

(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2012-115269

(P2012-115269A)

(43) 公開日 平成24年6月21日(2012.6.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A Z	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/115 (2010.01)</b>	C 1 2 N 15/00 H	4 B O 6 3
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 D	
<b>G O 1 N 33/542 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/542 A	
<b>G O 1 N 33/543 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/543 5 9 5	

審査請求 有 請求項の数 108 O L 外国語出願 (全 140 頁)

(21) 出願番号	特願2011-284014 (P2011-284014)	(71) 出願人	506200555 セントルイス ユニバーシティー
(22) 出願日	平成23年12月26日 (2011.12.26)		アメリカ合衆国 6 3 1 0 4 ミズーリ州
(62) 分割の表示	特願2006-543991 (P2006-543991) の分割		セントルイス スイート シー 1 1 0
原出願日	平成16年12月10日 (2004.12.10)		キャロライン モール 3 5 5 6 セント
(31) 優先権主張番号	60/529,076		ルイス ユニバーシティー テクノロジー
(32) 優先日	平成15年12月12日 (2003.12.12)		トランスファー オフィス
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
		(74) 代理人	100101454 弁理士 山田 卓二
		(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人	100146259 弁理士 橋本 諭志

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】 (修正有)

【課題】 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、コアダマー構築物セットを利用した組成物と方法を提供する。

【解決手段】 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ダマー構築物。これらアダマー構築物は、エピトープ結合部位、コアダマー結合部位、および検出可能な標識を含む。同族ポリペプチド、アナライト - 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、コアダマーは互いに結合して検出可能なシグナルを生み出す。コアダマー構築物はリンカーで連結されて二価アダマー構築物を産生してもよい。

【選択図】 なし

## 【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前記ポリペプチドの第 2 のエピトープに結合でき、

(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。

## 【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。

## 【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 F R E T である請求項 6 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。

## 【請求項 10】

ポリペプチドがトロンピンである請求項 9 の方法。

## 【請求項 11】

第 1 のアプタマーがトロンピ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ンピ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。

10

20

30

40

50

## 【請求項 14】

第2の標識がダブルで、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】

サンプル中のアナライトを検出する方法であって、該方法は

10

(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、およびアナライトの結合を検出方法により検出するステップと、

を含み、

(c) アナライトの存在下で、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、

20

(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~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】

30

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】

40

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アナライト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】

アナライトが薬物であり、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。

50

## 【請求項 28】

アナライト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請求項27の方法。

## 【請求項 29】

アナライト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。

10

## 【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のアプタマーに結合させるステップと、

(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、

20

(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。

30

## 【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~7ヌクレオチドからなる請求項32の方法。

40

## 【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】

50

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 3 2 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ーを含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。

10

【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。

【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】

リンカーがスペーサー 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。

20

【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。

【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～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、リンカーがスペーサー 1 8 である、請求項 4 2 の二価アプタマー構築物。

40

【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、リンカー分子がスペーサー 1 8 である請求項 4 3 の二価アプタマー構築物。

【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

50

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。

10

【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～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。

20

【請求項 6 3】

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

【請求項 6 4】

アナライト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

30

、  
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、

40

( 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】

50

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、
  - (c) サンプル中の、前記ポリペプチドに結合できるアナライトの存在を、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71】

- (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) アナライト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70の方法。

10

【請求項72】

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70の方法。

【請求項73】

患者がヒトである請求項70の方法。

20

【請求項74】

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、
  - (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75】

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74の方法。

【請求項76】

アナライト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、前記有用な試薬がアナライトである、請求項74の方法。

30

【請求項77】

前記有用な試薬が潜在的な治療組成物である、請求項74の方法。

【請求項78】

- (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74の方法。

40

【請求項79】

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78の方法。

【請求項80】

アナライト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、有用な試薬がアナライトである、請求項78の方法。

【請求項81】

有用な試薬は潜在的な治療組成物である、請求項78の方法。

50

## 【請求項 8 2】

請求項 4 2 ~ 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的組成物。

## 【請求項 8 3】

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 ~ 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。

10

## 【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 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 i ) 第 1 のシグナリングオリゴと、( i i i i ) 第 1 の標識とを含み、

20

( 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。

30

## 【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。

40

## 【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 ~ 9 4 のい

50

ずれか一項の方法。

【請求項 96】

検出方法が発光共鳴エネルギー移動である請求項 95 の方法。

【請求項 97】

ポリペプチドがトロンビンあるいは cAMP 反応エレメント結合タンパク質 (CPR) である、請求項 85 ~ 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 ~ 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。

10

【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。

20

【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含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。

30

【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含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 の結合部位を含む二本鎖ポリヌクレオチドである、請求項 107 の方法。

40

【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 CA9435

50

6)、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ー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、コンピューター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。

【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、アナライト(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係るものである。本発明はバイオメディカル研究ツールと診断キットに係っている。

10

【背景技術】

【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・スループットな並列タンパク質検出(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)。

30

【0008】

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つ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光学的シグナルを生み出すのに用いられる。

40

【0009】

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

50

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.; Heyduk, 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より有用だが、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。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】米国特許番号6,544,746

【特許文献2】PCT/US02/24822

【特許文献3】PCT/US03/02157

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Heyduk, T.; Heyduk, E. *Nature Biotechnology* 2002, 20, 171-176

【非特許文献1】Heyduk, E.; Knoll, E.; Heyduk, T. *Analyt. Biochem.* 2003, 316, 1-10

【非特許文献1】Knoll, E.; Heyduk, T. *Analyt. Chem.* 2004, 76, 1156-1164

【非特許文献1】Heyduk, E.; Fei, Y.; Heyduk, T. *Combinatorial Chemistry and High-throughput Screening* 2003, 6, 183-194

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

#### 分子ビーコンとしてのアプタマー

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、目標タンパク質の認識と該タンパク質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。

【0013】

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剤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. Biophys. 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

10

20

30

40

50

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。

【課題を解決するための手段】

【0014】

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アナライトへの配列特異的ヌクレオチド結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および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。

【0015】

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)アナライト、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。

【0016】

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。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【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DNA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つのアダプターからなるであろう。(B)天然のDNA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DNA配列を含む短いDNA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DNA(RNA)アダプターとからなるであろう。

【図2】第1のアダプター(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、についてのコアアダプターを作製する方法。

【図3】DNA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ダプタ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(60-18[29])およびヘパリンエクソサイト(G15D)で結合するアダプターを含むアダプター構築物。

【図5】フルオレセイン標識アダプターのトロンピンへの結合。(A)蛍光偏光で検出された60-18[29]アダプター(THR1)(50nM)の結合;(B)蛍光強度の変化により検出されたG15Dアダプター(THR2)(50nM)の結合;(C)フルオレセイン標識G15Dアダプター(THR2)(20nM)のトロンピンによる定量的平衡滴定。実線はアダプタ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;(D)十倍過剰量の非標識60-18[29]のアダプター(THR3)の存在かにおける、フルオレセイン標識G15Dアダプター(THR2)(20nM)のトロンピンによる定量的平衡滴定。実線はアダプタ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、トロンピンアダプター構築物とフルオレセイン標識G15Dアダプター(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、トロンピンアダプター構築物とフルオレセイン標識G15Dアダプター(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アダプター(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アダプター(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]アダプター(THR3)が、フルオレセイン標識G15Dアダプター(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アダプタ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】二価トロンピンアダプター構築物のファミリーで、G15Dと60-18[29]アダプターが、9-27個のヌクレオチド長のpolyTリンカーによって20bp二本鎖DNAに連結されたもの。

10

20

30

40

50

【図11】ゲルシフト法 ( EMSA ) によって検出された、トロンビンの図8中に示された二価アプタマー構築物 ( 各 33 nM ) への結合。星印は、トロンビンが9ヌクレオチド長のポリ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。トロンビンの濃度は0から400 nMの間で変化された。

【図12】17ヌクレオチド長のpoly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ビンビーコンの設計。(A)フルオレセイン標識G15D構築物 (THR9) とダブルシグナル標識60-18 [29]構築物 (THR8) のヌクレオチド配列。(B)トロンビンビーコンによるシグナル機構。(C)トロンビンをトロンビ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、ダブルシグナル標識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) トロンビ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ビンビーコンの設計。(A)フルオレセイン標識G15D構築物 (THR21) とダブルシグナル標識60-18 [29]構築物 (THR20) のヌクレオチドの配列。(B)トロンビンビーコンによるシグナル機構。(C)トロンビンをトロンビ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、ダブルシグナル標識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)ビーコンのトロンビンに対する特異性。50 nMのTHR21と95 nMのTHR20がトロンビン (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ンビンの混合物のシグナル (F<sub>0</sub>) 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

10

20

30

40

50

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濃度の関数としてプロットした。挿入図：s y b r 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 $I_0$ はそれぞれ所定濃度のトロニ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7bp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）トロニンビーコンによるシグナル機構。（C）トロニンビーコンにトロニ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 $I_0$ はそれぞれ所定濃度のトロニ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ーコンのバリエーションを示す。（A）フルオレセイン-ダブル；（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。トロニンの非存在下（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ニ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。蛍光値は任意単位（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。

【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）飽和トロニ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。挿入図は低トロニ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ニ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。

【図22】トロニ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。低トロニン濃度で、フルオレセイン-ダブルペア（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】トロニンビーコンの再現性と安定性を示す。（A）四つの異なるトロニン濃度における、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）四つのトロニン濃度におけるトロニ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（THR2

10

20

30

40

50

1)と5.5 nMのテキサスレッド標識アプタマー (THR 27) 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。

【図24】トロンピンビーコンの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+トロンピン、下半部のウェルは-トロンピン)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、5 nMのフルオレセイン標識アプタマー(THR 21)と5.5 nMのテキサスレッド標識アプタマー(THR 27)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(任意単位で表示)に対応する。

【図25】複合体混合液中でのトロンピンの検出を表す。(A)過剰量の無関係なタンパク質の存在下における1 nMのトロンピン濃度での、トロンピンビーコンの反応。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)種々の量のトロンピンでスパイクされたHeLa細胞抽出物中でのトロンピンの検出。示されたデータは3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ピン濃度は: 1.88 nM(淡灰色の棒); 3.75 nM(濃灰色の棒); 7.5 nM(黒棒)。ビーコン混合液単体のシグナルは、細胞抽出物(トロンピン未添加)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)トロンピ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ピンからトロンピンへの変換の時間的経過。(D)血漿中でのトロンピンの検出。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。用いられた血漿の体積(アッセイ混合液20 μlあたり)は: 0.005 μl(淡灰色棒); 0.015 μl(濃灰色棒); 0.045 μl(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(THR 7)、「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(任意単位で表示)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。

【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。

【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THR 27およびフルオレセイン標識THR 35あるいはTHR 36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。

【発明を実施するための形態】

【0018】

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

10

20

30

40

50

ブと第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、アナライト、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。

【0019】

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。

10

【0020】

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ブロッキング、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。好ましい対象はヒト、家畜、あるいはペットである。

20

【0021】

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。好ましい対象はヒト、家畜、あるいはペットである。

【0022】

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。

30

【0023】

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。

【0024】

「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。

40

【0025】

「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。

【0026】

「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」

50

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、アナライト、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。

【0027】

「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。

10

「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。

【0028】

「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。

20

【0029】

「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。

30

【0030】

「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。

40

【0031】

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-d Tである。

【0032】

「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

50

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」、「SELEX」あるいは「指数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数的に増加する。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.Lilley, 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。

10

#### 【0033】

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。

20

#### 【0034】

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）、ビオチン、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、 $Ni^{2+}$ 、フラッグタグ、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のである。

30

#### 【0035】

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。

40

#### 【0036】

本明細書中で「アナライト」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

50

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。

【0037】

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的な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。

10

【0038】

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。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。

20

30

【0039】

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。

40

【0040】

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

50

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。

【0041】

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。

10

【0042】

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される。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。

【0043】

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アナライトの検出に使用される。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、アナライトが、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。

20

【0044】

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。

30

40

【0045】

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

50

いに連結してもよい。

【0046】

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。

【0047】

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、アナライトに結合したポリペプ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。

10

【0048】

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、（カラムあるいはプ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。

20

30

【0049】

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、アナライト、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。

40

【0050】

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、アナライト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、アナライト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

50

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。好ましい患者にはヒト、家畜、およびペットが含まれる。

#### 【0051】

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アナライト(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与された第2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。

#### 【0052】

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】

#### 【0053】

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アナライト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)。

#### 【0054】

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。

## 【 0 0 5 5 】

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 (exocite) 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。

## 【 0 0 5 6 】

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。

10

## 【 0 0 5 7 】

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。

20

## 【 0 0 5 8 】

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。

30

## 【 実施例 2 】

## 【 0 0 5 9 】

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 / US 02 / 24822 および PCT / US 03 / 02157 (これらは参照により本明細書に取り込まれる)。

40

## 【 0 0 6 0 】

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

50

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中の中に存在する時、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。

#### 【0061】

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 and 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フォ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。

10

#### 【0062】

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; および 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。

20

30

#### 【0063】

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。トロンピンの例 (上掲) は本発明の実験的妥当性を示す。

#### 【0064】

##### 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

40

50

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。

【0065】

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、このタンパク質の2つの異なるエピトープを選択的に認識するDNA/aptamer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 human thrombin, *Nature* 355, 564-566, 1992; および Tasset, D.M., Kubik, M.F., and Steiner, W. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin 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1つのaptamer (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aptamer (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aptamer-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aptamerが柔軟なリンカーにより共有結合した種々のaptamer-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aptamer-構築物を連結すると、本当に個々のaptamer-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aptamer-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aptamer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。

10

20

【0066】

個々のaptamer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] aptamer (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 aptamer (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aptamer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] aptamer (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 aptamerと60-18 [29] aptamer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。

30

40

【0067】

つぎのステップにおいて、図4に示された各種のaptamer-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aptamer-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aptamer-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。

【0068】

すべての二価aptamer-構築物は、個々のaptamer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

50

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、トロンピ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。

#### 【0069】

図8の実験の目的は、トロンピンの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ピ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ピ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ピ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。

#### 【0070】

二価アプタマー構築物 - トロンピ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 - トロンピン複合体の形成を追跡し、複合体の化学量論を決定した。我々はトロンピンによる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、トロンピンの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）。

#### 【0071】

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でき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ピンで動じて規定した結果を示す。アプタマー構築物 - トロンピン複合体の生成をEMSAで追跡した。構築物はそれぞれトロンピ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ピ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、この特定のトロンピン濃度では、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ピ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

10

20

30

40

50

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、構築物をトロンピンに結合するのにより適していることを示している。

#### 【0072】

図3から図11に提示された実験データは、トロンピンおよびそれぞれトロンピンの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3B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、我々はトロンピンシグナリングビーコンを設計し、テストした。図12Aと図12Bに示されたビーコンはTHR16/THR17二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sein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'端をダブルシルで標識された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。トロンピンをTHR8とTHR9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。ダブルシル標識されたパートナー（THR8）が存在しないと、トロンピンをTHR9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ピンに誘発されるTHR8とTHR9の間の結合（図12Bに示されるとおり）が実際に観察され、機能的なトロンピ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

20

#### 【0073】

トロンピ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、最初はそれほど大きくはなかった（約20%）。このため、我々はトロンピ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13A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ピ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13Cは、トロンピンをTHR20とTHR21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、トロンピンがTHR21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、ビーコンのトロンピ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ピ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ピ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、我々はこのトロンピ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。

30

40

#### 【0074】

図14に示された実験は、THR20とトロンピンの存在下でフルオレsein標識アプタマー構築物（THR21）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、トロンピン検出の感度（図15A）と特異性（図15B）を示している。トロンピ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seinシグナルの検出感度のみ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ピン検出感度を調整できる。このことは図15Aに示され、50nMのTHR21と75nMのTHR20を使用した時、おおよそ10nM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（5nMのTHR21と7.5nMのTHR20）、10倍低い濃

50

度（およそ 1 nM）のトロンピンが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。

#### 【0075】

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。

#### 【0076】

#### 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。

#### 【実施例3】

#### 【0077】

サンプル中のアナライトの検出

#### 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、オポアルブミン、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-sulfonHNSはPierce（Rockford、IL）から購入した。そのほかのすべての試薬は、商業的に入手可能な分析グレードのものであった。

10

20

30

40

50

## 【0078】

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'端のダブル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。

10

## 【0079】

【表 1 - 1】

表 1

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 60-18 [29] 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 G15D 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) <sub>5</sub> 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) <sub>10</sub> 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) <sub>10</sub> 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) <sub>5</sub> C GCA TCT 3' ダブシル	配列番号 : 16	3' 端をダブシル標識された 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) <sub>5</sub> 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) <sub>5</sub> (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) <sub>5</sub> 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

【 0 0 8 0 】

【表 1 - 2】

THR12	5' フルオレイン CTG TCG TTA GTG AAG GTT	配列番号：21	THR11用プライマー1	
THR13	5' ビオチン CGT CTG TGA TAT GGC GTT	配列番号：22	THR11用プライマー2	
THR22	GGT TGG TGT GGT TGG (スベ-サ-18) <sub>2</sub> GA CAG	配列番号：23	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 (スベ-サ-18) <sub>5</sub> AC GA CAG	配列番号：24	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：25	ssDNAセンサー成分	10
THR32	5' フルオレイン AGA TGC G XXXXX TTGAACTGGACC	配列番号：26	ssDNAセンサー成分	
THR33	GGTCCAGTTCAA TT GCACTCTCGTTC	配列番号：27	ssDNAセンサーの目標ss DNA	
THR42	GGT TGG TGT GGT TGG XX XXX AAC GAC AG	配列番号：28	トロンビンアプタマー選択用コ アプタマー	
THR43	CTG TCG TT (スベ-サ-18) <sub>5</sub> TTGAGTCAGCGTCGAG CA NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN TTC ACT GTG CTG CGG CTA	配列番号：29	33ヌ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	20
THR44	5' フルオレイン CTG TCG TT (スベ-サ-18) <sub>5</sub> TTG AGT CAG CGT CGA GCA	配列番号：30	THR43用プライマー1	
THR45	5' ビオチン TAGCCGACAGCACAGTG AA	配列番号：31	THR43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：32	30ヌ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：33	30ヌ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	30
THR51	5' フルオレイン CAC CTG ATC GCT CCT CGT	配列番号：34	THR49用プライマー1	
THR52	5' ビオチンTTG TGC CTG TGC ATC CTG	配列番号：35	THR49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：36	THR50用プライマー3	
THR54	5' ビオチン CAC CTG ATC GGC ATC CTG	配列番号：37	THR50用プライマー4	
THR35	5' フルオレイン AGA TGC G (スベ-サ-18) <sub>5</sub> AG GTT GGG GGT ACT AGG TAT CAA TGG GTA GGG TGG TGT AAC CC	配列番号：38	トロンビンセンサー成分	40

【0081】

【表 1 - 3】

THR36	5' フルオレイン AGA TGC G (スベーター-18) <sub>5</sub> A GTG AAG GTT GGG GGT ACT AGG TAT CAA TGG GTA GGG TGG TGT AAC GCC ATA T	配列番号：39	トロンピンセンサー成分
MIS10X3	AAC GCA ATA AAT GTG AAG TAG ATC ACA TTT TAG GCA CC (スベーター-18) <sub>5</sub> GA TGGCT	配列番号：40	CRPアプタマー選択用コアアプタマー
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

## 【0082】

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 MgCl<sub>2</sub>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。バッファー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 FluorPlusマイクロプレートリーダー (Research Triangle Park、NC) で読んだ。あるいは、マイクロプレートを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 μlと20 μl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ー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

## 【0083】

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。

40

## 【0084】

トロンピ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。トロンピン、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ピ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。

## 【0085】

ゲルシフト分析 (EMSA) によるトロンピンアプタマー結合

50

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。

【0086】

#### 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。

【0087】

#### 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。

【0088】

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 G 1 5 D アプタマー（T H R 2）の結合は蛍光強度によって追跡できた（図 1 8 A）。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ピンに結合した（T H R 1 および図 1 8 A にはデータを示していない）。T H R 2 の場合の結合の定量的分析（図 1 8 A）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、Tasset 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。T H R 2 の結合が十倍過剰量の未標識 6 0 - 1 8 [ 2 9 ] アプタマー（T H R 3）中で行われた場合（図 1 8 B）、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 1 7.7 nM）。これにより、以前報告されたとおり、G 1 5 D アプタマーと 6 0 - 1 8 [ 2 9 ] アプタマーは独立にトロンピンの 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

#### 【 0 0 8 9 】

次のステップでは、各種アプタマー構築物の有する、トロンピンへの結合について T H R 2 と競合する能力が評価された。トロンピンを加えた場合の T H R 2 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ピンに結合した T H R 2 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 T H R 2 およびトロンピ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。T H R 3 は競合物ではなく（図 1 8 C）、これは図 1 8 A および B に示されたデータと一致する。T H R 4（T H R 2 の未標識変種）は予測どおり競合能力を備えていた（図 1 8 C）。この場合の競合の定量的分析により、T H R 4 は T H R 2 より 1.7 倍よくトロンピ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、トロンピ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 T H R 4 よりもはるかに優れた競合物であった（図 1 8 C）。T H R 7 が最高の競合物のようで、1 : 1 の比において T H R 2 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、T H R 7 は T H R 2 より少なくとも 6 5 倍（T H R 7 の推定  $K_d$ （9 7 pM）強くトロンピンに結合したことが明らかになった。図 1 8 C 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、高親和性トロンピ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（1 0 個スペーサー 1 8 単位を含む（5 個のスペーサー 1 8 単位との比較））で連結した場合、トロンピンに対してやや良好な親和性（T H R 5 と T H R 6 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 T H R 7 のような場合は、親和性がより良い（T H R 6 と T H R 7 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、T H R 7 のようなアプタマーの向きが用いられた。

20

30

#### 【 0 0 9 0 】

二価のアプタマー構築物（T H R 7）とトロンピンの間の複合体は、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 1 8 D）。我々はこの観察を利用して、ゲルシフト分析法（EMSA）（Fried, M.G.; Crothers, 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、T H R 7 - トロンピン複合体形成を追跡した。我々はトロンピンで T H R 7 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ンピンの T H R 7 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 1 8 D）、これは両アプタマー（T H R 7 の成分）が T H R 7 - トロンピ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。

40

#### 【 0 0 9 1 】

トロンピ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 1 7 B に示されたシグナリングビーコン設計を成功裏に

50

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 19 A に示されたトロンピ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ンピンアダプター（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ダプターに比べ、より緊密に（約 36 倍）トロンピンに結合した（図 18 C）が、これは 2つのアダプターを柔軟なリンカーで永続的に接続した二価アダプター構築物について観察された高いトロンピン親和性と整合する。トロンピンをそれぞれ蛍光団および消光剤で標識された THR 20 と THR 21 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 19 C）。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（THR 20）の非存在下ではトロンピンを THR 21 に加えても蛍光変化は観察されず（図 19 C）、蛍光の消光は、図 19 B 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ンピ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 d T 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ンピンビーコンについてもテストした。トロンピ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 d T 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つのアダプターがトロンピ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。トロンピ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 17 B に示された設計による機能的なトロンピンビーコンが得られたと結論付けた。

#### 【0092】

##### 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が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 17 B 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ンピンビーコン構築物を作製した。適切な染料の NHS エステルで標識された THR 21（あるいは適当な染料の NHS エステルで標識された THR 28）と THR 27 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 20 B）、フルオレセイン - Cy 5（図 20 C）、および Cy 3 - Cy 5（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 - Cy 5 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; Matthis, G. *Clinic. 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 - Cy 5 ペアの場合の約 2.2 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す。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 2.2 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 - Cy 5 標識ビーコン (飽和トロンピン濃度で約 1.5 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最低のトロンピン濃度 (50 pM) で既に検出できた。

10

20

#### 【0093】

図 2.3 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 2.3 A)。ビーコンシグナルは少なくとも 2.4 時間にわたり安定であった (図 2.3 B)。

#### 【0094】

図 1.7 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。

30

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 SSB (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)。SSB 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 (THR 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。SSB 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 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。対照的に、トロンピンビーコンをナノモルの SSB 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 SSB 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。

40

#### 【0095】

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質検出であろう。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られる簡単な統計的パラメーターを開発した。Z'-因子

50

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。トロンビンビーコンの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。

#### 【0096】

##### 複合体混合液中のトロンビンの検出

次の一連の実験は、トロンビ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ビンを検出する能力についてのものである。1 nMのトロンビ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(オプアルブミン、図25A)では影響されなかった。また、100倍過剰量のXa因子(トロンビンに類似する別の凝血プロテアーゼ)は1 nMのトロンビ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のトロンビンは依然として容易に検出可能であった(図25A)。トロンビ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、ビーコンはトロンビンに対して高度に選択的であると結論した。

#### 【0097】

ビーコンが複合体混合液中でトロンビンを検出できるかをテストするため、我々はHEL細胞抽出液を様々な量のトロンビンでスパイクし、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ビ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(未標識トロンビンアプタマー)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ビ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ー添加剤を試して、細胞抽出液の存在下でトロンビ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ビンに対する反応に有意な影響を与えることなくトロンビ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。

#### 【0098】

トロンビ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ビンは全てその前駆体であるプロトロンビンの形で存在しており、プロトロンビンはXa因子によるタンパク質分解的な処理によってトロンビンに変換される。プロトロンビンはトロンビンビーコンに認識されるものの、トロンビ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ビ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、プロトロンビンのトロンビ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ビンに対するはるかに高い感度と整合する。このため、血漿中のトロンビ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(未標識トロンビンアプタマー)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ビンによるものであることが確

10

20

30

40

50

認められた。20  $\mu$ l の反応容量中、5 nL 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、複雑な生物的混合液中のタンパク質を検出するトロンビンビーコンの機能性を証明した。

【0099】

#### 考察

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)。トロンビ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)に依存的でありえ、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。

【0100】

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(SEL EX)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。トロンビ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である(Bock, 1992; Tasset, 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SEL EXによっても作製可能である。我々のトロンビ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. および 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. および 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。

