

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-515271

(P2020-515271A)

(43) 公表日 令和2年5月28日(2020.5.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/115 Z	2 G 0 4 3
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B 0 2 9
C 4 0 B 40/06 (2006.01)	C 4 0 B 40/06	4 B 0 5 0
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6869 Z	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-553852 (P2019-553852)	(71) 出願人 519262283 オーグマニティ ナノ リミテッド イスラエル国, 7670308 レホヴォ ト, ハマダ 8, ロットマン ビルディン グ
(86) (22) 出願日 平成30年3月30日 (2018. 3. 30)	
(85) 翻訳文提出日 令和1年10月29日 (2019. 10. 29)	
(86) 国際出願番号 PCT/IB2018/000418	
(87) 国際公開番号 W02018/178770	
(87) 国際公開日 平成30年10月4日 (2018. 10. 4)	(74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号 62/478, 993	(74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日 平成29年3月30日 (2017. 3. 30)	(74) 代理人 100181674 弁理士 飯田 貴敏
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	(74) 代理人 100181641 弁理士 石川 大輔
	(74) 代理人 230113332 弁護士 山本 健策
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 機能性オリゴヌクレオチドの選択のための方法及び組成物

(57) 【要約】

本開示は、結合オリゴヌクレオチド及び機能的オリゴヌクレオチド(DNA、RNA、またはこれらの任意の天然または合成類似体)の両方を迅速に選択するための組成物及び方法を説明する。特定の実施形態では、本明細書に提供されるのは、フローチャンバー内に複数の固定されたアプタマークラスター(例えば、本明細書に記載のアプタマーライブラリーから)及び必要に応じて、1つ以上の標的細胞(例えば、がん細胞、免疫細胞など)及び/または細胞機能の検出可能な指標(例えば、アポトーシス、細胞増殖、遺伝子またはタンパク質発現などの蛍光指標)を含むフローセル(例えば、Illumina配列決定装置またはPolonator配列決定装置のフローセル)である。特定の実施形態において、本明細書に提供されるのは、そのようなアプタマークラスター含有フローセルを使用して、アプタマーライブラリーから機能的アプタマーを特定する方法である(例えば、Illumina配列決定装置などの配列決定装置において)。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フローチャンバーを含むフローセルであって、複数のアプタマークラスタが前記フローチャンバー内の固体表面に固定されている前記フローセル。

【請求項 2】

少なくとも約 10^6 個の別個のアプタマークラスタを含む、請求項 1 に記載のフローセル。

【請求項 3】

$10^6 \sim 10^9$ 個のアプタマークラスタを含む、請求項 2 に記載のフローセル。

【請求項 4】

各々のアプタマークラスタが、少なくとも約 10^4 個のアプタマのコピーを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のフローセル。

【請求項 5】

各々のアプタマークラスタが $10^4 \sim 10^6$ 個のアプタマのコピーを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のフローセル。

【請求項 6】

前記フローセル内に標的セルをさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のフローセル。

【請求項 7】

前記標的細胞が原核細胞である、請求項 6 に記載のフローセル。

【請求項 8】

前記標的細胞が真核細胞である、請求項 6 に記載のフローセル。

【請求項 9】

前記真核細胞がヒト細胞である、請求項 8 に記載のフローセル。

【請求項 10】

前記ヒト細胞ががん細胞である、請求項 9 に記載のフローセル。

【請求項 11】

前記ヒト細胞が免疫細胞である、請求項 9 に記載のフローセル。

【請求項 12】

前記免疫細胞が、T細胞、B細胞、マクロファージ、好酸球、NK細胞または樹状細胞である、請求項 11 に記載のフローセル。

【請求項 13】

前記フローセル内の細胞機能のレポーターをさらに含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のフローセル。

【請求項 14】

前記細胞機能のレポーターが、前記細胞が細胞機能を受けるときに蛍光を発する色素である、請求項 13 に記載のフローセル。

【請求項 15】

前記細胞機能がアポトーシスである、請求項 14 に記載のフローセル。

【請求項 16】

前記色素がカスパーゼ - 3 / 7 活性の検出器である、請求項 14 に記載のフローセル。

【請求項 17】

前記細胞機能が増殖である、請求項 14 に記載のフローセル。

【請求項 18】

前記細胞機能が遺伝子発現である、請求項 14 に記載のフローセル。

【請求項 19】

前記細胞機能がサイトカイン発現である、請求項 14 に記載のフローセル。

【請求項 20】

前記アプタマークラスタがアプタマークラスタライブラリー由来である、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のフローセル。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

標的に特異的に結合する 1 つ以上のアプタマーを特定する方法であって、以下：(i) 表面に固定された複数のアプタマークラスタと前記標的とを接触させること；及び(i i) 前記標的に特異的に結合する固定されたアプタマークラスタを特定すること、を包含する前記方法。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の方法であって、さらに以下のステップ：

(a) 表面上のアプタマライブラリーから複数のアプタマーを固定するステップ；及び

(b) 前記フローセル表面上の複数の局所的に固定されたアプタマーを増幅して、複数の固定されたアプタマークラスタを形成するステップ、を包含する、前記方法。

10

【請求項 2 3】

前記増幅が、ブリッジ P C R 増幅またはローリングサークル増幅を介して実施される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記固定されたアプタマークラスタから相補鎖を除去して、一本鎖の固定されたアプタマークラスタを提供することをさらに包含する、請求項 2 2 または 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記固定されたアプタマークラスタが、ステップ(i) の前に配列決定される、請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 2 6】

前記配列決定が、I l l u m i n a 配列決定または P o l o n a t o r 配列決定を介して行われる、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

アプタマライブラリーから前記表面にアプタマーをプリントすることにより、前記複数の固定されたアプタマークラスタを生成することをさらに包含する、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 8】

少なくとも 10^8 個の別個のアプタマーが前記表面に固定されている、請求項 2 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 2 9】

各々のアプタマークラスタが少なくとも 5 0 個の同一のアプタマーを含む、請求項 2 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記表面がフローセル表面である、請求項 2 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記方法は、フローセルから未結合の標的を除去するために、ステップ(i) の後に洗浄ステップを実行することをさらに包含する、請求項 2 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 3 2】

前記固定されたアプタマーの各々が、式 I I または式 I I I による配列：

P 1 - S 1 - L 1 - S 1 * - S 2 - L 2 - S 2 * - P 2 (I I)、または

P 1 - S 1 - L 1 - S 2 - L 2 - S 2 * - L 1 - S 1 * - P 2 (I I I)、

を有する、請求項 2 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法であって、

ここで：

P 1 は 5 ' プライマー部位配列であり；

P 2 は 3 ' プライマー部位配列であり；

S 1 及び S 2 は、各々独立して、少なくとも 1 つの塩基のステム領域配列であり；

S 1 * は S 1 の相補配列であり；

50

S 2 * は S 2 の相補配列であり ; そして
L 1 及び L 2 は各々独立して、少なくとも 1 つの塩基のループ領域配列である、前記方法。

【請求項 3 3】

前記標的が細胞である、請求項 2 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記細胞が原核細胞である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記標的が細菌である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記細胞が真核細胞である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記真核細胞が哺乳動物細胞である、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 8】

前記標的がウイルスである、請求項 2 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記標的がタンパク質である、請求項 2 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記標的が検出可能に標識されている、請求項 2 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法

。

【請求項 4 1】

細胞の特性を調節する 1 つ以上のアプタマーを特定する方法であって、以下 : (i) 表面に固定された複数のアプタマークラスタを前記細胞と接触させること ; 及び (i i) 前記細胞の特性を調節する前記固定されたアプタマークラスタを特定すること、を包含する、方法。

【請求項 4 2】

請求項 4 1 に記載の方法であって、さらに以下のステップ :

(a) 表面上にアプタマライブラリー由来の複数のアプタマーを固定するステップ ;
及び

(b) フローセル表面上の前記複数の局所的に固定されたアプタマーを増幅して、前記複数の固定されたアプタマークラスタを形成するステップ、をさらに包含する、前記方法。

【請求項 4 3】

前記増幅が、ブリッジ P C R 増幅またはローリングサークル増幅を介して実施される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記固定されたアプタマークラスタから前記相補鎖を除去して、一本鎖固定されたアプタマークラスタを提供することをさらに包含する、請求項 4 2 または 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記固定されたアプタマークラスタが、ステップ (i) の前に配列決定される、請求項 4 1 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記配列決定が I l l u m i n a 配列決定または P o l o n a t o r 配列決定を介して行われる、請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 7】

アプタマライブラリー由来のアプタマーを前記表面にプリントすることにより、前記複数の固定されたアプタマークラスタを生成することをさらに包含する、請求項 4 1 記載の方法。

【請求項 4 8】

10

20

30

40

50

少なくとも 10^8 個の別個のアプタマーが前記表面に固定されている、請求項 41 ~ 47 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 49】

各々のアプタマークラスターが少なくとも 50 個の同一のアプタマーを含む、請求項 41 ~ 48 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 50】

前記表面がフローセル表面である、請求項 41 ~ 49 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 51】

前記固定されたアプタマーの各々が、式 I I または式 I I I による配列：

P 1 - S 1 - L 1 - S 1 * - S 2 - L 2 - S 2 * - P 2 (I I)、または

P 1 - S 1 - L 1 - S 2 - L 2 - S 2 * - L 1 - S 1 * - P 2 (I I I)、

を有する、請求項 41 ~ 50 のいずれか 1 項に記載の方法であって、

ここで：

P 1 は 5' プライマー部位配列であり；

P 2 は 3' プライマー部位配列であり；

S 1 及び S 2 は、各々独立して、少なくとも 1 つの塩基のステム領域配列であり；

S 1 * は S 1 の相補配列であり；

S 2 * は S 2 の相補配列であり；かつ

L 1 及び L 2 は各々独立して、少なくとも 1 つの塩基のループ領域配列である、前記方法。

【請求項 52】

前記細胞が原核細胞である、請求項 41 ~ 51 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 53】

前記原核細胞が細菌である、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記細胞が真核細胞である、請求項 41 ~ 51 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 55】

前記真核細胞が哺乳動物細胞である、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記アプタマーと前記標的とを接触させる前に、前記細胞が検出可能な標識で標識されている、請求項 41 ~ 55 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 57】

前記検出可能な標識が蛍光色素である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記蛍光色素が、カルシウム感受性色素、細胞トレーサー色素、親油性色素、細胞増殖色素、細胞周期色素、代謝産物感受性色素、pH 感受性色素、膜電位感受性色素、ミトコンドリア膜電位感受性色素、または酸化還元電位色素である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記検出可能な標識が、活性化関連マーカー、酸化ストレスレポーター、血管新生マーカー、アポトーシスマーカー、オートファジーマーカー、細胞生存マーカー、またはイオン濃度のマーカーである、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 60】

前記細胞が、蛍光標識抗体またはその抗原結合フラグメント、アネキシン V、蛍光標識融合タンパク質、蛍光標識糖、または蛍光標識レクチンで標識されている、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 61】

前記細胞が、前記細胞へのアプタマーの曝露後に検出可能に標識される、請求項 41 ~ 60 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 62】

前記調節される細胞の特性が、細胞生存率、細胞増殖、遺伝子発現、細胞形態学、細胞

10

20

30

40

50

活性化、リン酸化、カルシウム動員、脱顆粒または細胞移動、細胞分化である、請求項 4 1 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記アプタマライブラリーを合成することをさらに包含する、請求項 2 1 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 4】

請求項 2 1 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法に従って特定されたアプタマー。

【請求項 6 5】

複数のアプタマークラスター、標的、及び蛍光レポーターを含む組成物。

【請求項 6 6】

少なくとも約 10^6 個のアプタマークラスターを含む、請求項 6 5 に記載の組成物。

【請求項 6 7】

10^6 ~ 10^9 個のアプタマークラスターを含む、請求項 6 6 に記載の組成物。

【請求項 6 8】

各々のアプタマークラスターが少なくとも約 10^4 個のアプタマーのコピーを含む、請求項 6 5 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6 9】

各々のアプタマークラスターが 10^4 ~ 10^6 個のアプタマーのコピーを含む、請求項 6 5 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 0】

前記標的が標的細胞である、請求項 6 5 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 1】

前記細胞が原核細胞である、請求項 7 0 に記載の組成物。

【請求項 7 2】

前記細胞が真核細胞である、請求項 7 0 に記載の組成物。

【請求項 7 3】

前記真核細胞がヒト細胞である、請求項 7 2 に記載の組成物。

【請求項 7 4】

前記ヒト細胞ががん細胞である、請求項 7 3 に記載の組成物。

【請求項 7 5】

前記標的が標的ウイルスである、請求項 6 5 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 6】

前記標的が標的タンパク質である、請求項 6 5 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 7】

前記蛍光レポーターが細胞死レポーターである、請求項 6 5 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 8】

前記蛍光レポーターが酸化還元電位レポーターである、請求項 6 5 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 9】

前記蛍光レポーターが膜完全性レポーターである、請求項 6 5 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8 0】

前記蛍光レポーターがキャプシド完全性レポーターである、請求項 6 5 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8 1】

前記蛍光レポーターがタンパク質完全性レポーターである、請求項 6 5 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8 2】

前記蛍光レポーターがタンパク質変性レポーターである、請求項 6 5 ~ 7 6 のいずれか

10

20

30

40

50

1 項に記載の組成物。

【請求項 8 3】

前記アプタマクラスターが蛍光マーカで標識されている、請求項 6 5 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8 4】

前記アプタマクラスターが、光学顕微鏡下での可視性を可能にするための要素で標識されている、請求項 6 5 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8 5】

前記要素がナノ粒子である、請求項に 8 4 記載の組成物。

【請求項 8 6】

前記アプタマクラスターがアンチセンス鎖で標識されている、請求項 6 5 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8 7】

前記アンチセンス鎖が、標的の結合時に置換または除去される、請求項 8 6 に記載の組成物。

【請求項 8 8】

酵素をさらに包含する、請求項 6 5 ~ 8 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8 9】

前記酵素がリガーゼ、ポリメラーゼ、ヌクレアーゼ、編集酵素、及び/または制限酵素である、請求項 8 8 に記載の組成物。

【請求項 9 0】

前記アプタマクラスターが固体支持体上に固定されている、請求項 6 5 ~ 8 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9 1】

前記固体支持体がフローセルである、請求項 9 0 に記載の組成物。

【請求項 9 2】

前記フローセルが、プラスチック、ガラス、ポリマー、または金属でできている、請求項 9 1 に記載の組成物。

【請求項 9 3】

前記フローセルがプレート、トレイ、またはチップである、請求項 9 1 または 9 2 に記載の組成物。

【請求項 9 4】

前記フローセルが床及び天井を備え、前記床及び前記天井がその間に充填可能な空間を備える、請求項 9 1 ~ 9 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9 5】

前記充填可能な空間が、空気、水、水性緩衝液、培養培地、血清、患者由来の試料、基質、ポリマー、またはタンパク質で満たされている、請求項 9 4 に記載の組成物。

【請求項 9 6】

前記患者由来の試料が血液、血清、及び/または尿である、請求項 9 5 に記載の組成物。

【請求項 9 7】

前記基質がゲルである、請求項 9 5 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2017年3月30日に出願された米国仮特許出願第62/478,993号の優先権の利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

10

20

30

40

50

背景

アプタマーは、特定の標的分子に結合し得る短い一本鎖核酸オリゴマーである。アプタマーは通常、反復プロセスでオリゴヌクレオチドの大きなランダムプールから選択される。つい最近では、細胞内、インピボ、及びインピトロでアプタマーが首尾よく選択されている。

【0003】

アプタマーの選択、それらの構造と機能の関係、及びそれらの作用機序は、全て十分に理解されていない。100を超えるアプタマー構造が解明及び報告されているが、繰り返し起こる構造モチーフはほとんど確認されていない。

