

(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2015-520385

(P2015-520385A)

(43) 公表日 平成27年7月16日(2015.7.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 0 1 J	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 0 1 F	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
	GO 1 N 33/53 D	
	C 1 2 Q 1/68 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁)

(21) 出願番号 特願2015-516253 (P2015-516253)
 (86) (22) 出願日 平成25年6月7日(2013.6.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年2月5日(2015.2.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/044792
 (87) 国際公開番号 W02013/185078
 (87) 国際公開日 平成25年12月12日(2013.12.12)
 (31) 優先権主張番号 61/656, 956
 (32) 優先日 平成24年6月7日(2012.6.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510016254
 ソマロジック・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国コロラド州80301, ボールダー, ウィルダネス・プレイス 2945
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100135415
 弁理士 中濱 明子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アプタマーに基づく多重化アッセイ

(57) 【要約】

本開示は、試験試料中に存在し得る1つ以上の標的分子の検出のための方法、デバイス、試薬、およびキットについて記載する。記載される方法、デバイス、キット、および試薬は、核酸(すなわち、アプタマー)を検出および定量化することによって試験試料中の非核酸標的(例えば、タンパク質標的)の検出および定量化を促進し、アプタマー-標的の相互作用を維持しながら、アプタマー-アプタマーの相互作用が有意に減少されるかまたは排除される。

【選択図】 図1

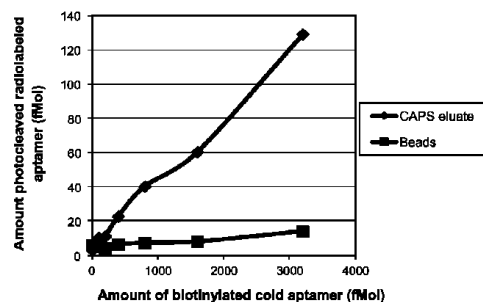


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的分子に対する特異的結合親和性を有し、かつ第 1 の捕捉要素に対する親和性を有する第 1 のタグを担持するアプタマーを、第 1 の捕捉要素を含む第 1 の固体支持体に曝露し、前記第 1 のタグを前記第 1 の捕捉要素と会合させることと、

凝集したアプタマーを解離させる 1 つ以上の溶液で前記第 1 の固体支持体を洗浄することと、

前記アプタマーを試験試料と接触させることであって、前記標的分子が前記試験試料中に存在する場合、アプタマー - 標的親和性複合体が形成される、接触させることと、

前記第 1 の固体支持体と会合していない混合物の 1 つ以上の成分を除去することと、

第 2 の捕捉要素に対する親和性を有する第 2 のタグを、前記アプタマー - 標的親和性複合体中の前記標的分子に付着させることと、

前記第 1 の固体支持体から前記アプタマー - 標的親和性複合体を放出させることと、

前記放出されたアプタマー - 標的親和性複合体を、第 2 の捕捉要素を含む第 2 の固体支持体に曝露し、前記第 2 のタグを前記第 2 の捕捉要素と会合させることと、

前記第 2 の固体支持体と会合していない前記混合物のあらゆる成分を除去することと、

アプタマー / 分析物の相互作用を妨害するカオトロピック塩を含む 1 つ以上の溶液で前記第 2 の固体支持体からアプタマーを溶出することと、を含む、方法。

【請求項 2】

前記アプタマーは、少なくとも 1 つの C - 5 修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記アプタマーは、リボース位置、デオキシリボース位置、ホスフェート位置、および塩基位置から独立して選択される 1 つ以上の位置における化学置換を含む少なくとも 1 つの化学修飾を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記化学修飾は、2' 位糖修飾、2' - アミノ (2' - NH₂)、2' - フルオロ (2' - F)、2' - O - メチル (2' - OMe)、5 位ピリミジン修飾、8 位プリン修飾、シトシン環外アミンにおける修飾、5 - プロモウラシルの置換、5 - プロモデオキシウリジンの置換、5 - プロモデオキシシチジンの置換、主鎖修飾、メチル化、3' キャップ、および 5' キャップからなる群から独立して選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

動的負荷を導入することをさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記アプタマー - 標的親和性複合体は、緩徐な解離速度を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記アプタマー - 標的親和性複合体の前記解離速度 ($t_{1/2}$) は、30 分以上である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記アプタマー - 標的親和性複合体の前記解離速度 ($t_{1/2}$) は、約 30 分 ~ 約 240 分である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記アプタマー - 標的親和性複合体の前記解離速度 ($t_{1/2}$) は、30 分以上、60 分以上、90 分以上、120 分以上、150 分以上、180 分以上、210 分以上、および 240 分以上からなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記緩衝溶液のうちの 1 つ以上は、有機溶媒を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記有機溶媒は、グリセロールである、請求項 10 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

前記カオトロピック塩は、過塩素酸ナトリウム、塩化リチウム、塩化マグネシウム、および塩化ナトリウムからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記アプタマーは、Q - P C R、M S、次世代シーケンシング、およびハイブリダイゼーションからなる群から選択される方法を用いて検出および任意選択的に定量化される、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記 Q - P C R は、T a q M a n (登録商標) P C R、P C R プロセス中の挿入蛍光色素、または P C R プロセス中の分子ビーコンを用いて行われる、請求項 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

前記アプタマーは、検出可能な部分を含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6】

前記検出可能な部分は、色素、量子ドット、放射標識、電気化学的官能基、ならびに酵素および検出可能な酵素基質からなる群から選択される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記色素は、蛍光色素である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記アプタマーは、一本鎖核酸または二本鎖核酸である、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 1 9】

前記アプタマーは、D N A、R N A、または D N A および R N A の両方を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記標的分子は、タンパク質、ペプチド、炭水化物、多糖、糖タンパク質、ホルモン、受容体、抗原、抗体、ウイルス、基質、代謝物、遷移状態類似体、補因子、阻害剤、薬物、色素、栄養素、増殖因子、組織、および制御基質からなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記標的分子は、タンパク質またはペプチドである、請求項 2 0 に記載の方法。

30

【請求項 2 2】

前記試験試料は、生物試料、環境試料、化学試料、製剤試料、食物試料、農産物試料、および動物試料からなる群から選択される、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記試験試料は、血液、全血、白血球、末梢血単核細胞、血漿、血清、痰、息、尿、精液、唾液、髄膜液、羊水、腺液、リンパ液、乳頭吸引液、気管支吸引液、滑液、関節吸引液、細胞、細胞抽出物、糞便、組織、組織抽出物、組織生検、および脳脊髄液からなる群から選択される生物試料である、請求項 2 2 に記載の方法。

40

【請求項 2 4】

前記試験試料は、血漿または血清を含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記第 1 のタグおよび前記第 2 のタグは、各々、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド核酸、ロック核酸、オリゴ糖、多糖、抗体、アフィボディ、抗体模倣体、細胞受容体、リガンド、脂質、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、E x t r a v i d i n、ニュートラビジン、T r a p t a v i d i n、金属、ヒスチジン、およびこれらの構造のいずれかの任意の部分からなる群から独立して選択される少なくとも 1 つの成分を含む、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 26】

前記第1の捕捉要素および前記第2の捕捉要素は、各々、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド核酸、ロック核酸、オリゴ糖、多糖、抗体、アフィボディ、抗体模倣体、細胞受容体、リガンド、脂質、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、Extravidin、ニュートラビジン、Traptavidin、金属、ヒスチジン、およびこれらの構造のいずれかの任意の部分から独立して選択される少なくとも1つの成分を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 27】

前記第1のタグは、放出可能な部分を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 28】

前記放出可能な部分は、光切断可能な部分を含む、請求項27に記載の方法。

10

【請求項 29】

前記第1の固体支持体および第2の固体支持体は、各々、ポリマービーズ、アガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、アクリルアミドビーズ、固体コアビーズ、多孔ビーズ、常磁性ビーズ、ガラスビーズ、制御孔ビーズ、マイクロタイターウェル、シクロ-オレフィンコポリマー基質、膜、プラスチック基質、ナイロン、Langmuir-Blodgettフィルム、ガラス、ゲルマニウム基質、シリコン基質、シリコンウエハチップ、フロースルーチップ、マイクロビーズ、ナノ粒子、ポリテトラフルオロエチレン基質、ポリスチレン基質、ガリウムヒ素基質、金基質、および銀基質からなる群から独立して選択される、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 30】

前記アプタマーを定量化することにより前記標的を定量化することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 31】

前記アプタマーの前記検出は、前記アプタマーを第3の固体支持体にハイブリダイズさせることを含み、前記第3の固体支持体は、複数のアドレス可能な特徴を含み、前記特徴のうちの少なくとも1つは、その上に配置された、前記アプタマー内に含有されるいずれかの配列に相補的な少なくとも捕捉要素を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 32】

前記アプタマー-標的親和性複合体のアプタマー部分を検出することによって前記標的分子を検出するステップをさらに含む、請求項1~31のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 33】

試料中の標的分子の存在を検出するか、またはその量を決定する方法であって、複数のアプタマーを標的分子に提供することであって、前記複数のアプタマーの各々が、第1の切断可能な捕捉タグを含む、提供することと、

前記アプタマーを、固体支持体の表面に接着されたプローブを有する前記支持体と接触させることであって、第1のタグと前記プローブとの結合によって前記アプタマーが前記固体支持体上に固定されるように、前記プローブが前記第1のタグに結合することができる、接触させることと、

前記固定されたアプタマーを、標的分子を含有する試料と接触させて、前記固体支持体に結合したアプタマー-標的分子複合体を含有する混合物を形成することと、

40

前記混合物の残りから、前記固体支持体に結合したアプタマー-標的分子複合体を分配することと、

前記アプタマー-標的分子複合体の標的分子成分に第2の捕捉タグを導入することと、前記第1の切断可能な捕捉タグを切断することによって、前記固体支持体の前記表面から前記アプタマー-標的分子複合体を解離させることと、

第2の固体支持体の表面に接着されたプローブを有する前記支持体を提供することであって、前記プローブは、標的分子上の前記第2の捕捉タグに結合することができる、提供することと、

前記第2の捕捉タグとプローブとの結合によって前記アプタマー-標的分子複合体が前

50

記第 2 の支持体に結合するように、前記解離させたアプタマー - 標的分子複合体を前記第 2 の固体支持体と接触させることと、

アプタマー / 分析物の相互作用を妨害するが、アプタマー / アプタマーの相互作用および DNA ハイブリダイゼーションを支持するカオトロピック塩を含む 1 つ以上の緩衝溶液で、前記固体支持体からアプタマーを溶出することと、

前記アプタマー - 標的分子複合体を解離させて、遊離アプタマーおよび前記支持体に結合した標的分子を得ることと、

前記遊離アプタマーを検出することと、を含む、方法。

【請求項 3 4】

前記前記アプタマーは、少なくとも 1 つの C - 5 修飾ヌクレオチドを含む、請求項 3 3 に記載の方法。

10

【請求項 3 5】

前記アプタマーは、リボース位置、デオキシリボース位置、ホスフェート位置、および塩基位置から独立して選択される 1 つ以上の位置における化学置換を含む少なくとも 1 つの化学修飾さらに含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記化学修飾は、2' 位糖修飾、2' - アミノ (2' - NH₂)、2' - フルオロ (2' - F)、2' - O - メチル (2' - OMe)、5 位ピリミジン修飾、8 位プリン修飾、シトシン環外アミンにおける修飾、5 - プロモウラシルの置換、5 - プロモデオキシウリジンの置換、5 - プロモデオキシシチジンの置換、主鎖修飾、メチル化、3' キャップ、および 5' キャップからなる群から独立して選択される、請求項 3 5 に記載の方法。

20

【請求項 3 7】

動的負荷を導入することをさらに含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記アプタマー - 標的親和性複合体は、緩徐な解離速度を有する、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記アプタマー - 標的親和性複合体の前記解離速度 ($t_{1/2}$) は、30 分以上である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記アプタマー - 標的親和性複合体の前記解離速度 ($t_{1/2}$) は、約 30 分 ~ 約 2 4 0 分である、請求項 3 9 に記載の方法。

30

【請求項 4 1】

前記アプタマー - 標的親和性複合体の前記解離速度 ($t_{1/2}$) は、30 分以上、60 分以上、90 分以上、120 分以上、150 分以上、180 分以上、210 分以上、および 240 分以上からなる群から選択される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記緩衝溶液のうちの 1 つ以上は、有機溶媒を含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記有機溶媒は、グリセロールである、請求項 4 2 に記載の方法。

40

【請求項 4 4】

前記カオトロピック塩は、過塩素酸ナトリウム、塩化リチウム、塩化ナトリウム、および塩化マグネシウムからなる群から選択される、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記アプタマーは、Q - PCR、MS、次世代シーケンシング、およびハイブリダイゼーションからなる群から選択される方法を用いて検出および任意選択的に定量化される、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記 Q - PCR は、TaqMan (登録商標) PCR、PCR プロセス中の挿入蛍光色素、または PCR プロセス中の分子ビーコンを用いて行われる、請求項 4 5 に記載の方法

50

。

【請求項 47】

前記アプタマーに検出可能な部分を付加することをさらに含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 48】

前記検出可能な部分は、色素、量子ドット、放射標識、電気化学的官能基、酵素、および酵素基質からなる群から選択される、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記色素は、蛍光色素である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記アプタマーは、一本鎖核酸または二本鎖核酸である、請求項 33 に記載の方法。

10

【請求項 51】

前記アプタマーは、DNA、RNA、または DNA および RNA の両方を含む、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記標的分子は、タンパク質、ペプチド、炭水化物、多糖、糖タンパク質、ホルモン、受容体、抗原、抗体、ウイルス、基質、代謝物、遷移状態類似体、補因子、阻害剤、薬物、色素、栄養素、増殖因子、組織、および制御基質からなる群から選択される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 53】

前記標的分子は、タンパク質またはペプチドである、請求項 33 に記載の方法。

20

【請求項 54】

前記試験試料は、生物試料、環境試料、化学試料、製剤試料、食物試料、農産物試料、および動物試料からなる群から選択される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 55】

前記試験試料は、血液、全血、白血球、末梢血単核細胞、血漿、血清、痰、息、尿、精液、唾液、髄膜液、羊水、腺液、リンパ液、乳頭吸引液、気管支吸引液、滑液、関節吸引液、細胞、細胞抽出物、糞便、組織、組織抽出物、組織生検、および脳脊髄液からなる群から選択される生物試料である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 56】

前記試験試料は、血漿または血清である、請求項 33 に記載の方法。

30

【請求項 57】

前記第 1 のタグおよび前記第 2 のタグは、各々、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド核酸、ロック核酸、オリゴ糖、多糖、抗体、アフィボディ、抗体模倣体、細胞受容体、リガンド、脂質、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、Extravidin、ニュートラビジン、Traptavidin、金属、ヒスチジン、およびこれらの構造のいずれかの任意の部分からなる群から独立して選択される少なくとも 1 つの成分を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 58】

前記第 1 の捕捉要素および前記第 2 の捕捉要素は、各々、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド核酸、ロック核酸、オリゴ糖、多糖、抗体、アフィボディ、抗体模倣体、細胞受容体、リガンド、脂質、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、Extravidin、ニュートラビジン、Traptavidin、金属、ヒスチジン、およびこれらの構造のいずれかの任意の部分から独立して選択される少なくとも 1 つの成分を含む、請求項 33 に記載の方法。

40

【請求項 59】

前記第 1 のタグは、放出可能な部分を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 60】

前記放出可能な部分は、光切断可能な部分を含む、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

50

前記第 1 の固体支持体および第 2 の固体支持体は、各々、ポリマービーズ、アガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、アクリルアミドビーズ、固体コアビーズ、多孔ビーズ、常磁性ビーズ、ガラスビーズ、制御孔ビーズ、マイクロタイターウェル、シクロ - オレフィンコポリマー基質、膜、プラスチック基質、ナイロン、Langmuir - Blodgett フィルム、ガラス、ゲルマニウム基質、シリコン基質、シリコンウエハチップ、フロースルーチップ、マイクロビーズ、ナノ粒子、ポリテトラフルオロエチレン基質、ポリスチレン基質、ガリウムヒ素基質、金基質、および銀基質からなる群から独立して選択される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 62】

前記アプタマーを定量化することにより前記標的を定量化することをさらに含む、請求項 33 に記載の方法。

10

【請求項 63】

前記アプタマーの前記検出は、前記アプタマーを第 3 の固体支持体にハイブリダイズさせることを含み、前記第 3 の固体支持体は、複数のアドレス可能な特徴を含み、前記特徴のうちの少なくとも 1 つは、その上に配置された、前記アプタマー内に含有されるいずれかの配列に相補的な少なくとも捕捉要素を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 64】

キットであって、

- a) 1 つ以上の対象とする標的に特異的な 1 つ以上のアプタマーと、
- b) 1 つ以上の固体支持体と、
- c) 1 つ以上の分配試薬と、
- d) 親和性複合体からのアプタマーの放出のための 1 つ以上の試薬と、
- (e) 有機溶媒を含む 1 つ以上の緩衝溶液と、
- (f) カオトロピック塩を含む 1 つ以上の緩衝溶液と、を備える、キット。

20

【請求項 65】

前記有機溶媒は、グリセロールである、請求項 64 に記載のキット。

【請求項 66】

前記カオトロピック塩は、過塩素酸ナトリウムである、請求項 64 に記載のキット。

【請求項 67】

前記 1 つ以上の対象とする標的を誘導体化するための試薬をさらに備える、請求項 64 に記載のキット。

30

【請求項 68】

前記 1 つ以上のアプタマーにおいて切断可能な部分を切断するための試薬をさらに備える、請求項 64 に記載のキット。

【請求項 69】

動的負荷において使用するための試薬をさらに備える、請求項 64 に記載のキット。

【請求項 70】

試験試料中に存在し得る標的分子を検出するための方法であって、

前記標的分子に対する特異的親和性を有し、かつ第 1 の捕捉要素に対する特異的親和性を有する第 1 のタグを担持するアプタマーを、第 1 の捕捉要素を含む第 1 の固体支持体に曝露し、前記第 1 のタグを前記第 1 の捕捉要素と会合させることと、

40

凝集したアプタマーを解離させる 1 つ以上の緩衝溶液で前記固体支持体を洗浄することと、

アプタマー / 分析物の相互作用を妨害するが、アプタマー / アプタマーの相互作用および DNA ハイブリダイゼーションを支持するカオトロピック塩を含む 1 つ以上の緩衝溶液で、前記固体支持体からアプタマーを溶出することと、を含む、方法。

【請求項 71】

前記カオトロピック塩は、過塩素酸ナトリウム、塩化リチウム、塩化ナトリウム、および塩化マグネシウムからなる群から選択される、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 72】

50

凝集したアプタマーを解離させる前記緩衝溶液は、有機溶媒を含む、請求項70に記載の方法。

【請求項73】

前記有機溶媒は、グリセロールである、請求項72に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

〔0001〕 本出願は、2012年6月7日に提出された米国仮特許出願第61/656,956号の利益を主張するものであり、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。

【技術分野】

【0002】

〔0002〕 本発明は、概して、アプタマーに基づく多重化アッセイの性能を向上させるように設計された方法、デバイス、試薬、およびキットに関する。そのような方法は、診断用途だけでなく、バイオマーカーの発見、ならびに研究開発用のツールおよびアプタマーに基づく治療薬の設計および開発において、幅広い有用性を有する。具体的には、バックグラウンドシグナルの減少または排除のための材料および方法が提供される。

