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

特許第4065555号
(P4065555)

(45)発行日　平成20年3月26日(2008.3.26)　(24)登録日　平成20年1月11日(2008.1.11)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C40B 50/00	(2006.01)	C40B	50/00	ZCC
C40B 40/00	(2006.01)	C40B	40/00	
C07H 21/04	(2006.01)	C07H	21/04	B
C07K 14/00	(2006.01)	C07K	14/00	

請求項の数 4　(全 36 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平5-517730
(86)(22)出願日　平成5年3月30日(1993.3.30)
(65)公表番号　特表平7-505530
(43)公表日　平成7年6月22日(1995.6.22)
(86)国際出願番号　PCT/US1993/003127
(87)国際公開番号　WO1993/020242
(87)国際公開日　平成5年10月14日(1993.10.14)
審査請求日　平成12年3月30日(2000.3.30)
(31)優先権主張番号　860,445
(32)優先日　平成4年3月30日(1992.3.30)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　593052785
ザ　スクリップス　リサーチ　インスティテュート
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９２０３７　ラ　ジョラ　ノース　トーリー　パインス　ロード　１０５５０
(74)代理人　100059959
弁理士　中村　稔
(74)代理人　100067013
弁理士　大塚　文昭
(74)代理人　100065189
弁理士　宍戸　嘉一
(74)代理人　100084009
弁理士　小川　信夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】コードされた組合わせ化学ライブラリー

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

式Ａ－Ｂ－Ｃで表される二官能分子

［式中、Ａは、ポリペプチドであるポリマーであり、かつ、

式：（X_n）－…－（X_3）－（X_2）－（X_1）

（式中、X_1、X_2、X_3、…X_nは、それぞれ該ポリマーＡを構成する単一化学単位であり、かつ、ポリペプチドのサブユニットであり、

ｎは該ポリマーＡ中のＸの位置を同定する番号であり、４～５０の整数である）で表される線状の化学単位を含み、

ＢはＡ及びＣに操作的に結合したリンカー分子であり、

Ｃはアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドであり、該アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドＣは、

式：Ｐ１－（Z_1）－（Z_2）－（Z_3）－…－（Z_n）－Ｐ２

（式中、Ｐ１及びＰ２は、該アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドを増幅するために適合したポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）プライマー結合部位を与えるヌクレオチド配列であり、Ｐ１及びＰ２は、それぞれＰＣＲ増幅二重らせんＤＮＡフラグメントに存在する場合、制限エンドヌクレアーゼ部位を定義する配列を含む、

ここで、Z_1、Z_2、Z_3、…Z_nは、それぞれ該アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドＣを構成する単位アイデンティファイアーヌクレオチド配列であり、

ｎは該アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドＣ中のＺの位置を同定する番号であり

、４～５０の整数である）で表される］。
【請求項２】
請求項１記載の二官能分子を複数含むライブラリーであって、該二官能分子の数が、式V^a（式中、Ｖはポリマーにおける異なる化学単位の数であり、ａは、４～５０の整数である）によって表される事を特徴とするライブラリー。
【請求項３】
生物活性分子との前選択結合相互作用に関与する化学構造の同定方法において、該化学構造が請求項２記載の二官能分子のライブラリーに存在する方法であって、
ａ）該二官能分子ライブラリーを生物活性分子と溶液中で結合条件下で結合反応複合体を形成するのに十分な時間混合し、
ｂ）段階（ａ）で形成した複合体を単離し、
ｃ）単離した複合体のアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定し、それにより前選択結合相互作用に関与する化学構造を同定する、
段階を含む事を特徴とする方法。
【請求項４】
請求項２記載の複数の二官能分子を含むライブラリーの調製方法であって、
ａ）末端Ａ′でアミノ酸前駆体単位Ｘ′と、及び末端Ｃ′でヌクレオチド前駆体Ｚ′と反応するのに適応するＡ′－Ｂ－Ｃ′で表される末端Ａ′及びＣ′を有するリンカー分子Ｂを供給し、
ｂ）末端Ｃ′にＰ１を付加し、
ｃ）アミノ酸前駆体単位Ｘ′を該リンカーの末端Ａ′に付加しかつ前駆体単位アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドＺ′を該リンカーの末端Ｃ′に付加して構造X_n－Ｂ－Ｐ１－Z_n（式中、ｎは、ＸとＺに対する位置アイデンティファイアーであって１＋ｉの値を有し、ｉは０～１０の整数であり、ｎが１の場合、ＸとＺはリンカーＢの最も近くに配置される）を有する二官能分子を含む組成物を形成することにより合成を行い、
ｄ）組成物の１つ以上のアリコートで段階（ｃ）を繰り返して二官能分子を含む産物を含むアリコートを作製し、
ｅ）Z_nにＰ２を付加し、
ｆ）段階（ｅ）で作製したアリコートを合わせて二官能分子の混合物を形成し、
それにより該ライブラリーを形成する、
段階を含み、
該二官能分子中のポリマーＡはオリゴペプチドである
事を特徴とする方法。
【発明の詳細な説明】
説明
技術分野
本発明は、生物構造の多様性を定義する化学構造の集積を含むコードされた化学ライブラリーに関する。
背景
医薬及び農薬に適用する場合、広範囲な生物学的過程を効果的に調節することができる新規な分子を見出すことがますます求められている。生物活性化学薬品を検索する標準的方法は、天然物質のコレクション、例えば発酵ブイヨンもしくは植物エキス又は合成分子のライブラリーを複雑度が簡単な結合反応から緻密な生理的標品までにわたる分析を用いてスクリーンすることである。スクリーンはたいてい手がかりを与えるだけであり、更に経験的方法あるいは化学設計による改良が必要である。時間がかかりかつ高価な方法であれば、標的分子の化学構造の詳細な知識に基づく合理的な方法であってもまったく置き換えられることにはならない。即ち、“不合理な薬剤設計”と呼ばれる－大量の集団又は集積から正しい分子を選択する方法－には、集積の作成及び選択方法の双方に引き続き改良が必要とされている。
最近、手がかりを発見する化合物ライブラリーを提供するためにペプチド又はヌクレオチ

ドを用いるに当たりいくつかが開発された。モノクローナル抗体で認識されたエピトープの決定を速める方法が最初に開発された。いまでは例えば合成ペプチドの段階的検索の標準的連続方法は極めて精巧な方法を包含し、大量のペプチド配列が平行して合成されかつ蛍光又は他のリポーター基で標識された受容体分子を用いてスクリーンされる。有効なペプチド配列は、配列中のアドレスから解読することができる。例えば、Geysenら，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，81: 3998-4002（1984）；Maejiら，J.Immunol.Met.，146:83-90（1992）;及びFodorら，Science，251:767-775（1991）参照。

別の研究において、Lamら，Nature，354:82-84（1991）には、各樹脂ビーズが約２０モルのペプチドを含むように樹脂ビーズ上で合成されるペプチドの組合わせライブラリーが記載されている。このビーズは標識受容体分子を用いてスクリーンされ、結合受容体を有するものが肉眼による検査で検索し、物理的に取り出し、ペプチドが直接配列分析により同定される。理論上、この方法は他の化学物質と用いることができるが、配列決定に感受性のある方法が必要である。

組合わせペプチドライブラリーにおける同定の課題を解決する別の方法が、Houghtenら，Nature,354:84-86（1991）によって用いられている。２０種の天然アミノ酸のヘキサペプチドの場合、４００種の別個のライブラリーが合成され、各々最初の２つのアミノ酸は一定であり残りの４位置はすべての可能な組合わせで占められる。次いで活性ペプチドを用いてライブラリーを見出すために、結合又は他の活性の競合に基づく分析が用いられる。次いで２０種の新しいライブラリーが合成され、３番目の位置の有効なアミノ酸を決定するために分析され、活性ヘキサペプチドが定義されるまでこの方法でプロセスが反復される。これは暗号辞書を検索するのに用いられる方法と似ており、一連のふるい又はバケツを用いて構築することによりペプチドが解読され、これにより検索が対数になる。

最近極めて強力な生物学的方法であって、各ファージが個々のペプチドを有しかつそれを特定するＤＮＡ配列を含むようにペプチドライブラリーがバクテリオファージの表面に存在する方法が記載された。ライブラリーはすべての組合わせが生じるようにランダムオリゴヌクレオチドの集積を合成することにより作成され、次いでファージベクターに挿入される。各々の配列が１つのファージでクローン化され、特定の標的に結合するものを見出すことにより適切なペプチドを選択することができる。この方法で回収されたファージを増幅し、選択を繰り返すことができる。ペプチド配列は、ＤＮＡの配列を決定することにより解読される。例えば、Cwirlaら，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，87:6378-6382（1990）；Scottら，Science，249:386-390（1990）;及びDevlinら，Science，249:404-406（1990）参照。

ライブラリーが合成オリゴヌクレオチド自体であって、活性オリゴヌクレオチド分子が受容体に結合することにより選択され、次いでポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって増幅される別の“遺伝的”方法が記載された。ＰＣＲは連続的に強化することができ、次いでＰＣＲ産物から作成されたクローンのＤＮＡ配列を決定することにより活性分子の構造が解読される。この集積はヌクレオチド及び天然ピリミジン及びプリン塩基又は特定のワトソン・クリック対を保存する修飾体に限定され、ポリメラーゼによりコピーされる。

遺伝的方法の主な利点はＤＮＡ配列のクローン化及び増幅能力にあり、連続的選択により強化することができかつ活性分子の構造を解読する簡便な方法を与える。しかしながら、遺伝的集積はヌクレオチド及び天然アミノ酸からなるペプチドに限定され、結合部位の全領域にある広範囲な化学集積が必要である。反対に、化学的方法は無限の集積を与えることができるが連続的強化の能力がなく、選択された活性分子の構造を発見するに当たり困難がある。

発明の要約

本発明は、コードされた組合わせ化学ライブラリーの構築により上記に纏められた化学的及び遺伝的方法の双方の利点を組合わせる方法であって、各化学配列が化学合成によりそれ自体構築された“遺伝的”垂れはしの付加により標識されて各化学構造を特定する“レトロ遺伝子”法を提供する方法を提供するものである。

概略は、２つの交互の平行組合わせ合成が合成される化学構造に化学的に結合され、各場

合においては、特定の化学単位の１種を構造に付加するとオリゴヌクレオチド配列が付加され、その化学単位を“コード”するように、即ち化学単位構造をアイデンティファイアーとして機能するように定義される。プール及び分割後このプロセスを繰り返すことによりライブラリーがつくられる。
そのようにして作製されたライブラリーから問題の前選択された生物学的分子に結合するか又は結合、活性化、化学的触媒等のような所望の活性を有するライブラリー中の種類を同定することにより、活性分子が選択される。その後、活性分子の同一性は遺伝的垂れはし、即ちアイデンティファイアーオリゴヌクレオチド配列を読み取ることにより決定される。１実施態様においては、レトロ遺伝子垂れはしの増殖コピーはポリメラーゼ連鎖反応により得ることができる。
次いで適切な極性を有する増幅コピー鎖を用いてマッチング垂れはしによるハイブリッド形成によりサブセットのライブラリーを強化することができ、次いでこのプロセスがこのサブセットに繰り返される。即ち、増幅することができるヌクレオチド配列への結合を利用する精製プロセスにより連続的強化が得られる。最後に、ＰＣＲ反応の生産物をクローン化及び配列決定することにより化学物質の構造が解読される。
従って、本発明は化学多様性の強化源である二官能分子ライブラリーの使用による前選択結合又は触媒活性を有する化学構造を同定する新規な方法を提供するものである。このライブラリーは前選択生物分子を相互作用する化学構造（構造モチーフ）を同定するために用いられる。
即ち、１実施態様においては、本発明は式Ａ－Ｂ－Ｃ（式中、Ａは化学部分であり、ＢはＡ及びＣに操作的に結合したリンカー分子であり、Ｃは化学部分Ａの構造を同定するヌクレオチド配列を含むアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドである。）による二官能分子を企図するものである。
もう１つの実施態様においては、本発明は複数種の二官能分子を含むライブラリーを企図するものであり、これにより化学多様性の集積が形成される。
もう１つの実施態様は、結合又は触媒のような生物活性分子と前選択化学的又は生化学的相互作用に関与する化学構造の同定方法であって、その化学構造が本発明による二官能分子のライブラリーに存在する方法を企図するものである。本方法は下記段階を含んでいる：
ａ）二官能分子のライブラリーと生物学的に活性な分子とを溶液中で結合条件下結合反応複合体を形成するのに十分な時間混合し；
ｂ）段階（ａ）で形成された複合体を単離し；
ｃ）単離複合体中のポリマーアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列を求め、それにより前選択結合相互作用に関与した化学構造を同定する。
本発明は、また下記段階を含む本発明によるライブラリーの調製方法を企図するものである：
ａ）末端Ａ′で化学前駆体単位及び末端Ｃ′でヌクレオチド前駆体Ｚ′との反応に適応する式Ａ′－Ｂ－Ｃ′による末端Ａ′及びＣ′を有するリンカーＢを供給し；
ｂ）化学前駆体単位Ｘ′を該リンカーの末端Ａ′に付加するとともに前駆体単位アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドＺ′を該リンカーの末端Ｃ′に付加して構造X_n－Ｂ－Z_nを有する二官能分子を含む組成物を形成することにより合成を行い；
ｃ）組成物の１個以上のアリコートで段階（ｂ）を繰り返して二官能分子を含む産物を含むアリコートを作製し；
ｄ）段階（ｃ）で作製した部分を組合わせて二官能分子の混合物を形成し、それにより該ライブラリーを形成する。
関連の実施態様においては、本発明は、（１）水溶液に分散できる種類である固体支持体、（２）固体支持体に結合した第１結合単位、（３）第１結合単位に結合した第２結合単位及び（４）第２結合単位に結合した二官能単位を含むオリゴペプチド／オリゴヌクレオチド複合体を合成する二官能固体支持体であって、二官能単位がオリゴペプチド合成に使用できる第１脱離基及びオリゴヌクレオチド合成に使用できる第２脱離基を有し、第１脱

離基がＮ－ＦＭＯＣ又はその官能等価基であり、第２脱離基がＯ－ＤＭＴ又はその官能等価基であり、第２結合単位が濃アンモニア水にさらすことにより切断可能結合によって第１結合単位に結合され、固体支持体、第１結合単位、第２結合単位、切断可能結合、第１及び第２脱離基のみの二官能単位の各々がＦＭＯＣ脱離基を用いるオリゴヌクレオチド合成プロトコールで用いられる条件及びＯ－ＤＭＴ脱離基を用いるオリゴヌクレオチド合成プロトコールで用いられる条件に実質的に化学的に反応しない該支持体が記載される。
更に、（１）水溶液に分散できる種類の固体支持体、（２）固体支持体に結合した第１結合単位、（３）第１結合単位に結合した第２結合単位、（４）第２結合単位に結合した二官能単位、（５）二官能単位に結合したオリゴヌクレオチド及び（６）二官能単位に結合したオリゴヌクレオチドを含むオリゴペプチド／オリゴヌクレオチドライブラリーの要素が企図される。

【図面の簡単な説明】

本開示の一部をなす図面において：
図１は、本発明の二官能分子から誘導されたＰＣＲ増幅産物の制限エンドヌクレアーゼ切断（段階１）、引き続きその切断ＰＣＲ産物へのビオチン添加（段階２）のスキームを示すものである。
図２は、実施例９に記載される方法による二官能分子を有するライブラリーの作製方法を示すものである。
図３は、本発明を実施するのに有効であり実施例３Ｂに記載される“ｂｆ－ＣＰＧ”と称される制御細孔ガラス（ＣＰＧ）支持体に基づく好ましい二官能リンカー－支持体分子の構造を示すものである。

発明の詳細な説明

Ａ．コードされた組合わせ化学ライブラリー

コードされた組合わせ化学ライブラリーは、各々が異なる化学構造を定義しかつヌクレオチド配列が対応する化学構造を定義するユニークなアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドを含む複数の二官能分子種を含む組成物である。

１．二官能分子

二官能分子は本発明のライブラリーの基本単位であり、ライブラリーの化学部分を形成する一連の化学ビルディングブロックから構成されたポリマー要素及び化学部分の構造を確認するコードを備えている。
即ち、二官能分子は式Ａ－Ｂ－Ｃ（式中、Ａは化学部分であり、ＢはＡ及びＣに操作的に結合したリンカー分子であり、Ｃは化学部分Ａの構造を同定するヌクレオチド配列を含むアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドである。）で表すことができる。