【0004】

特定の標的に結合できるアプタマーを特定するためのさまざまな異なるアプタマー選択プロセスが記載されている。しかし、目的の標的に対する望ましい機能的効果を媒介し得るアプタマーを迅速かつ便利に特定する能力は、アプタマー治療に顕著な影響を有するであろう。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

要約

本明細書で提供されるのは、標的（例えば、標的細胞または標的分子）に結合するか、及び/またはその機能的効果を媒介するアプタマーの特定に関する組成物及び方法である。例えば、特定の実施形態では、本明細書では、そのフローチャンバー内に複数の固定されたアプタマークラスタ（例えば、本明細書に記載のアプタマーライブラリー由来）を含むフローセル（例えば、Illumina配列決定装置またはPolonator配列決定装置のフローセル）、及び、必要に応じて、1つ以上の標的細胞（例えば、がん細胞、免疫細胞など）及び/または細胞機能の検出可能な指標（例えば、アポトーシス、細胞増殖、遺伝子またはタンパク質発現などの蛍光指標）が提供される。特定の実施形態において、本明細書に提供されるのは、そのようなアプタマークラスタ含有フローセルを使用して、アプタマーライブラリーから機能的アプタマーを（例えば、Illumina配列決定装置などの配列決定装置において）特定する方法である。

【0006】

特定の態様において、標的（例えば、標的細胞、標的ウイルス、標的タンパク質、細胞上のトポグラフィ的特徴）に特異的に結合する1つ以上のアプタマーを特定する方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、この方法は、(i)表面（例えば、フローセル表面）に固定された複数のアプタマークラスタと標的とを接触させること；及び(ii)標的に結合する固定されたアプタマークラスタを特定することを包含する。特定の実施形態において、この方法は、ステップ(i)の後に洗浄ステップを実施して、表面（例えば、フローセル表面）から結合していない標的を除去することをさらに包含する。いくつかの実施形態において、この標的は検出可能に標識される（例えば、蛍光標識される）。

【0007】

いくつかの態様では、細胞（例えば、原核細胞または真核細胞）の特性を調節する1つ以上のアプタマーを特定するための方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、この方法は、(i)表面に固定された複数のアプタマークラスタと細胞とを接触させること；及び(ii)細胞の特性（例えば、細胞生存率、細胞増殖、遺伝子発現、細胞形態など）を調節する固定されたアプタマークラスタを特定することを包含する。いくつかの実施形態において、この方法は、表面（例えば、フローセル表面）から結合していない標的を除去するために、ステップ(i)の後に洗浄ステップを実施することをさらに包含する。いくつかの実施形態では、細胞は、検出可能な標識（例えば、カルシウム感受性色素、細胞トレーサー色素、親油性色素、細胞増殖色素、細胞周期色素、代謝産物感受性色素、pH感受性色素、膜電位感受性色素、ミトコンドリア膜電位感受性色素、または

10

20

30

40

50

酸化還元電位色素などの蛍光色素)を含む。いくつかの実施形態において、細胞の特性の変化は、細胞の特性を調節する固定されたアプタマークラスターを特定するために、検出される検出可能な標識の特性の変化を引き起こす。

【0008】

いくつかの態様では、本明細書で提供されるのは、標的(例えば、標的タンパク質などの標的分子)を調節する機能的特性(例えば、酵素特性)を保有する1つ以上のアプタマーを特定する方法である。いくつかの実施形態では、この方法は、(i)表面に固定された複数のアプタマークラスターと標的とを接触させること;及び(ii)標的を調節する(例えば、標的を切断する、標的の化学的または構造的変化を誘発するなど)固定されたアプタマークラスターを特定することを包含する。いくつかの実施形態では、この方法は、フローセルから未結合の標的を除去するために、ステップ(i)の後に洗浄ステップを実行することをさらに包含する。

10

【0009】

特定の実施形態では、この方法は、固定されたアプタマークラスターの生成をさらに包含する。いくつかの実施形態において、この固定されたアプタマークラスターは、以下によって生成される:(a)複数のアプタマー(例えば、アプタマーライブラリーから)を表面に固定すること;及び(b)フローセル表面上の複数の局所的に固定されたアプタマーを増幅し(例えば、ブリッジPCR増幅またはローリングサークル増幅を介して)、複数の固定されたアプタマークラスターを形成することによって、生成される。いくつかの実施形態では、この方法はさらに、固定されたアプタマークラスターから相補鎖を除去して、一本鎖の固定されたアプタマークラスターを提供することをさらに包含する。特定の実施形態において、固定されたアプタマークラスターは、ステップ(b)に続いて配列決定される(例えば、Illumina配列決定またはPacBio配列決定を使用する)。いくつかの実施形態において、この固定されたアプタマークラスターは、表面上にアプタマークラスター(例えば、アプタマーライブラリーから)を直接プリントすることにより生成される。いくつかの実施形態において、この方法は、アプタマーライブラリーの生成を含む(例えば、化学的核酸合成による)。

20

【0010】

特定の態様において、本明細書に提供されるのは、アプタマークラスター(例えば、クラスター化アプタマーライブラリー)を含む組成物である。特定の実施形態において、アプタマークラスターは、固体支持体(例えば、フローセル)上に固定される。特定の実施形態では、組成物は、標的(例えば、標的細胞、標的分子、標的タンパク質)をさらに含む。特定の実施形態では、この組成物はさらに、検出可能な標識(例えば、カルシウム感受性色素、細胞トレーサー色素、親油性色素、細胞増殖色素、細胞周期色素、代謝産物感受性色素、pH感受性色素、膜電位感受性色素、ミトコンドリア膜電位感受性色素、または酸化還元電位色素などの蛍光色素)を含む。いくつかの実施形態では、この組成物は、 $10^4 \sim 10^9$ 個のアプタマークラスター(例えば、少なくとも約 10^4 、 5×10^4 、 10^5 、 5×10^5 、 10^6 、 5×10^6 、 10^7 、 5×10^7 、または 10^8 個のアプタマークラスター)を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリー内の各クラスターは $10^3 \sim 10^6$ 個のアプタマー(例えば、1クラスターあたり少なくとも約 10^3 、 5×10^3 、 10^4 、 5×10^4 、 10^5 、 5×10^5 個のアプタマー)を含む。

30

40

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、本明細書に記載される特定の実施形態による、アプタマーライブラリー合成、配列決定、及び標的特定ワークフローの概略図である。

【図2】図2は、アプタマーライブラリー(Lib)、ランダム配列の短いまたは長いアプタマー、特定の標的細胞サイクル6及び7(それぞれCyc6及びCyc7)のSELEX選択プロセスのアプタマー出力、SELEX選択プロセスからの特定のアプタマー配列(Apt1及びApt2)、及びIllumina GAIIXフローセル上の空のレ

50

ーン（空）への標的細胞（Hana細胞）の結合を示す棒グラフである。細胞をフローセルレーンに流し、結合細胞をカウントした（結合対非結合、分数として表され、1 = 100%の細胞）。

【図3】図3は、フローセル上のアプタマーに結合した細胞の画像である。この画像は、経時的な、表面に対する細胞の動きを示す。その画像によって、細胞が表面自体に付着するのではなく、固定されたアプタマークラスターによって保持されており、したがって、自由に移動できるが、その場所に限定されていることが示される。画像化は、Illumina GAIIxで実行した。

【図4】図4は、本明細書で提供される特定の例示的な実施形態による特定のアプタマー構造の概略図である。

【図5】図5は、3つのパネルを含み、本明細書に開示される特定の実施形態による例示的なアプタマー特定方法を示す。パネルAは、フローセルベースのアプタマー検出法の概略図である。最初のアプタマーライブラリーを配列決定し、ライブラリー由来のアプタマーが固有の座標でクラスター化されるフローセルが生成される。陽性標的（例えば、腫瘍生検細胞）及び陰性標的（例えば、末梢血）を、1つ以上の生物学的効果（例えば、アポトーシス）の蛍光指標で標識し、アプタマークラスターが固定されているフローセルの異なるレーンに導入する。インキュベーション後、蛍光が検出され、アプタマークラスターが固定されているフローセル上の位置に関連付けられる。アプタマーを、有効性の有/無（効果あり/効果なし）及び選択性の有/無（選択的/非選択的）に基づいてスコア付けする。最高スコアのオリゴ（E+S）を合成し、検証する。パネルBは、スクリーニング蛍光顕微鏡用の特注アダプター内に保持された、配列決定後のフローセルの写真を示す。パネルCは、アポトーシス細胞が陽性シグナルを生成する、インキュベーション後の標的細胞を示す、特許請求される方法の実施形態の実施中に得られた蛍光顕微鏡画像のスクリーンショットである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

詳細な説明
全般

本明細書で提供されるのは、標的（例えば、標的細胞または標的分子）に対して結合、及び/またはその機能的効果を媒介するアプタマーの特定に関する方法及び組成物である。特定の実施形態では、この方法は、表面に固定された複数のアプタマークラスターに標的を接触させることを包含する。したがって、いくつかの実施形態では、この方法は、アプタマーのクラスターが固定されているフローセルの表面全体にまたがって標的を含む溶液を流すこと、及びどのアプタマークラスターが標的に結合するか、それと相互作用するか、及び/またはその機能的効果を媒介するかを検出することを包含する。

【0013】

特定の実施形態において、各々の固定されたアプタマークラスターの配列は、例えば、アプタマークラスターを配列決定することにより、または既知配列のアプタマーを表面の所定の位置にプリントすることにより、既知となるか及び/または決定される。したがって、標的がアプタマークラスターに結合するか、それと相互作用するか、及び/または調節される表面上の位置を決定することにより、関連する効果をその位置のアプタマー配列に関連付けることができる。

【0014】

例えば、いくつかの実施形態において、標的に結合するアプタマーは、既知の配列のアプタマークラスターが既知の位置に固定されている表面を横切って検出可能な標識（例えば、蛍光標識）を含む標的を含む組成物を流すことにより特定される。標的が保持される表面上の位置が決定され（例えば、蛍光顕微鏡を使用して）、それらの位置に固定されたアプタマーが標的に結合することが示される。

【0015】

特定の実施形態では、標的を機能的に調節するアプタマーは、既知の配列のアプタマー

クラスターが既知の位置に固定されている表面にまたがって、調節される機能を示す検出可能な標識（例えば、カルシウム感受性色素、細胞トレーサー色素、親油性色素、細胞増殖色素、細胞周期色素、代謝産物感受性色素、pH感受性色素、膜電位感受性色素、ミトコンドリア膜電位感受性色素、または酸化還元電位色素などの蛍光色素）を含む標的を含む組成物を流すことにより特定される。標的が調節されることを検出可能な標識が示す表面上の位置が決定され（例えば、蛍光顕微鏡を使用して）、それらの位置に固定されたアプタマーが標的を調節可能であることが示される。

【0016】

特定の態様において、表面上に固定されたアプタマークラスターの生成に関連する方法及び組成物も本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、アプタマー（例えば、本明細書に開示されるアプタマライブラリー由来）は、フローセル表面などの表面上に固定される。いくつかの実施形態では、次いで、ブリッジ増幅またはローリングサークル増幅などの局所的増幅プロセスを実行して、アプタマークラスターが生成される。次いで、各々のアプタマークラスターの配列を表面上の位置と関連付けるために、アプタマークラスターを配列決定してもよい（例えば、Illumina配列決定またはPacBio配列決定により）。相補鎖を除去して、一本鎖アプタマークラスターを生成してもよい。次いで、表面（例えば、フローセル）を、本明細書で提供されるアプタマー特定方法で使用する準備を行う。

10

【0017】

好都合なことに、特定の実施形態では、本明細書で提供される方法の全てのステップは、Illumina GAIIx機器などのIllumina配列決定装置で実行される。

20

【0018】

特定の態様では、本明細書で提供されるのは、アプタマークラスター（例えば、本明細書で提供される方法の実施中に生成されるクラスター化アプタマライブラリー）を含む組成物である。特定の実施形態において、アプタマークラスターは、固体支持体（例えば、フローセル）上に固定される。特定の実施形態では、この組成物は、標的（例えば、標的細胞、標的分子、標的タンパク質）をさらに含む。特定の実施形態では、この組成物は、検出可能な標識（例えば、カルシウム感受性色素、細胞トレーサー色素、親油性色素、細胞増殖色素、細胞周期色素、代謝産物感受性色素、pH感受性色素、膜電位感受性色素、ミトコンドリア膜電位感受性色素、または酸化還元電位色素などの蛍光色素）をさらに含む。いくつかの実施形態では、この組成物は、 $10^4 \sim 10^9$ 個のアプタマークラスター（例えば、少なくとも約 10^4 、 5×10^4 、 10^5 、 5×10^5 、 10^6 、 5×10^5 、 10^6 、 5×10^6 、 10^7 、 5×10^7 、または 10^8 個のアプタマークラスター）を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリー内の各々のクラスターは $10^3 \sim 10^6$ 個のアプタマー（例えば、1クラスターあたり少なくとも約 10^3 、 5×10^3 、 10^4 、 5×10^4 、 10^5 、 5×10^5 個のアプタマー）を含む。

30

【0019】

いくつかの実施形態では、標的は、任意のタイプの細胞（例えば、細菌などの原核細胞、または哺乳動物細胞などの真核細胞）、ウイルス、タンパク質、及び/または粒子であり得る。いくつかの実施形態では、粒子は標的に付着されている。

40

【0020】

いくつかの実施形態において、検出可能な標識は、機能の蛍光レポーターである。いくつかの実施形態では、機能の蛍光レポーターは、細胞死レポーター、酸化還元電位レポーター、膜完全性レポーターである。いくつかの実施形態では、機能の蛍光レポーターは、キャプシド完全性レポーター（例えば、ウイルスのキャプシド完全性及びまたは機能を測定するためのレポーター）などのウイルスレポーターである。いくつかの実施形態において、機能の蛍光レポーターは、タンパク質完全性レポーター（すなわち、タンパク質の構造的完全性及び安定性を測定するためのレポーター）またはタンパク質変性レポーター（すなわち、タンパク質変性を検出するレポーター）などのタンパク質レポーターである。

50

【 0 0 2 1 】

細胞死レポーターの例は、7 - A A D、及びアネキシンVフルオロフォアである。特定の実施形態では、標的は、標的に対する生物学的または化学的効果の検出を可能にする検出可能な標識に連結するか、結合するか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、検出可能な標識は、蛍光色素である。蛍光色素の非限定的な例としては、限定するものではないが、カルシウム感受性色素、細胞トレーサー色素、親油性色素、細胞増殖色素、細胞周期色素、代謝産物感受性色素、pH感受性色素、膜電位感受性色素、ミトコンドリア膜電位感受性色素、及び酸化還元電位色素が挙げられる。一実施形態では、標的は、カルシウム感受性色素、細胞トレーサー色素、親油性色素、細胞増殖色素、細胞周期色素、代謝産物感受性色素、pH感受性色素、膜電位感受性色素、ミトコンドリア膜電位感受性色素、または酸化還元電位色素で標識される。

10

【 0 0 2 2 】

特定の実施形態では、標的は、活性化関連マーカー、酸化ストレスレポーター、血管新生マーカー、アポトーシスマーカー、オートファジーマーカー、細胞生存マーカー、またはイオン濃度のマーカーで標識されている。さらに別の実施形態では、標的は、活性化関連マーカー、酸化ストレスレポーター、血管新生マーカー、アポトーシスマーカー、オートファジーマーカー、細胞生存マーカー、または標識に対するアプタマーの曝露前のイオン濃度のマーカーで標識されている。