【背景技術】

【0003】

〔0003〕 以下の説明は、本発明に関連する情報の概要を提供するものであって、本明細書において提供される情報または参照される刊行物のいずれかが、本明細書で請求される発明に対する先行技術であることを容認するものではない。

【0004】

〔0004〕 生物試料および他の試料中の生理学的に意義のある分子の検出および定量化を対象とするアッセイは、科学研究および医療分野における重要なツールである。そのようなアッセイの1つのクラスは、固体支持体に固定された1つ以上のアプタマーを含むマイクロアレイの使用を伴う。アプタマーは、各々が、高度に特異的な様式で、かつ非常に高い親和性で、標的分子に結合することができる。例えば、米国特許第5,475,096号、表題「Nucleic Acid Ligands」を参照されたく、また、例えば、それぞれが「Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip」という表題である米国特許第6,242,246号、米国特許第6,458,543号、および米国特許第6,503,715号も参照されたい。マイクロアレイを試料に接触させると、アプタマーは、試料中に存在するそれらのそれぞれの標的分子に結合し、それによって、試料中の標的分子の非存在、存在、量、および/または濃度の決定を可能にする。

【0005】

〔0005〕 また、アッセイ混合物の特定の成分を除去するように設計された、溶液に基づく標的の相互作用および分離ステップを提供する多重化アプタマーアッセイも記載されている：米国特許第7,855,054号および同第7,964,356号、ならびに米国公開公報第US/2011/0136099号および同第US/2012/0115752号を参照のこと。記載されるアプタマーアッセイ法は、アプタマー-標的親和性複合体を単離する一方で、検出される標的(単数または複数)から試験試料の成分を分離するための1つ以上の特異的な捕捉ステップを使用する。

【0006】

〔0006〕 多くのアッセイ形式の感度および特異性は、検出方法が、アッセイ中の非特異的会合に起因して発生するシグナルから真のシグナルを分解して、検出可能なシグナルを生じる能力によって制限される。これは、アプタマーに基づく多重化アッセイの場合に特に当てはまる。この種類のアッセイにおける非特異的結合の主な源の1つは、予期せぬアプタマー-アプタマー相互作用の関数であることが観察されている。標的/アプタマー相互作用は、標的的特異的アプタマーの構造的特徴を維持することに依存し、アプタマ

10

20

30

40

50

ー アプタマー相互作用を減少させるいずれの方法も、特異的／標的アプタマー相互作用を減少させないように均衡を保つ必要がある。本開示は、標的／アプタマー特異的相互作用を維持しながら、単一または多重化アプタマーアッセイにおけるバックグラウンドを排除するための方法について記載する。

【発明の概要】

【0007】

〔0007〕 本開示は、単一分析物アッセイおよびアプタマーに基づく多重化アッセイの性能を向上させるように設計された方法、デバイス、試薬、およびキットを提供する。具体的には、バックグラウンドシグナルの減少または排除のための材料および方法が提供される。

10

【0008】

〔0008〕 一実施形態において、標的分子および第1の放出可能なタグに対して高い親和性および特異性を有するアプタマーが提供される。いくつかの実施形態において、アプタマーは、光アプタマーである。いくつかの実施形態において、この第1の放出可能なタグは、光切断可能なビオチンである。他のタグおよび切断可能な部分、ならびにそのようなタグおよび切断可能な部分を含有するアプタマーについて記載する。

【0009】

〔0009〕 標的分子に対して特異的親和性を有する第1の放出可能な第1のタグを含むアプタマーを、試験試料との平衡結合の前に、溶液中の固体支持体に固定する。アプタマーの固体支持体への付着は、第1の固体支持体とアプタマーを接触させ、アプタマー上に含まれる放出可能な第1のタグを、直接的または間接的のいずれかで、第1の固体支持体に付着しているかまたはその一部である適切な第1の捕捉剤と会合させることによって達成される。付着後、pH 11に緩衝された溶液で洗浄してアプタマー／アプタマー凝集物を除去し、それによってアッセイバックグラウンドを減少させる（後に定義する「キャッチ-0」固定）。

20

【0010】

〔0010〕 次いで、試験試料を調製し、それらのそれぞれの標的分子に対して特異的親和性を有する固定されたアプタマーに接触させる。試験試料が標的分子（複数可）を含有する場合、アプタマー-標的親和性複合体が、試験試料を含む混合物中に形成する。アプタマー-標的親和性複合体に加えて、複合化していないアプタマーも、第1の固体支持体に付着することに留意されたい。次いで、固体支持体上のプローブと会合したアプタマー-標的親和性複合体および複合化していないアプタマーを混合物の残りから分配し、それによって試験試料（試料マトリックス）中の遊離標的および全ての他の複合化していない物質、すなわち、第1の固体支持体と会合していない混合物の成分を除去する。この分配ステップは、本明細書においてキャッチ-1分配と称される（後述の定義を参照）。分配後、用いられる特定の放出可能な第1のタグに適切な方法を使用して、あらゆる複合化していないアプタマーとともに、アプタマー-標的親和性複合体を第1の固体支持体から放出させる。

30

【0011】

〔0011〕 一実施形態において、固体支持体に結合したアプタマー-標的親和性複合体は、アプタマー-標的親和性複合体の標的分子成分に第2のタグを導入する薬剤で処理される。一実施形態において、標的は、タンパク質またはペプチドであり、NHS-PEO4-ビオチンで処理することにより標的がビオチン化される。標的分子に導入される第2のタグは、アプタマー捕捉タグと同じであってもよいがまたは異なってもよい。第2のタグが、第1のタグまたはアプタマー捕捉タグと同じである場合、このタグ付けステップの開始前に、第1の固体支持体上の遊離捕捉部位をブロックしてもよい。この例示的な実施形態において、第1の固体支持体は、標的のタグ付け開始前に遊離ビオチンで洗浄される。タグ付けの方法、具体的には、ペプチドおよびタンパク質等の標的のタグ付けについては、米国特許第7,855,054号に記載される。

40

【0012】

50

〔0012〕 複合化していないアプタマーおよびアプタマー-標的親和性複合体を第1の固体支持体から放出させることにより、分配が完了する。一実施形態において、第1の放出可能なタグは、第1の放出可能なタグの90%以上を切断する条件下におけるUVランプを用いた照射によって切断される光切断可能な部分である。他の実施形態において、第1の放出可能なタグ内の選択された放出可能な部分に適切な方法によって、放出が達成される。アプタマー-標的親和性複合体は、アッセイにおいてさらに使用するために溶出して収集してもよいが、またはアッセイの残りのステップを行うために別の固体支持体と接触させてもよい。

【0013】

〔0013〕 一実施形態において、遊離アプタマーを除去するために第2の分配（本明細書においてキャッチ-2分配と称される、後述の定義を参照）が行われる。上述のように、一実施形態において、アプタマー-標的親和性複合体がキャッチ-0捕捉で用いられた固体支持体と依然として接触した状態で、キャッチ-2分配で用いる第2のタグが標的に付加されてもよい。他の実施形態において、第2のタグは、キャッチ-2分配開始前のアッセイにおける別の時点で標的に付加されてもよい。混合物を固体支持体と接触させる：固体支持体には、好ましくは高い親和性および特異性で、標的捕捉タグ（第2のタグ）に結合することができる（第2の）捕捉要素が表面に付着している。一実施形態において、固体支持体は、マイクロタイタープレートのウェル内に収容された磁気ビーズ（DynaBeads MyOne Streptavidin C1等）であり、捕捉要素（第2の捕捉要素）は、ストレプトアビジンである。磁気ビーズは、分配された混合物の成分の分離に都合のよい方法を提供する。混合物中に含有されるアプタマー-標的親和性複合体は、それによって、標的（第2の）捕捉タグと第2の固体支持体上の第2の捕捉要素との結合相互作用を通して固体支持体に結合する。次いで、グリセロールを含むがこれに限定されない有機溶媒を含む緩衝液を含む緩衝溶液で支持体を洗浄することにより、アプタマー-標的親和性複合体が混合物の残りから分配される。

【0014】

〔0014〕 次いで、アプタマーは、限定されないが、過塩素酸ナトリウム、塩化リチウム、塩化ナトリウム、および塩化マグネシウムを含む群からのカオトロピック塩を含む緩衝液で、アプタマー-標的複合体から選択的に溶出される。アプタマー/アプタマー相互作用によりキャッチ-2ビーズ上に保持されるアプタマーは、この処理によって溶出されない。

【0015】

〔0015〕 別の実施形態において、キャッチ-2分配から放出されたアプタマーは、例えば、DNAマイクロアレイハイブリダイゼーション、Q-PCR、質量分析法、インベダーアッセイ、次世代シーケンシング等の任意の好適な核酸検出法によって検出および任意選択的に定量化される。これらの検出方法については、後に詳述する。

【0016】

〔0016〕 本明細書に記載されるいずれの方法が、試験試料の単一分析物試験または多重化分析を実施するために使用されてもよい。いずれの多重化分析も、試験試料、例えば、生物試料中の等しい数の標的分子を同時にアッセイするために、2個、数十個、数百個、または数千個のアプタマーの使用を含むことができる。これらの実施形態において、複数のアプタマーが試験試料中に導入され、上述のいずれのアッセイが行われてもよい。アプタマーの放出後、放出された異なるアプタマーを独立して測定するために、いずれの好適な多重化核酸検出法が用いられてもよい。一実施形態において、これは、固体表面上に別々に配置された相補的プローブへのハイブリダイゼーションによって達成することができる。別の実施形態において、異なるアプタマーの各々は、質量分析法を使用して、分子量に基づいて検出されてもよい。さらに別の実施形態において、例えばキャピラリー電気泳動において、ゲルにおいて、または液体クロマトグラフィーによる等の電気泳動移動度に基づいて、異なるアプタマーの各々が検出されてもよい。別の実施形態において、Q-PCRを使用して異なるアプタマーの各々を検出および任意選択的に定量化するため

10

20

30

40

50

に、固有のPCRプローブを使用することができる。別の実施形態において、異なるアダプターの各々を検出および任意選択的に定量化するために、次世代シーケンシング法を使用することができる。

【0017】

【0017】本明細書に開示されるアッセイの各々において、アッセイの特異性を増加させるため、および非特異的結合を減少させるために、動的負荷が用いられてもよい。本明細書に記載されるアッセイの各々に任意選択的に用いることができる一実施形態において、競合物質と試験試料とのプレインキュベーションによって、または平衡結合中の混合物への競合物質の添加によって、非特異的結合のさらなる減少が達成され得る。他の実施形態において、動的負荷は、希釈によって実行される。

10

【0018】

【0018】別の実施形態は、試験試料中に存在し得る標的分子を検出するための方法について記載しており、該方法は、標的分子に対する特異的親和性を有し、かつ第1の捕捉要素に対する特異的親和性を有する第1のタグを担持するアダプターを、第1の捕捉要素を含む第1の固体支持体に曝露し、第1のタグを第1の捕捉要素と会合させることと、凝集したアダプターを解離させる1つ以上の緩衝溶液で前記固体支持体を洗浄することと、アダプター/分析物の相互作用を妨害するが、アダプター/アダプターの相互作用およびDNAハイブリダイゼーションを支持するカオトロピック塩を含む1つ以上の緩衝溶液で、前記固体支持体からアダプターを溶出することとを含む。一実施形態において、カオトロピック塩は、過塩素酸ナトリウム、塩化リチウム、塩化ナトリウム、および塩化マグネシウムからなる群から選択され、凝集したアダプターを解離させる緩衝溶液は、有機溶媒を含む。一実施形態において、有機溶媒は、グリセロールである。

20

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】【0019】アダプター依存性の保持、およびそれに続くキャッチ-2ビーズからのアダプターの溶出を図で示したものである。ビオチンを担持しない放射標識アダプターを、増加する量の非放射標識ビオチン化アダプターを担持する磁性ストレプトアビジンビーズでインキュベートし、洗浄した。次いで、保持された材料を、pH10のCAPS緩衝液中1Mの塩化ナトリウムで溶出した。溶出した放射標識アダプターの量は、キャッチ-2ビーズに吸着した非放射性アダプターの量に比例する。

30

【図2A】【0020】図2A~2Fは、試験試料と平衡化する前にアダプターを前固定しない場合に、血漿の濃度がアッセイに与える影響を示す。図2を参照すると、血漿を0% v/vから25% v/vに滴定した。見て分かるように、ほとんどの分析物のシグナルが10~20%の間で横ばいであった。

【図2B】図2Aの説明と同じ。

【図2C】図2Aの説明と同じ。

【図2D】図2Aの説明と同じ。

【図2E】図2Aの説明と同じ。

【図2F】図2Aの説明と同じ。

【図3A】【0021】図3A~3Fは、試験試料と平衡化する前にアダプターを前固定しない場合の、光切断溶出物中のアダプターの回復を、血漿濃度の関数として図で示したものである。キャッチ-1光切断(溶出液を回収し、ハイブリダイゼーションにより定量化(Y軸、相対蛍光単位)。見て分かるように、血漿濃度の上昇に伴ってアダプターの回収率が劇的に低下し、たとえ5%の血漿であっても有意な影響が見られる。分析物の結合がアダプターのビーズへの結合に影響するかどうかは分かっていないが、複合化アダプターの選択的損失が、さらに高い血漿依存性の影響をもたらすであろうことに留意されたい。

40

【図3B】図3Aの説明と同じ。

【図3C】図3Aの説明と同じ。

【図3D】図3Aの説明と同じ。

50

【図3E】図3Aの説明と同じ。

【図3F】図3Aの説明と同じ。

【図4A】〔0022〕図4A～4Dは、標準的アッセイ（実線）および前固定アッセイ（破線）における血漿滴定の比較を図で示したものである。

【図4B】図4Aの説明と同じ。

【図4C】図4Aの説明と同じ。

【図4D】図4Aの説明と同じ。

【図5A】〔0023〕図5A～5Dは、本明細書に記載される前固定アッセイ形式を使用した、1M NaCl/CAPSの溶出と1.8M NaClO₄/PIPESの溶出の比較を図で示したものである。緩衝液の標準曲線（下の曲線）および40%血漿中のスパイク（上の曲線）を前固定アッセイ形式で実行した。

10

【図5B】図5Aの説明と同じ。

【図5C】図5Aの説明と同じ。

【図5D】図5Aの説明と同じ。

【図6】〔0024〕過塩素酸による溶出および前固定されたアプタマーを使用した、8つの複製緩衝液のみを含むウェルにわたるCV（変動係数）を示す。

【図7】〔0025〕300個の分析物について測定されたスパイクおよび回収率を示す。スパイク回収率は、（分析物シグナル_{血漿}にスパイクされた10pM-分析物シグナル_{血漿}）/分析物シグナル_{10pM}緩衝液スパイク）として定義される。

【図8】〔0026〕左に推移したタンパク質ERBB2の固定形態における緩衝液の用量反応を示す。測定された内在性レベルは、10倍以上低く、報告された内在性レベルに非常に近い。

20

【図9】〔0027〕タンパク質アクチビンAに関する、改善された緩衝液中のタンパク質滴定、より良好なスパイクおよび回収挙動、血漿滴定のより直線的な挙動、ならびに血漿中のより安定した予測内在性タンパク質レベルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

〔0028〕次に、本発明の代表的な実施形態について具体的に言及する。本発明は、列挙される実施形態とともに記載されるが、本発明は、これらの実施形態に限定されることを意図するものではないことを理解されたい。対照的に、本発明は、特許請求の範囲によって定義されるような本発明の範囲内に含まれ得る全ての代替例、変更例、および均等物を包含することが意図される。

30

【0021】

〔0029〕本発明の実施は、別途指示のない限り、当該技術分野の技術のレベル内である、化学、微生物学、分子生物学、および組換えDNA技術の従来法を用いる。そのような技術は、文献において完全に説明されている。例えば、Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Current Edition); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I&II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., Current Edition); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition)を参照のこと。

40

【0022】

〔0030〕別途定義されない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野（複数可）の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等であるいずれの方法、デバイス、および材料が、本発明の実施または試験に使用されてもよいが、好ましい方法、デバイス、および材料を次に記載する。

50

【 0 0 2 3 】

【 0 0 3 1 】 本明細書において引用される全ての刊行物、公開された特許文書、および特許出願は、本発明が関連する技術分野（複数可）の技術のレベルを示唆するものである。本明細書において引用される全ての刊行物、公開された特許文書、および特許出願は、各個別の刊行物、公開された特許文書、または特許出願が、参照によって具体的かつ個別に組み込まれることが示されているのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 2 4 】

【 0 0 3 2 】 引用される刊行物における例およびそれに関連する限界は、排他的ではなく、例示的であることが意図される。引用される刊行物の他の限界は、本明細書を読み、図面を検討すれば、当業者には明白となるであろう。

10

【 0 0 2 5 】

【 0 0 3 3 】 本開示は、アダプターに基づく多重化アッセイの性能を向上させるように設計された方法、デバイス、試薬、およびキットを含む。開示される方法、デバイス、試薬、およびキットは、バックグラウンドシグナルを減少させるかまたは排除することにより、試験試料中の標的分子の検出および/または定量化のための高感度アッセイを提供する。

【 0 0 2 6 】

【 0 0 3 4 】 特定の実施形態において別途指定のない限り、本明細書に記載される標的分子の検出および/または定量化のための方法は、ステップが記載される特定の順序とは無関係であることは注目に値する。例示の目的のために、方法は、特定の順序のステップとして記載されるが、記載される特定のアッセイの目的が達成される限り、指定されたステップの順序を任意の数だけ並び替えることが可能であることを理解されたい。換言すると、開示される方法のいずれかに列挙されるステップは、いずれの実行可能な順序で行われてもよく、本発明の方法は、記載される実施形態、実施例、または添付の特許請求の範囲のいずれかに提示されるいずれの特定の順序にも限定されない。さらに、便宜上、かつ提示を容易にするために、種々の方法が、単一標的分子および単一アダプターに関連して記載される。しかしながら、記載される方法はいずれも、複数のアダプターを用いて、複数の標的の同時検出および/または定量化を提供することができる多重形式で行うことができるため、例えば、試験試料を複数のアダプターと接触させることによって（各アダプターは、特定の標的分子に対する特異的親和性を有する）、試験試料中の複数の標的分子が検出および/または定量化され得ること（すなわち、多重化形式である）を理解されたい。

20

30

【 0 0 2 7 】

【 0 0 3 5 】 添付の特許請求の範囲を含む本開示において使用される場合、単数形の「a」、「an」、および「the」は、別途明確な指示のない限り、複数形の指示対象を含むものとし、「少なくとも1つの」および「1つ以上の」と同義に使用される。したがって、単数の「アダプター」への言及は、アダプターの混合物等を含む。

【 0 0 2 8 】

【 0 0 3 6 】 本明細書において使用される場合、「約」という用語は、数値が関連する項目の基本的な機能が不変であるような、数値の重要ではない変更または変動を表す。

40

【 0 0 2 9 】

【 0 0 3 7 】 「各」という用語は、本明細書において使用される場合、複数の項目が、少なくとも2つの項目を指すことが意図される。複数を形成している全ての項目が、関連するさらなる制約を満たすことは必要ではない。

