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

特許第4058704号
(P4058704)

(45)発行日　平成20年3月12日(2008.3.12)　(24)登録日　平成19年12月28日(2007.12.28)

(51)Int.Cl.		F I	
C07C 205/00	(2006.01)	C07C 205/00	
C07C 205/06	(2006.01)	C07C 205/06	
C07C 205/07	(2006.01)	C07C 205/07	
C07D 235/02	(2006.01)	C07D 235/02	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	A

請求項の数 12　(全 65 頁)　最終頁に続く

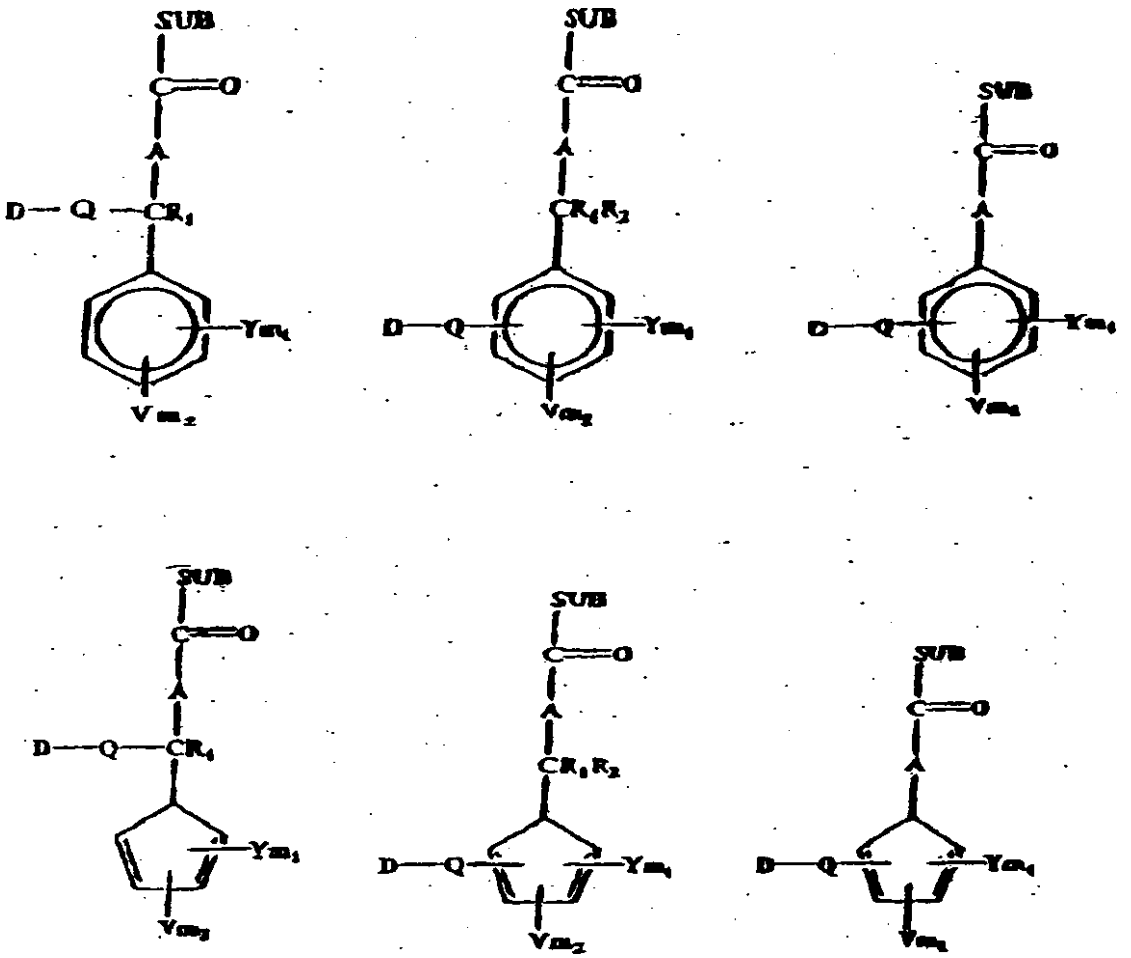
(21)出願番号	特願平7-529698
(86)(22)出願日	平成7年5月11日(1995.5.11)
(65)公表番号	特表平10-500409
(43)公表日	平成10年1月13日(1998.1.13)
(86)国際出願番号	PCT/US1995/005555
(87)国際公開番号	WO1995/031429
(87)国際公開日	平成7年11月23日(1995.11.23)
審査請求日	平成14年5月13日(2002.5.13)
(31)優先権主張番号	08/240,511
(32)優先日	平成6年5月11日(1994.5.11)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	08/345,807
(32)優先日	平成6年11月22日(1994.11.22)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
トラスティーズ、アヴ、ボースタン、ユーニヴァーサティ
アメリカ合衆国マサチューシッツ州０２２１５、ボースタン、ベイ・ステイト・ロウド　１４７番
(74)代理人
弁理士　真田　雄造
(74)代理人
弁理士　尾原　静夫
(72)発明者　ラスシルド，ケニス、ジェイ
アメリカ合衆国マサチューシッツ州０２１５９、ニュートン、ドーカ・ロウド　９７番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】生体分子の検出および単離のための光分解性の反応剤ならびにコンジュゲート

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
次の化学構造：



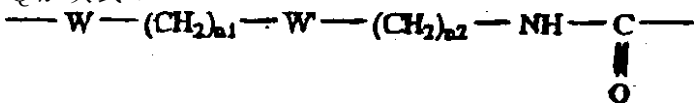
（式中、ＳＵＢは基質を含み、ヌクレオシド、ヌクレオチド、アミノ酸、ペプチド、ホスホルアミダイトおよびリポソームよりなる群から選択されるものであり；R_1およびR_2は水素、アルキル、置換アルキル、アリールおよび置換アリール、－ＣＦ$_3$、－ＮＯ$_2$、－ＣＯＯＨおよび－ＣＯＯＲよりなる群から選択され、同一または異なっていてもよく；Ａは－Ｏ－、－Ｓ－および－ＮＲ$_1$－よりなる群から選択される２価の官能基であり；Ｙｍ$_1$では、Ｙはニトロ基、スルホキシド基、アルキル基、アルコキシル基よりなる群から選択される１以上の多原子基を含み、ここで該多原子基は同一または異なっていてもよく、ｍ$_1$は１～５の整数であり、；Ｖｍ$_2$では、Ｖは塩素、フッ素、ヨウ素、臭素および水素よりなる群から選択される１以上の単原子を含み、ここで該単原子基は同一または異なっていてもよく、ｍ$_2$は１～５の整数であり；Ｑはスペーサ部を含み；そしてＤはR_1およびR_2と異なる選択的に検出可能な部分を含み、Ｄはビオチン、クマリン、ダンシル、ローダミン、フルオロセイン、ジニトロフェニルおよび抗原の各部分よりなる群から選択されるものである）よりなる群から選択される化学構造を含んでなるコンジュゲート。

【請求項２】

Ｑが分岐または非分岐炭化水素スペーサ部分を含む、請求項１記載のコンジュゲート。

【請求項３】

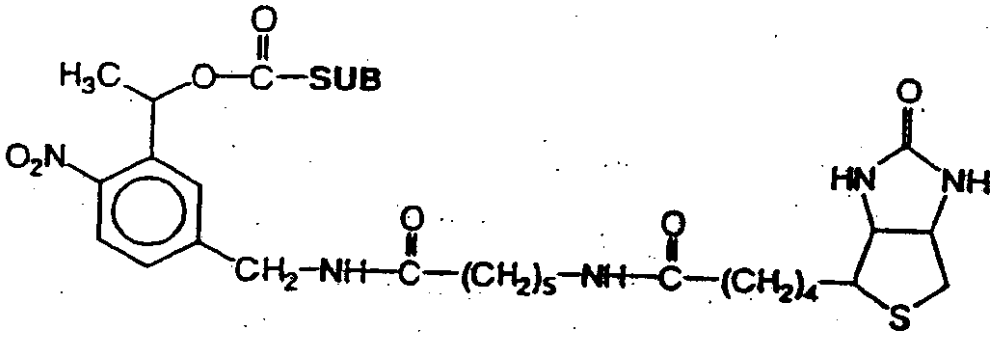
Ｑが次式：



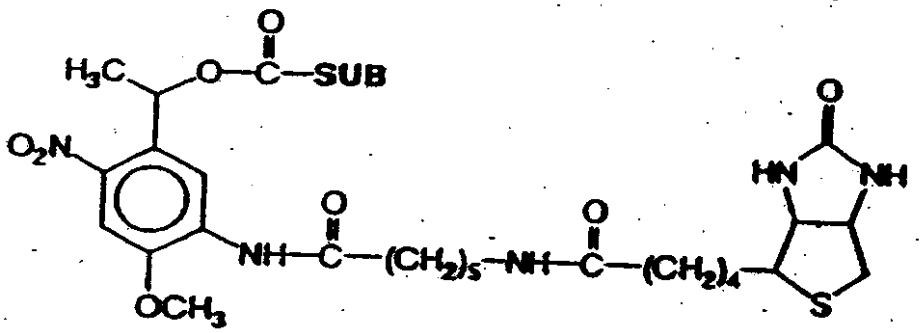
（式中、ＷおよびＷ′は－ＣＯ－、－ＣＯ－ＮＨ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－および－ＣＨ$_2$－、よりなる群からそれぞれ選択され、同一でも異なっていてもよく；ｎ１およびｎ２は、同一または異なっている０～１０の整数であり、ｎ１またはｎ２のどちらかが０である場合、ＷおよびＷ′は選択的である）

によって表される、請求項１記載のコンジュゲート。

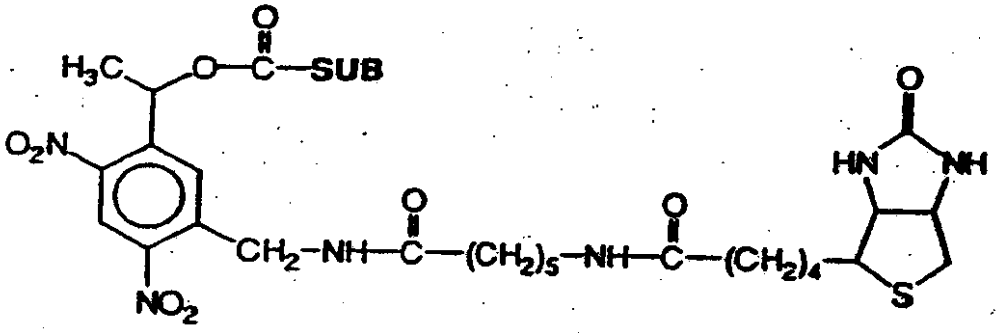
【請求項４】
次式：



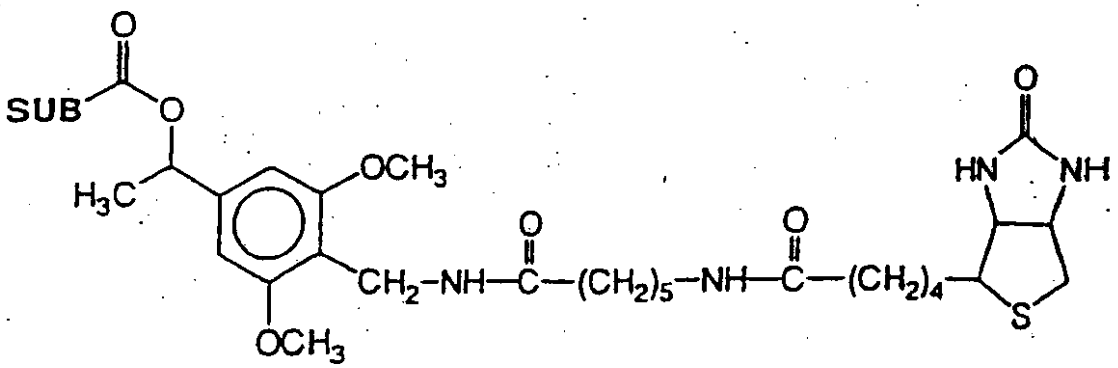
または



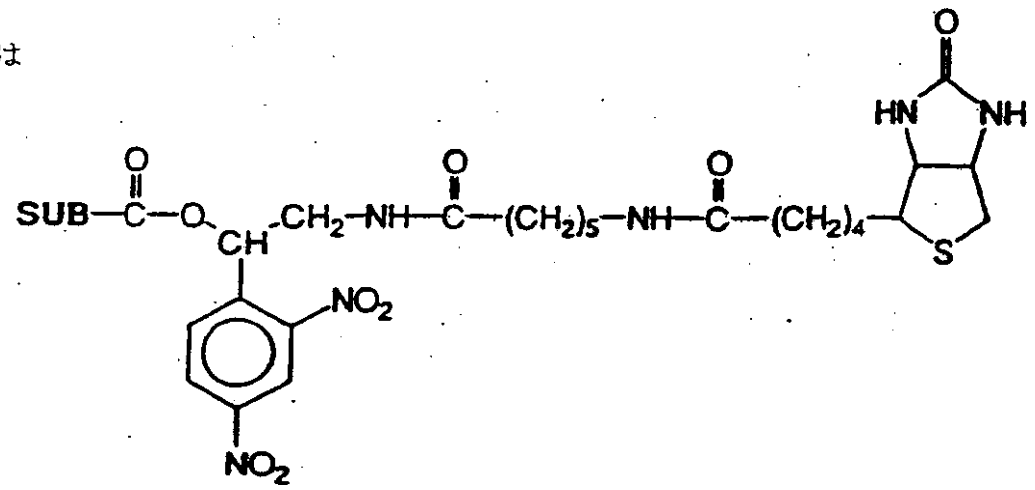
または



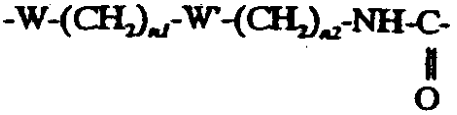
または



または



よりなる群から選択された式を有する、請求項１に記載のコンジュゲート。
【請求項５】
基質が薬剤組成物である、請求項１に記載のコンジュゲート。
【請求項６】
医薬組成物が、水、油、脂質、糖、多糖、グリセロール、コラーゲンおよびこれらの組合せよりなる群から選ばれる製剤学的に許容される担体を含んでなる請求項５に記載のコンジュゲート。
【請求項７】
ＰＣＲ産物を単離する方法であって、
ａ）電磁線により選択的に切断し得る共有結合で生物学的反応剤を１以上のオリゴヌクレオチドプライマーにコンジュゲートさせ、ここでコンジュゲートされた生物学的反応剤は請求項１に記載された化合物よりなる群から選択される化学構造を有するものであり、
ｂ）コンジュゲートされたプライマーを用いて核酸配列をＰＣＲ増幅させ、
ｃ）増幅配列を単離し、そして
ｄ）該増幅配列を電磁線で処理して生物学的反応剤を放出させる、
各工程を含んでなる方法。
【請求項８】
前記の核酸配列が、生物学的試料、バクテリアのＤＮＡおよび真核ＤＮＡにおいて見られる核酸配列よりなる群から選ばれる、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
検出可能な成分が磁性である請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
検出可能な成分が電荷である、請求項７に記載の方法。
【請求項１１】
スペーサー部分が分枝鎖または直鎖の炭化水素を含む、請求項７に記載の方法。
【請求項１２】
Ｑが次式：



〔式中、WおよびW’はそれぞれが-C（O）-、-C（O）-NH-、-HN-C（O）-、-NH-、-O-、-S-および-CH2-よりなる群から選ばれ、同一であっても異なっていてもよく；そしてn1またはn2がゼロであるとき、WおよびW’は任意である〕
で表される、請求項７に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
関連出願
この特許出願は、1994年５月11日付けの米国特許出願第08/240,511号の一部継続出願であ

る。

本発明の権利

本発明は、米国立保健研究所により授与された認可番号 EM4727-03、および陸軍調査局により授与された認可番号 DAAL03-92-G-0172のもとで、米国政府の支援により行われたものであり、米国政府は本発明に対して一定の権利を有する。

発明の背景

１．発明の分野

本発明は、異種混合物からの標的の検出および単離に用いられる反応剤およびコンジュゲート（結合体）に関する。反応剤は光反応性成分に結合された検出可能な成分を含むものである。コンジュゲートは１以上の共有結合で基質に結合された反応剤を含むものである。これらの結合は電磁線にさらすことにより容易にかつ選択的に切断または光分解され得る。反応剤に結合され得る基質としては、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、ヌクレオチド、ＰＣＲ反応用の核酸プライマー、脂質などがある。本発明はまた、細胞、核酸、タンパク質などの標的を検出および単離するための迅速で効率のよい方法、ならびにこれらの成分を含むキットに関する。

２．背景の説明

分子生物学、化学および医学の分野で飛躍的な進歩をとげた基本的な科学技術は、共通して、ある種の特徴を有する。これらの特徴のうちの二つは、複雑な混合物からの個々の成分の特異的検出および単離である。例えば、電気泳動とクロマトグラフィーは、生物学的試料から巨大分子を検出または単離するために、それぞれ広く利用されている手法である。こうした手法は、巨大分子の特性付けおよび同定を行うにあたって、単離すべき成分の特異なまたは同定可能な分子特性（例えば、電荷、疎水性、分子量）を利用するものである。この単離法しだいでは、単離された巨大分子を下流プロセスにおいて生成物として利用することができる。

さらに有用な検出・単離法のいくつかは、対象となる元素、基質、または基質に容易に結合され得る分子の物理的性質を利用している。かかる性質のうち、最も広範に利用されているものの一つが放射能であり、放射性核種を用いる放射性標識である。たいていの物質は自然界では放射性でなく、放射性核種と呼ばれる放射性原子で標識でき、そして標準的な公知の放射線撮影技術を使って検出し得る。放射性元素は、それらが崩壊するとき、α、βまたはγ線の形のエネルギーを大量に発生するので検出可能である。一般的に放射能は標識として有用である。というのは、標識される物質の物理的状態または化学的組合せによってその標識が影響されないからである。その上、発生した特定の放射線をその放射線（例えば、α、βまたはγ）の性質、エネルギーおよび半減期により同定可能である。複雑な混合物中の標的は発生した放射線のプロフィールから同定し得る。さらに、放射性標識された物質は化学的経路または生物学的系において放射線撮影法により追跡することが可能である。

残念ながら、放射能はヒトの健康と環境のどちらにも有害である。各研究者に提供しなければならない防護用具は相当なものである。特殊な実験室手順、専門的設備および装置、詳細な記録の保管、そして実験室全員の特殊な訓練がすべて安全な放射性核種の使用にとって必要となる。また、放射性試薬の製造には相当の費用がかかり、その安全な廃棄処分も同様であって、放射性薬剤を扱う全ての実験のコストを引き上げる。さらに、現行のガイドラインのもとでは、放射能の全使用者は特定の管理を必要とし、膨大な量の記録の保管を要求することになる連邦政府の法規を厳格にかつ注意深く固守しなければならない。放射性標識法はまた、その後に利用できる形で生成物を単離する手段を常に提供するわけではない。放射能の存在は実験室および動物における更なる生物化学的または生物物理的な方法の有用性を危うくするものである。これは、放射性アミノ酸で生合成的に標識されたり、他の放射性マーカーでタグ付けされたタンパク質のin vitroまたはin vivo発現の場合に明らかである。放射能の害または少なくとも潜在的な害は、そのタンパク質により得られるであろう利益を越えるものである。

放射性廃棄物の処分についても、公衆への危険の可能性と放射性廃棄物の処分場の不足の

両面から、次第に関心が高まってきている。さらに、放射性標識法の使用は時間がかかり、いくつかの場合には放射性標識の検出に数日間もの日数を要する。このような実験に長時間を要することは重大な考慮事項であり、研究の効率を大いに妨げる。より迅速な放射能検出法も利用可能であるが、それらは高価で、しばしば複雑な画像増強装置を必要とする。

化学物質および化学成分中には、物質の検出および単離に利用できる他の検出可能な物理的性質が数多く存在し得る。こうした物理的性質の一つに蛍光およびリン光の現象を含むルミネセンス（発光）の性質がある。蛍光物質は、光の吸収のために一層高い電子状態に励起された分子の崩壊によって発光する。リン光分子はかなり長時間にわたって発光することができる。発生した放射エネルギーの特定波長の検出が、その発光物質と関連のある標的の検出を可能にするのである。

生物発光は多くの異なるタイプの化合物を標識するための方法として急速に使用されてきている。基本的には、還元型の基質が酸素と反応して、高揚または励起された電子状態の酸化型生成物に変換される。励起分子は基底状態へと崩壊し、この過程で光子を発生する。このプロセスは細菌や真菌のいくつかの株、海綿のような海洋無脊椎動物、およびエビやクラゲにおいて起こることがわかっている。光を発する細菌はしばしば特殊な発光器内で魚と共生生活を営んでいる。多種多様の陸上生物、例えばミミズ、ヤスデ、昆虫なども生物発光特性を有している。

発光と同時に酸化を受ける化合物の一群はルシフェリンと呼ばれているが、それらの個々の構造はさまざまである。酸化型の生成物はオキシルシフェリンと呼ばれ、また、このプロセスを触媒する酵素はルシフェラーゼと呼ばれる。全プロセスは吸熱的で、生じる光子につき１～２分子のアデノシン三リン酸（ＡＴＰ）中に蓄えられた化学エネルギーを必要とする。分子生物学の分野で広く用いられているルシフェラーゼ系の２つのタイプは細菌系（Vibrio harveyiまたはV.fischeri）とホタル系（Photinus pyralis）である。

基質に検出可能な性質を付与する他の標識としては、特異な吸収スペクトル、電子スピン共鳴スペクトル、光学活性、ラマンスペクトルまたは共鳴ラマンスペクトルを有する化学物質がある。この種の標識は医学、分子生物学および化学を含めて多くの分野で使用されている。例えば、分子の可視または赤外吸収スペクトルはしばしば、複雑な混合物の存在下でさえも該分子の同定を可能とする特徴のあるフィンガープリントを構成する。可視吸収の場合には、分子がその励起電子状態（基底状態からの遷移のエネルギーは1.5～３eVの範囲である）の存在ゆえに特定の波長範囲にわたる放射エネルギーを吸収する。赤外吸収の場合には、分子の振動モードの励起ゆえにバンドが検出される。これらのバンドの振動数はジスルフィド結合、カルボニル基、芳香族基などの特徴的な分子基の有無についての情報を提供する。

分子の分光特性の他の適用例としては、核磁気共鳴（ＮＭＲ）分光分析が混合物中の特定分子の同定に使用されてきた。正味の磁気モーメントを有する、水素原子のプロトンのような原子核は、磁場に置かれるとその磁場と整合して、粒子のそれぞれの性質に依存する周波数（Lamar周波数）でもって磁場のまわりで歳差運動をするだろう。ＮＭＲスペクトルを測定するためには、プロトンの試料を強磁場内に入れ、主磁場に対して90°の角度でラジオ周波数の範囲を照射する。この処置は試料中の全プロトンにそれらの特徴的な周波数のエネルギーを吸収させて、それら磁気方向をもとの状態に対して90°向きを変えさせる。加えた磁場を切った後には、分子は徐々に緩和して主磁場のまわりで歳差運動をする。試料を取り巻くレシーバーコイルがＮＭＲシグナルを構成する一組の振動電流として歳差運動スピンの周波数を検知する。

これらの方法はどれも同様の欠点を抱えている。たいていの標的は、放射能や蛍光といった固有の検出可能な性質を持ち合わせていない。そこで、それ自体検出可能で、それゆえ標的を検出可能にする標識を結合させる必要がある。しかしながら、一部の標識法は永久に損なわれた標識産物をもたらす。例えば、蛍光物質は細胞にとって極めて有毒であり得る。蛍光物質に長期間さらすことは高度の細胞死につながる。往々にして、標識用の化合物は標的の構造や活性に有害作用を及ぼし得る。タンパク質の構造は検出可能な化学成分

の結合により悪影響を受けることが多い。核酸の標識付けはポリメラーゼによって転写、翻訳される能力やＤＮＡ結合タンパク質と相互作用する能力を妨げることがある。ほとんどの場合、化学成分は除去されねばならない。さらに、検出可能な物理的性質を有するこれら化学成分の除去方法は、しばしば分子の改変または細胞死を直接引き起こす。

標的基質を選択的に検出して単離するために使用されてきた方法は、複雑なものも単純なものも、多数存在している。核酸の検出および同定に大変革をもたらして、それを大いに加速した一つの方法はポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）法である。ＰＣＲの本質的概念は、生物学的試料中のユニークな核酸配列またはユニークでない核酸配列さえも迅速かつ大規模に増幅させることである。特定のまたは無作為の配列を有する標識プライマーを用いて、ごく少量の核酸の遺伝子コードを検出し、数の上で増幅し、その後反復重合法により特徴付けすることができる。形成された核酸は新しいが、もとの試料の配列を維持しており、容易にその配列を決定し得る。核酸配列は事実上全てのタンパク質の構築のための生物学的暗号であるから、あらゆる生物または試料の起源、進化年代、構造および組成をその配列情報から決定し得る。この方法は分子および進化生物学の分野で有用であることが判明し、ヒトの病気や障害の検査、治療および予防への応用が実証された。

ＰＣＲ技術は、革命的であったけれども、多くの慣用の検出・単離法と同様の限界を有する。プライマーに組み込まれ、最終的には新たに形成された核酸に組み込まれた標識は除去されねばならない。この方法は、可能なときは、非常に時間がかかり、しばしば、その結果は核酸の修飾または破壊となる。

物質を特異的に検出可能にする方法の他の例は、抗原と抗原特異的抗体との結合において起こるような、選ばれた他の分子に対して特定の親和性を有する結合性分子を用いることである。これらの化学対は、ときにカップリング剤とも呼ばれているが、検出・単離法において広く用いられてきた。通常、この対の一方の分子が、クロマトグラフ充填材料や磁性ビーズにおいて用いられるようなアフィニティ媒体上に固定化されて、標的分子の単離に用いられる。さらに有用なカップリング剤のいくつかはビオチンとアビジンまたは関連タンパク質のストレプトアビジンである。これらの物質は複雑な混合物からの一成分または他成分の単離を容易にするために多くの分離技術で用いられている。

水溶性ビタミンであるビオチンは、巨大分子の検出、精製および単離を含むさまざまな目的で生化学および分子生物学の分野において、さらに細胞化学的染色の分野で広範に使用されている。また、ビオチンは、臨床診断アッセイ、腫瘍イメージングおよび薬剤デリバリーの領域の医学分野にも重要な用途を有し、さらには、細胞、細胞下構造およびタンパク質の選択的標識付けのアフィニティ細胞化学の分野でも常用されている。

ビオチンの有用性は、卵白またはトリ、爬虫類、両生類の組織に存在する四量体タンパク質のアビジンに、あるいはストレプトマイセス（Streptomyces）菌から単離された、アビジンと化学的に密接な関係があるストレプトアビジンに強く結合するその能力によるものである。一般的には、最初に、ビオチンまたはビオチンの誘導体を、タンパク質やオリゴヌクレオチドのような標的分子に直接、または特定の化学結合を用いてプローブに結合させる。次いで、磁性またはセファロースビーズのようなアフィニティ媒体に結合させたストレプトアビジンまたはアビジンと上記の結合ビオチンとの相互作用により標的分子を単離する。また、標的分子を検出するにあたって、共有結合ビオチンと、標的分子の検出に用いられる色素形成反応を触媒する西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）のような酵素に結合させたアビジンまたはストレプトアビジンとの相互作用も利用される。これまでにビオチン－アビジン技術により単離された巨大分子を表１および２に示してある。

表１　直接ビオチン化により単離された巨大分子

ビオチン化標的	溶出条件	文献
膜タンパク質および糖タンパク質	アセテート、pH 4	1，2
抗体	低pH	3
酵素	非生理的条件	4
ｔＲＮＡ	6Mグアニジン-HCl pH 2.5	5
ｒＲＮＡ	70% ギ酸	6
ヌクレオソーム	切断可能ビオチンのＳＳ還元	7，8
ＤＮＡ	非生理的条件	9

1. G.A. Orr, J. Biol. Chem. 256:761, 1981
2. C.A. Beardら, Mol. Biochem. Parasitol. 16:199, 1985
3. E.A. Bayerら, FEBS Lett. 68:240, 1976
4. C.S. Chandler ら, Biochem. J. 237:123, 1986
5. T.R. Broker ら, Nucl. Acids Res. 5:363, 1978
6. D.J. Eckermannら, Eur. J. Biochem. 82:225, 1978
7. M.L. Shimkusら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2593, 1986
8. M.L. Shimkusら, DNA 5:247, 1986
9. P.L. Langer ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6633, 1981

表２　ビオチン化結合分子を用いて単離された生物学的物質

標的分子	結合分子	溶出条件	文献
糖タンパク質	コンカナバリン A	2% SDS	10
膜抗原	抗体	SDS(沸騰)	11
エストロゲン受容体	エストラジアセテート	エストラジオール	12
インスリン 受容体	インスリン	アセテート, pH5.0 ビオチン	13, 14
オピオイド 受容体	エンケファリン	エンケファリン	15
ヒト Bリンパ球	抗原	FACSによる選別	16
リンパ 球サブ集団	モノクローナル 抗体	機械的攪拌、 赤血球溶解	17, 18, 19
プラスミド DNA	DNA	0.1M NaOH	20
スプライセオソーム	RNA	SDS 中90℃	21
組換えプラスミド	DNA	切断可能ビオチン 加熱、低イオン 強度 およびフェノール	22

10. J.W. Buckie ら, Anal. Biochem. 156:463, 1986
11. T.V. Updyke ら, J. Immunol. Methods 73:83, 1984
12. G. Redeulih ら, J. Biol. Chem. 260:3996, 1985
13. F.M. Finn ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7328, 1984
14. R.A. Kohanski ら, J. Biol. Chem. 260:5014, 1985
15. H. Nakayama ら, FEBS Lett. 208:278, 1986
16. P. Casali ら, Sci. 234:476, 1986
17. J. Wormmeesterら, J. Immunol. Methods 67:389, 1984
18. P.J. Lucasら, J. Immunol. Methods 99:123, 1987
19. R.J. Berenson ら, J. Immunol. Methods 91:11, 1986
20. H. Delius ら, Nucl. Acids Res. 13:5457, 1985
21. P.J. Grabowskiら, Sci. 233:1294, 1986
22. B. Riggsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9591, 1986

ビオチンの有用性は高まる一方であるが、ビオチンーストレプトアビジン技術を多くの用

途において使用するには依然として重大な難点がある。この難点は、ビオチンとストレプトアビジンとの高い親和性、正確にはそれを最も有用にしている分子特性、から生じる。ひとたび標的分子または細胞がストレプトアビジン－ビオチン相互作用により単離されると、標的分子を放出させるのにこの相互作用の破壊が必要となる。ビオチンをストレプトアビジンから解離させるには相当に過酷な条件、例えば６～８モル（Ｍ）グアニジニウム－ＨＣｌ，pH1.5が必要である。こうした条件はほとんどのタンパク質を変性させ、その結果不活性化し、かつ大部分の細胞を破壊する。

例えば、ビオチンをアミド結合を介してタンパク質および核酸に結合させるためには、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基を含むビオチン誘導体が一般に用いられる。この結合の選択的切断は結合した分子中に存在する同様の天然化学結合を破壊する。また、特有の細胞表面抗原に対するビオチン化抗体と結合させることにより、異種細胞混合物から特定細胞を単離する際にもビオチンがしばしば用いられる。続いて、標的細胞を単離するために、ビオチン化抗体と、ストレプトアビジンを被覆した磁性ビーズまたはセファロース粒子との相互作用が効率よく用いられる。抗体－抗原相互作用の破壊には、通常、細胞の生存にとって有害な低ｐＨや機械的攪拌といった条件に細胞をさらす必要がある。一般的に、完全に未変化のままの形態で標的を回収することは不可能である。

いったんビオチン化ＤＮＡがストレプトアビジンに結合すると、それを放出させることは極端な困難を伴ってのみ可能である。ストレプトアビジン分子を分離するための各種方法が、プロテイナーゼＫによる消化（M. Wilchek and E.A.Bayer, Anal. Biochem. 171:1, 1988）を含めて、多数提案されている。プロテイナーゼＫは隣接タンパク質をも消化するので、ストレプトアビジンの完全消化という仕事を完全に果たすわけではない。相当量のストレプトアビジン分子が結合されたまま残り、さらに、ストレプトアビジンが分離されてもビオチンは放出されない。その上、ビオチン化ＤＮＡは、細胞の形質転換および遺伝病の検査のためのハイブリダイゼーションに基づくアッセイを含めた、各種方法におけるその後の使用を妨げる。

ビオチンとストレプトアビジンの本質的に不可逆的な結合はまた、単一の試料中に存在する生体分子、巨大分子複合体、ウイルスまたは細胞の特定のタイプを検出する多数回または連続アッセイの実施にとって重大な制限となる。通常は一回アッセイのみが実施可能である。なぜなら、酵素検出系がストレプトアビジンに基づくもので、ストレプトアビジンはビオチン化標的または標的プローブにしっかりと結合したままであるからである。検出のために異なる色素原系を利用することができるが、それらは大多数のプローブが必要とされる場合に限って適用可能であるにすぎない。

ビオチン－アビジン技術の使用における更なる問題点は、精製またはアッセイしようとする試料に含まれる、遊離のまたは他の分子に複合体化された、内因性ビオチンの存在である。この場合は、内因性ビオチンが非標的分子の単離または検出を生じさせる。正確かつ高感度の検出のために高いシグナル対ノイズ比が必要とされる場合には、このことが特に重大な問題となり得る。

