(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4803851号
(P4803851)

(45)発行日　平成23年10月26日(2011.10.26)　(24)登録日　平成23年8月19日(2011.8.19)

(51)Int.Cl.		F I		
C07H 21/00	(2006.01)	C07H	21/00	
C08G 61/12	(2006.01)	C08G	61/12	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	F
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A
G01N 27/327	(2006.01)	G01N	27/30	351

請求項の数 10　(全 15 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平10-502453
(86)(22)出願日　平成9年6月25日(1997.6.25)
(65)公表番号　特表2000-514786(P2000-514786A)
(43)公表日　平成12年11月7日(2000.11.7)
(86)国際出願番号　PCT/FR1997/001134
(87)国際公開番号　WO1997/049718
(87)国際公開日　平成9年12月31日(1997.12.31)
審査請求日　平成16年6月8日(2004.6.8)
審判番号　不服2009-25113(P2009-25113/J1)
審判請求日　平成21年12月18日(2009.12.18)
(31)優先権主張番号　96/07846
(32)優先日　平成8年6月25日(1996.6.25)
(33)優先権主張国　フランス(FR)

(73)特許権者　506423291
コミサリア　ア　レネルジィ　アトミーク　エ　オ　ゼネ　ルジイ　アルテアナティーフ
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES
フランス国　エフ－７５０１５　パリ　バティメン　”ル　ポナーン　デ”　リュ　ルブラン　２５
(74)代理人　110000796
特許業務法人三枝国際特許事務所

最終頁に続く

(54)【発明の名称】オリゴヌクレオチド／電子伝導性ポリマーの興味ある分子との複合体、およびその使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
一般式（Ｉ）：
P-O-M（Ｉ）
［式中、
Mは、タンパク質、ペプチド、及び糖ペプチドからなる群から選択される興味ある分子を示し、
Oは、一本鎖オリゴヌクレオチド、または少なくともその長さの一部分に沿って二本鎖オリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド鎖を示し、該ヌクレオチド鎖は少なくとも6個のヌクレオチドを含有し、
Pは、ピロール基を示し、
PはOとアミノアルキルアームを介して共有結合し、
MはOとアミノアルキルアームを介して共有結合している］のマクロ分子。
【請求項２】
オリゴヌクレオチド鎖Oが一本鎖オリゴヌクレオチドからなることを特徴とする、請求項１に記載のマクロ分子。
【請求項３】
オリゴヌクレオチド鎖Oの（G+C）のパーセンテージが70％以下であることを特徴とする、請求項１～２のいずれか１つに記載のマクロ分子。
【請求項４】

請求項１又は２に記載のマクロ分子P-O-Mを、該マクロ分子並びにそれが形成されたP-OおよびM試薬を含む混合物から調製する方法であって、
該混合物がMおよびP-O-Mをそれぞれ含む分画をP-O含有分画から分離可能とさせる任意の手段によって分画化される少なくとも１つの工程１、
前記工程１の後に、オリゴヌクレオチドOには関連するが興味ある分子Mには関連しないパラメーターを検出および／または測定することによって、P-O-Mを含む分画が検出および／またはP-O-Mの量が測定される工程２、
前記工程２の後に、P-O-Mを含む画分を回収する工程３、
を含むことを特徴とする方法であり、
前記オリゴヌクレオチドOには関連するが興味ある分子Mには関連しないパラメーターを検出および／または測定することが、
ｉ）240と270nmとの間の波長の紫外線の特異的吸収を測定すること、または
ｉｉ）オリゴヌクレオチドOと相補性配列を有するオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって検出すること、
である方法。
【請求項５】
そのユニットの少なくとも１つが請求項１～３のいずれか１つに記載のマクロ分子からなることを特徴とする電子伝導性コポリマー。
【請求項６】
その表面が請求項５に記載の少なくとも１つのコポリマーを含むことを特徴とする電極。
【請求項７】
請求項６に記載の少なくとも１つの電極を含むことを特徴とする、支持固体上で電極を整列してなる、電極マトリックス。
【請求項８】
それらの表面に存在するモノマーP、オリゴヌクレオチドOおよび／または分子Mの少なくとも１種において互いに異なる少なくとも２種の電極を含むことを特徴とする、請求項７に記載の電極マトリックス。
【請求項９】
表面積の単位当りオリゴヌクレオチドOおよび／または分子Mの量において互いに異なる少なくとも２種の電極を含むことを特徴とする、請求項７に記載の電極マトリックス。
【請求項１０】
少なくとも１種の分子Xの電極への結合を定性的および／または定量的にモニターするための、請求項５に記載の少なくとも１つのコポリマーの使用。
【発明の詳細な説明】
本発明は、異なる興味ある分子の電子伝導性ポリマー（ECP）への結合をコントロールする新規な方法および新規な化合物に関する；
CIS BIO INTERNATIONAL（発明者、TEOULEら）という名称のPCT出願WO94/22889は、オリゴヌクレオチドの電子伝導性ポリマー（ECP）からなる支持体への結合を記載している。
この結合は、様々な方法で実施され得る：
１）予め合成されたオリゴヌクレオチドのECPへの結合による（即ち、予め官能化されたECP上でオリゴヌクレオチドを化学反応させる又はECPモノマーを該モノマーの１種上でオリゴヌクレオチドの縮合産物と共重合させることによる）。
２）例えば、核酸を合成する標準的方法の１つを使用して、ECPに既に結合された１個のヌクレオシド、１個のヌクレオチドまたは１個のオリゴヌクレオチドを用いて出発するオリゴヌクレオチドの伸長。
オリゴヌクレオチドのECPsへの結合は、核酸配列決定や診断に特に使用され得るオリゴヌクレオチド・マトリックスの単離および使用を促進する。
丁度オリゴヌクレオチド・マトリックスのように、ペプチド・マトリックス、およびより一般には、様々な分子のマトリックスは、例えば、診断の分野で又は活性分子のスクリーニングのために、特に有利なツールとなる。従って、他のタイプのマトリックスが、ECPs

