

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4413428号
(P4413428)

(45) 発行日 平成22年2月10日(2010.2.10)

(24) 登録日 平成21年11月27日(2009.11.27)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A
A 61 K 31/7088 (2006.01)	A 61 K 31/7088
A 61 K 47/48 (2006.01)	A 61 K 47/48
A 61 K 49/00 (2006.01)	A 61 K 49/00 A
A 61 P 9/00 (2006.01)	A 61 P 9/00

請求項の数 31 (全 148 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-539042 (P2000-539042)
(86) (22) 出願日	平成10年4月29日(1998.4.29)
(65) 公表番号	特表2002-508387 (P2002-508387A)
(43) 公表日	平成14年3月19日(2002.3.19)
(86) 國際出願番号	PCT/US1998/009050
(87) 國際公開番号	W01999/031119
(87) 國際公開日	平成11年6月24日(1999.6.24)
審査請求日	平成16年11月25日(2004.11.25)
(31) 優先権主張番号	08/991,743
(32) 優先日	平成9年12月16日(1997.12.16)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	597036237 ネクスター ファーマスティカルズ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国80301 コロラド州, ボルダー, スウィート 200, ウィルダーネス プレース 2860
(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(74) 代理人	100071124 弁理士 今井 庄亮
(74) 代理人	100076691 弁理士 増井 忠式
(74) 代理人	100075236 弁理士 栗田 忠彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板由来増殖因子(PDG F)核酸リガンド複合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の配列 :

【化 1】

- (i) C₁A₂G₃G₄C₅U₆A₇C₈G₉
- (ii) C₉G₈T₇A₆G₅AGC₁₀U₁₁C₁₂A₁₃
- (iii) T₁₃G₁₂A₁₁T₁₀C₄C₃U₂G₁

10

(ここで、C₁-G₁, A₂-U₂, G₃-C₃, G₄-C₄, C₅-G₅, U₆-A₆, A₇-T₇, C₈-G₈, G₉-C₉, T₁₀-A₁₀, A₁₁-U₁₁, G₁₂-C₁₂, T₁₃-A₁₃は塩基対であり；

また、A,C,G,T=deoxy-A,C,G,T; A_nG=2'-OMe-A,G; およびC,U=2'-F-C,U; であり、かつ

配列(i), (ii)と(iii)の間の該塩基対によって3方向ヘリックス連結部の二次構造モチーフが形成される)

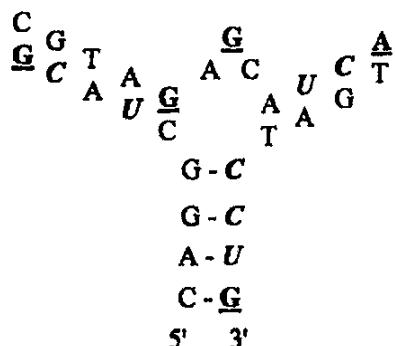
を含む、PDGFに特異的に結合する核酸リガンド。

20

【請求項 2】

以下の配列：

【化 2】

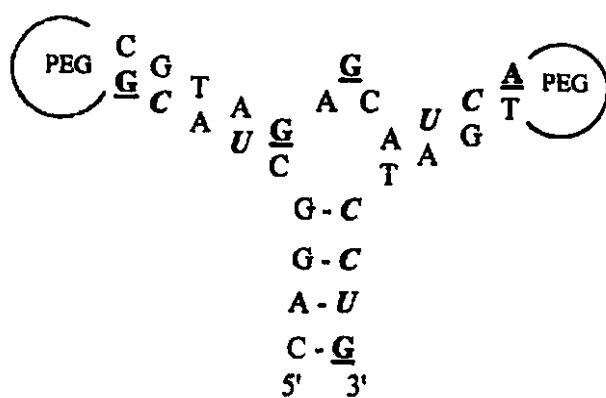
(ここで A,C,G,T = deoxy-A,C,G,T; **A**, **G** = 2'-OMe-A, G; and **C**, **U** = 2'-F-C, Uである)

を含む、P D G F に特異的に結合する核酸リガンド。

【請求項 3】

3 方向ヘリックスが以下の構造：

【化 3】



(ここで P E G はポリエチレングリコールである)

をもつ請求項 2 の核酸リガンド。

【請求項 4】

P E G がヘキサエチレングリコールである請求項 3 の核酸リガンド。

【請求項 5】

3' 逆方向 T をさらに含む請求項 4 の核酸リガンド。

【請求項 6】

請求項 1 - 5 のいずれかに記載の P D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物を含む複合体。

【請求項 7】

さらに、前記リガンドおよび前記非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物の間にリンカーを含む、請求項 6 の複合体。

【請求項 8】

前記リガンドがリンカーを含む、請求項 6 の複合体。

【請求項 9】

前記非免疫原性高分子量化合物がポリアルキレングリコールである、請求項 6 の複合体。

【請求項 10】

前記ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである、請求項 9 の複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記ポリエチレングリコールが 10 - 80 K の間の分子量を有する、請求項 1 0 の複合体。

【請求項 1 2】

前記ポリエチレングリコールが 20 - 45 K の間の分子量を有する、請求項 1 1 の複合体。

【請求項 1 3】

請求項 1 - 5 のいずれかに記載の P D G F 核酸リガンドを非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物と結合させる、ことを含む請求項 6 の複合体の調整方法。

【請求項 1 4】

前記複合体が、さらに脂質構築物に結合している、請求項 1 3 の方法。

【請求項 1 5】

前記脂質構築物がリポソームである、請求項 1 4 の方法。

【請求項 1 6】

前記複合体が P D G F 核酸リガンドおよび親油性化合物を含み、そして前記複合体が：
a) リポソームを形成し；そして

b) 核酸リガンドおよび親油性化合物を含む前記複合体を、段階 a) のリポソームと混合する、これにより前記複合体の核酸リガンド構成要素がリポソームの二重層と結合し、そして脂質二重層の外側から突出する

段階を含む方法により、前記リポソームの二重層と受動的に結合している、請求項 1 5 の方法。

【請求項 1 7】

前記複合体が、さらに前記リガンドおよび前記親油性化合物の間にリンカーを含む、請求項 1 6 の方法。

【請求項 1 8】

前記リガンドがさらにリンカーを含む、請求項 1 6 の方法。

【請求項 1 9】

哺乳動物およびヒトにおける P D G F 仲介疾患または医学症状の治療用医薬組成物の製造のための、請求項 6 - 1 2 のいずれかに記載の複合体の使用。

【請求項 2 0】

哺乳動物およびヒトにおける前記リガンドの薬物動態学的特性を改良するための医薬組成物の製造のための、請求項 6 - 1 2 のいずれかに記載の複合体の使用。

【請求項 2 1】

哺乳動物およびヒトにおける特定のあらかじめ決定された生物学的標的に、療法用または診断用剤を標的化するための医薬組成物の製造のための、療法用または診断用剤をさらに含む請求項 6 - 1 2 のいずれかに記載の複合体の使用。

【請求項 2 2】

哺乳動物およびヒトにおける P D G F 仲介血管形成を阻害するための医薬組成物の製造のための、請求項 6 - 1 2 のいずれかに記載の複合体の使用。

【請求項 2 3】

哺乳動物およびヒトにおける腫瘍増殖を阻害するための医薬組成物の製造のための、請求項 6 - 1 2 のいずれかに記載の複合体の使用。

【請求項 2 4】

前記腫瘍あるいは前記腫瘍の周囲の細胞または組織が P D G F または P D G F 受容体を発現している、請求項 2 3 に記載の使用。

【請求項 2 5】

哺乳動物およびヒトにおける線維症を阻害するための医薬組成物の製造のための、請求項 6 - 1 2 のいずれかに記載の複合体の使用。

【請求項 2 6】

前記線維症が腎臓線維症、肺線維症、骨髄線維症および放射線治療関連線維症からなる

10

20

30

40

50

群から選択される、請求項 25 の使用。

【請求項 27】

哺乳動物およびヒトにおける再狭窄を阻害するための医薬組成物の製造のための、請求項 6-12 のいずれかに記載の複合体の使用。

【請求項 28】

前記再狭窄がイン・ステント (in-stent) 再狭窄、冠動脈再狭窄および非冠動脈再狭窄からなる群から選択される、請求項 27 の使用。

【請求項 29】

薬学的有効量の請求項 6-12 のいずれかに記載の複合体を活性成分として含む、P D G F 仲介疾患または医学症状の治療用医薬組成物。

10

【請求項 30】

P D G F 仲介疾患または医学症状が腫瘍、線維症、再狭窄および P D G F 仲介血管形成からなる群から選択される、請求項 29 の医薬組成物。

【請求項 31】

療法用または診断用剤をさらに含む請求項 29 の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本明細書に記載されるのは、血小板由来増殖因子 (P D G F) に対する、高親和性 s s D N A および R N A リガンドである。こうした核酸リガンドを同定するために本発明で利用される方法は S E L E X と呼ばれる。これは S y s t e m a t i c E v o l u t i o n

20

o f L i g a n d s b y E x p o n e n t i a l e n r i c h m e n t (指数的濃縮による体系的リガンド展開) の頭字語である。本発明にさらに含まれるのは、S E L E X 方法論により P D G F 核酸リガンドを同定し、そして該 P D G F 核酸リガンドを非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物と共有結合させることにより、P D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物を含む療法用または診断用複合体を調製するための方法である。本発明はさらに、1つまたはそれ以上の P D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物を含む複合体を含む。本発明はさらに、P D G F 核酸リガンドを非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物と共有結合させ複合体を形成することにより、P D G F 核酸リガンドの薬剤動態学的特性を改良することに関する。本発明はさらに、P D G F 核酸リガンドを含む脂質構築物 (L i p i d C o n s t r u c t) 、または P D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体を含む脂質構築物を使用することにより、P D G F 核酸リガンドの薬剤動態学的特性を改良することに関する。本発明はさらに、療法用または診断用剤を、P D G F 核酸リガンドおよび親油性化合物または非免疫原性高分子量化合物を含む複合体と結合させることにより、P D G F を発現している生物学的標的に療法用または診断用剤に標的化するための方法であって、該複合体がさらに脂質構築物と結合し、そして P D G F 核酸リガンドがさらに該脂質構築物の外側と結合している方法に関する。

30

発明の背景

40

A . S E L E X 法

核酸は主に情報の役割をもつというのが長年の定説であった。S E L E X と呼ばれる、指数的濃縮による体系的リガンド展開として知られる方法によって、核酸はタンパク質と異なる三次元構造多様性を有することが明らかになってきている。S E L E X は高い特異性で標的分子に結合する核酸分子を i n v i t r o 展開する方法であり、そして 1990 年 6 月 11 日に出願され、現在は放棄されている、“ S y s t e m a t i c E v o l u t i o n o f L i g a n d s b y E x p o n e n t i a l E n r i c h m e n t ” と題される米国特許出願第 07 / 536,428 号、1991 年 6 月 10 日に出願された、“ N u c l e i c A c i d L i g a n d s ” と題される米国特許出願第 07 / 714,131 号、現在は米国特許第 5,475,096 号、1992 年 8 月 17 日に出

50

願された、“Methods for Identifying Nucleic Acid Ligands”と題される米国特許出願第07/931,473号、現在は米国特許第5,270,163号(WO91/19813も参照されたい)に記載されており、これらはそれぞれ特に本明細書に援用される。これらの各特許出願を、本明細書においてはまとめてSELLEX特許出願と呼ぶ。該SELLEX特許出願には、いかなる望ましい標的分子に対する核酸リガンドも調製するための、基本的には新規な方法が記載されている。SELLEX法は、核酸リガンドと呼ばれる一群の産物を提供する。これらのリガンドはそれぞれ特有な配列を有し、そして望ましい標的化合物または分子に特異的に結合する特性を有する。SELLEXにより同定された核酸リガンドはそれぞれ、既定の標的化合物または分子に特異的なリガンドである。SELLEXは、核酸が、モノマーであってもポリマーであっても、実質的にいかなる化学物質にもリガンドとして作用する(特異的結合対を形成する)のに十分な多様な二次元および三次元構造の形成能、ならびにそれに十分な化学的多能性をそれらのモノマー内に有するという、特有な洞察に基づく。いかなるサイズまたは組成の分子も、標的とすることが可能である。

【0002】

SELLEX法は、候補オリゴヌクレオチド混合物からの選択、ならびに同じ一般的選択方式を用いた結合、分配、および増幅の段階的反復を行って、実質的にいかなる望ましい基準の結合親和性および選択性も達成するものである。SELLEX法は、好ましくはランダム配列の部分を含む核酸混合物から出発し、結合に好ましい条件下で該混合物を標的と接触させ、標的分子に特異的に結合している核酸から未結合核酸を分配し、該核酸-標的複合体を解離させ、核酸-標的複合体から解離した核酸を増幅し、核酸のリガンド濃縮混合物を得て、次いで結合、分配、解離および増幅の各段階を望ましいサイクル数で再反復して、標的分子に対し特異性の高い高親和性核酸リガンドを得る段階を含む。

【0003】

SELLEX法は、核酸が化学物質として広範な形状、サイズおよび立体配置のアレイを形成することが可能であり、そして生物学的系において核酸が示すよりはるかに広いレパートリーの結合その他の機能を示しうることを証明することを、本発明者は認識してきた。

【0004】

本発明者らは、いかなる既定の標的に対しても核酸リガンドを同定しうるものと類似の様式で、SELLEXまたはSELLEX様方法を利用していかなる選択された反応も促進しうる核酸を同定することが可能であることを認識してきた。理論的には、核酸約 10^{13} ないし 10^{18} の候補混合物内に、多様な物理的および化学的相互作用のそれぞれを促進するのに適した形状をもつ核酸が少なくとも1つ存在すると本発明者らは仮定する。

【0005】

多数の特定の目的を達成するように、基本的SELLEX法が変更されている。例えば1992年10月14日に出願された、“Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure”と題される米国特許出願第07/960,093号は、SELLEXをゲル電気泳動と併用し、特定の構造特性をもつ核酸分子、例えば折れ曲がりDNAを選択することを記載する。1993年9月17日に出願された、“Photoselection of Nucleic Acid Ligands”と題される米国特許出願第08/123,935号は、SELLEXに基づく方法であって、標的分子に結合および/または光架橋し、ならびに/あるいはそれらの分子を光不活性化しうる光反応性基を含む核酸リガンドを選択するための方法を記載する。1993年10月7日に出願された、“High-Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine”と題される米国特許出願第08/134,028号は、現在は米国特許第5,580,737号である米国特許出願第08/443,957号に有利になるよう放棄されたが、非ペプチド性であってもよい非常に近縁な分子間を識別しうる高特異性核酸リガンドを同定するための、対抗SELLEX(Counter-SELLEX)と呼ばれる方法を記載する。1993

