

(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. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 A	2 G O 5 4
C 1 2 Q 1/25	C 1 2 Q 1/25	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/28	C 1 2 Q 1/28	4 B O 2 9
C 1 2 Q 1/42	C 1 2 Q 1/42	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 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)	(71) 出願人	501192222
(86) (22) 出願日	平成15年2月10日 (2003. 2. 10)		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)		Soma Logic, Inc.
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/004142		アメリカ合衆国コロラド州80301, ボ
(87) 国際公開番号	W02003/070984		ールダー, サーティエイス・ストリート
(87) 国際公開日	平成15年8月28日 (2003. 8. 28)		1 7 7 5
(31) 優先権主張番号	60/357, 297		1 7 7 5 3 8 t h S t r e e t, B o
(32) 優先日	平成14年2月15日 (2002. 2. 15)		u l d e r, C o l o r a d o 8 0 3 0
(33) 優先権主張国	米国 (US)		1, U n i t e d S t a t e s o f
(31) 優先権主張番号	10/114, 187		A m e r i c a
(32) 優先日	平成14年4月1日 (2002. 4. 1)	(74) 代理人	100089705
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 社本 一夫
(31) 優先権主張番号	60/398, 666	(74) 代理人	100076691
(32) 優先日	平成14年7月26日 (2002. 7. 26)		弁理士 増井 忠武
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
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 (U P S) 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 (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。

10

20

30

40

50

## 【請求項 16】

前記 UPS 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 UPS 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 UPS 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 UPS 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 UPS 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 UPS が：

a ) 第一級アミンと反応可能なビオチン誘導体；および 20

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。

## 【請求項 22】

前記 UPS 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。

## 【請求項 23】

前記 UPS が：

a ) 2 - イミノチオレーン；および 30

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 UPS 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 40

を含んでなる、請求項 1 の方法。

## 【請求項 26】

前記 UPS 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 UPS が：

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) 剤であり、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】

前記ニトロシル化剤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、それに付着した単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 (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

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。

30

【請求項 33】

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 (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

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、それに付着した単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) タンパク質と共有的に反応し、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35】

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。

【請求項36】

20

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。

【請求項37】

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38】

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ァイルを含んでなる；

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39】

前記標的タンパク質濃度プロファイルが各々、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40】

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ァイ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 3 8 の方法。

## 【請求項 4 2】

ヒト免疫不全ウイルス (H I V) g p 1 2 0 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 g p 1 2 0 が H I V 株 M N 由来である ( g p 1 2 0<sub>M N</sub> )、請求項 4 2 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 4 3 の核酸リガンド。

## 【請求項 4 5】

前記リガンドが：

## 【化 1】

5'

GGGAGGACGATGCGGAAUGCGCGAGCUUCCGAAAAGGAAAUUACGCAGACGA

20

C GAGCGGGA 3'.

である、請求項 4 4 の核酸リガンド。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

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。

## 【0 0 0 2】

30

発明の背景

S E L E X 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 “ S y s t e m a t i c E v o l u t i o n o f L i g a n d s b y E X p o n e n t i a l E n r i c h m e n t ” 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 “ N u c l e i c A c i d L i g a n d s ” である米国特許第 5, 475, 096 号、および表題 “ N u c l e i c A c i d L i g a n d s ” である米国特許第 5, 270, 163 号 ( W O 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 S E L E X 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。S E L E X 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。S E L E X 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

## 【0 0 0 3】

S E L E X 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つ。高親和性結合の適用に適用される S E L E X 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。SELEX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。

#### 【0004】

SELEX法の特に重要な態様の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 SELEX*”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、SELEX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SELEX法出願」と称される。SELEX法の光SELEX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-プロモ-2'-デオキシウリジン(5-BrdU)である(Meissenheimer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、プ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うる(Norrisら (1997) Photochem. Photobiol. 65: 201-207)。特に重要なことに、DNA中で励起されたプロモウラシルは、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; Willis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SELLEX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 - BrdU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、増幅する；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SELLEX法の別の周期を開始する。

#### 【0006】

光SELLEX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産生する。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' - NH<sub>2</sub>) 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SELLEX法によって産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SELLEX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 - BrdU) および5 - ヨード - 2' - デオキシウリジン (5 - IdU) 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SELLEX法によって産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、非常にストリンジェントで、そしてアグレッシブな条件下（好ましくは核酸



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。ストリンジェントな洗浄後、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

#### 【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。

20

#### 【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;

30

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。

40

#### 【0010】

好ましい態様において、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】

50

好ましい態様において、前記 UPS 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。

【0012】

いくつかの態様において、UPS 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 NHS - ALEXA 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。

【0013】

他の態様において、UPS は 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）を含んでなる。

さらなる態様において、UPS 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（STP）エステル、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。

【0014】

さらなる態様において、UPS 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、UPS 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。

【0015】

さらなる態様において、UPS 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、UPS 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。

【0016】

さらなる態様において、UPS 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。この態様にしたがつ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（nitrosylation）剤（テトラニトロメタンなど）およびアセチル化剤（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。

【0017】

本明細書が提供する UPS 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、それに付着した単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 (UP S) を接触させ、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、それに付着した単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；

e) タンパク質と共有的に反応し、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、前記方法を提供する。

#### 【0019】

これらの方法を用い、単一の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ァイルを含んでなる；

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

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、「アプタマー」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/改変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

## 【 0 0 2 6 】

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。光反応基を持つヌクレオチドなどの修飾ヌ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 S E L E X 法によって候補混合物を産生することが可能であり、例えば、第一の S E L E X 法実験を用いて、リガンド濃縮核酸混合物を産生可能であり、この混合物をその後、第二の S E L E X 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“N u c l e i c A c i d L i g a n d s W i t h I n t r a m o l e c u l a r D u p l e x e s”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

## 【 0 0 2 7 】

好ましい態様において、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 S E L E X 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。

## 【 0 0 2 8 】

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 ( f l u x i o n a l i t y ) 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。

20

## 【 0 0 2 9 】

「S E L E X」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つまたは少数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。S E L E X 方法論は S E L E X 特許出願に記載される。S E L E X 法のいくつかの態様において、標的に非共有結合するアダマーを生成する。S E L E X 法の他の態様において、標的に共有結合するアダマーを生成する。

30

## 【 0 0 3 0 】

本明細書において、「普遍的タンパク質染色剤」または「U P S」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ァイル」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。本発明の好ましい態様において、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産生され、各混合物は、特有の標的タンパク質濃度プロファイルを含んでなる。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ァイルは、その標的タンパク質に関して、値0Mを含むであろう。

## 【 0 0 3 1 】

「S E L E X 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 法の態様が、表題“ M o d i f 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（i n t a c t）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-ブロッジェット膜、官能化ガラス、ゲルマニウム、シリコン、PTFE、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-液体分配と共にもろ過ゲル遅延、および密度勾配遠心分離が使用可能である。

10

20

#### 【0036】

本明細書において、「光S E L E X」は、指數的濃縮によるリガンドの光化学的計画的進化(Phot ochem ical 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(「光アプタマー」または「光架橋アプタマー」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リ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。

30

#### 【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。

40

#### 【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、シリコンウエハーチップ、フロースル

50

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関して、1以上の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関して、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の各々が、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。

10

#### 【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、ストリンジェ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。

20

#### 【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産生し、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变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関し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。

30

#### 【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関し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。

40

#### 【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関し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

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と比較して、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一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

において、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 100 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 ~

10

20

30

40

50

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】

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

10

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

【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。

20

【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】

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

30

【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プ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。

40

【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】

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

50

## 【 0 0 6 2 】

[ 式中、 $R F_j$  は光架橋核酸リガンド  $j$  に関して測定される相対蛍光であり、 $f_{ij}$  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。

## 【 0 0 6 3 】

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  $K_{ij} = 10^{-11} \text{ M}^{-1}$  ( $K_d = 10 \text{ pM}$ ) および  $f_{ij} / b = 5 \cdot 0 \times 10^{-13}$  (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  $10^{-11} \text{ M}$  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。ここでの飽和は、主に、光架橋核酸リガンド濃度によって設定される。

10

## 【 0 0 6 4 】

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関して 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関して、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、 $K_{ij} = 10^{-8} \text{ M}^{-1}$  ( $K_d = 10 \text{ nM}$ ) であり、そして  $f_{ij} / b = 5 \cdot 0 \times 10^{-12}$  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。

20

## 【 0 0 6 5 】

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。

30

## 【 0 0 6 6 】

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。

40

## 【 0 0 6 7 】

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関して、光架橋核酸リガンドの交差反応性を評価する。

## 【 0 0 6 8 】

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きており、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、Accelr 8 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

#### 【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 (「スポッティング」とも称される) 緩衝液構成要素には、緩衝剤 ( $\text{NaPO}_4$ 、 $\text{NaBO}_4$ 、 $\text{NaCO}_3$  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。

20

#### 【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。表面上に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グリ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 (エチレングリコール) (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。

30

#### 【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 - ビニルスルホンと 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。

40

50

## 【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ッ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などのブロッキング核酸、およびメチル化カゼインキャリアなどのブ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、111 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM  $MgCl_2$ 、1 mM  $CaCl_2$ 、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  $NaH_2PO_4$ 、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

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（システイン、ジスルフィド連結の還元によって産生可能）、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。

10

#### 【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、単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、シアニ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アル化剤が含まれる。

20

30

#### 【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。

40

#### 【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可能な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

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標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、iii)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。

