

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02011/099576

発行日 平成25年6月17日(2013.6.17)

(43) 国際公開日 平成23年8月18日(2011.8.18)

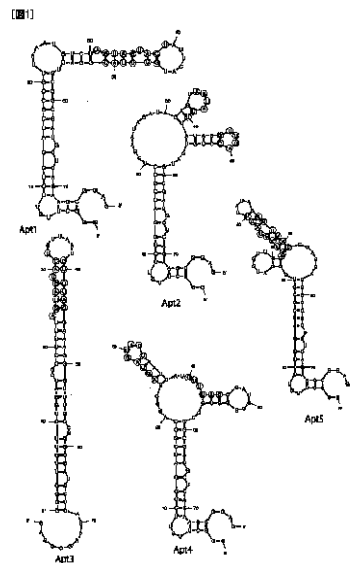
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/115 (2010.01)</b>	C 1 2 N 15/00 H	4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 C O 8 6
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 37/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2011-553898 (P2011-553898)	(71) 出願人	505254175 株式会社リボミック 東京都港区白金台三丁目16番13号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/052925	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(22) 国際出願日	平成23年2月10日(2011.2.10)	(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子
(31) 優先権主張番号	特願2010-29377 (P2010-29377)	(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宜
(32) 優先日	平成22年2月12日(2010.2.12)	(74) 代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100122688 弁理士 山本 健二
		(74) 代理人	100117743 弁理士 村田 美由紀
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 FGF2に対するアプタマー及びその使用

## (57) 【要約】

FGF2に対する阻害活性を有するアプタマー； FGF2に対する結合活性又は阻害活性を有するアプタマー及び機能性物質（例えば、親和性物質、標識用物質、酵素、薬物送達媒体、又は薬物など）を含む複合体； FGF2に対する結合活性又は阻害活性を有するアプタマー、又は当該アプタマー及び機能性物質を含む複合体を含む医薬、診断薬及び標識剤；などを提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

F G F 2 に結合するアプタマー。

## 【請求項 2】

F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害する、請求項 1 記載のアプタマー。

## 【請求項 3】

F G F 2 と F G F 2 受容体との結合は阻害するが、F G F 1 と受容体との結合は阻害しない、請求項 2 記載のアプタマー。

## 【請求項 4】

下記式：

A G U A C U A C U N G U U A C C (式中、A はアデニン、G はグアニン、C はシトシン、U はウラシルをそれぞれ示し、N は、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルからそれぞれ選択される 6 または 7 個の連続したヌクレオチドからなる配列を示す) で表される配列を含んでいる、F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害するアプタマー。

10

## 【請求項 5】

ピリミジンヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、かつ F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害する、請求項 4 記載のアプタマー。

## 【請求項 6】

下記式：

G A G G G U G A C G G U N ' G C U G U U U (式中、A はアデニン、G はグアニン、C はシトシン、U はウラシルをそれぞれ示し、N ' は、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルからそれぞれ選択される 7 または 10 個の連続したヌクレオチドからなる配列を示す) で表される配列を含んでいる、F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害するアプタマー。

20

## 【請求項 7】

ピリミジンヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、かつ F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害する、請求項 6 記載のアプタマー。

## 【請求項 8】

下記式：

U A G G G C N ' ' C A G U (式中、A はアデニン、G はグアニン、C はシトシン、U はウラシルをそれぞれ示し、N ' ' は、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルからそれぞれ選択される 10 ~ 18 個の連続したヌクレオチドからなる配列を示す) で表される配列を含んでいる、F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害するアプタマー。

30

## 【請求項 9】

ピリミジンヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、かつ F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害する、請求項 8 記載のアプタマー。

## 【請求項 10】

配列番号 42 で表される配列を含んでいる、F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害するアプタマー。

40

## 【請求項 11】

ピリミジンヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、かつ F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害する、請求項 10 記載のアプタマー。

## 【請求項 12】

配列番号 36 または 38 の配列を含んでいる、F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害するアプタマー。

## 【請求項 13】

ピリミジンヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、かつ F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害する、請求項 12 記載のアプタマー。

50

## 【請求項 14】

以下 (a) 又は (b) のいずれかである、請求項 1 に記載のアプタマー：

(a) 配列番号 1 ~ 38 および 42 ~ 57 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列 (但し、ウラシルはチミンであってもよい) を含むアプタマーであって、該アプタマーに含まれるヌクレオチドにおいて、

(i) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの 2' 位が、同一又は異なって、フッ素原子であるか、あるいは水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群より選ばれる原子又は基で置換されており、

(ii) 各プリンヌクレオチドのリボースの 2' 位が、同一又は異なって、ヒドロキシ基であるか、あるいは水素原子、メトキシ基及びフッ素原子からなる群より選ばれる原子又は基で置換されている、アプタマー；

(b) 配列番号 1 ~ 38 および 42 ~ 57 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列 (但し、ウラシルはチミンであってもよい) において、1 又は数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を含むアプタマーであって、該アプタマーに含まれるヌクレオチドにおいて、

(i) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの 2' 位が、同一又は異なって、フッ素原子であるか、あるいは水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群より選ばれる原子又は基で置換されており、

(ii) 各プリンヌクレオチドのリボースの 2' 位が、同一又は異なって、ヒドロキシ基であるか、あるいは水素原子、メトキシ基及びフッ素原子からなる群より選ばれる原子又は基で置換されている、アプタマー。

## 【請求項 15】

ヌクレオチドが修飾されている、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のアプタマー。

## 【請求項 16】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のアプタマー及び機能性物質を含む複合体。

## 【請求項 17】

機能性物質が、親和性物質、標識用物質、酵素、薬物送達媒体又は薬物である、請求項 16 に記載の複合体。

## 【請求項 18】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項 16 又は 17 に記載の複合体を含む、医薬。

## 【請求項 19】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項 16 又は 17 に記載の複合体を含む、癌、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、あるいは心臓の形成異常、血管の形成異常または骨格の形成異常の治療用または予防用医薬。

## 【請求項 20】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項 16 又は 17 に記載の複合体を含む、診断薬。

## 【請求項 21】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項 16 又は 17 に記載の複合体を用いることを特徴とする、FGF2 の検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、FGF2 に対するアプタマー及びその利用方法などに関する発明である。

## 【背景技術】

## 【0002】

塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF2 または bFGF) は種々の細胞から分泌される増殖因子であり、発生段階では細胞増殖や分化に深く関与し、成体では組織修復時や癌組織において高い発現が認められる。

10

20

30

40

50

## 【0003】

ヒトFGF2は複数のアイソフォームを有するが、そのうち最も分子量の小さいアイソフォームのみが細胞外に分泌される。このアイソフォームは154アミノ酸から構成される約18kDaのタンパク質で、糖鎖は持たず、等電点は9.4と塩基性に傾いている。読み取り枠の異なるFGF2の高分子量アイソフォーム(22、22.5、24、34kD)の機能はまだ明らかではないが、核内移行シグナルを持ち、核内で機能すると考えられている。

## 【0004】

ヒトFGFファミリータンパク質は、FGF1からFGF23までの22種類が知られている(FGF15とFGF19は同一分子であるため、現在はFGF19に統一されている)。系統発生的解析により、FGF2はFGF1とともにFGF1サブファミリーに分類される。FGF1とのアミノ酸配列の相同性は全FGFの中で最も高く、その値は55%である。FGFの受容体(FGFR)はチロシンキナーゼ型受容体であり、4つのサブタイプに分類される。FGFR1~3は、それぞれbとcのアイソフォームが知られているが、FGF2はこのうちのFGFR1b、FGFR1c、FGFR2cおよびFGFR3c、ならびにFGFR4と2量体を形成して結合する。

10

## 【0005】

マウス線維芽細胞(NIH-3T3細胞)は細胞膜表面にFGFR1を発現している細胞である。このFGFR1はヒトFGF2の結合により活性化されることが知られている。FGF2がFGFR1に結合すると、FRS2(Fibroblast growth factor receptor substrate 2)、Grb2(growth factor receptor-bound protein 2)、SOSを介してMAPキナーゼ(mitogen-activated protein kinase)経路やPIK3(phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT1(actin related gene 1)経路などが活性化され、最終的にVEGF(vascular endothelial growth factor precursor)-A、VEGF-C、HGF(hepatocyte growth factor)、angiopoietin-2、VEGFR、PDGFR-(platelet-derived growth factor beta receptor-)など各種サイトカインや受容体遺伝子が発現誘導される。

20

30

## 【0006】

FGF2はヘパリン結合領域を持ち、他のFGFと同様、ヘパリンやヘパラン硫酸と結合する。細胞から分泌されたFGF2は一般に細胞外マトリックスのヘパラン硫酸に結合し、濃縮され、プロテアーゼからの保護を受けると考えられている。リガンドとして機能する際は、結合した細胞外マトリックスからの遊離が必要だが、これにはFGF-BP(FGF-binding protein)が関与し、FGFRへの誘導を補助するとの報告がなされている。

## 【0007】

FGF2は血管内皮細胞に対する強い増殖、遊走促進作用を持ち、腫瘍組織の血管新生にも深く関与していることがわかっている。例えば腎臓がんなど、血管の多い腫瘍において特にFGF2の血清濃度が高いことが報告されており、その他前立腺がん、乳がん、肺がん等、様々な腫瘍にも存在する。

40

## 【0008】

血管新生にはFGF2のほか、FGF1、VEGF、TNF-(tumor necrosis factor-)、PDGF、EGF(epidermal growth factor)、MMP(matrix metalloproteinase)、angiogeninなどの因子が関与している。これらの因子は腫瘍や血管芽細胞、支持細胞などから分泌され、オートクラインやパラクラインの成長因子として血管新生に寄与する。ただしFGF2は血管内皮細胞だけでなく、平滑筋細胞など、内皮細胞を取り囲む間葉系の細胞にも作用する点が他の因子と異なる。つまりFGF2は間葉系細胞を刺激し

50

てPDGFやPDGFR、VEGF、HGF等の発現を亢進させ、これらの因子が直接的な血管内皮細胞の増殖を促進すると考えられている。

【0009】

現在、腫瘍組織における異常型血管新生を阻害し、腫瘍組織への栄養供給経路の遮断を目的とした薬の開発が多く試みられている。実際に臨床の場で用いられている薬も存在し、例えばジェネンテック社により開発されたヒト型VEGFモノクローナル抗体（アバチン（登録商標））は、大腸癌及び非小細胞肺癌に対する有効性が認められている。しかしながら、未だ強力な抗腫瘍薬は開発されていない。これらの薬の多くはVEGFやPDGFを標的としたものであるが、より上流で機能するFGF2を標的とすることで、異常血管新生の初期段階をブロックすることが期待される。

10

【0010】

また、異常血管新生は腫瘍のほか、歯周病、強皮症、新生血管性緑内障、関節炎等の慢性炎症、乾癬、加齢性黄斑変性症などの疾患にも関与している。

【0011】

一方、FGF2の強い血管新生作用を、閉塞性血管障害に対する治療や創傷治癒に用いる試みがなされている。実際に、科研製薬株式会社によるヒトFGF2製剤（フィブロラスプレー（登録商標））は、創傷治癒の促進薬として既に認可、販売されている。

【0012】

ところで、近年、RNAアプタマーの治療薬、診断薬、試薬への応用が注目されており、いくつかのRNAアプタマーが臨床段階あるいは実用化段階に入っている。2004年12月には、世界初のRNAアプタマー医薬であるMacugenが加齢性黄斑変性症の治療薬として米国で承認された。RNAアプタマーとはタンパク質などの標的物質に特異的に結合するRNAのことで、SELEX法（Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment）を用いて作製することができる（特許文献1～3参照）。SELEX法とは、 $10^{14}$ 個程度の異なるヌクレオチド配列を持つRNAのプールから、標的物質に特異的に結合するRNAを選別してくる方法である。使用されるRNAは40残基程度のランダム配列をプライマー配列で挟み込んだ構造をしている。このRNAプールを標的物質と会合させて、フィルターなどを用いて標的物質に結合したRNAのみを回収する。回収したRNAはRT-PCRで増幅し、これを次のラウンドの鑄型として用いる。この作業を10回程度繰り返すことにより、標的物質と特異的に結合するRNAアプタマーを取得することができる場合がある。

20

30

【0013】

特許文献2には、SELEX法により得られたbFGF（FGF2）に対する核酸リガンド（この項において、「アプタマー」を含む）が記載されている。また特許文献4には、腫瘍転移または血管新生の阻害を目的として、HGFに対する核酸リガンドがbFGFを阻害する核酸リガンドと共に使用できることが記載されており、bFGFを阻害する核酸リガンドとしては、特許文献5および6に記載の核酸リガンドが挙げられている。しかしながら、これらの文献に記載のアプタマーは、本明細書中に具体的に示されるアプタマーとは配列が異なる。またこれらの文献には、本明細書中に具体的に示されるアプタマーについて、記載も示唆もない。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】国際公開W091/19813号パンフレット

【特許文献2】国際公開W094/08050号パンフレット

【特許文献3】国際公開W095/07364号パンフレット

【特許文献4】国際公開W001/009159号パンフレット

【特許文献5】米国特許5,639,868号

【特許文献6】米国特許6,759,392号

50

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0015】

本発明は、FGF2に対するアプタマー及びその利用方法などを提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0016】

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討した結果、FGF2に対する良質なアプタマーを作製することに成功し、もって本発明を完成するに至った。

## 【0017】

即ち、本発明は、以下の発明などを提供するものである。

[1] FGF2に結合するアプタマー。

[2] FGF2とFGF2受容体との結合を阻害する、[1]記載のアプタマー。

[3] FGF2とFGF2受容体との結合は阻害するが、FGF1と受容体との結合は阻害しない、[2]記載のアプタマー。

[4] 下記式：

AGUACUACUNGUUACCC (式中、Aはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Uはウラシルをそれぞれ示し、Nは、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルからそれぞれ選択される6または7個の連続したヌクレオチドからなる配列を示す)で表される配列を含んでいる、FGF2とFGF2受容体との結合を阻害するアプタマー。

