一実施形態では、抗原結合物質は、抗体のFab部分であり、試料のFc結合構成要素の潜在的な干渉を低減する。特定の種からの試料中の分析物を測定するための一実施形態では、抗原結合物質は、その種の抗体クラスに一致するように設計された抗体の改変形態である（例えば、マウス抗体は、ヒト試料にしばしば存在するヒト抗マウス抗体（すなわち、マウス抗体を標的とするヒト抗体）からの干渉を回避するために、ヒト試料に対して実施されるアッセイで使用するためにヒト化され得る）。

【0159】

本明細書で使用される場合、「ヒト」抗体または「完全ヒト」抗体には、下記および例えば、米国特許第5,939,598号に記載されているように、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体が含まれ、ヒト免疫グロブリンライブラリーから、または1つ以上のヒト免疫グロブリンの遺伝子導入動物から単離され、内因性免疫グロブリンを発現しない抗体が含まれる。「ヒト」抗体または「完全ヒト」抗体はまた、少なくとも重鎖の可変ドメイン、または少なくとも重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む抗体も含み、可変ドメインはヒト免疫グロブリン可変ドメインのアミノ酸配列を有する。「ヒト化」抗体は、元の抗体の標的抗原に結合する能力を維持しながら、その定常配列およびフレームワーク配列がヒト抗体のクラスと一致するように改変された、他の種由来の抗体である。

【0160】

「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、本明細書では同義で使用される。抗体または免疫グロブリンは、少なくとも重鎖の可変ドメインを含み、通常、少なくとも重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む。脊椎動物系の基本的な免疫グロブリンの構造は比較的よく理解されている。例えば、Harlow et al. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press) を参照。

【0161】

「免疫グロブリン」という用語は、生化学的に識別することができる様々な幅広いクラスのポリペプチドを含む。当業者は、動物種によって産生される重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンなどの異なるクラスに分類され得、これらのクラ

スがさらにサブクラス（例えば、ガンマ1～ガンマ4）に分けられ得ることを理解するであろう。抗体の「クラス」を、それぞれIgG、IgM、IgA、IgG、またはIgEとして決定するのは、この鎖の性質である。免疫グロブリンサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1などは、十分に特性評価され、機能分化を与えることが知られている。これらのクラスおよびアイソタイプのそれぞれの改変版は、本開示の観点から当業者には容易に識別可能であり、したがって、本発明の範囲内である。すべての免疫グロブリンクラスは明らかに本発明の範囲内にある。以下の考察は、一般的に、IgGクラスの免疫グロブリンに関する。哺乳動物で産生されるIgGのほとんどの形態は、分子量が約23,000ダルトンの2つの同一軽鎖ポリペプチド、および分子量が53,000～70,000の2つの同一重鎖ポリペプチドを含む。4つの鎖は、通常、「Y」字立体配置でジスルフィド結合によって結合され、軽鎖は、「Y」字の口から始まり可変領域を通して続く重鎖を挟む。正確な分子量は、種によって、およびサブクラス間で異なる場合がある。ラクダ種などの一部の種は、軽鎖のないIgG型を産生する場合もある。

【0162】

軽鎖は、カッパ（Vκ）またはラムダ（Vλ）の形態など、分類可能な異なる形態で産生される場合もある。各重鎖クラスは、カッパまたはラムダの軽鎖のいずれかに結合することができる。一般に、軽鎖および重鎖は互いに共有結合しており、2つの重鎖の「尾」部分は、共有ジスルフィド結合または非共有結合によって互いに結合している。重鎖では、アミノ酸配列は、Y字立体配置の分岐末端のN末端から各鎖の底部のC末端まで伸びている。

【0163】

軽鎖および重鎖の両方が、構造的および機能的相同性の領域に分けられる。「定常」および「可変」という用語は、機能的に使用される。これに関して、軽鎖部分（VκまたはVλ—総称して「VL」）および重鎖部分（VH）の両方の可変ドメインが抗原認識および特異性を決定することが理解されよう。逆に、軽鎖（CL）および重鎖（CH1、CH2またはCH3）の定常ドメインは、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、相補体結合などの重要な生物学的特性を付与する。慣例により、定常領域ドメインの付番は、それらが抗原結合部位または抗体のアミノ末端からより遠位になるにつれて増加する。N末端部分は可変領域であり、C末端部分は定常領域であり、CH3ドメインおよびCLドメインは通常、重鎖および軽鎖のカルボキシ末端をそれぞれ含む。

【0164】

前述のとおり、可変領域は、抗体が抗原上のエピトープを選択的に認識し、特異的に結合することを可能にする。すなわち、抗体のVLドメインおよびVHドメイン、またはこれらの可変ドメイン内の相補性決定領域（CDR）のサブセットが組み合わさって、三次元抗原結合部位を規定する可変領域を形成する。この四次抗体構造は、Y字の各アームの末端に存在する抗原結合部位を形成する。より具体的には、抗原結合部位は通常、VH鎖およびVL鎖のそれぞれの3つのCDRによって規定される。本明細書で使用される場合、HCDR1、HCDR2、HCDR3という用語は、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3をそれぞれ指す。同様に、本明細書で使用される場合、LCDR1、LCDR2、LCDR3という用語は、VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3をそれぞれ指す。場合によっては、例えば、ラクダ種に由来する、またはラクダ免疫グロブリンに基づいて操作された特定の免疫グロブリンでは、完全免疫グロブリンは、軽鎖を含まず、重鎖のみからなり得る。例えば、Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-448 (1993)を参照されたい。

【0165】

天然の抗体では、各抗原結合ドメインに通常存在する6つの「相補性決定領域」または「CDR」は、抗体が水性環境での三次元立体配置を想定しているため、抗原結合ドメインを形成するように特異的に位置付けられたアミノ酸の短い非連続配列である。「フレームワーク」領域と呼ばれる、抗原結合ドメインの残りのアミノ酸は、分子間変動が少ない

10

20

30

40

50

ことを示す。フレームワーク領域は主にシートコンフォメーションを採用し、CDRはβシート構造を接続するループを形成し、場合によってはその一部を形成する。したがって、フレームワーク領域は、足場を形成するように機能し、足場は、鎖間、非共有相互作用によってCDRを正しい方向に位置付ける。位置付けられたCDRによって形成される抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエピトープに相補的な表面を規定する。この相補的な表面は、抗体の同族エピトープへの非共有結合を促進する。CDRおよびフレームワーク領域をそれぞれ含むアミノ酸は、それらが正確に規定されているため、当業者によって、所与の重鎖または軽鎖の可変ドメインについて容易に特定され得る（以下を参照）。

【0166】

当技術分野で使用および／または受け入れられる用語に2つ以上の定義がある場合、本明細書で使用される用語の定義は、反対に明確に述べられていない限り、そのようなすべての意味を含むことを意図する。特定の例は、「相補性決定領域」（「CDR」）という用語を使用して、重鎖および軽鎖の両ポリペプチドの可変領域内に見出される非隣接抗原結合部位を説明することである。この領域は、Kabat et al. (1983) U. S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)に記載されており、最近、Kunik et al., Nucl. Acids Res. 40:W521-W524 (2012)によって更新され、これらは参照により本明細書に組み込まれ、定義には、互いに比較した場合のアミノ酸残基の重複またはサブセットが含まれる。それにもかかわらず、抗体またはその変異体のCDRを指すための任意の定義の適用は、本明細書で定義および使用される用語の範囲内にあることが意図される。特定のCDRを包含する正確な残基番号は、CDRの配列およびサイズによって異なる。当業者は、抗体の可変領域アミノ酸配列が与えられると、どの残基が特定のCDRを含むかを日常的に決定することができる。

【0167】

Kabatらはまた、あらゆる抗体に適用可能な可変ドメイン配列の付番システムを定義した。当業者は、配列自体を超える実験データに依存することなく、この「カバット付番」システムを任意の可変ドメイン配列に明確に割り当てることができる。本明細書で 사용되는場合、「カバット付番」とは、配列または構造に基づく抗体の抗原結合領域の体系的な特定について、オンラインツールであるParatomeに開示されたKabat et al. (1983) U. S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest."

【0168】

Kunik et al., Nucl. Acids Res. 40:W521-W524 (2012)によって明記された付番システムを指す。通常、Paratomeに基づく分析は、カバット付番と一致するが、従来のCDRに隣接する残基も含まれる場合がある。

【0169】

本発明の抗体またはその抗原結合断片、変異体、または誘導体には、ポリクローナル、モノクローナル、多特異性、ヒト、ヒト化、霊長類化、キメラの抗体、一本鎖抗体、エピトープ結合断片、例えば、Fab、Fab'およびF(ab')₂、Fd、Fvs、一本鎖Fvs(scFv)、ジスルフィド結合Fvs(sdFv)、VLまたはVHドメインのいずれかを含む断片、Fab発現ライブラリーによって産生された断片、および抗イディオタイプ(抗Id)抗体が含まれるが、これらに限定されない。scFv構築物は、当技術分野で知られており、例えば、米国特許第5,892,019号に記載されている。本発明の免疫グロブリンまたは抗体は、任意のタイプのIgG、IgE、IgD、IgA、およびIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2など)、または免疫グロブリン分子のサブクラスのものであり得る。抗体および他の抗原結合物質を産生するための多くのアプローチは当技術分野で周知であり、

B細胞の培養物、ハイブリドーマ細胞の培養物、培養物または一過性または恒久的にトランスフェクションされた宿主細胞株、細菌、酵母、植物細胞および昆虫細胞からの産生を含む。

【0170】

本明細書で使用される場合、「重鎖部分」という用語は、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列を含む。重鎖部分を含むポリペプチドは、CH1ドメイン、ヒンジ（例えば、上部、中間、および／または下部のヒンジ領域）ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、またはそれらの変異体もしくは断片のうちの少なくとも1つを含む。例えば、本発明で使用するための結合ポリペプチドは、CH1ドメインを含むポリペプチド鎖、CH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、およびCH2ドメインを含むポリペプチド鎖、CH1ドメインおよびCH3ドメインを含むポリペプチド鎖、CH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、およびCH3ドメインを含むポリペプチド鎖、またはCH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含むポリペプチド鎖を含み得る。別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、CH3ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。さらに、本発明で使用するための結合ポリペプチドは、CH2ドメインの少なくとも一部（例えば、CH2ドメインの全部または一部）を欠き得る。上記のように、これらのドメイン（例えば、重鎖部分）は、天然の免疫グロブリン分子とはアミノ酸配列が異なるように改変され得ることが当業者によって理解されるであろう。

【0171】

本明細書に開示される特定の抗体、またはその抗原結合断片、変異体、または誘導体において、マルチマーの1つのポリペプチド鎖の重鎖部分は、マルチマーの第2のポリペプチド鎖上のものと同じである。代替的に、本発明の重鎖部分を含むモノマーは同一ではない。例えば、各モノマーは、異なる標的結合部位を含み得、例えば、二重特異性抗体を形成する。

【0172】

本明細書で使用される場合、「軽鎖部分」という用語は、免疫グロブリン軽鎖、例えば、カッパまたはラムダの軽鎖に由来するアミノ酸配列を含む。好ましくは、軽鎖部分は、VLまたはCLドメインのうちの少なくとも1つを含む。

【0173】

上で定義された「抗原結合物質」は、それが認識するまたは特異的に結合する物質のエピトープまたは部分に関して説明または特定され得る。抗体の抗原結合ドメインと特異的に相互作用する標的ポリペプチドの部分は、「エピトープ」または「抗原決定基」である。標的ポリペプチドは、単一のエピトープを含み得るが、通常は少なくとも2つのエピトープを含み、サイズ、立体構造、および抗原の種類に応じて、任意の数のエピトープを含み得る。さらに、標的ポリペプチド上の「エピトープ」は、非ポリペプチド要素であり得るか、または非ポリペプチド要素を含み得、例えば、エピトープは、炭水化物側鎖を含み得ることに留意されたい。

【0174】

抗原結合物質のペプチドまたはポリペプチドエピトープの最小サイズは、約4～5アミノ酸であると考えられている。ペプチドまたはポリペプチドエピトープは、好ましくは少なくとも7つ、より好ましくは少なくとも9つ、最も好ましくは少なくとも約15～約30のアミノ酸を含む。CDRは抗原性ペプチドまたはポリペプチドをその三次形態で認識できるため、エピトープを含むアミノ酸は隣接している必要がなく、場合によっては、同じペプチド鎖上にさえない場合もある。本発明の抗原結合分子によって認識されるペプチドまたはポリペプチドエピトープは、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、より好ましくは少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、または約15～約30の隣接または非隣接アミノ酸の配列を含み得る。

【0175】

「抗原」とは、抗体またはその抗原結合断片などの抗体結合物質に特異的または優先的に結合することができる物質を意味する。

【0176】

抗体（および相似性により、他の抗原結合物質）の文脈において、「優先的に結合する」とは、抗体が参照エピトープ（関連する、類似の、相同または類似のエピトープであろう）に結合するよりも容易にエピトープに特異的に結合することを意味する。したがって、所与のエピトープに「優先的に結合する」抗体は、たとえそのような抗体が参照エピトープと交差反応し得るとしても、参照エピトープよりもそのエピトープにより容易に結合するであろう。

【0177】

抗体（および相似性により、他の抗原結合物質）の文脈において、「特異的に結合する」とは、抗体がその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合すること、および結合が抗原結合ドメインとエピトープとの間の相補性を伴うことを意味する。この定義によれば、抗体は、ランダムな無関係のエピトープと比較して、その抗原結合ドメインを介してそのエピトープに優先的に結合する場合、エピトープに「特異的に結合する」と言われる。

【0178】

非限定的な例として、実験条件（例えば、アッセイを実施するための条件）下で、第2のエピトープに結合する量に対する第1のエピトープに結合する量（比率として表される）が、1、10、100、1,000、または10,000を超える場合、抗体は、第2のエピトープに比べて、第1のエピトープに優先的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例において、第1のエピトープに結合するための平衡解離定数（ K_D ）が、第2のエピトープの抗体の K_D に対して（比率として表される）、1、0.1、0.01、0.001、または0.0001未満である場合、抗体は、第2のエピトープに比べて、第1のエピトープに優先的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例において、第1のエピトープに結合するための会合速度定数（オンレートまたは k_{on} とも呼ばれる）が、第2のエピトープの抗体の k_{on} に対して（比率として表される）、1、10、100、1,000、または10,000を超える場合、抗体は、第2のエピトープに比べて、第1のエピトープに優先的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例において、第1のエピトープから解離するための解離速度定数（オフレートまたは k_{off} とも呼ばれる）が、第2のエピトープの抗体の k_{off} に対して（比率として表される）、1、0.1、0.01、0.001または0.0001未満である場合、抗体は、第2のエピトープに比べて、第1のエピトープに優先的に結合するとみなされ得る。

【0179】

第2のエピトープと比べて第1のエピトープに対する2つの抗体の優先度を比較する場合、第1のエピトープに対してより強い優先度を有する抗体は、第1のエピトープに対してより特異的であると言えることができる。優先度の強さは、例えば、選択された実験条件下での2つのエピトープへの結合量の比率によって、 K_D 値の比率によって、 k_{on} 値の比率によって、および／または k_{off} 値の比率によって決定され得る（これらの比率は最後の段落で記載されるように決定される）。

【0180】

一般に、アッセイの感度と堅牢性は、高親和性および低速オフレートの抗体を使用することで改善される。実施形態では、本明細書に開示される抗体または他の抗原結合物質は、10 nM、1 nM、500 pM、200 pM、100 pM、30 pMまたは10 pM以下の K_D を有する標的抗原に結合する。実施形態では、本明細書に開示される抗体または他の抗原結合物質は、10 nM、1 nM、500 pM、200 pM、100 pM、30 pMまたは10 pM以下の K_D を有する標的ポリペプチドに結合する。実施形態では、本明細書に開示される抗体または他の抗原結合物質は、 $5 \times 10^{-2} \text{秒}^{-1}$ 、 10^{-2}秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{秒}^{-1}$ または 10^{-3}秒^{-1} 以下の k_{off} を有する標的抗原から解離する。実施形態では、本明細書に開示される本発明の抗体または他の抗原結合物質は、 $5 \times 10^{-4} \text{秒}^{-1}$ 、 10^{-4}秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 、または 10^{-5}秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{秒}^{-1}$ 、

10^{-6} 秒 $^{-1}$ 、 5×10^{-7} 秒 $^{-1}$ または 10^{-7} 秒 $^{-1}$ 以下の k_{off} を有する標的ポリペプチドから解離する。

【0181】

本発明の抗原結合物質は、「多特異性」、二重特異性、三重特異性、またはより高い多特異性であり得、これは、同時に1つ以上の異なる抗原（例えば、タンパク質）上に存在する2つ以上の異なるエピトープを認識して結合することを意味する。したがって、抗原結合物質が、「単一特異性」または「多特異性」、例えば「二重特異性」であるか否かは、結合ポリペプチドが反応する異なるエピトープの数を指す。多特異性抗体は、標的の異なるエピトープに特異的であり得るか、または標的ポリペプチドならびに異種ポリペプチドなどの異種エピトープに特異的であり得る。

10

【0182】

前述したように、様々な免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造および三次元立体配置は周知である。本明細書で使用される場合、「VHドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインを含み、「CH1ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖の第1（最もアミノ末端）の定常領域ドメインを含む。CH1ドメインはVHドメインに隣接しており、免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域に対してアミノ末端にある。

【0183】

本明細書で使用される場合、「ヒンジ領域」という用語は、CH1ドメインをCH2ドメインに結合する重鎖の部分を含む。このヒンジ領域は約25残基を含み、柔軟性があるため、2つのN末端抗原結合領域を独立して移動させることができる。ヒンジ領域は、3つの異なるドメイン、即ち、上部、中間、および下部のヒンジドメインに細分することができる（Roux et al., J. Immunol. 161: 4083 (1998)）。

20

【0184】

本明細書で使用される場合、「ジスルフィド結合」という用語は、2つの硫黄原子の間に形成される共有結合を含む。アミノ酸システインは、ジスルフィド結合を形成するか、または第2のチオール基と架橋することができるチオール基を含む。ほとんどの天然のIgGでは、CH1およびCL領域はジスルフィド結合によって連結され、2つの重鎖はカバット付番システムを使用して239および242に対応する位置（226または229の位置、EU付番システム）で2つのジスルフィド結合によって連結される。

30

【0185】

本明細書で使用される場合、「連結された」、「融合された」、または「融合」という用語は同義で使用される。これらの用語は、化学的結合または組換え手段を含むあらゆる手段による、2つ以上の要素または構成要素の結合を指す。「インフレイム融合」とは、元のORFの正しい翻訳リーディングフレームを維持する様式で、2つ以上のポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム（ORF）を結合して連続的でより長いORFを形成することを指す。したがって、組換え融合タンパク質は、元のORFによってコードされるポリペプチドに対応する2つ以上のセグメントを含む単一のタンパク質である（これらのセグメントは通常、自然界ではそのように結合していない）。したがって、リーディングフレームは融合セグメント全体にわたって連続的にされるが、セグメントは、例えば、インフレイムリンカー配列によって物理的または空間的に分離され得る。例えば、免疫グロブリン可変領域のCDRをコードするポリヌクレオチドは、インフレイムで融合され得るが、「融合された」CDRが連続ポリペプチドの一部として共翻訳される限り、少なくとも1つの免疫グロブリンフレームワーク領域または追加のCDR領域をコードするポリヌクレオチドによって分離され得る。

40

【0186】

本明細書で使用される「オリゴヌクレオチド」という用語は、DNAまたはRNAなどの核酸の短いポリマーを指す。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約5～約150ヌクレオチドの長さである。オリゴヌクレオチドは、例えば、オリゴヌクレオチドに相補的な特定の配列を検出するためのプローブとして、DNAまたはRNA配列に特異的にハイ

50

ブリダイズするように設計され得る。オリゴヌクレオチドは一本鎖または二本鎖であり得る。本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは、化学合成を含む任意の様式で生成することができる。

【0187】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、非天然の化学構造を含む構造類似体を含み得る。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、その5'末端または3'末端での修飾、内部修飾、またはそれらの組み合わせを含む。ヌクレオチドおよび／または核酸を修飾する方法は、この分野で知られている。オリゴヌクレオチド修飾の例には、オリゴヌクレオチドを別の物質または表面に付着させるために使用できる付着修飾、フルオロフォアおよび蛍光消光剤、修飾塩基、例えば、オリゴヌクレオチドがリガーゼ基質として使用されている場合のリン酸化修飾、例えば、核酸配列と反応性官能基との間にオリゴヌクレオチド内の距離を作り出すためのスペーサー、および、例えば、ヌクレアーゼ分解に対するオリゴヌクレオチドの耐性を高めるためのホスホロチオエート結合が含まれるが、これらに限定されない。例示的な修飾は、以下の表Aに提供されている。

【表1】

表A. オリゴヌクレオチドの修飾

修飾型	例
アミノ修飾因子	5'アミノ修飾因子 C6(5AmMC6)、5'アミノ修飾因子 C12(5AmMC12)、アミノ修飾因子 C6 dT(5AmMC6T, iAmMC6T, 3AmMC6T)、3'アミノ修飾因子(3AmMO)、UNILINK(商標)アミノ修飾因子(5UniAmM, iUniAmM)
ビオチン化	ビオチン(5Biosg, 3Bio)、ビオチン-アジド(5BioK, iBiodUK)、ビオチン dT(5BiodT, iBiodT, 3BiodT)、ビオチン-TEG(5BioTEG, 3BioTEG)、5'デュアルビオチン(52-Bio)、5'光開裂性ビオチン(5PCBio)、デスチオビオチン-TEG(5deSBioTEG, ideSBioTEG, 3deSBioTEG)
チオール	3'チオール修飾因子 C3 S-S(3ThioMC3-D)、ジチオール(5DTPA, iDTPA, 3DTPA)、5'チオール修飾因子 C6 S-S(5ThioMC6-D)
アルキン	5'ヘキシニル(5ヘキシニル)、5-オクタジニル(55OctdU, i5OctdU, 35OctdU)
スペーサー	C3 スペーサー(5SpC3, iSpC3, 3SpC3)、ヘキサンジオール(3C6)、1'2'-ジデオキシリボース dSpacer(5dSp, idSp, 3dSp)、光開裂性スペーサー(5SpPC, iSpPC)、スペーサー9(5Sp9, iSp9, 3Sp9)、スペーサー18(5Sp18, iSp18, 3Sp18)
他	5'ACRYDITE(商標)(5Acryd)、5'アデニル化(5rApp)、アジド NHS エステル(5AzideN, iAzideN, 3AzideN)、3'コレステロール-TEG(3CholTEG)、ジゴキシゲニン NHS エステル(5DigN, 3DigN)、5'I-Linker(5ILink12)、リン酸化(5Phos, 3Phos)、6-FAM アジド(56-FAMK, i6-FAMK)、6-FAM NHS エステル(56-FAMN, i6-FAMN)、5-TAMRA アジド(55-TAMK, i5-TAMK)

【0188】

実施形態では、修飾は、ビオチン、ストレプトアビジン、アビジン、アミノ基、チオール基、アルデヒド基、ヒドラジド基、アジド基、アルキン基、マレイミド基および／またはヨードアセトアミド基を含む。

【0189】

一例では、ヌクレオチドおよび／または核酸は、それを標識などの別の物質に連結する、または、例えば、アミンまたはチオール修飾ヌクレオチド塩基、ホスフェートまたは糖の使用により、標識などの別の物質に連結することができる反応性官能基を提供する化学

修飾を含み得る。「反応性官能基」という用語は、例えば、別の官能基と共有結合を形成するために、さらなる化学反応を受け得る原子または原子の関連する基を指す。反応性官能基の例には、アミノ、チオール、ヒドロキシ、およびカルボニル基が含まれるが、これらに限定されない。一態様では、反応性官能基は、反応性チオール基を含む。これらの化学修飾を介してヌクレオチドまたは核酸に連結することができる標識には、ビオチン、ハプテン、フルオロフォア、および電気化学発光（ECL）標識などの検出可能な部分が含まれるが、これらに限定されない。

【0190】

別の態様では、オリゴヌクレオチドのヌクレオチドは、例えば、リボースまたはデオキシリボース基をジデオキシリボースで置き換えることによって、それが組み込まれる核酸鎖の酵素的または化学的伸長を妨げるように修飾され得る。別の例では、ヌクレオチド塩基（例えば、糖および／またはホスフェート基）と一緒に連結する骨格構成要素は、例えば、ペプチド核酸（PNA）の使用によって、または2'-O-メチル置換RNAで見られるものなどのリボース類似体、ロック核酸、架橋核酸、およびモルフォリノ核酸の組み込みによって、修飾または置換することができる。これらの「骨格」類似体は、核酸および／またはオリゴヌクレオチドの骨格結合（backbone linkages）の1つ、いくつか、またはすべてに存在し得、改良された結合（binding）安定性および／またはヌクレアーゼへの結合（linkages）の安定性を有するハイブリダイゼーション産物などの特定の利点を提供し得る。ヌクレオチドおよび核酸の構造類似体の別の例では、非天然ヌクレオチド塩基が含まれ得る。非天然（「非正準」塩基とも呼ばれる）は、天然（正準）塩基とハイブリダイズする場合もあれば、別の非天然塩基とハイブリダイズする場合もある。

【0191】

核酸の文脈における「プローブ」とは、一般に、別の核酸配列に相補的であり得る配列を含むオリゴヌクレオチド（通常5～50塩基）を指す。一部の適用では、標的配列の相補領域にハイブリダイズするプローブは、ポリメラーゼによるプローブのプライム伸長を可能にし、標的配列上の隣接する一本鎖領域の複製の開始点として機能する（このような場合、プローブは「プライマー」と呼ばれることもある）。

【0192】

本明細書で使用される「核酸プローブ」は、（i）反応するために使用され得る1つ以上の反応性部分で修飾されるオリゴヌクレオチドであって、それによって別の物質と連結するオリゴヌクレオチド、または（ii）別の物質に連結される（例えば、（i）項に記載されている反応による）オリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、検出試薬に連結されている。実施形態では、核酸プローブは、ポリペプチドに連結されている。実施形態では、核酸プローブは、抗体または他の抗原結合物質に連結されている。実施形態では、反応性部分は反応性官能基である。実施形態では、反応性官能基は、アルケン、歪んだアルケン、アルキン、ハロゲン化物、アルコール、チオール、アミン、ホスフェート、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、カルボキシレート、アミド、エステル、チオエステル、アシルホスフェート、酸ハロゲン化物、ニトリル、酸無水物、ヒドラジン、テトラジン、またはアジドである。実施形態では、反応性部分は、結合試薬-結合相手対の一員であり、例えば、ビオチンまたはストレプトアビジンである。実施形態では、核酸プローブは、増幅のためのテンプレートオリゴヌクレオチドに相補的な配列を含む。実施形態では、核酸プローブは、環状テンプレートオリゴヌクレオチドのローリングサークル増幅（RCA）のために環状テンプレートオリゴヌクレオチドに結合する。実施形態では、RCAは伸長配列を生成する。実施形態では、核酸プローブは、RCA用のプライマーである。

【0193】

「標識プローブ」とは、オリゴヌクレオチドおよび検出可能な部分（「標識」とも呼ばれる）を含む化合物を指す。検出可能な部分（または標識）は、検出可能な物理的特性を有するか、または化学基または部分に検出可能な物理的特性を示すことができる化学基ま

たは部分を指し、例えば、検出可能な産物への基質の変換を触媒する酵素を含む。標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、化学的、または他の方法によって検出することができる。標識の例には、放射性同位元素、酵素、基質、蛍光分子、化学発光部分、電気化学発光部分、磁性粒子、および生物発光部分が含まれるが、これらに限定されない。別の態様では、標識は、結合対の一員である化合物であり、結合対の第1のメンバー（「一次結合試薬」と呼ぶことができる）は、基質、例えば、オリゴヌクレオチドに付着し、結合対の他のメンバー（「二次結合試薬」と呼ぶことができる）は、検出可能な物理的特性を有する。結合対の非限定的な例には、ビオチンおよびストレプトアビジン、またはアビジン、相補的オリゴヌクレオチド、および抗体／抗原結合対が含まれる。実施形態では、「標識プローブ」は、オリゴヌクレオチドおよび電気化学発光部分を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される方法の伸長配列に対する相補的配列を含む。実施形態では、標識プローブは、伸長配列に結合し、検出可能な標識は、伸長配列の量の測定を可能にするように機能する。本明細書に記載される方法の実施形態では、標識プローブ、すなわち、伸長配列の量を測定することにより、試料中の分析物の量が決定される。

【0194】

「相補的」とは、例えば、ワトソン・クリック塩基対形成モデルに従って、水素結合の形成によって互いに結合する（または「ハイブリダイズする」）核酸分子または核酸分子の配列を指す。例えば、ハイブリダイゼーションは、2つの相補的DNA分子間（DNA-DNAハイブリダイゼーション）、2つのRNA分子間（RNA-RNAハイブリダイゼーション）、または相補的DNAとRNA分子間（DNA-RNAハイブリダイゼーション）で起こり得る。ハイブリダイゼーションは、より長いヌクレオチド配列の一部に相補的な短いヌクレオチド配列の間で起こり得る。ハイブリダイゼーションは、100%の「配列相補性」を有しない配列（すなわち、ワトソン・クリック塩基対形成モデルなどの塩基対形成モデルに基づいてヌクレオチドの100%未満が整列する配列）間で起こり得るが、配列相補性が低い配列は、配列相補性が高い配列よりも安定性が低く、ハイブリダイズする可能性が低い。一態様では、相補的配列のヌクレオチドは、ワトソン・クリックモデルに基づいて100%の配列相補性を有する。別の態様では、相補的配列のヌクレオチドは、ワトソン・クリックモデルに基づいて、少なくとも約90%、95%、97%、または99%の配列相補性を有する。

【0195】

2つの核酸は、それらがハイブリダイズすることができるか、またはハイブリダイズした場合、それぞれ「ハイブリダイズできる」または「ハイブリダイズした」である。2つの相補的配列がハイブリダイズするか否かは、ハイブリダイゼーション条件の厳密性に依存する可能性があり、温度、溶媒、イオン強度、および他のパラメータなどの条件に応じて変化する可能性がある（厳密なハイブリダイゼーション条件を作り出すアプローチは周知であり、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)、特に第11章およびその中の表11.1に例示される）。ハイブリダイゼーション条件の厳密性は、他の潜在的に交差反応するまたは干渉する配列の存在下で、2つの相補的な核酸配列の所望のハイブリダイゼーション産物の選択的な形成または維持を提供するように選択することができる。厳密な条件は配列依存性であり、通常、より長い相補的配列は、より短い相補的配列よりも高温で特異的にハイブリダイズする。一般に、厳密なハイブリダイゼーション条件は、規定されたイオン強度、化学変性剤の濃度、pH、およびハイブリダイゼーション相手の濃度で、特定のヌクレオチド配列の熱融点（ T_m ）（すなわち、配列の50%が実質的に相補的な配列にハイブリダイズする温度）よりも約5℃～約10℃低い。一般に、GおよびC塩基の割合が高いヌクレオチド配列は、GおよびC塩基の割合が低いヌクレオチド配列よりも厳しい条件下でハイブリダイズする。一般に、厳密性は、温度の上昇、pHの上昇、イオン強度の低下、および／ま

たは化学核酸変性剤（ホルムアミド、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、エチレングリコール、プロピレングリコール、エチレンカーボネートなど）の濃度の上昇によって高めることができる。厳密なハイブリダイゼーション条件には、通常、約1 M、500 mM、200 mM、100 mM、または50 mM未満の塩濃度またはイオン強度、約20℃、30℃、40℃、60℃または80℃を超えるハイブリダイゼーション温度、約10%、20%、30%、40%、または50%を超える化学変性剤の濃度が含まれる。多くの因子がハイブリダイゼーションの厳密性に影響を及ぼし得るため、パラメータの組み合わせは、パラメータ単独の絶対値よりも重要な場合がある。

【0196】

例示的なハイブリダイゼーション条件には、約15～40℃の温度で、約6.5～8.5のpHで、約20～200 mMのイオン強度を有する緩衝液（例えば、ホスフェート、トリスまたはHEPES緩衝液、約20～200 mMの緩衝構成要素を有する）が含まれる。例えば、緩衝液は、約10 mM～約1 M、約20 mM～約500 mM、約30 mM～約100 mM、約40 mM～約80 mM、または約50 mMの濃度の塩を含み得る。例示的な塩には、NaCl、KCl、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2SO_4 、および $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ が含まれる。特定の一例は、50 M Tris-HCl、pH 7.4、室温（約18～25℃）である。別の特定の例は、66 mM 酢酸カリウム、50 mM 塩化カリウム、10 mM 酢酸マグネシウム、33 mM トリス緩衝液、pH 8.2、22℃～37℃（または約27℃）である。

【0197】

核酸配列またはアミノ酸配列の文脈における「配列同一性」または「%同一性」という用語は、配列が特定の比較ウィンドウ上で整列した場合に同じである比較配列の残基のパーセンテージを指す。いくつかの実施形態では、2つ以上の配列の特定の部分のみが整列して配列同一性を決定する。いくつかの実施形態では、2つ以上の配列の特定のドメインのみが整列して配列類似性を決定する。比較ウィンドウは、配列を整列させて比較することができる、少なくとも10～1000残基超、少なくとも20～約1000残基、または少なくとも50～500残基のセグメントであり得る。配列同一性を決定するためのアラインメントの方法は周知であり、BLASTなどの公的に利用可能なデータベースを使用して行うことができる。アミノ酸配列に言及する場合の「パーセント同一性」または「%同一性」は、当技術分野で知られている方法によって決定することができる。例えば、いくつかの実施形態では、2つのアミノ酸配列の「パーセント同一性」は、Karlin and Altschul, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 87:2264-2268 (1990) のアルゴリズムを使用して決定され、Karlin and Altschul, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 90:5873-5877 (1993) のように修正された。そのようなアルゴリズムは、BLASTプログラム、例えば、BLAST+またはAltschul et al., Journal of Molecular Biology, 215:403-410 (1990) に記載されているNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTタンパク質検索は、例えば、XBLASTプログラム、スコア=50、語長=3などのプログラムを用いて行い、本開示のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。2つの配列間にギャップが存在する場合、Altschul et al., Nucleic Acids Research 25 (17):3389-3402 (1997) に記載されているように、Gapped BLASTを利用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用することができる。

【0198】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたは核酸分子は、参照ポリペプチドまたは核酸分子（または参照ポリペプチドまたは核酸分子の断片）と、70%、少なくとも70%

10

20

30

40

50

、75%、少なくとも75%、80%、少なくとも80%、85%、少なくとも85%、90%、少なくとも90%、95%、少なくとも95%、97%、少なくとも97%、98%、少なくとも98%、99%、または少なくとも99%または100%の配列同一性をそれぞれ有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたは核酸分子は、参照ポリペプチドまたは核酸分子（または参照ポリペプチドまたは核酸分子の断片）と、約70%、少なくとも約70%、約75%、少なくとも約75%、約80%、少なくとも約80%、約85%、少なくとも約85%、約90%、少なくとも約90%、約95%、少なくとも約95%、約97%、少なくとも約97%、約98%、少なくとも約98%、約99%、少なくとも約99%または約100%の配列同一性をそれぞれ有する。

【0199】

2つの核酸に相補的配列が含まれている場合にハイブリダイゼーションは起きるが、ハイブリダイゼーションの厳密性によっては、塩基間のミスマッチが起こり得る。実施形態では、第2の配列の相補体にハイブリダイズすることができる配列は、第2の配列と実質的に類似している。実施形態では、第2の配列の相補体にハイブリダイズすることができる配列は、第2の配列と、70%、少なくとも70%、75%、少なくとも75%、80%、少なくとも80%、85%、少なくとも85%、90%、少なくとも90%、95%、少なくとも95%、97%、少なくとも97%、98%、少なくとも98%、99%、または少なくとも99%または100%の配列同一性を有する。

【0200】

本発明は、(i) 標的分析物と、アッセイで使用される1つ以上の分析物結合試薬との間に形成された検出複合体をアンカリングすることと、および／または(ii) 標識された検出複合体からのシグナルを増幅することと、を含む免疫測定法を含む。アンカリングは、低結合親和性相互作用および／または高分子量標識または標識部位を含む複合体を安定化するために使用することができる。シグナル増幅は、複数の標識または検出標識部位を含む結合複合体に伸長プローブを付着させることによって、個々の検出複合体ごとに検出可能なシグナルを増幅することにより、達成することができる。好ましい実施形態では、本方法は、複数の標識または検出標識部位を含む伸長プローブを検出複合体に付着させること、複合体が表面に保持されることを確実にするために複合体を表面にアンカリングすることと、を含む。この改変アッセイ法は、個々の分析物結合試薬複合体でさえ、非常に少数の結合事象を検出するために使用することができる。基本的なアプローチは免疫測定法に限定されず、他のクラスの結合試薬を使用して結合アッセイを実行するために使用

【0201】

実施形態では、本発明は、目的的分析物を含む検出複合体を表面に接着し、検出複合体を安定化するために、表面結合アンカー試薬を使用する結合アッセイを提供する。このアプローチは、検出複合体を形成する試薬間の低い結合親和性を克服するため、および／または後続の処理の前に複合体が表面から解離するのを防ぐために使用することができる。結合アッセイにおけるアンカー試薬の使用を図1(a)に示す。表面(101)は、分析物Aに結合する捕捉試薬(102)、およびアンカー試薬(103)を含む。1つ以上の工程において、分析物は、分析物にも結合する捕捉試薬および検出試薬(104)に結合し、検出試薬は、核酸プローブ(105)に連結される。分析物は、同時にまたは実質的に同時に、捕捉試薬および検出試薬に結合することができ、または分析物は、捕捉試薬および検出試薬のそれぞれに逐次(いずれかの順序で)結合することができる。したがって、複合体(106)は、捕捉試薬、分析物、および検出試薬を含む表面上に形成される。プローブは、アンカー試薬に結合するアンカー領域を含む伸長配列(107)を形成するように伸長する。伸長配列はアンカー試薬に結合し、表面に結合した伸長配列の量が測定される。

【0202】

結合アッセイの分野の当業者は、本方法で 사용할 ことができる捕捉試薬およびコンパニオン結合相手の範囲を容易に理解するであろう。そのような対の非限定的列挙には、(

10

20

30

40

50

いずれかの順序で) 受容体／リガンド対、抗体／抗原、天然または合成の受容体／リガンド対、ハプテン／抗体対、抗原／抗体対、エピトープ／抗体対、ミモトープ／抗体対、アプタマー／標的分子対、ハイブリダイゼーション相手、およびインターカレーター／標的分子対が含まれる。一実施形態では、結合アッセイは、目的の分析物の捕捉試薬および／または検出試薬として抗体または他の受容体タンパク質を使用する。「抗体」という用語は、インタクト抗体分子(抗体サブユニットのインビトロ再会合によって組み立てられたハイブリッド抗体を含む)、抗体断片、および抗体の抗原結合ドメインを含む組換えタンパク質構築物(例えば、Porter, R. R. and Weir, R. C. J. Cell Physiol., 67 (Suppl.) ; 51-64 (1966) および Hochman, I., Inbar, D. and Givol, D. Biochemistry 12: 1130 (1973) に記載される)、ならびに、例えば、検出可能な標識の導入によって化学的に修飾された抗体構築物を含む。

【0203】

同様に、アンカー試薬および対応するアンカーメンバーまたはアンカー領域は、任意の適切な結合対、例えば、受容体／リガンド対、抗体／抗原、天然または合成受容体／リガンド対、ハプテン／抗体対、抗原／抗体対、エピトープ／抗体対、ミモトープ／抗体対、アプタマー／標的分子対、ハイブリダイゼーション相手、インターカレーター／標的分子対、および静電荷によって結合する表面およびアンカー試薬の使用を含み得る。例えば、アンカー試薬は、オリゴヌクレオチド配列、アプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミモトープであり得、対応するアンカー領域は、相補的オリゴヌクレオチド配列、アプタマーリガンド、アプタマー、抗原、抗体、受容体、リガンド、または抗体をそれぞれ含む。特定の一実施形態では、アンカー領域はオリゴヌクレオチド配列であり、アンカー試薬はDNA結合タンパク質を含む。代替的に、アンカー領域が二本鎖オリゴヌクレオチド配列である場合、アンカー試薬はインターカレーターを含み得る。追加の実施形態では、アンカー領域は、1つ以上の修飾オリゴヌクレオチド塩基を含み得、対応するアンカー試薬は、アンカー領域上の修飾塩基に結合する1つ以上の部分を含む。例えば、修飾塩基は、ハプテンまたはリガンドを含み得、対応するアンカー試薬は、ハプテンまたはリガンドに特異的な1つ以上の抗体またはリガンドをそれぞれ含む。さらに、アンカー領域は、検出複合体を検出するために使用することができる複数の標識ヌクレオチド塩基を含み得る。

【0204】

図1(b)に示される特定の実施形態では、表面と結合するアンカー試薬は、検出複合体を表面にアンカリングするために使用されるオリゴヌクレオチドを含む。アンカーオリゴヌクレオチド配列は、検出複合体に付着している相補的なオリゴヌクレオチド配列に結合する。この実施形態では、表面(108)は、分析物Aに結合する捕捉試薬(109)、およびアンカーオリゴヌクレオチド配列(111)を含むアンカー試薬(110)を含む。1つ以上の工程において、分析物は、分析物にも結合する捕捉試薬および検出試薬(112)に結合し、検出試薬は、核酸プローブ(113)と連結する。図1(a)を参照して上で説明したように、分析物は、同時にまたは実質的に同時に、捕捉試薬および検出試薬に結合することができ、または分析物は、捕捉試薬および検出試薬のそれぞれに逐次(いずれかの順序で)結合することができる。したがって、複合体(114)は、結合試薬、分析物、および検出試薬を含む表面上に形成される。プローブは、アンカー配列に相補的であるアンカー配列相補体を含む伸長配列(115)を形成するように伸長する。アンカー配列はアンカー配列相補体にハイブリダイズし、表面に結合した伸長配列の量が測定される。伸長配列はまた、検出配列を含み得、その場合、検出配列に相補的な検出プローブが追加され、伸長配列と結合され、標識が測定されて、表面上の伸長配列の量を決定し得る。

【0205】

図1(b)に示される方法の特定の実施形態では、アンカー試薬は、検出複合体を表面に接着させるために使用され、検出複合体に付着したプローブは、伸長してアンカー試薬

に結合する伸長領域を生成し、実施形態は、検出試薬上の核酸プローブを、(i) 次にローリングサークル増幅に供してアンカー試薬に結合するアンプリコンを生成する環状オリゴヌクレオチド、または(ii) 末端が核酸プローブに結合しかつ連結して環状オリゴヌクレオチドを形成する、直鎖オリゴヌクレオチドに結合することをさらに含み、環状オリゴヌクレオチドは次いでローリングサークル増幅に供され、アンカー試薬に結合するアンプリコンを生成する。表面には、捕捉試薬およびアンカー試薬が含まれる。1つ以上の工程において、分析物は、捕捉試薬、核酸プローブを含む検出試薬に結合することにより、表面上に検出複合体を形成する。検出複合体は、(i) 核酸プローブに相補的な配列を含む環状オリゴヌクレオチド、または(ii) 核酸プローブの非重複領域に対する第1の末端配列および第2の末端配列を有する直鎖オリゴヌクレオチドのいずれかと接触する。環状または直鎖のオリゴヌクレオチドは、核酸プローブにハイブリダイズし、直鎖オリゴヌクレオチドを使用した場合、直鎖オリゴヌクレオチドの末端配列は、核酸プローブにハイブリダイズする環状標的配列から連結される。核酸プローブは、ローリングサークルハイブリダイゼーションによって伸長して、アンカー試薬に結合する結合試薬を含む伸長配列を生成し、表面に結合した伸長配列の量が測定される。伸長配列はまた、標識された検出プローブに相補的な1つ以上の検出配列を含み得、標識された検出プローブはアンプリコンにハイブリダイズし、表面に結合したアンプリコンの量を測定するために使用される。代替の実施形態では、伸長プロセスは、アンプリコンに相補的な1つ以上の標識プローブを添加することなく、表面上のアンプリコンを直接検出するために使用される伸長配列に標識ヌクレオチド塩基を組み込む。アンカーオリゴヌクレオチドおよび／または検出プローブの配列に相補的な伸長配列の生成は、アンカーおよび／または検出プローブからの環状または直鎖のオリゴヌクレオチド配列に組み込むことによって達成することができる。

【0206】

検出複合体は、例えば、分析物に対するアッセイの特異性を高めるために、1つ以上の検出試薬を含み得る。例えば、アッセイが検出可能なシグナルを放出するように設計されている場合、各検出試薬が分析物に近接している場合、または分析物に結合した単一の検出試薬からのシグナルが分析物に結合した複数の検出試薬から放出されるシグナルと識別可能である場合、複数の検出試薬の使用は、アッセイの特異性を高めることができる。そのようなアッセイの一実施形態が図1(c)に示されている。表面(116)は、分析物Aに結合する捕捉試薬(117)と、アンカーオリゴヌクレオチド配列(119)を含むアンカー試薬(118)とを含む。1つ以上の工程において、分析物は、分析物に結合する捕捉試薬および2つ(またはそれ以上)の検出試薬(それぞれ120および121)のそれぞれに結合し、第1および第2の検出試薬のそれぞれは、核酸プローブ(122および123、それぞれ第1および第2の核酸プローブ)に連結する。分析物は、同時にまたは実質的に同時に、または逐次段階的に、捕捉試薬および検出試薬に結合することができる。したがって、複合体(124)は、捕捉試薬、分析物、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に形成される。第1および第2のプローブが互いに近接していることを要する伸長プロセスを使用して、第1のプローブは伸長して、アンカー配列に相補的なアンカー配列の相補体を含む伸長配列(125)を形成する。最後から2番目の工程では、アンカー配列がアンカー配列の相補体にハイブリダイズし、表面に結合した伸長配列の量が測定される。

【0207】

図1(c)に示される方法の特定の実施形態は、図2(a)に示され、アンカー試薬は、検出複合体を表面に接着させるために使用され、検出複合体に付着したプローブは、伸長してアンカー試薬に結合する伸長領域を生成する。この実施形態では、複合体は、近接プローブに結合した2つの検出試薬を使用して検出される。本方法はさらに、検出試薬をコネクタ配列と結合し、次いで、連結して、環状標的配列を形成することと、ローリングサークル増幅に供して、アンカー試薬に結合するアンプリコンを生成することと、を含む。表面(201)は、捕捉試薬(202)およびアンカー試薬(203)を含む。1つ以上の工程において、分析物は、捕捉試薬、第1の近接プローブ(205)を含む第1の

10

20

30

40

50

検出試薬（２０４）、および第２の近接プローブ（２０７）を含む第２の検出試薬（２０６）に結合することによって、表面上に検出複合体（２０８）を形成する。検出複合体は、２つのコネクタ配列（２０９ a および ２０９ b）と接触し、２つのコネクタ配列は、第１の近接プローブの非重複領域に相補的な末端配列および第２の近接プローブの非重複領域に相補的な末端配列をそれぞれ含む。コネクタ配列は、第１および第２の近接プローブにハイブリダイズし、コネクタオリゴヌクレオチドの末端配列は、第１および第２の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状標的配列（２１０）から連結される。第２の近接プローブは、ローリングサークルハイブリダイゼーションによって伸長し、アンカー試薬に結合する結合試薬を含むアンプリコンを生成し、表面に結合したアンプリコンの量が測定される。第１の近接プローブは、第１のプローブの伸長を防ぐために、キャップされ得るか、さもなければ修飾され得る。（代替の実施形態では、第１の近接プローブは伸長し、第２の近接プローブは、伸長を防ぐためにキャップされ得るか、さもなければ修飾され得る）。図２（a）に示される実施形態では、アンプリコンはまた、標識検出プローブに相補的な２つ以上の検出配列を含み、標識検出プローブは、アンプリコンにハイブリダイズし、表面に結合したアンプリコンの量を測定するために使用される。代替の実施形態（図２（a）には示されていない）では、伸長プロセスは、アンプリコンに相補的な１つ以上の標識プローブを追加することなく、表面上のアンプリコンを直接検出するために使用されるアンプリコンに標識ヌクレオチド塩基を組み込む。図２（b）は、第１および第２のコネクタオリゴヌクレオチド（それぞれ、２０９ a および ２０９ b）を示すコネクタ配列の構成要素の概略図であり、第１のコネクタの第１の末端（ $C_1(E_1)$ ）および第２のコネクタの第１の末端（ $C_2(E_1)$ ）は、第１の近接プローブの２つの非重複領域に相補的であり、第１のコネクタの第２の末端（ $C_1(E_2)$ ）および第２のコネクタの第２の末端（ $C_2(E_2)$ ）は、第２の近接プローブの２つの非重複領域に相補的である。第１および第２のコネクタは、第１および第２の近接プローブにハイブリダイズし、第１および第２のコネクタは連結して、第１および第２の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状標的配列を形成する。

【０２０８】

図２（c）は、コネクタの代替の実施形態を示している。コネクタ配列２１１は、第２の近接プローブに相補的な内部配列（ C_{IS} ）および第１の近接プローブの非重複領域に相補的な２つの末端配列（それぞれ C_{E1} および C_{E2} ）を含む。この実施形態では、ローリングサークル増幅のための環状標的配列を形成するために１つの連結事象のみが必要であるが（すなわち、第１の近接プローブにハイブリダイズした末端 C_{E1} および C_{E2} の連結）、プライミング／伸長は第２の近接プローブからであるため、２つの近接プローブの近接性の要件が維持される。好ましくは、第１の近接プローブは、第１のプローブの伸長を防ぐために、キャップされるか、さもなければ修飾される。

【０２０９】

その後、第２の近接プローブは、環状標的配列のローリングサークル増幅によって伸長し、アンカー試薬に結合する結合領域を含むアンプリコンを生成し、表面に結合したアンプリコンの量が測定される。

【０２１０】

第１および第２の近接プローブの配列は、当業者に知られている方法によって設計することができる。例えば、各プローブは、長さが約２０～５０塩基、好ましくは長さが２５～４０塩基、最も好ましくは長さが約３０～３５塩基である。第１および第２の近接プローブはまた、本明細書に記載のプロセスで使用される１つ以上のコネクタ配列またはその一部に相補的な配列を含む。一実施形態では、検出複合体は、２つのコネクタ配列（２０９ a および ２０９ b）と接触し、２つのコネクタ配列は、第１の近接プローブの非重複領域に相補的な末端配列および第２の近接プローブの非重複領域に相補的な末端配列をそれぞれ含む。したがって、この実施形態では、第１および第２の近接プローブは、コネクタの末端配列に相補的な非重複領域をそれぞれ含む。代替的に、唯一つのコネクタを使用することができ、コネクタ配列（２１１）は、第２の近接プローブに相補的な

内部配列（ C_{IS} ）および第1の近接プローブの非重複領域に相補的な2つの末端配列（それぞれ C_{E1} および C_{E2} ）を含む。したがって、この実施形態では、第1の近接プローブは、コネクターの2つの末端配列である C_{E1} および C_{E2} に相補的な非重複領域をそれぞれ含み、第2の近接プローブは、コネクターの内部配列（ C_{IS} ）に相補的な配列を含む。第1の近接プローブは、第1のプローブの伸長を防ぐために、キャップされ得るか、さもなければ修飾され得る。（代替の実施形態では、第1の近接プローブは伸長し、第2の近接プローブは、伸長を防ぐために、キャップされ得るか、さもなければ修飾され得る）。

【0211】

したがって、図1～2に示される実施形態は、結合アッセイを改変してアンカー試薬を組み込むことができ、かつ／または検出複合体からのシグナルを増幅することができることを実証している。好ましい実施形態では、アンカー試薬およびシグナル増幅法は、結合アッセイで使用される。アンカー試薬の使用を含む実施形態では、表面に存在するアンカー試薬の濃度は、 $0.2 \sim 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、具体的には、 $1.0 \sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、より具体的には、 $3.0 \sim 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ である。代替的に、一方または他方の方法のみを使用して、結合アッセイの増強を達成することができる。したがって、本発明は、アンカー試薬を省略して、図1～2に記載されるようなシグナル増幅法を用いたアッセイを含む。

【0212】

アンカー試薬が、表面に直接または間接的に（例えば、結合反応を介して）結合したアンカー配列を含むこれらの実施形態では、オリゴヌクレオチドを固定するための当技術分野で確立された方法を使用して、共有結合法および非共有結合法を含むアンカー試薬を生成することができる。アンカー試薬は、固相に直接固定され得る、または以下に説明する標的試薬などの二次結合試薬を介して間接的に固定され得る。例えば、アンカー試薬は、固相上に固定された標的試薬の相補体に結合する標的試薬に連結され得るか、またはそれを含み得る。標的試薬のその相補体への結合は、直接的（例えば、標的試薬はストレプトアビジンであり、相補体はビオチンであり得る）または架橋剤を介した間接的（例えば、標的試薬および相補体はビオチンであり得る、架橋試薬は、ストレプトアビジンなどの多価ビオチン結合受容体であり得る）であり得る。一実施形態では、標的剤およびその相補体は、第1のオリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチド、受容体ーリガンド対、抗原ー抗体対、ハプテンー抗体対、エピトープー抗体対、ミモトープー抗体対、アプタマーー標的分子対、ハイブリダイゼーション相手、またはインターカレーターー標的分子対を含む。複数の分析物のマルチプレックスアッセイで使用される標的剤および相補体は、アッセイによって測定される分析物の捕捉試薬または検出試薬に関連する標的剤および相補体が、アッセイによって測定される他の分析物のための捕捉試薬または検出試薬に関連する標的剤および相補体と実質的に非交差反応性であるように選択される。例えば、結合試薬の関連する結合ドメインへの（関連する標的剤および標的剤の相補体を介した）結合は、他の分析物に関連する（および異なる標的剤の相補体を提示する）結合ドメインへの結合よりも実質的に大きくなければならない。好ましくは、正しい結合ドメインへの結合と比較して、他の分析物に関連する結合ドメインへの分析物の捕捉試薬または検出試薬の結合の交差反応性は、 $<1\%$ 、より好ましくは $<0.1\%$ 、より好ましくは $<0.01\%$ である。好ましい実施形態では、標的剤／標的剤相補体は、相補的配列を含むオリゴヌクレオチドの対を含み、標的剤およびその相補体は、標的剤をその相補体にハイブリダイズするのに十分な条件下で接触する。

【0213】

標的剤を使用する場合、アッセイ法で使用するアンカー試薬を固相に固定する場合にはある程度の柔軟性がある。一実施形態では、アンカー試薬は、標的剤ー標的剤相補体の相互作用を介して、固相に事前に固定されたユーザーに提供される。別の実施形態では、標的剤に連結されたアンカー試薬および固定された標的剤相補体を支持する固相は、別個の構成要素として提供される。したがって、アッセイ法は、標的剤をその相補体に結合することによって（直接的にまたは架橋剤の使用を介して）、アンカー試薬を固相に固定する

工程をさらに含む。この工程は、検出複合体の形成に関連する工程の前、同時、または後に実行することができる。

【0214】

一実施形態では、アンカー試薬は、アンカー配列に連結しているか、そうでなければ結合しているタンパク質を含む。この実施形態では、表面に（共有結合または非共有結合で）固定され、アンカーオリゴヌクレオチドによって修飾され得る任意のタンパク質を使用することができる。非限定的な例には、ストレプトアビジン、アビジン、またはウシ血清アルブミン（BSA）が含まれる。好ましい実施形態では、アンカー試薬はBSAを含む。タンパク質は、アンカーオリゴヌクレオチドによって修飾され、既知の方法を使用して、例えば、図3に示されるように、十分に確立されたヘテロ二官能性架橋剤であるスルホスクシンイミジル-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（スルホ-SMCC）を使用して表面に付着され得る。SMCCのN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）基とウシ血清アルブミン（BSA）との反応により、BSAはチオール反応性マレイミド基で標識される。次に、マレイミド基はチオール修飾オリゴヌクレオチドと反応して、安定したチオエーテル結合を介して連結されたBSA-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを形成する。1つの特定の例では、アレイは、一連のBSA-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを黒鉛状炭素の表面、好ましくはスクリーン印刷された炭素インク電極に印刷することによって形成される。代替的に、タンパク質がアビジンまたはストレプトアビジンである場合、アンカー配列はビオチンに連結され、ビオチン-アビジンまたはビオチン-ストレプトアビジン相互作用を介して固定されたアビジンまたはストレプトアビジンに結合され得る。

【0215】

アンカー試薬に付着したアンカーオリゴヌクレオチドは、伸長プロセス中に発達する伸長配列（またはアンプリコン）にハイブリダイズする任意の配列であり得る。アンカーオリゴヌクレオチドはまた、非相補的領域（例えば、ポリ（A）配列）を含み得、非相補的領域は、表面と相補的（ハイブリダイズ）領域との間のリンカー配列として使用され、相補的領域は表面から離れて伸長する。一実施形態では、ハイブリダイゼーション配列は、近接プローブまたは検出プローブへの結合に関連しないアンプリコンの領域（「不活性」領域）に対して選択される。より具体的な実施形態では、ハイブリダイゼーション配列は、アンプリコンの不活性領域の全長に相補的であり（好ましくは、約25ヌクレオチドの長さ）、単独で、または例えば、最長で30ヌクレオチドの長さのポリ（A）アームと組み合わせて含まれる。好ましくは、アンカーオリゴヌクレオチドは、（i）（アンプリコンの不活性領域に対する全長相補体、長さ25ヌクレオチド）-（20ヌクレオチドポリ（A）アーム）、または（ii）（アンプリコンの不活性領域の一部に対する相補体、長さ15ヌクレオチド）-（30ヌクレオチドのポリ（A）アーム）から選択される。

【0216】

一実施形態では、近接連結増幅（PLA）が実行されて、第2の近接プローブを伸長する。図2（a）～（c）を参照して上記のように、2つの近接プローブを含む複合体は、1つ以上のコネクタオリゴヌクレオチド（209a～209bまたは211）と接触し、ハイブリダイズしたコネクタ配列の連結は、環状オリゴヌクレオチドを形成した後、環状オリゴヌクレオチドを使用して、環のローリングサークル増幅（RCA）によって第2の近接プローブを伸長する。近接連結増幅用の適切なプローブ設計および増幅条件は、当技術分野で十分に確立されている。本発明の独特の態様は、アンカー試薬で使用されるのと同じ配列のコネクタの1つに含まれることである。第2の近接プローブの伸長中、伸長領域は、それにより、アンカー試薬にハイブリダイズするアンカー配列の相補体を含み、それにより、サンドイッチ複合体を安定化し、第2の近接プローブの解離を防止する。伸長した第2の近接プローブは、表面上の分析物の量を決定するために測定され得る検出可能な標識を含み得る（例えば、RCA伸長反応中に標識されたヌクレオチドを含めることによる）。代替的に、検出可能な標識を含む複数の標識プローブが追加され、伸長した第2の近接プローブにハイブリダイズし、表面に結合した分析物の量が測定される。

【0217】

PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）、LCR（リガーゼ連鎖反応）、SDA（鎖置換増幅）、3SR（自立合成反応）および等温増幅法、例えば、ヘリカーゼ依存性増幅およびローリングサークル増幅（RCA）を含むがこれらに限定されない、任意の適切な増幅技術を使用して、伸長配列（またはアンプリコン）を生成することができる。好ましい実施形態では、RCAは、感度、マルチプレックス化、ダイナミックレンジ、およびスケラビリティの点で重要な利点を有するため、使用される。RCAの技術は当技術分野で知られている（例えば、Baner et al., *Nucleic Acids Research*, 26:5073-5078, 1998; Lizardi et al., *Nature Genetics* 19:226, 1998; Schweitzer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10113-10119, 2000; Faruqi et al., *BMC Genomics* 2:4, 2000; Nallur et al., *Nucl. Acids Res.* 29:e118, 2001; Dean et al., *Genome Res.* 11:1095-1099, 2001; Schweitzer et al., *Nature Biotech.* 20:359-365, 2002; 米国特許第6,054,274号、第6,291,187号、第6,323,009号、第6,344,329号および第6,368,801号を参照）。線形RCA（LRCA）および指数RCA（ERCA）など、RCAのいくつかの異なる変異体が知られている。RCAは、元の標的DNAにコピー鎖が付着した、環状テンプレートの何千ものコピーを生成し、標的の空間分解能およびシグナルの迅速な増幅を可能にする。RCAは、(i) 単一の標的分子の検出、(ii) タンパク質ならびにDNAおよびRNAからのシグナルの増幅、(iii) 固体表面で増幅された分子の位置の特定、(iv) 同時に多くの異なる標的の測定、(v) 溶液または固相中の1つ以上の標的の分析を容易にする。検出複合体を用いたRCA製品の空間的局在化は、アレイまたは粒子に基づく形式でマルチプレックス結合アッセイを実施する場合に特に有利である。

【0218】

本発明の特定の実施形態は、アンカー試薬およびシグナル増幅プロセスの両方が使用される図4(a)に示されている。複合体は、捕捉試薬(402)、分析物(403)、ならびに第1および第2の近接プローブ(406および407)をそれぞれ含む2つの検出試薬(304および305)の間の表面(401)上に形成される。第1および第2のコネクターオリゴヌクレオチド(それぞれ、図4(a)のCirc-1(408)およびCirc-2(409))が加えられ、両方の近接プローブが複合体に存在する場合、それぞれが2つの近接プローブにハイブリダイズし、架橋する。結合したコネクタープローブは、連結部位1および2(410および411)でそれぞれ連結され、環状DNAテンプレート(412)を形成する。環状DNAテンプレートは、ローリングサークル増幅によって増幅されて第2の近接プローブを伸長し、それにより、1つ以上の検出配列(413)およびアンカーオリゴヌクレオチド配列相補体(414)（部分的アンカー配列相補体(415)を含む）を含むアンプリコンを生成する。アンカーオリゴヌクレオチド配列(416)（捕捉部分(417)に付着している）およびその相補体がハイブリダイズし、複数の検出プローブが複数の検出プローブ配列にハイブリダイズし、表面に結合した分析物の量が測定される（示されていないが図1(a)で説明されている）。図4(b)は、第1の環状DNAテンプレートCirc-1(408)（第1の近接プローブ(PP1)にハイブリダイズするように設計されている）の例示的な配列、検出オリゴヌクレオチド配列、アンプリコンの不活性領域（全体的または部分的にアンカーオリゴヌクレオチド配列に結合するために使用することができる）、および部分PP2（第2の近接プローブにハイブリダイズするように設計されている）を示す。追加の実施形態が図4(c)に示され、環状DNAテンプレートは、ローリングサークル増幅によって増幅されて、複数の検出配列（それぞれ418および419）を含むアンプリコンを生成する。さらなる実施形態では、捕捉部分417に付着したアンカーオリゴヌクレオチド配列(416)は、遊離の3'末端を有するプライマーとして作用することができる。この実施形態では、第2の近

10

20

30

40

50

接プローブは、検出配列（４１３）に相補的な配列を含む。

【０２１９】

一実施形態では、本明細書に記載のアッセイ形式は、コネクタプローブへの連結を容易にするために曝露された３'末端とともに５'末端で検出配列に結合した検出試薬を利用して、環状DNAテンプレートを形成し、次いで、環状DNAテンプレートは、ローリングサークル増幅によって増幅されて、第２の近接プローブ（PP2）を伸長する。この実施形態では、PP1は、ポリメラーゼによる伸長のために潜在的に独立して利用可能であるが、この問題は、ポリメラーゼによるプライミングを防ぐために修飾塩基を加えることによって対処することができる。代替的に、連結テンプレートPP1は、その３'末端を介して検出試薬に直接結合することができ、分解される場合でも、このオリゴヌクレオチドがDNAポリメラーゼのプライマーとして関与するのを防ぐ。

10

【０２２０】

RCAまたは任意の適切な増幅方法によって増幅される標的配列を生成するための別のアプローチが図５に示されている。この実施形態では、近接プローブのそれぞれは、ループ状のヘアピン構造に折りたたむことができる。これらのヘアピン構造の形成は、組換えシグナルを含む一本鎖ループおよび二本鎖部分を生成する。リコンビナーゼが追加され、２つのヘアピン構造の組換えを駆動して環状DNAテンプレートを形成し、続いて、上記のようにRCAに供される。アンプリコンは標識され、任意でアンカー試薬にアンカリングされ、分析物が検出される。この実施形態の重要な要素は、配列特異的組換え部位を含むDNAの部位特異的組換えを触媒するリコンビナーゼの能力である。例えば、バクテリオファージP1由来のCreリコンビナーゼは、loxP部位を含む部位での組換えを触媒し、他の非限定的な例には、フリッパーゼ（flp、Yeast由来）、Hin（Salmonella）、およびCreの操作（進化）版であるTreが含まれるが、これらに限定されない。この代替アプローチでは、オリゴヌクレオチドテンプレート、ATP、およびdNTPなどの追加構成要素を追加する必要はない。この実施形態では、loxP（組換え）部位は、好ましくは、非対称であるように修飾され、所望の組換え産物の形成に向けて正常平衡の移動をもたらす。これは、組換え部位の明暗の陰影とともに、図５に示されている。

20

【０２２１】

さらに、図６（a）は、RCAまたは任意の適切な増幅方法によって増幅される標的配列を生成するためのさらなる別の方法を示している。検出試薬に付着した各近接プローブには、Creリコンビナーゼによる２つのオリゴヌクレオチド間の部位特異的組換えを可能にするloxP部位が含まれ、１つの近接プローブの５'部分とloxP部位に隣接する他の近接プローブの３'部分からなる新しいオリゴヌクレオチド配列の形成をもたらす。新たに作成された標的配列は、その後、任意の適切な方法によって増幅され、標識され、任意でアンカリングされ、上記のように検出され得る。図６（a）は、増幅のための操作可能な要素としてT7 RNAポリメラーゼプロモーターを使用するこの実施形態を示す。近接プローブの３または５'部分のいずれかで連結されたT3およびSP6などの他のRNAポリメラーゼ部位が、この方法での使用に等しく適していることも理解されよう。この実施形態では、loxP（組換え）部位は、好ましくは、非対称であるように修飾され、所望の組換え産物の形成に向けて正常平衡の移動をもたらす。図６（b）に示されるように、この方法はまた、RCAで使用され得る環状DNAテンプレートを生成するために使用することができる。

30

40

【０２２２】

本発明は、分析物を検出するための方法を含み、本方法は、分析物を表面上の捕捉試薬および２つの検出試薬に結合して検出複合体を形成することを含む。本方法は、検出複合体を測定することを含み、測定方法は、２つの検出試薬のうち的一方のみを含む複合体と比較して、両方の検出試薬を含む複合体を優先的に測定する。一実施形態では、本方法は、複合体を形成することと、次に検出試薬を架橋することと、架橋試薬を検出することと、を含む。任意の適切な架橋化学を使用して、検出複合体の構成要素を結合することがで

50

きる。例えば、第1および第2の検出試薬は、反応性部分に連結する多官能性架橋剤の添加によって反応および結合される反応性部分を含み得る。この実施形態では、反応性部分および架橋剤は、アミン、チオール、ヒドラジド、アルデヒド、エステル、ヨードアセトアミド、マレイミド、クリック化学試薬、およびそれらの組み合わせを含み得る。別の実施形態では、第1および第2の検出試薬は、結合部分を含み得、架橋剤は、結合部分の多価結合相手である。この実施形態のいくつかの非限定的な例には、(a) 第1および第2の検出試薬は動物種の抗体であり、架橋剤は動物種の抗体を標的とする多価抗種抗体であること、(b) 第1および第2の検出試薬はビオチンを含み、架橋剤はストレプトアビジンである（または逆もまた同様である）こと、(c) 第1および第2の検出試薬はストレプトアビジンに連結しており、架橋剤は複数のビオチン分子を含むポリマーである（または逆もまた同様である）こと、または(d) 第1および第2の検出試薬は、第1および第2の核酸プローブをそれぞれ含み、架橋剤は、第1の核酸プローブに相補的な配列および第2の核酸プローブに相補的な別個の配列を含むオリゴヌクレオチドであることが含まれる。

【0223】

特定の実施形態では、試料中の目的の分析物は、分析物を固定された捕捉試薬、第1の検出試薬および第2の検出試薬に結合して複合体を形成することによって検出することができ、第1の検出試薬は第1の検出可能な標識および第1の核酸プローブを含み、第2の検出試薬は、第2の検出可能な標識および第2の核酸プローブを含む。この実施形態では、第1および第2の検出試薬は、(i) 第1のプローブを第2のプローブにハイブリダイズすること、(i i) 第1および第2のプローブを第1および第2のプローブに相補的な領域を有する第3の核酸にハイブリダイズすること、または(i i i) 第1および第2のプローブを連結することによって架橋される。

【0224】

架橋産物は、一旦それらが表面に結合すると検出することができ、または任意で、架橋産物を表面から溶離液に放出して検出することができる。これに関して、第1および第2の検出可能な標識の両方を含む溶離液中の個々の架橋産物のみが計数される。溶離液中の標識の存在を検出するために、任意の適切な検出方法を使用することができる。好ましい実施形態では、標識は蛍光分子であり、溶離液中に存在する標識された架橋産物は、単一分子蛍光の検出、例えば、蛍光相関分光法、および／または蛍光相互相関分光法によって計数される。この実施形態では、単一分子蛍光の検出は、キャピラリーを通して溶離液を流すことと、キャピラリー内の体積に光源を集束させて照合(interrogation)ゾーンを作り出すことと、光検出器で照合ゾーンを観察して照合ゾーンを通る蛍光分子の通過を検出することと、を含む。検出方法は、第1の標識に関連する第1の蛍光シグナルおよび第2の標識に関連する第2の蛍光シグナルを検出すること、および両シグナルが照合ゾーンから検出された場合の検出事象を計数することをさらに含み得る。代替的に、一方の標識は蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)ドナーであり、他方の標識はFRETアクセプターであり、検出方法は、照合ゾーンでFRETドナーを励起することと、FRETアクセプターからの蛍光シグナルを検出することと、をさらに含み得る。

【0225】

特定の実施形態では、試料中の分析物は、分析物を固定された捕捉試薬、第1の検出試薬、および第2の検出試薬に結合して複合体を形成することであって、第1の検出試薬が第1の核酸プローブを含み、第2の検出試薬が第2の核酸プローブを含む、複合体を形成することと、第2の核酸プローブを伸長して、検出可能な標識を含む伸長配列を形成することであって、伸長が複合体における第1および第2の核酸プローブの共局在化に依存する、伸長配列を形成することと、伸長配列を表面から溶離液に放出することと、溶離液中の個々の伸長配列を計数することと、によって検出することができる。伸長工程は、プローブをテンプレート核酸配列に結合することと、ポリメラーゼ連鎖反応によってプローブを伸長することと、を含み得る。代替的に、伸長工程は、第1のプローブをテンプレート核酸配列に結合することと、環状核酸テンプレートを形成することと、ローリングサーク

ル増幅による環状テンプレートを伸長することを含む。伸長工程はまた、第1のプローブをテンプレート核酸配列に結合することと、第2のプローブをテンプレート配列に結合することと、第1および第2のプローブを連結することと、を含み得る。

【0226】

捕捉試薬を使用する本発明の方法において、捕捉試薬は、固相に直接固定され得る、または以下に説明する標的試薬などの二次結合試薬を介して間接的に固定され得る。例えば、捕捉試薬は、固相上に固定された標的試薬の相補体に結合する標的試薬に連結され得るか、またはそれを含み得る。標的試薬のその相補体への結合は、直接的（例えば、標的試薬はストレプトアビジンであり、相補体はビオチンであり得る）または架橋剤を介した間接的（例えば、標的試薬および相補体はビオチンであり得る、架橋試薬は、ストレプトアビジンなどの多価ビオチン結合受容体であり得る）であり得る。一実施形態では、標的剤およびその相補体は、第1のオリゴヌクレオチドおよび相補的オリゴヌクレオチド、受容体ーリガンド対、抗原ー抗体対、ハプテンー抗体対、エピトープー抗体対、ミモトープー抗体対、アプタマーー標的分子対、ハイブリダイゼーション相手、またはインターカレーターー標的分子対を含む。アッセイで使用される標的剤および相補体は、アッセイによって測定される分析物の捕捉試薬または検出試薬に関連する標的剤および相補体が、アッセイによって測定される他の分析物のための捕捉試薬または検出試薬に関連する標的剤および相補体と実質的に非交差反応性であるように選択される。例えば、結合試薬の関連する結合ドメインへの（関連する標的剤および標的剤の相補体を介した）結合は、他の分析物に関連する（および異なる標的剤の相補体を提示する）結合ドメインへの結合よりも実質的に大きくなければならない。好ましくは、正しい結合ドメインへの結合と比較して、他の分析物に関連する結合ドメインへの分析物の捕捉試薬または検出試薬の結合の交差反応性は、 $< 1\%$ 、より好ましくは $< 0.1\%$ 、より好ましくは $< 0.01\%$ である。好ましい実施形態では、標的剤／標的剤相補体は、相補的配列を含むオリゴヌクレオチドの対を含み、標的剤およびその相補体は、標的剤をその相補体にハイブリダイズするのに十分な条件下で接触する。

【0227】

標的剤を使用する場合、アッセイ法で使用する捕捉試薬を固相に固定する場合にはある程度の柔軟性がある。一実施形態では、捕捉試薬は、標的剤ー標的剤相補体の相互作用を介して、固相に事前に固定されたユーザーに提供される。別の実施形態では、標的剤に連結された捕捉試薬および固定された標的剤相補体を支持する固相は、別個の構成要素として提供される。したがって、アッセイ法は、標的剤をその相補体に結合することによって（直接的にまたは架橋剤の使用を介して）、捕捉試薬を固相に固定する工程をさらに含む。この工程は、検出複合体の形成に関連する工程の前、同時、または後に実行することができる。