10

#### 【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。

20

#### 【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。

30

#### 【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。

40

#### 【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

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 N H S - 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。

#### 【 0 0 9 0 】

いくつかの態様において、U P S は、ジスルフィド連結の還元によって産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 ] - プロピオンアミド（S P D 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 U P S 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

#### 【 0 0 9 1 】

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 U P S 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 U P S 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ピオチン；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 U P S 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

#### 【 0 0 9 2 】

上に提供する態様にしたがって、U P S 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 - ( 3 H ) - キナゾリノン（E L F - 9 7 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 E L F アルコールを産生し、この E L F 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

#### 【 0 0 9 3 】

上述の態様にしたがって、U P S 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（H R P）であり、特に、チラミドシグナル増幅（T S A）系において使用するのに適している。H R P 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

#### 【 0 0 9 4 】

N - ヒドロキシスクシンイミド基を含む U P S 試薬を使用する本発明の態様において、N H S 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、N H S 基の加水分解と競合する。N H S 加水分解を最小限にするため、好ましくは、N H S 試薬を水性緩衝液で希釈する前に、乾燥 D M S O 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（D M F）などの乾燥有機溶媒を反応中に含んで、それによって、N H S 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。D I E A（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UPS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ノ側鎖の反応を触媒させることが可能である。

【0095】

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UPS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、UPS反応（単数または複数）を、少なくとも部分的に、UPS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、NHSに活性化される色素用のAcceler8スライド上のOptiChem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DMFまたはDMSC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

【0096】

当業者は、本明細書に提供する方法にしたがってUPS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UPS反応（単数または複数）で用いると、UPS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、NHSに活性化される色素を含んでなるUPS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ノの利用可能性増加のため、そしてNHS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

【0097】

UPSの感度は、アレイが固定されている固体支持体の表面とUPS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DNA塩基とUPS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、UPS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。UPS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UPS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

【0098】

修飾アミノ酸を使用する1つの態様において、UPS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、UPSは、スルホ-NHS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。

【0099】

UPS試薬の例を実施例3および実施例4に提供する。

40

本明細書に記載するUPS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、UPS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、UPS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UPS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。

【0100】

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  $\text{NaPO}_4$  pH 8.5、0.001% ギャラクシール中で、各核酸リガンドの10  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{l}$  を384 ウェルマイクロタイタープレートウェルに入れる。対照には、30 N12 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30 N12 無作為DNA + 0.2  $\mu\text{M}$  NH-モデル-Cy3が含まれる。マイクロタイタ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ます。

## 【0103】

以下の方法にしたがってPackard Gene Arrayコンタクトスポッター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(コンタクトスポッターは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 nl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  $\text{CaCl}_2$ 、1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、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 nl 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、表面上に残った官能基を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ddH<sub>2</sub>O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ブロッキングし、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、ddH<sub>2</sub>Oでリンスする。このブロッキング工程は、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)

10

20

30

40

50

- 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 CTAB (ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド)、2% PEG (8 kDa) 中の 10  $\mu$ M 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 (1x SELEX 緩衝液、0.05% Tween、150  $\mu$ g/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  $\mu$ l、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.  $3 \text{ J/cm}^2$ 、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. 1x SSPE + 0.1% SDS : 15 分間 (20x SSPE = 200 mM pH 7.4  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、5 M NaCl および 20 mM EDTA)

b. 20 mM NaOH : 5 分間

c.  $\text{H}_2\text{O}$  で 3 回、全部で 5 分間洗浄し、 $\text{N}_2$  乾燥する

7. 炭酸緩衝液 (0.1 M 炭酸 Na、pH 8.75、1 mM EDTA、.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.  $\text{dH}_2\text{O}$  で 3 回、全部で 5 分間洗浄して、乾燥する

11. Alexa 555 の cy3 チャンネル中、Array Worx 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 Sumodixs 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 bFGF

10

20

30

40

50

Fで、2つの異なるb F G F核酸リガンドに関して、C B Q C A染色と比較したN H S - A l e x a - 5 5 5染色を示す。

#### 【0109】

b F G F、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S u r m o d i c sスライドを用いて、さらなるU P S試薬をアッセイした。標的タンパク質濃度は10 n M b F G F、50 n Mエンドスタチン、および50 n Mアンジオゲニンであった。図5は、明記する濃度のN H S - A l e x a - 5 5 5、マレイミド - A l e x a - 5 5 5、および2つの異なるp H値のトラウト試薬後、マレイミド - A l e x a - 5 5 5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、U P S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b F G Fアプタマーを用いて得た結果を示す。具体的には、グラフは、log (タンパク質の存在下の相対蛍光単位 (R F U) - タンパク質の非存在下のR F U) に対してlog (p g / m l b F G Fタンパク質) をプロットする。

#### 【0111】

(実施例5)

#### ビニル - スルホン - P E G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、p H 9.2の100 m Mホウ酸緩衝液の10 μ lアリコット中、2 μ l乾燥D M S O中の6等量の二官能性N H S - P E G (3400 k D a) - ビニルスルホン(S h e a r w a t e r)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 - P E G - 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(S a r t o r i u s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P E G試薬を取り除き、その後、1 M N a C lで溶出した後、S e p h a d e x G 50脱塩カラム上で脱塩した。ビニルスルホン - P E G - 核酸リガンドをチオール活性化表面(A p o g e n t)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A p o g e n t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、P E G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R F U(R F U - 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。P E G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D N Aの非特異的結合/標識を評価するための無作為D N Aプール(30 N 12 D N A)；

3. アミン修飾D N AでなくヒドロキシD N A(O H 6.7)と接触させたアドレス。ヒドロキシD N A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 D N A。塩基性線維芽細胞増殖因子(b F G F)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）。

#### 【 0 1 1 4 】

このレイアウトで 8 つの複製アレイを産生した。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 - C 6 リンカーの存在を示す）。

#### 【 0 1 1 5 】

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産生した。

#### 【 0 1 1 6 】

##### 【表 2】

タンパク質レベル範囲 (モル/l)						
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

#### 【 0 1 1 7 】

##### 表 2

#### 【 0 1 1 8 】

##### 【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セレクトイン	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
トロニン	7	6	5	2	3	8	4	1
TGF-β1	6	5	2	3	8	4	1	7

#### 【 0 1 1 9 】

##### 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、b F G F、アンジオゲニン、エンドスタチン、およびトロニ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、トロニ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、トロニ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 b F G F、アンジオゲニン、エンドスタチン、およびトロニ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 b F G F と接触させた、複数のアレイ由来の b F G F 光架橋核酸リガンド結合曲線を示す。グラフは、R F U に対する b F G F 濃度 ( p M ) のプロットである。

#### 【 0 1 2 0 】

##### ( 実施例 7 )

##### 血清中の H I V g p 1 2 0 M N の検出

実施例 1 および実施例 3 の技術を用いて、g p 1 2 0 M N、b F G F、およびトロニ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。

10

#### 【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産生した。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  
20  
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ィールを示す）に提供する。

20

#### 【0123】

##### 【表4】

	タンパク質レベル範囲（モル/l）							
	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, <sup>フォン・ウィルブランド</sup>	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

30

#### 【0124】

表3：標的タンパク質濃度手掛かり

#### 【0125】

【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・ウィルブランド	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
IPA	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
トロロビン	G	B	C	H	E	F	D	A
カタラーゼ	B	C	H	E	F	D	A	G

10

## 【 0 1 2 6 】

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：

20

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ッシング血清。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3mg/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、300K分子量カットオフフィルターでろ過し、そして、12mg/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。

30

## 【 0 1 2 7 】

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ッシングした。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。

## 【 0 1 2 8 】

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、1nM未満の濃度で、すべてのタンパク質が検出可能であった。

40

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 (0pM ~ 1,000pM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。

## 【 0 1 2 9 】

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

50



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（ $< 100 \mu\text{l}$ ）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）

##### 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 pH 11.0、および500mM NaClの流れ、40～30分間。未処理血清の存在下で、Accelr 8および他のものが提供する非汚染（nonfouling）表面は、最も信頼のおける用量反応曲線を生じる。Accelr 8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log RFUに対するlog [タンパク質、M]のものである。

#### 【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関して、核酸リガンドをランク付けすることが可能である。

#### 【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%過血清をアレイ（実施例1にしたがって産生）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ニ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Alexa-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。

#### 【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

## 【 0 1 3 3 】

【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 ( $\log([P])$  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。

【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 ( $\log([P])$  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 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。

【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。

20

【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、 $1\text{ nM}$   $bFGF$  および  $10\text{ nM}$   $bFGF$  での 2 つの異なる  $bFGF$  核酸リガンドに関して、 $CBQC A$  染色と比較した  $NHS - Alexa - 555$  染色を示す。

【図 5】図 5 は、明記した濃度の  $NHS - Alexa - 555$ 、マレイミド -  $Alexa - 555$ 、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 -  $Alexa - 555$  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  $bFGF$  アプ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、 $\log$  (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  $\log(pg/ml\ bFGF\text{ タンパク質})$  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  $RFU$  ( $RFU - \text{バックグラウンド}$ ) 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 1 3】図 1 3 は、g p 1 2 0 M N、b F G F、およびトロニ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 1 4】図 1 4 は、光架橋核酸アレイのレイアウトを例示する。

【図 1 5】図 1 5 は、同族標的タンパク質とのインキュベーション後の、図 1 4 のアレイの蛍光画像を示す。

【図 1 6】図 1 6 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 1 7 A】図 1 7 A 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 1 4 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 R F U を示す。