10

20

30

40

50

## 【実施例 4】

## 【0101】

## 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 26 F 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）。

10

## 【0102】

図 26 G 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 28 B、“+”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 THR 29 および THR 32 を含んでいた。

## 【0103】

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（ $G$ ）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關係のため、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（THR 1、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〔THR 21（フルオレセイン標識標識）と THR 27（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（破線）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 とトロンピ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。

20

30

## 【0104】

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 26 A 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。

40

## 【0105】

パネル B には別のシナリオが示されており、こ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 26 A 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。

50

## 【0106】

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。

## 【0107】

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。

10

## 【0108】

G15Dアプタマーの結合部位と異なるエピトープでトロンピ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のトロンピン結合活性を示す。測定可能なトロンピン結合活性は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。

20

30

## 【0109】

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THR35あるいはTHR36とを含む機能的なトロンピンセンサーが図32に示されている。THR35とTHR36は、クローン20~26の配列に隣接するDNA配列の長さの点で異なる。20nM(パネルA)あるいは100nM(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、THR21とTHR27を含むセンサーも示される。

## 【0110】

図33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、30ヌクレオチド長のランダム配列を含む2つの構築物(THR49とTHR50)から始まるSELEX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DNA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、14回目の選択の後に最大値に達した。14回目の選択後に得られたDNAをクローニングし、個々のクローンから得られたDNA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(ClustalX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。

40

## 【0111】

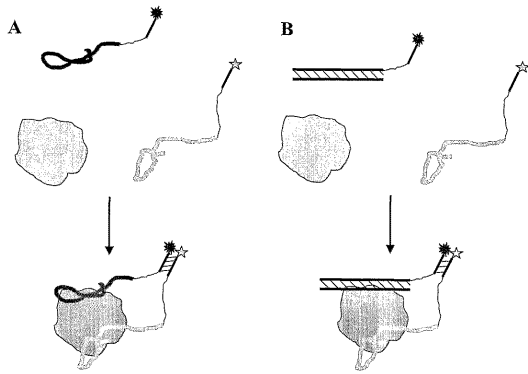
アプタマーを基礎とした分子ビーコンをcAMP反応エレメント結合タンパク質("C

50

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、33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、12 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。12 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 16 ヌクレオチド長の保存されたコア配列が同定できた。

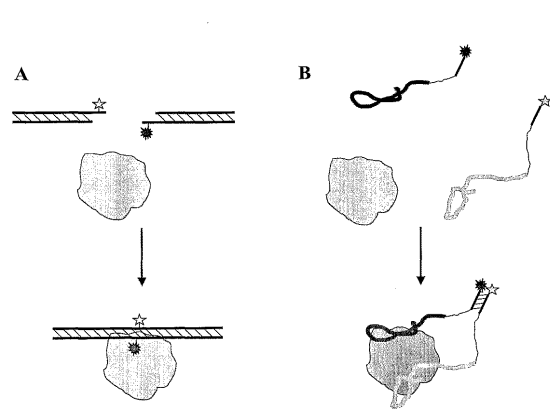
【 図 1 】

Figure 1

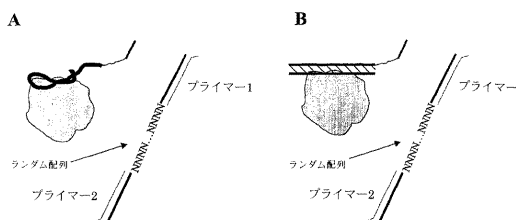


【 図 3 】

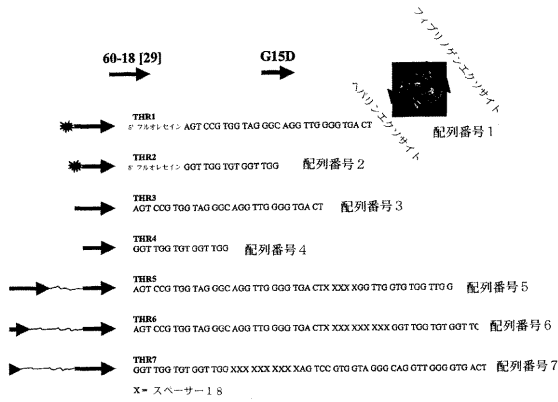
Figure 3



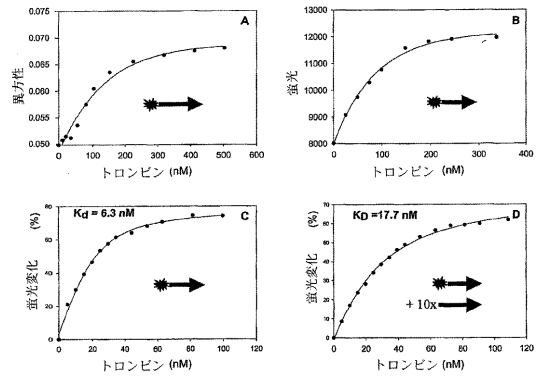
【 図 2 】



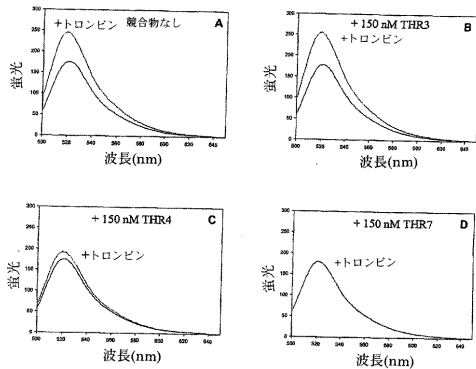
【 図 4 】



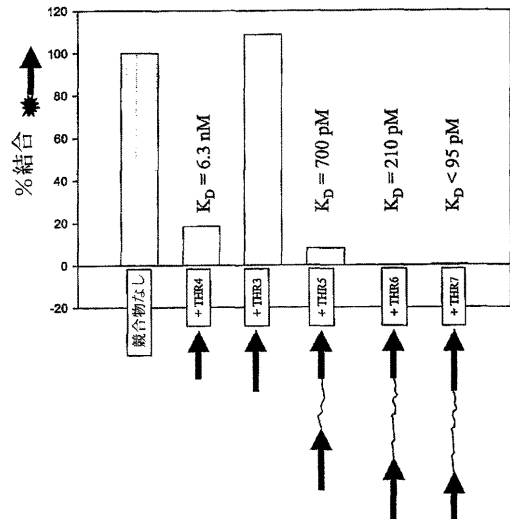
【 図 5 】



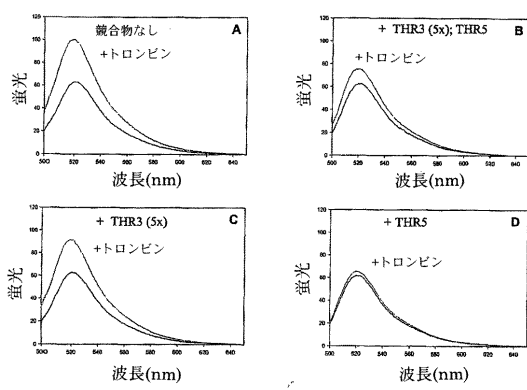
【 図 6 】



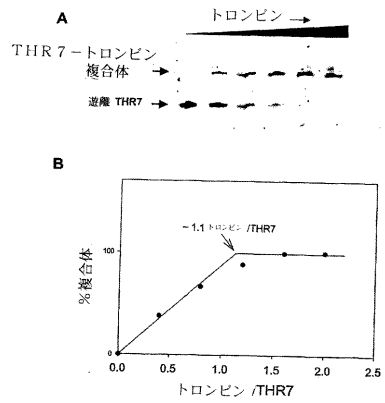
【 図 7 】



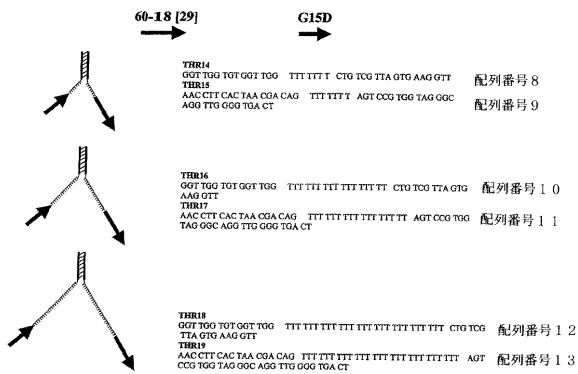
【 図 8 】



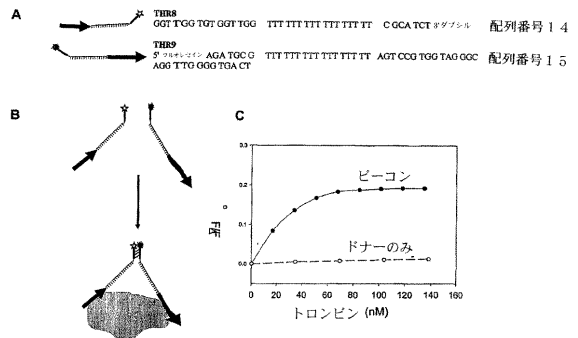
【 図 9 】



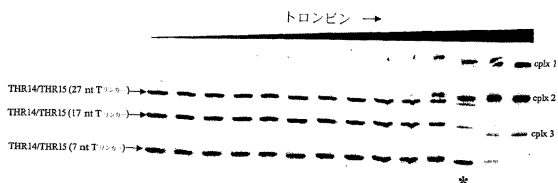
【 図 10 】



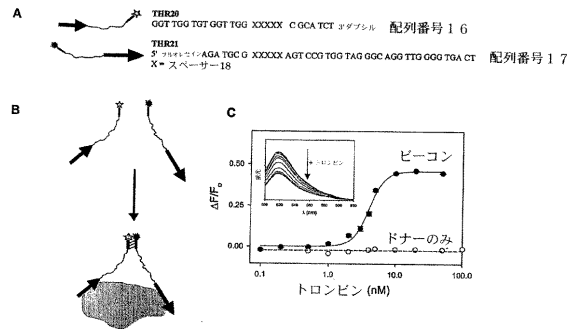
【 図 12 】



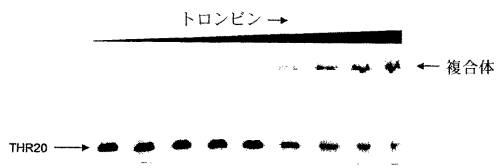
【 図 11 】



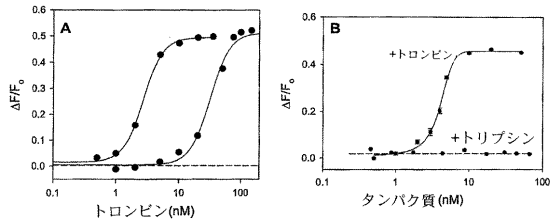
【 図 13 】



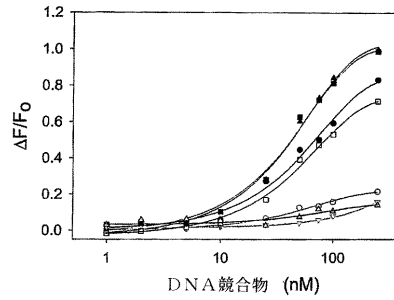
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

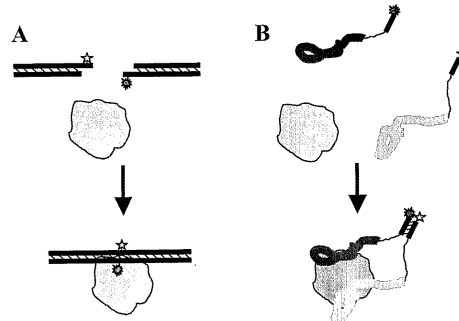


【 図 1 6 】

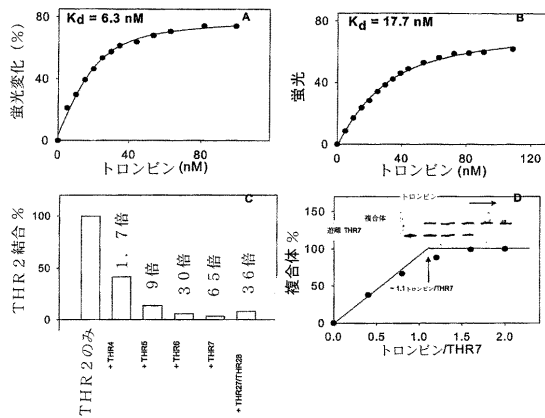


【 図 1 7 】

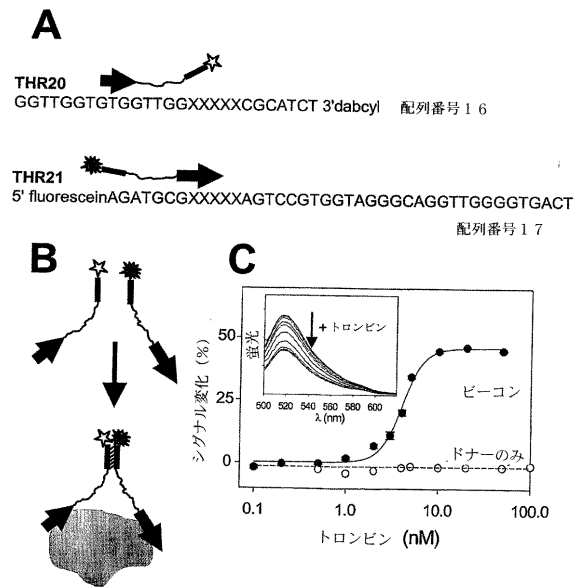
Figure 17



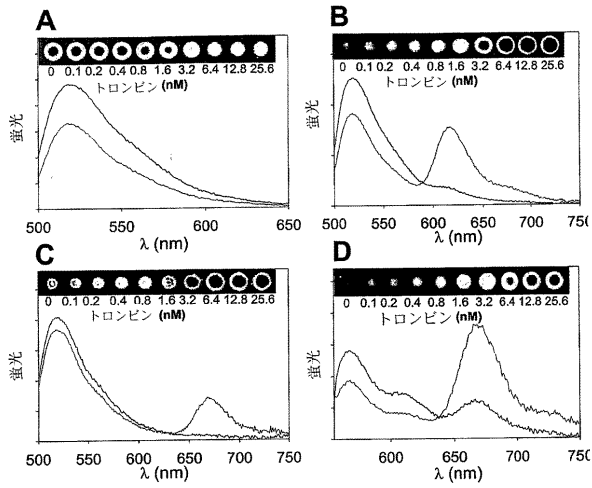
【 図 1 8 】



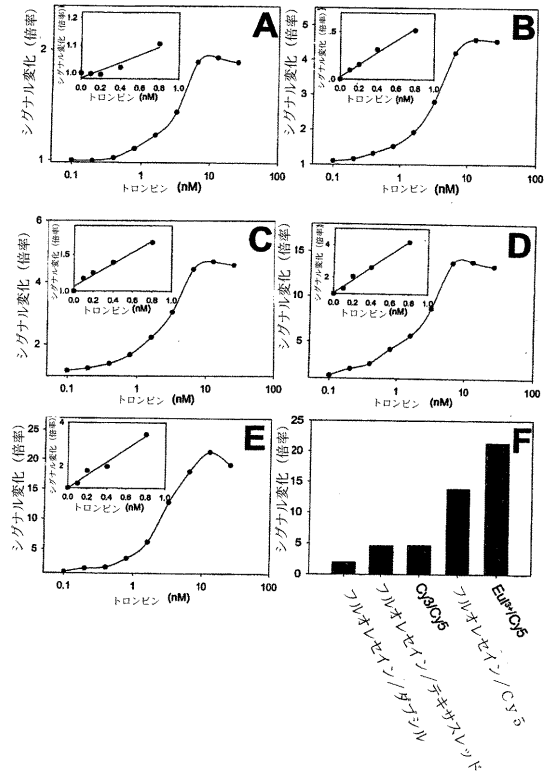
【 図 1 9 】



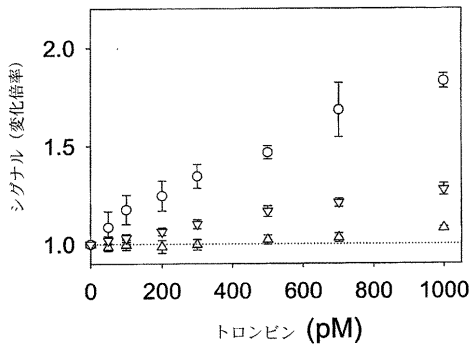
【 図 2 0 】



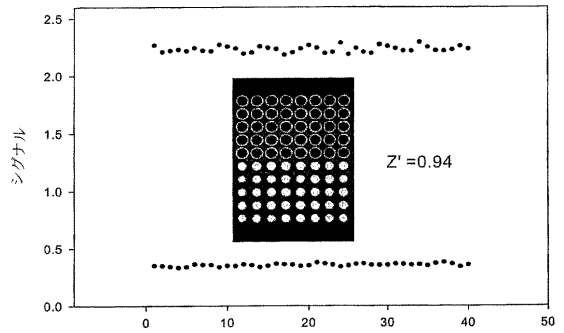
【 図 2 1 】



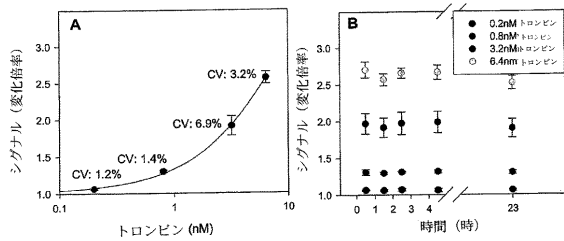
【 図 2 2 】



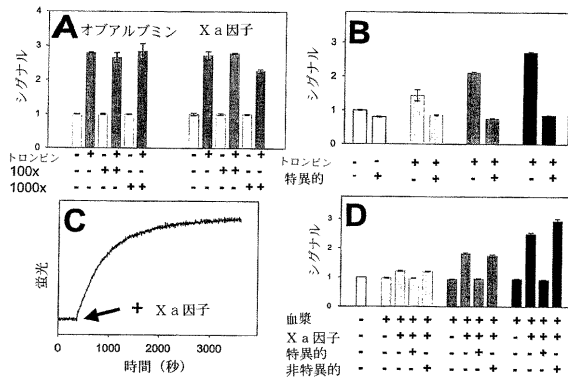
【 図 2 4 】



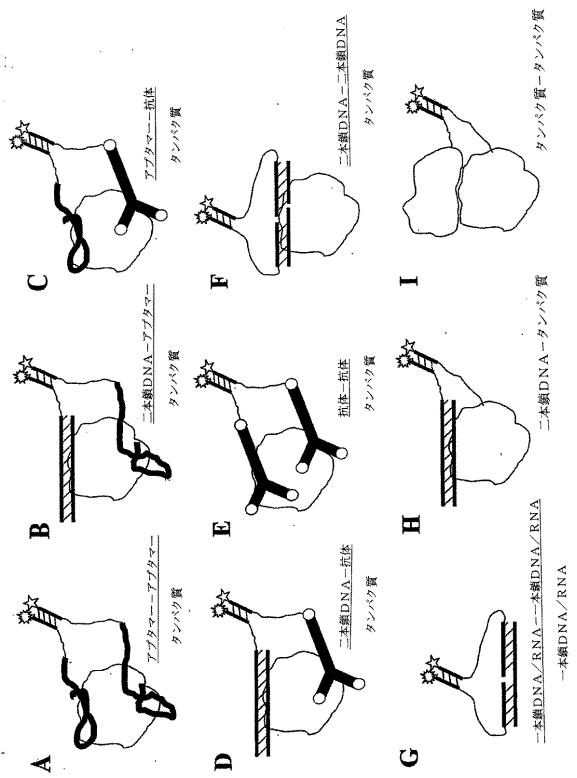
【 図 2 3 】



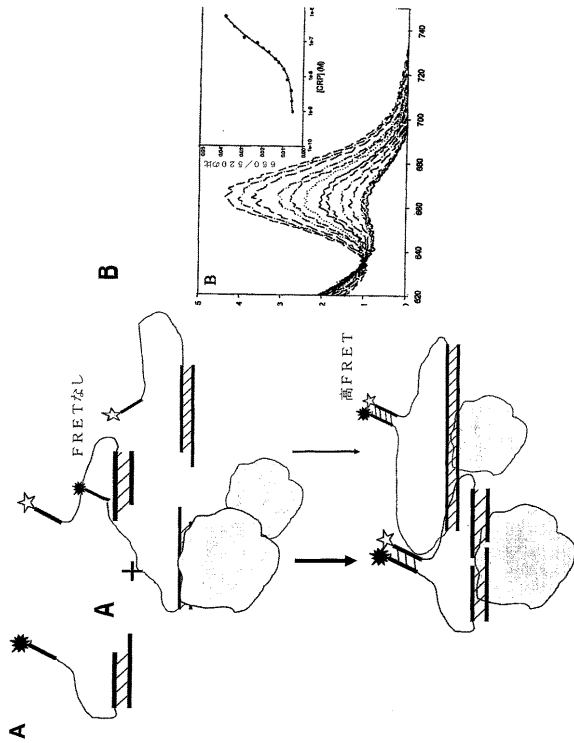
【 図 2 5 】



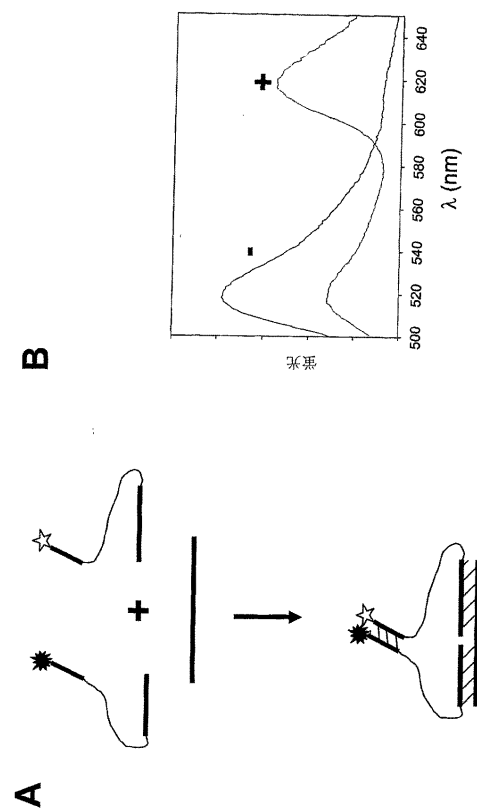
【 図 2 6 】



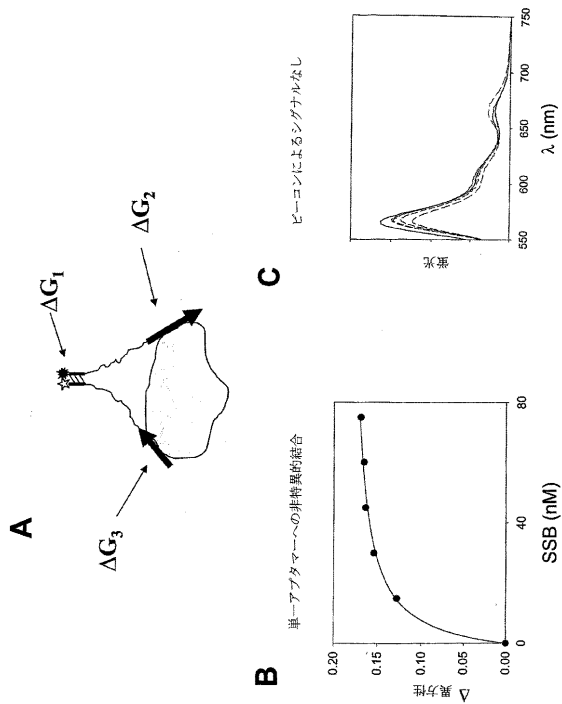
【 図 2 7 】



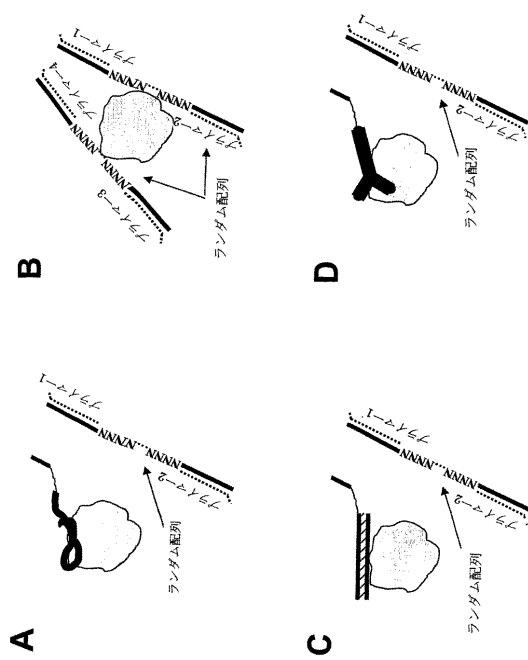
【 図 2 8 】



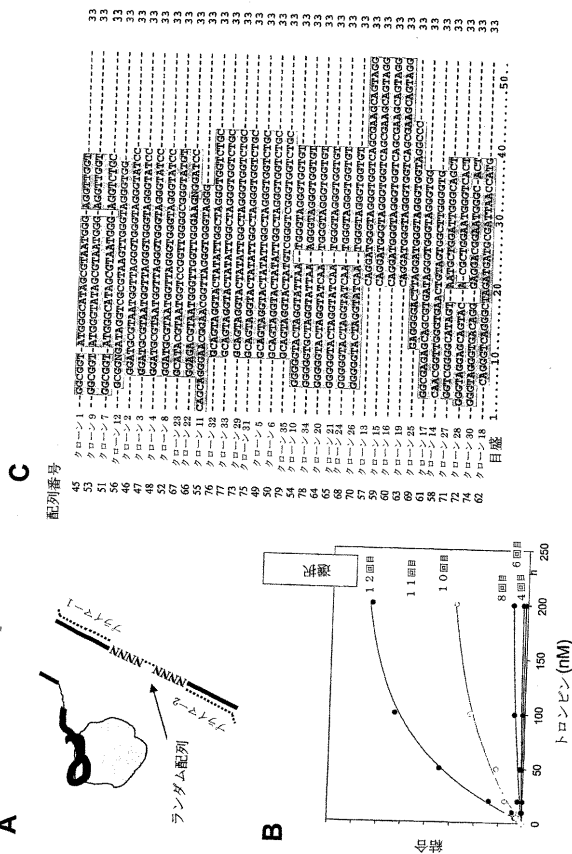
【 図 2 9 】



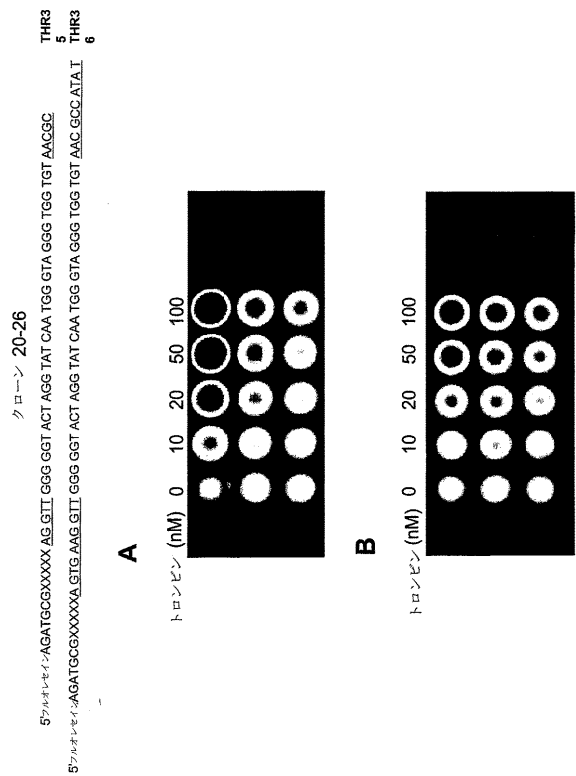
【 図 3 0 】



【 図 3 1 】



【 図 3 2 】





## フロントページの続き

(74)代理人 100165892

弁理士 坂田 啓司

(72)発明者 トマーズ・ヘイダック

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 エワ・ヘイダック

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 エリック・クノール

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) 4B024 AA11 CA01 CA20 HA11

4B063 QA01 QA18 QQ36 QQ79 QR32 QR48 QR62 QR66 QX02

## 【 外国語明細書 】

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

BIOSENSORS FOR DETECTING MACROMOLECULES AND OTHER  
ANALYTES

## PARENT CASE TEXT

- [0001] This patent application claims priority to U.S. Provisional Patent Application No. 60/529,076, which was filed on December 12, 2003.

