

(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2016-539639

(P2016-539639A)

(43) 公表日 平成28年12月22日(2016.12.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 4 O B 40/06 (2006.01)	C 4 O B 40/06	
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	H

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 102 頁)

(21) 出願番号	特願2016-531034 (P2016-531034)	(71) 出願人	591100596
(86) (22) 出願日	平成26年11月13日 (2014.11.13)		アンスティチュ ナショナル ドウ ラ
(85) 翻訳文提出日	平成28年7月12日 (2016.7.12)		サンテ エ ドウ ラ ルシエルシュ メ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/074548		ディカル
(87) 国際公開番号	W02015/071385		フランス国、エフー75013 パリ、リ
(87) 国際公開日	平成27年5月21日 (2015.5.21)		ユ・ドウ・トルビアック 101
(31) 優先権主張番号	13306546.6	(71) 出願人	514058706
(32) 優先日	平成25年11月13日 (2013.11.13)		ユニヴェルシテ・ドウ・ボルドー
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		フランス・F-33000・ボルドー・ブ
			ラス・ペイ・ベルラン・35

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キッシング複合体を形成することができる核酸を含むキットオブパーツ及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも1つの核酸分子NA1と少なくとも1つの核酸分子NA2を含むキットオブパーツであって、核酸分子NA1及びNA2がキッシング複合体の形成を介して二本鎖を形成することができるキットオブパーツに関する。本発明はまた、溶液中の関心対象のターゲット分子を検出するためだけでなく、関心対象のアプタマーを選択するための、そのようなキットオブパーツの使用も記載する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの核酸分子 NA 1 と少なくとも 1 つの核酸分子 NA 2 を含むキットオブパーツであって：

- a) 第一の核酸分子 NA 1 が、NS 1 - NSK 1 - NS 2 のヌクレオチド酸配列を含み、ここで
- NS 1 及び NS 2 が、少なくとも 1 ヌクレオチド長を有するポリヌクレオチドからなり、そして NS 1 及び NS 2 が相補的配列を有し；
 - NSK 1 が、少なくとも 2 個のヌクレオチドのヌクレオチド酸配列を有し、
- b) 第二の核酸分子 NA 2 が、NS 3 - NSK 2 - NS 4 のヌクレオチド配列を含み、ここで：
- NS 3 及び NS 4 が、少なくとも 1 ヌクレオチド長を有するポリヌクレオチドからなり、そして NS 3 及び NS 4 が相補的配列を有し；
 - NSK 2 が、少なくとも 2 個のヌクレオチドのヌクレオチド酸配列を有し
- c) 核酸分子 NA 1 及び NA 2 が共に、適切な条件で、配列 NSK 1 及び NSK 2 をそれぞれ含む少なくとも 1 つのヘアピンループを形成することができ；そして
- d) 核酸分子 NA 1 及び NA 2 が、配列 NSK 1 及び NSK 2 をそれぞれ含むヘアピンループ間のキッキング複合体の形成によって二本鎖を形成することができ；そして
- e) 少なくとも 1 つの核酸分子 NA 1 又は NA 2 がターゲット分子に対して特異性及び親和性を示すアダプターである、キットオブパーツ。

10

20

【請求項 2】

ヘアピン構造中に折り畳まれた第一の核酸分子 NA 1 を含み、ここで、NSK 1 が、ヘアピン構造中に折り畳まれた第二の核酸分子 NA 2 のループ中に存在する第二の核酸配列 NSK 2 と相互作用することができる配列ループによって表される、請求項 1 に記載のキットオブパーツ。

【請求項 3】

NKS 1 が、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 又は 15 個のヌクレオチドのヌクレオチド酸配列を有する、請求項 1 に記載のキットオブパーツ。

【請求項 4】

NKS 2 が、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 又は 15 個のヌクレオチドのヌクレオチド酸配列を有する、請求項 1 に記載のキットオブパーツ。

30

【請求項 5】

第一の核酸分子 NA 1 (ここで、NSK 1 は、YRYR、RYRY、YYRY、RYRR、YYYR、YRYY、RYYR、YRRY、YRRR、RYYY、RRYR、RRYY、RRRR、RRRY、YYYY、Y Y R R からなる群より選択される配列を有する)、及び第二の核酸分子 NA 2 (ここで、NKS 2 は、NKS 1 とキッキング複合体を形成することができる)を含む、請求項 1 に記載のキットオブパーツ。

【請求項 6】

第一の核酸分子 NA 1 (ここで、NSK 1 は、 K_n によって表される)及び第二の核酸分子 NA 2 (ここで、NKS 2 は、 K_n' によって表される)を含み、ここで、 K_n 及び K_n' が表 B に記述されるように選択され、そして K_n 及び K_n' が同一であるか又は異なる、請求項 1 に記載のキットオブパーツ。

40

【請求項 7】

第一の核酸分子 NA 1 (ここで、NSK 1 は、 K_n によって表される)及び第二の核酸分子 NA 2 (ここで、NKS 2 は、 K_n' によって表される)を含み、ここで、 K_n 及び K_n' が表 C 1 に記述されるように選択され、そして K_n 及び K_n' が同一であるか又は異なる、請求項 1 に記載のキットオブパーツ。

【請求項 8】

50

第一の核酸分子NA1（ここで、NSK1は、CCNYからなる核酸配列を含む）及び第二の核酸分子NA2（ここで、NKS2は、RNGGからなる核酸配列を含む）を含む、請求項1に記載のキットオブパーツ。

【請求項9】

第一の核酸分子NA1（ここで、NSK1は、NCCNYNからなる核酸配列を含む）及び第二の核酸分子NA2（ここで、NKS2は、NRNGGNからなる核酸配列を含む）を含む、請求項1に記載のキットオブパーツ。

【請求項10】

第一の核酸分子NA1（ここで、NSK1は、NCCNYNからなる核酸配列を含む）及び第二の核酸分子NA2（ここで、NKS2は、NRNGGNからなる核酸配列を含む）を含み、ここで配列NCCNYN及び配列NRNGGNが、それぞれ、表C2に記述されるように選択される、請求項1に記載のキットオブパーツ。

10

【請求項11】

NS1、NS2、NS3又はNS4が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個のヌクレオチドを含む、請求項1～10のいずれか一項に記載のキットオブパーツ。

【請求項12】

NS1がUGCUCGによって表され、そしてNS2がCGAGCAによって表される、請求項1～10のいずれか一項に記載のキットオブパーツ。

【請求項13】

NS3がACGAGCによって表され、そしてNS4がGUCUGUによって表される、請求項1～10のいずれか一項に記載のキットオブパーツ。

20

【請求項14】

ACGAGCUGGGGCGCUCGU（KG51）によって示される核酸配列を含む第一の核酸分子及びUGCUCGGCCCCCGCGAGCA（KC24-Aptakiss）によって示される核酸配列を含む第二の核酸分子を含む、請求項1に記載のキットオブパーツ。

【請求項15】

TGGGGGACUGGGGCGGGAGGAAによって示される核酸配列を含む第一の核酸分子及びUGCUCGGCCCCCGCGAGCA（KC24-Aptakiss）によって示される核酸配列を含む第二の核酸分子を含む、請求項1に記載のキットオブパーツ。

30

【請求項16】

TTGGGGGACUGGGGCGGGAGGAAAによって示される核酸配列からなる第一の核酸分子及びUGCUCGGCCCCCGCGAGCA（KC24-Aptakiss）によって示される核酸配列からなる第二の核酸分子を含む、請求項1に記載のキットオブパーツ。

【請求項17】

GTTGGGGGACUGGGGCGGGAGGAAACによって示される核酸配列からなる第一の核酸分子及びUGCUCGGCCCCCGCGAGCA（KC24-Aptakiss）によって示される核酸配列からなる第二の核酸分子を含む、請求項1に記載のキットオブパーツ。

40

【請求項18】

UCCGAAGUGGUUGGGGCGUGUGGAAACGGGAによって示される核酸配列からなる第一の核酸分子及びUGCUCGGCCCCCGCGAGCA（KC24-Aptakiss）によって示される核酸配列からなる第二の核酸分子を含む、請求項1に記載のキットオブパーツ。

【請求項19】

アダマーが、有機小分子、特に少なくとも1つの芳香族環基を含有する有機小分子に特異的である、請求項1～18のいずれか一項に記載のキットオブパーツ。

【請求項20】

ターゲット分子に特異的なアダマーである核酸分子が、それがターゲット分子に結合

50

する場合にのみ、キットオブパーツの他の核酸分子との複合体を形成することができる、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載のキットオブパーツ。

【請求項 21】

アダプターが、ターゲット分子に対して産生された以前から公知のアダプターから誘導される、請求項 18 又は 19 に記載のキットオブパーツ。

【請求項 22】

少なくとも 1 つの核酸分子 NA 1 又は NA 2 が標識され、ここで、標識が、視覚的、光学的、フォトニック、電子的、音響的、光音響的、質量により、電気化学的、電気光学的、分光法、酵素的、又はそうでなければ化学的、生化学的若しくは物理的に検出可能である標識からなる群より選択される、請求項 1 に記載のキットオブパーツ。

10

【請求項 23】

マイクロアレイを形成するために固体支持体中に固定化された少なくとも 1 つの核酸分子 NA 1 又は NA 2 を含む、請求項 1 に記載のキットオブパーツ。

【請求項 24】

少なくとも 1 つの可変領域によってフランキングされたキッシング複合体を形成することができる配列 NA 1 又は NA 2 を含む内部領域を有する核酸分子からなるコンビナトリアルランダムライブラリー。

【請求項 25】

一般式：

- 5' - P1 - V - NSKn - P2 - 3' 又は 5' - P1 - NSKn - V - P2 - 3' (式中、P1 及び P2 は、プライマー領域を表し、V は、少なくとも 2 つのヌクレオチドの可変領域を表し、NSKn は、核酸配列 NSK1 又は NSK2 を表す)、又は

20

- 5' - P1 - V1 - NSKn - V2 - P2 - 3' (式中、P1 及び P2 は、プライマー領域を表し、V1 及び V2 は、少なくとも 2 つのヌクレオチドの可変領域を表し、NSKn は、核酸配列 NSK1 又は NSK2 を表す)、又は

- 5' - P1 - Xn - V1 - NSKn - V2 - Yn - P2 (式中、P1 及び P2 は、プライマー領域を表し、V1 及び V2 は、少なくとも 2 つのヌクレオチドの可変領域を表し、Xn 及び Yn は、1、2、3 個またはそれ以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列を表し、かつ Xn 及び Yn はハイブリダイズすることができ、そして NSKn は、核酸配列 NSK1 又は NSK2 を表す)；

30

を有する複数の核酸分子を含む、請求項 24 に記載のコンビナトリアルランダムライブラリーであって、

NSKn が、少なくとも 2 個のヌクレオチドのヌクレオチド酸配列を有し、

核酸分子が、適切な条件下で、NSKn 配列を含む少なくとも 1 つのヘアピンループを形成することができ、かつキッシング複合体を形成することができ；そして

NSKn 配列が別のヘアピンループとキッシング複合体を形成することができる、コンビナトリアルランダムライブラリー。

【請求項 26】

可変領域が、2；3；4；5；6；7；8；9；10；11；12；13；14；15；16；17；18；19；20；21；22；23；24；25；26；27；28；29；30 個またはそれ以上のヌクレオチドを含む、請求項 24 又は 25 に記載のコンビナトリアルランダムライブラリー。

40

【請求項 27】

可変領域が同じ長さを有するか又は有さない、請求項 24 ~ 26 のいずれか一項に記載のコンビナトリアルランダムライブラリー。

【請求項 28】

NSKn が、YRYR、RYRY、YYRY、RYRR、YYYR、YRYY、RYYR、YRRY、YRRR、RYYY、RRYR、RRYY、RRRR、RRRY、YYYY、YYRR からなる群より選択される配列を有する、請求項 24 ~ 27 のいずれか一項に記載のコンビナトリアルランダムライブラリー。

50

【請求項 29】

NSK1又はNSK2が、表B又は表C1に記述されるように選択されるKn又はKn'によって表される、請求項24～28のいずれか一項に記載のコンビナトリアルランダムライブラリー。

【請求項 30】

NSK1がCCNYからなる核酸配列を含むか、又はNKS2がRNGGからなる核酸配列を含む、請求項24～29のいずれか一項に記載のコンビナトリアルランダムライブラリー。

【請求項 31】

NSK1がNCCNYNからなる核酸配列を含むか、又はNKS2がNRNGGNからなる核酸配列を含む、請求項24～30のいずれか一項に記載のコンビナトリアルランダムライブラリー。

10

【請求項 32】

NSK1がNCCNYNからなる核酸配列を含むか、又はNKS2がNRNGGNからなる核酸配列を含み、ここで、配列NCCNYN及び配列NRNGGNが、それぞれ、表C2に記述されるように選択される、請求項24～31のいずれか一項に記載のコンビナトリアルランダムライブラリー。

【請求項 33】

可変領域V1及びV2が、5；6；7；8；9；10；11；12；13；14；15；16；17；18；19；20；21；22；23；24；25；26；27；28；29；又は30個のヌクレオチドを含む、請求項24～32のいずれか一項に記載のコンビナトリアルランダムライブラリー。

20

【請求項 34】

Xnが、1；2；3；4；5；6；7；8；9；10；11；12；13；14；15；16；17；18；19；20；21；22；23；24；25；26；27；28；29；又は30個のヌクレオチドのヌクレオチド配列を表す、請求項24～33のいずれか一項に記載のコンビナトリアルランダムライブラリー。

【請求項 35】

Ynが、1；2；3；4；5；6；7；8；9；10；11；12；13；14；15；16；17；18；19；20；21；22；23；24；25；26；27；28；29；又は30個のヌクレオチドのヌクレオチド配列を表す、請求項24～34のいずれか一項に記載のコンビナトリアルランダムライブラリー。

30

【請求項 36】

以下の工程：

i) ターゲット分子を請求項24～35のいずれか一項に記載のコンビナトリアルランダムライブラリーと接触させる工程；

ii) 工程i)の混合物を、対応する配列NSK1又はNSK2配列を含む核酸と接触させる工程；

iii) ターゲット分子に親和性を有する核酸をライブラリーの残りから分割する工程であって、配列NSK1及びNSK2をそれぞれ含む2つの核酸間で形成された二本鎖の形成の検出がターゲット分子に親和性を有する核酸の存在を示す工程を含む、ターゲット分子に指向するアプタマーを同定するための方法。

40

【請求項 37】

ターゲット分子が固体支持体上に固定化されず、流体サンプル中に可溶化される、請求項36に記載の方法。

【請求項 38】

ターゲット分子に親和性を有する核酸の候補濃縮混合物を生成するための親和性を有する核酸を増幅する工程、場合により、ターゲット分子に最も強い親和性を有するアプタマーを選択するための工程i)～iii)を何回も繰り返す工程並びに最も強い親和性を有するアプタマーを配列決定及び生成する工程をさらに含む、請求項36又は37に記載の

50

方法。

【請求項 39】

対応する核酸分子が固体支持体上に固定化される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

ターゲット分子ではなく固定化されたヘアピンとキッキング複合体を形成し得る非特異的候補を取り除くための、ターゲット分子の非存在下での、固定化されたヘアピン及び支持体に対するライブラリーの対抗選択からなる工程をさらに含む、請求項 36 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

陽性候補を溶離する工程をさらに含む、請求項 36 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法

10

【請求項 42】

ライブラリー及びターゲット分子を、一緒に、ターゲット分子とライブラリーのメンバーとの相互作用を可能にするのに十分な時間、とりわけライブラリーのメンバーのターゲット分子との立体構造再配列を可能にするであろう十分な時間インキュベートする、請求項 36 ~ 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

ターゲット分子が有機小分子である、請求項 36 ~ 42 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

ターゲット分子が少なくとも 1 つの芳香族環基を含有する有機小分子である、請求項 43 に記載の方法。

20

【請求項 45】

サンプル中の少なくとも 1 つのターゲット分子を検出するための方法であって、i) ターゲット分子に特異的であるアプタマーである核酸分子 NA 1 又は NA 2 を含む請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載のキットパーツを提供する工程（ここで、前記アプタマーは、それがターゲット分子に結合する場合にのみ、キットパーツの他の核酸分子との複合体を形成することができる）；ii) サンプルをキットパーツの核酸分子と接触させる工程、及びiii) 2 つの核酸 NA 1 と NA 2 との間に形成される二本鎖の形成を検出する工程からなる工程を含む方法。

【請求項 46】

工程 i) が、ターゲット分子に特異的なアプタマーを各々含む複数のキットパーツを提供し、それによってサンプル中の複数のターゲット分子の存在又は非存在を検出する工程を含む、請求項 28 に記載の方法。

30

【請求項 47】

ターゲット分子が有機小分子である、請求項 28 又は 29 に記載の方法。

【請求項 48】

サンプルが、個体から単離された生物学的物質、例えば、生物学的組織及び流体（血液、皮膚、血漿、血清、リンパ液、尿、脳脊髄液、涙液、スミア、水のサンプル、特に飲料水、地下水、表流水又は廃水サンプル、環境由来物質から調製されたサンプル、臨床検体又は食品サンプルを含む）からなる群より選択される、請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 49】

サンプルがかなりの量のマグネシウムを含む、請求項 28 ~ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

検出が、液相中、多数の標準的な技術（限定されないが、クロマトグラフィー、電気泳動又は濾過を含む）のいずれかによって実行される、請求項 28 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

ターゲット分子に特異的なアプタマーではない核酸分子が上述した固体支持体上に固定

50

化され、そして、アプタマーではない核酸分子がターゲット分子に特異的なアプタマーである核酸分子に結合することができるバイオセンサー素子として使用される、請求項 28 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

以下の工程：

i) ターゲット分子を、請求項 24 ~ 27 のいずれか一項に記載のコンビナトリアルランダムライブラリーと接触させる工程

ii) 工程 i) の混合物を、対応する配列 NSK1 又は NSK2 配列を含む核酸と接触させる工程

iii) ターゲット分子に親和性を有する核酸をライブラリーの残りから分割する工程であって、配列 NSK1 及び NSK2 をそれぞれ含む 2 つの核酸間で形成された二本鎖の形成の検出がターゲット分子に親和性を有する核酸の存在を示す工程

を含む、ターゲット分子に指向するアプタマーを同定するための方法。

【請求項 53】

ターゲット分子に親和性を有する核酸の候補濃縮混合物を生成するための親和性を有する核酸を増幅する工程、場合により、ターゲット分子に最も強い親和性を有するアプタマーを選択するための工程 i) ~ iii) を何回も繰り返す工程並びに最も強い親和性を有するアプタマーを配列決定及び生成する工程をさらに含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 54】

対応する核酸分子が上述した固体支持体上に固定化される、請求項 35 又は 36 に記載の方法。

【請求項 55】

非特異的候補及びターゲット分子ではなく固定化されたヘアピンとキッシング複合体を形成し得る候補を取り除くための、ターゲット分子の非存在下での、固定化されたヘアピン及び支持体に対するライブラリーの対抗選択からなる工程をさらに含む、請求項 35 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 56】

陽性候補を溶離する工程をさらに含む、請求項 35 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

ACGAGCUGGGGCGCUCGU、UGCUCGGCCCCGCGAGCA、TGGGGGACUGGGGCGGGAGGAA、TTGGGGGACUGGGGCGGGAGGAAAC、UCCGAAAGUGGUUGGGCUGGGGCGUGUGAAAACGGA、UGCUCGGCCGCGCGAGCA 及び TGGGGGACUGCGGGCGGGAGGAA からなる群より選択される配列を含むか又は前記配列からなる、核酸分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、キッシング複合体を形成することができる核酸を含むキットパーツ及びその使用に関する。

【0002】

発明の背景

アプタマーは、他の分子に結合するそれらの能力に基づいてランダムプールから選択された DNA 又は RNA オリゴマーである (Ellington et al (1990) Nature 346 (6287): 818, Robertson and Joyce (1990) Nature 344 (6265): 467, Tuerk and Gold (1990) Science 249 (4968): 505)。現在までに、多くの異なる種類のターゲット：低分子有機化合物、タンパク質、核酸及び複合スキャフォールド（生細胞など）に対して、アプタマーが選択されている (Dausse et al. (2009) Curr. Opin. Pharmacol 9(5): 602, Hall et

10

20

30

40

50

al. (2009) Curr. Protoc. Mol. Biol. Chapter 24, Unit 24 (3))。これらの分子は、結合特性、認識の特異性、並びに医学及び科学技術における潜在的使用に関して抗体に匹敵する。アプタマーは、一般に、試験管内選択法 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) (S E L E X) (Gold et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1): 89) によって得られるが、増幅工程を伴わない選択 (非 S E L E X) も記載されている (Berezovski M et al. (2006) J Am Chem Soc. 2006 Feb 8;128(5):1410-1, Javaherian et al. (2009) Nucleic Acids Res 37 (8): e62)。

【0003】

R N Aヘアピンに対する R N A候補の選択は、そのループがターゲットヘアピンのループと相補的である (したがって、ループ-ループ相互作用を生じる)ヘアピンアプタマーを導く。そのようないわゆるキッキング複合体の安定性は、ループ-ループヘリックスのワトソクリック塩基対に由来するが、ループ-ループモジュールと各ヘアピンパートナーの二本鎖ステムの間の接合部におけるスタッキング相互作用にも由来する。実際に、6塩基対ループ-ループヘリックスを生じる、ヒト免疫不全ウイルスのトランス活性化応答 (Trans-Activating Responsive) (T A R) R N A不完全ステムループエレメントのヘアピンアプタマーへの結合は、同じ6塩基対二本鎖を生じる、T A Rとアンチセンスオリゴマー間の複合体の融解温度よりも20 高い融解温度によって特徴付けられた。しかしながら、その複合体の融解温度よりも20 高い融解温度について折り畳み構造と直線構造とを区別するヘアピンの潜在性はまだ活用されていない。

【0004】

発明の概要

本発明は、少なくとも1つの核酸分子 N A 1 と少なくとも1つの核酸分子 N A 2 を含むキットオブパーツであって、核酸分子 N A 1 及び N A 2 がキッキング複合体の形成を介して二本鎖を形成することができるキットオブパーツに関する。本発明はまた、溶液中の関心対象のターゲット分子を検出するためだけでなく、関心対象のアプタマーを選択するための、そのようなキットオブパーツの使用も記載する。

【0005】

発明の詳細な説明

キットオブパーツ：

本発明は、少なくとも1つの核酸分子 N A 1 と少なくとも1つの核酸分子 N A 2 を含むキットオブパーツであって：

a) 第一の核酸分子 N A 1 が、N S 1 - N S K 1 - N S 2 のヌクレオチド酸配列を含み、ここで

- N S 1 及び N S 2 が、少なくとも1ヌクレオチド長を有するポリヌクレオチドからなり、そして N S 1 及び N S 2 が相補的配列を有し；

- N S K 1 が、少なくとも2個のヌクレオチドのヌクレオチド酸配列を有し、

b) 第二の核酸分子 N A 2 が、N S 3 - N S K 2 - N S 4 のヌクレオチド配列を含み、ここで：

- N S 3 及び N S 4 が、少なくとも1ヌクレオチド長を有するポリヌクレオチドからなり、そして N S 3 及び N S 4 が相補的配列を有し；

- N S K 2 が、少なくとも2個のヌクレオチドのヌクレオチド酸配列を有し、

c) 核酸分子 (N A 1 及び N A 2) が共に、適切な条件で、配列 N S K 1 及び N S K 2 をそれぞれ含む少なくとも1つのヘアピルループを形成することができ、そして

d) 核酸分子 N A 1 及び N A 2 が、配列 N S K 1 及び N S K 2 をそれぞれ含むヘアピルループ間のキッキング複合体の形成によって二本鎖を形成することができる、キットオブパーツに関する。

【0006】

本明細書において使用される場合、用語「ヌクレオチド」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、限定されないが、天然ヌクレオチド、合成ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体を含む。ヌクレオシドリルン酸は、ヌクレオシドーリン酸、ヌクレオシドニリ

ン酸又はヌクレオチド三リン酸であり得る。ヌクレオシドリリン酸中の糖部分は、リボースなどの五炭糖であり得、そしてリン酸エステル化部位は、ヌクレオシドの五炭糖の C - 5 位に連結されたヒドロキシル基に対応し得る。ヌクレオチドは、限定されないが、デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (d N T P) 又はリボヌクレオチド三リン酸 (N T P) であり得る。ヌクレオチドは、表 A に記載されるように、アルファベット文字 (文字表記) を使用して表され得る。例えば、A はアデノシン (すなわち、ヌクレオ塩基アデニンを含有するヌクレオチド) を表し、C はシトシンを表し、G はグアノシンを表し、そして T はチミジンを表す。W は A 又は T / U のいずれかを表し、そして S は G 又は C のいずれかを表す。N は、ランダムヌクレオチドを表す (すなわち、N は、A、C、G 又は T / U のいずれかであり得る)。本明細書において使用される場合、用語「ヌクレオチド類似体」は、天然に存在するヌクレオチドに構造的に類似する修飾化合物を指す。ヌクレオチド類似体は、変化したホスホロチオアート骨格、糖部分、ヌクレオ塩基又はそれらの組み合わせを有し得る。一般に、変化したヌクレオ塩基を有するヌクレオチド類似体は、とりわけ、異なる塩基対合及び塩基スタッキング特性を付与する。変化したリン酸 - 糖骨格 (例えば、P N A、L N A など) を有するヌクレオチド類似体は、しばしば、とりわけ、二次構造形成などの鎖の特性を改変する。本出願においては、時に、用語「ヌクレオチド類似体」、「ヌクレオチド類似体塩基」、「修飾ヌクレオチド塩基」又は「修飾塩基」は、互換的に使用され得る。

10

【 0 0 0 7 】

【 表 1 】

20

表 A : 種々のヌクレオチドの文字表記

記号文字	ヌクレオチド
G	グアノシン
A	アデノシン
T	チミジン
C	シトシン
U	ウラシル
R	G 又は A
Y	T, U, 又は C
N	G, A, T, U 又は C
W	A, T/U
S	G/C

30

40

【 0 0 0 8 】

本明細書において使用される場合、用語「ヘアピンループ」は、リボ核酸 (R N A) 二次構造の 1 つの特徴を指すことを意味する。ヘアピンループは、R N A がそれ自体でフォールドバックする場合に生じる。二本鎖システムに沿った塩基対合は、完全に相補的であるか又はミスマッチを含有するかのいずれかであり得る。