【0228】

特定の実施形態では、多官能性標的剤を、本明細書に記載のアッセイ方法および構成要素で 사용할ことができる。多官能性標的剤は、（a）第1のセグメント相補体を介して捕捉試薬に結合するように設計された第1のセグメント（すなわち、捕捉試薬は、多官能性標的剤の第1のセグメントに相補的な標的剤相補体を含む）と、（b）アンブリコンに結合するように設計された第2のセグメント（すなわち、多官能性標的剤の第2のセグメントは、表面上のアンカー試薬として機能する）と、を含み得る。したがって、この実施形態では、表面は、第1のセグメントおよび第1のセグメント相補体との間の結合を介して標的剤に結合する捕捉試薬と接触する多官能性標的剤を含む。3-AB RCA/PLA アッセイは、本明細書に記載されているように進行し、アンブリコンは、測定工程の前に、多官能性標的剤のアンカーセグメントに結合する。この方法は、捕捉剤とアンカー試薬の比率が1:1であることを保証するために使用でき、本アッセイ方法で使用される。

【0229】

結合アッセイの技術からの従来の表面を含む、多種多様な表面が本発明の方法での使用に適している。表面は、ポリマー（例えば、ポリスチレンおよびポリプロピレン）、セラ

ミック、ガラス、複合材料（例えば、炭素系インクなどの炭素-ポリマー複合材料）を含む様々な異なる材料から作製され得る。適切な表面には、アッセイ容器（例えば、試験管、キュベット、フローセル、マイクロ流体チャネル、キャピラリー（例えば、BioTecniqueのELLAガラスナノリアクター）の内面、FACSセルソーター、カートリッジ、マルチウェルプレートのウェルなど）、スライド、アッセイチップ（遺伝子またはタンパク質チップの測定に使用されるものなど）、ピンまたはプローブ、ビーズ、濾過媒体、側方流動媒体（例えば、側方流動試験片で使用される濾過膜）などの巨視的物体の表面が含まれる。

【0230】

適切な表面には、他のタイプの粒子系アッセイで一般的に使用される粒子（コロイドまたはビーズを含むがこれらに限定されない）、例えば、磁性、ポリプロピレン、およびラテックスの粒子、固相合成で通常使用される材料、例えば、ポリスチレンおよびポリアクリルアミド粒子、ならびにクロマトグラフィー用途で通常使用される材料、例えば、シリカ、アルミナ、ポリアクリルアミド、ポリスチレンも含まれる。材料はまた、炭素フィブリルなどの繊維であり得る。微粒子は無生物であり得るか、代替的に、細胞、ウイルス、細菌などのような生物の生物学的実体を含み得る。本方法で使用される粒子は、1つ以上の捕捉試薬または検出試薬への付着に適した任意の材料から構成され得、例えば、遠心分離、重力、濾過または磁気収集により収集され得る。捕捉試薬または検出試薬に付着し得る多種多様な異なるタイプの粒子が、結合アッセイで使用するために市販されている。これらには、非磁性粒子、ならびに粒子が磁場で収集されることを可能にする磁化可能な材料を含む粒子が含まれる。一実施形態では、粒子は、導電性および／または半導電性の材料、例えば、コロイド金粒子からなる。微粒子は、多種多様なサイズおよび形状を有し得る。限定ではなく例として、微粒子は5ナノメートル〜100マイクロメートルであり得る。好ましくは、微粒子は、20nm〜10マイクロメートルのサイズを有する。粒子は、球形、長方形、棒状などであり得るか、または形状が不規則であり得る。

【0231】

本方法で使用される粒子は、粒子の混合物中の特定の粒子または粒子の亜集団の特定を可能にするようにコード化され得る。そのようなコード化粒子の使用は、結合アッセイ用の固相担体として粒子を使用するアッセイのマルチプレックス化を可能にするために使用されてきた。1つのアプローチでは、粒子は、1つ以上の蛍光色素を含むように製造され、粒子の特定集団は、1つ以上の波長での蛍光発光の強度および／または相対強度に基づいて特定される。このアプローチは、Luminex XMAPシステム（例えば、米国特許第6,939,720号を参照）およびBECTON DICKINSONサイトメトリービーズアレイシステムで使用されている。代替的に、粒子は、サイズ、形状、埋込光学パターンなどの他の物理的特性の違いによってコード化され得る。粒子の混合物またはセットで提供される1つ以上の粒子は、粒子の光学特性、サイズ、形状、埋込光学パターンなどによって、混合物中の他の粒子と識別されるようにコード化することができる。

【0232】

特定の実施形態では、本発明の方法は、複数の異なる分析物をそれらの分析物の複数の捕捉試薬に結合することによってマルチプレックス化形式でを使用することができ、捕捉分析物は、コード化ビーズに固定され、その結果、コード化は特定のビーズの捕捉試薬（および分析物標的）を特定する。本方法は、（本明細書に記載の検出アプローチを使用して）結合分析物を有するビーズの数を計数することをさらに含み得る。

【0233】

代替的または追加的に、検出複合体および／または捕捉試薬は、例えば、結合ドメインが個々のアレイ要素である結合アレイの場合のように、または結合ドメインが個々のビーズであるビーズのセットの場合のように、1つ以上の固相上の異なる個別の結合ドメインに直接もしくは間接的に結合することができ、その結果、個別のアッセイシグナルは各結合ドメイン上で生成し、各結合ドメインから測定される。異なる分析物の捕捉試薬が異なる結合ドメインに固定されている場合、それらのドメインに結合した異なる分析物を個別

に測定できる。そのような実施形態の一例では、結合ドメインは、目的の分析物に結合する捕捉試薬の別個のドメインを1つ以上の表面に固定化することによって調製される。任意で、表面は、試料を保持するか、または試料が通過する容器（例えば、フローセル、ウェル、キュベットなど）の1つ以上の境界を部分的に定義することができる。好ましい実施形態では、個々の結合ドメインは、電気化学アッセイまたは電気化学発光アッセイで使用するために電極上に形成される。電気化学発光を使用して複数の結合ドメインを含む、表面上の分析物のマルチプレックス測定は、Meso Scale Diagnostics、LLC、MULTI-ARRAY（登録商標）および製品のSECTOR（登録商標）撮像装置ラインで使用されている（例えば、米国特許第7,842,246号および第6,977,722号を参照、その開示は、全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【0234】

10

さらに、検出複合体および／または捕捉試薬は、電極表面に直接または間接的に結合することができる、これは、上記のように、任意で異なる個別の結合ドメインを含む。電極表面は、マルチウェルプレートおよび／またはフローセルの構成要素であり得る。電極は、導電性材料、例えば、金、銀、白金、ニッケル、銅、イリジウム、銅、アルミニウム、導電性許可物などの金属を含み得る。それらはまた、酸化物でコーティングされた金属、例えば、酸化アルミニウムでコーティングされたアルミニウムを含み得る。電極は、同じまたは異なる材料で作ることができる作用電極および対電極、例えば、金属対電極および炭素作用電極を含み得る。1つの特定の実施形態では、電極は、炭素、カーボンブラック、グラファイトカーボン、カーボンナノチューブ、カーボンフィブリル、グラファイト、グラフェン、カーボンファイバーおよびそれらの混合物などの炭素系材料を含む。一実施形態では、電極は、元素状炭素、例えば、グラファイト、カーボンブラック、カーボンナノチューブなどを含む。有利には、それらは、導電性炭素-ポリマー複合材料、マトリックス中に分散した導電性粒子（例えば、カーボンインク、カーボンペースト、金属インク、グラフェンインク）、および／または導電性ポリマーを含み得る。本発明の1つの特定の実施形態は、炭素、例えば炭素層、および／またはカーボンインクのスクリーン印刷層を含む電極（例えば、作用電極および／または対電極）を有するアッセイモジュール、好ましくはマルチウェルプレートである。

20

【0235】

本発明は、個々の検出複合体を検出および計数するための方法を含む。特定の実施形態では、表面は、試料中に存在する1つ以上の分析物分子のための複数の捕捉試薬を含み得、複数の捕捉試薬は、表面に位置付けられた複数の分解可能な結合領域に分布する。測定を実行および分析するために使用される条件下で、「分解可能な結合領域」は、追加の個々の結合事象が発生している別の領域から解決および区別できる、個々の結合事象に関連する最小表面積である。したがって、本方法は、1つ以上の分析物分子を表面上の1つ以上の捕捉試薬に結合すること、表面上の複数の分解可能な結合領域における分析物分子の存否を決定すること、ならびに分析物分子を含む分解可能な結合領域の数および／または分析物分子を含まない分析物ドメインの数を特定することからなる。

30

【0236】

分解可能な結合領域は、全体的または部分的に光学的に照合することができ、すなわち、個々の分解可能な結合領域を個別に光学的に照合することができ、かつ／または複数の分解可能な結合領域を含む表面全体を画像化することができ、その画像内の1つ以上のピクセルまたはピクセルの集団は、個々の分解可能な結合領域にマッピングできる。分解可能な結合領域はまた、複数の微粒子内の微粒子であり得る。それらの光学的特徴の変化を示す分解可能な結合領域は、従来の光学的検出システムによって特定され得る。検出された種（例えば、蛍光実体のタイプなど）および動作波長に応じて、特定の波長用に設計された光学フィルターを、分解可能な結合領域の光学的照合に使用することができる。光学的照合が使用される実施形態では、システムは、光源の波長および／または強度を調整するために、2つ以上の光源および／または複数のフィルタを含み得る。いくつかの実施形態では、複数の分解可能な結合領域からの光シグナルは、CCDカメラを使用して捕捉さ

40

50

れる。画像の取込みに使用できるカメライメージングシステムの他の非限定的な例には、当業者に知られるように、電荷注入デバイス（C I D）、相補型金属酸化膜半導体（C M O S）デバイス、科学的C M O S（s C M O S）デバイス、および時間遅延積分（T D I）デバイスが含まれる。いくつかの実施形態では、光ダイオードまたは光電子増倍管（P M T）と結合した走査ミラーシステムを画像化に使用することができる。

【0237】

本方法の測定工程は、表面（またはその一部）からの光シグナルを画像化して、複数のピクセルからなる画像を作成することを含み得、分解可能な各結合領域は、画像の1つ以上のピクセルまたはピクセルのグループにマッピングされる。結合事象（検出複合体）を示すシグナルを有するピクセルまたはピクセルのセットを特定するための画像分析は、当技術分野で認められている方法、例えば、蛍光顕微鏡画像における標識された生物学的構造を特定し計数するために利用可能な多量の画像分析アルゴリズムおよびソフトウェアを使用して達成することができる。一実施形態では、画像をフィルタリングして大規模なシグナル勾配を除去した後、画像は、セグメンテーション閾値を使用して二値画像に変換される。分解可能な結合領域は、閾値を超える強度の隣接領域を特定することによって見出される。結合ドメインは、サイズおよび強度の要件を満たす場合、結合事象として分類される。

10

【0238】

一実施形態では、分解可能な結合領域は、アレイの要素である。好ましい実施形態では、アレイは、マイクロウェルまたはナノウェルのアレイ、例えば、単一基質の個々のくぼみまたはウェルである。好ましくは、ウェルの体積は、100 n L未満、好ましくは50 n L未満である。一実施形態では、ウェルの体積は、約10 a L～100 p Lの範囲である。任意で、ウェルは、微粒子を保持するように構成され得る。

20

【0239】

一実施形態では、基質上に位置付けられ、アッセイ中に対処される分解可能な結合領域の少なくとも50%は、ゼロまたは1つの分析物分子のいずれかを含む。好ましくは、分解可能な結合領域の少なくとも80%、より好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%が、ゼロ以上の分析物分子を含む。試料中の分析物分子の濃度は、少なくとも部分的に、較正曲線、ポアソン分布分析、および／または少なくとも1つまたは1つの分析物分子を含む結合領域の数のガウス分布分析を使用して決定される。特定の実施形態では、表面は、それぞれが分析物分子のための複数の捕捉試薬を含む複数の粒子を含み、複数の粒子は、複数の分解可能な結合領域（例えば、マイクロウェルまたはナノウェルのアレイ）にわたって分布する。したがって、本方法は、分析物分子を含む結合ドメインの数および／または分析物分子を含まない結合ドメインの数を特定するために、（i）1つ以上の分析物分子を表面上の1つ以上の捕捉試薬に結合することと、（i i）複数の粒子を分解可能な結合領域のアレイ全体に分布させることと、（i i i）分解可能な各結合領域における分析物分子の存否を決定することと、を含む。

30

【0240】

本発明の方法のうちの1つ以上を使用して、限定された体積中の分析物を検出することもまた有利であり得る。これらの実施形態では、試料中の分析物分子は、それぞれが識別可能な標識を有する一対の検出試薬に結合し、分析物は、反応容器の大部分が1つ以下の分析物を含むように、複数の場所、例えば、プレート、ディッシュ、チップ、光ファイバー、グリッドなどの基質上の、例えば、ウェルまたは反応容器（本明細書では「反応容器」と呼ばれる）に分配される。この方法により、ユーザーは、分析物に付着した識別可能な標識のそれぞれを含む反応容器の数を計数することにより、分析物分子を検出することができる。一部の場合では、対処される複数の反応容器は、少なくとも1つの分析物分子を含み得る（例えば、少なくとも1つの分析物分子に関連するか、またはいずれの分析物分子にも関連しない）反応容器の総量の一部または本質的にすべてである。以下の公開された米国特許出願を参照のこと。米国特許出願第2007/0259448号、米国特許出願第2007/0259385号、米国特許出願第2007/0259381号、およ

40

50

び国際特許出願第 P C T / U S 0 7 / 0 1 9 1 8 4 号、および国際特許出願第 P C T / U S 0 9 / 0 0 5 4 2 8 号。これらの刊行物のそれぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。反応容器の少なくとも一部は対処することができ、少なくとも1つの分析物分子または粒子を含む反応容器の数／パーセンテージを示す測定を行うことができる。一部の場合では、数／パーセンテージに基づいて、流体試料中の分析物分子の濃度の測定値が決定され得る。

【0241】

限定された体積中の分析物分子の検出を可能にする特定の実施形態では、試料中の分析物は、分析物を第1および第2の検出試薬に結合して検出複合体を形成することによって検出することができる。各検出複合体は、分析物、第1の検出試薬、および第2の検出試薬を含み、第1の検出試薬および第2の検出試薬は、第1および第2の検出可能な標識をそれぞれ有する。検出複合体は、同時に、実質的に同時に、または逐次形成することができる。検出複合体は、反応容器の大部分が1つ以下の検出複合体を含むように、複数の反応容器に分配され、分析物分子の数は、第1および第2の検出可能な標識のそれぞれを含む反応容器の数を計数することによって検出される。好ましくは、検出複合体は、同じ容器内で非結合の第1の検出試薬および非結合の第2の検出試薬を検出する可能性が約10分の1未満、好ましくは約100分の1未満、より好ましくは約1000分の1未満、最も好ましくは約10,000分の1未満であるように、複数の反応容器に分配される。検出複合体は、複数の反応容器に分配され、すなわち、検出複合体が担体上の個々の反応容器に分離されるように、例えば、複数の反応容器に検出複合体の一部を分注することによって、および／または検出複合体を含む溶液を複数の反応容器に流すことによって、部分または部分に分配または分離される。

【0242】

さらなる実施形態では、試料中の分析物は、(a) 分析物を表面結合捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬に結合して検出複合体を形成することによって検出ことができ、(i) 各検出複合体は、捕捉試薬、分析物、第1の検出試薬、および第2の検出試薬を含み、(ii) 第1の検出試薬は、第1の検出可能な標識を有し、第2の検出試薬は、第2の検出可能な標識を有する。検出複合体は、構成要素の任意の順序の追加によって、例えば、同時にまたは実質的に同時に、構成要素をまとめることによって、または各構成要素を逐次追加して段階的に検出複合体を構築することによって形成することができる。検出複合体は、反応容器の大部分が1つ以下の分析物を含むように複数の反応容器に分配され、分析物分子の数は、第1および第2の検出可能な標識を含む反応容器の数を計数することによって検出される。本方法は、各工程の後、検出工程の前に、洗浄の有無にかかわらず実施することができる。

【0243】

表面は粒子であり得、任意で、複数の捕捉試薬が粒子または複数の粒子上に固定される。この実施形態では、分配工程は、いくつかの方法で実施することができる。(i) 捕捉試薬は、複数の粒子上に固定され、分析物の分配は、分析物を捕捉試薬に結合し、粒子を複数の反応容器に分配することによって達成され、(ii) 捕捉試薬は、複数の粒子上に固定され、分析物の分配は、粒子を複数の反応容器に分配し、次に分析物を捕捉試薬に結合することによって達成される。

【0244】

複数の反応容器はまた、油中水型乳濁液に分散された水滴を含み得る。乳濁液は、直径が最大100 μm 、体積が約1 nLの液滴で作られ得る。高容量、すなわち、1 mLの乳濁液に 10^{10} 個超の液滴、乳濁液の調製の容易さおよび広範囲の条件にわたる高い安定性によって、生化学的アッセイを区画化する理想的な手段になる。各水滴は独立した反応容器として機能し、任意で粒子に付着した検出複合体を複数の水滴に分配することができる。

【0245】

代替的に、表面は、反応容器のうちの1つ内の位置であり、例えば、反応容器がプレー

トのウェルである場合、表面は、プレートのウェルのうちの1つ内のドメインまたは領域であり得る。この実施形態では、捕捉試薬は、複数の反応容器のドメインまたは領域に固定することができ、分配工程は、分析物分子を捕捉試薬に結合することによって達成される。別の実施形態では、複数の反応容器は、標的部分が固定された領域を含み、捕捉試薬は、標的部分の相補体を含み、分配工程は、標的部分の相補体を複数の反応容器に位置付けられた標的部分に結合することによって達成される。

【0246】

追加または代替の実施形態では、本明細書に記載の結合アッセイはまた、例えば、試料中の分析物の濃度を増加させることによって、および／または試料中に存在しアッセイの性能を妨げ得る異物の濃度を低減することによって、アッセイの性能を改善するための濃縮前工程も含み得る。これは、(a) 目的の分析物を含む試料を、分析物に結合する第1の結合試薬に連結した固相、例えば粒子と接触させることにより、該第1の結合試薬に結合した分析物を含む複合体を形成し、(b) 複合体を収集し、(c) 試料の非結合構成要素を複合体から分離し、(d) 複合体を放出することによって実施できる。分析物を濃縮する方法は、アッセイの性能を妨げる可能性のある不純物を除去するために、本明細書に記載の結合アッセイを行う前に行うことができる。これに関して、米国出願公開第2010/0261292号が参照され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0247】

特に、濃縮工程は、第1の検出試薬に結合した分析物を含む分析物複合体を形成するのに十分な条件下で、分析物を含む試料を供することを含み、第1の検出試薬は第1の核酸プローブに連結される。その後、濃縮工程の終了時に形成された分析物複合体は、(i) 分析物の捕捉試薬を含む表面上の捕捉試薬、およびアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬、ならびに(ii) 第2の核酸プローブに連結された分析物の第2の検出試薬に結合することにより、捕捉試薬、分析物、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に複合体を形成する。表面結合複合体は、第1および第2のプローブが近接していることを必要とする伸長プロセスに供され、第2のプローブを伸長して、アンカー配列に相補的なアンカー配列相補体を含む伸長配列を形成する。次に、アンカー配列はアンカー配列相補体にハイブリダイズし、表面に結合した伸長配列の量が測定される。特定の実施形態では、濃縮工程は、(i) 分析物を含む試料を、第1の核酸プローブの少なくとも一部に相補的な標的剤に結合した固相と接触させることにより、第1の核酸プローブと標的剤との間の結合反応を介して固相に結合する分析物を含む濃縮複合体を形成することと、(ii) 濃縮複合体を収集することと、(iii) 試料の非結合構成要素を濃縮複合体から分離することと、(iv) 濃縮複合体を放出して、固相を分析物から分離して、分析物複合体を形成することと、をさらに含む。

【0248】

本明細書で使用される収集とは、混合物における材料の物理的局在化を指す。収集には、結合反応または吸着による材料の局在化が含まれる。例えば、混合物中の材料は、固相への材料の吸着によって、または固相上の結合試薬への材料の結合によって、固相上に収集され得る。しかしながら、収集は、固相での局在化に限定されず、より大きな流体体積内の位置／体積で材料を局在化するための当技術分野の技術、例えば、光ピンセット（単一原子と同じくらい小さい微小物体を操作するための光を使用し、集束レーザービームからの放射圧が小さな粒子をトラップすることができる）、電場または磁場、集束流、密度勾配遠心分離などの使用による材料の局在化も含み得る。

【0249】

本発明の特定の実施形態は、微粒子または微粒子に結合した材料の集合を含む。適切な収集方法には、懸濁液から微粒子の局在化を達成する微粒子系アッセイの分野で知られている多くの方法が含まれる。これらには、重力下または遠心分離による沈降、フィルターまたは多孔質膜への濾過、磁場の印加による（磁化可能な粒子の）局在化、巨視的固相への粒子の結合または吸着、光ピンセットの使用などが含まれる。

【0250】

本明細書で使用される放出とは、以前に収集された材料の非局在化を指す。化学結合によって、または特異的もしくは非特異的な結合相互作用によって局在化した位置に保持される材料は、材料が周囲の媒体に拡散または混合し得るように、結合または相互作用を切断することによって非局在化させることができる。使用できる十分に確立された切断可能な化学リンカーが多数あり、厳しい条件を必要とせずに切断できる共有結合を提供する。例えば、ジスルフィド含有リンカーは、チオールまたは他の還元剤を使用して切断され得、シスジオール含有リンカーは、ペルヨードートを使用して切断され得、金属ーリガンド相互作用（ニッケルーヒスチジンなど）は、pHを変更するか、または競合リガンドを導入することによって切断され得る。同様に、使用することができる多くの確立された可逆的結合対が存在する（アフィニティークロマトグラフィーの分野で特定されたものを含む）。例として、多くの抗体ーリガンド対の結合は、pHの変化、タンパク質変性剤またはカオトロピック剤の添加、競合リガンドの添加などによって逆転させることができる。他の適切な可逆的結合対には、相補的核酸配列が含まれ、このハイブリダイゼーションは、pHの変化、塩濃度の低下、対の融解温度を超える温度の上昇、および／または核酸変性剤（ホルムアミドなど）の添加を含む様々な条件下で逆転する可能性がある。そのような可逆的結合対は、（上記のように）標的剤として使用され得、例えば、第1の標的剤は、分析物に結合する第1の結合試薬に連結され得、第2の標的剤は、固相に連結され得、第1および第2の標的剤の結合相互作用を使用して、第1の結合試薬を固相に可逆的に固定することができる。

【0251】

放出はまた、例えば、混合、振とう、ボルテックス、対流流体の流れ、磁力、電気力または光学力の適用による混合などによる材料の物理的非局在化を含む。微粒子または微粒子に結合した材料が収集されている場合、そのような物理的方法を使用して、粒子を周囲のマトリックスに再懸濁することができる。放出は、単に前の収集工程の逆である場合もある（例えば、上記の機構のいずれかによって）、収集と放出が2つの異なる機構によって進行する場合もある。そのような一例では、粒子に結合した材料（分析物または分析物を含む複合体など）の収集は、粒子の物理的収集によって達成することができる。次に、材料は、結合を切断するか、粒子上に材料を保持する結合反応を逆転させることによって、放出される。第2のそのような例では、材料（分析物を含む複合体の分析物など）は、表面に連結された結合試薬との結合相互作用を介して表面上に収集される。次に、結合試薬を表面に連結する結合または第2の結合相互作用を切断することにより、材料が放出される。

【0252】

収集、続いて放出は、試料中の分析物を濃縮および／または精製するために使用することができる。第1の体積に収集し、第2のより少ない体積に放出することにより、試料の分析物を濃縮することができる。濃縮によって、後続の測定工程の感度を有意に向上できる場合が多い。試料から収集し、未収集試料の一部またはすべてを除去することにより、試料中の潜在的なアッセイ干渉物を低減または排除することができる。任意で、非結合試料の除去は、後続のアッセイ工程用に均一なマトリックスを提供するように、収集材料を規定の液体試薬（例えば、アッセイまたは洗浄緩衝液）で洗浄することと、収集材料を該液体試薬に放出することと、を含み得る。

【0253】

参照により本明細書に組み込まれるUS2010/0261292の図3(a)に示されるように、本方法は、標的分析物を含む試料を、標的分析物に結合する第1の結合試薬に結合した粒子と接触させることを含み、第1の結合試薬は第1の標的剤に連結され、粒子は第2の標的剤に連結され、第1の結合試薬および粒子は、第1および第2の標的剤間の結合反応を介して連結されて、該第1の結合試薬に結合した該標的分析物を含む複合体を形成する。次に、複合体が収集され、試料の非結合構成要素が複合体から分離される。複合体が放出され、放出された複合体は、固相に結合した第2の結合試薬と接触し、第2の結合試薬は、複合体に結合する。この特定の実施形態は、図16に示されている。粒子

(1601)は、検出抗体1604に結合する近接プローブ1603の配列に少なくとも部分的に相補的である捕捉オリゴヌクレオチド配列1602を含むように修飾される。粒子は近接プローブと混合されて、捕捉配列がプローブ配列にハイブリダイズし、複合体1605を形成する。次に、複合体は、分析物1606、および任意で1つ以上の混入物1607～1608を含む試料と混合される。分析物は検出抗体(1609)に結合し、混入物は除去される(1610)。粒子は、結合した分析物を含む複合体から適切な条件下で除去され、近接プローブ(1611)に結合した分析物の濃縮溶液を形成し、これは、免疫測定法で本明細書に記載のとおり使用され得、免疫測定法では、追加の近接プローブが分析物に結合し、3-抗体複合体は、例えば、図2(a)および添付の説明に記載されるように、試料(1612)中の分析物の存在を検出するためにRCA-PLAに供される。

10

【0254】

別の実施形態では、検出抗体と分析物との間の免疫測定複合体が溶液中で形成され、続いて増幅され、次いで増幅産物が捕捉試薬および／またはアンカーを介して粒子に接着される。任意で、増幅産物を濾過し、次いで捕捉試薬および／またはアンカーを介して粒子上に捕捉することができる。この方法を図17に示す。分析物A(1701)は、近接プローブ(それぞれ1704および1705)にそれぞれ結合した検出抗体(それぞれ1702および1703)に結合し、各検出抗体(1706)に結合した分析物を含む検出複合体が形成される。検出複合体は、2つのコネクタ配列(1707aおよび1707b)と接触し、コネクタ配列は、第1の近接プローブの非重複領域に相補的な末端配列および第2の近接プローブの非重複領域に相補的な末端配列をそれぞれ含む。コネクタ配列は、第1および第2の近接プローブにハイブリダイズし、コネクタオリゴヌクレオチドの末端配列は、第1および第2の両近接プローブにハイブリダイズする環状標的配列(1708)から連結される。第2の近接プローブは、ローリングサークルハイブリダイゼーションによって伸長し、アンカー試薬に相補的な結合試薬を含むアンプリコンを生成する。アンプリコンは、捕捉試薬(1710)およびアンカー試薬(1711)を含む表面(1709)と接触し、表面に結合したアンプリコンの量は、複数の標識プローブ(1712)を使用する標識によって測定される。

20

【0255】

標識プローブ

実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチドおよび少なくとも1つの電気化学発光部分を含む標識プローブを提供する。実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチドおよび少なくとも2つの電気化学発光部分を含む標識プローブを提供する。実施形態では、エレクトロルミネセンス部分は、電気化学発光標識である。実施形態では、標識プローブは、伸長配列の量を測定するために、本明細書に記載される方法およびアッセイで使用される。実施形態では、伸長配列は、RCAプロセスの増幅産物(またはアンプリコン)である。実施形態では、標識プローブは、伸長配列における検出配列に相補的なオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、複数の標識プローブを使用して、本明細書に記載の方法で表面に結合した伸長配列の量を測定する。実施形態では、標識プローブを測定することにより、試料中の分析物の量が決定される。

30

40

【0256】

フルオロフォアなどの検出可能な発光標識には、自己消光効果があることが知られている。自己消光は、ある標識の発光強度が別の標識によって減少することであり、通常、標識濃度が高いか、標識密度が高いと増加する。したがって、自己消光効果を低減するために、近接する複数の発光標識は一般に回避される。したがって、意外なことに、本発明の標識プローブは、複数の電気化学発光標識を近接して保持する構造を含むが、標識からのECLの効率的な生成を依然提供し、標識が1つだけのプローブと比較してシグナルを改良したことを本発明者らによって発見された。したがって、実施形態では、本開示の標識プローブは、2つ以上の電気化学発光標識を含む。実施形態では、標識プローブは、2～10個の電気化学発光標識を含む。実施形態では、標識プローブは、2～5個の電気化学

50

発光標識を含む。実施形態では、標識プローブは、3個の電気化学発光標識を含む。実施形態では、標識プローブは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の電気化学発光標識を含む。

【0257】

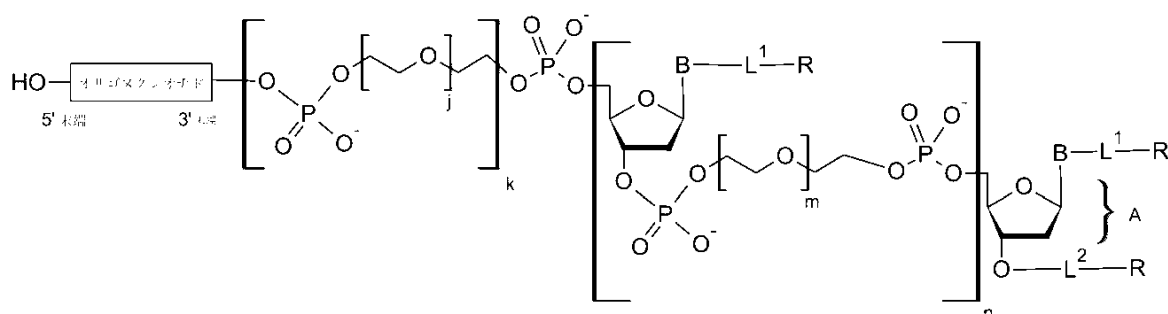
実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチドおよび複数の電気化学発光標識を含む標識プローブを提供する。プローブは、(i) オリゴヌクレオチドの修飾ヌクレオチド塩基に連結された1つ以上（または2つ以上）の標識、(ii) 1つ以上（または2つ以上）の標識を有する標識部分であって、オリゴヌクレオチドの5'末端に連結されている標識部分、(iii) 1つ以上（または2つ以上）の標識を有する標識部分であって、オリゴヌクレオチドの3'末端に連結されている標識部分、または(iv) (i)、(ii) および(iii) の2つ以上の組み合わせを含み得る。

10

【0258】

実施形態では、本開示は、式Iの標識プローブを提供し、

【化5】



20

式 I

式中、Bはヌクレオチド塩基であり、Rは電気化学発光標識であり、 L^1 は連結基であり、 L^2 は連結基であり、jは0～11の整数であり、kは0～1の整数であり、mは0～11の整数であり、nは0～5の整数である。

【0259】

式Iのヌクレオチド塩基Bは、ヌクレオチド塩基が標識プローブの電気化学発光能に干渉しない限り、任意のヌクレオチド塩基である。実施形態では、ヌクレオチド塩基は、天然のヌクレオチド塩基である。実施形態では、ヌクレオチド塩基は、合成ヌクレオチド塩基である。実施形態では、ヌクレオチド塩基は、プリンまたはピリミジンである。実施形態では、ヌクレオチド塩基は、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、またはウラシルである。実施形態では、ヌクレオチド塩基は、キサンチン、ヒポキサンチン、2,6-ジアミノプリン、6,8-ジアミノプリン、5,6-ジヒドロウラシル、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、イソグアニン、またはイソシトシンである。

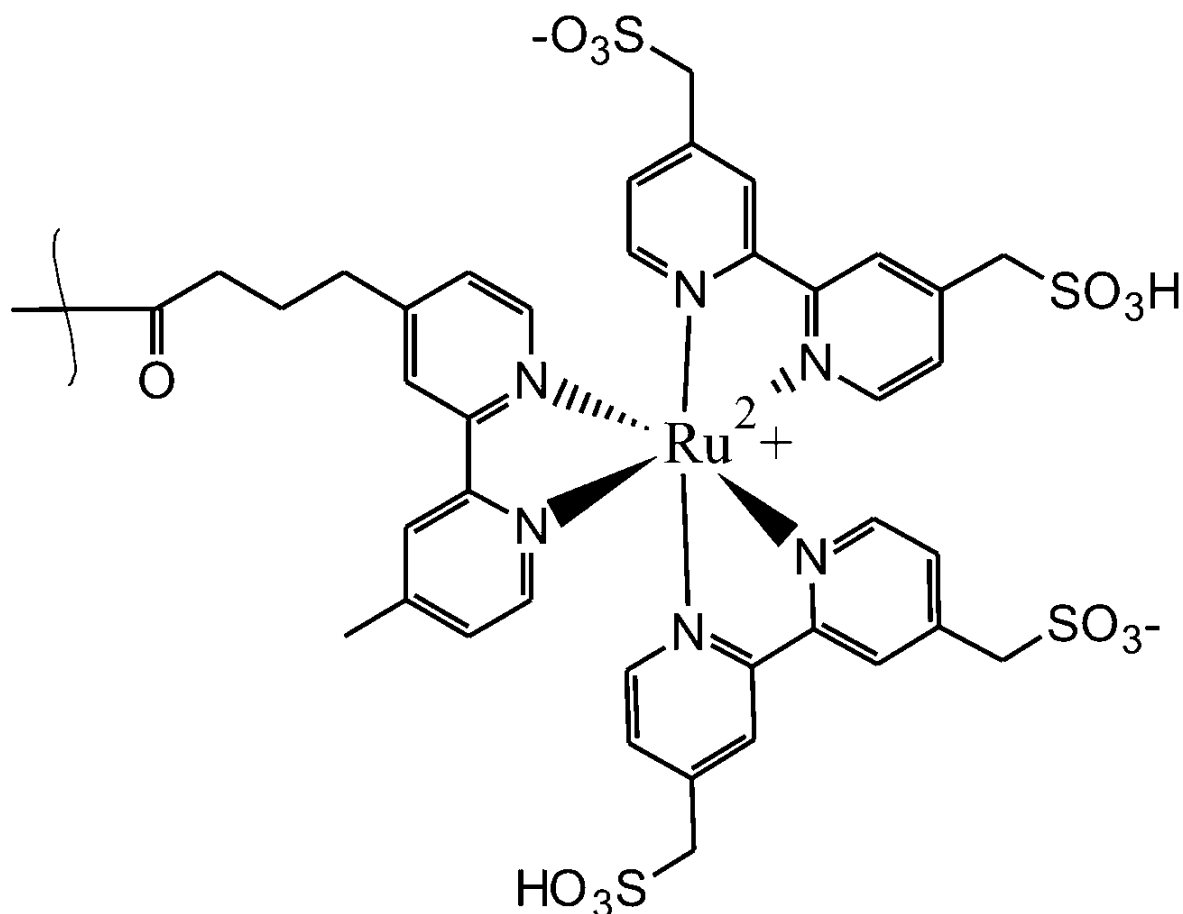
30

【0260】

式IのRは、任意の適切な電気化学発光標識であり得る。適切な電気化学発光標識には、ルテニウム、オスミウム、イリジウム、レニウム、およびランタニド金属の電気化学発光有機金属錯体が含まれる。適切な電気化学発光標識には、ビビリジンまたはフェナントロリン配位子（置換または非置換）を含むこれらの金属の電気化学発光有機金属錯体が含まれる。適切な電気化学発光標識の例は、米国特許第5,714,089号、第6,316,607号、第6,808,939号、第9,499,573号、第6,468,741号、第6,479,233号、および第6,136,268号に見出すことができる。実施形態では、電気化学発光標識は、

40

【化 6】



である。

【0261】

実施形態では、 L^1 および L^2 は、独立して、アルキル、ハロアルキル、アリール、アラールキル、ヘテロアリール、ヘテロアラールキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアルキル置換シクロアルキル、ヘテロ置換シクロアルキル、ヘテロアルキル、シアノアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、またはそれらの組み合わせであり、任意で、ヘテロ原子で置換された、ゼロまたは1つ以上の炭素鎖を有する。実施形態では、 L^1 および L^2 は、独立して、ゼロまたは1つ以上の炭素鎖を有するアルキルリンカーであり、任意でヘテロ原子で置換される。実施形態では、1つ以上のヘテロ原子は、独立して、窒素、硫黄、ホスフェート、または酸素である。実施形態では、 L^1 は、長さが約1～約20の炭素および／またはヘテロ原子である。実施形態では、 L^1 は、長さが約4～約15の炭素および／またはヘテロ原子である。実施形態では、 L^1 は、長さが約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、または約15個の炭素および／またはヘテロ原子である。実施形態では、 L^2 は、長さが約1～約30個の炭素および／またはヘテロ原子である。実施形態では、 L^2 は、長さが約7～約26個の炭素および／またはヘテロ原子である。実施形態では、 L^2 は、長さが約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、または約26個の炭素および／またはヘテロ原子である。

【0262】

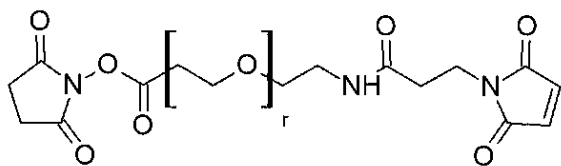
本明細書で使用される場合、「～(between)」は、範囲の終わりを含む範囲である。例えば、0～11の整数には、0および11の整数、ならびに0と11の範囲内にある任意の整数、すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、および10が明確に

含まれる。0～5の整数には、0および5の整数、ならびに0と5の範囲内にある任意の整数、すなわち、1、2、3、および4が明確に含まれる。

【0263】

実施形態では、Rはルテニウム錯体 $R P^1 P^2 P^3$ を含み、 P^1 、 P^2 および P^3 のそれぞれは独立して、ピピリジン、置換ピピリジン、フェナントロリン、または置換フェナントロリンである。実施形態では、化学発光標識Rは、

【化7】



10

式VII

である。

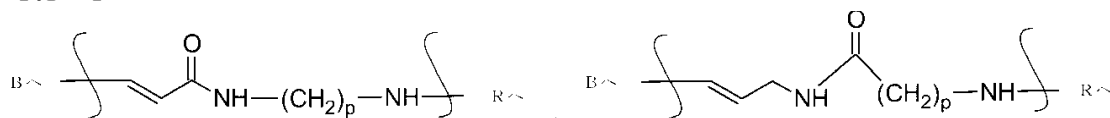
【0264】

実施形態では、Bは、ウラシルの5位で L^1 に付着したウラシルである。

【0265】

実施形態では、 L^1 は、

【化8】



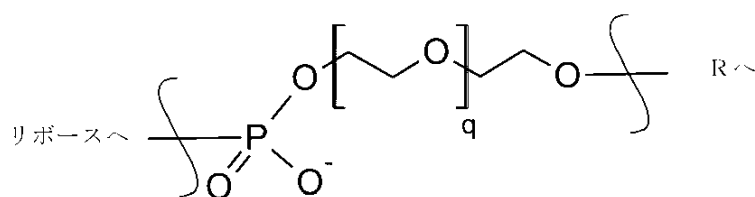
20

またはそれらの組み合わせを含み、pは1～12の整数である。

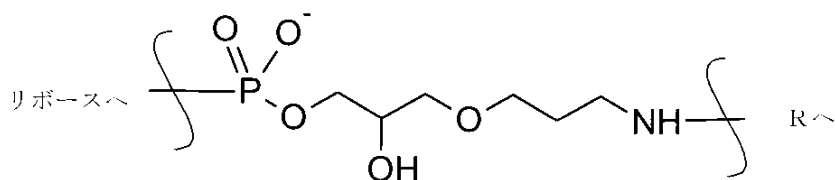
【0266】

実施形態では、 L^2 は、

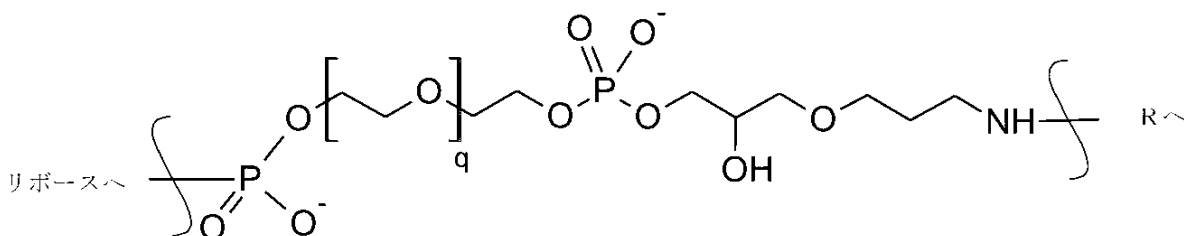
【化9】



30



40



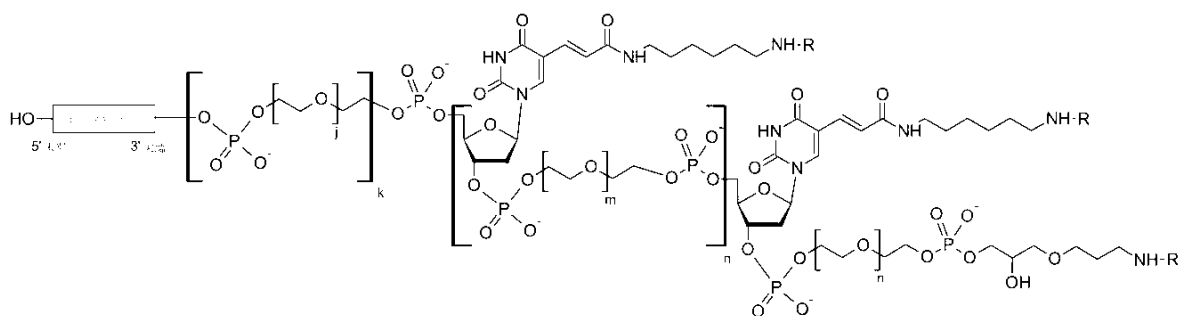
50

、
またはそれらの組み合わせを含み、 q は、 $0 \sim 11$ の整数である。

【0267】

実施形態では、本開示は、式 I I の標識プローブを提供し、

【化10】

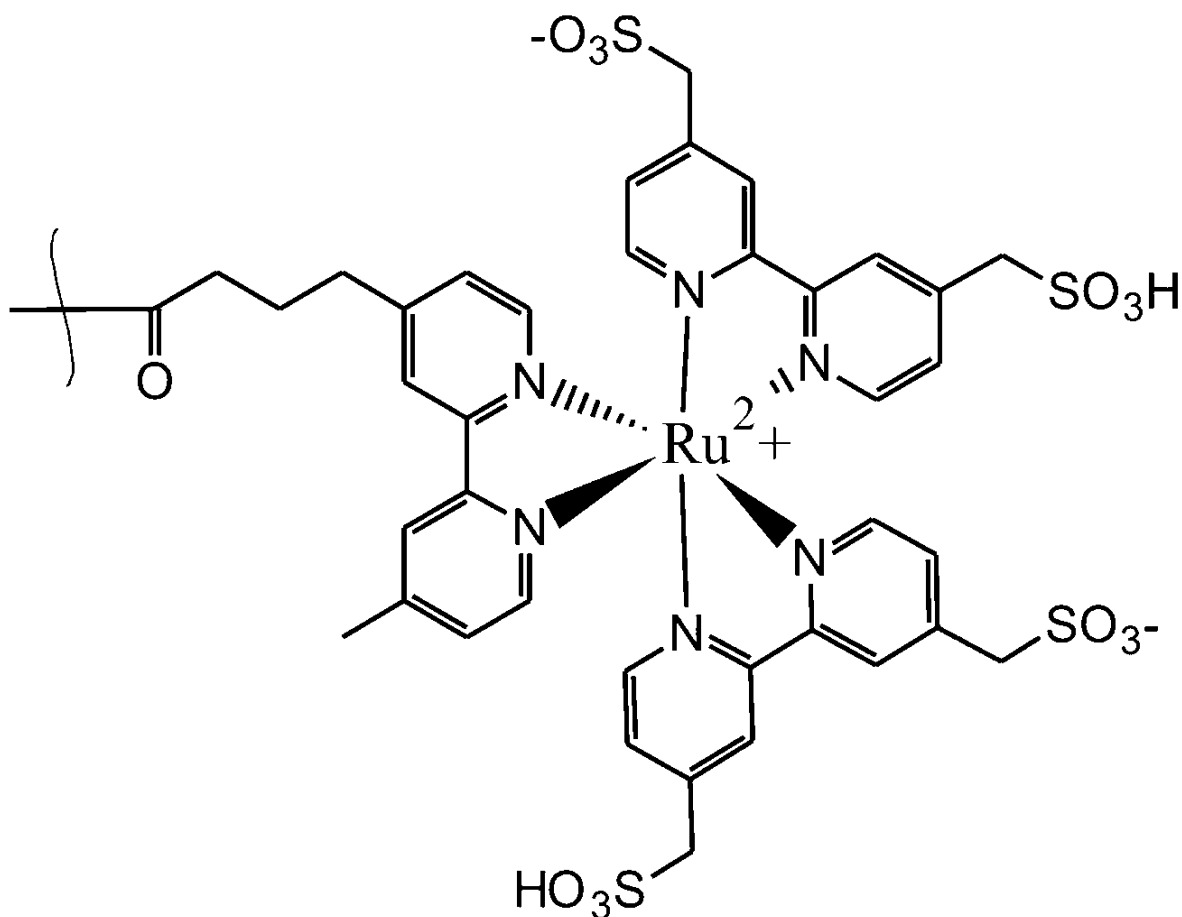


10

式 I I

式中、 j は $0 \sim 11$ の整数であり、 k は $0 \sim 1$ の整数であり、 m は $0 \sim 11$ の整数であり、 n は $0 \sim 5$ の整数であり、 R は、電気化学発光標識：

【化11】



20

30

40

である。実施形態では、 j は $0 \sim 5$ の整数であり、 k は 0 であり、 m は $0 \sim 5$ の整数であり、 n は $2 \sim 7$ の整数である。実施形態では、 k は 0 であり、 j は 0 であり、 m は 1 であり、 n は 5 である。

【0268】

実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、 $5' - \text{CAGTGAATGCGA}$

50

G T C C G T C T - 3 ' (配列番号 NO : 31) と、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または約 100 % の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 85 % の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 88 % の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 98 % の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 99 % の配列同一性を有する配列を含む。

【0269】

実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T A A G - 3' (配列番号 32) を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される 1 つ以上の修飾を含む。実施形態では、標識プローブは、アミノ修飾因子を含む。実施形態では、標識プローブは、内部アミノ修飾 d T 塩基 (i A m M C 6 T) を含む。実施形態では、標識プローブは、内部スペーサー 18 (i S p 18) を含む。実施形態では、標識プローブは、3' アミノ修飾因子 (3 A m M O) を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T A A G / i A m M C 6 T / i S p 18 / i A m M C 6 T / i S p 18 / 3 A m M O - 3' (修飾を有する配列番号 44) を含む。

【0270】

実施形態では、本開示は、電気化学発光を測定する方法であって、(a) 電極に近接している複合体が電気化学発光を放出する条件下で、電極に電位を印加することであって、複合体が、本明細書で提供される標的オリゴヌクレオチドおよび標識プローブを含み、標識プローブが、標的オリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドを含む、電極に電位を印加することと、(b) 放出された電気化学発光を測定することと、を含む方法を提供する。例示的な電極および電気化学発光を測定する方法が本明細書に記載されている。

【0271】

実施形態では、標識プローブは、本明細書に記載のアッセイの測定工程、すなわち、表面に結合した伸長配列の量を測定する際に使用される。標識プローブは、本明細書に記載されるすべての方法、例えば、1 つの検出試薬、2 つの検出試薬、または 2 つ以上の検出試薬を使用する方法で使うことができる。実施形態では、電気化学発光を測定する方法は、(i) 標的配列を含む標的核酸、および (i i) 標識プローブを含む組成物を形成することであって、標識プローブが、標的配列に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、組成物を形成することと、標識プローブが標的核酸にハイブリダイズして複合体を形成する条件下で組成物をインキュベーションすることと、複合体を電極に近接させることと、複合体が電気化学発光を放出する条件下で電極に電位を印加することと、放出された電気化学発光を測定することと、を含む。

【0272】

実施形態では、標識プローブは、本明細書に記載のアッセイの検出工程、すなわち、表面に結合した伸長配列の量を測定する際に使用される。標識プローブは、本明細書に記載されるすべての方法、例えば、1つの検出試薬、2つの検出試薬、または2つ以上の検出試薬を使用する方法で使用方法を使用することができる。

【0273】

実施形態では、標的核酸は、本明細書に記載されるようなRCA反応から生成される伸長配列である。実施形態では、標的核酸は電極上に固定されている。実施形態では、複合体の形成により、複合体が電極に近接するように、標的核酸は電極上に固定される。実施形態では、標的核酸は、電極上に直接固定されるか、または本明細書で提供されるような結合試薬を介して間接的に固定される。実施形態では、複合体が、標的核酸に結合することができる結合試薬をさらに含み、結合試薬が電極上に固定されている。実施形態では、複合体は、標的核酸に結合することができる結合試薬をさらに含み、結合試薬は電極上に固定され、複合体が電極に近接することは、標識核酸が結合試薬に結合する条件下で、組成物を電極とインキュベーションすることを含む。実施形態では、結合試薬は、アンカー試薬である。実施形態では、結合試薬は、標的核酸に対して相補的な配列を含む。

【0274】

実施形態では、標的核酸は、固相担体上に固定される。実施形態では、標的核酸は、固相担体上に直接固定されるか、または本明細書で提供されるような結合試薬を介して間接的に固定される。実施形態では、標的核酸に結合することができる結合試薬は、固相担体上に固定され、固相担体は、電極上に固定される。実施形態では、標的核酸は、固相担体上に固定され、複合体が電極に近接することは、標識核酸が結合試薬に結合する条件下で、組成物を電極とインキュベーションすることを含む。実施形態では、結合試薬は、固相担体上に固定され、複合体が電極に近接することは、標識核酸が結合試薬に結合する条件下で、組成物を固相担体とインキュベーションすることと、固相担体を収集することと、を含む。

【0275】

実施形態では、インキュベーションは、約9分、10分、約20分、約30分、約40分、約50分、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、または約8時間である。実施形態では、インキュベーションは、約15℃、約18℃、約20℃、約21℃、約22℃、約23℃、約24℃、約25℃、約26℃、約27℃、約28℃、約29℃、または約30℃である。実施形態では、インキュベーションは、約15℃～約30℃で、約10分～約8時間である。実施形態では、インキュベーションは、約15℃～約30℃で、約10分～約8時間である。実施形態では、インキュベーションは、約18℃～約29℃で、約20分～約6時間である。実施形態では、インキュベーションは、約20℃～約28℃で、約20分～約6時間である。実施形態では、インキュベーションは、約21℃～約26℃で、約30分～約4時間である。実施形態では、インキュベーションは、約22℃～約24℃で、約40分～約2時間である。実施形態では、インキュベーションは、約23℃で約1時間である。

【0276】

例示的な固相担体が本明細書に記載されている。実施形態では、結合試薬は、標的オリゴヌクレオチドに対して相補的な配列を含む。実施形態では、固相担体は粒子であり、粒子は、重力、遠心分離、濾過、または磁場の印加を使用して電極上に収集される。

【0277】

実施形態では、本開示は、本明細書で提供される標識プローブ、および電極、ECL読み取り緩衝液、核酸ポリメラーゼ、核酸リガーゼ、アッセイ希釈剤、追加の核酸試薬、アッセイ消耗品、またはそれらの組み合わせを含む電気化学発光を測定するためのキットを提供する。追加の核酸試薬の例には、核酸を可溶化し、希釈し、および／または安定化するための緩衝液および試薬が含まれる。キットに含まれ得るアッセイ消耗品の例は、アッセイの1つ以上の工程中に試料および／もしくは試薬を収容するように設計されたアッセイモジュール、液体試料および試薬を移すためのピペットチップおよび他の消耗品、アッ

セイモジュール用のカバーおよびシール、ならびにアッセイで使用される他の消耗品、他のアッセイ消耗品を保持するためのラック、試料を特定するための標識（バーコード、RFIDなどの人間が読み取り可能または機械が読み取り可能な形式を含む）、または他のアッセイ消耗品、ならびにアッセイに関する情報を提供するための媒体（紙および電子媒体を含む）および／またはアッセイを実行するための取扱説明書である。

【0278】

実施形態では、キットは電極を含み、電極は炭素系電極である。実施形態では、キットはアッセイ消耗品を含み、アッセイ消耗品はマルチウェルプレートアッセイ消耗品であり、プレートの各ウェルはカーボンインク電極を含む。実施形態では、キットは、複数のウェルを有するマルチウェルアッセイプレートを含み、アッセイプレートは、少なくとも1つの結合試薬用の容器として使用される。実施形態では、結合試薬は、プレートに固定される。プレート内の複数のウェルは、それらの中に固定された結合試薬を有し得る。これらのウェルの各々における結合試薬は、これらのウェルのすべて、これらのウェルのうちの一部と同じ、またはこれらのウェルのいずれとも同じではない場合がある。実施形態では、複数の結合試薬は、これらのウェルの各々における結合試薬のアレイとして固定される。固定された結合試薬および／または固定された結合試薬のアレイは、ウェル内の電極（炭素系電極、またはより具体的には、カーボンインク電極であり得る）上に固定され得る。

10

【0279】

実施形態では、キットは、ECL読み取り緩衝液を含み、ECL読み取り緩衝液は、トリプロピルアミンを含む。実施形態では、キットは、ECL読み取り緩衝液を含み、ECL読み取り緩衝液は、ブチルジエタノールアミンを含む。例示的なECL読み取り緩衝液は、例えば、2019年1月3日に出願されたU.S. 62/787, 892に記載されている。

20

【0280】

標識プローブの製造方法

本開示は、本明細書に記載の標識プローブを製造する方法を含む。実施形態では、2つ以上のアルキルアミン部分を有する修飾オリゴヌクレオチドを、電気化学発光標識を含む過剰のアミン反応性標識試薬と反応させる。次に、反応混合物を精製して、アミン部分のそれぞれが電気化学発光標識に結合している産物を単離する。

30

【0281】

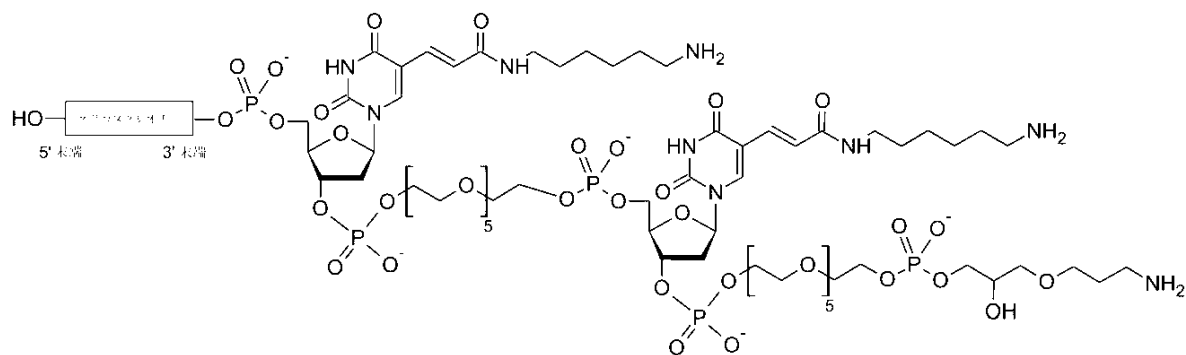
実施形態では、反応性アミン基を有する修飾オリゴヌクレオチドは、式VIIに示される構造を有し、産物は、式Iに示される構造を有し、Rは、電気化学発光標識である。実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、式IXに示される構造を有し、産物は、式Iに示される構造を有し、Rは、電気化学発光標識である。式の他の構成要素（ L^1 、 L^2 、k、mなど）は、上記の式IおよびIIについて記載されたとおりである。

40

50

[illegible]

10



20

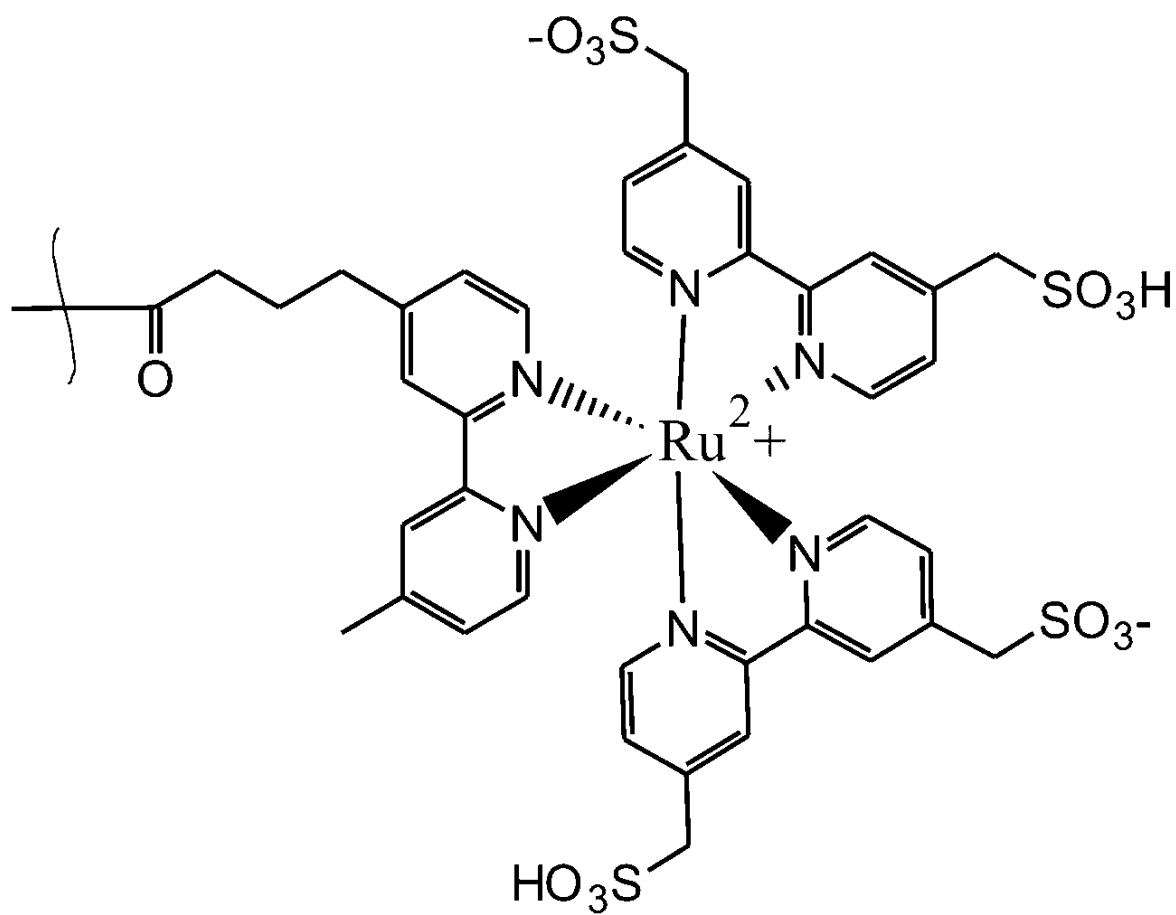
実施形態では、アミン反応性標識試薬は、電気化学発光標識の活性エステル形態を含み、アミン部分と反応して、修飾オリゴヌクレオチドと標識との間にアミド結合を形成する。実施形態では、活性エステルは、NHSエステルである。実施形態では、標識は、

30

40

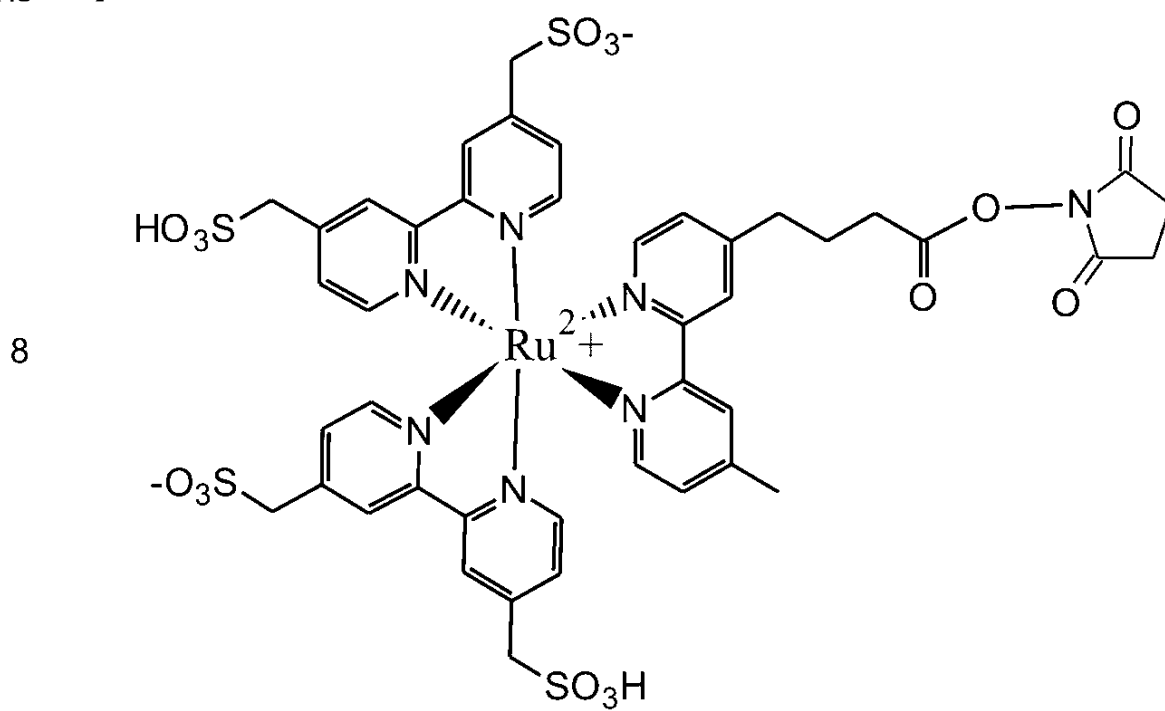
50

【化 1 3】



であり、アミン反応性標識試薬は、

【化 1 4】



である。

【 0 2 8 3】

実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、固相合成によって調製される。実施形態では、最終産物は、イオン交換クロマトグラフィーによって精製される。実施形態では、最終産物は、陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製される。実施形態では、最終産物は、ゲル電気泳動によって精製される。

【0284】

核酸プローブ

実施形態では、検出試薬に連結された核酸プローブは、検出試薬に架橋またはコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドである。「コンジュゲーション」、「バイオコンジュゲーション」またはその変形は、本明細書では、2つの分子間の安定な共有結合の形成を指すために使用され、そのうちの少なくとも1つは、生体分子、例えば、タンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチドなどである。連結分子は、「コンジュゲート」または「バイオコンジュゲート」と呼ばれることがある。実施形態では、コンジュゲートは、核酸プローブおよび検出試薬を含む。

【0285】

実施形態では、核酸プローブは、テンプレート核酸に対して1つ以上の相補的な領域を含む。実施形態では、テンプレート核酸は、例えば、PCRによる増幅用のテンプレートである。実施形態では、テンプレート核酸は、環状核酸テンプレート、または、例えば、RCAのために環状核酸テンプレートを形成するために連結される1つ以上の直鎖核酸テンプレートである。実施形態では、テンプレート核酸配列は、本明細書に記載の電気化学発光測定法で使用されるコネクタオリゴヌクレオチドである。実施形態では、コネクタオリゴヌクレオチドは直鎖オリゴヌクレオチドであり、その5'および3'末端を連結して環状核酸テンプレートを生成することができる。実施形態では、コネクタオリゴヌクレオチドは、リガーゼが5'および3'末端と一緒に連結して環状核酸テンプレートを形成することができるように、その3'末端の配列に相補的なその5'末端の配列を含む。実施形態では、環状核酸テンプレートは、ローリングサークル増幅(RCA)用のテンプレートである。実施形態では、核酸プローブは、RCA反応のためのプライマーであり、すなわち、環状核酸テンプレートを伸長して、伸長配列を形成する。

【0286】

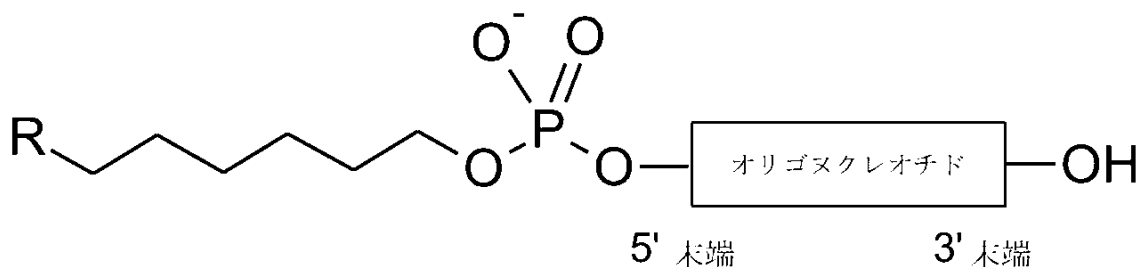
本発明者らは、より短い核酸プローブが本発明の電気化学発光測定およびアッセイ方法の性能を改良することを予期せず発見した。従来の考え方は、適切な性能を得るには比較的長いオリゴヌクレオチドが必要であろうというものであった。より短い核酸プローブは、コンジュゲーションプロトコルを単純化するという追加の利点を提供し(特に、タンパク質-プローブコンジュゲートを非コンジュゲートプローブから分離するために、より単純で、労働集約的でなく、より速いアプローチの使用を可能にする)、また、より容易により安価に合成および精製する。したがって、実施形態では、本開示の核酸プローブは、長さが約10~約30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約12~約28ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約13~約26ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約14~約24ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約11~約22ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約12~約21ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約13~約20ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約13~約18ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約14~約19ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、または約30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、約14ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、約15ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プ

【 0 2 8 7 】

【 0 2 8 8 】

【 0 2 8 9 】

【化 1 5】



式 I I I

反応性官能基（R）を含み、反応性官能基は、チオール、アミン、カルボン酸、活性エステル、ヒドラジン、アルデヒド、ケトン、アルキン、歪んだアルケン、アジド、またはテトラジンである。一実施形態では、反応性官能基はチオールである（－Rは－SHである）。

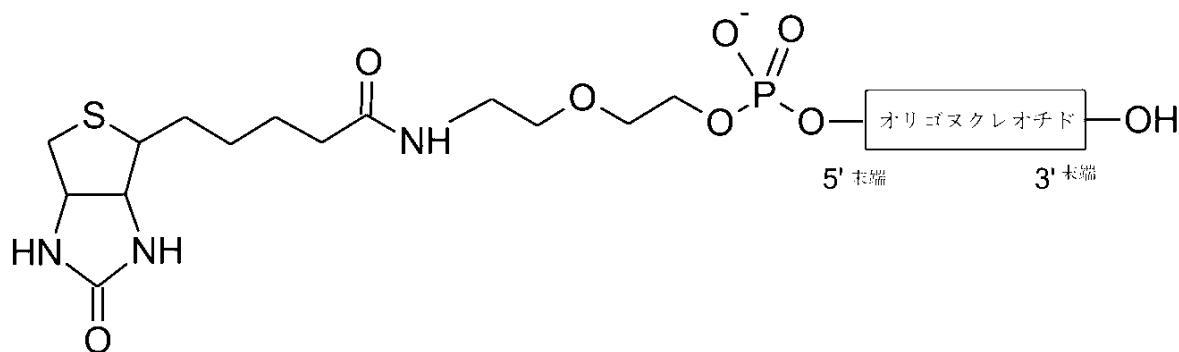
【0290】

実施形態では、非天然核酸プローブは、ハプテンまたはビオチンを含む非天然の5'修飾をさらに含む。実施形態では、ハプテンは、フルオレセイン、ジニトロフェニル、またはジゴキシゲニンを含む。実施形態では、修飾はビオチンを含む。実施形態では、修飾はチオールを含む。実施形態では、修飾は、5'チオール修飾因子C6 S-S(5ThioMC6-D)である。

【0291】

実施形態では、非天然核酸プローブは、式I Vのものである。

【化16】

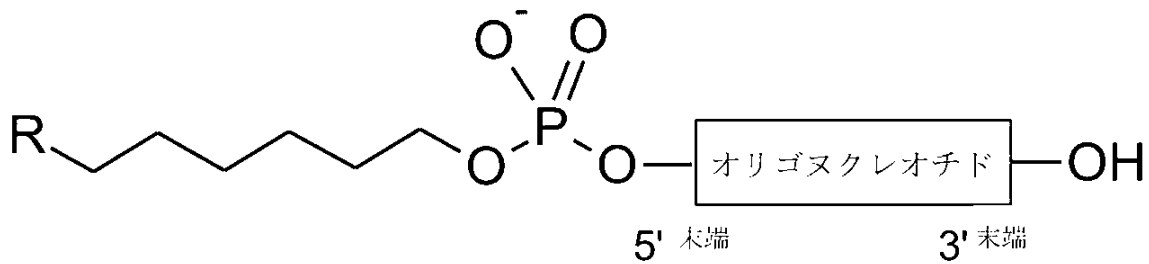


式I V

【0292】

実施形態では、本開示は、本明細書に記載の非天然核酸プローブにコンジュゲートした検出試薬を含むコンジュゲート化合物を提供する。実施形態では、コンジュゲート化合物のオリゴヌクレオチドは、長さが14～24ヌクレオチドであり、配列番号33の14または15個の連続したヌクレオチドを含む。実施形態では、コンジュゲート化合物のオリゴヌクレオチドは、長さが14～24ヌクレオチドであり、配列番号33の14または15個の連続したヌクレオチドを含み、反応性官能基を含む非天然の5'修飾をさらに含む。実施形態では、コンジュゲート化合物のオリゴヌクレオチドは、長さが14～24ヌクレオチドであり、配列番号33の14または15個の連続したヌクレオチドを含み、チオール、アミン、カルボン酸、活性エステル、ヒドラジン、アルデヒド、ケトン、アルキン、歪んだアルケン、アジドまたはテトラジンをさらに含む。実施形態では、コンジュゲート化合物のオリゴヌクレオチドは、長さが14～24ヌクレオチドであり、式I I Iのものであり、配列番号33の14または15個の連続したヌクレオチドを含み、

【化 17】



式 I I I

式中、Rは反応基である。実施形態では、反応基Rは、チオール、アミン、カルボン酸、活性エステル、ヒドラジン、アルデヒド、ケトン、アルキン、歪んだアルケン、アジド、またはテトラジンである。実施形態では、反応基Rはチオールである（-Rは-SHである）。実施形態では、核酸プローブは、5'-GACAGAACTAGACAC-3'（配列番号33）を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-ACAGAACTAGACAC-3'（配列番号40）を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-GACAGAACTAGACA-3'（配列番号41）を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-TGCAACGCTCGACGC-3'（配列番号42）を含むオリゴヌクレオチドを含む。

【0293】

実施形態では、コンジュゲート化合物の検出試薬は結合試薬である。実施形態では、コンジュゲート化合物の検出試薬は、抗原結合物質である。実施形態では、検出試薬は抗体である。実施形態では、非天然核酸プローブのオリゴヌクレオチドは、長さが10～30ヌクレオチドである。実施形態では、非天然核酸プローブのオリゴヌクレオチドは、長さが14～19ヌクレオチドである。実施形態では、非天然核酸プローブのオリゴヌクレオチドは、長さが約14、約15、約16、約17、約18、または約19ヌクレオチドである。実施形態では、非天然核酸プローブのオリゴヌクレオチドは、14ヌクレオチドの長さである。実施形態では、非天然核酸プローブのオリゴヌクレオチドは、15ヌクレオチドの長さである。

【0294】

実施形態では、核酸プローブは、テンプレート核酸配列に対して相補的な領域を含む。実施形態では、テンプレート核酸配列は、環状核酸テンプレート、または連結して環状核酸テンプレートを形成し得る直鎖核酸テンプレートである。実施形態では、環状核酸テンプレートは、ローリングサークル増幅（RCA）用のテンプレートである。実施形態では、核酸プローブは、RCA反応用のプライマーであり、すなわち、環状核酸テンプレートを伸長して、伸長配列を形成する。

【0295】

実施形態では、本開示の非天然オリゴヌクレオチドは、従来のRCAテンプレートオリゴヌクレオチドよりも短い。核酸プローブと同様に、より短いテンプレートオリゴヌクレオチドは、合成および精製がより容易でより安価であるという利点を提供する。より長いオリゴヌクレオチドと比較して、より短いオリゴヌクレオチドのより多くのコピーが単位時間当たりのRCA反応で増幅され得るため、より短いテンプレートオリゴヌクレオチドは、アッセイ感度も増加させ得る。実施形態では、本開示は、長さが約40～約100ヌクレオチドの非天然オリゴヌクレオチドを提供し、その5'末端に配列5'-GTTCTGTCTC-3'を、その3'末端配列に5'-GTGTCCTA-3'を含む。オリゴヌクレオチドの5'末端（end）配列および3'末端（end）配列は、それぞれ5'末端（termin

a l) 配列および3'末端(terminal)配列と呼ばれることもある。実施形態では、非天然オリゴヌクレオチドは、5'-CAGTGAAATGCGAGTCCGTCTAAG-3'(配列番号34)および5'-AAGAGAGTAGTACAGCA-3'(配列番号35)を含む。実施形態では、非天然オリゴヌクレオチドは、長さが約50~約78ヌクレオチドである。実施形態では、非天然オリゴヌクレオチドは、長さが約53~約76ヌクレオチドである。実施形態では、非天然オリゴヌクレオチドは、長さが約50~約70ヌクレオチドである。実施形態では、非天然オリゴヌクレオチドは、長さが約53~約61ヌクレオチドである。実施形態では、非天然オリゴヌクレオチドは、長さが約54~約61ヌクレオチドである。実施形態では、非天然オリゴヌクレオチドは、61ヌクレオチドの長さである。実施形態では、非天然オリゴヌクレオチドは、約53、約54、約55、約56、約57、約58、約59、約60、約61、約62、約63、約64、約65、約66、約67、約68、約69、約70、約71、約72、約73、約74、約75、または約76個のヌクレオチドを含み、その5'末端配列に5'-GTTCTGTCTC-3'を、その3'末端配列に5'-GTGTCCTA-3'を含む。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、5'末端ホスフェート基をさらに含む。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、その5'末端配列に5'-GTTCTGTCTC-3'を、その3'末端配列に5'-GTGTCCTA-3'を含む。