ａ．化学ポリマー

本発明の二官能分子の化学部分は、上記式Ａ－Ｂ－ＣのＡで表され、式$(X_n)_a$（式中、Ｘはポリマーの単一化学単位であり、ｎはポリマーＡのＸの位置アイデンティファイアーである。）で表される線状の化学単位を含むポリマーである。ｎが１の場合、Ｘはリンカー（Ｂ）に最も近い位置にあるように、ｎは１＋ｉ（ｉは０～１０の整数である。）値を有する。
ａで定義されるポリマーの長さは変動することができるが、本明細書で更に述べられる大きなアルファベットサイズがある場合には実施しやすいライブラリーサイズ限界が生じる。典型的には、ａは４～５０の整数である。
化学部分（ポリマーＡ）は種々のポリマー構造であり、本発明のライブラリーで表されるべき化学多様性の種類の選択に左右される。ポリマーＡは、ポリマー形に結合及び伸長することができるモノマー化学単位である。例えば、ポリマーＡはポリペプチド、オリゴ糖、糖脂質、脂質、プロテオグリカン、糖ペプチド、スルホンアミド、核タンパク質、複合ペプチド（即ち、補欠分子族を有する）、遷移状態類縁体のような酵素基質を含有するポリマー、Ψ［COH_2］、Ψ［ＣＯＳ］、Ψ［ＣＯＯ］又はΨ［PO_2NH］のようなアミド結合置換部分を有するポリペプチド類縁体ポリマー及び類似の生化学ポリマーとすることができる。具体的に発現本明細書で記載されたポリペプチド系ライブラリーである。

ライブラリーがペプチドポリマーを含む場合、化学単位Ｘは天然タンパク質の領域を形成するように選択されるか又は非天然ポリペプチドであるか、天然Ｄ－アミノ酸を含むか又は非天然アミノ酸もしくは天然及び非天然アミノ酸の混合物を含むことができる。非天然混合物は、生物学的相互作用に関係する有効かつユニークな構造モチーフの同定を与える。

非天然アミノ酸としては、修飾アミノ酸及びＬ－アミノ酸、Ｄ－アミノ酸び立体異性体及びアミド又はプソイドアミド結合を形成することができる他の化合物が挙げられる。

本明細書に記載されるアミノ酸残基は、“Ｌ”異性体であることが好ましい。“Ｈ”は、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基を意味する。“ＯＨ”は、ポリペプチドのカルボキシ末端に存在する遊離カルボキシ基を意味する。J. Biol. Chem.,243:3552-59（1969）及び37 C.F.R. §1.822（b）（2）で採用された標準ポリペプチド命名法と一致したアミノ酸の略号を下記対応表に示す：

対応表

記号		アミノ酸
1-文字	3-文字	
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	トレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リシン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
C	Cys	システイン

“アミノ酸残基”なる語は、対応表並びに修飾及び特異アミノ酸、例えば37 C.F.R.§1.822（b）（4）に挙げられたものを包含するように広く定義され、参考として本明細書に引用される。

従って、化学部分Aで定義されたポリマーは化学的多様性を高めるポリマーバックボーン修飾を含むことができる。例としてポリペプチド系をつくるに当たり、次のバックボーン構造：－ＮＨＮ（Ｒ）ＣＯ－、－ＮＨＢ（Ｒ）ＣＯ－、－ＮＨＣ（ＲＲ′）ＣＯ－、－ＮＨＣ（＝ＣＨＲ）ＣＯ－、－NHC_6H_4CO－、－$NHCH_2CHRCO$－、－$NHCHRCH_2CO$－及びラクタム構造のような種々の修飾が企図される。

更に、－$COCH_2$－、－ＣＯＳ－、－ＣＯＮＲ、－ＣＯＯ－、－ＣＳＮＨ－、－CH_2NH－、－CH_2CH_2－、－CH_2S－、－CH_2SO－、－CH_2SO_2、－$CH(CH_3)S$－、－ＣＨ＝ＣＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯＮＨＯ－、－Ｃ（＝Ｃ

H_2）CH_2－、－PO_2^-NH－、－$PO_2^-CH_2$－、－$PO_2^-CH_2N^+$及びSO_2NH^-－のようなアミド結合修飾が企図される。

ｂ．ポリマーアイデンティファイアーオリゴヌクレオチド

本発明の二官能分子内のアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドは、上記式Ａ－Ｂ－ＣのＣで表されかつ式（Z_n）$_a$（式中、Ｚは位置ｎの化学単位Ｘを同定するオリゴヌクレオチドＣ内の単位アイデンティファイアーヌクレオチド配列である。）で表された配列を有するオリゴヌクレオチドである。ｎが１の場合、Ｚはリンカー（Ｂ）に最も近い位置にあるように、ｎは１＋ｉ（ｉは０～１０の整数である。）値を有する。ａは前述のようにオリゴヌクレオチドの化学単位アイデンティファイアー数を意味する整数である。

例えば、二官能分子は下記式で表される。

$X_4X_3X_2X_1$－Ｂ－$Z_1Z_2Z_3Z_4$

この例においては、オリゴヌクレオチドZ_1、Z_2、Z_3及びZ_4の配列は各々化学単位X_1、X_2、X_3及びX_4の構造を同定する。即ち、アイデンティファイアー配列において位置ｎの化学単位Ｘと位置ｎの単位アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドＺとの間に対応がある。

単位アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドの長さは、ライブラリーの複雑度、独自に同定されるべき異種化学単位数並びにハイブリッド形成及びポリメラーゼ連鎖反応忠実度のようなオリゴヌクレオチドの一意性の要求に関する他の検討に基づいて変動させることができる。典型的な長さは約２～約１０ヌクレオチドであるが、より長いものから単位アイデンティファイアーを除外することはなにもない。

アデノシン（Ａ）、グアノシン（Ｇ）、チミジン（Ｔ）及びシチジン（Ｃ）が単位アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドに介在するデオキシヌクレオチドの典型的選択を表す限りにおいては、Ａ、Ｇ、Ｔ及びＣは単位アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドの配列を“はっきり説明する”ために用いられる代表的な“アルファベット”を形成する。他のヌクレオチド又はヌクレオチド類縁体は、ワトソン・クリック対の形成能を有しかつＰＣＲ反応においてＤＮＡポリメラーゼで複製される限り、上記４種のヌクレオチドの他にあるいは代わりに用いることができる。しかしながら、ヌクレオチドＡ、Ｇ、Ｔ及びＣが好ましい。

アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドのコード設計の場合、オリゴヌクレオチド配列の重要な部分が偶然にさもなければライブラリーの二官能分子の操作中に別の関係のない組合わせに生じないようにコード表示を選択することが必要である。

例えば、Ｚがトリヌクレオチドであり、その配列がユニークな化学単位Ｘを定義するライブラリーを検討する。本発明の方法は化学単位のアルファベットのすべての組合わせ及び順列を与えるので、２種類の異なった単位アイデンティファイアーオリゴヌクレオチド配列がフレームシフトだけで異なり従ってフレームが明確でない限りハイブリッド形成又は配列決定で容易に区別できる密接に関連した配列を有することが可能である。

単位アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドの誤解読の他の原因が生じることがある。例えば、ＤＮＡハイブリッド形成におけるミスマッチ、アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドを増幅又は配列決定するプライマー伸長反応での転写エラー及び類似エラーが二官能分子の操作で生じる。

本発明は、アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドを読み取る際にエラーの可能性を減少する、例えば単位アイデンティファイアーヌクレオチド配列間の類似性を低下させるように単位アイデンティファイアーヌクレオチド配列のより長いヌクレオチドを使用する種々の手段を企図するものである。典型的な長さは、化学単位のアルファベットのサイズに左右される。

フレームシフト又は突然変異による解読エラーを取り除くのに有効な代表的な系は、遺伝コードに対する理論代替コードとして開発されたコードでありかつ無コンマ遺伝コードとして知られている。Crickら，Proc. Natl. Acad. Sci. USA.43:416-421（1957）。

化学単位がアミノ酸である場合、便利な単位アイデンティファイアーヌクレオチド配列はトリプレットコドンを用いた周知の遺伝コード又は上記Crickらに記載されている無コン

マコードの使用である。本発明は、遺伝コードのトリプレットコドンと天然アミノ酸との間に与えられた翻訳によって限定される必要がなく、他の対応系を対応させることができる。

典型的な及び例示の単位アイデンティファイアーヌクレオチドは、実施例において記載される無コンマコードに基づきかつ相補的ハイブリッド形成を確実にする長さを示すために化学単位当たり６ヌクレオチド（ヘキサヌクレオチド）の長さを有する。

アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドは、効果的なハイブリッド形成の場合垂れはし（コード）領域に少なくとも１５ヌクレオチドを有することが好ましい。更に、ライブラリーの複雑度の検討、化学単位のアルファベットのサイズ及び化学部分のポリマーの長さがすべて本明細書で更に詳細に述べられるアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドの長さに寄与している。

好ましい実施例においては、アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドＣは式Ｐ１－（Z_n）$_a$－Ｐ２（Ｐ１及びＰ２はポリマーアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドを増幅するために適応されたポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）プライマー結合部位を与えるヌクレオチド配列である。）で表されるヌクレオチド配列を有する。ＰＣＲプライマー結合部位の要求は通常当該技術において周知であるが、ポリマーアイデンティファイアーオリゴヌクレオチド配列を含むＰＣＲ増幅産物（ＰＣＲ増幅二重らせんＤＮＡフラグメント）を形成させるように設計される。

アイデンティファイアーオリゴヌクレオチド配列（Z_n）$_a$に隣接する２つのＰＣＲプライマー結合部位、Ｐ１及びＰ２が存在すると、ＰＣＲを用いて二官能分子から誘導されたＰＣＲ増幅二重らせんＤＮＡフラグメントを作製する手段をとなる。この設計は、二官能分子内の化学部分の構造を決定するアイデンティファイアーコードの解読方法においてクローン化及び配列決定する目的に対して特定の二官能分子上に存在する垂れはし配列を増幅させるのに有効である。

ヌクレオチドＰ１及びＰ２の一方又は双方がアイデンティファイアーオリゴヌクレオチド配列からＰＣＲプライマー結合部位を除去する手段を含むように設計される二官能分子であることが更に好ましい。配列が次のハイブリッド形成反応に寄与しないように、フランキングＰ１及びＰ２配列の除去が好ましい。ＰＣＲ増幅産物からＰＣＲプライマー結合部位を除去する好ましい手段は、ＰＣＲ増幅二重らせんＤＮＡフラグメント内の制限エンドヌクレアーゼ部位の形にある。

制限エンドヌクレアーゼは当該技術において周知であり、二重らせんＤＮＡの特定の長さを認識しかつ配列特異的方法でＤＮＡを切断する酵素である。

好ましくは制限エンドヌクレアーゼ部位は、特定の制限エンドヌクレアーゼに対する二官能分子を処理する際に除去されるＰ１及びＰ２の量を最大にするためにＰＣＲプライマー結合部位に相対する（Z_n）$_a$に近く位置しなければならない。更に好ましくはＰ１及びＰ２は各々得られたＰＣＲ増幅二重らせんＤＮＡの制限エンドヌクレアーゼ部位を形成するように適応し、制限エンドヌクレアーゼで切断される場合、２つの制限部位は非オーバーラップ付着末端を形成して次の操作を容易にする。

切断した場合次の操作を容易にするビオチニル化ヌクレオチド（例えばビオチニルデオキシＵＴＰ）の取込みのような末端特異的修飾に適応したオーバーラップ末端を得る制限部位が特に好ましい。

アイデンティファイアーオリゴヌクレオチド内の上記好ましい実施態様は、図１に示される特定の実施態様に纏められる。

図１においては、実施例に記載されているアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドから誘導されるＰＣＲ増幅二重らせんＤＮＡが示されている。（Z_n）配列はコード配列として角括弧に示され、その二重らせんの相補鎖はアンチコード鎖として角括弧に示されている。Ｐ１及びＰ２配列は、５′から角括弧まであるＰ１配列で区切られたＳｔｙＩ制限エンドヌクレアーゼ部位及び３′から角括弧まであるＰ２配列で区切られたＡｐａＩ制限エンドヌクレアーゼ部位を用いて詳細に示されている。

段階１は、ＰＣＲ増幅２重らせんＤＮＡを酵素ＳｔｙＩ及びＡｐａＩで切断して付着末端

を有する修飾アイデンティファイアー配列を形成することを示すものである。段階２はＳｔｙＩ部位のアンチコード鎖を特異的にビオチニル化し、それによりビオチニル化ＵＴＰの取込みがＢで示されている。
図１において段階１後非オーバーラッピング付着末端が存在すると、制限消化ＰＣＲ増幅フラグメントを適切なベクター、例えば配列決定ベクターに特異的及び方向性クローン化することができる。更に、得られた突出部分がＤＮＡポリメラーゼクレノウフラグメントを用いるｄＣＴＰ及びビオチニルｄＵＴＰ（ＢＴＰ）による挿入反応の基質であることから、ＳｔｙＩはＰ１の中に設計された。他の制限部位、ＡｐａＩは上記ビオチニル化の基質とならないように選択されたので、アンチコード鎖のみをビオチニル化することができる。
ビオチニル化されると、二重らせんフラグメントは固定化アビジンに結合することができ、二重らせんを変性してアイデンティファイアーヌクレオチド配列を含むコード配列を遊離することができ、それにより更に本明細書に記載される関連のコーディング鎖の選択にハイブリッド形成試薬として有効な精製アンチコード鎖を得ることができる。
ｃ．リンカー分子
本発明の二官能分子のリンカー分子は上記式Ａ－Ｂ－ＣのＢで表され、化学部分をアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドに操作的に結合する機能を行う分子とすることができる。
リンカー分子は固体支持体に結合する手段を有し、それにより固体相における二官能分子の合成を容易にすることが好ましい。更に、固体支持体に結合すると、本明細書に記載される二官能分子のライブラリーを用いるスクリーニング法を実施するに当たりある種特徴を与える。支持体に結合する手段が可逆的である、即ちリンカーを固体支持体から分離することができるリンカー分子が特に好ましい。
リンカー分子は構造及び長さを変動させ、少なくとも２つの特徴：（１）化学部分Ａへの操作的結合及び（２）アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドへの操作的結合を与えることができる。化学結合の種類はまちまちであるので、結合の種類が本発明の必須の特徴とみなされないようにＡ及びＣへの操作的指定結合を行うために種々の化学が用いられる。ＡとＣの間の長さとしてのリンカーのサイズは広く変動させることができるが、本発明の目的のために指定した結合機能を与えるのに十分な長さを超える必要はない。即ち、少なくとも１個から約２０個の原子の鎖長が好ましい。
固体支持体に結合する可逆的手段の好ましい付加手段を含む好ましいリンカー分子は、実施例３に記載されている。即ち、二官能分子は合成後固体支持体から除去できる。別の実施態様においては、二官能分子をその部分を遊離するために時間が経つにつれて徐々に切断される能力を有する。
種々の化学又は酵素選択的切断機能性を、本発明に有効なリンカー－支持体分子に組込むことができる。例えば、４－ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸部分は酸切断可能リンカーを与える。２－［（tert－ブチルジフェニルシロキシ）メチル］安息香酸部分はフッ化物切断可能部分を与える。２－ヒドロキシメチル安息香酸部分のリン酸塩は、アルカリ性ホスファターゼ処理を組合わせ、次いで緩和なアルカリ処理により切断可能な部位を与える。即ち、上記で挙げたもの以外の選択的に切断可能なリンカーの取込みも本発明の一部とみなされる。
化学合成用固体支持体は一般的には周知である。オリゴヌクレオチド及びポリペプチド合成において用いられるGlen Research（Herndon,VA），Bachem Biosciences（Philadelphia,PA），Sigma Chemical Co.（St.Louis,MO），CPG Inc.,（Fairfield,NJ）及びApplied Biosystems（Foster City,CA）のような多くの販売元から入手できる合成樹脂及び制御細孔ガラス（ＣＰＧ）が特に好ましい。実施例２に記載されるようにテフロン及びＣＰＧ支持体が最も好ましい。
関連実施態様においては、本発明は化学部分としてポリペプチドを有する本発明の二官能分子（即ち、オリゴペプチド／オリゴヌクレオチド複合体）を作製するのに特に適した好ましい二官能固体支持体を記載するものである。

オリゴペプチド／オリゴヌクレオチド複合体を合成する好ましい二官能固体支持体は、固体支持体、第１結合単位、第２結合単位及び二官能単位を含んでいる。この文において“二官能単位”は、本発明の二官能分子と混同されるべきでなく、代わりに２つの（二）反応機能性を与える、１つがペプチドを結合しもう１つがオリゴヌクレオチドを結合する二官能固体支持体に存在するその化学部分を意味する。具体的な二官能単位は、アミノヘキサノールリンカーに続くセリン分枝モノマーとして図３に示されている。

本明細書で用いられる固体支持体は、上記のように水溶液中に分散できる種類のものである。好ましい固体支持体は、ペプチド及びオリゴヌクレオチド合成に使用できる種類の制御細孔ガラス、例えばSigmaで販売されているアミノプロピル－ＣＰＧである。固体支持体は第１結合単位にしっかりと結合される。好ましい第１結合単位としては、アミド結合によってアミノプロピル－ＣＰＧに結合されたサルコシンリンカー及びサルコシンリンカーに結合されたサクシニルリンカーが挙げられる。また、第２結合単位は第１結合単位に結合される。好ましい第２結合単位はアミノヘキサノール基である。第１及び第２結合単位のカップリングに好ましい結合はアルキルエステルである。アルキルエステルは濃アンモニア水と反応すると容易に加水分解又は切断される。

