

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-148709

(P2008-148709A)

(43) 公開日 平成20年7月3日(2008.7.3)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------|------------------|-------------|
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 A | 2 G 0 5 4 |
| G O 1 N 33/53 (2006.01) | G O 1 N 33/53 D | 4 B 0 2 4 |
| G O 1 N 33/536 (2006.01) | G O 1 N 33/536 D | 4 B 0 6 3 |
| G O 1 N 21/78 (2006.01) | G O 1 N 21/78 C | |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | G O 1 N 33/53 U | |

審査請求 有 請求項の数 30 O L (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-5049 (P2008-5049)
 (22) 出願日 平成20年1月11日 (2008.1.11)
 (62) 分割の表示 特願2004-110340 (P2004-110340) の分割
 原出願日 平成16年4月2日 (2004.4.2)
 (31) 優先権主張番号 10/407818
 (32) 優先日 平成15年4月3日 (2003.4.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502237353
 エンゾー ライフ サイエンセズ インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、ニュー ヨーク 117 35-4716、ファーミングデイル、エグゼキューティブ ブールバード 60
 (74) 代理人 100064012
 弁理士 浜田 治雄
 (72) 発明者 イレーザー ラバニ
 アメリカ合衆国、ニュー ヨーク 100 03、ニュー ヨーク、フィフス アベニュー 69、アパートメント 19エイ

最終頁に続く

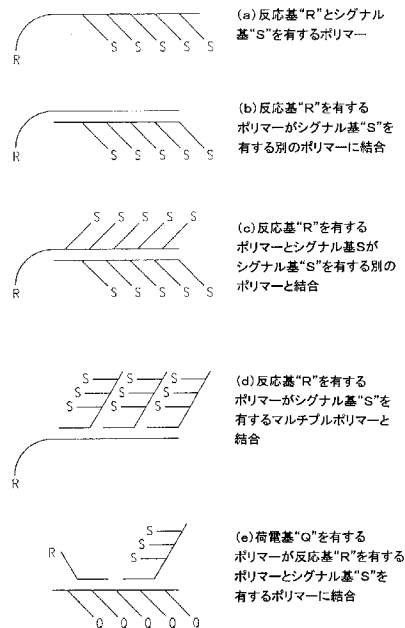
(54) 【発明の名称】 マルチシグナル標識化試薬及びそれらの標識化方法並びに定量化方法

(57) 【要約】

【課題】 生物分子プローブの製造及び分析体固有部分の検出あるいは増幅への使用など多くの生化学的使用に有効であるマルチシグナル標識化試薬を提供する。

【解決手段】 本発明は以下の成分、 a) 1つあるいは複数の標識がオリゴマーあるいはポリマーに化学的に結合する2つ以上の標識成分、 b) 1つ以上の反応基、及び c) 1つ以上の荷電基とからなるオリゴマーあるいはポリマーを含有する組成物を提供する。この荷電基は (i) オリゴマーあるいはポリマーに共有結合されるか、あるいは (i i) オリゴマーあるいはポリマーの主鎖の一部を含有するか、あるいは (i i i) 前述の組合せを含有する。

【選択図】 図 1



ポリマー中のR、SおよびQの配列の実施例

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 2 つ以上の標識ヌクレオチドあるいは標識ヌクレオチドアナログと、(i i) 前記標識とは異なる 1 つ以上の結合相手とからなる核酸鎖あるいは二つ以上の核酸鎖の複合体を含有する組成物。

【請求項 2】

前記鎖あるいは複合体は 1 つ以上の非標識ヌクレオチドアナログを含有する請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

前記ヌクレオチドアナログは脱塩基核酸、スパーサ基あるいはペプチド核酸サブユニットを含有するグループから選択される請求項 1 または 2 記載の組成物。

10

【請求項 4】

前記標識は蛍光化合物、燐光化合物、化学発光化合物、キレート化合物、高電子密度化合物、磁気化合物、内位添加化合物及びエネルギー伝達化合物あるいはそれらの組合せからなるグループから選択される請求項 1 記載の組成物。

【請求項 5】

前記結合相手はリガンド / 受容体、ホルモン / 受容体、ビオチン / アビジン、ビオチン / ストレプトアビジン及び抗原 / 抗体の対からなるグループから選択される請求項 1 記載の組成物。

【請求項 6】

前記結合相手はリンカーを介して前記鎖あるいは複合体に添加される請求項 1 記載の組成物。

20

【請求項 7】

前記リンカーはヌクレオチドあるいは前記鎖あるいは複合体からなるヌクレオチドアナログに添加され且つ前記添加は塩基、糖類、ホスフェートあるいはそれらのアナログを介する請求項 6 記載の組成物。

【請求項 8】

前記リンカーは 1 つ以上の炭素、窒素、酸素、リンあるいは硫黄原子あるいはそれらの組合せを含有する請求項 6 記載の組成物。

【請求項 9】

前記リンカーは 1 つ以上のペプチド結合、アルキル鎖、アルケン基、アルキル基、アリアル基、共役系、糖類あるいはそれらの誘導体を含有する請求項 6 記載の組成物。

30

【請求項 10】

前記核酸鎖は直鎖かあるいは分岐する請求項 1 記載の組成物。

【請求項 11】

前記複合体は塩基対あるいは三重鎖構造を介して生成される請求項 1 記載の組成物。

【請求項 12】

組成物を標的分子に添加あるいは結合する標的分子の標識化方法において、前記組成物は (i) 2 つ以上の標識ヌクレオチドあるいは標識ヌクレオチドアナログと、(i i) 1 つ以上の結合相手とからなる核酸鎖あるいは 2 つ以上の核酸鎖の複合体を含有する方法。

40

【請求項 13】

前記標的分子はペプチド、タンパク質、抗体、酵素、酵素基質、リガンド、ホルモン、受容体、抗原、ハプテン、レクチン、アビジン、ストレプトアビジン、トキシソ、炭水化物、オリゴ糖、多糖類、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチド及びジデオキシヌクレオチドアナログ、変性デオキシヌクレオチド、変性リボヌクレオチド、変性ジデオキシヌクレオチドオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドからなるグループから選択される請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

(i) (a) 分析体が検出あるいは定量化されると予測される検体と、

50

(b) 組成物が第一の非交雑結合相手からなる請求項 1 記載の組成物と、
 (c) 前記第一の結合相手と第二非交雑結合相手が結合対を構成する前記第二非交雑結合相手からなる分析体固有部分とを提供し、

(ii) 前記分析体固有部分(c)を検体(a)中に存在する分析体に結合させ、

(iii) 前記第一結合相手と前記第二結合相手との相互作用を介して前記組成物(b)を前記工程(ii)からの結合分析体固有部分に結合させ、更に

(iv) シグナル生成を測定しそれにより前記分析体の存在あるいは量を検出する工程から構成される検体中の分析体を検出あるいは定量化する方法。

【請求項 15】

前記第一及び第二結合相手はビオチン/アビジン、ビオチン/ストレプトアビジン、抗原/抗体、ホルモン/ホルモン受容体、レクチン/糖、酵素/酵素基質、酵素/基質アナログ、酵素/酵素阻害剤、コファクター/コファクター酵素結合部位、及びキレーター/キレートからなるグループから選択される対である請求項 14 記載の方法。

10

【請求項 16】

前記分析体固有部分は抗体あるいは抗原である請求項 14 記載の方法。

【請求項 17】

前記方法は更に(d)一つ以上の非標識核酸を提供する工程から構成される請求項 14 記載の方法。

【請求項 18】

前記非標識核酸は請求項 1 記載の組成物における核酸部分の配列を一部あるいは全て含有する請求項 17 記載の方法。

20

【請求項 19】

(i) (a) 分析体が検出あるいは定量化されると予測される検体と、

(b) 組成物が第一の非交雑結合相手である請求項 1 記載の組成物と、

(c) 第二非交雑結合相手と第三非交雑結合相手とからなるリンク部分と、

(d) 第四非交雑結合相手を含有する分析体固有部分であって、前記第一結合相手と前記第二結合相手が第一結合対を構成し、更に前記第三結合相手と第四結合相手が第二結合対を構成する分析体固有部分とを提供し、

(ii) (a) 前記分析体固有部分(d)を検体(a)中に存在する分析体に結合させ、

30

(b) 前記第三結合相手を前記第四結合相手に結合させ、

(c) 前記第一結合相手を前記第二結合相手に結合させて、分析体、分析体固有部分、リンク部分及び請求項 1 記載の組成物とからなる複合体を生成する工程から構成される少なくとも一つの結合反応を処理あるいは実施し、

