

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-534836

(P2010-534836A)

(43) 公表日 平成22年11月11日(2010.11.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	
	G O 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 122 頁)

(21) 出願番号	特願2010-518318 (P2010-518318)	(71) 出願人	507358424
(86) (22) 出願日	平成20年7月21日 (2008.7.21)		アンサンブル ディスカバリー コーポレ イション
(85) 翻訳文提出日	平成22年3月16日 (2010.3.16)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー スト リート 9 9
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/070643	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02009/018003		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成21年2月5日 (2009.2.5)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/962, 333		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成19年7月27日 (2007.7.27)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検出アッセイとそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、1 種以上の反応生成物、例えば、エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質、およびリガンドの核酸テンプレート生成による生物学的標的（例えば、核酸およびタンパク質）の検出および／または定量化のための組成物ならびに方法を提供する。増幅系を用いたシグナル増幅後に、これらの反応生成物を検出および／または定量することができる。本発明は、DNA プログラム化学（DPC）媒介アッセイにおける検出限界の改善は、1 標的分子当り複数の検出可能な部分を生成できる場合に達成し得るという発見に一部基づいている。本質的には、DPC 媒介反応を使用して 1 つまたは複数の反応生成物の生成を介して標的分子を検出する。次いで反応生成物の各分子を用い、増幅方法論を用いて複数の検出可能な部分を生成させる。その結果、所与のアッセイ感度を増大させることができ、サンプル中の生物学的標的の検出および／または定量化が可能になる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サンプル中の生物学的標的の存在および／または量を判定する方法であって：

(a)(1)(i) 前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii) 第一のオリゴヌクレオチド配列と、(iii) 前記第一のオリゴヌクレオチド配列と結合した第一の生成物前駆体とを含んでなる第一のプロープと、(2)(i) 前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(ii) 前記第一のオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチド配列と、(iii) 前記第二のオリゴヌクレオチド配列と結合した第二の生成物前駆体とを含んでなる第二のプロープと、前記サンプルとを合わせることであって、前記生物学的標的が前記サンプル中に存在する場合、前記第一および第二の結合性部分の双方を前記生物学的標的に結合させ、その際、前記第一および第二のオリゴヌクレオチド配列が互いにハイブリダイズして、前記第一および第二の生成物前駆体を互いに反応性に近接させ、完全エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質、およびリガンドよりなる群から選択される反応生成物を生成させる条件下で、前記サンプルを前記第一および第二のプロープと合わせることで、

10

(b) ステップ(a)の反応生成物が存在する場合、複数の検出可能な部分を生成させる条件下で増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムに前記反応生成物を曝露させること；および

(c) ステップ(b)において生成した検出可能な部分の存在および／または量を判定し、それによってサンプル中の生物学的標的の存在および／または量を判定すること、を含んでなる方法。

20

【請求項 2】

ステップ(a)において、前記第一の結合性部分が、前記第一のオリゴヌクレオチド配列に共有結合している請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ(a)において、前記第二の結合性部分が、前記第二のオリゴヌクレオチド配列に共有結合している請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ(a)において、前記第一の結合性部分が、前記第一のオリゴヌクレオチド配列に非共有結合している請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 5】

アンチジップコード配列にハイブリダイズしたジップコード配列を介して、前記第一の結合性部分が、前記第一のオリゴヌクレオチド配列に非共有結合している請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ(a)において、前記第二の結合性部分が、前記第二のオリゴヌクレオチド配列に非共有結合している請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

アンチジップコード配列にハイブリダイズしたジップコード配列を介して、前記第二の結合性部分が、前記第二のオリゴヌクレオチド配列に非共有結合している請求項 6 に記載の方法。

40

【請求項 8】

サンプル中の生物学的標的の存在および／または量を判定する方法であって：

(a)(i) 前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii) 第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第一の標的結合性成分を提供すること；

(b)(i) 前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(ii) 第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第二の標的結合性成分を提供すること；

(c)(i) 前記第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズでき

50

る第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(i i) 第一のレポーターオリゴヌクレオチドと、(i i i) 前記第一のレポーターオリゴヌクレオチドと結合した第一の生成物前駆体と、を含んでなる第一のレポーター成分を提供すること；

(d) (i) 前記第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(i i) 前記第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のレポーターオリゴヌクレオチドと、(i i i) 前記第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合しており、前記第一の生成物前駆体と反応性に近接させると、前記第一の生成物前駆体と反応できる第二の生成物前駆体と、を含んでなる第二のレポーター成分を提供すること；

(e) 前記生物学的標的がサンプル中に存在する場合、前記第一および第二の結合性部分が前記生物学的標的に結合し、その際(i) 前記第一のジップコード配列が、前記第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列にハイブリダイズし、(i i) 前記第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列が、前記第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列にハイブリダイズし、(i i i) 前記第二のレポーターオリゴヌクレオチドを、前記第一のレポーターオリゴヌクレオチドにハイブリダイズして、前記第一および第二の生成物前駆体を反応性に近接させて反応生成物を生成させるような条件下で、前記第一の標的結合性成分と、前記第二の標的結合性成分と、前記第一のレポーター成分と、前記第二のレポーター成分とを前記サンプルと合わせること；

(f) ステップ(e) の反応生成物が存在する場合、複数の検出可能な部分を生成させる条件下で増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムに前記反応生成物を曝露させること；および

(g) 検出可能な部分の存在および／または量を判定し、それによって前記サンプル中の生物学的標的の存在および／または量を判定すること；
を含んでなる方法。

【請求項 9】

ステップ(e) において、前記第一の標的結合性成分と、前記第二の標的結合性成分と、前記第一のレポーター成分と、前記第二のレポーター成分とを、全て同時に前記サンプルと合わせる請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ(e) において、前記第一のレポーター成分および前記第二のレポーター成分の前に、前記第一の標的結合性成分と前記第二の標的結合性成分とを前記サンプルに加える請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記増幅成分が、検出可能性部分の生成を触媒する酵素を含んでなる請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記増幅成分が、前記反応生成物 1 分子当たり少なくとも 10 分子の前記検出可能な部分を生成させることができる請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記増幅成分が、前記反応生成物 1 分子当たり少なくとも 100 分子の前記検出可能な部分を生成させることができる請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記増幅成分が、前記反応生成物 1 分子当たり少なくとも 1,000 分子の前記検出可能な部分を生成させることができる請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記反応生成物が、ペプチドまたはタンパク質である請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記反応生成物が、図 15 に掲げられたペプチド類から選択されるペプチジル配列を含んでなる請求項 15 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

前記反応生成物が小型分子である請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記反応生成物が、色素、抗生物質、酵素補因子、酵素阻害剤、殺虫剤、薬物、毒素、蛍光体、発色団、ホルモン、炭水化物または脂質である請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記生物学的標的が、タンパク質、ペプチド、免疫グロブリン、成長因子受容体または酵素である請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記生物学的標的が、ホモ二量体タンパク質である請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 21】

前記生物学的標的が、ヘテロ二量体タンパク質である請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記生物学的標的が、B c r - A b 1 のヘテロ二量体、E r b B ファミリーのホモ二量体、E r b B ファミリーのヘテロ二量体、および P D G F よりなる群から選択される請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 23】

前記生物学的標的が核酸である請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記核酸が、D N A または R N A である請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記第一および第二の結合性部分が同一である請求項 1 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記第一および第二の結合性部分が異なっている請求項 1 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 27】

前記第一および第二の結合性部分の各々が、前記生物学的標的により規定された別個の結合部位に結合する請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

第一の結合性部分、第二の結合性部分または前記第一および第二の結合性部分の各々が抗体である請求項 1 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記第一の生成物前駆体および前記第二の生成物前駆体が、追加の試薬の存在下で互いに反応する請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記第一の生成物前駆体が前記第二の生成物前駆体と自発的に反応して前記反応生成物を生成する請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 31】

前記反応が、天然の化学的連結によって生じる請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

C - 末端チオエステルを含有する第一の前駆体ペプチドと N - 末端システインを含有する第二の前駆体ペプチドとの間の反応によって、ペプチド結合が生成する請求項 30 または 31 に記載の方法。

【請求項 33】

C - 末端チオエステルとシステイン以外の N - 末端チオールとの間の反応によって、ペプチド結合アイソスターが生成する請求項 30 に記載の方法。

50

【請求項 34】

前記第一および第二のオリゴヌクレオチド配列または前記第一および第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列が、約 8 と約 25 との間の融解温度を有する請求項 30 から 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記融解温度が、約 9 と約 20 との間である請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

サンプル中の生物学的標的の存在および／または量を判定する方法であって：

(a) (1) (i) 前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii) 第一のオリゴヌクレオチド配列と、(iii) 前記第一のオリゴヌクレオチド配列と結合した第一のマスク化生成物前駆体とを含んでなる第一のプローブと、(2) (i) 前記生物学的標的に対して結合親和力を有する第二の結合性部分と、(ii) 前記第一のオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチド配列と、(iii) 前記第二のオリゴヌクレオチド配列と結合した非マスク性基とを含んでなる第二のプローブと前記サンプルとを合わせることであって、前記生物学的標的が前記サンプル中に存在する場合、前記第一および第二の結合性部分を前記生物学的標的に結合させ、前記第一および第二のオリゴヌクレオチド配列が互いにハイブリダイズして、前記非マスク性基と前記マスク化生成物前駆体とを反応性に近接させて、非マスク化反応生成物を生成させる条件下で、前記サンプルを前記第一および第二のプローブと合わせること；

(b) ステップ (a) の反応生成物が存在する場合、複数の検出可能な部分を生成させる条件下で増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムに前記反応生成物を曝露させること；および

(c) 検出可能な部分の存在および／または量を判定し、それによってサンプル中の生物学的標的の存在および／または量を判定すること、を含んでなる方法。

【請求項 37】

前記マスク化生成物前駆体が、マスク化エピトープ、マスク化酵素基質、マスク化酵素活性化物質、またはマスク化リガンドである請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記非マスク化反応生成物が、ペプチドまたはタンパク質である請求項 36 または 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記非マスク化反応生成物が、小型分子である請求項 36 または 37 に記載の方法。

【請求項 40】

前記生物学的標的が、タンパク質、ペプチド、免疫グロブリン、成長因子、または酵素である請求項 36 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記生物学的標的が、ホモ二量体タンパク質である請求項 36 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記生物学的標的が、ヘテロ二量体タンパク質である請求項 36 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

前記生物学的標的が、Bcr - Ab1 のヘテロ二量体、ErbB ファミリーのホモ二量体、ErbB ファミリーのヘテロ二量体、および PDGF よりなる群から選択される請求項 36 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

前記生物学的標的が核酸である請求項 36 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

前記第一の結合性部分、前記第二の結合性部分、または前記第一の結合性部分および前

10

20

30

40

50

記第二の結合性部分の各々が、抗体である請求項 36 から 43 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

前記第一および第二の結合性部分が同一である請求項 36 から 43 および 45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 48】

前記第一および第二の結合性部分が異なっている請求項 36 から 43 および 45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

ステップ (b) の前記増幅成分が、前記検出可能な部分の生成を触媒する酵素を含んでなる請求項 36 から 47 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 50】

前記増幅成分が、ステップ (a) において生成した反応生成物 1 分子当たり少なくとも 100 分子の前記検出可能な部分を生成させることができる請求項 48 に記載の方法。

【請求項 51】

前記酵素が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、または乳酸デヒドロゲナーゼである請求項 11 または 49 に記載の方法。

【請求項 52】

前記サンプルが、組織サンプルまたは体液サンプルである請求項 1 から 50 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 53】

(a) (i) 生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii) 前記第一の結合性部分と結合した第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と、(iii) 前記第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した第一の生成物前駆体と、を含んでなる第一のプローブと、

(b) (i) 前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(ii) 前記第二の結合性部分と結合した第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と、(iii) 前記第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した第二の生成物前駆体と、を含んでなり、

前記生物学的標的に対する前記第一および第二の結合性部分の結合の際に、前記第一および第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列が、互いにハイブリダイズでき、前記第一および第二の生成物前駆体が互いに反応して、完全エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質、およびリガンドよりなる群から選択される反応生成物を生成させることができる第二のプローブと；

30

(c) 複数の検出可能な部分を生成させることができる増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムと；

(d) 生物学的標的の検出用キットを使用するための取扱説明書と、を含んでなるキット。

【請求項 54】

第一のプローブが、第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列にハイブリダイズした第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列をさらに含んでなり、第二のプローブが、第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列にハイブリダイズした第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列をさらに含んでなる請求項 52 に記載のキット。

40

【請求項 55】

(a) (i) 前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii) 前記第一の結合性部分と結合した第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第一の標的結合性成分と、

(b) (i) 前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(ii) 前記第二の結合性部分と結合した第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、

50

を含んでなる第二の標的結合性成分と、

(c) (i) 前記第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズできる第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(ii) 前記第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と結合した第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と、(iii) 前記第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した第一の生成物前駆体と、を含んでなる第一のレポーター成分と、

(d) (i) 前記第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(ii) 前記第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と結合しており、前記第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のレポーターオリゴヌクレオチドと、(iii) 前記第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した第二の生成物前駆体と、を含んでなり、

前記生物学的標的に対する前記第一および第二の結合性部分の結合、前記第一のジップコードのオリゴヌクレオチド配列とアンチジップコードのオリゴヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーション、および前記第二のジップコードのオリゴヌクレオチド配列とアンチジップコードのオリゴヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーションの際に、前記第一および第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列が、互いにハイブリダイズして、前記第一および第二の生成物前駆体を反応性に近接させ、完全エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質、およびリガンドよりなる群から選択される反応生成物を生成させる第二のレポーター成分と；

(e) 複数の検出可能な部分を生成させることができる増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムと；

(f) 生物学的標的の検出用キットを使用するための取扱説明書と、
を含んでなるキット。

【請求項 5 6】

直接にまたはペプチドリンカーを介して、またはオリゴヌクレオチドリンカーを介して、前記第一の結合性部分が、前記第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列に共有結合しており；

直接にまたはペプチドリンカーを介して、またはオリゴヌクレオチドリンカーを介して、前記第一のレポーターオリゴヌクレオチドが、前記第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列に共有結合している請求項 5 3 または 5 4 に記載のキット。

【請求項 5 7】

直接にまたはペプチドリンカーを介して、またはオリゴヌクレオチドリンカーを介して、前記第一の生成物前駆体が、前記第一のレポーターオリゴヌクレオチドに共有結合しており；

直接にまたはペプチドリンカーを介して、またはオリゴヌクレオチドリンカーを介して、前記第二の生成物断片が、前記第二のレポーターオリゴヌクレオチドに共有結合している請求項 5 2 から 5 5 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 8】

前記検出可能な部分の前駆体をさらに含んでなる請求項 5 2 から 5 6 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 9】

前記反応生成物が、MASMTGGQQMG (配列番号 4)、MASMTCGQQMG (配列番号 38)、MASMTGCQQMG (配列番号 39)、MASMTGGCQMG (配列番号 40)、MASMTGGQCMG (配列番号 41)、(G)₀₋₂-NWCHPQFE-(G)₀₋₂ (配列番号 42)、(G)₀₋₂-NWSCPQFE-(G)₀₋₂ (配列番号 43)、(G)₀₋₂-NWSHCQFE-(G)₀₋₂ (配列番号 44)、(G)₀₋₂-NWSHPCFE-(G)₀₋₂ (配列番号 45)、(G)₀₋₂-NWSHPCFE-(G)₀₋₂ (配列番号 46)、KETAAAKFCRQHMD (配列番号 47)、KETAAAKFCRQHMD (配列番号 48)、およびMASMT

G - [S C H ₂ C (O)] - Q Q M G (配列番号 4 9) から選択されるペプチジル配列を含んでなる請求項 5 2 から 5 5 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 6 0】

各結合性部分が、前記生物学的標的に直接的または間接的に結合する抗体であり、前記生物学的標的が、B c r - A b l、E r b B ファミリーのホモ二量体、E r b B ファミリーのヘテロ二量体、および P D G F よりなる群から選択される請求項 5 2 から 5 8 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 6 1】

各抗体が、前記生物学的標的に間接的に結合する請求項 5 9 に記載のキット。

【請求項 6 2】

2 種の追加抗体をさらに含み、それらの各々が、前記生物学的標的に直接的に結合し、前記生物学的標的が、B c r - A b l、E r b B ファミリーのホモ二量体、E r b B ファミリーのヘテロ二量体、および P D G F よりなる群から選択される請求項 6 0 に記載のキット。

【請求項 6 3】

前記第一の結合性部分および前記第二の結合性部分が、異なる抗体である請求項 5 2 から 6 1 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 6 4】

M A S M T C G Q Q M G (配列番号 3 8)、M A S M T - チオエステル (配列番号 5 0)、M A S M T G C Q Q M G (配列番号 3 9)、M A S M T G - チオエステル (配列番号 5)、M A S M T G G C Q M G (配列番号 4 0)、M A S M T G G - チオエステル (配列番号 5 1)、M A S M T G G Q C M G (配列番号 4 1)、M A S M T G G Q - チオエステル (配列番号 5 2)、(G) _{0 - 2} - N W C H P Q F E - (G) _{0 - 2} (配列番号 4 2)、(G) _{0 - 2} - N W - チオエステル (配列番号 5 3)、(G) _{0 - 2} - N W S C P Q F E - (G) _{0 - 2} (配列番号 4 3)、(G) _{0 - 2} - N W S - チオエステル (配列番号 5 4)、(G) _{0 - 2} - N W S H C Q F E - (G) _{0 - 2} (配列番号 4 4)、(G) _{0 - 2} - N W S H - チオエステル (配列番号 5 5)、(G) _{0 - 2} - N W S H P C F E - (G) _{0 - 2} (配列番号 4 5)、(G) _{0 - 2} - N W S H P - チオエステル (配列番号 5 6)、K E T A A A K F C R Q H M D S (配列番号 4 7)、K E T A A A K F - チオエステル (配列番号 5 7)、C G Q Q M G (配列番号 5 8)、C H P Q F E - (G) _{0 - 2} (配列番号 5 9)、C P Q F E - (G) _{0 - 2} (配列番号 6 0)、C R Q H M D S (配列番号 6 1)、および M A S M T G - [S C H ₂ C (O)] - Q Q M G (配列番号 4 9) よりなる群から選択されるペプチジル部分を含んでなり、前記チオエステルは、R が C - 末端チオエステルを含有するペプチドと N - 末端システインを含有するペプチドとの間でのペプチド結合の形成を妨げない任意の部分である式 - C (O) - S - R を有する分子。

【請求項 6 5】

R が、C₁ ~ C₆ 直鎖状または分枝状アルキルである請求項 6 3 に記載の分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2007年7月27日に出願された米国仮特許出願第60/962,333号の利益と優先権を主張しており、参照としてその全体が本明細書に援用されている。

【0002】

本発明は一般に、生体検出および診断におけるアッセイ技術とそれらの使用に関する。本発明は、より具体的には、生体検出および診断における核酸鋳型化学（例えば、反応生成物の合成）の組成物と方法に関する。

【背景技術】

【0003】

標的依存のDNAプログラム化学（「DPC」）に基づく検出原理は、例えば、C o u

10

20

30

40

50

11らにより特許文献1に示されている。ある一定の適用に関して、DPC反応は、検出可能な単一分子、例えば、1標的分子につき1蛍光体を作出することができる。これは、所望の感度を有するアッセイを提供することができる。しかしながら、ある一定の他のアッセイでは、必要な感度を欠く場合がある。例えば、ある一定のアッセイにおいて、検出可能な単一分子の生成では、生物学的標的、例えば、組織または体液サンプル中に低濃度で存在するタンパク質二量体を検出するための適切な感度を有する系を付与することができない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

10

【特許文献1】国際公開第06/128138号パンフレット

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、一定の生物学的標的、例えば、注目しているサンプル中のタンパク質または核酸の検出を可能にするために、検出感度を改善したアッセイ系を提供する必要性が存続している。

【課題を解決するための手段】

【0006】

20

本発明は、DNAプログラム化学(DPC)媒介アッセイにおける検出限界の改善は、1標的分子当り複数の検出可能な部分を生成できる場合に達成し得るという発見に一部基づいている。本質的には、DPC媒介反応を使用して1つまたは複数の反応生成物の生成を介して標的分子を検出する。次いで反応生成物の各分子を用い、増幅方法論を用いて複数の検出可能な部分を生成させる。その結果、所与のアッセイ感度を増大させることができ、サンプル中、例えば、組織または体液サンプル中の生物学的標的の検出および/または定量化が可能になる。

【0007】

選択されたアッセイフォーマットに依って、反応生成物は、例えば、完全エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質またはリガンドであり得、それらの各々は、下記により詳細に検討されている直接的または間接的な検出システムを用いることによって検出または定量化することができる。本発明に使用される検出システムは、検出成分と、DPC反応から生じるシグナルを増幅させることによってアッセイ感度を増大させるために互いに相互作用する増幅成分とを含んでなる。例えば、下記により詳細に検討されているように、反応生成物が完全エピトープである場合、このエピトープを、抗体によって認識させることができる。この抗体は、アルカリホスフェートまたはペルオキシダーゼなどの酵素など、通常使用される幾つかのシグナル発生システムの任意の1つと結合(例えば、共有結合)させることができる(Tijssen, P., Laboratory Technique in Biochemistry and Molecular Biologyにおいて「Practice and Theory of Enzyme Immunoassay」、15巻、1985年、編集者R. H. BurdonおよびP. H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam)。あるいは、このエピトープに結合する抗体は、非標識でもよい。この場合、非標識抗体を次に、別の抗体またはシグナル発生システムと結合した(例えば、共有結合した)他の結合部分により結合させる。酵素が使用される場合、これらは、高ターンオーバー速度を有し、出発基質、例えば、比色基質、蛍光基質、および化学発光前駆体基質から大量の検出可能な部分を迅速に生成させることができる。

30

40

【0008】

一態様において、本発明は、サンプル中の生物学的標的の存在および/または量を判定する方法を提供する。本法は：(1)(i)生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii)第一の結合性部分と結合(例えば、共有または非共有結合)

50

した第一のオリゴヌクレオチド配列と、(i i i) 第一のオリゴヌクレオチド配列と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第一の生成物前駆体とを含んでなる第一のプロープと、(2) (i) 生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(i i) 第二の結合性部分に結合した(例えば、共有または非共有結合した)第一のオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチド配列と、(i i i) サンプル中に生物学的標的が存在する場合、その生物学的標的に第一および第二の結合性部分双方を結合させる条件下、第二のオリゴヌクレオチド配列と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第二の生成物前駆体とを含んでなる第二のプロープをサンプルと合わせることを含んでなる。第一および第二の結合性部分が生物学的標的に結合する時に、第一および第二のオリゴヌクレオチド配列は互いにハイブリダイズし、第一および第二の生成物前駆体を互いに反応性に近接させて反応生成物を生成させる。反応生成物は、完全エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質またはリガンドであり得る。

10

【 0 0 0 9 】

反応生成物が得られた場合、それを、反応生成物と相互作用することができる検出成分と、複数の検出可能な部分を生成させることのできる増幅成分とを含んでなる検出システムに曝露させる。検出可能な部分の存在および/または量により、サンプル中の生物学的標的の存在および/または量が示されることになる。

【 0 0 1 0 】

当然のことながら第一および第二のプロープは各々、単一分子であり得る。例えば、第一および第二のプロープにおいて、結合性部分を、1つまたは複数のオリゴヌクレオチド配列を介して生成物前駆体と共有結合させることができる。あるいは、第一プロープおよび第二のプロープは、機能性プロープを生成させるため、互いに相互作用する2つ以上の部分を含むことができる。これは、例えば、生成物前駆体と共有結合した相補的または実質的に相補的なアンチジップコードのオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズする結合性部分と共有結合したジップコードのオリゴヌクレオチド配列を介して促進させることができる。このプロープはまた、一定の実施形態において、一端でアンチジップのオリゴヌクレオチド配列と、他端では生成物前駆体と共有結合している1つまたは複数のオリゴヌクレオチドを含む。

20

【 0 0 1 1 】

別の態様において、本発明は、サンプル中の生物学的標的の存在および/または量を判定する方法を提供する。本法は、

30

(a) (i) 生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(i i) 第一の結合性部分に結合した(例えば、共有または非共有結合した)第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第一の標的結合性成分を提供すること；

(b) (i) 生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(i i) 第二の結合性部分に結合した(例えば、共有または非共有結合した)第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第二の標的結合性成分を提供すること；

(c) (i) 第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズできる第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(i i) 第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列に結合した(例えば、共有または非共有結合した)第一のレポーターオリゴヌクレオチドと、(i i i) 第一のレポーターオリゴヌクレオチドと結合した(例えば、共有または非共有結合した)第一の生成物前駆体と、を含んでなる第一のレポーター成分を提供すること；

40

(d) (i) 第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(i i) 第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と結合(例えば、共有または非共有結合)しており、第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のレポーターオリゴヌクレオチドと、(i i i) 第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合(例えば、共有または非共有結合)しており、反応性に近接させた場合に第一の生成物前駆体と反応することができる第二の生成物前駆体とを含んでなる第二のレポーター成分を提供すること、

50

を含んでなる。

【0012】

一実施形態において、サンプル中に生物学的標的が存在する場合、第一および第二の結合性部分が生物学的標的に結合するような条件下で、サンプルは、第一の標的結合性成分、第二の標的結合性成分、第一のレポーター成分、および第二のレポーター成分と同時に結合する。第一および第二の結合性部分が生物学的標的に結合すると、第一のジップコード配列が、第一のアンチジップコードのオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズし、第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列が、第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列にハイブリダイズし、第二のレポーターオリゴヌクレオチドが、第一のレポーターオリゴヌクレオチドにハイブリダイズして、第一および第二の反応生成物前駆体を反応性に近接させて反応生成物を生成する。

10

【0013】

別の実施形態において、第一および第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列を、対応する第一および第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列にアニールさせて機能性プローブを生成させる条件下で、第一の標的結合性成分、第二の標的結合性成分、第一のレポーター成分、および第二のレポーターをサンプルと合わせる前に互いにプレインキュベートする。当然のことながら、加える順序は、シグナル対ノイズ比を最適化するために変えることができる。例えば、第一および第二の標的結合性成分をサンプルと共にインキュベートし、第一および第二のレポーター成分を加える前に生物学的標的に結合させることができる。

20

【0014】

反応生成物が得られた場合、これを検出システムに曝露させる。その後、検出可能な部分の存在および/または量を用いて、サンプル中の生物学的標的の存在および/または量を判定することができる。

【0015】

本明細書に記載されたそれぞれの方法において、検出システムの増幅成分は、触媒、例えば、検出可能な部分の生成を触媒する酵素を含んでなる。例えば、増幅成分は、反応生成物1分子当たり少なくとも10分子、100分子、1,000分子、または10,000分子の検出可能な部分を生成することができる。一定の代表的な酵素としては、例えば、ペルオキシダーゼ類、例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)、ホスファターゼ類、例えば、アルカリホスファターゼ、ヌクレアーゼ類、例えば、リボヌクレアーゼ、およびデヒドロゲナーゼ類、例えば、乳酸デヒドロゲナーゼが挙げられる。

30

【0016】

選択されたアッセイフォーマットに依って、反応生成物は、ペプチドまたはタンパク質であり得る。例えば、反応生成物は、本明細書に開示された1つまたは複数のペプチジル配列、例えば、以下の実施例3に検討されたペプチジル配列ならびに、例えば、図15に表されたものを含むことができる。あるいは、反応生成物は、小型分子、例えば、エピトープを規定する小型分子であり得る。反応生成物は、色素、抗生物質、酵素補因子、酵素阻害剤、殺虫剤、薬物、毒素、蛍光体、発色団、ホルモン、炭水化物または脂質であり得る。

40

【0017】

当然のことながら、本明細書に記載された方法を用いて、例えば、タンパク質またはペプチドなど多数の生物学的標的を検出および/または定量することができる。本法を用いて多量体タンパク質、例えば、ホモ二量体タンパク質、ヘテロ二量体タンパク質、および融合タンパク質の存在および/または量を判定することができる。代表的な生物学的標的としては、例えば、Bcr-Ablヘテロ二量体、ErbBファミリーのホモ二量体、ErbBファミリーのヘテロ二量体、およびPDGFを挙げることができる。あるいは、本明細書に記載された方法を用いて、核酸、例えば、DNAまたはRNAを検出および/または定量することができる。

【0018】

50

生物学的標的およびアッセイ様式に依って、第一および第二の結合性部分の各々を、生物学的標的により規定された別個の結合性部位に結合させることができる。さらに、第一および第二の結合性部分は、同一であっても異なってもよい。さらに、第一の結合性部分、第二の結合性部分または第一および第二の結合性部分の各々が、抗体であり得る。

【0019】

さらに、使用されるアッセイ様式およびDPC化学に依って、第一の生成物前駆体および第二の生成物前駆体は、追加の試薬、例えば、この化学反応を促進させるために必要な試薬の存在下でのみ反応することができる。しかしながら、選択された化学に依って、第一の生成物前駆体は、第二の生成物前駆体と自然に反応して反応生成物を生成することができる。本明細書に記載されるアプローチの1つは、天然の化学的連結と称され、この一実施形態において、たとえばC-末端チオエステルを含有する第一の前駆体ペプチドとN-末端システインを含有する第二の前駆体ペプチドとの間の反応によって、ペプチド結合が生成する。一定の実施形態において、C-末端チオエステルとシステイン以外の部分によって提供されるN-末端チオールとの間の反応によって、ペプチド結合アイソスターが生成する。アッセイ特異性を最大にするために、当然のことながら一定の反応物および反応条件の調整を必要とする場合が考えられる。このことは、例えば、約8 から約25、より好ましくは約9 から約20 の融解温度を有するように第一および第二のオリゴヌクレオチド配列または第一および第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列を選択することによって達成することができる。あるいは、または前記に加えて、このことは、例えば、サンプルを第一の生成物前駆体を含んでなるプローブと共にインキュベートし、未結合の第一の生成物プローブを除去し、次いでサンプルを第二の生成物前駆体を含んでなる第二のプローブと共にインキュベートすることによって達成することができる。

10

20

【0020】

別の態様において、本発明は、生成物前駆体の非マスク化に基づいた、サンプル中の生物学的標的の存在および/または量を判定する別の方法を提供する。本法は、(1)(i)生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii)第一の結合性部分と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第一のオリゴヌクレオチド配列と、(iii)第一のオリゴヌクレオチド配列と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第一のマスク化生成物前駆体とを含んでなる第一のプローブと、(2)(i)生物学的標的に対して結合親和力を有する第二の結合性部分と、(ii)第二の結合性部分と結合(例えば、共有または非共有結合)しており、第一のオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチド配列と、(iii)生物学的標的がサンプル中に存在する場合、第一および第二の結合性部分を生物学的標的に結合させる条件下、第二のオリゴヌクレオチド配列と結合した(例えば、共有または非共有結合した)非マスク基とを含んでなる第二のプローブと、サンプルとを合わせることを含んでなる。結合性部分を生物学的標的に結合する際、第一および第二のオリゴヌクレオチド配列が互いにハイブリダイズし、非マスク基をマスク化生成物前駆体との反応性に近接させ、反応生成物、すなわち、非マスク化反応生成物が生成する。

30

【0021】

反応生成物が得られた場合、これを検出システムに曝露させる。次いで検出可能な部分の存在および/または量を用いてサンプル中の生物学的標的の存在および/または量を判定することができる。

40

【0022】

当然のことながら、マスク化前駆体は、マスク化エピトープ、マスク化酵素基質、マスク化酵素活性化物質、またはマスク化リガンドであり得る。この反応時に、マスク基が除去されて、非マスク生成物、例えば、非マスクエピトープ、非マスク酵素基質、非マスク酵素活性化物質、または非マスクリガンドを生成する。この反応生成物は、例えば、ペプチド、タンパク質または小型分子であり得る。

【0023】

一定の状況下で生物学的標的は、多量体タンパク質、例えば、ホモ二量体タンパク質、

50

ヘテロ二量体タンパク質または融合タンパク質であり得る。例えば、生物学的標的は、Bcr-Ablヘテロ二量体、ErbBファミリーのホモ二量体、ErbBファミリーのヘテロ二量体、およびPDGFから選択することができる。

【0024】

生物学的標的およびアッセイ様式に依って、第一の結合性部分、第二の結合性部分、または第一の結合性部分および第二の結合性部分の各々は、抗体であり得る。さらに、当然のことながら、第一および第二の結合性部分は、同一であっても異なってもよい。

【0025】

さらに、選択された増幅成分に依って、増幅成分は、検出可能な部分の生成を触媒する酵素を含むことができる。具体的な用途に求められるアッセイ感度に依って、増幅成分は、反応生成物1分子当たり少なくとも10分子、100分子、1,000分子または10,000分子の検出可能な部分を生成することができると考えられる。

【0026】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載された1つまたは複数のアッセイを促進させるキットを提供する。このキットは、(i)生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii)第一の結合性部分と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と、(iii)第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第一の生成物前駆体と、を含む第一のプローブを含んでなる。このキットはまた、(i)生物学的標的に対して結合親和力を有する第二の結合性部分と、(ii)第二の結合性部分と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と、(iii)第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第二の生成物前駆体と、を含む第二のプローブを含んでなり、生物学的標的に対する第一および第二の結合性部分の結合の際に、第一および第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列は、互いにハイブリダイズでき、第一および第二の生成物前駆体が互いに反応して、反応生成物を生成させることができる。この反応生成物は、完全エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質、およびリガンドよりなる群から選択することができる。

【0027】

別の態様において、このキットは、(i)生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii)第一の結合性部分と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と、(iii)第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第一のマスク化生成物前駆体と、を含む第一のプローブを含んでなる。このキットはまた、(i)生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(ii)第二の結合性部分と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と、(iii)第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した(例えば、共有または非共有結合した)非マスク基を含む第二のプローブを含んでなる。生物学的標的に対する第一および第二の結合性部分の結合の際に、第一および第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列は、互いにハイブリダイズし、非マスク剤およびマスク化生成物前駆体が互いに反応して反応生成物(すなわち、非マスク化反応生成物)が生成する。この反応生成物は、非マスクエピトープ、非マスク酵素基質、非マスク酵素活性化物質、および非マスクリガンドよりなる群から選択することができる。

【0028】

本明細書に記載されたキットはまた、複数の検出可能な部分を生成できる検出システムを任意に含んでなる。さらに、キットはまた、生物学的標的の検出用キット使用するための取扱説明書を任意に含んでなる。

【0029】

幾つかのキットにおいて、第一および第二のプローブの各々は、各プローブの成分が互いに共有結合している単一分子である。あるいは、第一および第二のプローブの各々は、互いに非共有結合している複数の成分を含んで機能性プローブを生成することができる。

例えば、これらのプローブは、互いにハイブリダイズして種々のプローブ成分の非共有結合を可能にすることのできる2つ以上のオリゴヌクレオチド配列、例えば、ジップコードのオリゴヌクレオチド配列および相補的または実質的に相補的なアンチジップコードのオリゴヌクレオチド配列を含むことができる。

【0030】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載された1つまたは複数のアッセイを促進させるために別のキットを提供する。そのキットは、

(a) (i) 生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii) 第一の結合性部分と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第一の標的結合性成分と；

(b) (i) 生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(ii) 第二の結合性部分と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第二の標的結合性成分と；

(c) (i) 第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズできる第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(ii) 第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第一のレポーターオリゴヌクレオチドと、(iii) 第一のレポーターオリゴヌクレオチドと結合した(例えば、共有または非共有結合した)第一の生成物前駆体と、を含んでなる第一のレポーター成分と；

(d) (i) 第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(ii) 第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と結合(例えば、共有または非共有結合)しており、第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のレポーターオリゴヌクレオチドと、(iii) 第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した(例えば、共有または非共有結合した)第二の生成物前駆体とを含む第二のレポーター成分を含んでなる。生物学的標的に対する第一および第二の結合性部分の結合、ならびにジップコードおよびアンチジップコードそれぞれのオリゴヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションの際に、レポーターオリゴヌクレオチド配列は、互いにハイブリダイズして、第一および第二の生成物前駆体を反応性に近接させ、反応生成物、例えば、完全エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質、およびリガンドを生成させる。

【0031】

本明細書に記載されたキットはまた、複数の検出可能な部分を生成させることができる検出システムを任意に含んでなる。さらに、キットはまた、生物学的標的の検出用キットを使用するための取扱説明書を任意に含んでなる。

【0032】

さらにキットの各々において、反応生成物は、MASMTGGQQMG(配列番号4)、MASMTCCGQQMG(配列番号38)、MASMTGCCQQMG(配列番号39)、MASMTGGCCQMG(配列番号40)、MASMTGGQCQMG(配列番号41)、(G)₀₋₂-NWCHPQFE-(G)₀₋₂(配列番号42)、(G)₀₋₂-NWSCPQFE-(G)₀₋₂(配列番号43)、(G)₀₋₂-NWSHCQFE-(G)₀₋₂(配列番号44)、(G)₀₋₂-NWSHPCFE-(G)₀₋₂(配列番号45)、(G)₀₋₂-NWSHPQFE-(G)₀₋₂(配列番号46)、KETAAAKFCRQHMD(配列番号47)、KETAAAKFGRQHMD(配列番号48)、およびMASMTG-[SCH₂C(O)]-QQMG(配列番号49)から選択されるペプチジル配列を含むことができる。さらに、各々のキットは、Bcr-Ab1、Erbbファミリーのホモ二量体、Erbbファミリーのヘテロ二量体、およびPDGFよりなる群から選択された生物学的標的を結合する抗体を含むことができる。

【0033】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載された方法およびキットに使用できる分子を提供する。この分子は、MASMTCCGQQMG(配列番号38)、MASMT-チ

オエステル（配列番号50）、MASMTGCQQMG（配列番号39）、MASMTG
 - チオエステル（配列番号5）、MASMTGGCQQMG（配列番号40）、MASMT
 GG - チオエステル（配列番号51）、MASMTGGQCMG（配列番号41）、MA
 SMTGGQ - チオエステル（配列番号52）、 $(G)_0 - 2$ - NWCHPQFE - (G)
 $_0 - 2$ （配列番号42）、 $(G)_0 - 2$ - NW - チオエステル、（配列番号53）、 (G)
 $_0 - 2$ - NWS CPQFE - $(G)_0 - 2$ （配列番号43）、 $(G)_0 - 2$ - NWS
 - チオエステル（配列番号54）、 $(G)_0 - 2$ - NWSHCQFE - $(G)_0 - 2$ （配
 列番号44）、 $(G)_0 - 2$ - NWSH - チオエステル（配列番号55）、 $(G)_0 - 2$
 - NWSHP CFE - $(G)_0 - 2$ （配列番号45）、 $(G)_0 - 2$ - NWSHP - チオ
 エステル（配列番号56）、KETAAAKFCRQHMD S（配列番号47）、KET
 A A A K F - チオエステル（配列番号57）、CGQQMG（配列番号58）、CHPQ
 FE - $(G)_0 - 2$ （配列番号59）、CPQFE - $(G)_0 - 2$ （配列番号60）、C
 RQHMD S（配列番号61）、およびMASMTG - $[SCH_2C(O)]$ - QQMG
 （配列番号49）よりなる群から選択されるペプチジル部分を含むことができる。前述の
 ペプチド配列において、チオエステルは、RがC - 末端チオエステルを含有するペプチド
 とN - 末端システインを含有するペプチドとの間でのペプチド結合の形成を妨げない任意
 の部分、例えば、 $C_1 \sim C_6$ 直鎖状または分枝状アルキルである式 - C(O) - S - Rを
 有する。さらに、配列番号49のペプチドにおいて、基 $[SCH_2C(O)]$ は、成分の
 各々がアミノ酸ではなく、原子を表す（例えば、「S」は硫黄である）リンカーのこと
 である。

10

20

定義

本明細書に用いられる用語の「抗体」とは、完全抗体（例えば、モノクローナル抗体ま
 たはポリクローナル抗血清に見られる完全抗体）、抗体の抗原結合性断片、または生合成
 抗体結合部位のことである。抗体断片としては、例えば、Fab断片、Fab'断片、 $(F$
 $ab')$ ₂断片またはFv断片が挙げられる。抗体および抗体断片は、当業界に知られ
 た従来の技法を用いて作製することができる。多数の生合成抗体結合部位が当業界に知ら
 れており、例えば、米国特許第5,091,513号明細書、米国特許第5,132,4
 05号明細書、および米国特許第5,476,786号明細書に記載された、例えば、単
 一のFv分子またはsFv分子が挙げられる。他の生合成抗体結合部位としては、例えば
 、二重特異性または二官能性結合タンパク質、例えば、少なくとも2つの異なるエピト
 ープに結合する抗体または抗体断片である二重特異性または二官能性抗体が挙げられる。二
 重特異性抗体を作製する方法は、当業界に知られており、例えば、ハイブリドーマを融合
 するか、Fab'断片を結合させることによる方法が挙げられる。例えば、Song s i
 v i l a iら（1990）CLIN. EXP. IMMUNOL. 79:315-325;
 K o s t e l n yら（1992）J. IMMUNOL. 148:1547-1553頁を
 参照されたい。

30

【0034】

本明細書に用いられる用語の「と結合した」とは、2つ以上の基、部分、化合物、モノ
 マー、ポリマー、または小型分子の間での相互作用のことである。本明細書に明記されな
 い限り、この相互作用は、共有結合および非共有結合を含み得る。共有結合は、例えば、
 アミド結合、エステル結合、炭素 - 炭素結合、ジスルフィド結合、カルバメート結合、エ
 ーテル結合、またはカーボネート結合を介して生じ得る。非共有結合としては、例えば、
 水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、磁気相互作用、および静電相
 互作用が挙げられる。非共有相互作用とは、具体的にはオリゴヌクレオチドのハイブリダ
 イゼーションが挙げられる。この用語はまた、オリゴヌクレオチドのリンカー配列、ペプ
 チドのリンカー配列、化学的リンカー、または前述のものの任意の機能的等価体、または
 それらの任意の組合わせなど、スパーサーまたはクロスリンカーを介した結合を含む。

40

【0035】

本明細書に用いられる用語の「結合性部分」とは、異なる分子に特異的に結合できる1
 つの分子のことである。代表的な結合部分としては、例えば、タンパク質（例えば、抗体

50

、アドネクチン (adnectins)、アフィボディ (affibodies)、受容体、リガンド、成長因子、ホルモン、サイトカイン、アビジンおよびアビジン類縁体)、核酸 (例えば、一本鎖 DNA 配列または RNA 配列、アプタマー)、炭水化物、脂質、および小型分子が挙げられる。

【0036】

本明細書に用いられる用語の「検出システム」とは、反応生成物 (非マスク反応生成物を含む) の検出および単一の反応生成物から複数の検出可能な部分 (例えば、視覚または好適な検出器、例えば、光学検出器、蛍光検出器、比色計、同位体検出器により検出できる部分) の合成を可能にする 1 つまたは複数の成分を含有するシステムのことである。検出システムは、検出成分および増幅成分を含んでなる。検出成分は、生成物前駆体またはマスク化生成物前駆体に比して反応生成物と優先的に相互作用し、したがって、生成物前駆体またはマスク化生成物前駆体に曝露させた場合よりも反応性生物に曝露させた場合に、有意により多くの検出可能な部分を生じる。例えば、検出成分と増幅成分とが、生成物前駆体および / またはマスク化生成物前駆体と相互作用する際に生じた検出可能な部分の数は、反応生成物の存在下で生じたものの 20 % 未満、10 % 未満、5 % 未満、1 % 未満、または 0.1 % 未満である。