【 0 0 0 9 】

本明細書において使用される場合、用語「キッシング複合体」は、R N A 三次接触の基本形式である、2 つのヘアピンの頂点ループ中の相補的配列間の塩基対合を指すことを意

50

味する (Lee et al., Structure 6:993-1005.1998)。この複合体は、ヘアピンループの対合を容易にし、2つの核酸分子が二本鎖を形成することを可能にする。分子動力学、液晶NMR分光学及びX線結晶学は、キッシング複合体の三次元構造が、i) 分子間ループ-ループヘリックスを介した1つのステムから他のステムへの擬似連続スタッキング、ii) 安定性に不可欠であると示されたマグネシウムイオンに対する結合部位を構成する可能性が高い、ループ-ループヘリックスの主溝をフランキングする2つのリン酸クラスター、iii) スタッキング相互作用及び骨格間H結合ネットワークなどの非正規相互作用によって特徴付けられることを示した。本発明によれば、キッシング複合体は、配列NSK1及びNSK2をそれぞれ含むヘアピンループの対の間で形成される。

【0010】

本明細書において使用される場合、表現「適切な条件」は、上に定義したようなキッシング複合体の形成を促す任意の条件を指す。特に、適切な条件は、核酸NA1及びNA2が正確に折り畳まれる(すなわち、配列NSK1及びNSK2をそれぞれ含む配列を含むヘアピンループが正確に形成される)条件を指す。

【0011】

いくつかの実施態様において、本発明に係るキットオブパーツは、ヘアピン構造中に折り畳まれた第一の核酸分子NA1を含み、ここで、NSK1は、ヘアピン構造中に折り畳まれた第二の核酸分子NA2のループ中に存在する第二の核酸配列NSK2と相互作用することができる配列ループによって表される。

【0012】

いくつかの実施態様において、NKS1は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個のヌクレオチドのヌクレオチド酸配列を有する。

【0013】

いくつかの実施態様において、NKS2は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個のヌクレオチドのヌクレオチド酸配列を有する。

【0014】

いくつかの実施態様において、本発明に係るキットオブパーツは、第一の核酸分子NA1(ここで、NSK1は、YRYR、RYRY、YYRY、RYRR、YYYR、YRY Y、RYYR、YRRY、YRRR、RYYY、RRYR、RRYY、RRRR、RRR Y、YYYY、YYRRからなる群より選択される配列を有する)、及び第二の核酸分子NA2(ここで、NKS2は、NKS1とキッシング複合体を形成することができる)を含む。

【0015】

いくつかの実施態様において、本発明に係るキットオブパーツは、第一の核酸分子NA1(ここで、NSK1は、 K_n によって表される)及び第二の核酸分子NA2(ここで、NKS2は、 K_n' によって表される)を含み、ここで、 K_n 及び K_n' は、表Bに記述されるように選択される(K_n 及び K_n' は、同一であるか又は異なる)。

【0016】

10

20

30

【表 2】

K_n is	K_n' は、以下からなる群より選択される
K1	K11, K14, K15, K1, K28, K34, K39, K51, K52, K53, K59, K61, K73, K75, 及び K85
K10	K13, K25, K29, K37, K4, K60bis, K61, K74, K86, 及び K94,
K11	K14, K17, K1, K30, K37, K44, K52, K61, K78, K82, K86, K87, 及び K98
K13	K10, K18, K24, K35, K36, K50, K73, K96, 及び K98
K15	K1, K76, 及び K89
K16	K24, K30, K36, K39, K52, K63, K90, 及び K98
K17	K11, K17, K20, K38, K39, K8, 及び K96
K18	K14, K16, K18, K24, K2, K34, K36, K41, K44, K50, K58, K5, K70, K97, 及び K98
K2	K14, K18, K24, K2, K36, K45, K52, K78, K87, 及び K98
K20	K16, K17, K5, K60bis, K61, K76, 及び K98
K21	K39, K44, K52, K58, K64, K82, 及び K8
K24	K14, K18, K24, K2, K41, K42, K50, K52, K5, K77, K78, K87, 及び K92bis
K25	K10, K34, K41, 及び K44
K27	K27, K2, K32, K5, K76, K80, K91, 及び K98
K28	K11, K14, K1, K28, K35, K61, 及び K89
K29	K10, K50, K59, 及び K77
K30	K11, K16, K1, K30, K52, K61, K74, 及び K89
K32	K14, K27, K39, K52, K53, K58, K74, K77, K89, K91, K92bis, 及び K9
K34	K18, K25, K55, K76, K86, 及び K89
K35	K13, K28, K42, K59, K5, K75, K88, 及び K95
K36	K13, K14, K16, K18, K2, K50, K5, K89, K98, 及び K9
K37	K10, K11, K34, K44, K52, K73, K74, 及び K9
K38	K17, K44, K4, K60bis, K64, K76, 及び K82
K39	K16, K17, K1, K32, K5, K61, 及び K80
K4	K10, K38, K76, 及び K85
K40	K45, K56, K64, K70, K76, K77, K79, 及び K94
K41	K18, K24, K25, K70, 及び K76
K42	K35, K73, K88, 及び K8
K44	K10, K11, K18, K24, K25, K2, K38, K5, 及び K76

10

20

30

40

K45	K2, K40, K53, K5, K6, K76, K77, 及び K85	
K5	K13, K24, K35, K39, K45, K4, K64, K73, K80, K82, K8, K90, 及び K99	
K50	K13, K18, K24, K29, K36, K52, K74, K82, 及び K98	
K51	K1, K55, 及び K80	
K52	K11, K16, K1, K21, K24, K25, K2, K30, K32, K37, K50, K60bis, K61, 及び K74	
K53	K10, K1, K45, K55, K56, K59, K79, K80, 及び K96	
K55	K34, K51, K53, K6, 及び K71	10
K56	K16, K53, K85, 及び K9	
K58	K18, K21, K32, K60bis, K76, K86, 及び K98	
K59	K1, K24, K29, K35, K53, K5, K76, 及び K85	
K6	K36, K45, K6, 及び K89	
K60bis	K20, K70, K74, K96, 及び K99	
K61	K11, K14, K1, K20, K28, K30, K52, K61, K89, 及び K8	
K63	K16, K5, K76, 及び K98	20
K64	K16, K38, K40, K5, K76, K94, 及び K95	
K70	K14, K18, K21, K2, K32, K34, K40, K41, K52, K71, K77, K92bis, 及び K95	
K71	K10, K55, K70, 及び K82	
K73	K13, K1, K28, K37, K42, K5, K76, K89, 及び K99	
K74	K10, K21, K30, K32, K50, K52, K60bis, 及び K74,	
K76	K15, K20, K27, K34, K38, K3, K40, K41, K44, K45, K58, K59, K63, K64, K73, K82, K89, K90, K96, K99, 及び K9	30
K77	K24, K29, K40, K45, K70, K77, K80, 及び K9	
K78	K11, K24, K2, K80, 及び K89	
K79	K40, K53, 及び K85	
K8	K17, K21, K42, 及び K61	
K80	K27, K38, K39, K41, K51, K53, K5, K77, K78, K85, K87, K91, K92bis, 及び K9	
K82	K11, K21, K38, K50, K5, K71, K76, K86, 及び K95	
K85	K2, K45, K4, K56, K59, K79, K80, 及び K97	40
K86	K11, K58, 及び K82	
K87	K11, K24, K2, K80, 及び K89	
K89	K15, K28, K32, K36, K61, K6, K73, K76, K78, K87, K90, K91, 及び K94	
K9	K18, K25, K32, K56, K76, K79, K80, K91, 及び K97	

K90	K16, K36, K5, K76, 及び K89
K91	K27, K32, K89, K91, 及び K98
K92bis	K24, K32, K70, 及び K80
K94	K40, K64, 及び K96
K95	K34, K35, K64, K70 及び K82
K96	K13, K17, K25, K37, K38, K53, K60bis, K61, K76, K86, 及び K94
K97	K38, K85, K97, 及び K9
K98	K11, K13, K14, K16, K18, K24, K27, K2, K36, K50, K5, K91, 及び K98
K99	K5, K60bis, K73, K76, 及び K98

10

表B : K_n と K_n' 間の可能なカップルの記載

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施態様において、本発明に係るキットオブパーツは、第一の核酸分子 N A 1 (ここで、N S K 1 は、 K_n によって表される) 及び第二の核酸分子 N A 2 (ここで、N K S 2 は、 K_n' によって表される) を含み、ここで、 K_n 及び K_n' は、表 C 1 に記述されるように選択される (K_n 及び K_n' は、同一であるか又は異なる)。

20

【 0 0 1 8 】

【表 3】

K_n is	K_n' is
K1	K39
K10	K13
K10	K4
K11	K44
K13	K10
K14	K14
K15	K76
K16	K30
K17	K8
K18	K18
K18	K24
K18	K98
K2	K36
K20	K17
K20	K24
K20	K76
K21	K58
K21	K8
K24	K78
K24	K87
K25	K41
K27	K76
K28	K52
K29	K59
K3	K32
K3	K76
K30	K30
K30	K70
K32	K58
K34	K18

10

20

30

40

K34	K25
K35	K13
K35	K28
K35	K42
K35	K5
K36	K2
K37	K97
K38	K41
K39	K1
K39	K70
K4	K10
K40	K44
K41	K25
K42	K52
K42	K8
K44	K11
K45	K2
K5	K64
K50	K58
K51	K70
K52	K21
K52	K28
K53	K1
K55	K44
K56	K41
K58	K21
K59	K24
K6	K45
K6	K4
K6	K97
K60bis	K82
K60bis	K8
K61	K8

10

20

30

40

K63	K76	
K64	K5	
K70	K70	
K71	K70	
K73	K24	
K74	K74	
K75	K70	10
K76	K27	
K76	K63	
K77	K44	
K77	K80	
K78	K24	
K79	K44	
K8	K21	20
K80	K99	
K82	K95	
K85	K59	
K86	K8	
K87	K24	
K88	K25	
K89	K99	30
K9	K76	
K90	K21	
K91	K17	
K92bis	K80	
K92bis	K92bis	
K94	K11	
K95	K82	40
K96	K60bis	
K97	K37	
K98	K18	
K98	K98	
K99	K5	

表C1 : K_n と K_n' 間の最良のカップルの記載

いくつかの実施態様において、本発明に係るキットオブパーツは、第一の核酸分子 N A 1 (ここで、N S K 1 は、C C N Y からなる核酸配列を含む) 及び第二の核酸分子 N A 2 (ここで、N K S 2 は、R N G G からなる核酸配列を含む) を含む。

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施態様において、本発明に係るキットオブパーツは、第一の核酸分子 N A 1 (ここで、N S K 1 は、N C C N Y N からなる核酸配列を含む) 及び第二の核酸分子 N A 2 (ここで、N K S 2 は、N R N G G N からなる核酸配列を含む) を含む。

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施態様において、本発明に係るキットオブパーツは、第一の核酸分子 N A 1 (ここで、N S K 1 は、N C C N Y N からなる核酸配列を含む) 及び第二の核酸分子 N A 2 (ここで、N K S 2 は、N R N G G N からなる核酸配列を含む) を含み、ここで、配列 N C C N Y N 及び配列 N R N G G N は、それぞれ、表 C 2 に記述されるように選択される。

【 0 0 2 2 】

【表 4】

NCCNYNは、以下からなる群より選択される	NRNGGNは、以下からなる群より選択される	
GCCCCG	UGGGGC GGGGGG 及び AGGGGA	
GCCUCG	GGAGGG 及び GGAGGU	
GCCGCG	UGCUGC UGCGGU UGCGGG 及び AGCGGG	
GCCUUG	GAAGGU	10
ACCGCG	AGCGGG GCGGGG 及び UGCGGG	
ACCACG	GGUGGU 及び GGUGGG	
ACCCCG	UGGGGU AGGGGG GGGGGC 及び GGGGGG	
ACCUUG	CAAGGG	
GCCCCU	GGGGGU 及び CGGGGC	
GCCGCU	GGCGGU CGCGGU 及び CGCGGA	
GCCUCU	UGAGGC 及び AGAGGG	20
UCCCUG	GAGGGG GAGGGA 及び UAGGGA	
UCCACG	UGUGGC GGUGGU AGUGGC CGUGGU GGUGGG 及び AGUGGG	
UCCAUG	AAUGGA	
UCCUUG	GAAGGG	
ACCGCC UCCGCC 及び CCCGCU	GGCGGU GCGGGG 及び GCGGGA	
CCCAUC GCCAUC UCCAUC ACCAUU 及び CCCAUU	UAUGGC	30
UCCACU	GGUGGG 及び AGUGGA	
GCCCCA GCCCCC	GGGGGU 及び AGGGGA	
ACCUCA CCCUCC CCCUCG	GGAGGG UGAGGA 及び UGAGGG	
CCCUUC	GAAGGC 及び AAAGGA	
ACCCCC UCCCCC CCCCCC CCCCCU	GGGGGG AGGGGG GGGGGU 及び UGGGGA	40
ACCUCU	UGAGGA 及び UGAGGG	
CCCCUC	UAGGGA	

表C 2 : NCCNYN/NRNGGNの可能なカップルの記載

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施態様において、NS 1、NS 2、NS 3又はNS 4は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個のヌクレオチドを含む。

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施態様において、NS 1は、UGCUCGによって表され、そしてNS 2は、CGAGCAによって表される。

【0025】

いくつかの実施態様において、NS 3は、ACGAGCによって表され、そしてNS 4は、GUCGUによって表される。

【0026】

いくつかの実施態様において、核酸のループは、特に実施例に提供されるような、D 2 1 DNAループを含む。

【0027】

いくつかの実施態様において、本発明に係るキットオブパーツは、ACGAGCUGG GGCUCGU (KG51)によって示される核酸配列を含む第一の核酸分子及びUGCUCGGCCCCGCGAGCA (KC24-Aptakiss)によって示される核酸配列を含む第二の核酸分子を含む。

10

【0028】

いくつかの実施態様において、本発明に係るキットオブパーツは、TGGGGGACUGGGGCGGGAAGGAによって示される核酸配列を含む第一の核酸分子及びUGCUCGGCCCCGCGAGCA (KC24-Aptakiss)によって示される核酸配列を含む第二の核酸分子を含む。

【0029】

いくつかの実施態様において、本発明に係るキットオブパーツは、TTGGGGGACUGGGGCGGGAAGGAAによって示される核酸配列からなる第一の核酸分子及びUGCUCGGCCCCGCGAGCA (KC24-Aptakiss)によって示される核酸配列からなる第二の核酸分子を含む。

20

【0030】

いくつかの実施態様において、本発明に係るキットオブパーツは、GTTGGGGGACUGGGGCGGGAAGGAAACによって示される核酸配列からなる第一の核酸分子及びUGCUCGGCCCCGCGAGCA (KC24-Aptakiss)によって示される核酸配列からなる第二の核酸分子を含む。

【0031】

いくつかの実施態様において、少なくとも1つの核酸分子は、アプタマー、すなわち、ターゲット分子に対して特異性及び親和性を示す核酸分子であり、それによって、このアプタマーのRNAループ部分は、第二の核酸ヘアピンとキッキング複合体を形成することができる任意の核酸配列であり得る。

30

【0032】

いくつかの実施態様において、NS K 1及び/又はNS K 2配列(すなわち、分子のループを形成する配列)は、DNA又はRNA核酸配列である。

【0033】

本明細書において使用される場合、「特異性」は、ターゲット分子と任意の他の分子を合理的で固有の方法で区別する核酸分子の能力を指す。

【0034】

核酸分子のそのターゲット分子に対する「親和性」は、その2つの間の複合体の安定性に対応し、平衡解離定数(KD)として表現され得る。親和性を測定するために使用される技術は、当業者に周知である。これらは、例えば、表面プラズモン共鳴であり得る。親和性は、核酸分子及びターゲット分子の性質に依存する。当業者は、試験される核酸分子及びターゲット分子に応じて所望の条件を決定することができる。より正確に言えば、当業者は、所望のアプタマーを得るための十分な親和性レベルを定義することができる。

40

【0035】

特に、アプタマーは、種々の有機及び無機物質又は分子をターゲティングするために使用され得る。典型的には、アプタマーは、核酸分子、脂質、微生物、ウイルス、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ポリマー、巨大分子、有機小分子などの任意のタ

50

イブのターゲットに特異的である。

【0036】

いくつかの実施態様において、アプタマーは、有機小分子に特異的である。用語「有機小分子」は、医薬において一般に使用される有機分子に相当するサイズの分子を指す。この用語は、生体巨大分子（例えば、タンパク質、核酸など）を除く。好ましい有機小分子は、最大約5000Da、より好ましくは最大2000Da、最も好ましくは最大約1000Daのサイズの範囲である。

【0037】

いくつかの実施態様において、アプタマーは、少なくとも1つの芳香族環基を含有する有機小分子に特異的である。本明細書において使用される場合、用語「芳香族環基」は、電子が非局在化又は共鳴された基を指し得、例は、アリール基、ヘテロアリール基などを含み得る。

10

【0038】

いくつかの実施態様において、有機小分子に結合するアプタマーは、有機小分子と相互作用することで立体構造変化を受け、それによってキッキング複合体を形成することができるヘアピンループの形成を可能にする。したがって、有機小分子の非存在下では、アプタマーは、キッキング複合体の形成を介してヘテロ二量体を形成することができないが、有機小分子の存在下では、アプタマーは立体構造変化を受け入れ、それによってキッキング複合体の形成を介してヘテロ二量体を形成することができる。

【0039】

いくつかの実施態様において、アプタマーは、ターゲット分子に対して産生された以前から公知のアプタマー（すなわち、一次アプタマー）から誘導される。本明細書において使用される場合、用語「誘導される」は、一次アプタマーが、キッキング複合体を形成することができる本明細書に記載されるような配列を含むように改変されていることを意味する。典型的には、以前の一次アプタマーは、以前の公知のアプタマーのヘアピンループの配列（例えば、以前から公知のアプタマーの頂点部分を形成する）を、キッキング複合体を形成することができる本明細書に記載されるような配列で置換することによって、キットパーツの二次アプタマーに変換される。実施例2は、一次アプタマーが本発明に係る二次アプタマーに変換される1つの例を記載する。

20

【0040】

いくつかの実施態様において、本発明のアプタマーは、好ましくは、基礎を成す合成コンピナトリアルライブラリーからSELEX法によって選択される合成核酸分子である。実際に、当業者は、公知のSELEX法を、通常の条件下及び好適な親和性で、すなわち、強い親和性を有する核酸分子（出発混合物中の最も強い親和性を有するもの）を含有する候補濃縮混合物を得るために実施することができる。したがって、SELEX法は、全てがキッキング複合体を形成することができる本明細書に記載されるような配列を含有しかつターゲット分子に結合する核酸候補の選択とそのような選択された核酸の増幅との組み合わせを包含する。選択/増幅工程の反復サイクルは、膨大な数の核酸を含有するプールからのターゲットに最も強く結合する核酸の選択を可能にする。例えば、SELEX法（本明細書で以降、SELEXと呼ぶ）は、1990年6月11日に出願された表題「Systematic Evolution of Ligands By Exponential Enrichment」の米国出願第07/536,428号（現在は放棄されている）に最初に記載された。表題「Nucleic Acid Ligands」の米国特許第5,475,096号及び表題「Methods for Identifying Nucleic Acid Ligands」の米国特許第5,270,163号も、基本的なSELEXプロセスを開示している。

30

40

【0041】

本発明に係る方法において使用されるようなSELEX型プロセスは、例えば、以下の一連の工程によって定義され得る：

i) 全てがキッキング複合体を形成することができる本明細書に記載されるような配列を含有する候補核酸の混合物をターゲット分子と接触させる工程；候補混合物と比較してターゲット分子に最も強い親和性を有する核酸が候補核酸混合物の残りから分割され得る

50

。好ましくは、混合物を、選択されたターゲット分子と、それらの間で結合が起こるような好適な条件下で接触させる。これらの状況下で、ターゲット分子とターゲット分子に最も強い親和性を有する核酸との間の複合体が形成され得る。

【0042】

i i) ターゲット分子に最も強い親和性を有する核酸を候補混合物の残りから分割する工程。この工程では、ターゲット分子に最も強い親和性を有する核酸が、ターゲット分子により小さい親和性を有する核酸から分割される。

【0043】

i i i) ターゲット分子に最も強い親和性を有する核酸を増幅して、核酸の候補濃縮混合物を生成する工程。この工程では、分割の間にターゲット分子に比較的高い親和性を有すると選択された核酸が増幅され、ターゲットに比較的高い親和性を有する核酸が濃縮された新たな候補混合物が生じる。

10

【0044】

いくつかの実施態様において、上の分割工程及び増幅工程を繰り返す(サイクルする)ことができ、それによって、新たに形成された候補混合物が数種の固有の配列を含有し、ターゲットに対する核酸混合物の平均親和性度が増加する。

【0045】

「分割する」は、ターゲット分子に結合された核酸候補(本明細書において候補-ターゲット複合体として同定される)がターゲット分子に結合していない核酸から分離される任意のプロセスを意味する。分割することは、当技術分野において公知の種々の方法によって達成され得る。例えば、候補-ターゲット複合体はニトロセルロースフィルターに結合され得るが、未結合の候補は結合されない。候補-ターゲット複合体を特異的に保持するカラムを分割するために使用することができる。また、液体-液体分割を濾過ゲルシフト法、親和性クロマトグラフィー法及び密度勾配遠心分離法と同様に使用することができる。代替的に、分割することは、ターゲット分子の磁気ビーズ上への付着、続く、核酸のターゲット分子への結合及びその後の磁気ビーズ/ターゲット分子/核酸粒子の分離によって実施され得る。磁気ビーズの自動分別のいくつかの異なる方法が当技術分野から公知である。第一の方法は、磁気デバイス又は磁化可能デバイスを、磁気ビーズを含有する媒体に挿入し、磁気ビーズを磁気デバイス又は磁化可能デバイスに結合させ、そして磁気デバイス又は磁化可能デバイスを取り出すことである。第二の方法では、共にピペットチップ中に吸引された媒体と磁気粒子の分離は、ピペットチップに空間的に近接させた磁気デバイス又は磁化可能デバイスによって容易になる。分割方法の選択は、ターゲット及び候補-ターゲット複合体の特性に依存し、当業者に公知の原理に従って行われ得る。

20

30

【0046】

ターゲット分子に結合した候補核酸を未結合のままの核酸から分離した後、分割する工程の次の工程は、それらをターゲット分子から分離することである。それゆえ、候補核酸を、水中にてその種の分離を可能にするのに十分な温度で加熱することによって分離することができる。代替的に、分離は、変性剤又は分解剤(例えば、酵素)の添加によって達成され得る。結合した候補はまた、遊離ターゲットとの競合によって収集され得る。例えば、候補核酸は、水中にて75 で1分間加熱することによって分離され得る。それゆえ、ターゲット分子に対して増加した親和性を有する核酸の混合物が得られる。

40

【0047】

分割した後、高い親和性を有する候補核酸が増幅され得る。本明細書において意図するように、「増幅する」は、分子又は分子のクラスのコピーの量又は数を増加させる、任意のプロセス又はプロセス工程の組み合わせを意味する。

【0048】

増幅工程は、当業者に周知の種々の方法によって実施され得る。DNA分子を増幅するための方法は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)であり得る。その基本形態では、PCR増幅は、一本鎖DNAの3'及び5'末端に相補的な特異的オリゴヌクレオチドをプライマーとして使用した、所望の一本鎖DNA(又はRNAのcDNAコピー)の複

50

製の繰り返しサイクル（DNAポリメラーゼを用いたプライマー伸長と、それに続くDNA変性を達成する）を包含する。1つのプライマーからの伸長によって生成された産物は、他のプライマーからの伸長のための鋳型として役立つ。PCR法の記載は、Saiki et al. (1985) Science 230:1350-1354 又はSaiki et al. (1986) Nature 324:163-166 に見出される。RNA分子を増幅するための方法は、当業者から周知である。例えば、増幅は、一連の3つの反応：選択されたRNAのcDNAコピーを作製し（逆転写酵素を使用して）、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して各cDNAのコピー数を増加させ、そしてcDNAコピーを転写して選択されたRNAと同じ配列を有するRNA分子を得ることによって行われ得る。本発明によれば、候補核酸は、好ましくは、これらの核酸に共通する固定配列にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドの援助によって増幅される。本発明によれば、増幅工程は、優先的には、分割工程の間に得られた増加した親和性を有する核酸の混合物に対して行われ、核酸の候補濃縮混合物を生成する。所望の分割を達成するために用いられる核酸に対するターゲット分子の相対濃度は、例えば、ターゲット分子の性質、結合相互作用の強度及び使用される緩衝液に依存するだろう。所望の分割結果を達成するために必要な相対濃度は、過度の実験なしに、実験的に容易に決定され得る。

10

20

30

40

50

【0049】

分割/増幅手順のサイクリング（繰り返し）は、選択された目標が達成されるまで続けられ得る。例えば、サイクリングは、試験混合物中の核酸の所望の結合レベルが達成されるまで又は混合物の最小数の核酸成分が得られるまで続けられ得る。結合のさらなる改善が達成されなくなるまでサイクリングを続けることが望ましいだろう。行われるべきサイクル数は、好ましくは100以下、より好ましくは10以下である。本発明を実施する1つの方法によれば、サイクル数は7である。本発明を実施する別の方法によれば、サイクル数は7未満であり、優先的には、6、5、4、3、2又は1サイクルに等しい。

【0050】

したがって、いくつかの実施態様において、SELEXのためのコンビナトリアルランダムライブラリーは、内部可変領域（例えば、10～60個のヌクレオチド）、キッキング複合体を形成することができる本明細書に記載されるような配列を含む領域を有する核酸分子からなり、ここで、2つの領域は、その5'及び3'末端がプライマー領域でフランキングされている。プライマー領域は、SELEXの増幅工程のためのプライマー結合部位として役立つ。

【0051】

いくつかの実施態様において、SELEXのためのコンビナトリアルランダムライブラリーは、少なくとも1つの可変領域（例えば、6～60個のヌクレオチド）によってフランキングされたキッキング複合体を形成することができる上述したような配列NSK1又はNSK2を含む内部領域を有する核酸分子からなる。