(iii) 前記複合体中のシグナル生成量を検出あるいは定量化する工程から構成される検体中の分析体を検出あるいは定量化する方法。

【請求項 20】

前記処理工程(ii)において結合反応は順次あるいは付随して処理あるいは実施される請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

前記順次結合反応は工程(ii)(a)、(ii)(b)、(ii)(c)の順序で行われる請求項 20 記載の方法。

40

【請求項 22】

前記順次結合反応は工程(ii)(b)、(ii)(c)、(ii)(a)の順序で行われる請求項 20 記載の方法。

【請求項 23】

前記順次結合反応は工程(ii)(a)、(ii)(c)、(ii)(b)の順序で行われる請求項 20 記載の方法。

【請求項 24】

前記順次結合反応は工程(ii)(c)、(ii)(b)、(ii)(a)の順序で行

50

われる請求項 20 記載の方法。

【請求項 25】

前記第一及び第二結合相手及び前記第三及び第四結合相手はビオチン/アビジン、ビオチン/ストレプトアビジン、抗原/抗体、ホルモン/ホルモン受容体、レクチン/糖、酵素/酵素基質、酵素/基質アナログ、酵素/酵素阻害剤、コファクター/コファクター酵素結合部位、及びキレーター/キレートからなるグループから選択される対である請求項 19 記載の方法。

【請求項 26】

前記提供工程 (i) において、前記第一結合対と前記第二結合対は結合相手が同じ対である請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】

前記提供工程 (i) において、前記第一結合対と前記第二結合対は結合相手が異なる対である請求項 25 記載の方法。

【請求項 28】

前記分析体固有部分は抗体あるいは抗原である請求項 19 記載の方法。

【請求項 29】

前記方法は更に (e) 一つ以上の非標識核酸を提供する工程を構成する請求項 19 記載の方法。

【請求項 30】

前記非標識核酸は請求項 1 の前記組成物中の核酸部分の一部あるいは全ての配列を含有する請求項 29 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マルチシグナル標識化試薬として有効な組成物に関する。より詳しくは、これらの試薬は、シグナルをタンパク質、特に、抗体のような分析体固有部分に添加することを含む、多くの生化学的使用において有効である。これらの試薬は、また、タンパク質配列系で分析しようとするサンプルの標識化において有効である。この種の試薬におけるマルチシグナルの添加は、検出感度を増やす際に有効である。

【0002】

本出願において引用あるいは記載される全ての特許、特許出願、特許公報、科学文献などは、本発明が関連する技術をより完全に記載するためにそれら全部をここに参考として組込まれる。

【発明の背景】

【0003】

生化学および分子生物学における非放射性ラベルの使用は、近年急激に増加した。非放射性ラベルとして使用されたさまざまな化合物の一つに、蛍光性または発光シグナルを生じる芳香族色素は、特に有効である。この種の化合物の顕著な例として、フルオレセイン、ローダミン、クマリンおよびシアニン染料、例えば Cy 3 および Cy 5 が含まれる。複合色素は、また、2つの異なる色素を共に溶かすことによって合成された(リーその他、(1992)核酸リサーチ 20; 2471 - 2488; リーその他、米国特許第 5,945,526 号及びワゴナーその他、米国特許第 6,008,373 号、これら全てここに参考として組み込まれる)。

【0004】

非放射性標識化方法は、当初、タンパク質上にシグナル発生基を取り付けるために開発された。これは化学基がタンパク質上に天然で存在するアミン、チオールおよびヒドロキシル基と反応できるように、標識を化学基で修飾することによって実施された。このために使われた反応基の例として、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、イソチオシアネートおよび他の化合物などの活性化エステルが含まれる。従って、それが非放射性手段によってヌクレオチドおよび核酸を標識するのに適すると、ヌクレオチド及びポリヌクレオ

10

20

30

40

50

チドをタンパク質に機能的に類似する形に変換する方法が開発された。例えば、米国特許第4,711,955号(ここに引用する)はプリン8-位置、ピリミジンの5-位置およびデアザプリンの7-位置にアミンを添加することが開示された。現在標識をタンパク質のアミン基に添加できる方法はここで同様にこれらの変性ヌクレオチドに対して適用される。

【0005】

標識ヌクレオチドは、末端トランスフェラーゼ標識化、ニックトランスレーション、ランダムプライミング、逆転写、RNA転写およびプライマ伸展を含む多くの酵素法におけるDNA及びRNAプローブの合成に使用されてきた。これらヌクレオチドの標識ホスホラミダイト変型は、また、標識オリゴヌクレオチドを生成するために自動化シンセサイザーで使用された。得られた標識プローブはノーザンブロットイング、サザンブロットイング、元来ハイブリッド形成、RNAse保護アッセイ、DNAシーケンス反応、DNAおよびRNAマイクロ配列分析および染色体塗装のような標準的処理法において広く使われている。

10

【0006】

核酸に対して、シグナル部分を核酸に直接にまたは間接的に添加する方法により化学的に修飾することに関する多くの文献が存在する。この分野における最重要関心事として、核酸のどの部位、すなわち糖、塩基またはホスファート類似体などが添加に使用されるか、及び、これらの部位が破壊的であるか非破壊かどうかに関して(たとえば米国特許第4,711,955号および米国特許第5,241,060号の記載を参照、両方とも引用したものとする)、また通常単一の芳香族基(米国特許第4,952,685号及び米国特許第5,013,831号;両方とも引用したものとする)あるいは炭素/炭素脂肪鎖から構成されるスペーサ基をシグナリング部分あるいは反応基に対して連結を可能にし、核酸と反応基の距離あるいはシグナリング部分とOH, NH, SHあるいはシグナリング部分及びシグナリング部分の性質にカップリングできる別の基のようなスペーサの端部における反応基との距離を提供するような添加部位の化学に関する。

20

【0007】

最近、2002年3月12日に出願された米国特許出願第10/096/075号(ここに引用される)において、マーカーあるいは標識と目的の標的分子との間において炭素-炭素結合を形成できる反応基を含有する新規な標識化試薬が開示された。これは前に記載されている標識化試薬とは対照的に、アミン基、スルフヒドリル基、あるいはヒドロキシル基と適切な反応基との間の結合を形成することを含むタンパク質誘導化学作用を使用する。リンカーアームの存在及び性質はまた標識化標的分子の生物学的あるいは化学的活性を増加させる。核酸におけるシグナル基の適度な距離を提供するのに使用されるリンカーアームはまた本記載においても利用される。

30

【発明の要旨】

【0008】

本発明は生化学及びその関連分野におけるマルチシグナル標識化試薬及びその応用に関する。

【0009】

本発明は以下の成分、a)1つあるいは複数の標識がオリゴマーあるいはポリマーに化学的に結合する2つ以上の標識成分、b)1つ以上の反応基、及びc)1つ以上の荷電基とからなるオリゴマーあるいはポリマーを含有する組成物を提供する。この荷電基は(i)オリゴマーあるいはポリマーに共有結合されるか、あるいは(ii)オリゴマーあるいはポリマーの主鎖の一部を含有するか、あるいは(iii)前述の組合せを含有する。

40

【0010】

本発明はまた核酸鎖あるいは2つ以上の核酸鎖複合体を含有する組成物であって、前記鎖あるいは複合体は(i)2つ以上の標識ヌクレオチドあるいは標識ヌクレオチドアナログ及び(ii)前記標識と異なる1つ以上の結合相手とからなる組成物を提供する。

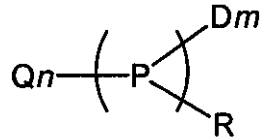
【0011】

50

また、本発明により提供される組成物は、以下の式の構造を有する化合物を含有する組成物からなり、

【0012】

【化1】



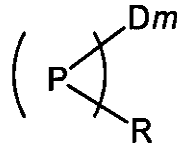
ここで、Qは非固有荷電基を表し、nは1以上の整数を表し、Dは標識を表し、mは2と等しいかそれ以上の整数を表し、Rは少なくとも1つの反応基を表し、及びPはオリゴマーあるいはポリマーを表す。

【0013】

本発明の更に別の態様として、以下の式の構造を有する化合物を含有する組成物に関する。

【0014】

【化2】



上記構造において、Dは標識を表し、mは2と等しいかあるいはそれ以上の整数を表し、Rは少なくとも1つの反応基を表し、及びPは合成あるいはキメラのオリゴマーあるいはポリマーを表す。更に構造において、DあるいはPの少なくとも1つのモノマーユニットは1つ以上の荷電基を含有する。