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態では、標的細胞は、カルシウム感受性色素、細胞トレーサー色素、親油性色素、細胞増殖色素、細胞周期色素、代謝産物感受性色素、pH感受性色素、膜電位感受性色素、ミトコンドリア膜電位感受性色素、または酸化還元電位色素で標識される。特定の実施形態では、標的細胞は、活性化関連マーカー、酸化ストレスレポーター、血管新生マーカー、アポトーシスマーカー、オートファジーマーカー、細胞生存マーカー、またはイオン濃度のマーカーで標識されている。さらに別の実施形態では、標的細胞は、活性化関連マーカー、酸化ストレスレポーター、血管新生マーカー、アポトーシスマーカー、オートファジーマーカー、細胞生存マーカー、またはイオン濃度のマーカーで、細胞に対するアプタマーの曝露前に標識されている。いくつかの実施形態において、標的細胞は、標的へのアプタマーの曝露後に標識される。一実施形態では、標的細胞は、蛍光標識抗体またはその抗原結合断片、アネキシンV、蛍光標識融合タンパク質、蛍光標識糖、または蛍光標識レクチンで標識される。一実施形態において、標的細胞は、蛍光標識抗体またはその抗原結合断片、アネキシンV、蛍光標識融合タンパク質、蛍光標識糖、または蛍光標識レクチンで、細胞へのアプタマーの曝露後に標識される。

20

30

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態では、アプタマークラスターはフローセルに固定される（例えば、フローセルは、Illumina機器フローセル及び/またはPolonatorシーケンサーフローセルなどの画像ベースのDNA配列決定に使用される）。特定の実施形態において、フローセルは、任意の材料から作製され得る。いくつかの実施形態では、フローセルは、プラスチック、ガラス、ポリマー、または金属でできている。いくつかの実施形態では、フローセルはプレート、トレイ、またはチップである。いくつかの実施形態において、フローセルは、その床と天井との間に、以下：空気、水、水性緩衝液、培養培地、血清、患者由来試料（例えば、血液、血漿、血清、尿）、基質（例えば、ゲル）、ポリマー、及び/またはタンパク質（例えば、コラーゲン、または患者由来の細胞外基質）のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、フローセルは標的（例えば、標的細胞）を含む。いくつかの実施形態において、フローセル（例えば、その床及び/またはその天井）は、ポリマー、タンパク質、オリゴ、脂質、及び/または化学基などのブロッカーでコーティングされている。いくつかの実施形態では、フローセルは、クラスターに近接して標的を結合するための任意の長さのアンカーを含む。いくつかの実施形態では、アンカーはポリマー、タンパク質、オリゴ、脂質、及び/または化学基である。

40

【 0 0 2 5 】

50

いくつかの実施形態において、アプタマクラスターはフローセル内にランダムに配置される。他の実施形態において、アプタマクラスターは、フローセル内の特定のパターンに従って配置される。いくつかの実施形態では、フローセルは任意の段階で固定される。いくつかの実施形態では、組成物は固定剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、フローセルは、オリゴ選択の反復プロセスに使用される。他の実施形態では、フローセルは、オリゴ選択の非反復プロセスで使用される。

【0026】

特定の実施形態では、この標的は、活性化関連マーカー、酸化ストレスレポーター、血管新生マーカー、アポトーシスマーカー、オートファジーマーカー、細胞生存マーカー、またはイオン濃度のマーカーで標識されている。さらに別の実施形態では、この標的は、

10

【0027】

定義

便宜上、本明細書、実施例、及び添付の特許請求の範囲で使用される特定の用語をここに集める。

【0028】

冠詞「a」及び「an」は、本明細書では、冠詞の文法的対象の2つ以上（例えば、少なくとも1つ）を指すために使用される。一例として、「要素」は、1つの要素または2

20

【0029】

本明細書で使用される場合、「アプタマ」という用語は、タンパク質もしくはペプチド標的または標的細胞に対するトポグラフィック特徴に特異的に結合し得る短い（例えば、200塩基未満）一本鎖核酸分子（ssDNA及び/またはssRNA）を指す。

【0030】

本明細書で使用される場合「アプタマクラスター」という用語は、同一配列の局所的に固定されたアプタマ（例えば、少なくとも10個）の集合を指す。

【0031】

「結合」または「相互作用する」という用語は、会合であって、例えば、生理学的条件下での、静電、疎水性、イオン及び/または水素による結合の相互作用に起因して、例えばアプタマと標的との間の2つの分子間の安定した結合であり得る会合を指す。

30

【0032】

本明細書で使用される場合、2つの核酸配列は、それらが各位置で互いに塩基対を形成する場合、互いに「相補性」であるか、または「相補的」である。

【0033】

本明細書で使用する場合、2つの核酸配列は、両方が同じ核酸配列に相補的である場合、互いに「対応する」。

【0034】

「調節」という用語は、機能的特性または生物学的な活性もしくはプロセス（例えば、酵素活性または受容体結合）に関して使用される場合、上方制御する（例えば、活性化または刺激する）、下方制御する（例えば、阻害または抑制する）か、そうでなければこのような特性、活性、もしくはプロセスの品質を変更する能力を指す。特定の例では、そのような調節は、シグナル伝達経路の活性化などの特定の事象の発生を条件とする場合があるか、及び/または特定の細胞タイプでのみ顕在化する場合がある。

40

【0035】

本明細書で使用される場合、「特異的結合」とは、所定の標的に結合するアプタマの能力を指す。典型的には、アプタマは、約 10^{-7} M以下、約 10^{-8} M以下、または約 10^{-9} M以下という K_D に対応する親和性でその標的に特異的に結合し、その非特異的で無関係な標的（例えば、BSA、カゼイン、またはHEK293細胞もしくはE.c

50

o l i 細胞などの無関係な細胞)への結合に対するその親和性よりも顕著に少ない(例えば、少なくとも2倍少ない、少なくとも5倍小さい、少なくとも10倍小さい、少なくとも50倍小さい、少なくとも100倍小さい、少なくとも500倍小さい、または少なくとも1000倍小さい)K_Dで標的に結合する。

【0036】

本明細書で使用される場合、2つのオリゴヌクレオチドのT_mまたは融解温度とは、オリゴヌクレオチド/標的の50%が結合し、オリゴヌクレオチド標的分子の50%が結合しない温度である。2つのオリゴヌクレオチドのT_m値は、オリゴヌクレオチド濃度に依存し、反応混合物中の一価、二価カチオンの濃度に影響される。T_mは、参照により本明細書に組み込まれる、Santa Lucia, J. PNAS (USA) 95: 1460 - 1465 (1998)に記載されているように、経験的に決定されてもよいし、最近傍式を使用して計算されてもよい。

【0037】

「ポリヌクレオチド」及び「核酸」という用語は、本明細書では互換的に使用される。それらは、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはそれらの類似体のいずれかの長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有する場合があり、既知または未知の任意の機能を実行する場合がある。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片のコーディングまたは非コーディング領域、連鎖解析から定義される遺伝子座(遺伝子座)、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、合成ポリヌクレオチド、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、及びプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体などの修飾ヌクレオチドを含んでもよい。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーのアセンブリの前に付与されても、または後に付与されてもよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断される場合がある。ポリヌクレオチドは、標識成分との結合などによりさらに修飾され得る。

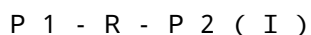
【0038】

アプタマーライブラリー

特定の実施形態では、本明細書で提供される方法及び組成物は、アプタマーライブラリーに存在するアプタマーのうちで所望の特性を有するアプタマーの特定に関する。本明細書で使用される場合、アプタマーライブラリーは、別個の配列(例えば、少なくとも10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶または10⁷の別個の配列)を有する核酸分子(例えば、DNA及び/またはRNA)の集合であり、少なくとも核酸分子のサブセットは、標的タンパク質、ペプチド、または細胞の組織分布的特徴に特異的に結合し得るように構造化されている。いくつかの実施形態では、潜在的なアプタマーの任意のライブラリーが、本明細書で提供される方法及び組成物で使用され得る。

【0039】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法及び組成物で使用されるアプタマーライブラリーは、式(I)：



による配列を有する核酸分子(例えば、DNA及び/またはRNA)を含む、からなるか、及び/または本質的にからなり

ここで、P1は、約10~100塩基長、約10~50塩基長、約10~30塩基長、約15~50塩基長、または約15~30塩基長の5'プライマー部位配列であり；P2は、約10~100塩基長、約10~50塩基長、約10~30塩基長、約15~50塩基長、または約15~30塩基長の3'プライマー部位配列であり；及びRは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75もしくは80塩基長及び/または約120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55もしくは50塩基長以下のランダム

10

20

30

40

50

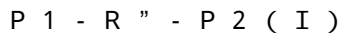
に配置された塩基を含む配列である。

【0040】

一実施形態では、Rは、約25%のAを含む配列である。別の実施形態では、Rは約25%のTを含む配列である。別の実施形態では、Rは約25%のGを含む配列である。別の実施形態では、Rは約25%のCを含む配列である。さらに別の実施形態では、Rは、約25%のA、約25%のT、約25%のG、及び約25%のCを含む配列である。

【0041】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法及び組成物で使用されるアプタマーライブラリーは、式(I)：



10

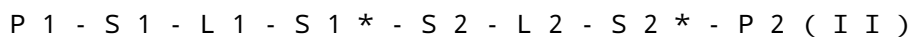
による配列を有する核酸分子(DNA及び/またはRNA)を含むか、からなるか、及び/または本質的にからなり、

ここで、P1は、約10~100塩基長、約10~50塩基長、約10~30塩基長、約15~50塩基長、または約15~30塩基長の5'プライマー部位配列であり；P2は、約10~100塩基長、約10~50塩基長、約10~30塩基長、約15~50塩基長、または約15~30塩基長の3'プライマー部位配列であり；及びRⁿは、バイアスのかかった混合物からのランダムに配置された塩基、またはランダムな文字列と反復またはバイアスされた文字列の任意の組み合わせを含む、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75もしくは80塩基長及び/または約120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、または50塩基長以下の配列である。

20

【0042】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法及び組成物で使用されるアプタマーライブラリーは、式II：



による配列を有する核酸分子(DNA及び/またはRNA)を含むか、からなるか、及び/または本質的にからなり(例示的な模式図は、図4Aに示される)、

ここで、

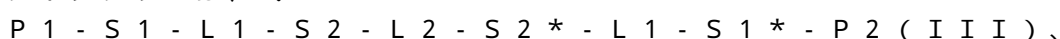
P1は、約10~100塩基長、約10~50塩基長、約10~30塩基長、約15~50塩基長、または約15~30塩基長の5'プライマー部位配列であり；P2は、約10~100塩基長、約10~50塩基長、約10~30塩基長、約15~50塩基長、または約15~30塩基長の3'プライマー部位配列であり；S1及びS2は、各々独立して、少なくとも1つの塩基(例えば、約4~40塩基長または4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40塩基長)のステム領域配列であり；S1*は、S1の相補配列であり；S2*はS2の相補配列であり；L1及びL2は、各々独立して、少なくとも1塩基(例えば、約1~50塩基長または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49もしくは50塩基長)のループ領域配列であり；及びS1-L1-S1*-S2-L2-S2*は、合計で少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75または80塩基長、及び/または約120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55もしくは50塩基長以下である。

30

40

【0043】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法及び組成物で使用されるアプタマーライブラリーは、式III：



50

による配列を有する核酸分子（DNA及び/またはRNA）を含むか、からなるか、及び/または本質的にからなり（例示的な模式図を、図4Bに示す）、

ここで、

P1は、約10～100塩基長、約10～50塩基長、約10～30塩基長、約15～50塩基長、または約15～30塩基長の5'プライマー部位配列であり；P2は、約10～100塩基長、約10～50塩基長、約10～30塩基長、約15～50塩基長、または約15～30塩基長の3'プライマー部位配列であり；

S1及びS2は、各々独立して、少なくとも1つの塩基（例えば、約4～40塩基長または4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40塩基長）のステム領域配列であり；S1*はS1の相補配列であり；S2*はS2の相補配列であり；

L1及びL2は、各々独立して、少なくとも1塩基（例えば、約1～50塩基長または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、もしくは50塩基長のループ領域配列である）であり；そして

S1-L1-S2-L2-S2*-L1-S1*は、合計で少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75もしくは80塩基長、及び/または約120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55もしくは50塩基長以下である。

【0044】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法及び組成物で使用されるアプタマーライブラリーは、式IV：

P1-Lib-M1/M2-D-M1/M2*-Lib-P2 (IV)

による配列を有する核酸分子（DNA及び/またはRNA）を含むか、からなるか、及び/または本質的にからなり（例示的な概略図を図4Cに提供する）、

ここで、

P1は、約10～100塩基長、約10～50塩基長、約10～30塩基長、約15～50塩基長、または約15～30塩基長の5'プライマー部位配列である；P2は、約10～100塩基長、約10～50塩基長、約10～30塩基長、約15～50塩基長、または約15～30塩基長の3'プライマー部位配列であり；

Libは：(i) R；(ii) R"；(iii) S1-L1-S1*-S2-L2-S2*；及び(iv) S1-L1-S2-L2-S2*-L1-S1*から選択される式を有する配列であり；

Rは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75もしくは80塩基長及び/または約120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55もしくは50塩基長以下のランダムに配置された塩基を含む配列であり；

R"は、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75もしくは80塩基長、及び/または約120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55もしくは50塩基長以下の配列であり、バイアスされた混合物からのランダムに配置された塩基、またはランダムな文字列と繰り返しもしくはバイアスされた文字列との任意の組み合わせを含む；

S1及びS2は、各々独立して、少なくとも1つの塩基（例えば、約4～40塩基長または4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39もしくは40塩基長）のステム領域配列

であり；S 1 * はS 1 の相補配列であり；S 2 * はS 2 の相補配列であり；

L 1 及びL 2 は、各々独立して、少なくとも1塩基（例えば、約1～50塩基長または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49もしくは50塩基長）のループ領域配列であり；

ここで、S 1 - L 1 - S 1 * - S 2 - L 2 - S 2 * は、合計で少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75もしくは80塩基長及び/または約120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55もしくは50塩基長以下であり；

D は、少なくとも1つの塩基（例えば、約1～20塩基長、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20塩基長）を含むスペーサー配列であり；

M 1 は、約10～18塩基長または10、11、12、13、14、15、16、17もしくは18塩基長の多量体形成ドメイン配列であり、配列の鎖が相補的なドメインを含む別の鎖と相互作用し得；そして

M 2 は、M 1 配列の鎖と相互作用する鎖を含むM 1 の相補的ドメインである。

【0045】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法及び組成物で使用されるアダプターライブラリーは、式V：

P 1 - L i b - T * - L i b - P 2 (V) による配列を有する核酸分子（DNA及び/またはRNA）を含むか、からなるか、及び/または本質的にからなり（例示的な概略図を図4Dに示す）、

ここで：

P 1 は、約10～100塩基長、約10～50塩基長、約10～30塩基長、約15～50塩基長、または約15～30塩基長の5'プライマー部位配列であり；P 2 は、約10～100塩基長、約10～50塩基長、約10～30塩基長、約15～50塩基長、または約15～30塩基長の3'プライマー部位配列であり；

L i b は、以下から選択される式を有する配列である：(i) R ； (i i) R " ； (i i i) S 1 - L 1 - S 1 * - S 2 - L 2 - S 2 * ；及び(i v) S 1 - L 1 - S 2 - L 2 - S 2 * - L 1 - S 1 * ；

R は、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75もしくは80塩基長及び/または約120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55もしくは50塩基長以下のランダムに配置された塩基を含む配列であり；

R " は、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75または80塩基長及び/または約120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55もしくは50塩基長以下の配列であり、バイアスされた混合物からのランダムに配置された塩基、またはランダムな文字列と繰り返しもしくはバイアスされた文字列との任意の組み合わせを含み；

