

(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2007-525661

(P2007-525661A)

(43) 公表日 平成19年9月6日(2007.9.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/542 (2006.01)	GO 1 N 33/542 A	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 5 4
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	4 B O 2 4
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	4 B O 6 3
GO 1 N 33/00 (2006.01)	GO 1 N 33/00 D	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-543991 (P2006-543991)
 (86) (22) 出願日 平成16年12月10日 (2004.12.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年8月11日 (2006.8.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/041315
 (87) 国際公開番号 W02005/059509
 (87) 国際公開日 平成17年6月30日 (2005.6.30)
 (31) 優先権主張番号 60/529,076
 (32) 優先日 平成15年12月12日 (2003.12.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

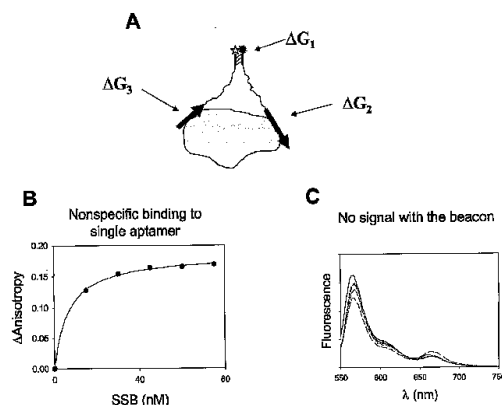
(71) 出願人 506200555
 セントルイス ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 63104 ミズーリ州
 セントルイス スイート シー110
 キャロライン モール 3556 セント
 ルイス ユニバーシティ テクノロジー
 トランスファー オフィス
 (74) 代理人 100079049
 弁理士 中島 淳
 (74) 代理人 100084995
 弁理士 加藤 和詳
 (74) 代理人 100085279
 弁理士 西元 勝一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 大分子その他の分析物の検出用生物センサー

(57) 【要約】

任意のポリペプチドあるいは大分子複合体の同定と定量に有用な、コアプタマー構築物セットを利用した組成物と方法が開示される。大分子構築物のポリペプチドの固有のエピトープに結合するアプタマー構築物が作製される。これらアプタマー構築物は、エピトープ結合部位、コアプタマー結合部位、および検出可能な標識を含む。同族ポリペプチド、被分析物 - ポリペプチド複合体、あるいはその他の大分子複合体の存在下で、コアプタマーは互いに結合して検出可能なシグナルを生み出す。コアプタマー構築物はリンカーで連結されて二価アプタマー構築物を産生してもよい。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中のポリペプチドを検出する方法であって、該方法は

(a) 第 1 のアプタマー構築物と第 2 のアプタマー構築物にサンプルを接触させるステップと、

(b) 第 1 のアプタマー構築物、第 2 のアプタマー構築物、およびポリペプチドの結合を検出方法により検出するステップと、

を含み、

(c) 第 1 のアプタマー構築物は前記ポリペプチドの第 1 エピトープに結合でき、第 2 のアプタマー構築物はポリペプチドの第 2 のエピトープに結合でき、

10

(d) 第 1 アプタマー構築物は

(i) 第 1 のエピトープと結合できる第 1 のアプタマーと、

(i i) 第 1 のシグナリングオリゴと、

(i i i) 第 1 の標識と

を含み、

(e) 第 2 のアプタマー構築物は

(i v) 第 2 のエピトープと結合できる第 2 のアプタマーと、

(v) 第 1 のシグナリングオリゴに相補的な第 2 のシグナリングオリゴと、

(v i) 第 2 の標識と

を含む、前記方法。

20

【請求項 2】

第 1 と第 2 のシグナリングオリゴが、それぞれ 5 ヌクレオチド～7 ヌクレオチドからなる、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

第 1 のアプタマーは天然の同族結合エレメント配列を含み、第 2 のアプタマーはインビトロ進化を用いて選択される、請求項 1 の方法。

【請求項 4】

第 1 の標識は蛍光ドナーであり、第 2 の標識は蛍光アクセプターである、請求項 1 の方法。

【請求項 5】

第 1 の標識は蛍光アクセプターであり、第 2 の標識は蛍光ドナーである、請求項 1 の方法。

30

【請求項 6】

検出方法が蛍光の変化を検出する請求項 1 の方法。

【請求項 7】

検出方法が FRET である請求項 2 1 の方法。

【請求項 8】

第 1 のアプタマーと第 2 のアプタマーがインビトロの進化によって選択される請求項 1 の方法。

【請求項 9】

ポリペプチドは元来は天然同族結合エレメント配列に結合しない請求項 1 の方法。

40

【請求項 10】

ポリペプチドがトロニンである請求項 9 の方法。

【請求項 11】

第 1 のアプタマーがトロニンフィブリノゲンエクソサイトに結合し、第 2 のアプタマーがトロニンのフィブリノゲンエクソサイトに結合する請求項 10 の方法。

【請求項 12】

第 1 の標識がフルオレセインである請求項 11 の方法。

【請求項 13】

検出方法が蛍光偏光である請求項 12 の方法。

50

【請求項 14】

第2の標識がダブルシルで、検出方法がフルオレセインの蛍光強度の変化を検出することである請求項12の方法。

【請求項 15】

第1のアプタマー構築物と第2のアプタマー構築物がリンカーで連結されている請求項1の方法。

【請求項 16】

リンカーが柔軟なスペーサー18リンカーである、請求項1の方法。

【請求項 17】

サンプル中の被分析物を検出する方法であって、該方法は

(a) 第1のアプタマー構築物、第2のアプタマー構築物、およびポリペプチドにサンプルを接触させるステップと、

(b) 第1のアプタマー構築物、第2のアプタマー構築物、ポリペプチド、および被分析物の結合を検出方法により検出するステップと、

を含み、

(c) 被分析物の存在下で、第1のアプタマー構築物はポリペプチドの第1のエピトープに結合でき、第2のアプタマー構築物はポリペプチドの第2のエピトープに結合でき、

(d) 第1のアプタマー構築物は、第1のエピトープと結合できる第1のアプタマーと、第1のシグナリングオリゴと、第1の標識とを含み、

(e) 第2のアプタマー構築物は、第2のエピトープと結合できる第2のアプタマーと、第1のシグナリングオリゴに相補的な第2のシグナリングオリゴと、第2の標識とを含む

前記方法。

【請求項 18】

第1のシグナリングオリゴと第2のシグナリングオリゴは、それぞれ5ヌクレオチド乃至7ヌクレオチドからなる請求項17の方法。

【請求項 19】

第1のアプタマーは天然同族結合エレメントの配列を含み、第2のアプタマーはインビトロ進化を用いて選択される請求項17の方法。

【請求項 20】

第1の標識は蛍光ドナーであり、第2の標識は蛍光アクセプターである請求項17の方法。

【請求項 21】

第1の標識は蛍光アクセプターであり、第2の標識は蛍光ドナーである、請求項17の方法。

【請求項 22】

検出方法が蛍光の変化を検出する請求項17の方法。

【請求項 23】

検出方法がFRETである請求項22の方法。

【請求項 24】

第1のアプタマーと第2のアプタマーはインビトロ進化を用いて選択される請求項17の方法。

【請求項 25】

前記ポリペプチドが元々は天然同族結合エレメント配列に結合しない請求項17の方法。

【請求項 26】

前記ポリペプチドが被分析物との結合の際に構造上の変化を起こす請求項17の方法。

【請求項 27】

被分析物が薬物であり、前記ポリペプチドは該薬物に結合できる請求項26の方法。

【請求項 28】

被分析物がスタチン薬物であり、前記ポリペプチドがHMG-CoAレダクターゼである

10

20

30

40

50

請求項 27 の方法。

【請求項 29】

被分析物が環境中に見出される毒素である請求項 17 の方法。

【請求項 30】

第 1 のアプタマー構築物と第 2 のアプタマー構築物がリンカーで連結されている請求項 17 の方法。

【請求項 31】

リンカーが柔軟なスペーサー 18 リンカーである請求項 30 の方法。

【請求項 32】

第 1 と第 2 のアプタマー構築物を含むアプタマー構築物セットを作製する方法であって、
該方法は

(a) 第 1 のエピトープを含む第 1 の基質に対する第 1 のアプタマーを選択し、第 2 のエピトープを含む第 2 の基質に対する第 2 のアプタマーを選択することを含むステップであって、第 1 のアプタマーは第 1 のエピトープに結合でき、第 2 のアプタマーは第 2 のエピトープに結合できるステップと、

(b) 第 1 の標識を第 1 のアプタマーに結合させ、第 2 の標識を第 2 のアプタマーにさせるステップと、

(c) 第 1 のシグナリングオリゴを第 1 のアプタマーに結合させ、第 2 のシグナリングオリゴが第 2 のアプタマーに結合させるステップであって、第 2 のシグナリングオリゴが第 1 のシグナリングオリゴに相補的であるステップと、

(d) その結果 (i) 第 1 のアプタマー構築物が第 1 のアプタマー、第 1 の標識、および第 1 のシグナリングオリゴを含み、(ii) 第 2 のアプタマー構築物が第 2 のアプタマー、第 2 の標識、および第 2 のシグナリングオリゴを含むステップと

を含む前記方法。

【請求項 33】

第 1 の基質がポリペプチドであり、第 2 の基質が第 1 のアプタマーと結合したポリペプチドであり、第 1 のアプタマーが第 1 のエピトープをマスクする請求項 32 の方法。

【請求項 34】

第 1 の基質がポリペプチドあるいは大分子複合体であり、第 2 の基質が第 1 のアプタマーと結合したポリペプチドあるいは大分子複合体であり、第 1 のアプタマーが (a) 第 1 のシグナリングオリゴあるいは第 1 の標識上に結合され、(b) 第 1 のエピトープをマスクしている、請求項 32 の方法。

【請求項 35】

第 1 の基質が本質的に第 1 のエピトープからなるポリペプチドの断片であり、第 2 の基質が本質的に第 2 のエピトープからなるポリペプチドの断片である請求項 32 の方法。

【請求項 36】

第 1 のシグナリングオリゴと第 2 のシグナリングオリゴが、各々 5 ヌクレオチド乃至 7 ヌクレオチドからなる請求項 32 の方法。

【請求項 37】

第 1 のアプタマーが天然同族結合エレメント配列を含み、第 2 のアプタマーはインビトロ進化を用いて選択される、請求項 32 の方法。

【請求項 38】

第 1 の標識が蛍光ドナーであり、第 2 の標識が蛍光アクセプターである請求項 32 の方法。

【請求項 39】

第 1 の標識が蛍光アクセプターであり、第 2 の標識が蛍光ドナーである請求項 32 の方法。

【請求項 40】

第 1 のアプタマーと第 2 のアプタマーがインビトロ進化を用いて選択される請求項 32 の方法。

【請求項 4 1】

柔軟なリンカーで第 1 のアプタマー構築物を第 2 のアプタマー構築物に連結するステップを含む請求項 3 2 の方法。

【請求項 4 2】

第 1 のアプタマー、第 1 の標識、第 1 のシグナリングオリゴ、第 2 のアプタマー、第 2 の標識、第 2 のシグナリングオリゴおよびリンカを包む二価アプタマー構築物であって、第 1 のアプタマーが第 1 のエピトープに結合でき、第 2 のアプタマーが第 2 のエピトープに結合できる二価アプタマー構築物。

【請求項 4 3】

第 1 のエピトープと第 2 のエピトープが同一のポリペプチドの重複しない異なるエピトープである請求項 4 2 の二価アプタマー構築物。 10

【請求項 4 4】

リンカーが柔軟なリンカーである請求項 4 2 の二価アプタマー構築物。

【請求項 4 5】

リンカーがスパーサー 1 8 リンカーである請求項 4 4 の二価アプタマー構築物。

【請求項 4 6】

リンカーがデオキシチミジンポリマーである請求項 4 4 の二価アプタマー構築物。

【請求項 4 7】

第 1 の標識が蛍光ドナーである請求項 4 2 の二価アプタマー構築物。

【請求項 4 8】

第 2 の標識が蛍光受容体である請求項 4 7 の二価アプタマー構築物。 20

【請求項 4 9】

第 1 と第 2 のシグナリングオリゴは、5 ヌクレオチド長乃至 7 ヌクレオチド長である請求項 4 2 の二価アプタマー構築物。

【請求項 5 0】

第 1 のアプタマーが天然同族結合エレメント配列を含む請求項 4 2 の二価アプタマー構築物。

【請求項 5 1】

第 2 のアプタマーがインビトロ進化を用いて選択された、請求項 5 0 の二価アプタマー構築物。 30

【請求項 5 2】

第 1 のアプタマーがインビトロ進化を用いて選択された請求項 4 2 の二価アプタマー構築物。

【請求項 5 3】

ポリペプチドがトロンピンであり、第 1 の標識がフルオレセインであり、第 2 の標識がダブルシルであり、第 1 のエピトープがヘパリンエクソサイトであり、第 2 のエピトープがフィブリノゲンエクソサイトであり、リンカーがスパーサー 1 8 である、請求項 4 2 の二価アプタマー構築物。

【請求項 5 4】

ポリペプチドがトロンピンであり、第 1 の標識がフルオレセインであり、第 2 の標識がダブルシルであり、第 1 のエピトープがヘパリンエクソサイトであり、第 2 のエピトープがフィブリノゲンエクソサイトであり、リンカー分子がスパーサー 1 8 である請求項 4 3 の二価アプタマー構築物。 40

【請求項 5 5】

第 1 の標識が結合された第 1 のエピトープおよび第 2 の標識が結合された第 2 のエピトープを含むキットであって、

(a) 第 1 のエピトープ結合剤と第 2 のエピトープ結合剤標識が、それぞれポリペプチドの第 1 のエピトープとポリペプチドの第 2 のエピトープに結合した時 (b) 第 1 の標識と第 2 の標識が相互作用して観測可能なシグナルを生み出す、キット。

【請求項 5 6】

第 1 のエピトープ結合剤が抗体である請求項 5 5 のキット。

【請求項 5 7】

第 1 のエピトープの結合剤は第 1 のアプタマー構築物であり、第 1 のアプタマー構築物は第 1 のアプタマー、第 1 の標識、および第 1 のシグナリングオリゴを含む請求項 5 5 のキット。

【請求項 5 8】

第 2 のエピトープ結合剤が第 2 のアプタマー構築物であり、第 2 のアプタマー構築物は第 2 の標識と第 1 のシグナリングオリゴに相補的な第 2 のシグナリングオリゴを含む、請求項 5 7 のキット。

【請求項 5 9】

第 1 のシグナリングオリゴと第 2 のシグナリングオリゴが 5 個ヌクレオチド乃至 7 個ヌクレオチドの長さである請求項 5 8 のキット。

【請求項 6 0】

第 1 のアプタマーが天然同族結合エレメント配列を含む、請求項 5 8 のキット。

【請求項 6 1】

第 2 のアプタマーがインビトロ進化を用いて選択される、請求項 5 8 のキット。

【請求項 6 2】

第 1 の標識は蛍光ドナーであり、第 2 の標識は蛍光受容体である請求項 5 5 のキット。

【請求項 6 3】

第 1 の標識がフルオレセインで第 2 の標識がダブシルである請求項 6 2 のキット。

【請求項 6 4】

被分析物と結合できるポリペプチドをさらに含む請求項 5 5 のキット。

【請求項 6 5】

キットを使用するためのプリントされた指示のセットをさらに含む請求項 5 5 のキット。

【請求項 6 6】

疾病を診断する方法であって、該方法は

(a) 患者からサンプルを得るステップと、

(b) 第 1 のエピトープ結合剤と第 2 のエピトープ結合剤に該サンプルを接触させるステップと、

(c) 該サンプル中のポリヌクレオチドの存在を検出方法を用いて検出するステップと、
を含み、該サンプル中の前記ポリペプチドの存在は患者に疾病があるかどうかを示す、
疾病を診断する方法。

【請求項 6 7】

(a) 第 1 のエピトープ結合剤は第 1 の標識と第 1 のシグナリングオリゴが結合された第 1 のアプタマーであり、(b) 第 2 のエピトープ結合剤は第 2 の標識と第 1 のシグナリングオリゴに相補的な第 2 のシグナリングオリゴが結合した第 2 のアプタマーであり、(c) 検出方法は蛍光検出法であり、

(d) 第 1 のアプタマーがポリペプチドに結合し第 2 のアプタマーもポリペプチドに結合した時、(e) 第 1 のシグナリングオリゴと第 2 のシグナリングオリゴが互いに結合し、(f) 第 1 の標識が第 2 の標識に接近して蛍光の変化が起こる、請求項 6 6 の方法。

【請求項 6 8】

サンプルが、血液、尿、腹水、および組織サンプルからなる群から選択される請求項 6 6 の方法。

【請求項 6 9】

患者がヒトである請求項 6 6 の方法。

【請求項 7 0】

疾病を診断する方法であって、該方法は

(a) 患者からサンプルを得るステップと、

(b) 第 1 のエピトープ結合剤、第 2 のエピトープ結合剤、および第 1 のエピトープと第 2 のエピトープを含むポリペプチドにサンプルを接触させるステップと、

10

20

30

40

50

(c) サンプル中の、前記ポリペプチドに結合できる被分析物の存在を検出方法を用いて検出するステップと、

を含み、前記分析物の存在は疾病が患者にあるかを示す、疾病を診断する方法。

【請求項 7 1】

(a) 第 1 のエピトープ結合剤は第 1 の標識と第 1 のシグナリングオリゴが結合した第 1 のアプタマーであり、(b) 第 2 のエピトープ結合剤は第 2 の標識と、第 1 のシグナリングオリゴに相補的な第 2 シグナリングオリゴとが結合した第 2 のアプタマーであり、(c) 検出方法は蛍光検出法であり、

(d) 被分析物がポリペプチドに結合した時、(e) 第 1 のアプタマーがポリペプチドに結合し、第 2 のアプタマーもポリペプチドに結合し、(f) 第 1 のシグナリングオリゴと第 2 のシグナリングオリゴが互いに結合し、(g) 第 1 の標識が第 2 の標識に接近して蛍光の変化が起こる、請求項 7 0 の方法。

10

【請求項 7 2】

サンプルが、血液、尿、腹水、および組織サンプルからなる群より選択される請求項 7 0 の方法。

【請求項 7 3】

患者がヒトである請求項 7 0 の方法。

【請求項 7 4】

有用な試薬についてサンプルをスクリーニングする方法であって、

(a) 第 1 のエピトープ結合剤と第 2 のエピトープ結合剤にサンプルを接触させるステップと、

20

(b) 検出方法を用いてサンプル中の有用な試薬の存在を検出するステップと、
を含む方法。

【請求項 7 5】

有用な試薬が第 1 のエピトープと第 2 のエピトープを含むポリペプチドである請求項 7 4 の方法。

【請求項 7 6】

被分析物と結合できるポリペプチドにサンプルを接触させるステップをさらに含み、前記有用な試薬が被分析物である、請求項 7 4 の方法。

【請求項 7 7】

前記有用な試薬が潜在的な治療組成物である、請求項 7 4 の方法。

30

【請求項 7 8】

(a) 第 1 のエピトープ結合剤が、第 1 の標識と第 1 シグナリングオリゴが結合した第 1 のアプタマーであり、(b) 第 2 のエピトープ結合剤が、第 2 の標識と第 1 のシグナリングオリゴに相補的な第 2 シグナリングオリゴが結合した第 2 のアプタマーであり、(c) 検出方法が蛍光検出法であり、(d) 第 1 のアプタマーがポリペプチドに結合するとき、また第 2 のアプタマーとポリペプチドが結合した時、(e) 第 1 のシグナリングオリゴと第 2 のシグナリングオリゴが互いに結合し、(f) 第 1 の標識が第 2 の標識に接近して蛍光の変化が起こる、請求項 7 4 の方法。

【請求項 7 9】

有用な試薬が第 1 のエピトープと第 2 のエピトープとを含むポリペプチドである、請求項 7 8 の方法。

40

【請求項 8 0】

被分析物に結合できるポリペプチドにサンプルを接触させるステップをさらに含み、有用な試薬が被分析物である、請求項 7 8 の方法。

【請求項 8 1】

有用な試薬は潜在的な治療組成物である、請求項 7 8 の方法。

【請求項 8 2】

請求項 4 2 乃至 5 4 のいずれか一項の二価アプタマー構築物を含む薬理学的組成物。

【請求項 8 3】

50

サンプル中の分子間相互作用を促進する方法であって、請求項 4 2 乃至 5 4 のいずれか一項の二価アプタマーをサンプルに投与するステップを含み、第 1 のエピトープと第 2 のエピトープは異なる分子上にあり、第 1 のエピトープと第 2 のエピトープは接近して分子間相互作用を行う、サンプル中の分子間相互作用を促進する方法。

【請求項 8 4】

サンプルが細胞、組織、脳脊髄液、血液、インビトロ反応混合液、および環境システムからなる群から選択される請求項 8 3 の方法。

【請求項 8 5】

サンプル中のポリペプチドを検出する方法であって、該方法は

(a) 第 1 の分子認識構築物と第 2 の分子認識構築物にサンプルを接触させるステップと、
(b) 検出方法を用いて第 1 の分子認識構築物、第 2 の分子認識構築物、およびポリペプチドの結合を検出するステップと