を用いてもたらされる改善から恩恵を被ることができることが望ましいであろう。
しかしながら、ECPへの、オリゴヌクレオチド以外の興味ある分子の結合、例えば、ペプチドの結合は、オリゴヌクレオチドの結合が提起する以上に大きな問題を提起する。
従って、ピロール含有アミノ酸またはジペプチドを合成する方法が文献［GARNIERら.J. Am. Chem. Soc., 116, 8813-8814（1994）］に記載されているけれども、これらは、溶液中で合成を行う方法であり、該方法は実際には、２または３アミノ酸より大きいサイズの合成ペプチド分子を十分な収率で得ることを可能にしない。しかしながら、診断の分野または活性分子をスクリーニングする分野で真に興味ある分子は、より長い；例えば、「最小の」抗原性モチーフは一般に、平均６個のアミノ酸を含む。
固体支持体上でペプチドを合成する通常の方法は、MERRIFIELD技術に由来するものであり、アミノ酸の側鎖を保護するために異なる基の使用を包含する。これらの基の除去、および合成の終結時のペプチドと支持体の分離は、強い酸媒体（フッ化水素酸またはトリフルオロ酢酸）で実施される。しかしながら、ECPモノマー、特にピロール残基は、酸媒体中で重合する傾向を有し、それにより望ましくない副産物を作り出す。
従って、溶液中で行なわれ、その可能性がジペプチドまたはトリペプチド合成に限定される合成方法も、その実施がピロール残基の安定性と不適合である化学的条件を要求する支持体上での合成も、ピロール残基によって修飾されるペプチド合成に適当ではない。
にもかかわらず、ECPモノマー、例えばピロール残基を、固相上で従来型のペプチド合成によって得られた予め形成されたオリゴペプチド上にグラフトすることが可能である。このグラフトは、公知の方法、例えば、下記スキーム［S.E.WOLOWACZら, Anal. Chem., 64, 1541-1545,（1992）］に従い、（カップリング剤で活性化された）ピロールのカルボン酸誘導体と、ペプチドの利用可能なアミノ官能基（例えば、N-末端でのアミノ官能基）の１種との間の反応によって、実施され得る。

ピロール－COOR + NH2－ペプチド　→　ピロール－CONH－ペプチド

反応の終結時に、ピロール－ペプチド複合体は、未反応ペプチドおよびピロール並びに任意の可能性のある塩および副産物を含む反応混合物から単離されなければならない。
よって先験的に、この目的のために企図することが可能であり得る様々な方法は、ペプチド精製に慣用的に使用されるもの、特に逆相クロマトグラフィー法（RP-HPLC）またはゲル濾過である。
クロマトグラフィーの終結時にペプチドを検出する最も単純な方法は、215nm～220nmの波長で紫外線吸収を測定することである；これは、全てのペプチドがこの波長で光を吸収するからである。しかしながら、215nmの領域で吸収を測定するこのアプローチは、溶媒および有機もしくは無機イオンも検出されるので、比較的不感度であること及び特異的でないことの欠点を被る。
ペプチドが、クロマトグラフィーカラム出口での「インライン」化学反応により、特異的に検出されるのを可能にする方法が存在する。この方法は、検出感度を増大させる利点を有するが、それはこの検出をより厄介なものにさせ、更に、ペプチドを非可逆的に修飾する；この修飾は特に、その機能性（例えば、その抗原性）について重大な結果を有し得る。
ペプチドに関して上記で詳述された問題は、興味ある他の分子を検出する時などにも生じる。従って、糖、ポリサッカライドまたはステロイドのような多くの物質は、UVの定められた波長でいかなる特異的吸収も示さないか、或いは、弱い吸収しか示さず、それは検出感度を損なう。
よって、クロマトグラフィーに由来するそれぞれの分画中の望ましい分子の存在を検出する適切な物理的または化学的手段を使用することが義務づけられており、そのあるものは、全く明確に多くの時間を必要とする；さらに、この分析はしばしば、問題の分析物を破壊する。
本発明の目的は、合成および精製が容易である、興味ある分子のECPモノマーとの複合体を得ることである。これを目的として、本発明者は、興味ある分子によって又はECPモノマーによって天然には所有されない特性を有する複合体を調製した。

これらの複合体では、興味ある分子とECPモノマーが、オリゴヌクレオチド鎖によって連結され、それはECPモノマーと研究中の興味ある分子との間のスペーサー・アームとして役割を果たす。

本発明は、下記一般式（Ｉ）のマクロ分子に関し：

P-O-M　（Ｉ）

［式中、

Mは、興味ある分子を示し、

Oは、オリゴヌクレオチド鎖を示し、

Pは、電子伝導性ポリマーのモノマーを示す］。

本発明の意味の範囲において、「興味ある分子」は、固体支持体上で行なわれる反応、例えば、合成反応または直接的もしくは間接的検出反応で有用な官能性を発揮する任意の分子を示すことが理解される。興味あるこの分子は、例えばこのリストに限定されることなく、タンパク質（特に酵素）、アミノ酸、ペプチド、糖ペプチド、脂質、ステロイド、糖脂質、糖、ポリサッカライド、直接的もしくは間接的にシグナルを発生することができる分子、或いは、複雑な多官能性分子などの成体分子であり得る。有利には、興味あるこの分子は、アフィニティカップルのメンバーの１つであり、例えば、ビオチンまたは潜在的に抗原性のペプチドなどであり得る。

Pは、例えば、ポリアセチレンの、ポリアジンの、ポリ（p-フェニレン）の、ポリ（p-フェニレンビニレン）の、ポリピレンの、ポリピロールの、ポリチオフェンの、ポリフランの、ポリセレノフェンの、ポリピリダジンの、ポリカルバゾールの、ポリアニリンのモノマーなどであり得る。

有利には、Pは、ピロール基である。

オリゴヌクレオチド鎖Oは、例えば、UHLMANN［Chemical Review, 90:4, 543-584（1990）］に記載されるもののような、天然のヌクレオチドおよび／またはヌクレオチド・アナローグのアッセンブリーからなり得る。それは、その長さの少なくとも一部において一本鎖オリゴヌクレオチドまたは二本鎖オリゴヌクレオチドであり得る。二つ目の場合、一方の鎖はPモノマーに共有結合し、他方の鎖は興味ある分子Mに共有結合する。

理論的には、オリゴヌクレオチドの性質または長さに制限はない；実際的には、オリゴヌクレオチド鎖は有利には、6と60との間の、好ましくは10と30との間のヌクレオチドの長さを有する。有利には、オリゴヌクレオチドO中の（G+C）のパーセンテージは、70%以下、好ましくは、50%以下である。

オリゴヌクレオチドOのECPモノマーへの結合は、PCT出願WO94/22889に記載されるように実施され得る。興味ある分子Mのオリゴヌクレオチド0への結合は、それ自身公知である、オリゴヌクレオチドを他の分子に結合するための様々な方法によって実施され得る。最も適切な方法の選択は、本質的に、興味ある分子Mの性質に依存する。