【0015】

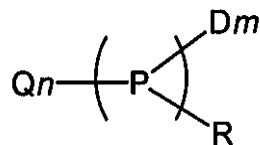
様々な方法が本発明により提供される。ある態様の一つに、本発明は組成物を標的分子に添加あるいは結合することからなる標的分子を標識化する方法を提供する。組成物は核酸鎖あるいは2つ以上の核酸鎖の複合体を含有し前記鎖あるいは複合体は(i)2つ以上の標識ヌクレオチドあるいは標識ヌクレオチドアナログと(ii)一つ以上の結合相手とを含有する。

【0016】

更に、本発明は(a)(i)標識化のための標的、および(ii)以下の式、

【0017】

【化3】



上記式において、Qは非固有荷電基を表し、nは1以上の整数を表し、Dは標識を表し、mは2と等しいかそれ以上の整数を表し、Rは少なくとも1つの反応基を表し、Pはオリゴマーあるいはポリマーを表す式を有する標識化試薬とを提供し、(b)標的(i)と前記標識化試薬(ii)を反応させて組成物を生成し、ここで組成物は以下の式、

【0018】

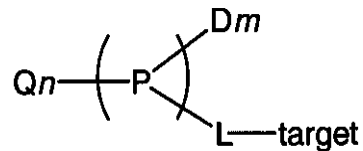
10

20

30

40

【化4】



ここでLはオリゴマーあるいはポリマーと標的間の結合あるいはリンカーを表す式を有する組成物を生成する工程から構成される標的標識化方法により生成された組成物を提供する。

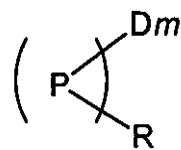
【0019】

10

本発明により提供される別の組成物は、(a)(i)標識化のための標的と、(ii)以下の式、

【0020】

【化5】



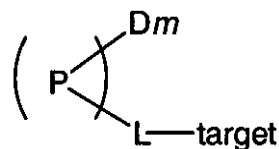
上記式において、Dは標識を表し、mは2と等しいかそれ以上の整数を表し、Rは少なくとも1つの反応基を表し、Pは合成あるいはキメラのオリゴマーあるいはポリマーを表し、DあるいはPの少なくとも1つのモノマーユニットは1つ以上の荷電基からなる式を有する標識試薬とを提供し；

20

(b)前記標的(i)と前記標識化試薬(ii)とを反応させて以下の式、

【0021】

【化6】



30

ここで、Lは前記オリゴマーあるいはポリマーと前記標的間の結合あるいはリンカーを表す式を有する組成物を生成する工程とから構成される標的標識化方法により生成される。

【0022】

本発明の多くの別の態様あるいは実施例は以下にさらに詳細に説明する。

【発明の詳細な説明】

【0023】

本発明は従来技術に比較して感受性及び溶解度を上昇させた標識標的、標識分析体及び標識分析体固有部分を生成する方法及び組成物に関する。本発明で使用される分析体固有部分の実施例として、核酸、タンパク質、抗体、抗原、リガンド、受容体、ホルモン及び合成化合物が含まれるがそれに限定されない。本発明の一態様として、新規な標識化試薬は、a)1つあるいは複数の標識がオリゴマーあるいはポリマーと化学的に結合する2つ以上の標識成分、b)1つ以上の反応基、c)(i)オリゴマーあるいはポリマーと化学的に結合するか、(ii)オリゴマーあるいはポリマーの主鎖の一部を含有するか、(iii)前記のいずれかの組合せを含有する1つ以上の荷電基とを含有するオリゴマーあるいはポリマーからなることを開示する。新規な標識組成物あるいは試薬は固有な分析体を検出する化合物を標識することに使用される際に、オリゴマーあるいはポリマーは分析体に固有な親和性を実質的になくすべきである。

40

【0024】

マルチプル標識基は分析体固有部分に添加されるシグナル量を増加させ、すなわち反応

50

基の存在によりマルチプル標識基が目的の標的に添加され、また荷電基の存在により溶解度を維持あるいは増加させる。標識あるいは荷電基をオリゴマーあるいはポリマーに結合させるのに有効な化学結合の例として、共有結合、非共有結合、イオン結合、リガンド、受容体及び複合体を含むがこれに限定されない。標識あるいはマーカーの例として、蛍光化合物、燐光化合物、化学発光化合物、キレート化合物、高電子密度化合物、磁気化合物、内位添加化合物及びエネルギー伝達化合物が含まれるがこれに限定されない。溶解度に関して、標識として使用される多くの蛍光化合物は高い芳香性あるいは疎水性を有し、また本発明の1つあるいは複数の荷電基はこの特性を補償する。溶解性を提供するのに利用される荷電基の例として、ホスフェート基、カルボン酸基、スルホン基、アミン基、ヒドロキシ基が含まれるがこれに限定されない。荷電基はオリゴマーあるいはポリマーの固有部分となるかあるいは人為的に導入される非固有改質となりえる。新規な標識分析体固有部分は核酸、タンパク質、抗体、抗原、リガンド、受容体、ホルモンあるいは薬剤を含むいずれかの分析体を検出するのに使用されるがこれに限定されない。

10

20

30

40

50

【0025】

オリゴマーあるいはポリマーの各モノマーユニットはマーカーを含有するかあるいはオリゴマーあるいはポリマーは標識及び非標識モノマーユニットの混合物を含有する。標識モノマーユニットは単一標識あるいは1つ以上の標識を含有しえる。1つ以上の標識がモノマーユニットに含まれる場合、モノマー上の同じ部位あるいは別々の部位に添加される。1つの部位にある1つ以上の標識を有するモノマーユニットの例として、ローダミン部分に結合されるフルオレセイン部分のような複合染料を有するヌクレオチドである。一方、ここに引例として参照される2002年3月12日付け出願の米国特許出願第10/096,076号に記載される複合染料を生成するための同様な方法が同じ染料のタンデム二量体、三量体等の合成に適用できる。このように、使用者はモノマーユニットの数、標識モノマーユニットの割合、モノマー当りの標識の数を直接導ける。

【0026】

オリゴマーあるいはポリマー標識試薬を生成するのに利用可能なモノマーユニットの例として、アミノ酸、ヌクレオチド、炭水化物、糖類、芳香族化合物あるいはオリゴマーあるいはポリマー部分を生成できるよう誘導されるいずれかの有機化合物が含まれるがこれに限定されない。いずれかのモノマーユニットの変性種あるいは変性アナログも使用可能である。本発明に使用されるアナログの例として、以下全て参照として引用されるが、自在あるいは変質塩基を含むヌクレオチドアナログ(レビュード イン ロックハート 2001、核酸研究 29; 2437-2447)、ペプチド核酸モノマー(ニールセン他、1991、サイエンス 254; 1497)、非ヌクレオチドスベサ基(米国特許第5,696,251号)、糖類アナログ(オノ他、1997 核酸研究 25; 4581-4588)、メチルホスホンアミダイト(ロシュナー及びエンゲルス 1988 ヌクレオチドヌクレオチド 7; 729)及びホスホロチオエート(ステック他、1984 ジェイ エーエム ケム ソサイエティ 106; 6077)等が含まれるがこれに限定されない。

【0027】

このようなモノマーユニットから生成されるオリゴマーあるいはポリマーの例として核酸、脱塩基核酸、ペプチド核酸、ポリペプチド、タンパク質、オリゴ糖、多糖類あるいは有機ポリマーが含まれるがこれに限定されない。本発明に使用されるオリゴマーあるいはポリマーは生物源から単離されるかあるいは合成的または試験管内で生成される。オリゴマーあるいはポリマーに化学的に結合する標識および/あるいは反応基はこのオリゴマーあるいはポリマーに内在していないものが好ましい。このオリゴマーあるいはポリマーは、ホモポリマーでありたった1つの特有の特定型のモノマーユニットの複合体から構成されるか、あるいはそれらはヘテロポリマーまたはキメラであり異なるモノマーユニットを含有する。例えば、キメラのオリゴマーあるいはポリマーは、正常な核酸セグメントとペプチド核酸セグメントの両方を含有する核酸構成体が、ヌクレオチドとアミノ酸の組合せ、あるいは脱塩基核酸セグメントとペプチド核酸からなるセグメントとの組合せとなり得