10

【0296】

実施形態では、オリゴヌクレオチドは、5'-GTTCTGTCTCATATTTTCAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGAGAGTAGTACAGCAAGAGTGTCCTA-3'(配列番号36)からなる。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、5'-GCTGTGCAATATTTTCAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGAGAGTAGTACAGCAAGAGCGTCTCGA-3'(配列番号43)からなる。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、5'末端ホスフェート基をさらに含む。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、環状オリゴヌクレオチド、例えば、環状RCAテンプレートを形成するために連結することができる直鎖オリゴヌクレオチドである。

20

【0297】

オリゴヌクレオチド配列

表Bは、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチド配列の概要である。

30

40

50

【表 2 - 1】

表B オリゴヌクレオチド配列

配列番号:	説明および配列
1	チオール修飾近接プローブ 1(U=2' O-メチル-RNA) SH-AAA AAA AAA AGA CGC TAA TAG TTA AGA CGC TTU UU
2	チオール修飾近接プローブ 2 SH-AAA AAA AAA ATA TGA CAG AAC TAG ACA CTC TT
3	アンカーオリゴ 5'-AAGAGAGTAGTACAGCAGCCGTCAAAAAAAAAAAAAA-/3ThioMC3-D/-3'
4	環状化オリゴ 1 ホスフェート-CTA TTA GCG TCC AGT GAA TGC GAG TCC GTC TAA GAG AGT AGT AGA GCA GCC GTC AAG AGT GTC TA
5	環状化オリゴ 2 ホスフェート GTT CTG TCA TAT TTA AGC GTC TTA A
6	検出プローブ CAG TGA ATG CGA GTC CGT CT
7	検出プローブ 5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3'
8	近接プローブ 1 /5ThioMC6-D/aaaaaaaaCACTAAGCTGTTAGTCCATTACCGmUmUmU
9	近接プローブ 2 /5ThioMC6-D/aaaaaaaaGCTGGAGGTTACAGACGATTTTGCG
10	環状化オリゴ 1 /5Phos/AACAGCTTAGTGACATCGGTAGTTAACAGATTGATCTTGACACATCGGTAGTTCGC AAAATCGTC
11	環状化オリゴ 2 /5Phos/TGAACCTCCAGCTTTCGGTAATGGACT
12	アンカーオリゴ 5'ACAGATTGATCTTGAAAA AAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/
13	近接プローブ 1 /5ThioMC6-D/aaaaaaaaAGAGTCCAGAGGCAAAGCGTGAATmUmUmU
14	近接プローブ 2 /5ThioMC6-D/aaaaaaaaGATAAGGAAGGGGCCTTAGCGACA
15	環状化オリゴ 1 /5Phos/CCTCTGGACTCTACATCGGTAGTTTGGACATTTTATTCTAACATCGGTAGTTTGTC GCTAAGGC
16	環状化オリゴ 2 /5Phos/CCCTTCCTTATCTTTATTACGCTTTG

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

17	アンカーオリゴ 5'GGAACATTTTATTCTAAA AAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/
18	近接プローブ 1 /5ThioMC6-D/aaaaaaaaAACAACTCCGATTGCTTGCTTCTTmUmUmU
19	近接プローブ 2 /5ThioMC6-D/aaaaaaaaTAGCCCTACGTGCCCTGCATAGAC
20	環状化オリゴ 1 /5Phos/ATCGGAGTTGTTACATCGGTAGTTCGCGCAGGTCGGAATTACATCGGTAGTTGTC TATGCAGGG
21	環状化オリゴ 2 /5Phos/CACGTAGGGCTATTTAAGAAGCAAGCA
22	アンカーオリゴ 5'GCGCAGGTCGGAATAAAA AAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/
23	近接プローブ 1 /5ThioMC6-D/AAAAAAAAAAGACGCTAATAGTTAAGACGCTTmUmUmU
24	捕捉オリゴ 1 Aagcgtctaactatt
25	捕捉オリゴ 2 Aagcgtctaact
26	捕捉オリゴ 3 Aagcgtctaac
27	捕捉オリゴ 4 Aagcgtcttaa
28	捕捉オリゴ 5 Aagcgtctta
29	捕捉オリゴ 6 Aagcgtctt
30	捕捉オリゴ 7 Aagcgtct
31	標識プローブ 5'-CAGTGAATGCGAGTCCGTCT-3'
32	標識プローブ 5'-CAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAG-3'
33	核酸プローブ 5'-GACAGAACTAGACAC-3'
34	テンプレート/コネクターオリゴ 5'-CAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAG-3'
35	テンプレート/コネクターオリゴ/アンカーオリゴ 5'-AAGAGAGTAGTACAGCA-3'

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

36	テンプレート/コネクターオリゴ 5'- GTTCTGTCATATTTTCAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGAGAGTAGTACAGCAAGAGTGTCTA -3'	
37	アンカーオリゴ 5'-AAGAGAGTAGTACAGCAGCCGTCAA-3'	
38	ポリ A リンカー AAAAAAAAAAAA	10
39	プローブ結合配列 TAT GAC AGA ACT AGA CAC TCT T	
40	核酸プローブ 5'-ACAGAACTAGACAC-3'	
41	核酸プローブ 5'-GACAGAACTAGACA-3'	
42	高 GC 核酸プローブ TGCACAGC-TCGACGC 修飾あり 5'-/5ThioMC6-D/TGCACAGCTCGACGC	20
43	高 GC 環状化オリゴ GCTGTGCAATATTTTCAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAG AGAGTAGTACAGCAAGAGCGTCGA 修飾あり /5Phos/GCTGTGCAATATTTTCAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGAGAGTAGTACAGCAAGAGC GTCGA	
44	修飾された標識プローブ 5'-CAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAG/iAmMC6T/iSp18/iAmMC6T/iSp18/3AmMO/-3'	30
45	修飾されたアンカーオリゴ 5'-/5AmMC6/AAGAGAGTAGTACAGCAGCCGTCAA/3AmMC6T/3'(配列番号 45)	

【0298】

表 B に提供されるオリゴヌクレオチドのいずれも、1つ以上の修飾を含み得る。オリゴヌクレオチドの修飾は本明細書に記載されている。実施形態では、表 B のオリゴヌクレオチドは、標識、タンパク質、または表面などの別の物質に付着するための1つ以上の修飾を含む。実施形態では、表 B のオリゴヌクレオチドは、ビオチン、ストレプトアビジン、アビジン、アミノ基、チオール基、アルデヒド基、ヒドラジド基、アジド基、アルキン基、マレイミド基および／またはヨードアセトアミド基を含む。実施形態では、表 B のオリゴヌクレオチドは、表 A の修飾のうちの1つ以上を含む。

【0299】

実施形態では、表 B のオリゴヌクレオチドは、5' アミノ修飾因子 C 6 (5 AmMC 6)、5' アミノ修飾因子 C 1 2 (5 AmMC 1 2)、アミノ修飾因子 C 6 d T (5 AmMC 6 T、i AmMC 6 T、3 AmMC 6 T)、3' アミノ修飾因子 (3 AmMO)、UNILINK (商標) アミノ修飾因子 (5 UniAmM、i UniAmM)、ビオチン (5 Bio sg、3 Bio)、ビオチン-アジド (5 Bio K、i Biod UK)、ビオチン d T (5 Biod T、i Biod T、3 Biod T)、ビオチン-TEG (5 Bio TEG、

10

20

30

40

50

3 BioTEG)、5'デュアルビオチン(52-Bio)、5'光開裂性ビオチン(5PCBio)、デスチオビオチン-TEG(5deSBioTEG、ideSBioTEG、3deSBioTEG)、3'チオール修飾因子C3-S-S(3ThioMC3-D)、ジチオール(5DTPA、iDTPA、3DTPA)、5'チオール修飾因子C6-S-S(5ThioMC6-D)、5'ヘキシニル(5Hexynyl)、5-オクタジニル(55OctdU、i5OctdU、35OctdU)、C3スペーサー(5SpC3、iSpC3、3SpC3)、ヘキサンジオール(3C6)、1'2'-ジデオキシリボースdSpacer(5dSp、idSp、3dSp)、光開裂性スペーサー(5SpPC、iSpPC)、スペーサー9(5Sp9、iSp9、3Sp9)、スペーサー18(5Sp18、iSp18、3Sp18)、5'ACRYDITE(商標)(5Acryd)、5'アデニル化(5rApp)、アジドNHSエステル(5AzideN、iAzideN、3AzideN)、3'コレステロール-TEG(3CholTEG)、ジゴキシゲニンNHSエステル(5DigN、3DigN)、5'イーリンカー(5ILink12)、リン酸化(5Phos、3Phos)、6-FAMアジド(56-FAMK、i6-FAMK)、6-FAM NHSエステル(56-FAMN、i6-FAMN)、5-TAMRAアジド(55-TAMK、i5-TAMK)、またはそれらの組み合わせを含む。

【0300】

ポリペプチドをオリゴヌクレオチドに結合する方法

実施形態では、本開示は、核酸プローブを検出試薬にコンジュゲートしてコンジュゲートを形成する方法、およびコンジュゲーション効率を分析する方法を提供する。したがって、本開示は、検出試薬(例えば、抗体)に対する核酸プローブのカップリング効率を標識および定量化するための単純かつ定量的な方法を提供する。核酸プローブに組み込まれた蛍光標識を検出することを含む以前の方法には、非特異的な結合およびバックグラウンドシグナルの増加などの重大な欠点がある。そのような欠点は、例えば、蛍光標識が通常はかさばる疎水性残基であるためである。このような問題は、本明細書に記載の方法などの超高感度アッセイにおいて特定の課題を提起する。本発明の方法は、カップリング効率を定量化するために、蛍光標識などの大きな分子の使用を伴うそのような問題を取り除く。

【0301】

実施形態では、核酸プローブと検出試薬とのコンジュゲーションの効率は、コンジュゲートの核酸プローブ構成要素を定量化することができるように、核酸に結合した場合に蛍光を発する化合物を使用して決定される。実施形態では、コンジュゲート反応から未反応の核酸プローブを除去した後、コンジュゲートは、最初に検出試薬の量を特異的に測定するアッセイを使用して定量化され、次に核酸プローブ構成要素の量を特異的に測定するアッセイを使用して定量化される(コンジュゲートと蛍光化合物とを組み合わせることによる)。蛍光シグナルを、対照試料、例えば、校正オリゴヌクレオチドと比較することで、最小限で十分なコンジュゲーションがある否か(すなわち、低対照を超える蛍光シグナル)、または未反応の核酸プローブの除去が不十分である否か(すなわち、高対照を超える蛍光シグナル)をさらに決定することができる。

【0302】

実施形態では、本開示は、核酸プローブを非核酸検出試薬にコンジュゲートしてコンジュゲートを形成する方法を提供し、本方法は、(a)検出試薬および核酸プローブを反応させてコンジュゲートを形成することと、(b)サイズ分離デバイスを使用して、コンジュゲートを未反応の核酸プローブから分離し、精製されたコンジュゲートを形成することと、(c)精製されたコンジュゲートの試料、およびフルオロフォアが、例えば、一本鎖または二本鎖の核酸に結合すると増加する蛍光強度を有するように選択された核酸結合フルオロフォアを含む試験組成物を形成することと、(d)試験組成物の蛍光を測定して、コンジュゲート中のオリゴヌクレオチド量を決定することと、を含む。

【0303】

実施形態では、フルオロフォアが一本鎖核酸に結合すると、フルオロフォアの蛍光強度が増加する。実施形態では、フルオロフォアが二本鎖核酸に結合すると、フルオロフォア

の蛍光強度が増加する。実施形態では、フルオロフォアは、QUANT-IT OLIGREEN色素、QUANT-IT RIBOGREEN色素、QUANTIFLUOR ssDNA色素、SYBR Green I色素、またはSYBR Green II色素である。実施形態では、フルオロフォアは、SYBR Green I色素である。

【0304】

実施形態では、サイズ分離デバイスは、オリゴヌクレオチドおよび検出試薬を含むコンジュゲートを未反応の核酸プローブから分離するように構成される。実施形態では、コンジュゲートを未反応の核酸プローブから分離するためのサイズ分離デバイスは、透析デバイス、限外濾過デバイスまたはサイズ排除カラムであり、分離デバイスは、分子量が約5,000ダルトン以下のオリゴヌクレオチドを、分子量が50,000ダルトンを超えるコンジュゲートから分離するのに適した分画分子量を有する。実施形態では、サイズ分離デバイスは、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスを含むカラムである。サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスの非限定的な例には、SEPHADEX、SEPHAROSE、SEPHACRYL、ECONO-COLUMN、ECONO-PAC、BIO-SPIN、MICRO BIO-SPINなどが含まれ、列挙されたマトリックス型のそれぞれは、試料中の異なるサイズの化合物を分離するように構成された異なるビーズサイズを含む。実施形態では、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスは、SEPHADEX G100ビーズを含む。実施形態では、サイズ排除カラムは、重力カラム、スピンカラム、ポンプカラム、または真空系カラムである。

【0305】

実施形態では、核酸プローブを検出試薬に結合する方法は、既知量の校正オリゴヌクレオチドおよびフルオロフォアを含む少なくとも1つの校正組成物を形成することと、蛍光を測定することと、をさらに含む。実施形態では、精製されたコンジュゲート中のオリゴヌクレオチド量を決定することは、試験組成物から測定された蛍光を、1つ以上の校正組成物で測定された蛍光と比較することを含む。実施形態では、核酸プローブを検出試薬にコンジュゲートする方法は、精製されたコンジュゲートにおける検出試薬の濃度を測定することをさらに含む。実施形態では、検出試薬濃度は、タンパク質アッセイを使用して測定される。様々な適切なタンパク質アッセイが当技術分野で知られている。例としては、タンパク質-金属キレート化に基づく方法（例えば、ビウレット法、BCA法、ローリー法）、タンパク質-色素相互作用に基づく方法（例えば、ブラッドフォード（クマシー）法、Quant-iT法、およびQubit法）およびタンパク質アミノ基とアミン反応性色素との反応に基づく方法（例えば、CBQCA法）-例えば、Protein Assay Technical Handbook、ThermoFisher Scientific、2017を参照）が含まれる。実施形態では、検出試薬の濃度は、BCAタンパク質アッセイを使用して測定される。実施形態では、本方法は、精製されたコンジュゲートにおける検出試薬当たりのコンジュゲートオリゴヌクレオチドの平均数を計算することをさらに含む。実施形態では、検出試薬は結合試薬である。実施形態では、検出試薬は、抗原結合物質である。

【0306】

典型的なコンジュゲーション方法は、コンジュゲートの第1の構成要素を架橋剤と反応させることと、第1の構成要素と架橋剤との反応産物を精製することと、次に反応産物を第2の反応構成要素と反応させることと、を含む。しかしながら、中間精製工程は、コンジュゲート構成要素の量が限られている場合、および／または反応が少量で行われる場合など、いくつかの状況では望ましくない場合がある。中間精製工程も、ワークフロー全体にとって負担になる可能性がある。本明細書に記載される方法の実施形態では、核酸プローブは、架橋剤と核酸プローブとの反応の前に、検出試薬と架橋剤との反応産物を精製する必要なしに、架橋剤を使用して検出試薬と効率的に結合され、従来方法よりも改良されている。反応物のモル比により、中間精製工程を除外することができる。

【0307】

実施形態では、本開示は、核酸プローブを非核酸検出試薬にコンジュゲートしてコンジ

ュゲートを形成する方法を提供し、本方法は、検出試薬が架橋剤の第1の反応基と反応し、核酸プローブが架橋剤の第2の反応基と反応する条件下で、検出試薬および核酸プローブを、ヘテロ二官能性架橋剤と接触させてコンジュゲートを形成することを含み、ヘテロ二官能性架橋剤は、(i) 検出試薬と反応して架橋剤を検出試薬に付着させることができる第1の反応基と、(ii) 核酸プローブと反応して架橋剤を核酸プローブに付着させることができるが、実質的に検出試薬に対して非反応性である第2の反応基と、を含み、本方法は、架橋剤と核酸プローブとの反応前に、検出試薬と架橋剤との反応産物を精製することを含まない。

【0308】

実施形態では、本方法は、検出試薬および核酸プローブを架橋剤に付着させてコンジュゲートを形成するために、検出試薬が架橋剤の第1の反応基と反応し、核酸プローブが架橋剤の第2の反応基と反応する条件下で、検出試薬、架橋剤、および核酸プローブをインキュベーションすることを含む。実施形態では、インキュベーションは、約10分～約8時間である。実施形態では、インキュベーションは、約20分～約6時間である。実施形態では、インキュベーションは、約30分～約4時間である。実施形態では、インキュベーションは、約40分～約2時間である。実施形態では、インキュベーションは約1時間である。実施形態では、インキュベーションは、約10分、約20分、約30分、約40分、約50分、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、または約8時間である。

【0309】

実施形態では、インキュベーションは、約15℃～約30℃である。実施形態では、インキュベーションは、約18℃～約29℃である。実施形態では、インキュベーションは、約20℃～約28℃である。実施形態では、インキュベーションは、約21℃～約26℃である。実施形態では、インキュベーションは、約22℃～約24℃である。実施形態では、インキュベーションは約23℃である。実施形態では、インキュベーションは、約15℃、約18℃、約20℃、約21℃、約22℃、約23℃、約24℃、約25℃、約26℃、約27℃、約28℃、約29℃、または約30℃である。実施形態では、インキュベーションは、約15℃～約30℃で、約10分～約8時間である。実施形態では、インキュベーションは、約18℃～約29℃で、約20分～約6時間である。実施形態では、インキュベーションは、約20℃～約28℃で、約20分～約6時間である。実施形態では、インキュベーションは、約21℃～約26℃で、約30分～約4時間である。実施形態では、インキュベーションは、約22℃～約24℃で、約40分～約2時間である。実施形態では、インキュベーションは、約23℃で約1時間である。

【0310】

実施形態では、本開示は、核酸プローブを非核酸検出試薬にコンジュゲートしてコンジュゲートを形成する方法を提供し、本方法は、(a) 検出試薬が架橋剤の第1の反応基と反応する条件下で、検出試薬を、ヘテロ二官能性架橋剤と接触させて第1の組成物を形成することであって、ヘテロ二官能性架橋剤が、(i) 検出試薬と反応して架橋剤を検出試薬に付着させることができる第1の反応基と、(ii) 核酸プローブと反応して架橋剤を核酸プローブに付着させることができるが、実質的に検出試薬に対して非反応性である第2の反応基と、を含む、第1の組成物を形成することと、(b) 架橋剤の第2の反応基が核酸プローブと反応する条件下で、第1の組成物を核酸プローブと接触させてコンジュゲートを形成することと、を含み、本方法は、架橋剤と核酸プローブとの反応前に、検出試薬と架橋剤との反応産物を精製することを含まない。

【0311】

実施形態では、本方法は、検出試薬を架橋剤に付着させるために検出試薬が架橋剤の第1の反応基と反応して活性化された検出試薬を形成する条件下で、第1の組成物をインキュベーションすることと、活性化された検出試薬および核酸プローブを含む第2の組成物を形成することと、核酸プローブが架橋剤の第2の反応基と反応してコンジュゲートを形成する条件下で、第2の組成物をインキュベーションすることと、を含む。

【0312】

実施形態では、インキュベーションは、約10分～約8時間である。実施形態では、インキュベーションは、約20分～約6時間である。実施形態では、インキュベーションは、約30分～約4時間である。実施形態では、インキュベーションは、約40分～約2時間である。実施形態では、インキュベーションは約1時間である。実施形態では、インキュベーションは、約10分、約20分、約30分、約40分、約50分、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、または約8時間である。

【0313】

実施形態では、インキュベーションは、約15℃～約30℃である。実施形態では、インキュベーションは、約18℃～約29℃である。実施形態では、インキュベーションは、約20℃～約28℃である。実施形態では、インキュベーションは、約21℃～約26℃である。実施形態では、インキュベーションは、約22℃～約24℃である。実施形態では、インキュベーションは約23℃である。実施形態では、インキュベーションは、約15℃、約18℃、約20℃、約21℃、約22℃、約23℃、約24℃、約25℃、約26℃、約27℃、約28℃、約29℃、または約30℃である。実施形態では、インキュベーションは、約15℃～約30℃で、約10分～約8時間である。実施形態では、インキュベーションは、約18℃～約29℃で、約20分～約6時間である。実施形態では、インキュベーションは、約20℃～約28℃で、約20分～約6時間である。実施形態では、インキュベーションは、約21℃～約26℃で、約30分～約4時間である。実施形態では、インキュベーションは、約22℃～約24℃で、約40分～約2時間である。実施形態では、インキュベーションは、約23℃で約1時間である。

【0314】

実施形態では、本方法は、サイズ分離デバイスを使用して、コンジュゲートを非コンジュゲート核酸プローブから分離することをさらに含む。実施形態では、本方法は、サイズ分離デバイスを使用してコンジュゲートを未反応の核酸プローブから分離し、精製されたコンジュゲートを生成することと、精製されたコンジュゲートと、フルオロフォアが核酸に結合すると増加する蛍光強度を有するように選択された核酸結合フルオロフォアとを含む試験組成物を形成することと、試験組成物の蛍光を測定して、精製されたコンジュゲートにおける核酸プローブ量を決定することと、をさらに含む。実施形態では、フルオロフォアが一本鎖核酸に結合すると、フルオロフォアの蛍光強度が増加する。実施形態では、フルオロフォアが二本鎖核酸に結合すると、フルオロフォアの蛍光強度が増加する。実施形態では、フルオロフォアは、QUANT-IT OLIGREEN色素、QUANT-IT RIBOGREEN色素、QUANTIFLUOR ssDNA色素、SYBR Green I色素、またはSYBR Green II色素である。実施形態では、フルオロフォアは、SYBR Green I色素である。実施形態では、核酸プローブの数は、コンジュゲートごとに測定され、精製されたコンジュゲートにおけるコンジュゲートオリゴヌクレオチドの濃度および精製されたコンジュゲートにおける検出試薬の量を測定することを含む。実施形態では、検出試薬は、タンパク質、例えば、抗原結合物質である。

【0315】

実施形態では、核酸プローブを検出試薬に結合する方法は、既知量の較正オリゴヌクレオチドおよびフルオロフォアを含む少なくとも1つの較正組成物を形成することと、蛍光を測定することと、をさらに含む。実施形態では、精製されたコンジュゲート中のオリゴヌクレオチド量を決定することは、試験組成物から測定された蛍光を、1つ以上の較正組成物で測定された蛍光と比較することを含む。実施形態では、核酸プローブを検出試薬にコンジュゲートする方法は、精製されたコンジュゲートにおける検出試薬の濃度を測定するためにタンパク質アッセイを使用することをさらに含む。実施形態では、検出試薬の濃度は、BCAタンパク質アッセイを使用して測定される。実施形態では、本方法は、精製されたコンジュゲートにおける検出試薬当たりの結合オリゴヌクレオチドの平均数を計算することをさらに含む。実施形態では、コンジュゲート化合物の検出試薬は結合試薬である。実施形態では、検出試薬は、抗原結合物質である。実施形態では、検出試薬は、非核

酸検出試薬である。

【0316】

実施形態では、異なる濃度での複数のオリゴヌクレオチド較正標準は、オリゴヌクレオチドアッセイを使用して試験され、蛍光対オリゴヌクレオチド濃度の較正曲線を作成する。次に、コンジュゲートの試験試料の蛍光を較正曲線と比較して、例えば、試料のオリゴヌクレオチド濃度を決定する。この比較は、実施形態では、例えば、較正点を数学モデルに適合させ、モデルを使用して試験試料からの蛍光値をバックフィッティングして試料のオリゴヌクレオチド濃度を決定することによって、グラフまたは数学的に行われる。代替的に、コンジュゲーションレベルのより定性的な評価が使用される。例えば、単一濃度のオリゴヌクレオチド較正標準（低対照試料）は、コンジュゲートにおけるオリゴヌクレオチドの最小許容濃度に等しいレベルで試験され、この場合、コンジュゲート試料の蛍光シグナルと低対照試料の蛍光の比較を使用して、コンジュゲートに許容レベルの標識化があるか（コンジュゲートの蛍光 $\geq$ 低対照の蛍光）または否か（コンジュゲートの蛍光 $<$ 低対照の蛍光）を決定することができる。同様に、コンジュゲートにおけるオリゴヌクレオチドの最大予想濃度を超えるレベルを有する別のオリゴヌクレオチド較正標準（高対照試料）も試験することができ、この場合、コンジュゲートの蛍光シグナルと蛍光シグナルの比較を使用して、コンジュゲートが過剰標識されたか否か、または精製工程で非コンジュゲートオリゴヌクレオチドが適切に除去されたか否か（コンジュゲートの蛍光 $>$ 高対照の蛍光）を決定することができる。実施形態では、許容可能なオリゴヌクレオチド濃度の範囲（コンジュゲート1分子当たりのオリゴヌクレオチド分子として表される最小から最大）は、1～8、1～6、2～5、2～4、3～4、1～2、または約1、約2、または約3である。

【0317】

実施形態では、架橋剤の第1の反応基は、アミン反応性部分を含む。アミノ反応性部分は、例えば、ポリペプチドのN末端、またはポリペプチドのリジン残基で、ポリペプチドの遊離アミノ基と反応性であり得る。実施形態では、第1の反応基は、活性エステル（すなわち、エステル $-C(O)OR$ であり、脱離基 HOR は、エステルが求核性物質 HNu と迅速に反応して、求核試薬との反応の速度定数が比較的高いコンジュゲート $-C(O)Nu$ を形成するように選択される。）を含む。実施形態では、活性エステルは、タンパク質上の求核試薬（例えば、タンパク質上のリジンアミン）と容易に（例えば、1日未満の時間尺度で）反応して、穏やかな条件（例えば、6～9の範囲のpHおよび0～40℃の温度）下で（例えば、アミド結合の形成により）コンジュゲートを形成する。実施形態では、第1の反応基は、脱離基がN-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシルホスクシンイミド、ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）、1-ヒドロキシー-7-アザベンゾトリアゾール（HOAt）、またはペンタフルオロフェノールであるエステルである。実施形態では、第1の反応基は、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルまたはN-ヒドロキシルホスクシンイミドエステルを含む。実施形態では、N-ヒドロキシスクシンイミドまたはN-ヒドロキシルホスクシンイミドは、検出試薬と反応する前に、最初にカルボン酸と反応して、N-ヒドロキシルホスクシンイミドエステルまたはN-ヒドロキシルホスクシンイミドエステルを形成する。

【0318】

実施形態では、架橋剤の第2の反応基は、マレイミド、ヨードアセトアミド、活性化ジスルフィド、チオール、アミン、カルボン酸、活性エステル、ヒドラジン、アルデヒド、ケトン、アルキン、歪んだアルケン、アジド、またはテトラジンを含む。実施形態では、核酸プローブはチオール部分を含み、第2の反応基は、マレイミド、ヨードアセトアミドまたは活性化ジスルフィド部分を含み、核酸プローブは、アルケンまたは歪んだアルケン部分を含み、第2の反応基は、テトラジン部分を含み、核酸プローブは、アルキンまたは歪んだアルキン部分を含み、第2の反応基は、アジド部分を含み、核酸プローブはアジド部分を含み、第2の反応基はアルキンまたは歪んだアルキン部分を含み、核酸プ

ローブは、4-ホルミルベンズアミド部分を含み、第2の反応基はヒドラジノニコチンアミド部分を含み、または、核酸プローブはヒドラジノニコチンアミド部分を含み、第2の反応基は4-ホルミルベンズアミド部分を含む。実施形態では、核酸プローブはチオールを含み、第2の反応基はチオール反応基である。

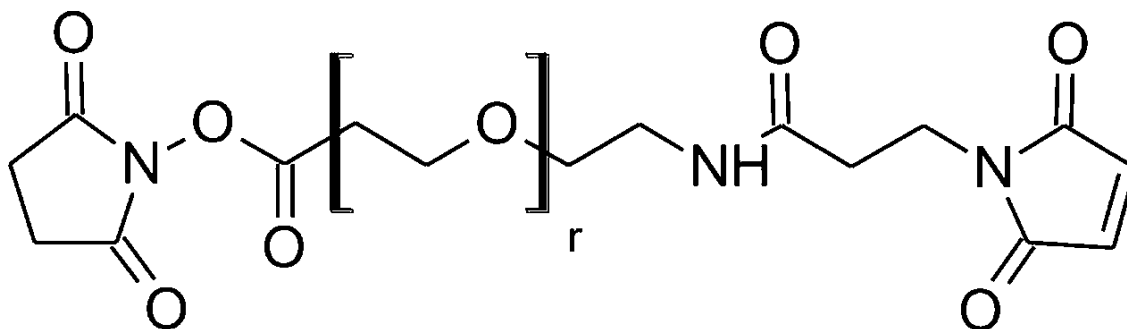
【0319】

実施形態では、第2の反応基は、マレイミド、ヨードアセトアミドまたは活性化ジスルフィド部分を含む。実施形態では、第2の反応基は、マレイミドまたはヨードアセトアミド部分を含む。実施形態では、第2の反応基は、テトラジン部分を含む。実施形態では、第2の反応基は、ビニルまたは歪んだアルケン部分を含む。実施形態では、第2の反応基はアジド部分を含む。実施形態では、第2の反応基は、アルキンまたは歪んだアルキン部分を含む。実施形態では、第2の反応基は、ヒドラジノニコチンアミド部分を含む。実施形態では、第2の反応基は、4-ホルミルベンズアミド部分を含む。実施形態では、第2の反応基はチオール反応基である。

【0320】

実施形態では、核酸プローブはチオールを含み、第1の反応基はアミン反応基であり、第2の反応基はチオール反応基であり、ヘテロ二官能性架橋剤は、式Vの化合物であり、

【化18】



式V

式中、 r は0～24の整数である。実施形態では、 r は1～20の整数である。実施形態では、 r は2～15の整数である。実施形態では、 r は3～10の整数である。実施形態では、 r は4である。

【0321】

実施形態では、架橋剤は、ホモ二官能性架橋剤である。実施形態では、ホモ二官能性架橋試薬は、第1および第2の反応基を含み、第1および第2の反応基は同じ官能基である。実施形態では、第1および第2の反応基は、マレイミド、ヨードアセトアミドまたは活性化ジスルフィド部分をそれぞれ含む。実施形態では、第1および第2の反応基は、マレイミドまたはヨードアセトアミド部分をそれぞれ含む。実施形態では、第1および第2の反応基は、テトラジン部分をそれぞれ含む。実施形態では、第1および第2の反応基は、ビニルまたは歪んだアルケン部分をそれぞれ含む。実施形態では、第1および第2の反応基は、アジド部分をそれぞれ含む。実施形態では、第1および第2の反応基は、アルキンまたは歪んだアルキン部分をそれぞれ含む。実施形態では、第1および第2の反応基は、ヒドラジノニコチンアミド部分をそれぞれ含む。実施形態では、第1および第2の反応基は、4-ホルミルベンズアミド部分をそれぞれ含む。実施形態では、第1および第2の反応基は、それぞれチオール反応基である。

【0322】

実施形態では、本開示は、核酸プローブを非核酸検出試薬にコンジュゲートしてコンジュゲートを形成する方法を提供し、本方法は、検出試薬をホモ二官能性架橋剤と接触させ

ることであって、ホモ二官能性架橋剤が、(i) 検出試薬と反応して架橋剤を検出試薬に付着することができる第1の反応基と、(ii) 核酸プローブと反応して架橋剤を核酸プローブに付着することができる第2の反応基と、を含み、第1および第2の反応基が同じ官能基である、検出試薬をホモ二官能性架橋剤と接触させることと、未反応の架橋剤を除去することと、次に、架橋剤に付着した検出試薬を核酸プローブと接触させることと、を含む。

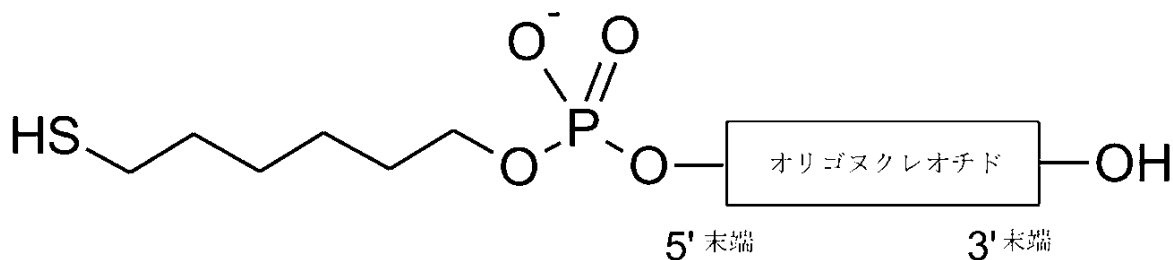
【0323】

実施形態では、本開示は、核酸プローブを非核酸検出試薬にコンジュゲートしてコンジュゲートを形成する方法を提供し、本方法は、核酸プローブをホモ二官能性架橋剤と接触させることであって、ホモ二官能性架橋剤が、(i) 検出試薬と反応して架橋剤を検出試薬に付着することができる第1の反応基と、(ii) 核酸プローブと反応して架橋剤を核酸プローブに付着することができる第2の反応基と、を含み、第1および第2の反応基が同じ官能基である、核酸プローブをホモ二官能性架橋剤と接触させることと、未反応の架橋剤を除去することと、次に、架橋剤に付着した核酸プローブを検出試薬と接触させることと、を含む。

【0324】

実施形態では、核酸プローブは、5'-GACAGAACTAGACAC-3' (配列番号33) の14または15個の連続したヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-GACAGAACTAGACAC-3' (配列番号33) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-ACAGAACTAGACAC-3' (配列番号40) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-GACAGAACTAGACA-3' (配列番号41) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-TGCAACAGCTCGACGC-3' (配列番号42) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは5'修飾を含む。実施形態では、核酸プローブは、5'末端でチオール部分で修飾されている。実施形態では、核酸プローブは、式IIIAの化合物である。

【化19】



式IIIA

【0325】

実施形態では、核酸プローブのオリゴヌクレオチドは、5'-GACAGAACTAGACAC-3' (配列番号33) を含む。実施形態では、核酸プローブのオリゴヌクレオチドは、5'-ACAGAACTAGACAC-3' (配列番号40) を含む。実施形態では、核酸プローブのオリゴヌクレオチドは、5'-GACAGAACTAGACA-3' (配列番号41) を含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-TGCAACAGCTCGACGC-3' (配列番号42) を含むオリゴヌクレオチドを含む。

【0326】

実施形態では、サイズ分離デバイスは、オリゴヌクレオチドおよび検出試薬を含むコンジュゲートを未反応の核酸プローブから分離するように構成される。実施形態では、コンジュゲートを未反応の核酸プローブから分離するためのサイズ分離デバイスは、透析デバ

イス、限外濾過デバイスまたはサイズ排除カラムであり、分離デバイスは、分子量が約5,000ダルトン以下のオリゴヌクレオチドを、分子量が50,000ダルトンを超えるコンジュゲートから分離するのに適した分画分子量を有する。実施形態では、サイズ分離デバイスは、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスを含むカラムである。サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスの非限定的な例には、SEPHADEX、SEPHAROSE、SEPHACRYL、ECONO-COLUMN、ECONO-PAC、BIO-SPIN、MICRO BIO-SPINなどが含まれ、列挙されたマトリックス型のそれぞれは、試料中の異なるサイズの化合物を分離するように構成された異なるビーズサイズを含む。実施形態では、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスは、SEPHADEX G100ビーズを含む。実施形態では、サイズ排除カラムは、重力カラム、スピンカラム、ポンプカラム、または真空系カラムである。実施形態では、検出試薬は、抗原結合物質である。実施形態では、検出試薬は、非核酸検出試薬である。

【0327】

実施形態では、コンジュゲーション反応における1つ以上の構成要素のモル比は、中間精製工程を必要とせずに、コンジュゲート当たりの所望する数の付着オリゴヌクレオチドを達成する再現可能なコンジュゲーションを可能にするように制御される。実施形態では、架橋試薬は、検出試薬の量に対してモル過剰であり、核酸プローブの量は、架橋剤の量に対してモル過剰である。実施形態では、架橋剤の量は、検出試薬の量に対して、約1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15倍のモル過剰で添加される。実施形態では、架橋剤の量は、約1.5~15、2~12、3~10、または4~8のモル過剰で（検出試薬に対して）添加される。実施形態では、架橋剤の量は、検出試薬の量に対する量に対して、少なくとも10倍モル過剰である。実施形態では、架橋剤の量は、検出試薬の量に対して少なくとも6倍モル過剰である。実施形態では、架橋剤の量は、検出試薬の量に対して少なくとも5倍モル過剰である。実施形態では、架橋剤の量は、検出試薬の量に対して少なくとも4倍モル過剰である。実施形態では、核酸プローブのモル量は、架橋剤のモル量の少なくとも1.1倍である。実施形態では、核酸プローブのモル量は、架橋剤の少なくとも1.1倍、少なくとも1.2倍、少なくとも1.3倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.5倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.7倍、少なくとも1.8倍、少なくとも1.9倍、または少なくとも2.0倍のモル量である。実施形態では、本方法は、核酸プローブにコンジュゲートした検出試薬の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または約100%をもたらす。実施形態では、本方法は、核酸プローブにコンジュゲートした検出試薬の少なくとも95%をもたらす。

【0328】

実施形態では、2つ以上の核酸プローブが、本明細書で提供される方法を使用して検出試薬にコンジュゲートする。実施形態では、コンジュゲートの各検出試薬に結合した核酸プローブの平均数は、約2以上である。実施形態では、コンジュゲートの各検出試薬に結合した核酸プローブの平均数は、約1~約20である。実施形態では、コンジュゲートの各検出試薬に結合した核酸プローブの平均数は、約2~約15である。実施形態では、コンジュゲートの各検出試薬に結合した核酸プローブの平均数は、約2~約7である。実施形態では、コンジュゲートの各検出試薬に結合した核酸プローブの平均数は、約3~約6である。実施形態では、コンジュゲートの各検出試薬に結合した核酸プローブの平均数は、約2~約4である。実施形態では、コンジュゲートの各検出試薬に結合した核酸プローブの平均数は、約3~約4である。実施形態では、コンジュゲートの各検出試薬に結合した核酸プローブの平均数は、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、または20超である。

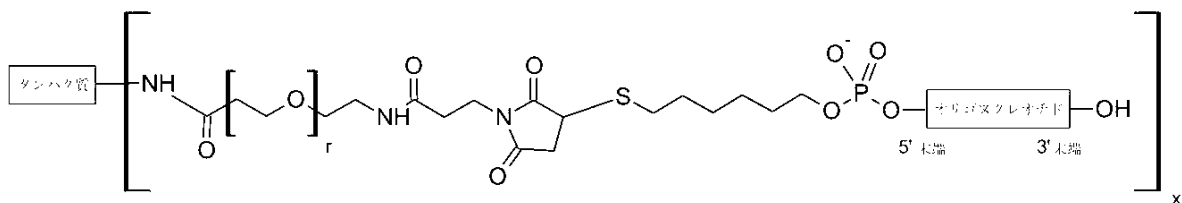
【0329】

したがって、実施形態では、コンジュゲートは、検出試薬と、約1、約2、約3、約4

、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、または 20 超の核酸プローブを含む。

【0330】

実施形態では、検出試薬はタンパク質であり、コンジュゲートは式 V I の化合物であり、
【化 20】



10

式 V I

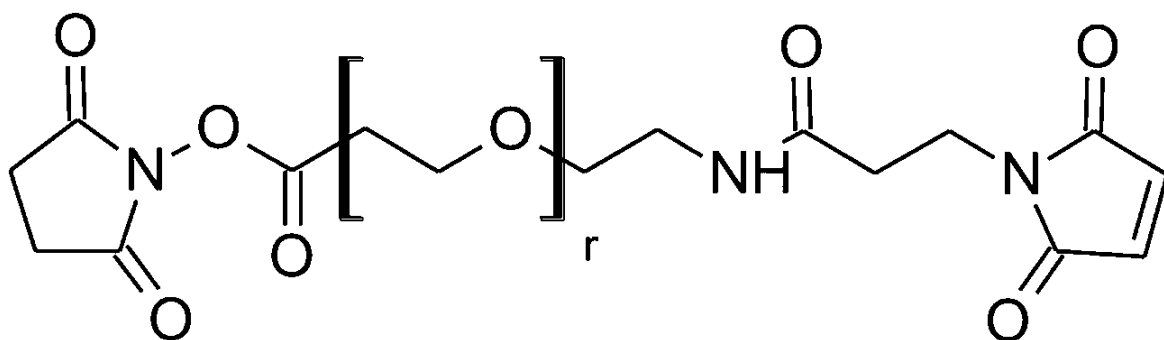
式中、 r は 0 ～ 24 の整数であり、 x は 1 ～ 20 の整数であり、 $-NH-$ は、タンパク質に由来するアミノ基である。実施形態では、核酸プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - GACAGAACTAGACAC - 3' (配列番号 33) の 14 ～ 15 個の連続したオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5' - GACAGAACTAGACAC - 3' (配列番号 33) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5' - ACAGAACTAGACAC - 3' (配列番号 40) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5' - GACAGAACTAGACA - 3' (配列番号 41) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5' - TGCACAGCTCGACGC - 3' (配列番号 42) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、 r は 1 ～ 20 である。実施形態では、 r は 2 ～ 15 である。実施形態では、 r は 3 ～ 10 である。実施形態では、 r は 4 である。実施形態では、 r は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または 24 である。実施形態では、 x は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 である。実施形態では、 x は 1 である。実施形態では、 x は 2 である。

20

【0331】

実施形態では、式 V I のコンジュゲートは、(a) 検出試薬および核酸プローブを含むコンジュゲートを形成することを含む方法であって、(i) 検出試薬を、ヘテロ二官能性架橋剤の NHS エステル部分と反応させて活性化された検出試薬を形成することと、(ii) ヘテロ二官能性架橋剤のマレイミド部分を、核酸プローブのチオール含有オリゴヌクレオチドと反応させてコンジュゲートを形成することと、(iii) 未反応の核酸プローブを除去することと、を含む方法によって産生され、架橋剤は、式 V I I の化合物であり、
【化 21】

30



40

式 I I

50

式中、 r は 0 ～ 24 の整数である。

【0332】

本明細書に記載の方法で使用される場合、コンジュゲートの検出試薬は、本明細書で提供される任意の検出試薬であり得る。例えば、検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得る。コンジュゲーション法で適切に使用される検出試薬は、本出願に記載されているアッセイの検出試薬に限定されない。したがって、コンジュゲーションの文脈において、コンジュゲートの検出試薬は、本明細書のアッセイ方法での使用に限定されない。コンジュゲーション法およびコンジュゲート自体の文脈において、検出試薬は、結果として、任意の他の適切かつ適性な用途、例えば、本明細書に明確に記載されていない追加のアッセイ法で使用する事ができる。

10

【0333】

ポリペプチドをオリゴヌクレオチドに結合するためのキット

実施形態では、本開示は、核酸プローブを非核酸検出試薬にコンジュゲートしてコンジュゲートを形成するためのキットを提供し、キットは、(a) (i) 検出試薬と反応して架橋剤を検出試薬に付着させることができる第1の反応基、および (ii) 検出試薬に対して実質的に非反応性でありながら、核酸プローブと反応して架橋剤を核酸プローブに付着させることができる第2の反応基を含むヘテロ二官能性架橋剤と、(b) コンジュゲートを未反応の核酸プローブから分離することができる第1のサイズ分離デバイスと、(c) 核酸結合フルオロフォアと、を含み、フルオロフォアが核酸に結合するとフルオロフォアの蛍光強度は増加する。実施形態では、フルオロフォアが一本鎖核酸に結合すると、フルオロフォアの蛍光強度が増加する。

20

【0334】

実施形態では、架橋剤の第1の反応基は、アミン反応性部分を含む。アミノ反応性部分は、例えば、ポリペプチドのN末端、またはポリペプチドのリジン残基で、ポリペプチドの遊離アミノ基と反応性であり得る。実施形態では、第1の反応基は、活性エステル（すなわち、エステル $-C(O)OR$ であり、脱離基 HOR は、エステルが求核性物質 HNu と迅速に反応して、求核試薬との反応の速度定数が比較的高いコンジュゲート $-C(O)Nu$ を形成するように選択される。）を含む。実施形態では、活性エステルは、タンパク質上の求核試薬（例えば、タンパク質上のリジンアミン）と容易に（例えば、1日未満の時間尺度で）反応して、穏やかな条件（例えば、6～9の範囲のpHおよび0～40℃の温度）下で（例えば、アミド結合の形成により）コンジュゲートを形成する。実施形態では、第1の反応基は、脱離基がN-ヒドロキスクシンイミド、N-ヒドロキシルホスクシンイミド、N-ヒドロキシルホスクシンイミド、ヒドロキシベンゾトリアゾール（ $HOBT$ ）、1-ヒドロキシー-7-アザベンゾトリアゾール（ $HOAT$ ）、またはペンタフルオロフェノールであるエステルである。実施形態では、第1の反応基は、N-ヒドロキスクシンイミドエステルまたはN-ヒドロキシルホスクシンイミドエステルを含む。実施形態では、N-ヒドロキスクシンイミドまたはN-ヒドロキシルホスクシンイミドは、検出試薬と反応する前に、最初にカルボン酸と反応して、N-ヒドロキシルホスクシンイミドエステルまたはN-ヒドロキシルホスクシンイミドエステルを形成する。

30

40

【0335】

実施形態では、架橋剤の第2の反応基は、マレイミド、ヨードアセトアミド、活性化ジスルフィド、チオール、アミン、カルボン酸、活性エステル、ヒドラジン、アルデヒド、ケトン、アルキン、歪んだアルケン、アジド、またはテトラジンを含む。実施形態では、核酸プローブはチオール部分を含み、第2の反応基は、マレイミド、ヨードアセトアミドまたは活性化ジスルフィド部分を含み、核酸プローブは、アルケンまたは歪んだアルケン部分を含み、第2の反応基は、テトラジン部分を含み、核酸プローブはテトラジン部分を含み、第2の反応基はビニルまたは歪んだアルケン部分を含み、核酸プローブは、アルキンまたは歪んだアルキン部分を含み、第2の反応基は、アジド部分を含み、核酸プローブ

50

はアジド部分を含み、第2の反応基はアルキンまたは歪んだアルキン部分を含み、核酸プローブは、4-ホルミルベンズアミド部分を含み、第2の反応基はヒドラジノニコチンアミド部分を含み、または、核酸プローブはヒドラジノニコチンアミド部分を含み、第2の反応基は4-ホルミルベンズアミド部分を含む。実施形態では、核酸プローブはチオールを含み、第2の反応基はチオール反応基である。

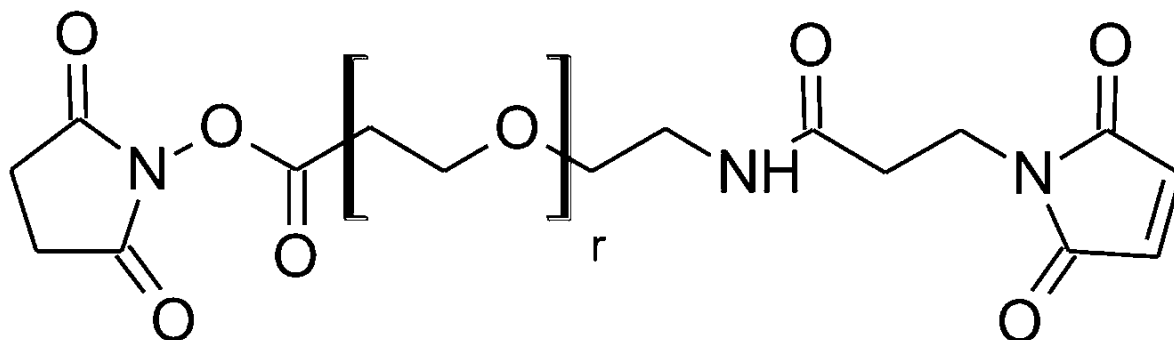
【0336】

実施形態では、第2の反応基は、マレイミド、ヨードアセトアミドまたは活性化ジスルフィド部分を含む。実施形態では、第2の反応基は、マレイミドまたはヨードアセトアミド部分を含む。実施形態では、第2の反応基は、テトラジン部分を含む。実施形態では、第2の反応基は、ビニルまたは歪んだアルケン部分を含む。実施形態では、第2の反応基はアジド部分を含む。実施形態では、第2の反応基は、アルキンまたは歪んだアルキン部分を含む。実施形態では、第2の反応基は、ヒドラジノニコチンアミド部分を含む。実施形態では、第2の反応基は、4-ホルミルベンズアミド部分を含む。実施形態では、第2の反応基はチオール反応基である。

【0337】

実施形態では、核酸プローブはチオールを含み、第1の反応基はアミン反応基であり、第2の反応基はチオール反応基であり、ヘテロ二官能性架橋剤は、式Vの化合物であり、

【化22】



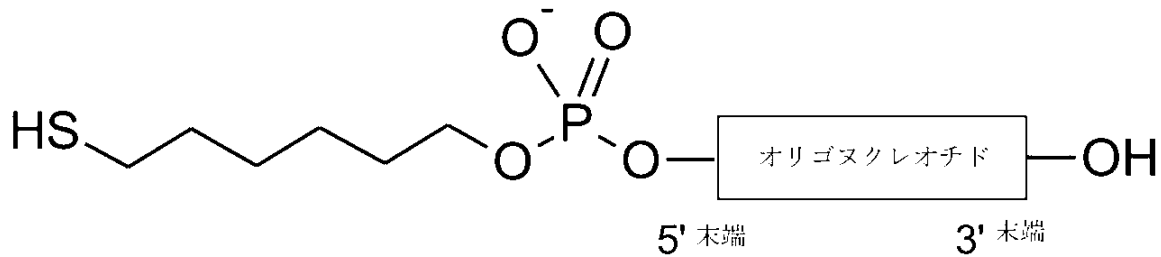
式V

式中、 r は0～24の整数である。実施形態では、 r は1～20の整数である。実施形態では、 r は2～15の整数である。実施形態では、 r は3～10の整数である。実施形態では、 r は4である。

【0338】

実施形態では、キットは、核酸プローブをさらに含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-GACAGAACTAGACAC-3'（配列番号33）の14または15個の連続したヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-GACAGAACTAGACAC-3'（配列番号33）を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-ACAGAACTAGACAC-3'（配列番号40）を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-GACAGAACTAGACA-3'（配列番号41）を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-TGCAACAGCTCGACGC-3'（配列番号42）を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは5'修飾を含む。実施形態では、核酸プローブは、5'末端でチオール部分で修飾されている。実施形態では、核酸プローブは、式IIIAの化合物である。

【化 2 3】



式 I I I A

実施形態では、核酸プローブのオリゴヌクレオチドは、5'-GACAGAACTAGACAC-3'（配列番号33）の14または15個の連続したヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-GACAGAACTAGACAC-3'（配列番号33）を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-ACAGAACTAGACAC-3'（配列番号40）を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-GACAGAACTAGACA-3'（配列番号41）を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-TGACACAGCTCGACGC-3'（配列番号42）を含むオリゴヌクレオチドを含む。

【0339】

実施形態では、第1のサイズ分離デバイスは、オリゴヌクレオチドおよび検出試薬を含むコンジュゲートを未反応の核酸プローブから分離するように構成される。実施形態では、コンジュゲートを未反応の核酸プローブから分離するための第1のサイズ分離デバイスは、透析デバイス、限外濾過デバイスまたはサイズ排除カラムであり、分離デバイスは、分子量が約5,000ダルトン以下のオリゴヌクレオチドを、分子量が50,000ダルトンを超えるコンジュゲートから分離するのに適した分画分子量を有する。実施形態では、第1のサイズ分離デバイスは、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスを含むカラムである。サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスの非限定的な例には、SEPHADEX、SEPHAROSE、SEPHACRYL、ECONO-COLUMN、ECONO-PAC、BIO-SPIN、MICRO BIO-SPINなどが含まれ、列挙されたマトリックス型のそれぞれは、試料中の異なるサイズの化合物を分離するように構成された異なるビーズサイズを含む。実施形態では、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスは、SEPHADEX G100ビーズを含む。実施形態では、サイズ排除カラムは、重力カラム、スピнкаラム、ポンプカラム、または真空系カラムである。

【0340】

実施形態では、フルオロフォアは、QUANT-IT OLIGREEN色素、QUANTIT-IT RIBOGREEN色素、QUANTIFLUOR ssDNA色素、SYBR Green I色素、またはSYBR Green II色素である。実施形態では、フルオロフォアは、SYBR Green I色素である。

【0341】

実施形態では、キットは、校正オリゴヌクレオチドをさらに含む。実施形態では、校正オリゴヌクレオチドの濃度は、キットと共に提供される。実施形態では、校正オリゴヌクレオチドは、フルオロフォアに結合する。実施形態では、様々な濃度の校正オリゴヌクレオチドをフルオロフォアと共に使用して、蛍光強度をオリゴヌクレオチド濃度と相関させる校正曲線を作成する。

【0342】

実施形態では、キットは、コンジュゲーションの前に検出試薬を脱塩するための第2のサイズ分離デバイスをさらに含む。本明細書で使用される場合、「脱塩」、「脱塩する」

またはその変形は、特定の高分子量化合物が保管される溶液（または緩衝液）の低分子量構成要素を交換するプロセスを指し、「緩衝液交換」とも呼ばれる。実施形態では、第2のサイズ分離デバイスは、保管（例えば、4℃、-20℃、または-80℃での検出試薬の保管）に適した緩衝液から、核酸プローブに対する結合反応に適した緩衝液に検出試薬を脱塩するように構成される。実施形態では、第2のサイズ分離デバイスは、透析デバイス、限外濾過デバイス、またはサイズ排除カラムであり、分離デバイスは、分子量が約5000ダルトン以下の分子を、分子量が50,000ダルトンを超える検出試薬から分離するのに適した分画分子量を有する。実施形態では、第2のサイズ分離デバイスは、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスを含む脱塩カラムである。サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスの非限定的な例には、SEPHADEX、SEPHAROSE、SEPHACRYL、ECONO-COLUMN、ECONO-PAC、BIO-SPIN、MICRO BIO-SPINなどが含まれ、列挙されたマトリックス型のそれぞれは、試料中の異なるサイズの化合物を分離するように構成された異なるビーズサイズを含む。実施形態では、脱塩は、重力カラム、スピンカラム、ポンプカラム、または真空系カラムである。

【0343】

実施形態では、検出試薬は、抗原結合物質である。実施形態では、検出試薬は、非核酸検出試薬である。実施形態では、キット構成要素は単一のパッケージに入っている。実施形態では、キット構成要素は、1つ以上のバイアル、パッケージ、または容器に入っている。

【0344】

本明細書に記載のキットで使用される場合、コンジュゲートの検出試薬は、本明細書で提供される任意の検出試薬であり得る。例えば、検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーであり得る。コンジュゲーションキットで適切に使用される検出試薬は、本出願に記載されているアッセイの検出試薬に限定されない。したがって、コンジュゲーションの文脈において、コンジュゲートの検出試薬は、本明細書のアッセイ方法での使用に限定されない。コンジュゲーション法およびコンジュゲート自体の文脈において、検出試薬は、結果として、任意の他の適切かつ適性な用途、例えば、本明細書に明確に記載されていない追加のアッセイ法で 사용할ことができる。

【0345】

2つの抗体を使用した検出方法

実施形態では、本開示は、2つの抗体、具体的には、1つの捕捉抗体および1つの検出抗体を使用して、試料中の目的の分析物を検出する方法を提供する。3抗体（3-A b）形式は特異性の点でいくつかの利点を提供し得る一方、2抗体（2-A b）アッセイ形式は開発しやすく、必要な試薬が少ないため、標的用に利用できる試薬が限られている場合に利点となり得、サイズが小さく、非免疫原性配列が存在し、または非常に可変的な配列が存在するために、結合に利用できる3つの直交エピトープを有しない標的により適している場合がある。

【0346】

2-A bアッセイの課題には、プレート形式とコーティング濃度の決定、実現可能性、アッセイで使用される様々なオリゴヌクレオチドの配列、捕捉抗体およびアンカーオリゴヌクレオチドコーティング濃度、検出抗体および核酸プローブの結合方法、結合効率の評価方法、精製技術、緩衝液構成要素などが含まれる。本開示の組成物および方法は、そのような課題を克服する。

【0347】

実施形態では、本開示は、試料中の目的の分析物を検出する方法を提供し、本方法は、分析物を、（i）分析物の捕捉試薬を含む表面上の捕捉試薬（表面は、ストレプトアビジンでコーティングされ、捕捉試薬はビオチンを含む）、および（ii）核酸プローブを含む分析物のための単一の検出試薬に結合することにより、捕捉試薬、分析物、および検出

試薬を含む表面上に複合体を形成することと、核酸プローブを伸長して伸長配列を形成することと、標識プローブを使用して、表面に結合した伸長配列の量を測定することと、を含む。

【0348】

実施形態では、本開示は、試料中の目的の分析物を検出する方法を提供し、本方法は、分析物を、(i) 分析物の捕捉試薬、およびアンカー試薬を含む表面上の捕捉試薬（表面はストレプトアビジンでコーティングされており、捕捉試薬およびアンカー試薬はビオチンを含む）、ならびに(ii) 核酸プローブを含む分析物のための単一の検出試薬に結合することにより、捕捉試薬、分析物、および検出試薬を含む表面上に複合体を形成することと、核酸プローブを伸長して、アンカー試薬に結合するアンカー領域を含む伸長配列を形成することと、伸長配列をアンカー試薬に結合することと、標識プローブを使用して、表面に結合した伸長配列の量を測定することと、を含む。

10

【0349】

実施形態では、本開示は、分析物を測定する方法を提供し、本方法は、(a) 分析物を、(i) 表面上の結合ドメイン内の捕捉試薬、および(ii) 検出試薬および核酸プローブを含むコンジュゲートに結合することにより、捕捉試薬、分析物、およびコンジュゲートを含む複合体を結合ドメインに形成することと、(b) コンジュゲートの核酸プローブを伸長して、標識プローブのオリゴヌクレオチドに相補的な検出配列相補体を含む伸長配列を形成することと、(c) オリゴヌクレオチドを含む標識プローブを伸長配列に結合することと、(d) 結合ドメインに結合した標識プローブの量を測定することと、を含み、標識プローブは、本開示による標識プローブである。

20

【0350】

実施形態では、本開示は、分析物を測定する方法を提供し、本方法は、(a) 分析物を、(i) 表面上の結合ドメイン内の捕捉試薬であって、結合ドメインが、アンカーオリゴヌクレオチドを含むアンカー試薬をさらに含む、捕捉試薬ならびに(ii) 検出試薬および核酸プローブを含むコンジュゲートに結合することにより、捕捉試薬、分析物、およびコンジュゲートを含む複合体を結合ドメインに形成することと、(b) コンジュゲートの核酸プローブを伸長して、アンカーオリゴヌクレオチドに相補的なアンカーオリゴヌクレオチド相補体および標識プローブのオリゴヌクレオチドに相補的な検出配列相補体を含む伸長配列を形成することと、(c) オリゴヌクレオチドを含む標識プローブを伸長配列に結合することと、(d) 結合ドメインに結合した標識プローブの量を測定することと、を含み、標識プローブは、本開示による標識プローブである。

30

【0351】

実施形態では、本開示は、分析物を測定する方法を提供し、本方法は、(a) 分析物を、(i) 表面上の結合ドメイン内の捕捉試薬、ならびに(ii) 検出試薬と、第1のプローブ配列および隣接する第2のプローブ配列を有するオリゴヌクレオチドを含む核酸プローブと、を含むコンジュゲートに結合することにより、捕捉試薬、分析物、およびコンジュゲートを含む複合体を結合ドメインに形成することと、(b) 複合体の核酸プローブをコネクタオリゴヌクレオチドに結合することであって、コネクタオリゴヌクレオチドが、第1のプローブ配列に相補的な5'末端配列、第2のプローブ配列に相補的な3'末端配列、および標識プローブの検出オリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる配列を含む、核酸プローブをコネクタオリゴヌクレオチドに結合することと、(c) コネクタオリゴヌクレオチドを連結して環状テンプレートオリゴヌクレオチドを形成することと、(d) ローリングサークル増幅によって核酸プローブを伸長して、伸長配列を形成することと、(e) 検出オリゴヌクレオチドを含む標識プローブを伸長配列に結合することと、(f) 結合ドメインに結合した標識プローブの量を測定することと、を含み、標識プローブは、本開示による標識プローブである。

40

【0352】

実施形態では、本開示は、分析物を測定する方法を提供し、本方法は、(a) 分析物を、(i) 表面上の結合ドメイン内の捕捉試薬であって、結合ドメインが、アンカーオリゴ

50

ヌクレオチドを有するアンカー試薬をさらに含む、捕捉試薬ならびに (i i) 検出試薬と、第1のプローブ配列および隣接する第2のプローブ配列を有するオリゴヌクレオチドを含む核酸プローブと、を含むコンジュゲートに結合することにより、捕捉試薬、分析物、およびコンジュゲートを含む複合体を結合ドメインに形成することと、(b) 複合体の核酸プローブをコネクターオリゴヌクレオチドに結合することと、コネクターオリゴヌクレオチドが、第1のプローブ配列に相補的な5'末端配列、第2のプローブ配列に相補的な3'末端配列、アンカーオリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる第1の内部配列、および標識プローブの検出オリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる第2の内部配列を含む、複合体の核酸プローブをコネクターオリゴヌクレオチドに結合することと、(c) コネクターオリゴヌクレオチドを連結して環状テンプレートオリゴヌクレオチドを形成することと、(d) ローリングサークル増幅によって核酸プローブを伸長して、伸長配列を形成することと、(e) 検出オリゴヌクレオチドを含む標識プローブを伸長配列に結合することと、(f) 結合ドメインに結合した標識プローブの量を測定することと、を含み、標識プローブは、本開示による標識プローブである。

【0353】

実施形態では、本発明は、分析物を測定する方法を提供し、本方法は、検出試薬と溶液中の分析物との間に複合体を形成することと、続いて、例えば、RCAによって増幅することと、を含み、増幅産物は、捕捉試薬および／またはアンカー試薬を介して表面に結合する。実施形態では、表面は粒子である。実施形態では、表面は電極である。任意で、増幅産物は、捕捉試薬および／またはアンカー試薬を介して表面に結合する前に濾過される。

【0354】

実施形態では、分析物を測定する方法は、(a) 溶液において、分析物を、(i) 標的試薬を含む捕捉試薬、ならびに (i i) 検出試薬および核酸プローブを含むコンジュゲートに結合することによって、捕捉試薬、分析物、およびコンジュゲートを含む複合体を溶液中で形成することと、(b) コンジュゲートの核酸プローブを伸長して、標識プローブのオリゴヌクレオチドに相補的な検出配列相補体を含む伸長配列を形成することと、(c) 捕捉試薬を、標的試薬に相補的な標的試薬の相補体を含む表面上の結合ドメインに結合することと、(d) オリゴヌクレオチドを含む標識プローブを伸長配列に結合することと、(e) 結合ドメインに結合した標識プローブの量を測定することと、を含み、標識プローブは、本開示による標識プローブである。

【0355】

実施形態では、分析物を測定する方法は、(a) 溶液において、分析物を、(i) 捕捉試薬、ならびに (i i) 検出試薬および核酸プローブを含むコンジュゲートに結合することにより、捕捉試薬、分析物、およびコンジュゲートを含む複合体を溶液中で形成することと、(b) コンジュゲートの核酸プローブを伸長して、アンカーオリゴヌクレオチドに相補的なアンカーオリゴヌクレオチド相補体および標識プローブのオリゴヌクレオチドに相補的な検出配列相補体を含む伸長配列を形成することと、(c) 伸長配列を表面上の結合ドメイン内のアンカーオリゴヌクレオチドに結合することと、(d) オリゴヌクレオチドを含む標識プローブを伸長配列に結合することと、(e) 結合ドメインに結合した標識プローブの量を測定することと、を含み、標識プローブは、本開示による標識プローブである。

【0356】

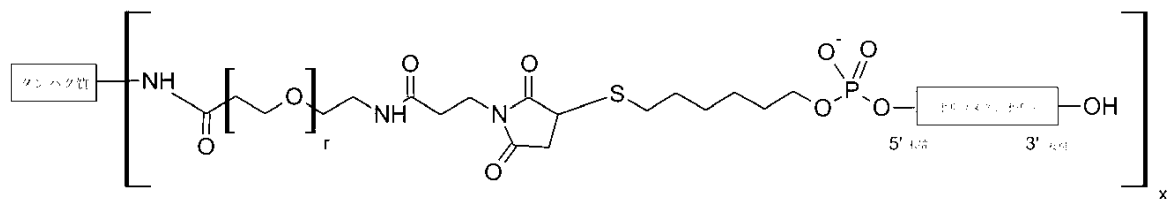
実施形態では、分析物を測定する方法は、(a) 溶液において、分析物を、検出試薬、ならびに第1のプローブ配列および隣接する第2のプローブ配列を有するオリゴヌクレオチドを含む核酸プローブを含むコンジュゲートに結合することによって、分析物およびコンジュゲートを含む複合体を溶液中で形成することと、(b) 複合体の核酸プローブをコネクターオリゴヌクレオチドに結合することと、コネクターオリゴヌクレオチドが、第1のプローブ配列に相補的な5'末端配列、第2のプローブ配列に相補的な3'末端配列、および標識プローブの検出オリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることが

できる配列を含む、複合体の核酸プローブをコネクターオリゴヌクレオチドに結合することと、(c) コネクターオリゴヌクレオチドを連結して環状テンプレートオリゴヌクレオチドを形成することと、(d) ローリングサークル増幅によって核酸プローブを伸長して、アンカーオリゴヌクレオチドに相補的なアンカーオリゴヌクレオチド相補体および標識プローブのオリゴヌクレオチドに相補的な検出配列相補体を含む伸長配列を形成することと、(e) 伸長配列を表面上の結合ドメイン内のアンカー試薬に結合することと、(f) 検出オリゴヌクレオチドを含む標識プローブを伸長配列に結合することと、(g) 結合ドメインに結合した標識プローブの量を測定することと、を含み、標識プローブは、本開示による標識プローブである。

【0357】

実施形態では、本開示は、分析物を測定する方法を提供し、本方法は、(a) 分析物を、(i) 表面上の結合ドメイン内の捕捉試薬および(ii) 式V Iのコンジュゲートに結合することにより、捕捉試薬、分析物、およびコンジュゲートを含む複合体を結合ドメインに形成することであって、

【化24】



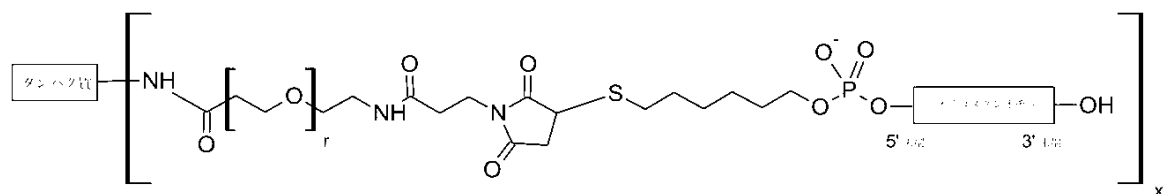
式V I

式中、rが0～24の整数であり、xが1～20の整数であり、-NH-が、タンパク質に由来するアミノ基である、複合体を結合ドメインに形成することと、(b) コンジュゲートの核酸プローブを伸長して伸長配列を形成することと、(c) 結合ドメインに結合した伸長配列の量を測定することと、を含む。

【0358】

実施形態では、本開示は、分析物を測定する方法を提供し、本方法は、(a) 分析物を、(i) 表面上の結合ドメイン内の捕捉試薬であって、結合ドメインがアンカーオリゴヌクレオチドをさらに含む、捕捉試薬および(ii) 式V Iのコンジュゲートに結合することにより、捕捉試薬、分析物、およびコンジュゲートを含む複合体を結合ドメインに形成することであって、

【化25】



式V I

式中、rが0～24の整数であり、xが1～20の整数であり、タンパク質-NH-がタンパク質に由来するアミノ基の共役型である、コンジュゲートを含む複合体を結合ドメインに形成することと、(b) コンジュゲートの核酸プローブを伸長して、アンカーオリゴヌクレオチドに相補的なアンカーオリゴヌクレオチド相補体を含む伸長配列を形成することと、(c) 結合ドメインに結合した伸長配列の量を測定することと、を含む。

【0359】

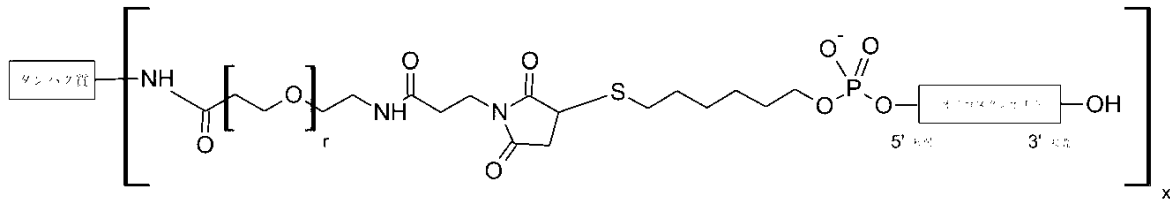
実施形態では、タンパク質は検出試薬である。実施形態では、rは1～20である。実施形態では、rは2～15である。実施形態では、rは3～10である。実施形態では、

r は 4 である。実施形態では、r は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または 24 である。実施形態では、x は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 である。実施形態では、x は、平均で約 2 ～ 4、または約 3 である。

【0360】

実施形態では、本開示は、分析物を測定する方法を提供し、本方法は、(a) 分析物を、(i) 表面上の結合ドメイン内の捕捉試薬および (ii) 式 V I のコンジュゲートに結合することにより、捕捉試薬、分析物、およびコンジュゲートを含む複合体を結合ドメインに形成することであって、

【化 26】



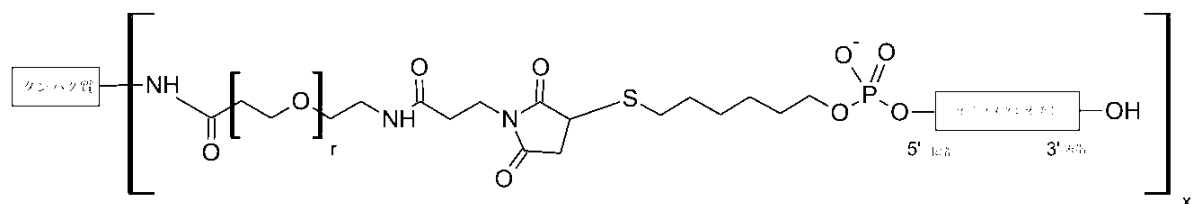
式 V I

式中、「タンパク質」が検出試薬であり、r が 0 ～ 24 の整数であり、x が 1 ～ 20 の整数であり、タンパク質-NH-がタンパク質に由来するアミノ基の共役形態であり、コンジュゲートが、検出試薬と、第 1 のプローブ配列および隣接する第 2 のプローブ配列を有するオリゴヌクレオチドを含む核酸プローブとを含む、複合体を結合ドメインに形成することと、(b) 複合体の核酸プローブをコネクタオリゴヌクレオチドに結合することであって、コネクタオリゴヌクレオチドが、第 1 のプローブ配列に相補的な 5' 末端配列、第 2 のプローブ配列に相補的な 3' 末端配列、および標識プローブの検出オリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる内部配列を含む、複合体の核酸プローブをコネクタオリゴヌクレオチドに結合することと、(c) コネクタオリゴヌクレオチドを連結して環状テンプレートオリゴヌクレオチドを形成することと、(d) ローリングサークル増幅によって核酸プローブを伸長して、伸長配列を形成することと、(e) 検出オリゴヌクレオチドを含む標識プローブを伸長配列に結合することと、(f) 結合ドメインに結合した標識プローブの量を測定することと、を含む。

【0361】

実施形態では、本開示は、分析物を測定する方法を提供し、本方法は、(a) 分析物を、(i) 表面上の結合ドメイン内の捕捉試薬であって、結合ドメインが、アンカーオリゴヌクレオチドを含むアンカーオリゴヌクレオチドをさらに含む、捕捉試薬および (ii) 式 V I のコンジュゲートに結合することにより、捕捉試薬、分析物、およびコンジュゲートを含む複合体を結合ドメインに形成することであって、

【化 27】



式 V I

式中、「タンパク質」が検出試薬であり、r が 0 ～ 24 の整数であり、x が 1 ～ 20 の整数であり、タンパク質-NH-がタンパク質に由来するアミノ基の共役形態であり、コン

ジュゲートが、検出試薬と、第1のプローブ配列および隣接する第2のプローブ配列を有するオリゴヌクレオチドを含む核酸プローブとを含む、コンジュゲートを含む複合体を結合ドメインに形成することと、(b)複合体の核酸プローブをコネクターオリゴヌクレオチドに結合することと、コネクターオリゴヌクレオチドが、第1のプローブ配列に相補的な5'末端配列、第2のプローブ配列に相補的な3'末端配列、アンカーオリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる第1の内部配列、および標識プローブの検出オリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる第2の内部配列を含む、複合体の核酸プローブをコネクターオリゴヌクレオチドに結合することと、(c)コネクターオリゴヌクレオチドを連結して環状テンプレートオリゴヌクレオチドを形成することと、(d)ローリングサークル増幅によって核酸プローブを伸長して、伸長配列を形成することと、(e)検出オリゴヌクレオチドを含む標識プローブを伸長配列に結合することと、(f)結合ドメインに結合した標識プローブの量を測定することと、を含む。

