

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	ZNA		A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 39/395				N
			A 6 1 P 43/00	111
A 6 1 P 43/00	111		C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 Q 1/68			G 0 1 N 33/53	D
審査請求 未請求 請求項の数 31 O L（全 19数） 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2000－252476(P2000－252476)		(71)出願人	500396492
(22)出願日	平成12年8月23日(2000.8.23)			トマス アントニオ、サンタ コロマ
(31)優先権主張番号	P990104272			アルゼンチン国、ブエノスアイレス、オル
(32)優先日	平成11年8月26日(1999.8.26)		(72)発明者	トマス アントニオ、サンタ コロマ
(33)優先権主張国	アルゼンティン(AR)			アルゼンチン国、ブエノスアイレス、オル
				ティズ デ オキャンポ 2515 13 ビー
			(74)代理人	100066692
				弁理士 浅村 皓（外3名）

(54)【発明の名称】 ポリクローナルおよびモノクローナルオリゴ体（合成オリゴヌクレオチドに基づく抗体様試薬）
およびオリゴ体の作成方法

(57)【要約】（修正有）

【課題】抗体と同等の用途に有用なオリゴ体試薬とその作成法の提供。

【解決手段】高親和性でなく高特異性に基づく方法により選択される天然又は誘導体化オリゴヌクレオチドを含んでなる、合成オリゴヌクレオチドに基づく抗体様試薬又はオリゴ体であって、多くの用途で天然のポリクローナル又はモノクローナル抗体のように作用するユニークな能力を有し、未変性及び／又は変性タンパク質の両方の認識に関与するすべての用途（例えば、ウェスタンブロット、免疫沈降、免疫組織染色、放射免疫定量法、E L I S A、疾患のための薬剤、診断のためのマイクロトレイなど）に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 高親和性ではなく高特異性に基づく方法により選択される天然または誘導体化オリゴヌクレオチドを含んでなる、合成オリゴヌクレオチドに基づく抗体様試薬または「オリゴ体」であって、多くの用途で天然のポリクローナルまたはモノクローナル抗体のように作用するユニークな能力を有して、未変性および／または変性タンパク質の両方を非常に特異的に認識する上記試薬。

【請求項2】 オリゴ体を得る方法であって、均一な、プライマー結合5'末端配列と3'末端配列、および間にランダムなコア配列を有する、オリゴヌクレオチドのライブラリーを提供する工程；オリゴヌクレオチドライブラリーを、最終標的分子（これに対してオリゴ体が得られる）の一部に対応する合成一時的標的と一緒に、一時的標的に対する特異的結合を示すライブラリーからオリゴヌクレオチドを結合させるのに十分な時間インキュベートする工程；未結合オリゴヌクレオチドを一時的標的から分離し、次にインキュベーション中に一時的標的に結合するオリゴヌクレオチドを溶出および採取することにより、一時的標的に特異的に結合するオリゴヌクレオチドを選択する工程；採取したオリゴヌクレオチドを増幅する工程；検出可能な結合が得られるまで、一時的標的とのインキュベーション、選択および増幅工程を繰り返す工程；次に、検出可能な結合を示す採取および増幅したオリゴヌクレオチドを、他の分子との混合物中に最終標的分子を含む標的混合物と一緒に、採取および増幅したオリゴヌクレオチドからオリゴヌクレオチドを最終標的分子に結合させるのに十分な時間インキュベートする工程；最終標的から未結合オリゴヌクレオチドを分離し、続いて上昇した特異性で最終標的に結合するオリゴヌクレオチドを溶出および採取することにより、上昇した特異性で最終標的に結合するオリゴヌクレオチドを選択する工程；最終標的から採取した、上昇した特異性で結合するオリゴヌクレオチドを増幅する工程；および最終標的に対する結合特異性の上昇がもはや観察されなくなるまで、最終標的分子を含む標的混合物とのインキュベーション、選択および増幅工程を繰り返す工程を含んでなる、上記方法。

【請求項3】 最終標的分子はタンパク質であり、かつ一時的標的は該タンパク質の断片に対応する合成ペプチドである、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 合成ペプチドは、該タンパク質の抗原性断片に対応する、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 増幅は、オリゴヌクレオチドライブラリーからのオリゴヌクレオチドの均一な5'および3'末端部分に結合するプライマーを使用する、ポリメラーゼ連鎖反応により行われる、請求項2に記載の方法。

【請求項6】 増幅は、標的に結合する採取したオリゴヌクレオチドを指数関数的PCR増幅に供し；指数関数

的に増幅したオリゴヌクレオチドを精製して、末端切断型オリゴヌクレオチドとポリマーを除去し；そして次に、精製したオリゴヌクレオチドを、1つだけのプライマーを使用する線状PCR増幅に供して1本鎖オリゴヌクレオチドを得ることにより行われる、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 増幅したオリゴヌクレオチドが標識された型で得られるように、線状PCR増幅は標識物の存在下で行われる、請求項6に記載の方法。

10 【請求項8】 標識物は、放射性標識物、ビオチンおよび蛍光標識物よりなる群から選択される、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 一時的標的は固体マトリックスに結合している、請求項2に記載の方法。

【請求項10】 固体マトリックスはニトロセルロース紙である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 固体マトリックスは、非特異的結合部位をブロックするために前処理される、請求項9に記載の方法。

20 【請求項12】 分離は、固体マトリックスから未結合オリゴヌクレオチドを洗浄することにより行われる、請求項9に記載の方法。

【請求項13】 インキュベーションは、一時的標的と一緒に2回または3回だけ、そして最終標的と一緒に2回または3回だけ行われる、請求項2に記載の方法。

【請求項14】 インキュベーションサイクルの総数は5回を超えない、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 結合特異性の上昇がもはや観察されなくなった後に採取したオリゴヌクレオチドを、適切なベクターに連結し、クローン化し、スクリーニングし、精製し、配列決定して、モノクローナルオリゴ体を得る、請求項2に記載の方法。

【請求項16】 PCR増幅、プラスミド消化または化学合成（天然または誘導体化オリゴヌクレオチドを使用する）により、得られるモノクローナルオリゴ体を大量に産生することをさらに含んでなる、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 最終標的は、未変性タンパク質であり、そして上昇した特異性で最終標的に結合するオリゴヌクレオチドの選択は、ドットブロット、液相分離、免疫組織染色、ゲルシフトおよびカラム分離よりなる群から選択される、最終標的タンパク質を天然のコンホメーションに維持する非変性法により行われる、請求項2に記載の方法。

【請求項18】 請求項2に記載の方法により得られる、標的タンパク質に特異的に結合するオリゴヌクレオチドを含んでなるオリゴ体。

【請求項19】 請求項15に記載の方法により得られる、標的タンパク質に特異的に結合するオリゴヌクレオチドを含んでなるモノクローナルオリゴ体。

【請求項20】 オリゴヌクレオチドは、未変性および／または変性タンパク質を認識する、請求項18に記載のオリゴ体。

【請求項21】 標的タンパク質に特異的に結合するオリゴヌクレオチドからなるオリゴ体を結合させた固体マトリックスを含んでなる製造品。

【請求項22】 2本鎖または1本鎖の核酸から作られる生成物を含んでなるオリゴ体。

【請求項23】 天然または修飾化学基を有するリボ核酸を含んでなるオリゴ体。

【請求項24】 天然または修飾化学基を含む、デオキシリボ核酸を含んでなるオリゴ体。

【請求項25】 バイオテクノロジー、研究または臨床に重要な任意のポリマー（タンパク質、炭水化物、オリゴヌクレオチドなど）または分子であってよい、最終標的の断片を一時的標的として使用することにより得られるオリゴ体。

【請求項26】 修飾合成ペプチド（例えば、リン酸化、イソプレニル化、グリコシル化）を一時的標的として使用して得られるオリゴ体。

【請求項27】 薬物の担体（吸着または共有結合）として、または生理学的方法のインヒビター／アクチベーターとして使用されるか、あるいは工業的または商業的に重要な研究または他の用途に使用されるオリゴ体。

【請求項28】 ウェスタンブロット、免疫組織染色、免疫沈降、放射免疫定量法、ELISAなどのような、診断のために抗体が使用される種々の用途に使用されるオリゴ体。

【請求項29】 タンパク質精製、親和性クロマトグラフィー、ライブラリースクリーニング、細胞選別、および共焦点顕微鏡法のような、種々のバイオテクノロジーの用途に使用されるオリゴ体。

【請求項30】 種々の疾患の診断のためのキットに使用されるオリゴ体。

【請求項31】 疾患の治療のための製剤としてのオリゴ体。

【発明の詳細な説明】

【0001】（関連出願への相互参照）本出願は、2000年5月19日に出願の米国仮出願第60/205,238号（1999年8月26日出願のアルゼンチン出願第990104272号に基づく）に基づく優先権を主張する。

【0002】（発明の分野）本発明は、合成抗体様試薬（以降「オリゴ体」と呼ぶ）およびこれを効率的に調製するための方法に関する。この試薬は、未変性または変性タンパク質に対して非常に高い特異性を有する、オリゴヌクレオチドの組合せライブラリーから選択される2本鎖または1本鎖オリゴヌクレオチドにより構成される。この試薬は、先行技術において既知のどの合成試薬にも存在しない特徴である、免疫プロットング、免疫

組織染色および免疫沈降のような種々の用途において、モノクローナルまたはポリクローナル抗体の代替物としての効力が証明された。

【0003】（発明の背景）タンパク質の検出、単離および精製では、タンパク質を未変性または変性型のいずれかで認識する抗体の能力が利用される。しかし、必要な抗体、特にモノクローナル抗体は、これらの抗体の入手および精製のための方法が一般に時間と費用がかかるために、必ずしも容易に利用できるとは限らない。さらに、抗体を開発するために、免疫系に認識させるべき分子は、「抗原性」である必要があり、すなわち外来タンパク質として免疫系に認識される必要があり、これはよくある状況ではない。一方抗体はかさ高く、これは組織へのこれらの拡散および腫瘍のような標的へのこれらの利用可能性に影響するだけでなく、免疫原性反応の引き金になりうる性質である。これらの要因は、特に、抗体の治療的応用に影響しこれを限定する。

【0004】したがって、「合成抗体」、すなわちウェスタンブロット、免疫組織染色、免疫沈降などのような測定法において抗体のように作用することができる、動物、哺乳動物細胞、免疫系などを必要とせずに行得られる合成分子を開発できれば、非常に有益である。研究と診断の重要な道具であること以外に、これらの分子はさらに、癌または自己免疫過程のような疾患における免疫療法のための方法の効率を改善する助けとなる。

【0005】高い親和性でタンパク質を認識する試薬を調製するために、最近いくつかの方法が着想および応用されている。これらの方法は、オリゴヌクレオチドではない標的（例えばタンパク質、低分子、代謝物）に結合するある種のオリゴヌクレオチド（DNAまたはRNA）の能力に基づいている。これらの試薬は、ランダム配列の領域を含む組合せ合成から誘導される配列を有する、1本鎖の集団から構成され、4つの塩基（A、C、G、およびT）の混合物を合成の各工程に添加することにより得られる。このように、数十億の異なるコンホメーション（約 10^{14} 個）を有しており、そのいくつかは、高い親和性で標的に結合することができる、1本鎖オリゴヌクレオチドのライブラリーまたはコレクションが得られる。この領域における最初の研究は、ツエルク（Tuerk）とゴールド（Gold）（ツエルク（Tuerk）とゴールド（Gold）（1990）「指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化：バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼに対するRNAリガンド」、Science, 249:505-10）、エリントン（Ellington）とズスタック（Szostak）（エリントン（Ellington）とズスタック（Szostak）（1990）「特異的リガンドに結合するRNA分子のインビトロ選択」、Nature, 346:818-22）およびブラックウェル（Blackwell）とヴァイントラウブ（Weintraub）（ブラックウェル（Blackwell）とヴァイントラウブ（Weintraub）（1990）「結合部位選択により現れるM

y o DおよびE 2 Aタンパク質複合体のDNA結合優先における差と類似性」, Science, 250:1104-10) により行われた。

【0006】ある標的に対して親和性を有するこれらのライブラリーのメンバーを選択するための方法を、ラリー・ゴールド (Larry Gold) と共同研究者達 (ツエルク (Tuerk) とゴールド (Gold) (1990) 「指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化: バクテリオファージ T4 DNAポリメラーゼに対するRNAリガンド」, Science, 249:505-10) は、セレックス (SELEX) と呼び; 一方エリントン (Ellington) と共同研究者達 (エリントン (Ellington) とズスタック (Szostak) (1990)