[5] ピリミジンヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、かつFGF2とFGF2受容体との結合を阻害する、[4]記載のアプタマー。

[6] 下記式：

GAGGGUGACGGUN'GCGUUUU (式中、Aはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Uはウラシルをそれぞれ示し、N'は、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルからそれぞれ選択される7または10個の連続したヌクレオチドからなる配列を示す)で表される配列を含んでいる、FGF2とFGF2受容体との結合を阻害するアプタマー。

[7] ピリミジンヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、かつFGF2とFGF2受容体との結合を阻害する、[6]記載のアプタマー。

[8] 下記式：

UAGGGCN''CAGU (式中、Aはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Uはウラシルをそれぞれ示し、N''は、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルからそれぞれ選択される10~18個の連続したヌクレオチドからなる配列を示す)で表される配列を含んでいる、FGF2とFGF2受容体との結合を阻害するアプタマー。

[9] ピリミジンヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、かつFGF2とFGF2受容体との結合を阻害する、[8]記載のアプタマー。

[10] 配列番号42で表される配列を含んでいる、FGF2とFGF2受容体との結合を阻害するアプタマー。

[11] ピリミジンヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、かつFGF2とFGF2受容体との結合を阻害する、[10]記載のアプタマー。

[12] 配列番号36または38の配列を含んでいる、FGF2とFGF2受容体との結合を阻害するアプタマー。

[13] ピリミジンヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、かつFGF2とFGF2受容体との結合を阻害する、[12]記載のアプタマー。

[14] 以下(a)又は(b)のいずれかである、[1]記載のアプタマー：

(a) 配列番号1~38および42~57のいずれかから選択されるヌクレオチド配列(但し、ウラシルはチミンであってもよい)を含むアプタマーであって、該アプタマーに含

10

20

30

40

50

まれるヌクレオチドにおいて、

( i ) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの 2' 位が、同一又は異なって、フッ素原子であるか、あるいは水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群より選ばれる原子又は基で置換されており、

( i i ) 各プリンヌクレオチドのリボースの 2' 位が、同一又は異なって、ヒドロキシ基であるか、あるいは水素原子、メトキシ基及びフッ素原子からなる群より選ばれる原子又は基で置換されている、アダマー；

( b ) 配列番号 1 ~ 38 および 42 ~ 57 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであってもよい）において、1 又は数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を含むアダマーであって、該アダマーに  
10

( i ) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの 2' 位が、同一又は異なって、フッ素原子であるか、あるいは水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群より選ばれる原子又は基で置換されており、

( i i ) 各プリンヌクレオチドのリボースの 2' 位が、同一又は異なって、ヒドロキシ基であるか、あるいは水素原子、メトキシ基及びフッ素原子からなる群より選ばれる原子又は基で置換されている、アダマー。

[ 15 ] ヌクレオチドが修飾されている、[ 1 ] ~ [ 14 ] のいずれかーに記載のアダマー。

[ 16 ] [ 1 ] ~ [ 15 ] のいずれかーに記載のアダマー及び機能性物質を含む複合体  
20

[ 17 ] 機能性物質が、親和性物質、標識用物質、酵素、薬物送達媒体又は薬物である、[ 16 ] に記載の複合体。

[ 18 ] [ 1 ] ~ [ 15 ] のいずれかーに記載のアダマーあるいは [ 16 ] 又は [ 17 ] に記載の複合体を含む、医薬。

[ 19 ] [ 1 ] ~ [ 15 ] のいずれかーに記載のアダマーあるいは [ 16 ] 又は [ 17 ] に記載の複合体を含む、癌、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、あるいは心臓の形成異常、血管の形成異常または骨格の形成異常の治療用または予防用の医薬。

[ 20 ] [ 1 ] ~ [ 15 ] のいずれかーに記載のアダマーあるいは [ 16 ] 又は [ 17 ] に記載の複合体を含む、診断薬。  
30

[ 21 ] [ 1 ] ~ [ 15 ] のいずれかーに記載のアダマーあるいは [ 16 ] 又は [ 17 ] に記載の複合体を用いることを特徴とする、FGF2 の検出方法。

【発明の効果】

【0018】

本発明のアダマーまたは複合体は、癌、歯周病、強皮症、新生血管性緑内障、関節炎等の慢性炎症、乾癬、加齢性黄斑変性症などの疾患用治療薬または予防薬、あるいは診断薬、試薬として有用であり得る。本発明のアダマーまたは複合体はまた、FGF2 の精製及び濃縮、FGF2 の標識、並びに FGF2 の検出及び定量に有用であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】配列番号 1 ~ 5 で表されるアダマーの MFOLD プログラムにより予想される二次構造をそれぞれ示す図である。共通配列を黒丸で示す。

【図2】配列番号 7 および 8 で表されるアダマーの MFOLD プログラムにより予想される二次構造をそれぞれ示す図である。共通配列を黒丸で示す。

【図3】配列番号 10 ~ 13 で表されるアダマーの MFOLD プログラムにより予想される二次構造をそれぞれ示す図である。共通配列を黒丸で示す。

【図4】配列番号 9 で表されるアダマー ( Apt 9 ) がヒト FGF2 に結合することを示すセンサーグラムである。

【図5】配列番号 9 で表されるアダマー ( Apt 9 ) がヒト FGF1 に結合しないことを示すセンサーグラムである。  
50

【図6】配列番号9で表されるアプタマー(Apt9)がヒトFGF2とヒトFGF2受容体の結合を阻害することを示すセンサーグラムである。

【図7】配列番号1、6、7、9~11で表されるアプタマーがヒトFGF2の生理活性を阻害することを示す、ウエスタンブロットングの結果である。

【図8】配列番号36と38で表される短小化アプタマーのMFOLDプログラムによる二次構造予測である。

【図9】配列番号36と38で表されるアプタマーがヒトFGF2の生理活性を阻害することを示す、ウエスタンブロットングの結果である。

【図10】配列番号36および43~46で表されるアプタマーのMFOLDプログラムにより予想される二次構造を示す図である。共通配列を黒丸で示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

アプタマーとは、所定の標的分子に対する結合活性を有する核酸分子をいう。アプタマーは、所定の標的分子に対して結合することにより、所定の標的分子の活性を阻害し得る。本発明のアプタマーは、RNA、DNA、修飾核酸又はそれらの混合物であり得る。また本発明のアプタマーは、直鎖状又は環状の形態であり得る。

【0021】

本発明は、FGF2に対して結合活性を有するアプタマーを提供する。本発明のアプタマーは、FGF2の活性を阻害し得る。すなわち、本発明のアプタマーは、FGF2に対する阻害活性を有する。

【0022】

FGF2に対する阻害活性とは、FGF2が保有する任意の活性に対する阻害能を意味する。例えば、FGF2はFGF受容体発現細胞に作用して、シグナル伝達を活性化し、各種細胞増殖因子やその受容体の産生を誘導する。従って、FGF2に対する阻害活性とは、FGF受容体を介した細胞内シグナル伝達を阻害する活性のことでありうる。また、これら各種細胞増殖因子やその受容体の発現は、結果的に細胞の増殖活性や遊走活性の亢進を導くので、FGF2の阻害活性とはそれらの活性の阻害を意味する。

【0023】

FGF2とは、発生初期や分化、増殖、再生時に強く発現するタンパク質であり、例えば、Accession code EAX05222やNP001997で表されるアミノ酸配列を持つタンパク質である。FGF2は、bFGF(basic FGF)、FGFBまたはHBGF-2と呼ばれることもある。本発明におけるFGF2は、動物体内で作られる他、マウスなどの哺乳細胞、昆虫細胞、大腸菌などの培養細胞を用いても作製することができ、更に、化学合成によっても作ることができる。培養細胞や化学合成によって作製する場合は、自体公知の方法で容易に変異体を作製することができる。ここでFGF2の「変異体」とは、公知のFGF2のアミノ酸配列からアミノ酸が1~数个置換、欠失、付加等されたものや、公知のFGF2のアミノ酸配列の一部分のアミノ酸配列からなるものであって、本来FGF2が有している活性の少なくとも一つ以上の活性を有しているタンパク質またはペプチドを意味する。アミノ酸が置換、付加される場合、当該アミノ酸は天然のアミノ酸であってもよいし、非天然のアミノ酸であってもよい。本発明におけるFGF2はこれらの変異体を含む。

【0024】

FGF2受容体とは、FGF2が結合する細胞表面タンパク質を意味する。FGF2受容体としては、FGFR1b、FGFR1c、FGFR2c、FGFR3cおよびFGFR4が知られている。本発明におけるFGF2受容体とは、天然のアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよいし、その変異体であってもよい。ここでFGF2受容体の「変異体」とは、アミノ酸が1~数个置換、欠失、付加等されたものや、公知のFGF2のアミノ酸配列の一部分のアミノ酸配列からなるものであって、FGF2に対して結合活性を有するタンパク質またはペプチドを意味する。本発明は、FGF2とFGF2受容体との結合を阻害するアプタマーを提供する。

10

20

30

40

50

## 【0025】

本発明のアプタマーは、任意の哺乳動物に由来するFGF2に対する阻害活性を有し得る。このような哺乳動物としては、例えば、霊長類（例、ヒト、サル）、げっ歯類（例、マウス、ラット、モルモット）、並びにペット、家畜及び使役動物（例、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ）が挙げられる。

## 【0026】

本発明のアプタマーは、FGF2の任意の部分に結合し、その活性を阻害し得るものである限り特に限定されないが、下記式：

AGUACUACUNGUUACC（式中、Aはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Uはウラシルをそれぞれ示し、Nは、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルからそれぞれ選択される6または7個の連続したヌクレオチドからなる配列を示す）

10

で表される共通配列（以下、「共通配列1」と記載する場合がある）を含んでいる、FGF2とFGF2受容体との結合を阻害するアプタマーであることが好ましい。この配列は、後述する配列番号1、2、3、4および5で表されるヌクレオチド配列の共通配列であって、MFOLDプログラムを用いて予測される二次構造が同じ形状であるものを含む（図1参照）。

## 【0027】

本発明のアプタマーは、FGF2の任意の部分に結合し、その活性を阻害し得るものである限り特に限定されないが、下記式：

20

GAGGGUGACGGUN'GCGUGUUU（式中、Aはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Uはウラシルをそれぞれ示し、N'は、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルからそれぞれ選択される7または10個の連続したヌクレオチドからなる配列を示す）

で表される共通配列（以下、「共通配列2」と記載する場合がある）を含んでいる、FGF2とFGF2受容体との結合を阻害するアプタマーであることが好ましい。この配列は、後述する配列番号7および8で表されるヌクレオチド配列の共通配列であって、MFOLDプログラムを用いて予測される二次構造が同じ形状であるものを含む（図2参照）。

## 【0028】

本発明のアプタマーは、FGF2の任意の部分に結合し、その活性を阻害し得るものである限り特に限定されないが、下記式：

30

UAGGGCN''CAGU（式中、Aはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Uはウラシルをそれぞれ示し、N''は、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルからそれぞれ選択される10～18個の連続したヌクレオチドからなる配列を示す）

で表される共通配列（以下、「共通配列3」と記載する場合がある）を含んでいる、FGF2とFGF2受容体との結合を阻害するアプタマーであることが好ましい。この配列は、後述する配列番号10、11、12および13で表されるヌクレオチド配列の共通配列であって、MFOLDプログラムを用いて予測される二次構造が同じ形状であるものである（図3参照）。

## 【0029】

40

本発明のアプタマーは、FGF2の任意の部分に結合し、その活性を阻害し得るものである限り特に限定されないが、gggc(F)u(F)u(F)gu(F)u(F)c(F)u(F)ggau(F)c(F)gc(F)u(F)gau(F)aaagc(F)aggagggu(F)gac(F)gggu(F)gau(F)ggc(F)agc(F)u(F)gu(F)u(F)u(F)gggggc(F)gau(F)gc(F)u(F)c(F)agaaagc(F)ggag(配列番号7)の配列を含んでいる、FGF2とFGF2受容体との結合を阻害するアプタマーであることが好ましい（図7参照）。

## 【0030】

また本発明のアプタマーは、FGF2の任意の部分に結合し、その活性を阻害し得るものである限り特に限定されないが、gggc(F)u(F)u(F)gu(F)u(F)

50

c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c ( F ) g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) a a g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g u ( F ) g u ( F ) a g c ( F ) u ( F ) a g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g g c ( F ) g u ( F ) g u ( F ) g u ( F ) u ( F ) g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g ( 配列番号 9 ) ; g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) g u ( F ) u ( F ) g a c ( F ) u ( F ) a g g g c ( F ) g u ( F ) a c ( F ) a u ( F ) c ( F ) g u ( F ) g a c ( F ) c ( F ) a g u ( F ) g u ( F ) c ( F ) a g u ( F ) u ( F ) c ( F ) a g g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g ( 配列番号 10 ) ; または g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c ( F ) g c ( F ) a u ( F ) c ( F ) a g u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g g c ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) u ( F ) a g g a g u ( F ) g a c ( F ) c ( F ) a g u ( F ) g u ( F ) g u ( F ) u ( F ) g u ( F ) a a g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g ( 配列番号 11 ) の配列を含んでいる、F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害するアプタマーであることが好ましい ( 図 7 参照 ) 。

10

## 【 0 0 3 1 】

本発明のアプタマーは、F G F 2 の任意の部分に結合し、その活性を阻害し得るものである限り特に限定されないが、g g g g c ( F ) a a g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g u ( F ) g u ( F ) a g c ( F ) u ( F ) a g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g g c ( F ) g u ( F ) g u ( F ) c ( F ) c ( F ) c ( F ) ( 配列番号 36 ) の配列を含んでいる、F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害するアプタマーであることが好ましい ( 図 9 参照 ) 。

20

## 【 0 0 3 2 】

本発明のアプタマーは、F G F 2 の任意の部分に結合し、その活性を阻害し得るものである限り特に限定されないが、g g g u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g g c ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) u ( F ) a g g a g u ( F ) g a c ( F ) c ( F ) a g u ( F ) g u ( F ) g c ( F ) c ( F ) c ( F ) ( 配列番号 38 ) の配列を含んでいる、F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害し、細胞に対しても F G F 2 シグナリングの阻害活性を有しているアプタマーであることが好ましい ( 図 9 参照 ) 。