## GOVERNMENTAL SUPPORT

- [0002] This work was supported by the U.S. Department of Health and Human Services/ National Institutes of Health grant number CA94356. The U.S. Government has certain rights in this invention.

## SEQUENCE LISTING

- [0003] A paper copy of the sequence listing and a computer readable form of the same sequence listing are appended below and herein incorporated by reference. The information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing, according to 37 C.F.R. 1.821 (f).

## BACKGROUND OF THE INVENTION

## 1. Field of the Invention

- [0004] The invention relates to kits, molecular beacons, and methods for detecting any polypeptide, analyte, macromolecular complex, or combination thereof. The invention relates to biomedical research tools and diagnostic kits.

## 2. Description of the Related Art

- [0005] The detection, identification and quantification of specific molecules in our environment, food supply, water supply and biological samples (blood, cerebral spinal fluid, urine, et cetera) can be very complex, expensive and time consuming. Those methods include gas chromatography, mass spectroscopy, DNA sequencing, immunoassays, cell-based assays, biomolecular blots and gels, and myriad other multi-step chemical and physical assays.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

[0006] There continues to be a high demand for convenient methodologies for detecting and measuring the levels of specific proteins in biological and environmental samples. Detecting and measuring levels of proteins is one of the most fundamental and most often performed methodologies in biomedical research. While antibody-based protein detection methodologies are enormously useful in research and medical diagnostics, they are not well adapted to rapid, high-throughput parallel protein detection.

[0007] Previously, the inventor had developed a fluorescent sensor methodology for detecting a specific subclass of proteins, i.e., sequence-specific DNA binding protein (Heyduk, T.; Heyduk, E. *Nature Biotechnology* **2002**, 20, 171-176; Heyduk, E.; Knoll, E.; Heyduk, T. *Analyt. Biochem.* **2003**, 316, 1-10; U.S. Patent No. 6,544,746 and copending patent applications number 10/062,064, PCT/US02/24822 and PCT/US03/02157, which are incorporated herein by reference). This methodology is based on splitting the DNA binding site of proteins into two DNA "half-sites". Each of the resulting "half-sites" contains a short complementary single-stranded region of the length designed to introduce some propensity for the two DNA "half-sites" to associate recreating the duplex containing the fully functional protein binding site. This propensity is designed to be low such that in the absence of the protein only a small fraction of DNA half-sites will associate. When the protein is present in the reaction mixture, it will bind only to the duplex containing fully functional binding site. This selective binding will drive association of DNA half-sites and this protein-dependent association can be used to generate a spectroscopic signal reporting the presence of the target protein. The term "molecular beacons" is used in the art to describe the above assay to emphasize that selective recognition and generation of the signal reporting the recognition occur in this assay simultaneously. Molecular beacons for DNA binding proteins have been developed for several proteins illustrating their general applicability (Heyduk, T.; Heyduk, E. *Nature Biotechnology* **2002**, 20, 171-176, which is herein incorporated by reference). Their physical mechanism of action has been established and they have been also used as a platform for the assay detecting the presence of ligands binding to DNA binding proteins (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, which are incorporated herein by reference.) While already very useful, this assay is limited to proteins that exhibit natural DNA binding activity.

#### Aptamers as "Molecular Beacons"

[0008] Development of convenient, specific, sensitive high-throughput assays for detecting proteins remains an extremely important goal. Such assays find applications in research, drug

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

discovery and medical diagnosis. Antibodies recognizing target protein are the centerpiece of the great majority of protein detection assays so far. Development of *in vitro* methods for selecting aptamers recognizing target proteins from a population of random sequence nucleic acids provided the first real alternative to antibodies. One of the potentially important advantages of aptamers is that they are made of easy to propagate and synthesize oligonucleotides. Additionally, standard nucleic acid chemistry procedures can be used to engineer aptamers to contain reporter groups such as, for example, fluorescence probes. Thus, it is no wonder that there is a significant interest to utilize aptamers in various formats of protein detection assays. One of the most promising routes is the development of aptamer-based sensors combining recognition of the target protein with generation of optical signal reporting the presence of the protein.

[0009] There are several published reports that document ingenious designs of aptamer-based "molecular beacons" which produced fluorescence signal upon binding to a specific target protein. All of these designs rely on target protein-induced conformational transition in the aptamer to generate fluorescence signal change. Yamamoto and Kumar (*Genes to Cells* 2000, 5, 389-396) described molecular beacon aptamer that produced an increase of fluorescence upon recognition of HIV Tat protein. Fluorescence signal was generated due to a change of proximity of fluorophore-quencher pair resulting from Tat protein-induced transition between hairpin and duplex forms of the aptamer. Hamaguchi et al. (*Analyt. Biochem.* 2001, 294, 126-131) described molecular beacon aptamer that produced an increase of fluorescence upon recognition of thrombin. In the absence of the target protein, the beacon was designed to form a stem-loop structure bringing fluorophore and the quencher to close proximity. In the presence of the protein, the beacon was forced to ligand-binding conformation resulting in increased separation between fluorophore and the quencher and increased fluorescence signal. Li et al. (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 292, 31-40) described molecular beacon aptamer, which underwent transition from loose random coil to a compact unimolecular quadruplex in the presence of a target protein. This protein-induced change in aptamer conformation resulted in a change of proximity between fluorescence probes attached to the ends of the aptamer generating a fluorescence signal change. Analogous approach was used by Fang et al. (*ChemBioChem.* 2003, 4, 829-834) to design molecular beacon aptamer recognizing PDGF. These examples illustrate the great potential of aptamers for designing sensors, which could transduce the presence of the protein into an optical signal.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

[00010] The inventor has successfully generalized the sensor design applied previously for detecting sequence-specific polynucleotide binding to proteins and other analytes that lack

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

natural nucleic acid binding activity, to greatly expand the applicability of these sensors. Briefly, natural DNA sequences recognizing sequence specific DNA binding proteins were replaced with nucleic acids that bind a particular target protein obtained by *in vitro* selection from a pool of random sequences. It has been well established that nucleic acid (DNA or RNA) aptamers capable of specific binding to proteins lacking natural DNA binding activity can be produced by *in vitro* SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) procedure (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 involves selection of nucleic acid sequences binding a specific target from a pool of random DNA (or RNA) sequences by cycles of binding, washing out unbound sequences, and PCR amplification of target-bound sequences. Numerous examples of successful selection of aptamers specifically binding various proteins as well as other target molecules (Turek 1990, Polisky 1995 and Wilson 1999) provide a strong indication that producing aptamers to a large number of naturally occurring proteins is possible.

[0001 1]

The inventors have developed compositions and methods which further enable the application of the proximity-based assay described in copending patent application 10/062,064 (which is incorporated herein by reference) to extend beyond nucleic acid binding factors, their ligands and coregulators to include any polypeptide (including prions or other misfolded proteins), analyte, small molecule ligand or macromolecular complex. The invention is directed to the use of a set of labeled aptamers that contain short (preferably about 5-7 nucleotides) complementary single stranded polynucleotide sequences at the distal tip of each aptamer (called "signaling oligos"). Each aptamer of the set of aptamers binds to a specific and different epitope of a polypeptide or macromolecular complex, i.e., a first aptamer of the set binds to a first epitope of the polypeptide or macromolecular complex, and a second aptamer of the set binds to a second epitope of the polypeptide or macromolecular complex. In the presence of the polypeptide or macromolecular complex, the first aptamer binds to the first epitope and the second aptamer binds to the second epitope such that the short complementary single stranded polynucleotide sequences at the distal tip of each aptamer can stably associate with each other. Upon the stable association of the short single stranded polynucleotide sequence at the distal tip of the first aptamer with the short single stranded polynucleotide sequence at the distal tip of the second aptamer, a label on the first aptamer is brought into proximity to a label on the second aptamer to produce a measurable signal. In other words, two or more novel nucleic acid half sites that bind to any polypeptide or macromolecular complex may be made and used in a proximity-based assay to detect any

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

polypeptide or macromolecular complex. The set of aptamers may be joined by a flexible linker to form a bivalent aptamer construct.

[00012] One embodiment of the invention is a method comprising making a first aptamer and a second aptamer, which bind to a first epitope and a second epitope respectively of a polypeptide or biomolecular macromolecular complex. The aptamers may be made using in vitro selection, such as systematic evolution of ligands by exponential enrichment (a.k.a. SELEX; see Klug, S.; Famulok, M., All you wanted to know about SELEX. *Mol. Biol. Reports* 1994, 20, 97-107, which is incorporated herein by reference.) Alternatively, one or more pre-existing aptamer or naturally occurring cognate nucleic acid sequence may be modified to contain a label and a short single stranded polynucleotide sequence at the distal tip and used to detect a polypeptide, analyte or macromolecular complex.

[00013] In another embodiment, the invention is drawn to bivalent aptamers, which comprise a first aptamer construct, which recognizes a first epitope of a polypeptide or macromolecular complex and contains a first signaling oligo, and a second aptamer construct, which recognizes a first epitope of a polypeptide or macromolecular complex and contains a first signaling oligo, wherein the first aptamer construct and the second aptamer construct are linked together via a flexible linker. In a preferred embodiment, the first aptamer construct contains a first label and the second aptamer construct contains a second label for the purpose of detection.

[00014] It is envisioned that the bivalent aptamer constructs can be useful in myriad applications beyond the detection of molecules and macromolecular complexes. The bivalent aptamers may be used in much the same way as antibodies, e.g., to detect molecules and complexes, to purify molecules and complexes, to block epitopes and antigens, to facilitate immune responses (both innate and specific) in an organism, to treat diseases and to confer passive immunity to a subject. The preferred subject is a human, a farm animal or a companion animal.

[00015] It is further envisioned that the bivalent aptamers can be used as therapeutic compositions to block molecular interactions in a cell or tissue, or to facilitate molecular interactions in a cell or tissue to effect a desired therapeutic outcome in a patient. Preferred patients include humans, farm animals and companion animals.

[00016] It is further envisioned that the aptamer constructs or bivalent aptamer constructs can be used in medical or veterinary diagnostics or in pharmaceutical screens to help identify potential safe and effective pharmaceutical products.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

## BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- [00017] Fig. 1. Overall design of molecular beacons for detecting proteins. (A) Variant of the design for proteins lacking natural DNA binding activity. The beacon in this case will be composed of two aptamers developed to recognize two different epitopes of the protein. (B) Variant of the design for protein exhibiting natural DNA binding activity. The beacon in this case will be composed of a short DNA duplex containing the DNA sequence corresponding to the protein binding site and DNA (RNA) aptamer developed to recognize a different epitope of the protein.
- [00018] Fig. 2. Methods for preparing co-aptamers directed to an epitope distinct from the binding site of the first aptamer (A) or distinct from the binding site of nucleic acid containing the natural binding site of the protein (B).
- [00019] Fig. 3. Comparison of the design of molecular beacons for DNA binding proteins (A) and molecular beacons for detecting proteins based on aptamers directed to two different epitopes of the protein (B).
- [00020] Fig. 4. Aptamer constructs containing aptamers binding thrombin at fibrinogen exosite (60-18 [29]) and at heparin exosite (G15D).
- [00021] Fig. 5. Binding of fluorescein-labeled aptamers to thrombin. (A) Binding of 60-18 [29] aptamer (THR1) (50 nM) detected by fluorescence polarization; (B) Binding of G15D aptamer (THR2) (50 nM) detected by change in fluorescence intensity; (C) Quantitative equilibrium titration of fluorescein-labeled G15D aptamer (THR2) (20 nM) with thrombin. Solid line represents nonlinear fit of experimental data to an equation describing formation of 1:1 complex between the aptamer and thrombin; (D) Quantitative equilibrium titration of fluorescein-labeled G15D aptamer (THR2) (20 nM) with thrombin in the presence of ten fold excess of unlabeled 60-18 [29] aptamer (THR3). Solid line represents nonlinear fit of experimental data to an equation describing formation of 1:1 complex between the aptamer and thrombin
- [00022] Fig. 6. Illustration of the competition between thrombin aptamer constructs and fluorescein-labeled G15D aptamer (THR2) for binding to thrombin. Fluorescence spectra of 50 nM fluorescein-labeled G15D (THR2) with and without thrombin in the absence of competitor (A), in the presence of 150 nM THR3 (B), in the presence of 150 nM THR4 (C), and in the presence of 150 nM THR7 (D).
- [00023] Fig. 7. Summary of experiments probing competition between thrombin aptamer constructs and fluorescein-labeled G15D aptamer (THR2) for binding to thrombin. Fluorescence intensity of fluorescein-labeled G15D aptamer (THR2) (50 nM) in the absence

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

and the presence of the competitor (250 nM) was used to determine % of THR2 bound in the presence of the competitor. Thrombin concentration was 75 nM. The values of dissociation constants shown in the figure were calculated from a separate experiment in which 200 nM fluorescein-labeled G15D aptamer (THR2), 200 nM competitor and 150 nM thrombin were used.

- [00024] Fig. 8. The effect of 60-18 [29] aptamer (THR3) on the competition between fluorescein-labeled G15D aptamer (THR2) and THR5 construct for binding to thrombin. Fluorescence spectra of 200 nM fluorescein-labeled G15D (THR2) with and without thrombin (150 nM) in the absence of the competitor (A), in the presence of 1000 nM THR3 and 200 nM THR5 (B), in the presence of 1000 nM THR3 (C), and in the presence of 200 nM THR5 (D).
- [00025] Fig. 9. Binding of THR7 aptamer construct to thrombin detected by gel electrophoresis mobility shift assay. Samples of 417 nM THR7 were incubated with various amounts of thrombin (0 to 833 nM) and after 15 min incubation were loaded on a native 10% polyacrylamide gel. (A) Image of the gel stained with Sybr Green. (B) Intensity of the band corresponding to THR7-thrombin complex as a function of thrombin concentration
- [00026] Fig. 10. Family of bivalent thrombin aptamer constructs in which G15D and 60-18 [29] aptamers were connected to a 20 bp DNA duplex by a 9-27 nt long poly T linker.
- [00027] Fig. 11. Binding of thrombin to bivalent aptamer constructs (33 nM each) illustrated in Fig. 8 detected by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Asterisk marks the lane best illustrating preferential binding of thrombin to constructs with 27 and 17 nt poly T linker over the constructs with 9 nt poly T linker. Thrombin concentration was varied from 0 to 400 nM.
- [00028] Fig. 12. Thrombin beacon design using G15D and 60-18 [29] aptamers connected to 9 bp fluorophore (or quencher)-labeled "signaling" duplex through 17 nt poly T linker. (A) Nucleotide sequence of the fluorescein-labeled G15D construct (THR9) and dabcy1-labeled 60-18 [29] construct (THR8). (B) Mechanism of signaling by thrombin beacon. (C) Fluorescence signal change detected upon addition of thrombin to the thrombin beacon. For comparison, titration of the fluorescein-labeled G15D construct (THR9) with thrombin in the absence of dabcy1-labeled 60-18 [29] construct (THR8) is also shown (donor only curve).
- [00029] Fig. 13. Thrombin beacon design using G15D and 60-18 [29] aptamers connected to 9 bp fluorophore (or quencher)-labeled "signaling" duplex through a linker containing 5 Spacer18 units. (A) Nucleotide sequence of the fluorescein-labeled G15D construct (THR21) and dabcy1-labeled 60-18 [29] construct (THR20). (B) Mechanism of signaling by thrombin beacon. (C) Fluorescence signal change detected upon addition of thrombin to the thrombin beacon. For comparison, titration of the fluorescein-labeled G15D construct (THR21) with thrombin in the absence of dabcy1-labeled 60-18 [29] construct (THR20) is also shown (donor

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

only curve). Inset shows fluorescence emission spectra recorded at various concentrations of thrombin corresponding to data points in the main graph.

- [00030] Fig. 14. Binding of thrombin to the beacon illustrated in Fig. 13 (THR20/THR21) detected by gel electrophoresis mobility shift assay. The gel was imaged for fluorescein emission (i.e. only THR21 component of the beacon is visible).
- [00031] Fig. 15. (A) Sensitivity of thrombin detection at two different concentrations of the beacon. Red circles: 50 nM THR21 and 95 nM THR20. Blue circles: 5 nM THR21 and 9.5 nM THR20. (B) Specificity of the beacon for thrombin. 50 nM THR21 and 95 nM THR20 were titrated with thrombin (red circles) and trypsin (blue circles).
- [00032] Fig. 16. Reversal of thrombin beacon signal by competitor aptamer constructs. Fluorescence intensity of 50 nM THR21, 95 nM THR20, and 100 nM thrombin was measured at increasing concentrations of competitor DNA's. The data are plotted as a relative fluorescence increase with respect to a signal ( $F_0$ ) of a starting beacon and thrombin mixture. Open blue squares: THR7; filled black circles: THR14/THR15; filled red squares: THR16/THR17; filled blue triangles: THR18/THR19; open magenta triangles: THR3; green filled inverted triangles: THR4; open black triangles: nonspecific single stranded DNA.
- [00033] Figure 17 depicts molecular beacons for detecting proteins. Comparison of the design of molecular beacons for DNA binding proteins (A) and molecular beacons for detecting proteins based on aptamers directed to two different epitopes of the protein (B).
- [00034] Figure 18 depicts the binding of aptamer constructs to thrombin. (A) Binding of G15D aptamer (THR2) (50 nM) detected by change in fluorescence intensity of 5' fluorescein moiety. Solid line represents the best fit of the experimental data to a simple 1:1 binding isotherm. (B) Binding of G15D aptamer (THR2) in the presence of 10x excess of unlabeled 60-18 [29] aptamer. Solid line represents the best fit of the experimental data to a simple 1:1 binding isotherm. (C) Summary of experiments probing competition between thrombin aptamer constructs and fluorescein-labeled G15D aptamer (THR2). Fluorescence intensity of THR2 (200 nM) was used to determine % THR2 bound in the presence of competitor (200 nM). Thrombin was 150 nM. The labels above each bar indicate relative affinity (expressed as fold increase of affinity constant) of the competitor compared to the affinity of THR2 aptamer. (D) Binding of THR7 aptamer construct to thrombin detected by gel electrophoresis mobility shift assay. Intensity of the band corresponding to THR7-thrombin complex is plotted as a function of thrombin concentration. Inset: Image of the gel stained with Sybr Green. Fluorescence change (%) was calculated as  $100 * (I - I_0) / I_0$  where I and  $I_0$  correspond to dilution-corrected fluorescence emission intensity observed in the presence and absence of a given thrombin concentration, respectively.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

[00035] Figure 19 depicts a thrombin beacon design. G15D and 60-18 [29] aptamers were connected to 7 bp fluorophore (or quencher)-labeled "signaling" duplex through a linker containing 5 Spacer18 units. (A) Nucleotide sequence of the fluorescein-labeled G15D construct (THR21) and dabcy1-labeled 60-18 [29] construct (THR20). X corresponds to Spacer 18 moiety. (B) Mechanism of signaling by thrombin beacon. (C) Fluorescence signal change detected upon addition of thrombin to the thrombin beacon. For comparison, titration of the fluorescein-labeled G15D construct (THR21) with thrombin in the absence of dabcy1-labeled 60-18 [29] construct (THR20) is also shown (donor only curve). Signal change (%) was calculated as  $100 * (I - I_0) / I_0$ , where I and  $I_0$  correspond to dilution-corrected fluorescence emission intensity observed in the presence and absence of a given thrombin concentration, respectively. Inset shows fluorescence emission spectra recorded at various concentrations of thrombin corresponding to data points in the main graph.

[00036] Figure 20 depicts variants of thrombin beacon with various combinations of donor-acceptor fluorophores. (A) fluorescein-dabcy1; (B) fluorescein-Texas Red; (C) fluorescein-Cy5, (D) Cy3-Cy5. Emission spectra of the beacon in the absence (black line) and presence (red line) of thrombin are shown. Insets show false color images of microplate wells containing corresponding beacon and indicated concentrations of thrombin. The images were obtained on Bio-Rad Molecular Imager FX using the following excitation-emission settings: (A) 488 nm laser – 530 nm bandpass filter; (B) 488 nm laser – 640 nm bandpass filter; (C) 488 nm laser – 695 nm bandpass filter; (D) 532 nm laser – 695 nm bandpass filter. Fluorescence is in arbitrary units (corrected for instrument response) and is plotted in a linear scale.

[00037] Figure 21 depicts response curves for the beacon with various combinations of donor-acceptor pairs. (A) fluorescein-dabcy1, (B) fluorescein-Texas Red, (C) Cy3-Cy5, (D) fluorescein-Cy5, (E) europium chelate-Cy5, (F) Fold signal change observed for indicated donor-acceptor pair at saturating thrombin concentration. Insets show expanded view of data points at low thrombin concentrations. In all experiments 5 nM donor-labeled and 5.5 nM acceptor-labeled aptamer constructs were used. Signal change (fold) was calculated as  $I / I_0$ , where I and  $I_0$  correspond to dilution-corrected acceptor fluorescence emission intensity (measured with donor excitation) observed in the presence and absence of a given thrombin concentration, respectively. Buffer background was subtracted from I and  $I_0$  before calculating signal change.

[00038] Figure 22 depicts the dependence of the sensitivity of the thrombin beacon on a donor-acceptor pair. Response of 10 nM donor-labeled and 11 nM acceptor-labeled beacon was determined at low thrombin concentrations using beacon labeled with fluorescein-dabcy1 pair (triangles), fluorescein-Texas Red pair (inverted triangles), and fluorescein-Cy5 pair (circles).

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Averages and standard deviations of four independent experiments are shown. Signal change (fold) was calculated as in Fig. 5.

- [00039] Figure 23 depicts the reproducibility and stability of thrombin beacon. (A) Five independent determinations of beacon signal at four different thrombin concentrations were performed. Data shown represent mean  $\pm$  standard deviation. (B) Thrombin beacon signal at four thrombin concentrations was monitored over time up to 24 hours. Data shown represent mean  $\pm$  standard deviation of 5 independent measurements. Beacon containing 5 nM fluorescein-labeled aptamer (THR21) and 5.5 nM Texas Red-labeled aptamer (THR27) was used in this experiment. Signal change (fold) was calculated as in Fig. 5 except that buffer background was not subtracted.
- [00040] Figure 24 shows the determination of Z'-factor for thrombin beacon. Panel in the middle of the plot shows the false color image of wells of the microplate corresponding to the experiment shown in a graph (the upper half of wells are + thrombin, the lower half of the wells is - thrombin. Beacon containing with 5 nM fluorescein-labeled aptamer (THR21) and 5.5 nM Texas Red-labeled aptamer (THR27) was used in this experiment. Signal corresponds to a ratio of acceptor to donor emission (in arbitrary units) measured with donor excitation.
- [00041] Figure 25 depicts the detection of thrombin in complex mixtures. (A) Response of thrombin beacon at 1 nM thrombin concentration in the absence and presence of the excess of unrelated proteins. The data shown are averages and standard deviation of 4 independent experiments. (B) Detection of thrombin in HeLa extract "spiked" with various amounts of thrombin. Data shown are averages and standard deviation from 3 independent measurements. Concentrations of thrombin in cell extract were: 1.88 nM (light grey bars); 3.75 nM (dark grey bars); 7.5 nM (black bars). Signal for beacon mixture alone was ~25% lower than when cell extract (no thrombin added) was present (not shown) which was essentially the same as the signal observed in the presence of cell extract and specific competitor. (C) Time course of prothrombin to thrombin conversion catalyzed by Factor Xa monitored by thrombin beacon. (D) Detection of thrombin in plasma. Data shown are averages and standard deviation from 4 independent measurements. The volumes of plasma used (per 20  $\mu$ l assay mixture) were: 0.005  $\mu$ l (light grey bars); 0.015  $\mu$ l (dark grey bars); 0.045  $\mu$ l (black bars). "Specific" refers to unlabeled thrombin aptamer competitor (THR7) whereas "nonspecific" refers to random sequence 30 nt DNA. Signal in panels A, B and D corresponds to a ratio of acceptor to donor emission measured with donor excitation. Signals were normalized to value of 1 for beacon mixture alone (panels A and D) and beacon mixture in the presence of cell extract (panel B). Panel C shows raw acceptor fluorescence intensity (with donor excitation).