「特異的リガンドに結合するRNA分子のインビトロ選択」, Nature, 346:818-22) は、これらの試薬を「アプタマー (aptamers)」と呼んだ。簡単に述べると、ランダムコア配列を有するオリゴヌクレオチドの混合物を、一般には固体支持体に結合した標的分子で刺激する。標的に親和性を有するこれらのオリゴヌクレオチドの結合後、洗浄工程を利用して、低親和性または親和性のないオリゴヌクレオチドを廃棄することにより、高い親和性を有するものを選択および分離することができる。次に結合した高い親和性のオリゴヌクレオチドを標的から分離して、ライブラリーの5'および3'末端両方の固定配列に対して相補的な配列を含む前進および逆進プライマーを用いることによりPCR増幅する。この方法によって、2本鎖オリゴヌクレオチドの多数のコピーが得られる。次にこれらの鎖は、いくつかの異なる方法を使用することにより分離して、多数のコンホメーションの1本鎖分子として標的に再度結合させることができる。このサイクルを数回繰り返すことにより、各工程において標的に対する高い親和性を有するアプタマーの量を増大させることができる。この一般法のいくつかの変法が、引用文献に言及される。

【0007】しかしセレックス (SELEX) により得られる結果は、未だ満足のいくものではない。最初の研究の10年後でさえ、約150種の異なる分子に対する限られた量のアプタマーしか得られていない。例としては、トロンビン (ボック (Bock) ら (1992) 「ヒトトロンビンに結合してこれを阻害する1本鎖DNA分子の選択」, Nature, 355:564-6)、セレクトインP (ジェニソン (Jenison) ら (1998) 「P-セレクトイン-依存性好中球-血小板接着のオリゴヌクレオチドインヒビター」, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 8:265-79)、VEGF (ジェリネック (Jellinek) ら (1994)

「血管内皮増殖因子に対する高親和性RNAリガンドによる受容体結合の阻害」, Biochemistry, 33:10450-6; ラックマン (Ruckman) ら (1998) 「165アミノ酸型の血管内皮増殖因子 (VEGF 165) に対する2'-フルオロピリミジンRNAに基づくアプタマー。エクソン7がコードするドメインを必要とする相互作用によ

る、受容体結合およびVEGF誘導性血管透過性の阻害」, J. Biol. Chem., 273:20556-67); インターフェロン γ (バラスブラマニアン (Balasubramanian) ら (1998) 「インターフェロン-ガンマ阻害性オリゴデオキシヌクレオチドはインターフェロン-ガンマのコンホメーションを変化させる」, Mol. Pharmacol., 53:926-32; リー (Lee) ら (1996) 「オリゴヌクレオチドはインターフェロン-ガンマのシグナル伝達をブロックする」, Transplantation, 62:1297-301; クービック (Kubik) ら (1997) 「受容体結合を阻害する、ヒトIFN- γ に対する2'-フルオロー、2'-アミノ、および2'-フルオロー/アミノ修飾RNAリガンドの単離と性状解析」, J. Immunol., 159:259-67); CD4 (デイヴィス (Davis) ら (1998) 「フローサイトメトリーのための2'-F-ピリミジン含有RNAアプタマーによる細胞表面ヒトCD4の染色」, Nucleic Acids Res., 26:3915-24; クラウス (Kraus) ら (1998) 「CD4抗原に結合してCD4+Tリンパ球機能を阻害することができる新規なRNAリガンド」, J. Immunol., 160:5209-12); ズブチリシン (タケノ (Takeno) ら (1999) 「ズブチリシンのプロテアーゼ活性を特異的に阻害するRNA分子の選択」, J. Biochem., 125:1115-9); 肝炎からのプロテアーゼNS3 (クマール (Kumar) ら (1997) 「相補的ランダムRNAのプールからのC型肝炎ウイルスのNS3タンパク質に特異的なRNAアプタマーの単離」, Virology, 237:270-82; アーヴィル (Urvil) ら (1997) 「C型肝炎ウイルスのNS3プロテアーゼに特異的に結合するRNAアプタマーの選択」, Eur. J. Biochem., 248:130-8); エラスターゼ (デイヴィス (Davis) ら (1996) 「フローサイトメトリーにおける高親和性DNAリガンドの使用」, Nucleic Acid Res., 24:702-6; チャールトン (Charlton) ら (1997) 「ヒト好中球エラスターゼのアプタマーインヒビターを使用する炎症のインビボイメージング」, Chem. Biol., 4:809-16; ブレス (Bless) ら (1997) 「肺炎炎症性損傷における好中球エラスターゼのアプタマーインヒビターの保護作用」, Curr. Biol., 7:877-80); HIV-1 ウイルスのいくつかのタンパク質 (ボイジアウ (Boiziau) ら (1997) 「HIV-1 TAR成分のインビトロ転写のためのDNA鋳型に対するアプタマーの同定」, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 7:369-80; アレン (Allen) ら (1996) 「特異的なRNA構造モチーフはHIV-1ヌクレオキャプシドタンパク質 (NCp7) による高親和性結合を仲介する」, Virology, 225:306-15; バーグランド (Berglund) ら (1997) 「HIV-1ヌクレオキャプシドタンパク質に関する高親和性結合部位」, Nucleic Acid Res., 25:1042-9; ボイジアウ (Boiziau) ら (1999) 「HIV-1トランス-活性化-応答性RNA成分に対して選択されたDNAアプタマーはRNA-DNAキッキング複合体を形成す

る」, J. Biol. Chem., 274:12730-7; ギヴァー (Give
r) ら (1993) 「HIV-1 Revに対する高親和性R
NAリガンドの選択と設計」, Gene, 137:19-24; ジェ
ンセン (Jensen) ら (1994) 「HIV-1 Revタン
パク質に対するインビトロで選択したRNAリガンドの
性状解析」, J. Mol. Biol., 235:237-47; マロツィ
(Marozzi) ら (1998) 「Tatタンパク質によるHIV-
1 TAR変種のインビトロ選択」, J. Biotechno
l., 61:117-28; シュナイダー (Schneider) ら (1995)
「1型ヒト免疫不全ウイルスの逆転写酵素の高親和性 s
s DNA インヒビター」, Biochemistry, 34:9599-61
0; ツエルク (Tuerk) とマクドガルウォー (MacDoug
al-Waugh) (1993) 「機能的核酸のインビトロ進化: H
IV-1 タンパク質の高親和性RNAリガンド」, Gen
e, 137:33-9; 低分子、例えばアデノシン (バーク (B
urke) とゴールド (Gold) (1997) 「S-アデノシルメ
チオニンのアデノシン残基に対するRNAアプタマー:
セレックス (SELEX) の主題と再現性における変化から
の構造の推理」, Nucleic Acids Res., 25:2020-4; ヒ
ュイゼンガ (Huizenga) とズスタック (Szostak) (199
5) 「アデノシンとATPに結合するDNAアプタマ
ー」, Biochemistry, 34:656-65; ドーパミン (マニ
ロニ (Mannironi) ら (1997) 「ドーパミンRNAリガ
ンドのインビトロ選択」, Biochemistry, 36:9726-34)
などを含む。

【0008】多少異なる方策を用いて、スー (Xu) とエ
リントン (Ellington) は、タンパク質Revの断片に
対応する合成ペプチドにセレックス (SELEX) を応用し
た (スー (Xu) とエリントン (Ellington) (1996)
「抗-ペプチドアプタマーはアミノ酸配列を認識してタ
ンパク質エピトープに結合する」, Proc. Natl. Acad. S
ci. USA., 93:7475-80)。10サイクルの選択後、タン
パク質Revに結合できるRNAが得られた。しかし、
このタンパク質は天然にRNAに結合するため、この結
果が一般化できるかどうかを知ることは困難であった。
さらに、特異性は納得のゆくように証明されなかった。
ゲルシフト測定法を使用して特異性を証明したが、タン
パク質の混合物 (例えば核抽出物、細胞質ゾルなど) で
はなく、ゲルシフトで通常行われるようにわずかな他の
純粋なタンパク質を使用して行った。さらに、ウェスタ
ンブロットは行わなかった。したがって、使用した方法
は、納得のゆくように特異性を証明しなかった。ここ
で、このことがアプタマーまたはセレックス (SELEX)
に関するどの研究にも共通の、非常に重大な限界である
ことに注意することが重要である。すなわちタンパク質
に対して選択された試薬の特異性は、抗体のための適切
な方法 (例えば、総タンパク質の混合物を使用して準備
されたウェスタンブロット、または免疫組織染色または
免疫沈降) では明白に証明されていない。

【0009】したがって、タンパク質-オリゴヌクレオ

チド高親和性に基づく先行技術の方法では、未変性また
は変性された任意の標的タンパク質に対して抗体と同等
な試薬は産生されていないし、また、このようなアプタ
マーの特異性も納得のゆく証明がされていない。さら
に、これまで報告された方法は、時間と手間がかかり、
一般に10サイクル〜25サイクルの選択/増幅を必要
とし、選択の方法中にセンス鎖とアンチセンス鎖の分離
を必要とする。さらに、セレックス (SELEX) 方法後に
これらの試薬を得るためには、純粋で未変性型の標的タ
ンパク質を持つ必要があり、そして最終産物は、未変性
タンパク質のみを認識する (ヴァイス (Weiss) ら (199
7) 「RNAアプタマーはプリオンタンパク質PrPと
特異的に相互作用する」, J. Virol., 71:8790-7) 必要
があり、このことが別の重大な限界である。全体とし
て、セレックス (SELEX) 法の有効性は、10年後にな
っても、セレックス (SELEX) 方法により得られた試薬
は、非常に要求の厳しい抗体市場を侵略はおろか探索さ
えていないという事実により充分に明らかになっている。

【0010】(発明の要約) 先行技術の問題点は、合成
ペプチド、合成オリゴヌクレオチド、PCR、および最
も重要なことに「標的スイッチング」と命名された方策
(これは、主として親和性よりむしろ特異性に基づく選
択を意味する) の利用を組合せる本発明により克服され
る。こうして産生された試薬は、そのオリゴヌクレオチ
ドの性質とその抗体としての挙動のために「オリゴ体」
と呼ばれる。利点の1つは、本発明は一般にわずかに4
サイクルまたは5サイクルの選択/増幅しか必要としない
ことである。さらに、得られる試薬は、非常に高い特
異性が証明されており、これはウェスタンブロット、免
疫組織染色および免疫沈降を用いて、初めて検証されて
いる。増幅後にDNA鎖の分離を必要とせず、そして合
成ペプチドを使用するため、最終的な標的を純粋な形で
得る必要がない。さらに、本法は免疫系とは独立してい
るため、「抗原性」領域を必要とすることなくタンパク
質の異なる領域に対して「モノクローナルオリゴ体」ま
たは「ポリクローナルオリゴ体」を産生することが可能
である。本発明のオリゴ体が標的タンパク質の「抗原
性」領域に限定されないという事実は、従来の抗体にま
さる重要な利点である。対応するペプチドを合成しかつ
標的タンパク質に対するオリゴ体を調製することが可能
であるためには、タンパク質 (またはADNまたはARN)
の一部の配列を知ることが必要なだけである。オリ
ゴ体は、放射性同位体またはビオチンの結合のようなオ
リゴヌクレオチドを標識するための任意の従来法で標識
することができる。

【0011】本発明は「オリゴ体」を説明し、そしてこ
れらを組合せライブラリーから効率的に入手するための
方法を含む。オリゴ体はその特異性と応用に関して抗体
と類似した性質を有する。本発明で説明されるオリゴ体

を入手するための方法は、純粋なタンパク質を必要としない。さらに本方法はまた、データベースから得られる対応するDNAまたはRNA配列からの部分的コード配列を知ることまたは単に推測すること、そしてそのタンパク質を発現する組織の非常に粗い調製物を有することで充分であるため、目的のタンパク質が精製されていない状況にも応用可能である。