を含み、

(c) 第 1 の分子認識構築物はポリペプチドの第 1 のエピトープと結合でき、第 2 の分子認識構築物はポリペプチドの第 2 のエピトープと結合でき、

(d) 第 1 の分子認識構築物は (i) 第 1 のエピトープに結合できる第 1 のエピトープ結合剤と、(i i) 第 1 のシグナリングオリゴと、(i i i) 第 1 の標識とを含み、

(e) 第 2 の分子認識構築物は (i v) 第 2 のエピトープに結合できる第 2 のエピトープ結合剤と、(v) 第 1 のシグナリングオリゴに相補的な第 2 のシグナリングオリゴと、(v i) 第 2 の標識とを含む、

サンプル中のポリペプチドを検出する方法。

【請求項 8 6】

第 1 のエピトープ結合剤がアプタマーである請求項 8 5 の方法。

【請求項 8 7】

第 2 のエピトープ結合剤がアプタマーである請求項 8 6 の方法。

【請求項 8 8】

第 2 のエピトープ結合剤が抗体である請求項 8 6 の方法。

【請求項 8 9】

第 2 のエピトープ結合剤がポリペプチドへの結合部位を含む二本鎖ポリヌクレオチドである請求項 8 6 の方法。

【請求項 9 0】

第 1 のエピトープ結合剤が抗体である請求項 8 5 の方法。

【請求項 9 1】

第 2 のエピトープ結合剤が第 2 の抗体である請求項 9 0 の方法。

【請求項 9 2】

第 2 のエピトープ結合剤がポリペプチドへの結合部位を含む二本鎖ポリヌクレオチドである、請求項 9 0 の方法。

【請求項 9 3】

第 1 のエピトープ結合剤がポリペプチドへの第 1 の結合部位を含む二本鎖ポリヌクレオチドである、請求項 8 5 の方法。

【請求項 9 4】

第 2 のエピトープ結合剤がポリペプチドへの第 2 の結合部位を含む二本鎖ポリヌクレオチドである、請求項 9 3 の方法。

【請求項 9 5】

検出方法が、プラズモン共鳴、蛍光共鳴エネルギー移動 (F R E T)、蛍光相互相関分光 (F C C S)、蛍光消光、蛍光偏光、着色物産生、化学発光、シンチレーション、生物発光、および発光共鳴エネルギー移動からなる群から選択される、請求項 8 5 乃至 9 4 のいずれか一項の方法。

【請求項 9 6】

検出方法が発光共鳴エネルギー移動である請求項 9 5 の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 97】

ポリペプチドがトロニンあるいは cAMP 反応エレメント結合タンパク質 (CPR) である、請求項 85 乃至 96 のいずれか一項の方法。

【請求項 98】

サンプルが、血液、尿、腹水、細胞サンプル、および組織サンプルからなる群より選択される、請求項 85 乃至 97 のいずれか一項の方法。

【請求項 99】

第 1 の分子認識構築物と第 2 の分子認識構築物とを含む分子ビーコンであって、

(a) 第 1 の分子認識構築物はポリペプチドの第 1 のエピトープと結合でき、また第 2 の分子認識構築物はポリペプチドの第 2 のエピトープと結合することができ、

(b) 第 1 の分子認識構築物は (i) 第 1 のエピトープに結合できる第 1 のエピトープ結合剤と、(ii) 第 1 のシグナリングオリゴと (iii) 第 1 の標識とを含み、

(c) 第 2 の分子認識構築物は (iv) 第 2 のエピトープに結合できる第 2 のエピトープ結合剤と、(v) 第 1 のシグナリングオリゴに相補的な第 2 のシグナリングオリゴと、(vi) 第 2 の標識とを含む、

分子ビーコン。

【請求項 100】

第 1 のエピトープ結合剤がアプタマーである、請求項 99 の分子ビーコン。

【請求項 101】

第 2 のエピトープ結合剤がアプタマーである、請求項 100 の方法。

【請求項 102】

第 2 のエピトープ結合剤が抗体である請求項 100 の方法。

【請求項 103】

第 2 のエピトープ結合剤がポリペプチドへの結合部位を包む二本鎖ポリヌクレオチドである、請求項 100 の方法。

【請求項 104】

第 1 のエピトープ結合剤が抗体である、請求項 99 の方法。

【請求項 105】

第 2 のエピトープ結合剤が第 2 の抗体である、請求項 104 の方法。

【請求項 106】

第 2 のエピトープの結合剤がポリペプチドへの結合部位を包む二本鎖ポリヌクレオチドである、請求項 104 の方法。

【請求項 107】

第 1 のエピトープ結合剤がポリペプチドへの第 1 の結合部位を含む二本鎖ポリヌクレオチドである、請求項 99 の方法。

【請求項 108】

第 2 のエピトープ結合剤がポリペプチドへの第 2 の結合部位を包む二本鎖ポリヌクレオチドである、請求項 107 の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

親出願に関する記載

この特許出願は 2003 年 12 月 12 日に出願された米国仮出願 (Provisional Patent Application) 番号 60/529,076 からの優先権を主張する。

【0002】

政府援助

この研究業務は保健福祉省 / 国立衛生研究所に支援されており (補助番号 CA94356)、アメリカ政府は本発明に関して一定の権利を有する。

【0003】

配列リスト

紙にコピーした配列リストと、同じ配列のコンピュータで読み取り可能な形式とは下に添付され、本明細書に参照により取り込まれる。37 C.F.R. 1.821 (f) に従い、コンピュータで読み取り可能な形式で記録された情報は記載された配列リストと同一のものである。

バックグラウンド技術

【0004】

発明の分野

本発明は、キット (kit)、分子ビーコン (molecular beacon)、および任意のポリペプチド、被分析物 (analyte)、大分子複合体 (macromolecular complex) あるいはその組み合わせ方法を検出する方法に関するものである。本発明はバイオメディカル研究ツールと診断キットに関連している。

10

【0005】

バックグラウンド技術

我々の環境、食物、水、生物サンプル (血液、脳脊髄液、尿など) の中の特定分子の検出、同定、および定量は、非常に複雑、高価、かつ時間もかかるものでありえる。これらの方法にはガスクロマトグラフィー、質量分析、DNA 配列決定、免疫分析、細胞を基礎とする分析、生物分子プロットおよびゲル、および無数の多段化学および物理分析法が含まれる。

20

【0006】

生物あるいは環境サンプル中の特定タンパク質のレベルを検出および測定する簡便な方法が強く求められ続けている。タンパク質を検出しそのレベルを測定することは生物医学研究における最も基礎的かつよく行われる方法の一つである。抗体ベースのタンパク質検出方法は研究および医学的診断において非常に有用であるが、迅速かつハイ・スループット (high-throughput) な並列蛋白質検出 (parallel protein detection) によく適合するものではない。

【0007】

以前に、本発明者は、タンパク質の特定のサブクラス (つまり配列特異的 DNA 結合タンパク質) を検出するための蛍光センサー法を開発した (Heyduk, T.; Heyduk, E. Nature Biotechnology 2002, 20, 171-176; Heyduk, E.; Knoll, E.; Heyduk, T. Analyt. Biochem. 2003, 316, 1-10; 米国特許番号 6,544,746 および係属中の特許出願番号 10/062,064、PCT/US02/24822 と PCT/US03/02157、これらは参照により本明細書に取り込まれる)。この方法はタンパク質の DNA 結合部位を 2 つの DNA 半部位 (half-sites) に分けることに基づいている。生じる半部位の各々は、2 つの DNA 半部位が完全に機能的なタンパク結合部位を再構成するように結合するいくらかの傾向を導入するように設計された長さの、短い相補的一本鎖部位を含んでいる。この傾向は、タンパク質が存在しない時は DNA 半部位のほんの一部のみが結合するように、低く設計されている。タンパク質が反応混合液の中に存在する時、それは完全に機能的な結合部位にのみ結合する。この選択的結合は、DNA 半部位の結合を促進し、このタンパク質依存的な結合は、目標タンパク質の存在を知らせる分光的シグナルを生み出すのに用いられる。単語「分子ビーコン」当業界で前記検出を述べるのに用いられ、選択的認識と、認識を知らせるシグナルの発生が検出の際に同時に起こることを強調している。いくつかのタンパク質について、DNA 結合タンパク質用分子ビーコンが開発されており、その一般的適用可能性について示している (Heyduk, T.; Heyduk, E. Nature Biotechnology 2002, 20, 171-176、参照により本明細書に取り込まれる)。その物理的作用機構は確立されており、DNA 結合タンパク質に結合するリガンドの存在を検出するアッセイ用のプラットフォーム

30

40

50

としても用いられている (Heyduk、E.; Knoll、E.; Heyduk、T.; *Analyt. Biochem.* 2003、316、1-10; Knoll、E.; Hetduk、T. *Analyt. Chem.* 2004、76、1156-1164; Heyduk、E.; Fei、Y.; Heyduk、T. *Combinatorial Chemistry and High-throughput Screening* 2003、6、183-194、参照により本明細書に取り込まれる)。このアッセイはすでにかなり有用だが、このアッセイは天然のDNA結合活性を示すタンパク質に限定されている。

【0008】

分子ビーコンとしてのアプタマー

10

タンパク質検出のための簡便で、特異的で高感度のハイ・スループット (high-throughput) アッセイの開発は、依然として非常に重要な目標である。このようなアッセイは研究、創薬および医学診断に応用できる。これまでのところ、目標のタンパク質を認識する抗体が、大部分のタンパク質検出アッセイの最重要物である。インビトロ (in vitro) で、一群のランダムな配列の核酸の中から目標タンパク質を認識するアプタマーを選択する方法は、最初の本当の抗体の替代物を提供した。アプタマーの潜在的な利点の一つは、オリゴヌクレオチドを増やし合成するのが容易であるということである。さらに、例えば蛍光プローブなどのレポーター基を含むアプタマーを設計するのに標準的な核酸化学操作を用いる。このため、様々なフォーマットのタンパク質の検出アッセイにおいてアプタマーを使用することについてかなりの関心があることには疑いがない。最も有望な路線は、目標タンパクの認識と該タンパクの存在を知らせる光学的シグナルの産生を組み合わせるアプタマーを基礎としたセンサーの開発である。

20

【0009】

いくつかの発行された報告では、特定のタンパク質と結合した際に蛍光シグナルを発するアプタマーを基礎とした「分子ビーコン」の巧妙な設計について述べられている。これらの設計は全て、蛍光シグナルの変化を生み出す、目標タンパク質によって誘導されるアプタマー中の構造遷移に依存している。YamamotoとKumer (*Genes to Cells* 2000、5、389-396) は、HIVのTatタンパク質認識の際に蛍光シグナルが増強した分子ビーコンアプタマーを記載している。蛍光シグナルは、Tatタンパク質に誘導されるアプタマーのヘアピン構造と二重らせん構造の間の遷移に起因する、蛍光団-消光剤間の近さの変化によって生み出される。Hamaguchiらは (*Analyt. Biochem.* 2001、294、126-131) トロンピン認識の際に蛍光を増強させた分子ビーコンアプタマーを記載している。目標タンパク質が存在しない時、このビーコンは蛍光団と消光団を近接させるようにステム-ループ構造を形成するように設計されている。該タンパク質が存在する時、ビーコンはリガンド結合構造をとられ、その結果蛍光団と消光剤の間の距離が開き、蛍光シグナルは増強される。Liらは (*Biochem. Biophysics Res. Commun.* 2002、292、31-40) は、目標タンパク質の存在時に緩いらせんから稠密な単分子四重らせんへの遷移を行う分子ビーコンアプタマーを記載している。このタンパク質に誘導されるアプタマー構造の変化は、アプタマーの末端に結合した蛍光プローブの間の近さの変化を生じ、蛍光シグナルの変化を生み出す。類似の手法がPDGFを認識する分子ビーコンアプタマーを設計するためにFangら (*ChemBioChem.* 2003、4、829-834) に用いられた。これらの例は、タンパク質の存在を光学的シグナルに変換できるセンサーを設計するためのアプタマーの大きな可能性を示している。

30

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本願発明者は、先のセンサーの設計を成功裏に押し広め、これらセンサーをタンパク質および天然の核酸結合活性を持たないその他の被分析物への配列特異的ヌクレオチド結

50

合の検出に先に適用されたセンサーの設計を一般化することに成功し、これらセンサーの応用範囲を拡大した。簡単に言えば、配列特異的なDNA結合タンパク質を認識する天然のDNA配列を、ランダム配列のプールからインビトロ選択によって得られた、特定の目標タンパク質に結合する核酸によって置き換えた。インビトロSELEX（指数的濃縮によるリガンドの体系的進化）の手法を使用して天然のDNA結合活性を欠くタンパク質に特異的に結合できる核酸（DNAまたはRNA）アプタマーを生み出せることが良く確立された（Tuerk、C.；Gold、L. Science 1990、249、505-510；Gold、L.；Polisky、B.；Uhlenbeck、O.；Yarus、M. Ann. Rev. Biochem. 1995、64、763-797；Wilson、D.S.；Szostak、J.W. Ann. Rev. Biochem. 1999、68、611-647）。SELEXは、結合、非結合配列の洗い落とし、および目標結合配列のPCR増幅のサイクルによってランダムDNA（またはRNA）配列プールから特定の目標に結合する核酸配列を選択することを伴う。様々なタンパク質およびその他の目標分子に特異的に結合するアプタマーを成功裏に選択した多数の例（Turek 1990、Polisky 1995 and Wilson 1999）は、数多くの天然タンパク質に対するアプタマーを作り出すことが可能であることを強く示している。

【0011】

発明者は係属中の特許出願10/062、064（参照により本明細書に取り込まれる）に記載された近接性を基礎としたアッセイの応用を、核酸結合因子、そのリガンドおよび共調節因子を超えて、任意のポリペプチド（プリオンその他の誤って折り畳まれたタンパク質を含む）被分析物、小分子リガンドあるいは大分子複合体をも含むようにすることをさらに可能とする組成物と方法を開発した。本発明は、各アプタマーの末端に短い（好ましくは約5～7ヌクレオチドの）相補的一本鎖ポリヌクレオチド配列（シグナリングオリゴと呼ばれる）を含む一群の標識アプタマーの使用に関する。アプタマー群中の各アプタマーは、ポリペプチドあるいは大分子複合体の特異的かつ異なるエピトープに結合する；つまりアプタマー群のうち第1のアプタマーはポリペプチドあるいは大分子複合体の第1のエピトープに結合し、アプタマー群のうち第2のアプタマーはこのポリペプチドあるいは大分子複合体の第2のエピトープと結合する。ポリペプチドあるいは大分子複合体が存在する時、各アプタマーの末端の短い相補的な一本鎖ポリヌクレオチド配列が互いに安定に結合するように、第1のアプタマーは第1のエピトープと結合し、第2のアプタマーは第2のエピトープと結合する、第1のアプタマー末端の短い一本鎖ポリヌクレオチド配列が、第2のアプタマー末端の短い一本鎖ポリヌクレオチド配列に安定に結合する時、第1のアプタマー上の標識は第2のアプタマー上の標識に接近し、測定可能なシグナルを生み出す。言い換えれば、任意のポリペプチドあるいは大分子複合体に結合する2つ以上の新規な核酸半部位を作製し、任意のポリペプチドあるいは大分子複合体を検出するための近接性を基礎とするアッセイに用いることができる。アプタマー群は柔軟なリンカーによって結合されて二価アプタマー構築物を形成してもよい。

【0012】

本発明の一つの実施形態は、ポリペプチドあるいは生体大分子複合体の第1のエピトープと第2のエピトープにそれぞれ結合する第1のアプタマーと第2のアプタマーを製造することを含む方法である。アプタマーは、指数的濃縮によるリガンドの体系的進化（a.k.a. SELEX；Klug、S.；Famulok、M.、All you wanted to know about SELEX. Mol. Biol. Reports 1994、20、97-107、参照により本明細書に取り込まれる）などのインビトロ選択を使ってアプタマーを作ることができる。あるいは、一つ以上の既存のアプタマーあるいは天然の同族核酸を、末端に標識と短い一本鎖ポリヌクレオチド配列を含むように変化して、ポリペプチド、被分析物、あるいは大分子複合体を検出するのに用いることができる。

【0013】

本発明の別の実施形態では本願は、ポリペプチドあるいは大分子複合体の第1のエピトープを認識し第1のシグナリングオリゴを含む第1のアプタマー構築物と、ポリペプチドあるいは大分子複合体の第1のエピトープを認識し第1のシグナリングオリゴを含む第2のアプタマー構築物とを含む二価アプタマーに関係し、ここで第1のアプタマー構築物と第2のアプタマー構築物は柔軟なリンカーによって互いに結合されている。好ましい実施形態では、第1のアプタマー構築物は第1の標識を含み、第2のアプタマー構築物は検出のための第2の標識を含む。

【0014】

この二価アプタマー構築物は、分子と大分子複合体の検出にとどまらず非常に多くの応用範囲で有用であると想定される。この二価アプタマーは抗体と同様に用いることができる。例えば、分子と複合体の検出、分子と複合体の精製、エピトープと抗原のプロッキング、生物内の免疫反応（先天性および特異的の両者）の促進、疾病の治療および対象への受動免疫の付与である。好ましい対象は人、家畜、あるいはペットである。

10

【0015】

二価アプタマーは細胞あるいは組織中の分子の相互作用の阻害、あるいは細胞や組織中分子の相互作用を促進することで患者に所望の治療結果をもたらす治療組成物として用いることができることがさらに想定される。好ましい対象は人、家畜、あるいはペットである。

【0016】

アプタマー構築物あるいは二価アプタマー構築物は、医学あるいは獣医学の診断、あるいは安全で有効な有力な薬物製品を同定するのを助ける薬学的スクリーニングにも使用できることが想定される。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

別途定義されない限り、本明細書中の技術的および科学的用語は全て、本発明の属する分野の当業者が共通して理解するのと同じ意味を有する。本明細書中に記載されるのと同様あるいは等価な任意の方法あるいは材料が本発明の実施あるいは試験において用いられるが、好ましい方法と材料を記載する。本発明のために、以下の用語を下記のように定義する。

「アプタマー」の語は生化学的活性、分子認識または結合属性に関して有用な生物学的活性を有する任意のポリヌクレオチド、一般にRNAまたはDNAを指している。通常、アプタマーはポリペプチドの特定のエピトープ（領域）においてポリペプチドに結合する、あるいは酵素活性を有するなどの分子活性を有する。任意のポリペプチドに結合する際に特異的であるアプタマーがインビトロ進化で合成および/または同定できることが一般に受け入れられている。

30

「天然の同族結合エレメント配列」の語は核酸結合因子の結合部位として働くヌクレオチドの配列を指している。好ましくは天然の同族結合エレメント配列は天然のヌクレオチド結合因子によって認識される天然の配列である。

「分子認識構築物」の語は「エピトープ結合剤」を含み、また「分子ビーコン」として働くことができる構築物を指す。好ましくは分子認識構築物は「シグナリングオリゴ」と「標識」をも含む。第一の分子認識構築物と第二の分子認識構築物は「リンカー」で連結されて「二価分子認識構築物」を形成してもよい。「分子ビーコン」は検出方法として測定可能な読み出しシステムを用いる、被分析物、ポリペプチドその他の生体分子、生体分子を含む大分子複合体、あるいは生物学的共調節因子（biological coregulator）を検出し定量化するための任意の化学を基礎としたシステムを指す。分子認識構築物あるいは二価分子認識構築物は、よりよい特異性および感度を有する特定のタイプの分子ビーコンである。

40

「アプタマー構築物」の語は、アプタマーあるいは天然の同族結合エレメント配列を含み、「分子ビーコン」として働くことができる構築物を指す。好ましくはアプタマー構築物は「シグナリングオリゴ」と「標識」も含む。第1のアプタマー構築物と第2のアプタマ

50

ー構築物は「リンカー」で連結され、「二価アプタマー構築物」を形成してもよい。アプタマー構築物は、分子認識構築物の部分集合である。アプタマー構築物あるいは二価アプタマー構築物もよりよい特異性および感度を有する特定の形式の分子ビーコンである。

「抗体」の語は一般に、抗原のエピトープを認識し、結合できるポリペプチドあるいはタンパク質を意味する。ここで抗体は当業界で理解されるような完全な抗体（つまり2つの重鎖と2つの軽鎖からなる）でもよいし、あるいは抗体は、F a b断片や超可変領域を含むペプチドのような完全抗体の断片でもよい。

「エピトープ結合剤」の語は、抗原、ポリペプチド、タンパク質、あるいは大分子複合体の特定のエピトープに結合できる任意の物質を指す。エピトープ結合剤の非限定的な例はリガンドとリガンドの断片、レセプターとレセプターの断片、抗体と抗体の断片、アプタマーその他のポリヌクレオチド、補酵素その他の共同調節因子、およびアロステリック分子とイオンを含む。好ましいエピトープ結合剤は、アプタマー、天然同族結合エレメント配列、抗体およびその断片が含まれる。

「エピトープ」の語は一般に、抗原、ハプテン、分子、ポリマー、プリオン、ビリオン、細胞、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、あるいは大分子複合体の特定の領域を指す。エピトープはより大きなポリペプチドに由来する小ペプチドからなっているてもよい。エピトープは、ポリペプチド、タンパク質、あるいはいくつかの不連続なペプチド領域あるいはアミノ酸基を含む大分子複合体の二次元あるいは三次元表面、あるいは表面特徴でありうる。