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

- [00042] Figure 26 depicts sensor variants.
- [00043] Figure 27 depicts the experimental demonstration of sensor design shown in Fig. 26F. (A) Principle of sensor function. (B) Increase of sensitized acceptor fluorescence upon titration of increasing concentrations of DNA binding protein to the mixture of donor and acceptor labeled sensor components.
- [00044] Figure 28 depicts the experimental demonstration of functioning of sensor design shown in Fig. 26G. (A) Principle of sensor function. (B) Increase of sensitized acceptor fluorescence (emission spectrum labeled with "+") upon addition of ss DNA containing two distinct sequence elements complementary to sensor elements to the mixture of two donor and acceptor labeled sensor components (spectrum labeled with "-").
- [00045] Figure 29 depicts the experimental demonstration of the increased specificity of our sensor design compared to assays based on a single, target macromolecule-recognizing element.
- [00046] Figure 30 depicts methods for preparing aptamers for the sensors illustrated in Fig. 26.
- [00047] Figure 31 summarizes the selection of the aptamer binding to thrombin at an epitope distinct from the binding site of the G15D aptamer.
- [00048] Figure 32 depicts the demonstration of the functional thrombin sensor comprising Texas Red-labeled THR27 and fluorescein-labeled THR35 or THR36, which contain sequence corresponding to that of clones 20-26 of Figure 31, panel C.
- [00049] Figure 33 summarizes the simultaneous selection of two aptamers binding to the thrombin at two distinct epitopes.
- [00050] Figure 34 summarizes the selection of the aptamer binding to CRP protein at a site distinct from the DNA binding site of that protein.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

- [00051] Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods or materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are described. For the purposes of the present invention, the following terms are defined below.
- [00052] The term "aptamer" refers to any polynucleotide, generally a RNA or a DNA that has a useful biological activity in terms of biochemical activity, molecular recognition or binding attributes. Usually, an aptamer has a molecular activity such as binding to a polypeptide at a

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

specific epitope (region) of the polypeptide or having an enzymatic activity. It is generally accepted that an aptamer, which is specific in its binding to any polypeptide, may be synthesized and/or identified by in vitro evolution methods.

[00053] The phrase “natural cognate binding element sequence” refers to a nucleotide sequence that serves as a binding site for a nucleic acid binding factor. Preferably the natural cognate binding element sequence is a naturally occurring sequence that is recognized by a naturally occurring nucleotide binding factor.

[00054] The term “molecular-recognition construct” refers to a construct that contains an “epitope binding agent” and can serve as a “molecular beacon”. Preferably, a molecular-recognition construct also contains a “signaling oligo” and a “label”. A first molecular-recognition construct and a second molecular-recognition construct may be joined together by a “linker” to form a “bivalent molecular-recognition construct.” “Molecular beacon” refers to any chemical-based system for detecting or quantifying the presence of an analyte, polypeptide or other biomolecules, macromolecular complex comprising a biomolecules or a biological coregulator using a measurable read-out system as the detection method. An molecular-recognition construct or bivalent molecular-recognition construct is a particular type of molecular beacon with improved specificity and sensitivity.

[00055] The term “aptamer construct” refers to a construct that contains an aptamer or a natural cognate binding element sequence and can serve as a “molecular beacon”. Preferably, an aptamer construct also contains a “signaling oligo” and a “label”. A first aptamer construct and a second aptamer construct may be joined together by a “linker” to form a “bivalent aptamer construct.” An aptamer construct is a subset of molecular-recognition construct. An aptamer construct or bivalent aptamer construct is also a particular type of molecular beacon with improved specificity and sensitivity.

[00056] The term “antibody” generally means a polypeptide or protein that recognizes and can bind to an epitope of an antigen. An antibody, as used herein, may be a complete antibody as understood in the art, i.e., consisting of two heavy chains and two light chains; or an antibody may be a fragment of a complete antibody, such as a Fab fragment or a peptide comprising a hypervariable region.

[00057] The term “epitope binding agent” refers to any substance that is capable of binding to a specific epitope of an antigen, a polypeptide, protein or macromolecular complex. Non-limiting examples of epitope binding agents include ligands and fragments of ligands, receptors and fragments of receptors, antibodies and fragments of antibodies, aptamers and other polynucleotides, coenzymes and other coregulators, and allosteric molecules and ions.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Preferred epitope binding agents include aptamers, natural cognate binding element sequences, antibodies and fragments thereof.

[00058] The term "epitope" refers generally to a particular region of an antigen, a hapten, a molecule, a polymer, a prion, a virion, a cell, a peptide, polypeptide, protein, or macromolecular complex. An epitope may consist of a small peptide derived from a larger polypeptide. An epitope may be a two or three dimensional surface or surface feature of a polypeptide, protein or macromolecular complex that comprises several non-contiguous peptide stretches or amino acid groups.

[00059] The term "signaling oligo" means a short (generally 2 to 15 nucleotides, preferably 5 to 7 nucleotides in length) single stranded polynucleotide. Preferably, a first signaling oligo sequence is complementary to the second signaling oligo. Preferably, the first signaling oligo and the second signaling oligo can not form a stable association with each other through hydrogen bonding unless the first and second signaling oligos are brought into close proximity to each other through the mediation of a third party agent.

[00060] As used herein, the term "linker" or "linker molecule" refers to any polymer attached to an aptamer or aptamer construct. The attachment may be covalent or non-covalent. It is envisioned that the linker can be a polymer of amino acids or nucleotides. A preferred linker molecule is flexible and does not interfere with the binding of a nucleic acid binding factor to the set of nucleic acid components. A preferred linker molecule is comprised of 12 moieties of the Spacer 18 phosphoramidate (Glen Research, Sterling, VA). Another preferred linker molecule is poly dT.

[00061] The phrase "in vitro evolution" generally means any method of selecting for an aptamer which binds to a biomolecule, particularly a peptide or polypeptide. In vitro evolution is also known as "in vitro selection", "SELEX" or "systematic evolution of ligands by exponential enrichment." Briefly, in vitro evolution involves screening a pool of random polynucleotides for a particular polynucleotide that binds to a biomolecule or has a particular activity that is selectable. Generally, the particular polynucleotide (i.e., aptamer) represents a very small fraction of the pool, therefore, a round of aptamer amplification, usually via polymerase chain reaction, is employed to increase the representation of potentially useful aptamers. Successive rounds of selection and amplification are employed to exponentially increase the abundance of the particular and useful aptamer. In vitro evolution is described in 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. Lilley, Eds.,

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

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), which are incorporated herein by reference.

[00062] In the practice of this invention, in vitro evolution is used to generate aptamers that bind to distinct epitopes of any given polypeptide or macromolecular complex. Aptamers are selected against "substrates", which contain the epitope of interest. As used herein, a "substrate" is any molecular entity that contains an epitope to which an aptamer can bind and that is useful in the selection of an aptamer.

[00063] The term "label", as used herein, refers to any substance attachable to a polynucleotide, polypeptide, aptamer, nucleic acid component, or other substrate material, in which the substance is detectable by a detection method. Non-limiting examples of labels applicable to this invention include but are not limited to luminescent molecules, chemiluminescent molecules, fluorochromes, fluorescent quenching agents, colored molecules, radioisotopes, scintillants, massive labels (for detection via mass changes), biotin, avidin, streptavidin, protein A, protein G, antibodies or fragments thereof, Grb2, polyhistidine, Ni<sup>2+</sup>, Flag tags, myc tags, heavy metals, enzymes, alkaline phosphatase, peroxidase, luciferase, electron donors/acceptors, acridinium esters, and colorimetric substrates. The skilled artisan would readily recognize other useful labels that are not mentioned above, which may be employed in the operation of the present invention.

[00064] As used herein, "detection method" means any method known in the art to detect a molecular interaction event. The phrase "detectable signal", as used herein, is essentially equivalent to "detection method." Detection methods include detecting changes in mass (e.g., plasmin resonance), changes in fluorescence (e.g., FRET, FCCS, fluorescence quenching or increasing fluorescence, fluorescence polarization), enzymatic activity (e.g., depletion of substrate or formation of a product, such as a detectable dye - NBT-BCIP system of alkaline phosphatase is an example), changes chemiluminescence or scintillation (e.g., scintillation proximity assay, luminescence resonance energy transfer, bioluminescence resonance energy transfer and the like).

[00065] As used herein, the term "analyte" refers generally to a ligand, chemical moiety, compound, ion, salt, metal, enzyme, secondary messenger of a cellular signal transduction pathway, drug, nanoparticle, environmental contaminant, toxin, fatty acid, steroid, hormone, carbohydrate, amino acid, peptide, polypeptide, protein or other amino acid polymer, microbe, virus or any other agent which is capable of binding to a polypeptide, protein or

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

macromolecular complex in such a way as to create an epitope or alter the availability of an epitope for binding to an aptamer.

[00066] As used herein, the term "macromolecular complex" refers to any composition of matter comprising a macromolecule. Preferably, these are complexes of one or more macromolecules, such as polypeptides, lipids, carbohydrates, nucleic acids, natural or artificial polymers and the like, in association with each other. The association may involve covalent or non-covalent interactions between components of the macromolecular complex. Macromolecular complexes may be relatively simple, such as a ligand bound polypeptide, relatively complex, such as a lipid raft, or very complex, such as a cell surface, virus, bacteria, spore and the like. Macromolecular complexes may be biological or non-biological in nature.

[00067] In one embodiment, the invention is directed to a method of detecting a polypeptide in a sample comprising the steps of contacting a sample with a first molecular-recognition construct and a second molecular-recognition construct, then detecting the stable interaction of the first and second molecular-recognition constructs via a detection method. Several useful molecular-recognition construct combination (sensor) variants are envisioned by the inventor, which are graphically depicted in figure 26. Panel A depicts a sensor variant comprising two aptamers recognizing two distinct epitopes of a protein. Panel B depicts a sensor variant comprising a double stranded polynucleotide containing binding site for DNA binding protein and an aptamer recognizing a distinct epitope of the protein. Panel C depicts a sensor variant comprising an antibody and an aptamer recognizing distinct epitopes of the protein. Panel D depicts a sensor variant comprising a double stranded polynucleotide containing a binding site for a DNA binding protein and an antibody recognizing a distinct epitope of the protein. Panel E depicts a sensor variant comprising two antibodies recognizing two distinct epitopes of the protein. Panel F depicts a sensor variant comprising two double stranded polynucleotide fragments recognizing two distinct sites of the protein. Panel G depicts a sensor variant comprising two single stranded polynucleotide elements recognizing two distinct sequence elements of another single stranded polynucleotide. Panel H depicts a sensor variant that allows for the direct detection of formation of a protein-polynucleotide complex using a double stranded polynucleotide fragment (containing the binding site of the protein) labeled with a first signaling oligonucleotide and the protein labeled with a second signaling oligonucleotide. Panel I depicts a sensor variant that allows for the direct detection of the formation of a protein-protein complex using two corresponding proteins labeled with signaling oligonucleotides.

[00068] In a preferred embodiment, the first and second molecular-recognition constructs are aptamer constructs, such that the first aptamer construct contains an aptamer or a naturally

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

occurring nucleic acid sequence that recognizes an epitope on a polypeptide (i.e., the first epitope) and the second aptamer construct contains an aptamer or a naturally occurring nucleic acid sequence that recognizes a separate epitope (i.e., the second epitope) on the same polypeptide (Figure 26, panels A and B). Preferably, the first aptamer construct and the second aptamer construct each contain a short single stranded oligonucleotide sequence (signaling oligo) such that the short single stranded oligonucleotide of the first aptamer construct (i.e., first signaling oligo) is complementary to the short single stranded oligonucleotide of the second aptamer construct (i.e., second signaling oligo). Without wishing to be bound by theory, the signaling oligos should be short enough so that they can not form a stable interaction with each other in the absence of the polypeptide, which is capable of bringing the two aptamer constructs together. Preferably, the signaling oligos are at least 5 nucleotides long, and no more than 7 nucleotides long.

[00069] Preferably, the first aptamer construct contains a first label and the second aptamer construct contains a second label, such that, in the presence of a polypeptide that contains the first epitope and the second epitope, the first and second labels interact to produce a detectable signal that signifies the presence or amount of polypeptide present in the sample. Preferably, the first label is a fluorescence donor and the second label is a fluorescence recipient and the detection method is a detection of a change in fluorescence signal output.

[00070] Optionally, the first aptamer construct may be fixed to a surface, the second aptamer construct may be fixed to a surface, or both may be fixed to a surface. (Surfaces can be microtitre plates, test tubes, beads, resins and other polymers and the like). In a preferred embodiment, the first aptamer construct and the second aptamer construct may be joined with each other by a flexible linker to form a bivalent aptamer. Preferred flexible linkers include Spacer 18 polymers and deoxythymidine ("dT") polymers.

[00071] In another embodiment, the first and second aptamers may be used to detect macromolecular complexes in a sample. In this embodiment, the first epitope is preferably on one polypeptide and the second epitope is on another polypeptide, such that when a macromolecular complex is formed, the one and another polypeptides are brought into proximity, resulting in the stable interaction of the first aptamer construct and the second aptamer construct to produce a detectable signal, as described above. Also, the first and second aptamer constructs may be fixed to a surface or to each other via a flexible linker, as described above.

[00072] In another embodiment, the first and second aptamers may be used to detect analytes in a sample. In this embodiment, when the analyte is bound to a polypeptide or macromolecular complex, a first or second epitope is created or made available to bind to a first or second

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

aptamer construct. Thus, when an analyte is present in a sample that contains its cognate polypeptide or macromolecular binding partner, the first aptamer construct and the second aptamer construct are brought into stable proximity to produce a detectable signal, as described above. Also, the first and second aptamer constructs may be fixed to a surface or to each other via a flexible linker, as described above.

[00073] In another embodiment, the invention is directed to a method of making a set of aptamer constructs, comprising a first and second aptamer construct, comprising the steps of (a) selecting a first aptamer against a first substrate, which comprises a first epitope, and selecting a second aptamer against a second substrate, which comprises a second epitope, wherein the first aptamer is capable of binding to the first epitope and the second aptamer is capable of binding to the second epitope, (b) attaching a first label to the first aptamer and attaching a second label to the second aptamer, (c) attaching a first signaling oligo to the first aptamer and attaching a second signaling oligo to the second aptamer, wherein the second signaling oligo is complementary to the first signaling oligo, and (d) such that (i) the first aptamer construct comprises the first aptamer, the first label and the first signaling oligo, and (ii) the second aptamer construct comprises the second aptamer, the second label and the second signaling oligo. Preferably, the aptamers are selected using in vitro evolution methods (supra), however, natural DNA binding elements may be used in the practice of this invention.

[00074] In a preferred embodiment, the first substrate is a polypeptide and the second substrate is the polypeptide bound to the first aptamer, wherein the first aptamer masks the first epitope, such that the first epitope is not available for the second aptamer to bind. Alternatively, the first aptamer may be replaced by a first aptamer construct that contains (i) the first aptamer and signaling oligo, or (ii) the first aptamer, signaling oligo and label, thereby producing a second substrate that allows for the selection of the optimum second aptamer or aptamer construct for signal detection. As a further step, the first and second aptamer constructs may then be joined together by a flexible linker, as described above.

[00075] In an alternate preferred embodiment, the first substrate is a peptide consisting essentially of the first epitope and the second substrate is a peptide consisting essentially of the second epitope. Thus, in this alternate embodiment, there is no need to mask an epitope in the production or selection of aptamers. Again, the first and second aptamer constructs created by this method may be linked together by a flexible linker, as described above.

[00076] In another embodiment, the invention is directed to a bivalent aptamer construct comprising a first aptamer, a first label, a first signaling oligo, a second aptamer, a second label, a second signaling oligo and a linker, wherein the first aptamer is capable of binding to

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

a first epitope and the second aptamer is capable of binding to a second epitope. The first and second epitopes may be on the same polypeptide, on different polypeptides of a macromolecular complex, or present on a polypeptide that is bound to an analyte. The flexible linker is preferably a polymer that does not interfere with the function of the aptamers. Preferred flexible linkers include deoxythymidine polymer (poly dT) and Spacer 18 polymer. However, the skilled artisan in the practice of this invention may substitute any number of linkers.

[00077] Alternatively, the bivalent aptamer construct may not have labels for detection. It is envisioned that these alternative bivalent aptamer constructs may be used much like antibodies to detect molecules, bind molecules, purify molecules (as in a column or pull-down type of procedure), block molecular interactions, facilitate or stabilize molecular interactions, or confer passive immunity to an organism. It is further envisioned that the bivalent aptamer construct can be used for therapeutic purposes. This invention is truly powerful in that it enables the skilled artisan to build any combination of aptamers that recognize any two or more disparate epitopes from any number of molecules into a bivalent, trivalent, or other multivalent aptamer construct to pull together those disparate molecules to test the effect or to produce a desired therapeutic outcome. For example, a bivalent aptamer construct may be constructed to facilitate the binding of a ligand to its receptor in a situation wherein the natural binding kinetics of that ligand to the receptor is not favorable (e.g., insulin to insulin receptor in patients suffering diabetes.)

[00078] In another embodiment, the invention is directed to a kit comprising a first epitope binding agent, to which is attached a first label, and a second epitope binding agent, to which is attached a second label, wherein (a) when the first epitope binding agent and the second epitope binding agent label bind to a first epitope of a polypeptide and a second epitope of the polypeptide, respectively, (b) the first label and the second label interact to produce a detectable signal. In a preferred embodiment the epitope binding agent is an aptamer construct, which comprises an aptamer, a label and a signaling oligo. However, the epitope binding agent may be an antibody or antibody fragment. The kit is useful in the detection of polypeptides, analytes or macromolecular complexes, and as such, may be used in research or medical/veterinary diagnostics applications.

[00079] In yet another embodiment, the invention is directed to a method of diagnosing a disease comprising the steps of (a) obtaining a sample from a patient, (b) contacting the sample with a first epitope binding agent and a second epitope binding agent, and (c) detecting the presence of a polypeptide, analyte or macromolecular complex in the sample using a detection method, wherein the presence of the polypeptide, analyte or macromolecular complex in the sample indicates whether a disease is present in the patient. In a preferred embodiment, (a) the first

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

epitope binding agent is a first aptamer to which a first label and a first signaling oligo are attached, (b) the second epitope binding agent is a second aptamer to which a second label and a second signaling oligo, which is complementary to the first signaling oligo, are attached, and (c) the detection method is a fluorescence detection method, wherein, (d) when the first aptamer binds to the polypeptide and the second aptamer binds to the polypeptide, (e) the first signaling oligo and the second signaling oligo associate with each other, and (f) the first label is brought into proximity to the second label such that a change in fluorescence occurs. Preferred samples include blood, urine, ascites, cells and tissue samples/biopsies. Preferred patients include humans, farm animals and companion animals.

[00080] In yet another embodiment, the invention is directed to a method of screening a sample for useful reagents comprising the steps of (a) contacting a sample with a first epitope binding agent and a second epitope binding agent, and (b) detecting the presence of a useful reagent in the sample using a detection method. Preferred reagents include a polypeptide, which comprises a first epitope and a second epitope, an analyte that binds to a polypeptide (in which case the method further comprises the step of adding the polypeptide to the screening mixture) and a potential therapeutic composition. In a preferred embodiment, (a) the first epitope binding agent is a first aptamer to which a first label and a first signaling oligo are attached, (b) the second epitope binding agent is a second aptamer to which a second label and a second signaling oligo, which is complementary to the first signaling oligo, are attached, and (c) the detection method is a fluorescence detection method, wherein, (d) when the first aptamer binds to the polypeptide and the second aptamer binds to the polypeptide, (e) the first signaling oligo and the second signaling oligo associate with each other, and (f) the first label is brought into proximity to the second label such that a change in fluorescence occurs.

[00081] Preferred embodiments of the invention are described in the following examples. Other embodiments within the scope of the claims herein will be apparent to one skilled in the art from consideration of the specification or practice of the invention as disclosed herein. It is intended that the specification, together with the examples, be considered exemplary only, with the scope and spirit of the invention being indicated by the claims, which follow the examples.

#### EXAMPLE 1: GENERAL METHOD FOR PREPARING SPECIFIC APTAMER CONSTRUCTS

##### Introduction

[00082] Disclosed is a method for the rapid and sensitive detection in a sample of proteins, protein complexes, or analytes that bind to proteins. This method is based on the protein-driven

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

association of two nucleic acid constructs containing aptamers that recognize two distinct epitopes of a protein (a.k.a. "aptamer constructs") (Fig. 1A). These two aptamer constructs also contain short complementary signaling oligonucleotides attached to the aptamers through a flexible linker. Upon the simultaneous binding of the two aptamers to the target protein, the complementary oligonucleotides (a.k.a. "signaling oligos") are brought into relative proximity which promotes their association to form a stable duplex. Attaching fluorescence probes to the ends of the signaling oligos provides a means of detecting the protein-induced association of the two aptamer constructs (Fig. 1A). In the case of proteins which possess natural nucleic acid binding activity, one of the aptamers can be substituted with a nucleic acid sequence containing the natural binding site of the protein (Fig. 1B).

[00083] Development or selection of aptamers directed to two distinct epitopes of a given protein is an essential step in developing the aptamer constructs depicted in Fig. 1. Review of the available literature on aptamers reveals at least two possible approaches to achieve this goal. The first approach is to perform *in vitro* selection (a.k.a. *in vitro* evolution) of nucleic acid aptamers using different methods for the separation of protein-bound and protein-unbound nucleic acid aptamers. The rationale here is that in these different partitioning methods different regions of the protein is preferentially displayed resulting in aptamers directed to different regions of the protein surface. Aptamers selected to thrombin (*infra*) are an example of such an approach.

[00084] The *in vitro* selection of a first aptamer using as a substrate thrombin immobilized on agarose beads resulted in aptamer binding the thrombin at the heparin exosite. Additional *in vitro* selection using as a substrate the thrombin-first aptamer complex, which was bound to nitrocellulose as the partitioning method, resulted in second aptamer binding the thrombin at the fibrinogen exosite.

[00085] While useful, this partitioning approach relies on the chance selection of distinct epitopes rather than on intelligent design. The second approach is to raise or select the aptamers using as substrates peptides that correspond to selected regions of the target protein molecule. There is evidence in the art which demonstrates that such strategy can be used to develop aptamers capable of recognizing the intact protein from which the peptide used as a substrate for aptamer development was derived. Furthermore, this approach has been widely used to generate antibodies which recognize an intact protein.

[00086] The general approach for preparing a set of aptamers directed to an epitope of the protein distinct from the binding site of the first aptamer can be also used for proteins that possess natural DNA binding activity. That is, co-aptamers, which bind the substrate protein at a site

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

distinct from the natural DNA binding site, can be produced. Co-aptamers produced by this method are optimized for functioning in the molecular detection method depicted in Fig. 1.

### Results and Discussion

[00087] Fig. 2 illustrates the overall design of the methods described above. Selection of the co-aptamer is performed using substrate protein pre-bound to the first aptamer (Fig. 2A). Alternatively, selection of the co-aptamer is performed using protein pre-bound to its natural nucleic acid binding site (Fig. 2B). A short (5-7 nt) single-stranded oligonucleotide, i.e., the signaling oligo (Fig. 2), is attached to the first aptamer by a flexible linker. Random DNA (or RNA) to be used for selection of co-aptamers is flanked by uniform sequences for the purpose of PCR amplification. One of these uniform flanking sequences contains at its end a sequence that is complementary to the signaling oligo of the first aptamer, i.e., the other signaling oligo (Fig. 2). Thus, the creation and selection of co-aptamers using such a random DNA (or RNA) construct is biased towards aptamers that are able to bind to the substrate protein at a site distinct from the epitope of the first aptamer, and are able to form a duplex between the signaling oligo of the first aptamer. The degree of the bias in the selection is adjusted by varying the length of the signaling oligo of the first aptamer and complementary signaling oligo of the second aptamer.

## EXAMPLE 2: METHODS AND APTAMERS FOR DETECTING THROMBIN

### Introduction

[00088] The inventors of the instant invention have developed a methodology for detecting DNA binding proteins, as described in 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, and copending patent applications number 09/928,385, which issued as U.S. Pat. No. 6,544,746, 10/062,064, PCT/US02/24822 and PCT/US03/02157, all of which are incorporated herein by reference. This methodology is based on splitting the DNA binding site for a protein into two DNA "half-sites" (Fig. 3A). Each of the resulting "half-sites" contains a short complementary single-stranded region of the length designed to introduce some propensity for the two DNA "half-sites" to associate recreating the duplex containing the fully functional cognate protein binding site. This propensity is designed to be low such that in the absence of the protein only a small fraction of DNA half-sites will associate. When the protein is present in the reaction mixture, it will bind only to the duplex containing a full and functional binding site. This selective binding

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

drives the association of DNA half-sites and this protein-dependent association can be used to generate a spectroscopic or other signal reporting the presence of the target protein.

[00089] The term “molecular beacons” is used in the scientific literature to describe this assay in order to emphasize the fact that the selective recognition and generation of the reporting signal occur simultaneously. Molecular beacons for DNA binding proteins have been developed for several proteins (Heyduk and Heyduk, 2002) illustrating their general applicability. Their physical mechanism of action has been established (Heyduk, Knoll and Heyduk, 2003) and they have been also used as a platform for the assay detecting the presence of ligands binding to DNA binding proteins (Heyduk, E., Fei, Y., and Heyduk, T. Homogenous fluorescence assay for cAMP. *Combinatorial Chemistry and High-throughput Screening* 6, 183-194, 2003). While already very useful, this assay is limited to proteins which exhibit natural DNA binding activity.