10

20

30

40

50

年10月25日に出願された、“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Solution SELEX”と題される米国特許出願第08/143,564号は、現在は米国特許第5,567,588号である米国特許出願第08/461,069号に有利になるよう放棄されたが、標的分子に対し高い親和性をもつオリゴヌクレオチドと低い親和性をもつものとを高い効率で分配しうる、SELEXに基づく方法を記載する。

【0006】

SELEX法は、例えば改良された *in vivo* 安定性または改良された搬送特性などの改良された特性をリガンドに与える修飾ヌクレオチドを含む、高親和性核酸リガンドの同定を含む。こうした修飾の例には、リボースおよび／またはリン酸および／または塩基の位置での化学的置換が含まれる。SELEXにより同定された、修飾ヌクレオチドを含む核酸リガンドは、1993年9月8日に出願された、“High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides”と題される米国特許出願第08/117,991号であるが、現在は米国特許第5,660,985号である米国特許出願第08/430,709号に有利になるよう放棄された出願に記載されており、そこにはピリミジン類の5-および2'-位が化学的に修飾されたヌクレオチド誘導体を含む、オリゴヌクレオチドが記載されている。前掲の米国特許出願第08/134,028号は、2'-アミノ(2'-NH₂)、2'-フルオロ(2'-F)、および／または2'-O-メチル(2'-OMe)で修飾された1つまたはそれ以上のヌクレオチドを含む、高特異性核酸リガンドが記載されている。1994年6月22日に出願された、“Novel Method of Preparation of Known and Novel 2'-Modified Nucleosides by Intramolecular Nucleophilic Displacement”と題される米国特許出願第08/264,029号は、種々の2'-修飾ピリミジンを含むオリゴヌクレオチドを記載する。

【0007】

SELEX法は、選択したオリゴヌクレオチドを、他の選択したオリゴヌクレオチドおよび非オリゴヌクレオチド官能性単位と組み合わせることを含む。これらはそれぞれ1994年8月2日に出願された、“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chimeric SELEX”と題される米国特許出願第08/284,063号、現在は米国特許第5,637,459号、および1994年4月28日に出願された、“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Blended SELEX”と題される米国特許出願第08/234,997号、現在は米国特許第5,683,867号に記載されている。これらの特許出願により、オリゴヌクレオチドの広範な形状およびその他の特性のアレイならびに効率的な増幅特性および複製特性を、他の分子の望ましい特性と組み合わせることが可能になる。

【0008】

SELEX法はさらに、選択した核酸リガンドと親油性化合物または非免疫原性高分子量化合物とを組み合わせて、診断用または療法用複合体にすることを包含する。これは1995年5月4日に出願された、“Nucleic Acid Ligand Complexes”と題される米国特許出願第08/434,465号に記載されている。診断用または療法用複合体において、親油性化合物、例えばジアシルグリセロールまたはジアルキルグリセロールと結合しているVEGF核酸リガンドは、1996年10月25日に出願された、“Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Nucleic Acid Ligand Complexes”と題される米国特許出願第08/739,109号に記載されている。グリセロール脂質などの親油性化合物、またはポリエチレングリコールなどの非免疫原性高分子量化合物と結合しているVEGF核酸リガンドは、1997年7月21日に出願された、“Vascular

10

20

30

40

50

r Endothelial Growth Factor (VEGF) Nucleic Acid Ligand Complexes”と題される米国特許出願第08/897,351号にさらに記載されている。非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物と結合しているVEGF核酸リガンドはまた、1997年10月17日に出願された、“Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Nucleic Acid Ligand Complexes”と題されるPCT/US97/18944にもさらに記載される。基本的SELLEX法の修飾につき記載した上記特許出願それは、全体として特に本明細書に援用される。

B. 脂質構築物

脂質二重層小胞は、主に極性（親水性）部分と非極性（親油性）部分を有する個々の分子から形成される、閉じた、流体に満たされた顕微鏡的球体である。親水性部分はホスファト、グリセリルホスファト、カルボキシ、スルファト、アミノ、ヒドロキシ、コリンまたはその他の極性基を含みうる。親油性基の例は、飽和または不飽和炭化水素、例えばアルキル、アルケニルまたは他の脂質基である。小胞の安定性を改良するために、または他の望ましい特性を付与するために、ステロール類（例えばコレステロール）および他の薬学的に許容しうる佐剤（adjuvant）（アルファ-トコフェロールのような酸化防止剤を含む）もまた、含有されてもよい。

【0009】

リポソームはこれらの二重層小胞の集合体であり、主に、脂肪酸鎖からなる2つの疎水性テイルを含むリン脂質分子を含む。これらの分子は水に曝露されると自発的に整列し、各層の分子の親油性末端が膜の中心で結合し、対向する極性末端が二重膜の内面と外面をそれぞれ形成した、球状二重膜を形成する。したがって膜のそれぞれの側は親水性表面となり、一方、膜の内部は親油性媒質を含む。これらの膜を、内部水性空間の周りにタマネギの層と似た様式で薄い水の層で分離された一連の同心球状膜として配置させることができる。これらの多重膜小胞（MLV）に剪断力を適用して、小さな小胞、または単膜小胞（UV）に変換することが可能である。

【0010】

療法用としてのリポソームの使用には、遊離の形では通常は有毒である薬剤の搬送が含まれる。リポソームの形で有毒薬剤を密閉し、そして該薬剤に対し感受性である組織から逸らし、そして選択した領域に標的化することが可能である。リポソームはまた、長期間にわたって薬剤を放出させる療法に使用することも可能であり、これにより投与回数を減らすことが可能である。さらにリポソームは、通常は静脈内搬送に適さない疎水性または両親媒性薬剤の水性分散液の調製方法を提供することが可能である。

【0011】

多くの薬剤および造影剤は、療法能または診断能を持つためには体内の適正な位置へ搬送されることが必要であり、そしてしたがって、リポソームを容易に注入し、そして特定の細胞種または身体部分へ持続放出および薬剤搬送するための基礎を形成することが可能である。被包（encapsulated）薬剤を、感受性組織から逸らし、選択した宿主の組織に標的化するためにリポソームを使用するには、幾つかの技術を採用してもよい。これらの技術には、リポソームのサイズ、それらの正味表面電荷、およびそれらの投与経路を操作することが含まれる。MLVは、主として比較的大型であるという理由で、通常は細網内皮系（原則として肝臓および脾臓）によって速やかに取り込まれる。これに対しUVは、MLVと比べて長い循環時間、低いクリアランス速度、および広い生体内分布を示すことが認められてきている。

【0012】

リポソームの受動搬送には、種々の投与経路、例えば静脈内、皮下、筋内および局所の使用を伴う。各投与経路により、リポソーム局在性の違いが生じる。選択した標的領域へリポソームを能動的に向けるために用いる2つの一般的な方法は、リポソームの表面に抗体または特異的受容体リガンドを付着させることを伴う。抗体はそれらの対応する抗原に対し高い特異性をもつことが知られており、そしてリポソームの表面に付着されたが、多くの

10

20

30

40

50

場合、結果は成功とはいえたかった。しかし抗体を用いずに腫瘍にリポソームを標的化する幾つかの試みが成功した。例えば米国特許第5,019,369号、米国特許第5,441,745号、または米国特許第5,435,989号を参照されたい。

【0013】

研究者らが積極的に追求している開発分野は、特定の細胞種のみでなく、細胞の細胞質中へ、そしてさらには核中へ薬剤を搬送することである。これは、DNA、RNA、リボザイムおよびタンパク質など、生物学的剤の搬送に特に重要である。この分野の有望な療法の試みは、アンチセンスDNAおよびRNAオリゴヌクレオチドを疾患の治療に用いるものである。しかしアンチセンス技術の有効適用に際し生じる重大な問題のひとつは、ホスホジエステル型のオリゴヌクレオチドが標的細胞に達する前に、体液中で、そして細胞内および細胞外酵素、例えばエンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼにより、速やかに分解されることである。静脈内投与によっても腎臓により血流から速やかにクリアランスされ、そして有効な細胞内薬剤濃度を生じるのには取り込みが不十分である。リポソーム被包は分解酵素からオリゴヌクレオチドを保護し、循環半減期を延長し、そしてリポソームの食作用の結果、取り込み効率を高める。このように、オリゴヌクレオチドを *in vivo* でそれらの望ましい標的に到達させ、そして細胞に搬送することが可能である。

【0014】

研究者らがアンチセンスオリゴヌクレオチドを親油性化合物または非免疫原性高分子量化合物に付着させた数例が報告されている。しかしアンチセンスオリゴヌクレオチドは細胞内剤として有効であるにすぎない。上皮増殖因子(EGF)受容体を標的とするアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドは、ポリエチレングリコールスペーサーを介し葉酸に結合させたリポソーム(葉酸-PEG-リポソーム)に被包され、そして葉酸受容体仲介エンドサイトーシスにより培養KB細胞中へ搬送されている(Wangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 3318 - 3322)。さらに、アルキレンジオールがオリゴヌクレオチドに結合されている(Weissら、米国特許第5,245,022号)。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドに共有結合させた親油性化合物が文献に示されている(EP 462 145 B1)。

【0015】

リポソームへの生物学的剤の装填は、脂質処方への含有またはあらかじめ形成したリポソームへの装填により達成してもよい。オリゴペプチドおよびオリゴ糖リガンドをリポソームの外面に受動的にアンカリング(anchoring)させることが記載されている(Zalipskyら(1997) Bioconjug. Chem. 8: 111: 118)。

C. PDGF

血小板由来増殖因子(PDGF)は、元来、血小板溶解物から単離され、そして血清に存在するが血漿には存在しない主要な増殖促進活性として同定された。2つの相同なPDGFアイソフォーム、PDGF AおよびBが同定されてきており、これらは別個の遺伝子(染色体7上および22上)にコードされる。血小板由来の最も豊富な種は、ABヘテロ二量体であるが、発生しうる3つの二量体(AA、ABおよびBB)はすべて、天然に発生する。翻訳に続き、PDGF二量体は~30 kDaの分泌タンパク質にプロセシングされる。高い親和性でPDGFに結合する2つの細胞表面タンパク質、およびが同定されてきている(Heldinら(1981) Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 3664; Williamsら(1981) Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 5867)。両種とも、5つの免疫グロブリン様細胞外ドメイン、单一の膜貫通ドメイン、およびキナーゼ挿入ドメインにより分離されている細胞内チロシンキナーゼドメインを含む。機能する高親和性受容体は二量体であり、そして該受容体の細胞外ドメインをPDGFが占めると、いくつかのチロシン残基の交差リン酸化(1つの受容体チロシンキナーゼが二量体のもう一方をリン酸化する)が生じる。受容体リン酸化により、核への分裂促進性または走化性情報伝達を生じる事象のカスケードが導かれる。例えば、PDGF受容体の細胞内ドメインにおける9つのチロシン残基は、リ

10

20

30

40

50

ン酸化された際、ホスホリパーゼC-g、ホスファチジルイノシトール3'-キナーゼ、GTPアーゼ活性化タンパク質およびいくつかのアダプター分子、例えばShc、Grb2およびNckを含む、異なるsrc相同性2(SH2)ドメイン含有タンパク質と相互作用すると同定されてきている(Heldin(1995)Cell 80:213)。ここ数年で、3つの受容体二量体(　　、　　、および　　)に対する3つのPDGFアイソフォームの特異性が解明されてきている。受容体ホモ二量体は、高い親和性で3つのPDGFアイソフォームすべてと結合し、受容体ホモ二量体は、PDGF-BBにのみ高い親和性で結合し、そしてPDGF-ABにはおよそ10倍低い親和性で結合し、そして受容体ヘテロ二量体は、PDGF-BBおよびPDGF-ABと高い親和性で結合する(WestermarkおよびHeldin(1993)Acta Oncologica 32:101)。この特異性パターンは、A鎖が受容体にのみ結合し、そしてB鎖が高い親和性でおよび受容体サブユニット両方に結合できることから生じる。

【0016】

増殖性疾患、例えば、癌、再狭窄、線維症、血管形成、および創傷治癒などにおけるPDGFの役割が確立されてきている。

【0017】

癌におけるPDGF

PDGF発現が悪性トランスフォーメーションに関連しているという最初の暗示は、PDGF-B鎖のアミノ酸配列が、サル肉腫ウイルス(simian sarcoma virus)(SSV)のトランスフォーミングタンパク質であるp28^{sis}のものと実質的に同一であるという発見に由来した(Waterfieldら(1983)Nature 304:35; Johnssonら(1984)EMBO J. 3:921)。PDGF-B鎖遺伝子のトランスフォーミング能および、それより低い度合いであるがPDGF-A遺伝子のトランスフォーミング能が、その後まもなく立証された(Clarkら(1984)Nature 308:464; Gazitら(1984)Cell 39:89; Beckmannら, Science 241:1346; Bywaterら(1998)Mol. Cell. Biol. 8:2753)。それ以来、多くの腫瘍細胞株がPDGFを産生しそして分泌し、そのうちいくつかはまた、PDGF受容体も発現していることが示されてきている(Rainesら(1990)Peptide Growth Factors and Their Receptors中, Springer-Verlag,第一部, p173)。したがって、PDGFによりパラクリン、そしていくつかの細胞株においてはオートクリン増殖刺激されている可能性がある。例えば、ヒト神経膠腫由来の生検の解析により、2つのオートクリンループの存在が明らかになってきていている：腫瘍関連内皮細胞におけるPDGF-B/受容体ループおよび腫瘍細胞におけるPDGF-A/受容体ループである(Hermannssonら(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7748; Hermanssonら(1992)Cancer Res. 52:3213)。高度の神経膠腫の進行には、腫瘍関連内皮細胞におけるPDGF-Bおよび受容体、および神経膠腫細胞におけるPDGF-Aの発現増加が伴う。したがって、PDGF過剰発現は、腫瘍細胞を直接刺激することにより、または腫瘍関連ストローマ細胞(例えば内皮細胞)を刺激することにより、腫瘍増殖を促進する可能性がある。内皮細胞の増殖は、血管形成の特徴である。PDGFおよび/またはPDGF受容体の発現増加はまた、線維肉腫(Smitsら(1992)Am. J. Pathol. 140:639)および甲状腺癌(Heldinら(1991)Endocrinology 129:2187)を含む、他の悪性疾患でも観察されている。

【0018】

心臓血管疾患におけるPDGF

経皮経管冠動脈形成術(PTCA)は、1つまたは2つの冠動脈を含む閉塞性冠動脈疾患(CAD)の最も一般的な治療となってきた。米国のみで、年間約500,000の処置がなされ、2000年までに700,000を超える処置が計画され、そして世界的