30

## 【 0 0 3 3 】

本発明のアプタマーは、F G F 2 の任意の部分に結合し、その活性を阻害し得るものである限り特に限定されないが、g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g u ( F ) g u ( F ) n n n n n n n n n n n a g g g c ( F ) ( 配列番号 42 ) の配列を含んでいる、F G F 2 と F G F 2 受容体との結合を阻害し、細胞に対しても F G F 2 シグナリングの阻害活性を有しているアプタマーであることが好ましい。この配列は、後述する配列番号 43 ~ 46 で表されるヌクレオチド配列の共通配列 ( 以下、「共通配列 4」と記載する場合がある ) であって、M F O L D プログラムを用いて予測される二次構造が同じ形状であるものである ( 図 10 参照 ) 。

40

## 【 0 0 3 4 】

これらの配列は、前述した特許文献 2、特許文献 5 および特許文献 6 に記載の核酸リガンドとは配列が異なる。

## 【 0 0 3 5 】

本発明のアプタマーの長さは特に限定されず、通常、約 10 ~ 約 200 ヌクレオチドであり得るが、例えば約 100 ヌクレオチド以下であり、好ましくは約 50 ヌクレオチド以下であり、より好ましくは約 40 ヌクレオチド以下であり、最も好ましくは約 35 ヌクレオチド以下であり得る。総ヌクレオチド数が少なければ、化学合成及び大量生産がより容易であり、かつコスト面でのメリットも大きい。また、化学修飾も容易であり、生体内安定性も高く、毒性も低いと考えられる。

## 【 0 0 3 6 】

50

本発明のアプタマーに含まれる各ヌクレオチドはそれぞれ、同一又は異なって、リボース（例、ピリミジンヌクレオチドのリボース、プリンヌクレオチドのリボース）の2'位においてヒドロキシ基を含むヌクレオチド（即ち、無置換であるヌクレオチド）であるか、あるいはリボースの2'位において、ヒドロキシ基が、任意の原子又は基で置換（修飾）されているヌクレオチド（本発明において、「置換ヌクレオチド」または「修飾ヌクレオチド」と記載する場合がある）であり得る。

【0037】

このような任意の原子又は基としては、例えば、水素原子、フッ素原子又は-O-アルキル基（例、-O-Me基）、-O-アシル基（例、-O-CHO基）、アミノ基（例、-NH<sub>2</sub>基）で置換されているヌクレオチドが挙げられる。本発明のアプタマーはまた、少なくとも1種（例、1、2、3又は4種）のヌクレオチドが、リボースの2'位において、ヒドロキシ基、又は上述した任意の原子又は基、例えば、水素原子、フッ素原子、ヒドロキシ基及び-O-Me基からなる群より選ばれる少なくとも2種（例、2、3又は4種）の基を含む修飾ヌクレオチドであり得る。

10

【0038】

本発明のアプタマーにおいてはまた、全てのピリミジンヌクレオチドが、リボースの2'位において、同一または異なって、フッ素原子で置換されるヌクレオチドであるか、又は上述した任意の原子又は基、好ましくは、水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群より選ばれる原子または基で置換されているヌクレオチドであり得る。

20

【0039】

本発明のアプタマーにおいてはまた、全てのプリンヌクレオチドが、リボースの2'位において、同一または異なって、ヒドロキシ基で置換されるヌクレオチドであるか、又は上述した任意の原子又は基、好ましくは、水素原子、メトキシ基及びフッ素原子からなる群より選ばれる原子または基で置換されるヌクレオチドであり得る。

【0040】

本発明のアプタマーにおいてはまた、全てのヌクレオチドが、リボースの2'位において、ヒドロキシ基、又は上述した任意の原子又は基、例えば、水素原子、フッ素原子、ヒドロキシ基及び-O-Me基からなる群より選ばれる同一の原子または基で置換されるヌクレオチドであり得る。

30

【0041】

本発明のアプタマーはまた、FGF2の活性を阻害し得るが、FGF1の活性を阻害し得ないという特徴を有し得る。また本発明のアプタマーは、FGF2とFGF2受容体との結合は阻害するが、FGF1とFGF1受容体との結合は阻害しないという特徴を有し得る。FGF1はFGFファミリータンパク質であり、最もFGF2に類似している。

【0042】

本発明のアプタマーはまた、(a)共通配列1~4のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであってもよい）を含むアプタマー；(b)共通配列1~4のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであってもよい）において1又は数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を含むアプタマー；(c)上記(a)の複数の連結物、上記(b)の複数の連結物、上記(a)及び(b)の複数の連結物からなる群より選ばれる連結物；であり得る。

40

【0043】

上記(b)において、置換、欠失、挿入又は付加されるヌクレオチド数は、置換、欠失、挿入又は付加後も依然としてFGF2に結合する限り特に限定されないが、例えば約30個以下、好ましくは約20個以下、より好ましくは約10個以下、さらにより好ましくは5個以下、最も好ましくは4個、3個、2個又は1個であり得る。上記(c)において連結はタンデム結合にて行われ得る。また、連結に際し、リンカーを利用してよい。リンカーとしては、ヌクレオチド鎖（例、1~約20ヌクレオチド）、非ヌクレオチド鎖（例、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-リンカー、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-リンカー、ヘキサエチレングリコールリンカー、TEGリンカー、ペプチドを含むリンカー、-S-S-結合を含むリ

50

ンカー、-CONH-結合を含むリンカー、-OPO<sub>3</sub>-結合を含むリンカー)が挙げられる。上記複数の連結物における複数とは、2以上であれば特に限定されないが、例えば2個、3個又は4個であり得る。

【0044】

上記(a)~(c)に含まれる各ヌクレオチドはそれぞれ、同一又は異なって、リボース(例、ピリミジンヌクレオチドのリボース)の2'位においてヒドロキシ基を含むヌクレオチドであるか、あるいはリボースの2'位において、ヒドロキシ基が、任意の原子または基(例、水素原子、フッ素原子又は-O-Me基)で置換されているヌクレオチドであり得る。

例えば、上記(a)~(c)に含まれる各ヌクレオチドにおいて、

(i)各ピリミジンヌクレオチドが、リボースの2'位において、同一または異なって、フッ素原子で置換されるヌクレオチドであるか、又は上述した任意の原子又は基、好ましくは、水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群より選ばれる原子または基で置換されており；

(ii)各プリンヌクレオチドが、リボースの2'位において、同一または異なって、ヒドロキシ基で置換されるヌクレオチドであるか、又は上述した任意の原子又は基、好ましくは、水素原子、メトキシ基及びフッ素原子からなる群より選ばれる原子または基で置換されている；

アダプターであってもよい。本発明は、上記アダプターも提供する。

【0045】

本発明のアダプターはまた、

(a')配列番号1~38および42~57のいずれかから選択されるヌクレオチド配列(但し、ウラシルはチミンであってもよい)を含むアダプター；

(b')配列番号1~38および42~57のいずれかから選択されるヌクレオチド配列(但し、ウラシルはチミンであってもよい)において1又は数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を含むアダプター；

(c')上記(a')の複数の連結物、上記(b')の複数の連結物、上記(a')及び(b')の複数の連結物からなる群より選ばれる連結物；

であり得る。

【0046】

上記(a')~(c')のうち、好ましいものは、配列番号1~38および42~57のいずれかから選択されるヌクレオチド配列が、配列番号36または38の配列である、(a')~(c')である。

【0047】

上記(b')において、置換、欠失、挿入又は付加されるヌクレオチド数は、置換、欠失、挿入又は付加後も依然としてFGF<sub>2</sub>に結合する限り特に限定されないが、例えば約30個以下、好ましくは約20個以下、より好ましくは約10個以下、さらにより好ましくは5個以下、最も好ましくは4個、3個、2個又は1個であり得る。上記(c')において連結はタンデム結合にて行われ得る。また、連結に際し、リンカーを利用してよい。リンカーとしては、ヌクレオチド鎖(例、1~約20ヌクレオチド)、非ヌクレオチド鎖(例、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-リンカー、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-リンカー、ヘキサエチレングリコールリンカー、TEGリンカー、ペプチドを含むリンカー、-S-S-結合を含むリンカー、-CONH-結合を含むリンカー、-OPO<sub>3</sub>-結合を含むリンカー)が挙げられる。上記複数の連結物における複数とは、2以上であれば特に限定されないが、例えば2個、3個又は4個であり得る。

【0048】

上記(a')~(c')に含まれる各ヌクレオチドはそれぞれ、同一又は異なって、リボース(例、ピリミジンヌクレオチドのリボース)の2'位においてヒドロキシ基を含むヌクレオチドであるか、あるいはリボースの2'位において、ヒドロキシ基が、任意の原子または基(例、水素原子、フッ素原子又は-O-Me基)で置換されているヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドであり得る。

例えば、上記 (a') ~ (c') に含まれる各ヌクレオチドにおいて、

(i') 各ピリミジンヌクレオチドが、リボースの 2' 位において、同一または異なって、フッ素原子で置換されるヌクレオチドであるか、又は上述した任意の原子又は基、好ましくは、水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群より選ばれる原子または基で置換されており；

(ii') 各プリンヌクレオチドが、リボースの 2' 位において、同一または異なって、ヒドロキシ基で置換されるヌクレオチドであるか、又は上述した任意の原子又は基、好ましくは、水素原子、メトキシ基及びフッ素原子からなる群より選ばれる原子または基で置換されている；アプタマーであってもよい。本発明は、上記アプタマーも提供する。

10

#### 【0049】

本発明のアプタマーは、FGF2 に対する結合性、安定性、薬物送達性等を高めるため、各ヌクレオチドの糖残基 (例、リボース) が修飾されたものであってもよい。糖残基において修飾される部位としては、例えば、糖残基の 2' 位、3' 位及び / 又は 4' 位の酸素原子を他の原子に置き換えたものなどが挙げられる。修飾の種類としては、例えば、フルオロ化、O-アルキル化 (例、O-メチル化、O-エチル化)、O-アリル化、S-アルキル化 (例、S-メチル化、S-エチル化)、S-アリル化、アミノ化 (例、-NH<sub>2</sub>) が挙げられる。このような糖残基の改変は、自体公知の方法により行うことができる (例えば、Sproat et al., (1991), Nucl. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991), Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973), Biochemistry 12, 5138-5145 参照)。

20

#### 【0050】

本発明のアプタマーはまた、FGF2 に対する結合性等を高めるため、核酸塩基 (例、プリン、ピリミジン) が改変 (例、化学的置換) されたものであってもよい。このような改変としては、例えば、5 位ピリミジン改変、6 および / または 8 位プリン改変、環外アミンでの改変、4-チオウリジンでの置換、5-プロモ又は 5-ヨード-ウラシルでの置換が挙げられる。また、ヌクレアーゼ及び加水分解に対して耐性であるように、本発明のアプタマーに含まれるリン酸基が改変されていてもよい。例えば、P(O)O 基が、P(O)S (チオエート)、P(S)S (ジチオエート)、P(O)NR<sub>2</sub> (アミデート)、P(O)R、R(O)OR'、CO 又は CH<sub>2</sub> (ホルムアセタール) 又は 3'-アミン (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) で置換されていてもよい [ここで各々の R 又は R' は独立して、H であるか、あるいは置換されているか、又は置換されていないアルキル (例、メチル、エチル) である]。

30

連結基としては、-O-、-N- 又は -S- が例示され、これらの連結基を通じて隣接するヌクレオチドに結合し得る。

改変はまた、キャッピングのような 3' 及び 5' の改変を含んでもよい。

#### 【0051】

改変はさらに、ポリエチレングリコール、アミノ酸、ペプチド、inverted d T、核酸、ヌクレオシド、Myristoyl、Lithocolic-oleyl、Docosanyl、Lauroyl、Stearoyl、Palmitoyl、Oleoyl、Linoleoyl、その他脂質、ステロイド、コレステロール、カフェイン、ビタミン、色素、蛍光物質、抗癌剤、毒素、酵素、放射性物質、ビオチンなどを末端に付加することにより行われ得る。このような改変については、例えば、米国特許第 5,660,985 号、同第 5,756,703 号を参照のこと。

40

#### 【0052】

本発明のアプタマーは、本明細書中の開示及び当該技術分野における自体公知の方法により化学合成することができる。アプタマーは、リン酸基の負電荷を利用したイオン結合、リボースを利用した疎水結合および水素結合、核酸塩基を利用した水素結合やスタッキング結合など多様な結合様式により標的物質と結合する。特に、構成ヌクレオチドの数だ

50

け存在するリン酸基の負電荷を利用したイオン結合は強く、タンパク質の表面に存在するリジンやアルギニンの正電荷と結合する。このため、標的物質との直接的な結合に関わっていない核酸塩基は置換することができる。特に、ステム構造の部分は既に塩基対が作られており、また、二重らせん構造の内側を向いているので、核酸塩基は、標的物質と直接結合し難い。従って、塩基対を他の塩基対に置換してもアプタマーの活性は減少しない場合が多い。ループ構造など塩基対を作っていない構造においても、核酸塩基が標的分子との直接的な結合に関与していない場合に、塩基の置換が可能である。リボースの2'位の修飾に関しては、まれにリボースの2'位の官能基が標的分子と直接的に相互作用していることがあるが、多くの場合無関係であり、他の修飾分子に置換可能である。このようにアプタマーは、標的分子との直接的な結合に関与している官能基を置換または削除しない限り、その活性を保持していることが多い。また、全体の立体構造が大きく変わらないことも重要である。

