

(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2005-517456
(P2005-517456A)

(43) 公表日 平成17年6月16日(2005.6.16)

(51) Int.Cl.⁷

C12N 15/09
C12Q 1/25
C12Q 1/28
C12Q 1/42
C12Q 1/68

F 1

C 12 N 15/00
C 12 Q 1/25
C 12 Q 1/28
C 12 Q 1/42
C 12 Q 1/68

A

テーマコード(参考)

2 G 05 4
4 B 02 4
4 B 02 9
4 B 06 3

C 12 Q Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-569875 (P2003-569875)
(86) (22) 出願日 平成15年2月10日 (2003.2.10)
(85) 翻訳文提出日 平成16年9月10日 (2004.9.10)
(86) 國際出願番号 PCT/US2003/004142
(87) 國際公開番号 WO2003/070984
(87) 國際公開日 平成15年8月28日 (2003.8.28)
(31) 優先権主張番号 60/357,297
(32) 優先日 平成14年2月15日 (2002.2.15)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 10/114,187
(32) 優先日 平成14年4月1日 (2002.4.1)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/398,666
(32) 優先日 平成14年7月26日 (2002.7.26)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 501192222
ソマロジック・インコーポレーテッド
S o m a L o g i c , I n c .
アメリカ合衆国コロラド州80301, ボ
ールダー, サーティエイス・ストリート
1775
1775 38th Street, Bo
ulder, Colorado 8030
1, United States of
America
(74) 代理人 100089705
弁理士 松本 一夫
(74) 代理人 100076691
弁理士 増井 忠式

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】核酸リガンドによる標的結合を検出する方法および試薬

(57) 【要約】

本発明は、核酸リガンドへのタンパク質標的の結合を検出する新規方法および試薬を提供する。普遍的タンパク質染色剤(UPS)を用いると、核酸リガンドが結合したタンパク質を検出可能部分で標識することが可能である。該方法および試薬は、核酸リガンドの多重化アレイに結合したタンパク質標的の検出には特に有用である。本発明はまた、光架橋核酸リガンドを多重評価する新規方法も提供する。該方法は：(1)複数の光架橋核酸リガンドの性能(ダイナミックレンジ)を評価し；そして(2)同族標的タンパク質に対する各光架橋核酸リガンドの特異性を評価することを同時に可能にする。その後、診断および予後の医学的アッセイに使用するため、最も望ましい特性を持つ光架橋核酸リガンドを選択することが可能である。本発明はまた、H I V g p 1 2 0 M N に特異的に結合する光架橋核酸リガンドも提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試験混合物に含有されると推測される標的分子の存在を検出する方法であって、前記標的分子がタンパク質であり、該方法が；

a) 固体支持体を提供し、ここで前記固体支持体は前記標的タンパク質に特異的な親和性を有する光反応性核酸リガンドを含んでなり、前記光反応性核酸リガンドは非ワトソン-クリック相互作用を通じて前記標的分子に特異的に結合する；

b) 前記標的分子を含有していると推測される前記試験混合物と前記固体支持体を接触させ、ここで前記標的分子が存在しているならば、核酸リガンド-標的分子複合体が形成される；

c) 前記固体支持体に光照射し、ここで前記核酸リガンド-標的分子複合体が光架橋される；

d) 前記固体支持体から、非特異的に結合した物質を取り除き；

e) 前記固体支持体と普遍的タンパク質染色剤(UPS)を接触させ、ここで前記UPSは検出可能部分でタンパク質を標識する1以上の試薬を含んでなる；そして

f) 前記固体支持体上の前記検出可能部分の存在を検出することによって、前記標的分子の存在を検出する

ことを含んでなる、前記方法。

【請求項 2】

前記工程d)が、前記バイオチップを、核酸を変性させる条件に曝露することによって達成される、請求項1の方法。

【請求項 3】

工程d)が、前記バイオチップを、タンパク質を変性させる条件に曝露することによって達成される、請求項1の方法。

【請求項 4】

前記検出可能部分が色素(dye)である、請求項1の方法。

【請求項 5】

前記色素が蛍光体である、請求項4の方法。

【請求項 6】

前記検出可能部分が酵素である、請求項1の方法。

【請求項 7】

前記酵素がアルカリホスファターゼである、請求項6の方法。

【請求項 8】

前記酵素が西洋ワサビ(horseradish)ペルオキシダーゼである、請求項6の方法。

【請求項 9】

前記検出可能部分が酵素基質である、請求項1の方法。

【請求項 10】

前記検出可能部分が放射標識である、請求項1の方法。

【請求項 11】

前記UPS試薬の少なくとも1つが第一級アミンと反応する、請求項1の方法。

【請求項 12】

第一級アミンがリジン残基上に存在する、請求項11の方法。

【請求項 13】

前記UPS試薬の少なくとも1つと前記第一級アミンとの反応が、有機溶媒の存在下で起こる、請求項11の方法。

【請求項 14】

前記UPS試薬の少なくとも1つがチオールと反応する、請求項1の方法。

【請求項 15】

前記UPS試薬の少なくとも1つがアルコールと反応する、請求項1の方法。

【請求項 16】

前記 U P S 試薬の少なくとも 1 つがカルボキシレートと反応する、請求項 1 の方法。

【請求項 17】

前記 U P S が N - ヒドロキシスクシンイミドに活性化される色素を含んでなる、請求項 1 の方法。

【請求項 18】

前記 U P S が N - ヒドロキシスクシンイミドに活性化される蛍光体を含んでなる、請求項 17 の方法。

【請求項 19】

前記 U P S が C B Q C A (3 - (4 - カルボキシベンゾイル) キノリン - 2 - カルボキシアルデヒド) を含んでなる、請求項 1 の方法。 10

【請求項 20】

前記 U P S が、イソシアネート、イソチオシアネート、アジ化アシル、塩化スルホニル、アルデヒド、4 - スルホ - 2 , 3 , 5 , 6 - テトラフルオロフェノール (S T P) エステル、N B D (7 - ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジアゾール) クロリド、N B D フルオリド、およびジクロロトリアジンからなるリストから選択されるアミン反応基を所持する試薬を含んでなる、請求項 1 の方法。

【請求項 21】

前記 U P S が :

- a) 第一級アミンと反応可能なビオチン誘導体 ; および
- b) 前記検出可能部分にコンジュゲート化されたストレプトアビジンを含んでなる、請求項 1 の方法。 20

【請求項 22】

前記 U P S が :

- a) 第一級アミンと反応可能な第一のビオチン誘導体 ;
- b) ストレプトアビジン ; および
- c) 前記検出可能部分にコンジュゲート化された第二のビオチン誘導体を含んでなる、請求項 1 の方法。 30

【請求項 23】

前記 U P S が :

- a) 2 - イミノチオレーン ; および
 - b) 色素のチオール反応性誘導体
- を含んでなる、請求項 1 の方法。

【請求項 24】

前記色素の前記チオール反応性誘導体がマレイミド基を含んでなる、請求項 23 の方法。

【請求項 25】

前記 U P S が :

- a) 第一級アミンと反応可能なハプテン誘導体 ; および
 - b) 前記検出可能部分にコンジュゲート化された抗ハプテン抗体
- を含んでなる、請求項 1 の方法。 40

【請求項 26】

前記 U P S が :

- a) 第一級アミンと反応可能なハプテン誘導体 ;
 - b) 抗ハプテン抗体 ; および
 - c) 前記検出可能部分にコンジュゲート化された二次抗体、ここで前記の二次抗体は前記抗ハプテン抗体に結合する
- を含んでなる、請求項 1 の方法。

【請求項 27】

前記 U P S が :

50

a) アミノ酸側鎖を修飾する試薬；
 b) 前記の修飾されたアミノ酸側鎖を特異的に認識する抗体を含んでなる、請求項 1 の方法。

【請求項 28】

前記抗体が前記検出可能部分にコンジュゲート化されている、請求項 27 の方法。

【請求項 29】

アミノ酸側鎖を修飾する前記試薬がニトロシル化 (nitrosylation) 効果であり、そして前記抗体が抗ニトロチロシン抗体である、請求項 27 の方法。

【請求項 30】

前記ニトロシル化効果がテトラニトロメタンである、請求項 29 の方法。

10

【請求項 31】

アミノ酸側鎖を修飾する前記試薬がスルホ - N - ヒドロキシスクシンイミドアセテートであり、そして前記抗体が抗アセチル化リジン抗体である、請求項 27 の方法。

【請求項 32】

試験混合物に含有されると推測される標的分子の存在を検出する方法であって、検出しようとする前記標的分子がタンパク質であり、該方法が；

a) 固体支持体を含んでなるバイオチップを提供し、ここで前記固体支持体は複数の空間的に定義されたアドレスを含んでなり、前記アドレスは各々、それに付着した單一種の核酸リガンドを少なくとも 1 コピー含んでなり、前記種の核酸リガンドは各々、前記試験混合物に含有されると推測される前記標的分子の 1 つに特異的な親和性を有し、そして前記種の核酸リガンドは各々、非ワトソン - クリック相互作用を通じて前記標的分子に特異的に結合する；

20

b) 前記標的分子を含有していると推測される前記試験混合物と前記バイオチップを接触させ；

c) 前記バイオチップから、非特異的に結合した物質を取り除き；

d) 前記固体支持体と普遍的タンパク質染色剤 (UPPS) を接触させ、ここで前記 UPPS は検出可能部分でタンパク質を標識する 1 以上の試薬を含んでなる；そして

e) 前記バイオチップ上の適切なアドレスで、前記検出可能部分の存在を検出することによって、前記標的分子の存在を検出する

30

ことを含んでなる、前記方法。

【請求項 33】

試験混合物に含有されると推測される標的分子の存在を検出する方法であって、前記標的分子がタンパク質であり、該方法が；

a) 固体支持体を提供し、ここで前記固体支持体は前記標的タンパク質に特異的な親和性を有する核酸リガンドを含んでなり、前記核酸リガンドは非ワトソン - クリック相互作用を通じて前記標的分子に特異的に結合する；

b) 前記標的分子を含有していると推測される前記試験混合物と前記固体支持体を接触させ；

c) 前記固体支持体から、非特異的に結合した物質を取り除き；

d) 前記固体支持体と普遍的タンパク質染色剤 (UPPS) を接触させ、ここで前記 UPPS は検出可能部分でタンパク質を標識する 1 以上の試薬を含んでなる；そして

40

e) 前記バイオチップ上の適切なアドレスで、前記検出可能部分の存在を検出することによって、前記標的分子の存在を検出する
 ことを含んでなる、前記方法。

【請求項 34】

試験混合物に含有されると推測される標的分子の存在を検出する方法であって、検出しようとする前記標的分子がタンパク質であり、該方法が；

a) 固体支持体を含んでなるバイオチップを提供し、ここで前記固体支持体は複数の空間的に定義されたアドレスを含んでなり、前記アドレスは各々、それに付着した單一種の核酸リガンドを少なくとも 1 コピー含んでなり、前記種の核酸リガンドは各々、前記試験

50

混合物に含有されると推測される前記標的分子の1つに特異的な親和性を有し、前記種の核酸リガンドは各々、非ワトソン-クリック相互作用を通じて前記標的分子に特異的に結合し、そして検出しようとする前記標的分子に特異的な親和性を有する前記核酸リガンドは光反応性核酸リガンドである；

b) 前記標的分子を含有していると推測される前記試験混合物と前記バイオチップを接触させ、ここで前記標的分子が存在しているならば、核酸リガンド-標的分子複合体が形成される；

c) 前記バイオチップに光照射し、ここで前記核酸リガンド-標的分子複合体が光架橋される；

d) 前記バイオチップから、非特異的に結合した物質を取り除き；

10

e) タンパク質と共に反応し、そして核酸とは反応しない試薬と、前記バイオチップを接触させ；そして

f) 前記バイオチップ上の適切なアドレスで、前記検出可能部分の存在を検出することによって、前記標的分子の存在を検出することを含んでなる、前記方法。

【請求項 3 5】

固体支持体に付着した複数の核酸リガンドのアレイを含んでなるバイオチップであって、複数の前記核酸リガンドが非ワトソン-クリック相互作用を通じて標的分子と特異的に会合し、そして前記標的分子が検出可能部分で標識される、前記バイオチップ。

20

【請求項 3 6】

核酸リガンドを固体支持体に付着させる方法であって：

a) 前記核酸リガンドをポリ(エチレングリコール)(PEG)で誘導体化し；

b) 前記固体支持体に前記PEGを付着させることを含んでなる、前記方法。

20

【請求項 3 7】

前記PEGがビニルスルホン-PEGであり、そして前記固体支持体がチオール基を含んでなる、請求項36の方法。

【請求項 3 8】

複数種の光架橋核酸リガンドの用量-反応特性を同時に測定する方法であって、光架橋核酸リガンドの前記種が各々、同族(cognate)標的タンパク質に特異的な親和性を有し、該方法が：

30

a) 複数のアレイを提供し、ここで前記アレイは各々、複数の空間的に定義されたアドレスを含んでなり、前記アドレスは各々、それに付着した単一種の光架橋核酸リガンドを少なくとも1コピー有する；

b) 複数の標的タンパク質混合物を提供し、ここで混合物は各々、特有の標的タンパク質濃度プロフィールを含んでなる；

c) 前記アレイを各々、前記混合物の異なる1つと接触させ；そして

d) 前記アレイ各々の上の前記アドレス各々に結合した標的タンパク質の量を測定し、それによって、光架橋核酸リガンドの前記種各々の用量-反応特性を同時に測定することを含んでなる、前記方法。

40

【請求項 3 9】

前記標的タンパク質濃度プロフィールが各々、前記標的タンパク質の異なる1つに関して約0Mの濃度値を含んでなる、請求項38の方法。

【請求項 4 0】

前記同族標的タンパク質の各対の組み合わせに対して、少なくとも1つの標的タンパク質混合物が、対の組み合わせの第二のメンバーよりも少なくとも一桁高い濃度で、対の組み合わせの第一のメンバーを含んでなり、そして少なくとも1つの標的タンパク質混合物が、対の組み合わせの第二のメンバーよりも少なくとも一桁低い濃度で、対の組み合わせの第一のメンバーを含んでなるように、前記標的タンパク質濃度プロフィールが設定されている、請求項38の方法。

50

【請求項 4 1】

前記同族標的タンパク質の各対の組み合わせに対して、少なくとも1つの標的タンパク質混合物が、対の組み合わせの第二のメンバーよりも少なくとも二桁高い濃度で、対の組み合わせの第一のメンバーを含んでなり、そして少なくとも1つの標的タンパク質混合物が、対の組み合わせの第二のメンバーよりも少なくとも二桁低い濃度で、対の組み合わせの第一のメンバーを含んでなるように、前記標的タンパク質濃度プロフィールが設定されている、請求項38の方法。

【請求項 4 2】

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)gp120に対する、精製され、そして単離された非天然存在核酸リガンド。

10

【請求項 4 3】

前記gp120がHIV株MN由来である(gp120_{MN})、請求項42の核酸リガンド。

【請求項 4 4】

デオキシリボ核酸である、請求項43の核酸リガンド。

【請求項 4 5】

前記リガンドが：

【化1】

5'

GGGAGGACGATGCGGAAUGCAGCUUCCGAAAAGGAAAUACGCAGACGA

20

CGAGCGGGA 3'.

である、請求項44の核酸リガンド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、核酸リガンド、核酸リガンドを性質決定する方法、並びに核酸リガンドへの標的結合を検出する方法および試薬に向けられる。

【0002】

30

発明の背景

SELEX法は、標的分子に非常に特異的な結合を持つ、核酸分子の *in vitro* 進化のための方法であり、そして表題“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment”であり、現在放棄されている、1990年6月11日出願の米国特許出願第07/536,428号、表題“Nucleic Acid Ligands”である米国特許第5,475,096号、および表題“Nucleic Acid Ligands”である米国特許第5,270,163号(WO 91/19813も参照されたい)に記載され、これらの各々は、特に本明細書に援用される。これらの特許および出願は各々、本明細書において、集合的にSELEX特許出願と称され、いかなる望ましい標的分子に対しても核酸リガンドを作成するための根本的に新規の方法を記載する。SELEX法は、核酸リガンドまたはアプタマーと称され、各々、特有の配列を有し、そして望ましい標的化合物または分子に特異的に結合する特性を有する種類の産物を提供する。SELEX法によって同定される各核酸リガンドは、既定の標的化合物または分子の特異的リガンドである。

40

【0003】

SELEX法は、核酸が、多様な二次元構造および三次元構造を形成するのに十分な能力、並びに、モノマーであれポリマーであれ、モノマー内に、実質的にいかなる化学化合物に対してもリガンドとして作用する(特異的な結合対を形成する)のに利用可能な十分な化学的万能性を有するという、特有の洞察に基づく。いかなる大きさまたは組成の分子も標的として役立ちうる。高親和性結合の適用に適用されるSELEX法は、同じ一般的

50

選択スキームを用いた、候補オリゴヌクレオチド混合物からの選択、並びに結合、分配および増幅の段階的反復を伴い、実質的にいかなる望ましい基準の結合親和性および選択性も達成する。S E L E X 法は、好ましくは無作為化配列セグメントを含んでなる核酸混合物から出発し、結合に好ましい条件下で標的と混合物を接触させ、標的分子に特異的に結合している核酸から未結合核酸を分配し、核酸 - 標的複合体を解離させ、核酸 - 標的複合体から解離した核酸を増幅して、リガンド濃縮核酸混合物を生じ、その後、結合、分配、解離および増幅の工程を、望ましいだけ多くの周期で再反復して、標的分子に対する非常に特異的な高親和性核酸リガンドを生じる工程を含む。

【 0 0 0 4 】

SELLEX法の特に重要な様の1つは、どちらも表題“Photoselection of Nucleic Acid Ligands”であり、そしてどちらも現在放棄されている、1993年9月17日出願の米国特許出願第08/123,935号、および1995年5月18日出願の米国特許出願第08/443,959号、並びに各々、表題“Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELLEX”であり、そして各々、標的分子への結合および/または光架橋、および/または標的分子の光活性化が可能な光反応基を含有する核酸リガンドを選択する、SELLEX法に基づく方法を記載する、米国特許第5,763,177号、米国特許第6,001,577号、WO 95/08003、米国特許第6,291,184号、米国特許第6,458,539号、および2000年11月28日出願の米国特許出願第09/723,718号に記載される。生じた核酸リガンドは、交換可能に「光架橋核酸リガンド」および「光アプタマー」と称される。これらの特許および特許出願は、本出願において、集合的に「光SELLEX法出願」と称される。SELLEX法の光SELLEX法態様において、RNAまたはssDNA無作為化オリゴヌクレオチドライブラリーいずれかにおいて、天然塩基の代わりに光の吸収によって活性化される修飾ヌクレオチドを取り込む。光化学がこの目的に特によく適している、こうした光反応性ヌクレオチドの1つが、5-ブロモ-2'-デオキシウリジン(5-BrdU)である(MeisenheimerおよびKoch(1997) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32: 101-140)。5-BrdU発色団は、核酸およびタンパク質の天然の発色団が吸収しないかまたは非常に弱くしか吸収しない310nm範囲で、紫外(UV)光を吸収する。生じる励起一重項状態は、最低三重項状態に項間交差し、これが、適切に近接したタンパク質標的の芳香族およびイオウ所持アミノ酸残基と特異的に架橋する(DietzおよびKoch(1987) *Photochem. Photobiol.* 46: 971-8; DietzおよびKoch(1989) *Photochem. Photobiol.* 49: 121-9; Dietzら(1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109: 1793-1797; Itoら(1980) *J. Am. Chem. Soc.* 102: 7535-7541; Swansonら(1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103: 1274-1276)。架橋はまた、ブロモウラシル発色団に近接したタンパク質の芳香族残基の励起を介しても生じる(Norrisら(1997) *Photochem. Photobiol.* 65: 201-207)。特に重要なことに、DNA中で励起されたブロモウラシルは、近位にあり、正しく方向付けされた反応性アミノ酸(Gottら(1991) *Biochemistry* 30: 6290-6295; Williisら(1994) *Nucleic Acids Res.* 22: 4947-4952; Norrisら(1997) *Photochem. Photobiol.* 65: 201-207)またはヌクレオチド残基(Sugiyamaら(1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112: 6720-6721; CookおよびGreenberg(1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118: 10025-10030)の非存在下で、比較的の非反応性で

ある。方向付けの重要性は、架橋する芳香族アミノ酸残基とプロモウラシル発色団が錠前および鍵の配置であることを示す、タンパク質・核酸複合体の結晶構造で明らかである (Horvathら (1998) Cell 95: 963-974; MeisenheimerおよびKoch (1997) Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 32: 101-140)。

【0005】

基本的な態様において、光SEL EX法は以下の工程を含んでなる：

- a) 核酸の候補混合物を調製する。候補混合物核酸は、例えば候補混合物内に5'-Br dUを取り込むことによって、光反応基を含む無作為化領域を持つ配列を含んでなる。
- b) 候補混合物を一定量の標的と接触させる。候補混合物中の標的の核酸リガンドが標的と複合体を形成する；
- c) 候補核酸リガンド中の光反応基を光照射によって光活性化する。それによって、標的と特異的な複合体を形成していた核酸リガンドが標的に光架橋される；
- d) 標的に光架橋された核酸リガンドを、候補混合物中の他の核酸から分配する；
- e) 標的に光架橋された核酸リガンドを標的から放出させ（例えば標的がタンパク質である場合、プロテアーゼ消化によって）、そしてその後、增幅する；そして
- f) 増幅された核酸リガンドを候補混合物として用いて、光SEL EX法の別の周期を開始する。

【0006】

光SEL EX法は、一本鎖または二本鎖RNAまたはDNAオリゴヌクレオチドである核酸リガンドを产生する。光反応基は、増加した反応性または光反応性を核酸残基に与える、比較的単純な修飾を含む天然核酸残基を含んでなることが可能である。こうした修飾には、限定されるわけではないが、シトシン環外アミンでの修飾、ハロゲン化基、例えば5'-プロモまたは5'-ヨード-ウラシルでの置換、2'位での修飾、例えば2'-アミノ(2'-NH₂)および2'-フルオロ(2'-F)、主鎖修飾、メチル化、異常な塩基対の組み合わせ等が含まれる。例えば、光SEL EX法によって产生される光架橋核酸リガンドには、以下：5'-プロモウラシル(BrU)、5'-ヨードウラシル(IU)、5'-プロモビニルウラシル、5'-ヨードビニルウラシル、5'-アジドウラシル、4'-チオウラシル、5'-プロモシトシン、5'-ヨードシトシン、5'-プロモビニルシトシン、5'-ヨードビニルシトシン、5'-アジドシトシン、8'-アジドアデニン、8'-プロモアデニン、8'-ヨードアデニン、8'-アジドグアニン、8'-プロモグアニン、8'-ヨードグアニン、8'-アジドヒポキサンチン、8'-プロモヒポキサンチン、8'-ヨードヒポキサンチン、8'-アジドキサンチン、8'-プロモキサンチン、8'-ヨードキサンチン、5'-プロモデオキシウリジン、8'-プロモ-2'-デオキシアデニン、5'-ヨード-2'-デオキシウラシル、5'-ヨード-2'-デオキシシトシン、5'-[(4'-アジドフェナシル)チオ]シトシン、5'-[(4'-アジドフェナシル)チオ]ウラシル、7'-デアザ-7'-ヨードアデニン、7'-デアザ-7'-ヨードグアニン、7'-デアザ-7'-プロモアデニン、および7'-デアザ-7'-プロモグアニンから選択される光反応基が含まれる。好ましくは、光反応基は、標的またはオリゴヌクレオチドの非修飾部分に吸収されない波長のスペクトルで光を吸収するであろう。光SEL EX法の好ましい態様において、光架橋核酸リガンドに取り込まれる光反応性ヌクレオチドは、5'-プロモ-2'-デオキシウリジン(5'-Br dU)および5'-ヨード-2'-デオキシウリジン(5'-I dU)である。これらのヌクレオチドは、チミジンヌクレオチドの代わりにDNAに取り込まれることが可能である。

【0007】

光SEL EX法によって产生される光架橋核酸リガンドは、診断または予後の医学的アッセイにおいて、特に有用性を有する。こうした態様の1つにおいて、疾患に関連付けられる標的の光架橋核酸リガンドをアレイ形式で平面固体支持体に付着させ、そしてその後、標的の存在または非存在に関して解析しようとする生物学的液体と、該固体支持体を接触させる。光架橋核酸リガンドを光活性化し、そして非特異的に結合した分子をすべて取り除くため、非常にストリングエントで、そしてアグレッシブな条件下（好ましくは核酸

10

20

30

40

50

および / またはタンパク質を変性させる条件下) で、固体支持体を洗浄する。結合した標的は、光反応基を介して核酸リガンドに共有架橋されているため、取り除かれない。ストリンジエントな洗浄後、行おうとする、平行しない (unparalleled) 感度および特異性の診断および予後アッセイが、光架橋する能力によって可能になる。光架橋核酸リガンドおよびアプタマーを含む、核酸リガンドのアレイ (通常、「バイオチップ」または「マイクロアレイ」とも称される)、並びにその製造法および使用法が、各々、表題 “Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip” である、米国特許第 6,242,246 号、現在放棄されている 1998 年 12 月 14 日出願の米国特許出願第 08/211,680 号、WO99/31275、2000 年 6 月 12 日出願の米国特許出願第 09/581,465 号、米国特許第 6,503,715 号、および米国特許第 6,458,543 号に記載される。これらの特許および特許出願は、集合的に「バイオチップ出願」と称され、そして各々、特に、完全に本明細書に援用される。