10

20

30

40

50

にはこれらの2倍の量がなされている。PTCAは、冠動脈内部の操作を伴う一方、心臓の外科的介入とは見なされていない。最も一般的なPTCA処置においては、バルーンカテーテルを大腿動脈を通して入れ、そして閉塞した冠動脈の斑(plateau)がある部分に配置し；配置したら直ちにバルーンを高圧で膨らませ、斑に圧を加え、そして血管腔を増加させる。不運なことに、30-50%のPTCA処置で、罹患した血管壁での細胞事象のため、数週間または数か月の期間にわたり、再閉塞が次第に発展する。ひとたび、再閉塞が、元来の血管腔の50%またはそれ以上の減少を達成したなら、血管において臨床的再狭窄が確立される。

【0019】

冠動脈形成術がバイパス手術より侵襲性の低い代替法として人気が増加していることを考慮すると、再狭窄は、深刻な医学的问题である。平滑筋細胞(SMC)は再狭窄損傷の主要な構成要素を代表する。未損傷動脈において、SMCは、主に中間の血管層(中膜)に位置する。内側の層(内膜)から内皮細胞を除く、バルーン損傷に際し、SMCが増殖しそして内膜に移動し、再狭窄損傷に特徴的な新規の内膜肥厚を形成する。血管形成術に続き、再狭窄が起こると、通常、ステント配置を伴うまたは伴わない血管形成術を繰り返すことにより、または血管移植手術(バイパス)により治療する。

10

【0020】

ステントは、堅い筒状のメッシュであり、疾患血管部位にひとたび配置され、そして拡大すると、機械的に拡張血管壁を保持する。ステントは、カテーテルにより配置され、そして、望ましい部位に配置されると、高圧バルーンの膨張により、in situで拡大する。堅くそして非圧縮性であるため、拡張ステントは隣接する非疾患血管と匹敵する血管腔直径を達成し、そして維持する；上層の内膜/中膜に強く押し付けられることにより、血流に反応し血管内を移動することに抵抗する。ステント配置を伴うPTCAは、単独のPTCAと比較されてきており、そして再狭窄を約半数に減らし、そして他の臨床的結果、例えば心筋梗塞(MI)およびバイパス手術の必要性を、有意に改善することが示されている。

20

【0021】

現在、PDGF-B鎖が新規内膜損傷形成の主な貢献因子である、かなりの証拠がある。ラットの再狭窄モデルにおいて、新規内膜肥厚が抗PDGF-B抗体で阻害された(Ferns(1991)Science 253:1129-1132; Rutherfordら(1997)Atherosclerosis 130:45-51)。逆に、PDGF-BBの外因性投与は、SMC移動を促進し、そして新規内膜肥厚増加を引き起こす(Jawiela(1992)J. Clin. Invest. 89:507-511)。SMCに対するPDGF-Bの効果は、バルーン損傷後、これらの細胞で高レベルで発現されるPDGF受容体を通じて仲介される(LindnerおよびReidy(1995)Circulation Res. 76:951-957)。さらに、バルーン損傷後の新規内膜肥厚の度合いは、損傷部位のPDGF受容体の発現レベルに逆に相關していることが見出された(Siroisら(1997)Circulation 95:669-676)。

30

【0022】

米国特許第5,171,217号は、バルーンカテーテル処置、例えば血管形成術と組み合わせ、または該処置の後に、持続放出のため、罹患した壁内部位に薬剤を搬送するための方法および組成物を開示する。薬剤は、PDGFに対する増殖因子受容体アンタゴニストを含む、平滑筋細胞増殖を阻害することが知られる多様な薬剤から選択してもよい。

40

【0023】

米国特許第5,593,974号は、血管障害、例えば血管再狭窄を、アンチセンスオリゴヌクレオチドで治療するための方法を開示する。該方法は、in vivoでアンチセンスオリゴヌクレオチドを特定の部位に限局して適用することに基づく。該オリゴヌクレオチドは、移植植物またはゲルとの混合物中で、標的組織に直接適用しても、あるいは直接注射または注入により適用してもよい。

50

【0024】

米国特許第5,562,922号は、患者に、生物学的に活性がある化合物を限局化搬送するのに適した系を調製するための方法を開示する。該方法は、生物学的に活性がある化合物をポリウレタン被覆全体に浸透させることを可能にするであろう条件下で、ポリウレタン被覆支持体を、被覆増大溶液で処理することに関する。本発明に適した支持体には、とりわけ、金属性ステントが含まれる。本発明に使用するのに適した生物学的に活性がある化合物には、とりわけ、脂質修飾オリゴヌクレオチドが含まれる。

【0025】

Rutherfordら(1997, Atherosclerosis 130:45-51)は、ラット頸動脈におけるバルーン損傷に対する新規内膜反応を、PDGF-BBおよび塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)に対する抗体の組み合わせを用い、実質的に阻害することを報告する。10

【0026】

腎臓疾患におけるPDGF

多様な進行性腎臓疾患は、線維症を導く、糸球体メサンギウム細胞増殖およびマトリックス集積により特徴付けられる(Slomowitzら(1988) New Eng. J. Med. 319:1547-1548)。1)メサンギウム細胞がin vivoでPDGFを産生し、そして多様な増殖因子がオートまたはパラクリンPDGF-B鎖合成の誘導を介し、メサンギウム増殖を誘導し；2)PDGF-B鎖およびその受容体が多く糸球体疾患で過剰発現され；3)PDGF-BBの注入またはPDGF-B鎖cDNAでの糸球体トランスフェクションにより、in vivoで選択的メサンギウム細胞増殖およびマトリックス集積を誘導することが可能であり；そして4)PDGF-B鎖または受容体ノックアウトマウスはメサンギウムを発達させないことから、PDGF-B鎖は、これらの過程の両方を操縦するのに中心的役割を有するようである(FloegelおよびJohnson(1995) Miner. Electrolyte Metab. 21:271-282)。腎臓線維症に貢献するのに加え、PDGFはまた、肺および骨髄などの他の器官での線維症発展にも役割を果たすと考えられており、そして他の疾患と関連する可能性もある(Rainesら(1990) Experimental Pharmacology, Peptide Growth Factors and Their Receptors, SpornおよびRoberts監修, 中, pp. 173-262, Springer, Heidelberg)。20

【0027】

1つの研究は、腎臓疾患におけるPDGF-B鎖阻害の効果を調べている：Johnsonらは、PDGFに対する中和ポリクローナル抗体を用い、実験的膜性増殖性糸球体腎炎においてメサンギウム細胞増殖およびマトリックス集積を減少させることに成功した(Johnsonら(1992) J. Exp. Med. 175:1413-1416)。本モデルにおいて、抗メサンギウム細胞抗体(抗Thy1.1)をラットに注射することにより、メサンギウム細胞の補体依存溶解に続き、ヒト膜性増殖性腎炎に似た修復の行き過ぎ段階を生じた(Floegelら(1993) Kidney Int. Suppl. 39:S47-54)。Johnsonら(Johnsonら(1992) J. Exp. Med. 175:1413-1416)の研究の限界には、多量の異種性IgGを投与する必要性、および異種性IgGが免疫反応を引き出す可能性がある懸念のため、研究期間が4日に限定されたことが含まれた。40

【0028】

PDGFの阻害

増殖因子、例えばPDGFの特異的阻害は、実験および臨床医学の主要な目的となってきた。しかし、本アプローチは、通常、特異的な薬理学的アンタゴニストの欠如により妨げられる。中和抗体はしばしば、in vivoで低い有効性を示し、そして通常免疫原性であるため、利用可能な代替アプローチもまた限定されており、そしてこれによりこれらの目的のためのin vivo遺伝子治療は、まだ初期にある。現在、PDGFに対50

する抗体 (Johnssonら (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1721 - 1725; Fernsら (1991) Science 253: 1129 - 1132; Herrenら (1993) Biochimica et Biophysica Acta 1173: 294 - 302; Rutherfordら (1997) Atherosclerosis 130: 45 - 51) および可溶性 PDGF受容体 (Herrenら (1993) Biochimica et Biophysica Acta 1173: 294 - 302; Duanら (1991) J. Biol. Chem. 266: 413 - 418; Tiesmannら (1993) J. Biol. Chem. 268: 9621 - 9628) は、最も強力でそして特異的な PDGFのアンタゴニストである。PDGFに対する中和抗体は、SSVトランスフォーム表現型を逆転させること (Johnssonら (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1721 - 1725)、および動脈損傷後の新規内膜損傷の発展を阻害すること (Fernsら (1991) Science 253: 1129 - 1132) が示されてきている。他のPDGFの阻害剤、例えばスラミン (Williamsら (1984) J. Biol. Chem. 259: 287 - 5294; Betsholtzら (1984) Cell 39: 447 - 457)、ネオマイシン (Vassbotnら (1992) J. Biol. Chem. 267: 15635 - 15641) およびPDGFアミノ酸配列由来のペプチド (Engstromら (1992) J. Biol. Chem. 267: 16581 - 16587) が報告されてきているが、これらは、優れた薬剤候補になるには、毒性が強すぎるかまたは十分な特異性または効能を欠いている。臨床利用の可能性がある他の種類のアンタゴニストは、PDGF受容体チロシンキナーゼを選択的に阻害する分子である (Buchdungerら (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 2558 - 2562; Kovalenkoら (1994) Cancer Res. 54: 6106 - 6114)。

発明の概要

本発明は、血小板由来増殖因子 (PDGF) および相同タンパク質に対する核酸リガンドを同定しそして產生する方法、ならびにこうして同定されそして產生された核酸リガンドを含む。本適用の目的には、PDGFはPDGF-AA、-AB、および-BBアイソフォームならびに相同タンパク質を指す。特に該定義に含まれるのは、ヒトPDGF-AA、-AB、および-BBアイソフォームである。

【0029】

本明細書に記載されるのは、血小板由来増殖因子 (PDGF) に対する高親和性 s s DNA およびRNAリガンドである。このような核酸リガンドを同定するために本発明で利用される方法は SEL EXと呼ばれる。これは指数的濃縮による体系的リガンド展開の頭字語である。本明細書に含まれるのは、表2 - 3、6 - 7、および9ならびに図1 - 2A、2B、2C、8A、8Bおよび9Aに示される展開されたリガンドである。本発明にさらに含まれるのは、PDGF核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物を含む複合体を調製するための方法であって、(a) 候補核酸混合物をPDGFと接触させ、(b) 前記候補混合物のメンバーをPDGFに対する親和性に基づいて分配し、そして(c) 選択した分子を增幅してPDGFに対する結合に関し比較的高い親和性をもつ核酸配列が濃縮されている核酸混合物を得る方法により、候補核酸混合物から核酸リガンド (核酸がPDGFのリガンドである) を同定し、そして前記の同定したPDGF核酸リガンドを非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物と共有結合させることを含む方法による前記方法である。本発明はさらに、PDGF核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物を含む複合体を含む。

【0030】

本発明はさらに、PDGF核酸リガンドまたは複合体を含む脂質構築物を含む。本発明はさらに、複合体を含む脂質構築物を調製するための方法であって、該複合体がPDGF核酸リガンドおよび親油性化合物を含む方法に関する。

【 0 0 3 1 】

別の態様において本発明は、 P D G F 核酸リガンドを非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物と共有結合させて複合体を形成することにより、 P D G F 核酸リガンドの薬物動態学的特性を改良し、そして該複合体を患者に投与するための方法を提供する。本発明はさらに、該複合体をさらに脂質構築物と結合させることにより、 P D G F 核酸リガンドの薬物動態学的特性を改良するための方法に関する。

【 0 0 3 2 】

本発明の目的は、 1つまたはそれ以上の非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物と結合している1つまたはそれ以上のP D G F 核酸リガンドを含む複合体、および該複合体を産生するための方法を提供することである。本発明のさらなる目的は、複合体を含む脂質構築物を提供することである。本発明のさらなる目的は、改良された薬物動態学的特性を備えた、1つまたはそれ以上の非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物と結合している1つまたはそれ以上のP D G F 核酸リガンドを提供することである。10

【 0 0 3 3 】

P D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物を含む複合体に向けられる本発明の態様において、非免疫原性高分子量化合物はポリアルキレンジリコールであることが好ましく、より好ましくはポリエチレンジリコール(P E G)である。より好ましくは、 P E G は約 10 - 80 K の分子量を有する。最も好ましくは、 P E G は約 20 - 45 K の分子量を有する。 P D G F 核酸リガンドおよび親油性化合物を含む複合体に向けられる本発明の態様において、親油性化合物はグリセロ脂質であることが好ましい。本発明の好ましい態様において、脂質構築物は、好ましくは脂質二重層小胞であり、そして最も好ましくはリポソームである。好ましい態様において、 P D G F 核酸リガンドは S E L E X 法により同定される。20

【 0 0 3 4 】

単数または複数の P D G F 核酸リガンドに共有結合している非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物を含む複合体に向けられる本発明の態様において、単数または複数の P D G F 核酸リガンドは標的化能に作用することが可能である。

【 0 0 3 5 】

さらに P D G F 核酸リガンドは、複合体の一部となることなく、脂質構築物と共有結合または非共有結合相互作用により結合していてもよい。30

【 0 0 3 6 】

さらに、 P D G F 核酸リガンドを含む脂質構築物または非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物 / P D G F 核酸リガンド複合体を含む脂質構築物に向けられる本発明の態様であって、該脂質構築物が内部コンパートメントを定める膜を有するタイプのもの、例えば脂質二重層小胞である場合、脂質構築物と結合している P D G F 核酸リガンドまたは複合体は脂質構築物の膜と結合するか、またはコンパートメント内に被包されていてもよい。 P D G F 核酸リガンドが膜と結合している態様において、 P D G F 核酸リガンドは膜の内側に面した部分または外側に面した部分と結合し、これにより P D G F 核酸リガンドが小胞の内側または外側へ突出していてもよい。特定の態様では、あらかじめ形成した脂質構築物の外側に P D G F 核酸リガンド複合体を受動的に装填することが可能である。核酸リガンドが脂質構築物から突出した態様の場合、 P D G F 核酸リガンドは標的化能に作用することが可能である。40

【 0 0 3 7 】

脂質構築物の P D G F 核酸リガンドが標的化能に作用する態様において、脂質構築物はさらに療法用または診断用薬剤と結合していてもよい。1つの態様において、療法用または診断用剤は脂質構築物の外側に結合している。他の態様において、療法用または診断用剤は脂質構築物に被包されているか、または脂質構築物の内側に結合している。さらに他の態様において、療法用または診断用剤は複合体と結合している。1つの態様において、療法用剤は薬剤である。他の態様において、療法用または診断用剤は1つまたはそれ以上の他の核酸リガンドである。50

