



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118064441 A

(43) 申请公布日 2024.05.24

(21) 申请号 202410234423.3

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

(22) 申请日 2008.07.17

72002

(30) 优先权数据

专利代理人 左路 林晓红

60/950,283 2007.07.17 US

(51) Int.Cl.

60/950,281 2007.07.17 US

C12N 15/115 (2010.01)

60/950,293 2007.07.17 US

C12N 15/10 (2006.01)

61/031,420 2008.02.26 US

G01N 33/53 (2006.01)

61/051,594 2008.05.08 US

(62) 分案原申请数据

200880107336.0 2008.07.17

(71) 申请人 私募蛋白质体运营有限公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 D·济奇 S·K.·威尔科克斯

权利要求书1页 说明书35页  
序列表（电子公布） 附图30页

C·博克 D·J.·施奈德

B·伊顿 L·戈尔德

(54) 发明名称

产生具有改良的解离速率的适配体的方法

(57) 摘要

本发明描述了产生能结合靶分子的适配体的改良的SELEX方法，以及产生能结合且共价交联靶分子的光反应性适配体的改良的光SELEX方法。特别地，本发明描述了产生与使用先前的SELEX和光SELEX方法获得的适配体相比具有更慢的解离速率常数的适配体和光适配体的方法。本发明进一步描述了与使用先前方法获得的适配体和光适配体相比具有更慢的解离速率常数的适配体和光适配体。此外，本发明描述了包含多种功能性的适配体构建体，其包括可裂解元件、检测元件以及捕获或固定元件。

1. 鉴别适配体的方法,所述方法包括:
  - (a) 制备核酸候选混合物;
  - (b) 将所述候选混合物与靶分子接触,其中相对于候选混合物中其它核酸对靶分子具有增加的亲和性的核酸结合所述靶分子,形成核酸-靶分子复合物;
  - (c) 将所述核酸-靶分子复合物暴露于慢解离速率富集过程;
  - (d) 将所述核酸-靶分子复合物与候选混合物分开;
  - (e) 解离所述核酸-靶分子复合物以产生游离核酸;
  - (f) 扩增所述游离核酸以产生富含能以增加的亲和性结合靶分子的序列的核酸的混合物,从而可以鉴别靶分子的适配体;
  - (g) 如果需要重复步骤(b)至(f);及
  - (h) 鉴别靶分子的至少一个适配体。
2. 权利要求1的方法,其中所述候选混合物是单链核酸或者双链核酸。
3. 权利要求1的方法,其中所述候选混合物包含DNA或RNA。
4. 权利要求1的方法,其中所述候选混合物包含至少一种化学修饰。
5. 权利要求4的方法,其中所述化学修饰的核酸在一或多个位置包含化学取代,所述位置独立地选自由核糖位置、脱氧核糖位置、磷酸酯位置以及碱基位置组成的组中。
6. 权利要求4的方法,其中所述化学修饰的核酸独立地选自由2'-位置糖修饰、2'-氨基(2'-NH<sub>2</sub>)、2'-氟(2'-F)、2'-O-甲基(2'-OMe)、5-位置嘧啶修饰、在胞嘧啶环外胺的修饰、5-溴尿嘧啶的取代、5-溴脱氧尿苷的取代、5-溴脱氧胞苷的取代、主链修饰、甲基化、3'加帽以及5'加帽组成的组中。
7. 权利要求4的方法,其中所述化学修饰的核酸独立地选自由5-(N-苄基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷,5-(N-异丁基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷,5-(N-[2-(1H-吲哚-3-基)乙基]羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷,5-(N-[1-(3-三甲基铵)丙基]羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷氯化物,5-(N-萘基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷和5-(N-[1-(2,3-二羟基丙基)]羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷组成的组中。
8. 权利要求1的方法,其中所述慢解离速率富集过程包括稀释含有核酸-靶分子复合物的候选混合物。
9. 权利要求1的方法,其中所述慢解离速率富集过程包括在含有核酸-靶分子复合物的候选混合物中加入至少一种竞争剂。
10. 权利要求1的方法,其中所述慢解离速率富集过程包括稀释含有核酸-靶分子复合物的候选混合物以及在含有核酸-靶分子复合物的候选混合物中加入至少一种竞争剂。

## 产生具有改良的解离速率的适配体的方法

[0001] 本申请是2008年7月17日提交的题为“产生具有改良的解离速率的适配体的方法”的中国专利申请201510086825.4的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2007年7月17日提交的美国临时申请系列号60/950,281、2007年7月17日提交的美国临时申请系列号60/950,293、2007年7月17日提交的美国临时申请系列号60/950,283、2008年2月26日提交的美国临时申请系列号61/031,420和2008年5月8日提交的美国临时申请系列号61/051,594的权益。本申请还是2007年1月16日提交的美国申请系列号11/623,580和美国申请系列号11/623,535的部分继续申请。所述每篇文献均以其全文援引加入本文。

### 发明领域

[0004] 本发明一般性涉及产生具有改良性质的适配体(aptamer)和光适配体(photoaptamer)的方法,以及涉及由此产生的改良的适配体和光适配体。特别地,本发明描述了对感兴趣的靶高度特异的慢解离速率(off-rate)适配体。本发明描述了这些慢解离速率适配体的组成以及选择其的方法。本发明进一步描述了用于检测方法的具有的改良功能性的适配体构建体。进一步地,本发明描述了这些改良的适配体的应用。

[0005] 发明背景

[0006] 以下说明书提供了与本发明内容相关的信息总结,但并非承认本文提供的任何信息或参考的任何出版物是请求保护的发明的现有技术。

[0007] SELEX方法是在体外选择能高特异性结合靶分子的核酸分子的方法,在发明名称为“Nucleic Acid Ligands”的美国专利No.5,475,096和发明名称为“Nucleic Acid Ligands”的美国专利No.5,270,163(也见WO 91/19813)中描述,所述专利在此均特异地援引入。这些专利在此统称作SELEX专利,描述了产生任何希望的靶分子的适配体的方法。

[0008] 已对基本的SELEX方法进行了修饰以实现许多特别目的。例如,发明名称为“Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure”美国专利No.5,707,796描述了SELEX方法结合凝胶电泳在选择具有特异性结构特征的核酸分子如bent DNA中的应用。发明名称为“High-Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine”的美国专利No.5,580,737描述了鉴别能区分密切相关的分子的高特异性适配体的方法,称作Counter-SELEX。发明名称为“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment:Solution SELEX”的美国专利No.5,567,588描述了基于SELEX的方法,其实现了高效分开(partitioning)对靶分子具有高和低亲和性的寡核苷酸。发明名称为“Nucleic Acid Ligands to HIV-RT and HIV-1Rev”的美国专利No.5,496,938描述了在进行SELEX之后获得改良的适配体的方法。发明名称为“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment:Chemi-SELEX”的美国专利No.5,705,337描述了共价连接适配体与其靶的方法。

[0009] SELEX方法包括鉴别含有赋予配体改良特征的修饰的核苷酸的高亲和性适配体，所述特征如改良的体内稳定性或者改良的输送特征。这种修饰的例子包括在核糖和/或磷酸酯和/或碱基位置的化学取代。SELEX方法鉴别的含有修饰的核苷酸的适配体在发明名称为“High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides”的美国专利No.5,660,985中描述，其描述了在嘧啶的5'-和2'-位置含有化学修饰的核苷酸衍生物的寡核苷酸。如前的美国专利No.5,580,737描述了含有用2'-氨基(2'-NH<sub>2</sub>)、2'-氟(2'-F)和/或2'-O-甲基(2'-OMe)修饰的一或多个核苷酸的高特异性适配体。

[0010] 对SELEX方法的进一步修改在发明名称为“Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment:Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX”的美国专利No.5,763,177、美国专利No.6,001,577和美国专利No.6,291,184以及发明名称为“Photoselection of Nucleic Acid Ligands”的美国专利No.6,458,539中所述。这些专利在此统称为“PhotoSELEX专利”，其描述了选择含有能结合和/或光交联(photo-crosslinking)和/或光失活靶分子的光反应性官能团的适配体的各种SELEX方法。所得光反应性适配体称做光交联适配体或者光适配体。

[0011] 尽管这些SELEX和光SELEX(photoSELEX)方法是有用的，但是仍需要使得在体外选择方法中产生的适配体性质改良的方法。例如，需要与天然发生的DNA或者RNA核苷酸相比与靶分子具有更好的结合亲和性的适配体，以及产生这种适配体的方法。对于许多应用而言，例如体外测定、诊断、治疗或者成像应用，感兴趣的是产生从适配体/靶亲和性复合物具有慢解离速率的适配体。已经提议一些技术用于产生这种试剂(见例如W099/27133和US2005/0003362)。然而，这些选择方法不区分与靶具有快结合动力学(即快结合速率)的试剂的选择及与靶具有慢解离动力学(即慢解离速率)的试剂的选择。因此，需要新的方法和技术以有利地选择慢解离速率适配体，同时抑制与靶具有快结合速率的适配体的选择。

[0012] 最后，需要包括不同的内在功能性的适配体构建体。这些功能性可包括用于固定标签(tag)、检测标记(label)、促进或控制分离的方式等。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明描述了新的适配体以及产生和使用这种适配体的方法。特别地，本发明描述了慢解离速率适配体、含有C-5修饰的嘧啶的慢解离速率适配体以及通过稀释、加入竞争剂或者通过组合这两种方法选择慢解离速率适配体的方法。此外，本发明描述了多种靶分子如蛋白质和肽的慢解离速率适配体。本发明还描述了具有独特结构特征和解链温度的慢解离速率适配体。本发明还描述了具有光反应性官能团的慢解离速率适配体，耐聚阴离子材料存在的适配体，及选择这些适配体的方法，以及用多种其它功能性构建的适配体以改良其在多种应用中的用途。

[0015] 本发明描述了产生能结合靶分子的适配体的改良的SELEX方法。更特别地，本发明描述了产生与用先前的SELEX方法获得的适配体和光适配体相比与其各自的靶分子具有更慢的解离速率的适配体和/或光适配体的方法。通常，在候选混合物与靶分子接触及使得核酸-靶复合物形成之后，导入慢解离速率富集过程，其中具有快解离速率的核酸-靶复合物将解离且不再形成，而具有慢解离速率的复合物保持完整。导入慢解离速率富集过程的方法包括但不限于在核酸与靶分子的混合物中加入竞争剂分子，稀释核酸与靶分子的混合物，或者组合这两种方法。本发明进一步描述了使用这些方法获得的适配体与光适配体。

[0016] 在一个实施方案中,所述方法包括制备核酸的候选混合物;将该候选混合物与靶分子接触,其中与靶分子具有最高相对亲和性的核酸优先结合靶分子,形成核酸-靶分子复合物;导入慢解离速率富集过程以诱导具有相对快解离速率的核酸-靶分子复合物解离;分开候选混合物中剩余的结合的核酸-靶分子复合物与游离核酸;以及鉴别结合靶分子的核酸。所述过程可进一步包括扩增结合靶分子的核酸以产生富集结合靶分子但仍产生具有慢解离速率的核酸-靶分子复合物的核酸的核酸混合物的重复步骤。

[0017] 在另一个实施方案中,核酸的候选混合物包括含有修饰的核苷酸碱基的核酸,所述修饰的核苷酸碱基可有助于具有慢解离速率的修饰的核酸-靶复合物的形成。用修饰的核苷酸包括含有光反应性或者其它官能团的核苷酸或者含有光反应性基团占位物(placeholder)的核苷酸进行SELEX的改良的方法在2008年7月17日与本申请同时申请的发明名称为“Improved SELEX and PHOTOSELEX”的美国申请系列No.12/175,388中描述,其以全文援引加入本文。占位核苷酸也可用于非光反应性的修饰的核苷酸的SELEX中或者SELEX后导入。

[0018] 本文描述的多种方法和步骤可用于产生能(1)结合靶分子或者(2)结合靶分子及随后在用UV光或者可见光照射时与靶分子形成共价连接的适配体。

[0019] 另一方面,本文描述的多种方法和步骤可用于产生通过结合和/或交联靶分子而能修饰靶分子的生物活性的适配体。在一个实施方案中,鉴别了与特殊疾病相关或有关的独特靶分子的适配体。这个适配体可用作体外或体内诊断试剂。在另一个实施方案中,与疾病状态相关的靶分子的适配体可以施用给个体及用于在体内治疗疾病。本发明鉴别的适配体和光适配体可用于可以无限制地使用适配体、寡核苷酸、抗体和配体的任何诊断、成像、高通量筛选或者靶确认技术或者程序或者测定中。例如,根据在同时提交的名称为“MultiplexedAnalyses of Test Samples”的美国申请系列No.12/175,446中详细描述的方法,可以使用本发明鉴别的适配体和光适配体,该申请以其全文援引加入本文。

[0020] 不具有本发明适配体的慢解离速率性质的先前的适配体已经用于多种目的。在几乎所有的这种应用中,慢解离速率适配体相对于未选择具有慢解离速率性质的适配体具有改良的性能。

[0021] 已经批准适配体**Macugen®**(见例如美国专利No.6,168,778、美国专利No.6,051,698、美国专利No.6,426,335和美国专利No.6,962,784,其均以全文援引加入本文)用于治疗黄斑变性,其由于对VEGF的特异性亲和性而发挥功能。其它适配体已经被研究和/或在用作治疗剂的开发中。未选择具有慢解离速率性质的适配体也已经用于许多诊断和成像应用(见例如美国专利No.5,843,653、美国专利No.5,789,163、美国专利No.5,853,984、美国专利No.5,874,218、美国专利No.6,261,783、美国专利No.5,989,823、美国专利No.6,177,555、美国专利No.6,531,286,其均以全文援引加入本文)、高通量筛选(见例如美国专利No.6,329,145、美国专利No.6,670,132、美国专利No.7,258,980,其均以全文援引加入本文)以及PCR试剂盒(见例如美国专利No.6,183,967、美国专利No.6,020,130、美国专利No.5,763,173、美国专利No.5,874,557、美国专利No.5,693,502,其均以全文援引加入本文)。本发明的慢解离速率适配体可用于任何诊断、治疗、成像或者使用抗体、适配体和配体结合对的任何其它应用中。

[0022] 另一方面,本发明提供了通过本发明所述改良的方法鉴别的适配体和光适配体、

包括这种适配体和光适配体的诊断试剂盒以及这种适配体和光适配体的治疗和诊断应用。使用所述方法鉴别的新的慢解离速率适配体和光适配体可用于多种测定中,包括使用平面阵列、珠及其它类型固体支持物的测定。在各种情形中可以使用的测定包括生命科学的研究应用、临床诊断应用(例如疾病的诊断检验,或者预防性保健的“健康”检测),ALONA和UPS测定以及体内成像应用。对于一些应用,可以使用应用所述适配体和光适配体的多元测定。

[0023] 在一些实施方案中,本文描述的慢解离速率适配体(或者光适配体)可用作CAT扫描及其它成像应用的静脉内或者口服造影剂。CAT扫描用于诊断肌和骨病症、定位血凝块、检测内部出血、监测疾病如癌症等。所述慢解离速率适配体可以用CAT扫描可检测成分如碘、钡或者gastrograffin标记。除了具有可检测成分之外,所述适配体可以被设计为使所述成分定向于特异组织或者希望的靶。所述适配体可以浓缩或定位可检测成分并因此通过增加可利用的信号而改良信噪比。由于适配体的解离速率可以足够低,因此可以增加扫描的持续时间,且可以改良扫描的信噪比。在这些成像应用中适配体对靶的特异性也可以改良信噪比。

[0024] 在一个实施方案中,所述慢解离速率适配体用反磁性或者顺磁性材料标记。在这个实施方案中,标记的适配体可用于改良磁共振成像(MRI)的性能。MRI特别适于成像小的、选择性的具有高水含量的区域和组织或者适于监测血流。慢解离速率适配体的特异性可改良MRI试剂定位于希望的组织切片。相似地,慢解离速率适配体可用如氟、碳11、氧15或者氮13等材料修饰以用于PET扫描中。在另一个实施方案中,适配体可以用可用于红外成像的IR活性材料标记。也预期可以标记慢解离速率适配体以与其它成像技术一起使用。

[0025] 在一个实施方案中,慢解离速率适配体可用作非常灵敏的和特异的试剂,以掺入各种体外诊断方法或试剂盒中。在一些实施方案中,慢解离速率适配体在许多感染性或者其它类型疾病检测方法中用作抗体的替代物,其中感兴趣的靶的适配体包括可检测材料和固定或捕获成分任一或二者。在这些实施方案中,在将试剂盒中的适配体与临床样本混合后,可以利用各种测定形式。在一个实施方案中,适配体也包括可检测标记如荧光团。在其它实施方案中,测定形式可包括荧光猝灭、杂交方法、流式细胞术、质谱分析、抑制或竞争方法、酶联寡核苷酸测定、SPR、倏逝波法(evanescent wave method)等。在一些实施方案中,适配体在试剂盒中在溶液中提供。在其它实施方案中,试剂盒中适配体固定于固体支持物上,与检测样本的测定联合使用。在多个实施方案中,所述固体支持物被设计为检测一或多个感兴趣的靶。在其它实施方案中,试剂盒可进一步包括提取感兴趣的靶的试剂、扩增适配体的试剂、洗涤试剂、检测试剂等。

[0026] 在另一个实施方案中,慢解离速率适配体可用于治疗性成像研究中。在新的治疗化合物的开发期间,通常难以评估化合物的某些特征,如生物分布、洗脱率(washout rate)、生物利用率、体内药物/靶相互作用等。在许多情况下,如果使用合适的可检测材料修饰所述治疗化合物,则可以使用成像研究评估所有这些特征。尽管直接修饰治疗化合物通常抑制其与其靶的相互作用能力并因此降低效力,但是适配体的小规格和可定制的特异性使其潜在地非常适于与治疗化合物(例如抗体或其它基于蛋白质的治疗剂)反应,同时使得对于化合物的治疗效力的任何不希望的作用最小化。为了评估这种特征如生物分布和洗脱率,可以使适配体/治疗复合物保持一段时间。这些类型的研究在治疗化合物是慢解离速率适配体的情况下可简化。在多个实施方案中,治疗性、成像和诊断应用中使用的适配体可

包括各种修饰如2'氟及其它修饰以在暴露于检测样品中可能存在的各种成分或者体内如核酸酶及其它样品或者体液成分时增加适配体的稳定性。

[0027] 附图简述

[0028] 图1A例证了举例的SELEX方法,图1B例证了举例的SELEX方法,其包括掺入慢解离速率富集过程的步骤。

[0029] 图2例证了本发明中使用的代表性适配体模板、引物和互补寡核苷酸序列。所述寡核苷酸通过标准固相合成技术制备。B=dT-生物素。

[0030] 图3例证了如实施例2所述不用(图3A)和用(图3B)慢解离速率富集过程选择的亲和性适配体的解离速率常数的柱状图。

[0031] 图4A和B示出用于如实施例2所述制备候选混合物或者进行选择过程中的各个步骤的寡核苷酸。所述寡核苷酸通过标准固相合成技术制备。BrdU(5-溴-dUTP)、蒽醌(AQ)和补骨脂素(Psor)生色团以亚磷酰胺形式购买,并在合成期间加入正向引物的5'末端。4-叠氮-2-硝基-苯胺(ANA)制备成对-硝基-苯基碳酸盐/酯衍生物且在合成功与5'-己胺亚磷酰胺偶联。这个实施例中使用两个候选混合物序列,称作1和2。B=dT-生物素。(图4A)模板1仅与含有5'-BrdU、AQ和ANA的候选混合物一起使用;(图4B)模板2仅与含有5'-Psor的用于实施例2的候选混合物一起使用。

[0032] 图5例证了与如图4A和4B例证的正向引物的5'末端偶联的生色团的化学结构。

[0033] 图6例证了使用实施例3所述的5'-固定光SELEX对TIMP-35'ANA/BndU富集的文库的交联活性的PAGE分析。凝胶例证了游离适配体( $A_f$ )、分子内交联的适配体( $A_f^*$ )以及交联的蛋白质:适配体复合物(P:A)的分离。

[0034] 图7是已经鉴别了适配体的500个以上的靶的图表。许多这些适配体已被设计为与其各自靶具有慢解离速率。

[0035] 图8A-8D例证了含有多种不同及任选功能性包括固定标签、标记、光交联部分、间隔序列和可释放部分的适配体构建体。

[0036] 图9A-9F例证了包括可裂解或可释放元件、标签(例如生物素)、间隔序列和标记(例如Cy3)的适配体构建体的实例。

[0037] 图10例证了本发明所述的适配体和引物构建体。Cy3表示花菁3染料,PC表示光可裂解接头,ANA表示光反应性交联基团,(AB)<sub>2</sub>表示由dA残基分开的一对生物素残基,(T)<sub>8</sub>表示聚dT接头。引物构建体与适配体构建体的完整3'固定区互补。

[0038] 图11A-11C例证了慢解离速率适配体对传统适配体与三个不同靶的剂量应答曲线。

[0039] 图12A和12B例证了慢解离速率适配体的性能曲线,其中靶是肽。

[0040] 图13例证了许多慢解离速率适配体的测量的解链温度相对于预测的解链温度的图示。

[0041] 图14描述了本发明中包括的核苷酸的碱基修饰。除了在核苷酸附着点与R基团之间可以使用接头(X)之外,还描述了可以使用的R基团。在各自R基团上还标出了不同“R”基团的附着位置。

[0042] 图15例证了用于确定凝血酶的含有C-5修饰嘧啶的慢解离速率适配体的结合常数的图示。

[0043] 发明详述

[0044] 除非特别指出,则实施本发明应用本领域技术人员已知的常规化学、微生物学、分子生物学和重组DNA技术。这种技术在文献中充分阐述。见例如Sambrook, et al. Molecular Cloning: ALaboratory Manual (Current Edition); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I&II (D.Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N.Gait, ed., Current Edition); Nucleic Acid Hybridization (B.Hames&S.Higgins, eds., Current Edition); Transcription and Translation (B.Hames&S.Higgins, eds., Current Edition)。

[0045] 本说明书中引用的所有出版物、公开的专利文献和专利申请均表示本发明所属领域技术人员知识水平。本文引用的所有出版物、公开的专利文件和专利申请均以如每篇出版物、公开的专利文件或专利申请通过特异和单独的援引加入形式相同的程度援引加入本文。

[0046] 如在本说明书包括所附权利要求书中所用,除非特别指出,则单数形式“一个”、“一种”、“所述……”包括复数引用,且可与“至少一个/种”及“一或多个/种”互换使用。因此,“一种适配体”包括适配体混合物,“一种探针”包括探针混合物等。

[0047] 如本文所用,术语“大约”代表数值的非显著修改或改变,从而数值涉及的项目的基本功能不变。

[0048] 如本文所用,术语“包含”、“包括”、“含有”及其任何变化用语均意指非排除性包括,由此包含、包括或含有一个元件或一系列元件的过程、方法、方法限定的产物或物质组合物不仅只包括所述那些元件还包括没有明确列出的或所述过程、方法、方法限定的产物或物质组合物所固有的其他元件。

[0049] 如本文所用,“核酸配体”、“适配体”与“克隆”可互换使用,是指对靶分子具有或可具有希望作用的非天然发生的核酸。希望的作用包括但不限于结合靶、催化性改变靶、与靶以一定方式反应从而修饰或改变所述靶或者所述靶的功能活性、共价附着于靶(如在自杀抑制剂中)以及促进靶与另一分子之间的反应。在一个实施方案中,所述作用是与靶分子的特异性结合亲和性,这种靶分子除了多核苷酸之外是三维化学结构,其通过主要不依赖于Watson/Crick碱基配对或者三螺旋结合的机制结合适配体,其中适配体不是具有已知生理学功能的由靶分子结合的核酸。适配体包括通过一定方法从核酸候选混合物中鉴别的核酸,所述适配体是指定靶的配体,所述方法包括: (a) 将候选混合物与靶接触,其中可以将候选混合物中相对于其它核酸与所述靶具有增加的亲和性的核酸与剩余的候选混合物分开; (b) 将亲和性增加和/或慢解离速率的核酸与剩余的候选混合物分开; 以及 (c) 扩增亲和性增加的慢解离速率核酸以产生配体富集的核酸混合物,从而鉴别所述靶分子的适配体。本领域意识到亲和性相互作用是程度的问题,然而在本文中适配体与其靶的“特异性结合亲和性”是指适配体通常以比其结合混合物或样品中其它非靶成分高很多程度的亲和性结合其靶。“适配体”或者“核酸配体”是具有特定核苷酸序列的一种类型或种类的核酸分子的一组拷贝。适配体可包括任何合适数目的核苷酸。“多种适配体”指一组以上这种分子。不同适配体可具有相同或不同数目的核苷酸。适配体可以是DNA或RNA且可以是单链、双链或者含有双链区。

[0050] 如本文所用,“慢解离速率”是指适配体/靶复合物开始解离所需的时间。这可以半衰期 $t_{1/2}$ 表示,或者以50%的适配体/靶复合物已经解离的时间点表示。以 $t_{1/2}$ 值表示的慢解

离速率适配体的解离速率可以是大约 $\geq 30$ 分钟、 $\geq$ 大约60分钟、 $\geq$ 大约90分钟、 $\geq$ 大约120分钟、 $\geq$ 大约150分钟、 $\geq$ 大约180分钟、 $\geq$ 大约210分钟和 $\geq$ 大约240分钟。

[0051] 在一个实施方案中,产生核酸的合成文库的方法包括:1) 合成核酸;2) 使所述核酸去保护;3) 纯化所述核酸;以及4) 分析所述核酸。在合成步骤中,制备单体混合物,其中优化混合物中多种核苷酸的比率以使得终产物中每种核苷酸等比率。混合物中的一或多个单体可包含修饰的核苷酸。在这个方法中使用酰胺(amidite)保护基团,在一个实施方案中,单体浓度为0.1M。在合成期间,产物核酸中保留5个主要的保护基团。在固体支持物(受控多孔玻璃,CPG)上进行合成,且完成至少大约80次循环以合成终产物。

[0052] 在合成过程之后,对核酸产物去保护。将1.0M赖氨酸水相缓冲液(pH 9.0)用于裂解无嘌呤位点,而产物保留在支持物(受控多孔玻璃,CPG)上。用去离子化(dI)水洗涤两次洗去这些裂解的截短的序列。在准备去保护步骤中两次洗涤之后加入500uL的dI水。这个步骤包括用1.0mL的1:1:2的T-丁胺:甲醇:水在70°C处理5小时,随后冷冻、过滤以及蒸发干燥。基于保护基团的疏水性,在PRP-3HPLC柱(Hamilton)上纯化核酸产物。收集并集合合适的柱级分,脱盐及蒸发干燥以除去可挥发的洗脱缓冲液。通过离心用水洗涤终产物并重悬。最后,处理重悬的材料以使终产物去保护。通过碱基组成、引物延伸和测序凝胶鉴定终产物。

[0053] 核酸候选混合物或核酸文库也可以使用固相通过酶促方法产生。在一个实施方案中,这种方法包括与上述相同的基本步骤。在这种情况下,目标是合成反义文库且这些文库用5'生物素修饰产生。所有剩下的合成过程如上所述。一旦制备了合成文库,则核酸可用于含有一或多个修饰的核苷酸的引物延伸混合物中,通过传统的引物延伸方法产生最终候选混合物。