10

20

【0008】

光架橋核酸リガンドを生成するための自動化法および装置が、各々、表題 “Method and Apparatus for the Automated Generation of Nucleic Acid Ligands” である、2001 年 11 月 21 日出願の米国特許出願第 09/993,294 号、2001 年 3 月 22 日出願の米国特許出願第 09/815,171 号、2000 年 7 月 14 日出願の米国特許出願第 09/616,284 号、1999 年 7 月 16 日出願の米国特許出願第 09/356,233 号、1999 年 1 月 19 日出願の米国特許出願第 09/232,946 号に提供される。これらの非常に平行な自動化法が光架橋核酸リガンドを迅速に生成可能であることを考慮すると、光架橋核酸リガンドの特異性および用量 - 反応特性を評価する、多重化法 (multiplexed methods) を有することが望ましい。本発明にはこうした方法が含まれる。

30

30

40

50

50

【0009】

発明の概要

1 つの側面において、本発明は、試験混合物に含有されていると推測される標的分子の存在を検出する方法であって、前記標的分子がタンパク質であり、該方法が；

a) 固体支持体を提供し、ここで前記固体支持体は前記標的タンパク質に特異的な親和性を有する光反応性核酸リガンドを含んでなり、前記光反応性核酸リガンドは非ワトソン - クリック相互作用を通じて前記標的分子に特異的に結合する；

b) 前記標的分子を含有していると推測される前記試験混合物と前記固体支持体を接触させ、ここで前記標的分子が存在しているならば、核酸リガンド - 標的分子複合体が形成される；

c) 前記固体支持体に光照射し、ここで前記核酸リガンド - 標的分子複合体が光架橋される；

d) 前記固体支持体から、非特異的に結合した物質を取り除き；

e) 前記固体支持体と普遍的タンパク質染色剤 (Universal Protein Stain) (UPS) を接触させ、ここで前記 UPS は検出可能部分でタンパク質を標識する 1 以上の試薬を含んでなる；そして

f) 前記固体支持体上の前記検出可能部分の存在を検出することによって、前記標的分子の存在を検出する

ことを含んでなる、前記方法を提供する。

【0010】

好みの態様において、工程 d) は、前記バイオチップを、核酸および / またはタンパク質を変性させる条件に曝露することによって達成される。

適切な検出可能部分には、限定されるわけではないが、色素 (dye) (蛍光体を含む)、酵素 (限定されるわけではないが、アルカリホスファターゼおよび西洋ワサビ (horseradish) ペルオキシダーゼを含む)、酵素基質、および放射標識が含まれる。

【0011】

好ましい態様において、前記 U P S 試薬の少なくとも 1 つが、限定されるわけではないが、第一級アミン（好ましくはリジン残基上）、チオール、アルコール（限定されるわけではないが、セリン、スレオニン、チロシン上のアルコール基、および糖タンパク質上の糖部分を含む）、およびカルボキシレートを含む、タンパク質上に見られる基と反応する。

【 0 0 1 2 】

いくつかの態様において、U P S は N - ヒドロキシスクシンイミドに活性化される色素、最も好ましくは、限定されるわけではないが N H S - A L E X A 蛍光体を含む、N - ヒドロキシスクシンイミドに活性化される蛍光体を含んでなる。

【 0 0 1 3 】

他の態様において、U P S は C B Q C A (3 - (4 - カルボキシベンゾイル) キノリン - 2 - カルボキシアルデヒド) を含んでなる。

さらなる態様において、U P S は、イソシアネート、イソチオシアネート、アジ化アシル、塩化スルホニル、アルデヒド、4 - スルホ - 2 , 3 , 5 , 6 - テトラフルオロフェノール (S T P) エステル、N B D (7 - ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジアゾール) クロリド、N B D フルオリド、およびジクロロトリアジンからなるリストから選択されるアミン反応基を所持する試薬を含んでなる。

【 0 0 1 4 】

さらなる態様において、U P S は、第一級アミンと反応可能なビオチン誘導体、および前記検出可能部分で誘導体化されたストレプトアビジンを含んでなる。

さらなる態様において、U P S は：第一級アミンと反応可能な第一のビオチン誘導体、ストレプトアビジン、および前記検出可能部分にコンジュゲート化された第二のビオチン誘導体を含んでなる。

【 0 0 1 5 】

さらなる態様において、U P S は：2 - イミノチオレーン、および色素のチオール反応性誘導体、好ましくは色素のマレイミド誘導体を含んでなる。

さらなる態様において、U P S は：第一級アミンと反応可能なハプテン誘導体、および前記検出可能部分にコンジュゲート化された抗ハプテン抗体を含んでなる。あるいは、検出可能部分を、抗ハプテン抗体を認識する二次抗体にコンジュゲート化可能である。

【 0 0 1 6 】

さらなる態様において、U P S は：アミノ酸側鎖を修飾する試薬、および前記の修飾されたアミノ酸側鎖を特異的に認識する抗体を含んでなる。この態様において、該抗体を検出可能部分にコンジュゲート化可能である。あるいは、検出可能部分を、抗修飾側鎖抗体を認識する二次抗体にコンジュゲート化可能である。この態様にしたがったアミノ酸側鎖の修飾に適した試薬には、限定されるわけではないが、ニトロシル化 (n i t r o s y l a t i n g) 効 (テトラニトロメタンなど) およびアセチル化効 (スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミドアセテートなど) が含まれる。ニトロシル化タンパク質は、抗ニトロチロシン抗体によって認識可能であり；アセチル化タンパク質は、抗アセチル化リジン抗体によって認識可能である。

【 0 0 1 7 】

本明細書が提供するU P S 試薬および方法は、バイオチップ（「アレイ」または「マイクロアレイ」とも称される）を用いて多重化アッセイが行われる態様において、特に有用である。1 つのこうした態様において、本発明は、試験混合物に含有されていると推測される標的分子の存在を検出する方法であって、検出しようとする前記標的分子がタンパク質であり、該方法が：

a) 固体支持体を含んでなるバイオチップを提供し、ここで前記固体支持体は複数の空間的に定義されたアドレスを含んでなり、前記アドレスは各々、それに付着した單一種の核酸リガンドを少なくとも 1 コピー含んでなり、前記種の核酸リガンドは各々、前記試験混合物に含有されていると推測される前記標的分子の 1 つに特異的な親和性を有し、そして前記種の核酸リガンドは各々、非ワトソン - クリック相互作用を通じて前記標的分子に

10

20

30

40

50

特異的に結合する；

b) 前記標的分子を含有していると推測される前記試験混合物と前記バイオチップを接觸させ；

c) 前記バイオチップから、非特異的に結合した物質を取り除き；

d) 前記固体支持体と普遍的タンパク質染色剤(UP-S)を接觸させ、ここで前記UP-Sは検出可能部分でタンパク質を標識する1以上の試薬を含んでなる；そして

e) 前記バイオチップ上の適切なアドレスで、前記検出可能部分の存在を検出することによって、前記標的分子の存在を検出することを含んでなる、前記方法を提供する。

【0018】

関連する態様において、本発明は、試験混合物に含有されていると推測される標的分子の存在を検出する方法であって、検出しようとする前記標的分子がタンパク質であり、該方法が；

a) 固体支持体を含んでなるバイオチップを提供し、ここで前記固体支持体は複数の空間的に定義されたアドレスを含んでなり、前記アドレスは各々、それに付着した單一種の核酸リガンドを1コピー含んでなり、前記種の核酸リガンドは各々、前記試験混合物に含有されていると推測される前記標的分子の1つに特異的な親和性を有し、前記種の核酸リガンドは各々、非ワトソン-クリック相互作用を通じて前記標的分子に特異的に結合し、そして検出しようとする前記標的分子に特異的な親和性を有する前記核酸リガンドは光反応性核酸リガンドである；

b) 前記標的分子を含有していると推測される前記試験混合物と前記バイオチップを接觸させ、ここで前記標的分子が存在しているならば、核酸リガンド-標的分子複合体が形成される；

c) 前記バイオチップに光照射し、ここで前記核酸リガンド-標的分子複合体が光架橋される；

d) 前記バイオチップから、非特異的に結合した物質を取り除き；

e) タンパク質と共に反応し、そして核酸とは反応しない試薬と、前記バイオチップを接觸させ；そして

f) 前記バイオチップ上の適切なアドレスで、前記検出可能部分の存在を検出することによって、前記標的分子の存在を検出することを含んでなる、前記方法を提供する。

【0019】

これらの方法を用い、單一のUP-Sを用いて、アレイ上の核酸リガンド(光架橋および非光架橋両方)に結合されている標的タンパク質をすべて検出することが可能である。

別の側面において、本発明は、固体支持体に付着した複数の核酸リガンドのアレイを含んでなるバイオチップであって、複数の前記核酸リガンドが非ワトソン-クリック相互作用を通じて標的分子と特異的に会合し、そして前記標的分子が検出可能部分で標識される、前記バイオチップを提供する。

【0020】

別の側面において、本発明は、複数種の光架橋核酸リガンドの用量-反応特性を同時に測定する方法であって、光架橋核酸リガンドの前記種が各々、同族(cognate)標的タンパク質に特異的な親和性を有し、該方法が；

a) 複数のアレイを提供し、ここで前記アレイは各々、複数の空間的に定義されたアドレスを含んでなり、前記アドレスは各々、それに付着した單一種の光架橋核酸リガンドを少なくとも1コピー有する；

b) 複数の標的タンパク質混合物を提供し、ここで混合物は各々、特有の標的タンパク質濃度プロフィールを含んでなる；

c) 前記アレイを各々、前記混合物の異なる1つと接觸させ；そして

d) 前記アレイ各々の上の前記アドレス各々に結合した標的タンパク質の量を測定し、それによって、光架橋核酸リガンドの前記種各々の用量-反応特性を同時に測定する

10

20

30

40

50

ことを含んでなる、前記方法を提供する。

【0021】

好ましくは、前記の各標的タンパク質は、標的タンパク質混合物の少なくとも1つに存在しない。好ましくは、さらに、前記同族標的タンパク質の各対の組み合わせに対して、少なくとも1つの標的タンパク質混合物が、対の組み合わせの第二のメンバーよりも少なくとも一桁高い濃度で、対の組み合わせの第一のメンバーを含んでなり、そして少なくとも1つの標的タンパク質混合物が、対の組み合わせの第二のメンバーよりも少なくとも一桁低い濃度で、対の組み合わせの第一のメンバーを含んでなるように、標的タンパク質濃度プロフィールが設定されている。より好ましくは、前記同族標的タンパク質の各対の組み合わせに対して、少なくとも1つの標的タンパク質混合物が、対の組み合わせの第二のメンバーよりも少なくとも二桁高い濃度で、対の組み合わせの第一のメンバーを含んでなり、そして少なくとも1つの標的タンパク質混合物が、対の組み合わせの第二のメンバーよりも少なくとも二桁低い濃度で、対の組み合わせの第一のメンバーを含んでなるように、標的タンパク質濃度プロフィールが設定されている。

10

【0022】

本発明が提供する方法によって：(1)複数の光架橋核酸リガンドの性能(ダイナミックレンジ)を評価し；そして(2)同族標的タンパク質に対する各光架橋核酸リガンドの特異性を評価することが同時に可能になる。その後、診断および予後の医学的アッセイに使用するため、最も望ましい特性を持つ光架橋核酸リガンドを選択することが可能である。

20

【0023】

別の側面において、本発明は、核酸リガンドを固体支持体に付着させる方法であって：
a)前記核酸リガンドをポリ(エチレングリコール)(PEG)で誘導体化し；
b)前記固体支持体に前記PEGを付着させる

ことを含んでなる、前記方法を提供する。

【0024】

好ましくは、工程a)のPEGは、ビニルスルホン-PEGであり、そして固体支持体はチオール基を含んでなる。

さらに別の側面において、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)gp120MNに対する光架橋核酸リガンドを提供する。

30

【0025】

好ましい態様の詳細な説明

定義

本発明の側面に言及するため、本明細書において、多様な用語を用いる。本発明の構成要素の説明を明確にするのを補助するため、以下の定義を提供する：

本明細書において、「核酸リガンド」は、標的に対して望ましい作用を有する、非天然存在(non-naturally occurring)核酸である。核酸リガンドはまた、本出願において、ときに、「アブタマー」とも称される。望ましい作用には、限定されるわけではないが、標的の結合、標的の触媒的变化、標的または標的の機能的活性を修飾する/改变する方式での標的との反応、自殺阻害剤におけるような、標的への共有結合、標的および別の分子の間の反応の促進が含まれる。好ましい態様において、作用は、標的分子への特異的結合親和性であり、こうした標的分子は、主にワトソン/クリック塩基対形成または三重鎖らせん結合に依存する機構を通じて核酸リガンドに結合するポリヌクレオチド以外の三次元化学構造であり、ここで核酸リガンドは、標的分子に結合される既知の生理学的機能を有する核酸ではない。既定の標的のリガンドである核酸リガンドには：a)核酸候補混合物を標的と接触させ、ここで候補混合物に比較して、標的に対して増加した親和性を有する核酸を、残りの候補混合物から分配することが可能である；b)親和性が増加した核酸を、残りの候補混合物から分配し；そしてc)親和性が増加した核酸を増幅して、リガンド濃縮核酸混合物を生じ、これによって標的分子の核酸リガンドが同定されることを含む方法によって、核酸候補混合物から同定される核酸が含まれる。

40

50

【0026】

本明細書において、「候補混合物」は、そこから望ましいリガンドを選択しようとする、異なる配列の核酸の混合物である。候補混合物の供給源は、天然存在核酸またはその断片、化学的に合成された核酸、酵素的に合成された核酸、あるいは前述の技術の組み合わせによって作成された核酸由来であることが可能である。光反応基を持つスクレオチドなどの修飾スクレオチドを候補混合物内に取り込むことが可能である。さらに、事前に SEL EX 法によって候補混合物を产生することが可能であり、例えば、第一の SEL EX 法実験を用いて、リガンド濃縮核酸混合物を产生可能であり、この混合物をその後、第二の SEL EX 法実験において、候補混合物として使用可能である。候補混合物はまた、1 以上の共通の構造モチーフを持つ核酸を含んでなることも可能である。例えば、表題 "Nucleic Acid Ligands With Intramolecular Duplexes" であり、そして完全に本明細書に援用される、2001年8月9日出願の米国仮特許出願第 60/311,281 号は、5' 端および 3' 端間に形成される分子内二重鎖を持つ核酸を含んでなる候補混合物を記載する。

10

【0027】

好みの態様において、各核酸は、増幅プロセスを容易にするため、無作為化領域の周りに、固定配列を有する。自動化 SEL EX 法適用に詳述されるように、候補混合物核酸は、その 5' 末端および 3' 末端に固定「テール」配列をさらに含んでなり、増幅プロセスの高分子量混入物質の形成を防止することが可能である。

20

【0028】

本明細書において、「核酸」は、DNA、RNA、一本鎖または二本鎖いずれか、およびそのいかなる化学修飾物をも意味する。修飾には、限定されるわけではないが、核酸リガンド塩基または全体としての核酸リガンドに、さらなる電荷、分極率、水素結合、静電相互作用、および流動性 (fluxionality) を取り込む、他の化学基を提供するものが含まれる。こうした修飾には、限定されるわけではないが、2' 位糖修飾、5 位ピリミジン修飾、8 位プリン修飾、環外アミンでの修飾、4-チオウリジンの置換、5-プロモまたは 5-ヨード-ウラシルの置換；主鎖修飾、メチル化、異常塩基対の組み合わせ、例えばイソ塩基、イソシチジンおよびイソグアニジン等が含まれる。修飾はまた、キャッピングなどの 3' および 5' 修飾も含むことが可能である。

30

【0029】

「SEL EX」方法論は、望ましい方式で標的と相互作用する、例えばタンパク質に結合する、核酸リガンドの選択と、選択された核酸の増幅との組み合わせを伴う。場合による、選択 / 増幅工程の反復周期によって、非常に多数の核酸を含有するプールから、標的と最も強く相互作用する 1 つまたは少數の核酸の選択が可能になる。選択 / 増幅法の周期は、選択された目的が達成されるまで続ける。SEL EX 方法論は SEL EX 特許出願に記載される。SEL EX 法のいくつかの態様において、標的に非共有結合するアプタマーを生成する。SEL EX 法の他の態様において、標的に共有結合するアプタマーを生成する。

30

【0030】

本明細書において、「普遍的タンパク質染色剤」または「UPS」は、検出可能部分でタンパク質を標識し、そして核酸を標識しない、単数または複数の試薬を指す。

40

本明細書において、「標的タンパク質濃度プロフィール」は、前記標的タンパク質の混合物中に存在する個々の標的タンパク質濃度の説明を指す。本発明の好みの態様において、標的タンパク質の特定の集合に関して、複数の標的タンパク質混合物が产生され、各混合物は、特有の標的タンパク質濃度プロフィールを含んでなる。集合中の特定の標的タンパク質が混合物の 1 つに存在しない場合、その混合物の標的タンパク質濃度プロフィールは、その標的タンパク質に関して、値 0 M を含むであろう。

【0031】

「SEL EX 標的」または「標的分子」または「標的」は、本明細書において、あらかじめ決定された望ましい方式で、核酸がそれに対して作用可能な、いかなる化合物も指す

50

。S E L E X 標的分子は、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質、多糖、糖タンパク質、ホルモン、受容体、抗原、抗体、ウイルス、病原体、毒性物質、基質、代謝物、遷移状態類似体、補因子、阻害剤、薬剤、色素、栄養物、増殖因子、細胞、組織などであることが可能であり、制限はない。実質的にいかなる化学的または生物学的エフェクターも、適切なS E L E X 標的であろう。いかなる大きさの分子もS E L E X 標的として役立つ。標的はまた、標的および核酸間の相互作用の見込みを増進するため、特定の方法で修飾可能である。標的がペプチドであるS E L E X 法の様態が、表題“Modif i e d S E L E X P r o c e s s e s W i t h o u t P u r i f i e d P r o t e i n”である、2000年9月22日出願の米国特許出願第09/668,602号に記載され、該出願は完全に本明細書に援用される。

10

【0032】

「組織標的」または「組織」は、本明細書において、上述のS E L E X 標的の特定のサブセットを指す。この定義にしたがうと、組織は、不均一環境中の巨大分子である。本明細書において、組織は、単一の細胞種、細胞種の集合、細胞の凝集物、または巨大分子の凝集物を指す。これは、典型的にはタンパク質などの単離された可溶性分子である、より単純なS E L E X 標的とは異なる。好ましい態様において、組織は、より単純なS E L E X 標的よりも数桁大きい不溶性巨大分子である。組織は、多くの巨大分子で構成される複雑な標的であり、巨大分子は各々、多くの潜在的なエピトープを有する。多くのエピトープを含んでなる、異なる巨大分子は、タンパク質、脂質、炭水化物など、またはその組み合わせであることが可能である。組織は、一般的に、構造および組成両方に関して流動的であることも、または強固であることも可能である、巨大分子の物理的アレイである。細胞外マトリックスは、構造的および組成的に、より強固な組織の例であり、一方、膜二重層は、構造および組成がより流動的である。組織は一般的に可溶性でなく、そして固相に留まり、そしてしたがって分配は比較的容易に達成可能である。組織には、限定されるわけではないが、既定の臓器、例えば腎臓組織、脳組織の全体的な細胞構造を与えるのに、一般的に用いられる構造物質の1つを形成する細胞間物質とともに、通常は特定の種類である、細胞の凝集物が含まれる。組織の4つの一般的な種類は、上皮組織、結合組織、神経組織および筋組織である。

20

【0033】

この定義に属する組織の例には、限定されるわけではないが、無細胞であるフィブリン塊などの巨大分子の不均一凝集物；細胞の均一または不均一凝集物；臓器、腫瘍、リンパ節、動脈など、特定の機能を有し、細胞を含有する、より高次の構造；および個々の細胞が含まれる。組織または細胞は、天然環境にあるか、単離されているか、または組織培養中にあることが可能である。組織は、損なわれていない（intact）か、または修飾されていることが可能である。修飾には、形質転換、トランスフェクション、活性化などの多くの変化、および下部構造単離、例えば細胞膜、細胞核、細胞小器官などの単離が含まれることが可能である。組織、細胞または細胞内構造の供給源は、原核生物とともに真核生物から得ることが可能である。これには、ヒト、動物、植物、細菌、真菌およびウイルス構造が含まれる。

30

【0034】

本明細書において、「固体支持体」は、共有結合または非共有結合いずれかを通じて分子が付着可能である表面いずれかと定義される。これには、限定されるわけではないが、膜、プラスチック、常磁性ビーズ、荷電紙、ナイロン、ラングミュア-プロジェット膜、官能化ガラス、ゲルマニウム、シリコン、P T F E、ポリスチレン、ヒ化ガリウム、金および銀が含まれる。表面上に取り込まれたアミノ、カルボキシル、チオールまたはヒドロキシルなどの官能基を有することが可能な、当該技術分野に知られるいかなる他の素材も意図される。これには、いかなるトポロジーの表面も含まれ、限定されるわけではないが、球状表面、溝付き表面、および筒状表面、例えばカラムが含まれる。各々異なる標的に特異的な、複数の核酸リガンドを、アドレス可能な形式で固体支持体表面上の特定の位置（「アドレス」）に付着させて、「マイクロアレイ」または「バイオチップ」とも称され

40

50

るアレイを形成することが可能である。限定されない例でしかないが、表面に核酸リガンドが付着した平面固体支持体を用いて、アレイを形成可能である。限定されない例でしかないが、核酸リガンドをビーズに付着させ、そしてその後、マイクロタイタープレートなどの別の固体支持体上のアレイ形式にビーズを配置することによってもまた、アレイを形成可能である。

【0035】

「分配」は、標的分子に結合しているリガンドを、標的分子に結合していない核酸から分離することが可能なプロセスいずれかを意味する。より広く言及すると、分配は、標的分子への相対的親和性に基づき、候補混合物中のすべての核酸を少なくとも2つのプールに分離することを可能にする。分配は、当該技術分野に知られる多様な方法によって達成可能である。核酸 - タンパク質対は、ニトロセルロースフィルターに結合することが可能であるが、未結合核酸はフィルターに結合しない。核酸 - 標的複合体を特異的に保持するカラムが、分配に使用可能である。例えば、カラム上に結合している標的分子と会合可能なオリゴヌクレオチドの場合、最も高い親和性の核酸リガンドを分離しそして単離するのに、カラムクロマトグラフィーを使用することが可能である。標的分子がコンジュゲート化されているビーズもまた、混合物中の核酸リガンドを分配するのに使用可能である。ビーズが常磁性である場合、磁場の適用によって分配が達成可能である。表面プラズモン共鳴技術を用いて、センサーチップ上に標的を固定し、そして該チップ上に混合物を流すことによって混合物中の核酸を分配可能であり、ここで標的に対して親和性を有する核酸が標的に結合可能であり、そして残った核酸を洗い流すことが可能である。液体 - 液体分配と共にろ過ゲル遅延、および密度勾配遠心分離が使用可能である。

10

20

30

40

50

【0036】

本明細書において、「光S E L E X」は、指数的濃縮によるリガンドの光化学的計画的進化 (Photochemical Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) の頭文字であり、そして光架橋核酸リガンド（「光アブタマー」または「光架橋アブタマー」とも称する）を生成するS E L E X法の態様を指す。光S E L E X法において、RNAまたはssDNA無作為化オリゴヌクレオチドライブラーー中の天然塩基の代わりに、光の吸収によって活性化される光反応性ヌクレオチドを取り込み、核酸標的分子混合物に光照射して、核酸 - 標的分子複合体に取り込まれたいいくつかの核酸を、光反応性官能基を介して標的分子に架橋させ、そして選択工程は光架橋活性に関する選択である。光S E L E X法は、光S E L E X法出願に非常に詳細に記載されている。

【0037】

S E L E X特許出願および光S E L E X法出願は、前述の方法を非常に詳細に記載し、そして精巧に作り上げている。含まれるのは、使用可能な標的；最初の候補混合物の調製法；候補混合物内の核酸の分配法；および分配された核酸を増幅して、濃縮された候補混合物を生成する方法である。S E L E X特許出願および光S E L E X法出願はまた、核酸結合タンパク質であるか、またはない、タンパク質標的を含む、いくつかの標的種に対して得られたリガンド溶液も記載する。

【0038】

本出願全体で、多様な刊行物、刊行物、および特許出願に言及することに注目されたい；各刊行物および特許出願は、特にそして個々に本明細書に援用されるのと同じ度合いで、本明細書に援用される。

【0039】

光架橋核酸リガンドの多重化評価

本発明の1つの態様において、本明細書において交換可能に「マイクロアレイ」または「バイオチップ」とも称される核酸リガンドアレイ上の多重化アッセイを用いて、潜在的に有用な親和性および光架橋活性を所持すると同定される光架橋核酸リガンドを迅速にアッセイする。アッセイプロトコルで使用可能であり、限定されるわけではないが、以下の形式：マイクロタイターウェル、顕微鏡スライド、シリコンウェハーチップ、フロースル

ーチップ、およびマイクロビーズを含む、非常に多様な固体支持体表面上に、核酸リガンドを固定することが可能である。固体支持体に核酸を固定する方法が当該技術分野に周知である。

【0040】

各タンパク質標的に關して、1以上同定される光架橋核酸リガンドをアレイ上の別個のアドレスに固定することが可能である。好ましくは、複数の同一アレイを構築し、そしてその後、個々のアレイを各々、分析物溶液（例えば、タンパク質標的の混合物（本明細書において、「カクテル」とも称される）、または限定されるわけではないが、血清、組織培養上清、尿、および組織ホモジネートを含む生物学的液体）と接触させることが可能である。アレイを用いて、（1）核酸リガンドの多重化性能を試験するか；または（2）分析物タンパク質濃度について、試料をアッセイするか、いずれかが可能である。アレイを用いて、核酸リガンドの多重化された性能を試験する場合、対応する光架橋核酸リガンドがアレイ上に存在するタンパク質標的各々が、アレイとインキュベーションする標的タンパク質混合物中に含まれる。