【図 1 7 B】図 1 7 B 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 1 4 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 R F U を示す。

【図 1 7 C】図 1 7 C 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 1 4 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 R F U を示す。

【図 1 7 D】図 1 7 D 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 1 4 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 R F U を示す。

20

【図 1 7 E】図 1 7 E 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 1 4 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 R F U を示す。

【図 1 7 F】図 1 7 F 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 1 4 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 R F U を示す。

【図 1 7 G】図 1 7 G 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 1 4 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 R F U を示す。

30

【図 1 8】図 1 8 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、log R F U に対する log [ タンパク質、M ] のものである。

【図 1 9】図 1 9 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 2 0】図 2 0 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ニン光架橋核酸リガンドを用いた、組織培地および 2 0 % 「血餅除去」血清における内因性トロニンおよびエンドスタチンの検出を例示する。

【配列表】

40

## 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

<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

<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

<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

10

20

30

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (1)..(1)  
<223> 5'-amino-C6-g  
  
<400> 2  
gggaggacga tgcgggcggg agcagtctat gtcattctgc cacctccaga 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 cgtcccagac 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 cccccagac 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 cttctacag ggcagtctat gtcacagac 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 tgcgggcca ccacgtggta ttattgacct tgcaatggga atgccagac 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 tgcggggcaa 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 gtgtcacctt ggccccagac 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 aaaggtgggtc ttagcctaata 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

10

<400> 11  
 gggaggacga tgcgggccac 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 tgcnggccct 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 gtcttggtcc accaaatatg tgatgtcacc accagcagac 60

gacgagcggg 70

<210> 14

<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> 14

gggaggacga tgcgggcaaa gtcttggtcc accaaatatg tgatgtcacc accagcagac 60

gacgagcggg 70

<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

<400> 15

gggaggacga tgcgggcaaa ggcacaccga gttcatagta tcccacagac gacgagcggg 60

a 61

<210> 16

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

10

20

30

<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> 16  
 gggaggacga tgcgggacgaa ggcacaccga gttcatagta tcccacagac gacgagcggg 60  
 a 61

10

<210> 17  
 <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

20

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

<210> 18  
 <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'-biotin-g

<400> 18  
 gggaggacga tgcgggacgaa 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

10

<400> 19  
gggaggacga tgcggtgacg taagagtgta atcgatgcag cctggcagac gacgagcggg 60  
a 61

<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 tgcgggacga 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 tgcgggacga 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 tgcgggacga ataacactac actgatcatc tcccttctat gtccccagac 60  
 gacgagcggg 70

<210> 23  
 <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> 23  
 gggaggacga tgcgggacga cttaaatacca cttcacctta caattccttt atctgcagac 60  
 gacgagcggg 70

<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 30

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

<400> 24  
 gggaggacga tgcggccata cgcacttcag tggggataat ccaactgggt tgggtgcagac 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 ccacctctaa 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 tcctatcttt caacccccct tgatccagac 60

gacgagcggg 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 cttaaattcca cttcacctta caattccttt atctgcagac 60

gacgagcggg 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 ttcttagatc ttccccagac 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 tgcgggcagt 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

10

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

<400> 33  
 gggaggacga tgcgggctac gtacaacgtc cactctacct ccgtccagac 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 taaacctca gtagtcagac gacgagcggg 60

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

<220>  
 <223> Synthetic Sequence

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n is a, c, g, or 5-Brdu

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> 35  
 gggaggacga tgcggnacca caggttcatt ccaacagctt ctggccgac ttagcagac 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

<400> 36  
 gggaggacga tgcggccact acacctcact aggcttccta cctccagac 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

<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

10

20

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> 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

20

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

<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 ccttcgtttg cttgctgctc cccccagac 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 tgcgggtca cttcgtttg cttgctgctc cccccagac 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 tctttcccat aactgcagac gacgagcggg 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 acctaccttt tcgcaactac tgggtgcagac gacgagcggg 60

<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 gcttttctca atttccagac gacgagcggg 60

<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 gtcttggtta 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 tgcggcaca 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 tgcggcaca 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 tcttgcaag ctctacttt 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 cttgtgacg ttgccagac 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

30

<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>  
 <223> Synthetic Sequence 10

<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  
 <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> 57  
 gggaggacga tgcgggacgaa ggcacaccga gttcatagta tcccacagac gacgagcggg 60 30

<210> 58  
 <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> 58  
 gggaggacga tgcgggacga gggaccagac cgccacagcg ggatgcagac 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 gaccacagcg 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

30

<400> 60  
 gggaggacga tgcgggcaca ggcctaakat acctccatct cctggcagac gacgagcggg 60

<210> 61  
 <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> 61  
 gggaggacga tgcgggacca acgagaccac acgacaagcg ctgtgcagac gacgagcggg 60

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

10

<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 tgcgggccat ggatggtttg gttggctgtc ctcagacgac gacgaggg 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 gcgagcttcc gaaaaggaaa ttacgcagac gacgagcggg 60

a 61

<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 ttgatctggt 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 ttgatctggt 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

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> 5'-amino-C6-g

<400> 66

gggaggacga tgcggccacc atgtcacctc aattaccctt cctcccagac gacgagcggg 60

<210> 67

<211> 60

30

<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 tgcggccaac cctcactcct tcttcacttc 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

20

<400> 68  
gggaggacga tgcgggcaca actcccacca ccttctttc aactccctac tgccccagac 60  
gacgagcggg 70

<210> 69  
<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> 69  
gggaggacga tgcgggcaga 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

10

<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

20

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

<400> 71  
 gggaggacga tgcggggacct ccgggtaacc aggtaactcc tagccagacg acgagcggg 59

<210> 72  
 <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> 72  
 gggaggacga tgcggccacc tacctctaca ctaccttacc tactccagac gacgagcggg 60

<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 caaccttacc 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 tgcggccccg agtttcccta aggtttggtt 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

10

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

<210> 77  
 <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> 77  
 gggaggacga tgcgggccga agtctaaacc tgctcgtgac tttctttcga tgttcagac 60  
 gacgagcggg 70

<210> 78  
 <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> 78  
 gggaggacga tgcgggccta ccaactcccc tctagtcctg ttctatccac 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 gggtcccttc tgcctcattg ttgtgggaac ccatccagac 60  
 gacgagcggg 70

<210> 80  
 <211> 69  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

20

<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  
 gggaggacga tgcgggcaca gggtctatca acgttgcct gagtaattga cctgcagacg 60  
 acgagcggg 69

30

<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 tgcgggcca ggacattctt gttcgttggt gctgtccact gtctccagac 60  
 gacgagcggg 70

<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 tgcggcccg agtttccta aggtttggtt gacctgtcat ttcagcagac 60  
 gacgagcggg 70

<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

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

<400> 83  
 gggaggacga tgcggcacac ggttgccata ccttcatta 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 tgcttcccc 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

20

<400> 85  
 gggaggacga tgcgggcca agttccatc cacgttactc ttgtccagac gacgagcggg 60

<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 tgcgggcca 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 gttgcggtac 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 tcccagcgcg gctaacttt 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 ttccccagac 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

20

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

<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

30

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

<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

10

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

<210> 94  
 <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> 94  
 gggaggacga tgcgggctga aaggaaacgg acgattgagc ttccccttac ctctccagac 60  
 gacgagcggg 70

<210> 95  
 <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> 95  
 gggaggacga tgcgggacgc tagtacctg gctggcttgg ttgggcagac gacgagcggg 60

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

<220>  
 <223> Synthetic Sequence

<220> 10  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(67)  
 <223> t is 5-Brdu

<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 tgcggcaca 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 gggccagac 60  
 gacgagcggg 70

<210> 99  
 <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> 99  
 gggaggacga tgcgggacca ctttaacctt cttttctcat ttccaccccc ctccccagac 60  
 gacgagcggg 70

20

<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

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

30

<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 tgcgggcca cccctagtga acaacaacac tcccacagac gacgagcggg 60

<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

<400> 102

gggaggacga tgcggcagca ccgaggtacc caacagggat ccgccagac 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

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> 5'-amino-C6-g

<400> 103

gggaggacga tgcgggcggc agacgcgccg ggtacccag gtcccagac gacgagcggg 60

<210> 104

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

20

30



<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 tgcggcaciaa ggaacaaagc ggccccatc cccaacagac gacgagcggg 60

<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 aagaagcacg gtaccccagg tccgccagac gacgagcggg 60

<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

<400> 106

gggaggacga tgcggccgga catccccag ggcaaaacca actcccagac gacgagcggg 60

<210> 107

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

20

30

<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 cccccagac gacgagcggg 60

<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 cttttggggt aaccgcagac 60

gacgagcggg 70

<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

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> 5'-Acrydite-g

<400> 109

gggaggacga tgcggcaacc ctgacaccac gttgtttctc cttttggggt aaccgcagac 60

gacgagcggg 70

<210> 110

10

20

30

<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 tcgatttatc ctacttatgg caccacagac 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 gggaaacacc 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 ctgggtcata 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 tctaccttc cctagcaaag gtctgcagac 60  
gacgagcggg 70

<210> 114  
<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> 114  
gggaggacga tgcggccata cgcacttcag tggggataat ccaactggtt tgggtgcagac 60  
gacgagcggg 70

30

<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

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

<400> 115  
 gggaggacga tgcgggccga ctctgaggaa aaggttttat 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 aaggttttat 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)  
 <223> 5'-amino-C6-g 30