二官能単位は、オリゴペプチド合成に使用できる第１脱離基及びオリゴヌクレオチド合成に使用できる第２脱離基を有する。好ましい二官能単単位は、Ｌ－セリン残基である。Ｌ－セリン残基としては、アミノ末端、カルボキシル末端及びヒドロキシル末端が挙げられる。セリン残基は、そのカルボキシル末端で第２結合単位に結合される。好ましい実施態様においては、セリン残基のカルボキシル末端がアミド結合によってアミノヘキサノールリンカーに結合される。セリン残基は、そのアミノ末端で第１脱離基に、そのヒドロキシル末端で第２脱離基に結合される。好ましい第１脱離基は、Ｎ－ＦＭＯＣ［Ｎ－（９－フルオレニルメトキシカルボニル］又はその官能等価基である。好ましい第２脱離基は、Ｏ－ＤＭＴ（Ｏ－ジメトキシトリチル）又はその官能等価基である。

固体支持体、第１結合単位、第２結合単位、その間の切断可能な結合及び該第１及び第２脱離基のみの二官能単位は、ＦＭＯＣ脱離基を用いた慣用のオリゴヌクレオチド合成プロトコールで用いられる条件下［Bodanszkyら,The practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag（1984）;及びBodanszkyら,Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag（1984）］及びＯ－ＤＭＴ脱離基及びホスホルアミダイトドナーを用いた慣用のオリゴヌクレオチド合成プロトコールで用いられる条件下で各々実質的に化学的非反応性である。

別の実施態様においては、二官能固体支持体は第３結合単位も含まれる。第３結合単位は二官能単位と第１脱離基との間にあり結合される。この実施態様の好ましい方法においては、第３結合単位は感光性であり、即ち紫外線に露光することにより切断できる。第３結合単位には、アミド結合によって二官能セリン残基のアミノ末端に結合した及びエステル結合によってＦＭＯＣ遮断アミノ酸に結合した３－ニトロ－４－ブロモメチルベンゾエート基が含められる。

２．ライブラリー

本発明のライブラリーは、本発明による複数の種類の二官能分子を含む化学多様性の集積である。ライブラリーにおける複数の種類は各々が異なった化学部分を有する化学多様性群を定義するものである。即ち、ライブラリーはペプチド、脂質、オリゴ糖又は他の種類の前記化学ポリマー群を定義することができる。

ライブラリーにおける異なる種類の数はライブラリーの複雑度を表し、化学部分のポリマーの長さ及び化学単位ポリマーをつくるために用いることができる化学単位アルファベットのサイズで定義される。ライブラリーにおいて“複数の種類”なる句によって言及される異なる種類の数は、式V^a、即ちＶのａ乗（指数ａ）で定義される。Ｖは、アルファベットサイズ、即ち化学部分に使用するのに有効な異なった化学単位Ｘの数を表す。“ａ”はＶに対する指数であり、ポリマーＡを形成する化学単位Ｘの数、即ちポリマーＡの長さを表す。

例えば、ポリマーＡが６個のアミノ酸の長さを有するペプチドでありかつ用いられるアミ

ノ酸が２０個の天然アミノ酸である二官能分子の場合、アルファベット（Ｖ）は２０でありポリマーの長さ（ａ）は６であり、ライブラリーサイズは20^6又は６４００万である。この具体的なライブラリーは、対応するユニークなアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドに操作的に結合した６４００万の異なる六量体ポリペプチドを供給する。

ライブラリーの複雑度はライブラリーの他の種類に相対して二官能分子の具体的な種類の量を決定することから、ライブラリーにおいて有効な最大複雑度に対して理論上限界がある。もう１つの限界は、ライブラリーに存在する実際の支持体分子又はビーズの数によって定義されたライブラリーサイズである。従って、ライブラリーがどのくらいの大きさ（複雑さ）でなければならないかを検討することは有効である。このサイズの限界は、本発明のスクリーニング法の後のポリマーアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドの存在を検出する感受性のレベルによって示される。検出感受性は、分析されるべき受容体分子と二官能分子との間の結合又は触媒活性の閾値で示される。

例えば結合閾値が10^{-6}Ｍ（マイクロモル）である場合には、１ミリリットル（ｍｌ）容量において各々の種類少なくとも１ナノモルでなければならない。この閾値において、10^4の複雑度を有するライブラリーは各々の種類１０マイクロモルを含むことができる。ライブラリー複雑度と結合閾値との間の逆数関係から、より複雑なライブラリーは結合閾値がより低い場合に可能である。

ライブラリー内の個々の二官能分子の種類の相対量は約0.2～約１０当量に変動させることができ、１当量はライブラリー内の種類の平均量を示す。各々の種類がほぼ等モル量でライブラリーに存在することが好ましい。

好ましい実施態様においては、ライブラリーはライブラリーのすべての種類に所定のアルファベットと化学単位の前選択数がある一定のライブラリーの数学的組合わせに基づいて可能な化学多様性の完全な集積を含んでいる。即ち完全な集積は、所定のアルファベットと化学長さを有する本発明のライブラリーに見出される可能な化学多様性すべての原因を与えるものである。

ライブラリーは、二官能分子の各種類がＰ１又はＰ２ＰＣＲプライマー結合部位に対して同じヌクレオチド配列を含む二官能分子から構成されることが特に好ましい。この設計によるライブラリーは、本発明の方法を実施する場合、ライブラリーに存在するアイデンティファイアーオリゴヌクレオチド（コード配列）の種類を増幅するために単一ＰＣＲプライマー対を用いることができることから特に好ましい。

関連の実施態様においては、本発明はライブラリー要素、即ち本発明の二官能分子を企図するものである。好ましいライブラリー要素は、前記オリゴペプチド／オリゴヌクレオチド複合体である。

即ち、１実施態様においてオリゴペプチド／オリゴヌクレオチド複合体のライブラリーの要素は、固体支持体、第１結合単位、第２結合単位、二官能単位、オリゴペプチド及びオリゴヌクレオチドを含んでいる。固体支持体は水溶液に分散できる種類のものである。第１結合単位は、固体支持体に結合される。第２結合単位は、第１結合単位に結合される。二官能単位は、第２結合単位に結合される。オリゴペプチド及びオリゴヌクレオチドは二官能単位に結合される。

別の実施態様においては、ライブラリー要素は第１結合単位を第２結合単位に結合するための切断可能な結合を包含する。切断可能な結合は濃アンモニア水にさらすことにより切断可能な種類のものである。

別の実施態様においては、ライブラリー要素には二官能単位をオリゴペプチドに結合するための切断可能な結合を包含する。切断可能な結合は、紫外線にさらすことにより切断可能な種類、例えばアミド結合によって二官能セリン残基のアミノ末端に結合した及びエステル結合によってＦＭＯＣ遮断アミノ酸に結合した３－ニトロ－４－ブロモメチルベンゾエート基とすることができる。

ライブラリー要素は、固体支持体及び第１及び／又は第２結合単位なしで作成することもできる。この場合、ライブラリー要素は二官能単位、該二官能単位に結合したオリゴペプチド及び該二官能単位に結合したオリゴヌクレオチドを含んでいる。これと別の実施態様

には、二官能単位をオリゴペプチドに結合するための切断可能な結合を包含する。切断可能な結合は、上記で示したように感受性、即ち紫外線にさらすことにより切断可能な種類のものである。

Ｂ．ライブラリーの作製方法

本発明のライブラリーを形成する複数の二官能分子の作製方法は、多数の異なる種類の効率のよい合成に関して種々の課題を解決するものである。

本合成法においては、まず化学単位Ｘを付加し、次にオリゴヌクレオチド配列をリンカー分子に付加する連続段階には、化学単位Ｘを付加し、次に対応する化学単位を定義する（コードする）単位アイデンティファイアーヌクレオチド配列Ｚを付加する交互の平行合成手順が必要である。ライブラリーは、本明細書に記載される反応産物をプール及び分裂した後この交互の平行プロセスを反復することによりつくられる。

コードされたライブラリーを作成する唯一の制約は、ヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド配列を加えることに比べて化学単位を加える２つの交互合成手順の間に適合しうる化学がなければならないことである。

合成適合性の課題は、交互ポリマーが合成される適合しうる保護基の正しい選択及び１つの成長ポリマーを選択的に脱保護するとともに他の成長ポリマーはブロックされたままである方法の正しい選択、例えば一時的な保護基又は特定の脱保護化学によって除去できる保護基の使用によって解決される。適合しうる適切な保護化学は本明細書に記載され、更に適切な化学はSynopsys, Inc.から入手できるしGreeneら,“Protective Groups in Organic Synthesis”, 2nd Ed.,John Wiley & Sons（1991）に記載されている化学保護記載データベースにも記載されている。

複数の二官能分子を有するライブラリーの合成は、下記段階を含んでいる。

（１）第１化学単位X_1を操作的に結合しかつ単位アイデンティファイアーヌクレオチドZ_1を定義する第１ヌクレオチド配列を操作的に結合しその配列が化学単位X_1の構造をコードする（定義する）適切な手段を有するリンカー分子を供給する。リンカーは固体支持体に結合する手段を有することが好ましく、それだけで合成が固体相で進行する。

即ち、供給されたリンカー分子は構造Ａ′－Ｂ－Ｃ′を有し、Ａ′は前駆体（Ｘ′）の化学単位Ｘを操作的に結合する反応に適応させた末端を表し、Ｃ′は前駆体（Ｚ′）のヌクレオチド又はポリマーアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドＺを操作的に結合する反応に適応させた末端を表す。末端Ａ′及びＣ′は、一方の末端の操作的結合反応中他方の末端が反応から保護されるように各々の遮断基で保護される。

（２）次いでリンカー分子を合成の第１サイクルに供して一方の末端のビルディングブロックを加える。末端Ａ′に最初に化学単位Ｘを付加するか又は末端Ｃ′に最初にアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドＺを付加するように決められる限り合成の順序は通常重要でない。第１サイクルは、ビルディングブロックが付加されるべきリンカーの末端を脱保護し次いでビルディングブロックを末端に付加する段階を含んでいる。典型的には、付加したビルディングブロックはその遊離末端、即ちその種類の次のビルディングブロックの付加に関与する末端に遮断基を含んでいる。次いでリンカー分子を合成の第２サイクルに供してもう一方（第２）末端のビルディングブロックを付加する。第２サイクルは、ビルディングブロックが付加されるリンカーの第２末端を脱保護し次いでビルディングブロックを末端に付加する段階を含んでいる。また、付加したビルディングブロックは典型的にはその遊離末端で遮断される。

アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドＺの末端Ｃ′への付加が行われ、完全な単位アイデンティファイアーヌクレオチド配列Ｚを形成するヌクレオチドによるヌクレオチド又はＺが前合成され、オリゴヌクレオチドＺがブロックとして末端Ｃ′に付加される。オリゴヌクレオチドの合成が当該技術において周知である限り、二官能分子を合成する際に操作の数を減少させることからオリゴヌクレオチドの前合成及びブロックの成長ヌクレオチドポリマーへの付加が好ましい。

化学単位Ｘ又は単位アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドＺは、適切な末端において成長ポリマーへの前駆体操作的結合を容易にする反応化学と適合しうる脱離基を含むこ

とを示すために前駆体（Ｘ′又はＺ′）と呼ばれる。
段階（２）から得られた産物は構造Ａ′－X_1－Ｂ－Z_1－Ｃ′を有する二官能分子であり、X_2及びZ_2を成長ポリマーに加えるために上記第１及び第２サイクルを反復しやすい。
（３）二官能分子産物Ａ′－X_1－Ｂ－Z_1－Ｃ′が形成された後、産物のアリコートが作られ、各アリコートで段階（２）のサイクルが繰り返されるが、異なる種類のＸ（及びその対応するＺ）を各々異なるアリコートに加えることを除く。各アリコートの反応産物は、構造Ａ′－X_2－X_1－Ｂ－Z_1－Z_2－Ｃ′を有する。
（４）各々が産物Ａ′－X_2－X_1－Ｂ－Z_1－Z_2－Ｃ′を含有するアリコートを合わせて（プールして）異なる二官能分子の混合物を形成し、混合物をアリコートに分けた。各アリコートで再び段階（２）のサイクルが繰り返され、異なったＸ及びＺビルディングブロックを各アリコートに加えて二官能分子産物Ａ′－X_3－X_2－X_1－Ｂ－Z_1－Z_2－Z_3－Ｃ′を形成する。
一組の次のビルディングブロックのプール、分割及び付加方法が所望のポリマーの長さに基づいて位置ｎ＝４、５、６．．．等で繰り返すことができる。サイクルが繰り返されポリマーの長さが成長するので、得られたライブラリーの複雑度も増大する。各サイクルの場合、ポリマーの長さａが１つだけ増え、従ってライブラリー複雑度は式V^aに従って指数的に増大する。好ましい実施態様においては、サイクルは約１～１０回繰り返される。
関連実施態様においては、段階（１）で得られたリンカーがまずアリコートに分けられ、段階（２）のサイクルが各アリコートで行われ、異なるＸ及び対応するＺをリンカーに各々の異なるアリコートにおいて付加する。次いでアリコートを前のようにプールし、段階（２）のサイクルを１以上のアリコートで繰り返すことができる。
即ち、（ｉ）リンカー又はプールをアリコートに分け、（ii）Ｘ及びＺをリンカー基質に別々のアリコートで平行付加し、（iii）アリコートをプールする段階をサイクルして（繰り返して）化学単位及びその対応する単位アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドを連続して付加し、各々がリンカーを介して対応するアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドに操作的に結合した異なる化学ポリマーを有する多数の二官能分子を含むライブラリーを形成することができる。
好ましい実施態様においては、本発明のライブラリーを形成する方法はＰＣＲプライマー結合部位Ｐ１及びＰ２をライブラリーの二官能分子の各々に付加する段階を包含する。この方法は上記と実質的同様であるが、Ｘ及びＺを加える段階（２）のサイクルの前に段階（１）で得られたリンカー分子に一連のヌクレオチド又は前合成Ｐ１オリゴヌクレオチドを加えることを包含する。ライブラリーのすべての部分が同じＰ１配列を含んでいることから、リンカーをアリコートに分けかつそのアリコートをX_1及びZ_1を加える段階（２）のサイクルに供する前にリンカー分子Ａ′－Ｂ－Ｃ′のＣ′末端にＰ１を加える。得られた産物は、式Ａ′－Ｂ－Ｐ１－Ｃ′を有する。
その後、前のように産物を分割しサイクルすると、産物Ａ′－$(X_n)_a$－Ｂ－Ｐ１－$(Z_n)_a$－Ｃ′（ａは長さ“ａ”のポリマーの存在を示す。）の標品を生じる。
次に、産物Ａ′－$(X_n)_a$－Ｂ－Ｐ１－$(Z_n)_a$－Ｃ′を含有するプール混合物に一連のヌクレオチド又は前合成オリゴヌクレオチドＰ２を末端Ｃ′で付加して産物Ａ′－$(X_n)_a$－Ｂ－Ｐ１－$(Z_n)_a$－Ｐ２－Ｃ′を形成する。即ちライブラリーのすべての部分が、ライブラリーの二官能分子の種類の存在に無関係に普遍的ＰＣＲ反応を行うことができる共通配列Ｐ１及び共通配列Ｐ２を含んでいる。
関連実施態様においては、本発明のライブラリーの作製方法は本明細書に記載されるようにｂｆ－ＣＰＧ固体支持体を使用する。
１．ポリペプチドライブラリー
好ましい１実施態様においては、本発明は、二官能分子がポリマーＡのポリペプチドを有するライブラリー及びライブラリーの作製方法を企図する。
この実施態様においては、アミノ酸及びオリゴヌクレオチドを成長ポリマーに連続して加えることに適合しうる化学は、カルボキシからアミノ末端の向きに、またアミノからカルボキシ末端の向きにアミノ酸ポリマーの合成を開発した。化学は、３′から５′の向きに

、また５′から３′の向きにオリゴヌクレオチドの合成も開発した。更に、これらの合成の各々においてはアミノ酸側鎖（Ｒ基）がある種アミノ酸残基を保護し、合成又は脱保護段階の１つでＲ基が反応性末端となることが好ましい。
各種の化学は、次に詳細に記載される。
合成の場合、数種のアミノ酸の反応性側鎖を保護しなければならない。下記表１は、保護基を含有することが好ましいＲ基を有する天然アミノ酸を示すものである。任意の適合しうる保護（遮断）基が用いられ、特定の保護基に本発明が限定されるべきではない。表１には好ましい保護基も示される。