例えば、オリゴヌクレオチドOは、N-ヒドロキシスクシンイミドのエステル、アミノ酸、SH基［ARARら，Bioconjugate Chem. 6, p.573-577,（1995）］またはマレイミド基を結合することによって活性化され得る。

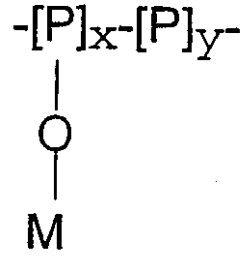
本発明はまた、上記のようなマクロ分子P-O-Mを、該マクロ分子並びにそれが形成されたP-OおよびM試薬を含む混合物から調製する方法に関し、該方法は、該混合物がMおよびP-O-Mそれぞれを含む分画をP-O含有分画から分離可能とさせる任意の手段によって分画化される少なくとも１つの工程、およびP-O-Mを含む分画が検出され、および／またはP-O-Mの量が、オリゴヌクレオチドOには関連するが興味ある分子Mには関連しないパラメーターを検出および／または測定することによって測定される工程を含むことを特徴とする。

その化学的性質およびその長さによって、オリゴヌクレオチド鎖Oは、研究中の興味ある分子による複合体の物理的特性（例えば、クロマトグラフィー中の極性）、すなわち過剰試薬から生じた複合体の至適分離を調整可能とする事実において役割を果たす。さらに、オリゴヌクレオチド鎖は、複合体が、紫外線中の240と270nmとの間（有利には265nm）の波長で、および好適な場合には、相補性配列を有するオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって特異的に検出されることを可能にする。

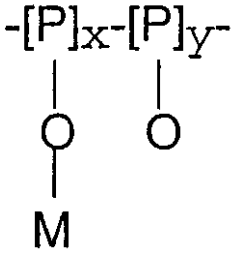
オリゴヌクレオチド鎖Oによって付与される特性は、従って、限外濾過および／または分配クロマトグラフィーあるいは相補性配列を有するオリゴヌクレオチド上でのアフィニティ・クロマトグラフィー法を用いて、それらの分離を促進することにより、興味ある分子の少量を容易に操作すること、および240と270nmとの間で特異的吸収を測定することによってそれらの検出および迅速な定量を可能にする。興味ある分子Mがペプチドであるとき、これは特に有利である；これは、265nmでのオリゴヌクレオチド吸収測定が、205nmでペプチド吸収が測定されるよりも更により鋭敏で特異的（塩および溶媒からの干渉は無い）であるからである。

本発明は、共重合体にも関し、そのユニットの少なくとも１つは、上記のようなマクロ分子P-O-Mからなる。

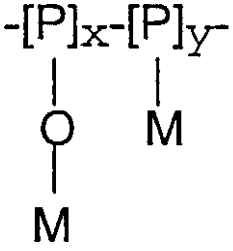
本発明に従うポリマーは、例えば、下記式（II）、（III）または（IV）の１つにより定義される：



(II)



(III)



(IV)

［式中、
xおよびyは、１に等しいか又はそれより大きい整数を示し、および
Mは、興味ある分子を示し；
Oは、オリゴヌクレオチド鎖を示し、
Pは、電子伝導性ポリマーのモノマーを示す］。

本発明に従うコポリマーにおいて、電子伝導性ポリマーのモノマーPは、互いに同一であるか又は互いに異なっても良い；オリゴヌクレオチドOも互いに同一であるか又はそれらの配列および／またはそれらのサイズおよび／またはそれらの一本鎖もしくは二本鎖の性質において異なっても良い；同様に、M分子は、互いに同一または異なっても良い。

これらのコポリマーは、１種以上の精製されたP-O-M複合体または上記のようなものを、PCT出願WO94/22889に記載されるもののようなPモノマーおよび／またはP-O複合体、および／またはP-M複合体と共重合することによって調製され得る；それらはまた、１種以上の興味ある分子Mを、PCT出願WO94/22889に記載されるもののようなECP/オリゴヌクレオチド・コポリマーのオリゴヌクレオチド側鎖の全部または幾つかに結合させることによって得られ得る。この結合は例えば、興味ある分子Mを、それ自身ECPに結合されているオリゴヌ