結合された分子からビオチンを分離するために、化学的に開裂可能なビオチン誘導体が何種類か製造されている。免疫的に純粋なNHS-SS-ビオチン（Pierce Chemical; Rockford, IL）は、ジスルフィド結合により連結されたビオチン分子および第一級アミンと選択的に反応するN-ヒドロキシスクシンイミドエステル基から構成される。この基を用いると、NHS-SS-ビオチンをタンパク質に結合させ、次いで、ジスルフィド結合をチオールで開裂することによりビオチン部分を除くことができる。この方法は、チオールがタンパク質中の天然ジスルフィド結合を破壊するので、その使用が制限される。さらに、複合体のスペーサーアーム部分は除かれないので、この開裂では標的細胞または分子が修飾されたままで残り、また、開裂用緩衝液を試料から除去する必要がある。

ビオチンの一つの除去方法は、ジスルフィドに基づいた開裂可能なビオチンを用いるものである。しかし、開裂された分子は反応性のスルフヒドリル基を有し、この基は混合物の他の成分とジスルフィド結合を形成しやすい。スルフヒドリル基を含むこれら物質の機能的活性は非常に疑わしいものとなる。一般に、このようなタンパク質は活性が低下したり

消失し、また、このような核酸はもはやハイブリダイズせず、クローニングに使えなくなるだろう。さらに、この方法は遅く、複雑な溶液の調製を必要とする。
ビオチン－アビジン技術の更なる制限は、標的をビオチン－アビジン結合複合体から放出させることに問題があるため、標的を単離および／または検出する自動化システムの開発が難しいことである。これは特殊な化学試薬の添加および反応の注意深い監視を必要とする。
核酸および特定の配列の検出・単離のためにビオチン－アビジン技術がＰＣＲ技術と組み合わされた。しかし、組み込まれたビオチンを除去することの困難に結びついた根本的問題が依然として残っている。ＤＮＡの構造を不可逆的に改変することなく従来のビオチンを用いてこれを行うことは通常不可能である。先に論じたように、ビオチン化はビオチン化プローブのその後の使用を妨げるばかりでなく、ＰＣＲ産物の性質を変えてしまう。
単離のために必要なビオチン化ヌクレオチドまたはプライマーを含むＰＣＲ産物は、ビオチン化されたハイブリダイゼーションプローブと共に使用することはできない。ＰＣＲ産物上のビオチンの存在は、アビジンに基づく酵素結合検出系から誤ったシグナルを発生させる。ＤＮＡへのビオチンの組み込みは、おそらくヌクレオチドをビオチン分子に結合させるスペーサーアームの存在ゆえに、鎖ハイブリダイゼーションを妨害するだろう。さらに、ビオチン化されたＰＣＲ産物はクローニングの材料として適していない。ビオチン化ヌクレオチドを含むＰＣＲ産物の分析は困難である。ＤＮＡにビオチン化ヌクレオチドが組み込まれると、アガロースゲル電気泳動における移動度が遅くなり、この移動度のずれはＰＣＲ産物の特性付けを難しくする。適切なＤＮＡ－ＤＮＡハイブリダイゼーションは精度の高い正確な特性決定および高感度アッセイの土台となるものであるから、ビオチン－アビジン結合系は不利な立場におかれる。
標的物質の検出および単離に用いることができる他のカップリングパートナーは細胞接着分子（ＣＡＭ）である。十分に特性付けされたタイプの一つに、いまではセレクチンと呼ばれる、内皮細胞接着分子LEC-CAM（白血球内皮細胞－細胞接着分子）がある。この分子は白血球と選択的に結合する。自然界でのその機能は、後毛細管小静脈のような細胞の内皮層から炎症部位または組織損傷部位への白血球の運搬を促進させることである。ヒトや他の哺乳動物において同定されたこれらの接着分子は、結合特異性が非常に大まかなものから高度に特異的なものまで多数存在している。これらには、内皮細胞接着リガンドICAM-1、VCAM-1およびELAM-1、内皮細胞、血小板および白血球上に見られる炭水化物結合ＣＡＭである３種のタンパク質LFA-1、Mac-1、VLA-4、MO-1およびp150/95のファミリーから成るβ-インテグリン、および大部分の細胞上に存在するカルシウム依存性ＣＡＭであるカドヘリンが含まれる。これらの分子の付着または接着ドメインを含む融合タンパク質の創製は、結合パートナーの単離および検出を容易にするために用いられる。しかし、いったん結合が起こってしまうと、この分子を解離させるために、複雑で、高価で、時間のかかる生化学的操作と、時には相当に過酷な化学的処理が必要となる。さらに、対象となるそれぞれの標的のために結合パートナーを配置しなければならないので、これら分子の一般的使用には限度がある。
その他のカップリングパートナーとして、核酸と核酸結合タンパク質、脂質と脂質結合タンパク質、互いに対して特定の親和性を有するタンパク質または特定のドメインが挙げられる。これらのカップリングパートナーはビオチン－アビジン系および接着分子と同様の欠点を抱えている。
もう一つの、かなり汎用の検出・単離法はゲル電気泳動である。この方法では、例えばポリアクリルアミドから、均一なマトリックスまたはゲルを形成し、これに電場をかける。ゲルの一端に注入された混合物はその大きさおよび電場との相互作用に応じてゲル中を移動するだろう。移動度は物質のコンホメーション、大きさ、電荷などの固有の性質に依存する。例えば濃度またはｐＨ勾配の形成により、ゲル細孔の大きさを変えることによって、あるいは緩衝液の組成（ｐＨ、ＳＤＳ、ＤＯＣ、グリシン、塩）を変えることによって移動度が影響を受ける。大部分の研究室では、一次元および二次元ゲル電気泳動がかなりルーチンの方法となっている。標的物質はゲルを通過させたり、かつ／またはゲルからの

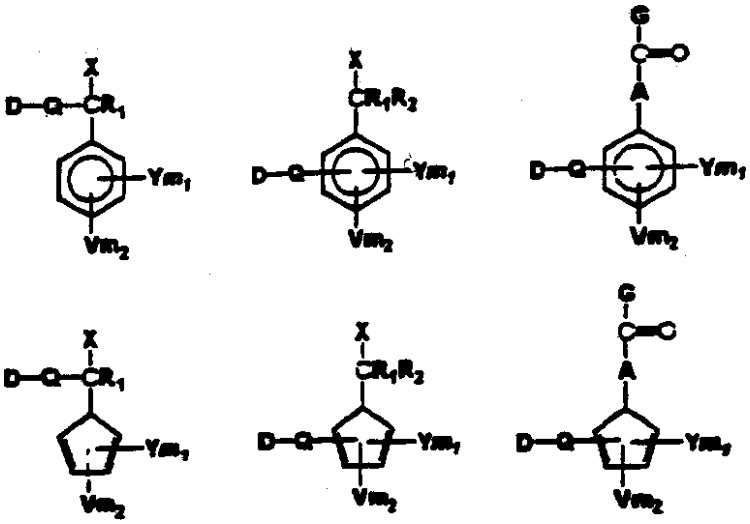
物理的抽出を行うことにより精製することができる。
標的物質の検出・単離法には、平衡－密度－勾配遠心のような遠心分離法も含まれる。この方法は、高遠心力のもとでは塩溶液中に安定した勾配が確立されるという原理に基づいている。高速遠心に付された混合物はその特定の密度に応じて個々の成分に分離されるだろう。こうした方法はすべて有用であるけれども、定性的というよりも定量的である。
検出および単離法の大きな進歩は液体クロマトグラフィーの出現である。クロマトグラフィー、とりわけカラムクロマトグラフィーは、最も効果的で、融通性のある精製法のいくつかを含む。大半の方法に共通していることは、水和されたマトリックス材料を含むオープンシリンダーを使うことである。例えばゲル濾過、アフィニティクロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーにおいて常用されている代表的なマトリックス材料としては、セファロース（アガロースから製造されたビーズ状のゲル：Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ）、セファデックス（デキストランをエピクロロヒドリンで架橋することにより製造されたビーズ状のゲル：Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ）、およびセファクリル（N,N'-メチレンビスアクリルアミドを有する共有結合で架橋されたアリルデキストラン：Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ）などがある。基本的には、異種試料または混合物をカラムの頂上にアプライし、続いて適当な緩衝液を加える。混合物中に含まれる物質は他の物質に対して異なる移動度でカラム内を通過し、カラムの他端においてフラクションごとに集められる。各フラクションは標的の存在について分析され、そして陽性フラクションをプールする。
また、試料中の標的は緩衝液の存在下でカラム材料に選択的に結合させることができ、この方法はアフィニティクロマトグラフィーとして知られている。結合させた後に、カラムを緩衝液で連続的に洗浄して未結合の物質を除去する。続いて、溶離を起こさせる溶出緩衝液を加えて、カラムから標的分子を放出させる。それらがカラムから溶出するときフラクションを集める。ゲル排除クロマトグラフィーでは、カラムマトリックス材料として架橋デキストランを用いる。カラム材料の有効な孔サイズを変えるために架橋を変化させることができ、また、標的を選択的に捕獲するためにデキストランを多種多様の化学成分に結合させることができる。イオン交換クロマトグラフィーは、標的（例えばタンパク質）がカラム材料上の陽電荷または陰電荷に対するそれらの親和性の点で大いに相違するという事実を利用するものである。標的に対する材料の親和性は緩衝液の塩濃度に比例する。塩濃度を上げたり下げたりすることによって、カラム材料への標的の親和性を変えることが可能である。
アフィニティカラムクロマトグラフィーは対象となる標的を特異的に引きつける化学基を使用するものである。例えば、酵素はある種の自然界で関連した補因子に優先的に結合する。補因子を結合させたカラム材料はこのような標的酵素と選択的に結合するだろう。酵素を比較的単純で容易に精製できるようになる。同様のやり方で、酵素特異的抗体をカラムマトリックスに共有結合または非共有結合で結合させることができる。標的抗原に対する抗体の特異な親和性が、異種混合物からの標的の選択的分離を可能にする。検出および分離はこの場合も相当に簡便である。
比較的よく定着している２つの方法、すなわち逆相ＨＰＬＣとサイズ排除ＨＰＬＣを含む高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、および最近の技術であって、ＨＰＬＣよりも大容量の試料を取り扱える高速性能液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）は、標準的なクロマトグラフィー技術に基づくものであるが、極端な高圧（5,000～10,000psiまたはそれ以上）を用いる。高圧のため、より微細なカラム材料を使用することができ、また、より速くより良好な分割能でもって分離を行うことができる。
クロマトグラフィーは計り知れないほど重要な道具であるが、それにも限界がある。分離しようとする物質を、カラムに悪影響を与えない適当な緩衝液中に溶解しなければならない。さらに、基質混合物および標的を適当な時間内にカラムマトリックス中を通過させる必要がある。ＨＰＬＣはこの時間をときに短縮させるが、ほんの少量しか検出できず、また、高圧が単離されたカラム物質を損なうことがある。

発明の概要

本発明は、現在の検出および単離戦略および設計に伴う問題点や欠点を克服するもので、複雑な混合物から分子を検出および単離するための新規な方法を提供する。

本発明の一態様は、光反応性成分に結合された検出可能な成分を含んでなる生物学的反応剤に向けられ、該光反応性成分は、選択的に光分解されて基質を放出することができるコンジュゲートを形成するように、該基質に共有結合し得る基を少なくとも１個含むものである。検出可能な成分は、蛍光、吸着、またはアビジン、ストレプトアビジン、抗体、抗原、結合タンパク質などのカップリング剤と特異的に結合する能力といった、選択的に検出可能な物理的性質をもつべきである。光反応性成分は、基質の化学基と１以上の共有結合を形成できるものである。これらの共有結合は電磁線により切断つまり光分解されて基質を放出させる。

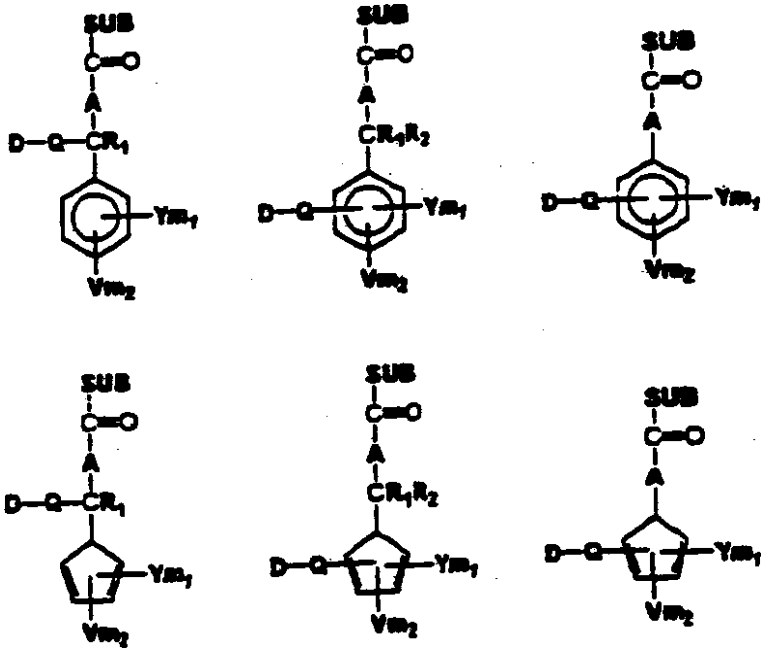
生物学的反応剤は次の群から選ばれる化学構造をもつことができる：



上記各式中、Ｘはハロゲン、N_2、CH_2-ハロゲン、-N=C=O、－N=C=S、-S-S-R、NC_2H_4、-$NC_4H_2O_2$、-OH、-$NHNH_2$、-OP（OR_3）N（R_4）R_5および-OCO-G（ここでGはハロゲン、N_3、O-エステルおよびN-アミドよりなる群から選ばれる）よりなる群から選ばれ；R_1、R_2、R_3、R_4およびR_5は水素、アルキル、置換アルキル、アリールおよび置換アリール、-CF_3、-NO_2、-COOHおよび-COORよりなる群から選ばれ、同一であっても異なっていてもよく；Ａは-O-、-S-および-NR_1よりなる群から選ばれる２価の官能基であり；Ｙは同一であっても異なっていてもよい１以上の多原子基を含み；Ｖは同一であっても異なっていてもよい１以上の任意の単原子基を含み；Ｑは任意のスペーサー部分を含み；m1およびm2は０～５の整数で、同一であっても異なっていてもよく；そしてＤはR_1～R_5と異なる検出可能な部分を含む。

本発明の別の態様は、基質に光分解可能に結合された生物学的反応剤を含んでなるコンジュゲートに向けられ、該生物学的反応剤は光反応性成分に結合された検出可能な成分を含むものであり、該コンジュゲートは電磁線により選択的に分解されて該基質を放出することができる。生物学的反応剤に結合させ得る基質としては、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、アミノ酸類似体、核酸、ヌクレオシド、ヌクレオチド、脂質、小胞、界面活性剤ミセル、細胞、ウイルス粒子、脂肪酸、炭水化物、糖、多糖、無機分子、金属、およびこれらの誘導体および組合せが挙げられる。基質はサイトカイン、免疫系調節剤、造血系の薬剤、化学療法剤、ラジオアイソトープ、抗原、抗腫瘍剤、組換えタンパク質、酵素、ＰＣＲ産物、受容体、ホルモン、ワクチン、ハプテン、トキシン、抗生物質、新生タンパク質（nascent protein）、細胞、合成薬品、およびこれらの誘導体および組合せのような薬剤であってもよい。

コンジュゲートは次の群から選ばれる化学構造をもつことができる：



上記各式中、SUBは基質を含み；R_1およびR_2は水素、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、$-CF_3$、$-NO_2$、-COOHおよび-COORよりなる群から選ばれ、同一であっても異なっていてもよく；Ａは-O-、-S-および$-NR_1$よりなる群から選ばれる２価の官能基であり；Ｙは同一であっても異なっていてもよい１以上の多原子基を含み；Ｖは同一であっても異なっていてもよい１以上の任意の単原子基を含み；Ｑは任意のスペーサー部分を含み；m1およびm2は１～５の整数で、同一であっても異なっていてもよく；そしてＤはR_1およびR_2と異なる検出可能な部分を含む。

本発明の他の態様は、コンジュゲートおよび製剤学的に許容される担体、例えば水、油、脂質、糖、多糖、グリセロール、コラーゲンまたはこれらの組合せ、を含んでなる医薬組成物に向けられる。こうした薬品はヒトや他の動物の疾患および障害の予防と治療に用いられる。

本発明の他の態様は、異種混合物から標的を単離する方法に向けられる。簡単に説明すると、電磁線により選択的に切断し得る共有結合で基質に生物学的反応剤を結合させてコンジュゲートを製造する（ただし、該生物学的反応剤は検出可能な成分に結合された光反応性成分を含むものである）。該コンジュゲートを異種混合物と接触させて、基質を１以上の標的に結合させる。結合したコンジュゲートを該混合物から分離し、電磁線で処理すると、該基質を放出して、標的が単離される。この方法は、生物学的試料、タンパク質性組成物、核酸、バイオマス、不死化細胞培養物、一次細胞培養物、小胞、動物モデル、哺乳動物、細胞および細胞膜抽出物、生体内の細胞およびこれらの組合せといった異種混合物から、免疫系調節剤、サイトカイン、造血系の薬剤、タンパク質、ホルモン、遺伝子産物、抗原、細胞、トキシン、細菌、膜小胞、ウイルス粒子、およびこれらの組合せのような標的を単離するために用いられる。

本発明の他の態様は、医薬組成物または産業用の他の組成物および混合物において用いられる、上記方法により単離された標的分子に向けられる。

本発明の他の態様は、異種混合物から標的を単離する方法に向けられる。電磁線により選択的に切断し得る共有結合で基質に結合された生物学的反応剤を含むコンジュゲートを製造する（ただし、該生物学的反応剤は検出可能な成分に結合された光反応性成分を含むものであり、また、該基質は標的の前駆物質である）。該コンジュゲートを異種混合物と接触させて、基質を標的に組み込む。組み込まれたコンジュゲートを該混合物から分離し、電磁線で処理すると、該基質を放出して、該標的が単離される。この方法は新生タンパク質（nascent protein）、核酸および他の生物学的物質の検出および単離に有用である。

本発明の他の態様は、異種混合物から標的を単離する方法に向けられる。電磁線により選択的に切断可能な共有結合で受容体に結合された生物学的反応剤を含んでなるコンジュゲ

ートを製造する（ただし、該生物学的反応剤は検出可能な成分に結合された光反応性成分を含むものである）。該コンジュゲートを異種混合物と接触させて、受容体を標的に結合させ、結合した受容体－標的を該混合物から分離する。分離したコンジュゲートを電磁線で処理すると、該受容体を放出して、該標的が単離される。

本発明の他の態様は、異種混合物から標的細胞を単離する方法に向けられる。電磁線を用いて選択的に切断可能な共有結合により細胞受容体に結合された生物学的反応剤を含んでなるコンジュゲートを製造する（ただし、該生物学的反応剤は検出可能な成分に結合された光反応性成分を含むものである）。該コンジュゲートを異種混合物と接触させて、該受容体を標的細胞に結合させる。結合したコンジュゲートを該混合物から分離し、電磁線で処理すると、該基質を放出する。その後、標的細胞は、例えばオートメーションにより、簡単に単離することができる。

本発明の他の態様は、光分解性オリゴヌクレオチドの製造方法に向けられる。プリン－ホスホルアミダイトまたはピリミジン－ホスホルアミダイトであり得るホスホルアミダイトに結合された生物学的反応剤を含むコンジュゲートを製造する。オリゴヌクレオチドは光分解性ホスホルアミダイトを用いて合成される。この方法は手動で行うことも、また、オリゴヌクレオチド合成機で製造するように自動化することもできる。

本発明の他の態様は、患者の体内における薬品のin vivo半減期を測定する方法に向けられる。電磁線により選択的に切断し得る共有結合で生物学的反応剤に薬品を結合させてコンジュゲートを製造する（ただし、該生物学的反応剤は検出可能な成分に結合された光反応性成分を含むものである）。該コンジュゲートを患者に投与し、該コンジュゲートの投与後、それぞれ異なる時間に患者から２以上の生物学的試料を採取する。該試料を電磁線で処理して、生物学的反応剤から該薬品を放出させ、生物学的試料中の該生物学的反応剤の量を測定する。その後、該薬品のin vivo半減期を決定することができる。

本発明の他の態様は、媒体への基質の制御放出方法に向けられる。電磁線により選択的に切断し得る共有結合で基質に結合された生物学的反応剤を含むコンジュゲートを製造する（ただし、該生物学的反応剤は光反応性成分に結合された検出可能な成分を含むものである）。該コンジュゲートを媒体中に配置した物品の表面に結合させる。該物品の表面を測定量の電磁線に暴露して、該媒体中に基質を制御放出させる。

本発明の他の態様は、異種混合物中の標的分子を検出する方法に向けられる。電磁線により選択的に切断可能な共有結合で基質を生物学的反応剤に結合させてコンジュゲートを製造する（ただし、該生物学的反応剤は光反応性成分に結合された検出可能な成分を含むものである）。該コンジュゲートを異種混合物と接触させて、該基質を１以上の標的分子に結合させる。未結合のコンジュゲートを除去し、結合したコンジュゲートを電磁線で処理して検出可能な成分を放出させる。放出された検出可能な成分は簡単に直接検出することができる。

本発明の他の態様は、異種混合物中の標的分子を検出する方法に向けられる。生物学的反応剤に結合された基質を含むコンジュゲートを製造し、これを異種混合物と接触させて、該コンジュゲートを１以上の標的分子に結合させる。未結合のコンジュゲートを除去し、結合したコンジュゲートを電磁線で処理して該基質を放出させる。放出された基質を検出し、さらに単離することができる。

本発明の他の態様は、ＰＣＲ産物を単離する方法に向けられる。電磁線により選択的に切断し得る共有結合で生物学的反応剤を１以上のオリゴヌクレオチドプライマーに結合させる（ただし、該生物学的反応剤は光反応性成分に結合された検出可能な成分を含むものである）。結合されたプライマーを用いて核酸配列をＰＣＲ増幅させる。増幅した配列を単離し、その後電磁線で処理して生物学的反応剤を放出させる。

本発明の他の態様は、所定の部位での治療薬の制御放出により疾患を治療する方法に向けられる。電磁線により選択的に切断し得る共有結合で生物学的反応剤を治療薬に結合させてコンジュゲートを製造する（ただし、該生物学的反応剤は光反応性成分に結合された誘導可能な成分を含むものであり、また、該誘導可能成分は所定の部位に対して親和性を有するものである）。疾患を有する患者に該コンジュゲートを投与する。所定の部位を測定

量の電磁線にさらし、治療薬を制御放出させて該疾患を治療する。
本発明の他の態様は、生物学的試料における疾患を検出するためのキットに向けられ、該キットは、生物学的試料における疾患の指示物質に対して親和性を有する診断薬に共有結合された生物学的反応剤を含んでなるコンジュゲートを含むものである（ただし、該共有結合は電磁線を用いて選択的に切断可能である）。
本発明の他の態様は、オリゴヌクレオチドに共有結合された生物学的反応剤を含んでなるキットに向けられる。光分解性オリゴヌクレオチドは二本鎖でも一本鎖でもよく、クローニングおよび分子生物学の他の技法において有用な制限酵素認識部位が存在してもよい。
本発明の他の態様および利点については、以下の説明において部分的に示されるが、一部は以下の説明から自明であるか、本発明の実施より習得し得るだろう。

図面の説明

図１　光分解性物質の例。
図２　各種の光反応性成分を有する光分解性ビオチン。
図３　光分解性ビオチンの図式的表示。
図４　2-ニトロベンジルをベースとした系における光分解の作用機序。
図５　光分解性ビオチンの合成。
図６　光分解性物質の化学的変異体。
図７　ＰＣＢの光分解。
図８　ＰＣＢコンジュゲート。
図９　ＰＣＢの可能なアミノ酸結合。
図10　（A）ｔＲＮＡのアミノアシル化、および（B）酵素的アミノアシル化と化学的アミノアシル化の比較。
図11　ＰＣＢを用いて純粋な基質を単離する際の４つの基本工程。
図12　ＰＣＢを用いて標的タンパク質およびその抗体を検出する方法。
図13　ＰＣＢ－ホスホルアミダイトおよびＰＣＢ－ヌクレオチド。
図14　ＰＣＢを用いてＰＣＲ産物を単離するための２方法（ＡおよびＢ）。
図15　（A）ＰＣＢを用いておよび（B）ＰＣＢを用いないでｃＤＮＡを構築する方法の比較。
図16　ＰＣＢ脂質。
図17　ＰＣＢを用いる免疫選択的細胞分離。
図18　光分解性ビオチン－ＮＨＳエステル、化合物18の合成。
図19　光分解性ビオチン－ＮＨＳエステル、化合物25の合成。
図20　ＰＣＢを用いる逐次ＥＬＩＳＡ法。
図21　光分解性クマリンの合成。

発明の説明

本明細書で具体的かつ広範に記載するように、本発明は混合物から、化学物質、巨大分子、細胞およびあらゆる同定可能な物質などの標的を検出および単離するのに使用する反応剤およびコンジュゲートに関する。反応剤は光反応性成分に結合された検出可能な成分を含む。コンジュゲートは、光反応性成分の存在によって電磁線の照射により選択的に分解され得る１以上の共有結合で基質に結合された反応剤を含む。本発明はまた、これらの反応剤およびコンジュゲートを用いる標的の単離および検出方法、これらの方法を用いて患者の病気または障害を検出するためのキット、ならびに異種混合物からほとんど全ての物質を検出および単離するための方法に関する。
複雑な混合物から所望の物質または標的を検出および単離するために現在使用できる多くの方法が存在する。これらの方法の多くは検出すべき物質または標的の特異的標識、この標識の検出、ならびに標的からの標識の除去を必要とする。率直なところ、現在の検出および単離法は多くの問題点をかかえている。例えば、標的に標識を特異的に付着するのが困難であることが多い。標的への標識のアフィニティーが低かったり、特定の物質に使用するのに適した付着点がなかったり、また標識と標的が単に化学的または物理的に不適合であったりする。さらに、標識が標的の機能的活性を覆い隠したり、完全に破壊してしま

い、単離目的を達成できないことがある。毒性または障害性標識の存在のために単離した標的の汚染や不活性化が避けられない。この種の問題の典型的な例は、ストレプトアビジンと結合することにより選択した後のビオチン結合細胞の単離である。ビオチンとストレプトアビジンとの強力なアフィニティーのために、単離工程は比較的簡単かつ特異的であるが、単離された細胞は結合剤の毒性または厳しい単離工程のために死んでいるか、あるいは死にかけていることが多い。生物学的サンプルやその他の複雑は混合物から活性タンパク質を単離して後に使用しようとするときにも同様である。標識の存在のためにタンパク質生成物が変性したり、あるいは不活性となったり、または現在のＦＤＡ基準やガイドラインの下ではin vivo使用できないようになることがある。反応剤の除去によりこの問題を克服できる場合があるが、標的から標識を分離および除去する方法は一般に過酷で、時間、手間と費用がかかり、ほとんどの場合最終生成物の収率が低い。標的の生存性および機能的活性が著しく損傷され、破壊されることが多い。

本発明は標的を検出および単離できる検出可能な生物学的反応剤を提供することによってこれらの問題を克服する。本発明の反応剤は、検出可能な成分と光反応性成分とを含み、種々の標的基質と共有結合し得る。反応剤と基質との共有結合は、アミン、ヒドロキシル、イミダゾール、アルデヒド、カルボン酸、エステルおよびチオールを含む広範な化学成分から作ることができる。反応剤－基質の組み合わせを本明細書ではコンジュゲートと呼ぶ。検出可能な成分の存在によって、コンジュゲートは迅速かつ正確に検出され、標的が単離される。さらに、これらのコンジュゲートは選択的に分解可能であり、これによって単離工程が有利になる。基質は反応剤から迅速かつ効率よく分離される。複雑な工程や高度に熟練した専門家を必要としない。単離すべき新しい標的のそれぞれについて新しい付着（attachment）や分離工程を開発する必要がない。単離後に、コンジュゲートを電磁線で処理して基質を放出させることは比較的簡単なことである。放出された基質は機能的に活性であり構造的に変化していないことが好ましい。それでも、付着する点によっては構造にいくらかの化学変化が起きるかも知れない。このような変化が機能的活性に影響しないことが一般には好ましい。しかしながら、機能的活性を保持する必要がないときには、このような変化を考慮する必要はなく、むしろ本発明の方法で単離した標的を同定し区別するのに有用である。

本明細書で標的とは、本発明の反応剤、コンジュゲートおよび方法を用いて同定、性状決定または単離される物質である。本明細書で基質とは、生物学的反応剤と共有結合される物質である。同定される標的が生物学的反応剤と特異的に結合するときには、基質を標的と呼ぶこともある。

本発明の一つの態様は、光反応性成分に結合された検出可能な成分を含んでなる生物学的反応剤であって、該光反応性成分は、コンジュゲートを形成するように基質に共有結合し得る基を少なくとも１個含む。得られるコンジュゲートは選択的に分解されて該基質を放出するか、あるいはコンジュゲートの化学基または反応剤を放出することができる。本明細書で分解とは、光分解またはコンジュゲートへの照射を行うことによって引き起こされる分解結果である。適用される放射線はＸ線（約０．1ｎｍから約１０．０ｎｍ；または約10^{18}から約10^{16}Ｈｚ）、紫外線（ＵＶ）（約１０．０ｎｍから約３８０ｎｍ；または約8×10^{16}から約10^{15}Ｈｚ）、可視光線（約３８０ｎｍから約７５０ｎｍ；または約8×10^{14}から約4×10^{14}Ｈｚ）、赤外線（約７５０ｎｍから約０．１ｃｍ；または約4×10^{14}から約5×10^{11}Ｈｚ）、マイクロ波（約０．１ｃｍから約１００ｃｍ；または約10^{8}から約5×10^{11}Ｈｚ）、および高周波（約１００ｃｍから約10^{4}ｍ；または約10^{4}から約10^{8}Ｈｚ）を含む電磁スペクトルの１以上の波長を含む。複数の形態の放射線を同時に、または段階的に組み合わせて同等に適用することもできる。放射線は数秒、数分または数時間にわたって一定で行うことができ、または予め定めた間隔でパルスを変えてもよい。

典型的には、放射線源は照射すべきコンジュゲートから一定の距離に置く。この距離は経験的に決めるか、または放射線源と標的との間に生じるエネルギー損失および放射線源から発射されるエネルギー量から計算できる。コンジュゲートは溶液であるか、またはガラ

ス、セラミック、ポリマーまたは半導体表面などの固体支持体に付着させてもよい。典型的な固体支持体はニトロセルロース膜、アガロースビーズ、ストレプトアビジンで被覆した磁気ビーズ、半導体表面および樹脂である。好ましくは、適用する放射線は約２００ｎｍから約１０００ｎｍ、より好ましくは約２６０ｎｍから約６００ｎｍ、そしてより好ましくは約３００ｎｍから約５００ｎｍの波長のＵＶ、可視またはＩＲ線である。照射は連続的に行うか、あるいは数時間、数分または数秒のパルスで行い、好ましくは基質への損傷の危険を最小にし、また便宜上できるだけ短時間行う。照射は約１時間以内、好ましくは約３０分以内、より好ましくは約１０分以内、そしてさらに好ましくは約１分以内行う。可視、ＵＶおよびＩＲ線はいずれも市販の放射線源から便利にかつ安く発生できるので、この理由からもこれらが好ましい。

共有結合を選択的に切断するのに必要な面積当たりの光のエネルギー密度または強度は極めて小さく、このため光分解可能なプロセスが実施しやすくなる。効率を最大にすることも選択的切断を達成するのに必要な暴露時間を少なくし、また好ましくないバックグランド効果を最小にする。

生物学的反応剤の一部は検出可能な成分である。検出可能な成分とは、異種混合物中に存在するその他の化学物質の物理的性質から区別し得る特定的に同定し得る物理的性質を有する化学基、構造または化合物である。蛍光、りん光および電気発光、化学発光および生物発光を含む発光はほとんどの物質に見られない検出可能な物理的性質であるが、その他の物質に発生させたり誘導し得ることが知られている。例えば、ダンシル、クマリン、ローダミンおよびフロオレセインは全て特定波長の光で励起すると固有の蛍光性を有し、その他の物質に特異的に結合または付着し得る。クマリンはダンシル成分よりも高い高蛍光量子収率をもち、目指す標的が極めて低いレベルのときの検出を可能にする。クマリンはトリプトファンと構造的に類似しており、非天然アミノ酸を用いる新生タンパク質の翻訳に例えば有用である。これはまた検出または単離を可能にするための検出可能なある種の成分を組み合わせるのにも有用である。好ましくは検出可能な成分は蛍光性化合物であり、好ましい蛍光性化合物を表３に挙げるが、これらは全て市販されている（Sigma Chemical; St. Louis, MO）。

表３　蛍光標識用化合物

4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2-2'-ジスルホン酸	
7-アミノ-4-メチルクマリン（ＡＭＣ）	
7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン	
N-(4-アニリノ-1-ナフチル)マレイミド	
4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（ＤＡＰＩ）	
5-(4,6-ジクロロトリアジン-2-イル)アミノフルオレセイン（ＤＴＡＦ）	
4,4'-ジイソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸	
テトラメチルローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）	
キノリジノフルオレセインイソチオシアネート（ＯＦＩＴＣ）	
塩化ダンシル	エオシンイソチオシアネート
エリスロシンＢ	フルオレスカミン
フルオレセイン	フルオレセイン誘導体
4-メチルウンベリフェロン	o-フタルジアルデヒド
ローダミンＢ	ローダミンＢ誘導体
ローダミン６Ｇ	ローダミン１２３
スルホローダミンＢ	スルホローダミン１０１
スルホローダミン１０１酸クロライド	