る。本発明の標識化試薬がオリゴマーあるいはポリマー標的分子を標識するのに使用される際の特別な方法を発見し、ここで標識化試薬のモノマーユニットはオリゴマーあるいはポリマー標的のモノマーユニットとは別の特徴を有する。この例として、オリゴマーあるいはポリマー部分は標識ヌクレオチドあるいはヌクレオチドアナログ及び少なくとも1つの反応基を含有する核酸構成体であり、これによりマルチプル標識を標的タンパク質を生成する1つ以上のアミノ酸に添加することができる。従来文献に記載されるマーカー、リンカー、及び反応基のいずれも本発明の具体的な実施態様において使用される。

【0028】

更に、オリゴマーあるいはポリマーのモノマーユニットが類似の特徴を有する場合さえ、それらが同じ場合もあれば異なる場合もある。例えば、核酸ポリマーは単一塩基の反復からなるホモポリマーかあるいは多様なヌクレオチドを有するヘテロポリマーとなり得る。ポリペプチドはホモポリマーであり単一アミノ酸の複合体を含有するかあるいはヘテロポリマーであり異なるアミノ酸を含有しえる。オリゴマーあるいはポリマー標識化試薬の標識は同一か異なる場合もあり得る。例えば、ポリヌクレオチド上に不連続間隔で添加される2つの異なる染料を含有する標識化試薬はシグナル生成へのエネルギー伝達に關与する。

10

【0029】

本発明のオリゴマーあるいはポリマーはモノマーユニット同士を結合する単一鎖を含有するかあるいは一つ以上の鎖を含有する。例えば、分岐した、二重鎖のあるいは三重鎖の核酸は全て本発明に利用可能である。このような多鎖構造は有効な特性を提供する。例えば、二重鎖核酸は一本鎖核酸よりも固定される。二重鎖構造を使用すると標識部分の分布あるいは間隔をより制御しやすくし、近接性の必要な場合あるいは必要でない場合も可能である。例えば、エネルギー伝達を利用した効果的なシグナル生成は供与体部分と受容体部分の近接性に依存し、従ってこれらの部分間の近接の実現は有利である。一方で、単一染料種がシグナル生成剤として利用される場合、いくつかの染料分子の近接性は自己発光抑制(クエンチング)現象を導き、これら染料の位置を分散させることが有利である。一つ以上の鎖を利用するとシグナル生成量を増加させたり荷電数を増加させるなどの別の有利な特性を導く。マルチプル鎖はまたその系に適応性をもたらす。例えば、第一の核酸鎖は反応基を含有し、相補配列を有する第二の核酸鎖はシグナル基を含有する。これらの鎖間の相補塩基対により複合体は反応基とシグナル基を含有するよう生成される。これらの点を更に説明するために、マルチプル鎖を利用した様々な種を図1に示す。本発明の新規な標識化試薬にマルチプル鎖を利用すると平行して使用できる試薬あるいは標識部分を生成することに広がりをもたらす。例えば、反応基を含有する第一鎖は2つの第二鎖のどちらかと混合して、同じ反応基を利用し且つ互いに異なる標識からなる2つの異なる化合物を生成できる。本発明のオリゴマー及びポリマーはまた同様に非ポリマー成分を含有する。例えば、延長したマルチプル荷電基を有する末端あるいは延長鎖を構成する。有効な追加の特性を提供する別の基も本発明において利用される。

20

30

【0030】

従来技術にタンパク質用の標識化試薬として核酸の利用が記載される(米国特許出願第08/479,995、1995年6月7日出願、ヨーロッパ特許庁により発行/登録されたヨーロッパ特許第0128332号)。しかしながら、この引例の方法は、標的に非標識ポリヌクレオチドを添加させた後に標識相補ヌクレオチドの交雑を実施することが記載される。対照的に、本発明においては、2つ以上のオリゴヌクレオチドあるいはポリヌクレオチドを含有する複合体はマルチプルシグナルを伝達することに利用される際に、予め生成された試薬が利用され、それはシグナルと一つ以上の反応基を含有する。この方法において、標的は交雑反応を介さない。この方法論はまた標的に添加する前に複合体を精製することができ、これにより反応基を有する複合体中に最大量の標識ヌクレオチド鎖が存在するよう保証する。核酸を標識することに関心が広がったため、この分野において核酸と非核酸とを結合する広範で多様な技術が知られる。この方法の実施例は、ジャブロンスキ他、1986年核酸リサーチ 14; 6115-6128、米国特許出願第08/4

40

50

79, 995号(1995年6月7日出願)、米国特許出願第09/896, 897号(2001年6月30日出願)及び非アイソトーププローブ、プロット及びシーケンス、第2版、ラリー ジェイ クリカ著、1995年、アカデミックプレス社、サンディエゴ、シーエーにおける「核酸の非放射性標識の方法」クリストファーケスラー pp 42 - 109などに記載され、全てここに引用される。

【0031】

本発明の更に別の態様として、オリゴマーあるいはポリマーが核酸である場合、反応基は結合相手に置換される。すなわち、標識化試薬の結合相手と標的分子上における結合相手の片方との相互作用により標的分子に標識が添加できる。結合相手の対の例として、リガンド/受容体、ホルモン/受容体、ビオチン/アビジン及び抗原/抗体の対が含まれるがこれに限定されない。

10

【0032】

従って、本発明のこの態様において、新規な標識化試薬は核酸鎖、あるいは2つ以上の標識と一つ以上の結合相手を含む且つ結合相手が標識と異なるかあるいは同一であるような核酸鎖複合体を含む。本発明のこの態様は標識核酸鎖あるいは複合体が結合相手により非核酸標的と結合するような特別な利用が可能である。すなわち、従来技術は標識タンパク質を結合することにより核酸を標識できることが記載されているが、本発明のこの態様では標識核酸を結合することによりタンパク質を標識できることを開示する。

【0033】

本発明の更に別の態様において、新規なオリゴマーあるいはポリマーユニットが1つ以上の反応基Rを含むし、これは炭素、窒素、酸素、硫黄のいずれかの組合せおよび別の可能な原子を含む所定の長さを有する原子鎖であるリンカーアームLにより結合される。この連結鎖は飽和状態か、非飽和状態か芳香環を含み、また結合鎖は柔軟性があるか固定的である。連結鎖は更にいずれかの固定ユニットを含み、米国特許出願第10/096, 075号(2002年3月12日出願)に記載され、ここに引用される。本発明のこの態様において、反応基の例として、活性エステル、炭素-炭素結合を形成できる基およびO, N, Sと化学結合できる基を含むがこれに限定されない。このような基の例として、イソチオシアネート、イソシアネート、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、モノ-あるいはジ-ハロゲン置換ピリジン、モノ-あるいはジ-ハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハロゲン化物、酸ハロゲン化物、ヒドロキシスクシンイミドエステル、ヒドロキシルスルホスクシンイミドエステル、イミドエステル、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、アジド、3-(2-ピリジルジチオ)-プロプリオンアミド、グリオキサール、アルデヒド、炭素-炭素間二重結合、水銀塩及び炭素-炭素二重結合、アミン、ヒドロキシル基、スルフヒドリル基およびハロゲンと反応可能な基を含むがこれに限定されない。反応基はまた、Rがリガンドあるいは金属を含む際に配位結合の形成に関与する。反応基Rは上述したリンカーアームLを介してオリゴマーあるいはポリマー部分に添加されるかあるいは必要であればリンカーアームを使用せずに直接添加される。更に本発明の別の態様において、反応基は末端、側鎖あるいはオリゴマーまたはポリマー部分の内部で新規な標識化試薬と化学的に結合しえる。更に、記載した新規なポリマー組成物はまた主鎖上に追加のアルキル基、アリール基および/または極性基あるいは荷電基、リンカーアームあるいは染料あるいは標識を含む。極性基あるいは荷電基はハロゲン、飽和または不飽和アルキルまたはアリール基、飽和または不飽和アルキル基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミノ基、アミド基およびカルボキシ基、および硝酸塩のような極性基、スルホネート、スルフヒドリル基、亜硝酸塩、カルボン酸、ホスフェートあるいはこの類の別の基あるいは置換基などが含まれるがこれに限定されない。