「シグナリングオリゴ」の語は、短い（一般に2から15ヌクレオチド長、好ましくは5から7ヌクレオチド長）一本鎖ポリヌクレオチドを指す。好ましくは第1のシグナリングオリゴは第2のシグナリングオリゴに相補的である。好ましくは、第1のシグナリングオリゴと第2のシグナリングオリゴは、第3の薬剤の媒介によって第1のシグナリングオリゴと第2のシグナリングオリゴが接近しない限りは水素結合による安定な結合を形成できない。

本明細書において「リンカー」あるいは「リンカー分子」の語はアプタマーあるいはアプタマー構築物に結合された任意のポリマーを指す。結合は共有結合であるかあるいは非共有結合である。リンカーはアミノ酸あるいはヌクレオチドのポリマーでもよいことが想定される。好ましいリンカー分子は柔軟で、核酸結合因子が核酸成分セットに結合することを妨害しない。好ましいリンカーは、12個の（スパーサー18-フォスフォルアミデート）（Glen Research, Sterling, VA）部分からなる。別の好ましいリンカーは、ポリ-dTである。

「インビトロ進化」の語は一般に、生体分子、特にペプチドあるいはポリペプチド、に結合するアプタマーを選択する任意の方法を意味する。インビトロ進化はまた「インビトロ選択」、「S E L E X」あるいは「指數的濃縮によるリガンドの体系的進化」としても知られている。簡単に言えば、インビトロ進化是一群のランダムポリペプチドを、生体分子と結合する、あるいは選択可能な特定の活性を有する特定のポリペプチドについてスクリーニングすることを伴う。一般的に、前記特定のポリペプチド（つまりアプタマー）はランダムポリヌクレオチドのプールのごくわずかな割合でしかなく、そのためアプタマー増幅過程（通常はポリメラーゼ連鎖反応）が潜在的に有用なアプタマーの割合を増やすために用いられる。選択と増幅を連続して繰り返すことにより、特定の有用なアプタマーの量が指數的に増加する。インビトロ進化は、Famulok, M. ; Szostak, J. W., In Vitro Selection of Specific Ligand Binding Nucleic Acids, Angew. Chem. 1992, 104, 1001. (Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1992, 31, 979-988.); Famulok, M. ; Szostak, J. W., Selection of Functional RNA and DNA Molecules from Randomized Sequences, Nucleic Acids and Molecular Biology, Vol 7, F. Eckstein, D. M. J. Lil

10

20

30

40

50

ley、Eds.、14 Springer Verlag、Berlin、1993、pp. 271; Klug、S.; Famulok、M.、All you wanted to know about SELEX; Mol. Biol. Reports 1994、20、97-107; and Burgstaller、P.; Famulok、M.、Synthetic ribozymes and the first deoxyribozyme; Angew. Chem. 1995、107、1303-1306 (Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995、34、1189-1192)、(これらは参照により本明細書に取り込まれる)に記載されている。

本発明を実施する際に、インビトロ進化は任意の与えられたポリペプチドあるいは大分子複合体上の異なるエピトープと結合する複数のアプタマーを作製するために用いられる。アプタマーは興味のあるエピトープを含む「基質」に対して選択される。ここで「基質」は、アプタマーが結合できるエピトープを含みアプタマーの選択の上で有用な任意の分子の実体である。

本明細書中で「標識」の語は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アプタマー、核酸成分、その他の基質材料に結合でき、検出法によって検出できる物質を指す。本発明に適用可能な標識の非限定的な例は、これに限定されないが、発光分子、化学発光分子、蛍光色素、蛍光消光剤、有色分子、放射性同位元素、シンチラント、質量標識(質量変化から検出)、ピオチン、アビジン、ストレプトアビジン、Aタンパク、Gタンパク、抗体あるいは抗体断片、Grb2、ポリヒスチジン、Ni²⁺、フラッグタグ(Flag tag)、mycタグ、重金属、酵素、アルカリンホスファターゼ、ペロキシダーゼ、ルシフェラーゼ、電子ドナー/アクセプター、アクリジニウム・エステル類、および発色基質を含む。当業者は上には挙げられていないが本発明の操作で用いることの出来る他の有用な標識を容易に認識するであろう。

本明細書中で「検出方法」は、分子相互作用を検出する、当業界で知られている任意の方法を意味する。本明細書中で「検出可能なシグナル」は本質的には「検出方法」と同様である。検出方法は、質量変化の検出(例: プラスミン共振)、蛍光変化(例: FRET、FCCS、蛍光の消滅あるいは増強、蛍光偏光)、酵素活性(例: 基質の枯渇あるいは生成物の形成(例えば検出可能な色素(アルカリ性ホスファターゼのNBT-BCIPシステムは一例である))、化学発光あるいはシンチレーションの変化(例: シンチレーション近接アッセイ、発光共鳴エネルギー移動、生物発光共鳴エネルギー移動など)を含む。

【0018】

本明細書中で「被分析物」は一般に、リガンド、化学構造部分、化合物、イオン、塩類、金属、酵素、細胞内シグナル伝達経路のセカンド・メッセンジャー、薬物、ナノ粒子、環境的汚染物質、毒素、脂肪酸、ステロイド、ホルモン、炭水化物、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質その他アミノ酸ポリマー、微生物、ウイルス、あるいはアプタマーへの結合のためにエピトープを形成するかエピトープの利用可能性を変化させるようにポリペプチド、タンパク質、あるいは大分子複合体に結合できる任意の他の薬剤、を指す。

【0019】

本明細書中で「大分子複合体」の語は、大分子を含む任意の組成物を指す。好ましくは、これらは互いに会合した一つ以上の大分子(ポリペプチド、脂質、炭水化物、核酸、天然あるいは人工ポリマーなど)の複合体である。会合は大分子複合体の成分間での共有のあるいは非共有の相互作用を伴っていても良い。大分子複合体は比較的単純(ポリペプチドに結合したリガンドなど)であってもよいし、比較的複雑(脂質ラフト)でもよく、非常に複雑(細胞表面、ウイルス、細菌、孢子など)でもよい。大分子複合体は本質的に生物性でも非生物性でもよい。

【0020】

一つの実施形態では、本発明は、サンプルを第1の分子認識構築物と第2の分子認識構築物とに接触させるステップと、検出方法によって第1と第2の分子認識構築物の間の安

10

20

30

40

50

定な相互作用を検出するステップとを含む、サンプル中のポリペプチドを検出する方法に関する。いくつかの有用な分子認識構築物の組み合わせ（センサー）のバリエーションが本発明者によって想定され、図 26 中に図示されている。パネル A は、タンパク質の 2 つの異なるエピトープを認識する 2 つのアプタマーを含むセンサーのバリエーションを示している。パネル B は、DNA 結合タンパクへの結合部位を含む二本鎖ポリヌクレオチドとタンパクの異なるエピトープを認識するアプタマーを含むセンサーのバリエーションを示す。パネル C は、タンパク質の異なるエピトープを認識する抗体およびアプタマーを含むセンサーのバリエーションを示している。パネル D は、DNA 結合タンパクへの結合部位を含む二本鎖ポリヌクレオチドとタンパク質の異なるエピトープを認識する抗体とを含むセンサーのバリエーションを示している。パネル E は、タンパク質の異なる 2 つのエピトープを認識する 2 つの抗体を含むセンサーのバリエーションを示している。パネル F は、タンパク質の異なる 2 つのエピトープを認識する 2 つの二本鎖ポリヌクレオチド断片を含むセンサーのバリエーションを示している。パネル G は、別の一本鎖ポリヌクレオチドの 2 つの異なる配列エレメントを認識する 2 つの一本鎖ポリヌクレオチドエレメントを含むセンサーのバリエーションを示している。パネル H は、第 1 のシグナリングオリゴヌクレオチドで標識された二本鎖ポリヌクレオチド断片（タンパク質の結合部位を含む）と第 2 のシグナリングオリゴヌクレオチドで標識されたタンパク質を用いる、タンパク質 - ポリヌクレオチド複合体の形成の直接検出を可能にするセンサーのバリエーションを示している。に接続したもの。パネル I は、それぞれシグナリングオリゴヌクレオチドで標識された 2 つの対応するタンパク質を用いる、タンパク質 - タンパク質複合体の形成の直接検出を可能にするセンサーのバリエーションを示している。

10

20

【0021】

好ましい実施形態では、第 1 と第 2 の分子認識構築物はアプタマー構築物であり、第 1 アプタマー構築物はポリペプチド上のエピトープ（つまり第 1 のエピトープ）を認識するアプタマーあるいは天然の核酸配列を含み、第 2 のアプタマー構築物は同じポリペプチド上の別のエピトープ（つまり第 2 のエピトープ）を認識するアプタマーあるいは天然の核酸配列を含む（図 26、A と B の部分）。好ましくは第 1 と第 2 のアプタマー構築物はそれぞれ短い一本鎖オリゴヌクレオチド配列（シグナリングオリゴ）を含んでおり、第 1 のアプタマー構築物の短い一本鎖オリゴヌクレオチド（つまり第一シグナリングオリゴ）は第 2 のアプタマー構築物の短い一本鎖オリゴヌクレオチド（つまり第二シグナリングオリゴ）に相補的である。理論に拘束されることを意図するものではないが、2 つのアプタマー構築物を一緒にすることができるポリペプチドが存在しない時に互いに安定な相互作用を形成出来ないように、2 つのシグナリングオリゴの長さは短くすべきである。好ましくはシグナリングオリゴは、少なくとも 5 ヌクレオチド長であり、7 ヌクレオチド長を超えない。

30

【0022】

好ましくは、第 1 のアプタマー構築物は第 1 の標識を含み、第 2 のアプタマー構築物は第 2 の標識を含み、第 1 と第 2 のエピトープを含むポリペプチドの存在下で、第 1 と第 2 の標識は相互作用してサンプル中のポリペプチドの存在や量のシグナルとなる検出可能なシグナルを生み出す。好ましくは第 1 の標識は蛍光ドナーで、第 2 の標識は蛍光受容体で、検出方法は蛍光シグナル出力の変化を検出である。

40

【0023】

所望により、第 1 のアプタマー構築物を表面に固定してもよく、第 2 のアプタマー構築物を表面に固定してもよく、あるいは両者を表面に固定してもよい〔表面はマイクロタイタプレート、試験管、ビーズ、樹脂、その他のポリマーなどでもよい〕。好ましい実施形態では、第 1 のアプタマー構築物と第 2 のアプタマー構築物を柔軟なリンカーで連結して二価アプタマーを形成してもよい。好ましい柔軟なリンカーには、スパーサー 18 ポリマーおよびデオキシチミジン（dT）ポリマーが含まれる。

【0024】

別の実施形態では、第 1 と第 2 のアプタマーはサンプル中の大分子複合体の検出に使用

50

されうる。この実施形態では、前記のように、第1のエピトープは1つのポリペプチド上にあり、第2のエピトープは別のポリペプチド上にあり、大分子複合体が形成される時、前記2つのポリペプチドは接近し、その結果第1のアプタマー構築物と第2のアプタマー構築物が安定した相互作用を形成して検出可能なシグナルを生み出す。また、前記のように、第1と第2のアプタマー構築物は表面に固定されてもよく、互いに柔軟なリンカーで固定されていてもよい。

【0025】

別の実施形態では、第1と第2のアプタマーはサンプル中の被分析物の検出に使用されうる。この実施形態では、分析物がポリペプチドあるいは大分子複合体に結合する時、第1あるいは第2のエピトープが作られあるいは利用可能になり、第1あるいは第2アプタマー構築物と結合する。このため、被分析物が、その同族ポリペプチドあるいは大分子複合体結合パートナーを含むサンプル中にある時、第1のアプタマー構築物と第2のアプタマー構築物は安定な接近状態となり、前記のように検出可能なシグナルを生み出す。また、前記のように第1と第2のアプタマーは表面上に固定されていてもよく、柔軟なリンカーによって互いに固定されていてもよい。

10

【0026】

本発明の別の実施形態では、本発明は第1と第2のアプタマー構築物を含む1セットのアプタマー構築物を作製する方法に関し、この方法は(a) (第1のエピトープを含む) 第1の基質に対して (第1のエピトープに結合できる) 第1のアプタマーを選択し、(第2のエピトープを含む) 第2の基質に対して (第2のエピトープに結合できる) 第2のアプタマーを選択するステップと、(b) 第1の標識を第1のアプタマーに付し、第2の標識を第2のアプタマーに付すステップと、(c) 第1のシグナリングオリゴを第1のアプタマーに付し、第1のシグナリングオリゴに相補的な第2のシグナリングオリゴを第2のアプタマーに付すステップと、(d) その結果(i) 第1のアプタマー構築物は第1のアプタマー、第1の標識、および第1のシグナリングオリゴを含み、および(ii) 第2のアプタマー構築物は第2のアプタマー、第2の標識、および第2のシグナリングオリゴを含むステップ、を含む。好ましくは、アプタマーはインビトロ進化法(上掲)を用いて選択される。しかし本願の実施においては天然のDNA結合エレメントも使用できる。

20

【0027】

好ましい実施形態では、第1の基質はポリペプチドで、第2の基質は第1のアプタマーに結合した前記ポリペプチドである。ここで、第2のアプタマーが第1のエピトープに結合できないように第1のアプタマーは第1のエピトープをマスクする。あるいは、(i) 第1のアプタマーおよび第1のシグナリングオリゴを含む、あるいは(ii) 第1のアプタマー、シグナリングオリゴおよび標識を含む、第1のアプタマー構築物で第1のアプタマーを置き換えてもよく、それによりシグナル検出のために最適な第2のアプタマーあるいはアプタマー構築物を選択することを可能にする第2の基質を生み出す。さらなるステップとして、前述の通り、それから第1と第2のアプタマー構築物を柔軟なリンカーで互いに連結してもよい。

30

【0028】

別の実施形態では、第1の基質は本質的に第1のエピトープからなるペプチドであり、第2の基質は本質的に第2のエピトープからなるペプチドである。よって、別の実施形態では、アプタマーの製造あるいは選択において、エピトープをマスクする必要はない。同様に、前述の通り、この方法を用いて製作される第1と第2のアプタマー構築物は柔軟なリンカーで互いに連結されてもよい。

40

【0029】

別の実施形態では、本発明は(第1のエピトープに結合できる) 第1のアプタマー、第1の標識、第1のシグナリングオリゴ、(第2のエピトープに結合できる) 第2のアプタマー、第2の標識、第2のシグナリングオリゴ、およびリンカーを含む二価のアプタマー構築物に関するものである。第1と第2のエピトープは同じポリペプチド上にあってもよく、大分子複合体の異なるポリペプチド上にあってもよく、被分析物に結合したポリペ

50

チド上にあってもよい。柔軟なリンカーは好ましくはアプタマーの働きを妨害しないポリマーである。好ましい柔軟なリンカーには、デオキシチミジンポリマー（ポリ-dT）およびスパーサー18ポリマーが含まれる。しかし、本願を実施する際に当業者は任意の数のリンカーを置換できるであろう。

【0030】

あるいは、二価アプタマー構築物は検出用の標識を有していなくてもよい。これら別の二価アプタマー構築物は抗体と同じようにして分子を検出する、分子を結合する、（カラムあるいはブルダウン形式の操作のように）分子を精製する、分子の相互作用を阻害する、分子の相互作用を促進あるいは安定させる、あるいは生物に受動免疫を付与することに用いることが想定される。二価アプタマー構築物が治療の目的にも使用できることがさらに想定される。本発明は、本発明により当業者が任意の数の分子から2つ以上の異なるエピトープを認識するアプタマーの任意の組み合わせを、二価、三価、あるいはその他の多価アプタマー構築物に構築し、それら異なる複数の分子を引っ張り合わせて効果をテストしたり所望の治療結果を生み出すことができるという点で本当に強力である。例えば、リガンドのレセプターに対する天然の結合速度論が好ましくない場合（例えば糖尿病患者中でのインスリンのインスリンレセプターへの結合）、リガンドのレセプターへの結合を促進するため二価アプタマー構築物を作ることができる

10

別の実施形態では、本発明は第1の標識が付与された第1のエピトープ結合剤、および第2の標識が付与された第2のエピトープ結合剤を含むキットに関するものである。ここで（a）第1のエピトープ結合剤と第2のエピトープの結合剤標識がそれぞれポリペプチドの第1のエピトープとポリペプチドの第2のエピトープに結合する時、（b）第1の標識と第2の標識が相互作用して、検出可能なシグナルを生み出す。好ましい実施形態では、エピトープ結合剤はアプタマー、標識、およびシグナリングオリゴを含むアプタマー構築物である。しかし、エピトープ結合剤は抗体あるいは抗体断片でもよい。このキットはポリペプチド、被分析物、あるいは大分子複合体の検出に有用であり、そのため研究あるいは医学的／獣医学的診断の用途で使用可能であろう。

20

【0031】

さらに別の実施形態では本発明は、（a）患者からサンプルを取得するステップ、（b）サンプルを第1のエピトープ結合剤および第2のエピトープ結合剤と接触させるステップ、および（c）検出方法を用いてサンプル中のポリペプチド、被分析物あるいは大分子複合体の存在を検出するステップを含む疾病を診断する方法に関する。ここでサンプル中のポリペプチド、被分析物あるいは大分子複合体の存在は患者に疾病が存在するかどうかを示す。好ましい実施形態では、（a）第1のエピトープ結合剤は、第1の標識と第1のシグナリングオリゴが付着した第1のアプタマーであり、（b）第2のエピトープ結合剤は、第2の標識と第1のシグナリングオリゴに相補的な第2シグナリングオリゴが付着した第2のアプタマーであり、（c）検出方法は蛍光検出方法で、（d）第1のアプタマーがポリペプチドに結合し第2のアプタマーがポリペプチドに結合すると、（e）第1のシグナリングオリゴと第2のシグナリングオリゴが互いに結合し、（f）第1の標識が第2の標識に接近して蛍光の変化が起こる。好ましいサンプルには血液、尿、腹水、細胞と組織サンプル／生検が含まれる。好ましい患者には人、家畜、およびペットが含まれる。

30

40

【0032】

さらに別の実施形態では、本発明はサンプルから有用な試薬をスクリーニングする方法に関し、該方法は（a）サンプルを第1のエピトープ結合剤と第2のエピトープ結合剤に接触させるステップと、（b）検出方法を用いて該サンプル中の有用な試薬の存在を検出するステップとを含む。好ましい試薬には、第1のエピトープと第2のエピトープを含むポリペプチド、ポリペプチドに結合する被分析物（この場合は、前記方法はさらにポリペプチドをスクリーニング混合液に加えるステップを含む）、および潜在的な治療組成物が含まれる。好ましい実施形態では、（a）第1のエピトープ結合剤は第1の標識と第1のシグナリングオリゴが付与された第1のアプタマーであり、（b）第2のエピトープ結合剤は、第2の標識と第1のシグナリングオリゴに相補的な第2のシグナリングオリゴが付

50

与された第2アプタマーにであり、(c)検出方法は蛍光検出法であり、(d)第1のアプタマーがポリペプチドに結合し第2のアプタマーがポリペプチドに結合する時、(e)第1のシグナリングオリゴと第2のシグナリングオリゴが互いに結合し、(f)第1の標識が第2の標識に接近して、蛍光の変化が生じる。

【0033】

本発明の好ましい実施形態が以下の実施例で記載される。請求の範囲の範囲内にある他の実施形態は、本明細書の考察および本明細書に開示された発明の実施から当業者には明らかになるであろう。本明細書および実施例は単に例示であると考えられることが意図されており、本発明の範囲と精神は実施例の後にある請求の範囲に示されている。

【実施例1】

10

【0034】

特定のアプタマー構築物を製造する一般的方法

序説

開示されるのはサンプル中のタンパク質、タンパク質複合体、あるいはタンパク質と結合する被分析物を速やかにかつ高感度で検出する方法である。この方法の基礎はタンパク質によって誘発される、タンパク質の2つの異なるエピトープを認識する2つの核酸構築物の結合に基づいている(通称「アプタマー構築物」)(図1A)。この2つのアプタマー構築物は、柔軟なリンカーによってアプタマーに結合された短く相補的なシグナリングオリゴを含んでいる。2つのアプタマーが同時に目標タンパク質に結合した時、前記相補的なヌクレオチド(通称「シグナリングオリゴ」)の相対的位置は近接し、シグナリングオリゴ間の結合が促進されて安定した二本鎖を形成する。蛍光プローブをシグナリングオリゴの末端に付与することで、タンパク質が誘発する2つのアプタマー構築物の間の結合を検出する手段が与えられる(図1A)。天然の核酸結合活性を有するタンパク質の場合、アプタマーの一方は天然のタンパク質結合部位を含む核酸配列で置き換えてもよい(図1B)。

20

【0035】

所与のタンパク質の2つの異なるエピトープについてのアプタマーの開発あるいは選択は、図1に示されたアプタマー構築物の開発の必須のステップである。アプタマーに関する利用可能な文献を検討すると、この目標を達成する少なくとも2つの可能な手法が明らかとなる。第1の手法は、タンパク質と結合した核酸アプタマーとタンパク質と結合していない核酸アプタマーの分離に異なる方法を用いる、核酸アプタマーのインビトロ選択(通称インビトロ進化)を行うことである。その原理は、これら異なる区分法では、タンパク質の異なる領域が選択的に示され、その結果タンパク質表面の異なる領域に対するアプタマーが得られる。トロンピンについて選択されたアプタマー(後述)は、そのような手法の一例である。