【 0 0 3 0 】

【 0 0 3 8 】 本明細書において使用される場合、用語「含む (comprise)」、「含むこと (comprising)」、「含む (include)」、「含むこと (including)」、「含有する (contain)」、「含有すること (containing)」、およびそれらの任意の変形例は、非排他的な包含を含むことが意図さ

50

れるため、要素または要素の一覧を含む (comprise、include) かまたは含有するプロセス、方法、プロダクト・バイ・プロセス、または組成物は、これらの要素のみを含むのではなく、そのようなプロセス、方法、プロダクト・バイ・プロセス、または組成物に明示的に列挙されていないかまたは本来備わっていない他の要素も含むことができる。

【0031】

【0039】 本明細書において使用される場合、「会合する (associate、associates)」およびその任意の変形例は、所与の複合体形成条件または反応条件下で、タグ-プローブ複合体からの「非会合」または未結合物質、例えば、試験試料の未結合成分の分離を可能にするように十分に安定な複合体を生じる、タグとプローブとの間の相互作用または複合体形成を指す。タグおよびプローブは、特異性を持って互いに相互作用および結合することにより、直接的に互いに会合することができる。タグおよびプローブはまた、それらの複合体形成がリンカー分子によって媒介される場合等に、間接的に互いに会合することができる。

10

【0032】

【0040】 本明細書において使用される場合、「ヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド、もしくはデオキシリボヌクレオチド、またはそれらの修飾形態、およびそれらの類似体を指す。ヌクレオチドは、プリン (例えば、アデニン、ヒポキサンチン、グアニン、ならびにそれらの誘導体および類似体)、ならびにピリミジン (例えば、シトシン、ウラシル、チミン、ならびにそれらの誘導体および類似体) を含む種を含む。

20

【0033】

【0041】 本明細書において使用される場合、「核酸」、「オリゴヌクレオチド」、および「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチドのポリマーを指して交換可能に使用され、これらの種類の核酸、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドのDNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、および修飾型を含み、種々の実体または部分の任意の位置におけるヌクレオチド単位への付着が含まれる。「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、および「核酸」という用語は、二本鎖または一本鎖分子、および複数鎖分子 (すなわち、三重らせん) 分子を含む。核酸、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドは、アダプターという用語よりも広義の用語であるため、核酸、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドという用語は、アダプターであるヌクレオチドのポリマーを含むが、核酸、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドという用語は、アダプターに限定されない。

30

【0034】

【0042】 本明細書において使用される場合、「核酸リガンド」、「アダプター」、「SOMAmer」、および「クローン」は、標的分子に対する望ましい作用を有する非天然の核酸を指して交換可能に使用される。望ましい作用は、限定されないが、標的の結合、標的を触媒的に変更すること、標的または標的の機能活性を修飾または変更する様式で標的と反応すること、共有結合的に標的に付着すること (自殺阻害剤におけるように)、および標的と別の分子との間の反応を促進させることを含む。一実施形態において、作用は、標的分子に対する特異的結合親和性であり、そのような標的分子は、Watson/Crick塩基対形成または三重らせん形成とは無関係な機構を通して核酸リガンドに結合するポリヌクレオチド以外の三次元化学構造であり、アダプターは、標的分子によって結合されるといった既知の生理学的機能を有する核酸ではない。所与の標的に対するアダプターは、(a) 候補混合物を標的と接触させることであって、候補混合物中の他の核酸と比較して標的に対する高い親和性を有する核酸を、候補混合物の残りから分配することができる、接触させることと、(b) 候補混合物の残りから高い親和性の核酸を分配することと、(c) リガンドが豊富な核酸混合物を得るよう高い親和性の核酸を増殖させることであって、それによって標的分子のアダプターが同定される、増殖させることと、を含む方法によって、核酸の候補混合物から同定される核酸を含む (アダプターは標的のリガンドである)。親和性相互作用が程度の問題であることは認識されているが、この

40

50

文脈において、アプタマーのその標的に対する「特異的結合親和性」とは、アプタマーが、混合物または試料中の、他の標的以外の成分に結合するよりもはるかに高い程度の親和性でその標的に結合することを意味する。アプタマーは、任意の好適な数のヌクレオチドを含むことができる。「アプタマー」は、1つより多くのそのような分子のセットを指す。異なるアプタマーが、同じかまたは異なる数のヌクレオチドを有することができる。アプタマーは、DNAまたはRNAであってもよく、かつ一本鎖、二本鎖であってもよいが、または二本鎖もしくは三本鎖領域を含有してもよい。アプタマーは、所望の塩基修飾ヌクレオチドの任意の組み合わせを用いて設計することができる。

【0035】

〔0043〕 本明細書において使用される場合、「SOMAmer」またはSlow Off-Rate Modified Aptamerは、30分以上の解離速度($t_{1/2}$)を有するアプタマーを指す(疎水性修飾を有する少なくとも1つのヌクレオチドを含むアプタマーを含む)。いくつかの実施形態において、SOMAmerは、米国特許第7,947,447号、表題「Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates」に記載される改良SELEX法を用いて作製される。

10

【0036】

〔0044〕 アプタマーは、SELEXプロセスを含む任意の既知の方法を用いて同定することができる。例えば、米国特許第5,475,096号、表題「Nucleic Acid Ligands」を参照のこと。アプタマーは、一旦同定されると、化学合成法および酵素合成法を含む任意の既知の方法に従って調製または合成することができる。

20

【0037】

〔0045〕 本明細書において使用される場合、「アプタマー-標的親和性複合体」、「アプタマー親和性複合体」、または「アプタマー複合体」という用語は、アプタマーとその標的分子との相互作用によって形成される非共有結合複合体を指す。「アプタマー-標的親和性複合体」、「アプタマー親和性複合体」、または「アプタマー複合体」は、1つより多くのそのような複合体のセットを指す。アプタマー-標的親和性複合体、アプタマー親和性複合体、またはアプタマー複合体は、一般的に、環境条件の変化、例えば、温度の増加、塩濃度の増加、または変性剤の添加によって、逆転または解離させることができる。

30

【0038】

〔0046〕 いくつかの実施形態において、アプタマーとその標的との非共有複合体が提供され、アプタマーは、標的に対して約100nM以下の K_d を有し、標的からのアプタマーの解離速度(複合体の半減期によって得られる場合; $t_{1/2}$)は、約30分以上であり、かつ/または、アプタマーの核酸配列中の1個、数個、または全てのピリミジンが、塩基の5位で修飾される。

【0039】

〔0047〕 本明細書において使用される場合、「非特異的複合体」は、アプタマーおよびその標的分子以外の2つ以上の分子間の非共有結合的な会合を指す。非特異的複合体は、その構成分子間の親和性相互作用に基づいては選択されるのではなく、分子のクラス間の相互作用を表すため、非特異的複合体において会合する分子は、平均して、互いに対してはるかに低い親和性を示し、それに応じて、アプタマーおよびその標的分子よりも速い解離速度を有する。非特異的複合体は、アプタマーと非標的分子、アプタマーと別のアプタマー、競合物質と非標的分子、競合物質と標的分子、アプタマーと競合物質、および標的分子と非標的分子との間で形成される複合体、ならびにアプタマー、標的分子、非標的分子、表面および競合物質のより高次な凝集体を含む。

40

【0040】

〔0048〕 本明細書において使用される場合、「標的分子」、「分析物」、および「標的」は、アプタマーが高い親和性および特異性で結合することができ、かつ試験試料

50

に存在し得る、対象とする任意の分子を指して交換可能に使用される。「対象とする分子」は、特定の分子のいかなるわずかな変異も含み、例えば、タンパク質の場合、例えば、アミノ酸配列におけるわずかな変異、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作もしくは修飾、例えば、分子の同一性を実質的に変化させない標識成分等とのコンジュゲーションを含む。例示的な標的分子は、タンパク質、ポリペプチド、核酸、炭水化物、脂質、多糖、糖タンパク質、ホルモン、受容体、抗原、抗体、アフィボディ、抗体模倣物、ウイルス、病原体、毒性物質、基質、代謝物、遷移状態類似体、補因子、阻害剤、薬物、色素、栄養素、増殖因子、細胞、組織、および上記のいずれかの任意の断片または部分を含む。アプタマーは、任意のサイズの任意の実質的に、化学的または生物学的分子について同定されてもよく、したがって、任意のサイズの10 実質的に任意の化学的または生物学的分子もまた、好適な標的であり得る。また、標的は、標的とアプタマーとの間の相互作用の可能性または強度を高めるように修飾することもできる。また、上に定義するように、標的は、タグを含むように修飾することもできる。例示的な実施形態において、標的分子は、タンパク質である。SELEX標的がペプチドである方法については、例えば、米国特許第6,376,190号、表題「Modified SELEX Processes Without Purified Protein」を参照のこと。

【0041】

【0049】 「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、本明細書において、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指して交換可能に使用される。ポリマーは、直鎖または分枝鎖であってもよく、それは、修飾されたアミノ酸を含んでもよく、またそれは、非アミノ酸によって中断されてもよい。この用語はまた、天然に修飾された、または介入によって修飾された、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作もしくは修飾、例えば、標識成分とのコンジュゲーションによって修飾された、アミノ酸ポリマーも包含する。例えば、アミノ酸（例えば、非天然アミノ酸等を含む）の1つ以上の類似体、および当該技術分野で既知の他の修飾を含有するポリペプチドも、定義の中にも含まれる。ポリペプチドは、一本鎖または会合鎖であり得る。20

【0042】

【0050】 「試験試料」という用語は、本明細書において、複数の分子を含有し、かつ少なくとも1つの標的分子を含み得る、任意の材料、溶液、または混合物を指す。試験試料という用語は、後に定義するような生物試料、および環境試験または毒性試験に使用され得る試料、例えば、汚染されているかまたは潜在的に汚染されている水および産業排水等を含む。試験試料は、準備プロセス、例えば、製造プロセスの最終産物、中間産物、または副産物でもあってもよい。試験試料は、生物から、またはいくつかの他の源（例えば、環境または産業源）から得られた材料、溶液、または混合物に添加された、任意の好適なアッセイ培地、緩衝液、または希釈剤を含んでもよい。30

【0043】

【0051】 「生物試料」という用語は、生物から得られた任意の材料、溶液、または混合物を指す。これは、血液（全血、白血球、末梢血単核細胞、血漿、および血清を含む）、痰、息、尿、精液、唾液、髄膜液、羊水、腺液、リンパ液、乳頭吸引液、気管支吸引液、滑液、関節吸引液、細胞、細胞抽出物、および脳脊髄液を含む。これはまた、上記の全ての実験的に分離された分画も含む。「生物試料」という用語はまた、例えば、糞便試料、組織試料、または組織生検等に由来する、ホモジナイズされた固形材料を含有する、材料、溶液、または混合物も含む。「生物試料」という用語はまた、細胞株、組織培養、細胞培養、細菌培養、ウイルス培養、または無細胞生物系（例えば、IVTT）から誘導された材料、溶液、または混合物も含む。40

【0044】

【0052】 本明細書に開示される実施形態のいずれにおいて、試験試料を参照試料と比較してもよい。「参照試料」は、本明細書において、複数の分子を含有し、また少な 50

くとも1つの標的分子を含むことが分かっている、任意の材料、溶液、または混合物を指す。参照試料中に存在する任意の標的分子の正確な量または濃度も知ることができる。参照試料という用語は、本明細書に定義されるような生物試料、および環境試験または毒性試験に使用され得る試料、例えば、汚染されているかまたは潜在的に汚染されている水および産業排水等を含む。参照試料は、準備プロセス、例えば、製造プロセスの最終産物、中間産物、または副産物でもあってもよい。参照試料は、生物から、またはいくつかの他の源（例えば、環境または産業源）から得られた材料、溶液、または混合物に添加された、任意の好適なアッセイ培地、緩衝液、または希釈剤を含んでもよい。

【0045】

〔0053〕 本明細書において使用される場合、「非標的分子」および「非標的」は、アプタマーと非特異的複合体を形成することができる、試験試料中に含有される分子を指して交換可能に使用される。第1のアプタマーにとって非標的である分子が、第2のアプタマーにとっては標的であり得ることを認識されたい。同様に、第1のアプタマーにとって標的である分子が、第2のアプタマーにとっては非標的であり得る。

10

【0046】

〔0054〕 本明細書において使用される場合、「分配」という用語は、試験試料からの1つ以上の分子種または試験試料中の他の分子の分離、濃縮または除去を指す。分配は、感度を増加させるためおよび/またはバックグラウンドを減少させるために用いることができる。分配は、アプタマー複合体の形成後、またはアプタマー-標的親和性複合体が、架橋中に導入された共有結合のために不可逆的となる場合に、最も効果的である。アプタマー-標的親和性複合体が固定される場合、分配ステップは、いずれかのステップの後、またはあらゆるステップの後に導入されてもよい。分配はまた、サイズの差、またはアプタマー-標的親和性複合体と試験試料の他の成分との間に差次的に存在する他の特異的特性に依存し得る。分配はまた、アプタマーまたは標的との特異的な相互作用を通して達成され得る。分配はまた、アプタマー、標的、アプタマー-標的親和性複合体、またはアプタマー-標的共有結合複合体の物理的または生化学的特性に基づいても達成され得る。

20

【0047】

〔0055〕 単一分析物アッセイおよび多重化アプタマーアッセイにおいて、交絡バックグラウンドシグナルをもたらし得る試料またはアッセイ試薬中の材料から特定のアプタマー/親和性複合体を分離するために、数多くのステップが設計されてきた。これらのステップを実行したにもかかわらず、これらの種類のアッセイにおいてバックグラウンドは依然として問題のままである。分析方法におけるバックグラウンドは、経験的に対処することができるか、またはより良好なアプローチは、バックグラウンドの源を特定し、バックグラウンドを引き起こす相互作用を排除することである。アプタマー-アプタマー相互作用が、多重化アプタマー法におけるバックグラウンドの源であることが発見されている。配列に基づくものを含む、DNA-DNAおよびRNA-RNA相互作用を減少させる試薬が知られている。アプタマーの内部相互作用が、アプタマーの二次および三次構造を決定するため、これらの種類の試薬が、アプタマーの折り畳み、ひいてはその対応する標的への結合に影響を及ぼすことなく、多重化アッセイにおいてバックグラウンドシグナルを実質的に減少させることは、予想されていなかった。バックグラウンドを減少させる必要性とアプタマー構造の維持を両立させる材料および方法について記載する。

30

40

【0048】

〔0056〕 本開示は、試験試料中に存在し得る1つ以上の標的分子（複数可）の定量化のためのアプタマーおよび光アプタマーに基づく多重化アッセイを行うための改善された方法を記載し、本明細書に記載されるできるだけ多くの材料および方法を使用して、全体的なアッセイ性能を向上させることができるため、任意の好適な核酸検出法を用いた最終的な検出のためにアプタマー-標的親和性複合体（または光アプタマー-標的共有結合複合体）からアプタマー（または光アプタマー）を分離することができる。光アプタマーは、アプタマーが、それらの標的分子に共有結合的に結合または「光架橋」できるよう

50

にする光反応性官能基を含むアプタマーである。

【0049】

【0057】 アプタマーに基づく単一および多重化アッセイ（多重化プロテオミクスアプタマー親和性アッセイを含む）を行うための以前に記載された方法の詳細な調査から、2つの予期せぬ限界が浮かび上がった。第一に、アプタマー/アプタマー相互作用は、アッセイバックグラウンドの主な源であり、多重化能力に対する潜在的な限界であると特定された。第二に、試料マトリックス（主に血清および血漿）が、ストレプトアビジンで置換したマトリックス上でビオチン化アプタマーの固定を阻害することが分かった。プロセスにおけるこれらの限界を両方とも減少させるおよび/または排除する3つの主要な革新を本明細書に記載する。2つは、本明細書に記載される改善された方法に固有である（本明細書において、多重化アッセイの「バージョン3」と称される：1つは、Gold et al. (Dec. 2010) 「Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery」、PLoS One 5(12) : e15005に記載されるアッセイの初期バージョンにおいて実行された）。バージョン3は、本明細書に記載される本発明の1つの実施形態である。

10

【0050】

【0058】 Gold et al. (PLoS One (2010) 5(12) : e15005) に記載されるように、アッセイにおける第1の改善は、培地の誘電率を低下させるための、キャッチ-2ステップの洗浄緩衝液のいくつかにおける有機溶媒の使用を含んでいた。このような洗浄緩衝液の添加は、アプタマーの隣接するホスホジエステル骨格の同様の電荷の反発を効果的に強調し、したがって、バックグラウンドの原因となる相互作用するアプタマーの解離を促進した。

20

【0051】

【0059】 本明細書に記載されるプロセスにおける第2の改善は、二重の利点を提供する。第一に、アッセイのキャッチ-2ステップで用いられる洗浄緩衝液のうちのいくつかに対する有機溶媒の添加の場合のように、これもまた、アプタマーの相互作用する傾向に抵抗するため、バックグラウンドを低下させ、多重化能力を増加させる。しかしながら、その主な利点は、ストレプトアビジンマトリックスへのビオチン化アプタマーの吸着のマトリックス依存性阻害を妨げることである。そのような阻害は、たとえ5% v/v 血清または血漿であっても容易に検出可能であり、アッセイの作用濃度を5~10%の血清または血漿濃度に限定する。この制限のために、今度はアッセイ感度が制限される。

30

【0052】

【0060】 本明細書に記載される多重化アッセイに対する第2の改善は、試験溶液と平衡化（「キャッチ-0」と称される）される前の、固体支持体マトリックス上でのタグ付きアプタマーの前固定を含む。次いで、プロセス容器自体の中で、結合アプタマーを用いて試験溶液との平衡化が行われる。例示目的のためのみに本明細書に記載されるように、ビオチン化アプタマーをストレプトアビジンビーズマトリックス上で前固定し、ビーズに結合したアプタマーを用いて試験溶液との平衡化を行った。この前固定ステップは、アプタマーが相互作用する傾向が低い条件下での固定を可能にし、また平衡化前の非常にストリンジェントな洗浄（塩基およびカオトロピック塩を用いる）も可能にし、相互作用するアプタマーを妨害して、非常にロバスタなビオチン-ストレプトアビジンの相互作用を通して結合しなかった全てのアプタマーを除去する。これは、アッセイを横断するアプタマーの「凝集塊」の数を減少させる：ある程度検出可能な周波数を有する凝集塊は、ビオチン部分を保持するか、またはアッセイ中にビオチン化される。いくつかのアプタマーは、「タグ」タンパク質を対象とするNHS-ビオチン処理を介してビオチン化される一方で、照射は、全てではないがほとんどの光切断可能なビオチン部分をアプタマーから切断することは、言及に値する。キャッチ-2ステップで捕捉されたビオチン化アプタマーは、バルクの光切断されたアプタマーと相互作用することによってバックグラウンドを形成し、次いで、溶出時に放出される（図1）。また、アプタマーパネルが別個に固定され

40

50

、次いで、ビーズ結合形態に組み合わせられ得るため、前固定形態は、非常に高い多重化能力を支持する可能性が高く、したがってアプタマーが相互作用して凝集する状態を回避することにも留意されたい。