<400> 117  
 gggaggacga tgcgggcaca 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 tgcggggacca tccaatacct tccgtaacac tttccttctt ctttccagac 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

<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> 120

gggaggacga tgcgggcacc tttcttacat ctgggcttca 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  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 5'-amino-C6-g

10

<400> 121  
 gggaggacga tgcgggcaca atcaagacct ctccaaactt gaactctgtc tatccagac 60  
 gacgagcggg 70

<210> 122  
 <211> 58  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic Sequence

20

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(58)  
 <223> t is 5-Brdu

<400> 122  
 gggaggacga tgcgggcagt aggttgggta ggggtggtctg ctacagacgac gagcggga 58

<210> 123  
 <211> 58  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic Sequence

30

<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> 123  
 gggaggacga tgcgggcagt aggttgggta ggggtggtctg ctacagacgac 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 ggggtggtctg ctcagacgac gagcgga 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

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

10

<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

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

20

<400> 128  
 gggaggacga tgcgggcggt tggcgtggtt ggaaatgtcc cgtcagacga cgagcggg 58

<210> 129  
 <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'-Acrydite-g

30

<400> 129  
 gggaggacga tgcgggcagt aggttgggta ggggtggtctg 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 taccccagac 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 ctctatctct 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>  
 <223> Synthetic Sequence

10

<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> 134  
 <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> 134  
 gggaggacga tgcgggctgg gaacatccct cttgtcttgc ttaccaaacac cgctccagac 60  
 gacgagcggg 70

30

<210> 135  
 <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 tccctcttgt 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 ttgcaccggt gcactgggtc agtatggcgg ggggtttggc cagaagcaga 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 ttgcaccggt gtccgaatgg ctcgtaggt ggaacgtggc cagaagcaga 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  
 gccgtagtga tcgctcgggg ccgttgacac agggaccca tgttgtaggc 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 20  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 5'-amino-C6-g  
  
 <400> 139  
 gccgtagtga tcgctcgggc agggccccc gtttggggta gttcaggtgc gaaacgacaa 60  
 gaagac 66  
  
 <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  
 gccgtagtga tcgctcggtat tcgtccggga taggacctga tcatgaaggc cagaagcaga 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

10

<400> 141  
 gcggatcagc ttgcaccgct aaggtagggg cgcgtggggc ggggacaagc cagaagcaga 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

20

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

<400> 142  
 gcggatcagc ttgcaccgtc cgcgcgcgga tatgctttgg gaggctggc cagaagcaga 60  
 aggacg 66

<210> 143  
 <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> 143  
 gcggatcagc ttgcaccggg ggtgtagaga atgccacaaa gtgcccgggc 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 ttgcaccgta ggggctcggg tgggcagggg tagggtaagc cagaagcaga 60  
 aggacg 66

<210> 145  
 <211> 66  
 <212> DNA 20  
 <213> Artificial Sequence

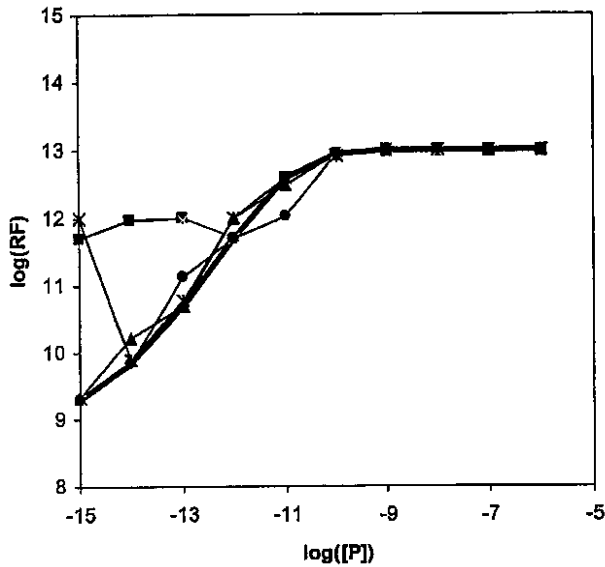
<220>  
 <223> Synthetic Sequence

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(66)  
 <223> t is 5-Brdu

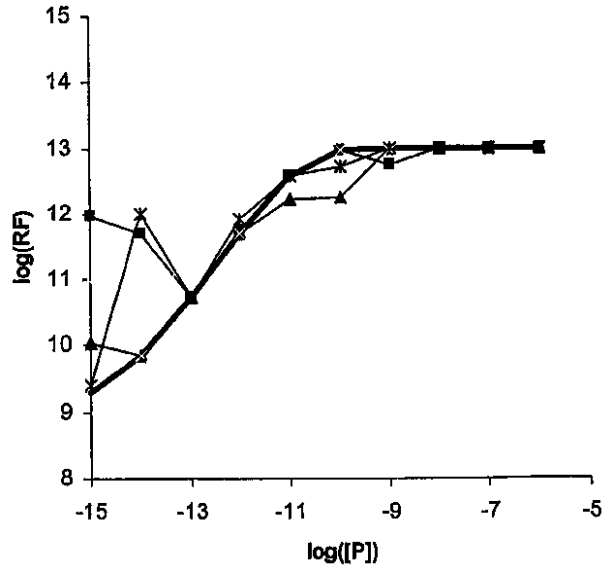
<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 5'-amino-C6-g

<400> 145  
 gcggatcagc ttgcaccggg gtgctcgggt tagggcaggg atgggtaagc cagaagcaga 60  
 aggacg 66 30

【 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 ACG ATG CGG GGU CAC CUU AAC CAC AUG ACC AGU CUA UGC CAG ACG ACG AGC GGG	1
α 2 -抗プラスミン b p	N-28.16	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCG GGA GCA GUC UAU GUC AUC 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 ACG ATG CGG CCG GGA GUU AAA CAC UCA GUC UAU GCG CCC CAG ACG ACG AGC GGG	3
α 2 -抗プラスミン b p	N-28.2	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC CCA CGG CAG UCU AUG UCA UCA ACC CCC CAG ACG ACG AGC GGG	4
α 2 -抗プラスミン b p	N-28.32	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC CAC UUU CUA CAG GCC AGU CUA UGU CAU CAG ACG ACG AGC GGG	5
アンジオゲニン	N-11.11	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC AAC CAC CAC GUG GUA UUA UUG ACC UUG CAA UGG GAA UGC CCA GAC GAC GAG CGG G	6
アンジオゲニン	N-11.12	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GGC AAA CUG 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 ACG ATG CGG GCA CCU ACC UGA GCU ACA UAU GAC AGU GUC ACC CUG GCC CCA GAC GAC GAG CGG G	8
アンジオゲニン	N-11.16	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC AAA UGG ACU UUU GGC CAC GAA CUU ACG ACG GUG UUG CCA GAC GAC GAG CGG G	9
アンジオゲニン	N-11.27	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAC CAA AAG GUG GUC UUA GCC UAA UUA UGG ACG 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 ACG ATG CGG GCC ACG UGU AUU AUC 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 ACG ATG CnG GCC CUA CUU GCA UGA AUA UCC ACU CCU AGG CUU 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 ACG ATG CGG GCA AAG UCU UGG UCC ACC AAA UAU GUG AUG UCA CCA CCA GCA GAC GAC GAG CGG G	13
アンジオゲニン	Ac-11.59	Ac-GGG AGG ACG ATG CGG GCA AAG UCU UGG UCC ACC AAA UAU GUG AUG UCA CCA CCA GCA GAC GAC GAG CGG G	14
bFGF	6.7	GGG AGG ACG ATG CGG GCG AAG GCA CAC CGA GUU CAU AGU AUC CCA CAG ACG ACG AGC GGG A	15
bFGF	N-6.7	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GGG AAG GCA CAC CGA GUU CAU AGU AUC CCA CAG ACG ACG AGC GGG A	16
bFGF	N-HBG-6.7	アミノ-C18-GGG AGG ACG ATG CGG CGG GCG AAG GCA CAC CGA GUU CAU AGU AUC CCA CAG ACG AGC AGC GGG A	17
bFGF	B-6.7	ビオチン-GGG AGG ACG ATG CGG GCG AAG GCA CAC CGA GUU CAU AGU AUC CCA CAG ACG ACG AGC GGG A	18
bFGF	N-6.40	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG UGA CGU AAG AGU GUA AUC GAU CCA GCC UGG CAG ACG ACG AGC GGG A	19
bFGF	S-6.7	チオール-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCG AAG GCA CAC CGA GUU CAU AGU AUC CCA CAG ACG ACG AGC GGG A	20
bFGF	Ac-6.7	Ac-GGG AGG ACG ATG CGG GCG AAG GCA CAC CGA GUU CAU AGU AUC CCA CAG ACG ACG AGC GGG	21
bNGF	N-13.7	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAC CAA UAA CAC UAC ACU GAU CAU CUC CCU UCU AUG UCC CCA GAC GAC GAG CGG G	22
bNGF	N-13.17	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CAC UUA AUU CCA CUU CAC CUU ACA AUU CCU UUA UCU GCA GAC GAC GAG CGG G	23
bNGF	N-13.43	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCA UAC GCA CUU CAG UGG GGA UAA UCC AAC UGG UUU GGU GCA GAC GAC GAG CGG G	24
bNGF	N-13.44	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAC CAA AUA CCA ACU UCA CAU CAC CUU UCU UAU UCU CCG GCA GAC GAC GAG CGG G	25
bNGF	N-13.65	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CUA ACU UUA CCU CCA CCU CUA ACC ACC CUC CUU UCU GCA GAC GAC GAG CGG G	26