【0038】

P D G F 仲介疾患を阻害するための方法を提供するのが、本発明のさらなる目的である。P D G F 仲介疾患には、限定されるわけではないが、癌、血管形成、再狭窄、および線維症が含まれる。したがって、P D G F 核酸リガンド、またはP D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体、または本発明の複合体を含む脂質構築物を投与することにより、血管形成を阻害するための方法を提供することが、本発明のさらなる目的である。本発明の他の目的は、P D G F 核酸リガンド、またはP D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体、または本発明の複合体を含む脂質構築物を投与することにより、腫瘍増殖を阻害するための方法を提供することである。本発明のさらに他の目的は、P D G F 核酸リガンド、またはP D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体、または本発明の複合体を含む脂質構築物を投与することにより、線維症を阻害する方法を提供することである。本発明のさらに他の目的は、P D G F 核酸リガンド、またはP D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体、または本発明の複合体を含む脂質構築物を投与することにより、再狭窄を阻害する方法を提供することである。10

【0039】

本発明のさらなる目的は、療法用または診断用剤を、P D G F 核酸リガンドおよび親油性化合物または非免疫原性高分子量化合物を含む複合体と結合させることにより、P D G F を発現している生物学的標的に療法用または診断用剤を標的化する方法であって、該複合体がさらに脂質構築物と結合し、そしてP D G F 核酸リガンドがさらに該脂質構築物の外側と結合している方法を提供することである。20

【0040】

これらおよび他の本発明の目的、ならびに本発明の性質、範囲および有用性は、以下の記載および付随する請求項の記載から当業者に明らかになるであろう。

発明の詳細な説明

定義：

“共有結合”は、電子の共有により形成される化学結合である。

【0041】

“非共有結合相互作用”は、分子実体が共有結合以外の、イオン性相互作用および水素結合を含めた相互作用により互いに保持される手段である。30

【0042】

“親油性化合物”は、脂質および／または誘電率の低い他の物質もしくは相と結合するか、またはそれらに分配される傾向を有する化合物であり、実質的に親油性構成要素を含む構造体がこれに含まれる。親油性化合物には、脂質と共に、脂質（および／または誘電率の低い他の物質もしくは相）と結合する傾向を有する脂質非含有化合物が含まれる。コレステロール、リン脂質、ならびにグリセロ脂質、例えばジアルキルグリセロールおよびジアシルグリセロール、ならびにグリセロールアミド脂質は、親油性化合物のさらなる例である。

【0043】

本明細書において“複合体”は、P D G F 核酸リガンドを非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物に共有結合させることにより形成される分子実体を表す。本発明の特定の態様において、複合体はA - B - Yとして示され、ここでAは本明細書に記載される親油性化合物または非免疫原性高分子量化合物であり；Bは所望により、そして1つまたはそれ以上のリンカーZを含んでもよいスペーサーを含み；そしてYはP D G F 核酸リガンドである。40

【0044】

本発明の目的に関し“脂質構築物”は、脂質、リン脂質、またはそれらの誘導体を含む構造であり、多様な異なる構造様式を含み、これらの脂質は水性懸濁液中に受容されることが知られている。これらの構造には、限定されるわけではないが、脂質二重層小胞、ミセ50

ル、リポソーム、エマルジョン、脂質リボンまたはシートが含まれ、そして薬学的に許容しうることが知られている種々の薬剤および構成要素と複合体を形成していくてもよい。好ましい態様において、脂質構築物はリポソームである。好ましいリポソームは単層であり、そして 200 nm 未満の相対サイズを有する。脂質構築物の一般的な追加構成要素には、特にコレステロールおよびアルファ - トコフェロールが含まれる。脂質構築物は単独で、または特定の適用に望ましい特性を提供すると当業者が認めるであろういかなる組合せで使用してもよい。さらに、脂質構築物およびリポソーム形成の技術的観点は当業者に周知であり、そして当技術分野で一般的に実施されるいかなる方法も本発明に用いてもよい。

【 0045】

10

本明細書において“核酸リガンド”は、標的に對し望ましい作用を有する、非天然発生核酸である。本発明の標的是 P D G F であり、したがってこの用語は P D G F 核酸リガンドである。望ましい作用には、限定されるわけではないが、標的に結合すること、触媒作用により標的を変化させること、標的または標的の機能活性を修飾 / 变化させるように標的と反応すること、自殺阻害物質のように標的と共有結合すること、または標的および別の分子の間の反応を促進することが含まれる。好ましい態様において、該作用は P D G F に対する特異的結合親和性であり、その際、該核酸リガンドは P D G F が結合する、既知の生理学的機能を有する核酸ではない。

【 0046】

20

本発明の好ましい態様において、本発明の複合体および脂質構築物の P D G F 核酸リガンドは S E L E X 方法論により同定される。P D G F 核酸リガンドは、候補核酸混合物（核酸が P D G F のリガンドである）から：a) 該候補混合物を P D G F と接触させ、その際、P D G F に対し該候補混合物と比較して増加した親和性をもつ核酸を、残りの候補混合物から分配することが可能である；b) 親和性が増加している核酸を残りの候補混合物から分配し；そして c) 親和性が増加している核酸を增幅して、リガンドが濃縮されている核酸混合物を得ることを含む方法により、同定される（本明細書に援用される、1995 年 6 月 7 日に出願された、“High Affinity PDGF Nucleic Acid Ligands”と題される米国特許出願第 08 / 479,725 号、現在は米国特許第 5,674,685 号；1995 年 6 月 7 日に出願された、“High Affinity PDGF Nucleic Acid Ligands”と題される米国特許出願第 08 / 479,783 号、現在は米国特許第 5,668,264 号、および 1996 年 3 月 20 日に出願された、“High Affinity PDGF Ligands”と題される米国特許出願第 08 / 618,693 号、現在は米国特許第 5,723,564 号を参照されたい）。

30

【 0047】

特定の態様において、P D G F 核酸リガンドの部分 (Y) は、結合を維持するのに必ずしも必要ではなく、そして隣接している P D G F 核酸リガンドの特定の部分をスペーサーまたはリンカーで置換してもよい。これらの態様において、例えば Y は Y - B' - Y' - B " - Y " として表してもよく、ここで、Y、Y' および Y " は、单一の P D G F 核酸リガンドの一部または異なる P D G F 核酸リガンドの部分であり、そして B' および / または B " は、元来の P D G F 核酸リガンドの特定の核酸特徴を置換するスペーサーまたはリンカーモノマーである。B' および B " が存在し、そして Y、Y' および Y " が 1 つの P D G F 核酸リガンドの一部である場合、P D G F に結合する三次構造が形成される。B' および B " が存在しない場合、Y、Y' および Y " は、1 つの連続する P D G F 核酸リガンドを表す。こうした様式で修飾されている P D G F 核酸リガンドが、本定義に含まれる。

40

【 0048】

“候補混合物”は、望ましいリガンドをそれから選択する、種々の配列の核酸の混合物である。候補混合物源は、天然発生核酸もしくはその断片、化学的に合成した核酸、酵素により合成した核酸、または以上の技術の組合せにより作成した核酸由来であってもよい。好ましい態様において、増殖過程を促進するために、それぞれの核酸はランダム領域を

50

囲む固定配列を有する。

【0049】

“核酸”は、一本鎖もしくは二本鎖のDNA、RNA、およびそれらのいかなる化学修飾体をも意味する。修飾には、限定されるわけではないが、核酸リガンド塩基または核酸リガンド全体に付加的な電荷、分極率、水素結合、静電相互作用および流動性(fluency)を取り込む他の化学基を提供するものが含まれる。このような修飾には、限定されるわけではないが、2'-位糖修飾、5'-位ピリミジン修飾、8'-位プリン修飾、環外アミンの修飾、4'-チオウリジンの置換、5'-ブロモまたは5'-ヨード-ウラシルの置換、主鎖修飾、例えばスクレオシド間ホスホロチオエート結合、メチル化、異例の塩基対合組合せ、例えばイソ塩基であるイソシチジンおよびイソグアニジンおよびそれらに匹敵するものが含まれる。修飾にはまた、キャッピングのような3'および5'修飾も含んでもよい。10

【0050】

“非免疫原性高分子量化合物”は、典型的には免疫原応答を生じない、約1000ないし1,000,000Da、より好ましくは約1000ないし500,000Da、および最も好ましくは約1000ないし200,000Daの間の化合物である。本発明の目的に関し、免疫原応答は、生物に抗体タンパク質を産生させるものである。非免疫原性高分子量化合物の例には、ポリアルキレンゲリコールおよびポリエチレンゲリコールが含まれる。本発明の1つの好ましい態様において、PDGF核酸リガンドに共有結合している非免疫原性高分子量化合物はポリアルキレンゲリコールであり、そして構造R(O(CH₂)_x)_nO-を有する、ここでRは独立してHおよびCH₃からなる群より選択され、x=2-5であり、nはほぼ、ポリアルキレンゲリコールの分子量/(16+14x)である。本発明の好ましい態様において、分子量は約10-80kDaの間である。最も好ましい態様において、ポリアルキレンゲリコールの分子量は約20-45kDaの間である。最も好ましい態様において、x=2およびn=9×10²である。1つまたはそれ以上のポリアルキレンゲリコールが同一のPDGF核酸リガンドに結合して、分子量の和が好ましくは約10-80kDa、最も好ましくは約20-45kDaの間であってもよい。20

【0051】

特定の態様においては、非免疫原性高分子量化合物もまた核酸リガンドであってもよい。

【0052】

“脂質二重層小胞”は、主に極性(親水性)部分と非極性(親油性)部分を有する個々の分子から形成される、閉じた、流体に満たされた顕微鏡的球体である。親水性部分はホスファト、グリセリルホスファト、カルボキシ、スルファト、アミノ、ヒドロキシ、コリンおよびその他の極性基を含んでもよい。非極性基の例は、飽和または不飽和炭化水素、例えばアルキル、アルケニルまたは他の脂質基である。小胞の安定性を改良するために、または他の望ましい特性を付与するために、ステロール類(例えばコレステロール)および薬学的に許容しうる他の構成要素(アルファ-トコフェロールのような酸化防止剤を含む)を含んでもよい。

【0053】

“リポソーム”は脂質二重層小胞の集合体であり、そして主に、長い脂肪酸鎖からなる2つの疎水性テイルを含むリン脂質分子を含む。これらの分子は水に曝露されると自発的に整列し、各層の分子の親油性末端が膜の中心で結合し、対向する極性末端が二重膜の内面と外面をそれぞれ形成した、二重膜を形成する。したがって膜のそれぞれの側は親水性表面を提供し、一方、膜の内部は親油性媒質を含む。これらの膜は、形成されたとき一般に内部水性空間の周りにタマネギの層と似た様式で層間水相により分離された、閉じた同心膜の系として配列する。これらの多重膜小胞(MLV)に剪断力を適用して、単膜小胞(UV)に変換することが可能である。40

【0054】

“陽イオンリポソーム”は、生理学的pHで全体として正の電荷をもつ脂質構成要素を含むリポソームである。50

【0055】

“S E L E X”方法論は、標的と望ましい様式で相互作用する（例えばタンパク質への結合）核酸リガンドの選択と、選択したこれらの核酸の増幅との組合せを伴うものである。選択 / 増幅の段階を反復循環することにより、きわめて多数の核酸を含むプールから、標的と最も強く相互作用する1つまたは少数の核酸を選択することが可能になる。選択した目標に達するまで、この選択 / 増幅過程循環を続ける。S E L E X方法論はS E L E X特許出願に記載されている。

【0056】

“標的”は、それに対するリガンドが望ましいという関心のあるいかなる化合物または分子も意味する。標的は、タンパク質（例えばP D G F、トロンビンおよびセレクチン）、ペプチド、炭水化物、多糖類、糖タンパク質、ホルモン、受容体、抗原、抗体、ウイルス、基質、代謝産物、遷移状態類似体、補因子、阻害剤、薬剤、色素、栄養素、増殖因子などであってもよく、制限がない。本発明の主な標的是P D G Fである。10

【0057】

“改良された薬物動態学的特性”とは、非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物に共有結合しているか、または脂質構築物と結合しているP D G F核酸リガンドが、非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物に結合していない、または脂質構築物と結合していない同一のP D G F核酸リガンドと対比して、より長い循環半減期をin vivoで示すことを意味する。

“リンカー”は、2つまたはそれ以上の分子実体を共有結合または非共有結合相互作用により連結し、そして1つまたはそれ以上の該分子実体の機能特性を保存する様式で分子実体を空間的に分離しうる分子である。リンカーはまたスペーサーとしても知られる。リンカーニーの例には、限定されるわけではないが、図9C-9Eに示される構造および図9Aに示されるPEGスペーサーが含まれる。20

【0058】

好ましい態様において、リンカーバ'およびバ"は、ペンタエチレングリコールである。

【0059】

本明細書において“療法”には、治療および/または予防が含まれる。療法という場合、これはヒトおよび他の動物について述べたものである。

【0060】

本発明は、P D G Fに対するssDNAおよびRNAリガンドを含む。本発明はさらに、表2-3、6-7、および9、ならびに図1-2A、2Bおよび2C、8Aおよび8B(S EQ ID No: 4-35、39-87、97-144、148-149)に示されるP D G Fに対する特異的なssDNAおよびRNAリガンドを含む。より詳細には、本発明は、表2-3、6-7、および9、ならびに図1-2A、2Bおよび2C、8Aおよび8B(S EQ ID No: 4-35、39-87、97-144、148-149)に示される特異的核酸リガンドと実質的に相同な核酸配列、および実質的に同じP D G F結合能を有する核酸配列を含む。実質的に相同とは、70%以上、最も好ましくは80%以上、そしてさらにより好ましくは90%、95%または99%以上の一次配列相同性の程度を意味する。本明細書に記載する相同パーセンテージは、比較する配列中の同一のヌクレオチド残基で並列する2配列のうち小さい方にみられるヌクレオチドのパーセンテージとして計算される。その際、並列を補助するために10ヌクレオチドの長さに1ギャップを導入してもよい。実質的に同じP D G F結合能とは、該親和性が、本明細書に記載するリガンド親和性の1桁または2桁以内であることを意味する。本明細書に具体的に記載したものと実質的に相同である既定の配列が、同じP D G F結合能をもつか否かの判定は、当業者が容易になしうる。30