20

30

40

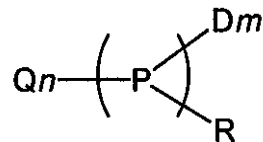
【0034】

本発明の別の態様において、新規なオリゴマーあるいはポリマー標識化試薬は以下の式7として表される。

【0035】

50

【化7】



【0036】

この略図において、Qは荷電基を示し、nは1あるいはそれ以上の整数に等しく、Dは染料あるいは別の適切な試薬を示し、mは2と等しいかそれ以上であり、Rは適切な標的に対して標識化試薬を結合させるのに使用される少なくとも1つの反応基を示し、更にPはオリゴマーあるいはポリマーを示す。荷電基および染料はPを含有するモノマーユニットそれぞれに添加されるかあるいはいくつかのモノマーユニットのみがこれらの基を含有する。

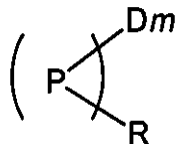
10

【0037】

本発明の別の態様において、新規なオリゴマーあるいはポリマー標識化試薬は以下の式8として表される。

【0038】

【化8】



20

【0039】

上記略図において、Dは染料あるいは別の適切な標識を示し、mは2と等しいかそれ以上であり、Rは少なくとも1つの反応基を示し、Pはオリゴマーあるいはポリマーを示し更に、ここでDあるいはPのモノマーユニットの1つは1つ以上の荷電基を含有する。染料はPを含有するモノマーユニットのそれぞれに添加し得るかあるいはいくつかのモノマーユニットのみがこれらの基を含有する。

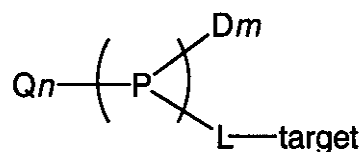
【0040】

30

本発明の別の態様において、以下に示す式9の新規な組成物として、本発明の新規なオリゴマーあるいはポリマー標識化試薬は適切な標的分子を標識するために使用される。

【0041】

【化9】



【0042】

40

上記の略図において、Qは荷電基を示し、nは1の整数と等しいかそれ以上であり、Dは染料があるいはべつの適切な標識を示し、mは2と等しいかそれ以上であり、Pはオリゴマーあるいはポリマーを示し、Lは標的分子に標識化試薬を結合させる連結部である。荷電基および染料はPを構成するモノマーユニットのそれぞれに添加されるかあるいはいくつかのモノマーユニットのみがこれらの基を含有する。Lは上述したなんらかの連結アームを構成するかあるいは反応基と標的分子上の適切な化学基との間を形成する連結部を含有する。標的はペプチド、タンパク質、抗体、酵素、酵素基質、リガンド、ホルモン、受容体、抗原、ハプテン、レクチン、アビジン、ストレプトアビジン、トキシソ、炭水化物、オリゴ糖、多糖、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチドアナログ、リボヌクレオチド及びジデオキシヌクレオ

50

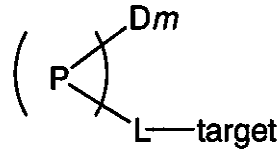
チド、変性デオキシヌクレオチド、変性リボヌクレオチド、変性ジデオキシヌクレオチドオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、及び反応基 R と連結部を形成できる別の分析体固有部分を含むがこれに限定されない。

【0043】

本発明の別の態様において、以下に示す式 10 の新規な組成物として、本発明の新規なオリゴマーあるいはポリマー標識化試薬は適切な標的分子を標識するのに使用されることを開示する。

【0044】

【化 10】



10

【0045】

上記略図において、D は染料あるいは別の適切な標識を示し、m は 2 と等しいかそれ以上であり、P はオリゴマーあるいはポリマーを示し、L は標識試薬を標的分子に結合させる連結部を示し、ここで D あるいは P のモノマーユニットの内の 1 つは 1 つ以上の荷電基を含有する。染料は P を含有するモノマーユニットそれぞれに添加されるかあるいはいくつかのモノマーユニットのみがこれらの基を含有する。L は上述したなんらかの連結アームを含有するかあるいは反応基 R と標的分子上の適切な化学基間を形成する連結部を含有する。標的は上述した基のいずれかから選択される。

20

【0046】

マルチプルシグナルを提供する本発明の様々な態様は高感度な標識化組成物の合成を実施できる。酵素的組み込みのような標識試薬を生成するために使用される従来の方法において、染料ユニットの数は酵素による染料の組み込みが乏しいため限られていた。更に、酵素的組み込みの後に 2 つ以上の染料ユニットが互いに隣接して配置されるため、度々シグナルの発光抑制（クエンチング）が生じる。本発明の長所の一つに、染料の配置が特異的に調節されるため、染料ユニットの望ましい数及びそれらの間の間隙が最適なシグナル用に設計できる。このことは隣接するユニットに対して最小のクエンチングを有する最大のシグナル量を生成できる標識ユニットを有する標識化試薬となり得る。本発明の新規な標識化試薬はシグナル強度の増加が有益であるような広範囲の目的に使用可能である。

30

【0047】

本発明の別の目的は、本発明、あるいは別の標識化試薬あるいは標識材料と協同して利用可能な非標識試薬を提供することである。例えば、化合物が標的固有部分あるいは標識を含有する際に、ノイズに対するシグナル（S/N）の最大値は、結合が標的固有部分の媒介を介し且つ標識自体、あるいは標識を標的固有部分に結合させるのに使用される成分を介さない時に生じる。明らかに、標的固有でない化合物の部分がどこか識別不可能であり、更に非標的分子に対するこのような部分の結合はバックグラウンドシグナル生成の上昇を引き起こし、続いて S/N 比の低下を引き起こす可能性がある。そのため、本発明において、標的固有部分を標識するのに使用される標識オリゴマーあるいはポリマー部分と類似する非標識オリゴマーあるいはポリマー化合物が、非標識オリゴマーあるいはポリマーが標識化合物のオリゴマーあるいはポリマー成分による非特異的結合を抑制できるような特定の分析体の存在あるいは量を検出するアッセイに使用できることを開示する。

40

【0048】

本発明の具体的な例として、マルチプルフルオレセイン部分を含有するオリゴヌクレオチドにより標識された抗体は検出試薬として利用される。非標識オリゴヌクレオチドはこの試薬の非特異的な結合を阻害するのに利用できる。この阻害試薬は抗体検出試薬に対して検体を作用させる前あるいは間のいずれかに使用可能である。核酸は配列の非均質なコレクションとなりえる。例えば、サケの精子あるいは子ウシの胸腺 DNA は通常標識 DN

50

Aプローブと共にアッセイに使用され、核酸の非特異的結合を除外する。逆に、抗体を標識するのに使用される核酸の配列は阻害剤、すなわち離散的配列などにも利用可能である。離散的、ランダム、置換、不均一核酸の組合せあるいは混合物がこの目的に利用される。

【0049】

以下の実施例は図示することにより説明されるが本発明はこれに限定されるものではない。

【好適な実施態様の説明】

【0050】

本出願における実施例は以下に列挙される。

- 実施例 1 5'末端に反応基を有するマルチシグナル試薬
- 実施例 2 タンパク質のSH基を有するマルチシグナル試薬の使用
- 実施例 3 マルチシグナル試薬に使用されるタンパク質の変性
- 実施例 4 マルチシグナル試薬の5'末端に対するプロモアセチル基の添加
- 実施例 5 糖タンパク質に使用されるマルチシグナル標識試薬
- 実施例 6 3'末端に反応基を有するマルチシグナル試薬
- 実施例 7 TdTによるマルチシグナル試薬の合成
- 実施例 8 第二水銀塩類を使用するマルチシグナル標識試薬の合成
- 実施例 9 二重鎖マルチシグナル試薬
- 実施例 10 タンパク質配列に使用されるマルチシグナル試薬
- 実施例 11 末端シグナル試薬を有するマルチシグナル試薬
- 実施例 12 ビオチンを使用する二重鎖マルチシグナル試薬で標識された抗体
- 実施例 13 マイクロアレイチップ用ノイズ・サプレッサ及びビオチンを利用した単一鎖マルチシグナル試薬
- 実施例 14 相補核酸を使用するマイクロアレイチップ用マルチシグナル試薬
- 実施例 15 エネルギー伝達を利用するマイクロアレイチップ用マルチシグナル試薬

【実施例1】

【0051】

マルチシグナル標識化試薬

a) 以下の構造を有する33-マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0052】

【化11】



ここで、5'末端はホスフェート基を有し、オリゴヌクレオチドはアリアルアミン変性ウリジン(U*として記される)を含有する。

【0053】

b) 2002年3月12日付け出願米国特許出願第10,096,075号、スタブリアノポロスにより開示されるアフェニリックテキサスレッドアナログの活性エステルはオリゴヌクレオチド中のアリアルアミン部分と反応し、アフェニリックテキサスレッドアナログをアリアルアミン変性dUTPに添加させた上記引例に記載される方法を使用して標識オリゴヌクレオチドを生成する。