表１

アミノ酸	保護基
アルギニン	N-MTr[1], N-PMC[7]
ヒスチジン	N π-Bum[2], SEM[10], FMOC, DNP
システイン	S-Trt[3], Acm[11], S-t-ブチル
トリプロファン	N[i]-CHO, なし
チロシン	O-TBS[4]
アスパラギン酸	O-TSE[5], DMB[12]
グルタミン酸	O-TSE[5], DMB
セリン	O-TBS[4]
トレオニン	O-TBS[4]
リシン	N-Bz[6], TFA[8], TEOC[9]
アスパラギン	なし
グルタミン	なし
グリシン	なし
フェニルアラニン	なし
メチオニン	なし

アラニン	なし
イソロイシン	なし
ロイシン	なし
バリン	なし
プロリン	なし

[1] MTrはN^{g}-4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニルである。

[2] Bumはtert-ブトキシメチルである。

[3] Trtはトリフェニルメチルである。

[4] TBSはtert-ブチル-ジメチルシリルエステルである。

[5] TSEはトリメチルシリルエチルエステルである。

[6] Bzはベンジルである。

[7] PMCはN_{G}-2,2,5,7,8-ペンタメチルクロモン-6-スルホニルである。

[8] TFAはトリフルオロアセチルである。

[9] TEOCはβ-(トリメチルシリル) エトキシカルボニルである。

[10] SEMはβ-(トリメチルシリル) エトキシメチルである。

[11] Acmはアセトアミドメチルである。

[12] DMBはジメトキシベンジルである。

保護前駆体として二官能分子に付加するのに適切な保護アミノ酸は、Bachem Biosciences Inc.（Philadelphia, PA）、Peninsula Labs（CA）及びNova Biochem（CA）のような多くの販売業者から入手することができる。更に、保護アミノ酸の調製はとにかく実施例１に記載されている。

ａ．ポリペプチド合成

リンカー基質上のポリペプチドのカルボキシからアミノ末端の向きの合成の場合、必要に応じて便宜上保護及び脱保護することができる遊離アミノ末端が必要である。好ましいアミノ末端保護基はフルオレニルメトキシカルボニル基（ＦＭＯＣ）である。

ＦＭＯＣ保護アミノ末端は、ポリペプチド合成に周知のジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中２０％（v/v）ピペリジン又はジクロロメタン（ＤＣＭ）中1, 8－ジアザトリシクロ［5,4,0］ウンデセ－７－エンを用いて脱保護される。アミノ酸単位は、ＦＭＯＣ保護アミノ末端及びペンタフルオロフェニルエステル（Ｏｐｆｐ）で保護されたカルボキシル末端を有する保護アミノ酸の形で又はＢＯＰ、ＨＢＴＵ、ＴＢＴＵ又は好ましくはｐｙＢＯＰと共に用いて遊離酸を活性化することにより付加される。ＢＯＰはベンゾトリアゾール－１－イルオキシトリス（ジメチルアミノ）－ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（カストロ試薬）である。ＨＢＴＵは、２－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－1,1,3,3－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートである。ＴＢＴＵは、２－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－1,1,3,3－テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレートである。ｐｙＢＯＰは、ベンゾトリアゾール－１－イルオキシトリス［ジメチルアミノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート］である。付加反応には、ペプチド合成に周知であるように保護アミノ酸、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）及びヒドロキシ

－ベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）が必要である。得られた産物はＦＭＯＣ保護アミノ末端を有する付加アミノ酸残基を含み、その後前のように保護アミノ酸が脱保護付加される。

リンカー基質上ポリペプチドのアミノからカルボキシ末端の向きの合成の場合、必要に応じて便宜上保護及び脱保護することができる遊離カルボキシ末端が必要である。好ましいカルボキシ末端保護／活性化基は前記Ｏｐｆｐである。リンカー上のカルボキシ末端は、遊離アミノ末端を有するリンカーとＨＯＢＴ中スクシンアミド及びプロトン触媒とを反応させることにより作製される。その後、ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）及びエタノール中ペンタフルオロフェノールと反応させて遊離カルボキシ末端にＯｐｆＰエステルを形成することにより、末端を修飾することができる。Ｏｐｆｐエステルは保護リンカー末端であり、前記のようにＦＭＯＣ－、Ｏｐｆｐ－保護アミノ酸による付加反応に有効であるが、アミノ酸は逆方向でリンカーに付加する。得られた産物はＯｐｆｐ保護末端を有する付加アミノ酸残基を含有し、その後保護アミノ酸による付加を繰り返すことができる。

ｂ．オリゴヌクレオチド合成

オリゴヌクレオチドは、周知であるように種々の化学により合成することができる。非常に良い再検討は“Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach”,ed. M. J. Gait, IRL Press, Oxford（1984）である。好ましいオリゴヌクレオチド合成は、Applied Biosystems Inc.（ABI; Foster City, CA）から入手できるような種々の自動ＤＮＡ合成機械により行われる。更にオリゴヌクレオチド合成及びＤＮＡ合成機械及び技術用の優れた文献には、Caruthers, Science, 230: 281-285（1985）；及びCaruthers, Acc. Chem. Res.,24:278-284（1991）がある。

リンカー基質上オリゴヌクレオチドの３′から５′の向きの合成の場合、必要に応じて便宜上保護及び脱保護することができる遊離ヒドロキシ末端が必要である。好ましいヒドロキシ末端保護基は、ジメトキシトリチルエーテル（ＤＭＴ）である。オリゴヌクレオチド合成に周知であるようにジクロロメタン（ＤＣＭ）中３％ジクロロ酢酸で処理して遊離ヒドロキシ末端を形成することにより、ＤＭＴ保護末端がまず脱保護される。

遊離ヒドロキシ末端に３′から５′の向きに付加する前駆体としてのヌクレオチドには、ヌクレオチドの３′末端にジイソプロピルホスホルアミダイトを有するホスホルアミダイト部分が必要である。更に、ホスホルアミダイトの酸素はシアノエチル基（ＣＮＥ）で保護され、５′末端はＤＭＴエーテルで保護される。

５′ＤＮＴ－、３′－ＣＮＥ－保護ヌクレオシドホスホルアミダイトの遊離ヒドロキシルへの付加には、オリゴヌクレオチド合成に周知であるように、アセトニトリル中テトラゾールが必要であり、次いで（ヨウ素）酸化及び酢酸無水物による未反応ヒドロキシルのキャップ形成が行われる。得られた産物は、ＤＭＴ保護５′末端を有する付加ヌクレオチド残基を含有し、その後前記のように保護ヌクレオチドを脱保護及び付加することができる。

リンカー上オリゴヌクレオチドの５′から３′の向きの合成の場合、前記のようにリンカー上に遊離ヒドロキシ末端が必要である。しかしながら、付加されるべき保護ヌクレオチドはその５′及び３′末端に逆の保護化学を有し反対の向きの付加を容易にする。

遊離３′ヒドロキシル及び５′ＤＭＴエーテルを有するヌクレオチドはまずイミダゾール中ＴＢＳ－Ｃｌと反応させることにより３′ヒドロキシ末端で保護されて３′末端にＴＢＳエステルを形成する。次いで、ＤＭＴ－保護５′末端が前記のようにＤＣＭ中ＤＣＡで脱保護されて遊離５′ヒドロキシ末端を形成する。試薬（Ｎ, Ｎ－ジイソプロピルアミノ）（シアノエチル）ホスホンアミジッククロリドをテトラヒドロフラン（ＴＨＦ）中５′脱保護ヌクレオチドと反応させて５′末端にアミノジイソプロピル－、ＣＮＥ－保護ホスホルアミダイト基を形成する。その後、３′ＴＢＳエステルをＤＣＭ中テトラブチルアンモニウムフルオリド（ＴＢＡＦ）で除去してホスホルアミダイト－保護５′末端及び遊離３′ヒドロキシ末端を有するヌクレオチドを形成する。塩基中ＤＭＴ－Ｃｌとの反応は、ＤＭＴエーテル保護基を３′ヒドロキシ末端に付加する。

次いで３′ＤＭＴ－、５′ＣＮＥ－保護ホスホルアミダイト化ヌクレオチドの遊離ヒドロキシ末端を有するリンカー基質への付加は、オリゴヌクレオチド合成に周知であるように前記テトラゾール接触反応を用いて進行する。得られた産物はＤＭＴ－保護３′末端を有する付加ヌクレオチド残基を含有し、その後保護ヌクレオチドを前記のようにＤＣＭ中ＤＣＡで脱保護及び付加することができる。

上記は、ポリペプチド（Ｘ）$_a$を両方の向きで有しかつポリマーアイデンティファイアーオリゴヌクレオチド（Ｚ）$_a$を両方の向きで有する本二官能分子を合成することができることを示すものである。具体的には、３′末端を介してリンカーに結合したオリゴヌクレオチドを有しかつカルボキシ末端を介してリンカーに結合したペプチドを有する二官能分子のライブラリーを形成する詳細に記載される合成である。

好ましい１実施態様においては、付加後付加アミノ酸が遊離アミノ末端を有する、即ちポリマーがカルボキシからアミノ末端の向きに構築されるように、合成順序がリンカーのポリペプチドを配向させる。この合成の具体的化学は実施例に記載されている。

単一ヌクレオチドよりオリゴヌクレオチドの成長ポリマーアイデンティファイアーヌクレオチド配列への付加は別の実施態様であり、ライブラリーの急速かつ調節構築を与えることから好ましい。前述の合成は単一ヌクレオチド塩基単位を含んでいるが、オリゴヌクレオチドが付加されるべき場合同様の保護基及び付加化学があてはまる。

５′ＣＮＥ保護及び３′ＤＭＴ保護末端を有するか又は３′ＣＮＥ保護及び５′ＤＭＴ保護末端を有するオリゴヌクレオチドの合成は、一般に利用できかつ本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド合成法を用いて容易に調製することができる。

二官能分子又は分子ライブラリーの合成後、末端及びアミノ酸側鎖の保護基が除去される。末端が相対的に不安定であることから、機能性、特に側鎖機能性を保存するように脱保護順序が選ばれることが好ましい。

ポリペプチドライブラリーの好ましい本実施態様においては、実施例２－３に記載されているテフロン支持体及び５′ＢＣＭ３を用いる場合下記順序の脱保護が好ましい：

１）テトラブチルアンモニウムフルオリド（ＴＢＡＦ）処理してＴＢＳ及びＴＭＳエチルエーテルを除去する；

２）ＭＴｒ、Ｂｕｍ、ＰＭＣ及びＴｒｔ基を除去するのに十分なトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）で簡単に５分処理し、次いでトリエチルアミンで５分間中和する；

３）アンモニア水処理してＢｚ及びＣＮＥ基を除去する；及び

４）過ヨウ素酸酸化を用いて固体支持体から二官能分子を切断する。

また、下記順序の脱保護が光活性的に切断可能なリンカー部分のあり又はなしの実施例３に記載されているＣＰＧリンカーについて用いられる：

１）ＴＢＡＦ処理してＴＢＳ及びＴＭＳエチルエーテルを除去する；及び

２）アンモニア水処理してＢｚ及びＣＮＥ基を除去する。

示されるように、ライブラリーを合成した後及び保護基が除去された後、二官能分子が固体支持体から切断され、遊離した二官能分子を固体支持体から分離して複数の二官能分子を含む溶液を形成する。また、固相中複数の二官能分子の形上でライブラリーが維持される。

実施例において天然アミノ酸が用いられるが、本発明はそのように限定されるべきでない。可能なアミノ酸残基のアルファベットは、アミノ酸を定義する基礎化学、即ちカルボキシル及びアミノ末端を満足させる分子を包含するように拡大させることができる。重合の際にアミド結合が形成される。即ち、可能なアミノ酸には医薬的に活性な分子のようなＬ－アミノ酸、Ｄ－アミノ酸、天然アミノ酸、非天然アミノ酸及びその誘導体が含められる。

更に、末端を慣用的なアミノ酸構造に結合するポリペプチドバックボーンを限定する根拠はない。アミノ酸及びカルボン酸部分は、側鎖基が本明細書に記載されるように適切に保護される限り、側鎖置換基を有するバックボーン上にある。チアゾール－アラニン又はプリン－アラニンのような特異複素環のようなヘテロ原子を有する本発明で用いることができる前に記載のないアミノ酸も開発される。

慣用的及び特異アミノ酸の双方の構造を開発及び使用すると、本発明のライブラリーの化学部分の多様性が大きくなる。そのようなライブラリーは、重要なコア化学構造の新規な組合わせの本発明のスクリーン方法により探索することができる。
典型的なバックボーンは、（CH_2）$_n$（ｎは１～少なくとも６である。）のアルキル鎖とすることができる。更に、アルファベットはα、β又はγアミノ酸のような種々のバックボーン構造を有するアミノ酸を含むことができる。アルファベットは、バックボーン内の炭素原子数及びその配置を変動させることができるアミノ酸も含むことができる。
ｃ．化学構造の同定方法
本発明のライブラリーは、化学構造の同定を容易にする遺伝的垂れはしに各化学部分を結合するように化学多様性の集積を与える。
本スクリーニング方法により、一度に１種合成するかあるいは予め相互作用を知ることを必要とせずに異種化学単位の組合わせ結合によってランダムに形成された構造の集積を抜き取るとにより、生物活性分子との相互作用又は化学触媒事象を結合する際に関与する最適化化学構造を同定することができる。
従って、本発明はまた化学構造と生物活性分子との間に前選択結合又は触媒相互作用に関与する化学構造の同定方法を企図するものである。同定されるべき化学構造は本発明のライブラリー部分の１種で表され、本方法は下記段階を含むものである：
（１）本発明によるライブラリーを前選択生物活性分子と結合条件下（即ち、結合反応混合物）生物活性分子がライブラリーに存在する本発明の少なくとも１種の二官能分子と相互作用するのに十分な時間混合する。
（２）次いで結合反応複合体をライブラリー混合物から単離して単離複合体を形成する。
（３）単離結合反応複合体に存在するポリマーアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定する。ヌクレオチド配列は結合反応に関与する化学構造を定義するコードを示すので、配列が生物活性分子との結合反応に関与する化学構造を同定するを決定する。
触媒が同定されるべき活性がある場合、反応体を同定して触媒事象の存在を示すことができ、ライブラリーの原因固体支持体が候補的触媒分子として選択される。
前選択結合相互作用又は触媒反応を示す典型的な生物活性分子は、抗原に対する抗体、オリゴ糖に対するレクチン、リガンドに対するレセプター、基質に対する酵素及び分子相互作用の類似の媒体のようなもう１つの分子に選択的に結合及び／又は反応する種々の分子のいずれかとすることができ、プロテアーゼのような触媒分子とすることができる。従って、前選択結合相互作用はライブラリー部分が結合されるべき生物活性分子の選択により定義される。同様に、前選択触媒活性はライブラリー部分が触媒的に活性な物質を選択することにより定義される。結合反応は具体例として述べられるが、その手順を触媒ポリマーを検出するために使用するのに容易に適応することができることは理解される。
１．結合反応混合物
本発明のライブラリーと生物活性分子との混合物は、不均一又は均一混合物の形態とすることができる。即ち、ライブラリー部分は液相に存在する生物活性分子と共に固相とすることができる。また、生物活性分子は液相に存在するライブラリー部分と共に固相とすることができる。また更に、ライブラリー部分と生物活性分子の双方が液相とすることもできる。
結合条件は、生物活性分子の既知の自然結合機能と適合しうる条件である。適合しうる条件は生物活性分子の生物活性を維持するバッファー、ｐＨ及び温度条件であり、それにより前選択結合相互作用に関与する分子の能力を維持する。典型的には、条件としては通常問題の生物活性分子と結合されるｐＨ及びイオン強度を有する生理的水溶液がある。
例えば、結合相互作用が抗体分子を結合することができるライブラリーの一部を同定する場合、好ましい結合条件は免疫原又は既知の免疫反応抗原と免疫反応する抗体に適した条件である。レセプター分子の場合、結合条件はレセプター－リガンド相互作用の測定と適合しうるものである。
混合物が結合反応複合体を形成するのに十分な時間は、典型的には相互作用と適合しうる

条件下生物活性分子が通常の結合パートナーと相互作用するのに要した時間である。その分子に基づいて時間を変動させることができるが、混合時間は典型的に少なくとも数分、通常数時間より長くないが、より長い混合時間を用いて結合反応複合体が形成することを除外することはなにもない。

結合反応複合体は、生物活性分子と本発明の二官能分子との間の相互作用の安定な産物である。この産物は、複合体が著しく解離されることになることなく複合体がライブラリーの残りの部分から単離することができる十分な時間にわたって相互作用が維持される点で安定な産物を意味する。

２．二官能分子の結合反応混合物からの単離

結合反応複合体は複合体に選択的な分離手段により結合反応混合物から単離され、それにより生物活性分子に結合したその種類の二官能分子を単離する。生物活性分子の状態により、種々の分離手段がある。

例えば、生物活性分子は固相試薬として、少なくとも固体支持体に付着した混合物で得ることができるので、液相から容易に分離することができ、それにより大部分の種類の二官能分子を除去することができる。固相の結合反応混合物からの分離には、固相から結合親和性の低い二官能分子をすすぐために固体支持体の洗浄が任意に伴われる。