【0012】本発明の方策は、「一時的標的」として標的タンパク質の断片に対応する合成ペプチドを使用すること、およびこの合成ペプチドを認識できるオリゴヌクレオチドの最初の選択を行うことである。次に検出可能な結合が得られた後（これは、通常わずか1または2サイクルの選択／PCR増幅後に起こる）、合成ペプチド（一時的標的）を「最終標的」（これは、好ましくはタンパク質の非常に粗い調製物として存在する）で置き換える。この方策は、「標的スイッチング」と呼ばれるように、標的タンパク質に特異的なオリゴ体を入手するために非常に重要である。必要であれば、特異性の改善がもはや得られなくなるまで、最終標的で新しいサイクルの選択が繰り返されるが、これは通常わずか2または3選択サイクル後に起こる。こうしてオリゴ体（すなわち、抗体と非常に類似した挙動を示す試薬）は、合成ペプチドと、最終的標的タンパク質を含むタンパク質混合物を使用することにより得られる。さらに本発明により、CPD1についての図4および例4に示されるように、そのADN配列の断片から推測されるタンパク質に対する「オリゴ体」を調製することができる。タンパク質CPD1は、これまで実験室で精製されておらず、従って良好なモデル系である（ジーンバンク（GenBank）受け入れ番号U89345）。

【0013】本発明の方法において、「一時的標的」として合成ペプチドを使用することによるライブラリーサブセットの最初の選択、およびこれに続く「標的スイッチング」は非常に重要である。合成ペプチドを使用することにより選択されるサブセットは、標的のスイッチング後、未変性、変性または両方の形の「最終標的」を認識することができる。これは、液相または固相において多数のコンホメーションを取る合成ペプチドの能力により促進される（クロダ（Kuroda）ら（1994）「モンテカルロ（Monte-Carlo）シミュレーションにより試験した水溶液中のエンドセリン-1のC末端のコンホメーション」, FEBS Lett., 355:263-6; リー（Li）ら（1995）「環境および／または1次配列の微調整によるペプチドコンホメーションの操作」, Biopolymers, 35:667-75）が、これらのいくつかは、未変性または変性標的タンパク質に存在するコンホメーションを有する。特異性は、この新しいサブセットから、標的のスイッチング後、数千のタンパク質の混合物と一緒に最終標的の存在のために得られる（ウェスタンブロット、ゲルシフトなどで）。

【0014】本発明は、タンパク質を認識するための試薬の製造において重要な革新を導入し、未変性および変性タンパク質の両方の認識を初めて可能にする。さらに、ウェスタンブロット、免疫組織染色および免疫沈降のような、以前は合成試薬に対して予め除外されており抗体だけに制限されていた方法を使用することにより、本発明のオリゴ体の特異性が初めて明瞭に証明された。

【0015】何らかの型の最終標的を認識できるオリゴ体を産生する必要に応じて、最終標的は、未変性または変性型の形で存在しなければならない。あるいは、両方の形が認識できる試薬が開発されるなら、両方の形の混合物により構成されていてもよい。合成ペプチドの使用も重要である。また標的のコンホメーションの空間が、セレックス（SELEX）のように、未変性タンパク質に許されるほとんど暴露されない適切なコンホメーションに制限されていないため、これにより純粋なタンパク質の必要性が回避され、試薬の入手に成功する確率が增大する。当然ながら、未変性タンパク質中で合成ペプチドの配列が塞がれているならば、オリゴ体は変性タンパク質だけを認識し未変性タンパク質を認識しない可能性もある。このため、表面に暴露されるであろう標的タンパク質中の領域を同定または予測することができるある種のコンピュータプログラムを使用すること、および「一時的標的」として対応する合成ペプチドを使用することが推奨される。

【0016】一方、本方法にはさらに別の利点がある。例えば、ペプチド中の抗原性領域は必要とされないため、本方策は免疫系とは独立である。その代わり、オリゴ体は、標的タンパク質中の特異的領域に対して、またはあるファミリーのタンパク質を同定しようとするならばコンセンサス配列に対して、またはユニークな配列などに対して得ることができる。

【0017】さらに本発明の1つの変法では、各サイクルにおいて一時的にせよ鎖を分離する必要なく、特異的結合領域を得ることができる。このための方策は、結合後に抽出される産物の最初の指数関数的増幅の実施、続いて標識ヌクレオチドの存在下での線状増幅（または1つだけのプライマーを使用する不斉PCR）である。この方法を使用することにより、センスおよびアンチセンス鎖を分離する面倒な方法を回避しながら、1つの標識鎖のみを得ることができる。

【0018】あるいは、鎖は、迅速な加熱と冷却により一時的に分離することができる。しかし時に、選択されるオリゴヌクレオチドの高い解離温度（ T_m ）が、この単純な操作の利用を妨害する。

【0019】本発明はまた、別の非常に重要な変法を含む。最初の増幅／選択サイクル後に高分子量種の形成が観察された。これらの種は、各サイクルにおいてサイズが大きくなり、最終的には選択が不可能になる。この問題は、指数関数的増幅後、アガロースゲルにおける分離

を使用して、各サイクルにおいて得られる産物を精製することにより克服されている。次に、以後のPCR増幅ではさらなるポリマー形成は観察されないが、未だ理由は不明であるが、分子量は時に最初のライブラリーサイズの1倍または2倍増大する。しかし、サイズが1倍または2倍大きいこれらの種は、結合に関しては完全に能力がある。

【0020】望ましくない高分子量ポリマーの形成を回避するための代替方策は、PCR増幅工程で使用される前進および逆進プライマーのサイズを増大させることである（最初のライブラリーにおいて、これは必要でない）。32量体（前進）プライマーおよび38量体（逆進）プライマーによって、高分子量ポリマーがうまく回避されることが証明された。別の代替法は、エンド/エキソヌクレアーゼ活性を回避するために、配列中に誘導体化オリゴヌクレオチドを使用することであり、この方策は、未だ理由は不明であるが、PCR増幅中の望ましくないポリマーの形成を阻害する（結果は示していない）。

【0021】言及した種々の方策の中で最も重要なもの（これは本発明の成功への鍵である）は、高親和性よりむしろ高特異性に基づく選択の使用であった。従来他の研究者が使用した方法は、特異性は当然高親和性に至ることを仮定して、主として多数回の選択を実施して非常に親和性の高いサブセットを探索することである（イートン（Eaton）ら（1995）「特異的なものを獲得しよう：特異性と親和性の間の関係」、Chem. Biol., 2:633-8、を参照のこと）。しかしこの先行技術の仮定は、正しくない。例えば、アプタマーは低分子を認識することができるため、ペプチド鎖中のアミノ酸アルギニンを非常に高い親和性で認識するオリゴヌクレオチドを単離することができる。しかし、このオリゴヌクレオチドは、表面に暴露されたアルギニンを有する大部分のタンパク質、および混合物中のほぼ全ての変性タンパク質を認識することは間違いない。したがってこのアプタマーはアルギニンに対する高い親和性を有するであろうが、非常に非特異的でもある。一方本発明は、中程度の親和性でタンパク質に結合するオリゴヌクレオチドでも非常に特異的でありうるという事実を利用する。実際このことは、多数のモノクローナル抗体について起こり、これらは中程度の親和性であるが高度の特異性を有する。こういう理由で、本発明において使用される主要な方策は、最初の工程で親和性にあまり注目することなく、可能な限り即座に、非常に特異的な種を捜す選択を行うことである。従って、検出可能なシグナルを有するのに十分な最小数のサイクルを一時的標的で実施し、選択標的を即座に、タンパク質の混合物中に存在する最終標的にスイッチングして、親和性ではなく主として特異性に関して選択する。特異的結合が得られて初めて親和性に注目して、特異性の高いクローンから検出目的に十分な親和性

を有するクローンを選択する。すなわち、本発明の方策は、セレックス（SELEX）または類似の方法で利用されたものとはちょうど逆であり、後者では高親和性種を捜し、多数回のサイクルの選択／増幅を実施する。このような選択が一旦行われると、ライブラリー（および性質）の最も重要な特色である多様性が、小さくなるかまたは消失する。そこで、高親和性を示すもののサブセットから特異的な試薬を捜すことは既に遅すぎる。親和性よりむしろ特異性に関する選択という本発明の方策により我々は、10年以上の間他の研究者にも非常に大きな困難を克服する合成（オリゴヌクレオチドに基づく）抗体または「オリゴ体」を初めて作りだすことが可能になったため、この方策は非常に重要である。

【0022】セレックス（SELEX）方法に内在するもう1つの困難さは、得られた高親和性化合物は必ずコンホメーションが非常に限定されており、このため標的のコンホメーションの小さな変更でも結合が破壊されてしまうことである。セレックス（SELEX）方法が未変性タンパク質または小さな硬直した低分子だけに有用であったのは、恐らくこのためであろう。

【0023】1. 要約すると、本発明の利点は下記を含む：（1）非常に少数回のサイクルの選択／増幅しか必要としない：通常合成ペプチドでは2回、そしてタンパク質の混合物では2回か3回。すなわち、先行技術の方法で通常必要とされる10回～25回に比較して、最大4回か5回のサイクルしが必要でない。（2）標的タンパク質は純粋である必要がない。それどころか、好ましくは非常に粗調製物として使用するのがよい。この性質により、たとえ標的タンパク質が未だ精製されていないとしても、データベースから推測される配列を持つタンパク質に対してオリゴ体を作ることができる。また、この方法を使用して、3つの可能性ある枠に対するオリゴ体を合成し、次にどれが実際に天然に存在するかを決定することにより、正しい読み枠を求めることが可能である。（3）各増幅工程後、鎖を永久に分離させることを必要としない。単に加熱／冷却またはpH変更と中和により一時的に分離を行うか、あるいは鎖の一方を過剰に得るための線状増幅を行うことを要するだけである。このことは、選択中にも、さらには最終産物についても真である。しかし試料の加熱後の希釈は、再結合を回避するために注意深く試験すべきであり、そしてT_mは適切である必要がある。T_mが高すぎると、鎖を分離するための異なる方法が必要となる。（4）モノクローナル抗体に比較して、「オリゴ体」は、迅速な設計と製造、低コスト、高親和性（nM範囲）、免疫系からの独立（標的が抗原性である必要がない）および良好な拡散性（天然の抗体より少なくとも5倍小さい）という利点がある。この最後の性質は、モノクローナル抗体では標的への近づきやすさが限定されているために失敗してきた腫瘍や他の疾患の治療において、うまく使用できる確率を改善

する。オリゴ体は、その抗原性には無関係に、標的タンパク質の異なる領域に対して、容易に製造することができる。(5) 診断、遺伝子発現研究などにおいて使用するため、DNAについて使用されるものと同様なチップを容易に製造することができる。

【0024】したがって、本発明は、オリゴ体、これらを手に入れるための方法、およびこれまで抗体が使用されてきた用途におけるオリゴ体の使用に関する。(発明の詳細な説明)

【0025】本発明は、天然のまたは変性型のタンパク質を非常に特異的に認識するユニークな能力と、測定法(ウェスタンブロット、免疫組織染色、および免疫沈降を含むが、これらに限定されない)で抗体として挙動するユニークな能力を有する分子を含んでなる、ランダム配列のオリゴヌクレオチドのライブラリーを使用して得られる「オリゴ体」すなわち結合試薬を得る方法であって、