ルシフェリンと呼ばれるある種の化学物質中では発光を誘導し得る。ＡＴＰなどのエネルギー分子はルシフェラーゼ酵素の触媒活性のための化学エネルギーを供給し、これによりルシフェリンが発光する。細菌ルシフェラーゼ系（Vibrio harveyiまたはV. fischeri）および蛍ルシフェラーゼ系（Photinus pyralis）用の試薬が多く市販されている（例えば、Sigma Chem. Co; St. Louis, MO）。

好ましくは、発光性反応剤は、光分解に用いるのとは異なる励起波長において高い蛍光量子収率をもつ。このような波長で励起すると、反応剤は低濃度であっても目視または通常の発光検出器や蛍光分光器を用いて検出可能である。極度の感度が必要な場合には、ルテニウムキレートやその誘導体などの反応剤、またはニトロキシド成分や類似の誘導体をもつ反応剤によって生じる電気発光が好ましい（J. DiCesareら,Bio Techniques 15:152-59, 1993）。これらの反応剤はフェムトモルレベルおよびそれ以下で検出可能である。

電場をかけることによっても、物質を電場に移動させる正味電荷によってある種の化学物質中に検出可能な応答を誘導できる。鉄やその他の磁気化された金属などの磁気化された物質が検出可能な成分であるか、または検出可能な成分と会合しているならば、磁気も検出可能な性質である。

検出可能な物理的性質のその他の形態には、同定可能な電気分極、電子スピン共鳴およびラマン散乱を含む。反応剤は、外部の電磁場またはその他の物質の導入に応答する色の変化などの化学的、生化学的、酵素的、電気化学的または光化学的反応も行う。このような電磁場や物質は、生物学的反応剤の検出を可能にし、あるいは反応剤を検出可能な成分に変える触媒またはその他の反応性分子であり得る。

これらの標識反応剤は全て分光光度計または電気泳動やクロマトグラフィー系などの適当な検出器または検出系を用いて特異的に検出できる。場合によっては、光電セル（photoelectric cell）を入れたり、手で検出、記録したりといった目視で識別できる検出系も好ましい。吸収および蛍光分光計を含む分光計は多くの検出可能な成分からの吸収または発光の特異エネルギーを極めて感度よく検出する。蛍光標識をもつ細胞を検出、単離する蛍光活性化細胞ソーター（ＦＡＣＳ）の場合のように、標的の検出やソーティングは自動化されていてもよい。磁気化されたコンジュゲートでは簡単に磁石を用いて行えるように標的を手で検出、ソーティングすることもできる。

簡単かつ正確に検出できるさらに別の物理的性質には、彩色性（例えば、紫＝約４００－４３０ｎｍ、青＝約４５０－５００ｎｍ、緑＝約５５０ｎｍ、黄色＝約６００ｎｍ、オレンジ＝約６５０ｎｍ、赤＝約７００－７５０ｎｍ）、電磁吸収、酵素活性またはカップリング剤との特異的結合能を含む。有用なカップリング剤には、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、核酸、核酸および脂質結合タンパク質、ハプテン、抗体、受容体、炭水化物、免疫原性分子、およびその誘導体ならびに組み合わせを含む。検出可能な成分はこれらの性質を組み合わせてもつことができ、バックグラウンド物質の広範な種類に応じて選択できる。本発明の光分解可能な反応剤の化学構造の幾つかの例を図１に示す。

その他の好ましい検出可能な成分はカップリング剤であり、好ましいカップリング剤はビオチンまたはビオチン誘導体である。ビオチン含有の生物学的反応剤を本明細書では光分解可能なビオチンまたはＰＣＢという。トリの卵に見られる四量体タンパク質である卵白タンパク質アビジンと水溶性ビタミンであるビオチンとの結合は、抗体－抗原の相互作用よりも強い約$10^{15}M^{-1}$の会合定数をもつ生物界における最強の相互作用の１つである（M. Wilchek and E.A. Bayer, Methods Enzymol. 184, 1990）。アビジンの細菌対応物はStreptomyces avidiniiに見られるストレプトアビジンであり、これはアビジンよりもさらに少しビオチンに対して特異的である。この強い相互作用、ならびにタンパク質、核酸、脂質および神経ペプチドやホルモンなどの受容体リガンドを含む広範な基質とビオチンとの共有結合し得る能力のために、これらのカップリング剤は非常に有用であり、これらは全てＰＣＢの使用によって改良され増強される。

ＰＣＢ分子の形成には広範な種類のビオチン成分を用いることができる。ビオチン（$C_{10}H_{16}N_2O_3S$）は分子量２４４．３１ダルトンで、末端にカルボキシル基をもつアルキル基と結合した環を含む。ビオチン成分には多数の修飾を施すことができ、これには環、スペーサーアームおよび末端基の変化を含むが、これらは全てストレプトアビジン、アビジンおよびその誘導体への高いアフィニティーを保持する。種々の光反応性成分に基づいて設計した光分解可能なビオチンの例を図２に示す。

ビオチンとストレプトアビジンとの相互作用を用いる化学的、生化学的および生物学的物質の検出および単離は、通常アビジンまたはストレプトアビジンを表面（例えば、膜、ゲル、フィルター、マイクロタイターウエル、磁性ビーズ）に固定することに基づく。この表面に、標的と結合したビオチンを含む溶液を加えると、その後これがストレプトアビジンで被覆した表面に結合する。ビオチン含有標的分子は単離され、非ビオチン化成分は洗い流される。あるいは、ビオチン化標的分子は異種混合物からストレプトアビジン含有アフィニティーカラムを用いて分離できる。核酸（ＤＮＡまたはＲＮＡ）、タンパク質およびタンパク質含有複合体を含むビオチン化巨大分子、ならびにその表面がビオチン化されているか、またはビオチン化抗体と結合した細胞でさえ、この方法で検出、単離できる。

上述したように、ビオチンはタンパク質、炭水化物および核酸を含む広範な種々の分子と結合できる。ビオチン誘導体の有用性はこの領域をさらに広げている。例えば、アミン、フェノール、イミダゾール、アルデヒド、カルボン酸およびチオールと反応性の官能基をもつビオチン誘導体が調製されている。ビオチンをアミノ酸やヌクレオチドなどの巨大分子の構成成分にまず結合させ、これをこれらの分子と直接結合させるか、あるいは化学的または酵素的手段により合成中に導入することによって、ビオチンをタンパク質、ＤＮＡおよびＲＮＡ中に導入することもできる。

従来のビオチンとは異なり、光分解可能なビオチンは、完全に修飾されない形で固定化ア

ビジン、ストレプトアビジンまたはその誘導体から結合基質を放出または溶出させる。これは多くの理由により現存するビオチンに比べてはるかに有用かつ重要な改良である。標的物質のビオチン化は次の使用または性状決定を妨げ得る。タンパク質のビオチン化はその活性、電気泳動の移動度、基質への結合能、抗原性、天然形への再構成能および多サブユニット複合体形成能を変更することがある。これとは対照的に、光分解可能なビオチンを用いる場合には、ビオチンがタンパク質またはタンパク質／結合複合体からいったん光分解されると、全ての天然の性質と機能が天然形に戻り、再使用や性状決定に用い得る。表４に記載のものは、ＰＣＢなどの光分解可能な反応剤が結合し得る基質を例示する。

表４　種々の分子と光分解可能なビオチンとの化学結合

分子または集合体	分子上の官能基	ＰＣＢ上の反応性成分	得られる結合および反応条件
アミノ酸、タンパク質、酵素または抗体	アミノ基または $R-NH_2$	ＮＨＳ－エステル	アミド結合
アミノ酸、タンパク質、酵素または抗体	Ｒ－ＯＨ	クロロホルメートカルボン酸	エステル結合
アミノ酸、タンパク質、酵素または抗体	Ｒ－ＣＯＯＨ	親アルコールとの反応（ＤＣＣカップリング）	エステル結合
ヌクレオチド、ＲＮＡまたはＤＮＡ分子	芳香族アミン	クロロホルメート	アミド
炭水化物リボヌクレオチド用ＲＮＡ	糖ヒドロキシＲ－ＯＨ	クロロホルメート	エステル結合
ヌクレオチドホスホルアミダイト	リン酸基	ジアゾエタン	リン酸エステル
脂質／ホスファチジルセリン	$R-NH_2$	クロロホルメートＮＨＳ－エステル	アミド
炭水化物	糖ヒドロキシ	クロロホルメート	エステル結合

本発明の生物学的反応剤およびコンジュゲートに使用できる多数の化学成分が存在する。例えば、ＰＣＢに導入されるＮＨＳ－エステル官能基は反応性が高く、タンパク質中に存在する脂肪族アミノ基と選択的に反応する。その他の例としてはホスホルアミダイト成分

があり、これは反応性が高く、核酸のヒドロキシル基と選択的に反応する。カルボキシル基（－ＣＯＯＨ）またはリン酸基などの化学成分が修飾を要する場合には、親アルコールの形のＰＣＢ前駆物質を用いて適当なエステル型結合を形成できる。これらの誘導体はアミノ酸、ヌクレオチド、タンパク質およびポリペプチド、核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡ）、脂質、ホルモンおよび受容体へのリガンドとして機能する分子を含む種々の巨大分子および分子成分と化学的に結合できる。

化学的および生物学的物質の検出および単離へのビオチン－アビジン法の適用は、最初にビオチン化され、次いで単離すべき標的分子と選択的に相互作用し得るような結合分子を使用することによってさらに広がった。標的分子または細胞の単離は、ビオチン化結合－複合体をストレプトアビジン含有カラムまたはストレプトアビジン被覆磁気ビーズに結合させることによって可能になる。結合分子には、特定抗原に選択的に結合する抗体、特定ＤＮＡ配列に選択的に結合するＤＮＡプローブおよび特定受容体に選択的に結合するリガンドを含む。このアプローチは種々の巨大分子および細胞の単離に用いられてきた（表２および３）。しかしながら、このような単離法ではビオチン化標的が結合ストレプトアビジンから放出されることを要する。この結合の破壊には典型的には、標的分子または細胞を通常は損傷する低ｐＨと高濃度のグアニジンＨＣｌのような非生理学的条件を必要とする。ストレプトアビジン－ビオチン相互作用を破壊した後であっても、標的または結合分子は部分的または完全にビオチン化されたままであり、このため後の使用を妨害し得る。さらに、溶出条件が非生理学的であり、これによっても標的分子または細胞が破壊される。これとは対照的に、光分解可能なビオチンを用いると、基質のコンホメーションや活性にほとんどまたは全く影響を及ぼさずに、基質がビオチンから迅速かつ簡単に分解される。

上述の方法を含む通常のいかなる検出および精製法においてもＰＣＢを用いると、時間、エネルギーおよび最終的にはコストを有意に節約できる。さらに、化学的または遺伝的手法で修飾されたアビジンやストレプトアビジンの各種誘導体が市販されている。これらと同じ誘導体をＰＣＢと一緒に使用できる。一例としては、市販のＩｍｍｕｎｏＰｕｒｅＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ（Pierce Chemical; Rockford, IL）が挙げられる。このタンパク質は脱グリコシル化されており、多くの細胞受容体に対する普遍的な認識配列として作用するＲＹＤドメインを含まない修飾アビジン誘導体である。その他のタンパク質や細胞表面への非特異的吸着は非常に少なくなっている。

光分解可能なビオチン（ＰＣＢ）の主要な分子要素は光反応性成分と検出可能成分を構成するビオチン成分である（図３）。光反応性成分とビオチン成分とはスペーサーアームで結合されてＰＣＢ分子を形成する。光反応性成分はＸ、ＹおよびＡ－Ｃ（Ｏ）－Ｇ（ここでＸは生体分子基質へのＰＣＢの結合を可能にする）で表される官能基で誘導体化された５または６員の環を含む。好ましい態様では、Ｙはニトロまたはアルコキシ基のような１以上の置換基を含むフェニル環上の置換パターンを表す。官能基Ｗは光反応性成分への架橋成分の結合を可能にする基を表す。スペーサーアームの目的は、ストレプトアビジンとの有効な相互作用を行うためにビオチン成分の接近を増加し、これによって結合効率を増加することにある。典型的には長いアルキル鎖を用いるか、またはアミド結合を介して結合したカプロイル成分の繰り返し単位を用いて構築できる。

光不安定基、スペーサーアームおよびビオチン成分の選択は、光分解可能なビオチンを付けるべきアミノ酸、タンパク質、抗体、ヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡ、脂質、炭水化物および細胞を含む標的基質に依存する。また光分解の正確な条件およびビオチン成分とストレプトアビジン、アビジンまたその誘導体との所望の相互作用にも依存する。ＰＣＢ用の光不安定基とリンカーアームの各種選択の幾つかを図２に示す。

別のタイプのカップリング剤には抗体、抗体断片および抗原を含む。抗体はそれぞれの抗原と大きな特異性で結合できるので有利である。抗原である基質は入手可能な抗体または簡単に作製可能な抗体との特異的結合能によって検出できる。有用な抗体または抗体断片はモノクローナルまたはポリクローナルであり、クラスＩｇＧであることが好ましいが、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤまたはＩｇＥであってもよい。その他の好ましい検出可能な成分

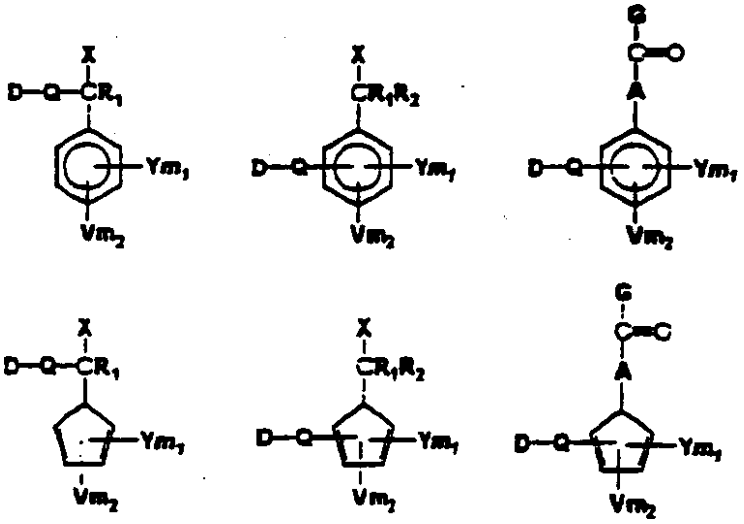
には核酸を含む。ＲＮＡまたはＤＮＡまたはオリゴヌクレオチド、好ましくは長さ約３０ヌクレオチド以下で４～１０ヌクレオチドの短い配列は、相補的核酸との特異的ハイブリダイズ能によって検出でき、また後で検出される特定配列を大きく増幅するＰＣＲを用いて直接または間接に検出できる。同様に、結合タンパク質および受容体－リガンドの組み合わせも検出可能な標識として有用である。

生物学的反応剤の第２の成分は光反応性成分である。光反応性成分とは、電磁線の照射により分解され得る基質と１以上の共有結合を形成し得る化学成分である。これらの結合は、例えばアミン、フェノール、イミダゾール、アルデヒド、カルボン酸またはチオールなどの基質上の化学基とで形成される。光反応剤は少なくとも１つの多原子基と、場合によっては１以上の単原子基を含む置換芳香族環である。芳香族環は好ましくは５または６員環である。置換基は多原子基および場合により単原子基を含む。多原子基は化学構造内の一定の位置に電子を引き付けたり追い払うための電子チャネリング性質を付与し、これによって選択的に分解可能な共有結合を作り出す条件を作成または樹立する。ハロゲン化物などの幾つかの単原子基は分解を誘導する電磁線の周波数または波長を調整できる。従って、単原子基は予め定めた電磁線周波数または強度に対してコンジュゲートを感受性にするために分解反応を調整する。

光反応性成分の１つのクラスは２－ニトロベンジル誘導体である。基底状態では、２－ニトロベンジルをベースとする反応剤およびコンジュゲートは、ベンジル水素とオルトのニトロ基との間に分子内水素結合をもつ（－ＣＨ…O_2Ｎ）（B. Brzezinskiら，J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2:2257-61，1992）。３００ｎｍ以上の波長で照射すると、これらの化合物は励起状態に遷移する。ベンジル炭素からニトロ基中の酸素へのプロトンの転移反応が起こり、次に電子の再配列が起こる（図４）。この反応によりａｃｉ－ニトロイオンと呼ばれる一時的な化学種を形成し、これは急速に環状形と平衡になる。環状中間体では、電子の再配列と窒素からベンジル炭素への酸素の転移が起こり、２－ニトロソ誘導体を形成して良好な脱離基である基質を放出する（J.A. McCrayら，Annu. Rev. Biophys. Chem. 18:239-70，1989）。

ＰＣＢ　ＮＨＳ－エステルの化学合成には次の３つの主要工程を含む：（１）光反応性成分、例えば５－メチル－２－ニトロアセトフェノンの生成、（２）適当なアミノ基の生成とビオチン含有スペーサーへの付着、（３）ヒドロキシル基の生成とＮ－ヒドロキシスクシンイミジルカーボネート（ＮＨＳ－エステル）としての誘導体化。これらの工程を図５に模式図で示す。

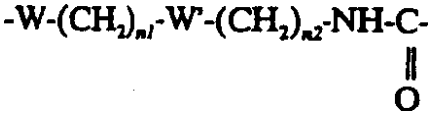
生物学的反応剤はその他の光反応性成分に基づいても合成できる。他の２つの光分解可能な成分クラスである３，５－ジメトキシベンジルおよび２－ニトロベンゼンスルフェニルの化学合成は同様の合成法を用いて行うことができる（図２）。これらの２－ニトロベンジル基は全てニトロ基のオルトにベンジル炭素－水素結合を含み、これが光不安定性に必要である。保護基としてのこれらの光不安定基の開発においては、これらのカルボニル化合物の次の反応が結合アゾ化合物を形成し、これが内部光フィルターとして作用するので困難が生じていた（V.N.R. Pillai，Synthesis 1，1980）。本発明ではこれらの困難性をα－置換ｏ－ニトロベンジル化合物を使用することにより克服した。検出可能な光分解可能なコンジュゲートを形成する本発明の生物学的反応剤は例えば以下の式で表される：



〔式中、Ｘはハロゲン、N_2、CH_2－ハロゲン、－Ｎ＝Ｃ＝Ｏ、－Ｎ＝Ｃ＝Ｓ、－Ｓ－Ｓ－Ｒ、NC_2H_4、$-NC_4H_2O_2$、－ＯＨ、－ＮＨＮH_2、－ＯＰ（OR_3）Ｎ（R_4）R_5および－ＯＣＯ－Ｇからなる群より選択され、ここでＧはハロゲン、N_3、Ｏ－エステルおよびＮ－アミドからなる群より選択され；R_1、R_2、R_3、R_4およびR_5は水素、アルキル、置換アルキル、アリールおよび置換アリール、－CF_3、－NO_2、－ＣＯＯＨおよび－ＣＯＯＲからなる群より選択され同一または異なっていてよく；Ａは－Ｏ－、－Ｓ－および－ＮR_1からなる群より選択される２価の官能基であり；Ｙは同一または異なっていてよい１以上の多原子基を含み；Ｖは同一または異なっていてよい１以上の任意の単原子基を含み；Ｑは任意のスペーサー成分を含み；ｍ１およびｍ２は０－５の整数であり同一または異なっていてよく；そしてＤはR_1－R_5とは異なる選択的に検出可能な成分を含む〕。Ｏ－エステルはシアノメチル、ｏおよびｐニトロフェニル、２，４－ジニトロフェニル、２，４，５－トリクロロフェニル、ペンタクロロフェニル、ペンタフルオロフェニル、Ｎ－ヒドロキシフタルイミジル、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル、１－ヒドロキシピペリジニル、５－クロロ－８－ヒドロキシ－キノリル、１－ヒドロキシベンゾトリアゾリル、３，４－ジヒドロ－４－オキソベンゾトリアジン－３－イル（ＤＨＢＴ）、２，３－ジヒドロ－２，５－ジフェニル－３－オキソ－チオフェン－１，１－ジオキシド－４－イル（ＴＤＯ）、１，２－ベンズイソキサゾリル、２－ヒドロキシピリジルまたはその誘導体または組み合わせであり得る。Ｎ－アミドはイミダゾリル、ベンズイミダゾリル、ベンズイソキサゾリル、３，５－ジオキソ－４－メチル－１，２，４－オキサジエゾリジニルまたはその誘導体または組み合わせである。

芳香族環に結合させることのできる多原子基はニトロ基（－NO_2）、（－SO_3）などのスルホキシド基、メチル（－CH_3）やエチル（－C_2H_5）などのアルキル基、（－OCH_3）などのアルコキシル基、およびその誘導体および組み合わせを含む。有用な単原子基は塩素（－Ｃｌ）、フッ素（－Ｆ）、ヨウ素（－Ｉ）、臭素（－Ｂｒ）および水素（－Ｈ）である。これらの基は環周囲の適当な位置に配置できる。多原子基および単原子基の選択と配置は、分解を誘導するのに必要な電磁線の波長と、有効な分解を誘導するために照射しなければならない時間とに影響する。R_1、R_2、R_3、R4および／またはR_5における化学成分も光反応に影響する。

光反応性成分と検出可能な成分との間に結合されたスペーサー成分を反応剤中に含むことが有用であることがある。スペーサーの存在は基質結合にとって立体的に有利でありうる。スペーサー成分（Ｑ）は分枝または直鎖状の炭化水素、重合体化炭水化物、またはその誘導体または組み合わせを含む。好ましいスペーサー成分は以下の式で表される：



〔式中、ＷおよびＷ’はそれぞれ－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ－、－ＨＮ－Ｃ（Ｏ）

－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－および－CH_2－からなる群より選択され同一または異なっていてよく；そしてｎ１およびｎ２は０－１０の整数であり同一または異なっていてよく、もしもｎ１またはｎ２のどちらかが０であるならば、ＷおよびＷ’は任意である〕。生物学的反応剤の化学構造を図６に例示する。

本発明の別の態様は、基質に光分解可能に結合された生物学的反応剤を含む光分解可能なコンジュゲートに関する。コンジュゲートは電磁線照射によって選択的に分解されて基質を放出する性質をもつ。基質は、標的を検出および単離するのに使用し得る化学物質、巨大分子、細胞およびその他の物質である。コンジュゲートから選択的に分解される基質は光分解によって修飾されるが、なお機能的に活性であるか、あるいは光分解によって全く修飾されないままコンジュゲートから放出される。基質は随意に反応剤と結合されるか、結合されないか、あるいは新しい反応剤と再結合されることができる。

有用な基質は生物学的反応剤と結合できる化学物質、巨大分子または細胞である。有用な基質の例には、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、アミノ酸類似体、核酸、ヌクレオシド、ヌクレオチド、脂質、小胞、界面活性剤ミセル、細胞、ウイルス粒子、脂肪酸、糖類、多糖類、無機分子、および金属を含む。基質は融合タンパク質、タンパク質－炭水化物複合体および有機金属化合物などのこれらの物質の誘導体および組み合わせも含む。基質はサイトカイン、免疫系調節剤、造血系薬剤、組換えタンパク質、化学療法剤、放射性同位元素、抗原、抗新生物剤、酵素、ＰＣＲ産物、受容体、ホルモン、ワクチン、ハプテン、トキシン、抗体、新生タンパク質、合成薬品およびその誘導体および組み合わせなどの薬剤であってもよい。

基質は新生ポリペプチド鎖の合成におけるアミノ酸のような標的または標的の一部であってよく、このとき基質は伸びていくペプチド鎖中に導入されていくアミノ酸またはアミノ酸誘導体でありうる。基質は核酸合成の前駆体としてのヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体であってもよい。合成オリゴヌクレオチドコンジュゲートの作成に有用な構築体はｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＴＴＰおよびｄＧＴＰ、ならびにＡＴＰ、ＣＴＰ、ＵＴＰおよびＧＴＰのホスホルアミダイトまたは誘導体も含む。得られる核酸－コンジュゲートはＰＣＲ法、アンチセンス治療、ならびに予防、診断に用いることができる。例えば、反応がコンジュゲートを作り出すような混合物中で生物学的反応剤を基質と反応させることができる場合には、基質は標的でありうる。このようなコンジュゲートは、医薬の半減期を決定するときのように生物学的またはその他の系を介して標的を追跡することが望ましい場合に有用である。

本発明のコンジュゲートの光分解は放出された基質を損傷しないか、または基質活性を損なわないことが好ましい。タンパク質、核酸、およびペプチドや核酸化学で用いるその他の保護基は、約３００ｎｍ以上のほとんどの照射波長に対して安定であることが知られている。例えば、ＰＣＢカルバメートは長波ＵＶ光（３２０－４００ｎｍ）の照射で光分解を起こし、変化しない基質と二酸化炭素を放出する（図７）。基質光放出の放出に必要な収率と暴露時間は光反応性成分の構造に大きく依存する。非置換の２－ニトロベンジルＰＣＢ誘導体の場合では、光分解の収率および基質の回収は、内部光フィルターとして作用して基質のアミノ基と反応しうる副生成物の形成によって有意に減少する。この場合、照射時間は約１分から約２４時間まで、好ましくは４時間以内、より好ましくは２時間以内、そしてさらに好ましくは１時間以内で変更でき、収率は約１％から約９５％である（V. N.R. Pillai, Synthesis 1, 1980）。α－置換２－ニトロベンジル誘導体（メチル、フェニル）の場合では、光除去の速度および放出される基質の収率はかなり増加する（J.E. Baldwin et al., Tetrahedron 46:6879, 1990; J. Nargeot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2395, 1983）。

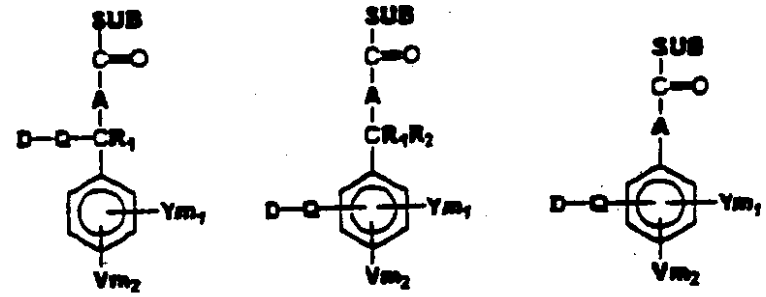
特定の生物学的反応剤の選択は、基質のうちのどの分子基を誘導体とするのかに依存する。例えば、光分解可能なビオチンＮＨＳ－エステルとタンパク質との反応は、リシン残基のε－位などの第１アミノ基またはタンパク質のＮ－末端にあるα－NH_2基との共有結合を形成する。通常は、多数のリシン残基がタンパク質表面にさらされており、このような反応に使用可能である。あるいは、幾つかの他の光分解可能なビオチンは、チロシン、

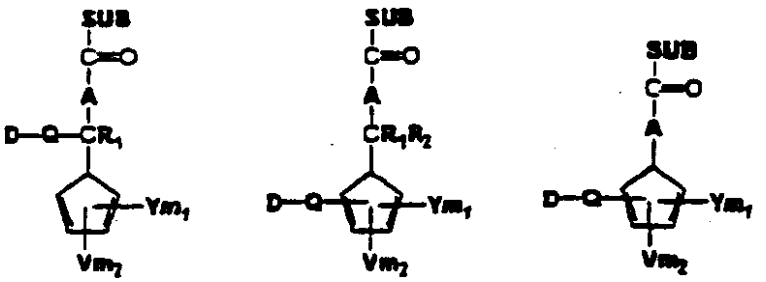
スレオニンおよびセリン残基に存在するヒドロキシル基（－ＯＨ）、アスパラギン酸やグルタミン酸残基に存在するカルボキシル基（－ＣＯＯＨ）、およびシステイン残基に存在するスルフヒドリル基（－ＳＨ）と反応するのに使用できる（表４）。従って、標的タンパク質の表面にある広範な種々の基が使用可能である。

光分解可能なビオチンには広範な種々の反応基が使用可能であるために、受容体リガンド、ホルモン、抗体、核酸などのタンパク質、または糖タンパク質に結合するタンパク質と結合する分子に光分解可能なビオチンを付着することができる。例えば、光分解可能なビオチンは特定タンパク質に対する抗体と便宜的に結合することができる。あるいは、光分解可能なビオチンはＤＮＡやＲＮＡと、または受容体リガンドやホルモンを含む種々の小分子と結合することができる。膜受容体やスプライセオソームなどのタンパク質の単離において結合複合体のビオチン化が重要なことは、従来のビオチンまたは非光分解可能なビオチンを用いて既に示されている。

検出可能な成分の選択は、基質、その環境並びに所望する検出および単離方法に依存する。例えば、低濃度で存在する基質では蛍光分光などの感度の高い検出法が必要であり、従ってクマリンなどの蛍光成分を必要とする。蛍光発光の波長は、混合物中に存在するかも知れない天然蛍光体を妨げないような検出可能な成分を選択することにより選ぶ。基質の迅速な単離を望む場合には、検出可能な成分の選択は適当な結合剤が使用可能であるかによって決定される。例えば、適当な抗体が使用可能であれば、検出可能な成分として抗原を使用できる。生物学的反応剤中において、検出可能な成分、反応性基および光反応性成分は化学的に分離しているので、特定基質の検出及び単離に必要な複数の条件を満たすようにそれぞれの性質を調整できる。

本発明のコンジュゲートは、検出可能な成分、基質または構造中にあるその他のあらゆる化学基を介して固体支持体に付着させることができる。固体支持体はガラス、セラミック、プラスチック、金属またはこれらの物質の組み合わせから構成される。有用な構造と構成には、ミクロタイタープレートウエルなどのプラスチック構造、またはスティック、パドル、ビーズまたはミクロビーズなどの表面、合金および半導体などの無機表面、二次元または三次元のハイブリダイゼーション結合チップ、ならびに磁気ビーズ、クロマトグラフィーマトリックス物質およびこれらの物質の組み合わせを含む。本発明のコンジュゲートの化学構造の例には以下のものを含む：

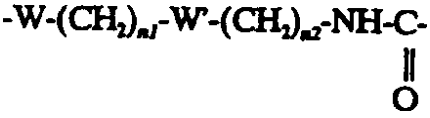




（式中、ＳＵＢは基質を含み；R_1およびR_2は水素、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、－CF_3、－NO_2、－ＣＯＯＨおよび－ＣＯＯＲからなる群より選択され同一または異なっていてよく；Ａは－Ｏ－、－Ｓ－および－NR_1からなる群より選択

される２価の官能基であり；Ｙは同一または異なっていてよい１以上の多原子基を含み；Ｖは同一または異なっていてよい１以上の任意の単原子基を含み；Ｑは任意のスペーサー成分を含み；ｍ１およびｍ２は１－５の整数であり同一または異なっていてよく；そしてＤはR_1およびR_2とは異なる選択的に検出可能な成分を含む）。

上述したように、多原子基は１以上のニトロ基、アルキル基、アルコキシル基、およびその誘導体および組み合わせである。任意の単原子基は１以上のフッ素、塩素、臭素またはヨウ素基、または水素である。多原子基および単原子基ならびにR_1とR_2の化学成分は、光分解反応を開始するのに必要な電磁線照射の周波数と、有効な分解を行うために必要な暴露時間とに影響する。スペーサー成分（Ｑ）は分枝または直鎖状の炭化水素または重合体化炭水化物であり、好ましくは以下の式で表される：



（式中、ＷおよびＷ’はそれぞれ－ＣＯ－、－ＣＯ－ＮＨ－、－ＨＮ－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－および－CH_2－からなる群より選択され同一または異なっていてよく；そしてｎ１およびｎ２は０－１０の整数であり同一または異なっていてよく、もしもｎ１またはｎ２のどちらかが０であるならば、ＷおよびＷ’は任意である。本発明のコンジュゲートの特定の例を図８に示す。

本発明の別の態様は医薬組成物であるコンジュゲートに関する。組成物は安全かつ非毒性でなければならず、ヒトおよびその他の哺乳動物などの患者に投与できる。組成物は水、オイル、脂質、糖類、多糖類、グリセロール、コラーゲンおよびその組み合わせなどの医薬的に許容し得る担体と混合されて患者に投与される。

光放出可能な基質を含む医薬組成物は、例えば短い半減期をもつ薬剤を送達するのに有用である。このような薬剤は、現在の方法では効果を発揮する前に不活性化されることなく投与することはできない。生物学反応剤と共有結合されたコンジュゲートの形の薬剤は単離された薬剤よりも安定である。患者に組成物を投与した後、治療すべき部位を適当に照射して基質を放出させると、患者に即座に好ましい応答を生じる。最大の生物学的効果を生じる点で生物学的反応剤の結合を切断することは、現在の投与法または安定化法では得られない有利な点である。同様にして、薬剤の生物学的効果から患者の体の他の部分を保護することができる。結論として、これらのコンジュゲートを用いると、薬剤の部位指向的および部位特異的な送達が可能である。

本発明の別の態様は、異種混合物からの標的の単離方法に関する。生物学的反応剤を混合物と接触させ標的と反応させてコンジュゲートを形成する。あるいは、コンジュゲートを異種混合物と接触させコンジュゲート内の基質を１以上の標的と結合させる。現在使用可能な方法によってコンジュゲートを混合物から分離することができる（例えば表５参照）。