図 3 (続き)



【図 3 - 3】

bNGP	N-13.78	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC CCA AAC ACU UGU UCC UAU CUU UCA ACC CCC CUU GAU CCA GAC GAC GAG CGG G	27
bNGP	Ac-13.17	Ac-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CAC UUA AAU CCA CUU CAC CUU ACA AUU CCU UUA UCU GCA GAC GAC GAG CGG G	28
C18 f	N-31.56	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CAA GCC CAA CCU UUC CUA GAU CUU CCC CAG ACG ACG AGC GGG	29
C18 f	N-31.62	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAC CAA CCU AGA AGA GCC AAC CUA GCU GUC CAG ACG ACG AGC GGG	30
C18 f	N-31.65	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GUA AUC ACC UCG UUG AAC CAG ACC CUU CGU UUA UUG CCA GAC GAC GAG CGG G	31
C18 f	N-31.73	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAA CCC CCU UAC UAC ACC UUC UCC AAC UUG AUC ACU CUG 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 GCU ACG UAC AAC GUC CAC UCU ACC UCC GUC CAG ACG ACG AGC GGG	33
カルバスタチン b p	N-32.23	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAU GCA GUA GGU GCU UAA ACC CUC AGU AGU CAG ACG ACG AGC GGG	34
カタラーゼ f	N-33.56	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG AAC CAC AGG UUC AUU CCA ACA GCU UCU GGC CGA UCU UUA 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 CUA CAC CUC ACU AGG CUU CCU ACC CUC CAG ACG ACG AGC GGG	36
カタラーゼ f	N-33.77	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAA GCA GUA AAG GAU CAG GAC CAC CUU AGG CAG ACG ACG AGC GGG	37
カタラーゼ f	N-33.79	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCA CAC GAU CUC CUU CAC CCU CCU GUC CCU ACU AGA GCA UCA GAC GAC GAG CGG G	38
カタラーゼ f	N-33.88	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAC ACC CUA CCC UUA ACC UCA CCU GUC CCU ACU 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 ACG ACG 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 ACG ACG AGC GGG	41
エラスターゼ	Bla43	GGG AGG ACG ATG CGG CAA CCC ACC ACU CUA UCU UUC CCA UAA CUG CAG ACG ACG AGC GGG A	42
エラスターゼ	N-Bla43	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAA CCC ACC ACU CUA UCU UUC CCA UAA CUG CAG ACG ACG AGC GGG A	43
エラスターゼ	B-2.43	ビオチン-GGG AGG ACG ATG CGG CAA CCC ACC ACU CUA UCU UUC CCA UAA CUG CAG ACG ACG AGC GGG A	44
エラスターゼ	N-34.15	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAC GGA CCU ACC UUU UCG CAA CUA CUG GUG CAG ACG ACG AGC GGG	45
エラスターゼ	N-34.17	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAC AGC GAG GGU UUG GCU UUU CUC AAU UUC CAG ACG ACG AGC GGG	46
エラスターゼ	N-34.5	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCU GGG GCU ACC GUU UCC UUA CCU ACU GGG CAG ACG ACG AGC GGG	47
エラスターゼ	N-34.8	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAA CAC UUG UCG AUA GUC UUG GUU AAG CUG CAG ACG ACG AGC GGG	48
エンドスタチン	N-92.4	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAC AAU GAA GUC ACU CUU GAC CGU UGU AUU CAG ACG ACG AGC GGG	49
エンドスタチン	Ac-92.4	Ac-GGG AGG ACG ATG CGG CAC AAU GAA GUC ACU CUU GAC GCU UGU AUU CAG ACG ACG AGC GGG	50
フェリチン f	N-36.51	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GGG GAC UUG ACG GUG UCU UGC GAA GCU CCU ACU UUA 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 GUU AGC GAU AGC CUU UCC AAG UCC UUG UGA CGU UGC CCA GAC GAC GAG CGG G	52
GP120MN	SL0518	GGG AGG ACG ATG CGG AAU GCG CGA GCU UCC GAA AAG GAA AUU ACG CAG ACG ACG AGC GGG A	53

図 3 (続き)

【図 3 - 5】

GP120MN	N-3.7	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG AAU GCG CGA GCU UCC GAA AAG GAA AUU ACG CAG ACG ACG AGC GGG A	54
GP120MN	S-3.7	デオキシ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG AAU GCG CGA GCU UCC GAA AAG GAA AUU ACG CAG ACG ACG AGC GGG A	55
GP120MN	N-3.5	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAA CCA CAC GCA GGA GGA CAC AAC GAU CCG CAG ACG ACG AGC GGG	56
GP120MN	N-3.54	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCG AAG GCA CAC CGA GUU CAU AGU AUC CCA CAG ACG ACG AGC GGG	57
GP120MN	N-3.76	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAC GAG GGA CCA GAC CGC CAC AGC GGG AUG CAG ACG ACG AGC GGG	58
GP120MN	N-7.3	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAG GAC CAC GAC CAU GAC CCA CCA GGA AUG CAG ACG ACG AGC GGG	59
GP120MN	N-7.4	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CAG GCC UAA CAU ACC UCC AUC UCC UGG CAG ACG ACG AGC GGG	60
GP120MN	N-7.11	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAC CAA CGA GAC CAC ACG ACA AGC GCU GUG CAG ACG ACG AGC GGG	61
GP120MN	N-7.20	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC AAU GAU GGU UUG GGU GGC UGU CCU CAG ACG ACG AGC GGG	62
GP120MN	N-HBG-3.7	Sp18 GGG AGG ACG ATG CGG AAU GCG CGA GCU UCC GAA AAG GAA AUU ACG CAG ACG ACG AGC GGG A	63
IGFBP-3	N-112.65	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA AAG UGU UAU UUC UUG AUC UGU UUC ACC CAG ACG ACG AGC GGG	64
IGFBP-3	Ac-112.65	Ac-GGG AGG ACG ATG CGG GCA AAG UGU UAU UUC UUG AUC UGU UUC ACC CAG ACG ACG AGC GGG	65
IL-2 bc	N-39.56	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCA CCA UGU CAC CUC AAU UAC CCU UCC UCC CAG ACG ACG AGC GGG	66
IL-2 bc	N-39.61	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCA ACC CUC ACU CCU UCU UCA CUU CAC CUC CAG ACG ACG AGC GGG	67

図 3 (続き)

【図 3 - 6】

IL-2 bp	N-38.22	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CAA CUC CCA CCA CCC UUC UUU CAA CUC CCU ACU GCC CCA GAC GAC GAG CGG G	68
IL-2 bp	N-38.26	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GAC AGU GUG GGG UUU AGU GUC CAU GGC CAG ACG ACG AGC GGG	69
IL-2 bp	N-38.27	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CAC UCU UCA CCC CCU CCU UUU AGC UGC CAG ACG ACG AGC GGG	70
IL-2 bp	N-38.37	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAC CUC CGG GUA ACC AGG UAA CUC CUA GCC AGA CGA CGA GCG GG	71
IL-2 bp	N-38.38	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCA CCU ACC UCU ACA CUA CCU UAC CUA CUC CAG ACG ACG AGC GGG	72
IL-2 bp	N-38.47	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GGC AAC CUU ACC AAG AUG CCC CUC CUG CAG ACG ACG AGC GGG	73
IL-2 bp	N-38.5	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAC ACC CCU CAA CUU ACC CUA CUU CUU GGC CAG ACG ACG AGC GGG	74
IL-4	B-12.48	ビオチン-GGG AGG ACG ATG CGG CCC CGA GUU UCC CUA AGG UUU GGU UGA CCU GUC AUU UCA GCA GAC GAC GAG CGG G	75
IL-4	N-12.48	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCC CGA GUU UCC CUA AGG UUU GGU UGA CCU GUC AUU UCA GCA GAC GAC GAG CGG G	76
IL-4	N-12.8	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC GAA GUC UAA ACC UGC UGC UGA CUU UCU UUC GAU GUU GCA GAC GAC GAG CGG G	77
IL-4	N-12.13	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC UAU CAA CUC CCC UCU AGU CCU GUU CUA UCC ACG UUG GCA GAC GAC GAG CGG G	78
IL-4	N-12.41	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC AAG GUU CCC UUC UGC CCU AAU GGU GUG GGA ACC CAU CCA GAC GAC GAG CGG G	79
IL-4	N-12.63	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CAG GUU CUA UCA ACG UUG UCC UGA GUA AUU GAC CUG CAG ACG ACG AGC GGG	80

図 3 (続き)