S 1 及びS 2 は、各々独立して、少なくとも1つの塩基（例えば、約4～40塩基長または4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39もしくは40塩基長）のステム領域配列であり；

S 1 * はS 1 の相補配列であり；S 2 * はS 2 の相補配列であり；

L 1 及びL 2 は、各々独立して、少なくとも1塩基（例えば、約1～50塩基長または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、

10

20

30

40

50

44、45、46、47、48、49もしくは50塩基長)のループ領域配列であり;

ここで、S1-L1-S1*-S2-L2-S2*は、合計で少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75もしくは80塩基長及び/または約120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55もしくは50塩基長以下であり;

Tは、Lib配列またはT*の任意の部分にワトソン/クリックまたはフーグスティーンの塩基対によって結合される2番目の鎖であり、ここでこの鎖は、必要に応じてその5'及び3'末端に不対ドメインを含む(例えば、アダマーへの機能的部分の付着を促進するため);そして

T*は専用ドメイン配列である(例えば、約4~40塩基長、または4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39もしくは40塩基長)。

10

【0046】

上記の式のいくつかの実施形態では、Rは少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75もしくは80塩基長、及び/または約120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55もしくは50塩基長以下という任意のランダム混合物(例えば、基準塩基の場合、25%A、25%T、25%G、25%C)からランダムに配置された塩基である。

20

【0047】

上記式の一実施形態では、Rは約25%のAを含む配列である。別の実施形態では、Rは約25%のTを含む配列である。別の実施形態では、Rは約25%のGを含む配列である。別の実施形態では、Rは約25%のCを含む配列である。さらに別の実施形態では、Rは約25%のA、約25%のT、約25%のG、及び約25%のCを含む配列である。

【0048】

上記の式のいくつかの実施形態では、R''は、バイアスされた混合物からランダムに配置された塩基を含む配列である(例えば、基準塩基については、1塩基あたり25%から逸脱する任意の混合物)。いくつかの実施形態では、R''は約0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%または75%のAを含む配列である。いくつかの実施形態では、R''は、約0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%または75%のTを含む配列である。いくつかの実施形態では、R''は、約0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%または75%のCを含む配列である。いくつかの実施形態では、R''は、約0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、または75%のGを含む配列である。いくつかの実施形態では、R''はランダムな文字列(文字列は、単一の塩基を含む任意の配列)と繰り返し文字列またはバイアス文字列との任意の組み合わせを含む配列である。

30

40

【0049】

上記の式のいくつかの実施形態において、R''は、バイアスされた混合物からランダムに配置された塩基(例えば、基準塩基の場合、1塩基あたり25%から逸脱する任意の混合物);またはランダムな文字列(文字列は単一の塩基を含む任意の配列)と、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75もしくは80塩基長、及び/または約120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55もしくは50塩基長以下の繰り返しまたはバイアスされた文字列との任意の組み合わせである。

【0050】

上記の式のいくつかの実施形態では、S1は少なくとも1塩基以上のステム領域配列で

50

ある。他の実施形態では、S 1 は、約 4 ~ 40 塩基長または 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 もしくは 40 塩基長のステム領域配列である。

【0051】

上記の式のいくつかの実施形態では、S 2 は少なくとも 1 塩基以上のステム領域配列である。他の実施形態では、S 2 は、約 4 ~ 40 塩基長または 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 もしくは 40 塩基長の間のステム領域配列である。

10

【0052】

上記の式のいくつかの実施形態では、L 1 は少なくとも 1 つの塩基のループ領域配列である。他の実施形態では、L 1 は、約 1 ~ 50 塩基長または 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 もしくは 50 塩基長のループ領域配列である。

【0053】

上記の式のいくつかの実施形態では、L 2 は少なくとも 1 つの塩基のループ領域配列である。他の実施形態では、L 2 は、約 1 ~ 50 塩基長または 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 もしくは 50 塩基長のループ領域配列である。

20

【0054】

上記の式のいくつかの実施形態では、T はその 5' 及び 3' 末端に不対ドメインを含んでもよく、またはパドロック (padding) テール (例えば、ライブラリーと対になった 2 つのドメイン間のループ) であってもよい。

【0055】

本開示のアプタマーは、任意の数のステム及びループ、ならびにステム及びループからなる他の構造 (例えば、ヘアピン、バルジなど) を含んでもよい。いくつかの実施形態では、アプタマーのループは、主ライブラリー軸に直交するステムを形成する安定したループ-ループ WC ペアリングを形成するために埋め込まれた塩基を含む。他の実施形態では、アプタマー内の 2 つのループが一緒になって直交ステムを形成する。さらに他の実施形態では、アプタマーのループは、主ライブラリー軸に沿って既存のステムと安定したフーグスティーンペアリングを形成するために埋め込まれた塩基を含む。他の実施形態では、アプタマーのループは、アプタマーの任意のステムとフーグスティーンペアリングを形成し得る。

30

【0056】

上記の式のいくつかの実施形態では、アプタマー配列は、1 つ以上の多量体形成ドメインをさらに含む。

40

【0057】

上記の式のいくつかの実施形態では、アプタマー配列は、1 つ以上 (例えば、約 1 ~ 20 塩基長または 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 もしくは 20 塩基長) のスペーサーをさらに含む。

【0058】

本開示のアプタマーは、様々な方法で調製され得る。一実施形態では、アプタマーは化学合成により調製される。別の実施形態では、アプタマーは酵素合成により調製される。一実施形態では、酵素合成は、鋳型を使用してまたは使用せずに、ヌクレオチドを付加してプライマーを伸長し得る任意の酵素を使用して実行され得る。いくつかの実施形態では

50

、アプタマーは、kマー（例えば、k 2塩基）を一緒にアセンブルすることにより調製される。

【0059】

いくつかの実施形態において、本開示のアプタマーは、DNA、RNA、ならびにそれらの天然及び/または合成類似体の任意の組み合わせを含んでもよい。一実施形態では、アプタマーはDNAを含む。一実施形態では、アプタマーはRNAを含む。

【0060】

他の実施形態において、本開示のアプタマーは、5'末端、3'末端、または内部に任意の変更を含んでもよい。アプタマーの修飾としては、限定するものではないが、スパーサー、リン酸化、リンカー、結合化学、フルオロフォア、クエンチャー、光反応性、及び修飾塩基（例えば、LNA、PNA、UNA、PS、メチル化、2-O-メチル、ハロゲン化、超強塩基、iso-dN、逆塩基、L-リボース、骨格としての他の糖など）が挙げられる。

10

【0061】

いくつかの実施形態では、本開示のアプタマーは、5'末端、3'末端、または内部的に、外部の非核酸分子に結合され得る。非核酸分子の非限定的な例としては、限定するものではないが、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、低分子薬、単糖類及び多糖類、脂質、抗体及び抗体断片、またはそれらの組み合わせが挙げられる。

【0062】

本開示のアプタマーは、生物学的機能を有する任意のドメインを含んでもよい。本明細書に記載のアプタマーの生物学的機能の非限定的な例としては、限定するものではないが、RNA転写の鋳型としての機能、タンパク質への結合、認識、及び/または活性の調節、転写因子への結合、特殊化された核酸構造（例えば、Z-DNA、H-DNA、G-quadなど）、制限酵素の酵素基質としての作用、特定のエキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼ、組換え部位、編集部位、またはsiRNAが挙げられる。一実施形態では、アプタマーは、少なくとも1つのタンパク質の活性を調節する。別の実施形態では、アプタマーは少なくとも1つのタンパク質の活性を阻害する。さらに別の実施形態では、アプタマーは少なくとも1つのタンパク質の活性を阻害する。

20

【0063】

他の実施形態では、本開示のアプタマーは、いくつかの公知の方法のいずれか1つによって構築された核酸ナノ構造に組み込むための任意のドメインを含んでもよい（Shih et al, Nature 427:618-621(2004); Rothemund, Nature 440:297-302(2006); Zheng et al, Nature 461:74-77(2009); Dietz et al, Science 325:725-730(2009); Wei et al., Nature 485:623-626(2012); Ke et al., Science 338:1177-1183(2012); Douglas et al., Science 335:831-834(2012)、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる）。さらに他の実施形態では、本開示のアプタマーは、分子論理及び計算の機能を果たす任意のドメインを含んでもよい（Seelig et al, Science 314:1585-1588(2006); Macdonald et al, Nano Lett 6:2598-2603(2006); Qian et al., Nature 475:368-372(2011); Douglas et al, Science 335:831-834(2012); Amir et al, Nat Nanotechnol 9:353-357(2014)、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる）。

30

40

【0064】

いくつかの実施形態では、本開示のアプタマーは、標的（例えば、真核生物または原核生物の細胞、ウイルスまたはウイルス粒子、分子、組織、または生物全体、インビボまたはエキソビボ）に対して1回以上の負の選択サイクルを受ける。他の実施形態では、本開

50

示のアプタマーは、標的（例えば、真核細胞または原核細胞、ウイルスまたはウイルス粒子、分子、組織、または生物全体、インピボまたはエキソピボ）に対して1回以上の正の選択サイクルを受ける。

【0065】

本開示のアプタマーは、溶液中にあってもよいし、固相（例えば、表面、粒子、樹脂、基質など）に付着してもよい。いくつかの実施形態では、アプタマーは表面に付着している。一実施形態では、表面はフローセル表面である。

【0066】

いくつかの実施形態では、本開示のアプタマーは、アプタマーライブラリーで合成される。本開示のアプタマーライブラリーは、様々な方法で調製され得る。一実施形態では、アプタマーライブラリーは化学合成により調製される。別の実施形態では、アプタマーライブラリーは、酵素合成により調製される。一実施形態では、この酵素合成は、鋳型を使用してまたは使用せずに、ヌクレオチドを付加してプライマーを伸長し得る任意の酵素を使用して行われ得る。

10

【0067】

いくつかの実施形態では、アプタマーライブラリーで合成されたアプタマーは、DNA、RNA、及びそれらの天然及び/または合成類似体の任意の組み合わせを含んでもよい。一実施形態では、アプタマーライブラリーで合成されたアプタマーは、DNAを含む。一実施形態では、アプタマーライブラリーで合成されたアプタマーはRNAを含む。

【0068】

いくつかの実施形態において、アプタマーライブラリーで合成されるアプタマーは、核酸（例えば、DNA、RNA、天然または合成塩基、塩基類似体、またはそれらの組み合わせ） 10^K 種（ $K \geq 2$ ）のコレクションであり、1種あたりZコピー（ $1 \leq Z \leq K - 1$ ）がある。

20

【0069】

他の実施形態において、本開示のアプタマーライブラリーで合成されたアプタマーは、5'末端、3'末端、または内部に、任意の改変を含んでもよい。アプタマーの修飾としては、限定するものではないが、スペーサー、リン酸化、リンカー、結合化学、フルオロフォア、クエンチャー、光反応性修飾、及び修飾塩基（例えば、LNA、PNA、UNA、PS、メチル化、2-O-メチル、ハロゲン化、超強塩基、iso-dN、逆塩基、L-リボース、骨格としての他の糖）が挙げられる。

30

【0070】

いくつかの実施形態では、アプタマーライブラリーで合成されたアプタマーは、5'末端、3'末端、または内部で外部の非核酸分子に結合されてもよい。非核酸分子の非限定的な例としては、限定するものではないが、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、低分子薬、単糖類及び多糖類、脂質、抗体及び抗体断片、またはそれらの組み合わせが挙げられる。

【0071】

アプタマーライブラリーで合成されたアプタマーは、生物学的機能を有する任意のドメインを含んでもよい。本明細書に記載のアプタマーの生物学的機能の非限定的な例としては、限定するものではないが、RNA転写の鋳型としての機能、タンパク質への結合、認識、及び/またはタンパク質の活性調節、転写因子への結合、特殊化された核酸構造（例えば、Z-DNA、H-DNA、G-quadなど）、制限酵素の酵素基質としての作用、特定のエキソヌクラーゼ及びエンドヌクラーゼ、組換え部位、編集部位、またはsiRNAが挙げられる。一実施形態では、アプタマーライブラリーで合成されたアプタマーは、少なくとも1つのタンパク質の活性を調節する。別の実施形態では、アプタマーライブラリーで合成されたアプタマーは、少なくとも1つのタンパク質の活性を阻害する。さらに別の実施形態では、アプタマーライブラリーで合成されたアプタマーは、少なくとも1つのタンパク質の活性を阻害する。

40

【0072】

50

他の実施形態では、アプタマーライブラリーで合成されたアプタマーは、いくつかの公知の方法の1つによって構築された核酸ナノ構造への組み込みのための任意のドメインを含んでもよい (Shih et al, Nature 427: 618 - 621 (2004); Rothmund, Nature 440: 297 - 302 (2006); Zheng et al, Nature 461: 74 - 77 (2009); Dietz et al, Science 325: 725 - 730 (2009); Wei et al., Nature 485: 623 - 626 (2012); Ke et al, Science 338: 1177 - 1183 (2012); Douglas et al., Science 335: 831 - 834 (2012)、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる)。さらに他の実施形態では、本開示のアプタマーは、分子論理及び計算の機能を果たす任意のドメインを含んでもよい (Seelig et al., Science 314: 1585 - 1588 (2006); Macdonald et al., Nano Lett 6: 2598 - 2603 (2006); Qian et al., Nature 475: 368 - 372 (2011); Douglas et al., Science 335: 831 - 834 (2012); Amir et al., Nat Nanotechnol 9: 353 - 357 (2014)、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる)。

【0073】

いくつかの実施形態では、アプタマーライブラリーで合成されたアプタマーは、標的 (例えば、真核細胞または原核細胞、ウイルスまたはウイルス粒子、分子、組織、または生物全体、インビボまたはエキソビボ) に対して1回以上の負の選択サイクルを受ける。他の実施形態では、本開示のアプタマーは、標的 (例えば、真核細胞または原核細胞、ウイルスまたはウイルス粒子、分子、組織、または生物全体、インビボまたはエキソビボ) に対して1回以上の正の選択サイクルを受ける。

アプタマーライブラリーで合成されたアプタマーは、溶液中にあっても、固相 (例えば、表面、粒子、樹脂、基質など) に付着していてもよい。いくつかの実施形態では、アプタマーライブラリーで合成されたアプタマーは表面に付着している。一実施形態では、表面はフローセル表面である。

【0074】

固定されたアプタマークラスタ

特定の態様では、表面に固定された複数のアプタマークラスタ (例えば、本明細書で提供されるアプタマーライブラリー由来のアプタマーのクラスタ) にまたがって標的を含む試料を流すことにより、標的に結合するか及び/または調節するアプタマーを特定する方法が本明細書で提供される。特定の実施形態では、表面は任意の固体支持体であってもよい。いくつかの実施形態では、表面はフローセルの表面である。いくつかの実施形態において、表面はスライドまたはチップである (例えば、遺伝子チップの表面)。いくつかの実施形態では、表面はビーズ (例えば、常磁性ビーズ) である。

【0075】

特定の実施形態では、当技術分野で公知の任意の方法を使用して、表面上に固定されたアプタマークラスタを生成し得る。いくつかの実施形態では、アプタマークラスタは表面に直接プリントされる。例えば、いくつかの実施形態において、アプタマークラスタは、ガラススライド上に細いピンでプリントされるか、フォトリソグラフィを使用してプリントされるか、インクジェットプリントを使用してプリントされるか、または微小電極アレイ上の電気化学によってプリントされる。いくつかの実施形態では、少なくとも約 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 または 10^7 個の別個のアプタマークラスタが表面にプリントされる。いくつかの実施形態では、各々のアプタマークラスタは、少なくとも約 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、