10

【0037】

本明細書に用いられる用語の「検出成分」とは、生成物前駆体またはマスク化生成物前駆体よりも反応生成物 (非マスク反応生成物を含む) と優先的に相互作用し、および / または優先的にそれと結合する検出システムのことである。検出成分は、例えば、結合性部分、例えば、抗体、アフィボディ (affibody)、リガンド、受容体、アプタマー、アドネクチン (adnectin)、酵素、または小型分子 (例えば、アビジンまたはストレプトビジン) であり得る。

20

【0038】

本明細書に用いられる用語の「増幅成分」とは、検出成分と直接または間接的に結合して複数の検出可能な部分を生成する検出システム成分のことである。増幅成分は、検出成分と同じ分子の一部、例えば、アンチ反応生成物抗体 - 酵素 (例えば、HRP) 結合体の酵素成分であり得る。あるいは、増幅成分と検出成分とは、互いに相互作用する異なる分子、例えば、反応生成物に結合する検出成分に結合するアンチ検出成分抗体 - 酵素 (例えば、HRP) 結合体の酵素成分であり得る。増幅成分は、一緒に作用するか、または互いに相互作用して検出可能な部分を生成する 2 つ以上の分子を含むことができる。例えば、増幅成分は、増幅システムの他の試剤により検出可能な部分に変換される検出可能な部分の前駆体を含むことができる。

30

【0039】

本明細書に用いられる用語の「DNA プログラム化学」、「DPC」、「核酸プログラム化学」または「核酸鑄型反応」は、同義語であり、特異的な反応生成物を生成するために、核酸配列が、それと結合した反応物の反応性を制御する化学反応のことである。一般に、この反応は、(i) 結合した反応性基を有する 1 つまたは複数の核酸鑄型を提供すること; (ii) 1 つまたは複数の鑄型の少なくとも一部に相補的な配列であるオリゴヌクレオチド配列および結合した反応性基を有する 1 つまたは複数の試薬 (時にはトランスファ単位と称される) を提供すること; および (iii) 試薬を (それらの相補的オリゴヌクレオチド配列を介して) 鑄型にハイブリダイズさせ、反応性基を反応性に近接させて 1 つまたは複数の反応生成物を生成させる条件下で鑄型と試薬を接触させること、によって達成される。例えば、ワンステップの核酸鑄型反応において、「鑄型」と「相補的」オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションにより、それらと結合した反応性基を反応性に近接させて特定の生成物を生成させる化学反応が可能になる。反応物ならびに生成物の構造は、鑄型および試薬に存在する核酸配列の構造と関連させる必要はない。核酸鑄型反応の考察に関しては、例えば、Liu による米国特許第 7,070,928 B1 号明細書ならびに米国特許第 7,223,545 号明細書および欧州特許第 1,423,400 B1 号明細書; Liu による米国特許出願公開第 2004/0180412 号明細書 (米

40

50

国特許出願第10/643,752号明細書；2003年8月19日）；Gartnerら、（2004）、Science、305巻、1601-1605頁；Doyonら、（2003）、JACS、125巻、12372-12373頁、を参照されたい。これらは全て参照として本明細書に援用されている。また、2006年3月3日に出願されたCoul1らによる「Turn Over Probes and Use There of」、PCT国際公開第07/008276A2号パンフレットを参照されたい。

【0040】

本明細書に用いられる用語の「エピトープ」とは、抗体のようなエピトープ結合分子により認識され、結合される分子（例えば、生体分子）または小型分子のことである。古典的には、エピトープは、抗体により認識される高分子の小部分、しばしばタンパク質の一部である。一定のエピトープでは、エピトープは、アミノ酸の線形配列により規定し得るか、またはエピトープを規定する分子の一部の三次元構造を介して互いに近接させたアミノ酸から生じ得る。エピトープは、ペプチド配列であることが多い。また、本明細書に用いられる用語の「エピトープ」とは、それ自体は免疫原性であり得ないが、抗体以外のタンパク質などの高分子に結合した場合に、小型分子、高分子または小型分子/高分子複合体に特異的な免疫応答を誘発するペプチドなどの任意のタイプの小型分子、またはその一部のことである。現在、ホルモン、薬物、殺虫剤および毒素などの小型分子からなる多種多様のエピトープに結合する抗体が一般に利用でき、このような抗体は、これら小型分子の検出アッセイにしばしば使用される。

10

【0041】

本明細書に用いられる用語の「核酸」、「オリゴヌクレオチド」（時には単に「オリゴ」と称される）または「ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのポリマーのことである。このポリマーとしては、限定はしないが、天然のヌクレオシド類（すなわち、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、およびデオキシシチジン）、ヌクレオシド類縁体（例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロ-ピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニルウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン、および2-チオシチジン）、化学的に修飾された塩基類、生物学的に修飾された塩基類（例えば、メチル化塩基類）、介在塩基類、修飾された糖類（例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、およびヘキソース）、または修飾されたリン酸基（例えば、ホスホロチオエート類および5'-N-ホスホラミダイト結合）が挙げられる。また、核酸およびオリゴヌクレオチドとしては、ロックド核酸（LNA）、ペプチド核酸（PNA）、トレオース核酸（TNA）などの修飾された主鎖を有する塩基類の他のポリマーを挙げることができる。

20

30

【0042】

本明細書に用いられる用語の「タンパク質」および「ペプチド」とは、アミノ酸のポリマーのことであり、特定の長さまたは数のアミノ酸のことではない。当然のことながら、アミノ酸は、天然であっても非天然であってもよく、1つまたは複数の修飾、例えば、アミノ酸側鎖に対して1つまたは複数の修飾を含有してもよい。さらに、このポリマーは、1つまたは複数のペプチジル結合、および任意に1つまたは複数の修飾された結合を含有してもよい。

40

【0043】

本明細書に用いられる用語の「生成物前駆体」または「反応生成物前駆体」とは、DNAプログラム化学によって反応生成物に変換される出発物質に存在する任意の原子または分子のことである。当然のことながら、反応生成物中に生成物前駆体の全体もしくは反応生成物前駆体の全体が存在してもよいし、それらの一部が存在してもよい。前駆体としては、例えば、小型分子の一部、酵素基質、酵素活性化物質、リガンドまたはエピトープを

50

挙げることができる。

【0044】

本明細書に用いられる用語の「マスク化前駆体」または「マスク化生成物前駆体」とは、除去されると、操作性生成物、例えば、操作性酵素基質、操作性酵素活性化物質、操作性リガンドおよび操作性エピトープを生じ得る、1つまたは複数の化学基によって不活化された任意の分子のことである。

【0045】

本明細書に用いられる用語の「小型分子」とは、1モル当り5,000グラム未満、任意に1モル当り2,000グラム未満、および任意に1モル当り1,000グラム未満の分子量を有し、実験室で合成されたか、または天然に見出された有機化合物のことである。

10

【0046】

組成物が、特定の成分を有する、含む、もしくは含んでなると記載されているか、または処理が、特定の処理ステップを有する、含む、または含んでなると記載されている記述を通して、本発明の組成物はまた、列挙された組成物からなるか、または本質的になること、また、本発明の加工処理が、挙げられた処理ステップから本質的になるか、またはなることが考慮されている。さらに当然のことながら、本発明が操作可能のままである限り、ステップの順序または一定の作用を実施する順序は重要なことではない。さらに、2つ以上のステップまたは動作が同時に実施されてもよい。

20

【0047】

本発明は、以下の図面からさらに理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】DPCベースのエピトープ作出を介して生物学的標的を検出する代表的な方法を示す概略図である。このアッセイは、各アセンブリが生物学的標的(L₁またはL₂と示す)上の部位に対する結合性部分(結合性リガンド)、核酸配列(レポーター核酸または補体と示す)、および化学反応することができる前駆体分子(前駆体1または前駆体2と示す)を含んでなる2つのプローブ(リガンド-レポーターアセンブリと示す)を使用する。各リガンド-レポーターアセンブリは、任意のスペーサー基(Sp1、Sp2、Sp3、Sp4と示す)および架橋基(CLと示す)を含有することができる。レポーター核酸配列および補体は、核酸二重鎖を形成するために、通常は完全に、または殆どが自己相補的かつ逆平行である。リガンド-レポーターアセンブリが標的に結合すると、レポーター核酸と補体とが互いにハイブリダイズし、前駆体1を前駆体2へ反応性に近接させて生成物、例えば、エピトープを含有する生成物が生成する。エピトープに結合する抗体(ABと示す)を用いることによって、この反応生成物を検出することができる。

30

【図2】2つの別個のオリゴヌクレオチド結合体から生成されるプローブ(2ピース断片のリガンド-レポーターアセンブリ)を示す概略図である。一方のオリゴヌクレオチド結合体(標的結合性成分と示す)は、結合性部分(L)、任意のスペーサー/クロスリンカー(Sp/CL)、およびジップコードDNAの配列を含有する。他方のオリゴヌクレオチド結合体(レポーター結合体と示す)は、前駆体、任意のスペーサーまたはクロスリンカー(Sp/CL)、レポーター核酸、任意のスペーサー(Sp)およびアンチジップコードの配列を含有する。ジップコード(「ジップ」)およびアンチジップコード(「アンチジップ」)配列は、相補的または実質的に相補的であり、通常、レポーター核酸よりも配列が長く、それらの配列は、レポーター配列にアニールしないように選択される。ジップコード配列とアンチジップコード配列とが共にハイブリダイズして、安定なリガンド-レポーター複合体を支持する安定な二重鎖を形成する。生じた複合体は、図1に示された単一分子のリガンド-レポーターアセンブリの機能的に等価である。

40

【図3-1】エピトープを生成できる代表的なDPC反応の概要を示す図である。

【図3-2】エピトープを生成できる代表的なDPC反応の概要を示す図である。

【図4】ビオチンリガーゼによるビオチン化に利用できる部位を作製する酵素ビオチンリ

50

ガーゼに対する基質中のイブシロンリシンからブロック性アジド基を除去する方法を示す概略図である。

【図 5 - 1】アジドピオチンリガーゼペプチド (B L P) - オリゴヌクレオチド結合体の合成を示す概略図である。

【図 5 - 2】アジドピオチンリガーゼペプチド (B L P) - オリゴヌクレオチド結合体の合成を示す概略図である。

【図 6】ピオチンリガーゼにより脱ブロック化 B L P 基質 (図 4 を参照) に加えたピオチン分子の存在を検出できる代表的なアッセイ様式を示す概略図である。

【図 7】図 6 に記載されたアッセイ様式の結果を示す棒グラフである。最初の 2 つのカラムは、ピオチンリガーゼの非存在下のサンプルを表し、1 つは、トリス - (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) 塩酸塩で還元されたサンプル、2 番目は、T C E P で還元されないサンプルを表す。3 番目と 4 番目のカラムは、ピオチンリガーゼと共にインキュベートした同じサンプルを表す。T C E P で還元され、ピオチンリガーゼと共にインキュベートしたサンプルだけが、陽性のシグナルを生じ、このサンプルがピオチン化されていることを示した。

【図 8 - 1】4 - アジドベンジルカルバメート形成を介して、ピオチンリガーゼに対し基質中のリシンの - アミノ基をマスクするための反応スキームを示す概略図である。

【図 8 - 2】4 - アジドベンジルカルバメート形成を介して、ピオチンリガーゼに対し基質中のリシンの - アミノ基をマスクするための反応スキームを示す概略図である。

【図 9】ピオチンリガーゼに対する基質を作製するための 2 つのヘミペプチドの連結に基づく D P C 媒介検出反応を示す概略図である。連結前に、このヘミペプチドは、ピオチンリガーゼにより認識されない。連結後、生じた生成物は、ピオチンリガーゼにより認識され、ペプチド中のリシンのイブシロンアミノ基にピオチンが付加される。

【図 10】ピオチンリガーゼに対する基質を形成するために連結させることのできる代表的なヘミペプチドを示す概略図である。この場合、N - 末端ヘミペプチドは、E L I S A アッセイにおいて抗フルオレセイン抗体により連結ペプチドの捕獲を可能にするフルオレセイン分子を含有する。2 つのヘミペプチドは、1 - エチル - 3 - [3 - ジメチルアミノプロピル] カルボジイミド (E D C) 塩酸塩の存在下で連結することができる。

【図 11】図 10 に記載されたペプチドを用いたアッセイ系の結果を示す棒グラフである。陽性対照は、完全長フルオレセイン含有ピオチンリガーゼペプチドを含んだ。ペプチドは、2 つの異なる濃度、2 . 5 m M と 0 . 2 5 m M を用い、E D C は、2 つの異なる濃度、1 m g / m L と 0 . 1 m g / m L で加えた。ピオチン化反応で生じたシグナル量は、ペプチドおよび E D C のより高い濃度の存在下で最大であった。E D C の不存在下で生じたシグナルは、バックグラウンドに等しかった (ヘミペプチド自体を除いたものと同じ) 。

【図 12】完全長 T 7 エピトープペプチド (完全長として示す) だけを認識するが、2 つのヘミペプチド (それぞれ N - 末端および C - 末端として示す) は認識しないモノクローナルアンチ T 7 抗体の能力を示す E L I S A アッセイの結果を示すグラフである。

【図 13 - 1】T 7 ヘミペプチド - オリゴヌクレオチド結合体を生成するための反応スキームを示す概略図である。

【図 13 - 2】T 7 ヘミペプチド - オリゴヌクレオチド結合体を生成するための反応スキームを示す概略図である。

【図 13 - 3】T 7 ヘミペプチド - オリゴヌクレオチド結合体を生成するための反応スキームを示す概略図である。

【図 14 A】ゲル電気泳動により特性化された (図 14 B)、T 7 ヘミペプチド - オリゴヌクレオチド結合体 (図 14 A) から T 7 ペプチドを形成した結果を示す図である。

【図 14 B】ゲル電気泳動により特性化された (図 14 B)、T 7 ヘミペプチド - オリゴヌクレオチド結合体 (図 14 A) から T 7 ペプチドを形成した結果を示す図である。

【図 15 - 1】ペプチドエピトープに結合する抗体が市販されている代表的なペプチドエピトープを示す表である。

【図 15 - 2】ペプチドエピトープに結合する抗体が市販されている代表的なペプチドエ

10

20

30

40

50

ピトーブを示す表である。

【図 1 6 A】チオエステル形成を介して (図 1 6 A) または S t a u d i n g e r 連結を介して (図 1 6 B) ペプチド連結を促進させるために使用することができる D P C 反応の 2 つの例を示す図である。

【図 1 6 B】チオエステル形成を介して (図 1 6 A) または S t a u d i n g e r 連結を介して (図 1 6 B) ペプチド連結を促進させるために使用することができる D P C 反応の 2 つの例を示す図である。

【図 1 7】固相ペプチド合成 (S P P S) によりチオエステルおよびホスフィンペプチドを生成するための反応スキームを示す概略図である。

【図 1 8 A】リボヌクレアーゼ S - タンパク質のリボヌクレアーゼ活性を活性化できるペプチドを可逆的に不活化するための 3 つのアプローチを示す系統図である。図 1 8 A は、ジスルフィド結合を介してペプチドを循環させ、不活化するために使用できるさらなる N - 末端および C - 末端システインを含有するペプチドを示す。このジスルフィド結合は、スルフヒドリル系還元試薬により切断することができる。図 1 8 B は、ペプチド中の 1 つまたは複数のリシンを任意にジアゾ化し、S - タンパク質による配列認識を破壊するペプチドを示す。図 1 8 C は、活性な完全長生成物を生成するために連結させることができる完全長 S - ペプチド配列の 2 つのヘミペプチドを示す。

【図 1 8 B】リボヌクレアーゼ S - タンパク質のリボヌクレアーゼ活性を活性化できるペプチドを可逆的に不活化するための 3 つのアプローチを示す系統図である。図 1 8 A は、ジスルフィド結合を介してペプチドを循環させ、不活化するために使用できるさらなる N - 末端および C - 末端システインを含有するペプチドを示す。このジスルフィド結合は、スルフヒドリル系還元試薬により切断することができる。図 1 8 B は、ペプチド中の 1 つまたは複数のリシンを任意にジアゾ化し、S - タンパク質による配列認識を破壊するペプチドを示す。図 1 8 C は、活性な完全長生成物を生成するために連結させることができる完全長 S - ペプチド配列の 2 つのヘミペプチドを示す。

【図 1 8 C】リボヌクレアーゼ S - タンパク質のリボヌクレアーゼ活性を活性化できるペプチドを可逆的に不活化するための 3 つのアプローチを示す系統図である。図 1 8 A は、ジスルフィド結合を介してペプチドを循環させ、不活化するために使用できるさらなる N - 末端および C - 末端システインを含有するペプチドを示す。このジスルフィド結合は、スルフヒドリル系還元試薬により切断することができる。図 1 8 B は、ペプチド中の 1 つまたは複数のリシンを任意にジアゾ化し、S - タンパク質による配列認識を破壊するペプチドを示す。図 1 8 C は、活性な完全長生成物を生成するために連結させることができる完全長 S - ペプチド配列の 2 つのヘミペプチドを示す。

【図 1 9】核酸標的上の標的配列を検出するためのエピトーブ作出反応を示す概略図である。2 つのオリゴヌクレオチド - ペプチド結合体は、標的配列上で隣接またはほぼ隣接した相補的配列にアニールする。この結合体上の局在化した高濃度のペプチドは、核酸標的上の相補的配列にアニールする際に迅速な連結を促進させる。

【図 2 0】特定の標的の検出に適応させた図 3 に記載したジアジドローダミン (D A Z R) のビスジフェニルホスフィン還元の D P C 反応を説明する試験系を示す概略図である。この場合、2 つの標的結合性成分は、P D G F - A B の A および B のサブユニットに対して特異的である。標的結合性成分の各々は、別個にジップコード化されて、それぞれ D A Z R 基およびビスジフェニルホスフィン基を含有するオリゴヌクレオチド結合体を保持した。2 つの標的結合性成分への同時結合は、レポーター D N A 配列のアニールを増加させ、D A Z R 基とビスジフェニルホスフィン基との近接を増加させ、蛍光生成物ローダミンを生成する反応を迅速にする。

【図 2 1】図 2 0 に記載されたアッセイ様式の反応の時間経過を示すグラフである。ローダミン生成の蛍光が経時的にモニターされた。陰性対照は、P D G F - A B 標的またはビスジフェニルホスフィンオリゴヌクレオチド結合体のいずれかを除外する操作をした。陽性対照は、大過剰の遊離 T C E P を含んだ。

【図 2 2】D A Z R 上のローダミンに優先的に結合する抗フルオレセイン抗体 - 西洋わさ

10

20

30

40

50

びペルオキシダーゼ結合体により、シグナルが増幅される代表的なアッセイ様式を示す概略図である。

【図 2 3】図 2 2 に記載された反応からの反応生成物を検出する E L I S A アッセイの結果を示すグラフである。標的分子 (P D G F - A B) を除くか、またはビスジフェニルホスフィンを除いた陰性対照と比較して、反応物の全てを含有した反応からより大きなシグナルが得られた。全ての反応物の存在下で生じたシグナル量は、全ての D A Z R が過剰の T C E P により還元された陽性対照において生じたシグナル量にほぼ等しかった。

【図 2 4】アルドールタイプの縮合反応を介してシアニン色素を生成する代表的な D P C 反応スキームを示す概略図である。

【図 2 5】アルドール縮合を介して p - クマリン酸を生成する代表的な D P C 反応スキームを示す概略図である。

【図 2 6】D P C を介して近接させた場合に、アンチ T 7 抗体により検出可能な T 7 ペプチドを生成する、T 7 ヘミペプチドと結合した E G F R の各々に対する 2 つの別個の抗体を用いて A 4 3 1 細胞上の E G F R ホモ二量体の検出を示す棒グラフである。

【図 2 7】T 7 ヘミペプチドと結合した E G F R の各々に対する 2 つの別個の抗体または T 7 ヘミペプチドと結合した E G F R に対する抗体および T 7 ヘミペプチドと結合した E r b B 2 に対するアフィボディを用いてフローサイトメトリーにより A 4 3 1 細胞中の E G F R ホモ二量体または E G F R - E r b B 2 ヘテロ二量体の検出を示す棒グラフである。抗体 - ヘミペプチド複合体が、D P C を介して反応性に近接させられると、アンチ T 7 抗体 - H R P 結合体により触媒されたチラミド - A l e x a 5 6 8 の組込みにより検出可能な T 7 ペプチドが生成する。

【図 2 8 A】アンチ T 7 単独で処理された K Y 0 1 細胞 (図 2 8 A) 、アンチ T 7 抗体と反応した B c r および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体 (図 2 8 B) 、およびアンチ T 7 抗体と反応した A b 1 および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体と共に B c r および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体 (図 2 8 C) 、のフローサイトメトリーによる分布を示すヒストグラムである。

【図 2 8 B】アンチ T 7 単独で処理された K Y 0 1 細胞 (図 2 8 A) 、アンチ T 7 抗体と反応した B c r および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体 (図 2 8 B) 、およびアンチ T 7 抗体と反応した A b 1 および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体と共に B c r および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体 (図 2 8 C) 、のフローサイトメトリーによる分布を示すヒストグラムである。

【図 2 8 C】アンチ T 7 単独で処理された K Y 0 1 細胞 (図 2 8 A) 、アンチ T 7 抗体と反応した B c r および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体 (図 2 8 B) 、およびアンチ T 7 抗体と反応した A b 1 および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体と共に B c r および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体 (図 2 8 C) 、のフローサイトメトリーによる分布を示すヒストグラムである。

【図 2 9 A】図 2 9 A は、B c r および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体で処理した K Y 0 1 細胞；A b 1 および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体；または B c r および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体と A b 1 および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体双方のフローサイトメトリー分布を示す図である。各々の場合に、結合体処理細胞をアンチ T 7 抗体と反応させ、次いでヤギ抗ウサギ I g G F (a b) 2 - A l e x a 5 6 8 シグナルを増幅して検出した。図 2 9 B は、A b 1 および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体で処理した精製骨髓単核細胞；または B c r および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体と A b 1 および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体双方のフローサイトメトリー分布を示す図である。各々の場合に、結合体処理細胞をアンチ T 7 抗体と反応させ、次いでヤギ抗ウサギ I g G F (a b) 2 - A l e x a 5 6 8 シグナルを増幅して検出した。

【図 2 9 B】図 2 9 A は、B c r および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体で処理した K Y 0 1 細胞；A b 1 および T 7 ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結

10

20

30

40

50

合体；またはB c rおよびT 7ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体とA b 1およびT 7ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体双方のフローサイトメトリー分布を示す図である。各々の場合に、結合体処理細胞をアンチT 7抗体と反応させ、次いでヤギ抗ウサギIg G F (a b) 2 - A l e x a 5 6 8シグナルを増幅して検出した。図29 Bは、A b 1およびT 7ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体で処理した精製骨髓単核細胞；またはB c rおよびT 7ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体とA b 1およびT 7ヘミペプチドに対する抗体を含んでなる結合体双方のフローサイトメトリー分布を示す図である。各々の場合に、結合体処理細胞をアンチT 7抗体と反応させ、次いでヤギ抗ウサギIg G F (a b) 2 - A l e x a 5 6 8シグナルを増幅して検出した。

10

【図30 A】それぞれT 7ヘミペプチドに結合したE r b B 2に対する抗体なしで（図30 D）、1つの抗体で（図30 C）または2つの別個の抗体（図30 A）で処理したヒト乳癌の組織切片を示す画像である。各々をT 7ヘミペプチドと結合したE r b B 2に対する2つの別個の抗体は、D P Cを介して反応性に近接させた場合にT 7ペプチドを生成した。図30 Bは、ヘマトキシリン - エオシン染色切片を示す。図30 A、30 Cおよび30 Dの各々に関して、細胞は、H R Pに結合したアンチT 7抗体で処理し、次いでチラミド - A l e x a F l u o r 5 6 8で検出した。

【図30 B】それぞれT 7ヘミペプチドに結合したE r b B 2に対する抗体なしで（図30 D）、1つの抗体で（図30 C）または2つの別個の抗体（図30 A）で処理したヒト乳癌の組織切片を示す画像である。各々をT 7ヘミペプチドと結合したE r b B 2に対する2つの別個の抗体は、D P Cを介して反応性に近接させた場合にT 7ペプチドを生成した。図30 Bは、ヘマトキシリン - エオシン染色切片を示す。図30 A、30 Cおよび30 Dの各々に関して、細胞は、H R Pに結合したアンチT 7抗体で処理し、次いでチラミド - A l e x a F l u o r 5 6 8で検出した。

20

【図30 C】それぞれT 7ヘミペプチドに結合したE r b B 2に対する抗体なしで（図30 D）、1つの抗体で（図30 C）または2つの別個の抗体（図30 A）で処理したヒト乳癌の組織切片を示す画像である。各々をT 7ヘミペプチドと結合したE r b B 2に対する2つの別個の抗体は、D P Cを介して反応性に近接させた場合にT 7ペプチドを生成した。図30 Bは、ヘマトキシリン - エオシン染色切片を示す。図30 A、30 Cおよび30 Dの各々に関して、細胞は、H R Pに結合したアンチT 7抗体で処理し、次いでチラミド - A l e x a F l u o r 5 6 8で検出した。

30

【図30 D】それぞれT 7ヘミペプチドに結合したE r b B 2に対する抗体なしで（図30 D）、1つの抗体で（図30 C）または2つの別個の抗体（図30 A）で処理したヒト乳癌の組織切片を示す画像である。各々をT 7ヘミペプチドと結合したE r b B 2に対する2つの別個の抗体は、D P Cを介して反応性に近接させた場合にT 7ペプチドを生成した。図30 Bは、ヘマトキシリン - エオシン染色切片を示す。図30 A、30 Cおよび30 Dの各々に関して、細胞は、H R Pに結合したアンチT 7抗体で処理し、次いでチラミド - A l e x a F l u o r 5 6 8で検出した。

【図31】C - 末端チオエステルを有する第一のD N A - ペプチド結合体およびN - 末端システインまたはシステイン類縁体を有する第二のD N A - ペプチド結合体を用いて天然のペプチド結合を生成するための一般的な反応スキームを示す図である。

40

【図32 - 1】脱保護T 7 __ p 1 __チオエステル合成のための代表的な反応スキームを示す図である。

【図32 - 2】脱保護T 7 __ p 1 __チオエステル合成のための代表的な反応スキームを示す図である。

【図33】天然の化学的連結による変異体Tペプチドの形成に対する、種々のミスマッチド対または異なるサイズのレポーター配列、すなわち、1つはT 7 __ p 1 - S (E t 3 M P) に結合したもの、他はT 7 __ p 2 __ C y s に結合したものの影響を示す棒グラフである。

【図34】T 7 __ p 1 - S (E t 3 M P) およびT 7 __ p 2 __ C y s の天然の化学的連結

50

、ならびにマッチド対もしくはミスマッチド対またはレポーターオリゴヌクレオチドを用いたDPCによるA431細胞系におけるEGFRホモ二量体の検出を示す棒グラフである。

【図35】T7__p1-S(Et3MP)およびT7__p2_Cysの天然の化学的連結(NCL)、またはT7__p1-S(Et3MP)およびT7__p2_MAのチオエステル交換を用いたDPCによるDNA配列の検出を示す棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0049】

本発明は、サンプル中の生物学的標的(標的分子とも称される)の検出を可能にする。生物学的標的の存在下、DPC反応は、反応生成物、適切な検出システムを用いて直接的または間接的に検出できる、例えば、完全エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質、またはリガンドを生成する。この検出システムは、1反応性生物当り複数の検出可能な部分を生成できる増幅成分を含む。次いで検出可能な部分は、視覚または適切な検出器(例えば、光学検出器、蛍光検出器、比色計、または同位体検出器)を介して検出することができる。適切な検出器は、所与のアッセイにおいて生成した検出可能な部分に依存する。

【0050】

本発明は、サンプル、例えば、組織サンプルまたは体液サンプル中の生物学的標的の存在および/または量を判定するための方法、試薬、およびキットを提供する。一般にこのアッセイシステムは、2つのプローブを含み、それらの各々は、他方にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド結合体、生物学的標的に結合するための結合性部分および前駆体、例えば、生成物前駆体またはマスク化生成物前駆体を含んでなる。これらの成分は、互いに共有または非共有結合して機能性プローブを生成することができる。このような2つのプローブをサンプルと合わせると、生物学的標的が存在する場合、この結合性部分が生物学的標的に結合し、その際、オリゴヌクレオチドは互いにハイブリダイズして生成物前駆体またはマスク化生成物前駆体および非マスク基を反応性に近接させ、反応生成物(非マスク反応生成物を含む)を生成させる。その後、適切な検出システムを用い、反応生成物の各々を用いて、各反応生成物から複数の検出可能な部分を生成することができる。

【0051】

一定の実施形態において、生成物前駆体(エピトープを欠く)は互いに反応して、検出成分、例えば、抗体により検出できるエピトープを含有する生成物を生成する。あるいは、反応生成物は、結合性部分、例えば、受容体に対するリガンドであり得るが、その前駆体は検出成分により結合されない。あるいは、反応生成物は、酵素活性化物質および/または酵素基質であり得るが、その前駆体は、酵素に対する操作性基質として活性化せず、および/または作用しない。当然のことながら、反応生成物は、合成スキーム、分解スキームまたは修飾によって作製することができる。この2つの前駆体分子自体は、互いに自然反応性があってもよいし、反応生成物を生成するためには溶液中に存在する他の試薬または触媒の存在を必要としてもよい。

【0052】

本明細書に記載された方法および組成物を使用して、注目しているサンプル中の特定の生物学的標的の存在、所望の場合は量を判定することができる。生物学的標的は、例えば、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物またはタンパク質であり得る。代表的なタンパク質としては、例えば、受容体、リガンド、ホルモン、酵素、または免疫グロブリンが挙げられる。代表的な標的としては、タンパク質複合体、細胞表面抗原、抗体、抗原、ウィルス、細菌、有機表面、膜、または細胞小器官が挙げられる。

【0053】

一定の状況下で、生物学的標的は、多量体タンパク質、例えば、ホモ二量体タンパク質、ヘテロ二量体タンパク質、または融合タンパク質であり得る。本明細書に記載されたアッセイを用いて、一定の二量体タンパク質および融合タンパク質の存在および/または量を判定することができる。さらに、本明細書に記載されたアッセイを用いて、一定の翻訳後の修飾タンパク質の存在および/または量を判定することができる。

【0054】

検出および/または定量できる代表的な多量体タンパク質としては、例えば、E r b B タンパク質ファミリーのホモおよびヘテロ二量体；V E G F 受容体のホモおよびヘテロ二量体；V E G F 二量体；P D G F 二量体；チロシンキナーゼ受容体の複合体；T N F / T N F R 複合体；カドヘリン複合体；カテニン複合体；I G F R 複合体；インスリン受容体複合体；受容体/受容体リガンド複合体（例えば、E P O / E P O 受容体）；N F - k B / I k B 複合体；T細胞抗原複合体；インテグリンタンパク質複合体；F K B P タンパク質複合体；p 5 3 タンパク質複合体；B c l ファミリーのタンパク質複合体；M y c / M a x 複合体；シクリンタンパク質複合体；細胞内タンパク質キナーゼ複合体；カスパーゼタンパク質複合体；自己抗体-抗原複合体；および分泌タンパク質複合体（例えば、アミロイドタンパク質複合体）が挙げられる。

10

【0055】

検出および/または定量できる代表的な融合タンパク質としては、例えば、B c r - A b 1；N P M - A L K；および一定のA L K 含有融合タンパク質が挙げられる。検出および/または定量できる代表的な翻訳後の修飾としては、例えば、リン酸化タンパク質（例えば、リン酸化S T A T タンパク質）；グリコシル化タンパク質；およびファルネシル化タンパク質（例えば、R A S）が挙げられる。

【0056】

当然のことながら、本明細書に記載されたプローブに関して、用語の「生物学的標的に対する結合親和性を有する結合性部分」とは、結合性部分が、生物学的標的に対して直接的または間接的に結合し得ることを意味していると解釈される。例えば、結合性部分は、生物学的標的に直接結合することができ、例えば、プローブ中の結合性部分が抗E r b B 抗体の場合は、E r b B タンパク質に直接結合する。しかしながら、また当然のことながら、結合性部分は、生物学的標的に間接的に結合してもよく、例えば、プローブの結合性部分が、例えば、ヤギ抗マウス抗体である場合、本明細書に記載された本発明の実施時に、E r b B タンパク質に結合したマウス抗E r b B 抗体は結合する。当然のことながら、後者の実施形態において、実際にE r b B タンパク質に結合する抗体は、一般に何らかの様式が異なっている（例えば、異なる供給源に由来する（例えば、1つは、マウスに由来する抗体であり、他は、ウサギに由来する抗体である）か、または異なる構造形体を有する（例えば、異なるF c 領域を有する）抗体）。

20

30

【0057】

代表的な核酸としては、D N A（例えば、ゲノムまたは相補的D N A（c D N A））またはそれらの部分、またはR N A（例えば、メッセンジャーR N A（m R N A）、トランスファーR N A（t R N A）、マイクロR N A（m i R N A）、またはリボソームR N A（r R N A）またはそれらの部分）が挙げられる。

【0058】

これらの標的は、本明細書に記載された方法と組成物とを用いて検出することができる。しかし、当然のことながら、具体的なアッセイ様式は、そのアッセイが定量的であろうと、半定量的であろうと定性的であろうと、一定の考慮事項、例えば、検出される生物学的標的、所望のアッセイ感度に依って、本明細書に記載された1つまたは複数の形体、試薬および化学を含み得る。下記の節では、代表的なアッセイ様式、試薬の考慮事項、およびアッセイの考慮事項を記載している。

40

I. 代表的なアッセイ様式

本明細書に記載されたアッセイ様式は、一般に2つ以上の生成物前駆体からの反応生成物の合成、および/または1つまたは複数のマスク化（不活性）前駆体からの反応生成物の合成を含む。

【0059】

2つ以上の生成物前駆体から反応生成物の合成を含む代表的なアッセイは、以下のとおり実施することができる。この方法は、試験するサンプルを2つのプローブと合わせることを含んでなる。第一のプローブは、（i）生物学的標的に対して結合親和性を有する第

50

一の結合性部分と、(i i) 第一の結合性部分と結合した (例えば、共有または非共有結合した) 第一のオリゴヌクレオチド配列と、(i i i) 第一のオリゴヌクレオチド配列と結合した (例えば、共有または非共有結合した) 第一の生成物前駆体とを含んでなる。第二のプロープは、(i) 生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(i i) 第二の結合性部分に結合 (例えば、共有または非共有結合) しており、第一のオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチド配列と、(i i i) 第二のオリゴヌクレオチド配列と結合した (例えば、共有または非共有結合した) 第二の生成物前駆体とを含んでなる。

【 0 0 6 0 】

生物学的標的がサンプル中に存在する場合、生物学的標的に第一および第二の結合性部分の双方を結合させる条件下でこれらのプロープをサンプルと合わせる。第一および第二の結合性部分が生物学的標的に結合する際、第一および第二のオリゴヌクレオチド配列を互いにハイブリダイズして、第一および第二の生成物前駆体を互いに反応性に近接させ、反応生成物を生成させる。反応生成物は、完全エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質またはリガンドであり得る。

10

【 0 0 6 1 】

反応生成物が得られたら、反応生成物の単一の分子が、複数の検出可能な部分を生成するように、検出可能な部分を生成できる検出システムに曝露させる。この検出システムの検出成分は、反応生成物と相互作用するが生成物前駆体と相互作用せず、増幅成分と結合して複数の検出可能な部分を生成する。検出可能な部分の存在および / または量により、

20

【 0 0 6 2 】

D P C 反応により完全エピトープを生成する場合、当然のことながら、多くの既知のエピトープおよびそれらの類縁体を、図 3 にも掲げている前述の反応を介して生成させることができる。図 1 5 はまた、エピトープに結合する抗体が市販されているエピトープのリストを提供している。幾つかの場合、有効な D P C 反応を設計して化合物を合成でき、このような化合物に対する抗体を生じさせることができる。同様の反応化学を用いて、他の反応生成物、例えば、酵素基質および抗素活性化物質などを生成することができる。

【 0 0 6 3 】

1 つまたは複数の不活性前駆体からの反応性生成物の合成を含む別の代表的なアッセイは、以下のとおり実施することができる。この方法は、試験するサンプルを 2 つのプロープと合わせることを含んでなる。第一のプロープは、(i) 生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(i i) 第一の結合性部分と結合した (例えば、共有または非共有結合した) 第一のオリゴヌクレオチド配列と、(i i i) 第一のオリゴヌクレオチド配列と結合した (例えば、共有または非共有結合した) 第一のマスク化前駆体とを含んでなる。第二のプロープは、(i) 生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(i i) 第二の結合性部分に結合 (例えば、共有または非共有結合) しており、第一のオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチド配列と、(i i i) 第二のオリゴヌクレオチド配列と結合した (例えば、共有または非共有結合した) 非マスク基とを含んでなる。生物学的標的がサンプル中に存在する場合、その生物学的標的に第一および第二の結合性部分を結合させる条件下で、このサンプルとプロープとを合わせる。結合性部分が生物学的標的に結合する場合、第一および第二のオリゴヌクレオチド配列は互いにハイブリダイズし、非マスク基をマスク化生成物前駆体との反応性に近接させて反応生成物 (非マスク化反応生成物) を生成させる。

30

40

【 0 0 6 4 】

反応生成物が得られたら、反応生成物の単一の分子が複数の検出可能な部分を生成するように、検出可能な部分を生成できる検出システムに曝露させる。次いで検出可能な部分の存在および / または量を用いて、サンプル中の生物学的標的の存在および / または量を判定することができる。

【 0 0 6 5 】

50

当然のことながら、マスク化前駆体は、マスク化エピトープ、マスク化酵素基質、マスク化酵素活性化物質またはマスク化リガンドであり得る。反応時に、マスク基が除去されて、非マスク化生成物、例えば、非マスク化エピトープ、非マスク化酵素基質、非マスク化酵素活性化物質または非マスク化リガンドが生成する。

II. 試薬およびアッセイ条件

当然のことながら、具体的なアッセイでは、本明細書に開示された多数の試薬およびアッセイ条件を使用することができる。例えば、リガンド - 受容体アセンブリとも称される本明細書に記載されたプローブは、例えば、図 1 に示されたような単一の分子、または図 2 に示されたような互いに非共有結合して機能性プローブを生成する複数の分子であり得る。

10

【0066】

図 1 に示された反応生成物は、完全エピトープを含有するペプチドである。しかしながら、本明細書に記載された他の反応生成物に関して同じ原理を適用できる。本様式において、このアッセイでは、所望のエピトープの前駆体（前駆体 1 および前駆体 2 と示す）の各々が、オリゴヌクレオチド（それぞれレポーター核酸と補体とで示す）と結合する 2 つのリガンド - レポーターアセンブリ 100 と 120 とを使用する。さらに、各リガンド - レポーターアセンブリは、標的分子 140 上の対応する結合部位（それぞれ B_1 と B_2 とで示す）に結合する結合性部分（それぞれ L_1 と L_2 とで示す）を含有する。この結合性部分は、標的に対して結合親和性を有する抗体、アドネクチン、アプタマー、または他の分子を含むことができる。核酸標的の検出に関して、結合性部分は、標的核酸配列またはその部分に相補的なヌクレオチド配列であり得る。このように、標的はまた、核酸または 2 つの結合部位を有する任意の他の分子でもあり得る。

20

【0067】

本アッセイ時に、リガンド - レポーター複合体の 2 つの結合部位（ L_1 と L_2 ）は、標的上の対応する結合部位 B_1 と B_2 の各々に結合する。生物学的標的に依って、当然のことながら、 L_1 および L_2 は、同じであっても異なってもよい。「レポーター DNA 配列」および「補体」は、核酸、例えば、長さが一般に短く、好ましくは 4 ~ 25 の塩基、より好ましくは 8 ~ 15 の塩基であり、互いに相補的または実質的に相補的である DNA 配列を表す。標的に結合した場合、2 つのアニールした核酸配列を含有するハイブリッドの融解温度（ T_m ）が、典型的には、使用される緩衝系において幾らか周囲温度（ T_m ）超であるように、核酸の長さ、塩基組成、および相補的配列の程度が選択される。標的に対する結合の非存在下、2 つのアニールした核酸配列を含有するハイブリッドの T_m は、周囲温度未満である。

30

【0068】

図 1 に記載されたアッセイ様式において、オリゴヌクレオチド配列は、任意のスペーサー（Sp 1、Sp 2、Sp 3 および Sp 4 と示す）および / またはクロスリンカー（CL と示す）を介して結合性部分および前駆体と共有結合している。種々のヘテロ二官能性クロスリンカーを用いて、リガンド - 受容体アセンブリを合成することができる。以下のものが最も一般的に用いられる：1）スクシイミジル - 4 - （N - マレイミドメチル）シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート（SMCC）などのアミン反応性およびスルフヒドリル反応性クロスリンカー；2）化合物を含有するヒドラジン / ヒドロキシルアミンおよびマレイミド / ヨードアセテート官能基などのアルデヒド反応性およびスルフヒドリル反応性クロスリンカー；3）化合物を含有するヒドラジン / ヒドロキシルアミンおよびスクシイミジル官能基などのアルデヒド反応性およびアミン反応性クロスリンカー（例えば、Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*, Academic Press 1996 年を参照）。前駆体を核酸に結合させるために通常、例えば、前駆体を、カルボン酸基により官能化し、次いでアミン含有 DNA と反応させる。アルデヒド基およびスルフヒドリル基などの他の官能基もまた、核酸に組み込むことができる。幾つの場合、前駆体は、例えば、それぞれヒドラゾン / ヒドロキシルアミン基およびマレイミド基により官能化することが好ましい。

40

50

【0069】

S p 1 および S p 2 は、結合性部分 (L_1 と L_2) がそれらの標的に結合する間に、レポーター核酸および補体が互いにアニールできるように、標的上の結合性部位 (例えば、 B_1 と B_2) 間の距離にまたがる十分な長さを加えるように設計されるさらなる任意の分子スペーサーを表す。S p 1 および S p 2 は、レポーターを有する DNA の単一片として合成された DNA モノマーまたはオリゴマーそれら自体を含む DNA オリゴヌクレオチドであり得る。しかしながら、スペーサーは、標準的な合成化学を用いて組み込むことができるエチレングリコールオリゴマーなどの他の基を含有することもできる。エチレングリコールのスペーサーはその配列に可撓性と親水性とを付与することから、有用であることが多い。S p 3 および S p 4 はまた、前駆体分子の反応性を妨げる何らかの立体障害を防ぐための任意のスペーサーでもある。