【0053】

〔0061〕 したがって、前固定は、分析物溶液中でのアプタマー吸着の必要性を回避し、たとえ分析物溶液の阻害濃度をアッセイする場合であっても定量的な固定を保証する。これは、以前に記載されたプロセスの10%最高濃度 (Gold et al. (Dec. 2010) PLoS One 5(12): e15005)、またはより最新版の該プロセスで用いられた5%最高濃度ではなく、少なくとも40% v/vまでの血漿または血清を含む、はるかに高い濃度の使用を可能にし、それによって約4~8倍感度を増加させると同時に、アッセイの全体的な口バスト性を高める。

10

【0054】

〔0062〕 本明細書に記載されるような、プロセス全体に対する第3の改善は、後に詳述するようなキャッチ-2ステップ中の溶出のための中性pHのカオトロピック塩の使用を含む。以前の手法は、高pH(10)の塩化ナトリウムの使用を含んでいたが、これはDNAハイブリダイゼーションおよびアプタマー/アプタマー相互作用、ならびにタンパク質/アプタマー相互作用を妨害する。上述のように、DNAハイブリダイゼーションおよびアプタマー/アプタマー相互作用は、アッセイバックグラウンドの原因となる。限定されないが、中性pHの過塩素酸ナトリウム、塩化リチウム、塩化ナトリウム、および塩化マグネシウムを含むカオトロピック塩は、DNAハイブリダイゼーションおよびアプタマー/アプタマー相互作用を支持する一方で、アプタマー/タンパク質相互作用を妨害する。最終結果は、アッセイ感度の上昇を伴う、有意に低い(約10倍)バックグラウンドである。

20

【0055】

〔0063〕 以前に記載された多重化アプタマーアッセイの概要

〔0064〕 アプタマーを溶液中の試験試料(例えば、血漿)と平衡化した。分析物とアプタマーとの長命(約30分の半減期中央値)複合体、具体的には解離速度の緩徐なアプタマーを、この期間に形成した。次いで、試料マトリックス、アプタマー、タンパク質分析物、およびアプタマー/分析物複合体を含む平衡混合物を、アガロースビーズ(SA-アガロース)に固定したストレプトアビジンに曝露した(アプタマーがビオチン部分でタグ付けされている場合)。混合物中のアプタマーは、付加されたビオチン部分を介してSA-アガロース上に捕捉される。このアッセイは、この段階ではアプタマーの定量的捕捉に依存することに留意されたい。次いで、固定したアプタマーを温和な条件下で洗浄し、遊離タンパク質および緩やかに結合したタンパク質を除去したが、アプタマーおよびアプタマー/分析物複合体はそのまま残した。「キャッチ-1」と称されるこのステップは、タンパク質精製ステップであると考えることができる。(例えば、米国特許第7,947,447号および同第7,855,054号を参照)。

30

【0056】

〔0065〕 次いで、アプタマーおよび分析物/アプタマー複合体を担持するアガロースビーズをNH₂-ビオチンで処理し、ビオチン「タグ」をアプタマーと結合したタンパク質分析物上に残した。さらに洗浄した後、アプタマーとビオチン部分との間の不安定なリンカーの切断により、アプタマー/ビオチン化分析物複合体を含むアプタマーをアガロースビーズから放出させた(例示目的のみのために後述する実施形態に記載されるように、UV光に露光すると切断される感光性リンカーを用いた)。次いで、いわゆる光切断溶出液を、磁性ストレプトアビジンビーズを含むウェルに移す。アプタマー/ビオチン化分析物複合体が、選択的に吸着される。この捕捉ステップは、「キャッチ-2」と称される。(例えば、米国特許第7,947,447号および同第7,855号を参照)。洗浄後、今や分析物を介してビーズに結合したアプタマーを、高いpHの塩化ナトリウム溶液を用いて溶出した。次いで、回収されたアプタマーを、市販のマイクロアレイとのハイブリダイゼーションにより定量化した。回収されたアプタマーの量は、標準曲線によって形

40

50

式的に決定されるタンパク質濃度の代わりとして機能する。

【0057】

〔0066〕 上述のように、相当な量のアプタマーがアッセイを横断し（すなわち、分配ステップを通過し）、添加したタンパク質が存在しない場合でも試験試料からバックグラウンドを形成することが観察された。図1に示すように、このタンパク質依存性バックグラウンドの源は、アプタマー/アプタマー相互作用に由来する。この課題に対処するためにいくつかの軽減戦略が検討されており、それらは、Gold et al. (PLOS One (2010) 5(12): e15005) に記載されている。最終的には、加温グリセロールによる洗浄が、この問題を軽減するための効果的かつ好適な戦略として選択された。しかしながら、水の誘電率を低下させる他の溶媒および試薬も、同様の様式でアッセイバックグラウンドを軽減することができる。その例として、限定されないが、グリセロール、プロピレングリコール、トレハロース、エタノール等が挙げられる。

10

【0058】

〔0067〕 アプタマーの前吸収による捕捉阻害の軽減

〔0068〕 上述のように、血清および血漿は、アプタマーの捕捉効率を低下させ、図2および3に示されるように、測定され得る濃度を限定することが分かった。

〔0069〕 図4に示すように、アプタマーの前固定およびそれに続く平衡化は、本明細書に記載されるように、捕捉阻害の問題を軽減し、はるかに高い血漿濃度の使用を可能にする。具体的には、以前に記載されたプロセスの10%最高濃度Gold et al. (PLOS One (2010) 5(12): e15005)、またはより最新版の5%最高濃度ではなく、少なくとも40% v/vまでの血漿または血清を含む濃度を使用することができ、それによって約4~8倍感度を増加させると同時に、アッセイの全体的なロバスト性を高める。

20

【0059】

〔0070〕 図4を参照すると、40% v/v血漿までずっと直線的な増加がシグナルにより、観察され得ることを見てとることができる（（ ）で印した線である前固定形態を、（ ）で印した線である標準形態と比較）。Spuriomer（タンパク質依存性のバックグラウンドの代理、下の2つのパネル）で観察されたシグナルは、標準形式においてかなり高いことに留意されたく、前固定が、タンパク質依存性のバックグラウンドを減少させ得ることが示唆される。

30

【0060】

〔0071〕 溶出にカオトロピック塩を用いたアッセイバックグラウンドの減少およびアッセイ感度の増加

〔0072〕 図5に示すように、溶出のためのカオトロピック塩の使用は、アッセイバックグラウンドを軽減するとともにアッセイ感度を増加させる。図5を参照すると、緩衝液中のアッセイバックグラウンドは、過塩素酸塩による溶出により有意に減少されることが見てとれる（図5Aの下側の曲線を図5Bの下側の曲線と比較）。アッセイバックグラウンドは、20~40RFUまで低下した。見かけの内在性レベルも、過塩素酸塩による溶出によりIL-11で若干減少されたことから、タンパク質依存性のバックグラウンドの低下（約0.2 pM対1 pM）が示唆される。

40

【0061】

〔0073〕 次の表は、CAPSO/NaClによる溶出と過塩素酸塩による溶出の比較の結果（RFU）を要約したものである。血漿の存在下（5% SOMAmerは5% v/v血漿、0.316% SOMAmerは0.316% v/v血漿、および0.01% SOMAmerは0.01%血漿）における各希釈群（列2）の全てのSOMAmerの中央値シグナルおよび平均シグナルを1~6行目に示し、5%血漿の存在下におけるSpuriomer（同種の分析物を有しない、コンピュータで設計したSOMAmer）と称される全てのSOMAmerの中央値シグナルおよび平均シグナルを8および9行目に示し、緩衝液のみの存在下における全ての希釈物中のSOMAmerの中央値シグナルお

50

よび平均シグナルを 10 行目に示す。

【 0 0 6 2 】

表 1

【 0 0 6 3 】

【 表 1 】

	希釈	CAPSO	NaClO ₄
中央値	5%	850	400
平均値	5%	6500	6200
中央値	0.316%	8500	7300
平均値	0.316%	20000	22000
中央値	0.01%	27000	22000
平均値	0.01%	62000	63000
中央値	Spuriomer	280	85
平均値	Spuriomer	350	150
中央値	緩衝液	75	20
平均値	緩衝液	95	28

10

【 0 0 6 4 】

20

【 0 0 7 4 】 図 5 に示した結果が、この表に示される結果に反映されている。シグナルが明確に同種の分析物から生じる場合、過塩素酸塩による溶出は、比較的低い緩衝液のシグナル、有意に減少した血漿中の Spuriomer のシグナル、ならびに 0.01% および 0.316% 混合物においてわずかに減少したシグナルを発生する。

【 0 0 6 5 】

【 0 0 7 5 】 過塩素酸塩による溶出を用いた緩衝液シグナルにおける変動係数 (CV) を 8 つの複製物にわたって測定した：機械のバックグラウンドに近いシグナルにノイズが生じるべきであり、したがって、これらの非常に低いバックグラウンドによって示される定量下限値 (LLoQ) の実現を妨げ得ると推論した。この実験では、わずか 32 RFU の中央値シグナルで、CV の粗中央値は 6.2% であった (図 6)。これらの非常に低いシグナルでの安定性が LLoQ を制限する要因である可能性は低かった。

30

【 0 0 6 6 】

【 0 0 7 6 】 アッセイ性能の比較

【 0 0 7 7 】 Gold et al. (PLOS One (Dec. 2010) 5 (12) : e15005) に開示される方法の最新版 (表 2 の中で「以前のアッセイ」と称される) と、本開示 (表 2 の中のバージョン 3) との形式比較を行った。プロトコル間の類似性の程度が高かったことから、単一口ボット実験において、実際には、同じフィルタープレート上で最小限の人的介入を伴って、両方のアッセイプロトコルを実行できる試験が可能であった。試験は、可変性を測定するための 8 つの複製血漿試料、8 つの緩衝液の用量反応用ウェル、および 8 つの血漿スパイク用ウェルを含んでいた。バージョン 3 は、初期のアッセイ型が以前のアッセイで用いたよりもはるかに高い血漿濃度を用いたことに留意されたい (5、0.167、および 0.0056% に対して 40、1.3、および 0.044%)。RFU 空間および血漿濃度に対して正規化された RFU の結果の概要を下に示す (表 2)。

40

【 0 0 6 7 】

表 2

【 0 0 6 8 】

【表 2】

	以前のアッセイ	バージョン 3	変化 (倍)
Spuriomer および非ヒトシグナル(rfu)	756 (15,120) 5%血漿	202 (505) 40%血漿	3.7 倍低下(30 倍低下)
多量(rfu) (正規化 rf)	42,313 (7.61×10^8) 0.0056%血漿	50,741 (1.14×10^8) 0.044%血漿	1.2 倍増加(約 7 倍低下)
中程度の量(rfu) (正規化 rf)	22,375 (1.3×10^7) 0.167%血漿 a	22,812 (1.7×10^6) 1.3%血漿	ほぼ同じ (約 7 倍低下)
定量(rfu) (正規化 rf)	1540 (30,800) 5%血漿	931 (2,327) 40%血漿	1.7 倍低下(13 倍低下)
緩衝液のみ (全て)	252	27	9.3 倍低下

10

【0069】

〔0078〕 表 2 を参照すると、Spuriomer および非ヒト標的のアプタマーからのシグナルによって決定されるように、バージョン 3 において生のバックグラウンドシグナルが約 4 倍弱まる一方で、中程度の量および多量の分析物からのシグナルによって測定されるように、生の分析物シグナルはほぼ同じであることを見て取ることができる。バージョン 3 では、40% 血漿でこれらの値が観察されたのに対し、初期のアッセイ型では 5% 血漿が用いられたことに留意されたい。100% 血漿に対してシグナルを正規化する場合（丸カッコ内の値）、バックグラウンドが有意に低下し（約 30 倍）、分析物シグナルは約 7 倍低下する。緩衝液のみのシグナルは、ほぼ 1 対数低下する。バックグラウンドの減少は代償を伴うことに留意されたい：以前のアッセイには約 15 μ L の血漿が必要であるのに対して、バージョン 3 は約 60 μ L を必要とする。この試料消費量の増加は、大型動物の試料（例えば、ヒト）の場合には重要である可能性は低い、マウスのような小動物では長期試料の分析の要因となり得る。図 7 に示すように、全体的なスパイクの回収率は、初期のアッセイ型の場合よりも、バージョン 3 において示された本発明の実施形態の場合にはるかに高く、中央値は、バージョン 3 で約 80%、以前のアッセイでは丁度 25% であった。この改善のほとんどは、平衡化前のアプタマーの固定に寄与し得る。

20

30

【0070】

〔0079〕 図 8 および 9 は、以前のアッセイ（上パネル）と本明細書に記載される方法（下パネル）に関する、緩衝液のタンパク質滴定曲線（左パネル、下の曲線）、血漿にスパイクしたタンパク質（左パネル、上の曲線）、血漿滴定（中央パネル）、および算出した内在性レベル（タンパク質標準曲線に血漿滴定をマッピング、右パネル）の直接比較の 2 つの例を示す。タンパク質は、前回のアッセイでは 5% 血漿中でスパイクされ、本明細書に記載される方法では 40% 血漿中でスパイクされたことに留意されたい。緩衝液用量 - 反応、血漿スパイク、および測定された内在性レベルを示す典型的な比較曲線は、図 8 に見ることができる。スパイク回収率の改善の明らかな例は、図 9 に見ることができる。

40

【0071】

〔0080〕 多重化アプタマーアッセイの改善

〔0081〕 一実施形態において、標的分子および第 1 の放出可能なタグに対して高い親和性および特異性を有するアプタマーが提供される。いくつかの実施形態において、アプタマーは、光アプタマーである。別の実施形態において、第 1 の放出可能なタグは、キャッチ - 1（後に段落 [0074] で定義される）分配の前に、アッセイの任意の時点で

50

付加される。一実施形態において、この第1の放出可能なタグは、光切断可能なビオチンである。他のタグおよび切断可能な部分、ならびにそのようなタグおよび切断可能な部分を含有するアプタマーについて記載する。

【0072】

【0082】 標的分子に対して特異的親和性を有する放出可能な第1のタグを含むアプタマーを、試験試料との平衡の前に、溶液中の固体支持体に固定する。アプタマーの固体支持体への付着は、第1の固体支持体とアプタマーを接触させ、アプタマー上に含まれる放出可能な第1のタグを、直接的または間接的のいずれかで、第1の固体支持体に付着している適切な第1の捕捉剤と会合させることによって達成される。pH 11に緩衝された溶液で洗浄してアプタマー/アプタマー凝集物を除去し、それによってアッセイバックグラウンドを減少させる。これらのステップは、「キャッチ - 0」を含む。

10

【0073】

【0083】 次いで、(実施例に記載されるように)試験試料を調製し、それらのそれぞれの標的分子に対して特異的親和性を有する固定されたアプタマーに接触させる。試験試料が標的分子(複数可)を含有する場合、アプタマー - 標的親和性複合体が、試験試料を含む混合物中に形成する。アプタマー - 標的親和性複合体に加えて、複合化していないアプタマーも、第1の固体支持体に付着することに留意されたい。次いで、固体支持体で会合したアプタマー - 標的親和性複合体および複合化していないアプタマーを混合物の残りから分配し、それによって試験試料(試料マトリックス)中の遊離標的および全ての他の複合化していない物質、すなわち、第1の固体支持体と会合していない混合物の成分を除去する。分配後、用いられる特定の放出可能な第1のタグに適切な方法を使用して、あらゆる複合化していないアプタマーとともに、アプタマー - 標的親和性複合体を第1の固体支持体から放出させる。

20

【0074】

【0084】 一実施形態において、固体支持体に結合したアプタマー - 標的親和性複合体は、次いで、アプタマー - 標的親和性複合体の標的分子成分に第2のタグを導入する薬剤で処理される。一実施形態において、標的は、タンパク質またはペプチドであり、NH₂-PEO₄-ビオチンで処理することにより標的がビオチン化される。標的分子に導入される第2のタグは、アプタマー捕捉タグと同じであってもよいがまたは異なってもよい。第2のタグが、第1のタグまたはアプタマー捕捉タグと同じである場合、このタグ付けステップの開始前に、第1の固体支持体上の遊離捕捉部位をブロックしてもよい。この例示的な実施形態において、第1の固体支持体は、標的にタグ付け開始前に遊離ビオチンで洗浄される。タグ付けの方法、具体的には、ペプチドおよびタンパク質等の標的のタグ付けについては、米国特許第7,855,054号に記載される。他の実施形態において、標的のタグ付けは、キャッチ - 2分配を開始する前の、アッセイの任意の他の時点に行われる。

30

【0075】

【0085】 アプタマーおよびアプタマー - 標的親和性複合体を第1の固体支持体から放出させることにより、キャッチ - 1分配が完了する。一実施形態において、第1の放出可能なタグは、第1の放出可能なタグの90%以上を切断する条件下におけるUVランプを用いた照射によって切断される光切断可能な部分である。他の実施形態において、第1の放出可能なタグ内の選択された放出可能な部分に適切な方法によって、放出が達成される。アプタマー - 標的親和性複合体は、アッセイにおいてさらに使用するために溶出して収集してもよいが、またはアッセイの残りのステップを行うために別の固体支持体と接触させてもよい。

40

【0076】

【0086】 一実施形態において、混合物は、任意選択的に動的負荷に供されてもよい。動的負荷は、アプタマーと非標的分子との間のあらゆる非特異的結合を減少させるのに役立つ。一実施形態において、10mM硫酸デキストランがアプタマー - 標的親和性複合体に添加され、混合物が約15分間インキュベートされる。他の競合物質は、限定され

50

ないが、競合核酸を含む。別の実施形態において、動的負荷は、10 mM 硫酸デキストランの存在下でキャッチ - 1 溶出を行うことによって開始される。他の実施形態において、平衡結合ステップの後およびキャッチ - 2 分配の前に、動的負荷を実行する。他の実施形態において、動的負荷は、希釈によって実行される。

【0077】

【0087】 一実施形態において、キャッチ - 2 分配は、遊離アプタマーを除去するために行われる。上述のように、一実施形態において、アプタマー - 標的親和性複合体がキャッチ - 1 分配で用いられた固体支持体と依然として接触した状態で、キャッチ - 2 分配で用いられる第2のタグが標的に付加されてもよい。他の実施形態において、第2のタグは、キャッチ - 2 分配開始前のアッセイにおける別の時点で標的に付加されてもよい。混合物を固体支持体と接触させる：固体支持体には、好ましくは高い親和性および特異性で、標的捕捉タグ（第2のタグ）に結合することができる（第2の）捕捉要素が表面に付着している。一実施形態において、固体支持体は、マイクロタイタープレートのウェル内に収容された磁気ビーズ（DynaBeads MyOne Streptavidin C1等）であり、捕捉要素（第2の捕捉要素）は、ストレプトアビジンである。磁気ビーズは、分配された混合物の成分の分離に都合のよい方法を提供する。混合物中に含有されるアプタマー - 標的親和性複合体は、それによって、標的（第2の）捕捉タグと第2の固体支持体上の第2の捕捉要素との結合相互作用を通して固体支持体に結合する。次いで、例えば、グリセロールを含むがこれに限定されない有機溶媒を含む緩衝液を含む緩衝液で支持体を洗浄することにより、アプタマー - 標的親和性複合体を混合物の残りから分配する。

10

20

【0078】

【0088】 次いで、アプタマーは、限定されないが、過塩素酸ナトリウムおよび塩化リチウムを含む群からのカオトロピック塩を含む緩衝液で、アプタマー - 標的複合体から選択的に溶出される。アプタマー / アプタマー相互作用によりキャッチ - 2 ビーズ上に保持されるアプタマーは、この処理によって溶出されない。