[0054] 适配体可以通过用于合成文库的相同化学方法合成。然而,代替核苷酸混合物,在合成的每个步骤中导入一种核苷酸以控制通过常规方法产生的最终序列。在合成过程中在序列的所需位置可以导入修饰的核苷酸。使用已知的核苷酸化学修饰方法可以导入所需的其它功能性。

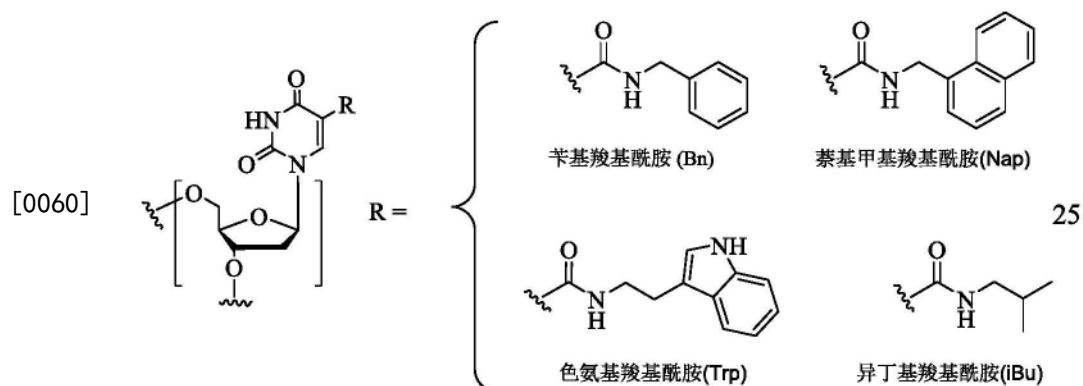
[0055] 如本文所用,“候选混合物”是从中选择希望的配体的不同序列的核酸的混合物。候选混合物的来源可以来自天然发生的核酸或者其片段、化学合成的核酸、酶促合成的核酸或者通过组合前述技术产生的核酸。修饰的核苷酸如具有光反应性基团或者其它修饰的核苷酸可以掺入候选混合物中。此外,可以使用SELEX方法产生候选混合物,即第一个SELEX方法实验可用于产生配体富集的核酸混合物,该混合物在第二个SELEX方法实验中用作候选混合物。候选混合物也可以包含具有一或多个普通结构基序的核酸。如本文所用,候选混合物有时也称作“集合(pool)”或者“文库”。例如,“RNA集合”是指包括RNA的候选混合物。

[0056] 在不同的实施方案中,候选混合物中的每个核酸在随机化区域的任一侧可具有固定的序列以便于扩增过程。核酸候选混合物中的核酸在其5'和3'末端均可进一步包含固定区或者“尾”序列以防止在扩增过程期间形成高分子量寄生物(parasite)。

[0057] 如本文所用,“核酸”、“寡核苷酸”和“多核苷酸”可以互换使用,是指任何长度的核苷酸聚合物,这种核苷酸可以包括脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和/或类似物或者化学修饰的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸。术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”包括双链或单链分子以及三螺旋分子。

[0058] 如果存在,核苷酸的化学修饰可包含单一或任意组合修饰,2'-位置糖修饰,5-位置嘧啶修饰(例如5-(N-苄基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷,5-(N-异丁基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷,5-(N-色氨基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷,5-(N-[1-(3-三甲基铵)丙基]羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷氯化物,5-(N-萘基甲基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷或者5-(N-[1-(2,3-二羟基丙基)]羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷),环外胺修饰,4-硫尿嘧啶取代,5-溴-或5-碘-尿嘧啶取代,主链修饰,甲基化,独特的碱基配对组合如异碱基异胞苷(isobases isocytidine)和异胍(isoguanidine)等。

[0059] 在一个实施方案中,术语“C-5修饰的嘧啶”指在C-5位置具有修饰的嘧啶,包括但不限于图14所述的那些部分。C-5修饰的嘧啶的例子包括U.S.Pat.Nos.5,719,273和5,945,527所述的那些。C-5修饰的例子包括在C-5位置用选自如下的取代基对脱氧尿苷的取代:苄基羧基酰胺(或者苄基氨基羰基)(Bn)、萘基甲基羧基酰胺(或者萘基甲基氨基羰基)(Nap)、色氨基羧基酰胺(或者色氨基羰基)(Trp)和异丁基羧基酰胺(或者异丁基氨基羰基)(iBu),如下文所述。



[0061] 如上所示,代表性C-5修饰的嘧啶包括:5-(N-苄基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷(BndU)、5-(N-异丁基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷(iBudU)、5-(N-色氨基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷(TrpdU)和5-(N-萘基甲基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷(NapdU)。

[0062] 修饰也可包括3'和5'修饰,如加帽(capping)或聚乙二醇化。其它修饰可包括一或多个天然发生的核苷酸由类似物取代,核苷酸间修饰如具有无电荷连接的那些(例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯(phosphoamidate)、氨基甲酸酯等)和具有带电荷连接的那些(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等),具有嵌入物的那些(例如吖啶、补骨脂素等),含有螯合剂的那些(例如金属,放射性金属,硼、氧化金属等),含有烷化剂的那些以及具有修饰的连接的那些(例如 $\alpha$ -异头核酸等)。进一步地,最初存在于糖中的任何羟基可以由磷酸酯或者磷酸酯基团置换;由标准保护基团保护;或者被激活以制备与额外的核苷酸或者固体支持物的额外连接。5'和3'末端OH基团可以被磷酸化或者取代为胺、大约1至大约20个碳原子的有机加帽基团部分或者大约1至大约20个聚乙二醇(PEG)聚合物或者其它亲水性或疏水性生物或合成聚合物的有机加帽基团部分。如果存在,核苷酸结构修饰可以在聚合物装配之前或之后赋予。核苷酸序列可以由非核苷酸成分间断。多核苷酸可以在聚合之后被进一步修饰,例如通过与标记成分缀合进行。

[0063] 多核苷酸也可以含有本领域通常已知的核糖或脱氧核糖的类似形式,包括2'-0-甲基-、2'-0-烯丙基、2'-氟-或者2'-叠氮-核糖,碳环糖类似物, $\alpha$ -异头糖,差向异构体糖如

阿拉伯糖、木糖或者来苏糖,吡喃糖,呋喃糖,景天庚酮糖,无环类似物和无碱基核苷酸类似物如甲基核苷。如上所述,一或多个磷酸二酯键可以由可变连接基团置换。这些可变连接基团包括这样的实施方案,其中磷酸酯由P(0)S(硫代酯)、P(S)S(二硫代酯)、(0)NR<sub>2</sub>(酰胺酯(amidate))、P(0)R、P(0)OR'、CO或者CH<sub>2</sub>(formacetal)置换,其中每个R或R'独立地是H或者取代或未取代的烷基(1-20C),任选含有醚(-O-)键、芳基、烯基、环烷基、环烯基或者araldy1。多核苷酸中不是所有键均需要相同。糖、嘌呤和嘧啶的类似形式的取代可有利于设计终产物,这样可以改变主链结构如多酰胺主链。

[0064] 在一个实施方案中,适配体的可变区可包括包括修饰的碱基的核苷酸。某些修饰的适配体可用于任何所述方法、装置和试剂盒中。这些修饰的核苷酸已经示出产生新的适配体,所述新的适配体与其各自的靶具有极慢解离速率,同时与靶保持高亲和性。在一个实施方案中,可以修饰嘧啶碱基的C-5位置。含有具有修饰的碱基的核苷酸的适配体具有不同于仅包含天然核苷酸(即未修饰的核苷酸)的标准适配体的许多性质。在一个实施方案中,修饰核苷酸的方法包括使用酰胺键。然而,可以使用其它合适的修饰方法。令人惊奇地观测到鉴别的慢解离速率适配体的结构似乎与通过标准碱基配对模型预测的结构不完全一致。这个观测结果通过这样的事实得以支持,即慢解离速率适配体的测量的解链温度与通过模型预测的解链温度不一致,见图13。正如所示,看起来慢解离速率适配体的测量的解链温度与预测的解链温度之间无相关性。计算的平均解链温度(Tm)比测量的Tm低6°C。测量的解链温度表示包括这些修饰的核苷酸的慢解离速率适配体比预测的更稳定及潜在具有新的二级结构。这些修饰的适配体与仅包括未修饰的核苷酸的相应适配体相比也具有不同的圆二色谱。在许多靶的情况下,当修饰的核苷酸用于产生初始文库或候选混合物时,所述靶的慢解离速率适配体更可能被鉴别。

[0065] 如本文所用,“修饰的核酸”是指含有一或多个修饰的核苷酸的核酸序列。在一些实施方案中,希望修饰的核苷酸与SELEX方法相容。

[0066] “多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文可互换使用,是指任何长度的氨基酸聚合物。所述聚合物可以是线性或者分支的,其可包含修饰的氨基酸,和/或其可以由非氨基酸间断。该术语还包含已经天然修饰或者通过人工干预如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或者任何其它操纵或修饰如与标记成分缀合而修饰的氨基酸聚合物。这个定义还包含例如含有一或多个氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸等)以及本领域已知其它修饰的多肽。多肽可以是单链或缔合的多个链。

[0067] 如本文所用,“光反应性核苷酸”是指在用一定波长的光照射时能与靶如蛋白质光交联的任何修饰的核苷酸。例如,通过光SELEX方法产生的光适配体可包括选自如下的光反应性基团:5-溴尿嘧啶(BrU)、5-碘尿嘧啶(IU)、5-溴乙烯基尿嘧啶、5-碘乙烯基尿嘧啶、5-叠氮尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、5-溴乙烯基胞嘧啶、5-碘乙烯基胞嘧啶、5-叠氮胞嘧啶、8-叠氮腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、8-碘腺嘌呤、8-叠氮鸟嘌呤、8-溴鸟嘌呤、8-碘鸟嘌呤、8-叠氮次黄嘌呤、8-溴次黄嘌呤、8-碘次黄嘌呤、8-叠氮黄嘌呤、8-溴黄嘌呤、8-碘黄嘌呤、5-溴脱氧尿苷、8-溴-2'-脱氧腺嘌呤、5-碘-2'-脱氧尿嘧啶、5-碘-2'-脱氧胞嘧啶、5-[(4-叠氮苯甲酰甲基)硫]胞嘧啶、5-[(4-叠氮苯甲酰甲基)硫]尿嘧啶、7-脱氮-7-碘腺嘌呤、7-脱氮-7-碘鸟嘌呤、7-脱氮-7-溴腺嘌呤和7-脱氮-7-溴鸟嘌呤。“光反应性嘧啶”是指在用一定波长的光照射时能与靶光交联的任何修饰的嘧啶。举例的光反应性嘧啶包括

5-溴-尿嘧啶(BrdU)、5-溴-胞嘧啶(BrdC)、5-碘-尿嘧啶(IdU)和5-碘-胞嘧啶(IdC)。在多个实施方案中,所述光反应性官能团将吸收一定波长的光,这种波长的光不被靶或者所述寡核苷酸的未修饰部分吸收。

[0068] “SELEX”是指组合了选择以希望的方式(例如结合蛋白质)与靶相互作用的核酸以及扩增这些选择的核酸的方法。任选重复选择/扩增步骤循环,以可以选择与含有非常大量核酸的集合中的靶最强相互作用的一个或少数核酸。持续选择/扩增循环,直至实现选择目标。SELEX方法学在SELEX专利中描述。在SELEX方法的一些实施方案中,产生与其靶非共价结合的适配体。在SELEX方法的其它实施方案中产生与其靶共价结合的适配体。

[0069] 如本文所用,术语“扩增”是指增加一个分子或一类分子的量或拷贝数的任何方法和方法步骤组合。

[0070] “SELEX靶”或者“靶分子”或者“靶”在本文是指核酸可以希望的方式作用的任何化合物。SELEX靶分子非限制性地可以是蛋白质、肽、核酸、碳水化合物、脂质、多糖、糖蛋白、激素、受体、抗原、抗体、病毒、病原体、毒性物质、底物、代谢物、过渡态类似物、辅因子、抑制剂、药物、染料、营养素、生长因子、细胞、组织,前述任何材料的任何部分或片段等。在一个实施方案中,SELEX靶不包括已知结合核酸的分子,例如已知的核酸结合蛋白(如转录因子)。实际上任何化学或生物效应物均可以是合适的SELEX靶。任何大小的分子均可作为SELEX靶。也可以通过一些方式修饰靶以增强所述靶与核酸之间的相互作用的可能性或强度。靶也可以包括特定化合物或分子的任何微小变化,如在蛋白质的情况下可包括如氨基酸序列、二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或者任何其它操纵或修饰如与标记成分缀合的的微小变化,其基本上不改变分子的同一性(identity)。“靶分子”或者“靶”是能结合适配体的一种类型或种类的分子或多分子结构的一组拷贝。“多个靶分子”或“多个靶”是指一组以上这种分子。其中靶是肽的SELEX方法的实施方案在发明名称为“Modified SELEX Processes Without Purified Protein”的美国专利No.6,376,190中描述,其以全部内容援引加入本文。图7列出了已经产生其适配体包括各种慢解离速率适配体的500个以上的靶。

[0071] 如本文所用,“竞争剂分子”和“竞争剂”可互换使用,是指可以与非靶分子形成非特异性复合物的任何分子。在本文中,非靶分子包括游离适配体,例如竞争剂可用于抑制适配体与另一非靶分子的非特异性结合(再结合)。“竞争剂分子”或者“竞争剂”是一种类型或种类分子的一组拷贝。“多个竞争剂分子”或者“多个竞争剂”是指一组以上这种分子。竞争剂分子包括但不限于寡核苷酸、聚阴离子(例如肝素、鲱精DNA、鲑精DNA、tRNA、硫酸葡聚糖、聚葡聚糖、无碱基磷酸二酯聚合物、dNTP以及焦磷酸盐/酯)。在多个实施方案中可以使用一或多个竞争剂的组合。

[0072] 如本文所用,“非特异性复合物”是指除了适配体与其靶分子之外两或多个分子之间的非共价缔合。非特异性复合物代表分子类别之间的相互作用。非特异性复合物包括在适配体与非靶分子、竞争剂与非靶分子、竞争剂与靶分子以及靶分子与非靶分子之间形成的复合物。

[0073] 如本文所用,术语“慢解离速率富集过程”是指改变候选混合物的某些成分的相对浓度的过程,由此具有慢解离速率的适配体亲和性复合物的相对浓度相对于具有较快、不太希望的解离速率的适配体亲和性复合物的浓度增加。在一个实施方案中,慢解离速率富

集过程是基于溶液的慢解离速率富集过程。在这个实施方案中，基于溶液的慢解离速率富集过程在溶液中发生，由此在慢解离速率富集过程期间在混合物中形成适配体亲和性复合物的靶或核酸均不固定在固体支持物上。在多个实施方案中，慢解离速率富集过程可包括一或多个步骤，包括加入竞争剂及保温，稀释混合物，或者这些步骤的组合（例如在存在竞争剂分子的条件下稀释混合物）。由于慢解离速率富集过程的作用通常依赖于不同适配体亲和性复合物（即在候选混合物中靶分子与不同核酸之间形成的适配体亲和性复合物）的不同解离速率，选择慢解离速率富集过程的持续时间以保持高比例的具有低解离速率的适配体亲和性复合物，同时充分降低具有快解离速率的适配体亲和性复合物的数量。在SELEX中的一或多个循环中可以使用慢解离速率富集过程。当组合使用稀释和加入竞争剂时，其可以同时或以任何顺序相继进行。当混合物中总靶（蛋白质）浓度较低时可以使用慢解离速率富集过程。在一个实施方案中，当慢解离速率富集过程包括稀释时，可以根据实际需要稀释混合物，需注意的是回收核酸以进行随后的SELEX方法。在一个实施方案中，慢解离速率富集过程包括使用竞争剂以及稀释，允许以比不使用竞争剂时可能需要的稀释倍数更低的稀释倍数稀释混合物。

[0074] 在一个实施方案中，慢解离速率富集过程包括加入竞争剂，所述竞争剂是聚阴离子（例如肝素或者硫酸葡聚糖（葡聚糖））。肝素或葡聚糖在先前的SELEX选择中用于鉴别特异的适配体。然而在这种方法中，肝素或葡聚糖在靶与适配体结合形成复合物的平衡步骤期间存在。在这种方法中，随着肝素或葡聚糖的浓度增加，高亲和性靶/适配体复合物与低亲和性靶/适配体复合物的比率增加。然而，高浓度的肝素或者葡聚糖可以降低在平衡时高亲和性靶/适配体复合物的数目，这是由于核酸与竞争剂之间对靶结合的竞争所致。相反，本发明描述的方法在靶/适配体复合物已经形成之后加入竞争剂，因此不影响形成的复合物的数目。在靶与适配体之间已经出现平衡结合之后加入竞争剂产生非平衡状态，其随时间进化为具有更少靶/适配体复合物的新平衡。在达到新的平衡之前捕获靶/适配体复合物富集了样品中的慢解离速率适配体，因为快解离速率复合物首先解离。

[0075] 在另一个实施方案中，聚阴离子竞争剂（例如硫酸葡聚糖或者另一种聚阴离子材料）用于慢解离速率富集过程中以便于鉴别耐聚阴离子存在的适配体。在本文中，“耐聚阴离子适配体”是能形成适配体/靶复合物的适配体，所述复合物与包括非耐聚阴离子适配体的适配体/靶复合物相比在也含有耐聚阴离子材料的溶液中不太可能解离。以这种方式，耐聚阴离子适配体可用于实施分析方法以检测样品中靶的存在或量或浓度，其中所述检测方法包括使用适配体耐的聚阴离子材料（如硫酸葡聚糖）。

[0076] 因此在一个实施方案中，提供了产生耐聚阴离子的适配体的方法。在这个实施方案中，在核酸候选混合物与靶接触后，使候选混合物中的靶与核酸达到平衡。导入聚阴离子竞争剂，在溶液中保温足以保证候选混合物中大多数快解离速率适配体与靶分子解离的一段时间。而且候选混合物中在存在聚阴离子竞争剂条件下可以解离的适配体也从靶分子中释放。分开该混合物以分离与靶分子保持缔合的高亲和性慢解离速率适配体及从溶液中除去任何未复合的材料。然后适配体可以从靶分子中释放并分离。也可以扩增分离的适配体以及进行额外的选择循环以增加选择的适配体的整体性能。如果针对特定应用不需要选择慢解离速率适配体，这个方法可以使用最短的保温时间。

[0077] 因此在一个实施方案中，提供了修改的SELEX方法以鉴别或产生具有慢（长）解离

速率的适配体,其中将靶分子与候选混合物接触并一起保温足以在靶分子与候选混合物中含有的核酸之间发生平衡结合的一段时间。在平衡结合之后在混合物中加入过量的竞争剂分子如聚阴离子竞争剂,将该混合物与过量的竞争剂分子一起保温预定时间。在预定保温时间期间,解离速率低于这个预定保温时间的大部分适配体将与靶解离。使这些“快”解离速率适配体与靶的再结合最小化,因为过量的竞争剂分子可以非特异性结合靶且占据靶上的适配体结合位点。具有较长解离速率的大部分适配体在预定保温时间期间将保持与靶复合。在保温结束时,将核酸-靶复合物与剩余的混合物分开使得可以从具有快解离速率的适配体中分离慢解离速率适配体群。解离步骤可用于使慢解离速率适配体与其靶解离且使得可以分离、鉴别、测序、合成及扩增对靶分子具有高亲和性和特异性的慢解离速率适配体(各个适配体或者一组慢解离速率适配体)。使用常规SELEX方法从修改的SELEX方法的一个循环中鉴别的适配体序列可用于合成新的候选混合物,由此根据需要可以重复多次接触、平衡结合、介入竞争剂分子、与竞争剂分子保温及分开慢解离速率适配体的步骤。

[0078] 组合在加入竞争剂之前使候选混合物与靶达到平衡结合,随后加入过量竞争剂及与该竞争剂一起保温预定时间可以选择具有比先前达到的那些解离速率高很多的解离速率的适配体群。

[0079] 为了实现平衡结合,可以将候选混合物与靶保温至少大约5分钟,或者至少大约15分钟、大约30分钟、大约45分钟、大约1小时、大约2小时、大约3小时、大约4小时、大约5小时或者大约6小时。

[0080] 可以根据需要,考虑到如靶的性质以及靶的已知适配体的已知解离速率(如果有的话)等因素,选择竞争剂分子与候选混合物与靶分子的混合物的预定保温时间。预定保温时间可以选自:至少大约5分钟、至少大约10分钟、至少大约20分钟、至少大约30分钟、至少45分钟、至少大约1小时、至少大约2小时、至少大约3小时、至少大约4小时、至少大约5小时、至少大约6小时。

[0081] 在其它实施方案中,使用稀释作为解离速率增强方法,将稀释的候选混合物、靶分子/适配体复合物保温预定时间,所述保温时间可选自:至少大约5分钟、至少大约10分钟、至少大约20分钟、至少大约30分钟、至少大约45分钟、至少大约1小时、至少大约2小时、至少大约3小时、至少大约4小时、至少大约5小时、至少大约6小时。

[0082] 本发明的实施方案涉及慢解离速率适配体的鉴别、产生、合成及应用。这些适配体是与非共价适配体-靶复合物的解离速率( $t_{1/2}$ )大于通过常规SELEX方法获得的适配体的解离速率的适配体。对于含有适配体与靶的非共价复合物的混合物, $t_{1/2}$ 表示一半的适配体从适配体-靶复合物中解离所需时间。本发明的慢解离速率适配体的 $t_{1/2}$ 选自如下之一:大于或等于大约30分钟,在大约30分钟至大约240分钟之间,在大约30分钟至大约60分钟之间,在大约60分钟至大约90分钟之间,在大约90分钟至大约120分钟之间,在大约120分钟至大约150分钟之间,在大约150分钟至大约180分钟之间,在大约180分钟至大约210分钟之间,在大约210分钟至大约240分钟之间。

[0083] 通过SELEX方法鉴别的适配体的特征性特点是其对靶的高亲和性。适配体对其靶的解离常数选自如下之一:低于大约1μM、低于大约100nM、低于大约10nM、低于大约1nM、低于大约100pM、低于大约10pM、低于大约1pM。

[0084] “组织靶”或者“组织”在本文是指上述SELEX靶的某一子集。根据这个定义,组织是

异质环境中的大分子。如本文所用,组织是指单一细胞类型、细胞类型集合、细胞聚集体,或者大分子聚集体。这与是典型分离的可溶分子如蛋白质的简单SELEX靶不同。在一些实施方案中,组织是不溶的大分子,是大于简单SELEX靶的量级。组织是由许多大分子组成的复杂靶,每个大分子具有许多潜在表位。包含许多表位的不同大分子可以是蛋白质、脂质、碳水化合物等或其组合。组织通常是大分子的物理阵列,在结构和组成方面可以是流动性或刚性的。胞外基质是在结构和组成方面更刚性的组织的例子,而膜双层在结构和组成方面是更流动性的。组织通常是不溶的,保持为固相,因此可以相对容易地实现分开。组织包括但不限于特定种类的细胞与其胞内物质的聚集体,形成通常用于表示指定器官如肾组织、脑组织的一般细胞结构的结构材料之一。四种基本组织类别是上皮组织、结缔组织、神经组织和肌组织。

[0085] 符合这个定义的组织的例子包括但不限于大分子的异质聚集体如纤维蛋白凝块,其是细胞性的;细胞的同质或异质聚集体;含有具有特定功能的细胞的较高级别的结构,如器官、肿瘤、淋巴结、动脉等;以及个体细胞。组织或细胞可以在其天然环境中,是分离的,或者在组织培养物中。组织可以是完整的或者是修饰的。所述修饰可包括许多改变如转化、转染、激活以及亚结构(substructure)分离,例如细胞膜、细胞核、细胞器等。

[0086] 组织、细胞或者亚细胞结构的来源可以得自原核生物以及真核生物。这包括人、动物、植物、细菌、真菌和病毒结构。

[0087] 如本文所用,术语“标记物质”、“标记”或者“可检测部分”或者“可检测元件”或者“可检测成分”是指可用于检测靶分子/适配体复合物的一或多种试剂。可检测部分或标记能被直接或间接检测。通常,任何可检测的报道分子均可以是标记。标记包括例如(i)通过产生信号而可以被直接检测的报道分子,(ii)通过随后与含有报道分子的同源物(cognate)结合而可以被间接检测的特异性结合对成员,(iii)通过质谱分析可以检测的质量标签,(iv)可以提供扩增或连接模板的寡核苷酸引物,以及(v)可作为配体如阻抑物蛋白的特异性多核苷酸序列或识别序列,其中在后两种情况中寡核苷酸引物或者阻抑物蛋白具有或者能具有报道分子等等。报道分子可以是催化剂如酶,编码催化剂的多核苷酸,染料,荧光分子、量子点、化学发光分子、辅酶、酶底物、放射性基团、小有机分子、可扩增的多核苷酸序列、颗粒如胶乳或碳颗粒、金属溶胶、微晶、脂质体、细胞等,其可以或者不可以染料、催化剂或者其它可检测基团、改变其缀合的分子的分子量以进行质谱分析的质量标签等进一步标记。所述标记可选自电磁性或电化学材料。在一个实施方案中,可检测标记是荧光染料。本领域技术人员基于本发明揭示显而易见其它标记和标记方案。

[0088] 可检测部分(元件或成分)可包括上文列出的任何报道分子及以任何方式用于产生可检测信号的任何其它化学品或成分。所述可检测部分可以通过荧光信号、化学发光信号或者依赖于检测部分的同一性的任何其它可检测信号检测。在可检测部分是酶(例如碱性磷酸酶)的情况下,信号可以在存在酶底物以及为酶活性所需的任何其它因子的条件下产生。在可检测部分是酶底物的情况下,信号可以在存在酶及为酶活性所需的任何其它因子的条件下产生。使可检测部分与靶分子附着的合适试剂构型包括可检测部分与靶分子的共价附着、可检测部分与共价附着于靶分子的另一标记物质成分的非共价缔合以及可检测部分与非共价缔合靶分子的标记物质成分的共价附着。通用蛋白质染色(Universal protein stains, UPS)在2004年8月12日申请的发明名称为“Methods and Reagents for

Detecting Target Binding by Nucleic Acid Ligands”的美国专利申请系列No.10/504,696中详细描述。

[0089] “固体支持物”在本文是指具有分子可以通过共价或非共价键直接或者间接附着的表面的任何基材。所述基材材料可以是天然发生的、合成的或者天然发生的材料的修饰的材料。固体支持物材料可包括硅、石墨、镜面、薄片、陶瓷、塑料(包括聚合物如聚氯乙烯,环烯共聚物,聚丙烯酰胺,聚丙烯酸酯,聚乙烯,聚丙烯,聚-4-甲基丁烯,聚苯乙烯,聚甲基丙烯酸酯,聚对苯二甲酸乙二酯,聚四氟乙烯(PTFE或Teflon®),尼龙,聚乙烯醇丁酸酯(poly(vinyl butyrate))、锗、砷化镓、金、银等,单独使用或者联合其它材料一起使用。可以考虑其它刚性材料,如玻璃,包括二氧化硅及进一步包括如Bioglass。可用的其它材料包括有孔材料如受控有孔玻璃珠。也包含本领域已知的在表面具有掺入的一或多个官能团如任意氨基、羧基、硫醇或者羟基官能团的任何其它材料。