【0362】

実施形態では、タンパク質は検出試薬である。実施形態では、 r は1~20である。実施形態では、 r は2~15である。実施形態では、 r は3~10である。実施形態では、 r は4である。実施形態では、 r は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24である。実施形態では、 x は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20である。実施形態では、 x は、平均で約2~4、または約3である。実施形態では、コンジュゲートは、第1および第2のプローブ配列を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、コンジュゲートは、本明細書で提供される方法によって産生される。

【0363】

実施形態では、本開示は、分析物を測定する方法を提供し、本方法は、(a)分析物を、(i)表面上の結合ドメイン内の捕捉試薬、ならびに(ii)検出試薬、および第1のプローブ配列および隣接する第2のプローブ配列を有するオリゴヌクレオチドを含む核酸プローブを含むコンジュゲートに結合することにより、捕捉試薬、分析物、およびコンジュゲートを含む複合体を結合ドメインに形成することと、(b)複合体の核酸プローブをコネクターオリゴヌクレオチドに結合することと、コネクターオリゴヌクレオチドが、第1のプローブ配列に相補的な5'末端配列、および第2のプローブ配列に相補的な3'末端配列を含む、複合体の核酸プローブをコネクターオリゴヌクレオチドに結合することと、(c)コネクターオリゴヌクレオチドを連結して環状テンプレートオリゴヌクレオチドを形成することと、(d)ローリングサークル増幅によって核酸プローブを伸長して、伸長配列を形成することと、(e)結合ドメインに結合した伸長配列の量を測定することと、を含み、第1および第2のプローブ配列の長さの合計は、14~24ヌクレオチドである。

【0364】

実施形態では、本開示は、分析物を測定する方法を提供し、本方法は、(a)分析物を、(i)表面上の結合ドメイン内の捕捉試薬であって、結合ドメインが、アンカーオリゴヌクレオチドを有するアンカー試薬をさらに含む、捕捉試薬ならびに(ii)検出試薬、および第1のプローブ配列および隣接する第2のプローブ配列を有するオリゴヌクレオチドを含む核酸プローブを含むコンジュゲートに結合することにより、捕捉試薬、分析物、およびコンジュゲートを含む複合体を結合ドメインに形成することと、(b)複合体の核酸プローブをコネクターオリゴヌクレオチドに結合することと、コネクターオリゴヌクレオチドが、第1のプローブ配列に相補的な5'末端配列、第2のプローブ配列に相補的な3'末端配列、アンカーオリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる内部配列を含む、複合体の核酸プローブをコネクターオリゴヌクレオチドに結合することと、(c)コネクターオリゴヌクレオチドを連結して環状テンプレートオリゴヌクレオチドを形成することと、(d)ローリングサークル増幅によって核酸プローブを伸長して、伸長配列を形成することと、(e)結合ドメインに結合した伸長配列の量を測定するこ

と、を含み、第1および第2のプローブ配列の長さの合計は、14～24ヌクレオチドである。

【0365】

実施形態では、本開示は、分析物を測定する方法を提供し、本方法は、(a) 分析物を、(i) 表面上の結合ドメイン内の捕捉試薬、ならびに(ii) 検出試薬と、第1のプローブ配列および第2のプローブ配列を有するオリゴヌクレオチドを含む核酸プローブと、を含むコンジュゲートに結合することにより、捕捉試薬、分析物、およびコンジュゲートを含む複合体を結合ドメインに形成することと、(b) 複合体の核酸プローブをコネクタ-オリゴヌクレオチドに結合することと、コネクタ-オリゴヌクレオチドが、第1のプローブ配列に相補的な5'末端配列、第2のプローブ配列に相補的な3'末端配列、および標識プローブの検出オリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる内部配列を含む、複合体の核酸プローブをコネクタ-オリゴヌクレオチドに結合することと、(c) コネクタ-オリゴヌクレオチドを連結して環状テンプレートオリゴヌクレオチドを形成することと、(d) ローリングサークル増幅によって核酸プローブを伸長して、伸長配列を形成することと、(e) 検出オリゴヌクレオチドを含む標識プローブを伸長配列に結合することと、(f) 結合ドメインに結合した標識プローブの量を測定することと、を含み、第1および第2のプローブ配列の長さの合計は、14～24ヌクレオチドである。

10

【0366】

実施形態では、本開示は、分析物を測定する方法を提供し、本方法は、(a) 分析物を、(i) 表面上の結合ドメイン内の捕捉試薬であって、結合ドメインが、アンカーオリゴヌクレオチドを有するアンカー試薬をさらに含む、捕捉試薬ならびに(ii) 検出試薬と、第1のプローブ配列および第2のプローブ配列を有するオリゴヌクレオチドを含む核酸プローブと、を含むコンジュゲートに結合することにより、捕捉試薬、分析物、およびコンジュゲートを含む複合体を結合ドメインに形成することと、(b) 複合体の核酸プローブをコネクタ-オリゴヌクレオチドに結合することと、コネクタ-オリゴヌクレオチドが、第1のプローブ配列に相補的な5'末端配列、第2のプローブ配列に相補的な3'末端配列、アンカーオリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる第1の内部配列、および標識プローブの検出オリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる第2の内部配列を含む、複合体の核酸プローブをコネクタ-オリゴヌクレオチドに結合することと、(c) コネクタ-オリゴヌクレオチドを連結して環状テンプレートオリゴヌクレオチドを形成することと、(d) ローリングサークル増幅によって核酸プローブを伸長して、伸長配列を形成することと、(e) 検出オリゴヌクレオチドを含む標識プローブを伸長配列に結合することと、(f) 結合ドメインに結合した標識プローブの量を測定することと、を含み、第1および第2のプローブ配列の長さの合計は、14～24ヌクレオチドである。

20

30

【0367】

実施形態では、核酸プローブは、長さが約10～約30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約12～約28ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約13～約26ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約14～約24ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約11～約22ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約12～約21ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約13～約20ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約14～約18ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。

40

【0368】

実施形態では、第1および第2のプローブ配列の長さの合計は、約10～約30ヌクレオチドである。実施形態では、第1および第2のプローブ配列の長さの合計は、約12～約28ヌクレオチドである。実施形態では、第1および第2のプローブ配列の長さの合計

50

は、約 13～約 26 ヌクレオチドである。実施形態では、第 1 および第 2 のプローブ配列の長さの合計は、約 14～約 24 ヌクレオチドである。実施形態では、第 1 および第 2 のプローブ配列の長さの合計は、約 11～約 22 ヌクレオチドである。実施形態では、第 1 および第 2 のプローブ配列の長さの合計は、約 12～約 21 ヌクレオチドである。実施形態では、第 1 および第 2 のプローブ配列の長さの合計は、約 13～約 20 ヌクレオチドである。実施形態では、第 1 および第 2 のプローブ配列の長さの合計は、約 14～約 18 ヌクレオチドである。

【0369】

実施形態では、核酸プローブは、長さが約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、または約 30 ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約 14 ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約 15 ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-GACAGAACTAGACAC-3' (配列番号 33) の 14 または 15 個の連続したヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、オリゴヌクレオチドを含み、オリゴヌクレオチドは、長さが 14～24 ヌクレオチドであり、5'-GACAGAACTAGACAC-3' (配列番号 33) の 14 または 15 個の連続したヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-GACAGAACTAGACAC-3' (配列番号 33) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-ACAGAACTAGACAC-3' (配列番号 40) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-GACAGAACTAGACA-3' (配列番号 41) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-TGCAACAGCTCGACGC-3' (配列番号 42) を含むオリゴヌクレオチドを含む。

【0370】

実施形態では、第 1 および第 2 のプローブ配列は、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、または約 30 ヌクレオチドの合計長さを有する。実施形態では、第 1 および第 2 のプローブ配列は、約 14 ヌクレオチドの合計長さを有する。実施形態では、第 1 および第 2 のプローブ配列は、約 15 ヌクレオチドの合計長さを有する。実施形態では、第 1 および第 2 のプローブ配列の組み合わせは、配列 5'-GACAGAACTAGACAC-3' (配列番号 33) の 14 または 15 個の連続したヌクレオチドを含む。実施形態では、第 1 および第 2 のプローブ配列の組み合わせは、長さが 14～24 ヌクレオチドであり、配列 5'-GACAGAACTAGACAC-3' (配列番号 33) の 14 または 15 個の連続したヌクレオチドを含む。実施形態では、第 1 および第 2 のプローブ配列の組み合わせは、配列 5'-GACAGAACTAGACAC-3' (配列番号 33) を含む。実施形態では、第 1 および第 2 のプローブ配列の組み合わせは、配列 5'-ACAGAACTAGACAC-3' (配列番号 40) を含む。実施形態では、第 1 および第 2 のプローブ配列の組み合わせは、配列 5'-GACAGAACTAGACA-3' (配列番号 41) を含む。実施形態では、第 1 および第 2 のプローブ配列の組み合わせは、配列 5'-TGCAACAGCTCGACGC-3' (配列番号 42) を含む。

【0371】

実施形態では、核酸プローブは、反応性官能基を含む非天然の 5' 修飾を含む。官能基の非限定的な例には、例えば、アルケンおよび歪んだアルケン、アルキン、ハロゲン化物、アルコール、チオール、アミン、ホスフェート、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、カルボキシレート、アミド、エステル、チオエステル、アシルホスフェート、酸ハロゲン化物、ニトリル、酸無水物、ヒドラジン、テトラジン、アジドなどが含まれる。実施形態では、反応性官能基は、チオール、アミン、カルボン酸、活性エステル、ヒドラジン、アルデヒド、ケトン、アルキン、歪んだアルケン、アジド、またはテトラジンである。実施形態では、反応性官能基はチオールである。実施形態では、反応性官能基はテトラジンである

。実施形態では、反応性官能基は、ビニルまたは歪んだアルケンである。実施形態では、反応性官能基はアジドである。実施形態では、反応性官能基は、アルキンまたは歪んだアルキンである。実施形態では、反応性官能基は、4-ホルミルベンズアミドである。実施形態では、反応性官能基はヒドラジノニコチンアミドである。

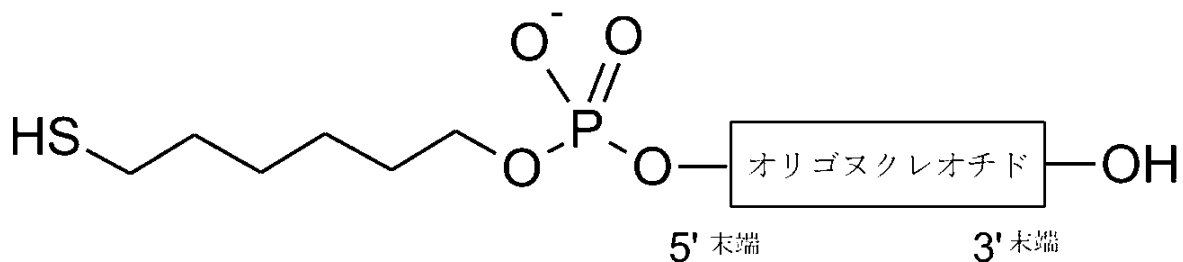
【0372】

実施形態では、非天然の5'修飾は、本開示のヘテロニ官能性架橋剤と反応することができる。実施形態では、非天然の5'修飾は、マレイミド、ヨードアセトアミド、または活性化ジスルフィドと反応することができる。実施形態では、非天然の5'修飾は、テトラジンと反応することができる。実施形態では、非天然の5'修飾は、ビニルまたは歪んだアルケンと反応することができる。実施形態では、非天然の5'修飾は、アジドと反応することができる。実施形態では、非天然の5'修飾は、アルキンまたは歪んだアルキンと反応することができる。実施形態では、非天然の5'修飾は、ヒドラジノニコチンアミドと反応することができる。実施形態では、非天然の5'修飾は、4-ホルミルベンズアミドと反応することができる。

【0373】

実施形態では、核酸プローブは、式IIIAのものであり、

【化28】



式IIIA

反応性官能基を含み、反応性官能基は、チオール、アミン、カルボン酸、活性エステル、ヒドラジン、アルデヒド、ケトン、アルキン、歪んだアルケン、アジドまたはテトラジンである。

【0374】

実施形態では、核酸プローブは、ハプテンまたはビオチンを含む、非天然の5'修飾をさらに含む。実施形態では、ハプテンは、フルオレセイン、ジニトロフェニル、またはジゴキシゲニンを含む。実施形態では、修飾はビオチンを含む。

【0375】

実施形態では、核酸プローブは、式IVのものである。

10

20

30

40

50

NC1=NC(=O)NC2=C1S[C@H](CCCCC(=O)NCCOCCOP(=O)([O-])OCC3=CC=CC=C3O)C2

オリゴヌクレオチド

5'末端 3'末端

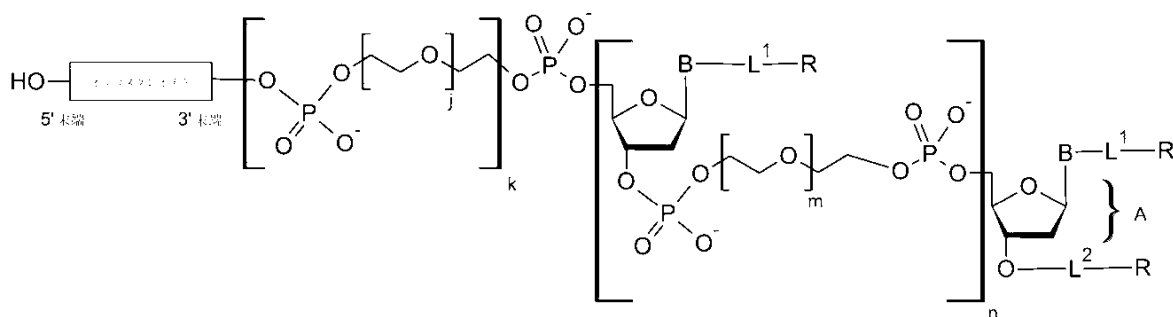
10

実施形態では、核酸プローブは、テンプレート核酸配列上の1つ以上の配列に相補的な1つ以上の配列を含む。実施形態では、テンプレート核酸配列は、環状核酸テンプレート、または直鎖核酸テンプレートであり、直鎖核酸テンプレートは連結されて（核酸プローブに1度ハイブリダイズすると）環状核酸テンプレートを形成することができる。実施形態では、環状核酸テンプレートは、ローリングサークル増幅（RCA）用のテンプレートである。実施形態では、核酸プローブは、RCA反応用のプライマーであり、すなわち、環状核酸テンプレートを伸長して、伸長配列を形成する。

20

実施形態では、標識プローブは、オリゴヌクレオチドおよび電気化学発光部分を含む。実施形態では、標識プローブは、1つ以上の電気化学発光標識を含む。実施形態では、標識プローブは、オリゴヌクレオチドおよび複数の電気化学発光標識を含む。実施形態では、標識プローブは、(i) オリゴヌクレオチドの修飾ヌクレオチド塩基に連結された1つ以上（または2つ以上）の標識、(ii) 1つ以上（または2つ以上）の標識を有する標識部分（オリゴヌクレオチドの5'末端に連結されている部分）、(iii) 1つ以上（または2つ以上）の標識を有する標識部分（オリゴヌクレオチドの3'末端に連結されている部分）、または(iv) (i)、(ii) および (iii) の2つ以上の組み合わせを含む。実施形態では、標識プローブは、式Iのものであり、

30



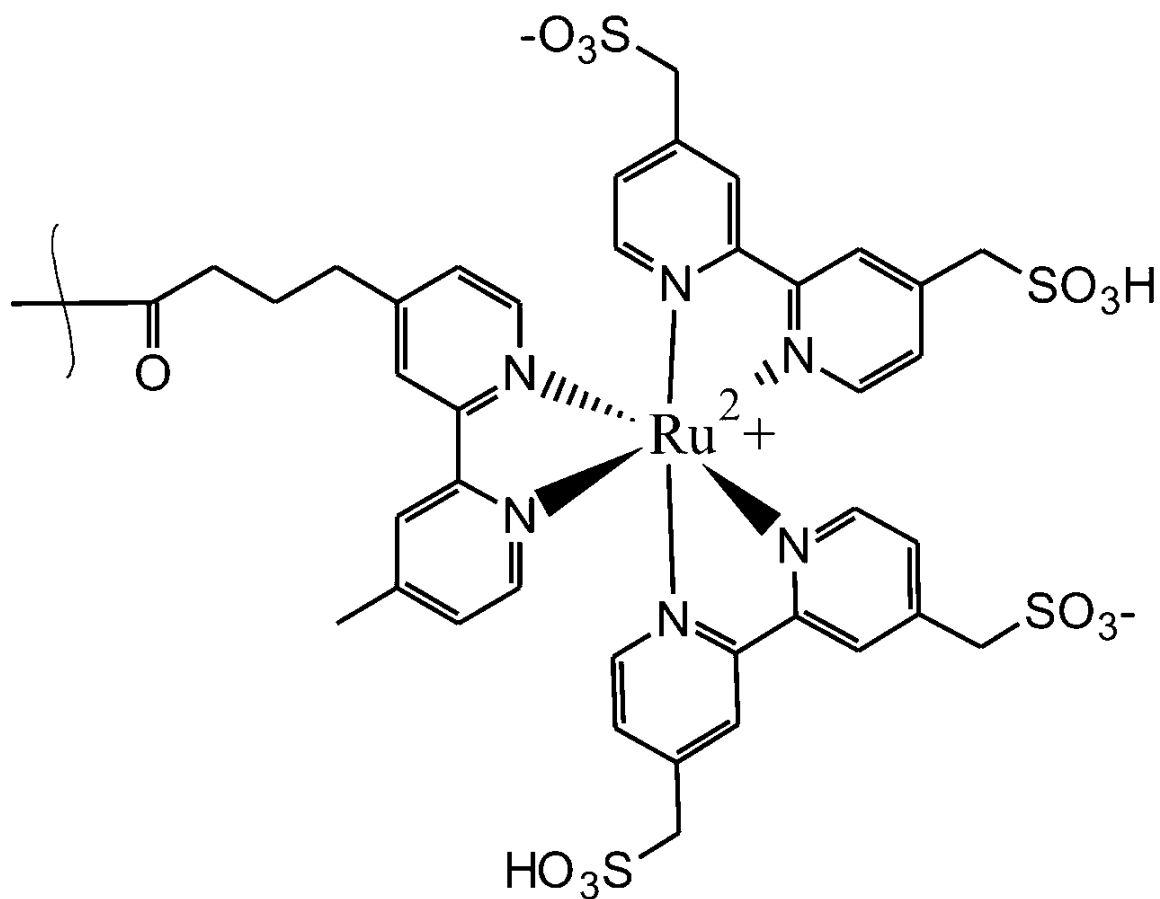
40

式中、Bはヌクレオチド塩基であり、Rは電気化学発光標識であり、 L^1 は連結基であり、 L^2 は連結基であり、jは0～11の整数であり、kは0～1の整数であり、mは0～11の整数であり、nは0～5の整数である。

実施形態では、Rはルテニウム錯体 $RP^1P^2P^3$ を含み、 P^1 、 P^2 および P^3 のそれぞれは独立して、ビピリジン、置換ビピリジン、フェナントロリン、または置換フェナントロリンである。実施形態では、化学発光標識Rは、

50

【化 3 1】



である。

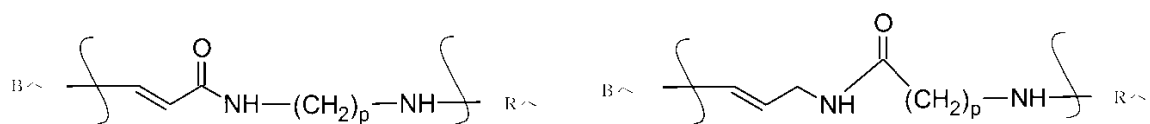
【0379】

実施形態では、Bは、ウラシルの5位でL¹に付着したウラシルである。

【0380】

実施形態では、L¹は、

【化 3 2】



またはそれらの組み合わせを含み、pは1～12の整数である。

【0381】

実施形態では、L²は、

10

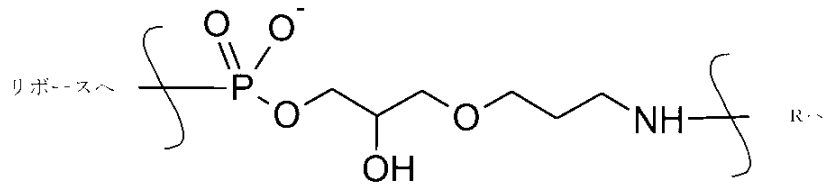
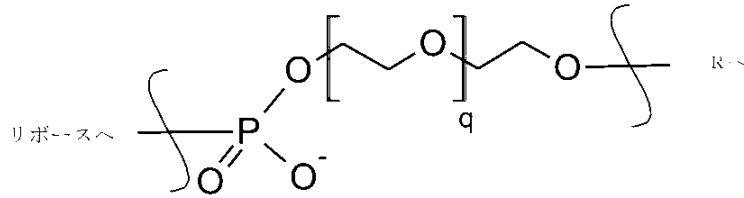
20

30

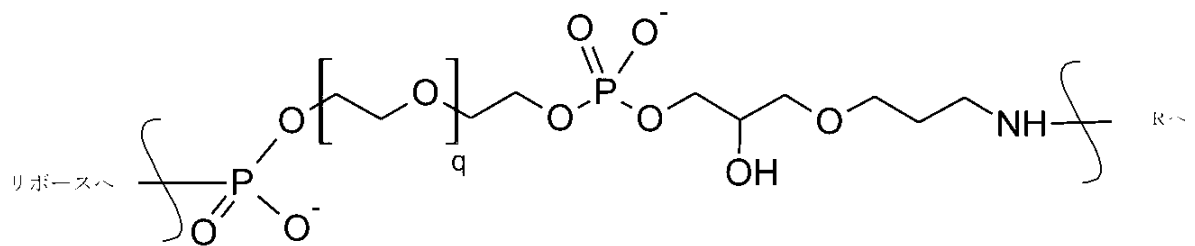
40

50

【化 3 3】



10



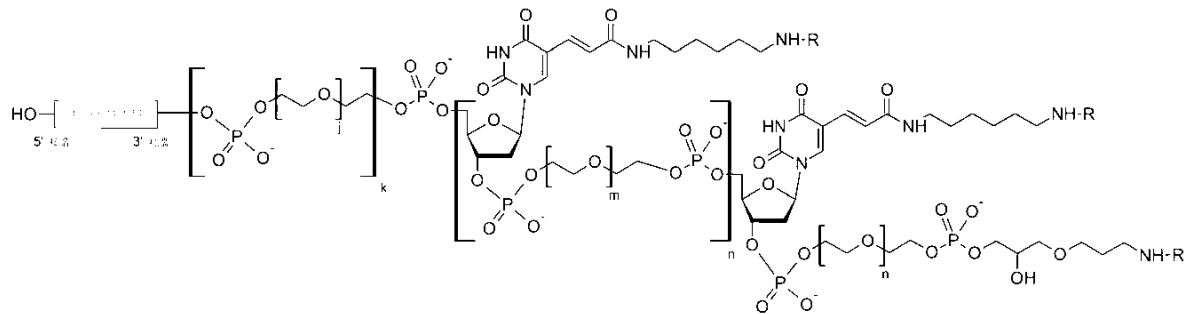
20

またはそれらの組み合わせを含み、 q は 0 ～ 11 の整数である。

【 0 3 8 2】

実施形態では、本開示は、式 I I の標識プローブを提供し、

【化 3 4】



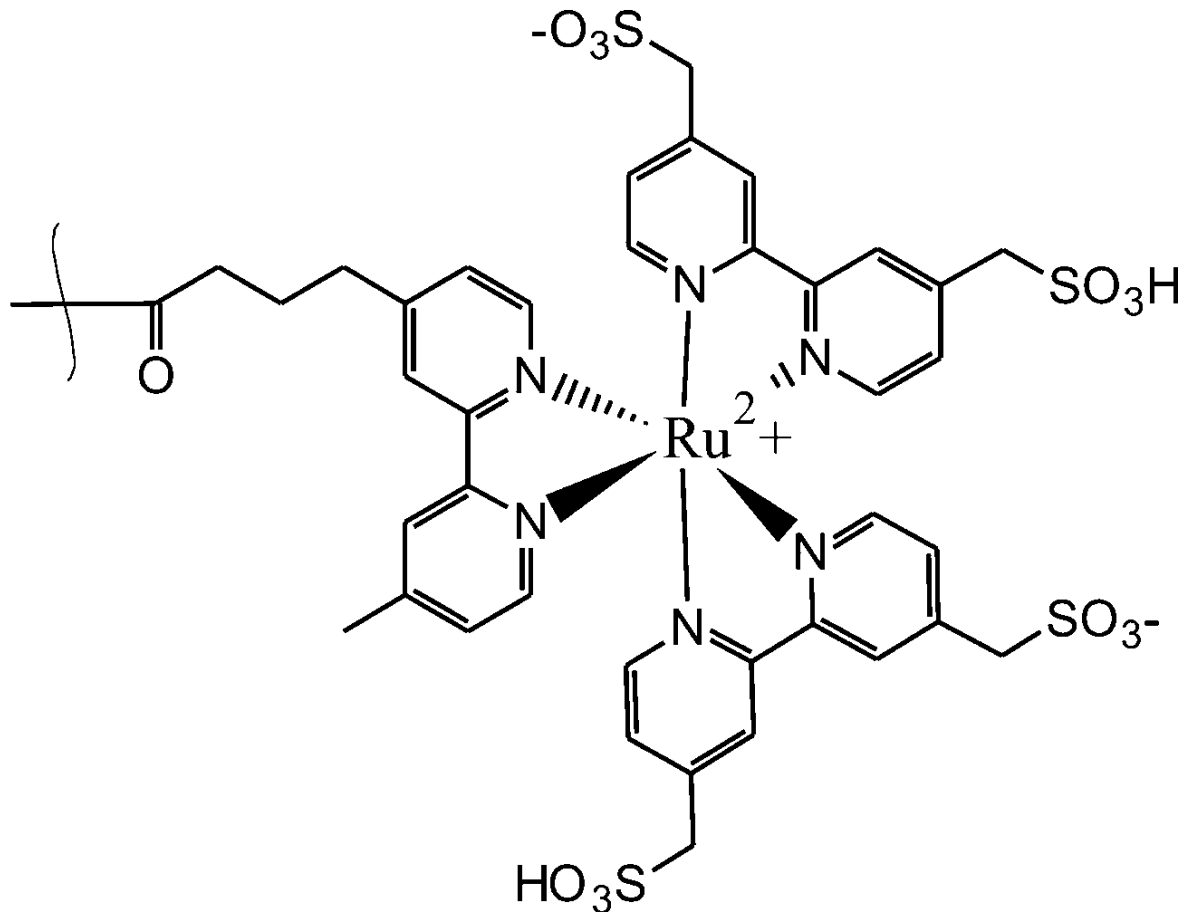
30

式 I I

式中、 j は 0 ～ 11 の整数であり、 k は 0 ～ 1 の整数であり、 m は 0 ～ 11 の整数であり、 n は 0 ～ 5 の整数であり、 R は、電気化学発光標識：

40

【化 3 5】



である。実施形態では、 j は 0 ～ 5 の整数であり、 k は 0 であり、 m は 0 ～ 5 の整数であり、 n は 2 ～ 7 の整数である。実施形態では、 k は 0 であり、 j は 0 であり、 m は 1 であり、 n は 5 である。

【0383】

実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 NO: 31) と、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または約 100% の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 85% の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 88% の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 95% の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 98% の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G

TCT-3'（配列番号31）と少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。

【0384】

実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5'-CAGTGAATGCGAGTCCGTCCT-3'（配列番号31）を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5'-CAGTGAATGCGAGTCCGTCCTAAG-3'（配列番号32）を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される1つ以上の修飾を含む。実施形態では、標識プローブは、アミノ修飾因子を含む。実施形態では、標識プローブは、内部アミノ修飾dT塩基（iAmMC6T）を含む。実施形態では、標識プローブは、内部スパーサー18（iSp18）を含む。実施形態では、標識プローブは、3'アミノ修飾因子（3AmMO）を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5'-CAGTGAATGCGAGTCCGTCCTAAG/iAmMC6T/iSp18/iAmMC6T/iSp18/3AmMO/-3'（修飾を有する配列番号44）を含む。

10

【0385】

実施形態では、核酸プローブは、コネクターオリゴヌクレオチドの一部に相補的である。実施形態では、第1および第2のプローブ配列は、コネクターオリゴヌクレオチドの異なる部分にそれぞれ相補的である。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、直鎖オリゴヌクレオチドである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、増幅用のテンプレートオリゴヌクレオチドである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、連結されてRCA用の環状テンプレートオリゴヌクレオチドを形成する。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドの5'末端配列は、第1または第2のプローブ配列の一方に相補的であり、コネクターオリゴヌクレオチドの3'末端配列は、第1または第2のプローブ配列の他方に相補的である。

20

【0386】

実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドの第1の内部配列は、アンカー試薬のアンカーオリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドの第1の内部配列は、アンカーオリゴヌクレオチドと、70%、少なくとも70%、75%、少なくとも75%、80%、少なくとも80%、85%、少なくとも85%、90%、少なくとも90%、95%、少なくとも95%、97%、少なくとも97%、98%、少なくとも98%、99%、または少なくとも99%または100%の配列同一性を有する。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドから増幅された伸長配列は、アンカーオリゴヌクレオチドに相補的な配列を含む。

30

【0387】

実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドの第2の内部配列は、標識プローブのオリゴヌクレオチド（検出オリゴヌクレオチド）の相補体にハイブリダイズすることができる。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドの第2の内部配列は、標識プローブの検出オリゴヌクレオチドと、70%、少なくとも70%、75%、少なくとも75%、80%、少なくとも80%、85%、少なくとも85%、90%、少なくとも90%、95%、少なくとも95%、97%、少なくとも97%、98%、少なくとも98%、99%、または少なくとも99%または100%の配列同一性を有する。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドから増幅された伸長配列は、標識プローブの検出オリゴヌクレオチドに相補的な配列を含む。

40

【0388】

実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、長さが約53～約76ヌクレオチドであり、その5'末端に配列5'-GTTCTGTC-3'を、その3'末端に配列5'-GTGTCCTA-3'を含む。オリゴヌクレオチドの5'末端（end）配列および3'末端（end）配列は、それぞれ5'末端（terminal）配列および3'末端（terminal）配列と呼ばれることもある。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、5'-CAGTGAATGCGAGTCCGTCCTAAG-3'（配列番号34）および5'-AAGAGAGTAGTACAGCA-3'（配列番号35）を含む。実施形態では、コネ

50

クターオリゴヌクレオチドは、約40～約100ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約50～約78ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約53～約76ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約50～約70ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約53～約61ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約54～約61ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約61ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約53、約54、約55、約56、約57、約58、約59、約60、約61、約62、約63、約64、約65、約66、約67、約68、約69、約70、約71、約72、約73、約74、約75、または約76ヌクレオチドの長さであり、その5'末端に配列5'-GTTCTGTCTC-3'を、3'末端に配列5'-GTGTCCTA-3'を含む。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、5'末端ホスフェート基をさらに含む。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、その5'末端に配列5'-GTTCTGTCTC-3'を、その3'末端に配列5'-GTGTCCTA-3'を含む。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、5'末端ホスフェートを含む。

【0389】

実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、5'-GTTCTGTCTCATATTT CAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGAGAGTAGTACAGCAAGA GTGTCCTA-3'（配列番号36）からなる。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、5'-GCTGTGTGCAATATTT CAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGA GAGTAGTACAGCAAGAGCGTCGA-3'（配列番号43）からなる。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、5'末端ホスフェート基をさらに含む。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、連結されて環状オリゴヌクレオチド、例えば、環状RCAテンプレートを形成することができる直鎖オリゴヌクレオチドである。

【0390】

実施形態では、本開示のアンカーオリゴヌクレオチドは、従来のアンカーオリゴヌクレオチドよりも短い。核酸プローブおよびテンプレートオリゴヌクレオチドと同様に、より短いアンカーオリゴヌクレオチドは、合成および精製がより容易でより安価であるという利点を提供する。より短いアンカーオリゴヌクレオチドはまた、試料に存在し得る結合試薬、例えば、血液試料に存在し得る抗DNA抗体からの非特異的結合を減少させることにより、アッセイ感度を増加させ得る。実施形態では、アンカー試薬は、アンカーオリゴヌクレオチドを含み、アンカーオリゴヌクレオチドは、約10～約30ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、約15～約28ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、約17～約25ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、または約25ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、5'-AAGAGAGTAGTACAGCA-3'（配列番号35）を含む。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、5'-AAGAGAGTAGTACAGCAGCCGTCAA-3'（配列番号37）からなる。実施形態では、アンカー試薬は、アミノ修飾因子を含む。実施形態では、アミノ修飾因子は、5'アミノ修飾因子C6（5AmMC6）である。いくつかの実施形態では、アミノ修飾因子は、3'アミノ修飾dT塩基（3AmMC6T）である。実施形態では、アンカー試薬は、5'-/5AmMC6/AAGAGAGTAGTACAGCAGCCGTCAA/3AmMC6T/3'（修飾を有する配列番号45）を含む。

【0391】

実施形態では、アンカー試薬は、分析物を捕捉試薬に結合する前、結合中、または結合した後に表面に付着する。したがって、キットを含む実施形態では、アンカー試薬は、表面とは別個に提供され、次いで表面に固定され得、表面は、その上に固定された捕捉試薬を含む。実施形態では、捕捉試薬が表面に固定された後、分析物を含む試料の添加前に、

アンカー試薬が表面に固定される。実施形態では、分析物を含む試料を、固定された捕捉試薬を含む表面に添加する間に、アンカー試薬が表面に固定される。実施形態では、アンカー試薬は、分析物、捕捉試薬、および検出試薬を含む複合体の形成後に表面に固定される。実施形態では、アンカー試薬は、検出試薬と同時に表面に添加される。実施形態では、アンカー試薬は、伸長工程の前に表面に添加される。実施形態では、洗浄工程は、表面へのアンカー試薬の添加に先行する。分析物を含む試料が表面に添加された後にアンカー試薬が添加され、アンカー試薬が添加される前に洗浄工程が行われる実施形態では、洗浄工程は、例えば、分析物-DNA相互作用または抗DNA反応性（例えば、抗DNA抗体と）、DNA結合タンパク質、または試料のDNAもしくはRNAなどの試料-DNA相互作用による潜在的な干渉を除去する。実施形態では、アンカー試薬および捕捉試薬は、異なる標的試薬を含み、表面は、異なる標的試薬に結合することができる標的試薬の相補体を含む。いくつかの実施形態では、標的試薬の相補体は抗体であり、アンカー試薬は、抗体標的試薬の相補体に結合することができる抗原を含む。例えば、アンカー試薬はジニトロフェノール（DNP）を含み得、表面は抗DNP抗体を含み得る。

10

【0392】

実施形態では、捕捉試薬および／または検出試薬はタンパク質である。実施形態では、捕捉試薬および／または検出試薬は、抗原結合物質である。実施形態では、捕捉試薬および／または検出試薬は抗体である。実施形態では、捕捉試薬および検出試薬は、抗原結合物質である。実施形態では、捕捉試薬および検出試薬は抗体である。

【0393】

捕捉試薬および検出試薬、例えば、捕捉抗体および検出抗体の選択、ならびにそれらの性能は、親和性、純度、分解、凝集、オフレート、および他の分析物および抗体への非特異的結合を含む抗体特性に依存する。低レベルの分解および凝集を有することを特徴とする高親和性結合抗体が好ましい場合がある。

20

【0394】

アッセイの感度、特異性、および形式は、捕捉抗体および検出抗体の選択によって影響を受ける可能性があり、それぞれが分析物上の異なる非重複エピトープを認識する必要がある。通常、抗体対を特定する最も包括的な方法は、抗体の各組み合わせを捕捉抗体および検出抗体として試験することである。

【0395】

多くのアッセイでは、捕捉抗体と検出抗体の両方がモノクローナル抗体であることが好ましく、それぞれが固有のエピトープを認識する。モノクローナル抗体は通常、ロットからロットへの複製が容易であり、大量に産生できるため、アッセイの寿命が長くなる。2つのモノクローナル抗体の選択は、試薬の入手可能性または望ましい感度のために不可能な場合がある。実施形態では、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の両方が使用される場合、モノクローナル抗体を捕捉抗体として使用し、ポリクローナル抗体を検出抗体として使用することが好ましい。

30

【0396】

ポリクローナル抗体を使用することの潜在的な利点は、異なるエピトープを認識する複数の抗体を含む可能性があり、より高い結合活性をもたらすことである。ポリクローナル抗体がアフィニティー精製されていない場合、非特異性の問題またはアッセイ性能の低下につながり得る非特異的抗体が含まれている。アフィニティー精製されたポリクローナル抗体は、タンパク質AまたはGによって精製されたものよりも高い特異性を有するが、各ロットは抗体の異なる混合物であり得るため、依然ロット間のばらつきを示す可能性がある。ポリクローナル抗体を捕捉抗体として使用する場合、検出抗体エピトープを共有または遮断する抗体の集団が含まれている可能性があり、シグナルまたは感度の低下につながる。

40

【0397】

方法の実施形態では、アンカー試薬および捕捉試薬は、標的試薬の相補体に結合することができる標的試薬をそれぞれ含み、結合ドメインは、その上に固定された標的試薬の相

50

補体を含み、本方法は、アンカー試薬および捕捉試薬を結合ドメインに結合することをさらに含む。標的試薬および標的試薬の相補体の使用を介して試薬を結合ドメインに固定する方法、アレイを形成するためのこれらの方法の使用、アッセイにおけるこれらのアレイの使用、ならびに例示的な標的試薬および標的試薬の相補体は、米国特許第10,189,023号に記載されている。例えば、標的試薬の使用を介して、捕捉試薬およびアンカー試薬を表面に直接または間接的に固定する方法が本明細書に記載されている。実施形態では、標的試薬および標的試薬の相補体は、アビジン-ビオチン、ストレプトアビジン-ビオチン、抗体-ハプテン、抗体-抗原、抗体-エピトープタグ、核酸-相補的核酸、アダプター-アダプター標的、および受容体-リガンドから選択される結合相手対の2つのメンバーである。実施形態では、標的試薬はビオチンであり、標的試薬の相補体はストレプトアビジンである。

10

【0398】

本発明で使用するのに適した表面が本明細書で提供され、結合アッセイの分野で固相担体として使用される表面が含まれる。実施形態では、表面は粒子である。実施形態では、表面はビーズである。粒子およびビーズの非限定的な例が本明細書に提供され、ビーズ-アレイアッセイ形式で使用されるビーズ（LUMINEX商標で販売されるものなど）および磁気ビーズ（Roche ELECSYS電気化学発光アッセイで使用されるものなど）が含まれる。実施形態では、表面は、マルチウェルプレートのウェルを含む。実施形態では、表面は、複数の別個の結合ドメインを含む。実施形態では、表面は電極を含む。実施形態では、電極は、カーボンインク電極である。実施形態では、表面は電極を含み、本方法の検出工程は、電極に電位を印加することと、電気化学発光を測定することと、を含む。実施形態では、電極に電位を印加すると、電気化学発光シグナルが生成する。

20

【0399】

マルチプレックス方法

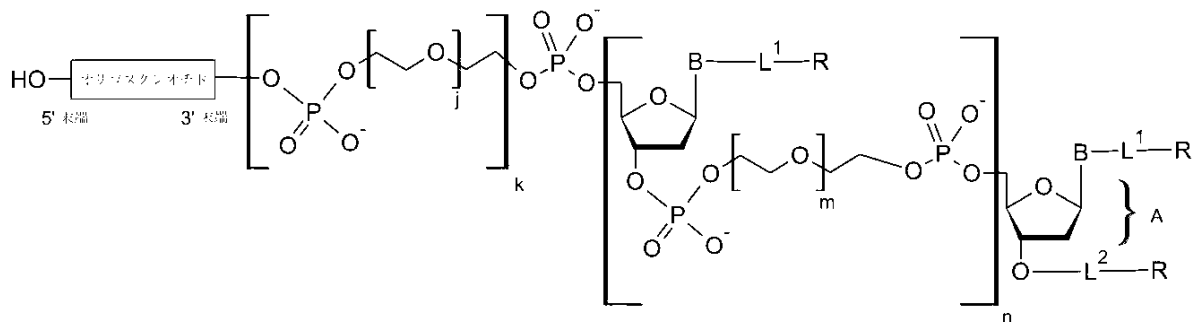
実施形態では、本開示は、複数の分析物を測定するための方法を提供する。実施形態では、本方法は、本明細書で提供される分析物を測定する方法の1つ以上の工程を繰り返して、1つ以上の追加の分析物を測定することを含み、各分析物は、同じ表面または異なる表面上の異なる結合ドメインで異なる捕捉試薬に結合する。

【0400】

実施形態では、1つ以上の追加の分析物の各分析物についての標識プローブは、式Iの化合物であり、

30

【化36】



40

式 I

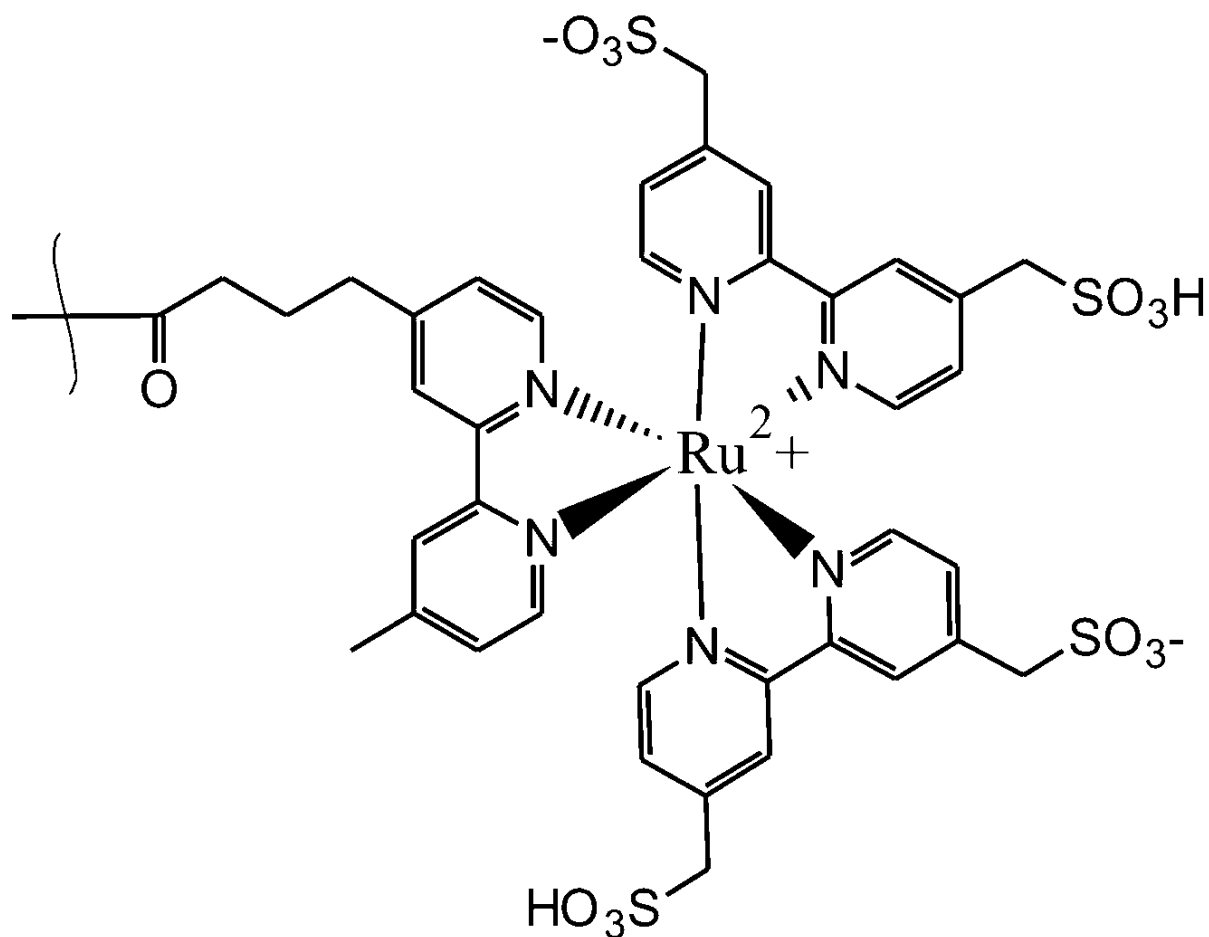
式中、Bはヌクレオチド塩基であり、Rは電気化学発光標識であり、 L^1 は連結基であり、 L^2 は連結基であり、jは0～11の整数であり、kは0～1の整数であり、mは0～11の整数であり、nは0～5の整数である。

【0401】

実施形態では、Rはルテニウム錯体 $RP^1P^2P^3$ を含み、 P^1 、 P^2 および P^3 のそれぞれは独立して、ビピリジン、置換ビピリジン、フェナントロリン、または置換フェナントロリンである。実施形態では、化学発光標識Rは、

50

【化 3 7】



である。

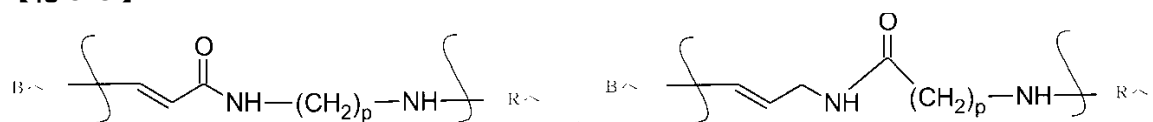
【0402】

実施形態では、Bは、ウラシルの5位でL¹に付着したウラシルである。

【0403】

実施形態では、L¹は、

【化 3 8】



またはそれらの組み合わせを含み、pは1～12の整数である。

【0404】

実施形態では、L²は、

10

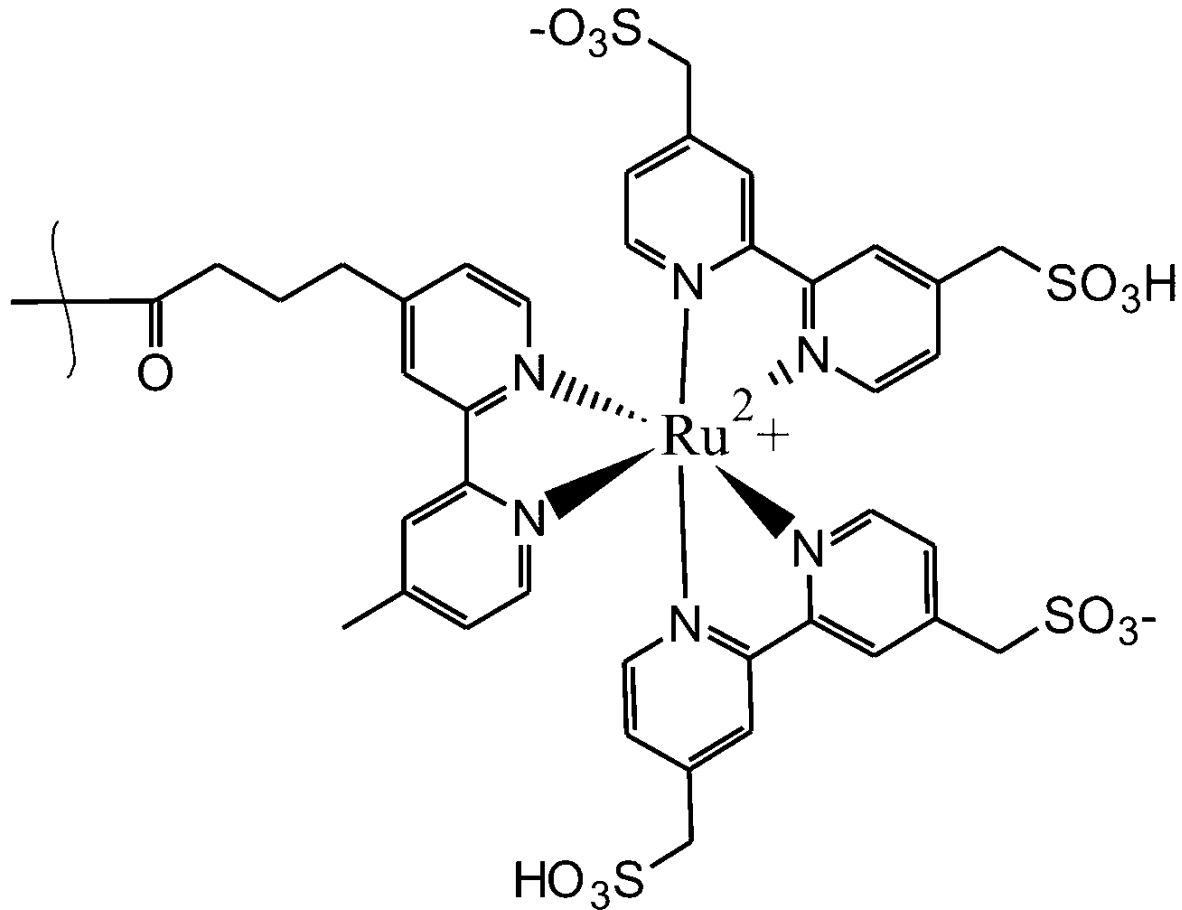
20

30

40

50

【化 4 1】



である。実施形態では、 j は 0 ～ 5 の整数であり、 k は 0 であり、 m は 0 ～ 5 の整数であり、 n は 2 ～ 7 の整数である。実施形態では、 k は 0 であり、 j は 0 であり、 m は 1 であり、 n は 5 である。

【0406】

実施形態では、各分析物に使用される標識プローブは、同じオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、5' - CAGTGAATGCGAGTCCGTC T - 3' (配列番号 31) からなる。

【0407】

実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - CAGTGAATGCGAGTCCGTC T - 3' (配列番号 NO: 31) と、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または約 100% の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - CAGTGAATGCGAGTCCGTC T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 85% の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - CAGTGAATGCGAGTCCGTC T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 88% の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - CAGTGAATGCGAGTCCGTC T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - CAGTGAATGCGAGTCCGTC T -

3'（配列番号31）と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5'-CAGTGAATGCGAGTCCGTC T-3'（配列番号31）と少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5'-CAGTGAATGCGAGTCCG TCT-3'（配列番号31）と少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。

【0408】

実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5'-CAGTGAATGCGA GTCCGTC T-3'（配列番号31）を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5'-CAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAG-3'（配列番号32）を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される1つ以上の修飾を含む。実施形態では、標識プローブは、アミノ修飾因子を含む。実施形態では、標識プローブは、内部アミノ修飾dT塩基（iAmMC6T）を含む。実施形態では、標識プローブは、内部スパーサー18（iSp18）を含む。実施形態では、標識プローブは、3'アミノ修飾因子（3AmMO）を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5'-CAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAG/iAmMC6T/iSp18/iAmMC6T/iSp18/3AmMO-3'（修飾を有する配列番号44）を含む。

【0409】

実施形態では、1つ以上の追加の分析物の各分析物についてのコネクターオリゴヌクレオチドは、5'末端ホスフェート基をさらに含む。実施形態では、各分析物のコネクターオリゴヌクレオチドは、53〜61ヌクレオチドの長さである。実施形態では、各分析物に使用されるコネクターオリゴヌクレオチドは同じ配列を有する。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、長さが約53〜約76ヌクレオチドであり、その5'末端に配列5'-GTTCTGTCTC-3'を、その3'末端に配列5'-GTGTCTTA-3'を含む。オリゴヌクレオチドの5'末端（end）配列および3'末端（end）配列は、それぞれ5'末端（terminal）配列および3'末端（terminal）配列と呼ばれることもある。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、5'-CAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAG-3'（配列番号34）および5'-AAGAGAGTAGTACAGCA-3'（配列番号35）を含む。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約40〜約100ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約50〜約78ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約53〜約76ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約50〜約70ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約53〜約61ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約54〜約61ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約61ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約53、約54、約55、約56、約57、約58、約59、約60、約61、約62、約63、約64、約65、約66、約67、約68、約69、約70、約71、約72、約73、約74、約75、または約76ヌクレオチドの長さであり、その5'末端に配列5'-GTTCTGTCTC-3'を、3'末端に配列5'-GTGTCTTA-3'を含む。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、5'末端ホスフェート基をさらに含む。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、その5'末端に配列5'-GTTCTGTCTC-3'を、その3'末端に配列5'-GTGTCTTA-3'を含む。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、5'末端ホスフェートを含む。

【0410】

実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、5'-GTTCTGTCTCATATTT CAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGAGAGTAGTACAGCAAGA GTGTCTTA-3'（配列番号36）からなる。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、5'-GCTGTGCAATATTT CAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGA

G A G T A G T A C A G C A A G A G C G T C G A - 3' (配列番号 43) からなる。実施形態では、コネクタオリゴヌクレオチドは、5' 末端ホスフェート基をさらに含む。実施形態では、コネクタオリゴヌクレオチドは、連結されて環状オリゴヌクレオチド、例えば、環状 R C A テンプレートを形成することができる直鎖オリゴヌクレオチドである。

【0411】

実施形態では、1つ以上の追加の分析物の各分析物に使用される核酸プローブは、14～19ヌクレオチドの長さである。実施形態では、1つ以上の追加の分析物の各分析物に使用される核酸プローブは、14ヌクレオチドの長さである。実施形態では、1つ以上の追加の分析物の各分析物に使用される核酸プローブは、15ヌクレオチドの長さである。実施形態では、核酸プローブは、24ヌクレオチド未満の長さである。実施形態では、核酸プローブは、19ヌクレオチド未満の長さである。実施形態では、核酸プローブは、15ヌクレオチド未満の長さである。実施形態では、核酸プローブは、長さが約10～約30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約12～約28ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約13～約26ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約14～約24ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約11～約22ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約12～約21ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約13～約20ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約14～約18ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、または約30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-G A C A G A A C T A G A C A C-3' (配列番号 33) の14または15個の連続したヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、オリゴヌクレオチドを含み、オリゴヌクレオチドは、長さが14～19ヌクレオチドであり、5'-G A C A G A A C T A G A C A C-3' (配列番号 33) の14または15個の連続したヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-G A C A G A A C T A G A C A C-3' (配列番号 33) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-A C A G A A C T A G A C A C-3' (配列番号 40) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-G A C A G A A C T A G A C A-3' (配列番号 41) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-T G C A C A G C T C G A C G C-3' (配列番号 42) を含むオリゴヌクレオチドを含む。

【0412】

実施形態では、1つ以上の追加の分析物の各分析物に使用されるコンジュゲートは、同じ核酸プローブ配列を有する。実施形態では、核酸プローブは、5'-G A C A G A A C T A G A C A C-3' (配列番号 33) の14または15個の連続したヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-G A C A G A A C T A G A C A C-3' (配列番号 33) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-A C A G A A C T A G A C A C-3' (配列番号 40) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-G A C A G A A C T A G A C A-3' (配列番号 41) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、5'-T G C A C A G C T C G A C G C-3' (配列番号 42) を含むオリゴヌクレオチドを含む。

【0413】

実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドを含むアンカー試薬が提供され、1つ以上の追加の分析物の各分析物のアンカーオリゴヌクレオチドは、17～25ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカー試薬は、アンカーオリゴヌクレオチドを含み、アンカーオリゴヌクレオチドは、約10～約30ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、約15～約28ヌクレオチドの長さである。実施形態で

は、アンカーオリゴヌクレオチドは、約 17～約 25 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、または約 25 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、同じアンカーオリゴヌクレオチドが、1つ以上の追加の分析物の各分析物に使用される。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、5'-AAGAGAGTAGTACAGCA-3'（配列番号 35）を含む。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、5'-AAGAGAGAGTAGTACAGCAGCCGTCAA-3'（配列番号 37）からなる。

【0414】

実施形態では、異なる検出試薬が各分析物に使用される。実施形態では、同じ検出試薬が各分析物に使用される。実施形態では、異なる捕捉試薬が各分析物に使用される。実施形態では、捕捉試薬および／または検出試薬は、タンパク質を含む。実施形態では、捕捉試薬および／または検出試薬は、抗体を含む。実施形態では、捕捉試薬および／または検出試薬は、抗原結合物質を含む。実施形態では、捕捉試薬および検出試薬は、抗原結合物質である。実施形態では、捕捉試薬および検出試薬は抗体である。

【0415】

実施形態では、表面は複数の結合ドメインを含み、各分析物は、複数の結合ドメインの異なる結合ドメインにおいて複合体を形成する。実施形態では、表面は粒子である。実施形態では、表面はビーズである。実施形態では、表面はプレートである。実施形態では、表面はマルチウェルアレイのウェルである。実施形態では、表面は電極を含む。実施形態では、電極は、カーボンインク電極である。実施形態では、1つ以上の追加の分析物の各分析物の各結合ドメインは、別個の表面上にあり、表面は、ビーズアレイ内のビーズである。実施形態では、1つ以上の追加の分析物の各分析物の各結合ドメインは単一の表面上にあり、結合ドメインは表面上の捕捉試薬アレイの要素を形成する。実施形態では、表面は電極を含み、本方法の検出工程は、電極に電位を印加することと、電気化学発光を測定することと、を含む。実施形態では、電極に電位を印加すると、電気化学発光シグナルが生成する。

【0416】

実施形態では、各分析物の対応する捕捉試薬への結合は、1つ以上の表面を複数の分析物を含む単一の液体体積と接触させることによって並行して行われる。実施形態では、複数の分析物は、分析物および1つ以上の追加の分析物を含む。実施形態では、方法の各工程は、各分析物に対して並行して実行される。実施形態では、本方法は同時マルチプレックスアッセイである。表面上の分析物のマルチプレックス測定は、本明細書に記載され、例えば、米国特許第7,842,246号および第6,977,722号も参照。

【0417】

実施形態では、各結合ドメインは、標的試薬の相補体に結合することができる標的試薬の相補体を含み、各アンカー試薬および捕捉試薬は、連結試薬に結合することができる追加の連結試薬を含み、本方法は、（1）捕捉試薬およびアンカー試薬を、追加の連結試薬を介して、連結試薬に接続された標的試薬の相補体に結合し、（2）工程（1）の産物を、標的試薬の相補体を含む結合ドメインに結合することにより、各結合ドメインの捕捉試薬およびアンカー試薬を固定することをさらに含み、（i）各結合ドメインは、異なる標的試薬の相補体を含み、（ii）各標的試薬の相補体は、標的試薬のうちの1つに選択的に結合する。

【0418】

したがって、実施形態では、表面は標的試薬の相補体を含み、標的試薬は連結試薬に接続され、捕捉試薬およびアンカー試薬のそれぞれは、追加の連結試薬を含む。したがって、実施形態では、表面上の標的試薬の相補体は標的試薬に結合し、標的試薬は連結試薬に接続され、連結試薬は捕捉試薬およびアンカー試薬上の追加の連結試薬に結合している。

【0419】

実施形態では、連結試薬は、追加の連結試薬のための複数の結合部位を有し、捕捉試薬およびアンカー試薬の固定化は、捕捉試薬およびアンカー試薬を、追加の連結試薬を介し

て、連結試薬に接続された標的試薬に結合することと、産物を標的試薬の相補体を含む結合ドメインに結合することと、をさらに含み、(i) 各結合ドメインは、異なる標的試薬の相補体を含み、(ii) 各標的試薬の相補体は、標的試薬のうちの1つに選択的に結合する。例えば、標的剤がオリゴヌクレオチドであり、連結試薬がストレプトアビジンであり、追加の連結剤がビオチンである場合、ビオチン標識オリゴヌクレオチドは、ストレプトアビジンの4つのビオチン結合部位のうちの第1に結合して、連結試薬に接続された標的試薬を形成する。次に、ビオチン標識捕捉試薬（すなわち、追加の連結剤に結合した捕捉試薬）は、ストレプトアビジン上の残りのビオチン結合部位に結合して、標的剤を捕捉試薬に接続することができる。

【0420】

例示的な標的試薬および標的試薬の相補体は、本明細書に記載されている。実施形態では、標的化試薬および標的化試薬の相補体は、アビジン-ビオチン、ストレプトアビジン-ビオチン、抗体-ハプテン、抗体-抗原、抗体-エピトープタグ、核酸-相補的核酸、アプタマー-アプタマー標的、および受容体-リガンドから選択される結合相手対の2つのメンバーである。実施形態では、標的試薬はビオチンであり、標的試薬の相補体はストレプトアビジンである。実施形態では、連結試薬および追加の連結試薬対は、標的試薬および標的試薬の相補体対とは異なる結合相手対である。実施形態では、連結試薬はアビジンまたはストレプトアビジンであり、追加の連結試薬はビオチンである。実施形態では、標的試薬および標的試薬の相補体は、相補的オリゴヌクレオチドである。

【0421】

本明細書に記載のアッセイで使用される様々な試薬の濃度は、アッセイの最適化中に選択することができる。実施形態では、表面に結合するための捕捉試薬の濃度は、約0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。実施形態では、表面に結合するための捕捉試薬の濃度は、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満である。実施形態では、分析物に結合するための検出試薬の濃度は、約0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。実施形態では、分析物に結合するための検出試薬の濃度は、約0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。

【0422】

本明細書に記載のアッセイ方法は、結合または他のタイプの反応が起こるアッセイ工程を有し得る。例えば、方法は、(i) 分析物を、捕捉試薬、ならびに検出試薬および核酸プローブを含む検出コンジュゲートに結合すること、(ii) 核酸プローブを伸長して伸長配列を形成すること、(iii) 伸長配列をアンカーオリゴヌクレオチドに結合すること、(iv) 伸長配列を標識検出プローブに結合すること、ならびに(v) 標識プローブを測定することのうちの1つ以上を含み得る。別の例では、方法は、(i) 分析物を、捕捉試薬、ならびに検出試薬および核酸プローブを含む検出コンジュゲートに結合すること、(ii) コネクターオリゴヌクレオチドを核酸プローブに結合すること、(iii) コネクター配列を連結して環状テンプレートを形成すること、(iv) 環状テンプレートのローリングサークル増幅を実行して核酸プローブを伸長し、伸長配列を形成すること、(v) 伸長配列をアンカーオリゴヌクレオチドに結合すること、(vi) 伸長配列を標識検出プローブに結合すること、および(vii) 標識プローブを測定することのうちの1つ以上を含み得る。特定の記載された工程内の異なる反応が逐次または同時に実行され得る（例えば、分析物の捕捉試薬および検出コンジュゲートへの結合が同時に実行され得る、または分析物の捕捉試薬への結合が最初に実行され、続いて検出コンジュゲートへの結合が実行され得るか、または分析物の検出試薬への結合が最初に実施され、続いて検出コンジュゲートへの結合が実行され得る）ことが理解されよう。特定の工程を同時に実行することも理解されよう（例えば、核酸プローブの伸長および検出プローブの結合は、逐次または同時に実行され得る）。

【0423】

一部の場合では、表面に固定された材料を伴って実行される結合または他の反応を含む方法の性能は、表面から離れた溶液中の未反応物質または残留物質を除去するため、および表面でのその後の反応または表面の測定に干渉するのを防ぐために、これらのタイプの反応を有する1つ以上の工程後、「洗浄」工程を実行することによって改良され得ることも理解されよう。例えば、分析物または試薬の表面への結合を含む工程後、洗浄工程を使用して、表面に接触している溶液から未結合の分析物または試薬を除去することができる。別の例では、表面結合種の連結、伸長、または増幅を含む工程後、洗浄工程を使用して、表面に接触している溶液から過剰の未結合反応物または酵素を除去することができる。洗浄工程は、例えば、手動洗浄法を使用して、または自動プレートウォッシャー（例えば、B I O T E K 4 0 5 L Sマイクロプレートウォッシャー）を使用して実施することができる。本明細書に記載のアッセイに自動プレートウォッシャーを使用する場合、実施形態では、低ディスペンス流量を使用し、ウェルの外縁にディスペンスチップを位置付けることによって（例えば、ウェルの片側に向けた水平ディスペンスオフセット）最良の結果が得られ得る。本明細書で提供されるアッセイの検出工程後に、低流量のディスペンス洗浄を使用することができ、他のすべての洗浄工程は、デフォルトの洗浄プログラムを使用することができる。代替的に、洗浄緩衝液が完全に除去されていれば、手動洗浄を再現性よく行うこともできる。結合または他の反応を含む工程は、所望の程度まで進行するのに一定の時間（インキュベーション時間）を必要とし得、最も効率的または最適な性能を提供するために選択された温度で実行され得ることも理解される。実施形態では、分析物を表面上の捕捉試薬に結合するためのインキュベーション時間は、約1分～24時間、約5分～4時間、約9分～2時間、約9分、約15分、約30分、約1時間または約2時間である。実施形態では、この工程のインキュベーション温度は、約10℃～50℃、15℃～40℃、室温程度、約25℃、約27℃、約30℃、または約37℃である。

【0424】

実施形態では、検出コンジュゲートを分析物に結合する時間（これは、分析物の捕捉試薬への結合と同時または逐次にあり得る）は、約1分～24時間、約5分～4時間、約9分～2時間、約9分、約1時間、または約2時間である。実施形態では、この工程のインキュベーション温度は、約10℃～50℃、15℃～40℃、室温程度、約25℃、約27℃、約30℃、または約37℃である。

【0425】

実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドを検出コンジュゲートの核酸プローブに結合し、コネクターオリゴヌクレオチドを連結して環状テンプレートオリゴヌクレオチドを形成する時間（これは、同時または逐次に実施され得る）は、約1分～24時間、約5分～4時間、約9分～2時間、約9分、約15分、約30分、約1時間、または約2時間である。実施形態では、この工程のインキュベーション温度は、約10℃～50℃、15℃～40℃、室温程度、約25℃、約27℃、約30℃、または約37℃である。

【0426】

実施形態では、（例えば、ローリングサークル増幅によって）核酸プローブを伸長する時間は、約1分～24時間、約5分～4時間、約9分～2時間、約9分、約15分、約30分、約1時間、または約2時間である。実施形態では、この工程のインキュベーション温度は、約10℃～50℃、15℃～40℃、室温程度、約25℃、約27℃、約30℃、または約37℃である。

【0427】

実施形態では、（i）分析物の表面への結合および検出コンジュゲートの分析物への結合は、それぞれ室温（約18～27℃）で1～2時間逐次行われ、それぞれ続いて洗浄工程があり、（i i）コネクターオリゴヌクレオチドの結合および連結は、室温で約30分間同時に行われ、続いて洗浄工程があり、かつ／または（i i i）ローリングサークル増幅、検出プローブの結合、および（アンカーオリゴヌクレオチドが存在する場合）アンカーオリゴヌクレオチドへの結合は、約27℃の設定温度で約1時間にわたって同時に実行され、続いて洗浄工程がある。

【0428】

一実施形態では、表面は磁気ビーズ（例えば、ストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズ）であり、アッセイ工程は、（i）ビオチン標識捕捉試薬および検出コンジュゲート（核酸プローブを含む）を分析物に結合して、捕捉試薬、分析物、および検出コンジュゲートを含む複合物を形成することと、（ii）ストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズ上で複合物を捕捉することと、（iii）核酸プローブをコネクタオリゴヌクレオチドに結合し、コネクタオリゴヌクレオチドを連結して環状オリゴヌクレオチドテンプレートを形成することと、（iv）ローリングサークル増幅によって核酸プローブを伸長し、検出プローブを増幅産物に結合することと、（v）ビーズをフローセルに導入し、磁場の印加によってビーズを電極上に捕捉し、電極に電位を印加し、電気化学発光の測定を実施してビーズ上の検出プローブ量を測定することと、を含む。ビーズには、事前に結合したアンカーオリゴヌクレオチドを提供することができ、ビオチン標識アンカーオリゴヌクレオチドを工程（ii）の間に加えることができ、またはアンカーオリゴヌクレオチドを別の工程でビーズに結合することができ、これらの場合、本方法は、伸長プローブをアンカーオリゴヌクレオチドに結合することも含むであろう。実施形態では、個々の工程は、設定されたインキュベーション時間でそれぞれ実行される（2つ以上の工程が同時操作で実行される場合、この同時操作の時間は、事前に設定されたインキュベーション時間である）。実施形態では、各工程または操作は、同じインキュベーション時間で実行される。実施形態では、このインキュベーション時間は、工程または操作当たり約9分である。実施形態では、各工程または操作は、約9分の倍数であるインキュベーション時間で実行される。実施形態では、磁気ビーズは、工程（ii）、工程（iii）および／または工程（iv）の後に（例えば、磁石を使用してチューブに磁気ビーズを収集し、チューブから液体を除去することによって）洗浄される。ビーズは、フローセルに収集する操作中に洗浄することもできる。

【0429】

実施形態では、検出工程は、伸長配列を本明細書で提供される標識プローブと接触させることを含む。実施形態では、伸長配列および標識プローブは、約1分～24時間、約5分～4時間、約9分～2時間、約30分～90分、約9分、約30分、約1時間、約90分、または約2時間の間インキュベーションされる。実施形態では、この工程のインキュベーション温度は、約10℃～50℃、15℃～40℃、室温程度、約23℃、約25℃、約27℃、約30℃、または約37℃である。実施形態では、検出工程は、約27℃で約60分間、伸長配列を標識プローブと接触させることを含む。検出工程は、アッセイの感度とバックグラウンドに対するシグナルの比率を最適化するように変更できる。2つのパラメータがこれらの要因に最も影響を及ぼす可能性がある。（1）温度および（2）検出工程のインキュベーション時間。一般に、シグナルとバックグラウンドの両方は、温度とインキュベーション時間の増加とともに増加する。より短いインキュベーション時間が所望される場合は、温度を上げるか、他のアッセイパラメータのうちの1つを変更してシグナルを増やすことが最適な場合がある。代替的に、アッセイのバックグラウンドが非常に低い場合、および／またはより多くのシグナルが必要な場合は、検出工程のインキュベーション時間および／または温度を上げて、シグナルおよび潜在的に感度を高めることができる。バックグラウンドシグナルが高すぎる場合は、より低い温度をより短いインキュベーション時間と組み合わせてもよい。これにより、特定のシグナルがバックグラウンドとともに減少する可能性があるが、シグナル対バックグラウンド比が増加する可能性がある。実施形態では、好ましいインキュベーション時間および温度が一旦決定されると、アッセイの一貫性を改善するために、時間および温度は、アッセイ実行間で変更されるべきではない。例えば、サーモシェーカーまたは他の制御温度シェーカーを使用して、インキュベーション温度および時間の一貫性を達成することができる。

【0430】

2 抗体アッセイで使用するためのキット

実施形態では、本開示は、（a）本開示による標識プローブと、（b）5'末端ヌクレオ

チド配列および3'末端ヌクレオチド配列を含むコネクターオリゴヌクレオチド(5'および3'末端のヌクレオチド配列は、核酸プローブにハイブリダイズすることができ、内部ヌクレオチド配列は、標識プローブの検出オリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる)と、(c)核酸リガーゼと、(d)核酸ポリメラーゼと、を含むアッセイを実施するためのキットを提供する。

【0431】

実施形態では、本開示は、(a)アンカーオリゴヌクレオチドを含むアンカー試薬と、(b)本開示による標識プローブと、(c)5'末端ヌクレオチド配列および3'末端ヌクレオチド配列を含むコネクターオリゴヌクレオチド(5'および3'末端のヌクレオチド配列は、核酸プローブにハイブリダイズすることができ、第1の内部ヌクレオチド配列は、アンカーオリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができ、第2の内部ヌクレオチド配列は標識プローブの検出オリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる)と、(d)核酸リガーゼと、(e)核酸ポリメラーゼと、を含むアッセイを実施するためのキットを提供する。

10

【0432】

実施形態では、本開示は、(a)標識プローブと、(b)5'末端ヌクレオチド配列、3'末端ヌクレオチド配列を含むコネクターオリゴヌクレオチド(5'および3'末端のヌクレオチド配列は、核酸プローブにハイブリダイズすることができ、内部ヌクレオチド配列は、標識プローブの検出オリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる)と、(d)核酸リガーゼと、(e)核酸ポリメラーゼと、を含むアッセイを実施するためのキットを提供し、5'および3'末端のヌクレオチド配列は内部配列と重複せず、5'および3'末端配列の長さの合計は14~24ヌクレオチドの長さであり、コネクターオリゴヌクレオチドは53~76ヌクレオチドの長さである。

20

【0433】

実施形態では、本開示は、(a)アンカーオリゴヌクレオチドを含むアンカー試薬と、(b)標識プローブと、(c)5'末端ヌクレオチド配列、3'末端ヌクレオチド配列を含むコネクターオリゴヌクレオチド(5'および3'末端のヌクレオチド配列は、核酸プローブにハイブリダイズすることができ、第1の内部ヌクレオチド配列は、アンカーオリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができ、第2の内部ヌクレオチド配列は、標識プローブの検出オリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる)と、(d)核酸リガーゼと、(e)核酸ポリメラーゼと、を含むアッセイを実施するためのキットを提供し、5'および3'末端のヌクレオチド配列は、第1および第2の内部配列と重複せず、5'および3'末端配列の長さの合計は、14~24ヌクレオチドの長さであり、コネクターオリゴヌクレオチドは53~76ヌクレオチドの長さである。

30

【0434】

実施形態では、核酸プローブは、長さが約10~約30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約12~約28ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約14~約26ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約14~約24ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約11~約22ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約12~約21ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約13~約20ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約14~約18ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。

40

【0435】

実施形態では、核酸プローブは、長さが約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、または約30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約14ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、長さが約15ヌクレオチドのオリゴヌクレ