10

【0070】

前駆体 1 および前駆体 2 は、2 種の反応性 (例えば、交差反応性) 化学種、例えば、反応して反応生成物を生成する小型の分子である。結合性部分 L_1 と L_2 とが標的上の対応する結合性部位に同時に結合した後、局在化した高濃度のリガンド・レポーター基は、レポーター核酸と補体とを、互いにアニールさせ (T_m を上昇させ)、前駆体を互いに反応性に近接させるとバルク溶液中よりも高濃度になる。反応性前駆体が反応して、反応生成物には結合するが、2 つの開始前駆体には反応しない抗体 (AB と示す) により検出できる生成物が生成する。図 1 は、合成反応の 1 つのタイプを例示しているが、この反応がエピトープ・結合部分により認識される生成物を作製するという条件で、実際の機構は異なる可能性がある。あるいは、アッセイ様式および反応生成物に依って、反応生成物は、例えば、酵素、リガンドまたは受容体により認識される。この反応は、同時に生じ得るか、または生成物の合成を促進させるために溶液中に存在する 1 つまたは複数の反応物、補因子、または触媒を必要とし得る。

20

【0071】

一定の状況下、5' 末端および 3' 末端において 2 つの異なる官能基を有し、それらの双方は、互いに反応してはならないが、それでも固相 DNA 合成および DNA 開裂条件を可能にしなければならない核酸を必要とするために、単一分子のアセンブリは困難であり得る。5' 官能基が、溶液中で DNA に組み込む必要がある場合、3' 官能基に交差反応しないヘテロ二官能性クロスリンカーを使用することができる。

30

【0072】

一アプローチにおいて、プローブは、2 つ以上の別個のピースとして合成することができ、次いでそれらをアセンブルして (例えば、非共役結合により) 官能性リガンド・レポーターアセンブリを生成できる。これは、各結合性部分をいわゆるジップコード配列に結合させ、別に前駆体分子を相補的なアンチジップコード配列に結合させることにより実施できる (図 2 を参照)。2 ピースのリガンド・レポーターアセンブリでは、1 つのリガンド受容体アセンブリ (標的結合性成分と示す) は、ジップコード DNA (ジップコードと示す)、任意のスペーサー (S p と示す) および任意の架橋剤 (C L) を有するオリゴヌクレオチドと結合した結合性部分 (リガンド) を含んでなる。他のリガンド受容体アセンブリ (レポーター成分と示す) は、任意のスペーサーと共にアンチジップコード DNA 配列 (アンチジップコードと示す) に結合しているレポーター核酸 (例えば、DNA) と結合した生成物前駆体 (使用される化学に依ってマスク化生成物前駆体であり得る) を含んでなる。しかし当然のことながら、具体的なアッセイに依って、レポーター成分におけるこれら要素の順序は、変わり得る。例えば、その順序は、例えば、アンチジップコード・レポーター核酸・前駆体または、例えば、レポーター核酸・アンチジップコード・前駆体などを含み得る。

40

【0073】

互いに相対的に高い T_m でアニールするが、ジップコードとアンチジップコードの第二の対に対してもレポーター核酸配列に対しても有意にアニールしないようにジップコード配列とアンチジップコード配列の各対を設計する必要がある。単一の自己アセンブル化種

50

の各々は、標的結合性部分、レポーター配列、および前駆体に非共役結合するが、典型的な反応条件下の溶液中で安定である。

【0074】

ジップコード配列とアンチジップコード配列は、典型的にはレポーター核酸およびその補体よりも長く、より安定な二重鎖を形成する。このことは、完全に相補的でレポーター核酸よりも長くするようにジップコード配列とアンチジップコード配列を設計することにより達成することができる。典型的なジップコード配列とアンチジップコード配列は、長さが15~25の塩基である。ジップコードは、一般にDNAからなるが、任意のタイプの核酸(DNA、RNA、PNA、LNA)であり得る。アッセイが、2つのリガンド-レポーターアセンブリを必要とする場合(図1を参照)、このようなアッセイは図2に示されるように、2つの標的結合性成分および2つのレポーター成分を一般に必要とする。ジップコード配列およびアンチジップコード配列は、各対が、互いに対してだけアニールするが、他のジップコードまたはアンチジップコードにも、いずれのレポーターDNA配列のいずれにもアニールしないように選択される。これらの設計条件下で図1に例示されたアッセイは、十分なレポーター成分が標的結合成分に対してアニールされることだけを必要とする。2ピースのリガンド-レポーターアセンブリ(すなわち、プローブ)はまた、予備アセンブルし、所望の場合は精製して反応混合物に添加することができる。

【0075】

一定の実施形態において、このアッセイは、同一であっても同一でなくてもよい2つの結合性部位を有する生物学的標的の検出に有用である。一般に、本明細書に記載されたアッセイは、2つのリガンド-レポーターアセンブリを使用し、それらの各々が、(1)標的の結合性部位に対する結合性部分;(2)対の各々が、対の他方のレポーター配列に相補的または実質的に相補的なレポーター核酸配列;および(3)生成物前駆体、マスク化生成物前駆体または非マスク基、を含む。双方の結合性部分がそれらの標的に結合すると、局在化したより高濃度のアセンブリにより、より高い T_m および核酸二重鎖の形成に至る。

【0076】

プローブに用いられた結合性部分は、同定される標的分子に依って変わり得る。検討されたように、本明細書に記載されたアッセイシステムを用いてサンプル中の種々の生物学的標的を検出できる。このアッセイは、タンパク質多量体、例えば、タンパク質二量体、融合タンパク質およびグリコシル化タンパク質を検出するのに特に有用である。種々の結合性部分、例えば、抗体、アフィボディ、アドネクチン、リガンド、受容体、アプタマー、および当業界に知られた他の結合分子を、本発明の実施に使用することができる。標的に依って、リガンド-レポーターアセンブリの各々に使用される結合性部分は、同じであっても異なってもよい。

【0077】

例えば、本発明は、融合タンパク質(例えば、BCR-ABL)、受容体ホモ二量体およびヘテロ二量体(例えば、ErbB受容体ファミリーのホモ二量体およびヘテロ二量体、例えば、ErbB2(HER2)ホモ二量体、ErbB1(EGFR)ホモ二量体、EGFR/ErbB2ヘテロ二量体など)、および複数サブユニット含有タンパク質(例えば、PDGF)の検出に特に有用である。例えば、標的がEGFR/ErbB2ヘテロ二量体である場合、結合部分の1つは、EGFRを結合するように選択され、他の結合部分は、ErbB2を結合するように選択される。

【0078】

ヘテロ二量体タンパク質PDGF-ABの検出のための代表的なアッセイ様式が、図2に示してある。本アッセイにおいて、PDGF-ABヘテロ二量体は、固体支持体、例えば、ELISAプレートのウェルの表面上に捕捉される。その後、PDGF分子を、図2に示されたタイプの2つのリガンド-レポーターアセンブリに曝露させる。第一の標的結合性成分(標的結合性成分1と示す)は、ジップ3配列に結合したアンチPDGF-A抗体を含んでなり、ヘテロ二量体のサブユニットAに結合する。第二の標的結合性成分

(標的結合性成分 2 と示す) は、ジップ 2 配列に結合したアンチ PDGF - B 抗体を含んでなり、ヘテロ二量体のサブユニット B に結合する。第一のレポーター成分 (レポーター成分 1 と示す) は、ジフェニルホスフィンに結合したアンチジップ 3 配列を含んでなり、このアンチジップ 3 配列は、プローブ 1 のジップ 3 配列にアニールする。第二のレポーター成分 (レポーター成分 2 と示す) は、ローダミン前駆体に結合したアンチジップ 2 配列を含んでなる。レポーター成分の各々においてレポーター配列 (レポーター 1 およびレポーター 2) のハイブリダイゼーションにより促進されて、レポーター成分 1 がレポーター成分 2 との反応性に近接すると、ローダミン前駆体は還元されてローダミングリーンを生成する。ローダミングリーンの存在は、ローダミングリーンに結合するが、ローダミン前駆体には結合しない抗フルオレセイン抗体 - HRP 結合体を用いて検出することができる。HRP は、基質 (TMB) を発色された検出可能な部分に変換する。

10

【0079】

当然のことながら、反応生成物はエピトープではなくて、例えば、酵素基質または酵素活性化物質でもあり得る。代表的な酵素基質 (ビオチンリガーゼペプチド) の合成は、実施例 2 に記載されている。図 9 に示されているように、操作性ビオチンリガーゼ基質を、2 つの非操作性ヘミペプチドから完全操作性ペプチドの DPC 媒介合成により作出する。合成後、ビオチンリガーゼは、ビオチン分子をペプチドに加えた。次いでビオチンを、酵素 (増幅成分) に結合したアンチビオチン分子 (検出成分) を含有する検出システムを用いて検出することができる。変異リボヌクレアーゼを活性化するための操作性酵素活性化物質、S-13 ペプチドの合成を、実施例 4 に記載している。

20

【0080】

DPC が、反応生成物、例えば、エピトープ、酵素基質または酵素活性化物質の新規合成を促進させるアッセイ様式に加えて、当然のことながら、1 つまたは複数のマスク基を含有するマスク化生成物前駆体から反応生成物を生成することができる。DPC 時にマスク基は除去される。例えば、DPC 時に、脱マスク剤を、1 つまたは複数のマスク基を含有するマスク化生成物前駆体との反応性に近接させる。その結果、マスク基は、1 つまたは複数のマスク基を含有する前駆体から除去される。代表的なアッセイ様式は、実施例 1 に記載している。実施例 1 において、アジド修飾リシンを含有する修飾 BLP は、ビオチンリガーゼによるビオチン化に対してブロックされる。アジド基は、DPC により還元されて第一級アミノ基を生成する。次いで非マスク化 BLP は、ビオチンリガーゼに対する基質として作用することができる。

30

【0081】

当然のことながら、操作性エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質またはリガンドの形成を可能にする任意のタイプの DPC 媒介化学反応を、本発明の実施に使用することができる。しかしながら、増幅処理時により高いシグナル/ノイズ比を得るために、DPC 反応は、クリーンで迅速かつ定量的であることが好ましい。有用な DPC 反応の例としては以下のものが挙げられる: 1) 1 - エチル - 3 - [3 - ジメチルアミノプロピル] カルボジイミド塩酸塩 (EDC) を介したアミド結合またはシステインアミノ酸残基またはシステイン類縁体を含んでなるエピトープに対するチオエステル (NCL) を介した天然の化学的連結 (Dawson, P E ら、Science, 1994 年、266、776 - 779 頁)、2) アミン触媒存在下でのアルドール縮合、3) ホスホロチオエステル結合 (Xu ら、J. Am. Chem. Soc., 2000 年、122、9040 - 9041 頁)、および 4) チオエステル/チオエーテルペプチド結合のアイソスター連結。チオエステル置換により、エピトープ反応性断片の末端アミノ酸の窒素原子は硫黄原子と効率的に置き換わる。

40

【0082】

理論に拘束されることは望まないが、ペプチドベースの反応生成物の合成に使用する連結法を判定する際に以下の一般的ガイドラインが使用できることが考慮されている。例えば、一般に EDC / s NHS 媒介アミド結合形成反応は、実施例 2 に記載されているように、嵩高いアミノ酸側鎖による立体障害に鋭敏であるため、この化学は、連結反応に関与

50

するアミノ酸のうちの少なくとも1つがグリシンである場合に最も好適である。E D C / s N H S は、A s p、G l u、L y s、またはT y rを含有するペプチド、あるいはC - 末端ヘミペプチド中に3つ以上連続したH i sを含有するペプチドには最適とは考えられない。例えば、一般に天然の化学的連結は、実施例12に記載されているようなC - 末端ヘミペプチドにおけるようにN - 末端システイン残基の存在を必要とする。C y s含有ペプチドが、特定の結合性部分に対する結合親和性を保持することを判定しなければならない。一般に、チオエステル結合の形成には、C - 末端ヘミペプチドのN - 末端が、A l a、G l y、H i s、I l e、L e u、P h eまたはT r pであることが必要である。ペプチドがC y sを含有する場合にチオール交換副反応を妨げるため、チオエステル結合の形成を用いてはならない。

10

【0083】

当然のことながら、反応生成物（例えば、完全エピトープを含有する生成物、酵素基質、酵素活性化物質またはリガンドである生成物）の生成には、その反応を促進させるために溶液中に追加の試薬または反応物が必要であり得る。そうした場合、それらを過剰の濃度で提供できる。アッセイ様式に依って、またこのアッセイが、定性的ではなくて定量的または半定量的であることに依って、生成物前駆体および非マスク基は、律速である必要があると考えられる。反応濃度は、反応生成物（例えば、エピトープ）の量、したがってアッセイで生じたシグナル量が、サンプル中の生物学的標的量に直接比例するように提供されることが好ましい。

20

【0084】

しかし当然のことながら、天然の化学的連結の場合、反応生成物（例えば、ペプチド）を自然に合成される。その結果、一定の状況下での生成物前駆体は、生物学的標的に対する結合性を欠いていても互いに反応し得る。これは、多くのアプローチを用いることによって減少または除去することができる。実施例13は、ミスマッチを導入するか、または長さの異なる配列を用いることによってリガンド - レポーターアセンブリのレポーターオリゴヌクレオチド部分のT_mを（例えば、約8 から約25 、より好ましくは約9 から約20 の範囲で）低下させることにより達成することができるという利点を記載している。これらのアプローチの各々は、検出システムの特異性を改善するために見出された。

30

【0085】

以下の実施例は、種々の実施形態およびそれらの等価体において本発明の実施に適應させることができる重要なさらなる情報、例証および指針を含有する。本発明の実施は、以下の実施例からさらに十分に理解されるであろうが、これらは、例示のみを目的として本明細書に提示されており、決して限定するものとして解釈してはならない。

【実施例】

【0086】

実施例1は、ビオチンリガーゼのマスク化ペプチド基質を非マスク化して酵素に対する操作性基質になる試験系を記載している。実施例2は、ペプチド断片が互いに連結して操作性酵素基質を生成する実験を記載している。実施例3は、ペプチド断片が、互いに連結して完全エピトープを生成する実験を記載している。実施例4は、酵素活性化物質の合成に関連する実験を記載している。実施例5および6は、反応生成物が、完全エピトープを含有する小型の分子である実験を記載している。実施例7は、E G F R二量体を検出するためのアッセイ様式を記載している。実施例8は、E G F R二量体およびE r b B 2二量体を検出するためのアッセイ様式を記載している。実施例9は、B c r - A b 1融合タンパク質を検出するためのアッセイ様式を記載している。実施例10は、C M L由来の細胞系および骨髓サンプル中のB c r - A b 1を検出するためのアッセイ様式を記載している。実施例11は、乳癌組織中のE r b B 2ホモ二量体を検出するためのアッセイ様式を記載している。実施例12は、N C Lによるエピトープを含有するペプチドの生成を記載している。実施例13は、反応生成物が、N C Lにより作製されるアッセイの特異性を増加させるアプローチを記載している。実施例14は、N C L時に生成することができる代表

40

50

的なヘミペプチドを記載している。実施例 15 は、NCL を用いた EGF R ホモ二量体を検出するためのアッセイ様式を記載している。実施例 16 は、NCL に有用なペプチドを作製するためのさらなる反応スキームを記載している。実施例 17 は、アミド結合アイソスターを含有する T7 ペプチドの形成を介して DNA 標的を検出するためのアッセイ様式を記載している。

【0087】

実施例に記載されたオリゴヌクレオチドは、標準的なホスホラミダイト化学 (Glen Research, Sterling VA、米国) を用いて調製し、逆相 C18 クロマトグラフィーにより精製した。5' - アミノ基を有するオリゴヌクレオチドは、5' - アミノ - モディファイヤー 5 制御ボアガラス (アンチジップオリゴ) または 5' - アミノ - モディファイヤー C6 制御ボアガラス (ジップオリゴ) を用いて調製し、3' - アミノ基を有するオリゴヌクレオチドは、3' - アミノ - モディファイヤー C7 CPG (Glen Research, Sterling VA、米国) を用いて調製した。実施例に用いられた種々のオリゴヌクレオチドは、表 1 に示してある。

【0088】

【表 1】

表 1

オリゴ	配列(5' + 3')	配列番号
ジップ 2	TTGGTGCTCGAGTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC-NH ₂	62
ジップ 3	NH ₂ -CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGCTGCCATCGATGGT	63
ジップ 5	NH ₂ -CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGCTGCCATCCATAGTCAG	64
ジップ 2 ジップ 5	NH ₂ -TTGGTGCTCGAGTCCCCCCCCGCTGCCATCCATAGTCAG	65
アンチジップ 2 受容体	GGACTCGAGCACCAATAC-X-TATAAATTCG-NH ₂	66
アンチジップ 3- 受容体	NH ₂ -CGAATTTATA-X-CTGACCATCGATGGCAGC	67
アンチジップ 5 受容体	NH ₂ -CGAATTTATA-X-CTGACTATGGATGGCACG	68

表中 X は、スパーサーホスホラミダイト 18(Glen Research, Sterlind VA、米国)である

実施例 1 : ビオチンリガーゼペプチド - ビオチン化部位の非マスク化

ビオチンおよび ATP の存在下、ビオチンリガーゼは、ビオチン分子をビオチンリガーゼにより認識されたペプチド配列に存在するリシン残基に特異的に付加する。より大きな配列の一部であり得るビオチンリガーゼペプチドとして知られているビオチンリガーゼに対する基質は、配列 L X₁ X₂ I X₃ X₄ X₅ X₆ K X₇ X₈ X₉ X₁₀ を含むことができ、式中、X₁ は、任意のアミノ酸であり；X₂ は、L、V、I、W、F、Y を除く任意のアミノ酸であり；X₃ は、F、L であり；X₄ は、E、D であり；X₅ は、A、G、S、T であり；X₆ は、Q、M であり；K は、リシンであり；X₇ は、I、M であり；X₈ は、E、L、V、Y、I であり；X₉ は、W、Y、V、F、L、I であり；X₁₀ は、D、E ではなくて、好ましくは R、H である (Beckett ら、(1999) A minimal Peptide Substrate in Biotin Holoe nzyme Synthetase - catalyzed Biotinylation、Protein Science、8、921 - 929 頁)。ペプチドがビオチン化されたら、ビオチン分子の存在は、一般に当業界に使用されるアビジンまたはストレプトアビジンなど、結合性部分を含有するレポーター分子を用いて検出できる。

【0089】

アジド修飾リシンを含有する修飾 BLP を、ビオチンリガーゼによるビオチン化に対し

てブロックする。アジド基は、ビス(ジフェニルホスフィン)などの還元剤の存在下で第一級アミノ基に還元することができる(図4)。あるいは、リポ酸およびリポアミドなどの他の試剤を用いてアジド基を第一級アミノ基に還元することができる。

【0090】

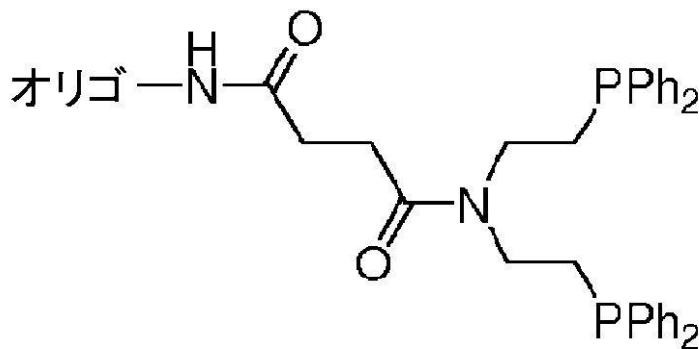
図4は、前述の図2に示されたように2成分のリガンドレポーターアセンブリ(プローブ)のアンチジップコード・レポーターオリゴヌクレオチド・前駆体の結合体における生成物前駆体部分(すなわち、レポーター成分の生成物前駆体部分)を表す。共有結合の前駆体種が、アミノ酸配列LGGIFEAMKMLH(配列番号1)を含有したオリゴヌクレオチド・ペプチド結合体を合成し、式中、リシン残基(K)を、リシン末端側鎖のイプシロンアミン上のアジド基により修飾した(図4を参照)。Fmoc-Lys-OHのイプシロンアミンを、最初にアジドFmoc-Lys-OHに変換し、次いで標準的なFmoc固相方式を介してBLPに結合した。アジドBLPを、ヒドラゾンを経由してオリゴヌクレオチド(DNAと示す)に結合した。手短かに言えば、Fmoc保護6-ヒドラジニルニコチン酸とアジドBLPとの結合を経由してヒドラジン官能基を組み込み、図5に示されるように、アルデヒド官能基をアミン含有オリゴヌクレオチドに付加した。さらにN-Fmoc-アミノ-dPEG2-酸のBLPへの結合によりアジドBLPとDNAとの間に、ポリエチレングリコール(PEG)スペーサーを組み込んでその可撓性を増加させた(図5を参照)。第二のプローブ上で、ビスジフェニルホスフィン(ビスジPhp)を、標準的なアミド結合形成を経由してオリゴヌクレオチドに結合させて式Iの化合物を生成させた。

10

20

【0091】

【化1】



30

式 I

40

第一のアンチジップコード・レポーターオリゴヌクレオチド前駆体の結合体は、18塩基アンチジップのオリゴヌクレオチド配列、10の塩基オリゴヌクレオチドレポーター、およびアジド修飾ペプチドを含有した。

【0092】

50 mMのリン酸ナトリウム、pH 8中で30分間、30℃で4 mMのTCPEP存在下、第一のオリゴペプチド結合体を非還元または還元状態で試験した。還元後、この結合体は、ビオチン、ATP、ならびに緩衝液(「BioMix A」および「BioMix B」)(Avidity, Inc., Aurora, CO)および2 μgのビオチンリガゼ(Avidity, Inc., Aurora, CO)の反応混合物20 μL中、30

50

で1時間インキュベートした。

【0093】

アジド基が、第一級アミンに還元されると、このアミノ基は、ビオチンリガーゼにより認識され、ATPおよびビオチンの存在下、ビオチンにより置換され得る。リシン上のビオチンの存在を、図6に記載されたアッセイ様式により検出した。具体的には、この結合体を、固定化ジップコードのオリゴヌクレオチドを含有するELISAプレート（固体支持体）上で捕捉し、ストレプトアビジン-HRP結合体を用いて検出した（図6を参照）。

【0094】

手短に言えば、ELISAプレートは、PBS緩衝液中、ヤギ抗マウス抗体（Pierce、Rockford、IL）に次いで1：1000希釈の1mg/mLのマウスモノクローナル抗フルオレセイン抗体（Roche Molecular systems、Pleasanton、CA）の100μLで置換された第一のコーティングELISAプレートウェルにより調製した。洗浄後、抗フルオレセイン抗体の同定を開始させるために、このウェルを、6カルボキシ-フルオレセインにより5'末端が標識された10ピコモルのジップ2オリゴヌクレオチドと共にさらにインキュベートした。次にTCEPにより還元されないかまたは還元されたビオチン-リガーゼのオリゴヌクレオチドペプチド結合体（アジド置換された）をインキュベートし、固定化ジップ2捕捉オリゴヌクレオチドにアニールした。結合体上のビオチンの存在は、1：4000希釈の1mg/mLのストレプトアビジン-HRP結合体（Molecular Probes、Carlsbad、CA）とのインキュベーションにより検出した。このウェルを洗浄し、TMB基質（KPL、Gaithersburg、MD）の存在下で発色させた。この結果を図7に要約してある。

【0095】

TCEPでインキュベートすることによってリシン残基が非マスクされた結合体に関してのみ、陽性応答が見られた。次いで非マスクリシンは、ビオチンリガーゼによりビオチン化した。

【0096】

リシンの - アミノ基をマスク化する別の方法は、4-アジドベンジル-4-ニトロフェニルカルボネートを用いて、4-アジドベンジロキシカルボニルで - アミンを保護する（Mitchinsonら、1994年、J. Chem. Soc. Chem. Commun. 2613-2614頁）。アジドの化学的還元により、イミノキノンの中間体を介して自然断片化を受けた4-アミノベンジルカルバメートを生成する（Griffinら、1996年、J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1205-1211頁）。前の方法よりもこの方法の利点としては、脂肪族アジドよりも芳香族アジドの還元が容易であること、およびBLP-オリゴの合成後に保護基が取込み得ることから、不安定なヒドラゾン結合の還元的アミノ化を介して安定な結合形成を含む。4-アミノベンジルカルバメートのBLP-オリゴを生成するための一般的な合成経路は、図8に示してある。手短に言えば、水性塩酸中、4-アミノベンジルアルコールのジアゾ化-アジド化により、4-アジドベンジルアルコールが得られ、さらにこれは、4-ニトロフェニルカルボノクロリデートによる反応を受けて4-アジドベンジル-4-ニトロフェニルカルボネートが得られた（2ステップで80%収率）。次に4-アジドベンジル-4-ニトロフェニルカルボネートをNaCNBH₃と反応させ、BLP-オリゴを還元して4-アジドベンジロキシカルボニル保護のlys BLP-オリゴを生成した。

【0097】

リシンの - アミノ基または他のアミノ基をマスクするさらに別の方法は、チオ（フェニル）エチルカルバメートなど、メチオニンおよび類縁体基による保護である。この実施形態において、結合体の1つは、メチオニンまたはその類縁体で保護されたアミノ酸側鎖のアミン基を有する前駆体を含む。他の結合体は、ヨードアセトアミドなど、反応性ヨウ化アルキル基を有する前駆体を含む。2つの前駆体を、DPCにより反応性に近接させる

(例えば、それぞれの結合体上の相補的レポーター核酸の結合により)と、メチオニンが開裂して遊離アミンが残る。メチオニンまたはチオ(フェニル)エチルカルバメートの遊離アミン基への付加およびヨードアセトアミドの遊離アミンへの付加に関する化学は、当業界に周知である。

【0098】

1つの前駆体上のヒスチジン側鎖をブロックする方法は、2,6-ジニトロフェニルを用いて達成できる(Shaltiel, S.ら、1970年Biochemistry、9:5122-27頁)。この前駆体を有する結合体を、チオール基を有する前駆体がある別の結合体との反応性に近接させると、ヒスチジンは脱保護される。この脱保護法は、完全長Streptag(WSH PQFEG-配列番号69)または切断Streptag(H PQFEG-配列番号70)を利用する場合に有用である。いずれの前駆体に関しても、ヒスチジン側鎖の保護は、Streptactin結合をブロックする。脱保護によりStreptactin結合が回復する。

実施例2: 酵素基質を作製するためのペプチド断片の連結

本実施例は、DPCによる前駆体断片からの合成(連結)後の操作性酵素基質の検出を記載する。

(i) ビオチンリガーゼペプチド

本アプローチの操作可能性は、BLPを用いて立証されている。このペプチドの酵素認識に関する最少要件としては、ペプチド中の単ーリシン上の遊離の第一級アミノ基に関する要件など、各部位に指定された特定のアミノ酸を有する最少の長さである13のアミノ酸(実施例1に示すBLP配列を参照)が挙げられる。13の残基よりも短い断片は、通常ビオチンリガーゼにより認識されない。

【0099】

図9に示されるように、DPCベースの検出アッセイは、各々がビオチンリガーゼペプチドの部分長の断片(前駆体)を含有する2つのリガンドレポーターアセンブリに基づくことができる。Hermanson、Greg T.、Bioconjugate Techniquesの170頁(Academic Press、San Diego、1996年)に記載されているように、1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩(EDC)の存在下、N-末端断片のカルボキシ末端とC-末端断片のアミノ末端とを一緒に結合させることができる。他の2つの末端は、アミドとしての合成により、または図10に記載された試験系に示されるように、フルオレセイン残基によりブロックすることができる。

【0100】

図9に例示されるように、注目のサンプルを、100と120とで示された2つの単一分子のリガンドレポーターアセンブリと合わせる。リガンドレポーターアセンブリ100は、ビオチンリガーゼに対する基質の第一のペプチド断片(N-末端ペプチド断片と示す)に結合する第一のオリゴヌクレオチド配列(レポーター核酸と示す)に結合した標的140に対して結合親和性を有する第一の結合性部分(L₁と示す)を含有する。第二のリガンドレポーターアセンブリ120は、第一のオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズでき、ビオチンリガーゼに対する基質の第二のペプチド断片(C-末端ペプチド断片と示す)に結合する第二のオリゴヌクレオチド配列(補体と示す)に結合した標的140に対して結合親和性を有する第二の結合性部分(L₂と示す)を含有する。標的140の存在下、第一および第二双方のリガンドレポーターアセンブリは標的に結合するが、その際、第一のオリゴヌクレオチド配列(レポーターDNA)および第二のオリゴヌクレオチド配列(補体)が互いにハイブリダイズして、N-末端ペプチド断片とC-末端ペプチド断片とを反応性に近接させる。

【0101】

EDCの存在下、ペプチドが一緒になって結合して遊離リシン側鎖を含有する完全長ペプチドを生成する。C-末端断片に存在するリシンは、連結前にATPおよびビオチンの存在下でビオチンリガーゼによりビオチン化されない。対照的に、ペプチド断片の連結後

、A T Pおよびビオチンの存在下でビオチンリガーゼにより遊離のリシンがビオチン化されるペプチドが生成する。

【0102】

図10は、ビオチンリガーゼによりビオチン化できる基質を生成するために、E D Cの存在下で連結できる2つのヘミペプチドのアミノ酸配列を例示している。N - 末端ヘミペプチド(L G G I F E - 配列番号2)は、フルオレセインでブロックされたそのN - 末端基を有し、C - 末端ヘミペプチド(A M K M V L H - 配列番号3)は、アミド基でブロックされたそのC - 末端を有する。E D Cの存在下で反応性の可能性のある他の基は、グルタメートのカルボキシル側鎖(E)およびリシンのイプシロンアミノ基(K)だけである。連結の反応速度は、ペプチド断片の濃度に依存し、したがって、D P Cベースアッセイにおいて、ペプチド断片の局在化された濃度増大が、完全長ビオチンリガーゼペプチドの形成のための反応速度を大いに増加させることが予想され、次いでそれをビオチンリガーゼによりビオチン化できる。

10

【0103】

この連結反応に関して、連結生成物(N - 末端ペプチド上のN - 末端フルオレセインにより完全連結されたペプチド)が、抗フルオレセイン抗体でコーティングされたプレート上で捕捉されるE L I S Aアッセイを開発した。50 μ Lのペプチド混合物(2.5 mM)を、0.1 MのM E S緩衝液、p H 6.5中、1 mg / mLのE D Cの存在下または非存在下、25 で1時間インキュベートした。次に5 μ Lの各混合物を、抗フルオレセイン抗体を含有するE L I S Aプレートのウェルに加えた。次いで、100 μ Lのビオチン化反応混合物(実施例1に記載した)を、各ウェルに加え、30 で1時間インキュベートして固定化リガンドペプチドをビオチン化した。この結果を図11に示す。

20

【0104】

2つの断片ペプチド(各々が完全長ビオチンリガーゼペプチドの半分の長さ)のE D C触媒結合の生成物は、ビオチンリガーゼによりビオチン化されたが、E D Cの非存在下では非結合ペプチドはビオチン化されなかったことが分かった(図11を参照)。反応速度は0.1 mg / mLのE D Cよりも1 mg / mLのE D Cの存在下の方がより速く、また、より高濃度のペプチドの存在下の方がより速かった(すなわち、反応速度は、0.25 mMのペプチドよりも2.5 mMのペプチドの存在下の方がより効率的であった)。結合生成物から得られるシグナルの量(450 nmにおける吸光度)は、2.5 mMに比較して、0.025 mMのペプチド断片投入濃度ではより少なかった(E D C濃度は同一)。これらの結果は、完全長結合生成物の収量はおよそ10%であったことを示している。反応速度は、高濃度のペプチドでは増加し、溶液中、遊離状態の触媒の存在下で生じ得ることを、このアッセイは示している。

30

【0105】

一定の状況下で、E D C化学はカルボキシル基およびアミノ基の結合に関して非特異的であり、したがって一定の状況下で、ペプチド内の第一級アミンとカルボキシルの可能な全ての対のランダムな結合をもたらし得る。ビオチンリガーゼペプチドの場合、必ずしも全ての架橋が所望のN末端とC末端との間に位置するとは限らず、N末端ヘミペプチドにおけるグルタミン側鎖カルボキシルからカルボキシル末端ヘミペプチドにおける重要なりシン残基のアミノ末端への架橋も含み得る。結合のこの非特異性により、所望の完全長、非ブロックペプチドの収量の減少に至り得る。

40

実施例3：エピトープ作出のためのペプチド断片の連結

本実施例では、ペプチド前駆体からのD P Cにより作出されたエピトープの検出を記載する。

(i)モノクローナル抗T7抗体による完全長T7エピトープペプチドを検出するためのE L I S Aアッセイ

T7エピトープペプチドは、ヘミペプチドの双方とも操作的T7エピトープ、例えば、抗T7抗体により特異的に結合したエピトープの再構成に必要なヘミペプチドの連結により作出できる。得られた完全長ペプチドは、高反応性のアミノ側鎖またはカルボキシル側

50

鎖を含有しない。したがって、T7ヘミペプチドは、ペプチド内の他のアミノ酸の他の遊離アミノ側鎖またはカルボキシル側鎖との望ましくない架橋反応なしに、EDCと架橋することができる。

【0106】

2つのT7ヘミペプチド、N末端ヘミペプチドとC末端ヘミペプチドを合成した。N末端ヘミペプチドのN末端アミンおよびC末端ヘミペプチドのC末端カルボキシルは双方ともアミドとして合成し、1つだけの遊離アミンと遊離カルボキシルを反応に残した。N末端ペプチドはフルオレセインと結合させてフルオレセイン-MASMT（配列番号50）を与え、C末端ペプチドはGQQMG（配列番号71）であった。したがって、完全長ペプチドは、フルオレセイン-MASMTGQQMG（配列番号4）であった。これらのペプチドは、実施例1および2に記載されたように、EDCを用いて連結させた。ヘミペプチドまたは結合させた、フルオレセイン標識化完全長ペプチドをELISAプレートのウェルに固定した抗フルオレセイン抗体に暴露させてから、セイヨウワサビペルオキシダーゼに結合させた抗T7抗体（Novagen、Gibbstown、NJ）により検出した。モノクローナル抗T7抗体が完全長エピトープのみを認識した結果が図12にまとめられている。前駆体ヘミペプチドは検出可能なシグナル応答を生じなかった。

(ii)ヘミペプチドからEDC媒介DPCを経てT7ペプチドの合成

2つのT7ヘミペプチドを合成し、図13に示したように、オキシム形成を経てオリゴヌクレオチドに結合させた。N末端ヘミペプチドMASMTG（配列番号5）（T7__p1）はオリゴヌクレオチド結合に関して、そのC末端に遊離のカルボン酸基を、そのN末端にヒドロキシルアミン基を含んだ。C末端ヘミペプチドGQQMG（配列番号6）（T7__p2）はオリゴヌクレオチド結合に関して、そのN末端に遊離のアミン基を、そのC末端にヒドロキシルアミン基を含んだ。

【0107】

これらのヘミペプチドは双方とも標準的なFmoc固相法により合成した。SerおよびThrの側鎖官能基は第三級ブチル基で保護し、Glnの遊離アミド側鎖はトリチル基で保護した。ペプチド結合は、標準的なo-ベンゾトリアゾール-N,N,N',N'-テトラメチル-ウロニウム-ヘキサフルオロ-ホスフェート（HBTU）結合により実施し、Fmoc基は、DMF中20%ピペリジンを用いて脱保護した。

【0108】

合成後、TFA（水中80容量%）、水（5容量%）、チオアニソール（5容量%）、エタンジチオール（2.5容量%）およびフェノール（7.5重量/容量%）の緩衝液を用いて、ペプチドを樹脂から開裂させた。次いで粗製ペプチドは、TFA勾配（0%のBを0~2分間維持、次いで勾配0~30%のBを15分間、続いて30~95%で2分間；緩衝液A：水中0.1%TFA；緩衝液B：アセトニトリル中0.1%TFA）を20mL/分で用いてペプチドを溶出させる分離用HPLC（XTerra Prep MS C18 OBD、5μm、19×100mmのカラム、Waters）により精製した。N末端ヘミペプチドのN末端-MASMTG-C末端（配列番号5）（T7__p1）内にヒドロキシルアミン官能基を導入するために、固相ペプチド合成（SPPS）の最後にビス-Boc-アミノオキシ酢酸を末端メタン基に結合させ、ワン（Wang）樹脂を開裂させた結果、遊離のカルボン酸を得た。50mgの粗製材料から、約3mgの純粋な生成物T7__p1を単離した（回収率6%、 $C_{24}H_{43}N_7O_{11}S_2$ の計算質量値：669.25、実測値：M+H 670.2531Da）。ヒドロキシルアミン基は、ヒドロキシルアミンNovatag樹脂（Novabiochem、Gibbstown、NJ）を用いて、C末端ヘミペプチドのN末端-GQQMG-C末端（配列番号6）（T7__p2）内に簡便に導入した。42mgの粗製産物から、約10.2mgの最終生成物T7__p2が得られた（回収率24%、分子 $C_{23}H_{42}N_{10}O_9S$ の計算質量値：634.29、実測値：M+H 635.3265）。

【0109】

次いでこれらのヘミペプチド（T7__p1およびT7__p2）を、アルデヒド官能基（

表 1 に記載された配列番号を有する、図 1 3 におけるアンチジップ 2 __アルデヒドおよびアンチジップ 5 __アルデヒドと称する) を含有する一対の相補 DNA に結合させた。簡単に述べると、200 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 20 μ L、pH 4.6 中、2 nモルの DNA __アルデヒドを 20 nモルのヘミペプチドと合わせて、37 で混合した。HPLC 分析により、1 時間後に出発 DNA __アルデヒドは反応混合物中に残っていないことが確認された。次いで産物を、TEAA 勾配緩衝液 (緩衝液 A : 0.1 % TEAA、pH 7.0 ; 緩衝液 B : アセトニトリル ; 勾配 5 ~ 30 % の B を 15 分間、次いで、30 ~ 80 % で 5 分間、最終勾配は 80 ~ 100 % で 5 分間を 1 mL / 分で) 中、分析用 C18 カラム (Waters XTerra C18、3.5 μ m、4.6 x 50 nm) を用いて精製し、LC-MS により分析した。質量分析データ : アンチジップ 2 __アルデヒド : C₃₀H₃₈N₁₀O₁₇P₂[M-7]⁻ の計算単一同位体質量値 : 1320.0947、実測値 : 1320.1364 ; アンチジップ 5 __アルデヒド : C₃₀H₃₈N₁₀O₁₈P₂[M-7]⁻ の計算単一同位体質量値 : 1324.6631、実測値 : 1324.7086 ; アンチジップ 2 __T7__p1 : C₃₂H₄₃N₁₁O₁₈P₂S₂[M-7]⁻ の計算平均質量値 : 1413.8617、実測値 : 1413.5623 ; アンチジップ 5 __T7__p2 : C₃₂H₄₂N₁₁O₁₈P₂S[M-7]⁻ の計算平均質量値 : 1413.4237、実測値 : 1413.1477。

【0110】

アンチジップ 2 __T7__p1 およびアンチジップ 5 __T7__p2 の DPC 反応は、図 1 4 A に示されるように、EDC およびスルホ-NHS (N-ヒドロキシルスルホスクシンイミドナトリウム塩) の存在下で実施した。スルホ-NHS の添加は必ずしも必要ではないがそれは高収量をもたらした。しかし、EDC はカルボキシル基と反応して、活性エステル (O-アシルソユリア) 遊離基を形成し、これは水溶液中の標的アミンに遭遇する前に加水分解され得る。スルホ-NHS 上のヒドロキシル基は EDC 活性エステル複合体と反応して、究極的には攻撃性のアミンと反応する活性中間体の安定性を増大させることができる。この反応は、800 μ L の総反応容量で実施され、アンチジップ 2 __T7__p1 およびアンチジップ 5 __T7__p2 を各々 0.2 μ M、ならびに MES (0.1 M、pH 6.0)、NaCl (150 mM)、EDC (20 mM) および sNHS (15 mM) を含有し、室温で実施された。50 μ L のアリコートが、異なる時間インターバル後に取り出され、Bio-Rad P-6 サイズ排除カラムにおけるクロマトグラフィーによって脱塩された。減圧乾燥後、サンプルを 14 μ L の TBE-尿素サンプル緩衝液中に再溶解し、45 で 3 分間加熱し、氷上で冷却してからゲル電気泳動 (15 % TBE-尿素ゲル、300 ボルト、25 分) により分析した。エチジウムブロマイド染色によりゲルを可視化した。結果は図 1 4 B に示してある。

【0111】

図 1 4 B は、T7 ペプチドが 15 分以内に形成されたことを示している (約 30 ~ 40 % の産物形成)。生成物のバンドは反応時間が増加するにつれて強くなり、一方出発材料は減少した。4 時間後の DPC 反応混合物の HPLC 分析が生成物のピークを示した (アンチジップ 2 __T7__p1 の精製と同じ方法だが、カラムを 35 で操作した)。これを回収し、LC-MS により確認した。

(iii) 他のペプチドエピトープ

エピトープ含有ペプチドの作出に上記のプロトコルを用いることができる。特異的抗体が確認されている他の多数のペプチド配列が知られている (例えば、imtech.res.in/raghava/mhchem/index/html におけるワールドワイドウェブで見ることができる The Epitope Binding Peptide Database を参照)。やはり市販の抗体が入手できるペプチドエピトープの小型サブセットのリストが図 1 5 により提供されている。これらのペプチドエピトープは他のタンパク質においては出現することが稀であるため、遺伝子改変タンパク質の単離用アフィニータグとして通常用いられる。多くの場合、ペプチドの最短の長さおよびこれら

のエピトープの種々の配列に対する抗体の親和性が同定されている。

【0112】

図15ではまた、どの配列がアミンまたはカルボキシル側鎖を含有するペプチドを有さないか、そしてどれが内部グリシンを含有するかが確認されている。EDC結合を用いる高特異的に結合するヘミペプチドの選択に関して、アミンまたはカルボキシル側鎖の欠如は望ましい。内部グリシンの存在は、当業界に知られているいくつかの利用可能な化学を用いてヘミペプチドに関するペプチド配列における簡便なブレイクポイントを提供することができる。

【0113】

反応可能性を有する側鎖基を含有するペプチドの選択的結合に関する好適な反応スキームの2つの例を図16に示す。図16Aは、チオエステル部分を介するアミド形成を示す。チオエステルは一般に、N末端Cys(トランス-チオエステル化)と特異的に反応して、チオエステル結合中間体を与え、それが自然に迅速な分子内反応を受けて、アミド結合を形成する(Dawsonら、1994年、Science 266、776頁)。ピリミジルおよびベンゾチアゾールなどの一定の遊離基を有するチオエステルは、金属触媒の添加なしにアミノ基と直接的に反応できることが報告されている(Benagliaら、2005年、A. Tetrahedron、61、12100-12106頁)。金属触媒の添加はDNAにとって有害であると考えられる。図16Bは、チオエステルとアジドとの間のシュタウディングー結合反応を示す(Nilssonら、2000年、Org. Lett. 2、1939-1941頁)。

【0114】

本発明の構築体を構成するために、同様の反応スキームを用いてペプチドをオリゴヌクレオチドに結合させることができる。図17は、固相ペプチド合成(SPPS)によるチオエステルとホスフィンペプチドDNA結合体の合成に関する反応スキームを示す。