【0054】

c) 標識オリゴヌクレオチドの5'ホスフェートはハロランとパーカー(1966, ジェイ 免疫96; 373)に記載される方法により第一ジアルキルアミンと反応させて標識オリゴヌクレオチドを5'アミン基を有するマルチシグナル標識化試薬に変換させる。

【0055】

d) 5'末端の第一アミンはその後室温で45分間、pH7.8、20倍モル過剰のスクシニルマレイン酸活性エステルと反応させマレイミド基を5'末端につなぐ。pHは濃酢酸を添加してすぐにpH4-5へ調整し更にマレイミド誘導オリゴヌクレオチドはエタ

10

20

30

40

50

ノールにより沈殿させる。次にLiAcバッファ(pH 4)中に再懸濁させて再び沈殿させる。使用前に、マレイミド誘導オリゴヌクレオチドは酢酸エステルバッファ(pH 5.5)中に溶解させる。この方法は6テキサスレッド染料部分と目的の標的に添加するためのシグナル反応基を含有するマルチシグナル標識化試薬を生成する。

【実施例2】

【0056】

タンパク質を有するマルチシグナル標識化試薬の使用

実施例1からえた試薬は有効スルフィドリル基を有するタンパク質を標識するのに直接使用される。例えば、BSAはpH 5.5のマレイミド誘導試薬と共に反応させて室温にて標識できる。

【実施例3】

【0057】

マルチシグナル標識化試薬と共に使用されるタンパク質の変性

有効スルフィドリル基の欠如したタンパク質も実施例1の試薬と共に利用可能である。例えば、抗体はpH 9のN-アセチル-ホモシステインチオラクトンと反応させてスルフィドリル基を導入することにより実施例2に記載したマレイミド誘導試薬で標識化できる。N-アセチル-ホモシステインチオラクトンの濃度及び反応時間を変化させてタンパク質に導入されるスルフィドリル基の数を調節できる。生物活性を維持するために、抗体はおよそ2-3スルフィドリル基で変性されることが好適である。

【実施例4】

【0058】

マルチシグナル標識化試薬の変性

実施例1の工程c)に記載されるマルチシグナル標識化試薬はプロモ酢酸NHSEステルと反応させて5'末端にプロモアセチル基をつなぐ。この基は第一アミンに非常に反応し且つpH 9でタンパク質あるいは第一アミンあるいはチオール基を含む別の所望の基を標識するのに使用される。前述のようにこれらの基は標的分子に固有であるかあるいは導入される。

【実施例5】

【0059】

糖タンパク質に利用されるマルチシグナル標識化試薬

前述したアミン基及びスルフィドリル基に加えて、哺乳類細胞から単離される多くのタンパク質はグリコシル化されることにより追加に使用できる追加の標的基を提供する。このようなタンパク質の著名な例として抗体がある。IgGの酸化は暗室で4、20分間の間pH 4-5の10mM過ヨウ素酸塩により実施され、抗体にアルデヒド基を導入する。過剰な過ヨウ素酸塩はG50遠心分離によりその後取り除かれる。変性試薬はシスタチオンをエルマン試薬で反応させることにより生成し、従ってチオール分子を除去可能基で阻害する。抗体のグリコン部のアルデヒド基は次にpH 6の40倍過剰の変性試薬で室温にて1時間反応させる。pHは次にpH 9まで上昇させ、溶液は冷却し更にシッフ塩基はNaBH₄で還元する。これはシッフ塩基をアミンに還元しチオールを遊離させる。過剰NaBH₄はアセテートバッファ(pH 4)を加えて消失させる。チオール標識IgGは実施例1のマレイミド誘導試薬かあるいは実施例4のプロモアセチル変性試薬と結合するのに有効である。この方法はグリコシル化が生じる部位にのみ生じるため、非常に調節された量の標識化となる。例えば、本実施例において使用される抗体は不変領域においてグリコシル化される。このように、標識化試薬の添加はその標的の抗原に対して抗体を結合する抗体の部分である可変領域に干渉されない。

【実施例6】

【0060】

3'末端に反応基を有するマルチシグナル試薬

以下の構造を有する29-マーオリゴヌクレオチドが合成される。

【0061】

10

20

30

40

50

【化 1 2】

5' -U^FTTTTTTU^FTTTTTTU^FTTTTTTU^FTTTTTTU^F -NH₂ 3'

ここで、オリゴヌクレオチドは 3' 第一アミンとフルオレセイン標識を有するウリジン (U^Fとして記す) を含有する。これらの変性でオリゴヌクレオチドを生成するためのホスホラミダイト及び C P G は市販されている。あるいは、オリゴヌクレオチドを 5' 末端の第一アミンで合成するホスホラミダイトは、類似の標識オリゴヌクレオチドを合成するのに使用されてきた。この製品は 5 フルオレセン部分及び一つのアミン基を含有する。この試薬は実施例 1、2、3、4 及び 5 において記載した同じ方法で使用される。

【実施例 7】

【0062】

マルチシグナル標識化試薬を合成する末端トランスフェラーゼの利用

a) 以下の構造を有する 27 - マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0063】

【化 1 3】

5' -U*TTTTTU*TTTTTU*TTTTTU*TTTTTU*TT-3'

ここで、オリゴヌクレオチドはアリールアミン変性ウリジンを含有する。(U*と記す)。アレクサフルオール 555 (分子プローブ、インク、ユージン、OR) の活性エステルの添加は実施例 1 に記載される方法で実施できる。

【0064】

b) 標識オリゴヌクレオチドは更に末端トランスフェラーゼによるジデオキシ変型のアリールアミン d U T P の追加により反応する。この工程は単一アミン基をオリゴヌクレオチドの 3' 末端に導入することにより 5 アレクサ染料及び単一アミン基を有する標識化試薬を生成できる。この標識化試薬は前述のように使用できる。

【実施例 8】

【0065】

第二水銀塩類を使用するマルチシグナル標識化試薬の合成

以下の構造を有する 57 - マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0066】

【化 1 4】

5' (UTTTTTTT)₈ T-NH₂ 3'

ここで 3' 末端はアミン基を有する。オリゴヌクレオチドは 5 時間 65 で酢酸エステルバッファ (pH 4.0) 中に 3 倍モル到達の酢酸水銀 II で処理しオリゴヌクレオチドのウリジン環の 5 位を水銀で化合する。この水銀処理オリゴヌクレオチドは次ぎにエタノールで沈殿され必要となるまで -20 で保存される。オリゴヌクレオチドは次ぎに米国特許出願第 10,096,075 号、出願日 2002 年 3 月 12 日、ストラブリアノポロスに記載されここに引用される末端二重結合反応基を含有する Cy 染料で反応させる。この合成されたオリゴヌクレオチドは 3' 末端に単一アミン反応基と U が存在していた 8 部位それぞれの Cy 染料とを含有する。この標識化試薬は前述のように使用される。

【実施例 9】

【0067】

核酸の二重鎖により標識されたタンパク質

a) 以下の構造を有する 12 - マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0068】

【化 1 5】

5' -GTG U* GTG U* GTG U* -3'

ここでオリゴヌクレオチドはアルリアミン変性ウリジン (U*により記す) を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 9 】

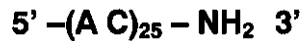
b) 実施例 1 で使用されるアフェニリック テキサス レッド アナログの活性エステルはオリゴヌクレオチドのアリアルアミン部分と反応し前述した同様な方法によりシグナルオリゴヌクレオチドを生成する。

【 0 0 7 0 】

c) 以下の構造を有する 5 0 - マー 添加オリゴヌクレオチドが合成される。

【 0 0 7 1 】

【 化 1 6 】



10

【 0 0 7 2 】

d) テキサスレッド標識シグナルオリゴヌクレオチドは添加オリゴヌクレオチドにアニーリングされマルチシグナル標識化試薬を生成する。ジヌクレオチドの繰り返しが過剰であるために交雑が速い反応速度で行われる。シグナルオリゴヌクレオチドは添加オリゴヌクレオチドよりも小さく、マルチシグナル標識化試薬の各添加オリゴヌクレオチドに結合するために 4 つほどのシグナルオリゴヌクレオチドの空間が存在する。このことはマルチシグナル標識化試薬のアミン基を介して結合される 1 つの標的の全ての部位に対して 1 2 このシグナル部分が潜在的に添加されることになる。A / T 塩基対あたり 2 、 G / C 塩基対あたり 4 の規定を使用してシグナルオリゴヌクレオチドの理論 T m はおよそ 3 6 である。従って、マルチシグナル標識化試薬複合体は室温で完全に安定しなければならない。なお、添加オリゴヌクレオチドの隣接部位にある 2 つのシグナルオリゴヌクレオチドが交雑することにより各オリゴヌクレオチドの温度安定化を提供する相互作用を段階可能にするため、より高い T m 値もおそらく実現可能である。