10

20

30

40

50

#### 【0053】

アプタマーは、SELEX法及びその改良法（例えば、Ellington et al., (1990), Nature, 346, 818-822; Tuerk et al., (1990), Science, 249, 505-510)を利用することで作製することができる。SELEX法ではラウンド数を増やしたり、競合物質を使用したりすることで、標的物質に対してより結合力の強いアプタマーが濃縮され、選別されてくる。よって、SELEXのラウンド数を調節したり、及び/又は競合状態を変化させたりすることで、結合力が異なるアプタマー、結合形態が異なるアプタマー、結合力や結合形態は同じであるが塩基配列が異なるアプタマーを得ることができる場合がある。また、SELEX法にはPCRによる増幅過程が含まれるが、その過程でマンガンイオンを使用するなどして変異を入れることで、より多様性に富んだSELEXを行うことが可能となる。

#### 【0054】

SELEXで得られるアプタマーは標的物質に対して親和性が高い核酸であり、そのことは標的物質の活性部位に結合することを意味しない。従って、SELEXで得られるアプタマーは必ずしも標的物質の機能に作用するとは限らない。FGF2は塩基性タンパク質であり、核酸が非特異的に結合しやすいと考えられる。活性部位に結合しないアプタマーはその標的物質の活性に影響を及ぼさない。実際、コントロールで用いたRNAはFGF2とFGF2受容体の結合を阻害しなかった。

#### 【0055】

このようにして選ばれた活性のあるアプタマーは、最適化SELEXを行うことで、更に高性能化することが可能である。最適化SELEXとは、ある配列が決まっているアプタマーの一部をランダム配列にしたテンプレートや10~30%程度のランダム配列をドープしたテンプレートを作製して、再度SELEXを行うものである。

#### 【0056】

SELEXで得られるアプタマーは80ヌクレオチド程度の長さがあり、これをそのまま医薬にすることは難しい。そこで、試行錯誤を繰り返し、容易に化学合成ができる50ヌクレオチド程度以下の長さまで短くする必要がある。

SELEXで得られるアプタマーはそのプライマー設計に依存して、その後の最小化作業のしやすさが変わる。うまくプライマーを設計しないと、SELEXによって活性のあるアプタマーが選別できたとしても、その後の開発が不可能となる。本発明では41ヌクレオチド（配列番号36）や35ヌクレオチド（配列番号38）でも活性を保持しているアプタマーを得ることができ、これらの配列がFGF2と結合するために特に重要であることがわかった。

#### 【0057】

アプタマーは化学合成が可能であるので改変が容易である。アプタマーはMFOLDプログラムを用いて二次構造を予測したり、X線解析やNMR解析によって立体構造を予測したりすることで、どのヌクレオチドを置換または欠損することが可能か、また、どこに新たなヌクレオチドを挿入可能かある程度予測することができる。予測された新しい配列

のアプタマーは容易に化学合成することができ、そのアプタマーが活性を保持しているかどうかを既存のアッセイ系により確認することができる。

【0058】

得られたアプタマーの標的物質との結合に重要な部分が、上記のような試行錯誤を繰り返すことにより特定できた場合、その配列の両端に新しい配列を付加しても、多くの場合活性は変化しない。そして、新しい配列の長さは特に限定されるものではない。

【0059】

さらに、既に述べたように、修飾に関しても配列と同様に高度に設計又は改変可能である。

【0060】

以上のように、アプタマーは高度に設計又は改変可能である。本発明はまた、所定の配列（例、ステム部分、インターナルループ部分、ヘアピンループ部分及び一本鎖部分から選ばれる部分に対応する配列：以下、必要に応じて固定配列と省略する）を含むアプタマーを高度に設計又は改変可能である、アプタマーの製造方法を提供する。

【0061】

例えば、このようなアプタマーの製造方法は、下記：

【0062】

【化1】

プライマー用配列(i) — (N)<sub>a</sub> — 固定配列 — (N)<sub>b</sub> — プライマー用配列(ii)

【0063】

〔上記において、(N)<sub>a</sub>はa個のNからなるヌクレオチド鎖を示し、(N)<sub>b</sub>は、b個のNからなるヌクレオチド鎖を示し、Nはそれぞれ、同一又は異なって、A、G、C、U及びT（好ましくは、A、G、C及びU）からなる群より選ばれるヌクレオチドである。a、bはそれぞれ、同一又は異なって、任意の数であり得るが、例えば1～約100、好ましくは1～約50、より好ましくは1～約30、さらにより好ましくは1～約20又は1～約10であり得る〕で表されるヌクレオチド配列からなる単一種の核酸分子又は複数種の核酸分子（例、a、bの数等が異なる核酸分子のライブラリ）、及びプライマー用配列(i)、(ii)にそれぞれ対応するプライマー対を用いて、固定配列を含むアプタマーを製造することを含む。

【0064】

本発明はまた、本発明のアプタマー及びそれに結合した機能性物質を含む複合体を提供する。本発明の複合体におけるアプタマーと機能性物質との間の結合は、共有結合、又は非共有結合であり得る。本発明の複合体は、本発明のアプタマーと1以上（例、2又は3個）の同種又は異種の機能性物質とが結合したものであり得る。機能性物質は、本発明のアプタマーに何らかの機能を新たに付加するもの、あるいは本発明のアプタマーが保持し得る何らかの特性を変化（例、向上）させ得るものである限り特に限定されない。機能性物質としては、例えば、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、糖質、単糖、ポリヌクレオチド、ヌクレオチドが挙げられる。機能性物質としてはまた、例えば、親和性物質（例、ビオチン、ストレプトアビジン、標的相補配列に対して親和性を有するポリヌクレオチド、抗体、グルタチオンセファロース、ヒスチジン）、標識用物質（例、蛍光物質、発光物質、放射性同位体）、酵素（例、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ）、薬物送達媒体（例、リポソーム、マイクロスフェア、ペプチド、ポリエチレングリコール類）、薬物（例、カリケアマイシンやデュオカルマイシンなどミサイル療法に使用されているもの、シクロフォスファミド、メルファラン、イホスファミドまたはトロホスファミドなどのナイトロジェンマスタード類似体、チオテバなどのエチレンイミン類、カルムスチンなどのニトロソ尿素、テモゾロミドまたはダカルバジンなどのリースト剤、メトトレキセートまたはラルチトレキセドなどの葉酸類似代謝拮抗剤、チオグアニン、クラドリピンまたはフルダラビンなどのプリン類似体、フルオロウラシル、テガフルまたはゲムシタピンなどのピリミジン類似体、ピンブラスチン、ピンクリスチンまたはピンオレ

10

20

30

40

50

ルビンなどのピンカルカロイド及びその類似体、エトポシド、タキサン、ドセタキセルまたはパクリタキセルなどのポドフィロトキシン誘導体、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン及びミトキサントロンなどのアントラサイクリン類及び類似体、プレオマイシン及びミトマイシンなどの他の細胞毒性抗生物質、シスプラチン、カルボプラチン及びオキサリプラチンなどの白金化合物、ペントスタチン、ミルテフォシン、エストラムスチン、トポテカン、イリノテカン及びピカルタミド)、毒素(例、リシン毒素、リア毒素及びペロ毒素)が挙げられる。これらの機能性分子は最終的に取り除かれる場合がある。更に、トロンピンやマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)、Factor Xなどの酵素が認識して切断することができるペプチド、ヌクレアーゼや制限酵素が切断できるポリヌクレオチドであってもよい。

10

## 【0065】

本発明のアプタマーまたは複合体は、例えば、医薬又は診断薬、検査薬、試薬として使用され得る。特に、癌、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、あるいは心臓の形成異常、血管の形成異常、骨格の形成異常といった疾患の治療用または予防用の医薬、あるいは診断薬、検査薬、試薬として有用である。

## 【0066】

上記医薬の対象疾患としては、食道癌、甲状腺癌、膀胱癌、大腸癌、胃癌、膵臓癌、胸部癌、肝臓癌、肺癌、非小細胞肺癌、乳癌、神経芽細胞腫、ニューログラストーマ、グリオブラストーマ、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌、ウィルムス腫瘍、前立腺癌、歯周病、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス(SLE)、強皮症、シェーグレン症候群、多発性筋炎(PM)、皮膚筋炎(DM)、リウマチ性関節炎(慢性関節リウマチ(RA)、変形性関節症(OA))、炎症性腸炎(クローン病など)、進行性全身性硬化症(PSS)、結節性動脈周囲炎(PN)、甲状腺疾患(パセドウ病など)、ギラン・バレー症候群、原発性胆汁性肝硬変(PBC)、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫溶血性貧血、重症筋無力症(MG)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、I型糖尿病、乾癬、喘息、好中球機能異常、好酸球性肺炎、突発性肺線維症、過敏性肺炎、移植時の拒絶反応、移植片対宿主病、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症、蕁麻疹、術後癒着、子宮内膜症、成人性歯周炎、気管支炎、COPD、感染症、頭蓋骨癒合症、軟骨無形成症、軟骨低形成症などの骨・軟骨疾患、低リン酸血症性くる病・骨軟化症など挙げられる。

20

## 【0067】

また本発明のアプタマーまたは複合体は、薬物送達剤、インビボイメージング用プローブ、FGF2の血中濃度測定用プローブ、組織染色用プローブ、ELISA用プローブ、FGF2の分離精製用リガンドとしても使用され得る。

30

## 【0068】

FGF2は、線維芽細胞、幹細胞、内皮細胞、上皮細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、神経前駆細胞、骨髄由来間質細胞、T細胞、マクロファージ、好中球、造血系細胞、腫瘍細胞などの各種細胞に作用することが知られている。FGF2はこれらの細胞に受容体を介して作用することで下流のMAPKカスケードや、PLCカスケード、PI3キナーゼカスケードなどを活性化させ、更に下流の遺伝子の発現を制御する。従って、本発明のアプタマーまたは複合体は、これらの細胞およびシグナル伝達経路などに関係した疾患の治療用または予防用医薬、あるいは診断薬、検査薬、試薬として使用され得る。

40

## 【0069】

本発明の医薬は、医薬上許容される担体が配合されたものであり得る。医薬上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウム-グリコール-スターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン

50

酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

【0070】

経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水、オレンジジュースのような希釈液に有効量のリガンドを溶解させた液剤、有効量のリガンドを固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤又は錠剤、適当な分散媒中に有効量の有効成分を懸濁させた懸濁液剤、有効量の有効成分を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等である。

10

【0071】

また、本発明の医薬は必要により、味のマスクング、腸溶性あるいは持続性などの目的のため、自体公知の方法でコーティングすることができる。コーティングに用いられるコーティング剤としては、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリオキシエチレングリコール、ツイーン80、プルロニックF68、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシメチルセルロースアセテートサクシネート、オイドラギット（ローム社製、ドイツ、メタアクリル酸・アクリル酸共重合体）および色素（例、ベンガラ、二酸化チタンなど）などが用いられる。当該医薬は、速放性製剤、徐放性製剤のいずれであってもよい。徐放性製剤の基材としては、例えば、リポソーム、アテロコラーゲン、ゼラチン、ヒドロキシアパタイト、PLGAなどが挙げられる。

20

【0072】

非経口的な投与（例えば、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、局所投与、腹腔内投与、経鼻投与、経肺投与など）に好適な製剤としては、水性及び非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性及び非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分及び医薬上許容される担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌の溶媒に溶解又は懸濁すればよい状態で保存することもできる。更に注射液剤以外にも、吸入剤、軟膏剤も可能である。吸入剤の場合、凍結乾燥状態の有効成分を微細化し適当な吸入デバイスを用いて吸入投与する。吸入剤には、更に必要に応じて従来使用されている界面活性剤、油、調味料、シクロデキストリンまたはその誘導体等を適宜配合することができる。

30

【0073】

ここで界面活性剤としては、例えばオレイン酸、レシチン、ジエチレングリコールジオレエート、テトラヒドロフルフリルオレエート、エチルオレエート、イソプロピルミリスレート、グリセリルトリオレエート、グリセリルモノラウレート、グリセリルモノオレエート、グリセリルモノステアレート、グリセリルモノリシノエート、セチルアルコール、ステアリルアルコール、ポリエチレングリコール400、セチルピリジニウムクロリド、ソルビタントリオレエート（商品名Span（スパン）85）、ソルビタンモノオレエート（商品名Span（スパン）80）、ソルビタンモノラウエート（商品名Span（スパン）20）、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（商品名HCO-60）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート（商品名Tween（ツイーン）20）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレエート（商品名Tween（ツイーン）80）、天然資源由来のレシチン（商品名Epilcon（エピクロン））、オレイルポリオキシエチレン（2）エーテル（商品名Brj（ブリジ）92）、ステアリルポリオキシエチレン（2）エーテル（商品名Brj（ブリジ）72）、ラウリルポリオキシエチレン（4）エーテル（商品名Brj（ブリジ）30）、オレイルポリオキシエチレン（2

40

50

) エーテル (商品名 Genapol (ゲナポル) 0-020)、オキシエチレンとオキシプロピレンとのブロック共重合体 (商品名 Synperonic (シンペロニック)) 等が挙げられる。Span (スパン)、Tween (ツイーン)、Epiclon (エピクロン)、Brij (ブリジ)、Genapol (ゲナポル) および Synperonic (シンペロニック) は商標である。

油としては、例えばトウモロコシ油、オリーブ油、綿実油、ヒマワリ油等が挙げられる。また、軟膏剤の場合、適当な医薬上許容される基剤 (黄色ワセリン、白色ワセリン、パラフィン、プラスチックベース、シリコーン、白色軟膏、ミツロウ、豚油、植物油、親水軟膏、親水ワセリン、精製ラノリン、加水ラノリン、吸水軟膏、親水プラスチックベース、マクロゴール軟膏等) を用い、有効成分と混合し製剤化し使用する。

#### 【0074】

吸入剤は常法に従って製造することができる。すなわち、上記本発明のアプタマーまたは複合体を粉末または液状にして、吸入噴射剤および/または担体中に配合し、適当な吸入容器に充填することにより製造することができる。また上記本発明のアプタマーまたは複合体が粉末の場合は通常の機械的粉末吸入器を、液状の場合はネブライザー等の吸入器をそれぞれ使用することもできる。ここで噴射剤としては従来公知のものを広く使用でき、フロン-11、フロン-12、フロン-21、フロン-22、フロン-113、フロン-114、フロン-123、フロン-142c、フロン-134a、フロン-227、フロン-C318、1,1,1,2-テトラフルオロエタン等のフロン系化合物、プロパン、イソブタン、n-ブタン等の炭化水素類、ジエチルエーテル等のエーテル類、窒素ガス、炭酸ガス等の圧縮ガス等を例示できる。