[00090] It has been well established that nucleic acid (DNA or RNA) aptamers capable of specific binding to proteins lacking natural DNA binding activity can be produced by in vitro selection methods (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; all of which are incorporated herein by reference). In vitro selection involves selection of nucleic acid sequences, which bind to a specific substrate target, from a pool of random DNA sequences by cycles of binding, washing out unbound sequences and PCR amplification of target-bound sequences. Numerous examples of the successful selection of aptamers that specifically bind to a variety of proteins as well as other target molecules (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990; Gold et alia, 1995; Wilson and Szostak, 1999) provide a strong indication that producing aptamers to any and all proteins is possible.

[00091] Described in this example is the novel concept of nucleic acid-based molecular beacons for protein detection, which is not limited to proteins with natural DNA binding activity. The example of thrombin (infra) provides experimental validation for this invention.

### Results and Discussion

[00092] Fig. 3B illustrates the overall concept of molecular beacons recognizing any target protein. This design shares some general similarities with molecular beacons for DNA binding proteins described previously and supra (Fig. 3A). Instead of splitting the DNA duplex containing the natural binding site for a protein into the two “half-sites”, two aptamers

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

recognizing two different epitopes of the protein are used as functional equivalents of the "half-sites". Short complementary oligonucleotides (signaling oligos) containing the fluorophore (first label) and the quencher (second label) are attached to the two aptamers via a flexible linker (Fig. 3B). In the absence of the target protein, the two aptamer constructs do not associate since the complementary signal oligos are too short to promote association. In the presence of the target protein, the preferential binding of the protein to the two aptamers should drive the association of the two aptamer constructs resulting in a fluorescence signal change due to bringing the first and second labels into a close proximity.

[00093] Thrombin was selected as a model non-DNA-binding-protein system to provide experimental verification of the concept illustrated in Fig. 3B. Two laboratories have previously identified DNA aptamers which selectively recognized two distinct epitopes of the protein (Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vernass, E.H., and Toole, J.J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, *Nature* **355**, 564-566, 1992; and Tasset, D.M., Kubik, M.F., and Steiner, W. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes, *J. Mol. Biol.* **272**, 688-98, 1997, which are incorporated herein by reference). One aptamer (G15D; THR4 in Fig. 4) was shown to bind to the heparin exosite whereas the other aptamer (60-18 [29]; THR3 in Fig. 4) was shown to bind to the fibrinogen exosite. As a first step towards developing a set of aptamer constructs useful for recognizing thrombin, we prepared various aptamer constructs in which the above aptamers were covalently linked by flexible linkers (Fig. 4). The primary purpose of these experiments was to determine if indeed linking the two aptamer constructs with a flexible linker would produce a bivalent aptamer construct capable of binding thrombin with higher affinity compared to a set of individual aptamer constructs. A second purpose of these experiments was to establish a suitable length of the linker and the appropriate orientation of 5' and 3' ends of the two aptamers with respect to the linker.

[00094] Individual aptamers were labeled with fluorescein (THR1 and THR2 in Fig. 4) to facilitate determination of the affinity of various constructs for thrombin. Formation of a complex between thrombin and fluorescein-labeled 60-18 [29] aptamer (THR1) could be conveniently followed by fluorescence polarization (Fig. 5A) whereas binding of the fluorescein-labeled G15D aptamer (THR2) could be followed by changes in fluorescence intensity (Fig. 5B). Both aptamers bound thrombin in the nanomolar concentration range (Fig. 5A and 5B). Quantitative analysis of the binding in the case of THR2 (Fig. 5C) returned the value of  $K_d$  of 6.3 nM. This is somewhat of a higher affinity than that previously suggested (Bock et alia, 1992), which could be explained by the true equilibrium binding assay used by us vs. the non-equilibrium methodology used previously. When the binding of THR2 was performed in the presence of 10-fold excess of unlabeled 60-18 [29] aptamer (THR3) (Fig.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

5D) only a small and insignificant decrease in affinity was observed. This shows that indeed G15D and 60-18 [29] aptamers bind independently to two distinct epitopes of thrombin.

[00095] In the next step the ability of various aptamer constructs illustrated in Fig. 4 to compete with THR2 for binding to thrombin was evaluated. Fig. 6 illustrates the manner in which these experiments were performed. Fluorescence spectra of THR2 were recorded in the presence and absence of thrombin (Fig. 6A). Thrombin produced ~50% increase in fluorescence of THR2. Unlabeled competitor aptamer constructs were then added (Figs. 6B-D). A small effect of thrombin on the fluorescence of THR2 in the presence of a competitor would be a hallmark of an efficient competitor. THR3 was not a competitor (Fig. 6B) in agreement with the data shown in Fig. 5 C and D. THR4 (an unlabeled variant of THR2) was able to compete as expected (Fig. 6C). However, THR7 (one of the bivalent aptamer constructs) was a much better competitor than THR4 (Fig. 6D). No fluorescence change of THR2 in the presence of thrombin was detected when THR7 was present in solution. Fig. 7 shows a summary of the competition experiments with all of the constructs shown in Fig. 4.

[00096] All bivalent aptamer constructs were shown to bind to thrombin much tighter ( $K_d$ 's in pM range) than individual aptamers, thus providing validation of the expectation that linking two aptamers, which recognize two different epitopes of the protein, with flexible linkers should produce high-affinity thrombin ligands. Additionally, these data showed that linking two aptamers by a longer linker containing 10 Spacer18 units produced slightly better affinity for thrombin (compare binding of THR5 vs. THR6). Also, these data showed that orientation of the aptamers with respect to the linker as in THR7 produced better affinity (compare affinity of THR6 vs. THR7). Thus, in all subsequent experiments constructs having an aptamer orientation as in THR7 were used.

[00097] The purpose of experiments shown in Fig. 8 was to demonstrate that both epitopes of thrombin are important for high affinity binding of bivalent aptamer constructs. Direct competition between binding of THR2 and the bivalent aptamer construct provided evidence that the epitope recognized by THR2 (heparin exosite) was necessary for bivalent aptamer binding. To demonstrate that the second epitope was also important, we compared the ability of a bivalent aptamer construct (THR5) to compete with THR2 for binding to thrombin in the absence and presence of excess of unlabeled THR3. We expected that if THR5 needs both thrombin epitopes for high-affinity binding, in the presence of THR3 one should observe diminished ability of THR5 to compete with THR2. This is exactly what has been observed in experiments illustrated in Fig. 8. THR5 alone was a very effective competitor for THR2 (compare Fig. 8D with 8A). THR3 alone was not a competitor for THR2 (compare Fig. 8A and C). THR5 in the presence of THR3 was a worse competitor than THR5 alone (compare

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Fig. 8B with 8C). We therefore concluded that high-affinity binding of the bivalent aptamer constructs to thrombin involves both first and second aptamer epitopes.

[00098] The bivalent aptamer construct-thrombin complex was stable enough to survive electrophoresis in native polyacrylamide gel (Fig. 9A). We took advantage of this attribute to determine the stoichiometry of the complex using EMSA to follow THR7-thrombin complex formation. We performed a titration of THR7 with thrombin at high concentrations of both molecules. Under these conditions, the binding should be stoichiometric. The plot of the complex formed vs. the ratio of thrombin to THR7 did in fact show a 1:1 stoichiometry of the complex (Fig. 9B).

[00099] The experiments illustrated in Fig. 10 and 11 were performed to test if an alternative design of bivalent aptamer constructs could be used to prepare these constructs. We designed bivalent aptamer constructs shown in Fig. 10 such that they were made entirely of DNA, avoiding the use of non-DNA linker (poly dT was used as the linker in this case) (Fig. 10). This could potentially offer more flexibility in designing such constructs and could also lower the cost of making the aptamer constructs. Two aptamers were joined together by a DNA duplex at the end of flexible linkers (Fig. 10). This aspect of the invention was intended to mimic the design of signaling "beacons" (Fig. 3B) in which the signaling function involves formation of a DNA duplex at the end of the linkers connecting the aptamers to the duplex. Three different lengths of the poly dT linker were tested (7, 17 and 27 nt) to determine the minimal linker length requirement for high-affinity binding. Fig. 11 shows the results of simultaneous titration of the constructs shown in Fig. 10 with thrombin. Formation of aptamer construct-thrombin complexes was followed by EMSA. Each of the constructs bound thrombin with high affinity. However, it is clear that the construct with 7 nt poly dT linker had significantly lower affinity to thrombin compared to constructs with 17 and 27 nt linkers. This is best illustrated by inspecting a lane marked with the asterisk which shows that at this particular concentration of thrombin almost all of 17 and 27 nt poly dT linker constructs were bound by thrombin whereas a significant (~50%) fraction of the 7 nt poly dT construct remained unbound. In summary, the results described in Figs. 10 and 11 show that the alternative design of bivalent aptamer constructs illustrated in Fig. 10 is feasible and that at least 17 nt long poly dT linker connecting the aptamers with the DNA duplex is more optimal for binding of the constructs to thrombin.

[000100] The experimental data presented in Figs. 3-11 provided evidence that all necessary conditions for the signaling beacon shown in Fig. 3B to function were met in the case of thrombin and the two aptamers binding to two distinct region of thrombin. Based on the information provided by the experiments illustrated in Figs. 3-11, we designed and tested a thrombin signaling beacon. The beacon shown in Fig. 12A and B is a derivative of

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

THR16/THR17 bivalent aptamer construct. Aptamers were connected using 17 nt long poly dT linker to 7 nt complementary oligonucleotides (signaling oligos) labeled at 5' and 3' with fluorescein and dabcyI, respectively. Addition of thrombin to a mixture of THR8 and THR9 resulted in protein-dependent quenching of fluorescence intensity. No fluorescence change was observed upon addition of thrombin to THR9 in the absence of dabcyI-labeled partner (THR8). Clearly, these data show that indeed the expected thrombin-driven association between THR8 and THR9 (as illustrated in Fig. 12B) was observed and a functional thrombin signaling beacon was thus obtained.

[000101] The magnitude of the fluorescence change induced by thrombin, while very reproducible and specific, initially was not very large (~20%). We therefore sought to improve this property of the thrombin signaling beacon by replacing the poly dT linkers with the more flexible Spacer 18 linker (Fig. 13A&B). We reasoned that poly dT linkers, while flexible, exhibit some residual rigidity (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; which is incorporated herein by reference), which could impede the association of the signaling duplex when the two aptamers are bound to thrombin. The beacon shown in Fig. 13 differs only in the nature of the linkers from the beacon shown in Fig. 12. The remaining sequence is otherwise identical. Fig. 13 C shows that upon addition of thrombin to a mixture of THR20 and THR21, protein concentration-dependent quenching of fluorescence was observed whereas no change of fluorescence was detected when thrombin was added to THR21 alone. Response of the beacon to thrombin in the case of this particular beacon was much larger (a ~2-fold decrease in fluorescence). The degree of fluorescence signal change in this case was comparable to what we had previously observed with beacons for detecting DNA binding proteins (supra). We concluded thus that a functional thrombin beacon was obtained and that the design utilizing a more flexible Spacer18 linker resulted in a better signal change upon thrombin binding compared to the design with poly dT linker. We next conducted a series of experiments to further characterize the behavior of this thrombin beacon.

[000102] The experiment illustrated in Fig. 14 was conducted to provide confirmation that indeed the fluorescein-labeled aptamer construct (THR21) was incorporated into a stable complex in the presence of THR20 and thrombin. Fig. 15 shows the results, which illustrates the sensitivity of thrombin detection (Fig. 15A) and specificity of thrombin detection (Fig. 15B). Because the binding of thrombin to bivalent aptamer constructs was extremely tight (pM  $K_d$ 's), and since the assay appears to be limited only by the sensitivity of detection of fluorescein signal, the sensitivity of thrombin detection could be manipulated by changing the concentration of the aptamer constructs. This is illustrated in Fig. 15 A where using 50 nM

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

THR21 and 75 nM THR20, ~ 10 nM of thrombin could be detected whereas, when 10 fold smaller concentrations of aptamer constructs were used (5 nM THR21 and 7.5 nM THR20), a 10 fold lower (~ 1nM) concentration of thrombin could be detected. Using even lower aptamer construct concentrations (500 pM THR21 and 750 pM THR22), ~ 100 pM thrombin could be detected (not shown), but this low concentration of fluorescein-labeled aptamer construct is close to the limits of sensitivity of our instrumentation and the quality of the data was concomitantly decreased. To demonstrate the specificity of thrombin detection, we compared the response of the aptamer constructs to thrombin with the response to trypsin, a protease belonging to the same family as thrombin and sharing structural homologies with thrombin. No signal was detected upon addition of trypsin (Fig. 15B), indicating a high specificity of the aptamer constructs for thrombin.

[000103] Fig. 16 shows the results of competition experiments, in which the ability of various aptamer constructs to dissociate the preformed thrombin-aptamer construct complex was tested. The data obtained showed that all bivalent aptamer constructs were by far much more efficient competitors than any of the individual epitope-specific aptamers, in agreement with similar experiments performed with fluorescein-labeled individual aptamer (supra, THR2; Fig. 6). Among the bivalent aptamer constructs, THR18/THR19 (a construct with 27 nt long poly dT linker) and THR16/THR17 (a construct with 17 nt long poly dT linker) were the most efficient competitors followed by THR14/THR15 (a construct with 7 nt poly dT linker) and THR7 (which has a Spacer18 linker). It appears thus that although additional flexibility of Spacer18 linkers was beneficial in terms of the magnitude of fluorescence signal change produced by the aptamer construct signal change, it also resulted in somewhat reduced affinity for binding thrombin in comparison with the constructs containing more rigid poly dT linkers.

### Conclusions

[000104] We obtained data provided basic physicochemical characterization of the bivalent aptamer constructs containing two aptamers recognizing two different epitopes of thrombin. The bivalent constructs exhibited much higher affinity for thrombin than the individual aptamers-components of the bivalent construct. This suggested that addition of thrombin to a mixture of aptamers "half-sites" should induce association of the two "half-sites" generating fluorescence signal as a result of bringing the fluorophore and the quencher to close proximity. Experiments with beacon constructs fully validated this prediction. We expect that it will be possible to develop analogous beacons for a large number of target proteins. We also note that the beacon design described here can be also adopted to improve beacons for detecting proteins exhibiting natural DNA binding activity (Fig. 1 A). In this case one of the

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

aptamers "half-sites" can be replaced with the DNA duplex (containing the protein binding site sequence) connected to signaling complementary oligonucleotide via flexible linker.

### EXAMPLE 3: ANALYTE DETECTION IN A SAMPLE

#### Materials

[000105] Purified thrombin was a gift from Dr. Ray Rezaie (St. Louis University). Factor Xa, prothrombin, ovalbumin, bovine serum albumin, SSB, trypsin and plasma were purchased from Sigma (St. Louis, MO). HeLa cellular extracts were from ProteinOne (College Park, MD). Texas Red-NHS and Sybr Green were from Molecular Probes (Eugene, OR), Cy5-NHS and Cy3-NHS were from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ), and AMCA-sulfoNHS was from Pierce (Rockford, IL). All other reagents were commercially available analytical grade.

[000106] Oligonucleotide constructs used throughout this work are listed in Table 1. Oligonucleotides were obtained from Keck Oligonucleotide Synthesis Facility at Yale University or from IDT (Coralville, IA). 5' fluorescein and 3' dabcyl were incorporated using appropriate phosphoramidates during oligonucleotide synthesis. All other fluorophores were incorporated into oligonucleotides by post-synthetic modification of oligonucleotides containing 5' amino or C6 amino-dT at appropriate positions with NHS esters of the dyes. Oligonucleotides labeled with fluorescence probes were purified by reverse-phase HPLC as described previously (Heyduk, E.; Heyduk, T. *Anal. Biochem.* 1997, 248, 216-227). Modification of oligonucleotides with europium chelate ((Eu<sup>3+</sup>)DTPA-AMCA) was performed by a two-step procedure described in Heyduk, E.; Heyduk, T.; Claus, P.; Wisniewski, J.R. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 19763-19770. Concentrations of all oligonucleotides were calculated from UV absorbance at 260 nm after correction for the contribution of the fluorophore absorbance at 260 nm.

Table 1

<b>Construct</b>	<b>Sequence</b>	<b>Sequence Identifier</b>	<b>Description</b>
THR1	5' Fluorescein AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT	SEQ ID NO:1	60-18 [29] <sup>8</sup> aptamer labeled with fluorescein
THR2	5' Fluorescein GGT TGG TGT GGT TGG	SEQ ID NO:2	G15D <sup>9</sup> aptamer labeled with fluorescein
THR3	AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT	SEQ ID NO:3	60-18 [29] aptamer

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

THR4	GGT TGG TGT GGT TGG	SEQ ID NO:4	G15D aptamer
THR5	AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT (Spacer18) <sub>5</sub> GG TTG GTG TGG TTG G	SEQ ID NO:5	60-18 [29] aptamer connected to G15D aptamer via 5 Spacer18 linkers
THR6	AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT (Spacer18) <sub>10</sub> GGT TGG TGT GGT TGG	SEQ ID NO:6	60-18 [29] aptamer connected to G15D aptamer via 10 Spacer18 linkers
THR7	GGT TGG TGT GGT TGG (Spacer18) <sub>10</sub> AG TCC GTG GTA GGG CAG GTT GGG GTG ACT	SEQ ID NO:7	G15D aptamer connected to 60-18 [29] aptamer via 10 Spacer18 linkers
THR20	GGT TGG TGT GGT TGG (Spacer18) <sub>5</sub> C GCA TCT 3'dabcyl	SEQ ID NO:16	G15D aptamer connected via 5 Spacer18 linkers to 7 nt "signaling" oligonucleotide labeled with dabcyl at 3' end
THR21	5' fluorescein AGA TGC G (Spacer18) <sub>5</sub> AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT	SEQ ID NO:17	7 nt "signaling" oligonucleotide labeled at 5' with fluorescein connected to 60-18 [29] aptamer via 5 Spacer18 linkers
THR27	GGT TGG TGT GGT TGG (Spacer18) <sub>5</sub> (C6 amino-dT) C GCA TCT	SEQ ID NO:18	G15D aptamer connected via 5 Spacer18 linkers to 7 nt "signaling" oligonucleotide containing amino-dT (near its 5' end)
THR28	5' amino AGA TGC G (Spacer18) <sub>5</sub> AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT	SEQ ID NO:19	7 nt "signaling" oligonucleotide containing 5' amino connected to 60-18 [29] aptamer via 5 Spacer18 linkers
THR11	CTG TCG TTA GTG AAG GTT NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN AAC GCC ATA TCA CAG ACG	SEQ ID NO:20	Construct containing 33 nt random DNA sequence for thrombin aptamer selection
THR12	5' fluorescein CTG TCG TTA GTG AAG GTT	SEQ ID NO:21	Primer1 for THR11
THR13	5' biotin CGT CTG TGA TAT GGC GTT	SEQ ID NO:22	Primer2 for THR11

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

THR22	GGT TGG TGT GGT TGG (Spacer18) <sub>2</sub> GA CAG	SEQ ID NO:23	Co-aptamer for thrombin aptamer selection
THR25	GGT TGG TGT GGT TGG (Spacer18) <sub>5</sub> AC GA CAG	SEQ ID NO:24	Co-aptamer for thrombin aptamer selection
THR29	GAACGAGAGTGC XXXXX amino C GCA TCT	SEQ ID NO:25	ss DNA sensor component
THR32	5' fluorescein AGA TGC G XXXXX TTGAACTGGACC	SEQ ID NO:26	ss DNA sensor component
THR33	GGTCCAGTTCAA TT GCACTCTCGTTC	SEQ ID NO:27	target ss DNA for ss DNA sensor
THR42	GGT TGG TGT GGT TGG XX XXX AAC GAC AG	SEQ ID NO:28	co-aptamer for thrombin aptamer selection
THR43	CTG TCG TT (Spacer18) <sub>5</sub> TTGAGTCAGCGTCGAG CA NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN TTC ACT GTG CTG CGG CTA	SEQ ID NO:29	Construct containing 33 nt random DNA sequence for thrombin aptamer selection
THR44	5' fluorescein CTG TCG TT (Spacer18) <sub>5</sub> TTG AGT CAG CGT CGA GCA	SEQ ID NO:30	Primer1 for THR43
THR45	5'biotin TAGCCGCAGCACAGTG AA	SEQ ID NO:31	Primer2 for THR43
THR49	CACCTGATCGCTCCTC GT NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN CAG GAT GCA CAG GCA CAA	SEQ ID NO:32	Construct containing 30 nt random DNA sequence for simultaneous selection of two thrombin aptamers
THR50	AGCCGCCATTCCATAG TG NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN CAG GAT GCC GAT CAG GTG	SEQ ID NO:33	Construct containing 30 nt random DNA sequence for simultaneous selection of two thrombin aptamers
THR51	5' fluorescein CAC CTG ATC GCT CCT CGT	SEQ ID NO:34	Primer1 for THR49
THR52	5'biotin TTG TGC CTG TGC ATC CTG	SEQ ID NO:35	Primer2 for THR49
THR53	5' fluorescein-AGC CGC CAT TCC ATA GTG	SEQ ID NO:36	Primer3 for THR50
THR54	5'biotin CAC CTG ATC GGC ATC CTG	SEQ ID NO:37	Primer4 for THR50

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

THR35	5' fluorescein AGA TGC G (Spacer18) <sub>5</sub> AG GTT GGG GGT ACT AGG TAT CAA TGG GTA GGG TGG TGT AAC GC	SEQ ID NO:38	Thrombin sensor component
THR36	5' fluorescein AGA TGC G (Spacer18) <sub>5</sub> A GTG AAG GTT GGG GGT ACT AGG TAT CAA TGG GTA GGG TGG TGT AAC GCC ATA T	SEQ ID NO:39	Thrombin sensor component
MIS10X3	AAC GCA ATA AAT GTG AAG TAG ATC ACA TTT TAG GCA CC (Spacer18) <sub>5</sub> GA TGGCT	SEQ ID NO:40	co-aptamer for CRP aptamer selection
MIS12	AGCCA T CTA ACT ATT CCC NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN GAG CGA GAA ATT CTA GGT	SEQ ID NO:41	Construct containing 33 nt random DNA sequence for CRP aptamer selection
MIS11	GGT GCC TAA AAT GTG ATC TAC TTC ACA TTT ATT GCG TT	SEQ ID NO:42	Complement to MIS10X3
MIS13	5'-fluorescein - AGC CA T CTA ACT ATT CCC	SEQ ID NO:43	Primer1 for MIS10X3
MIS14	5' biotin- ACC TAG AAT TTC TCG CTC	SEQ ID NO:44	Primer2 for MIS10X3

#### Fluorescence measurements

[000107]        II fluorescence measurements were performed in 50 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Fluorescence spectra were recorded on Aminco Bowman Series 2 spectrofluorometer (Spectronic Instruments, Rochester, NY). Spectra were corrected for buffer and instrument response. Fluorescence in microplates was read with Tecan Spectra FluorPlus microplate reader (Research Triangle Park, NC). Alternatively, microplates were imaged on Molecular Imager FX (BioRad, Hercules, CA) and fluorescence intensity was determined by integrating the areas of images corresponding to individual wells using QuantityOne software (BioRad). Experiments in 96-well plates and 384-well plates were conducted in 100 µl and 20 µl volume, respectively. Depending on particular instrumentation, slightly different beacon signal changes are recorded due to different buffer background readings with different instruments (depending on the sensitivity of the instrumentation) and different wavelengths of excitation and emission available with each instrument.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

[000108] Time-resolved fluorescence in the case of europium chelate – Cy5 labeled beacons was recorded on a laboratory-built instrumentation (Heyduk, T.; Heyduk, E. *Analytical Biochemistry* **2001**, 289, 60-67) which employed pulsed nitrogen laser as the excitation source. Emission was integrated for 100  $\mu$ s with 30  $\mu$ sec delay after laser pulse.

Competition assay to determine thrombin aptamer dissociation constants.

[000109] Fluorescence intensity of THR2 in the presence and absence of the competitor was determined. Concentration of thrombin, THR2, and the competitor (when present) were 150 nM, 200 nM, and 200 nM, respectively. Under these conditions, binding of aptamers to thrombin was essentially stoichiometric. Previously described method (Matlock, D.L.; Heyduk, T. *Biochemistry* **2000**, 39, 12274-12283) was used to calculate the ratio of the dissociation constant for THR2 to that of the competitor under these experimental conditions.

Thrombin aptamer binding by electrophoretic mobility shift analysis (EMSA).

[000110] Five microliter samples of 417 nM THR7 were incubated with various amounts of thrombin (0 to 833 nM). After 15 min incubation, 1  $\mu$ l of 30% Ficoll were added and the samples were run on a 10% polyacrylamide gel in TBE buffer. After the run the gel was stained for 30 min with Sybr Green and the image of the gel was obtained using Molecular Imager FX (BioRad). Intensity of the bands in the gel was determined by integrating the areas of image corresponding to individual bands using QuantityOne software (BioRad).

Design of aptamer-based molecular beacons

[000111] Fig. 17B illustrates the overall concept of molecular beacons for proteins lacking natural sequence-specific DNA binding activity. This design shares some general similarities with molecular beacons for DNA binding proteins described previously by inventor (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), (Fig. 17A). Instead of splitting the DNA duplex containing the natural binding site for a protein into the two "half-sites", two aptamers recognizing two nonoverlapping epitopes of the protein are used as functional equivalents of the "half-sites". Short complementary "signaling" oligonucleotides containing the fluorophore and the quencher are attached to the two aptamers via flexible linkers (Fig. 17B). In the absence of the target protein the two-aptamer "half-sites" can not associate since the complementary oligonucleotides are too short to promote efficient annealing. Binding of the aptamer "half-sites" to the target protein brings the two "signaling" oligonucleotides to relative proximity

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

increasing their local concentrations. This results in the annealing of the “signaling” oligonucleotides, which brings the fluorophore and the quencher to close proximity resulting in a change of fluorescence signal.