30

【0036】

アガロースビーズ上に固定されたトロンピンを基質として用いた、第1のアプタマーのインビトロ選択の結果、ヘパリンエクソサイト(exosite)上でトロンピンに結合するアプタマーが得られた。区分法としてのニトロセルロースに結合されたトロンピン-第1のアプタマー複合体を基質として用いたさらなるインビトロ選択の結果、フィブリノゲンエクソサイトでトロンピンに結合する第2のアプタマーが得られた。

40

【0037】

有用ではあるものの、この区分手法は理知的な設計というよりは、異なるエピトープの偶然による選択に依存するものである。第2の手法は目標タンパク質分子の選択された領域に対応するペプチドを基質として用いて、アプタマーを育てあるいは選択するものである。このような戦略がアプタマー開発のために基質として用いられるペプチドが由来する完全なタンパク質を認識できるアプタマーを開発するのに使用可能であることを示す証拠が当業界には存在する。さらに、この手法はすでに完全なタンパク質を認識する抗体を作製するのに広く用いられている。

【0038】

50

第1のアプタマーの結合部位とは異なるタンパク質のエピトープについてのアプタマーセットを作製する前記の一般的手法は、天然のDNA結合活性を有するタンパク質にも用いることができる。つまり、天然DNA結合部位とは異なる部位で基質に結合するコアプタマー (co-aptamers) を作製できる。この方法で作製されたコアプタマーは、図1に示された分子検出法で働くのに最適化されている。

結果と考察

図2は上記方法の全体的設計を表す。コアプタマーの選択は、第1のアプタマーにあらかじめ結合された基質タンパク質を用いて行われる (図2A)。あるいは、コアプタマーの選択は、その天然の核酸結合部位にあらかじめ結合したタンパク質を用いて行われる (図2B)。短い (5 - 7ヌクレオチド長) 一本鎖オリゴヌクレオチド、つまりシグナリングオリゴ (図2)、を柔軟なリンカーによって第1のアプタマーに連結させる。コアプタマーの選択に用いられるランダムDNA (あるいはRNA) の両端に、PCR増幅のため均一な配列を配置する。これらの均一な隣接配列のうちの1つは末端に第1のアプタマーのシグナリングオリゴに相補的な配列、つまりもう一つのシグナリングオリゴ (図2) を含む。このため、このようなランダムDNA (あるいはRNA) 構築物を利用したコアプタマーの作製あるいは選択は、第1のアプタマーのエピトープとは異なる部位で基質タンパク質に結合できるアプタマーへとバイアスがかかり、第1のアプタマーのシグナリングオリゴとの間で二重鎖を形成できる。選択におけるバイアスの程度は、第1のアプタマーのシグナリングオリゴおよび第2のアプタマーの相補的シグナリングオリゴの長さを変えることで調節できる。

10

20

【実施例2】

【0039】

トロンピンを検出する方法とアプタマー

序説

本発明の発明者は、以下の文献に記載されているようにDNA結合タンパク質の検出方法を開発した: Heyduk, T. and Heyduk, E. Molecular beacons for detecting DNA binding proteins. Nature Biotechnology, 20, 171-176, 2002, Heyduk, E., Knoll, E., and Heyduk, T. Molecular beacons for detecting DNA binding proteins: mechanism of action, Analyt. Biochem. 316, 1-10, 2003, および同時係属した特許出願番号09/928,385 (米国特許番号6,544,746)、10/062,064、PCT/US02/24822およびPCT/US03/02157 (これらは参照により本明細書に取り込まれる)。この方法の基礎は、DNAのタンパク質結合部位を2つの「半部位」に分けることにある。生じた「半部位」は、2つの「半部位」同士が結合して完全に機能的な同族タンパク質結合部位を含む二本鎖を再構成する蛍光を与えるように設計された長さの短い相補的な一本鎖領域を含んでいる。この傾向は、タンパク質の非存在下ではDNA半部位のほんの一部しか結合しないように、低く設計されている。タンパク質が反応混合液の中に存在する時、タンパク質は完全に機能的な結合部位を含む二本鎖にのみ結合する。この選択的な結合は、DNA半部位同士の結合を促し、またこのタンパク質依存的な相互結合は、目標タンパク質の存在を示す分光学的その他のシグナルを生み出すのに用いることができる。

30

40

【0040】

科学文献中では、「分子ビーコン」の語は、選択的な認識と報告シグナルの発生が同時に起こることを強調するために、このアッセイを記述するために用いられる。いくつかのタンパク質について、DNA結合タンパク質の分子ビーコンが開発されており、その一般的適用可能性を示している (Heyduk と Heyduk, 2002)。その物理的な作用原理は確立されており (Heyduk, Knoll, Heyduk, 2003)、DNA結合タンパク質に結合するリガンドの存在を検出するアッセイのプラット

50

ホームとしても用いられている (Heyduk, E.; Fei, Y.; Heyduk, T. *Combinatorial Chemistry and High-throughput Screening* 2003, 6, 183-194)。すでに非常に有用ではあるものの、このアッセイは天然のDNA結合活性を示すタンパク質に限定されている。

【0041】

インビトロ選択法によって、天然のDNA結合活性を持たないタンパク質に特異的に結合できる核酸 (DNAあるいはRNA) アプタマーを作製できることは十分に確立されている (Ellington, A.D., and Szostak, J.W. *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. *Nature* 346, 818-822, 1990; Tuerk, C., and Gold, L. *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*. *Science* 249, 505-510, 1990; Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. & Yarus, M. *Diversity of Oligonucleotide Function*. *Ann. Rev. Biochem.* 64, 763-797, 1995; and Wilson, D.S. & Szostak, J.W. *In vitro selection of functional nucleic acids*. *Ann. Rev. Biochem.* 68, 611-647, 1999; これらの文献は全て参照により本明細書に取り込まれる)。インビトロ選択は、結合、非結合配列の洗い出し、目標に結合した配列のPCR増幅のサイクルによって、ランダムDNA配列のプールから特定の基質目標に結合する核酸配列を選択することを伴う。種々のタンパク質その他の目標分子に特異的に結合するアプタマーを成功裏に選択できた数多くの例 (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990; Gold et alia, 1995; Wilson and Szostak, 1999) は任意のおよび全てのタンパク質に対するアプタマーを作製することが可能であることを強く示唆している。

【0042】

本実施例に記載されるのは、天然のDNA結合活性を有するタンパク質に限定されない、タンパク質検出用の核酸を基礎とする分子ビーコンの新規な概念である。トロンビンの例 (上掲) は本発明の実験的妥当性を示す。

結果と考察

図3Bは任意の目標タンパク質を認識する分子ビーコンの総体的概念を示す。この設計は、先述のおよび上掲のDNA結合タンパク質用分子ビーコン (図3A) との一般的類似性を有する。タンパク質への天然の結合部位を含むDNA二本鎖を2つの「半部位」に分割する代わりに、半部位の機能上の等価物としてタンパク質の2つの異なるエピトープを認識する2つのアプタマーを用いる。蛍光団 (第1の標識) を含んだ短いオリゴヌクレオチド (シグナリングオリゴ) と消光剤 (第2の標識) を含んだ短い前記オリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチド (シグナリングオリゴ) は、柔軟なリンカーで2つのアプタマーに連結される (図3B)。目標タンパク質が存在しない時、相補的なシグナルオリゴが結合を促進するには短かすぎるため、2つのアプタマー構築物は結合しない。目標タンパク質が存在する時、2つのアプタマーへのタンパク質の結合は2つのアプタマー構築物の間の結合を促し、第1と第2の標識が接近するために蛍光シグナルの変化が起こる。

【0043】

図3Bの概念の実験的検証を与えるため、トロンピンをモデル的非DNA結合タンパク質システムとして選択する。先に2つの実験室のがこのタンパク質の2つの異なるエピトープを背宅的に認識するDNAアプタマーを同定している (Bock, L.C.,

Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermass, E.H., and Toole, J.J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit humanthrombin, Nature 355, 564-566, 1992; and Tasset, D.M., Kubik, M.F., and Steiner, W. Oligonucleotide inhibitors of humanthrombin that bind distinct epitopes, J. Mol. Biol. 272, 688-98, 1997、参照により本明細書に取り込まれる)。そのうちの一つのアプタマー (G15D; 図4中のTHR4) はヘパリンエクソサイト (heparin exosite) で結合することが示され、もう一つのアプタマー (60-18 [29]; 図4中のTHR3) はフィブリノゲンエクソサイトで結合することが示された。トロンピンを認識するのに有用なアプタマー構築物セットを開発するための最初のステップとして、前記アプタマーが柔軟なリンカーにより共有結合した種々のアプタマー構築物を作製した (図4)。これら実験の主要な目的は、柔軟なリンカーで2つのアプタマー構築物を連結すると、本当に個々のアプタマー構築物のセットに比べてより高い親和性でトロンピンに結合することが出来る二価アプタマー構築物を作製できるかどうかを決定することである。これら実験の第2の目的は、リンカーの適切な長さの確立し、2つのアプタマーのリンカーに対する5'端と3'端の適切な向きを確立することである。

【0044】

個々のアプタマーをフルオレセインで標識し (図4中のTHR1とTHR2)、トロンピン用の様々な構築物の親和性の決定を容易にした。トロンピンとフルオレセイン標識60-18 [29] アプタマー (THR1) との間の複合体の形成は、蛍光偏光により簡単に追跡でき (図5A)、フルオレセイン標識G15Dアプタマー (THR2) の結合は蛍光強度の変化により追跡することが出来た (図5B)。どちらのアプタマーもナノモル濃度範囲でトロンピンに結合した (図5Aと図5B)。THR2の場合の結合の定量分析 (図5C) の結果、 K_d 値として6.3 nMの値が得られた。この値は以前に示唆された値 (Bock 1992、Tasset 1997) よりも幾分高い親和性であるが、それは我々が真平衡結合アッセイを用いたのに対し、以前の報告では非平衡法が用いられたことで説明ができる。THR2の結合が十倍過剰量の未標識60-18 [29] アプタマー (THR3) の存在下で行われた場合 (図5D)、僅かな、有意義ではない親和性の低下が見られたのみであった。このことからG15Dアプタマーと60-18 [29] アプタマーが実際にトロンピンの2つの異なるエピトープに独立に結合することが示された。

【0045】

つぎのステップにおいて、図4に示された各種のアプタマー構築物がトロンピンへの結合についてTHR2と競合する能力が評価された。図6はこれらの実験を行うやり方を説明したものである。トロンピンがある時とない時のTHR2の蛍光スペクトルを記録した (図6A)。トロンピンはTHR2の蛍光を約50%増強した。続いて、未標識競合アプタマー構築物が加えられた (図6B-D)。競合物の存在下でトロンピンがTHR2の蛍光に与える影響が小さければ、有効な競合物の証明となるであろう。THR3は競合物ではなく (図6B)、これは図5Cと5Dの結果と調和する。THR4 (未標識のTHR2のバリエーション) は予測されたとおり競合できる (図6C)。しかし、THR7 (二価アプタマー構築物の一つ) はTHR4よりもずっと優れた競合物であった (図6D)。溶液中にTHR7が存在するときは、トロンピンの存在するときでもTHR2の蛍光変化を検出できなかった。図7は、図4に示された構築物の全てを用いた競合実験のまとめである。

【0046】

すべての二価アプタマー構築物は、個々のアプタマーに比べてより緊密にトロンピンに結合することが示され (K_d は pM 範囲)、タンパク質上の2つの異なるエピトープを認識する2つのアプタマーを柔軟なリンカーで連結すれば高い親和性を有するトロンピンリ

ガンドを作製できるという予想を実証した。さらに、これらのデータは、2つのアプタマーを10個のスペーサー18単位を含むより長いリンカーで連結した場合に、トロンプインに対する親和性が若干向上したことも示した。これらデータは、アプタマーのリンカーに対する向きがTHR7のようであると親和性が向上することも示した（THR6とTHR7の親和性の比較）。このため、以降の全ての実験において、THR7同様の向きのアプタマーを有する構築物が用いられた。

【0047】

図8の実験の目的は、トロンプインの2つのエピトープはどちらも、二価アプタマーが高い親和性で結合するのに重要であることを証明することである。THR2と二価アプタマー構築物の間の結合の直接競合から、THR2により認識されるエピトープ（ヘパリンエクソサイト）は二価アプタマー結合のために必要であることが示された。第2のエピトープも重要であることを証明するため、我々は過剰量の未標識THR3の非存在下および存在下でのトロンプインに対する結合について、二価アプタマー構築物（THR5）がTHR2と競合する能力を比較した。我々は、もしTHR5が高い親和性の結合のために両方のトロンプインエピトープを必要とするのであれば、THR3の存在下ではTHR5がTHR2と競合する能力が低下するであろうと予測した。この予測は図8に示された実験でまさに観察されたものであった。THR5は単独でTHR2に対する非常に強力な競合物であった（図8Dと8Aを比較）。THR3は単独ではTHR2の競合物ではなかった（図8Aと8Cを比較）。THR5単独の場合に比べ、THR3が存在する時にはTHR5はより劣った競合物となった（図8Bと8Cを比較）。我々はそれゆえ、二価のアプタマー構築物のトロンプインへの高い親和性での結合には第1と第2のアプタマーのエピトープが関与すると結論付けた。

10

20

【0048】

二価アプタマー構築物 - トロンプイン複合体は未変性ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動に耐えるのに十分なほど安定している（図9A）。我々はこの属性を利用して、ゲルシフト法（EMSA）を用いてTHR7 - トロンプイン複合体の形成を追跡し、複合体の化学量論を決定した。我々はトロンプインによるTHR7の滴定を行った（どちらの分子も高濃度であった）。この条件の下で、結合は化学量論的であるはずである。実際には、形成された複合体を、トロンプインのTHR7に対する比に対してプロットすると、複合体の1:1の化学量論は示さなかった（図9B）。

30

【0049】

図10と図11に示された実験は、二価アプタマー構築物の別の設計がこれらの構築物を作製するのに用いることが出来るかどうかをテストするために行われた。我々は図10に示された二価アプタマー構築物を設計し、それが完全にDNAからなり、非DNAリンカーの使用は避けた（この場合はポリdTをリンカーとして用いた）（図10）。これによりこのような構築物の設計に更なる柔軟性が潜在的にもたらされ、アプタマー構築物を作製するコストも低減できるであろう。2つのアプタマーはDNA二本鎖により柔軟なリンカーの末端で互いに連結されている（図10）。本発明のこの側面はシグナル「ピーコン」（図3B）の設計を模倣することを意図しており、シグナル機能はアプタマーと二本鎖を連結するリンカーの末端での二本鎖DNAの形成を伴う。3種の異なる長さのポリdTリンカー（7、17、および27ヌクレオチド長）をテストして高親和性結合のための最小必要リンカー長を決定した。図11は、図10に示された構築物をトロンプインで動じて規定した結果を示す。アプタマー構築物 - トロンプイン複合体の生成をEMSAで追跡した。構築物はそれぞれトロンプインに高い親和性で結合した。しかし7ヌクレオチド長のポリdTリンカーを有する構築物は、17ヌクレオチド長あるいは27ヌクレオチド長のポリdTリンカーを有する構築物よりもトロンプインに対する親和性が有意に低かったことが明らかである。これは星印でマークされたレーンを調べると最もよく分かり、この特定のトロンプイン濃度では、17および27ヌクレオチド長のポリdTリンカー構築物のほとんど全てがトロンプインに結合したのに対し、7ヌクレオチド長のポリdT構築物のかなりの割合（約50%）は結合してないままだった。要約すると、図10と図11に述べられた

40

50

結果は、図 10 に示された別の二価アプタマー構築物設計も実行可能であり、またアプタマーと DNA 二本鎖を連結する少なくとも 17ヌクレオチド長のポリ dT リンカーは、構築物をトロンプビンに結合するのにより適していることを示している。

【0050】

図 3 から図 11 に提示された実験データは、トロンプビンおよびそれぞれトロンプビンの 2 つの異なる領域に結合する 2 つのアプタマーの場合は、図 3 B に示されたシグナリングビーコンに必要な条件は全て満たされていることの証明を与えた。図 3 から図 11 に示された実験により与えられた情報に基づいて、我々はトロンプビンシグナリングビーコンを設計し、テストした。図 12 A と図 12 B に示されたビーコンは THR 16 / THR 17 二価アプタマー構築物の誘導体である。複数のアプタマーは 17ヌクレオチド長のポリ dT リンカーで、5' 端をフルオレセインで標識された 7ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチド (シグナリングオリゴ) と 3' 端をダブシルで標識された 7ヌクレオチド長の前記オリゴヌクレオチドに相補的なヌクレオチド (シグナリングオリゴ) にそれぞれ連結された。トロンプビンを THR 8 と THR 9 の混合液に加えると、タンパク質依存的な蛍光強度の消光が見られた。ダブシル標識されたパートナー (THR 8) が存在しないと、トロンプビンを THR 9 に加えても蛍光の変化は観察されない。明らかに、これらのデータは予測されたトロンプビンに誘発される THR 8 と THR 9 の間の結合 (図 12 B に示されるとおり) が実際に観察され、機能的なトロンプビンシグナリングビーコンを得ることができたことを示している。

10

【0051】

トロンプビンに誘導される蛍光変化の程度は非常に再現性がよく特異的ではあるが、最初はそのほど大きくはなかった (約 20%)。このため、我々はトロンプビンのシグナリングビーコンのこの性質を、より柔軟なスパーサー 18 リンカーでポリ dT リンカーを置き換えることにより改善することを試みた (図 13 A および B)。我々は、ポリ dT リンカーは柔軟ではあるものの、若干の残留合成を示し (Mills, J. B., Vacano, E., and Hagerman, P. J. Flexibility of single-stranded DNA: use of gapped duplex helices to determine the persistence lengths of poly(dT) and poly(dA), J. Mol. Biol. 285, 245-57, 1999、本明細書に参照により取り込まれる) 2 つのアプタマーがトロンプビンに結合する時にシグナリング二本鎖の結合を阻害すると考えた。図 13 に示されたビーコンは図 12 に示されたビーコンとリンカーの性質のみが異なる。それ以外の点では、残りの配列は同一である。図 13 C は、トロンプビンを THR 20 と THR 21 の混合液に加えた時、タンパク質濃度依存的な蛍光消光が観察され、トロンプビンが THR 21 単独に加えられた場合は蛍光の変化は検出されないことを示す。この特定のビーコンの場合、ビーコンのトロンプビンに対する反応はずっと大きかった (蛍光における約二倍の減少)。この場合の蛍光シグナル変化の度合いは、DNA 結合タンパク質検出用分子ビーコン (前掲) について我々が先に観察したものと同程度であった。よって、我々は機能的なトロンプビンビーコンが得られ、より柔軟なスパーサー 18 リンカーを用いた設計によりポリ dT リンカーを用いた場合に比べてトロンプビン結合の際により良いシグナル変化が得られたと結論づけた。続いて、我々はこのトロンプビンビーコンの挙動をさらに特徴づけるための一連の実験を行った。

20

30

40

【0052】

図 14 に示された実験は、THR 20 とトロンプビンの存在下でフルオレセイン標識アプタマー構築物 (THR 21) が実際に安定な複合体の中に組み込まれることを確認するために行われた。図 15 に結果は示され、トロンプビン検出の感度 (図 15 A) と特異性 (図 15 B) を示している。トロンプビンの二価のアプタマー構築物への結合性は非常に緊密であり (pM K_d 's)、アッセイはフルオレセインシグナルの検出感度のみで制限されているようであるため、アプタマー構築物の濃度を変化させることでトロンプビン検出感度を調整できる。このことは図 15 A に示され、50 nM の THR 21 と 75 nM の TH

50

R20を使用した時、およそ10 nMのトロンピンを検出でき、10倍低い濃度のアプタマー構築物を使った時(5 nMのTHR21と7.5 nMのTHR20)、10倍低い濃度(およそ1 nM)のトロンピンを検出できたことを描いている。さらに低い濃度のアプタマー構築物を使用すると(500 pMのTHR21と750 pMのTHR22)、およそ100 pM程度のトロンピンを検出できた(図示なし)が、フルオレセイン標識アプタマー構築物のこの低い濃度は我々の機器の測定機器の感度の限界に近く、データの質もこれに伴って落ちてゆく。トロンピン検出の特異性を証明するために、我々はこのアプタマー構築物のトロンピンに対する反応とトリプシン(トロンピンと同じファミリーに属しトロンピンと構造上の相同性を有するプロテアーゼ)に対する反応を比較した。トリプシン添加の場合、シグナル(図15B)は検出されず、アプタマー構築物のトロンピンに対する高い特異性を示している。 10

【0053】

図16は比較実験の結果を示し、様々なアプタマー構築物の有する、あらかじめ形成されたトロンピンアプタマー構築物の複合体を分離させる能力が試験された。得られたデータは、全ての二価のアプタマー構築物は個々のエピトープ特異的のアプタマーのどれよりもはるかに効果的な競合物であることを示したが、これはフルオレセイン標識された個々のアプタマーを用いて行った同様の実験と一致する(上掲、THR2; 図6)。これら二価のアプタマー構築物の中で、THR18/THR19(27ヌクレオチド長のポリdTリンカーを有する構築物)およびTHR16/THR17(17ヌクレオチド長のポリdTリンカーを有する構築物)は最も効果的な競合物で、その次はTHR14/THR15(7ヌクレオチド長のポリdTリンカーを有する構築物)とTHR7(スパーサー18リンカーを有する)。よって、スパーサー18リンカーの有するさらなる柔軟性はアプタマー構築物シグナル変化による蛍光シグナル変化の強度の面では有益だが、より硬いポリdTリンカーを含む構築物と比較した場合トロンピンに結合する親和性の若干の低下にもつながっているようである。 20