50

10

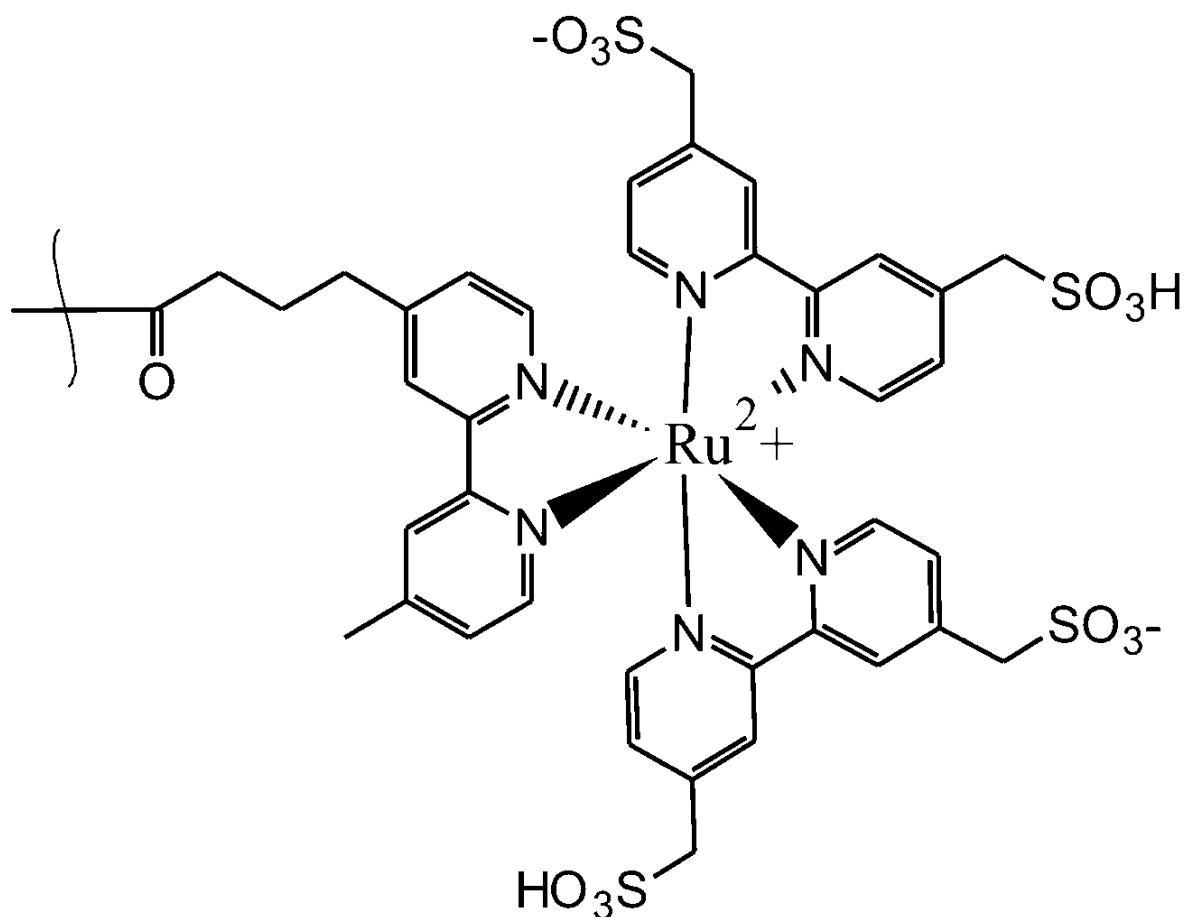
20

[illegible]

30

40

【化 4 3】



である。

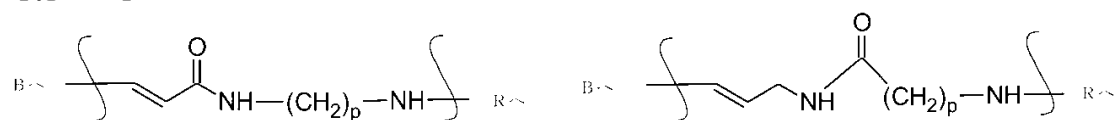
【0 4 3 9】

実施形態では、Bは、ウラシルの5位で L^1 に付着したウラシルである。

【0 4 4 0】

実施形態では、 L^1 は、

【化 4 4】



またはそれらの組み合わせを含み、pは1～12の整数である。

【0 4 4 1】

実施形態では、 L^2 は、

10

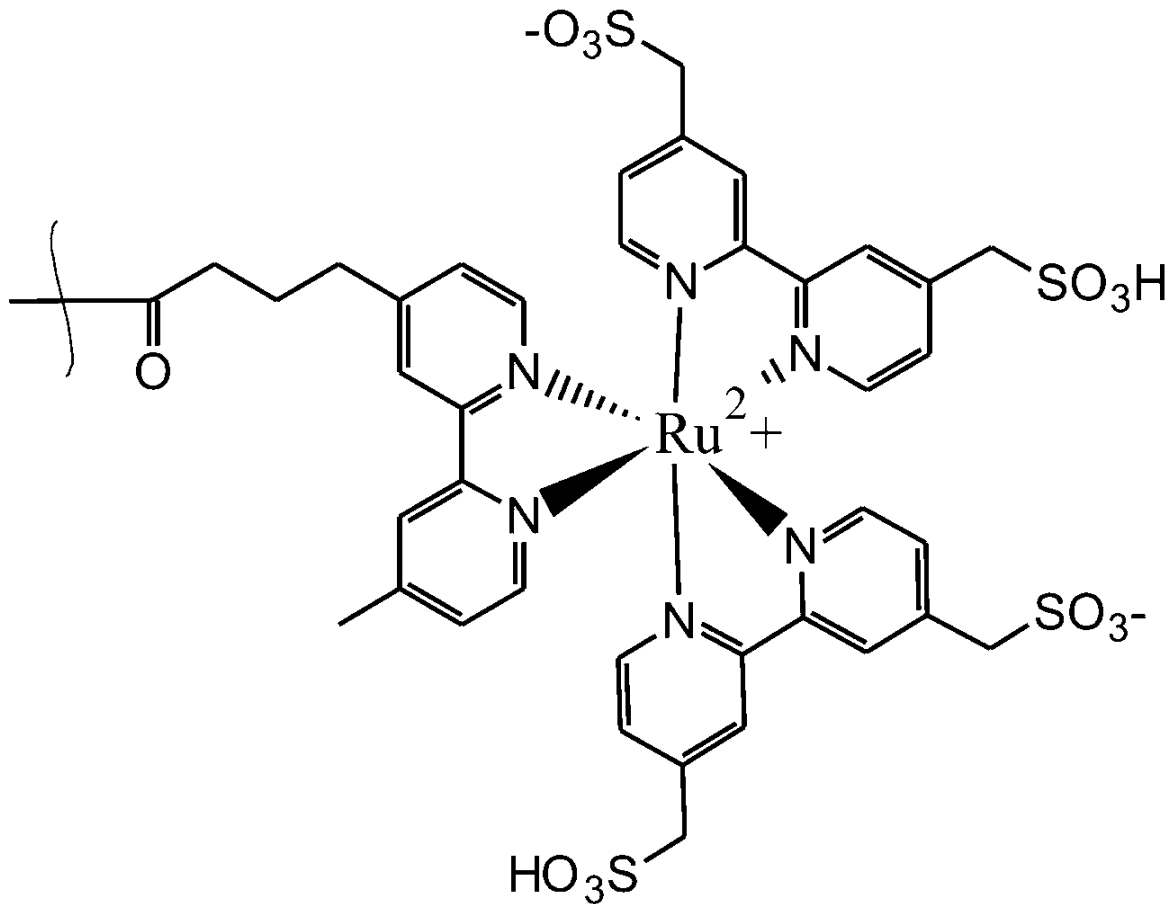
20

30

40

50

【化 4 7】



である。実施形態では、 j は 0 ～ 5 の整数であり、 k は 0 であり、 m は 0 ～ 5 の整数であり、 n は 2 ～ 7 の整数である。実施形態では、 k は 0 であり、 j は 0 であり、 m は 1 であり、 n は 5 である。

【0 4 4 3】

実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 NO : 31) と、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または約 100 % の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 85 % の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 88 % の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 98 % の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 31) と少なくとも 99 % の配列同一性を有する配列を含む。

【0444】

実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号31)を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T A A G - 3' (配列番号32)を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される1つ以上の修飾を含む。実施形態では、標識プローブは、アミノ修飾因子を含む。実施形態では、標識プローブは、内部アミノ修飾dT塩基 (iAmMC6T)を含む。実施形態では、標識プローブは、内部スペーサー18 (iSp18)を含む。実施形態では、標識プローブは、3'アミノ修飾因子 (3AmMO)を含む。実施形態では、標識プローブのオリゴヌクレオチドは、5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T A A G / i A m M C 6 T / i S p 1 8 / i A m M C 6 T / i S p 1 8 / 3 A m M O - 3' (修飾を有する配列番号44)を含む。

10

【0445】

実施形態では、核酸プローブは、互いに隣接し、それぞれがコネクターオリゴヌクレオチドの一部に相補的である第1および第2の核酸プローブ配列を含む。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、直鎖オリゴヌクレオチドである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、増幅用のテンプレートオリゴヌクレオチドである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、連結されてRCA用の環状テンプレートオリゴヌクレオチドを形成する。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドの5'末端配列は、第1または第2の核酸配列の一方に相補的であり、コネクターオリゴヌクレオチドの3'末端配列は、第1または第2の核酸プローブ配列の他方に相補的である。コネクターオリゴヌクレオチドの適切な5'および3'末端配列および適切で相補的な第1および第2プローブ配列を選択することにより、コネクターの核酸プローブへの結合は、コネクターの平滑末端を近接して配置し (すなわち、コネクター上の2つの末端ヌクレオチドは、核酸プローブ上の近接するヌクレオチドに水素結合している)、リガーゼ酵素の存在下で連結を可能にして、環状オリゴヌクレオチドテンプレートを形成する。

20

【0446】

実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、第1の内部配列を有し、コネクターオリゴヌクレオチドの第1の内部配列は、アンカー試薬のアンカーオリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドの第1の内部配列は、アンカーオリゴヌクレオチドと、70%、少なくとも70%、75%、少なくとも75%、80%、少なくとも80%、85%、少なくとも85%、90%、少なくとも90%、95%、少なくとも95%、97%、少なくとも97%、98%、少なくとも98%、99%、または少なくとも99%または100%の配列同一性を有する。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドから増幅された伸長配列は、アンカーオリゴヌクレオチドに相補的な配列を含む。

30

【0447】

実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドの内部配列 (または、第1の内部配列が存在する場合、コネクターオリゴヌクレオチドの第2の内部配列) は、標識プローブのオリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができる。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドの内部配列 (または第2の内部配列) は、標識プローブのオリゴヌクレオチドと、70%、少なくとも70%、75%、少なくとも75%、80%、少なくとも80%、85%、少なくとも85%、90%、少なくとも90%、95%、少なくとも95%、97%、少なくとも97%、98%、少なくとも98%、99%、または少なくとも99%または100%の配列同一性を有する。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドから増幅された伸長配列は、標識プローブの検出オリゴヌクレオチドに相補的な配列を含む。

40

【0448】

実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、長さが約53~約76ヌクレオチドであり、その5'末端に配列5' - G T T C T G T C - 3'を、その3'末端に配列5' - G T 50

G T C T A - 3 ' を含む。オリゴヌクレオチドの 5 ' 末端 (e n d) 配列および 3 ' 末端 (e n d) 配列は、それぞれ 5 ' 末端 (t e r m i n a l) 配列および 3 ' 末端 (t e r m i n a l) 配列と呼ばれることもある。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、 5 ' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T A A G - 3 ' (配列番号 3 4) および 5 ' - A A G A G A G T A G T A C A G C A - 3 ' (配列番号 3 5) を含む。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約 4 0 ~ 約 1 0 0 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約 5 0 ~ 約 7 8 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約 5 3 ~ 約 7 6 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約 5 0 ~ 約 7 0 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約 5 3 ~ 約 6 1 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約 5 4 ~ 約 6 1 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約 6 1 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、約 5 3、約 5 4、約 5 5、約 5 6、約 5 7、約 5 8、約 5 9、約 6 0、約 6 1、約 6 2、約 6 3、約 6 4、約 6 5、約 6 6、約 6 7、約 6 8、約 6 9、約 7 0、約 7 1、約 7 2、約 7 3、約 7 4、約 7 5、または約 7 6 ヌクレオチドの長さであり、その 5 ' 末端に配列 5 ' - G T T C T G T C - 3 ' を、 3 ' 末端に配列 5 ' - G T G T C T A - 3 ' を含む。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、 5 ' 末端ホスフェート基をさらに含む。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、その 5 ' 末端に配列 5 ' - G T T C T G T C - 3 ' を、その 3 ' 末端に配列 5 ' - G T G T C T A - 3 ' を含む。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、 5 ' 末端ホスフェートを含む。

【 0 4 4 9 】

実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、 5 ' - G T T C T G T C A T A T T T C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T A A G A G A G T A G T A C A G C A A G A G T G T C T A - 3 ' (配列番号 3 6) からなる。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、 5 ' - G C T G T G C A A T A T T T C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T A A G A G A G T A G T A C A G C A A G A G C G T C G A - 3 ' (配列番号 4 3) からなる。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、 5 ' 末端ホスフェート基をさらに含む。実施形態では、コネクターオリゴヌクレオチドは、連結されて環状オリゴヌクレオチド、例えば、環状 R C A テンプレートを形成することができる直鎖オリゴヌクレオチドである。

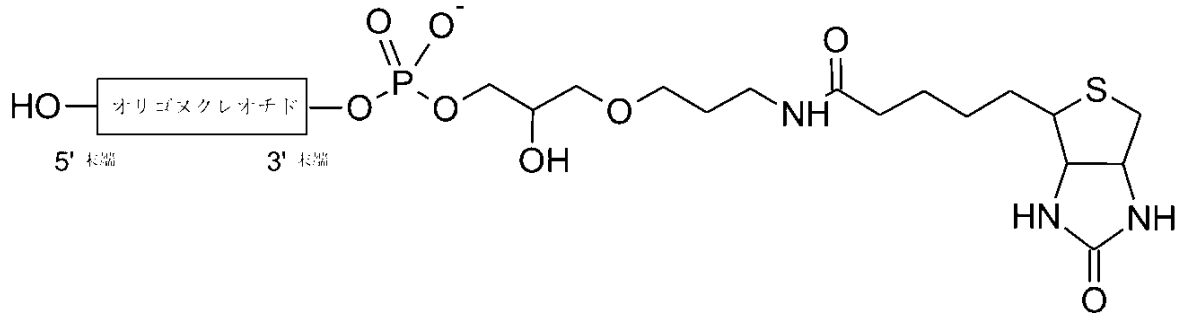
【 0 4 5 0 】

実施形態では、 5 ' および 3 ' 末端配列の長さの合計は、 1 0 ~ 3 0 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、 5 ' および 3 ' 末端配列の長さの合計は、 1 2 ~ 2 5 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、 5 ' および 3 ' 末端配列の長さの合計は、 1 4 ~ 1 9 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、 5 ' および 3 ' 末端配列の長さの合計は、約 1 0、約 1 1、約 1 2、約 1 3、約 1 4、約 1 5、約 1 6、約 1 7、約 1 8、約 1 9、約 2 0、約 2 1、約 2 2、約 2 3、約 2 4、約 2 5、約 2 6、約 2 7、約 2 8、約 2 9、または約 3 0 ヌクレオチドである。実施形態では、 5 ' および 3 ' 末端配列の長さの合計は約 1 4 ヌクレオチドである。実施形態では、 5 ' および 3 ' 末端配列の長さの合計は約 1 5 ヌクレオチドである。実施形態では、 5 ' および 3 ' 末端配列の長さの合計は、 1 9 未満のヌクレオチドである。実施形態では、 5 ' および 3 ' 末端配列の長さの合計は、 1 5 未満のヌクレオチドである。

【 0 4 5 1 】

実施形態では、アンカー試薬が含まれ、アンカー試薬はアンカーオリゴヌクレオチドを含み、アンカーオリゴヌクレオチドは、約 1 0 ~ 約 3 0 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、約 1 5 ~ 約 2 8 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、約 1 7 ~ 約 2 5 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、約 1 7、約 1 8、約 1 9、約 2 0、約 2 1、約 2 2、約 2 3、約 2 4、または約 2 5 ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、 5 ' - A A G A G A G T A G T A C A G C A - 3 ' (

配列番号 35) を含む。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、5' - A A G A G A G T A G T A C A G C A G C C G T C A A - 3' (配列番号 37) からなる。実施形態では、アンカー試薬は
【化 48】



10

である。

【0452】

実施形態では、キットは、コネクターオリゴヌクレオチドの 5' 末端配列に相補的な第 1 の配列と、コネクターオリゴヌクレオチドの 3' 末端配列に相補的な隣接する第 2 の配列とを含む核酸プローブをさらに含む。

【0453】

実施形態では、キットは、分析物の捕捉試薬、および分析物の検出試薬をさらに含み、捕捉試薬および検出試薬は、分析物に結合して複合体を形成することができ、検出試薬は、コネクターオリゴヌクレオチドの 5' 末端配列に相補的な第 1 の配列と、コネクターオリゴヌクレオチドの 3' 末端配列に相補的な隣接する第 2 の配列とを含む核酸プローブに連結されている。

20

【0454】

実施形態では、キットは、複数の分析物のための複数の捕捉試薬、および複数の分析物のための 1 つ以上の検出試薬をさらに含み、各分析物について、キットは、分析物に結合して複合体を形成することができる捕捉試薬および検出試薬を含み、1 つ以上の検出試薬は、コネクターオリゴヌクレオチドの 5' 末端配列に相補的な第 1 の配列と、コネクターオリゴヌクレオチドの 3' 末端配列に相補的な隣接する第 2 の配列と、を含む核酸プローブにそれぞれ連結されている。

30

【0455】

実施形態では、核酸プローブは、配列 5' - G A C A G A A C T A G A C A C - 3' (配列番号 33) の 14 または 15 個の連続したヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、配列 5' - G A C A G A A C T A G A C A C - 3' (配列番号 33) を含む。実施形態では、核酸プローブは、配列 5' - A C A G A A C T A G A C A C - 3' (配列番号 40) を含む。実施形態では、核酸プローブは、配列 5' - G A C A G A A C T A G A C A - 3' (配列番号 41) を含む。実施形態では、核酸プローブは、5' - T G C A C A G C T C G A C G C - 3' (配列番号 42) を含むオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、核酸プローブは、反応性官能基を含む非天然の 5' 修飾を含む。官能基の非限定的な例には、例えば、アルケンおよび歪んだアルケン、アルキン、ハロゲン化物、アルコール、チオール、アミン、ホスフェート、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、カルボキシレート、アミド、エステル、チオエステル、アシルホスフェート、酸ハロゲン化物、ニトリル、酸無水物、ヒドラジン、テトラジン、アジドなどが含まれる。実施形態では、反応性官能基は、チオール、アミン、カルボン酸、活性エステル、ヒドラジン、アルデヒド、ケトン、アルキン、歪んだアルケン、アジド、またはテトラジンである。実施形態では、反応性官能基はチオールである。実施形態では、反応性官能基はテトラジンである。実施形態では、反応性官能基は、ビニルまたは歪んだアルケンである。実施形態では、反応性官能基はアジドである。実施形態では、反応性官能基は、アルキンまたは歪んだアルキンである。実

40

50

施形態では、反応性官能基は、4-ホルミルベンズアミドである。実施形態では、反応性官能基はヒドラジノニコチンアミドである。

【0456】

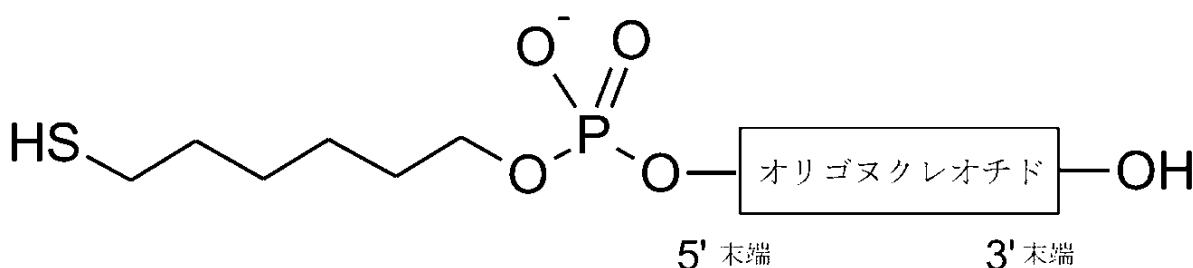
実施形態では、非天然の5'修飾は、本開示のヘテロニ官能性架橋剤と反応することができる。実施形態では、非天然の5'修飾は、マレイミド、ヨードアセトアミド、または活性化ジスルフィドと反応することができる。実施形態では、非天然の5'修飾は、テトラジンと反応することができる。実施形態では、非天然の5'修飾は、ビニルまたは歪んだアルケンと反応することができる。実施形態では、非天然の5'修飾は、アジドと反応することができる。実施形態では、非天然の5'修飾は、アルキンまたは歪んだアルキンと反応することができる。実施形態では、非天然の5'修飾は、ヒドラジノニコチンアミドと反応することができる。実施形態では、非天然の5'修飾は、4-ホルミルベンズアミドと反応することができる。

10

【0457】

実施形態では、非天然核酸プローブは、式IIIAのものであり、

【化49】



20

式IIIA

反応性官能基を含み、反応性官能基は、チオール、アミン、カルボン酸、活性エステル、ヒドラジン、アルデヒド、ケトン、アルキン、歪んだアルケン、アジドまたはテトラジンである。

30

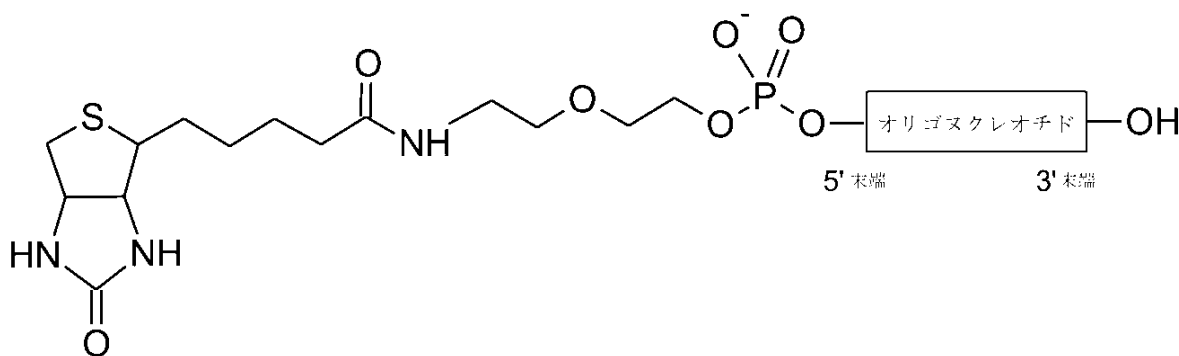
【0458】

実施形態では、核酸プローブは、ハプテンまたはビオチンを含む、非天然の5'修飾をさらに含む。実施形態では、ハプテンは、フルオレセイン、ジニトロフェニル、またはジゴキシゲニンを含む。実施形態では、修飾はビオチンを含む。

【0459】

実施形態では、核酸プローブは、式IVのものである。

【化50】



40

式IV

50

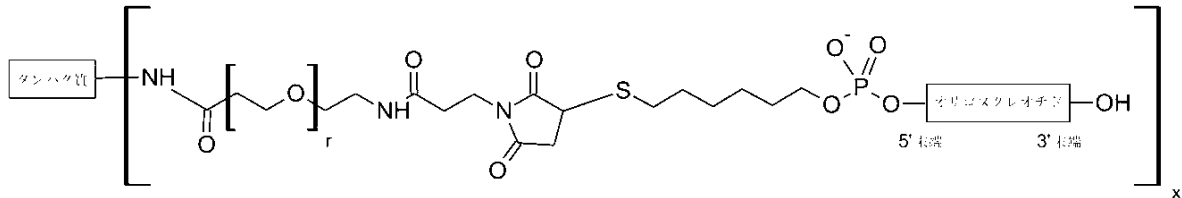
【0460】

実施形態では、核酸プローブは、テンプレート核酸配列に対して相補的な領域を含む。実施形態では、テンプレート核酸配列は、環状核酸テンプレート、または連結して環状核酸テンプレートを形成し得る直鎖核酸テンプレートである。実施形態では、環状核酸テンプレートは、ローリングサークル増幅（RCA）用のテンプレートである。実施形態では、核酸プローブは、RCA反応用のプライマーであり、すなわち、環状核酸テンプレートを伸長して、伸長配列を形成する。

【0461】

実施形態では、核酸プローブは、検出試薬にコンジュゲートしている。実施形態では、検出試薬はタンパク質であり、コンジュゲートは、式V Iの化合物であり、

【化51】



式V I

式中、 r は0～24の整数であり、 x は1～20の整数であり、 $-NH-$ は、タンパク質に由来するアミノ基である。実施形態では、 r は1～20である。実施形態では、 r は2～15である。実施形態では、 r は3～10である。実施形態では、 r は4である。実施形態では、 r は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24である。実施形態では、 x は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20である。実施形態では、 x は1である。実施形態では、 x は2である。

【0462】

実施形態では、捕捉試薬および／または検出試薬はタンパク質である。実施形態では、捕捉試薬および／または検出試薬は、抗原結合物質である。実施形態では、捕捉試薬および検出試薬はタンパク質である。実施形態では、捕捉試薬および検出試薬は抗体である。

【0463】

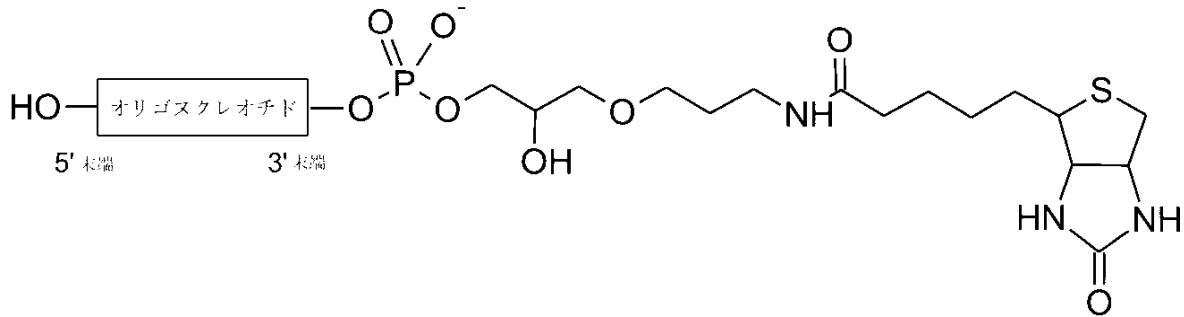
実施形態では、アンカー試薬は、標的試薬の相補体に結合することができる標的試薬をさらに含む。実施形態では、アンカー試薬および捕捉試薬は、標的試薬の相補体に結合することができる標的試薬をそれぞれ含む。実施形態では、キットは、標的試薬の相補体をその上に固定した固相担体をさらに含む。標的試薬および標的試薬の相補体は、本明細書に記載されている。実施形態では、標的試薬および標的試薬の相補体は、アビジン-ビオチン、ストレプトアビジン-ビオチン、抗体-ハプテン、抗体-抗原、抗体-エピトープタグ、核酸-相補的核酸、アプタマー-アプタマー標的、および受容体-リガンドから選択される結合相手対の2つのメンバーである。実施形態では、標的試薬はアビジンまたはストレプトアビジンであり、標的試薬の相補体はビオチンである。実施形態では、標的試薬の相補体はアビジンまたはストレプトアビジンであり、標的試薬はビオチンである。

【0464】

実施形態では、固相担体は表面を含む。本発明で使用するのに適した表面および固相担体が本明細書で提供され、結合アッセイの分野で固相担体として使用される表面が含まれる。実施形態では、固相担体は電極である。実施形態では、固相担体は炭素系電極である。実施形態では、キットは、マルチウェルプレートアッセイの消耗品を含み、プレートの各ウェルは、カーボンインク電極を含む。実施形態では、固相担体は粒子である。実施形態では、固相担体はビーズである。

【0465】

実施形態では、アンカー試薬は、アンカーオリゴヌクレオチドを含み、アンカーオリゴヌクレオチドは、約10～約30ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、約15～約28ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、約17～約25ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、または約25ヌクレオチドの長さである。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、5'-AAGAGAGTAGTACAGCA-3'（配列番号35）を含む。実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、5'-AAGAGAGTAGTACAGCAGCCGTCAA-3'（配列番号37）からなる。実施形態では、アンカー試薬は【化52】



である。

【0466】

実施形態では、キットは、固相担体をさらに含み、アンカー試薬は、固相担体上に固定される。実施形態では、キットは、固相担体をさらに含み、アンカー試薬および捕捉試薬は、固相担体上に固定される。アンカー試薬および捕捉試薬を固相担体などの表面に固定する方法が本明細書に記載されている。

【0467】

実施形態では、固相担体は表面を含む。実施形態では、固相担体は電極である。実施形態では、固相担体は炭素系電極である。実施形態では、キットは、マルチウェルプレートアッセイの消耗品を含み、プレートの各ウェルは、カーボンインク電極を含む。実施形態では、固相担体は粒子である。実施形態では、固相担体はビーズである。

【0468】

複数の捕捉試薬を含むキットの実施形態では、キットは固相担体をさらに含み、アンカー試薬および捕捉試薬は固相担体上に固定されてアレイを形成し、各アレイ要素は、複数の捕捉試薬およびアンカー試薬のうちの1つを含む。実施形態では、固相担体は表面を含む。実施形態では、固相担体は電極である。実施形態では、固相担体は炭素系電極である。実施形態では、キットは、マルチウェルプレートアッセイの消耗品を含み、プレートの各ウェルは、カーボンインク電極を含む。実施形態では、固相担体は粒子である。実施形態では、固相担体はビーズである。

【0469】

複数の捕捉試薬を含むキットの実施形態では、キットは1つ以上の固相担体をさらに含み、アンカー試薬および捕捉試薬は1つ以上の固相担体上に固定されてアレイを形成し、各アレイ要素は、複数の捕捉試薬およびアンカー試薬のうちの1つを含む。実施形態では、キットは複数の固相担体を含み、各固相担体は少なくとも1つのアレイ要素を有する。実施形態では、キットは複数の固相担体を含み、各固相担体は1つのアレイ要素のみを有する。実施形態では、固相担体は表面を含む。実施形態では、固相担体は電極である。実施形態では、固相担体は炭素系電極である。実施形態では、キットは、マルチウェルプレートアッセイの消耗品を含み、プレートの各ウェルは、電極のうちの1つを含む。実施形態では、固相担体は粒子である。実施形態では、固相担体は、ビーズアレイ内のビーズである。

【0470】

複数の捕捉試薬を含むキットの実施形態では、キットは、1つ以上の固相担体上に固定された複数の異なる標的試薬の相補体を有するアレイをさらに含み、各アレイ要素は、異なる標的試薬の相補体を含み、異なる標的試薬の相補体のそれぞれは、異なる標的試薬の結合相手である。実施形態では、捕捉試薬は、異なる標的試薬のうちの1つに接続され、捕捉試薬のそれぞれは、異なる標的試薬に接続される。さらに、アンカー試薬は、それぞれが少なくともアンカー試薬のコピーを有する複数の部分に分割され、各部分のアンカー試薬は、異なる標的試薬に接続される。したがって、実施形態では、固相担体は、標的試薬の相補体を含み、捕捉試薬およびアンカー試薬のそれぞれは、標的試薬を含む。実施形態では、各捕捉試薬およびアンカー試薬部分は別々に提供され得、同じ標的試薬に連結されたすべての試薬／部分は混合物として提供され、他の試薬から分離され、すべての捕捉試薬は混合物として提供され、すべてのアンカー試薬部分は混合物として提供されるか、またはすべての捕捉試薬およびアンカー試薬部分は1つの混合物として提供される。

10

【0471】

実施形態では、捕捉試薬は、追加の連結試薬を含み、アンカー試薬は、追加の連結試薬を含み、標的試薬は連結試薬に接続され、連結試薬は、追加の連結試薬の結合相手である。したがって、実施形態では、固相担体は、連結試薬に接続されている標的試薬に結合する標的試薬の相補体を含み、連結試薬は、捕捉試薬およびアンカー試薬上の追加の連結試薬に結合する。

【0472】

例示的な標的試薬および標的試薬の相補体は、本明細書に記載されている。実施形態では、標的化試薬および標的化試薬の相補体は、アビジン-ビオチン、ストレプトアビジン-ビオチン、抗体-ハプテン、抗体-抗原、抗体-エピトープタグ、核酸-相補的核酸、アプタマー-アプタマー標的、および受容体-リガンドから選択される結合相手対の2つのメンバーである。実施形態では、標的試薬はビオチンであり、標的試薬の相補体はストレプトアビジンである。実施形態では、連結試薬および追加の連結試薬対は、標的試薬および標的試薬の相補体対とは異なる結合相手対である。実施形態では、連結試薬はアビジンまたはストレプトアビジンであり、追加の連結試薬はビオチンである。実施形態では、標的試薬および標的試薬の相補体は、相補的オリゴヌクレオチドである。

20

【0473】

実施形態では、アレイは1つの固相担体上にあり、固相担体は電極である。実施形態では、固相担体は炭素系電極である。実施形態では、キットは、マルチウェルプレートアッセイの消耗品を含み、プレートの各ウェルは、カーボンインク電極を含む。いくつかの実施形態では、固相担体は粒子である。実施形態では、アレイの各要素は異なる固相担体上にあり、固相担体はビーズである。実施形態では、連結試薬および追加の連結試薬は、アビジン-ビオチン、ストレプトアビジン-ビオチン、抗体-ハプテン、抗体-抗原、抗体-エピトープタグ、核酸-相補的核酸、アプタマー-アプタマー標的、および受容体-リガンドから選択される結合相手対の2つのメンバーである。実施形態では、連結試薬はビオチンであり、追加の連結試薬はストレプトアビジンである。実施形態では、連結試薬はアビジンまたはストレプトアビジンであり、追加の連結試薬はビオチンである。

30

【0474】

実施形態では、本開示のキットは、ブロッキング試薬、結合アッセイ反応緩衝液、リガーゼ反応緩衝液、ポリメラーゼ反応緩衝液、ECL読み取り緩衝液、および／または固有商品識別子のうちの1つ以上をさらに含む。ブロッキング試薬を使用して、アッセイのバックグラウンドシグナルを減少させ、非特異的結合を防止し、および／または検出複合体を安定化して検出を改良することができる。実施形態では、結合アッセイ反応緩衝液、リガーゼ反応、および／またはポリメラーゼ反応緩衝液のそれぞれは、トリス緩衝液、ホスフェート緩衝液、MOPS緩衝液、PIPES緩衝液、またはHEPES緩衝液である。実施形態では、結合アッセイ反応緩衝液、リガーゼ反応緩衝液、およびポリメラーゼ反応緩衝液は、同じ緩衝液である。実施形態では、結合アッセイ反応緩衝液、リガーゼ反応、

40

50

および／またはポリメラーゼ反応緩衝液は、約10mM～約1M、約20mM～約500mM、約30mM～約100mM、約40mM～約80mM、または約50mMの塩濃度を有する。実施形態では、結合アッセイ反応緩衝液、リガーゼ反応、および／またはポリメラーゼ反応緩衝液は、NaCl、KCl、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2SO_4 、または $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ を含む。実施形態では、ポリメラーゼ反応緩衝液は、約50mMの塩濃度を有する。実施形態では、ポリメラーゼ反応緩衝液は、KClを含む。実施形態では、ポリメラーゼ反応緩衝液は、約50mMの濃度でKClを含む。実施形態では、ECL読み取り緩衝液は、トリプロピルアミンを含む。実施形態では、ECL読み取り緩衝液は、ブチルジエタノールアミンを含む。実施形態では、固有商品識別子は、「バーコード」オリゴヌクレオチド配列、例えば、対応するヌクレオチドまたは分子を特定することを可能にする短いヌクレオチド（典型的には約5～約40ヌクレオチドの長さ）である。

【0475】

追加の実施形態

実施形態では、本明細書で提供される分析物を検出および測定する方法は、競合アッセイ形式であり得る。一般的に、競合アッセイ、例えば、競合免疫測定法または競合阻害アッセイ、分析物と競合相手は、結合試薬への結合について競合する。このようなアッセイでは、分析物は通常、競合相手を直接測定することによって間接的に測定される。本明細書で使用される場合、「競合相手」は、分析物と同じ結合試薬に結合することができる化合物を指し、その結果、結合試薬、例えば、抗原結合物質または抗体は、分析物または競合相手のいずれかにのみ結合できるが、両方には結合できない。実施形態では、競合アッセイは、複数の結合試薬に結合することができない分析物、例えば、小分子分析物または複数の別個の結合部位を有さない分析物を検出および測定するために使用される。例えば、結合試薬が抗体である場合、1つの抗体が小さな分析物に結合すると、立体障害が生じ、第2の抗体が結合できない。競合アッセイに適した分析物の例を本明細書に記載する。競合免疫測定法のさらなる例には、米国特許第4,235,601号、第4,442,204号および第5,028,535号に記載されているものが含まれる。

【0476】

競合アッセイの文脈において、「捕捉試薬」および「検出試薬」は、結合試薬、例えば、抗原結合物質または抗体を指し得、または、「捕捉試薬」および「検出試薬」は、分析物の競合相手であり得る。競合アッセイの実施形態では、捕捉試薬または検出試薬の一方は本明細書で定義されたとおりであり、捕捉試薬または検出試薬の他方は、分析物、例えばホルモンなどの修飾小分子の競合相手である。実施形態では、競合相手は、本開示の核酸プローブを含む。実施形態では、競合相手は、分析物と同じ構造を有し、標識またはプローブ、例えば、検出可能な標識または核酸プローブを含む。実施形態では、競合相手は、分析物と類似の構造を有し、標識またはプローブ、例えば、検出可能な標識または核酸プローブを含む。実施形態では、競合相手は、アッセイで使用する結合試薬（例えば、結合試薬の分析物認識部位またはポケットに結合するように選択された核酸またはペプチドアプタマー）について分析物と競合することができる限り、分析物と組成が非常に異なってもよい。そのようなアプタマーは、ペプチドまたは核酸をスクリーニングするための当技術分野で確立された方法を使用して、例えば、ペプチドまたは核酸のランダムライブラリーをスクリーニングすることによって、所望の結合活性を有するアプタマーについて選択され得る。

【0477】

実施形態では、分析物は（または分析物および競合相手はそれぞれ）ホルモンである。実施形態では、分析物は（または分析物および競合相手はそれぞれ）ハプテンである。実施形態では、分析物は（または分析物および競合相手はそれぞれ）代謝物である。実施形態では、分析物は（または分析物および競合相手はそれぞれ）、エストロゲンまたはテストステロンなどの内分泌ホルモン、抗ミューラー管ホルモン、成長ホルモン（例えば、ヒト成長ホルモンまたは組換えヒト成長ホルモン）、または環境内分泌かく乱物質、例えば、Tian et al., Chemical and Biological Techn

10

20

30

40

50

ologies in Agriculture 5:5 (2018) に開示されているものなどである。実施形態では、分析物は（または分析物および競合相手はそれぞれ）、炭水化物または炭水化物誘導体、例えば、ジギトキシンまたはサリシンなどのグリコシドである。実施形態では、分析物は（または分析物および競合相手はそれぞれ）、例えば、コレステロールである。実施形態では、分析物は（または分析物および競合相手はそれぞれ）ハプテン、例えば、ジゴキシンである。実施形態では、分析物は（または分析物および競合相手はそれぞれ）、ビタミン、例えば、ビタミンA、ビタミンB、フォレート、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンKなどである。実施形態では、分析物は（または分析物および競合相手はそれぞれ）、ハプテン、例えば、アニリンおよびその誘導体、ウルシオール、ヒドララジン、ハロタン、フルオレセイン、ピオチン、ジゴキシゲニン、およびジニトロフェノールである。実施形態では、競合相手は捕捉試薬である。実施形態では、競合相手は検出試薬であり、核酸プローブを含む。

【0478】

実施形態では、競合相手は表面に結合し、分析物および検出試薬（例えば、検出抗体および核酸プローブを含むコンジュゲート）は溶液中にあり、競合相手は、検出試薬への結合について分析物と競合する。そのような実施形態では、競合相手質および検出試薬を含む表面上の複合体が検出および測定され、競合相手の測定量は分析物の量を決定するために使用される。実施形態では、捕捉試薬は表面に結合し、分析物および検出可能に標識された競合相手は溶液中にあり、検出可能に標識された競合相手は、捕捉試薬への結合について分析物と競合する。そのような実施形態では、捕捉試薬および検出可能に標識された競合相手を含む表面上の複合体が検出および測定され、競合相手の測定量は分析物の量を決定するために使用される。実施形態では、捕捉試薬、検出試薬および分析物（上記のとおり）の間の競合反応は、溶液中で行われ、捕捉試薬は、その後、表面に固定される（例えば、例えば、標的部分を含む捕捉試薬および標的部分の相補体を含む表面の使用により）。

【0479】

実施形態では、本開示は、（a）分析物を、表面上の結合ドメインの第1の捕捉試薬に結合することであって、結合ドメインが、アンカーオリゴヌクレオチドを含むアンカー試薬をさらに含む、分析物を第1の捕捉試薬に結合することと、（b）検出試薬および核酸プローブを含むコンジュゲートを、結合ドメインの第2の捕捉試薬に結合して、第2の捕捉試薬およびコンジュゲートを含む複合体を形成することであって、検出試薬が、第1および第2の捕捉試薬に結合するための分析物の競合相手である、複合体を形成することと、（c）複合体におけるコンジュゲートの核酸プローブを伸長して、アンカーオリゴヌクレオチドに相補的なアンカーオリゴヌクレオチド相補体および標識プローブの検出オリゴヌクレオチドに相補的な検出配列相補体を含む伸長配列を形成することと、（d）検出オリゴヌクレオチドを含む標識プローブを伸長配列に結合することと、（e）結合ドメインに結合した標識プローブの量を測定することであって、標識プローブが、本開示による標識プローブである、標識プローブの量を測定することと、を含む、分析物を測定する方法を提供する。

【0480】

実施形態では、本開示は、（a）分析物を、第1の検出試薬および核酸プローブを含む第1のコンジュゲートに結合することと、（b）表面上の結合ドメインの捕捉試薬を、第2の検出試薬および核酸プローブを含む第2のコンジュゲートに結合して、捕捉試薬および第2のコンジュゲートを含む複合体を形成することであって、（i）結合ドメインが、アンカーオリゴヌクレオチドを含むアンカー試薬をさらに含み、（ii）捕捉試薬が、第1および第2の検出試薬に結合するための分析物の競合相手である、複合体を形成することと、（c）複合体における第2のコンジュゲートの核酸プローブを伸長して、アンカーオリゴヌクレオチドに相補的なアンカーオリゴヌクレオチド相補体および標識プローブの検出オリゴヌクレオチドに相補的な検出配列相補体を含む伸長配列を形成することと、（d）検出オリゴヌクレオチドを含む標識プローブを伸長配列に結合することと、（e）結

合ドメインに結合した標識プローブの量を測定することであって、標識プローブが、本開示による標識プローブである、標識プローブの量を測定することと、を含む、分析物を測定する方法を提供する。

【0481】

さらに、本明細書に記載の方法は、オリゴマー分析物の検出および定量に使用することができる。標的抗原がホモオリゴマー、すなわち、2つ以上の同一のサブユニットを有する抗原である場合、検出抗体は、独立して、連結テンプレートオリゴヌクレオチドとプライマーオリゴヌクレオチドの両方で標識される必要がある。テンプレートオリゴヌクレオチドのみを含む2つの抗体またはプライミングオリゴヌクレオチドのみを含む2つの抗体が結合し得、そのような非生産的な複合体がこのアプローチの感度を低下させ得るため、これは非効率につながる可能性がある。このアプローチを特定のオリゴマー構造の検出に適用すると、この問題が悪化する可能性があり、追加の特定のテンプレートオリゴヌクレオチドを使用して、オリゴマーの特定の検出が可能になる。したがって、本明細書に記載の方法は、ローリングサークルテンプレートを形成するためのテンプレートとともに、所望のオリゴマー分析物に効率的に結合するように構成された一連の検出抗体の予備形成を含み得る。これは、追加のオリゴヌクレオチド配列、例えば、抗体結合オリゴヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることができる足場オリゴヌクレオチドを使用して達成することができ、その結果、抗体は、標的抗原オリゴマーに一致するオリゴマー形態で検出抗体混合物中に構成される。この事前組織化工程により、検出抗体の標的オリゴマーへの最適な結合が可能になる。検出抗体がオリゴマー抗原に結合した後、足場オリゴヌクレオチドは、エキソヌクレアーゼ分解または別の適切な化学的方法またはエンドヌクレアーゼ処理を介して除去することができる。一旦、足場オリゴヌクレオチドが除去されると、近接連結ローリングサークル増幅アッセイは、本明細書に記載されるように進行し得る。

【0482】

追加の実施形態では、本明細書に記載のアッセイ形式は、1つ以上の対照アッセイをさらに含む。陰性対照は、対応する検出抗体を有しない捕捉抗体を含む結合ドメインに含めることができ、それによって全試料に一貫したバックグラウンドシグナルを提供する。事前設定された閾値を超えるシグナルの測定は、不適切なアッセイ処理または試料依存性マトリックス効果の存在を示し、標識された検出プローブの非特異的結合を引き起こし得る。さらに、検体対照は、複数の対照機能を実行するヒト標的抗原（分泌タンパク質または細胞内タンパク質など）のアッセイに含めることもできる。陽性シグナルは人体物質の存在を示し、したがって試料の添加および品質を試験する。ヒト抗原は、細菌抗原抽出のプロセス対照としても機能し得る。例えば、細胞内のヒト分析物は、検出されるために溶解および抽出も必要とする標本対照として選択され得、例えば、Aktである。事前定義された閾値を下回るシグナルの測定は、試料が追加されなかったこと、試薬またはプロセスで不具合が発生したこと、または増幅もしくは検出に干渉する物質が存在することを示す。内部対照に加えて、外部の陽性対照および陰性対照も本方法および／またはキットで使用できる。陽性対照は、マルチプレックスパネルによって検出されたすべての特定の標的抗原を表す非感染性細菌抽出物の混合物を含み得、試験された場合に全アッセイに陽性シグナルを提供する。陰性対照は、いずれの標的タンパク質も含まない代表的なマトリックスを含む。

【0483】

本発明の方法によって分析され得る試料の例には、食品試料（食品抽出物、食品ホモジネート、飲料などを含む）、環境試料（例えば、土壌試料、環境スラッジ、収集された環境エアロゾル、環境ワイプ、水濾液など）、工業用試料（例えば、出発材料、工業生産プロセスからの製品または中間体）、ヒトの臨床試料、獣医試料、および生物学的起源の他の試料が含まれるが、これらに限定されない。分析することができる生物学的試料には、糞便、粘膜スワブ、生理学的試料、および／または細胞の懸濁液を含む試料が含まれるが、これらに限定されない。生物学的試料の特定の例には、血液、血清、血漿、糞便、粘膜スワブ、組織吸引物、組織ホモジネート、細胞培養および細胞培養上清（真核細胞および

原核細胞の培養を含む)、尿、唾液、痰、および脳脊髄試料が含まれる。

【0484】

本発明の方法を使用して測定することができる分析物には、タンパク質、毒素、核酸、微生物、ウイルス、細胞、真菌、孢子、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖類、薬物、ホルモン、ステロイド、栄養素、代謝産物、および上記分子の任意の修飾誘導体、または上記分子の1つ以上を含む任意の複合体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。試料中の対象の分析物のレベルは、疾患または疾患状態を示している場合もあれば、患者がその分析物に曝露されたか否かを単に示している場合もある。

【0485】

特定の実施形態では、目的の分析物は、エキソソーム、すなわち、ほとんどの細胞型によって放出される小さな膜小胞である。エキソソームの放出およびその後の取り込みは、細胞間コミュニケーションの方法であり、多くの生理学および病理学的プロセスの調節に役割を果たしている。エキソソームは、表面結合タンパク質および細胞質タンパク質、脂質、mRNA、およびmiRNAを含むがこれらに限定されない多種多様なシグナル伝達分子を含むことが示されており、細胞の起源および機能を推測するために各エキソソームにおけるこれらの種の同一性および濃度を使用できることが示唆されている。したがって、患者の総エキソソーム集団のゲノムまたはプロテオミクスプロファイリングは、とりわけ、がん、感染症、腎疾患および肝疾患、ならびに外傷性脳損傷を含む様々な病態についての貴重な予後情報を提供し得る。

【0486】

エキソソームは通常、体液から多数を単離し、それらの膜を破壊し、ウエスタンブロット、PCR、または配列決定などの従来方法によって内容物をアッセイすることによって、全体で測定される。しかしながら、本発明の方法およびキットを使用して、表面上のエキソソームの捕捉およびエキソソームによって発現される標的分子のその後の検出によりエキソソームを特徴付けることができる。いくつかのタンパク質、例えば、CD9、CD63、CD81、Hsp70、PDCD6IP、Tsg101がほとんどのエキソソームに共通であることが確認されており、一実施形態では、これらの標的を個別にまたは組み合わせて使用して、1つ以上の捕捉試薬と1つ以上の共通エキソソーム標的タンパク質との間の結合相互作用を介して表面上のエキソソームを捕捉することができる。代替または追加の実施形態では、エキソソーム上またはエキソソーム内に存在する疾患関連マーカーを使用して、1つ以上の捕捉試薬と疾患関連エキソソームマーカーとの間の結合相互作用を介して表面上のエキソソームを捕捉する。次に、捕捉されたエキソソームは、1つ以上の共通エキソソームタンパク質、またはエキソソームの一部の画分の表面内もしくは表面上に存在する1つ以上の追加の分子標的のいずれかに対する1つ以上の検出試薬を使用して探索することができる。捕捉試薬と検出試薬に異なる標的を選択すると、両標的を含むエキソソームのみが検出され、エキソソームの部分集団を特定または定量する際の特異性が高まる。特定の実施形態では、使用される試料は、精製されたエキソソーム調製物である。

【0487】

特定の実施形態では、特定の表現型が異なるエキソソーム部分集団の検出は、本明細書に記載の近位標的との結合相互作用によって近接した場合にのみシグナルを生成する一対の検出試薬を使用して達成することができる。本実施形態では、近位標的は、同じ分子上の別個のエピトープであり得るか、それらは、単一のエキソソームの内部内に近接して保持されるか、または同じエキソソームの膜に結合する、同じ分子種の異なるコピーであり得るか、またはそれらは、2つの相互作用するタンパク質（例えば、テトラスパニン-インテグリン複合体）、タンパク質受容体とリガンド（例えば、EFGおよびEGFR）、またはmRNA分子とRNA結合タンパク質（例えば、アルゴノート1-4またはGW182）など、単一のエキソソーム内またはエキソソーム上にある異なる相互作用種であり得る。さらに、本明細書に記載の方法の使用により、機能的に連結され得ないが、単一の

エキソソーム内の存在によって連結され得る最大3つの異なる標的分子の分析を可能にする。本明細書に記載のPLA/RCA法で使用される近接プローブは、延長され得、エキソソーム上またはエキソソーム内でさらに離れて位置付けられている標的分子の連結およびその後の増幅を可能にする。一実施形態では、PLA/RCAアッセイは、アンプリコンに特異的な蛍光プローブを使用して実施される。その後、捕捉エキソソームは、一般的な蛍光試薬、例えば、エキソソーム内のRNA用のアクリジンオレンジで標識され、捕捉エキソソームは、画像化されて、2つの蛍光シグネチャ間の相関を決定する。一般的な蛍光試薬を使用すると、サイズおよび染色強度に基づいて、目的のエキソソームまたはその分画からシグナルを選択できる。

【0488】

内部の標的分子（カーゴタンパク質、脂質、またはRNA分子）を探索するために、捕捉の前または後のいずれかであるが検出試薬を追加する前に、エキソソームを固定および透過処理することができる。透過処理されたエキソソームが本明細書に記載の方法を使用して照合される場合、検出試薬の一方または両方は、特定のRNA配列に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを含み得、mRNA、miRNA、および／またはタンパク質とRNAとの間の相互作用の検出を可能にする。

【0489】

エキソソームは、アンカー試薬の使用の有無を問わず、本明細書に記載の方法を使用して測定することができる。上記のように、結合アッセイにおけるアンカー試薬の使用は、図1(a)に示され、分析物がエキソソームである場合、表面(101)は、例えば、一般的なエキソソーム標的タンパク質に対する捕捉試薬を含む。特定の実施形態では、表面はまた、アンカー試薬(103)を含む。1つ以上の工程において、エキソソームは、捕捉試薬および検出試薬(104)に結合し、検出試薬(104)はまた、同じまたは異なるエキソソーム標的タンパク質を介してエキソソームに結合し、検出試薬は、核酸プローブ(105)に連結される。したがって、複合体は、捕捉試薬、エキソソーム、および検出試薬を含む表面上に形成される。プローブは、アンカー試薬に結合するアンカー領域を含む伸長配列(107)を形成するように伸長する。伸長配列はアンカー試薬に結合し、表面に結合した伸長配列の量が測定される。

【0490】

同様に、図1(b)に示される方法はまた、エキソソームの検出に適用することができる。特定の実施形態では、検出複合体は、例えば、図1(c)に示されるように、エキソソームに対するアッセイの特異性を増強するための1つ以上の検出試薬を含み得る。1つ以上の工程において、エキソソームは、エキソソームによって発現される標的タンパク質に結合する捕捉試薬および2つ（またはそれ以上）の検出試薬（それぞれ120および121）のそれぞれに結合し、第1および第2の検出試薬のそれぞれは、核酸プローブ（122および123、それぞれ第1および第2の核酸プローブ）に連結する。エキソソームは、同時にまたは実質的に同時に、または逐次段階的に、捕捉試薬および検出試薬に結合することができる。したがって、複合体(124)は、捕捉試薬、エキソソーム、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に形成される。第1および第2のプローブが互いに近接していることを要する伸長プロセスを使用して、第1のプローブは伸長して、アンカー配列に相補的なアンカー配列の相補体を含む伸長配列(125)を形成する。最後から2番目の工程では、アンカー配列がアンカー配列の相補体にハイブリダイズし、表面に結合した伸長配列の量が測定される。同様に、図2(a)～(c)のそれぞれに示されている方法を使用して、エキソソームを検出することができる。

【0491】

本発明のアッセイは、試料中の1つ以上、例えば2つ以上の分析物の濃度を決定するために使用され得る。したがって、2つ以上の分析物が同じ試料で測定され得る。同じ試料で測定できる分析物のパネルには、例えば、病状または生理学的状態に関連する分析物または活性についてのアッセイのパネルが含まれる。特定のそのようなパネルは、サイトカインおよび／またはそれらの受容体（例えば、TNF-アルファ、TNF-ベータ、IL

10

20

30

40

50

1-α、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IFN-γなどのうちの1つ以上)、成長因子および／またはそれらの受容体(例えば、EGF、VGF、TGF、VEGFなどのうちの1つ以上)、乱用薬物、治療薬、ビタミン、病原体に特異的な抗体、自己抗体(例えば、Sm、RNP、SS-A、SS-α、JO-1、およびScl-70抗原に対する1つ以上の抗体)、アレルゲン特異的な抗体、腫瘍マーカー(例えば、CEA、PSA、CA-125、CA15-3、CA19-9、CA72-4、CYFRA21-1、NSE、AFPなどのうちの1つ以上)、うつ血性心臓病および／または急性心筋梗塞を含む心疾患のマーカー(例えば、トロポニンT、トロポニンI、トロポニンC、ミオグロビン、CKMB、ミエロペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、β-ナトリウム利尿タンパク質(BNP)、アルファ-ナトリウム利尿タンパク質(ANP)、エンドセリン、アルドステロン、C反応性タンパク質(CRP)などのうちの1つ以上)、止血に関連するマーカー(例えば、フィブリンモノマー、D-ダイマー、トロンビン-抗トロンビン複合体、プロトロンビン断片1および2、抗因子Xaなどのうちの1つ以上)、急性ウイルス性肝炎感染のマーカー(例えば、A型肝炎ウイルスに対するIgM抗体、B型肝炎コア抗原に対するIgM抗体、B型肝炎表面抗原、C型肝炎ウイルスに対する抗体などのうちの1つ以上)、アルツハイマー病のマーカー(アルファ-アミロイド、ベータ-アミロイド、Aβ42、Aβ40、Aβ38、Aβ39、Aβ37、Aβ34、タウタンパク質など)、骨粗鬆症のマーカー(例えば、架橋Nor-C-テロペプチド、総デオキシピリジノリン、遊離デオキシピリジノリン、オステオカルシン、アルカリホスファターゼ、I型コラーゲンのC末端プロペプチド、骨特異的アルカリホスファターゼなどのうちの1つ以上)、受胎状態または受胎関連障害のマーカー(例えば、エストラジオール、プロゲステロン、濾胞刺激ホルモン(FSH)、ルテナイジングホルモン(LH)、プロラクチン、hCG、テストステロンなどのうちの1つ以上)、甲状腺障害のマーカー(例えば、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、総T3、遊離T3、総T4、遊離T4、および逆T3のうちの1つ以上)、ならびに前立腺がんのマーカー(例えば、総PSA、遊離PSA、複合PSA、前立腺酸性ホスファターゼ、クレアチンキナーゼなどのうちの1つ以上)のパネルを含む。本発明の特定の実施形態は、例えば、特定の病状または生理学的状態に関連する1つ以上、2つ以上、4つ以上または10つ以上の分析物(例えば、上記で列挙されたものなどのパネルと一緒に大別された分析物、例えば、甲状腺障害の診断に有用なパネルは、例えば、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、総T3、遊離T3、総T4、遊離T4、および逆T3のうちの1つ以上を含み得る)を測定することを含む。

【0492】

好ましい実施形態では、パネルは、従来の試料マトリックス中の1つ以上の少量の分析物、例えば、約100fg/mL未満、好ましくは約10fg/mL未満の濃度の分析物を含む。パネルに含めることができる分析物の非限定的な列挙には、例えば、IL-17、IL-21、IL-31、Ab-38、Ab-40、Ab-42、Ab-39、Ab-43、Ab-15、Ab-16、Ab-17、Aベータオリゴマー、C-ペプチド、IL-13、IL-17A、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12/23p40、IL-12p70、INF-γ、PSA、PSAc、タウ、ホスホータウ、TNFα、トロポニンI、心臓トロポニンT、トロポニンC、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、EPO、LC3B、アルブミン、CHO-P、E.coli HCP、IgA、IgE、IgG、IgG1、IgG4、IgM、NSO-P、Per-C6、残留タンパク質A、IgG2、IgG3、IgG4、AFP、CA125、カスパーゼ-3活性、CXCL11/I-TAC、ErbbB2/HER2、HGFR/o-MET、IFN-β、MMP1、MMP2、MMP3、MMP9、ベータ-NGF、TFF3、TIMP1、Kim-1、アルファ-2マクログロブリン、D-ダイマー、ICAM-1、ミエロペルオキシダーゼ、ミオグロビン、PAI-1、PCSK9、プラスミノーゲン、レニン/プロレニン、tPA、CXCL1/GRO-α、CCL2/MCP1、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β

ータ、CCL5／ランテス、CRP、CXCL9／MIG、CXCL10／IL-10、G-CSF、GM-CSF、IFN-アルファ、IFN-ガンマ、IL1アルファ、IL-1ベータ、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL12（p70）、IL13、IL15、IL18、IL-22、IL-23、IL-33、c-MET、アジポネクチン、FGF21、TSLP、GLP-1、成長ホルモン、IGF1、IGF2、インスリン、レプチン、プロラクチン、HIV p24、HB-EGF、AKT、ホスホ-AKT、およびそれらの組み合わせが含まれる。

【0493】

特定の実施形態では、パネルは、従来の試料マトリックス中の1つ以上の少量の分析物、例えば、約100fg/mL未満、好ましくは約10fg/mL未満の濃度の分析物を含み、パネルは、以下のヒト標的のうちの1つ以上を含む。G-CDF、GM-CSF、IFNガンマ、IL-1ベータ、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12/23p40、IL12p70、IL-17A、IL21、IL-22、IL-23、IL-31、IL-33、TNFアルファ、TSLP、VEGF、複合PSA、遊離PSA、Abeta42、Abeta40、Abeta38、タウ、心臓トロポニンI、心臓トロポニンT、HIV p24、C-ペプチド、および／またはFGF21。

【0494】

さらに、本明細書に記載の方法およびキットは、免疫測定法で使用されて、抗菌薬耐性マーカー（PBP2a/mecA（*S. aureus*、グラム陽性）、TEM1（*E. coli*、グラム陰性））に対する単一生物の感受性を検出することができる。これらのアッセイは、グラム陽性菌とグラム陰性菌の両方で、このクラスの分析物に使用できる。バンコマイシン、ベータラクタム、カルバペネム、アミノグリコシド、およびマクロライド系抗生物質に対する抗菌薬耐性に関与する以下の標的タンパク質のうちの1つ以上を本アッセイに含めることができる。ermファミリー、vanA、vanB、aac（6'）-aph（2'））、KPC、NDM、OXA-48、VIM、OXA-23様、OXA-40様、OXA-58様、CTX-M-1およびCTX-M-9ファミリーのESBL遺伝子、およびそれらの組み合わせ。さらに、以下のタンパク質のうちの1つ以上をアッセイに含めることができる。50Sリボソームタンパク質L20、30Sリボソームタンパク質S7、30Sリボソームタンパク質S2、50Sリボソームタンパク質L21、50Sリボソームタンパク質L17、30Sリボソームタンパク質S4、50Sリボソームタンパク質L15、30Sリボソームタンパク質S5、50Sリボソームタンパク質L16、30Sリボソームタンパク質S3、50Sリボソームタンパク質L22、50Sリボソームタンパク質L4、リボソームタンパク質L25、50Sリボソームタンパク質L5、30Sリボソームタンパク質S2、リボソームタンパク質L30、L31、およびL32、ならびにそれらの組み合わせ。さらに、以下の標的のうちの1つ以上は、単独で、または本明細書で特定されるマーカーのうちの1つ以上と組み合わせて、評価され得る。例えば、伸長因子EF-TU、アシルキャリアタンパク質のACP、RplL、リボソームタンパク質GroS（MopB、65,000）、シャペロンシステムGro-EL-Gro-ESおよびGapAの構成要素、解糖系の酵素、およびそれらの組み合わせ。

【0495】

さらに、本明細書に記載の方法およびキットは、免疫測定法でも使用されて、Klebsiella pneumoniae、Acinetobacter baumannii、Pseudomonas aeruginosa、Enterobacter species、および腸外病原性Escherichia coliを含むがこれらに限定されない医療関連感染（HAI生物）を検出することができる。各HAI生物の耐性マーカーを以下の表に示す。

10

20

30

40

50

【表 3】

病原体	薬剤耐性マーカー(GenBank ID)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC(KPC-2:AAK70220.1)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	VIM(VIM-1:CCG05854.1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-1(AAL17637.1)
Enterobacter 種	OXA-48(AGD80396.1)
腸外病原性 <i>Escherichia coli</i>	NDM(NDM-1:AHF22464.1)

10

【0496】

特定の外膜タンパク質は、本明細書に記載の免疫測定法で評価することができる。

【表 4】

病原体	外膜タンパク質	GenBank 受入番号
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	lpp	YP_002238023.1
	ompA	WP_004144094.1
<i>Enterobacter cloacae</i>	lpp	YP_003612855.1
	ompA	WP_023481315.1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	lpp	YP_004593622.1
	ompA	YP_007388430.1
<i>Escherichia coli</i>	lpp	NP_416192.1
	ompA	NP_286832.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	oprF	NP_250468.1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	omp38	YP_008889447.1

20

【0497】

さらに、本明細書に記載の方法およびキットは、免疫測定法で使用されて、以下のクラスのバイオマーカーのうちの1つ以上を検出することができる。サイトカイン、血中腫瘍特異的タンパク質、1つ以上の感染症に関連するタンパク質、細胞内マーカーなど、およびそれらの組み合わせ。

30

【0498】

さらに、以下の自己免疫疾患は、以下に列挙される関連抗原のうちの1つ以上の存否を評価することにより、本明細書に記載の方法およびキットを使用して特定することができる。

40

50

【表 5】

臓器特異的疾患	関連抗原
1 型糖尿病	グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD) インスリノーマ-2(IA2A) 亜鉛輸送 8 タンパク質(ZnT8) プロインスリン インスリン
セリアック病	トランスグルタミナーゼ(tTG) グリアジン(脱アミド化) グリアジンペプチド(DGP)の脱アミド化形態
アジソン病	21-ヒドロキシラーゼ(21-OH) 17-ヒドロキシラーゼ(17-OH) シトクロム p450 側鎖切断酵素(SCC)
橋本甲状腺炎	甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO) サイログロブリン
グレーブス病の甲状腺機能亢進症	チロトロピン受容体
副甲状腺機能低下症	カルシウム感知受容体
原発性胆汁性肝硬変	ビルベートデヒドロゲナーゼ複合体(PDC-E2) 分枝鎖 2-オキソ酸デヒドロゲナーゼ複合体(BCOADC-E2) 2-オキソグルタレートデヒドロゲナーゼ複合体(OGDC-E2) Gp120 Sp100 Nup62
自己免疫性肝炎 II 型	シトクロム P450 2D6 ホルムイミノトランスフェラーゼシクロデアミナーゼ
自己免疫性胃炎	H+/K+ATP アーゼ
悪性貧血	H+/K+ATP アーゼ
脱毛症	チロシンヒドロキシラーゼ
白斑	チロシナーゼ SOX-10 SOX-9

【0499】

特定の実施形態では、パネルは、従来の試料マトリックス中に1つ以上の少量の分析物、例えば、約100 fg/mL未満、好ましくは約10 fg/mL未満の濃度の分析物を含む。パネルは、好ましくは、以下の分析物のうちの1つ以上を含む。IL-17、IL-21、IL-31、IL-22、IL-23、IL-33、心臓トロポニンT、およびそれらの組み合わせ。特定の実施形態では、試料で検出される分析物の濃度は、0.01 fM~100 fM、0.03 fM~50 fM、または0.03 fM~10 fMの範囲内である。いくつかの実施形態では、実質的に正確に決定され得る試料中の分析物分子の濃度は、約100 fM未満、約10 fM未満、約3 fM未満、約1 fM未満、約0.3 fM未

満、約 0.1 fM 未満、約 0.03 fM 未満、またはそれ以下である。試料中の分析物分子の測定濃度が、試料中の分析物分子の実際の濃度の約 20% 以内である場合、試料中の分析物分子の濃度は、実質的に正確に決定されるとみなされ得る。ある特定の実施形態では、試料中の分析物分子の測定濃度は、試料中の分析物分子の実際の濃度の約 10% 以内、約 3% 以内、または約 1% 以内であり得る。アッセイの検出限界は、バックグラウンドシグナルより少なくとも 2.5 標準偏差高いシグナルを与える濃度であり、好ましくは、アッセイは、試料中の約 10~10,000 分子、または試料中の 100~5,000 分子、または試料中の 100~1000 分子を検出できる。

【0500】

さらなる実施形態では、本明細書に記載の方法を使用して、最近の曝露および／または感染のために少量で存在する分析物を検出することができる。様々な疾患または状態の早期診断、例えば、がん、細菌感染、例えば、*Bacillus anthracis* (Anthrax)、ウイルス感染、例えば、HIV、肝炎、HPV など、毒素曝露、例えば、リシン、ボツリヌス毒素 A、B、または E などは、ELISA などの利用可能な技術の検出限界 (LOD) が、疾患の発症を示す可能性のある少量のタンパク質の血中濃度よりも高いという事実によって制限される。パネルは、従来の試料マトリックス中に 1 つ以上の少量の分析物、例えば、約 100 fg/mL 未満、または約 10 fg/mL 未満の濃度の分析物を含み得る。パネルに含めることができる分析物の非限定的な列举には、例えば、HIV gp41、HIV gp120、HIV gp160、HIV p24、HIV p66、HIV p51、HIV p17、HIV p31、Tat、Nef、Vif、A 型、B 型、C 型、D 型、または E 型の肝炎抗原、16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73、および／または 82 型 HPV、HPV-E6 および E7 タンパク質、IL-17、IL-21、IL-31、IL-22、IL-23、IL-33、心臓トロポニン T、ならびにそれらの組み合わせが含まれる。さらに、パネルはまた、最近の疾患発症、曝露および／または感染のために少量で存在する可能性がある以下の分析物のうちの 1 つ以上を含み得る。Ab-38、Ab-40、Ab-42、Ab-39、Ab-43、Ab-15、Ab-16、Ab-17、A ベータオリゴマー、C-ペプチド、IL-13、IL-17A、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、INF-g、PSA、タウ、ホスホータウ、TNF-a、トロポニン I、心臓トロポニン T、トロポニン C、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、EPO、LC3B、アルブミン、CHO-P、E. coli HCP、IgA、IgE、IgG、IgG1、IgG4、IgM、NSO-P、Per-C6、残留タンパク質 A、IgG2、IgG3、IgG4、AFP、CA125、カスパーゼ-3 活性、CXCL11/I-TAC、ErbB2/HER2、HGFR/ο-MET、IFN-β、MMP1、MMP2、MMP3、MMP9、ベータ-NGF、TFF3、TIMP1、Kim-1、アルファ-2 マクログロブリン、D-ダイマー、ICAM-1、ミエロペルオキシダーゼ、ミオグロビン、PAI-1、PCSK9、プラスミノゲン、レニン/プロレニン、tPA、CXCL1/GRO-α、CCL2/MCP1、CCL3/MIP-1 α、CCL4/MIP-1 β、CCL5/Rantes、CRP、CXCL9/MIG、CXCL10/IL-10、G-CSF、GM-CSF、IFN-α、IFN-γ、IL1 α、IL-1 β、IL-3、IL-7、IL-12 (p70)、IL-13、IL-15、IL-18、c-MET、アジポネクチン、FGF21、GLP-1、成長ホルモン、IGF1、IGF2、インスリン、レプチン、プロラクチン、HB-EGF、AKT、ホスホ-AKT、およびそれらの組み合わせ。

【0501】

本発明の方法は、上記のように、多種多様な生物学および生化学的薬剤の検出を可能にするように設計されている。一実施形態では、本方法を使用して、血液、痰、糞便、フィルター、スワブなどを含むがこれらに限定されない、様々な関連する臨床および環境マトリックス中の生物兵器剤 (「BWA」) を含む病原性および／または潜在的に病原性の

10

20

30

40

50

ウイルス、細菌および毒素を検出することができる。本発明の方法を使用して（単独または組み合わせて）分析することができる病原体および毒素の非限定的な列挙には、*Bacillus anthracis*（炭疽）、*Yersinia pestis*（ペスト）、*Vibrio cholerae*（コレラ）、*Francisella tularensis*（野兔病）、*Brucella*種（ブルセラ症）、*Coxiella burnetii*（Q熱）、*Listeria*、*Salmonella*、*Shigella*、*V. cholera*、*Chlamydia trachomatis*、*Burkholderia pseudomallei*、痘瘡ウイルス（痘瘡）を含むオルソボックスウイルス、ウイルス性脳炎、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEE）、西部ウマ脳炎ウイルス（WEE）、東部ウマ脳炎ウイルス（EEE）、アルファウイルス、ウイルス性出血熱、アレナウイルス科、ブニヤウイルス科、フィロウイルス科、フラビウイルス科、エボラウイルス、*Staphylococcal enterotoxin*、リシン、ボツリヌス毒素（A、B、E）、*Clostridium botulinum*、マイコトキシン、*Fusarium*、*Myrothecium*、*Cephalosporium*、*Trichoderma*、*Verticillium*、*Stachybotrys*、鼻疽、小麦菌、*Bacillus globigii*、*Serratia marcescens*、黄雨、*trichothecene mycotoxin*、*Salmonella typhimurium*、アフマトキシン、*Xenopsylla cheopis*、*Dianthus montanus*、小痘瘡、サル痘、アレナウイルス、ハンタウイルス、ラッサ熱、アルゼンチン出血熱、ボリビア出血熱、リフトバレー熱ウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、ハンタウイルス、マールブルグ出血熱、黄熱ウイルス、デング熱ウイルス、インフルエンザ（H5N1鳥インフルエンザ、インフルエンザA、インフルエンザA、H1特異的、インフルエンザA、H3特異的、インフルエンザA、H5特異的、インフルエンザA、2009-H1N1特異的、インフルエンザBを含むヒトおよび動物株を含む）、RSV、ヒト免疫不全ウイルスIおよびII（HIV IおよびII）、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎（非A、BもしくはC）、エンテロウイルス、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルス、*Chlamydia trachomatis*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Trichomonas vaginalis*、ヒトパピローマウイルス、*Treponema pallidum*、*Streptococcus pneumoniae*、*Borrelia burgdorferi*、*Haemophilus influenzae*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Chlamydophila pneumoniae*、*Legionella pneumophila*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus*エンテロトキシンB（SEB）、アブリン、志賀毒素1、志賀毒素2、*Moraxella catarrhalis*、*Streptococcus pyogenes*、*Clostridium difficile*、*Neisseria meningitidis*、*Klebsiella pneumoniae*、*Mycobacterium tuberculosis*、A群*Streptococcus*、E. Coli O157、コロナウイルス、コクサッキーAウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、メタニューモウイルス、ワクシニア、およびアデノウイルス。

【0502】

本明細書に記載の結合アッセイの改良は、結合アッセイのダイナミックレンジ、すなわち、試料の希釈もしくは濃縮または同様の結果（例えば、使用される試薬の濃度など）を生じるアッセイ条件の変更なしに、システムまたは方法によって定量化され得る流体試料中の分析物分子の濃度の範囲を拡大するために使用することができ、分析物分子の測定濃度は実質的に正確に決定され得る。流体試料中の分析物分子の測定濃度が、流体試料中の分析物分子の実際の（例えば、真の）濃度の約10%以内である場合、流体試料中の分析物分子の濃度は、実質的に正確に決定されているとみなされ得る。ある特定の実施形態では、流体試料中の分析物分子の測定濃度は、測定濃度が流体試料中の分析物分子の実際の