【0026】i) ランダムコア配列を含有するオリゴヌクレオチドのライブラリーを合成し、このライブラリーを前進プライマーと逆進プライマーを使用してPCRにより指数関数的に増幅し(合成中に現れる末端切断型を最少にする方法);次に、増幅したライブラリーを精製し、精製した生成物を1つのプライマーのみを使用する線状または不斉PCR増幅に供し;

ii) 工程i)で得られた線状に増幅した生成物を、標的タンパク質の領域に対応する合成ペプチドで作成した「一時的標的」とともにインキュベートする。好ましくは合成ペプチドは固体マトリックスに結合しているが、液相への結合も使用でき、次に当該分野で公知のいくつかの方法のうち任意のものを使用して結合種と遊離種とを分離する;

iii) 標的に結合したオリゴヌクレオチドを洗浄し、次に溶出して、一時的標的に特異的に結合するオリゴヌクレオチドを選択し;

iv) 次に、工程iii)で選択したオリゴヌクレオチドをPCRにより指数関数的に増幅し、増幅した生成物を精製し、そして次に、精製した生成物を、標識物質の存在下で1つのプライマーのみを使用する線状PCR増幅に供し;

v) 検出可能な結合が得られるまで工程ii)、iii)およびiv)を繰り返して、一時的標的に結合した選択されたオリゴヌクレオチドを回収する。典型的には工程i)、iii)およびiv)は、1回または2回のみ繰り返せばよい;

vi) 「最終標的」を含有するタンパク質の混合物により合成ペプチドまたは「一時的標的」を変化させ(標的スイッチング)、工程vで回収したオリゴヌクレオチドを最終標的とともにインキュベートし、最終標的に特異的に結合するオリゴヌクレオチドを選択し;

vii) 工程vi)で選択したオリゴヌクレオチドをPCR

により指数関数的に増幅し、増幅生成物を精製し、そして次に、精製した生成物を1つのプライマーのみを使用する線状PCR増幅に供し、線状増幅されたオリゴヌクレオチドを回収し;

viii) 標的分子について特異的結合がもはや得られなくなるまで工程vi)とvii)を繰り返し、得られた特異的に結合したオリゴヌクレオチド(これは、「ポリクローナルオリゴ体」を構成する)を採取する;これらの特異的結合オリゴヌクレオチドまたはポリクローナルオリゴ体はPCR増幅することができ、ベクター-T(プロメガ社(Promega Corp.))のような適当なベクターに連結し、クローン化し、スクリーニングし、精製して、一定の規定配列を有する「モノクローナルオリゴ体」を得ることができる。このモノクローナルオリゴ体は、次にPCR増幅、プラスミド消化、またはオリゴヌクレオチド合成機を使用する完全な化学合成により、有用な量で得ることができる。

【0027】オリゴ体を得る方法を図1に要約する。この方法の異なる工程を調節するために、線状PCR増幅工程の間、³²P標識ヌクレオチドを使用してオリゴヌクレオチドを標識する。オリゴヌクレオチドはまた、ビオチン化のような他の方法により問題無く標識することもできる。こうして最後の工程で得られるポリクローナルオリゴ体は、ウェスタンブロット、ドットブロット、免疫組織染色、および免疫沈降(後者では、例えばビオチン標識を使用する)のために直接使用することができる。あるいは、選択方法の最後に、オリゴヌクレオチドプローブを標識するために通常使用される任意の方法(例えば、ビオチン化し、ジゴキシゲニンまたは蛍光性化合物に結合した塩基で、ターミナルトランスフェラーゼを使用し、2次プローブでハイブリダイゼーションなど)によりオリゴ体を標識することができる。ビオチン標識は、免疫沈降、親和性カラム、疾患の治療などに特に有用である。当該分野で公知の他に多くの標識法がある。図7は、最後の増幅工程でビオチン化プライマー(前進プライマー)を加えて標識したモノクローナルオリゴ体の例を示す。

【0028】一時的標的として使用される合成ペプチドを設計するために、標的タンパク質の一部の断片がわかっていなければならない。読みとり枠(読みとり枠)も公知であることが好ましいが、必ずしも必要ではない。読みとり枠が不明なら、3つの読みとり枠に対応するペプチドを合成し、それぞれ別々に試験することが必要であろう。対応する配列が入手できないなら、一時的標的として純粋なタンパク質を使用しなければならないであろう。

【0029】未変性のタンパク質を認識できるオリゴ体を開発することが目的であり、充分な配列情報が入手できるなら、抗原性部位を予測するのに有用な任意のソフトウェアを使用して、一時的標的として使用される断片

を選択することが便利である。こうして、オリゴ体に認識される未変性のタンパク質の確率を上昇させることができる。これは、予測された「抗原性領域」が通常分子の表面にあるためであり、これらが「抗原性」であるためではない。というのは、前記したように、本発明の方法は免疫系とは独立しているため抗原性が必要ないからである。抗原性領域を予測するために適したコンピュータープログラムの例の1つは、ジェニティックコンピューターグループ (Genetic Computer Group) (オックスフォードモレキュラー (Oxford Molecular)、www.gcg.com) のGCGパッケージである。一時的標的ペプチドは、最近のペプチド合成機の古典的固相法を使用して合成することが好ましい。

【0030】例1

実験法

オリゴ体を得るための方法を図1に要約する。

【0031】オリゴヌクレオチドライブラリーの合成と増幅

一般に、PCR増幅ライブラリーを得るために3つのオリゴヌクレオチドが必要である。1つは前進プライマーであり、これは約20～40塩基の非ランダム配列を含有する。第2は、逆進プライマーであり、これもまた、同様の非ランダム配列を含有する。第3は、組合せライブラリー (combinatorial library) であり、これは、前進プライマーに対応する配列と、その後に長さが異なる (通常30～80塩基) ランダムコア配列と、その後に逆進プライマーに相補的な別の非ランダム配列を含有する。前進 (または逆進) プライマーは、随時ビオチンに結合して、鎖の分離を促進したり、またはオリゴヌクレオチドの標識を促進する。本例で使用したオリゴヌクレオチドは、以下のものである：

【0032】

オリゴ1 (前進プライマー、領域5') : 5'-CTGCAGCCGCGGGGATCCT-3' (配列番号1)

オリゴ2 (逆進プライマー、領域3') : 5-GCCACTAAGCTTGAATTCGACTAGA-3' (配列番号2)

オリゴ3 (ライブラリー) : 5-CTGCAGCCGCGGGGATCCN₅₆TCTAGTCGAATTACAAGCTT AGTGGC-3 (配列番号3)、ここで、N₅₆はランダムポリヌクレオチドコアライブラリー配列である。もちろんこれらのオリゴヌクレオチドは、単なる例であり、誘導体化オリゴヌクレオチドやプライマー配列を使用して、本発明から逸脱することなく、その長さまたは組成を変更することができる。興味深いことに誘導体化オリゴヌクレオチドは、例えばビオチン化を使用すると、理由は不明であるが、好ましくない高分子量ポリマーの形成を避けることが観察された (結果は示していない)。まだ誰も、これらの好ましく

ない高分子量ポリマーの形成を報告していないことに注目されたい。

【0033】合成後、プライマーのみがHPLCで精製される。100量体 (またはこれより長い) オリゴヌクレオチドが選択されているため、合成中の収率は低い。生成物の大部分は、末端切断型副産物からなり、PCR増幅前の未成熟HPLC精製は、末端切断型のみを生じるであろう。不純物を除去するために、対応するプライマー (オリゴ1とオリゴ2) でPCRを使用して、ライブラリーを増幅することが必要である。この増幅工程とその後のアガロースゲルでの精製を使用して、最終ライブラリーが得られる。

【0034】ライブラリー増幅と標識

元々のライブラリーを増幅するために我々は以下のプロトコルを使用した：

【0035】元々のライブラリーを増幅するために以下のプロトコルを使用した。元々の凍結乾燥オリゴヌクレオチドを、DNAseを含有しない水の中で最終濃度100 μMに溶解した。

【0036】プライマー、オリゴ1 : 25 μMのストック溶液4.8 μl (最終濃度1.2 μM)

プライマー、オリゴ2 : 25 μMのストック溶液4.8 μl (最終濃度1.2 μM)

Taqポリメラーゼ : 5U/μlのストック溶液1 μl (最終濃度0.05U/μl)

鋳型、オリゴ3 : 10 μMのストック溶液10 μl (最終濃度5 μM)

緩衝液 : 緩衝液10× (KCl 500mM、トリス塩酸 100mM 25℃でpH9.0、トリトン-X 100 1%) 10 μl

MgCl₂ : 25mMのストック溶液6 μl (最終濃度1.5mM)

DNAseを含有しない水、63.5 μl (最終容量100 μl)

塩基 (DNTPs) : 25mMのストック溶液1.0 μl (各DNTPの最終濃度0.25mM)

標識物 : 1.5 × 10⁶cpm (α-³²P) dCTP、3000Ci/mmol、NEG513H、NEN)。

【0037】増幅は、以下のようにプログラムしたサイクルを使用して行った：

最初のサイクル : 94℃で5分

35サイクル : 94℃で30秒、50℃で30秒、72℃で60秒

最後の伸長 : 72℃で5分

【0038】これらのパラメータは、元々のライブラリーの長さ (すなわち、省略される最終長さなど) に従って最適化することができる。

【0039】こうして、ランダム配列を含む2本鎖が得られた。これらの鎖は、他の研究者が記載したように、最初の測定法で永久分離を行った。以後、一般に鎖の永

久分離は必要ではないことが発見され、従って、しばしば一時的分離のみを使用した(図5と6を参照)。最後に、線状(不斉)増幅を使用すると、この場合PCR産物は1つの鎖のみを有するため、鎖の一時的分離は必要ないことが観察された。従って、これは増幅に使用するのに好適な方法であった。

【0040】はじめに、鎖を分離するために、ボック(Bock)ら(ボック(Bock)ら(1992)「ヒトトロニンビンに結合してこれを阻害する1本鎖DNA分子の選択」, Nature, 355:564-6)が記載した方法を若干変更して行った。ビオチン化プライマー2の存在下でPCR増幅と標識後、2つの鎖を、ストレプトアビジンマグネシア(MagneSphere)常磁性ビーズ(プロメガ社(Promega Corp.))を使用して分離した。2本鎖は、ビオチン化プライマーを含有する末端を介してアビジンに結合する。次に他の鎖を、0.15N NaOHを使用して溶出する。詳細な方法は以下の通りである。

【0041】85 μ lのPCR増幅産物を、85 μ lの水(蒸留し、オートクレーブで滅菌した)と85 μ lのストレプトアビジンマグネシア(MagneSphere)常磁性ビーズとに混合した。スラリーを室温で10分インキュベートした。次に、磁性ラック(プロメガ社(Promega Corp.))を使用して、ビーズを溶液から分離し、上清を廃棄した。ビーズを220 μ lずつの0.1% SSCで数回洗浄した。最後にビーズを73 μ lの0.15N NaOHに再懸濁し、1分後再度分離し、上清を回収した。0.15N NaOHによる抽出をもう一度繰り返し、46 μ lの0.2M NaAcを加えて上清を中和した。こうして1本鎖オリゴヌクレオチドが得られ、次にこれを、最初に「一時的標的」を含有するニトロセルロース膜と、次に「最終標的」を含有するニトロセルロース膜とインキュベートした。

【0042】本発明のオリゴヌクレオチドの選択をストレプトアビジンマグネシア(MagneSphere)常磁性ビーズを使用して説明したが、両方の鎖を分離するのに他の方法を使用することも理解されたい。例えばcDNAをプラスミド中に挿入し、次にRNAに翻訳し、cDNAに逆転写して、続いてRNAaseで処理して1本鎖cDNAを遊離させる。他の方法を用いることも可能であり、当該分野で公知である。しかし、両方の鎖の永久的分離は不要なことが多いことがわかり、これは操作を大幅に単純化する。多くの場合、以下の方法の鎖の一時的分離が必要である。

【0043】DNA鎖の一時的分離

前記したように、初期PCR増幅後に鎖の永久的分離は必要ないことが観察されている。こうしてこの方法は大幅に簡略化された。これはまた、追加の利点を有する：両方の鎖が存在するために、存在するライブラリーのメンバーの数は2倍になり、有用な化合物を得る可能性が増加する。さらに試薬は2本鎖として保存でき使用直前

に分離され、これはこれらの安定性を大幅に上昇させる。例外的に鎖の永久的分離が必要な場合がある：例えば、標的に結合する高親和性種が存在しない時、およびアンチセンス鎖との競合が重要な時、または選択されたオリゴヌクレオチドのTmが非常に高い時。鎖を分離するための好適な方法は非常に簡単である：PCR産物を90℃で5分加熱し、次に氷上で急速に冷却する。他の方法も可能である：例えば、0.1N NaOHを加え、次に急速に中和する。

【0044】線状(または不斉増幅)