70,000、80,000、90,000、または100,000個の同一のアプタマー分子を含む。有利なことに、マイクロアレイの直接プリントにより、既知の配列のアプタマーを表面の所定の位置に特異的に固定可能になり、その後の配列決定が不要になる場合がある。

【0076】

特定の実施形態では、表面に固定されたアプタマークラスターは、最初にアプタマー（例えば、本明細書に開示されたアプタマーライブラリーから）を表面に固定すること（例えば、各々のアプタマーが固定される位置はランダムである）により生成される。いくつかの実施形態では、少なくとも約 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 または 10^{10} 個の別個のアプタマーが表面上に固定される。アプタマーの固定化に続いて、局所増幅プロセス（例えば、ブリッジ増幅またはローリングサークル増幅）を実行して、それによって、元の固定されたアプタマーの固定化部位の近くに配置された各々の固定されたアプタマーのコピーのクラスターを生成する。特定の実施形態（例えば、ローリングサークル増幅が実施される実施形態）では、アプタマークラスターは、表面に直接固定されるのではなく、表面のナノピットまたは細孔に収容される。いくつかの態様において、増幅は、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、または100,000個の同一のアプタマー分子を含む各々のアプタマークラスターをもたらす。特定の実施形態では、次いで、各々のアプタマークラスターの配列を表面上のその位置に関連付けるために、アプタマークラスターを配列決定する（例えば、Illumina配列決定またはPolonator配列決定により）。存在する場合、一本鎖アプタマーのクラスターを生成するために、鎖のハイブリダイゼーションの影響を受けにくい（例えば、塩濃度及び/または温度による）条件下で、表面を洗浄することにより、相補鎖をアプタマークラスターから除去してもよい。次いで、表面（例えば、フローセル）は、本明細書で提供されるアプタマー特定方法で使用する準備が行われる。いくつかの実施形態において、固定されたアプタマークラスターは、1つの機器上で調製及び/または配列決定され、次いで、アプタマー特定のために別個の機器に移される。他の実施形態において、アプタマークラスターは、アプタマー特定に使用されるのと同じ機器で調製及び/または配列決定される。

【0077】

上記の方法のいくつかの実施形態において、アプタマーまたはアプタマークラスター（例えば、アプタマーライブラリー由来）は、アプタマーを表面の高さにするアダプターを含む（例えば、細孔を備えるフローセルのように表面が平坦でない場合）。一実施形態において、アプタマーまたはアプタマークラスターは、フローセル表面上の細孔の内側に固定され、アダプターを使用して、アプタマーを表面に結合させて、アプタマーを表面の高さにする。いくつかの実施形態において、アダプターは核酸アダプター（例えば、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100塩基長の配列）である。いくつかの実施形態において、アダプター配列に相補的な配列は、アプタマースクリーニングの前にアダプターにハイブリダイズされる。いくつかの実施形態では、アダプターは化学アダプター（例えば、アプタマーを表面に接続するポリマー）である。

【0078】

アプタマーライブラリースクリーニング

特定の態様では、本明細書で提供されるのは、標的に特異的に結合するか、及び/または調節する1つ以上のアプタマーを特定する方法であり、この方法は、一般的に以下を含む：(i) 表面に固定された複数のアプタマークラスターと標的とを接触させること；及び(ii) 標的に特異的に結合するか、及び/または調節する固定されたアプタマークラ

スターを特定すること。各々のアプタマークラスターの配列は表面上の特定の位置（例えば、本明細書で提供される方法に従って決定される）に関連付けられているため、その結合/変調に關与するアプタマーの配列が特定され、標的が結合するか、及び/または位置される位置が決定され得る。

【0079】

いくつかの実施形態では、標的は検出可能な標識で標識されるか、及び/または検出可能な標識を含む。この標的は、検出可能に直接（例えば、直接化学リンカーを介して）または間接的に（例えば、検出可能に標識された標的特異的抗体を使用して）標識され得る。標的が細胞である実施形態では、検出可能な標識が細胞によって内在化されるような条件下で、標的細胞を検出可能な標識とインキュベートすることにより、この標的細胞が標識され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアプタマースクリーニング方法を実施する前に、標的を検出可能に標識する。いくつかの実施形態において、標的は、本明細書で提供されるアプタマースクリーニング方法の実施中に標識される。いくつかの実施形態において、この標的は、アプタマークラスターに結合した後に標識される（例えば、結合した標的を検出可能に標識された抗体と接触させることにより）。いくつかの実施形態では、任意の検出可能な標識が使用され得る。検出可能な標識の例としては、限定するものではないが、蛍光部分、放射性部分、常磁性部分、発光部分及び/または比色部分が挙げられる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される標的は、蛍光部分に連結されるか、それを含むか、及び/またはそれによって結合される。蛍光部分の例としては、限定するものではないが、アロフィコシアニン、フルオレセイン、フィコエリトリン、ペリジニン-クロロフィルタンパク質複合体、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 635、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、EGFP、mPlum、mCherry、mOrange、mKO、EYFP、mCitrine、Venus、YPet、Emerald、Cerulean、及びCyPetが挙げられる。

10

20

30

【0080】

標的は、非分子標的であっても、または超分子標的であってもよい。本開示のアプタマーが結合及び/または調節し得る標的の非限定的な例としては、限定するものではないが、細胞、細菌、真菌、古細菌、原生動物、ウイルス、ビリオン粒子、合成及び自然発生の顕微鏡的粒子、及びリポソームが挙げられる。いくつかの実施形態では、フローセルに導入される標的は、生/天然である。他の実施形態において、フローセルに導入される標的は、任意の溶液に固定されている。

【0081】

いくつかの実施形態では、標的は細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は原核細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は細菌細胞である。細菌の非限定的な例としては、Aspergillus、Brugia、Candida、Chlamydia、Coccidia、Cryptococcus、Dirofilaria、Gonococcus、Histoplasma、Klebsiella、Legionella、Leishmania、Meningococci、Mycobacterium、Mycoplasma、Paramecium、Pertussis、Plasmodium、Pneumococcus、Pneumocystis、Pseudomonas、Rickettsia、Salmonella、Shigella、Staphylococcus、Streptococcus、Toxoplasma及びVibriocholeraeが挙げられる。例示的な種としては、Neisseria gonorrhoea、Mycobacterium tuberculosis、Candida albic

40

50

ans、*Candida tropicalis*、*Trichomonas vaginalis*、*Haemophilus vaginalis*、B群*Streptococcus* sp.、*Mycoplasma hominis*、*Hemophilus ducreyi*、*Granuloma inguinale*、*Lymphopathia venereum*、*Treponema pallidum*、*Brucella abortus*、*Brucella melitensis*、*Brucella suis*、*Brucella canis*、*Campylobacter fetus*、*Campylobacter fetus intestinalis*、*Leptospira pomona*、*Listeria monocytogenes*、*Brucella oviss*、*Chlamydia psittaci*、*Trichomonas foetus*、*Toxoplasma gondii*、*Escherichia coli*、*Actinobacillus equuli*、*Salmonella abortus ovis*、*Salmonella abortus equi*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Corynebacterium equi*、*Corynebacterium pyogenes*、*Actinobacillus seminis*、*Mycoplasma bovis genitalium*、*Aspergillus fumigatus*、*Absidia ramosa*、*Trypanosoma equiperdum*、*Babesia caballi*、*Clostridium tetani*、及び *Clostridium botulinum* が挙げられる。いくつかの実施形態では、細胞は真核細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は動物細胞（例えば、哺乳動物細胞）である。いくつかの実施形態では、細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ（例えば、雌ウシ、雄ウシ、バッファロー）、シカ、ヒツジ、ヤギ、ラマ、ニワトリ、ネコ、イヌ、フェレットまたは霊長類（例えば、マーモセット、アカゲザル）などの非ヒト動物に由来する。いくつかの実施形態では、細胞は、寄生虫細胞（例えば、マラリア細胞、リーシュマニア細胞、クリプトスポリジウム細胞またはアメーバ細胞）である。いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、*Paracoccidioides brasiliensis* などの真菌細胞である。

【0082】

いくつかの実施形態では、細胞はがん細胞（例えば、ヒトがん細胞）である。いくつかの実施形態では、細胞は、任意のがん性または前がん性腫瘍由来である。がん細胞の非限定的な例としては、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳房、結腸、食道、胃腸、歯肉、頭部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、首、卵巣、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌、または子宮由来のがん細胞が挙げられる。さらに、がんは具体的には以下の組織型のものであってもよいが、これらに限定されない：新生物、悪性、癌腫、がん、未分化、巨細胞及び紡錘細胞癌、小細胞癌、乳頭癌、扁平上皮癌、リンパ上皮癌、基底細胞癌、毛母癌、移行細胞癌、乳頭移行細胞癌、腺癌、ガストリノーマ、悪性、胆管癌、肝細胞癌、肝細胞癌と胆管癌の組み合わせ、小柱腺癌、腺様嚢胞癌、腺腫性ポリープの腺癌、腺癌、家族性大腸ポリポーシス、固形癌、カルチノイド腫瘍、悪性、分枝肺胞腺癌、乳頭腺癌、嫌色素性癌、好酸性癌、好酸性腺癌、好塩基性癌、明細胞腺癌、顆粒細胞癌、濾胞性腺癌、乳頭及び濾胞性腺癌、非被包性硬化癌、副腎皮質癌、子宮内膜癌、皮膚付属器癌、アポクリン腺癌、皮脂腺癌、耳垢腺癌、粘表皮癌、嚢胞腺癌、乳頭嚢胞腺癌、乳頭漿液性嚢胞腺癌、ムチン性嚢胞細胞癌、ムチン性腺癌、印環細胞癌、浸潤管癌、髓様癌、小葉癌、炎症性癌、ページェット病、乳腺、腺房細胞癌、腺扁平上皮癌、扁平上皮化生随伴腺癌、胸腺腫、悪性、卵巣間質腫瘍、悪性、莢膜腫、悪性、顆粒膜細胞腫瘍、悪性および芽球腫、悪性、セルトリ細胞癌、ライディッヒ細胞腫瘍、悪性、脂質細胞腫瘍、悪性、傍神経節腫、悪性、乳腺外傍神経節腫、悪性、褐色細胞腫、グロマン肉腫、悪性黒色腫、メラニン欠乏性黒色腫、表在拡大型黒色腫、悪性黒色腫巨大色素性母斑、類上皮細胞黒色腫、青母斑、悪性、肉腫、線維肉腫、線維性組織球腫、悪性、粘液肉腫、脂肪肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、胚性横紋筋肉腫、肺胞性横紋筋肉腫、肺胞横紋筋肉腫、間質肉腫、混合腫瘍、悪性、ミユラー混合腫瘍、腎

芽腫、肝芽腫、癌肉腫、間葉腫、悪性、ブレンナー腫瘍、悪性、葉状腫瘍、悪性、滑膜肉腫、中皮腫、悪性、芽細胞腫、胎児性癌、奇形腫、悪性、卵巢甲状腺腫、悪性、絨毛腫、中腎腫、悪性、血管肉腫、血管内皮腫、悪性、カボジ肉腫、血管周囲細胞腫、悪性、リンパ管肉腫、骨肉腫、傍皮質骨肉腫、軟骨肉腫、軟骨芽細胞腫、悪性、間葉性軟骨肉腫、骨の巨大細胞腫瘍、ユーイング肉腫、歯源性腫瘍、悪性、エナメル上皮歯牙肉腫、エナメル上皮腫、悪性、エナメル芽細胞性線維肉腫、松果体腫、悪性、脊索腫、神経膠腫、悪性、上衣細胞腫、星状細胞腫、原形質星細胞腫、線維性星状細胞腫、星状芽細胞腫、グリア芽細胞腫、乏突起細胞腫、乏突起膠腫、原始神経外胚葉、小脳肉腫、神経節芽細胞腫、神経芽腫、網膜芽腫、嗅神経原性腫瘍、髄膜腫、悪性、神経線維肉腫、神経鞘腫、悪性、顆粒細胞腫瘍、悪性、悪性リンパ腫、ホジキン病、ホジキンリンパ腫、傍肉芽腫、悪性リンパ腫、小リンパ球、悪性リンパ腫、大細胞、びまん性、悪性リンパ腫、濾胞、菌状息肉腫、その他の特定の非ホジキンリンパ腫、悪性組織球症、多発性骨髄腫、肥満細胞肉腫、免疫増殖性小腸疾患、白血病、リンパ性白血病、形質細胞白血病、赤白血病、リンパ肉腫細胞白血病、骨髄性白血病、好塩基球性白血病、好酸球性白血病、単球性白血病、肥満細胞性白血病、巨核球性白血病、骨髄肉腫、及びヘアリー細胞白血病。

10

【0083】

いくつかの実施形態では、標的はウイルスである。例えば、いくつかの実施形態では、ウイルスは、HIV、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、ヘルペスウイルス（例えば、HSV-1、HSV-2、CMV、HAV-6、VZV、エプスタインバーウイルス）、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、おたふく風邪ウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、ワクシニアウイルス、HTLV、デングウイルス、パピローマウイルス、軟属腫ウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、JCウイルス、またはエボラウイルスである。

20

【0084】

いくつかの実施形態では、標的はタンパク質である。特定の実施形態では、タンパク質標的がスクリーニングされる時、それらはビーズ（例えば、検出可能に標識されたビーズ）上に固定される。いくつかの実施形態では、タンパク質標的は、検出可能な部分に連結されている。標的タンパク質の非限定的な例としては、糖タンパク質IIb/IIa、TNF- α 、TNF受容体、CD52、IL-2R、B細胞活性化因子、VEGF、CD30、IL-1 α 、上皮成長因子受容体、CD38、RANKリガンド、補体タンパク質C5、CD11a、CD20、CTLA4、PD-1、PD-L1、PD-L2、CD3、アルファ-4インテグリン、IgE、RSV Fタンパク質、IL-6R、ErbbB2、IL-12、及びIL-23が挙げられる。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、がん関連抗原である。がん関連抗原の例としては、限定するものではないが、アジポフィリン、AIM-2、ALDH1A1、 α -アクチニン-4、 β -フェトプロテイン（「AFP」）、ALK、ANKRD30A、ARTC1、B-RAF、BAGE-1、BCLX(L)、BCR-ABL融合タンパク質b3a2、ベータカテニン、BIN2、BIRC7、CA-125、CA9、CALCA、がん胎児性抗原（「CEA」）、CALR、CASP-5、CASP-8、CCR5、CD19、CD20、CD22、CD27、CD274、CD30、CD33、CD38、CD40、CD44、CD45、CD52、CD56、CD79、Cdc27、CDK12、CDK4、CDKN2A、CEA、CLEC12A、CLPP、COA-1、CPSF、CSNK1A1、CTAG1、CTAG2、サイクリンD1、サイクリンA1、dek-can融合タンパク質、DKK1、EFTUD2、EGFR、EGFRバリエーションI1I、伸長因子2、ENAH（hMena）、Ep-CAM、EpCAM、EphA2、EphA3、上皮腫瘍抗原（「ETA」）、ERBB3、ERBB4、ETV6-AML1融合タンパク質、EZH2、FCRL3、FGF5、FLT3-ITD、FN1、FOLR1、G250/MN/CAIX、GAGE-1, 2, 8、GAGE-3, 4, 5, 6, 7、GAS7、グリピカン-3、GnTV、gp100/Pmel17、GPNMB、GM3、GPR112、IL