結論

我々は、トロンピンの二つの異なるエピトープを認識する2つのアプタマーを含む二価のアプタマー構築物の基本的な物理化学的特徴を明らかにするデータを得た。この二価のアプタマー構築物のトロンピンに対する親和性は、二価構築物中の個々のアプタマー成分に比べて高い。これは、トロンピンをアプタマー「半部位」の混合液に加えることで2つの半部位の結合を誘導し、蛍光団と消光剤は接近させることで蛍光シグナルを生み出すことを示唆する。ビーコン構築物を用いた実験はこの仮説を完全に証明した。我々は多くの目標タンパクに対して同様のビーコンを開発することが可能であると予想する。我々はまた、ここに記載されたビーコンの設計は天然のDNA結合活性を有するタンパク質を検出するためのビーコン(図1A)を改善するためにも採用できることを注記する。この場合、アプタマー「半部位」のうち一つは柔軟なリンカーで相補的なシグナリングオリゴに連結された(タンパク質結合部位の配列を含む)二本鎖DNAで置き換えることができる。 30

【実施例3】

【0054】

サンプル中の被分析物の検出

材料

精製トロンピンはRay Rezaie博士(St. Louis大学)から贈られたものであった。Xa因子、プロトロンピン、オボアルブミン、牛血清アルブミン、SSB、トリプシン、および血漿はシグマ(St. Louis, MO)から購入した。HeLa細胞抽出物はプロテイン・ワン(College Park, MD)から購入した。Texas Red-NHSとSybr GreenはMolecular Probes(Eugene, OR)から購入し、Cy5-NHSとCy3-NHSはAmersham Biosciences(Piscataway, NJ)から購入、AMCA 40 50

-sulfoNHSはPierce (Rockford, IL)から購入した。その他のすべての試薬は、商業的に入手可能な分析グレードのものであった。

【0055】

この研究を通じて用いられたオリゴヌクレオチドは表1に列記されている。オリゴヌクレオチドはエール大学のKeck Oligonucleotide Synthesis Facilityから購入、あるいはIDT (Coralville, IA)から購入したものである。5'端のフルオレセインと3'端のダブシルは適当なホスホラミデートを使用して、オリゴヌクレオチド合成の間に取り込まれた。他のすべての蛍光団は、5'アミノあるいはC6アミノ-dTを適切な位置に有するオリゴヌクレオチドを色素のNHSエステルを用いて合成後修飾することで、オリゴヌクレオチド中に取り入れられた。蛍光プローブで標識されたオリゴヌクレオチドは、先に述べたとおり逆相HPLCにより精製された(Heyduk, E.; Heyduk, T. Anal. Biochem. 1997, 248, 16-227)。Heyduk, E.; Heyduk, T.; Claus, P.; Wisniewski, J. R. J. Biol. Chem. 1997, 272, 19763-19770に記載された2段階法により、ユーロピウムキレート((Eu^{3+}) DTPA-AMCA)によるオリゴヌクレオチドの修飾が行われた。すべてのオリゴヌクレオチドの濃度は、260nmにおける蛍光団吸光の寄与についての補正後の260nmのUV吸光値から計算された、。

【0056】

表1

20

構築物	配列	配列番号	特記
THR1	5' フルオレセイン AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT	配列番号：1	フルオレセインで標識された6 0-18 [29] ^a アプタマー
THR2	5' フルオレセイン GGT TGG TGT GGT TGG	配列番号：2	フルオレセインで標識されたG 15D ^b アプタマー
THR3	AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT	配列番号：3	60-18 [29] のアプタマ ー
THR4	GGT TGG TGT GGT TGG	配列番号：4	G15Dアプタマー
THR5	AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT (スパーサー18) ₅ GG TTG GTG TGG TTG G	配列番号：5	5個のスパーサー18リンカー でG15Dアプタマーに連結さ れた60-18 [29] アプタマ ー
THR6	AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT (スパーサー18) ₁₀ GGT TGG TGT GGT TGG	配列番号：6	10個のスパーサー18リンカー でG15Dアプタマーに連結 された60-18 [29] アプタ マー
THR7	GGT TGG TGT GGT TGG (スパーサー18) ₁₀ AG TCC GTG GTA GGG CAG GTT GGG GTG ACT	配列番号：7	10個のスパーサー18リンカー で60-18 [29] のアプタ マーに連結されたG15Dアプ タマー
THR20	GGT TGG TGT GGT TGG (スパーサー18) ₅ C GCA TCT 3' タグ	配列番号：16	3' 端をダブル標識された7 ヌクレオチド長の“シグナリン グ” オリゴヌクレオチドに5個の スパーサー18リンカーで連結 されたG15Dアプタマー
THR21	5' フルオレセイン AGA TGC G (スパーサー18) ₅ AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT	配列番号：17	5個のスパーサー18リンカー で60-18 [29] アプタマー に連結された、5' 端をフルオレ セインで標識された7ヌクレオ チド長の“シグナリング” オリゴ ヌクレオチド
THR27	GGT TGG TGT GGT TGG (スパーサー18) ₅ (C6 アミノ-dT) C GCA TCT	配列番号：18	アミノ-dTを(5' 端近くに) 含んだ7ヌクレオチド長のシグ ナリングオリゴヌクレオチドに、 5個のスパーサー18リンカー で連結されたG15Dアプタマ ー
THR28	5' amino AGA TGC G (スパーサー18) ₅ AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT	配列番号：19	5個のスパーサー18リンカー で60-18 [29] アプタマー に連結された、5' アミノを含む 7ヌクレオチド長のシグナリン グオリゴヌクレオチド
THR11	CTG TCG TTA GTG AAG GTT NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN AAC GCC ATA TCA CAG ACG	配列番号：20	トロンビンアプタマー選択用の 33ヌクレオチド長のランダム DNA配列を含む構築物

10

20

30

40

THR12	5' フルオレイン CTG TCG TTA GTG AAG GTT	配列番号 : 2 1	THR 1 1 用プライマー 1
THR13	5' ビオチン CGT CTG TGA TAT GGC GTT	配列番号 : 2 2	THR 1 1 用プライマー 2
THR22	GGT TGG TGT GGT TGG (スパーサー-18) ₂ GA CAG	配列番号 : 2 3	トロンビンアプタマー選択用コ アプタマー
THR25	GGT TGG TGT GGT TGG (スパーサー-18) ₅ AC GA CAG	配列番号 : 2 4	トロンビンアプタマー選択用コ アプタマー
THR29	GAACGAGAGTGC XXXXX アミノ C GCA TCT	配列番号 : 2 5	s s DNA センサー成分
THR32	5' フルオレイン AGA TGC G XXXXX TTGAACTGGACC	配列番号 : 2 6	s s DNA センサー成分
THR33	GGTCCAGTTCAA TT GCACTCTCGTTC	配列番号 : 2 7	s s DNA センサーの目標 s s DNA
THR42	GGT TGG TGT GGT TGG XX XXX AAC GAC AG	配列番号 : 2 8	トロンビンアプタマー選択用コ アプタマー
THR43	CTG TCG TT (スパーサー-18) ₅ TTGAGTCAGCGTCGAG CA NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN TTC ACT GTG CTG CGG CTA	配列番号 : 2 9	3 3 スクレオチド長ランダム D NA 配列を含むトロンビンア プタマー選択用構築物
THR44	5' フルオレイン CTG TCG TT (スパーサー-18) ₅ TTG AGT CAG CGT CGA GCA	配列番号 : 3 0	THR 4 3 用プライマー 1
THR45	5' ビオチン TAGCCGCAGCACAGTG AA	配列番号 : 3 1	THR 4 3 用プライマー 2
THR49	CACCTGATCGCTCCTC GT NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN CAG GAT GCA CAG GCA CAA	配列番号 : 3 2	3 0 スクレオチド長のランダム DNA 配列を含む 2 つのトロン ビンアプタマーの同時選択用構 築物
THR50	AGCCGCCATTCCATAG TG NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN CAG GAT GCC GAT CAG GTG	配列番号 : 3 3	3 0 スクレオチド長のランダム DNA 配列を含む 2 つのトロン ビンアプタマーの同時選択用構 築物
THR51	5' フルオレイン CAC CTG ATC GCT CCT CGT	配列番号 : 3 4	THR 4 9 用プライマー 1
THR52	5' ビオチン TTG TGC CTG TGC ATC CTG	配列番号 : 3 5	THR 4 9 用プライマー 2
THR53	5' フルオレイン-AGC CGC CAT TCC ATA GTG	配列番号 : 3 6	THR 5 0 用プライマー 3
THR54	5' ビオチン CAC CTG ATC GGC ATC CTG	配列番号 : 3 7	THR 5 0 用プライマー 4
THR35	5' フルオレイン AGA TGC G (スパーサー-18) ₅ AG GTT GGG GGT ACT AGG TAT CAA TGG GTA GGG TGG TGT AAC GC	配列番号 : 3 8	トロンビンセンサー成分

10

20

30

40

THR36	5' フルオレイン AGA TGC G (スベ-サー18) ₅ A GTG AAG GTT GGG GGT ACT AGG TAT CAA TGG GTA GGG TGG TGT AAC GCC ATA T	配列番号：39	トロンビンセンサー成分
MIS10X3	AAC GCA ATA AAT GTG AAG TAG ATC ACA TTT TAG GCA CC (スベ-サー18) ₅ GA TGGCT	配列番号：40	CRPアプタマー選択用コアブ タマー
MIS12	AGCCA T CTA ACT ATT CCC NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN GAG CGA GAA ATT CTA GGT	配列番号：41	33ヌクレオチド長のランダム DNA配列を含むCRPアプタ マー選択用構築物
MIS11	GGT GCC TAA AAT GTG ATC TAC TTC ACA TTT ATT GCG TT	配列番号：42	MIS10X3の相補物
MIS13	5'-フルオレイン- AGC CAT CTA ACT ATT CCC	配列番号：43	MIS10X3用プライマー1
MIS14	5' ビオチン- ACC TAG AAT TTC TCG CTC	配列番号：44	MIS10X3用プライマー2

10

20

蛍光の測定

すべての蛍光測定は50 mMのTris (pH 7.5)、100 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM MgCl₂中で行った。蛍光スペクトルはAminco Bowman Series 2分光光度計 (Spectronic Instruments、Rochester、NY) に記録した。バッファおよび測定機器の反応についてスペクトルを校正した。マイクロプレート中の蛍光はTecan Spectra Fluor Plusマイクロプレートリーダー (Research Triangle Park、NC) で読んだ。あるいは、マイクロプレートはMolecular Imager FX (BioRad、Hercules、CA) で画像化し、Quantity One (BioRad) を用いて個々のウェルに対応する画像面積について積分して蛍光強度を決定した。96-ウェルプレートと384-ウェルプレート中での実験は、それぞれ100 μ lと20 μ lの体積で行われた。測定機器に依存して、僅かに異なるピーコンシグナル変化が記録されたが、これは異なる測定機器を用いた場合のことなるバッファ-バックグラウンドの読み取り値 (測定機器の感度による)、および各測定機器で利用可能な励起波長と発光波長についての差異に起因する。

30

40

【0057】

ユーロピウムキレートCy5標識ビーコンの場合の時間分解蛍光は、励起源としてパルス窒素レーザーを用いた、実験室で製作された機器 (Heyduk、T.; Heyduk、E. Analytical Biochemistry 2001、289、60-67) で記録された。レーザーパルス後30マイクロ秒後に、100マイクロ秒分発光を積分した。

トロンビンアプタマー解離定数を決定するための競合アッセイ

競合物の存在下および非存在下でのTHR2の蛍光強度を決定した。トロンビン、THR2、および (もし存在すれば) 競合物の濃度はそれぞれ150 nM、200 nM、および200 nMであった。これらの条件の下、アプタマーのトロンビンへの結合は本質的に化学量論的であった。先に記載した方法 (Matlock、D.L.; Heyduk、T. Biochemistry 2000、39、12274-12283) を

50

用いて、これらの条件下で、THR2の競合物に対する解離定数の比を計算した。

ゲルシフト分析 (EMSA) によるトロンビンアプタマー結合

417 nMのTHR2のサンプル5マイクロリットルを、種々の量のトロンビン (0 ~ 833 nM) と共にインキュベートした。15分間インキュベートした後、1 (1の30 % Ficoll) を加え、サンプルはTBEバッファー中10%のポリアクリルアミドゲルで泳動された。泳動後、ゲルはSybr Greenで30分間染色され、ゲル上のイメージがMolecular Imager FX (BioRad) を用いて得られた。ゲル中のバンド強度はQuantity Oneソフトウェア (BioRad) を用いて個々のバンドに対応するイメージの面積について積分することで求められた。

10

アプタマーを基礎とする分子ビーコンの設計

図17Bは天然の配列特異的DNA結合活性を有さないタンパク質用の分子ビーコンの全体的概念を示す。この設計は発明者が先に記載したDNA結合タンパク質用分子ビーコンにある程度の一般的類似性を有する (Heyduk、 T . ; Heyduk、 E . Nature Biotechnology 2002、 20、 171 - 176 ; Heyduk、 E . ; Knoll、 E . ; Heyduk、 T . Analyt . Biochem . 2003、 316、 1 - 10 ; Knoll、 E . ; Heyduk、 T . Analyt . Chem . 2004、 76、 1156 - 1164 ; Heyduk、 E . ; Fei、 Y . ; Heyduk、 T . Combinatorial Chemistry and High-throughput Screening 2003、 6、 183 - 194) (図17A)。タンパク質への天然の結合部位を含むDNA二本鎖を2つの半部位に分割する代わりに、「半部位の」機能的等価物として、タンパク質の2つの重複しないエピトープを認識する2つのアプタマーが用いられる。蛍光団と消光剤を含む複数の短く相補的な「シグナリング」オリゴヌクレオチドは柔軟なリンカーによって2つのアプタマーに連結されている (図17B)。目標タンパク質が存在しない時、相補的なオリゴヌクレオチドは効率的なアニーリングを促進するには短かすぎるからである。アプタマー「半部位」が目標タンパク質に結合すると、2つの「シグナリング」オリゴヌクレオチドが相対的に接近して、それらの局所的濃度を高める。これによって「シグナリング」オリゴヌクレオチドはアニーリングし、蛍光団と消光剤は接近し、蛍光シグナルが変化する。

30

二価トロンビンアプタマーの特性

我々は図17Bの概念の「理論の証明」を示すためのモデル系としてトロンビンを用いた。トロンビンは凝血カスケードに関与し天然にはDNAやRNAに結合しないタンパク質分解酵素である。タンパク質の2つの異なるエピトープを選択的に認識するDNAアプタマーが、すでに2つの実験室によって開発された (Bock、 L . C . ; Griffin、 L . C . ; Latham、 J . A . ; Vermass、 E . H . ; Toole、 J . J . Nature 1992、 355、 564 - 566、 Tasset、 D . M . ; Kubik、 M . F . ; Steiner、 W . J . Mol . Biol . 1997、 272、 688 - 698)。一つのアプタマー (G15D ; THR4、表1) はヘパリン結合エクソサイト (exosite) (Bock、 1992) に結合することが示され、またもう一つのアプタマー (60 - 18 [29] ; THR3、表1) はフィブリノゲン結合エクソサイト (Tasset 1997) に結合することが示されている。トロンビンを認識するビーコンを開発する最初のステップとして、我々は前記アプタマーが柔軟なリンカーで共有結合された種々のアプタマー構築物を作製した。これらの実験の主要な目的は、柔軟なリンカーでタンパク質表面上の2つの異なるエピトープを認識する2つのアプタマーを連結すれば、個々のアプタマーよりも高い親和性でタンパク質に結合できる二価アプタマーが得られるかどうかを決定することであった。そのような二価のアプタマー構築物のこの性質は、図17Bのアッセイが機能するために必要不可欠な条件である。これらの二価構築物の親和性に対する長い柔軟な

50

リンカーが与える影響を予測することは不可能なため、この問題に実験的に対処することが必要であった。これらの実験の第二の目的はリンカーの適切な長さ、および2つのアプタマーの5'端と3'端のリンカーに対する適切な向きを確立することであった。

【0058】

様々な構築物の有するトロンビンへの親和性の決定を容易にするため、個々のアプタマーはフルオレセインで標識された〔THR1(表1)はフィブリノゲンのエクソサイトに特異的であり、THR2(表1)はヘパリンのエクソサイトに特異的である〕。トロンビンとフルオレセイン標識60-18[29]アプタマー(THR1)との間の複合体の形成は蛍光偏光によって簡便に追跡でき(図示はしない)、フルオレセイン標識G15Dアプタマー(THR2)の結合は蛍光強度によって追跡できた(図18A)。どちらのアプタマーもナノモル程度の濃度範囲でトロンビンに結合した(THR1および図18Aにはデータを示していない)。THR2の場合の結合の定量的分析(図18A)は K_d 値として6.3 nMの値を返した。これは以前に示唆されていたもの(Bock 1992、Tassett 1997)より若干高い親和性であり、これはおそらく我々が真平衡結合アッセイを用いたのに対して以前は非平衡結合法が用いられたためである。THR2の結合が十倍過剰量の未標識60-18[29]アプタマー(THR3)中で行われた場合(図18B)、僅かな有意義ではない親和性の減少が観察されただけであった(K_d は17.7 nM)。これにより、以前報告されたとおり、G15Dアプタマーと60-18[29]アプタマーは独立にトロンビンの2つの異なるエピトープに結合したことが証明された。

10

20

【0059】

次のステップでは、各種アプタマー構築物の有する、トロンビンへの結合についてTHR2と競合する能力が評価された。トロンビンを加えた場合のTHR2の蛍光強度の変化を競合物の存在下および非存在下で測定し、競合物の存在下でのトロンビンに結合したTHR2の量を材料と方法(Materials and Methods)に記載したとおりに計算した。これら実験で用いたアプタマーの濃度では、アプタマー-アプタマー相互作用は蛍光偏光アッセイで検出できず(未陳列)、競合データはTHR2およびトロンビンへの結合についての競合物の相対的親和性について正しく報告したことを示している。THR3は競合物ではなく(図18C)、これは図18AおよびBに示されたデータと一致する。THR4(THR2の未標識変種)は予測どおり競合能力を備えていた(図18C)。この場合の競合の定量的分析により、THR4はTHR2より1.7倍よくトロンビンに結合したことが示され、このアプタマーのフルオレセインによる標識が、トロンビンへのアプタマー結合に対して僅かな(有意義ではない)負の作用しか与えなかったことを示した。明らかに、すべての二価アプタマー構築物はTHR4よりもはるかに優れた競合物であった(図18C)。THR7が最高の競合物のようで、1:1の比においてTHR2の結合を本質的に完全に阻害した。この場合の競合の定量分析によって、THR7はTHR2より少なくとも65倍(THR7の推定 K_d (97 pM)強くトロンビンに結合したことが明らかになった。図18Cに示されたデータは、タンパク質の2つの異なるエピトープを認識する2つのアプタマーを柔軟なリンカーで連結すると、高親和性トロンビンリガンドが作り出されるという予想を確認した。さらに、これら2つのアプタマーをより長いリンカー(10個スペーサー18単位を含む(5個のスペーサー18単位との比較))で連結した場合、トロンビンに対してやや良好な親和性(THR5とTHR6の結合の比較)が得られることをこれらのデータは示した。これらのデータはまた、アプタマーのリンカーに対する向きがTHR7のような場合は、親和性がより良い(THR6とTHR7の親和性の比較)ことを示した。このため、以下のすべて構築物中、THR7のようなアプタマーの向きが用いられた。

30

40

【0060】

二価のアプタマー構築物(THR7)とトロンビンの間の複合体は、非変性ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動に耐えるのに十分なほど安定している(図18D)。我々はこの観察を利用して、ゲルシフト分析法(EMSA)(Fried, M. G.; Cr

50

others、D. M. Nucleic Acid Res. 1981、9、6505 - 6525)を用いて複合体の化学量論を決定し、THR7-トロニン複合体形成を追跡した。我々はトロニンでTHR7滴定した(どちらの分子も高濃度であった)。これらの条件の下では、結合は化学量論的であるはずである。形成された複合体対トロニンのTHR7に対する比のプロットは、複合体の1:1の化学量論を示し(図18D)、これは両アプタマー(THR7の成分)がTHR7-トロニンの複合体中でその各々のエピトープに結合するという観念と整合している。