実施例4．酵素基質の作出

エピトープを含有するペプチド以外のペプチド配列を作出するために、実施例2および3に記載されたものと同様の方法が使用できると考えられる。例えば、いくつかの酵素は、活性のために特定のペプチド配列の存在を必要とする。一例は、活性のために15アミノ酸長のペプチド(S-15ペプチド)の存在に依存する、リボヌクレアーゼの欠失変異体であるリボヌクレアーゼS-タンパク質酵素の基質である(Levitら、1976年、「Ribonuclease S-Peptide」J. Biol. Chem. 251(5)1333-1339頁)。したがって、15のアミノ酸よりも短い基質ペプチドはS-タンパク質のリボヌクレアーゼ活性を活性化する能力はるかに低いか、またはその能力が無い。S-15ペプチドの不活性な断片を連結させて、リボヌクレアーゼ活性を再構成できる操作的S-15ペプチドを形成するために、上記のペプチドエピトープの結合に提案された同じ反応を用いることができる。したがって、S-15ペプチドは、リボヌクレアーゼS-タンパク質酵素の操作的酵素活性化剤である。この方法において、リボヌクレアーゼはシグナル報告酵素として使用できる。リボヌクレアーゼは迅速なターンオーバー速度を有し、クエンチした蛍光基質を用いて、蛍光発生を引き起こすことができる(Kelemenら、1999年、「Hypersensitive Substrate for Ribonucleases」Nucleic Acids Research 27、18号、3696-3701頁)。

【0115】

図18は、不活性のS-15ペプチドを作出してから、それをDPCによって活性化することのできる3つの方法を示す。例えば、図18Aに示されるように、S-15配列に加えられたN末端とC末端のシステイン間のジスルフィド架橋を介した環化によって、S-15ペプチドを不活性化することができる。次いで、還元剤、例えばジフェニルホスフィン-オリゴヌクレオチド結合体によりジスルフィド架橋を還元して、活性の、S-15ペプチドを作製することができる。図18Bに示されるように、ペプチドを不活性化するために、ペプチドの内部リシンの1つまたは両方(星印で示されている)をジアゾ基に変

換する。チアアジド基もまた、ビオチンリガーゼペプチドによるジアゾ基の還元を用いたのと同じ方法を用いて、例えば、ジフェニルホスフィン-オリゴヌクレオチド結合体により還元することができる。図18Cに示されるように、S-15は2つのヘミペプチド、1つはC末端チオエステルを有するもの、他方はN末端システインを有するものに開裂する。どちらも単独ではリボヌクレアーゼS-タンパク質を活性化しない得られたヘミペプチドを、天然の化学結合を介して本発明の方法において連結させることができる。

【0116】

すでに検討したように、非核酸生物学的標的に対して、抗体などの結合部分を含有するリガンドレポーター構築体、およびレポーター基を用いることができる。しかしながら、図19に示されるように、上記の同様な化学を用いて、結合体は核酸標的の検出のために用いることもできる。この場合、反応物は、「核酸レポーター」および「相補体」が自己相補性ではなく、標的DNA内の隣接の（またはほぼ隣接した）相補的配列にアニールするプローブであることを除いては、タンパク質ベースの検出試薬と同様である。

10

【0117】

図19に示すように、第一のプローブ（リガンドレポーター構築体）150は、ペプチド前駆体180（前駆体1と示されている）に結合した標的配列における相補的な、または実質的に相補的な配列170にアニールする核酸配列160（NAプローブ1と示されている）を含有する。第二のプローブ（リガンドレポーター構築体）190は、ペプチド前駆体200（前駆体2と示されている）に結合した標的配列における相補的な、または実質的に相補的な配列210にアニールする核酸配列220（NAプローブ2と示されている）を含有する。標的配列における領域170および210内の配列は、同一の場合も、異なってもよい。プローブが標的領域にハイブリダイズすると、それらは2種の前駆体を反応性に近接させ、エピトープを規定するペプチド生成物が生成する。次いでこの生成物を、これと特異的に結合する抗体（ABと示されている）などの結合部分を用いて検出することができる。

20

実施例5：エピトープとしての色素の作出

フルオレセインなどの単純な色素もまたエピトープとして役立ち得る。例えば、DPCアッセイは、ジフェニルホスフィンにより非蛍光分子ジアジドローダミン（DAZR）を還元して蛍光色素ローダミングリーンを作製することを含み得る（図3を参照）。ローダミングリーンは抗フルオレセイン抗体に結合するため、直接検出することができる。より高感度にするため、ローダミングリーン色素はレポーター酵素に結合させた抗フルオレセイン抗体によって検出することができる。

30

【0118】

調べたDPCアッセイ様式の一つでは、ジップコード配列およびアンチジップコード配列を介してジフェニルホスフィンおよびDAZRにそれぞれ結合した抗PDGF-A抗体および抗PDGF-B抗体の結合体を用いてタンパク質血小板由来成長因子（ABサブユニット）またはPDGF-ABの存在を検出した（図20を参照）。この反応において、抗PDGF-B結合体および抗PDGF-A結合体（0.15 μM）を、0.15 μMの標的（PDGF-AB）の存在下および非存在下で、0.15 μMのジップコード化DAZRオリゴヌクレオチド結合体および0.30 μMのジフェニルホスフィンジップコード化オリゴヌクレオチド結合体と共にインキュベートした。これらの反応混合物は、緩衝液として0.05 Mのリン酸ナトリウム、pH 8を含有し、マイクロプレートベースの蛍光光度計で520 nmにおいて30 で経時的にモニターした。図21は、PDGF-ABの存在下でのこのような系の蛍光発生の典型的な時間経過を示す。陰性対照は、PDGF-ABまたはジップコード化ビスジフェニルホスフィン反応物質を欠いていた。高濃度の過剰なTCPE（「+TCPE」と示されている）の存在下での陽性対照は、全てのDAZRオリゴヌクレオチドがローダミンに還元された場合に得ることのできる最大の蛍光を示す。

40

【0119】

図22は、最初の反応生成物（ローダミングリーン）が検出システムの増幅成分（例え

50

ば H R P) によって増幅される P D G F - A B の検出に関するアッセイの概略図を示す。E L I S A 様式に基づいたアッセイでは、十分な親和性と特異性でローダミンググリーンに結合しローダミンググリーンを D A Z R 前駆体から識別する抗フルオレセイン抗体 - H R P 結合体 (R o c k l a n d 、 ヤギ抗フルオレセイン - H R P 結合体) が用いられる。P D G F - A B の存在下で D P C を介した D A Z R 還元からのシグナルを増幅する一方、D A Z R およびジフェニルホスフィン前駆体を識別するために抗体結合体を使用し得るかどうかを試験した。

【 0 1 2 0 】

手短に述べると、E L I S A プレート (固体支持体) のウェルを抗 P D G F ポリクローナル抗血清によってコーティングした。P D G F と共にインキュベートした後、2 種のリガンド - レポーター構築体 (プローブ) を用いて、P D G F - A B のヘテロダイマーを検出した。リガンド - レポーター構築体の各々は図 2 に示した 2 種の分子系に基づいていた。標的結合性成分 1 は、ジップ 3 オリゴヌクレオチドに共有結合した抗 P D G F - A 抗体を含んでなり、標的結合性成分 2 は、ジップ 2 オリゴヌクレオチドに共有結合した抗 P D G F - B 抗体を含んでなる。これら 2 種の標的結合性成分を、レポーター成分 1 およびレポーター成分 2 と示された 2 種のレポーター成分と共にインキュベートした。レポーター成分 1 は、D i P h P と共有結合したアンチジップ 3 オリゴヌクレオチド (ジップ 3 オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする) を含有した。レポーター成分 2 は、D A Z R と共有結合したアンチジップ 2 オリゴヌクレオチド (ジップ 2 オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする) を含有した。レポーター成分 1 のレポーター 1 配列がレポーター成分 2 のレポーター 2 配列にハイブリダイズすると、D i P h P は D A Z R と反応性に近接し、D A Z R 分子を還元してローダミンを生成させる。

【 0 1 2 1 】

生じた産物は抗フルオレセイン抗体 - H R P 結合体 (抗フルオレセイン - H R P と示す) により結合した。H R P 酵素は T M B を発色産物に変換する。T M B 基質を有する R o c k l a n d ヤギ抗フルオレセイン - 西洋わさびペルオキシダーゼ結合体と共にインキュベーション後、シグナル (4 5 0 n m における吸光度) が発現した。

【 0 1 2 2 】

図 2 2 に示された反応の最後に生じた D P C 生成物を、E L I S A への反応供給量からの D A Z R オリゴヌクレオチドの総ピコモルの関数としてプロットした (図 2 3 を参照) 。図 2 3 に示されるように、P D G F - A B の存在下 (+ 標的として示す) で発現した反応混合物の E L I S A 応答は、T C E P の存在下 (+ T C E P と示されている) で得られたものと同様であり、それらは両方とも、P D G F - A B の非存在下 (標的なしとして示す) 、またはビスジフェニルホスフィンオリゴヌクレオチドを除いて (- ビス D i P h P と示す) 発現した応答よりはるかに高かった。試験条件下では、前駆体と生成物との間の抗体の識別は、ほぼ還元 D A Z R (ローダミンググリーン) を生成させた反応条件を出発産物 (非還元 D A Z R) と比較して約 5 倍であった。

【 0 1 2 3 】

抗体を多くのクラスの色素、例えばローダミン類やクマリン類に対して発現させた。他の有用な検出試薬のセットは、非蛍光前駆体であるインドリニウムおよびインドールアルデヒド、ならびに C y 3 として知られているそれらの蛍光反応生成物である (図 2 4) 。C y 3 反応生成物は抗 C y 3 抗体 (S i g m a A n t i C y 3 / C y 5 または K r e a t e c h A n t i C y 3) により検出でき、これらはどちらもインドリニウムまたはアルデヒド前駆体に結合しない。

実施例 6 : エピトープを含有する小型分子

抗体を発現させた多数の小型分子がエピトープを規定する。抗体は、典型的には免疫アッセイにおいて、例えば、E L I S A 様式において、例えば毒素、殺虫剤残基、薬剤等の検出用に通常は検出試薬として利用される。D P C によって生成させることができ (すなわち前駆体ではなくて生成物が抗体に結合する) 、それらに対する抗体が市販入手できる (例えば S a n t a C r u z から) エピトープとしては、限定はしないが、アモジアキ

10

20

30

40

50

ン、アンピシリン、アルギニン、ベンゾピレン、ビオチン、セファロスポリン、クロロキン、クマル酸、ジゴキシゲニン、ジゴキシシン、エテノアデノシン、フルオレセイン、イソチオシアネート、FK506、グルタチオン、モルフィン、フェンシクリジン、テオフィリン、チオグアニンが挙げられる。

【0124】

アルドール縮合によるp-クマル酸のDPC媒介合成に関する代表的な合成スキームが図25に記載されている。

実施例7：EGFR二量体の検出

本実施例では、エピトープを作製するために、EDC-sNHSDPCを用いてEGFR二量体の存在および/または量を検出するためのアッセイを記載する。検出可能なシグナルの生成は受容体二量体の存在に依存し、このアッセイにより構成成分一量体が効果的に識別される。

【0125】

EGF活性化A431細胞を、リン酸緩衝生理食塩水(「PBS」;Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)中、3回遠心分離により洗浄した。50,000個の細胞をPBS中ハイバインドプレートの各ウェル内に導入し、4で一晩沈降させた。固定化した細胞をPBSで3回洗浄した。これらのウェルをブロック用溶液(PBS-T 1mg/mLのウシ血清アルブミン(BSA)0.1mg/mLのウサギIgG)で1時間、室温でブロックしてから、PBSプラスTween-20(「PBS-T」;Sigma Chemical Company)で3回、水で1回洗浄し、室温で乾燥した。

【0126】

次いでウェルを、Zip2のアミノ末端に結合させた抗EGFR(Labvision, Fremont, CA)(抗EGFR-Zip2;0~15ピコモル)の等量およびZip5のアミノ末端に結合させた抗EGFR(Labvision)(抗EGFR-Zip5;0~15ピコモル)の等量と共に1時間インキュベートし、PBS-Tで3回洗浄した。次いでウェルをアンチジップ2-T7-p1およびアンチジップ5-T7-p2の各々20ピコモルと共にインキュベートし、PBS-Tで3回洗浄した。次いで、アンチジップ-T7ヘミペプチド結合体を含有するウェルを、0.1Mの4-モルホリンエタンスルホン酸(MES)、pH6.5緩衝液中、0.2MのEDC、0.15Mのスルホ-NHsの溶液(EDC-スルホ-NHs)と共に30分間インキュベートした。次いで、2回目のインキュベーションおよびブロック用溶液による洗浄を行った。

【0127】

次いでサンプルをブロック用溶液中、6.6μM抗T7-HRP結合体100μLと共に1時間インキュベートした。ウェルを製造元の指示に従い、Amplex Redと共にインキュベートし、Molecular Devices Fluorescent Microplateリーダーを用いて、530nmにおける励起ならびに585nmにおける発光によりモニターした。対照は、抗EGFR結合体なしでインキュベートしたサンプル;T7ヘミペプチド結合体なしでインキュベートしたサンプル;および抗EGFR結合体とT7ヘミペプチド結合体の双方なしでインキュベートしたサンプルを含んだ。

【0128】

結果は図26に示されている。このアッセイの線形位相における反応速度は、細胞上の完全長T7エピトープの関数として増加した。

実施例8：EGFRおよびErbb2二量体に関するフローサイトメトリーアッセイ

接着性のA431細胞を一晩血清飢餓状態にしてから洗浄し、トリプシン消化によりプレートから分離した。A431細胞の懸濁液を非処理のままおくか、または氷上でEGF(200ng/mL)により処理した。次いで細胞を、2%ホルムアルデヒドと共に氷上で20分間のインキュベーションにより固定した。内因性ペルオキシダーゼ活性を、PBS中、3%過酸化水素と共に、室温で5分間のインキュベーションによりクエンチした。2%BSAおよび5%硫酸デキストランを含有するPBS中、非特異的ウサギIgG(

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および tRNA (1 μM) によりブロックしてから、PBS 中、2% BSA、5% 硫酸デキストラン、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウサギ IgG、1 μM の tRNA、ならびに以下の抗体 - ジップコード結合体およびアンチジップコード T7 ヘミペプチドを含有する溶液と共にインキュベートした。

【0129】

EGFR ホモ二量体のアッセイでは、抗体結合体 egfr1 抗体 - Zip2 および egfr1 抗体 - Zip5 の各 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ならびにアンチジップ 2 __ T7 __ p1 およびアンチジップ 5 __ T7 __ p2 の各 60 nM と共に細胞をインキュベートした。

【0130】

EGFR - ErbB2 ヘテロ二量体では、egfr1 抗体 - Zip5 の各 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ およびジップコード 2 レポーターのアミノ末端に結合した 200 nM の抗 ErbB2 抗体、ならびにアンチジップ 2 __ T7 __ p1 およびアンチジップ 5 __ T7 __ p2 の各 60 nM と共に細胞をインキュベートした。

【0131】

試薬は細胞と共に 30 で 1 時間インキュベートした。各アッセイに、EDC - スルホ - NHS を室温で 1 時間添加して結合させ、得られたヘミペプチドをアンチジップコード配列の相補性部分のハイブリダイゼーションを介して反応近接性とした。次いで、セイヨウサビエルオキシダーゼに結合させた 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウサギ抗 T7 抗体 (Novus Biologicals、Littleton、CO) を各アッセイに添加し、アッセイ混合物中、室温で 1 時間インキュベートした。次いでチラミド - Alexa568 (Invitrogen、Carlsbad、CA) を加え、混合物を室温で 5 分間インキュベートした。ウサギ抗 T7 抗体 - HRP 複合体において、Alexa568 標識は HRP により共有結合した。Alexa568 標識の存在に関して、細胞をフローサイトメトリーにより分析した。結果は図 27 にまとめてある。

【0132】

図 27 に見られるように、EGFR ホモ二量体に関する T7 ペプチド結合 DPC アッセイで得られた平均蛍光強度 (MFI) は、バックグラウンド (bk g d と示されている) よりも有意に大きかった。バックグラウンド値は、上記のように判定したが、抗 EGFR 抗体のうちの 1 つを欠いていた。EGFR ホモ二量体に関する MFI は、EGF 処理 (EGF と示されている) に応答して増加した。これらの結果は、非処理細胞における EGFR ホモ二量体の基底レベルの存在および外因性 EGF に応答したさらなるホモ二量体化の誘導と一致した。対照的に、非処理細胞における EGFR - ErbB2 ヘテロ二量体に関する MFI は、バックグラウンドを有意に超えていることはなく、基底レベルにおいては、ヘテロ二量体がきわめてわずかしき存在しないか、または存在しないことを示唆した。しかし、EGF に応答して、EGFR - ErbB2 に関する DPC シグナルは基底レベル以上に上昇し、EGF によりヘテロ二量体が誘導されたことを示唆した。

【0133】

これらの結果は、EGF に対する応答における細胞の活動の受容された機序と一致する。A431 細胞において、EGFR は高度に発現するが、ErbB2 の発現ははるかに低いレベルである。本アッセイにおいて検出された MFI シグナルの大きさはこれらの発現レベルと一致した。

実施例 9 : Bcr - Abl に関する DPC アッセイ

Bcr - Abl は、慢性骨髄性白血病 (CML) において発現する異常な融合腫瘍性タンパク質である。Bcr - Abl の検出および個々の Bcr および Abl の識別は、CML の診断ならびに Gleevec (登録商標) (イマチニブメシレート) などの治療薬で治療した後の最小残留疾患の検出にとって重要であり得る。CML 細胞系の KY01 は、Bcr - Abl 融合タンパク質ならびに個々の Bcr および Abl タンパク質を発現する。

【0134】

Bcr - Abl に関する T7 ペプチド結合 DPC アッセイのプロトコルは、使用された

10

20

30

40

50

抗体 - ジップコード結合体が Zip 2 のアミノ末端に共有結合した抗 B c r 抗体 7 C 6 および Zip 5 のアミノ末端 (1 9 ~ 1 1 0 - Zip 5) に共有結合した抗 A b 1 抗体 1 9 ~ 1 1 0 であったことを除いては、実施例 8 に記載されたものと同様であった。また、B c r - A b 1 は細胞内タンパク質であるため、細胞内に D P C アッセイの試薬を透過させるために細胞を透過化処理した。透過化処理は、細胞を固定するために先ずホルムアルデヒドを用い、アッセイに用いられた全ての溶液に 0 . 3 % のサポニンを添加することによって達成した。これらの修飾以外に、実施例 8 に記載されたものと同じプロトコルを用いて、K Y 0 1 細胞内の B c r - A b 1 を検出した。

【 0 1 3 5 】

3 つのアッセイサンプルのフローサイトメトリー分析結果が図 2 8 にまとめてある。図 2 8 A は、非特異的 I g G によりブロックし、ウサギ抗 T 7 - H R P のみに暴露させた K Y 0 1 細胞の M F I 分布を示し；K Y 0 1 細胞に対するこの抗体の非特異的結合によるバックグラウンドの影響内にある。図 2 8 B は、抗 A b 1 抗体結合体は含有せず、D P C 反応に必要な他の全ての試薬を含有した陰性対照サンプルの M F I 分布を示す。この陰性対照の M F I は、抗 T 7 - H R P バックグラウンドの M F I よりわずかに上昇する。図 2 8 C は、B c r - A b 1 の存在を指示する D P C シグナルを示す。このサンプルは、抗体 - ジップコード結合体、ならびに D P C 結合および完全 T 7 ペプチドの検出に必要な他の試薬の双方を含有した。M F I 分布はいずれの対照よりも高い。

実施例 1 0 : C M L 由来細胞系および C M L 親の骨髓サンプルにおける B c r - A b 1 の D P C 検出

1 0 % ウシ胎仔血清を有する 1 0 % R P M I 1 6 4 0 培地中で K Y 0 1 細胞を増殖させた。精製 C M L 親の骨髓単核細胞を新鮮採取して精製するか、または凍結保存したサンプルから得た。約 2 0 0 , 0 0 0 個の細胞を P B S 中で洗浄してから、0 . 2 5 m L の透過化 / 固定緩衝液 (B e c t o n - D i c k i n s o n , F r a n k l i n L a k e s , N J) と共に、室温で 2 0 分間インキュベートした。次いで細胞を、1 % B S A / P B S 中で洗浄してから、3 % の過酸化水素を含有する 0 . 2 m L の透過化 / 洗浄用緩衝液 (P e r m / W a s h) (B e c t o n - D i c k i n s o n , F r a n k l i n L a k e s , N J) と共に、室温で 1 0 分間インキュベートした。次いで細胞を、P e r m / W a s h 緩衝液で 2 回洗浄してから、非特異的 5 9 量体オリゴヌクレオチドの混合物 5 0 n M を含有する P e r m / W a s h 緩衝液で 3 0 分間ブロックした。

【 0 1 3 6 】

室温で、Zip 2 のアミノ末端に共有結合した抗 B c r 抗体 B 1 2 、Zip 5 のアミノ末端に共有結合した抗 A b 1 抗体 1 9 ~ 1 1 0 と共に、5 0 n M のブロックオリゴマー混合物を含有する P e r m / W a s h 緩衝液中、アンチジップ 2 __ T 7 __ p 1 およびアンチジップ 5 __ T 7 __ p 2 を含有する混合物 (0 . 1 m L) を調製した。この混合物を前記細胞に加えてから、細胞を氷上で 1 時間インキュベートした。次いで細胞を P e r m / W a s h 緩衝液で洗浄し、0 . 2 % のサポニンを含有する E D C - スルホ - N H S 0 . 3 m L と共に、室温で 1 時間インキュベートした。

【 0 1 3 7 】

前記細胞を P e r m / W a s h 緩衝液で 1 回洗浄し、2 0 0 μ g / m L の正常なヒト I g G で 3 0 分間ブロックしてから、H R P に共有結合したウサギ抗 T 7 抗体 (N o v u s B i o l o g i c a l s , L i t t l e t o n , C O) と共に 1 時間インキュベートした。次いで細胞を P e r m / W a s h 緩衝液で洗浄し、A l e x a 5 6 8 に共有結合したヤギ抗ウサギ I g G F (a b ') ₂ 断片と共にインキュベートした。前記抗体は使用前に、2 0 0 μ g / m L の正常なヤギ I g G を含有する P e r m / W a s h 緩衝液中で 1 : 2 0 0 0 に希釈した。反応容量は 0 . 2 m L であった。次いで細胞を P e r m / W a s h 緩衝液で 2 回洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。結果は図 2 9 に示してある。

【 0 1 3 8 】

図 2 9 は、K Y 0 1 細胞に関して (図 2 9 A) および C M L 親の単核細胞に関して (図 2 9 B) この方法により得られた結果を示す。各細胞型に関して、B c r - A b 1 の存在

に関連したシグナルは、有意にバックグラウンドの対照以上であった。これらの対照は、反応混合物中に A b 1 抗体 1 9 ~ 1 1 0 ジップ 5 も B c r 抗体 B 1 2 ジップ 2 も含まないサンプルを含んだ。

実施例 1 1 : 乳癌組織中の E r b B 2 ホモ二量体の検出

乳管癌の組織切片 (4 ミクロン厚 ; B i o G e n e x 、 S a n R a m o n 、 C A 、カタログ番号 F G - 1 3 4 M) を、キシレンの 3 回交換で脱パラフィンし、エチルアルコールの段階系 (9 0 % 、 8 0 % および 7 0 %) で再水和した。マイクロ波オープン内で、1 0 m M のクエン酸ナトリウム緩衝液 (p H 6 . 0) 中 2 0 分間、E r b B 2 に関するエピトープ回収を行った。P B S 中 3 % H ₂ O ₂ 中で内因性 H R P 活性をブロックした。洗浄後、ブロック用緩衝液中、4 で 1 時間切片をブロックした。インキュベート時、スライドは加湿チャンパー内に保持した。

【 0 1 3 9 】

ジップ 2 に共有結合した抗 E r b B 2 9 G 6 抗体 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y 、 S a n t a C r u z 、 C A) およびジップ 5 に共有結合した抗 E r b B 2 9 G 6 抗体 (結合用緩衝液中、各 6 0 n M) の混合物を室温で 3 0 分間、前記切片に適用した。結合用緩衝液で洗浄後、結合用緩衝液中、各 1 8 0 n M のアンチジップ 2 _ T 7 _ p 1 およびアンチジップ 5 _ T 7 _ p 2 と共に、前記切片を室温で 1 時間インキュベートした。P B S で 2 回洗浄し、0 . 1 M の M E S / 1 5 0 m M N a C l 緩衝液で 1 回洗浄した後、E D C - スルホ - N H S 中、室温で 2 時間、T 7 ペプチド結合を実施した。P B S で洗浄後、T 7 ブロック用緩衝液 (P B S 、 2 % B S A 、 0 . 1 m g / m L のラクトアルブミン、0 . 1 m g / m L のウサギ I g G) 中、室温で 4 5 分間、前記スライドをブロックしてから、T 7 ブロック用緩衝液中、2 μ g / m L の抗 T 7 - H R P 抗体 (N o v u s B i o l o g i c a l s 、 L i t t l e t o n 、 C O) と共に、室温でさらに 4 5 分間インキュベートした。次いで、前記スライドをチラミド - A l e x a F l u o r 5 6 8 (T S A K I T 、 M o l e c u l a r P r o b e s 、 C a r l s b a d 、 C A) により、室温で 5 分間標識し、P B S 中で洗浄し、P r o l o n g G o l d のアンチフェード封入剤 (M o l e c u l a r P r o b e s 、 C a r l s b a d 、 C A) 中に封入し、4 で保存した。通過幅 5 1 0 ~ 5 5 0 n m 、励起およびロングパス 5 8 0 n m 、発光フィルターを備えたエビ蛍光の N i k o n E T - 2 0 0 0 U 顕微鏡で顕微鏡分析を実施した。結果は図 3 0 に示してある。

【 0 1 4 0 】

E r b B 2 ホモ二量体の特異的染色を管細胞でのみ観察すると、細胞膜に局在していた (図 3 0 A) 。図 3 0 B は、組織構成を明らかにするために示された対応する H E 染色断面である。図 3 0 C および 3 0 D は、9 G 6 - Z i p 5 結合体を欠いた (図 3 0 C) 、または 9 G 6 - Z i p 2 結合体と 9 G 6 - Z i p 5 結合体の双方を欠いた (図 3 0 D) 陰性対照である。

実施例 1 2 : 天然化学結合を用いた T 7 修飾ヘミペプチドの作製および使用

天然の化学的連結 (N C L) は、あるペプチドのチオエステル置換カルボキシル基と別のペプチドにおける N 末端システインアミノ酸 (またはシステイン類縁体) との反応を縮合し再構成して両者を連結し、天然のペプチド結合を生じさせることを含む。この化学の利点として考えられることは、外部触媒を必要とせず、標的のタンパク質または細胞に対する非特異的反応の程度が大きく減少することである。さらにこの化学では、アミノ酸を含有するカルボキシル側鎖およびアミノ側鎖は副反応をもたらしなため、エピトープ内にそれらが多数許容される。本実施例で用いられる一般的な化学は図 3 1 に記載されている。

【 0 1 4 1 】

T 7 P 1 ヘミペプチドチオエステルの合成は、図 3 2 に記載されている。手短に述べると、T 7 P 1 ヘミペプチドを先ず、標準的な F m o c プロトコルにより予め充填されたアシルスルホンアミドセーフティーキャッチ樹脂 (N o v a B i o c h e m 、 G i b b s t o w n 、 N J) 上に構成した。ビス - B o c (t - ブトキシカルボニル) 保護したアミノ

10

20

30

40

50

オキシ酢酸の結合を介してDNA結合を可能にするために、N末端にヒドロキシルアミン官能基を組み込んだ。合成後、前記樹脂をトリメチルシリルジアゾメタン(TMS-CHN₂)によって活性化してから、エチル3-メルカプトプロピオネートおよび触媒量のNaSPhで処理した。これにより、T7P1におけるカルボキシル末端のグリシンがチオエステルに変換される。粗製開裂混合物が主に保護されたT7P1チオエステルを含有していることを、MSデータは示した。さらにTFA処理およびHPLC精製により、完全に脱保護されたT7P1チオエステルが得られた。T7P1チオエステルの合成への代替経路は、下記の実施例17に記載されている。

【0142】

修飾T7P2ヘミペプチドは、GlyからGysへの変異および配列GMQQC-NH₂(配列番号72)を含有した。先に記載されたように、T7P1ヘミペプチドチオエステルは、アンチジップ2に結合してアンチジップ2-T7-p1チオエステルを作出し、修飾T7P2ヘミペプチドは、アンチジップ5に結合してアンチジップ5-T7-p2-Cysを作出した。アンチジップ5に対するT7P2ヘミペプチドの結合は、システイン残基の酸化を防ぐために、2mMのDTTの存在下で行われた。アンチジップに結合したヘミペプチド類(各5μM)を、2%のチオフエノール、50mMのNaPi、150mMのNaCl、pH6.0中で一晩一緒に混合した。反応生成物のゲル電気泳動により、Cys含有T7ペプチドの生成が実証された。T7ペプチド生成物は、2%のチオフエノールを0.5mMのDTTに替える場合にも調製し得る。先の実験に用いられた抗T7抗体はCys修飾T7ペプチドを認識したが、T7-p1-S(Et3MP)ヘミペプチドにもT7-p2-Cysヘミペプチドにも結合しなかった。

【0143】

EDC/sNHSペプチド連結プロトコルとは異なり、NCLはペプチド結合の形成にさらなる試薬を必要としない2種のヘミペプチドを利用する。したがって、生成物の形成が標的依存のオリゴヌクレオチド二重鎖の存在下でのみ生じることを確実にするために、アッセイプロトコルにおける調整か、各々のヘミペプチドに結合したレポーターオリゴヌクレオチドの融解温度(T_m)における調整かのいずれかが必要となり得る。一実施形態において、アンチジップ-レポーター-ヘミペプチド構築体の1つを反応混合物に加え、標的への特異的結合を可能にするのに十分なインキュベーションの時間インキュベートした。次いで、非結合の構築体を除去するために反応混合物を洗浄してから、第二のアンチジップ-レポーター-ヘミペプチド構築体を加えた。

【0144】

EDC/sNHSペプチド結合プロトコルでは、レポーターオリゴヌクレオチドは典型的には10塩基長で100%相補性である。このようなレポーターオリゴヌクレオチドは約25 超の融解温度(T_m)を有する。しかしNCLプロトコルでは、レポーターオリゴヌクレオチドは、標的への特異的結合なしにペプチド形成をもたらし得る。それでも、T_mを25 未満に下げることによって、非特異的結合を減少させることができる。したがって一実施形態において、レポーターオリゴヌクレオチドが約8 から約25 のT_mを有するように、それらが修飾される。レポーターオリゴヌクレオチドは、約9 から約20 のT_mを有することが好ましい。個々のレポーターオリゴヌクレオチドの長さが異なる場合、長い方のリポーターオリゴヌクレオチドは一般に、チオエステル末端を有するヘミペプチドに結合させ、短い方のリポーターヘミペプチドは、チオール(すなわちシステインまたはシステイン類縁体)末端を有するヘミペプチドに結合させる。

【0145】

レポーターオリゴヌクレオチドのT_mの修飾は、レポーターの一方または両方の長さを短くすること、反応の塩条件および他の試薬を変えること、および/またはレポーター配列の相補性を100%以下に減少させるミスマッチを導入することによって達成することができる。2種のオリゴヌクレオチドのT_mは、Panjkovich, A.ら、Bioinformatics、2005年、21(6):711-22頁およびPanjkovich, A.ら、Nucleic Acid Res. 2005年、33:W570-W57

10

20

30

40

50

2 頁に記載されている方法を用いて、公知の数式により、配列の長さおよび内容に基づいて推定することができる。あるいは、本発明で用いられた 2 種のレポーターオリゴヌクレオチドいずれの T_m の判定も、当業界で周知の実験的試験によって達成される。

実施例 13：NCL を介した DNA 標的検出のため、低い T_m のレポーターオリゴヌクレオチド部分を含有する T7 修飾ヘミペプチド - アンチジップ結合体の使用

種々のレポーターオリゴヌクレオチド部分を含有するアンチジップ 2 __ T7 __ p1 - S (Et3MP) および種々のレポーターオリゴヌクレオチド部分を含有するアンチジップ 5 __ T7 __ p2 - Cys の各 5 ピコモルを、5 重量 / 容量 % の硫酸デキストランを含有する 50 mM のリン酸ナトリウム (pH 6) 100 μ L に加えた。ストレプトアビジンプレート上に固定した 5 ピコモルのビオチン - ジップ 5 またはビオチン - ジップ 2 とビオチン - ジップ 5 各々 2.5 ピコモルの組合わせを含有するウェルを試験した。これらのウェルを 25 で 30 分間インキュベートしてから、PBS - T 緩衝液で 3 回洗浄した。反応は PBS - T 緩衝液中、0.01 μ M のマウス抗 T7 - アルカリホスファターゼ結合体 (Novagen、Gibbstown、NJ) 100 μ L と共にインキュベートした。反応混合物を Attophos 検出用溶液 (Amersham、Piscataway、NJ) により発現させ、蛍光発現の動態を動態をモニターした (25 で、Molecular Devices Fluorescence プレートリーダー上、励起 435 nm / 585 nm における発光)。各実験条件に対する線形範囲内 (典型的には 0 秒と 600 秒との間) の蛍光発光の増加率 (F / sec) をプロットした。

【0146】

この実験に用いられた種々のアンチジップ 2 およびアンチジップ 5 の個々の配列は、表 2 に記載されている。

【0147】

【表 2】

表 2. 非修飾および修飾レポーターオリゴヌクレオチドを有するアンチジップ配列

名称	配列	配列番号
アンチジップ 5_10 量体 (Cys 完全長)	NH ₂ -CGAATTTATA-X-CTGACTATGGATGGCACG	68
アンチジップ 2_10 量体 (TE 10 量体)	GGACTCGAGCACCAATAC-X-TATAAATTCG-NH ₂	66
アンチジップ 5_2 ミスマッチ (Cys 10 量体 2 MM)	NH ₂ -CCAATTAATA-X-CTGACTATGGATGGCACG	73
アンチジップ 5_1 ミス (Cys 10 量体 1 MM)	NH ₂ -CCAATTAATA-X-CTGACTATGGATGGCACG	74
アンチジップ 2_9 量体 (TE 9 量体)	GGACTCGAGCACCAATAC-X-TATAAATTC-NH ₂	75
アンチジップ 2_8 量体 (TE 8 量体)	GGACTCGAGCACCAATAC-X-TATAAATT-NH ₂	76
アンチジップ 5_9 量体 (Cys 9 量体)	NH ₂ -GAATTTATA-X-CTGACTATGGATGGCACG	77
アンチジップ 5_8 量体 (Cys 8 量体)	NH ₂ -AATTTATA-X-CTGACTATGGATGGCACG	78

室温で PBS 緩衝液 (10 mM のリン酸ナトリウム、154 mM の NaCl、pH 7.4) 中、修飾アンチジップ 5 レポーター DNA と修飾アンチジップ 2 レポーター DNA の各 1 μ M を組み合わせることによって作製されたサンプル溶液によって、UV 融解曲線を得た。測定は全て、光路長 1 cm の石英セル (合計 1200 μ L) 中、磁気攪拌バーを入れて行った。260 nm における吸光度を、Peltier システム温度調整器を備えた

Cary 300 Bio UV-Vis 分光計を用いて、0 ～ 75 の範囲にわたり、0.5 / 分の加熱 / 冷却速度で、温度の関数として記録した。室温以下での結露を防ぐために、乾燥 N₂ ガスを分光計のサンプルチャンバーに通した。

【0148】

データを補正し、得られた曲線を補整した。次いで補整した融解曲線を、非線形最小二乗プログラム MeltWin 3.0 (McDowell, J A ら、Biochemist ry、1996 年、35: 14077 - 14089 頁) を用い、勾配ベースラインで二状態モデルに適合化した。融解温度 T_m (50% の複合体がその構成成分へと解離する温度として規定) は、融解曲線の第一微分の屈曲点極大値から判定した。結合用緩衝液が硫酸デキストランを含有する場合は、適合化を行う前に、サンプルから緩衝液融解曲線を差し引いた。

【0149】

この実験で用いられた特異的なアンチジップ対、およびそれらの実験的に判定された融解温度を表 3 に示す。特定のアンチジップ対に対して 2 つ以上の T_m が示されている場合は、複数の T_m 判定の結果を反映するものである。

【0150】

【表 3】

表 3. アンチジップ対の T_m

アンチジップ対	$T_m(^{\circ}\text{C})$
アンチジップ 5_10 量体/アンチジップ 2_10 量体	26.0、25.6、25.5
アンチジップ 5_9 量体/アンチジップ 2_10 量体	17.0
アンチジップ 2_9 量体/アンチジップ 5_10 量体	15.5
アンチジップ 5_2 ミスマッチ/アンチジップ 2_10 量体	14.1、14.0
アンチジップ 5_9 量体/アンチジップ 2_9 量体	11.0
アンチジップ 5_1 ミス/アンチジップ 2_10 量体	8.9、8.5、9.1
アンチジップ 5_8 量体/アンチジップ 2_10 量体	8.1
アンチジップ 2_10 量体/アンチジップ 5_8 量体	8.1
アンチジップ 5_8 量体/アンチジップ 2_8 量体	7.2

図 3 3 に示されている本試験の結果は、一般に、25 未満かつ 8 超の T_m を有するレポーターオリゴヌクレオチド対は、特異的なヘミペプチド結合をもたらすことを実証している。理論に拘束されることは望まないが、アンチジップ 2_9 量体 / アンチジップ 5_10 量体対で見られる低シグナルは、効率的な結合が妨げられた 2 種のヘミペプチド間に作り出された幾何学的配置に関連すると考えられる。同様の T_m を示したアンチジップ 5_9 量体 / アンチジップ 2_10 量体は、極めて長い特異的シグナルを生じた。したがって、レポーターオリゴヌクレオチドが異なる長さの場合は、長い方のレポーターがチオエステル末端を有し、短い方のレポーターがシステインまたはシステイン類縁体の末端を有することが重要であると考えられる。

実施例 14: さらに Cys 置換変異ペプチドならびにヘミペプチド対

T7 における他の位置でシステイン組込みを試験した。Gly 7、Gln 8 および Gln 9 各々での T7 におけるシステイン組込みにより、抗 T7 抗体および非反応性のヘミペプチドにより認識されたペプチドが生成した。したがって本発明は表 4 に示された変異 T7 ペプチドならびに P1 ヘミペプチドおよび P2 ヘミペプチドと示されるヘミペプチド対を提供する。下記のペプチドおよび P2 ヘミペプチドの各々に関して、システインはシス

テイン類縁体に任意に置換される。

【 0 1 5 1 】

【 表 4 】

表 4. 変異体 T7 ペプチドおよび対応するヘミペプチド

変異体 T7 ペプチド	配列番号	P1 ヘミペプチド	配列番号	P2 ヘミペプチド	配列番号
MASMTGCGQMG	38	MASMT-チオエステル	50	CGQMG	58
MASMTGCQMG	39	MASMTG-チオエステル	5	CQMG	72
MASMTGGCQMG	40	MASMTGG-チオエステル	51	CQMG	79
MASMTGGQCMG	41	MASMTGGQ-チオエステル	52	CMG	80

10

リガンド結合などの他の手段によって検出されるペプチド（ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンに対する結合により検出される StreptTag ペプチド）に関しても同様な NCL 法が用いられた。StreptTag に関して、Ser₃、His₄、Pro₅ および Glu₆ のいずれにおける Cys 置換も、StreptTag および非反応性ヘミペプチドによって認識されるペプチドを生成した。したがって、本発明は下表 5 に示された変異 StreptTag ペプチドならびに P1 ヘミペプチドおよび P2 ヘミペプチドと表された対応するヘミペプチド対（同列の P1 および P2 ヘミペプチド）を提供し、それらは本発明において有用であり、本発明の一部である。下記のペプチドおよび P2 ヘミペプチドの各々に関して、システインはシステイン類縁体に任意に置換される。

20

【 0 1 5 2 】

【 表 5 】

表 5. 変異体 StreptTag ペプチドおよび対応するヘミペプチド対

StreptTag ペプチド	配列番号	P ₁ ヘミペプチド	配列番号	P ₂ ヘミペプチド	配列番号
(G) ₀₋₂ -NWCHPQFE-(G) ₀₋₂	42	(G) ₀₋₂ -NW-チオエステル	53	CHPQFE-(G) ₀₋₂	59
(G) ₀₋₂ -NWSCPQFE-(G) ₀₋₂	43	(Gly) ₀₋₂ -NWS-チオエステル	54	CPQFE-(G) ₀₋₂	60
(G) ₀₋₂ -NWSHCQFE-(G) ₀₋₂	44	(Gly) ₀₋₂ -NWSH-チオエステル	55	CQFE-(G) ₀₋₂	81
(G) ₀₋₂ -NWSHPCFE-(G) ₀₋₂	45	(Gly) ₀₋₂ -NWSHP-チオエステル	56	CFE-(G) ₀₋₂	82

30

酵素活性化により検出されるペプチド（例えば、リボヌクレアーゼ S - タンパク質の欠失変異体を活性化するために必要な S - 15 ペプチド）に関しても同様の NCL 法を用いた。S - 15 では、Glu₉ における Cys 置換により、リボヌクレアーゼ変異体および N 末端不活性ヘミペプチドを活性化するペプチドが生成される。したがって、本発明は下表 6 に示された変異 S - 15 ペプチドならびに対応するヘミペプチド対を提供し、それらは本発明において有用であり、本発明の一部である。下記のペプチドおよび P2 ヘミペプチドに関して、システインはシステイン類縁体に任意に置換される。

40

【 0 1 5 3 】

【 表 6 】

表 6. 変異体 S-15 ペプチドおよび対応するヘミペプチド対

S-15 ペプチド	配列番号	P ₁ ヘミペプチド	配列番号	P ₂ ヘミペプチド	配列番号
KETAAAKFCRQHMDS	47	KETAAAKF-チオエステル	57	CRQHMDS	61

50

表 4 ~ 6 に記載された各ヘミペプチドは、本発明による反応性ペプチド断片である。したがって、いずれのヘミペプチドもレポーターオリゴヌクレオチド配列に結合することができる。同様に、表 4 ~ 6 に記載されたペプチドもまた、レポーターオリゴヌクレオチド配列に結合することができる。ヘミペプチド - レポーターオリゴヌクレオチド配列ならびにペプチド - レポーターオリゴヌクレオチド配列は、アンチジップ配列に任意にさらに結合される。

【 0 1 5 4 】

一実施形態において、本発明は、第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列に結合した表 4 ~ 6 に記載された第一のヘミペプチド対のメンバーを含んでなる第一のリガンド - レポーターアセンブリ、および第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列に結合した対応するヘミペプチド対のメンバーを含んでなる第二のリガンド - レポーターアセンブリを含んでなるキットを提供し、第一および第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列は、互いに十分相補性であってハイブリダイズし、約 8 から約 25 の T_m を有する。各リガンド - レポーターアセンブリは、ジップまたはアンチジップオリゴヌクレオチド配列、スパーサーオリゴヌクレオチド配列、および生物学的標的に対して結合親和性を有する結合部分から選択される 1 つまたは複数の追加成分を任意に含んでなり得る。