30

40

50

3RA、HAUS3、ヘブシン、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2 HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13Rアルファ2、腸内カルウボキシルエステラーゼ、K-ras、カリクレイン4、KIF20A、KIT、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、CCDC110としても公知のKMHN1、KRAS、LAGE-1、LDLR-フコシルトランスフェラーゼAS融合タンパク質、Lengsin、LGR5、LMP2、M-CSF、MAGE-A1、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-C1、MAGE-C2、リンゴ酸酵素、マンマグロピン-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、Melan-A/MART-1、Meloe、Midkine、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUC5AC、MUC16、ムチン、MUM-1、MUM-2、MUM-3、ミオシン、ミオシンクラスI、N-ras、NA88-A、ネオ-PAP(neo-PAP)、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、OX40、ポリペプチド、p53、PAP、PAX3、PAX5、PBF、PLAC1、PMEL、pml-RARアルファ融合タンパク質、多型上皮ムチン(「PEM」)、PPP1R3B、PRAME、PRDX5、PRLR、PSA、PSMA、PTPRK、RAB38/NY-MEL-1、RAGE-1、RBAF600、RET、RGS5、RhoC、RNF43、ROR1、RU2AS、SAGE、SART1、SART3、セセルニン1、SIRT2、SLAMF7、SLC39A6、SNRPD1 SOX10、Sp17、SPA17、SSX-2、SSX-4、STEAP1、STEAP2、スルビピン、SYT-SSX1または-SSX2融合タンパク質、TAG-1、TAG-2、テロメラーゼ、TERT、TGF-ベータRII、トンプソン-ヌーヴェル(Thompson-nouvelle)抗原、TMPRSS2、TNFRSF17、TPBG、TRAG-3、トリオースリン酸イソメラーゼ、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、チロシナーゼ、チロシナーゼ(「TYR」)、UPK3A、VEGF、VTCN1 WT1、及びXAGE-1b/GAGED2aが挙げられる。いくつかの実施形態では、標的タンパク質はネオ抗原(neo-antigen)である。

10

20

【0085】

いくつかの実施形態では、調節される細胞の特性は、細胞生存率、細胞増殖、遺伝子発現、細胞形態、細胞活性化、リン酸化、カルシウム動員、脱顆粒、細胞移動、及び/または細胞分化である。特定の実施形態では、標的は、標的に対する生物学的または化学的効果の検出を可能にする検出可能な標識に連結されるか、結合されるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、検出可能な標識とは蛍光色素である。蛍光色素の非限定的な例としては、限定するものではないが、カルシウム感受性色素、細胞トレーサー色素、親油性色素、細胞増殖色素、細胞周期色素、代謝産物感受性色素、pH感受性色素、膜電位感受性色素、ミトコンドリア膜電位感受性色素、及び酸化還元電位色素が挙げられる。一実施形態では、標的は、カルシウム感受性色素、細胞トレーサー色素、親油性色素、細胞増殖色素、細胞周期色素、代謝産物感受性色素、pH感受性色素、膜電位感受性色素、ミトコンドリア膜電位感受性色素、または酸化還元電位色素で標識される。

30

40

【0086】

特定の実施形態では、標的は、活性化関連マーカー、酸化ストレスレポーター、血管新生マーカー、アポトーシスマーカー、オートファジーマーカー、細胞生存マーカー、またはイオン濃度のマーカーで標識されている。さらに別の実施形態では、標的は、活性化関連マーカー、酸化ストレスレポーター、血管新生マーカー、アポトーシスマーカー、オートファジーマーカー、細胞生存マーカー、またはイオン濃度のマーカーで、標的へのアプタマーの曝露前に標識されている。

【0087】

いくつかの実施形態において、標的は、標的へのアプタマーの曝露後に標識される。一実施形態では、標的は、蛍光標識抗体、アネキシンV、抗体断片、及び人工抗体ベースの

50

構築物、融合タンパク質、糖、またはレクチンで標識されている。別の実施形態では、標的は、蛍光標識抗体、アネキシンV、抗体断片及び人工抗体ベースの構築物、融合タンパク質、糖、またはレクチンで、標的へのアプタマーの曝露の後に、標識される。

【0088】

いくつかの実施形態では、標的細胞は蛍光色素で標識されている。蛍光色素の非限定的な例としては、限定するものではないが、カルシウム感受性色素、細胞トレーサー色素、親油性色素、細胞増殖色素、細胞周期色素、代謝産物感受性色素、pH感受性色素、膜電位感受性色素、ミトコンドリア膜電位感受性色素、及び酸化還元電位色素が挙げられる。

【0089】

いくつかの実施形態では、標的細胞は、カルシウム感受性色素、細胞トレーサー色素、親油性色素、細胞増殖色素、細胞周期色素、代謝産物感受性色素、pH感受性色素、膜電位感受性色素、ミトコンドリア膜電位感受性色素、または酸化還元電位色素で標識されている。特定の実施形態では、標的細胞は、活性化関連マーカー、酸化ストレスレポーター、血管新生マーカー、アポトーシスマーカー、オートファジーマーカー、細胞生存マーカー、またはイオン濃度のマーカーで標識されている。さらに別の実施形態では、標的細胞は、活性化関連マーカー、酸化ストレスレポーター、血管新生マーカー、アポトーシスマーカー、オートファジーマーカー、細胞生存マーカー、またはイオン濃度のマーカーで、細胞へのアプタマーの曝露前に標識されている。いくつかの実施形態において、標的細胞は、標的へのアプタマーの曝露後に標識される。一実施形態では、標的細胞は、蛍光標識抗体またはその抗原結合断片、アネキシンV、蛍光標識融合タンパク質、蛍光標識糖、または蛍光標識レクチンで標識される。一実施形態において、標的細胞は、蛍光標識抗体またはその抗原結合断片、アネキシンV、蛍光標識融合タンパク質、蛍光標識糖、または蛍光標識レクチンで、細胞へのアプタマーの曝露後に標識される。

10

20

【0090】

表面上の検出可能なマーカーの位置は、例えば蛍光顕微鏡法を含む、当技術分野で公知の任意の方法を使用して決定され得る。

【0091】

図1は、本明細書で提供される方法の特定の実施形態を示す例示的なワークフローを提供する。このワークフローは、あたかもIllumina配列決定のように選択及び準備された最初のアプタマーライブラリー（例えば、本明細書で提供されるアプタマーライブラリー）から始まる。このライブラリーは、例えば、新しく合成されてもよく、または以前の選択プロセスの出力であってもよい。このプロセスには、1つ以上の正の選択サイクル、1つ以上の負の選択サイクル、または両方を、組み合わせ及び配列のいずれかで含み得る。

30

【0092】

準備されたライブラリーは、Illuminaフローセルのアダプターにマウントされる。ブリッジPCR増幅は、初期ライブラリーの各単一配列を、同じ配列の約100,000コピーのクラスターに変換する。次いで、このライブラリーはIllumina配列決定される。このプロセスにより、ライブラリーの各配列をフローセル表面の特定の座標セットにリンクするマップが作成される。

40

【0093】

合成による配列決定のプロセスで追加された、ライブラリー由来の鎖に相補的な鎖は、多数の方法のうちいずれか1つ（例えば、界面活性剤、変性剤など）によって除去される。次に、Illuminaのアダプター、及びPCRプライマーに相補的なオリゴヌクレオチド鎖をフローセルにボンピングし、アプタマー領域のみを一本鎖にする。RNAアプタマーがライブラリーの一部として合成される場合、転写は多くの方法（例えば、Ter結合Tusタンパク質、ピオチン結合ストレプトアビジンタンパク質）のいずれか1つによって開始及び停止される。

【0094】

表面上の全てのオリゴヌクレオチドが折り畳みプロトコールに従って折り畳まれて適切

50

な3D構造をとることができるように、フローセルの温度を上げた後、冷却する。この状態では、オリゴライブラリーは折りたたまれており、標的と係合する準備ができています。

【0095】

標的を含む溶液を、機器のハードウェアを使用してフローセルに流す。標的に対する生物学的または化学的効果を報告する目的で、フローセル/機器に導入する前に蛍光色素で標的を標識してもよい。標的を一定時間インキュベートして、効果を生じさせる。次に、生物学的または化学的効果（例えば、細胞の活性化、アポトーシスなど）を報告するための蛍光色素またはマーカーをフローセルにポンピングしてもよい（図1を参照）。

【0096】

影響を受ける標的（ヒット）を画像分析によって認識して、対応する配列を分析する。抽出された配列を、結合及び機能について個別に合成及び試験する。

10

【実施例】

【0097】

実施例1 - アプタマーライブラリーの準備

アプタマーライブラリーは、フローセルの表面に既に付着している鎖を補完するためにサンプル配列の側面にアダプターDNA配列の添付を含んだ、Illuminaのハイスループット配列決定プラットフォーム試料調製キットを使用して調製した。調製したライブラリーを、Illuminaフローセルの表面のアダプターにマウントした。

【0098】

アプタマーライブラリーの調製には、アダプターを取り付けるために2ステップの「テール」PCRプロセスを使用した。PCR反応ミックスには、表1に示す以下の成分を含んでいた。

20

【表1】

表1：

成分	量 (μ l)
Herculase II 融合DNAポリメラーゼ	0.5
緩衝液	10
Dntp (各10mM)	1.25
フォワードテールプライマー	1
リバーステールプライマー	1
upw	35.25
試料	1

30

【0099】

プライマーは、アダプターがサンプル配列に対して特定の方向を持つように設定した。これは、クラスター内のフォワードアプタマー配列を、1回の読み取りで保持するように行った。

40

【0100】

1回目のPCR反応で使用されるプライマーの配列：

TruSeq p7側スタブフォワードプライマー

GTCACATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTGATCCAGAGTGACGCAGCA [配列番号1]；及び

TruSeq p5側スタブリバースプライマー

CTCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACTAAGCCACCGTGTCACA [配列番号2]

最初の反応に使用されたPCRプログラムは、以下の表2に示されている。

【表 2】

表 2 :

ステップ	温度	時間 (秒)
1	95	180
2	95	30
3	56	10
4	72	10
5	ステップ 2 に戻す×3	
6	95	30
7	85	10
8	72	10
9	ステップ 6 に戻す×10	
10	4	永続

10

【0101】

最初の PCR 反応の生成物 (PCR 1) は、2 回目の PCR 反応の入力である。

【0102】

2 回目の PCR 反応で使用されるプライマーの配列 :

TruSeq p7 側開始

GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACATCTCGT
ATGCCG [配列番号 3] ; 及び

TruSeq p5 側開始

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACACTCTTTCC
CTACACGACG [配列番号 4] 。

20

【0103】

2 番目の反応に使用される PCR プログラムは、以下の表 3 に示されている :

【表 3】

表 3 :

ステップ	温度	時間
1	95	30
2	67	10
3	72	10
4	95	30
5	65	10
6	72	10
7	95	30
8	63	10
9	72	10
10	95	30
11	62	10
12	72	10
13	95	30
14	87	10
15	72	10
16	ステップ13に戻す×1	
17	95	30
18	85	10
19	72	10
20	ステップ17に戻す×7	
21	4	永続

10

20

30

【0104】

完成したライブラリーには、濃度のqbitチェックならびにライブラリーのサイズ及び副産物をチェックするためのタップステーション/フラグメントアナライザー（断片分析器）を含む品質管理を行った。クラスターの生成及び配列決定は、シーケンシングプラットフォーム及びIlluminaのプロトコルに従って実行した。配列決定プロセスの後、変性によりクラスターが一本鎖型で提供される。その後、アダプター及びプライマーがブロックされ、アプタマーは、それらの折り畳み緩衝液中で、その3Dの高次構造に折り畳まれる。

40

【0105】

クラスターの生成及び配列決定

ブリッジPCR増幅を使用して、初期ライブラリーの由来の各単一配列を、同じ配列の約100,000コピーのクラスターに変換した。その後、クラスターライブラリーを、Illumina配列決定した。このプロセスにより、ライブラリー由来の各配列をフローセル表面の特定の座標セットにリンクするマップが作成された。

【0106】

合成による配列決定のプロセスで追加されたライブラリーからの相補鎖を除去し、Illuminaアダプター及びPCRプライマーに相補的なオリゴヌクレオチド鎖を、フローセルにボンピングし、アプタマー領域のみを一本鎖にした。RNAアプタマーの場合、

50

転写は多数の方法 (Ter 結合 Tus タンパク質、またはピオチン結合ストレプトアビジンタンパク質など) のうちのいずれか 1 つによって開始及び停止された。

【0107】

フローセルの温度を上げてから冷却し、フローセルの表面上の全てのオリゴヌクレオチドが適切な折りたたみ緩衝液中で適切な 3D 高次構造をとるようにさせた。例えば、使用された 1 つの折りたたみ緩衝液レシピ (セルセックス紙) には、1 リットルの PBS、5 ml の 1 M $MgCl_2$ 、及び 4.5 g のグルコースを含んでいた。

【0108】

標的導入

標的 (例えば、細胞、細菌、粒子、ウイルス、タンパク質など) は、機械のハードウェアを使用して、使用される環境 (例えば、ヒト血清、PBS、lb) に応じて、所望の結合緩衝液でシステムに導入した。一般的な結合緩衝液レシピのオプションの 1 つは (セルセックス紙) : 1 リットルの PBS、5 ml の 1 M の $MgCl_2$ 、4.5 g のグルコース、100 mg の tRNA、及び 1 g の BSA である。標的は、フローセル / 機械への導入の前または後に標識され、特定の時間インキュベートされて効果が生じた。

10

【0109】

プラットフォームの励起源と発光フィルターに適合する種々のフルオロフォアを使用して、標的を標識してもよい。標識化は、標的で利用可能な任意の可能なドッキング部位を通じて行ってもよい。標識剤の例としては、限定するものではないが、DiI、抗HLA + 二次DyLight 650、抗HLA PE-Cy5、及びDyLight 650

20

【0110】

機能的アプタマーのスクリーニングでは、蛍光レポーターを使用して効果が視覚化され得る。例えば、フローセルへの7AADの導入を使用して、標的を標識して細胞死をスクリーニングしてもよく、また、アネキシンVフルオロフォアコンジュゲートを使用して、アポトーシスをスクリーニングするために標的を標識してもよい。レポーター剤、その濃度、インキュベーション時間、及び特定のレシピプロトコールは、特定のスクリーニング効果に従って調整する必要がある。

【0111】

初期ライブラリーを配列決定した後、標的細胞を導入し、機能性オリゴヌクレオチドクラスターを取得する代表的な方法

30

80 μ l の「取り込みミックス緩衝液 (Incorporation Mix Buffer)」を 250 μ l / 分の速度でフローセルにポンピングする。次に、温度を 55 に設定する。60 μ l の「取り込みミックス (Incorporation Mix)」を、250 μ l / 分の速度でフローセルにポンピングし、80 秒後に 10 μ l の「取り込みミックス」を 250 μ l / 分の速度でフローセルにポンピングする。211 秒後、温度を 22 に設定し、60 μ l の「取り込みミックス緩衝液」を 250 μ l / 分の速度でフローセルにポンピングする。次に、75 μ l の「スキャンミックス (Scan Mix)」を 250 μ l / 分の速度でフローセルにポンピングする。

【0112】

40

次に、この方法は、クラスターの平面に焦点を合わせ、顕微鏡とフローセルの平面を位置合わせするように調整する。100 μ l の「取り込みミックス緩衝液」を 250 μ l / 分の速度でフローセルにポンピングする。上記の組み込みステップを 99 回反復する。

【0113】

温度制御をオフにして、125 μ l の「Cleavage Buffer」を、250 μ l / 分の速度でフローセルにポンピングする。次に、温度を 55 に設定し、75 μ l の「Cleavage Mix」を 250 μ l / 分の速度でフローセルにポンピングする。80 秒後、25 μ l の「Cleavage Mix」を 250 μ l / 分の速度でフローセルにポンピングする。