【0061】

表2-3、6-7、および9、ならびに図1-2A、2Bおよび2C、8Aおよび8B(S EQ ID No: 4-35、39-87、97-144、148-149)に示される、P D G Fの核酸リガンドの配列相同性をみると、一次相同性をほとんど、または全く40

もたない配列が、実質的に同じ P D G F 結合能を有する可能性があることが分かる。これらの理由から、本発明はまた、表 2 - 3、6 - 7、および 9、ならびに図 1 - 2 A、2 B および 2 C、8 A および 8 B (SEQ ID No: 4 - 35、39 - 87、97 - 144、148 - 149) に示される核酸リガンドと実質的に同じ推定構造または構造モチーフおよび P D G F 結合能をもつ核酸リガンドも含む。実質的に同じ構造または構造モチーフは、ツッカーフォールド (Zucker fold) プログラム (Zucker (1989) Science 244: 48 - 52 を参照されたい) を用いる配列並列により推定することが可能である。当業で知られているように、二次構造および構造モチーフを推定するために他のコンピュータープログラムを使用してもよい。溶液中または結合構造体としての核酸リガンドの実質的に同じ構造または構造モチーフはまた、N M R または当業に知られるであろう他の技術を用いて推定してもよい。

【0062】

本発明はさらに、P D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物を含む複合体を調製するための方法であって、(a) 候補核酸混合物を P D G F と接触させ、(b) 前記候補混合物のメンバーを P D G F に対する親和性に基づいて分配し、そして(c) 選択した分子を増幅して P D G F に対する結合に関し比較的高い親和性をもつ核酸配列が濃縮されている核酸混合物を得る方法により、候補核酸混合物から核酸リガンド (核酸が P D G F のリガンドである) を同定し、そして同定した前記 P D G F 核酸リガンドを非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物と共有結合させることを含む方法による前記方法を包含する。

【0063】

本発明のさらなる目的は、非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物に共有結合している 1 つまたはそれ以上の P D G F 核酸リガンドを含む複合体を提供することである。このような複合体は、非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物と結合していない P D G F 核酸リガンドに優る下記の利点 1 つまたはそれ以上を有する：1) 改良された薬物動態学的特性、および 2) 改良された細胞内搬送能、または 3) 改良された標的化能である。さらに脂質構築物と結合している複合体も同じ利点を有する。

【0064】

複合体、または P D G F 核酸リガンドもしくは複合体を含む脂質構築物は、これらの利点のうち 1、2 または 3 つを有するであろう。例えば、本発明の脂質構築物は、下記のものを含んでもよい：a) リポソーム、b) リポソームの内部に被包された薬剤、および c) P D G F 核酸リガンドおよび親油性化合物を含む複合体であって、該複合体の P D G F 核酸リガンド構成要素が脂質構築物の外側と結合し、そこから突出しているもの。そのような場合、複合体を含む脂質構築物は、1) 改良された薬物動態学的特性を有し、2) 被包された薬剤の細胞内搬送能が増大し、そして 3) 外側に結合している P D G F 核酸リガンドにより、P D G F を発現しているあらかじめ選択された位置を、in vivo で特異的に標的化する。

【0065】

別の態様において本発明は、P D G F 核酸リガンドを非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物と共有結合させて複合体を形成することにより、P D G F 核酸リガンドの薬物動態学的特性を改良し、そして該複合体を患者に投与するための方法を提供する。本発明はさらに、該複合体を脂質構築物とさらに結合させることにより、P D G F 核酸リガンドの薬物動態学的特性を改良するための方法に関する。

【0066】

別の態様において本発明の複合体は、親油性化合物、例えばグリセロ脂質、または非免疫原性高分子量化合物、例えばポリアルキレングリコールまたはポリエチレングリコール (PEG) に共有結合している、P D G F 核酸リガンドを含む。これらの場合、複合体の薬物動態学的特性は P D G F 核酸リガンド単独と比較して向上するであろう。別の態様において、P D G F 核酸リガンドを非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物と共有結合させ、そして該複合体を脂質構築物とさらに結合させるか、あるいは P D G F 核酸リガンド

10

20

30

40

50

ドを脂質構築物に被包すると、P D G F 核酸リガンドの薬物動態学的特性が P D G F 核酸リガンド単独と比較して改良される。

【 0 0 6 7 】

多数の P D G F 核酸リガンドがある態様では、P D G F との多重結合相互作用のためアビディティーが増大する。さらに、複合体が多数の P D G F 核酸リガンドを含む態様では、1 つの P D G F 核酸リガンドのみと比較して、複合体の薬物動態学的特性が改良されるであろう。脂質構築物が多数の核酸リガンドまたは複合体を含む態様では、1 つの核酸リガンドまたは複合体のみがある脂質構築物と比較して、P D G F 核酸リガンドの薬物動態学的特性が改良されるであろう。

【 0 0 6 8 】

本発明の特定の態様において、本発明の複合体は他の核酸リガンド1つ(二量体)またはそれ以上(多量体)に結合している P D G F 核酸リガンドを含む。該核酸リガンドは P D G F に対するものであってもよく、または異なる標的に対するものであってもよい。多数の P D G F 核酸リガンドがある態様では、P D G F との多重結合相互作用のためアビディティーが増大する。さらに、複合体が1つまたはそれ以上の他の P D G F 核酸リガンドに結合している P D G F 核酸リガンドを含む本発明の態様では、1つの P D G F 核酸リガンドのみと比較して、該複合体の薬物動態学的特性が改良されるであろう。

10

【 0 0 6 9 】

非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物を P D G F 核酸リガンドの多様な位置に、例えば塩基の環外アミノ基、ピリミジンヌクレオチドの5'-位、プリンヌクレオチドの8'-位、リン酸のヒドロキシル基、または P D G F 核酸リガンドの5'もしくは3'末端のヒドロキシル基もしくは他の基に、共有結合させてもよい。非免疫原性高分子量化合物がポリアルキレングリコール、またはポリエチレングリコールである態様では、好ましくは該化合物は、それらのリン酸基の5'または3'ヒドロキシルに結合する。最も好ましい態様において、非免疫原性高分子量化合物は核酸リガンドのリン酸基の5'ヒドロキシルに結合する。非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物の P D G F 核酸リガンドに対する結合は、直接またはリンカーもしくはスペーサーを利用し、行ってもよい。脂質構築物が複合体を含む態様または P D G F 核酸リガンドがリボソームに被包されている態様では、P D G F 核酸リガンドまたは複合体および脂質構築物間の非共有結合相互作用が好ましい。

20

【 0 0 7 0 】

核酸を療法に用いる際に生じる問題のひとつは、オリゴヌクレオチドがそれらのホスホジエステル型である場合、望ましい効果を表す前に、体液中で細胞内および細胞外酵素、例えばエンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼによって速やかに分解される可能性があることである。P D G F 核酸リガンドの in vivo 安定性を高めるために、または P D G F 核酸リガンドの搬送を向上もしくは仲介するために、P D G F 核酸リガンドの特定の化学修飾を行ってもよい。本発明において意図される P D G F 核酸リガンド修飾には、限定されるわけではないが、P D G F 核酸リガンド塩基または P D G F 核酸リガンド全体に、附加的な電荷、分極率、疎水性、水素結合、静電相互作用および流動性を取り込む他の化学基を提供するものが含まれる。このような修飾には、限定されるわけではないが、2'-位糖修飾、5'-位ピリミジン修飾、8'-位プリン修飾、環外アミンの修飾、4'-チオウリジンの置換、5'-ブロモまたは5'-ヨード-ウラシルの置換；主鎖修飾、ホスホロチオエートまたはアルキルリン酸修飾、メチル化、異例の塩基対合組合せ、例えばイソ塩基であるイソシチジンおよびイソグアニジンおよびそれらに匹敵するものが含まれる。修飾にはまた、キャッピングのような3'および5'修飾も含んでもよい。

30

【 0 0 7 1 】

核酸リガンドが S E L E X 法に由来する場合、修飾は S E L E X 前または後、いずれの修飾であってもよい。S E L E X 前修飾によれば、P D G F に対する特異性および改良された in vivo 安定性の両方を備えた P D G F 核酸リガンドが得られる。2'-O H 核酸リガンドに S E L E X 後修飾を行うと、核酸リガンドの結合能に不都合な影響を与える

40

50

に、改良された *in vivo* 安定性を得ることが可能である。本発明の P D G F 核酸リガンドの好ましい修飾は、5 および 3 ホスホロチオエートキャッピング、ならびに 3 末端の 3' 3' 逆転ホスホジエステル結合である。最も好ましい態様では、好ましい P D G F 核酸リガンド修飾は 3' 末端の 3' 3' 逆転ホスホジエステル結合である。さらに、一部または全部のヌクレオチドの 2' - フルオロ (2' - F)、2' - アミノ (2' - NH₂)、および 2' - O - メチル (2' - OMe) 修飾が好ましい。最も好ましい態様において、好ましい修飾は、いくつかのヌクレオチドの 2' - OMe および 2' - F 修飾である。さらに、P D G F 核酸リガンドを S E L E X 後修飾し、特定の部分を、ヘキサエチレングリコールスペーサーなどのリンカーまたはスペーサーで置換してもよい。

【 0 0 7 2 】

10

本発明の別の側面では、P D G F 核酸リガンドと非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物の共有結合により、非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物と結合していない P D G F 核酸リガンドと比較して改良された薬物動態学的特性（すなわち、より遅いクリアランス速度）が得られる。

【 0 0 7 3 】

本発明の別の側面では、P D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物または親油性化合物を含む複合体をさらに脂質構築物と結合させてもよい。この結合により、脂質構築物と結合していない P D G F 核酸リガンドと比較して改良された薬物動態学的特性が生じる可能性がある。P D G F 核酸リガンドまたは複合体を共有結合または非共有結合相互作用により脂質構築物と結合させてもよい。別の側面では、P D G F 核酸リガンドを共有結合または非共有結合相互作用により脂質構築物と結合させてもよい。好ましい態様において、結合は非共有結合相互作用による。好ましい態様において、脂質構築物は脂質二重層小胞である。最も好ましい態様において、脂質構築物はリポソームである。

20

【 0 0 7 4 】

本発明に用いるリポソームは当業で現在知られている種々の技術または今後開発される技術のいずれによって調製してもよい。典型的には、それらはリン脂質、例えばジステアロイルホスファチジルコリンから調製され、そして他の材料、例えば中性脂質、例えばコレステロール、および表面修飾剤、例えば正に荷電した化合物（例えばコレステロールのステリルアミンまたはアミノマンノースまたはアミノマンニトール誘導体）または負に荷電した化合物（例えばジアセチルリン酸、ホスファチジルグリセロール）を含んでもよい。多重膜リポソームは慣用技術により、すなわち脂質を適切な溶剤に溶解し、そしてその後、溶剤を蒸発させて容器の内側に薄膜を残留させて、適切な容器または器の内壁に選択した脂質を沈着させるか、または噴霧乾燥することにより形成することが可能である。その後、容器に水相を添加し、回転運動または渦攪拌運動を与えると、M L V が生成する。その後、M L V のホモジナイゼーション、超音波処理または押し出し（フィルターを通して）により、U V を形成することが可能である。さらに、界面活性剤除去技術により U V を形成することが可能である。

30

【 0 0 7 5 】

本発明の特定の態様において脂質構築物は、脂質構築物の表面と結合している単数または複数の標的化用 P D G F 核酸リガンドおよび被包された療法剤または診断剤を含む。好ましくは、脂質構築物はリポソームである。あらかじめ形成したリポソームを P D G F 核酸リガンドと結合するように修飾してもよい。例えば陽イオン性リポソームは静電相互作用により P D G F 核酸リガンドと結合する。グリセロ脂質などの親油性化合物に共有結合している P D G F 核酸リガンドを、あらかじめ形成したリポソームに添加してもよく、これによりグリセロ脂質、リン脂質またはグリセロールアミド脂質がリポソーム膜と結合する。あるいはリポソーム形成中に P D G F 核酸リガンドをリポソームと結合させてもよい。

40

【 0 0 7 6 】

リポソームが広範な療法剤および診断剤の被包または取り込みに有利であることは当業に周知である。多様ないかなる化合物もリポソーム内部の水性コンパートメントに収容することが可能である。療法剤の例には、抗生物質、抗ウイルス性ヌクレオシド、抗真菌性又

50

クレオシド、代謝制御剤、免疫調節剤、化学療法薬剤、毒素解毒薬、DNA、RNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどが含まれる。同様に、脂質二重層小胞に診断用放射性核種（例えばインジウム111、ヨウ素131、イットリウム90、リン32またはガドリニウム）、ならびに蛍光物質、またはin vitroおよびin vivo適用において検出可能な他の物質を装填してもよい。療法剤または診断剤を、リポソーム壁により水性内部に被包してもよいことを理解すべきである。あるいは保持される剤が小胞壁形成材料の一部であってもよく、すなわち該材料に分散または溶解していてもよい。

【0077】

リポソーム形成中に、水溶性キャリヤー剤を水和溶液に含有させることにより水性内部に被包し、そして親油性分子を脂質处方に含有させることにより脂質二重層に取り込ませてもよい。特定の分子（例えば陽イオン性または陰イオン性の親油性薬剤）の場合、あらかじめ形成したリポソーム中への薬剤の装填は、例えば、その開示が本明細書に援用される米国特許第4,946,683号に記載される方法で達成してもよい。薬剤被包後、リポソームをゲルクロマトグラフィーまたは限外ろ過などの方法で処理して、被包されていない薬剤を除去してもよい。その後、典型的には、リポソームを無菌的にろ過し、懸濁液中に存在する可能性があるいかなる微生物も除去する。微生物はまた、無菌処理によって除去してもよい。

10

【0078】

大型の親水性分子をリポソームで被包したい場合、逆相蒸発法（REV）または溶剤注入法などの方法で、比較的大きな単層小胞を形成することが可能である。リポソーム形成のための他の標準法は当業に知られ、例えば商業的なリポソーム製造方法には、米国特許第4,753,788号に記載されるホモジナイゼーション法、および米国特許第4,935,171号に記載される薄膜蒸発法が含まれる。これらは本明細書に援用される。

20

【0079】

療法剤または診断剤はまた、脂質二重層小胞の表面と結合していくてもよいことを理解すべきである。例えば、薬剤をリン脂質またはグリセリドに結合させてもよい（プロドラッグ）。このプロドラッグのリン脂質またはグリセリド部分を脂質处方に含有させることによりリポソームの脂質二重層に取り込ませてもよく、またはあらかじめ形成したリポソーム中へ装填してもよい（本明細書に援用される、米国特許第5,194,654号および第5,223,263号を参照されたい）。