[0090] 固体支持物可采用从简单到复杂的多种构型,可具有多种形状包括条状、平板、盘状、杆状、颗粒包括珠、管、孔等的任一种。表面可以是相对平面(例如载玻片)、球形(例如珠)、圆柱状(例如柱)或者凹槽状。举例的可以使用的固体支持物包括微滴定平板孔、显微镜载玻片、膜、顺磁性珠、带电荷的纸张、Langmuir-Blodgett膜、硅晶片芯片、流控芯片(flow through chip)和微珠。

[0091] 如本文所用,“分开(partitioning)”是指将混合物的一或多种成分与混合物的其它成分分开的任何方法。例如,结合靶分子的适配体可以与未结合靶分子的其它核酸以及与非靶分子分开。更广义而言,分开使得基于核酸对靶分子的相对亲和性和/或解离速率可以将候选混合物中的所有核酸分离成至少两个集合。分开可以通过本领域已知的许多方法实现,包括过滤、亲和性层析、液体-液体分配、HPLC等。例如,核酸-蛋白质对可以结合硝化纤维素膜,而未结合的核酸则否。特异性保留核酸-靶复合物的柱也可用于分开。例如,能与结合柱的靶分子缔合的寡核苷酸使得可以使用柱层析分开和分离最高亲和性适配体。靶分子缀合于其上的珠也可用于分开混合物中的适配体。如果珠是顺磁性的,则可以通过施加磁场实现分开。表面等离子体共振技术可用于分开混合物中的核酸,通过将靶固定于传感芯片上并使混合物流经该芯片进行,其中对靶具有亲和性的那些核酸可以结合靶,剩余的核酸可被洗去。可以使用液体-液体分配以及过滤凝胶阻滞和密度梯度离心。靶分子上的亲和性标签也可用于将与标签标记(tagged)的靶结合的核酸分子与溶液中的游离适配体分离。例如,使用链霉抗生物素蛋白顺磁性珠,可以将生物素化的靶分子以及与其结合的适配体与未结合的核酸序列溶液隔离(sequester)。在制备期间也可以将亲和性标签掺入适配体中。

[0092] 如本文所用,“光SELEX”是Photochemical Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment的首字母缩写,是指产生光交联适配体的SELEX方法的实施方案。在光SELEX方法的一个实施方案中,掺入通过吸收光激活的光反应性核苷酸代替RNA-或ssDNA-随机化寡核苷酸文库中的天然碱基,照射所述核酸靶分子混合物使得掺入核酸-靶分子复合物中的一些核酸通过光反应性官能团与靶分子交联,选择步骤是根据光交联活性进行选择。所述光SELEX方法在光SELEX专利中更详细描述。

[0093] 如本文所用,“光适配体”以及“光反应性适配体”可互换使用,是指含有可与靶分子共价结合或者“交联”的一或多个光反应性官能团的适配体。例如,可以修饰天然发生的

核酸残基以包括在所述核酸残基暴露于适当波长的放射源时赋予光反应性的化学官能团。在一些实施方案中，光反应性适配体是最初鉴别的。在其它实施方案中，首先鉴别适配体，随后对其进行修饰以掺入一或多个光反应性官能团，从而产生光适配体。在这些实施方案中，可以在适配体中掺入一或多个光反应性核酸残基，通过用光反应性核酸残基取代适配体中一或多个其它核苷酸如一或多个胸苷和/或胞苷或者通过修饰一或多个核酸残基以包括光反应性官能团进行。

[0094] 举例的可以通过光适配体掺入的光反应性官能团包括5-溴尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、5-溴乙烯基尿嘧啶、5-碘乙烯基尿嘧啶、5-叠氮尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-硫尿嘧啶、4-硫胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、5-溴乙烯基胞嘧啶、5-碘乙烯基胞嘧啶、5-叠氮胞嘧啶、8-叠氮腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、8-碘腺嘌呤、8-叠氮鸟嘌呤、8-溴鸟嘌呤、8-碘鸟嘌呤、8-叠氮次黄嘌呤、8-溴次黄嘌呤、8-碘次黄嘌呤、8-叠氮黄嘌呤、8-溴黄嘌呤、8-碘黄嘌呤、5-[(4-叠氮苯甲酰甲基)硫]胞嘧啶、5-[(4-叠氮苯甲酰甲基)硫]尿嘧啶、7-脱氮-7-碘腺嘌呤、7-脱氮-7-碘鸟嘌呤、7-脱氮-7-溴腺嘌呤和7-脱氮-7-溴鸟嘌呤。

[0095] 除了这些举例的基于核苷的光反应性官能团之外，也可以使用通过使用合适接头分子可以加入适配体末端的其它光反应性官能团。这种光反应性官能团包括苯甲酮、蒽醌、4-叠氮-2-硝基-苯胺、补骨脂素，任何这些官能团的衍生物等。

[0096] 通过光适配体掺入的光反应性官能团可以通过任何合适方法激活。在一个实施方案中，可以通过将光适配体及其结合的靶分子暴露于电磁放射源而使含有光反应性官能团的光适配体与其靶交联。合适类型的电磁放射包括紫外光、可见光、X-射线和 $\gamma$ 射线。合适的放射源包括利用单色光或者滤波的多色光的源。

[0097] 如本文所用，术语“亲和性SELEX方法”是指其中产生靶的非光交联适配体的SELEX方法的实施方案。在亲和性SELEX方法的一些实施方案中，在将靶与核酸候选混合物接触之前或之后将靶固定于固体支持物上。靶与固体支持物的结合使得候选混合物中已经结合的核酸(以及在使用慢解离速率富集过程的情况下)保持结合将与剩余的候选混合物分开的靶。术语“珠亲和性SELEX方法”是指亲和性SELEX方法的特定实施方案，其中例如在与核酸候选混合物接触之前将靶固定于珠上。在一些实施方案中，所述珠是顺磁性珠。术语“滤膜亲和性SELEX方法”是指这样的实施方案，其中通过其与滤膜如硝化纤维素膜的结合而将核酸靶复合物与候选混合物分开。这包括这样的实施方案，其中靶与核酸最初在溶液中接触及与滤膜接触；也包括这样的实施方案，其中将核酸与预先固定在滤膜上的靶接触。术语“平板亲和性SELEX方法”是指这样的实施方案，其中将靶固定于平板如多孔微滴定平板的表面。在一些实施方案中，所述平板包括聚苯乙烯。在一些实施方案中，通过疏水性相互作用在平板亲和性SELEX方法中将靶附着于平板。

[0098] 本发明描述了改良的SELEX方法用以产生能结合靶分子的适配体。更特别地，本发明描述了鉴别与使用先前的SELEX方法获得的适配体相比与其各自的靶向分子具有较慢解离速率的适配体和/或光适配体的方法。本发明进一步描述了使用本文所述方法获得的适配体和/或光适配体及使用其的方法。

[0099] 在一个实施方案中，提供了鉴别与其靶分子具有慢解离速率的适配体的方法，所述方法包括(a)制备核酸序列的候选混合物；(b)将候选混合物与靶分子接触，其中对靶分子具有最高相对亲和性的核酸优先结合靶分子，形成核酸-靶分子复合物；(c)应用慢解离

速率富集过程法使得具有相对快解离速率的核酸-靶分子复合物解离；(d) 将剩余的核酸-靶分子复合物与候选混合物中的游离核酸及非靶分子分开；以及(e) 鉴别靶分子的适配体。所述方法可进一步包括扩增结合靶分子的核酸的重复步骤以产生能结合靶分子但仍产生具有慢解离速率的核酸-靶分子复合物的序列富集核酸的混合物。如上所述，慢解离速率富集过程可选自(a) 稀释含有核酸-靶分子复合物的候选混合物，(b) 在含有核酸-靶分子复合物的候选混合物中加入至少一种竞争剂，(c) 以及稀释含有核酸-靶分子复合物的候选混合物以及在含有核酸-靶分子复合物的候选混合物中加入至少一种竞争剂。

[0100] 在一个实施方案中，提供了鉴别与其靶分子具有慢解离速率的适配体的方法，所述方法包括：(a) 制备核酸候选混合物；(b) 将所述候选混合物与靶分子接触，其中相对于候选混合物中其它核酸与其靶分子具有增加的亲和性的核酸结合所述靶分子，形成核酸-靶分子复合物；(c) 将候选混合物与靶分子一起保温足以实现平衡结合的一段时间；(d) 应用慢解离速率富集过程以使得(c) 的混合物中具有相对快解离速率的核酸-靶分子复合物解离；(e) 将(d) 的候选混合物、核酸-靶分子复合物与竞争剂分子的混合物保温预定时间；(f) 将核酸-靶分子复合物与候选混合物分开；(g) 使核酸-靶分子复合物解离以产生游离核酸；(h) 扩增所述游离核酸以产生富含能以增加的亲和性结合靶分子的核酸序列的核酸的混合物，从而可以鉴别所述靶分子的适配体。

[0101] 在另一个实施方案中，提供了产生与其靶分子具有慢解离速率的适配体的方法，所述方法包括制备或合成适配体，所述适配体包括通过包括如下步骤的方法鉴别的核酸序列：(a) 制备核酸候选混合物；(b) 将所述候选混合物与靶分子接触，其中相对于候选混合物中其它核酸与靶分子具有增加的亲和性的核酸结合所述靶分子，形成核酸-靶分子复合物；(c) 将候选混合物与靶分子保温足以实现平衡结合的一段时间；(d) 在(c) 的混合物中加入过量的至少一种竞争剂分子；(e) 将(d) 的候选混合物、核酸-靶分子复合物和竞争剂分子的混合物保温预定时间；(f) 将核酸-靶分子复合物与候选混合物分开；(g) 解离核酸-靶分子复合物以产生游离核酸；(h) 扩增游离核酸以产生富含能以增加的亲和性结合靶分子的核酸序列的核酸的混合物，从而鉴别所述靶分子的适配体。

[0102] 在一个实施方案中，提供了用于产生与其靶分子具有慢解离速率的适配体的方法，所述方法包括(a) 制备核酸序列的候选混合物；(b) 将所述候选混合物与靶分子接触，其中对所述靶分子具有最高相对亲和性的核酸优先结合所述靶分子，形成核酸-靶分子复合物；(c) 应用慢解离速率富集过程以使得具有相对快解离速率的核酸-靶分子复合物解离；(d) 将保留的核酸-靶分子复合物与候选混合物中的游离核酸以及非靶分子二者分开；及(e) 产生所述靶分子的适配体。所述过程可进一步包括扩增结合所述靶分子的核酸的重复步骤，产生富含能结合靶分子且产生具有慢解离速率的核酸-靶分子复合物的序列的核酸的混合物。如上所述，慢解离速率富集过程可以选自(a) 稀释含有核酸-靶分子复合物的候选混合物；(b) 向含有核酸-靶分子复合物的候选混合物中加入至少一种竞争剂并稀释含有核酸-靶分子复合物的候选混合物；(c) 及向含有核酸-靶分子复合物的候选混合物中加入至少一种竞争剂。

[0103] 在另一个实施方案中，提供了用于产生与其靶分子具有慢解离速率的适配体的方法，所述方法包括：(a) 制备核酸候选混合物；(b) 将所述候选混合物与靶分子接触，其中相对于候选混合物中其他核酸对所述靶分子具有增加的亲和性的核酸结合所述靶分子，形成

核酸-靶分子复合物；(c) 将候选混合物与靶分子一起保温足以达到平衡结合的一段时间；(d) 应用慢解离速率富集过程以使得步骤(c)的混合物中具有相对快解离速率的核酸-靶分子复合物解离；(e) 将(d)的候选混合物、核酸-靶分子复合物和竞争剂分子的混合物保温预定的时间；(f) 将核酸-靶分子复合物与候选混合物分开；(g) 解离核酸-靶分子复合物以产生游离核酸；(h) 扩增所述游离核酸以产生富含能以增加的亲和性结合靶分子的核酸序列的核酸的混合物，从而可以产生靶分子的适配体。如上所述，慢解离速率富集过程可以选自(a) 稀释含有核酸-靶分子复合物的候选混合物；(b) 向含有核酸-靶分子复合物的候选混合物中加入至少一种竞争剂并稀释含有核酸-靶分子复合物的候选混合物；(c) 及向含有核酸-靶分子复合物的候选混合物中加入至少一种竞争剂。

[0104] 在另一个实施方案中，提供了鉴别与其靶分子具有慢解离速率的适配体的方法，所述方法包括：(a) 制备核酸的候选混合物，其中所述候选混合物包含修饰的核酸，其中候选混合物的至少一个或每个核酸的一个、若干个或者所有嘧啶在5-位置被化学修饰；(b) 将所述候选混合物与靶分子接触，其中相对于候选混合物中其它核酸与靶分子具有增加的亲和性的核酸结合所述靶分子，形成核酸-靶分子复合物；(c) 将具有增加的亲和性的核酸与剩余的候选混合物分开；及(d) 扩增具有增加的亲和性的核酸以产生富含能以增加的亲和性结合靶分子的核酸序列的核酸的混合物，从而可以鉴别所述靶分子的适配体。

[0105] 在另一个实施方案中，提供了产生与其靶分子具有慢解离速率的适配体的方法，所述方法包括制备或合成适配体，所述适配体包括通过如下方法鉴别的核酸序列：(a) 制备核酸的候选混合物，其中所述候选混合物包含修饰的核酸，其中候选混合物的至少一个或每个核酸的一个、若干个或者所有嘧啶在5-位置被化学修饰；(b) 将所述候选混合物与靶分子接触，其中相对于候选混合物中其它核酸与靶分子具有增加的亲和性的核酸结合所述靶分子，形成核酸-靶分子复合物；(c) 将具有增加的亲和性的核酸与剩余的候选混合物分开；及(d) 扩增具有增加的亲和性的核酸以产生富含能以增加的亲和性结合靶分子的核酸序列的核酸的混合物，从而鉴别所述靶分子的适配体。

[0106] 在另一个实施方案中，提供了适配体与其靶的非共价复合物，其中所示适配体与其靶的解离速率( $t_{1/2}$ )选自如下之一：大于或等于大约30分钟、在大约30分钟至大约240分钟之间、在大约30分钟至大约60分钟之间、在大约60分钟至大约90分钟之间、在大约90分钟至大约120分钟之间、在大约120分钟至大约150分钟之间、在大约150分钟至大约180分钟之间、在大约180分钟至大约210分钟之间、大约210分钟至大约240分钟之间。

[0107] 在另一个实施方案中，提供了适配体与靶的非共价复合物，其中所述适配体与靶的 $K_d$ 为大约100nM或更低，其中适配体与靶的解离速率( $t_{1/2}$ )大于或等于大约30分钟，且其中适配体的核酸序列中的一个、若干个或所有嘧啶在碱基5-位置被修饰。所述修饰可选自图14所示化合物的基团，这些修饰被称作“碱基修饰的核苷酸”。可以设计适配体具有希望的碱基修饰的嘧啶的任意组合。

[0108] 使用修饰的核苷酸包括含有光反应性基团的核苷酸或者含有光活性基团占位物(placeholder)的核苷酸进行SELEX的改良的方法在发明名称为“Improved SELEX and PHOTOSELEX”的美国申请系列No.12/175,388中揭示，其与本申请同时申请，且以其全部内容援引加入本文。在另一个实施方案中，核酸分子候选混合物包括含有有助于具有相对较慢解离速率的修饰的核酸-靶复合物形成的修饰的核苷酸碱基的核酸。

[0109] 本文描述的各种方法和各个步骤可用于产生能(1)结合靶分子或者(2)结合靶分子及随后在照射时与靶分子形成共价键的适配体。

[0110] 根据本文所述方法鉴别的适配体可用于诊断和治疗方法中。慢解离速率适配体将长期结合靶。这在适配体与靶的结合可用于检测靶分子的存在、不存在、量或数量以及适配体与靶的延长的相互作用促进这种检测的诊断方法中有用。在慢解离速率适配体用于体外或体内成像方法的情况下提供相似优点。适配体与靶延长的相互作用也提供改良的治疗方法，其中例如由于靶分子或者下游信号级联的较长时间活化或抑制，延长的相互作用可以改良治疗效果。

[0111] 因此在多个实施方案中，通过本文所述方法获得、鉴别或产生的慢解离速率适配体可用于多种医学治疗或者诊断方法(体外或体内)中。在一个实施方案中，慢解离速率适配体可用于疾病治疗方法中。在一个实施方案中，慢解离速率适配体可用于疾病的体内诊断方法中。在另一个实施方案中，慢解离速率适配体可用于疾病的体外诊断方法中。在另一个实施方案中，慢解离速率适配体可用于生产用于疾病的治疗或诊断方法中的治疗剂(如药物组合物)或者诊断剂。慢解离速率适配体的诊断或者治疗应用可包括依赖于慢解离速率适配体与其靶的特异性和/或高亲和性结合的诊断或者治疗结果。慢解离速率适配体也可用于药物开发过程中的靶确认和高通量筛选测定中。

[0112] 在一个实施方案中，慢解离速率适配体是体内分子成像的合适试剂。在这个实施方案中，慢解离速率适配体可在体内用于检测个体(如人或动物)机体内病理学、疾病过程或者其它病症的存在，其中适配体与其靶的结合表示疾病过程或其它病症的存在。例如，VEGF受体的适配体可以在体内用于检测个体机体特定区域(例如组织、器官等)内癌症的存在，因为VEGF受体在肿瘤及其新血管内高丰度表达；或者EGF受体的适配体可以在体内用于检测个体机体特定区域(例如组织、器官等)内癌症的存在，因为EGF受体在肿瘤细胞上通常高水平表达。即分子靶是诱导的受体的胞外结构域(ECD)，因为这些靶位于细胞的外部且可通过血管接近。此外，ECD趋于位于病变部位，即使小部分特异性ECD级分可以通过生物学过程包括细胞死亡而脱落(shed)。

[0113] 分子成像的显而易见的候选物，高亲和性单克隆抗体，未成为选择用于这项应用的试剂。分子成像试剂具有精确的要求。它们与人或动物体内其指定靶必须具有高结合亲和性，而对于其它靶具有低结合活性。慢解离速率适配体具有独特优势，使其可用于体内分子成像。一方面，选择具有慢解离速率常数的适配体，因此可以在体内指定靶上停留足够时间(至少大约30分钟)。另一方面，期望慢解离速率适配体具有从血管中极快的清除率。慢解离速率常数和从血管中的快清除率是在体内分子成像的两个希望的性质。从动力学观点看，良好的体内分子成像试剂必须定位于病理学部位，而周围血管中游离的试剂浓度低。这是信噪限制。合适的信噪比可以通过在血管中过量信号的病理学部位积聚信号而获得，或者可以通过保持病理学部位的信号同时降低血管浓度而获得。

[0114] 在动物和人体中对不具有慢解离速率性质的与慢解离速率适配体具有大约相同分子量和净电荷的适配体已经研究10年以上。通常发现这些适配体从血管中快速清除，一般通过进入肾和/或肝，然后进一步代谢而排泄。除非高分子量加合物(如PEG)与适配体连接，否则这种适配体示出所谓的“首过”清除率。用其靶是生腱蛋白C的适配体已经进行实验，生腱蛋白C是在一些肿瘤中高浓度存在的胞外蛋白(不是ECD)。在这些实验中，生腱蛋白

C-特异性适配体快速清除且能保持在肿瘤部位,因为生腱蛋白C的胞外局部浓度非常高。相反,慢解离速率适配体保持适配体的快速清除率,但是由于其慢解离速率而提供动力学优势,使其适用于在感兴趣的部位(例如病理学部位)的存在可能略微稀少的靶(例如肿瘤上的ECD)。

[0115] 分子成像的可选试剂不具有这两个慢解离速率适配体性质(即慢解离速率和从机体的快清除率)。单克隆抗体通常具有高亲和性和特异性,且可以具有慢解离速率常数;然而单克隆抗体具有极慢的从血管中的清除率。通过如噬菌体展示方法鉴别的短肽可具有快速清除率,但是与指定的靶的亲和性和特异性差且解离速率快,Affibody是抗体模拟物的一种特定的肽形式,可具有合适的亲和性和特异性以及具有比单克隆抗体快的清除率,但是为了实现与其靶的慢解离速率,通常将Affibody制成二聚体和更高级别的多聚体,减慢其清除率的同时增强其解离速率。

[0116] 慢解离速率适配体可以与一或多种低分子量加合物一起用于体内分子成像,所述加合物保护慢解离速率适配体免于机体内核酸酶解且检测与慢解离速率适配体结合的指定靶。例如,慢解离速率适配体可以被血液中核酸酶攻击,典型为核酸外切酶(对于DNA而言),其通过在慢解离速率适配体的5'和3'末端位置使用耐核酸外切酶加合物而易于被封闭,或者是核酸内切酶(对于RNA而言),其通过在慢解离速率适配体中掺入耐核酸内切酶嘧啶(如2'氟核苷酸)而易于被封闭。慢解离速率适配体-靶复合物的检测可以通过使检测部分附着于慢解离速率适配体而实现。在一些实施方案中,为了这些目的的检测部分可包含放射性分子(例如锝99)笼(cage)、磁共振检测的铁簇(cluster)、用于PET成像的氟同位素等。应设计为保护机体内慢解离速率适配体的完整性且使得能够检测指定靶而对慢解离速率适配体进行的修饰,由此其不干扰慢解离速率适配体与其靶的相互作用且不导致慢解离速率适配体从血管中太缓慢清除。

[0117] 本发明也提供了诊断或测定装置,如柱、测试条或生物芯片,在该装置的固体表面上粘附一或多个慢解离速率适配体。可定位所述一或多个适配体以能结合与固体表面接触的靶分子以形成保持粘附于该装置表面的适配体-靶复合物,从而捕获所述靶且能检测及任选量化所述靶。慢解离速率适配体的阵列(其可以相同或不同)可以提供在这种装置上。

[0118] 在另一个实施方案中,提供了包括慢解离速率适配体和靶的复合物。在其它实施方案中,提供了特征在于与其相应靶分子具有高亲和性以及与适配体的非共价复合物具有慢解离速率( $t_{1/2}$ )的一类适配体。

[0119] 参考图1A,基本SELEX方法通常从制备不同序列的核酸的候选混合物开始。所述候选混合物通常包括这样的核酸序列,即所述核酸序列包括两个固定区(即候选混合物的每个成员在相同位置均含有相同序列)和可变区。典型地,选择固定的序列区,由此其有助于下文所述的扩增步骤或者增强候选混合物中核酸的指定结构排列的潜力。可变区典型提供候选混合物中每个核酸的靶结合区且这个可变区可以是完全随机的(即在任何位置发现一个碱基的概率是1/4)或者仅是部分随机的(例如在任何位置发现一个碱基的概率可以在0-100%之间的任意水平)。将制备的候选混合物与选择的靶在一定条件下接触,所述条件是有利于在靶与候选混合物成员之间发生结合的条件。在这些条件下,靶与候选混合物的核酸之间的相互作用通常形成核酸-靶对,其成对成员之间具有最强的相对亲和性。将对靶具有最强亲和性的核酸与对靶具有较低亲和性的核酸分开。所述分开过程以保留最大数目的

高亲和性候选物的方式进行。扩增在分开期间选择的对靶具有相对高亲和性的那些核酸以产生富集对靶具有相对高亲和性的核酸的新候选混合物。重复上述分开与扩增步骤，新形成的候选混合物含有越来越少的独特序列，且核酸混合物与靶的平均亲和性程度通常将增加。最终，SELEX方法将产生含有一或极少数独特核酸的候选混合物，独特核酸表示来自原始候选混合物的对靶分子具有最高的亲和性的那些核酸。然而，这种基本SELEX方法不选择对于与其靶具有慢解离速率的适配体。

[0120] SELEX专利和光SELEX专利详细描述和解释了这种方法。这些专利包括可用于所述方法中的各种靶、制备初始候选混合物的方法、分开候选混合物中核酸的方法以及扩增分开的核酸以产生富集的候选混合物的方法的描述。SELEX专利还描述了针对许多不同类型靶分子获得的适配体溶液，所述靶分子包括蛋白质靶，其中蛋白质是或不是核酸结合蛋白。

[0121] 参考图1B，本发明揭示的修改的SELEX方法包括在核酸候选混合物与一或多个靶平衡之后导入慢解离速率富集过程以及在SELEX方法的随后步骤之前导入分开步骤。在基本SELEX方法中导入慢解离速率富集过程提供了富集与包括多种解离速率的一组核酸-靶复合物具有慢解离速率的适配体亲和性复合物的方式。因此修改的SELEX方法提供了鉴别结合靶分子且一旦结合即与靶分子具有相对慢解离速率的适配体的方法。

[0122] 如本文所用，“结合”一般是指配体与靶之间形成非共价缔合，这种结合非必须是可逆的。术语“核酸-靶复合物”或者“复合物”或者“亲和性复合物”用于指这种非共价结合缔合的产物。

[0123] 在多个实施方案中，所述慢解离速率适配体可以是单链或双链RNA或DNA寡核苷酸。所述适配体可含有非标准或修饰碱基。进一步地，所述适配体可含有任何类型修饰。如本文所用，“修饰碱基”可包括对天然核酸残基的相对简单的修饰，这种修饰赋予核酸残基的物理性质改变。这种修饰包括但不限于嘧啶5-位置修饰，用疏水性基团如苄基羧基酰胺(Bn)、异丁基羧基酰胺(iBu)、色氨基羧基酰胺(Trp)或者萘基甲基羧基酰胺(Nap)取代，或者用亲水性基团如季胺或胍基取代，或者用更“中性”基团如咪唑等取代。额外的修饰可存在于核糖环例如2'-位置如2'-氨基(2'-NH<sub>2</sub>)和2'-氟(2'-F)或者位于磷酸二酯主链例如硫代酸磷酸酯或者甲基膦酸酯。

[0124] 在多个实施方案中，将一组随机化的含有修饰的核苷酸碱基的核酸序列的候选混合物与一些靶分子混合，使得与靶分子建立结合平衡。通常仅一些与靶分子高亲和性结合的那些核酸将与靶有效的分开。

[0125] 在多个实施方案中，候选混合物包括具有可变区的核酸序列，所述可变区包括修饰的基团。所述修饰的基团可以是修饰的核苷酸残基。所述可变区可含有完全或部分随机序列；其也可以含有掺入可变区内的固定序列的一部分。固定区内的核苷酸也可以含有修饰的核苷酸碱基，或者其可以含有一组标准的天然发生的碱基。

[0126] 在一些实施方案中，在分开检测混合物的成员后且其是被扩增的核酸之后进行扩增。例如可以通过一系列三个反应扩增RNA分子：产生选择的RNA的cDNA拷贝，使用聚合酶链反应增加每个cDNA的拷贝数以及转录所述cDNA拷贝以获得具有与选择的RNA相同序列的RNA分子。可以适当地使用本领域已知的任何反应或者反应组合，包括直接DNA复制、直接RNA扩增等，这些方法为本领域技术人员所已知。扩增方法可使得扩增的混合物的比例代表扩增前混合物中不同序列的比例。已知许多核酸修饰与酶扩增相容。如果需要，在每次扩增