10

【 0 1 5 5 】

リガンド - レポーターアセンブリは単一分子であり得る。あるいは、リガンドレポーターアセンブリは、機能的プローブを作り出すために互いに非共有結合している 2 つ以上の成分（例えば、レポーター成分と標的結合性成分）を含んでなり得る。一定の実施形態において、各プローブ成分は、1 つのアンチジップオリゴヌクレオチド配列を含んでなるが、結合性部分を欠いている。一定の実施形態において、各プローブ成分は、異なるアンチジップオリゴヌクレオチド配列を含んでなるが、結合性部分を欠いている。

20

【 0 1 5 6 】

一定の実施形態において、前記キットは、ジップオリゴヌクレオチド配列に共有結合または非共有結合している生物学的標的に対して結合親和性を有する結合性部分を含んでなる 1 つまたは複数の結合性成分をさらに含んでなり、前記ジップオリゴヌクレオチド配列は、第一または第二のレポーター成分上に存在するアンチジップオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズする。前記キットは、第一および第二のレポーター成分ならびに第一および第二の標的結合性成分を任意にさらに含んでなることができ、前記第一の標的結合性成分のジップ配列は、前記第一のレポーター成分のアンチジップ配列にハイブリダイズし；前記第二の標的結合性成分のジップ配列は、前記第二のレポーター成分のアンチジップ配列にハイブリダイズする。

30

【 0 1 5 7 】

前記キットは、ヘミペプチド対の 2 つのメンバーにより形成されたエピトープ検出用の検出成分を任意に含んでなる。一実施形態において、ヘミペプチド対は表 4 における対の 1 つであり、検出試薬は抗 T 7 抗体である。別の実施形態において、ヘミペプチド対は表 5 における対の 1 つであり、検出試薬はストレプトアクチンまたはストレプトアビジンである。別の実施形態において、ヘミペプチド対は表 6 における対の 1 つであり、検出試薬は、S - 15 により活性化される変異リボヌクレアーゼおよび検出可能なりボヌクレアーゼ基質である。一定の実施形態において、前記キットは、DCS によって生成した反応生成物の各分子に対して複数の検出可能部分を生成するための増幅成分をさらに含んでなる。

40

実施例 15 : NCL を用いた A431 細胞における EGFR ホモ二量体の検出

A431 細胞の接着培養物を 16 時間、血清飢餓状態にした。細胞をトリプシンによりプレートから分離し、受容体の二量体化を誘導するために、細胞懸濁液を AG1478 (1 μ M) により 37 で 5 分間、次いで氷上で EGF (200 ng/mL) により 15 分間処理した。細胞懸濁液を氷上、PBS 中の 2 %ホルムアルデヒドにより 30 分間固定した。固定した細胞を 2 %の BSA、5 %の硫酸デキストラン、10 μ M の tRNA、および 100 μ g/mL のヤギ IgG を含有する 50 mM のリン酸ナトリウム、pH 6 と共に

50

10

20

実施例 16：アミド結合アイソスターを含有する T7 ペプチドの形成に有用な T7 修飾ヘミペプチドの合成

【化 2】



40

50

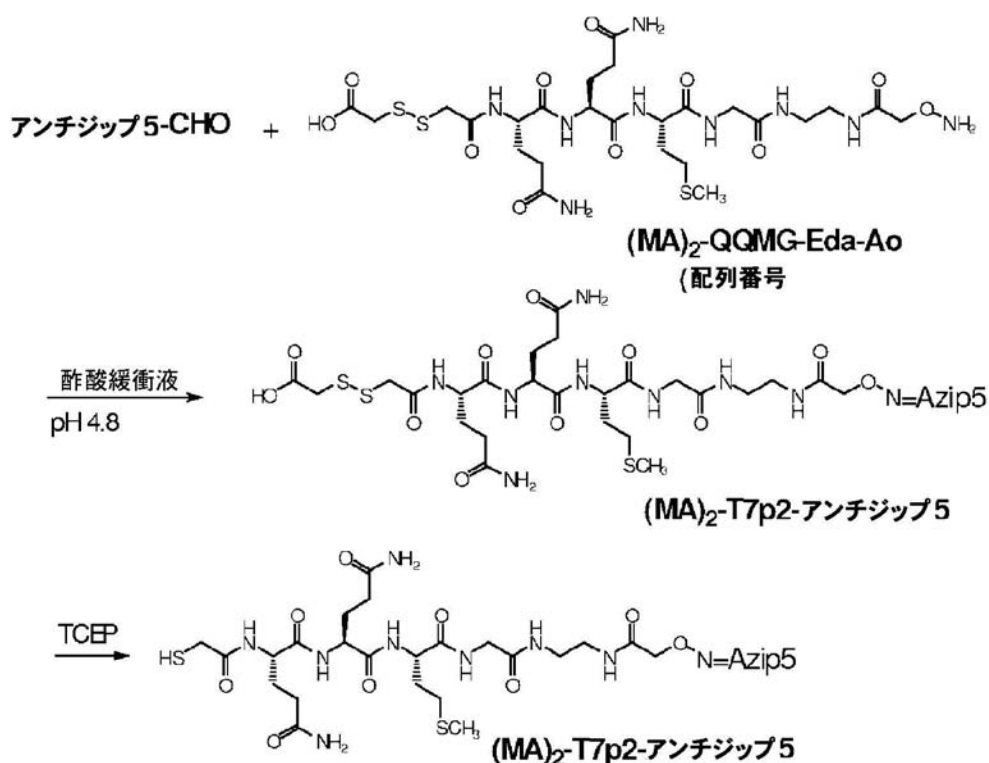
アミノピリジン (0.33 mg、2.7 μ mol) を加え、引き続き 5 μ L (39 μ mol) のエチル 3-メルカプトプロピオネートを加えた。反応混合物を室温で 15 時間攪拌し、75 μ L の水でクエンチした。反応混合物を NAP5 カラム (GE health care、Piscataway、NJ) 上に充填した。生成物を 700 μ L の TEAA 緩衝液 (0.05 M、pH 5.5) により溶出させ、TEAA 系 (溶媒 A、0.05 M の TEAA、pH 5.5；溶媒 B、アセトニトリル；溶媒 B の勾配は 4 ~ 14 分間に 10% から 40% へと増加)。12.4 分の時点でのフラクションを回収して、3.3 nmol のアンチジップ 2 __ T7 p1 - S (Et3MP) を得た。

(ii) アンチジップ 5 __ T7 __ p2 - MA の合成

【0160】

【化3】

10



20

30

(MA)₂ - QQMG - Eda - Aoa (配列番号 83)

最後の結合を除き、C末端ヘミペプチド GQQMG (T7 - p2) (配列番号 6) と同様にペプチドを合成した。N末端にグリシンの代わりにメルカプトアセテートのジスルフィド型を置くためにジチオグリコール酸を用いた。TFA / TIS / H₂O (94 : 3 : 3) により樹脂からペプチドを開裂させ、精製せずに使用した。

40

(MA)₂ - T7p2 - アンチジップ 5

100 μ L の酢酸緩衝液 (0.1 M、pH 4.8) 中、アンチジップ 5 - CHO (20 nmol) および (MA)₂ - QQMG - Eda - Aoa (1.12 mg) (配列番号 83) を、室温で 4 時間攪拌した。反応混合物を 100 μ L の TEAA 緩衝液 (0.1 M、pH 7) により希釈し、NAP5 カラム上に充填した。精製物を、700 μ L の TEAA 緩衝液で溶出させ、TEAA 系 (溶媒 A、0.1 M の TEAA、pH 7；溶媒 B、アセトニトリル；溶媒 B の勾配は 4 ~ 14 分間に 10% から 40% へと増加) を用い HPLC で精製した。9.8 分の時点でのフラクションを回収して、12.2 nmol (61%) のアンチジップ 5 __ T7 __ p2 - (MA)₂ を得た。

【0161】

50

アンチジップ5 __ T 7 __ p 2 - M A ストック溶液の調製：水中、アンチジップ5 __ T 7 __ p 2 - (M A)₂ (9 μ L 、 1 0 0 μ M) の溶液に、水中 T C E P ・ H C l (1 μ L 、 1 0 0 m M) の溶液を加えた。使用前にサンプル溶液を室温で 1 時間攪拌するか、または 1 ヶ月まで - 8 0 で保存した。

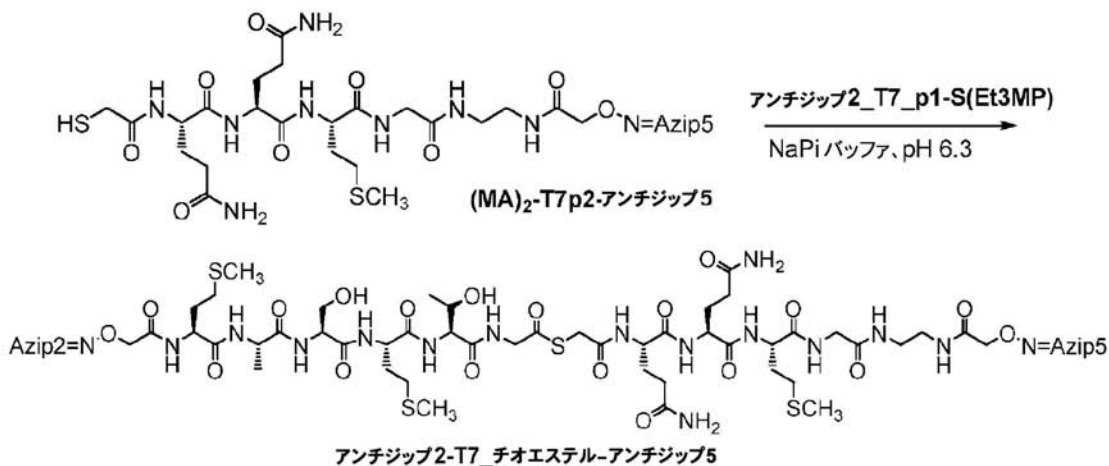
【 0 1 6 2 】

アンチジップ5 __ T 7 __ p 2 - M A とアンチジップ2 __ T 7 __ p 1 - チオエステルを合わせると、以下のスキームに示されるように、2 種のアンチジップレポーターオリゴヌクレオチドに結合した完全変異 T 7 ペプチド (T 7 __ チオエステル) であるアンチジップ2 __ T 7 __ チオエステル __ アンチジップ5 が自然に生成した。

【 0 1 6 3 】

【 化 4 】

10



20

アイソスターとしてチオエーテル結合を含有する T 7 ペプチドを生成させるために、代替化学も使用した。この化学においては、一方のヘミペプチドはエチルチオール末端を含有するように修飾し、他方のヘミペプチドはハロアセトアミド部分を含有するように修飾した。これら 2 種のヘミペプチドは自然に反応して、G l y - G l y 配列を模倣するチオエーテル結合を形成する。

30

実施例 1 7 : アミド結合アイソスターを含有する T 7 ペプチドの形成を介して D N A 標的を検出するための D P C の使用

9 6 ウェルマイクロプレート (P i e r c e ; R o c k f o r d 、 I L 、 B S A ブロック) のウェル (固体支持体) 内に固定化したストレプトアビジンを一晩インキュベートすることにより、固定化 D N A 標的配列を調製した。ビオチン - ジップ 2 およびビオチン - ジップ 5 の各々 2 . 5 ピコモルの混合物を含有する 1 0 0 μ L の P B S 緩衝液によりウェルを洗浄した。インキュベーション後、2 0 0 μ L の P B S - T で 3 回、次いで水で 1 回プレートを洗浄し、風乾した。

40

【 0 1 6 4 】

次いで、5 % の硫酸デキストランを含有する 5 0 m M のリン酸ナトリウム緩衝液、p H 6 . 0 中、0 . 0 5 μ M のアンチジップ2 __ T 7 __ p 1 - S (E t 3 M P) と共にウェルをインキュベートした。次いでウェルを、リン酸ナトリウム / 硫酸デキストラン緩衝液により洗浄してから、同じ緩衝液中の (M A)₂ - T 7 p 2 - アンチジップ5 またはアンチジップ5 __ T 7 __ p 2 __ C y s のいずれかをウェルに加えた。次いで各ウェルに P B S - T 緩衝液中、0 . 0 1 μ M のマウス抗 T 7 抗体アルカリホスファターゼ結合体 (N o v a g e n 、 G i b b s t o w n 、 N J) 1 0 0 μ L を加えた。ウェルを 2 5 で 3 0 分間インキュベートしてから、2 0 0 μ L の P B S - T 緩衝液で 4 回洗浄した。A t t o p h o s 検出用溶液 (A m e r s h a m 、 P i s c a t a w a y 、 N J) により反応混合物を発

50

現させ、実施例 13 に記載されたように、蛍光発現の動態をモニターした。結果は図 35 にまとめてある。

【0165】

結果として T7 チオエステルペプチド（チオエステルと表されている）が形成され、対応する T7 - Cys ペプチド（NCL と表されている）よりもわずかに低いレベルで検出されたことを図 35 は実証している。標的またはいずれかの T7 ヘミペプチドアンチジップ分子を欠いた陰性対照は、低いバックグラウンド値を示した。

文献の援用

本明細書に引用した刊行物および特許文書各々の全開示は、各々個々の刊行物または特許文書が個々に表されたのと同じ程度に、全ての目的のためにその全体が参照として援用されている。

10

等価物

本発明は、本発明の意図または基本的な性格を逸脱することなく、他の特定の形態に具体化できる。したがって前述の実施形態は全てに関して、本明細書に記載した本発明を限定するものではなく例示と考えるべきである。したがって本発明の範囲は、前述の説明によるのではなく、添付の請求項によって示され、また請求項の等価物の意味および範囲内に入る変更は全てそれらに包含されることが意図されている。

図 2

2 ピースのリガンド-レポーターアセンブリ (プローブ)

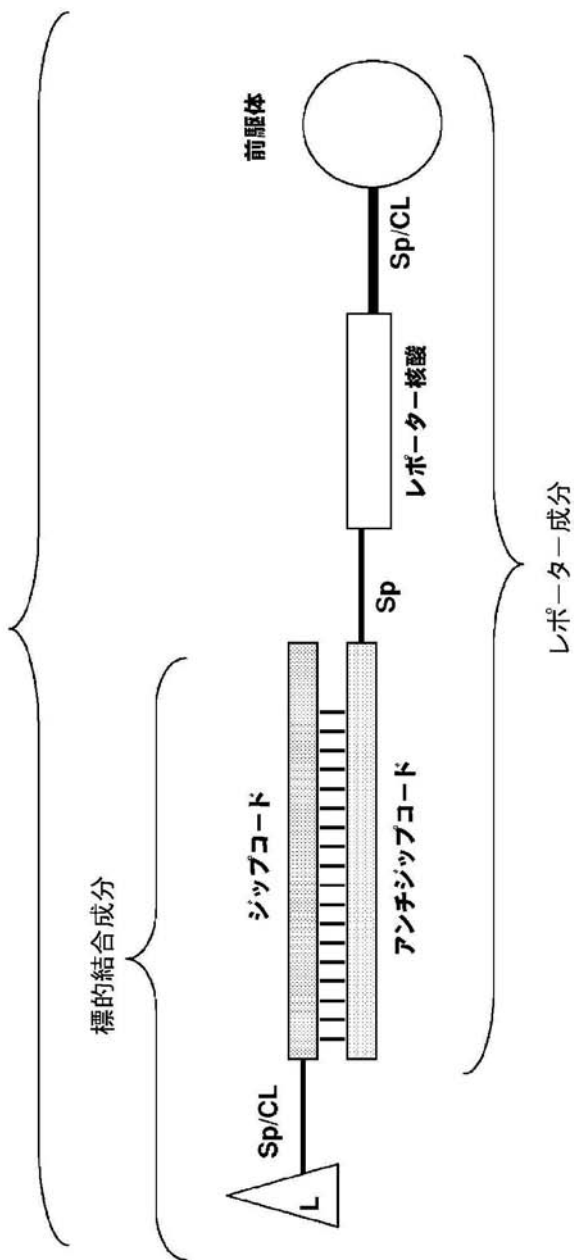


図 3

エピトープを生成できるDPC 反応

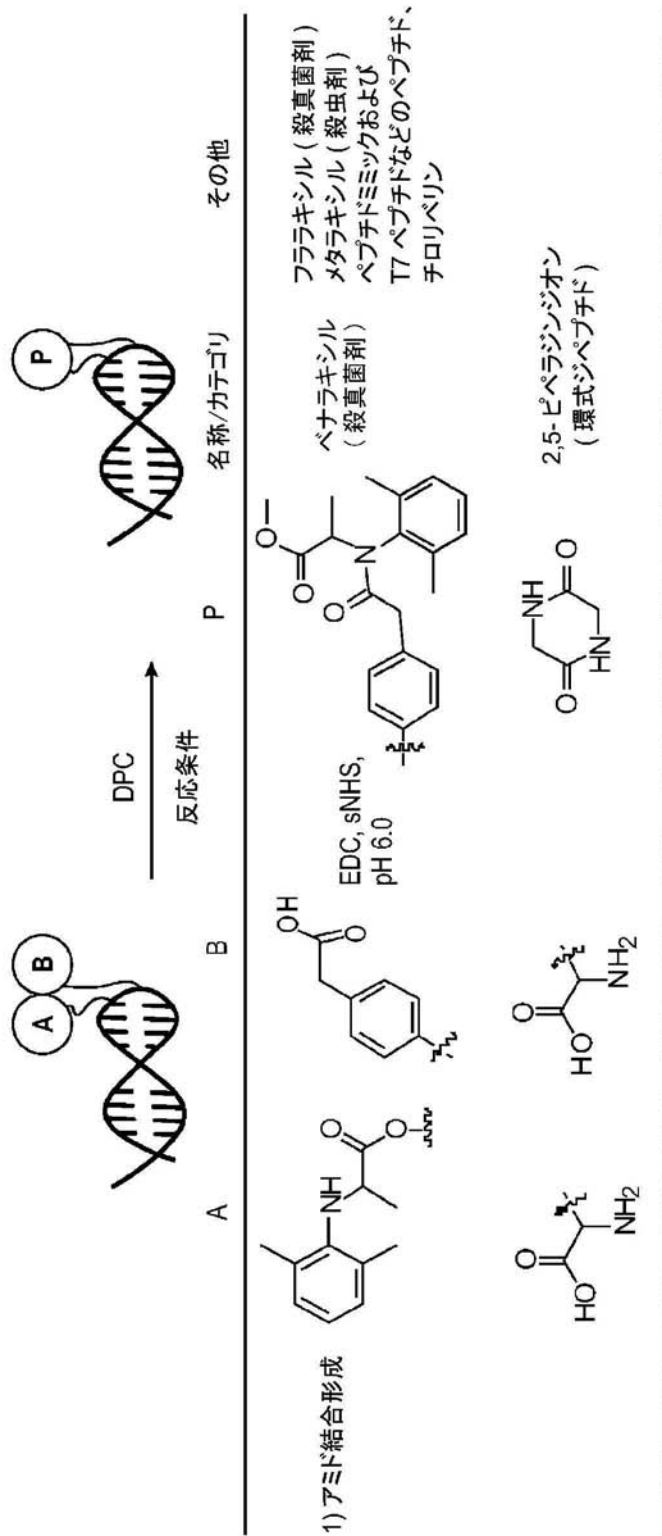
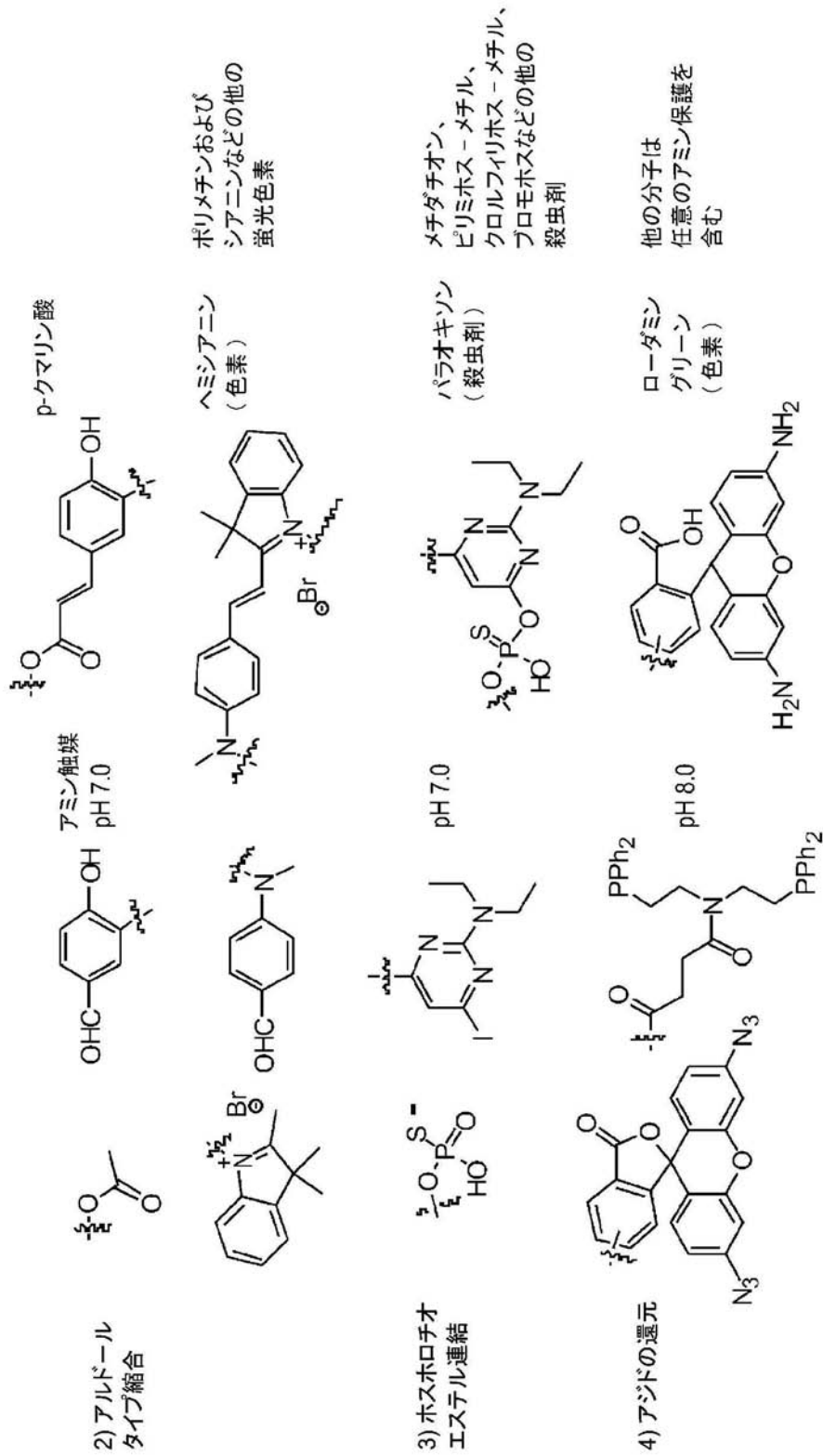
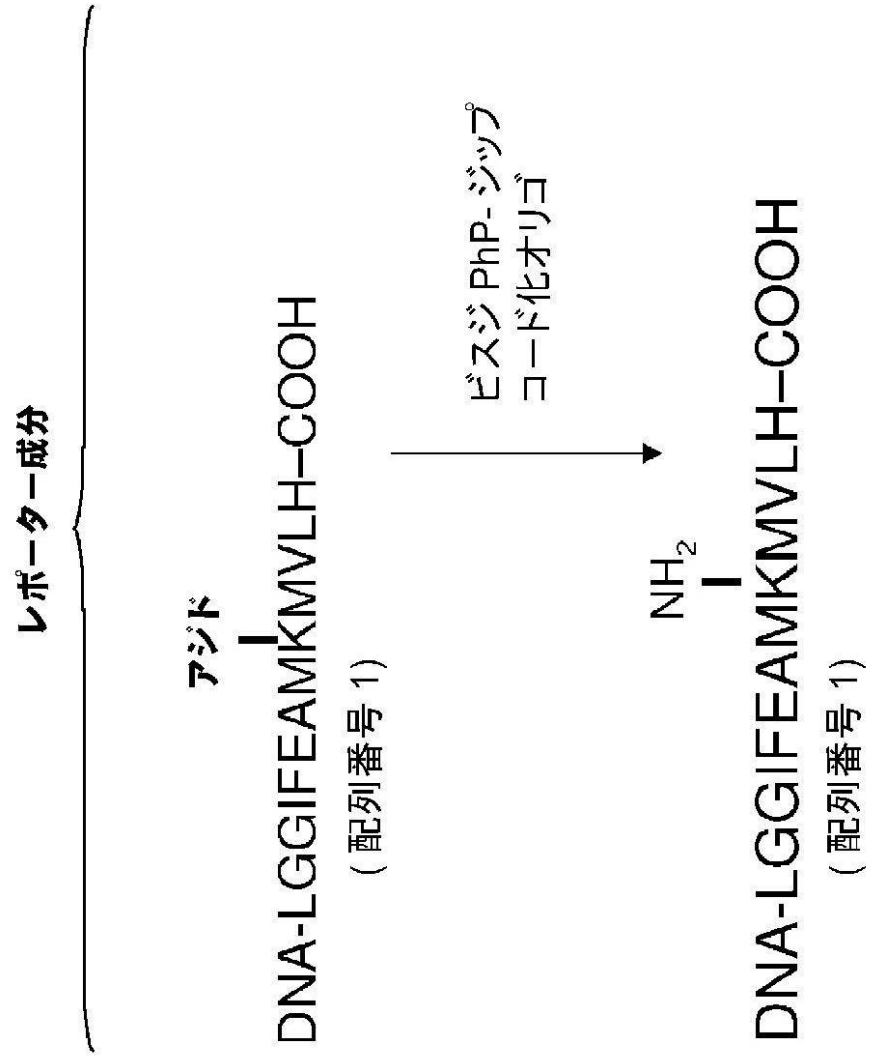


図 3 (続き)



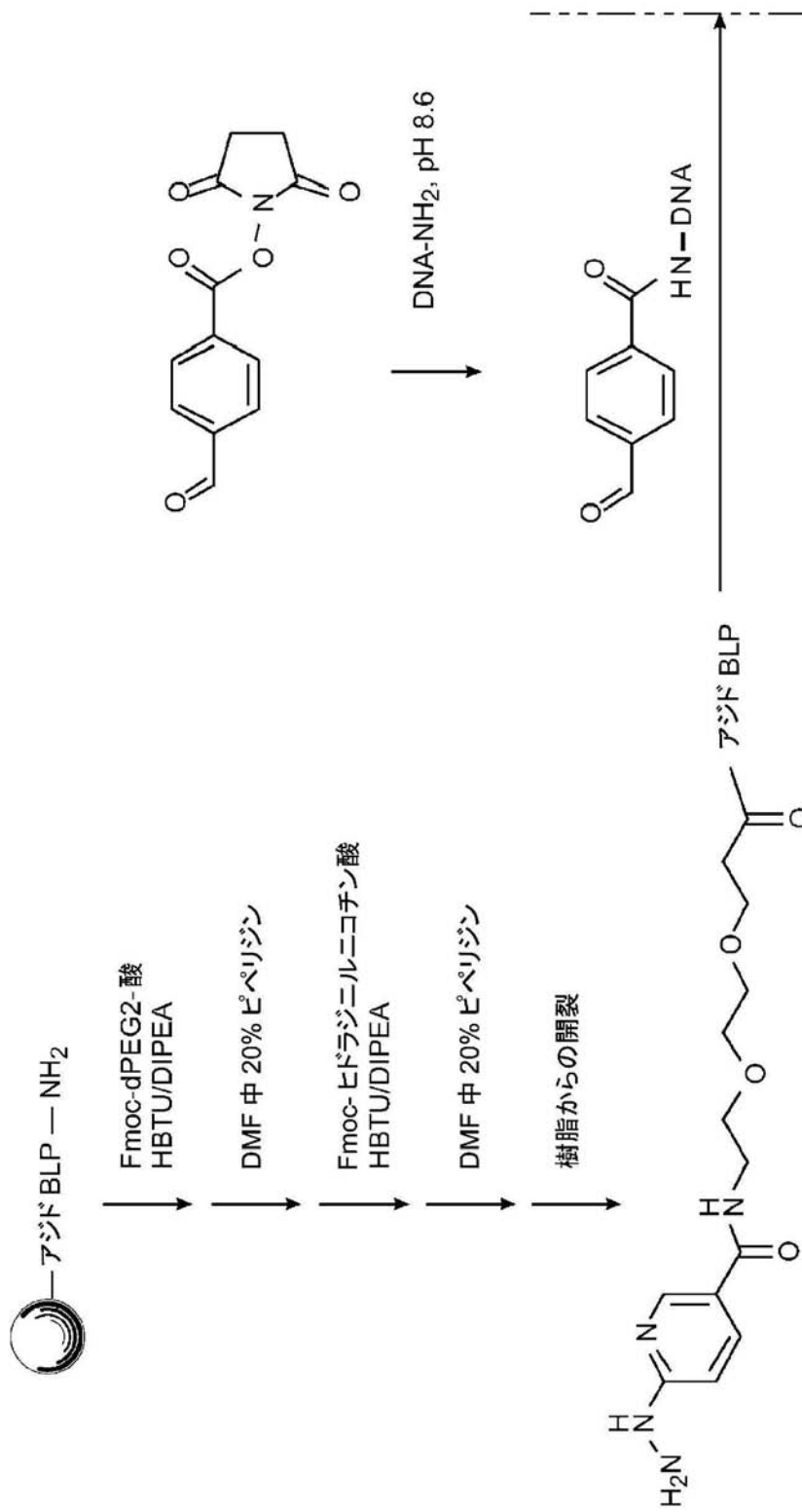
【図 4】

図 4 - ビオチン部位の脱ブロッキングに基づく検出



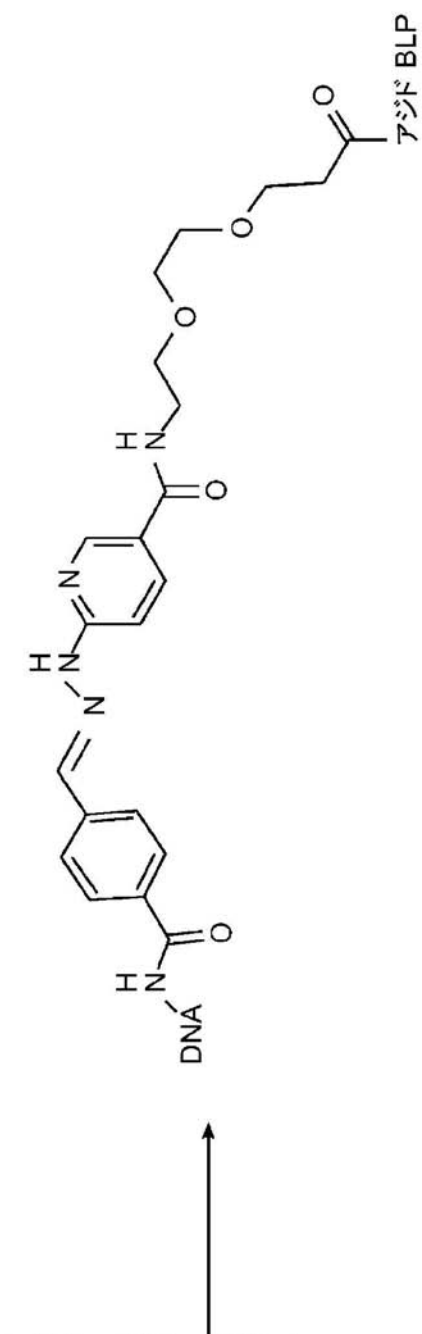
【図 5 - 1】

図 5



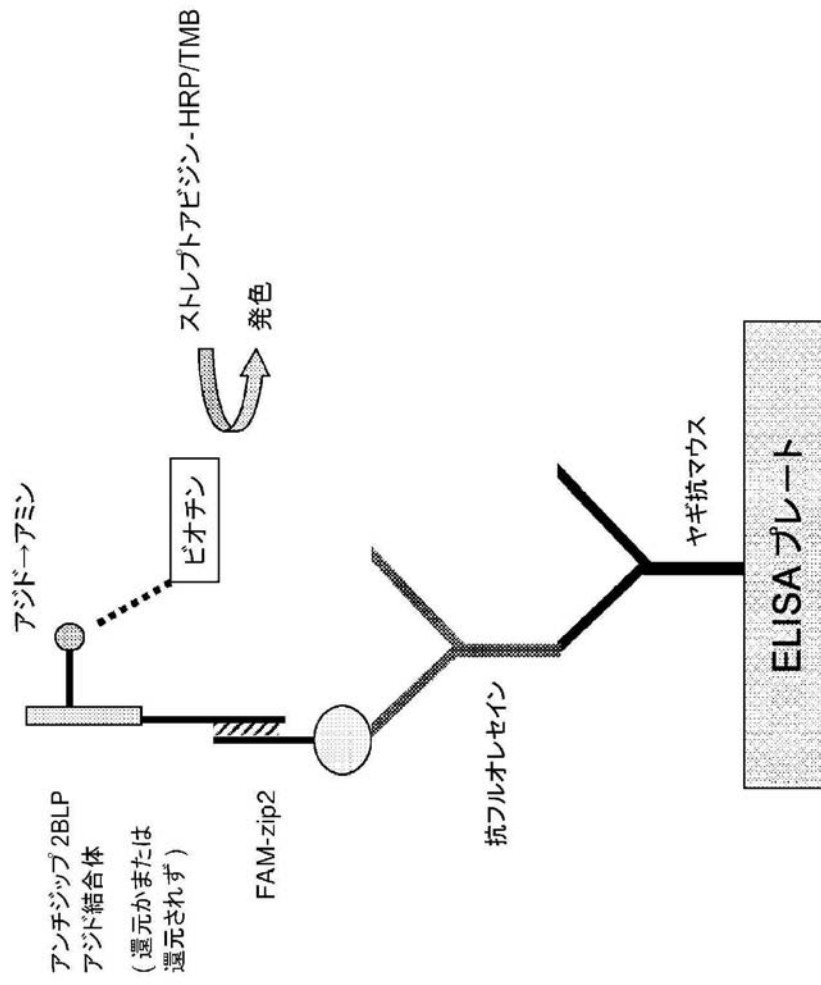
【 図 5 - 2 】

図 5 (続き)



【図 6】

図 6 - ビオチンリガーゼペプチド結合体上のビオチン検出



【 図 7 】

図 7

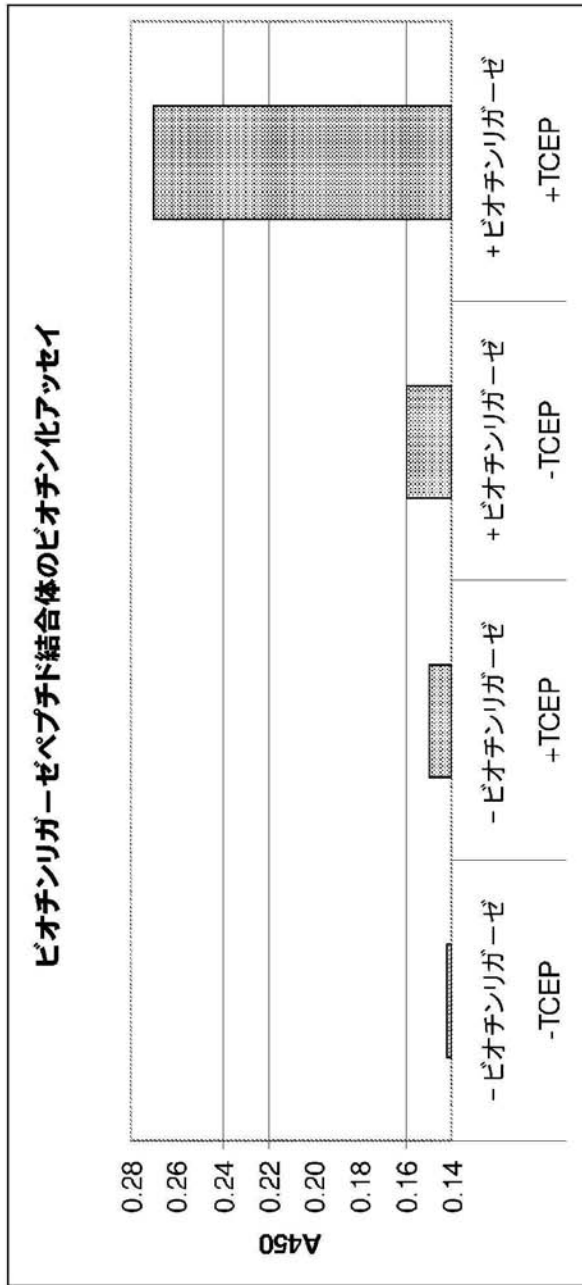
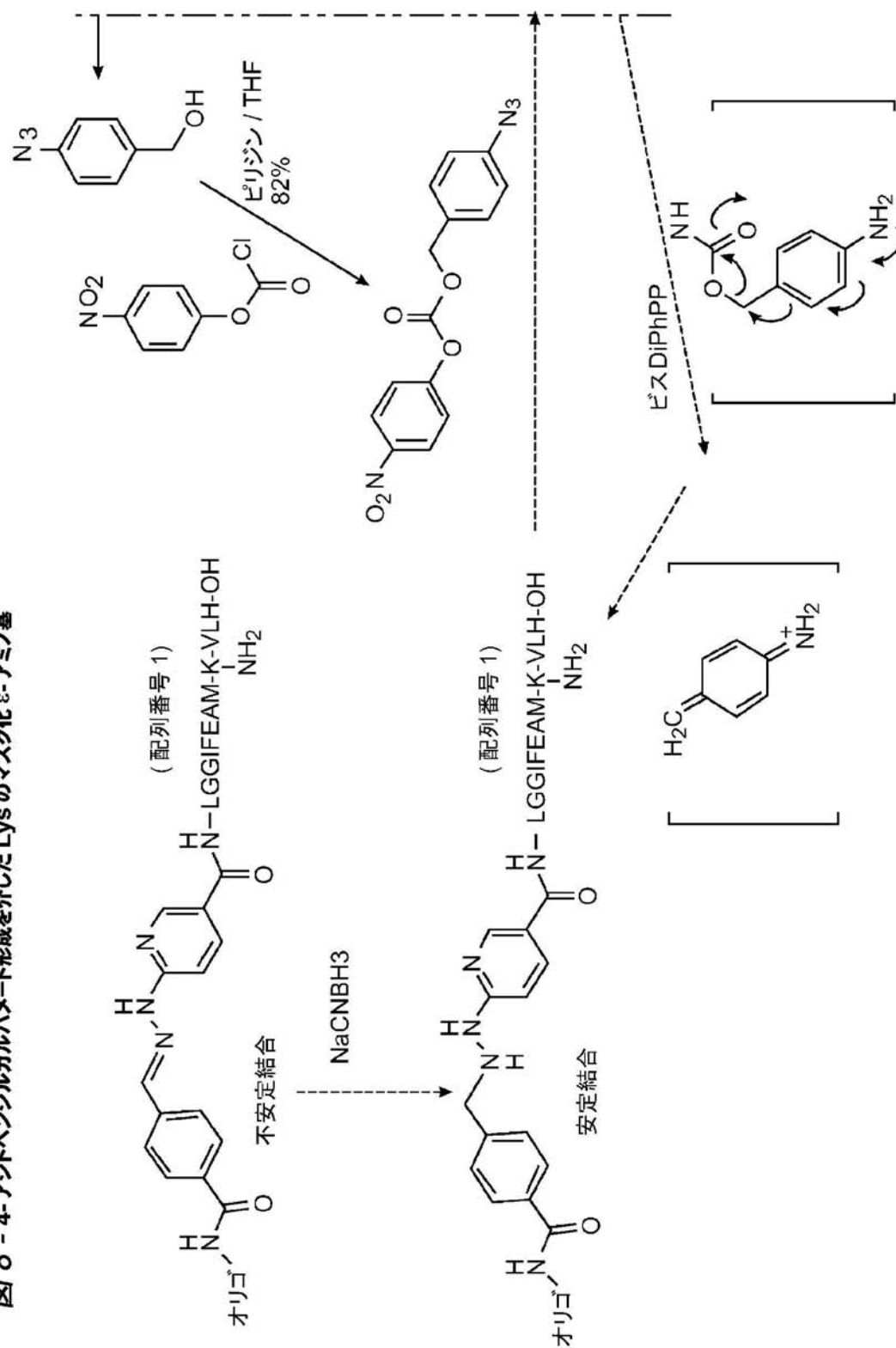
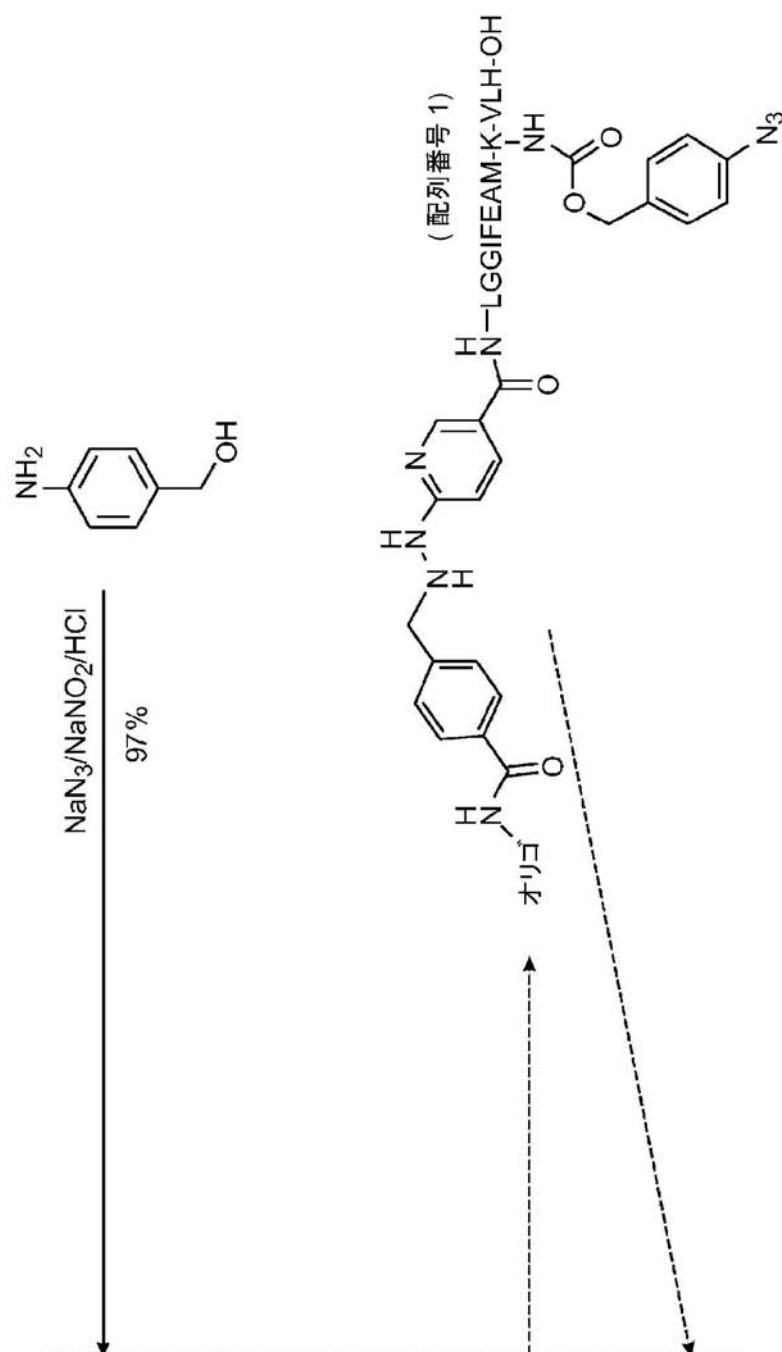