さらに 80 秒後、25 μ l の「Cleavage Mix」を 250 μ l / 分の速度でフ

50

ローセルにポンピングする。80秒後、温度を22 に設定する。次いで、温度制御をオフにして、60 μ lの「取り込みミックス緩衝液」を250 μ l/分の速度でフローセルにポンピングする。次いで、各々の水チューブに残っている容積をチェックして、適切な送達を確認する。

【0114】

その後、変性が起こり、キャッピングが続く。変性ステップの場合、温度は120秒間20 に設定する。75 μ lの「洗浄緩衝液 (Wash Buffer)」をフローセルに60 μ l/分の速度でポンピングし、続いて75 μ lの「Denaturation Solution」を60 μ l/分の速度で、75 μ lの「洗浄緩衝液」を60 μ l/分の速度でポンピングする。

10

【0115】

キャッピングステップでは、75 μ lの「洗浄緩衝液」を60 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を120秒間85 に設定する。次に、80 μ lの「5'キャップ」を80 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を30秒間85 に設定する。10 μ lの「5'キャップ」を、13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を60秒間85 に設定する。10 μ lの「5'キャップ」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を90秒間85 に設定する。10 μ lの「5'キャップ」を、13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を120秒間85 に設定する。10 μ lの「5'キャップ」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を150秒間85 に設定する。

20

【0116】

10 μ lの「5'キャップ」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を180秒間85 に設定する。10 μ lの「5'キャップ」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を210秒間85 に設定する。10 μ lの「5'キャップ」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を240秒間85 に設定する。10 μ lの「5'キャップ」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を270秒間85 に設定する。75 μ lの「洗浄緩衝液」を60 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を120秒間85 に設定する。

【0117】

3'キャップの場合、80 μ lの「3'キャップ」を80 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を30秒間85 に設定する。10 μ lの「3'キャップ」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を60秒間85 に設定する。10 μ lの「3'キャップ」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を90秒間85 に設定する。10 μ lの「3'キャップ」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を120秒間85 に設定する。10 μ lの「3'キャップ」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を150秒間85 に設定する。10 μ lの「3'キャップ」を、13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を180秒間85 に設定する。10 μ lの「3'キャップ」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を210秒間85 に設定する。10 μ lの「3'キャップ」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を240秒間85 に設定する。

30

40

【0118】

10 μ lの「3'キャップ」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を270秒間85 に設定する。75 μ lの「洗浄緩衝液」を60 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を0 に設定する。200 μ lの「折り畳み緩衝液 (Folding Buffer) (冷却)」を250 μ l/分の速度で、続いて160 μ lの折り畳み緩衝液 (冷却)」を40 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を600秒間0 に設定する。

【0119】

その温度を120秒間37 に上げる。これに結合ステップが続く。

50

【0120】

結合ステップでは、80 μ lの「結合緩衝液 (Binding Buffer)」を250 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を37 に設定する。80 μ lの「標的 # 1」を100 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を300秒間37 に設定する。10 μ lの「標的 # 1」を、再び13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を300秒間37 に設定する。最後に、10 μ lの「標的 # 1」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングし、その温度を2700秒間37 に設定する。

【0121】

その後、3つの連続した取り込みステップ及び洗浄ステップを続けて、未結合の標的を除去し、これは、取り込み、80 μ lの「結合緩衝液」を13 μ l/分の速度でフローセルにポンピングすること、取り込み、80 μ lの「結合緩衝液」を80 μ l/分の速度でフローセルにポンピングすること、取り込み、80 μ lの「結合緩衝液」を200 μ l/分の速度でフローセルにポンピングすること、及び取り込みからなる。

10

【0122】

上記の変性、キャッピング、結合、取り込み、洗浄の各ステップは、配列決定と標的の導入が完了するまで繰り返される。次いで、種々の標的を追加して、アプタマーへの結合及び/または活性を評価する。

【0123】

図3は、フローセルに結合されたハナ (Hana) セルの動きの低速度撮影の画像を示している。その結果、セルは実際には表面自体ではなく表面自体に結合された配列によって結合されているため、自由に移動するが、その場所に限定されていることが示されている。

20

【0124】

実施例2 - 機能アプタマーの特定

本明細書で提供される方法の実施形態を使用して、新たに単離された(12時間)ヒトトリプルネガティブ乳癌細胞においてアポトーシスを誘導するアプタマーを特定した。

【0125】

本明細書に記載のアプタマーライブラリーをフローセル上に固定化し、Illumina機器でブリッジPCRを実施して、クラスター化ライブラリーを生成した。増幅プロセスの間、クラスター化ライブラリーは、フローセルが配列決定後に破壊されないように配列決定プロセスの最後にPBSを漂白試薬の代わりに使用したことを除いて、Illuminaのプロトコルに従って配列決定した。公知のプローブはライブラリーの0.1~1%を占めていたため、得られた配列決定マップを、後で生成される蛍光顕微鏡画像に合わせる事ができた。

30

【0126】

最終的なPBS洗浄後、フローセルを、温度制御機能を備えた蛍光顕微鏡にロードし、位相でクラスターを画像化してクラスターを見て、緑色の蛍光チャンネルで画像化してアポトーシス指標を見た。公知のプローブ配列の座標を使用して、顕微鏡で生成された画像を、シーケンサーによる配列決定プロセス中に生成された配列クラスターマップと整列させた。

40

【0127】

骨髄吸引液から新たに単離されたヒト乳癌細胞を、 10^6 細胞/mLの濃度で調製し、1%アルブミン及び1mMのMg²⁺を含むPBS中のフローセルチャンバー床で100ミクロン²あたり平均細胞密度が約1になるようにした。製造業者の指示に従って、標的細胞に緑色蛍光カスパーゼ3/7活性レポーター色素をロードして、洗浄した。シリンジポンプを使用して、細胞をフローセルにポンピングした。

【0128】

フローセルは、Phase及びGreenチャンネルのt=0で画像化し、次いで37度でインキュベートして、30分間隔で再度画像化した。標的細胞が機能的アプタマーに係

50

合している場合、アプタマー誘発アポトーシスを、緑色蛍光によって検出した。漸増するポンプ圧力下で細胞を同じ緩衝液で洗浄し、さらに画像化して、標的細胞に対してより高い親和性を有する機能的アプタマーを特定した。

【0129】

クラスター化されたアプタマーライブラリー分析は、標的特異的なアプタマー配列を特定するために同じ配列決定されたライブラリーを使用して、フローセルの異なるレーンのカウンター標的として末梢血単核細胞を使用して繰り返した。計算解析を実行して、標的またはカウンター標的細胞がアプタマークラスターに結合し、アポトーシスを受けた座標を変換して、標的細胞対カウンター標的細胞のアポトーシス機能を優先的に媒介するアプタマー配列を特定した。特定のドナーからの腫瘍細胞に対する標的選択的アポトーシスを特異的に媒介し得る1,000を超えるアプタマーが、ライブラリーから首尾よく特定された。

10

【0130】

実施例3 - Illuminaシーケンサーでの機能アプタマーの特定

本明細書で提供される方法の実施形態を使用して、新たに単離された(12時間)ヒト腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導するアプタマーを特定する。

【0131】

本明細書に記載のアプタマーライブラリーを、フローセル上に固定し、Illumina機器でブリッジPCRを実施して、クラスター化ライブラリーを生成した。増幅プロセス中、配列決定後にフローセルが破壊されないように、配列決定プロセスの最後にPBSを漂白試薬の代わりに使用したことを除いて、クラスター化されたライブラリーを、Illuminaのプロトコルに従って配列決定する。

20

【0132】

最終的なPBS洗浄後、クラスターを、Illumina Instrumentの緑色蛍光チャンネルで画像化して、アポトーシス指標を見る。骨髓吸引液から新たに単離されたヒト乳癌細胞を、 10^6 細胞/mLの濃度で調製し、1%アルブミン及び1mMの Mg^{2+} を含むPBSのフローセルチャンバー床で100ミクロン²あたり平均細胞密度が約1になるようにする。製造業者の指示に従って、標的細胞に緑色蛍光カスパーゼ3/7活性レポーター色素をロードして、洗浄する。セルは、Illumina機器を使用してフローセルにポンピングされる。

30

【0133】

フローセルの画像化中に、追加の配列決定サイクルを実行する。フローセル内の標的細胞の位置は、細胞特異的な蛍光シグナルの存在に基づいて決定される。アプタマー誘導アポトーシスは、1つ以上のアプタマークラスターに関連付けられたフローセル座標での蛍光シグナルの出現によって検出される。セルはいくつかのクラスターの「スポット」としてシーケンサーに表示される。アポトーシスを起こしている標的細胞は、活性レポーター色素の蛍光発光に基づいて特定される。

【0134】

クラスター化されたアプタマーライブラリー分析は、同じ配列決定されたライブラリーを使用してフローセルの異なるレーンでカウンター標的として非腫瘍細胞を使用して繰り返し、標的特異的なアプタマー配列を特定する。計算解析を実行して、標的またはカウンター標的細胞がアプタマークラスターに結合し、アポトーシスを受けた座標を変換して、標的細胞対カウンター標的細胞のアポトーシス機能を優先的に媒介するアプタマー配列を特定する。特定のドナーからの腫瘍細胞に対する標的選択的アポトーシスを特異的に媒介し得るアプタマーを、ライブラリーから特定する。

40

【0135】

参照による組み込み

本明細書で言及される全ての出版物、特許、及び特許出願は、各々の個々の出版物、特許、または特許出願が、参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されるかのように、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。矛盾する場合、本明細書の任意の

50

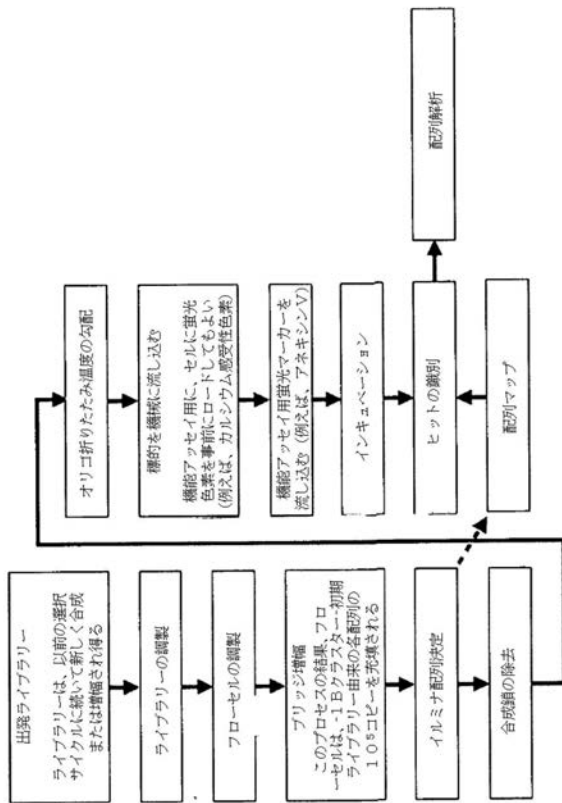
定義を含む本出願が支配する。

【0136】

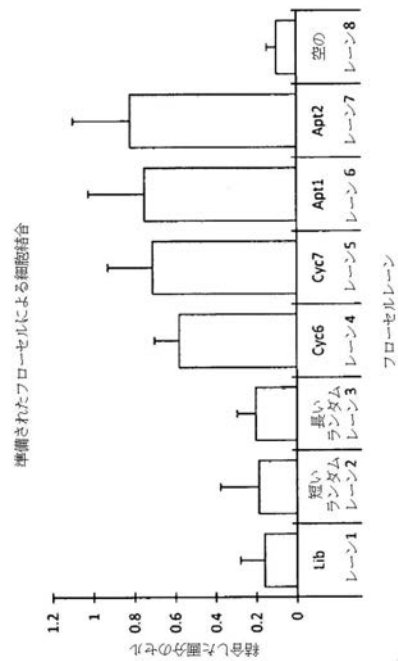
等価物

当業者は、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、または慣用的な実験以下を使用して確認することができるであろう。そのような等価物は、添付の特許請求の範囲に包含されることが意図されている。

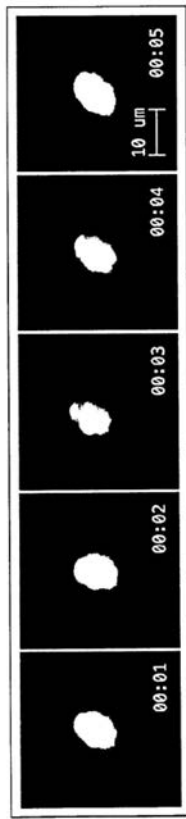
【図1】
【図1】



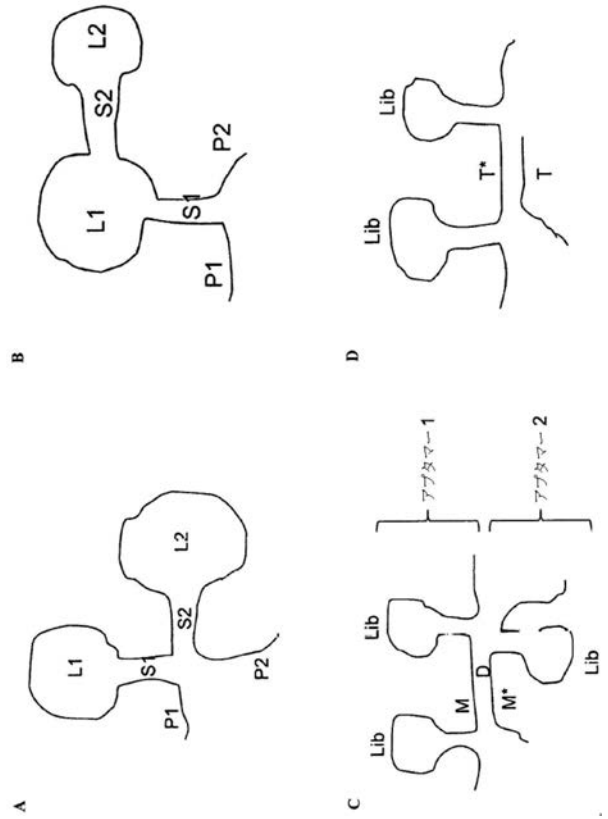
【図2】
【図2】



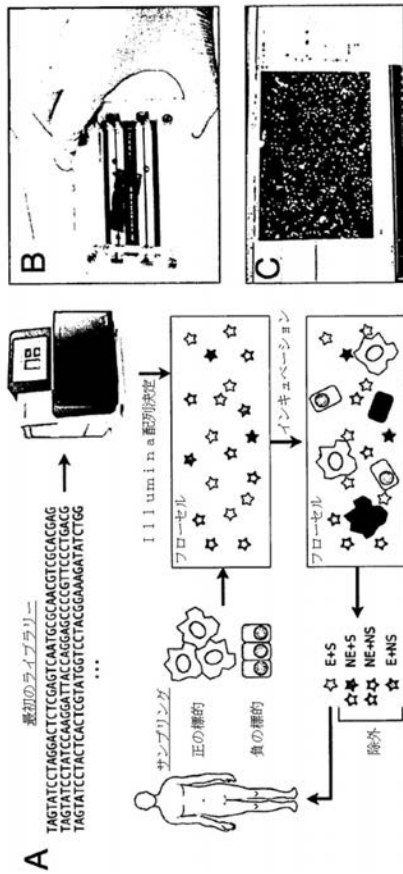
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2018/000418

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/115 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JASON D BUENROSTRO ET AL: "Quantitative analysis of RNA-protein interactions on a massively parallel array reveals biophysical and evolutionary landscapes", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 32, no. 6, 13 April 2014 (2014-04-13), pages 562-568, XP055504072, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2880 the whole document ----- -/--	1-5, 20-31, 33-40, 64,65, 70-97
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 29 November 2018		Date of mailing of the international search report 07/12/2018
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Spindler, Mark-Peter