表５　アビジンを使用したアフィニティ法

材　　料	分離方法
ストレプトアビジンで被覆した磁性ビーズ	磁性分離
ストレプトアビジンで被覆したビーズ	洗浄（例えば遠心分離）および溶出
ビオチン化抗体	免疫沈降
アビジンを有する架橋ビスアクリルアミド／アゾラクトンコポリマー	カラムクロマトグラフィー
ストレプトアビジンで被覆されたアガロース	カラムクロマトグラフィー

混合物の成分の化学的あるいは物理学的分離、電気泳動、エレクトロエリューション、沈殿、遠心分離、濾過、磁性分離、化学的抽出、アフィニティ分離法、例えばアフィニティクロマトグラフィー、あるいはその他のクロマトグラフィー法、例えばイオン交換、勾配分離、ＨＰＬＣまたはＦＰＬＣ等の手順、およびこれらの技術の組み合わせは周知であり、高い回収効率での高速の単離を可能とする（例えば、M. Wilchekら, Mehtods Enzymol. 184, 1990; M. Wilchekら, Anal. Biochem. 171:l, 1988）。分離あるいは単離の後、利用可能な方法、例えば光学吸収あるいは透過（例えば核酸、タンパク質、脂質）、あるいはいずれも市販品として利用可能なBradfordアッセイ（M. Bradford, Anal. Biochem. 72:248, 1976）またはLowryアッセイ（例えばタンパク質）（O. Lowryら, J. Biol. Chem. 193:265, 1951）等を用いて標的を容易に定量できる。分離の後、結合したコンジュゲートに電磁線を照射して基質を放出させる。基質標的は所望であればその後放出された生物学的反応剤から分離し、実質的にあるいは完全に純粋な標的を得ることができる。

この方法により高度に純粋な形態で検出および単離できる標的としては、免疫系の調節物質、造血系の物質、サイトカイン、タンパク質、ホルモン、遺伝子産物、抗原、胎児細胞および幹細胞を含む細胞、毒素、細菌、膜ベシクル、ウィルス粒子、およびこれらの組み合わせ等の殆ど全ての任意の化学的分子あるいは巨大分子が挙げられる。検出と単離は生物学的反応剤の基質に結合する能力により起こる。例えば、核酸は相補的な核酸、タンパク質を結合する核酸、あるいは核酸に存在する化学的部分と特異的に反応する化学的部分と塩基対を形成することができる。タンパク質はそれらのタンパク質に特異的なモノクローナルあるいはポリクローナル抗体、もしくは抗体断片、あるいは対象のタンパク質に存在する化学的部分に特異的に反応する化学的部分により結合することができる。基質は、例えば標的が新生タンパク質の場合は１種以上の天然あるいは非天然のアミノ酸、標的が

核酸の場合は１種以上のリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドあるいはプライマーのような標的の前駆体とすることができる。前駆体は、例えばin vivoあるいはin vitro複製、転写、あるいは翻訳により標的分子中に取り込ませることができる。標的はタンパク質あるいはタンパク質含有複合体、核酸、遺伝子配列、あるいはPCR産物とすることができる。基質はまた、受容体であって、その受容体分子に特異的なリガンドに結合、あるいはさもなくば会合するものであってもよい。単離できる受容体としては、標的がサイトカイン受容体の場合のサイトカイン、標的が抗体である場合の抗原が挙げられる。異種混合物からの標的の検出と単離のために好ましいコンジュゲートは、抗体（ポリクローナル、モノクローナル、断片）に結合した光分解性ビオチン、抗体に結合した光分解性クマリン、脂質に結合した光分解性ダンシル、およびこれらの誘導体および修飾物である。

標的を含む異種混合物は、生物学的試料、任意のタンパク質性組成物、例えば細胞あるいは無細胞抽出物、核酸含有組成物、例えば植物性もしくは微生物物質を含むバイオマス、一次細胞あるいは不死化細胞の細胞培養物、脂質ベシクル、さらには動物であってもよい。動物は体内あるいは体内の部分に存在し得る標的を検出するのに使用し得、あるいは動物モデルから巨大分子あるいは細胞のような標的を回収し、単離するのに使用し得る。基質はまた、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、アミノ酸類似体、ヌクレオシド、ヌクレオチド、脂質、ベシクル、界面活性剤ミセル、脂肪酸、糖、多糖、無機分子、金属およびこれらの誘導体および組み合わせとすることができる。

本方法の適用においては、基質は標的と一体となった成分であってもよく、例えば新生核酸の検出および単離におけるヌクレオチド、新生タンパク質の検出および単離におけるアミノ酸等である。基質は化学的、あるいは酵素的方法により標的中に取り込ませ、検出可能な部分の存在により検出し、単離する。簡単にいうと、例えば複製、転写、翻訳、あるいは転写／翻訳結合系中でコンジュゲートを異種混合物中の物質と接触させる。基質は系中の成分、例えば酵素、前駆体分子、系のその他の物質等の作用により標的中に取り込まれる。コンジュゲートが結合した標的を混合物から分離し、電磁線照射により処理して標的を放出させ、そしてこれを単離する。

コンジュゲートは、例えば、in vivoであってもin vitroであってもよいが、例えば新生巨大分子への酵素による巨大分子前駆体の取り込みにおけるインキュベーションのように、異種混合物と接触させることができる。核酸ポリメラーゼは前駆体ヌクレオチドあるいは核酸プライマーを核酸中に取り込む。無細胞反応混合物中におけるin vitroインキュベーションは典型的には約４℃～45℃、好ましくは約12℃～約37℃の範囲、より好ましくはほぼ室温で行われる。新生巨大分子中へのコンジュゲートのインキュベーションは、インキュベーション条件により約５分、あるいは15分、あるいは約１時間で完了し、あるいは完了するのに２、３時間からそれ以上を要する場合もある。異種混合物が動物あるいは動物モデルである場合には、一般的に体温でin vivoインキュベーションを行い、導入部位からは離れていることがあり得る動物体内の部位へコンジュゲートを行き渡らせてコンジュゲートを標的と反応させ、コンジュゲートを回収する標的と結合させるためには、数時間から数日かかり得る。

本発明の好ましい態様の１つは、光分解性ビオチンを使用したタンパク質の検出または単離に関する。この態様の１つの応用においては、コンジュゲートを形成するタンパク質の特異的な化学基との共有結合の形成によりPCBをタンパク質と反応させる。タンパク質は単離あるいは検出すべき標的であってもよく、あるいは抗体のような標的タンパク質のプローブであってもよい。標的タンパク質はその後、ストレプトアビジンアフィニティ法を用いて単離することができる。

この態様の別の応用は、in vivoあるいはin vitroタンパク質合成から生成され得る新生タンパク質を単離するための光分解性ビオチンの使用に関する。基本的には、光分解性ビオチンを合成し、特別なブロック基を含むアミノ酸（PCB-アミノ酸）に結合する。このようなコンジュゲートをｔＲＮＡ分子に結合させ、翻訳あるいは転写/翻訳結合系を用いてペプチドやタンパク質に取り込ませる。本発明のPCB-アミノ酸は、光が照射されると光分解を起こし、本来のアミノ酸と遊離したビオチン誘導体を形成する特性を有している。こ

のようなタンパク質は構造的および／または機能的に変化を受けていない形態で単離できる。
光分解性ビオチンアミノ酸の製造およびその新生タンパク質への取り込みの手順は僅かの基本的な段階を含むだけである。まず、光分解性ビオチンを合成し、適当なブロック基を有するアミノ酸に結合する。そしてこれらのPCB-アミノ酸コンジュゲートをｔＲＮＡ分子に結合させ、in vivoあるいはin vitro翻訳系で新生タンパク質に取り込ませる。あるいは、ｔＲＮＡ分子をまずリシンのようなアミノ酸に酵素的に結合し、これを次いで反応性PCBに結合する。新生タンパク質は、固定ストレプトアビジンを使用して合成の他の成分から分離および単離する。新生タンパク質からのPCB-ストレプトアビジン複合体の光分解により純粋なもとの形態の新生タンパク質が生成される。
例えば、アミノ基（リシン）、脂肪性およびフェノール性ヒドロキシル基（セリン、スレオニンおよびチロシン）、スルフヒドリル基（システイン）、カルボキシレート基（アスパラギン酸およびグルタミン酸）のような側鎖基を使用してPCBをアミノ酸に結合する（図９）。合成は適当に保護された母体アミノ酸に直接縮合することにより行うことができる。例えば、リシン側鎖アミノ基は、ε-アミノ基の修飾によりPCBで修飾できる。例えば、PCB-メチオニンの合成には主としてα-アミノ基の修飾を使用する。PCB-メチオニンを開始部位においてのみタンパク質合成に参加できるイニシエーターｔＲＮＡに結合させ、新生タンパク質のコピーあたり単一のPCBを取り込ませることができる。
光分解性ビオチンアミノ酸の新生タンパク質への取り込みのための１つの方法は、ｔＲＮＡのミスアミノアシル化を使用する。通常は１つの種のｔＲＮＡは単一の関連する天然のアミノ酸と結合する。本明細書で酵素的アミノアシル化と指称するこの選択的な結合はアミノアシル－ｔＲＮＡシンテターゼと呼ばれる酵素により得られ、ｔＲＮＡ分子に結合されるアミノ酸は天然のアミノ酸に構造的に類似している必要がある。化学的なミスアミノアシル化を使用してｔＲＮＡを非天然のアミノ酸、例えば光分解性アミノ酸と結合することができる。ｔＲＮＡの化学的ミスアミノアシル化の具体的な段階は図10に示す。
示したように、ｔＲＮＡ分子を最初に過ヨウ素酸塩、リシン（pH8.0）及びアルカリ金属リン酸塩で連続的に処理することにより切断して3'-末端残基を除去する（Neuら，Ｊ．Biol．Chem．239:2927-34，1964）。あるいは、遺伝子操作により切断を行うこともでき、即ちｔＲＮＡ分子をコードする切断遺伝子を構築し、転写して切断ｔＲＮＡ分子を生成することができる（Sampsonら，Proc．Natl．Acad．Sci．USA 85:1033，1988）。次に保護されたアシル化ジヌクレオチドであるpdCpAを合成する（Hudson，Ｊ．Org．Chem．53:617，1988；E．Happ，Ｊ．Org．Chem．52:5387，1987）。Fmocのような標準的な保護基を用いてその側鎖および／またはα-アミノ基を適当にブロックしたPCB-アミノ酸を調製し、カルボキシ基活性化剤の存在下で合成ジヌクレオチドと結合する。その後Fmoc基を脱保護することによりアミノアシル化ジヌクレオチドが得られる。
その後その脱保護ジヌクレオチドを介して光分解性ビオチンアミノ酸を切断ｔＲＮＡに結合する。この過程により形成される結合は、アミノアシル-ｔＲＮＡシンテターゼによるｔＲＮＡ活性化から得られるものとは異なるが、最終的な生成物は同じである。T4ＲＮＡリガーゼは0-アシル置換基を認識せず、従って結合アミノ酸の種類に依存することはない（図10）。多くの種類の非天然アミノ酸のミスアミノアシル化を容易に行うことができる。この工程は非常に感受性が高く、ｔＲＮＡとアミノ酸の構造に特異的である。
光分解性ビオチンアミノ酸に結合したアミノアシル化ｔＲＮＡは、慣用のアミノアシルシンテターゼを使用して天然のアミノ酸によりｔＲＮＡをアミノアシル化するか、ｔＲＮＡに結合した天然のアミノ酸を特異的に修飾する特別な化学反応を使用して光分解性ビオチンアミノアシル-ｔＲＮＡ誘導体を製造することにより生成することもできる。これらの反応はポストアミノアシル化修飾と称する。このようなポストアミノアシル化修飾は、ｔＲＮＡは最初にその関連する決められたアミノ酸によりアミノアシル化されるので、ミスアミノアシル化の方法の範疇にあるものではない。
化学的なアミノアシル化とは異なり、ポストアミノアシル化修飾を使用して光分解性ビオチン非天然アミノ酸を新生タンパク質に取り込むことは、ミスアミノアシル化に使用され

る多くの段階を避けることができるので非常に有用である。その上、所望のアミノ酸側鎖と特異的に反応する反応性基を有する多くの光分解性ビオチン誘導体を製造できる。例えば、リシン-ｔＲＮＡ^{Lys}のポストアミノアシル化修飾により、容易に接近可能な一級ε-アミノと反応し、ｔＲＮＡ上のその他の求核基あるいはアミノアシル化された天然のアミノ酸のα-アミノ基と起こる反応を最小にする、PCBのN-ヒドロキシスクシンイミド誘導体を製造できる。このような別の非特異的修飾によりｔＲＮＡ構造の構造的変化を起こし、そのタンパク質合成への参加を高度に抑制することができる。不完全な鎖の形成は、アミノ酸のα-アミノ基が修飾された場合にも起こる。リシン-ビオチン非天然アミノ酸を新生タンパク質へ取り込ませるポストアミノアシル化修飾はこれまでに示されており（ｔＲＮＡ^{nacendTM}; Promega; Madison, WI）、これはウェスタンブロットおよびその後のビオチンの酵素的アッセイを使用したビオチンを含む新生タンパク質の検出に使用されたものである（T.V. Kurzchaliaら, Eur. J. Biochem. 172:663-68, 1988）。しかしこれらのビオチン誘導体は、PCBのNHS-誘導体の場合、光化学的に分解されるビオチンのリシンへの結合を可能とするような光分解性ではない。

PCB-アミノ酸は固体支持体ペプチド合成によりポリペプチドに取り込ませることもできる。まず、α-アミノ官能基の保護のために塩基に不安定なフルオレニルメチルオキシカルボニル（Fmoc）基を使用し、反応性側鎖の保護のために酸に不安定なt-ブチル誘導体を使用してPCB-アミノ酸を誘導化する。合成はポリアミド型樹脂上で行う。アミノ酸を結合のために対称無水物あるいはペンタフルオロフェニルエステルに活性化する（E. Athertonら, Solid Phase Peptide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1989）。次にアミノ酸とPCBを結合し、PCB-アミノ酸をポリペプチド鎖中に取り込ませる。ε-アミノ-Lys、GluおよびAspの側鎖PCB-アミノ酸エステル、Ser、ThrおよびTyrのエステルのような側鎖PCB-誘導体を、ポリペプチドの任意の部位での取り込みに使用できる。PCB-アミノ酸は、予め決められた位置に、あるいは例えばイニシエーターｔＲＮＡに結合されたPCB-誘導化メチオニンを使用して鎖のN-末端に、鎖中に部位特異的に取り込ませることもできる。

PCB-アミノ酸サイトカインおよび真核および原核生物の組換えタンパク質（例えば、α-、β-あるいはγ-インターフェロン、インターロイキン-1、-2、-3等、表皮細胞、繊維芽細胞、幹細胞およびその他の種類の成長因子）、及びホルモン、例えば副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、インシュリン、副甲状腺ホルモン（bPTH）、形質転換成長因子β（TGF-β）およびゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH）等から広範なポリペプチドを形成することができる（M. Wilchekら, Methods Enzymol. 184:243, 1990; F.M. Finnら, Methods Enzymol. 184:244, 1990; W. Newmanら,Methods Enzymol. 184:275, 1990; E. Hazum, Methods Enzymol. 184:285, 1990）。これらのホルモンはホルモン受容体に対する結合特異性を保有している。一つの例はGnRHホルモンであり、この場合ビオチンは、d-ビオチンp-ニトロフェニルエステルの反応によりεアミノ基Lys-6に結合される。このビオチニル化ホルモンは、アビジン被覆カラムを使用してGnRH受容体の単離に使用できる。

PCBのタンパク質、タンパク質複合体あるいはその他のアミノ酸含有標的への取り込みあるいは結合の後、標的を単純な四段階法により単離する（図11）。まず、生物学的反応剤（PCB）を合成する。第２に基質をコンジュゲートを形成する生物学的反応剤に結合する。第２に光分解性ビオチンとアビジン、ストレプトアビジンまたはそれらの誘導体との選択的な相互作用により混合物中のその他の物質から標的を分離する。捕獲された標的は、汚染物の除去を容易にする磁性ビーズ、アフィニティカラムパック物質あるいは充填剤のような固体支持体上に固定することができる。最後に光分解性ビオチンの共有結合の分解を起こす波長を照射して標的から光分解性ビオチンを切り離す。標的は所望の濃度で溶液中に溶解するか懸濁する。コンジュゲート結合標的が固体支持体に結合されていない場合は、標的の放出の後、別の磁性捕獲を行い、PCBの光分解から放出されたアビジン/ストレプトアビジン結合ビオチン部分をその時点で含む磁性粒子を除去することができる。このようにして、全く変化していないタンパク質が精製された形態で、ほぼ所望の任意の濃度で選択した任意の溶液中へ放出される。

PCBの使用の別の例はコンジュゲートがPCB-結合抗体を含んでいる場合である。光分解性

ビオチンを使用することにより、その後に使用するための標的分子と抗体を回収する手段が得られる。結合複合体からのタンパク質の放出は固定化ストレプトアビジンからの結合複合体の放出の後に行うことができる。これにより放出を十分に制御された条件下で行うことができるので有利である。例えば、アフィニティカラムから標的タンパク質を溶出するためには、バッファーの交換、および／または例えば抗体結合部位について競合するエピトープのような競合剤を使用しなければならないことが多い。このためにはタンパク質を損傷をうけるような条件に長時間さらしたり、非常に高価であり得る競合剤を増量する必要があり得る。これに対し、光分解により固定ストレプトアビジンからタンパク質複合体が一旦除去されると、該複合体はより便利に分離することができる。抗体を基質として使用する場合は、抗体を変化しておらず精製された形態で回収することもできるという別の利点がある。

PCB-抗体を使用するための簡単なスキームを図12Aおよび12Bに示す。光分解性ビオチンにコンジュゲートされた標的タンパク質/抗体は次いでストレプトアビジンで固定化される。標的タンパク質/抗体は光を照射することにより切断され、標的タンパク質/抗体が放出される。標的タンパク質は、例えば高くしたか低くした塩（NaCl、KCl）濃度を使用して抗体から分離され、回収される。あるいは、図12Bに示すように、抗体結合部位について競合するエピトープ-PCBコンジュゲートを使用して標的を抗体から除去する。次いでストレプトアビジンで固定することにより抗体-エピトープ複合体コンジュゲートを標的から単離する。その後ビオチン-エピトープ複合体を光分解することにより抗体-エピトープ複合体を放出させる。表２に示すように、タンパク質と相互反応する広範な種類のその他の分子をPCBとともに使用して、ポリペプチド、タンパク質複合体および小リガンド等のタンパク質の分離を行うことができる。

抗体やハイブリダイゼーションプローブとして機能するＤＮＡのようなその他の巨大分子に結合され、あるいは取り込まれたPCB誘導体は、標的の連続的な複数回の検出にも有利に使用できる。ストレプトアビジン-ビオチン相互反応に基づく標的の慣用のアッセイにおけるように、標的の存在はビオチン化プローブに結合するストレプトアビジン-酵素複合体により信号化され、発色や蛍光のような明確な物理的特性により容易に検出される生成物に基質を変換することで増幅された信号を生成する。しかし慣用のビオチンとは異なり、PCB誘導体は完全に除去され得、ストレプトアビジン-酵素複合体の分離除去とその後の別の標的分子の検出のための新たなプローブとストレプトアビジン複合体を添加することを可能とする。ストレプトアビジン-ビオチン相互作用に基づいた細胞化学的標識化についても同様な利点がある。この場合、標識は光により完全に除去され得、別の特異的な細胞化学的標識を使用できるようになる。

好ましい態様の別の応用においては、光分解性ビオチンあるいはPCB誘導体を例えば化学合成、PCR、ニックトランスレーションあるいはＤＮＡもしくはＲＮＡポリメラーゼにより製造されたＤＮＡ（デオキシリボ核酸）、ＲＮＡ（リボ核酸）あるいはＰＮＡ（ポリヌクレイックアミド; P.E. Nielsenら, Sci. 254:1497-1500, 1991）分子に取り込ませることができる（表６）。標的ＤＮＡあるいはＲＮＡはその後上記に記載した方法と同様のストレプトアビジンアフィニティ法を使用して単離できる。単離は例えば市販品として入手できるストレプトアビジンで被覆された磁性ビーズを使用して行うことができる。ビーズはPCB誘導体を含むあらゆるＤＮＡおよびＲＮＡと強固に結合するが、その他の全ての分子は洗浄除去される。光分解性ビオチンはその後照射により標的核酸から除去される。

PCBのＤＮＡおよびＲＮＡのような核酸への取り込みには、ヌクレオチドを光分解性ビオチンで誘導化することにより形成される化合物を合成し、使用する。光分解性ビオチンを使用して修飾されたヌクレオチドの例は図13Aに示す。

PCB部分の核酸への非特異的な取り込みは、例えばビスルファイト触媒シトシンアミノ基転移およびその後のPCB-NHSエステルあるいはPCB-NH-NH_2（PCB-ヒドラジド）との反応を使用して行われる。あるいは、5'-ホスフェートを水溶性カルボジイミド、イミダゾール及びジアミンと反応させてホスホルアミダイトに変換し、得られたホスホルアミダイトをPCB-NHSエステルと反応させる。

固体支持体合成の間に保護オリゴヌクレオチドの5'末端にアミノ基を導入するためには多くの方法が開発されている。例えばカルボニルジイミダゾールにより媒介される5'-OHのジアミンによる修飾、特別なホスホルアミダイトを使用した合成の間の脂肪族アミン部分の5'-または3'-末端への導入等がある。二官能性ホスホルアミダイトも開発されており、これは反応性のアミノ基を合成オリゴヌクレオチドの複数の部位に導入することを可能とする。これらの方法により、それぞれのPCB-NHSエステルとの反応により容易にPCB-カルバメートに変換され得る脂肪族アミノ基を有するオリゴヌクレオチド生成物が製造される。慣用のビオチンのように、類似の方法でそれぞれのPCB-ホスホルアミダイトを使用した固体支持体合成の間にPCB部分をオリゴヌクレオチドに直接導入することができる。

予め決められた、あるいは任意の配列の合成オリゴヌクレオチドは種々の用途を有しており、例えば、プライマー、ハイブリダイゼーションプローブあるいはアンチセンス配列として使用される。ＤＮＡおよびＲＮＡオリゴヌクレオチドの合成にはホスホルアミダイト化学を使用して自動合成機で日常的に行うことができ、CPG（制御孔ガラス）のような固体支持体に結合した核酸鎖を成長させることができる。この方法においては、ホスホルアミダイトおよびその他の試薬は過剰に添加して濾過により除去することができる。合成サイクルは４つの反応を含んでいる。第１に酸に不安定なトリチル基を5'-OH基から除去する。第２に、ホスホルアミダイトを5'-OHに結合する。第３に未処理の5'-OH基をアセチル基でキャップすることにより保護する。最後に、酸化によりヌクレオチド間の結合をホスファイトからホスホトリエステルに変換する。このサイクルを所望の配列が得られるまで繰り返し、その後オリゴヌクレオチドを固体支持体から開裂し、例えばゲル電気泳動およびHPLCを使用して精製する。

各段階の結合効率はできるだけ高いことが好ましく、例えば90%を越え、あるいは約97～99%である。非反応分子は各段階でアセチル基でキャップして望ましくない配列の形成を防ぐことにより排除する。粗オリゴヌクレオチドは完全長の配列に加え、不全配列とも呼ばれる多数のより短い配列を含む。そのような複合混合物の精製は、特に完全長配列を僅かに短い不全配列（例えばn-1、n-2）から単離する場合に困難である。ＤＮＡあるいはＲＮＡの長い配列を合成する場合は結合効率がより低くなって不全配列の数が大きくなり、この問題はさらに深刻になる。5'-PCB-ホスホルアミダイトを使用して、自動核酸合成機での固体支持体合成の間に、完全長オリゴヌクレオチドの5'-末端を選択的に不安定にすることができる。

PCB-ホスホルアミダイトは、アビジンに対する効率的な結合を可能とする、スペーサアームを介してホスホルアミダイト官能基に結合したPCB部分を含み得る。この試薬は糖環上の5'-OHと選択的に反応し、自動合成機で使用し得る。ビオチン化配列は、トリチル分析により結合効率をモニターしながら標準的な合成サイクルを使用して製造することもできる。典型的な結合効率は約90～95%の間である。さらに、5'-PCB核酸の光分解により5'-リン酸化配列が形成される。5'-リン酸化オリゴヌクレオチドは分子生物学の殆どの応用において必要とされるものである。

あるいは、例えば二官能性非ヌクレオシドバックボーンを利用したPCB-ホスホルアミダイトを使用して、3'-末端を含む任意の位置、および複数の部位において、合成の間にPCB部分をオリゴヌクレオチド中に取り込ませることができる。PCR反応で使用されるTaqＤＮＡポリメラーゼおよびその他のＤＮＡおよびＲＮＡポリメラーゼ等の酵素は、ビオチン化ヌクレオチドを核酸に取り込ませることができる。PCR法は、プライマーと酵素的重合剤を使用して核酸中の１以上の特異的な核酸配列を増幅する工程と、その後の増幅された配列の検出を含む（R.K. Saikiら, Sci. 230:1350, 1985; T.J. Whiteら, Trends Gent. 5:185, 1989）。基本的な技術は、米国特許第4,683,195号に記載されており、また米国特許第5,043,272号、第5,057,410号および第5,106,727号にその変形が記載されており、これらは引用により具体的に本明細書の一部とするものである。PCRの用途において、ビオチン化ヌクレオチドが効率的に取り込まれたといういくつかの例がある。これらの実験により、PCB-ヌクレオチドの存在下にPCRを実施すると、標的ＤＮＡ断片の大きな増幅が得られ、同時にPCBによる標識化が得られる。PCR反応に必要なプライマーも標識され得る。

表６は、PCB-ヌクレオチドを取り込ませてin situハイブリダイゼーションおよびPCRのような多くの用途のための標識プローブを生成することができる種々の酵素的方法を挙げたものである。

表６　PCB-ヌクレオチドの取り込みのための酵素的方法

方　法	基　質	酵　素	備　考
ニックトランスレーション	ＤＮＡまたはＲＮＡ	大腸菌ＤＮＡ pol Ｉ	最も一般的な方法
T4　ＤＮＡポリメラーゼを使用した置換合成	二本鎖ＤＮＡ	T4　ＤＮＡポリメラーゼ	dsＤＮＡへの高度に特異的な取り込み
逆転写酵素	ＲＮＡ	モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素	ＲＮＡの長いｃＤＮＡコピーの製造
3'- 末端標識化	dsＤＮＡ	末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ	dsＤＮＡの3'- ヒドロキシル末端標識化
ＲＮＡ標識化	ＲＮＡ	SP6 ポリメラーゼ T3またはT7ＲＮＡポリメラーゼ	T3ＲＮＡがＲＮＡ標識化にもっとも効率がよい
転写後標識化	ＲＮＡ	SP6 、T3または T7 pol	最初にアリルアミン-UTPを取り込ませ、その後それをPCB で修飾する
ＲＮＡの3'- 標識化	ＲＮＡ（ｔＲＮＡ等を含む）	T4ＲＮＡリガーゼ	PCB のADP 誘導体に基づく

ビオチン-アビジン技術は分子生物学および生物医学の分野でＤＮＡおよびＲＮＡ合成の産物の効率的な分離、あるいは核酸中の特異的な配列の検出のための手段として現在広く

使用されている。単離では通常ビオチンをＤＮＡまたはＲＮＡに取り込ませ、その後ビオチンのストレプトアビジンとの相互作用により分離する。例えばこの方法はポリメラーゼ連鎖反応の生成物であるＤＮＡの単離に広く使用されている。検出では典型的にはビオチン標識核酸プローブを製造する。このプローブは遺伝子構造および遺伝子機能研究、ヒト、動物および植物病原体の診断、およびヒト遺伝子異常の検出において広い用途が見出されている。

しかし慣用の方法はビオチンを核酸から切断あるいは放出させることの困難により制限されるものであった。特に、ＤＮＡまたはＲＮＡがビオチン-アビジン相互作用により分離された後に、変化していないＤＮＡまたはＲＮＡを得ることが非常に望ましい。例えば、新生ＤＮＡにビオチンが存在すると、その後のクローニングあるいはハイブリダイゼーション分析におけるその利用が妨害され得る。さらに、酵素結合アッセイの後にビオチン化核酸プローブからビオチンを除去できないと、同じ試料について別のハイブリダイゼーションアッセイを行うことができない。

核酸の単離あるいは検出において光分解性のビオチンを使用すると、ビオチンを一段階で除去する迅速で有効な方法が得られ、上記のような困難の多くのものが解消される。ビオチン-アビジンに基づいたＤＮＡの単離の場合には、これにより固定化されたアビジンからのＤＮＡの放出の段階も得られる。

本発明の好ましい態様においては、核酸の単離は３つの基本的な段階に基づくものである。第１に、酵素的あるいは化学的手段により光分解性ビオチン誘導体を核酸分子に結合するか、あるいは酵素的あるいは化学的手段により光分解性ビオチンヌクレオチドを核酸に取り込ませる。特定の光分解性ビオチンの選択は、核酸上のどの分子基を誘導化するのかによる。例えば、芳香族アミン、糖ヒドロキシル基あるいはリン酸基と共有結合を形成することにより光分解性ビオチンを核酸に結合できる（表４）。PCBは、化学的あるいは酵素的手段によりオリゴヌクレオチドに取り込ませることもできる。次に、磁性ビーズ、アフィニティカラムパック物質あるいは充填剤のような物質上に固定されていてもよいアビジン、ストレプトアビジンあるいはその誘導体との光分解性ビオチンの選択的相互作用により核酸分子を分離する。光分解性ビオチンを使用して核酸を複合混合物中のその他の分子から分離する方法は十分に確立されており、非分解性ビオチンを利用するより慣用的な方法と同様なものである。これには典型的にはストレプトアビジン-ビオチン相互作用に基づいたアフィニティ法を使用し、それによりビオチンを含む核酸がそのストレプトアビジンとの相互作用により固定化される。この方法は、表５に示したように、ストレプトアビジン被覆磁性ビーズ、ストレプトアビジン－セファロースカラムおよびストレプトアビジンコンジュゲート充填剤を使用するものであり、これらは全て市販品として入手できる。例えば、結合あるいは取り込みによりPCBを含む核酸分子は、ストレプトアビジン被覆磁性ビーズを使用して単離される。次いで非結合生物分子をプールしたものを洗浄してその他の反応物、バッファーおよび塩を除去する。最後に、光分解性ビオチン共有結合の破壊を起こすような波長で照射して核酸から光分解性ビオチンを切断する。生物学的反応剤は実質的に、あるいは完全に純粋な核酸を残して除去することができる。

本発明の別の形態は、光分解性コンジュゲートをPCR増幅とともに使用することに関する。PCR産物の単離のための方法には１種以上のオリゴヌクレオチドプライマーを基質として使用することができる。標的の核酸配列をコンジュゲートされたプライマーを使用してPCR増幅する。プライマーと生物学的反応剤との間の共有結合は電磁線により選択的に分解性であり、増幅された配列を放出する。この方法により選択的に増幅できるヌクレオチド配列としては、生物学的試料中に見られるヌクレオチド配列、細菌ＤＮＡおよび真核生物ＤＮＡがある。慣用のビオチンとは異なり、PCBによりポリメラーゼ連鎖反応のビオチン化ＤＮＡ産物を完全に除去する有効な方法が得られ、単一の段階で同時にPCR産物をアビジンあるいはストレプトアビジン結合媒体から放出しそのビオチン化を除去する手段が提供される。

慣用のビオチンに対する別の利点としては、特別な試薬やバッファーを必要としないということがある。PCR産物からのビオチンの光切断の後に得られるＤＮＡはクローニングや

分子生物学におけるその他の通常の用途に適している。PCR産物からのビオチンの光切断の後、ゲル電気泳動のような標準的な分析方法により正確に分析することができる。PCBを含むハイブリダイゼーションプローブを純粋なものとすることができ、この場合はビオチンを完全が除去され、第２のビオチン化プローブを使用して標的ＤＮＡを再プロービングできるようなる。ＤＮＡに取り込まれたPCBは、簡単に放出できるようにするためにビオチンの特性を弱めたいくつかのビオチンの誘導体（例えばイミノビオチン）とは異なり、アビジンに対する高い結合アフィニティを保持している。

PCBを使用したPCR産物の単離のための２つの方法を図14Aと14Bに示す。両方の方法において、標的ＤＮＡを増幅するもととなる細胞の最初のプールのソースは、抹消血や生検組織のような種々のソースからのものとすることができる。細胞溶解の後、全ゲノムの粗抽出物をPCRにかける。