トロニンを検出するアプタマーを基礎とした分子ビーコン

以上に記載の実験データは、図17Bに示されたシグナリングビーコン設計を成功裏に実施するために必要な全ての条件が満たされたことの証明を与えた。これらのデータに基づき、我々は図19Aに示されたトロニンビーコンを設計した。5個のスペーサー18リンカーを用いてトロニンアプタマー(複数)を、それぞれ5'端と3'端がフルオレセインおよびダブシルで標識された7ヌクレオチド長の相補的なオリゴヌクレオチドに連結された。これら2つの構築物の混合物は個々のアプタマーに比べ、より緊密に(約36倍)トロニンに結合した(図18C)が、これは2つのアプタマーを柔軟なリンカーで永続的に接続した二価アプタマー構築物について観察された高いトロニン親和性と整合する。トロニンをそれぞれ蛍光団および消光剤で標識されたTHR20とTHR21の混合液に加えると、タンパク質濃度に依存した蛍光強度の消光が起こった(図19C)。観測された最大の消光は約40%であった。ダブシル標識されたパートナー(THR20)の非存在下ではトロニンをTHR21に加えても蛍光変化は観察されず(図19C)、蛍光の消光は、図19Bに示されるようにアニーリングにつながるタンパク質に誘導されるシグナリングオリゴヌクレオチドのさらなる接近に起因することを示している。ビーコン成分とトロニンがナノモル濃度であるとき、約15分間のインキュベーションはビーコンの最大の反応を生み出すのに十分である。我々は類似した図19に示されたビーコンと同様であるが、17ヌクレオチド長のポリdTリンカーがスペーサー18リンカーの代わりに用いられている種々のトロニンビーコンについてもテストした。トロニン依存的な蛍光消光は観察されたが、消光はスペーサー18リンカーを含む構築物を用いた場合よりも約2倍小さかった。ポリdTリンカーは柔軟ではあるもののいくつかの残留硬さを示した可能性が強い(Mills、J. B.; Vacano、E.; Hagerman、P. J. J. Mol. Biol. 1999、285、245 - 257)、そのためおそらく2つのアプタマーがトロニンに結合した際のシグナリング二本鎖の結合を阻害したのであろう。トロニンと構造的に類似するタンパク質分解酵素であるトリプシンで図19に示されたビーコンを滴定すると、蛍光強度の変化は観測されなかった。我々は、図17Bに示された設計による機能的なトロニンビーコンが得られたと結論付けた。

ビーコン性能の改善

次の一群の実験において、我々は別のドナー-アクセプター標識ペアを利用してビーコンの性能を改善することを追求した。前述の通り、FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)を讀取に用いたアッセイでは、アクセプター発光を増強すると潜在的によりよいシグナル対バックグラウンド比、より高いダイナミックレンジ、およびよりよい感度を得られることが先に示されている(Heyduk、E.; Knoll、E.; Heyduk、T. Analyt. Biochem. 2003、316、1-10)。我々は図17Bに示されたものと同様だが、フルオレセイン-ダブシルのペアに代えて蛍光ドナーと蛍光アクセプターの様々な組み合わせがシグナリングオリゴヌクレオチドに導入された一連のトロニンビーコン構築物を作製した。適切な染料のNHSEステルで標識されたTHR21(あるいは適当な染料のNHSEステルで標識されたTHR28)とTHR27をこれらのビーコンの作製に用いた。図20は、フルオレセイン-テキサスレッド(図20B)、フルオレセイン-Cy5(図20C)、およびCy3-Cy5(図20

D) で標識されたビーコンの蛍光スペクトル (トロンピン添加有りおよび無し) を示す。全てのケースで機能性ビーコンが得られた。蛍光ドナーと蛍光アクセプターを有するビーコンの各ケースにおいて、トロンピン濃度依存的な感作アクセプター発光の大きな増加が観察された (図 20 の挿入図、および図 21 A - D)。比較のため、図 20 A は蛍光団 - 消光剤 (フルオレセイン - ダブシル) のペアの場合にトロンピン存在下で観察された蛍光消光を示している。図 21 E は時間分解 FRET (TR - FRET) を検出方法として用いることを可能にするユーロピウムキレート - Cy5 ドナー - アクセプターペアを用いて得られる結果を示している (Selvin, P. R.; Rana, T. M.; Hearst, J. E. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 6029 - 6030; Selvin, P. R.; Hearst, J. E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 10024 - 10028; Matthias, G. Clin. Chem. 1995, 41, 1391 - 1397)。TR - FRET を用いることで、光散乱および直接励起されたアクセプターからの即時蛍光を除き、ビーコンのシグナル対バックグラウンド比をさらに改善することが可能になる。図 21 F はドナーおよびアクセプタープローブの様々な組合せを用いたビーコンバリエーションの性能をまとめている。数値は、トロンピン非存在下で観測されるビーコンのバックグラウンドシグナルと比較した、飽和濃度のトロンピンの存在下におけるシグナル変化の倍率を示している。その比は、フルオレセイン - ダブシルペアの場合の約 2 倍から、ユーロピウムキレート - Cy5 ペアの場合の約 22 倍にまでばらついている。このため、最良のドナー - アクセプターペアを選択し、シグナル検出のやり方として感作アクセプター発光を用いることによりビーコン性能の実質的改善をなしうる。蛍光ドナーと蛍光アクセプターのビーコンバリエーションのさらなる利点は、その反応をアクセプター対ドナーのシグナル比の二色決定により測定できることである。このようなレシオメトリック (ratiometric) な測定により、より安定したシグナルが得られ、これはサンプル中に存在する添加剤による光吸収、光散乱、蛍光消光などの非特異的影響により抵抗性である。最良のドナー - アクセプターペアを用いて得られる上昇したシグナル対バックグラウンド比により、ビーコン感度も上昇する。このことは図 22 に示され、低濃度のトロンピンに対する三つの選ばれたビーコンバリエーションの反応を示している。フルオレセイン - ダブシル標識ビーコン (飽和濃度のトロンピンの存在下で最低 (約 2 倍) のシグナル変化を示す) の場合、統計的に有意なシグナル変化は最高のトロンピン濃度 (1 nM) においてのみ検出された。フルオレセイン - テキサスレッド標識ビーコン (飽和トロンピン濃度で約 5 倍のシグナル変化を示す) の場合、統計的に有意なシグナル変化はより低いトロンピン濃度 (200 pM) において検出された。フルオレセイン - Cy5 標識ビーコン (飽和トロンピン濃度で約 15 倍のシグナル変化を示す) の場合、統計的に有意なシグナル変化は最低のトロンピン濃度 (50 pM) で既に検出できた。

【0061】

図 23 はトロンピンビーコンシグナルの優れた再現性と安定性を示す。ビーコンシグナルは 5 回の独立したテストにおいて 4 つのトロンピン濃度で測定された。テストされた各タンパク質濃度において変動係数は小さかった (図 23 A)。ビーコンシグナルは少なくとも 24 時間にわたり安定であった (図 23 B)。

【0062】

図 17 B に示されたビーコンを用いてシグナルを発生するためには、三つの分子接触が同時に起こることが必要である：アプタマーの各々とタンパク質との間の 2 つの接触と、2 つの相補的なシグナリングオリゴヌクレオチド間の接触である。3 つの接触は各々、ビーコン - タンパク質複合体の全体的安定性に対して自由エネルギー上の寄与を与える。複合体の自由エネルギーと平衡解離定数との間の指数的關係のため、上述の三個の分子接触のいずれがかけても複合体の全体的安定性が大きく減少する。よって、単一分子接触に基づいたアッセイ (例えば、単一アプタマーを基礎としたアッセイ) に比べて、ここに記載された分子ビーコンはタンパク質検出におけるより高い特異性を示すことが予想される。

この観点を説明するため、我々は単一のトロンピンアプタマーとトロンピンビーコンの S S B (大腸菌の一本鎖 DNA 結合タンパク質、一本鎖 DNA への結合について非特異的な高い親和性を示すタンパク質である) に対する反応を比較した (データは示さない)。S S B はナノモル濃度で単一のフルオレセイン標識アプタマー (T H R 1、表 1) と共に大きなシグナル (蛍光偏光アッセイで測定) を生み出した。S S B は、トロンピンがこのアプタマーに結合するのに必要な濃度と同様の濃度範囲で反応を示した。よって、単一のトロンピンアプタマーは S S B とトロンピンを非常に弱くしか区別しないことが分かった。対照的に、トロンピンビーコンをナノモルの S S B 濃度にさらした場合、有意なビーコン反応は生まれず、トロンピンは同じ濃度範囲で大きなビーコン反応を生み出した。このため、トロンピンビーコンは S S B とトロンピンを非常によく区別し、ビーコンの向上した特異性が示された。 10

【0063】

ここに記載したアッセイ設計の主な応用は、均一で高スループットのタンパク検出であろう。Zhangらは (Biomol. Screening 1999、4、67-73) 高スループットでの使用用のアッセイを評価するのに用いれる簡単な統計的パラメーターを開発した。Z'-因子はタンパク質の存在下および非存在下における、多回数の測定の繰り返しから計算される。Z' 値が 1 であることは理想的なアッセイであることを示しており、Z' 値が 0.5 から 1 であると優れたアッセイであることを示している。Z' 値が 0.5 より小さいことは高スループットへの応用にはあまり適していないことを示している。トロンピンビーコンの Z' 値は 0.94 (図 24) であり、これが非常に優れた高スループットアッセイであることを示している。 20

複合体混合液中のトロンピンの検出

次の一連の実験は、トロンピンビーコンの特異性、およびそれが細胞抽出液と血漿中のトロンピンを検出する能力についてのものである。1 nM のトロンピンに対するビーコンの反応は、100 および 1000 倍過剰量の関係ないタンパク質 (オブアルブミン、図 25A) では影響されなかった。また、100 倍過剰量の Xa 因子 (トロンピンに類似する別の凝血プロテアーゼ) は 1 nM のトロンピンに対するビーコンの反応に影響を与えなかった (図 25A)。1000 倍過剰量の Xa 因子はビーコンの反応を僅かに弱めたが、これらの条件の下でも 1 nM のトロンピンは依然として容易に検出可能であった (図 25A)。トロンピンが存在しない場合は、1 μM までの濃度のオボアルブミンと Xa 因子はビーコンシグナルに影響しなかった (図 25A)。我々はビーコンはトロンピンに対して高度に選択的であると結論した。 30

【0064】

ビーコンが複合体混合液中でトロンピンを検出できるかをテストするため、我々は HeLa 細胞抽出液を様々な量のトロンピンでスパイクし、該混合液に対するビーコン反応を決定した (図 25B)。低ナノモル濃度のトロンピンは容易に検出された。20 μl の分析液の中に総量 8 μg のタンパク質を加えるが、この量は細胞抽出液を使用した実験において使用される典型的な範囲に属するものである。細胞抽出液を加えた時に観察されたシグナルは、特定の競合物 (未標識トロンピンアプタマー) を加えることで完全に消去された。細胞抽出液中で観察されたシグナルはトロンピンによるものであることが確認された。細胞抽出液を使用した実験において遭遇した一つの問題はアッセイの成分であるオリゴヌクレオチドの、細胞抽出物中のヌクレアーゼによる分解であった。我々は様々なバッファ添加剤を試して、細胞抽出液の存在下でトロンピンビーコンが十分に長い時間安定性でいられる条件を見出した。我々は高濃度のランダムな配列の 30 bp の二本鎖 DNA (10 μM)、高濃度の 20 ヌクレオチド長のランダム配列一本鎖 DNA (0.1 μM)、および 2.5 mM の EDTA の添加により、細胞抽出液の存在下においてビーコンのトロンピンに対する反応に有意な影響を与えることなくトロンピンビーコンは分解から保護されることを見出した。図 25B に示されたデータは、上述の添加物の存在下で得られた。 40

【0065】

トロンピンは血漿タンパク質であるので、我々はビーコンが血漿中のタンパク質を検出するのに使用できるかを確かめた。血漿中にあるトロンピンは全てその前駆体であるプロトロンピンの形で存在しており、プロトロンピンはXa因子によるタンパク質分解的な処理によってトロンピンに変換される。プロトロンピンはトロンピンビーコンに認識されるものの、トロンピンに比べはるかに低い感度である(約20倍低い、データは示さない)。このことは図25Cの実験によってよく表され、そこではプロトロンピンの存在下でのビーコンの感作アクセプター発光が時間の関数として観察された。矢印でマークされた点において、Xa因子が混合液に加えられ、プロトロンピンのトロンピンへの変換を開始した。この変換により、ビーコンシグナルは時間とともに増加したが、これはビーコンのトロンピンに対するはるかに高い感度と整合する。このため、血漿中のトロンピンを検出するためには、Xa因子はアッセイ混合液中に含まれる(図25D)。血漿の添加量を増加させるとビーコンシグナルはそれに比例して増加した(図25D)。Xa因子がアッセイ中に存在する場合のみ血漿の添加によりビーコンの反応が生み出された。血漿を加えた時に生まれたシグナルは、特定の競合物(未標識トロンピンアプタマー)の添加により完全に消去され、細胞抽出液中の観察されたシグナルがトロンピンによるものであることが確認された。20 μ lの反応容量中、5nLの血漿サンプルはビーコンの測定可能な反応を生み出した。まとめると、図25に示された実験は、複雑な生物学的混合液中のタンパク質を検出するトロンピンビーコンの機能性を証明した。

10

考察

20

ここで説明したアプタマーを基礎とした分子ビーコンの設計は、我々によって先に開発された配列特異的なDNA結合タンパク質を検出する分子ビーコンを一般化したものである(図17)。トロンピンをモデルタンパク質として用いたここに記載された実験によりこの設計の実施可能性についての原理の証明が得られた。我々はこの設計がいくつかの重要な利点を有するであろうと信じる。ここに記載された分子ビーコンの設計はいかなる特定のタンパク質に限定されるものではないため、多くのタンパク質に一般的に適用可能である。目標タンパク質の存在下での我々のビーコンによるシグナリングには、2つの異なるアプタマーによるタンパク質の2つの別々のエピトープの協働的認識が必要である。これによってビーコンの特異性が向上し、親和性(つまり検出感度)も向上する。この2つのアプタマーによる協働的作用により、ほどほどの親和性を有するアプタマーを用いて高親和性と高特異性で目標タンパク質に結合する分子ビーコンを作製できる。ビーコンのアプタマー成分は、タンパク質の存在下で異なる状態間のスイッチングを可能にするために構造の分布を調製するためのいかなる構造の加工も必要としない。この種の加工はアプタマーの特定の配列(構造)に依存적でありえ、核酸の代替的構造のエネルギー論のそのようなバランスは些少なものであるとは限らない。本ビーコン設計中のシグナリング要素(“シグナリング”オリゴヌクレオチド)はそのアプタマー成分と分離しているため、任意のアプタマー配列(および構造)が我々のビーコンの設計に適用可能である。“シグナリング”オリゴヌクレオチドの添加が、ビーコンの成分であるアプタマーの親和性や特異性に有害な影響を及ぼすことはありそうにない。このため、タンパク質の2つの異なるエピトープを認識する2つのアプタマーを得ることのできる任意のタンパク質は、図17の設計による分子ビーコンの開発の良いターゲットとなるはずである。

30

40

【0066】

タンパク質の異なるエピトープを認識する抗体(複数)を得ることは比較的容易である。同様に、多くの目標タンパク質について異なるエピトープを認識するアプタマー(複数)を開発できない理由は無く、すでにいくつかの例が得られている(Jayasena, S. D. Clinical Chem. 1999, 45, 1628-1650)。この目標を達成するためにはいくつかのやり方が可能である。第一のやり方はタンパク質に結合したオリゴヌクレオチドとタンパク質に結合していないオリゴヌクレオチドを分離するために異なる方法を用いながらインビトロ選択(SELEX)を行うことであろう。その原理はこれらの異なる区分法において、タンパク質の異なる領域を選択的に提示で

50

き、タンパク質表面上の異なる領域に対するアプタマーが得られる。トロンピンについて選択されたアプタマーはそのようなやり方の一例となる (Bock、1992; Tassett、1997)。第2のやり方は、目標タンパク質分子の異なる領域に相当するペプチドに対するアプタマーを生成させることであろう。アプタマー開発の目標として用いられたペプチドが由来する完全タンパク質を認識できるアプタマーを開発するためにそのような戦略を用いることが出来ることについては、実験的証拠が存在する。(Wei、X.; Ellington、A.D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996、93、7475-7480)。このやり方はタンパク質を認識する抗体を作製するために広く用いられている。タンパク質の異なるエピトープを認識する2つのアプタマーは、第1の段階で選択されたアプタマーが飽和濃度存在する中でアプタマーを選択することを第2の段階が伴う2段階連続SELEXによっても作製可能である。我々のトロンピンをモデルシステムとして用いてこの手順を検証した (Heyduk、E. と Heyduk、K. 未発表)。最後に我々は、我々の分子ビーコン設計中で機能するように特に設計された一対のアプタマーを作製するための新規なインビトロ選択戦略を開発した (Heyduk、E.、Kalucka、J.、Kinnear、B.、Knoll、E.、and Heyduk、T.、未発表)。このため、タンパク質の重複しないエピトープ (複数) を認識するアプタマー対を得る多くの手法が利用可能である。

【実施例4】

【0067】

センサー設計のバリエーション

本発明を実施する際には、本分子ビーコンのいくつかのバリエーションが利用可能である。分子ビーコンのそれらバリエーションは図26に示され、本明細書中でまとめられている (前記)。図26Fに示されたセンサー設計は、DNA結合タンパク質を効果的に検出できることが示されている。DNA結合タンパク質の一例であるcAMP反応エレメント結合タンパク質 ("CRP") をドナーおよびアクセプター標識センサー成分 (複数) の混合液に滴定した場合、感作アクセプター蛍光強度もそれに合わせて増加する (図27)。

【0068】

図26Gに示されたセンサーの設計は図28で証明されている。パネルAはセンサー機能の原理を示している。センサーの要素 (複数) に相補的な2つの異なる配列エレメントを含む一本鎖DNAを、それぞれドナーおよびアクセプター標識された2つのセンサー成分の混合液に加えた場合、感作アクセプター蛍光強度もそれに合わせて上昇する (図28B、" + " 記号がある線)。この特定の場合におけるセンサーはテキサスレッド標識されたTHR29およびTHR32を含んでいた。

【0069】

本分子ビーコンセンサーの設計を、単一の目標大分子認識要素に基づいたアッセイと比べた場合の増加した特異性は実験的に証明されている (図29)。センサーによる目標分子の認識は、それぞれ複合体全体の安定性に寄与する自由エネルギー (ΔG) を与える3つの分子接触が同時に起こることを伴う。自由エネルギーと複合体の平衡解離定数の間の指数的关系のため、複合体全体の安定性は上述の3つの分子接触のいずれが欠けても大きく減少するため、目標分子認識の特異性が高くなる。ナノモル濃度の非特異的一本鎖DNA結合タンパク質 (SSB) は単一のフルオレセイン標識アプタマー (THR1、表1) と共に大きなシグナルを生み出した (蛍光偏光アッセイによって測定した)。トロンピンがこのアプタマーを結合するのに必要な濃度に非常に近い濃度範囲で、SSBは反応を生み出した。このため、単一トロンピンアプタマーはSSBとトロンピンを非常に弱くしか区別しないことが分かった (パネルB)。ナノモル濃度のSSBにトロンピンセンサー (THR21 (フルオレセイン標識) と THR27 (テキサスレッド標識) の混合液) をさらした場合、有意なビーコン反応は起こらなかった (虚線) のに対し、同濃度範囲でトロンピンは大きなビーコン反応を生み出す (パネルC)。このため、トロンピンビーコ

ンはSSBとトロンプンを非常によく区別することが分かり、ビーコンの向上した特異性を示している。

各種センサー用アプタマーを作製する方法

図30は本発明の実施に有用なアプタマーを選択する方法をまとめている。パネルAは第1のアプタマーに結合したタンパク質の存在下での第2のアプタマーの選択を示す。シグナリングオリゴはランダム配列含有構築物の5'端に位置しており、相補的なシグナリングオリゴは長く柔軟なリンカーで第1のアプタマーに連結されている。この種のランダムDNA（あるいはRNA）構築物を用いたコアプタマーの選択は、第1のアプタマーのエピトープと箱となる部位でタンパク質に結合でき、図26Aに示されたセンサー内で機能するアプタマーへとバイアスがかかる。

【0070】

パネルBには別のシナリオが示されており、そこではタンパク質の2つの異なるエピトープに結合する2つのアプタマーの同時選択が記載されている。（プライマー1およびプライマー4の末端の）棒は、アプタマー構築物を含むランダム配列の5'端と3'端にある短い相補的配列を示している。この種のランダムDNA（あるいはRNA）構築物を用いたアプタマー選択は、同時にタンパク質の2つの異なるエピトープに結合でき、図26Aが示すセンサーで機能するアプタマー（複数）へとバイアスがかかる。

【0071】

さらに別の実施形態では、二本鎖DNAが結合したタンパク質の存在下で第2のアプタマーが選択される（図30、パネルC）。棒は（ランダム配列含有構築物の5'端の）短い配列を示し、二本鎖DNAに長い柔軟なリンカーで連結されたシグナリングオリゴヌクレオチドに相補的である。このようなランダムDNA（あるいはRNA）構築物を用いたコアプタマー選択は、タンパク質の二本鎖DNA結合部位とは異なる部位でタンパク質に結合でき、図17Bに示されたセンサーで機能するアプタマーへとバイアスがかかるであろう。

【0072】

さらに別の実施形態では、タンパク質の別のエピトープに抗体が結合した該タンパク質の存在下で、第2のアプタマーが選択される（図30、パネルD）。棒は（ランダム配列含有構築物の5'端の）短い配列を表し、長い柔軟なリンカーで抗体に連結されたシグナリングオリゴヌクレオチドに相補的である。このようなランダムDNA（あるいはRNA）構築物を用いたコアプタマーの選択は、タンパク質に抗体のエピトープとは異なる部位で結合でき、図17Cに示されたセンサーで機能するアプタマーへとバイアスがかかるであろう。