【0041】

分析物をマイクロアレイとインキュベーションした後、光架橋核酸リガンドを同族タンパク質標的に光架橋し、そして非特異的に結合したタンパク質を取り除くため、ストリンジメントな条件下でアレイを洗浄する。「普遍的タンパク質染色剤」と題するセクションに後述するとおり、普遍的タンパク質染色剤（UPS）を用いることによって、アレイによるタンパク質結合を定量可能である。実施例3および4は、多重化アレイをプロセシングする典型的な方法を提供する。

【0042】

本明細書に記載する多重化アッセイは：（1）アレイ形式の光架橋核酸リガンドの性能（ダイナミックレンジ）を評価し、そして（2）同族標的タンパク質に対する光架橋核酸リガンドの特異性を評価するのを可能にすることによって、光架橋核酸リガンドの2倍の評価を可能にする。アレイを用いて、核酸リガンドの性能を評価する場合、各々異なる標的タンパク質濃度プロフィールを有する標的タンパク質混合物を產生し、そして該混合物を、アレイと接触させる試料として用いることが可能である。各タンパク質の絶対濃度を変化させることによって、各光架橋核酸リガンドの用量-反応曲線を得ることが可能である。各光架橋核酸リガンドの特異性を同時に評価することが可能である。多重化アッセイはまた、非特異的相互作用についてさらにスクリーニングするため、血清の存在下および非存在下でも実行可能である。この方式では、単一のアレイシリーズ上で、多くの光架橋核酸リガンドを同時に評価可能である。その後、最も望ましい特性を持つ光架橋核酸リガンドを、診断および予後の医学的アッセイに使用するため、選択可能である。

【0043】

本発明の多重化アッセイによって、光架橋核酸リガンド評価プロセスを劇的に合理化することが可能になり、時間および資源が両方節約できる。例えば、各光架橋核酸リガンドについて別個のアッセイを行うと、例えば緩衝液および血清各々において、10の測定が必要であろう。各々100の異なるタンパク質に対して、5つの光架橋核酸リガンドを評価するためには、 $2 \times 10 \times 5 \times 100 = 10,000$ 実験が必要であろう。多重化アッセイは、標的タンパク質混合物（「カクテル」）に対して500の光架橋核酸リガンド反応を同時に測定可能である。緩衝液および血清両方において、各々特異的な標的タンパク質濃度プロフィールを有する10の標的タンパク質混合物を測定するのに、20の実験しか必要でなく、そして10,000実験と同じデータが提供されるのに加えて、特異性に関するさらなる情報が得られるであろう。

【0044】

本発明のこの態様の限定されない例の1つにおいて、 $10^{-6} M$ から開始して、そして $10^{-14} M$ まで濃度を1対数ずつ減少させた標的タンパク質混合物中の9つの異なるタンパク質濃度についてデータを収集することによって、単一の光架橋核酸リガンドのダイナミックレンジを評価する。第10の標的タンパク質混合物は、同族タンパク質を含有せ

10

20

30

40

50

ず、すなわち、その混合物に関する標的タンパク質濃度プロフィールは 0 M であろう。より適切な限定に関して、これらの正確な数および範囲を調整可能であることが、当業者には明らかであろう。非常に多重化されたアッセイのためには、100 以上の異なるタンパク質のダイナミックレンジを同時に評価することが望ましい可能性があり、したがって、単一リガンドの場合におけるように、少なくとも 10 の標的タンパク質混合物が必要である。例えば、ごくわずかな非特異的結合を持つ光架橋核酸リガンドに関しては、10 の標的タンパク質混合物を作成可能であり、ここで、最初の 10 の標的タンパク質は、最初の標的タンパク質混合物中に存在せず、次の 10 の標的タンパク質が範囲の中で最低の濃度で存在し、以下同様であって、最後の 10 の標的タンパク質が最高の濃度で存在する。それから、次の標的タンパク質混合物は、最低濃度で最初の 10 の標的タンパク質を有し、二番目に低い濃度で次の 10 のタンパク質を有し、以下同様であって、最後の 10 の標的タンパク質はこの標的タンパク質混合物中に存在しない。このパターンをあと 8 回反復すると、特有の標的タンパク質濃度プロフィールを有する、10 の複合標的タンパク質混合物が生じるであろう。各標的タンパク質は、望ましい全濃度範囲をサンプリングするであろう。この戦略は、潜在的に、100 の異なるタンパク質標的のダイナミックレンジを測定可能であるが、異なるタンパク質分布戦略は、同時に特異性データも生じるであろう。

【0045】

多重化アッセイでは非特異的結合 / 架橋および干渉の可能性があるが、光架橋核酸リガンド特有の特性によって、この可能性は、診断チップに基づくアッセイで使用する他の試薬に比較して、非常に低いレベルに減少する。多重化アッセイにおけるこうした影響の可能性をさらに最小限にするため、これらの影響を検出し、そして非同族タンパク質に架橋を示す光架橋核酸リガンドを取り除く（または少なくとも適切な光架橋核酸リガンドを選択することによって、こうした影響を最小限にする）ことが望ましい。本発明の 1 つの態様において、個々の標的タンパク質混合物の標的タンパク質濃度プロフィールを適切に設定することによって、これを達成可能である。標的タンパク質混合物中のいかなるタンパク質も、他のタンパク質いずれかのシグナルに影響を及ぼす可能性があるため、好ましい態様において、タンパク質標的混合物のすべてに渡って、多様な濃度で標的タンパク質の各対の組み合わせを試験する - 光架橋核酸リガンド交差反応性はもちろん対称でないため、あるものは第一のタンパク質に対して高く、そしてあるものは第二のタンパク質に対して高い。例えば、10 のタンパク質 1 ~ 10 に関して、タンパク質 1 の対の組み合わせは : [1, 2] 、 [1, 3] 、 [1, 4] ・・・ [1, 10] であろう。特に好ましい態様において、各タンパク質対は、いくつかの標的タンパク質混合物において、濃度が少なくとも 1 対数多く、そして少ないとことで異なり（すなわち少なくとも一桁多く、そして少ない）、より好ましくは、濃度が少なくとも 2 対数多く、そして少なく、そしてさらにより好ましくは、濃度が少なくとも 3 対数多く、そして少ない。例えば、少なくとも 1 つの標的タンパク質試験混合物における、メンバー 1 およびメンバー 2 の前述の対の組み合わせに言及すると、タンパク質 1 はタンパク質 2 より二桁高い濃度で存在し；そして少なくとも 1 つの標的タンパク質混合物において、タンパク質 1 はタンパク質 2 より少なくとも二桁低い濃度で存在するであろう。これによって、評価アッセイにおいて、交差反応性を検出可能であることが確実になるであろう。さらに、標的タンパク質混合物組成に対するこの制限は、また、いかなる 2 つの標的タンパク質混合物においても、2 つのタンパク質が同じ濃度でないことも必要とするであろう。

【0046】

10 の標的タンパク質混合物 A ~ J において、10 の異なる濃度で存在する 10 のタンパク質 1 ~ 10 があるとする。第一のタンパク質に関して、10 の標的タンパク質混合物に 10 の濃度を割り当てるには、 $10! = 3628800$ 通りある。第二のタンパク質に関しては、タンパク質混合物の間に第一のものと同じ割り当てを有することは不能であるため、 $10! - 1$ 通りがあり、以下同様である。標的タンパク質濃度プロフィールを設定する重要な側面は、上述のように、100 タンパク質各々の割り当ての相異を最大にすることに関連するはずである。以下の表 1 は、10 の生じる標的タンパク質混合物 A ~ J に

10

20

30

40

50

おいて、典型的な標的タンパク質濃度プロフィールを列挙する。例えばタンパク質1は、混合物Aには存在せず、混合物B中で 10^{-11} の濃度を有し、混合物C中で 10^{-9} の濃度を有するなどである。表に示す標的タンパク質濃度プロフィールは、各タンパク質対が、10の標的タンパク質混合物中で、少なくとも2回、プラスおよびマイナス両方に、3対数離れた濃度を有することを確実にする。例えば、混合物Aにおいて、タンパク質6は、タンパク質10、8、9、2、7、および5より、少なくとも3対数少ない。混合物Eにおいて、タンパク質6は、タンパク質5、10、8、7、および4より、少なくとも3対数多い。

【0047】

【表1】

混合物	標的タンパク質濃度プロフィール (M)									
	0	10^{-14}	10^{-13}	10^{-12}	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
A	1	6	4	3	10	8	9	2	7	5
B	2	7	5	4	1	9	10	3	8	6
C	3	8	6	5	2	10	1	4	9	7
D	4	9	7	6	3	1	2	5	10	8
E	5	10	8	7	4	2	3	6	1	9
F	6	1	9	8	5	3	4	7	2	10
G	7	2	10	9	6	4	5	8	3	1
H	8	3	1	10	7	5	6	9	4	2
I	9	4	2	1	8	6	7	10	5	3
J	10	5	3	2	9	7	8	1	6	4

【0048】

表1：典型的な標的タンパク質濃度プロフィール

3, 628, 800のありうる標的タンパク質濃度プロフィールのうち、非同族光架橋核酸リガンドに対するタンパク質の交差反応性を明らかにする最善の機会を提供する10通りを見出すことが可能である。割り当てを無作為にサンプリングし、そしてタンパク質の各対間の複数の比較を有する基準を満たすもののみを容認することによって、モンテカルロ技術を用いて、これらの割り当てを生成する。過剰な「バックグラウンド」タンパク質の存在下で同族タンパク質を測定する回数を最大化することによって、妥当な特異性試験が提供されるであろう。有意な交差反応性の非存在下で、妥当な標準曲線が生成されるであろう。低い同族タンパク質レベルでのこれらの曲線中のスパイク、または感度の損失は、交差反応性の指標となるであろう。

【0049】

あらゆる非特異的結合または干渉の非存在下で、上述の方法にしたがって行う多重化評価アッセイは、各光架橋核酸リガンドの標準曲線を産生するだろうし、ここで各曲線は、光架橋核酸リガンドのダイナミックレンジを明らかにするであろう。非特異的結合の影響を決定するため、本発明はここで、各光架橋核酸リガンドに結合する複合混合物の割合を評価するモデルを提供する。

【0050】

該モデルは、以下の等式：

【0051】

【化1】

$$P_i + L_j \rightleftharpoons P_i \cdot L_j \quad K_{ij} = [P_i \cdot L_j] / [P_i][L_j] \quad (1)$$

【0052】

[式中、 $[P_i]$ は、試料中の未結合タンパク質分析物i (i は1~100の間で多様である)の濃度であり、 $[L_j]$ は、チップ上の未結合光架橋核酸リガンドj (j は1~

500の間で多様であり、すなわち1つのアッセイで測定する各タンパク質に対して、5つの光架橋核酸リガンドがある)の濃度であり、 $[P_i : L_j]$ は固定タンパク質/光架橋核酸リガンド複合体の濃度であり、そして K_{ij} は反応の平衡会合定数である]にしたがった平衡結合の標準的処理に基づく。非特異的結合がなければ、会合定数Kのマトリックスは、タンパク質あたり1つの光架橋核酸リガンドしかないタンパク質チップに対して対角であり; 非対角のエントリーは交差反応性を示し、そして特異的な(対角)相互作用条件より、数対数低い会合定数を有する可能性が最も高い。

【0053】

総タンパク質および光架橋核酸リガンド濃度に関して、物質収支等式は

【0054】

【化2】

$$[P_i]_{\text{総計}} = [P_i] + \sum_j [P_i : L_j] = [P_i] (1 + \sum_j K_{ij} [L_j]) \quad (2)$$

$$[L_j]_{\text{総計}} = [L_j] + \sum_i [P_i : L_j] = [L_j] (1 + \sum_i K_{ij} [P_i]) \quad (3)$$

【0055】

であり、ここで、第二の等式は、 $[P_i] K_{ij} [L_j]$ を $[P_i : L_j]$ (等式(1)を参照されたい)に代入することによって得られる。等式(2)への等式(3)の代入によって、遊離タンパク質濃度の連立方程式が得られる。

【0056】

【化3】

$$[P_i] = [P_i]_{\text{総計}} (1 + \sum_j K_{ij} [L_j]_{\text{総計}} / (1 + \sum_k K_{kj} [P_k]))^{-1} \quad (4)$$

【0057】

遊離タンパク質濃度 $[P_i]$ において、自己無矛盾まで、連立方程式を反復して解くことが可能である。その後、結合した光架橋核酸リガンドの濃度を、以下を用いて計算する。

【0058】

【化4】

$$[P_i : L_j] = [P_i] K_{ij} [L_j]_{\text{総計}} / (1 + \sum_k K_{kj} [P_k])^{-1} \quad (5)$$

【0059】

洗浄および架橋によって、検出されるタンパク質の量は、元来結合していたものよりも減少するであろう。洗浄による損失の割合は、個々の複合体の脱離速度(off rate)に応じるであろう; 脱離速度が遅い、高親和性の相互作用は、特異的に結合したタンパク質をほとんど失わず、一方、非特異的結合物質は、実質的に減少するはずである。濃縮プールから回収されるアブタマーの架橋効率は、もちろん、0~100%の範囲で多様であろう; 架橋していない光架橋核酸リガンドは、厳しい洗浄後、アレイ上にとどまらないであろうため、該核酸リガンドを取り除くことが可能である。最後に、各タンパク質は、捕捉したタンパク質に特異的に結合する染色剤分子の数に比例するシグナルを、例えばタンパク質に含有されるリジンの数およびその反応性の関数として、生じるであろう。

【0060】

以下の議論に関しては、洗浄および架橋の損失とともに、染色剤シグナル増進を、各複合体に特有の因子として処理するであろう。アレイ上の各光架橋核酸リガンドに関して測定される最終シグナルは

【0061】

【化5】

$$RF_j = \sum_i f_{ij} [P_i : L_j] + b \quad (6)$$

10

20

30

40

50

【0062】

[式中、 $R F_j$ は光架橋核酸リガンド j に関する測定される相対蛍光であり、 $f_{i,j}$ は、各タンパク質 / 光架橋核酸リガンド複合体 $P_i : L_j$ の洗浄、架橋効率、および染色を計上し、そして b は検出の絶対下限を設定する装置バックグラウンドである] として与えられる。

【0063】

これでモデルは完了である。上に定義する 10 の標的タンパク質混合物を例として用いて、提唱するアッセイを質的に検討することが可能である。例えば、標的タンパク質特異的相互作用 $K_{i,j} = 10^{11} M^{-1}$ ($K_d = 10 \text{ pM}$) および $f_{i,j} / b = 5.0 \times 10^{13}$ (これはいくぶん恣意的であり、そして検出の下限にしか影響を及ぼさない - ここで、光架橋核酸リガンドの飽和が上限を設定する) で、濃度 $10^{-11} M$ の光架橋核酸リガンドが 1 つあるとする。図 1 は、異なる標的タンパク質混合物に関するアッセイ反応を例示する ($\log([P])$ 対 \log 相対蛍光 (RF) のプロットとして示す)。太い曲線は、交差反応性がない場合に期待される反応である。タンパク質 1 ~ 5 に関する非特異的相互作用の反応を、印をつけた曲線に示す。バックグラウンドタンパク質に対する交差反応性がなければ、図 1 の太い曲線は、期待される反応曲線であろう。直線領域はおよそ $10^{-14} \sim 10^{-11}$ であり、タンパク質濃度 4 対数分である。ここで飽和は、主に、光架橋核酸リガンド濃度によって設定される。

【0064】

単一の非特異的相互作用の存在下で、反応の振る舞いを検討するため、標的タンパク質混合物中の他のタンパク質各々について 1 つずつ、9 つの曲線を生成し；各シミュレーションにおいて、1 つのタンパク質のみが、交差反応を許された。上記と同一の光架橋核酸リガンドについて、非特異的相互作用は、特異的なものより 3 対数少なく設定され、 $K_{i,j} = 10^8 M^{-1}$ ($K_d = 10 \text{ nM}$) であり、そして $f_{i,j} / b = 5.0 \times 10^{12}$ であり、特異的なものの 10 パーセントであった。各計算には、同一の標的タンパク質混合物を用いた。図 1 は 5 つの曲線 (タンパク質 1 ~ 5) を含有し、そして残りの 4 つ (タンパク質 6 ~ 9) を図 2 に示す。再び、図 2 において、太い曲線は、交差反応性がない場合に期待される反応である。タンパク質 6 ~ 9 に関する非特異的相互作用の反応を、印をつけた曲線に示す。

【0065】

データは対数 / 対数目盛り上にプロットするため、非特異的相互作用による直線性からの逸脱は、通常、非常に明らかである。2 つの曲線は逸脱を示し、この逸脱は、ノイズの存在下では識別が困難である可能性があるが、完全にここで用いる標的タンパク質混合物の結果である；タンパク質混合物をさらに注意深く選択することによって、さらなる増進が達成可能である。

【0066】

図 1 および図 2 は、最も非特異的な結合 / 架橋が、直線性からの陽性の逸脱を生じることが可能であるが、タンパク質濃度のいくつかの組み合わせは、非特異的タンパク質が同族タンパク質より非常に過剰であり、そうでなければ占有されるであろう部位に関して競合する際には、特異的シグナルの損失を生じるであろうことを示す。

【0067】

本明細書に提供するモデルは、多重化評価アッセイにおける、光架橋核酸リガンドのダイナミックレンジおよび潜在的な非特異的相互作用を、10 の測定のセットから得ることが可能であることを示す。10 の標的タンパク質混合物を用いることに対しては制限がないことに注目することが重要であり - 20 を用いて、非特異的相互作用の検出を最大限にするため、混合物中のすべての他のタンパク質に対して、低レベルの同族タンパク質のより多くの比較を確実にすることが可能である。実験数を二倍にしても、アプローチの効率を危うくしない。標的タンパク質混合物中のすべての標的タンパク質について、光架橋核酸リガンドの交差反応性を評価する。

【0068】

10

20

30

40

50

アレイ合成

多くの表面付着化学反応を核酸リガンド固定に使用可能であり、これらには、限定されるわけではないが：金を含むチオール反応性表面に結合したチオール修飾核酸リガンド；チオール含有表面に結合したアクリダイト修飾核酸リガンド；ストレプトアビジン表面に結合したビオチン化核酸リガンド；カルボキシレート、イソチオシアネート、N-ヒドロキシ-スクシンイミド、またはエポキシド活性化表面に結合したアミン修飾核酸リガンドが含まれる。非常に多様な表面コーティングが核酸リガンドアレイに適していると立証されており、これらには：ガラス上のエポキシド、シリコン上のエポキシド、Accel 1r8 N-ヒドロキシ-スクシンイミド活性化有機ポリマー、Surmodics N-ヒドロキシ-スクシンイミド活性化アクリルアミドポリマー、Rosatechアミン反応性有機ポリマー、有機自己集合単層(SAM)でコーティングした金、およびマトリックスチオール含有アクリルアミドポリマーが含まれる。

10

20

30

40

50

【0069】

定期的に最初のスクリーニングで評価されるプリンティング(「スポットティング」とも称される)緩衝液構成要素には、緩衝剤(NaPO₄、NaBO₄、NaCO₃が一般的に用いられる)、界面活性剤(ザルコシル、Tween 20、およびSDS)、親水性添加剤(PEG、Me-PEG、グリセロール)、および有機溶媒(ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジメチルホルムアミド(DMF)、N-メチルピロリドン(NMP))が含まれる。

【0070】

修飾表面上に核酸リガンドをプリンティングした後、好ましい態様において、プリンティング後処理を行って、残った官能基を除去し、そして核酸リガンドフィーチャー周囲の環境を修飾する。表面上の残った官能性をキャッピングするために行う、典型的なプリンティング後処理には、不安定な基を加水分解するアルカリ洗浄、並びに第一級アミンまたは未結合(free)スルフィドリルのアセチル化が含まれる。

【0071】

さらなるプリンティング後処理には、核酸リガンド自体の周囲環境を修飾する、アルキルまたはポリエチレンジコール鎖と表面官能基の反応が含まれる(以下の実施例5を参照されたい)。例えば、いくつかの態様において、ポリ(エチレンジコール)(PEG)スペーサーを核酸リガンドおよび固体支持体表面の間に挿入する。本発明の発明者らは、PEGスペーサーが、マイクロアレイ中の核酸リガンドによる特異的タンパク質結合活性を促進することを発見している。同様に、アレイを生成するため、PEG分子を核酸リガンドと同時にスポットティングして使用すると、マイクロアレイ中の核酸リガンドの特異的結合活性が促進される。単一の理論または仮説に限定されることなく、PEG分子は、各核酸リガンドおよびアレイ表面間に、長い柔軟な中性荷電および親水性スペーサーを提供することによって、核酸リガンドの変性を最小限にし、そしてその特異的活性を改善すると考えられる。

【0072】

具体的には、限定されるわけではないが、5'誘導体化核酸リガンドへのPEGスペーサーを含む(そしてまたフルオロ化合物も含むことが可能である)二官能性リンカーのコンジュゲート化は、表面への付着を促進し、そしてまた、核酸リガンドを、支持体自体から離れた、より親水性の環境に移動させる。PEGスペーサーの非存在下では、いくつかの核酸リガンドに関して、表面特異的不活性化効果が観察され、そして核酸リガンド固定にPEGスペーサーを用いると、タンパク質結合活性が回復した。表面に同時にスポットティングされるPEGポリマーは、多様な表面上の非特異的相互作用を減少させるのに用いられてきている。PEG分子を核酸に、そして固体支持体にカップリングする方法および試薬が当該技術分野に周知である。例えば、NHS-PEG-ビニルスルホンを5'アミン誘導体化核酸リガンドと反応させて、核酸リガンドへのPEGビニル-スルホン部分のカップリングを導くことが可能である。その後、生じたビニルスルホン-PEG核酸リガンドを、チオール基で標識した固体支持体にカップリングすることが可能である。

【0073】

アレイ合成のための前述の方法は、光架橋核酸リガンドおよび非光架橋核酸リガンド両方に使用可能であることが理解されるであろう。

実施例5は、核酸リガンドをPEG化するための典型的なプロトコルを提供する。

【0074】

光アプタマーアッセイプロトコル

本発明は、光架橋核酸リガンドのアレイを使用する多重化アッセイを設計する方法を提供する。ここに、多重化アレイをプロセシングする典型的な方法を提供する。

【0075】

本発明の好ましい態様において、まずSELEX緩衝液、tRNAなどのプロッキング核酸、およびメチル化カゼインキャリアーなどのプロッキングタンパク質でアレイを平衡化することによって、光架橋核酸リガンドのアレイへのタンパク質標的結合の多重化検出を行う。タンパク質分析物を表面と、好ましくは平衡に達するのに十分な時間（静的条件下またはアレイ表面上を渡る流れの中で）、インキュベーションする。非同族タンパク質バックグラウンドが最小限であることを確実にするため、好ましくは親和性結合タンパク質を緩衝液、最も好ましくはSELEX緩衝液（40 mM HEPES、pH 7.5、11 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、0.05% Tween-20）で洗浄して、アレイから非同族の低親和性タンパク質を取り除く。いくつかの態様において、増加したイオン強度で、この架橋前洗浄を行って、こうした非特異的相互作用が破壊される可能性を増加させる。

10

20

【0076】

その後、アレイをUV光（好ましくは単色光供給源からの308 nmの光、または水銀ランプにカットオフフィルターを適用することによって選択する、312 nmを超える波長を用いる）に曝露して、その同族タンパク質標的に結合した核酸リガンドを光架橋する。好ましくは、架橋は、アレイ表面上の水性緩衝液の薄層を用いて行う。

【0077】

最も好ましくは、その後、核酸および/またはタンパク質を変性させる条件下で、アレイを厳しく洗浄する。例えば、塩（例えば20 mM NaH₂PO₄、pH 7.4、150 mM NaCl、0.1% SDS、1 mM EDTA）、界面活性剤、水酸化物（例えば20 mM NaOH）、酸、カオトロピック剤（例えば8 M 尿素）、熱（例えば40）、および流れの組み合わせによって、適切な厳しい条件を達成する。洗浄の厳しさは、構造の完全性を維持する有機表面コーティングの能力によってのみ制限される。上に提供する固定化学反応および光架橋自体は、どちらも、こうした洗浄で安定である。

30

【0078】

非特異的結合タンパク質を取り除くため、スライドを厳しく洗浄した後、検出可能部分を持つタンパク質をすべて標識するため、UPSでアレイを染色する。バックグラウンドシグナルを最小限にするため、好ましい態様において、UPS処理後、アレイを再び厳しく洗浄する。その後、検出可能部分からのシグナルを定量化することによって、アレイを「読み取る」。好ましい態様において、適切な励起供給源およびフィルターを持つ標準的マイクロアレイ蛍光読み取り装置を用いる。

40

【0079】

普遍的タンパク質染色剤

普遍的タンパク質染色剤（UPS）は、検出可能部分を持つタンパク質をすべて標識するが、核酸またはアレイの他の構成要素、例えば核酸リガンドを固定するのに使用する誘導体化表面は標識しない、単数または複数の試薬を含んでなる。検出可能部分は、蛍光、化学発光シグナル、または同一性にしたがって、他の定量可能シグナルいずれかを介して検出可能である。UPS試薬の少なくとも1つがタンパク質と共有的に反応することが好ましいが、必要ではない。タンパク質上に見られるが、核酸またはスライド支持体上には見られない反応性化学基いずれかが、共有結合部位として役立つ。タンパク質標的の検出において、これらの基には、限定されるわけではないが、第一級アミン（リジン）、