方法Ａ（図14A）においては、ＤＮＡプライマーは標的ＤＮＡの隣接配列から合成され、5'末端に光分解性ビオチンを取り込ませる。このためには、ＤＮＡ合成の間にオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端にPCB-ホスホルアミダイトを直接導入することができる。通常のdNTPを使用してPCRサイクルを複数回行う。この過程により、各相補鎖の5'末端に光分解性ビオチンが存在するPCR産物が得られる。PCR産物を、例えばＤＮＡの5'末端に存在する光分解性ビオチンに結合する、例えば被覆磁性ビーズ（例えばDynabeads M-280 Streptavidin）上に存在するようなストレプトアビジンを使用して、ヌクレオチド、酵素、バッファーを含むPCR混合物のその他の成分を含む混合物から分離する。その後の典型的な手順としては、40μｌの洗浄したDynabeads M-280 Streptavidinを40μｌのPCR混合物と混合し、室温で15分間インキュベートする。次いで例えばDYNAL磁性粒子濃縮機のような磁性手段を使用してDynabeadsを回収する。残りのプライマーは、その5'末端に光分解性ビオチンが存在することによりストレプトアビジン結合物質に結合する。NAP-5（Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ）のような小さな遠心分離管を使用して、ストレプトアビジン-磁性ビーズ捕獲を行う前に小分子およびプライマーを除去することができる。ストレプトアビジンに結合した固定されたPCR産物を光分解してＤＮＡからビオチンを放出させ、修飾されていないPCR産物を回収する。

方法Ｂ（図14B）においては、プライマー汚染の問題は解消される。慣用のオリゴヌクレオチド合成を使用して5'ビオチン化することなく標的ＤＮＡの隣接配列についてＤＮＡプライマーを合成する。通常のdNTPをPCB-dUTPの小プールとともにPCR反応物中に導入する。便宜上、dNTPとPCB-dUTPとは予め混合してアリコートとしPCR反応物とともに使用することができる。PCR産物を例えば被覆磁性ビーズ（例えばDynabeads M-280 Streptavidin）上に存在するようなストレプトアビジンを使用して、ヌクレオチド、酵素、バッファー及びプライマーを含むPCR混合物のその他の成分を含む混合物から分離する。

この時点でストレプトアビジンに結合した固定PCR産物を光分解してＤＮＡからビオチンを放出させ、修飾されていないPCR産物を回収する。ストレプトアビジンに結合した固定ＤＮＡをビオチン化プローブを使用してアッセイする場合は方法Ａが好ましい場合がある。この場合は、全複合体をアッセイの後に光分解とその後の付加分離段階により放出させ、ビオチン化プローブを除去し、例えばクローニング等に障害なくさらに使用し得るPCR産物を残すことができる。また、中間的なアッセイなしにプライマーを含まない産物の放出を必要とする場合には方法Ｂが好ましい場合がある。これによっても、ＤＮＡの分子あたりより多くのPCB分子が存在するのでより高率の回収が得られる。

PCRは多様な疾患関連マーカーの検出にも広く使用されている。表７には疾患および疾病の検出のためのPCRの種々の使用とそのような診断的および試験的用途におけるPCBを導入したPCRの可能性のある使用を示す。

表７　疾患関連ＤＮＡ／ＲＮＡの検出のためのPCR の使用

疾患／ウイルス／細菌	プライマー	PCR産物のアッセイ
HTLV-I	tax 、gag またはenv を含む種々の標的	液体ハイブリダイゼーション/ スポットブロット
HIV	ウイルスの保存領域における標的化	オリゴマーハイブリダイゼーション
B 型肝炎	pol 遺伝子	サザンハイブリダイゼーション
パピローマウイルス		ドットブロット 制限酵素分析
サイトメガロウイルス （ヘルペスウイルス群）		ハイブリダイゼーション
エンテロウイルス	100%保存された領域 ＲＮＡ	RT-PCRとその後のハイブリダイゼーション
胃腸炎 コレラ		リバースハイブリダイゼーション

本発明の好ましい態様においては、PCBに基づいたPCR産物の単離および検出のための方法を種々の疾患の診断アッセイ、変異の検出、並びに特異的なＤＮＡ配列の同定に応用することができる。例えば、ウェスタンブロットおよび免疫蛍光法のような血清学的アッセイおよび放射免疫沈降アッセイはHIV-1に対する抗体の存在についてスクリーニングするための迅速で感受性の高い方法を提供する。さらに、現行のPCRに基づいた分析においては、ウイルスゲノムの高度に保存された領域を増幅の標的とし、溶液中で増幅された産物の１つの鎖に対する^{32}P-標識オリゴマープローブを使用したハイブリダイゼーションを行う。このような試験はウイルスの直接の検出のためにのみ使用できる。HIVの検出に有用なアッセイは、活性なウイルスだけでなく、ゲノム中にまだ発現されていないが細胞中には

以前として存在する潜伏性のウイルスの存在も検出するものである。これにより潜伏性のウイルスと活発に複製しているウイルスの両方の検出が可能となる。これは母体抗体が血清学試験を妨害する新生児においては特に有用である。
別の好ましい態様においては、コンジュゲートを使用してゲノムまたはｃＤＮＡライブラリーを効率的に作成し得る。全ＲＮＡからのPCRによるｃＤＮＡライブラリーの構築により、生物学的組織の量が厳密に制限されている場合の細胞特異的遺伝子発現を分析するための唯一の方法が提供される。この方法は特異的な刺激が集団中の少数の細胞の修飾あるいは分化を生じる場合に特に応用できる。
例えばｃＤＮＡライブラリーの構築のための現在の方法は、細胞ＲＮＡの単離と、通常はより豊富なｒＲＮＡおよびｍＲＮＡ成分からｍＲＮＡをさらに精製することを必要とする。PCRに基づいた方法の主要な利点はｍＲＮＡの精製が必要ないことである。これは、生物学的材料が制限され、効率的なｍＲＮＡ精製が不可能である場合に特に有利である。全体的な手順は概略的に図15に示す。
高クオリティーのそのままのＲＮＡはグアニジウム塩酸塩法により製造される（S.J. Gurrら, PCR: A Practical Approach, Oxford University Press, New York, 1991）。第１鎖ｃＤＮＡは、1:1の比でdCTPとともにあるPCB-dCTPの存在下（両者の最終濃度はその他のdNTPのものに等しくなければならない）にAMV逆転写酵素を使用して合成される。この後にオリゴ-dTプライマーを除去するが、これは磁性捕獲とその後の照射により迅速で定量的な形態で行うことができる。現在の方法は、価値のあるｃＤＮＡ：ＲＮＡハイブリッドの損失を招くCTAB沈降を使用するものであり、この後にオリゴ-dGを使用してホモポリマーテイリングを行う（A. Otsuka, Gene 13:339, 1981）。ホモポリマーテイリングの後、ＲＮＡを加水分解するが、これはｃＤＮＡを65℃で50mM NaOHのような過酷な条件にさらすことになる。これらの段階は、PCB-ヌクレオチドコンジュゲートを使用すれば必要ない。第２鎖合成およびｃＤＮＡ増幅はPCB-ヌクレオチドの存在下でのPCRにより行われる。全てのPCR産物をエタノール沈殿させ、適当に消化したベクターと結合する。これらのベクターは磁性捕獲および照射を使用して迅速に精製される。これらのベクターはPCB-修飾ハイブリダイゼーションプローブを使用して対象のベクターを選択的に除去することによりスクリーニングすることができる。このベクターをその後磁性により捕獲し照射して対象のＤＮＡを含む純粋なベクターを得ることができる。
本発明の別の形態は、部位特異的突然変異誘発の方法を容易にする。例えば、カセット式変異誘発は部位特異的変異体を形成する強力な方法であり、変異の導入を確認するのに遺伝子全体を配列決定する必要がない。カセット式変異誘発の基本的な段階は、十分に離れた特異的な制限部位とともに対象の遺伝子を含むベクターを構築することを必要とする。対象の遺伝子を有するベクターの２種の特異的な制限酵素を使用した制限消化により、変異を導入する二本鎖ＤＮＡのカセットを除去する。
自動オリゴヌクレオチド合成を使用して所望の変異を含むカセットを合成する。消化したベクターとそのカセットとを結合して完全なベクターを生成する。この結合混合物を宿主細胞中に形質転換し、プラスミドミニプレップのカセット領域を配列決定することによりコロニーをスクリーニングする。この方法は、バクテリオロドプシンについて示されているように多数の部位特異的変異体を迅速にかつ正確に生成できるが（H.G. Khorana, J. Biol. Chem. 263:7439, 1988）、PCBを使用することにより時間と資源を節約できる場合がある。
最初のベクター制限処理の後、カセットを含む新しい変異体を化学的にあるいは酵素的にPCBで標識する。その後結合混合物をストレプトアビジン相互作用、例えばDynabead-280ストレプトアビジンを使用する磁性捕獲を使用して精製する。この捕獲によりPCB-カセットと遊離のPCB-標識カセットとを含む組換え体ベクターの選択的単離ができる。光分解により任意の所望の溶液及び濃度で純粋な形態のベクターを含む変異体が放出される。その後の形質転換体は非常に高い確率で所望の変異体のみを含む。
現在の方法においては、ベクターの制限消化の後、二重に制限処理されたベクターを、例えばアガロースゲル電気泳動により完全に精製することは困難であることが多い。得られ

るＤＮＡ断片のサイズの差は非常に小さいのが通常である。例えば、典型的なカセットのサイズは約30塩基対（bp）であり、典型的なベクターは約5000bpである。カセットを除去するための制限酵素消化により5000bpと30bpの断片が生成されることになり、これらは容易に区別できるとともに単離できる。しかしこれは完全な消化が起こると仮定した場合のことである。部分的な消化であると5030bpの別の断片が生成され、これは容易には検出されず、まして区別や単離することはできない。即ち、制限処理されたベクターの精製が有効でないと変異体カセットが導入されない結合の確率が高くなる。PCBを使用するとゲル電気泳動とその後の制限処理断片の溶出とが避けられる。磁性捕獲は結合混合物中で行うこともできる。

リポソームは、細胞膜への融合を経て細胞に生物学的に重要な物質を向かわせ導入するのに広く使用されている（G. Gregoriadis編, Liposome Technology, vol III, CRC Press, Boca Raton, FL, 1984）。アビジン-ビオチン系はカプセル化したリポソームと標的細胞との間が媒介されるin vitro実験に有用である。このような実験は、ビオチンを膜に導入するためにリン脂質を含むビオチンを使用することを含む（E.A. Bayerら, Biochim. Biophys. Acta 550:464, 1979）。アビジン-ビオチン系を、薬剤を細胞内に向かわせるのに使用することも試みられている。これらの実験により、修飾された脂質の特性に対するビオチン化の影響と、ビオチン化分子が化学的に変化しているとしてもその基本的な性質を維持することが判った。例えば、ビオチン化脂質は有機溶媒中に完全に抽出され得、リポソームおよび混合リポソームを形成し、後者においては正確に配向する（B.Rivnayら, Methods Enzymol. 149:119, 1987）。脂肪酸成分は二重層の内側を構成し、ビオチニル頭部基は溶媒の水性環境に露出される。このように、ビオチン化脂質をリポソーム製造に使用すると、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用の殆ど不可逆的な結合が得られる。ビオチンおよびその相互作用はこれらのリポソームの取り扱いを容易にするが、例えばストレプトアビジンで被覆した磁性ビーズのような固定ストレプトアビジンを使用してこれらのリポソームを濃縮しあるいは分離する試みは悉く失敗しており、これは濃縮/分離されたリポソームを結合ストレプトアビジンから分離することが実質的に不可能であることによる。

PCB-脂質を使用すると、照射によりPCB-脂質を含むリポソームが所望の溶液中に所望の濃度で放出されるのでこれらの制限が容易に解消される。PCB-脂質を使用したリポソームの操作に含まれる段階は、（1）光分解性ビオチン誘導体を化学的手段によりリポソームに結合するか、あるいは最初に脂質をPCBで誘導化しその後リポソーム（PCB-リポソーム）を製造することにより光分解性ビオチン脂質（PCB-脂質）をリポソームに取り込ませること、（2）通常は磁性ビーズ、アフィニティカラムパッキング物質およびフィルターのような物質上に固定したアビジン、ストレプトアビジンあるいはそれらの誘導体との光分解性ビオチンの選択的相互作用によりPCB-リポソームを濃縮しあるいは分離すること、および（3）光分解性ビオチン共有結合の破壊を起こす波長で照射することによりPCB-ビオチンから光分解性ビオチンを切断することを含む。

種々の光分解性ビオチンを直接リポソームに結合する方法はPCBを使用して脂質分子上の官能基を修飾することを含む。特定の光分解性ビオチンの選択は、リポソームを構成する脂質上でどの分子基を誘導化するかによる。例えば、光分解性ビオチンのリポソームへの結合は、ホスファチジルセリン上のアミノ基と共有結合を形成することにより得られる。任意の官能基を修飾してPCB-脂質を生成することができる基特異的PCB誘導体は多数のものが利用できるが、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルセリンを例示できる。PCB-ホスファチジルセリンおよびPCB-ホスファチジルエタノールアミンを図16に示す。

異種混合物からのリポソームの濃縮と分離は、非分解性ビオチン脂質を利用する、より慣用の方法と同様の確立された方法により、光分解性ビオチンを使用して容易に行うことができる。これは通常はストレプトアビジン-ビオチン相互作用に基づいたアフィニティ法を使用し、これによりビオチンを含むリポソームをそのストレプトアビジンとの相互作用により固定することを含む。これらの技術は、ストレプトアビジン被覆磁性ビーズ、スト

レプトアビジン-セファロースカラムおよびストレプトアビジンコンジュゲートフィルターを使用し、これらは全て市販品として入手可能である。ストレプトアビジンとのアフィニティ相互作用を使用してPCB-リポソームを濃縮した後、照射により所望の溶液中に所望の濃度でリポソームを放出させることができる。

アビジン－ビオチン技術は、アフィニティークロマト化学の分野において、広く使用されている。アフィニティー化学においては、特異的細胞構造またはサブ細胞成分が選択的な標識によって局在化されている。免疫組織化学（ＩＨＣ）およびin situハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）という２つの異なるアプローチがある。ＩＨＣにおいては、ビオチン化された一次抗体または結合リガンド（または、ビオチン化された二次抗体を使用することもできる）は、細胞表面上の特異的抗原または細胞構造を指向する。その後、細胞または細胞構造を、アビジン－酵素コンジュゲート、アビジン－蛍光マーカー、またはアビジン－フェリチン複合体からなる電子顕微鏡的な位置測定のためのリポーター複合体を適用して、位置を測定する。

ＩＳＨにおいては、ビオチン化されたＤＮＡプローブを用いて、個々の細胞または組織切片のｍＲＮＡまたはＤＮＡ配列の特異的な位置を標識する。同様な範囲のアビジンベースのリポーター複合体を、免疫組織化学において、酵素を含めて、蛍光およびフェリチン結合アビジンとして使用することができる。しかしながら、これらの２つの技術の従来の応用における大きな制限により、試料に一度標識がなされると、ビオチンーマーカー複合体の除去が困難となる。標識の除去は別の標識を行うことを可能にし、それによって組織におけるサブ細胞成分と種々の細胞との間の相互関係をマッピングするための手段を提供する。ＰＣＢの使用は、抗体またはＤＮＡプローブおよびＰＣＢに結合されているリンカーの光分解によりマーカー複合体の遊離が生じるであろうから、この終着点に到達するための簡便な手段を提供する。

in situハイブリダイゼーション技術は、特異的な細胞性ＤＮＡ、または個別の細胞もしくは組織切片中に不均一に分布されているＤＮＡを検出したり、分布においてしばしば焦点であるウイルスの核酸配列を検出するために用いられる。摘出された組織において細胞当たりの標的分子の平均含量を求めるためのサザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、またはドットブロット－ハイブリダイゼーションアッセイと対照的に、ＩＳＨによって、標的分子の有意なレベルを含む少数の細胞中に固まりとなって分布している特異的な標的配列が検出される（E.J. Gowans et al., Nucleic Acid Probes, R.H. Symons editor, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989）。

現在の技術は、単一の組織切片、染色体スライドまたは細胞のスライドは一回に限って使用可能であり、共に調節されているか相関している別の配列のセットであるかもしれない第二の標的の分布をつり上げることはほとんど不可能であるという事実によって制限されている。ＰＣＢラベルされたプローブは、このような貴重な試料についての複数回のin situハイブリダイゼーションのための完全に非侵襲的なアプローチを提供する。複数回のin situハイブリダイゼーションと組み合わせて、合成写真により、各種の核酸の分布を構成することができる。ＩＳＨの手順は、発表された手順を採用した（D.J. Brigati et al., Virol. 126:32, 1983; I. Guerin-Reverchon et al., J. Immunol. Meth. 123:167, 1989）。この手順は、パラフィン包埋組織または凍結組織であるかもしれない組織の注意深い固定と切片作製とを含む。固定は核酸を固定するばかりでなく、組織をスライドにしっかりと固定するようにする。グルタールアルデヒドをＤＮＡの検出のために使用し、パラホルムアルデヒドをＲＮＡの検出のために使用する。いずれの工程も、dsＤＮＡまたはdsＲＮＡが反応の標的である場合には必要な任意の変性工程を含む。さらなる工程はＰＣＢを用いて標識された異なるプローブの製造と連続的な様式によるこれらのプローブのハイブリダイゼーションとを含む。ＩＳＨは、溶液およびフィルターハイブリダイゼーションと同様の原理に続く（R.J. Britton et al., Nucleic Acid Hybridization, B.D. Hames and S.J. Higgins editors, IRL Press, Oxford, 1985）。ＰＣＢ－標識プローブは、その後、ストレプトアビジン結合検出系を用いる種々の技術を用いて検出される。組織切片または染色体写真中の第一のプローブの分布を示す写真が得られる。光分解により、ビ

オチン部分に沿った検出アセンブリの遊離が生じる。ＩＳＨおよび検出は、その後、第二のプローブを用いて繰り返され、そしてその分布が得られる。組織切片中の種々のプローブの分布を示す合成写真を作製する。

in situハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）技術は、個別の細胞または組織切片中における染色体レベルでの特異的細胞性ＤＮＡ配列またはＲＮＡ配列を検出するためにも使用される。この方法は、ハイブリダイゼーション組織化学と呼ばれる。ＩＳＨは、概念的には、組織または細胞中に不均一に分布している細胞性核酸の分布の検出に適するばかりでなく、しばしば分布における焦点であるウイルス核酸配列の検出にも適している。ＩＳＨによる核酸の検出は、試料中における標的分子の細胞内および細胞間分布を正確に反映するという初期の目的を満足させるものである。一般的に、ＩＳＨは正常な遺伝子または異常な遺伝子に対応するＤＮＡを検出し、特殊なＤＮＡ配列の染色体の位置を同定し、ｍＲＮＡ検出によるこれらの遺伝子の発現のレベルを測定するために使用される。

特に、ｍＲＮＡは遺伝子発現および細胞の分化の研究におけるin situハイブリダイゼーションのための共通の標的である。ウイルス感染細胞の特別の場合には、ウイルスのゲノム核酸またはＲＮＡ転写物を検出することができる。ＩＳＨは、組織内の標的細胞の組織学的マッピングを行う上では特に貴重である。対照的に、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーションおよびドット－ブロットハイブリダイゼーションアッセイでは、摘出された組織中における細胞あたりの標的分子の全体的な濃度が測定される。ＰＣＢを免疫化学およびin situハイブリダイゼーションの応用によりビオチンの代わりに用いる場合には、標識の局在の方法論はほぼ同じである。しかしながら、抗体またはハイブリダイゼーションプローブとのＰＣＢ結合を光で切断する試料の単純な照射によってＰＣＢ－アビジンマーカー複合体の形態で標識を完全に除去できるということが大きな利点である。この工程により、試料、典型的には組織切片は、別の異なるプローブによってさらに連続的な標識を行うために有用なものとなる。

免疫組織化学的な技術によって細胞内で検出される抗原性ペプチドである、ホルモンやウイルス遺伝子の産物は、新生（de novo）合成または単なる沈着および受動的蓄積を表すのかどうかを決定するための要請がしばしばある。それは、ＩＳＨによって検出された特異的ｍＲＮＡが翻訳されてタンパク質産物となったかどうかを決定するためにも有用である。同じ酵素－アビジン結合リポーター複合体を用いて単一の同じ試料の連続的なインターロゲーション（interrogation）が可能であるから、ＰＣＢを用いるとこのような決定が容易になる。このアプローチにより、異なる試料の使用による複雑化を避けることができる。

本発明のコンジュゲートを用いて、他の方法で位置を決めることが難しい、または不可能な多くの異なる遺伝子の位置を決定することができる。神経伝達物質レセプターは、大きな遺伝子ファミリーのメンバーである。発現戦略と相同クローニングとの組合せによって、このファミリーにおける多数のレセプター遺伝子が、現在、クローニングされている。これらの遺伝子は、グルタメート、グリシン、γ－アミノ酪酸（ＧＡＢＡ）レセプターのためのレセプターをコードする遺伝子を含む。クローニングにより、神経生物学者によって予想されていなかった別の神経伝達物質レセプターがメンバー中に存在することが明らかになった。この驚くべきレセプターの相同性の重要性は、未だ知られていないが、ＩＳＨは個別のレセプターのサブタイプが脳内でユニークなパターンで発現していることを示した。重要な目的は、脳内でのこれらのレセプターの分布を決定することである。通常、これは、各々が異なるハイブリダイゼーションプローブと接触させられた多くの薄片を用いてなされる。しかしながら、これらの実験には、複数の組織切片が用いられるという欠点がある。対照的に、ＰＣＢを用いると、同じラットの脳の切片を繰り返して分析し、各レセプターの発現の完全な分布を決定することが可能となる。

さらに、クローニングされた遺伝子とマーカーとは、ＩＳＨによって染色体の特異的な領域に局在化される。配列は、放射能で標識されたプローブを、直接、染色体スプレッド（spread）にハイブリダイズさせることによってサブ－染色体領域に局在化することができる。染色体スプレッドは、有糸分裂の紡錘体を破壊するコルセミド様の化学品によって細

胞の分割が中期でブロックされた細胞を用いてなされる。固定および染色の後、明るいバンドと暗いバンドのパターンが各染色体上に現れるので、染色体が同定される。ＩＳＨの後、放射活性のあるプローブの位置がスプレッドを覆う写真用感光乳剤中の銀粒子の分布によって明らかになる。しかしながら、ヒトの遺伝子の単一のコピーの検出は困難であり、３０またはそれ以上の多数の中期スプレッドを覆う銀粒子の分布をプールすることによってのみ行うことができる。

ＰＣＢは、発色団上の特異的遺伝子配列上の位置決めと第二のプローブを適用した後にプローブを光遊離させることができるというユニークな利点を提供する。あまりに近接した配列を検出する場合は、プローブを予め除去することが、当初の（オリジナルの）プローブからの妨害を避けるために必要であるかもしれない。

さらに、この方法では、非常に多数のプローブを連続的に適用することが可能となり、そして同時に測定することができる異なるマーカー複合体の有用性によっては制限されない。この技術は、染色体上に複数のプローブを迅速に整列させるためにも有利に使用することができる。

ビオチン－アビジン技術の重要な応用は、しばしば種々の細胞型を含む複合体混合物からの細胞の分離である。利用され得る細胞には、生物学的試料、組織培養細胞、バクテリア細胞および病変細胞の範囲にある細胞が含まれる。細胞は、哺乳類の幹細胞または胎児細胞などの哺乳類の細胞であってもよい。レセプターには、古典的な細胞表面レセプターおよび他の表面タンパク質に対する抗体ばかりでなく、他の分子に特異的なアフィニティーを有する細胞表面分子もまた含まれる。好ましくは、レセプターは標的細胞上の細胞表面マーカーを認識する抗体、または標的細胞上の細胞表面リガンドもしくは他の巨大分子を認識する特異的タンパク質である。細胞上の表面抗原、レセプターまたはリガンドに特異的な、ＰＣＢ－修飾抗体は、例えば、蛍光－活性化セルソーター（fluorescence-adtivated cell sorter，ＦＡＣＳ）などの装置を用いた細胞の分離または選別（ソーティング）に使用することができる。これらのＰＣＢ－抗体は、ストレプトアビジンでコートした磁性ビーズに結合したときに、特別の抗原を有する特異的細胞集団と結合することができ、その後、免疫磁性分離（ImmunoMagnetic Separation、ＩＭＳ）を用いて分離することができる。

現在の方法論では、分離されたまたは選別された細胞集団からこれらの磁性粒子をおだやかに分離することはできない。しかしながら、ＰＣＢ－修飾抗体は、照射後に、磁性粒子から速やかに分離され得る。ＰＣＢ－抗体を含むＩＭＳは、細胞－選別、組織のタイピングで使用することができ、そして上述した手順の変法を用いて微生物の選択的な豊富化に使用することができる（A. Elbe, J. Immunol. 149:1694, 1992; S. Qin, Sci. 259:974, 1993; L. Leclerecq, Immunol. Lett. 28:135, 1991）。

従来の方法においては、標的細胞上だけにある抗原に選択的に結合するビオチン化抗体が使用された。標的細胞を、その後、混合物からストレプトアビジン被覆磁性ビーズまたはストレプトアビジン系のアフィニティーカラムを用いて単離することができる。アフィニティー物質は、時折、一次抗体に対する二次抗体を含む。このアプローチには、がビオチン－ストレプトアビジンの相互作用を介してひとたび細胞がアフィニティー媒体に結合したときに、それらの遊離が困難であるため、厳格な制限がある。ビオチン－ストレプトアビジンの相互作用、または抗原－抗体の相互作用を破壊するように設計された普通の方法では、遊離された細胞の生存率が全体的に低下し得る。これは、後に細胞を培養したり、または移植したりするために使用することになる場合には、非常に大きな不利益となる。同様に、抗原－抗体相互作用を破壊する低ｐＨなどの条件は、細胞の障害の原因となる。標準的な技術では、培地中で終夜インキュベートし、ついで激しく攪拌する。これによって、結合に関与する抗原がはずれて落ちる。しかしながら、この方法は時間を要し、細胞の破壊につながり、そして完全な遊離は生じない。別の方法は、酵素処理によって抗原－抗体相互作用を破壊するものであり、この方法も細胞を障害しうる。さらに別の方法は、抗－ＦＡＢ抗体を利用して、抗原と競合させる方法である。このような方法は時間を要し、抗体を使用するために費用がかさみ、部分的に有効であるにすぎない。これらの細胞の

分離（遊離）方法は、特に、抗原－抗体の相互作用が強いとき、またはその結合に数種類の抗原－抗体相互作用が混合して含まれているときには、全く効果がない。ＮＨＳ－ＳＳ－ビオチン（スルホスクシニミジル　２－（ビオチンアミド）エチル－１，３－ジチオプロピオネート；Pierce Chemical；Rockford，IL）のように化学的に切断することができる従来のビオチンには、切断媒体がチオールなどの高濃度の還元剤を含むため、タンパク質のジスルフィド結合の還元を引起し、さらに細胞の生存率を低下させるという深刻な問題がある。

対照的に、光分解性ビオチンは、単に光を当てるだけで固定化された細胞を遊離するための高価でなく、効果的かつ迅速な手段を提供する。遊離は、抗体とビオチンとの間の共有結合の光切断によって生じる。抗体が遊離された細胞上にまだ残っている間は、このことは、通常、細胞の完全な状態または分離された細胞の他の利用にとっての問題とはならない。光切断は短時間に行われ、そして光分解されたビオチンのほぼ全部が除去されるため、遊離は迅速かつ完全である。

さらに、光分解性コンジュゲートを用いると、試料細胞の少数集団を代表する細胞を、正確かつ効果的に選択することができる。このことは、免疫細胞、幹細胞、胎児細胞、前駆細胞およびほとんどのおよびリンパ（例えば、間質性、リンパ性）、血液（例えば、動脈血および末梢血）または組織（器官、軟組織、筋肉）の試料からの細胞の型の選択方法などを可能なものにする。選択され、そして単離された細胞を、その後、非常に多数培養し、そして同じ患者または別の患者に再導入することができる。培養された細胞は、培養細胞に遺伝物質を導入することによって遺伝子治療に用いることもできる。このような技術は、従来の検出および単離の手順を用いたのでは不可能である。

光分解性ビオチンを細胞と会合しているリガンドまたは抗原などの他の細胞特異的巨大分子に結合させることによっても、同じアプローチを用いることができる。例えば、標的抗原のための特異的免疫グロブリンレセプターを発現しているＢ細胞を、光分解性ビオチンを標的抗原に接着させ、次いでそれをストレプトアビジン被覆ビーズと結合させることによって単離することができる。また、ハイブリドーマのスクリーニングと幹細胞の選択は、このアプローチを用いて行うことができるはずである。

ＰＣＢを用いた細胞の単離に含まれる３つの基本的な工程は、（１）光分解性ビオチン、または光分解性ビオチン誘導体を含む分子（抗体、レセプターリガンド、抗原）を標的細胞の表面への光化学的に切断できる結合による接着、（２）複合体混合物中の他の細胞および物質からの、光分解性ビオチンとアビジン、ストレプトアビジンまたはそれらの誘導体との間の選択的相互作用を介した上記細胞型の分離、および（３）光分解性ビオチンの共有結合を切断する波長での照射による上記細胞型からの光分解性ビオチンの分離である。これらの工程は、ＰＣＢを用いて、普通のビオチンと組み合わせて行うこともできる。この場合、２以上の表面マーカーを含む細胞は、１種類だけを含むこれらからのものであってもよい。これらの各工程は、図１７に示した。

細胞分離用のＰＣＢの使用のための幾つかの応用は、存在している技術を越える明らかな利点を提供する。細胞の分離のための一般的な方法は、細胞を抗体－蛍光コンジュゲートを介した標的細胞指向性の蛍光染料で標識することである。細胞を、その後、蛍光活性化セルソーティング装置で分離することができ、セルタイピング、ハイブリドーマ産生および組織培養を含む種々の目的のために使用することができる。しかしながら、この技術を用いて分離された細胞には、蛍光染料による標識が残っている。このことは、細胞の生存率を低下させ、染料が毒性となりうる場合には治療への応用を妨げ、そしてさらに、蛍光ベースのソーティングによる細胞の亜種への選別を妨げるものである。１例は、ＣＤ２、ＣＤ４、ＣＤ８、およびＣＤ１９などの特徴付抗原を用いて、リンパ球を分離し、次いで亜種への選別を行なう。

別のアプローチは、ＰＣＢにコンジュゲートする抗体を利用するものである。この場合、細胞を種々の形態で市販されているアビジン－フルオレセイン複合体で蛍光標識することができる（表８）。蛍光標識は、その後、ＰＣＢ－アビジン－蛍光複合体の遊離を生じるＢＣＢの光分解によって除去することができる。ＰＣＢの吸収帯の領域外で吸光する種々

の蛍光標識が存在し、かくして細胞のソーティングの間の光分解を避けることができる。

表８　　市販のアビジン－蛍光染料複合体

コンジュゲート	吸収（nm）	発光	製造元
ｱﾋﾞｼﾞﾝ-ﾌﾙｵﾚｾｲﾝ	490	520	Pierce
ｱﾋﾞｼﾞﾝ-R-ﾌｨｺｴﾘｽﾘﾝ	450-470	574	Pierce
ｱﾋﾞｼﾞﾝ-ﾛｰﾀﾞﾐﾝ	515-520	575	Pierce
ｱﾋﾞｼﾞﾝ-ﾛｰﾀﾞﾐﾝ600	575	600	Pierce
ｱﾋﾞｼﾞﾝ-ﾃｷｻｽﾚｯﾄﾞ	595	615	Pierce

細胞単離のためのＰＣＢ方法論の有用性のもう一つの例は、ハイブリドーマ生産のためのＢ細胞の単離である。簡単に説明すると、モノクローナル抗体生産を目的とするハイブリドーマの形成は、リンパ球Ｂ細胞とミエローマ細胞の融合を含む。一般に、異なる免疫グロブリンレセプターを含むＢ細胞の不均質な集団が利用される。その後、特定の抗原への結合を検定することにより、所望の抗体を発現するハイブリドーマがスクリーニングされる。このスクリーニング過程は時間がかかり、費用もかさむ。もし、所望の免疫グロブリンレセプターだけを発現するＢ細胞の特定の集団を単離する方法があるなら、スクリーニングを省略することができるであろう。原則として、抗原に対する特定の免疫グロブリンレセプターを発現するＢ細胞のみと結合する、特定の配列を有するポリペプチドのようなビオチン化抗原を用いることにより、これは達成できる。その後、アビジン被覆磁性ビーズのようなアビジンアフィニティー技術を用いることにより、Ｂ細胞のこのサブ集団を選択することができるであろう。しかしながら、Ｂ細胞を生存可能な形態でアビジン－ビオチン複合体から放出することができなければ、ハイブリドーマ形成というその後の工程が妨げられることになる。

ＰＣＢ－ビオチンの使用により、ビオチン－アビジン相互作用による固定化の後に生存可能な形態でＢ細胞を放出する簡単な方法が提供され、この問題が回避される。抗体との光分解性ビオチン結合の光切断により、Ｂ細胞と未修飾形態の結合抗原が放出される。化学的処理が要求されないので、細胞はミエローマ細胞とのさらなる融合に必要な生存性を保持することになる。さらに、この方法は迅速で自動化に適している。

本発明のもう一つの態様は、疾患や障害を治療または予防するための医薬組成物において利用されうる上記の方法により単離された標的に関する。医薬組成物は、単離された標的と、水、油、脂質、サッカライド、多糖、グリセロール、コラーゲンまたはこれらの成分の組み合わせのような製剤上許容できる担体とを含んでよい。この組成物は、ある種の疾患および障害の治療または予防のために、および、医薬的薬剤の部位指向性投与（site-directed administration）のために、患者に投与される。

本発明のもう一つの態様は、患者における医薬のin vivo半減期を決定する方法に関する。電磁線により選択的に切断し得る共有結合を介して医薬を生物学的反応剤と結合させる（coupling）ことにより、コンジュゲートを形成する。コンジュゲートを患者に投与した後、２以上の生物学的試料を取り出す。試料を電磁線で処理して生物学的反応剤から医薬を放出させ、生物学的試料中の生物学的反応剤の量を測定し、医薬のin vivo半減期を決定する。