濃度の約 5 % 以内、約 4 % 以内、約 3 % 以内、約 2 % 以内、約 1 % 以内、約 0.5 % 以内、約 0.4 % 以内、約 0.3 % 以内、約 0.2 % 以内、または約 0.1 % 以内である実施形態において、実質的に正確に決定される。一部の場合では、決定された濃度の測定値は、真の（例えば、実際の）濃度と約 20 % 以下、約 15 % 以下、約 10 % 以下、約 5 % 以下、約 4 % 以下、約 3 % 以下、約 2 % 以下、約 1 % 以下、または約 0.5 % 以下の差異がある。アッセイ法の精度は、いくつかの実施形態では、選択されたアッセイ法を使用して既知濃度の流体試料中の分析物分子の濃度を決定し、測定濃度を実際の濃度と比較することによって決定され得る。

【0503】

いくつかの実施形態では、本システムまたは方法は、約 1000（3 ログ）、約 10,000（4 ログ）、約 100,000（5 ログ）、約 350,000（5.5 ログ）、約 1,000,000（6 ログ）、約 3,500,000（6.5 ログ）、約 10,000,000（7 ログ）、約 35,000,000（7.5 ログ）、約 100,000,000（8 ログ）以上を超えるダイナミックレンジにわたって、流体試料中の分析物分子の濃度を測定することができ得る。

【0504】

いくつかの実施形態では、実質的に正確に決定され得る流体試料中の分析物分子の濃度（例えば、未知の濃度）は、約 5000 fM（フェムトモル）未満、約 3000 fM 未満、約 2000 fM 未満、1000 fM 未満、約 500 fM 未満、約 300 fM 未満、約 200 fM 未満、約 100 fM 未満、約 50 fM 未満、約 25 fM 未満、約 10 fM 未満、約 5 fM 未満、約 2 fM 未満、約 1 fM 未満、約 500 aM 未満（アトモル）、約 100 aM 未満、約 10 aM 未満、約 5 aM 未満、約 1 aM 未満、約 0.1 aM 未満、約 500 zM（zeptomol）未満、約 100 zM 未満、約 10 zM 未満、約 5 zM 未満、約 1 zM 未満、約 0.1 zM 未満、またはそれ以下である。一部の場合では、検出限界（例えば、溶液中で測定され得る分析物分子の最低濃度）は、約 100 fM、約 50 fM、約 25 fM、約 10 fM、約 5 fM、約 2 fM、約 1 fM、約 500 aM（アトモル）、約 100 aM、約 50 aM、約 10 aM、約 5 aM、約 1 aM、約 0.1 aM、約 500 zM（zeptomol）、約 100 zM、約 50 zM、約 10 zM、約 5 zM、約 1 zM、約 0.1 zM 以下である。いくつかの実施形態では、実質的に正確に決定され得る流体試料中の分析物の分子または粒子の濃度は、約 5000 fM～約 0.1 fM、約 3000 fM～約 0.1 fM、約 1000 fM～約 0.1 fM、約 1000 fM～約 0.1 zM、約 100 fM～約 1 zM、約 100 aM～約 0.1 zM 以下である。検出の上限（例えば、溶液で決定され得る分析物分子の上方濃度）は、少なくとも約 100 fM、少なくとも約 1000 fM、少なくとも約 10 pM（ピコモル）、少なくとも約 100 pM、少なくとも約 100 pM、少なくとも約 10 nM（ナノモル）、少なくとも約 100 nM、少なくとも約 1000 nM、少なくとも約 10 μM、少なくとも約 100 μM、少なくとも約 1000 μM、少なくとも約 10 mM、少なくとも約 100 mM、少なくとも約 1000 mM 以上である。いくつかの実施形態では、決定される流体試料中の分析物の分子または粒子の濃度は、約 50×10^{-15} M 未満、または約 40×10^{-15} M 未満、または約 30×10^{-15} M 未満、または約 20×10^{-15} M 未満、または約 10×10^{-15} M 未満、または約 1 未満、または約 1×10^{-15} M 未満である。

【0505】

いくつかの実施形態では、実質的に正確に決定され得る試料中の分析物分子の濃度は、約 100 fM 未満、約 10 fM 未満、約 3 fM 未満、約 1 fM 未満、約 0.3 fM 未満、約 0.1 fM 未満、約 0.03 fM 未満、またはそれ以下である。いくつかの実施形態では、実質的に正確に決定され得る試料中の分析物分子の濃度は、約 5000 fM～約 0.1 fM、約 3000 fM～約 0.1 fM、約 1000 fM～約 0.1 fM、約 1000 fM～約 1 fM、約 100 fM～約 1 fM、約 100 fM～約 0.1 fM である。試料中の分析物分子の測定濃度が、試料中の分析物分子の実際の濃度の約 20 % 以内である場合、試料中の分析物分子の濃度は、実質的に正確に決定されるとみなされ得る。ある特定の实

10

20

30

40

50

施形態では、試料中の分析物分子の測定濃度は、試料中の分析物分子の実際の濃度の約 10 % 以内、約 3 % 以内、または約 1 % 以内であり得る。アッセイ法の精度は、いくつかの実施形態では、選択されたアッセイ法を使用して既知濃度の試料中の分析物分子の濃度を決定することによって決定され得る。好ましくは、アッセイは、試料中の約 10 ~ 10,000 分子、好ましくは試料中の 100 ~ 5,000 分子、より好ましくは試料中の 100 ~ 1000 分子を検出することができる。

【0506】

例えば、同じ捕捉抗体および 2 つの検出抗体のいずれか 1 つ、ならびに同じ標識および検出技術を使用して測定される従来のサンドイッチ免疫測定技術と比較して、本明細書に記載のアッセイ形式の使用は、検出シグナルおよびアッセイ感度を 10 倍、好ましくは 50 倍、100 倍、または 1000 倍も改善することができる。好ましくは、本明細書に記載のアッセイ形式の使用は、標準的なサンドイッチ免疫測定法と比較して、検出シグナルおよびアッセイ感度を 100 倍も改善する。

【0507】

本発明方法の 1 つの有利な態様は、特に高感度の光学検出技術と組み合わせた場合、シグナル増幅が光の輝点として個々の結合事象の検出を可能にすることである。次に、シグナルの定量は、個々の事象を計数することによって（これにより、バックグラウンドノイズからの結合事象の識別を改良することにより、低い分析物濃度でより優れた感度を提供できる）、またはすべての結合事象のシグナルを積分することによって（高い分析物濃度を測定するためのより優れたダイナミックレンジを提供できる）実行できる。

【0508】

本発明の方法は、様々なアッセイデバイスおよび／または形式で 사용할 ことができる。アッセイデバイスは、例えば、アッセイプレート、カートリッジ、マルチウェルアッセイプレート、反応容器、試験管、キュベット、フローセル、アッセイチップ、側方流動デバイスなど、アッセイが進行するにつれて添加されるか、またはアッセイモジュールのウェル、チャンバー、またはアッセイ領域にプレロードされるアッセイ試薬（標的剤または他の結合試薬を含み得る）を有するアッセイモジュールを含み得る。これらのデバイスは、特定の結合アッセイ、例えば、免疫測定法またはイムノクロマトグラフィーアッセイのために様々なアッセイ形式を使用することができる。例示的なアッセイデバイスおよび形式は、本明細書で以下に記載されている。ある特定の実施形態では、本発明の方法は、乾燥状態で保管されるアッセイ試薬を使用することができ、アッセイデバイス／キットは、アッセイ試薬を乾燥状態で維持するための乾燥剤材料をさらに含むか、または同梱され得る。アッセイ試薬がプレロードされたアッセイデバイスは、保管中の優れた安定性を維持しながら、速度を大幅に向上させ、アッセイ測定の複雑さを軽減することができる。乾燥したアッセイ試薬は、アッセイで使用する前に乾燥させてから再構成することができる任意のアッセイ試薬であり得る。これらには、結合アッセイに有用な結合試薬、酵素、酵素基質、指示薬色素、および目的の分析物を検出するために使用できる他の反応性化合物が含まれるが、これらに限定されない。アッセイ試薬はまた、検出の機構に直接関与しないが、ブロッキング剤、安定剤、界面活性剤、塩、pH 緩衝液、防腐剤などを含むがこれらに限定されない、アッセイにおいて補助的な役割を果たす物質を含み得る。試薬は、遊離形態で存在するか、またはアッセイモジュールの区画の表面（例えば、チャンバー、チャネル、フローセル、ウェルなど）またはコロイド、ビーズ、もしくは他の粒子状担体の表面を含む固相上に支持され得る。

【0509】

本発明の方法は、分析物の量を測定するための様々な方法、特に、固相に結合した分析物の量を測定するための様々な方法と共に使用することができる。使用できる技術には、細胞培養系アッセイ、結合アッセイ（凝集試験、免疫測定法、核酸ハイブリダイゼーションアッセイなどを含む）、酵素アッセイ、比色アッセイなどの当技術分野で知られている技術が含まれるが、これらに限定されない。他の適切な技術は、当技術分野の平均的な技術の 1 つに容易に明らかになるであろう。いくつかの測定技術は、目視検査によって測定

を行うことを可能にし、他の測定技術は、測定を実施するために機器の使用を必要とするか、またはそれから利益を得る場合がある。

【0510】

分析物の量を測定するための方法は、標識フリー技術を含み、これには、i) 分析物が表面に結合した後の表面での質量または屈折率の変化を測定する技術（例えば、表面音響波技術、表面プラズモン共鳴センサー、偏光解析技術など）、ii) 質量分析技術（表面上の分析物を測定できるMALDI、SELDIなどの技術を含む）、iii) クロマトグラフィーまたは電気泳動技術、iv) 蛍光技術（分析物の固有の蛍光に基づく場合がある）などが含まれるが、これらに限定されない。

【0511】

分析物の量を測定するための方法はまた、分析物に直接または間接的に付着され得る標識の検出により（例えば、分析物の標識された結合相手の使用により）、分析物を測定する技術を含む。適切な標識には、直接視覚化できる標識が含まれる（例えば、視覚的に見ることができる粒子、光散乱、光学的吸収、蛍光、化学発光、電気化学発光、放射能、磁場などの測定可能なシグナルを生成する標識）。使用できる標識には、光散乱、吸光度、蛍光などの測定可能なシグナルをもたらす化学活性を有する酵素または他の化学反応種も含まれる。標識としての酵素の使用は、ELISA、酵素免疫測定法またはEIAとも呼ばれる酵素結合免疫吸着測定法で十分に確立されている。ELISA形式では、未知の量の抗原が表面に付着し、次に特定の抗体が表面上で洗浄されて、抗原に結合できるようになる。この抗体は酵素に結合しており、最終工程で、酵素が検出可能なシグナルの変化を提供する産物に変換する物質が追加される。産物の形成は、例えば、基質との違いにより、吸光度、蛍光、化学発光、光散乱などの測定可能な特性において検出可能であり得る。本発明による固相結合方法で使用できる特定の（すべてではないが）測定方法は、固相から非結合構成要素（例えば、標識）を除去するための洗浄工程から利益を得るか、または洗浄工程を必要とし得る。したがって、本発明の方法は、そのような洗浄工程を含み得る。

【0512】

一対の検出可能な標識を使用するそれらの実施形態では、それらの標識物質は、独立して検出可能であるそれらの能力および／または標識対が互いに近接である、すなわち、それぞれが検出複合体中の目的の分析物に直接または間接的に結合する場合に、一致協力して検出可能なシグナルを生成するそれらの物質の能力に基づいて選択される。一実施形態では、第1の検出可能な標識は、共役酵素反応系の第1の酵素であり、第2の検出可能な標識は、共役酵素反応系の第2の酵素であり、本方法は、反応系の1つ以上の基質を添加する工程をさらに含むことにより、酵素反応系の検出可能な産物を生成する。検出可能な産物を含むそれらの反応容器は、含まないそれらの反応容器と識別することができる。好ましい実施形態では、検出可能な産物は、第1の酵素および第2の酵素が、例えば、200 nm未満、理想的には50 nm未満に近接している場合にのみ生成される。一実施形態では、第1の酵素はオキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼであり、第2の酵素はペルオキシダーゼであり、基質はオキシダーゼ基質、例えばグルコース、および標識チラミド、Amplex Red（10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジン）、またはルミノール誘導体（本明細書では集合的に標識反応性誘導体と呼ばれ、好ましい実施形態では、標識反応性誘導体はAmplex Redまたはルミノールを含む）を含む。この実施形態では、第1の酵素は基質と反応して産物を生成し、これは第2の酵素と反応して第2の産物を生成し、これは標識された反応性誘導体と反応して検出可能な種を生成する。好ましくは、検出複合体中の第1および第2の酵素によって触媒される反応は、表面上に標識された反応性誘導体の固定化をもたらす、これは、表面上に存在する分析物分子の数を決定するために測定され得る。一実施形態では、標識された反応性誘導体はビオチン-チラミドであり、この方法は、標識されたストレプトアビジンを添加することと、ストレプトアビジン上の標識を測定することと、をさらに含む。

【0513】

本方法で使用できるさらに別の近位依存性標識システムは、FRET対であり、例えば

、第1の検出可能な標識はFRETドナーであり、検出可能な標識はFRETアクセプターである。蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）は、2つの色素分子の電子励起状態間の距離依存性相互作用であり、励起は光子を放出せずにドナー分子からアクセプター分子に移動する。FRETの効率は、分子間分離の6乗の逆数に依存するため、生体高分子の寸法に匹敵する距離で有用になる。この標識システムでは、近位依存性シグナルは、FRETドナーを励起し、FRETアクセプターからの発光を測定することによって測定される。ドナー分子およびアクセプター分子は、好ましくは、例えば、約10～100オングストロームで近接しており、アクセプターの吸収スペクトルは、好ましくは、ドナーの蛍光発光スペクトルと重複し、ドナーおよびアクセプターの遷移双極子配向は、ほぼ平行でなければならない。FRET対の非限定的な列举を以下の表1に示す。

【表6】

表1 FRET対の例

ドナー	アクセプター
フルオレセイン	テトラメチルローダミン
IAEDANS	フルオレセイン
EDANS	ダブシル
フルオレセイン	フルオレセイン
BODIPY FL	BODIPY FL
フルオレセイン	QSY7 および QSY9 色素

【0514】

光学顕微鏡法には、アクセプター光退色、ドナー光退色、レシオイメージング、増感発光、蛍光寿命測定など、様々なFRET検出方法が存在する。

【0515】

一対の検出標識を使用する一実施形態で利用できる別の適切な標識システムは、第1および第2の検出可能な標識を独立して測定することができるシステムである。例えば、第1および第2の検出可能な標識は、スペクトル特性に関して互いに異なる発光標識であり得る。代替的に、第1の検出可能な標識は、第1の基質と反応して第1のシグナルを生成する第1の酵素であり、第2の検出可能な標識は、第2の基質と反応して異なる第2のシグナルを生成する第2の酵素であり、本方法は、第1の酵素基質および第2の酵素基質を添加することと、第1および第2のシグナルが生成する反応容器の数を計数することと、をさらに含む。第1および第2のシグナルは、異なるスペクトル特性を有する光学吸収および／または発光シグナルの変化であり得る。

【0516】

第1および第2の検出可能な標識が第1および第2の酵素を含む場合、それらはそれぞれ、加水分解酵素、例えば、ホスファターゼ、スルファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、またはそれらの組み合わせであり得、したがって、第1および第2の基質は、ホスフェート、サルフェート、ガラクトシドおよびグルクロニド修飾安定化ジオキセタン、4-メチルウンベリフェリル、フルオレセイン、またはそれらの組み合わせから選択される。代替的に、第1および第2の酵素は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ペクターガラクトシダーゼ、およびアルカリホスファターゼから選択される。

【0517】

代替的に、分析物分子を検出するために使用される標識は、単一分子蛍光検出、例えば、蛍光相関分光法、および／または蛍光相互相関分光法で使用する蛍光種であり得る。単一分子蛍光の検出は、キャピラリーを通して検出可能な種を含む溶離液を流すことと、キャピラリー内の体積に光源を集束させて照合（interrogation）ゾーンを作り出すことと、光検出器で照合ゾーンを観察して照合ゾーンを通る蛍光分子の通過を検出することと、を含む。

【0518】

一実施形態では、試料中の目的の分析物は、電気化学発光系アッセイ形式、例えば、電気化学発光（ECL）系免疫測定法を使用して測定することができる。ECLの高感度、広いダイナミックレンジ、および選択性は、医療診断の重要な要素である。市販のECL機器は並外れた性能を証明し、錯体試料マトリックスの感度、ダイナミックレンジ、精度、許容範囲を含む理由で広く使用されるようになってきている。ECLを放出するように誘導できる種（ECL活性種）は、ECL標識として使用されており、例えば、i) 金属が、例えば、Ru含有およびOs含有の有機金属化合物を含む、VII族の貴金属に由来する有機金属化合物、トリスービピリジルルーテニウム（RuBpy）部分など、ii) ルミノールおよび関連化合物。ECLプロセスでECL標識に関与する種は、本明細書ではECL共反応物と称される。通常使用される共反応物としては、第三級アミン（例えば、米国特許第5,846,485号を参照）、オキサレート、ならびにRuBpyからのECL用のパーサルフェート、およびルミノールからのECL用の過酸化水素（例えば、米国特許第5,240,863号を参照）が挙げられる。ECL標識によって生成される光は、診断手順のレポーターシグナルとして使用することができる（Bard et al.、米国特許第5,238,808号、参照により本明細書に組み込まれる）。例えば、ECL標識は、抗体、核酸プローブ、受容体もしくはリガンドなどの結合剤に共有結合することができ、結合相互作用における結合試薬の関与は、ECL標識から放出されたECLを測定することによって監視することができる。代替的に、ECL活性化化合物からのECLシグナルは、化学環境の指標であり得る（例えば、ECL共反応物の形成または破壊を監視するECLアッセイについて説明している米国特許第5,641,623号を参照）。ECL、ECL標識、ECLアッセイ、およびECLアッセイを実施するための器具類のさらなる背景については、米国特許第5,093,268号、同第5,147,806号、同第5,324,457号、同第5,591,581号、同第5,597,910号、同第5,641,623号、同第5,643,713号、同第5,679,519号、同第5,705,402号、同第5,846,485号、同第5,866,434号、同第5,786,141号、同第5,731,147号、同第6,066,448号、同第6,136,268号、同第5,776,672号、同第5,308,754号、同第5,240,863号、同第6,207,369号、同第6,214,552号、および同第5,589,136号、ならびに公開PCT第99/63347号、同第00/03233号、同第99/58962号、同第99/32662号、同第99/14599号、同第98/12539号、同第97/36931号、および同第98/57154号を参照し、これらのすべては、参照により本明細書に組み込まれる。

【0519】

本発明の方法は、単一の試料に対して複数のアッセイ測定が行われるシングルプレックスまたはマルチプレックスの形式に適用することができる。本発明で使用できるマルチプレックス測定には、i) 複数のセンサーの使用を伴うマルチプレックス測定、ii) 表面上の位置に基づいて識別できる、表面上の個別のアッセイドメイン（例えば、アレイ）を使用するマルチプレックス測定、iii) サイズ、形状、色などの粒子特性に基づいて識別できる粒子にコーティングされた試薬の使用を伴うマルチプレックス測定、iv) 光学特性（例えば、吸光度もしくは発光スペクトル）に基づいて識別できるアッセイシグナルを生成するマルチプレックス測定、またはv) アッセイシグナルの時間特性（例えば、シグナルの時間、周波数もしくは位相）に基づくマルチプレックス測定が含まれるが、これらに限定されない。

【0520】

いくつかの実施形態では、試料中の分析物分子の濃度の測定値は、測定されたパラメータを較正標準と比較することによって少なくとも部分的に決定され得る。例えば、分析物分子を含む結合表面の割合を、較正曲線と比較して、試料中の分析物分子の濃度の測定値を決定することができる。較正曲線は、試験試料の分析に使用される条件下で、既知濃度の複数の標準化試料を用いてアッセイを達成することによって作成することができる。標

準化された各試料の分析物分子の検出／定量に関するシグナルを読み取ることができるため、分析物分子の検出を既知濃度の分析物分子と関連付ける較正曲線の形成が可能になる。次に、未知濃度の分析物分子を含む試料でアッセイを達成し、このアッセイからの分析物分子の検出を較正曲線にプロットし、したがって、試料中の分析物分子の濃度の測定値を決定することができる。

【0521】

画像化技術を使用して光シグナル（蛍光、化学発光、電気化学発光など）を測定する特定の事例では、結合事象を光の輝点源として検出できる。点光源の面密度が低い場合（例えば、 $R \times R$ 領域で点光源を見出す確率（ R は検出システムの空間分解能である）が10%未満である場合）、観測された光源が単一の結合事象による可能性がある。これらの条件下では、事象の計数が最も感度の高い測定を提供できる。表面密度が増加するにつれて、個々の結合事象を解像して計数することがますます困難になる。これらの条件下で、結合面上で光シグナルを積分すると、より正確な測定が提供される。

【0522】

本明細書に記載の方法が当業者に知られている多数の免疫測定プラットフォームに適用できることは当業者には明らかであろう。免疫測定プラットフォームの様々な特徴は、特定のプラットフォームに適合するように調整することができるが、それらの調整は、十分に通常技術者の技術の範囲内である。例えば、本明細書に記載の方法は、コード化された粒子を使用するビーズ系形式に適用することができる。そのようなシステムでは、使用されるビーズは磁性または非磁性であり得、ビーズの表面は、捕捉試薬の1つ以上のコピーを含むように修飾される。このシステムで使用される検出試薬は、一対の検出試薬である。一実施形態では、2つの検出試薬は、識別可能な蛍光標識を含む。代替的に、2つの検出試薬は、本明細書に記載されるように、核酸プローブで修飾され、その場合、免疫測定法は、伸長プロセス、例えば、 $RCA-PLA$ を含み、検出され得る各検出試薬の存在を示す増幅産物を生成する。検出試薬が2つの識別可能な蛍光標識を含む場合、測定工程にはビーズをフローセルに導入することが含まれ、ビーズが磁性である場合は、フローセルのビーズを捕捉する。検出試薬が核酸プローブで修飾されている場合、測定工程は、ビーズ上にサンドイッチ複合体を形成することと、 $RCA-PLA$ を実行することと、蛍光標識された検出プローブでアンプリコンを標識することと、を含む。次に、標識ビーズがフローセルに導入され、ビーズが磁性である場合、ビーズはフローセルで捕捉される。各実施形態では、アッセイは、蛍光標識されたコード化ビーズの特定に基づいてスペクトル的にマルチプレックス化され得る。マルチカラー検出用の励起光源および発光光検出器を使用して、各実施形態の結合事象を検出することができ、定量は、検出可能な標識または検出可能に標識された伸長産物を含むビーズの両方を有するビーズを計数することによって達成され、定量はまた、積分強度によって、例えば、全結合事象のシグナルの積分による検出によっても達成される。したがって、キットは、上記の方法で使用するために提供され得、下記のうちの1つ以上を、1つ以上のバイアル、容器、または区画を含む。(a) 捕捉試薬を備えた磁性または非磁性ビーズ、(b) 識別可能な蛍光標識を備えた2つの検出試薬、ならびに(c) アッセイプロトコル用の任意の緩衝液および／または希釈剤。上記の方法で使用できる別のキットは、下記のうちの1つ以上を、1つ以上のバイアル、容器、または区画上に含むことができる。(a) 捕捉試薬を備えた磁性または非磁性ビーズ、(b) 核酸プローブで修飾された2つの検出試薬（任意で、検出試薬は別々に提供され、近接プローブ（1および2）は追加でプローブで検出試薬を修飾するための取扱説明書とともに提供される）、(c) 蛍光標識プローブ、近接プローブによる検出試薬の修飾に必要な任意の試薬、アッセイ希釈剤、較正物質、環状化オリゴヌクレオチド、連結混合物またはその構成要素、例えば、連結緩衝液、ATP、BSA、Tween 20、T4 DNAリガーゼ、RCA混合物またはその構成要素、例えば、BSA、緩衝液、dNTP、Tween 20、Phi 29 DNAポリメラーゼ。

【0523】

別の実施形態では、本明細書に記載の方法は、フローセル分析されたビーズ系形式に適

用することができる。そのようなシステムでは、使用されるビーズは磁性であり得、ビーズの表面は、捕捉試薬の1つ以上のコピーを含むように修飾される。このシステムで使用する検出試薬は、本明細書に記載されるように、核酸プローブで修飾された一対の検出試薬であり、その場合、免疫測定法は、伸長プロセス、例えばRCA-PLAを含み、検出され得る各検出試薬の存在を示す増幅産物を生成する。測定工程は、ビーズ上にサンドイッチ複合体を形成することと、RCA-PLAを実行することと、ECL標識された検出プローブでアンプリコンを標識することと、を含む。次に、標識ビーズがフローセルに導入され、ビーズはフローセルで捕捉される。特に、磁場を印加して、磁性粒子、例えば、ビーズを電極表面に引き寄せ、電極表面は、様々な金属、例えば、白金を含み得る。電圧源を使用して電極に電圧を印加し、発光検出器を使用して、結合事象を検出することができ、定量は、検出可能に標識された伸長産物を有するビーズを計数することによって達成され、定量はまた、積分強度によって、例えば、全結合事象のシグナルの積分による検出によっても達成される。上記の方法で利用できるキットは、下記のうちの1つ以上を、1つ以上のバイアル、容器、または区画上に含むことができる。(a) 捕捉試薬を備えた磁気ビーズ、(b) 核酸プローブで修飾された2つの検出試薬(任意で、検出試薬は別々に提供され、近接プローブ(1および2)はさらにプローブで検出試薬を修飾するための取扱説明書とともに提供される)、(c) ECL標識プローブ、近接プローブによる検出試薬の修飾に必要な任意の試薬、アッセイ希釈剤、校正物質、環状化オリゴヌクレオチド、連結混合物またはその構成要素、例えば、連結緩衝液、ATP、BSA、Tween 20、T4 DNAリガーゼ、RCA混合物またはその構成要素、例えば、BSA、緩衝液、dNTP、Tween 20、Phi 29 DNAポリメラーゼ。

【0524】

フローセル分析されたビーズ系形式の特定の実施形態では、試料は、ビオチン化モノクローナル分析物に特異的な捕捉抗体およびモノクローナル分析物に特異的な抗体の混合物と共にインキュベーションされ、それぞれがオリゴヌクレオチドにコンジュゲートし、これらは反応してサンドイッチ複合体を形成する。ストレプトアビジンでコーティングされた微粒子の添加後、複合体はビオチンとストレプトアビジンの間の相互作用を介して固相に結合するようになる。連結混合物を混合物に添加し、混合物を連結混合物とインキュベーションし、洗浄して過剰の環状化オリゴヌクレオチドを除去し、RCA混合物とインキュベーションする。混合物を洗浄し、ビオチンで標識された検出プローブの混合物を添加する。適切な標識、例えば、発光、化学発光、または電気化学発光の標識、例えば、SULFO-TAGを組み込むために、検出プローブは、末端ビオチン標識で合成され、SULFO-TAGで標識されたストレプトアビジンに事前に結合する。反応混合物は測定セルに吸引され、そこで微粒子は電極、例えば白金電極などの金属電極の表面上に磁気的に捕捉される。次に、未結合の物質を、適切な洗浄緩衝液、例えば、PROCELL(TPA含有緩衝液)で除去する。次に、電極に電圧を印加すると、光電子増倍管によって測定される化学発光が誘起される。電圧の印加および結果として生じる発光の測定は、任意の適切なフローセル、例えば、COBASおよび/またはELECSYS機器(Hoffmann-La Roche LTD. から入手可能)で行うことができる。

【0525】

さらに別の実施形態では、本明細書に記載の方法は、個々の分子をデジタルで計数するための毛細管流を用いて、ビーズ系形式に適用することができる。そのようなシステムでは、使用されるビーズは磁性であり得、ビーズの表面は、捕捉試薬の1つ以上のコピーを含むように修飾される。このシステムで使用する検出試薬は、識別可能な蛍光標識を含む一対の検出試薬である。測定工程は、捕捉試薬、分析物、および検出試薬を含むサンドイッチ複合体を形成することと、検出試薬を架橋することと、検出試薬を溶出することと、ビーズをフローセルに導入することと、を含む。マルチカラー検出用の励起光源および発光検出器を使用して、結合事象を検出することができ、定量は、フローセル内の2つのフルオロフォアの検出を相関させることによって達成され、定量はまた、積分強度によって、例えば、全結合事象のシグナルの積分による検出によっても達成される。上記の方

法で使用できるキットは、下記のうちの1つ以上を、1つ以上のバイアル、容器、または区画に含み得る。(a) 捕捉試薬を備えた磁気ビーズ、(b) 識別可能な蛍光標識を備えた2つの架橋可能な検出試薬、ならびに(c) アッセイプロトコル用の任意の緩衝液および／または希釈剤。

【0526】

さらに、本明細書に記載の方法は、ビーズを個々のナノウェルに分離することを含むビーズ系形式に適用することができる。そのようなシステムでは、使用されるビーズは磁性であり得、ビーズの表面は、捕捉試薬の1つ以上のコピーを含むように修飾される。このシステムで使用される検出試薬は、識別可能な酵素標識を含む一対の検出試薬である。測定工程は、捕捉試薬、分析物、および検出試薬を含むサンドイッチ複合体を形成することと、2つの酵素標識用の基質を添加することと、を含む。次に、ビーズは個々のナノウェルに捕捉される。アッセイは、異なるスペクトル特性を有する酵素産物の特定に基づいてスペクトル的にマルチプレックス化することができる。マルチカラー検出用の励起光源および発光光検出器を使用して、結合事象を検出することができ、定量は、両方の酵素産物を含むナノウェルを計数することによって達成され、定量はまた、積分強度によって、例えば、全ナノウェルのシグナルの積分による検出によっても達成される。上記の方法で使用できるキットは、下記のうちの1つ以上を、1つ以上のバイアル、容器、または区画に含み得る。(a) 捕捉試薬を備えた磁気ビーズ、(b) それぞれが識別可能な酵素標識で修飾された2つの検出試薬、例えば、ビオチン化検出試薬およびハプテンにコンジュゲートした検出試薬、(c) ストレプトアビジン-ベータガラクトシダーゼ、抗ハプテンにコンジュゲートした酵素、レゾルフィン-ベータ-d-ガラクトピラノシド、(d) アレイ、例えば、QUANTERIX DVD形式アレイ、(e) フルオロカーボンオイル、ならびに(f) アッセイプロトコル用の任意の緩衝液および／または希釈剤。この特定の実施形態では、検出可能なシグナルは、ナノウェル高感度システムの使用を近接系検出システムと組み合わせることによって増強される。この特定の実施形態は、特定の近接系検出システムを使用して示されているが、当業者は、本明細書に記載の他の近接系検出システムもまた、アッセイの検出可能なシグナル、例えば、FRETドナー／アクセプターシステム、スペクトル特性に関して互いに異なる発光標識を増強するために使用できるという事実、または、上記のように加水分解酵素である第1および第2の酵素、ならびに適切な添加基質の使用を理解するであろう。

【0527】

さらに、本明細書に記載の方法は、ビーズアレイ系プラットフォームに適用することができる。そのようなシステムでは、使用されるビーズは非磁性であり得、ビーズの表面は、捕捉試薬の1つ以上のコピーを含むように修飾される。このシステムで使用される検出試薬は、第1および第2の核酸プローブを含む一対の検出試薬である。測定工程は、捕捉試薬、分析物、および検出試薬を含むサンドイッチ複合体を形成することと、プローブのうちの1つを伸長して伸長配列を形成することと、伸長がサンドイッチ複合体における第1および第2のプローブの共局在化に依存する、伸長配列を形成することと、伸長配列を蛍光プローブで標識することと、伸長配列を表面から溶離液に放出することと、を含む。マルチカラー検出用の励起光源および発光光検出器を使用して、結合事象を検出することができ、定量は、検出可能に標識された個々の伸長産物を計数することによって達成され、定量はまた、積分強度によって、例えば、全結合事象のシグナルの積分による検出によっても達成される。上記の方法で使用できるキットは、下記のうちの1つ以上を、1つ以上のバイアル、容器、または区画上に含み得る。(a) 捕捉試薬を備えた非磁気ビーズ、(b) 核酸プローブで修飾された2つの検出試薬(任意で、検出試薬は別々に提供され、近接プローブ(1および2)はさらにプローブで検出試薬を修飾するための取扱説明書とともに提供される)、(c) 蛍光標識プローブ、近接プローブによる検出試薬の修飾に必要な任意の試薬、アッセイ希釈剤、校正物質、環状化オリゴヌクレオチド、連結混合物またはその構成要素、例えば、連結緩衝液、ATP、BSA、Tween 20、T4 DNAリガーゼ、RCA混合物またはその構成要素、例えば、BSA、緩衝液

、dNTP、Tween 20、Phi 29 DNAポリメラーゼ。

【0528】

本明細書に記載の結合アッセイは、アッセイで使用される一組の構成要素を含む1つ以上のキットを使用して行うことができる。例えば、試料中の分析物の検出に使用されるキットは、1つ以上のバイアル、容器、または区画内に、分析物の捕捉試薬およびアンカー試薬を含む表面と、核酸プローブに連結された分析物の検出試薬と、を含む。そのようなキットは、アンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含み得る。

【0529】

本明細書に記載の方法を実行するために使用できる別のキットは、1つ以上のバイアル、容器、または区画内に、分析物の捕捉試薬、およびアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面と、第1の核酸プローブに連結された第1の検出試薬および第2の核酸プローブに連結された第2の検出試薬とを含む。

【0530】

本明細書に記載の結合アッセイを実施するために使用できるさらに別のキットは、1つ以上のバイアル、容器、または区画内に、分析物の捕捉試薬およびアンカー試薬を含む表面と、第1の近接プローブを含む分析物のための第1の検出試薬と、第2の近接プローブを含む分析物のための第2の検出試薬と、(i)第2の近接プローブに相補的な内部配列および(ii)第1の近接プローブの非重複領域に相補的な2つの末端配列を含むコネクター配列と、を含む。代替的に、キットは、代わりに、分析物の捕捉試薬、およびアンカー試薬を含む表面と、第1の近接プローブを含む分析物の第1の検出試薬と、第2の近接プローブを含む分析物の第2の検出試薬と、(i)第1のコネクターオリゴヌクレオチドおよび(ii)第2のコネクターオリゴヌクレオチドとを含み得、(x)第1のコネクターの第1の末端および第2のコネクターの第1の末端は、第1の近接プローブの2つの非重複領域に相補的であり、(y)第1のコネクターの第2の末端および第2のコネクターの第2の末端は、第1の近接プローブの2つの非重複領域に相補的である。さらに、これらのキットの一方または両方のアンカー試薬は、アンカーオリゴヌクレオチド配列を含み得る。

【0531】

さらに、本明細書に記載の方法は、1つ以上のバイアル、容器、または区画において、第1の検出可能な標識を含む第1の検出試薬と、第2の検出可能な標識を含む第2の検出試薬と、1つ以下の分析物分子を含むように構成された複数の反応容器と、任意で、捕捉試薬を含む表面と、を含むキットを使用して行うことができる。

【0532】

最後に、本明細書に記載の方法を使用して分析物を検出するためのキットは、1つ以上のバイアル、容器、または区画に、固定された捕捉試薬を含む表面と、第1の検出可能な標識を有する第1の検出試薬と、第2の検出可能な標識を有する第2の検出試薬と、第1および第2の検出試薬と反応性のある架橋剤と、を含む。架橋剤は、検出試薬に付着した反応性部分または検出試薬に付着した結合部分の多価結合相手を連結する多官能性架橋剤を含み得る。適切な多機能架橋剤には、アミン、チオール、ヒドラジド、アルデヒド、エステル、ヨードアセトアミド、マレイミド、クリック化学試薬、および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。同様に、多価結合相手の例は、その動物種の抗体である検出試薬を標的とする多価抗種抗体である。架橋剤はまた、検出試薬に付着したコンパニオン結合相手と対合する場合、ストレプトアビジン、アビジン、またはビオチンを含み得る。架橋剤はまた、キットの構成要素に直接的または間接的に結合した核酸プローブに相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法で使用されるキットは、1つ以上のバイアル、容器、または区画に、固定された捕捉試薬を含む表面と、第1の検出可能な標識および第1の核酸プローブを有する第1の検出試薬と、第2の検出可能な標識および第2の核酸プローブを有する第2の検出試薬と、第1および第2の核酸プローブに相補的な領域を有する第3の核酸と、を含む。

【0533】

本明細書に記載のキットの表面は、1つ以上の分析物分子のための複数の捕捉試薬を含み得、捕捉試薬は、表面上に位置付けられた複数の分解可能な結合領域または反応容器、例えば、アレイ、マルチウェルプレート、またはマイクロウェルプレートもしくはナノウェルプレートに分布する。さらに、表面はまた、それぞれが分析物分子のための複数の捕捉試薬を含む複数の粒子を含み得る。

【0534】

上記のキットは、下記のうちの1つ以上をさらに含み得る。1つ以上の追加の試薬、緩衝液、ポリメラーゼ、リガーゼ、および／またはdNTP（標識または非標識）。さらに、1つ以上の検出試薬が検出可能な標識を含む場合、キットはまた、キットで使用される検出可能な標識のための共反応物を含み得る。代替的に、1つ以上の検出試薬が共役酵素反応系の構成要素である場合、検出試薬のそれぞれは、第1および第2の酵素を含み、キットは、1つ以上の容器、バイアルまたは区画に、共役酵素反応系のための1つ以上の基質と、任意で、共役酵素反応系の産物に結合するように構成された標識構成要素と、をさらに含む。例えば、第1の酵素はオキシダーゼであり得、第2の酵素はペルオキシダーゼであり得、キットはオキシダーゼ基質および標識されたチラミド誘導体をさらに含む。別の実施形態では、第1および第2の検出可能な試薬は、近位依存性検出系の構成要素、例えば、FRETドナーおよびFRETアクセプター、またはそれらのスペクトル特性に関して互いに異なる発光標識を含む。

【0535】

追加の代替実施形態

さらなる実施形態が図7に示される。パネル(a)のサンドイッチ免疫測定複合体の各近接プローブの一部が、各セグメントにハイブリダイズしたRNAの短鎖によって一時的に保護される。近接プローブのそれぞれが互いにハイブリダイズし、ビオチン化dNTPを使用したポリメラーゼ伸長によって鎖が伸長するように、RNA鎖は酵素で除去される(パネル(b))。鎖に組み込まれた各ビオチン化塩基は、検出可能な標識で標識されたストレプトアビジンに結合する(パネル(c))。

【0536】

さらに別のアプローチが図8に示される。近接プローブは、アンカー試薬および検出試薬に付着することができ(パネル(a)に示すように)、または近接プローブのそれぞれは、上記のように2つの検出試薬に付着することができる(図示しない)。図7に示される方法と同様に、各近接プローブの一部が、各セグメントにハイブリダイズしたRNAの短鎖によって一時的に保護される。近接プローブのそれぞれが互いにハイブリダイズし、ビオチン化dNTPを使用したポリメラーゼ伸長によって鎖が伸長するように、RNA鎖は酵素で除去される(パネル(b))。鎖に組み込まれた各ビオチン化塩基は、検出可能な標識で標識されたストレプトアビジンに結合する(パネル(c))。

【0537】

追加の実施形態が図18に示される。この実施形態では、複数の短いオリゴヌクレオチドがステーブル配列(1801)として使用されて、アンプリコンの一部にハイブリダイズし、それにより、産物を、容易に画像化されるコンパクトな構造に折りたたむ。各ステーブル配列は、アンプリコンの配列にそれぞれ相補的な少なくとも2つの配列(それぞれ1802および1803)を含み、各ステーブル配列がその相相補体にハイブリダイズすると、アンプリコンは、図18に示すように折りたたまれる。さらに、アンプリコンはまた、本明細書で上記に記載されるように、アンカー試薬(1804)とのアンカー相互作用を介して表面に接着することができる。ステープリングプロセスは、増幅工程中に反応混合物にステーブル配列を加えることにより、インサイツで行うことができる。したがって、増幅の各サイクルが完了すると、ステーブル配列は新しく形成されたアンプリコンに自由にハイブリダイズし、それを折りたたむ。ステーブル配列およびそれに対応する相補体の設計に応じて、増幅プロセスの完了後にステーブルを追加して、線形アンプリコンをコイルまたはフラットシートに折りたたむこともできる。標識分子、例えば、ECFまたは蛍光を、ステーブル配列に組み込むことができる(または、上記のようにアンプリコン

10

20

30

40

50

に組み込むことができる)。この実施形態は、表面上に三次元構造をもたらし、より高いシグナル密度のより小さな特徴を生じ、これは、表面上のアンプリコンのより容易な画像化を可能にする。

【0538】

手動および自動の実施形態

本明細書に開示される方法は、手動で、自動化技術を使用して、またはその両方で行うことができる。自動化技術は、部分的に自動化されていてもよく、例えば、1つ以上のモジュール式機器、または完全に一体化された自動化機器でもよい。

【0539】

自動化システムの例は、共同所有された国際特許出願公開第2018/017156号および第2017/015636号および国際特許出願公開第2016/164477号に考察および記載されており、それぞれは参照によりその全体が組み込まれている。

【0540】

本明細書の方法が実行され得る自動化システム（モジュールおよび完全に一体化された）は、以下の自動化サブシステムを含み得る。ハードウェア（例えば、パーソナルコンピュータ、ラップトップ、ハードウェアプロセッサ、ディスク、キーボード、ディスプレイ、プリンター）、ソフトウェア（例えば、ドライバー、ドライバーコントローラー、およびデータ分析器などのプロセス）、およびデータベースを含み得るコンピュータサブシステム、液体処理サブシステム、例えば、試料処理および試薬処理、例えば、ロボットピペッティングヘッド、シリンジ、攪拌装置、超音波混合装置、磁気混合装置、試料、試薬、および消耗品の保管および処理サブシステム、例えば、ロボットマニピュレータ、チューブまたは蓋またはホイルの穿孔装置、蓋取り外し装置、線形および円形コンベヤーおよびロボットマニピュレータなどの搬送装置、チューブラック、プレートキャリア、トラフキャリア、ピペットチップキャリア、プレートシェーカー、遠心分離機、アッセイ反応サブシステム、例えば、流体系および消耗品系（チューブおよびマルチウェルプレートなど）、容器および消耗品洗浄サブシステム、例えば、プレート洗浄装置、磁気分離器または磁性粒子濃縮器サブシステム、例えば、フローセル、チューブ、およびプレート型、細胞および粒子の検出、分類および分離サブシステム、例えば、フローサイトメーターおよびコールターカウンター、比色、比濁、蛍光、ECL検出器などの検出サブシステム、温度制御サブシステム、例えば、空気処理、空冷、空気加温、ファン、送風機、水浴、廃棄サブシステム、例えば、液体および固体の廃棄物容器、サブシステムを検出するグローバル固有識別子（GUI）、例えば、フラットベッドおよび棒形などの1Dおよび2Dバーコードスキャナー、試料識別子検出サブシステム、例えば、フラットベッドおよび棒形などの1Dおよび2Dバーコードスキャナー。分析サブシステム、例えば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（FPLC）などのクロマトグラフィーシステム、および質量分析計も、モジュールであり得、または完全に一体化され得る。

【0541】

試料の特定および調製を実行するシステムまたはモジュールは、アッセイを実行し、検出を実行する、またはその両方を実行するシステムまたはモジュールと組み合わせる（または隣り合うか、隣接するか、ロボットで連結または結合する）ことができる。同じ種類の複数のモジュラーシステムを組み合わせ、処理能力を向上させることができる。モジュラーシステムは、化学的、生化学的、および核酸分析などの他のタイプの分析を実行するモジュールと組み合わせることができる。

【0542】

自動化システムにより、バッチ、連続、ランダムアクセス、およびポイントオブケアのワークフロー、ならびに単一、中、および高の試料処理能力が可能になる。

【0543】

システムは、例えば、下記のデバイスのうちの1つ以上を含み得る。プレートシーラー（例えば、Zymark）、プレートウォッシャー（例えば、BioTek、TECAN

10

20

30

40

50

)、試薬ディスペンサーおよび／または自動ピペッティングステーションおよび／または液体処理ステーション(例えば、TECAN、Zymark、Lab systems、Beckman、Hamilton)、インキュベーター(例えば、Zymark)、プレートシェーカー(例えば、Q. Instruments、Inheco、Thermo Fisher Scientific)、化合物ライブラリーまたは試料保管および／または化合物および／または試料検索モジュール。これらのデバイスのうちの1つ以上は、アッセイプロセス全体を自動的に行うことができるように、ロボット組み立てを介して本発明の装置に結合される。代替の実施形態によれば、容器(例えば、プレート)は、装置と様々なデバイス(例えば、プレートのスタック)との間を手動で移動される。

【0544】

自動システムは、以下の機能のうちの1つ以上を実行するように構成され得る。(a) 検出サブシステムの中、内および外でのプレートなどの消耗品の移動、(b) 他のサブシステム間での消耗品の移動、(c) 消耗品の保管、(d) 試料および試薬の取り扱い(例えば、試薬の混合および／または試薬の消耗品への導入に適合させる)、(e) 消耗品の振とう(例えば、試薬の混合のため、および／または反応速度の増加のため)、(f) 消耗品の洗浄(例えば、プレートの洗浄および／またはアッセイ洗浄工程の実行(例えば、十分な吸引))、(g) フローセルまたはチューブもしくはプレートなどの消耗品でのECLの測定。自動化システムは、ラックに置かれた個々のチューブ、96または384ウェルプレートなどのマルチウェルプレートを処理するように構成することができる。

【0545】

本明細書に記載されるような自動化システムに構成要素およびモジュールを統合するための方法は、当技術分野で周知であり、例えば、Sargeant et al., Platform Perfection, Medical Product Outsourcing, May 17, 2010を参照。

【0546】

実施形態では、自動化システムは、完全に自動化され、モジュール式であり、コンピュータ化され、広範囲の分析物に対してインビトロで定量的および定性的試験を実行し、測光アッセイ、イオン選択性電極測定、および／または電気化学発光(ECL)アッセイを実行する。実施形態では、システムは、以下のハードウェアユニットを含む。制御ユニット、コアユニット、および少なくとも1つの分析モジュール。

【0547】

実施形態では、制御ユニットは、すべての機器機能を制御するためにグラフィカルユーザインターフェースを使用し、モニタなどの読み出しデバイス、キーボードおよびマウスなどの入力デバイス、および例えば、Windowsオペレーティングシステムを使用するパーソナルコンピュータを含む。実施形態では、コアユニットは、割り当てられた各分析モジュールへの試料の運搬を管理するいくつかの構成要素を含む。コアユニットの実際の構成は、分析モジュールの立体配置に依存し、分析モジュールは、当技術分野で知られている方法を使用して当業者によって構成することができる。実施形態では、コアユニットは、主要構成要素として、少なくともサンプリングユニットおよび1つのラックローターを含む。コンベヤーラインおよび第2のラックローターは可能な拡張である。他のいくつかのコアユニット構成要素には、試料ラックローダー／アンローダー、ポート、バーコードリーダー(ラックおよび試料用)、給水、およびシステムインターフェイスポートが含まれ得る。実施形態では、分析モジュールは、ECLアッセイを実施し、試薬領域、測定領域、消耗品領域、およびブレクリーン領域を含む。

【実施例】

【0548】

実施例1. 近接連結およびローリングサークル増幅の一般プロトコル

標的分析物に対する一対の検出抗体は、次のように近接プローブ1および2を添加することにより修飾された。200 μ gの第1の検出抗体を含む100 μ L緩衝液に、1.74 μ Lの23 mMスルホ-SMCCを添加し、150 mMホスフェート緩衝液で希釈し、

10

20

30

40

50

室温で30分間インキュベーションした。サイズ排除クロマトグラフィーにより、遊離のスルホ-SMCCを除去した。検出抗体の最終濃度は、2mg/mLまたはそれよりわずかに低かった。95μLの300μMチオール修飾オリゴヌクレオチド（近接プローブ1および2）を、1mM DTTを含む100mMホスフェート緩衝液、0.5mM EDTA、pH8.4の5μLを用いて室温で1時間還元した。近接プローブ1および2の配列は、

チオール修飾近接プローブ1：SH-AAA AAA AAA AGA CGC TAA TAG TTA AGA CGC TTU UU（配列番号1、3つのU残基は、2'オームチルRNAである）

チオール修飾近接プローブ2：SH-AAA AAA AAA ATA TGA CAG AAC TAG ACA CTC TT（配列番号2）である。

【0549】

過剰なスルホ-SMCCおよびDTTは、例えば3つのスピンカラムセパレートを使用して除去され、抗体およびDNAを共有結合コンジュゲーション用にプールした。溶液を混合しながら室温で1時間インキュベーションした。抗体-近接プローブコンジュゲートは、例えば、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製され、非コンジュゲート抗体およびオリゴヌクレオチドを除去した。

【0550】

AN MSD MULTI-SPOT（登録商標）プレートを、適切なMSD（登録商標）ブロッキング溶液で1時間ブロッキングし、洗浄した。プレート上の各結合ドメインには、捕捉抗体およびアンカー部分（BSA-オリゴヌクレオチドコンジュゲートとして固定され、ローリングサークルアンプリコンに特異的に選択されたオリゴヌクレオチド）が含まれた。この実施例で使用されたアンカーオリゴヌクレオチドの配列は、5'-AAGA GAGTAGTACAGCAGCCGTCAAAAA-3' ThioMC3-D-3'（配列番号3）であった。25μLの各アッセイ希釈剤および較正物質、または試料（必要に応じて希釈）（50μLの総量になる）を各ウェルに添加した。プレートを振とうしながら1~3時間インキュベーションし、各ウェルを洗浄した。上記のように調製した近接プローブ1および2で標識された検出抗体の溶液を各ウェルに加え（ウェル当たり25μL）、振とうしながら1~2時間インキュベーションした（代替的に、個々の検出抗体を逐次添加し、各添加後に1時間インキュベーションすることができる）。下記の構成要素を含む連結混合物を各ウェルに加えた。（i）環状化オリゴヌクレオチド1（4nm）、環状化オリゴヌクレオチド2（4nm）、連結緩衝液、ATP（1mM）、T4 DNAリガーゼ（0.15U/μL）。環状化オリゴヌクレオチドのそれぞれは、

環状化オリゴヌクレオチド1：ホスフェート-CTA TTA GCG TCC AGT GAA TGC GAG TCC GTC TAA GAG AGT AGT AGA GCA GCC GTC AAG AGT GTC TA（配列番号4）

環状化オリゴヌクレオチド2：ホスフェート-GTT CTG TCA TAT TTA AGC GTC TTA A（配列番号5）であった。

【0551】

プレートを連結混合物とともに室温で30分間インキュベーションし、洗浄して過剰な環状化オリゴヌクレオチドを除去し、RCA混合物と37℃で1.5時間インキュベーションし、RCA混合物にはRCA緩衝液、dNTP（各250μM）、Phi29 DNAポリメラーゼ（0.125U/mL）が含まれた。プレートを洗浄し、検出プローブの混合物を加え、37℃で30分間インキュベーションし、検出プローブ混合物には、20mM Tris、1mM SDTA、250mM NaCl、0.01% Triton、BSA（200μg/mL）、Tween20（0.05%）、検出プローブ（6.25nM）が含まれる。検出プローブは、配列CAG TGA ATG CGA GTC CGT CT（配列番号6）であった。電気化学発光標識SULFO-TAG（Meso Scale Diagnostics）を組み込むために、検出プローブは末端ビオチン標識を用いて合成され、SULFO-TAG標識ストレプトアビジンに事前に結合させた。プレ

10

20

30

40

50

ートを150 μ lのMSD読み取り緩衝液で洗浄し、充填し、MSD SECTOR（登録商標）6000リーダー（Meso Scale Discovery、メリーランド州ロックビルによって供給されるプレートおよびリーダー）で直ちに読み取られた。

【0552】

この一般的手順を使用して、次の分析物を検出した：トロポニンI、Akt（総量）、ホスホーAkt（473）、ホスホーAkt（308）、インフルエンザA核タンパク質（NP）、IL-12p40、IL-12p70、Abeta1-42、TNFアルファモデルシステムを使用する架橋およびアイソタイピングIgアッセイ、B型肝炎表面抗原を使用する架橋およびアイソタイピングIgアッセイ、ならびにLyme C6を使用する架橋およびアイソタイピングIgアッセイ。標準サンドイッチ免疫測定法と比較したECシグナルおよびアッセイ感度の増加はアッセイ間で異なったが、100倍もの改善が認められた。試験されたある特定のアッセイ、例えば、トロポニンI、Akt（総量）、IL-12p40、IL-12p70、およびAbeta1-42の場合、アンカー部分の存在は、増幅工程中の検出複合体の解離を防ぐことによって、シグナルおよび／または希釈の直線性を改善した。上記の手順に従って実施されたIL-10アッセイの較正曲線を図9に示す。さらに、表2（下記）に、上記の手順に従って実施された一連の代表的アッセイのLOD（列2、「3-AB RCA/PLAアッセイ」）を、Meso Scale Diagnostics（MSD）、メリーランド州ロックビルからの標準的な2抗体免疫測定法プロトコルのLOD（列3、「MSD V-Plex 2-AB免疫測定プロトコル」）と比較して示す。

【表7】

表2

分析物	3-AB RCA/PLA アッセイ LOD(fg/mL)	MSD V-Plex 2-AB 免疫測定プロトコル (fg/mL)
IL-1b	2-5	80
IL-2	4	180
IL-4	0.7	40
IL-6	0.6	120
IL-10	2	60

【0553】

実施例2．アンカー試薬を使用する場合および使用しない場合のアッセイプロトコル

MSD7-スポットMULTI-SPOTプレートは、上記の実施例1で説明したように、トロポニンI捕捉抗体（220 μ g/mL）でそれぞれコーティングされた。捕捉抗体は、アンプリコンに特異的なオリゴヌクレオチドが共有結合したアンカー部分BSAの有無にかかわらず、共スポットされた（存在する場合は5 μ g/mLアンカー）。25 μ lの各アッセイ希釈液、較正物質、または試料（必要に応じて希釈）を各ウェルに添加した（合計50 μ l）。プレートを振とうしながら2時間インキュベーションし、各ウェルを洗浄した。上記のように調製した近接プローブ1および2で標識された検出抗体の溶液を各ウェルに加え（ウェル当たり25 μ l）、振とうしながら1時間インキュベーションした。上記の実施例1に記載したように、連結混合物を各ウェルに加えた。プレートを連結混合物とともに室温で30分間インキュベーションし、洗浄して過剰な環状化オリゴヌクレオチドを除去し、上記の実施例1に記載したように、RCA混合物と37℃で1.5時間インキュベーションした。プレートを洗浄し、上記の実施例1に記載したように、検出プローブの混合物を加え、37℃で30分間インキュベーションした。プレートを150 μ lのMSD読み取り緩衝液で洗浄し、充填し、MSD SECTOR6000リーダーで直ちに読み取られた。蛍光画像化のためにMSD電極をプレート上部から取り外し、

PBSおよびカバースリップで湿らせたままにした。表面は、Zyloカメラ、20倍の対物レンズ、2×2ビニング、カスタマーフィルターセットを備えた顕微鏡で、2秒間の露光で観察された。

【0554】

表3（下記）に示すように、ECL値はアンカー試薬の存在下で4～5倍高く、検出限界は3倍低かった（より感度が高い）。

【表8】

算出濃度(pg/ml)	+アンカー	アンカーなし
500	134,705	29,818
50	12,713	2,486
5	1,121	270
0.5	150	60
0.05	92	43
0.005	40	86
0.0005	56	30
0	71	37
検出限界	0.36	1.16

表3

【0555】

図10（a）および（b）は、5 μg/mLのアンカー試薬を使用した場合（パネル（a））および使用しない場合（パネル（b））のプレート表面の蛍光顕微鏡画像を示している。画像は、個々の結合事象に関連する明るい蛍光スポットを示しており、アンカー試薬の存在下におけるRCA増幅により、観察可能な結合事象の生成により効率的であったことが確認される。

【0556】

実施例3．1つ対2つのコネクターオリゴヌクレオチドの比較

実施例2に記載のアッセイを、1つの連結部位を有する単一の直鎖コネクターオリゴヌクレオチドを使用して繰り返し、2つの別個の連結部位を有する2つのコネクターオリゴヌクレオチドの代わりに円形テンプレートを形成した。図11（a）に示すように、連結部位1または連結部位2で開いている単一の直鎖コネクターオリゴヌクレオチドを調製した。両方の単一直鎖コネクターオリゴヌクレオチドを、実施例1および2で使用されたオリゴヌクレオチドの組み合わせ、Circ-1およびCirc-2と並べて試験した。実施例2に記載のプロトコルを使用し、さらに、単一の直鎖コネクターオリゴヌクレオチドを3つの濃度、すなわち125 nM、62.5 nM、および31 nMで試験した一方、Circ-1およびCirc-2オリゴヌクレオチドの組み合わせを使用する標準的アッセイは、125 nMで試験した。図11（b）に示すように、2つの単一直鎖コネクターオリゴヌクレオチドは、2つの部分からなるコネクターオリゴヌクレオチドミックス（Circ-1およびCirc-2）とほぼ同じ効率でRCA増幅産物にうまく組み込まれた。連結部位1で開いていた単一の直鎖コネクターオリゴヌクレオチドは、シグナル強度、非特異的バックグラウンド、および総合感度に基づいて、2つの部分からなるコネクターミックスに匹敵する性能を有した。予想どおり、連結部位2で開いていた単一の直鎖コネクターオリゴヌクレオチドは、非特異的バックグラウンドが高く、感度が低かった。この後者の場合、連結およびプライミングの両方は、近接プローブ#1の存在にのみ依存し、し

たがって、近接増幅アプローチの特異性の利点のいくつかが失われた。

【0557】

実施例4．代替の近接プローブ、アンカーオリゴヌクレオチド、およびコネクター配列を使用して実施された3抗体アッセイ

下記の代替試薬セットを使用して、実施例1で概説されたプロトコルを使用してアッセイを実施した。

【表9】

表4

配列の説明	配列
代替セット(a)	
検出オリゴ	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3'(配列番号7)
近接オリゴ1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaCACTAAGCTGTTAGTCCATTACCGmUmUmU(配列番号8)
近接オリゴ2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaGCTGGAGGTTTCAGACGATTTTGCG(配列番号9)
Circ-1	/5Phos/AACAGCTTAGTGACATCGGTAGTTAACAGATTGATCTTGACACATCGGTAGTTCGCAAAATCGTC(配列番号:10)
Circ-2	/5Phos/TGAACCTCCAGCTTTCGGTAATGGACT(配列番号11)
アンカーオリゴ	5'ACAGATTGATCTTGAAAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/(配列番号12)
代替セット(b)	
検出オリゴ	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3'(配列番号7)
近接オリゴ1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaAGAGTCCAGAGGCAAAGCGTGAATmUmUmU(配列番号13)
近接オリゴ2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaGATAAGGAAGGGGCCTTAGCGACA(配列番号14)
Circ-1	/5Phos/CCTCTGGACTCTACATCGGTAGTTTGGAACATTTATTCTAACATCGGTAGTTTGTCGCTAAGGC(配列番号15)
Circ-2	/5Phos/CCCTTCCTTATCTTTATTACGCTTTG(配列番号16)
アンカーオリゴ	5'GGAACATTTTATTCTAAA AAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/(配列番号17)
代替セット(c)	
検出オリゴ	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3'(配列番号7)
近接オリゴ1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaAACAACCTCCGATTGCTTGCTTCTTmUmUmU(配列番号18)
近接オリゴ2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaTAGCCCTACGTGCCCTGCATAGAC(配列番号19)
Circ-1	/5Phos/ATCGGAGTTGTTACATCGGTAGTTTCGCGCAGGTCGGAATTACATCGGTAGTTGTCTATGCAGGG(配列番号20)
Circ-2	/5Phos/CACGTAGGGCTATTTAAGAAGCAAGCA(配列番号21)
アンカーオリゴ	5'GCGCAGGTCGGGAATAAAA AAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/(配列番号22)

【0558】

以下の表5の結果は、トロポニンの濃度が500pg/mLであったトロポニンアッセイについてであり、MULTI-SPOTプレートの各ウェルには、表4に列挙されたセットのうちの1つからのアンカーオリゴヌクレオチドと1つの捕捉スポットが含まれた。

アッセイは、実施例 1 に記載されたのと同じ濃度で、1 つの近接プローブ（1）および 1 つの近接プローブ（2）を使用した。実施例 1 に記載されたものと比較して、検出オリゴヌクレオチド－S A－S T A G の濃度が 9 倍高かったため、セット（a）～（c）の非特異的結合はより高かった。より高濃度の検出オリゴヌクレオチド－S A－S T A G は、実施例 1 のように S A－S T A G 単独を滴定するのではなく、事前に結合した複合体と一緒に滴定したことに起因した。

【表 10】

表 5.

PLA セット	(a)	(b)	(c)	実施例 1
トロポニン	178,560	138,540	189,166	273,261
ゼロトロポニン	412	314	545	88

10

【0559】

実施例 5 . 追加の免疫測定プラットフォームで実施される 3 抗体アッセイ

（a）コード化粒子を使用したビーズ系免疫測定形式

すべてのアッセイ工程は、96 ウェルフィルタープレートで行われる。真空マニホールド（Hg の 10 インチを超えない）でプレートから液体を取り除く。プレートを裏返しにしない。目詰まりが発生した場合は、15 ml コニカルチューブのとがった端を使用して、目詰まりしたウェルの下の領域を静かに押した後、1 ml パスツールピペットゴム球を使用するか、目詰まりしたウェルの上に親指を置いて、圧力を発生させて目詰まりを取り除く。最後の吸引工程に続いて、ペーパータオルの束でプレートの底を軽くたたき、次にキムワイプでフィルタープレートの底を軽くたたいて、残留する液体／液滴を取り除く。

20

【0560】

洗浄液の調製：20 × 洗浄液ボトルの内容物全体を 285 ml の脱イオン水で希釈することにより、1 × 作業洗浄液を調製する。

【0561】

アッセイ標準物質の調製物：凍結乾燥された標準物質を 100 % アッセイ希釈液（血清および血漿試料）または 50 % アッセイ希釈液／50 % 組織培養培地（組織培養上清）で再構成する。再構成量：（i）1 バイアル：1 ml、（ii）2 バイアル：バイアル当たり 0.5 ml。室温で 8～10 分間再水和する。バイアルを数回静かに反転させ、バイアルをさらに 3～5 分間置いて、完全に水和させる。複数の標準物質を使用する場合は、等量の各標準物質を組み合わせ、穏やかに混合する。再構成された標準物質の 3 倍段階希釈を実行して、7 ポイントの標準曲線を作成する。

30

【0562】

分析物の捕捉：

（1）10 × 捕捉ビーズストックをボルテックス（30 秒）および超音波処理（30 秒）する。ホイルで包んだチューブで、10 × 捕捉ビーズストック（ウェル当たり 2.5 μl）を作業洗浄液（ウェル当たり 25 μl、約 2,000～5,000 ビーズ／アッセイ）で希釈する。より高いマルチプレックス化のために、保持される 10 × 捕捉ビーズストックの余分な量を考慮して、作業洗浄液の量を調整する。

40

【0563】

（2）標準ウェルおよび試料ウェルを 200 μl の作業洗浄液で事前に湿らせる。

【0564】

（3）希釈された捕捉ビーズ溶液をボルテックス（30 秒）および超音波処理（30 秒）する。直ちに各アッセイウェルに 25 μl を加え、続いて 200 μl の 1 × 洗浄液を加える。吸引し、200 μl の作業洗浄液で洗浄を繰り返す。必要に応じて、フィルタープレートの底を軽くたたく。

【0565】

（4）すべてのアッセイウェルに 50 μl のインキュベーション緩衝液を加える。

50

【0566】

(5) 指定ウェルに100 μ lの標準物質を加える。試料用に指定されたウェルの場合、50 μ lのアッセイ希釈液を追加し、続いて50 μ lの試料を追加する。プレートを覆い、オービタルプレートシェーカー（500～600rpm）上で2時間室温でインキュベーションする。光から保護するために、すべてのインキュベーション中は不透明な蓋でアッセイプレートを覆う。オービタルシェーカーの半径によっては、速度の調整が必要になる場合がある。

【0567】

分析物の検出

(6) 蛍光標識検出抗体の1 $\times$ 混合物を調製する。10 $\times$ 検出抗体混合物（ウェル当たり10 μ l）を希釈液（ウェル当たり100 μ l）で希釈する。混合物には、目的の分析物に特異的な一対の検出抗体が含まれ、一方はAlexa Fluor 350（青色蛍光標識）で標識され、他方はAlexa Fluor 594（赤色蛍光標識）で標識されている（これらの蛍光標識は、Life Technologies、ニューヨーク州グラントアイランド、www.lifetechnologies.comからそれぞれ入手できる）。より高度なマルチプレックス化のために、必要な10 $\times$ 抗体混合物ストックの余分な量を考慮して希釈剤の量を調整する。アッセイウェルを吸引し、200 μ lの作業洗浄液で2回洗浄する。100 μ lの希釈された検出抗体混合物を各アッセイウェルに加える。プレートを覆い、プレートシェーカー（500～600rpm）上で1時間インキュベーションする。

【0568】

アッセイの読み取り

(8) アッセイウェルを吸引し、200 μ lの作業洗浄液で3回洗浄する。フィルタープレートの底を清潔なペーパータオルで乾燥させ、残留する液滴をすべて完全に除去する。100 μ lの作業洗浄液を各アッセイウェルに加え、プレートをプレートシェーカー（500～600rpm）上に2～3分間置く。

【0569】

(9) 各蛍光標識のカラーチャネルを含むマルチカラー蛍光粒子分析器（FACSシステムまたは改変XMAP機器など）でビーズ懸濁液を分析する。最高の感度のために、アッセイは、粒子がゼロまたは1つの分析物しか結合していない可能性が高い条件下で実行され、分析物の量は、両蛍光標識を含む特定の分析物に特異的な粒子の数を計数することによって定量される（粒子コーディングに基づく）。任意で、アッセイは、コードがビーズ上の捕捉抗体の分析物特異性および各分析物に対する検出抗体の追加の対を示すコード化ビーズを使用するマルチプレックス形式で実行することができる。ビーズに組み込まれた追加の蛍光色を使用するXMAPのように、コーディングが決定される場合、分析器には、追加の色を測定し、ビーズコードを特定するための追加の検出チャンネルが必要である。

【0570】

(b) アンカー部分を含むコード化粒子を使用し、核酸プローブで修飾された2つの検出試薬を使用するビーズ系免疫測定形式

実施例5（a）で概説されるように、すべてのアッセイ工程は、96ウェルフィルタープレートで行われる。洗浄溶液およびアッセイ標準物質は、実施例5（a）に記載されるように調製され、標的分析物に対する一対の検出抗体は、実施例1に記載されるように近接プローブ1および2の添加によって修飾される。実施例5（a）に記載されているように、分析物は捕捉ビーズに捕捉される。捕捉ビーズには、ローリングサークルアンプリコンに特異的であるように選択されたオリゴヌクレオチドとともに、BSA-オリゴヌクレオチドコンジュゲートとしてビーズ表面に固定されたアンカー部分が含まれる。使用されるアンカーオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号3である。

【0571】

25 μ lのアッセイ希釈液、校正物質、または試料（必要に応じて希釈）を捕捉ビーズの混合物と混合する。混合物を振とうしながら1～3時間インキュベーションし、洗浄す

10

20

30

40

50

る。上記のように調製した近接プローブ 1 および 2 で標識された検出抗体の溶液を混合物に加え、振とうしながら 1～2 時間インキュベーションする（代替的に、個々の検出抗体を逐次添加し、各添加後に 1 時間インキュベーションすることができる）。実施例 1 に記載の連結混合物を加える。混合物を連結混合物と 37℃で 30 分間インキュベーションし、洗浄して過剰の環状化オリゴヌクレオチドを除去し、RCA 混合物と 37℃で 1.5 時間インキュベーションし、RCA 混合物は上記の実施例 1 に記載されている。混合物を洗浄し、フルオレセインで標識された検出プローブの混合物を添加し、37℃で 30 分間インキュベーションし、検出プローブ混合物は上記に記載されている。混合物を洗浄し、粒子をマルチチャンネル蛍光粒子分析器に吸引する。

【0572】

(c) ビーズ系形式および個々のナノウェルへの捕捉分析物分子の分離

試料は、100 μl の 25% ウシ血清（2～4 倍希釈）で調製され、捕捉抗体でコーティングされた 500 K ビーズ（常磁性 2.7 μm、任意で蛍光コード化）が試料に追加される。試料を 23℃で約 2 時間インキュベーションする。試料を PBS（5×、0.1% Tween-20）で 3 回洗浄し、標識検出抗体の混合物（第 1 のビオチン化検出抗体およびハプテンにコンジュゲートした抗体を含む混合物）を添加する。混合物を 23℃で約 1 時間インキュベーションする。混合物を PBS（5×、0.1% Tween-20）で 3 回洗浄し、酵素標識を加え、ストレプトアビジン-ペクターガラクトシダーゼ（40 pM）、抗ハプテンにコンジュゲートした酵素も加え、混合物を 23℃で約 30 分間（または SIMOA 分析器では 3 分）インキュベーションする。混合物を PBS（5×、0.1% Tween-20）で 7 回洗浄し、酵素基質である 15 μl のレゾルフィン-ペクター d-ガラクトピラノシド（100 μM、ローディング緩衝液）を添加する。

【0573】

混合物は、ナノウェルのアレイ（QUANTERIX によって DVD 形式で提供され、環状オレフィンポリマーから作られ、ディスク当たり 24 試料）上に引き込まれ、約 2 分間静置される。アレイを緩衝液でフラッシュし、アレイをフルオロカーボンオイルで密封し、23℃で 2～5 分間インキュベーションし、結果を多色蛍光撮像装置で読み取る。画像解析は、両方の蛍光酵素産物を含むナノウェルの数を計数するために使用され、それによって試料中の分析物の濃度と関連する値を提供する。

【0574】

(d) フローセル分析、ビーズ系の免疫測定形式

第 1 のインキュベーション：10 μl の試料、ビオチン化モノクローナル分析物に特異的な捕捉抗体（2.6 mg/l の作業溶液）、およびそれぞれがオリゴヌクレオチドにコンジュゲートし、モノクローナル分析物に特異的な抗体の混合物（0.3 mg/l の作業溶液）は、反応してサンドイッチ複合体を形成する。モノクローナル分析物に特異的な抗体の混合物は、実施例 1 のように調製され、混合物は、上記の実施例 1 に記載されたように近接プローブ 1 および 2 にコンジュゲートした 1 対の抗体を含む。

【0575】

第 2 のインキュベーション：ストレプトアビジンでコーティングされた微粒子（DYNAL M280、2.8 μm、0.72 mg/ml、ビオチン 470 ng/mg の結合能力）の添加後、複合体はビオチンとストレプトアビジンとの間の相互作用を介して固相に結合する。連結混合物を混合物に添加し、連結混合物を実施例 1 に記載のプロトコルに従って調製する。実施例 1 に記載されているように、混合物を連結混合物と 37℃で 30 分間インキュベーションし、洗浄して過剰の環状化オリゴヌクレオチドを除去し、RCA 混合物とインキュベーションする。混合物を洗浄し、ビオチンで標識された検出プローブの混合物を添加し、37℃で 30 分間インキュベーションし、実施例 1 に記載されているように検出プローブ混合物を調製する。電気化学発光標識 SULFO-TAG（Meso Scale Diagnostics）を組み込むために、検出プローブは末端ビオチン標識を用いて合成され、SULFO-TAG 標識ストレプトアビジンに事前に結合させる。

【0576】

10

20

30

40

50

反応混合物は測定セルに吸引され、そこで微粒子は電極の表面上に磁氣的に捕捉される。次に、未結合の物質をPROCELL（TPA含有緩衝液）で除去する。次に、電極に電圧を印加すると、光電子増倍管によって測定される化学発光が誘起される。結果は、2点較正により特異的に作成された手段である較正曲線、および試薬バーコードにより提供されるマスター曲線によって決定される。

【0577】

実施例6．HIV-1 P24の検出

材料、方法、および結果：

実施例1に記載の手順を使用して、HIV-1 p24を検出した。HIV-1 混合力価性能パネル（Seracare Life Sciences、www.seracarecatalog.comから入手可能）、HIV-1 血清転換パネル（Seracare Life Sciencesからも入手可能）、HIV抗体陽性試料（ProMedDx, LLC、www.promeddx.comから入手可能）、および通常の一致試料（Bioreclamation、www.bioreclamation.comから入手可能）からの約64の血清または血漿試料を試験した。上記の手順に従って実施されたHIV-1 p24アッセイの較正曲線を図12に示す。アッセイのLODは1.3 fg/mLであることが見出され、LLOQは3.0 fg/mL、ULOQは37,500 fg/mLであった。25 µL 試料についての1.3 fg/mLの検出限界は、約650 p24分子に対応し、各ウイルス粒子（分子）は約2000コピーのp24タンパク質を産生する。

【0578】

混合力価性能パネルPRA204（B）は、市販のアッセイ（bioMérieux、Perkin Elmer、およびZeptometrix）により、HIV p24抗原に対して弱陽性から強陽性にわたる反応性をもつ10個の検体のセットで構成されていた。パネルには2つの陰性検体が含まれていた。アッセイの結果を以下の表6に示す。

【表11】

表6．

パネルメンバー	bioMérieux HIV Ag VIDAS p24(pg/mL)	Perkin Elmer HIV Ag p24(s/co)	Zeptometrix HIV Ag p24(s/co)	MSD 3AB 形式 (pg/mL)	MSD 3AB 形式 (ECL)
PRA204(B)-09	>400	>42	75	>38	1915873
PRA204(B)-10	<3	1	0	0.0	174
PRA204(B)-11	85	18	16	>38	1674519
PRA204(B)-12	60	11	14	>38	1601078
PRA204(B)-13	170	47	41	>38	1902237
PRA204(B)-15	192	45	36	>38	1884816
PRA204(B)-17	>400	42	61	>38	1897359
PRA204(B)-20	<3	1	0	0.0	150
PRA204(B)-21	68	14	18	>38	1422070
PRA204(B)-22	17	3	1	10	347517
PRA204(B)-23	14	2	2	7	237726
PRA204(B)-24	15	3	3	9	306728

【0579】

ほとんどの試料で、HIV p24レベルは高く、ULOQを上回っていた。10個の陽性試料はすべて検出可能であり、市販のp24キットと同等であったが、陰性試料（市

販のアッセイに基づく、それぞれP R A 2 0 4 (B) - 1 0 および - 2 0) は、それぞれ約3および2 f g / m L と非常に低かった。

【0580】

血清転換パネルの分析結果を図13に示す。3抗体アッセイ形式はP C Rと同じくらい高感度であることが見出され、第1の陽性試料を検出するための推定遅延時間ならびにP R B 9 4 8 およびP R B 9 6 2 パネルからの両試料におけるp 2 4 レベルは、P C R キットと比較して、他の市販のp 2 4 アッセイよりも優れている。データを表7に示す。

【表12-1】

表7.