#### 【0075】

本発明の医薬の投与量は、有効成分の種類・活性、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、通常、成人1日あたり有効成分量として約0.0001~約100mg/kg、例えば約0.0001~約10mg/kg、好ましくは約0.005~約1mg/kgであり得る。

#### 【0076】

本発明はまた、本発明のアプタマーまたは複合体が固定化された固相担体を提供する。固相担体としては、例えば、基板、樹脂、プレート (例、マルチウェルプレート)、フィルター、カートリッジ、カラム、多孔質材が挙げられる。基板は、DNAチップやプロテインチップなどに使われているものなどであり得、例えば、ニッケル-PTFE (ポリテトラフルオロエチレン) 基板やガラス基板、アパタイト基板、シリコーン基板、アルミナ基板などで、これらの基板にポリマーなどのコーティングを施したものが挙げられる。樹脂としては、例えば、アガロース粒子、シリカ粒子、アクリルアミドとN,N'-メチレンビスアクリルアミドの共重合体、ポリスチレン架橋ジビニルベンゼン粒子、デキストランをエピクロロヒドリンで架橋した粒子、セルロースファイバー、アリルデキストランとN,N'-メチレンビスアクリルアミドの架橋ポリマー、単分散系合成ポリマー、単分散系親水性ポリマー、セファロース、トヨパールなどが挙げられ、また、これらの樹脂に各種官能基を結合させた樹脂も含まれる。本発明の固相担体は、例えば、FGF2の精製、及びFGF2の検出、定量に有用であり得る。

#### 【0077】

本発明のアプタマーまたは複合体は、自体公知の方法により固相担体に固定できる。例えば、親和性物質 (例、上述したもの) や所定の官能基を本発明のアプタマーまたは複合体に導入し、次いで当該親和性物質や所定の官能基を利用して固相担体に固定化する方法が挙げられる。本発明はまた、本発明のアプタマーまたは複合体を固相担体に固定する方法、およびそうして得られる固相担体を提供する。所定の官能基は、カップリング反応に供することが可能な官能基であり得、例えば、アミノ基、チオール基、ヒドロキシ基、カルボキシル基が挙げられる。本発明はまた、このような官能基が導入されたアプタマーを提供する。

#### 【0078】

10

20

30

40

50

本発明はまた、FGF2の精製及び濃縮方法を提供する。特に本発明の精製方法はFGF2を他のFGFファミリータンパク質から分離することが可能である。本発明の精製及び濃縮方法は、本発明の固相担体にFGF2を吸着させ、吸着したFGF2を溶出液により溶出させることを含み得る。本発明の固相担体へのFGF2の吸着は自体公知の方法により行うことができる。例えば、FGF2を含有する試料（例、細菌又は細胞の培養物又は培養上清、血液）を、本発明の固相担体又はその含有物に導入する。FGF2の溶出は、中性溶液等の溶出液を用いて行うことができる。中性溶出液は特に限定されるものではないが、例えばpH約6～約9、好ましくは約6.5～約8.5、より好ましくは約7～約8であり得る。中性溶液はまた、例えば、カリウム塩（例、KCl）、マグネシウム塩（例、MgCl<sub>2</sub>）、界面活性剤（例、Tween（ツイーン）20、Triton、NP40）、グリセリンを含むものであり得る。

10

本発明の精製及び濃縮方法はさらに、FGF2の吸着後、洗浄液を用いて当該固相担体を洗浄することを含み得る。洗浄液としては、例えば、尿素、キレート剤（例、EDTA）、Tris、酸、アルカリ、Transfer RNA、DNA、Tween（ツイーン）20などの界面活性剤、NaClなどの塩を含むものなどが挙げられる。本発明の精製及び濃縮方法はさらに、当該固相担体を加熱処理することを含み得る。かかる工程により、当該固相担体の再生、滅菌が可能である。

#### 【0079】

本発明のアプタマーまたは複合体は、検出用プローブ、特にFGF2の検出用プローブとして利用することができる。アプタマーの標識方法としては特に限定されず、自体公知の方法が適用可能である。このような方法としては、例えば放射性同位元素による標識、蛍光色素や蛍光蛋白質による標識などが挙げられる。

20

#### 【0080】

本発明はまた、FGF2の検出及び定量方法を提供する。特に本発明はFGF2を他のFGFファミリータンパク質と区別して検出及び定量することができる。本発明の検出及び定量方法は、本発明のアプタマーを利用して（例、本発明の複合体及び固相担体の使用により）FGF2を測定することを含み得る。FGF2の検出及び定量方法は、抗体の代わりに本発明のアプタマーを用いること以外は、免疫学的方法と同様の方法により行われ得る。従って、抗体の代わりに本発明のアプタマーを用いることにより、酵素免疫測定法（EIA）（例、直接競合ELISA、間接競合ELISA、サンドイッチELISA）、放射免疫測定法（RIA）、蛍光免疫測定法（FIA）、ウエスタンブロット法（例、ウエスタンブロット法における二次抗体の代わりとしての使用）、免疫組織化学的染色法、セルソーティング法等の方法と同様の方法により、検出及び定量を行うことができる。このような方法は、例えば、生体又は生物学的サンプルにおけるFGF2量の測定、FGF2が関連する疾患の診断に有用であり得る。

30

#### 【0081】

本明細書中で挙げられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、本明細書での引用により、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

#### 【0082】

以下に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明するが、本発明は下記実施例等に何ら制約されるものではない。

40

#### 【実施例】

#### 【0083】

#### 実施例1：FGF2に特異的に結合する核酸の作製

FGF2に特異的に結合する核酸はSELEX法を用いて作製した。SELEXはEllingtonらの方法（Ellington and Szostak, Nature 346, 818-822, 1990）及びTuerkらの方法（Tuerk and Gold, Science 249, 505-510, 1990）を改良して行った。標的物質としてヒトFGF2（Peprotech社製）を用いた。FGF2はアミノカッ

50

ブリッジによってアガロース樹脂 (NHS-activated Sepharose, GEヘルスケア社製) に固定化した。アミノカップリングはGEヘルスケア社の仕様書にそって行った。固定化量は、固定化前のFGF2溶液と固定化直後の上清をSDS-PAGEにより調べることで確認した。SDS-PAGEの結果、上清からはFGF2のバンドは検出されず、使用したFGF2のほぼ全てがカップリングされたことが確認された。約400 pmolのFGF2が約10 µLの樹脂に固定化されたことになる。

【0084】

最初のラウンドで用いたRNA (40N-RNA) は、化学合成によって得られたDNAをDuraScribe (商標) T7 Transcription Kit (Epicentre社製) を用いて転写して得た。この方法によって得られたRNAはピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位がフルオロ化されたものである。DNA鋳型として以下に示す40ヌクレオチドのランダム配列の両端にプライマー配列を持った長さ95ヌクレオチドのDNAを用いた。DNA鋳型とプライマーは化学合成によって作製した。以下に用いたDNA鋳型とプライマーを示す。

【0085】

DNA鋳型:

5' - t a a t a c g a c t c a c t a t a g g g c t t g t t c t g g a t c g c - 4  
0N - g g c g a t g c t c a g a a g c g g a g - 3' (配列番号39)

プライマーFwd:

5' - t a a t a c g a c t c a c t a t a g g g c t t g t t c t g g a t c g c - 3  
' (配列番号40)

プライマーRev:

5' - c t c c g c t t c t g a g c a t c g c c - 3' (配列番号41)

【0086】

NはA、G、C又はTのいずれか一つを示す。プライマーFwdはT7RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含んでいる。最初のラウンドで用いたRNAプールのバリエーションは理論上 $10^{14}$ であった。

【0087】

FGF2が固定化された樹脂にRNAプールを加え、30分室温で保持した。30分後、FGF2に結合しないRNAを取り除くために、溶液Aで樹脂を洗浄した。ここで溶液Aは145 mM塩化ナトリウム、5.4 mM塩化カリウム、1.8 mM塩化カルシウム、0.8 mM塩化マグネシウム、20 mMトリス (pH 7.6)、0.05% Tween 20の混合溶液である。FGF2に結合したRNAは、溶出液を加えて室温で10分間攪拌することで回収した。溶出液として溶液Aに、6 Mグアニジン塩酸塩を加えpH 7.6に調整したものをを用いた。回収されたRNAはRT-PCRで増幅し、DuraScribe (商標) T7 Transcription Kitで転写して次のラウンドのプールとして用いた。以上を1ラウンドとし、同様の作業を8ラウンド行った。SELEX終了後、PCR産物をpGEM-T Easyベクター (Promega社製) にクローニングし、大腸菌株DH5 (Toyobo社製) にトランスフォーメーションした。シングルコロニーからプラスミドを抽出後、DNAシーケンサー (3130xl Genetic Analyzer、ABI社製) で97クローンの塩基配列を調べた。

【0088】

SELEXを10ラウンド行った後に配列を調べたところ、配列に収束が見られた。

配列番号1で表される配列は12配列存在し、1塩基置換体が4配列、存在した。配列番号1で表される配列に含まれる、共通配列1を含む配列が、5配列、4種類存在した (配列番号2~5)。

【0089】

配列番号6で表される配列は12配列存在し、1塩基置換体が1配列、2塩基置換体が6配列、存在した。

配列番号7で表される配列は12配列存在し、1塩基置換体が2配列、2塩基置換体が

10

20

30

40

50

1 配列、存在した。

【0090】

配列番号7で表される配列に含まれる、共通配列2を含む配列が1配列存在した(配列番号8)。

配列番号9で表される配列は7配列存在し、1塩基置換体が1配列、2塩基置換体が2配列、存在した。

【0091】

配列番号10で表される配列は4配列存在した。配列番号10で表される配列に含まれる、共通配列3を含む配列が他に3種類、8配列存在した(配列番号11~13)。

【0092】

配列番号14で表される配列は4配列存在し、1塩基欠失体が1配列、存在した。配列番号15~17で表される配列は3配列、存在した。配列番号18で表される配列は3配列存在し、2塩基変異体が1配列、存在した。配列番号19~20で表される配列は2配列、存在した。配列番号21で表される配列は2配列存在し、1塩基変異体が1配列、存在した。配列番号22で表される配列は2配列存在し、2塩基変異体が1配列、存在した。配列番号23~34で表される配列は1配列であった。

【0093】

共通配列1を含む、配列番号1~5で表される配列の二次構造をMFOLDプログラム(M. Zuker, Nucleic Acids Res. 31(13), 3406-3415, 2003)を用いて予測したところ、共通配列の部分の形状に相似がみられた(図1参照)。

【0094】

共通配列2を含む、配列番号7および8で表される配列の二次構造を、MFOLDプログラムを用いて予測したところ、共通配列の部分がループの形状をとることがわかった(図2参照)。

【0095】

共通配列3を含む、配列番号10~13で表される配列の二次構造をMFOLDプログラムによって予測したところ、共通配列の部分が同じ形状となった(図3参照)。

【0096】

これらの配列は、前述した特許文献2、特許文献5および特許文献6に記載の核酸リガンドとは配列が異なっていた。

【0097】

以下にそれぞれのヌクレオチド配列を示す。なお、各ヌクレオチドにおける括弧は、リボースの2'位の修飾を示す。またFはフッ素原子を示す。具体的には、c(F)はリボースの2'位がフッ素原子で置換されたシチジンを示し、u(F)はリボースの2'位がフッ素原子で置換されたウリジンを示す。

また各配列の先頭は5'末端であり、終端が3'末端である。

【0098】

配列番号1:

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) c ( F ) g u ( F ) u ( F ) a a a u ( F ) g u ( F ) c ( F ) u ( F )  
) a g u ( F ) a g u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a u ( F ) u ( F ) c ( F ) a u ( F )  
g u ( F ) u ( F ) u ( F ) a c ( F ) g g a u ( F ) u ( F ) g c ( F ) g g c ( F )  
g a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【0099】

配列番号2:

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a a u ( F ) a g a u ( F ) a g a g u ( F ) a  
g u ( F ) a c ( F ) u ( F ) u ( F ) a u ( F ) a g g u ( F ) u ( F ) u ( F ) a c  
( F ) c ( F ) u ( F ) g u ( F ) g a u ( F ) g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u

10

20

30

40

50

( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【 0 1 0 0 】

配列番号 3 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) c ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) a g u ( F ) a g u ( F )  
a c ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) a a u ( F ) g u ( F ) u ( F ) u ( F ) a c ( F )  
g a a a g g g u ( F ) u ( F ) u ( F ) g g c ( F ) u ( F ) g g c ( F ) g a u  
( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【 0 1 0 1 】

配列番号 4 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) c ( F ) a u ( F ) g c ( F ) g a g u ( F ) a g u a c ( F ) u ( F )  
) a a u ( F ) c ( F ) a u ( F ) g u ( F ) u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) g a  
u ( F ) g u ( F ) g g g u ( F ) g g c ( F ) g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u  
( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【 0 1 0 2 】

配列番号 5 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) c ( F ) u ( F ) g g g a u ( F ) g g u ( F ) u ( F ) u ( F ) c ( F )  
F ) a g u ( F ) a g u ( F ) a c ( F ) u ( F ) u ( F ) a u ( F ) a g g u ( F ) u  
( F ) u ( F ) a c ( F ) g g a g g a g g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u ( F )  
c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【 0 1 0 3 】

配列番号 6 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) c ( F ) u ( F ) u ( F ) a c ( F ) g a u ( F ) u ( F ) a g a g g  
a u ( F ) a u ( F ) u ( F ) a u ( F ) a u ( F ) u ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F )  
) c ( F ) g a u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) g g g g c ( F ) g a u ( F ) g c  
( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【 0 1 0 4 】