医薬は、サイトカイン、免疫系モジュレーター、造血系の薬剤、化学療法剤、放射性同位体、抗原、抗腫瘍剤、組換えタンパク質、酵素、ＰＣＲ産物、核酸、ホルモン、ワクチン

、ハプテン、毒素、抗生物質、新生タンパク質、合成および組換え医薬、並びにこれらの成分の誘導体および組み合わせを含む組成物であってもよい。コンジュゲートは、非経口投与、舌下投与、腸内投与、肺吸収、局所適用およびそれらの組み合わせにより、患者に投与されうる。試験できる動物としては、ヒト、ウシ、ブタ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマおよび齧歯類動物などの哺乳動物を挙げることができる。採取される生物学的試料は、末梢血、血漿、血清、髄液、リンパ液、尿、糞便、眼液、器官および身体組織の試料でありうる。

本発明のもう一つの態様は、媒体（medium）への基質の制御された放出に関する。電磁線により選択的に切断し得る共有結合により基質に結合された生物学的反応剤で構成されるコンジュゲートを記載のように創製する。これらのコンジュゲートは、物品（article）の表面に結合されて媒体中に置かれる。この物品の表面は測定された量の電磁線に暴露され、基質が媒体中へと放出されて、有益な作用を起こす。あるいはまた、物品はある選択した部位に置かれてもよく、その物品に対するアフィニティーを持つコンジュゲートが遠位の部位に投与される。その後、コンジュゲートはその選択した部位に移動し、意図されている機能を果たす。その機能が完結した後、電磁線を照射して、基質を固定された生物学的反応剤から放出させる。放出された基質は、自然に、患者の系から排除されうる。このことは、例えば、癌患者の放射線療法において大変役立つ。

媒体を透過できる電磁線波長が好ましい。電磁線暴露の量と頻度に依存して、放出を一定の期間に渡って制御し、継続させることができる。この方法は、患者への医薬組成物の制御された部位指向性投与に役立つ。その場合、その中に物品が置かれる媒体は、血液、リンパ球、間質液または組織であってもよい。制御された放出は、一定または周期的な量の基質を細胞培養液または細胞取り込み用平衡塩類溶液へ投与するために組織培養において行われてもよい。基質と結合させ、患者の身体の内部または患者の身体に隣接して置くことができる物品としては、炭水化物、脂質、タンパク質、多糖、セルロース、磁石を含む金属、有機ポリマーおよびそれらの組み合わせを含む物品を挙げることができる。好ましくは、物品の表面はストレプトアビジンで被覆され、生物学的反応剤は光分解性ビオチンである。

あるいはまた、コンジュゲートまたは薬剤を含有する物品を腫瘍のような障害の部位に置くことができる。例えば、放射性薬剤のような医薬的薬剤を患者に投与し、固定したコンジュゲートまたは薬剤に結合させる。医薬的薬剤に起因する作用を局在化させる。物品を測定された量の電磁線に暴露し、医薬的薬剤を身体中に放出させ、分泌させる。医薬的薬剤の短い期間の暴露のみが望ましいときや、有害となりうる薬剤が所望の作用を呈した後にそれらを効率的に除去するためには、この方法は好ましい。

本発明のもうひとつの態様は、光分解性オリゴヌクレオチドを創製する方法に関する。検出可能な部分（moiety）に結合された光反応性部分から構成され、ホスホルアミダイトを含む生物学的反応剤が創製される。このオリゴヌクレオチドは、慣用のホスホルアミダイト化学を用いて合成される。このヌクレオチド前駆体は、リボースもしくはデオキシリボース体、またはそれらの誘導体としてプリン－ホスホルアミダイト（ウラシル、シトシン、チミン）またはピリミジン－ホスホルアミダイト（アデニン、グアニン）のような１以上の光分解性ホスホルアミダイトを含む。この方法は手動で行うことができるが、市販のオリゴヌクレオチド合成機を用いて自動化することもできる。光分解性オリゴヌクレオチドは、診断キットにおいて、また、核酸が使用されうるあらゆる場合において、プライマーまたはプローブとして利用することができる。

本発明のもう一つの態様は、異種混合物において標的分子を検出する方法に関する。電磁線で選択的に切断し得る共有結合により基質を生物学的反応剤に結合させることにより、コンジュゲートを生成させる。コンジュゲートを異種混合物と接触させて、基質を１以上の標的分子に結合させる。未結合コンジュゲートを除去し、結合したコンジュゲートを電磁線で処理して、検出可能な部分を放出させる。標的分子の存在は、放出された検出可能な部分の存在を検出することにより検出できる。標的巨大分子は、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、多糖、金属化合物、ウイルス、細菌、真核細胞、寄生体並びにそれらの誘

導体および組み合わせであってもよい。一度検出されれば、標的巨大分子は単離され、単離された量を当業者に利用可能な現在の技術のいずれかにより定量することができる。
ストレプトアビジン－ビオチン技術の特別な応用は、医学的診断における標的の検出にある。一般に、標的はビオチン化された分子あるいは標的分子用ビオチン化プローブである。ビオチン化された標的またはプローブとのストレプトアビジンの相互作用は、色素産生反応を触媒するストレプトアビジンに結合された酵素により増幅される。例えば、ストレプトアビジンに結合された種々の酵素が市販されており、その例としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼを挙げることができる。これらの酵素の各々は、色素産生反応を触媒する。さらなる検出法は、ストレプトアビジンを蛍光、化学蛍光、放射性または高電子密度分子に結合させることを含む。
医学的診断におけるビオチン－アビジン相互作用は、一例として、広い一連の酵素結合イムノソルベント検定（ELISA）の基礎を与える。この場合、標的分子に特異的な抗体、一次抗体、または一次抗体に対する二次抗体はビオチン化される。検出は、記載のようにストレプトアビジン－酵素コンジュゲートを用いて行われる。この方法を基礎として、多数の免疫検定法が開発されていきた。しかしながら、試料に損傷を与えることなく、ビオチン誘導体に一度結合されたアビジン－酵素複合体を除去する簡単な方法が存在しないために、慣用の技術を用いて、同じ試料につき多数の免疫検定が容易に行われることはない。伝統的な方法論とは対照的に、ＰＣＢは、ヒト疾患の病原体や他のマーカーの多数のスクリーニングのための同じ試料の多数の検定に何度も再使用することができる。
また、ビオチン－アビジン相互作用は、ヒトＤＮＡ試料をスクリーニングするような特定の核酸配列を検出する感度の高い方法の基礎を与える。標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズするＤＮＡまたはＲＮＡプローブはビオチン化される。標的配列を含むＤＮＡは、ストレプトアビジン－酵素コンジュゲートにより検出される。スクリーニングされる標的遺伝子または配列をまず特定のプライマーを用いて増幅させるポリメラーゼ連鎖反応と合わせて、この方法は用いられる。ビオチン化ヌクレオチドを用いてビオチンヌクレオチドをプライマーへあるいは直接新生ＰＣＲ産物へ導入すると、標的ＤＮＡの単離が容易になる。ビオチン－ｄＵＴＰのような種々のビオチン化ヌクレオチドがそのような目的のために利用できる。しかしながら、この方法には少なくとも２つの制限がある。
まず第一に、増幅された標的ＤＮＡにビオチンが存在すると、前もってビオチン化を除くことなしにビオチン化したプローブを使用することができなくなる。また、内因性ビオチンまたはビオチン含有分子が試料に存在すると、この検定の感度が低くなる。第二に、ビオチンが標的ＤＮＡに存在すると、ハイブリダイゼーション効率が低くなり、それ故、検定の感度が低くなる。上記のように、ＰＣＢ－ヌクレオチドのようなＰＣＢ誘導体の使用により、その手順からビオチンを完全に除去することができるようになり、これらの問題を効果的に除くことができる。
新生タンパク質の検出を含む種々の診断用検定と合わせて、本発明のコンジュゲートおよび方法を用いることができる。例えば、ＰＣＲ増幅された遺伝子のin vitro発現とそれに続くゲル電気泳動を用いる新生タンパク質産物の試験による癌の診断用検定が開発されてきた（S.M. Powell et al., N. Engl. J. Med. 329:1982,1993）。そのようなタンパク質の単離およびそれに続くそのような試験の感度は、ＰＣＢアミノ酸を組み込むことにより向上させることができる。
ビオチン－ストレプトアビジン技術は、アデノウイルス抗原（K. Mortensson-Egnund et al., J. Virol. Methods 14:57, 1986）、ウシ白血病ウイルス（E.N. Esteban et al., Cancer Res. 45:3231, 1985）、フラビウイルス（E.A. Gould et al., J. Virol. Methods 11:41. 1985）、Ｂ型肝炎表面抗原（C.Kendall et al., J. Immunol., Methods 56:329, 1983）、単純ヘルペスウイルス抗原（K. Adler-Strorthz et al., J. Clin. Microbiol. 18:1329, 1983）、呼吸シンシチアウイルス（A. Hornsleth et al., J. Med. Virol. 18:113, 1986）、細菌抗原（R.H. Yolken et al., J. Immunol. Methods 56:319, 1983）およびメラノーマ関連抗原（ヒト）（A.C. Morgan et al., Cancer Res. 43:3155, 1983）

を含む疾患関連抗原のような疾患および障害の特定のインジケータの診断用検定を含む非放射性ELISAの基礎として広く用いられている。内因性ビオチンが試料に存在すると、これらの検定の有用性が危うくなるかもしない。この場合、ストレプトアビジン－リポーター酵素複合体が、非特異的ビオチンと、標的タンパク質に対するビオチン化された抗体との両方に反応することになるので、誤ったバックグラウンドが得られることになる。非ビオチン化標的へのアビジンまたはストレプトアビジンの非特異的結合によるバックグラウンドを除くいくつかの方法として、高イオン強度緩衝液（C.J.P. Jones et al., Histochem. J. 19:264, 1987）、乳タンパク質（R.C. Duhamel et al., J. Histochem. Cytochem. 33:711, 1985）およびリゾチーム（E. A. Bayer et al., Anal. Biochem 163:204, 1987）並びにImmunoPure NeutrAvidin（Pierce Chemical; Rockford, IL）のような変更ストレプトアビジンの使用があるが、内因性ビオチンによるバックグラウンドを除くのに非常に有効なものはない。

免疫検定と合わせて光分解性ビオチンを使用することにより、非特異的ビオチンのバックグラウンドのレベルを決定する手段が提供されて、上記の問題が緩和される。タンパク質に対する抗体が光分解性ビオチンにより標的化されることを以外は、慣用の方法論を用いて、このELISA検定がまず行われる（図19）。プローブ抗体系に結合されたストレプトアビジン－リポーター酵素複合体が、その後、光分解性ビオチンの光切断により除去される。切断により、結合されたリポーター酵素－アビジン複合体が非特異的な結合ビオチンから放出されることはない。というのは、このビオチンは非分解性だからである。試料に存在する内因性ビオチンの量として、残っているビオチンから得られるシグナルを用い、工程１で得られた最初のシグナル（primary signal）から差し引くことができる。

ビオチン－アビジンをベースとするELISAにおける内因性ビオチンによるバックグラウンドのシグナルは、光分解性ビオチンを用いて簡単に検出することができる。ストレプトアビジン－リポーター酵素複合体を用いる通常の方法に従ってELISAを行う。しかしながら、その後、ストレプトアビジン－リポーター酵素複合体を光により除去し、系を再検定して、内因性ビオチンのバッググラウンドのレベルを決定する。

光分解性ビオチンの第二の応用は、これを利用して同じ試料についてビオチンをベースとする多数のELISA検定を行うことである。これは、ＰＣＢ結合の光切断により光を用いてストレプトアビジン－リポーター酵素複合体を完全に除去する能力に基づく。この場合、図20に示されるように、第一のELISAからの干渉なしに、異なる抗体プローブおよびリポーター酵素複合体を用いて、第二のELISAを行うことができる。通常、ストレプトアビジン－リポーター酵素複合体と結合された第二の抗体プローブから得られるシグナルをもとのシグナルから容易に分離することができないので、そのような多数ELISAは不可能である。

例えば、慣用のビオチン－アビジンELISAにおいては、リポーター酵素の色素産生産物が除去された後でさえ、ストレプトアビジン－リポーター酵素複合体はプローブ抗体に結合したままでいる。従って、第二のELISAが行われた後でさえ、それは色素産生産物を生成し続けて、その第二の免疫検定のシグナルを妨げる。対照的に、もとのリポーター酵素はもはや存在しないので、光分解性ビオチンの光による切断によってストレプトアビジン－酵素複合体を除去し、それに続いて、洗浄することにより、この問題は除かれる。

本発明のもう一つの応用において、生物学的材料からの微生物のような病原体の検出は、しばしば、その単離と培養を必要とする。単離工程がより効果的になるにつれ、培養工程がより確実でより迅速になる。なぜならば、他の不純物が排除され、標的病原体が濃縮されるからである。選択された抗体に結合された磁性ビーズのような微生物分離のための種々のアフィニティー技術が存在するが、培養および感度の高い検出に適した生存可能な形態での微生物の放出の問題が依然として残されている。対照的に、抗体に結合したＰＣＢまたは結合リガンドは、生存可能な形態での微生物の光化学的放出のための損傷を与えない迅速な手段を提供する。

例えば、本発明を応用することにより、ヒトおよび動物の疾患に関与する種々の病原体の迅速な診断用検定を開発するための基礎を与えるが、それはそれまで慣用のビオチン－ス

トレプトアビジン技術を用いては不可能であった。また、微生物は、食物、乳、土壌および他の材料から、この方法を用いて枯渇させたり、検出したりすることを目的として、単離されうる。

本発明のもう一つの態様は、選択された部位での治療剤の制御された放出により障害を治療する方法に関する。電磁線により選択的に切断し得る結合により、生物学的反応剤を治療剤に結合させることにより、コンジュゲートが生成する。ここで、生物学的反応剤は、光反応性部分に結合された検出可能な部分から構成され、検出可能な部分は選択された部位へのアフィニティーを持つ。コンジュゲートは、障害を持つ患者に投与され、治療剤の放出を制御して障害を治療するために、選択された部位が測定された量の電磁線に暴露される。検出可能な障害としては、細菌感染、ウイルス感染および寄生体感染のような感染、腫瘍のような新形成、および酵素または他の遺伝子産物の過剰産生または欠乏のような遺伝的障害を挙げることができる。

治療剤は、毒素、免疫系モジュレーター、造血剤、タンパク質、核酸、基質類似体、転写および翻訳因子、抗原およびそれらの組み合わせであってもよい。検出可能な部分は、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体のような抗体または抗体フラグメントであってもよい。

本発明のもう一つの態様は、患者の疾患および障害を検出またはスクリーニングするための診断キットに関する。キットは、患者から得られた生物学的試料中のかかる障害のインジケータに対するアフィニティーを持つ診断剤に共有結合した生物学的反応剤から構成されるコンジュゲートを含む。インジケータは、抗原または抗体、サイトカイン、特定の細胞型（例えば、Ｂ細胞；細胞障害性サプレッサーまたはヘルパーＴ細胞；マクロファージ；幹細胞）、特定の酵素、核酸またはタンパク質のような、障害の特徴的マーカーの存在もくしは不存在または増加したあるいは減少した量もしくはレベルである。検出できる障害としては、感染、新形成および遺伝的障害が挙げられる。検出できる感染としては、細菌感染、ウイルス感染および寄生体感染が挙げられる。検出できる新形成としては、腫瘍が挙げられる。検出できる遺伝的障害としては、酵素の過剰産生または欠乏が挙げられる。試料に添加することができる生物学的試料としては、末梢血、血漿、血清、髄液、リンパ液、尿、糞便、眼液、器官および身体組織の試料が挙げられる。単離し、培養するか、さらに分析することができる胎児細胞または幹細胞の生物学的試料における存在を検出したり、スクリーニングするために、そのようなキットを使用することができる。

また、ビオチンに結合した一連の二次プローブを用いて、例えば、エレクトロブロット上の多数の核酸および／またはタンパク質の存在を検出するために、キットを使用することもできる。各プローブを導入した後、ビオチン結合を切断することにより、酵素的検定複合体を除去し、かくして、導入する新たな二次プローブに備えることができる。そのような方法は、多数の抗原または核酸配列が迅速にかつ自動的に釣り上げられることが必要な、医学的診断用検定の基礎として非常に役立つ。

また、このキットは、ＤＮＡまたはＲＮＡにおける突然変異を導入または修正するような分子生物学的応用に用いるための核酸突然変異誘発キットであってもよい。この核酸は、ＰＣＲでの使用またはカセット型適用のためのオリゴヌクレオチドであってもよい。そのようなオリゴヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であってよく、好ましくは、１以上の制限酵素認識配列を内部に含み、そして、制限酵素認識部位の部分も含む連結可能な５’および３’末端を含む。あるいはまた、１以上の末端は、指向された結合が容易になるように、ブロックされていてもよい。

以下の実施例は、本発明の種々の態様を説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

実施例１　光分解性反応剤の合成

5-メチル-2-ニトロ安息香酸５g又は27.6mmol（図５、化合物“６”;Aldrich Chemical;Milwaukee,WI）を少しずつ、塩化チオニル10ml（16.4g又は148mmol）に攪拌しながら加えた。その混合物を室温で10時間攪拌した。過剰の塩化チオニルを真空で除去し、酸塩化物（

“７”）を得た。マグネシウムの削り屑（1.07g又は44.2mmol）、無水エタノール（６ml）、クロロベンゼン（８ml）、及び乾燥CCl_4（0.1ml）を、大半のマグネシウムが反応するまで還流した。クロロベンゼン10mlに溶解させたマロン酸ジエチル（4.82g又はmmol）の溶液を加えた後、クロロベンゼン10mlに溶解させた酸塩化物（5.49g）を加えた。反応混合物を１時間攪拌し、濃硫酸1.7mlを水17mlで希釈したものを加え、さらに15分間攪拌した。クロロホルム20mlを加え、層を分離させた。水層をクロロホルム10mlで３回抽出し、抽出液を合わせ、乾燥して蒸発乾固させた。残渣を酢酸8.25mlに溶解し、H_2O 5.4ml及び濃硫酸1mlを加え、混合物を６時間還流した。そして、Na_2CO_3水溶液で中和して、$CHCl_3$ 20mlで３回抽出した。抽出液を合わせ、乾燥させ、真空で溶媒を除去した。残渣を70%エタノールから結晶化させ、4.46g（約81%）の5-メチル-2-ニトロアセトフェノンを得た。5-メチル-2-ニトロアセトフェノン（3.51g又は19.6mmol）、N-ブロモスクシンイミド（3.66g又は20.6mmol）、および過酸化ベンゾイル（46mg又は0.01当量）をCCl_4 20ml中で５時間還流し、反応混合物を濾過した。濾液を濃縮し、CCl_4から結晶化させ5-ブロモメチル-2-ニトロアセトフェノン（“８”）3.64g（72%）を得た。化合物８（2.0g又は7.75mmol）を、ヘキサメチレンテトラミン（1.14g又は8.13mmol）をクロロベンゼン15mlに溶解させた溶液に加えた。その混合物を一晩攪拌し、生じた沈殿物を濾取し、クロロベンゼン10ml及びジエチルエーテル20mlで洗浄した。沈殿物（2.93g又は7.36mmol）を95%エタノール35ml中に懸濁させた後、濃塩酸（3.12ml又は５当量）を加えた。その混合物を一晩攪拌し、溶媒をとばして乾燥させた。残渣にＤＭＦ10mlを加えた後、N-メチルピロリドン35mlに溶解した6-ビオチンアミドカプロン酸（3.29g又は1.25当量）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（2.28g又は1.5当量）、及びトリエチルアミン（1.28ml又は1.25当量）を加えた。その溶液を室温で一晩攪拌し、生じた沈殿物を濾取するとともに、濾液をジエチルエーテル700ml中に注ぎ沈殿物を得た。その沈殿物を乾燥させ、シリカゲルカラムで$CHCl_3$中のMeOHの段階的グラジエント（5-20%）を用いて精製し、2.27g（約58%）の化合物11を得た。

化合物11（1g又は1.87mmol）を70% EtOH 15mlに溶解した（図５）。その溶液を０℃まで冷却し、ホウ水素化ナトリウム（141mg又は４当量）を加えた。その溶液を０℃で30分間攪拌し、さらに室温で２時間攪拌した。アセトン１mlを加えて反応を止め、0.1N HClで中和してから、濃縮し、上清を取り除き、残渣を水で洗浄し乾燥させて、0.71g（約71%）の化合物12を得た。

化合物12（1.07g又は２mmol）をＤＭＦ10mlに溶解した。N,N'-ジスクシンイミジルカーボネート（Fluka Chemical;Ronkonkoma,NY）（1g, 1.5当量）を加えた後、トリエチルアミン0.081ml又は３当量を加えた（図５）。室温で５時間後、溶媒を蒸発乾固させて、残渣を0.1N $NaHCO_3$、水、ジオキサン、及びジエチルエーテルで連続して洗浄し、乾燥させて5-（5-ビオチンアミドカプロアミドメチル）-1-（2-ニトロ）フェニルエチル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネート（PCB-NHS）エステル（化合物13）を1.04g（約69%）得た。M.P.=113-114℃（未補正）;CI-MS（M^+:676.5）;UV-VISλ=204nm, ε1=19190 $M^{-1}cm^{-1}$; λ2=272nm, ε2=6350 $M^{-1}cm^{-1}$（リン酸緩衝液pH=7.4中における）。^1H NMR（DMSO-d_6,Varian XL-400MHz）,［δppm］:8.48（t,1H）,8.05-8.03（d,1H）,7.75-7.71（t,1H）,7.66（s,1H）,7.46-7.45（d,1H）,6.44（s,1H）,6.37（s,1H）,6.28-6.27（m,1H）,4.39（m,2H）,4.30（m,1H）,4.12（m,1H）,3.57（d,2H）,3.09（m,1H）,3.01-2.99（m,2H）,2.79（m,5H）,2.58-2.55（d,1H）,2.17-2.15（m,2H）,2.04-2.02（m,2H）,1.72-1.71（m,2H）,1.66-1.43（m,br,6H）,1.38-1.36（m,br,2H）,1.26-1.25（m,br,3H）;IR（KBr）;$V_{C=0}$1815及び1790cm^{-1}。

PCB-NHSエステルの合成（図18）：2-ブロモ-2'-ニトロアセトフェノン（“14”）（Aldrich Chemical;Milwaukee,WI）（1g;4.09mmol）を、1.05当量のヘキサメチレンテトラミンとの反応及び加水分解によって、2-アミノ-2'-ニトロアセトフェノン塩酸塩（“15”）に転化させた後、ＤＭＦ中のＤＣＣ（1.5当量）を用いて5-ビオチンアミドカプロン酸（1.25当量）と結合させて、2-（5-ビオチンアミドカプロアミド）-2'-ニトロアセトフェノン（“16”）（収率　約52%）を合成した。そして、化合物16を還元した後（収率　約75%;“17”）、上記と同様にして反応性ＮＨＳ誘導体（“18”）である2-（5-ビオチンアミド

カプロアミド）-2'-ニトロフェニルエチル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネート（収率　約69%）に転化させた。

ＰＣＢ-ＮＨＳエステルの合成（図19）：3-アミノ-4-メトキシ安息香酸（“19”）（Aldrich Chemical;Milwaukee,WI）（5g又は29.9mmol）を酢酸40mlに懸濁させ、無水酢酸（3ml又は1.04当量）を攪拌しながら加えた。その反応混合物を室温で２時間攪拌した。0.1N HCl 25mlを加え、生じた沈殿物を濾取し、３×0.1N HCl 10ml及び５×水10mlで洗浄し、3-（N-アセチル）アミノ-4-メトキシ安息香酸（“20”）5.97g（約95%）を得た。化合物20（5g又は23.5mmol）を０℃で激しく攪拌しながら発煙硝酸20mlに加えた。その溶液を０℃でさらに１時間攪拌した後、氷200gに注いだ。生じた沈殿物を濾取し、５×水20mlで洗浄し、乾燥させ、2-ニトロ-4-メトキシ-5-（N-アセチル）アミノ安息香酸（“21”）4.38g（約72%）を得た。そして、化合物21を、上記と同様にして2-ニトロ-4-メトキシ-5-（N-アセチル）アミノアセトフェノン（“22”）に転化させた（収率　約63%）。化合物22（1g又は4.76mmol）をＤＭＦ５mlに溶解し、その溶液を、5-ビオチンアミドカプロン酸（1.55g又は１当量）及び塩化チオニル５mlから別に調製した5-ビオチンアミドカプロイルクロライドに加えた。その反応混合物を一晩室温で攪拌した後、ジエチルエーテル100mlに加えた。生じた沈殿物を、小型のシリカゲルカラム及び$CHCl_3$中のMeOHの段階的グラジエントを用いて精製し、2-ニトロ-4-メトキシ-5-（5-ビオチンアミドカプロアミド）アセトフェノン（“23”）1.16（約47%）を得た。化合物23を対応するアルコールに転化させた後（収率　約85%）、反応性ＮＨＳエステル誘導体である5-（5-ビオチンアミドカプロアミド）-4-メトキシ-1-（2-ニトロ）フェニルエチル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネート（“25”）に転化させた（収率　約69%）。

光分解性クマリンの合成（図21）：5-アミノメチル-2-ニトロアセトフェノン塩酸塩（“26”）（1.15g又は5mmol）をＤＭＦ20mlに溶解した。この溶液に、7-メトキシクマリン-4-酢酸（“27”）（Aldrich Chemical;Milwaukee,WI）（1.46g又は1.25当量）及びジシクロヘキシルカルボジイミド（1.55g又は1.5当量）を加えた後、トリエチルアミン（0.7ml又は１当量）を加えた。その溶液を一晩室温で攪拌した後、$CHCl_3$ 20mlを加え、0.1N $NaHCO_3$（3×15ml）で洗浄し、有機層を乾燥させ、シリカゲルカラムでCH_2Cl_2中のMeOHの段階的グラジエントを用いて精製し、化合物“28”1.37g（約64%）を得た。化合物28（1g又は2.33mmol）を95% EtOH 15mlに溶解し、その溶液を０℃まで冷却し、ホウ水素化ナトリウム（176mg又は４当量）を加えた。その溶液を０℃で１時間攪拌し、アセトン１mlを加えることにより反応を止め、0.1N HClで中和した。そして、その溶液を３×15ml $CHCl_3$で抽出した。抽出液を合わせ、乾燥させ、シリカゲルカラムでCH_2Cl_2中のMeOHの段階的グラジエントを用いて精製し、832mg（約83%）の化合物29を得た。化合物29（1.29g又は３mmol）をＤＭＦ－アセトニトリル（1:1）10mlに溶解した。N,N'-ジスクシンイミジルカーボネート（Fluka Chemical;Ronkonkoma,NY）（1.15g又は1.5当量）を加えた後、クロロホルムを加えた。その溶液を0.1N $NaHCO_3$（３×15ml）で洗浄し、溶媒をとばし乾燥させ、得られた残渣をアセトニトリルから再結晶化させて、光分解性クマリンＮＨＳエステル（“30”）1.22g（約71%）を得た。

実施例２　光分解性コンジュゲート-PCB-アミノ酸の合成

PCB-アミノ酸を、アミノ酸のα-アミノ基の誘導体化によって調製した。誘導体を、Sigler らの変形法を用いて、PCBクロロギ酸エステル又はそれらに対応するN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルのいずれかとアミノ酸とから弱アルカリ性溶媒中で調製した（Biopolymers 22:2157,1983;L.Lapatsanisら.,Can.J.Chem. 60:976,1982;A.Paquet,Can.J.Chem.60:2711,1977）。この方法は、ε-NH_2-PCB-Lysの合成（Lysのα-アミノ基はFmocで保護される）にも使用された。PCB-アミノ酸をカルボキシル基又はヒドロキシル基の誘導体化によっても調製した。すなわち、アスパラギン酸及びグルタミン酸のカルボキシル残基をPCB-OHを用いてエステル化した。α-アミノ基をFmoc誘導体として保護し、α-カルボキシル基をt-ブチルエステルとして保護した。カルボキシル側鎖のエステル化はジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）を用いて媒介させた（P.Sieber,Helv.Chim.Acta 60:2711,1977）。エステル化はまた、PCB-クロロギ酸エステルを適当に保護されたトレオニン又はセリ

ン残基のヒドロキシル側鎖と反応させることによっても実施した（M.Bednarekら.,Int.J.Pept.Prot.Res.21:196,1983;H.Kesslerら.,Tetrahedron281,1983）。

PCB-ロイシン-エンケファリンの調製及び光分解：ロイシン-エンケファリン（Sigma Chemical;St.Louis,MO）（0.1N $NaHCO_3$，pH8.0中に15.5μmol/ml）及びPCB-NHSエステル（DMF中に17μmol/ml）を混合し、一晩室温で攪拌した。この時点で、HPLCで分析すると、Leu-Enkは完全にPCB-Leu-Enkに転化されたことが示された。HPLC分析は、U6Kインジェクター、600コントローラー、Novapak C_{10}-カラム（3.9×150mm）及び996フォトダイオードアレイ検知器からなるWaters System（Waters Chromatography;Marlboro,MA）で実施した。実験は30-45%の直線グラジエントのBを用いて10分間にわたり行なった後、45%の無勾配Bで同様に10分間行なった。

PCB-Leu Enk（リン酸緩衝液,pH7.4中に1.93μmol/ml）を長波長UVランプ（Blak Ray XX-15 UV lamp;UVP Inc;San Gabriel,CA）で距離15cmで照射した（発光ピーク365mm，ランプ強度=1.1mW/cm^2（距離31cm））。HPLCの分析によると、５分以内にLeu-Enkは完全に光放出されることが示され、保持時間及びUVスペクトルに基づいて、放出された基質がLeu-Enkであることが確認された。

PCB-Leu Enk（10nmol）をモノマー性アビジンアガロースビーズ（15nmol）の懸濁液中で30分間インキュベートした。その懸濁液を３分間スパン濾過（spun-filtered）した（16,000×）。結合効率は約94%と決定された。サンプルをリン酸緩衝液（2ml）中に再び懸濁させ、上記のように照射した。放出されたLeu-Enkをフルオレスカミンを用いて分析した。380nmで励起させて、発光スペクトルをSLM48000蛍光計で測定した（λ=488nm）。Leu-Enkの光放出を５分間の照射後に定量した。

実施例３ PCB-ポリペプチドの固相合成

PCB-アミノ酸を固体支持体ペプチド合成によってポリペプチドに組み込んだ。α-アミノ基を保護するために塩基に不安定なフルオレニルメチルオキシ（Fmoc）を用いるとともに、α-カルボキシル基及び反応性側鎖を保護するために酸に不安定なt-ブチル誘導体を用いるといった標準的方法を使用した。合成は、ポリアミド系樹脂上で行なった。アミノ酸を対称無水物又はペンタフルオロフェニルエステルとして結合させるために活性化した（E.Athertonら.,Solid Phase Peptide Synthesis,IRL Press,Oxford,1989）。ポリペプチド鎖に位置特異的に組み込むためのPCB-アミノ酸はPCB分子で誘導体化した。側鎖PCB誘導体（例えば、ε-アミノ-Lys）、Glu及びAspの側鎖PCB-AAエステル、並びにSer、Thy及びTyrのエステルをポリペプチド中へ組み込んだ。これらのPCB-アミノ酸は固相ペプチド合成の間20%ピペリジン/DMF（Fmoc除去）及び1-95%トリフルオロ酢酸（t-Bu、t-Boc除去、ポリアミド樹脂からのペプチドの切断）中で、安定であった（E.Athertonら.,Solid Phase Peptide Synthesis,IRL Press,Oxford,1989）。

実施例４ 新生タンパク質の検出および単離

ｔＲＮＡのミスアミノアシル化：ミスアミノアシル化ｔＲＮＡの作製のために使用する一般的な戦略を図10に示すが、これにはｔＲＮＡ分子の先端部切断、ジヌクレオチド合成、ジヌクレオチドのアミノアシル化およびリガーゼ仲介結合が含まれる。

先端部を切断したｔＲＮＡ分子は、基本的にNeuおよびHeppelによる記載（J.Biol.Chem.239:2927-34,1964）にしたがって、リジンおよびアルカリホスファターゼの存在下での過ヨウ素酸塩分解によって作製された。簡単に述べると、非荷電E.coliｔＲＮＡ^{Lys}分子（Sigma Chemical;St.Louis,MO）４ミリモルを、ｐＨ9.0、60℃において30分間、総容積50μl中において、50mMメタ過ヨウ素酸ナトリウムおよび0.5Mリシンによる連続した２処理を行なうことによって、先端部を切断した。反応条件は常に50℃以上とし、また10倍過剰のメタ過ヨウ素酸塩を使用した。過剰の過ヨウ素酸塩を1Mグリセロール5μｌで処理して分解した。トリス－ＨＣｌ 15μｌを最終濃度0.1Mとなるように添加して、溶液のｐＨを8.5に調節した。水100μｌを添加することによって、反応物容積を150μｌに増加させた。アルカリホスファターゼ（15μｌ、30単位）を添加し、反応混合物を再び60℃で２時間インキュベートした。インキュベート後、総ｔＲＮＡをエタノール沈殿させ、エタノール洗浄し、このペレットを乾燥し、そしてペレットを水20μｌに溶解させた。この工程を２回繰り返