図 8-4-4-アジドベンジルカルバメート形成を介した Lys のマスキ化 ε -アミノ基



【 図 8 - 2 】

図 8 (続き)



【図 9】

図 9 - ビオチンリガーゼヘミペプチドを形成するヘミペプチドの連結に基づくDPC 検出

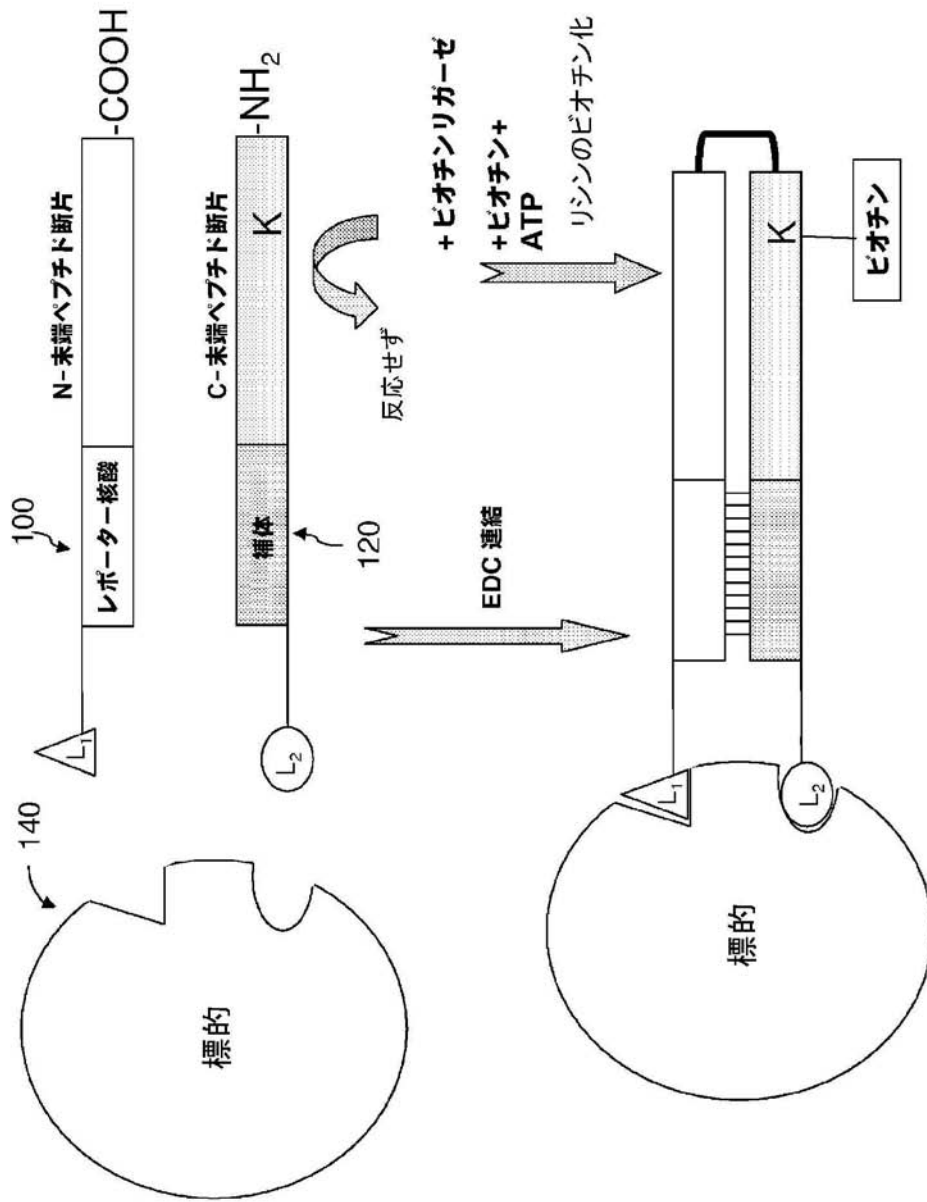
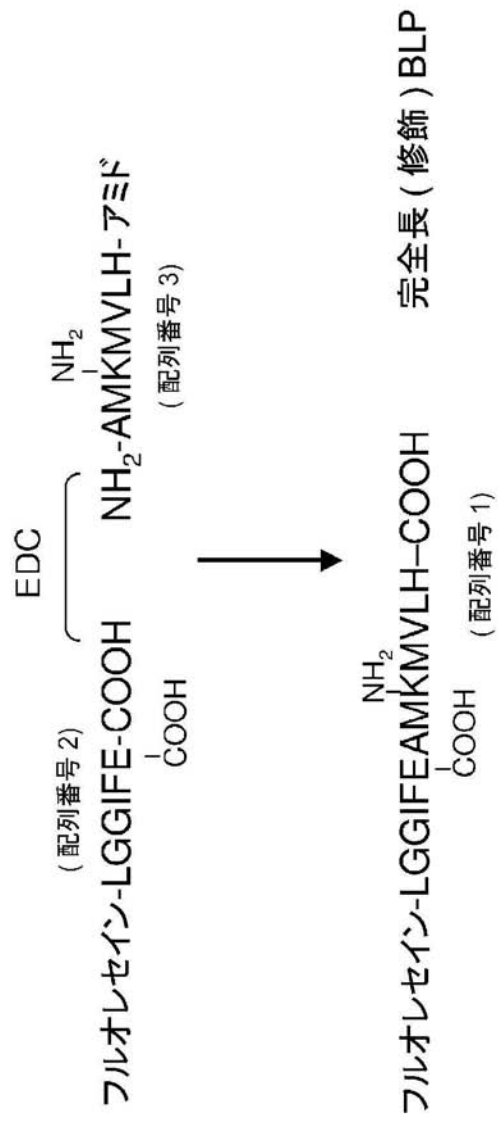
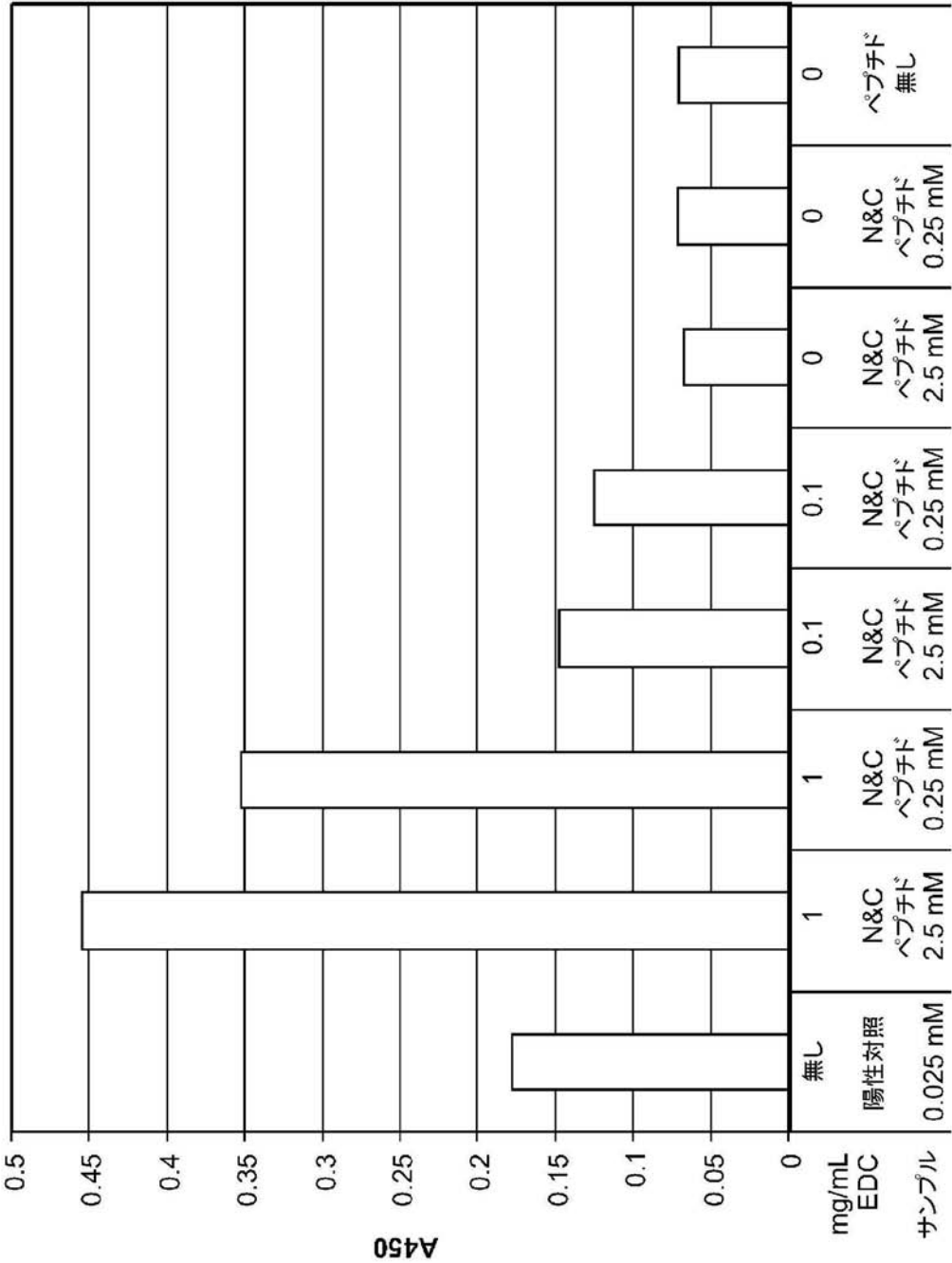


図 10 - 試験系 - ビオチンリガーゼペプチドの N- および C- 末端断片



【 図 1 1 】

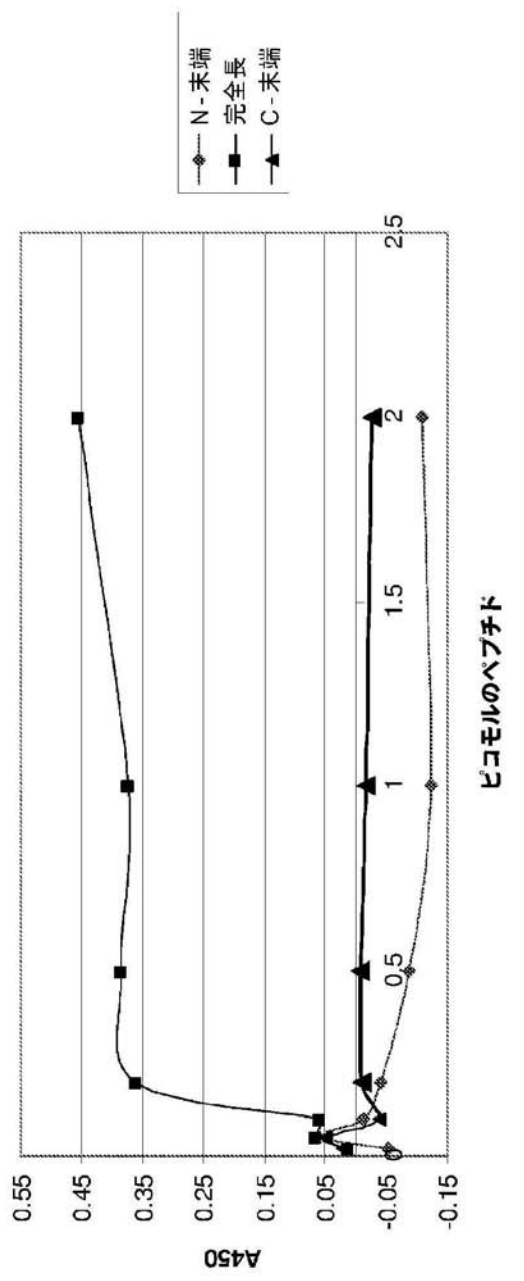
図 11



【 図 1 2 】

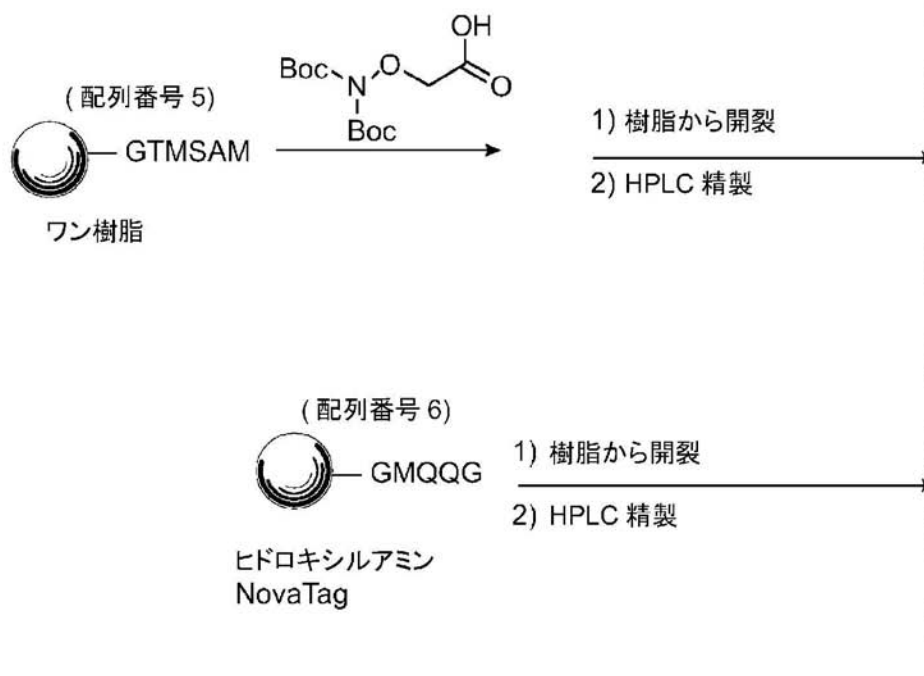
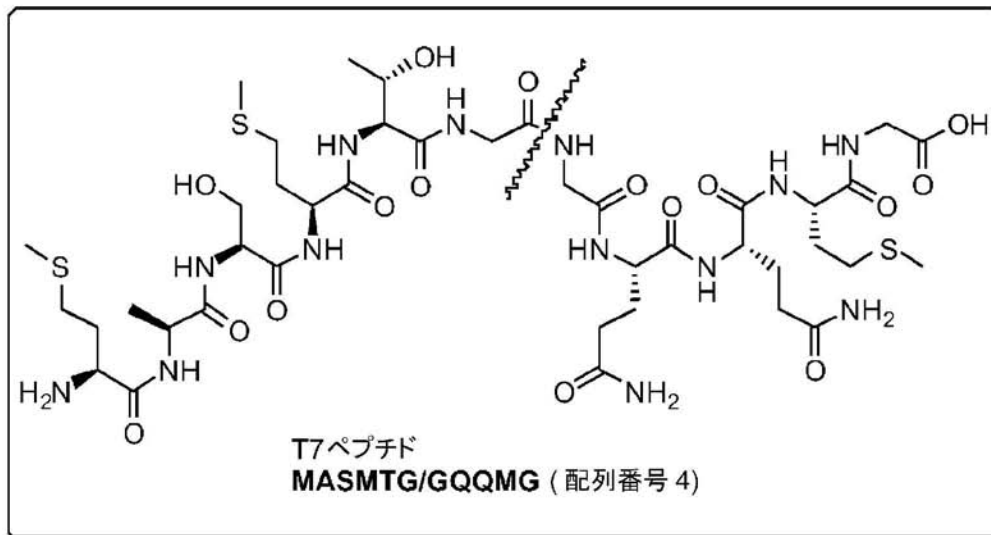
図 12

T7 ペプチドの ELISA による滴定



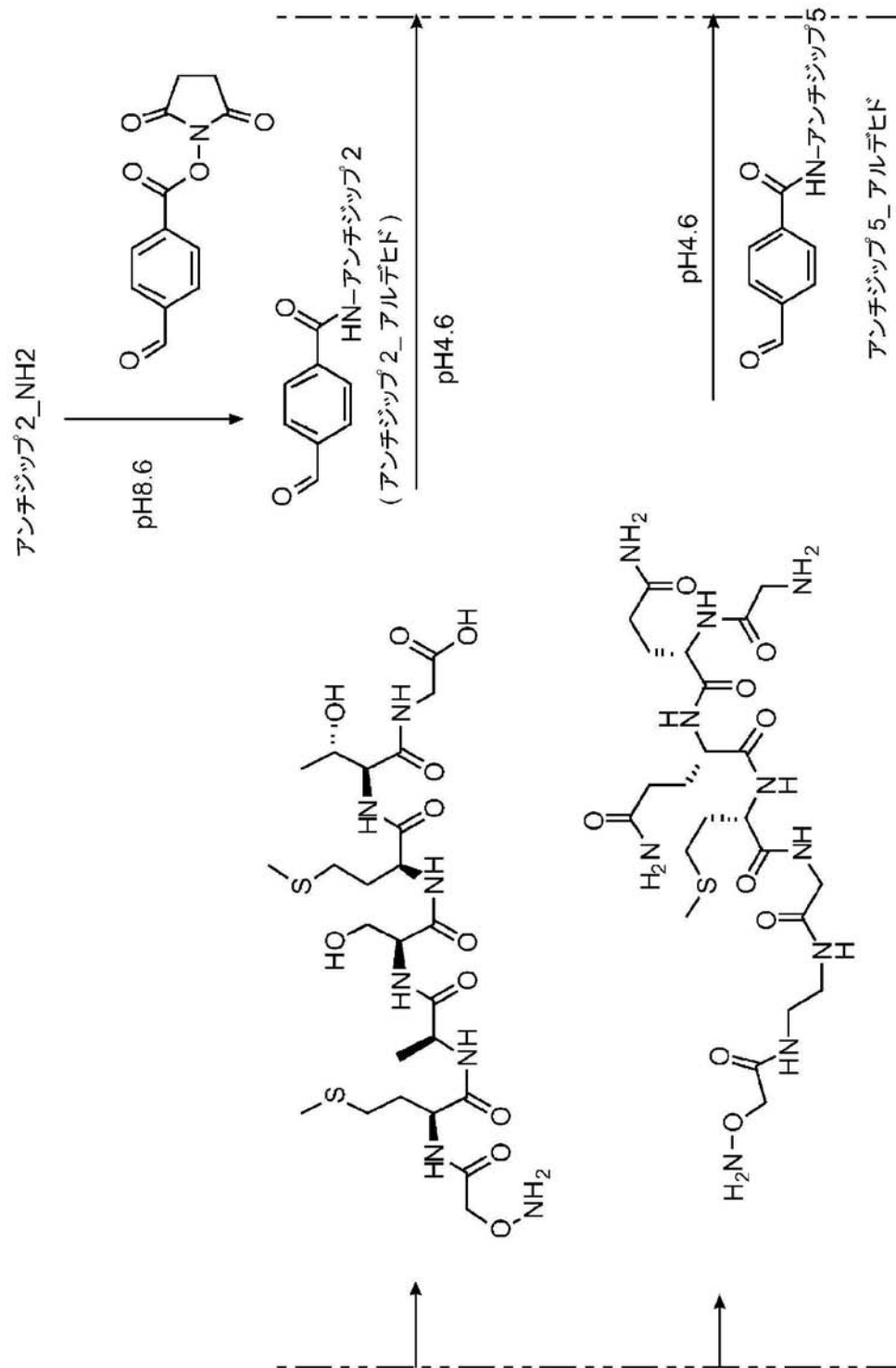
【図 13 - 1】

図 13 - T7 ヘミペプチドオリゴヌクレオチド結合体の合成



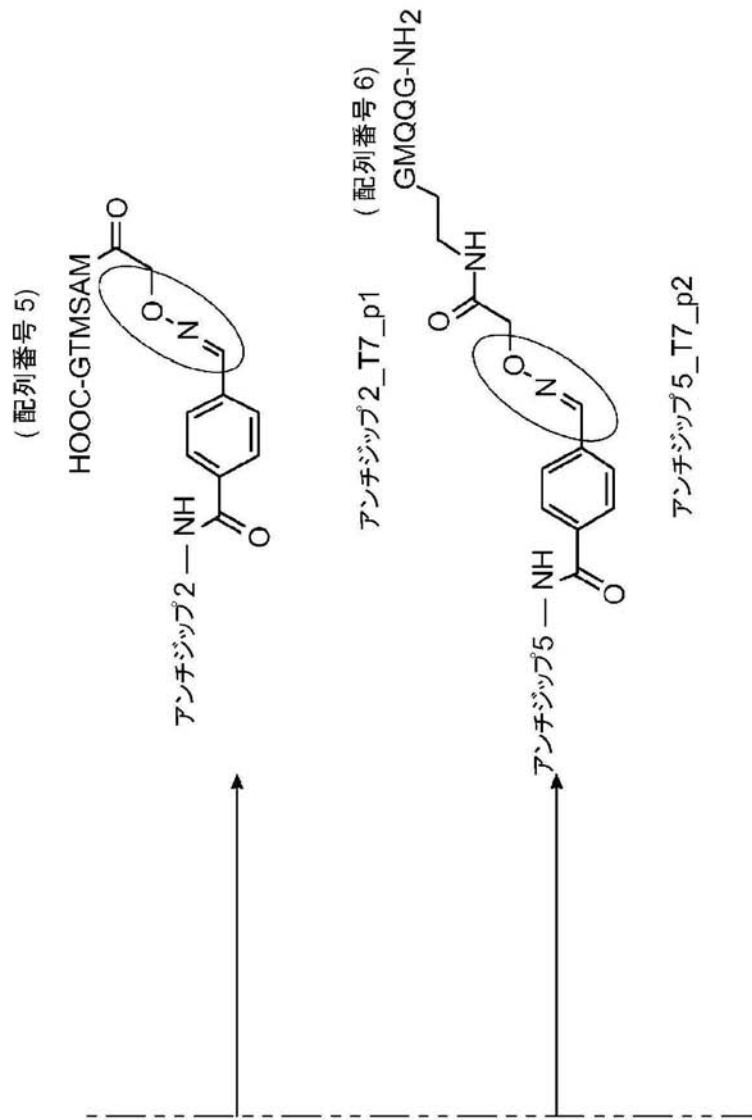
【 図 13 - 2 】

図 13 (続き 1)



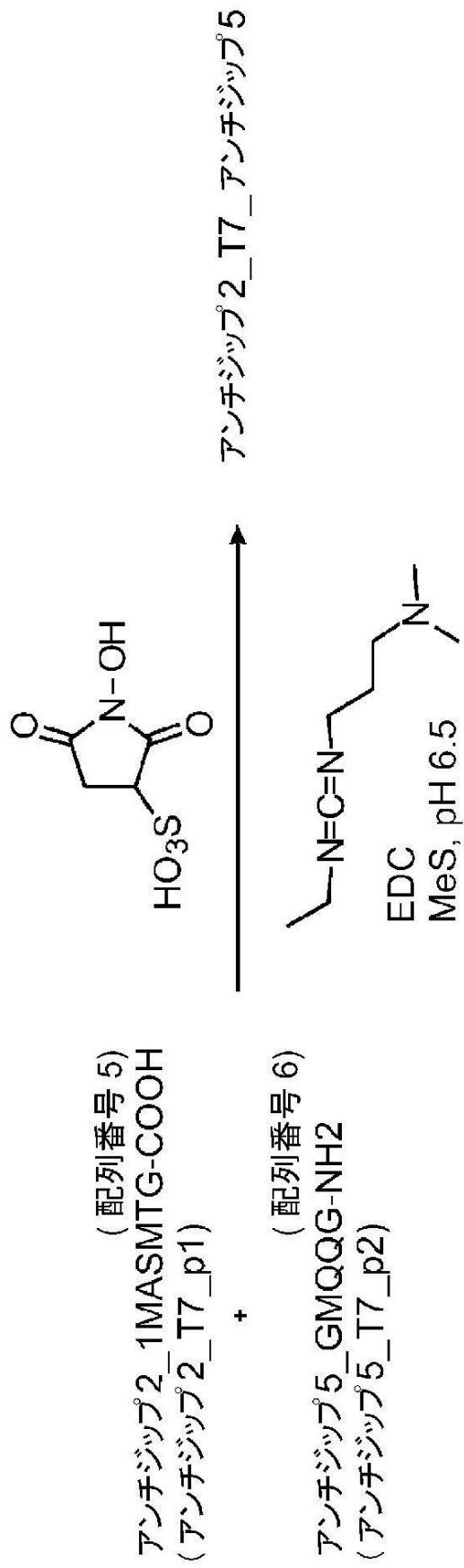
【図 13 - 3】

図 13 (続き)



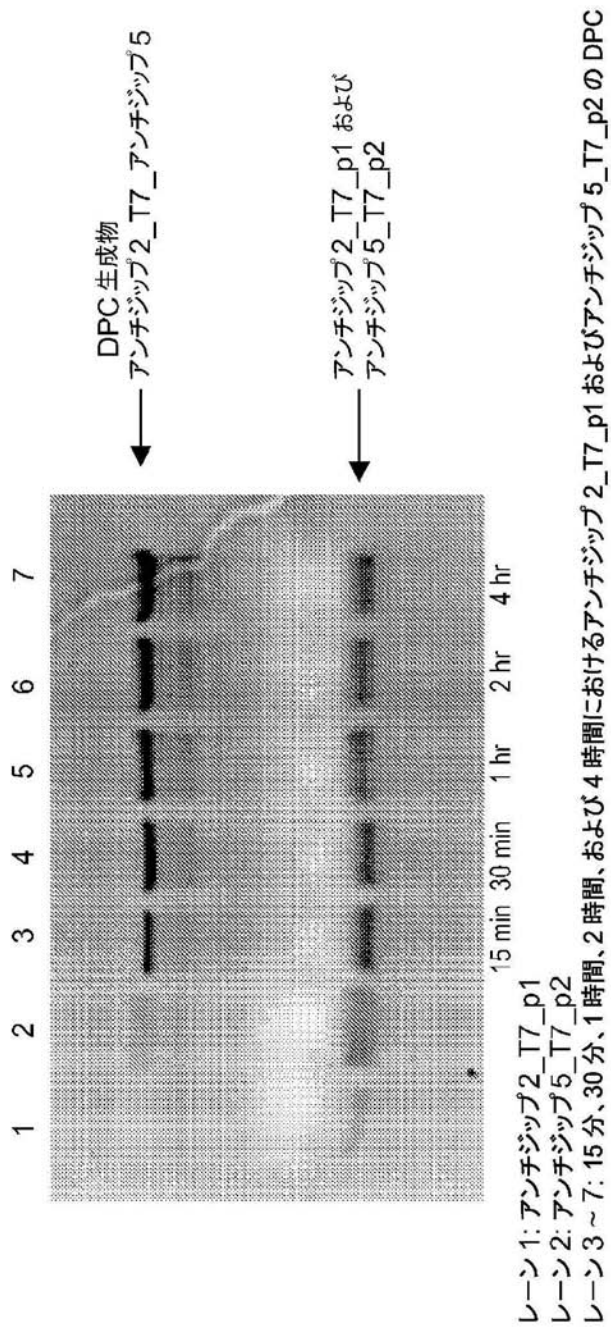
【 図 1 4 A 】

図 14A



【図 14 B】

図 14B



【図 15 - 1】

図 15

ペプチド エピトープの名称	配列	配列番号	抗体例	コメント	内部 Gly
E2 タグ	SSISSDFRDR	/	Abcam 911	アミノ側鎖が無い	
HA タグ	YPYDVPDYA	8	Abcam 9111	アミノ側鎖が無い	
S- タグ	KETAAAKFERQYDVS	9	Abcam 18598		
S1 タグ	NANFCWDF	10	Abcam 1016	アミノ側鎖が無い	
T7 タグ	MASMTGGQMG	11	Abcam 9115	-COOH または 第一級アミン側鎖が無い	Yes
V5 タグ	GKPIPNPIIGLD	12	Abcam 1209		Yes
FLAG- タグ	DYKDDDDK	13	Sigma F1804	(最初の 4 つのアミノ酸が最少)	
His(4-6)	HHEHHH	14	Sigma H1029	-COOH または 第一級アミン側鎖が無い	
C-Myc	QQKLISEEDL	15	Sigma C3956		
VSG ペプチド	YTDIEMNLGK	16	Abcam 1874		Yes
チオレドキシン	WAECGPGCAV	17	Sigma T0803	(ジスルフィドとしてのシステイン)	Yes
AU1	DTYRYI	18	Abcam 24620	第一級アミン側鎖が無い	
DDDDK	DDDDK	19	Abcam 1162		
AU5 タグ	TDFYLK	20	Abcam 3406		
E- タグ	EAPVPYPDFLEPR	21	Abcam 3397	アミノ側鎖が無い	
HSV タグ	EQPELAPDEDED	22	Abcam 19354	アミノ側鎖が無い	

【図 15 - 2】

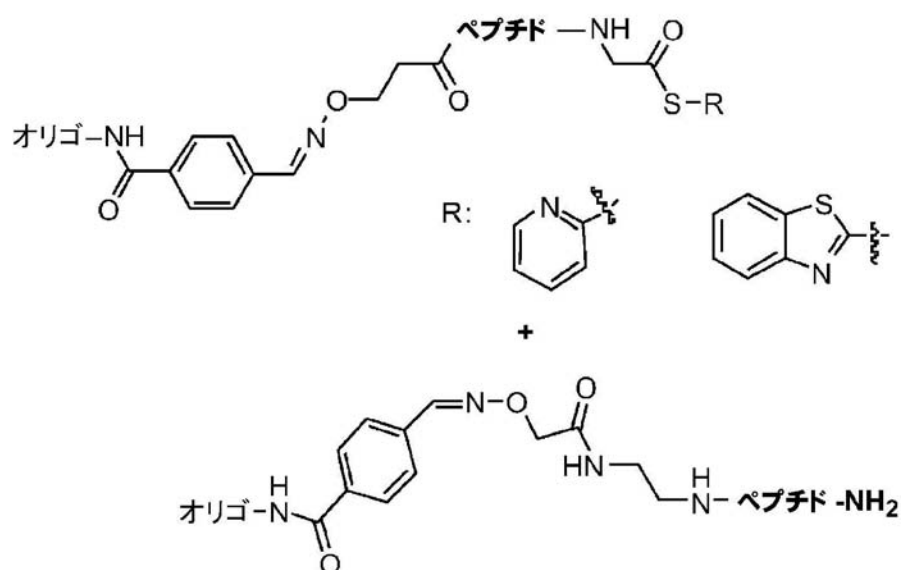
図 15 (続き)

ペプチド エピトープの名称	配列	配列番号	抗体例	Asp	EDC/sNHS に対する反応性の可能性 Glu	Tyr
タグ-100	EEIARFQPGYRS	23	Genscript A00677		2	1
K13	KPTTPPPPET	24	Genscript A00632		2	
Strept タグ	NWSHFQFE	25	Genscript A00625		1	
ユニバーサル	ETTFHH	26	Genscript A00680			
VSV	YTDIEMNRIGK	27	Genscript A00199	1	1	1
DDDK	DDDK	28	Abcam 1257	3		
glu-glu	EYMEVE	29	Meridian KO3122K Abcam 40767		2	1
タンパク質 C	EDQVDPRLIDGK	30	Acris (novus)	3	1	
HALL	YPYDVDPYASL	31	Covance A488	2		3
839	ETYNITLKY	32			1	2
ロトブジン	TETSQVAFPA	33	Anaspec 62190		1	
Cruz タグ 41	MKDGEEYSRAFR	34	Santa Cruz	1	2	1

【図 16 A】

図 16A

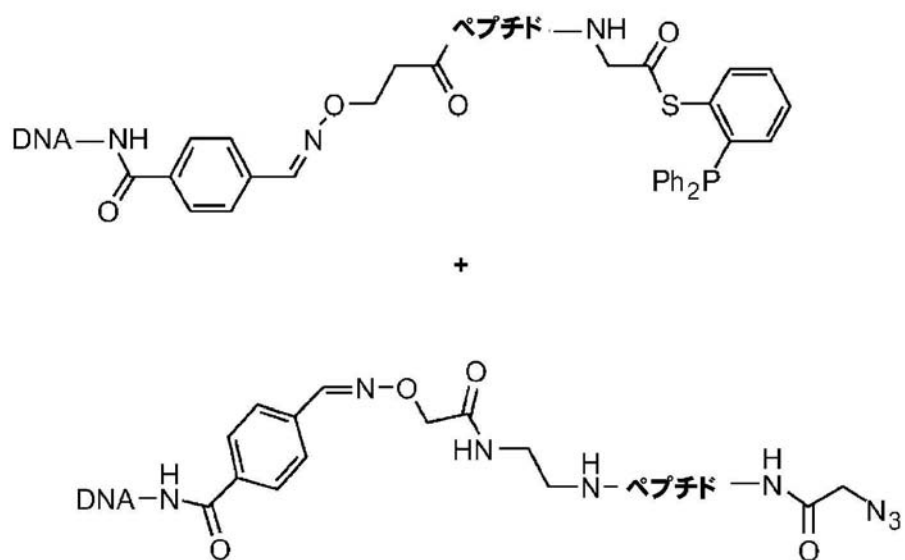
チオエステルを介するアミド形成



【図 16 B】

図 16B

Staudinger 連結



【図 18 A】

図 18A



【 図 18B 】

図 18B

Cys-Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser-Cys-COOH
* *
(配列番号 35)

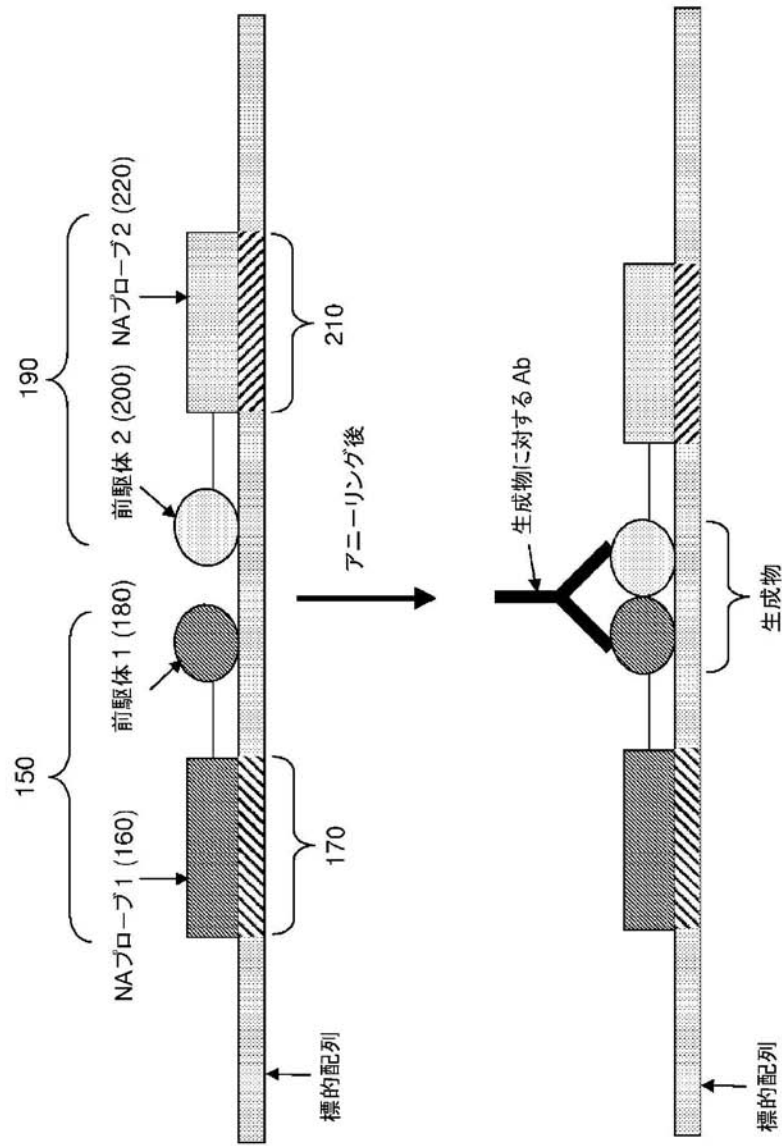
【 図 18 C 】

図 18C

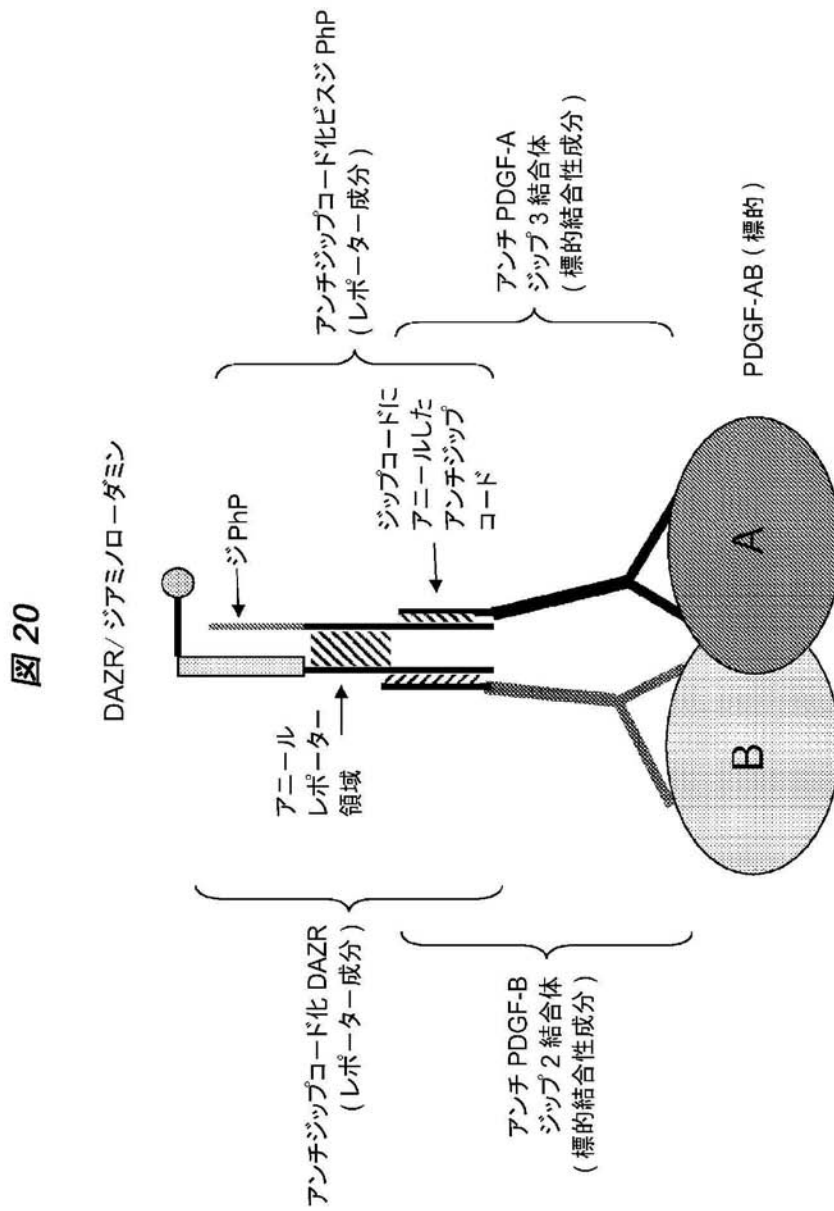
Cys-Lys-Glu-thr-Ala-Ala-Ala Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser-Cys-COOH
(配列番号 36) (配列番号 37)