また、均一液状結合反応混合液の場合、生物活性分子に特異的な二次結合手段を使用して分子を結合するとともに結合反応混合液からその分離を得ることができる。

例えば、生物活性分子に免疫特異的な固定化抗体は結合反応複合体が形成された後結合反応混合液に対して固相付着抗体として得ることができる。固定化抗体は、結合反応混合液に存在する生物活性分子と免疫反応して抗体－生物活性分子免疫反応複合体を形成する。その後、固相を結合反応混合液から分離することにより免疫反応複合体、従って任意の結合反応複合体が混合液から分離されて単離二官能分子を形成する。

また、結合手段を生物活性分子に操作的に結合して結合反応混合物からの検索を容易にする。具体的な結合手段は次の高親和対：ビオチン－アビジン、プロテイン－Ｆｃレセプター、フェリチン－磁気ビーズ等の１種である。即ち、生物活性分子をビオチン、プロテインＡ、フェリチン及び類似の結合手段に操作的に結合（複合）し、固相中対応する結合パートナー、例えば固相アビジン、固相Ｆｃレセプター、固相磁気ビーズ等を使用することにより結合反応複合体が単離される。

タンパク質性分子を操作的に結合するために固体支持体を使用することは、一般的に当該技術において周知である。有効な固体支持体基質は当該技術において周知であり、Pharmacia Fine Chemicals（Piscataway, NJ）製の商品名SEPHADEXのような架橋デキストラン；直径約１ミクロンから約５ミリメートルのアガロース、ボロシリケート、ポリスチレン又はラテックスビーズ、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロース又はナイロン系ウェブ、例えばシート、ストリップ、パドル、プレートマイクロタイタープレートウェル及び類似の不溶性基質が挙げられる。

３．アイデンティファイアー配列の決定

単離した二官能分子に存在するアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定して触媒反応の前選択結合相互作用に関与する化学部分の種類を同定する。慣用のＤＮＡ配列決定法はこの決定に容易に利用できかつ有効であるが、単離した二官能分子の量及び質には配列決定反応の前に追加の操作が必要である。

量が少ない場合には、アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドに存在するプライマーＰ１及びＰ２に対するＰＣＲプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によってアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドの量を増加させることが好ましい。

更に、単離した二官能分子の質は、複数種の二官能分子が同様の生物活性分子結合能によって同時単離されるようなものである。１種以上の二官能分子が単離される場合、単離した異なる種類をアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドの配列決定する前に分離しなければならない。

即ち１実施態様においては、単離二官能分子の異なるアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドはＤＮＡ配列決定法により配列を決定する前に別個の配列決定用ベクターにクロ

ーン化される。これは、典型的には本明細書で記載されるＰＣＲにより異なるアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドのすべてを増幅し、次いで図１に示されているように増幅産物のユニークな制限エンドヌクレアーゼ部位を用いて増幅フラグメントを配列決定用ベクターに方向的にクローン化することにより行われる。その増幅フラグメントのクローン化及び配列決定は、当該技術において既知の多くの分子生物学的方法によって行うことができる通常の手順である。

また、単離した二官能分子の集団から誘導されたＰＣＲ増幅産物をハイブリッド形成プローブとして用いて単離した二官能分子の質を選択的に強化することができる。例えば、図１に示されるようにビオチニル化で修飾されるハイブリッド形成プローブを用いて、ハイブリッド形成によりライブラリー部分を単離して上記ハイブリッド形成プローブに対してハイブリッド形成する配列を有する二官能分子のみ含有する強化ライブラリーを形成することができる。異なった結合条件、例えばより高い厳密な結合条件下第２スクリーン反応において、生物活性分子と最も強く結合する二官能分子の種類を単離することができる。即ち、化学多様性をスクリーンする強化ライブラリーを形成するためにライブラリーを操作することができる。

４．ポリメラーゼ連鎖反応

本発明の方法の一部として単離した複合体中のアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定する場合、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）の使用は好ましい実施態様である。

本発明において使用する場合、アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドはｍＲＮＡ及び／又はゲノムＤＮＡのセンス鎖のようなポリヌクレオチドコーディング鎖を含んでいる。分析されるべき遺伝物質は二本鎖ＤＮＡの形である場合には、まず典型的には溶融により一本鎖に変性される。対の各部分が前選択ヌクレオチド配列を有するＰＣＲプライマー対で試料を処理（接触）することにより、核酸をＰＣＲ反応に供する。ＰＣＲプライマー対は、長さが少なくとも約１０ヌクレオチドであることが好ましく、長さが少なくとも約２０ヌクレオチドであることが更に好ましいアイデンティファイアーヌクレオチドのヌクレオチド配列上のＰＣＲプライマー結合部位に対してハイブリッド形成することによりプライマー伸長反応を開始することができる。ＰＣＲプライマー対の第１プライマーは、核酸の非コーディンング又はアンチセンス鎖、即ちコーディング鎖に相補的な鎖に対してハイブリッド形成することから、本明細書ではしばしば“アンチセンスプライマー”と呼ばれる。ＰＣＲプライマー対の第２プライマーは、核酸のコーディング又はセンス鎖に対してハイブリッド形成することから、“センスプライマー”と呼ばれる。

ＰＣＲ反応は、ＰＣＲプライマー対、好ましくはその所定量と試料の核酸、好ましくはその所定量とをＰＣＲバッファー中で混合してＰＣＲ反応混合液を形成することにより行われる。混合液をＰＣＲ反応産物の形成に十分な典型的には予め決定された多数のサイクルに熱循環し、それにより単離された複合体中のアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドを分析されるべき試料を強化する。

ＰＣＲは、典型的には熱循環、即ち低限が約３０度摂氏（３０℃）から約５５℃までであり上限が約９０～約１００℃である温度範囲内でＰＣＲ反応混合液の温度を繰り返し上昇及び降下することにより行われる。上昇及び降下は連続的であるが、ポリヌクレオチド合成、変性及びハイブリッド形成を容易にする各温度における相対温度の安定性の時間によって相的である。

複数の第１プライマー及び／又は複数の第２プライマーを各増幅において用いることができ、例えば第１プライマーの１種を多数の異なる第２プライマーと対になっていくつかの異なるプライマー対を形成することができる。また、個々の第１及び第２プライマー対を用いることができる。いずれの場合にも第１及び第２プライマーの同種又は異種組合わせを用いた増幅の増幅産物は突然変異を分析するために混合することができる。

ＰＣＲ反応は、任意の適切な方法を用いて行われる。通常、緩衝化した水溶液、即ちＰＣＲバッファー、好ましくはｐＨ７－９、最も好ましくは約８で起こる。好ましくはプライマーのモル過剰量が鋳型鎖を含むバッファーに混合される。プロセスの効率を改良するた

めには多量のモル過剰量が好ましい。
ＰＣＲバッファーは、デオキシリボヌクレオチドトリホスフェート（ポリヌクレオチド合成基質）ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ及びｄＴＴＰ並びに典型的には熱安定性のポリメラーゼをすべてプライマー伸長（ポリヌクレオチド合成）反応に十分な量で含有する。得られた溶液（ＰＣＲ混合液）を約９０－１００℃まで約１～１０分間、好ましくは１～４分間加熱する。この加熱時間の後、この溶液をプライマーハイブリッド形成に好ましい５４℃まで冷却する。合成反応は、室温からポリメラーゼ（誘導剤）がもはや効率よく機能しない温度まで生じる。即ち、例えばＤＮＡポリメラーゼが誘導剤として用いられる場合には、温度は通常約４０℃より高くない。熱循環は、ＰＣＲ産物の所望量が作製されるまで繰り返される。具体的なＰＣＲバッファーは次のものを含んでいる：バッファー１００ミクロリットル（μｌ）当たり５０mMＫＣｌ；ｐＨ８．３の１０mMトリス－ＨＣｌ；１．５mMＭｇＣｌ$_2$;０．００１％（wt/vol）ゼラチン、２００μＭ ｄＡＴＰ；２００μＭ ｄＴＴＰ；２００μＭ ｄＣＴＰ；２００μＭ ｄＧＴＰ；及び２．５単位サーマスアグアチカス（Thermus aguaticus）（Tag）ＤＮＡポリメラーゼＩ（米国特許第4,889,818号）。
誘導剤は、酵素のようなプライマー伸長産物の合成を行うために機能する任意の化合物又は系である。この目的のために適切な酵素としては、例えばE.コリＤＮＡポリメラーゼＩ、E.コリＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウフラグメント、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼ、他の有効なＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素及び各核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物を形成する適切な方法においてヌクレオチドの組合わせを容易にする熱安定酵素のような他の酵素が挙げられる。通常、合成は各プライマーの３′端で開始し、鋳型鎖に沿って５′の方向に合成が終結するまで進行し、異なる長さの分子を作製する。しかしながら、上記と同じプロセスを用いて５′端で合成を開始し上記の方向に進行する誘導剤がある。
誘導剤はまた、酵素のようなＲＮＡプライマー伸長産物の合成を行うために機能する任意の化合物又は系である。好ましい実施態様においては、誘導剤はＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ、例えばＴ７ＲＮＡポリメラーゼ、Ｔ３ＲＮＡポリメラーゼ又はＳＰ６ＲＮＡポリメラーゼである。これらのポリメラーゼは相補的ＲＮＡポリヌクレオチドを作製する。ＲＮＡポリメラーゼの高代謝回転速度が、Chamberlinら，The Enzymes，ed. P. Boyer，pp. 87-108，Academic Press，New York（1982）に記載されているように出発ポリヌクレオチドを増幅する。転写に基づく増幅系は、Gingerasら，PCR Protocols，A Guide to Methods and Applications，pp. 245-252，Innisら，eds，Academic Press，Inc.,San Diego，CA（1990）に記載されている。
誘導剤がＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼであり、従ってリボヌクレオチドトリホスフェートを取込む場合には、ＡＴＰ、ＣＴＰ、ＧＴＰ及びＵＴＰの十分な量がプライマー伸長反応混合液に混合され、得られた溶液は上記のように処理される。
新たに合成された鎖及びその相補的核酸鎖はプロセスの次の段階で用いることができる二本鎖分子を形成する。
ＰＣＲ増幅法は、米国特許第4,683,192号、同第4,683,202号、同第4,800,159号及び同第4,965,188号並びにPCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification，H. Erlich，ed.，Stockton Press，New York（1989）;及びPCR Protocols: A Guide to Methods and Applications,Innisら，eds.,Academic Press，San Diego，California（1990）のような少なくともいくつかのテキストに詳細に記載されている。
プライマー伸長によって合成されるべきプライマー、プローブ及び核酸フラグメント又はセグメントに関して、本明細書で用いられる“ポリヌクレオチド”なる語は、２個以上、好ましくは３個以上のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドを含む分子として定義される。その正確なサイズは多くの要因に左右され、また最後の使用条件に左右される。
本明細書で用いられる“プライマー”なる語は、核酸制限消化物から精製されたか合成的に作製されたポリヌクレオチドを意味し、核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下、即ちヌクレオチドとＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素等の重合用剤の存在下及び適切な温度とｐＨに置かれた場合に核酸合成の開始点として作用することでき

る。プライマーは最大効率の場合一本鎖が好ましいが、二本鎖の形でもよい。二本鎖の場合には、プライマーは伸長産物を調製するために用いる前にそれを相補鎖から分離するようにまず処理される。プライマーはポリデオキシリボヌクレオチドであることが好ましい。プライマーは、重合用剤の存在下に伸長産物の合成を開始するのに十分に長くなければならない。プライマーの正確な長さは、温度及びプライマー源のような多くの要因に左右される。例えば、標的配列の複雑度により、ポリヌクレオチドプライマーは典型的には１５～２５個以上のヌクレオチドを含むがそれより少ないヌクレオチドを含むこともできる。短いプライマー分子には通常鋳型と十分に安定なハイブリッドを形成するために低い温度が必要である。

本明細書で用いられるプライマーは、合成又は増幅されるべき各特定配列の種々の鎖に“実質的に”相補的であるように選択される。これは、プライマーが各々の鋳型鎖とランダムにでなくハイブリッド形成するのに十分に相補的でなければならないことを意味する。従って、プライマー配列は鋳型の正確な配列を反映してもしなくてもよい。例えば、非相補的ヌクレオチドフラグメントはプライマーの５′端に結合することができ、プライマー配列の残りは鎖に実質的に相補的である。そのような非相補的フラグメントは典型的にはエンドヌクレアーゼ制限部位をコードする。また、プライマー配列が非ランダムにハイブリッド形成するために合成又は増幅されるべき鎖の配列と十分な相補性を有し、それによりポリヌクレオチド合成条件下に伸長産物を形成するのであれば、非相補的塩基又は長い配列をプライマーに散在させることができる。

本発明のプライマーは、ＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼプロモーター配列又はその補体を含むこともできる。例えば、Kriegら，Nucl. Acids Res.,12:7057-70（1984）；Studierら，J. Mol. Biol,189:113-130（1986）;及びMolecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Maniatisら，eds.,Cold Spring Harbor, NY（1989）参照。

ＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含むプライマーを用いる場合、プライマーは増幅されるべきポリヌクレオチド鎖に対してハイブリッド形成され、ＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼプロモーターの第２ポリヌクレオチド鎖はE.コリＤＮＡポリメラーゼＩ又はE.コリＤＮＡポリメラーゼのクレノウフラグメントのような誘導剤を用いて終わる。出発ポリヌクレオチドは、ＲＮＡポリヌクレオチドとＤＮＡポリヌクレオチドの作製を交互にすることにより増幅される。

プライマーは、ＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼの鋳型配列又は複製開始部位を含むこともできる。典型的なＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼには、Lizardiら，Biotechnology,6:1197-1202（1988）に記載されているＱＢレプリカーゼがある。ＲＮＡ依存性ポリメラーゼ、鋳型配列又は複製開始部位を含む少数の鋳型ＲＮＡ鎖から多数のＲＮＡ鎖を作製する。これらのポリメラーゼは、典型的にはKramerら，J. Mol. Biol., 89:719-736（1974）に記載されているように鋳型鎖を１００万倍増幅する。

ポリヌクレオチドプライマーは、例えばホスホトリエステル又はホスホジエステル法のような適切な方法を用いて調製することができる。Narangら，Meth. Enzymol.,68:90,（1979）;米国特許第4,356,270号、同第4,458,066号、同第4,416,988号、同第4,293,652号;及びBrownら，Meth. Enzymol.,68:109,（1979）参照。

単離複合体のアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドの核酸試料がＰＣＲ増幅によって強化されるべきである場合には、２つのプライマー、即ちＰＣＲプライマー対を増幅されるべき核酸の各コーディング鎖に用いなければならない。第１プライマーは非コーディング（アンチセンス又はマイナス又は相補）鎖の一部になり、プラス又はコーディング鎖上のヌクレオチド配列に対してハイブリッド形成する。第２プライマーは、コーディング（センス又はプラス）鎖の一部になり、マイナス又は非コーディング鎖上のヌクレオチド配列に対してハイブリッド形成する。第１及び第２プライマーの一方又は双方は、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼ認識部位を定義するヌクレオチド配列を含むことができる。この部位は増幅されるポリマーアイデンティファイアーオリゴヌクレオチドの異型である。

１実施態様においては、本発明はプライマーの３′末端に位置する開始領域を有するプラ

イマーを形成する１組のポリヌクレオチドを利用する。開始領域は、典型的には３′端（３′末端）１５～３０ヌクレオチド塩基である。各プライマーの３′末端開始部分は、核酸の合成を触媒する、即ちプライマー伸長反応をその３′末端から開始するプライマーとして作用することができる。プライマーの一方又は双方は、更に５′末端（５′端）非開始部分、即ち好ましい鋳型に対するハイブリッド形成に関与しない領域を含むことができる。

５．核酸配列分析

核酸配列分析は、ヌクレオチド配列を決定する周知の手順であり、本発明のアイデンティファイアーオリゴヌクレオチド又はＰＣＲ増幅産物のヌクレオチド配列を決定するために本方法に適用される。核酸配列分析は、（ａ）プローブ鎖及びその相補的標的のハイブリッド形成又は変性に基づく物理化学的手法及び（ｂ）エンドヌクレアーゼ、リガーゼ及びポリメラーゼとの酵素反応の組合わせによって行われる。

核酸ハイブリッド形成を用いる分析において、本発明の方法のＤＮＡ二重らせんの存在の検出は種々の手段により行われる。

ＤＮＡ二重らせんの存在を検出する１方法においては、ＤＮＡ二重らせんでハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドには検出できる二重らせんを与える標識又は指示基を包含する。典型的には、そのような標識としては放射性原子、化学的修飾ヌクレオチド塩基等が挙げられる。