配列番号 7 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) c ( F ) u ( F ) g a u ( F ) a a g c ( F ) a g g a g g g u ( F )  
g a c ( F ) g g u ( F ) g a u ( F ) g g c ( F ) a g c ( F ) u ( F ) g u ( F ) u  
( F ) u ( F ) g g g g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g  
c ( F ) g g a g

【 0 1 0 5 】

配列番号 8 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) g g a g a g u ( F ) u ( F ) g u ( F ) c ( F ) g a g g g u ( F )  
g a c ( F ) g g u ( F ) a u ( F ) a g c ( F ) a g g a c ( F ) g c ( F ) u ( F )  
g u ( F ) u ( F ) u ( F ) g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g  
a a g c ( F ) g g a g

【 0 1 0 6 】

配列番号 9 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) a a g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a  
g u ( F ) g u ( F ) a g c ( F ) u ( F ) a g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a  
g g g c ( F ) g u ( F ) g u ( F ) g u ( F ) u ( F ) g g c ( F ) g a u ( F ) g c  
( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

10

20

30

40

50

【0107】

配列番号10:

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) g u ( F ) u ( F ) g a c ( F ) u ( F ) a g g g c  
( F ) g u ( F ) a c ( F ) a u ( F ) c ( F ) g u ( F ) g a c ( F ) c ( F ) a g u  
( F ) g u ( F ) c ( F ) a g u ( F ) u ( F ) c ( F ) a g g g c ( F ) g a u ( F )  
g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【0108】

配列番号11:

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) a u ( F ) c ( F ) a g u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g g c ( F )  
u ( F ) c ( F ) u ( F ) u ( F ) a g g a g u ( F ) g a c ( F ) c ( F ) a g u ( F )  
) g u ( F ) g u ( F ) u ( F ) g u ( F ) a a g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u  
( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

10

【0109】

配列番号12:

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) u ( F ) g c ( F ) u ( F ) a g g g c ( F ) g c ( F ) a u ( F ) u  
( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) u ( F ) g c ( F ) g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c  
( F ) a g u ( F ) g c ( F ) g g c ( F ) g g u ( F ) g u ( F ) g g c ( F ) g a u  
( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

20

【0110】

配列番号13:

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) u ( F ) g g c ( F ) u ( F ) c ( F ) g a c ( F ) a c ( F ) u ( F )  
) a g g g c ( F ) c ( F ) g a g g g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g u ( F )  
) g u ( F ) g u ( F ) u ( F ) a a g u ( F ) a g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F )  
u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【0111】

配列番号14:

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g a a g u ( F ) u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F )  
( F ) u ( F ) g c ( F ) u ( F ) g a c ( F ) c ( F ) g a g u ( F ) a g g u ( F ) u  
( F ) g g g g a u ( F ) g u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F )  
( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

30

【0112】

配列番号15:

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) c ( F ) g g u ( F ) a u ( F ) a u ( F ) a a a a u ( F ) g u ( F )  
) c ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) g a c ( F ) g g g u ( F ) g c ( F ) g u ( F )  
c ( F ) u ( F ) g g u ( F ) c ( F ) g g u ( F ) a g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F )  
( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

40

【0113】

配列番号16:

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) c ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) a u ( F ) g u ( F ) u ( F ) u  
( F ) a g a a c ( F ) u ( F ) u ( F ) g g u ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F )  
) a g g a g u ( F ) c ( F ) g a c ( F ) a u ( F ) g g g g g c ( F ) g a u ( F )  
g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【0114】

50

配列番号 17 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) c ( F ) c ( F ) c ( F ) u ( F ) u ( F ) g a u ( F ) c ( F ) a a  
u ( F ) g g g u ( F ) c ( F ) a a g a a u ( F ) u ( F ) u ( F ) c ( F ) g c ( F )  
) a a c ( F ) u ( F ) c ( F ) c ( F ) g g g c ( F ) g u ( F ) g g c ( F ) g a u  
( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【 0 1 1 5 】

配列番号 18 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) g a u ( F ) g g a u ( F ) g c ( F ) a u  
( F ) u ( F ) c ( F ) c ( F ) a a c ( F ) u ( F ) a u ( F ) u ( F ) g a u ( F )  
u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) g g g a u ( F ) u ( F ) c ( F ) c ( F ) g g c  
( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

10

【 0 1 1 6 】

配列番号 19 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) g c ( F ) g g u ( F ) a g a u ( F ) c ( F ) a a u ( F ) a a g a  
u ( F ) u ( F ) a u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) g g u ( F ) a g g a  
a g a u ( F ) u ( F ) g u ( F ) g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F )  
) a g a a g c ( F ) g g a g

20

【 0 1 1 7 】

配列番号 20 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) c ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) a a u ( F ) u ( F ) g  
c ( F ) a u ( F ) g u ( F ) u ( F ) g g a a g a u ( F ) g c ( F ) a u ( F ) g u  
( F ) u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) g g g c  
( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【 0 1 1 8 】

配列番号 21 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) c ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a u ( F ) a a u ( F ) a c ( F )  
) g u ( F ) u ( F ) a u ( F ) u ( F ) g a g u ( F ) g g c ( F ) g c ( F ) a u ( F )  
( F ) a u ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) g u ( F ) a g g c ( F )  
g a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

30

【 0 1 1 9 】

配列番号 22 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) a g c ( F ) g a a u ( F ) g g u ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F )  
u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) g c ( F ) a g u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a u ( F )  
( F ) u ( F ) u ( F ) a g u ( F ) g c ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) g g g c ( F )  
g a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

40

【 0 1 2 0 】

配列番号 23 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
( F ) g c ( F ) g g u ( F ) g g a u ( F ) a u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u  
( F ) a u ( F ) c ( F ) c ( F ) a a a u ( F ) g u ( F ) a a u ( F ) a a u ( F )  
u ( F ) u ( F ) g u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a u ( F ) g g c ( F ) g a u ( F ) g  
c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【 0 1 2 1 】

配列番号 24 :

50

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
 ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) g u ( F ) g u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g u ( F )  
 ( F ) g u ( F ) g u ( F ) c ( F ) g a a a u ( F ) g u ( F ) u ( F ) a g c ( F ) u  
 ( F ) u ( F ) u ( F ) c ( F ) g c ( F ) g a g a g g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F )  
 ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【 0 1 2 2 】

配列番号 2 5 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
 ( F ) g c ( F ) c ( F ) g g u ( F ) a g u ( F ) a g a a g a a u ( F ) c ( F ) g  
 a u ( F ) u ( F ) u ( F ) a u ( F ) g c ( F ) g u ( F ) a u ( F ) g c ( F ) u ( F )  
 ( F ) g g u ( F ) c ( F ) g u ( F ) u ( F ) a g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u  
 ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

10

【 0 1 2 3 】

配列番号 2 6 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
 ( F ) g c ( F ) a u ( F ) a u ( F ) u ( F ) g a g a g a u ( F ) g u ( F ) a u ( F )  
 ( F ) g a c ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) a a g g a a c ( F ) a g g u ( F )  
 ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) g g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F )  
 a g a a g c ( F ) g g a g

20

【 0 1 2 4 】

配列番号 2 7 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
 ( F ) g c ( F ) c ( F ) a u ( F ) u ( F ) a a g c ( F ) a a a g u ( F ) u ( F )  
 u ( F ) g g u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) a g u ( F ) a  
 a c ( F ) u ( F ) g a g a u ( F ) a u ( F ) g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u  
 ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【 0 1 2 5 】

配列番号 2 8 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
 ( F ) g c ( F ) a c ( F ) a u ( F ) c ( F ) g g g g c ( F ) a a a u ( F ) g u ( F )  
 ( F ) u ( F ) u ( F ) a u ( F ) u ( F ) u ( F ) g g a a a c ( F ) a a c ( F ) g g  
 u ( F ) c ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) g g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u ( F )  
 ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

30

【 0 1 2 6 】

配列番号 2 9 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
 ( F ) g c ( F ) c ( F ) u ( F ) a g a u ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) u  
 ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) a g a g g c ( F ) a u ( F ) c ( F ) a c ( F ) u ( F )  
 ( F ) g u ( F ) g a u ( F ) u ( F ) u ( F ) u ( F ) g c ( F ) a u ( F ) u ( F ) g  
 g a u ( F ) g u ( F ) g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a  
 g c ( F ) g g a g

40

【 0 1 2 7 】

配列番号 3 0 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
 ( F ) g c ( F ) c ( F ) g g u ( F ) a a u ( F ) g u ( F ) g c ( F ) a u ( F ) a  
 c ( F ) a c ( F ) a c ( F ) u ( F ) a u ( F ) u ( F ) g a c ( F ) c ( F ) u ( F )  
 ) u ( F ) a a c ( F ) a g a u ( F ) u ( F ) g a g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F )  
 ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【 0 1 2 8 】

配列番号 3 1 :

50

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
 ( F ) g c ( F ) g c ( F ) g c ( F ) a a a c ( F ) u ( F ) a g u ( F ) u ( F ) a  
 a g c ( F ) u ( F ) a g c ( F ) c ( F ) g a u ( F ) c ( F ) a c ( F ) a g g g g  
 u ( F ) c ( F ) g c ( F ) a u ( F ) u ( F ) g g c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u  
 ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【 0 1 2 9 】

配列番号 3 2 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
 ( F ) g c ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) u ( F ) a a c ( F ) a c ( F ) a c ( F )  
 ) u ( F ) g g u ( F ) a a c ( F ) c ( F ) c ( F ) u ( F ) c ( F ) g g c ( F ) c  
 ( F ) c ( F ) u ( F ) a g u ( F ) g u ( F ) c ( F ) g a g c ( F ) c ( F ) a g g  
 c ( F ) g a u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

10

【 0 1 3 0 】

配列番号 3 3 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
 ( F ) g c ( F ) c ( F ) c ( F ) a u ( F ) a u ( F ) a g g c ( F ) u ( F ) g u ( F )  
 u ( F ) c ( F ) c ( F ) g c ( F ) g g c ( F ) a a u ( F ) a g a a u ( F ) u  
 ( F ) u ( F ) g c ( F ) a g u ( F ) u ( F ) a u ( F ) u ( F ) g g g c ( F ) g a  
 u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

20

【 0 1 3 1 】

配列番号 3 4 :

g g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) g g a u ( F ) c  
 ( F ) g c ( F ) u ( F ) a a g g g u ( F ) u ( F ) u ( F ) g a g u ( F ) c ( F )  
 u ( F ) u ( F ) a u ( F ) c ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) u ( F ) g c ( F ) u  
 ( F ) g u ( F ) g c ( F ) a a a u ( F ) g c ( F ) g g c ( F ) g g c ( F ) g a u  
 ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a g a a g c ( F ) g g a g

【 0 1 3 2 】

配列番号 1、6、7、9、10、14～34で表される核酸の FGF 2 に対する結合活性を表面プラズモン共鳴法により評価した。測定には B I A c o r e 社製の 2000 を用いた。センサーチップにはストレプトアビジンが固定化されている SA チップを用いた。これに、5'末端にビオチンが結合している 16ヌクレオチドの Poly dT を 600 RU 程度結合させた。リガンドとなる核酸は、3'末端に 16ヌクレオチドの Poly A を付加し、dT と A の結合により SA チップに固定化した。固定化量は約 1000 RU とした。アナライト用の ヒト FGF 2 は 0.5 μM に調製し、非特異的吸着を軽減するために 0.5 mg / mL の tRNA を加えたものを 20 μL インジェクトした。ランニングバッファーには溶液 A を用いた。測定の結果、配列番号 1、6、7、9、10、14～34 で表される核酸の全てが、ネガティブコントロールの 40N よりも有意に FGF 2 に結合することがわかった。ここで 40N とは 40ヌクレオチドのランダム配列を含む、S E L E X の 1 ラウンド目に使用した核酸プールのことである。一例として配列番号 1 で表される アプタマー (A p t 1) と ヒト FGF 2 との結合の様子を示すセンサーグラムを図 4 に示す。以上より、配列番号 1、6、7、9、10、14～34 で表される核酸は FGF 2 に結合するアプタマーであることが示された。

30

40

【 0 1 3 3 】

配列番号 1、6、7、9、10、14～34 で表される FGF 2 アプタマーが同じ FGF ファミリーの FGF 1 に結合するかどうか表面プラズモン共鳴法で調べた。実験には R & D 社製の FGF 1 (232 - F A / C F) を用い、上述と同様に tRNA を加えて非特異的吸着を軽減させた状態でおこなった。その結果、配列番号 1～5 および 26～33 で表されるアプタマーの全てが FGF 1 に結合しないことがわかった。一例として、配列番号 11 で表されるアプタマーが ヒト FGF 1 に結合しないことを示すセンサーグラムを図 5 に示す。以上より、配列番号 1、6、7、9、10、14～34 で表されるアプタマー

50

は FGF2 に特異的に結合することがわかった。

【0134】

実施例 2：FGF2 と FGF2 受容体との結合を阻害するアプタマー

配列番号 1、6、7、9～11 で表されるアプタマーが、FGF2 と FGF2 受容体 (FGFR1C) との結合を阻害するかどうかを、表面プラズモン共鳴法を用いて調べた。

BIAcore 社のプロトコールに従って、CM5 センサーチップに Protein A (21181, Pierce) を固定化した。そこに、IgG の Fc 部分が融合した ヒト FGF2 - Fc (658-FR, R&D systems) を約 500 RU 固定化した。アナライトとして FGF2 (0.1 μM) とアプタマー (0.3 μM) を混合して 15 分保持したものを流した。もしアプタマーが FGF2 と FGF2 受容体の結合を阻害する場合はセンサーグラムのシグナルは上がらないが、もし阻害しない場合は三者複合体を形成しシグナルが上がるのが予想される。阻害実験を開始する前に FGF2 受容体に FGF2 が結合することを確認した。またネガティブコントロールとして、FGF2 と 40N を混ぜたものを用いた。40N は、40ヌクレオチドのランダム配列を含む、SELEX の 1 ラウンド目に使用した核酸プールのことである。実験の結果、配列番号 1、6、7、9～11 で表されるアプタマーの全てが FGF2 と FGF2 受容体の結合を阻害することがわかった。特に、配列番号 9～11 で表されるアプタマーの阻害効果が高かった。一方、40N は阻害活性を示さなかった。一例として配列番号 9 で表されるアプタマーが FGF2 と FGF2 受容体の結合を阻害していることを示すセンサーグラムを図 6 に示す。