前記したように、各選択サイクルで初期の指数関数的PCR後に、線状(または不斉)増幅が行われるなら、鎖の一時的分離でさえ不要であることが見いだされた。すなわち放射能標識せずに初期PCR増幅後、生成物をアガロースゲルにかけて精製して、プライマーおよび可能なポリマー性副産物を除去し、最後に1つのプライマーのみを使用して不斉PCRを行う。このPCRは、指数関数的(正常)PCRについて前記したものと同じ条件下で行うが、これは1つだけのプライマーの存在下でかつ放射能標識下で行われる。好ましくは、使用されるプライマーは前進プライマーであり、すなわち5'領域に対応するプライマーである。cDNAバンドを含有するゲルの領域は臭化エチジウムを使用して視覚化され、ゲルからの精製は視覚化領域を切り出し、次にワットマン1ろ紙を使用して調製したセルロースの層に12, 000 $\times$ gで10分遠心分離して溶出する(チャン(Chuang)とブラットナー(Blattner)(1994)「ペーパースラリーを介する遠心分離によるアガロースからウルトラファスト(Ultrafast)DNA回収」, Biotechniques, 17: 634, 636)。ジנקリーン(GenClean)は、短いcDNA断片の収率が低いため便利ではない。

【0045】合成ペプチドの固体マトリックスへの結合「一時的標的」に結合するライブラリーのメンバー(すなわち、合成ペプチド)を単離するために、分離法が必要である。原理的には固相または液相法が使用できるが、簡便さから固相法が好ましい。異なる固相法の中で、以下の実験についてはニトロセルロースへの吸着が選択された。約0.25m²のニトロセルロース断片を、飽和濃度の一時的標的ペプチドを含有する溶液に加えた。約2時間平衡化後、膜を風乾する。遊離のペプチドを、PBS(pH7.4)を使用して各回5分で3回洗浄した。

【0046】ある場合には、初期選択をするためにまたは後で標的スイッチングをすることができるよう、合成ペプチドをBSAに架橋することが必要であった(例2と3は、PP2AとPP2Bに架橋した合成ペプチドで作成した)。初期選択での失敗は、ニトロセルロースへの結合が弱いことを意味し、これはBSAへの架橋により促進される。架橋していないペプチドを使用する標的スイッチングの間の失敗は、タンパク質鎖中の実際の

コンフォメーションを模倣するコンフォメーションでペプチドを固定することをおそらく架橋法が助けていることを示唆する。しかし架橋が必要な正確な理由は不明である。当該分野で公知のいくつかの可能性があり、これらはしばしば、ウサギで抗体を産生するのに応用される。

【0047】オリゴ体の選択

最初の工程は、一時的標的（合成ペプチド）または最終標的（タンパク質）を封じ込めるのに使用されるマトリックス（ニトロセルロース、活性化セファロースなど）中の非特異的部位をブロックするために使用される固相マトリックスまたはタンパク質に結合するライブラリーからの、オリゴヌクレオチドの前吸着である。以下の実験では、ニトロセルロースをマトリックスとして使用したが、結合および遊離種を分離するための任意の他の固相または液相法を使用してもよい。ニトロセルロース（ペプチド無し、 0.25 cm^2 ）をまず、カゼイン5%（乾燥、無脂肪ミルク）を使用して30分ブロックした。次に70 μl のPCR増幅／標識オリゴヌクレオチドライブラリーを、ニトロセルロースマトリックスとともにカゼイン（PBS緩衝液中50mg/ml）を含有する溶液200 μl 中に加え、一晚インキュベートして前吸着を行った。いったん前吸着が完了すると、残りのオリゴヌクレオチドを、標的ペプチド（一時的標的）を含有するマトリックスとともに一晚インキュベートし、次に前記したように工程 i）～viii）を行った。

【0048】ある場合には、この前吸着工程は不要であった。飽和濃度で存在するペプチドとともにニトロセルロースに結合したペプチドで選択工程を1回または2回行い、次に標的が未変性のタンパク質なら標的タンパク質とともにドットプロットを行い、標的が変性タンパク質なら標的タンパク質とともにウェスタンブロットを行い、（カゼインでブロックされたニトロセルロースを用いて）、そして次に、前記したように得られる生成物をクローン化することで充分である。一時的標的から最終標的にスイッチする時は、適切な選択法を使用することが非常に重要である。未変性のタンパク質を認識することができるオリゴ体を単離することが目的であるなら、ドットプロット、液相での分離、免疫組織染色、ゲルシフト、カラム分離または他の非変性法などを、選択に使用すべきである。すなわち、標的タンパク質をできるだけ未変性の状態に維持する分離法を選択すべきである。これは、未変性のタンパク質に対するオリゴ体は、コンフォメーションの変化に対して非常に感受性であるかも知れないためである。一方、変性標的タンパク質を認識することができるオリゴ体を単離することが目的であるなら、こうして標的を維持する方法（例えば、ウェスタンブロット）を使用すべきである。しかし時に、天然の抗体で起きるように、変性標的に対して作成されたオリゴ体が未変性のタンパク質も認識することがあり、その

逆もある。これは確かに、以下の例でCPD1で起きているが、必ずしもいつもこうではない。

【0049】クローニング：前記方法で得られた「オリゴ体」は、ランダムコンフォーマーのライブラリーに由来するため、ポリクローナルである。しかし前記の方法により選択されたライブラリーの異なるメンバーはまた、モノクローナル型で得ることもできる。モノクローナル「オリゴ体」を得るために、ふつうの非ビオチン化プライマーを使用して最終ポリクローナルオリゴ体のPCR増幅後に、オリゴヌクレオチドを、ベクター-T（プロメガ社（Promega Corp.））または他のベクターのような適当なベクターに連結し、製造業者の説明書に従ってコンピタントな細菌中にトランスフェクトする。トランスフェクション後、いくつかのクローンを単離し、「コロニーPCR」法を使用して挿入体を増幅する。次に標的タンパク質に結合した各挿入体の能力を、ウェスタンブロットを使用して解析する。こうして例5のモノクローナルオリゴ体を得られ、これは次に、例6～10の出発物質として使用した。

【0050】特異性を決定するためのオリゴ体の性状解析

小脳から単離した総タンパク質から作成したウェスタンブロット（図2～8）を使用して、オリゴ体の特異性を決定した。この結果はまた、免疫沈降（例8と図8）と免疫組織染色（例9と図9）を使用して確認した。

【0051】化学合成したオリゴ体：モノクローナルオリゴ体がいっただん選択され、クローン化され、配列決定されると、その配列を使用して、オリゴヌクレオチド合成機により完全な化学合成オリゴ体を作製することができる。そのような試薬を使用して現像させたウェスタンブロットを図10に示す。これは、ウェスタンブロットで抗体のように挙動できる最初の化学合成試薬である。

【0052】得られた試薬の有用性

得られたオリゴ体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が使用されるすべての用途に有用である。さらに図7に示すように、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体で通常行われるように、ビオチンで誘導体化したプライマー1を使用して、オリゴ体を標識することが可能である。誘導体化は結果に影響を与えない。さらなる詳細については例7を参照されたい。オリゴ体はまた、図8に示すように免疫沈降に有用であり、これは、沈降法の間タンパク質が未変性型で維持されるため、ある場合にはオリゴ体が未変性タンパク質と変性タンパク質の両方を認識することができることを意味する（例8）。さらに図9に示すように、オリゴ体はまた、免疫組織染色の試薬として有用である（例9を参照）。

【0053】これらの結果は、診断検査、免疫組織染色、免疫沈降などの用途で、オリゴ体が天然のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に置き換わるこ

ができることを証明している。ビオチンによる標識はほんの一例である。蛍光性化合物を使用してオリゴ体を標識し、これらを他のタンパク質に担体として結合し、および／またはこれらを治療薬などの担体として使用することもできる。従って、本発明のオリゴ体は、ほとんどすべての用途においてモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に置き換えることができ、前記したように天然の抗体に対して重要な利点を有する。クローン化および配列決定後、これらのオリゴヌクレオチドは、診断または他の同様の用途に使用されるチップまたは他の固相マトリックス上で容易に合成される。

【0054】例2

PP2Aに対するポリクローナルオリゴ体の産生
固定した既知の配列が両側に位置するコアランダム領域を含有する合成オリゴヌクレオチドを用いて、1本鎖DNA分子のライブラリーを作成した。このライブラリーを、5'末端と3'末端に対応するプライマーを使用してPCRにより増幅した。逆進プライマーをビオチン化した。次にストレプトアビジンビーズへの結合と、NaOHによる溶出および中和を使用して、鎖を分離した。オリゴヌクレオチド混合物を、一時的標的として合成ペプチドとともにインキュベートし、これをニトロセルロース

*ースに結合させた。合成ペプチドは標的タンパク質の断片に対応した。この場合、ペプチドは、タンパク質ホスファターゼ2A (PP2A) の触媒性サブユニットCの残基298-309 (Pro-His-Val-Thr-Arg-Arg-Thr-Pro-Asp-Tyr-Phe-Leu) (配列番号4) に対応し、これをBSAに架橋させた。ペプチドに結合したオリゴヌクレオチドを選択し、放射能標識を使用してPCRにより増幅した。鎖の「永久的」分離法を使用して2本鎖を分離し、得られたオリゴヌクレオチドを、ニトロセルロースに結合したペプチドで再度インキュベートした。結合したオリゴヌクレオチドの量 (cpm) を、ドットプロット定量により定量した。対照と比較して充分な結合が検出されるまで、サイクルを繰り返した。この場合3サイクルが必要であった。結果を表1に要約するが、これは、選択／増幅の初期サイクルの間に一時的標的として使用した合成ペプチドに結合したオリゴヌクレオチドの量の定量の例である。表1の第2および第3のカラム中の数値は、ドットプロット測定法により測定した最初の3つの連続サイクルの間の、合成ペプチドに結合したcpmと対応する対照に結合したcpmである。

【0055】

表1

選択サイクル	ペプチド 結合したcpm	対照 結合したcpm	比 ペプチド／対照
第1サイクル	460	600	0.76
第2サイクル	6005	880	6.8
第3サイクル	9157	258	35.5

【0056】「標的スイッチング」工程に従った。この工程では、前工程で選択したオリゴヌクレオチドの混合物を使用して、オリゴヌクレオチド混合物が正常な放射能標識抗体であるかのように、ウェスタンブロットを現像させた。同時に、PP2Aに対応するスポットを市販の抗体を使用して同定した。このスポットに結合したオリゴヌクレオチドのPCR増幅を使用して、さらなる選択を行った。新しいウェスタンブロットで得られた結果を、市販のウサギ抗体を使用して得られた結果と比較した。図1から明らかなように、結果は同一である。

【0057】例3：PP2B、触媒性サブユニット (サブユニットα) に対するポリクローナルオリゴ体の産生
例2と同じ方法に従い、タンパク質ホスファターゼ2B (PP2B) のサブユニットαに対するポリクローナルオリゴ体を得た。オリゴ体を調製するのに使用した合成ペプチドは、ウサギで作成した市販の抗体をブロックする同じ市販のものであり、アミノ酸268-280 (Arg-Met-Pro-Pro-Arg-Arg-Asp-Ala-Met-Pro-Ser-Asp-Ala) (配列番号5) に対応した。これをまた、BSAに架橋させた。ポリクローナルオリゴ体で得られた結果 (オートラジオグラフィーで現像させた) を市販の抗体

で得られた結果 (アルカリホスファターゼを含有する2次抗体として現像させた) と比較すると、図3から明らかなように同じであった。

【0058】例4：CPD1 (cDNA配列から推定されるタンパク質、ジーンバンク (GenBank) MMU89345) に対するポリクローナルオリゴ体の産生
CPD1の断片に対応する、BSAに架橋していない合成ペプチド (Cys-Pro-Asn-Leu-Thr-Tyr-Leu-Asp-Leu-Ser-Gly-Asn-Lys-Ile-Lys) (配列番号6) を使用して、例2の方法に従って、ポリクローナルオリゴ体を得た。得られたオリゴ体は、グルタルアルデヒドを使用してBSAに架橋した同じペプチドによりウサギで得られた天然のポリクローナル抗体と、全く同様に挙動した。結果を図4に示す。

【0059】例5：CPD1に対するモノクローナルオリゴ体の産生

例4で得られたポリクローナルオリゴ体をPCR増幅し、ベクター-T (プロメガ社 (Promega Corp.)) に連結し、クローン化した。いくつかのクローンを単離し、その挿入体を、ミニウェスタンブロットを使用して、CPD1に結合する能力について試験した。1つの