【0079】

【0089】 別の実施形態において、キャッチ - 2 分配から放出されたアプタマーは、例えば、DNAマイクロアレイハイブリダイゼーション、Q-PCR、質量分析法、インベーターアッセイ、次世代シーケンシング等の任意の好適な核酸検出法によって検出および任意選択的に定量化される。これらの検出方法については、後に詳述する。

30

【0080】

【0090】 一実施形態において、参照試料は、対照群に相当する生物試料であってもよい。別の実施形態において、参照試料は、最初に収集された、個体から得られた生物試料であってもよく、試験試料は、同じ個体から得られてもよいが、2回目に収集され、それによって、個体によって経時的に提供される複数の生物試料中の1つ以上の標的分子の量または濃度のいかなる変化も測定および評価することにより、個体の長期試験を容易にする。

【0081】

【0091】 本明細書に記載されるいずれの方法が、試験試料の単一分析物試験または多重化分析を実施するために使用されてもよい。いずれの多重化分析も、試験試料、例えば、生物試料中の等しい数の標的分子を同時にアッセイするために、2個、数十個、数百個、または数千個のアプタマーの使用を含むことができる。これらの実施形態において、複数のアプタマー（それらの各々が、異なる分析物を認識し、任意選択的に架橋する）が試験試料中に導入され、上述のいずれのアッセイが行われてもよい。アプタマーの放出後、放出された異なるアプタマーを測定するために、いずれの好適な多重化核酸検出法が用いられてもよい。一実施形態において、これは、固体表面上に別々に配置された相補的プローブへのハイブリダイゼーションによって達成することができる。別の実施形態において、異なるアプタマーの各々は、質量分析法を使用して、分子量に基づいて検出されてもよい。さらに別の実施形態において、例えばキャピラリー電気泳動において、ゲルにお

40

50

いて、または液体クロマトグラフィーによる等の電気泳動移動度に基づいて、異なるアプタマーの各々が検出されてもよい。別の実施形態において、Q-PCRを使用して異なるアプタマーの各々を定量化するために、固有のPCRプローブを使用することができる。

【0082】

〔0092〕 本明細書に開示されるアッセイの各々において、アッセイの特異性を増加させるため、および非特異的結合を減少させるために、動的負荷が用いられてもよい。本明細書に記載されるアッセイの各々に任意選択的に用いることができる一実施形態において、競合物質と試験試料とのプレインキュベーションによって、または平衡結合中の混合物への競合物質の添加によって、非特異的結合のさらなる減少が達成され得る。一実施形態において、4 μMのZブロック競合オリゴヌクレオチド(5'-(ACZZ)₇AC-3' (式中、Z=5-ベンジル-dUTP)が、試験混合物とともに約5分間プレインキュベートされる。

10

【0083】

〔0093〕 キット

〔0094〕 本開示の別の態様は、試験試料を分析するための本明細書に開示される方法のいずれかを都合よく行うのに有用なキットに関する。開示される方法の多用途性を高めるために、試薬の比率が方法およびアッセイの実質的な最適化を提供するように、同じかまたは別個の容器中に、パッケージ化された組み合わせで試薬が提供されてもよい。試薬の交差反応性および安定性に応じて、試薬は、各々、別個の容器内に存在してもよいが、または種々の試薬が1つ以上の容器内で組み合わせられてもよい。

20

【0084】

〔0095〕 キットは、パッケージ化された組み合わせで、少なくとも1つのタグ付きアプタマー、および各々が少なくとも1つの捕捉剤を含む1つ以上の固体支持体を含む。キットはまた、試料の希釈のための緩衝水性媒体等の洗浄溶液、およびアレイ洗浄試薬、試料調製試薬等を含んでもよい。キットはさらに、一般的には標的の修飾または誘導体化によって、第2のタグを導入する際に有用な試薬を含有してもよい。また、キットは、分析法の間に所望の動的負荷を実行するのに好適な試薬を含んでもよい。アッセイ中に起こる必要がある反応を実質的に最適化し、さらにアッセイの感度を実質的に最適化する試薬の濃度を提供するために、キット内の種々の試薬の相対量を大きく変化させることができる。適切な状況下では、キット内の試薬のうちの1つ以上が、通常、賦形剤を含む、凍結乾燥された乾燥粉末として提供されてもよく、溶解すると、本開示による方法またはアッセイを行うための適切な濃度を有する試薬溶液を提供する。キットにはさらに、本明細書に記載されるような方法のいずれかによる方法の書面による説明を含むことができる。

30

【0085】

〔0096〕 一実施形態において、試験試料中に存在し得る1つ以上の標的分子の検出および/または定量化のためのキットは、標的分子に対する特異的親和性を有し、かつタグを含む、少なくとも1つのアプタマーと、固体支持体であって、その上に配置された少なくとも1つの捕捉剤を含み、捕捉要素がアプタマー上のタグと会合することができる、固体支持体とを含む。

40

【0086】

〔0097〕 別の実施形態において、試験試料中に存在し得る1つ以上の標的分子の検出および/または定量化のためのキットは、標的分子に対する特異的親和性を有し、かつタグおよび標識を含む、少なくとも1つのアプタマーと、固体支持体であって、その上に配置された少なくとも1つの捕捉剤を含み、捕捉要素がアプタマー上のタグと会合することができる、固体支持体とを含む。

【0087】

〔0098〕 別の実施形態において、試験試料中に存在し得る1つ以上の標的分子の検出および/または定量化のためのキットは、標的分子に対する特異的親和性を有し、かつ放出可能なタグおよび標識を含む、少なくとも1つのアプタマーと、固体支持体であって、その上に配置された少なくとも1つの捕捉剤を含み、捕捉要素がアプタマー上のタグ

50

と会合することができる、固体支持体とを含む。

【0088】

〔0099〕 さらに、上述のいずれのキットも、キットの検出法の間にも動的負荷を実行するための試薬および材料を含むことができる。

【0089】

〔0100〕 本明細書において使用される場合、「キャッチ - 1」は、アプタマー - 標的親和性複合体またはアプタマー - 標的共有結合複合体の分配を指す。キャッチ - 1の目的は、アプタマーと会合していない実質的に全ての試験試料中の成分を除去することである。そのような成分の大部分を除去すると、キャッチ - 2 捕捉に用いられた標的タグ付けステップからの非標的分子を除去することによって標的のタグ付け効率が概ね改善され、より低いアッセイバックグラウンドがもたらされ得る。一実施形態において、アプタマーにタグを付加することにより、アッセイの前、アッセイの調製中、またはアッセイ中のいずれかに、タグをアプタマーに付着させる。一実施形態において、タグは、放出可能なタグである。一実施形態において、放出可能なタグは、切断可能なリンカーおよびタグを含む。上述のように、固体支持体が、タグに適切な捕捉要素を含む場合、固体支持体上でタグ付きアプタマーを捕捉することができる。次いで、あらゆる不要な材料を除去するために、試験試料と平衡化させる前に、本明細書に記載されるように固体支持体を洗浄することができる（キャッチ - 0）。

10

【0090】

〔0101〕 本明細書において使用される場合、「キャッチ - 2」は、標的分子の捕捉に基づくアプタマー - 標的親和性複合体またはアプタマー - 標的共有結合複合体の分配を指す。キャッチ - 2 ステップの目的は、検出および任意選択的な定量化の前に、遊離する、つまりは複合していないアプタマーを、試験試料から除去することである。遊離アプタマーを試料から除去することによって、任意の好適な核酸検出技術によるアプタマー - 標的親和性複合体またはアプタマー - 標的共有結合複合体の検出が可能となる。検出および任意選択的な定量化に Q - PCR を用いる場合、標的分子の正確な検出および定量化のために、遊離アプタマーの除去が必要である。

20

【0091】

〔0102〕 一実施形態において、標的分子は、タンパク質またはペプチドであり、遊離アプタマーは、タンパク質（およびペプチド）およびタンパク質（またはペプチド）を含む複合体、例えばアプタマー - 標的親和性（または共有結合）複合体に取り込まれ得る試薬を用いて、アプタマー - 標的親和性（または共有結合）複合体（および試験試料の残り）から分配される。タグ付きタンパク質（またはペプチド）およびアプタマー - 標的親和性（または共有結合）複合体を固体支持体上に固定することができ、遊離アプタマーからのタンパク質（またはペプチド）およびアプタマー - 標的親和性（または共有結合）複合体の分配を可能にする。そのようなタグ付けは、例えば、タンパク質またはペプチドに取り込まれるビオチン部分を含むことができる。

30

【0092】

〔0103〕 一実施形態において、標的にタグを化学的に付加することにより、アッセイの前、アッセイの調製中、またはアッセイ中のいずれかに、キャッチ - 2 タグをタンパク質（またはペプチド）に付着させる。一実施形態において、キャッチ - 2 タグは、放出可能なタグである。一実施形態において、放出可能なタグは、切断可能なリンカーおよびタグを含む。しかしながら、キャッチ - 2 の固体支持体からタンパク質（またはペプチド）を放出させることは、一般的に必要なではない。上述のように、第 2 の固体支持体が、標的タグに適切な捕捉要素を含む場合、該固体支持体上でタグ付き標的を捕捉することができる。次いで、有機溶媒を含む緩衝溶液および塩を含む緩衝溶液を含む種々の緩衝溶液ならびに / または塩を含有する洗浄剤ならびに / または洗浄剤で、固体支持体を洗浄する。

40

【0093】

〔0104〕 第 2 の固体支持体を洗浄した後、アプタマー - 標的親和性複合体は、次

50

いで、解離ステップに供される：複合体は、破壊されて遊離アプタマーを生じ、標的分子は、概して、捕捉要素と標的捕捉タグとの結合相互作用を通して固体支持体に結合したままである。アプタマーは、アプタマーまたは標的のいずれかの構造を破壊する任意の方法によってアプタマー-標的親和性複合体から放出されてもよい。これは、非共有結合アプタマー-標的複合体を解離させる高塩緩衝液中で、支持体に結合したアプタマー-標的親和性複合体を洗浄することによって達成され得る。溶出された遊離アプタマーを収集し、検出する。別の実施形態において、高または低pHを用いてアプタマー-標的親和性複合体を破壊する。別の実施形態において、アプタマー-標的親和性複合体を解離させるために高温が用いられる。別の実施形態において、上記方法のうちのいずれの組み合わせが用いられてもよい。別の実施形態において、アプタマー成分を放出させるために、アプタマー-標的親和性複合体のタンパク質部分のタンパク質消化が用いられる。

10

【0094】

〔0105〕 アプタマー-標的共有結合複合体の場合、それに続く定量化のためのアプタマーの放出は、アプタマー構築物中の切断可能なリンカーを用いて達成される。別の実施形態において、標的タグ中の切断可能なリンカーは、アプタマー-標的共有結合複合体の放出をもたらす。

【0095】

〔0106〕 本明細書において使用される場合、「競合物質分子」および「競合物質」は、例えば、非標的分子がアプタマーに非特異的に再結合するのを防止するために、非標的分子と非特異的複合体を形成することができる任意の分子を指して交換可能に使用される。「競合物質分子」または「競合物質」は、1つより多くのそのような分子のセットを指す。競合物質分子は、オリゴヌクレオチド、ポリアニオン（例えば、ヘパリン、ニシン精子DNA、一本鎖サケ精子DNA、およびポリデキストラン（例えば、硫酸デキストラン））、脱塩基ホスホジエステルポリマー、dNTP、ならびにピロホスフェートを含む。競合物質を用いる動的負荷の場合、例えば、そのアプタマーまたはタンパク質が非標的分子に非特異的に再結合するのを防止するために、競合物質は、遊離アプタマーまたはタンパク質と非特異的複合体を形成することができる任意の分子であってもよい。そのような競合物質分子は、ポリカチオン（例えば、スペルミン、スペルミジン、ポリリジン、およびポリアルギニン）ならびにアミノ酸（例えば、アルギニンおよびリジン）を含む。競合物質を動的負荷として用いる場合、試料中に存在する総タンパク質または総アプタマーの予想される濃度に関して極めて高い濃度が用いられる。一実施形態において、約10mM硫酸デキストランが、動的負荷における競合物質として用いられる。一実施形態において、動的負荷は、アプタマー-標的親和性複合体を含有する混合物に競合物質を添加することと、約30秒、約1分、約2分、約3分、約4分、約5分、約10分、約30分、および約60分以上の時間の間、アプタマー-標的親和性複合体を含有する混合物をインキュベートすることを含む。別の実施形態において、動的負荷は、アプタマー-標的親和性複合体を含有する混合物に競合物質を添加することと、非特異的複合体の測定レベルに対するアプタマー-標的親和性複合体の測定レベルの比が増加する時間の間、アプタマー-標的親和性複合体を含有する混合物をインキュベートすることを含む。

20

30

【0096】

〔0107〕 いくつかの実施形態において、結合緩衝液で、またはアプタマー-標的親和性複合体の解離の自然の速度を有意に増加させない任意の他の溶液で、試験試料を希釈することにより、動的負荷を実行する。希釈度は、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、または任意の好適なより高い希釈度であってもよい。より高い希釈度は、希釈後に総タンパク質およびアプタマーの濃度、ひいてはそれらの再会合の速度減少をさせることによって、より効果的な動的負荷を提供する。動的負荷を導入するために希釈が用いられる場合、アプタマー-標的親和性複合体を含有するその後の試験試料混合物は、さらなる処理の前に濃縮されてもよい。該当する場合、この濃縮は、試験試料からのあらゆる遊離アプタマーの任意選択的な分配および/またはタギング剤と反応することができる試験試料の他の成分の任意選択的な除去に関する本明細書に記載される方法を用いて達成することがで

40

50

きる。希釈を動力学的負荷として用いる場合、最初の試験試料の体積、および複合体の有意な損失を招くことなく、最終（希釈）体積からアプタマー-標的親和性複合体を回収することの望ましさの両方を考慮して、できるだけ多く希釈の量が選択される。一実施形態において、アプタマー-標的親和性複合体が希釈され、混合物は、約30秒以上、約1分以上、約2分以上、約3分以上、約4分以上、約5分以上、約10分以上、約30分以上、および約60分以上の時間の間インキュベートされる。別の実施形態において、アプタマー-標的親和性複合体が希釈され、非特異的複合体の測定レベルに対するアプタマー-標的親和性複合体の測定レベルの比が増加する時間の間、アプタマー-標的親和性複合体を含有する混合物がインキュベートされる。

【0097】

【0108】 いくつかの実施形態において、試料希釈の効果と競合物質導入の効果が同時に実現される様式で、動的負荷を実行する。例えば、試験試料は、大量の競合物質を用いて希釈することができる。これらの2つの動的負荷ストラテジーを組み合わせることにより、1つのストラテジーを用いて達成され得るよりも効果的な動的負荷を提供することができる。一実施形態において、希釈度は、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、または任意の好適なより高い希釈度であってもよく、競合物質は、約10mMの硫酸デキストランである。一実施形態において、動的負荷は、アプタマー-標的親和性複合体を含有する混合物を希釈することと、アプタマー-標的親和性複合体を含有する混合物に競合物質を添加することと、約30秒以上、約1分以上、約2分以上、約3分以上、約4分以上、約5分以上、約10分以上、約30分以上、および約60分以上の時間の間、アプタマー-標的親和性複合体を含有する混合物をインキュベートすることとを含む。別の実施形態において、動的負荷は、アプタマー-標的親和性複合体を含有する混合物を希釈することと、アプタマー-標的親和性複合体を含有する混合物に競合物質を添加することと、非特異的複合体の測定レベルに対するアプタマー-標的親和性複合体の測定レベルの比が増加する時間の間、アプタマー-標的親和性複合体を含有する混合物をインキュベートすることとを含む。

【0098】

【0109】 本明細書に開示されるように、アプタマーは、「タグ」をさらに含むことができ、それは、固体支持体にアプタマー（およびそれに結合した任意の標的分子）を付着させるかまたは固定するための手段を提供する成分を指す。「タグ」は、「捕捉要素」と会合することができる部分である。「タグ」または「捕捉要素」は、1つより多くのそのような成分のセットを指す。タグは、任意の好適な方法によって、アプタマーに付着させることができるか、または含めることができる。一般的に、タグは、アプタマーが、固体支持体に付着した捕捉要素または受容体と、直接的または間接的のいずれかで会合できるようにする。捕捉要素は、典型的には、タグとの相互作用において非常に特異的であり、かつ、それに続く処理ステップまたは手順の間に、その会合を保持するように選択（または設計）される。タグは、固体支持体上の空間的に定義されたアドレスへの、アプタマー-標的親和性複合体（または共有結合アプタマー-標的親和性複合体）の局在化を可能にすることができる。したがって、異なるタグが、固体支持体上の空間的に定義された異なるアドレスへの異なるアプタマー-標的共有結合複合体の局在化を可能にすることができる。タグは、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド核酸、ロック核酸、オリゴ糖、多糖、抗体、アフィボディ、抗体模倣体、細胞受容体、リガンド、脂質、ピオチン、ポリヒスチジン、またはこれらの構造のあらゆる断片もしくは誘導體、上記の任意の組み合わせ、または捕捉要素（もしくは後に記載するようなリンカー分子）が特異性を持って結合するかもしくは別様に会合するように設計もしくは設定され得る任意の他の構造であってもよい。一般的に、タグは、分子内で、それ自体、またはタグが付着しているかもしくはその一部であるアプタマーのいずれかと相互作用しないように設定される。アプタマーを同定するためにSELEXを用いる場合、SELEXの前または後のいずれかに、タグをアプタマーに付加してもよい。一実施形態において、SELEX後、アプタマーの5'末端上にタグが含まれる。別の実施形態において、SELEX後、アプタマーの3'末

10

20

30

40

50

端上にタグが含まれる。さらに別の態様において、タグは、S E L E X 後修飾プロセスにおいて、アダマーの3'末端および5'末端上の両方に含まれてもよい。別の実施形態において、タグは、アダマーの内部セグメントであってもよい。

【0099】

【0110】 一実施形態において、タグは、ピオチン基であり、捕捉要素は、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラビジン、Extravidin、またはTrapavidin等のピオチン結合タンパク質である。ピオチンは、合成中にアダマーに容易に取り込まれ、またストレプトアビジンビーズは、容易に入手可能であるため、この組み合わせは、種々の実施形態において都合よく使用され得る。

【0100】

【0111】 一実施形態において、タグは、ポリヒスチジンであり、捕捉要素は、ニッケル、コバルト、鉄、またはNTAでキレートした時にポリヒスチジンと配位化合物を形成することができる任意の他の金属イオンでキレートされたニトリロ三酢酸 (NTA) である。

【0101】

【0112】 一実施形態において、タグは、相補的ポリヌクレオチド配列を含有する捕捉要素と直接ハイブリダイズするように設計されたポリヌクレオチドである。この場合、タグは、「配列タグ」と称されることもあり、捕捉要素は、一般的に「プローブ」と称される。この実施形態では、タグは、一般的に構成され、そのタグが完全な相補体であるプローブ以外のプローブとはタグがハイブリダイズしない条件下でハイブリダイゼーション反応が行われる。これにより、各タグ/プローブの組み合わせが固有の配列を有することができるため、多重化アッセイ形式の設計が可能となる。