循环后可以产生与扩增不相容的修饰。

[0127] 可以通过各种方式对候选核酸混合物进行修饰以增加核酸具有促进性质或者其它希望性质的可能性,特别是具有增强核酸与靶之间相互作用的那些性质。预期的修饰包括导入具有适当电荷、极性、氢键或者静电作用的其它化学基团的修饰以增强希望的配体-靶相互作用。可增强核酸的结合性质包括亲和性和/或解离速率的修饰例如包括亲水性部分、疏水性部分、刚性结构、在蛋白质中发现的官能团如咪唑、伯醇、羧酸酯、胍基、氨基、硫代等。修饰也可以用于增加适配体-靶复合物在可用于产生更广范围靶的慢解离速率适配体的严格选择压力下的存活。在一个实施方案中,BndU用于产生用于产生慢解离速率适配体的候选混合物,其它修饰的核苷酸也非常适用于产生这种适配体。其它修饰的核苷酸在图14中示出。

[0128] 为此使用目的修饰的核苷酸候选混合物是包括天然发生及非天然发生的核苷酸的任何RNA或DNA候选混合物。合适的修饰包含对核酸的每一残基、对核酸的一个残基、对随机残基、对所有嘧啶或者所有嘌呤、对核酸中所有出现的特异碱基(即G、C、A、T或U)的修饰,或者可适于特定应用的任何其它修饰方案。技术人员意识到修饰不是促进适配体的活性或者结合能力的必要条件。适配体可包括修饰的dUTP和dCTP残基。

[0129] 慢解离速率适配体的候选混合物可包含在5-碱基位置具有不同修饰的一组嘧啶。C-5修饰可以通过酰胺键直接或者间接或通过另一类型键导入。这些候选混合物用于SELEX方法中以鉴别慢解离速率适配体。这种方法也可包括使用慢解离速率富集过程。候选混合物可以通过酶促或者合成产生。

[0130] 如上所述,可以通过多种方式修饰核苷酸,包括修饰核糖和/或磷酸酯和/或碱基位置。某些修饰在发明名称为“High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides”的美国专利No.5,660,985、发明名称为“Method for Palladium Catalyzed Carbon-Carbon Coupling and Product”的美国专利No.5,428,149、发明名称为“Purine Nucleoside Modifications by Palladium Catalyzed Methods”的美国专利No.5,580,972中描述,所述文献以其全部内容援引加入本文。在一个实施方案中,修饰是其中另一化学基团附着于嘧啶的5-位置或者糖的2'位置的那些修饰。对于可掺入各个核苷酸上的其它化学基团的类型无限制。在一些实施方案中,所得修饰的核苷酸是可扩增的或者在扩增步骤之后可以被修饰(见例如发明名称为“Systematic evolution of ligands by exponential enrichment:Chemi-SELEX”的美国专利No.6,300,074所述)。

[0131] 在其它实施方案中,某些核苷酸被修饰以产生结合其靶分子且在光激活亲和性复合物时与其靶分子形成共价交联的适配体。这种方法包含结合、光交联和/或光失活靶分子的适配体。在多个实施方案中,适配体含有在用光照射时能/靶分子光交联的光反应性基团。在其它实施方案中,适配体能与靶在无照射的条件下形成键。

[0132] 光反应性基团可以是含有光生色团且能与靶分子光交联的任何化学结构。尽管在本文称作光反应性基团,但是如下文所述在一些情况下照射对于在适配体与靶之间发生共价结合不是必需的。在一些实施方案中,光反应性基团将吸收不被靶或者寡核苷酸的未修饰部分吸收的波长的光。光反应性基团包含5-卤代-尿苷、5-卤代-胞嘧啶、7-卤代-腺苷、2-硝基-5-叠氮苯甲酰、diazirine、芳基叠氮化物、氟化芳基叠氮化物、苯甲酮、氨基二苯(甲)酮、补骨脂素、蒽醌等。

[0133] 在照射缔合的核酸-靶对时,光反应性基团与靶通常形成键。在一些情况下,照射对于键形成不是必需的。典型发生的光交联是缔合的适配体与靶之间的共价键形成。然而,在照射时也可以发生适配体与靶之间的紧密离子相互作用。

[0134] 在一个实施方案中,由于暴露于电磁照射而发生光交联。电磁照射包括紫外光、可见光、X-射线和 $\gamma$ 射线。

[0135] 在各种其它实施方案中,使用SELEX方法限制性选择寡核苷酸,随后使用光SELEX方法选择。初始的SELEX选择循环使用含有光反应性基团的寡核苷酸进行。在多次SELEX循环后,进行光SELEX以选择能结合靶分子的寡核苷酸。

[0136] 在另一个实施方案中,描述了在适配体序列中包括可裂解或可释放部分(也称作元件或成分)的适配体的产生。这些额外的成分或元件是结构元件或成分,其在适配体中导入额外的功能性且因此是功能性元件或成分。进一步产生的适配体具有一或多个如下额外成分(也称作功能或结构元件或成分或部分或这些术语的组合):标记的或可检测的成分,间隔序列成分以及特异性结合标签或者固定元件或成分。

[0137] 如上所述,本发明提供了鉴别适配体的方法,所述适配体结合靶分子且一旦结合则具有慢解离速率。使用这种方法获得的慢解离速率可具有超过大约1小时的半衰期,以及多如大约240分钟,即一旦产生一组核酸-靶复合物,该组中一半的复合物在1小时后仍保持结合。由于慢解离速率富集过程的作用依赖于适配体亲和性复合物的不同解离速率,因此选择慢解离速率富集过程的持续时间以保持高比例的具有慢解离速率的适配体亲和性复合物,同时明显降低具有快解离速率的适配体亲和性复合物的数目。例如在实施慢解离速率富集过程之后将所述混合物保温相对较长的时间,与使用较短保温时间的慢解离速率富集过程选择的适配体相比可选择具有较长解离速率的适配体。

[0138] 在多个实施方案中,将候选混合物与一些靶分子混合,使得与靶分子建立结合平衡。在将靶结合的核酸与从溶液中那些游离的分开之前,实施慢解离速率富集过程以富集慢解离速率的结合的群。如上所述,慢解离速率富集过程可以通过加入竞争剂分子、通过样品稀释、通过在存在竞争剂分子的条件下组合样品稀释进行。因此,在一个实施方案中,慢解离速率富集过程通过在含有核酸-靶复合物的混合物中导入竞争剂分子及将该混合物保温一段时间之后将游离的与结合的核酸分开进行。竞争剂分子的量通常为高于所述核酸分子的量至少一个数量级,可以高于两或更多个数量级。在另一个实施方案中,慢解离速率富集过程通过将核酸-靶复合物的样品混合物的体积稀释几倍(如至少大约2x、3x、4x、5x之一)及将该混合物保温一段时间之后将游离的与结合的核酸分开进行。稀释体积通常为高于原始体积至少一个数量级,且可以是高于大约两或更多个数量级。在另一实施方案中,竞争剂分子与稀释二者的组合用于实施慢解离速率富集过程。在另一个实施方案中,已经示出使得慢解离速率适配体的频率增加的候选混合物用于选择许多候选适配体。筛选这些适配体以鉴别慢解离速率适配体。

[0139] 在另一个实施方案中,产生了在适配体的固定区中包括可裂解或可释放部分的慢解离速率适配体。也可以产生具有一或多个如下额外成分的适配体:标记的成分、间隔序列成分以及特异性结合标签。任何或所有这些元件均可以被导入单链适配体中。在一个实施方案中,所述元件被导入在适配体的5'末端。在另一个实施方案中,通过产生部分双链适配体以包括一或多个这些元件,其中一条链含有希望的不同元件以及与含有可变靶结合区的

第二条链的固定序列部分之一互补的序列。

[0140] “可释放”或“可裂解”元件或部分或成分是指其中官能团中的某些键可以被破坏以产生2个单独成分的官能团。在多个实施方案中,所述官能团可以通过以适当波长的光照射该官能团(光可裂解的)而被裂解或者通过用合适的化学或酶试剂处理而裂解。在另一个实施方案中,可释放元件可以是二硫键,可以用还原剂处理破坏该键。可释放元件使附着于固体支持物的适配体/靶亲和性复合物与固体支持物分离,如通过洗脱复合物而分离。可释放元件可以在剩余测定条件下保持稳定且在不破坏适配体/靶复合物的条件下可以是可释放的。

[0141] 如本文所述,适配体可进一步包含“标签”或“固定成分或元件”或者“特异性结合成分或元件”,其是指使适配体(以及与其结合的任何靶分子)附着或固定于固体支持物的成分。“标签”是能缔合探针的一种类型或种类的成分的一组拷贝。“多个标签”是指一组以上这种成分。可以通过任何合适方法将标签附着于或者包括在适配体内。通常,标签使适配体直接或者间接缔合附着于固体支持物的探针或受体。所述探针可以与所述标签高特异性相互作用且在所有随后的加工步骤或程序期间保持这种缔合。所述标签可以使适配体亲和性复合物(或者任选共价适配体亲和性复合物)定位于固体支持物上空间指定地址。因此,不同标签可以使不同适配体共价复合物定位于固体支持物上不同的空间指定地址。标签可以是多核苷酸、多肽、肽核酸、锁定核酸、寡糖、多糖、抗体、affybody、抗体模拟物、细胞受体、配体、脂质、生物素、这些结构的任何片段或衍生物,前述结构的任意组合,或者用其可以设计或构型探针(或者接头分子,如下文所述)以特异性结合或另外缔合的任何其它结构。通常标签被构型为与其自身或者与其附着的适配体或者其一部分不发生分子内相互作用。如果使用SELEX鉴别适配体,则该标签可以在SELEX之前或之后加入适配体。所述标签包括在SELEX之后适配体的5'-末端,或者该标签包括在SELEX之后适配体的3'-末端,或者该标签可以包括在SELEX方法之后适配体的3'和5'两个末端。

[0142] 如图8D所示,荧光染料(如Cy3)、光可裂解及生物素部分全部加入适配体的末端。由于光可裂解部分与染料之间的潜在相互作用,在这两个部分之间插入间隔序列。所有构建体均可以通过使用标准亚磷酰胺化学方法合成。代表性适配体构建体在图9A-图9F示出。所述功能性可以在5'和3'末端之间分开或者在一端组合。除了光可裂解部分之外,可以使用其它可裂解部分,包括化学或酶促可裂解部分。可以使用许多间隔序列部分,且可包含一或多个生物素部分。也可以掺入除了生物素之外的标签(也称作固定或特异性结合元件或成分)。合适的构建试剂包括生物素亚磷酰胺、PC接头(Glen Research PN 10-4920-02)、PC生物素亚磷酰胺(Glen Research PN 10-4950-02)、dSpacer CE亚磷酰胺(Glen Research PN 10-1914-02)、Cy3亚磷酰胺(Glen Research PN 10-5913-02)以及Arm26-Ach Spacer Amidite(Fidelity Systems PN SP26Ach-05)。

[0143] 在一个实施方案中,核苷酸的碱基修饰用于产生适配体的可变区。这些修饰的核苷酸已经示出产生与其靶具有极慢解离速率的适配体。

[0144] 在本发明的方法中,候选混合物可包含修饰的核酸,候选混合物中至少一个或者每个核酸中的一个、若干个(如一个或者至少1个、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个)或者所有嘧啶在5-位置被化学修饰。任选地,候选混合物的核酸中所有C残基在5-位置均被化学修饰。任选地,候选混合物的

核酸中所有T残基在5'-位置均被化学修饰。任选地，候选混合物的核酸中所有U残基在5'-位置均被化学修饰。

[0145] 在另一个实施方案中，将慢解离速率适配体与样品混合或暴露于样品。使慢解离速率适配体与样品中其特异性靶反应或结合以形成复合物。许多方法可用于检测靶或适配体。所述靶可以在复合物中或者在从复合物中释出时被检测。所述适配体可以在复合物中或者在从复合物中释出时被检测。适配体/靶复合物可用于将特异性靶与检测样品中其它成分分离。当希望用多元测定法检测多个靶时可以使用多个适配体。

[0146] 本发明的方法在实施例1-8中一般举例说明。实施例1描述了使用包含修饰的核苷酸的候选混合物的一般亲和性SELEX方法。实施例2描述了使用包含修饰的核苷酸和5'-末端光反应性基团的候选混合物的光SELEX方法，以及其中使用稀释为平衡的适配体：靶混合物提供慢解离速率富集过程的改良的SELEX方法。实施例3通过在稀释步骤中加入竞争剂扩展了实施例2所述的方法。实施例4例证了慢解离速率富集过程的效力。使用修饰核苷酸5-苄基羧基酰胺-dUTP (BndUTP)、5-异丁基羧基酰胺-dUTP (iBudTP) 或5-色氨基羧基酰胺 (tryptaminocarboxamide) -dUTP (TrpdUTP) 在不存在慢解离速率富集过程的条件下选择的适配体的平均解离半衰期值 ( $t_{1/2}$ ) 为20分钟，一些适配体的  $t_{1/2}$  值直至1小时 (图3A)。这明显长于先前使用天然碱基或者其它修饰的核苷酸描述的。使用慢解离速率富集过程选择的适配体的平均值超过85分钟。更特别地，参考图3B，可以看出导入慢解离速率富集过程产生  $t_{1/2}$  值为大约  $\geq 30$  分钟、 $\geq$  大约60分钟、 $\geq$  大约90分钟、 $\geq$  大约120分钟、 $\geq$  大约150分钟、 $\geq$  大约180分钟、 $\geq$  大约210分钟和 $\geq$  大约240分钟的适配体：靶复合物的解离速率是史无前例的。

[0147] 实施例5描述了使用NapdU(萘基甲基羧基酰胺-dU)候选混合物产生慢解离速率适配体。

[0148] 实施例6描述了肽靶的慢解离速率适配体的产生。

[0149] 实施例7例证了相对于常规适配体的慢解离速率适配体的应用。

[0150] 实施例8进一步例证了使用BndU候选混合物产生慢解离速率适配体。

## 实施例

[0151] 提供下述实施例仅为例证目的，不是试图限制所附权利要求中的本发明的范围。

[0152] 实施例1. 在核酸文库中掺入修饰的核苷酸导致在亲和性SELEX中更高亲和性富集的文库

[0153] A. 制备候选混合物

[0154] 候选混合物用dATP, dGTP, 5-甲基-dCTP (MedCTP) 及dTTP或三种dUTP类似物5-苄基羧基酰胺-dUTP (BndUTP)、5-异丁基羧基酰胺-dUTP (iBudUTP) 或5-色氨基羧基酰胺-dUTP (TrpdUTP) 之一制备。候选混合物通过聚合酶延伸与生物素化模板退火的引物而制备 (图2)。对于每种候选混合物组合物，将4.8nmol正向PCR引物和4nmol模板组合在100 $\mu$ L 1X KOD DNA聚合酶缓冲液 (Novagen) 中，加热至95°C 8分钟，在冰上冷却。将每种100 $\mu$ L引物：模板混合物加入到400 $\mu$ L延伸反应中，延伸反应含有1X KOD DNA聚合酶缓冲液、0.125U/ $\mu$ L KOD XL DNA聚合酶和0.5mM每种dATP、MedCTP、dGTP及dTTP或dUTP类似物，并70°C保温30分钟。通过加入1mL链霉抗生物素蛋白包被的磁珠 (MagnaBind Streptavidin, Pierce, 5mg/mL于1M

NaCl+0.05%TWEEN-20中)并在25℃混合保温10分钟而经模板链生物素捕获双链产物。珠用0.75mL SB1T缓冲液(40mM HEPES,pH 7.5,125mM NaCl,5mM KC1,1mM MgCl<sub>2</sub>,1mM CaCl<sub>2</sub>,0.05%TWEEN-20)洗3次。适配体链用1.2mL 20mM NaOH从珠洗脱,用0.3mL 80mM HC1中和,及用15μL 1M HEPES,pH 7.5缓冲。候选混合物用Centricon-30浓缩至大约0.2mL,用UV吸收光谱定量。

[0155] B. 靶蛋白的固定

[0156] 购买靶蛋白,其具有聚His标签,如(His)<sub>6</sub>标签(R&D Systems)并固定在Co<sup>+2</sup>-NTA顺磁性珠(MyOne TALON, Invitrogen,或者后文称为Talon珠)上。靶蛋白在0.5mL B/W缓冲液(50mM磷酸钠,pH 8.0,300mM NaCl,0.01%TWEEN-20)中稀释至0.2mg/mL,并加入到0.5mL TALON珠(预先用B/W缓冲液洗3次并在B/W缓冲液中重悬至10mg/mL)。混合物在25℃旋转30分钟,在4℃储存备用。还制备了用(His)<sub>6</sub>肽包被的TALON珠并如上所述储存。使用前,珠用B/W缓冲液洗3次,用SB1T洗1次,重悬于SB1T中。

[0157] C. 适配体选择方案

[0158] 用每种候选混合物单独进行亲和性选择,比较靶蛋白珠(信号,S)和(His)<sub>6</sub>珠(背景,B)之间的结合。对于每种样品,在40μL SB1T中制备0.5μM候选DNA混合物。将1μL (His)<sub>6</sub>-互补寡聚物(1mM)(图2)与10μL蛋白质竞争剂混合物(0.1%HSA,10μM酪蛋白和10μM凝血酶原于SB1T中)一起加入到DNA。

[0159] 结合反应通过将50μL靶蛋白包被的珠或(His)<sub>6</sub>包被的珠(5mg/mL于SB1T中)加入DNA混合物并在37℃混合保温15分钟而进行。除去DNA溶液,珠用含有0.1mg/mL鲱精DNA(Sigma-Aldrich)的SB1T在37℃洗5次。除非说明,所有洗涤均通过将珠重悬于100μL洗涤溶液,混合30秒,用磁铁分离珠及除去洗涤溶液而进行。结合的适配体通过加入100μL SB1T+2M胍-HC1并在37℃混合保温5分钟而从珠洗脱。适配体洗脱液在磁分离后转移到新管中。在前二次选择循环后,5次靶珠洗涤的最后两次进行5分钟而非30秒。

[0160] 引物珠通过将生物素化反向PCR引物固定于链霉抗生物素蛋白包被的顺磁性珠(MyOne-Streptavidin C1(SA珠),Invitrogen)而制备。将5mL SA珠(10mg/mL)用NaClT(5M NaCl,0.01%TWEEN-20)洗1次,并重悬于5mL生物素化反向PCR引物(5μM于NaClT中)中。样品在25℃保温15分钟,用5mL NaClT洗2次,重悬于12.5mL NaClT中(4mg/mL),储存在4℃。

[0161] 将25μL引物珠(4mg/mL于NaClT中)加入到100μL在胍缓冲液中的适配体溶液中并在50℃混合保温15分钟。除去适配体溶液,珠用SB1T洗5次。通过加入85uL 20mM NaOH并在37℃混合保温1分钟从珠洗脱适配体。80μL适配体洗脱液在磁分离后转移到新管中,用20μL 80mM HC1中和,用1μL 0.5M Tris-HCl,pH7.5缓冲。

[0162] D. 适配体扩增及纯化

[0163] 经QPCR扩增和量化选择的适配体DNA。将48μL DNA加入到12μL QPCR Mix(5X KOD DNA聚合酶缓冲液,25mM MgCl<sub>2</sub>,10μM正向PCR引物,10μM生物素化反向PCR引物,5X SYBR Green I,0.125U/μL KOD XL DNA聚合酶,和1mM每种dATP,dCTP,dGTP和dTTP)并在ABI5700 QPCR仪器中经下述方案热循环:1个循环的99.9℃、15秒,55℃、10秒,70℃、30分钟;30个循环的99.9℃、15秒,72℃、1分钟。定量用仪器软件进行,比较用靶珠和(His)<sub>6</sub>珠选择的DNA的拷贝数以确定信号/背景比。

[0164] 扩增后,经生物素化反义链将PCR产物捕获在SA珠上。将1.25mL SA珠(10mg/mL)用

0.5mL 20mM NaOH洗2次,用0.5mL SB1T洗1次,重悬于2.5mL 3M NaCl中并储存在4℃。将25μLSA珠(4mg/mL于3M NaCl中)加入到50μL双链QPCR产物中并在25℃混合保温5分钟。珠用SB1T洗1次,通过加入200μL 20mM NaOH并在37℃混合保温1分钟将“有义”链从珠中洗脱。洗脱的链弃去,珠用SB1T洗3次,用16mM NaCl洗1次。

[0165] 适配体有义链通过用合适的核苷酸组合物经从固定的反义链的引物延伸而制备。珠重悬于20μL引物延伸反应混合物中(1X KOD DNA聚合酶缓冲液,1.5mM MgCl<sub>2</sub>,5μM正向PCR引物,0.125U/μL KOD XL DNA聚合酶,0.5mM每种dATP,MedCTP,dGTP及dTTP或dUTP类似物)并在68℃混合保温30分钟。珠用SB1T洗3次,通过加入85μL 20mM NaOH并在37℃混合保温1分钟将适配体链从珠洗脱。80μL适配体洗脱液在磁分离后转移到新管中,用20μL 80mM HCl中和,用5μL 0.1M HEPES,pH 7.5缓冲。

#### [0166] E.选择严格性及反馈

[0167] 选择步骤的相对靶蛋白浓度应答如下S/B比率在每轮循环中降低,其中信号S和背景B在上述章节C中定义:

[0168] 如果S/B<10,[P]<sub>(i+1)</sub>=[P]<sub>i</sub>

[0169] 如果10≤S/B<100,[P]<sub>(i+1)</sub>=[P]<sub>i</sub>/3.2

[0170] 如果S/B≥100,[P]<sub>(i+1)</sub>=[P]<sub>i</sub>/10

[0171] 其中[P]=蛋白质浓度,i=当前循环数

[0172] 通过调整加入到选择步骤的靶蛋白珠(及用于背景确定的(His)<sub>6</sub>珠)的质量降低靶蛋白浓度。

[0173] 在每轮选择后,确定富集的DNA混合物的趋同状态。用含有1X SYBR Green I的4mM MgCl<sub>2</sub>将5μL双链QPCR产物稀释至200μL。样品用75μL硅油覆盖并用C<sub>0</sub>t分析分析趋同,该分析测量双链寡核苷酸的复杂混合物的杂交时间。样品用如下方案热循环:3个循环的98℃、1分钟,85℃、1分钟;1个循环的93℃、1分钟,85℃、15分钟。在85℃、15分钟期间,以5秒间隔测量荧光成像。荧光强度作为log(时间)的函数绘图以评估序列多样性。

#### [0174] F. 测量平衡结合常数(K<sub>d</sub>)

[0175] 富集文库的平衡结合常数用TALON珠分开(partitioning)测量。通过加热至95℃并缓慢冷却至37℃复性DNA。通过在SB1缓冲液中混合低浓度的放射性标记的DNA(~1x10<sup>-11</sup>M)与一系列浓度范围的靶蛋白(1x10<sup>-7</sup>M至1x10<sup>-12</sup>M最终)并在37℃保温形成复合物。将每个反应的一部分转移至尼龙膜并干燥以确定每个反应中的总计数。将少量5mg/mL TALON珠加入到余下的每个反应中并在37℃混合1分钟。将一部分在真空下通过MultiScreen HV Plate(Millipore)以从未结合的DNA中分离蛋白质结合的复合物并用100μL SB1缓冲液洗涤。尼龙膜和MultiScreen HV Plates磷光成像(phosphorimaged),每个样品中放射性的量用FUJI FLA-3000定量。捕获的DNA的级分作为蛋白质浓度的函数作图,用非线性曲线拟合算法从数据中提取平衡结合常数(K<sub>d</sub>值)。表1示出每种富集的候选混合物对一组靶确定的K<sub>d</sub>值。NT表示针对特定碱基组成富集的文库看起来未从原始候选混合物中改变,如C<sub>0</sub>t分析所确定的,并因此未测试(NT)。

[0176] 表1示出富集的集合对15种不同蛋白质靶和4个不同DNA文库的平衡结合常数:天然发生的碱基(dT),苄基(BzdU),异丁基(iBdU)或色氨酸(TrpdU)。具有小于1x 10<sup>-8</sup>的K<sub>d</sub>的适配体是希望的。修饰的碱基在SELEX方法中的应用产生了显著更高百分比的希望的高亲

和性适配体。观测到用正常核苷酸产生的14个适配体中仅2个具有希望的慢解离速率。对于BndUTP、iBudUTP和TrpdUTP分别鉴别了14个中的9个、14个中的7个及14个中的14个用修饰的核苷酸产生的慢解离速率适配体。

[0177] 表1.用不同的修饰核苷酸选择的富集的文库的平衡结合常数( $K_d$ )，以体积摩尔浓度报道。NT=未测试

靶蛋白	dTTP	BndUTP	iBudUTP	TrpdUTP
<b>4-1BB</b>	$>1.0 \times 10^{-7}$	$5.6 \times 10^{-9}$	$>1.0 \times 10^{-7}$	$3.9 \times 10^{-9}$
<b>B7</b>	$>1.0 \times 10^{-7}$	$1.1 \times 10^{-8}$	NT	$7.2 \times 10^{-9}$
<b>B7-2</b>	$>1.0 \times 10^{-7}$	NT	$>1.0 \times 10^{-7}$	$5.7 \times 10^{-9}$
<b>CTLA-4</b>	$>1.0 \times 10^{-7}$	NT	NT	$1.4 \times 10^{-9}$
<b>[0178]</b>	<b>E-选择蛋白</b>	$>1.0 \times 10^{-7}$	$>1.0 \times 10^{-7}$	$1.9 \times 10^{-9}$
	<b>CXXXC 趋化因子</b>	NT	$>1.0 \times 10^{-7}$	$5.1 \times 10^{-11}$
	<b>GA733-1 蛋白</b>	$8.9 \times 10^{-9}$	$2.8 \times 10^{-9}$	$4.5 \times 10^{-10}$
	<b>Gp130</b>	$>1.0 \times 10^{-7}$	$5.9 \times 10^{-9}$	$1.2 \times 10^{-9}$
	<b>HMG-1</b>	$>1.0 \times 10^{-7}$	NT	$4.9 \times 10^{-9}$
<b>[0179]</b>	<b>IR</b>	$>1.0 \times 10^{-7}$	$1.9 \times 10^{-9}$	$2.2 \times 10^{-10}$
	<b>OPG</b>	$3.7 \times 10^{-8}$	$4.6 \times 10^{-9}$	$1.7 \times 10^{-10}$
	<b>PAI-1</b>	$>1.0 \times 10^{-7}$	$3.7 \times 10^{-10}$	$9.1 \times 10^{-10}$
	<b>P-钙粘着蛋白</b>	$>1.0 \times 10^{-7}$	$3.5 \times 10^{-9}$	$5.2 \times 10^{-9}$
	<b>s 瘦蛋白 R</b>	$>1.0 \times 10^{-7}$	$2.3 \times 10^{-9}$	NT