10

20

以上より、配列番号 1、6、7、9～11 で表されるアプタマーは FGF2 の阻害剤として使用できることが示された。

【0135】

実施例 3：アプタマーは培養細胞の FGF2 シグナリングを阻害する

配列番号 1、6、7、9～11 で表されるアプタマーが、FGF2 による細胞刺激を阻害できるか、マウス線維芽細胞 (NIH3T3) を用いて確認した。NIH3T3 細胞は FGF2 による細胞刺激で、シグナル伝達系が活性化すると、FRS2、Grb2、SOS を介して MAPキナーゼ経路や PIK3/AKT1 経路などが活性化され、最終的に VEGF-A、VEGF-C、HGF、angiopoietin-2、VEGFR、PDGFR- などの各種サイトカインや受容体遺伝子が発現誘導される。その際、FRS2 や ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) 等の因子がリン酸化されることが解っている。NIH3T3 細胞をヒト FGF2 (Peprtech 社製) (50 ng/ml) で刺激する際、培地中にアプタマーを加え、30 分後にウエスタンブロッティング法により測定した。抗体はリン酸化特異的抗体 (P-FRS2-alpha Y196, P-ERK T202/Y204; Cell signaling technology 社) を用いた。アプタマーによる FGF2 シグナリングの阻害効果を図 7 に示す。配列番号 7、9～11 で表されるアプタマーは FRS2 や ERK のリン酸化を強く阻害した。配列番号 9～11 で表されるアプタマーによる強い阻害効果は、プラズモン共鳴法による FGF2 と FGF2 受容体の結合阻害結果と一致した。以上のことから、本発明の、配列番号 7、9～11 で表されるアプタマーは、生存している細胞に対しても FGF2 シグナリングの高い阻害活性を有していることが示された。

30

40

【0136】

実施例 4：配列番号 7、9～11 で表されるアプタマーの短小化

配列番号 7、9～11 で表されるアプタマーの短小化をおこない、これらの核酸が FGF2 と FGF2 受容体の結合阻害活性を有しているかどうか、実施例 2 と同様に表面プラズモン共鳴法により調べた。配列番号 35～38 で表される核酸を DuraScribe (商標) T7 Transcription Kit (Epicentre 社製) を用いて試験管内転写反応で得た。その結果、配列番号 36、38 で表されるアプタマーが、短小化後でも、FGF2 と FGF2 受容体の結合阻害を有していた。配列番号 36 と 38 で

50

表される短小化アプタマーのMFOLDプログラムによる二次構造予測を図8に示す。

【0137】

配列番号35：配列番号7で表されるアプタマーの改変体で38ヌクレオチドの長さのアプタマー

g g g a a g c ( F ) a g g a g g g u ( F ) g a c ( F ) g g u ( F ) g a u ( F ) g  
g c ( F ) a g c ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) u ( F ) c ( F ) c ( F ) c ( F )

【0138】

配列番号36：配列番号9で表されるアプタマーの改変体で41ヌクレオチドの長さのアプタマー

g g g g c ( F ) a a g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g u ( F ) g u ( F ) a  
g c ( F ) u ( F ) a g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g c ( F ) g u ( F )  
g u ( F ) c ( F ) c ( F ) c ( F )

10

【0139】

配列番号37：配列番号10で表されるアプタマーの改変体で47ヌクレオチドの長さのアプタマー

g g g a u ( F ) c g c ( F ) u ( F ) c ( F ) g u ( F ) u ( F ) g a c ( F ) u ( F )  
) a g g g c ( F ) g u ( F ) a c ( F ) a u ( F ) c g u ( F ) g a c ( F ) c ( F )  
a g u ( F ) g u ( F ) c ( F ) a g u ( F ) c ( F ) c ( F ) c ( F )

【0140】

配列番号38：配列番号11で表されるアプタマーの改変体で35ヌクレオチドの長さのアプタマー

g g g u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g g c ( F ) u ( F ) c ( F ) u ( F ) u ( F )  
a g g a g u ( F ) g a c ( F ) c ( F ) a g u ( F ) g u ( F ) g c ( F ) c ( F ) c  
( F )

20

【0141】

実施例5：短小化アプタマーは培養細胞のFGF2シグナリングを阻害する

配列番号36、38で表されるアプタマーが、FGF2による細胞刺激を阻害できるか、マウス線維芽細胞(NIH3T3)を用いて実施例3と同様に確認した。その結果、配列番号36、38で表されるアプタマーはFRS2やERKのリン酸化を強く阻害した(図9)。これらの短小化アプタマーは生存している細胞に対して、配列番号9、11で表されるアプタマー同様、FGF2シグナリングの高い阻害活性を有していることが示された。

30

【0142】

実施例6：配列番号36で表されるアプタマーの変異体の作製

配列番号36で表されるアプタマーの変異体をSELEX法で作製した。SELEXは配列番号36で表されるアプタマー配列に人為的に変異をおこしたDNA鋳型を用い、実施例1と同様に行った。標的物質としてヒトFGF2(Peprotech社製)を用いた。

【0143】

最初のラウンドで用いたRNAは、化学合成によって得られたDNAをDuraScribe(商標)T7 Transcription Kit(Epicentre社製)を用いて転写して得た。この方法によって得られたRNAはピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位がフルオロ化されたものである。DNA鋳型として以下に示す両端にプライマー配列を持った長さ100ヌクレオチドのDNAを用いた。DNA鋳型とプライマーは化学合成によって作製した。以下に用いたDNA鋳型とプライマーを示す。下線部は30%の割合で、それ以外の他の塩基に置換する様に合成した。

40

【0144】

DNA鋳型：

5' - t a a t a c g a c t c a c t a t a g g g a a g a g g t c a g a t g g g g c  
g a t g c a a g t t a c c a g t g t a g c t a g t t a c t a g g g c g t g t g t

50



( F ) c ( F ) u ( F ) g u ( F ) a u ( F ) u ( F ) g c ( F ) a c ( F ) c ( F ) u  
( F ) u ( F ) a u ( F ) g c ( F ) g u ( F ) g c ( F ) u ( F ) a g a g u ( F ) g  
a

【 0 1 5 3 】

配列番号 4 6 :

g g g a a g a g g u ( F ) c ( F ) a g a u ( F ) g g g g a c ( F ) c ( F ) u ( F )  
) u ( F ) g g c g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g u ( F ) g u ( F ) a g g  
a a a c ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g g c ( F ) g c ( F ) g u ( F ) g u  
( F ) a g c ( F ) a c ( F ) c ( F ) u ( F ) a u ( F ) g c ( F ) g u ( F ) g c ( F )  
( F ) u ( F ) a g a g u ( F ) g a u ( F ) a u ( F ) g c ( F ) g u ( F ) g c ( F )  
u ( F ) a g a g u ( F ) g a

10

【 0 1 5 4 】

配列番号 4 7 :

g g g a a g a g g u ( F ) c ( F ) a g a u ( F ) g g u ( F ) u ( F ) c ( F ) c ( F )  
( F ) c ( F ) c ( F ) g c ( F ) a c ( F ) g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g  
u ( F ) g u ( F ) a g a a a c ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g g c ( F )  
g u ( F ) g u ( F ) a a u ( F ) g c ( F ) a c ( F ) c ( F ) u ( F ) u ( F ) a u  
( F ) g c ( F ) g u ( F ) g c ( F ) u ( F ) a g a g u ( F ) g a

【 0 1 5 5 】

配列番号 4 8 :

g g g a a g a g g u ( F ) c ( F ) a g a u ( F ) g g c ( F ) u ( F ) c ( F ) c ( F )  
( F ) c ( F ) c ( F ) g c ( F ) a c ( F ) g u ( F ) g a c ( F ) c ( F ) a g u ( F )  
) g u ( F ) a g u ( F ) u ( F ) a a c ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g g c  
( F ) g u ( F ) g u ( F ) g a a g c ( F ) a c ( F ) c ( F ) u ( F ) a u ( F ) u  
( F ) g c ( F ) g u ( F ) g c ( F ) u ( F ) a g a g u ( F ) g a

20

【 0 1 5 6 】

配列番号 4 9 :

g g g a a g a g g u ( F ) c ( F ) a g a u ( F ) g g u ( F ) u ( F ) c ( F ) c ( F )  
( F ) c ( F ) c ( F ) g c ( F ) a c ( F ) g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g  
u ( F ) g u ( F ) a g a u ( F ) a g a u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g g c ( F )  
g u ( F ) g u ( F ) u ( F ) u ( F ) a g c ( F ) a c ( F ) c ( F ) u ( F ) u ( F )  
) a u ( F ) g c ( F ) g u ( F ) g c ( F ) u ( F ) a g a g u ( F ) g a

30

【 0 1 5 7 】

配列番号 5 0 :

g g g a a g a g g u ( F ) c ( F ) a g a u ( F ) g g g c ( F ) c ( F ) u ( F ) c  
( F ) c ( F ) a c ( F ) a a g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g u ( F ) g u  
( F ) a g c ( F ) g c ( F ) a u ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g g c ( F )  
u ( F ) u ( F ) g u ( F ) g c ( F ) u ( F ) c ( F ) a c ( F ) c ( F ) u ( F ) a  
u ( F ) g c ( F ) g u ( F ) g c ( F ) u ( F ) a g a g u ( F ) g a

40

【 0 1 5 8 】

配列番号 5 1 :

g g g a a g a g g u ( F ) c ( F ) a g a u ( F ) g g a u ( F ) c ( F ) u ( F ) c  
( F ) u ( F ) g c ( F ) a c ( F ) g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g u ( F )  
) g u ( F ) a u ( F ) g u ( F ) a a u ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g g c  
( F ) g u ( F ) g u ( F ) g u ( F ) u ( F ) g c ( F ) a c ( F ) c ( F ) u ( F )  
a u ( F ) g c ( F ) g u ( F ) g c ( F ) u ( F ) a g a g u ( F ) g a

【 0 1 5 9 】

配列番号 5 2 :

g g g a a g a g g u ( F ) c ( F ) a g a u ( F ) g g a u ( F ) c ( F ) u ( F ) c  
( F ) u ( F ) g c ( F ) a c ( F ) g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g u ( F )

50

) g u ( F ) a a g u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g g c  
( F ) g u ( F ) g u ( F ) g u ( F ) u ( F ) g c ( F ) a c ( F ) c ( F ) u ( F )  
a u ( F ) g c ( F ) g u ( F ) g c ( F ) u ( F ) a g a g u ( F ) g a

【 0 1 6 0 】

配列番号 5 3 :

g g g a a g a g g u ( F ) c ( F ) a g a u ( F ) g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) c ( F )  
( F ) c ( F ) u ( F ) g c ( F ) a c ( F ) g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a u  
( F ) u ( F ) g u ( F ) a u ( F ) g u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) a c ( F )  
u ( F ) a g g g c ( F ) g u ( F ) g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g c ( F ) a c ( F )  
) c ( F ) u ( F ) a u ( F ) g c ( F ) g u ( F ) g c ( F ) u ( F ) a g a g u ( F )  
) g a

10

【 0 1 6 1 】

配列番号 5 4 :

g g g a a g a g g u ( F ) c ( F ) a g a u ( F ) g g a c ( F ) u ( F ) u ( F ) c  
( F ) u ( F ) g c ( F ) a c ( F ) g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g u ( F )  
) g u ( F ) a g c ( F ) u ( F ) a u ( F ) u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g  
g g c ( F ) g u ( F ) g u ( F ) g u ( F ) a g c ( F ) a c ( F ) c ( F ) u ( F )  
a u ( F ) g c ( F ) g u ( F ) g c ( F ) u ( F ) a g a g u ( F ) g a

【 0 1 6 2 】

配列番号 5 5 :

20

g g g a a g a g g u ( F ) c ( F ) a g a u ( F ) g g a c ( F ) a c ( F ) c ( F )  
u ( F ) g c ( F ) a c ( F ) g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g u ( F ) g u  
( F ) a a c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g g g c  
( F ) g u ( F ) g u ( F ) g u ( F ) a g c ( F ) a c ( F ) c ( F ) u ( F ) a u ( F )  
( F ) g c ( F ) g u ( F ) g c ( F ) u ( F ) a g a g u ( F ) g a

【 0 1 6 3 】

配列番号 5 6 :

g g g a a g a g g u ( F ) c ( F ) a g a u ( F ) g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) c ( F )  
( F ) c ( F ) u ( F ) a c ( F ) a a g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g u ( F )  
) g u ( F ) a u ( F ) u ( F ) u ( F ) a g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F ) a g  
g g c ( F ) u ( F ) u ( F ) g u ( F ) g u ( F ) g g c ( F ) a c ( F ) c ( F ) u  
( F ) a u ( F ) g c ( F ) g u ( F ) g c ( F ) u ( F ) a g a g u ( F ) g a

30

【 0 1 6 4 】

配列番号 5 7 :

g g g a a g a g g u ( F ) c ( F ) a g a u ( F ) g g u ( F ) c ( F ) c ( F ) u ( F )  
( F ) c ( F ) u ( F ) a c ( F ) a g g u ( F ) u ( F ) a c ( F ) c ( F ) a g u ( F )  
) g u ( F ) a u ( F ) u ( F ) u ( F ) a u ( F ) u ( F ) u ( F ) a c ( F ) u ( F )  
) a g g g c ( F ) c ( F ) u ( F ) g u ( F ) g u ( F ) u ( F ) g c ( F ) a c ( F )  
) c ( F ) u ( F ) a u ( F ) g c ( F ) g u ( F ) g c ( F ) u ( F ) a g a g u ( F )  
) g a