パネル& メンバー	1 回 目の 出血 から の日 数	Abbott BBI(s/ co)	Coulter BBI(s/ co)	DuPont BBI(s/ co)	Inno.(s /co)	MSD 3AB(pg/ mL)	MSD 3AB(E CL)	Roche PCR(co/ mL)	
パネル I- I、 PRB948- 01	0	0.4	0	0.1	0.4	0.001	121	BLD	
パネル I- I、 PRB948- 01	18	0.4	0	0.1	0.4	0.001	100	BLD	
パネル I- I、 PRB948- 01	20	0.5	0.2	0.5	1	3	97688	3×10 ⁴	
パネル I- I、 PRB948- 01	23	5	23	15	31	>38	173680 9	6×10 ⁵	
	1 回 目の 出血 から の日 数	Coulter (s/co)2	PE(s/c o)2	Roche Elecsys (s/co)2	Zepto(s/co)2	MSD 3AB(pg/ mL)	MSD 3AB(E CL)	Roche Ultra(co/ mL)	Roche 標 準物質
パネル I- II、 PRB962- 01	0	0.3	0.3	0.1	0.1	0.002	149	<50	NT
パネル I- II、 PRB962- 02	2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.001	120	<50	NT

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

パネル I- II、 PRB962- 03	7	0.2	0.2	0.2	0.2	0.021	778	NT	7.6×10^2
パネル I- II、 PRB962- 04	9	0.6	0.3	0.3	0.3	0.2	7603	NT	7.7×10^2
パネル I- II、 PRB962- 05	14	>40	30	23	10	>38	180834 4	NT	7.0×10^3
パネル I- II、 PRB962- 06	17	>40	>49	155	24	>38	186369 9	NT	1.2×10^7

Abbott BBIとは、Abbott BBI HIV-1 抗原試験を指す。

Coulter BBIとは、Coulter BBI HIV-1 抗原試験を指す。

DuPont BBIとは、DuPont BBI HIV-1 抗原試験を指す。

Inno.とは、Innogenetics R129 HIV-1 抗原試験を指す。

Roche PCRとは、Roche PCR HIV RNA BBI試験を指す。

Coulterとは、Coulter ELISA HIV-1 抗原試験を指す。

PEとは、Perkin Elmer ELISA HIV-1 抗原試験を指す。

Zepto.とは、Zeptometrix ELISA HIV-1 抗原試験を指す。

Roche Ultraとは、Roche Ultrasensitive HIV-1 RNA試験を指す。

Roche 標準物質とは、Roche 標準物質のHIV-1 RNA試験を指す。

BLD=検出限界未満、NT=未試験。

【0581】

結論：

最近HIVに感染した患者は、疾患の蔓延に過度に寄与する。ウイルス量は感染後の最初の数週間は高く、新たに感染した患者は自分が感染していることに気付いている可能性が低く、他の人に疾患を蔓延させ得る。したがって、急性HIV感染の早期検出は公衆衛生にとって非常に重要である。PCR法は、感度に関する絶対的基準であり、血清または血漿1mL当たりわずか60のHIV RNAコピーを検出できる（1mL当たり30ウイルス粒子）。しかしながら、PCR技術は複雑で高価であるため、すべての設定に適しているわけではない。免疫測定法はより簡単で安価であるが、現在の第4世代p24免疫測定法の検出限界はわずか約10pg/mL、つまり1mL当たり約2億5000万のキャプシドタンパク質である。ウイルスごとに、これらの免疫測定法は、ウイルス当たり約2,000のp24キャプシドタンパク質があるという事実にもかかわらず、PCR検査よりも数千倍感度が低い。

【0582】

本明細書に記載されるように、MSDのMULTI-ARRAY（登録商標）技術に基

づく次世代の電気化学発光アッセイ形式を開発し、その性能を特性評価した。この新規な p 2 4 免疫測定法の検出限界は約 1 f g / m L であり、現在の p 2 4 免疫測定法よりも 1 0 , 0 0 0 倍感度が高かった。1 f g / m L の感度は、2 5 μ L の試料体積で 1 未満のウイルス粒子に対応する。定量の下限および上限は、それぞれ 3 f g / m L および 3 8 , 0 0 0 f g / m L であった。プレート内 C V は 7 %、合計 C V は 1 5 % であった。スパイクの回収率および希釈の直線性は 8 0 % ~ 1 2 0 % であった。p 2 4 は、3 2 名の明らかに健康なドナーの血清または血漿では検出できなかった。p 2 4 混合力価パネルは、3 - A B H I V p 2 4 アッセイおよび市販の p 2 4 免疫測定法との間に良好な相関関係を示した。2 つの血清転換パネルを試験した：S e r a C a r e P R B 9 4 8 (0 日目および 1 8 日目、P C R 陰性、2 2 日目および 2 3 日目、P C R 陽性)、P R B 9 6 2 (0 日目および 2 日目、P C R 陰性、7、9、1 4、および 1 7 日目、P C R 陽性)。どちらの場合も、3 A B H I V p 2 4 アッセイの結果は、すべての P C R 陰性試料で陰性であり、すべての P C R 陽性試料で陽性であり、従来の p 2 4 免疫測定のかかなり前に感染が検出された。

【 0 5 8 3 】

結論として、本明細書に記載の 3 - A B H I V p 2 4 免疫測定法は、p 2 4 E L I S A の現在の限界よりも 1 0 , 0 0 0 倍感度が高く、P C R アッセイと同等の感度である。アッセイは、特殊な設備を必要とせず、M E S O Q U I C K P L E X S Q 1 2 0、および S E C T O R (登録商標) 撮像装置上で実行することができる。

【 0 5 8 4 】

実施例 7 . 分析物の濃度、その後の 3 - A B R C A / P L A アッセイ

(a) 実験の条件を以下の表 8 (a) に示す。

【表 1 3】

表 8 (a)

試薬			
試薬	種類	量	結合条件
磁気ビーズ	DYNABEADS(登録商標)MYONE(商標)ストレプトアビジン T1	0.25mg	該当なし
捕捉オリゴヌクレオチド	PP1 相補体	100pmol	希釈剤 100(1 時間)
近接プローブ(PP)-分析物検出抗体	PP1-HIVp24 に特異的な検出抗体	6.7pmol	(1)1M NaCl(40 分)
			(2)0.5M NaCl(40 分)
抗原	HIVp24	7pg/ml	(1)1M NaCl(一晩)
			(2)0.5M NaCl(一晩)
対照	捕捉なしのビーズ、PP1 および抗原を含む	0.25mg	試料を試験するのと同じ結合条件、放出工程なし
放出条件			
PP/抗原複合体	PP1/HIVp24	0 塩	25C
			30C
			37C
		10mM 塩	25C
			30C
			37C

【 0 5 8 5 】

比較的短いオリゴヌクレオチド近接プローブ配列（例えば、9～13ヌクレオチドの長さ）の捕捉のために、近接プローブ配列の一部に相補的な捕捉オリゴヌクレオチドを調製し、3'末端でビオチン化した。表8（b）は、近接プローブおよび捕捉オリゴヌクレオチド配列の詳細を示している。

【表14】

表8（b）.

PP1 配列	/5ThioMC6-D/AAAAAAAAAAGACGCTAATAGTTAAGACGCTTmUmUmU(配列番号 23)		
捕捉オリゴ	配列名称	配列の長さ	配列(5'-3') 5'/ポリ A(20 スペーサービオチン/
捕捉オリゴ 1	Cap-1:16	16	Aagcgtcttaactatt(配列番号 24)
捕捉オリゴ 2	Cap-1:13	13	Aagcgtcttaact(配列番号 25)
捕捉オリゴ 3	Cap-1:12	12	Aagcgtcttaac(配列番号 26)
捕捉オリゴ 4	Cap-1:11	11	Aagcgtcttaa(配列番号 27)
捕捉オリゴ 5	Cap-1:10	10	Aagcgtctta(配列番号 28)
捕捉オリゴ 6	Cap-1:9	9	Aagcgtctt(配列番号 29)
捕捉オリゴ 7	Cap-1:8	8	Aagcgtct(配列番号 30)

【0586】

算出された融解温度を表8（c）に示す。

【表15】

Tm				
PP1 [C]、nM	10	10	10	10
Cap [C]、nM	10	10	10	100
塩、mM	1200	500	40	40
Cap1-16	57	51	37	43
Cap1-13	51	46	33	39
Cap1-12	46	42	28	35
Cap1-11	36	32	19	26
Cap1-10	34	29	16	24
Cap1-9	34	30	18	26
Cap1-8	26	22	9	19

【0587】

捕捉オリゴヌクレオチドで修飾されたビーズは、下記のように調製された。50 μ Lの DYNAL MYONE ストレプトアビジン T1 ビーズスラリーを、ボルテックス後に、

5本の1.5mL Eppendorfチューブに添加し、それぞれは2つの結合条件実験にわたる分割に必要な量の2倍であった。ビーズを1mLのDiluent 100 (Mesoscale Discovery、メリーランド州ロックビルから入手可能)で3回洗浄し、1.2mLの各捕捉オリゴヌクレオチドを、各バイアルに、200pmol/mLの各捕捉オリゴヌクレオチドで、EDTAを含むDiluent 100に添加した。溶液を室温で1時間回転させてインキュベーションし、各チューブの溶液に遊離ビオチンを5nmol/mLまでEDTAを含むDiluent 100に入れた。溶液を室温で15分間回転させてインキュベーションし、ビーズを1mLの0.5M NaCl/BSA溶液で3回洗浄した。チューブに1mLの0.5M NaCl/BSAを充填して混合し、各捕捉オリゴヌクレオチド-ビーズ混合物を2つのバイアルに分注して、合計10のバイアルにした。

10

【0588】

溶液をすべてのバイアルから吸引し、1μg/mL (6.7pmol/mL)のPP1 (HIVp24に特異的な検出抗体に結合したPP1配列)を含む0.5Mおよび1M NaCl/BSA 1mLを各捕捉チューブに添加した。溶液を室温で回転させながら40分間インキュベーションした。各チューブを塩溶液で3回洗浄した(捕捉オリゴヌクレオチドを含まない対照は洗浄されなかった)。4本のチューブに対して、1mLのHIVp24を7pg/mLで添加した一方、抗原をストック溶液から非捕捉対照チューブに入れた。溶液を4℃で一晩回転させながらインキュベーションし、捕捉オリゴヌクレオチドを含む各チューブを塩溶液(各1mL)で3回洗浄した。各チューブに洗浄緩衝液(0.1×PBS、500mM NaCl、1mM EDTA、0.1% Triton X-100、2mg/mL BSA)を1/3充填し、混合し、合計18本のチューブの2つの放出塩条件の場合、400μLのビーズのアリコート(捕捉なしの対照豆を含む)を2つのバイアルに加えた。捕捉なし対照チューブを除くすべてのバイアルから洗浄緩衝液を除去し、400μLの0.0Mおよび10mM塩緩衝液をチューブに添加した。チューブの内容物を混合し、各チューブから100μLのアリコート(捕捉なしの対照豆を含む)を、3つの温度放出条件の分析用に3つのマトリックスプレートに加えた。プレートを、サーモシェーカーで5分間混合しながら、それぞれ25℃、30℃、および37℃でインキュベーションした。ビーズを磁気で分離し、25μLの上清を、mIgGを含む5μLの6×PBSを入れたアッセイプレートのウェルに加えた(条件ごとに3回繰り返し)。プレートを振とうしながら室温で1時間インキュベーションし、PBS緩衝液で3回洗浄した。実施例1に記載のように、プレート上の各結合ドメインは、捕捉抗体およびアンカー部分を含み、インキュベーション工程に続いて、抗原に結合した捕捉抗体を含む各結合ドメインで複合体が形成され、これは、PP1配列を有する検出抗体に結合している(対照結合ドメインを除く)。

20

30

【0589】

PP2(または対照の場合はPP1+PP2)で標識された検出抗体の溶液を各ウェルに添加し(ウェル当たり25μL)、1時間振とうしながらインキュベーションした後、洗浄した。実施例1に記載のように、連結混合物を各ウェルに加え、プレートを連結混合物と室温で30分間インキュベーションし、洗浄して過剰の環状化オリゴヌクレオチドを除去し、RCA混合物と37℃で1.5時間インキュベーションした。プレートを洗浄し、検出プローブの混合物を加え、37℃で30分間インキュベーションした。プレートを洗浄し、150μLのMSD読み取り緩衝液で充填し、MSD SECTORリーダーで直ちに読み取った。

40

【0590】

この実験の結果を図14に示す。

【0591】

(b)分析物の濃度条件をさらに評価するために、追加の実験が実施された。一般的な実験条件を表9(a)に記載する。

50

【表 16】

PP1 ビーズによる捕捉-放出			
緩衝液	体積	時間、温度	濃縮係数
液相结合			
Diluent2(Meso Scale Discovery、メリーランド州ロックビルから入手可能)	5mL	一晩、4C	該当なし
放出			
0 塩溶液(1mM EDTA、2mg/mL BSA)	100μL	6 分、25C	50X
対照条件			
ビーズなし、捕捉-放出なし、抗原+PP1			
ビーズによる捕捉-放出、濃縮工程なし			
アッセイプレートの結合(固相条件)			
1×PBS	3μL 10×PBS/mIgG+30uL 試料	1.5 時間、室温	該当なし

【0592】

マイクロ遠心チューブにボルテックスした後、50 μLのDYNAL MYONEストレプトアビジンT1ビーズスラリーを添加した。ビーズを1mLのDiluent100で3回洗浄し、1mLの捕捉オリゴヌクレオチドCap1:9に、EDTAを含むDiluent100を加えた。溶液を室温で1時間回転させてインキュベーションし、遊離ビオチンを溶液に10倍過剰にEDTAを含むDiluent100に入れた。溶液を室温で30分間回転させてインキュベーションし、ビーズを1mLの洗浄緩衝液で3回洗浄した。PP1を含む結合緩衝液1(1.0)mLを添加し、溶液を室温で回転させながら40分間インキュベーションした。チューブを洗浄緩衝液で3回洗浄し、1mLのDiluent2をビーズに加えて混合し、ビーズ溶液を12本のチューブに分けて、抗原レベル2~4で1×、0.5×、0.25×、および0.125×のビーズ-PP1濃度にした。必要な体積のビーズ-PP1を対照チューブに移した。HIVp24およびDiluent2をビーズ溶液に添加して、必要な最終濃度の抗原およびビーズ-PP1を総量5mLにした。1×濃度のみの遊離PP1および全4レベルの抗原を含むようにビーズなし対照チューブを入れた。チューブを4℃で一晩回転させながらインキュベーションし、5mLのビーズ溶液を一度に1mLを移すことにより1.5mLのEppendorfチューブに移した。各チューブを洗浄緩衝液で洗浄した(3回)。ビーズのない対照チューブは洗浄されなかった。3回目の洗浄後、100 μLの0塩溶液を試験チューブに加え、500 μLの0塩溶液を対照チューブに加え、チューブを25℃で6分間インキュベーションした。上清をアッセイプレートに移し、実施例7(a)のように分析した。結果を表9(b)~(c)に示す。

【表 17】

表 9 (b) :

試料#	[C], fg/ml	ビーズ上の捕捉-放出		ビーズなし	シグナル増加、X
		非-[C]ed	50X[C]-ed	Cntrl	
1	120	3,764		3,687	
2	12		15,314	369	41.5
3	1.2		1,941	71	該当なし
4	0.12		280	32	該当なし
ゼロ			32		

10

【表 18】

表 9 (c) :

Ag [C], fg/ml	~ビリオン数/ml	~p24#/ml	~p24#30μL
120	1000	3,000,000	90,000
12	100	300,000	9,000
1.2	10	30,000	900
0.12	1	3000	90

20

【0593】

磁気ビーズで分析物を濃縮した後、約 50 倍のシグナルの増加が観察された。非濃縮試料 # 1 は、対照 # 1 シグナルと同様の結果を示し、これは、最高の効率で P P - 抗原複合体が放出されたことを示していた。分析物の予備濃縮を使用すると、0.1 fg/ml 未満の検出が達成され、これは、1 ビリオン/ml のウイルス量に相当する。対照的に、市販のウイルスアッセイでは、約 50 コピー/ml を合理的に検出でき、これは、25 ビリオン/ml に相当する。この実験の予備濃縮がある場合とない場合の校正曲線を図 15 に示す。

【0594】

実施例 8 ビーズ沈降プロトコルを使用した 3-AB RCA/PLA ビーズ系アッセイ

DYNABEADS の代わりにシリカビーズを使用したことを除いて、実施例 7 に記載されるように IL-4 の 3-AB RCA/PLA アッセイを実施した。RCA および検出インキュベーションは、37℃で静置して、MSD ラージスポットマルチウェルアッセイプレート (Meso Scale Discovery、メリーランド州ロックビルから入手可能) で行った。ビーズにはアンカー試薬は含まれなかった。RCA インキュベーション工程中に、溶液の体積に応じて、およそ 5~8 分の沈降時間で、重力によって、ビーズをウェルの表面上にゆっくりと沈降させた。プレートをスイングバケット遠心分離機で回転させることによりプレートを洗浄した。予備試験では、ビーズは回転後に均一に分散し、ウェル表面全体にほんのわずかな勾配があることが示された。

30

【0595】

プロトコルは、15 分対 90 分の RCA インキュベーションで試験された。アッセイの感度およびダイナミックレンジは、磁気捕捉と比較して、ビーズ沈降プロトコルを使用した 15 分間の RCA インキュベーションで約 10 倍改善されたことが見出された。感度は、90 分の RCA インキュベーション工程 (最大約 50~100 倍) でさらに改善された。

40

【0596】

代替的に、3-AB RCA/PLA アッセイは、本明細書に記載のように行われ、ビーズはアンカー試薬を含み、ブロッキング剤 (約 2.5 mg/ml) を連結工程中に添加して非特異的結合を減少させる。mBSA、剪断ポリ (A)、ポリ BSA-I、mIgG、Tween、ポリ BSA-II、酵母 RNA、mBSA+ポリ (a)、および/または

50

ポリ B S A + ポリ (A) を含むがこれらに限定されない様々な遮断薬を使用することができる。

【 0 5 9 7 】

実施例 9 . 変更された架橋免疫測定形式

上記のように、実施例 1 に記載の手順は、架橋および T N F アルファモデルシステムを使用するアイソタイピング I g アッセイ、架橋および H e p B 表面抗原を使用するアイソタイピング I g アッセイ、ならびに架橋および L y m e C 6 を使用するアイソタイピング I g アッセイに使用された。この手順の変更を図 1 9 に示し、 (i) P P 2 修飾抗ヒト I g 抗体 (1 9 0 2) 、および (i i) P P 1 標識自己抗原 (1 9 0 3) を使用して自己抗体 (1 9 0 1) を検出し、実施例 1 に記載したように P L A - R C A が続く。図 1 9 に示される形式はまた、捕捉部分、この場合は自己抗原を表面 (1 9 0 6) に接着させる手段として、標的部分 (1 9 0 4) および自己抗原 (1 9 0 5) に結合したその相補体の使用を示す。

【 0 5 9 8 】

同様に、抗体、例えば自己抗体の免疫測定法は、その抗体に対する抗原が捕捉部分として (表面に直接付着するか、または標的部分およびその相補体を介して) 使用される実施例 1 に記載のように実施することができ、2 つの検出種は、P P 1 に付着したアイソタイプ抗体、および P P 2 に付着した抗原 (または逆もまた同様である) である。サンドイッチ複合体が形成され、実施例 1 に記載されるように P L A - R C A が続く。これらの変更されたアッセイ形式はまた、アンプリコンを表面に接着するためのアンカー部分を含み得る。

【 0 5 9 9 】

実施例 1 0 . 近接連結ローリングサークルテンプレートを生成するための生合成法

近接連結ローリングサークルテンプレートは、生合成的に生成できる。この方法では、最初は高度に精製され、十分に特性評価されたテンプレートを利用して、効率的な溶液系の連結および R C A 反応シリーズで R C A 産物を生成する。このプロセスは、反応の選択性を高めるためにビーズで行うこともできる。

【 0 6 0 0 】

シード R C A テンプレートの増幅に続いて、一本鎖産物は、短い合成配列と組み合わせた独自の制限酵素を使用して部位特異的切断を受ける。したがって、R C A テンプレートはそれ自体の産物から生成される。生合成で生成された R C A テンプレートは、H P L C またはゲル精製に供され、正確な 5 ' および 3 ' 末端を 1 0 0 % 含む産物を生成する。この方法を図 2 0 (a) に示す。このアプローチでは、R C A テンプレートに制限部位を追加して、目的の連結部位で切断を指示する必要がある。制限部位から約 1 4 ~ 2 0 塩基離れて切断するような制限酵素が好ましい。代替的に、一本鎖テンプレートは、M 1 3 ファージからの一本鎖 D N A などと組み合わせてこのアプローチを使用してミリグラム量で生成することもできる。このアプローチにより、R C A テンプレートの R C A 系増幅を実行する必要がなくなり、D N A 産生用にテンプレートを M 1 3 ベクターにクローニングするだけで済む。これを図 2 0 (b) に示す。

【 0 6 0 1 】

実施例 1 1 . 試料のマルチプレックス化

本明細書に記載される方法は、分光的特徴の使用に基づいて試料をマルチプレックス化するために使用される。試料のマルチプレックス化により、ユーザーは内部較正および制御を行い、コストを削減し、処理能力を向上させることができる。分析物にコード化された、空間的および分光的特徴に基づく固有の特徴を使用して分析物をマルチプレックス化する能力は、試料のマルチプレックス化にも使用できる。

【 0 6 0 2 】

試料は、画像化された増幅産物の蛍光色素比コーディングを使用してマルチプレックス化される。試料中の各分析物について、固有のローリングサークル産物を産生できる固有のアッセイ試薬のセットが使用され、それぞれが固有の検出オリゴヌクレオチドで検出可

能である。一組の固有のアッセイ試薬の合成および使用は、例えば、実施例 1 に記載されている手順に従って行うことができる。図 2 1 に示されるように、目的の分析物を含む各試料 A および B は、その分析物に特異的な 2 つの検出抗体とインキュベーションされ、それぞれが固有の近接プローブを有する。このインキュベーション工程では、一式の固有の近接プローブがその試料の分析物と連結することによって、分析物と 2 つの抗体複合体を形成し、試料を「コード化」する。このインキュベーションに続いて、コード化試料をプールし、混合物として単一の捕捉抗体表面に添加し、インキュベーションし、洗浄する。

【0603】

洗浄工程に続いて、捕捉された 3 つの抗体複合体、各セットの近接プローブ用の直鎖ローリングサークルテンプレートが加えられ、混合物は、実施例 1 に記載されるようなハイブリダイゼーション条件に供される。この混合物を連結してローリングサークルテンプレートを生成し、洗浄し、ローリングサークル増幅に供し、洗浄する。各ローリングサークルアンプリコンは、相補的で固有の検出オリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、2 つ以上の蛍光標識の比率に基づいた固有の分光的特徴でコード化される。検出プローブのハイブリダイゼーションに続いて、アッセイ表面が画像化され、各ローリングサークル産物は、その分光的特徴、例えば、2 つ以上の蛍光標識の比率に基づいて解読され、計数される。これにより、複数の試料の分析物レベルを測定できる。このアプローチを使用すると、ユーザーは試料と分析物のマルチプレックス化を組み合わせ、複数の分析物を試験試料と対照試料で同時に試験できる。

【0604】

実施例 12. リポタンパク質複合体の検出

本明細書に記載の方法は、リポタンパク質複合体、例えば、HDL および LDL に存在するタンパク質複合体のセットを検出および定量するために使用される。例えば、実施例 1 に記載の方法を使用して、3 つの異なるタンパク質および／またはエピトープは、リポタンパク質複体内で検出され、したがって、患者のリポタンパク質内のタンパク質のプロファイルを分析することができる。

【0605】

ヒトでは、血中リポタンパク質は、HDL、LDL、IDL、VLDL、およびカイロミクロンの 5 つの主要なグループに分類される。これらのうち、HDL および LDL 画分は、心血管の健康のリスクマーカーとして最も臨床的な関心を集めている。これらの重要なリポタンパク質は、複数のタンパク質および脂質の複合体で構成されている。これらのリポタンパク質に関連するタンパク質は、それらの機能に不可欠なタンパク質およびパセンジャータンパク質で構成されている。これらのリポタンパク質はまた、個体のリスクプロファイルを変える酸化などの修飾を受ける可能性がある。例えば、酸化 HDL および LDL の高いレベルは、心血管有害事象のリスクの上昇と関連する。LDL は通常、2 つのコアタンパク質である Apo (a) および Apo B、ならびに脂質で構成される。Apo (a) の上昇は、心疾患リスクの上昇と関連し、さらに、Apo (a) タンパク質の長さの変動も、リスクプロファイルの変化に関連している。Apo (a) タンパク質は、サイズ多型によりサイズが異なり、これは、LPA 遺伝子のいわゆるクリングル反復の変数によって引き起こされる。LDL 粒子の Apo B は、様々な組織の LDL 受容体のリガンドを担持する。高レベルの Apo B はプラーク形成にも関連しており、心血管疾患を引き起こす。HDL は通常、Apo A1、Apo E、Apo C および Apo A-II を含むコアタンパク質のセットで構成されている。これらのコアタンパク質に加えて、HDL は臨床的価値もある追加のタンパク質と関連していることも知られている。例えば、HDL に関連する SAA および SP-B は、心臓事象および死亡率に関連していることが実証されている。Apo A-II の上昇による HDL 組成の変動も、アテローム発生リスクに関連付けられている。

【0606】

実施例 1 に記載の手順に従って、リポタンパク質複合体のマルチプレックス化近接アッセイを、図 2 2 に概説するように実施する。図 2 2 は、HDL リポタンパク質複合体の検

10

20

30

40

50

出を示し、コアタンパク質のそれぞれに特異的な捕捉抗体が表面に固定されて、リポタンパク質複合体を表面に結合する。追加のコアタンパク質に特異的な検出抗体が追加され、それぞれが近接プローブを備えている。実施例 1 に記載されているようにアッセイを完了する。

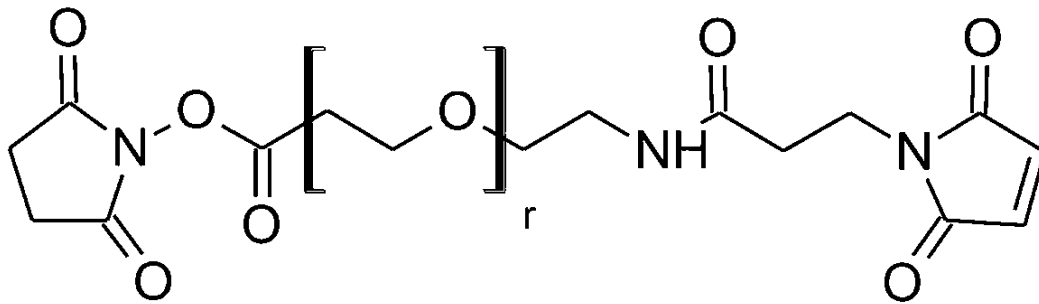
【0607】

実施例 13．抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲートを形成するための簡略プロトコル
ホスフェート緩衝生理食塩水、pH 7.4 + 1 mM EDTA (PBS/EDTA) に 2 mg/mL の抗体を含む抗体溶液を調製した。提供された抗体が、NHS エステルまたはマレイミド反応に干渉する構成要素を含むなどの不適合溶液にある場合、抗体は、最初に Zeba 40 ゲル濾過スピンカラムまたは 10 kD カットオフ AMICON 遠心限外濾過デバイスを使用して PBS/EDTA に緩衝液交換され、次いで 2 mg/mL に希釈された。

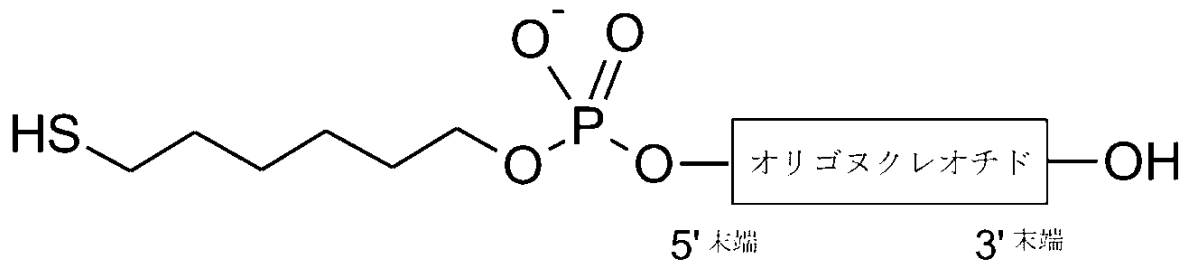
【0608】

次に、抗体を、(i) NHS エステルおよびマレイミド部分を有するヘテロ二官能性架橋剤 (式 V の化合物、 $r = 4$ (化合物 1)) および (ii) 5' 末端チオール (式 I I I A の化合物 (化合物 2)) で修飾された一本鎖 DNA オリゴヌクレオチド (オリゴヌクレオチド配列 = 5' - G A C A G A A C T A G A C A C - 3' (配列番号 33)) と反応させて、抗体とオリゴヌクレオチドのコンジュゲートを形成する。

【化 53】



式 V



式 I I I A

オリゴヌクレオチド = 5' - G A C A G A A C T A G A C A C - 3' (配列番号 33)

【0609】

反応は、適切な量の架橋剤 (1.5 mM の DMSO 溶液として) を抗体溶液に添加して、6 に等しい架橋剤 (CR_{xL}) のチャレンジ比を達成することによって実施され、 CR_{xL} は、追加された架橋剤分子の数と抗体分子の数の比率として定義される。得られた溶液を混合し、次に 23°C で 1 時間に等しい架橋剤インキュベーション時間 (T_{xL}) でイン

キュベーションした。次いで、適切な量のチオール修飾オリゴヌクレオチド（ 2 mg/mL のPBS/EDTA溶液として）を加え、9に等しいオリゴヌクレオチドのチャレンジ比（ CR_{on} ）を達成し、 CR_{on} は、追加されたオリゴヌクレオチド分子の数と抗体分子の数の比率として定義される。得られた溶液を混合し、次に 23°C で1時間に等しいオリゴヌクレオチドインキュベーション時間（ T_{xl} ）でインキュベーションした。このプロトコルでは、架橋剤と比較して1.5倍モル過剰のオリゴヌクレオチドが存在した。これらの条件により、抗体当たりのオリゴヌクレオチドの平均数が約3～4のコンジュゲートが生成されるはずである。注：架橋剤分子の量を、上方（例えば、 $CR_{xl}=8$ または10）、または下方（例えば、 $CR_{xl}=3$ または4）に調整して、抗体当たりのコンジュゲートオリゴヌクレオチドの平均数が多いまたは少ない産物を生成でき、これらの場合、 CR_{on} は、架橋剤に対して1.5倍の過剰を維持するように調整される。

【0610】

$100\text{ }\mu\text{g}$ ～ $500\text{ }\mu\text{g}$ の抗体を含む反応では、Sephadex G100スーパーファインゲル濾過樹脂（PBS/EDTAと0.05%アジ化ナトリウムからなる収集緩衝液で事前に平衡化）の 2 mL （ $\pm 0.1\text{ mL}$ ）カラムに、最終反応混合物をカラムの頂部に加えることによりロードし、カラムを通過させる。次に、カラムにロードされた総量（反応溶液とスタッキング体積）が 0.65 mL になるように、追加のスタッキング体積の収集緩衝液をカラムにロードした。次に、収集チューブをカラム出口の下に置き、追加の溶出量の収集緩衝液をロードし、得られる抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む溶離液を収集した。溶出量は、抗体 $100\text{ }\mu\text{g}$ 当たり $100\text{ }\mu\text{L}$ と $200\text{ }\mu\text{L}$ 、最大 $500\text{ }\mu\text{L}$ に設定した（代替的に、より低いスケールで追加希釈のコンジュゲートの費用をかけて、最大溶出量 $500\text{ }\mu\text{L}$ を反応スケール全体で使用できる）。以下の表は、3つの異なる反応スケールでの反応物および収集緩衝液のアリコート量を列挙している。 $500\text{ }\mu\text{g}$ 超の抗体を含む反応スケールは、より大きなカラムを使用し、体積を適切にスケールリングすることで達成することができる。

【表19】

Ab 重量(μg)	反応量(μL)				収集緩衝液量(μL)	
	Ab	X-リンカー	オリゴ	総量	スタッキング	溶出
100	50	4.4	20	74	576	300
200	100	9	40	149	501	400
500	250	22	98	370	280	500

【0611】

実施例14. 抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートへのオリゴヌクレオチド取り込みの程度を測定するための簡略化プロトコル

抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲート溶液のタンパク質濃度は、標準的なタンパク質測定アッセイ、特にビシンコニン酸（BCA）アッセイ（ThermoFisher Scientificからキット形式で入手可能）を使用して測定した。次に、コンジュゲートを収集緩衝液（実施例13を参照）で希釈して、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ のタンパク質濃度を得た。

【0612】

希釈されたコンジュゲート中のオリゴヌクレオチド濃度は、オリゴヌクレオチドを、DNA感受性蛍光色素であるSYBR-Green Iに結合することによって測定された。

10

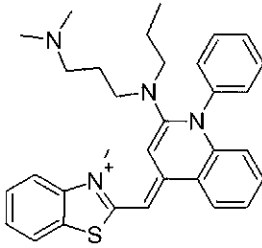
20

30

40

50

【化 5 4】



SYBR Green I

【0613】

SYBR Green Iの1000×ストック溶液を、370 nm光で約0.8～1.0の吸光度を提供する濃度でDMSOに調製した。1000×溶液をPBSで1000倍に希釈することにより、1×SYBR Green I試薬を調製した。SYBR Green Iの1×溶液200 μLに10 μL量のコンジュゲートを添加した。混合物を室温で5分間インキュベーションした後、485 nmの励起波長および528 nmの発光波長を用いた蛍光プレートリーダーを使用して混合物の蛍光を測定した。コンジュゲートを生成するために使用される遊離オリゴヌクレオチドの段階希釈を試験することによって作成された較正曲線と比較することによって、定量的濃度値を決定した（較正標準として実施例13からの式IIIAの化合物を使用）。オリゴヌクレオチドのモル濃度を抗体のモル濃度で割ると、抗体当たりのオリゴヌクレオチド数が得られる。

【0614】

代替的に、コンジュゲーションレベルのより定性的な評価が使用され得る。例えば、単一濃度の式IIIA化合物（低対照試料）は、コンジュゲートにおけるオリゴヌクレオチドの最小許容濃度に等しいレベルで試験され得（例えば、いくつかの用途では、2以上のタンパク質当たりのオリゴヌクレオチドの平均数を示す閾値濃度を設定することができる）、この場合、コンジュゲート試料の蛍光シグナルと低対照試料の蛍光の比較を使用して、コンジュゲートに許容レベルの標識化があるか（コンジュゲートの蛍光≧低対照の蛍光）または否か（コンジュゲートの蛍光<低対照の蛍光）を決定することができる。同様に、コンジュゲートにおけるオリゴヌクレオチドの最大予想濃度を超えるレベルを有する式IIIA化合物（高対照試料）から調製される別の標準物質も試験することができ（例えば、いくつかの用途では、6以上のタンパク質当たりのオリゴヌクレオチドの平均数を示す閾値濃度を設定することができる）、この場合、コンジュゲートの蛍光シグナルと蛍光シグナルの比較を使用して、コンジュゲートが過剰標識されたか否か、または精製工程で非コンジュゲートオリゴヌクレオチドが適切に除去されたか否か（コンジュゲートの蛍光>高対照の蛍光）を決定することができる。

【0615】

実施例14のように調製されたが、抗体分子当たりの結合オリゴヌクレオチドの比率を変えるために様々なレベルの架橋剤を使用する抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートのセットについて、図23aは、蛍光法によって決定された標識比が、平均分子量に基づいて決定された標識比とよく相関することを示す（EXPERION機器を使用したゲル電気泳動により測定される）。図23bは、調製物のオリゴヌクレオチド濃度の関数として、3つの異なる抗体から形成された遊離オリゴヌクレオチドと抗体-オリゴヌクレオチド複合体の蛍光アッセイシグナルを比較している（コンジュゲートの場合、EXPERION機器を使用したゲル電気泳動により決定される）。図は、蛍光がコンジュゲーションまたは抗体間の差異による影響を受けなかったことを示している。

【0616】

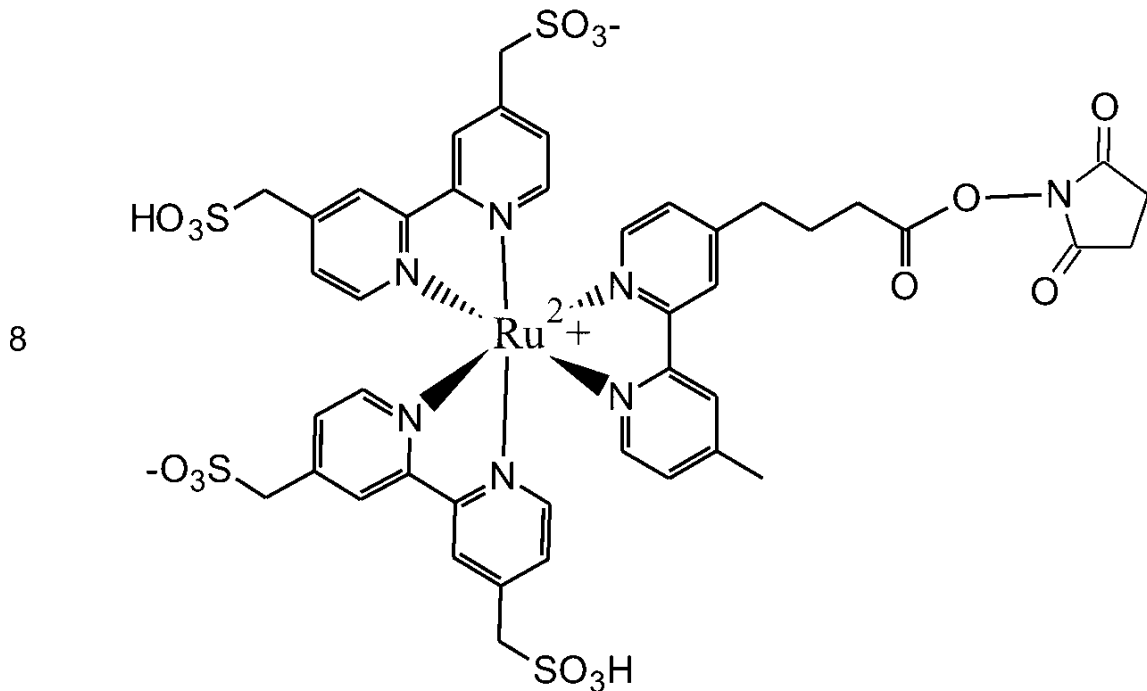
実施例15．標識検出プローブの合成

1つ以上の一級アルキルアミノ基を提示する一連のオリゴヌクレオチド（以下の番号4～7の化合物）を固相合成によって合成し、アルキルアミノ基でMSD SULFO-T

【化 5 5 - 1】



【化 5 5 - 2】



【0617】

標識反応は、アルキルアミノ基の数に対して約1.3倍過剰のNHSエステルを使用して、pH 8のホスフェート緩衝液で行い、これらの基すべての標識を促進した。標識産物は、pH 8の塩勾配を使用するカチオン性樹脂でのイオン交換クロマトグラフィーによって精製された。完全に標識された産物は、勾配の終わり近くに単一のピークとして現れた。

【0618】

実施例16. 2つの抗体増幅サンドイッチ免疫測定法のプロトコル

アッセイは、各ウェルの底に一体化されたカーボンインク電極を含むMSD MULTI-ARRAYマルチウェルプレートで実行された。電極は、固相結合アッセイにおける捕捉試薬の固相担体として、また電極上の結合複合体に存在するECL標識からECLを生成するための電気化学的エネルギー源として機能する。手順で使用された特定のマルチアレイプレートは、MSD金96 Small Spot SAプレートであり、各ウェルの作用電極上にストレプトアビジンの固定層が設けられている。捕捉抗体は、ビオチンNHSエステル試薬 (EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin, Thermo Fisher Scientific) を使用して、従来の手順に従ってビオチン標識された。検出抗体およびプローブオリゴヌクレオチドのコンジュゲート (検出抗体-プローブコンジュゲート) は、実施例14の手順に従って調製された。環状化オリゴヌクレオチドは5'末端ホスフェート基を有していた。実施例15に記載されているように、検出オリゴヌクレオチドは化合物11であった。使用したアッセイおよび検出抗体希釈液は、最適な抗原抗体結合を提供し、試料マトリックス効果を最小限にするために各アッセイ用に最適化されたが、増幅形式で使用する場合は、サケ精子DNAを15 μg/mLの濃度で添加することによりアッセイ希釈液を変更した。この実施例に記載される手順では、次のオリゴヌクレオチド配列を使用した。

アンカーオリゴヌクレオチド (アンカー) : 5'-AAGAGAGTAGTACAGCAGCCGTCAA-3' (配列番号37)

プローブオリゴヌクレオチド (プローブ) : 5'-GACAGAACTAGACAC-3' (配列番号33)

環状化オリゴヌクレオチド (Circ) : 5'-GTTCTGTTCATATTTTCAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGAGAGTAGTACAGCAAGAGTGT

10

20

30

40

50

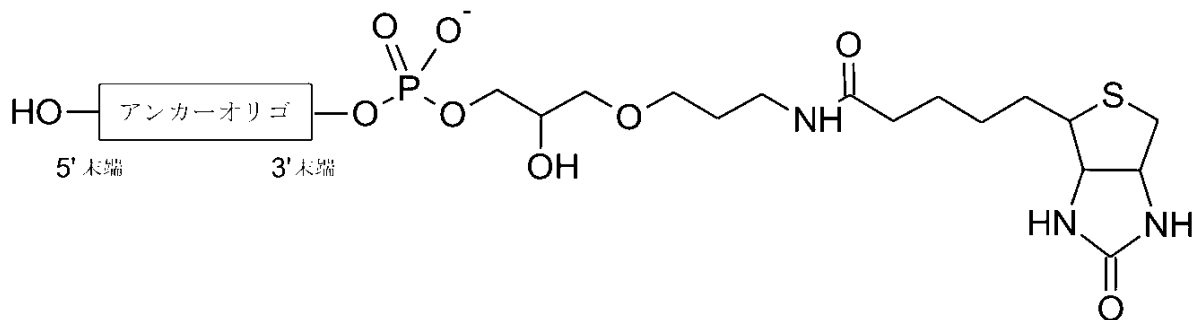
CTA-3' (配列番号 36)

検出オリゴヌクレオチド (検出器) : 5' - CAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAG - 3' (配列番号 32)

【0619】

捕捉抗体およびアンカーオリゴヌクレオチドは、ビオチン標識試薬がストレプトアビジンでコーティングされた電極に結合することにより、MSDプレートの電極上に固定された。まず、プレートのウェルを0.05% Tween-20を含むPBS (PBS-T) で3回洗浄した。次に、各ウェルに対して、ビオチン標識捕捉抗体 (0.25 μg/mL) および3'-ビオチン標識アンカーオリゴヌクレオチド (化合物13、0.2 ng/mL) を含むウシ血清アルブミン (BSA) 含有緩衝液50 μL (捕捉抗体およびアンカーのストック溶液を組み合わせることで調製された) を添加した。次に、プレートを振とうしながら室温で少なくとも1時間、または振とうせずに一晩インキュベーションし、次いで、PBS-Tで3回洗浄して、未結合のビオチン標識試薬を除去した。

【化56】



【0620】

次に、各ウェルに、サケ精子DNAを含む25 μLのアッセイ希釈液および25 μLの試料を添加し、プレートを室温で1~2時間インキュベーションした。プレートを再びPBS-Tで3回洗浄して、過剰な試料を除去した。次に、検出抗体-オリゴヌクレオチドプローブコンジュゲート (通常、約0.01 μg/mL~0.5 μg/mLの濃度で50 μL) を含む抗体希釈液をウェルに添加し、室温で1時間インキュベーションして、サンドイッチ複合体の形成を完了した。次に、ウェルをPBS-Tで3回洗浄することにより、過剰な検出抗体を除去した。

【0621】

サンドイッチ複合体をDNA環に結合させ、DNAリガーゼ、Circオリゴヌクレオチド、アセチル化重合BSA、MgCl₂、DTT、およびATPを含む50 μLのTris-HCl緩衝溶液、pH 7.4を各ウェルに添加し、プレートを室温で30分間振とうしながらインキュベーションして、Circオリゴヌクレオチドを、任意の結合検出抗体-オリゴヌクレオチドプローブコンジュゲートのプローブ構成要素に結合させ、リガーゼがCircオリゴヌクレオチドを環状化して結合環を形成することにより、ローリングサークル増幅用に調製した。次に、プレートをPBS-Tで3回洗浄して、未結合のCircオリゴヌクレオチドおよびリガーゼを除去した。ローリングサークル増幅およびECL標識による増幅産物の標識は、DNAポリメラーゼ、4つの各標準dNTP、検出プローブ、酢酸カリウム、50 mM塩化カリウム、酢酸マグネシウム、DTT、およびTween-20を含む50 μLのTris緩衝溶液、pH 8.2を各ウェルに添加し、プレートを27°Cで1時間振とうして、ローリングサークル増幅によりプローブオリゴヌクレオチドを伸長することにより実施され、増幅産物をアンカーオリゴにアンカリングし、検出オリゴヌクレオチドを増幅産物にハイブリダイズさせる。次に、プレートをPBS-Tで3回洗浄することにより、過剰な検出オリゴヌクレオチドを除去する。

【0622】

ECL測定を行うために、150 μLのECL共反応物を含むECL読み取り緩衝液 (

M S D読み取り緩衝液金、M e s o S c a l e D i a g n o s t i c s) を各ウェルに添加し、プレートをE C Lプレートリーダー(M S D S e c t o r I m a g e r 6 0 0 0またはM S D Q u i k P l e x 1 2 0、M e s o S c a l e D i a g n o s t i c s)で分析した。プレートリーダーは、プレートの各ウェルの作用電極(および関連する対極)に電位を印加し、結果として生じる電気化学発光放出を画像化し、各アッセイ測定の出光の量に比例する定量値を報告する。2つの抗体増幅アッセイ形式の概略図を図24に示し、これは、C i r cオリゴヌクレオチドの結合、それに続く連結およびローリングサークル増幅により、固定アンカー配列と標識検出配列の両方に結合する伸長産物を形成することを示す。

【0623】

実施例17. 抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの精製のためのサイズ排除樹脂の選択

15塩基長オリゴヌクレオチドを有する抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、コンジュゲート精製工程を除いて、実施例13に記載されるように、200μgスケールで調製された。この実施例では、いくつかの異なるサイズ排除樹脂を使用した精製を互いに比較し、遠心限外濾過デバイス(製造元の推奨に従って使用される50kDカットオフのA M I C O N限外濾過デバイス)を使用した精製と比較した。サイズ排除樹脂を比較するために、コンジュゲーション反応の産物を下記樹脂の2mLカラムにロードした。

【表20】

樹脂	販売会社	部#	粒子サイズ(μm)
Sephadex G-50 Fine	Sigma	G5080	20-80
Sephadex G-50 Fine	Roche	03117928001	20-80
Sephadex G-100 Fine	Sigma	27119-5	40-120
Sephadex G-100 Superfine	GE Healthcare	17-0061-01	10~40
Superdex G-200	GE Healthcare	17-1043-01	24-44
Sephacryl S-200	GE Healthcare	17-0584-10	50
Sephacryl S-300	GE Healthcare	17-0599-10	50

【0624】

さらに、純粋なコンジュゲート、非コンジュゲート抗体、および非コンジュゲートオリゴヌクレオチドを使用して走行も実施し、反応混合物の可能な各構成要素のピーク位置を特定した。樹脂のローディング後、産物を収集緩衝液で溶出し、0.2mLの画分に収集した。

【0625】

試験された樹脂のうちで、G-100 S u p e r f i n eはコンジュゲートオリゴヌクレオチドおよび非コンジュゲートオリゴヌクレオチドの分離が最も優れていた。G-100 S u p e r f i n e樹脂を使用した未精製コンジュゲートの溶出プロファイルを図25(a)に示し、非コンジュゲート抗体、非コンジュゲートオリゴヌクレオチド、および純粋コンジュゲートの対照プロファイルも示す。溶出画分は、B C Aアッセイを使用するタンパク質について、S Y B R G r e e n Iアッセイを使用するオリゴヌクレオチドについて定量された(実施例14に記載されているように)。図に示すように、G-100 S u p e r f i n eカラムでの精製により、非コンジュゲートオリゴヌクレオチドの混入(通常10%未満)を最小限にしながら、高収率(通常80~85%)で精製コンジュゲートを提供することができる。

【0626】

精製コンジュゲートの活性を試験するために、I L-6のサンドイッチ免疫測定法の検出抗体用にコンジュゲートを調製した。コンジュゲートは、G-100 S u p e r f i n eカラムを使用して、またはA m i c o n限外濾過デバイスを使用して精製された。ア

ッセイで使用された G-100 精製からの画分は、図 25 (b) の G-100 溶出プロファイルに示されている。検出抗体コンジュゲートはビオチン標識 IL-6 捕捉抗体と対合し、ローリングサークル増幅された 2 抗体アッセイで一連の IL-6 校正標準を測定するために使用された（実施例 16 に記載されているものと類似するプロトコルを使用）。図 25 (c) は、校正物質濃度の関数として測定された ECL シグナルを示し、G-100 法および Amicon 法を使用して精製された検出抗体がほぼ同一のアッセイシグナルを発したことを示している。結果は、G-100 重力精製の使用が、Amicon 法（デバイスを準備し精製を実行するために複数の遠心分離を実行する必要がある）よりも実行がはるかに簡単で高速であるにもかかわらず、抗体-オリゴヌクレオチド機能に悪影響を及ぼさなかったことを示している。

【0627】

実施例 18．抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの定量的ための代替蛍光色素

核酸に結合すると蛍光が増加することが知られている幾つかの蛍光色素が特定された。抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートにおける 15 塩基長のオリゴヌクレオチドを高感度かつ特異的に測定する色素の能力を、実施例 14 に記載されたものと類似の形式を使用して試験した（色素を変えることを除く）。試験された色素は、電気泳動ゲルにおける非コンジュゲート核酸を検出するために製造元によって報告された感度（絶対濃度または臭化エチジウム染色の使用と比較して）とともに次の表に列挙されている。表には、様々な形態の核酸について報告される感度、ならびに色素蛍光のピーク励起波長および発光波長も示されている。

【表 21】

試薬	特異性	感度	Ex/Em
Quant-iT OliGreen	すべての核酸、特に、チミン (ssDNA>10 塩基対)	1pg/ μ L	480/520
Quant-iT RiboGreen	RNA&DNA、特にアデニンまたはシトシン	約 1pg/ μ L	480/520
QuantiFluor ssDNA システム	ssDNA	約 1pg/ μ L	492/528
SYBR 緑 I	ssDNA への結合が少ない dsDNA	5-25X EtBr	497/520
SYBR 緑 II	ssDNA への結合が少ない RNA	5-25X EtBr	497/520
SYBR 金	すべての核酸	25-100X EtBr	495/537

【0628】

図 26 (a) は、色素の性能を比較した 3 つのグラフを示している。左のパネルは、抗体コンジュゲートにおけるオリゴヌクレオチドの当量濃度に対する非コンジュゲートオリゴヌクレオチドの蛍光シグナルを示し（コンジュゲート中のオリゴヌクレオチド濃度は、Experion 電気泳動機器でゲル電気泳動分離を使用して測定された平均分子量に基づいて決定された）、すべての色素は、非コンジュゲートオリゴヌクレオチドおよびコンジュゲートオリゴヌクレオチドでほぼ同等の蛍光シグナルを示し（比率は約 0.9 ~ 1.1）、オリゴヌクレオチドのタンパク質へのコンジュゲーションが蛍光シグナルの生成に干渉しなかったことを示している。中央のパネルは、オリゴヌクレオチドが存在しない場合の非コンジュゲート抗体のシグナルを、当量濃度のコンジュゲートのシグナルと比較しており、すべての色素は、コンジュゲートと比較して抗体の低いシグナルを提供し（比率は約 2% 未満）、抗体の存在が測定に干渉しなかったことを示している。右のパネルは、100 ng のコンジュゲートから得られたシグナルについてのシグナルとバックグラウンドの比率を示し（タンパク質測定に基づく）、すべての色素は比率が 5 を超えており（一部は比率が 10 または 15 を超えた）、これは、アッセイ法がわずかに 100 ng のコンジ

ュゲートでオリゴヌクレオチドレベルを分析するのに十分な感度を有することを示している。試験されたすべての色素は十分な性能を有したが、SYBR Green Iは、ゲル中のDNAの定量およびqPCRで一般的に使用されており、フルオレセインの測定用に開発されたフィルターセットとうまく機能するため（497 nmでの励起、520 nmでの発光）、さらなる開発用に選択された。図26（b）は、SYBR Green Iからの蛍光シグナルを、遊離形態または抗体コンジュゲートとしてのオリゴヌクレオチド濃度の関数として示し、2つの形態のシグナルが広いアッセイダイナミックレンジで厳密に一致していることを実証している。

【0629】

実施例19．代替の標識検出プローブ

ローリングサークル増幅アッセイで使用するための標識検出プローブの異なる可能な構造を比較するために、IL-4、IL-6、およびIL-10の捕捉-検出抗体対を使用し、使用した検出プローブの構造を変更して、実施例16に記載の2つの抗体手順を実行した。この実験において、比較された検出プローブは、実施例15に記載の以下のSULFO-TAG標識化合物である。化合物9（単一の3'標識を有し、実施例では「1×3」と呼ばれる）、化合物10（2つの内部標識ヌクレオチドおよび3'標識を有し、実施例では「2×内部&3'」と呼ばれる）、化合物11（3'末端に連結された3つの標識をもつ構造を有し、実施例では「3×3'+18EG B」と呼ばれる）、および実施例15からの化合物12（PEGリンカーを介して3'末端に連結された3'標識をもつ構造を有し、実施例では「3×3'+18EG」と呼ばれる）。評価された別の検出プローブアプローチは、SULFO-TAG標識ストレプトアビジンに事前に結合した3'ビオチン標識プローブの使用であった（「SA検出」と呼ばれる）。実施例16に記載のプロトコル（ローリングサークル産物が形成される際に検出プローブの結合が起こるように、検出プローブがポリメラーゼと一緒に追加されたため、「同時」プロトコルと呼ばれる）に加えて、改変プロトコルは「逐次」プロトコルとも呼ばれる。逐次プロトコルにおいて、検出プローブをポリメラーゼ反応から割愛し、ポリメラーゼ反応工程の後に洗浄工程を追加してポリメラーゼ溶液を除去し、検出プローブを追加のインキュベーション工程で添加した。検出プローブを結合させた後、ウェルを洗浄し、ECL読み取り緩衝液で充填し、同時プロトコルのようにECLを測定した。

【0630】

最初の実験では、「SA検出」、「1×3'」、「2×内部&3'」、および「3×3'+18EG」の検出プローブを、逐次（図27（a））および同時（図27（b））プロトコルを使用して比較した。逐次プロトコルにおいて、グラフは、マルチ標識されたオリゴヌクレオチド構造（「2×内部&3'」および「3×3'+18EG」）の使用により、単一標識の「1×3'」構造と比較してシグナルが1.5〜2倍増加することを示し、複数のECL標識が、小さなオリゴヌクレオチド上に近接して配置されている場合でも、ハイブリダイゼーション効率を損なうことなくECLシグナルを増加させることができることを示している。同時プロトコルでは、内部標識構造（「2×内部&3'」）も、単一標識構造に比べてシグナルが増加したが、末端標識された「3×3'+18EG」は、おそらくポリメラーゼを備えたプローブの相互作用により、はるかに低いシグナルであった。意外なことに、「3×3'+18EG」構造とオリゴヌクレオチドの間のポリエチレングリコールリンカーの除去（すなわち、「3×3'+18EG B」構造を提供するため）により、この干渉が排除された。第2の実験では、「2×内部&3'」および「3×3'+18EG B」検出プローブが、逐次プロトコルおよび同時プロトコルの両方でほぼ同等に機能することが示された。図28では、2つのプロトコルの下で2つの検出プローブを使用して測定された較正曲線を示し、中間レベルの較正標準（「Cal3」）のシグナル、ブランクシグナル（「NSB」）および推定検出限界（LOD）を提示する表もある。留意すべきは、逐次プロトコルのシグナルは同時プロトコルよりも高くなる傾向がある一方、バックグラウンドシグナルも同様に高くなる傾向があることであり、2つのプロトコルの総合感度はほぼ同等である。

10

20

30

40

50

【0631】

実施例20．抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲートを形成するための代替条件

IL-4 検出抗体の抗体－オリゴヌクレオチドプローブコンジュゲートは、2つのパラメータを変更することを除いて、実施例13の手順に従って調製した。(i) x 連結剤のチャレンジ比 (CR_{xL}) を3から14まで変更し(試験 CR_{xL} 値には、3、5、8、9、10、11、12、および14が含まれた)、(ii) 架橋剤とのインキュベーション時間 (T_{xL}) は、0分またはデフォルトの60分のいずれかであった。オリゴヌクレオチドのチャレンジ比 (CR_{on}) およびオリゴヌクレオチドとのインキュベーション時間 (T_{on}) は、それぞれ15時間および1時間で一定に保たれた。 $T_{xL}=0$ の条件では、「同時」条件と呼ばれる、オリゴヌクレオチドは架橋剤と同時に添加された(1つのアプローチは、添加時に架橋剤がタンパク質およびオリゴヌクレオチドの両方と同時に反応するように、架橋剤の前にオリゴヌクレオチドを添加することである)。オリゴヌクレオチドの添加前に架橋剤をタンパク質と反応させたデフォルトの条件は、「逐次」条件と呼ばれた。得られた抗体－オリゴヌクレオチドプローブコンジュゲートの性能は、(i) 実施例14に記載のタンパク質およびオリゴヌクレオチドアッセイの手順を使用して抗体分子当たりの付着オリゴヌクレオチドの数を決定することによって、および(ii) 実施例16に記載されているように実行されるIL-4アッセイにおいて、抗体－オリゴヌクレオチドプローブコンジュゲートを検出抗体として使用する場合の中間レベルIL-4校正標準から生成するシグナルを測定することによって分析された。

【0632】

図29aの表は、IL-4アッセイでECLシグナルを提供するコンジュゲートを生成する際に、逐次プロトコルおよび同時プロトコルの両方が効果的であったことを示している。逐次プロトコルでは3、同時プロトコルでは8の CR_{xL} 値は、抗体当たり3オリゴヌクレオチドの目標値を超えた標識とタンパク質の比率(「L/P」、抗体当たりの付着オリゴヌクレオチドの平均数)であるコンジュゲートを達成するのに十分であった。この標識とタンパク質の比率では、ポアソン分布は5%未満の非標識抗体の残存を予測している(低レベルの非標識抗体は、モデル化されたゲル画像として図29bに示すEXPERIONゲル電気泳動の結果によって確認される)。図29aおよび29bは、 CR_{xL} のさらなる増加を利用して、免疫測定法において、より高い標識比およびより高いシグナルの両方を提供できることも示している。

【0633】

実施例21．ローリングサークル増幅免疫測定法で使用するためのオリゴヌクレオチド配列の最適化

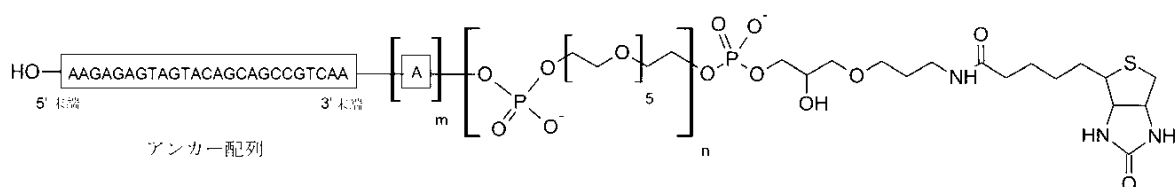
実施例16に記載される手順の開発において、試薬のコスト、サイズ、および複雑性を最小限にしながら性能を最適化するために、様々なオリゴヌクレオチドの配列および構造が試験および比較された。データは、オリゴヌクレオチド配列または試薬の置換を除いて、実施例16の手順に類似した手順を使用して実行された。

【0634】

アンカーオリゴヌクレオチド配列

ビオチン化アンカーオリゴヌクレオチドのバリエーションを試験し、長いポリAリンカーを備えたアンカー配列を有する対照アンカーと比較した(実施例1で使用したアンカーオリゴヌクレオチドと同様)。試験された構造を以下に示す。

【化57】



(配列番号37)

【表 2 2】

アンカーオリゴ	修飾	m,n
対照	ビオチンへのポリ A リンカー	m=18,n=0
オリゴ 1	ポリ A リンカーなし	m=0,n=0
オリゴ 2	ポリ A リンカーなし+1PEG スペーサー	m=0,n=1
オリゴ 3	ポリ A リンカーなし+2PEG スペーサー	m=0,n=2
オリゴ 4	ポリ A リンカーなし+3PEG スペーサー	m=0,n=3

10

【0 6 3 5】

これらの各アンカーオリゴヌクレオチドは、I L - 4 および I L - 1 0 の増幅 E C L アッセイで試験された。図 3 0 (a) および 3 0 (b) に示す結果は、高レベルの較正標準（高 - C a l）、中レベルの較正標準（中 - C a l）を含む試料、およびブランク試料（N S B）についての各アッセイで測定された E C L シグナルを示している。グラフは、ポリ A または P E G スペーサーの不在下でも最適な性能を維持できることを示している。

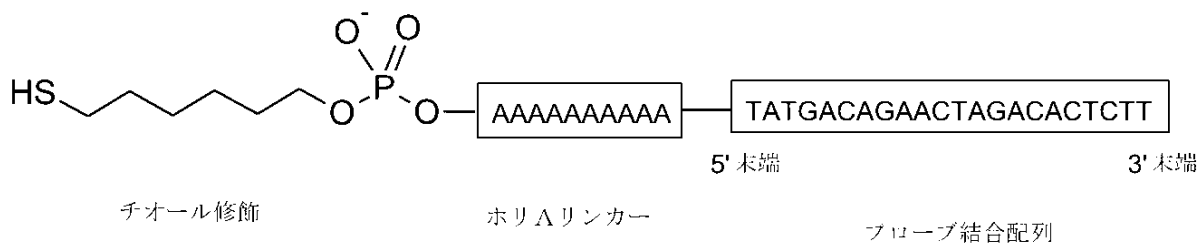
【0 6 3 6】

抗体 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのオリゴヌクレオチドプローブ配列

実施例 1（以下の構造）に記載のチオール修飾された近接プローブ 2 構築物を修飾することにより、抗体 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートで使用する最適なプローブ立体配置を決定するために実験を実施した。

20

【化 5 8】



(配列番号 3 8)

(配列番号 3 9)

30

【0 6 3 7】

新しいプローブでは、ポリ A リンカーが除去され、C i r c オリゴヌクレオチドの末端に対する相補性を維持しながら、プローブ結合配列の両端から塩基を追加または除去することにより、様々な長さ（8 ~ 3 0 塩基）の一連のプローブ結合配列を生成した。これらの新しいプローブ構築物は、I L - 1 0 免疫測定法（実施例 1 3 に類似）の検出抗体にコンジュゲートされ、2 つの抗体ローリングサークル増幅形式（実施例 1 6 に類似）で試験された。図 3 1 (a) は、中レベルの I L - 2 較正標準（中 C a l）で測定された特異的シグナル、I L - 2 の不在下での非特異的シグナル（N S B）、および推定検出限界（L O D）を示している。意外なことに、連結ユニットを省略し、プローブ結合配列（ハイブリダイゼーション長さ）を約 1 4 ~ 1 5 塩基に短縮することにより、シグナルが増加し、検出限界が向上した。より短いプローブを使用すると、性能が向上するだけでなく、プローブ生成のコストおよび複雑性が低減され、単純なサイズ分離デバイスを使用して非コンジュゲートプローブのコンジュゲートを分離できるため、抗体 - プローブコンジュゲートの精製手順が簡略化される。実験に基づいて、1 5 塩基長のプローブ配列を使用するために選択した。5' - G A C A G A A C T A G A C A C - 3'（配列番号 3 3）。

40

【0 6 3 8】

1 5 塩基長のプローブ配列の修飾も調査された。選択された配列の G C 含量は約 4 7 %（1 5 塩基中 7 塩基）である。別の 1 5 塩基長プローブが試験され、G C 含量が 6 0 % 超

50

、または約67%（15塩基中10塩基）に上昇し、Circオリゴヌクレオチドの相補領域に同様の変更がなされた。

高GCプローブ：TGCAACAGC-TCGACGC（配列番号42）

高GC Circ：GCTGTGCAATATTTTCAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGAGAGTAGTACAGCAAGA-GCGTCGA（配列番号43）
【0639】

図31（b）は、連結工程中の温度の関数として、高レベル（高Cal）、中レベル（中-Cal）、およびブランク（NSB）の較正標準のシグナルを提供し、GC配列の増加により高温でプローブ-Circ複合体のよりよい安定性を提供し得ることを示し、これは、増幅アッセイ形式の連結工程の温度および反応速度を上げる機会を提供し得る。

【0640】

テンプレート（Circ）オリゴヌクレオチド配列

実施例3および図11（a）に記載されるように、近接プローブ2用の単一の連結部位を備えたワンピース接続オリゴヌクレオチド（Circ）を修飾することにより、最適なCircオリゴヌクレオチド構築物を決定するために実験を実施した。実施例1（以下の構造）に記載の3抗体近接チオール修飾近接プローブ2構築物で使用するために設計されたこのCircオリゴヌクレオチド。このCircには、長さが最適化されていない2抗体オリゴヌクレオチドプローブコンジュゲート（2抗体増幅形式で使用されていないものを含む）の結合部位が含まれていた。試験されたCirc配列は、下記を含んでいた。

【表23】

Circ オリゴヌクレオチド	長さ	修飾
通常の Circ2	90 塩基対	元の全長 Circ
LCS2 Min2	78 塩基対	未使用のプローブ結合部位を除去
LCS2 Min1	68 塩基対	すべての未使用配列を除去
LCS2 Min3	61 塩基対	アンカー配列を 25 塩基対から 16 塩基対に削減
LCS2 Min4	53 塩基対	プローブ結合配列を 25 塩基対から 16 塩基対に削減

【0641】

すべてのCirc配列は、5'末端ホスフェートを含むように作製された。Circ配列は、15塩基長のプローブを有する検出抗体-オリゴヌクレオチドプローブ配列を使用するIL-10のアッセイで試験された。図32は、様々なCirc配列を使用した場合のIL-10濃度の関数としてのアッセイシグナルを示している。結果は、Circの長さが90塩基対（bps）未満、または約78塩基対もしくは約78塩基対未満に減少すると、アッセイシグナルが増加し、最大シグナルが約61～約68塩基対の範囲で達成することを示している。Circの長さの短縮は、性能を改善するだけでなく、オリゴヌクレオチドを産生するコストおよび複雑性を低減させ、ローリングサークル増幅産物における環複製のコピー数の増加につながる可能性があり、望ましくない核酸相互作用のリスクを低減させる可能性がある。アッセイで使用するために61塩基対の配列が選択された。GTTCTGTCAATATTTTCAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGAGAGTAGTACAGCAAGAGTGTCTA（配列番号36）。

【0642】

実施例3で使用されたものと比較した、この実施例に記載のアンカー、テンプレート、コンジュゲート、および検出オリゴヌクレオチドへの修飾の要約を図33に示す。

【0643】

実施例22．2抗体ローリングサークル増幅アッセイと従来の非増幅免疫測定法の比較

一連の異なる分析物のアッセイは、実施例16に記載されているように実行された。各アッセイは、実施例13および14に記載されるように調製および特性評価されたビオチ

ン標識捕捉抗体および検出抗体-オリゴヌクレオチドプローブコンジュゲートを使用した。アッセイ性能を従来のECLアッセイ形式と比較した。従来の形式では、検出抗体プローブコンジュゲートを使用する代わりに、チャレンジ比20で検出抗体をMSD SULFO-TAG NHS標識で標識した（通常、抗体当たり約8標識の最終標識比を提供する）。従来のアッセイは、検出抗体結合工程まで、増幅アッセイと同じように実行された（使用された標識検出抗体の差異を除く）。従来のアッセイでは、検出抗体とのインキュベーション工程が完了すると、プレートをPBS-Tで3回洗浄し、150μLのMSD金読み取り緩衝液を各ウェルに添加し、プレートをECLプレートリーダーで分析した。

【0644】

図34aは、増幅によって実質的に改善された3つのアッセイ（IL-2、IL-4、およびIL-10）の較正曲線を示している。グラフは、標準アッセイ形式および増幅アッセイ形式で得られたシグナルを比較し、増幅により約30倍から約100倍の範囲のシグナルの改善を実証している。図34bは、ヒトタンパク質標的（IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、TSLP、TNF-α、IL-21、IFN-γ、GM-CSF、IL-1β、IL-33、IL-31、IL-12p70、IL-22、IL-5、G-CSF、IL-15、IL-16、VEGF-A、IL-23、IFN-α2a、エオタキシン-3、IFN-β、IL-9、IL-7、IL-29/IFN-λ1、TPO、IL-27、MCP-3、MIP-3α、IL-3、I-TAC、IL-1α、IL-17B、IL-17C、IL-17E/IL-25、IL-17F、IL-17D、IL17A/F、およびTNF-β）についての41アッセイの標準版および増幅版の検出限界（アッセイバックグラウンドを2.5標準偏差上回るシグナルを生じる濃度として推定される）を比較している。試験したアッセイのうち、約90%（37/41）は増幅による検出限界で少なくとも2倍改善され、約68%（28/41）は少なくとも5倍改善され、約56%（23/41）は少なくとも10倍改善され、約44%（18/41）は少なくとも25倍改善され、約21%は少なくとも100倍改善された。最大の改善は約718倍であった。

【0645】

実施例23. 追加の免疫測定プラットフォームで実施される2抗体アッセイ

（a）コード化粒子を使用したビーズ系免疫測定形式

すべてのアッセイ工程は、96ウェルフィルタープレートで行われる。真空マニホールド（Hgの10インチを超えない）でプレートから液体を取り除く。プレートを裏返しにしない。目詰まりが発生した場合は、15mLコニカルチューブのとがった端を使用して、目詰まりしたウェルの下の領域を静かに押した後、1mLパスツールピペットゴム球を使用するか、目詰まりしたウェルの上に親指を置いて、圧力を発生させて目詰まりを取り除く。最後の吸引工程に続いて、ペーパータオルの束でプレートの底を軽くたたき、次にキムワイプでフィルタープレートの底を軽くたたいて、残留する液体/液滴を取り除く。

【0646】

洗浄液の調製：20×洗浄液ボトルの内容物全体を285mLの脱イオン水で希釈することにより、1×作業洗浄液を調製する。

【0647】

アッセイ標準調製物：凍結乾燥された標準物質を100%アッセイ希釈液（血清および血漿試料）または50%アッセイ希釈液/50%組織培養培地（組織培養上清）で再構成する。再構成量：（i）1バイアル：1mL、（ii）2バイアル：バイアル当たり0.5mL。室温で8~10分間再水和する。バイアルを数回静かに反転させ、バイアルをさらに3~5分間置いて、完全に水和させる。複数の標準物質を使用する場合は、等量の各標準物質を組み合わせ、穏やかに混合する。再構成された標準物質の3倍段階希釈を実行して、7ポイントの標準曲線を作成する。

【0648】

分析物の捕捉：

（1）10×捕捉ビーズストックをボルテックス（30秒）および超音波処理（30秒

）する。ホイルで包んだチューブで、 $10\times$ 捕捉ビーズストック（ウェル当たり $2.5\mu\text{l}$ ）を作業洗浄液（ウェル当たり $25\mu\text{l}$ 、約 $2,000\sim 5,000$ ビーズ／アッセイ）で希釈する。より高いマルチプレックス化のために、保持される $10\times$ 捕捉ビーズストックの余分な量を考慮して、作業洗浄液の量を調整する。

【0649】

（2）標準ウェルおよび試料ウェルを $200\mu\text{l}$ の作業洗浄液で事前に湿らせる。

【0650】

（3）希釈された捕捉ビーズ溶液をボルテックス（30秒）および超音波処理（30秒）する。直ちに各アッセイウェルに $25\mu\text{l}$ を加え、続いて $200\mu\text{l}$ の $1\times$ 洗浄液を加える。吸引し、 $200\mu\text{l}$ の作業洗浄液で洗浄を繰り返す。必要に応じて、フィルタープレートの底を軽くたたく。