【0102】

【0113】 いくつかの実施形態において、タグは、アダマー自体の一部であるヌクレオチドを含む。例えば、アダマーを同定するためにS E L E X を用いる場合、アダマーは、一般的に、アダマーに応じて異なるヌクレオチド配列、すなわち可変領域によって、3'固定端から分離された5'固定端を含む。一実施形態において、タグは、アダマーの固定端、例えば、固定端全体または固定端のいずれか一部に含まれる、固定端の内部のヌクレオチドを含む、任意の好適な数のヌクレオチドを含むことができる。別の実施形態において、タグは、アダマーの可変領域内、例えば、可変領域全体または可変領域のいずれか一部等に含まれる、任意の好適な数のヌクレオチドを含むことができる。さらなる実施形態において、タグは、可変領域および固定端のうちの一方の両方に重複する任意の好適な数のヌクレオチドを含むことができる：すなわち、タグは、可変領域の任意の部分（全てを含む）および固定端の任意の部分（全てを含む）を含むヌクレオチド配列を含むことができる。

【0103】

【0114】 別の実施形態において、タグは、プローブと直接会合し、プローブに共有結合的に結合することができ、それによって、固体支持体の表面にアダマーを共有結合的に連結させる。この実施形態において、タグおよびプローブは、タグとプローブとが会合すると、互いに十分に近接して共有結合を生じる化学反応を起こす好適な反応基を含むことができる。反応は、自発的に起こってもよいが、または、活性化、例えば、光活性化または化学的活性化を必要としてもよい。一実施形態において、タグは、ジエン部分を含み、プローブは、ジエノフィルを含み、ジエンとジエノフィルとの自発的なディールス・アルダーコンジュゲーション反応から共有結合の形成が生じる。例えば、N-マンニツヒ反応、ジスルフィド形成、カーティス反応、アルドール縮重、シッフ塩基形成、およびマイケル付加等の、いずれの適切な相補的化学が用いられてもよい。

【0104】

【0115】 別の実施形態において、タグは、後に詳述するように、例えばリンカー分子を介して、プローブと間接的に会合する。この実施形態において、タグは、リンカー分子の特定の領域または成分に相補的なポリヌクレオチド配列を含むことができる。タグ

10

20

30

40

50

は、一般的に構成され、タグが、リンカー分子に含まれるポリヌクレオチド配列以外のポリヌクレオチド配列とハイブリダイズしないように、ハイブリダイゼーション反応が行われる。

【0105】

〔0116〕 タグがポリヌクレオチドを含む場合、ポリヌクレオチドは、任意の適切な数のヌクレオチドを含むことができる。一実施形態において、タグは、少なくとも約10個のヌクレオチドを含む。別の実施形態において、タグは、約10～約45個のヌクレオチドを含む。さらに別の実施形態において、タグは、少なくとも約30個のヌクレオチドを含む。ポリヌクレオチドを含む異なるタグは、同じ数のヌクレオチドまたは異なる数のヌクレオチドのいずれかを含むことができる。

10

【0106】

〔0117〕 いくつかの実施形態において、固体支持体上の捕捉要素または以下に定義するような「プローブ」（プローブ会合成分）との特異的相互作用のための官能性と、それが付着した分子をタグのプローブ会合成分から解離させるための官能性とを含むという点において、タグ成分は二官能性である。タグのプローブ会合成分を解離させるための手段は、化学的手段、光化学的手段、または用いられる特定のタグに応じた他の手段を含む。

【0107】

〔0118〕 本明細書において使用される場合、「捕捉要素」、「プローブ」、または「受容体」は、タグと直接的または間接的のいずれかで会合するように構成される分子を指す。単数形の「捕捉要素」、「プローブ」、または「受容体」は、タグと直接的または間接的のいずれかで会合することによって、タグが付着する部分を固体支持体に固定することができる、1種類の分子または1種類の多分子構造のコピーのセットである。複数形の「捕捉要素」、「プローブ」、または「受容体」は、1つより多くのそのような分子のセットを指す。捕捉要素、プローブ、または受容体は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド核酸、ロック核酸、オリゴ糖、多糖、抗体、アフィボディ、抗体模倣体、細胞受容体、リガンド、脂質、ビオチン、ポリヒスチジン、またはこれらの構造のあらゆる断片もしくは誘導体、上記の任意の組み合わせ、またはタグ（もしくはリンカー分子）が特異性を持って結合するかもしくは別様に会合するように設計もしくは構成され得る任意の他の構造であってもよい。捕捉要素、プローブ、または受容体は、任意の好適な方法によって、共有的または非共有的のいずれかで固体支持体に付着させることができる。

20

30

【0108】

〔0119〕 「捕捉要素」、「プローブ」、および「受容体」という用語は、交換可能に使用されるが、プローブは、一般的に、ポリヌクレオチド配列を指す。一実施形態において、プローブは、ポリヌクレオチドタグ配列に相補的な配列を有するポリヌクレオチドを含む。この実施形態において、プローブ配列は、一般的に構成され、プローブが相補配列を含むタグ以外のヌクレオチド配列とはプローブがハイブリダイズしないような条件下で、ハイブリダイゼーション反応が行われる（すなわち、プローブは、一般的に構成され、プローブが異なるタグまたはアダプターとハイブリダイズしないような条件下で、ハイブリダイゼーション反応が行われる）。

40

【0109】

〔0120〕 別の実施形態において、プローブは、タグと間接的に、例えばリンカー分子を介して、会合する。この実施形態において、プローブは、リンカー分子の特定の領域または成分に相補的なポリヌクレオチド配列を含むことができる。プローブは、一般的に構成され、プローブが、リンカー分子に含まれるポリヌクレオチド配列以外のポリヌクレオチド配列とハイブリダイズしないように、ハイブリダイゼーション反応が行われる。

【0110】

〔0121〕 プローブがポリヌクレオチドを含む場合、ポリヌクレオチドは、任意の好適な数のヌクレオチドを含むことができる。一実施形態において、プローブは、少なくとも約10個のヌクレオチドを含む。別の実施形態において、プローブは、約10～約4

50

5個のヌクレオチドを含む。さらに別の実施形態において、プローブは、少なくとも約30個のヌクレオチドを含む。ポリヌクレオチドを含む異なるプローブは、同じ数のヌクレオチドまたは異なる数のヌクレオチドのいずれかを含むことができる。

【0111】

【0122】 いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドタグとの特異的相互作用のための官能性と、プローブおよびアダプターが同時に放出されるように固体支持体からプローブを解離させるための官能性とを含むという点において、捕捉プローブは二官能性である。固体支持体からプローブを解離させるための手段は、化学的手段、光化学的手段、または用いられる特定の捕捉プローブに応じた他の手段を含む。

【0112】

【0123】 特定のタグと捕捉要素対との間の相互作用の相反性のために、ある実施形態におけるタグが、別の実施形態において捕捉要素として用いられてもよく、ある実施形態における捕捉要素が、別の実施形態においてタグとして用いられてもよい。例えば、ある実施形態において、ピオチンタグを含むアダプターが、固体支持体に付着したストレプトアビジンで捕捉されてもよく、別の実施形態において、ストレプトアビジンタグを含むアダプターが、固体支持体に付着したピオチンで捕捉されてもよい。

【0113】

【0124】 本明細書において使用される場合、リンカーは、2つの官能基または分子構造を接続するために用いられる分子構造である。本明細書において使用される場合、「スペーシングリンカー」、またはより簡潔に「スペーサー」は、アダプター内の2つの異なる官能基間に分離または間隔を提供する、一群の無害な原子を指す。本明細書において使用される場合、「放出可能な」または「切断可能な」要素、部分、またはリンカーは、2つの別個の成分を生じるように破壊することができる分子構造を指す。放出可能（または切断可能）な要素は、化学結合が破壊され得る単一分子（本明細書において、「直列型切断可能リンカー」と称される）を含んでもよいが、または非共有結合的な相互作用が破壊もしくは中断され得る2つ以上の分子（本明細書において、「ハイブリダイゼーションリンカー」と称される）を含んでもよい。

【0114】

【0125】 いくつかの実施形態において、個々の官能性との干渉を避けるために、特定の官能基を他の官能基から空間的に分離することが必要である。例えば、特定の光の波長を吸収する標識が、光切断可能な基に近接して存在すると、光切断の効率を妨げる可能性がある。したがって、例えば、光切断の完全な活性を回復するのに十分な空間的分離を提供する非干渉部分を用いて、そのような基を分離することが望ましい。いくつかの実施形態において、標識および光切断型官能基の両方を有するアダプター内に「スペーシングリンカー」が導入された。

【0115】

【0126】 一実施形態において、スペーシングリンカーは、合成中にアダプターに導入され、そのため多くのホスホロアミダイトスペーサーを含んでもよく、これは、限定されないが、長さ3、6、9、12および18炭素原子の脂肪族炭素鎖、長さ1、3、および9エチレングリコール単位のポリエチレングリコール鎖、またはテトラヒドロフラン部分（dSpacerと呼ばれる（Glenn Research））、または上記の任意の組み合わせ、またはホスホジエステル主鎖に沿って長さを付加するように設計もしくは構成され得る、任意の他の構造もしくは化学成分を含む。別の実施形態において、スペーシングリンカーは、ポリdT、dA、dG、もしくはdC、またはポリU、A、G、もしくはC、または上記の任意の組み合わせ等のポリヌクレオチドを含む。別の実施形態において、スペーサーは、1つ以上の脱塩基性リボースまたはデオキシリボース部分を含む。そのような配列は、それらがアダプターの構造または機能に干渉しないように設計されることに留意されたい。

【0116】

【0127】 本明細書において使用される場合、「ハイブリダイゼーションリンカー

10

20

30

40

50

」は、非共有結合的な相互作用が化学的または物理的方法によって破壊または中断され得る2つ以上の分子を含むリンカーを指す。いくつかの実施形態において、ハイブリダイゼーションリンカーは、アプタマーをタグに結合させ、それによって放出可能なタグを形成するために用いられる。例えば、ハイブリダイゼーションリンカーは、アプタマーとビオチンとの間の放出可能な接続（例えば、親和性アッセイおよび架橋アッセイにおいて）、またはアプタマーと光架橋基との間の放出可能な接続（例えば架橋アッセイにおいて）を形成するために、記載されるアッセイのうちのいずれにおいても使用することができる。

【0117】

【0128】 一実施形態において、ハイブリダイゼーションリンカーは、ハイブリダイズして非共有結合を形成する2つの核酸を含む。一実施形態において、ハイブリダイゼーション結合を形成する核酸の一方は、アプタマー自体の領域であってもよく、他方の核酸は、その領域に相補的な核酸であってもよい。放出は、（なおもアッセイとの適合性を維持しながら）核酸二重鎖を破壊するための任意の好適な機構によって達成することができる。一実施形態において、二重キャッチ光架橋アッセイにおいてハイブリダイゼーションリンカーを破壊するために、20 mM NaOHが用いられる。ハイブリダイゼーションリンカー分子は、任意の好適な構成を有してもよく、また、1つ以上のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド核酸、ロック核酸、オリゴ糖、多糖、抗体、アフィボディ、抗体模倣体または断片、受容体、リガンド、脂質、これらの構造の任意の断片もしくは誘導体、上記の任意の組み合わせ、または放出可能な構造を形成するように設計もしくは構成され得る任意の他の構造または化学成分を含む、任意の好適な成分を含むことができる。

10

20

【0118】

【0129】 一実施形態において、放出可能なタグは、好適な数のヌクレオチドからなる少なくとも1つのポリヌクレオチドからなる。一実施形態において、リンカー分子のポリヌクレオチド成分は、少なくとも約10個のヌクレオチドを含む。別の実施形態において、リンカー分子のポリヌクレオチド成分は、約10～約45個のヌクレオチドを含む。さらに別の実施形態において、リンカー分子のポリヌクレオチド成分は、少なくとも約30個のヌクレオチドを含む。本明細書に開示される方法のいずれかに用いられるリンカー分子は、同じ数のヌクレオチドまたは異なる数のヌクレオチドのいずれかを有するポリヌクレオチド成分を含むことができる。

30

【0119】

【0130】 「固体支持体」は、共有結合または非共有結合のいずれかによって、分子が直接的または間接的に付着され得る表面を有する任意の基質を指す。固体支持体は、表面に付着する捕捉要素またはプローブに物理的支持を提供することができるいずれの支持材料を含んでもよい。材料は、一般的に、捕捉要素またはプローブの表面への付着、およびアッセイの実行中に遭遇するあらゆる後続処理、取り扱い、または処理に関連する条件に耐えることができる。材料は、天然起源、合成、または天然起源の材料の修飾型であってもよい。好適な固体支持体材料は、シリコン、シリコンウエハチップ、グラファイト、鏡面、積層、膜、セラミクス、プラスチック（例えば、ポリ（塩化ビニル）、シクロオレフィンコポリマー、アガロースゲルまたはビーズ、ポリアクリルアミド、ポリアクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（4-メチルブテン）、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ（テレフタル酸エチレン）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFEまたはテフロン（登録商標）を含む）、ナイロン、ポリ（酪酸ビニル）等のポリマーを含む）、ゲルマニウム、ガリウムヒ素、金、銀、Langmuir Blodgett フィルム、フロースルーチップ等を含んでもよく、それらのみで用いられるか、または他の材料と組み合わせて用いられるかのいずれかである。シリカを含み、かつ、例えば、バイオガラスとして利用可能なガラスをさらに含む、ガラス等のさらなる硬質材料が考慮されてもよい。利用され得る他の材料は、例えば、制御孔ガラスビーズ、架橋ビーズ Sepharose（登録商標）、もしくはアガロース樹脂等の多孔質材料、または架橋ビス-アクリルアミドおよびアザラクトンのコポリマーを含む。他のビーズは、ナノ粒子、ポリ

40

50

マービーズ、固体コアビーズ、常磁性ビーズ、またはマイクロビーズを含む。例えば、表面上に取り込まれた、1つ以上の官能基、例えば、アミノ、カルボキシル、チオール、またはヒドロキシル官能基等のいずれかを有することができる、当該技術分野で既知の任意の他の材料も企図される。

【0120】

〔0131〕 固体支持体に用いられる材料は、単純から複雑までの範囲に及ぶ多様な構成のうちのいずれをとってもよい。固体支持体は、ストリップ、プレート、ディスク、ロッド、粒子、ビーズ、チューブ、ウェル（マイクロタイター）等を含む、多くの形状のうちのいずれか1つを有することができる。固体支持体は、多孔質または非多孔質、磁性、常磁性、または非磁性、多分散または単分散、親水性または疎水性であってもよい。固体支持体はまた、密接に充填された（カラムマトリックスにおけるように）または緩やかに充填された粒子のゲルまたはスラリーの形態であってもよい。

10

【0121】

〔0132〕 一実施形態において、捕捉要素が付着した固体支持体を用いて、タグ付アプタマー - 標的親和性複合体またはアプタマー - 標的共有結合複合体を試験混合物から捕捉する。1つの特定の例において、タグがビオチン部分である場合、固体支持体は、ストレプトアビジンを被覆したビーズまたは樹脂、例えば、Dynabeads M-280ストレプトアビジン、Dynabeads MyOneストレプトアビジン、Dynabeads M-270ストレプトアビジン（Invitrogen）、ストレプトアビジンアガロース樹脂（Pierce）、ストレプトアビジンUltralink樹脂、MagnaBindストレプトアビジンビーズ（ThermoFisher Scientific）、BioMagストレプトアビジン、ProMagストレプトアビジン、シリカストレプトアビジン（Bangs Laboratories）、ストレプトアビジンセファロースHigh Performance（GE Healthcare）、ストレプトアビジンポリスチレンマイクロスフェア（Microspheres - Nanospheres）、ストレプトアビジン被覆ポリスチレン粒子（Spherotech）、またはビオチンタグ付き分子を捕捉するために当業者によって一般的に用いられる任意の他のストレプトアビジンを被覆したビーズもしくは樹脂であってもよい。

20

【0122】

〔0133〕 上述してきたように、本発明の1つの目的は、タンパク質シグナルをアプタマーシグナルに変換することである。その結果として、収集/検出されたアプタマーの量は、結合した標的分子の量および試料中の標的分子の量の指標となり、またそれらに正比例し得る。キャッチ - 2分配の後に、第2の固体支持体からアプタマー - 標的親和性またはアプタマー - 標的共有結合複合体を溶出させることなく、多くの検出スキームを用いることができる。以下の検出法の実施形態に加えて、他の検出法が当業者に既知である。

30

【0123】

〔0134〕 多くの検出法は、検出の前にアプタマーに取り込まれる明示的な標識を必要とする。これらの実施形態において、核酸合成のための標準技術を用いて、合成中または合成後のいずれかに、例えば、蛍光色素または化学発光色素等の標識をアプタマー内に取り込むことができる。適切な試薬とともに標準的な酵素反応を用いて、合成中または合成後のいずれかに、放射性標識を取り込むことができる。標識化はまた、好適な酵素技術を用いることによって、キャッチ - 2分配および溶出の後に行われてもよい。例えば、上述の標識を有するプライマーを用いて、PCRにより、溶出したアプタマーの増幅産物内に標識が取り込まれる。定量化のためにゲル技術を用いる場合、同様にPCRを用いて異なるサイズの質量標識を取り込むことができる。これらの質量標識はまた、さらなる多重化能力のために、異なる蛍光色素または化学発光色素も取り込むことができる。合成中または合成後のいずれかにアプタマーに取り込まれる特異的タグを用いること、次いで、タグと会合し、かつ標識を担持するプローブを添加することによって、標識を間接的にアプタマーに添加してもよい。標識は、上述のもの、および、例えば、比色読み取りのため

40

50

の標準的なアッセイに使用される酵素を含む。これらの酵素は、酵素基質と合わさって作用し、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）およびアルカリホスファターゼ（AP）等の酵素を含む。標識は、電気化学的検出のための電気化学的官能基である材料または化合物も含み得る。

【0124】

【0135】 例えば、アプタマーは、試験試料と接触させる前に、上述のように³²P等の放射性同位元素で標識されてもよい。4つの基本的アッセイ、および上述のようなその変形例のうちのいずれか1つを利用して、アッセイ終了時に第2の固体支持体上の放射活性を定量化することによって、アプタマーの検出は単純に達成され得る。放射活性のカウントは、元の試験試料中の標的の量に正比例するであろう。同様に、試験試料と接触させる前に、アプタマーを上述のように蛍光色素で標識すると、第2の固体支持体上で直接、単純な蛍光読み取りが可能となる。同様に、アプタマーの溶出を必要とせず、第2の固体支持体からの直接的な読み取りのために、化学発光標識または量子ドットが利用されてもよい。

10

【0125】

【0136】 第2の固体支持体からアプタマーを溶出させるか、または光アプタマー-標的共有結合複合体を放出させることにより、上述のものに加えて、さらなる検出スキームを用いることができる。例えば、放出したアプタマー、光アプタマー、または光アプタマー-標的共有結合複合体を、PAGEゲル上で泳動させて、検出し、任意選択的に、SYBRゴールド等の核酸染色により定量化することができる。代替として、上述のようにアプタマーに取り込まれた蛍光標識を用いたキャピラリーゲル電気泳動（CGE）を使用して、放出されたアプタマー、光アプタマー、または光アプタマー共有複合体を検出および定量化することができる。別の検出スキームは、溶出したアプタマーを検出および定量化するために、例えば、SYBRグリーンを用いた定量的PCRを利用する。代替として、溶出したアプタマーを検出および定量化するために、Invader（登録商標）DNAアッセイが用いられてもよい。別の代替の検出スキームは、次世代シーケンシングを利用する。