クローンを選択し、PCR増幅し、鎖を分離し、抗体様活性について試験した。図5に示すように、すでにモノクローナルであるこのオリゴ体は、例4で得られたポリクローナルオリゴ体と全く同様に挙動した。

【0060】モノクローナルオリゴ体を配列決定し、以下の配列を有することがわかった：5'-CTGCAGCCGCGGGGATCCTgggttagcccgaggactgggtttgcactgacatgcgcgtgtgggttggtactctgTCTAGTCGAATTCAAGCTTAGTGGC-3' (配列番号 7)。このオリゴヌクレオチドは、タンパク質CPD1に特異的な多くの可能なオリゴ体のほんの一例である。

【0061】例6：CPD1に対する2本鎖モノクローナルオリゴ体の産生

例5で産生されたオリゴ体の2本鎖を、一時的分離した後、90℃で5分加熱してインキュベートし、次に水で急速に冷却した。あるいはこの一時的分離は、いくつかの方法で行った：例えば、NaOHでpHを変化させ、次に緩衝液で急速に中和した。冷却後、オリゴヌクレオチドを使用して、図6に示すようにウェスタンブロットを現像させた。図6から明らかなように、鎖の永久的分離無しで使用される、PCR増幅後に得られた2本鎖モノクローナルオリゴ体は、両方の鎖の永久的分離後に使用されるものと同様に有効であった(図4と図5を比較されたい)。本例は、最終産物の選択プロセスの間または結合反応の間、2本鎖を分離することが必要ではないことを証明している。

【0062】例7：ビオチンによるモノクローナルオリゴ体の標識

例5で得られたオリゴ体をビオチンを使用して標識した。標識は、最後のPCR増幅の間ビオチン化前進プライマーを使用して行った。図7から明らかなように、結果は放射能標識により以前に得られたものと同一であったため、ビオチン化はオリゴ体の結合性に影響を与えなかった。本例は、放射能標識以外に、オリゴヌクレオチドまたは抗体をを標識するために典型的に使用された他の方法を、本発明のオリゴヌクレオチドを標識するのに使用できることを証明している。

【0063】例8：CPD1に対するモノクローナルオリゴ体によるウェスタンブロットと免疫沈降

新たに単離した小脳を、プロテイナーゼインヒビターのカクテルを含有するPBS中でホモジナイズした(最終濃度：EDTA 10mM、フェナントロリン10mM、E-64 10μM、ロイペプチン100μM、アプロチニン10mg/ml、ペプスタチンA 10μM)

(シグマ社(Sigma Co.)、セントルイス、ミズーリ州)。100μgのタンパク質を10%SDS-PAGEにかけ、ニトロセルロース膜に移し、PBS+5%BSAでブロックし、4℃でウサギポリクローナル抗体を使用してインキュベートして前記したように2次抗体で

現像させたか、またはビオチン化モノクローナルオリゴ体を使用してPBS+5%BSAで室温で1時間インキュベートしストレプトアビジン-APで現像させた。免疫沈降のために、ラドリッツニ(Radrizzani)と共同研究者らが発表した方法(ラドリッツニ(Radrizzani)ら(1995)「マウス小脳中のThy1.2合成速度の進化的制御」, J. Neurosci. Res., 42: 220-7)を若干変更して行った。簡単に説明すると、マウス小脳の小断片を³⁵S-メチオニンの存在下でインキュベートし、タンパク質を抽出し、そしてビオチン化上流プライマーの存在下でPCR増幅を使用してビオチンで標識したモノクローナルオリゴ体およびストレプトアビジン常磁性ビーズ(プロメガ社(Promega Corp.))を使用して、免疫沈降を行った。前例で記載したように、CPD1オリゴ体に対応する挿入体を、ビオチン化プライマーを使用してPCR増幅した。ウェスタンブロットを再度行い、結果をCPD1の免疫沈降と比較した。図8から明らかなように、モノクローナルオリゴ体はウェスタンブロット中で、同じ合成ペプチドを使用してウサギ中で現像させたポリクローナルオリゴ体と全く同様に挙動する。観察された唯一の差は、ポリクローナル抗体を使用した時、免疫前血清に対応するバンドが存在することである。ノーザンブロットでは、CPD1は小脳中で2つのアイソフォーム(CPD1_hとCPD1_l)で発現されるタンパク質である(結果は示していない)。ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体で現像させた小脳からのウェスタンブロットはまた、2つのアイソフォームを示し、これらは生後5~17日(P5からP17)の成長の間に差別的に発現され、34Kdのアイソフォームが最も多かった。これらの結果は、クローニング後にオリゴ体をビオチンで標識して得られ、従って標的を認識するオリゴ体の能力に影響を与えることなくビオチン標識が可能であることを再確認している。PCR増幅中に³²P-dCTPでオリゴヌクレオチドを標識して、同様の結果が得られた。これは、少なくともこの場合、前進プライマーと逆進プライマー配列に対応するオリゴ体の末端は、おそらく結合に関与しないことを示す。興味深いことに、ビオチンで標識したオリゴ体はまた、CPD1を「免疫沈降」するのに有用であった(図8Dを参照)。これは、オリゴ体が、GCGコンピュータープログラムで予測されるように、未変性および変性CPD1の両方を認識することができることを示す。これらの結果は、オリゴ体が、未変性タンパク質(例えば、免疫沈降中)と変性タンパク質(例えば、ウェスタンブロット中)の両方を認識できること、および合成抗体様試薬で作成した特異的「免疫沈降」の最初の例であることを示す。

【0064】例9：CPD1に対するモノクローナルオリゴ体を使用する「免疫組織染色」

抗体として挙動するオリゴ体の特異性と能力をさらに証

明するために、免疫組織染色を行った。生後7日目のマウスの小脳(C57BL/6Jマウス)を解剖し、アルコール/酸(95%エタノール:5%酢酸、-20℃で4時間)で固定し、脱水し、パラフィン包埋した。5μmの組織切片を、シラン化処理(シラン、シグマ(Sigma Co.)、セントルイス、ミズーリ州)したカバーガラスでマウントし、脱パラフィンを行い、再度水を加え、PBS-5%BSAを使用して1時間ブロックした。切片を、アフィニティ精製したウサギポリクローナル抗体に4℃で一晩暴露し、PBSで2回リンスし、2次抗体(ヤギ抗ウサギペルオキシダーゼ 1:1000)で1時間インキュベートし、DAB(ギブコビーアールエル(Gibco BRL)、ゲーサーズバーグ、メリーランド州)で現像させた。モノクローナルオリゴ体を使用する免疫組織染色のために、5'-ビオチン化プライマーをPCR反応物に加えることにより、ビオチン化モノクローナルオリゴ体を作成した(5'-Biot-CTGCAGCCGCGGGGATCCT-3') (配列番号8)。PCR増幅後、cDNA鎖を加熱(94℃、5分)により分離し、PBS-5%BSAで10倍希釈した。スライドをPBS-5%BSAでインキュベートして非特異部位をブロックした後、オリゴ体を組織と室温で1時間インキュベートし、次にストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ(プロメガ社(Promega Corporation)、マジソン、ウィスコンシン州)で現像させた。オリゴ体を過剰のブロックペプチドと4℃で一晩ブレインキュベートし、次に前記したように現像させて、対照試料を作成した。図9に示すように、ウサギで作成したアフィニティ精製したポリクローナル抗体を使用して得られた結果(図9A)は、モノクローナルオリゴ体で得られた結果(図9B)と区別できなかった。モノクローナルオリゴ体を、CPD1に対応する合成ペプチドとブレインキュベートして作成した対照は、染色を示さなかった(図9C)。CPD1の染色は顆粒細胞とブルキンエ細胞で観察され、ここで核膜と原形質膜染色が存在した。これは、合成抗体様試薬を使用して作成した「免疫組織染色」の最初の例である。

【0065】例10:化学合成したオリゴ体を使用して作成したウェスタンブロット

例5に記載のように得られた配列(配列番号7)を使用しオリゴヌクレオチド合成機(ベックマン(Beckman)オリゴ1000M)を使用して、CPD1に対して化学合成オリゴ体を作成した。この試薬は、完全に化学合成により作成した最初の合成抗体様試薬である。図(図10)から明らかなように、合成オリゴ体は、小脳抽出物中に存在するすべてのタンパク質の混合物で作成したウェスタンブロット中のCPD1を、非常に特異的に認識する。実験の前面に追加のスポットが1つだけ見られる。これはまた、他の例に記載される結果(PCR増幅産物が使用された)を確認している。

【0066】本発明は、一時的標的の使用、「標的スイッチング」法、および最も重要なことは、親和性ではなく特異性に基づいた選択により、従来技術とは区別される。本発明はまた、必要な工程の数が少ないことにより特徴付けられる。得られるオリゴ体は、ウェスタンブロット、免疫組織染色、および免疫沈降により初めて証明されるように、その挙動と特異性が従来の抗体と同一である。さらに、未変性のタンパク質と変性タンパク質の両方に特異的結合を示す、合成抗体様試薬(オリゴ体)が初めて得られる。これらのユニークな性質は、通常抗体を使用する方法に、これらの試薬が適するものとして

【0067】前記説明と例は、オリゴ体が、非常に特異的に、未変性または変性タンパク質を認識する能力において、抗体と同一の挙動をすることを単に例示するために提示したものであり、オリゴ体は、未変性または変性タンパク質の認識に関与するすべての用途(例えば、ウェスタンブロット、免疫沈降、免疫組織染色、放射免疫定量法、ELISA、疾患の治療のための薬剤、診断のためのマイクロトレイなど)において抗体を置換できることが明らかであるため、決して限定するものではない。当業者は、本発明の精神と実体を取り込んだ開示した実施態様の変更を思いつくであろうが、本発明は、本発明および添付の請求項ならびにその相当物の範囲のすべての変更を含むものと広く解釈される。

【0068】文献

ツエルク(Tuerk)とゴールド(Gold)(ツエルク(Tuerk)とゴールド(Gold)(1990)「指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化:バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼに対するRNAリガンド」, Science, 249:505-10)。エリントン(Ellington)とゾスタック(Szostak)(エリントン(Ellington)とゾスタック(Szostak)(1990)「特異的リガンドに結合するRNA分子のインビトロ選択」, Nature, 346:818-22。ブラックウェル(Blackwell)とヴァイントラウプ(Weintraub)(ブラックウェル(Blackwell)とヴァイントラウプ(Weintraub)(1990)「結合部位選択により現れるMyoDおよびE2Aタンパク質複合体のDNA結合優先における差と類似性」, Science, 250:1104-10。ボック(Bock)ら(1992)「ヒトトロニンに結合してこれを阻害する1本鎖DNA分子の選択」, Nature, 355:564-6。ジェニソン(Jenison)ら(1998)「P-セレクトイン-依存性好中球-血小板接着のオリゴヌクレオチドインヒビター」, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 8: 265-79。ジェリネック(Jellinek)ら(1994)「血管内皮増殖因子に対する高親和性RNAリガンドによる受容体結合の阻害」, Biochemistry, 33:10450-6。ラックマン(Ruckman)ら(1998)「165アミノ酸型の血管内皮増殖因子(VEGF165)に対する2'-フルオロピリミジンRNAに基づくアプタマー。エクソン7がコ