20

【 0 0 7 3 】

e) マルチシグナル標識化試薬は上述のようにアミン基を介してタンパク質に添加されてタンパク質上の各添加部位にマルチシグナルを含有する標識タンパク質を生成させる。

【 実施例 1 0 】

【 0 0 7 4 】

タンパク質配列のためのサンプルの精製

a) 以下の構造を有する 1 5 - マー オリゴヌクレオチドが合成される。

30

【 0 0 7 5 】

【 化 1 7 】



ここでオリゴヌクレオチドはアリアルアミン変性ウリジン (U * で記される) を含有する。

【 0 0 7 6 】

b) アルフェニリックテキサスレッドアナログの活性エステルはオリゴヌクレオチド中のアリアルアミン部分と反応し実施例 1 に記載される方法によりシグナルオリゴヌクレオチド # 1 を生成する。このオリゴヌクレオチドの T m 値はおよそ 5 0 である。

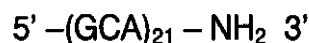
40

【 0 0 7 7 】

c) 以下の構造を有する添加オリゴヌクレオチド # 1 (6 3 - マー) が合成される。

【 0 0 7 8 】

【 化 1 8 】



【 0 0 7 9 】

d) シグナルオリゴヌクレオチド # 1 は添加オリゴヌクレオチド # 2 にアニーリングされ飽和値で 3 ' NH₂ 基あたり 8 このテキサスレッド部分の結合を有するマルチシグナル標識化試薬 # 1 を生成する。

50

【 0 0 8 0 】

e) 以下の構造を有する 15 - マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【 0 0 8 1 】

【 化 1 9 】



ここでオリゴヌクレオチドはアリアルアミン変性ウリジン (U* で記す) を含有する。

【 0 0 8 2 】

f) 工程 (b) と同様な方法を使用して、アレクサフルオール 647 (分子プローブ、
 インク、ユージン、OR) の活性エステルはオリゴヌクレオチド中のアリアルアミン部分
 と反応しマルチシグナルオリゴヌクレオチド # 2 を生成する。このオリゴヌクレオチドの
 Tm 値もおよそ 50 である。

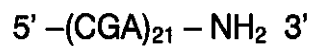
10

【 0 0 8 3 】

g) 以下の構造を有する添加オリゴヌクレオチド # 2 (63 - マー) が合成される。

【 0 0 8 4 】

【 化 2 0 】



【 0 0 8 5 】

h) シグナルオリゴヌクレオチド # 2 は添加オリゴヌクレオチド # 2 にアニーリングさ
 れて飽和値で 3' NH₂ 基あたり 8 このアレクサ部分の結合を有するマルチシグナル標識
 化試薬 # 2 を生成する。

20

【 0 0 8 6 】

i) 上述の実施例の方法を利用して、タンパク質サンプル # 1 は工程 (d) から得たマ
 ルチシグナル標識化試薬 # 1 と反応しタンパク質サンプル # 2 は工程 (h) から得たマ
 ルチシグナル標識化試薬 # 2 と反応する。

【 0 0 8 7 】

これらのサンプルは、タンパク質配列に利用されるために準備され、ここでタンパク質
 サンプル # 1 (テキサスレッド) から得たシグナルがタンパク質サンプル # 2 (アレクサ
) から得たシグナルと識別可能である。前述したように、本発明のこの実施例におけるマ
 ルチシグナル標識化試薬を連結すると、一つの染料を利用して得られるシグナル部分の量
 の 8 倍が 1 つのアミノ基と結合可能となる。

30

【 実施例 1 1 】

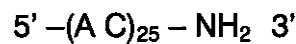
【 0 0 8 8 】

単一鎖末端を有するマルチシグナル標識化試薬

a) 以下の構造を有する 50 - マー 添加オリゴヌクレオチドが合成される。

【 0 0 8 9 】

【 化 2 1 】



40

【 0 0 9 0 】

b) 以下の構造を有する 32 - マー シグナルオリゴヌクレオチドが合成される。

【 0 0 9 1 】

【 化 2 2 】



ここでオリゴヌクレオチドはアリアルアミン変性ウリジン (U* で記す) を含有する。

【 0 0 9 2 】

c) アフェニリックテキサスレッドアナログの活性エステルはオリゴヌクレオチド中の
 アリアルアミン部分と反応し末端シグナルオリゴヌクレオチドを生成する。シグナルオリ

50

ゴヌクレオチドの5'末端にある16この塩基セグメントは工程(a)の添加オリゴヌクレオチドと相補的でありかつ8G'sおよび8T/U'sに基づくおよそ48のTmを有する。T'sおよびU*'sから構成されるシグナルオリゴヌクレオチドの16この塩基3'末端セグメントはシグナルを提供するが添加オリゴヌクレオチドへの結合には関与しない。

【0093】

d) 添加オリゴヌクレオチドへのシグナルオリゴヌクレオチドの交雑はマルチシグナル標識化試薬を生成し、これは8このシグナル部分をそれぞれ有した3つのシグナルオリゴヌクレオチドを、マルチシグナル試薬の添加オリゴヌクレオチド部がタンパク質標的に結合される各部位に対して潜在的に結合される正味総24このシグナル部分に提供される。

10

【0094】

マルチシグナル試薬の非標識添加オリゴヌクレオチド部分は上述のアミン基を介するタンパク質への結合に利用され1つ以上のマルチシグナル標識化試薬を含有する標識標的を生成する。

【実施例12】

【0095】

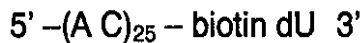
結合相手としてのビオチンを有する二重鎖マルチシグナル標識化試薬

a) 以下の構造を有する50-マー ビオチニル化添加オリゴヌクレオチドが合成される。

【0096】

20

【化23】



3'ビオチン標識ヌクレオチド用のホスホラミダイトは非常に多くの化学源から容易に適用できる。

【0097】

b) 実施例9の工程(c)から得た末端シグナルオリゴヌクレオチドはビオチリニル化添加オリゴヌクレオチドと交雑しビオチニル化マルチシグナル標識化試薬を生成する。前述のようにこの複合体はたった一つのビオチン添加部分と24シグナル部分を含有する。

【0098】

30

c) ビオチニル化抗体は多くの市販源から容易に適用可能である。ビオチニル化抗体は組織片検体中の適切な標的抗原に対して結合可能であり、抗原の存在を増幅させる検出は最初にストレプトアビジンと結合させ次に工程(b)から得られたビオチニル化マルチシグナル標識化試薬と結合させることによりシグナル生成を実施することで可能となる。

【実施例13】

【0099】

結合相手としてのビオチンを有する単一鎖マルチシグナル試薬とノイズサプレッサの添加

a) 以下の構造を有する61-マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0100】

40

【化24】



ここで5'末端はビオチニル化Uを有し且つオリゴヌクレオチドはアリアルアミン変性ウリジン部分(U*として記す)を含有する。

【0101】

b) Cy3染料(アメルシャム バイオサイエンス、ピスカタウェイ、ニュージャージ)の活性エステルがCy3標識ビオチニル化マルチシグナル試薬を生成するために前述と同様の方法を使用してオリゴヌクレオチド中のアリアルアミン部分と反応する。

【0102】

c) 以下の配列を有する20-マー オリゴヌクレオチドが標識あるいはビオチンを欠

50

いた状態で合成され、ノイズサプレッサを提供する。

【0103】

【化25】

5'-(TG)₁₀-3'

【0104】

d) ポリA mRNAはラバニ他、米国特許出願第09/896,897号、出願日2001年6月30日(ここに引用される)に記載される方法に従って増幅され、ここでピオチンが二重鎖cDNAコレクションの試験管内転写の間取り込まれて標識アンチセンスRNAを生成される。