【0052】

特定の実施態様において、NSK_nは、DNA又はRNA核酸配列である。

【0053】

したがって、本発明のさらなる態様は、一般式5'-P1-V-NSK_n-P2-3'又は5'-P1-NSK_n-V-P2-3'（式中、P1及びP2は、プライマー領域を表し、Vは、少なくとも2つのヌクレオチドの可変領域を表し、NSK_nは、上述したような核酸分子NSK1又はNSK2を表す）を有する複数の核酸分子を含むライブラリーに関する。

【0054】

プライマー領域は、SELEXの増幅工程のためのプライマー結合部位として役立つ。

【0055】

いくつかの実施態様において、可変領域Vは、2；3；4；5；6；7；8；9；10；11；12；13；14；15；16；17；18；19；20；21；22；23；24；25；26；27；28；29；又は30個のヌクレオチドを含む。

【0056】

したがって、本発明のさらなる態様は、一般式 $5' - P1 - V1 - NSK_n - V2 - P2 - 3'$ (式中、 $P1$ 及び $P2$ は、プライマー領域を表し、 $V1$ 及び $V2$ は、少なくとも5個のヌクレオチドの変領域を表し、 NSK_n は、上述したような核酸分子 $NSK1$ 又は $NSK2$ を表す) を有する複数の核酸分子を含むライブラリーに関する。

【0057】

いくつかの実施態様において、変領域 $V1$ 及び $V2$ の各々は、2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29 ; 30 個またはそれ以上のヌクレオチドを含む。

【0058】

いくつかの実施態様において、変領域 $V1$ 及び $V2$ は、同じ長さ(すなわち、同数のヌクレオチド)を有するか又は有さない。

【0059】

したがって、本発明のさらなる態様は、一般式 $5' P1 - X_n - V1 - NSK_n - V2 - Y_n - P2$ (式中、 $P1$ 及び $P2$ は、プライマー領域を表し、 $V1$ 及び $V2$ は、少なくとも5個のヌクレオチドの変領域を表し、 X_n 及び Y_n は、1、2、3個またはそれ以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列を表し、かつ X_n 及び Y_n は、ハイブリダイズすることができ、そして NSK_n は、上述したような核酸分子 $NSK1$ 又は $NSK2$ を表す) を有する複数の核酸分子を含むライブラリーに関する。

【0060】

いくつかの実施態様において、変領域 $V1$ 及び $V2$ は、2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29 ; 30 個またはそれ以上のヌクレオチドを含む。

【0061】

いくつかの実施態様において、変領域 $V1$ 及び $V2$ は、同じ長さ(すなわち、同数のヌクレオチド)を有するか又は有さない。

【0062】

いくつかの実施態様において、 X_n は、1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29 ; 30 個またはそれ以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列を表す。

【0063】

いくつかの実施態様において、 Y_n は、1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29 ; 30 個またはそれ以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列を表す。

【0064】

いくつかの実施態様において、本発明に係るキットオブパーツは、化学修飾された少なくとも1つの核酸分子 $NA1$ 及び/又は $NA2$ を含む。

【0065】

例えば、核酸分子の使用において直面する1つの潜在的な問題は、オリゴヌクレオチドがそのホスホジエステル形態では、所望の効果が現れる前に、生物学的流体(例えば、体液)中で細胞内及び細胞外酵素(エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼなど)によって素早く分解され得ることである。

【0066】

そのような修飾の例は、糖及び/又はリン酸及び/又は塩基位置での化学的置換を含む。例えば、米国特許第5,660,985号は、リボースの2'位、ピリミジンの5位及びプリン8位で化学修飾されたヌクレオチド誘導体を含むオリゴヌクレオチドを記載している。米国特許第5,756,703号は、種々の2'修飾ピリミジンを含むオリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドを記載しており、そして米国特許第5,580,737号は、2'-アミノ(2'-NH₂sub.2)、2'-フルオロ(2'-F)及び/又は2'-OMe置換基で修飾された1つ以上のヌクレオチドを含有する高特異的核酸リガンドを記載している。核酸の2'化学修飾のための技術はまた、米国特許出願第US 2005/0037394号及び第US 2006/0264369号に記載されている。本発明において意図される核酸分子の修飾は、限定されないが、塩基又は核酸分子全体に対して、追加の電荷、分極性、疎水性、感光性、水素結合、静電相互作用、スタッキング相互作用及び流動性を組み込む他の化学基を提供する修飾を含む。ヌクレアーゼに耐性を示すオリゴヌクレオチド集団を生成する修飾はまた、1つ以上の置換ヌクレオチド間連結、変化した糖、変化した塩基又はそれらの組み合わせを含むことができる。そのような修飾は、限定されないが、2'位の糖修飾、5位のピリミジン修飾、8位のプリン修飾、環外アミンにおける修飾、4-チオウリジンによる置換、5-プロモ又は5-ヨード-ウラシルによる置換、骨格修飾、ホスホロチオアート又はアルキルホスファート修飾、メチル化、伸長された芳香族環の使用及び非天然塩基対合の組み合わせ(イソ塩基のイソシチジン及びイソグアニジンなど)を含む。修飾はまた、キャッピングなどの3'及び5'修飾を含むことができる。

10

【0067】

いくつかの実施態様において、P(O)O基が、P(O)S(「チオアート」)、P(S)S(「ジチオアート」)、P(O)NR₂(「アミダート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO若しくはCH₂(「ホルムアセタール」)又は3'-アミン(-NH-CH₂-CH₂-)(式中、各R又はR'は、独立して、H又は置換若しくは非置換アルキルである)に置き換わっている、核酸分子(NA1及び/又はNA2)が提供される。連結基は、-O-、-N-又は-S-連結を介して隣接ヌクレオチドに接続され得る。オリゴヌクレオチド中の全ての連結が同一である必要はない。本明細書において使用される場合、ホスホロチオアートという用語は、ホスホジエステル結合中の1つ以上の非架橋酸素原子が1つ以上の硫黄原子に置き換わっていることを包含する。

20

【0068】

いくつかの実施態様において、核酸分子(NA1及び/又はNA2)は、修飾糖基を含み、例えば、ヒドロキシル基の1つ以上が、ハロゲン、脂肪族基で置き換わっているか、又はエーテル若しくはアミンとして官能化されている。1つの実施態様において、フラノース残基の2'位は、O-メチル、O-アルキル、O-アリル、S-アルキル、S-アリル又はハロ基のいずれかによって置換されている。2'修飾糖の合成の方法は、例えば、Sproat, et al., Nucl. Acid Res. 19:733-738 (1991); Cotten, et al., Nucl. Acid Res. 19:2629-2635 (1991); 及び Hobbs, et al., Biochemistry 12:5138-5145 (1973)に記載されている。閉環された糖環(LNA)などの他の修飾は、当業者に公知である。

30

【0069】

高耐性アプタマーを得るための別の方法は、Lアプタマー(左旋性の場合L、天然エナンチオマーDの鏡像)の使用である。この戦略は、ターゲットのアデノシン及びアルギニンに対して1996年にKlussmann及びNolteによって開発された。

【0070】

本発明の核酸分子は、当業者にとって日常的な方法によって組換えにより又は合成により生成され得る。例えば、合成RNA分子は、米国特許出願公報第20020161219号、又は米国特許第6,469,158号、第5,466,586号、第5,281,781号若しくは第6,787,305号に記載されているように製造され得る。

40

【0071】

いくつかの実施態様において、本発明に係るキットパーツは、標識された少なくとも1つの核酸分子NA1及び/又はNA2を含む。用語「標識」は、本明細書において広い意味で使用され、直接的に又はシグナル生成系の1つ以上の追加メンバーとの相互作用を介してのいずれかで、検出可能なシグナルを提供することができる作用物質を指す。本発明によれば、標識は、視覚的、光学的、フォトリソグラフィ、電子的、音響的、光音響的、質量により、電気化学的、電気光学的、分光法、酵素的、又はそうでなければ化学的、生化

50

学的、流体力学的、電氣的若しくは物理的に検出可能である。標識は、例えば、テールドレポーター (tailed reporter)、マーカー又はアダプター分子であり得る。したがって、核酸分子は、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤又は酵素からなる群より選択される検出可能な分子で標識される。標識の例は、限定されないが、以下の放射性同位体 (例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、蛍光標識 (例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体)、ルミノールなどの発光標識；酵素的標識 (例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、アセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase))、ビオチニル基 (標識されたアビジン、例えば、光学法又は熱量測定法によって検出され得る蛍光マーカー又は酵素活性を含有するストレプトアビジンによって検出され得る)、二次レポーターによって認識される既定のポリペプチドエピトープ (例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ) を含む。

【0072】

いくつかの実施態様において、本発明に係るキットオブパーツは、特にマイクロアレイを形成するために固体支持体に固定化された、少なくとも1つの核酸分子NA1及び/又はNA2を含む。

【0073】

いくつかの実施態様において、マイクロアレイは、約100スポット/cm²を超える、好ましくは約1000、1500、2000、3000、4000、5000スポット/cm²を超える、さらに好ましくは約9000、10000、11000、12000又は13000スポット/cm²を超える密度で高密度であり、これは、支持表面上に核酸分子 (NA1又はNA2) を接着させることによって形成される。

【0074】

いくつかの実施態様において、マイクロアレイは、比較的少数の核酸分子 (NA1又はNA2) (例えば、10~50個) を含む。

【0075】

基板又は支持体の特性は、意図する用途に応じて変化し得るが、基板の形状、材料及び表面修飾が考慮されなければならない。基板は、実質的にプレーナ又は平坦な少なくとも1つの表面を有することが好ましいが、くぼみ、突起、段部、隆起、段丘なども含み得、任意の幾何学的形状 (例えば、円柱状、円錐状、球状、凹面、凸面、糸状又はこれらのいずれかの組み合わせ) を有し得る。例えば、固体支持体は、例えば、シート、ストリップ、膜、フィルム、ゲル、ビーズ、マイクロ粒子及びナノ粒子であり得る。好適な基板材料は、限定されないが、ガラス、セラミック、プラスチック、金属、合金、炭素、紙、アガロース、シリカ、石英、セルロース、ポリアクリルアミド、ポリアミド及びゼラチン、並びに他のポリマー支持体、他の固体材料支持体、又はフレキシブル膜支持体を含む。基板として使用され得るポリマーは、限定されないが、ポリスチレン；ポリ(テトラ)フルオロエチレン (PTFE)；ポリビニリデンジフルオリド；ポリカーボネート；ポリメチルメタクリレート；ポリビニルエチレン；ポリエチレンイミン；ポリオキシメチレン (POM)；ポリビニルフェノール；ポリラクチド；ポリメタクリルイミド (PMI)；ポリアルケンスルホン (PAS)；ポリプロピレン；ポリエチレン；ポリヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA)；ポリジメチルシロキサン；ポリアクリルアミド；ポリイミド；及び種々のブロックコポリマーを含む。基板はまた、多層構成の材料 (透水性であるか否かにかかわらず) の組み合わせを含むことができる。

【0076】

アッセイ核酸分子を固体支持体に固定化するための多くの確立された方法がある。これらは、非限定的に、ビオチン及びストレプトアビジンのコンジュゲーションを介して固定化された核酸分子を含む。そのようなビオチニル化されたアッセイ成分は、当技術分野において公知の技術 (例えば、ビオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) を使用してビオチン-NHS (N-ヒドロキシ-スクシンイミド) から調製され、ストレ

10

20

30

40

50

プトアビジンコート 96 ウェルプレート (Pierce Chemical) のウェル中に固定化され得る。ある実施態様において、固定化されたアッセイ成分を有する表面があらかじめ調製され、保存され得る。

【0077】

サンプル中のターゲット分子を検出するための方法：

本発明のさらなる態様は、サンプル中の少なくとも1つのターゲット分子を検出するための方法であって、i) ターゲット分子に特異的であるアプタマーである核酸分子NA1又はNA2を含む本発明のキットパーツを提供する工程、ii) サンプルをキットパーツの核酸分子と接触させる工程、及びiii) 2つの核酸NA1とNA2との間に形成される二本鎖の形成を検出する工程からなる工程を含む方法に関する。

10

【0078】

いくつかの実施態様において、複数のターゲット分子がサンプル中で検出される。少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、50又は100個のターゲット分子がサンプル中で検出される。したがって、本発明のさらなる態様はまた、サンプル中の複数のターゲット分子を検出するための方法であって、i) ターゲット分子に特異的なアプタマーである核酸分子NA1又はNA2を含む本発明の複数のキットパーツを提供する工程、ii) サンプルをキットパーツの核酸分子と接触させる工程、及びiii) 2つの核酸によって形成される二本鎖の形成を検出する工程からなる工程を含む方法に関する。

20

【0079】

いくつかの実施態様において、ターゲット分子は、有機小分子である。

【0080】

本明細書において使用される場合、「サンプル」は、ターゲット分子を含有しそうな任意のサンプルを指す。例えば、サンプルは、さらに、個体から単離された任意の生物学的物質、例えば、生物学的組織及び流体(血液、皮膚、血漿、血清、リンパ液、尿、脳脊髄液、涙液、スミア...を含む)であり得る。サンプルはまた、水のサンプル、特に飲料水、地下水、表流水又は廃水サンプルであり得る。サンプルはまた、環境由来物質から調製されたサンプル、臨床検体又は食品サンプルであり得る。

【0081】

いくつかの実施態様において、サンプルは、かなりの量のマグネシウムを含む(すなわち、キッキング複合体は、マグネシウム感受性である)。

30

【0082】

いくつかの実施態様において、ターゲット分子に特異的なアプタマーである核酸分子は、それがターゲット分子に結合する場合にのみ、キットの他の核酸分子との複合体を形成することができる(すなわち、ターゲット分子に結合するアプタマーは、ターゲット分子と相互作用することで立体構造変化を受け、それによってキッキング複合体を形成することができるヘアピンループの形成を可能にする)。

【0083】

核酸分子NA1と核酸分子NA2との間で形成された複合体(キッキング複合体の形成を介して)の検出は、当技術分野において周知の任意の方法によって実施され得る。

40

【0084】

いくつかの実施態様において、検出は、液相中、溶質としての核酸分子を用いて実行され得る。そのようなアッセイでは、複合体(キッキング複合体の形成を介した)は、多数の標準的な技術(限定されないが、クロマトグラフィー、電気泳動、濾過...を含む)のいずれかによって、個々の未結合成分から分離される。例えば、複合体分子を未結合の分子から分離するために標準的なクロマトグラフ技術を利用することもできる。例えば、ゲル濾過クロマトグラフィーは、サイズに基づいてかつカラム形式の適切なゲル濾過樹脂の利用を介して分子を分離し、例えば、比較的大きい複合体が比較的小さい未結合成分から分離され得る。同様に、未結合成分と比べた複合体の比較的異なる電荷特性を活用することで、例えば、イオン交換クロマトグラフィー樹脂の利用を介して、複合体が未結合成分か

50

ら区別され得る。そのような樹脂及びクロマトグラフ技術は、当業者に周知である（例えば、Heegaard, N. H., 1998, J. Mol. Recognit. Winter 11(1-6):141-8; Hage, D. S., and Tweed, S. A. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997 Oct. 10;699 (1-2):499-525を参照のこと）。また、ゲル又はキャピラリー電気泳動を用いて、複合体を未結合成分から分離することもできる（例えば、Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1987-1999を参照のこと）。この技術では、核酸分子の複合体は、例えば、サイズ又は電荷に基づいて分離される。電気泳動プロセスの間の結合相互作用を維持するために、典型的には、非変性ゲルマトリックス材料、及び還元剤の非存在下での条件が好ましい。

【0085】

いくつかの実施態様において、ターゲット分子に特異的なアプタマーではない核酸分子が上述したような固体支持体上に固定化される。実際に、固体支持体上に固定化されたら、核酸分子は、ターゲット分子に特異的なアプタマーである核酸分子に結合することができるバイオセンサー素子として使用され得る。バイオセンサーは、固体表面上に生物学的要素（すなわち、核酸分子NA1又はNA2）を統合する分析デバイスであり、被検物質（すなわち、ターゲット分子）とシグナル伝達物質との可逆的な生物特異的相互作用を可能にする。バイオセンサーは、高感度検出システムを達成する高い分析特異性と現代の電子工学の処理能力を併せ持つ。一般に、これらのバイオセンサーは、2つの構成成分：高特異的認識要素と分子の認識事象を定量可能シグナルに変換するトランスデューサーからなる。シグナル変換は、蛍光分析、干渉分析、重量分析を含む多くの方法によって達成され得る。

【0086】

上で述べたアプローチを用いてアッセイを実行するために、サンプルを、次に、ターゲット分子に特異的なアプタマーではない核酸分子が固定化されたビーズ又はマイクロアレイと接触させる。次いで、キットの固定化されていない核酸分子（すなわち、アプタマー）が加えられる。反応が完了（キッキング複合体の形成を介した、核酸分子間での二本鎖の形成）した後、形成された任意の複合体がマイクロアレイ上に固定化されたままになるような条件下で、未結合成分（無関係なターゲット分子、それらのターゲット分子に結合しなかった核酸分子...）が取り除かれ得る（例えば、洗浄によって）。マイクロアレイに固着された複合体の検出は、最終的に、当技術分野において周知の及び本明細書に記載される多数の方法で達成され得る。

【0087】

いくつかの実施態様において、マイクロアレイ（micorarray）上に固定化されていない核酸分子（すなわち、アプタマー）は、アッセイの検出及び読み取りの目的で、本明細書で後述する及び当業者に周知である検出可能標識で直接的又は間接的に標識され得る。

【0088】

例えば、蛍光エネルギー移動又は蛍光異方性の技術（実施例を参照のこと）を利用することによって、いずれかの成分（例えば、アプタマー）のさらなる操作又は標識なしに、複合体形成を直接検出することも可能である（例えば、Lakowicz et al., 米国特許第5,631,169号; Stavrianopoulos, et al., 米国特許第4,868,103号を参照のこと）。第一の「ドナー」分子上のフルオロフォア標識は、適切な波長の入射光で励起することによって、その放射された蛍光エネルギーが第二の「アクセプター」分子上の蛍光標識に移動し、次いで吸収エネルギーに起因して蛍光を発することができるように選択される。「アクセプター」分子の標識が「ドナー」の標識と区別され得るように、異なる波長の光を発する標識が選択される。標識間のエネルギー移動効率が分子を分離する距離に関係するため、分子間の空間的相関関係が評価され得る。分子間で結合が起こる状況で、アッセイにおける「アクセプター」分子標識の蛍光発光が最大であるはずである。FRET結合事象は、当技術分野において周知の標準的な蛍光検出手段を介して（例えば、蛍光光度計を使用して）簡便に測定され得る。

【0089】

いくつかの実施態様において、複合体形成の検出は、リアルタイム生体分子相互作用解析 (BIA) (例えば、Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345 及び Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705 を参照のこと) などの技術を利用することによって達成され得る。本明細書において使用される場合、「BIA」又は「表面プラズモン共鳴」は、相互作用物のいずれも標識することなく、生物特異的相互作用をリアルタイムで研究するための技術である (例えば、BIAcore)。結合表面での質量変化 (結合事象の指標である) は、表面近くの光の屈折率の変動 (表面プラズモン共鳴 (SPR) の光学現象) を生じ、生体分子間のリアルタイム反応の指標として使用され得る検出可能シグナルを生じる。

【0090】

いくつかの実施態様において、検出は、Edwards 及び Leatherbarrow (Edwards and Leatherbarrow, 1997, Analytical Biochemistry, 246 : 1-6) によって又はまた Szabo 等 (Szabo et al., 1995, Curr. Opinion Struct. Biol., 5(5) : 699-705) によって記載されるような光学バイオセンサーを用いて達成され得る。この技術は、標識された分子を必要とすることなく、リアルタイムでの分子間相互作用の検出を可能にする。この技術は、表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象に基づくものである。この目的のために、被試験サンプルを含有しない基板の表面領域の側に光学ビームを向け、これを前記表面によって反射させる。SPR 現象は、角度と波長の特定の組み合わせに伴って反射光の強度の減少を引き起こす。核酸 NA 1 及び NA 2 の複合体の形成は、基板表面での屈折率の変化を引き起こし、その変化は SPR シグナルの変化として検出される。この技術は、本明細書の実施例において十分に説明される。

【0091】

いくつかの実施態様において、検出は、圧電トランスデューサーを用いて達成され得、これは、例えば、複合体が形成されたときの質量変化を検出する QCM センサー (水晶マイクロバランス) である。水晶振動子の表面での質量変化は、共振周波数の変化を生じ、これを定量化することができる。

【0092】

いくつかの実施態様において、検出は、キャピラリー電気泳動によって達成され得、これは、複合体が形成されたときの質量変化を電気泳動によって検出する。

【0093】

いくつかの実施態様において、検出は、アルファスクリーン技術によって達成され得、これは、複合体が形成されたときにルミネッセンス発光を可能にする。

【0094】

本発明の方法は、制限されないが、食品、水及び環境の分析における使用に特に好適である。本発明の方法はまた、診断目的に特に好適である。特に、本発明の方法は、任意の媒体及び環境中の、特に、水及び他の液体 (飲料及び廃水サンプルなどの) 中の有機小分子の検出に特に好適である。したがって、ターゲット分子は、代謝物、薬物及び汚染物質からなる群より選択され得る。特定の実施態様において、媒体及び環境は、前記媒体又は環境を本発明の核酸分子、キットパーツ又はコンビナトリアルライブラリーと接触させる前に、RNAse 阻害剤で事前に処理される。

【0095】

溶液中の S E L E X :

本発明はまた、以下の工程を含む、ターゲット分子に指向するアプタマーを同定するための方法に関する :

i) ターゲット分子を、少なくとも1つの可変領域によってフランキングされた上述したような配列 NSK 1 又は NSK 2 を含む内部領域を有する複数の核酸分子からなる本発明に係るコンビナトリアルランダムライブラリーと接触させる工程

ii) 工程 i) の混合物を、対応する NSK 1 又は NSK 2 を含む核酸と接触させる工程

iii) ターゲット分子に親和性を有する核酸をライブラリーの残りから分割する工程であって、配列 NSK 1 及び NSK 2 をそれぞれ含む2つの核酸間で形成された複合体の形

10

20

30

40

50

成の検出がターゲット分子に親和性を有する核酸の存在を示す工程。

【0096】

いくつかの実施態様において、本方法は、ターゲット分子に親和性を有する核酸の候補濃縮混合物を生成するための親和性を有する核酸を増幅する工程、場合により、ターゲット分子に最も強い親和性を有するアプタマーを選択するための工程 i) ~ iii) を何回も繰り返す工程並びに最も強い親和性を有するアプタマーを配列決定及び生成する工程をさらに含み得る。

【0097】

実際に、選択及び増幅のサイクルは、所望の目標が達成される：ターゲット分子に最も強い親和性を有するアプタマーを同定するまで繰り返される。最も一般的な場合では、選択/増幅は、サイクルの繰り返して結合強度の顕著な改善が達成されなくなるまで続けられる。

10

【0098】

本方法は、ターゲット分子に親和性を有するアプタマーが、それがターゲット分子に結合する場合にのみ、対応する NSK 1 又は NSK 2 を含む核酸との複合体を形成することができる（すなわち、ターゲット分子に結合するアプタマーは、ターゲット分子と相互作用することで立体構造変化を受け、それによってキッキング複合体を形成することができるヘアピンループの形成を可能にする）という原理に依存する。

【0099】

本発明によれば、ターゲット分子は、SELEX（商標）法について古典的に記載されているような固体支持体上に固定化されず、流体サンプル中に遊離する。典型的には、流体サンプルは、水溶液である。

20

【0100】

本明細書において使用される場合、「ライブラリー」は、核酸分子の混合物であり、ターゲット分子に潜在的に結合することができるライブラリー「メンバー」とも称される。典型的には、ライブラリーのメンバーは、多数の可能な配列バリエーションがライブラリー内で利用可能なように、配列がランダム化されている。ランダム化された領域は、本質的にはどんな長さであってもよいが、ランダム化されていない挿入物を組み込むことができる最大100ヌクレオチドの長さが好ましい。典型的には、ランダム化された領域は、2~60の間又はそれ以上であろう。

30

【0101】

ライブラリーメンバーのランダム化される部分は、多数の方法で誘導され得る。例えば、完全又は部分的な配列ランダム化は、メンバー（又はその部分）の直接化学合成によって、又はメンバー（又はその部分）が適切な酵素の使用によって調製され得る鑄型の合成によって容易に達成され得る。非限定濃度の4種全てのヌクレオチド三リン酸が存在する中でターミナルトランスフェラーゼによって触媒される末端付加は、ランダム化された配列をセグメントに付加することができる。試験核酸中の配列変動はまた、ゲノムDNA調製物又は細胞RNA調製物などの巨大な天然核酸の部分的に消化された（又はそうでなければ開裂された）調製物のサイズ選択されたフラグメントを用いることによって達成され得る。ランダム化された配列は、好ましくは、一連のオリゴヌクレオチドライブラリー中の各ヌクレオチドの合成の間に、4種全てのヌクレオチド（好ましくは、カップリング効率の相違を可能にするため、A:C:G:Tを6:5:5:4の比で）の混合物を使用することによって生成される。しかしながら、上で述べたように、核酸配列は、修飾ヌクレオチドを含むことができる。そのような修飾の例は、上述したような糖及び/又はリン酸及び/又は塩基位置での化学的置換（例えば、リボースの2'位、ピリミジンの5位及びプリン8位で化学修飾されたヌクレオチド誘導體）を含む。核酸分子の修飾はまた、限定されないが、塩基又は核酸分子全体に対して、追加の電荷、分極性、疎水性、水素結合、静電相互作用及び流動性を組み込む他の化学基を提供する修飾を含む。ヌクレアーゼに耐性を示すオリゴヌクレオチド集団を生成する修飾はまた、1つ以上の置換ヌクレオチド間連結、変化した糖、変化した塩基又はそれらの組み合わせを含むことができる。そのよ