30

【0080】

特定のリポソーム調製法が、意図する用途、および二重膜形成に用いる脂質の種類に依存するであろうことは当業者に自明である。

【0081】

LeeおよびLow（1994, JBC, 269: 3198 - 3204）、ならびにDeFreezら（1996, J. Am. Chem. Soc., 118: 6101 - 6104）は、リガンド-P EG-脂質と脂質構成要素の同時処方によりPEG-リガンドが内側と外側の両方に面したリポソームが得られることを最初に示した。受動アンカリングはZalipskyら（1997, Bioconj. Chem., 8: 111 - 118）が、オリゴペプチドおよびオリゴ糖リガンドをもっぱらリポソーム外面にアンカリングする方法として概説した。彼らの研究に提示された中心的概念は、オリゴ-P EG-脂質結合体（conjugate）を調製し、そしてその後、既存の脂質二重層中への脂質テイルの自発的取り込み（“アンカリング”）により、あらかじめ形成したリポソーム中へ処方しうるというものである。脂質基は、その疎水性脂質アンカーを水溶液から除去し、そして続いて疎水性脂質二重層中に配置することによって、より低い自由エネルギー状態に達するために、この挿入を経る。このような系の重要な利点は、オリゴ脂質がもっぱら脂質二重層の外側にアンカリングすることである。したがって、オリゴ脂質が内側に面した配向であることによりそれらの生物学的標的との相互作用に利用されず浪費されるということはない。

40

【0082】

50

細胞への P D G F 核酸リガンド搬送効率は、リポソームと細胞膜の融合を促進することが知られている脂質処方および条件を用いることにより、最適化することが可能である。例えば、ホスファチジルグリセロールおよびホスファチジルセリンなど負に荷電した特定の脂質は、特に他の融合誘導物質 (f u s o g e n) (例えば C a²⁺ など多価陽イオン、遊離脂肪酸、ウイルス性融合タンパク質、短鎖 P E G 、リゾレシチン、洗浄剤および界面活性剤) の存在下で融合を促進する。ホスファチジルエタノールアミンもまた、膜融合を高め、そして同時に細胞搬送を促進するために、リポソーム処方に含有させてもよい。さらに、例えばカルボキシラート部分を含む遊離脂肪酸およびその誘導体を用いて、高い pH では負に荷電し、そして低い pH では中性であるまたはプロトン付加される pH 感受性リポソームを調製することが可能である。そのような pH 感受性リポソームは、より高い融合傾向をもつことが知られている。

【 0 0 8 3 】

好ましい態様において、本発明の P D G F 核酸リガンドは S E L E X 法由来である。 S E L E X は、現在は放棄されている、“ Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment ” と題される米国特許出願第 07 / 536,428 号、 1991 年 6 月 10 日に出願された、“ Nucleic Acid Ligands ” と題される米国特許出願第 07 / 714,131 号、現在は米国特許第 5,475,096 号、 1992 年 8 月 17 日に出願された、“ Methods of Identifying Nucleic Acid Ligands ” と題される米国特許出願第 07 / 931,473 号、現在は米国特許第 5,270,163 号 (WO 91 / 19813 も参照されたい) に記載されている。これらの各特許出願は本明細書に特に援用され、まとめて S E L E X 特許出願と呼ぶ。

【 0 0 8 4 】

S E L E X 法によれば、それぞれ特有な配列を有し、そしてそれぞれ望ましい標的化合物または分子に特異的に結合する特性を有する核酸分子である一群の生成物が得られる。標的分子は、好ましくはタンパク質であるが、特に炭水化物、ペプチドグリカンおよび多様な小分子もまた、含んでもよい。 S E L E X 方法論は、生物学的構造体、例えば細胞表面またはウイルスに、その生物学的構造体に不可欠な部分である分子との特異的相互作用により標的化するのにも使用してもよい。

【 0 0 8 5 】

S E L E X 法は、その最も基本的な形態では下記の一連の段階により定義される：

- 1) 候補となる、異なる配列の核酸の混合物を調製する。候補混合物は一般に固定配列の領域 (すなわち候補混合物の各メンバーが同じ位置に同じ配列を含む) およびランダム配列の領域を含む。固定配列領域は： (a) 後記の增幅段階を補助する、 (b) 標的に結合することが知られる配列を模倣する、または (c) 候補混合物中の既定の構造配置の核酸の濃度を高めるよう、選択する。ランダム配列は完全にランダムであってもよく (すなわちある塩基をいずれかの位置に見出す確率は 1 / 4 である) 、または部分的にランダムであってもよい (例えばある塩基をいずれかの位置に見出す確率は、 0 および 100 % の間のいずれの水準でも選択することが可能である) 。

【 0 0 8 6 】

- 2) 標的および候補混合物のメンバーの結合に好ましい条件下で、候補混合物を選択された標的と接触させる。これらの状況下では、標的および候補核酸混合物間の相互作用により、標的および該標的に対し最も強い親和性を有する核酸の間に核酸 - 標的対が形成されるものと考えることが可能である。

【 0 0 8 7 】

- 3) 標的に対し最も高い親和性を持つ核酸を、標的に対しより低い親和性を持つ核酸から分配する。候補混合物中には最高親和性の核酸に相当する配列はきわめて少数存在するにすぎない (そしてわずか 1 分子の核酸である可能性がある) ため、一般に分配に際し、候補混合物中にかなりの量の核酸 (約 5 - 50 %) が保持されるように分配基準を設定することが望ましい。

10

20

30

40

50

【0088】

4) 分配に際し、標的に対し比較的高い親和性を有するとして選択された核酸を、その後增幅し、標的に対し比較的高い親和性を有する核酸が濃縮されている新たな候補混合物を生成する。

【0089】

5) 上記の分配段階および増幅段階を反復することにより、新たに形成された候補混合物が含有する特有な配列はいっそう少なくなり、そして標的に対する核酸の平均親和度は一般に高まるであろう。極端には S E L E X 法は、最初の候補混合物から標的分子に対し最も高い親和性を有する核酸に相当する 1 つまたは少数の核酸を含有する候補混合物を生じるであろう。

10

【0090】

多数の特定の目的を達成するように、基本的 S E L E X 法が変更されている。例えば 1992 年 10 月 14 日に出願された、“Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure”と題される米国特許出願第 07 / 960,093 号は、S E L E X をゲル電気泳動と併用し、特定の構造特性をもつ核酸分子、例えば折れ曲がり DNA を選択することを記載する。1993 年 9 月 17 日に出願された、“Photoselection of Nucleic Acid Ligands”と題される米国特許出願第 08 / 123,935 号は、S E L E X に基づく方法であって、標的分子に結合および / または光架橋し、ならびに / あるいはそれらの分子を光不活性化しうる光反応性基を含む核酸リガンドを選択するための方法を記載する。1993 年 10 月 7 日に出願された、“High-Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine”と題される米国特許出願第 08 / 134,028 号は、現在は米国特許第 5,580,737 号である米国特許出願第 08 / 443,957 号に有利になるよう放棄されたが、非常に近縁な分子間を識別しうる高特異性核酸リガンドを同定するための、対抗 S E L E X と呼ばれる方法を記載する。1993 年 10 月 25 日に出願された、“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Solution S E L E X”と題される米国特許出願第 08 / 143,564 号は、現在は米国特許第 5,567,588 号である米国特許出願第 08 / 461,069 号に有利になるよう放棄されたが、標的分子に対し高い親和性をもつオリゴヌクレオチドと低い親和性をもつものとを高い効率で分配しうる、S E L E X に基づく方法を記載する。1992 年 10 月 21 日に出願された、“Nucleic Acid Ligands to HIV-RT and HIV-1 Rev”と題される米国特許出願第 07 / 964,624 号は、現在は米国特許第 5,496,938 号である米国特許第 08 / 462,260 号に有利になるよう放棄されたが、S E L E X が行われた後、改良された核酸リガンドを得るための方法を記載する。1995 年 3 月 8 日に出願された、“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-S E L E X”と題される米国特許出願第 08 / 400,440 号、現在は米国特許第 5,705,337 号は、リガンドをその標的に共有結合させるための方法を記載する。

20

30

40

【0091】

S E L E X 法は、例えば改良された *in vivo* 安定性または改良された搬送特性などの改良された特性をリガンドに与える修飾ヌクレオチドを含む、高親和性核酸リガンドの同定を含む。このような修飾の例には、リボースおよび / またはリン酸および / または塩基の位置における化学的置換が含まれる。S E L E X により同定された、修飾ヌクレオチドを含む核酸リガンドは、1993 年 9 月 8 日に出願された、“High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides”と題される米国特許出願第 08 / 117,991 号であるが、現在は米国特許第 5,660,985 号である米国特許出願第 08 / 430,750

50

09号に有利になるよう放棄された出願に記載されており、そこにはピリミジン類の5-および2'-位が化学的に修飾されたヌクレオチド誘導体を含む、オリゴヌクレオチドが記載されている。前掲の米国特許出願第08/134,028号には、2'-アミノ(2'-NH₂)、2'-フルオロ(2'-F)、および/または2'-O-メチル(2'-OMe)で修飾された1つまたはそれ以上のヌクレオチドを含む、高特異性核酸リガンドが記載されている。1994年6月22日に出願された、“Novel Method of Preparation of Known and Novel 2'-Modified Nucleosides by Intramolecular Nucleophilic Displacement”と題される米国特許出願第08/264,029号は、種々の2'-修飾ピリミジンを含むオリゴヌクレオチドを記載する。

10

【0092】

SELEX法は、選択したオリゴヌクレオチドを、他の選択したオリゴヌクレオチドおよび非オリゴヌクレオチド官能性単位と組み合わせることを含む。これらはそれぞれ1994年8月2日に出願された、“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chimeric SELEX”と題される米国特許出願第08/284,063号、現在は米国特許第5,637,459号、および1994年4月28日に出願された、“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Blended SELEX”と題される米国特許出願第08/234,997号、現在は米国特許第5,683,867号に記載されている。これらの特許出願により、オリゴヌクレオチドの広範な形状およびその他の特性のアレイならびに効率的な増幅特性および複製特性を、他の分子の望ましい特性と組み合わせることが可能になる。

20

【0093】

SELEX法はさらに、選択した核酸リガンドと親油性化合物または非免疫原性高分子量化合物とを組み合わせて、診断用または療法用複合体にすることを包含する。これは1995年5月4日に出願された、“Nucleic Acid Ligand Complexes”と題される米国特許出願第08/434,465号に記載されている。SELEX法はさらに、親油性化合物、例えばジアシルグリセロールまたはジアルキルグリセロールと、選択したVEGF核酸リガンドを組み合わせることを含む。これは1996年10月25日に出願された、“Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Nucleic Acid Ligand Complexes”と題される米国特許出願第08/739,109号に記載されている。診断用または療法用複合体において、ポリエチレングリコールなどの高分子量非免疫原性化合物、またはグリセロ脂質、リン脂質、またはグリセロールアミド脂質などの親油性化合物と結合しているVEGF核酸リガンドは、1997年7月21日に出願された、“Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Nucleic Acid Ligand Complexes”と題される米国特許出願第08/897,351号に記載されている。基本的SELEX法の修飾につき記載した上記特許出願それぞれは、全体として本明細書に特に援用される。

30

【0094】

SELEXにより、高い親和性および卓越した特異性で標的と結合しうる核酸リガンドが同定される。これは核酸研究の分野で前例のない見事な成果である。これらの特性はもちろん当業者が療法用または診断用リガンドにおいて追求するであろう望ましい特性である。

40

【0095】

薬剤として使用するのに望ましい核酸リガンドを得るために、核酸リガンドは、好ましくは(1)標的に対し望ましい効果を達成する様式で標的に結合し；(2)望ましい効果を得るのに可能な限り小さく；(3)可能な限り安定であり；そして(4)選択した標的に対する特異的リガンドである。大部分の場合、核酸リガンドは標的に対し可能な限り最高

50

の親和性を有することが好ましい。さらに、核酸リガンドは促進性を有してもよい。

【0096】

同一出願人による、1992年10月21日に出願された米国特許出願第07/964,624号、現在は米国特許第5,496,938号('938)には、SELLEXが行われた後、改良された核酸リガンドを得る方法が記載されている。“Nucleic Acid Ligands to HIV-RT and HIV-1 Rev”と題されるこの'934特許は、特に本明細書に援用される。

【0097】

SELLEX法は、ランダムssDNAライブラリーからPDGFに対する一群の高親和性RNAリガンドを同定し、そしてランダムssDNAライブラリーから2'-フルオロ-2'-デオキシピリミジンRNAリガンドを同定するために用いられてきている(それぞれ本明細書に援用される、1995年6月7日に出願された、“High-Affinity PDGF Nucleic Acid Ligands”と題される米国特許出願第08/479,783号および1995年6月7日に出願された、“High-Affinity PDGF Nucleic Acid Ligands”と題される米国特許出願第08/479,725号の一部係属出願である、1996年3月20日に出願された、“High-Affinity PDGF Nucleic Acid Ligands”と題される米国特許出願第08/618,693号を参照されたい; Greenら(1995)Chemistry and Biology 2:683-695も参考されたい)。

10

20

【0098】

単数または複数のPDGF核酸リガンドが標的化能に作用することが可能な態様において、PDGF核酸リガンドは、PDGF核酸リガンドがその標的に結合しうるために保持しなければならない三次元構造を採用する。脂質構築物が複合体を含み、そして該複合体のPDGF核酸リガンドが脂質構築物の表面から突出している態様において、PDGF核酸リガンドは、その標的結合能が損なわれないように脂質構築物の表面に対し適正に配向しなければならない。これは、PDGF核酸リガンドをPDGF核酸リガンドの結合部分から離れた位置で付着させることにより達成することが可能である。該三次元構造および適正な配向はまた、前掲のリンカーまたはスペーサーを用いることによって保持することも可能である。

30

【0099】

複合体による標的化搬送のために、多様な療法剤または診断剤のいずれを複合体に結合させてもよい。さらに、脂質構築物による標的化搬送のために、多様な療法剤または診断剤のいずれを前記の脂質構築物に結合させ、被包し、または取り込ませてもよい。

【0100】

複合体が例えばリポソームに結合している親油性化合物およびPDGF核酸リガンドを含む態様において、PDGF核酸リガンドは、抗腫瘍薬剤(例えばダウノルビシン)または造影剤(例えば放射性標識)の搬送のために、PDGFを発現している腫瘍細胞(例えばカポジ肉腫)に標的化してもよい。腫瘍の周囲の細胞および組織もまたPDGFを発現する可能性があり、そしてこれらの細胞に標的化した抗腫瘍薬剤搬送も有効であることを留意すべきである。