【0073】

G15Dアプタマーの結合部位と異なるエピトープでトロンプンに結合するアプタマーの選択を、過剰量のG15Dアプタマー含有構築物（THR22）の存在下で33ヌクレオチド長のランダム配列を含む構築物（THR11）から始まるSELEX手順を用いて行った（図31、パネルA）。パネルBは、表示された各選択回数後に得られた一本鎖DNAのトロンプン結合活性を示す。測定可能なトロンプン結合活性は4回目の選択後に現れ、12回目の選択後に最大値に達した。過剰量のTHR22の存在下で結合を測定した。12回目の選択後に得られたDNAをクローニングし、各クローンから得られたDNAを配列決定した。パネルCは、それぞれのクローンの配列アラインメント（ClustalXを使用）を示す。4回の独立した選択実験により得られたクローンが示されている。これらの選択は、以下にあげたアプタマー構築物とランダム配列含有構築物のペアを用いて行った：THR22とTHR11；THR25とTHR11；THR42とTHR11；THR43とTHR11。いくつかの、高度に保存された配列のファミリーがパネルC中で容易に見られる。

【0074】

テキサスレッド標識されたTHR27と、図31Cのクローン20～26に対応する配

列を含むフルオレセイン標識された T H R 3 5 あるいは T H R 3 6 とを含む機能的なトロンピンセンサーが図 3 2 に示されている。T H R 3 5 と T H R 3 6 は、クローン 2 0 ~ 2 6 の配列に隣接する D N A 配列の長さの点で異なる。2 0 n M (パネル A) あるいは 1 0 0 n M (パネル B) の標示されたトロンピンセンサーと表示された濃度のトロンピンとを含むマイクロプレートのウェルの蛍光像 (感作アクセプター発光) が示される。比較のため、T H R 2 1 と T H R 2 7 を含むセンサーも示される。

【 0 0 7 5 】

図 3 3 は、2 つの異なるエピトープでトロンピンに結合する 2 つのアプタマーの同時選択をまとめている。アプタマーの選択は、3 0 ヌクレオチド長のランダム配列を含む 2 つの構築物 (T H R 4 9 と T H R 5 0) から始まる S E L E X 手順を用いて行った (パネル A) 。表示された各回の選択後に得られる一本鎖 D N A の混合物のトロンピン結合活性がパネル B に示されている。測定可能なトロンピン結合活性は、6 回目の選択後に現れ、1 4 回目の選択の後に最大値に達した。1 4 回目の選択後に得られた D N A をクローニング氏、個々のクローンから得られた D N A を配列決定した。パネル C はクローンの配列アラインメント (C l u s t a l X を使用) を示す。いくつかの高度に保存された配列のファミリーが容易に見い出せる。

10

【 0 0 7 6 】

アプタマーを基礎とした分子ビーコンを c A M P 反応エレメント結合タンパク質 (“ C R P ”) について開発した。タンパク質の D N A 結合部位とは異なる部位に結合するアプタマーを選択した。C R P 結合部位を含む構築物 [M I S 1 1 とハイブリダイズした M I S 1 0 X 3] の過剰量の存在下で、3 3 ヌクレオチド長のランダム配列を含む構築物 (M I S 1 2) から始めて S E L E X 手順を用いてアプタマーが選択された (図 3 4 、パネル A) 。各回の選択後に得られた一本鎖 D N A の C R P 結合活性が図 3 4 、パネル B に示されている。測定可能な C R P 結合活性は 6 回目の選択後に現れ、1 2 回目の選択後に最大値に達した。M I S 1 1 とハイブリダイズした M I S 1 0 X 3 の過剰量の存在下で結合を測定した。1 2 回目の選択後に得られた D N A をクローニングし、各クローンから得られた D N A を配列決定した。クローンの配列アラインメント (C l u s t a l X を使用) はパネル C に示されている。約 1 6 ヌクレオチド長の保存されたコア配列が同定できた。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 7 7 】

30

【 図 1 】タンパク質検出用の分子ビーコンの全体設計。(A) 天然の D N A 結合活性を有さないタンパク質用の設計のバリエーション。この場合のビーコンはタンパク質の 2 つの異なるエピトープを認識するように開発された 2 つのアプタマーからなるであろう。(B) 天然の D N A 結合活性を有するタンパク質用の設計バリエーション。この場合のビーコンはタンパク質結合部位に対応する D N A 配列を含む短い D N A 二本鎖と、タンパク質の異なるエピトープを認識するように開発された D N A (R N A) アプタマーとからなるであろう。

【 図 2 】第 1 のアプタマー (A) の結合部位とは異なるエピトープ、あるいはタンパク質 (B) の天然の結合部位を含む核酸の結合部位とは異なるエピトープ、についてのコアアプタマーを作製する方法。

40

【 図 3 】D N A 結合タンパク質 (A) 用分子ビーコンの設計と、タンパク質 (B) の 2 つの異なるエピトープに対するアプタマーに基づいてタンパク質を検出する分子ビーコンの比較。

【 図 4 】トロンピンにフィブリノゲンエクソサイト (6 0 - 1 8 [2 9]) およびヘパリン エクソサイト (G 1 5 D) で結合するアプタマーを含むアプタマー構築物。

【 図 5 】フルオレセイン標識アプタマーのトロンピンへの結合。(A) 蛍光偏光で検出された 6 0 - 1 8 [2 9] アプタマー (T H R 1) (5 0 n M) の結合 ; (B) 蛍光強度の変化により検出された G 1 5 D アプタマー (T H R 2) (5 0 n M) の結合 ; (C) フルオレセイン標識 G 1 5 D アプタマー (T H R 2) (2 0 n M) のトロンピンによる定量的平衡滴定。実線はアプタマーとトロンピンの間の 1 : 1 複合体形成を記述した方程式への

50

実験データの非線形適合；(D)十倍過剰量の非標識60-18[29]のアプタマー(THR3)の存在かにおける、フルオレセイン標識G15Dアプタマー(THR2)(20nM)のトロンピンによる定量的平衡滴定。実線はアプタマーとトロンピンの間の1:1複合体形成を記述した方程式への実験データの非線形適合。

【図6】トロンピンへの結合についての、トロンピンアプタマー構築物とフルオレセイン標識G15Dアプタマー(THR2)の間の競合。競合物がない時(A)、150nMのTHR3の存在下(B)、150nMのTHR4の存在下(C)、および150nMのTHR7の存在下(D)におけるトロンピンあり、および無しでの、50nMのフルオレセイン標識G15D(THR2)の蛍光スペクトル。

【図7】トロンピンへの結合に関する、トロンピンアプタマー構築物とフルオレセイン標識G15Dアプタマー(THR2)の間の競合を検出する実験の概要。競合物(250nM)の非存在下および存在下におけるフルオレセイン標識G15Dアプタマー(THR2)(50nM)の蛍光強度を、競合物の存在下における結合THR2の%を決定するのに用いた。トロンピンの濃度は75nMであった。図中に示された解離定数の値は、200nMのフルオレセイン標識G15Dアプタマー(THR2)、200nMの競合物および150nMのトロンピンを用いた別個の実験から計算された。

【図8】60-18[29]アプタマー(THR3)が、フルオレセイン標識G15Dアプタマー(THR2)とTHR5構築物の間のトロンピンへの結合についての競合について与える影響。トロンピン(150nM)の存在下および非存在下における、(A)競合物の非存在下、(B)1000nMのTHR3と200nMのTHR5の存在下、(C)1000nMのTHR3の存在下、および(D)200nMのTHR5の存在下での200nMのフルオレセイン標識G15D(THR2)の蛍光スペクトル。

【図9】ゲル電気泳動移動率シフトアッセイにより検出されたTHR7アプタマー構築物のトロンピンへの結合。417nMのTHR7のサンプルを様々な量の(0~833nM)のトロンピンと共にインキュベートし、15分のインキュベーション後に10%の天然プロピレンゲル上にロードした。(A)Sybr Greenで染色されたゲルのイメージ。(B)トロンピン濃度の関数としての、THR7-トロンピン複合体に相当するバンドの強度。

【図10】二価トロンピンアプタマー構築物のファミリーで、G15Dと60-18[29]アプタマーが、9-27個のヌクレオチド長のpoly Tリンカーによって20bp二本鎖DNAに連結されたもの。

【図11】ゲルシフト法(EMSA)によって検出された、トロンピンの図8中に示された二価アプタマー構築物(各33nM)への結合。星印は、トロンピンが9ヌクレオチド長のポリTリンカーを有する構築物と比較して27ヌクレオチド長および17ヌクレオチド長のpoly Tリンカーに選択的に結合することを最もよく示しているレーンを示す。トロンピンの濃度は0から400nMの間で変化された。

【図12】17ヌクレオチド長のpoly Tリンカーで9bpの蛍光団(あるいは消光剤)標識“シグナル”二本鎖に連結されたG15Dと60-18[29]アプタマーを用いたトロンピンビーコンの設計。(A)フルオレセイン標識G15D構築物(THR9)とダブル標識60-18[29]構築物(THR8)のヌクレオチド配列。(B)トロンピンビーコンによるシグナル機構。(C)トロンピンをトロンピンビーコンに加えた際に検出される蛍光シグナル変化。比較のため、ダブル標識60-18[29]構築物(THR8)の非存在下でのフルオレセイン標識G15D構築物(THR9)トロンピンによる滴定も示される(ドナーのみの曲線)。

【図13】5個のスペーサー18単位を含むリンカーを介して9bpの蛍光団(あるいは消光剤)標識“シグナル”二本鎖に連結されたG15Dと60-18[29]のアプタマーを用いたトロンピンビーコンの設計。(A)フルオレセイン標識G15D構築物(THR21)とダブル標識60-18[29]構築物(THR20)のヌクレオチドの配列。(B)トロンピンビーコンによるシグナル機構。(C)トロンピンをトロンピンビーコンに加えた際に検出される蛍光シグナルの変化。比較のため、ダブル標識60-18

【 29 】構築物 (THR20) が存在しない場合のフルオレセイン標識 G15D 構築物 (THR21) のトロニンビンによる滴定も示す (ドナーのみの曲線)。挿入図は、主グラフの各データ点に対応する様々なトロニンビン濃度において記録される蛍光発光スペクトルを示す。

【図 14】ゲルシフト法によって検出された、トロニンビンの図 13 中に示されたビーコン (THR20 / THR21) への結合。ゲルはフルオレセイン発光で画像化された (つまり、ビーコンの THR21 成分のみが見える)。

【図 15】(A) 2 つの異なるビーコン濃度でのトロニンビン検出の感度。赤丸: 50 nM の THR21 と 95 nM の THR20。青丸: 5 nM の THR21 と 9.5 nM の THR20。(B) ビーコンのトロニンビンに対する特異性。50 nM の THR21 と 95 nM の THR20 がトロニンビン (赤丸) およびトリプシン (青丸) で滴定された。

【図 16】競合的アプタマー構築物によるトロニンビンビーコンシグナルの反転。競合物 DNA の濃度を増加させながら、50 nM の THR21、95 nM の THR20 および 100 nM のトロニンビンの蛍光強度を測定した。実験数値は、初期のビーコンとトロニンビンの混合物のシグナル (F₀) に対する相対的蛍光増加量としてプロットされている。塗りつぶされていない青の四角: THR7; 塗りつぶされた黒丸: THR14 / THR15; 塗りつぶされた赤の四角: THR16 / THR17; 塗りつぶされた青の三角: THR18 / THR19; 塗りつぶされていない赤の三角: THR3; 塗りつぶされた緑の逆三角: THR4; 塗りつぶされていない黒の三角: 非特異的一本鎖 DNA。

【図 17】タンパク質検出用分子ビーコンを示す。DNA 結合タンパク質用分子ビーコン (A) と、タンパク質の 2 つの異なるエピトープに対するアプタマーを基礎としたタンパク質検出用分子ビーコン (B) の設計の比較。

【図 18】アプタマー構築物のトロニンビンへの結合を示す。(A) 5' フルオレセイン部位の蛍光強度の変化によって検出された G15D アプタマー (THR2) (50 nM) の結合; 実線は実験データの単純な 1:1 結合等温線への最適適合を示す。(B) 10 倍過剰量の未修飾 60-18 [29] アプタマーの存在下での G15D アプタマー (THR2) の結合; 実線は実験データの単純な 1:1 結合等温線への最適適合を示す。(C) トロニンビンアプタマー構築物とフルオレセイン標識 G15D アプタマー (THR2) の間の競合を検出する実験の概要。THR2 (200 nM) の蛍光の強度が、競合物 (200 nM) の存在下における結合 THR2 の % を決定するために用いられた。トロニンビンは 150 nM であった。各棒の上の表示は、THR2 アプタマーの親和性と比較した場合の競合物の相対的親和性 (親和性定数の増加倍率で表示) を示す。(D) ゲルシフトアッセイによって検出された THR7 アプタマー構築物のトロニンビンへの結合。THR7-アプタマー複合体に対応するバンドの強度をトロニンビン濃度の関数としてプロットした。挿入図: sybr Green によって染色されたゲルの画像。蛍光の変化 (%) は $100 \times (I - I_0) / I_0$ として計算された。ここで I および I₀ はそれぞれ所定濃度のトロニンビンの存在および非存在下で観察される、希釈補正蛍光発光強度に対応する。

【図 19】トロニンビンビーコンの設計を示す。G15D と 60-18 [29] のアプタマーが 5 個のスペーサー 18 単位を含むリンカーにより 7 bp の蛍光団 (あるいは消光剤) 標識シグナル二本鎖に連結された。(A) フルオレセイン標識 G15D 構築物 (THR21) とダブル鎖標識 60-18 [29] 構築物 (THR20) のヌクレオチド配列。X はスペーサー 18 部位に対応する。(B) トロニンビンビーコンによるシグナル機構。(C) トロニンビンビーコンにトロニンビンを加えた際に検出される蛍光シグナル変化。比較のため、ダブル鎖標識 60-18 [29] 構築物 (THR20) の非存在下での、フルオレセイン標識 G15D 構築物 (THR21) のトロニンビンによる滴定も示す (ドナーのみの曲線)。シグナル変化 (%) は $100 \times (I - I_0) / I_0$ として計算される。ここで I および I₀ はそれぞれ所定濃度のトロニンビンの存在および非存在下で観察される、希釈補正蛍光発光強度に対応する。挿入図は主グラフの各データ点に対応する種々のトロニンビン濃度において記録された蛍光発光スペクトルを示す。

【図 20】種々の組み合わせのドナー-アクセプター蛍光団を備えたトロニンビンビーコン

のバリエーションを示す。(A)フルオレセイン - ダブシル; (B)フルオレセイン - テキサスレッド; (C)フルオレセイン - Cy5; (D)Cy3 - Cy5。トロンビンの非存在下(黒線)および存在下(赤線)でのビーコンの発光スペクトルが示される。挿入図は対応するビーコンと表示された濃度のトロンビンを含むマイクロプレートのウェルの偽カラー画像を示す。画像はBio-Rad Molecular Imager FXで得られたもので、以下の励起 - 発光設定を用いた: (A)488nmレーザー - 530nmバンドパスフィルター; (B)488nmレーザー - 640nmバンドパスフィルター; (C)488nmレーザー - 695nmバンドパスフィルター; (D)532nmレーザー - 695nmバンドパスフィルター。蛍光値は恣意的単位(測定機器反応について補正)で表され、線形スケールにプロットされている。

10

【図21】様々な組み合わせのドナー - アクセプターペアを有するビーコンの反応曲線。(A)フルオレセイン - ダブシル; (B)フルオレセイン - テキサスレッド; (C)Cy3 - Cy5; (D)フルオレセイン - Cy5; (E)ユーロピウムキレート - Cy5; (F)飽和トロンビン濃度において法事されたドナー - アクセプターペアについて観察されるシグナル変化の倍率。挿入図は低トロンビン濃度におけるデータ点の拡大図を示す。全ての実験において5nMのドナーで標識され、5.5nMのアクセプターで標識されたアプタマー構築物が用いられた。シグナル変化(倍率)は $100 \times (I - I_0) / I_0$ として計算される。ここでIおよび I_0 はそれぞれ所定濃度のトロンビンの存在および非存在下で観察される、希釈補正蛍光発光強度に対応する。シグナル変化を計算する前に、Iおよび I_0 から緩衝液のバックグラウンドを差し引いた。

20

【図22】トロンビンビーコンの感度のドナー - アクセプターペアへの依存を示す。低トロンビン濃度で、フルオレセイン - ダブシルペア(三角形)、フルオレセイン - テキサスレッドペア(逆三角形)、およびフルオレセイン - Cy5ペア(丸)で標識されたビーコンを使用して、10nMのドナーで標識され11nMのアクセプターで標識されたビーコンの反応が決定された。四つの独立した実験の平均と標準偏差が示されている。シグナル変化(倍率)図5と同様に計算された。

【図23】トロンビンビーコンの再現性と安定性を示す。(A)四つの異なるトロンビン濃度における、5つの独立したビーコンシグナルの決定が行われた。示されたデータは平均値 + / - 標準偏差を示す。(B)四つのトロンビン濃度におけるトロンビンビーコンシグナルを最大24時間にわたり測定した。示された数値は5回の独立した測定の平均値 + / - 標準偏差を示す。本実験中では、5nMのフルオレセイン標識アプタマー(THR21)と5.5nMのテキサスレッド標識アプタマー(THR27)を含むビーコンを用いた。シグナル変化(倍率)の計算は、緩衝液バックグラウンドを差し引かなかった点を除けば図5と同様に行った。

30

【図24】トロンビンビーコンのZ'因子(Z' - factor)の決定を示す。プロットの中央のパネルは、グラフに示された実験(上半部のウェルは+トロンビン、下半部のウェルは-トロンビン)に対応するマイクロプレートウェルの偽カラー画像を示す。実験では、5nMのフルオレセイン標識アプタマー(THR21)と5.5nMのテキサスレッド標識アプタマー(THR27)を用いた。シグナルは、ドナー励起によって測定されたアクセプターの対ドナー発光強度比(恣意的単位で表示)に対応する。

40

【図25】複合体混合液中でのトロンビンの検出を表す。(A)過剰量の無関係なタンパク質の存在下における1nMのトロンビン濃度での、トロンビンビーコンの反応。示されたデータは4つの独立な実験の平均値と標準偏差である。(B)種々の量のトロンビンでスパイクされたHeLa細胞抽出物中でのトロンビンの検出。示されたデータは三つの独立な実験の平均値と標準偏差である。細胞抽出物中のトロンビン濃度は: 1.88nM(淡灰色の棒); 3.75nM(濃灰色の棒); 7.5nM(黒棒)。ビーコン混合液単体のシグナルは、細胞抽出物(トロンビン未添加)がある時(図には示されていない)より約25%低く、細胞抽出物および特異的競合物の存在下で観察されたシグナルとほぼ同じであった。(C)トロンビンビーコンで観察された、Xa因子によって触媒されるプロトロンビンからトロンビンへの変換の時間的経過。(D)血漿中でのトロンビンの

50

検出。示されたデータは四つの独立な実験の平均値と標準偏差である。用いられた血漿の体積（アッセイ混合液 20 μ l あたり）は：0.005 μ l（淡灰色棒）；0.015 μ l（濃灰色棒）；0.045 μ l（黒棒）。「特異的」は未標識トロンピンアプタマー競合物を指し（THR7）、「非特異的」は30ヌクレオチド長のランダム配列のDNAを指す。パネルA、B、およびD中のシグナルは、ドナー励起によって測定されたアクセプターの対ドナー発光強度比（恣意的単位で表示）を示す。ビーコン混合液単体（AとD）および細胞抽出物が存在する時のビーコン混合液（B）、の値が1となるようにシグナルを規格化した。パネルCは生のアクセプター蛍光強度（アクセプター励起下）を示す。

【図26】センサーのバリエーションを示す。

【図27】図26のFに示されたセンサー設計の実験的証明を示す。（A）センサー機能の原理。（B）DNA結合タンパク質の濃度を増加させた場合の、ドナーとアクセプターの標識センサー成分の混合物に対する滴定の際の、感作アクセプターの蛍光の増加。

10

【図28】図26のGに示されたセンサー設計の機能の実験的証明を示す。（A）センサー機能の原理。（B）2つのドナーおよびアクセプター標識センサー成分の混合物（-で示されるスペクトル）にセンサー要素に相補的な2つの異なる配列エレメントを含む一本鎖DNAを加えた場合の感作アクセプター蛍光の増加（+で表される発光スペクトル）。

【図29】目標大分子を認識する単一の要素に基づいたアッセイと比べた場合の、我々のセンサー設計の有する増加した特異的の実験的証明を示す。

【図30】図26に示されたセンサー用アプタマーを作る方法を示す。

【図31】G15Dアプタマーの結合部位とは異なるエピトープにおいてトロンピンに結合するアプタマーの選択の概要を示す。

20

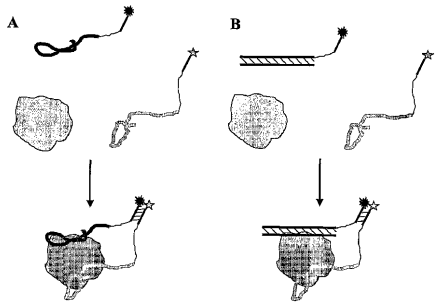
【図32】図31パネルCのクローン20-26中の配列に対応する配列を含む、テキサスレッド標識THR27およびフルオレセイン標識THR35あるいはTHR36を含む機能的トロンピンセンサーの証明を示す。