ードするドメインを必要とする相互作用による、受容体結合およびVEGF誘導性血管透過性の阻害」, J. Biol. Chem., 273:20556-67. バラスブラマニアン (Balasubramanian) ら (1998) 「インターフェロナーガンマ阻害性オリゴデオキシヌクレオチドはインターフェロナーガンマのコンホメーションを変化させる」, Mol. Pharmacol., 53:926-32. リー (Lee) ら (1996) 「オリゴヌクレオチドはインターフェロナーガンマのシグナル伝達をブロックする」, Transplantation, 62:1297-301. クービック (Kubik) ら (1997) 「受容体結合を阻害する、ヒトIFN- γ に対する2'-フルオロー、2'-アミノ、および2'-フルオロー/アミノ修飾RNAリガンドの単離と性状解析」, J. Immunol., 159:259-67. デイヴィス (Davis) ら (1998) 「フローサイトメトリーのための2'-F-ピリミジン含有RNAアプタマーによる細胞表面ヒトCD4の染色」, Nucleic Acids Res., 26:3915-24. クラウス (Kraus) ら (1998) 「CD4抗原に結合してCD4+Tリンパ球機能を阻害することができる新規なRNAリガンド」, J. Immunol., 160:5209-12. タケノ (Takeno) ら (1999) 「ズブチリシンのプロテアーゼ活性を特異的に阻害するRNA分子の選択」, J. Biochem., 125:1115-9. クマール (Kumar) ら (1997) 「相補的ランダムRNAのプールからのC型肝炎ウイルスのNS3タンパク質に特異的なRNAアプタマーの単離」, Virology, 237:270-82. アーヴィル (Urvil) ら (1997) 「C型肝炎ウイルスのNS3プロテアーゼに特異的に結合するRNAアプタマーの選択」, Eur. J. Biochem., 248:130-8. デイヴィス (Davis) ら (1996) 「フローサイトメトリーにおける高親和性DNAリガンドの使用」, Nucleic Acid Res., 24:702-6. チャールトン (Charlton) ら (1997) 「ヒト好中球エラスターゼのアプタマーインヒビターを使用する炎症のインビボイメージング」, Chem. Biol., 4:809-16. ブレス (Bless) ら (1997) 「肺炎症性損傷における好中球エラスターゼのアプタマーインヒビターの保護作用」, Curr. Biol., 7:877-80. ボイジアウ (Boiziau) ら (1997) 「HIV-1 TAR成分のインビトロ転写のためのDNA鋳型に対するアプタマーの同定」, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 7:369-80. アレン (Allen) ら (1996) 「特異的なRNA構造モチーフはHIV-1ヌクレオキャプシドタンパク質 (NCp7) による高親和性結合を仲介する」, Virology, 225:306-15. バーグランド (Berglund) ら (1997) 「HIV-1ヌクレオキャプシドタンパク質に関する高親和性結合部位」, Nucleic Acid Res., 25:1042-9. ボイジアウ (Boiziau) ら (1999) 「HIV-1トランススクリプター-応答性RNA成分に対して選択されたDNAアプタマーはRNA-DNAキッキング複合体を形成する」, J. Biol. Chem., 274:12730-7. ギヴァー (Giver) ら (1993) 「HIV-1 Revに対する高親和性RNA*

リガンドの選択と設計」, Gene, 137:19-24. ジェンセン (Jensen) ら (1994) 「HIV-1 Revタンパク質に対するインビトロで選択したRNAリガンドの性状解析」, J. Mol. Biol., 235:237-47. マロッツィ (Marozzi) ら (1998) 「Tatタンパク質によるHIV-1 TAR変種のインビトロ選択」, J. Biotechnol., 61:117-28. シュナイダー (Schneider) ら (1995) 「1型ヒト免疫不全ウイルスの逆転写酵素の高親和性ssDNAインヒビター」, Biochemistry, 34:9599-610. ツエルク (Tuerk) とマクドガルウオー (MacDougall-Waugh) (1993) 「機能性核酸のインビトロ進化: HIV-1タンパク質の高親和性RNAリガンド」, Gene, 137:33-9. バーク (Burke) とゴールド (Gold) (1997) 「S-アデノシルメチオニンのアデノシン残基に対するRNAアプタマー: セレックス (SELEX) の主題と再現性における変化からの構造の推理」, Nucleic Acids Res., 25:2020-4. ヒュイゼンガ (Huizenga) とズスタック (Szostak) (1995) 「アデノシンとATPに結合するDNAアプタマー」, Biochemistry, 34:656-65. マニロニ (Mannironi) ら (1997) 「ドーパミンRNAリガンドのインビトロ選択」, Biochemistry, 36:9726-34. スー (Xu) とエリントン (Ellington) は、タンパク質Revの断片に対応する合成ペプチドにセレックス (SELEX) を応用した (スー (Xu) とエリントン (Ellington) (1996) 「抗ペプチドアプタマーはアミノ酸配列を認識してタンパク質エピトープに結合する」, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93:7475-80. ヴェイス (Weiss) ら (1997) 「RNAアプタマーはプリオンタンパク質PrPと特異的に相互作用する」, J. Virol., 71:8790-7. クロダ (Kuroda) ら (1994) 「モンテカルロ (Monte-Carlo) シミュレーションにより試験した水溶液中のエンドセリン-1のC末端のコンホメーション」, FEBS Lett., 355:263-6. リー (Li) ら (1995) 「環境および/または1次配列の微調整によるペプチドコンホメーションの操作」, Biopolymers, 35:667-75. イートン (Eaton) ら (1995) 「特異的なものを獲得しよう: 特異性と親和性の間の関係」, Chem. Biol., 2:633-8. チャン (Chuang) とブラットナー (Blattner) (1994) 「ペーパースラリーを介する遠心分離によるアガロースからウルトラファスト (Ultrafast) DNAの回収」, Biotechniques, 17: 634, 636. ラドリッツァニ (Radrizzani) と共同研究者らの方法 (ラドリッツァニ (Radrizzani) ら (1995) 「マウス小脳中のThy1. 2合成速度の進化的制御」, J. Neurosci. Res., 42: 220-7.

【図面の簡単な説明】

以後、本発明を以下の添付図面を参照してさらに詳細に説明する。

【図1】図1は、オリゴ体入手するために使用される方法の概略図を示す。

【図2】図2は、タンパク質PP2Aに特異的なポリク

ローナル抗体で染色した小脳からの総タンパク質のウェスタンブロットを示す。ここで、「A」は、アルカリホスファターゼに結合した2次抗体で現像させた、市販のポリクローナル抗体で得られたウェスタンブロット（対照）であり、そして「B」は、 ^{32}P で標識した「オリゴ体」を使用し、オートラジオグラフィーにより現像させて得られた「ウェスタンブロット」である。

【図3】図3は、タンパク質PP2B α に対するポリクローナル抗体で現像させた、小脳からの総タンパク質のウェスタンブロットを示す。ここで、「A」は、PP2B α に対する市販のポリクローナル抗体を使用して得られ、アルカリホスファターゼに結合した2次抗体で現像させたウェスタンブロット（対照）であり、そして「B」は、 ^{32}P で標識したポリクローナル「オリゴ体」を使用し、オートラジオグラフィーにより現像させて得られた「ウェスタンブロット」である。

【図4】図4は、タンパク質CPD1に対するポリクローナル抗体を使用することにより現像させた、小脳からの総タンパク質のウェスタンブロットを示す。ここで、「A」は、CPD1に対応する合成ペプチドの注射によりウサギで産生したポリクローナル抗体を使用して得られ、アルカリホスファターゼに結合した2次抗体で現像させたウェスタンブロット（対照）であり、そして「B」は、 ^{32}P で標識した、同じ合成ペプチドで得られたポリクローナル「オリゴ体」を使用し、オートラジオグラフィーにより現像させて得られた「ウェスタンブロット」である。両方の抗体ともCPD1の多数のアイソフォームを認識する。

【図5】図5は、CPD1に対する抗体を使用することにより現像させた、小脳からの総タンパク質のウェスタンブロットを示す。ここで、「A」は、CPD1に対応する合成ペプチドを利用してウサギで製造したポリクローナル抗体を使用して得られ、アルカリホスファターゼに結合した2次抗体で現像させたウェスタンブロット（対照）であり、そして「B」は、 ^{32}P で標識したモノクローナル「オリゴ体」を使用し、オートラジオグラフィーにより現像させて得られたウェスタンブロットである。

【図6】図6は、タンパク質CPD1に対する ^{32}P 標識2本鎖モノクローナル「オリゴ体」を使用して現像させた、生後日数の異なる（P7、P13、およびP17）小脳からの総タンパク質のウェスタンブロットを示す。使用直前にオリゴ体溶液を95℃に加熱して、鎖を分離し、オートラジオグラフィーによりブロットを現像させた。ウサギポリクローナル抗体（図6参照）を使用して検出した同じアイソフォームが観察される。

【図7】図7は、タンパク質CPD1に対する抗体を使用することにより現像させた、生後日数の異なる（P5、P7、P13、およびP17）小脳からの総タンパク質のウェスタンブロットを示す。ここで、「A」は、

CPD1ペプチドに対するウサギポリクローナル抗体を使用して得られ、アルカリホスファターゼに結合した2次抗体で現像させたウェスタンブロット（対照）であり、そして「B」は、PCR増幅の間にビオチン化された2本鎖モノクローナル「オリゴ体」で得られ、アビジン-アルカリホスファターゼにより現像させたウェスタンブロットである。両方の抗体で同じアイソフォームが得られる。

【図8】図8は、CPD1に対するモノクローナルオリゴ体を使用した「ウェスタンブロット」と「免疫沈降」を示し、生後5～17日（P5、P7、P1、およびP17）のマウスから新に単離した新鮮な小脳をホモジナイズし、100 μg のタンパク質を10%SDS-PAGEにかけ、ニトロセルロース膜に移し、PBS-BSA 5%でブロックした。図中、「A」は、ウサギポリクローナル1次抗体で4℃で一晩インキュベートし、次に2次抗体で室温で1時間インキュベートし、ヤギ抗ウサギアルカリホスファターゼ結合体とNTB/BCIPを使用して現像させたウェスタンブロットである。

「B」は、免疫前ウサギ血清を使用してAのように得られた結果である。「C」は、ビオチン化モノクローナルオリゴ体を使用して、PBS-5%BSA中で室温で1時間インキュベートし、PBSで3回洗浄し、ストレプトアビジン-PAで現像させて得られた結果である。

「D」は、P7でのウェスタンブロットと ^{35}S -CPD1の「免疫沈降」の比較であり、ここでカラム「1」は、免疫前ウサギ血清を使用した生後7日のウェスタンブロットであり、カラム「2」は、ウサギポリクローナル抗体を使用したウェスタンブロットであり、カラム「3」は、モノクローナルオリゴ体を使用したウェスタンブロットであり、カラム「4」は、モノクローナルオリゴ体と ^{35}S で標識したタンパク質を使用したウェスタンブロットである。「h」と「l」の文字は、高分子量および低分子量アイソフォームを意味し、灰色の矢印は、免疫前血清に対応するバンドである。