20

【0126】

【0137】 別の実施形態において、アプタマー-標的親和性複合体（またはアプタマー-標的共有結合複合体）の量または濃度は、複製プロセス中に「分子ビーコン」を用いて決定される（例えば、Tyagi et al., Nat. Biotech. 16: 49-53, 1998; 米国特許第5,925,517号を参照のこと）。分子ビーコンは、折り畳まれてヘアピンループになり、ヘアピンが形成された時に、フルオロフォアによってほとんどまたはまったくシグナルが発生しないように、ヘアピン構造の一方の端にフルオロフォアを、また他方の端に消光剤を含有する、特異的核酸プローブである。ループ配列は、標的ポリヌクレオチド配列に特異的であり、アプタマー配列にハイブリダイズすると、ヘアピンの折り畳み構造がほどけ、それによって蛍光シグナルを発生する。

30

【0127】

【0138】 第2の固体支持体になおも結合する少数のアプタマーの多重化検出のために、異なる励起/発光スペクトルを有する蛍光色素を用いて、2つ、または3つ、または5つ、または最大10個までの個々のアプタマーを検出および定量化することができる。同様に、多重化読み取りのために、異なるサイズの量子ドットが用いられてもよい。第2の固体支持体から遊離アプタマーを分配した後で量子ドットが導入されてもよい。固有の量子ドットに付着したアプタマー特異的ハイブリダイゼーション配列を用いることにより、2、3、5、および最大10個までのアプタマーの多重化読み取りを行うことができる。個々に検出され得る異なる放射性同位体、例えば、³²P、¹²⁵I、³H、¹³C、および³⁵S等を用いた異なるアプタマーの標識化も、限定された多重化読み取りに用いることができる。

40

【0128】

【0139】 キャッチ-2の第2の固体支持体から放出されたアプタマーの多重化検

50

出のために、上述のように各アプタマーに取り込まれた単一の蛍光色素が、アプタマーレベルの定量化とともにアプタマー配列の同定を可能にする定量化方法と一緒に用いられてもよい。方法は、限定されないが、DNAチップハイブリダイゼーション、マイクロビーズハイブリダイゼーション、次世代シーケンシング、およびCGE分析を含む。

【0129】

【0140】 一実施形態において、スライドまたはチップ(Agilentのアレイ、IlluminaのBeadChipアレイ、NimbleGenのアレイ、またはカスタムプリントしたアレイ等)に固定された固有のプロープまたは一連の固有のプロープに各アプタマーまたは光アプタマーをハイブリダイズさせるために、標準的なDNAハイブリダイゼーションアレイ、またはチップが用いられる。それぞれの固有のプロープは、アプタマー上の配列に相補的である。相補配列は、アプタマーに取り込まれた固有のハイブリダイゼーションタグ、またはアプタマー配列の一部、または全アプタマー配列であってもよい。キャッチ-2の固体支持体から放出されたアプタマーは、適切なハイブリダイゼーション緩衝液に添加され、標準的なハイブリダイゼーション法を用いて処理される。例えば、アプタマー溶液をDNAハイブリダイゼーションアレイとともに約60で12時間インキュベートして、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを確実にする。アレイを洗浄し、次いで、蛍光スライドスキャナで走査して、アレイの各特徴についてアプタマーハイブリダイゼーション強度の画像を生成する。画像のセグメント化および定量化は、ArrayVision等の画像処理ソフトウェアを使用して達成される。一実施形態において、多重化アプタマーアッセイは、最大25個のアプタマー、最大50個のアプタマー、最大100個のアプタマー、最大200個のアプタマー、最大500個のアプタマー、最大1000個のアプタマー、および、最大10,000個のアプタマーを用いて検出することができる。

10

20

【0130】

【0141】 一実施形態において、上述のようなアプタマーに相補的な固有のDNAプロープを有するアドレス可能マイクロビーズが、ハイブリダイゼーションに用いられる。マイクロビーズは、Luminexビーズ技術等の固有の蛍光色素を用いてアドレス可能であり得るか、または、Illumina VeraCode技術におけるようなバーコード標識、もしくはレーザ方式のトランスポンダーを用いる。一実施形態において、キャッチ-2の固体支持体から放出されたアプタマーは、適切なハイブリダイゼーション緩衝液に添加され、標準的なマイクロビーズハイブリダイゼーション法を用いて処理される。例えば、アプタマー溶液をマイクロビーズのセットとともに60で2時間インキュベートして、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを確実にする。次いで、個々のビーズの種類を数えてアプタマー蛍光シグナルを定量化するLuminex機器で溶液を処理する。別の実施形態において、VeraCodeビーズをアプタマー溶液と接触させ、約60で2時間ハイブリダイズさせ、次いで、グリッド入りの表面に沈着させて、同定および蛍光定量化のためにスライドスキャナを使用して走査する。別の実施形態において、トランスポンダー用マイクロビーズをアプタマー試料とともに約60でインキュベートし、次いでトランスポンダー用マイクロビーズに適切なデバイスを使用して定量化する。一実施形態において、多重化アプタマーアッセイは、最大25個のアプタマー、最大50個のアプタマー、最大100個のアプタマー、最大200個のアプタマー、および、最大500個のアプタマーを用いたマイクロビーズへのハイブリダイゼーションによって検出することができる。

30

40

【0131】

【0142】 溶出したアプタマーを含有する試料は、上述のような蛍光標識とともに固有の質量タグを取り込むように処理することができる。次いで、質量標識アプタマーを、本質的にはDNAシーケンサーであるCGE機器に注入し、それらの固有の質量によってアプタマーを同定し、標識反応中に取り込まれた色素からの蛍光を用いて定量化する。この技術の1つの例示的な例が、Althea Technologiesによって開発されている。

50

【0132】

【0143】 上述の方法の多くにおいて、アプタマーの溶液は、増幅することができ、任意選択的に、定量化前にタグ付けすることができる。標準的なPCR増幅が、キャッチ-2の固体支持体から溶出したアプタマーの溶液と共に用いられてもよい。そのような増幅は、DNAアレイハイブリダイゼーション、マイクロビーズハイブリダイゼーション、およびCGE読み取りの前に用いることができる。

【0133】

【0144】 別の実施形態において、アプタマー-標的親和性複合体（またはアプタマー-標的共有結合複合体）は、Q-PCRを用いて検出および/または定量化される。本明細書において使用される場合、「Q-PCR」は、アッセイの結果が定量的である、すなわち、アッセイが、試験試料中に存在するアプタマーの量または濃度を定量化できるような方式で、また、そのような制御条件下で行われるPCR反応を指す。

10

【0134】

【0145】 一実施形態において、試験試料中のアプタマー-標的親和性複合体（またはアプタマー-標的共有結合複合体）の量または濃度は、TaqMan（登録商標）PCRを用いて決定される。この技術は、一般的に、標的配列からシグナルを発生させるために、オリゴヌクレオチド複製酵素の5'-3'エキソヌクレアーゼ活性に依存する。TaqManプローブは、定量化されるアプタマーの配列に基づいて選択され、一般的に、例えば、6-カルボキシフルオレセイン等の5'末端フルオロフォア、および、例えば、6-カルボキシテトラメチルフルオレセイン等の3'末端消光剤を含み、アプタマー配列がポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて増幅されるとシグナルを発生する。ポリメラーゼがアプタマー配列をコピーすると、PCRプライマーから下流にアニーリングされたプローブからエキソヌクレアーゼ活性によりフルオロフォアが遊離され、それによってシグナルを発生する。複製産物が生成されるとシグナルが増加する。PCR産物の量は、行われる複製周期の数、およびアプタマーの出発濃度の両方に依存する。

20

【0135】

【0146】 別の実施形態において、アプタマー-標的親和性複合体（またはアプタマー-標的共有結合複合体）の量または濃度は、複製プロセス中に挿入蛍光色素を用いて決定される。例えば、SYBR（登録商標）グリーン等の挿入色素は、一本鎖DNAの存在下で発生される蛍光シグナルと比較して、二本鎖DNAの存在下で大きな蛍光シグナルを発生する。PCR中に二本鎖DNA産物が形成されると、色素によって生成されるシグナルが増加する。生成されるシグナルの大きさは、PCR周期数およびアプタマーの出発濃度の両方に依存する。

30

【0136】

【0147】 別の実施形態において、アプタマー-標的親和性複合体（またはアプタマー-標的共有結合複合体）は、質量分析を用いて検出および/または定量化される。上述の酵素技術を用いて固有の質量タグを導入することができる。質量分析による読み取りのために、検出標識は必要ではなく、むしろ質量自体を用いて、同定、および、当業者に一般的に用いられる技術を用いて、質量分析法による分析中に生じる質量ピークの位置および質量ピーク下面積に基づいた定量化の両方を行った。質量分析を使用した例は、Sequenomによって開発されたMassARRAY（登録商標）システムである。

40

【0137】

【0148】 本明細書に開示される方法のいずれかの1つ以上のステップを実行するために、コンピュータプログラムが利用されてもよい。本開示の別の態様は、コンピュータプログラムが格納されたコンピュータ可読記憶媒体を含むコンピュータプログラム製品であり、コンピュータに読み込まれると、本明細書に開示される方法のいずれかの実行を行うかまたは補助する。

【0138】

【0149】 本開示の一態様は、本明細書に開示される方法のいずれかの産物、すなわちアッセイ結果であり、それは、試験施設で評価されてもよいが、または必要に応じて

50

、評価および連絡のために遠隔地の関係者に送られてもよい。本明細書において使用される場合、「遠隔地」は、結果が得られる場所と物理的に異なる場所を指す。そのため、結果は、異なる部屋、異なる建物、町の異なる地域、異なる町等に送られてもよい。データは、例えば、ファクシミリ、郵便、翌日配達便、eメール、ftp、ボイスメール等の任意の好適な手段によって送られてもよい。

【0139】

【0150】 情報を「通信する」とは、好適な通信チャネル（例えば、民間または公的ネットワーク）を介した電子シグナルとしてその情報を表すデータの伝達を指す。項目を「転送する」とは、その項目を物理的に輸送することによって、または別の手段によって（可能である場合）、その項目をある場所から次の場所に移動する任意の手段を指し、少なくともデータの場合、データを所持するかまたはデータを通信する媒体を物理的に輸送することを含む。

10

【実施例】

【0140】

【0151】 以下の実施例は、例示目的のみのために提供されるのであって、添付の特許請求の範囲に定義されるような本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【0141】

【0152】 上記の説明は、種々の実施形態および実施例を参照して本開示について記載している。特定の実施形態、実施例、または特定の実施形態もしくは実施例の要素は、特許請求の範囲のいずれかの決定的な、必要な、または本質的な要素もしくは特徴として見なされないものとする。

20

【0142】

【0153】 以下の特許請求の範囲に記載されるような本開示の範囲から逸脱することなく、開示される実施形態に対する種々の変更および置換を行うことができることを認識されたい。図および実施例を含む本明細書は、限定的ではなく例示的な様式で見なされるものとし、全てのそのような変更および置換は、本開示の範囲内に含まれることが意図される。したがって、本開示の範囲は、実施例によってではなく、添付の特許請求の範囲およびそれらの法的な均等物によって決定され得る。例えば、方法またはプロセスの請求項のいずれかに列挙されるステップは、実行可能ないずれの順で実行されてもよく、実施形態、実施例、または特許請求の範囲のいずれかに提示される順序に限定されない。

30

【0143】

プロテオミクス親和性アッセイ

【0154】 キャッチ - 0

【0155】 1 x SB17, Tw (40 mM HEPES, 102 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 0.05% Tween-20) 中の133 μLの7.5%ストレプトアビジン - アガローススラリーを、フィルタープレート (0.45 μm Millipore HVプレート (Duraporeカタログ番号MAHVN4550)) のウェルに添加した。適切な1.1 x アプタマー混合物 (全てのアプタマーは、5'末端にCy3フルオロフォアおよび光切断可能なビオチン部分を含有する) を解凍し、その後ボルテックスした。次いで、1.1 x アプタマー混合物を10分間沸騰させ、30分ボルテックスし、水浴で20分間中20 に冷却させた。次いで、ストレプトアビジンアガローススラリーを含有するフィルタープレート中の液体を、遠心分離 (1000 x gで1分間) により除去した。100 μLのアプタマー混合物を、フィルタープレートのウェルに (ロボット制御により) 添加した。光から保護された、850 rpmに設定された振盪機上で、混合物を25 で20分間インキュベートした。

40

【0144】

【0156】 キャッチ - 0 洗浄

【0157】 20分のインキュベーション後、真空濾過により溶液を除去した。190 μLの1 x CAPSアプタマー前洗浄緩衝液 (50 mM CAPS, 1 mM EDTA, 0.05% Tw-20, pH 11.0) を添加し、振盪させながら1分間混合物をイン

50

キュベートした。次いで、真空濾過によりCAPS洗浄溶液を除去した。次いで、CAPS洗浄を1回繰り返した。190 μ Lの1xSX17, Twを添加し、振盪させながら1分間混合物をインキュベートした。次いで、真空濾過により1xSB17, Twを除去した。さらに190 μ Lの1xSX17, Twを添加し、振盪させながら1分間混合物をインキュベートした。次いで、遠心分離(1000 \times gで1分)により1xSB17, Twを除去した。1xSB17, Twの除去後、150 μ Lのキャッチ-0保存緩衝液(150mM NaCl、40mM HEPES、1mM EDTA、0.02%アジ化ナトリウム、0.05% Tween-20)を添加し、フィルタープレートを外周部のみで慎重に密封し、使用するまで暗所にて4で保存した。

【0145】

【0158】 試料の調製

【0159】 75 μ Lの40%試料希釈液を40%試料プレートに入れた(最終40%試料は、20 μ M Zブロック、1mMベンズアミジン、1mM EGTA、40mM HEPES、5mM MgCl₂、5mM KCl、1% Tween-20を含有する)。195 μ Lの1xSB17, Twを1%試料プレートに入れた。90 μ Lの1xSB17, Twを1:10希釈用プレートに入れた。133 μ Lの1xSB17, Twを0.005%試料プレートに入れた。25のインキュベータ内のRack Thawing Station上で10分間試料を解凍し、次いでボルテックスし、1000 \times gで1分間回転させた。チューブからキャップを除去した。試料を混合し(50 μ Lで5回)、50 μ Lの100%試料を、試料希釈液を収容する40%試料プレートに移した。次いで、ピペットで吸引および吐出すること(110 μ L、10回)により、試料プレート上で40%試料を混合した。次いで、5 μ Lの40%試料を、1xSB17, Twを収容する1%試料プレートに移した。ピペットで吸引および吐出すること(120 μ L、10回)により、この試料を再び混合した。混合した後、10 μ Lの1%試料を、1xSB17, Twを収容する1:10希釈用プレートに移し、ピペットで吸引および吐出すること(75 μ L、10回)により混合した。1:10希釈用プレートからの7 μ Lの0.1%試料を、1xSB17, Twを収容する0.005%試料プレートに移し、ピペットで吸引および吐出すること(110 μ L、10回)により混合した。

【0146】

【0160】 平衡化前のプレートの調製

【0161】 真空濾過により、フィルタープレートからキャッチ-0保存溶液を除去した。次いで、190 μ Lの1xSB17, Twを添加し、その後、真空濾過によりフィルタープレートから除去した。次いで、さらに190 μ Lの1xSB17, Twをフィルタープレートに添加した。

【0147】

【0162】 平衡化

【0163】 遠心分離(1000 \times gで1分間)により、フィルタープレートから1xSB17, Tw緩衝液を除去した。100 μ Lの適切な試料希釈液をフィルタープレート(3つのフィルタープレート、40%、1%、または0.005%の各試料希釈液に1つ)に添加した。フィルタープレートを外周部のみで慎重に密封し、ウェルを加圧することを回避した。圧力は、平衡化の間に漏出の原因となる。次いで、光から保護された、850rpmに設定された熱振盪機上で、プレートを28で3.5時間インキュベートした。

【0148】

【0164】 フィルタープレートの処理

【0165】 平衡化後、フィルタープレートを真空マニホールド上に配置し、真空濾過により試料を除去した。190 μ Lのピオチン洗浄液(1xSB17, Tw中100 μ Mのピオチン)を添加し、真空濾過により液体を除去した。次いで、試料を190 μ Lの1xSB17, Twで5回洗浄した(真空濾過)。1xSB17, Tw中の100 μ Lの1mM NHS-ピオチン(新しく調製した)を添加し、フィルタープレートを吸収パッド

10

20

30

40

50

上にプロットし、振盪させながら5分間混合物をインキュベートした。真空濾過により液体を除去した。1 x S B 1 7 , T w 中の1 2 5 μ L の2 0 m M グリシンを添加し、真空濾過により液体を除去した。再び、1 x S B 1 7 , T w 中の1 2 5 μ L の2 0 m M グリシンを添加し、真空濾過により液体を除去した。続いて、1 9 0 μ L の1 x S B 1 7 , T w で試料を6回洗浄し、真空濾過により液体を除去した。次いで、8 5 μ L の光切断緩衝液(1 x S B 1 7 , T w 中2 μ M Zブロック)を各フィルタープレートに添加した。

【0149】

〔0166〕 光切断

〔0167〕 フィルタープレートを吸収パッド上にプロットし、振盪させながら(800 rpm、25) Black Ray UVランプで6分間照射した。プレートを180度回転させ、Black Ray光源下でさらに6分間照射した。40%フィルタープレートを、空の96ウェルプレート上に配置した。1%フィルタープレートを40%フィルタープレートの上に重ね、0.005%フィルタープレートを1%フィルタープレートの上に重ねた。プレートのアセンブリを1000 x gで1分間回転させた。溶出した試料を含む96ウェルプレートを、ロボットデッキ上に配置した。37 のインキュベータからの1 x S B 1 7 , T w 中の60%グリセロールを、ロボットデッキ上に配置した。

10

【0150】

〔0168〕 キャッチ - 2

〔0169〕 アッセイの設定中、キャッチ - 2のために、50 μ L の10 mg / mL MyOne SAビーズ(500 μ g)をABgene Omniチューブの96ウェルプレートに添加し、Cytomat内に配置した。キャッチ - 2の96ウェルビーズプレートを90秒間懸濁し、磁気ブロック上に60秒間置き、上清を除去した。全てのキャッチ - 1溶出液をキャッチ - 2ビーズプレートに移し、Peltier熱振盪機上でインキュベートした(1350 rpm、5分、25)。プレートを25 の磁石に2分間移し、上清を除去した。次いで、75 μ L の1 x S B 1 7 , T w を添加し、Peltier振盪機上、1350 rpm、37 で1分間試料をインキュベートした。次いで、1 x S B 1 7 , T w 中の75 μ L の60%グリセロール(37 に加熱)を添加し、再び、Peltier振盪機上、1350 rpm、37 で1分間試料をインキュベートした。37 に加熱した磁石にプレートを移して2分間インキュベートし、その後上清を除去した。37 、1 x S B 1 7 , T w 、およびグリセロールの洗浄サイクルを、あと2回繰り返した。次いで、試料を洗浄し、Peltier振盪機上(1350 rpm、1分、25)で、150 μ L の1 x S B 1 7 , T w とともに残ったグリセロールを除去し、その後1分間25 の磁気ブロックに置いた。上清を除去し、0.5 M NaClと置き換えた150 μ L の1 x S B 1 7 , T w を添加し、1350 rpmで1分間インキュベートし(25)、その後1分間25 の磁気ブロックにおいた。上清を除去し、75 μ L の過塩素酸塩溶出緩衝液(1.8 M NaClO₄、40 mM PIPES、1 mM EDTA、0.05% Triton X-100、1 x ハイブリダイゼーション対照、pH = 6.8)を添加し、その後、Peltier振盪機上で10分インキュベートした(25 、1350 rpm)。その後、プレートを磁気選別機に移し、90秒間インキュベートし、上清を回収した。