して、先端部切断ｔＲＮＡを得た。
基本的にHudson（J.Org.Chem. 53:617-24,1988）の実施にしたがって、ジヌクレオチド合成を実施したが、これをデオキシシチジン保護、アデノシン保護およびジヌクレオチド合成の３段階の工程について説明する。
デオキシシチジン保護：特に示さない限り、すべての反応を室温で実施した。最初に、トリメチルシリルクロライド4.1当量を常時撹拌しながら２時間反応させることによって、デオキシシチジンの5'および3'ヒドロキシル基を保護した。これにFmoc-Ｃｌ 1.1当量を３時間反応させることによって、環外アミン官能基を保護した。ＫＦ0.05当量を添加し、30分インキュベートすることによって、5'および3'ヒドロキシル基の脱保護を行った。得られた生成物は収率87％だった。この化合物をビス－（2-クロロフェニル）ホスホロクロリデート1当量とともにインキュベートし、この混合物を０℃で２時間インキュベートすることによって、ホスフェート基を添加した。この場合の収率は25-30％であった。
アデノシン保護：アデノシン残基にトリメチルシリルクロライド（4.1当量）を添加して２時間インキュベートし、その後Fmoc-Ｃｌ 1.1当量を導入して３時間インキュベートを続けた。前記のようにフルオリドイオン0.5当量によってＴＭＳ基を脱保護した。Fmoc保護アデノシンが収率56％で得られた。さらに2'-ヒドロキシルを保護するため、化合物22をテトライソプロピルジシロキシルクロライド（ＴＩＰＤＳＣｌ$_2$）1.1当量と３時間反応させ、これによって化合物23が68-70％の収率で生成した。この化合物をジオキサン中でジヒドロピラン20当量およびp-トルエンスルホン酸0.33当量と約4-5時間インキュベートすることによって、化合物24に転換させた。この化合物を単離せずに、テトラヒドロフラン、ピリジンおよび水の混合物中のテトラブチルアンモニウムフルオライド８当量を添加することによって、直接転換させた。
ジヌクレオチド合成：テトラヒドロフラン中の2-クロロフェニルビス-（1-ヒドロキシベンゾトリアゾリル）ホスフェート1.1当量を30分間常に撹拌しながら添加することによって、保護デオキシシチジン、化合物20（図19）、および保護アデノシンを結合させた。これに続いて、N-メチルイミダゾールの存在下で30分間、保護アデノシン1.3当量を添加した。結合の収率は約70％で、結合生成物のプロトンＮＭＲスペクトルは以下の通りである：（δ8.76m,2H），（δ8.0m,3H），（δ7.8m,3H）（δ7.6m,4H），（δ7.5m,3H），（δ7.4m,18H），（δ7.0m,2H），（δ4.85m,14H），（δ4.25m,1H）；（δ3.6m,2H），（δ3.2m,2H），（δ2.9m,3H），（δ2.6m,1H），（δ2.0-1.2m,7H）。
ジヌクレオチドにエステル結合によりＮα-保護Ｎε-ＰＣＢ-lysを結合させることによって、ジヌクレオチドのアミノアシル化を実施した。最初に、テトラヒドロフラン中の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6当量および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール60当量を使用して、保護アミノ酸を活性化した。この混合物を終始撹拌しながら20分間インキュベートした。次に、これにN-メチルイミダゾール３当量中のジヌクレオチド１当量を添加し、反応を室温で２時間継続させた。テトラメチルグアニジンおよび4-ニトロベンズアルドキシムを添加し、さらに３時間撹拌を続けることによって、脱保護を実施した。酢酸を添加して再び０℃で30分撹拌しながらインキュベートすることによって反応を完結させて、アミノアシル化ジヌクレオチドを生成させた。
基本的にT.G.Hecklerらの記載（Tetrahedron 40:87-94,1984）にしたがって、アミノアシル化ジヌクレオチドへのｔＲＮＡの連結を実施させた。簡単に述べると、先端部切断ｔＲＮＡ分子（8.6 O.D.$_{260}$単位／ml）およびアミノアシル化ジヌクレオチド（4.6 O.D.$_{260}$単位／ml）をT4ＲＮＡリガーゼ340単位／mlとともに４℃で16時間インキュベートした。反応緩衝液には55mMＮａ-Hepes，ｐH7.5，15mMＭｇＣｌ$_2$，250μＭＡＴＰ，20μg/mlＢＳＡおよび10％ＤＭＳＯが含まれていた。インキュベート後、反応混合物を最終的に10mMＭｇＣｌ$_2$を含有し50mMＮａＯＡｃ濃度、ｐH4.5となるように希釈した。生成混合物を、50mMＮａＯＡｃ、ｐH4.5、10mMＭｇＣｌ$_2$で平衡化したＤＥＡＥ－セルロースカラム（１ml）に、４℃において、適用した。ＲＮＡリガーゼおよびその他の非ｔＲＮＡ成分を除去するため、カラムを0.25mMＮａＣｌで洗浄した。ｔＲＮＡ含有画分を集め、50mMＮａＯＡｃ、

ｐH4.5、10mMＭｇＣｌ$_2$、および1.0MＮａＣｌで平衡化しておいたＢＤ－セルロースカラムに、４℃において添加した。同一の緩衝液10mlで洗浄することによって、未反応のｔＲＮＡを除去した。25％エタノールを含有する緩衝液でカラムから溶出させることによって、純粋ミスアミノアシル化ｔＲＮＡが得られた。

抽出物の調製：小麦胚芽の胚を濃縮するため、シクロヘキサンと四塩化炭素の混合物（１：６）を使用して、小麦胚芽を浮遊させることによって、小麦胚芽胚抽出物を調製し、続いて一晩（約14時間）乾燥した。浮遊した小麦胚芽胚（5g）を乳鉢でガラス粉末5gとともに磨砕し、微粉末を得た。抽出溶媒（緩衝液Ｉ：10mMトリス酢酸緩衝液、ｐH7.6、1nM酢酸マグネシウム、90mM酢酸カリウム、および1mM ＤＴＴ）を少しずつ添加してなめらかなペーストを得た。破砕した胚および抽出溶媒25mlのホモジネートを23,000xgで２回遠心分離した。抽出物をセファデックスG-25微細カラムに適用し、緩衝液II（10mMトリス酢酸緩衝液、ｐH7.6、3mM酢酸マグネシウム、50mM酢酸カリウム、および1mM ＤＴＴ)に溶出させた。ボイドボリュームに明るい黄色のバンドが移動し、１ml画分として回収し（S-23）、液体窒素中で凍結させた。

鋳型の調製：プラスミドｐＳＰ72-bopをEcoＲＩで線状化することによって、鋳型ＤＮＡを調製した。制限線状鋳型ＤＮＡをフェノール抽出およびＤＮＡ沈殿によって精製した。SP6-ribomax system（Promega;Madison,WI）を使用して、in vitro転写によって、大規模なｍＲＮＡ合成を実施した。精製ｍＲＮＡを使用直前に10分間67℃で変性した。

無細胞翻訳反応：取り込み混合物（100μl）にはS-23抽出物50μl、5mM酢酸マグネシウム、5mMトリス酢酸、ｐH7.6、20mM Hepes-ＫＯＨ緩衝液、ｐH7.5；100mM酢酸カリウム、0.5mM ＤＴＴ，0.375mM ＧＴＰ，2.5mM ＡＴＰ，10mMクレアチンホスフェート、60μg/mlクレアチンキナーゼ、およびバクテリオロドプシンをコードする遺伝子配列を含む100μg/mlｍＲＮＡを含有させた。ミスアミノアシル化ＰＣＢ－リジンを170μg/mlとなるように添加し、マグネシウムイオンおよびＡＴＰの濃度を最適化した。混合物を25℃で１時間インキュベートした。

ＰＣＢ－リジンを含有する新生タンパク質の単離：磁性Dynabeads M-280（Dynal;Oslo,Norway）に、ビーズ１mgあたりビオチン化タンパク質10μgの結合容量を有するように、ストレプトアビジンをコーティングした。安定化ＢＳＡを除去するため、2mg/ml濃度のビーズを少なくとも３回洗浄した。新生タンパク質中に取り込まれたＰＣＢ－リジンを含有する翻訳混合物をストレプトアビジンコーティングビーズに混合し、室温で30分インキュベートした。磁性粒子濃縮器（ＭＰＣ）（Dynal;Oslo,Norway）を使用して0.5-1.0分間磁界を適用し、上清をピペットで除去した。反応混合物を３回洗浄し、磁性ビーズを水50μl中に懸濁させた。

Black-Ray長波長ＵＶランプ、Model B-100（UV Products,Inc.;San Gabriel,CA）を使用して、石英キュベット中で光分解を実施した。発光ピーク強度は365umにおいておよそ1100μW/cm^{2}であった。ビーズを除去するため、磁気捕獲（magnetic capture）を繰り返した。得られた新生タンパク質を定量したところ、収率は70-95％であった。

実施例５　光分解性コンジュゲートを使用した、新生タンパク質のin vitro合成

アミノアシル化後の結合：アミノアシル化後の結合を利用する、標的の検出および／または単離のためのＰＣＢ－アミノ酸の取り込みを含む工程の図解を図10に示す。E.coliｔＲＮＡ^{Lys}（Sigma Chem;St.Louis,MO）をリジン（A.E.Johnsonら，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:3075,1978）でアミノアシル化した。Lys-ｔＲＮＡ^{Lys}の溶液に、ジメチルスルホキシドに溶解したＰＣＢのＮＨＳエステル（化合物13）を０℃において添加し、この修飾ｔＲＮＡをベンゾイル化ＤＥＡＥセルロースカラムを使用して精製した（U.C.Kreigら，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:8604,1986）。Sonarらによる記載（Biochem.32:13777，1993）にしたがって、無細胞小麦胚芽系でｍＲＮＡを翻訳した。ＰＣＢリジルｔＲＮＡを除去するため、ＰＣＢ－リジンを含有する新生タンパク質をアセトン沈殿によって精製し、続いてストレプトアビジンコーティング磁性ビーズを使用して、ＰＣＢ－リジンを含有する新生タンパク質の磁性捕獲を実施した。

実施例６　光分解性コンジュゲート－ＰＣＢヌクレオチドの合成

ＰＣＢ-dＵＴＰ（図13Ａ）の合成：5-（3-アミノアリル）-d ＵＴＰアンモニウム塩（“31”）（Sigma Chemical;St.Louis,MO）（10mgまたは16.6μmol）を0.1N ＮａＨＣＯ$_3$ 200μlに溶解した。この溶液に、ＤＭＦ100μl中のＰＣＢ－ＮＨＳ（化合物13;12.5mgまたは１当量）溶液を添加した。反応混合物を一晩室温で撹拌し、濃縮し、逆相半分離用ＨＰＬＣ（Novapak C_{18}カラム；Waters Chrcmatography;Marlboro,MA）により、5mMトリエチルアンモニウムアセテート（Ａ）中アセトニトリル（Ｂ）10-50%の直線勾配を使用して、30分かけて精製した。ＰＣＢ-dＵＴＰを含有する画分を集め、凍結乾燥し、ＴＥ緩衝液（ｐＨ7.4）中に濃度5mMとなるように再溶解し、そしてこの溶液を核酸中への酵素による取り込みに使用した（収率約56%）。5-（3-アミノヘキシル）-（デオキシ）シチジントリホスフェートを使用して、同様の操作を使用し、ＰＣＢ－ＵＴＰ，ＰＣＢ-（d）ＡＴＰ，およびＰＣＢ-（d）ＣＴＰのそれぞれを調製した。

実施例７　光分解性コンジュゲート－ＰＣＢホスホルアミダイトの合成

ＰＣＢ－ホスホルアミダイト（図13Ｂ）の合成：5-（5-ビオチンアミドカプロアミドメチル）-2-ニトロアセトフェノン（“37”）（534mgまたは1mmol)をピリジン（3x2ml）と共蒸留することによって無水物とし、ピリジン5mlに溶解した。4,4'-ジメトキシトリチルクロライド（406mgまたは1.2当量）および4-ジメチルアミノピリジン（6mgまたは0.05当量）を添加し、その溶液を室温で24時間撹拌した。ＣＨＣｌ$_3$ 10mlおよび0.1N水性ＮａＨＣＯ$_3$ 20mlを添加し、形成された層を分離し、有機相を乾燥し、蒸発乾燥し、そしてシリカゲルカラム上でＣＨＣｌ$_3$中でのＭｅＯＨの0-5%の段階勾配を使用して精製して、化合物38 576mg（約69%）を得た。中間体38（836mgまたは1mmol）を95%ＥｔＯＨ8mlに溶解した。溶液を０℃に冷却し、激しく撹拌した。この溶液にＮａＢＨ$_4$（19mgまたは２当量）を少しずつ添加し、この溶液をさらに２時間室温で撹拌した。反応をアセトン２mlで停止させ、ＣＨＣｌ$_3$ 10mlおよび0.1N水性ＮａＨＣＯ$_3$ 10mlを添加し、層を分離し、有機相を乾燥し、蒸発乾燥し、化合物39 704mg（約84%）を得、これをさらに精製せずにそのまま使用した。化合物39（838mgまたは1mmol）をＣＨＣｌ$_3$（5ml）およびジイソフロフィルエチルアミン（0.68mlまたは４当量）の混合物中に溶解した。この溶液に2-シアノエチル-N-,N-ジイソフロピルクロラ－ホスホルアミダイト（225μlまたは１当量）を添加し、溶液を室温で１時間撹拌した。酢酸エチル（5ml）を添加し、この溶液をＮａＣｌ溶液（3x1ml）およびＨ$_2$Ｏ（2ml）で洗浄した。乾燥溶媒を真空で除去し、シリカゲルカラム上でＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$中でのトリエチルアミンの段階勾配を使用して精製して、収量789mg（約74%）を得た。

実施例８　ＰＣＢ－ホスホルアミダイトを使用した、オリゴヌクレオチドの化学合成

5'ＰＣＢ－ホスホルアミダイトを使用した、オリゴヌクレオチドの自動合成および精製：無水アセトニトリル中の0.1M 5'-ＰＣＢ－ホスホルアミダイト溶液を調製した。この溶液のビンをApplied Biosystem 392 ＤＮＡ／ＲＮＡ合成装置のホスホルアミダイト添加口に入れた。オリゴデオキシヌクレオチド配列の１つをプログラムし、40nmolＣＥカラムおよび標準合成プロトコールを使用して合成した。ただ一つ必要な改変は、ビオチンのＮ^{1}部位からトリチル基を除去するために必要な脱トリチル化（180s）の拡張である。合成後、5'-ＰＣＢ－オリゴデオキシヌクレオチドを固相支持体から切断し、濃縮アンモニアで16時間50℃で処理することによって、脱保護した。粗オリゴヌクレオチドを凍結乾燥し、リン酸緩衝液、ｐＨ7.4 1mlに溶解した。この溶液にモノマー性アビジンアガロースビーズ（Sigma Chemical;St.Louis,MO）（40nmol）の懸濁物を添加し、混合物を室温で１時間インキュベートした。懸濁液を濾過し、リン酸緩衝液3x1mlで洗浄し、リン酸緩衝液3mlに再懸濁し、記載したように10分間穏やかに撹拌しながら照射した。混合物を濾過し、濾液を凍結乾燥し、再溶解した（収量＝3.8 ＯＤ$_{260}$）。

実施例９　ＰＣＢ－ヌクレオチドを使用した、ＤＮＡおよびＲＮＡの酵素的合成

核酸プローブのビオチン化のためには、いくつかの酵素的および化学的方法が利用し得る。ＰＣＢ－ヌクレオチドのＤＮＡ中への取り込みのための酵素的方法には、ニック翻訳、およびT4ＤＮＡポリメラーゼを使用する、置換合成が含まれる。ＤＮＡの末端標識もまた末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを使用して実施することができる。ＲＮ

AのＰＣＢ標識のためにはいくつかのＲＮＡポリメラーゼ酵素を使用することができる。ビオチン化について開発された方法（P.R.Langerら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:6633,1981）に基づいて、ＰＣＢ-dＣＴＰの存在下でニック翻訳を実施した。２本鎖および１本鎖ＤＮＡ分子について、酵素的テーリングを使用した。ＰＣＢヌクレオチドをＤＮＡの3'末端上に添加した。内部ビオチン部分とのビオチン化プローブの方が外部ビオチンとのプローブよりも不安定なハイブリッドを形成し、またこの方法で合成されたビオチン化プローブの方が単に5'末端でビオチン化したプローブよりもずっと感受性が強い（E.P.Diamandisら、Clin.Chem.37:625,1991）。

ＰＣＢ－標識ＲＮＡの調製：ＰＣＢ－ＵＴＰを使用する、標準ファージＴ７ＲＮＡポリメラーゼ転写システムにおいて、ＲＮＡのＰＣＢ－標識を達成した。プローブとして１本鎖ビオチン化ＲＮＡを調製するため、ポリリンカー領域の上流にＴ７プロモーターを含有する適当なベクター中に、適当なＤＮＡ配列をクローン化した。クローン化挿入物の下流のＤＮＡクローンを線状化後、基質としてＡＴＰ，ＣＴＰ，ＧＴＰおよびＰＣＢ－ＵＴＰを使用し、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼによって、所定の長さのＲＮＡ転写物を製造した。

実施例10　自己骨髄移植のための造血細胞の単離

正常な健康者および白血病患者の後部腸骨稜から骨髄をヘパリン中に採取した。低密度の単核細胞をFicoll-Hypaque（Sigma Chemical;St.Louis, MO）沈降によって分離する。ＰＣＢ－標識抗ＣＤ34モノクローナル抗体（Ｍｙ10）を使用してＣＤ34^{+}細胞を単離する。20％ＦＣＳを含むIscove改変Dulbeco培地（ＩＭＤＭ；Irvine Scientific;Santa Anna,CA）中に単核骨髄細胞を10^{6}/mlの濃度で入れる。付着細胞を除去するため、組織培養条件下で一晩、細胞を培養する。非付着細胞を回収し、冷却リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）で２回洗浄し、ＰＢＳ中で10^{7}/mlに希釈する。この細胞懸濁液にＰＣＢ－標識抗ＣＤ34抗体を5μ/mlとなるように添加し、４℃で１時間、間欠的に緩やかに撹拌しながらインキュベートする。インキュベート後、細胞を5%-ＦＣＳ／ＰＢＳ中で２回洗浄し、同一の容積に再懸濁する。この懸濁液にストレプトアビジンコーティング磁性ビーズ（Dynabeads;Oslo,Norway）を添加し、４℃で１時間、撹拌しながらインキュベートする。ビーズおよびこれに結合した細胞に磁石をあて、懸濁液から分離し、5%-ＦＣＳ／ＰＢＳ中に入れる。長波長ＵＶランプ（Black-Ray XX-15 UV lamp ;UVP Inc.;San Gabriel,CA）を使用して、15cmの距離から４分間ビーズに照射することによって、光分解を実施する（発光ピーク365nm、距離31cmにおけるランプ強度＝1.1mW/cm^{2}）。磁気捕獲によって放出ビーズを単離する。細胞懸濁液をＦＩＴＣコンジュゲートＭｙ10抗体で染色し、続いてＦＡＣＳ分析をすることによってＣＤ34^{+}に関する検定をし、95％以上がＣＤ34細胞であると定量される。

実施例11　医薬組成物のin vivo半減期の決定

ＰＣＢ－クマリンアミノ酸-ｔＲＮＡ^{leu}（前記のように化学的ミスアミノアシル化し、ＴＥ中に1.7mg/mlとなるように懸濁）10μｌ、Ｓ－23抽出物50μｌ、水10μｌならびに50mM酢酸マグネシウム、50mMトリス酢酸、ｐＨ7.6、200mM Hepes－ＫＯＨ緩衝液、ｐＨ7.5; 1M酢酸カリウム、5mM ＤＴＴ、3.75mMＧＴＰ、25mMＡＴＰ、100mMクレアチンホスフェートおよび600μg/mlクレアチンキナーゼの溶液10μｌ、を混合することによって、無細胞翻訳反応を実施する。この混合物を氷浴上に保持しておき、組換えIL-2ｃＤＮＡから転写して単離した500μg/mlヒトIL-2ｍＲＮＡ（26ロイシンコドンを含有）20μｌを添加する。この混合物を25℃において１時間インキュベートし、氷浴上に置く。この混合物にストレプトアビジンコーティング磁性Dynabeads（2mg/ml）100μｌを添加し、室温で30分保つ。インキュベート後、混合物をマイクロフュージで５分間3000xgで遠心分離するか、またはＭＰＣを使用してこの溶液に磁界を適用する。上清を除去し、ＴＥによる操作を３回繰り返す。最後の洗浄ペレットを50mMトリス塩酸、ｐＨ7.5,50μｌ中に再懸濁し、石英キュベットに移し入れる。この懸濁液におよそ１秒間、Black-Ray長波長ＵＶランプのＵＶ光を適用する。この溶液にＭＰＣで1.0分間磁界を適用し、上清をピペットで除去する。上清を殺菌濾過し、50％グリセロール、1.8％ＮａＣｌおよび25mM炭酸水素ナトリウムを含有する殺菌緩衝液を当容積混合する。Ｏ．Ｄ．$_{260}$を測定することによって、タンパク質濃度を定量する。

濃度1mg/mlの生成組成物0.25mlを２匹のBalb/cマウスの尾部静脈に静脈注射する。２匹の対照マウスにも相当量の緩衝液を注射する。各時間（０、５分、15分、30分、60分、２時間および６時間）毎に足蹠から血清試料100μｌを取得し、0.9％生理食塩水400μｌ中に添加する。血清試料を抗クマリン抗体でコーティングしたDynabeadsの溶液（2mg/ml）に添加し、室温で30分インキュベートする。この溶液にＭＰＣで１分間磁界を適用し、上清をピペットで取り出す。470nmにおける蛍光を測定し、試料をrat IL-2タンパク質特異的モノクローナル抗体で処理する。各試料についてIL-2タンパク質の含有量を定量し、検出した蛍光量と等式化する。得られた結果から、in vivo IL-2の半減期が正確に決定される。

実施例12　ＰＣＢによるポリメラーゼ連鎖反応

ＰＣＢを使用するＰＣＲ増幅ＤＮＡ配列に関与する段階を図12に示す。下記に示す実験方法は記載された（Y.Loら、Nucl.Acids Res.16:719,1988;R.K.Saikiら、Sci.239:487,1988）処方の組み合わせを基礎とするものである。合成されたＰＣＢ-dＣＴＰ（50μＭ）をｄＡＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＴＴＰ（すべて200μＭ）およびｄＣＴＰ（150μＭ）の混合物に添加した。反応混合物は標的ＤＮＡ源（単離された全ゲノムＤＮＡ）、フランキングプライマーおよび熱安定性ポリメラーゼ（Taqポリメラーゼ）で構成した。反応混合物を25-30サイクルの増幅操作に供した。試料を70-95℃に１分間加熱してＤＮＡを変性し40℃に２分間冷却してプライマーをアニーリングした。試料を再び70℃に１分間加熱してポリメラーゼを活性化し、この温度で0.5分インキュベートしてアニーリングされたプライマーを延長させた。最後のサイクル後、試料をさらに5-10分、37℃でインキュベートして、最後の延長の完了を確実なものにした。ストレプトアビジンコーティング磁性ビーズを使用して、核酸の磁性捕獲を実施した。捕獲物質を適当な緩衝液で洗浄し、所望の濃度に再懸濁した。試料に10分間照射して、非修飾形態のＰＣＲ生成物を放出させた。

ＰＣＢ標識核酸プローブを使用して、固定化形態または溶液形態の核酸を検出または分離（精製）した。ハイブリダイゼーションを実施して、ＤＮＡ：ＤＮＡ，ＤＮＡ：ＲＮＡおよびＲＮＡ：ＲＮＡハイブリッドを作製した。この実験では、最初にＰＣＢ標識プローブでハイブリダイゼーションし、続いてストレプトアビジンコーティング固定化支持体を使用してそのハイブリッドを捕獲する操作が含まれる。これらのハイブリッドを洗浄して当初の不要の成分を除去し、照射を使用して固定化支持体から放出させた（G.Gebeyehuら、Nucl.Acids Res.15:4513,1987;T.Itoら、Nucl.Acids Res.20:3524,1992）。ｓｓＤＮＡ分子のＰＣＢ－プローブとのハイブリダイゼーションにはこれらの成分をハイブリダイゼーション用緩衝液中、42℃で30分インキュベートする操作が含まれた。各プローブおよび実験系によってハイブリダイゼーション条件を最適化した。ＰＣＢ標識プローブは放射標識プローブよりも低い融点を有するので、少し改変したハイブリダイゼーション条件が必要であった。固定化ストレプトアビジン（Dynabeads M280ストレプトアビジン）を使用して、反応成分からこれらのハイブリッドを選択的に取り出した。複合体から光化学的放出をさせた結果、純粋ハイブリッドを単離した。

実施例13　ＰＣＢ－リポソームの合成

リポソームへのＰＣＢ－脂質の取り込み：ＰＣＢ－脂質を２：１の比率のクロロホルム：メタノール中の通常の脂質と混合した。この脂質混合物を窒素下で蒸留して乾燥し、乾燥脂質を溶媒ＤＭＳＯ中に最終濃度1mg/mlとなるように懸濁した。リポソームを氷冷容器内、窒素下で10分音波処理した。生成した懸濁物を10,000rpmで20分遠心分離し、ＰＣＢ－リポソームを含有する上清を使用に供した。ＰＣＢ－脂質はわずかに５％（モル当量）程度で、満足すべき結果が得られた。ＰＣＢ－ホスファチジルエタノールアミンおよびＰＣＢ－ホスファチジルセリンの化学構造式を図16に示す。

実施例14　in situハイブリダイゼーションのためのＰＣＢ

in situハイブリダイゼーション反応のための一般的方法論は、試料の調製、指標分子およびプローブの選択、ハイブリダイゼーション、洗浄、およびオートラジオグラフィーおよび検出に分けることができる。

試料の調製：5～6μｍの凍結組織切片をゼラチンコーティング顕微鏡スライドにマウントし、固定の前に30分空気乾燥する。続いて、グルタールアルデヒドまたはパラホルムアル

デヒドを使用して、ＤＮＡまたはＲＮＡを固定する。これらの固定化操作中、場合によっては変性操作（例えば100℃で５分）とそれに続く氷冷緩衝液への迅速な浸漬（dsＤＮＡまたはdsＲＮＡが反応の標的の場合必要）を導入することができる。細胞および細胞培養物の場合は、これらの細胞（$1x10^6$細胞）を細胞遠心または塗抹法（smearing）によってゼラチンコーティングスライド上に置く。細胞を空気乾燥し、ＤＮＡまたはＲＮＡを固定する。

指標分子およびプローブの選択：同位体検出の方が非同位体法の使用よりもいくつかの利点を示すが、後者の方を有効に利用することができる。オリゴヌクレオチドの合成からプラスミド挿入断片の切除に至るまでの各種技術によって、標識プローブを作製することができる。

ハイブリダイゼーション：ＩＳＨを溶液およびフィルターハイブリダイゼーションの一般的な原理にしたがって実施する。標準反応温度はおよそT_m-25℃（T_mはハイブリッドの50％が解離する温度である）。ハイブリダイゼーション混合物に50％ホルムアミドを添加することによって、反応温度を組織学的細部の保存に適合するレベルまで低下させる。これによると、典型的なＤＮＡ－ＤＮＡハイブリダイゼーション反応については温度は37℃、ＲＮＡ－ＤＮＡでは44℃、そしてＲＮＡ－ＲＮＡでは50℃である。試料を担持している顕微鏡スライドの表面に緩やかに送風し、この表面に最終のハイブリダイゼーション混合物をピペットで置く。その後、このフィルムをパラフィンオイル浴中で水平にして、必要な時間および温度でインキュベートする。

洗浄：パラフィンオイルを排出させ、クロロホルムで２回洗浄することによって、過剰のオイルを除去し、スライドを空気乾燥する。バックグラウンドを減じるため、きわめて厳密な洗浄を行なう。

オートラジオグラフィーおよび検出：検出は、放射性同位体標識プローブの場合は、Ｘ線フィルムまたはエマルジョン被覆カバースリップを使用し、酵素的検出法の場合は、他の方法で実施する。

実施例15　異なるの波長において光分解する薬剤による異なる細胞集団の単離

それぞれ異なる生物活性薬剤に結合した異なる抗原特異的抗体をそれぞれ有する、２つの異なるのコンジュゲートを作製する。コンジュゲートＡは化合物30（図21）、ＰＣＢ生物活性薬剤からなっており、細胞表面マーカーのＣＤ34（幹細胞マーカー）に特異的な抗体に結合し、300nmの照射によって光分解する。コンジュゲートＢは化合物25（図19）、ＰＣＢ生物活性薬剤からなっており、細胞表面マーカーのＣＤ３（Ｔ細胞マーカー）に特異的な抗体に結合し、400nmの照射によって光分解する。

コンジュゲートＡおよびＢを、２組ずつ、健康な提供者から得た末梢血試料とともにインキュベートする。インキュベートは、最大の抗体－抗原接触が得られるように緩やかにロッキングしながら、室温（22℃）で実施する。30分のインキュベート後、細胞をストレプトアビジンでコーティングした100mmの組織培養皿に置き、さらに30分インキュベートする。ストレプトアビジン－ビオチン結合後、プレートをＰＢＳ中で穏やかに洗浄して、付着していない細胞を除去する。

洗浄後、１組のプレートを300nmの電磁線照射処理し、放出された細胞を採取する。その後、この組を400nmの電磁線照射処理し、この周波数で放出された細胞を採取する。２組目を400nmの照射処理し、放出された細胞を採取し、このプレートをさらに300nmの照射処理し、再び放出された細胞を採取する。各処理後、各組のプレートから採取した細胞の数を測定することによって、細胞表面マーカーのＣＤ34，ＣＤ3，およびＣＤ34とＣＤ3の両方を担持する末梢血試料中の細胞数が決定される。

ここに開示した発明の明細書および実施を考慮に入れることによって、本発明のその他の態様および使用が当業者にとって明らかであると考えられる。明細書および実施例は、以下の請求の範囲によって示される本発明の真の範囲および精神の単なる代表例を意味するものである。