オリゴヌクレオチドを標識、即ち指示手段又は基に操作的に結合し、標識鋳型における特定のヌクレオチド配列の存在を検出するために使用することができる。

オリゴヌクレオチドプローブ（標識オリゴヌクレオチド）の一部に操作的に結合した又は存在した放射性元素は、ＤＮＡ二重らせんの検出を容易にする有効な手段となる。典型的な放射性元素は、β線放射を生じるものである。β線を放射する元素、例えば^{3}H、^{14}C、^{32}Ｐ及び^{35}Ｓはβ線放射発生放射性元素標識の種類を表す。放射性ポリヌクレオチドプローブは、ＤＮＡキナーゼを用いる放射性標識ヌクレオチドの核酸への酵素取込みにより典型的に調製される。

別の放射性標識オリゴヌクレオチドは、金属錯体形成剤、ビオチン含有基、蛍光化合物等を含むように化学的に修飾されるオリゴヌクレオチドである。

有効な金属錯体形成剤はランタニド及び芳香族βジケトンによって形成されたランタニドキレートであり、該ランタニドは蛍光ランタニド複合体を形成されるようにＥＤＴＡ類縁体のようなキレート形成化合物を介して核酸又はオリゴヌクレオチドに結合される。米国特許第4,374,120号、同第4,569,790号及び公開欧州特許出願第0139675号及び国際出願第87/02708号参照。

ポリヌクレオチドを標識するビオチン又はアクリジンエステル標識オリゴヌクレオチド及びその使用が記載されている。米国特許第4,707,404号、公開欧州特許出願第0212951号及び欧州特許第0087636号参照。有効な蛍光マーカー化合物としては、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、ＮＢＤ等が挙げられる。

ＤＮＡ二重らせんに存在する標識オリゴヌクレオチドは二重らせん自体を標識し、従って分析されるべき試料に存在する他の核酸より区別できる。二重らせんの標識の存在、それにより二重らせんの存在の検出は、典型的にはＤＮＡ二重らせんに対してハイブリッド形成されない標識オリゴヌクレオチドプローブからＤＮＡ二重らせんを分離することを含んでいる。

非ハイブリッド形成標識オリゴヌクレオチドプローブのような一本鎖オリゴヌクレオチドをＤＮＡ二重らせんから分離する技術は周知であり、典型的には二本鎖核酸から１本鎖をそれらの化学的性質に基づいて分離することを含んでいる。更にたいてい分離技術は、非ハイブリッドプローブを不溶性基質に結合するＤＮＡ二重らせんから典型的には洗浄により分離する不均一ハイブリッド形成方式の使用を含んでいる。具体的にはサザンブロット法であり、基質はニトロセルロースシートであり標識は^{32}Ｐである。Southern, Ｊ. Mol. Biol.,98:503（1975）。

オリゴヌクレオチドは、また典型的には５′末端で又はその近傍で固体基質、即ち前記不

溶性水性固体支持体に結合されることが有利である。
“結合”ヌクレオチドを５′又は３′端のオリゴヌクレオチド部分に加え、その部分を固体支持体に操作的に結合するために結合オリゴヌクレオチドを使用することも可能である。
ヌクレオチドハイブリッド形成分析においては、鋳型上の所定の配列に対して相補性を有するオリゴヌクレオチドが鋳型に存在する相補的核酸配列に対してハイブリッド形成するのに十分な時間のハイブリッド形成条件下企図された方法でハイブリッド形成反応混合液を維持してハイブリッド形成産物、即ちオリゴヌクレオチド及び標的核酸を含有する複合体を形成する。
維持時間に関して用いられる“ハイブリッド形成条件”なる語及びその文法上の相当語は、混合液中反応体と付随試薬の濃度の関係において、ハイブリッド形成反応混合液を１種以上のオリゴヌクレオチドが標的配列とアニールするのに十分な時間、温度及びｐＨ条件に供して核酸二重らせんを形成することを示すものである。ハイブリッド形成を行うために必要とされるそのような時間、温度及びｐＨ条件は、当該技術において周知のように、ハイブリッド形成されるべきオリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドと標的との間の相補性の程度、オリゴヌクレオチドのグアニン及びシトシン含量、所望のハイブリッド形成の厳密性及びハイブリッド形成速度論に影響するハイブリッド形成反応混合液中の塩又は追加試薬の存在に左右される。一定のハイブリッド形成反応混合液のハイブリッド形成条件を最適化する方法は、当該技術において周知である。
典型的なハイブリッド形成条件は、ｐＨ値４～９に緩衝化した溶液の使用を包含し、４～３７℃、好ましくは約１２～約３０℃、更に好ましくは約２２℃の温度で０．５秒～２４時間、好ましくは２分（min）～１時間行われる。具体的には実施例４に記載される条件である。
ハイブリッド形成は、周知のように均一又は不均一方式で行うことができる。均一ハイブリッド形成反応は、溶液中で完全に生じ、ハイブリッド形成（標的）されるべきオリゴヌクレオチドと核酸配列の双方が溶液中可溶形態で存在する。不均一反応は、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドプローブ又は標的核酸が結合される反応媒体に不溶な基質の使用を含んでいる。
標的配列を含む核酸が二本鎖（ｄｓ）形態である場合、ハイブリッド形成反応を行う前に加熱又はアルカリ処理のようにまずｄｓＤＮＡを変性することが好ましい。ｄｓＤＮＡの変性は、ハイブリッド形成されるべきオリゴヌクレオチドと混合する前に行われるか又はｄｓＤＮＡとオリゴヌクレオチドとの混合した後に行うことができる。
ハイブリッド形成反応混合物に存在するオリゴヌクレオチドの有効量は通常周知であり、典型的にはハイブリッド形成されるべきオリゴヌクレオチドと鋳型との間のモル比率によって表される。好ましい比率は、標的配列とオリゴヌクレオチドの等モル量を含むハイブリッド形成反応混合物である。周知のように、等モル濃度からの偏差は、低効率であるがハイブリッド反応産物を生じる。即ち、１成分が他の成分に相対して１００倍モル過剰ほどにあることができる比率であるが、５０倍モル未満、好ましくは１０倍未満、更に好ましくは２倍過剰量が本発明を実施するに当たり好ましい。

実施例

下記実施例は、本発明を具体的に説明するものであるが、限定するものではない。

１．保護アミノ酸の調製

二官能分子の合成には、保護アミノ酸が必要である。アミノ酸のアミノ末端はフルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＯＣ）で保護され、カルボキシ末端はペンタフルオロフェニルエステル（Ｏｐｆｐ）で保護される。アミノ酸リシン、システイン、チロシン、セリン、トレオニン、アルギニン、ヒスチジン、トリプトファン、アスパラギン酸及びグルタミン酸には、その側鎖（Ｒ基）保護の追加が必要である。
ほとんどのＦＭＯＣ及びＯｐｆｐ保護アミノ酸は市販されており、Bachem Biosciences, Inc.（Philadelphia, PA）から入手した。本明細書で用いられるその構造に対する用語は、グリシン（Ｇｌｙ）の場合次の例：ＦＭＯＣ－Ｇｌｙ－Ｏｐｆｐで示され、ＦＭＯＣ及

びＯｐｆｐはアミノ及びカルボキシ末端保護基である。側鎖保護の場合、次の保護アミノ酸はBachemから入手できる：アルギニンの側鎖アミノ末端に置換基N^9－４－メトキシ－2,3,6－トリメチルベンゼンスルホニルアルギニン（ＭＴｒ）を有するＦＭＯＣ－Ａｒｇ（ＭＴｒ）－Ｏｐｆｐ;ヒスチジン内の複素環反応性窒素に置換基Ｎπ－tert－ブトキシメチルヒスチジン（Ｂｕｍ）を有するＦＭＯＣ－Ｈｉｓ（Ｂｕｍ）－Ｏｐｆｐ；システインの側鎖イオウに置換基Ｓ－トリフェニルメチルシステインを有するＦＭＯＣ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－Ｏｐｆｐ；トリプトファンの複素環基のアミノ基にホルミル基を有するＦＭＯＣ－Ｔｒｐ（Ｎ－Ｆｏｒ）－Ｏｐｆｐ；及びリシン側鎖の遊離アミノ基にベンジル基を有するＦＭＯＣ－Ｌｙｓ（Ｎ－Ｂｚ）－Ｏｐｆｐ；括弧内の構造は反応性側鎖の保護基を示す。

チロシンの側鎖ヒドロキシにtert－ブチルジメチルシリル（ＴＢＳ）エステルを有するＦＭＯＣ－Ｔｙｒ（ＯＴＢＳ）－Ｏｐｆｐは、過剰量のギ酸とＦＭＯＣ－Ｔｙｒ（tert－ブチル）－Ｏｐｆｐ（Bachem）と反応させて保護ヒドロキシ基からtert－ブチル基を除去してＦＭＯＣ－Ｔｙｒ－Ｏｐｆｐを形成することにより調製される。その後、１当量のＦＭＯＣ－Ｔｙｒ－Ｏｐｆｐを１．２当量のＴＢＳ－Ｃｌ及び１．５当量のイミダゾールとＤＣＭ中不活性雰囲気下室温で１２時間反応させてＦＭＯＣ－Ｔｙｒ（ＯＴＢＳ）－Ｏｐｆｐを形成する。

ＦＭＯＣ－Ｓｅｒ（ＯＴＢＳ）－Ｏｐｆｐは、同様に反応にＦＭＯＣ－Ｓｅｒ（tert－ブチル）－Ｏｐｆｐ（Bachem）を用いて調製される。ＦＭＯＣ－Ｔｈｒ（ＯＴＢＳ）－Ｏｐｆｐもまた、ＦＭＯＣ－Ｔｈｒ（tert－ブチル）－Ｏｐｆｐ（Bachem）を用いてこの方法で調製される。

アスパラギン酸の側鎖カルボキシル基にトリメチルシリルエチルエステル（ＴＭＳＥ）を有するＦＭＯＣ－Ａｓｐ（ＴＭＳＥ）－Ｏｐｆｐは、まず１当量のＦＭＯＣ－Ａｓｐ－Ｏ－tertブチル（Bachem）と１．５当量の２－トリメチルシリルエタノール及び１．５当量のジシクロカルボジイミド（ＤＣＣ）とを酢酸エチル中不活性雰囲気下室温で１２時間反応させてＦＭＯＣ－Ａｓｐ（ＯＴＭＳＥ）－Ｏ－tert－ブチルを形成することにより調製される。その後、ＴＭＳＥエステルを過剰量のギ酸と室温で１４時間反応させてtert－ブチル部分を加水分解するとともにＦＭＯＣ－Ａｓｐ（ＯＴＭＳＥ）－ＣＯＯＨの形の遊離カルボキシル末端を形成する。ギ酸を蒸発し、１当量の残りのアミノ酸を１．１当量のペンタフルオロフェノール（ｐｆｐ；Bachem）及び１．１当量のＤＣＣと不活性雰囲気下室温１２時間混合して産物ＦＭＯＣ－Ａｓｐ（ＴＭＳＥ）－Ｏｐｆｐを形成する。この産物は、ヘキサン中１０％（v/v）酢酸エチルを用いるシリカゲルクロマトグラフィーにより未反応ｐｆｐ、ＤＣＣ及び前駆体アミノ酸から単離される。

グルタミン酸の側鎖カルボキシル基にＴＭＳＥエステルを有するＦＭＯＣ－Ｇｌｕ（ＴＭＳＥ）－Ｏｐｆｐは、アスパラギン酸前駆体の代わりにＦＭＯＣ－Ｇｌｕ－Ｏ－tert－ブチル（Bachem）を用いる以外はＦＭＯＣ－、ＴＭＳＥ及びｐｆｐ保護アスパラギン酸を調製する上記のように調製してＦＭＯＣ－Ｇｌｕ（ＴＭＳＥ）－Ｏｐｆｐを形成する。

２．固体支持体の調製

ａ．テフロン支持体

Ｎ６－（５′－Ｏ－ジメトキシトリチル－２′,３′－ジアセチル１－アデニルイル）－テフロン支持体を示す固体支持体をGlen Research（Herndon, VA）から入手した。固体支持体は、プリン塩基の６－アミノ基による固体支持体結合、リボース環の５′位にジメトキシトリチルエーテル（ＤＭＴ）及びリボース環の２′及び３′位に酢酸エステルを有する修飾アデニンヌクレオシドを有するテフロン樹脂である。この固体支持体をジクロロメタン中５容量の３％（v/v）ジクロロ酢酸（ＤＣＭ中３％ＤＣＡ）と混合し、不活性雰囲気下室温で１０分間維持し、ジメトキシトリチル（ＤＭＴ）保護基を除去して遊離５′ヒドロキシルを形成した。得られた脱保護固体支持体をＤＣＭで３回洗浄して過剰の反応しないＤＣＡを除去した。脱保護洗浄テフロン固体支持体はリンカーにカップリングすることができる。

３．リンカーの固体支持体へのカップリング

ａ．テフロン支持体
１当量の脱保護洗浄固体支持体（実施例２で調製した）を２０当量の（１－ジメトキシトリチルオキシ－３－フルオレニルメトキシカルボニルアミノプロパン－２イル）－（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）－ホスホルアミダイトを示し５′分枝修飾因子Ｃ３（又は５′ＢＭＣ３ ;Glen Researchから入手）と呼ばれるリンカー及び２０当量のテトラゾール（アセトニトリル中０．４５Ｍ，Glen Research）と混合し、不活性雰囲気下室温で０．５～１時間攪拌しながらかきまぜた。次いで混合液を過剰量のアセトニトリルで洗浄して反応しない試薬を除去した。洗浄固相物質が残り、２当量のテトラヒドロフラン／水、９：１中ヨウ素（Glen Researchから入手）と不活性雰囲気下で混合し、室温で１０分間維持して酸化固体支持体結合リンカーを形成した。
次いで１当量の酸化固体支持体結合リンカーを２０当量のアセトニトリル／酢酸無水物、８８：１２（キャップ形成試薬;Glen Research）と室温で１０分間混合して固体支持体上に存在する反応しない遊離ヒドロキシルにキャップを形成しかつキャップテフロン固体維持体結合リンカーを形成した。
ｂ．制御細孔ガラス（ＣＰＧ）支持体
本発明で用いられる制御細孔ガラス（ＰＣＧ）及びリンカーが特に好ましい。具体的なＣＰＧ支持体の完全な構造は図３に示されており、（１）リンカーをＣＰＧ支持体に結合するサルコシンリンカー部分、（２）固体支持体からポリペプチド－リンカー－オリゴヌクレオチド複合体（Ａ－Ｂ－Ｃ）を遊離するアンモニア水で切断できるスクシニルアミノヘキサノールリンカー及び（３）固体支持体からオリゴヌクレオチドを遊離する光不安定切断部位を有するセリン分枝モノマーを包含する。合成は下記のように段階的に行われる。
Ｎ－Ｆｍｏｃ－アミドヘキサン－１－オール（１）をまず調製してアミノヘキサノールリンカー部分を形成した。それを目的として、６－アミノ－１－ヘキサノール（０．７５ｇ、６．４ミリモル）を飽和水性Na_2CO_3（１０ml）に溶解し、氷で冷却した。ＴＨＦ（２５ml、新たに蒸留）中９－フルオレニルメチルクロロホーメート（Ｆｍｏｃ－Ｃｌ、１．８３ｇ、７．１ミリモル）を激しく攪拌しながら徐々に加えた。この溶液を１０％（w/v）クエン酸で酸性にし、酢酸エチルで抽出し、セライト５４５でろ過した後、相を分離した。有機相を乾燥（Na_2SO_4）で乾燥し、ろ過し、蒸発して粗生成物（２．１５ｇ）を得た。酢酸エチル／ヘキサン（１００ml、８／２、v/v）で再結晶して純粋な生成物を得てアルコール１を生成した。アルコール１の収量は１．６ｇであった。
Ｎ－Ｆｍｏｃ－アミドヘキサン－１－イルスクシネート（２）を調製してスクシニルアミノヘキサノールリンカー部分を形成した。アルコール１（７５８mg、２．２ミリモル）を無水ピリジン（５ml）に溶解し、減圧下で蒸発乾固した。蒸発した油状物を無水ピリジン（３ml）に再び溶解し、コハク酸無水物（２２９mg、２．３ミリモル）、４－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ、３７０μl、２７８mg、０．１ミリモル）及びジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ、３７０μl、２７８mg、２．２ミリモル）を不活性雰囲気（Ａｒ）下攪拌しながら加えた。この反応混合液を一晩攪拌し、蒸発乾固し、ジクロロメタン（１００ml）に再び溶解し、希釈水性塩酸（１Ｍ、５０ml）で抽出した。有機相を乾燥（Na_2SO_4）し、ろ過し、蒸発して粗生成物を化合物２を示す油状物として得、これを２－プロパノールで再結晶することができた。化合物２の収量は７３５mg（白色結晶として）であり、融点（Ｍｐ．）６７－６８℃（補正なし）;及び質量分析（ＭＳ）（ＥＩ、m/e）４４０（$C_{25}H_{29}O_6$+Hの計算値４４０）を有した。
Ｏ（４，４′－ジメトキシトリチル）－Ｎ－Ｆｍｏｃ－Ｌ－セリン（３）を調製してＦＭＯＣ及びＯ－ＤＭＴ末端を含むセリン分枝リンカー部分を形成した。Ｆｍｏｃ－Ｌ－セリン（４．０４ｇ、１２．２ミリモル）を無水ピリジン（１０ml）に溶解し、減圧下で蒸発乾固した。この工程を２回繰り返した。蒸発した油状物を無水ピリジン（１２ml）に再び溶解し、４，４′－ジメトキシトリチルクロリド（４．２０ｇ、１２．４ミリモル）を不活性雰囲気（Ａｒ）下室温で攪拌しながら加えた。反応混合液を一晩攪拌し、蒸発乾固し、クロロホルム（４×２５ml）に再び溶解し、飽和水性$NaHCO_3$（５０ml）で抽出した。水相をクロロホルム（２５ml）で１回逆抽出し、合わせた有機相をNa_2SO_4で乾燥