[0180] 实施例2. 用5' 固定光SELEX和经稀释的慢解离速率富集过程产生光适配体

[0181] A. 候选混合物的制备

[0182] 含有dATP,dCTP,dGTP和BndUTP的候选混合物通过聚合酶延伸与生物素化模板退火的引物而制备(图4A-B)。对于每种模板,使用4种不同的正向引物,每种在5'末端具有独特的生色团(见图5的生色团结构)。对于每种候选混合物,将11nmol正向引物(具有5'生色团)和10nmol模板在250μL引物延伸缓冲液(120mM Tris-HCl,pH 7.8,10mM KC1,6mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,7mM MgSO<sub>4</sub>,0.1mg/mL BSA,0.1% Triton X-100)中组合,加热至95℃5分钟,在冰上冷却。将125μL每种引物:模板混合物加入到1mL含有引物延伸缓冲液、0.125U/μL KOD XL DNA聚合酶及0.5mM每种dATP,dCTP,dGTP和BndUTP的延伸反应中,在70℃保温30分钟。每种1mL反应分成4个250μL等份并在冰上冷却。通过将1mL链霉抗生物素蛋白包被的磁珠(MagnaBind-Streptavidin,Pierce,5mg/mL于1M NaCl+0.05% TWEEN-20中)加入每个250μL等份中并在25℃混合保温60分钟经模板链生物素捕获双链产物。珠用0.5mL SB17T缓冲液(40mM HEPES,pH 7.5,125mM NaCl,5mM KC1,5mM MgCl<sub>2</sub>,1mM EDTA,0.05% TWEEN-20)洗3次。适配体链用1mL 20mM NaOH从珠洗脱,用0.25mL 80mM HC1中和,用10μL 1M HEPES,pH 7.5缓冲。候选混合物用Centricon-30浓缩至大约0.2mL,并用UV吸收光谱定量。

[0183] B. 靶蛋白的制备

[0184] 未标签标记的靶蛋白通过共价偶联NHS-PEO4-生物素(Pierce)至赖氨酸残基而生物素化。蛋白质(300pmol于50μL中)用Sephadex G-25微离心(microspin)柱交换进SB17T

中。将NHS-PE04-生物素加入到1.5mM并且反应在4℃保温16小时。未反应的NHS-PE04-生物素用Sephadex G-25微离心柱除去。

[0185] C. 使用慢解离速率富集过程和光交联的适配体选择

[0186] 用每种候选混合物单独进行选择,比较具有靶蛋白的样品(信号S)及无靶蛋白的样品(背景B)间的结合。进行前3轮循环选择亲和性(无光交联);第二和第三轮包括慢解离速率富集过程。第四至第八轮包括慢解离速率富集过程及光交联二者。

[0187] 对于每个样品,用10-20pmole候选混合物(第一轮中100pmole)和100pmole反向引物在SB17T中制备90μL DNA混合物。样品加热至95℃3分钟,以0.1C/秒速率冷却至37℃。样品与10μL蛋白质竞争剂混合物(0.1%HSA,10μM酪蛋白和10μM凝血酶原于SB17T中)组合,加入到0.5mg SA珠(预先用20mM NaOH洗2次,用SB17T洗1次),在37℃混合保温5分钟。经磁分离除去珠。

[0188] 通过将10μL靶蛋白(0.5μM于SB17T中)或SB17T加入40μL DNA混合物并在37℃保温30分钟进行结合反应。

[0189] 当采用慢解离速率富集过程时,样品通过加入950μL SB17T(预热至37℃)稀释20X,在37℃保温30分钟,之后捕获复合物。

[0190] 通过加入0.25mg MyOne-SA珠(Invitrogen)并在37℃混合保温15分钟经蛋白质生物素将复合物捕获在SA珠上。游离DNA通过用SB17T洗珠5次除去。除非说明,所有洗涤均通过将珠重悬于100μL洗涤溶液,在25℃混合30秒,用磁铁分离珠及除去洗涤溶液而进行。通过加入85μL 20mM NaOH并在37℃混合保温1分钟而从珠洗脱适配体链。将80μL适配体洗脱液在磁分离后转移至新管,用20μL 80mMHC1中和,用1μL 0.5MTris-HCl,pH7.5缓冲。

[0191] 当采用光选择时,50μL结合反应(或者1mL任选的经稀释的慢解离速率富集过程后的结合反应)用高压汞灯从上方照射(Optical Associates, Inc. model 0131-0003-01, 500W, 具有310nm镜装置(mirror set))。具有BrdU生色团的候选混合物被照射37秒,具有ANA生色团的那些被照射60秒,具有AQ或补骨脂素生色团的那些被照射10分钟。对于ANA、AQ和补骨脂素生色团使用额外的滤波器(5mm平板玻璃)以消除320nm以下不需要的但潜在破坏性波长。如上所述捕获复合物,通过用4M胍-HCl+0.05%TWEEN-20在50℃洗涤10分钟洗涤1次,用20mM NaOH在25℃洗涤2分钟洗涤1次,用SB17T洗涤2次及用16mM NaCl洗涤1次珠而除去未交联的DNA。交联的DNA未从珠表面除去,用于扩增步骤。

[0192] D. 适配体扩增及纯化

[0193] 经QPCR扩增和定量选择的适配体DNA。将48μL DNA加入到12μL QPCR Mix(5X KOD DNA聚合酶缓冲液,25mM MgCl<sub>2</sub>,10μM正向PCR引物,10μM生物素化反向PCR引物,5X SYBR Green I,0.125U/μL KOD XL DNA聚合酶,和1mM每种dATP,dCTP,dGTP和dTTP)并在Bio-Rad My IQ QPCR仪器中经下述方案热循环:1个循环的99.9℃、15秒,55℃、10秒,68℃、30分钟;30个循环的99.9℃、15秒,72℃、1分钟。量化用仪器软件进行,比较用靶或未用靶蛋白选择的DNA的拷贝数以确定信号/背景比。

[0194] 当采用光选择时,选择的DNA的cDNA拷贝通过在珠表面上的引物延伸制备。洗涤的珠重悬于20μL cDNA延伸混合物(含有5μM反向PCR引物、0.5mM每种dATP,dCTP,dGTP及dTTP和0.125U/μL KOD XL DNA聚合酶的引物延伸缓冲液)并在68℃混合保温30分钟。珠用SB17T洗3次,适配体链通过加入85μL 20mM NaOH并在37℃混合保温1分钟而从珠洗脱。将80μL适

配体洗脱液在磁分离后转移至新管,用20 $\mu$ L 80mM HC1中和,用1 $\mu$ L 0.5M Tris-HCl, pH 7.5缓冲。cDNA通过如上述30个循环的99.9℃、15秒,72℃、1分钟的QPCR扩增和定量。

[0195] 扩增后,PCR产物经生物素化反义链捕获在SA珠上。将1.25mL SA珠(10mg/mL)用0.5mL 20mM NaOH洗2次,用0.5mL SB17T洗1次,重悬于1.25mL 3M NaCl+0.05% Tween中,并储存在4℃。将25 $\mu$ L SA珠(10mg/mL于3M NaClT中)加入到50 $\mu$ L双链QPCR产物中并在25℃混合保温5分钟。珠用SB17T洗1次,“有义”链通过加入200 $\mu$ L 20mM NaOH并在37℃混合保温1分钟从珠洗脱。弃去洗脱的链,珠用SB17T洗3次,用16mM NaCl洗1次。

[0196] 适配体反义链用合适的生色团经从固定的反义链的引物延伸而制备。珠重悬于20 $\mu$ L引物延伸反应混合物中(1X引物延伸缓冲液,1.5mM MgCl<sub>2</sub>,5 $\mu$ M具有合适5'生色团的正向引物,0.5mM每种dATP,dCTP,dGTP及BndUTP和0.125U/ $\mu$ L KOD XL DNA聚合酶)并在68℃混合保温30分钟。珠用SB17T洗3次,适配体链通过加入85 $\mu$ L 20mM NaOH并在37℃混合保温1分钟而从珠洗脱。将80 $\mu$ L适配体洗脱液在磁分离后转移至新管,用20 $\mu$ L 80mM HC1中和,用5 $\mu$ L 0.1M HEPES,pH 7.5缓冲。

[0197] E.选择严格性及反馈

[0198] 靶蛋白在每轮如实施例1所述调整。每轮选择后,富集集合的趋同状态如实施例1所述确定。

[0199] F.富集文库的平衡集合常数

[0200] 结合亲和性如实施例1所述确定,但是使用SA捕获珠。下表2总结了用具有慢解离速率富集过程的光SELEX方案获得的平衡结合常数(Kd)。

[0201]	靶蛋白	BrdU	AQ	ANA	Psor
	$\beta$ -联蛋白	$2.7 \times 10^{-8}$	$3.6 \times 10^{-9}$	$1.1 \times 10^{-9}$	$1.6 \times 10^{-9}$
	bFGF	$3.1 \times 10^{-8}$	$5.7 \times 10^{-10}$	$7.1 \times 10^{-10}$	$5.1 \times 10^{-10}$
	CMP-SAS	x	$6.2 \times 10^{-9}$	$7.3 \times 10^{-9}$	$4.9 \times 10^{-8}$
	内皮抑制素	$1.3 \times 10^{-9}$	$8.7 \times 10^{-10}$	$8.8 \times 10^{-10}$	$1.3 \times 10^{-9}$
	IL-6	$1.0 \times 10^{-9}$	$5.4 \times 10^{-10}$	$4.0 \times 10^{-10}$	X
	髓过氧化物酶	$6.0 \times 10^{-10}$	$2.8 \times 10^{-10}$	$5.0 \times 10^{-10}$	$1.5 \times 10^{-10}$
	SDF-1 $\beta$	$8.1 \times 10^{-10}$	$5.7 \times 10^{-10}$	$3.8 \times 10^{-10}$	x
	TIMP-1	$5.2 \times 10^{-9}$	$7.3 \times 10^{-9}$	$8.9 \times 10^{-9}$	x
	VEGF	$7.2 \times 10^{-10}$	$4.2 \times 10^{-9}$	$5.5 \times 10^{-10}$	x
	vWF	$2.6 \times 10^{-8}$	$8.8 \times 10^{-9}$	$8.1 \times 10^{-9}$	x

[0202] 表2.用不同生色团选择的富集文库的平衡结合常数(Kd),以体积摩尔浓度报道。在未趋同的文库上未进行测量(用x标记)。

[0203] G.交联活性测定

[0204] 富集文库的交联率经测量在饱和蛋白质和光条件下交联至蛋白质的DNA的百分比确定。放射性标记的DNA(50pM)与反向引物(16nM)在SB17T中混合,加热至95℃3分钟,以0.1C/秒冷却至37℃。将靶蛋白加入DNA混合物中至10nM终浓度并在37℃保温30分钟。同时制备无蛋白质的对照样品。样品用上述生色团特异性条件交联,但是具有饱和剂量(对于BrdU为6分钟,对于ANA为10分钟,对于AQ和Psor为30分钟)。样品经变性PAGE分析,图6,并量化,结果见表3。

[0205]	靶蛋白	BrdU	AQ	ANA	Psor
	β-联蛋白	15	9	8	1
	bFGF	4	9	15	4
	CMP-SAS	x	3	5	2
	内皮抑制素	2	1	18	3
	IL-6	0	5	9	
	髓过氧化物酶	4	13	9	8
	SDF-1β	8	10	17	x
	TIMP-1	1	4	2	x
	VEGF	1	1	4	x
	vWF	2	2	7	x

[0206] 表3.用不同生色团选择的富集文库的交联率,以交联至蛋白质的总DNA的百分比单位报道。在未趋同的文库上未进行测量(用x标记)。

[0207] 实施例3.用具有竞争剂的慢解离速率富集过程产生慢解离速率适配体

[0208] A.候选混合物的制备

[0209] 经聚合酶延伸与生物素化模板退火的引物制备针对94个蛋白质靶的含有dATP, dCTP,dGTP及BndUTP的候选混合物。55nmol正向引物(具有5' ANA生色团)和55nmol模板组合在0.5mL引物延伸缓冲液中(120mM Tris-HCl, pH 7.8, 10mM KC1, 6mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 7mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1mg/mL BSA, 0.1% TritonX-100), 加热至95°C 5分钟, 70°C 5分钟, 48°C 5分钟, 在冰上冷却。将所述引物:模板混合物加到5.5mL含有引物延伸缓冲液、0.125U/μLKOD XL DNA聚合酶和0.5mM每种dATP, dCTP, dGTP及BndUTP的延伸反应中, 在70°C 保温60分钟。延伸反应完成后, 溶液在冰上冷却。通过向引物延伸产物中加入25mL链霉抗生物素蛋白包被的磁珠(MagnaBind-Streptavidin,Pierce, 5mg/mL于1M NaCl+0.05% TWEEN-20中)并在25°C旋转保温15分钟而经模板链生物素捕获双链产物。珠用40mL SB17T缓冲液(40mM HEPES, pH 7.5, 125mM NaCl, 5mM KC1, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 0.05% TWEEN-20)洗3次。用35.2mL 20mM NaOH振荡5分钟从珠洗脱适配体链。洗脱的链用8.8mL 80mM HC1中和并用400μL 1M HEPES, pH 7.3缓冲。候选混合物用Centricon-30浓缩至大约0.7mL, 并用UV吸收光谱定量。

[0210] B.制备靶蛋白

[0211] 未标签标记的靶蛋白如实施例2所述生物素化。

[0212] C.用慢解离速率富集过程和光交联选择适配体

[0213] 如实施例2所述单独进行选择,在第六至第九轮慢解离速率富集过程期间加入10mM硫酸葡聚糖作为适配体重结合的竞争剂。

[0214] 慢解离速率富集过程以三种不同方式进行。在第二和第三轮,通过在捕获复合物之前加入950μL SB17T(预热至37°C)并在37°C保温30分钟而将样品稀释20X。在第四和第五轮,通过在交联之前加入950μL SB17T(预热至37°C)并在37°C保温30分钟而将样品稀释20X。在第六和第七轮,通过加入950μL SB17T(预热至37°C)而将样品稀释20X。将50μL每种稀释样品转移至950μLSB17T+10mM 5000K硫酸葡聚糖(预热至37°C)中而再次稀释,产生总体400X稀释,并在37°C保温60分钟,之后交联。在第八和第九轮,通过加入950μL SB17T(预热至37°C)而将样品稀释20X,50μL每种样品转移至950μL SB17T(预热至37°C)中而再次稀

释,产生400X稀释。最后50 $\mu$ L每种400X稀释样品转移至950 $\mu$ L SB17T+10mM 5000K硫酸葡聚糖(预热至37°C)中而再次稀释,产生总体8000X稀释,并在37°C保温60分钟,之后交联。复合物如实施例2所述捕获和洗涤。当采用光交联时,在如实施例2所述进行复合物捕获之前将经慢解离速率富集过程之后的1mL结合反应用470nm LED阵列从上方照射60秒。

[0215] D.适配体扩增及纯化

[0216] 扩增及纯化如实施例2所述进行。

[0217] E.选择严格性及反馈

[0218] 靶蛋白在每轮如实施例1所述调整,除了是在第六和第八轮。为了最大化这些大稀释之后的信号,对于第六和第八轮靶蛋白增加至100nM。在每轮选择后,富集集合的趋同状态如实施例1所述确定。

[0219] F.解离速率常数确定方案

[0220] 通过测量在作为时间函数的稀释后保持结合的预先形成的适配体:蛋白质复合物的级分针对每个适配体确定适配体:蛋白质复合物解离的速率常数( $k_{off}$ )。放射性标记的适配体(50pM)用浓度为高于测量的 $K_d$ 值10倍的蛋白质在37°C在SB17T-0.002(具有降低至0.002%的TWEEN-20的SB17T)中平衡。样品用SB17T-0.002在37°C稀释100X,在不同时间点取等份并分开以从蛋白质:适配体复合物分离游离适配体。分开如下完成,将ZORBAX树脂(Agilent)加入样品,在树脂上捕获复合物,将样品在真空下通过DuraPore膜,及用SB17T-0.002洗涤树脂。对于未用ZORBAX树脂有效捕获的蛋白质,用生物素化蛋白质在SB17T中进行测定,分开通过用SA珠捕获复合物完成。在每个时间点剩余的复合物的量通过用FUJI FLA-3000磷光成像仪量化树脂上的放射性标记的适配体而确定。复合物级分作为时间函数绘图,解离速率常数( $k_{off}$ )及解离半衰期值( $t_{1/2}$ )通过用非线性回归拟合数据至用于生物分子解离动力学的分析式而确定。

[0221] G.一些适配体的动力学性质

[0222] 下表4总结了用这一方案针对10个靶选择的适配体所获得的解离半衰期值( $t_{1/2}$ )。

[0223]

靶蛋白	$t_{1/2}$ (min)
bFGFR	66
C3	164
过氧化氢酶	58
FGF-17	91
IB组磷脂酶A2	40
HB-EGF	49
HCC-4	143
IL-6sRa	114
SAP	186
uPA	85

[0224] 表4.用竞争剂慢解离速率富集步骤方案的适配体的解离半衰期值( $t_{1/2}$ )

[0225] 实施例4:慢解离速率富集过程增加选择的适配体的解离半衰期

[0226] 对用实施例1所述的亲和性SELEX方法或美国专利No.6,458,539(发明名称"Photoselection of Nucleic Acid Ligands")所述的无慢解离速率富集过程的光SELEX方

法选择的65个适配体测量解离半衰期值( $t_{1/2}$ )并作图(图3A)。还对通过具有通过稀释或用竞争剂稀释的慢解离速率富集过程的实施例2所述的慢解离速率富集过程选择的72个适配体测量了 $t_{1/2}$ 值并作图(图3B)。用修饰的核苷酸5'-苄基羧基酰胺-dUTP(BndUTP)、5'-异丁基羧基酰胺-dUTP(iBudUTP)、或5'-色氨基羧基酰胺-dUTP(TrpdUTP)在不存在慢解离速率富集过程下选择的适配体的平均 $t_{1/2}$ 值是20分钟,一些适配体具有直至1小时的 $t_{1/2}$ 值。这实质上长于先前用天然碱基或其它修饰的核苷酸所述的值。用慢解离速率富集过程选择的适配体的平均值超过85分钟,一些适配体具有超过4小时的 $t_{1/2}$ 值。

[0227] 实施例5:从NapdU随机文库产生适配体

[0228] A. 候选混合物制备

[0229] 含有dATP,dCTP,dGTP及NapdUTP的候选混合物如实施例3所述制备,但是不具有5'-ANA光反应性基团。

[0230] B. 靶蛋白的固定

[0231] 靶蛋白含有(His)6标签并如实施例1所述用Talon珠捕获。

[0232] C. 用慢解离速率富集过程进行适配体选择

[0233] 适配体选择如实施例3所述进行,但是没有光交联。

[0234] D. 适配体扩增及纯化

[0235] 扩增及纯化如实施例3所述进行。

[0236] E. 选择严格性及反馈

[0237] 选择严格性及反馈如实施例3所述进行。

[0238] F. 适配体性质

[0239] 来自这一选择的4个适配体的平衡结合常数(Kd)如表5所列。

[0240] 表5.

[0241] NapdU适配体的平衡结合常数(Kd)

靶蛋白	Kd (M)
bFGF	$1.1 \times 10^{-9}$
内皮抑制素	$2.0 \times 10^{-10}$
TIMP-3	$1.5 \times 10^{-10}$
VEGF	$7.2 \times 10^{-10}$

[0243] 实施例6.用具有竞争剂的慢解离速率富集过程产生对于肽靶的慢解离速率适配体

[0244] A. 候选混合物制备

[0245] 含有dATP,dCTP,dGTP及BndUTP的候选混合物经聚合酶延伸具有5' ANA生色团的引物而制备并如实施例3纯化。

[0246] B. 用慢解离速率富集过程和光交联进行适配体选择

[0247] 用29个氨基酸的生物素化靶肽SMAP29(绵羊骨髓抗菌肽MAP-29,Anaspec)如实施例3所述进行适配体选择。

[0248] C. 适配体扩增及纯化

[0249] 扩增及纯化如实施例3所述进行。

[0250] D. 选择严格性及反馈

[0251] 选择严格性及反馈如实施例3所述进行。

[0252] E.适配体性质

[0253] 来自这个选择的适配体的平衡结合常数 ( $K_d$ ) 是  $1.2 \times 10^{-8} M$  (根据实施例1所述方案测量)。这个适配体的解离半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 是 69 分钟 (根据实施例3所述方案测量)。结果示于图12A和图12B。

[0254] 实施例7:检测样品中的蛋白质测量通过具有慢解离速率的适配体进行。

[0255] A:适配体/引物混合物和检测样品的制备

[0256] 具有生物素Cy3检测标记的适配体 (每种4nM) 与3X过量的捕获探针 (互补于适配体3'固定区的含有生物素标签和光可裂解元件的寡核苷酸) 在1X SB17T中混合,在95°C加热4分钟,然后37°C 13分钟,在1x SB17T中1:4稀释。将55uL适配体/引物混合物加入微滴定板 (Hybaid#AB-0407) 并用箔密封。通过在SB17T中混合已知浓度的蛋白质分析物并用SB17T系列稀释而在微滴定板中制备检测样品。

[0257] B:样品平衡

[0258] 将55uL适配体/引物混合物加入到55uL检测样品中并在箔密封微滴定板中在37°C保温15分钟。每个适配体在平衡混合物中的终浓度是0.5nM。平衡后,这个方法的所用后续步骤均在室温进行,除非另有说明。

[0259] C:适配体捕获及游离蛋白质去除

[0260] DuraPore过滤平板 (Millipore HV cat#MAHVN4550) 用100uL 1X SB17T经真空过滤洗涤1次,向每孔中加入133.3uL 7.5%链霉抗生物素蛋白-琼脂糖树脂 (Pierce) 并用200uL 1X SB17T洗2次。将100uL平衡样品转移至含有链霉抗生物素蛋白-琼脂糖树脂的Durapore平板并在热混合仪 (Eppendorf) 上以800rpm保温5分钟。树脂用200uL 1X SB17T+100uM生物素洗1次,用200uL 1X SB17T洗1次。

[0261] D:用生物素标签标记蛋白质

[0262] 将在即将使用前制备的100uL于SB17T中的1.2mM NHS-PEO4-生物素加入到具有捕获的适配体和适配体:蛋白质复合物的树脂中并在热混合仪上以800rpm保温20分钟。树脂用200uL 1X SB17T经真空过滤洗涤5次。

[0263] E:慢解离速率富集过程及光裂解

[0264] 从DuraPore平板下面除去导管 (drip director) 并将该平板置于1mL微滴定收集平板上。树脂用200uL 1X SB17T经1000x g离心30秒洗1次。将80uL 1X SB17T+10mM硫酸葡聚糖加入树脂并用BlackRay汞灯照射,在热混合仪上800rpm 10分钟。将所述DuraPore平板转移至新的1mL深孔板并在1000x g离心30秒收集光裂解的适配体及蛋白质:适配体复合物。

[0265] F:蛋白质捕获及游离适配体去除

[0266] 将50uL MyOne-链霉抗生物素蛋白C1顺磁性珠 (Invitrogen) (10mg/mL于1X SB17T中) 加入到微滴定板。珠用磁铁分离60秒,去除上清。将225uL光裂解混合物加入到珠中并混合5分钟。通过分离磁珠及更换洗涤缓冲液用200uL 1X SB17T洗涤珠4次。除去最终洗涤缓冲液。

[0267] G:适配体洗脱

[0268] 将100uL磷酸钠洗脱缓冲液 (10mM Na<sub>2</sub>HPo<sub>4</sub>, pH 11) 加入到珠中并混合5分钟。将

90uL洗脱液转移到微滴定板中并用10uL磷酸钠中和缓冲液(10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5)中和。

[0269] H:适配体杂交至微阵列

[0270] 用固定化在市售显微镜玻片支持物上的寡核苷酸捕获探针制备DNA阵列,所述探针包含每个适配体的可变区的互补序列。多个阵列(亚阵列)存在于每个玻片上,各亚阵列经附加用于样品施加的衬垫(gasket)(Grace)而物理分隔。阵列用100uL封闭缓冲液预处理并在热混合仪上于65°C保温15分钟。将30uL高盐杂交缓冲液加入到微滴定板中的90uL中和的适配体洗脱液中,在热循环仪中于95°C加热5分钟,以0.1°C/秒冷却至65°C。从阵列除去封闭缓冲液,将110uL适配体样品加入到阵列中并在恒湿箱中于65°C保温20小时。

[0271] L:阵列洗涤

[0272] 从阵列除去适配体样品并将阵列用200uL磷酸钠Tween-20洗涤缓冲液在65°C洗涤1次(衬垫在原位),用25mL磷酸钠、Tween-20洗涤缓冲液在pap jar中于65°C洗3次(衬垫被除去)。阵列用氮枪干燥。

[0273] J:量化阵列上的信号

[0274] 在TECAN LS300上在针对Cy3检测的合适通道中扫描阵列玻片,量化每个阵列特征上的Cy3信号。

[0275] 结果:

[0276] 用传统SELEX方法及材料产生特异于三种不同靶(bFGF、VEGF和髓过氧化物酶)的适配体。用5-位置修饰的核苷酸制备特异于相同组的靶的第二组适配体并选择对它们各自靶的非常慢的解离速率。传统方法中制备的适配体的测量的解离速率在小于5分钟的级别。用修饰的核苷酸在选择期间使用慢解离速率富集过程制备的适配体的解离速率大于20分钟。对每个靶经两种不同方法制备2组适配体,对于每个靶总共4个不同适配体群。这些适配体群测量检测样品中分析物浓度的能力如上所述对一系列靶浓度来评估。来自DNA芯片检测的相对信号对输入靶浓度作图。见图11A至11C。传统适配体的应答曲线非常平,检测的灵敏性相当低。用慢解离速率适配体检测其各自靶的灵敏性非常好。数据支持需要使用慢解离适配体用于最大化分析性能。

[0277] 实施例8.产生对人凝血酶的高亲和性BndUTP适配体

[0278] A.候选混合物制备

[0279] 如实施例3所述经聚合酶延伸具有5' ANA生色团的引物而制备含有dATP, dCTP, dGTP和BndUTP的候选混合物并纯化。

[0280] B.靶蛋白制备

[0281] 如实施例2所述用生物素标签标记人凝血酶。

[0282] C.用慢解离速率富集及光交联进行适配体选择

[0283] 用生物素化人凝血酶作为靶如实施例3所述进行适配体选择。

[0284] D.适配体扩增及纯化

[0285] 如实施例3所述进行扩增及纯化。

[0286] E.选择严格性及反馈

[0287] 如实施例3所述进行选择严格性及反馈。

[0288] F.适配体性质

[0289] 来自这个用修饰的BndU选择的适配体2336-17的平衡结合常数(Kd)是4.4x10<sup>-11</sup>M

(根据实施例1所述方案测量),如图15所示。在本领域中,针对人凝血酶的单链DNA适配体从包含天然dA,dC,dG及dT核苷酸的文库选择(Bock,et al.,Selection of Single-Stranded DNA Molecules that Bind and Inhibit Human Thrombin,Nature 1992 355:564-566)。适配体的结合亲和性具有从 $2.5 \times 10^{-8}$ M至 $2.0 \times 10^{-7}$ M的Kd值。使用相似方案用包含天然dA,dC,dG及修饰的5-(1-戊炔基)-dUTP的文库,选择具有 $4 \times 10^{-7}$ M至 $1 \times 10^{-6}$ M的Kd值的适配体(Latham,et al.,The Application of a Modified Nucleotide in Aptamer Selection: Novel Thrombin Aptamers Containing 5-(1-Pentynyl)-2'-Deoxyuridine,Nucleic Acid Research 1994 22(14):2817-2822)。

[0290] 一些专利、专利申请出版物和科学出版物被引用和/或列于说明书结尾。这些的每一篇均以其全文援引加入本文。类似地,援引加入的出版物中提到的所有出版物也以其全文援引加入本文。