50

チオール（システィン、ジスルフィド連結の還元によって產生可能）、アルコール（セリン、スレオニン、チロシンおよび糖タンパク質上の糖部分（こうした糖上のシス・ジオールの酸化産物を含む））、およびカルボキシレート（グルタミン酸およびアスパラギン酸）が含まれる。

【0080】

検出可能部分は、限定なしに、色素（より好ましくは蛍光体）、放射標識、量子ドット、酵素、酵素基質、またはいずれかの方式で定量可能シグナルを生成するのに使用可能な他の物質いずれかであることが可能である。検出可能部分が酵素（例えばアルカリホスファターゼ）である場合、酵素基質および酵素活性に必要なあらゆるさらなる因子の存在下で、定量可能シグナルを生成可能である。検出可能部分が酵素基質である場合、酵素および酵素活性に必要なあらゆるさらなる因子の存在下で、定量可能シグナルを生成可能である。タンパク質に検出可能部分を付着させるのに適した試薬配置には、限定されるわけではないが、タンパク質への検出可能部分の共有結合、タンパク質に共有結合した別のUPS構成要素と検出可能部分の非共有結合、およびタンパク質に非共有結合したUPS構成要素への検出可能部分の共有結合が含まれる。

【0081】

最も基本的な態様において、UPSは、タンパク質特有の官能基と共有的に反応し、そしてその際に、タンパク質に検出可能部分を共有結合させる、单一の化学的試薬である。この態様にしたがった好ましいUPSは、タンパク質に特有の官能基と共有的に反応可能な基を含む色素を含んでなる。こうした基を誘導体化によって色素に付加することが可能であるし、またはこうした基が未修飾色素上に存在することが可能である。N-ヒドロキシスクシンイミドに活性化される色素（NHSに活性化される色素としても知られる）はアミン基と反応し、そして特に好ましいUPSである。別の特に好ましいUPSは、シアノ化物またはチオールの存在下で、やはりアミンと反応して、非常に蛍光性のイソインドールを形成する、CBQCA（3-（4-カルボキシベンゾイル）キノリン-2-カルボキシアルデヒド）である。UPSで使用するのに適した他のアミン反応基には、限定されるわけではないが、イソシアネート、イソチオシアネート、アジ化アシル、塩化スルホニル、アルデヒド、4-スルホ-2,3,5,6-テトラフルオロフェノール（STP）エステル、並びにNBD（7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール）クロリド、NBDフルオリド、およびジクロロトリアジンなどのアリール化剤が含まれる。

【0082】

いくつかの態様において、UPSは複数の試薬を含んでなる。例えば、UPSは、タンパク質と共有的に反応する第一の試薬、および直接または間接的に、共有的または非共有的に、第一の試薬が導入する化学基または他の官能性を介して、タンパク質に検出可能部分を付着させる、1以上のさらなる試薬を含んでなることが可能である。例えば、1つの態様において、適切なUPSは、（a）タンパク質と反応するビオチン誘導体；および（b）ストレプトアビジン-検出可能部分コンジュゲート、例えば蛍光ストレプトアビジン誘導体またはストレプトアビジン-酵素コンジュゲートを含んでなる。ビオチン誘導体は、アミン基と反応し、それによって、ビオチンをタンパク質に共有結合させる；ストレプトアビジン-検出可能部分コンジュゲートは、固定ビオチン基に結合し、それによって、アレイ上のタンパク質結合部位に検出可能部分を局在させる。

【0083】

別の態様において、適切なUPSは：i) 結合したタンパク質標的にビオチンまたはビオチン誘導体を共有結合させることができ反応基にコンジュゲート化された、ビオチンまたはビオチン誘導体；ii) アビジンおよび/またはストレプトアビジン；およびiii) ビオチン-検出可能部分コンジュゲート、例えば蛍光ビオチン誘導体を含んでなる。好ましくは、i)におけるビオチン誘導体は、アミン反応性ビオチン誘導体、最も好ましくはNHS-ビオチンであり、ここでビオチンは、場合によって、スペーサー原子によってNHSから分離されている（Calbiochem, Inc.）。結合したタンパク質標的上の第一級アミンとNHS基の反応は、アレイ上の核酸リガンドに結合したタンパ

10

20

30

40

50

ク質標的へのビオチンの共有結合を導く。その後、アレイをストレプトアビジンまたはアビジンで処理することが可能である。ストレプトアビジンおよびアビジンは、互いに4つのビオチンと結合可能であり、これらのタンパク質を添加すると、元来、NHS-ビオチンによって、結合したタンパク質的にカップリングしていた各ビオチンに3つのビオチン結合部位が提供される。その後、(i)のビオチン-検出可能部分誘導体を添加することが可能であり、その際、これはストレプトアビジンまたはアビジン上の占有されていないビオチン結合部位に緊密に結合する。

【0084】

別の態様において、UPSは(a)タンパク質と反応する基で誘導体化されたジニトロフェノール(DNP)などのハプテン；および(b)検出可能部分にコンジュゲート化された抗ハプテン抗体、例えば蛍光抗ハプテン抗体または酵素-抗ハプテン抗体コンジュゲートを含んでなる。さらなる態様において、UPSは：(a)タンパク質と反応する基で誘導体化されたジニトロフェノール(DNP)などのハプテン；および(b)抗ハプテン抗体；(c)抗ハプテン抗体に結合する二次抗体(例えば抗ハプテン抗体を調製するのに用いた動物種由来の免疫グロブリンすべてと反応する抗体調製)であって、検出可能部分にコンジュゲート化されている、前記二次抗体を含んでなる。

【0085】

UPSが複数の試薬を含んでなるとき、いくつかの場合、試薬を連続して添加すべきであり、一方、他の場合、一緒に添加することが可能であることを、当業者は理解するであろう。

【0086】

別の態様において、UPSは、ジスルフィド(例えばシステイン)をチオール基に還元する剤を含んでなり、そしてさらにチオール反応性化合物を含んでなる。UPSで使用可能な適切なチオール反応基には、限定されるわけではないが、ヨードアセトアミド、マレイイミド、ハロゲン化ベンジルおよびプロモメチルケトンが含まれる。例えば、この態様にしたがって適切な1つのUPSは、(a)還元剤；および(b)チオール反応基で誘導体化された検出可能部分を含んでなる。この態様にしたがったUPSの別の例は、(a)還元剤；(b)チオール基と反応するビオチン誘導体；および(c)ストレプトアビジン-検出可能部分コンジュゲートを含んでなる。

【0087】

さらなる態様において、UPSは、タンパク質グリコシル化部位のシス-ジオールを酸化する剤を含んでなり、そしてさらに、ヒドラジド反応基を所持する化合物を含んでなる。例えば、この態様にしたがって適切な1つのUPSは：(a)糖中のシス-ジオールを酸化する酸化剤；(b)検出可能部分のヒドラジド誘導体を含んでなる。

【0088】

別の態様において、タンパク質上のカルボキシレートは、(a)カルボキシレートと反応してNHS-エステル基を形成する、EDC(1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド)／スルホ-NHS(N-ヒドロキシスルホスクシンイミド)；および(b)NHS-エステル基と反応する基、例えばアミン基(類)またはヒドラジド基(類)にコンジュゲート化された検出可能部分を含んでなるUPSと反応可能である。こうした態様の1つにおいて、UPSは：(a)EDC(1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド)／スルホ-NHS(N-ヒドロキシスルホスクシンイミド)；(b)アミン基を含むビオチン誘導体；(c)ストレプトアビジン-酵素コンジュゲートまたは蛍光ストレプトアビジン誘導体を含んでなることが可能である。

【0089】

当業者は、本発明の特定の態様において、未反応官能基を「ブロック」する必要があることを認識するであろう。例えば、EDC(1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド)／スルホ-NHS(N-ヒドロキシスルホスクシンイミド)を伴う上述の例において、タンパク質上の未反応NHS-エステル基は、アミン基を含むビオチン誘導体を添加した後も残る可能性があり；その後、これらの未反応NHS-エス

10

20

30

40

50

テル基が酵素と反応し、その不活性化を導く可能性がある。この態様において、未反応NHS-エステル基のブロッキングは、エタノールアミンなどの、アミン基を含む小分子を用いて達成可能である。

【0090】

いくつかの態様において、UPSは、ジスルフィド連結の還元によって產生されるチオール基および酸化シス-ジオールを含む、タンパク質特有の基と反応し、そしてその際に、タンパク質に官能基を導入する試薬(類)を含んでなる。例えば、トラウト試薬(2-イミノチオレーン)およびN-スクシンイミジル3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオニアミド(SPD P)ヘテロ二官能性リンカーはどちらも、アミン基と反応し、それによってチオール基を導入する。その後、検出可能部分でタンパク質を標識するため、新たに導入したチオール基を上述のような他の試薬と反応させることが可能である。例えば、この態様にしたがって適切な1つのUPSは:(a)トラウト試薬;および(b)チオール反応基で誘導体化された色素を含んでなる。官能基でタンパク質を誘導体化する多くの他の試薬は、ホモ二官能性リンカーおよびヘテロ二官能性リンカーを含めて、当業者に周知である。

10

【0091】

タンパク質標的を染色することによって達成されるシグナルを増進するため、いくつかの態様において、検出可能部分として酵素を含むUPSを用いて、増幅を活用することが可能である。増幅は、各酵素による複数の基質の代謝回転の結果であり、最小限の全体のバックグラウンドで、システムにおけるタンパク質定量化のため、よりよいシグナル対ノイズ比を生じる。これらの態様において、酵素基質および酵素活性に必要なあらゆるさらなる因子を添加した際、定量可能シグナルが生成される。酵素でタンパク質を標識するのに適切な1つのUPSは、(a)タンパク質特有の基と反応する基で誘導体化されたビオチン;および(b)ストレプトアビジン-酵素コンジュゲートを含んでなる。別の適切なUPSは、(a)タンパク質特有の基と反応するハプテン誘導体(例えばジニトロフェノール誘導体);および(b)酵素にコンジュゲート化された抗ハプテン抗体を含んでなる。

20

【0092】

上に提供する態様にしたがって、UPS系で使用可能な、適切な1つの酵素はアルカリホスファターゼであり、特に、可溶性非蛍光基質、2-(5'-クロロ-2'-ホスホリルオキシフェニル)-6-クロロ-4-(3H)-キナゾリノン(ELF-97ホスフェート)を用いた場合に適している。アルカリホスファターゼは、この基質を切断して、不溶性および蛍光性のELFアルコールを產生し、このELFアルコールは局所的に沈降し、それによって酵素固定部位で定量可能シグナルを提供する。

30

【0093】

上述の態様にしたがって、UPS系で使用可能な、適切な別の酵素は、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ(HRP)であり、特に、チラミドシグナル増幅(TSA)系において使用するのに適している。HRPは、基質として、多様な蛍光標識チラミド誘導体を許容する。生じたチラミドラジカル産物は非常に反応性であり、そして局在チロシンおよび他の芳香族アミノ酸と共有結合を形成し、アレイ上のタンパク質結合部位に局在した蛍光シグナルを生じる。

40

【0094】

N-ヒドロキシスクシンイミド基を含むUPS試薬を使用する本発明の態様において、NHS基の望ましい反応(例えば、タンパク質上のアミン基とN-ヒドロキシスクシンイミドに活性化される色素の反応)は、NHS基の加水分解と競合する。NHS加水分解を最小限にするため、好ましくは、NHS試薬を水性緩衝液で希釈する前に、乾燥DMSO中に保管し、そして好ましくは、希釈した試薬を、希釈後直ちに使用する。さらに、好ましい態様において、ジメチルホルムアミド(DMF)などの乾燥有機溶媒を反応中に含んで、それによって、NHS基のより効率的な利用、そしてその結果、より効率的なタンパク質標識を可能にしうる。DIEA(ジイソプロピルエチルアミン)などの非求核有機塩

50

基を U P S 反応中に含んで、N - ヒドロキシスクシンイミジルエステルとリジンのアミン側鎖の反応を触媒させることが可能である。

【 0 0 9 5 】

有機溶媒は、疎水性側鎖を可溶化する能力を持っているため、強いタンパク質変性特性を有し、そしてしたがって、タンパク質側鎖上の基と反応する活性 U P S 試薬に対して、タンパク質側鎖の利用可能性を最大にする。溶媒の同一性もまた、固体支持体の表面層の特性および溶媒の特性にしたがって、核酸リガンドアレイが固定されている固体支持体の染色の度合いに大きな影響を及ぼしうる。したがって、本発明の好ましい態様において、U P S 反応（単数または複数）を、少なくとも部分的に、U P S の構成要素と固体支持体の表面層の反応性を抑制する能力のために選択された、有機溶媒（類）の存在下で行う。例えば、N H S に活性化される色素用の A c c e l r 8 スライド上の O p t i C h e m 表面の表面反応性は、水性条件下では、極性非プロトン性有機溶媒 D M F または D M S O 中で抑制される（おそらく表面ゲル層の脱水および崩壊のため）。

10

【 0 0 9 6 】

当業者は、本明細書に提供する方法にしたがって U P S 反応（単数または複数）用の有機溶媒を用いると、水性溶液中で行う同一の反応に比較して、タンパク質標識の劇的な改善が導かれうることを認識するであろう。具体的には、適切な有機溶媒（類）を U P S 反応（単数または複数）で用いると、U P S 試薬（類）の安定性の改善、タンパク質側鎖基の利用可能性の改善、および固体支持体表面層の反応性抑制の改善を同時に実現可能である。例えば、N H S に活性化される色素を含んでなる U P S と組み合わせて有機溶媒を使用すると、タンパク質の染色が増加し（タンパク質側鎖中のアミンの利用可能性増加のため、そして N H S 基の加水分解減少のため、少なくとも 10 倍）、そしてスライド表面の染色が減少し（およそ 5 倍）、こうして染色プロトコルの感度が増加する。

20

【 0 0 9 7 】

U P S の感度は、アレイが固定されている固体支持体の表面と U P S が反応することによる、または核酸リガンドフィーチャー中の少ない割合の D N A 塩基と U P S が反応することによる、バックグラウンドシグナルによって限定される可能性がある。いくつかの態様において、U P S には、アミノ酸と共有的に反応して、天然には存在しない修飾アミノ酸側鎖の形成を導く試薬が含まれる。U P S はさらに、修飾アミノ酸に結合するが、未修飾アミノ酸に結合しない試薬、好ましくは抗体を含んでなる。抗体を検出可能部分、例えば蛍光体または酵素に直接コンジュゲート化することが可能である。あるいは、さらなる U P S 試薬を添加して、結合した抗体に向けて検出可能部分を間接的に局在させることが可能である。例えば、第一の抗体を認識する蛍光標識二次抗体を使用可能である。

30

【 0 0 9 8 】

修飾アミノ酸を使用する 1 つの態様において、U P S は、テトラニトロメタン（チロシンおよび他の芳香族アミノ酸をニトロシル化する）を含んでなり、そしてさらに抗ニトロチロシン抗体を含んでなる。別の態様において、U P S は、スルホ - N H S アセテート（リジン残基をアセチル化する）を含んでなり、そしてさらに抗アセチル化リジン抗体を含んでなる。

40

【 0 0 9 9 】

U P S 試薬の例を実施例 3 および実施例 4 に提供する。

本明細書に記載する U P S 試薬を用いて、核酸リガンドに結合する標的タンパク質を検出することが可能であり、これには、光架橋核酸リガンドおよび非光架橋核酸リガンドが含まれる。好ましくは、U P S 試薬を用いて、固体支持体上に固定された核酸リガンドへの標的タンパク質結合を検出する。特に好ましい態様において、U P S 試薬を用いて、核酸リガンドの多重化アレイへの標的タンパク質結合を検出する。こうしたアレイにおいて、タンパク質が結合するアレイ上の位置（「アドレス」）によって、標的同一性を決定する。多重化アレイを用いたいくつかの態様において、単一の U P S を用いて、数百または数千の異なる標的タンパク質の結合を検出可能である。

【 0 1 0 0 】

50

実施例

例示目的のみのために以下の実施例を提供し、そして該実施例は本発明の範囲を限定することを意図しない。

【0101】

(実施例1)

固体支持体上に光架橋核酸リガンドをアレイ化するプロトコル

以下の説明は、光架橋核酸リガンドを含むアミン末端核酸リガンドを、Surmodics N-ヒドロキシ-スクシンイミド活性化スライド表面上にアレイ化する、典型的でそして限定されない方法を提供する。

【0102】

150 mM NaPO₄ pH 8.5、0.001% ザルコシル中で、各核酸リガンドの10 μM 溶液を作成することによって、プリンティング用の光アプタマーを調製する。各アプタマー 15 μl を 384 ウェルマイクロタイープレートウェルに入れる。対照には、30N12 無作為DNA、DNAを含有しないプリント緩衝液、およびコーナーマーカーとして使用するための 30N12 無作為DNA + 0.2 μM NH-モデル-Cy3 が含まれる。マイクロタイープレートを簡単に遠心分離して、すべての物質をウェル底に引き寄せ、そしてプレートはここでプリンティングの用意ができている。

【0103】

以下の方法にしたがって Packard Gene Array コンタクトスポットなどの商業的プリンターを用いて、プリンティングプロセスを行うことが可能である（コンタクトスポットは 22 および 62% RH に維持する）：

1. アレイ形式で、スライド上に ~1 n l の小滴を沈着させる。
2. 小滴を数時間インキュベーションさせる。
3. スライドをスポットティング後溶液 (0.2 M Tris HCl、0.05 M アスパラギン酸、pH 9.0、1% SDS (使用直前に添加)) に室温 (18) で 60 分間浸す。
4. スライドをスポットティング後安定化緩衝液 (NaCl、クエン酸Na、pH 7.0、0.1% SDS (使用直前に添加)) に 48 で 60 分間浸す。
5. スライドを SELEX 緩衝液 (40 mM HEPES、pH 7.5、111 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、0.05% Tween-20) に室温 (18) で 30 分間浸す。
6. 各々、300 ml 脱イオン水で 1 分間 5 回 リンスする。
7. 乾燥を防止するため、スライドを湿った環境に保管する。

【0104】

より好ましくは、以下の方法にしたがってプリンティング法を行うことが可能である：

1. 1 n l スポットをアレイ形式に沈着させ、そして表面上で小滴を 2 時間インキュベーションさせる。
2. プリンティングプロセス後、表面上の残った官能基を 20 mM NaOH に浸すことによって加水分解し、その後、20 分間震盪し、そして ddH₂O で リンスする。
3. その後、0.2 mg/ml のスルホ-NHS-アセテートで表面をプロッキングし、そして震盪しながら 60 分間インキュベーションし、その後、ddH₂O で リンスする。このプロッキング工程は、アミン反応性タンパク質色素でのスライド表面の染色を防止する。
4. 窒素ガス下でスライドを乾燥させる。

特異的なプリンティングプロトコルは、核酸リガンド固定に用いる各表面で異なる。

【0105】

(実施例2)

マイクロビーズ支持体

マイクロビーズが核酸リガンド結合の別の支持体である。カルボキシ誘導体化ビーズを NaOH で洗浄し、その後、pH 6.0 の 100 mM MES (2-(N-モルホリノ)

- エタンスルホン酸) 緩衝液中の 250 mM EDC で活性化する。その後、この活性化ビーズを、pH 6.0 の 100 mM MES 緩衝液中の 250 mM スルホ-N-ヒドロキシ-スクシンイミドを用いて室温で 3 時間処理する。pH 9.0 の 100 mM 重炭酸緩衝液中の 500 mM C TAB (ヘキサデシルトリメチルアンモニウムプロミド)、2% PEG (8 kDa) 中の 10 μM 5'-アミン核酸リガンドの溶液を添加することによって、アプタマーをビーズにカップリングする。カルボキシ、アミン、ストレプトアビジン、およびエポキシド官能性で誘導体化されたビーズを含む支持体として、多様なビーズ種が用いられてきている。

【0106】

(実施例 3)

UPS と標的のインキュベーション、光架橋、および検出

以下の典型的なプロトコルによって、同族光架橋核酸リガンドに結合して、そして光架橋されたタンパク質標的の多重化検出が可能になる。この実施例中の UPS は、蛍光体 Alexa 555 (Molecular Probes, Inc.) の NHS 誘導体である; しかし、当業者は、この実施例が他の UPS 試薬に広く適用可能であり、そして NHS 誘導体に限定されないことを理解するであろう。

【0107】

1. スライドを希釈緩衝液 (1× SEL EX 緩衝液、0.05% Tween、150 μg / ml tRNA、0.1 mg / ml カゼイン) で 15 分間平衡化し、そして溶液を取り除く

2. アレイに、適切な試料マトリックス中で調製したタンパク質混合物を添加する。

3. 加湿チャンバー中、より好ましくはフローセル (体積 300 μl、流速 3 ml / 分) 中、30 で 1~2 時間インキュベーションする。

4. タンパク質溶液を取り除き、希釈緩衝液を添加し、そして室温で 5 分間インキュベーションする。

5. 3 J / cm²、308 nm の光でスライドを架橋する (照射の間、スライドを湿ったままにしておく)

6. スライドを:

a. 1×SSPE + 0.1% SDS: 15 分間 (20×SSPE = 200 mM p H 7.4 NaH₂PO₄、5 M NaCl および 20 mM EDTA)

b. 20 mM NaOH: 5 分間

c. H₂O で 3 回、全部で 5 分間洗浄し、N₂ 乾燥する

7. 炭酸緩衝液 (0.1 M 炭酸 Na、pH 8.75、1 mM EDTA、0.1% Tween-20) 中、Alexa 555 NHS を 10 mg / ml のストックから 0.01 mg / ml に希釈する

8. 加湿チャンバー中、スライドあたり 1 ml を添加する

9. 室温で 30 分間インキュベーションする

10. スライドチャンバーを

a. 0.1% SDS で 15 分間

b. 20 mM NaOH で 5 分間

c. d H₂O で 3 回、全部で 5 分間洗浄して、乾燥する

11. Alexa 555 の cy3 チャネル中、Array Workx で読み取る

【0108】

(実施例 4)

UPS の比較

bFGF (塩基性線維芽細胞増殖因子) を認識する、2つの異なる光架橋核酸リガンド (6.7 および 6.40; 図 3 を参照されたい) を、実施例 1 に上述するような Surround odds スライド表面上に付着させ、そして 1 nM および 10 nM 濃度の bFGF とスライドを接触させた。実施例 3 にしたがって、架橋を開始し、そして異なる UPS を用いて、bFGF 結合レベルを決定した。図 4 は、1 nM bFGF および 10 nM bFG

10

20

30

40

50

Fで、2つの異なるbFGF核酸リガンドに関して、CBQCA染色と比較したNHS-Alexa-555染色を示す。

【0109】

bFGF、アンジオゲニン、およびエンドスタチンに対する光架橋核酸リガンドを含むSurmodicsスライドを用いて、さらなるUPS試薬をアッセイした。標的タンパク質濃度は10nM bFGF、50nMエンドスタチン、および50nMアンジオゲニンであった。図5は、明記する濃度のNHS-Alexa-555、マレイミド-Alexa-555、および2つの異なるpH値のトラウト試薬後、マレイミド-Alexa-555で観察された染色間の比較を例示する。光架橋核酸リガンドの配列を図3に提供する。

10

【0110】

また、UPSとして、チロシンのニトロシル化後、抗ニトロシル化チロシン一次抗体で染色し、その後、蛍光二次抗体で染色した場合も調べた。図6は、異なるタンパク質濃度で、固定bFGFアブタマーを用いて得た結果を示す。具体的には、グラフは、10g(タンパク質の存在下の相対蛍光単位(RFU) - タンパク質の非存在下のRFU)に対して10g(pg/ml bFGFタンパク質)をプロットする。

【0111】

(実施例5)

ビニル-スルホン-PEG核酸リガンドコンジュゲートの調製

いくつかの5'アミン誘導体化核酸リガンド(92.4、328.43、334.46、71.25、12.48、6.40、457.4、311.37)に関して、pH9.2の100mMホウ酸緩衝液の10μlアリコット中、2μl乾燥DMSO中の6等量の二官能性NHS-PEG(3400kDa) - ビニルスルホン(Shearwater)で核酸リガンドを処理することによって、ビニルスルホン-PEG-核酸リガンドコンジュゲートの調製を達成した。あらかじめ平衡化したイオン交換カラム(SartoriusのQ5)上でコンジュゲート化核酸リガンドを精製して、過剰なPEG試薬を取り除き、その後、1M NaClで溶出した後、Sephadex G50脱塩カラム上で脱塩した。ビニルスルホン-PEG-核酸リガンドをチオール活性化表面(Apogent)上にプリンティングした。

20

【0112】

図7は、核酸マイクロアレイを含むApogentスライド表面上の明記したタンパク質に関する用量反応曲線を示す。2つのデータセットは、PEGリンカー付着を伴うものおよび伴わないものの、エンドスタチンに対する光架橋核酸リガンド(92.4)の活性を対比させる。データは、修正RFU(RFU - バックグラウンド)に対するエンドスタチン濃度(M)としてプロットされている。PEGリンカーが92.4光架橋核酸リガンドのタンパク質結合活性を増進することがわかる。

30

【0113】

(実施例6)

67の光架橋核酸リガンドのアレイ

実施例1の方法にしたがって、25の異なるタンパク質標的に対する67の光架橋核酸リガンドをアレイ化した。各光架橋核酸リガンドを3つ組でスポットティングした。アレイはまた、以下のアドレスも含んでなる:

40

1. スキャナーにおいて、アレイを位置決定するための蛍光タンパク質(蛍光標識ヤギ抗ウサギ抗体);

2. アレイ上のDNAの非特異的結合/標識を評価するための無作為DNAプール(30N12 DNA);

3. アミン修飾DNAでなくヒドロキシDNA(OH6.7)と接触させたアドレス。ヒドロキシDNAは、スライドの誘導体化表面に結合しないであろう。

4. N-6.40 DNA。塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)に対するこのアミン修飾光架橋核酸リガンドは、3つの異なる位置(各々3つ組)でアレイ上に見られる

50

。各アドレスは別々のときにスポットティングされたため、アレイ上に最初にスポットティングされた光架橋核酸が、後にスポットティングされたものと異なる振る舞いをするかどうかを決定することが可能になる。アレイレイアウトを図8に提供する（各フィーチャーは連続3回存在する）。

【0114】

このレイアウトで8つの複製アレイを產生した。アレイ上の各光アプタマーの配列を図3に提供する（「N-」は、スライドに各光アプタマーを付着させるのに用いた5'アミノ-C6リンカーの存在を示す）。

【0115】

表2（レベル1～8と称する個々の濃度の手掛かりを提供する）および表3（個々の標的タンパク質混合物（試験管1～8）各々の標的タンパク質濃度プロフィール（レベル1～8）を示す）に詳述するように、タンパク質混合物を產生した。

【0116】

【表2】

タンパク質レベル範囲（モル/1）						
レベル1	レベル2	レベル3	レベル4	レベル5	レベル6	レベル7
0	1E-11	3.16E-11	1E-10	3.16E-10	1E-09	1E-08

【0117】

表2

【0118】

【表3】

	試験管1	試験管2	試験管3	試験管4	試験管5	試験管6	試験管7	試験管8
IL-4	5	2	3	8	4	1	7	6
bFGF	2	3	8	4	1	7	6	5
アンジオゲニン	3	8	4	1	7	6	5	2
エンドスタチン	8	4	1	7	6	5	2	3
pセレクチン	4	1	7	6	5	2	3	8
血清アミロイドタンパク質	1	7	6	5	2	3	8	4
トロンビン	7	6	5	2	3	8	4	1
TGF- β 1	6	5	2	3	8	4	1	7

【0119】

表3 個々の標的タンパク質混合物の標的タンパク質濃度プロフィール

図9は、明記する標的濃度で、bFGF、アンジオゲニン、エンドスタチン、およびトロンビン光架橋核酸リガンドのアレイから取った画像を示す。

図10は、トロンビン光架橋核酸リガンド反応の複数のアレイからの画像を示す。このデータを用いて、トロンビン光架橋核酸リガンドの用量-反応曲線を提供する。

図11は、4つの複製アレイからのbFGF、アンジオゲニン、エンドスタチン、およびトロンビン光架橋核酸リガンドの画像を示す。各標的タンパク質の相対濃度は、グラフに示すように、アレイ間で多様である。

図12は、各々、異なる濃度のbFGFと接触させた、複数のアレイ由来のbFGF光架橋核酸リガンド結合曲線を示す。グラフは、RFUに対するbFGF濃度(pM)のプロットである。

【0120】

(実施例7)

血清中のHIV gp120 MNの検出

実施例1および実施例3の技術を用いて、gp120 MN、bFGF、およびトロンビンに対する光架橋核酸リガンドをスライド上にアレイ化した。一方のスライドを5%血清

10

20

30

40

50

のみとインキュベーションし；もう一方のスライドを、5%血清 + 100 nM gp120 MNとインキュベーションした。図13は、生じたアレイシグナルを例示する。トロンビン（血清中に存在）が両方で検出され、そしてgp120 MN光架橋核酸リガンドがいかなる血清タンパク質とも交差反応しないことがわかる。

【0121】

（実施例8）

14の標的タンパク質分析物に向けられる光架橋核酸リガンドのアレイ

実施例1にしたがって、スライド上にアレイをプリンティングした。各スライドは8つの複製アレイを含んでなった。各光架橋核酸リガンドを連続4回スポットティングし、各アレイ上に総数96の光架橋核酸リガンドフィーチャーを生じた。アレイのレイアウトを図14に示す。個々の光架橋核酸リガンドの配列を図3に提供する。

【0122】

14の異なるタンパク質（エンドスタチン、ルシフェラーゼ、トロンビン、IL-4、tPA、カタラーゼ、C3、IL-8、フォン・ウィルブランド因子、bFGF、HIV gp120 MN、IGFBP-3、アンジオゲニン、およびVEGF）を含有するタンパク質混合物を產生した。アプタマー感度および特異性を試験するため、タンパク質混合物を設計した。8つのタンパク質混合物を、各タンパク質が、少なくとも一度は混合物中の他のタンパク質各々より多く存在するように設計した。個々のタンパク質の濃度範囲は、タンパク質の大部分に関して、10 pM ~ 10 nMであった。高濃度の場合、ある程度の非特異的反応が引き起こされるため、タンパク質のうち3つ（bFGF、HIV gp120 MN、およびフォン・ウィルブランド因子）は10 pM ~ 2 nMで存在した。各混合物中、添加した総タンパク質濃度はおよそ25 nMであった。タンパク質混合物多重設計の例を表3（レベルA ~ Hと称する個々の濃度の手掛かりを提供する）および表4（個々のタンパク質混合物（試験管1 ~ 8）の標的タンパク質濃度プロファイルを示す）に提供する。

【0123】

【表4】

	タンパク質レベル範囲（モル/1）							
	レベルA	レベルB	レベルC	レベルD	レベルE	レベルF	レベルG	レベルH
bFGF, gp120, フォン・ ウィルブランド	0.00E+00	1.00E-11	2.40E-11	5.80E-11	1.40E-10	3.40E-10	8.30E-10	2.00E-09
他のタンパク質すべて	0.00E+00	1.00E-11	3.20E-11	1.00E-10	3.20E-10	1.00E-09	3.20E-09	1.00E-08

【0124】

表3：標的タンパク質濃度手掛かり

【0125】

10

20

30

【表5】

	試験管1	試験管2	試験管3	試験管4	試験管5	試験管6	試験管7	試験管8
gp120MN	E	B	C	H	D	A	G	F
bFGF	C	H	D	A	G	F	E	B
フォン・ ウイルブランド	F	E	B	C	H	D	A	G
アンジオゲニン	B	C	H	D	A	G	F	E
IL4	H	D	A	G	F	E	B	C
ルシフェラーゼ	D	A	G	F	E	B	C	H
tPA	A	G	F	E	B	C	H	D
C3	G	F	E	B	C	H	D	A
IL8	E	F	D	A	G	B	C	H
IGFBP3	F	D	A	G	B	C	H	E
エンドスタチン	D	A	G	B	C	H	E	F
VEGF	A	G	B	C	H	E	F	D
トロンビン	G	B	C	H	E	F	D	A
カタラーゼ	B	C	H	E	F	D	A	G

【0126】

表4：個々の標的タンパク質混合物の標的タンパク質濃度プロフィール

4つの試料マトリックスにタンパク質混合物を添加した：

a. ヒト脱線維素 / 脱脂質血清基本マトリックス：病原体活性を中和するよう操作したプロセシング血清。この血清はグロブリンを欠き、そして脂質含量のほとんどを欠く。5 % 基本マトリックスの総血清タンパク質は 3 mg / ml である。

b. 尿：プールした男性の尿、総タンパク質 = 90 µg / ml。50 % 希釈で用いる。

c. 組織培地：RPMI (Roswell Park Memorial Institute)、血清補充なし。試料の 95 % として用いる。

d. 「血餅除去 (Off the Clot)」(OTC) 血清：プールしたヒト血清。血清を SELEX 緩衝液中で 50 % に希釈し、300 K 分子量カットオフフィルターでろ過し、そして、12 mg / ml 総タンパク質である、最終濃度 20 % に希釈した。血清ろ過後、タンパク質混合物を添加した。

【0127】

個々のタンパク質混合物（試料マトリックス中）各々をアレイとインキュベーションし、そして UPS として N - ヒドロキシ - スクシンイミド - Alexa - 555 を用い、実施例3の方法にしたがってプロセシングした。したがって、総数で 32 の異なるアッセイ試料があった（4つの試料マトリックス各々における 8 つのタンパク質混合物各々）。各スライドは 8 つの複製アレイを有するため、4つのスライドしか用いずに、すべてのアッセイを実行し、各スライドは、特定の試料マトリックスにおいて、14 のタンパク質標的の用量反応曲線を提供する。

【0128】

図15は、同族標的タンパク質とのインキュベーション後のアレイの蛍光画像を示す。5 % 脱線維素 / 脱脂質血清基本マトリックスまたは 50 % 尿または 95 % 組織培養上清において、1 nM 未満の濃度で、すべてのタンパク質が検出可能であった。

図16は、エンドスタチン核酸リガンドの用量反応プロフィールを示すアレイ画像を提供する（0 pM ~ 1,000 pM エンドスタチン）。アレイ上のエンドスタチンフィーチャーをボックスに区別する。

図17は、5 % 脱線維素 / 脱脂質ヒト血清基本マトリックス中の、14 の異なる標的タンパク質の用量反応曲線を提供する。各プロットは、タンパク質標的濃度 (pM) 対 RFU を示す。

【0129】

この実施例は、核酸リガンドマイクロアレイを用いて、血清および尿標本を含む複合タ

ンパク質混合物において、特定のタンパク質濃度を測定可能であることを立証する。単一のスライド上にプリンティングした8のアレイから、14のタンパク質に対して、用量反応曲線を同時に生成した。複数の試料マトリックスにおけるタンパク質のナノモル未満の測定によって、光アプタマーアレイの感度および再現性が立証されている。結果は、光アプタマーアレイが、分析実験室セッティング、すなわち：ハイスループットで使用するのに必要な品質、一定の条件で複数の分析物をアッセイする能力、最小限の試料体積(<100 μl)を使用する能力、再現可能な結果を提供する能力、および最小限のマトリックス干渉を所持することを立証する。

【0130】

(実施例9)

10

5%血清における同族タンパク質の検出

実施例1および実施例3の技術を用いて、bFGF、VEGF、エンドスタチン、およびカタラーゼに対する光架橋核酸リガンドをスライド上にアレイ化した。マイクロアレイを5%血清(0.2ミクロンフィルターでろ過して粒子を取り除くが、他のいかなる前処理も行わない)に曝露し、いくつかの試料を1pM~1nMのさまざまな濃度のさらなるbFGF、VEGF、エンドスタチン、およびカタラーゼでスパイク処理した。5%血清のマトリックスにおけるVEGF、エンドスタチン、およびカタラーゼの用量反応は明瞭であり、血清の干渉は最小限である。試料中で5%の血清を用いると、UV光架橋工程後、徹底的で厳しい洗浄処理が必要であり、これは以下のように定義される：マイクロアレイに渡る、10mM DTT、0.1% SDS、70mM TRIS緩衝液pH11.0、および500mM NaClの流れ、40~30分間。未処理血清の存在下で、Accell8および他のものが提供する非汚染(non fouling)表面は、最も信頼のにおける用量反応曲線を生じる。Accell8スライド表面上、5%血清におけるVEGF、エンドスタチン、およびカタラーゼの用量反応曲線を、図18に示す。個々のプロットは10g RFUに対する10g[タンパク質、M]のものである。

20

【0131】

(実施例10)

ビーズ上の同族タンパク質の検出

実施例2に記載するように、ビーズに核酸リガンドを装填し、その後、同族タンパク質に曝露した際、平面で観察されるものと類似の用量反応曲線を生成可能である。図19は、b-NGFに対する5つの特有の核酸リガンドとともに、1つの非同族アプタマーのタンパク質結合曲線を示す。10pM~100nMの範囲でタンパク質濃度を試験した。6.15と称する非同族核酸リガンドは、非特異的タンパク質結合のバックグラウンドシグナルを立証する。これらの結合曲線を用いて、最高の感度および最低の非特異的バックグラウンドについて、核酸リガンドをランク付けすることが可能である。

30

【0132】

(実施例11)

内因性血清タンパク質の検出

血清中にスパイク処理したタンパク質を検出するのに加えて、光架橋核酸アレイは、血清または組織培養上清などの試験液体において、標的タンパク質の内因性レベルを検出することが可能である。1%血清、5%脱脂質血清、50%血清基本マトリックスまたは50%ろ過血清をアレイ(実施例1にしたがって产生)に添加し、平衡化させ、架橋し、その後、捕捉したタンパク質が変性するのを回避するため、未変性条件下で洗浄した。エンドスタチンおよびトロンビンに特異的な抗体を、捕捉したタンパク質に結合させ、そしてAllexa-555標識抗ウサギ二次抗体の使用によって、これらの抗体を検出した。組織培養上清または未処理血清において、内因性タンパク質と光アプタマーの反応を観察し；アレイ上の他の光アプタマーはいずれも、内因性タンパク質と反応しなかった。図20を参照されたい。LNCAP組織培養上清由来の上清で処理し、そして抗エンドスタチン抗体で標識したアレイでも、同様の結果が観察された。

40

【図面の簡単な説明】

50

【0133】

【図1】図1は、異なる標的タンパク質混合物に関して予測されるアッセイ反応を例示する(10g([P])対10g相対蛍光(RF)のプロットとして示す)。太い曲線は、交差反応性がない場合に期待される反応である。タンパク質1~5に関する非特異的相互作用の反応を、印をつけた曲線に示す。

【図2】図2は、異なる標的タンパク質混合物に関するアッセイ反応を例示する(10g([P])対10g相対蛍光(RF)のプロットとして示す)。太い曲線は、交差反応性がない場合に期待される反応である。タンパク質6~9に関する非特異的相互作用の反応を、印をつけた曲線に示す。

【図3-1】図3は、本発明の光架橋核酸リガンドの配列を提供する。

10

【図3-2】図3は、本発明の光架橋核酸リガンドの配列を提供する。

【図3-3】図3は、本発明の光架橋核酸リガンドの配列を提供する。

【図3-4】図3は、本発明の光架橋核酸リガンドの配列を提供する。

【図3-5】図3は、本発明の光架橋核酸リガンドの配列を提供する。

【図3-6】図3は、本発明の光架橋核酸リガンドの配列を提供する。

【図3-7】図3は、本発明の光架橋核酸リガンドの配列を提供する。

【図3-8】図3は、本発明の光架橋核酸リガンドの配列を提供する。

【図3-9】図3は、本発明の光架橋核酸リガンドの配列を提供する。

【図3-10】図3は、本発明の光架橋核酸リガンドの配列を提供する。

20

【図3-11】図3は、本発明の光架橋核酸リガンドの配列を提供する。

【図3-12】図3は、本発明の光架橋核酸リガンドの配列を提供する。

【図4】図4は、1nM bFGFおよび10nM bFGFでの2つの異なるbFGF核酸リガンドに関して、CBQCA染色と比較したNHS-Allexa-555染色を示す。

【図5】図5は、明記した濃度のNHS-Allexa-555、マレイミド-Allexa-555、および2つの異なるpH値でのトラウト試薬処理後のマレイミド-Allexa-555下の、bFGF、アンジオゲニン、およびエンドスタチンに対する光架橋核酸リガンドで観察される標的染色間の比較を例示する。

【図6】図6は、テトラニトロメタン/抗ニトロチロシン抗体を含んでなるUPSを用い、異なるタンパク質濃度で固定bFGFアブタマーを用いて得られる結果を示す。具体的には、グラフは、10g(タンパク質の存在下での相対蛍光単位(RFU) - タンパク質の非存在下でのRFU)に対する10g(pg/ml bFGFタンパク質)をプロットする。

30

【図7】図7は、核酸マイクロアレイを含むApogentスライド表面上の明記するタンパク質に関する用量反応曲線を示す。2つのデータセットは、PEGリンカー付着を伴うものおよび伴わないものの、エンドスタチンに対する光架橋核酸リガンド(92.4)の活性を対比させる。データは、修正RFU(RFU - バックグラウンド)に対するエンドスタチン濃度(M)としてプロットされている。

【図8】図8は、光架橋核酸アレイのレイアウトを例示する。各フィーチャーを3回連続してスポットティングする。

40

【図9】図9は、明記する標的濃度で、bFGF、アンジオゲニン、エンドスタチン、およびトロンビン光架橋核酸リガンドのアレイから取った画像を示す。

【図10】図10は、トロンビン光架橋核酸リガンド反応の複数のアレイからの画像を示す。このデータを用いて、トロンビン光架橋核酸リガンドの用量 - 反応曲線を提供する。

【図11】図11は、4つの複製アレイからのbFGF、アンジオゲニン、エンドスタチン、およびトロンビン光架橋核酸リガンドの画像を示す。各標的タンパク質の相対濃度は、グラフが示すように、アレイ間で多様である。

【図12】図12は、各々、異なる濃度のbFGFと接触させた、複数のアレイ由来のbFGF光架橋核酸リガンド結合曲線を示す。グラフは、RFUに対するbFGF濃度(nM)のプロットである。

50

【図13】図13は、g p 1 2 0 M N、b F G F、およびトロンビンに対する光架橋核酸リガンドを含んでなるアレイを例示する。一方のスライドを5%血清のみとインキュベーションし；もう一方のスライドを、5%血清+1 0 0 n M g p 1 2 0 M Nとインキュベーションした。

【図14】図14は、光架橋核酸アレイのレイアウトを例示する。

【図15】図15は、同族標的タンパク質とのインキュベーション後の、図14のアレイの蛍光画像を示す。

【図16】図16は、エンドスタチン核酸リガンドの用量反応プロフィールを示すアレイ画像を提供する(0 p M ~ 1 0 , 0 0 0 p M エンドスタチン)。アレイ上のエンドスタチンフィーチャーをボックスに区別する。10

【図17A】図17Aは、5%脱線維素/脱脂質ヒト血清基本マトリックスにおける14の異なる標的タンパク質の用量反応曲線を提供する。各プロットは、タンパク質標的濃度(p M)対RFUを示す。

【図17B】図17Bは、5%脱線維素/脱脂質ヒト血清基本マトリックスにおける14の異なる標的タンパク質の用量反応曲線を提供する。各プロットは、タンパク質標的濃度(p M)対RFUを示す。

【図17C】図17Cは、5%脱線維素/脱脂質ヒト血清基本マトリックスにおける14の異なる標的タンパク質の用量反応曲線を提供する。各プロットは、タンパク質標的濃度(p M)対RFUを示す。

【図17D】図17Dは、5%脱線維素/脱脂質ヒト血清基本マトリックスにおける14の異なる標的タンパク質の用量反応曲線を提供する。各プロットは、タンパク質標的濃度(p M)対RFUを示す。20

【図17E】図17Eは、5%脱線維素/脱脂質ヒト血清基本マトリックスにおける14の異なる標的タンパク質の用量反応曲線を提供する。各プロットは、タンパク質標的濃度(p M)対RFUを示す。

【図17F】図17Fは、5%脱線維素/脱脂質ヒト血清基本マトリックスにおける14の異なる標的タンパク質の用量反応曲線を提供する。各プロットは、タンパク質標的濃度(p M)対RFUを示す。

【図17G】図17Gは、5%脱線維素/脱脂質ヒト血清基本マトリックスにおける14の異なる標的タンパク質の用量反応曲線を提供する。各プロットは、タンパク質標的濃度(p M)対RFUを示す。30

【図18】図18は、A c c e l r 8スライド表面上、5%血清におけるV E G F、エンドスタチン、およびカタラーゼの用量-反応曲線を例示する。個々のプロットは、10 g RFUに対する10 g [タンパク質、M] のものである。

【図19】図19は、ビーズ上に固定された、b - N G Fに対する5つの特有の核酸リガンドとともに、1つの非同族アプタマーのタンパク質結合曲線を示す。

【図20】図20は、固体支持体上に固定されたエンドスタチンおよびトロンビン光架橋核酸リガンドを用いた、組織培地および20%「血餅除去」血清における内因性トロンビンおよびエンドスタチンの検出を例示する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SomaLogic, Inc.
Gold, Larry
Smith, Jonathan Drew
Zichi, Dominic
Schneider, Daniel
Greef, Chad

<120> Methods and Reagents for Detecting Target Binding by Nucleic Acid
Ligands

<130> SML.07/PCT

10

<150> 60/357,297
<151> 2002-02-15

<150> 60/398,666
<151> 2002-07-26

<150> 60/400,759
<151> 2002-08-02

<150> 10/114,187
<151> 2002-04-01

<160> 145

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 1
gggaggacga tgcggggtca ccttaaccac atgaccagtc tatgccagac gacgagcggg

60

30

<210> 2
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 2
gggaggacga tgcgggcggg agcagtctat gtcatctgtc caccctccaga cgacgagcgg 60
g 61

<210> 3
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 10

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 3
gggaggacga tgcggccggg agttaaacac tcagtctatg cgccccagac gacgagcggg 60
20

<210> 4
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g 30

<400> 4
gggaggacga tgcgggcccc acggcagtct atgtcatcaa ccccccagac gacgagcggg 60

<210> 5
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base

```

<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 5
gggaggacga tgcgggcca ctttctacag ggcagtctat gtcatcagac gacgagcggg       60

<210> 6
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence                                              10

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 6
gggaggacga tgcgggcaa ccacgtggta ttattgacct tgcaatggga atgcccagac       60
gacgagcggg                                              70                                              20

<210> 7
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g                                              30

<400> 7
gggaggacga tgcgggcaa actgcgtcgt attataagcc tcgctacaga tgccacagac       60
gacgagcggg                                              70

<210> 8
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

```

<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 8
gggaggacga tgcgggcacc tacctgagct acatatgaca gtgtcacccct ggcccccagac 60
gacgagcggg 70

10

<210> 9
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

20

<400> 9
gggaggacga tgcgggccaa atggactttt cgccacgaac ttacgacggt gttgccagac 60
gacgagcggg 70

<210> 10
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

30

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 10
gggaggacga tgcggcacca aaaggtggtc ttagccta at tatggacgtg tccaccagac 60
gacgagcggg 70

```

<210> 11
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 11
gggaggacga tgcgggcccac gtgtattatc ctcagcttat agccatggca tggaccagac 60
gacgagcggg 70

<210> 12
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence 20

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 12
gggaggacga tgcngggccct acttgcatga atatccactc ctaggcttga gggagcagac 60
gacgagcggg 70 30

<210> 13
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)

```

```

<223> t is 5-BrdU
<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 13
gggaggacga tgcgggcaaa gtctggtcc accaaatatg tcatgtcacc accagcagac 60
gacgagcggg 70

<210> 14
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 10

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-acrydite-g

<400> 14
gggaggacga tgcgggcaaa gtctggtcc accaaatatg tcatgtcacc accagcagac 60
gacgagcggg 70 20

<210> 15
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> t is 5-BrdU 30

<400> 15
gggaggacga tgcgggcga ggcacaccga gttcatagta tcccacagac gacgagcggg 60
a 61

<210> 16
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

```

```

<220> 16
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> t is 5-BrdU

<220> 17
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 16
gggaggacga tgcgggcgaa ggcacaccga gttcatagta tcccacagac gacgagcggg 60
a 61
10

<210> 17
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220> 17
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-hexaethylene glycol-g
20

<400> 17
gggaggacga tgcgggcgaa ggcacaccga gttcatagta tcccacagac gacgagcggg 60
a 61

<210> 18
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220> 18
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> t is 5-BrdU
30

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-biotin-g

<400> 18
gggaggacga tgcgggcgaa ggcacaccga gttcatagta tcccacagac gacgagcggg 60
a 61

<210> 19
<211> 61

```

<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 19
gggaggacga tgcggtgacg taagagtgt aatcgatgcag cctggcagac gacgagcggg 60
a

10

<210> 20

<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> t is 5-BrdU

20

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-SH-C6-g

<400> 20
gggaggacga tgcgggcgaa ggcacaccga gttcatagta tcccacagac gacgagcggg 60
a

61

<210> 21
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial sequence

30

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-Acrydite-g

<400> 21	gggaggacga tgcgggcgaa ggcacaccga gttcatagta tcccacagac gacgagcggg	60
<210> 22		
<211> 70		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(70)		
<223> t is 5-BrdU		10
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(1)		
<223> 5'-amino-C6-g		
<400> 22	gggaggacga tgcgggacca ataacactac actgatcatc tcccttctat gtccccagac	60
	gacgagcggg	70
<210> 23		
<211> 70		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(70)		
<223> t is 5-BrdU		20
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(1)		
<223> 5'-amino-C6-g		
<400> 23	gggaggacga tgcgggcaca cttaaatcca cttcacctta caattccttt atctgcagac	60
	gacgagcggg	70
		30
<210> 24		
<211> 70		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(70)		
<223> t is 5-BrdU		

```

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 24
gggaggacga tgcggccata cgcaacttcag tggggataat ccaactggtt tggtgagac      60
gacgagcggg                                         70

<210> 25
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence                                         10
<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 25
gggaggacga tgcgggacca aataccaact tcacatcacc tttcttattc tccggcagac      60
gacgagcggg                                         70                                         20

<210> 26
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g                                         30

<400> 26
gggaggacga tgcgggcact aactttacct ccacacctaa ccaccctcct ttctgcagac      60
gacgagcggg                                         70

<210> 27
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

```

<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 27
gggaggacga tgcggggccc aaacacttgt tcctatctt caacccccc tgcacccatc
gacgagcggg 60
70 10

<210> 28
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-Acrydite-g 20

<400> 28
gggaggacga tgcgggcaca cttaaatcca cttcacctt caattccctt atctgcagac
gacgagcggg 60
70