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2018/000418

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JACOB M TOME ET AL: "Comprehensive analysis of RNA-protein interactions by high-throughput sequencing-RNA affinity profiling", NATURE METHODS, vol. 11, no. 6, 8 May 2014 (2014-05-08), pages 683-688, XP055504077, New York ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/nmeth.2970 the whole document -----	1-5, 20-31, 33-40, 64,65, 70-97
X	WO 03/070984 A1 (SOMALOGIC INC [US]; GOLD LARRY [US]; ZICHI DOMINIC A [US]; SMITH JONAT) 28 August 2003 (2003-08-28) page 17 - page 18; figures 14-16; examples 3, 8 -----	1-5,20, 64
X	WO 2009/151688 A2 (UNIV SYRACUSE [US]; BORER PHILIP N [US]; MCPIKE MARK P [US]) 17 December 2009 (2009-12-17) the whole document -----	1-5,20, 64-90
X	WO 2015/088455 A1 (NANOBIZ NANOBIYOTEKNOLOJIK SISTEMLER EGITIM BILISIM DANISMANLIK AR GE) 18 June 2015 (2015-06-18) page 9; claims 1, 10, 11, 19; figures 7-9 the whole document -----	1-14,64, 65,68-97
X	WO 2015/077441 A2 (UNIV FLORIDA [US]) 28 May 2015 (2015-05-28) page 12 - page 13; claims 1, 27, 31; example 1 the whole document -----	1-12,64
X	MCCAULEY T G ET AL: "Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 319, no. 2, 15 August 2003 (2003-08-15), pages 244-250, XP004437708, ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/S0003-2697(03)00297-5 the whole document -----	1-5,20, 64

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2018/000418

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEIAN SHENG ET AL: "Multivalent DNA Nanospheres for Enhanced Capture of Cancer Cells in Microfluidic Devices", ACS NANO, vol. 7, no. 8, 27 August 2013 (2013-08-27), pages 7067-7076, XP055234970, US ISSN: 1936-0851, DOI: 10.1021/nn4023747 the whole document	1-12,20, 64
X	JAN HOFFMANN ET AL: "Immobilized DNA aptamers used as potent attractors for porcine endothelial precursor cells", JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A, vol. 84A, no. 3, 16 July 2007 (2007-07-16), pages 614-621, XP055075888, ISSN: 1549-3296, DOI: 10.1002/jbm.a.31309 the whole document	1-12,20, 64
X	WO 2009/140326 A2 (UNIV LOUISIANA STATE [US]; SOPER STEVEN A [US]; MURPHY MICHAEL C [US];) 19 November 2009 (2009-11-19) the whole document	1-12,20, 64
X	COLLETT J R ET AL: "Functional RNA microarrays for high-throughput screening of antiprotein aptamers", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 338, no. 1, 16 December 2004 (2004-12-16), pages 113-123, XP004747522, ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/J.AB.2004.11.027 the whole document	1-5,20, 64-90
X	MINSEON CHO ET AL: "Array-based Discovery of Aptamer Pairs", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 87, no. 1, 11 December 2014 (2014-12-11), pages 821-828, XP055449381, US ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac504076k the whole document	1-5,20, 21, 25-30, 32-40, 64-90
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2018/000418

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI YUAN ET AL: "Fabrication and characterization of RNA aptamer microarrays for the study of protein-aptamer interactions with SPR imaging", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, INFORMATION RETRIEVAL LTD, vol. 34, no. 22, 27 November 2006 (2006-11-27), pages 6416-6424, XP002571829, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/NAR/GKL738 [retrieved on 2006-11-27] the whole document	1-5,20, 64-90
X	WO 2005/037053 A2 (UNIV TEXAS [US]; GORENSTEIN DAVID G [US]; LUXON BRUCE A [US]; BARRETT) 28 April 2005 (2005-04-28) page 40 - page 41; claims 1, 2, 6, 7, 9-12, 33 the whole document	21, 27-29, 32-40, 64-90
X	WO 2016/025804 A1 (MEDIMMUNE LLC [US]; UNIV CALIFORNIA [US]) 18 February 2016 (2016-02-18) the whole document	21,25, 27-29, 31-40, 64-69, 76-90
X	WO 2014/088830 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]) 12 June 2014 (2014-06-12) paragraphs [0031], [0086]; claims 84, 85, 87, 112, 118, 120; figure 2; examples 1-3 the whole document	21,28, 29, 31-40, 64-89
X A	WO 2010/023327 A2 (CONSIGLIO NAZIONALE RICERCHE [IT]; DE FRANCISCIS VITTORIO [IT]; CERCHI) 4 March 2010 (2010-03-04) the whole document	41, 45-49, 51-64 1-40, 42-44, 50,65-97
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2018/000418

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	O. S. KOLOVSKAYA ET AL: "DNA-aptamer/protein interaction as a cause of apoptosis and arrest of proliferation in Ehrlich ascites adenocarcinoma cells", BIOCHEMISTRY (MOSCOW) SUPPLEMENT SERIES A: MEMBRANE AND CELL BIOLOGY, vol. 8, no. 1, 1 January 2014 (2014-01-01) , pages 60-72, XP055504175, Moscow ISSN: 1990-7478, DOI: 10.1134/S1990747813050061	41, 45-49, 51-64
A	the whole document	1-40, 42-44, 50,65-97
X	----- WO 00/70329 A1 (UNIV BRANDEIS [US]; STANTON MARTIN [US]; WENSINK PIETER [US]; STEWART) 23 November 2000 (2000-11-23) claims 11-28; figures 1-10 the whole document	64-69, 76-90
X	----- KIRBY R ET AL: "APTAMER-BASED SENSOR ARRAYS FOR THE DETECTION AND QUANTITATION OF PROTEINS", ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 76, no. 14, 15 July 2004 (2004-07-15) , pages 4066-4075, XP001209816, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/AC049858N the whole document	64-69, 76-90
X	----- WO 2011/050000 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; MESSMER BRADLEY T [US]) 28 April 2011 (2011-04-28) figures 4, 5, 29; examples 1-4 the whole document	64-89
A	----- OKOCHI M ET AL: "High-throughput screening of cell death inducible short peptides from TNF-related apoptosis-inducing ligand sequence", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 580, no. 3, 6 February 2006 (2006-02-06), pages 885-889, XP028030434, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/J.FEBSLET.2006.01.010 [retrieved on 2006-02-06] the whole document	41-64

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2018/000418

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date				
WO 03070984	A1	28-08-2003	AU 2003217379 A1	09-09-2003			
			CA 2476309 A1	28-08-2003			
			EP 1481090 A1	01-12-2004			
			JP 2005517456 A	16-06-2005			
			US 2006057573 A1	16-03-2006			
			US 2008160535 A1	03-07-2008			
			WO 03070984 A1	28-08-2003			

WO 2009151688	A2	17-12-2009	AU 2009258033 A1	17-12-2009			
			CA 2718337 A1	17-12-2009			
			CN 102066562 A	18-05-2011			
			EP 2260103 A2	15-12-2010			
			US 2011263459 A1	27-10-2011			
			WO 2009151688 A2	17-12-2009			

WO 2015088455	A1	18-06-2015	EP 3080272 A1	19-10-2016			
			US 2016299136 A1	13-10-2016			
			WO 2015088455 A1	18-06-2015			

WO 2015077441	A2	28-05-2015	US 2016291023 A1	06-10-2016			
			WO 2015077441 A2	28-05-2015			

WO 2009140326	A2	19-11-2009	EP 2291509 A2	09-03-2011			
			US 2012100521 A1	26-04-2012			
			US 2018252698 A1	06-09-2018			
			WO 2009140326 A2	19-11-2009			

WO 2005037053	A2	28-04-2005	CA 2526691 A1	28-04-2005			
			EP 1635693 A2	22-03-2006			
			US 2006121489 A1	08-06-2006			
			WO 2005037053 A2	28-04-2005			

WO 2016025804	A1	18-02-2016	EP 3180463 A1	21-06-2017			
			JP 2017525390 A	07-09-2017			
			US 2017274734 A1	28-09-2017			
			WO 2016025804 A1	18-02-2016			

WO 2014088830	A2	12-06-2014	EP 2931948 A2	21-10-2015			
			US 2016130575 A1	12-05-2016			
			WO 2014088830 A2	12-06-2014			

WO 2010023327	A2	04-03-2010	AU 2009286624 A1	04-03-2010			
			CA 2735776 A1	04-03-2010			
			EP 2159286 A1	03-03-2010			
			EP 2329022 A2	08-06-2011			
			US 2011166213 A1	07-07-2011			
			WO 2010023327 A2	04-03-2010			

WO 0070329	A1	23-11-2000	AU 775563 B2	05-08-2004			
			AU 2004210601 A1	07-10-2004			
			CA 2373314 A1	23-11-2000			
			EP 1183521 A1	06-03-2002			
			ES 2459745 T3	12-05-2014			
			JP 4949560 B2	13-06-2012			
			JP 2003508729 A	04-03-2003			
			WO 0070329 A1	23-11-2000			

			WO 2011050000	A2	28-04-2011	EP 2491123 A2	29-08-2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2018/000418

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2012263783 A1	18-10-2012
		US 2015166997 A1	18-06-2015
		WO 2011050000 A2	28-04-2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/IB2018/000418**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/IB2018/000418

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-20

flow cell comprising a flow chamber, wherein a plurality of aptamer clusters are immobilized to a solid surface within the flow chamber

2. claims: 21-40(completely); 64(partially)

method for identifying one or more aptamers that specifically bind to a target, the method comprising: (i) contacting a plurality of aptamer clusters immobilized on a surface with the target; and (ii) identifying the immobilized aptamer clusters that specifically bind to the target; aptamer identified according to the method of any one of claims 21-40

3. claims: 41-63(completely); 64(partially)

method for identifying one or more aptamers that modulate a property of a cell, the method comprising: (i) contacting a plurality of aptamer clusters immobilized on a surface with the cell; and (ii) identifying the immobilized aptamer clusters that modulate the property of the cell.; aptamer identified according to the method of any one of claims 41 to 63

4. claims: 65-97

composition comprising a plurality of aptamer clusters, a target, and a fluorescent reporter

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/6837 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6837	Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	2 0 0
C 1 2 Q 1/6811 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6811	Z
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	Z
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	A
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 N 9/12 (2006.01)	C 1 2 N 9/00	
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/12	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 N 9/16	A
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	C 1 2 N 9/16	Z
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	G
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	G 0 1 N 33/543	5 7 5
	G 0 1 N 37/00	1 0 1
	G 0 1 N 21/64	F
	C 1 2 Q 1/686	Z

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 パチェレット, イドール
イスラエル国 6 8 0 2 0 0 6 テル アビブ, シモン ベン シャタック ストリート 6 エ

(72)発明者 マメット, ナオム
イスラエル国 7 6 7 0 3 2 2 レホボト, ハマダ ストリート 8

(72)発明者 ルシネク, イタイ
イスラエル国 7 6 7 0 3 2 2 レホボト, ハマダ ストリート 8

(72)発明者 ハラリ, ギル
イスラエル国 7 6 7 0 3 2 2 レホボト, ハマダ ストリート 8

(72)発明者 シャピロ, アナスタシア
イスラエル国 7 6 7 0 3 2 2 レホボト, ハマダ ストリート 8

(72)発明者 アミール, ヤニブ
イスラエル国 7 6 7 0 3 2 2 レホボト, ハマダ ストリート 8

(72)発明者 ラヴィ, エレッツ
イスラエル国 7 6 7 0 3 2 2 レホボト, ハマダ ストリート 8

(72)発明者 アブ - ホロウィッツ, アルモジット
イスラエル国 ヘルツリーヤ, イツハク サデー 2 5

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA04 DA02 DA05 DA08 EA01 FA01 FA02 JA02
JA03 LA03 NA01 NA05
4B029 AA07 AA23 BB11 BB20 CC03 CC08 FA12 GB04 GB06
4B050 DD02 LL03

4B063 QA13 QA18 QQ08 QQ42 QR32 QR55 QR62 QR77 QR82 QS25
QS32 QS39 QX02

专利名称(译)	选择功能性寡核苷酸的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2020515271A	公开(公告)日	2020-05-28
申请号	JP2019553852	申请日	2018-03-30
发明人	バチエレット, イドー マメット, ナオム ルシネク, イタイ ハラリ, ギル シャピロ, アナスタシア アミール, ヤニブ ラヴィ, エレッツ アブ-ホロウィッツ, アルモジット		
IPC分类号	C12N15/115 C12M1/00 C40B40/06 C12Q1/6869 C12Q1/02 C12Q1/6837 C12N15/09 C12Q1/6811 C12M1/34 C12Q1/70 C12N9/00 C12N9/12 C12N9/16 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/543 G01N37/00 G01N21/64 C12Q1/686		
CPC分类号	C12N15/115 C12N2310/16 C12N2320/13 B01L3/5027 C12N15/1048 C12Q1/6811		
FI分类号	C12N15/115.Z C12M1/00.A C40B40/06 C12Q1/6869.Z C12Q1/02 C12Q1/6837.Z C12N15/09.200 C12Q1/6811.Z C12M1/34.Z C12M1/34.A C12Q1/70 C12N9/00 C12N9/12 C12N9/16.A C12N9/16.Z G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/569.G G01N33/543.575 G01N37/00.101 G01N21/64.F C12Q1/686.Z		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/DA02 2G043/DA05 2G043/DA08 2G043/EA01 2G043/FA01 2G043/FA02 2G043/JA02 2G043/JA03 2G043/LA03 2G043/NA01 2G043/NA05 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB11 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/GB04 4B029/GB06 4B050/DD02 4B050/LL03 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	夏木森下 飯田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
優先権	62/478993 2017-03-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本公开描述了用于快速选择结合和功能寡核苷酸 (DNA, RNA或其任何天然或合成类似物) 的组合物和方法。在某些实施方案中, 本文提供了流动室内以及任选地一个或多个内的多个固定的适体簇 (例如, 来自本文所述的适体文库)。包含靶细胞 (例如癌细胞, 免疫细胞等) 和/或细胞功能可检测指标 (例如荧光指标例如凋亡, 细胞增殖, 基因或蛋白质表达) 的流通池 (例如Illumina测序)。仪器或Polonator测序设备的流通池)。在某些实施方案中, 本文提供了使用包含此类适体簇的流动池 (例如, Illumina测序仪等) 从适体文库中鉴定功能性适体的方法。在音器上)。[选择图]无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公表特許公報 (A)	(11) 特許出願公表番号 特表2020-515271 (P2020-515271A) 令和2年5月28日 (2020.5.28)
(43) 公表日	(49) 公表日	
(5) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考)
C12N 15/115 (2010.01)	C12N 15/115	Z 2G043
C12M 1/00 (2006.01)	C12M 1/00	A 4B029
C40B 40/06 (2006.01)	C40B 40/06	4B050
C12Q 1/6869 (2018.01)	C12Q 1/6869	Z 4B063
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 48 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2019-553852 (P2019-553852)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成30年3月30日 (2018.3.30)	519282283
(83) 翻訳文提出日	令和1年10月29日 (2019.10.29)	オーグマニティ ナノ リミテッド
(88) 国際出願番号	PCT/182018/000418	イスラエル国、7670308 レホヴォト、ハマダ 8、ロットマン ビルディング
(87) 国際公開番号	W02018/178770	
(87) 国際公開日	平成30年10月4日 (2018.10.4)	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	62/478,993	弁理士 山本 秀敏
(32) 優先日	平成29年3月30日 (2017.3.30)	弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	弁理士 坂田 貴敏
		弁理士 石川 大輔
		弁理士 山本 健作
		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 機能性オリゴヌクレオチドの選択のための方法及び組成物