[0291] 引用的出版物中的实例及其相关限制是例证的而非排除性的。在阅读说明书和研究附图后,引用的出版物的其它限制对于本领域技术人员是明显的。

[0292] 词语“包含”被解释为是包括性的而非排除性的。

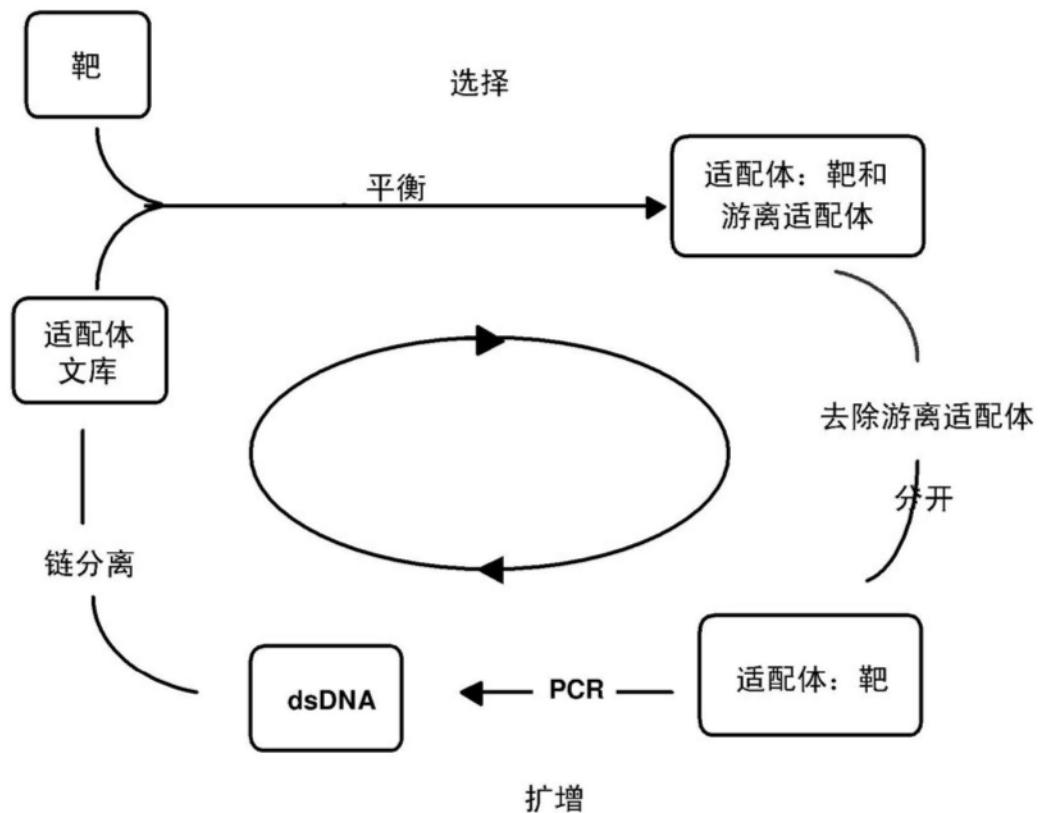


图1A

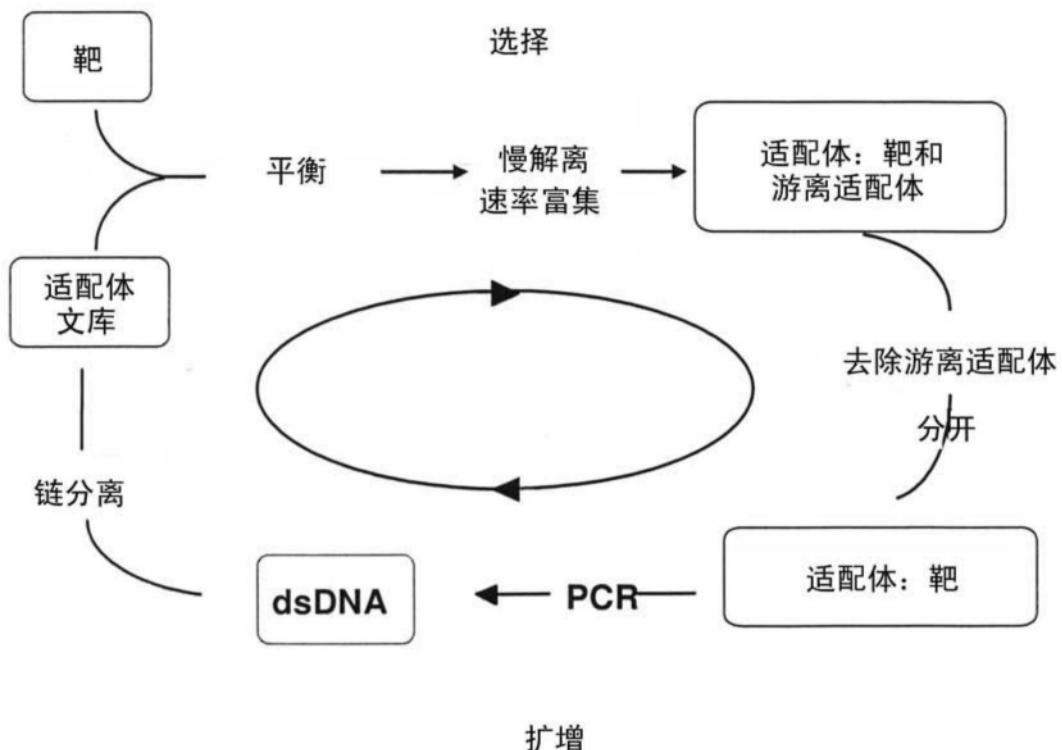


图1B

模板1

**5'-ABABGTCTTCTTGTCTCGTTCGC-(N)<sub>40</sub>-GGTGGAGTGTGGTGAGG-3'**

**(SEQ ID NO:1)**

正向 PCR 引物1

**5'-ATATATATCCTCACCACTCCACC-3' (SEQ ID NO:2)**

反向 PCR 引物1

**5'-ABABTTTTTTGTCTTCTTGTCTCGTTCGC-3' (SEQ ID NO:3)**

模板2

**5'-ABABCCTCCTCCTCTCCGTC-(N)<sub>40</sub>-GGGACACTGGGTGCAGG-3'**

**(SEQ ID NO:4)**

正向 PCR 引物2

**5'-ATATATATCCTGCACCCAGTGTCCC-3' (SEQ ID NO:5)**

反向 PCR 引物2

**5'-ABABTTTTTTCCGTCTCCTCTCCGTC-3' (SEQ ID NO:6)**

**(His)<sub>6</sub>-互补寡核苷酸**

**5'-GTCTTCTTGTCTCGTTCGC-3' (SEQ ID NO:7)**

图2

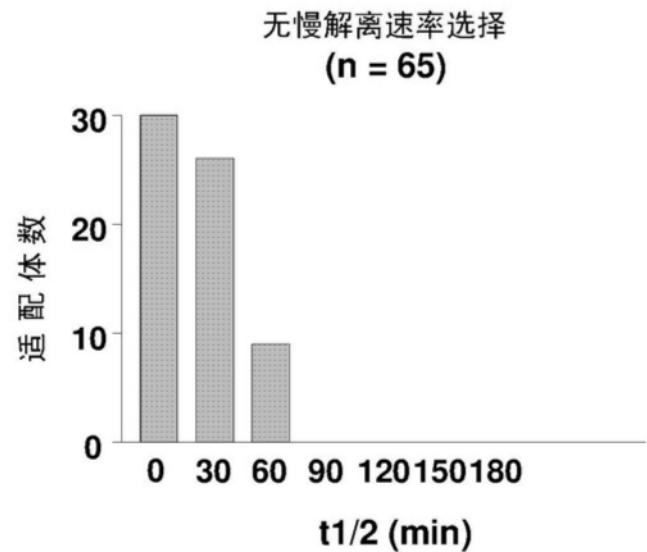


图3A

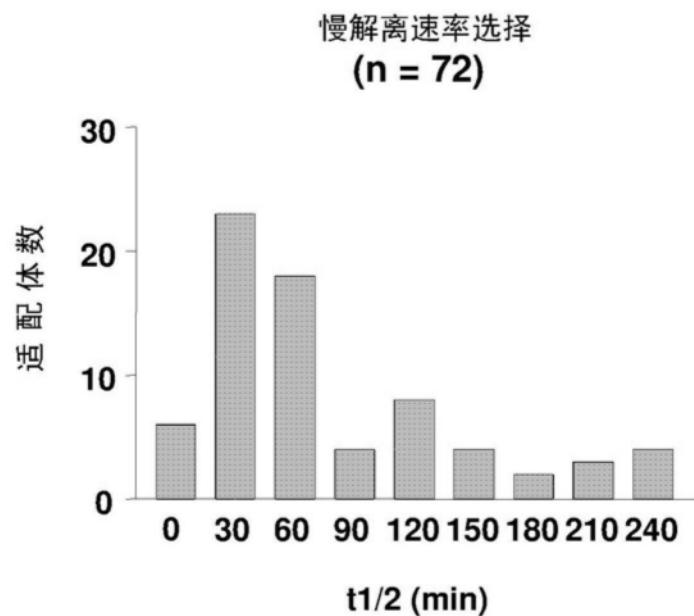


图3B

## 模板1

**5'-ABABCCCGCTCGTCGTCTG-(N)<sub>40</sub>-CAGGCAGACGGTCACTC-3'**

(SEQ ID NO:8)

正向 BrdU 引物1

**5'-BrdU - ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEQ ID NO:9)**

正向 ANA 引物1

**5'- ANA - ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEQ ID NO:10)**

正向 AQ 引物1

**5'- AQ - ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEQ ID NO:11)**

正向 Psor 引物1

**5'- Psor - ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEQ ID NO:12)**

正向 PCR 引物1

**5'-ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEQ ID NO:13)**

反向 引物1

**5'-TTTTTTTTCCCGCTCGTCGTCTG-3' (SEQ ID NO:14)**

反向 PCR 引物1

**5'-ABABTTTTTTCCCGCTCGTCGTCTG-3' (SEQ ID NO:15)**

图4A

模板2

**5'-ABABGTGTCTGTCTGTGTCCTC-(N)<sub>40</sub>-GGTGGAGTGTGGTGAGG-3'**

**(SEQ ID NO:16)**

正向 BrdU 引物1

**5'- BrdU - ATATATATCCTCACCACTCCACC-3' (SEQ ID NO:17)**

正向 ANA 引物2

**5'- ANA - ATATATATCCTCACCACTCCACC-3' (SEQ ID NO:18)**

正向 AQ 引物2

**5'- AQ - ATATATATCCTCACCACTCCACC-3' (SEQ ID NO:19)**

正向 Psor 引物2

**5'- Psor - ATATATATCCTCACCACTCCACC-3' (SEQ ID NO:20)**

正向 PCR 引物2

**5'-ATATATATCCTCACCACTCCACC-3' (SEQ ID NO:21)**

反向 引物2

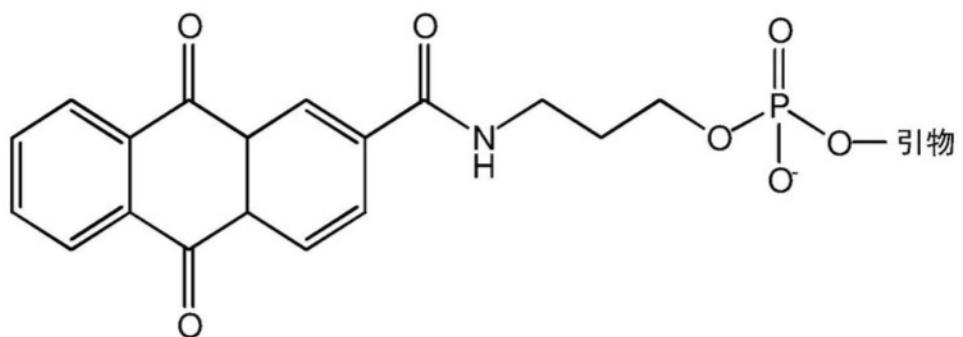
**5'-TTTTTTTTGTGTCTGTCTGTGTCCTC-3' (SEQ ID NO:22)**

反向 PCR 引物2

**5'- ABABTTTTTTGTGTCTGTCTGTGTCCTC-3' (SEQ ID NO:23)**

图4B

蒽醌 (AQ)



补骨脂素 (Psor)

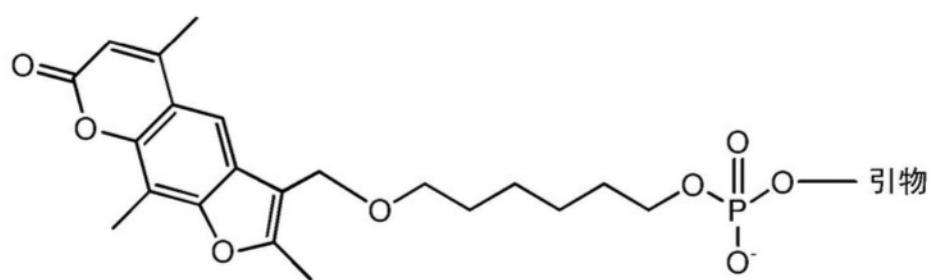


图5

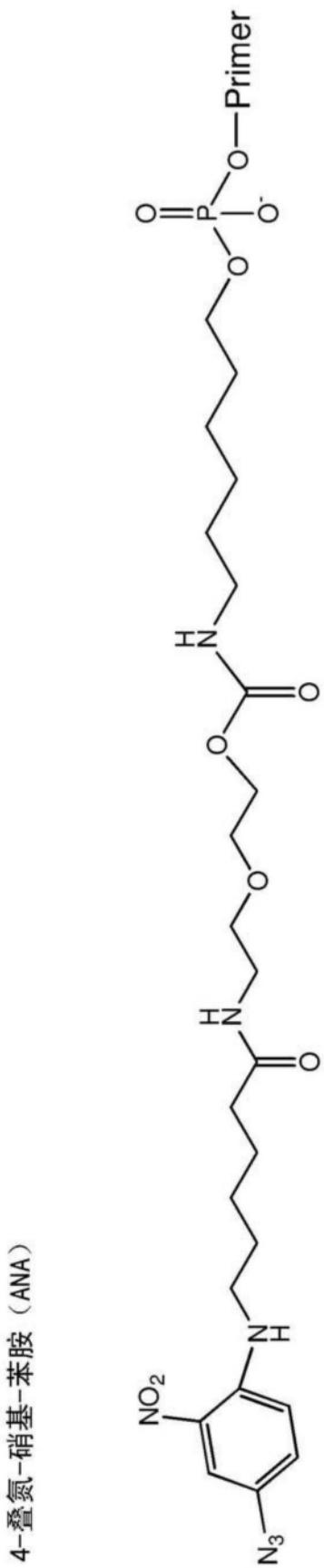


图5续

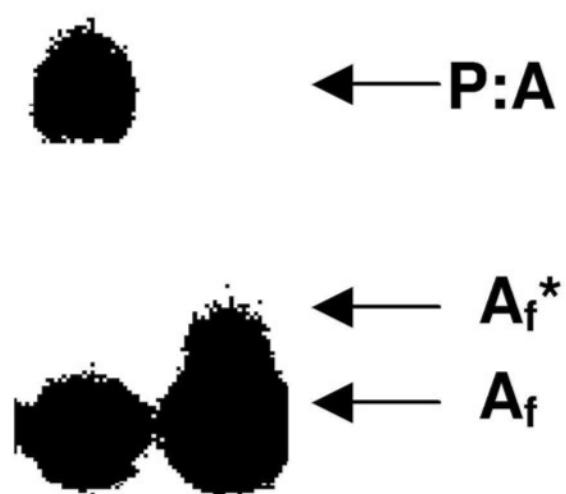


图6

4-1BB	Apo E4	BMP RII	组织蛋白酶D
4-1BB 配体	APRIL	β-NGF	组织蛋白酶G
6Ckine	AREG	骨蛋白聚糖II	组织蛋白酶S
α-1- 抗胰凝乳蛋白酶	ARGI1	BPI	组织蛋白酶V
α-2- 抗纤溶酶	ARSB	C1q	CCL28
ACE2	ART	C1r	CD5L
活化蛋白C	Artemin	C2	CD22
激活蛋白A	ASAHL2	C3	CD23
激活蛋白R1A	ASAHL	C3a	CD30
激活蛋白R1B	ATS1	C3adesArg	CD30 配体
ADAMTS - 4	ATS13	C3b	CD36 抗原
ASAMTS - 5	Aurora kinase A	C3d	CD39
聚集蛋白聚糖	天青杀素	C4	CD97
AIF1	B7	C4b	CD109
ALCAM	B7-2	C5	血浆铜蓝蛋白
ALK-1	BAFF	C5a	CFC1
碱性磷酸酶, 骨	BCAM	C5b, 6 复合物	Chk1
AMPM2	β- 连环蛋白	C6	Ck-β-8-1
淀粉状蛋白前体 蛋白	Bcl-2	C7	CK-BB
血管生成素	BCMA	C8	CK-MM
血管生成素-1	BDNF	C9	CLF-1/CLC 复合物
血管生成素-2	β- 内啡肽	钙粘蛋白E	CMP- 唾液酸 合成酶
血管生成素-4	bFGF	钙粘蛋白-5	CNTF
ANGL3	bFGF-R	钙神经素B α	CNTFR alpha
ANGL4	BGH3	钙激活中性蛋白酶I	CNTN2
Apo A -1	β- 糖苷酶	钙蛋白酶抑制蛋白	凝结因子 α -XIIa
Apo B	BGN	碳酸酐酶IV	凝结因子IX
Apo E	BLC	向心素1	凝结因子IXab
Apo E2	BMP-7	天冬氨酸特异性半胱 氨酸蛋白酶-3 (pro)	凝结因子V
Apo E3	BMP-14	过氧化氢酶	凝结因子VII
	BMPER	组织蛋白酶A	凝结因子X
	BMPR1A	组织蛋白酶B	凝结因子Xa

图7

凝结因子XI	DLL4	FCG2A	GDF -9
凝结因子XIIa	多巴脱羧酶	FCG2B	GDF -11
凝结因子XIII	DRG -1	FCG3B	GDNF
XIII			
胶原 I 型	DRR1	FCGR1	GFAP
COLEC 12	Dtk	铁蛋白	GFR $\alpha$ -1
COMMD7	EDA (A2)	FGF -4	GFR $\alpha$ -2
接触蛋白-1	EDAR	FGF -5	GFR $\alpha$ -3
接触蛋白-4	EG - VEGF	FGF -6	GIB
COX -2	eIF -5	FGF -7	GIIE
Cripto	弹性蛋白酶	FGF -8B	GITR
CRIS3	EMAP -2	FGF -9	糖皮质激素受体
CRP	ENA -78	FGF -10	谷氨酸羧肽酶
CTACK	内皮抑制素	FGF -16	谷胱甘肽S-转移酶Pi
CTGF	Eotaxin	FGF -17	磷脂酰肌醇蛋白聚糖3
	Eotaxin -2	FGF -18	gp130, 可溶
CTLA -4	Eotaxin -3	FGF -19	GPC2
CXCL 16, 可溶	Ephrin -A4	FGF -20	GPVI
胱蛋白酶抑制剂C	Ephrin -A5	FGFR -2	粒溶素
胱蛋白酶抑制剂M	Ephrin -B3	纤维蛋白原	粒酶B
CYTD	上皮细胞激酶	纤连蛋白	Gro - $\alpha$
CYTF	EPO - R	Flt -3	Gro - $\gamma$
CYTN	ER	Flt -3 配体	生长激素受体
细胞色素C	ERBB1	趋化因子/CX3CL -1	GSK - 3 beta
细胞色素 P450 3A4	ERBB2	FSH	GV
DAN	ERBB3	FST	GX
DARPP-32	ERBB4	FYN	HAI -1
DC - SIGN	ERK - 1	GA733 -1 蛋白	触珠蛋白, 混合型
DC - SIGNR	ESAM	半乳凝素-2	Hat 1
D - 二聚体	因子B	半乳凝素-3	HB -EGF
DEAD - Box 蛋白	因子D	半乳凝素-4	HCC -1
19B			
桥粒芯糖蛋白 1	因子H	半乳凝素-7	HCC -4
DKK1	因子I	GAS1	HDAC8
	Fas 配体, 可溶	GASP -2	血液结合素
	Fas, 可溶	G-CSF-R	

图7续

肝素辅因子II	IGFBP -4	IL - 17 sR	Layilin
HGF	IGFBP -5	IL - 17B	LBP
组蛋白H 1.2	IGFBP -6	IL - 17D	LD78-beta
HIV -2 Rev	IGFBP -7	IL - 17E	瘦蛋白
HMG -1	IGF - I	IL - 17F	脂质运载蛋白2
HO -2	IGF - I sR	IL - 18 Bpa	LKHA4
HPLN1	IGF - II 受体	IL - 18 R $\alpha$	LRIG3
HPV E7 Type16	IgM	IL - 18 R $\beta$	LRP8
HPV E7 Type18	IL - 1 $\beta$	IL - 19	LSAMP
HSP 60	IL - I R AcP	IL - 20	促黄体激素
HSP 70	IL - 1 R4	IL - 21 sR	LY86
HSP 90 $\alpha$	IL - 1 sRI	IL - 22	LY9
HSP 90 $\beta$	IL - 1F7	IL - 27	淋巴细胞趋化蛋白
HTRA2	IL - 1Rrp2	肌苷三磷酸酶	淋巴毒素 $\beta$ R
HVEM	IL - 2	IP -10	溶菌酶
I11RA	IL - 2 sR $\gamma$	IR	LYVE 1
I12R2	IL - 4	I - TAC	巨噬细胞甘露糖受体
I-309	IL - 4 sR	JAM - B	MAPK14
IC3b	IL - 6	JAM - C	MATN2
ICOS	IL - 6 sR $\gamma$	激肽释放酶4	MATN3
IDE	IL - 7	激肽释放酶5	MBL
IDS	IL - 7 R alpha	激肽释放酶8	MCP -1
IDUA	IL - 8	激肽释放酶11	MCP -2
IFN - $\gamma$	IL - 10	激肽释放酶12	MCP -3
IFN - $\gamma$ R1	IL - 10 R $\beta$	激肽释放酶13	MCP -4
IFN - lambda 1	IL - 11	核胞浆转运蛋白- $\alpha$ 2	M-CSF R
IFN - lambda 2	IL - 12	激肽原 单链	MDC
IgE	IL - 12R $\beta$ 1	激肽原 双链	MEK1
IGFBP-1	IL - 13	KLH	MEPE
IGFBP -2	IL - 13 R $\alpha$ 1	KREM2	MER
IGFBP -3	IL - 13 R $\alpha$ 2	Ku70	Met
	IL - 15 R $\alpha$	乳铁蛋白	METAP1
	IL - 16	LAG -1	MIA
		层粘连蛋白	MICA

图7续

肝素结合细胞因子	NG36	PKC- $\alpha$	SAP
Mif4gd, 小鼠	巢蛋白	PKC- $\beta$ -II	SARP-2
MIG	NKG2D	PKC-D	sCD14
Miox, 大鼠	NKp30	PKC- $\zeta$	SCF sR
MIP -1 $\alpha$	NKp44	纤溶酶	SCGF - $\alpha$
MIP -1 $\beta$	头蛋白	纤溶酶原	SCGF - $\beta$
MIP - 3 $\alpha$	Nogo 受体	PIGF	脑信号蛋白3A
MIP -3 $\beta$	NovH	前激肽释放酶	sE- 选择蛋白
MK01	NPS - PLA2	PRL	SET9
MMP -1	NRP1	备解素	sFRP-3
MMP -2	OLR1	前列腺酸性 磷酸酶	sICAM-2
MMP -3	ON	蛋白酶连结素I	sICAM-3
MMP -7	OPG	蛋白C	SIGIR R
MMP -8	OSM	蛋白S	Siglec-6
MMP -9	OX40 配体	凝血酶原	Siglec -7
MMP -13	PAFAH beta 亚基	PSA	Siglex -9
MMP -14	PAI -1	PSA-ACT	SLAMF8
MMP -17	PAPP - A	P- 选择蛋白	s瘦蛋白R
MOZ	PARC	PSMA	SLPI
MP 112	伙伴蛋白A	PTHRP	sL- 选择蛋白
MPIF -1	伙伴蛋白B	PTN	SMAC
MSP R	P - 钙粘蛋白	PTP-1 B	sn-1,2- 二酰甘油激酶
髓过氧化物酶	PCNA	Rab GDP 解离 抑制剂 $\beta$	SOD
肌球蛋白调节轻链2	PDGF Rb	Rac1	Soggy - 1
NADPH - P450 氧化还原酶	PDGF -AA	RAD51	Sonic Hedgehog
NANOG	PD-L2	RANTES	SPIN T2
NAP -2	PDPK1	RAP	Spondin -1
NCAM -L1	PECAM-1	RELT	sRage
NET4	Persephin	抵抗素	sRANKL
神经调节蛋白-1	PF-4	RET	sTie-1
神经营养蛋白-3	PGRP-S	RGMB	sTie-2
神经营养蛋白-5	PIGR	RGM-C	sTREM-1
	PKB	S100A4	STX1 $\alpha$

图7续

碘基转移酶, 结瘤因子 SuPar	凝血酶	TRAIL R4	ULBP-2
	甲状腺素结合球蛋白	转铁蛋白	ULBP-3
TACI	TIG2	TrATPase	uPA
TARC	TIMP-1	TrkB	URB
tau	TIMP-2	TrkC	VCAM-1
TBP	TIMP-3	肌钙蛋白I	VEGF
TECK	TNF sR-1	肌钙蛋白T	VEGF sR2
腱糖蛋白	TNF sR-II	胰蛋白酶	VEGF sR3
睾丸蛋白聚糖-2	TNFSF 15	胰蛋白酶2	玻连蛋白
TF	TNFSF 18	TSRP	vWF
TFPI	Tom34	TSRP R	WIFKN2
TGF - $\beta$ 1	拓扑异构酶	TSP2	WIF-1
TGF - $\beta$ 2	tPA	TSP4	WISP-3
TGF - $\beta$ RIII	Tpo	TWEAK	XEDAR
	TRAIL	UBC9	Yes
	TRAIL R2	泛素+1	
		ULBP-1	