40

50

うな修飾は、限定されないが、2'位の糖修飾、5位のピリミジン修飾、8位のプリン修飾、環外アミンにおける修飾、4-チオウリジンの置換、5-プロモ又は5-ヨード-ウラシルの置換、骨格修飾、ホスホロチオアート又はアルキルホスファート修飾、メチル化及び非天然塩基対合の組み合わせ（イソ塩基のイソシチジン及びイソグアニジンなど）を含む。修飾はまた、キャッピングなどの3'及び5'修飾を含むことができる。いくつかの実施態様において、P(O)O基が、P(O)S（「チオアート」）、P(S)S（「ジチオアート」）、P(O)NR₂（「アミダート」）、P(O)R、P(O)OR'、CO若しくはCH₂（「ホルムアセタール」）又は3'-アミン（-NH-CH₂-CH₂-）（式中、各R又はR'は、独立して、H又は置換若しくは非置換アルキルである）に置き換わっている、核酸分子（NA1及び/又はNA2）が提供される。連結基は、-O-、-N-又は-S-連結を介して隣接ヌクレオチドに接続され得る。オリゴヌクレオチド中の全ての連結が同一である必要はない。本明細書において使用される場合、ホスホロチオアートという用語は、ホスホジエステル結合中の1つ以上の非架橋酸素原子が1つ以上の硫黄原子に置き換わっていることを包含する。いくつかの実施態様において、核酸分子は、修飾糖基を含み、例えば、ヒドロキシル基の1つ以上が、ハロゲン、脂肪族基で置き換わっているか、又はエーテル若しくはアミンとして官能化されている。1つの実施態様において、フラノース残基の2'位は、O-メチル、O-アルキル、O-アリル、S-アルキル、S-アリル又はハロ基のいずれかによって置換されている。2'修飾糖の合成の方法は、例えば、Sproat, et al., Nucl. Acid Res. 19:733-738 (1991); Cotten, et al., Nucl. Acid Res. 19:2629-2635 (1991); 及び Hobbs, et al., Biochemistry 12:5138-5145 (1973) に記載されている。他の修飾は、当業者に公知である。修飾はまた、キャッピングなどの3'及び5'修飾を含むことができる。高耐性アプタマーを得るための別の方法は、天然ヌクレオチドの鏡像でありかつヌクレアーゼに耐性を示すLヌクレオチドから構築された、人工のLアプタマーの使用である。この戦略は、ターゲットのアデノシン及びアルギニンに対して1996年にKlussmann及びNolteによって開発された。本発明の核酸分子は、当業者にとって日常的な方法によって組換えにより又は合成により生成され得る。例えば、合成RNA分子は、米国特許出願公報第20020161219号、又は米国特許第6,469,158号、第5,466,586号、第5,281,781号若しくは第6,787,305号に記載されているように製造され得る。

10

20

30

40

50

【0102】

いくつかの実施態様において、ライブラリーは、一般式5'-P1-V-NSKn-P2-3'又は5'-P1-NSKn-V-P2-3'（式中、P1及びP2は、プライマー領域を表し、Vは、少なくとも2つのヌクレオチドの可変領域を表し、NSKnは、上述したような核酸分子NSK1又はNSK2を表す）を有する複数の核酸分子からなる。

【0103】

いくつかの実施態様において、可変領域Vの各々は、2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30個またはそれ以上のヌクレオチドを含む。

【0104】

いくつかの実施態様において、ライブラリーは、一般式5'-P1-V1-NSKn-V2-P2-3'（式中、P1及びP2は、プライマー領域を表し、V1及びV2は、少なくとも5個のヌクレオチドの可変領域を表し、NSKnは、上述したような核酸分子NSK1又はNSK2を表す）を有する複数の核酸分子からなる。

【0105】

いくつかの実施態様において、可変領域V1及びV2の各々は、2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30個またはそれ以上のヌクレオチドを含む。

【0106】

いくつかの実施態様において、ライブラリーは、一般式 $5' - P1 - X_n - V1 - NSK_n - V2 - Y_n - P2$ (式中、 $P1$ 及び $P2$ は、プライマー領域を表し、 $V1$ 及び $V2$ は、少なくとも5個のヌクレオチドの変領域を表し、 X_n 及び Y_n は、1、2、3個またはそれ以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列を表し、かつ X_n 及び Y_n は、ハイブリダイズすることができ、そして NSK_n は、上述したような核酸分子 NSK_1 又は NSK_2 を表す) を有する複数の核酸分子からなる。

【0107】

いくつかの実施態様において、変領域 $V1$ 及び $V2$ の各々は、2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29 ; 30個またはそれ以上のヌクレオチドを含む。

10

【0108】

いくつかの実施態様において、 X_n は、1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29 ; 30個またはそれ以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列を表す。

【0109】

いくつかの実施態様において、 Y_n は、1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29 ; 30個またはそれ以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列を表す。

20

【0110】

いくつかの実施態様において、そのため、本発明は、相当数のライブラリーメンバー、とりわけ遅い解離反応速度を有するものについての平衡の確立に依存する。好ましくは、ライブラリー及びターゲット分子を、一緒に、ターゲット分子とライブラリーのメンバーとの相互作用を可能にするのに十分な時間、とりわけライブラリーのメンバーのターゲット分子との立体構造再配列を可能にするであろう十分な時間インキュベートする。必要な期間は、ターゲット及びライブラリーに、また選択のラウンドにも左右されるだろう；好ましくは、例えば、選択の第一ラウンドは、約5分(又はそれ未満)~約48時間のインキュベーションを包含し得る。有利には、選択の第一ラウンドは、少なくとも約30分~約4時間、好ましくは1時間である。残りのラウンドは、完全な平衡の確立を可能にするために、少なくとも30分~約4時間、好ましくは1時間のインキュベーションを包含する。

30

【0111】

いくつかの実施態様において、対応する核酸分子は、上述したような固体支持体上に固定化される。

【0112】

いくつかの実施態様において、対応する核酸分子は、溶液中に遊離する。

【0113】

いくつかの実施態様において、本方法は、非特異的候補及びターゲット分子ではなく固定化されたヘアピンとキッシング複合体を形成し得る候補を取り除くための、ターゲット分子の非存在下での、固定化されたヘアピン(そうでなければ、本出願において「aptakiss」とも称される)及び支持体に対するライブラリーの対抗選択からなる工程をさらに含む。

40

【0114】

いくつかの実施態様において、本方法は、陽性候補を収集する工程をさらに含む。典型的には、キッシング複合体はマグネシウム感受性であるので、陽性候補の溶離は、EDTA(エチレンジアミン四酢酸)を用いて実施されるだろう。陽性候補の溶離のための古典的SELLEX法において使用される任意の他の方法も実施することができる。陽性候補の特異的溶離に対して新たな方法を考慮することもできる：i) 固定化されたヘアピンは、

50

ステムの底部にDNA酵素制限部位を示すDNA-RNAキメラ分子であろう。酵素的消化は、複合体(アプタマー-ターゲット-固定化されたヘアピン)の溶離を可能にし、非特異的候補の溶離を回避するであろう。ii)同様に、固定化されたヘアピンは、ステム中のDNA鎖(NS1)及びRNA相補鎖(NS2)からなるDNA-RNAキメラ分子であろう。溶離工程は、DNA-RNA二本鎖を認識するRNase Hを用いた酵素的消化によって行われ得る。

【0115】

核酸分子NA1とNA2の間で形成された複合体の検出のために上述したような任意の方法(例えば、クロマトグラフィー、電気泳動、濾過、FRET、表面プラズモン共鳴、ルミネッセンス...)が使用され得る。

10

【0116】

典型的には、ターゲット分子は、制限されないが、上に定義したような有機又は無機小分子、炭水化物、核酸分子及び誘導体、脂質、微生物、ウイルス、アミノ酸、抗生物質、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ポリマー、巨大分子、複合ターゲットなどであり得る。

【0117】

本発明は、以下の図面及び実施例によってさらに説明される。しかしながら、これらの実施例及び図面は、決して本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0118】

20

【図1】本研究において使用されるaptakiss及びaptaswitchの二次構造。使用される異なるオリゴヌクレオチド誘導体の配列は、表S1に提供される。赤色で示されるループ-ループ相互作用に参与するものを除いて、デオキシリボヌクレオチドは青色で、リボヌクレオチドは黒色で示される。aptakiss/adenoswitchループ中の点突然変異は、黒色に見える。

【図2】GTPswitch/aptakiss複合体のSPR解析。GTPswitch(200mM KCl及び10mM MgCl₂を含有する10mM K₂HPO₄(pH6.2)中20μM)を、増加濃度(0~1mM)のGTP(左上)又はATP(左下)のいずれかの存在下、ビオチニル化aptakissが固定化されたチップ上に注入した。得られた最大SPRシグナルをヌクレオチド三リン酸の濃度の関数としてプロットした(右上);結果を2つの個々の実験の平均誤差(mean±sem)として表す。対照として、GTP(0~1mM)の存在下のGTPswitchを、ビオチニル化aptakissmutで官能化されたチップ上に注入した(右下)。

30

【図3】固定化されたビオチニル化aptakissに対するadenoswitch/aptakiss複合体のSPRセンサーグラム。上段:adenoswitch(100mM NaCl及び10mM MgCl₂を含有する10mM Tris(pH7.4)中5μM)を、増加量(0、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8mM)のアデノシンの存在下で注入した。下段:増加濃度のadenoswitch(0、0.08、0.16、0.31、0.63、1.25、2.5又は5μM)を用いた8mMアデノシンでの同じ条件下の類似の実験。

【図4】3つのadenoswitch変異体(0.625μM)を8mMアデノシンの存在下で注入した(10mM Tris、100mM NaCl、10mM MgCl₂中)、固定化されたビオチニル化aptakissに対するSPRセンサーグラム(上のパネル)。増加量のアデノシン(0、0.13、0.25、0.5、1、2、4又は8mM)の存在下のadenoswitchATGCについてのSPRセンサーグラム(下のパネル)。

40

【図5】aptakiss-adenoswitch複合体のホモジニアス蛍光異方性アッセイ(結合緩衝液:10mM Tris、pH7.5、100mM NaCl、10mM MgCl₂;反応温度:4)。10nM aptakiss-TR及び10nM adenoswitch(黒色三角、アデノシン)を使用して用量反応曲線を得た。10nM adenoswitchTAGC(黒色菱形、アデノシン;白色四角、イノシン)又は10nM adenoswitchTAGCmut2(白色菱形、アデノシン)。 $r = r - r_0$ (式中、 r_0 は、リガンドの非存在下での蛍光異方性である)。3連実験。

【図6】Kx1ヘアピン~Kx4ヘアピンのSPR解析。

50

【図7】異なる複合体の融解転移。

【図8】抗アデノシン、A D O s w 1'、抗G T P、G T P s w 2'、抗テオフィリン、T H E s w 4' アプタマーの配列及び構造。

【図9】固定化されたK x 2又はK x 4によるG T P s w 2' - G T P及びT H E s w 4' - テオフィリン複合体のS P R解析。

【図10】4チャンネルS P Rチップにおけるaptaswitch - リガンド混合物のS P R解析。

【図11】a) H I V - 1のR N AヘアピンT A Rに対する選択されたD N AアプタマーD I I 2 1の頂点ループの略図。b) アプタマーD I I 2 1のD N Aループを有するadenoswitch D I I 2 1モデルA、B及びC、D N A D I I 2 1ループとアデノシンに結合するD N Aアプタマーの一部とを結合する種々のサイズ(3、2及び1塩基対)の3つのコネクター。

10

【図12】これらの3つのD I I 2 1 A、D I I 2 1 B及びD I I 2 1 CモデルのT A Rに結合する能力の蛍光異方性を使用することによる比較。

【図13】「D N A S E L K I S S」について使用されるライブラリーの略図。a) 変性配列は、D I I 2 1ループとアデノシンアプタマー結合領域の間に位置するコネクター中にある。b) 変性配列は、アデノシンへの結合に関与するアプタマーの領域中に位置する。

【実施例】

【0119】

実施例1：

20

概要：

キッシング複合体は、ループを介して互いに相互作用するR N Aステムループによって形成される。これらの複合体は、プラスミドのD N A複製の制御又はウイルスのゲノムR N Aの二量化などの多くの生物プロセスに参与する。さらに、R N Aヘアピンは、インビトロ選択によってターゲット化されており、R N Aヘアピンアプタマーは同定されている。相互作用するループがキッシング複合体を生成したことが示された。これらのループ-ループ相互作用の研究は十分に実証されているが、それらの形成、特異性及び安定性を導き得るいくつかの規則があるかを調査するために、本発明者等は、キッシングする能力についてR N Aヘアピンのインビトロ選択を実施した。高い親和性のいくつかのループ-ループ複合体が同定されている。インビトロ選択結果の配列解析によって、本発明者等は、ループの相互作用によって形成された二重螺旋中の新しいR N Aモチーフを特徴付けた。これらの仕事は、ループを介して高い親和性で相互作用してキッシング複合体を形成することができるR N Aヘアピンの一覧を得ることを可能にした。本発明者等は、これらの核酸分子をAptakissと命名した。

30

【0120】

材料及び方法：

オリゴヌクレオチド

不変プライマーアニーリング部位によってフランキングされた10又は11個のランダムヌクレオチド又はコンセンサスモチーフを含有する、選択I及びIIに使用されるR N Aランダムライブラリー：

40

【表 5】

A	GGUUACCAGCCUUCAC <u>UGCUCG</u> - N10/11-CGAGCACCACGGUCGGUCACAC
B	5'ACGAGC-NRNGGN-GCUCGU biotin
C	5'GGUUACCAGCCUUCAC <u>UGCUCG</u> - NCCNYN- CGAGCACCACGGUCGGUCACAC
D	5'GGGAGGACGAAGCGGACGAGC- NRNGGN- GCUCGU CAGAAGACACGCCCGA

10

及び種々の RNA アプタマーを、Expedite 8909 シンセサイザー (Applied Biosystems) で化学合成した。ステム配列に下線を引く。2つの異なるプライマー (Proligo) : ライブラリー A 及び C の 3' 末端に相補的な P20 (5' GTGTGACCGACCGTGTGTGC) と、3' SL (RNA プールと同じ極性でかつ T7 転写プロモーター (下線を引いた) を含む) 5' TAAATACGACTCACTATAGGTTACCAAGCCTTCACTGC を含有する) を PCR 増幅に使用した。プライマー P1A 5' TAAATACGACTCACTATAGGGAGGACGAAGCGG 及び P2A 5' TCGGGCGTGTCTTCTGTG をハンドルライブラリー (handle library) D に使用した。全てのオリゴヌクレオチド及び転写産物を、20% 変性ポリアクリルアミド (7M 尿素) ゲルでの電気泳動によって精製した。

20

【0121】

インビトロ選択 I :

ICN Pharmaceutical 社の [32 - P] ATP (10mCi/mL) (4500Ci/mmol) で標識した RNA ライブラリー A (50ピコモル) を、室温で、R 緩衝液 (20mM HEPES、20mM 酢酸ナトリウム、140mM 酢酸カリウム及び 3mM 酢酸マグネシウム、pH 7.4) 10µL の最終容量で室温で 24 時間混合した。選択の第一ラウンドでは、ストリンジエンシーは、選択されたプール中にキッキングすることができる配列を保持するのに十分に低かった。選択のその後のラウンドでは、高い安定性の複合体のみを維持するために、RNA ヘアピン濃度を各ラウンドで 10 倍減少させた。さらに、インキュベーションの時間を減少させた (ラウンド 1 では 24 時間、ラウンド 2 では 6 時間、ラウンド 3 では 1 時間、そして最終ラウンドでは 10 分間)。RNA 集団を電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) によって分離した。サンプルを、50mM Tris - アセタート (pH 7.3、20) 及び 3mM 酢酸マグネシウム (TAC 緩衝液) 中の天然ゲル (15% [w/v]、75:1 アクリルアミド:ビス - アクリルアミド) 上に 100V 及び 4 で 15 時間流した。Instant Imager (Packard Instrument) によってバンドを可視化及び定量化した。RNA がシフトした複合体に相当するバンドをゲルから抽出し、溶離緩衝液 (10mM Tris - HCl、pH 7.4、1mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 及び 25mM NaCl) 600µl 中、4 で 16 時間溶離し、次いで、エタノール沈殿した。

30

40

【0122】

RNA 増幅、クローニング及び配列決定 :

抽出した RNA ヘアピンを 95 で 40 秒間変性し、氷上に 2 分間置いた。次いで、5 ユニットの EZrTth (Perkin elmer) ポリメラーゼを使用し、製造業者のプロトコールに従って 63 で 30 分間かけて RNA プールを cDNA にコピーした。300µM の dNTP、25mM の MnOAc 及び 2µM の各プライマーの他に EZrTth 緩衝液を含

50

有する同じチューブで候補を増幅した。次いで、反応混合物を 94 に 2 分間変性させ、繰り返しサイクルに供した：94 で 1 分間、63 で 1 分間を 40 サイクル及び 63 で 7 分間を最終 1 サイクル。PCR 産物の沈殿後、ICN Pharmaceutical社の [32 - P] UTP (10 mCi/mL) (4500 Ci/mmol) を含むTEBU社のAmpliscribe T7高収率転写キットを用いたインビトロ転写によって、RNAヘアピンを得た。転写産物を 20 % 変性ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動によって精製し、次いで、次の選択サイクルに使用した。4 サイクルの後、Invitrogen社のTOPO TAクローニングキットを使用して、選択した配列をクローニングし、Perkin-Elmer社のdRhodamine Terminator Cycle配列決定キットを使用することによって製造業者の説明に従って配列決定した。

【 0 1 2 3 】

インビトロ選択 I I a :

ビオチニル化 RNA ライブラリー B を、R 緩衝液中、50 nM のライブラリー A (C C N Y) と室温で 1 時間混合した (図 1 4) 。使用前に、ライブラリー A を対抗選択に供した。ライブラリー A を、R 緩衝液中で事前に平衡化したストレプトアビジンビーズ (Promega 社の Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles 20 μ g) と混合し、ビーズに保持されない RNA 候補を選択 I I に使用した。ビオチンを含有するライブラリー B とライブラリー A とで形成された RNA 複合体をストレプトアビジンビーズで 10 分間捕捉した。未結合 RNA を除去し、ビーズを R 緩衝液 100 μ l で洗浄した。水 50 μ l 中 85 で 45 秒間加熱することによって、ライブラリー A の結合した候補をライブラリー B から溶離した。RNA 候補を、選択 I で記載したような RT - PCR 及び転写に供した。5 nM のライブラリー A 及び B を用いた選択の第二のラウンドを加えた。選択の 2 回のラウンドからの配列を上述したようにクローニングした。これらの配列を、ステム - ループ接合部におけるコンセンサヌクレオチド配列に従って 5 つの異なるファミリーに分類した。ファミリー 1 のメンバーは、GG クローニング塩基対、ファミリー 2 は AG、ファミリー 3 は GU 又は UG、ファミリー 4 及びファミリー 5 は、それぞれ選択の第一又は第二のラウンドの全ての他の配列を得た。

【 0 1 2 4 】

インビトロ選択 I I b

これらの候補の増幅を、5' 末端にポリ - T テールを含有する新たなプライマー P 20 を用いて実施した。それで、PCR 産物をポリ - A テールド RNA 候補にインビトロ転写した。ビオチニル化相補的ポリ - T オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションによって、ポリ - A 候補をストレプトアビジンビーズ上に固定化した。これらの候補に対して、D ライブラリーを用いて、ファミリー 1、2、3、4 については 50 nM での、ファミリー 5 については 5 nM での選択の新たなラウンドを実施して、N C C N Y N 候補の N R N G G N パートナーを同定した。D ライブラリーのプライマーは、ライブラリー A と比較して変化していた。この変化は、公知の候補 C ではなく候補 D だけを増幅することが可能であるので重要であった。選択プロトコールは、ポリ - T - ビオチニル化プライマー単独とストレプトアビジンビーズ上の RNA ポリ - A オリゴヌクレオチドとハイブリダイズしたポリ - T - ビオチニル化プライマーの混合物に対して対抗選択を行った以外は、A ライブラリーを用いた選択 I I a の第一ラウンドと同じであった。

【 0 1 2 5 】

電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA)

電気泳動移動度シフトアッセイを使用してループ - ループ RNA 複合体の解離定数 (K_d) を決定した。一般に、0.1 又は 1 nM の 32 P で 5' 末端標識したヘアピンを、R 緩衝液 10 μ l 中、増加濃度のパートナーと 23 で 20 分間インキュベートした。結合反応物を、4 で平衡化した非変性天然ゲル [50 mM Tris - アセタート (pH 7.3、20)] 及び 3 mM 酢酸マグネシウム中の 12 % (wt/v) 19 : 1 アクリルアミド / ビス (アクリルアミド)] 上にロードし、120 V (6 V/cm) で一晩電気泳動した。Instant Imager analysis (Hewlett-Packard) によって複合体を定量化した。式： $B = (B_{max}) ([L]_0) / ([L]_0 + K_d)$ (式中、B は、複合体の割合であり、 B_{max} は、形成さ

10

20

30

40

50

れた複合体の最大値であり、そして [L] 0 は、未標識リガンドの合計である) に従って、Kaleidagraph 3.0 (Abelbeck software) を用いたデータポイント適合から K d 値を推定した。

【 0 1 2 6 】

R N A 複合体の熱変性

R N A ヘアピン及び複合体を、140 mM 塩化カリウム、20 mM 塩化ナトリウム及び 0.3 M または 10 mM 塩化マグネシウムを含有する 20 mM カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.3、20) 中に調製した。R N A サンプルを 1 μM の最終濃度で調製した。サンプルを 90 秒で 1 分間及び 30 秒間変性し、氷上に 10 分間置いた。室温で 10 分間のインキュベーション後、R N A 配列を混合し、30 分間インキュベートした。0.4 / 分で 4 から 90 に昇温させることによってサンプルの変性を達成し、260 nm で追跡した。± 0.1 以内で温度を制御するペルティエ効果素子 (Peltier effect device) と適合する Cary 1 分光光度計で熱変性をモニタリングした。

10

【 0 1 2 7 】

表面プラズモン共鳴反応速度測定

BIAcore 2.1 ソフトウェアで実行する BIAcore 2000 又は 3000 装置 (Biacore AB, Sweden) で S P R 実験を実施した。ビオチニル化ヘアピン R N A (150 ~ 1000 R U) を、B I A アプリケーションハンドブックに記載されている手順に従って、R 選択緩衝液中の S A センサーチップ上に、5 μl / 分の流速で、50 nM で固定化した。1 つのストレプトアビジンコートフローセルを使用して、R N A ヘアピンの非特異的結合をチェックした。これらの制御チャンネルからのシグナルはベースラインとして役立ち、複合体が形成されたときに観察された R U 変化を減算した。3 mM E D T A の 1 回の 20 μl パルス、続く、蒸留水の 1 回の 20 μl パルス、最後に R 緩衝液の 1 回の 20 μl パルスでセンサーチップ (sensorship) 表面の再生に成功した。23 で 5 種の濃度 (少なくとも) の注入 R N A による単一のセンサーグラムの非線形回帰分析を使用して、複合体形成の動態パラメーターを決定した。BIA evaluation 2.2.4 ソフトウェアで、それぞれ会合段階及び解離段階について方程式 1 - 2 に従ってデータを解析し、擬一次モデルを推測した。式中、R は、シグナル応答であり、R m a x は最大応答レベルであり、C は注入した R N A 分子のモル濃度であり、k o n は会合速度定数であり、そして k o f f は解離速度定数である。

20

【 0 1 2 8 】

結果：

S E L E X I

キッシング複合体は、ループを介して互いに相互作用する R N A ステムループによって形成される。これらの複合体は、プラスミドの D N A 複製の制御又はウイルスのゲノム R N A の二量化などの多くの生物プロセスに参与する。さらに、R N A ヘアピンは、インビトロ 選択によってターゲット化されており、R N A ヘアピンアダプターは同定されている。相互作用するループがキッシング複合体を生成したことが示された。これらのループ - ループ相互作用の研究は十分に実証されてはいるが、それらの形成、特異性及び安定性を導き得るいくつかの規則があるかを調査するために、本発明者等は、キッシングする能力について R N A ヘアピンの インビトロ 選択を実施した。

40

【 0 1 2 9 】

選択 I に使用される R N A ランダムライブラリーは、不変プライマーアニーリング部位によってランキングされた 10 又は 11 個のランダムヌクレオチドを含有した。

【 0 1 3 0 】

高い親和性のいくつかのループ - ループ複合体が同定されている。 インビトロ 選択結果の配列解析によって、本発明者等は、ループの相互作用によって形成された二重螺旋中の新しい R N A モチーフを特徴付けた。これらの仕事は、ループを介して高い親和性で相互作用してキッシング複合体を形成することができる R N A ヘアピンの一覧を得ることを可能にした。

【 0 1 3 1 】

50

RNA集団を電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) によって分離した。サンプルを、50 mM Tris - アセタート (pH 7.3、20) 及び3 mM 酢酸マグネシウム (TAC 緩衝液) 中の天然ゲル (15% [w/v]、75:1 アクリルアミド:ビス - アクリルアミド) 上に100 V 及び4 で15時間流した。Instant Imager (Packard Instrument) によってバンドを可視化及び定量化した。RNAがシフトした複合体に相当するバンドをゲルから抽出し、溶離緩衝液 (10 mM Tris - HCl、pH 7.4、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 及び25 mM NaCl) 600 µl 中、4 で16時間溶離し、次いで、エタノール沈殿した。

【0132】

抽出したRNAヘアピンを95 で40秒間変性し、氷上に2分間置いた。次いで、5 ユニットのEZrTth (Perkin elmer) ポリメラーゼを使用し、製造業者のプロトコールに従って63 で30分間かけてRNA プールをcDNAにコピーした。300 µMのdNTP、25 mMのMnOAc 及び2 µMの各プライマーの他にEZrTth 緩衝液を含有する同じチューブで候補を増幅した。次いで、反応混合物を94 に2分間変性させ、繰り返しサイクルに供した: 94 で1分間、63 で1分間を40サイクル及び63 で7分間を最終1サイクル。PCR産物の沈殿後、ICN Pharmaceutical社の[32 - P]UTP (10 mCi/mL) (4500 Ci/mmol) を含むTEBU社のAmpliscribe T7高収率転写キットを用いたインビトロ転写によって、RNAヘアピンを得た。転写産物を20%変性ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動によって精製し、次いで、次の選択サイクルに使用した。4サイクルの後、Invitrogen社のTOPO TAクローニングキットを使用して、選択した配列をクローニングし、Perkin-Elmer社のdRhodamine Terminator Cycle配列決定キットを使用することによって製造業者の説明に従って配列決定した。

10

20

【0133】

110個のRNA候補を解析した。コンセンサス配列及び相補的配列を調査した。例えば: 配列を71個のファミリーに分類し、各ファミリーは、4つの隣接塩基対合を介して1つの推定相補的配列にマッチすることができる少なくとも3つの配列を含有する:

【0134】

ループの配列と少なくとも3つのパートナー及びアラインメント:

【表 6】

K1 -> K11:K14:K15:K1:K28:K34:K39:K51:K52:K53:K59:K61:K73:K75:K85:		
K1	ATGTGCGCCAA	
K11	TGGACGCCTTC	
K14	AGGCGCGCAATG	
K15	CNGGTGGTTA	
K28	TCTTCGCGTT	
K34	TACAGGAATA	10
K39	ACGGGGTTCT	
K51	TGGTTTTTACG	
K52	AAGGCGGAG	
K53	TACACGGTCT	
K59	GATTCGGTGT	
K61	TGTCCCGCGTT	
K73	AGGTTAGCGA	
K75	TTTGGTTTCT	20
K85	ACACTG	
K10 -> K13:K25:K29:K37:K4:K60bis:K61:K74:K86:K94:		
K10	ACAGCTCAGAA	
K13	TGAGTCGCA	
K25	GCCTGTCTAA	
K29	AGTCTGAATG	
K37	TGTCCGCTGT	
K4	TAGTGAGTTTT	30
K60bis	TGTCATCTCCc	
K61	TGTCCCGCGTT	
K74	TCCGGAGTTT	
K86	TTTGTCCCTC	
K94	GTCGTTCTCG	
K11 -> K14:K17:K1:K30:K37:K44:K52:K61:K78:K82:K86:K87:K98:		
K11	CTTCCGCAGGT	
K14	AGGCGCGCAATG	40
K17	ACGTCCCCT	
K1	AACCGCGTGTA	
K30	GTCCGGGTTA	
K37	TGTCCGCTGT	
K44	ACAGGGCGTCT	
K52	AAGGCGGAG	
K61	TGTCCCGCGTT	

K78 ATCGGCGTTT
 K82 GGAAGGTGAG
 K86 TTTGTCCTTC
 K87 ATCGGCGTTT
 K98 TCCATGCGCA
 K13 -> K10:K18:K24:K35:K36:K50:K73:K96:K98:
 K13 ACGCTGAGT
 K10 AAGACTCGACA 10
 K18 TCCTGCGCA
 K24 TGCGCCGATC
 K35 GCGAAATG
 K36 ATTACTTGCG
 K50 GACTTCCGCA
 K73 AGGTTAGCGA
 K96 CGACGTGACA
 K98 TCCATGCGCA 20
 K14 -> K11:K14:K18:K21:K24:K2:K32:K61:K70:K97:K98:
 K14 GTAACGCGCGGA
 K11 TGGACGCCTTC
 K18 TCCTGCGCA
 K21 GCCTCCCCTTT
 K24 TGCGCCGATC
 K2 GCGCCAGTAG
 K32 TGCCTCCGTT 30
 K61 TGTCCCGCGTT
 K70 CTAGGAGCCTGG
 K97 TTGCAGTGGG
 K98 TCCATGCGCA
 K15 -> K1:K76:K89:
 K15 ATTGGTGGNC
 K1 AACCGCGTGTA
 K76 GTCACCTGTTA
 K89 AGTATTAACG 40
 K16 -> K24:K30:K36:K39:K52:K63:K90:K98:
 K16 GTAACGCCCA
 K24 TGCGCCGATC
 K30 GTCCGGGTTA
 K36 ATTACTTGCG
 K39 ACGGGGTTCT
 K52 AAGCGGAG

K63 ATGATGGGTG
 K90 TGGGTGGTAAT
 K98 TCCATGCGCA

K17 -> K11:K17:K20:K38:K39:K8:K96:

K17 TCCCCTGCA
 K11 TGGACGCCTTC
 K20 TGGGATGGGTG
 K38 TCACTTGACG
 K39 ACGGGGTTCT
 K8 AGGGGGGATAG
 K96 CGACGTGACA

10

K18 -> K14:K16:K18:K24:K2:K34:K36:K41:K44:K50:K58:K5:K70:K97:K98:

K18 ACGCGTCCT
 K14 AGGCGCGCAATG
 K16 ACCCGCAATG
 K24 TCGCCCGATC
 K2 GCGCCAGTAG
 K34 TACAGGAATA
 K36 ATTACTTGCG
 K41 TCGGCAGGTAT
 K44 ACAGGGCGTCT
 K50 GACTTCCGCA
 K58 AGGTGGAGGA
 K5 TCGCACCTCA
 K70 CTAGGAGCCTGG
 K97 TTGCAGTGGG
 K98 TCCATGCGCA

20

30

K2 -> K14:K18:K24:K2:K36:K45:K52:K78:K87:K98:

K2 GATGACCGCG
 K14 AGGCGCGCAATG
 K18 TCCTGCGCA
 K24 TCGCCCGATC
 K36 ATTACTTGCG
 K45 GAGCTGGTGTT
 K52 AAGGCGGAG
 K78 ATCGGCGTTT
 K87 ATCGGCGTTT
 K98 TCCATGCGCA

40

K20 -> K16:K17:K5:K60bis:K61:K76:K98:

K20 GTGGGTAGGGT

K5	TCGCACCCTCA	
K76	GTCACCTGTTA	
K80	TAGTGCCGTA	
K91	GGGCATGTTA	
K98	TCCATGCGCA	
K28 -> K11:K14:K1:K28:K35:K61:K89:		
K28	TTGCGCTTCT	
K11	TGGACGCCTTC	10
K14	AGGCGCGCAATG	
K1	AACCGCGTGTA	
K35	GCGAAATG	
K61	TGTCCCGCGTT	
K89	AGTATTAACG	
K29 -> K10:K50:K59:K77:		
K29	GTAAGTCTGA	
K10	AAGACTCGACA	20
K50	GACTTCCGCA	
K59	GATTCGGTGT	
K77	ACGGCCAGA	
K30 -> K11:K16:K1:K30:K52:K61:K74:K89:		
K30	ATTGGGCCTG	
K11	TGGACGCCTTC	
K16	ACCCGCAATG	
K1	AACCGCGTGTA	30
K52	AAGGCGGAG	
K61	TGTCCCGCGTT	
K74	TCCGGAGTTT	
K89	AGTATTAACG	
K32 -> K14:K27:K39:K52:K53:K58:K74:K77:K89:K91:K92bis:K9:		
K32	TTGCCTCCGT	
K14	AGGCGCGCAATG	
K27	AGGTGGCATG	
K39	ACGGGGTTCT	40
K52	AAGGCGGAG	
K53	TACACGGTCT	
K58	AGGTGGAGGA	
K74	TCCGGAGTTT	
K77	ACGGCCAGA	
K89	AGTATTAACG	
K91	GGGCATGTTA	

K92bis ACGGCTG
 K9 TGGCAACAGG
 K34 -> K18:K25:K55:K76:K86:K89:
 K34 ATAAGGACAT
 K18 TCCTGCGCA
 K25 GCCTGTCTAA
 K55 GTTTTGTAAG
 K76 GTCACCTGTTA
 K86 TTTGTCCCTC
 K89 AGTATTAACG
 K35 -> K13:K28:K42:K59:K5:K75:K88:K95:
 K35 GTAAAGCG
 K13 TGAGTCGCA
 K28 TCTTCGCGTT
 K42 TTTATCGCTTTT
 K59 GATTCGGTGT
 K5 TCGCACCCTCA
 K75 TTTGGTTTCT
 K88 AGATTTGATAG
 K95 TCTCTCCTTTC
 K36 -> K13:K14:K16:K18:K2:K50:K5:K89:K98:K9:
 K36 GCGTTCATTA
 K13 TGAGTCGCA
 K14 AGGCGCGCAATG
 K16 ACCCGCAATG
 K18 TCCTGCGCA
 K2 GCGCCAGTAG
 K50 GACTTCCGCA
 K5 TCGCACCCTCA
 K89 AGTATTAACG
 K98 TCCATGCGCA
 K9 TGGCAACAGG
 K37 -> K10:K11:K34:K44:K52:K73:K74:K9:
 K37 TGTCGCCTGT
 K10 AAGACTCGACA
 K11 TGGACGCCTTC
 K34 TACAGGAATA
 K44 ACAGGGCGTCT
 K52 AAGCGGAG
 K73 AGGTTAGCGA

10

20

30

40

K25 GCCTGTCTAA

K70 CTAGGAGCCTGG

K76 GTCACCTGTTA

K42 -> K35:K73:K88:K8:

K42 TTTTCGCTATTT

K35 GCGAAATG

K73 AGGTTAGCGA

K88 AGATTTGATAG

K8 AGGGGGGATAG

10

K44 -> K10:K11:K18:K24:K25:K2:K38:K5:K76:

K44 TCTGCGGGACA

K10 AAGACTCGACA

K11 TGGACGCCTTC

K18 TCCTGCGCA

K24 TGCGCCGATC

K25 GCCTGTCTAA

K2 GCGCCAGTAG

K38 TCACTTGACG

K5 TCGCACCTCA

K76 GTCACCTGTTA

20

K45 -> K2:K40:K53:K5:K6:K76:K77:K85:

K45 TTGTGGTCGAG

K2 GCGCCAGTAG

K40 GCTCTGAACA

K53 TACACGGTCT

K5 TCGCACCTCA

K6 AGCTTAATGT

K76 GTCACCTGTTA

K77 ACGGCCAGA

K85 ACACTG

30

K5 -> K13:K24:K35:K39:K45:K4:K64:K73:K80:K82:K8:K90:K99:

K5 ACTCCCACGCT

K13 TGAGTCGCA

K24 TGCGCCGATC

K35 GCGAAATG

K39 ACGGGTTCT

K45 GAGCTGGTGTT

K4 TAGTGAGTTTT

K64 GGGGTGAGAG

K73 AGGTTAGCGA

40

K80 TAGTGCCGTA
 K82 GGAAGGTGAG
 K8 AGGGGGGATAG
 K90 TGGGTGGTAAT
 K99 GATGGTGCTA
 K50 -> K13:K18:K24:K29:K36:K52:K74:K82:K98:
 K50 ACGCCTTCAG
 K13 TGAGTCGCA 10
 K18 TCCTGCGCA
 K24 TGCGCCGATC
 K29 AGTCTGAATG
 K36 ATTACTTGCG
 K52 AAGGCGGAG
 K74 TCCGGAGTTT
 K82 GGAAGGTGAG
 K98 TCCATGCGCA 20
 K51 -> K1:K55:K80:
 K51 GCATTTTTGGT
 K1 AACCGCGTGTA
 K55 GTTTTGTAAG
 K80 TAGTGCCGTA
 K52 -> K11:K16:K1:K21:K24:K25:K2:K30:K32:K37:K50:K60bis:K61:K74:
 K52 GAGGCGGAA
 K11 TGGACGCCTTC 30
 K16 ACCCGCAATG
 K1 AACCGCGTGTA
 K21 GCCTCCCCTTT
 K24 TGCGCCGATC
 K25 GCCTGTCTAA
 K2 GCGCCAGTAG
 K30 GTCCGGGTTA
 K32 TGCCTCCGTT
 K37 TGTCCGCTGT 40
 K50 GACTTCCGCA
 K60bis TGTCATCTCCc
 K61 TGTCCCGCGTT
 K74 TCCGGAGTTT
 K53 -> K10:K1:K45:K55:K56:K59:K79:K80:K96:
 K53 TCTGGCACAT
 K10 AAGACTCGACA

K1	AACCGCGTGTA	
K45	GAGCTGGTGTT	
K55	GTTTTGTAAG	
K56	TGTGTTTGCT	
K59	GATTCGGTGT	
K79	ATGTGTTTTG	
K80	TAGTGCCGTA	
K96	CGACGTGACA	10
K55 -> K34:K51:K53:K6:K71:		
K55	GAATGTTTTG	
K34	TACAGGAATA	
K51	TGGTTTTTACG	
K53	TACACGGTCT	
K6	AGCTTAATGT	
K71	GGCTTCTTAT	
K56 -> K16:K53:K85:K9:		
K56	TCGTTTGTGT	20
K16	ACCCGCAATG	
K53	TACACGGTCT	
K85	ACACTG	
K9	TGGCAACAGG	
K58 -> K18:K21:K32:K60bis:K76:K86:K98:		
K58	AGGAGGTGGA	
K18	TCCTGCGCA	30
K21	GCCTCCCCTTT	
K32	TGCCTCCGTT	
K60bis	TGTCATCTCCc	
K76	GTCACCTGTTA	
K86	TTTGTCTTC	
K98	TCCATGCGCA	
K59 -> K1:K24:K29:K35:K53:K5:K76:K85:		
K59	TGTGGCTTAG	40
K1	AACCGCGTGTA	
K24	TGCGCCGATC	
K29	AGTCTGAATG	
K35	GCGAAATG	
K53	TACACGGTCT	
K5	TCGCACCCTCA	
K76	GTCACCTGTTA	
K85	ACACTG	

K6 -> K36:K45:K6:K89:

K6 TGTAATTCGA
 K36 ATTACTTGCG
 K45 GAGCTGGTGTT
 K89 AGTATTAACG

K60bis -> K20:K70:K74:K96:K99:

K60bis cCCTCTACTGT
 K20 TGGGATGGGTG
 K70 CTAGGAGCCTGG
 K74 TCCGGAGTTT
 K96 CGACGTGACA
 K99 GATGGTGCTA

10

K61 -> K11:K14:K1:K20:K28:K30:K52:K61:K89:K8:

K61 TTGCGCCCTGT
 K11 TGGACGCCTTC
 K14 AGGCGCGCAATG
 K1 AACCGCGTGTA
 K20 TGGGATGGGTG
 K28 TCTTCGCGTT
 K30 GTCCGGGTTA
 K52 AAGCGGAG
 K89 AGTATTAACG
 K8 AGGGGGGATAG

20

K63 -> K16:K5:K76:K98:

K63 GTGGGTAGTA
 K16 ACCCGCAATG
 K5 TCGCACCCTCA
 K76 GTCACCTGTTA
 K98 TCCATGCGCA

30

K64 -> K16:K38:K40:K5:K76:K94:K95:

K64 GAGAGTGGGG
 K16 ACCCGCAATG
 K38 TCACTTGACG
 K40 GCTCTGAACA
 K5 TCGCACCCTCA
 K76 GTCACCTGTTA
 K94 GTCGTTCTCG
 K95 TCTCTCCTTTC

40

K70 -> K14:K18:K21:K2:K32:K34:K40:K41:K52:K71:K77:K92bis:K95:

K70 GGTCCGAGGATC

K14 AGGCGCGCAATG
 K18 TCCTGCGCA
 K21 GCCTCCCCTTT
 K2 GCGCCAGTAG
 K32 TGCCTCCGTT
 K34 TACAGGAATA
 K40 GCTCTGAACA
 K41 TCGGCAGGTAT
 K52 AAGGCGGAG
 K71 GGCTTCTTAT
 K77 ACGGCCAGA
 K92bis ACGGCTG
 K95 TCTCTCCTTTC

10

K71 -> K10:K55:K70:K82:

K71 TATTCTTCGG
 K10 AAGACTCGACA
 K55 GTTTTGTAAG
 K70 CTAGGAGCCTGG
 K82 GGAAGGTGAG

20

K73 -> K13:K1:K28:K37:K42:K5:K76:K89:K99:

K73 AGCGATTGGA
 K13 TGAGTCGCA
 K1 AACCGCGTGTA
 K28 TCTTCGCGTT
 K37 TGTCCGCTGT
 K42 TTTATCGCTTTT
 K5 TCGCACCTCA
 K76 GTCACCTGTTA
 K89 AGTATTAACG
 K99 GATGGTGCTA

30

K74 -> K10:K21:K30:K32:K50:K52:K60bis:K74:

K74 TTTGAGGCCT
 K10 AAGACTCGACA
 K21 GCCTCCCCTTT
 K30 GTCCGGGTTA
 K32 TGCCTCCGTT
 K50 GACTTCCGCA
 K52 AAGGCGGAG
 K60bis TGTCATCTCCc

40

K76

K15:K20:K27:K34:K38:K3:K40:K41:K44:K45:K58:K59:K63:K64:K73:K82:K89:K90:K96:K99:K9:

K76	ATTGTCCACTG	
K15	CNGGTGGTTA	
K20	TGGGATGGGTG	
K27	AGGTGGCATG	
K34	TACAGGAATA	
K38	TCACTTGACG	10
K3	TAGGTA	
K40	GCTCTGAACA	
K41	TCGGCAGGTAT	
K44	ACAGGGCGTCT	
K45	GAGCTGGTGTT	
K58	AGGTGGAGGA	
K59	GATTCGGTGT	
K63	ATGATGGGTG	20
K64	GGGGTGAGAG	
K73	AGGTTAGCGA	
K82	GGAAGGTGAG	
K89	AGTATTAACG	
K90	TGGGTGGTAAT	
K96	CGACGTGACA	
K99	GATGGTGCTA	
K9	TGGCAACAGG	30

K77 -> K24:K29:K40:K45:K70:K77:K80:K9:

K77	AGACCGGCA	
K24	TGCGCCGATC	
K29	AGTCTGAATG	
K40	GCTCTGAACA	
K45	GAGCTGGTGTT	
K70	CTAGGAGCCTGG	
K80	TAGTGCCGTA	
K9	TGGCAACAGG	40

K78 -> K11:K24:K2:K80:K89:

K78	TTTGCGGCTA	
K11	TGGACGCCTTC	
K24	TGCGCCGATC	
K2	GCGCCAGTAG	
K80	TAGTGCCGTA	
K89	AGTATTAACG	

K79 -> K40:K53:K85:

K79 GTTTTGTGTA
 K40 GCTCTGAACA
 K53 TACACGGTCT
 K85 ACACTG

K8 -> K17:K21:K42:K61:

K8 GATAGGGGGGA
 K17 ACGTCCCCT
 K21 GCCTCCCCTTT
 K42 TTTATCGCTTTT
 K61 TGTCCCGCGTT

10

K80 -> K27:K38:K39:K41:K51:K53:K5:K77:K78:K85:K87:K91:K92bis:K9:

K80 ATGCCGTGAT
 K27 AGGTGGCATG
 K38 TCACTTGACG
 K39 ACGGGGTTCT
 K41 TCGGCAGGTAT
 K51 TGGTTTTTACG
 K53 TACACGGTCT
 K5 TCGCACCCCTCA
 K77 ACGGCCAGA
 K78 ATCGGCGTTT
 K85 ACACTG
 K87 ATCGGCGTTT
 K91 GGGCATGTTA
 K92bis ACGGCTG
 K9 TGGCAACAGG

20

30

K82 -> K11:K21:K38:K50:K5:K71:K76:K86:K95:

K82 GAGTGGAAGG
 K11 TGGACGCCTTC
 K21 GCCTCCCCTTT
 K38 TCACTTGACG
 K50 GACTTCCGCA
 K5 TCGCACCCCTCA
 K71 GGCTTCTTAT
 K76 GTCACCTGTTA
 K86 TTTGTCCTTC
 K95 TCTCTCCTTTC

40

K85 -> K2:K45:K4:K56:K59:K79:K80:K97:

K85 GTCACA

K2 GCGCCAGTAG
 K45 GAGCTGGTGT
 K4 TAGTGAGTTTT
 K56 TGTGTTTGCT
 K59 GATTCGGTGT
 K79 ATGTGTTTTG
 K80 TAGTGCCGTA
 K97 TTGCAGTGGG 10

K86 -> K11:K58:K82:

K86 CTCCTGTTT
 K11 TGGACGCCTTC
 K58 AGGTGGAGGA
 K82 GGAAGGTGAG

K87 -> K11:K24:K2:K80:K89:

K87 TTTGCGGCTA
 K11 TGGACGCCTTC 20
 K24 TGCCTCCGTT
 K2 GCGCCAGTAG
 K80 TAGTGCCGTA
 K89 AGTATTAACG

K89 -> K15:K28:K32:K36:K61:K6:K73:K76:K78:K87:K90:K91:K94:

K89 GCAATTATGA
 K15 CNGGTGGTTA
 K28 TCTTCGCGTT 30
 K32 TGCCTCCGTT
 K36 ATTACTTGCG
 K61 TGTCCCGCGTT
 K6 AGCTTAATGT
 K73 AGGTTAGCGA
 K76 GTCACCTGTTA
 K78 ATCGGCGTTT
 K87 ATCGGCGTTT
 K90 TGGGTGGTAAT 40
 K91 GGGCATGTTA
 K94 GTCGTTCTCG

K9 -> K18:K25:K32:K56:K76:K79:K80:K91:K97:

K9 GGACAACGGT
 K18 TCCTGCGCA
 K25 GCCTGTCTAA
 K32 TGCCTCCGTT

K56 TGTGTTTGCT
 K76 GTCACCTGTTA
 K79 ATGTGTTTTG
 K80 TAGTGCCGTA
 K91 GGGCATGTTA
 K97 TTGCAGTGGG
 K90 -> K16:K36:K5:K76:K89:
 K90 TAATGGTGGGT 10
 K16 ACCCGCAATG
 K36 ATTACTTGCG
 K5 TCGCACCTCA
 K76 GTCACCTGTTA
 K89 AGTATTAACG
 K91 -> K27:K32:K89:K91:K98:
 K91 ATTGTACGGG
 K27 AGGTGGCATG
 K32 TGCCTCCGTT 20
 K89 AGTATTAACG
 K98 TCCATGCGCA
 K92bis -> K24:K32:K70:K80:
 K92bis GTCGGCA
 K24 TGCGCCGATC
 K32 TGCCTCCGTT
 K70 CTAGGAGCCTGG
 K80 TAGTGCCGTA 30
 K94 -> K40:K64:K96:
 K94 GCTCTTGCTG
 K40 GCTCTGAACA
 K64 GGGGTGAGAG
 K96 CGACGTGACA
 K95 -> K34:K35:K64:K70:K82:
 K95 CTTTCCTCTCT
 K34 TACAGGAATA 40
 K35 GCGAAATG
 K64 GGGGTGAGAG
 K70 CTAGGAGCCTGG
 K82 GGAAGGTGAG
 K96 -> K13:K17:K25:K37:K38:K53:K60bis:K61:K76:K86:K94:
 K96 ACAGTGCAGC
 K13 TGAGTCGCA

K17	ACGTCCCCT	
K25	GCCTGTCTAA	
K37	TGTCCGCTGT	
K38	TCACTTGACG	
K53	TACACGGTCT	
K60bis	TGTCATCTCCc	
K61	TGTCCCGCGTT	
K76	GTCACCTGTTA	10
K86	TTTGTCCTTC	
K94	GTCGTTCTCG	
K97 -> K38:K85:K97:K9:		
K97	GGGTGACGTT	
K38	TCACTTGACG	
K85	ACACTG	
K9	TGGCAACAGG	
K98 -> K11:K13:K14:K16:K18:K24:K27:K2:K36:K50:K5:K91:K98:		
K98	ACGCGTACCT	20
K11	TGGACGCCTTC	
K13	TGAGTCGCA	
K14	AGGCGCGCAATG	
K16	ACCCGCAATG	
K18	TCCTGCGCA	
K24	TGCGCCGATC	
K27	AGGTGGCATG	30
K2	GCGCCAGTAG	
K36	ATTACTTGCG	
K50	GACTTCCGCA	
K5	TCGCACCCTCA	
K91	GGGCATGTTA	
K99 -> K5:K60bis:K73:K76:K98:		
K99	ATCGTGGTAG	
K5	TCGCACCCTCA	40
K60bis	TGTCATCTCCc	
K73	AGGTTAGCGA	
K76	GTCACCTGTTA	
K98	TCCATGCGCA	

【 0 1 3 5 】

相補性について最良のスコアを示すループ配列を本明細書以下に提示する：

【 0 1 3 6 】

各配列についての最良のスコア

【表 7】

配列番号	スコア	結果	アラインメント	配列番号	
K1	20.0	ATGTGCGCCAA	K1 . ACGGGGTTCT	K39	
K10	17.0	ACAGCTCAGAA	K10 : TGAGTCGCA	K13	10
K10	17.0	ACAGCTCAGAA	K10 : TAGTGAGTTTT	K4	
K11	26.0	CTTCCGCAGGT	K11 : : ACAGGGCGTCT	K44	20
K13	17.0	ACGCTGAGT	K13 : AAGACTCGACA	K10	
K14	24.0	GTAACGCGCGGA	K14 AGGCGCGCAATG	K14	30
K15	18.0	ATTGGTGGNC	K15 :: GTCACCTGTTA	K76	
K16	18.0	GTAACGCCCA	K16 GTCCGGGTTA	K30	40
K17	20.0	TCCCCTGCA	K17 : : AGGGGGGATAG	K8	

K18 20.0 ACGCGTCCT K18
 | | | | |
 TCCTGCGCA K18

K18 20.0 ACGCGTCCT K18
 | | | | . |
 TGCGCCGATC K24

K18 20.0 ACGCGTCCT K18
 | | | | |
 TCCATGCGCA K98

K2 21.0 GATGACCGCGK2
 : | | | . | | |
 ATTACTTGCG K36

K20 19.0 GTGGGTAGGGT K20
 | : | | | |
 ACGTCCCCT K17

K20 19.0 GTGGGTAGGGT K20
 | : | | . | | |
 TGCGCCGATC K24

K20 19.0 GTGGGTAGGGT K20
 | | | | : : | :
 GTCACCTGTTAK76

K21 23.0 TTTCCCCTCCGK21
 | : | . | | | | |
 AGGTGGAGGAK58

K21 23.0 TTTCCCCTCCGK21
 | | | | | : |
 AGGGGGGATAG K8

K24 25.0 CTAGCCGCGT K24
 | | | | | | :
 ATCGGCGTTT K78

10

20

30

40

K24	25.0	CTAGCCGCGT	K24		
		:			
		ATCGGCGTTT	K87		
K25	20.0	AATCTGTCCG	K25		
		. : :			
		TCGGCAGGTAT	K41		
					10
K27	21.0	GTACGGTGGA	K27		
		:			
		GTCACCTGTTA	K76		
K28	21.0	TTGCGCTTCT	K28		
		. :			
		AAGGCGGAG	K52		
					20
K29	15.0	GTAAGTCTGA	K29		
		:			
		GATTCGGTGT	K59		
K3	13.0	ATGGAT	K3		
		:			
		TGCCTCCGTT	K32		
					30
K3	13.0	ATGGAT	K3		
		:			
		GTCACCTGTTA	K76		
K30	20.0	ATTGGGCCTG	K30		
		:: ::			
		GTCCGGGTTA	K30		
					40
K30	20.0	ATTGGGCCTG	K30		
		: :			
		CTAGGAGCCTGG	K70		
K32	21.0	TTGCCTCCGT	K32		
		:::			
		AGGTGGAGGA	K58		