し、ろ過し、蒸発して粗生成物を茶色がかった油状物として得た。油状物をクロロホルム／酢酸エチルに溶解し、ヘキサンと１回摩砕し、次いで移動相としてＣＨＣｌ$_3$／ＭｅＯＨ／ＤＩＰＥＡ、９４／５／１を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィー（１５０ｍｌシリカ）で精製した。画分をｔｌｃで分析し、適切な画分をプールし、蒸発して化合物３を示す白色泡状物を得た。化合物３の収量は４．２９ｇであり、ＭＳ（ＥＩ、m/e）は６３０（$C_{39}H_{35}NO_7$+Hの計算値６３０）であった。

制御細孔ガラス（ＣＰＧ）を上記の調製リンカーに結合するために活性化した。それを目的として、ＣＰＧ（Sigma G5019、アミノプロピル－ＣＰＧ、４．９７ｇ）をジクロロメタン中トリクロロ酢酸（３％、２０ｍｌ）に懸濁し、シェーカーで４時間攪拌した。ＣＰＧをろ過で単離し、ジクロロメタン（２０ｍｌ）で３回、クロロホルム中ＤＩＰＥＡ（１０％、２０ｍｌ）で３回及びジエチルエーテルで３回洗浄して活性化ＣＰＧを形成した。活性化ＣＰＧを減圧下で乾燥した。

次いで図３に示されている要素をすべて含む二官能ＣＰＧ［ｂｆ－ＣＰＧ，ＣＰＧ－Ｓａｒ－ｓｕｃ－ａｈｏ－Ｓｅｒ（Ｏ－ＤＭＴ）（Ｎ－Ｆｍｏｃ）］を調製した。

ｉ．活性化ＣＰＧ（２．０ｇ、ローディング８３μモル／ｇ）をフィルター漏斗（２５ｍｌ）に入れた。Ｆｍｏｃ－Ｓａｒ（３１３．５mg、ミリモル）をＤＭＦ（２．８ｍｌ）に溶解し、ＤＭＦ（２．８ｍｌ）中ｐｙＢＯＰ（５２５．９mg、ミリモル）と混合し、合わせた活性化アミノ酸混合液をＣＰＧに加えた。ＤＩＰＥＡ（１ｍｌ）を反応混合液に加え、ＣＰＧを室温で１時間振盪した。クロロホルム（５ｍｌ）を加え、振盪をもう３時間続けた。Ｓａｒ機能性ＣＰＧをろ過で回収し、ＤＭＦ（２×）、ジクロロメタン（２×）、ジエチルエーテル（２×）で洗浄し、減圧下で乾燥した。最大ローディングを得るために、この工程を繰り返してローディング７７μモル／ｇを有するＣＰＧ－Ｓａｒを得た。残存する最終遊離アミノ基に酢酸無水物／ＤＭＡＰでキャップ形成し、次いで減圧下で多く洗浄及び乾燥してＳａｒ機能性ＣＰＧを形成した。

ii．Ｓａｒ機能性ＣＰＧ（２．０ｇ）をＤＭＦ（２／８、２×５分）中ピペリジンで処理し、化合物２（４５０mg）、ｐｙＢＯＰ（５７５mg）及びＤＩＰＥＡ（１０００μｌ）をＤＭＦ（２×２．８ｍｌ）中で反応させた。得られたＳａｒ－ｓｕｃ－ａｈｏ－Ｆｍｏｃ機能性ＣＰＧをろ過で回収し、ＤＭＦ（２×）、ジクロロメタン（２×）、ジエチルエーテル（２×）で洗浄し、減圧下で乾燥した。

iii．Ｓａｒ－ｓｕｃ－ａｈｏ－Ｆｍｏｃ機能性ＣＰＧをＤＭＦ（２／８、２×１０分）中ピペリジンで処理し、化合物３（７６４mg）、ｐｙＢＯＰ（５３６mg）及びＤＩＰＥＡ（１０００μｌ）とＤＭＦ（２×２．８ｍｌ）と反応させて二官能ＣＰＧ支持体又は“ｂｆ－ＣＰＧ”を形成した。ローディングは、３０２nmのＦｍｏｃ／ピペリジン付加物吸収から判断して６１．７μモル/ｇであることが決定された。

更に実施態様においては、上記ｂｆ－ＣＰＧは複合体からポリペプチドを除去するための光不安定切断部位を付加することにより更に機能化される。

それを目的として、３－ニトロ－４－ブロモメチル安息香酸をα－ブロモ－p-トルイル酸（４－ブロモメチル安息香酸；Aldrich Chemical Company, Milwaulkee, WI製）を用いてRichら，J. Am. Chem. Soc.,97:1575-1579(1975)に記載されているように調製する。３－ニトロ－４－ブロモメチル安息香酸部分をまずＤＭＦ中ピペリジンで処理（２／８、２×５分）してＮ末端官能を脱保護することにより上記ｂｆ－ＣＰＧ支持体に付加し、次いで十分に洗浄し、ｐｙＢＯＰで活性化される３－ニトロ－４－ブロモメチル安息香酸と反応させて図３に示される構造を有する光切断できるｂｆ－ＣＰＧを形成する。カップリング反応の完了はＦＭＯＣ脱保護及びカップリング反応の各々の後、ポジティブ及びネガティブカイゼル試験によりモニターされる。

アミノ酸残基モノマーの光切断できるｂｆ－ＣＰＧ（Ｏ－ＮＢ－ｂｆ－ＣＰＧとも呼ばれる）へのカップリングは、上記Richら及びBarauyら，J. Am. Chem. Soc.,107:4936-4942(1985)に記載されているエステル化手順により行われる。

得られたｂｆ－ＣＰＧリンカー／支持体分子は下記の本発明の関係において新規でかつ有効な特徴を有する。

（１）リンカー／支持体分子はＦｍｏｃペプチド合成条件に安定でありかつ切断の際固体ＣＰＧ支持体を含まないペプチド－オリゴヌクレオチド複合体を遊離するサルコシン／スクシニル部分のアンモニア水感受性切断部位を有し、それにより化学ライブラリーの可溶相形態を作製することができる。可溶相化学ライブラリーは、ＰＣＲ反応における使用及び溶液相結合相互作用においてペプチド相互作用を測定するのに特に適している。
（２）Ｌ－セリン分枝モノマーがあるので、ペプチド－オリゴヌクレオチド複合体は異性体的に純粋である。
（３）光不安定リンカー／支持体分子（Ｏ－ＮＢ－ｂｆ－ＣＰＧ）は、約３５０nmの光に感受性でありかつ切断の際可溶性ペプチドを遊離する図３に矢印で示された光感受性（ｈｖ）切断部位を有する。切断は、上記Baranyらに記載されているようなレイオネットＲＰＲ原子炉を用いて照射時間及び強度により調節することができる。
４．ヌクレオチドの固体支持体へのカップリング
ａ．ＤＭＴの脱保護
実施例３で調製したキャップ形式テフロン固体支持体結合リンカーを３％ＤＣＡとＤＣＭ中不活性雰囲気下室温で１０分間混合してＤＭＴ保護基をリンカーから除去し遊離ヒドロキシル基を形成した。次いで脱保護リンカー／支持体をＤＣＭで３回洗浄した。脱保護リンカー／支持体は、ヌクレオチドを付加することができる。
ｂ．ヌクレオチドのテフロン支持体への付加
１当量の脱保護リンカー／支持体を約２０当量の所望のブロックヌクレオチドホスホルアミダイト及び２０当量のテトラゾール（アセトニトリル中０．４５Ｍ）と混合して結合ヌクレオチド／リンカー／支持体（結合ヌクレオチド複合体）を形成した。次いで結合ヌクレオチド複合体を過剰量のアセトニトリルで洗浄して反応しない試薬を除去した。ブロックヌクレオチドホスホルアミダイトすべてをGlen Researchから入手し、ＤＭＴ保護ブロック５′ヒドロキシル、シアノエチルエステル（ＣＮＥ）及び３′ホスホルアミダイトのジイソプロピルアミン基を含む。更に、アデニン及びシトシン誘導体は塩基の遊離窒素上にベンゾイル基を含有し、グアノシン誘導体はプリン塩基の２－アミノ基上にイソブチル基を含む。
次いで１当量の結合ヌクレオチド複合体を上記実施例３のように酸化のためにテトラヒドロフラン／水、９：１中２当量のヨウ素と混合して結合ヌクレオチド複合体を酸化した。その後、１当量の酸化ヌクレオチド複合体を上記実施例３のように２０当量のキャップ形成試薬と混合して反応しない遊離ヒドロキシルにキャップ形成しキャップ固相結合ヌクレオチド複合体を形成した。
ｃ．ヌクレオチドの二官能ＣＰＧへのカップリング
ヌクレオチド残基を二官能ＣＰＧ支持体へ付加するカップリング化学の証明として、ｂｆ－ＣＰＧ上のオリゴデオキシリボヌクレオチドを合成および結合した。それを目的として、オリゴヌクレオチドを１μモル規模の標準合成サイクル並びに市販の試薬及びホスホルアミダイトを用いてＡＢＩ３９４ＤＮＡシンセサイザーにより合成した。使用した固体支持体は、ＡＢＩシンセサイザー用市販の中空合成カラムに入れたｂｆ－ＣＰＧ（２０mg、１μモル）とした。反復収率は、脱トリチル化を集めアセトニトリル中p-トルエンスルホン酸１水和物(０．１Ｍ)に希釈し４９８nmの吸収を測定することから判断した９８．９％を算出した。
オリゴヌクレオチドを濃アンモニア水によって支持体から遊離した（２４時間を超えて振盪する）。オリゴヌクレオチドを市販のＯＰＣカートリッジを用いて単離し、ＨＰＬＣ及びＰＡＧＥを分析した（^{32}Ｐ－ｇ－ＡＴＰ及びＴ４キナーゼで放射能標識した）。
５．アミノ酸の固体支持体へのカップリング
ａ．ヌクレオチド複合体の脱保護
１当量のキャップテフロン固相結合ヌクレオチド複合体を１当量の1,8，ジアザビシクロ［5,4,0］ウンデセ－７－エン(ＤＢＵ;Aldrich Chemical Co. 製，Milwaukee，WI)とＤＣＭ中不活性雰囲気下室温で１０分間混合してヌクレオチド複合体のリンカーからフルオロメトキシカルボニル（ＦＭＯＣ）保護基を除去（脱保護）した。次いで脱保護ヌクレオチ

ド複合体を過剰量のＤＣＭで洗浄して反応しないＤＢＵを除去し遊離アミノ基を有する脱保護ヌクレオチドを形成した。

ｂ．アミノ酸の付加

１当量の実施例５Ａの脱保護ヌクレオチドをジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中２０当量の保護アミノ酸と２０当量の１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）と不活性雰囲気下室温で０．５～１時間混合した。この反応条件は、アミノ酸のカルボキシ末端をそのペンタフルオロフェニルを介してヌクレオチド複合体の遊離アミノ基に結合してヌクレオチド／アミノ酸複合体（複合体）を形成する。次いでこの複合体を過剰量のＤＣＭで洗浄して反応しないＨＯＢｔ及び前駆体アミノ酸を除去した。保護アミノ酸は、アミノ及びカルボキシ末端にＦＭＯＣ及びＯｐｆｐ、場合によっては、上記側鎖上の保護基を有する実施例１で記載されたものの１種である。

ｃ．アミノ酸の二官能ＣＰＧへのカップリング

アミノ酸残基を二官能ＣＰＧ支持体へ付加するカップリング化学の証明として、ペプチド、Ｈ－ＨＰＱＦＶＳ－ａｈｏを合成し、そのペプチドをｂｆ－ＣＰＧに結合した。それを目的として、ｂｆ－ＣＰＧ（４２８mg、２６μモル）を＿＿＿装置の攪拌装置に接続したフィルター漏斗に入れた。使用した試薬は、Ｏ－ｐｆｐエステル（Ｖａｌ及びＨｉｓ［Ｆｍｏｃ］の場合）あるいはｐｙＢＯＰで活性化した遊離酸（Ｐｈｅ、Ｇｌｎ及びＰｒｏの場合）として市販のＦｍｏｃアミノ酸誘導体とした。カップリングは、慣用の＿＿＿化学を用いる自動ペプチドシンセサイザー＿＿＿で行った。Ｆｍｏｃ脱保護及びカップリング段階の各々の後、カップリング反応の成功をポジティブ及びネガティブカイゼル試験によりモニターした。

ペプチドを脱保護し、ｉ．ＤＭＦ中ピペリジン（２／８、２×５分）ii．濃アンモニア水（２４時間振盪）で処理することによりｂｆ－ＣＰＧの一部から遊離した。逆相ＨＰＬＧによりペプチドを１本の主ピークとして分析した。ＭＳ（イオンスプレー、m/e）８１３（$C_{39}H_{60}N_{10}O_9$+Hの計算値８１３）。

６．複合体の延長

複合体は、ヌクレオチドとアミノ酸付加の交互サイクルにより長くすることができる。複合体が所望のアミノ酸ポリマーとオリゴヌクレオチドポリマーをもつまで、次の交互サイクルが繰り返される。

ａ．ヌクレオチドの付加

付加ヌクレオチドを結合するために、末端ヌクレオチド上の５′－ＯＨをテフロンリンカー／支持体の脱保護の前記実施例４Ａに記載されるプロトコールに従ってＤＣＡで脱保護する。その後、保護ヌクレオチドが実施例４Ｂのように付加される。

ｂ．アミノ酸の付加

付加アミノ酸を結合するために、複合体に付加した最後のアミノ酸のアミノ－ＦＭＯＣ末端を前記実施例５ＡのようにＤＢＵで脱保護する。その後、保護アミノ酸が実施例５Ｂに記載されるように付加される。

別のヌクレオチド及びアミノ酸を付加する上記段階１及び２のサイクルは、複合体が所望の長さ及び構造のポリマーを有するまで繰り返すことができる。

ｃ．ポリペプチド－オリゴヌクレオチドＣＰＧ複合体の構築

二官能ＣＰＧ支持体上にペプチド－オリゴヌクレオチド複合体を調製するカップリング科学の証明として、ｂｆ－ＣＰＧ上にオリゴデオキシリボヌクレオチドを合成及び結合した。それを目的として、オリゴヌクレオチド（配列番号＿＿：TCT CTC TCT AAA CTC GGG TC T CTC[1]；及び配列番号＿＿：AGC TAC TTC CCA AGG ATC ACC ACA CTA GCG GGG CCC TAT TC T TAG[2]）を１μモル規模の標準合成サイクル及び市販の試薬及びホスホルアミダイトを用いるＡＢＩ３９４ＤＮＡシンセサイザーにより標準合成化学に従って合成した。固体支持体は、ＡＢＩシンセサイザーの市販の中空合成カラムに入れた上記実施例＿＿で作製したＦｍｏｃ－（Ｆｍｏｃ）ＨＰＱＦＶＳ（ＤＭＴ）－ａｈｏ－ＣＰＧ（２０mg、１μモル）とした。反復収量は、脱トリチル化を集め、アセトニトリル中p-トルエンスルホン酸１水和物で希釈し、４９８nmの吸収を測定することから測定した各々９７．９％（２４量体）

及び９８．３％（４５量体）を算出した。
上記４５量体オリゴヌクレオチドは、ＰＣＲプライマーの部位を示す２つの隣接１５量体領域及び無コンマコドンＦのCTA、ＨのATC、ＰのACC、ＱのACA及びＶのGCGを（任意に）用いるペプチドのコード配列である中間１５量体を有する。
ペプチド－オリゴヌクレオチド複合体は、濃アンモニア水（２４時間を超える振盪）により支持体から遊離した。ペプチド－オリゴヌクレオチド複合体を市販のＯＰＣカートリッジを用いて単離し、ＨＰＬＣ及びＰＡＧＥ（^{32}Ｐ－ｇ－ＡＴＰ及びＴ４キナーゼで放射能標識した）により分析した。

[1] ２４量体試験配列

[2] ４５量体配列。２つの隣接１５量体はＰＣＲプライマーであり、中間１５量体は無コンマコドンＦのCTA、ＨのATC、ＰのACC、ＱのACA及びＶのGCGを（任意に）用いるペプチドのコード配列である。