40

【0101】

別態様において、標的細胞へ搬送すべき療法剤または診断剤は別の核酸リガンドであってもよい。

【0102】

本発明によればさらに、搬送すべき剤(例えばプロドラッグ、受容体アンタゴニスト、または治療もしくは造影のための放射性物質)をリポソームの外面と結合するように複合体に取り込ませてもよい。PDGF核酸リガンドと同様に、該剤を共有結合または非共有結合相互作用により結合させてよい。リポソームによりこれらの剤を細胞外から標的化搬送し、その際リポソームはリンカーとして作用するであろう。

50

【 0 1 0 3 】

別の態様では、非免疫原性高分子量化合物（例えば P E G）をリポソームに結合させて、複合体の薬物動態学的特性を改良してもよい。P D G F 核酸リガンドをリポソーム膜に結合させるか、または非免疫原性高分子量化合物に結合させ、これを膜に結合させてもよい。この方法で複合体を血液タンパク質から遮蔽し、そしてこうして P D G F 核酸リガンドがなおその標的と接触して結合するのに十分な程度に露出した状態で、長期間循環させることが可能である。

【 0 1 0 4 】

本発明の別の態様では、1つより多い P D G F 核酸リガンドを同一リポソームの表面に結合させる。これにより同じ P D G F 分子を互いに接近させることができとなり、そしてこれをを利用して P D G F 分子間に特異的相互作用を生じさせることができる。10

【 0 1 0 5 】

本発明の別態様では、P D G F 核酸リガンドおよび異なる標的に対する核酸リガンドを同一リポソームの表面に結合させる。これにより P D G F を異なる標的に接近させることができとなり、そしてこれをを利用して P D G F と他の標的間に特異的相互作用を生じさせることができある。標的を接近させる方法としてリポソームを用いるほか、相互作用の強度を高めるためにリポソームに剤を被包してもよい。

【 0 1 0 6 】

複合体を含む脂質構築物は、P D G F に多くの結合相互作用をもたらすことが可能である。これはもちろん複合体当たりの P D G F 核酸リガンド数、および脂質構築物当たりの複合体数、ならびにそれぞれの膜中での P D G F 核酸リガンドおよび受容体の運動性に依存する。有効結合定数は各部位についての結合定数の積と共に増大することが可能であるので、多数の結合相互作用があることは実質的に有利である。すなわち、多数の P D G F 核酸リガンドを脂質構築物に結合、そしてしたがって多価を形成することにより、標的に対する多重複合体の有効親和性（すなわちアビディティ）は、各部位についての結合定数の積と同様に良好になるであろう。20

【 0 1 0 7 】

本発明の特定の態様において、本発明の複合体は親油性化合物に結合している P D G F 核酸リガンドを含む。この場合、複合体の薬物動態学的特性は、P D G F 核酸リガンド単独と比較して改良されるであろう。上に論じたように、親油性化合物を、P D G F 核酸リガンド上の多数の位置で P D G F 核酸リガンドに共有結合させてもよい。30

【 0 1 0 8 】

本発明の別の態様では、脂質構築物が P D G F 核酸リガンドまたは複合体を含む。この態様において、グリセロ脂質は他の親油性化合物と結合する傾向があるため、グリセロ脂質がリポソームへの P D G F 核酸リガンドの取り込みを補助することが可能である。P D G F 核酸リガンドと結合しているグリセロ脂質を、処方に含有させることにより、またはあらかじめ形成したリポソームに装填することにより、リポソームの脂質二重層に取り込ませることが可能である。グリセロ脂質は、P D G F 核酸リガンドがリポソームの内または外へ突出する様式で、リポソームの膜と結合させることができる。P D G F 核酸リガンドが複合体の外へ突出する態様では、P D G F 核酸リガンドは標的化能に作用することが可能である。脂質構築物の薬物動態学的特性をさらに改良するために、さらなる化合物を脂質構築物と結合させてもよいことを理解すべきである。例えば P E G を脂質構築物の膜の外側に面した部分に結合させてもよい。40

【 0 1 0 9 】

他の態様において、本発明の複合体は非免疫原性高分子量化合物、例えばポリアルキレングリコールまたは P E G に共有結合している P D G F 核酸リガンドを含む。この態様では、P D G F 核酸リガンド単独と比較して複合体の薬物動態学的特性が改良される。ポリアルキレングリコールまたは P E G を P D G F 核酸リガンド上の種々の位置に共有結合させてもよい。ポリアルキレングリコールまたは P E G を用いる態様では、P D G F 核酸リガンドを 5 ヒドロキシル基によりホスホジエステル結合を介して結合させることが好まし50

い。

【0110】

特定の態様では、多数の核酸リガンドを单一の非免疫原性高分子量化合物、例えばポリアルキレンゲリコールもしくはPEG、または親油性化合物、例えばグリセロ脂質に結合させてもよい。核酸リガンドはすべてがPDGFに対するものであってもよく、PDGFおよび異なる標的に対するものであってもよい。多数のPDGF核酸リガンドがある態様では、PDGFとの多重結合相互作用のためアビディティーが増大する。さらに他の態様では、多数のポリアルキレンゲリコール、PEG、グリセロール脂質分子を互いに結合させることが可能である。これらの態様では、1つまたはそれ以上のPDGF核酸リガンドまたはPDGFおよび他の標的に対する核酸リガンドを、ポリアルキレンゲリコール、PEG、またはグリセロール脂質それに結合させることが可能である。これもまた、標的に対するそれぞれの核酸リガンドのアビディティーの増大を生じる。多数のPDGF核酸リガンドがポarialキレンゲリコール、PEGまたはグリセロール脂質に結合している態様では、PDGFおよびPDGF間に特異的相互作用を生じさせるために、PDGF分子を互いに接近させる可能性がある。PDGFおよび異なる標的に特異的な多数の核酸リガンドがポarialキレンゲリコール、PEGまたはグリセロール脂質に結合している態様では、PDGFおよび他の標的に特異的相互作用を生じさせるために、PDGFおよび別の標的を互いに接近させる可能性がある。さらに、PDGFに対する核酸リガンドまたはPDGFおよび異なる標的に対する核酸リガンドがポarialキレンゲリコール、PEG、またはグリセロール脂質に結合している態様では、薬剤をポarialキレンゲリコール、PEG、またはグリセロール脂質と結合させることも可能である。したがって複合体は該薬剤を標的化搬送し、その際ポarialキレンゲリコール、PEG、またはグリセロール脂質はリンカーとして作用するであろう。
10

【0111】

PDGF核酸リガンドはPDGFに選択的に結合する。したがってPDGF核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体、またはPDGF核酸リガンドもしくはその複合体を含む脂質構築物は、医薬または診断剤として有用である。PDGF核酸リガンド含有複合体および脂質構築物を用い、不適切なPDGF産生を含むいかなる疾患状態、例えば癌、血管形成、再狭窄および線維症を、治療し、阻害し、予防または診断してもよい。PDGFは多くの腫瘍細胞により、異なる量で産生され、そして分泌される。したがって本発明は、PDGF核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体、複合体を含む脂質構築物、あるいは複合体の一部となることなく脂質構築物と結合しているPDGF核酸リガンドを投与することにより、癌を治療し、阻害し、予防し、または診断する方法を含む。
20

【0112】

血管形成は月経周期および創傷治癒以外には、健康な成人で起きるのは稀である。しかしこれに限定されるわけではないが、癌、糖尿病性網膜症、黄斑変性、乾癬および慢性関節リウマチを含む種々の疾患状態では、血管形成は主な特徴である。したがって本発明は、PDGF核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体、あるいはPDGF核酸リガンドまたはPDGF核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体を投与することにより、血管形成を治療し、阻害し、予防または診断する方法を含む。
40

【0113】

PDGFはまた、肺、骨髄および腎臓などの器官の線維症において產生される。線維症はまた、放射線治療と関連する可能性もある。したがって本発明は、PDGF核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体、あるいはPDGF核酸リガンドまたはPDGF核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体を投与することにより、肺、骨髄、腎臓および放射線治療関連線維症を治療し、阻害し、予防または診断する方法を含む。

【0114】

50

20

30

40

50

P D G F は再狭窄に関する重要な増殖因子である。再狭窄は、狭窄を除去する治療後の疾患血管の再閉塞であり、冠動脈介入に続いてよく発生し、そして末梢血管介入でもときに発生する。さらに、冠動脈および非冠動脈の治療にまたは治療と組み合わせ、ステントが使用されてきている；が、再狭窄はステントの使用にも関連付けられている（イン・ステント再狭窄と呼ばれる）。イン・ステント再狭窄は冠動脈介入の約 15 - 30 % で発生し、そしていくつかの末梢血管介入でもしばしば発生する。例えば、イン・ステント再狭窄は、小血管における重大な問題であり、ステント配置された大腿または膝窩動脈での頻度は 15 % ないし 40 % の範囲である。中程度の大きさの血管、例えば腎動脈のイン・ステント再狭窄率は 10 - 20 % である。

【 0 1 1 5 】

10

本発明は、したがって、P D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体、あるいは P D G F 核酸リガンドまたは P D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体を含む脂質構築物を投与することにより、再狭窄を治療し、阻害し、予防または診断する方法を含む。本発明はまた、冠動脈および非冠動脈における再狭窄を治療し、阻害し、予防または診断する方法も含む。本発明はまた、イン・ステント再狭窄を治療し、阻害し、予防または診断する方法も含む。

【 0 1 1 6 】

20

さらに、癌、血管形成、再狭窄および線維症は、P D G F 以外の増殖因子の產生を伴う。したがって、P D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体、あるいは P D G F 核酸リガンドまたは P D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体を含む脂質構築物を、他の増殖因子（例えば b F G F 、 T G F 、 h K G F など）に対する核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体、あるいは P D G F 核酸リガンドまたは P D G F 核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体を含む脂質構築物と組み合わせて用いてよいことが、本発明により意図される。

【 0 1 1 7 】

30

本発明の 1 つの態様において、脂質構築物は P D G F 核酸リガンドおよび親油性化合物を含む複合体を含み、さらに脂質構築物に被包された、または脂質構築物の内側と結合した診断剤もしくは療法剤を含む。好ましい態様において、脂質構築物は脂質二重層小胞であり、そしてより好ましくはリポソームである。療法用としてのリポソームの使用には、遊離の形では通常は有毒である薬剤の搬送が含まれる。リポソームの形で有毒薬剤を密閉し、そして該薬剤に対し感受性である組織から逸らし、そして選択した領域に標的化することが可能である。リポソームはまた、長期間にわたって薬剤を放出させる療法に使用することも可能であり、これにより投与回数を減らすことが可能である。さらにリポソームは、通常は静脈内搬送に適さない疎水性または両親媒性薬物の水性分散液の調製方法を提供することが可能である。

【 0 1 1 8 】

40

多くの薬剤および造影剤は、療法能または診断能を有するためには体内の適正な位置へ搬送されなければならない、そしてしたがって、リポソームを容易に注入し、そして特定の細胞種または身体部分へ持続放出および薬剤搬送するための基礎を形成することが可能である。被包薬剤を、感受性組織から逸らし、選択した宿主の組織に標的化するためにリポソームを使用するには、幾つかの技術を採用してもよい。これらの技術には、リポソームのサイズ、それらの正味表面電荷、およびそれらの投与経路を操作することが含まれる。M L V は、主として比較的大型であるという理由で、通常は細網内皮系（原則として肝臓および脾臓）によって速やかに取り込まれる。これに対し U V は、M L V と比べて長い循環時間、低いクリアランス速度、および広い生体内分布を示すことが認められてきている。

【 0 1 1 9 】

リポソームの受動搬送には、種々の投与経路、例えば静脈内、皮下、筋内および局所の使

50

用を伴う。各投与経路により、リポソーム局在性の違いが生じる。選択した標的領域へリポソームを能動的に向けるために用いる2つの一般的な方法は、リポソームの表面に抗体または特異的受容体リガンドを付着させることを伴う。本発明の1つの態様では、P D G F核酸リガンドがリポソームの外面に結合し、そして標的化能に作用する。当業者に知られるように、リポソームの表面に抗体または特異的受容体リガンドなど、さらなる標的化構成要素を含有させてもよい。さらに、抗体を用いずに腫瘍にリポソームを標的化させる幾つかの試みが成功してきている。例えば米国特許第5,019,369号、米国特許第5,435,989号、および米国特許第4,441,775号を参照されたい。これらの代替標的化法を採用するのは当業者に自明であろう。

【0120】

10

P D G F核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体、P D G F核酸リガンドおよび非免疫原性高分子量化合物もしくは親油性化合物を含む複合体を含む脂質構築物、ならびに複合体の一部となることなく脂質構築物と結合しているP D G F核酸リガンドの、療法用または診断用組成物を、注射により非経口的に投与してもよいが、他の効果的な投与形態、例えば関節内注射、吸入ミスト、経口用活性処方、経皮イオン導入(photophoresis)または坐剤もまた想定される。これらはまた、直接注射により局所的に適用してもよく、移植ステントまたはカテーテルなどの装置から放出してもよく、あるいは注入ポンプにより該部位に直接搬送してもよい。好ましいキャリヤーのひとつは、生理的食塩水であるが、薬学的に許容しうる他のキャリヤーの使用も考慮される。1つの態様では、キャリヤーおよびP D G F核酸リガンド複合体が生理学的に適合する徐放性処方を構成することが想定される。このようなキャリヤー中の主な溶剤は、水性でも非水性でもよい。さらにキャリヤーは、処方のpH、浸透圧モル濃度(osmolarity)、粘度、透明度、色、無菌性、安定性、溶解速度、または臭気を変更または維持するための、薬理学的に許容しうる他の賦形剤(excipient)を含有してもよい。同様に、キャリヤーは、P D G F核酸リガンドの安定性、溶解、放出または吸収の速度を変更または維持するために、さらに他の薬理学的に許容しうる賦形剤を含有してもよい。このような賦形剤は、1回量形または多数回量形の非経口投与用剤形を製造するのに普通に慣用されている物質である。

20

【0121】

30

療法用および診断用組成物を処方した後、それを無菌バイアルに液剤、懸濁液剤、ゲル剤、乳剤、固形剤、または脱水もしくは凍結乾燥した散剤として保存してもよい。このような処方は、そのまま使用する形または投与直前に再構成する必要のある形で保存してもよい。P D G F核酸リガンドを含有する処方を全身搬送のために投与する方法は、皮下、筋内、静脈内、鼻腔内、または膜もしくは直腸坐剤を介してもよい。