#### Properties of bivalent thrombin aptamers

[000112] We used thrombin as a model system to provide “proof-of-principle” verification of the concept illustrated in Fig. 17B. Thrombin is a proteolytic enzyme involved in blood clotting cascade and naturally does not bind to DNA or RNA. Two laboratories have previously developed DNA aptamers, which selectively recognized two distinct epitopes of the protein (Bock, L.C.; Griffin, L.C.; Latham, J.A.; Vermaas, 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). One aptamer (G15D; THR4, Table 1) was shown to bind to the heparin-binding exosite (Bock, 1992) whereas the other (60-18 [29]; THR3, Table 1) was shown to bind to fibrinogen-binding exosite (Tasset 1997). As a first step towards developing a beacon recognizing thrombin, we have prepared various aptamer constructs in which the above aptamers were covalently linked by flexible linkers. The primary purpose of these experiments was to determine if linking the two aptamers recognizing two distinct epitopes on protein surface with a flexible linker would produce a bivalent aptamer capable of binding the protein with higher affinity compared to individual aptamers. . This property of such bivalent aptamer constructs is an essential condition necessary for the assay illustrated in Fig. 17B to work. It was essential to experimentally address this question since it is impossible to predict the effect of long flexible linkers on the affinity of these bivalent constructs. A second purpose of these experiments was to establish a suitable length of the linker and the appropriate orientation of 5' and 3' ends of the two aptamers with respect to the linker.

[000113] Individual aptamers were labeled with fluorescein (THR1 (Table 1), specific for fibrinogen-binding exosite, and THR2 (Table 1), specific for heparin-binding exosite) to facilitate determination of the affinity of various constructs for thrombin. Formation of a complex between thrombin and fluorescein-labeled 60-18 [29] aptamer (THR1) could be conveniently followed by fluorescence polarization (not shown) whereas binding of the fluorescein-labeled G15D aptamer (THR2) could be followed by changes in fluorescence intensity (Fig. 18A). Both aptamers bound thrombin in nanomolar concentration range (data not shown for THR1 and Fig. 18A). Quantitative analysis of the binding in the case of THR2 (Fig. 18A) returned the value of  $K_d$  of 6.3 nM. This is somewhat higher affinity than previously suggested (Bock 1992, Tasset 1997) which is probably because we used a true equilibrium-binding assay whereas non-equilibrium methodology was used previously. When the binding of THR2 was performed in 10x excess of unlabeled 60-18 [29] aptamer (THR3)

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

(Fig. 18B) only a small, insignificant decrease in affinity was observed ( $K_d$  was 17.7 nM). This confirmed that, as reported previously, G15D and 60-18 [29] aptamers bound independently to two distinct epitopes of thrombin.

[000114] In the next step, the ability of various aptamer constructs to compete with THR2 for binding to thrombin was evaluated. Fluorescence intensity change of THR2 upon addition of thrombin in the presence and absence of the competitor was measured and the amount of THR2 bound to thrombin in the presence of the competitor was calculated as described in Materials and Methods. No aptamer-aptamer interactions could be detected by fluorescence polarization assay (not shown) at aptamer concentrations used in these experiments indicating that the competition data correctly reported on the relative affinity of THR2 and the competitor for binding to thrombin. THR3 was not a competitor (Fig. 18C) in agreement with the data shown in Fig. 18 A and B. THR4 (unlabeled variant of THR2), as expected, was able to compete (Fig. 18C). Quantitative analysis of the competition in this case showed that THR4 bound thrombin 1.7 times better than THR2 indicating that labeling this aptamer with fluorescein had small (insignificant) negative effect on aptamer binding to thrombin. It is obvious that all of the bivalent aptamer constructs were by far better competitors than THR4 (Fig. 18C). THR7 appeared to be the best competitor, essentially completely blocking THR2 binding at 1:1 ratio. Quantitative analysis of the competition in this case revealed that THR7 bound thrombin at least 65 fold tighter than THR2 (estimated  $K_d$  for THR7 was < 97 pM). The data shown in Fig. 18C confirmed the expectation that linking two aptamers recognizing two different epitopes of the protein with flexible linkers would produce high-affinity thrombin ligands. Additionally, these data showed that linking the two aptamers by a longer linker (containing 10 Spacer18 units vs. 5 Spacer18) produced slightly better affinity for thrombin (compare binding of THR5 vs. THR6). Also, these data showed that orientation of the aptamers with respect to the linker as in THR7 produced better affinity (compare affinity of THR6 vs. THR7). Thus, in all subsequent constructs, aptamer orientation as in THR7 was used.

[000115] The complex between the bivalent aptamer construct (THR7) and thrombin was stable enough to survive electrophoresis in native polyacrylamide gel (Fig. 18D). We took advantage of this observation and determined stoichiometry of the complex using electrophoretic mobility shift assay (EMSA) (Fried, M. G.; Crothers, D. M. *Nucleic Acid Res.* 1981, 9, 6505-6525) to follow THR7-thrombin complex formation. We performed a titration of THR7 with thrombin at high concentrations of both molecules. Under these conditions the binding should be stoichiometric. The plot of the complex formed vs. the ratio of thrombin to THR7 indicated 1:1 stoichiometry of the complex (Fig. 18D) consistent with the notion that

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

both aptamers – components of THR7 – bind to their respective epitopes in THR7-thrombin complex.

#### Aptamer-based molecular beacon detecting thrombin

[000116] Experimental data described above provided evidence that all necessary conditions for successful implementation of the design of the signaling beacon shown in Fig. 17B were met. Based on these data we have designed thrombin beacon illustrated in Fig. 19A. Thrombin aptamers were connected using 5 Spacer18 linkers to a 7 nucleotide (“nt”) complementary oligonucleotides labeled at 5’ and 3’ with fluorescein and dabcyf, respectively. Mixture of these two constructs bound thrombin much more tightly (~ 36 times) compared to individual aptamers (Fig. 18C) in agreement with high affinity thrombin binding observed for bivalent aptamer constructs in which the two aptamers were permanently linked with a flexible linker. Addition of thrombin to a mixture of fluorochrome and quencher-labeled THR20 and THR21 resulted in protein concentration-dependent quenching of fluorescence intensity (Fig. 19C). Maximum quenching observed was ~ 40%. No fluorescence change was observed (Fig. 19C) upon addition of thrombin to THR21 in the absence of dabcyf-labeled partner (THR20) indicating that fluorescence quenching occurred due to protein-induced increased proximity of signaling oligonucleotides resulting in their annealing as illustrated in Fig. 19B. At nanomolar concentrations of the beacon components and thrombin ~ 15 min of incubation was sufficient to produce maximal response of the beacon. We have also tested thrombin beacons analogous to one shown in Fig. 19 but in which 17 nt poly dT linkers were used in place of Spacer18 linkers. While thrombin-dependent quenching of fluorescence was observed, the quenching was ~ 2 times smaller than with the construct containing Spacer18 linkers. It is likely that poly dT linkers, while flexible, exhibited some residual rigidity (Mills, J.B.; Vacano, E.; Hagerman, P.J. *J. Mol. Biol.* **1999**, 285, 245-257), which perhaps might impede association of the signaling duplex when the two aptamers are bound to thrombin. When the beacon shown in Fig. 19 was titrated with trypsin, a proteolytic enzyme structurally similar to thrombin, no change of fluorescence intensity was observed. We concluded that a functional thrombin beacon according to the design illustrated in Fig. 17B was obtained.

#### Improvements in beacon performance

[000117] In the next set of experiments, we sought to improve the performance of the beacon by using alternative donor-acceptor label pairs. It has been shown previously that in assays employing FRET as the readout, enhancement of acceptor emission provides potentially better signal to background ratio, higher dynamic range, and better sensitivity (Heyduk, E.; Knoll, E.; Heyduk, T. *Analyt. Biochem.* **2003**, 316, 1-10). We have prepared a series of thrombin beacon constructs analogous to the one depicted in Fig. 17B, but in which various

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

combinations of fluorescent donor and fluorescent acceptor were incorporated into the signaling oligonucleotides in place of fluorescein-dabcyl pair. THR21 (or THR28 labeled with appropriate NHS ester of the dye) and THR27 labeled with appropriate NHS ester of the dye were used to prepare these beacons. Fig. 20 shows fluorescence spectra of beacons (without and with thrombin addition) labeled with: fluorescein-Texas Red (Fig. 20B), fluorescein-Cy5 (Fig. 20C) and Cy3-Cy5 (Fig. 20D). In all cases functional beacons were obtained. In each case of the beacon with fluorescent donor and fluorescent acceptor, a large thrombin concentration-dependent increase of sensitized acceptor emission was observed (Fig. 20, insets and Fig. 21 A-D). For comparison, Fig. 20A illustrates fluorescence quenching observed in the presence of thrombin in the case of fluorophore-quencher pair (fluorescein-dabcyl). Fig. 21E illustrates results obtained with europium chelate-Cy5 donor-acceptor pair which allowed the use of time-resolved FRET (TR-FRET) as a detection method (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; Matthis, G. *Clinic. Chem.* **1995**, *41*, 1391-1397). With TR-FRET it is possible to eliminate background due to light scattering and prompt fluorescence of directly excited acceptor to further improve signal-to-background ratio of the beacon. Fig. 21F summarizes the performance of beacon variants with various combinations of donor and acceptor probes. The figure shows the fold of signal change in the presence of saturating concentrations of thrombin compared to background signal of the beacon observed in the absence of the protein. This ratio varied from ~ 2 in the case of fluorescein-dabcyl pair to ~ 22 in the case of europium chelate-Cy5 pair. Thus, a substantial improvement of beacon performance can be obtained by selecting optimal donor-acceptor pair and using sensitized acceptor emission as the mode of signal detection. Additional advantage of beacon variants with fluorescent donor and fluorescent acceptor is that their response can be measured by a two-color determination of the ratio of acceptor to donor signals. Such ratiometric measurement provides more stable signal, which is more resistant to nonspecific effects due to light absorption, light scattering or fluorescence quenching caused by additives present in the sample. Increased signal-to-background ratio obtained with optimized donor-acceptor pairs resulted in an increased sensitivity of the beacon. This is illustrated in Fig. 22 which shows responses of three selected beacon variants to low concentrations of thrombin. In the case of fluorescein-dabcyl labeled beacon (the lowest (~ 2 fold) signal change in the presence of saturating concentration of thrombin), statistically significant signal change could only be detected at the highest thrombin concentration tested (1 nM). In the case of fluorescein-Texas Red labeled beacon (~ 5 fold signal change at saturating thrombin concentration), statistically significant signal change could be detected at lower thrombin concentration (200 pM). In the case of fluorescein-Cy5 labeled beacon (~ 15 fold signal change at saturating thrombin concentration), statistically

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

significant signal change could be detected already at the lowest thrombin concentration tested (50 pM).

- [000118] Fig. 23 illustrates excellent reproducibility and stability of thrombin beacon signal. Beacon signal was measured at four thrombin concentrations in five independent measurements. Coefficients of variation were small at each protein concentration tested (Fig. 23A). Beacon signal was stable for at least 24 hours (Fig. 23B).
- [000119] Coincidence of three molecular contacts is required to generate a signal with the beacon illustrated in Fig. 17B: two contacts between each of the aptamers and the protein and the contact between the two complementary “signaling” oligonucleotides. Each of these contacts provides its own free energy contribution to the overall stability of beacon-protein complex. Due to exponential relationship between the free energy and equilibrium dissociation constant of the complex, the overall stability of the complex will be greatly decreased if any of the above three molecular contacts would be missing. Thus, it is expected that molecular beacons described here should exhibit greater specificity of protein detection compared to an assay based on a single molecular contact (for example, a single aptamer-based assay). To illustrate this concept we have compared response of a single thrombin aptamer and thrombin beacon to SSB (Single Stranded DNA binding protein from *E. coli*), a protein exhibiting high nonspecific affinity for binding ss DNA (data not shown). SSB at nanomolar concentrations produced a large signal (as measured by fluorescence polarization assay) with the single, fluorescein-labeled aptamer (THR1, Table 1). SSB produced the response in a concentration range very similar to the concentration of thrombin required to bind this aptamer. Thus, single thrombin aptamer exhibited very poor discrimination between SSB and thrombin. In contrast, exposure of thrombin beacon to nanomolar SSB concentration did not produce any significant beacon response, while thrombin at the same concentration range produces large beacon response. Thus, thrombin beacon exhibited excellent discrimination between SSB and thrombin illustrating enhanced specificity of the beacon.
- [000120] The primary application of the assay design described here will be in homogeneous high-throughput protein detection. Zhang et al. *Biomol. Screening* **1999**, 4, 67-73) developed a simple statistical parameter, which could be used to evaluate assay for the use in a high-throughput manner.  $Z'$ -factor is calculated from large number of repeats of the measurement in the absence and the presence of the protein.  $Z'$  value of 1 indicates an ideal assay,  $Z'$  value of 0.5 to 1 indicates excellent assay.  $Z'$  values below 0.5 indicate assay not well suited for high-throughput applications.  $Z'$  value for the thrombin beacon was 0.94 (Fig. 24) which shows that it will be an outstanding high-throughput assay.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Detection of thrombin in complex mixtures

[000121] The next series of experiments addressed the specificity of thrombin beacon and its ability to detect thrombin in cell extracts and in plasma. Response of the beacon to 1 nM thrombin was not affected by 100 and 1000 fold excess of unrelated protein (ovalbumin, Fig. 25A). Also, 100-fold excess of factor Xa, another clotting protease structurally similar to thrombin, did not affect beacon response to 1 nM thrombin (Fig. 25A). A 1000-fold excess of factor Xa attenuated slightly the beacon response but 1 nM thrombin was still readily detectable under these conditions (Fig. 25A). Ovalbumin and factor Xa up to 1  $\mu$ M concentration had no effect on beacon signal in the absence of thrombin (Fig. 25A). We concluded that the beacon was highly selective for thrombin.

[000122] To test if the beacon could detect thrombin in a complex mixture, we spiked HeLa cellular extract with varying amounts of thrombin and determined beacon response to this mixture (Fig. 25B). Low nanomolar concentrations of thrombin were readily detected. A total of 8  $\mu$ g of protein were added to 20  $\mu$ l assay which is within a typical range used in experiments with cellular extracts. Signal observed upon addition of cell extract could be completely abrogated by addition of a specific competitor (unlabeled thrombin aptamer) confirming that the observed signal in the cell extract was due to thrombin. One difficulty we've encountered working with cellular extracts was the degradation of oligonucleotides – components of the assay – by nucleases present in cellular extracts. We have tested various buffer additives to find conditions in which thrombin beacon would remain stable in the presence of cell extracts for sufficiently long period of time. We found that addition of high concentrations of random sequence 30 bp ds DNA (10  $\mu$ M), high concentrations of 20 nt random sequence ss DNA (0.1 $\mu$ M), and 2.5 mM EGTA protected the thrombin beacon from degradation in the presence of cellular extracts without significantly affecting the response of the beacon to thrombin. Data shown in Fig. 25B were obtained in the presence of the above additives.

[000123] Since thrombin is a plasma protein, we determined if the beacon could be used to detect the protein in plasma. All of the thrombin in plasma is present in a form of its precursor, prothrombin, which is converted to thrombin via proteolytic processing by factor Xa. Prothrombin was recognized by thrombin beacon albeit with much reduced (>20 fold) sensitivity compared to thrombin (not shown). This is well illustrated by experiment shown in Fig. 25C in which sensitized acceptor emission of the beacon in the presence of prothrombin was monitored as a function of time. At the point marked by the arrow Factor Xa was added to the mixture to initiate conversion of prothrombin to thrombin. This conversion resulted in time-dependent increase of beacon signal consistent with a much higher sensitivity of the

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

beacon to thrombin. Thus, in order to detect thrombin in plasma, factor Xa was included in the assay mixture (Fig. 25D). Adding increasing amounts of plasma resulted in a proportional increase of beacon signal (Fig. 25D). Addition of plasma produced a response of the beacon only if factor Xa was present in the assay. Signal observed upon addition of plasma could be completely abrogated by addition of a specific competitor (unlabeled thrombin aptamer) confirming that the observed signal in the cell extract was due to thrombin. A 5 nL sample of plasma produced a measurable response of the beacon in 20  $\mu$ l reaction volume. In summary, the experiments illustrated in Fig. 25 demonstrated functionality of thrombin beacon for detecting the protein in complex biological mixtures.

#### Discussion

[000124] The design of aptamer-based molecular beacons described here is a generalization of the previously developed by us molecular beacons for detecting sequence-specific DNA binding proteins (Fig. 17). Experiments with thrombin as a model protein presented here provided a proof-of-principle evidence for the feasibility of this design. We believe this design will have several important advantages. Since the design of molecular beacons described here is not limited to any specific protein, it will be generally applicable to a large number of proteins. Signaling in the presence of the target protein by our beacon requires a cooperative recognition of two separate epitopes of the protein by two distinct aptamers. This will result in an enhanced specificity of the beacon and increased affinity (i.e. sensitivity of detection). This cooperative action of two aptamers will also allow the use of aptamers with modest affinity to produce molecular beacons binding to target proteins with high affinity and specificity. Aptamers - components of the beacon, do not require any engineering of their structure to tailor their distribution of conformations to allow "switching" between different states in the presence of the protein. Such engineering could be dependent on a particular sequence (structure) of the aptamer and, such balancing of the energetics of alternative conformations of nucleic acids is not necessarily a trivial matter. Since the signaling elements ("signaling" oligonucleotides) in the instant beacon design are separate from its aptamer components, any aptamer sequence (and structure) should be compatible with our beacon design. It is also unlikely that the addition of the "signaling" oligonucleotides will have any deleterious effect on the affinity and specificity of aptamers - components of the beacon. Thus, any protein for which it will be possible to obtain two aptamers recognizing two distinct epitopes of the protein should be a good target for developing molecular beacons according to scheme in Fig.17.

[000125] Antibodies recognizing distinct epitopes of the protein can be obtained relatively easily. Similarly, there are no reasons why aptamers recognizing distinct epitopes could not be

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

developed for many target proteins and several examples are already available (Jayasena, S.D. *Clinical Chem.* 1999, 45, 1628-1650). Several approaches towards achieving this goal would be possible. The first approach would be to perform *in vitro* selections (SELEX) using different methods for separation of protein-bound and unbound oligonucleotides. The rationale here is that in these different partitioning methods different regions of the protein could be preferentially displayed resulting in aptamers directed to different regions of protein surface. Aptamers selected to thrombin are an example of such approach (Bock, 1992; Tasset, 1997). The second approach could be to raise the aptamers to peptides corresponding to different regions of the target protein molecule. Experimental evidence exists to show that such strategy can be used to develop aptamers capable of recognizing the intact protein from which the peptide used as a target for aptamer development was derived (Wei, X.; Ellington, A.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 7475-7480). Such approach is widely used to generate antibodies recognizing proteins. Two aptamers recognizing different epitopes of the protein can be also produced by a two-step sequential SELEX in which the second step involves selecting an aptamer in the presence of saturating concentration of the aptamer selected in the first step. We have validated this procedure using thrombin as a model system (Heyduk, E. and Heyduk, T., unpublished). Finally, we have developed a novel *in vitro* selection strategy to produce pairs of aptamers specifically designed to function in our molecular beacon design (Heyduk, E., Kalucka, J., Kinnear, B., Knoll, E., and Heyduk, T., unpublished). Thus, multiple routes to obtain pairs of aptamers recognizing non-overlapping epitopes of the protein will be available.

#### EXAMPLE 4: SENSOR DESIGN VARIATIONS

[000126] Several variations of the instant molecular beacon are applicable in the practice of this invention. Those variants of the sensor design are depicted in Figure 26 and summarized herein (supra). The sensor design depicted in Fig. 26F is demonstrated to effectively detect DNA binding proteins. Upon the titration of cAMP response element binding protein ("CREB"), which is an example of a DNA binding protein, to a mixture of donor and acceptor labeled sensor components, there is a concomitant increase in sensitized acceptor fluorescence intensity (Figure 27).

[000127] The sensor design depicted shown in Fig. 26G is demonstrated in Figure 28. Panel A depicts the principle of the sensor function. Upon the addition of single stranded DNA, which contains two distinct sequence elements that are complementary to elements in the sensor, to the mixture of two donor and acceptor labeled sensor components, there is a concomitant increase in sensitized acceptor fluorescence intensity (Figure 28, B, line with + sign). The sensor in this particular case contained Texas Red-labeled THR29 and THR32.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

[000128] The increased specificity of the instant molecular beacon sensor design compared to assays based on a single, target macromolecule-recognizing element was experimentally demonstrated (Figure 29). Recognition of the target molecule by the sensor involves coincidence of three molecular contacts each providing a free energy ( $\Delta G$ ) contribution to the overall stability of the complex. Due to exponential relationship between the free energy and equilibrium dissociation constant of the complex, the overall stability of the complex will be greatly decreased if any of the above three molecular contacts would be missing resulting in high specificity of target molecule recognition. A nonspecific single stranded DNA binding protein ("SSB") at nanomolar concentrations produced a large signal (as measured by fluorescence polarization assay) with the single, fluorescein-labeled aptamer (THR1, Table 1). SSB produced the response in a concentration range very similar to the concentration of thrombin required to bind this aptamer. Thus, a single thrombin aptamer exhibited very poor discrimination between SSB and thrombin. (Panel B) Exposure of the thrombin sensor ( a mixture of THR21 (fluorescein-labeled) and Texas Red labeled THR27) to nanomolar SSB concentration did not produce any significant beacon response (dashed lines), while thrombin at the same concentration range produces large beacon response.(Panel C). Thus, the thrombin beacon exhibited excellent discrimination between SSB and thrombin, illustrating the enhanced specificity of the beacon.

#### Methods for preparing aptamers for the variant sensors

[000129] Figure 30 summarizes a method for selecting aptamers useful in the practice of the invention. Panel A depicts the selection of a second aptamer in the presence of the protein bound to the first aptamer. A signaling oligo is at the 5'-end of the random-sequence containing construct and the complementary signaling oligo is attached to the first aptamer via a long flexible linker. Selection of co-aptamers using this type of random DNA (or RNA) construct will be biased towards aptamers which are capable of binding to the protein at a site distinct from the epitope of the first aptamer, and which will function in sensors depicted in Fig. 26A.

[000130] An alternative scenario is depicted in panel B, which describes the simultaneous selection of two aptamers binding two distinct epitopes of the protein. The bars (at the end of primer 1 and primer 4) depict short complementary sequences at the 5'-end and 3'-end of a random-sequence containing the aptamer constructs. Selection of aptamers using such random DNA (or RNA) constructs will be biased towards aptamers that are capable of binding to the protein simultaneously at two distinct epitopes of the protein, and which will function in sensors depicted in Fig. 26A.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

[000131] In yet another alternate embodiment, a second aptamer can be selected in the presence of the protein bound with a double stranded DNA (Figure 30, panel C). The bar depicts the short sequence (at the 5'-end of the random-sequence containing construct) complementary to the signaling oligonucleotide attached to the double stranded DNA via a long flexible linker. Selection of co-aptamers using such a random DNA (or RNA) construct will be biased towards aptamers that are capable of binding to the protein at a site distinct from the double stranded DNA binding site of the protein and which will function in sensors depicted in Fig. 17B.

[000132] In yet another alternate embodiment, a second aptamer can be selected in the presence of the protein bound with an antibody at a distinct epitope of the protein (Figure 30, panel D). The bar depicts the short sequence (at the 5'-end of the random-sequence containing construct) complementary to the signaling oligonucleotide attached to the antibody via a long flexible linker. Selection of co-aptamers using such random DNA (or RNA) construct will be biased towards aptamers which would be able to bind to the protein at a site distinct from the epitope of antibody and which will function in sensors depicted in Fig. 17C:

[000133] The selection of an aptamer binding to the thrombin at the epitope distinct from the binding site of G15D aptamer was performed using SELEX procedure starting from a construct containing 33 nt random sequence (THR11) in the presence of the excess of G15D aptamer-containing construct (THR22) (Figure 31, panel A). Panel B depicts the thrombin binding activity of single stranded DNAs obtained after each indicated round of selection. Measurable thrombin binding activity appeared after 4<sup>th</sup> selection and reached maximum after 12<sup>th</sup> selection. Binding was measured in the presence of the excess of THR22. DNA obtained after 12<sup>th</sup> selection was cloned and DNA obtained from the individual clones was sequenced. Panel C depicts the sequence alignment (using ClustalX) of the individual clones. Clones obtained from 4 independent selection experiments are shown. These selections were performed using the following pairs of aptamer constructs and random sequence-containing constructs: THR22 and THR 11; THR25 and THR 11; THR42 and THR11; THR43 and THR 11. Several families of highly conserved sequences are easily visible in panel C.

[000134] A functional thrombin sensor comprising Texas Red-labeled THR27 and fluorescein-labeled THR35 or THR36, which contain sequences corresponding to that of clones 20-26 from Fig. 31C, is depicted in Figure 32. THR35 and THR36 differ by the length of DNA sequence flanking the sequence of clones 20-26. The fluorescence image (sensitized acceptor emission) of wells of a microplate containing 20 nM (panel A) or 100 nM (panel B) of the indicated thrombin sensor and the indicated concentrations of thrombin are shown. For comparison, a sensor comprising THR21 and THR27 is shown.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

[000135] Figure 33 summarizes of a simultaneous selection of two aptamers binding to thrombin at two distinct epitopes. Selection of aptamers was performed using the SELEX procedure starting from two constructs containing 30 nt random sequence (THR49 and THR50) (panel A). Thrombin binding activity of the mixture of single stranded DNA's obtained after each indicated round of selection is shown in panel B. Measurable thrombin binding activity appeared after 6<sup>th</sup> selection and reached a maximum after the 14<sup>th</sup> selection. DNA obtained after 14<sup>th</sup> selection was cloned and the DNA obtained from the individual clones were sequenced. Panel C depicts the sequence alignment (using ClustalX) of the clones. Several families of highly conserved sequences are easily visible.