クレオチドOに共有結合させることにより、或いは、その長さの少なくとも幾つかに沿って該オリゴヌクレオチドOにハイブリダイズされるオリゴヌクレオチドによって、実施され得る。
本発明に従うコポリマーは、興味ある分子を固体支持体、特に電極に結合させることが慣用的である全ての用途で使用され得る。
本発明は、本発明に従う少なくとも１種のコポリマーをその表面に含む電極に関する。
例えば、本発明に従う電極の表面は、本発明に従い、単一のコポリマーで全体的にカバーされ得る；それはまた、本発明に従い、成分P、OまたはMの少なくとも１種により互いに異なる幾種かのコポリマーを含み得る；これ又はこれらのコポリマーはまた、同じ電極上で他のポリマー、例えば、PCT出願WO94/22889に記載されるもののようなECP/オリゴヌクレオチド・コポリマーと、或いは、例えば、上記のようなPモノマーの重合から生じるECPsのような、異なる性質のポリマーと会合し得る。
本発明に従うポリマーは、興味ある分子のマトリックス、特に上記のような本発明に従う少なくとも１種の電極を含む電極マトリックスを構築するために使用され得る。
１つ及び同じマトリックスの異なるポイントを構成する電極は、それらの表面上および／またはOオリゴヌクレオチド中および／またはこれらのコポリマーの側鎖のM分子中に存在するコポリマーの組成に含まれるPモノマーにおいて異なっても良い；それらはまた、表面積の単位当りのこれらの側鎖の量において互いに異なっていても良い。
１つ及び同じマトリックスの電極の幾つかは、本発明に従うコポリマー以外のポリマー、例えばPCT出願WO94/22889に記載されるもののようなECP/オリゴヌクレオチド・コポリマーを含み得る。企図された使用に応じて、このECP/オリゴヌクレオチド・コポリマーは、そのようなものとして維持され得るか、或いは、直接的に又は興味ある分子を含む別のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって、興味ある他の分子を結合するのに使用され得る。
そのようなマトリックスは、予め定められた電極上で標的化される様式で、所望のポリマーを析出させることにより調製され得る；例えば、本発明に従うコポリマーは、P-O-M複合体および／または１つ又は同一のP-O-M複合体の各種量とPモノマーおよび適切な場合にはP-OおよびP-M複合体との標的された電気化学的共重合によって選択された電極上で析出され得る。本発明に従うマクロ分子P-O-Mおよびコポリマーの使用は、従って、多機能性マトリックスを単純な様式で得ることを可能にする。
本発明に従うP-O-M複合体はまた、電子伝導性ポリマー支持体に結合されているオリゴヌクレオチド・マトリックスを測定するのに使用され得る。従って、本発明者は、O-M側鎖の量と電子伝導性ポリマー支持体に結合したオリゴヌクレオチドの量との間の再現可能な相関関係を確立することが可能であることを観察した。結果として、所与の実験条件下でO-M側鎖の電極への結合の測定は、同じ実験条件下で別の電極（同じマトリックスまたは別のマトリックスの）に結合されるオリゴヌクレオチドの量を予測可能にする。
本発明に従うP-O-M複合体およびコポリマーの使用は、内部コントロールを構成する電極を得ることを可能にし、電子伝導性ポリマーを含む電極の表面からなる固体支持体への分子Xの結合を定性的および／または定量的にモニターすることを可能にする。分子Xの結合のこのモニターは、任意の時間（これらの分子が析出した後またはこれらの分子が使用されている間）に実施され得る。その結合が、本発明に従うコポリマーを用いて検出され得る分子Xは、様々な性質のものであり得る；有利には、それらは、少なくとも１種のオリゴヌクレオチド鎖Oおよび／または１種の興味ある分子Mを含み、使用される本発明に従うコポリマーのものと同一または異なり得る。
本発明に従うポリマーは、同じポリマー或いは、同じ電極または同じマトリックスもしくは異なるマトリックスの別の電極上に析出された、同じ式のポリマーの側鎖の１つを構成する分子Xを検出および／または定量するのに使用され得る。それはまた、異なるポリマーに属し、それはまた同じ電極または同じマトリックスもしくは異なるマトリックスの別の電極上に析出され得る分子Xの検出および／または定量に使用され得る。
この検出および／または定量は、例えば、標識プローブとのハイブリダイゼーションによ

って、本発明に従うコポリマーのオリゴヌクレオチド鎖Oを検出することにより、或いは、マトリックスの１以上の電極上で、容易に検出可能な標識を構成する興味ある分子M（例えば、ビオチンまたは蛍光標識）を含む、本発明に従うコポリマーを用いることによって、実施され得る。

本発明は、以下に続くおよび、本発明に従うマクロ分子およびコポリマーを調製および使用する実施例を参照する残りの説明の補助を得て、より良く理解される。

実施例１：ペプチドのスペクトルおよびクロマトグラフィー特性

分子量1652.1ダルトンを有しACTH（副腎皮質刺激ホルモン）フラグメント11-24に対応する、市販されている合成ペプチド（カタログ番号A2532 SIGMA-ALDRICH Chimie）を使用して、生物学的興味のあるペプチドを検出することにより提起される問題を例示する。製造者の使用説明書によると、調製物のペプチド含量は61%である。

25μlの該ペプチドの2mg/ml溶液を、LICHROSPHER▲R▼ RP-18E 5μm 125-4のHPLCカラム（MERCK、ダルムシュタット、ドイツ）上に注入する。カラムを、混合物A+B（A=5% ACN（アセトニトリル）、25mM TEAAc（トリエチルアンモニウムアセテート）；B=50% ACN、25mM TEAAc）を0%～100%Bの勾配で使用して、35分間（1ml/分）溶出する。

保持時間Rt=2分のピークおよびRt=10分の比較的ブロードなピークが観察される。これらの２つのピークに対応する分画を集め、濃縮し、そして分析する。

分画F1（Rt=2分）は、A_{220nm}=1.033の吸収を示す。他方、A_{275nm}は、バックグラウンド・ノイズ（0.005）と同じオーダーである。この分画は、従って、塩を含む（非特異的A_{220nm}）。

分画F2（Rt=10分）は、A_{220nm}=1.90およびA_{275nm}=0.073の吸収を示す。この分画は、従って、ペプチドを含む。

これは、215～220nmの範囲のUV検出は、それ自身では、ペプチドによるクロマトグラム上のシグナルを、他の物質の干渉シグナルから判別可能とはしないという事実を示す。

分子量2465.7ダルトンを有しACTHフラグメント（18-39）に対応する、市販されている合成ペプチド（カタログ番号A0673 SIGMA-ALDRICH CHIMIE）を、同様にしてRP-HPLCにより分析した。製造者の使用説明書によると、サンプルのペプチド含量は82%である。

HPLC分析は上記と同じ条件下で行ない、分画は215nmのUVで検出される。

Rt=18.45分を有する１つの主要なピークが観察される；このピークは、ACTHフラグメント（11-24）で観察されるものよりも狭い。

この実験は、２つの異なるペプチド・フラグメントが、非常に異なる保持時間で特徴付けられるピークを示すことを実証する。HPLCプロフィールの比較も、ピークがACTH（11-24）の場合のように広くなり得ることを示す。

実施例２：ピロール残基およびアミノアルキル・アームの両方で修飾されるオリゴヌクレオチドの合成

配列：

5’HO-dC^{ピロール}-（T）$_{10}$-p-dC^{アミノヘキシル}-p-dTOH3’

を有する修飾されたオリゴヌクレオチドを、BEAUCAGEおよびLYER［Tetrahedron., 48, 2223-2311,（1992）］に記載される「ホスファイト-ホスホルアミダイト」法を用いて、固体支持体（CPG（制御孔ガラス））上で合成する。

この合成の主要な工程を、以下で説明する。

5’-O-（4,4’-ジメトキシトリチル）-N-4-（6-アミノヘキシル）-2’-デオキシシチジンから誘導されるアミノアルキル-ホスホルアミダイト［ROGETらNucleic Acids Res., 17, 7643-7650,（1989）］を調製する。

このアミノアルキル-ホスホルアミダイトは、２工程で得られる：ヌクレオシドに含まれるアルキルアミン・アームの第一級アミンを、トリフルオロアセチル基で保護し、その後、SPROATら［Nucleic Acids Res. 15, 6181-6196,（1987）］による5’-トリフルオロアセトアミド-2’,5’-ジデオキシチミジンのホスホルアミダイトの場合には、SPROATら［Nucleic Acids Res. 15, 6181-6196,（1987）］に記載されるのと同様の方法を用いて、3’-ヒドロキシルをホスフィチル化（phosphitylation）する。