<210> 29
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence 30

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 29
gggaggacga tgcgggcaca agcccaacct ttcctagatc ttcccccagac gacgagcggg 60

```

<210> 30
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g 10

<400> 30
gggaggacga tgcggcacca acctagaaga gccaacctag ctgtccagac gacgagcggg 60

<210> 31
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU 20

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 31
gggaggacga tgcggcagt aatcacctcg ttgaaccaga cccttcgttt attgccagac 60
gacgagcggg 70

<210> 32
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 30

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 32
gggaggacga tgcggcaacc cccttactac accttctcca acttgatcac tctgccagac 60

```

gacgagcggg

70

<210> 33
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(60)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 33
 gggaggacga tgccggctac gtacaacgtc cactctaccc cccgtccagac gacgagcggg 60

<210> 34
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence

20

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(60)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 34
 gggaggacga tgcggcatgc agtaggtgct taaaaccctca gtatgcagac gacgagcggg 60

<210> 35
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n is a, c, g, or 5-BrdU

<220>

```

<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-Brdu

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 35
gggaggacga tgcgggnacca caggttcatt ccaacagctt ctggccgatc ttttagcagac      60
gacgagcggg                                         70

<210> 36
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-Brdu

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g                                         20

<400> 36
gggaggacga tgcggccact acacctcaact aggcttccta ccctccagac gacgagcggg      60

<210> 37
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-Brdu                                         30

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 37
gggaggacga tgcggcaagc agtaaaggat caggaccacc ttaggcagac gacgagcggg      60

<210> 38
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(70)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 38
 gggaggacga tgcggccaca cgatctcctt caccctcctg tccctactag agcatcagac 60
 gacgagcggg 70 10

<210> 39
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(70)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 39
 gggaggacga tgcggcacac cctaccctta acctcacctg tccctactag agcatcagac 60
 gacgagcggg 70 20

<210> 40
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence 30

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(60)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 40
 gggaggacga tgcggggtca ctttcgtttg cttgctgctc ccccccagac gacgagcggg 60

```

<210> 41
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-Acrydite-g 10

<400> 41
gggaggacga tgcggggtca cttcgtttg cttgctgctc ccccccagac gacgagcggg 60

<210> 42
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> t is 5-BrdU 20

<400> 42
gggaggacga tgcggcaacc caccactcta tctttcccat aactgcagac gacgagcggg 60
a 61

<210> 43
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> t is 5-BrdU 30

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 43
gggaggacga tgcggcaacc caccactcta tctttcccat aactgcagac gacgagcggg 60
a 61

<210> 44

```

```

<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-Biotin-g 10

<400> 44
gggaggacga tgcggcaacc caccactcta tctttccat aactgcagac gacgagcgg 60
a
61

<210> 45
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU 20

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 45
gggaggacga tgcgggacgg acctacccctt tcgcaactac tggtgacagac gacgagcgg 60
a
61

<210> 46
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 30
<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 46
gggaggacga tgcggcacag cgagggttgg gctttctca atttccagac gacgagcgg 60
a
61

```

<210> 47
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU 10

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 47
gggaggacga tgcgggctgc ggctaccgtt tccttaccga ctgggcagac gacgagcggg 60

<210> 48
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence 20

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 48
gggaggacga tgcgggaaca cttgtcgata gtcgtggta agctgcagac gacgagcggg 60

<210> 49
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 30

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 49
 gggaggacga tgcggcacaa tgaagtcact cttgacgctt gtattcagac gacgagcggg 60

<210> 50
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(60)
 <223> t is 5-BrdU 10

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-Acrydite-g

<400> 50
 gggaggacga tgcggcacaa tgaagtcact cttgacgctt gtattcagac gacgagcggg 60

<210> 51
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence 20

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(70)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 51
 gggaggacga tgcgggcgga cttgacggtg tcttgcgaag ctcctacttt acctacagac 60
 gacgagcggg 70

<210> 52
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 30

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(70)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)

<223> 5'-amino-C6-g
 <400> 52
 gggaggacga tgcgggcagt tagcgatagc ctttccaagt ctttgtgacg ttgcccagac 60
 gacgagcggg 70

<210> 53
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence 10

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(61)
 <223> t is 5-BrdU

<400> 53
 gggaggacga tgcggaatgc gcgagcttcc gaaaaggaaa ttacgcagac gacgagcggg 60
 a 61

<210> 54
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence 20

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(61)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 54
 gggaggacga tgcggaatgc gcgagcttcc gaaaaggaaa ttacgcagac gacgagcggg 60
 a 61

<210> 55
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(61)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base

<222> (1)..(1)
 <223> 5'-SH-C6-g

<400> 55
 gggaggacga tgcggaatgc gcgagcttcc gaaaaggaaa ttacgcagac gacgagcggg 60
 a 61

<210> 56
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> Synthetic Sequence 10
 <223>

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(60)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 56
 gggaggacga tgcggcaacc acacgcagga ggacacaacg atccgcagac gacgagcggg 60

<210> 57
 <211> 60
 <212> DNA 20
 <213> Artificial Sequence

<220> Synthetic Sequence
 <223>

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(60)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 57
 gggaggacga tgcggcgaa ggcacaccga gttcatagta tcccacagac gacgagcggg 60 30
 <210> 58

<211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(60)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 58
 gggaggacga tgcgggacga gggaccagac cgccacagcg gcatgcagac gacgagcggg 60

<210> 59
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 10
 <220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(60)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 59
 gggaggacga tgcgggagga ccacgaccat gacccaccag gaatgcagac gacgagcggg 60

<210> 60
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20
 <220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(60)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 60
 gggaggacga tgcgggcaca ggcctaacat acctccatct cctggcagac gacgagcggg 60

<210> 61
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 30
 <220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base

<222> (1)..(60)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 61
 gggaggacga tgcgggacca acgagaccac acgacaagcg ctgtgcagac gacgagcggg 60

10

<210> 62
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(57)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 62
 gggaggacga tgcgggcat ggtatggtttg gttggctgtc ctcagacgac gagcggg 57

20

<210> 63
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(61)

<223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-hexaethylene glycol-g

30

<400> 63
 gggaggacga tgcggaatgc gcgagttcc gaaaaggaaa ttacgcagac gacgagcggg 60

61

a

<210> 64
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 64
gggaggacga tgcgggcaaa gtgttatttc ttgatctgtt tcacccagac gacgagcggg 60

10

<210> 65
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)

<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-Acrydite-g

20

<400> 65
gggaggacga tgcgggcaaa gtgttatttc ttgatctgtt tcacccagac gacgagcggg 60

<210> 66
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

30

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 66
gggaggacga tgcggccacc atgtcaccc tc aattaccctt cctccagac / gacgagcggg 60

<210> 67
<211> 60

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 67
gggaggacga tgcgccaaac cctcactcct tcttcaattc acctccagac gacgagcggg 60

10

<210> 68
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 68
gggaggacga tgcgccaca actcccacca cccttcttac aactccctac tgccccagac 60
gacgagcggg 70

20

<210> 69
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

30

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 69
gggaggacga tgcgccaga cagtgtgggg tttagtgtcc atggccagac gacgagcggg 60

<210> 70
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 70
gggaggacga tgcgggcaca ctcttcaccc cctcctttta gctgccagac gacgagcggg 60

<210> 71
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(59)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 71
gggaggacga tgcgggacct ccgggtaacc aggttaactcc tagccagacg acgagcggg 59

<210> 72
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 72
gggaggacga tgcggccacc tacctctaca ctaccttacc tactccagac gacgagcggg 60

10

20

30

<210> 73
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Sequence

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(60)
 <223> t is 5-BrdU

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g 10

 <400> 73
 gggaggacga tgcgggcagg caaccattacc aagatgcccc tcctgcagac gacgagcggg 60

<210> 74
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Sequence

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(60)
 <223> t is 5-BrdU 20

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 74
 gggaggacga tgcggcacac ccctcaactt accctacttc ttggccagac gacgagcggg 60

<210> 75
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Sequence 30

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(70)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-Biotin-g

<400> 75
 gggaggacga tgcggccccc agtttcccta aggtttgggtt gacctgtcat ttcagcagac 60
 gacgagcggg 70

<210> 76
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 76
gggaggacga tgcggcccg agtttcccta aggtttggtt gacctgtcat ttcagcagac 60
gacgagcggg 70

<210> 77
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 77
gggaggacga tgcggccga agtctaaacc tgctcgtgac tttcttcga tggcagac 60
gacgagcggg 70

<210> 78
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)

<223> 5'-amino-C6-g

<400> 78
gggaggacga tgcgggccta ccaactcccc tctagtcctg ttcttatccac gttggcagac 60
gacgagcggg 70

<210> 79

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence 10

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(70)

<223> t is 5-BrdU

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5'-amino-C6-g

<400> 79
gggaggacga tgcgggccaa ggttcccttc tgcctcattt ttgtggaaac ccatccagac 60
gacgagcggg 70

<210> 80 20

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(69)

<223> t is 5-BrdU

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5'-amino-C6-g

<400> 80 30
gggaggacga tgcgggcaca ggttctatca acgttgtcct gagtaattga cctgcagacg 60
acgagcggg 69

<210> 81

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<220>

```

<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 81
gggaggacga tgcgggccaa ggacattctt gttcggtt gctgtccact gtctccagac      60
                                                               70
gacgagcggg

<210> 82
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-Acrydite-g

<400> 82
gggaggacga tgcggccccc agttcccta aggtttggtt gacctgtcat ttcagcagac      60
                                                               70
gacgagcggg

<210> 83
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU      30

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 83
gggaggacga tgcggcacac ggttgccata cccttcatta ttgagcagac gacgagcggg      60

<210> 84
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 84
gggaggacga tgcggccggc tgcttccccc ctggtcattg ttgtgcagac gacgagcggg 60

10

<210> 85
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 85
gggaggacga tgcggccaa agttccatc cacgttactc tttgccagac gacgagcggg 60

20

<210> 86
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

30

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 86
gggaggacga tgcggccaa ggttcccttc tgcctcattg ttgtgcagac gacgagcggg 60

<210> 87
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 87
gggaggacga tgcgggcacc ttctatcgac gttgcgtac ccatgcagac gacgagcggg 60

10

<210> 88
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

20

<400> 88
gggaggacga tgcgggcgga tcccaagcgcg gctaacgttt gggggcagac gacgagcggg 60

<210> 89
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

30

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 89
gggaggacga tgcgggaggc ggatcctaac gttgatttgg tgtgccagac gacgagcggg 60

<210> 90
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(70)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 90
 gggaggacga tgcggcaact accggctggg gacctgaact tcatatcccc ttcccccagac 60
 gacgagcggg 70 10

<210> 91
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(70)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 91
 gggaggacga tgcgggcacc agaacctgac cttaatgccc cctttctcag ctaagcagac 60
 gacgagcggg 70 20

<210> 92
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(70)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 92
 gggaggacga tgcgggcagg acggacgggt gagcttccct gatttaactc taccacagac 60
 gacgagcggg 70 30

<210> 93
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(70)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 93
 gggaggacga tgcgggccac ctgaatccct acgttgatag gagtatcccc ttgcccagac 60
 gacgagcggg 70

<210> 94
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(70)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 94
 gggaggacga tgcgggctga aaggaaacgg acgattgagc ttccccttac ctctccagac 60
 gacgagcggg 70

<210> 95
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(60)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base

10

20

30

<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 95
gggaggacga tgcgggacgc tagtaccctg gctggcttgg ttgggcagac gacgagcggg 60

<210> 96
<211> 67
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(67)
<223> t is 5-BrdU 10

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 96
gggaggacga tgcgggcacg cactacaggt tggtttggtt ggactttccg cacagacgac 60
gagcggg 67

<210> 97
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 20

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 97
gggaggacga tgcggcacaa accgagctct gtccagtcta tcttcacatc ttccccagac 60
gacgagcggg 70 30

<210> 98
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base

```

<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 98
gggaggacga tgcggcctgg attcaataac cggcactccc cttacctcat gggtccagac      60
gacgagcggg                                         70

<210> 99
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 99
gggaggacga tgcgggacca cttAACCTT CCTTtCTCAT ttCCACCCCC CTCcccAGAC      60
gacgagcggg                                         70

<210> 100
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU                                         30

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 100
gggaggacga tgcgggcgga agaggcaggg taccacggca gaggtcagac gacgagcggg      60

<210> 101
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

```

```

<223> Synthetic Sequence
<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU
<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g
<400> 101
gggaggacga tgcgggccaa cccctagtga acaacaacac tccccacagac gacgagcggg       60
10
<210> 102
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Sequence
<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU
<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g
20
<400> 102
gggaggacga tgcggcagca ccgaggatacc caacaggat ccgcccagac gacgagcggg       60
<210> 103
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Sequence
<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU
30
<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g
<400> 103
gggaggacga tgcggggcgc agacgcgccc ggtaccccaag gtccccagac gacgagcggg       60
<210> 104
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

```

<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 104
gggaggacga tgccggcacaa ggaacaaagc ggccctatc cccaacagac gacgagcggg 60

10

<210> 105
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 105
gggaggacga tgcggggggc aagaagcagc gtaccccagg tccgccagac gacgagcggg 60

20

<210> 106
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

30

<400> 106
gggaggacga tgcggccgga catccccag ggcaaaacca actccagac gacgagcggg 60

<210> 107
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 107
gggaggacga tgcggcaagg gaaacagata gcccaggctc ccccccagac gacgagcggg 60

10

<210> 108
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> t is 5-BrdU

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-amino-C6-g

<400> 108
gggaggacga tgcggcaacc ctgacaccac gttgtttctc cttttgggtt aaccgcagac 60
gacgagcggg 70

20

<210> 109
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> t is 5-BrdU

30

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 5'-Acrydite-g

<400> 109
gggaggacga tgcggcaacc ctgacaccac gttgtttctc cttttgggtt aaccgcagac 60
gacgagcggg 70

<210> 110

<211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Sequence

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(70)
 <223> t is 5-BrdU

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

10

<400> 110
 gggaggacga tgcggcgccc cgattgacct tcgatttatac ctacttatgg cacccagac

60

gacgagcggg

70

<210> 111
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Sequence

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(69)
 <223> t is 5-BrdU

20

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 111
 gggaggacga tgcggcacga ggaaatcacc tcgaacttgt cctggattac tgcccagacg

60

acgagcggg

69

<210> 112
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> Synthetic Sequence

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(70)
 <223> t is 5-BrdU

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 112

gggaggacga tgcggccatg aaccatcct ctggttcata atcgacgtgt tcgtgcagac	60	
gacgagcggg	70	
<210> 113		
<211> 70		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(70)		
<223> t is 5-BrdU		10
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(1)		
<223> 5'-amino-C6-g		
<400> 113		
gggaggacga tgcgggctca ataacctgaa tctacctttc cctagcaaag gtctgcagac	60	
gacgagcggg	70	
<210> 114		
<211> 70		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(70)		
<223> t is 5-BrdU		20
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(1)		
<223> 5'-amino-C6-g		
<400> 114		
gggaggacga tgcggccata cgcaacttcag tggggataat ccaactggtt tggtgcaagc	60	
gacgagcggg	70	
<210> 115		
<211> 70		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(70)		
<223> t is 5-BrdU		30

<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(1)			
<223> 5'-amino-C6-g			
<400> 115			
gggaggacga tgcgggccga ctctgaggaa aaggtttat gtatggctac ccctgcagac	60		
gacgagcggg	70		
<210> 116			
<211> 70			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			10
<220>			
<223> Synthetic Sequence			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(70)			
<223> t is 5-BrdU			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(1)			
<223> 5'-Acrydite-g			
<400> 116			
gggaggacga tgcgggccga ctctgaggaa aaggtttat gtatggctac ccctgcagac	60		
gacgagcggg	70		20
<210> 117			
<211> 70			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic Sequence			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(70)			
<223> t is 5-BrdU			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(1)			30
<223> 5'-amino-C6-g			
<400> 117			
gggaggacga tgcggccaca accttaccac cctagcctac ccctaacctc ctgtccagac	60		
gacgagcggg	70		
<210> 118			
<211> 70			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			

<223> Synthetic Sequence

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(70)

<223> t is 5-BrdU

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5'-amino-C6-g

<400> 118
gggaggacga tgcgggacca tccataacct tccgtaacac tttccttctt cttccagac 60
gacgagcggg 70 10

<210> 119

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(70)

<223> t is 5-BrdU

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5'-amino-C6-g 20

<400> 119
gggaggacga tgcgggcagc aacctacctt accttccctt agcctacctt atccccagac 60
gacgagcggg 70

<210> 120

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence 30

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(70)

<223> t is 5-BrdU

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5'-amino-C6-g

<400> 120
gggaggacga tgcgggcacc ttcttacat ctggcttca ttcttgacc attggcagac 60
gacgagcggg 70

<210> 121		
<211> 70		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(70)		
<223> t is 5-BrdU		
<220>		
<221> modified_base		10
<222> (1)..(1)		
<223> 5'-amino-C6-g		
<400> 121		
gggaggacga tgcgggcaca atcaagacct ctccaaacctt gaactctgtc tatcccagac	60	
gacgagcggg	70	
<210> 122		
<211> 58		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		
<220>		20
<221> modified_base		
<222> (1)..(58)		
<223> t is 5-BrdU		
<400> 122		
gggaggacga tgcggcagt aggttggta gggtgtctg ctcagacgac gagcggga	58	
<210> 123		
<211> 58		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		
<220>		30
<221> modified_base		
<222> (1)..(58)		
<223> t is 5-BrdU		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(1)		
<223> 5'-amino-C6-g		
<400> 123		
gggaggacga tgcggcagt aggttggta gggtgtctg ctcagacgac gagcggga	58	

<210> 124		
<211> 58		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(58)		
<223> t is 5-BrdU		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(1)		
<223> 5'-Biotin-g		10
<400> 124		
gggaggacga tgcgggcagt aggttgggta gggtgtgtctg ctcagacgac gagcggga	58	
<210> 125		
<211> 60		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(60)		
<223> t is 5-BrdU		20
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(1)		
<223> 5'-Biotin-g		
<400> 125		
gggaggacga tgcgggcagg acggacagca aggggtgagc acgagcagac gacgagcggg	60	
<210> 126		
<211> 57		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		30
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(57)		
<223> t is 5-BrdU		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(1)		
<223> 5'-amino-C6-g		
<400> 126		
gggaggacga tgcgggagga gctgatgggt ggtgaggttg gccagacgac gagcggg	57	

<210> 127			
<211> 60			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic Sequence			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(60)			
<223> t is 5-BrdU			10
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(1)			
<223> 5'-amino-C6-g			
<400> 127			
gggaggacga tgcgggcagg acggacagca aggggtgagc acgagcagac gacgagcggg		60	
<210> 128			
<211> 58			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic Sequence			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(58)			
<223> t is 5-BrdU			20
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(1)			
<223> 5'-amino-C6-g			
<400> 128			
gggaggacga tgcgggcggt tggcgtggtt ggaaatgtcc cgtcagacga cgagcggg		58	
<210> 129			
<211> 57			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			30
<220>			
<223> Synthetic Sequence			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(57)			
<223> t is 5-BrdU			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(1)			
<223> 5'-Acrydite-g			

<400> 129	gggaggacga tgcgggcagt aggttgggta gggtgtgtctg ctcagacgac gagcggg	57
<210> 130		
<211> 70		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(70)		
<223> t is 5-BrdU		10
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(1)		
<223> 5'-amino-C6-g		
<400> 130	gggaggacga tgcgggcagg agtccacttt cactccacct accggaatgt tacccagac	60
	gacgagcggg	70
<210> 131		
<211> 71		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		20
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(71)		
<223> t is 5-BrdU		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(1)		
<223> 5'-amino-C6-g		
<400> 131	gggaggacga tgcggccctc ccgaccacac ctccatcct gtccctacta gagcatcaga	60
	cgacgagcgg g	71
		30
<210> 132		
<211> 70		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Sequence		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (1)..(70)		
<223> t is 5-BrdU		
<220>		

<221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

 <400> 132
 gggaggacga tgcggcaagg tactactcct aaccttatcc cttcctcttc cttgccagac 60
 gacgagcggg 70

 <210> 133
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220> 10
 <223> Synthetic Sequence

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(71)
 <223> t is 5-BrdU

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

 <400> 133
 gggaggacga tgcggcatca aaactggggg cgagtgattt atgttagggg cctggccaga 60
 cgacgagcgg g 71

 <210> 20
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Sequence

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(70)
 <223> t is 5-BrdU

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

 <400> 134
 gggaggacga tgcgggctgg gaacatccct cttgtcttgc ttaccaaacac cgctccagac 30
 gacgagcggg 60

 <210> 70
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Sequence
 <220>

<221> modified_base			
<222> (1)..(58)			
<223> t is 5-BrdU			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(1)			
<223> 5'-amino-C6-g			
<400> 135			
gggaggacga tgcggcaaca tccctttgt cttgcttgcc ctacagacga cgagcggg		58	
<210> 136			
<211> 66			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			10
<220>			
<223> Synthetic Sequence			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(66)			
<223> t is 5-BrdU			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(1)			
<223> 5'-amino-C6-g			
<400> 136			
gcggatcagc ttgcaccggc gcaactggc agtatggcgg ggggtttggc cagaaggcaga		60	
aggacg		66	20
<210> 137			
<211> 66			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic Sequence			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(66)			
<223> t is 5-BrdU			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(1)			
<223> 5'-amino-C6-g			30
<400> 137			
gcggatcagc ttgcaccggc gtccgaatgg ctcgttaggt ggaacgtggc cagaaggcaga		60	
aggacg		66	
<210> 138			
<211> 66			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			

<220>			
<223>	Synthetic Sequence		
<220>			
<221>	modified_base		
<222>	(1)..(66)		
<223>	t is 5-BrdU		
<220>			
<221>	modified_base		
<222>	(1)..(1)		
<223>	5'-amino-C6-g		
<400>	138		
gccgttagtga	tcgctcgggg	ccgttgacac	agggacccca
			tgttgttaggc
			gaaacgacaa
		60	
gaagac			66
			10
<210>	139		
<211>	66		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Synthetic Sequence		
<220>			
<221>	modified_base		
<222>	(1)..(66)		
<223>	t is 5-BrdU		
<220>			
<221>	modified_base		
<222>	(1)..(1)		
<223>	5'-amino-C6-g		
<400>	139		
gccgttagtga	tcgctcggtc	aggccccca	gtttgggtt
			gttcaggtgc
			gaaacgacaa
		60	
gaagac			66
			20
<210>	140		
<211>	66		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Synthetic Sequence		
<220>			
<221>	modified_base		
<222>	(1)..(66)		
<223>	t is 5-BrdU		
<220>			
<221>	modified_base		
<222>	(1)..(1)		
<223>	5'-amino-C6-g		
<400>	140		
gccgttagtga	tcgctcgat	tcgtccggga	taggacctga
			tcatgaaggc
			cagaaggcaga
		60	
aggacg			66
			30

<210> 141
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Sequence

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(66)
 <223> t is 5-BrdU

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

 <400> 141
 gcggatcagc ttgcaccgct aaggtgggtg cgcgtggggc ggggacaaggc cagaaggcaga 60
 aggacg 66

 <210> 142
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Sequence

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(66)
 <223> t is 5-BrdU

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

 <400> 142
 gcggatcagc ttgcaccgtc cgcgcgcca tatgctttgg gagtgctggc cagaaggcaga 60
 aggacg 66

 <210> 143
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 30

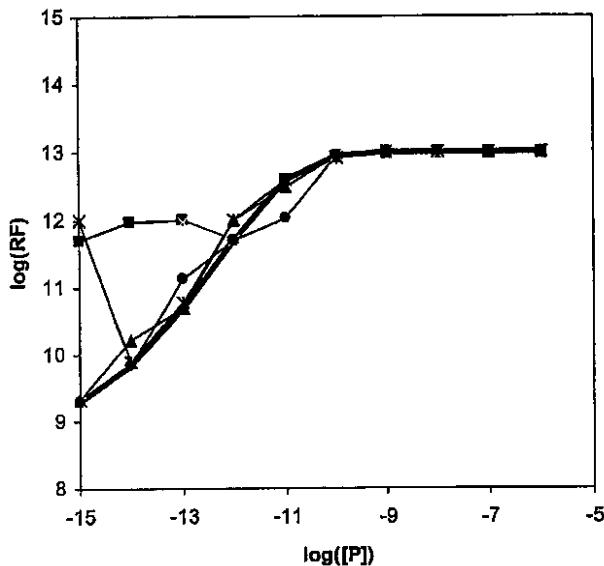
 <220>
 <223> Synthetic Sequence

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(66)
 <223> t is 5-BrdU

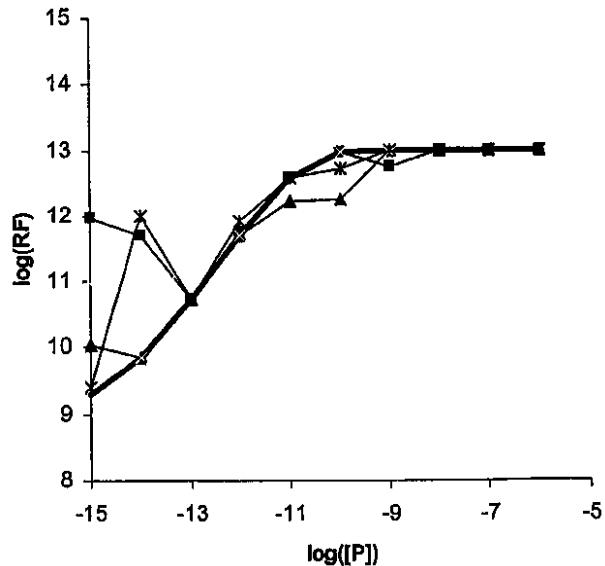
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 143			
gcggatcagc ttgcaccggg ggtgttagaga atgccacaaa gtgcccggc cagaagcaga	60		
aggacg	66		
<210> 144			
<211> 66			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic Sequence			
<220>			
<221> modified_base			10
<222> (1)..(66)			
<223> t is 5-Brdu			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(1)			
<223> 5'-amino-C6-g			
<400> 144			
gcggatcagc ttgcaccgtt gggctcggt tggcagggg tagggtaagc cagaagcaga	60		
aggacg	66		
<210> 145			
<211> 66			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic Sequence			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(66)			
<223> t is 5-Brdu			
<220>			
<221> modified_base			
<222> (1)..(1)			
<223> 5'-amino-C6-g			
<400> 145			
gcggatcagc ttgcaccggg gtgctcggt tagggcaggg atgggtaagc cagaagcaga	60		30
aggacg	66		