K34 16.0 ATAAGGACAT K34
 |||||
 TCCTGCGCA K18

K34 16.0 ATAAGGACAT K34
 |||||
 GCCTGTCTAA K25

K35 14.0 GTAAAGCG K35
 |||||
 TGAGTCGCA K13

K35 14.0 GTAAAGCG K35
 |||||
 TCTTCGCGTT K28

K35 14.0 GTAAAGCG K35
 |||||
 TTTATCGCTTTT K42

K35 14.0 GTAAAGCG K35
 |||||
 TCGCACCTCA K5

K36 21.0 GCGTTCATTAK36
 |||.||||:
 GCGCCAGTAG K2

K37 21.0 TGTCGCCTGT K37
 :|||:|:
 TTGCAGTGGG K97

K38 19.0 GCAGTTCACTK38
 ||.||:|
 TCGGCAGGTATK41

K39 20.0 TCTTGGGGCA K39
 ||||.|||
 AACCGCGTGTA K1

10

20

30

40

K39 20.0 TCTTGGGGCA K39
 ||:|.||:|
 CTAGGAGCCTGG K70

K4 18.0 TTTTGAGTGAT K4
 ||:||||:
 AAGACTCGACAK10

K40 19.0 ACAAGTCTCG K40
 |||:||
 ACAGGGCGTCT K44

K41 20.0 TATGGACGGCT K41
 :||||:|
 GCCTGTCTAA K25

K42 18.0 TTTTCGCTATTT K42
 ||:||||:
 AAGGCGGAG K52

K42 18.0 TTTTCGCTATTT K42
 |::|.||||:
 AGGGGGGATAG K8

K44 26.0 TCTGCGGGACA K44
 :||||||:|
 TGGACGCCTTC K11

K45 21.0 TTGTGGTCGAG K45
 :|:||||:
 GCGCCAGTAG K2

K5 23.0 ACTCCCACGCT K5
 :|||||.||
 GGGGTGAGAG K64

K50 20.0 ACGCCTTCAG K50
 |:||||:|
 AGGTGGAGGA K58

10

20

30

40

K51 17.0 GCATTTTTGGT K51
 ||::|:|
 CTAGGAGCCTGG K70

K52 21.0 GAGGCGGAA K52
 ||||. |:|
 GCCTCCCCTTT K21

K52 21.0 GAGGCGGAA K52
 ||: |||. |
 TCTTCGCGTT K28

K53 19.0 TCTGGCACAT K53
 ||||. |:
 AACCGCGTGTA K1

K55 15.0 GAATGTTTTG K55
 |||:::|
 ACAGGGCGTCT K44

K56 17.0 TCGTTTGTGT K56
 : |||:::|:
 TCGGCAGGTAT K41

K58 23.0 AGGAGGTGGA K58
 |||||. |:|
 GCCTCCCCTTT K21

K59 20.0 TGTGGCTTAG K59
 : |: ||||
 TGCGCCGATC K24

K6 13.0 TGTAATTCGA K6
 : ||||
 GAGCTGGTGTT K45

K6 13.0 TGTAATTCGA K6
 :|. |: ||:|
 TAGTGAGTTTT K4

10

20

30

40

K6 13.0 TGTAATTCGA K6
 :||.:||
 TTGCAGTGGG K97

K60bis 21.0 cCCTCTACTGTK60bis
 ||.||:||||
 GGAAGGTGAG K82

K60bis 21.0 cCCTCTACTGT K60bis
 |||:||||
 AGGGGGGATAG K8

10

K61 19.0 TTGCGCCCTGT K61
 |.|.||||:|
 AGGGGGGATAG K8

K63 21.0 GTGGGTAGTA K63
 ||||:|:|
 GTCACCTGTTAK76

20

K64 23.0 GAGAGTGGGG K64
 ||.|||||:
 TCGCACCTCA K5

K70 26.0 GGTCCGAGGATC K70
 |:|..|||:|
 CTAGGAGCCTGG K70

30

K71 19.0 TATTCTTCGG K71
 |:||||
 CTAGGAGCCTGG K70

K73 18.0 AGCGATTGGAK73
 |||.||:|
 TCGCCGATC K24

40

K74 20.0 TTTGAGGCCT K74
 |||||
 TCCGGAGTTT K74

K75 18.0 TCTTTGGTTT K75
 ||:|:|
 CTAGGAGCCTGG K70

K76 21.0 ATTGTCCACTG K76
 ||||:|
 AGGTGGCATG K27

K76 21.0 ATTGTCCACTG K76
 |:|:|
 ATGATGGGTG K63

K77 18.0 AGACCGGCA K77
 |.|.|
 ACAGGGCGTCT K44

K77 18.0 AGACCGGCA K77
 ||||
 TAGTGCCGTA K80

K78 24.0 TTTGCGGCTA K78
 |||||
 TGCGCCGATC K24

K79 15.0 GTTTTGTGTAK79
 ||:|:|:|
 ACAGGGCGTCT K44

K8 23.0 GATAGGGGGGA K8
 |:|
 GCCTCCCCTT K21

K80 21.0 ATGCCGTGAT K80
 |:|:|
 GATGGTGCTA K99

K82 25.0 GAGTGGAAGG K82
 |||.|||:|
 TCTCTCCTTTC K95

10

20

30

40

K85 17.0 GTCACA K85
 |:||||
 GATTCGGTGT K59

K86 20.0 CTCCTGTTT K86
 |:||||:|:
 AGGGGGGATAG K8

K87 24.0 TTTGCGGCTA K87
 |||
 TGCGCCGATC K24

K88 15.0 GATAGTTTAGA K88
 ||:|.||
 GCCTGTCTAA K25

K89 15.0 GCAATTATGA K89
 |. |:|:|:
 GATGGTGCTA K99

K9 18.0 GGACAACGGT K9
 |||
 GTCACCTGTTA K76

K90 19.0 TAATGGTGGGT K90
 :|.|||
 GCCTCCCCTTT K21

K91 19.0 ATTGTACGGG K91
 ||:|.|||
 ACGTCCCCT K17

K92bis 18.0 GTCGGCA K92bis
 |||
 TAGTGCCGTA K80

K92bis 18.0 GTCGGCA K92bis
 |:|:|
 ACGGCTG K92bis

10

20

30

40

K94 17.0 GCTCTTGCTG K94
 |:|||.||
 TGGACGCCTTC K11

K95 25.0 CTTTCCTCTCT K95
 |:||||.||||
 GGAAGGTGAG K82

K96 19.0 ACAGTGCAGC K96
 |||||:.||
 TGTCATCTCCcK60bis

K97 21.0 GGGTGACGTT K97
 :||:||||:
 TGTCCGCTGT K37

K98 20.0 ACGCGTACCT K98
 |||||
 TCCTGCGCA K18

K98 20.0 ACGCGTACCT K98
 |||||
 TCCATGCGCA K98

K99 22.0 ATCGTGGTAG K99
 |.|||||.||
 TCGCACCCCTCAK5

10

20

30

40

【 0 1 3 7 】

本発明者等はまた、各ファミリーのRNA配列についての相互作用する能力をEMSAによって10nM及び200nMでチェックした。50個の推定複合体をスクリーニングした。親和性は、7つの複合体及び3つのパンドローム配列（単独で試験した）について10nMより小さく、21個の複合体は10～200nMの間の親和性を示した。

【 0 1 3 8 】

10nMのヘアピン濃度で複合体の50%超が形成された最良の結果を表1に示す：

【 0 1 3 9 】

【表 8】

K14		A G G C G C G C A A U G 5'	KD	
K14		G U A A <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> C G G A		
K18		g A <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>U</u> C C U		
K98		A <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>U</u> A C C U		
K24		C U A G C <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>U</u>		
K2		G A U G A C <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u>		
K11		a c g U G G A C G C C U U C c g u 5'		
K44	u g c u c g	<u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> C A c g u g c a	10-200	
K52	u g c u G A	G <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> c g a g c a	10-200	10
K78	u g c u c g	<u>U</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> C U A c g a g c a	10-200	
K14	u g c c c g	G U A A C G C <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> g a g c a	>200	
K76		a c g a g c G U C A C C U G U U A g c u c g u 5'		
K41	u g c u c g	G U A <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> c g a g c a	<10	
K27	u g c u c g	A G G A <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> c g a g c a	10-200	
K58	u g c u c g	A G G A <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> c g a g c a	<10	
K82	u g c u c g	G A <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> A G G c g a g c a		
K5		a c g a g c U C G C A C C C U C A g c u c g u 5'		
K64	u g c u c g	G A G A <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> c g a g c a		
K90	u g c u c g	U A A U G <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> U c g a g c a		
K63		u g c c c g <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> U A G U A c u g a g c		20
K99	u g c u c g	A U <u>C</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> U A G c g a g c a		
K52		a c g a g c A A G G C G G A G u c g u 5'		
K32		u g c u c g <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> C G U c g a g c a	<<10	
K37		U G <u>U</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> G U		
K50		u g c u c g A <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>U</u> C A G c g a g c a	<<10	
K36	a c g a g c	A U U A C U U G C G g c u c g u 5'		
K13		A <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u>		
K14		G U A A <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> C G G A	>200	
K16		G U A A <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> C A		
K18		g A <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> U C C U	>>200	
K50		g A <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> U C A G	>>200	
K5		A C U C C C A <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>U</u>	?	30
K98		A <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> G U A C C U	>>200	
K32		a c g a g c U G C C U C C G U U g c u c g u 5'		
K52		u g c u <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> A A c g a g c a	<<10	
K58		u g c u c g A <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> A c g a g c a	<<10	
K74		U U U <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> C U		
K24		a c g a g c U G C G C C G A U C g c c c g u 5'		
K14		G U A A C <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> A	>200	
K18		A <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> U C C U	10-200	
K98		A <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> U A C C U	10-200	
K41		U A U G G A <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>U</u>	10-200	
K78		U U <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>U</u> A	<<10	40

表 1：選択したループ配列の相補性の例。名称を左に示す。配列をそれらの相同性及び相補性に従ってファミリーにまとめる。各ファミリーは、5つの隣接塩基対を介して1つの推定相補的配列（右から左へ5'～3'）とマッチすることができる、少なくとも3つの配列（左から右へ5'～3'）を含有する。推定相補的塩基を灰色で表す。第一のファミリーは、共通の繰り返しプリン/ピリミジンモチーフを共有するオクタ又はヘキサヌクレオチド自己相補的配列を示す。推測のKD（nM）を右に示す。

【0140】

短いコンセンサスモチーフは、2つの分子間G-C塩基対（Gが同じループ中で隣接し

温度を異なる濃度で研究し、結果は二量体が形成されたことを示した。1、5及び10 μ M (3 mMのマグネシウムで)における T_m は、それぞれ60.6、61.5及び62.3であった。観察された T_m がK18濃度に依存していたので、 T_m が、K18ヘアピンの融合にだけでなくK18-K18複合体の融合に対応していたことを意味する。1、5又は10 μ Mにおける値は、10 mM マグネシウムでそれぞれ62.6、65.4及び66.5に増加した；このことは、K18二本鎖の安定性がマグネシウムに依存することを示している。

【0143】

【表 1 1】

		パリンδροーム配列																								
		Py Pu Py Pu Py Pu Py																								
K18		5'	u	g	c	u	c	g	A	C	G	C	G	U	C	C	U	c	g	g	c	a	<<10			
K18		a	c	g	g	c	U	C	C	U	G	C	G	C	A	g	c	u	c	g	u	5'				
		Py Pu Py Pu Py Pu																								
K14	5'	u	g	c	c	c	g	G	U	A	A	C	G	C	G	C	G	G	A	g	a	g	c	a	<10	
K14		a	c	g	a	g	A	G	G	C	G	C	G	C	A	A	U	G	g	c	c	c	g	u		
		Pu Py Pu Py Pu Py																								
K98						5'	a	A	C	G	C	G	U	A	C	C	U	c						10		
K98		c	U	C	C	A	U	G	C	G	C	A	a	5'												
		Py Pu Py Pu																								
K24		5'	C	U	A	G	C	C	G	C	G	U														
K24							U	G	C	G	C	C	G	A	U	C	5'									
		Py Pu Py Pu																								
K108						U	A	U	A	C	G	C	G	C	A	U										
K108							U	A	C	G	C	G	C	A	U	A	U									
		Py Pu Py Pu																								
K2		5'	G	A	U	G	A	C	C	G	C	G	c													
K2								c	G	C	G	C	C	A	G	U	A	G	5'							

10

20

30

表 4 : パリンδροームループ配列の配列及びKD (10nM)

【 0 1 4 5】

【表 1 2】

		RYRY 配列														
		R Y R Y R Y R Y														
K18						A	C	G	C	G	U	C	C	U		
K14		G	U	A		A	C	G	C	G	C	G	G	A		
K98						A	C	G	C	G	U	A	C	C	U	
K50						A	C	G	C	C	U	U	C	A	G	
K16		G	U	A		A	C	G	C	C	C	A				
K13						A	C	G	C	U	G	A	G	U		
K118						G	A	C	G	U	C	U	A	U	G	G
K34	A	U	A	A	G	G	A	C	A	U						
K80						A	U	G	C	C	G	U	G	A	U	
K1						A	U	G	U	G	C	G	C	C	A	A
K55		G	A			A	U	G	U	U	U	G				
K108						G	C	G	U	C	C	A	U	G	U	
K36						G	C	G	U	U	C	A	U	U	A	
K112						G	C	G	C	C	G	U	U	A	C	
K142	A	G	A	U	C	A	G	C	G	C	G					
K53		U	C	U	G	G	C	A	C	A	U					
K107		U	A	U	G	G	C	A	C	G	A	A				
K27						G	C	A	C	G	U	G	G	A		
K104	A	U	U	U	A	G	C	A	U	U						
K123						G	G	U	A	C	C	G	U	U	A	
K27						G	U	A	C	G	G	U	G	G	A	
K134						G	U	A	U	G	G	U	G	U		
K137		U	G	G	U	A	U	U	G	U	G					
K139						G	U	A	U	U	G	G	G	C	A	
K113						G	U	G	C	U	G	A	C	A	U	
K96	A	C	A	G	U	G	C	A	G	C						
		Y R Y R Y R Y R Y R Y														
K102						U	A	U	A	C	G	C	G	C	A	U
K144		G	G	U		U	A	U	A	C	U					
K41						U	A	U	G	A	C	G	G	C	U	
K89	G	C	A	A	U	U	A	U	G	A						
K121						U	G	C	A	C	A	U	A	U	U	
K17	U	C	C	C	C	U	G	C	A							
K117	A	U	U	U	G	U	A	C	G	U						
K28						U	U	G	C	G	C	U	U	C	U	
K61						U	U	G	C	G	C	C	U	G	U	
K78						U	U	U	G	C	G	C	U	A		
K44						U	C	U	G	C	G	G	A	C	A	
K133	C	G	U	C	C	U	G	C	G	A						
K145						U	U	U	G	C	G	C	G	G	A	
K6						U	G	U	A	A	U	U	C	G	A	
K79		U	U	U	U	G	U	G	U	A						
K56	U	C	G	U	U	U	G	U	G	U						
K59						U	G	U	G	G	C	U	U	A	G	
K45						U	U	G	U	G	G	U	C	G	A	G
K91						A	U	U	G	U	A	C	G	G	G	
K131						G	G	U	U	G	U	A	G	U	U	
K2	G	A	U	G	A	C	C	G	C	G						
K24		C	U	A	G	C	C	G	C	G	U					
K11		C	U	U	C	C	G	C	A	G	G	U				
K99						A	U	C	G	U	G	G	U	A	G	
K103						C	G	U	G	A	G	G	G	A	U	
K129						C	C	G	U	G	A	G	C	A	A	
K110						U	C	G	U	A	G	G	C	U	U	
K5	A	C	U	C	C	C	A	C	G	C	U					
K85						G	U	C	A	C	A					

表 5 : 選択の 1 1 0 個の配列の計算解析は、Y R Y R 及び R Y R Y モチーフの関連性を確認する。

110個の配列内の4つの塩基変性モチーフの頻度解析は、以下の結果を与える（最も多く表されるものを左から右へ示す）：YRYR、RYRY、YYRY、RYRR、YYRYR、YRYY、RYYR、YRRY、YRRR、RYYY、RRYR、RRYY、RRRR、RRRY、YYYY及びYYRR。

【0147】

使用に適したキッキング複合体の数を増加させるためにかつRNAループ-ループ複合体の形成への他の重要な決定因子（ステム-ループ接合部に位置する優先的な塩基として）を決定するために、先に記載したモチーフの周囲で第二のインビトロ選択を実施した。

【0148】

SELEX II

RNGGモチーフを有するピオチニル化ライブラリーBに対するコンセンサス配列CCNYを含有するライブラリーAを用いて、第二のSELEXを実施した。2回のラウンドを行った。本発明者等は、最初にライブラリーAの候補を解析した。選択の第一ラウンドからの45個の配列及び第二のラウンドからの43個の配列をそれぞれ研究した。これらのヘアピンは全て、モチーフCCNYを含有していた。これらのCCNY候補の増幅を、5'末端にポリ-Tテールを含有する新たなプライマーP20を用いて実施した。それで、PCR産物をポリ-AテールドRNA候補にインビトロ転写した。ピオチニル化相補的ポリ-Tオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションによって、ポリ-A候補をストレプトアビジンビーズ上に固定化した。これらの候補に対して、Dライブラリーを用いて、新たな選択のラウンドを実施し、NCCNYN候補のNRNGGNパートナーを同定した。Dライブラリーのプライマーは、ライブラリーAと比較して変化していた。

【0149】

10

20

【表 1 3】

	ループ:	NCCNYN	NRRNGN				
ファミリー A		GCCCCG	UGGGGC	GGGGG	AGGGA		
		GCCUCG	GGAGGG	GGAGGU			
		GCCCGC	UGCGGC	UGCGGU	AGCGG		
		GCCUUG	GAAAGU				
		GCCGUG					
ファミリー B		GCCAUG					
		GCCUG					
		ACCGC	ACCGG	GGCGG	UGCGG		
		ACCACG	GGUGGU	GGUGG			
		ACCCG	UGGGU	AGGGG	GGGGC	GGGGG	
ファミリー C		ACCUUG	CAAGG				
		ACCGUG					
		ACCGUG					
		ACCUUG					
		GCCCCU	GGGGU	CGGGC			
ファミリー D		GCCGCU	GGCGGU	CGCGG	CGCGA		
		GCCUCU	UGAGGC	AGAGG			
		UCCGUG	GAGGG	GAGGA	UAGGA		
		UCCACG	UGUGC	GGUGU	AGUGC	CGUGU	AGUGG
		UCCAUG	AAUGA				
		UCCUUG	GAAGG				
		GCCGUU					
		UCCGUG					
		CCCGU	GGCGU	GGCGG	GGCGA		
		CCCAU	UAUGC				
ファミリー E		UCCACU	GGUGG	AGUGA			
		GCCGCC	GGGGU	AGGGA			
		CCCUCC	GGAGG	UGAGG	UGAGG		
		CCCGU	AAAGG				
		ACCGUC	GAAGC				
	UCCGUU						
	CCCUUC	GAAGC	AAAGG	AAAGG	UGGGA		
	CCCCU	GGGGG	AGGGG	GGGGU	UGGGA		
	ACCUCU	UGAGG	UGAGG				
	CCCUUG	UAGGA					
	UCCAUG						
	UCCGUA						
	UCCGUC						
	ACCGUA						

10

20

30

40

表 6 : SELEX II 後の少なくとも 4 つの中心ヌクレオチドと相互作用し得る CCNY 及び RNGG のループ配列

【 0 1 5 0 】

結果を表 6 に記述する。N 1 と N 6 の位置 (N 1 C C N Y N 6) の解析は、3 つのクラス の配列の出現を導いた。クラス A は、ステムループ接合部に G - G 塩基を含有する 2 4

50

個の配列から構成されていた。クラスBは、これらの位置にコンセンサス配列A-G塩基を提示する16個の配列から構成されていた。これらの位置にG-U又はU-G塩基を有する15個の他の配列はクラスCを構成した。これらのファミリーは、N1RNGGN6のN1-N6組成に対して出現した。さらに、クラスA'は、G-G塩基に富んでいた(21の配列)。クラスB'及びクラスC'は、それぞれ、U-Cを含有する16個の配列及びG-U又はU-Gを含有する15個の配列から構成されていた。

【0151】

配列KC24：UGCUCGGCCCCGCGAGCA及びKC23：UGCUCGGCCGUGCGAGCAが最も多く表された(それぞれ、8回及び7回)。2つの他の配列UGCUCGACCGCGCGAGCA及びUGCUCGACCCCCCGAGCAは、NCCNYNヘアピン中それぞれ5回及び4回見いだされ、NRNGGNパートナーについては、2つの配列：KG51：GACGAGCUGGGGCGCUCGUC及びKG114：GACGAGCGGGGGGCGCUCGUCが10回見いだされた。配列KG71：GACGAGCUGGGGUGCUCGUCは、5回表された。

10

【0152】

熱変性を使用して、異なる複合体の融解点を異なる濃度のマグネシウムで定義したが、このことは、複合体がマグネシウムに感受性であったことを示している。

【0153】

これらの複合体の高い親和性をSPR実験によって示し、例えば：ビオチニル化KC24(UGCUCGGCCCCGCGAGCA)をストレプトアビジンセンサーチップ上に固定化した。KG51(GACGAGCUGGGGCGCUCGUC)を、3mMマグネシウムで8nMのKdを決定することが可能であった異なる濃度で注入した。

20

【0154】

結論として、ループ-ループ複合体を選択するために使用したインビトロ選択は、マグネシウム感受性でかつ高い親和性を示すRNAキッキング複合体の同定を可能にした。

【0155】

実施例2：小さいリガンドの検出のためのキッキング複合体ベースriboswitch

アダプターは、SELEXと呼ばれるコンビナトリアルプロセスを介して得られた単鎖核酸である{C. Tuerk, L. Gold, Science 1990, 249, 505-510; A. D. Ellington, J. W. Szostak, Nature 1990, 346, 818-822}。これらは、アダプター分子内フォールディング(これは、その後ターゲット分子との最適化された分子間相互作用を導く)から生じるそれらの3D形状のおかげで既定のターゲットに対して強い親和性及び高い特異性を提示する。RNAヘアピンに対するRNA候補の選択は、そのループがターゲットヘアピンのループと相補的である(したがって、ループ-ループ相互作用を生じる)ヘアピンアダプターを導く{a) F. Duconge, J. J. Toulme, RNA 1999, 5, 1605-1614; b) K. Kikuchi, T. Umehara, K. Fukuda, J. Hwang, A. Kuno, T. Hasegawa, S. Nishikawa, J. Biochem. (Tokyo) 2003, 133, 263-270; c) S. Da Rocha Gomes, E. Dausse, J. J. Toulme, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004, 322, 820-826}。そのようないわゆるキッキング複合体の安定性は、ループ-ループヘリックスのワトソクリック塩基対に由来するが、ループ-ループモジュールと各ヘアピンパートナーの二本鎖ステムの間の接合部におけるスタッキング相互作用にも由来する{a) F. Beaurain, C. Di Primo, J. J. Toulme, M. Laguerre, Nucleic Acids Res. 2003, 31, 4275-4284; b) I. Lebars, P. Legrand, A. Aime, N. Pinaud, S. Fribourg, C. Di Primo, Nucleic Acids Res. 2008, 36, 7146-7156; c) H. Van Melckebeke, M. Devany, C. Di Primo, F. Beaurain, J. J. Toulme, D. L. Bryce, J. Boisbouvier, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 2008, 105, 9210-9215}。実際に、6塩基対ループ-ループヘリックスを生じる、ヒト免疫不全ウイルスのトランス活性化応答(TAR)RNA不完全ステムループエレメントのヘアピンアダプターへの結合は、同じ6塩基対二本鎖を生じる、TARとアンチセンスオリゴマー間の複合体の融解温度よりも20 高い融解温度によって特徴付けられた{F. Duconge, C. Di Primo, J. J. Toulme, J. Biol. Chem. 2000, 275, 21287-21294}。本発明者等は、アダプターベースセ

30

40

50

ンサーを設計するために、折畳み構造と直線構造とを区別するRNAヘアピンの可能性を活用した。

【0156】

riboswitchは、小さいリガンドに対する結合部位を含むセンサーから構成される、原核生物において同定されたRNAモジュールであり、このセンサーは、立体構造変化によってリガンドとの会合に応答する {a) A. Serganov, E. Nudler, Cell 2013, 152, 17-24; b) B. J. Tucker, R. R. Breaker, Curr. Opin. Struct. Biol. 2005, 15, 342-348}。センサーは、アプタマーの機能的等価物であり、特に特異性に関して類似の特性を提示する。アプタマーは、それぞれその同族ターゲットの存在下及び非存在下で、折り畳まれた構造と開構造との間で分子スイッチングし得る。そのようなアプタマーのいくつかの例が文献に記載されている。しかしながら、ターゲット分子に結合したときにキッキング複合体を形成することができるループを含む立体構造にスイッチングすることができるアプタマーを記載している研究はない。

10

【0157】

本発明者等は、ヘアピンアプタマーによって特異的に認識されるリガンドの存在を計測するためにキッキング複合体の形成を活用した。アプタマーは、小分子の結合がその立体構造を折り畳まれていない形状から折り畳まれた（ヘアピン）形状にシフトさせるように改変される（それゆえ、その名称は、aptaswitch）。折り畳まれた構造の認識は、aptaswitchとキッキング複合体を形成することができる第二のヘアピンによって確実となる。この第二の分子は、aptakissと呼ばれる。そのため、aptaswitch - aptakiss複合体の形成は、小分子の存在を示す。