ｄ．ｂｆ－ＣＰＧ支持体上ペプチド－オリゴヌクレオチド複合体ライブラリーの合成
実施例３Ｂに記載される二官能（ｂｆ）ＣＰＧ支持体を用いて、ペプチド－オリゴヌクレオチド複合体ライブラリーを下記段階に記載されるように構築する：
段階１．固体支持体、ｂｆ－ＣＰＧをＡＢＩ３９４ＤＮＡシンセサイザー（Applied Biosystems, Inc.,Foster City, CA)に使用する市販の中間合成カラムに入れる。３′オリゴヌクレオチドプライマー配列（配列番号＿＿）を合成し、次いで標準合成サイクル及び市販の試薬及びホスホルアミダイトを用いる製造業者の標準手順に従ってｂｆ－ＣＰＧに化学的に結合する。
段階２．段階２後の支持体は、合成されるべきポリペプチドのライブラリー位置１に付加されるべき異なるモノマーアミノ酸数を表す多数のアリコートに分けられる。各Ｆｍｏｃアミノ酸残基モノマー（１）は、モノマー上の保護と一致したプロトコールに従って結合される。典型的なプロトコールにおいては、ｂｆ－ＣＰＧを攪拌装置に接続したフィルター漏斗に入れる。使用される試薬は、Ｏ－ｐｆｐエステルあるいはｐｙＢＯＰで活性化された遊離酸として市販のＦｍｏｃアミノ酸誘導体である。機能性ｂｆ－ＣＰＧをＤＭＦピペリジン（２／８、２×５分）で処理し、上記のように活性化したモノマーと反応させる。カップリング反応の成功は、Ｆｍｏｃ脱保護及びカップリング各段階後ポジティブ及びネガティブカイゼル試験でモニターする。同様に、脱保護Ｆｍｏｃ／ピペリジン複合体の３０２nmにおける吸収は、カップリング反応がうまく進行する指標として作用する。モノマー（１）－機能性ｂｆ－ＣＰＧをろ過により回収し、ＤＭＦ（２×）、ジクロロメタン（２×）、ジエチルエーテル（２×）で洗浄し、減圧下で乾燥してモノマー（１）－複合ｂｆ－ＣＰＧを形成する。
段階３．適切なモノマー（１）の単位アイデンティファイアーであるオリゴヌクレオチドは、異なるモノマー（１）－機能性ｂｆ－ＣＰＧの各々をＤＮＡシンセサイザー用市販の別々の中空合成カラムに入れることによりモノマー（１）－機能性ｂｆ－ＣＰＧの各々に結合される。モノマー（１）－機能性ｂｆ－ＣＰＧ上に存在するモノマー（１）の種類に対応するオリゴヌクレオチドコード配列［例えば、オリゴ（１）を示す無コンマトリヌクレオチド単位］を標準合成サイクル並びに市販の試薬及びホスホルアミダイトを用いる前記ＤＮＡシンセサイザーによる３逐次合成サイクルによってモノマー（１）－機能性ｂｆ－ＣＰＧに化学的に結合してモノマー（１）、オリゴ（１）－ｂｆ－ＣＰＧ複合体を形成する。
段階４．異なるモノマー（１）－機能性ｂｆ－ＣＰＧをプールし、混合し、ライブラリーの位置２に付加されるべき異種アミノ酸残基モノマーの数を示す多数のアリコートに分けられる。モノマー（２）は、モノマー（１）の段階２に記載されるようにＣＰＧに結合される。

段階５．適切なモノマー（２）の単位アイデンティファイアーであるオリゴヌクレオチド配列は、異なるモノマー（１）－機能性ｂｆ－ＣＰＧの各々をＤＮＡシンセサイザー用市販の別々の中空合成カラムに入れることによりモノマー（１）－機能性ｂｆ－ＣＰＧの各々に結合される。
これらの段階、段階４－５は、適切な数のモノマー及び対応する単位アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドが取込まれるまで繰り返される。
段階６．合わせた固体支持体をＤＮＡシンセサイザー用市販の中空合成カラムに入れる。
５′オリゴヌクレオチドプライマー配列は、上記のように標準合成サイクル並びに市販の試薬及びホスホルアミダイトを用いてモノマー（ｎ）－モノマー（１）－機能性ｂｆ－ＣＰＧに化学的に結合される。最後のＤＭＴ基は、精製段階で親和性垂れはしとして用いられるべきオリゴヌクレオチド－ペプチド複合体に結合されたままである。
段階７．組合わせペプチド－オリゴヌクレオチドライブラリーを脱保護し、まずＴＢＡＦで適切な時間、次に濃アンモニア水（２４時間を超えて振盪）で処理することにより支持体から遊離する。ペプチド－オリゴヌクレオチド複合体を単離し、市販のＯＰＣカートリッジを用いて精製した。
７．保護基の除去
１種以上の二官能分子の完全な合成後、保護基を末端ヌクレオチド、末端アミノ酸及び保護アミノ酸の側鎖から除去する。
ａ．ヌクレオチド保護基の除去
オリゴヌクレオチドポリマーの最後のヌクレオチドの５′－ＯＨ上のＤＭＴ保護基を、上記実施例４Ａのプロトコールに従ってＤＣＡで除去する。
ｂ．アミノ酸保護基の除去
アミノ酸ポリマーの最後のアミノ酸のアミノ末端上のＦＭＯＣ保護基を、上記実施例５Ａに記載されるようにＤＢＵで除去する。
ｃ．アミノ酸側鎖保護基の除去
アミノ酸側鎖保護基を除去する条件は下記のように具体的な保護基に基づく：
ｉ．ＴＢＳ及びＴＳＥエステル基の除去
１単位の複合体を約２０当量のテトラブチルアンモニウムフルオリド（ＴＢＡＦ）とＤＣＭ中で混合し、不活性雰囲気下室温で一晩維持してチロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン及びトレオニンの側鎖を保護するＴＢＳ又はＴＭＳＥエーテルを除去する。
ii．Ｂｚ基の除去
複合体を過剰量のアンモニア水で混合し、不活性雰囲気下６０℃で一晩維持してリシンの側鎖アミノ基を保護するベンジル（Ｂｚ）基を除去する。
iii.ＭＴｒ、Ｂｕｍ及びＴｐｍ基の除去
複合体を２０～５０％ＴＦＡと混合し、不活性雰囲気下室温で約５分間維持してアルギニン、ヒスチジン又はシステインを各々保護するＭＴｒ、Ｂｕｍ又はＴｐｍ基を除去する。その後、複合体をトリエタノールアミン及び$CHCl_3$で中和する。
iv. ホルミル基の除去
複合体をｐＨ１２の水性バッファーと混合し、不活性雰囲気下室温で約５分間維持してトリプトファンの反応性２－アミノ基を保護するホルミル基を除去する。
８．複合体の固体支持体からの切断
ａ．テフロン支持体の切断
保護基をテフロン支持体上の複合体から除去した後、複合体をアセトニトリル／水（１：４v/v）中１００mM過ヨウ素酸ナトリウム、１００mMリン酸ナトリウムバッファー、ｐＨ７．２の切断溶液と混合することにより二官能分子を固体支持体から除去する。混合液は、遮光して室温で攪拌しながら維持される。４時間攪拌した後、液相を除去し、固体支持体を過剰量の水及びメタノールで洗浄する。次いで洗浄液を除去し、１ｕモルの固体支持体を５０ｕｌのn-プロピルアミン、１００ｕｌのアセトニトリル及び４００ｕｌの水と混合し、５５℃で３時間維持する。その後、液相を回収し、減圧下で蒸発乾固し、乾燥生成物をアセトニトリル／水に溶解する。溶解した生成物をＥＭ LiChrospher１００ＲＰ－１

８ｍ５０nmカラム（４×２５）ＨＰＬＣカラムによる逆相ＨＰＬＣを用いて精製する。移動相Ａは９５%0.1ＴＥＡＡバッファー（ｐＨ７．０）及び５%アセトニトリルであり、移動相Ｂは５%ＴＥＡＡバッファー（ｐＨ７．０）及び９５%アセトニトリルである。勾配は、流速１ml／分で１００%Ａ５分間、１００%Ａ～５０%５０分間である。均一画分を集めて純粋な二官能分子溶液を得る。

この溶液を精製物質のバッファーを変える必要がある場合、この溶液を透析する。

ｂ．ｂｆ－ＣＰＧ支持体の切断

ｂｆ－ＣＰＧ支持体に結合したペプチド－オリゴヌクレオチド複合体を２つの異なる位置で切断することができる。

図３に示されるように、アンモニア水反応はサルコシン－スクシニルリンカー部分を切断し、それによりペプチド－オリゴヌクレオチド複合体を固体支持体から遊離し、液相複合体を形成する。

図３に示されるように、約３５０nmの光による照射はセリン分枝モノマー部分に存在する光反応性部位を切断し、それによりポリペプチドを固体支持体から遊離する。

双方の場合ともに、固体支持体は遊離した可溶性物質からろ過により容易に分離されて切断反応に基づき単離可溶性複合体又はポリペプチドを形成する。

９．二官能分子のライブラリーの調製

実施例１－８の合成手順を用いて、二官能分子の作製方法が詳述される。分子のライブラリーを形成するために、操作を更に必要とする。まず、分割し、異なる単位を各アリコートに加え、そのアリコートをプールして実質的にライブラリーをつくる。第２に、場合によってはＰＣＲプライマー結合部位と単位アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドをヌクレオチドでヌクレオチドを付加するより前合成したブロックとして付加することができる。

ａ．保護オリゴヌクレオチドの合成

この手順を用いて、表２に示されるヌクレオチド配列を有するが、オリゴヌクレオチドの５′末端にＤＭＴを有するとともにオリゴヌクレオチド３′末端にＣＮＥエステル及びアミノジイソプロピルホスホルアミデートを有するＰＣＲプライマー結合部位オリゴヌクレオチドＰ１及びＰ２を合成した。同様に、１単位当たり６ヌクレオチドを有しかつ上記ブロック末端を有するグリシン（Ｇｌｙ）及びメチオニン（Ｍｅｔ）の単位アイデンティファイアーオリゴヌクレオチドを合成した。単位アイデンティファイアーオリゴヌクレオチド配列を表２に示す。

表２

呼称	オリゴヌクレオチド配列
P1	5′-GGGCCCTATTCTTAG-3′
P2	5′-AGCTACTTCCCAAGG-3′
Z^{gly}	5′-CTCATG-3′
Z^{met}	5′-ACGGTA-3′

ｂ．ライブラリーの合成

化学単位がアミノ酸であり、アルファベットサイズがグリシン及びメチオニンから構成される２であり、単位アイデンティファイアーヌクレオチド配列が長さ６ヌクレオチドであり、化学ポリマーの長さが３アミノ酸である始原型ライブラリーの合成を記載する。プロセスのスキームを図２に示す。

実施例２で調製された固体支持体を実施例３に記載されるリンカーに結合する。便宜上、固体支持体結合リンカー分子はＬＩＮＫと呼ばれる。その後、保護オリゴヌクレオチドＰ１が実施例４の単一保護ヌクレオチドに記載されるＬＩＮＫに結合されて構造Ｐ１－ＬＩ

ＮＫを形成する。
段階１において、Ｐ１－ＬＩＮＫは２アリコートに分けられる。第１アリコートは実施例５に記載されるアミノ酸残基グリシンの連続カップリング、次いで実施例４に記載される保護オリゴヌクレオチドＺ^{gly}のカップリングに供して構造CTCATG-P1-LINK-glyを形成する。第２アリコートを同様にアミノ酸メチオニン及びオリゴヌクレオチドＺ^{met}を付加するために結合して構造ACGGTA-P1-LINK-metを形成する。次いで２つのアリコートをプールして２種の二官能分子の混合物を形成する。
段階２において、段階１のプールを２アリコートに分ける。第１アリコートを前のように連続カップリングに供し、グリシン及びオリゴヌクレオチドＺ^{gly}を付加して下記構造を形成する：
CTCATGCTCATG-P1-LINK-gly.gly及び

CTCATGACGGTA-P1-LINK-met.gly。
第２アリコートを前のように連続カップリングに供し、メチオニン及びオリゴヌクレオチドＺ^{met}を付加して下記構造を形成する：
ACGGTACTCATG-P1-LINK-gly.met及び

ACGGTAACGGTA-P1-LINK-met.met。
次いで２つのアリコートをプールして４種の二官能分子の混合物を形成する。段階３において、段階２のプールを２アリコートに分ける。第１アリコートを前のように連続カップリングに供し、グリシン及びオリゴヌクレオチドＺ^{gly}を付加する。その後、保護オリゴヌクレオチドＰ２を実施例４の単一保護ヌクレオチドに記載されるプール中の成長二官能分子に結合して下記構造を形成する：
P2CTCATGCTCATGCTCATGP1-LINK-gly.gly.gly 、

P2CTCATGCTCATGACGGTAP1-LINK-met.gly.gly 、

P2CTCATGACGGTACTCATGP1-LINK-gly.met.gly 及び

P2CTCATGACGGTAACGGTAP1-LINK-met.met.gly 。
第２アリコートを前のように連続カップリングに供し、メチオニン及びオリゴヌクレオチドＺ^{met}を付加する。その後、保護オリゴヌクレオチドＰ２を実施例４の単一保護ヌクレオチドに記載されるプール中の成長二官能分子に結合して下記構造を形成する：
P2ACGGTACTCATGCTCATGP1-LINK-gly.gly.met 、

P2ACGGTACTCATGACGGTAP1-LINK-met.gly.met 、

P2ACGGTAACGGTACTCATGP1-LINK-gly.met.met 、及び

P2ACGGTAACGGTAACGGTAP1-LINK-met.met.met 。
次いで２つのアリコートをプールして８種の二官能分子の混合液を形成する。
得られた８種の二官能分子のプールは、本発明の方法に従って作製した小さなライブラリーを表す。アルファベットサイズを増やすことにより１段階当たりのアリコート数が増加される。
特定の実施態様及び実施例を含む前記明細書は、本発明を具体的に説明するものであり、限定するものとして解釈されるべきではない。本発明の真意及び範囲を逸脱することなく他の多くの変更及び修正を行うことができる。

【図１】

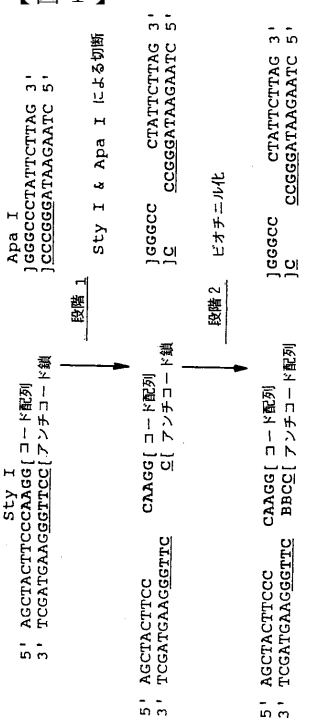


FIG. 1

【図２】



FIG. 2

【図３】

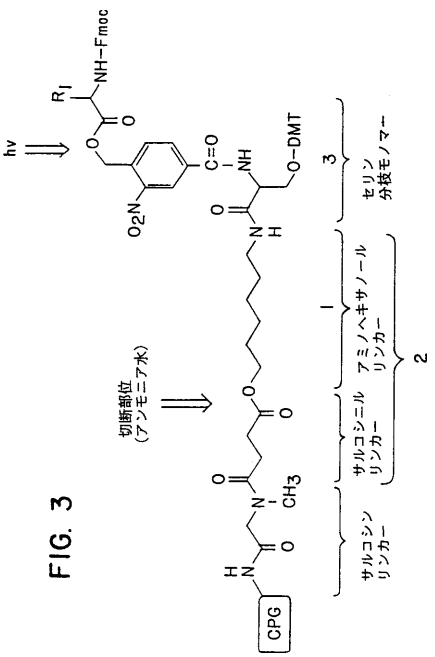


FIG. 3

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12Q	*1/68*	*(2006.01)*	C12Q	1/68	A
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	G01N	33/53	D
			G01N	33/53	M

(72)発明者 ラーナー リチャード
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ ローズランド 7750
(72)発明者 ジャンダ キム
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92107 サンディエゴ イアリー ストリート 3181
(72)発明者 ブレーナー シドニー
イギリス ケンブリッジ シービー2 3ピージェイ エドワーズ パッセージ ビー ストリート 17
(72)発明者 ニールセン ジョン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン ディエゴ ビー306 フィオーレ テラス 5205

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特表2001－524926（JP，A）
Science,Vol.249,No.4967(1990)p.404-406
Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,Vol.87,No.16(1990)p.6378-6382
Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,Vol.89,No.5(1992.Mar.1)p.1865-1869
Nature,Vol.354,No.6348(1991)p.82-84

(58)調査した分野(Int.Cl.，DB名)
BIOSIS/WPI(DIALOG)