图7续

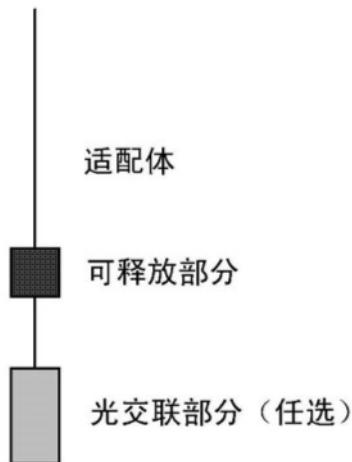


图8A

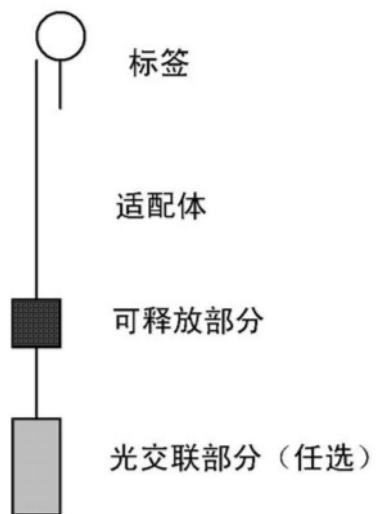


图8B

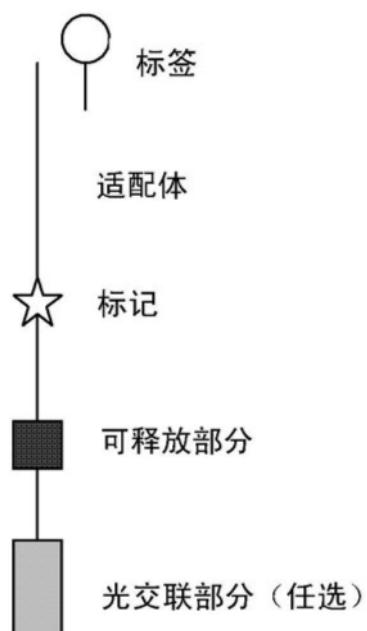


图8C

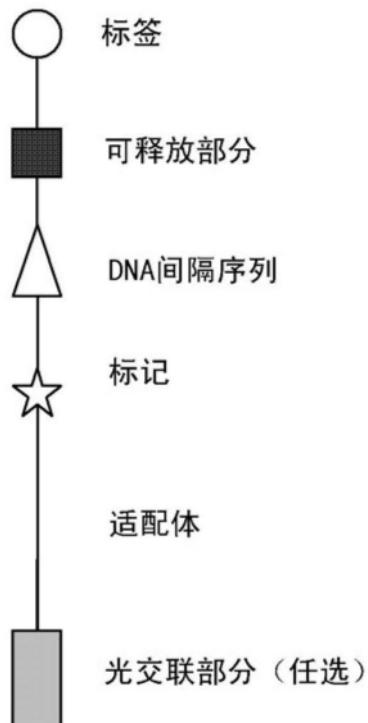


图8D

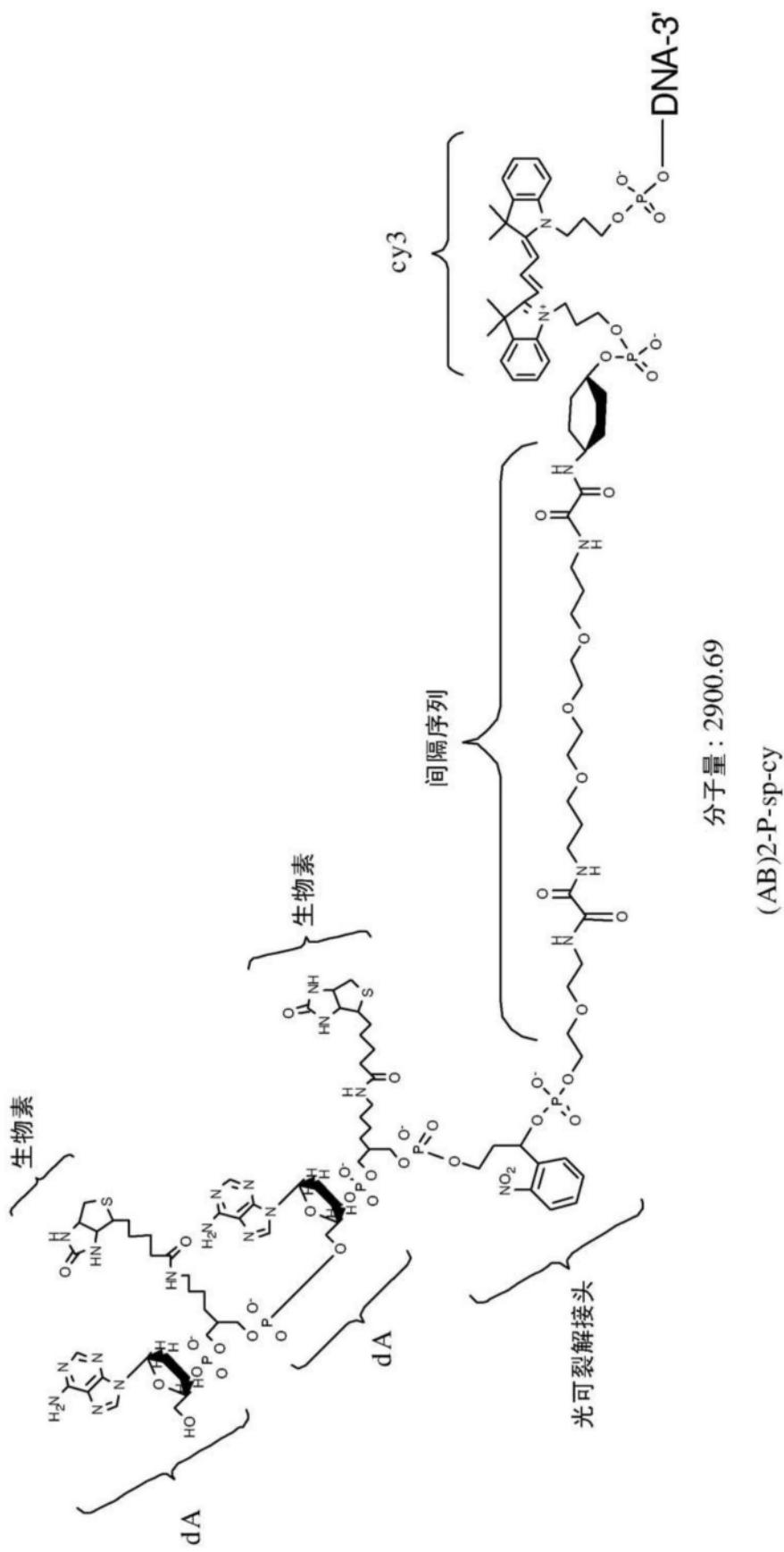


图9A

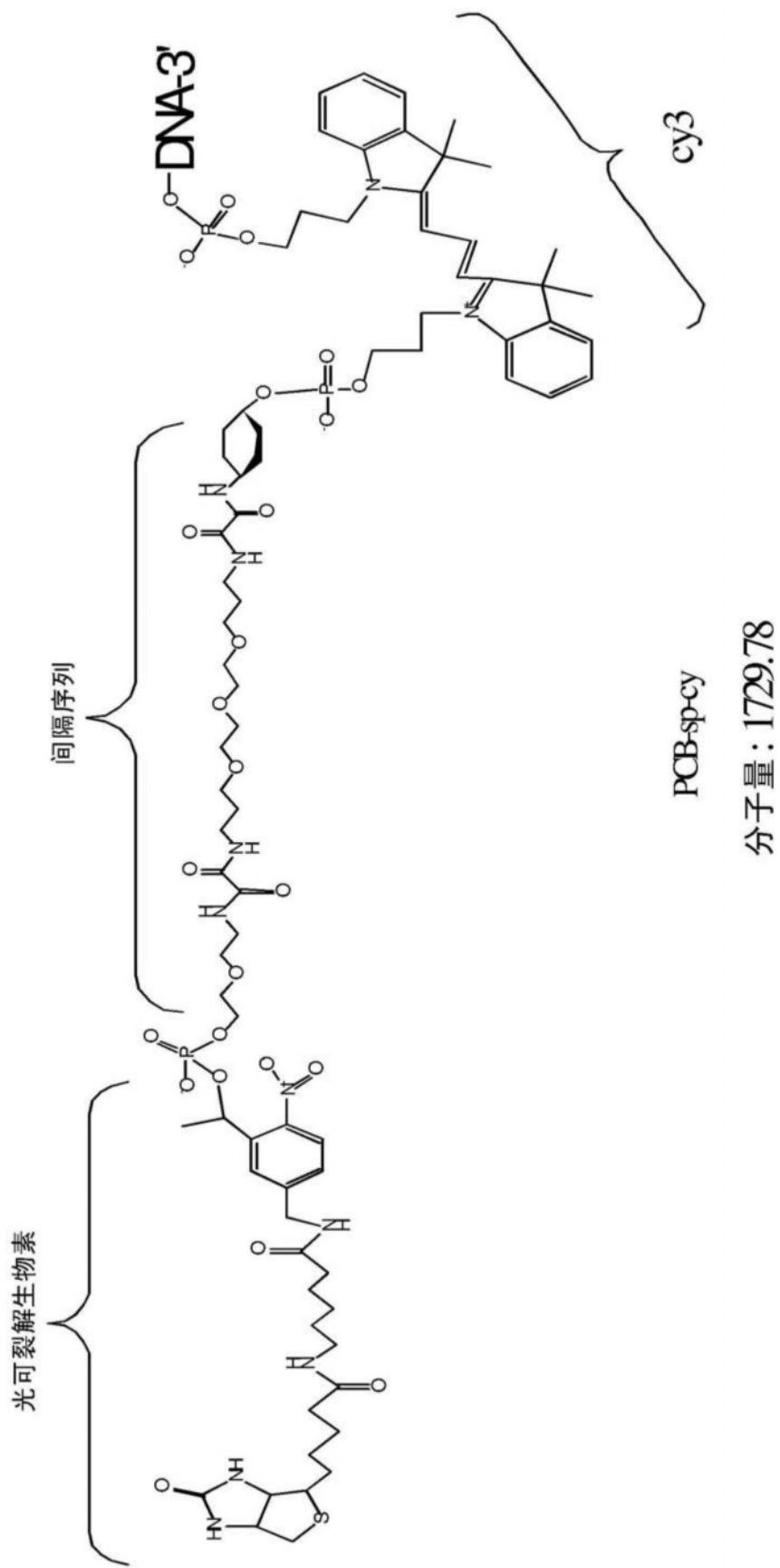


图9B

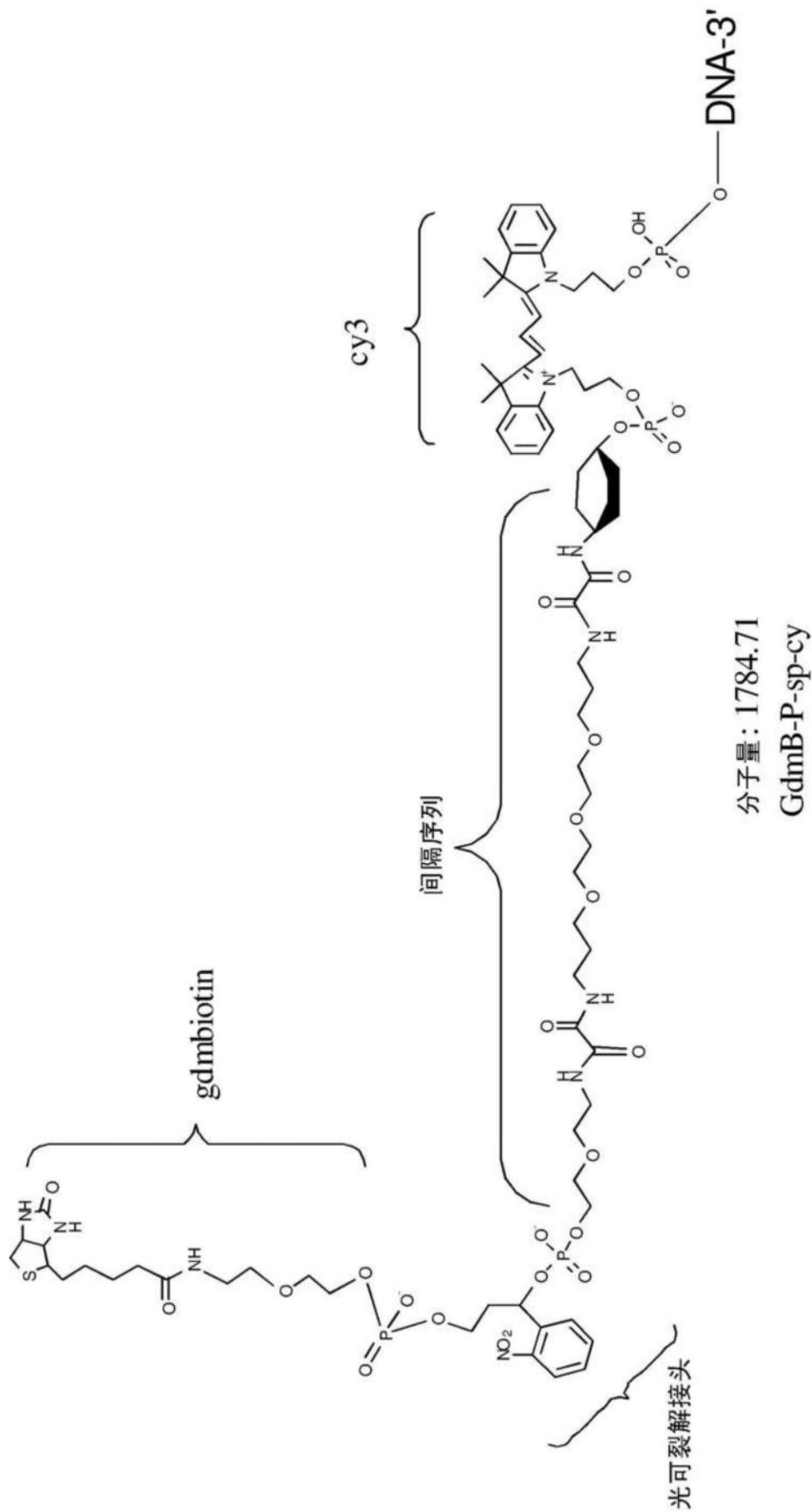


图9C

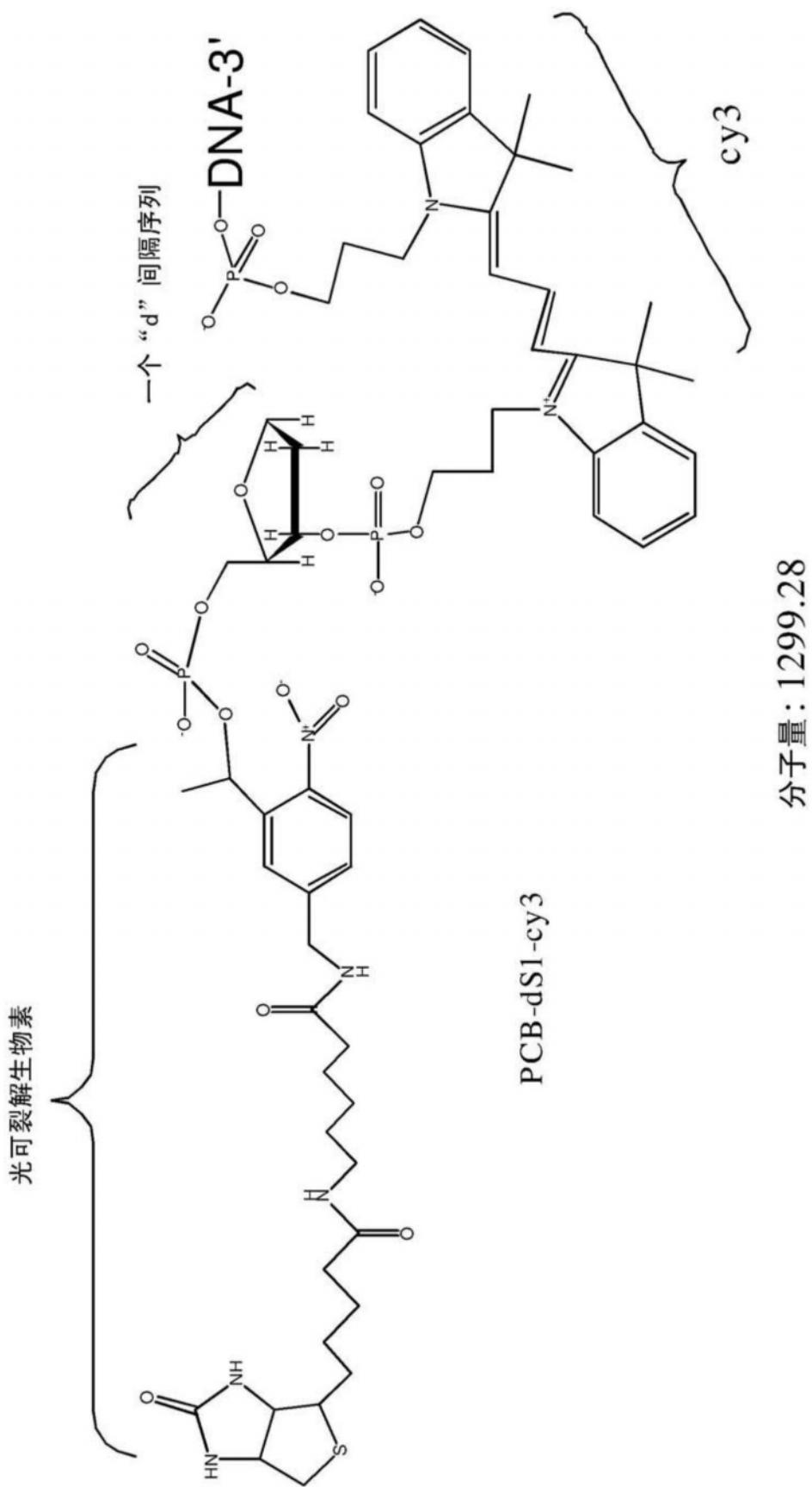


图9D

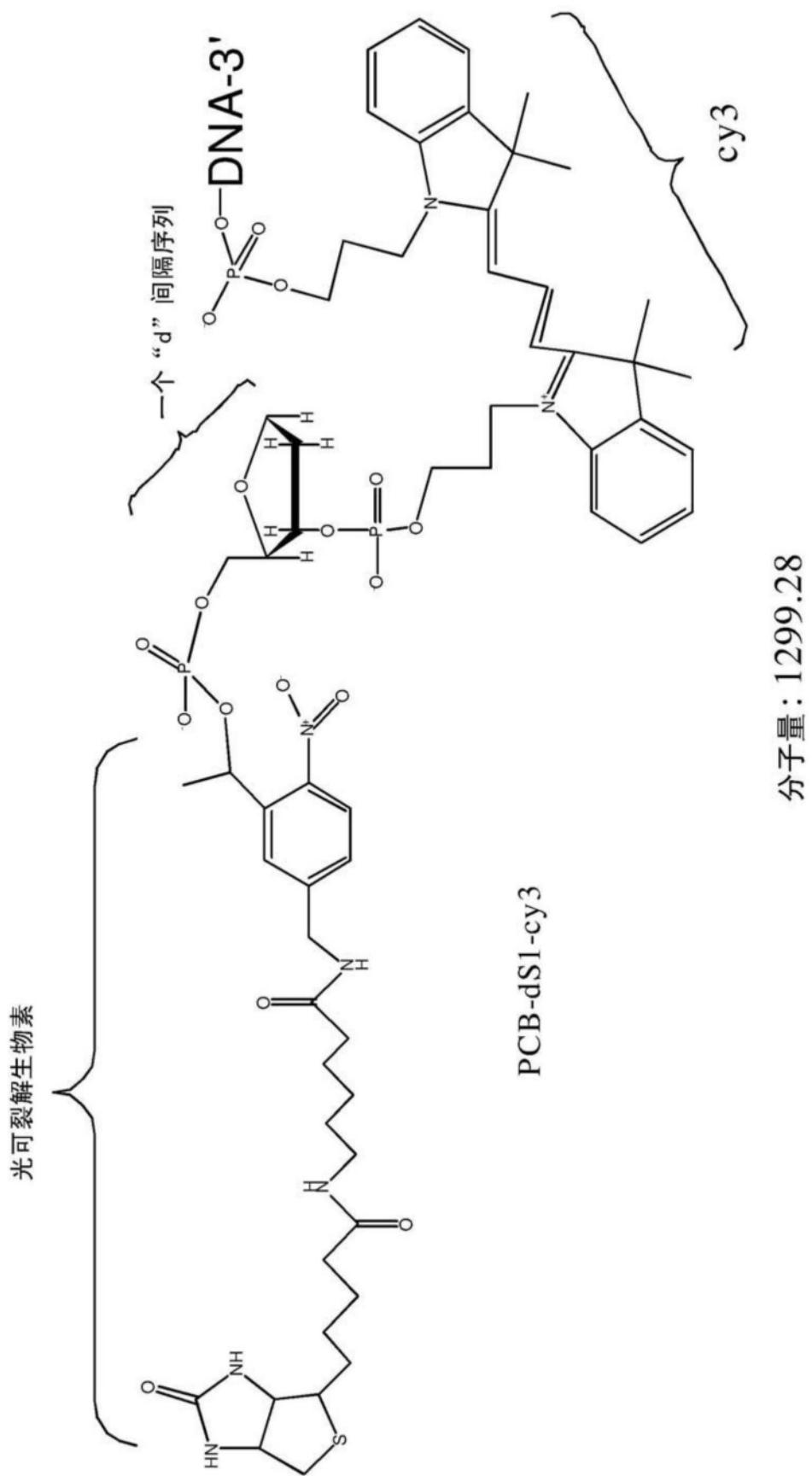


图9E

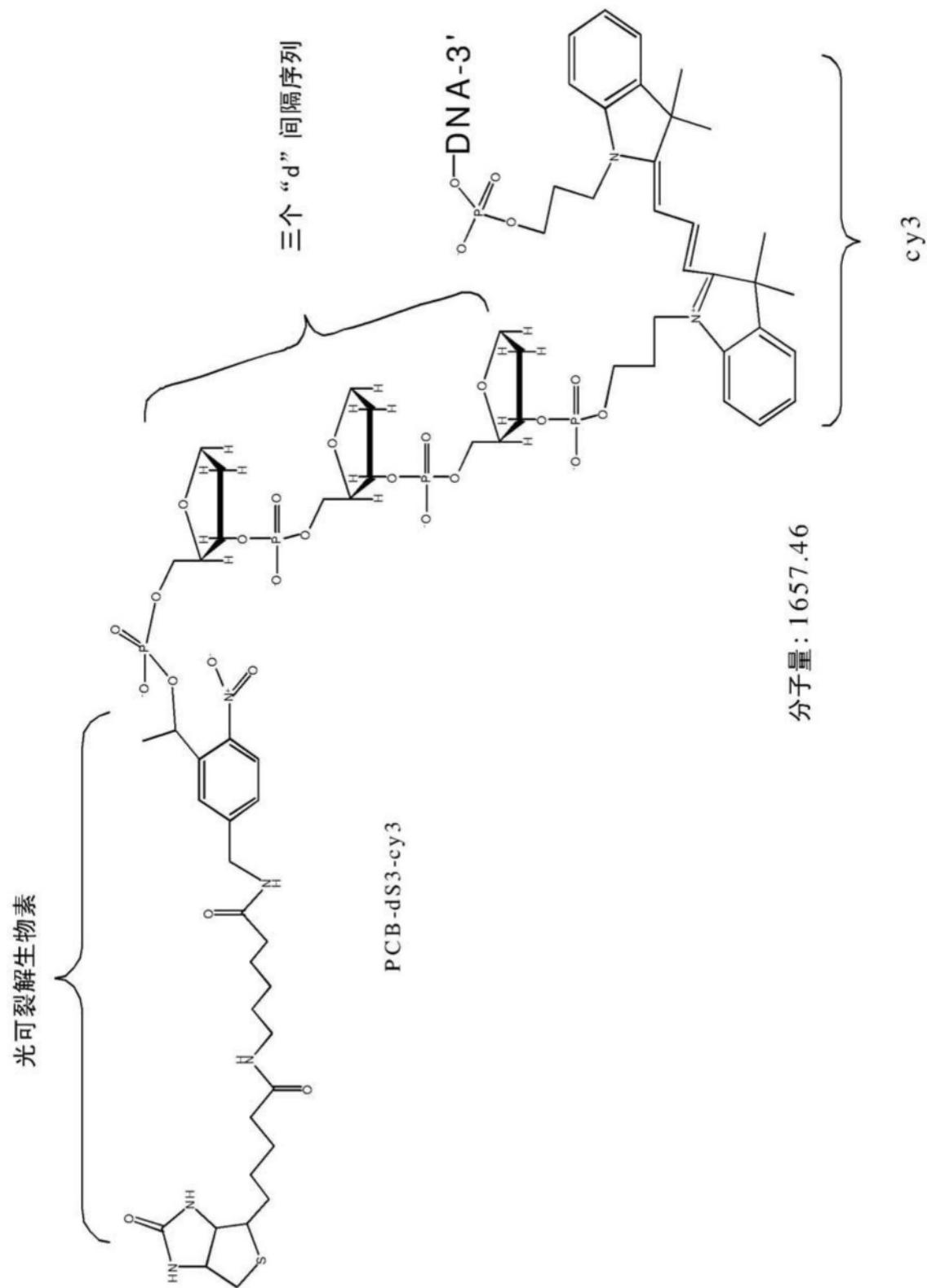


图9F

**A** 5' - CY3 – 适配体 – 3'

**B** 5' - (AB)<sub>2</sub> – (T)<sub>8</sub> – PC – 引物 – 3'

**C** 5' - ANA – PC – CY3 – 适配体 – 3'

**D** 5' - (AB)<sub>2</sub> – (T)<sub>8</sub> – 引物 – 3'

图10