【図１】

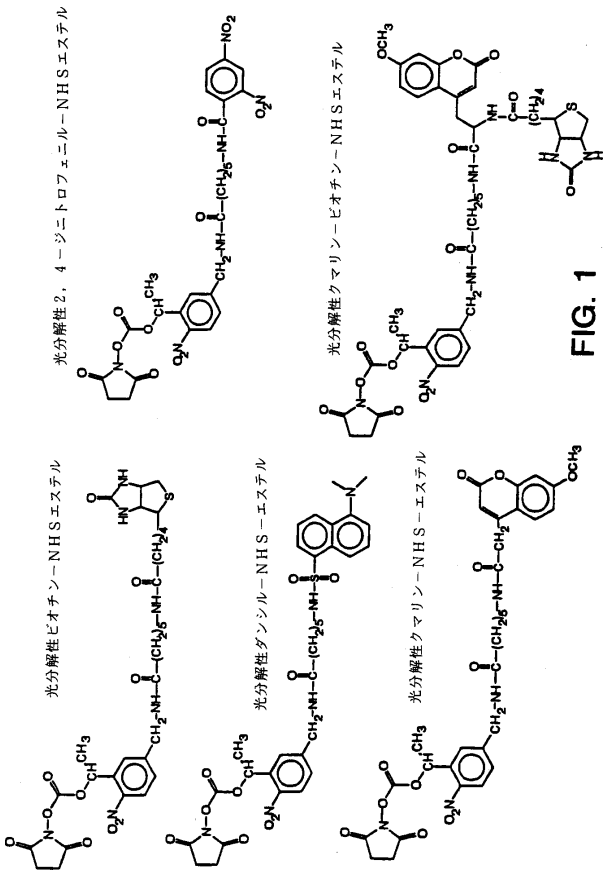


FIG. 1

【図２】

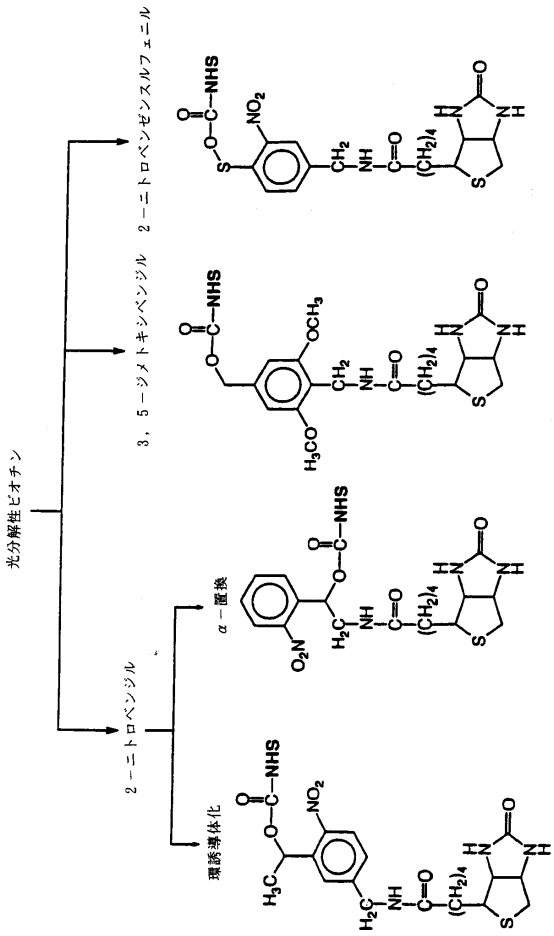


FIG. 2

【図３】

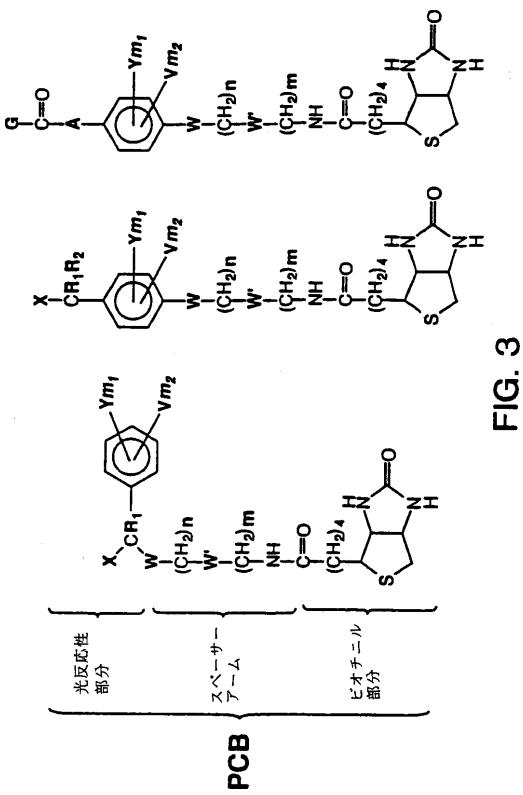


FIG. 3

【図４】

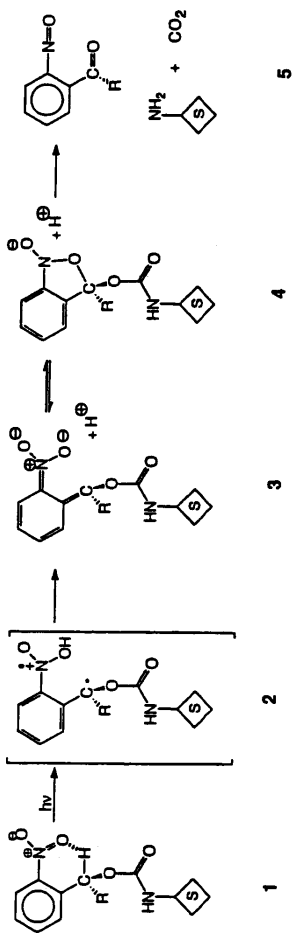


FIG. 4

【図５】

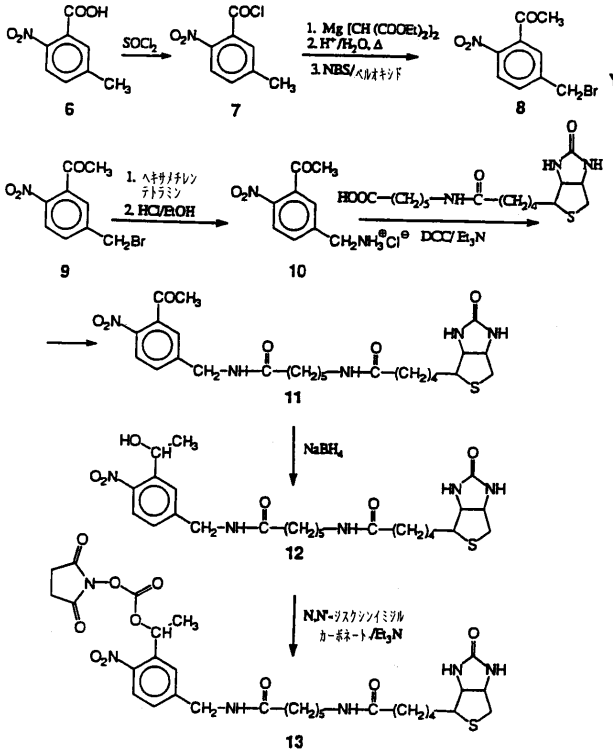


FIG. 5

【図６】

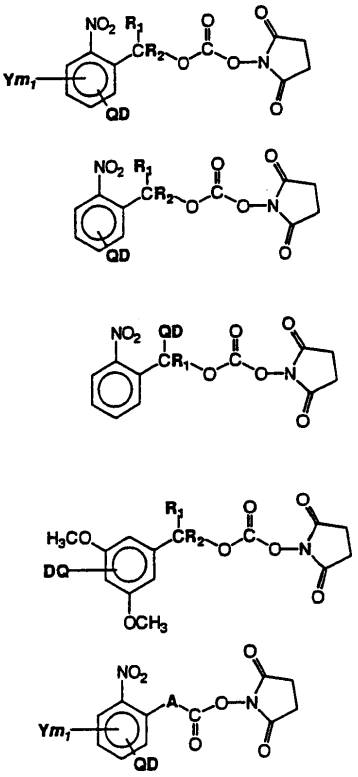


FIG. 6

【図７】

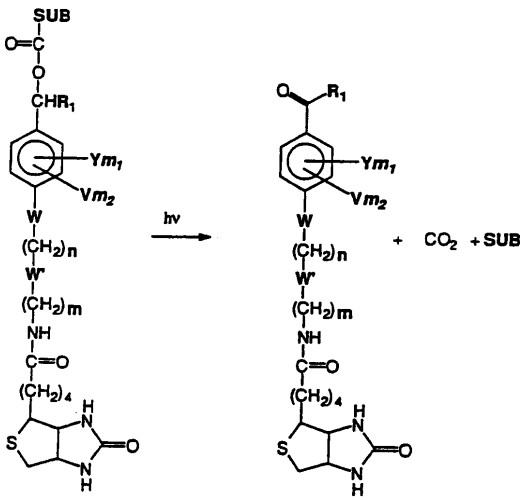


FIG.7

【図８】

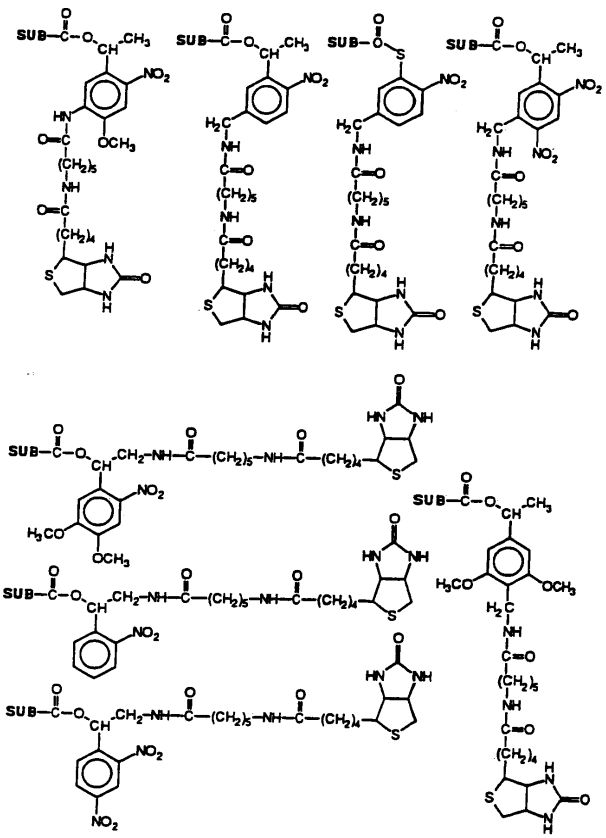


FIG. 8

【図９】

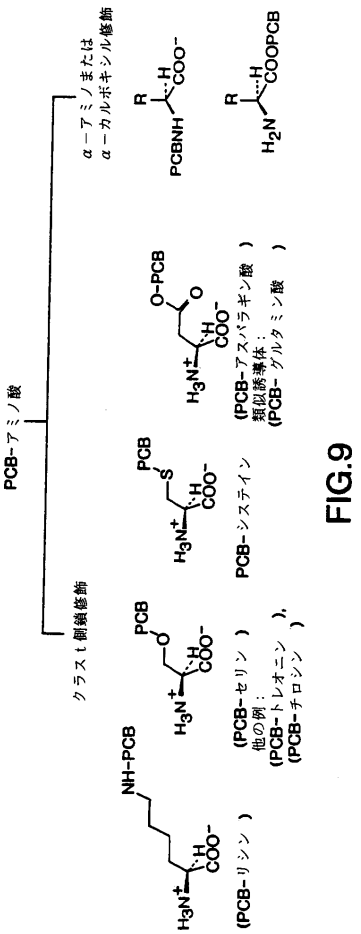


FIG.9

【図１０Ａ】

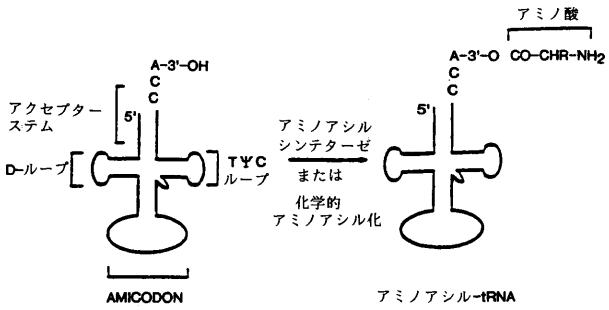


FIG. 10A

【図１０Ｂ】

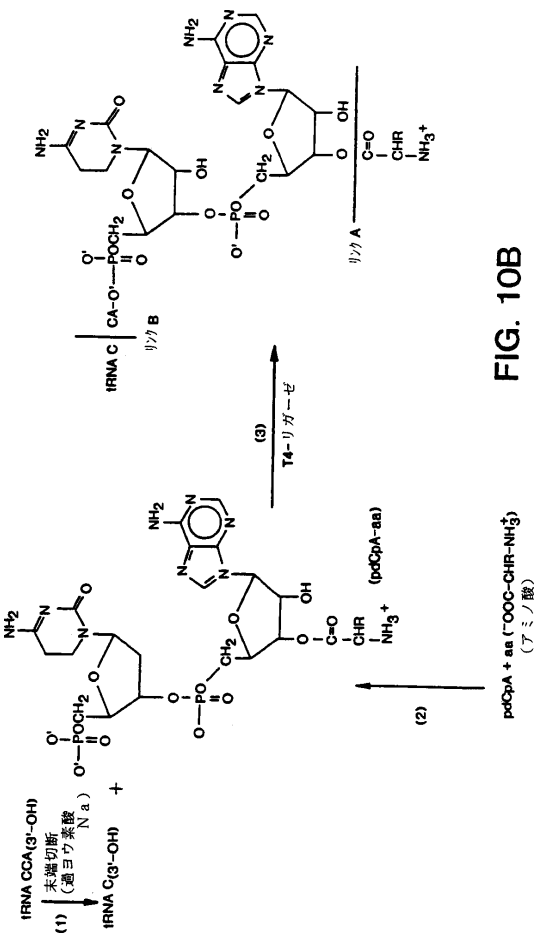


FIG. 10B

【図１１】

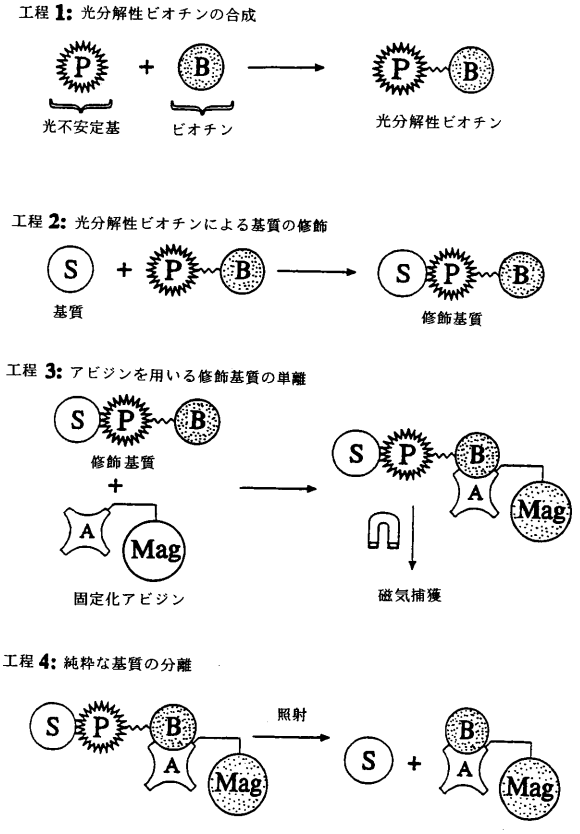


FIG. 11

【図１２Ａ】

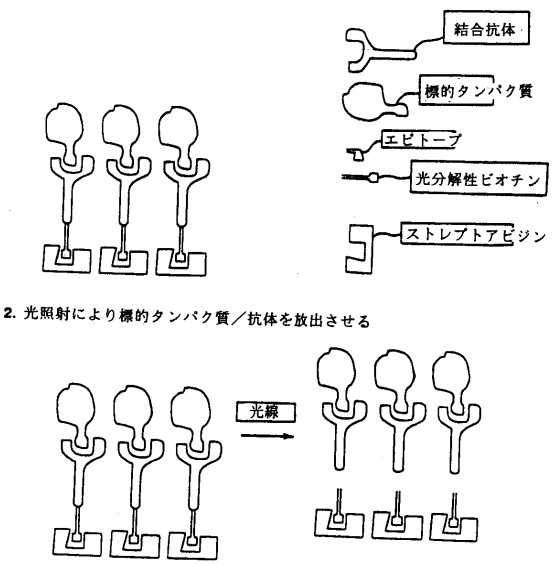


FIG. 12A

【図１２Ｂ】

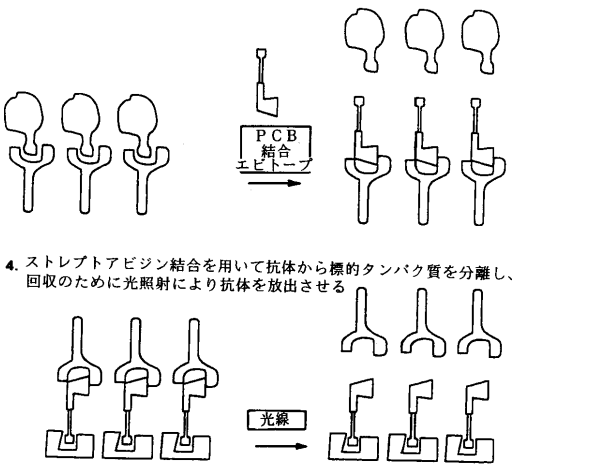


FIG. 12B

【図１３Ａ】

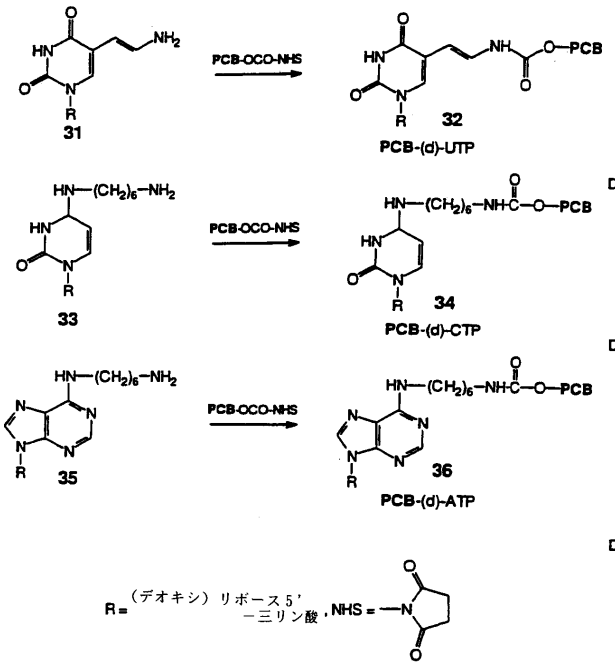


FIG. 13A

【図１３Ｂ】

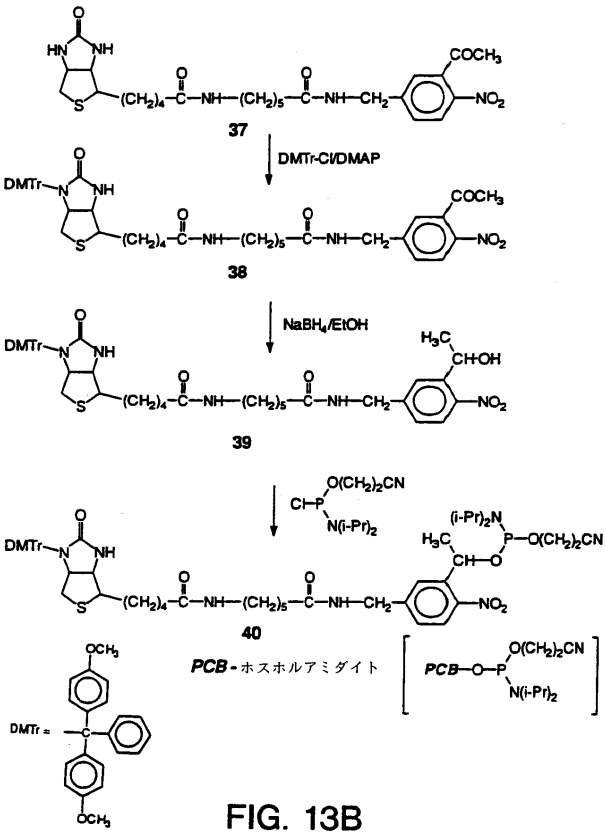


FIG. 13B

【図１３Ｃ】

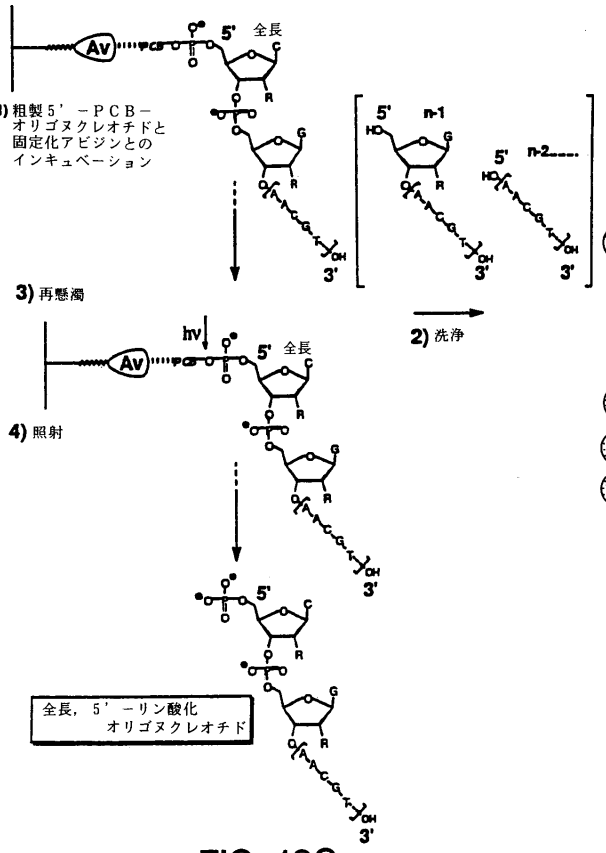


FIG. 13C

【図１４Ａ】

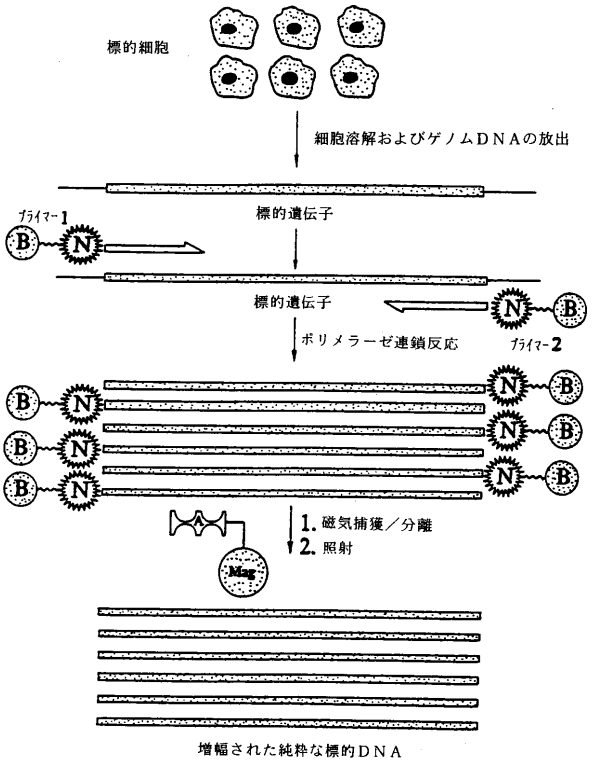


FIG. 14A

【図１４Ｂ】

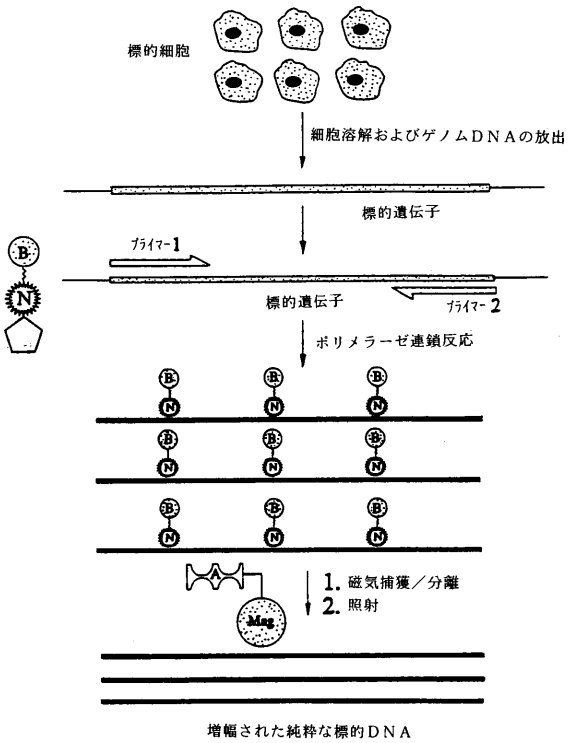


FIG. 14B

【図１５】

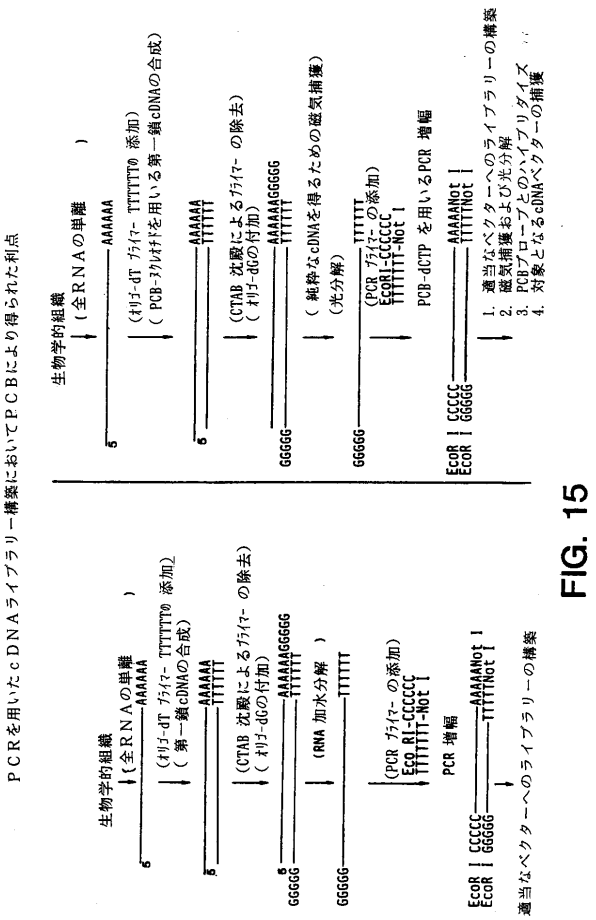


FIG. 15

【図１６】

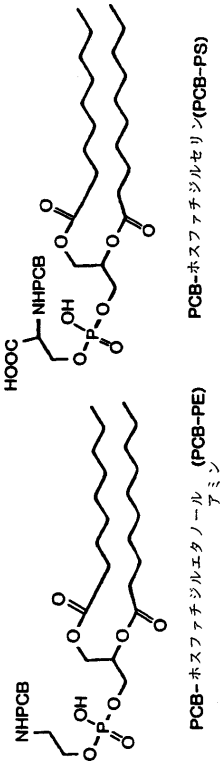


FIG. 16

【図１７】

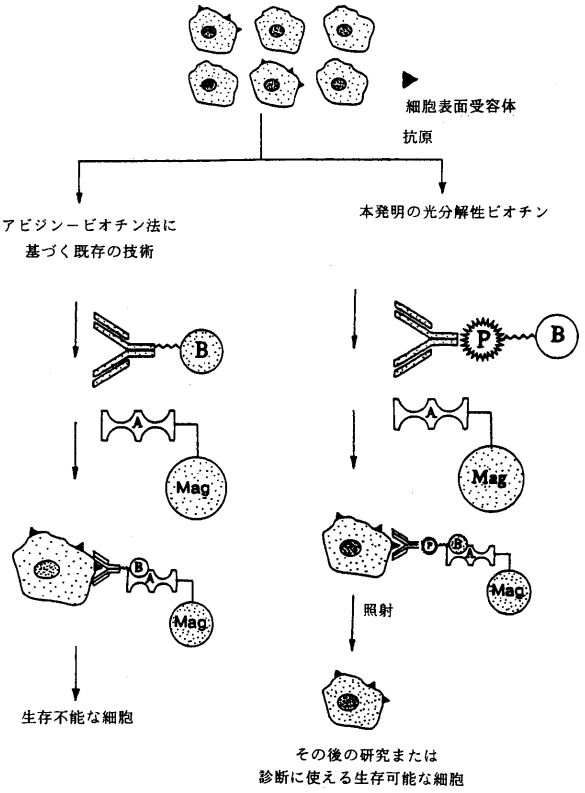


FIG. 17

【図１８】

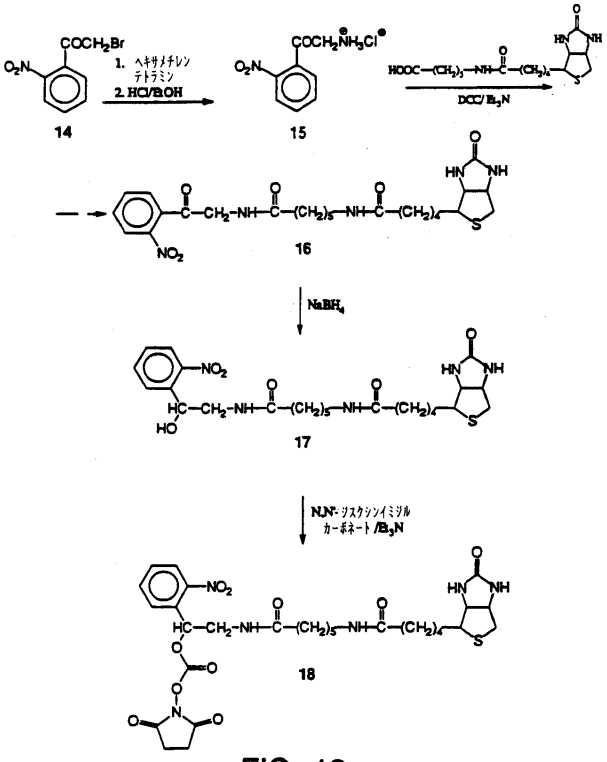


FIG. 18

【図１９】

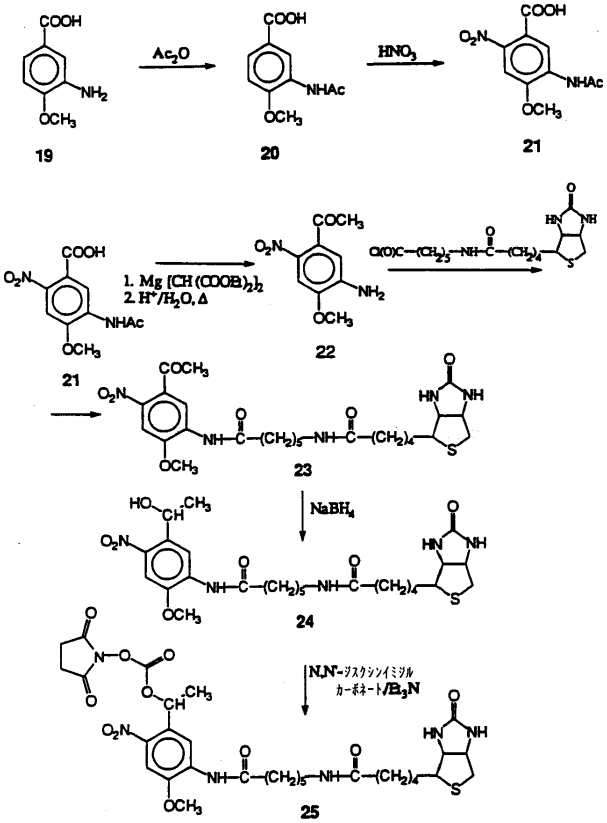


FIG. 19

【図２０】

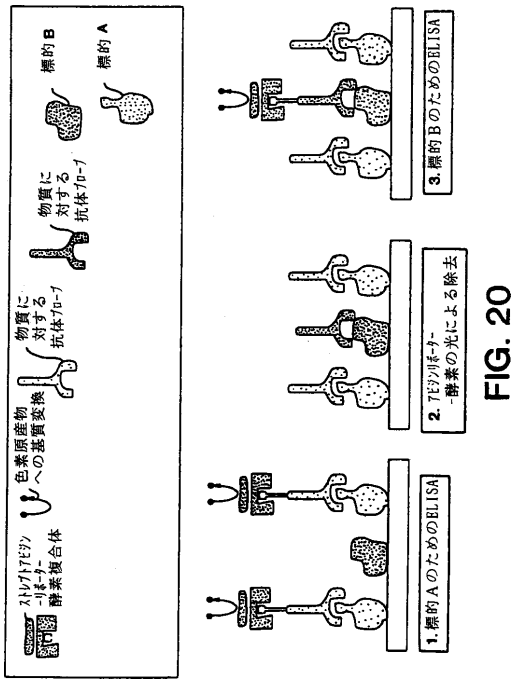


FIG. 20

【図２１】

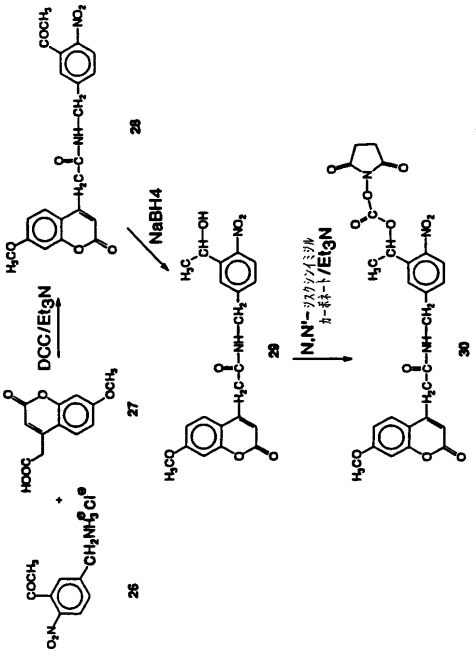


FIG. 21

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12Q 1/68	*(2006.01)*		C12Q 1/68		A
C07K 14/46	*(2006.01)*		C07K 14/46		
A61K 38/00	*(2006.01)*		A61K 37/02		
A61K 38/17	*(2006.01)*		A61K 37/12		
A61K 39/00	*(2006.01)*		A61K 39/00		A
A61K 49/00	*(2006.01)*		A61K 49/00		A
A61K 51/00	*(2006.01)*		A61K 43/00		
A61P 31/04	*(2006.01)*		A61P 31/04		
A61P 31/12	*(2006.01)*		A61P 31/12		
C07H 19/06	*(2006.01)*		C07H 19/06		
C07H 19/16	*(2006.01)*		C07H 19/16		
C07K 14/00	*(2006.01)*		C07K 14/00		
C07K 14/02	*(2006.01)*		C07K 14/02		
C07K 14/03	*(2006.01)*		C07K 14/03		
C07K 14/085	*(2006.01)*		C07K 14/085		
C07K 14/155	*(2006.01)*		C07K 14/155		
C07K 14/28	*(2006.01)*		C07K 14/28		
C07K 19/00	*(2006.01)*		C07K 19/00		
C12Q 1/00	*(2006.01)*		C12Q 1/00		Z
C12Q 1/02	*(2006.01)*		C12Q 1/02		
C12Q 1/04	*(2006.01)*		C12Q 1/04		
C12Q 1/25	*(2006.01)*		C12Q 1/25		
G01N 33/531	*(2006.01)*		G01N 33/531		B
C07D 207/46	*(2006.01)*		C07D 207/46		
C07D 495/04	*(2006.01)*		C07D 495/04	１０３	

(72)発明者　ソゥナ，サニャイ、エム
アメリカ合衆国マサチューシッツ州０２１２０、ボースタン、トレマント・ストリート　１５７５番　アパートマント　３０６
(72)発明者　アレイニク，ジャーズィ
アメリカ合衆国マサチューシッツ州０２１３４、オールスタン、カマンウエルス・アヴィニュー　１３０７番

審査官　斎藤　真由美

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)

C12N 15/00 - 90
C07K 14/00 - 16/46
C12P 21/00 - 08
C12N 1/00 - 7/08
G01N 33/50 - 98
C12Q 1/00 - 70
A61K 31/00 - 48/00
A61P 1/00 - 43/00
PubMed,MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)