【図 19】

図 19 - エピトープ作製に基づく DPC DNA 配列の検出

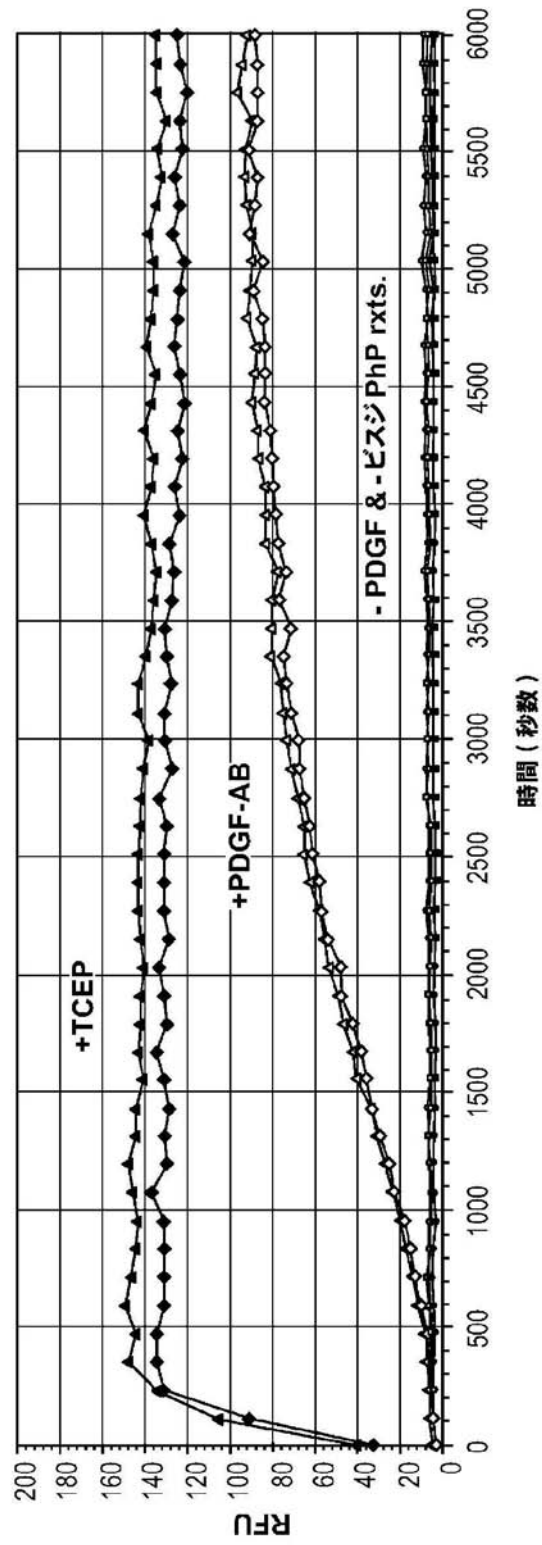


【図 20】

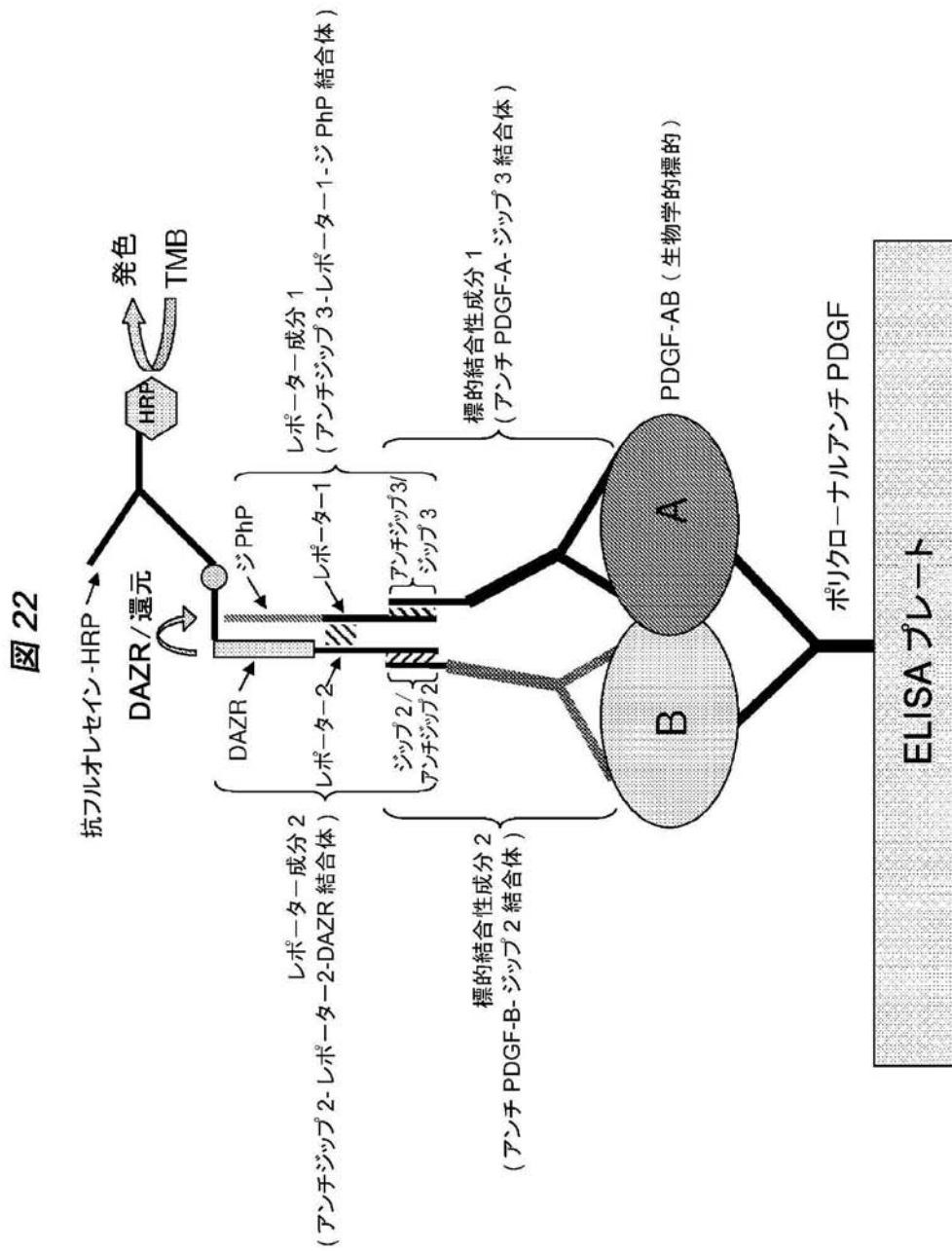


【 図 2 1 】

図 21

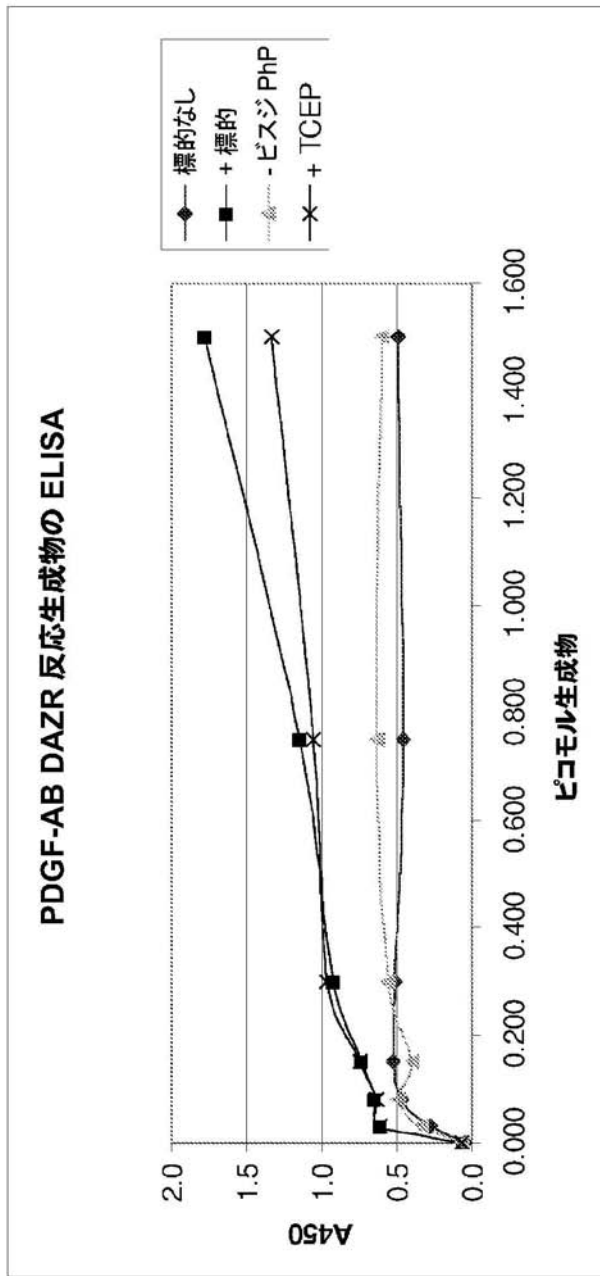


【図 22】



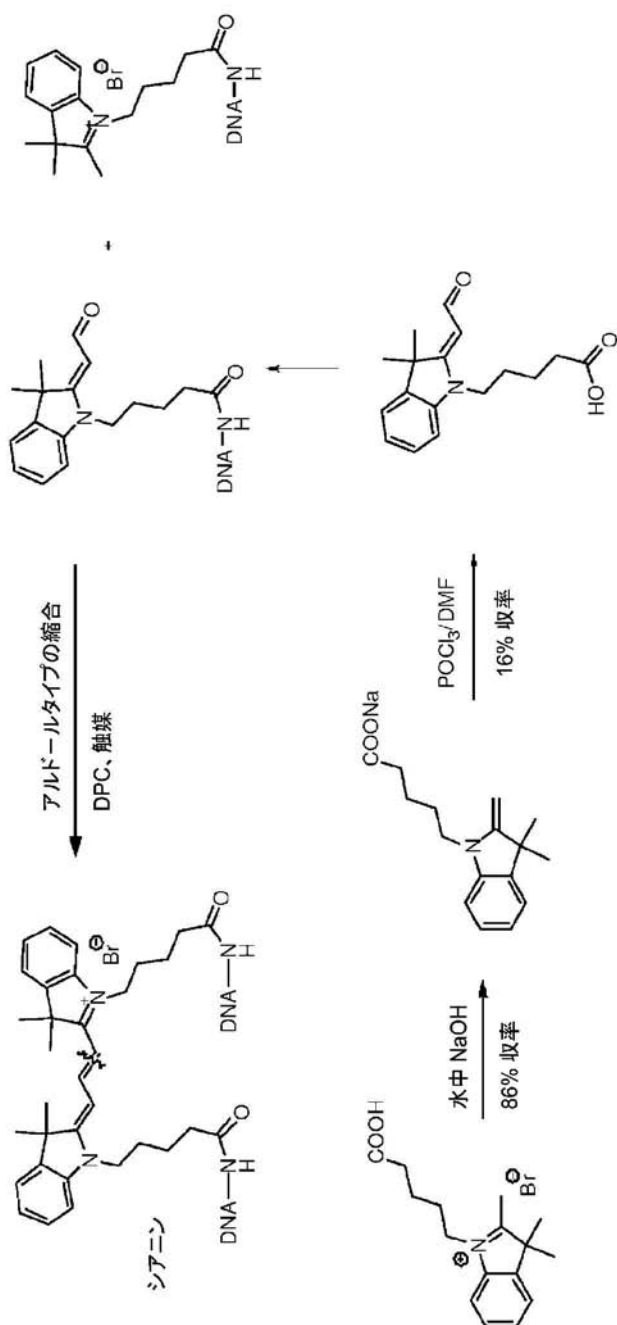
【 図 2 3 】

図 23



【 図 2 4 】

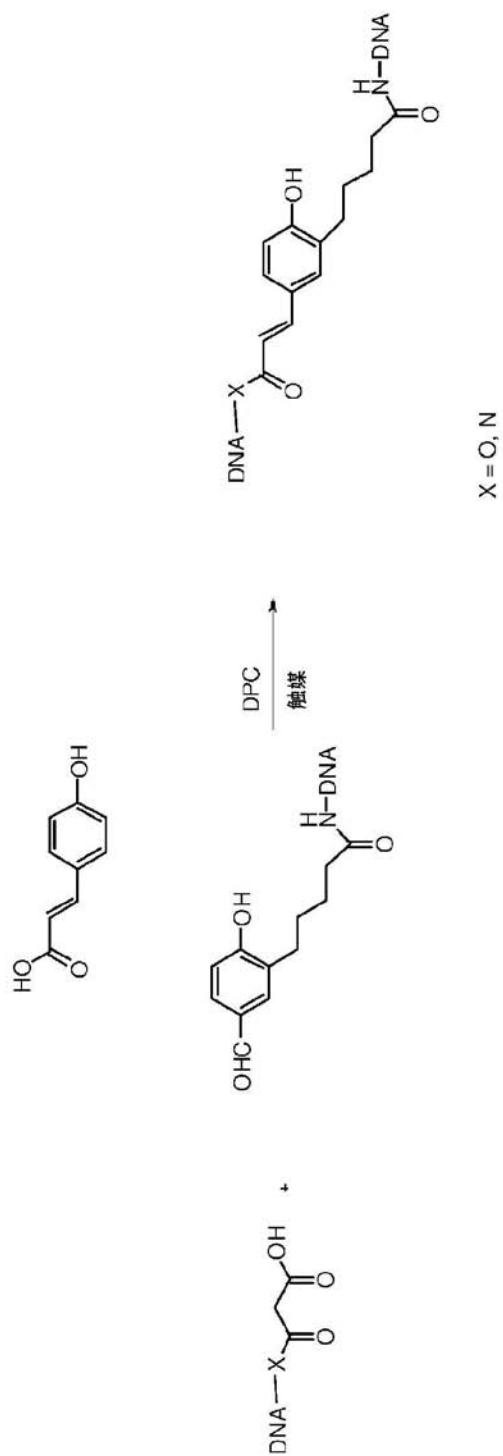
図 24 - DPC ベースのアルドールタイプの縮合による Cy3 の生成



【 図 2 5 】

図 25 - 前駆体から p-クマリン酸合成のための DPC 反応

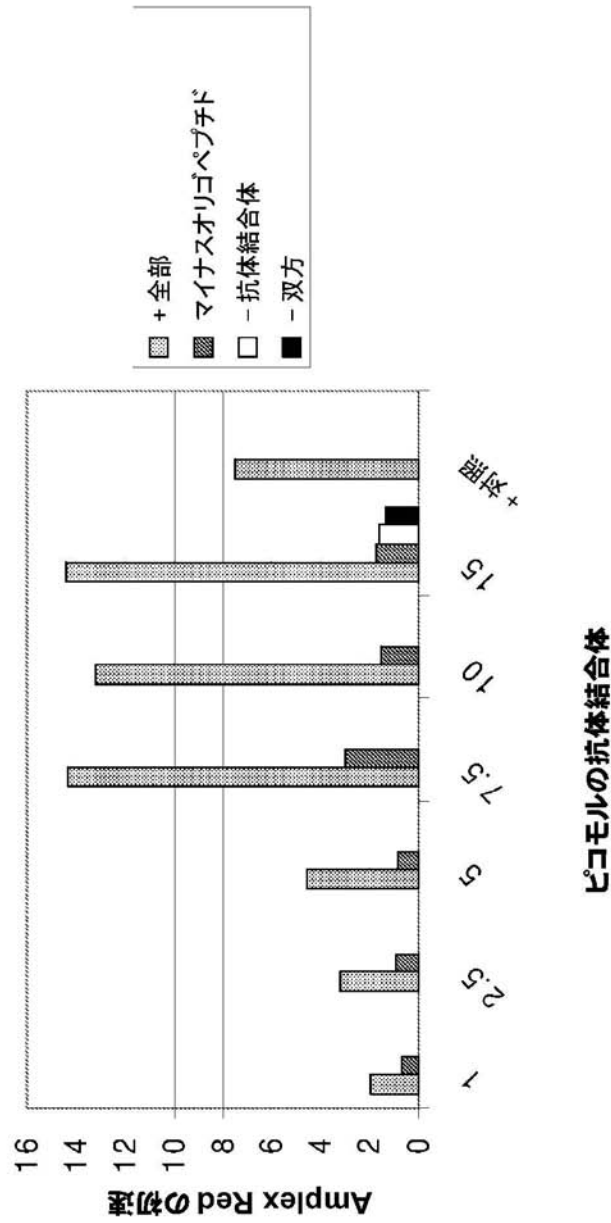
p-クマリン酸：アルドール縮合



【 図 2 6 】

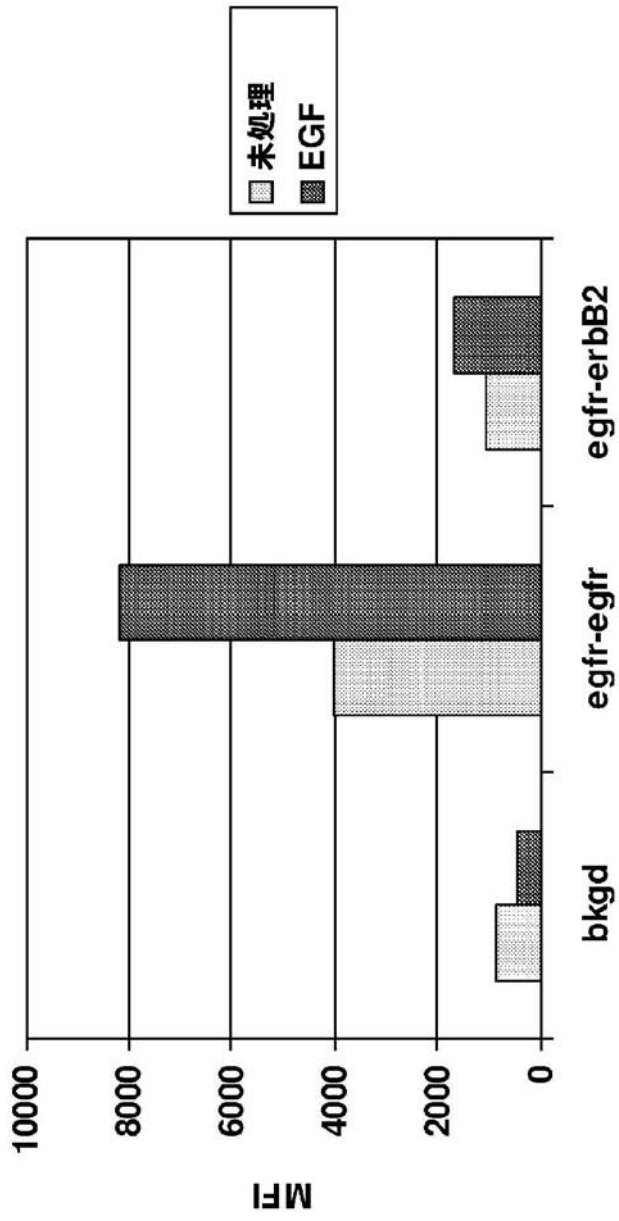
図 26

EDC ベースの DPC 反応の ELISA 分析



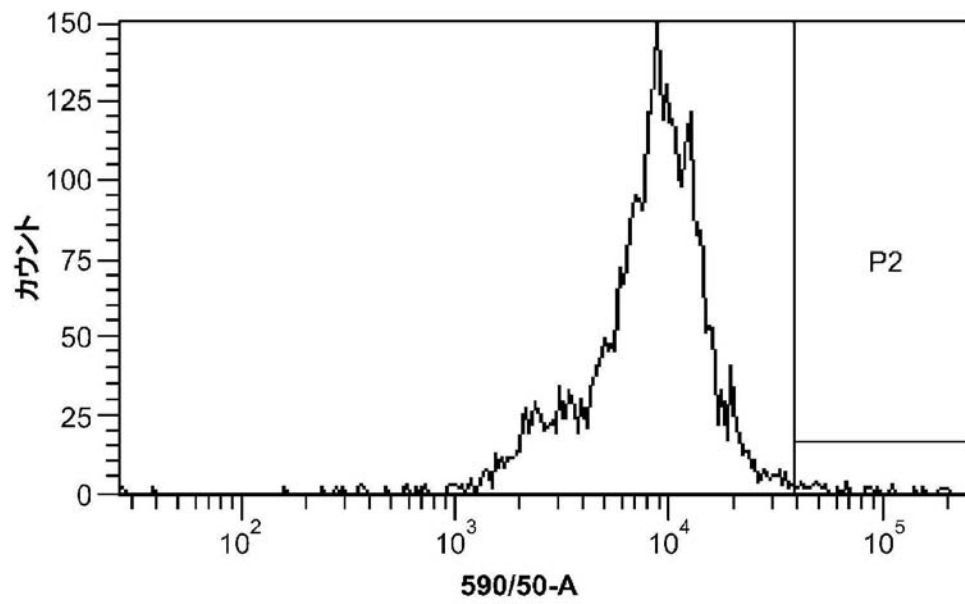
【 図 27 】

図 27



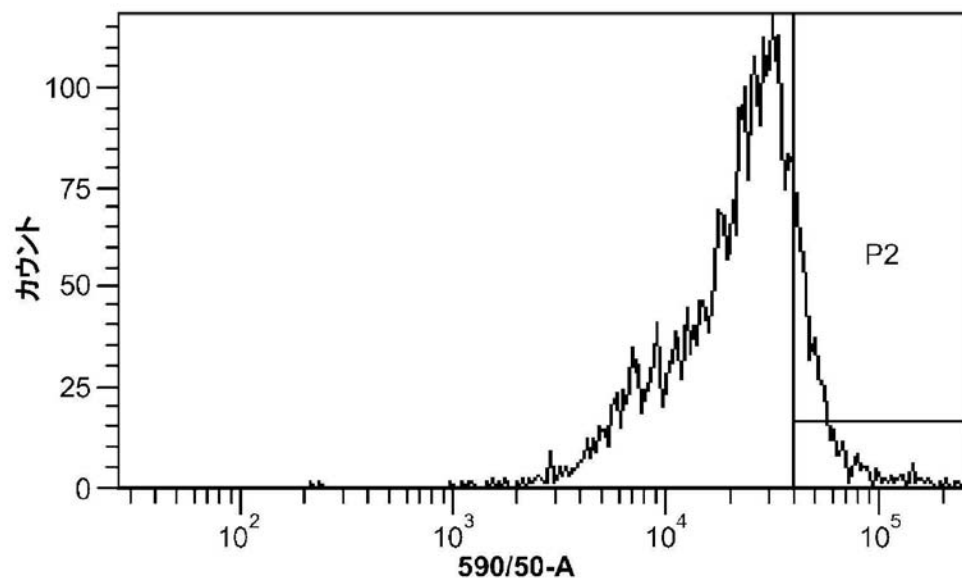
【図 28 A】

図 28A



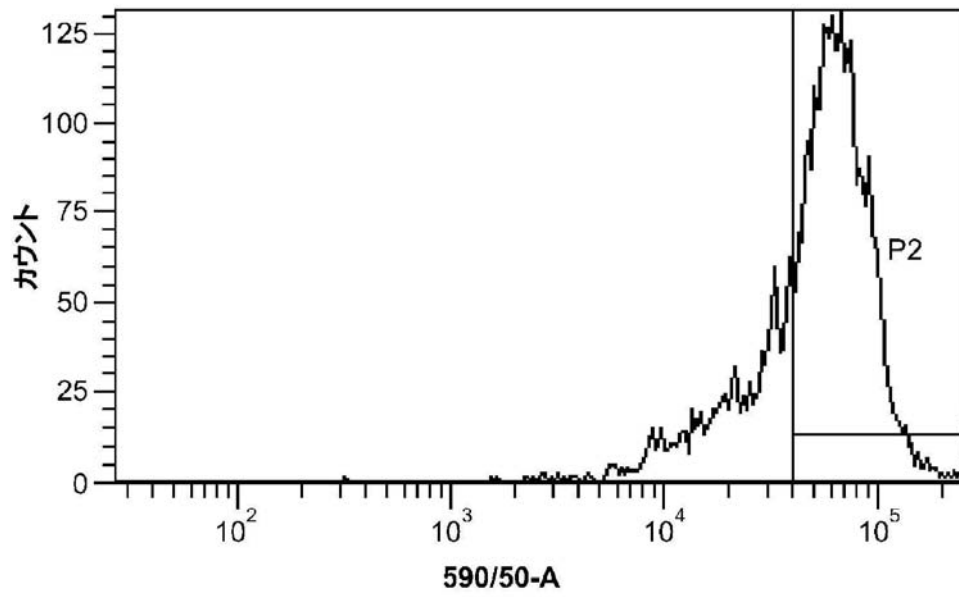
【図 28 B】

図 28B

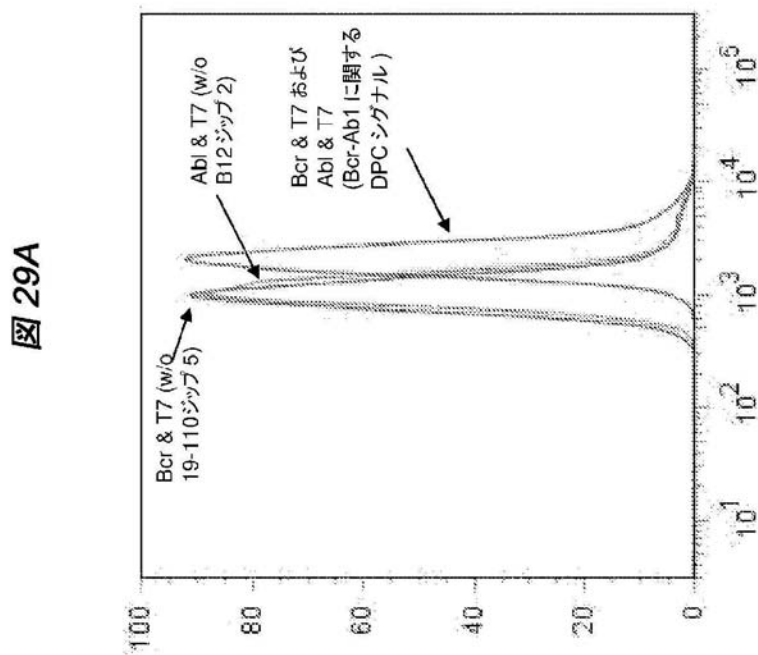


【図 28C】

図 28C

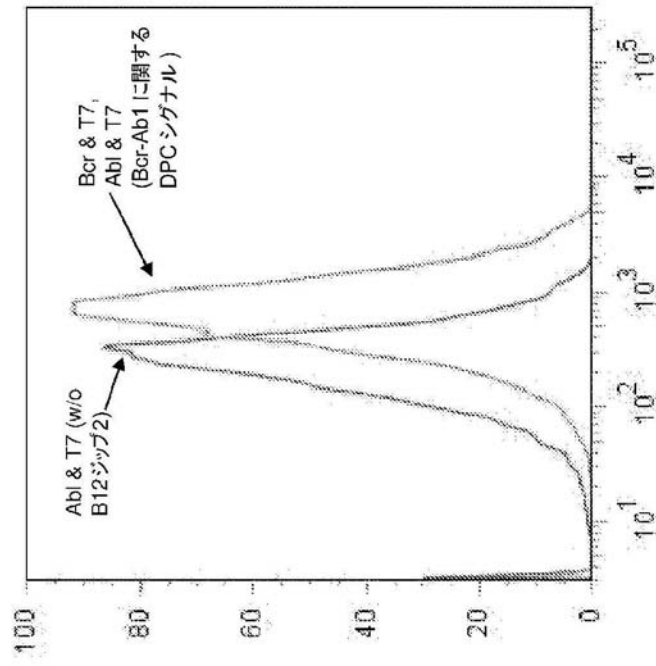


【図 29A】



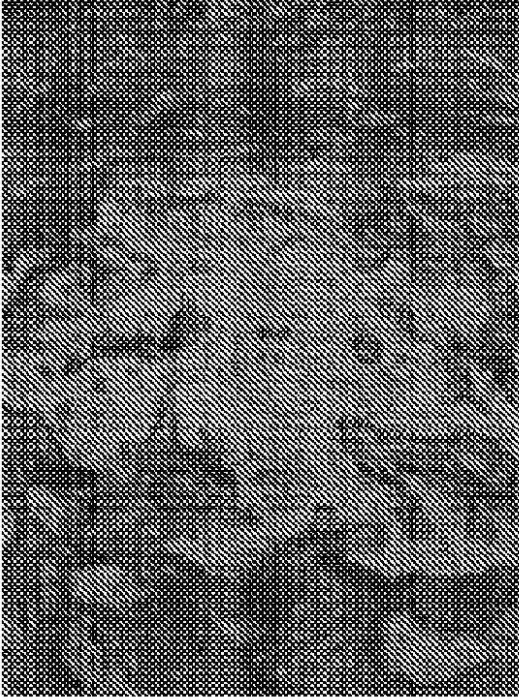
【図 29B】

図 29B



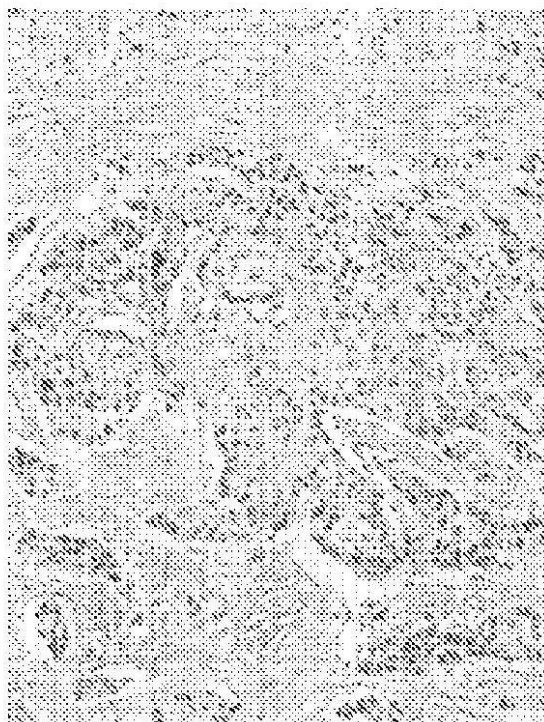
【図 30 A】

図 30A



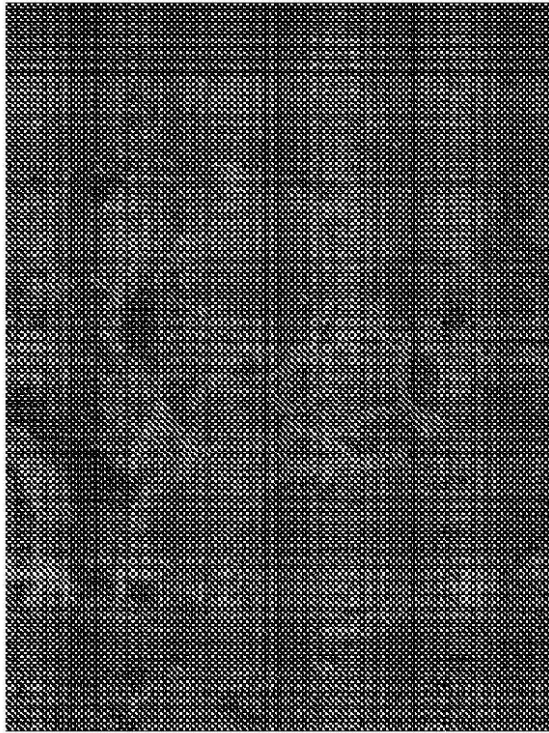
【図 30B】

図 30B



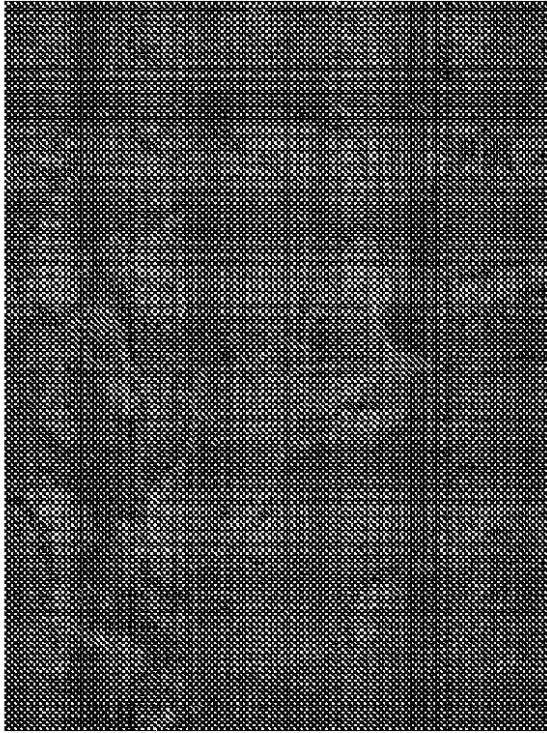
【図 30 C】

図 30C



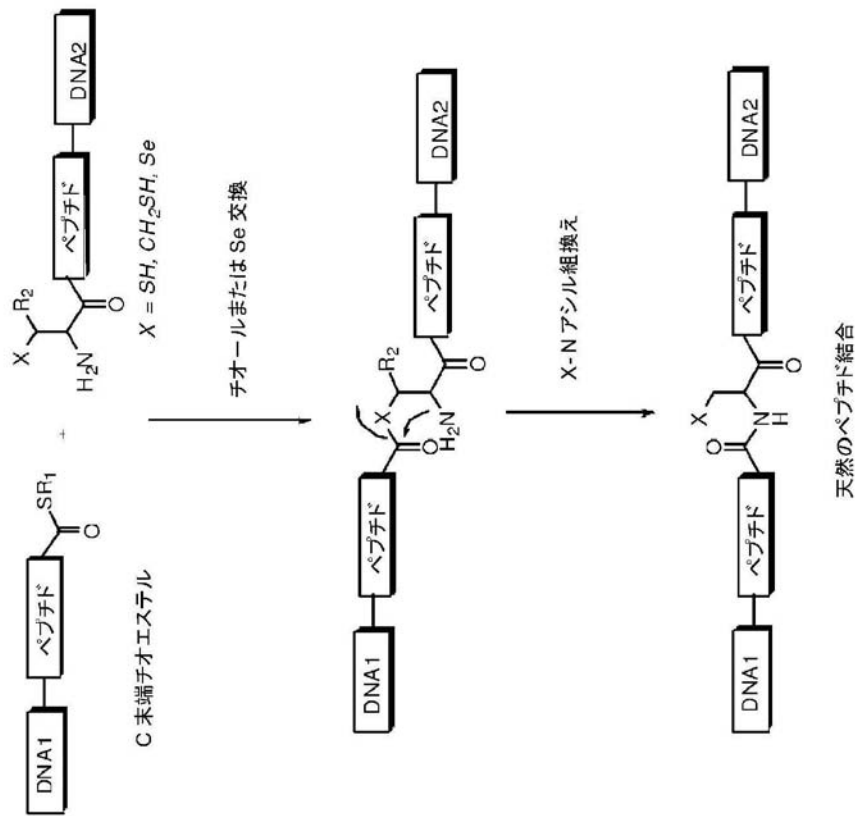
【図 30D】

図 30D



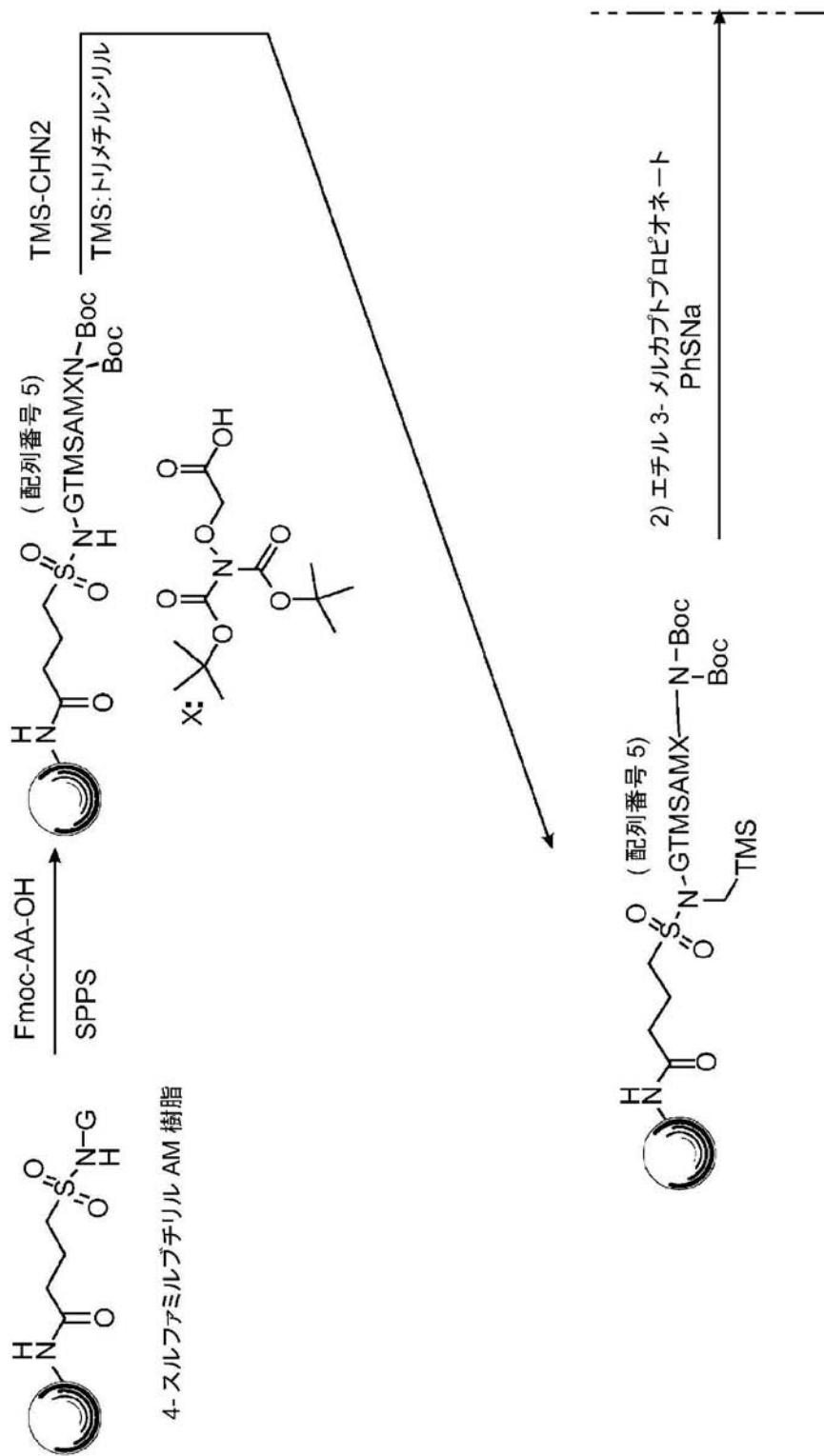
【 図 3 1 】

図 31



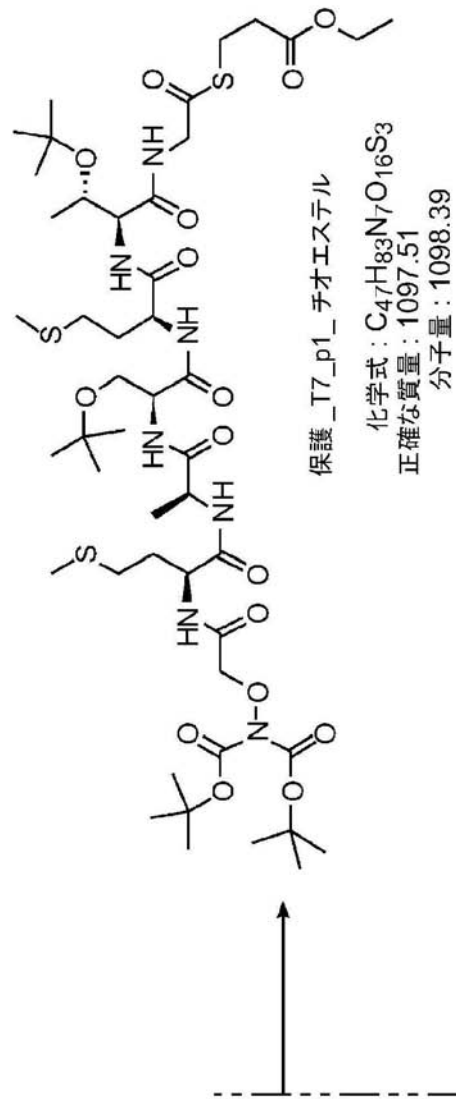
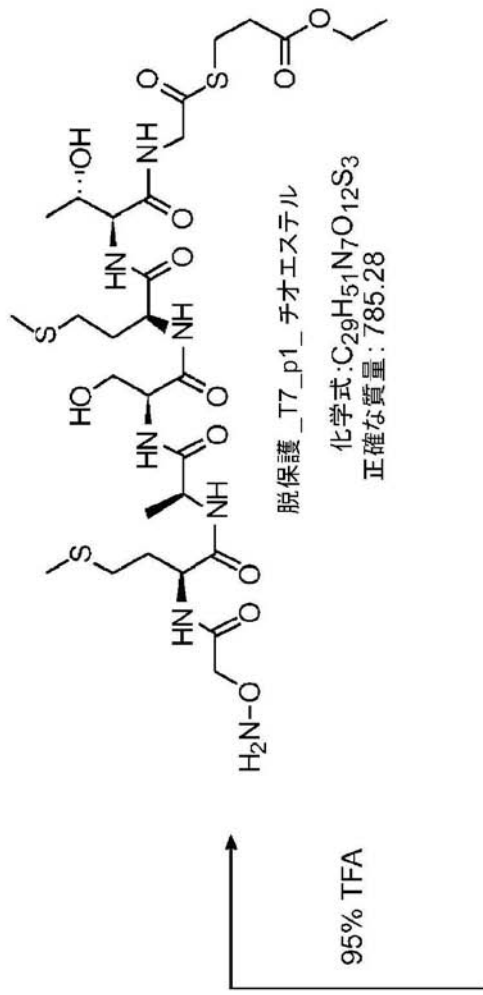
【図 32 - 1】

図 32



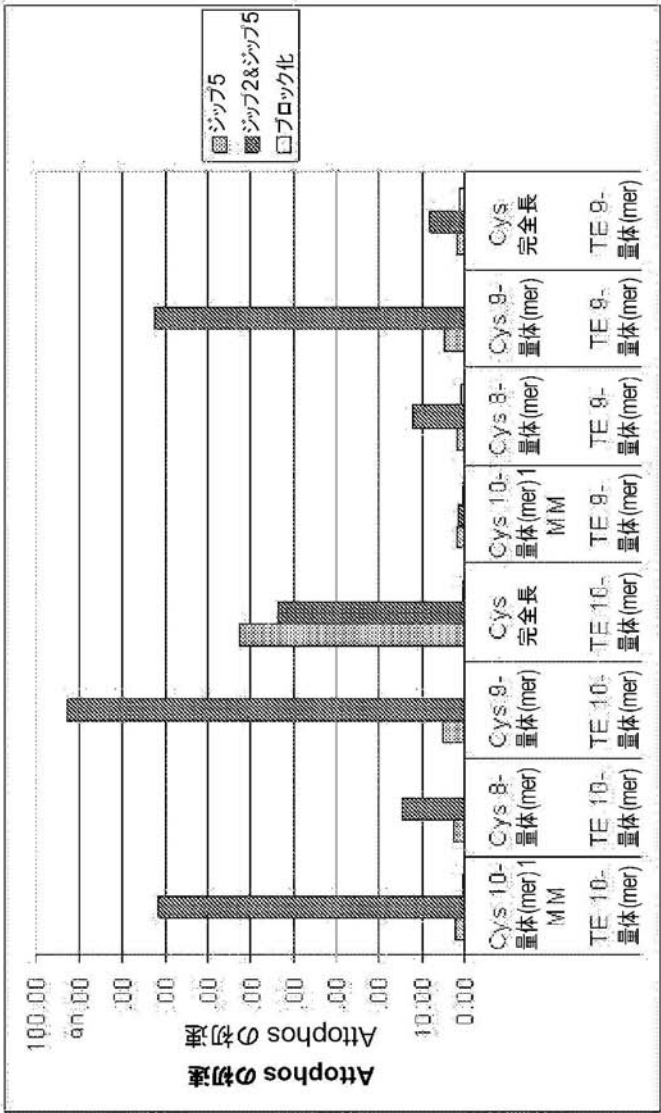
【 図 3 2 - 2 】

図 32 (続き)



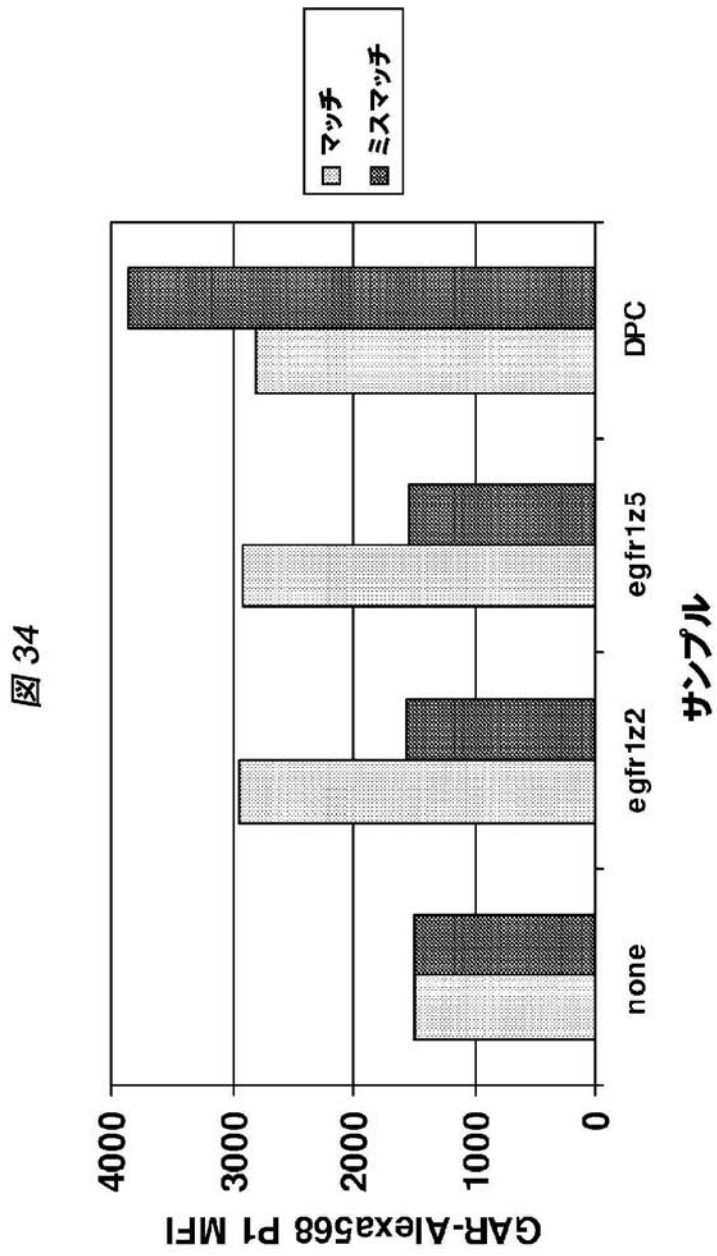
【図 33】

図 33 - 天然の化学的連結 - より短くかつミスマッチド P1 & P2'