【図 3 - 7】

IL-4	N-12.78	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC AAG GAC AUU CUU GUU CGU UGU UGC UGU CCA CUG UCU CCA GAC GAC GAG CGG G	81
IL-4	Ac-12.48	Ac-GGG AGG ACG ATG CGG CCC CGA GUU UCC CUA AGG UUU GGU UGA CCU GUC AUU UCA GCA GAC GAC GAG CGG G	82
IL-4 bc	N-41.49	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAC ACG GUU GCC AUA CCC UUC AUU AUU GAG CAG ACG ACG AGC GGG	83
IL-4 bc	N-41.50	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCG GCU GCU UCC CCC CUG GUC AUU GUU GUG CAG ACG ACG AGC GGG	84
IL-4 bc	N-41.56	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC AAA GUU CCC AUC CAC GUU ACU CUU UGC CAG ACG ACG AGC GGG	85
IL-4 bc	N-41.76	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC AAG GUU CCC UUC UGC UUC AUU GUU GUG CAG ACG ACG AGC GGG	86
IL-4 bp	N-40.2	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CCU UCU AUC GAC GUU GCG GUA CCC AUG CAG ACG ACG AGC GGG	87
IL-4 bp	N-40.3	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCG GAU CCC AGC GCG GCU AAC GUU UGG GGG CAG ACG ACG AGC GGG	88
IL-4 bp	N-40.5	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAG GCG GAU CCU AAC GUU GAU UUG GUU UGC CAG ACG ACG AGC GGG	89
IL-7 f	N-42.10	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAA CUA CCG GCU GGG GAC CUG AAC UUC AUA UCC CCU UCC CCA GAC GAC GAG CGG G	90
IL-7 f	N-42.22	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CCA GAA CCU GAC CUU AAU GCC CCC UUU CUC AGC UAA GCA GAC GAC GAG CGG G	91
IL-7 f	N-42.27	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GGA CCG AGG GGU GAG CUU CCC UGA UUU AAC UCU ACC ACA GAC GAC GAG CGG G	92
IL-7 f	N-42.3	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC ACC UGA UCC CCU ACG UUG AUA GGA GUA UCC CCU 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 ACG ATG CGG GCU GAA AGG AAA CCG ACG 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 ACG ATG CGG GAC GCU AGU ACC CUG GCU GGC UGU GUU GGG CAG ACG ACG AGC GGG	95
キニノーゲン、2 鎖 bc	N-46.35	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CCG ACU ACA GGU UGG UUU GGU UGG ACU UUC CCG 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 ACG ATG CGG CAC AAA CCG AGC UCU 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 ACG ATG CGG CCU GGA UUC AAU AAC CCG CAC UCC CCU 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 ACG ATG CGG GAC CAC UUU AAC CUU CCU UUC UCA UUU CCA CCC CCG UCC CCA GAC GAC GAG CGG G	99
PDGP	N-4.24	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCG GAA GAG GCA GGG UAC CAC GGC AGA GGU CAG ACG ACG AGC GGG	100
PDGP	N-4.87	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCC AAC CCC UAG UGA ACA ACA ACA CUC CCA CAG ACG ACG AGC GGG	101
PDGP	N-8.26	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAG CAC CGA GGU ACC CAA CAG GGA UCC GCC CAG ACG ACG AGC GGG	102
PDGP	N-8.27	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCG GCA GAC GCG CCG GGU ACC CCA GGU CCC CAG ACG ACG AGC GGG	103
PDGP	N-8.31	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAC AAG GAA CAA AGC GGC CCC UAU CCC CAA CAG ACG ACG AGC GGG	104
PDGP	N-8.33	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GGG GCA AGA AGC ACG GUA CCC CAG GUC CCG CAG ACG ACG AGC GGG	105
PDGP	N-8.35	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCG GAC AUC CCC CAG GGC AAA ACC AAC UCC CAG ACG ACG AGC GGG	106

図 3 (続き)

【図 3 - 9】

PDGP	N-8.37	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAA GGG AAA CAG AUA GCC CAG GCU CCC CCC CAG ACG ACG AGC GGG	107
プラスミン f	N-50.25	アミノ-C6-GGG AGG ACG 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 ACG ATG CGG CAA CCC UGA CAC CAC GUU GUU UCU CCU UUU GGG GUA ACC GCA GAC GAC GAG CGG G	109
P-セレクトチン	N-14.14	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCG CCC GAU UGA CCU UCG AUU UAU CCU ACU UAU GGC ACC CCA GAC GAC GAG CGG G	110
P-セレクトチン	N-14.21	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAC GAG GGA AUC ACC UCG AAC UGU UCU UGG AUU ACU GCC CAG ACG ACG AGC GGG	111
P-セレクトチン	N-14.17	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCA UGA ACC CAU CCU CUG GUU CAU AAU CGA CGU GUU CGU GCA GAC GAC GAG CGG G	112
P-セレクトチン	N-14.24	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCU CAA UAA CCU GAA UCU ACC UUU CCC UAG CAA AGG UCU GCA GAC GAC GAG CGG G	113
P-セレクトチン	N-14.95	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCA UAC GCA CUU CAG UGG GGA UAA 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 ACG ATG CGG GCG GAC UCU GAG GAA AAG GUU UUA UGU AUG GCU ACC CCU 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 ACG ATG CGG GCC GAC UCU GAG GAA AAG GUU UUA UGU AUG GCU ACC CCU GCA GAC GAC GAG CGG G	116
TGFB	N-15.74	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CAA CCU UAC CAC CCU AGC CUA CCC CUA ACC UCC UGU CCA GAC GAC GAG CGG G	117
TGFB	N-15.81	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAC CAU CCA AUA CCU UCC GUA ACA CUU UCC UUC CUU CCA GAC GAC GAG CGG G	118
TGFB	N-15.82	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GCA ACC UAC CUU ACC UUC CCC UAG CCU 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 ACG ATG CGG GCA CCU UUC UUA CAU CUU GGC UUC AUU CUU GCA CCA UUG GCA GAC GAC GAG CGG G	120
TGFB	N-15.87	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA CAA UCA AGA CCU CUC CAA ACU UGA ACU CUG UCU AUC CCA GAC GAC GAG CGG G	121
トロンビン	Thro4	GGG AGG ACG ATG CGG GCA GUA GGU UGG GUA GGG UGG UCU CUU CAG ACG ACG AGC GGG A	122
トロンビン	N-5.4	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GUA GGU UGG GUA GGG UGG UCU GCU CAG ACG ACG AGC GGG A	123
トロンビン	B-5.4	ヒオチン-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GUA GGU UGG GUA GGG UGG UCU GCU CAG ACG ACG AGC GGG A	124
トロンビン	B-5.75	ヒオチン-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GGA CCG ACA GCA AGG GGU GAG CAC GAG CAG ACG ACG AGC GGG	125
トロンビン	N-5.51	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GAG GAG CUG AUG GGU GGU GAG GUU GGC CAG ACG ACG AGC GGG G	126
トロンビン	N-5.75	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GGA CCG ACA GCA AGG GGU GAG CAC GAG CAG ACG ACG AGC GGG	127
トロンビン	N-5.77	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCG GUU GGC UGU GUU GGA AAU GUC CCG UCA GAC GAC GAG CGG G	128
トロンビン	Ac-5.4	Ac-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GUA GGU UGG GUA GGG UGG UCU GCU CAG ACG ACG AGC GGG G	129
VBGF	N-60.78	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG GCA GGA GUC CAC UUU CAC UCC ACC UAC CCG AAU GUU ACC CCA GAC GAC GAG CGG G	130
VBGF	N-60.87	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CCC UCC CGA CCA CAC CUC CUA UCC UGU CCC UAC UAG AGC AUC AGA CGA CGA GCG GG	131
VBGF	N-60.61	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAA GGU ACU ACU CCU AAC CUU AUC CCU UCC UCU UCC UUG CCA GAC GAC GAG CGG G	132
VBGF	N-60.52	アミノ-C6-GGG AGG ACG ATG CGG CAU CAA AAC UGG GGG CGA GUG AUU UAU GUU AGG GGC CUG GCC AGA CGA CGA GCG GG	133

図 3 (続き)

【 図 3 - 1 1 】

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

図 3 (続き)

【 図 3 - 1 2 】

U = 5-BrdU

n = A, G, C, または 5-BrdU

アミノ-C18 = アミノ (ヘキサエチレングリコール (HEG))

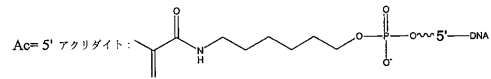
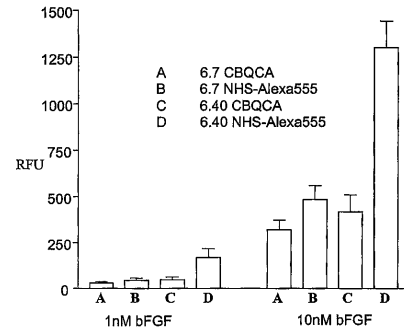


図 3 (続き)

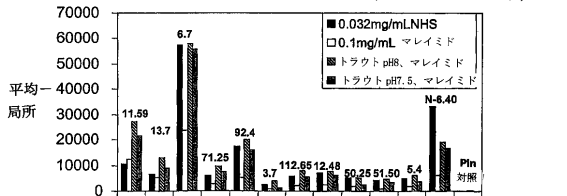
【 図 4 】



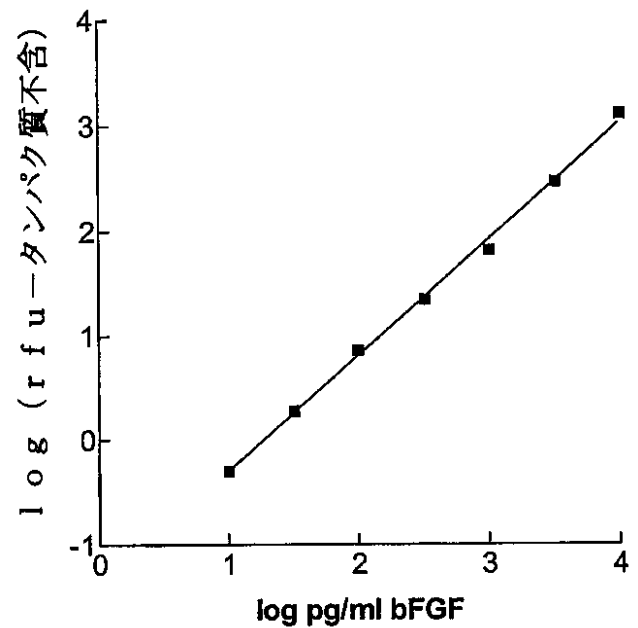
【 図 5 】

タンパク質分析物:

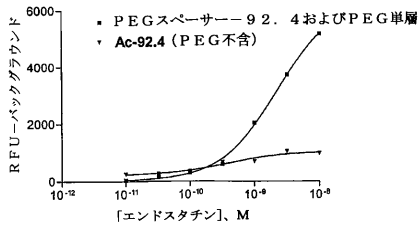
10 nM bFGF、50 nM エンドスタチン、50 nM アンジオゲニン



【 図 6 】

bFGF アプタマー +  
ニトロシル化チロシン検出

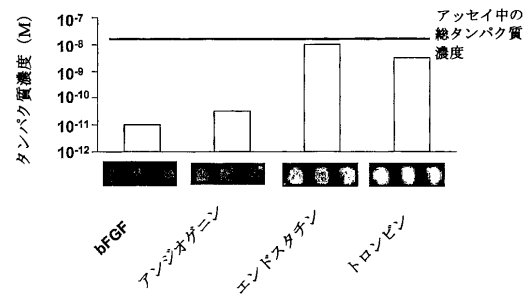
【図 7】



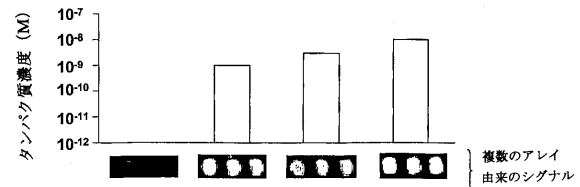
【図 8】

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 $\alpha$ -2-抗プラスミン bp
N-5.77 トロンピン	N-42.1 IL-7 f	N-8.31 PDGF	N-4.87 PDGF
N-40.2 IL-4	N-14.14 pセレクトリン	N-13.78 bNGF	N-11.27 アンジオゲニン
N-5.4 トロンピン	N-7.3 gp120MN	N-3.7 gp120MN	N-50.25 プラスミン
N-71.25 反応性タンパク質	N-5.51 トロンピン	N-41.49 IL-4 bc	N-14.24 pセレクトリン
N-15.83 TGF- $\beta$	N-8.37 PDGF	N-7.11 gp120MN	N-112.65 IGFBP-3
N-7.2 gp120MN	N-11.58 アンジオゲニン	N-41.5 IL-4 bc	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-11.11 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- $\beta$	N-14.95 pセレクトリン
N-6.7 bFGF	N-38.38 IL-2 bp	N-15.74 TGF- $\beta$	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 pセレクトリン	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 $\alpha$ -2-抗プラスミン bp	N-14.21 pセレクトリン
N-6.4 bFGF	N-7.4 gp120MN	N-13.17 bNGF	N-104.49 エボ
N-4.24 PDGF	N-51.5 血清アミロイドタンパク質	N-5.77 トロンピン	OH 6.7
抗体	30N12	N-N6.40	抗体

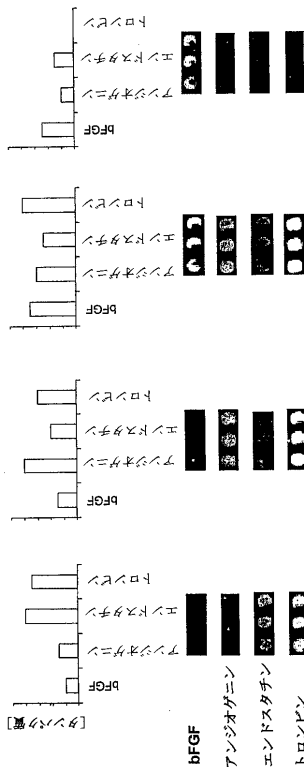
【図 9】



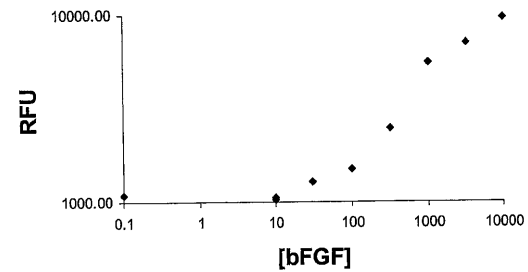
【図 10】



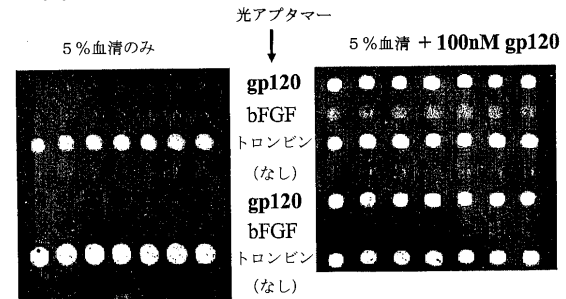
【図 11】



【図 12】



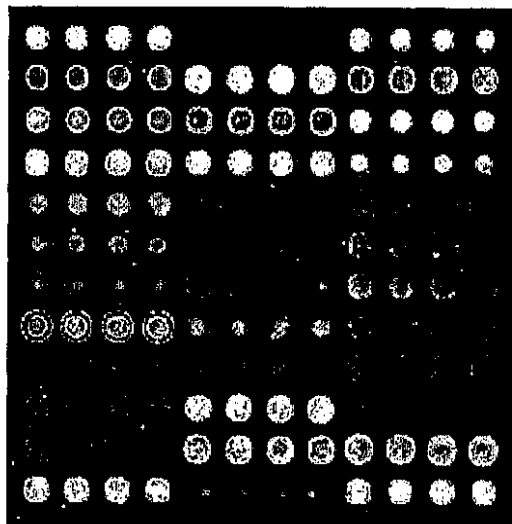
【図 13】



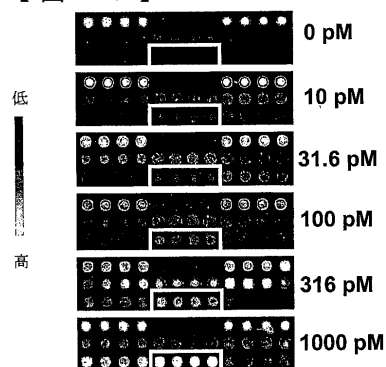
【 図 1 4 】

Cy3-オリゴコーナーマーカ	無作為 DNA (30N12)	Cy3-オリゴコーナーマーカ
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 トロンピン	N-5.77 トロンピン
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	緩衝液スポット	Cy3-オリゴコーナーマーカ