このようにして得られたアミノアルキル-ホスホルアミダイトを、予めカラムに結合されていたチミジンによって、DNAシンセサイザーのカラムにカップリングする。
AGRAWALら［Nucleic Acids Res., 14, 6227,（1986）］；CONNOLLY［Nucleic Acids Res., 15, 3131,（1987）］；並びにBEAUCAGEおよびLYER［Tetrahedron. 49, 1925-1963,（1993）］に記載されるもののような、他のアミノアルキル-ホスホルアミダイトも使用され得る。
続いて、チミジンのホスホルアミダイトを、カラムに結合されているアミノアルキル-ホスホルアミダイトと縮合する。この工程は、10量体のオリゴヌクレオチド鎖が得られるまで繰り返される。
PCT出願WO94/22889およびLIVACHEら［Nucleic Acids Res., 22, 2915-2921,（1994）］に記載されるプロトコールに従ってピロール残基がグラフトされた5’-O-（4,4’-ジメトキシトリチル）-N-4-（6-アミノヘキシル）-2’-デオキシシチジンのホスホルアミダイトを、得られたオリゴヌクレオチドの5’末端上で縮合する。
オリゴヌクレオチドを、”Oligonucleotide synthesis: A practical approach, M.J.Gait編, IRL Press, Oxford”に記載される方法に従い、濃アンモニア（55℃で16時間）中で脱保護し、50mMトリエチルアンモニウムアセテート（緩衝液A; 5%アセトニトリル, 緩衝液B: 50%アセトニトリル;流速5ml/分、20分間で10%B～25%Bの勾配）中のアセトニトリル勾配を用いて、LICHROSPHER▲R▼ RP-18E 250-10（10μm）カラム（MERCK、ダルムシュタット、ドイツ）上で、HPLCにより精製する。
主要なピーク（15分より長い保持時間）に対応する分画を留去する。留去後、得られたオリゴヌクレオチドを、NAP-5▲R▼カラム（PHARMACIA-LKB BIOTECHNOLOGY、ウップサラ、スウェーデン）を通して濾過して脱塩する。
実施例３：N-ヒドロキシスクシンイミドエステルの形態の活性オリゴヌクレオチドの調製
上記の実施例２に記載される方法に従い調製された、修飾されたオリゴヌクレオチド（以下、pyr-T_{10}-NH2と称する）を、下記のプロトコールに従って、その対応する活性化中間体（N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）に変換する。
凍結乾燥されたオリゴヌクレオチドpyr-T_{10}-NH2（10～25nmol）を、12μlの50mM N-（3-スルホプロピル）モルホリン（MOPS）緩衝液、pH7.0に取る。4μmolのスベリン酸ジスクシンイミジル（DSS、ピアースロックフォード、イリノイ州）を含むジメチルホルムアミド28μlを、この溶液に加え、次に混合物を機械的攪拌（16時間4℃または5時間20℃で）を続ける。反応混合物を、水で平衡化されていたNAP-5▲R▼カラム上に載せ、カラムを製造者に推奨されるプロトコールに従い、水で溶出する。排除された分画（1ml）を、1mlのn-ブタノールで５回抽出する。それぞれの抽出では、混合物を遠心分離し、その後で上部（有機）相を棄て、下部（水性）相を維持する。最後の抽出後、試験管の底に沈殿していたN-ヒドロキシスクシンイミドエステル（以下、pyr-T_{10}-NHSと称する）を真空で乾燥（SPEED-VAC）し、続いて、それが使用されるまで（好ましくは、24時間未満）-20℃で貯蔵する。
LICHROSPHER▲R▼ RP-18E/125-4（5μm）カラム（MERCK、ダルムシュタット、ドイツ）上での分析的HPLCを、異なる反応時間での反応混合物のアリコートについて行なう；50mMトリエチルアンモニウムアセテート中アセトニトリルの勾配（緩衝液A; 5%アセトニトリル, 緩衝液B: 50%アセトニトリル）；流速１ml/分、20分間で10%B～30%B、その後15分間で30%B～50%Bの勾配を溶出に使用する。このクロマトグラフィー分析は、pyr-T_{10}-NH_2オリゴヌクレオチド・ピーク（保持時間、約19分）の消失およびN-ヒドロキシスクシンイミドエステル（pyr-T_{10}-NHSと称する）に対応するピーク（保持時間、約27分）の出現を示す。
実施例４：修飾されたオリゴヌクレオチドのペプチドへのカップリング
A）ACTH（11-24）フラグメントへのカップリング：
実施例３に記載されるようにして得られた20nmolのpyr-T_{10}-NHSを、50mlのMOPS緩衝液（50mM、pH7.8）に取る。ACTH（11-24）ペプチド（SIGMA、セントルイス、米国）（26nmol、1.3当量）を、50μlのMOPS緩衝液、pH7.8に加える。混合物を4℃で一晩インキュベートす