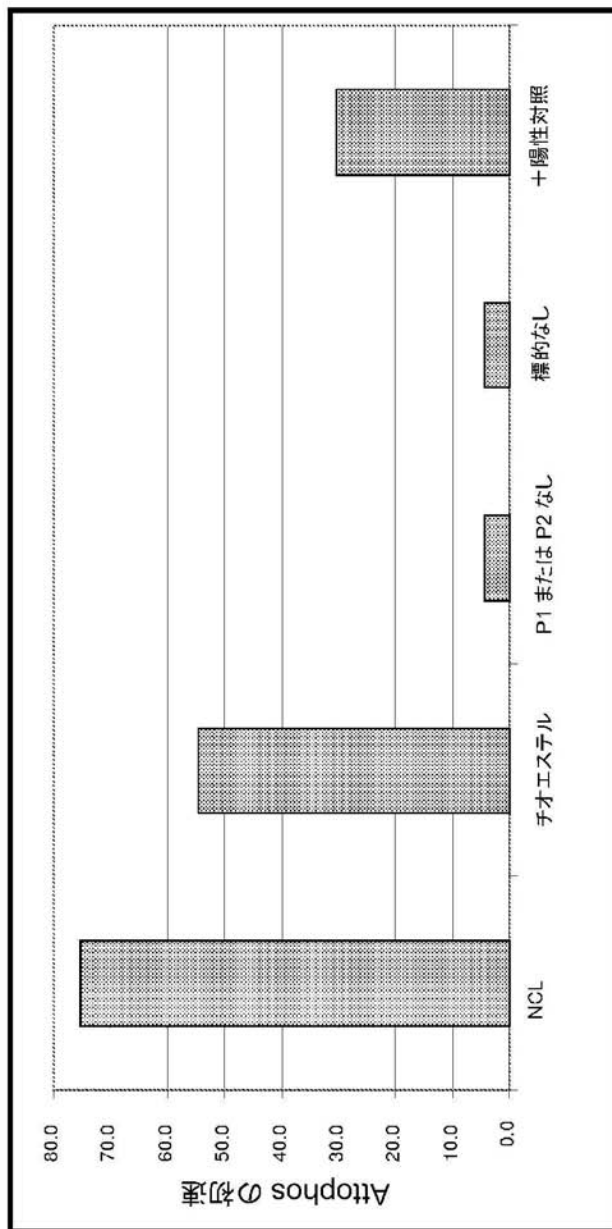
ストレプトアビジン - ジップ 5 または (ジップ 2 およびジップ 5) ウェル上での同時反応および捕捉
50mM の NaPi、pH6+5% 硫酸デキストラン中、25℃で 30 分

【図 34】



【図 35】

図 35



【手続補正書】

【提出日】平成22年7月12日(2010.7.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0047

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0047】

本発明は、以下の図面からさらに理解することができる。

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目1)

サンプル中の生物学的標的の存在および/または量を判定する方法であって：

(a)(1)(i) 上記生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と

、(i i) 第一のオリゴヌクレオチド配列と、(i i i) 上記第一のオリゴヌクレオチド配列と結合した第一の生成物前駆体とを含んでなる第一のプロープと、(2) (i) 上記生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(i i) 上記第一のオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチド配列と、(i i i) 上記第二のオリゴヌクレオチド配列と結合した第二の生成物前駆体とを含んでなる第二のプロープと、上記サンプルとを合わせることであって、上記生物学的標的が上記サンプル中に存在する場合、上記第一および第二の結合性部分の双方を上記生物学的標的に結合させ、その際、上記第一および第二のオリゴヌクレオチド配列が互いにハイブリダイズして、上記第一および第二の生成物前駆体を互いに反応性に近接させ、完全エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質、およびリガンドよりなる群から選択される反応生成物を生成させる条件下で、上記サンプルを上記第一および第二のプロープと合わせること；

(b) ステップ (a) の反応生成物が存在する場合、複数の検出可能な部分を生成させる条件下で増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムに上記反応生成物を曝露させること；および

(c) ステップ (b) において生成した検出可能な部分の存在および／または量を判定し、それによってサンプル中の生物学的標的の存在および／または量を判定すること、を含んでなる方法。

(項目 2)

ステップ (a) において、上記第一の結合性部分が、上記第一のオリゴヌクレオチド配列に共有結合している項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

ステップ (a) において、上記第二の結合性部分が、上記第二のオリゴヌクレオチド配列に共有結合している項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

ステップ (a) において、上記第一の結合性部分が、上記第一のオリゴヌクレオチド配列に非共有結合している項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

アンチジップコード配列にハイブリダイズしたジップコード配列を介して、上記第一の結合性部分が、上記第一のオリゴヌクレオチド配列に非共有結合している項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

ステップ (a) において、上記第二の結合性部分が、上記第二のオリゴヌクレオチド配列に非共有結合している項目 4 または 5 に記載の方法。

(項目 7)

アンチジップコード配列にハイブリダイズしたジップコード配列を介して、上記第二の結合性部分が、上記第二のオリゴヌクレオチド配列に非共有結合している項目 6 に記載の方法。

(項目 8)

サンプル中の生物学的標的の存在および／または量を判定する方法であって：

(a) (i) 上記生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(i i) 第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第一の標的結合性成分を提供すること；

(b) (i) 上記生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(i i) 第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第二の標的結合性成分を提供すること；

(c) (i) 上記第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズできる第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(i i) 第一のレポーターオリゴヌクレオチドと、(i i i) 上記第一のレポーターオリゴヌクレオチドと結合した第一の生成物前駆体と、を含んでなる第一のレポーター成分を提供すること；

(d) (i) 上記第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズでき

る第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(i i) 上記第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のレポーターオリゴヌクレオチドと、(i i i) 上記第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合しており、上記第一の生成物前駆体と反応性に近接させると、上記第一の生成物前駆体と反応できる第二の生成物前駆体と、を含んでなる第二のレポーター成分を提供すること；

(e) 上記生物学的標的がサンプル中に存在する場合、上記第一および第二の結合性部分が上記生物学的標的に結合し、その際 (i) 上記第一のジップコード配列が、上記第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列にハイブリダイズし、(i i) 上記第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列が、上記第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列にハイブリダイズし、(i i i) 上記第二のレポーターオリゴヌクレオチドを、上記第一のレポーターオリゴヌクレオチドにハイブリダイズして、上記第一および第二の生成物前駆体を反応性に近接させて反応生成物を生成させるような条件下で、上記第一の標的結合性成分と、上記第二の標的結合性成分と、上記第一のレポーター成分と、上記第二のレポーター成分とを上記サンプルと合わせること；

(f) ステップ (e) の反応生成物が存在する場合、複数の検出可能な部分を生成させる条件下で増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムに上記反応生成物を曝露させること；および

(g) 検出可能な部分の存在および / または量を判定し、それによって上記サンプル中の生物学的標的の存在および / または量を判定すること；
を含んでなる方法。

(項目 9)

ステップ (e) において、上記第一の標的結合性成分と、上記第二の標的結合性成分と、上記第一のレポーター成分と、上記第二のレポーター成分とを、全て同時に上記サンプルと合わせる項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

ステップ (e) において、上記第一のレポーター成分および上記第二のレポーター成分の前に、上記第一の標的結合性成分と上記第二の標的結合性成分とを上記サンプルに加える項目 8 に記載の方法。

(項目 11)

上記増幅成分が、検出可能性部分の生成を触媒する酵素を含んでなる項目 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 12)

上記増幅成分が、上記反応生成物 1 分子当たり少なくとも 10 分子の上記検出可能な部分を生成させることができる項目 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 13)

上記増幅成分が、上記反応生成物 1 分子当たり少なくとも 100 分子の上記検出可能な部分を生成させることができる項目 12 に記載の方法。

(項目 14)

上記増幅成分が、上記反応生成物 1 分子当たり少なくとも 1,000 分子の上記検出可能な部分を生成させることができる項目 13 に記載の方法。

(項目 15)

上記反応生成物が、ペプチドまたはタンパク質である項目 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 16)

上記反応生成物が、図 15 に掲げられたペプチド類から選択されるペプチジル配列を含んでなる項目 15 に記載の方法。

(項目 17)

上記反応生成物が小型分子である項目 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 18)

上記反応生成物が、色素、抗生物質、酵素補因子、酵素阻害剤、殺虫剤、薬物、毒素、

蛍光体、発色団、ホルモン、炭水化物または脂質である項目 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 19)

上記生物学的標的が、タンパク質、ペプチド、免疫グロブリン、成長因子受容体または酵素である項目 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 20)

上記生物学的標的が、ホモ二量体タンパク質である項目 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 21)

上記生物学的標的が、ヘテロ二量体タンパク質である項目 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 22)

上記生物学的標的が、B c r - A b 1 のヘテロ二量体、E r b B ファミリーのホモ二量体、E r b B ファミリーのヘテロ二量体、および P D G F よりなる群から選択される項目 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 23)

上記生物学的標的が核酸である項目 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 24)

上記核酸が、D N A または R N A である項目 23 に記載の方法。

(項目 25)

上記第一および第二の結合性部分が同一である項目 1 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 26)

上記第一および第二の結合性部分が異なっている項目 1 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 27)

上記第一および第二の結合性部分の各々が、上記生物学的標的により規定された別個の結合部位に結合する項目 26 に記載の方法。

(項目 28)

第一の結合性部分、第二の結合性部分または上記第一および第二の結合性部分の各々が抗体である項目 1 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 29)

上記第一の生成物前駆体および上記第二の生成物前駆体が、追加の試薬の存在下で互いに反応する項目 1 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 30)

上記第一の生成物前駆体が上記第二の生成物前駆体と自発的に反応して上記反応生成物を生成する項目 1 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 31)

上記反応が、天然の化学的連結によって生じる項目 30 に記載の方法。

(項目 32)

C - 末端チオエステルを含有する第一の前駆体ペプチドと N - 末端システインを含有する第二の前駆体ペプチドとの間の反応によって、ペプチド結合が生成する項目 30 または 31 に記載の方法。

(項目 33)

C - 末端チオエステルとシステイン以外の N - 末端チオールとの間の反応によって、ペプチド結合アイソスターが生成する項目 30 に記載の方法。

(項目 34)

上記第一および第二のオリゴヌクレオチド配列または上記第一および第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列が、約 8 と約 25 との間の融解温度を有する項目 30 から 33 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 5)

上記融解温度が、約 9 と約 20 との間である項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 6)

サンプル中の生物学的標的の存在および / または量を判定する方法であって：

(a) (1) (i) 上記生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(i i) 第一のオリゴヌクレオチド配列と、(i i i) 上記第一のオリゴヌクレオチド配列と結合した第一のマスク化生成物前駆体とを含んでなる第一のプロープと、(2) (i) 上記生物学的標的に対して結合親和力を有する第二の結合性部分と、(i i) 上記第一のオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチド配列と、(i i i) 上記第二のオリゴヌクレオチド配列と結合した非マスク性基とを含んでなる第二のプロープと上記サンプルとを合わせることであって、上記生物学的標的が上記サンプル中に存在する場合、上記第一および第二の結合性部分を上記生物学的標的に結合させ、上記第一および第二のオリゴヌクレオチド配列が互いにハイブリダイズして、上記非マスク性基と上記マスク化生成物前駆体とを反応性に近接させて、非マスク化反応生成物を生成させる条件下で、上記サンプルを上記第一および第二のプロープと合わせること；

(b) ステップ (a) の反応生成物が存在する場合、複数の検出可能な部分を生成させる条件下で増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムに上記反応生成物を曝露させること；および

(c) 検出可能な部分の存在および / または量を判定し、それによってサンプル中の生物学的標的の存在および / または量を判定すること、
を含んでなる方法。

(項目 3 7)

上記マスク化生成物前駆体が、マスク化エピトープ、マスク化酵素基質、マスク化酵素活性化物質、またはマスク化リガンドである項目 3 6 に記載の方法。

(項目 3 8)

上記非マスク化反応生成物が、ペプチドまたはタンパク質である項目 3 6 または 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

上記非マスク化反応生成物が、小型分子である項目 3 6 または 3 7 に記載の方法。

(項目 4 0)

上記生物学的標的が、タンパク質、ペプチド、免疫グロブリン、成長因子、または酵素である項目 3 6 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 1)

上記生物学的標的が、ホモ二量体タンパク質である項目 3 6 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 2)

上記生物学的標的が、ヘテロ二量体タンパク質である項目 3 6 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 3)

上記生物学的標的が、B c r - A b 1 のヘテロ二量体、E r b B ファミリーのホモ二量体、E r b B ファミリーのヘテロ二量体、および P D G F よりなる群から選択される項目 3 6 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 4)

上記生物学的標的が核酸である項目 3 6 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 5)

上記第一の結合性部分、上記第二の結合性部分、または上記第一の結合性部分および上記第二の結合性部分の各々が、抗体である項目 3 6 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

。

(項目 4 7)

上記第一および第二の結合性部分が同一である項目 3 6 から 4 3 および 4 5 のいずれか

一項に記載の方法。

(項目 4 8)

上記第一および第二の結合性部分が異なっている項目 3 6 から 4 3 および 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 9)

ステップ (b) の上記増幅成分が、上記検出可能な部分の生成を触媒する酵素を含んでなる項目 3 6 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 0)

上記増幅成分が、ステップ (a) において生成した反応生成物 1 分子当たり少なくとも 1 0 0 分子の上記検出可能な部分を生成させることができる項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 1)

上記酵素が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、または乳酸デヒドロゲナーゼである項目 1 1 または 4 9 に記載の方法。

(項目 5 2)

上記サンプルが、組織サンプルまたは体液サンプルである項目 1 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 3)

(a) (i) 生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(i i) 上記第一の結合性部分と結合した第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と、(i i i) 上記第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した第一の生成物前駆体と、を含んでなる第一のプロープと、

(b) (i) 上記生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(i i) 上記第二の結合性部分と結合した第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と、(i i i) 上記第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した第二の生成物前駆体と、を含んでなり、

上記生物学的標的に対する上記第一および第二の結合性部分の結合の際に、上記第一および第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列が、互いにハイブリダイズでき、上記第一および第二の生成物前駆体が互いに反応して、完全エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質、およびリガンドよりなる群から選択される反応生成物を生成させることができる第二のプロープと；

(c) 複数の検出可能な部分を生成させることができる増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムと；

(d) 生物学的標的の検出用キットを使用するための取扱説明書と、を含んでなるキット。

(項目 5 4)

第一のプロープが、第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列にハイブリダイズした第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列をさらに含んでなり、第二のプロープが、第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列にハイブリダイズした第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列をさらに含んでなる項目 5 2 に記載のキット。

(項目 5 5)

(a) (i) 上記生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(i i) 上記第一の結合性部分と結合した第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第一の標的結合性成分と、

(b) (i) 上記生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(i i) 上記第二の結合性部分と結合した第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第二の標的結合性成分と、

(c) (i) 上記第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズできる第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(i i) 上記第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と結合した第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と、(i i i) 上記第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した第一の生成物前駆体

と、を含んでなる第一のレポーター成分と、

(d) (i) 上記第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(i i) 上記第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と結合しており、上記第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のレポーターオリゴヌクレオチドと、(i i i) 上記第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した第二の生成物前駆体と、を含んでなり、

上記生物学的標的に対する上記第一および第二の結合性部分の結合、上記第一のジップコードのオリゴヌクレオチド配列とアンチジップコードのオリゴヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーション、および上記第二のジップコードのオリゴヌクレオチド配列とアンチジップコードのオリゴヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーションの際に、上記第一および第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列が、互いにハイブリダイズして、上記第一および第二の生成物前駆体を反応性に近接させ、完全エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質、およびリガンドよりなる群から選択される反応生成物を生成させる第二のレポーター成分と；

(e) 複数の検出可能な部分を生成させることができる増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムと；

(f) 生物学的標的の検出用キットを使用するための取扱説明書と、
を含んでなるキット。

(項目 5 6)

直接にまたはペプチドリンカーを介して、またはオリゴヌクレオチドリンカーを介して、上記第一の結合性部分が、上記第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列に共有結合しており；

直接にまたはペプチドリンカーを介して、またはオリゴヌクレオチドリンカーを介して、上記第一のレポーターオリゴヌクレオチドが、上記第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列に共有結合している項目 5 3 または 5 4 に記載のキット。

(項目 5 7)

直接にまたはペプチドリンカーを介して、またはオリゴヌクレオチドリンカーを介して、上記第一の生成物前駆体が、上記第一のレポーターオリゴヌクレオチドに共有結合しており；

直接にまたはペプチドリンカーを介して、またはオリゴヌクレオチドリンカーを介して、上記第二の生成物断片が、上記第二のレポーターオリゴヌクレオチドに共有結合している項目 5 2 から 5 5 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 5 8)

上記検出可能な部分の前駆体をさらに含んでなる項目 5 2 から 5 6 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 5 9)

上記反応生成物が、M A S M T G G Q Q M G (配列番号 4)、M A S M T C G Q Q M G (配列番号 3 8)、M A S M T G C Q Q M G (配列番号 3 9)、M A S M T G G C Q M G (配列番号 4 0)、M A S M T G G Q C M G (配列番号 4 1)、(G)₀₋₂- N W C H P Q F E - (G)₀₋₂ (配列番号 4 2)、(G)₀₋₂- N W S C P Q F E - (G)₀₋₂ (配列番号 4 3)、(G)₀₋₂- N W S H C Q F E - (G)₀₋₂ (配列番号 4 4)、(G)₀₋₂- N W S H P C F E - (G)₀₋₂ (配列番号 4 5)、(G)₀₋₂- N W S H P Q F E - (G)₀₋₂ (配列番号 4 6)、K E T A A A K F C R Q H M D S (配列番号 4 7)、K E T A A A K F G R Q H M D S (配列番号 4 8)、および M A S M T G - [S C H₂ C (O)] - Q Q M G (配列番号 4 9) から選択されるペプチジル配列を含んでなる項目 5 2 から 5 5 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 6 0)

各結合性部分が、上記生物学的標的に直接的または間接的に結合する抗体であり、上記生物学的標的が、B c r - A b l、E r b B ファミリーのホモ二量体、E r b B ファミリ

一のヘテロ二量体、およびPDGFよりなる群から選択される項目52から58のいずれか一項に記載のキット。

(項目61)

各抗体が、上記生物学的標的に間接的に結合する項目59に記載のキット。

(項目62)

2種の追加抗体をさらに含み、それらの各々が、上記生物学的標的に直接的に結合し、上記生物学的標的が、Bcr-Ab1、ErbBファミリーのホモ二量体、ErbBファミリーのヘテロ二量体、およびPDGFよりなる群から選択される項目60に記載のキット。

(項目63)

上記第一の結合性部分および上記第二の結合性部分が、異なる抗体である項目52から61のいずれか一項に記載のキット。

(項目64)

MASMT CGQQMG (配列番号38)、MASMT-チオエステル (配列番号50)、MASMTGCQQMG (配列番号39)、MASMTG-チオエステル (配列番号5)、MASMTGGCQQMG (配列番号40)、MASMTGG-チオエステル (配列番号51)、MASMTGGQCMG (配列番号41)、MASMTGGQ-チオエステル (配列番号52)、(G)₀₋₂-NWCHPQFE-(G)₀₋₂ (配列番号42)、(G)₀₋₂-NW-チオエステル (配列番号53)、(G)₀₋₂-NWS CPQFE-(G)₀₋₂ (配列番号43)、(G)₀₋₂-NWS-チオエステル (配列番号54)、(G)₀₋₂-NWSHCQFE-(G)₀₋₂ (配列番号44)、(G)₀₋₂-NWSH-チオエステル (配列番号55)、(G)₀₋₂-NWSHP CF E-(G)₀₋₂ (配列番号45)、(G)₀₋₂-NWSHP-チオエステル (配列番号56)、KETAAAKFCRQHMD S (配列番号47)、KETAAAKF-チオエステル (配列番号57)、CGQQMG (配列番号58)、CHPQFE-(G)₀₋₂ (配列番号59)、CPQFE-(G)₀₋₂ (配列番号60)、CRQHMD S (配列番号61)、およびMASMTG-[SCH₂C(O)]-QQMG (配列番号49)よりなる群から選択されるペプチジル部分を含んでなり、上記チオエステルは、RがC-末端チオエステルを含有するペプチドとN-末端システインを含有するペプチドとの間でのペプチド結合の形成を妨げない任意の部分である式-C(O)-S-Rを有する分子。

(項目65)

Rが、C₁~C₆直鎖状または分枝状アルキルである項目63に記載の分子。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

サンプル中の生物学的標的の存在および/または量を判定する方法であって：

(a)(1)(i)前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii)第一のオリゴヌクレオチド配列と、(iii)前記第一のオリゴヌクレオチド配列と結合した第一の生成物前駆体とを含んでなる第一のプローブと、(2)(i)前記生物学的標的に対して結合親和力を有する第二の結合性部分と、(ii)前記第一のオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチド配列と、(iii)前記第二のオリゴヌクレオチド配列と結合した第二の生成物前駆体とを含んでなる第二のプローブと、前記サンプルとを合わせることであって、前記生物学的標的が前記サンプル中に存在する場合、前記第一および第二の結合性部分の双方を前記生物学的標的に結合させ、その際、前記第一および第二のオリゴヌクレオチド配列が互いにハイブリダイズして、前記第一および第二の生成物前駆体を互いに反応性に近接させ、完全エピトープ、酵

素基質、酵素活性化物質、およびリガンドよりなる群から選択される反応生成物を生成させる条件下で、前記サンプルを前記第一および第二のプロープと合わせること；

(b) ステップ(a)の反応生成物が存在する場合、複数の検出可能な部分を生成させる条件下で増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムに前記反応生成物を曝露させること；および

(c) ステップ(b)において生成した検出可能な部分の存在および/または量を判定し、それによってサンプル中の生物学的標的の存在および/または量を判定すること、を含んでなる方法。

【請求項2】

ステップ(a)において、前記第一の結合性部分が、前記第一のオリゴヌクレオチド配列に共有結合している請求項1に記載の方法。

【請求項3】

ステップ(a)において、前記第二の結合性部分が、前記第二のオリゴヌクレオチド配列に共有結合している請求項2に記載の方法。

【請求項4】

ステップ(a)において、前記第一の結合性部分が、前記第一のオリゴヌクレオチド配列に非共有結合している請求項1に記載の方法。

【請求項5】

アンチジップコード配列にハイブリダイズしたジップコード配列を介して、前記第一の結合性部分が、前記第一のオリゴヌクレオチド配列に非共有結合している請求項4に記載の方法。

【請求項6】

ステップ(a)において、前記第二の結合性部分が、前記第二のオリゴヌクレオチド配列に非共有結合している請求項4または5に記載の方法。

【請求項7】

アンチジップコード配列にハイブリダイズしたジップコード配列を介して、前記第二の結合性部分が、前記第二のオリゴヌクレオチド配列に非共有結合している請求項6に記載の方法。

【請求項8】

サンプル中の生物学的標的の存在および/または量を判定する方法であって：

(a) (i) 前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii) 第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第一の標的結合性成分を提供すること；

(b) (i) 前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(ii) 第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第二の標的結合性成分を提供すること；

(c) (i) 前記第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズできる第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(ii) 第一のレポーターオリゴヌクレオチドと、(iii) 前記第一のレポーターオリゴヌクレオチドと結合した第一の生成物前駆体と、を含んでなる第一のレポーター成分を提供すること；

(d) (i) 前記第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(ii) 前記第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のレポーターオリゴヌクレオチドと、(iii) 前記第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合しており、前記第一の生成物前駆体と反応性に近接させると、前記第一の生成物前駆体と反応できる第二の生成物前駆体と、を含んでなる第二のレポーター成分を提供すること；

(e) 前記生物学的標的がサンプル中に存在する場合、前記第一および第二の結合性部分が前記生物学的標的に結合し、その際(i) 前記第一のジップコード配列が、前記第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列にハイブリダイズし、(ii) 前記第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列が、前記第二のオリゴヌクレオチドのアンチジ

ップコード配列にハイブリダイズし、(i i i) 前記第二のレポーターオリゴヌクレオチドを、前記第一のレポーターオリゴヌクレオチドにハイブリダイズして、前記第一および第二の生成物前駆体を反応性に近接させて反応生成物を生成させるような条件下で、前記第一の標的結合性成分と、前記第二の標的結合性成分と、前記第一のレポーター成分と、前記第二のレポーター成分とを前記サンプルと合わせること；

(f) ステップ (e) の反応生成物が存在する場合、複数の検出可能な部分を生成させる条件下で増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムに前記反応生成物を曝露させること；および

(g) 検出可能な部分の存在および / または量を判定し、それによって前記サンプル中の生物学的標的の存在および / または量を判定すること；
を含んでなる方法。

【請求項 9】

ステップ (e) において、前記第一の標的結合性成分と、前記第二の標的結合性成分と、前記第一のレポーター成分と、前記第二のレポーター成分とを、全て同時に前記サンプルと合わせる請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ (e) において、前記第一のレポーター成分および前記第二のレポーター成分の前に、前記第一の標的結合性成分と前記第二の標的結合性成分とを前記サンプルに加える請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記増幅成分が、検出可能性部分の生成を触媒する酵素を含んでなる請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記増幅成分が、前記反応生成物 1 分子当り少なくとも 10 分子の前記検出可能な部分を生成させることができる請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記増幅成分が、前記反応生成物 1 分子当り少なくとも 100 分子の前記検出可能な部分を生成させることができる請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記増幅成分が、前記反応生成物 1 分子当り少なくとも 1,000 分子の前記検出可能な部分を生成させることができる請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記反応生成物が、ペプチドまたはタンパク質である請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記反応生成物が、図 15 に掲げられたペプチド類から選択されるペプチジル配列を含んでなる請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記反応生成物が小型分子である請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記反応生成物が、色素、抗生物質、酵素補因子、酵素阻害剤、殺虫剤、薬物、毒素、蛍光体、発色団、ホルモン、炭水化物または脂質である請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記生物学的標的が、タンパク質、ペプチド、免疫グロブリン、成長因子受容体または酵素である請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記生物学的標的が、ホモ二量体タンパク質である請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記生物学的標的が、ヘテロ二量体タンパク質である請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記生物学的標的が、Bcr - Ab1 のヘテロ二量体、Erbb ファミリーのホモ二量体、Erbb ファミリーのヘテロ二量体、および PDGF よりなる群から選択される請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記生物学的標的が核酸である請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記核酸が、DNA または RNA である請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記第一および第二の結合性部分が同一である請求項 1 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記第一および第二の結合性部分が異なっている請求項 1 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記第一および第二の結合性部分の各々が、前記生物学的標的により規定された別個の結合部位に結合する請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

第一の結合性部分、第二の結合性部分または前記第一および第二の結合性部分の各々が抗体である請求項 1 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記第一の生成物前駆体および前記第二の生成物前駆体が、追加の試薬の存在下で互いに反応する請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記第一の生成物前駆体が前記第二の生成物前駆体と自発的に反応して前記反応生成物を生成する請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記反応が、天然の化学的連結によって生じる請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

C - 末端チオエステルを含有する第一の前駆体ペプチドと N - 末端システインを含有する第二の前駆体ペプチドとの間の反応によって、ペプチド結合が生成する請求項 30 または 31 に記載の方法。

【請求項 33】

C - 末端チオエステルとシステイン以外の N - 末端チオールとの間の反応によって、ペプチド結合アイソスターが生成する請求項 30 に記載の方法。

【請求項 34】

前記第一および第二のオリゴヌクレオチド配列または前記第一および第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列が、約 8 と約 25 との間の融解温度を有する請求項 30 から 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記融解温度が、約 9 と約 20 との間である請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

サンプル中の生物学的標的の存在および / または量を判定する方法であって：

(a) (1) (i) 前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii) 第一のオリゴヌクレオチド配列と、(iii) 前記第一のオリゴヌクレオチド配列と結合した第一のマスク化生成物前駆体とを含んでなる第一のプローブと、(2) (i) 前記生物学的標的に対して結合親和力を有する第二の結合性部分と、(ii) 前記第一のオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチド配列と、

(i i i) 前記第二のオリゴヌクレオチド配列と結合した非マスク性基とを含んでなる第二のプロープと前記サンプルとを合わせることであって、前記生物学的標的が前記サンプル中に存在する場合、前記第一および第二の結合性部分を前記生物学的標的に結合させ、前記第一および第二のオリゴヌクレオチド配列が互いにハイブリダイズして、前記非マスク性基と前記マスク化生成物前駆体とを反応性に近接させて、非マスク化反応生成物を生成させる条件下で、前記サンプルを前記第一および第二のプロープと合わせることに;

(b) ステップ (a) の反応生成物が存在する場合、複数の検出可能な部分を生成させる条件下で増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムに前記反応生成物を曝露させることに; および

(c) 検出可能な部分の存在および / または量を判定し、それによってサンプル中の生物学的標的の存在および / または量を判定すること、
を含んでなる方法。

【請求項 37】

前記マスク化生成物前駆体が、マスク化エピトープ、マスク化酵素基質、マスク化酵素活性化物質、またはマスク化リガンドである請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記非マスク化反応生成物が、ペプチドまたはタンパク質である請求項 36 または 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記非マスク化反応生成物が、小型分子である請求項 36 または 37 に記載の方法。

【請求項 40】

前記生物学的標的が、タンパク質、ペプチド、免疫グロブリン、成長因子、または酵素である請求項 36 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記生物学的標的が、ホモ二量体タンパク質である請求項 36 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記生物学的標的が、ヘテロ二量体タンパク質である請求項 36 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

前記生物学的標的が、B c r - A b 1 のヘテロ二量体、E r b B ファミリーのホモ二量体、E r b B ファミリーのヘテロ二量体、および P D G F よりなる群から選択される請求項 36 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

前記生物学的標的が核酸である請求項 36 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

前記第一の結合性部分、前記第二の結合性部分、または前記第一の結合性部分および前記第二の結合性部分の各々が、抗体である請求項 36 から 43 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 46】

前記第一および第二の結合性部分が同一である請求項 36 から 43 および 45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

前記第一および第二の結合性部分が異なっている請求項 36 から 43 および 45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 48】

ステップ (b) の前記増幅成分が、前記検出可能な部分の生成を触媒する酵素を含んでなる請求項 36 から 47 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

前記増幅成分が、ステップ (a) において生成した反応生成物 1 分子当たり少なくとも 1

00分子の前記検出可能な部分を生成させることができる請求項48に記載の方法。

【請求項50】

前記酵素が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、または乳酸デヒドロゲナーゼである請求項11または49に記載の方法。

【請求項51】

前記サンプルが、組織サンプルまたは体液サンプルである請求項1から50のいずれか一項に記載の方法。

【請求項52】

(a)(i)生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii)前記第一の結合性部分と結合した第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と、(iii)前記第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した第一の生成物前駆体と、を含んでなる第一のプロープと、

(b)(i)前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(ii)前記第二の結合性部分と結合した第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と、(iii)前記第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した第二の生成物前駆体と、を含んでなり、

前記生物学的標的に対する前記第一および第二の結合性部分の結合の際に、前記第一および第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列が、互いにハイブリダイズでき、前記第一および第二の生成物前駆体が互いに反応して、完全エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質、およびリガンドよりなる群から選択される反応生成物を生成させることができる第二のプロープと；

(c)複数の検出可能な部分を生成させることができる増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムと；

(d)生物学的標的の検出用キットを使用するための取扱説明書と、を含んでなるキット。

【請求項53】

第一のプロープが、第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列にハイブリダイズした第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列をさらに含んでなり、第二のプロープが、第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列にハイブリダイズした第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列をさらに含んでなる請求項52に記載のキット。

【請求項54】

(a)(i)前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第一の結合性部分と、(ii)前記第一の結合性部分と結合した第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第一の標的結合性成分と、

(b)(i)前記生物学的標的に対して結合親和性を有する第二の結合性部分と、(ii)前記第二の結合性部分と結合した第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と、を含んでなる第二の標的結合性成分と、

(c)(i)前記第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズできる第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(ii)前記第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と結合した第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と、(iii)前記第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した第一の生成物前駆体と、を含んでなる第一のレポーター成分と、

(d)(i)前記第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列にハイブリダイズできる第二のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列と、(ii)前記第二のオリゴヌクレオチドのジップコード配列と結合しており、前記第一のレポーターオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズできる第二のレポーターオリゴヌクレオチドと、(iii)前記第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列と結合した第二の生成物前駆体と、を含んでなり、

前記生物学的標的に対する前記第一および第二の結合性部分の結合、前記第一のジップ

コードのオリゴヌクレオチド配列とアンチジップコードのオリゴヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーション、および前記第二のジップコードのオリゴヌクレオチド配列とアンチジップコードのオリゴヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーションの際に、前記第一および第二のレポーターオリゴヌクレオチド配列が、互いにハイブリダイズして、前記第一および第二の生成物前駆体を反応性に近接させ、完全エピトープ、酵素基質、酵素活性化物質、およびリガンドよりなる群から選択される反応生成物を生成させる第二のレポーター成分と；

(e) 複数の検出可能な部分を生成させることができる増幅成分と検出成分とを含んでなる検出システムと；

(f) 生物学的標的の検出用キットを使用するための取扱説明書と、を含んでなるキット。

【請求項 55】

直接にまたはペプチドリンカーを介して、またはオリゴヌクレオチドリンカーを介して、前記第一の結合性部分が、前記第一のオリゴヌクレオチドのジップコード配列に共有結合しており；

直接にまたはペプチドリンカーを介して、またはオリゴヌクレオチドリンカーを介して、前記第一のレポーターオリゴヌクレオチドが、前記第一のオリゴヌクレオチドのアンチジップコード配列に共有結合している請求項 53 または 54 に記載のキット。

【請求項 56】

直接にまたはペプチドリンカーを介して、またはオリゴヌクレオチドリンカーを介して、前記第一の生成物前駆体が、前記第一のレポーターオリゴヌクレオチドに共有結合しており；

直接にまたはペプチドリンカーを介して、またはオリゴヌクレオチドリンカーを介して、前記第二の生成物断片が、前記第二のレポーターオリゴヌクレオチドに共有結合している請求項 52 から 55 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 57】

前記検出可能な部分の前駆体をさらに含んでなる請求項 52 から 56 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 58】

前記反応生成物が、MASMTGGQQMG (配列番号 4)、MASMTCGQQMG (配列番号 38)、MASMTGCQQMG (配列番号 39)、MASMTGGCQMG (配列番号 40)、MASMTGGQCMG (配列番号 41)、(G)₀₋₂-NWCHPQFE-(G)₀₋₂ (配列番号 42)、(G)₀₋₂-NWSCPQFE-(G)₀₋₂ (配列番号 43)、(G)₀₋₂-NWSHCQFE-(G)₀₋₂ (配列番号 44)、(G)₀₋₂-NWSHPQFE-(G)₀₋₂ (配列番号 45)、(G)₀₋₂-NWSHPQFE-(G)₀₋₂ (配列番号 46)、KETAAAKFCRQHMD (配列番号 47)、KETAAAKFCRQHMD (配列番号 48)、および MASMTG-[SCH₂C(O)]-QQMG (配列番号 49) から選択されるペプチジル配列を含んでなる請求項 52 から 55 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 59】

各結合性部分が、前記生物学的標的に直接的または間接的に結合する抗体であり、前記生物学的標的が、Bcr-Ab1、Erbbファミリーのホモ二量体、Erbbファミリーのヘテロ二量体、および PDGF よりなる群から選択される請求項 52 から 58 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 60】

各抗体が、前記生物学的標的に間接的に結合する請求項 59 に記載のキット。

【請求項 61】

2 種の追加抗体をさらに含み、それらの各々が、前記生物学的標的に直接的に結合し、前記生物学的標的が、Bcr-Ab1、Erbbファミリーのホモ二量体、Erbbファミリーのヘテロ二量体、および PDGF よりなる群から選択される請求項 60 に記載のキ

ット。

【請求項 6 2】

前記第一の結合性部分および前記第二の結合性部分が、異なる抗体である請求項 5 2 から 6 1 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 6 3】

M A S M T C G Q Q M G (配列番号 3 8)、M A S M T - チオエステル (配列番号 5 0)、M A S M T G C Q Q M G (配列番号 3 9)、M A S M T G - チオエステル (配列番号 5)、M A S M T G G C Q M G (配列番号 4 0)、M A S M T G G - チオエステル (配列番号 5 1)、M A S M T G G Q C M G (配列番号 4 1)、M A S M T G G Q - チオエステル (配列番号 5 2)、(G)₀₋₂ - N W C H P Q F E - (G)₀₋₂ (配列番号 4 2)、(G)₀₋₂ - N W - チオエステル (配列番号 5 3)、(G)₀₋₂ - N W S C P Q F E - (G)₀₋₂ (配列番号 4 3)、(G)₀₋₂ - N W S - チオエステル (配列番号 5 4)、(G)₀₋₂ - N W S H C Q F E - (G)₀₋₂ (配列番号 4 4)、(G)₀₋₂ - N W S H - チオエステル (配列番号 5 5)、(G)₀₋₂ - N W S H P C F E - (G)₀₋₂ (配列番号 4 5)、(G)₀₋₂ - N W S H P - チオエステル (配列番号 5 6)、K E T A A A K F C R Q H M D S (配列番号 4 7)、K E T A A A K F - チオエステル (配列番号 5 7)、C G Q Q M G (配列番号 5 8)、C H P Q F E - (G)₀₋₂ (配列番号 5 9)、C P Q F E - (G)₀₋₂ (配列番号 6 0)、C R Q H M D S (配列番号 6 1)、および M A S M T G - [S C H₂ C (O)] - Q Q M G (配列番号 4 9) よりなる群から選択されるペプチジル部分を含んでなり、前記チオエステルは、R が C - 末端チオエステルを含有するペプチドと N - 末端システインを含有するペプチドとの間でのペプチド結合の形成を妨げない任意の部分である式 - C (O) - S - R を有する分子。

【請求項 6 4】

R が、C₁ ~ C₆ 直鎖状または分枝状アルキルである請求項 6 3 に記載の分子。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2010534836000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/070643

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/128138 A (ENSEMBLE DISCOVERY CORPORATION [US]; COULL JAMES M [US]; STERN ANDREW M) 30 November 2006 (2006-11-30) the whole document	1-14, 17-37, 39-58, 60-63
X	HAFF LAWRENCE A ET AL: "DNA-programmed chemistry in rapid homogeneous assays for DNA and protein targets" CLINICAL CHEMISTRY, vol. 52, no. 11, November 2006 (2006-11), pages 2147-2148, XP002518494 & 39TH OAK RIDGE CONFERENCE; ST LOUIS, MO, USA; APRIL 19 -20, 2007 ISSN: 0009-9147 the whole document	1-14, 17-37, 39-58, 60-63
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 March 2009		Date of mailing of the international search report 04/06/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pinheiro Vieira, E

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/070643

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOTHELF K V ET AL: "A modular approach to DNA-programmed self-assembly of macromolecular nanostructures" CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL 20050204 WILEY-VCH VERLAG DE, vol. 11, no. 4, 4 February 2005 (2005-02-04), pages 1062-1069, XP002518495 the whole document	1-63
A	WO 2007/024029 A (UNIV KYOTO [JP]; SERA TAKASHI [JP]) 1 March 2007 (2007-03-01) the whole document	1-63
P,X	WO 2008/036273 A (ENSEMBLE DISCOVERY CORP [US]; LANDSMAN TANYA [US]; LIVINGSTON DAVID J) 27 March 2008 (2008-03-27) the whole document	1-14, 17-37, 39-58, 60-63
P,X	WO 2008/054600 A (ENSEMBLE DISCOVERY CORP [US]; HUANG YUMEI [US]; COULL JAMES M [US]) 8 May 2008 (2008-05-08) the whole document	1-14, 17-37, 39-58, 60-63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/070643

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

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

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

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

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers allsearchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

see additional sheet(s)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2008 /070643

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 1-63

A method of determining the presence and/or amount of a biological target in a sample, the method comprising: (a) combining the sample with a first and second probe comprising (i) a first/second binding moiety with binding affinity to the biological target, (ii) a first/second oligonucleotide sequence, and (iii) a first/second product precursor associated with the first/second oligonucleotide sequence, under conditions to permit both the first and second binding moieties to bind to the biological target, if present in the sample, whereupon the first and second oligonucleotide sequences hybridize to one another to bring the first and second product precursors into reactive proximity with one another to produce a reaction product, wherein the reaction product is selected from the group consisting of an intact epitope, an enzyme substrate, an enzyme activator and a ligand; (b) detecting and (c) measuring the reaction product

Invention 2-24: Claims 64-65

A molecule comprising a peptidyl portion selected from the claimed sequences (each sequence representing a further invention 2-24)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/070643

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006128138	A	30-11-2006	AU 2006249340 A1	30-11-2006
			CA 2610027 A1	30-11-2006
			EP 1885891 A2	13-02-2008
			JP 2008545416 T	18-12-2008
			KR 20080028886 A	02-04-2008
WO 2007024029	A	01-03-2007	JP 2009506025 T	12-02-2009
WO 2008036273	A	27-03-2008	AU 2007297671 A1	27-03-2008
WO 2008054600	A	08-05-2008	NONE	

フロントページの続き

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

(72)発明者 ハフ, ローレンス エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01581, ウェストボロー, スミス ストリート 15

(72)発明者 ファン, ユーメイ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01862, ビレリカ, シーウェル ストリート 9

(72)発明者 マーティネリ, リチャード エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02478, ベルモント, ホーン ロード 40

(72)発明者 シーガル, ベンジャミン アダム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02472, ウォータータウン, ダフ ストリート 104

(72)発明者 リビングストン, デイビッド ジェイ.

アメリカ合衆国 ロードアイランド 02806, パーリントン, ジェニーズ レーン 52

(72)発明者 サン, ウェイ - チャン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01720, アクトン, マートル ドライブ 6

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18