【図33】2つの異なるエピトープにおいてトロンピンと結合する2つのアプタマーの同時選択の概要を示す。

【図34】CRPタンパク質と、該タンパク質のDNA結合部位でない部位で結合するアプタマーの選択の概要を示す。

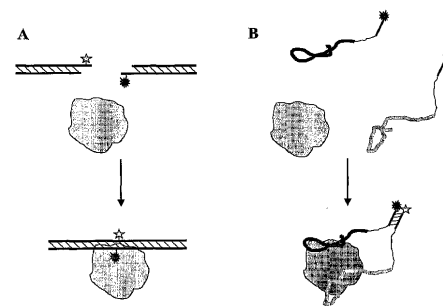
【 図 1 】

Figure 1

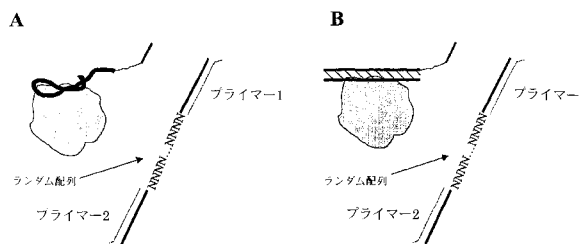


【 図 3 】

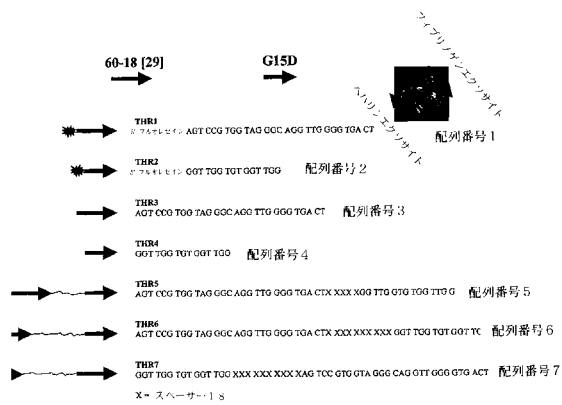
Figure 3



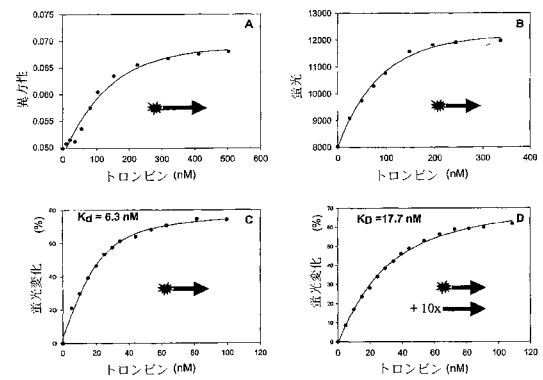
【 図 2 】



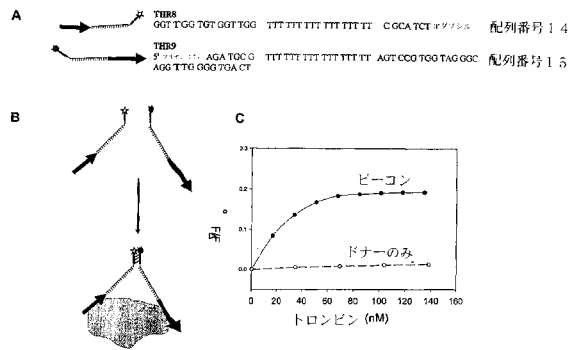
【 図 4 】



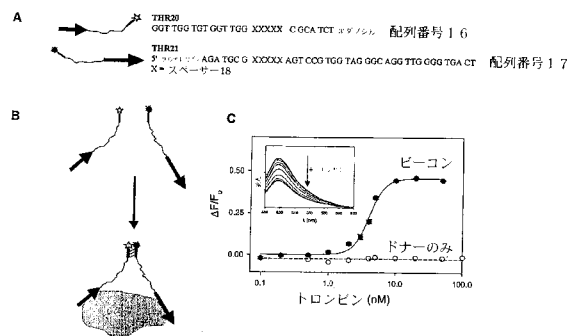
【 図 5 】



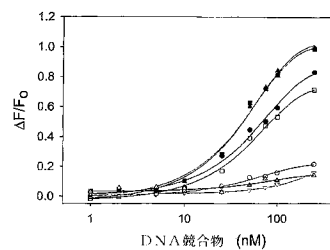
【図 12】



【図 13】

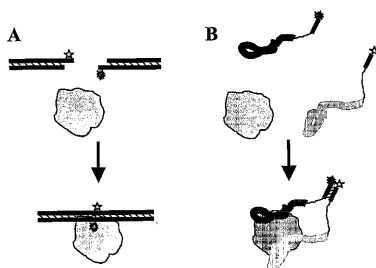


【図 16】

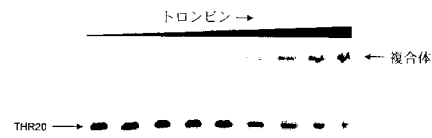


【図 17】

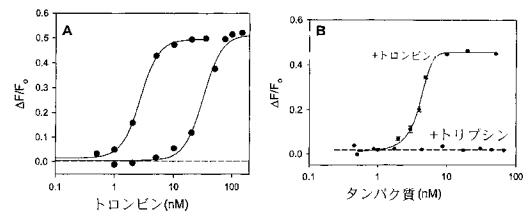
Figure 17



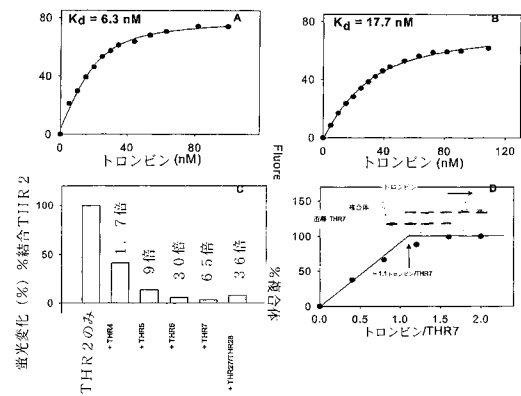
【図 14】



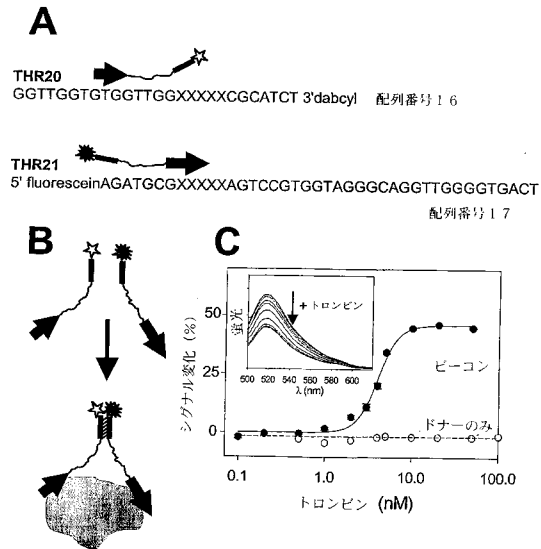
【図 15】



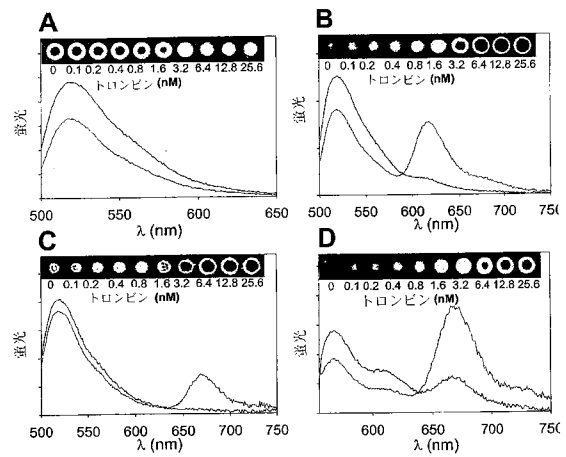
【図 18】



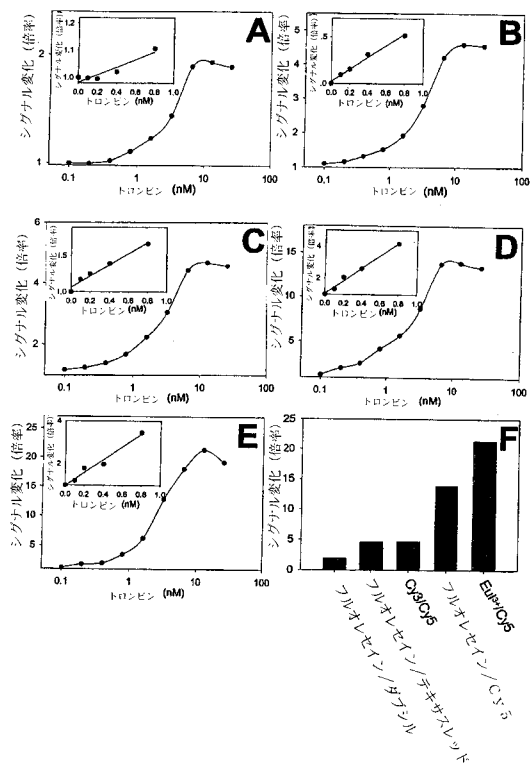
【図 19】



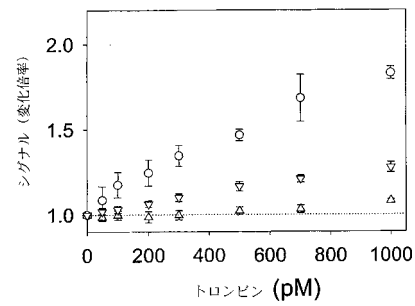
【図 20】



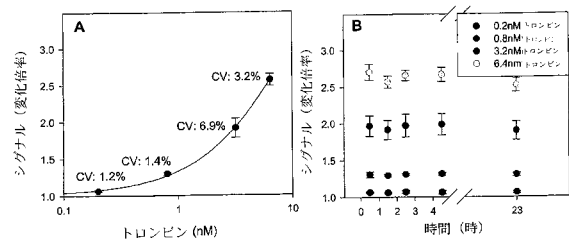
【図 21】



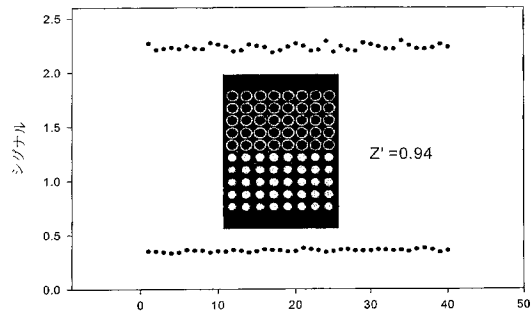
【図 22】



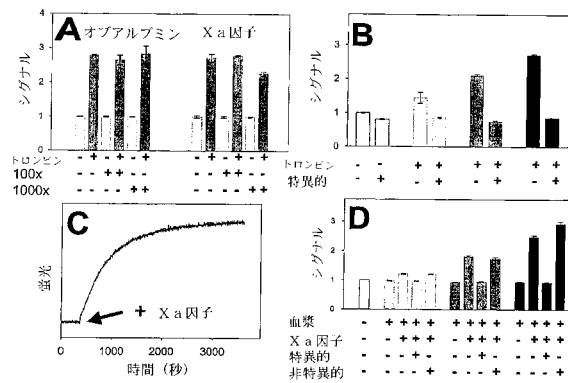
【図 23】



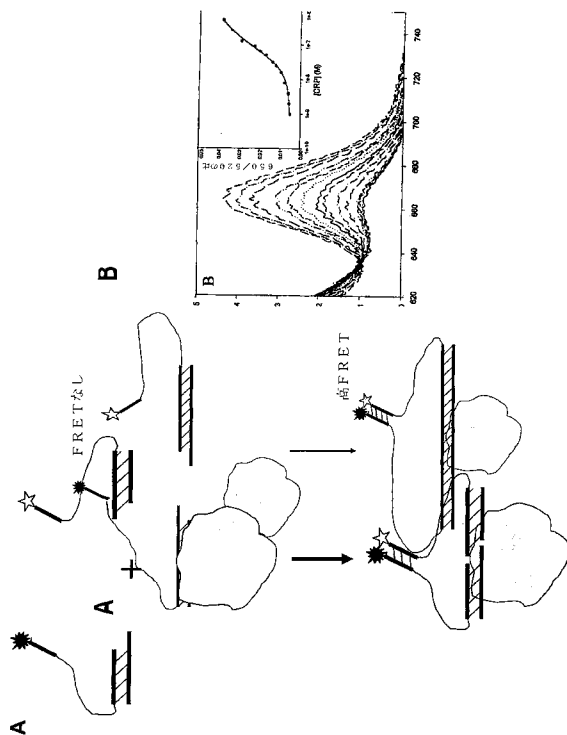
【図 24】



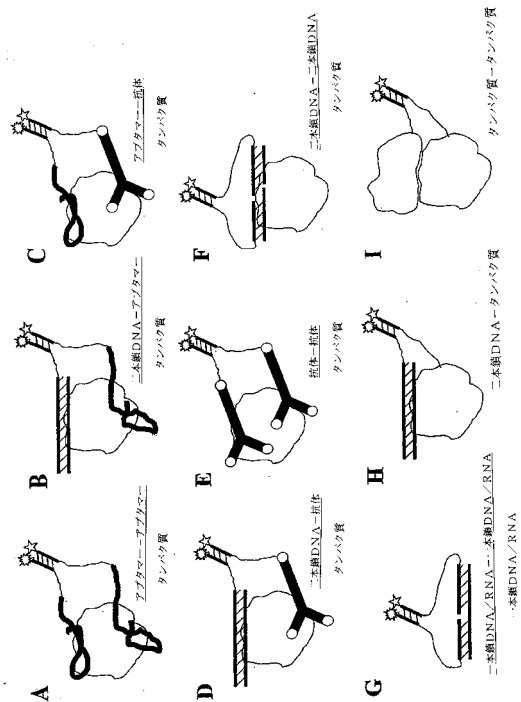
【図 25】



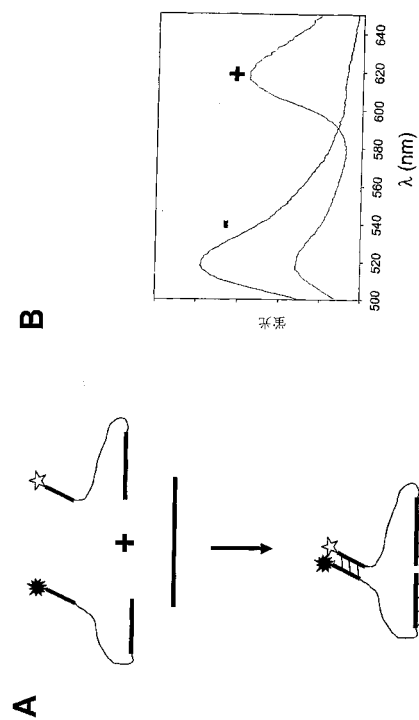
【図 27】



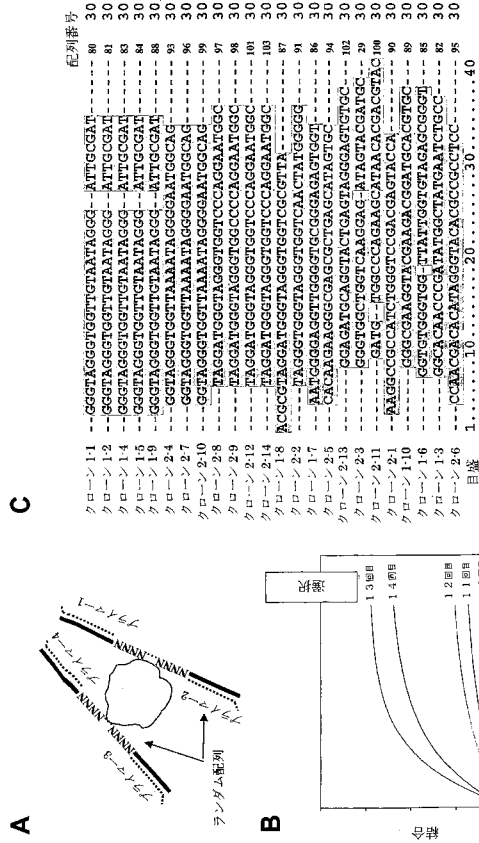
【図 26】



【図 28】



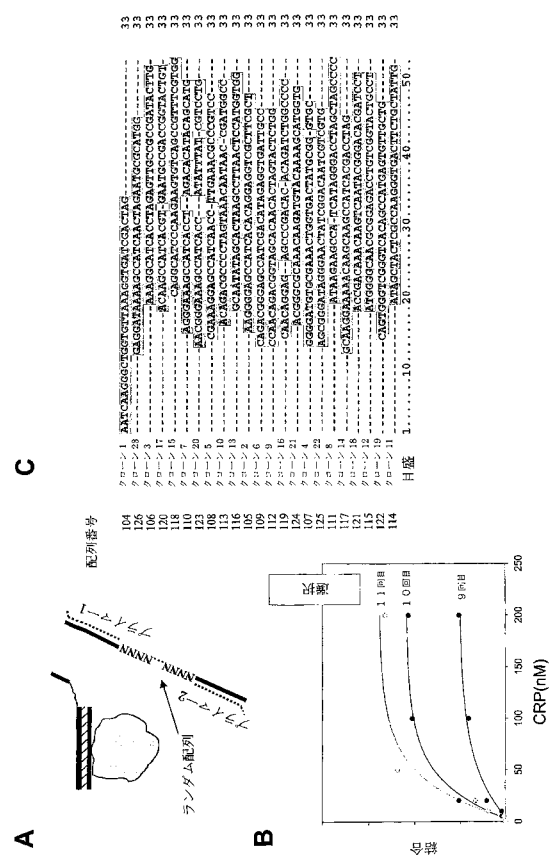
【図 3 3】



【配列表】

2007525661000001.xmI

【図 3 4】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/50		Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15		Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	Z N A A	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	A	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K 37/02		
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5	

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

(72) 発明者 ハイダック、トマーズ
アメリカ合衆国 6 3 0 2 1 ミズーリ州 セントルイス ジョンソン プレイス ドライブ 2
5 1 0

(72) 発明者 ハイダック、エワ
アメリカ合衆国 6 3 0 2 1 ミズーリ州 セントルイス ジョンソン プレイス ドライブ 2
5 1 0

(72) 発明者 クノール、エリック
アメリカ合衆国 6 3 1 2 6 ミズーリ州 クレストウッド フォックス クリーク コート 6
4 8

F ターム(参考) 2G045 CA25 CB01 CB03 DA36 DA77 FA11 FB03 FB12
2G054 AA06 AA10 AB04 CA21 CA23 CE02 EA03 EA07 GA04 GB02
4B024 AA11 CA01 CA11 HA11
4B063 QA18 QQ79 QR32 QR35 QR48 QR56 QS32 QX01
4C084 AA01 AA17 BA31 BA35 CA18 NA14 ZB211 ZC801

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2007525661A5	公开(公告)日	2008-01-31
申请号	JP2006543991	申请日	2004-12-10
[标]申请(专利权)人(译)	圣路易斯大学		
申请(专利权)人(译)	圣路易斯大学		
[标]发明人	ハイダックトマーズ ハイダックエワ クノールエリック		
发明人	ハイダック、トマーズ ハイダック、エワ クノール、エリック		
IPC分类号	G01N33/542 G01N33/53 G01N33/543 G01N21/78 G01N33/00 G01N33/50 G01N33/15 C12N15/09 C12Q1/68 A61K38/00 A61K45/00 A61P43/00		
CPC分类号	A61P43/00 C12N15/111 C12N2310/16 C12N2310/3517 C12N2320/10 C12Q1/6825 G01N21/6428 G01N33/5308 G01N33/542 G01N2021/6432 G01N2021/6441 C12Q2525/205		
FI分类号	G01N33/542.A G01N33/53.D G01N33/543.575 G01N21/78.C G01N33/00.D G01N33/50.Z G01N33/15. Z C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A A61K37/02 A61K45/00 A61P43/00.105		
F-TERM分类号	2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FA11 2G045/FB03 2G045/ /FB12 2G054/AA06 2G054/AA10 2G054/AB04 2G054/CA21 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EA07 2G054/GA04 2G054/GB02 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/HA11 4B063 /QA18 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS32 4B063/QX01 4C084/AA01 4C084/AA17 4C084/BA31 4C084/BA35 4C084/CA18 4C084/NA14 4C084/ZB211 4C084/ /ZC801		
代理人(译)	中岛敦		
优先权	60/529076 2003-12-12 US		
其他公开文献	JP2007525661A		

摘要(译)

公开了利用可用于鉴定和定量任何多肽或大分子复合物的核心构建体集的组合物和方法。创建与大分子构建体多肽的独特表位结合的适体构建体。这些适体构建体含有表位结合位点，核心结合位点和可检测标记。在存在同源多肽，分析物 - 多肽复合物或其他大分子复合物的情况下，所述共肽相互结合以产生可检测的信号。核心构建体构建体可以与接头连接以产生二价适体构建体。