[000136] Aptamer-based molecular beacons were developed for cAMP response element binding protein ("CRP"). Aptamers were selected to bind at sites distinct from the DNA binding site of the protein. Selection was performed using SELEX procedure starting from a construct containing 33 nucleotide random sequence (MIS12) in the presence of the excess of CRP binding site-containing construct (MIS10X3 hybridized with MIS11) (Figure 34, panel A). CRP binding activity of single stranded DNA that was obtained after indicated round of selection is depicted in Figure 34, panel B. Measurable CRP binding activity appeared after 6<sup>th</sup> selection and reached maximum after 12<sup>th</sup> selection. Binding was measured in the presence of the excess of MIS10X3 hybridized with MIS11. DNA obtained after 12<sup>th</sup> selection was cloned and DNA obtained from the individual clones were sequenced. The sequence alignment (using ClustalX) of the clones is depicted in panel C. Conserved core sequence of ~16 nucleotides could be identified.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

## SEQUENCE LISTING

<110> Heyduk, Tomasz  
 Heyduk, Ewa  
 Knoll, Eric

<120> BIOSENSORS FOR DETECTING MACROMOLECULES AND OTHER ANALYTES

<130> SLU 03-015 PCT

<150> US 60/529,076  
 <151> 2003-12-12

<160> 126

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic sequence based upon mammalian sequences

<400> 1  
 agtccgtggt agggcaggtt ggggtgact 29

<210> 2  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic sequence based on mammalian sequence

<400> 2  
 ggttggtgtg gttgg 15

<210> 3  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic sequence based on mammalian sequence

<400> 3  
 agtccgtggt agggcaggtt ggggtgact 29

<210> 4  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

<400> 4  
ggttggtgtg gttgg 15

<210> 5  
<211> 49  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (30)..(34)  
<223> n is a, c, g, t or u

<400> 5  
agtccgtggt agggcagggt ggggtgactn nnnnggttgg tgtggttgg 49

<210> 6  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (30)..(39)  
<223> n is a, c, g, t or u

<400> 6  
agtccgtggt agggcagggt ggggtgactn nnnnnnnng gttggttgg ttgg 54

<210> 7  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (16)..(25)  
<223> n is a, c, g, t or u

<400> 7  
ggttgggtgtg gttggnnnnn nnnnagtcg gtcgtagggc aggttggggg gact 54

<210> 8  
<211> 40

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 8  
ggttggtgtg gttggttttt ttctgtcgtt agtgaaggtt 40

<210> 9  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 9  
aaccttcact aacgacagtt ttttttagtcc gtggtagggc aggttggggt gact 54

<210> 10  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 10  
ggttggtgtg gttggttttt tttttttttt ttctgtcgtt agtgaaggtt 50

<210> 11  
<211> 64  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian

<400> 11  
aaccttcact aacgacagtt tttttttttt ttttttagtcc gtggtagggc aggttggggt 60  
gact 64

<210> 12  
<211> 60  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 12  
ggttggtgtg gttggttttt tttttttttt tttttttttt ttctgtcgtt agtgaaggtt 60

<210> 13

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

<211> 74  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 13  
 aaccttcact aacgacagtt tttttttttt tttttttttt ttttttagtcc gtggtagggc 60  
 aggttgggggt gact 74

<210> 14  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 14  
 ggttgggtgtg gttggttttt tttttttttt ttgcacatc 39

<210> 15  
 <211> 53  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 15  
 agatgcggtt tttttttttt ttttagtccg tggtagggca ggttgggggtg act 53

<210> 16  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(20)  
 <223> n is a, c, g, t or u

<400> 16  
 ggttgggtgtg gttggnnnnn cgcacatc 27

<210> 17  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

&lt;223&gt; based on mammalian sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (8)..(12)

&lt;223&gt; n is a, c, g, t or u

&lt;400&gt; 17

agatgcggnn nnagtcctgt gtagggcagg ttggggtgac t

41

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; based on mammalian sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (16)..(20)

&lt;223&gt; n is a, c, g, t or u

&lt;400&gt; 18

ggttggtgtg gttggnnnn tgcacatct

28

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; based on mammalian sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (8)..(12)

&lt;223&gt; n is a, c, g, t or u

&lt;400&gt; 19

agatgcggnn nnagtcctgt gtagggcagg ttggggtgac t

41

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 69

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; based on mammalian sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (19)..(51)

&lt;223&gt; n is a, c, g, t or u

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

<400> 20  
 ctgtcgttag tgaaggtnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn naacgccata 60  
 tcacagacg 69

<210> 21  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 21  
 ctgtcgttag tgaaggtt 18

<210> 22  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 22  
 cgtctgtgat atggcgtt 18

<210> 23  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(17)  
 <223> n is a, c, g, t or u

<400> 23  
 ggttggtgtg gttggngac ag 22

<210> 24  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<220>  
 <221> misc\_feature

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

&lt;222&gt; (16)..(20)

&lt;223&gt; n i s a, c, g, t o r u

&lt;400&gt; 24

ggttggtgtg gttggnnnnn acgacag

27

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; based on mammalian sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (13)..(17)

&lt;223&gt; n i s a, c, g, t o r u

&lt;400&gt; 25

gaacgagagt gcnnnnncgc atct

24

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; based on mammalian sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (8)..(12)

&lt;223&gt; n i s a, c, g, t o r u

&lt;400&gt; 26

agatgcgann nnttgaactg gacc

24

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; based on mammalian sequence

&lt;400&gt; 27

ggtccagttc aattgcactc tcgttc

26

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(20)  
 <223> n is a, c, g, t or u

<400> 28  
 ggttggtgtg gttggnnnnn aacgacag

28

<210> 29  
 <211> 82  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9)..(13)  
 <223> n is a, c, g, t or u

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (32)..(64)  
 <223> n is a, c, g, t or u

<400> 29  
 ctgctgtttnn nnnnttgagtc agcgtcgagc annnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

60

nnnnttcaet gtgctgcggc ta

82

<210> 30  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9)..(13)  
 <223> n is a, c, g, t or u

<400> 30  
 ctgctgtttnn nnnnttgagtc agcgtcgagc a

31

<210> 31  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

## WO 2005/059509

## PCT/US2004/041315

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 31  
 tagccgcagc acagtgaa 18

<210> 32  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (19)..(48)  
 <223> n is a, c, g, t or u

<400> 32  
 cacctgatcg ctctctgtnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnca ggatgcacag 60  
 gcacaa 66

<210> 33  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (19)..(48)  
 <223> n is a, c, g, t or u

<400> 33  
 agccgccatt ccatagtgnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnca ggatgccgat 60  
 caggtg 66

<210> 34  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 34  
 cacctgatcg ctctctgt 18

<210> 35  
 <211> 18

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

<212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 35  
 ttgtgectgt gcatcctg 18  
  
 <210> 36  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 36  
 agccgccatt ccatagtg 18  
  
 <210> 37  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 37  
 cacctgatcg gcatcctg 18  
  
 <210> 38  
 <211> 55  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(12)  
 <223> n is a, c, g, t or u  
  
 <400> 38  
 agatgcgnnn nnaggttggg ggtactaggt atcaatgggt agggtggtgt aacgc 55  
  
 <210> 39  
 <211> 65  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(12)
<223> n is a, c, g, t or u

<400> 39
agatgcggnn nnagtgaagg ttgggggtac taggtatcaa tgggtagggt ggtgtaacgc      60
catat                                                                    65

<210> 40
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> based on mammalian sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(43)
<223> n is a, c, g, t or u

<400> 40
aacgcaataa atgtgaagta gatcacattt taggcacnn nnngatggct      50

<210> 41
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> based on mammalian sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(51)
<223> n is a, c, g, t or u

<400> 41
agccatctaa ctattccnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngagcgagaa      60
attctaggt                                                                69

<210> 42
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> based on mammalian sequence