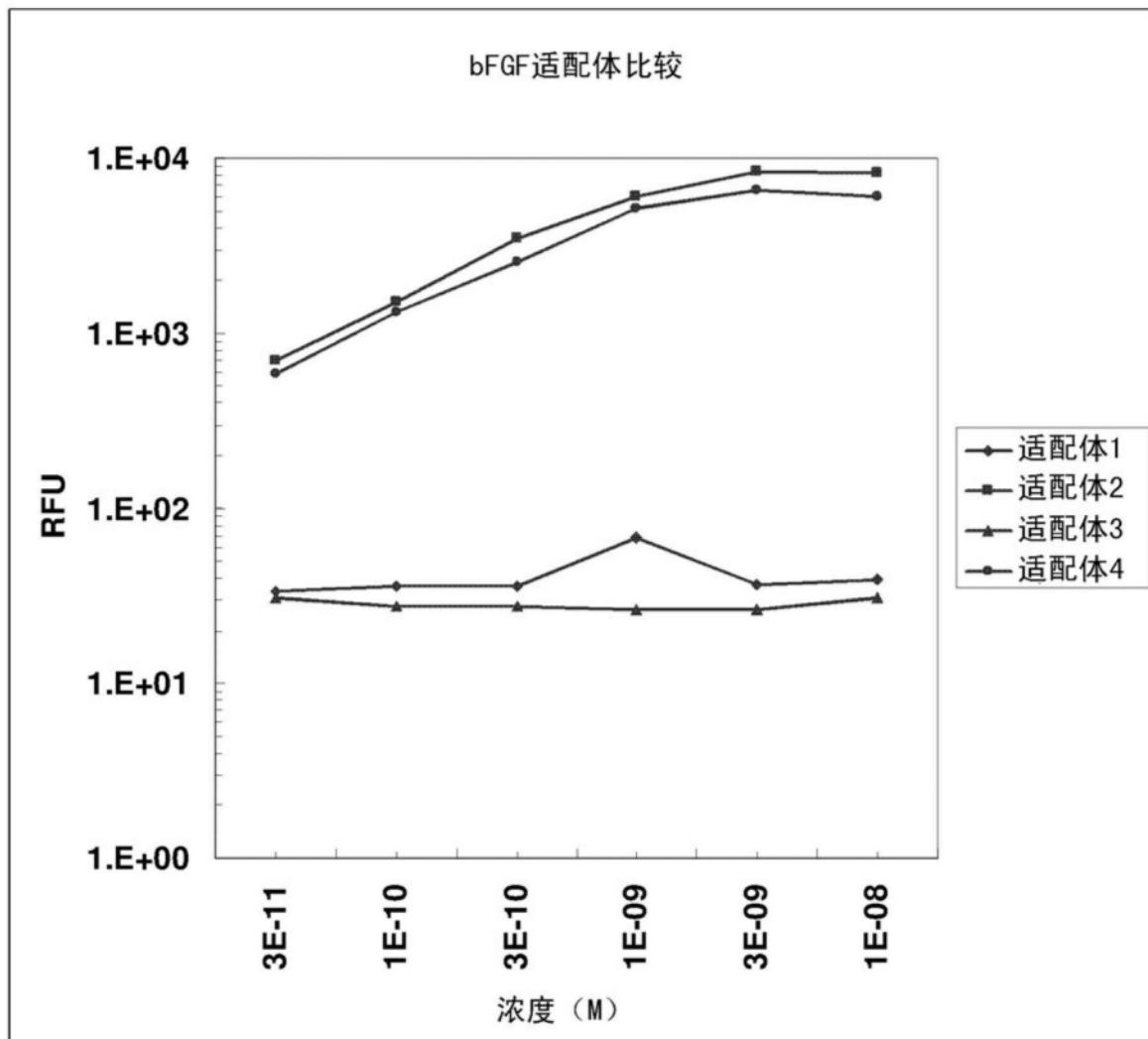


图11A

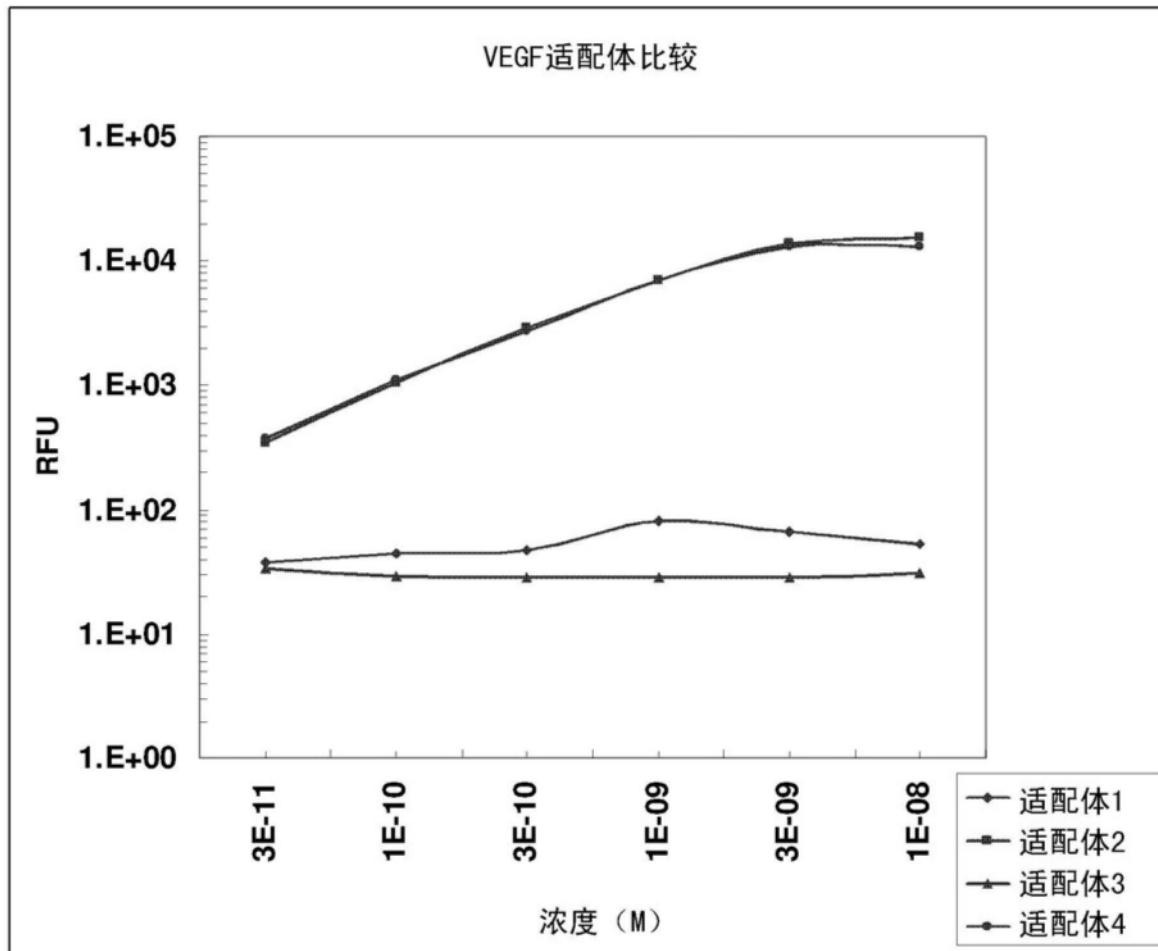


图11B

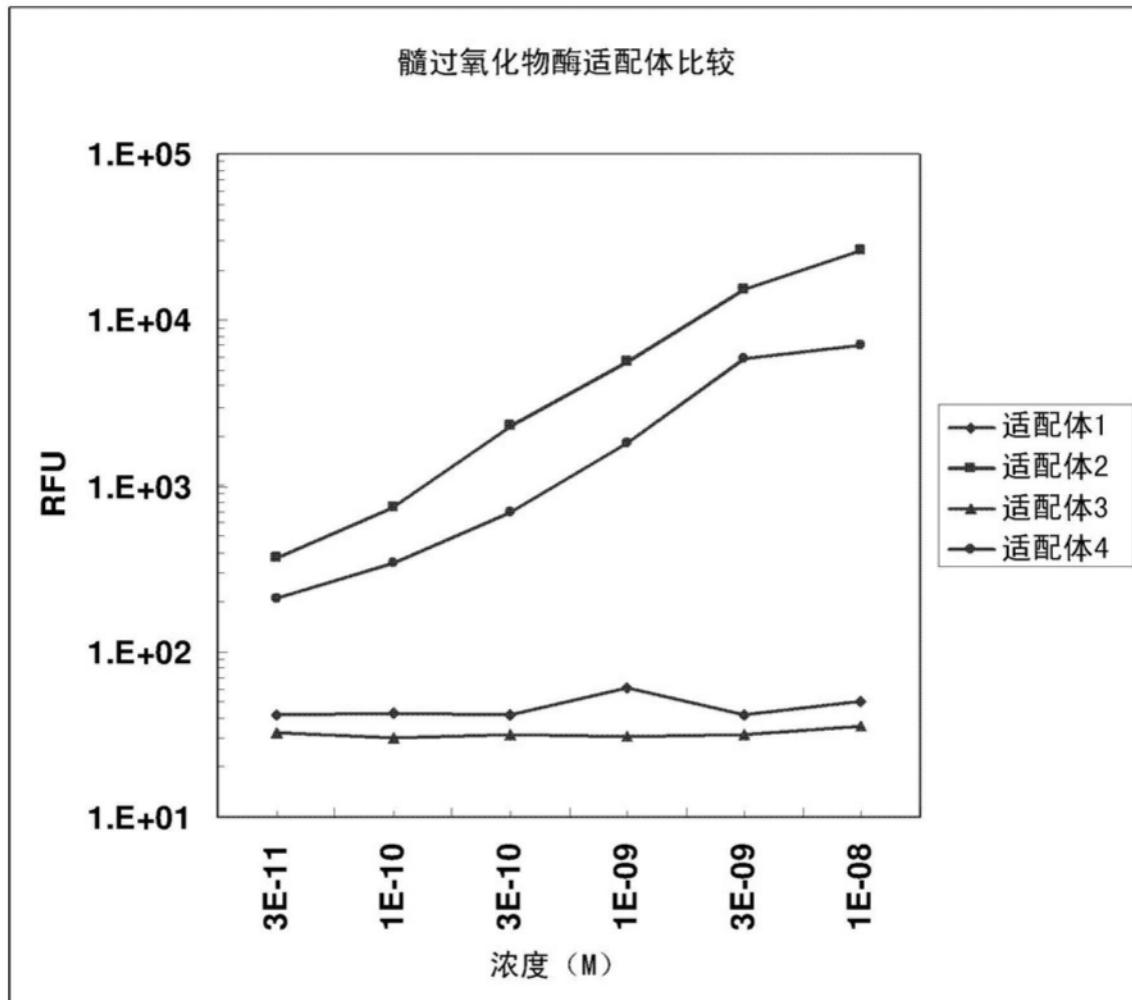


图11C

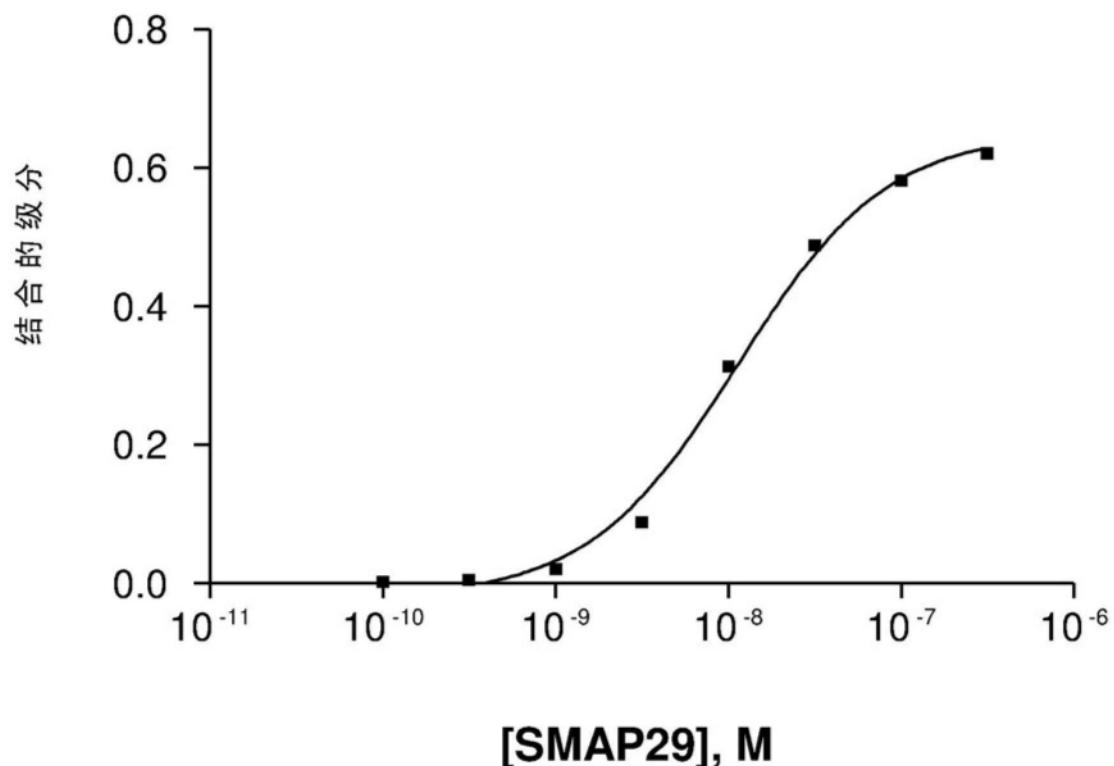


图12A

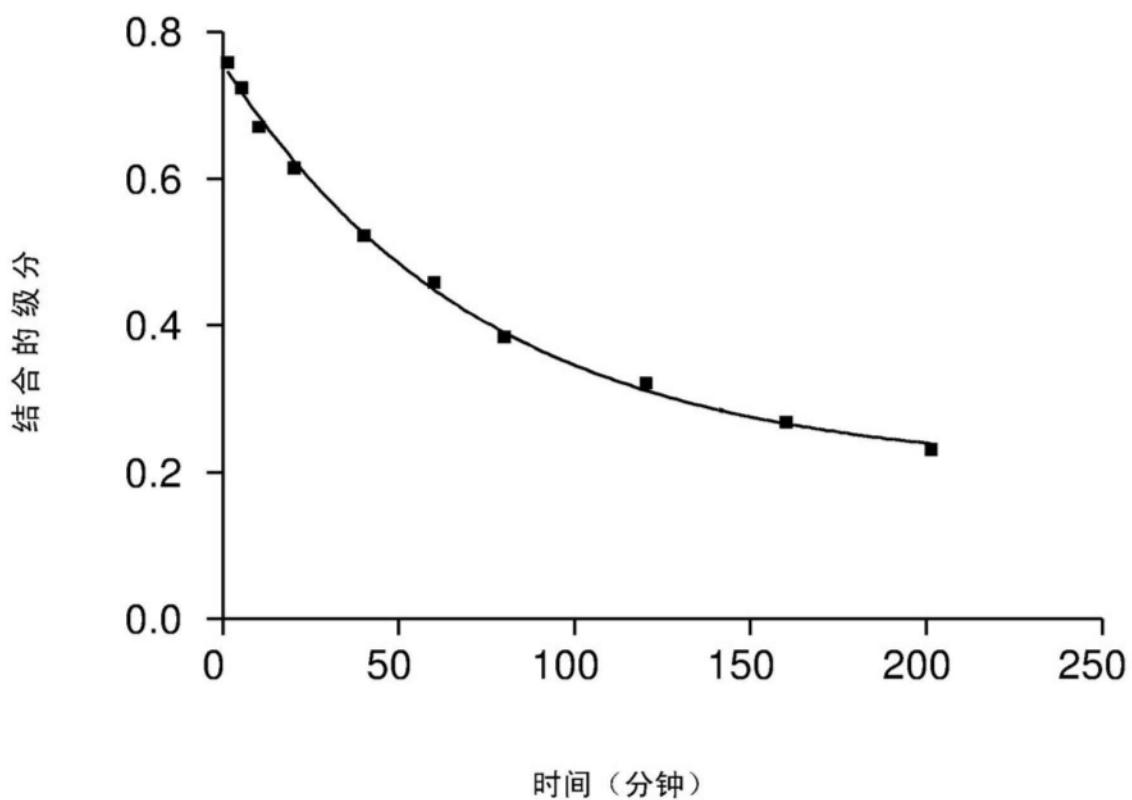


图12B

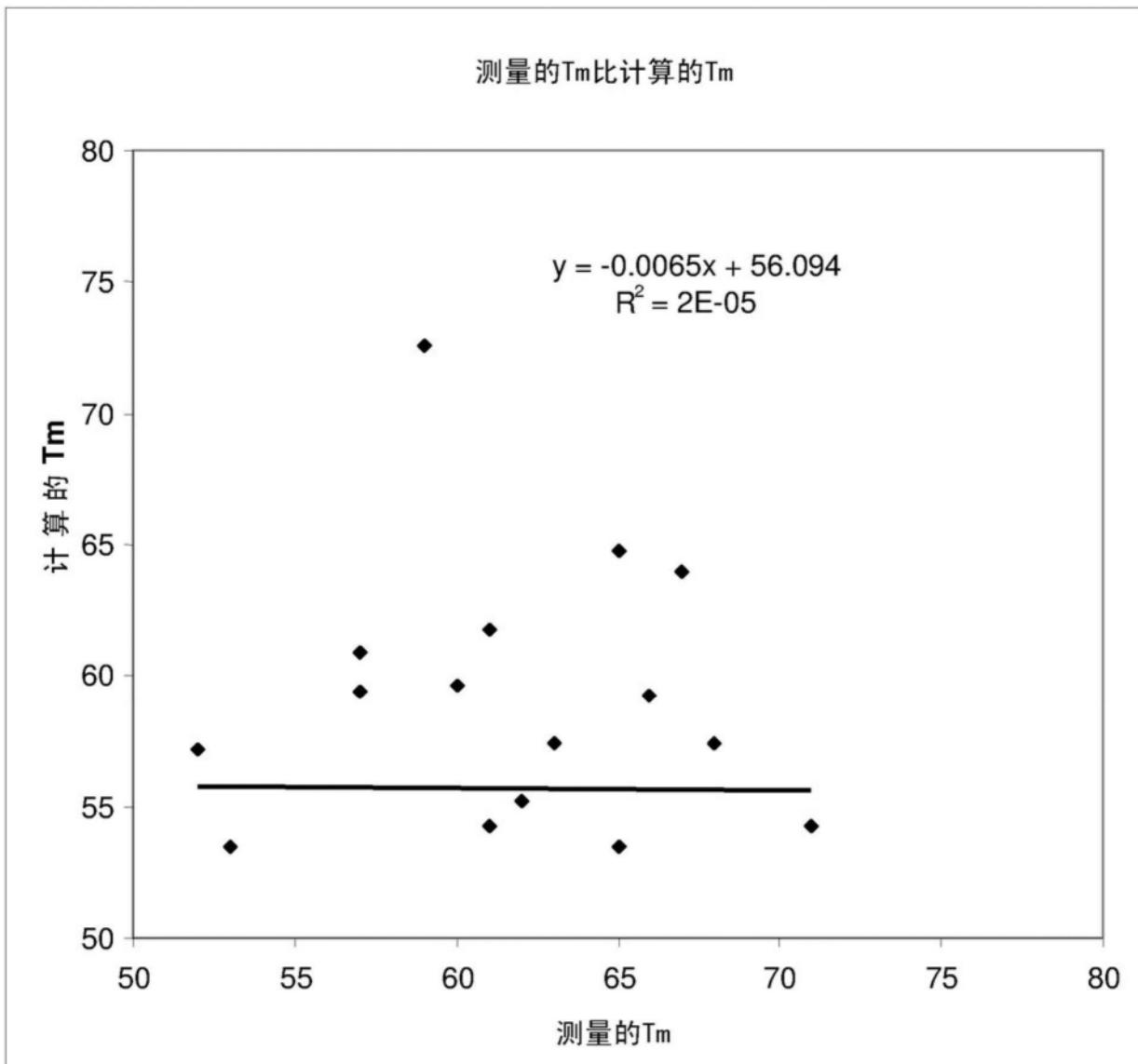
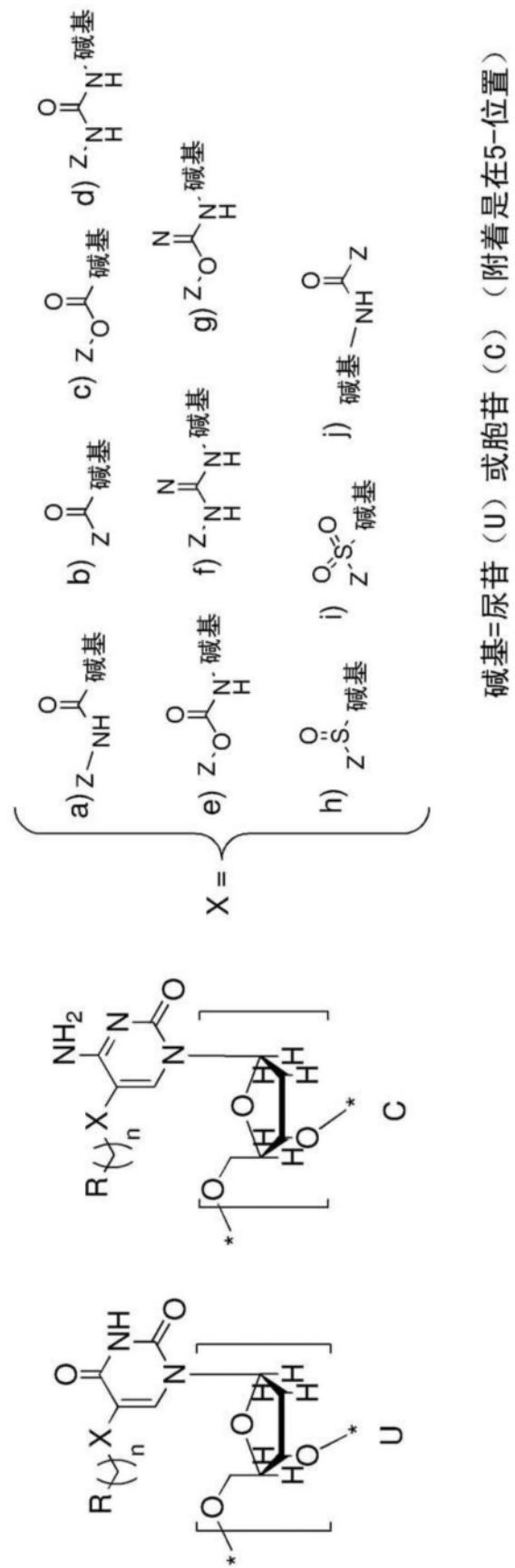


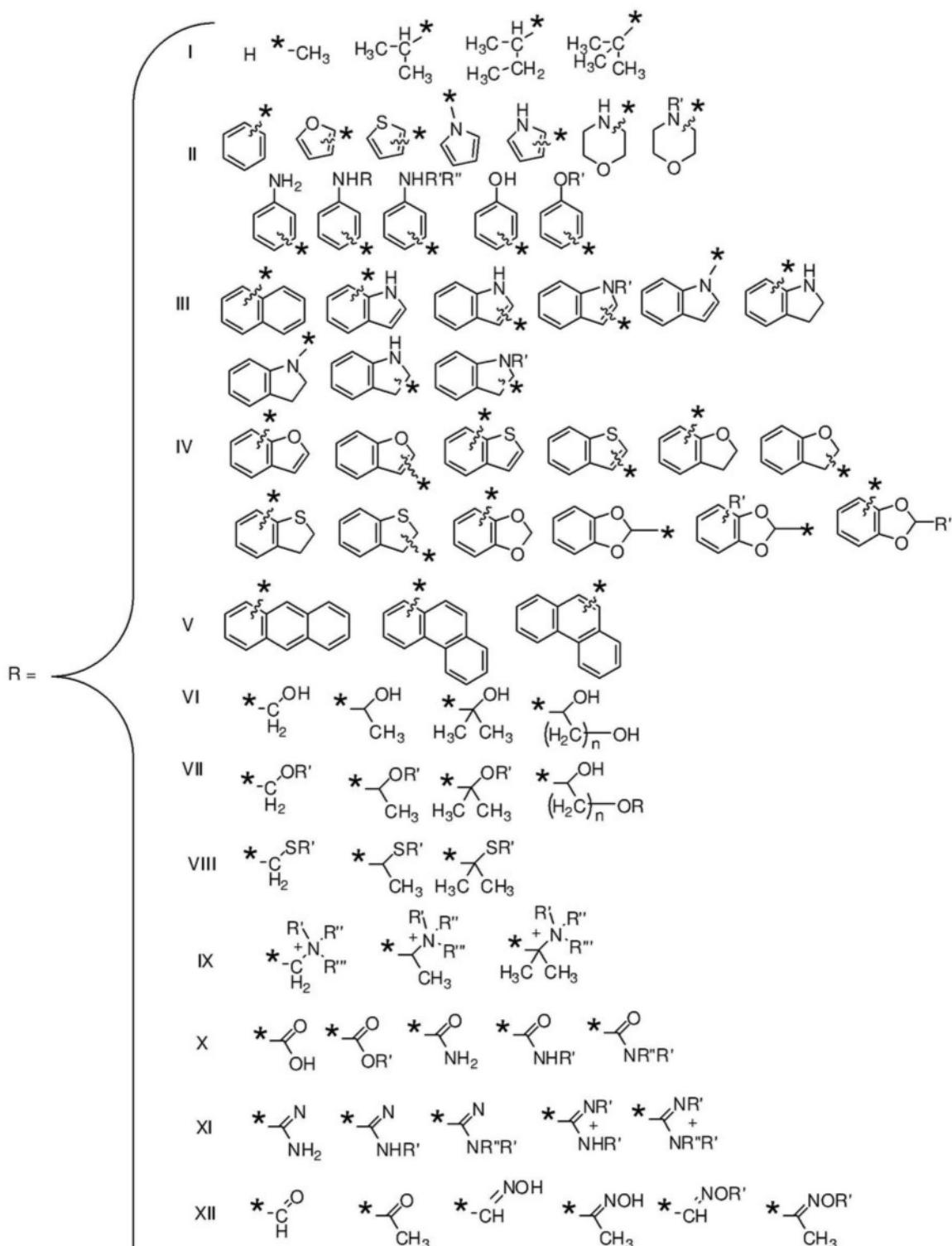
图13



碱基=尿苷（U）或胞苷（C）（附着是在5-位置）

$Z=R+(CH_2)_n$  连接基团，其中  $n=0-3$

图14



\* 表示*R*基团附着  $(\text{CH}_2)_n$  的点

图14续

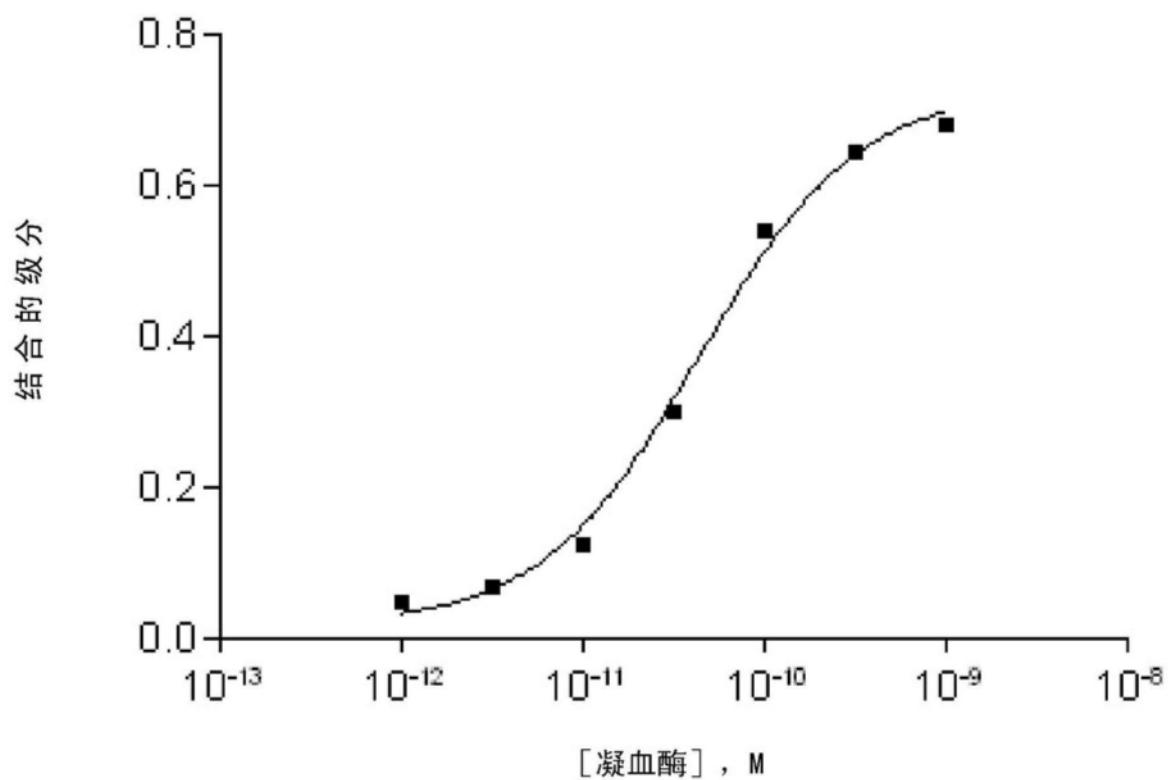


图15