る。
pyr-T_{10}-NHSの消失およびオリゴヌクレオチド・ペプチド複合体に対応する主要なピーク（保持時間、約26.4分）の出現は、実施例３のものと同一である条件下で行なわれる分析的HPLCで見られる。
反応混合物を、50mMトリエチルアンモニウムアセテート中アセトニトリル勾配を用い、LICHROSPHER▲R▼ RP-18E/125-4（5μm）カラム上で、セミプレパラティブHPLCにより精製する。溶出は、実施例３に記載される分析的HPLCと同じ条件下で行なう。
オリゴヌクレオチド-ペプチド複合体を、265nmでUV吸収を測定することによって検出し、24～25.5分の保持時間に対応する分画中に集める；この分画を、留去（SPEED-VAC）によって乾燥する。これは、pyr-T_{10}-ACTH（11-24）と称する約3.7nmolの複合体を生じる。
B）ACTH（18-39）フラグメントへのカップリング：
オリゴヌクレオチドエステルpyr-T_{10}-NHS（実施例３）（約20nmol）を、約1.8当量である約35nmolのACTH（18-39）フラグメント（SIGMA、セントルイス、米国）にカップリングし、pyr-T_{10}-ACTH（18-39）と称するカップリング生成物を、上記A）に記載されるプロトコールを用いて精製する。
pyr-T_{10}-ACTH（18-39）複合体を、26～27分の保持時間に対応する分画中で検出する。この分画が乾燥された後、約7nmolの複合体が得られる。
実施例５：ピロール-T_{10}-ビオチン複合体の合成：
配列pyr-T_{10}-NH2を有する修飾されたオリゴヌクレオチド（10～20μmol）を、炭酸塩緩衝液（1M）、pH9中のジメチルホルムアミド20μlに溶解された過剰のビオチン-NHS（約50当量）（SIGMA）で処理する；混合物を、20℃で30分間インキュベートする。
反応混合物を、排除カラム（NAP PHARMACIA）上で精製し、pyr-T_{10}-bio複合体（Rt=23分）を、実施例３の条件下で行なう分析的HPLCランにより、残余pyr-T_{10}-NH2オリゴヌクレオチド（Rt=18分）から分離する。分画を、265nmで検出する。
実施例６：PYR-T_{10}-ペプチドおよびPYR-T_{10}-ビオチン複合体の電解重合
実施例４Ａ）、４Ｂ）および５に記載されるように合成された複合体は、金被覆シリコン微小電極上で電解重合によって析出される。
これらの微小電極を整列して、「チェッカー盤」形態のマトリックスを作る；このマトリックスは、下記のスキーム（n=5列およびp=4行）に従い、５行４列に整列された辺50μmを有する正方形微小電極から形成される。微小電極は、それらの座標（i;j）によって同定される。
電解重合は、$LiClO_4$の0.1M溶液中に関心のあるピロール-オリゴヌクレオチド複合体の生体分子およびピロール（ピロール/複合体のモル比 = 約10,000）を含む媒体中に電極マトリックスを浸漬して行なう。その上で析出を実施することが望まれる電極をポテンシオスタットに接続し、-0.35V～+0.85Vのサイクル（電解セルに接続されポテンシオスタットに接続されたカロメル電極に対して測定された電位）を100mV/sの速度で行う。対極は、白金ワイアーからなる。
幾つかの微小電極は、ポリピロールおよび複合体から形成されたコポリマーで被覆される：
-pyr-T_{10}-ACTH（18-39）：電極（1;4）および（3;4）
-pyr-T_{10}-bio：電極（2;3）および（4;4）。
残りの電極は、それらの初期状態で維持される、即ち、金析出は不変に維持される（GOLD）、或いは、非修飾ポリピロール（PP）で被覆される；これらの電極は陰性コントロールを構成し、それはマトリックス上で行なわれる反応の特異性を評価可能とする。
下記の表Ｉは、微小電極マトリックスおよび異なる析出の位置を図表で示す。

表　I

i \ j	1	2	3	4	5
1	GOLD	GOLD	GOLD	ACTH	GOLD
2	GOLD	GOLD	BIO	GOLD	GOLD
3	PP	PP	PP	ACTH	PP
4	PP	PP	PP	BIO	PP

GOLD: 析出なし

PP: ポリピロール析出

実施例７：電極上で電解重合される生体分子の明示

実施例６で構築された電極マトリックスを、ストレプトアビジン-フィコエリトリン複合体（1mg/ml MOLECULAR PROBES 0.5M NaClおよび0.05% TWEEN 20を含む10mMリン酸緩衝液、pH7.4中1/20希釈されたストレプトアビジン-R-フィコエリトリンの市販溶液）存在下にインキュベートする。

エピ蛍光(épifluorescence)

顕微鏡下の観察は、蛍光が電極（2;3）および（4;4）上に位置することを実証する。他の電極上に干渉蛍光はなく、ピロール-オリゴヌクレオチド-ビオチン複合体が、所望の標的電極に特異的に結合したことを明示する。

同じ微小電極マトリックスを、ACTH 18-39ペプチド（ACR-17-bio抗体: CIS BIO INTERNATIONAL）のC末端部分に特異的であるビオチン化抗体の存在下に、続いてストレプトアビジン/フィコエリトリン複合体の存在下にインキュベートして、反応生成物を現わす。

エピ蛍光顕微鏡下の観察は、ピロール-オリゴヌクレオチド-ACTH複合体を含む微小電極およびビオチンを含むそれらのみが蛍光性であることを示し、ピロール-オリゴヌクレオチド-ACTH複合体が所望の標的電極に特異的に結合し、抗体に接近可能であり、その抗原性が維持されていたことを明示する。

実施例８：

実施例４に記載される方法を用いて、配列5’pyr-T_9-NH2を有する、実施例２に記載されるプロトコールに従い合成されたオリゴヌクレオチド-ピロールから、実施例３に記載される方法を用い調製されたN-ヒドロキシスクシンイミドのオリゴヌクレオチド-ピロールエステルに、ACTH（18-39）フラグメントをカップリングする。

P-O-M型の下記の複合体が、このように利用可能となる：

I.　pyr-T_{10}-ACTH（11-24）

II.　pyr-T_{10}-ACTH（18-39）

III. pyr-T_9-ACTH（18-39）
IV. pyr-T_{10}-ビオチン
V. pyr-T_5-HCVG（T_5アームとHCVウイルスのゲノムの特異的配列とを結合して形成される）
実施例６に記載される電解重合法に従い、複合体I～Vを、辺100μmを有する正方形微小電極の格子上に電気化学的に析出する。
下記の表IIは、微小電極格子および異なる析出の位置を図表で描く。
幾つかの電極は、被覆されないで維持されるか（GOLD）、非修飾ポリピロール（PP）で被覆される。