<400> 42
ggtgcctaaa atgtgatata cttcacattt attgcggt      38

```

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

<210> 43  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> baased on mammalian sequence

<400> 43  
 agccatctaa ctattccc 18

<210> 44  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 44  
 acctagaatt tctcgctc 18

<210> 45  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 45  
 ggcgggatgg gcatagcgtat atgggaggtt ggt 33

<210> 46  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 46  
 ggatgcgtaa tggttagggt gggtagggta tcc 33

<210> 47  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 47  
 ggatgcgtaa tggttagggt gggtagggta tcc 33

<210> 48

## WO 2005/059509

## PCT/US2004/041315

<211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 48  
 ggatgcgtaa tggttagggt gggtagggta tcc 33

<210> 49  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 49  
 gcagtaggta ctatattggc tagggtggtc tgc 33

<210> 50  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 50  
 gcagtaggta ctatattggc tagggtggtc tgc 33

<210> 51  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 51  
 ggcggtatgg gcatagcgta atgggaggtc tgc 33

<210> 52  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 52  
 ggatgcgtaa tggttagggt gggtagggta tcc 33

<210> 53  
 <211> 33

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

<212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 53  
 ggccggtatgg gtatagcgtg atgggagggtt ggt 33  
  
 <210> 54  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 54  
 ggggggtacta ggtattaatg ggtagggtgg tgt 33  
  
 <210> 55  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequences  
  
 <400> 55  
 cagcagggaa cggaacggtt aggggtgggta ggg 33  
  
 <210> 56  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequences  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5)..(5)  
 <223> n is a, c, g, t or u  
  
 <400> 56  
 gcggngatag gtcgcgtaag ttgggtaggg tgg 33  
  
 <210> 57  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequences  
  
 <400> 57

**WO 2005/059509****PCT/US2004/041315**

caggatgggt aggggtggtca gccaagcagt agg

33

<210> 58  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 58  
 caacgggttg gtgaactgta gtggcttggg gtg

33

<210> 59  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequences

<400> 59  
 caggatgggt aggggtggtca gccaagcagt agg

33

<210> 60  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 60  
 caggatgggt aggggtggtca gccaagcagt ag

32

<210> 61  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 61  
 ggcgagagca gcgtgatagg gtgggtaggg tgg

33

<210> 62  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequences

<400> 62  
 cagggtcagg gctagatgat gcgattaacc atg

33

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

<210> 63  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 63  
 caggatgggt agggtgggtca gcaagcagt agg 33

<210> 64  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 64  
 ggggtacta ggtatcaatg ggtagggtgg tgt 33

<210> 65  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 65  
 ggggtacta ggtatcaatg ggtagggtgg tgt 33

<210> 66  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (27)..(27)  
 <223> n is a, c, g, t or u

<400> 66  
 ggagacgtaa tgggttggt ggaagngga tcc 33

<210> 67  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

**WO 2005/059509****PCT/US2004/041315**

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 67  
 gcatacgtaa tggtcggtt gggcggtgta tgt 33

<210> 68  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 68  
 ggggtacta ggtatcaatg ggtagggtgg tgt 33

<210> 69  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 69  
 gaggggactt aggatgggta ggtggtagg ccc 33

<210> 70  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 70  
 ggggtacta ggtatcaatg ggtagggtgg tgt 33

<210> 71  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 71  
 ggtcggggca tagtaatgct ggattgggca gct 33

<210> 72  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

**WO 2005/059509****PCT/US2004/041315**

<220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 72  
 gggtaggagc agtacacgct ggaatgggtc act 33  
  
 <210> 73  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 73  
 gcagtaggta ctatattggc tagggtggtc tgc 33  
  
 <210> 74  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 74  
 gggtaggggtg acagggagga cggaatgggc act .33  
  
 <210> 75  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 75  
 gcagtaggta ctatattggc tagggtggtc tgc 33  
  
 <210> 76  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 76  
 gcagtaggta ctatattggc tagggtggtc tgc 33  
  
 <210> 77  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>

**WO 2005/059509****PCT/US2004/041315**

<223> based on mammalian sequence

<400> 77

gcagtaggta ctatattggc taggggtggtc tgc

33

<210> 78

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> based on mammalian sequence

<400> 78

gggggtgcta ggtattaaag gtaggggtgg tgt

33

<210> 79

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> based on mammalian sequence

<400> 79

gcagtaggta ctatgtcggg tcgggtggtc tgc

33

<210> 80

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> based on mammalian sequence

<400> 80

gggtaggggtg gttgtaatag ggattgcgat

30

<210> 81

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> based on mammalian sequence

<400> 81

gggtaggggtg gttgtaatag ggattgcgat

30

<210> 82

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> based on mammalian sequence

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

<400> 82  
ggcacaacc gatatggcta tgaatctgcc 30

<210> 83  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 83  
gggtagggg gttgtaatag ggattgcgat 30

<210> 84  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 84  
gggtagggg gttgtaatag ggattgcgat 30

<210> 85  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 85  
gggtgggg gttattggtg tagagcggg 30

<210> 86  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 86  
aatggggagg ttggggtgcg ggagagtgg 30

<210> 87  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

**WO 2005/059509****PCT/US2004/041315**

<400> 87  
acgcgtagga tgggtagggt ggtcgcgtta 30

<210> 88  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 88  
gggtaggggtg gttgtaatag ggattgcgat 30

<210> 89  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 89  
gggcgaaggt acgaagacgg atgcacgtgc 30

<210> 90  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 90  
aaggccgcca tctgggtccg acgagtacca 30

<210> 91  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 91  
tagggtaggggt agggtaggtca actatggggg 30

<210> 92  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 92

## WO 2005/059509

## PCT/US2004/041315

gggtggctgg tcaaggagat agtacgatgc

30

<210> 93  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 93  
 ggtagggtgg ttaaaatagg ggaatggcag

30

<210> 94  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 94  
 cacaagaagg gcgagcgctg agcatagtgc

30

<210> 95  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 95  
 ccaacgacac atagggtaga cgccgcctcc

30

<210> 96  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 96  
 ggtagggtgg ttaaaatagg ggaatggcag

30

<210> 97  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 97  
 taggatgggt agggtgggcc caggaatggc

30

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

<210> 98  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>

<223> based on mammalian sequence

<400> 98  
 taggatgggt agggtggccc caggaatggc 30

<210> 99  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>

<223> based on mammalian sequence

<400> 99  
 ggtaggggtg ttaaaatagg ggaatggcag 30

<210> 100  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>

<223> based on mammalian sequence

<400> 100  
 gatgtggccc agaagcataa cacgacgtac 30

<210> 101  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>

<223> based on mammalian sequence

<400> 101  
 taggatgggt agggtggtcc caggaatggc 30

<210> 102  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>

<223> based on mammalian sequence

<400> 102  
 ggagatgcag gtactgagta gggagtgtgc 30

WO 2005/052509

PCT/US2004/041315

<210> 103  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 103  
 taggatgggt aggggtgtcc caggaatggc 30

<210> 104  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 104  
 aatcaagggc tgggtgttaa ggtgatcgac tag 33

<210> 105  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 105  
 aaggggagcc atcacacagg aggtcgcttc gct 33

<210> 106  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 106  
 aaagcatca cctagagttg ccgccgatac ttg 33

<210> 107  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 107  
 ggggatgtgc gaaactggtg actatgctgg tgc 33

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

<210> 108  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 108  
 cgaagaggagc catcaacctt gaaacgcccg tcc 33

<210> 109  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 109  
 cagacgggag ccatcgacat agaggtgatt gcc 33

<210> 110  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 110  
 agggaaagcc atcacctaga cacatacagc atg 33

<210> 111  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 111  
 ataagaagcc atcatagga cctagctagc ccc 33

<210> 112  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> based on mammalian sequence  
  
 <400> 112  
 ccaacagaag gtagcacaac actagtactc tgg 33

## WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

<210> 113  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 113  
 acagacgccc ctagtaaaca ataaccgatg gcc 33

<210> 114  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 114  
 atagctactc gccagggtg acttctgcta ttg 33

<210> 115  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 115  
 atggggcaac ggggagacct gtcggtactg cct 33

<210> 116  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 116  
 gcaatatagc actaagcctt aactccatgg tgg 33

<210> 117  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 117  
 gcaaggaaaa acaagcaagc catcacgacc tag 33

<210> 118

## WO 2005/059509

## PCT/US2004/041315

<211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 118  
 caggcatccc aagaagtgtc agccgttttcg tgg 33

<210> 119  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 119  
 caacaggaga gcccgcacaca cagatctggc ccc 33

<210> 120  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 120  
 acaagccatc acgtgaatgc cgaccggtac tgt 33

<210> 121  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 121  
 accgacaaac aagtcaatac gggacacgat cct 33

<210> 122  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> based on mammalian sequence

<400> 122  
 cagtgggtcg ggtcacagcc atgagtgttg ctg 33

<210> 123  
 <211> 33

## WO 2005/059509

## PCT/US2004/041315

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 123  
aacgggaaag ccacacccat atttatcgtc ctg 33

<210> 124  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 124  
acggggcgcaa acaagatgta caaaagcatg gtg 33

<210> 125  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 125  
agcgggatag ggaactatcg gacaatcgtc gtg 33

<210> 126  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> based on mammalian sequence

<400> 126  
gaggataaaa gccatcaact agaatgcgca tgg 33

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

## WHAT IS CLAIMED IS

1. A method of detecting a polypeptide in a sample comprising the steps of (a) contacting a sample with a first aptamer construct and a second aptamer construct, and (b) detecting an association of the first aptamer construct, the second aptamer construct, and a polypeptide by a detection method; wherein (c) the first aptamer construct is capable of binding to a first epitope of the polypeptide and the second aptamer construct is capable of binding to a second epitope of the polypeptide, (d) the first aptamer construct comprises (i) a first aptamer that can bind to the first epitope, (ii) a first signaling oligo and (iii) a first label, and (e) the second aptamer construct comprises (iv) a second aptamer that can bind to the second epitope, (v) a second signaling oligo, which is complementary to the first signaling oligo, and (vi) a second label.
2. The method of claim 1 wherein the first and second signaling oligo each consists of at least 5 nucleotides and no more than 7 nucleotides.
3. The method of claim 1 wherein the first aptamer comprises a natural cognate binding element sequence and the second aptamer is selected using in vitro evolution.
4. The method of claim 1 wherein the first label is a fluorescence donor and the second label is a fluorescence acceptor.
5. The method of claim 1 wherein the first label is a fluorescence acceptor and the second label is a fluorescence donor.
6. The method of claim 1 wherein the detection method detects a change in fluorescence.
7. The method of claim 21 wherein the detection method is FRET.
8. The method of claim 1 wherein the first aptamer and the second aptamer are selected using in vitro evolution.
9. The method of claim 1 wherein the polypeptide does not naturally bind a natural cognate binding element sequence.
10. The method of claim 9 wherein the polypeptide is a thrombin.
11. The method of claim 10 wherein the first aptamer binds to fibrinogen exocite of the thrombin and the second aptamer binds to a fibrinogen exocite of the thrombin.
12. The method of claim 11 wherein the first label is a fluorescein.
13. The method of claim 12 wherein the detection method is fluorescence polarization.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

14. The method of claim 12 wherein the second label is a dabeyl and the detection method is a detecting a change in fluorescein fluorescence intensity.
15. The method of claim 1 wherein the first aptamer construct and the second aptamer construct are joined together by a linker.
16. The method of claim 1 wherein the linker is a flexible Spacer 18 linker.
17. A method of detecting an analyte in a sample comprising the steps of (a) contacting a sample with a first aptamer construct, a second aptamer construct, and a polypeptide, and (b) detecting an association of the first aptamer construct, the second aptamer construct, the polypeptide and an analyte by a detection method; wherein (c) in the presence of the analyte, the first aptamer construct is capable of binding to a first epitope of the polypeptide and the second aptamer construct is capable of binding to a second epitope of the polypeptide, and (d) the first aptamer construct comprises a first aptamer that can bind to the first epitope, a first signaling oligo and a first label, and (e) the second aptamer construct comprises a second aptamer that can bind to the second epitope, a second signaling oligo, which is complementary to the first signaling oligo, and a second label.
18. The method of claim 17 wherein the first signaling oligo and second signaling oligo each consists of at least 5 nucleotides and no more than 7 nucleotides.
19. The method of claim 17 wherein the first aptamer comprises a natural cognate binding element sequence and the second aptamer is selected using in vitro evolution.
20. The method of claim 17 wherein the first label is a fluorescence donor and the second label is a fluorescence acceptor.
21. The method of claim 17 wherein the first label is a fluorescence acceptor and the second label is a fluorescence donor.
22. The method of claim 17 wherein the detection method detects a change in fluorescence.
23. The method of claim 22 wherein the detection method is FRET.
24. The method of claim 17 wherein the first aptamer and the second aptamer are selected using in vitro evolution.
25. The method of claim 17 wherein the polypeptide does not naturally bind a natural cognate binding element sequence.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

26. The method of claim 17 wherein the polypeptide undergoes a conformational change upon binding the analyte.
27. The method of claim 26 wherein the analyte is a drug and the polypeptide is capable of binding the drug.
28. The method of claim 27 wherein the analyte is a statin drug and the polypeptide is a HMG-CoA reductase.
29. The method of claim 17 wherein the analyte is a toxin found in the environment.
30. The method of claim 17 wherein the first aptamer construct and the second aptamer construct are joined together by a linker.
31. The method of claim 30 wherein the linker is a flexible Spacer 18 linker.
32. A method of making a set of aptamer constructs, comprising a first and second aptamer construct, comprising the steps of (a) selecting a first aptamer against a first substrate, which comprises a first epitope, and selecting a second aptamer against a second substrate, which comprises a second epitope, wherein the first aptamer is capable of binding to the first epitope and the second aptamer is capable of binding to the second epitope, (b) attaching a first label to the first aptamer and attaching a second label to the second aptamer, (c) attaching a first signaling oligo to the first aptamer and attaching a second signaling oligo to the second aptamer, wherein the second signaling oligo is complementary to the first signaling oligo, and (d) such that (i) the first aptamer construct comprises the first aptamer, the first label and the first signaling oligo, and (ii) the second aptamer construct comprises the second aptamer, the second label and the second signaling oligo.
33. The method of claim 32 wherein the first substrate is a polypeptide and the second substrate is the polypeptide bound to the first aptamer, wherein the first aptamer masks the first epitope.
34. The method of claim 32 wherein the first substrate is a polypeptide or a macromolecular complex and the second substrate is the polypeptide or macromolecular complex bound to the first aptamer, wherein the first aptamer (a) is attached to the first signaling oligo or the first label and (b) masks the first epitope.
35. The method of claim 32 wherein the first substrate is a fragment of a polypeptide consisting essentially of the first epitope and the second substrate is a fragment of the polypeptide consisting essentially of the second epitope.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

36. The method of claim 32 wherein the first signaling oligo and the second signaling oligo each consist of at least 5 nucleotides and no more than 7 nucleotides.
37. The method of claim 32 wherein the first aptamer comprises a natural cognate binding element sequence and the second aptamer is selected using in vitro evolution.
38. The method of claim 32 wherein the first label is a fluorescence donor and the second label is a fluorescence acceptor.
39. The method of claim 32 wherein the first label is a fluorescence acceptor and the second label is a fluorescence donor.
40. The method of claim 32 wherein the first aptamer and the second aptamer are selected using in vitro evolution.
41. The method of claim 32 comprising the step joining the first aptamer construct to the second aptamer construct with a flexible linker.
42. A bivalent aptamer construct comprising a first aptamer, a first label, a first signaling oligo, a second aptamer, a second label, a second signaling oligo and a linker, wherein the first aptamer is capable of binding to a first epitope and the second aptamer is capable of binding to a second epitope.
43. The bivalent aptamer construct of claim 42 wherein the first epitope and the second epitope are distinct and non-overlapping epitopes of a same polypeptide.
44. The bivalent aptamer construct of claim 42 wherein the linker is a flexible linker.
45. The bivalent aptamer construct of claim 44 wherein the linker is a Spacer 18.
46. The bivalent aptamer construct of claim 44 wherein the linker is a deoxythymidine polymer.
47. The bivalent aptamer construct of claim 42 wherein the first label is a fluorescence donor.
48. The bivalent aptamer construct of claim 47 wherein the second label is a fluorescence recipient.
49. The bivalent aptamer construct of claim 42 wherein the first and second signaling oligos are at least 5 nucleotides in length and no more than 7 nucleotides in length.
50. The bivalent aptamer construct of claim 42 wherein the first aptamer comprises a natural cognate binding element sequence.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

51. The bivalent aptamer construct of claim 50 wherein the second aptamer is selected using in vitro evolution.
52. The bivalent aptamer construct of claim 42 wherein the first aptamer is selected using in vitro evolution.
53. The bivalent aptamer construct of claim 42 wherein the polypeptide is a thrombin, the first label is a fluorescein, the second label is a dabcyI, the first epitope is a heparin exosite, the second epitope is a fibrinogen exosite, and the linker is a Spacer 18.
54. The bivalent aptamer construct of claim 43 wherein the polypeptide is a thrombin, the first label is a fluorescein, the second label is a dabcyI, the first epitope is a heparin exosite, the second epitope is a fibrinogen exosite, and the linker is a Spacer 18.
55. A kit comprising a first epitope binding agent, to which is attached a first label, and a second epitope binding agent, to which is attached a second label, wherein (a) when the first epitope binding agent and the second epitope binding agent label bind to a first epitope of a polypeptide and a second epitope of the polypeptide, respectively, (b) the first label and the second label interact to produce a detectable signal.
56. The kit of claim 55 wherein the first epitope binding agent is an antibody.
57. The kit of claim 55 wherein the first epitope binding agent is a first aptamer construct, which comprises a first aptamer, a first label and a first signaling oligo.
58. The kit of claim 57 wherein the second epitope binding agent is a second aptamer construct, which comprises a second label and a second signaling oligo, which is complementary to the first signaling oligo.
59. The kit of claim 58 wherein the first signaling oligo and the second signaling oligo are at least 5 nucleotides in length and no more than 7 nucleotides in length.
60. The kit of claim 58 wherein the first aptamer comprises a natural cognate binding element sequence.
61. The kit of claim 58 wherein the second aptamer was selected using in vitro evolution.
62. The kit of claim 55 wherein the first label is a fluorescence donor and the second label is a fluorescence recipient.
63. The kit of claim 62 wherein the first label is a fluorescein and the second label is a dabcyI.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

64. The kit of claim 55 further comprising the polypeptide, wherein the polypeptide is capable of binding an analyte.
65. The kit of claim 55 further comprising a printed set of instructions for using said kit.
66. A method of diagnosing a disease comprising the steps of (a) obtaining a sample from a patient, (b) contacting the sample with a first epitope binding agent and a second epitope binding agent, and (c) detecting the presence of a polypeptide in the sample using a detection method, wherein the presence of the polypeptide in the sample indicates whether a disease is present in the patient.
67. The method of claim 66 wherein (a) the first epitope binding agent is a first aptamer to which a first label and a first signaling oligo are attached, (b) the second epitope binding agent is a second aptamer to which a second label and a second signaling oligo, which is complementary to the first signaling oligo, are attached, and (c) the detection method is a fluorescence detection method, wherein, (d) when the first aptamer binds to the polypeptide and the second aptamer binds to the polypeptide, (e) the first signaling oligo and the second signaling oligo associate with each other, and (f) the first label is brought into proximity to the second label such that a change in fluorescence occurs.
68. The method of claim 66 wherein the sample is selected from the group consisting of blood, urine, ascites and tissue sample.
69. The method of claim 66 wherein the patient is a human.
70. A method of diagnosing a disease comprising the steps of (a) obtaining a sample from a patient, (b) contacting the sample with a first epitope binding agent, a second epitope binding agent, and a polypeptide, which comprises a first epitope and a second epitope, and (c) detecting in the sample, using a detection method, the presence of an analyte, which is capable of binding the polypeptide, wherein the presence of the analyte indicates whether a disease is present in the patient.
71. The method of claim 70 wherein (a) the first epitope binding agent is a first aptamer to which a first label and a first signaling oligo are attached, (b) the second epitope binding agent is a second aptamer to which a second label and a second signaling oligo, which is complementary to the first signaling oligo, are attached, and (c) the detection method is a fluorescence detection method, wherein, (d) when the analyte binds to the polypeptide, (e) the first aptamer binds to the polypeptide and the second aptamer binds to the polypeptide, (e) the first signaling oligo and the

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

second signaling oligo associate with each other, and (f) the first label is brought into proximity to the second label such that a change in fluorescence occurs.

72. The method of claim 70 wherein the sample is selected from the group consisting of blood, urine, ascites and tissue sample.

73. The method of claim 70 wherein the patient is a human.

74. A method of screening a sample for useful reagents comprising the steps of (a) contacting a sample with a first epitope binding agent and a second epitope binding agent, and (b) detecting the presence of a useful reagent in the sample using a detection method.

75. The method of claim 74 wherein the useful reagent is a polypeptide which comprises a first epitope and a second epitope.

76. The method of claim 74 further comprising the step of contacting the sample with a polypeptide, which is capable of binding an analyte, wherein the useful reagent is an analyte.

77. The method of claim 74 wherein the useful reagent is a potential therapeutic composition.

78. The method of claim 74 wherein (a) the first epitope binding agent is a first aptamer to which a first label and a first signaling oligo are attached, (b) the second epitope binding agent is a second aptamer to which a second label and a second signaling oligo, which is complementary to the first signaling oligo, are attached, and (c) the detection method is a fluorescence detection method, wherein, (d) when the first aptamer binds to the polypeptide and the second aptamer binds to the polypeptide, (e) the first signaling oligo and the second signaling oligo associate with each other, and (f) the first label is brought into proximity to the second label such that a change in fluorescence occurs.

79. The method of claim 78 wherein the useful reagent is a polypeptide which comprises a first epitope and a second epitope.

80. The method of claim 78 further comprising the step of contacting the sample with a polypeptide, which is capable of binding an analyte, wherein the useful reagent is an analyte.

81. The method of claim 78 wherein the useful reagent is a potential therapeutic composition.

82. A pharmaceutical composition comprising a bivalent aptamer construct as set forth in any one of claims 42-54.

83. A method of facilitating molecular interactions in a sample comprising the step of administering to the sample a bivalent aptamer as set forth in any one of claims 42-54, wherein

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

the first epitope and the second epitope are on separate molecular entities and the first epitope and second epitope are brought into close proximity to effect a molecular interaction.

84. The method of claim 83 wherein the sample is selected from the group consisting of cell, tissue, cerebral spinal fluid, blood, in vitro reaction mixture, and environmental system.

85. A method of detecting a polypeptide in a sample comprising the steps of (a) contacting a sample with a first molecular-recognition construct and a second molecular-recognition construct, and (b) detecting an association of the first molecular-recognition construct, the second molecular-recognition construct, and a polypeptide by a detection method; wherein (c) the first molecular-recognition construct is capable of binding to a first epitope of the polypeptide and the second molecular-recognition construct is capable of binding to a second epitope of the polypeptide, (d) the first molecular-recognition construct comprises (i) a first epitope-binding agent that can bind to the first epitope, (ii) a first signaling oligo and (iii) a first label, and (e) the second molecular-recognition construct comprises (iv) a second epitope binding agent that can bind to the second epitope, (v) a second signaling oligo, which is complementary to the first signaling oligo, and (vi) a second label.

86. The method of claim 85 wherein the first epitope binding agent is an aptamer.

87. The method of claim 86 wherein the second epitope binding agent is an aptamer.

88. The method of claim 86 wherein the second epitope binding agent is an antibody.

89. The method of claim 86 wherein the second epitope binding agent is a double stranded polynucleotide containing binding site for the polypeptide.

90. The method of claim 85 wherein the first epitope binding agent is an antibody.

91. The method of claim 90 wherein the second epitope binding agent is a second antibody.

92. The method of claim 90 wherein the second epitope binding agent is a double stranded polynucleotide containing binding site for the polypeptide.

93. The method of claim 85 wherein the first epitope binding agent is a double stranded polynucleotide containing first binding site for the polypeptide.

94. The method of claim 93 wherein the second epitope binding agent is a double stranded polynucleotide containing second binding site for the polypeptide.

95. The method of any one of claims 85 through 94 wherein the detection method is selected from the group consisting of plasmon resonance, fluorescence resonance energy transfer

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

("FRET"), FCCS, fluorescence quenching, fluorescence polarization, production of a colored product, chemiluminescence, scintillation, bioluminescence, and luminescence resonance energy transfer.

96. The method of claim 95 wherein the detection method is luminescence resonance energy transfer.

97. The method of any one of claims 85 through 96 wherein the polypeptide is thrombin or cAMP response element binding protein ("CRP").

98. The method of any one of claims 85 through 97 wherein the sample is selected from the group consisting of blood, urine, ascites, cellular sample and tissue sample.

99. A molecular beacon comprising a first molecular-recognition construct and a second molecular-recognition construct; wherein (a) the first molecular-recognition construct is capable of binding to a first epitope of a polypeptide and the second molecular-recognition construct is capable of binding to a second epitope of the polypeptide, (b) the first molecular-recognition construct comprises (i) a first epitope-binding agent that can bind to the first epitope, (ii) a first signaling oligo and (iii) a first label, and (c) the second molecular-recognition construct comprises (iv) a second epitope binding agent that can bind to the second epitope, (v) a second signaling oligo, which is complementary to the first signaling oligo, and (vi) a second label.

100. The molecular beacon of claim 99 wherein the first epitope binding agent is an aptamer.

101. The method of claim 100 wherein the second epitope binding agent is an aptamer.

102. The method of claim 100 wherein the second epitope binding agent is an antibody.

103. The method of claim 100 wherein the second epitope binding agent is a double stranded polynucleotide containing binding site for the polypeptide.

104. The method of claim 99 wherein the first epitope binding agent is an antibody.

105. The method of claim 104 wherein the second epitope binding agent is a second antibody.

106. The method of claim 104 wherein the second epitope binding agent is a double stranded polynucleotide containing binding site for the polypeptide.

107. The method of claim 99 wherein the first epitope binding agent is a double stranded polynucleotide containing first binding site for the polypeptide.

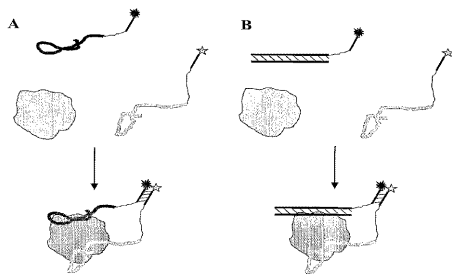
108. The method of claim 107 wherein the second epitope binding agent is a double stranded polynucleotide containing second binding site for the polypeptide.

(57) **Abstract:** Described are compositions and methods that are useful in the identification and quantification of any polypeptide or macromolecular complex using a set of co-aptamer constructs. Aptamer constructs are constructed that bind to unique epitopes of a polypeptide of macromolecular construct. Those aptamer constructs contain an epitope binding site, a co-aptamer binding site, and a detectable label. In the presence of the cognate polypeptide, analyte-polypeptide complex, or other macromolecular complex, the co-aptamers associate with one another to produce a detectable signal. The co-aptamer constructs may be joined by a linker to produce a bivalent aptamer construct.

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

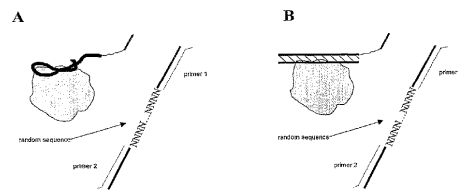
Figure 1



WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

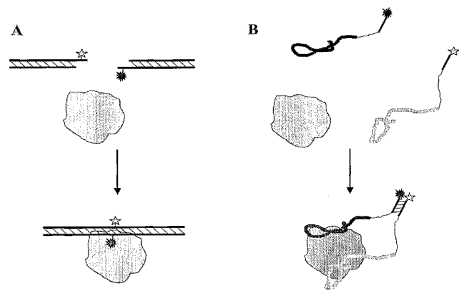
Figure 2



WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 3



3/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 4

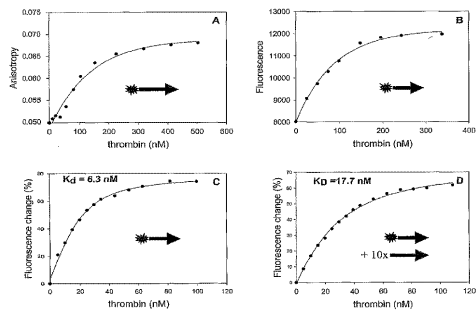


4/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 5

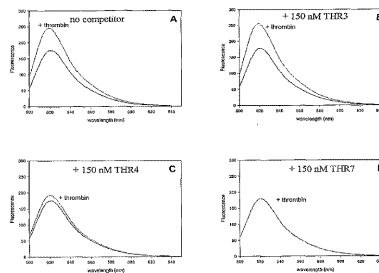


5/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 6



6/34

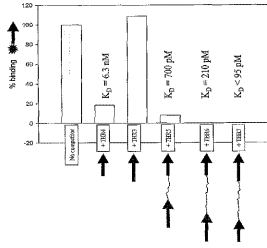
WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

WO 2005/059509

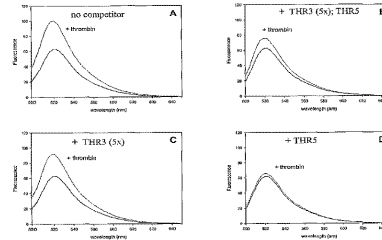
PCT/US2004/041315

Figure 7



7/34

Figure 8



8/34

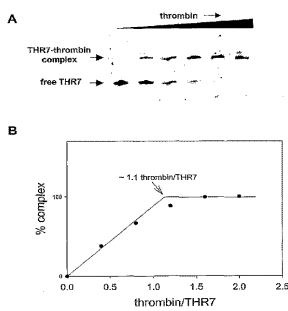
WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

WO 2005/059509

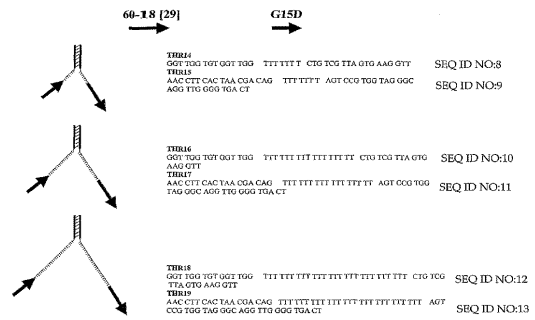
PCT/US2004/041315

Figure 9



9/34

Figure 10

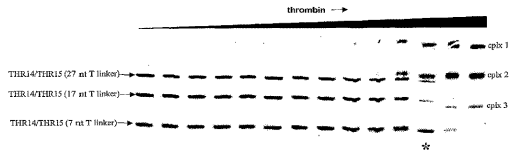


10/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 11

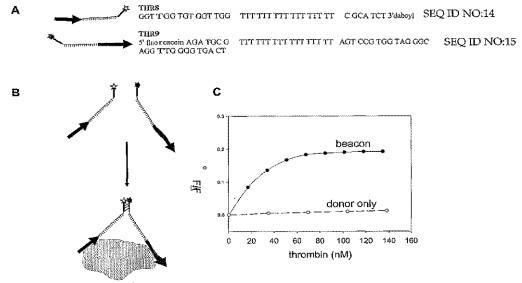


11/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 12

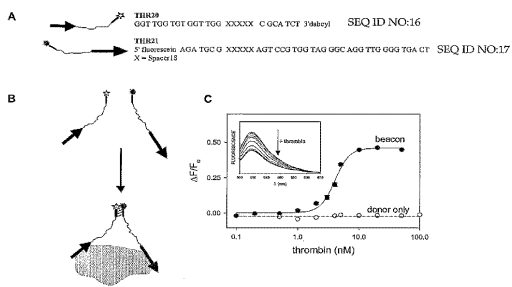


12/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 13

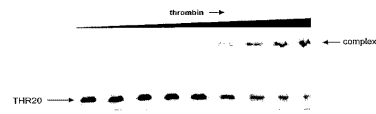


13/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 14



14/34

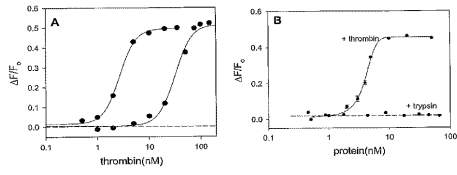
WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

WO 2005/059509

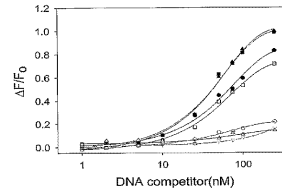
PCT/US2004/041315

Figure 15



15/34

Figure 16



16/34

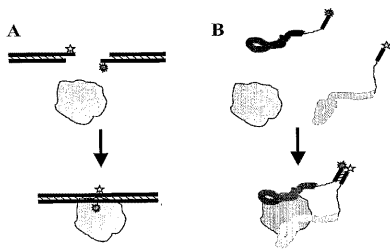
WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

WO 2005/059509

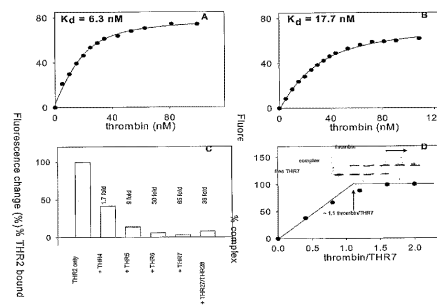
PCT/US2004/041315

Figure 17



17/34

Figure 18

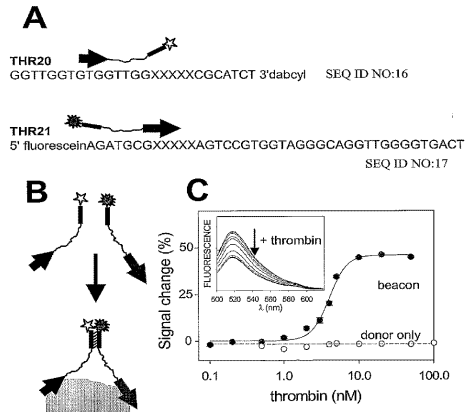


18/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 19

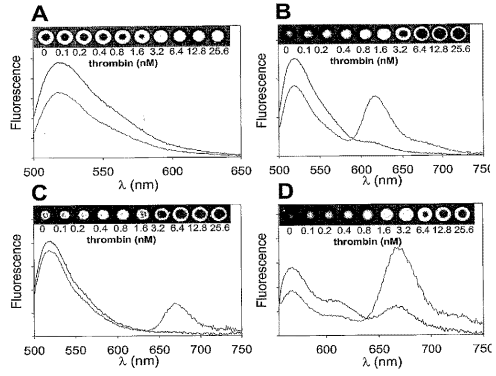


19/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 20

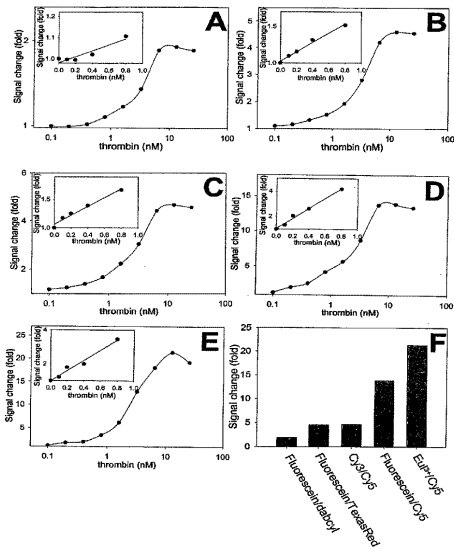


20/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 21

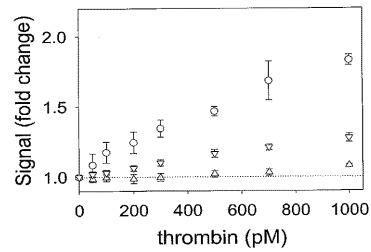


21/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 22

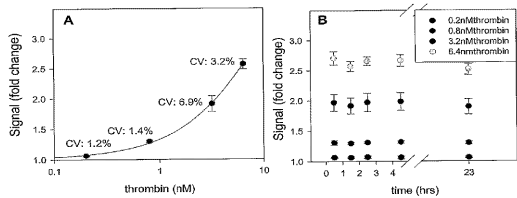


22/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 23

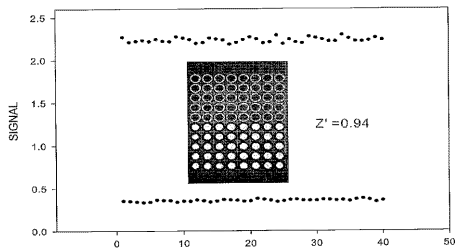


23/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 24

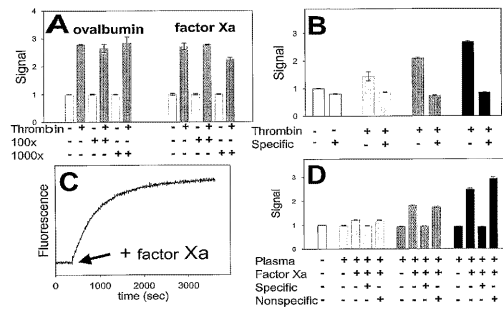


24/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

Figure 25

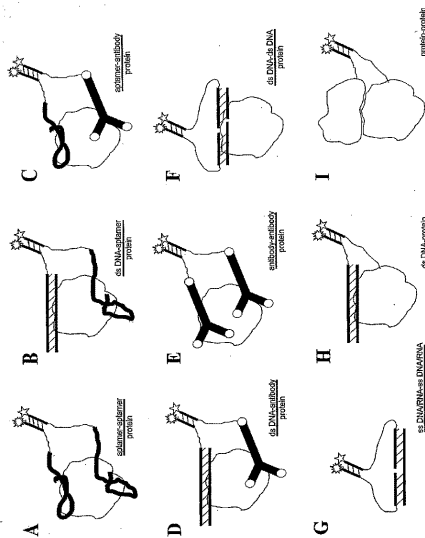


25/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315

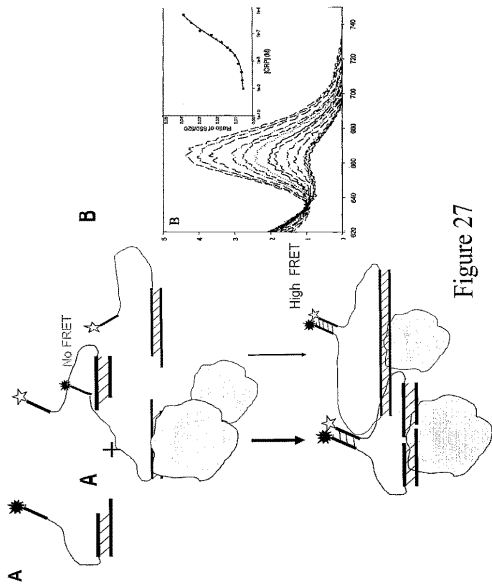
Figure 26



26/34

WO 2005/059509

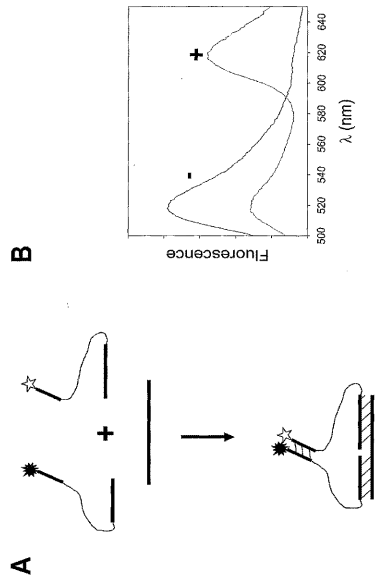
PCT/US2004/041315



27/34

WO 2005/059509

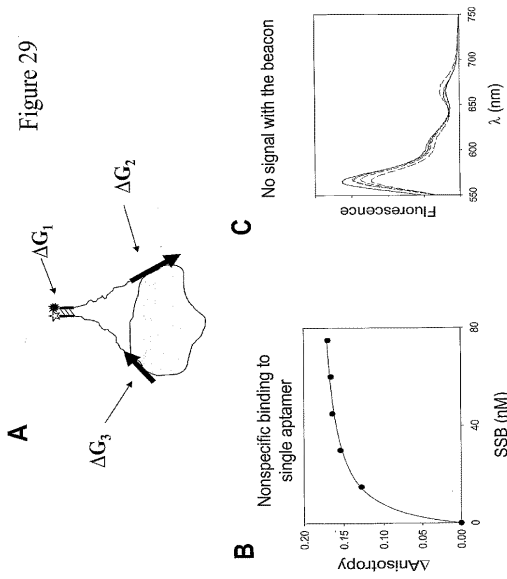
PCT/US2004/041315



28/34

WO 2005/059509

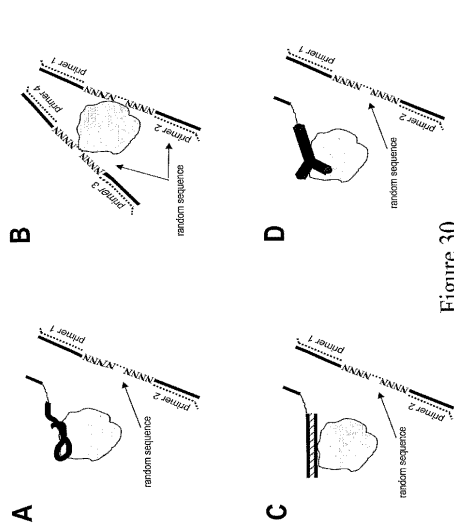
PCT/US2004/041315



29/34

WO 2005/059509

PCT/US2004/041315



30/34





专利名称(译)	用于检测大分子和其他分析物的生物传感器		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012115269A</a>	公开(公告)日	2012-06-21
申请号	JP2011284014	申请日	2011-12-26
[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	トマーズハイダック エワハイダック エリッククノール		
发明人	トマーズ・ハイダック エワ・ハイダック エリック・クノール		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/115 G01N33/53 G01N33/542 G01N33/543 C12N15/11 G01N G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6428 C12N15/111 C12N2310/16 C12N2310/3517 C12N2320/10 C12Q1/6825 G01N33/5308 G01N33/542 G01N2021/6432 G01N2021/6441 C12Q2525/205		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.Z C12N15/00.H G01N33/53.D G01N33/542.A G01N33/543.595 C12N15/11.P C12N15/11.Z C12N15/115.Z C12Q1/68.ZZN.A C12Q1/6825.C C12Q1/6825.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA20 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ36 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QX02		
代理人(译)	山田卓司 坂田启二		
优先权	60/529076 2003-12-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供使用一组核心适体构建体的组合物和方法，其可用于鉴定和定量任意多肽或大分子复合物。与多肽构建体的多肽的独特表位结合的适体构建体。这些适体构建体包含表位结合位点，核心适体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，核心适体彼此结合并产生可检测的信号。核心适体构建体可与接头连接以产生二价适体构建体。[选择图]无

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60-18 [29] 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G15Dアプタマー
THR3	AGT CCG TGG TAG GGG 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 GGG AGG TTG GGG TGA CT (ヌーサー18) <sub>2</sub> GG TTG GTG TGG TTG G	配列番号：5	5個のヌーサー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 GGG AGG TTG GGG TGA CT (ヌーサー18) <sub>10</sub> GGT TTG TGT GGT TGG	配列番号：6	10個のヌーサー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 (ヌーサー18) <sub>10</sub> AG TCC GTG GTA GGG CAG GTT GGG GTG ACT	配列番号：7	10個のヌーサー18リンカーに連結されたG15Dアプタマー
THR20	GGT TGG TGT GGT TGG (ヌーサー18) <sub>5</sub> C GCA TCT 3' タンク	配列番号：16	3' 端をダブル標識されたアスタレオチド長のシグナリングオリゴヌクレオチドに5個のヌーサー18リンカーで連結されたG15Dアプタマー
THR21	5' タンク AGA TCC G (ヌーサー18) <sub>5</sub> AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT	配列番号：17	5個のヌーサー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アスタ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 (ヌーサー18) <sub>5</sub> (GB A1/-dT) C GCA TCT	配列番号：18	アミノ酸 (5' 端近く) に含んだアスタレオチド長のシグナリングオリゴヌクレオチドに、5個のヌーサー18リンカーで連結されたG15Dアプタマー
THR28	5' 5'phos AGA TCC G (ヌーサー18) <sub>5</sub> AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT	配列番号：19	5個のヌーサー18リンカーで60-18 [29] アプタマーに連結された、5' アミノを含むアスタ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 ACC	配列番号：20	トリホンアミン-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