【図1】



【図2】



【図3-1】

図3

光架橋核酸リガンド配列

タンパク質	参照番号	配列	SEQ. ID. NO:
α 2-抗プラスミン b p	N-28.13	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GGU CAC CUU AAC CAC AUG ACC AGU CUA UGC CAG ACC AGC AGC GGG	1
α 2-抗プラスミン b p	N-28.16	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCG CGA GCA GUC UAU GUA UJC UGU CCA CCU CCA GAC GAC GAG CGG G	2
α 2-抗プラスミン b p	N-28.17	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG CGG CGA GGU AAA CAC UCA GUC UAU GCG CCC CAG AGC AGC AGC GGG	3
α 2-抗プラスミン b p	N-28.2	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCC CCA CGG CAG UCU AUG UCA UCA ACC CCC CAG AGC AGC AGC GGG	4
α 2-抗プラスミン b p	N-28.32	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCC CAC UUU CUA CAG GGC AGU CUA UGU CAU CAG AGC AGC AGC GGG	5
アンジオゲニン	N-11.11	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCC AAC CAC GUG GUA UUA UUG ACC UUG CAA UGG GAA UGG CCA GAC GAC GAG CGG G	6
アンジオゲニン	N-11.12	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GGC AAA CUG CGU CGU AUU AUA AGC CUC GCU ACA GAU GCC ACA GAC GAC GAG CGG G	7
アンジオゲニン	N-11.14	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCA CCU ACC UGA GCU ACA UAU GAC AGU GUC ACC CGG GCC CCA GAC GAC GAG CGG G	8
アンジオゲニン	N-11.16	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCC AAA UGG ACU UUU CGC CAC GAA CUU ACC AGC GUG UUG UUG CCA GAC GAC GAG CGG G	9
アンジオゲニン	N-11.27	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG CAC CAA AAC GUG GUC UUA GCC UAA UUA UGG AGC UGU CCA CCA GAC GAC GAG CGG G	10
アンジオゲニン	N-11.58	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCC AGC UGU AUU AUG CUC AGC UUA UAG CCA UGG CAU GGA CCA GAC GAC GAG CGG G	11
アンジオゲニン	N-11.85	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCC CUA CUU GCA UGA AUA UCC AGU CCA AGG CUD GAG GGA GCA GAC GAC GAG CGG G	12

【図3-2】

アンジオゲニン	N-11.59	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCA AUG UCU UGG UCC ACC AAA UAU UGU AUG UCA CCA GCA GAC GAC GAG CGG G	13
アンジオゲニン	Ac-11.59	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCA AUG UCU UGG UCC ACC AAA UAU UGU AUG UCA CCA GCA GAC GAC GAG CGG G	14
bFGF	6.7	GGG AGG ACC ATG CGG CGG AGG GCA CAC CGA GUU CAU AGU AUC CCA CAG AGC AGC AGC AGC GGG A	15
bFGF	N-6.7	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCG AGG GCA CAC CGA GUU CAI AGU AUC CCA CAG AGC AGC AGC AGC GGG A	16
bFGF	N-HEG-6.7	アミノ-C18-GGG AGG ACC ATG CGG CGG CGG AGG GCA CAC CGA GUU CAU AGU AUC CCA CAG AGC AGC AGC AGC GGG A	17
bFGF	B-6.7	ピオチン-CGG AGG ACC ATG CGG CGG AGG GCA CAC CGA GUU CAU AGU AUC CCA CAG AGC AGC AGC AGC GGG A	18
bFGF	N-6.40	アミノ-CGG AGG ACC ATG CGG CGG CGU AGG AGU GUA AUC GAU GCA GCC UGG CAG AGC AGC AGC AGC GGG A	19
bFGF	S-6.7	チオール-C6-GGG AGG ACC ATG CGG CGG AGG GCA CAC CGA GUU CAU AGU AUC CCA CAG AGC AGC AGC AGC GGG A	20
bFGF	Ac-6.7	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG AGG GCA CAC CGA GUU CAU AGU AUC CCA CAG AGC AGC AGC AGC GGG A	21
bNGF	N-13.7	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GAC CAA UAA CAC UAC ACT GAU CAU CUC CCU UCU AUC UCC CCA GAC GAC GAG CGG G	22
bNGF	N-13.17	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCA CAC UUA AAU CCA CUC UAC CAC CUU ACA AAU CCU UUA UCU GCA GAC GAC GAG CGG G	23
bNGF	N-13.43	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCA UAC GCA CAC CAG UGG GGA UAA UCC AUC UGS UUU GGU GCA GAC GAC GAG CGG G	24
bNGF	N-13.44	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCA UAU CCA ACU UCA CAU GAC GUU UCU UAU UCU CCA GCA GAC GAC GAG CGG G	25
bNGF	N-13.65	アミノ-C6-GGG AGG ACC ATG CGG GCA UAU CCA UUA CCU CCA CCA CUA ACC ACC CUC CCU UCU GCA GAC GAC GAG CGG G	26

図3(続き)

【図3-3】

bNGF	N-13.78	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC CCA AAC ACU UGU UCC GAA GAA UUU UCA ACC CCC CCA UUU GAA CCA GAC GAG CGG G	27
bNGF	Ac-13.17	AC-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CAC UUU AAU CCA CAA CAC CAA UUU CCA UUU UCA GCA GAC GAG CGG G	28
C1s f	N-31.56	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CAA GGC CAA CCA UUC CAA GAA UUU CCC CAG AGC AGC AGC GGG	29
C1s f	N-31.62	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CAA CCA AGA AGA GGC AAC CAA GCU GUC CAG AGC AGC GGG	30
C1s f	N-31.65	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GUA AUC ACC UCG UUG AAC GAC GAG CGG G	31
C1s f	N-31.73	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CCC CCA UAC AAC UUC UCC AAC UUU AAC CCA GAC GAC GAG CGG G	32
カルバスタチン b p	N-32.17	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA AGC UAC AAC GUC CAC UCU ACC UCC GUC CAG AGC AGC GGG	33
カルバスタチン b p	N-32.23	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GCA GUA GGU GCU UAA ACC CUC AGU AGU CAG AGC AGC GGG	34
カタラーゼ f	N-33.56	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG AAC AAC AGG UUC AAC CCA ACA GCU UCU GGG CCA UCU UAA GCA GAC GAC GAG CGG G	35
カタラーゼ f	N-33.76	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCA UUA AAC CAC UCU AGG COU CCA ACC CUC CAG AGC AGC GGG	36
カタラーゼ f	N-33.77	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAA GCA GUA AAC GUA GAG GAC GAC GGU AGG CAG AGC AGC GGG	37
カタラーゼ f	N-33.79	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GAC GAA CAC UUU AAC CCA UCA GAC GAG CGG G	38
カタラーゼ f	N-33.88	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA ACC CCA UUU AAC ACC UCA CCA GUC CCA AGA GCA UCA GAC GAC GAG CGG G	39

図3(続き)

【図3-4】

C反応性タンパク質	N-71.25	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GGU CAC CUU CGU UUG CUU GCU GCU CCC CCC CAG AGC AGC AGC GGG	40
C反応性タンパク質	Ac-71.25	AC-GGG AGG ACG ATG CGG GGU CAC CUU CGU UUG CUU GCU GCU CCC CCC CAG AGC AGC AGC GGG	41
エラスター ^z	Elas43	GGG AGG AGC ATG CGG CAA CCC ACC ACU CUA UCU UUC CCA UAA CUG CAG AGC AGC AGC GGG A	42
エラスター ^z	N-Elas43	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAA CCC ACC ACU CUA UCU UUC CCA UAA CUG CAG AGC AGC AGC GGG A	43
エラスター ^z	B-2.43	ピオチン-GGG AGG ACG ATG CGG CAA CCC ACC ACU CUA UCU UUC CCA UAA CUG CAG AGC AGC AGC GGG A	44
エラスター ^z	N-34.15	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAC GGA CCA ACC UUU UCG CAA CUA CUG GUG CAG AGC AGC AGC GGG	45
エラスター ^z	N-34.17	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAC AGC GAG GGU UGU GCU UUU CUC AAU UUC CAG AGC AGC AGC GGG	46
エラスター ^z	N-34.5	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCU GGG GCU ACC GUC UCU UUA CCG ACU GGG CAG AGC AGC AGC GGG	47
エラスター ^z	N-34.8	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAA CAC UUG UCG AUG GUC UUG GUA AAC CUG CAG AGC AGC AGC GGG	48
エンドスタチン	N-92.4	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAC AAC GAA GUU ACU CUU GAC GCU UGU AAU AAC CAC ACC AGC GGG	49
エンドスタチン	Ac-92.4	AC-GGG AGG AGC ATG CGG AAC GAA GUC AGC CAA GAC GOU UGU AAU CAG AAC AGC AGC GGG	50
フェリチン f	N-36.51	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCG GAC UUU AGC GUC UUU UCG VCU UGC GAA GCU CAA AGU UDU CCU ACA GAC GAC GAG CGG G	51
フェリチン f	N-36.53	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GDU AGC GAA AGC CAA UCC UCC AAC GAC GAG CGG G	52
GP120MN	SI0518	GCG AGG AGC ATG CGG AAU GGG GCG GCU UCU CRA AGG GAA AUU AGC CAG AGC AGC GGG A	53

図3(続き)

【図3-5】

GP120MN	N-3.7	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAA GCG CGA GCU UCC GAA AGG GAA AUU AGC CAG AGC AGC GGG A	54
GP120MN	S-3.7	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAA GCG CGA GCU UCC GAA AGG GAA AUU AGC CAG AGC AGC GGG A	55
GP120MN	N-3.5	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAA GCA CAC GCA GGA GGA AAC AAC GAC GAC AGC AGC GGG	56
GP120MN	N-3.54	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCG AAC AGC CAC CGA GGU CAU AGU AAC CCA CCA CAG AGC AGC AGG	57
GP120MN	N-3.76	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAC GAG GGA CCA GAC CGC AAC AGC AGC GGG	58
GP120MN	N-7.3	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAG GAC CAC GAC CAU GCA CCA GGA AUG CAG AGC AGC AGG	59
GP120MN	N-7.4	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CAG CGC UAA CAU AAC UCC AUG UGG CAG AGC AGC AGG	60
GP120MN	N-7.11	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAC CAA CGA GAC CAC AAC ACA AGC GCU UGU CAG AGC AGC AGG	61
GP120MN	N-7.20	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC AUG GAA GGU UUU GGU GGC UGU CCU CAG AGC AGC AGG	62
GP120MN	N-HBG-3.7	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCG CGA AGG AGC AAC AGC AGG AAC AGU UUU CAG AGC AGC AGG	63
IGFBP-3	N-112.65	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA AAG UGU UAU UUC UUU AUG UGU UUC ACC CAG AGC AGC AGG	64
IGFBP-3	Ac-112.65	AC-GGG AGG ACG ATG CGG GCA AAG UGU UAU UUC UUU AUG UGU UUC ACC CAG AGC AGC AGG	65
IL-2 bc	N-39.56	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCA CCA UGU CAC CUC AAC UAC CCA UCC UCC CAG AGC AGC AGG	66
IL-2 bc	N-39.61	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCA ACC CUC ACU CUC UCU UCA CCA CAC CUC CAG AGC AGC AGG	67

図3(続き)

【図3-6】

IL-2 bp	N-38.22	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GAA GCU CCA CCA CCC UUU UUU CAA CUC CAC GUC GCU GAC GAG CGG G	68
IL-2 bp	N-38.26	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GAC AGU GGU GGG UUU AGU GUC CAU GGC CAG AGC AGC AGC GGG	69
IL-2 bp	N-38.27	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GAC UCU UCA CCC CCA CCA UUU AGC UGC CAG AGC AGC AGC GGG	70
IL-2 bp	N-38.37	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAC CUC CGG GUA ACC AGG UUA CUC CAA GGC AGA CGA CGA CGC GCG GG	71
IL-2 bp	N-38.38	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CCA ACC UCU ACA CUA CCA CCA UAC CUA CUC CAG AGC AGC AGC GGG	72
IL-2 bp	N-38.47	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GGC AAC CAA ACC AAC AGG AUG CCC CUC CUG CAG AGC AGC AGC GGG	73
IL-2 bp	N-38.5	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GGC AAC CAA ACC AAC AGG AUG CCC CUC CUG CAG AGC AGC AGC GGG	74
IL-4	B-12.48	ピオチン-GGG AGG ACG ATG CGG CCC CGA GGU UCC CAA AGG UUU GGU UCA CCA GCA GAC GAG CGG CG	75
IL-4	N-12.48	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCC CGA GGU UCC CAA AGG UUU GGU UCA CCA GCA GAC GAG CGG CG	76
IL-4	N-12.8	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GAC UGU UUU GAC GUU GCA GAC GAG CGG CG	77
IL-4	N-12.13	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GAC UGU UUU GAC GUU GCA GAC GAG CGG CG	78
IL-4	N-12.41	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA AAC GGU CCC UUU GAC AGC CAU CCA GAC GAG CGG CG	79
IL-4	N-12.63	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA AAC GGU CCC UUU GAC AGC CAU CCA GAC GAG CGG CG	80

図3(続き)

【図3-7】

IL-4	N-12.78	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCC AGG GAC AUA CUA GUU CGU UGU UGG UGU CCA CUG UCU CCA GAC GAC GAG CGG G	81
IL-4	Ac-12.48	Ac-GGG AGG AGC ATG CGG CCC CGA GUU UCC CUA AGG UUU GUU UGA CCA GUU AUU UCA GCA GAC GAC GAG CGG G	82
IL-4 bc	N-41.49	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CAC AGG GUU GCC AUA CCA UUC AUU AUU GAG CAG AGC AGC AGC GGG	83
IL-4 bc	N-41.50	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CGG GCU GCU UCC CCC CUG GUC AUU GUU GUU CAG AGC AGC AGC GGG	84
IL-4 bc	N-41.55	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCC AAA GUU CCC AUC CAC GGU ACU CUU UGG CAG AGC AGC AGC GGG	85
IL-4 bc	N-41.76	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCC AGG GUU CCC UUC UGC CUC AUU GUU GUU CAG AGC AGC AGC GGG	86
IL-4 bp	N-40.2	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCC CCA UCU AUC GAC GUU GGG GUU CCC AUC CAG AGC AGC AGC GGG	87
IL-4 bp	N-40.3	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCC GGU CCC AGC GCG GUA AAC GUU UGG GGG CAG AGC AGC AGC GGG	88
IL-4 bp	N-40.5	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GAG GCG GGU CCC AAC GGU GAA UUG GUU UGG CAG AGC AGC AGC GGG	89
IL-7 f	N-42.10	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CAA CUA CCC GCU GGG GAC CUG AAC UUC AUA UCC UCC UCC CCA GAC GAC GAG CGG G	90
IL-7 f	N-42.22	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCA CGG GAA CCA GAC GUU AAU GCC CCC UUU AAC GCG UAA GCA GAC GAC GAG CGG G	91
IL-7 f	N-42.27	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCA CGG GGG AGC GGU GAG CUU CCC UGG UUU AAC UCU ACC ACA GAC GAC GAG CGG G	92
IL-7 f	N-42.3	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCC ACC UGA AUC CCA AGC UTG AUA GGA GUA UCC CCA UGC CCA GAC GAC GAG CGG G	93

図3(続き)

【図3-8】

IL-7 f	N-42.5	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCU GAA AGG AAA CGG AGC AUU GAG CUU CCC CUU ACC UCU CCA GAC GAC GAG CGG G	94
キニノーゲン、2鎖 bc	N-46.13	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GAC GCU AGU ACC CUC GCU GGC UUG UGU GGG CAG AGC AGC AGC GGG	95
キニノーゲン、2鎖 bc	N-46.35	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCA CGG ACU ACA GGU UGG UUU GGU UGG ACU UUC CGC ACA GAC GAC GAG CGG G	96
キニノーゲン、2鎖 f	N-43.50	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CAC AAC CGG AGC AGC GUC CAG UCU AUC UUC ACA UCU UCC CCA GAC GAC GAG CGG G	97
キニノーゲン、2鎖 f	N-43.57	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CCU GGG UUC AAU AAC CGG CAC UCC CCT UAC CUC AUG GGU CCA GAC GAC GAG CGG G	98
キニノーゲン、2鎖 f	N-43.60	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GAC CAC UUU AAC CUU CUC UUC UCA UUU CCA CCC CCC UCC CCA GAC GAC GAG CGG G	99
PDGF	N-4.24	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCC GAA GAG GCA GGG UAC CAC GGG AGA GGU CAG AGC AGC AGC GGG	100
PDGF	N-4.87	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCC AAC CCC UAC UGA ACA ACA ACA CUC CCA CAC AGC AGC AGC GGG	101
PDGF	N-8.26	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CAG CAC CGA GGU ACC CAA CAG GGA UGG CGC CAC AGC AGC AGC GGG	102
PDGF	N-8.27	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCA GCA GAC GCG CGG UGG ACC CGA CGU CCC CAC AGC AGC AGC GGG	103
PDGF	N-8.31	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CAC AMG GAA GAA AGC GGC CCC UAU CCC CAA CAG AGC AGC AGC GGG	104
PDGF	N-8.33	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GGG GCA AGA AGC AGC GUA CCC CAG GUC CGC CAG AGC AGC AGC GGG	105
PDGF	N-8.35	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CCG GAC AUC CCC CAG GGC AAA ACC AAC UCC CAG AGC AGC AGC GGG	106

図3(続き)

【図3-9】

PDGF	N-8.37	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CAA CGG AAA CAG AUA GCG CAG GCC CCC CCA CAG AGC AGC GGG	107
プラスミンf	N-50.25	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CAA CCC UGA CAC CAC GUU GUU UCU CCU UUU GGG GUA ACC GCA GAC GAC GAG CGG G	108
プラスミンf	Ac-50.25	Ac-GGG AGG AGC ATG CGG CAA CCC UGA CAC CAC GUU GUU UCU CCU UUU GGG GUA ACC GCA GAC GAC GAG CGG G	109
P-セレクチン	N-14.14	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CGC CCC GGU UGA CGU CCG AUC UAU CCU ACU UAU CGG ACC CCA GAC GAC GAG CGG G	110
P-セレクチン	N-14.21	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CAC GAG GGA AUC ACC UGG AAC UUG UCC UGG AUU ACU GGC CAG AGC AGC AGC GGG	111
P-セレクチン	N-14.17	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CCA UGA ACC CAU CCA CGU GUU CAU AUU CGA CGU CGU GCA GCA GAC GAC GAG CGG G	112
P-セレクチン	N-14.24	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCU CAA UUA CCC GUA GAA UCC ACC UUU CCC UAG CAA AGG UCU GCA GAC GAC GAG CGG G	113
P-セレクチン	N-14.95	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CCA UAC GCA CGU CAA CGU UGG GGA UUA UCC AAC UGG UUU GGU GCA GAC GAC GAG CGG G	114
血清アミロイド タンパク質f	N-51.50	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCC GAC UAC GUA CGG GAA AAG GUU UUA UGU AUG GCU ACC CCA GCA GAC GAC GAG CGG G	115
血清アミロイド タンパク質f	Ac-51.50	Ac-GGG AGG AGC ATG CGG GCC GAC UCU GAG GAA AAG GUU UUA UGU AUG GCU ACC CCA GCA GAC GAC GAG CGG G	116
TGFb	N-15.74	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCA CAA CCC UAC CAC CCA AGC CUA CCC CUA ACC UCC UGU CCA GAC GAC GAG CGG G	117
TGFb	N-15.81	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCA GCA ACC UAC UCU ACC UUC CCC UAG CCA ACC UUA UCC CCA GAC GAC GAG CGG G	118
TGFb	N-15.82	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCA GCA ACC UAC UCU ACC UUC CCC UAG CCA ACC UUA UCC CCA GAC GAC GAG CGG G	119

図3(続き)

【図3-10】

TGFb	N-15.83	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCC CCA UUC UUC UAU CAA CUU GGC UUC AUU CUU CCA CCA UUG GCA GAC GAC GAG CGG G	120
TGFb	N-15.87	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCA CAA UCA AGA CCA CUC CAA ACT UUA ACTU CUG UGU AUC CCA GAC GAC GAG CGG G	121
トロンビン	Throm	GCG AGG AGC AAG CAG GCA GUA GGU UGG GUA GGG UGG UCU GCU CAG AGC AGC AGC AGC GGG A	122
トロンビン	N-5.4	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCA GUA GGU UGG GUU GGG UGG UCU GCU CAG AGC AGC AGC AGC GGG A	123
トロンビン	B-5.4	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCA GUA GGU UGG GUU GGG UGG UCU GCU CAG AGC AGC AGC AGC GGG A	124
トロンビン	B-5.5	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCA GGU GGG AGC CAG AGC AGC GAG CAC GAG CAG AGC AGC AGC GGG	125
トロンビン	N-5.51	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GAG GAG CAG CAG GUU GGU GAG GUU GGG CAG AGC AGC AGC AGC GGG	126
トロンビン	N-5.75	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCA GGG CGG AGC GCA AGG GGU GAG CAC GAG CAG AGC AGC AGC GGG	127
トロンビン	N-5.77	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCC GUU GGC GUG GUU GGA AAU GUC CGG UCA GAC GAC GAG CGG G	128
トロンビン	Ac-5.4	Ac-GGG AGG AGC ATG CGG GCA GUA GGU UGG GUA GGG UGG UCU GCU CAG AGC AGC AGC AGC AGC GGG	129
VEGF	N-60.78	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCA UGA GUC CAC UUU CAC UCC ACC UAC CGG AUU GUU ACC CCA GAC GAC GAG CGG G	130
VEGF	N-60.87	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CCC UCC CGA CCA CAC CUC CUA UCC UGU CCC UAC UGG AGC AUC AGA CGA CGA CGA CGG GG	131
VEGF	N-60.61	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CAA CGU ACU ACU CCU AAC CUC AUC CCC UCC UCU UCC UUU CCA GAC GAC GAG CGG G	132
VEGF	N-60.52	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CAU CAA AAC UGG GGG CGA GUG AUU UAU GUU AGG GGC CUG CGC AGA CGA CGA CGA CGG GG	133

図3(続き)

【図3-11】

tPA	N-56.2	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG GCU GGG AAC AUC CCU CUU GUC UGG CUU ACC AAC ACC GCU CCA GAC GAG GNG CGG G	134
tPA	N-56.41	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CAA CAU CCC UCU UGU CUU GCU UGC CCU ACA GCA GAC GAC GAG CGG G	135
VEGF	N-467.65	アミノ-C6-GGG GAT CAG CCT GCA CGG GUG GAC UGG GUU AGU AUG GCG GGG GGU UUG GCC AGA AGC AGA AGG ACG	136
VEGF	N-509.80	アミノ-C6-GGG GAT CAG CCT GCA CGG GUG UCC GAA UGG CUC GUU AGG UGG AAC GUG GCC AGA AGC AGA AGG ACG	137
フォン・ヴィルブランド因子	N-311.37	アミノ-C6-GCC GTA GTG ATC GCT CGG GGC CGU UGA AAC AGG GAC CCC AUG UUU UAG GCG AAA CGA CAA GAA GAC	138
C3	N-225.65	アミノ-C6-GCC GTA GTG ATC GCT CGG UCA GGC CCC CCA GUU UGG GGU AGU UCA GGU GCG AAA CGA CAA GAA GAC	139
カタラーゼ	N-672.195	アミノ-C6-GCC GAT CAG CCT GCA CGG AUU CGU CGG GGA UAG GAC CUC AUC AUC AAG GGC AGA AGC AGA AGG ACG	140
カタラーゼ	N-434.37	アミノ-C6-GCC GAT CAG CCT GCA CGG CUA AGG UGG GUG CGC GUG GGG CGG GGG CAA GCC AGA AGC AGA AGG ACG	141
IL-4	N-455.68	アミノ-C6-GCC GAT CAG CCT GCA CGG UCC GGG CGC GGA UAU GCU UUG GGA GUG CUG GCC AGA AGC AGA AGG ACG	142
IL-8	N-457.4	アミノ-C6-GCC GAT CAG CCT GCA CGG GGG GUU UAG AGA AUG CCA CAA AGG GGC CGG GCC AGA AGC AGA AGG ACG	143
VEGF	N-60.87	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CGC UCC CGG CGC AAC CUC UGC UGU CGG UCC UAG AGC AUC AGA CGA CGA CGG G	144
VEGF	N-60.61	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CAA GGU ACU ACU CCU AAC CUU AUC CCU UGU UGU UCC UGG CCA GAC GAC GAG CGG G	145
VEGF	N-60.52	アミノ-C6-GGG AGG AGC ATG CGG CAU CAA AAC UGG GGG CGA GUU AUU UAU GUU AGG GGC CUG CGC AGA CGA CGA CGG GG	146