表 II

i\j	1	2	3	4	5	6	7	8
1	GOLD	IV	I	I	III	GOLD	V	PP
2	PP	III	II	II	IV	GOLD	V	GOLD

この微小電極プレートを、配列dC^{ビオチン}（dA）$_9$を有する、ROGETら［Nucleic Acids Res., 17, 7643-7650（1989）］に記載されるホスホルアミダイト・ビオチンを用いて、実施例２に従い調製され精製されたオリゴヌクレオチド・プローブとともにインキュベートする。
ハイブリダイゼーションを、0.5M NaCl/TWEENを含む200μlのハイブリダイゼーション緩衝液（0.1Mリン酸緩衝液、pH7.4）中で、約8pmolのオリゴヌクレオチド・プローブを用い、20℃で30分その後4℃で30分間行う。
続いて、ハイブリダイゼーション緩衝液中に1/20希釈されたストレプトアビジン-フィコエリトリン溶液（1mg/ml MOLECULAR PROBESストレプトアビジン-R-フィコエリトリンの市販溶液）中でインキュベートする（4℃で10分間）ことにより可視化が実施される。
蛍光顕微鏡下に調べた後、電極（1;2）および（2;5）は強く陽性であり、電極（1;3）、（1;4）、（2;3）および（2;4）は陽性であるが、電極（1;5）および（2;2）はより弱い蛍光を示し；（1;7）および（2;7）を含む全ての他の電極は、バックグラウンド・ノイズを上回るいかなる蛍光も示さないことが観察される。
複合体IV（pyr-T_{10}-ビオチン）は、陽性の可視化コントロールとして役割を果たす。プレートが初めて使用されるとき、それは、ストレプトアビジン/フィコエリトリン・コンプレックスによる可視化を保証する。0がT_{10}配列を有するオリゴヌクレオチドであるP-O-M型複合体を含む４つの微小電極、即ち、（1;3）、（1;4）、（2;3）および（2;4）は、陽性ハイブリダイゼーションを示し、よってこれらの電極上でP-O-M型化合物が共重合されたことを保証する。
電極（1;5）および（2;2）上で観察される弱いハイブリダイゼーション、並びに電極（1;7）および（2;7）上のハイブリダイゼーションの不存在は、ハイブリダイゼーションの選択性を明示し、実施されるべきハイブリダイゼーションによってこの希釈を可能とし、5～9ヌクレオチド長であると推定され得る複合体のオリゴヌクレオチド部分のサイズの下限値を示す。
実施例９：
実施例５に記載されるP-O-M型複合体pyr-T_{10}-Bioは、水溶液中で濃度140 A_{265}U/mlで使用され、この複合体の0部分のUV吸収特性により1.17μmol/ml（ε_{265}=120,000）であるモル濃度を測定可能とする。
複合体のある範囲の連続希釈物（1/5; 1/25; 1/50; 1/250; 1/1250）を水で調製し、10μlの各希釈物を、0.1M $LiClO_4$中ピロール20mM溶液300μlに加える。
共重合は、微小電極上で、実施例６に記載されるように様々な濃度のpyr-T_{10}-Bio複合体を含む溶液を用いて行なう。ピロール/複合体のモル比は、それぞれの電極で異なる。
下記の表IIIは、微小電極格子および異なる析出の位置を図表で示す。

表 III

i\j	1	2	3	4	5	6
1	GOLD	1/5	1/25	1/50	1/250	1/1250
2	PP	1/5	1/25	1/50	1/250	1/1250

0.5M NaClおよび0.05% Tween 20を含む10mMリン酸緩衝液、pH7.4中のストレプトアビジン/フィコエリトリンの1/20溶液をインキュベートすることにより、可視化を実施する。
電極プレートは、それ自身、画像分析プログラム搭載マイクロコンピューターに接続されたCCD（HAMAMATSU）カメラに連結されているエピ蛍光顕微鏡下に観察される。
露出の時間は、検出の感度を変化させるために調整され得る。
0.5秒、1秒、2秒、4秒、8秒および16秒の露出時間を用いると、少なくとも３つの隣接する接触物（1;2）、（1;3）および（1;4）が、増大する強度（1;2>（1;3）>1;4）である蛍光シグナルを常に与えることが観察される。接触物（1;1）および（2;1）は、バックグラウンド・ノイズ値を与える。
接触ペアー（1;2）および（2;2）、（1;3）および（2;3）などの各メンバーから与えられるシグナルは、同じオーダーのものであり、再現性の指標を与える。
これは、異なる電解質溶液中に導入されたP-O-M型化合物の初期量（最初に265nmでの吸収によって定量された）と、蛍光強度が相関することを明示する。
実施例10；
ａ）（28-41）が、ヌクレオチド34でG→A突然変異を有するヒトk-ras配列のセンス鎖のヌクレオチド28～41の配列を示す、式pyr-5’（T_{10}）-k-$ras_{(28-41)}$を有するピロール-オリゴヌクレオチド複合体（ピロール-（T_{10}）-k-ras）の様々な量が、実施例６に記載されるように一定量のピロール（600μlの0.1M $LiClO_4$中20mMピロール、すなわち1.2×10^{5}mol）存在下、下記の表IVに示されるように、金被覆された正方形微小電極（50μm×50μm）のプレートの５個の異なる微小電極上に電解重合された。

表 IV

析出	複合体の量	ピロール／複合体の比
1	3×10^{-9} mol	4 000
2	6×10^{-10} mol	20 000
3	$1,2\times10^{-10}$ mol	10^{5}
4	$2,4\times10^{-11}$ mol	5×10^{5}
5	$4,3\times10^{-12}$ mol	$2,5\times10^{6}$

ｂ）同じ手順を、P-O-M型複合体ピロール-T_{10}-ビオチンを用い、下記の表Vおよび図1（ｂ）に示される範囲を用いて、同じプレートの５個の他の微小電極上で行う。

表 V

析出	複合体の量	ピロール／複合体の比
1	$6,6\times10^{-9}$ mol	1800
2	$6,6\times10^{-10}$ mol	18000
3	$1,3\times10^{-10}$ mol	9×10^{4}
4	$2,6\times10^{-11}$ mol	$4,5\times10^{5}$
5	$5,3\times10^{-12}$ mol	$2,25\times10^{6}$

プレートを、45℃で30分間、k-$ras_{(28-41)}$配列に相補的である5’-ビオチン化オリゴヌクレオチドの存在下にインキュベートする。ビオチン化オリゴヌクレオチドの$2A_{260}$U/ml溶

液を使用し、この溶液は、0.5M NaClおよび10mM EDTAを含む10mM PBS緩衝液、pH7.4に1/1000希釈されている。0.5M NaClおよび0.05% TWEEN 20を含む10mM PBS緩衝液で洗浄した（20℃）後、プレートを、0.5M NaClおよび0.05% TWEEN 20を含む10mM PBS緩衝液pH7.4に1/20希釈されたストレプトアビジン-フィコエリトリン溶液（1mg/ml MOLECULAR PROBESストレプトアビジン-R-フィコエリトリンの市販溶液）中でインキュベート（20℃で10分間）する。

プレートは、画像分析ソフトウェア（IMAGE PRO）搭載コンピューターに接続されたCCDカメラ（積分時間t_i=2秒；増大=×4）に設置されているエピ蛍光顕微鏡（OLYMPUS）下に観察される。