40

【 0 1 6 5 】

配列番号 4 3 ~ 5 7 で表されるアプタマーが F G F 2 と F G F 2 受容体の結合阻害活性を有しているかどうか、実施例 2 と同様の表面プラズモン共鳴法により調べた。配列番号 4 3 ~ 5 7 で表される核酸を D u r a S c r i b e ( 商 標 ) T 7 T r a n s c r i p t i o n K i t ( E p i c e n t r e 社 製 ) を 用 い て 試 験 管 内 転 写 反 応 で 得 た 。 そ の 結 果 、 配 列 番 号 4 3 ~ 5 7 で 表 さ れ る ア プ タ マ ー が 、 F G F 2 と F G F 2 受 容 体 の 結 合 阻 害 活 性 を 有 し て い る こ と が 分 か っ た 。

【 産 業 上 の 利 用 可 能 性 】

【 0 1 6 6 】

本発明のアプタマーまたは複合体は、炎症性疾患や癌、アレルギー、感染症などの疾患

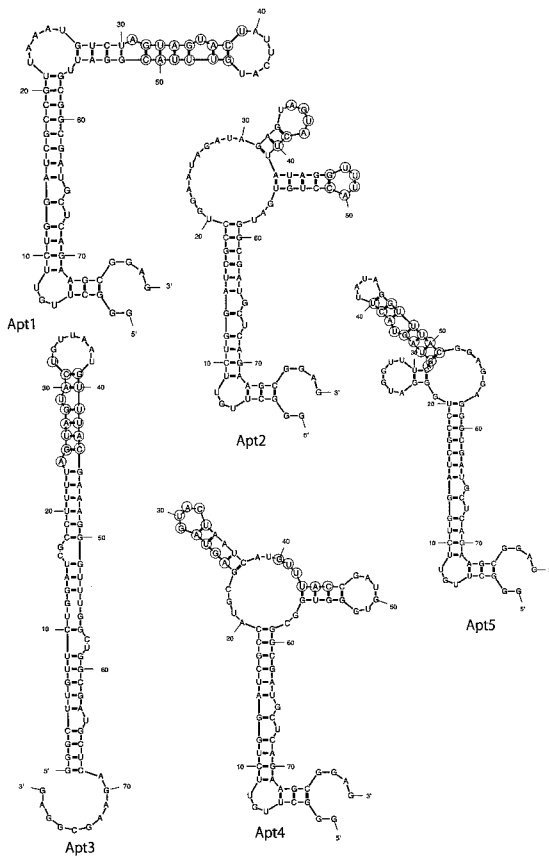
50

に対する医薬、あるいは診断薬、試薬として有用であり得る。本発明のアプタマーまたは複合体はまた、FGF2の精製及び濃縮、FGF2の標識、並びにFGF2の検出及び定量に有用であり得る。

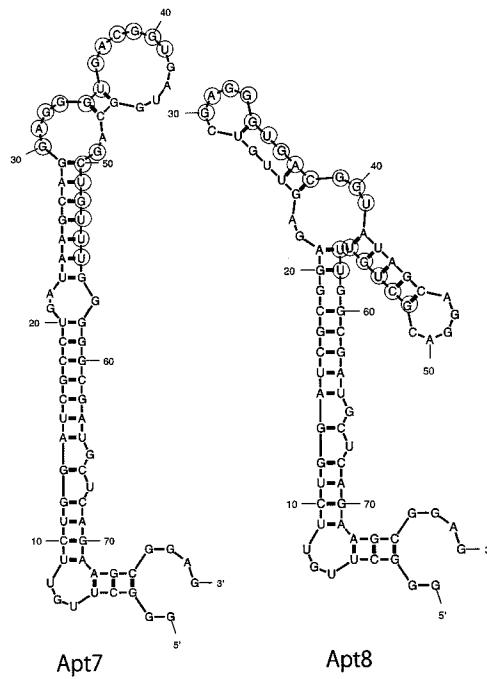
【0167】

本出願は、日本で出願された特願2010-029377を基礎としており、それらの内容は本明細書にすべて包含される。

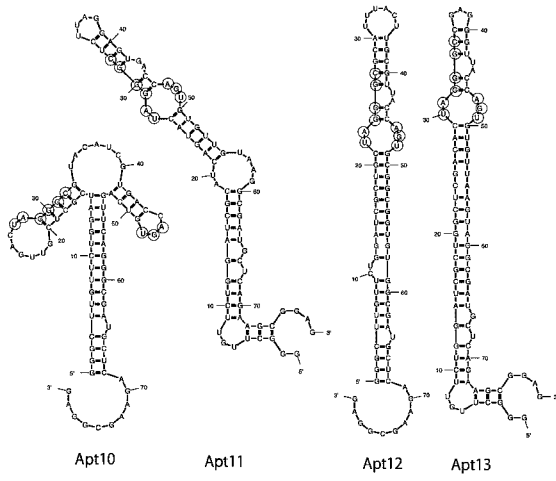
【図1】



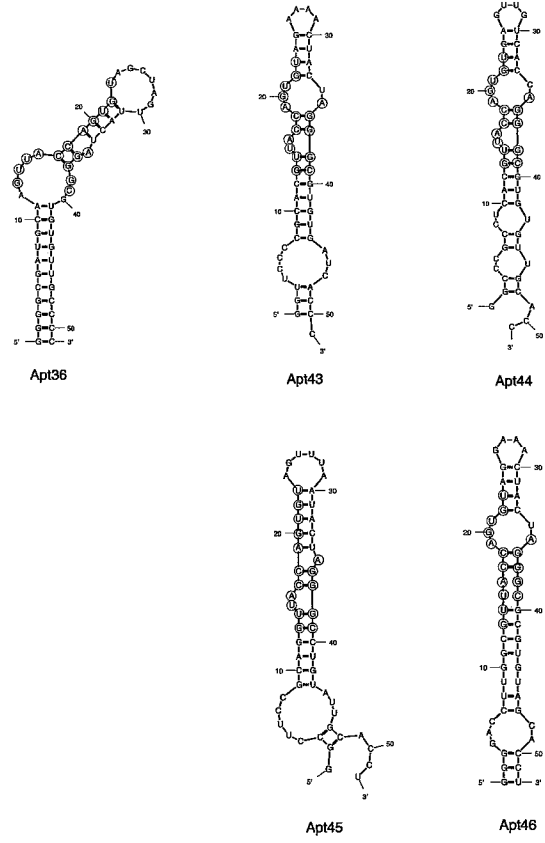
【図2】



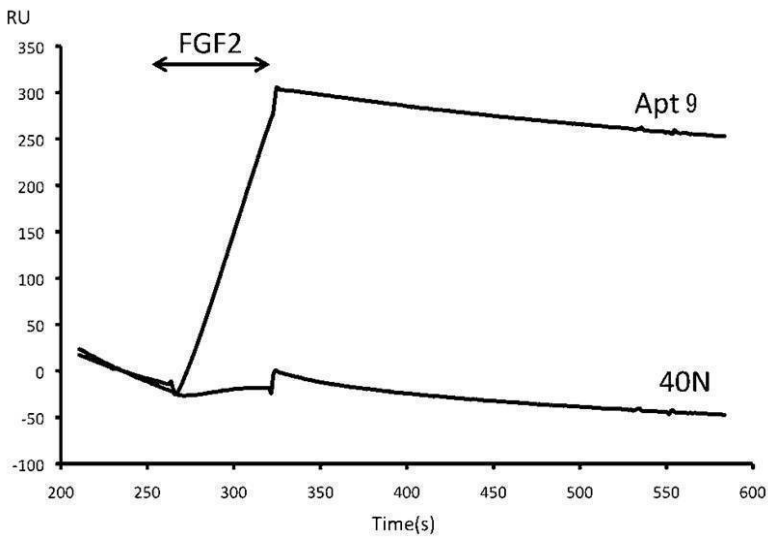
【 図 3 】



【 図 10 】

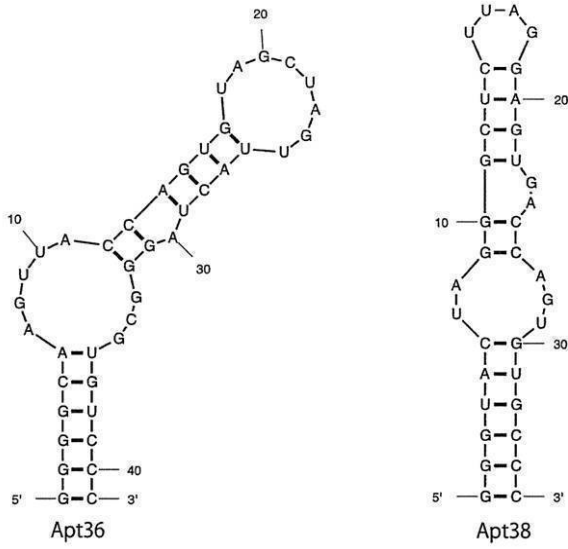


【 図 4 】

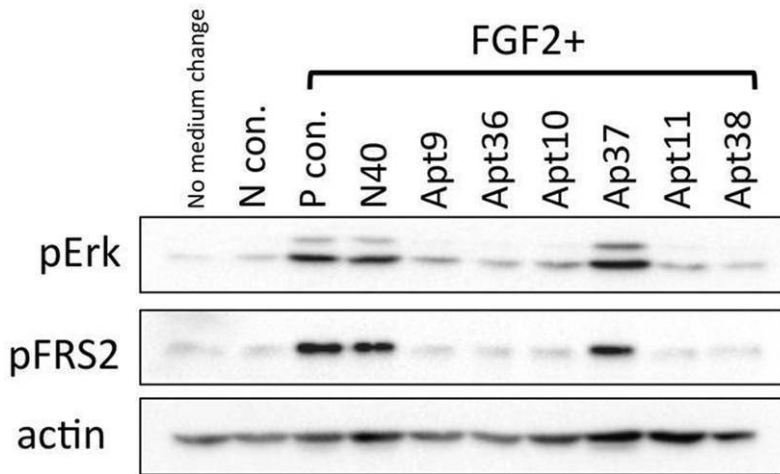




【 図 8 】



【 図 9 】



【 配列表 】

[2011099576000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/052925

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N15/09(2006.01)i, A61K31/712(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P19/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, C12N15/115(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, A61K31/712, A61P9/00, A61P19/00, A61P29/00, A61P35/00, A61P37/06, A61P37/08, C12N15/115, C12Q1/68  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), WPI		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
<b>Category*</b>	<b>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</b>	<b>Relevant to claim No.</b>
X/Y	JP 2008-206524 A (Gilead Sciences, Inc.), 11 September 2008 (11.09.2008), claims 66 to 83; paragraphs [0050], [0090], [0174], [0232] to [0251]; fig. 37 & EP 1683871 A2 & US 2002/0172962 A1 & US 2004/0241731 A1	1-4, 6, 8, 10, 12, 15-21/5, 7, 9, 11, 13, 14
Y	KEEFE, A.D., CLOAD, S.T., SELEX with modified nucleotides., Curr. Opin. Chem. Biol., 2008.08, Vol.12 No.4, pages 448-456, entire text	5, 7, 9, 11, 13, 14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 01 April, 2011 (01.04.11)		Date of mailing of the international search report 12 April, 2011 (12.04.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/052925									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))											
Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K31/712(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P19/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, C12N15/115(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i											
B. 調査を行った分野											
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))											
Int.Cl. C12N15/09, A61K31/712, A61P9/00, A61P19/00, A61P29/00, A61P35/00, A61P37/06, A61P37/08, C12N15/115, C12Q1/68											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの											
<table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2011年	日本国実用新案登録公報	1996-2011年	日本国登録実用新案公報	1994-2011年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2011年										
日本国実用新案登録公報	1996-2011年										
日本国登録実用新案公報	1994-2011年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)											
CA/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), WPI											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X/Y	JP 2008-206524 A (ギリード・サイエンシズ・インコーポレーテッド) 2008.09.11, 請求項 66-83, 段落[0050], [0090], [174], [0232]-[0251], 図 37 & EP 1683871 A2 & US 2002/0172962 A1 & US 2004/0241731 A1	1-4, 6, 8, 10, 12, 15-21/5, 7, 9, 11, 13, 14									
Y	KEEFE, A. D., CLOAD, S. T., SELEX with modified nucleotides., Curr. Opin. Chem. Biol., 2008.08, Vol.12 No.4, pages 448-456, 全文	5, 7, 9, 11, 13, 14									
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 01.04.2011		国際調査報告の発送日 12.04.2011									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 鶴 剛史	4B 4670								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00
A 6 1 K	31/712	(2006.01)	A 6 1 K	31/712
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53
				D

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

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 中村 義一

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 石黒 亮

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 坂本 真衣子

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA11 HA11 HA17

4B063 QA01 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR48 QR72

QR77 QS32 QX01

4C086 AA01 AA02 EA16 NA14 ZA36 ZA96 ZB08 ZB11 ZB13 ZB26

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	适合FGF2的适体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2011099576A1</a>	公开(公告)日	2013-06-17
申请号	JP2011553898	申请日	2011-02-10
[标]申请(专利权)人(译)	力博美科股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	株式会社リボミック		
[标]发明人	中村 義一 石黒 亮 坂本 真衣子		
发明人	中村 義一 石黒 亮 坂本 真衣子		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/115 C12Q1/68 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P29/00 A61P9/00 A61P19/00 A61K31/712 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/7105 A61K31/712 A61P19/00 A61P29/00 C12N15/115 C12N2310/16 C12N2310/322 C12N2310/344		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.H C12Q1/68.A A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P29/00 A61P9/00 A61P19/00 A61K31/712 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS32 4B063/QX01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA36 4C086/ZA96 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB26		
代理人(译)	高岛 肇 山本 健二 当麻 博文		
优先权	2010029377 2010-02-12 JP		
其他公开文献	JP5899550B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

对FGF2具有抑制活性的适体；含有对FGF2具有结合活性或抑制活性的适体与功能性物质（例如，亲和性物质，标记物质，酶，药物输送媒介物或药物）的复合物；本发明提供包含具有结合活性或抑制活性的适体的药物，诊断剂，标记剂等，或包含适体和功能性物质的复合物。