20

【0158】

本発明者等は、核酸塩基誘導体、すなわちGTP及びアデノシンに対して先に作製されたアプタマーを用いてこの概念を立証した。それらの両方は、リガンドの結合部位を構成するプリンリッチの中心ループを示す（図1）。本発明者等は、本発明者等の戦略をRNAアプタマー又はDNAアプタマーのいずれかに適合させることができることを実証した。以下に記載されるように、aptaswitch - aptakissの組み合わせは、固定化された又は蛍光標識されたaptakissをそれぞれ使用した表面プラズモン共鳴（SPR）又は蛍光異方性のいずれかによる、ターゲットリガンドの特異的かつ定量的な検出を可能にした。

30

【0159】

本発明者等は、実施例1において先に同定され、かつSPRによって評価したところ低いKd（室温、140mM K⁺、20mM Na⁺及び10mM Mg⁺⁺を含有する20mM HEPES緩衝液（pH7.4）中5nM）によって特徴付けられたRNA-RNAキッキング複合体であるKC24 - KG51に基づいて、本発明者等のセンサーを変更した。これらのヘアピンは、5つのGC対及び1つのGU対を含む6bpのループ-ループヘリックスを潜在的に形成する。KC24を18ntに短縮することで、6bpのステム及び6ntのループを有する本研究において使用されるaptakissを生成した（図1）。KC24（aptakiss）ループと相互作用しやすいKG51ループ配列5' CUGGGCGを、GTP又はアデノシンのいずれかに対して作製された先に記載した不完全ヘアピンアプタマーの頂点ループ中に挿入することによってaptaswitchを改変することで、それぞれGTPswitch及びadenoswitchを生成した（図1及び図7）。

40

【0160】

先のNMR研究は、アプタマーの中心ループのプリン対とのアデノシン環のスタッキングを実証した。これは、キッキング認識しやすいループとしてadenoswitchの頂点部分を形成することに寄与する。センサーの感度は、aptaswitchの折り畳まれていない状態と折り畳まれた状態との間の平衡、すなわち、aptaswitchのそのリガンドに対する結合定数に依存するだろう。言い換えると、aptakissによって認識されるadenoswitchのヘアピン構造の形成へのアデノシンによってもたらされるスタッキング寄与度は、検出に影響を与えるだろう。リガンドの非存在下でヘアピンが形成される極端な場合は、aptakissは遊離adenoswitchに結合するだろう。

【0165】

そのため、アプタマーベースの分子ビーコンについて先に報告されたように、センサー応答は、リガンドの非存在下で、adenoswitchヘアピンの安定性に関連するであろうと予想される。この仮説を試験するために、本発明者等は、ステムの底に1つ又は2つの塩基対を加えたadenoswitch変異体の特性を評価した(図1)。図4に示すように、一定のアデノシン濃度に対するSPR応答は、adenoswitch < adenoswitchTA < adenoswitchTAGCの順に(すなわち、ヘアピンシステム中の塩基対の数と共に)増加した。実際に、後者の変異体は、アデノシンの検出を、親adenoswitchの2mM(図3)に対して、0.125mM(図4)の濃度で可能にした。増加した感度は、特異性を犠牲にしては達成されなかった: adenoswitchATGC(そうでなければ、以下でADOSW1'とも称される)はイノシンを認識せず、aptakissmutで官能化されたチップ上でシグナルは観察されなかった。

【0166】

本発明者等は、蛍光異方性(FA)を使用して溶液中でaptakiss-aptaswitch複合体を検出する可能性をさらに考慮した。このために、蛍光プローブとしてテキサスレッド(TR)3'末端コンジュゲートaptakiss(aptakiss-TR)を使用して、上述したキメラadenoswitchを用いた。adenoswitchへのaptakissの結合は、全体のサイズを増加させ、その結果として増加したFAを生じるであろう。10nM adenoswitchの存在下では、反応混合物にアデノシンを加えた場合に、aptakiss-TR(10nM)のFAシグナル(r)が増大した。FA変化、すなわち、 $r = r - r_0$ (式中、 r_0 は、リガンドの非存在下の異方性である)は、2mM アデノシン濃度で約0.015に達した(図5)。

【0167】

次いで、最適化されたadenoswitchTAGCで用量反応曲線を確認した。図5に示すように、感度は親adenoswitchと比べて大きく改善した。adenoswitchTAGCと形成された三成分複合体について、オリジナルのアプタマーについて報告された5~10μM値に近い35μMの見掛けの解離定数を得た。アデノシン結合部位の一部である内部プリンループの5'側の2つのAを2つGに交換した場合に(adenoswitchTAGCmut2)、アデノシン添加時のFA応答は不変であった。予想通り、アデノシンアプタマーに結合しないイノシンの添加時にFAの変動は観察されなかった。これは、シグナル変換がadenoswitchのアプタマードメインへのアデノシンの結合に依存することを確認する。

【0168】

結論として、本発明者等は、スイッチングセンサーを生成するためにプリン誘導体に対するアプタマーを改変した。ヘアピン形状が同族リガンド(すなわち、GTP又はアデノシン)の存在下で独占的に採用されるようにアプタマーの構造を最適化した。加えて、本発明者等は、親アプタマーの頂点ループの部分を、aptaswitchの結合特性を著しく変化させることなく、ヘアピンaptakissとループ-ループ相互作用しやすい短いRNA配列に置換させることに成功した。リガンドの存在を示すaptaswitch-aptakiss複合体の形成を、自動化され得る種々の技術(蛍光、SPR)によってモニタリングすることができる。GTP及びアデノシンについてここで実証したように、同じaptakissを、そのループが相補的配列で適切に修飾された任意のaptaswitchを検出するために使用することができる。

【0169】

アデノシンの検出について他のアプタマーベースのセンサーを記載した。aptaswitchベースの蛍光異方性アッセイについて、アデノシンの検出限界は約10μMであると推測さ

10

20

30

40

50

れ、これは、蛍光aptasensing法（精巧な増幅系バイオセンサーを除く）で一般的に報告されたものと同じ範囲である。

【0170】

実施例3：K x 1、K x 2、K x 3及びK x 4複合体の特性決定

次いで、本発明者等は、いくつかのリガンドの同時検出を可能にし得るaptaswitchを設計するために二次的に使用されるであろう、数種のキッキングカップルの特性決定に着手した。このために、本発明者等は、便宜上、K x 1 ~ K x 4と呼ぶ4つの配列及びそれらのキッキング相補体K x 1' ~ K x 4'を選択した。K x 1、K x 1'、K x 2及びK x 2'は、それぞれ、上のKC 2 4、KG 5 1、KC 2 8及びKG 4 9配列に対応する。K x 3、K x 4、K x 3'及びK x 4'は、それぞれ、以下の配列を有する：GGUCGG UCCCAGACGACC（ループ配列GUCCCAGA）、GGUUUCAGGGCA GUGAUGUUGCCCCUCGGAAGAUAACC（ループ配列GUGAUGU）、CGAGCCUGGGAGCUCG（ループ配列CUGGGA）及びCCUGACAUC ACCAGG（ループ配列ACAUCAC）。ヘアピンK x 1 ~ K x 4は、ストレプトアビジンセンサーチップ上での固定化を可能にする3'ピオチニル残基を用いて化学合成した。キッキングモチーフは、ヘアピンとの関連で6ntステム及び6ntループで表示される。加えて、候補ヘアピンごとの同一のステムの存在に起因してオリジナルのプール中に生じ得る伸長した二本鎖の形成を抑制するために、本発明者等は異なるステムを有するパートナーを設計した。本発明者等は、最初に、これらの複合体の1つ：ループ配列5'GCCCCG及び5'UGGGGCをそれぞれ提示するK x 1 - K x 1'（K x 1'についてこの実験で使用されるステムは、2つの相補的配列：5' - ACGAGC . . . GCUCGU - 3'で形成され；K x 1'についてのステムは、2つの相補的配列：5' - UGCUCG . . . CGAGCA - 3'で形成される）を詳しく調査した。本発明者等は、UV吸光度モニタリング熱変性及び表面プラズモン共鳴（SPR）によって複合体安定性及び点突然変異の効果をチェックした。3mM Mg²⁺を含有する緩衝液中では、K x 1 - K x 1'親複合体の転移のT_mは、44.2 + 0.7であった（図7）。固定化されたK x 1を用いたSPR解析は、6.9 + 1.1nMのK_dを導いた（図7）。ループ-ループ二本鎖中に追加のGC対を生成するためにK x 1'ループ中の5'UをCに置換すると、実際にK_dの増加を生じた（18 + 1.1nM）。K x 1'中の相補的突然変異と組み合わせたK x 1中の他の点改変は、さらにより劇的な効果を導いた：例えば、ループ-ループ二本鎖の第二のGC対の反転は、弱い複合体（K x 1 m₃ / K x 1' m₄複合体：野生型と比べて、T_m = 31.5 + 0.7）を生じ、これはCCNY / RGGGモチーフの重要性と本発明者等の選択アプローチの関心の両方を指摘している。加えて、配列K x 5（ACCCCG）及びK x 5'（UGGGGU）を有する異なる複合体も評価し（図7）、安定な複合体を形成した。

【0171】

本発明者等は、SPRによって、ピオチニル化ヘアピンK x 1 ~ K x 4をバイオチップの異なるチャンネル上に固定化することによって4つの先に選択したキッキング複合体の適合性を調査した。K x 1'、K x 2'、K x 3'又はK x 4'の個々の溶液をチップ上に流した。各同族の組み合わせK x 1 - K x 1'、K x 2 - K x 2'及びK x 4 - K x 4'について予想した通り良好な共鳴シグナルを得た（図7）。対照的に、K x 3' - K x 1（示さず）以外の任意の他の組み合わせでは、シグナルは観察されなかった；結果として、本発明者等は、もはやK x 3 - K x 3'複合体を使用せず、キッキング複合体ベースのaptasensorの設計に関して3つの他の組み合わせに制限した。

【0172】

実施例4：テオフィリンの検出のためのキッキング複合体ベースのriboswitch

上述したように、頂点ループがそれらの同族リガンドの結合に関与しない不完全ヘアピンとして組織化されたアプタマーを、aptaswitchへと潜在的に改変することができる。このために、本発明者等は、まず、キッキング相互作用しやすい短い配列をオリジナルのアプタマーループに置換する必要がある。本発明者等は、アデノシン、GTP又はテオフィ

10

20

30

40

50

リンに対して先に選択されたアプタマー中に $K \times 1'$ 、 $K \times 2'$ 又は $K \times 4'$ のループを導入することで、それぞれ $ADOSw1'$ 、 $GTPsw2'$ 及び $THESw4'$ を生成した(図8)。これらのアプタマーは、それらのそれぞれのリガンドの結合部位を構成するプリンリッチ内部ループによって特徴付けられる。本発明者等は、同族アプタマータゲットの添加時に aptaswitch が条件付きでヘアピン中に折り畳まれるように、中心ループの上下に短い二本鎖領域を作った。次いで、aptaswitch - リガンド複合体は、aptakiss $K \times 1$ 、 $K \times 2$ 又は $K \times 3$ によって認識されるが、折り畳まれていないアプタマーは認識されない。 $ADOSw1'$ は、先の上で特徴付けられた(Adeno-switch TAGC) : アデノシン及び $K \times 1$ の同時添加時に特異的な SPR 又は蛍光シグナルが観察されたが、イノシンの存在下ではシグナルは検出されなかった。 $GTPsw2'$ は、 $K \times 2'$ ループを以前に使用した $K \times 1'$ に置換することによって上述した aptaswitch から誘導される。 GTP 及び aptakiss に関連するその特異的な応答性は保持される : GTP の添加時に用量依存 SPR シグナルが観察されたが、 ATP では共鳴は認められなかった(図9)。 $THESw4'$ の設計は、トライアル及びエラーを必要とした : 最良の aptaswitch (図8) は、内部ループの下と上に x 及び y 推定塩基対を含有する。 $THESw4'$ の及びテオフィリンの混合物は、 $K \times 4$ が固定化されたチップ上に流された場合に SPR シグナルを誘発する(図9)。カフェインの存在下ではシグナルは検出されず、このことは、結合の特異性が保持されることを示している。しかしながら、テオフィリンに対する $THESw4'$ の親和性は、親アプタマーに比べて低下する。全ての複合体に最良の媒体に相当していなくても、3つの aptaswitch-aptakiss 複合体が多重分析の必要条件である同じイオン条件下で評価されたことに注目すべきである。

10

20

【0173】

実施例5 : SPR 及び蛍光異方性によるリガンドの同時検出

このために、本発明者等は、4つのチャンネルを有する SPR ストレプトアビジンバイオチップを使用した。ピオチニル化 $K \times 1$ 、 $K \times 2$ 及び $K \times 4$ をそれぞれチャンネル1、2及び3上に固定化し、そして、4つ目のチャンネルをピオチニル化リンカーで飽和し、これを対照として使用した。示すように(図10)、 $ADOSw1'$ 、 $GTPsw2'$ 又は $THESw4'$ と、それぞれ飽和条件の同族リガンド、アデノシン、 GTP 又はテオフィリンを飽和条件下で流すと、独占的に、対応する官能化チャンネルすなわちそれぞれ1、2又は4上にシグナルを生じた。次いで、より複雑な混合物を試験した : 3つの aptaswitch の同時存在は、1つのリガンドの同時検出を可能にした : 例えば、 $5 \mu M ADOSw1' + 5 \mu M GTPsw2' + 1 \mu M THESw4'$ への $1 mM$ テオフィリンの添加は、チャンネル3上でのみシグナルを生成した(図10)。 $2 mM GTP$ で類似の結果が得られた(示さない)。1つの aptaswitch 及び3つのリガンドとの混合物もまた特異的な応答を生成した : 例えば、 $2 mM$ アデノシン + $1 mM GTP + 1 mM$ テオフィリンとの $5 \mu M GTPsw2'$ は、チャンネル2上でのみシグナルを与えた(図10)。3つのリガンドとの $ADOSw1'$ 又は $THESw4'$ のいずれかの使用もまた、同族リガンドの検出を可能にした(示さない)。最後に、本発明者等は、4つのチャンネルチップ上に3つの aptaswitch と3つのリガンドの混合物を注入し、3つの異なる aptakiss を有する3つのチャンネル上でシグナルを観察した(図10)。

30

40

【0174】

実施例6 : DNA aptaswitch - RNA aptakiss カップルの使用

上記において、本発明者等は、アデノシンに対して以前に同定された DNA アプタマーから誘導された aptaswitch の領域に小分子(アデノシン)が結合することを意味する、キメラ DNA - RNA を記載する。この DNA アプタマーには、aptakiss RNA とキッシング複合体を形成することができる RNA ループが加えられている。この制約は、2つの DNA ループが関与するキッシング複合体がまだ記載されていないという事実に関連する。対照的に、RNA 及び DNA ループループ相互作用が関与するキッシング複合体は選択されている(Darfeuille, F., Sekkai, D., Dausse, E., Kolb, G., Yurchenko, L., Boiziau, C., and Toulme, J. J. (2002) Comb Chem High Throughput Screen 5, 313-25)

50

。ランダムDNAライブラリーからのこのSELEXをHIV-1のTAR RNAヘアピン構造に指向した。選択した候補を、TARに対するそれらの親和性についてEMSA（電気泳動移動度シフトアッセイ）によって試験し、それらの中でDII21と呼ばれるものが、3mM マグネシウムの存在下、室温で20nMの親和性を示した。

【0175】

それで、本発明者等は、この複合体を利用して、アデノシンに指向するアプタマーのDNA頂点ループを、キッキング複合体を形成することができるDII21アプタマーのDNAループと置き換えた。ループとアデノシンの結合の領域との間に導入された3つの異なるコネクタを有する3つのモデル（A、B及びC）を合成した（図11）。

【0176】

これらの3つのモデルを、一方ではイノシン（アデノシンの特異性の対照）の存在下で、他方ではアデノシンの存在下で、蛍光基（テキサスレッド）で標識されたTARに結合するそれらの能力について蛍光異方性によって試験した（図12）。その結果は、イノシンの存在下でのDII21 Aの強い非特異的結合を示す。aptaswitch DII21 B及びCは、TARに対して高特異的結合を示す。

【0177】

これらの結果は、完全にDNA aptaswitchが機能的であり得ることを実証する。そのため、本発明者等のaptakiss - aptaswitch戦略は、RNA - RNAキッキング複合体に制限されることなく、RNA - DNAキッキング複合体まで拡張することができる。この可能性は、DII21配列に制限されることなく、RNA - DNA安定キッキング複合体を生成することができる任意の配列まで拡張することができる。

【0178】

実施例7：DNAコンビナトリアルライブラリー

DII21 Bモデルで得られた結果に基づいてDNAライブラリーを合成し、DNAライブラリーを用いてSELKISS（すなわち、キッキング複合体形成を遂行するSELEX）を実施した。RNAライブラリーと同じ設計を使用してDNAライブラリーを生成した：1つの固定された領域は、2つのランダムウィンドウ（それら自体は、2つのプライマーによってフランキンクされている）によってフランキンクされる。異なるランダムウィンドウを有する5つのライブラリーを2つの別個の目的で設計した：a）3つのライブラリーは、アデノシンの存在下でTARに結合することができる最良の配列を見つけるためにコネクタ上にランダム領域を含有する、b）アデノシンへの結合に關与する領域中にランダムウィンドウを有する2つのライブラリー（図13）。

【0179】

DNA SELKISSによって生成した集団の蛍光異方性による初期解析は、アデノシンに特異的な候補の小さな集団の存在を示す。異なる選択圧（DNA及びアデノシン濃度、解離時間...）で得られたサンプルのハイスループット配列決定は、aptaswitchファミリーを得ること及びTARに特異的に結合するそれらの能力をチェックすることによって特異的配列を同定することを可能にする。

【0180】

本明細書において使用されるaptakissは、常にRNAヘアピンである。しかしながら、実験は、RNA 2'-フルオロピリミジンaptakissも使用することができることを確認する（データは示さず）。

【0181】

さらに、DNA aptaswitch及びDNA aptakissを得るために、DNAキッキング複合体のSELEXに着手し、現在、これを配列決定している。

【0182】

DNA SELKISSは、未修飾RNAよりもヌクレアーゼに高い耐性を示すDNA aptaswitchを提供する。加えて、DNAオリゴヌクレオチドの合成コストは、RNAの場合の合成コストよりも非常に低い（ファクター5）。

【0183】

10

20

30

40

50

本センシングフォーマットは、三成分複合体形成に關与する二重認識メカニズムから生じるユニークな結合特異性での小さいリガンド検出のための、オリジナルのサンドイッチ様アッセイとして考慮することができる。さらに、そのようなサンドイッチ様アッセイは、酵素結合aptakiss及び表面固定化aptaswitchの両方を使用することによって、ELISA型フォーマットに容易に適合してシグナル増幅を達成することができる。本発明者等の戦略はまた多重解析も可能にする：本発明者等は、実際に、交差相互作用しないいくつかのキッシング対のレパートリーを同定した。そのため、本発明者等は、異なるアプタマー中に異なるキッシングしやすい配列を導入することで、これらを独立してモニタリングすることができる限り同時に使用することができる一連のaptaswitchを生成することができる。このアプローチを、頂点ループがリガンドとの相互作用に重要でない不完全ヘアピンとして折り畳まれた任意のアプタマーに適合することができるので、aptakiss-aptaswitchの組み合わせは、解析応用に広い潜在的関心を有する。

10

【 0 1 8 4 】

【表 15】

配列リスト：

配列 番号：	名称	配列
1	K10	ACAGCTCAGAA
2	K11	CTTCCGCAGGT
3	K13	ACGCTGAGT
4	K15	ATTGGTGGNC
5	K17	TCCCCTGCA
6	K18	ACGCGTCCT
7	K1	ATGTGCGCAA
8	K20	GTGGGTAGGGT
9	K24	CTAGCCGCGT
10	K25	AATCTGTCCG
11	K27	GTACGGTGGGA
12	K28	TTGCGCTTCT
13	K29	GTAAGtCTGA
14	K30	ATTGGgCCTG
15	K8	GATAGGGGGGA
16	K2	GATGACCGCG
17	K34	ATAAGGACAT
18	K35	GTAAAGCG
19	K14	GTAACGCGCGGA
20	K16	GTAACGCCCA
21	K3	ATGGAT
22	K4	TTTTGAGTGAT
23	K5	ACTCCCACGCT
24	K6	TGTAATTCGA
25	K9	GGACAACGGT
26	K21	TTCCCCTCCG
27	K32	TTGCCTCCGT
28	K37	TGTCGCCTGT

10

20

30

40

29	K42	TCTTCGCTATC	
30	K38	GCAGTTCACT	
31	K36	GCGTTCATTA	
32	K39	TCTTGGGGCA	
33	K44	TCTGCGGGACA	
34	K40	ACAAGTCTCG	
35	K41	TATGGACGGCT	10
36	K45	TTGTGGTCGAG	
37	K50	aCGCCTTCAG	
38	K51	GATTTtTGGT	
39	K52	GAGGCGGAA	
40	K53	TCTGGCACAT	
41	K55	gAATgtTtG	
42	K56	TCGTTTGTGT	20
43	K58	AGGAGGTGGA	
44	K59	TGTGGCTTAG	
45	K60	CCcTCCTACTGT	
46	K61	TTGCGCCCTGT	
47	K63	GTGGGTAGTA	
48	K64	GAGAGTGGGG	
49	K70	GGTCCGAGGATC	30
50	K71	TATTCTTCGG	
51	K73	AGCGATTGGA	
52	K74	TTTGAGGCCT	
53	K75	TCTTTGGTTT	
54	K76	ATTGTCCAcTG	
55	K77	AGACCGGCA	
56	K78	TTTGCGGCTA	40
57	K79	GTTTTGTGTA	
58	K80	ATGCCGTGAT	
59	K82	GAGtGgAAGG	
60	K85	GTCACA	
61	K86	CTTCCTGTTT	

62	K87	TTTGCGGCTA
63	K88	GATAGTTTA _g A
64	K89	GCAATTATGA
65	K90	TAATGGTGGGT
66	K91	ATTGTACGGG
67	K92	GTCGGTCA
68	K94	GCTCTTGCTG
69	K95	CTTTCCTCTCT
70	K96	ACAGTGCAGC
71	K97	GGGTGACGTT
72	K98	ACGCGTACCT
73	K99	ATCGTGGTAG
74	K101	GGGTAGGTTGC
75	K102	TATACGCGCAT
76	K103	CGTGAGGGAT
77	K104	ATT _t AGCATT
78	K105	TCGATGGNNNT
79	K107	TATGGCACGAA
80	K108	GCGTCCATGT
81	K109	GTTGGCCGGG
82	K110	TCGTAGGCTT
83	K111	GACCGGCCCT
84	K112	GCGCCGTTAC
85	K113	GTGCTGACAT
86	K115	TCCCCGAT _c G
87	K116	GGGTAGAGAA
88	K117	ATTTGTACGT
89	K118	GACGTCTATGG
90	K119	AGTGGCTGGG
91	K120	GATGGCGGCT
92	K121	TGCACATATT
93	K122	GTTATTGTTC
94	K123	GGTACCGTTA

10

20

30

40

95	K124	TATCCCTTTG
96	K126	ATAGAGCCCTT
97	K128	TTGGTTTTGT
98	K129	CCGTGAGCAA
99	K131	GGTTGTAGTT
100	K132	TCCGTCCGAG
101	K133	CGTCCTGCGa
102	K134	GTATGGGTGT
103	K137	TGGTATTGTG
104	K138	GGTCCAAAGT
105	K139	GTATTGGGCA
106	K141	CCTGGaCCTT
107	K142	AGATCAGCGCG
108	K143	ATTAGCCTGG
109	K144	GGTTATACT
110	K145	TTTGCGGCGGA
111		GCCCCG
112		GCCUCG
113		GCCGCG
114		GCCUUG
115		ACCGCG
116		ACCACG
117		ACCCCG
118		ACCUUG
119		GCCCCU
120		GCCGCU
121		GCCUCU
122		UCCUG
123		UCCACG
124		UCCAUG
125		UCCUUG
126		ACCGCC
127		UCCGCC

10

20

30

40

128		CCCGCU	
129		CCCAUC	
130		GCCAUC	
131		UCCAUC	
132		ACCAUU	
133		CCCAUU	
134		UCCACU	10
135		GCCCCA	
136		GCCCCC	
137		ACCUCA	
138		CCCUCC	
139		CCCUCG	
140		CCCUUC	
141		ACCCCC	20
142		UCCCCC	
143		CCCCCC	
144		CCCCCCU	
145		ACCUCU	
146		CCCCUC	
147		UGGGGC	
148		GGGGGG	30
149		AGGGGA	
150		GGAGGG	
151		GGAGGU	
152		UGC GGC	
153		UGC GGU	
154		UGC GGG	
155		AGCGGG	40
156		GAAGGU	
157		AGCGGG	
158		GGCGGG	
159		UGC GGG	
160		GGUGGU	

161		GGUGGG	
162		UGGGGU	
163		AGGGGG	
164		GGGGGC	
165		GGGGGG	
166		CAAGGG	
167		GGGGGU	10
168		CGGGGC	
169		GGCGGU	
170		CGCGGU	
171		CGCGGA	
172		UGAGGC	
173		AGAGGG	
174		GAGGGG	20
175		GAGGGA	
176		UAGGGA	
177		UGUGGC	
178		GGUGGU	
179		AGUGGC	
180		CGUGGU	
181		GGUGGG	30
182		AGUGGG	
183		AAUGGA	
184		GAAGGG	
185		GGCGGU	
186		GGCGGG	
187		GGCGGA	
188		UAUGGC	40
189		GGUGGG	
190		AGUGGA	
191		GGGGGU	
192		AGGGGA	
193		GGAGGG	

194		UGAGGA
195		UGAGGG
196		GAAGGC
197		AAAGGA
198		GGGGGG
199		AGGGGG
200		GGGGGU
201		UGGGGA
202		UGAGGA
203		UGAGGG
204		UAGGGA
205	NS1	UGCUCG
206	NS2	CGAGCA
207	NS3	ACGAGC
208	NS4	GCUCGU
209	KG51	ACGAGCUGGGGCGCUCGU
210	KC24 [Aptakiss]	UGCUCGGCCCCGCGAGCA
211	Adenoswitch	TGGGGGACUGGGGCGGGAGGAA
212	AdenoswitchTA	TTGGGGGACUGGGGCGGGAGGAAA
213	AdenoswitchTAGC	GTTGGGGGACUGGGGCGGGAGGAAAC
214		UGCUCGGCCCCGCGAGCA
215		CUGGGGCG
216		UGCUCGGCCCCGCGAGCA
217		GGUUACCAGCCUUCACUGCUCG-N10/11- CGAGCACCACGGUCGGUCACAC
218		ACGAGC-NRNGGN-GCUCGU
219		GGUUACCAGCCUUCACUGCUCG-NCCNYN- CGAGCACCACGGUCGGUCACAC
220		GGGAGGACGAAGCGGACGAGC-NRNGGN- GCUCGUCAGAAGACACGCCCGA
221	プライマー	TAATACGACTCACTATAGGTTACCAGCCTTCACTGC
222	プライマー	TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGAAGCGG
223	プライマー	TCGGGCGTGTCTTCTG