ピロール-T_{10}-k-rasおよびピロール-T_{10}-ビオチン複合体の範囲で得られる蛍光測定値を、図１に示す：

（—□— = k-ras；—●— = ビオチン）、

それは、電解重合の間にセル中に存在する複合体の初期量に対してプロットされた、それぞれの電極上の蛍光を描き、よってピロール/複合体のモル比である。

この実験は、ピロール/P-O-Mまたはピロール/オリゴヌクレオチドのモル比の選択が、それぞれの電極上にグラフトされる分子の量をコントロール可能とすることを明示する。

実施例11：

Pyr-T_{10}-ビオチン複合体は、実施例６に記載されるプロトコールに従って電解重合によって、50μm平方の電極から形成された微小電極マトリックス上で（実施例６を参照）、下記の表VIの最初の２行に示される整列（i/j座標で示される）に従い析出される。２シリーズの同一の析出、B_nおよびB_n'を実施する；析出B_1およびB_1'を、複合体の同じ溶液から調製された２つの溶液を用い連続的に行なう；電極およびセルは、それぞれの析出の間に洗浄する。同じ手順が、B_2およびB_2'などに採用される。各シリーズの析出を、［B_2］=［B_1］/5；［B_3］=［B_2］/5のような５倍希釈物（水中）を用いて行なう。これらの希釈物は、その濃度が125mmol/l（OD_{265}測定、ε_{265}=120,000である）と推定されるPyr-T_{10}-ビオチンの親溶液から得られる。8μlの各希釈物を、600μlの電解重合溶液（0.1M $LiClO_4$中、20mMピロール）で使用する。Pyr-T_{10}-ビオチン複合体の濃度（C）、［ピロール］/［Pyr-T_{10}-ビオチン］比（R）、および電解重合セル中に初期に存在するPyr-T_{10}-ビオチン複合体の量は、それぞれのB_1/B_1'；B_2/B_2'；などの群に関して、下記の表VIに示される。

表　VI

i\j	1	2	3	4	5	6	7
1	GOLD	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	GOLD
2	GOLD	B_1'	B_2'	B_3'	B_4'	B_5'	GOLD
C(μmol/l)	-	125	25	5	1	0.2	-
R	-	1.2×10^4	6×10^4	3×10^5	1.5×10^6	7.5×10^6	-
Q(mol)	-	1×10^{-9}	2×10^{-10}	4×10^{-11}	8×10^{-12}	1.6×10^{-12}	-

電極プレートを洗浄後、ストレプトアビジン-フィコエリトリン複合体の存在下にインキュベート（20℃10分間、0.5M NaClおよび0.05% TWEEN20を含む10mM PBS緩衝液、pH7.4に1/10希釈された市販溶液）することによって、可視化を実施する。

同じ緩衝液でリンスした後、CCD HAMAMATSUカメラおよびIMAGE PRO画像分析ソフトウェアを搭載した蛍光顕微鏡（積分時間t_i=2秒；増大=×4）下にプレートを観察する。このソフトウェアを用いると、それぞれの析出の蛍光を点ごとに測定することが可能である。

結果を、下記の表VIIに示す、ここで、蛍光は、表VIおよび図２の座標システム（i;j）に従い、任意の蛍光単位（AFU）で、それぞれの析出に関して示され、図２は、電解重合セル中のPyr-T_{10}-ビオチン複合体の初期量に対してプロットされたAFU中の蛍光を描く（□＝Bシリーズ；・＝B'シリーズ）。

表　VII

i＼j	1	2	3	4	5	6	7
1	10	206	97	55	21	21	11
2	11	208	100	51	22	12	9

これらの結果は、明らかに、電解重合混合物中の、反応（蛍光）とピロール-T_{10}-ビオチン複合体の初期量（ピロールの濃度は一定であるので、初期［ピロール］/［Pyr-T_{10}-ビオチン］比）との間の直接比例関係を明示する。

P-O-M型の化合物の使用は、従って、電解質溶液中に存在するピロール（pyr-T_{10}-bio）複合体の量を単純な方法でモニターし、電極マトリックスに関して目盛りを定める範囲を作ることを可能にする。

【図１】

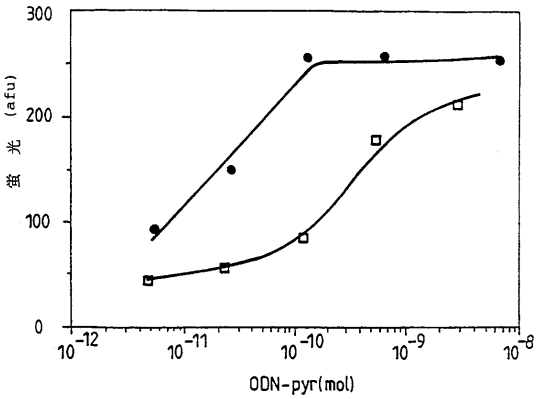


FIG.1

【図２】

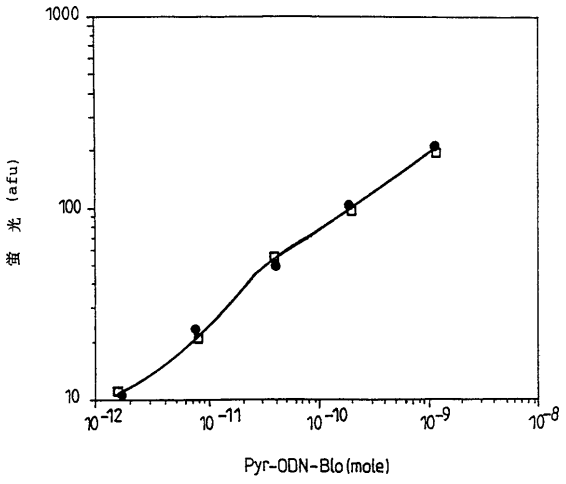


FIG.2

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
G01N 27/416 (2006.01) G01N 27/46 336G

(72)発明者 マルシャン ジョゼフ
フランス国 エフ－９１４００ オルセー レジダンス ドゥ シェブレウス 3
(72)発明者 バジン エルヴェ
フランス国 エフ－３０４００ ヴィレニューブ レ アヴィニョン イムパセ レネック バチマン １１ レジダンス “レ ジェネ”

合議体
審判長 川上 美秀
審判官 森井 隆信
審判官 穴吹 智子

(56)参考文献 国際公開第９４／２２８８９号

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07H21/00, C08G61/12, C12N15/00, C12Q1/68, G01N 27/00
BIOSIS/WPIDS