20

30

40

【0151】

〔0170〕 ハイブリダイゼーション

〔0171〕 20 μ L の溶出した試料を、空の96ウェルプレートにロボット制御により添加した。第2のセットのハイブリダイゼーション対照を含有する5 μ L の10 x Agilentブロック緩衝液を、溶出した試料にロボット制御により添加した。次いで、25 μ L の2 x Agilent HiRPM ハイブリダイゼーション緩衝液を、手作業でウェルに添加した。40 μ L のハイブリダイゼーション混合物を、Agilentのガスケットスライド上に負荷した。Agilentの8 x 15 kアレイをガスケットスライド上に添加し、クランプを用いてサンドイッチを締め付けた。次いで、サンドイッチを回転させながら(20 rpm)55 で19時間インキュベートした。

50

【0152】

〔0172〕 ハイブリダイゼーション後の洗浄

〔0173〕 Little Dipper Processor (SciGene、カタログ番号1080-40-1)上で、ハイブリダイゼーション後のスライド処理を行った。約750mLの洗浄緩衝液1 (Oligo aCGH/ChIP-on-chip Wash Buffer 1、Agilent Technologies)を1つのガラス製染色皿に入れた。約750mLの洗浄緩衝液1 (Oligo aCGH/ChIP-on-chip Wash Buffer 1、Agilent Technologies)を、Little Dipper Processorの溶液槽1に入れた。37 に加熱した約750mLの洗浄緩衝液2 (Oligo aCGH/ChIP-on-chip Wash Buffer 1、Agilent Technologies)を、Little Dipper Processorの溶液槽2に入れた。両方の溶液槽の磁気攪拌速度を5に設定した。溶液槽1の温度調節器は作動させなかったが、溶液槽2の温度調節器を37 に設定した。次いで、最大12個のスライド/ガスケットアセンブリを、Wash Buffer 1を収容する第1の染色皿内で分解し、依然としてWash Buffer 1に浸漬された状態のスライドをスライドラック内に入れた。全てのスライド/ガスケットアセンブリを分解してから、スライドラックを迅速にLittle Dipper Processorの溶液槽1に移し、自動洗浄プロトコルを開始した。Little Dipper Processorにより、溶液槽1内でスライドを250の速度で300秒間インキュベートし、その後、Agilent Wash 2 (Oligo aCGH/ChIP-on-chip Wash Buffer 2、Agilent Technologies)を収容する37 の溶液槽2に移し、速度100で300秒間インキュベートした。その後、Little Dipper Processorは、内臓された遠心分離機にスライドラックを移し、速度690で300秒間スライドを回転させた。

10

20

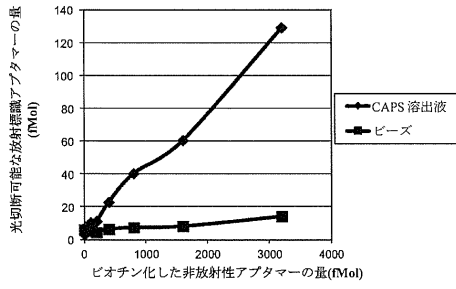
【0153】

〔0174〕 マイクロアレイ画像

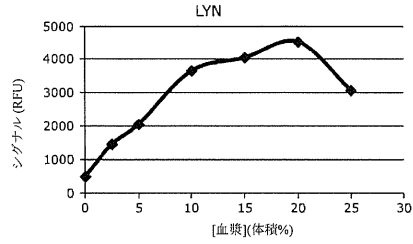
〔0175〕 100% PMT設定、5 μ mの解像度で、Cy3チャンネルにおいて、マイクロアレイスキャナー (Agilent G2565CA Microarray Scanner System、Agilent Technologies)を用いてマイクロアレイのスライドを画像処理し、XRDオプションを0.05で有効にした。GE1_107_Sep09プロトコルとともにAgilent特徴抽出ソフトウェアバージョン10.7.3.1を使用して、得られたtiff画像を処理した。

30

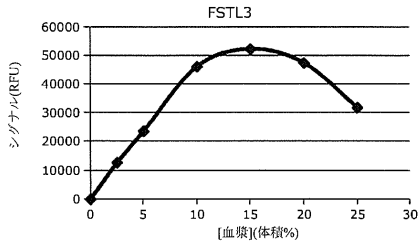
【 図 1 】



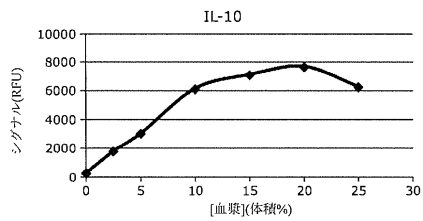
【 図 2 C 】



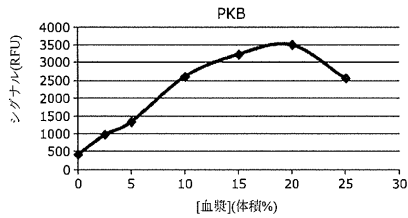
【 図 2 A 】



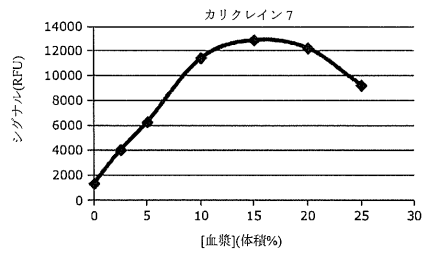
【 図 2 D 】



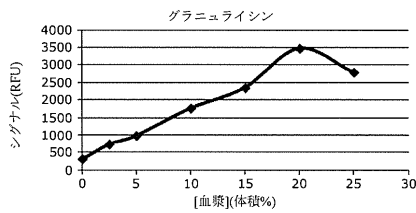
【 図 2 B 】



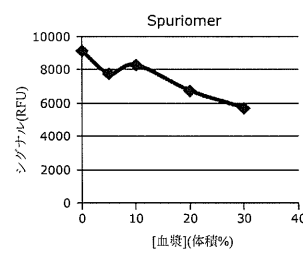
【 図 2 E 】



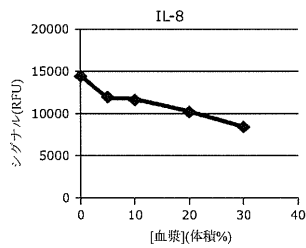
【 図 2 F 】



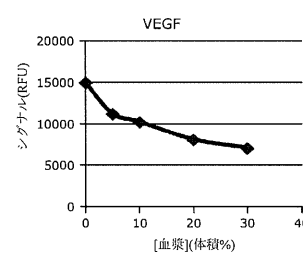
【 図 3 C 】



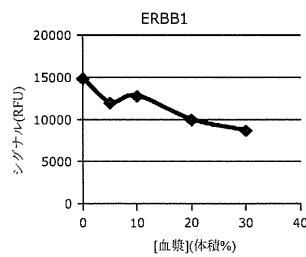
【 図 3 A 】



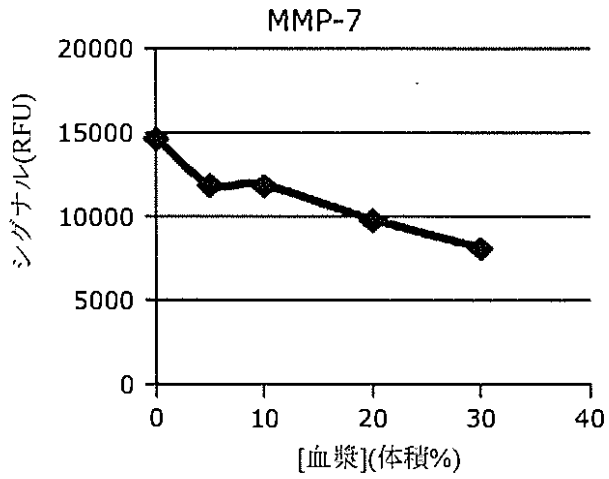
【 図 3 D 】



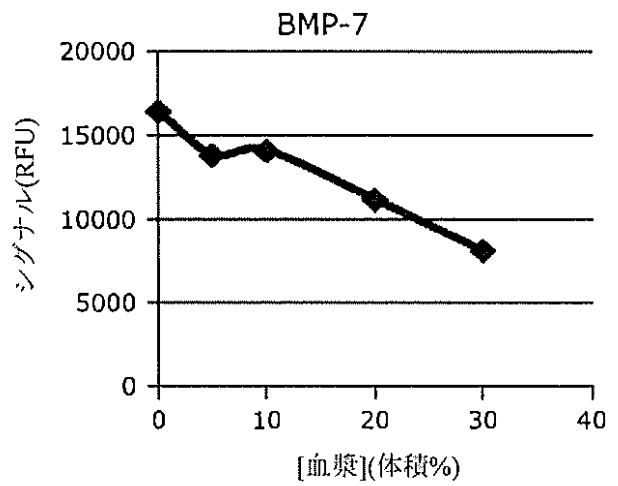
【 図 3 B 】



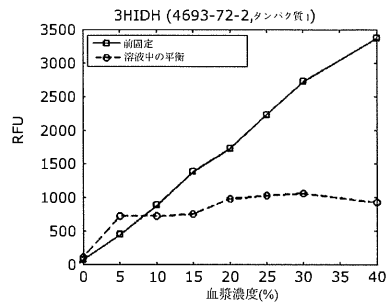
【 図 3 E 】



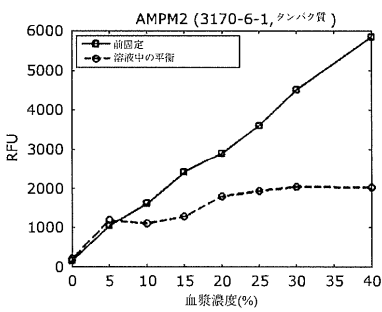
【 図 3 F 】



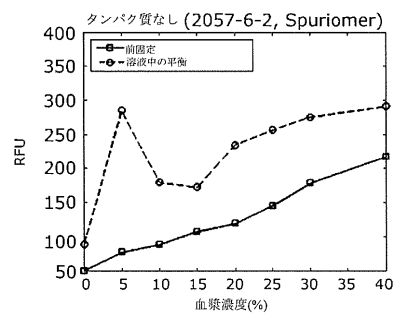
【 図 4 A 】



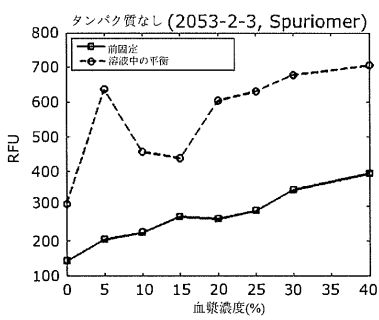
【 図 4 B 】



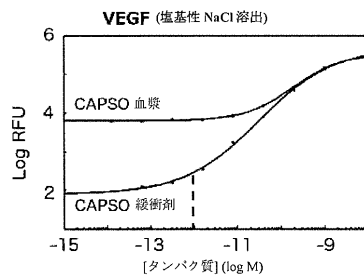
【 図 4 D 】



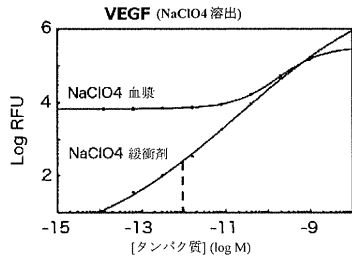
【 図 4 C 】



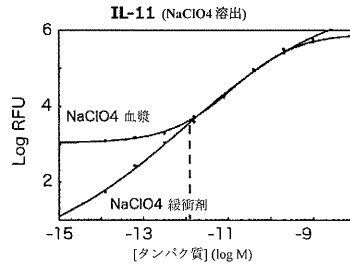
【 図 5 A 】



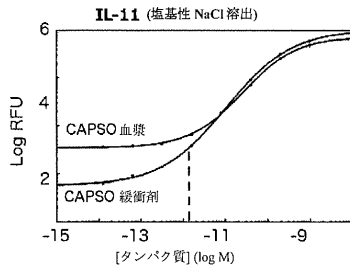
【 図 5 B 】



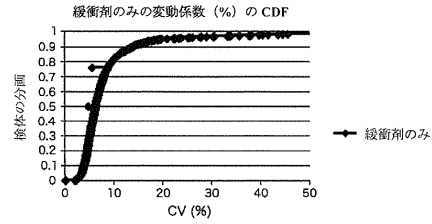
【 図 5 D 】



【 図 5 C 】

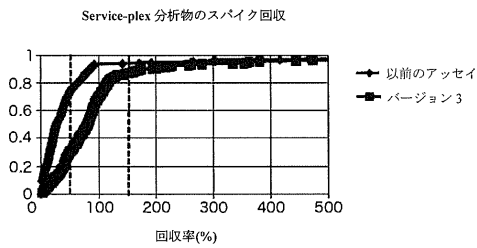


【 図 6 】



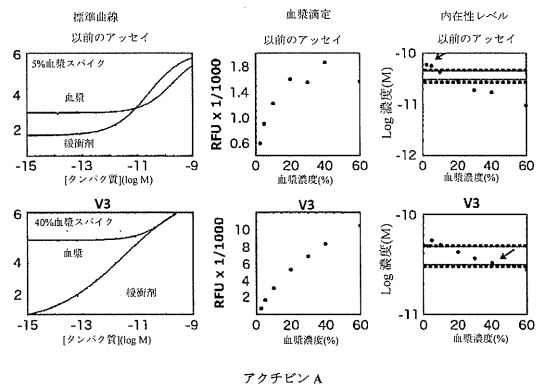
中央値シグナル	32
平均シグナル	45
中央値 CV(全ての分析物)	6.2%
平均 CV(全ての分析物)	8.6%

【 図 7 】

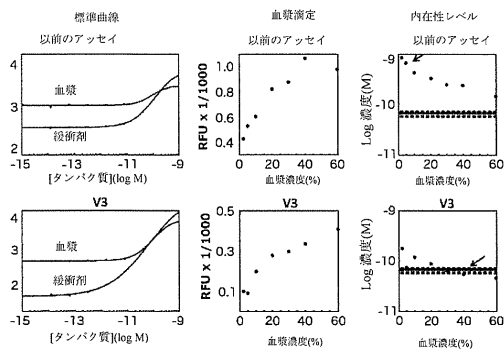


	以前のアッセイ	バージョン 3
中央値	25%	79.9%
50%~150%	48	138

【 図 9 】



【 図 8 】



ERBB2

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US13/44782

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - C12Q 1/68; C07H 21/00; G01N 33/543 (2013.01) USPC - 435/6.1; 436/518; 536/23.1 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) IPC(B): C12Q 1/68; C07H 21/00; G01N 33/543 (2013.01) USPC: 435/6.1; 436/518; 536/23.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google; Google Scholar; DialogPRO; PubMed; aptamer, tag, 'chaotropic salt,' 'solid support,' 'sodium perchlorate'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	GOLD, L et al. Aptamer-Based Multiplexed Proteomic Technology For Biomarker Discovery. PLoS One. 07 December 2010, Vol. 5, pp 1-17; page 3, left column, second paragraph; page 2, Table 1; page 2, figure 2; page 3, right column, fourth paragraph; page 5, figura 5; page 8, figure 7; page 14, left column, sixth paragraph, to right column, fourth paragraph. DOI: 10.1371/journal.pone.0015004.	1, 2, 3/1, 3/2, 4/3/1, 4/3/2, 10-12, 26-31, 33-63, 70-73 64-69
Y	US 2009/0042206 A1 (SCHNEIDER, DJ et al.) February 12, 2009; abstract; paragraph [0008]	64-69
Y	US 2003/0224386 A1 (WEINDEL, K et al.) December 4, 2003; paragraph [0036]	66
A	US 6544776 B1 (GOLD, L et al.) April 8, 2003; abstract; column 18, lines 14-40	33-73
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 October 2013 (29.10.2013)		Date of mailing of the international search report 12 NOV 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/44792

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.: 5-9, 13-25, 32
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 サンダース, グレン

アメリカ合衆国コロラド州 8 0 3 0 5 , ボルダール, クリップル・クリーク・トレイル 3 1 7 0

(72)発明者 クレーマー, ステファン

アメリカ合衆国コロラド州 8 0 3 0 5 , ボルダール, ウェスト・ムーアヘッド・サークル 4 7 8 0

(72)発明者 カティリウス, イヴァルダス

アメリカ合衆国コロラド州 8 0 0 2 7 , スーペリア, ジャローサ・レーン 2 1 8 4

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR56

QR62 QS25 QS34 QX02

专利名称(译)	基于适体的多重测定		
公开(公告)号	JP2015520385A	公开(公告)日	2015-07-16
申请号	JP2015516253	申请日	2013-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	私募蛋白质体公司		
申请(专利权)人(译)	Somarojikku公司		
[标]发明人	サンダースグレン クレーマーステファン カティリウスイヴァルダス		
发明人	サンダース,グレン クレーマー,ステファン カティリウス,イヴァルダス		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 C12Q1/68		
CPC分类号	C07H21/00 C12Q1/6811 G01N33/5308 G01N33/543 C12Q2525/113 C12Q2525/205 C12Q2561/101 C12Q1/6834 C12Q2563/107 C12Q1/6804 C12Q1/6837 G01N33/54306 G01N33/54393 G01N33/68 G01N33/6803 G01N2570/00		
FI分类号	G01N33/543.501.J G01N33/543.501.F G01N33/543.575 G01N33/53.D C12Q1/68.A		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063 /QR32 4B063/QR35 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修 中濱 明子		
优先权	61/656956 2012-06-07 US		
其他公开文献	JP6298456B2 JP2015520385A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开描述了用于检测可能存在于测试样品中的一种或多种靶分子的方法，装置，试剂和试剂盒。所描述的方法，装置，试剂盒和试剂通过检测和定量核酸（即适体）和适体，有助于检测和定量测试样品中的非核酸靶标（例如，蛋白质靶标）。- 在保持目标相互作用的同时显著减少或消除适体 - 适体相互作用。点域1

(21) 出願番号	特願2015-516253 (P2015-516253)	(71) 出願人	510016254
(66) (22) 出願日	平成25年6月7日 (2013.6.7)		ソマロジック・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月5日 (2015.2.5)		アメリカ合衆国コロラド州80301, ボールダー, ウィルダネス・プレイス 2945
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/044792		
(87) 国際公開番号	WO2013/185078	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開日	平成25年12月12日 (2013.12.12)		弁理士 小野 新次郎
(31) 優先権主張番号	61/656,956	(74) 代理人	100075270
(32) 優先日	平成24年6月7日 (2012.6.7)		弁理士 小林 泰
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101373
			弁理士 竹内 茂雄
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100135415
			弁理士 中濱 明子