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 A 】

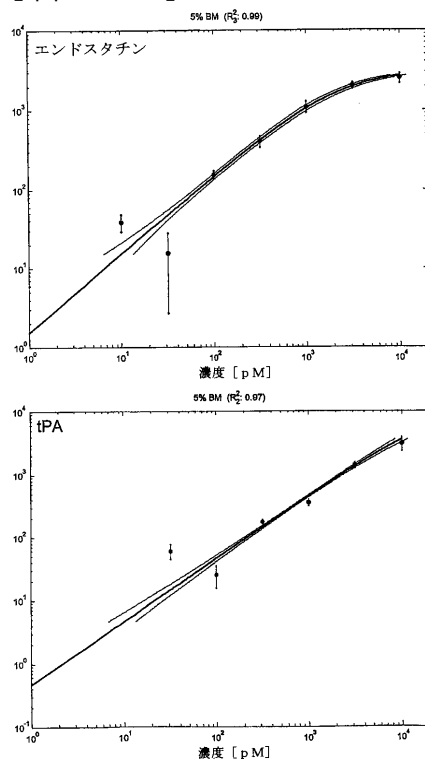


図 1 7 A

【 図 1 7 B 】

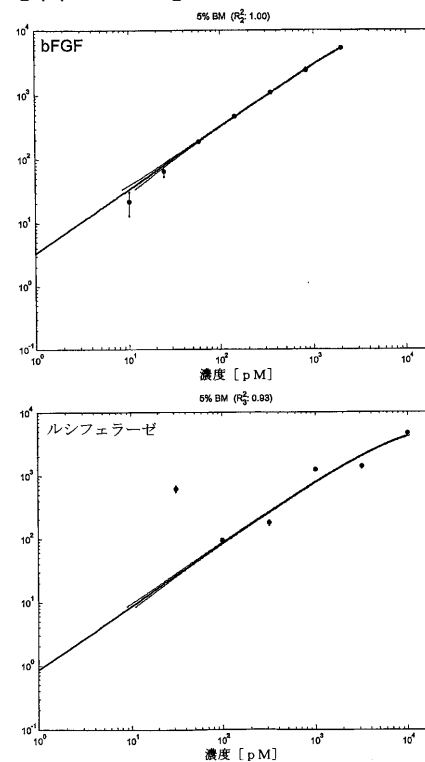


図 1 7 B

【図 17 C】

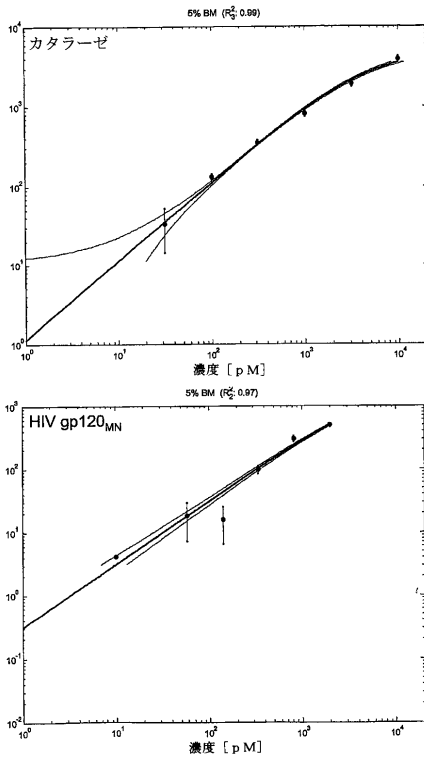


図 17 C

【図 17 D】

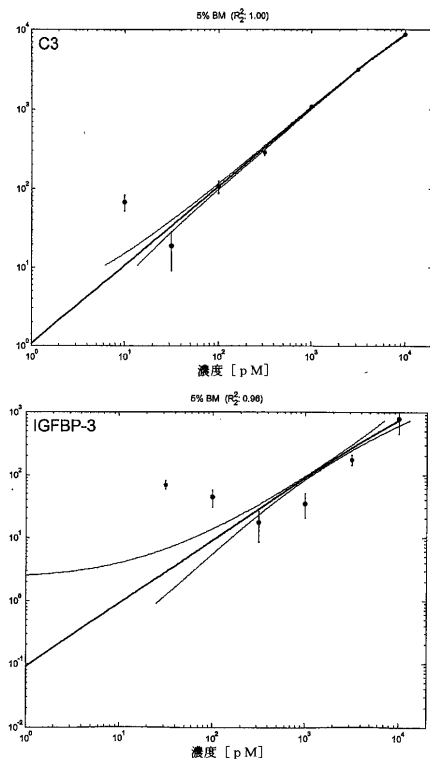


図 17 D

【図 17 E】

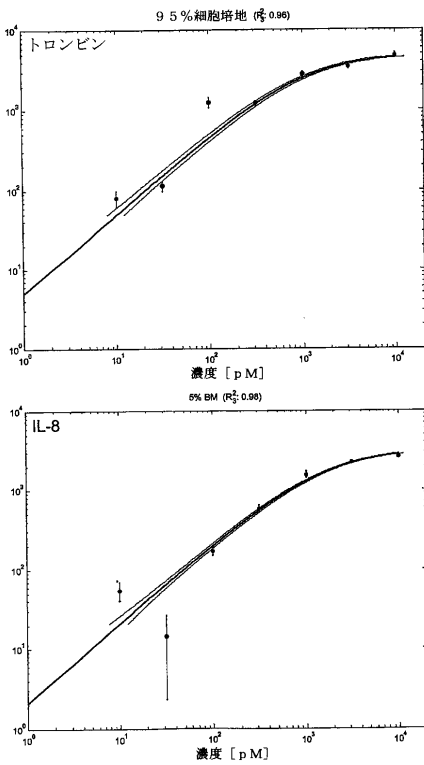


図 17 E

【図 17 F】

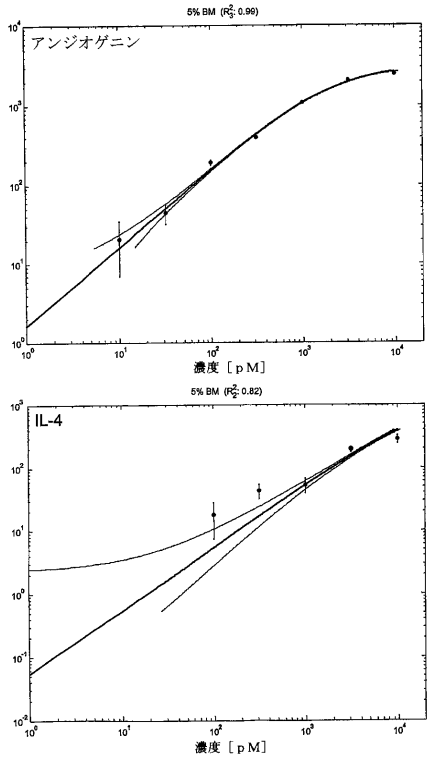


図 17 F

【図 17 G】

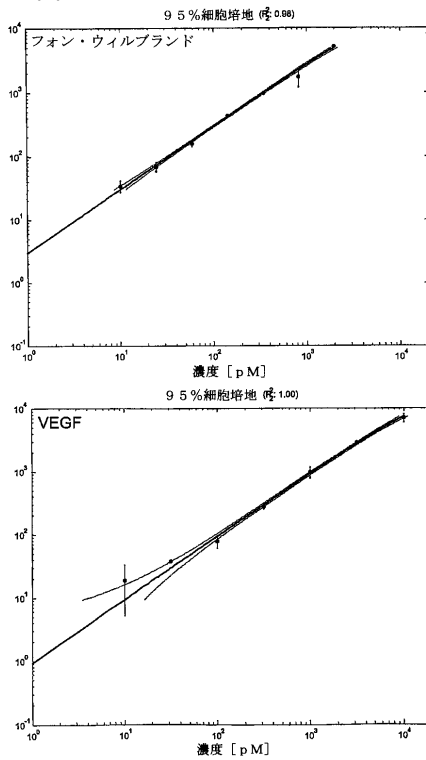
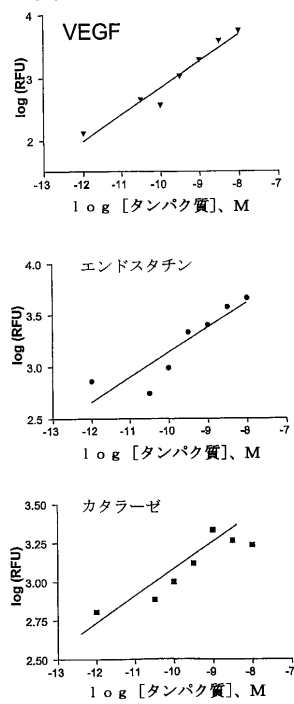


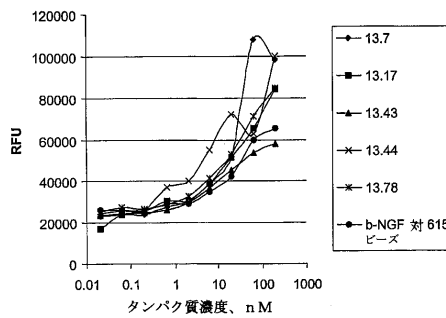
図 17 G

【図 18】

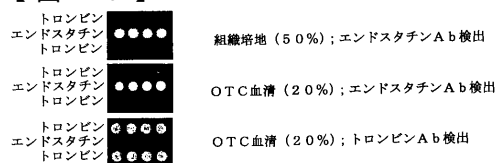


【図 19】

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												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> 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>B. FIELDS SEARCHED</b> 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														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,567,588 A (GOLD et al) 22 October 1996 (22.10.1996), see whole document.</td> <td>1-44</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td></td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>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 "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search 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 D. Roberts for</i> Jeffrey D. Roberts 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, caplus, 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. <sup>7</sup>	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,M X,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 8 0 3 0 2, ボールダー, フィフス・ストリート 1 0 3 3

(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 8 0 3 0 4, ボールダー, カルミア・アベニュー 2 2 0 0

(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 8 0 3 0 4, ボールダー, フィフティーンズ・ストリート 3 0 1 0

(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 8 0 0 0 5, アルバダ, ウェスト・エイティフォース・プレイス 1 9 0 2

(72)発明者 グリーフ, チャド

アメリカ合衆国コロラド州 8 0 0 2 7, ルイスヴィル, サウス・レインツリー・レイン 1 6 1

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	<a href="#">JP2005517456A</a>	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	ゴールドラリー ズィッチドミニクエイ スミスジョナサン・ドゥルー シュナイダー・ダニエル・ジェイ グリーン・チャド		
发明人	ゴールド, ラリー ズィッチ, ドミニク・エイ スミス, ジョナサン・ドゥルー シュナイダー, ダニエル・ジェイ グリーン, 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	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 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. <sup>7</sup>	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 A	2 G 0 5 4
C 1 2 Q 1/25	C 1 2 Q 1/25	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/28	C 1 2 Q 1/28	4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/42	C 1 2 Q 1/42	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 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		

(21) 出願番号	特願2003-569875 (P2003-569875)	(71) 出願人	501192222
(86) (22) 出願日	平成15年2月10日 (2003. 2. 10)		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) 国際出願番号	PCT/US2003/004142		アメリカ合衆国コロラド州80301
(87) 国際公開番号	W02003/070984		ールダー、サーティエイス・ストリー
(87) 国際公開日	平成15年8月28日 (2003. 8. 28)		1 7 7 5
(31) 優先権主張番号	60/357, 297		1 7 7 5 3 8 t h S t r e e t ,
(32) 優先日	平成14年2月15日 (2002. 2. 15)		ulder, Colorado 80301, 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	100089705
(32) 優先日	平成14年4月1日 (2002. 4. 1)		弁理士 社本 一夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100076691
(31) 優先権主張番号	60/388, 666		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)		