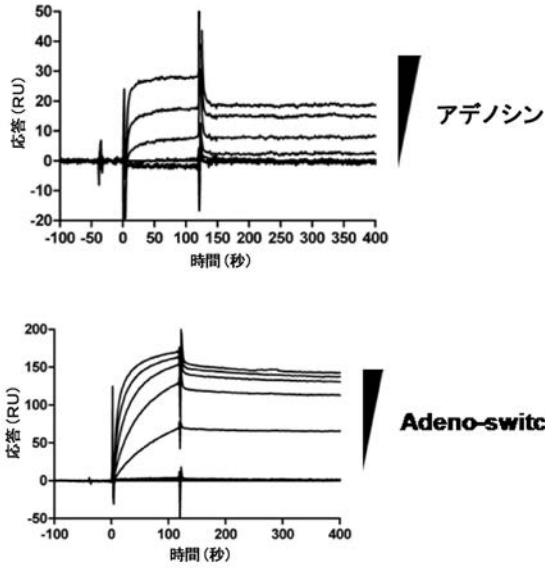
10

20

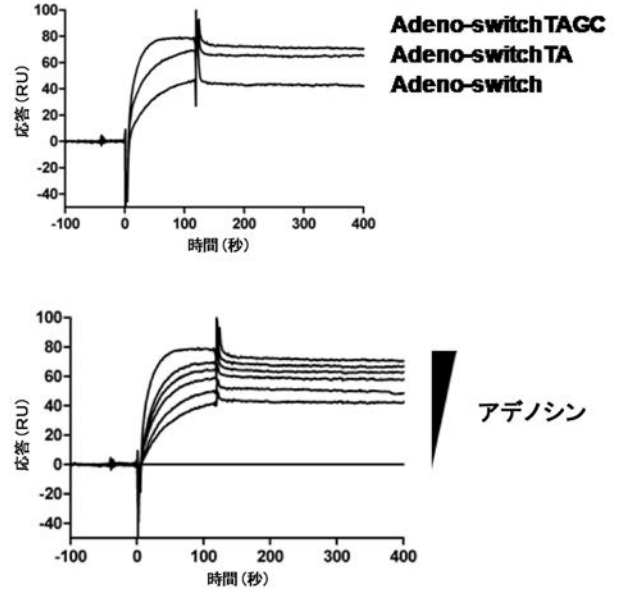
30

40

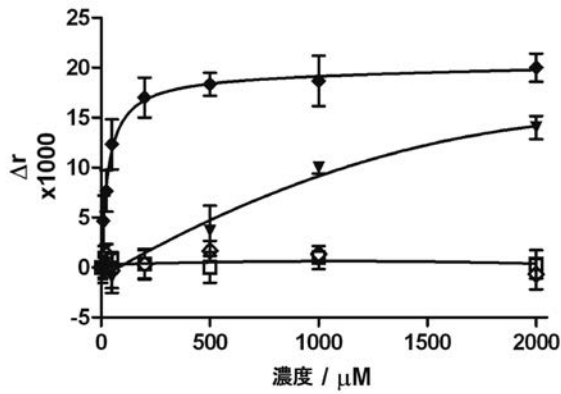
【 図 3 】



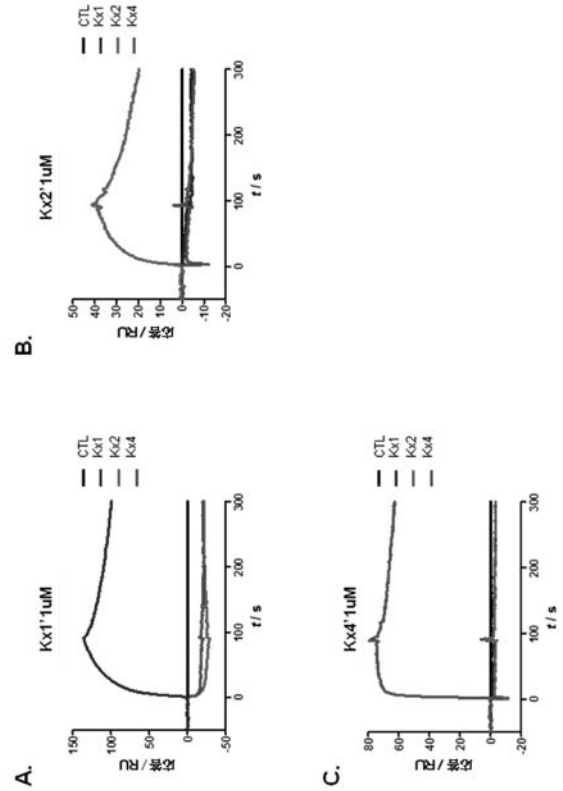
【 図 4 】



【 図 5 】

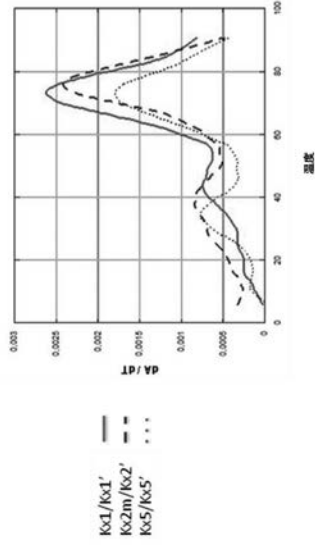


【 図 6 】

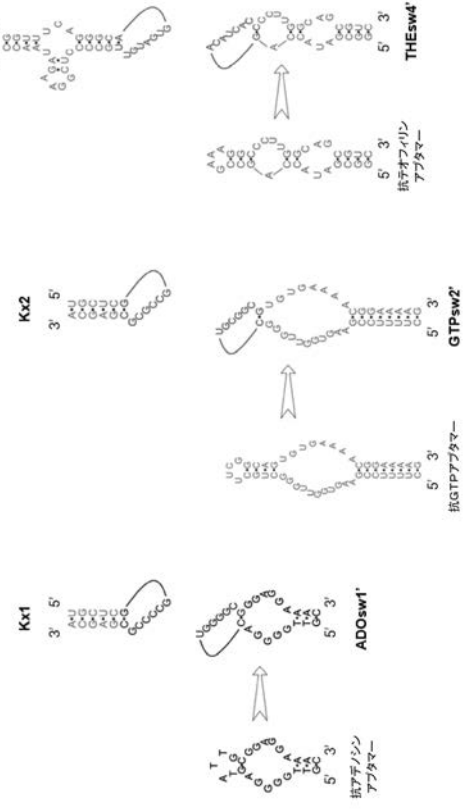


【 図 7 】

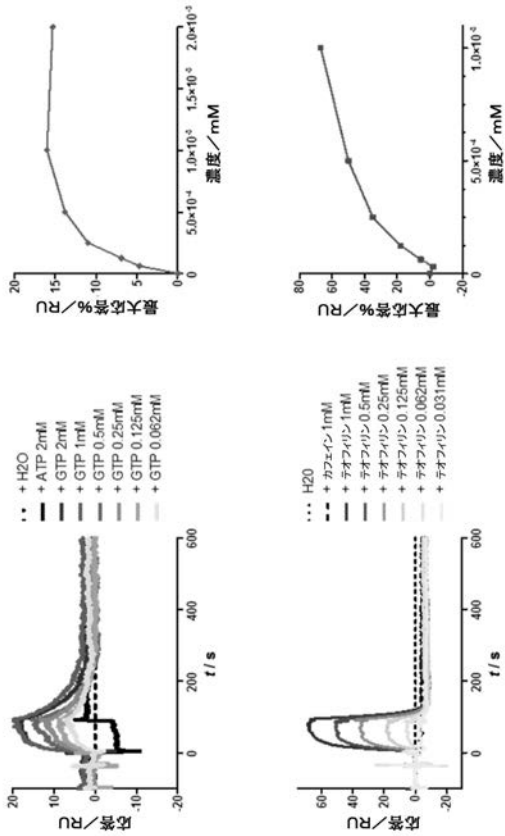
	5' CCNY	5' R N G G	Tm
Kx1/Kx1'	G C C C C G	U G G G G C	44.2 ± 0.7
Kx2/Kx2'	G C C C C G	U G C G G C	36.7 ± 1.4
Kx3/Kx3'	A C C C C G	U G G G G U	35.2 ± 0.8
Kx4/Kx4'	A C C C C G	U G G G G U	21.2 ± 0.7
Kx5/Kx5'	A C C C C G	U G G G G C	<15
Kx1m3/Kx1'm4	G C C C C G	U G G G G C	31.5 ± 0.7
Kx1m5/Kx1'm2	G C C C C G	U C G G G C	37.9 ± 0.4



【 図 8 】



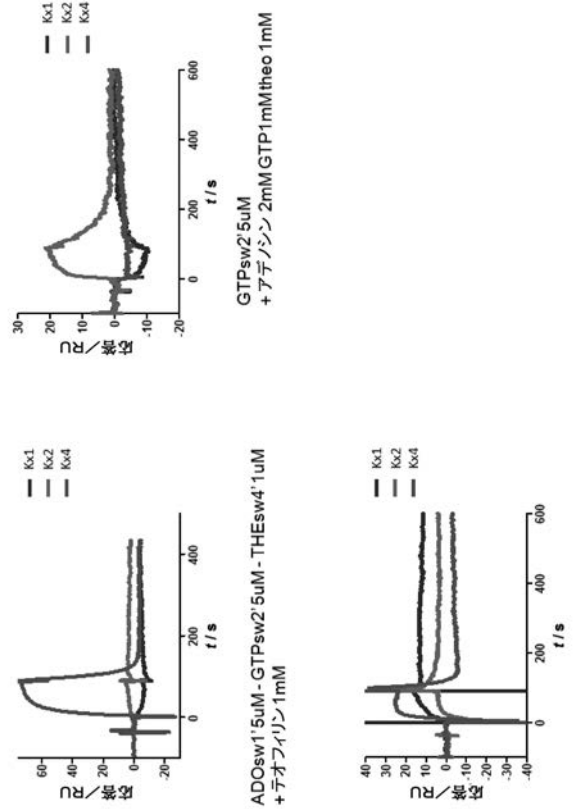
【 図 9 】



- .. + H2O
- + ATP 2mM
- + GTP 2mM
- + GTP 1mM
- + GTP 0.5mM
- + GTP 0.25mM
- + GTP 0.125mM
- + GTP 0.062mM

- ... H2O
- カフェイン 1mM
- テオフェリン 1mM
- テオフェリン 0.5mM
- テオフェリン 0.25mM
- テオフェリン 0.125mM
- テオフェリン 0.062mM
- テオフェリン 0.031mM

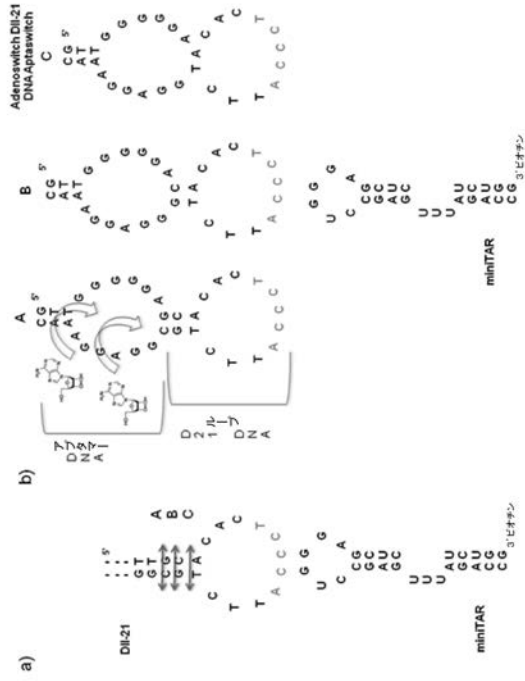
【 図 10 】



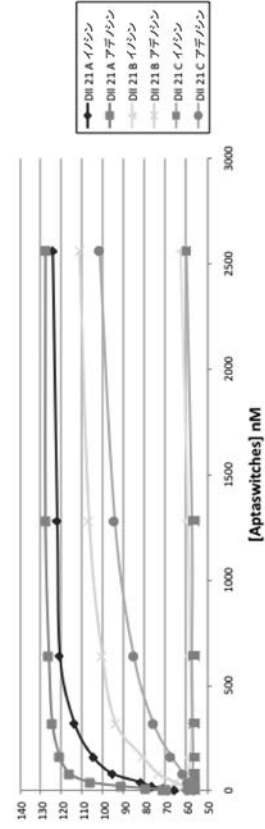
GTPsw2'5uM
+ アデニン 2mM GTP 1mM theoph 1mM

ADOsw1'5uM - GTPsw2' 5uM - THEsw4' 1uM
+ テオフェリン 1mM

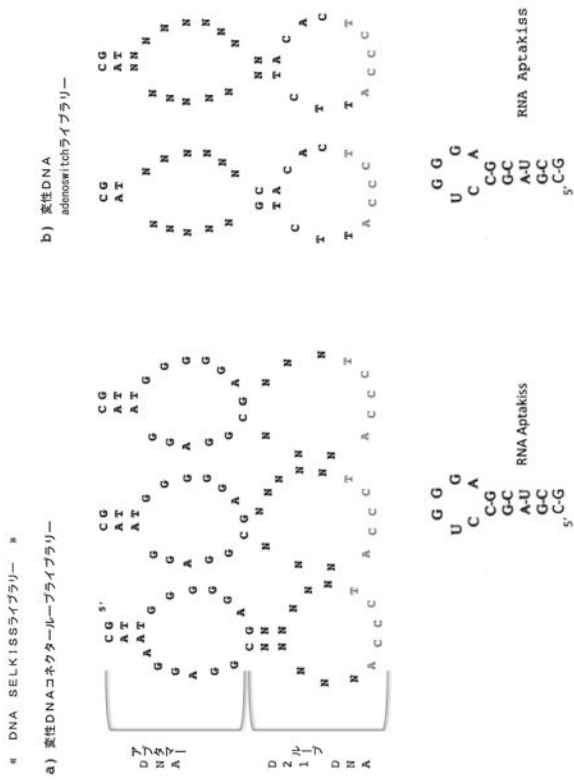
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【配列表】

2016539639000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/074548

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/11 C12N15/115 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/148085 A1 (US HEALTH [US]; UNIV CALIFORNIA [US]; SHAPIRO BRUCE A [US]; YINGLING Y) 23 December 2010 (2010-12-23) page 13, line 31 - line 32 page 45 - page 57; figures 1-3,9,25; example 21	1-57
X	WO 2008/039254 A2 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; YINGLING YAROSLAVA G [US]; SHAPIRO BR) 3 April 2008 (2008-04-03) page 27, line 30 - line 32; claims 1,5; figure 1; examples 1,2 ----- -/--	1-23, 45-51,57
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
8 May 2015		18/05/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bucka, Alexander

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/074548

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YINGLING YAROSLAVA G ET AL: "Computational design of an RNA hexagonal nanoring and an RNA nanotube", NANO LETTERS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 7, no. 8, 6 July 2007 (2007-07-06), pages 2328-2334, XP002488119, ISSN: 1530-6984, DOI: 10.1021/NL070984R [retrieved on 2007-07-06] figure 1	1-11, 19-23
A	----- PREETI SEHDEV ET AL: "Effect of Helix Stability on the Formation of Loop-Loop Complexes", BIOCHEMISTRY, vol. 51, no. 48, 24 October 2012 (2012-10-24), pages 9612-9623, XP055105765, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi300481v figure 1	1-23, 45-51,57
X	----- FRÉDÉRIC DUCONGÉ ET AL: "In vitro selection identifies key determinants for loop-loop interactions: RNA aptamers selective for the TAR RNA element of HIV-1", RNA, vol. 5, no. 12, December 1999 (1999-12), pages 1605-1614, XP055106255, ISSN: 1355-8382, DOI: 10.1017/S1355838299991318 figures 2,7	1-11, 19-44, 52-56
X	----- WO 2012/170372 A2 (UNIV CINCINNATI [US]; GUO PEIXUAN [US]) 13 December 2012 (2012-12-13) figures 2,3,5; examples 1,5	1-11, 19-23, 45-51
X	----- FABIEN DARFEUILLE ET AL: "Aptamers Targeted to an RNA Hairpin Show Improved Specificity Compared to that of Complementary Oligonucleotides", BIOCHEMISTRY, vol. 45, no. 39, 8 September 2006 (2006-09-08), pages 12076-12082, XP055105671, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi0606344 figure 1	1-11, 19-44, 52-56
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/074548

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARGUERITE WATRIN ET AL: "In Vitro Selection of RNA Aptamers Derived from a Genomic Human Library against the TAR RNA Element of HIV-1", BIOCHEMISTRY, vol. 48, no. 26, 4 June 2009 (2009-06-04), pages 6278-6284, XP055105731, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi802373d figure 1	1-11, 19-44, 52-56
X	DI PRIMO ET AL: "Systematic screening of LNA/2'-O-methyl chimeric derivatives of a TAR RNA aptamer", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 581, no. 4, 30 January 2007 (2007-01-30), pages 771-774, XP005884187, ISSN: 0014-5793 figure 1	1-11, 19-23
X	FABIEN DARFEUILLE ET AL: "Loop-loop interaction of HIV-1 TAR RNA with N3' -> P5' deoxyphosphoramidate aptamers inhibits in vitro Tat-mediated transcription", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 99, no. 15, 23 July 2002 (2002-07-23) , pages 9709-9714, XP055105994, figure 1	1-11, 19-23
A	CHWOROS A ET AL: "Building programmable jigsaw puzzles with RNA", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 306, no. 5704, 17 December 2004 (2004-12-17), pages 2068-2072, XP002396595, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/SCIENCE.1104686 figure 1	1-23, 45-51,57
A	A. D. GARST ET AL: "Riboswitches: Structures and Mechanisms", COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN BIOLOGY, vol. 3, no. 6, 13 October 2010 (2010-10-13), pages a003533-a003533, XP055108222, DOI: 10.1101/cshperspect.a003533 the whole document	1-23, 45-51,57

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/074548

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>GUILLAUME DURAND ET AL: "Riboswitches Based on Kissing Complexes for the Detection of Small Ligands", ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, vol. 53, no. 27, 10 June 2014 (2014-06-10), pages 6942-6945, XP055166366, ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201400402 the whole document</p> <p>-----</p>	1-57
T	<p>Jean-Jacques Toulmé: "Aptasensors: detecting small molecules with a kiss.", TNT Japan 2014, 31 January 2014 (2014-01-31), XP055108220, Retrieved from the Internet: URL:http://www.tntjapan.org/FILES/Keynotes/TNTJapan2014_Toulme.pdf [retrieved on 2014-03-17] abstract</p> <p>-----</p>	1-23, 45-51,57
X	<p>TOULMÉ J J ET AL: "Modulation of RNA function by oligonucleotides recognizing RNA structure", PROGRESS IN NUCLEIC ACID RESEARCH AND MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 69, 2001, pages 1-46, XP008164881, ISSN: 0079-6603, DOI: 10.1016/S0079-6603(01)69043-3 [retrieved on 2003-12-04] page 28 - pages 31,35; figure 4</p> <p>-----</p>	24-44, 52-56
X	<p>D. SCARABINO ET AL: "tRNA prefers to kiss", THE EMBO JOURNAL, vol. 18, no. 16, 16 August 1999 (1999-08-16), pages 4571-4578, XP055105998, DOI: 10.1093/emboj/18.16.4571 page 4571, right-hand column - page 4572, right-hand column</p> <p>-----</p>	24-44, 52-56
X	<p>A. YANO ET AL: "Identification of antisense RNA stem-loops that inhibit RNA-protein interactions using a bacterial reporter system", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 38, no. 10, 15 February 2010 (2010-02-15), pages 3489-3501, XP055118476, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkq027 page 3490, right-hand column - page 3492, left-hand column; figure 1</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	24-44, 52-56

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/074548

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BOIZIAU C ET AL: "DNA aptamers selected against the HIV-1 trans-activation response RNA element from RNA-DNA kissing complexes", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 274, no. 18, 30 April 1999 (1999-04-30), pages 12730-12737, XP003005118, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.274.18.12730 page 12730, right-hand column - page 12731, left-hand column; figure 3 -----</p>	24-44, 52-56
X	<p>J. B.-H. TOK ET AL: "RNA aptamers that specifically bind to a 16S ribosomal RNA decoding region construct", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 28, no. 15, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 2902-2910, XP055118432, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/28.15.2902 page 2904, left-hand column page 2910, left-hand column -----</p>	24-44, 52-56

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2014/074548**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2014/ 074548

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-23, 45-51, 57

A kit-of-parts comprising at least one nucleic acid molecule NA1 and at least one nucleic acid molecule NA2 wherein: a) the first nucleic acid molecule NA1 comprises the nucleotide acid sequence of NS1-NSK1- NS2, wherein- NS and NS2 consist of polynucleotides having at least 1 nucleotide in length, and NS 1 and NS2 have complementary sequences; - NSK1 has a nucleotide acid sequence of at least 2 nucleotides, b) the second nucleic acid molecule NA2 comprises the nucleotide sequence of NS3-NSK2-NS4 wherein :- NS3 and NS4 consist of polynucleotides having at least 1 nucleotide in length, and NS3 and NS4 have complementary sequences; - NSK2 has a nucleotide acid sequence of at least 2 nucleotides c) the nucleic acid molecules NA1 and NA2 are both capable to form in appropriate conditions at least one hairpin loop comprising the sequences NSK1 and NSK2 respectively; and d) the nucleic acid molecules NA1 and NA2 are able to form a duplex by the formation of a kissing complex between the hairpin loops comprising the sequences NSK1 and NSK2 respectively; and e) at least one nucleic acid molecule NA1 or NA2 is an aptamer exhibiting specificity and affinity for a target molecule;

a method for detecting at least one target molecule in a sample comprising the steps consisting of i) providing a kit-of-parts according to any one of claims 1 to 23 which comprises a nucleic acid molecule NA1 or NA2 which is an aptamer specific for the target molecule, wherein said aptamer is able to form a complex with the other nucleic acid molecule of the kit-of-parts only when it binds to the target molecule; ii) bringing into contact the sample with the nucleic acid molecules of the kit-of-parts and iii) detecting the formation of the duplexes formed between the 2 nucleic acids NA1 and NA2;

nucleic acid molecules comprising, or consisting of, a sequence selected in the group consisting of
 ACGAGCUGGGGCGCUCGU, UGCUCGGCCCCGCGAGCA,
 TGGGGGACUGGGGCGGGAGGAA, TTGGGGACUGGGGCGGGAGGAAA,
 GTTGGGGGACUGGGGCGGGAGGAAAC,
 UCCGAAGUGGUUGGGCUGGGGCGUGUGAAAACGGA, UGCUCGGCCGCGAGCA, and
 TGGGGGACUGCGCGGGAGGAA.

2. claims: 24-44, 52-56

A combinatorial random library consisting of nucleic acid molecules having an internal region comprising a sequence NA1 or NA2 that is able to form a kissing complex which is flanked by at least one variable region;

a method for identifying an aptamer directed against a target molecule comprising the following steps:i) contacting the target molecule with a combinatorial random library

International Application No. PCT/ EP2014/ 074548

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

according to any one of claims 24-35; ii) contacting the mixture of step i) with a nucleic acid comprising the corresponding sequence NSK1 or NSK2 sequence; iii) partitioning the nucleic acids having affinity for the target molecule from the remainder of the library wherein detecting the formation of the duplexes formed between the 2 nucleic acids comprising the sequences NSK1 and NSK2 respectively indicates the presence of nucleic acids having affinity for the target molecule;

a method for identifying an aptamer directed against a target molecule comprising the following steps: i) contacting the target molecule with a combinatorial random library according to any one of claims 24 to 27 ii) contacting the mixture of step i) with a nucleic acid comprising the corresponding sequence NSK1 or NSK2 sequence iii) partitioning the nucleic acids having affinity for the target molecule from the remainder of the library wherein detecting the formation of the duplexes formed between the 2 nucleic acids comprising the sequences NSK1 and NKS2 respectively indicates the presence of nucleic acids having affinity for the target molecule.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/074548

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010148085 A1	23-12-2010	US 2012263648 A1 WO 2010148085 A1	18-10-2012 23-12-2010
WO 2008039254 A2	03-04-2008	AU 2007300734 A1 CA 2654174 A1 EP 2035043 A2 US 2010016409 A1 WO 2008039254 A2	03-04-2008 03-04-2008 18-03-2009 21-01-2010 03-04-2008
WO 2012170372 A2	13-12-2012	CN 103403189 A US 2014179758 A1 WO 2012170372 A2	20-11-2013 26-06-2014 13-12-2012

フロントページの続き

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

(71) 出願人 595040744
 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・シャンティフィック
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 フランス国、75016 パリ、リュ・ミシェル・アンジュ 3

(71) 出願人 516065504
 ユニヴェルシテ グルノーブル アルプ
 フランス共和国、38400 サン マルタン デール、アヴェニュー セントラル 621

(74) 代理人 110001508
 特許業務法人 津国

(72) 発明者 トゥルム, ジャン - ジャック
 フランス国、エフ - 33310 ロルモン、リュ・デュ・ジェネラル・ド・ゴール 64

(72) 発明者 ドゥス, エリック
 フランス国、エフ - 33000 ボルドー、リュ・ドゥ・ラゼップ 118・テウエール

(72) 発明者 デュラン, ギヨーム
 フランス国、エフ - 33200 ボルドー、アンパッス・プティ - ベール 4

(72) 発明者 ペイラン, エリック
 フランス国、エフ - 38120 サン - テグレーヴ、リュ・シャンパヴィオット 1

(72) 発明者 ラヴレ, コリーヌ
 フランス国、エフ - 38190 エフ - ランセ、アヴェニュー・デ・パブトリ 4

Fターム(参考) 4B063 QA18 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR41 QS16 QS36 QX01 QX02