図3(続き)

【図3-12】

U = 5-BrdU
n = A, G, C, または5-Br dU
アミノ-C18 = アミノ-(ヘキサエチレングリコール (HEG))

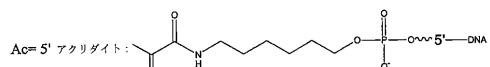
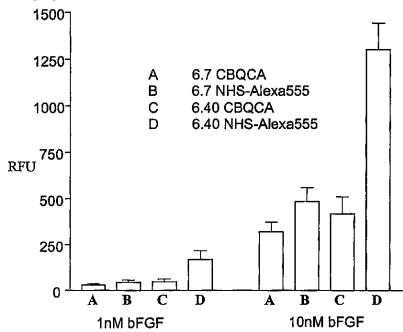
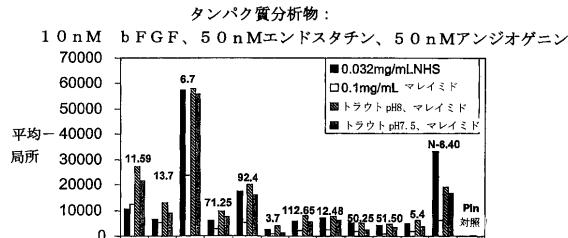


図3(続き)

【図4】

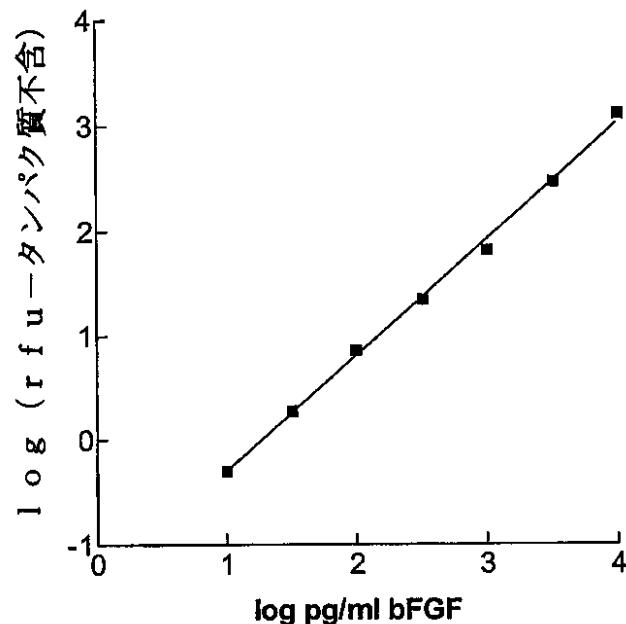


【図5】

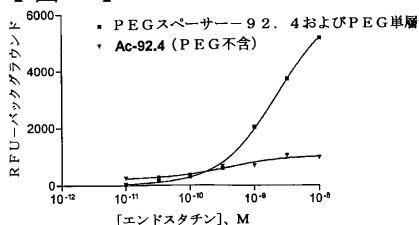


【図6】

bFGFアプタマー+ニトロシル化チロシン検出



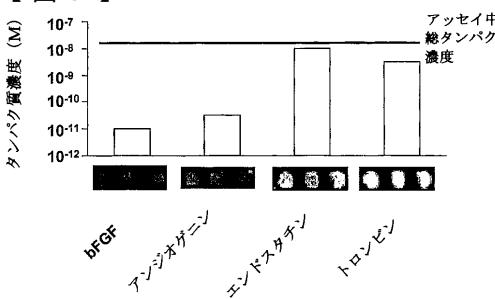
【 図 7 】



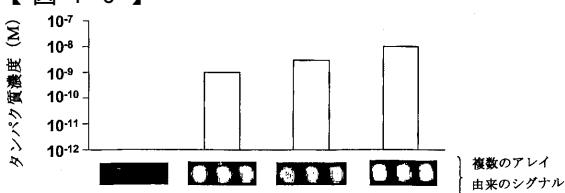
【 図 8 】

抗体	30N12	N-6.40	抗体
OH 6.7	N-41.76 IL-4 bc	N-12.48 IL-4	N-28.13 α ₂ -抗プラスミン bp
N-5.77トロンビン	N-42.1 IL-7 f	N-8.31 PDGF	N-48.87 PDGF
N-40.2 IL-4	N-14.14 pセレクチン	N-13.78 bNGF	N-11.27 アンジオゲニン
N-5.4トロンビン	N-7.3 gp120MN	N-3.7 gp120MN	N-50.25 プラズミン！
N-71.25 CX3C反応性タンパク質	N-5.51 トロンビン	N-41.49 IL-4 bc	N-14.24 pセレクチン
N-15.83 TGF- B	N-8.37 PDGF	N-7.11 gp120MN	N-112.65 JGFR- B
N-7.2 gp120MN	N-11.58 アンジオゲニン	N-41.5 IL-4 b	N-12.8 IL-4
N-92.4エンドスタチン	抗体	30N12	N-6.40
抗体	N-11.14 アンジオゲニン	N-38.22 IL-2bp	N-37.93 IgG bs
N-42.22 IL-7 f	N-38.47 IL-2 bp	N-13.7 bNGF	N-12.41 IL-4
N-11.17 アンジオゲニン	N-8.27 PDGF	N-12.13 IL-4	N-11.59 アンジオゲニン
N-38.37 IL-2 bp	N-40.3 IL-4 bp	N-15.81 TGF- B	N-14.95 pセレクチン
N-6.7 bNGF	N-38.38 IL-2 bp	N-15.74 TGF- B	N-13.43 bNGF
N-42.5 IL-7 f	N-12.63 IL-4	N-8.35 PDGF	N-40.5 IL-4 bp
N-42.3 IL-7 f	N-14.17 セレクチン	N-8.33 PDGF	N-3.76 gp120MN
N-8.26 PDGF	N-11.12 アンジオゲニン	N-28.16 g-2-抗体プラスミン bp	N-14.21 pセレクチン
N-6.4 bNGF	N-7.4 gp120MN	N-13.17 bNGF	N-104.49 エボ
N-4.24 PDGF	N-51.5 血清3ヨドイドタンパク質	N-5.77トロンビン	OH 6.7
抗体	30N12	N-6.40	抗体

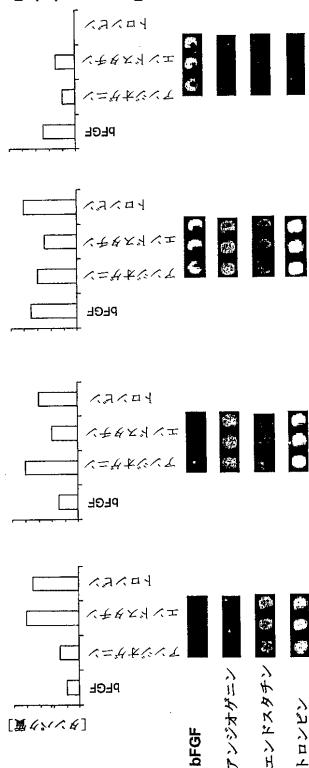
【 义 9 】



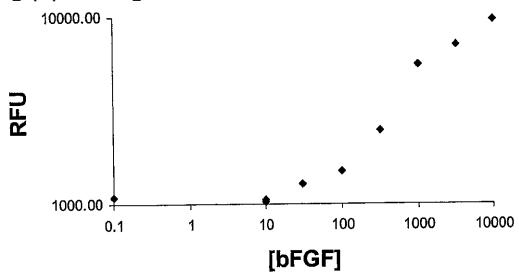
【 10 】



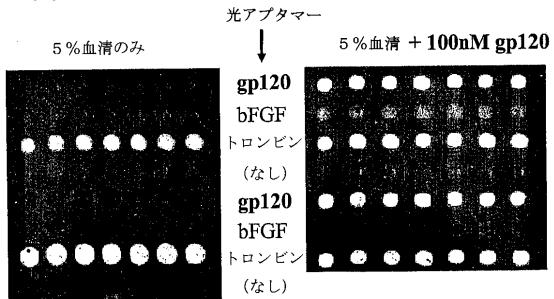
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



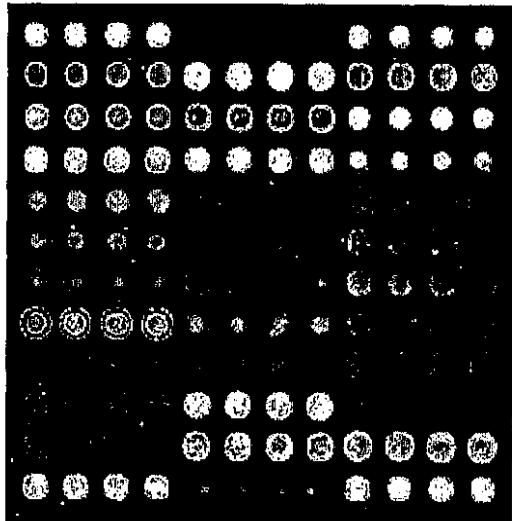
【 図 1 3 】



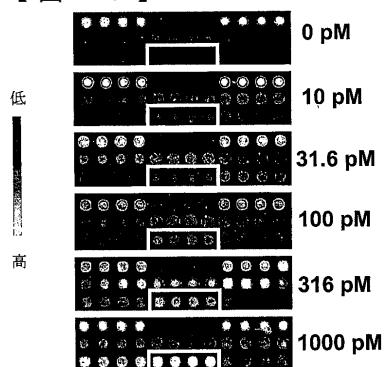
【図14】

Cy3-オリゴコーナーマーカー	無作為 DNA (30N12)	Cy3-オリゴコーナーマーカー
N-11.58 アンジオゲニン	N-11.12 アンジオゲニン	N-328.43 エンドスタチン
N-334.56 エンドスタチン	N-5.51 トロンビン	N-5.77 トロンビン
N-56.41 tPA	N-56.2 tPA	N-467.65 VEGF
N-509.80 VEGF	N-311.37 フォン・ウィルブランド因子	N-6.40 bFGF
N-6.7 bFGF	N-225.65 C3	N-672.195 カタラーゼ
N-434.37 カタラーゼ	N-3.7 HIV gp120MN	N-7.20 HIV gp120MN
N-112.65 IGFBP-3	N-455.68 IL-4	N-40.3 IL-4
N-457.4 IL-8	N-458.33 ルシフェラーゼ	N-458.45 ルシフェラーゼ
Cy3-オリゴコーナーマーカー	緩衝液スポット	Cy3-オリゴコーナーマーカー

【図15】



【図16】



【図17A】

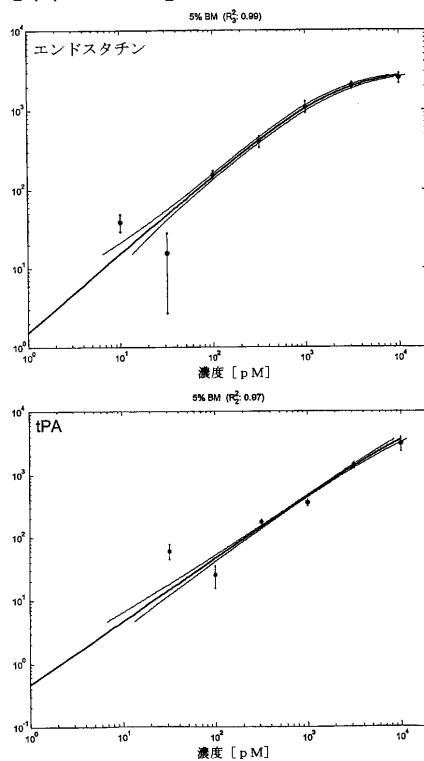


図17A

【図17B】

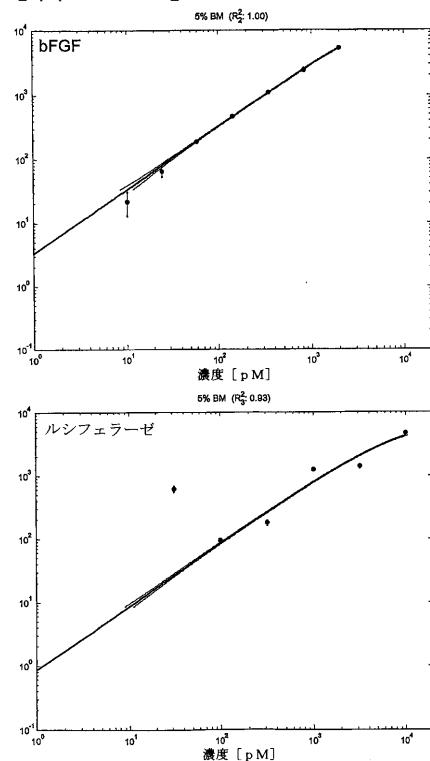


図17B

【図 17 C】

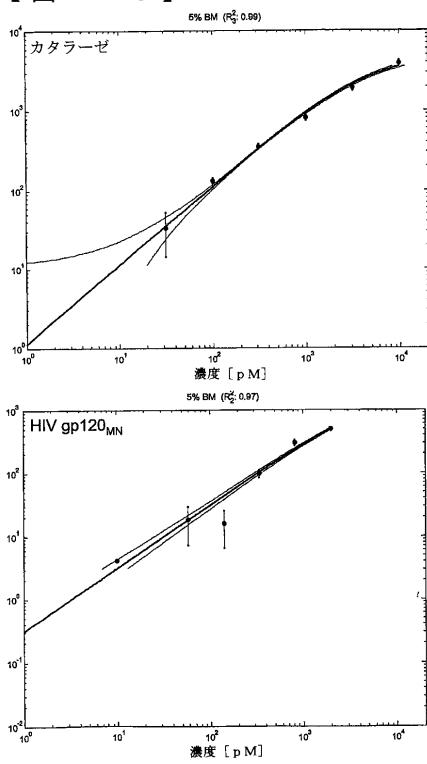


図 17 C

【図 17 D】

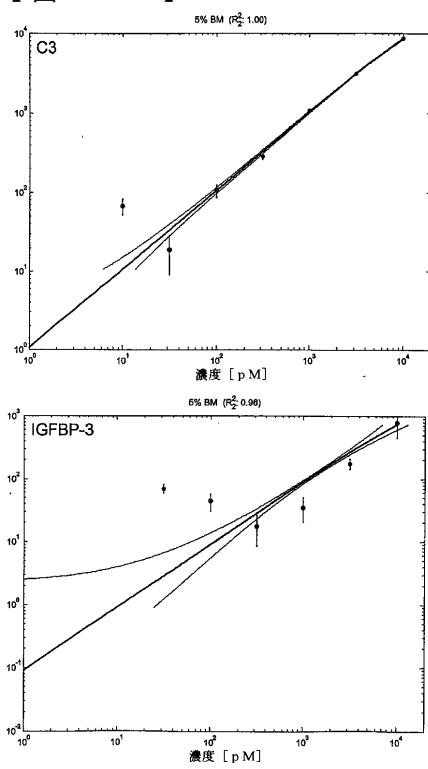


図 17 D

【図 17 E】

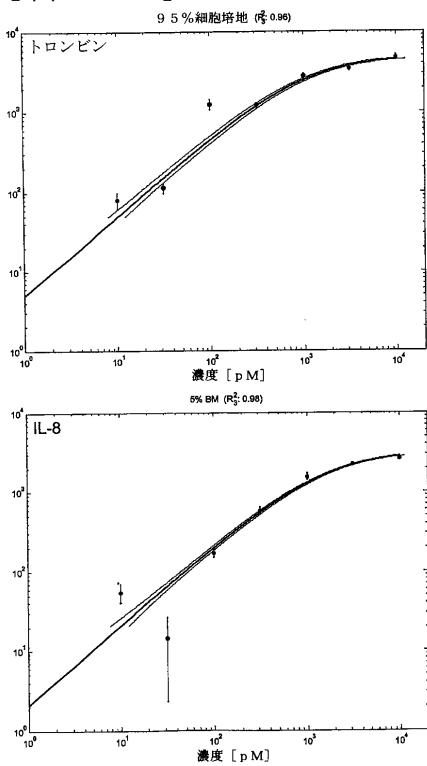


図 17 E

【図 17 F】

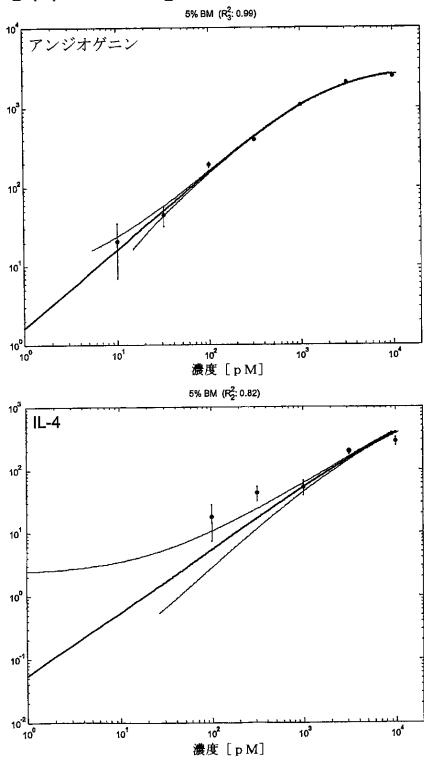


図 17 F

【図17G】

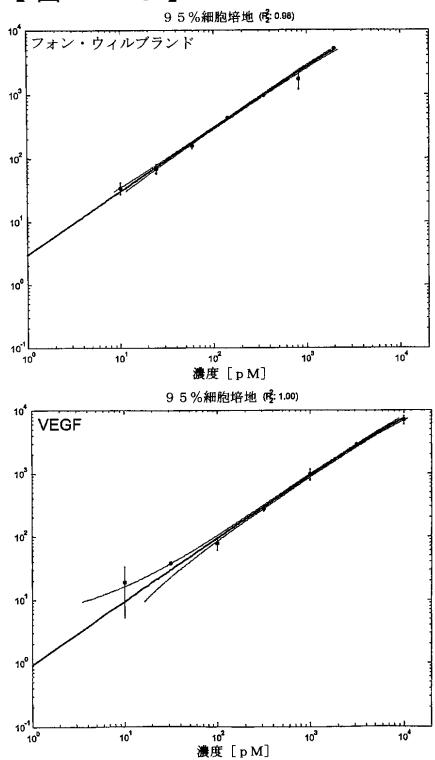
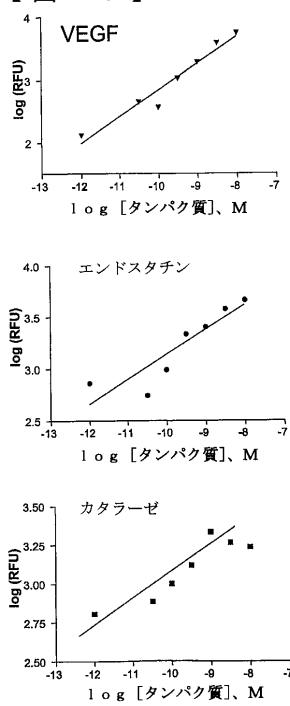


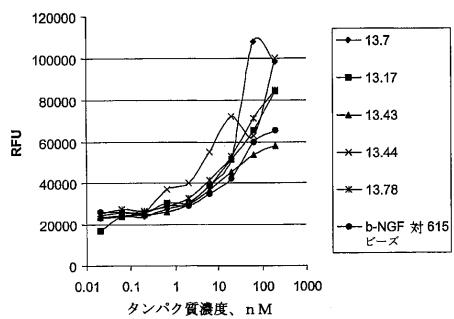
図17G

【 図 1 8 】



【図19】

b-NGFアプタマー評価



【図20】

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/04142												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68, C12P 19/34, C12M 1/34; C07H 21/02, 21/04, 19/00 US CL : 435/6,7,1,91.1,91.2,287.2; 536/22.1, 23.1, 24.3, 24.32, 24.33 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) U.S. : 435/6,7,1,91.1,91.2,287.2; 536/22.1, 23.1, 24.3, 24.32, 24.33														
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) Please See Continuation Sheet														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 5,567,588 A (GOLD et al) 22 October 1996 (22.10.1996), see whole document.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-44</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">---</td> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">-----</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">45</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 5,567,588 A (GOLD et al) 22 October 1996 (22.10.1996), see whole document.	1-44	---		-----	A		45
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	US 5,567,588 A (GOLD et al) 22 October 1996 (22.10.1996), see whole document.	1-44												
---		-----												
A		45												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input 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 "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt 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														
Date of the actual completion of the international search 04 May 2003 (04.05.2003)		Date of mailing of the international search report 02 JUL 2003												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Jeffrey S. New</i> Telephone No. 703-308-0196												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/04142

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST- all dbs, STN-biosis, medline, cancerlit, biotechds, lifesci, capplus, embase
search terms ligand, nucleic acid, selex, array, seq ID NO:18

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543	5 7 5
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 1 2 M 1/00	C 1 2 N 15/00	F
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/00	A
	C 1 2 M 1/34	Z

(31)優先権主張番号 60/400,759

(32)優先日 平成14年8月2日(2002.8.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(74)代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74)代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 ゴールド, ラリー

アメリカ合衆国コロラド州80302, ボルダー, フィフス・ストリート 1033

(72)発明者 ズィッチ, ドミニク・エイ

アメリカ合衆国コロラド州80304, ボルダー, カルミア・アベニュー 2200

(72)発明者 スミス, ジョナサン・ドゥルー

アメリカ合衆国コロラド州80304, ボルダー, フィフティーンス・ストリート 3010

(72)発明者 シュナイダー, ダニエル・ジェイ

アメリカ合衆国コロラド州80005, アルバダ, ウエスト・エイティフォース・プレイス 1902

(72)発明者 グリーフ, チャド

アメリカ合衆国コロラド州80027, ルイスヴィル, サウス・レインツリー・レイン 161

F ターム(参考) 2G054 CA23 CE02 EA03

4B024 AA11 CA01 HA08 HA12 HA20

4B029 AA07 AA21 BB15 BB16 BB17 BB20 CC03 FA12

4B063 QA01 QA18 QQ79 QR02 QR13 QR32 QR48 QR54 QR66 QR82

QS03 QS15 QS28 QS32 QS36 QS39 QX01

专利名称(译)	用于检测核酸配体的靶结合的方法和试剂		
公开(公告)号	JP2005517456A	公开(公告)日	2005-06-16
申请号	JP2003569875	申请日	2003-02-10
[标]申请(专利权)人(译)	私募蛋白质体公司		
申请(专利权)人(译)	Somarojikku公司		
[标]发明人	ゴールドラー ズイッチドミニクエイ スミスジョナサンドゥル シュナイダーダニエルジェイ グリーフチャド		
发明人	ゴールド,ラリー ズイッチ,ドミニク·エイ スミス,ジョナサン·ドゥル シュナイダー,ダニエル·ジェイ グリーフ,チャド		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 C12M1/00 C12M1/34 C12N15/09 C12N15/115 C12Q1/25 C12Q1/28 C12Q1/42 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	C12N15/115 G01N33/58		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/25 C12Q1/28 C12Q1/42 C12Q1/68.ZNA.A G01N21/78.C G01N33/53.D G01N33/543.575 G01N33/566 C12N15/00.F C12M1/00.A C12M1/34.Z		
F-TERM分类号	2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA20 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/BB15 4B029/BB16 4B029/BB17 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QR02 4B063/QR13 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR54 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS15 4B063/QS28 4B063/QS32 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/357297 2002-02-15 US 10/114187 2002-04-01 US 60/398666 2002-07-26 US 60/400759 2002-08-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于检测蛋白质靶标与核酸配体结合的新方法和试剂。使用通用蛋白质染色(UPS)，可以用可检测的部分标记由核酸配体结合的蛋白质。该方法和试剂特别适用于检测与多核核酸配体阵列结合的蛋白质靶标。本发明还提供了一种用于多重评估光交联核酸配体的新方法。该方法包括：(1)评估多个光交联核酸配体的性能(动态范围)；(2)同时评估每个光交联核酸配体对同源靶蛋白的特异性。此后，可以选择具有最理想特性的光交联核酸配体，用于诊断和预后医学测定。本发明还涉及治疗HIV的方法还提供了光交联的核酸配体，其特异性结合gp 120MN。

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テマコード (参考)
C 12 N 15/09	C 12 N 15/00	A 2 G 054
C 12 Q 1/25	C 12 Q 1/25	4 B 024
C 12 Q 1/28	C 12 Q 1/28	4 B 029
C 12 Q 1/42	C 12 Q 1/42	4 B 063
C 12 Q 1/68	C 12 Q 1/68 Z NAA	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 98 頁) 最終頁
(21) 出願番号	特願2003-569875 (P2003-569875)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成15年2月10日 (2003.2.10)	501192222 ソマロジック・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月10日 (2004.9.10)	SomaLogic, Inc.
(86) 國際出願番号	PCT/US2003/004142	アメリカ合衆国コロラド州80301
(87) 國際公開番号	W02003/070984	ーラダー, サーティエイス・ストリー
(87) 國際公開日	平成15年8月28日 (2003.8.28)	1775 1775 38th Street,
(31) 優先権主張番号	60/357,297	ulder, Colorado 80
(32) 優先日	平成14年2月15日 (2002.2.15)	1, United States of America
(33) 優先権主張国	米国 (US)	
(31) 優先権主張番号	10/114,187	(74) 代理人
(32) 優先日	平成14年4月1日 (2002.4.1)	100089705 弁理士 社本 一夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	60/398,666	100076691 弁理士 増井 忠式
(32) 優先日	平成14年7月26日 (2002.7.26)	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	

最終頁に当