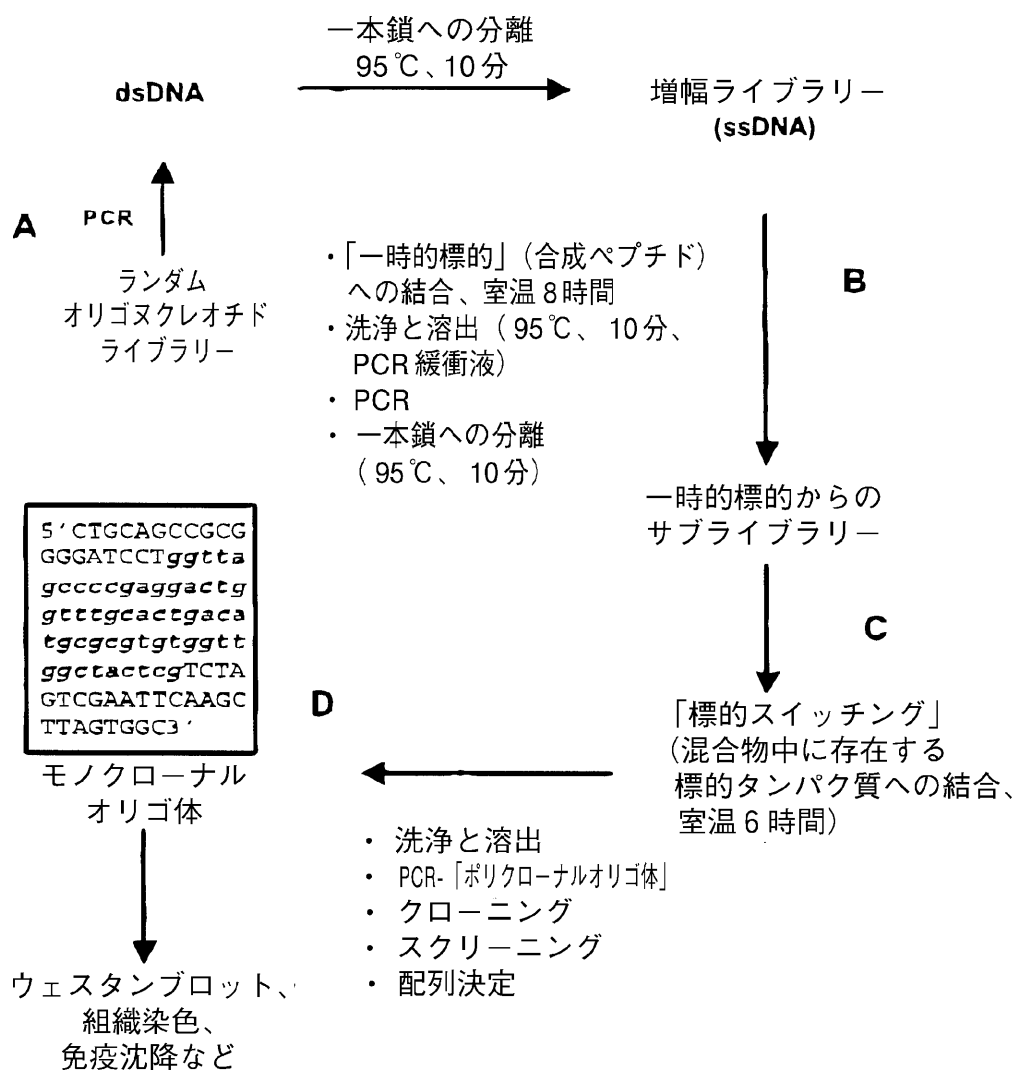
【図9】図9は、CPD1の免疫組織染色であり、ここでマウス小脳（C57BL/6Jマウス）は生後7日目に解剖し、アルコール/酸（95%エタノール：5%酢酸、-20℃で4時間）で固定し、脱水し、パラフィンに包埋した。5 μm の組織切片を、シラン化処理（シラン、シグマ（Sigma Co.）、セントルイス、ミズーリ州）したカバーガラスでマウントし、脱パラフィンを行い、再度水を加え、PBS-5%BSAを使用して1時間ブロックした。図中、「A」は、アフィニティ精製したウサギポリクローナル抗体に4℃で一晩暴露し、PBSで2回リンスし、2次抗体（ヤギ抗ウサギペルオキシダーゼ 1：1000）で1時間インキュベートし、DAB（ギブコビーアールエル（Gibco BRL）、ゲーザーズバーグ、メリーランド州）で現像させた切片である。「B」は、ビオチン化モノクローナルオリゴ体を用いて

得られた「免疫組織染色」である。試薬は、5'-ビオチン化プライマーをPCR反応物に加えることにより作成した(5'-Biot-CTGCAGCCGCGGGGATCCT-3')。PCR増幅後、cDNA鎖を加熱(94℃、5分)により分離し、PBS-5%BSAで10倍希釈した。スライドをPBS-5%BSAでインキュベートして非特異部位をブロックした後、オリゴ体を組織と室温で1時間インキュベートし、次にストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ(プロメガ社(Promega Corporation)、マジソン、ウィスコンシン州)で現像させた。ビオチン化-オリゴ体で染色したウェスタンブロットで得られたバンドは、³²P標識オリゴ体を使用して現像させたものと同一(結果は示していない)である

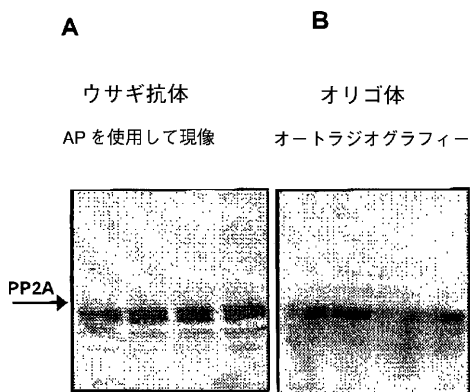
ため、ビオチンの存在は、PCR増幅や標的への結合に影響を与えない。「C」は、オリゴ体を過剰のブロッキングペプチドとプレインキュベート(4℃で一晩)し、次に「B」に記載したようにインキュベートして現像させた対照試料である。

【図10】図10は、図1に示すオリゴ体配列を使用してオリゴヌクレオチド合成機中で作成した、CPD1に対する合成オリゴ体を用いて得られたウェスタンブロットを示す。この試薬は、完全に化学合成により作成した最初の合成抗体様試薬であり、天然の抗体のようにウェスタンブロット中のタンパク質を認識することができる。

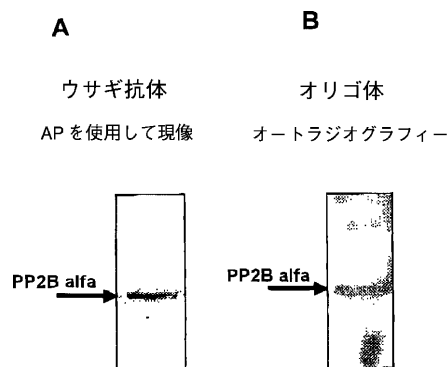
【図1】



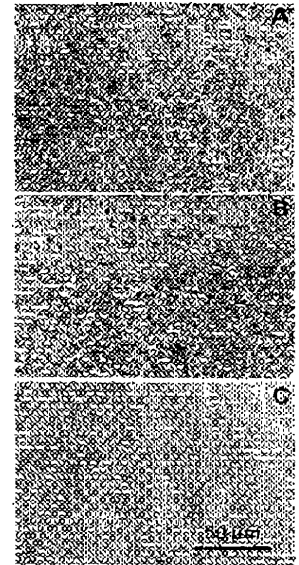
【図2】



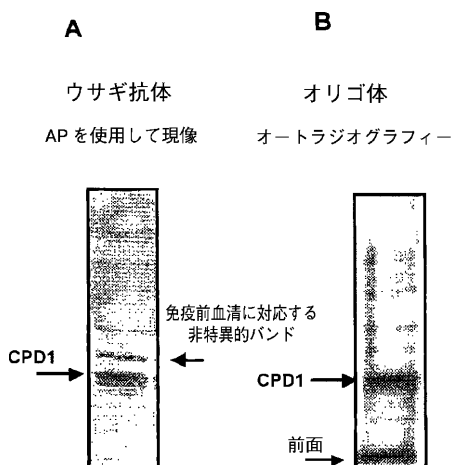
【図3】



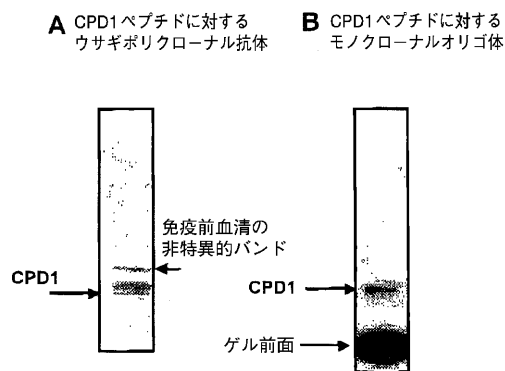
【図9】



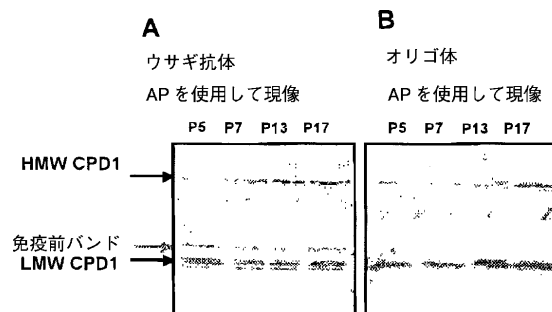
【図4】



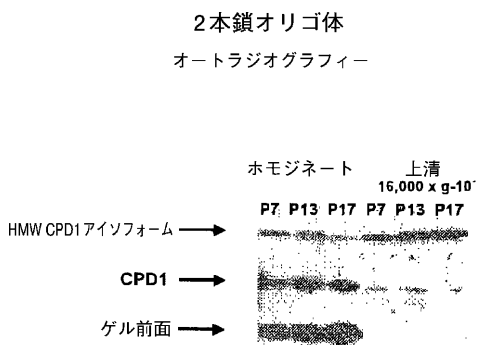
【図5】



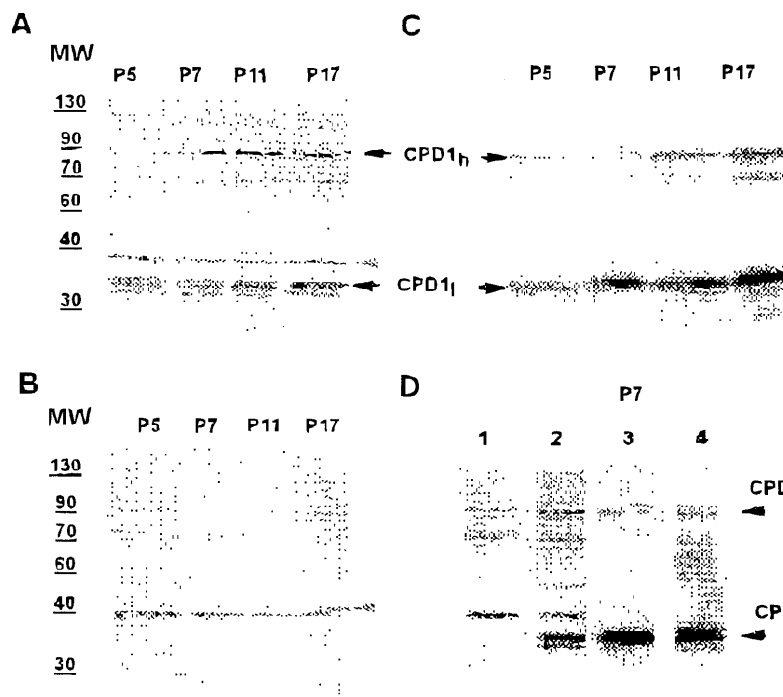
【図7】



【図6】

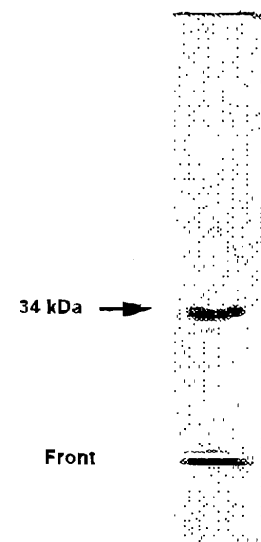


【図8】



【図10】

合成オリゴ体



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷G 0 1 N 33/53
33/566

識別記号

F I

G 0 1 N 33/566
C 1 2 N 15/00

テーマコード* (参考)

Z N A A

专利名称(译)	多克隆和单克隆寡核苷酸 (基于合成寡核苷酸的抗体样试剂) 和制备寡核苷酸的方法		
公开(公告)号	JP2001120282A	公开(公告)日	2001-05-08
申请号	JP2000252476	申请日	2000-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	托马斯·安东尼奥·圣马辊		
申请(专利权)人(译)	托马斯·安东尼奥，圣科洛马		
[标]发明人	トマスアントニオサンタコロマ		
发明人	トマス アントニオ、サンタ コロマ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P43/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6811 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6811 C12Q2525/179		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.N A61P43/00.111 C12Q1/68.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12Q1/6811.C C12Q1/6811.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/HA03 4B024/HA11 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ05 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS11 4B063/QS25 4B063/QS32 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB23 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/EE01		
优先权	P19990104272 1999-08-26 AR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：获得可用于类似于抗体的使用的寡聚体试剂，并提供一种制备寡聚体试剂的方法。解决方案：寡聚物试剂是抗体样试剂或寡聚物，其包含通过基于高特异性但不高亲和力的方法选择的天然或衍生的寡核苷酸，并且衍生自合成的寡核苷酸。低聚物试剂在许多用途中表现出与天然多克隆或单克隆抗体相似的异常能力，并且在所有用途（例如，蛋白质印迹，免疫沉淀，免疫细胞染色，放射免疫测定，ELISA，疾病药物，诊断微阵列等）识别非变性和/或变性蛋白。

「ムハ」ロ、リル「ロ」ルル」 100000
表1

選択サイクル	ペプチド 結合したcpm	対照 結合したcpm	比 ペプチド/対照
第1サイクル	460	600	0.76
第2サイクル	6005	880	6.8
第3サイクル	9157	258	35.5