10

【0105】

e) ピオチニル化RNAは高密度マイクロアレイチップに切断され更に交雑されて製造者用指示書(アフィメトリックス、インク、サンタクララ、カナダ)に従ってアフィメトリックスを生成する。

【0106】

f) そのチップはアフィメトリックス指示書に従ってストレプトアビジンと培養される。

【0107】

g) アフィメトリックス指示書に記載されるピオチニル化フィコエリトリンを使用する代わりに、チップを工程(b)で得たCy3標識ピオチニル化マルチシグナル試薬と工程(c)で得たノイズサプレッサとの混合物と培養する。

20

【0108】

h) 適切な洗浄の後、各遺伝子座からのシグナル生成を測定する。

【実施例14】

【0109】

結合相手としてのピオチンを有する単一鎖マルチシグナル標識化試薬及び非標識補体の追加

a) 以下の構造を有する61-マー オリゴヌクレオチドを合成する。

【0110】

【化26】

30

5' Biotin U- (U*GTGTGTGTGTG)₅-3'

5'末端はピオチニル化Uを有し更にオリゴヌクレオチドはアリアルアミン変性ウリジン成分(U*として記す)を含有する。

【0111】

b) Cy3染料(アメルシャム バイオサイエンス、ピスカタウェイ、ニュージャージー)の活性エステルは上述と同様の方法を使用してオリゴヌクレオチド中のアリアルアミン部分と反応し、Cy3標識ピオチニル化マルチシグナル標識化試薬を生成する。

【0112】

c) 以下の構造を有する20-マー オリゴヌクレオチドが標識あるいはピオチンなしで合成され、マルチシグナル試薬補体を生成する。このオリゴヌクレオチドのT_m値は10C'sおよび10A'sに基づきおよそ60となる。

40

【0113】

【化27】

5'-(AC)₁₀-3'

【0114】

d) ポリA mRNAはENZ61中に記載される方法に従って増幅され、これはピオチンが二重鎖cDNAコレクションの試験管内転写の間取り込まれ標識アンチセンスRNAを生成する。

50

【0115】

e) ビオチニル化RNAは製造者指示書(アフィメトリックス、インク、サンタクララ、カナダ)に従ってアフィメトリックスから高密度マイクロアレイチップに切断され交雑される。

【0116】

f) このチップはアフィメトリックス指示書に従ってストレプトアビジンで培養される。

【0117】

g) アフィメトリックス指示書に記載されるビオチニル化フィコエリトリンを使用する代わりに、そのチップを工程(b)で得たCy3標識ビオチニル化マルチシグナル試薬と工程(c)で得たマルチシグナル試薬補体との混合物で培養される。マルチシグナル試薬補体とCy3標識ビオチニル化マルチシグナル試薬との交雑はこの工程の間行われるかあるいは必要であればこれらはチップに添加される前に共に予め培養される。Cy3標識ビオチニル化マルチシグナル試薬に二重鎖形質を供与することによりCy3部分の相互作用により生じるクエンチングが減少できる。また必要であれば、実施例11の工程(c)から得たノイズサプレッサを含む。

10

【0118】

h) 適切な洗浄の後、各遺伝子座からのシグナル生成を測定する。

【実施例15】

【0119】

20

ビオチンを有するマルチシグナル標識化試薬とエネルギー伝達

a) 以下の構造を有する61-マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0120】

【化28】



ここで、5'末端はビオチニル化Uを有しオリゴヌクレオチドはフルオレセン変性シチジン部分(C^Fとして記す)を含有しエネルギー供与マルチシグナル標識化試薬を生成する。

【0121】

30

b) 以下の構造を有する20-マー オリゴヌクレオチドが合成される。

【0122】

【化29】



ここで5'末端はビオチニル化Uを有しオリゴヌクレオチドはアリアルアミン変性ウリジン部分(U*として記す)を含有する。このオリゴヌクレオチドのT_m値は10G'sおよび10T/U'sに基づきおよそ60である。

【0123】

c) アフェニリックテキサスレッドの活性エステルは上述に記載した方法を利用してオリゴヌクレオチド中のアリアルアミン部分と反応しエネルギー受容マルチシグナル標識化試薬を生成する。

40

【0124】

d) 工程(a)からのエネルギー供与マルチシグナル試薬と工程(c)からのエネルギー受容マルチシグナル標識化試薬は共に交雑されて1つのビオチンと5個供与体及び6個受容体とを含有するエネルギー伝達マルチシグナル標識化試薬を生成する。

【0125】

e) エネルギー伝達マルチシグナル標識化試薬は上述のように使用される。

【0126】

本発明の前述した記載及び実施例を考慮して、当業者は疑いなく多くの明白な多様性が

50

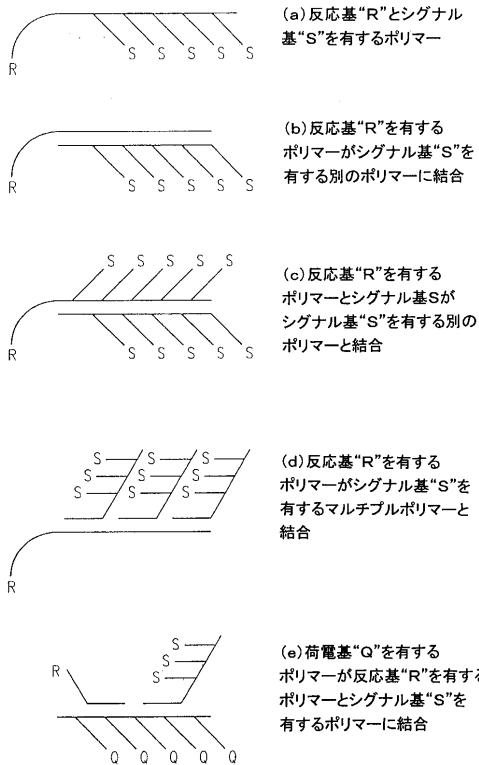
示唆される。すべてのこのような多様性は後に記載の請求項においてより特徴的に定義される発明の範囲及び主旨において完全に包含される。

【図面の簡単な説明】

【0127】

【図1】 図1は単一鎖あるいは二本鎖核酸マルチシグナル標識化試薬の多様な配列を示す。

【図1】



ポリマー中のR、SおよびQの配列の実施例

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 ジャニス ジー スタブリアノポロス
アメリカ合衆国、ニュー ヨーク 1 1 7 0 6、ベイショアー、サウス クリントン アベニュー
9 9、アパートメント 1 0シー

(72)発明者 ジェームズ ジェイ ドネガン
アメリカ合衆国、ニュー ヨーク 1 1 5 6 1、ロング ビーチ、イースト ブロードウェイ 2
1 0、アパートメント 4イー

Fターム(参考) 2G054 CA23 CE02 EA03 GA04 GB02
4B024 AA11 CA01 CA09 CA10 HA12
4B063 QA18 QQ21 QQ41 QQ79 QR32 QR56 QS03 QS28 QS33 QS34
QS36 QS39 QX02

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 多信号标记试剂，其标记方法和定量方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2008148709A | 公开(公告)日 | 2008-07-03 |
| 申请号 | JP2008005049 | 申请日 | 2008-01-11 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 恩佐生命科学公司说 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 恩佐生命Saiensezu公司 | | |
| [标]发明人 | イレーザラバニ ジャニスジースタブリアノポロス ジェームズジェイドネガン | | |
| 发明人 | イレーザラバニ ジャニスジースタブリアノポロス ジェームズジェイドネガン | | |
| IPC分类号 | C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/536 G01N21/78 C12N15/09 G01N33/58 C07H C07H21/04 G01N33/566 | | |
| CPC分类号 | C07H21/04 | | |
| FI分类号 | C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/536.D G01N21/78.C G01N33/53.U C12N15/00.A G01N33/566 G01N33/58.A | | |
| F-TERM分类号 | 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GB02 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QS03 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA30 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA54 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/FB13 | | |
| 优先权 | 10/407818 2003-04-03 US | | |
| 其他公开文献 | JP5313509B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：提供多信号标记试剂，可用于许多生物化学应用，包括生物分子探针的制造及其在检测或扩增分析物特异性部分中的用途。溶解：组合物包含低聚物或聚合物，其包括以下组分：(a) 标记组分，其中一个或多个标记物与低聚物或聚合物化学键合；(b) 一个或多个反应性基团和 (c) 一个或多个带电基团。带电基团与 (i) 低聚物或聚合物，或 (ii) 低聚物或聚合物主链的一部分，或 (iii) 它们的组合共价键合。Ž