【0651】

（4）すべてのアッセイウェルに $50\mu\text{l}$ のインキュベーション緩衝液を加える。

【0652】

（5）指定ウェルに $100\mu\text{l}$ の標準物質を加える。試料用に指定されたウェルの場合、 $50\mu\text{l}$ のアッセイ希釈液を追加し、続いて $50\mu\text{l}$ の試料を追加する。プレートを覆い、オービタルプレートシェーカー（ $500\sim 600\text{rpm}$ ）上で室温で2時間インキュベーションする。光から保護するために、すべてのインキュベーション中は不透明な蓋でアッセイプレートを覆う。オービタルシェーカーの半径によっては、速度の調整が必要になる場合がある。

【0653】

分析物の検出

（6）蛍光標識検出抗体の $1\times$ を調製する。 $10\times$ 検出抗体（ウェル当たり $10\mu\text{l}$ ）を希釈液（ウェル当たり $100\mu\text{l}$ ）で希釈する。検出抗体は、Alexa Fluor 350（青色蛍光標識）またはAlexa Fluor 594（赤色蛍光標識）（Life Technologies、ニューヨーク州グランドアイランドから入手可能）などの蛍光標識で標識されている。より高度なマルチプレックス化のために、必要な $10\times$ 抗体ストックの余分な量を考慮して希釈剤の量を調整する。アッセイウェルを吸引し、 $200\mu\text{l}$ の作業洗浄液で2回洗浄する。 $100\mu\text{l}$ の希釈された検出抗体を各アッセイウェルに加える。プレートを覆い、プレートシェーカー（ $500\sim 600\text{rpm}$ ）上で1時間インキュベーションする。

【0654】

アッセイの読み取り

（8）アッセイウェルを吸引し、 $200\mu\text{l}$ の作業洗浄液で3回洗浄する。フィルタープレートの底を清潔なペーパータオルで乾燥させ、残留する液滴をすべて完全に取り除く。 $100\mu\text{l}$ の作業洗浄液を各アッセイウェルに加え、プレートをプレートシェーカー（ $500\sim 600\text{rpm}$ ）上に2～3分間置く。

【0655】

（9）各蛍光標識のカラーチャネルを含むマルチカラー蛍光粒子アナライザー（FACSシステムまたは改変XMAP機器など）でビーズ懸濁液を分析する。最高の感度のために、アッセイは、粒子がゼロまたは1つの分析物しか結合していない可能性が高い条件下で実行され、分析物の量は、蛍光標識を含む特定の分析物に特異的な粒子の数を計数することによって定量される（粒子コーディングに基づく）。任意で、アッセイは、コードがビーズ上の捕捉抗体の分析物特異性および各分析物に対する検出抗体を示すコード化ビーズを使用するマルチプレックス形式で実行することができる。ビーズに組み込まれた追加の蛍光色を使用するXMAPのように、コーディングが決定される場合、分析器には、追加の色を測定し、ビーズコードを特定するための追加の検出チャンネルが必要である。

【0656】

（b）アンカー部分を含むコード化粒子を使用し、核酸プローブで修飾された検出試薬を使用するビーズ系免疫測定形式

10

20

30

40

50

実施例 23 (a) で概説されるように、すべてのアッセイ工程は、96 ウェルフィルタープレートで行われる。洗浄液およびアッセイ標準は、実施例 23 (a) に記載されるように調製され、標的分析物に対する検出抗体は、実施例 13 に記載されるように、配列番号 33 の核酸プローブの添加によって修飾される。実施例 23 (a) に記載されているように、分析物は捕捉ビーズに捕捉される。捕捉ビーズには、ローリングサークルアンプリコンに特異的であるように選択されたオリゴヌクレオチドとともに、BSA-オリゴヌクレオチドコンジュゲートとしてビーズ表面に固定されたアンカー部分が含まれる。使用されるアンカーオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号 37 または 45 である。

【0657】

25 μ l のアッセイ希釈液、校正物質、または試料（必要に応じて希釈）を捕捉ビーズの混合物と混合する。混合物を振とうしながら 1～3 時間インキュベーションし、洗浄する。上記のように調製した配列番号 33 の核酸プローブで標識された検出抗体の溶液を混合物に加え、振とうしながら 1～2 時間インキュベーションする（代替的に、個々の検出抗体を逐次添加し、各添加後に 1 時間インキュベーションすることができる）。実施例 1 に記載の連結混合物を加える。混合物を連結混合物と 37℃ で 30 分間インキュベーションし、洗浄して過剰の環状化オリゴヌクレオチドを除去し、RCA 混合物と 37℃ で 1.5 時間インキュベーションし、RCA 混合物は上記の実施例 1 に記載されている。混合物を洗浄し、フルオレセインで標識された検出プローブの混合物を添加し、37℃ で 30 分間インキュベーションし、検出プローブ混合物は上記に記載されている。混合物を洗浄し、粒子をマルチチャンネル蛍光粒子分析器に吸引する。

【0658】

(c) ビーズ系形式および個々のナノウェルへの捕捉分析物分子の分離

試料は、100 μ l の 25% ウシ血清（2～4 倍希釈）で調製され、捕捉抗体でコーティングされた 500 K ビーズ（常磁性 2.7 μ m、任意で蛍光コード化）が試料に追加される。試料を 23℃ で約 2 時間インキュベーションする。試料を PBS（5×、0.1% Tween-20）で 3 回洗浄し、標識検出抗体（ビオチン化検出抗体またはハプテンにコンジュゲートした抗体）を添加する。混合物を 23℃ で約 1 時間インキュベーションする。混合物を PBS（5×、0.1% Tween-20）で 3 回洗浄し、酵素標識を加え、ストレプトアビジン-ペクターガラクトシダーゼ（40 pM）、抗ハプテンにコンジュゲートした酵素も加え、混合物を 23℃ で約 30 分間（または Simoa 分析器では 3 分）インキュベーションする。混合物を PBS（5×、0.1% Tween-20）で 7 回洗浄し、酵素基質である 15 μ l のレゾルフィン-ペクター-d-ガラクトピラノシド（100 μ M、ローディング緩衝液）を添加する。

【0659】

混合物は、ナノウェルのアレイ（QUANTERIX によって DVD 形式で提供され、環状オレフィンポリマーから作られ、ディスク当たり 24 試料）上に引き込まれ、約 2 分間静置される。アレイを緩衝液でフラッシュし、アレイをフルオロカーボンオイルで密封し、23℃ で 2～5 分間インキュベーションし、結果を多色蛍光撮像装置で読み取る。画像解析は、両方の蛍光酵素産物を含むナノウェルの数を計数するために使用され、それによって試料中の分析物の濃度と相関する値を提供する。

【0660】

(d) フローセル分析、ビーズ系の免疫測定形式

第 1 のインキュベーション：10 μ l の試料、ビオチン化モノクローナル分析物に特異的な捕捉抗体（2.6 mg/l の作業溶液）、および核酸プローブにコンジュゲートし、モノクローナル分析物に特異的な検出抗体（0.3 mg/l の作業溶液）は、反応してサンドイッチ複合体を形成する。モノクローナル分析物に特異的な検出抗体は、実施例 13 に記載されるように、配列番号 33 の核酸プローブにコンジュゲートする。

【0661】

第 2 のインキュベーション：ストレプトアビジンでコーティングされた微粒子（DYNAL M280、2.8 μ m、0.72 mg/ml、ビオチン 470 ng/mg の結合能

力)の添加後、複合体はビオチンとストレプトアビジンとの間の相互作用を介して固相に結合する。連結混合物を混合物に添加し、連結混合物を実施例1に記載のプロトコルに従って調製する。実施例1に記載されているように、混合物を連結混合物と37℃で30分間インキュベーションし、洗浄して過剰の環状化オリゴヌクレオチドを除去し、RCA混合物とインキュベーションする。混合物を洗浄し、ビオチンで標識された検出プローブの混合物を添加し、37℃で30分間インキュベーションし、実施例1に記載されているように検出プローブ混合物を調製する。電気化学発光標識SULFO-TAG (Meso Scale Diagnostics)を組み込むために、末端ビオチン標識を用いて検出プローブを合成し、SULFO-TAG標識ストレプトアビジンに事前に結合させる。

【0662】

反応混合物は測定セルに吸引され、そこで微粒子は電極の表面上に磁氣的に捕捉される。次に、未結合の物質をPROCELL (TPA含有緩衝液)で除去する。次に、電極に電圧を印加すると、光電子増倍管によって測定される電気化学発光が誘起される。結果は、2点較正により特異的に作成された手段である較正曲線、および試薬バーコードにより提供されるマスター曲線によって決定される。

【0663】

任意で、増幅複合体のビーズへの付着を安定化するために、配列番号37または45を含むビオチン-アンカーオリゴヌクレオチドを、手順の開始前、またはRCA混合物の添加前もしくは添加中にビーズに結合させる。

【0664】

実施例24. 磁気ビーズを使用した3抗体RCA/PLAビーズ系アッセイ

エポキシ接着化学による2.8μm磁気ビーズのDYNABEAD280を使用して、基本的な実施例1に記載されているようにIL-4の3抗体RCA/PLAアッセイを実施した。これらのDYNALビーズは、抗体とアンカーの比率が20:1のIL-4捕捉抗体およびBSAアンカーオリゴヌクレオチドでコーティングされていた。コーティング工程に続いて、0.5%BSAを含むPBSでビーズを遮断し、洗浄し、0.1%BSAに保管した。RCAおよび検出インキュベーション工程は、洗浄工程のための磁気分離を用いて、回転ミキサー上でのインキュベーションを伴うPCRチューブストリップで実施例1のように行われた。RCAおよび検出工程に続いて、ビーズを洗浄し、1×読み取り緩衝液に再懸濁し、MSDラージスポットマルチウェルアッセイプレート (Meso Scale Discovery、メリーランド州ロックビルから入手可能)に移した。ECLを読み取る前に、MSDラージスポットプレートの磁気ビーズを、96個の磁石のアレイを使用してラージスポットマルチウェルアッセイプレートの電極表面上に引き下げた。IL-4アッセイの結果を以下の表に示す。

【0665】

次の表は、ビーズの磁気捕捉を使用した、DYNAL磁気ビーズ上での3抗体RCA/PLA IL-4アッセイのデータを示している。ECLシグナルは、較正曲線の2回の反復値からのものである。

【表24】

IL-4 較正物質 pg/mL	反復値 1	反復値 2
200	73,879	63,937
20	6,681	5,404
2	840	1,867
0	182	155

【0666】

実施例25. 増幅サンドイッチ免疫測定法のプロトコル、試料のインキュベーション後のアンカーオリゴヌクレオチドの添加

実施例16のアッセイ形式は、分析物の固相への捕捉後にアンカーDNA配列の導入を

可能にするように変更された。これらの形式は、アンカーDNAの非存在下で、分析物を含む試料を捕捉抗体とインキュベーションすることを可能にし、抗DNA反応性、DNA結合タンパク質相互作用、および分析物DNA相互作用などの試料DNA相互作用による干渉の可能性を排除する。

【0667】

アッセイは、本質的に以下の改変を加えて実施例16に記載されているように、各ウェルの底に一体化されたカーボンインク電極を含むMSD MULTI-ARRAYマルチウェルプレートで実行された。アンカーオリゴヌクレオチドは、5'アミノ修飾因子(／5AmMC6／)および3'アミノ修飾dT塩基(／3AmMC6T／)が追加されて、実施例16と同じ配列を含んでいた。このアミノ修飾アンカーは、20：1のモルチャレンジ比でDNPのNHSエステル(DNP-X-SE D2248、THERMOFISHER)を使用してジニトロフェノール(DNP)で標識され、続いて7K ZEB樹脂を使用して脱塩された。DNPの取り込みは、オリゴヌクレオチド当たり1.9DNPと測定された。抗DNPモノクローナル抗体クローン3571-E73-2(MSD)は、ビオチンNHSエステル試薬(EZ-LINK Sulfon-NHS-ビオチン、THERMOFISHER SCIENTIFIC)を製造元の手順に従って使用して標識された。実施例16の検出抗体(IL-4抗体)は、実施例15のように、プローブオリゴヌクレオチド(プローブ高GC)で標識された。

【0668】

この実施例で使用したオリゴヌクレオチドは次のとおりであった(市販の核酸プローブ製造業者で製造された)。

アンカーオリゴヌクレオチド(アンカー)：5'-／5AmMC6／AAGAGAGTAGTACAGCAGCCGTCAA／3AmMC6T／3' (修飾を含む配列番号45)

プローブオリゴヌクレオチド(高GCプローブ)：5'-／5ThioMC6-D／TGACACAGCTCGACGC (修飾を含む配列番号42)

環状化オリゴヌクレオチド(高GC Circ)：／5Phos／GCTGTGCAATAATTCAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGAGAGTAGTAGTACAGCAAGAGCGTTCGA (修飾を含む配列番号43)

検出オリゴヌクレオチド(検出器)：5'-CAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAG／iAmMC6T／iSp18／iAmMC6T／iSp18／3AmMO／-3' (修飾を含む配列番号44)

【0669】

捕捉抗体および抗DNP抗体は、ビオチン標識試薬がストレプトアビジンでコーティングされた電極に結合することにより、MSDプレートの電極上に固定された。まず、プレートのウェルを0.05%Tween-20を含むPBS(PBS-T)で3回洗浄した。次に、各ウェルに対して、ビオチン標識捕捉抗体(0.25μg/mL)および抗DNP抗体(20ng/mL)を含むウシ血清アルブミン(BSA)含有緩衝液50μL(IL-4捕捉抗体および抗DNP抗体のストック溶液を組み合わせで調製された)を添加した。次に、プレートを振とうしながら室温で少なくとも1時間、または振とうせずに一晩インキュベーションし、次いで、PBS-Tで3回洗浄して、未結合のビオチン標識抗体を除去した。これらのプレートを、追加のIL-4較正物質を含む試料とインキュベーションした。

【0670】

1つの形式では、IL-4-プローブインキュベーション工程で、検出抗体に2nmDNP標識アンカーオリゴを添加した。検出抗体は、実施例15のように処理されたが、上記のように高GC Circで処理された。代替の形式では、0.5nmのDNP標識アンカーを実施例16の連結工程に追加し、上記のように高GC Circを使用して実施例15のようなプロセスが続いた。これらの両形式は、実施例16に概説されている標準形式と同様の以下の表に示す結果を出すことができた。

10

20

30

40

50

【表 2 5】

表：様々なアンカー形式のアッセイからの E C L シグナル

IL-4pg/mL	標準実施例-16	DNP-アンカープローブ工程	DNP-アンカー連結工程
2.14	232,336	130,379	272,295
0.00	191	136	183

【0 6 7 1】

上記の表に示すように、I L - 4 較正物質からの E C L シグナルは、抗体系捕捉アプローチを使用して、増幅サンドイッチ免疫測定法の 3 つの異なるアンカー形式、すなわち、実施例 1 6 の標準、および試料のインキュベーション後にアンカーオリゴヌクレオチドを導入できる 2 つの代替方法で試験された。第 1 の代替アプローチでは、アンカーオリゴヌクレオチドがプローブ標識抗 I L - 4 抗体とともに導入された（D N P - アンカープローブ工程）。第 2 の代替アプローチでは、アンカーオリゴヌクレオチドが連結工程（D N P - アンカー連結工程）で導入された。

【0 6 7 2】

本開示は、本明細書に記載の特定の実施形態によって範囲が限定されるものではない。実際に、前述の説明および添付図面から、本明細書に記載されたものに追加して本方法の様々な変更が、当業者に明らかになるであろう。そのような変更は、特許請求の範囲内に含まれることを意図している。様々な刊行物が本明細書で引用されており、それらの開示は、それらの全体が参照により組み込まれる。

【0 6 7 3】

参考文献

1. 米国特許第 7, 3 0 6, 9 0 4 号
2. 米国特許第 7, 3 2 0, 8 6 0 号
3. 米国特許第 7, 3 5 1, 5 2 8 号
4. 米国特許第 7, 1 9 2, 7 0 3 号
5. 米国特許第 6, 8 7 8, 5 1 5 号
6. Zhou et al., Genome Biology (2004), 5:R28
7. Dean et al., Genome Research (2001), 11:1095-1099
8. Soderberg et al., Methods (2008), 45:227-232
9. Fredriksson et al., Nature Biotech (2002), 20:473-477
10. Fredriksson et al., Nature Methods (2007), 4(4):327-329
11. Vincent et al., EMBO Reports (2005), 5(8):795-800
12. Gajadjar et al., Biotechniques (1010), 48(22):145-152
13. Schallmeiner et al., Nature Methods (2007) 4(2):135-137
14. Ericsson et al., Nucl. Acids Research (2008), 36(8):e45
15. Darmanis et al., Biotechniques (2007), 43:443-450
16. Dahl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (2004), 101(13):4548-4553

17. Weibrecht et al., Expert Rev. Proteomics (2010), 7 (3): 401-409
18. Spits et al., Nature Protocols (2005), 1 (4): 1965-1970
19. Nordengrahn et al., Vet. Microbio (2008), 127: 227-236
20. Vuoriluoto et al., Mol. Oncology (2011), 5: 105-111
21. Zhang et al., Clinica Chimica Acta (2006), 363: 61-70
22. Andras et al., Mol. Biotech. (2001), 19: 29-44
23. Schweltzer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (2000), 97 (18): 10113-10119
24. Jeong, et al., Cell. Mol. Life Sci. (2009), 66: 3325-3336
25. Gill et al., Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids (2008), 27: 224-245
26. Gullberg, et al., Current Op. in Biotech. (2003), 14: 82-86
27. Gustafsdottir, et al., Clinical Chemistry (2006), 52 (6): 1152-1160
28. 米国特許公開第2010/0075862号
29. 米国特許第8,222,047号
30. 米国特許第8,236,574号
31. 米国特許第8,338,776号
32. 米国特許公開第2011/0212537号
33. 米国特許公開第2012/0196774号
34. 米国特許公開第2012/0289428号
35. Kopecky, C., et al., Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2014 Nov. 25
36. Watanabe, J., et al., Arthritis Rheum. 2012 Jun; 64 (6): 1828-37
37. Ribas, V., et al., Circ. Res. 2004 Oct. 15: 95 (8): 789-97

10

20

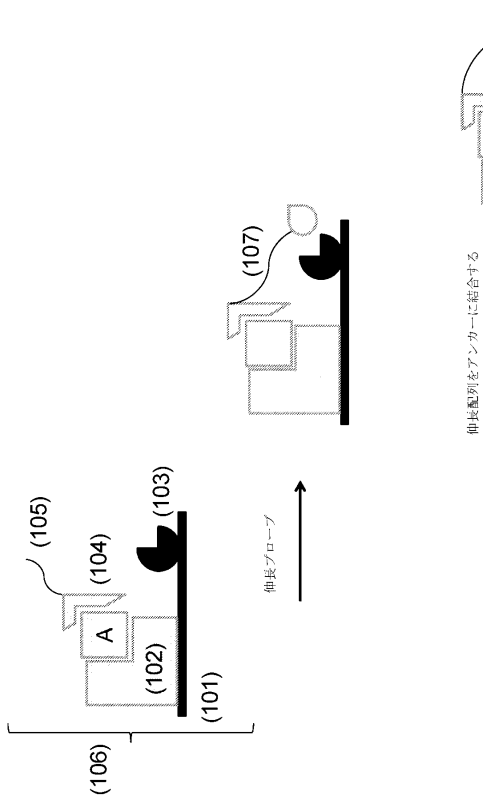
30

40

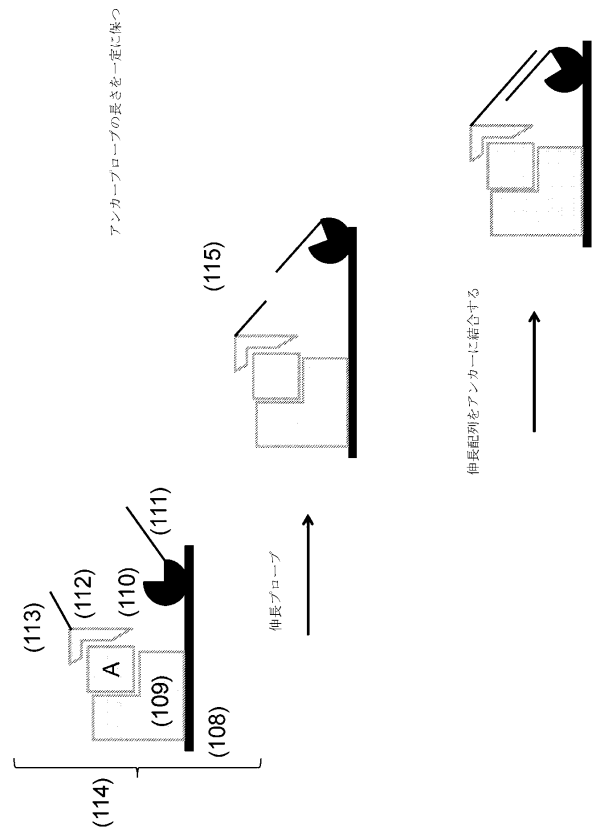
50

【図面】

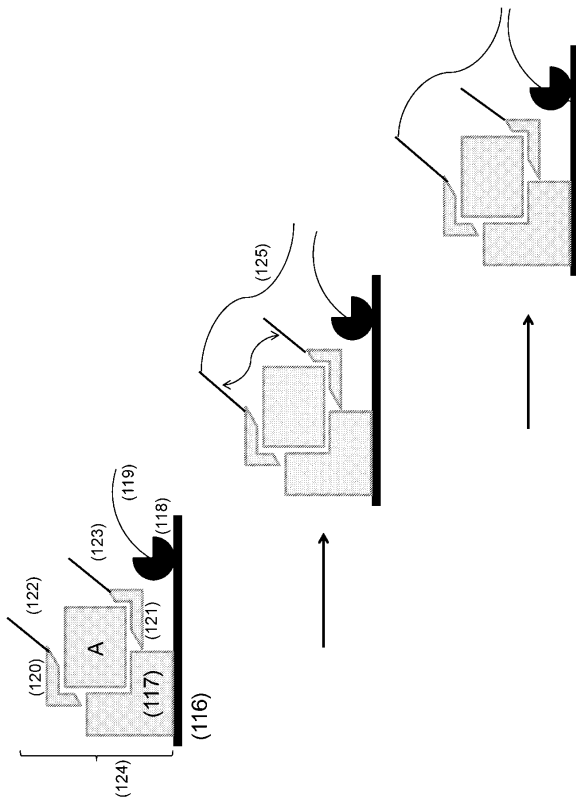
【図 1 (a) 】



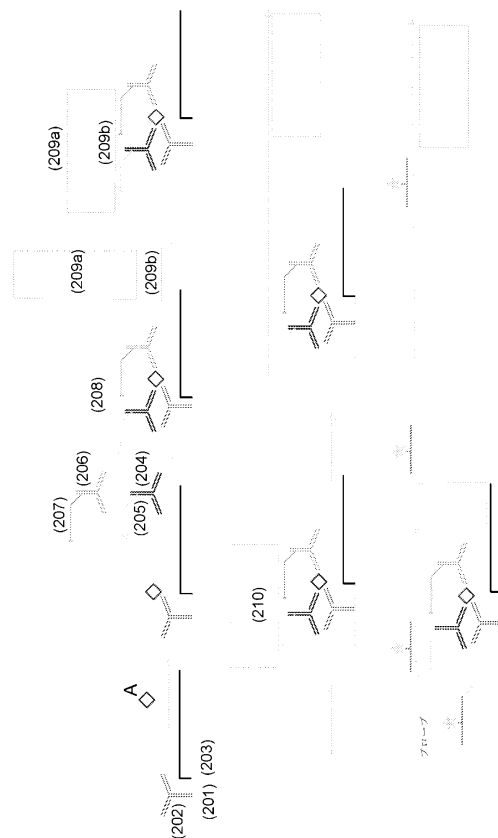
【図 1 (b) 】



【図 1 (c) 】



【図 2 (a) 】



10

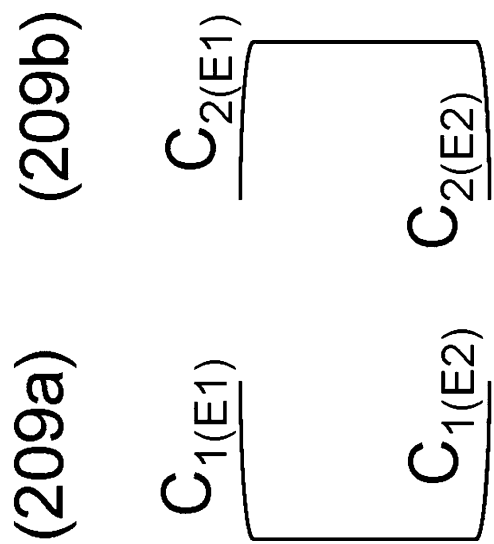
20

30

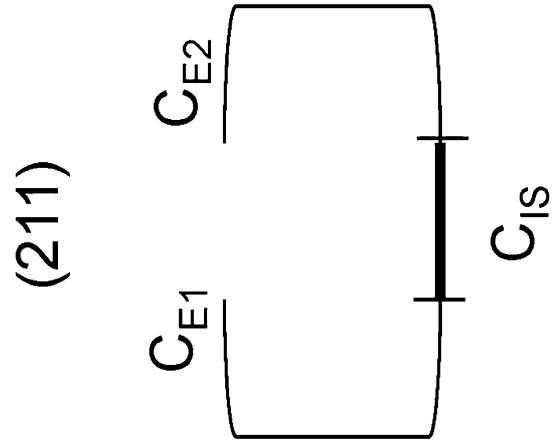
40

50

【図 2 (b) 】

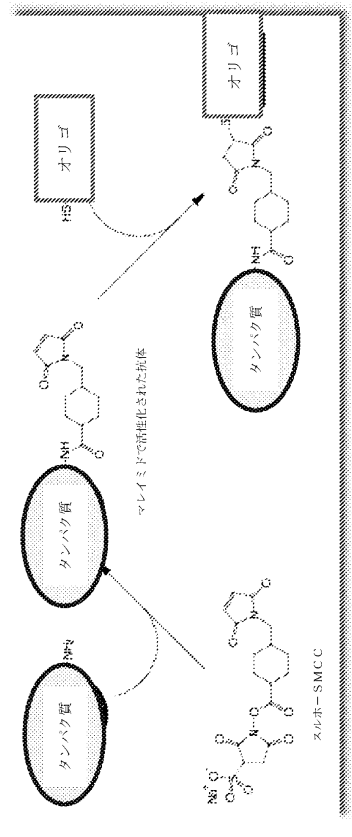


【図 2 (c) 】

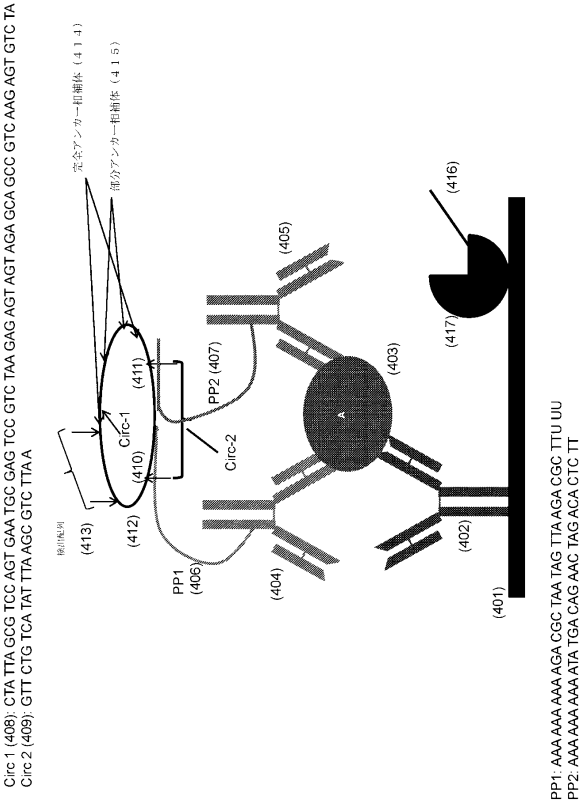


10

【図 3】



【図 4 (a) 】



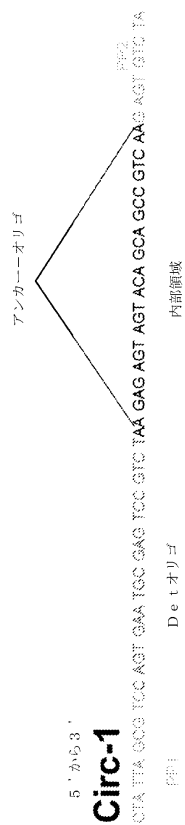
20

30

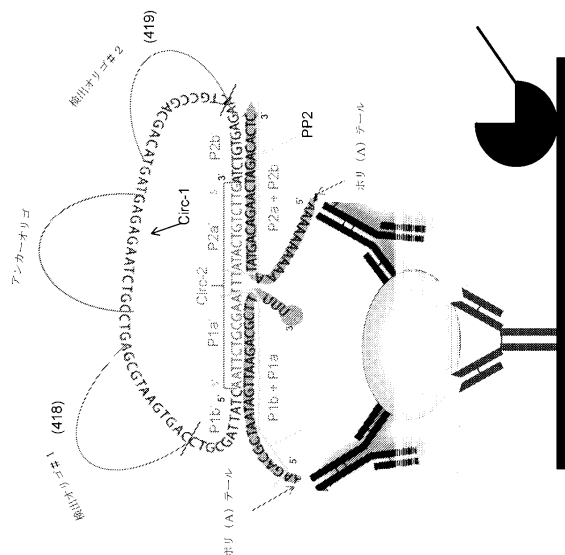
40

50

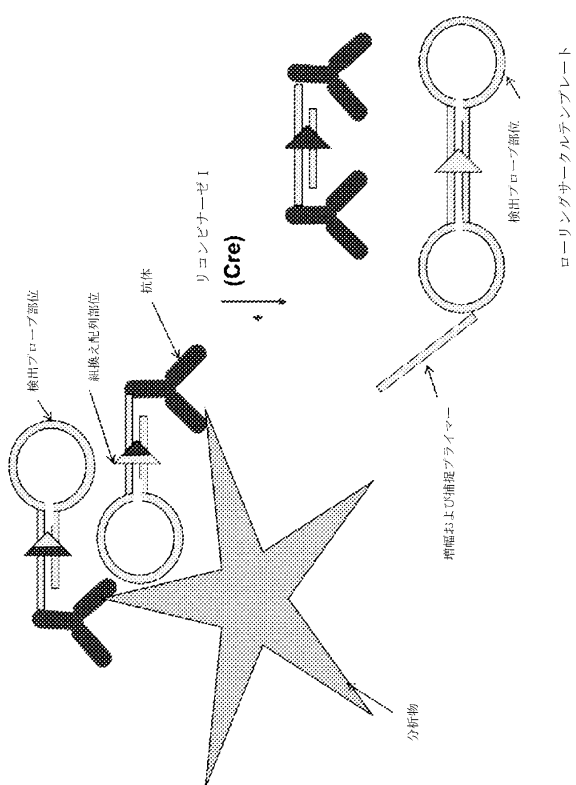
【図 4 (b)】



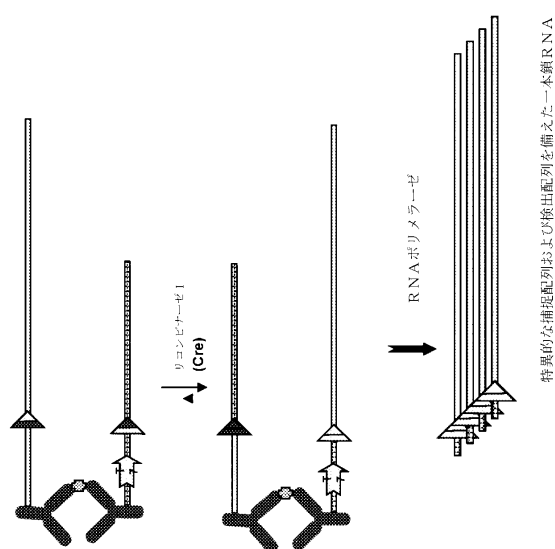
【図 4 (c)】



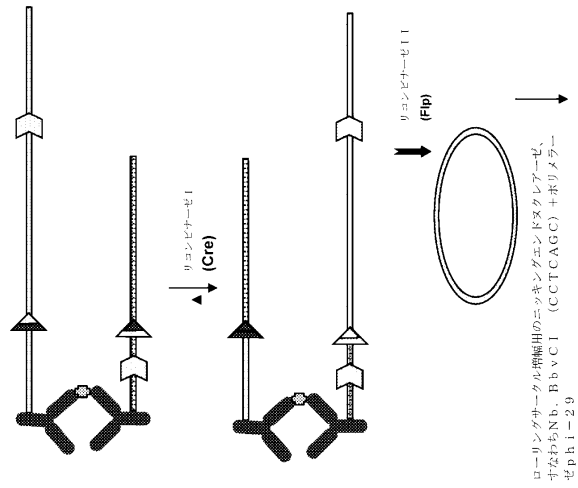
【図 5】



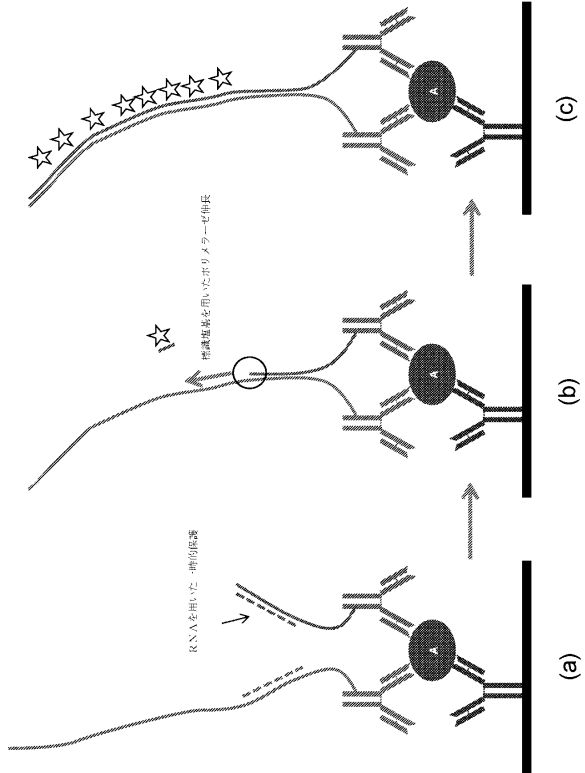
【図 6 (a)】



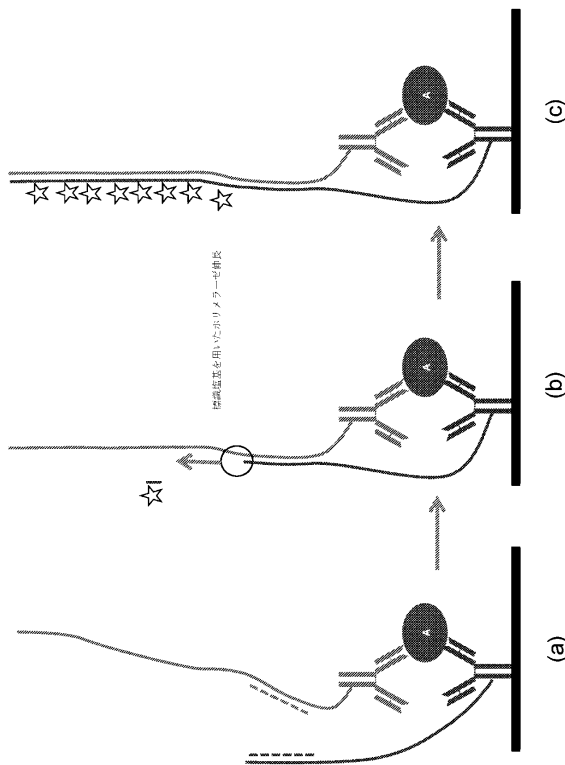
【図 6 (b)】



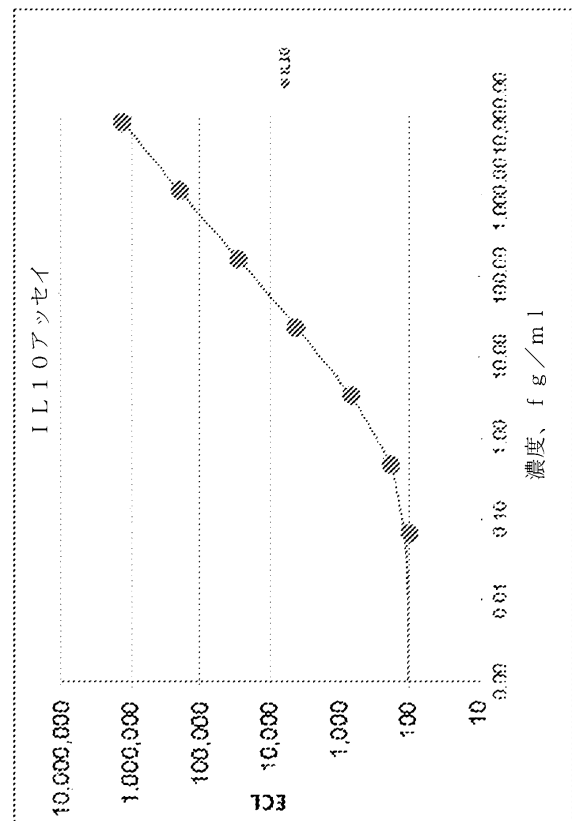
【図 7】



【図 8】



【図 9】



10

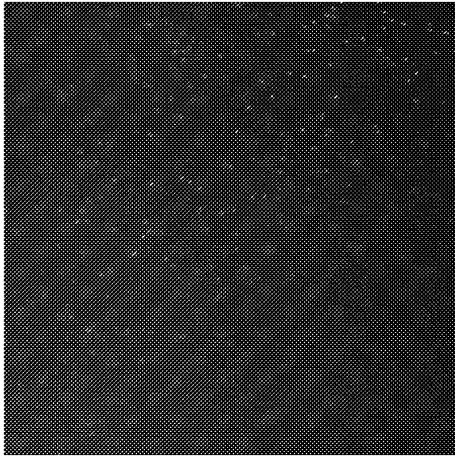
20

30

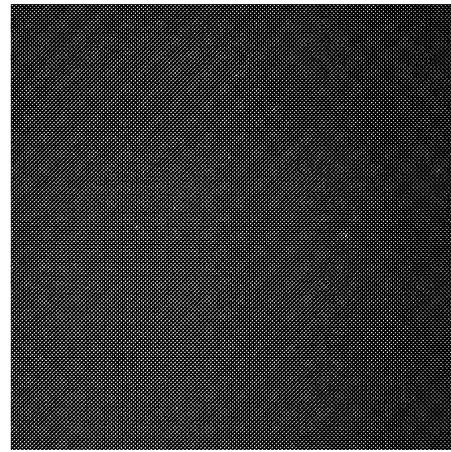
40

50

【図 10 (a)】



【図 10 (b)】

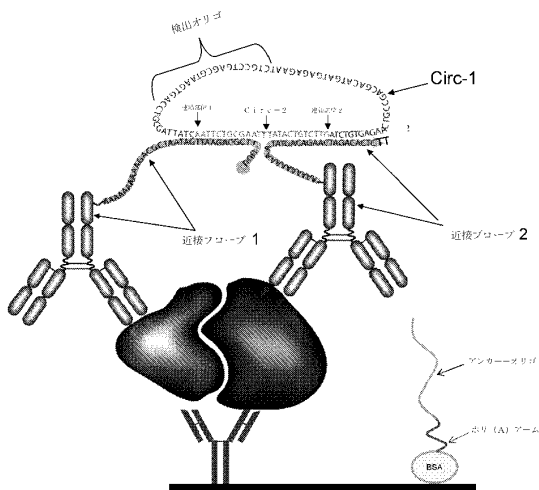


(a)

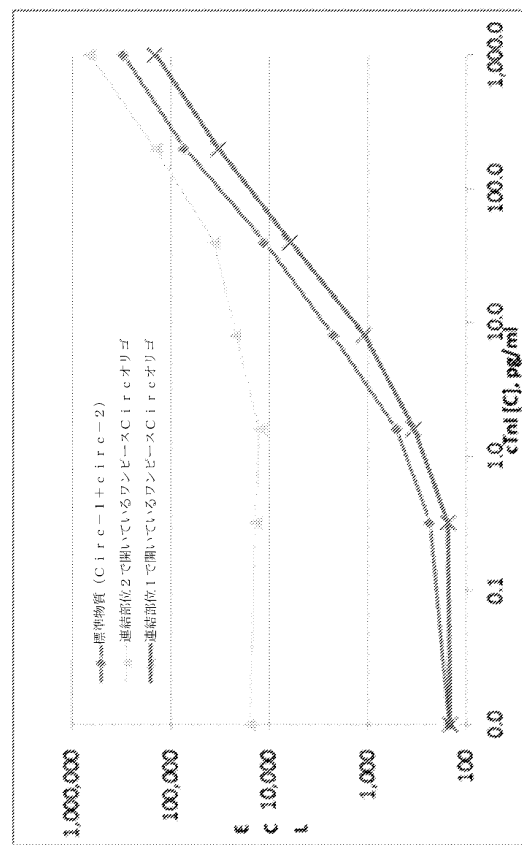
(9)

10

【図 1 1 (a)】



【図 11 (b)】



17

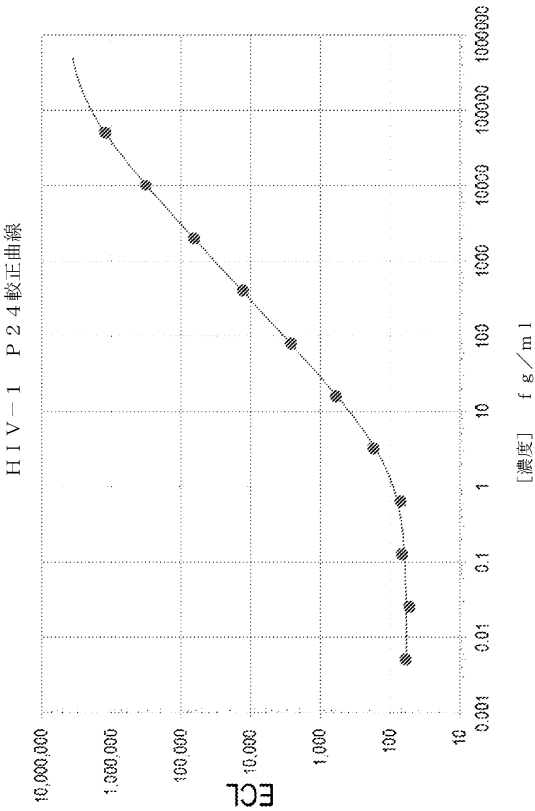
20

30

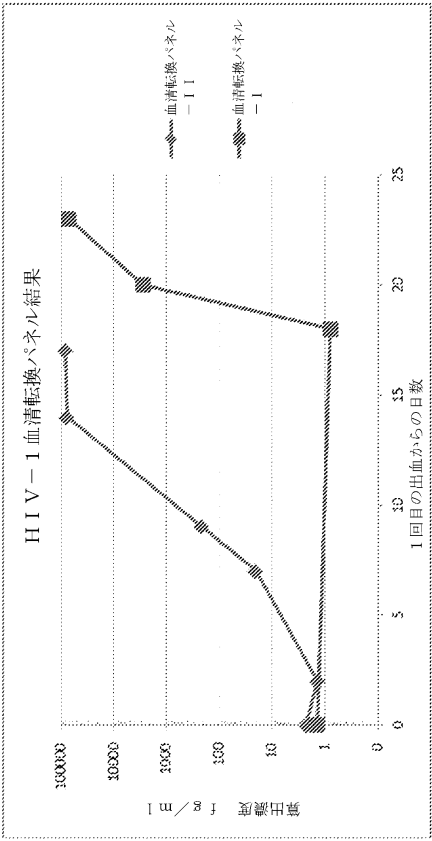
40

50

【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4 (a)】

HIV-1 p24 アッセイ		検出量 [C], 温度				検出量 [C], 温度			
アッセイ	検出量 [C], 温度	0 度		10mM		0 度		10mM	
		25C	30C	37C	25C	30C	37C	25C	37C
ヒト血清-陽性	1M	1,520	17,429	45,572	1,025	8,291	32,704	8%	4%
	Cap 113	22,842	42,265	34,946	20,260	32,714	22,365	14%	9%
	Cap 111	43,019	43,260	34,771	41,851	37,504	33,651	15%	7%
	Cap 110	45,161	42,934	42,337	43,245	42,635	40,488	10%	12%
0.5M	1M	1,520	9,022	40,514	1,365	11,873	37,773	20%	9%
	Cap 113	13,200	35,286	33,755	25,633	32,878	24,881	3%	16%
	Cap 111	28,988	38,518	37,488	45,106	44,400	35,133	12%	11%
	Cap 110	30,627	38,024	40,903	48,526	44,591	42,991	17%	17%

【図 1 4 (b)】

対照-捕捉オリゴなしのビーズ			
低塩処理なし			
結合 [モノ+]	25C	30C	37C
1M	51,125	51,843	50,823
0.5M	52,317	48,212	47,212
1M	13%	9%	7%
0.5M	18%	8%	8%

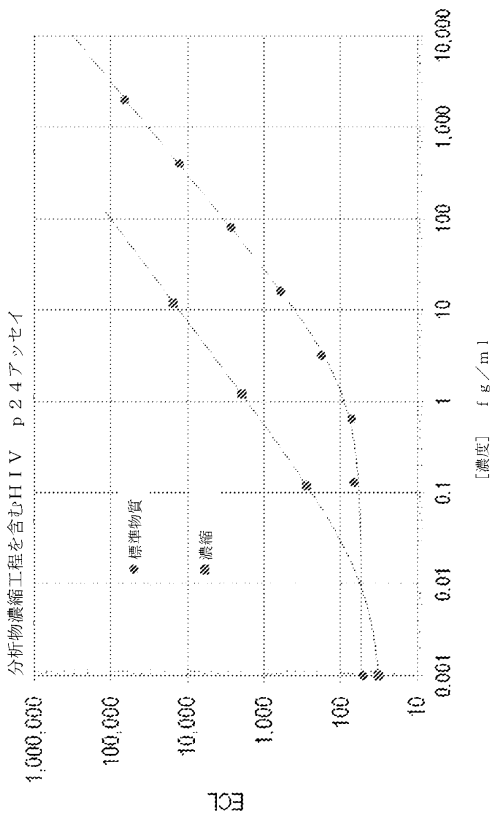
(b)

【図 1 4 (c)】

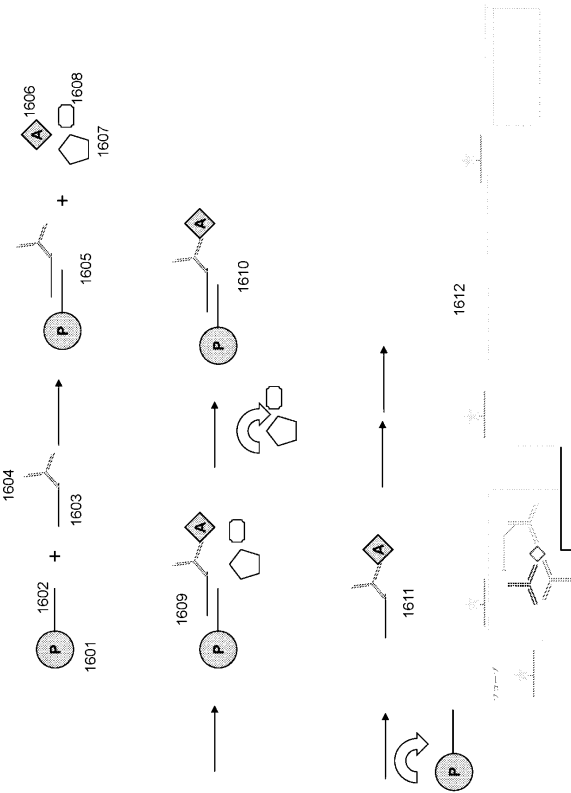
直接プレートアッセイ	Dil 2/11	ECL		NSB
		241,492	80	
		107,573	105	
	1M	213,186	32	
	0.5M	6%	5%	
	0.5M	9%	32	

(c)

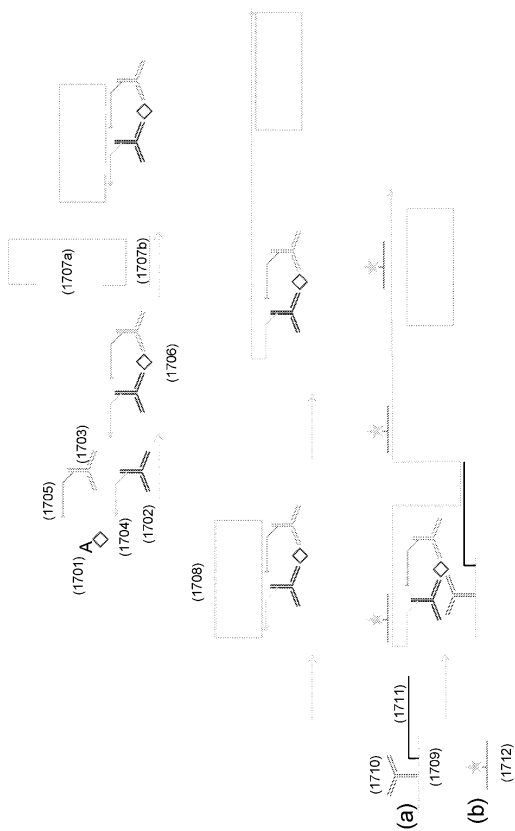
【図 1 5】



【図 1 6】



【図 1 7】



10

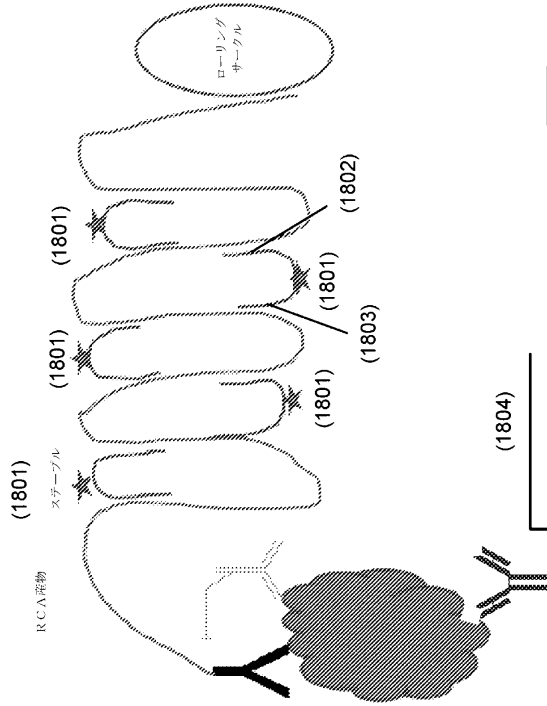
20

30

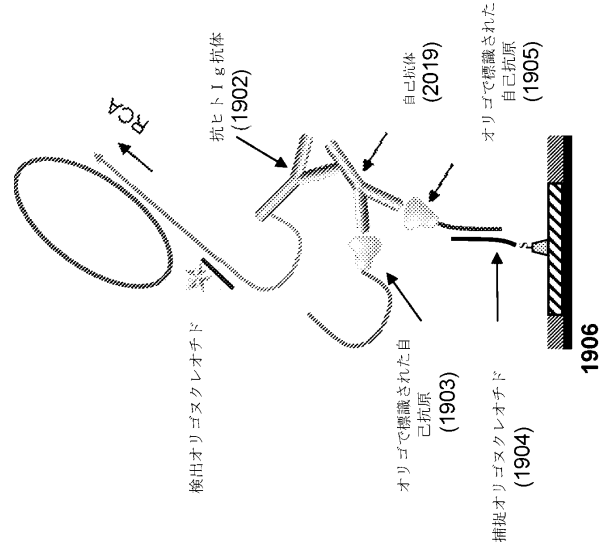
40

50

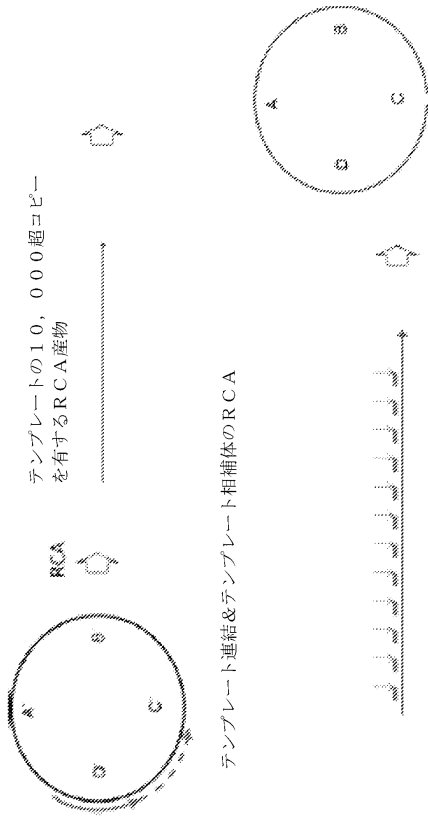
【図 18】



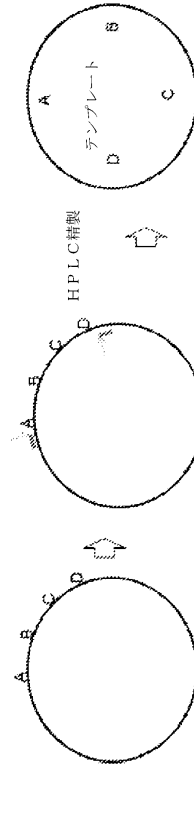
【図 19】



【図 20 (a)】



【図 20 (b)】

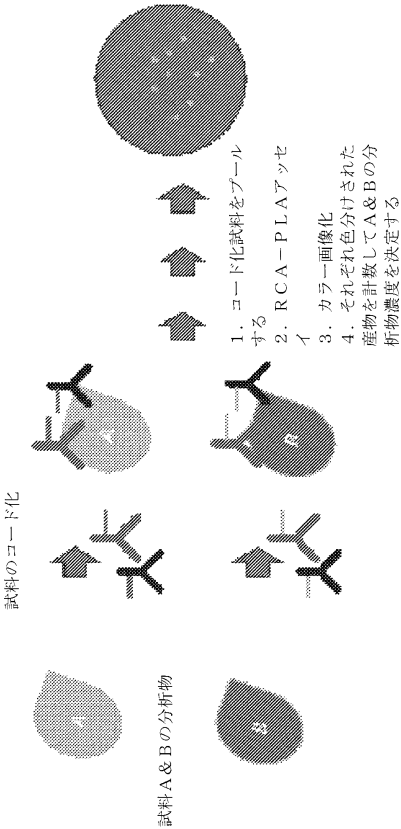


RCA産物の約20量体オリゴに対する制限酵素切断により所望の5'および3'末端を100%有するテンプレートを作成する

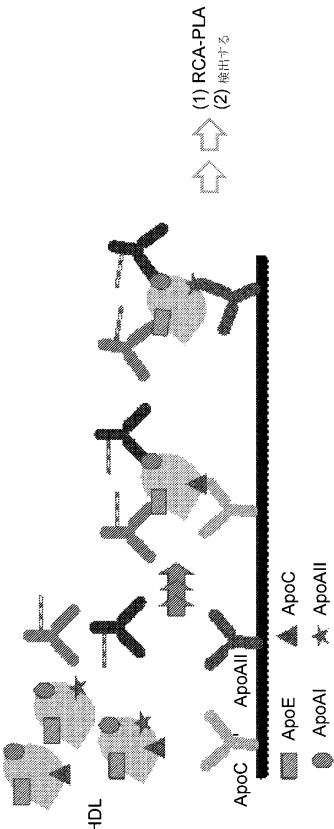
クロン化テンプレート (A、B、C、D) を有するM1 3一本鎖ファージDNA

M1 3産物の約20量体オリゴに対する制限酵素切断により所望の5'および3'末端を100%有するテンプレートを作成する

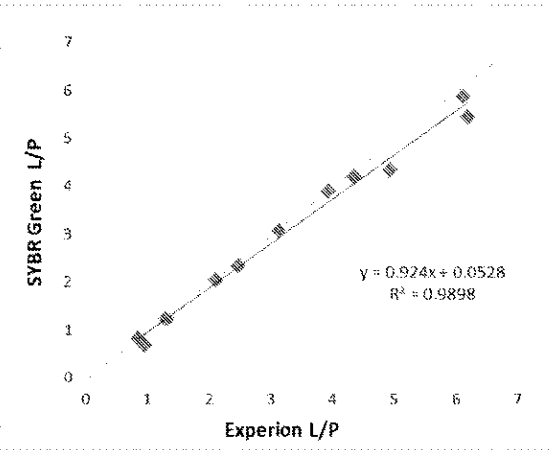
【図 2 1】



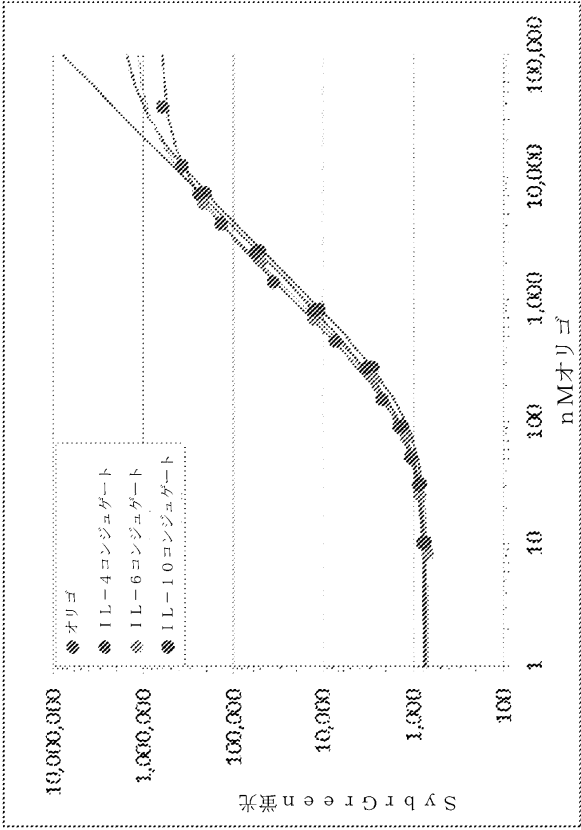
【図 2 2】



【図 2 3 a】



【図 2 3 b】



10

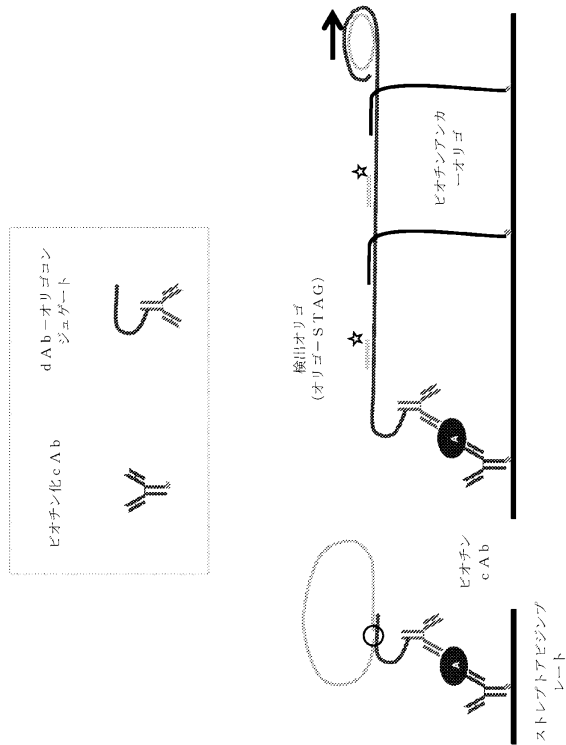
20

30

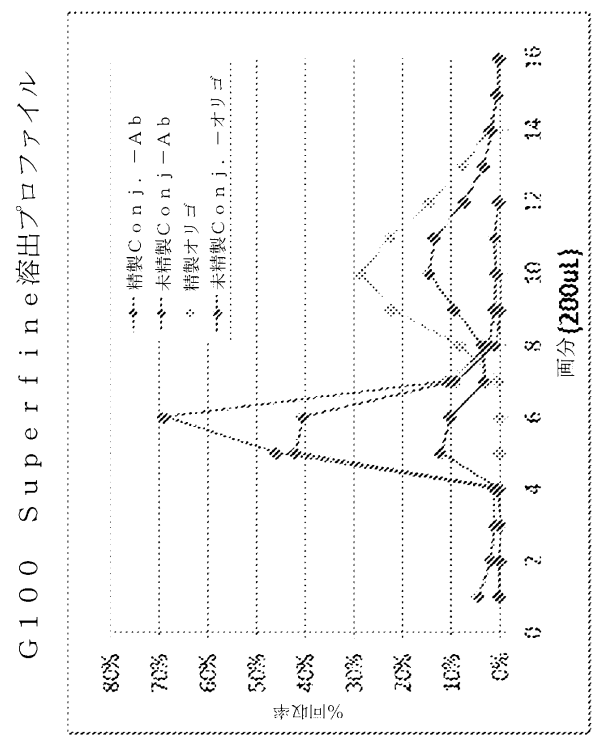
40

50

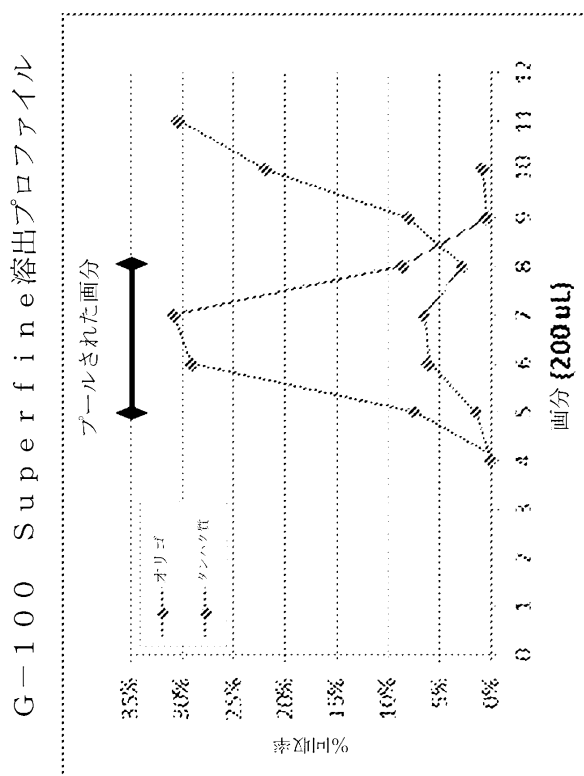
【図 2 4】



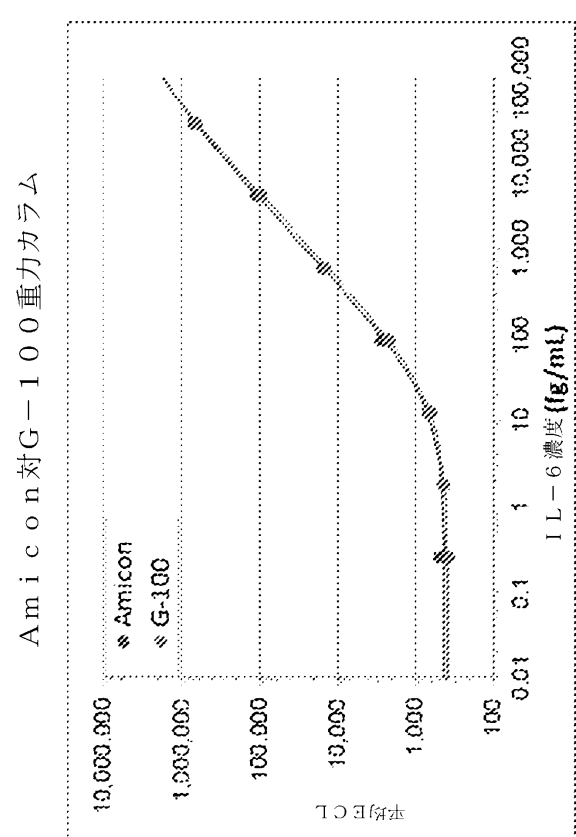
【図 2 5 (a)】



【図 2 5 (b)】



【図 2 5 (c)】



10

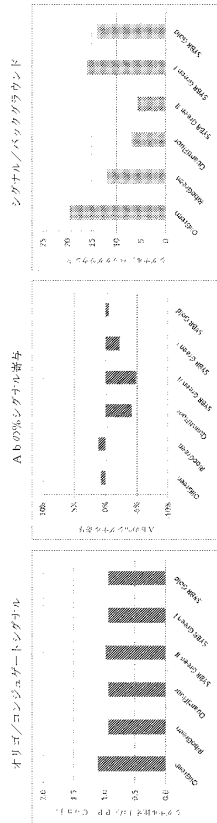
20

30

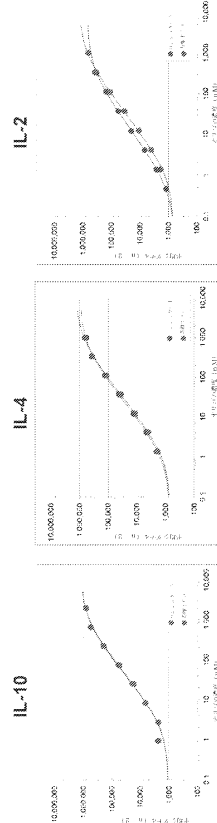
40

50

【図 26 (a)】



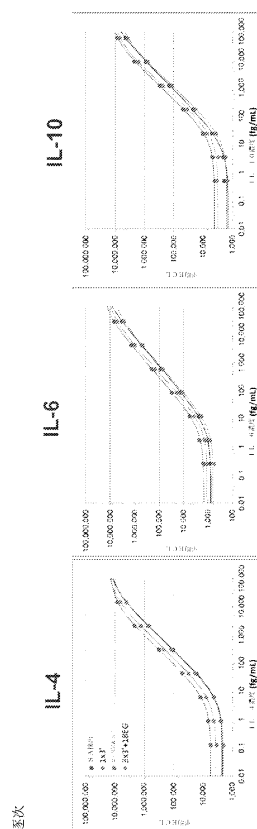
【図 26 (b)】



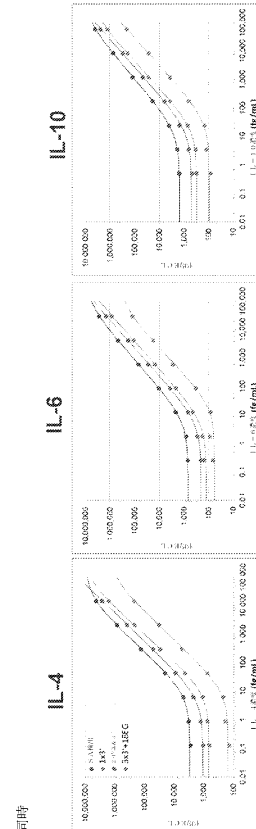
10

20

【図 27 (a)】



【図 27 (b)】

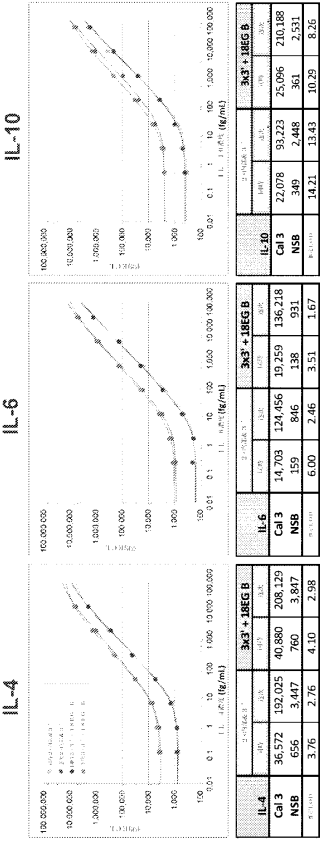


30

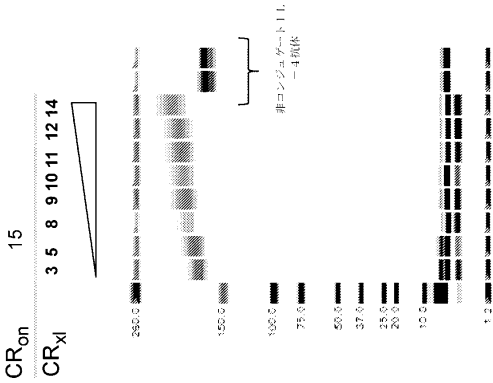
40

50

【図 2 8】



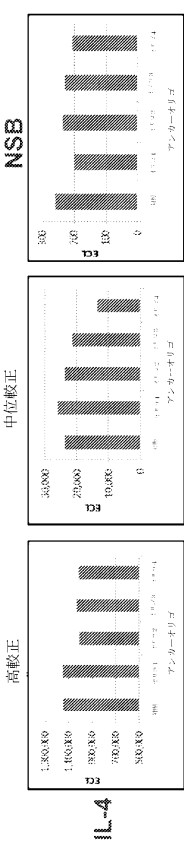
【図 2 9 (b)】



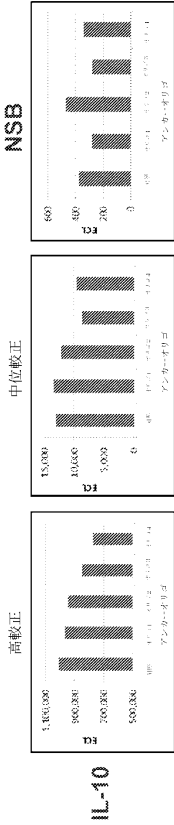
【図 2 9 (a)】

IL-4 抗体-オリゴヌクレオチドブロープコンジュゲート		IL-4 免疫測定法における中レベルの校正物質のシグナル	
コンジュゲーションプロトコル	CR _{on} /CR _{xl}	LP	
逐次 1 時間 / 1 時間	3/15	2.2	76,007
	5/15	3.8	116,848
	8/15	5.5	155,755
	9/15	6.3	189,394
	10/15	6.5	192,860
同時 1 時間	11/15	7.4	240,611
	12/15	7.5	243,976
	14/15	8.8	293,339
	3/15	1.8	56,162
	5/15	2.9	97,039
	8/15	4.2	145,605
	9/15	4.2	123,763
	10/15	4.6	141,339
	11/15	5.2	168,322
	12/15	5.7	212,052
	14/15	5.9	217,833

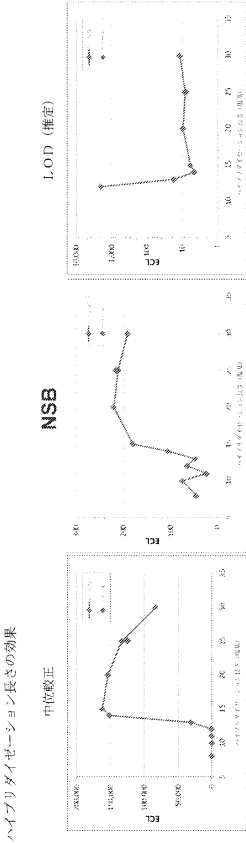
【図 3 0 (a)】



【図 3 0 (b)】



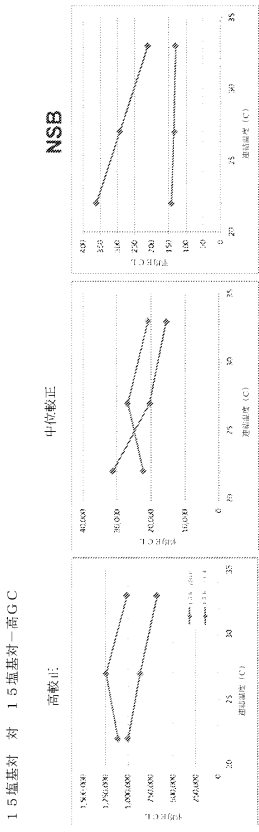
【図 3 1 (a)】



10

20

【図 3 1 (b)】



【図 3 2】

濃度 (fg/mL)	Regular Ci re 2 (9.9塩基対)	LCS2 Min 2 (7.8塩基対)	LCS2 Mi n1 (6.8塩基 対)	LCS2 Min3 (6.1塩基対)	LCS2 Mi n4 (5.3塩基 対)
60,000	733,254	871,910	1,273,967	1,183,597	520,832
8,571	101,423	138,786	179,267	183,383	68,388
1,224	13,171	18,329	25,150	25,031	8,757
174,927	2,023	2,757	3,727	3,970	1,426
24,990	369	540	823	611	236
3,570	146	260	312	234	61
0.510	116	132	203	273	57
0	201	149	189	232	43
ヒル	1.04	0.99	0.99	1.06	1.02
R ²	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
検出限界	19.43	5.48	4.04	8.58	6.11

30

40

50

フロントページの続き

- アメリカ合衆国，メリーランド州 20841，ボイズ，シュガー リッジ テラス 21021
(72)発明者 ヒギンズ，ミケイラ
アメリカ合衆国，メリーランド州 20879，ゲイザースバーグ，キングレット プレイス 19
132
(72)発明者 シガール，ジョージ
アメリカ合衆国，メリーランド州 20853，ロックヴィル，トレイルウェイ ドライブ 5333
審査官 北条 弥作子
(56)参考文献 特表2016-512429 (JP, A)
特表2005-522405 (JP, A)
米国特許出願公開第2014/0170654 (US, A1)
Development and Evaluation of Biotinylated DNA Probe for Clinical Diagnosis of Chikungun
ya Infection in Patients' Acute Phase Serum & CSF Samples, Indian Journal of Medical Res
earch, 2013年, Vol.138, No.1, pp.117-124
柴山 祥枝, 核酸 (DNA・RNA) の定量法 吸光分析法と蛍光分析法を中心に, ぶんせき, 2
018年, 7, pp.268-274
Marie Flamme, Applications of Ruthenium Complexes Covalently Linked to Nucleic Acid D
erivatives, Molecules, 2018年, 23(1515), pp.1-34, doi:10.3390/molecules23071515
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
G01N 33/48~33/98
Caplus/REGISTRY (STN)