【0122】

40

本発明の複合体および脂質構築物の利点には：i) 血漿中での核酸リガンドの薬物動態を改良し；ii) 核酸リガンドを、それらの標的との相互作用のアビディティーを高めるために多価アレイで提示し；iii) 異なる特異性をもつ提示核酸リガンド2つまたはそれ以上を、同一リポソーム粒子に組み合わせ；iv) リポソーム固有の腫瘍標的化特性を利用して、腫瘍への提示核酸リガンドの搬送を高め；そしてv) リポソーム内容物を特定の標的へ導くために、抗体のものに匹敵する提示核酸リガンドの高い親和性および特異性を用いることが含まれる。大部分のタンパク質と異なり、熱、種々の分子変性剤および有機溶剤による提示核酸リガンドの変性は易可逆性であるので、提示核酸リガンドは本明細書に記載する種類の製剤に好適である。

【0123】

以下の実施例は本発明を説明及び示すために提供されるのであって、本発明を限定すると受け取られてはならない。実施例1は、P D G Fに対するssDNAリガンドを產生するために実施例2～4において使用される様々な材料及び実験方法、及びそれに関連した試験を記載する。実施例2は、P D G Fに対するssDNAリガンド、及び選択される核酸リガンド及び共通の二次構造モチーフの予測される二次構造を記載する。実施例3は

50

、高アフィニティー結合に必要な最小配列、核酸とPDGFが接触する部位、PDGFイソ型のDNAリガンドによる培養細胞に対する阻害、及び細胞内PDGFのマイトジェニック効果のDNAリガンドによる阻害を記載する。実施例4は、SELEX-派生リガンドの修飾スクレオチドを用いた置換を記載する。実施例5は、PEG修飾PDGF核酸リガンドの合成を記載する。実施例6は、修飾されたリガンドの血清における安定性を記載する。実施例7は、修飾されたリガンド(NX31975-40K・PEG)の再狭窄における効果を記載する。実施例8は、糸球体腎炎におけるPDGFの阻害を試験することについて実施例9で使用される様々な材料及び方法を記載する。実施例9は、糸球対腎炎におけるPDGFの阻害を記載する。実施例10は、PDGFに対する2'-フルオロ-2'-デオキシピリミジンRNAリガンドを伸展させる実験方法及び得られたRNA配列を記載する。

実施例1. 実験方法

この実施例は、以下の実施例2～4に組み込まれている一般法を提供する。

材料

組換えヒトPDGF-AA(Mr = 29,000)、PDGF-AB(Mr = 27,000)及びPDGF-BB(Mr = 25,000)をR&D Systems(ミネアポリス、MN)より、担体タンパク質を含まない、凍結乾燥品として購入した。これら3種のイソ型は、成熟ヒトPDGF-A鎖(Betsholtzら、(1986)Nature 320:695-699)の長形及び天然に存在するヒトPDGF-B鎖(Johnssonら、(1984)EMBO J. 3:921-928)の成熟形についての配列に基づいた合成遺伝子から大腸菌において産生された。無作為化されたDNAライブラリー、PCRプライマー及びDNAリガンド及び5'-ヨード-2'-デオキシリジン置換DNAリガンドは、標準的な固相ホスホロアミダイト法(Sinhaら(1984)Nucleic Acids Res. 12:4539-4557)を使用して、Nextar Pharmaceuticals社(ボウルダー、CO)又はOperon Technologies(アラメダ、CA)によって合成された。

一本鎖DNA(ssDNA)SELEX

SELEX法の本質的な特徴は、参照により本明細書に組込まれている、SELEX特許出願に詳しく記載されている(TuerkとGold(1990)Science 249:505;Jellinekら(1994)Biochemistry 33:10450;Jellinekら(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11227も参照のこと)。定まった配列のプライマーアニーリング領域(表1)(SEQ ID NOS:1-3)が隣接した40スクレオチドの連続ランダム領域を含有する最初のssDNAライブラリーを、4つのホスホロアミダイトの等モル混合物を使用する固相ホスホロアミダイト法によって合成し、無作為化された位置を產生した。このssDNAライブラリーを8%ポリアクリルアミド/7M尿素ゲル上で電気泳動して精製した。完全長のDNAに相当するバンドをUV光で視覚化し、ゲルから切出し、破碎浸漬法によって溶出させ、エタノール沈殿して遠心分離によってペレット状にした。このペレットを真空乾燥し、1mM MgCl₂を補充したリン酸緩衝化生理食塩水(PBSM=10.1mM Na₂HPO₄、1.8mM KH₂PO₄、137mM NaCl及び2.7mM KCl、1mM MgCl₂、pH 7.4)で再懸濁した。タンパク質とインキュベーションする前に、ssDNAをPBSMにおいて2分間90°で加熱し、氷冷した。約500pmol(3×10¹⁴分子)の5'³²P末端標識化ランダムssDNAを結合緩衝液(0.01%ヒト血清アルブミン(HSA)を含有するPBSM)においてPDGF-ABとインキュベートすることによって最初の選択を開始した。この混合物を一晩4度でインキュベートし、次いで37度短い間(15分)インキュベートした。4%、8%ポリアクリルアミドゲル(ビス-アクリルアミド:アクリルアミド=1:30)、泳動緩衝液:2mM EDTA含有89mMトリスホウ酸塩(pH 8.3)、5V/cmの条件で電気泳動することにより、PDGF-ABに結合したDNAを非結合DNAから分離した。フリーssDNAの約半分の電気泳動移動度で泳動するPDGF-ssDNA複合体を確認した。

合体に相当するバンドを、オートラジオグラフィーによって視覚化し、ゲルから切出し、破碎浸漬法により溶出させた。次のアフィニティー選択では、ssDNAを結合緩衝液において37で15分間PDGF-ABとともにインキュベートし、既報のように(Greenら(1995)Chemistry and Biology 2:683-695)、ニトロセルロース濾過によって、非結合DNAからPDGF結合ssDNAを分離した。アフィニティー選択されたssDNAのプールをPCRによって増幅したが、ここでは、50mM KCl、7.5mM MgCl₂、ウシ血清アルブミン0.05mg/ml、1mM デオキシヌクレオシド三リン酸、5μM プライマー(表1)(SEQ ID NOS: 2, 3)及びTaqポリメラーゼ0.1ユニット/μlを含有する10mMトリス-C1(pH 8.4)において、12~20ラウンドの熱サイクル(93で30秒、52で10秒、72で60秒)にDNAをかけた。5' PCRプライマーは、ポリヌクレオチドキナーゼ及び[⁻³²P]ATPで5'末端を標識化し、3' PCRプライマーは、ビオチンホスホロアミダイト(Glen Research、スターリング、VA)を用いて5'末端をビオチニル化した。PCR増幅に続き、ストレプタビシン(Pierce、ロックフォード、IL)を、ビオチニル化プライマーの10倍過剰モル量で非精製PCR反応混合物へ加え、室温で15分間インキュベートした。等量の停止液(90%ホルムアミド、1%ドデシル硫酸ナトリウム、0.025%プロモフェノールブルー及びキシレンシアノール)を加え、室温で20分間インキュベートしてdsDNAを変性させた。12%ポリアクリルアミド/7M尿素ゲル電気泳動によって、放射標識された鎖をストレプタビシン結合ビオチニル化鎖から分離した。より速く泳動する放射標識化(非ビオチニル化)ssDNA鎖をゲルから切出し、上記のように回収した。ssDNAの量は、260nmでの吸光度から、33μg/ml/吸光度ユニットの吸光計数を用いて算定した(Sambrookら(1989)Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. 3 vols., Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールドスプリングハーバー、ニューヨーク)。

クローニング及び配列決定: SEL EX 12ラウンド由来の増幅されたアフィニティー濃縮プールを12%ポリアクリルアミドゲルで精製し、大腸菌JM109株のHind IIIとPst I部位の間でクローン化した(Sambrookら(1989)Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. 3 vols., Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールドスプリングハーバー)。各クローンを使用してアルカリ溶解によってプラスミドを製造した。製造業者のプロトコールにより、前進配列決定プライマ-及びSeq ue nase 2.0(アマーシャム、アーリントンハイツ、IL)を使用してプラスミドの挿入領域配列を決定した。

見かけの平衡解離定数及び解離速度定数の決定: 様々な濃度のPDGFに対する低濃度のssDNAリガンドの結合性を、既報のように(Greenら(1995)Chemistry and Biology 2:683-695)、ニトロセルロースフィルター結合法によって決定した。PDGFのストック(PBS)溶液濃度は、アミノ酸配列から算出される以下のe₂₈₀値を使用して、280nmでの吸光度読み取り値から決定した(Gill and von Hippel(1989)Anal. Biochem. 182:319-326): PDGF-AAに対しては19,500M⁻¹cm⁻¹、PDGF-ABに対しては15,700M⁻¹cm⁻¹、PDGF-BBに対しては11,800M⁻¹cm⁻¹。結合実験用のssDNAは、8%(>80ヌクレオチド)又は12%(<40ヌクレオチド)ポリアクリルアミド/7M尿素ゲルで電気泳動して精製した。すべてのssDNAリガンドを高希釈(約1nM)の結合緩衝液において90で2分間加熱し、氷上で冷却後、タンパク質溶液へさらに希釈した。典型的には、この結合混合物を37で15分間インキュベートし、ニトロセルロースフィルター上に分配した: DNAリガンド(L)のPDGF-AA(P)に対する結合性は、平衡時の結合DNA分画(q)が以下の式1で与えられる2分子結合モデルで十分示される:

【0124】

【式1】

$$q = \frac{f}{2} [L]_t \{ [P]_t + [L]_t + K_d - [([P]_t + [L]_t + K_d)^2 - 4 [P]_t [L]_t]^{1/2} \} \quad (1)$$

【0125】

ここで、 $[P]_t$ 及び $[R]_t$ は、全タンパク質濃度及び全DNA濃度であり、 K_d は平衡解離定数、及び f は、タンパク質-DNA複合体がニトロセルロースフィルター上に保持される効率性である (Irvin et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 739-761; Jellinek (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11227-11231)。

10

【0126】

P D G F - A B 及び P D G F - B B に対するDNAリガンドの結合は二相性であり、異なるアフィニティー（対応する解離定数、 K_{d1} 及び K_{d2} によって示される）でタンパク質に結合する2種の非相互変換成分 (L_1 及び L_2) からDNAリガンドが構成されるモデルによって記述され得る (Jellinek (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11227-11231)。この場合、結合DNA分画 (q) に対する明確な解は以下の式2によって与えられる。

【0127】

【式2】

$$q = f \left(\frac{\chi_1 K_{d1}}{1 + K_{d1} [P]} + \frac{\chi_2 K_{d2}}{1 + K_{d2} [P]} \right) [P] \quad (2)$$

$$[P] = \frac{[P]_t}{1 + \frac{\chi_1 K_{d1} [L]_t}{1 + K_{d1} [P]} + \frac{\chi_2 K_{d2} [L]_t}{1 + K_{d2} [P]}} \quad (3)$$

20

30

【0128】

ここで、 χ_1 及び χ_2 ($= 1 - \chi_1$) は、 L_1 及び L_2 のモル分画である。DNAリガンドの P D G Fへの結合に対する K_d 値は、非線形最少2乗法を用いてデータ点を式1 (P D G F - A A) 又は式2 (P D G F - A B 及び P D G F - B B) へフィッティングして算出した。

【0129】

解離速度定数 (k_{off}) は、分配法としてニトロセルロース結合を使用して、500倍過剰量の非標識リガンド添加後の時間を関数とした、P D G F - A B (1 nM) に結合した ^{32}P - 5'末端標識化最小リガンドの量 (0.17 nM) を測定して決定した。 k_{off} 値は、データ点を以下の1次速度式3へフィッティングして決定した：

40

【0130】

【式3】

$$(q - q_\infty) / (q_0 - q_\infty) = \exp(-k_{off} t) \quad (3)$$

【0131】

ここで、 q 、 q_0 及び q_∞ は、それぞれ任意時間 (t)、 $t = 0$ 及び $t = \infty$ のときに P D G F - A B に結合しているDNAの分画を表す。

最小リガンドの決定。3'末端から連続的に先端切れした5'末端標識DNAリガンドの

50

集団を產生するために、DNAリガンド鑄型の3'不变配列に相補的なプライマー（先端切れプライマー、5N2、表1）（SEQ ID NO:3）の5'末端を[^{-32P}] - ATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼで放射標識し、鑄型へアニールして、Seq uenase (Amersham、アーリントンハイツ、IL) 及び全4種のdNTP及びddNTPを用いて伸張した。結合緩衝液において37℃で15分間インキュベーションした後、PDGF-ABに対する高アフィニティー結合を保持しているこの集団由来のフラグメントを、ニトロセルロースフィルター分配によって、より弱いアフィニティーを有しているものから分離した。アフィニティー選択の前後で、8%ポリアクリルアミド/7M尿素ゲルによりこのフラグメントを電気泳動的に分離すれば、3'境界部分の判定が可能になる。5'末端から連続的に先端切れした3'末端標識DNAリガンドの集団を产生するために、[^{-32P}] - コルジセピン-5' - 三リン酸 (New England Nuclear, ボストン、MA) 及びT4 RNAリガーゼ (Promega, マジソン、WI) でDNAリガンドの3'末端を放射標識し、5'末端をATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、エクソヌクレアーゼ (Gibco BRL、ゲイサースブルグ、MD) で部分的に消化した。3' - 標識化リガンド10ピコモルの部分消化は、7mMグリシン-KOH (pH 9.4)、2.5mM MgCl₂、BSA 1 μg/ml、tRNA 15 μg及びエクソヌクレアーゼ 4ユニットを含む100 μLにおいて、37℃、15分間で実施した。5'境界部分は、3'境界部分について記載したものと同様の方法で決定した。

融解温度 (T_m) の測定。最小DNAリガンドの融解プロフィールは、Cary Model 1 E 分光光度計を用いて得た。オリゴヌクレオチド (320 ~ 400 nM) を、PBS、PBSTM又は1 mM EDTAを有するPBSにおいて95℃へ加熱し、室温へ冷却して融解プロフィールを決定した。15 ~ 95℃まで1/分の割合でサンプルを加熱し、0.1ごとに吸光度を記録することによって融解プロフィールを作成した。KaleidaGraphのプロットプログラム (Synergy Software, リーディング、PA) を用いてデータ点の第一微分係数を算出した。この第一微分係数値は、各点を各サイドの27データ点で平準化することによって、55点の補整関数を使用して補整した。補整された第一微分曲線のピークを用いて T_m を評価した。

PDGF-ABに対する5' - ヨード-2' - デオキシリジン置換DNAリガンドの架橋結合。単数又は複数の置換がある5' - ヨード-2' - デオキシリジンをチミジンの代わりに含有するDNAリガンドを、固相ホスホアミダイト法を用いて合成した。架橋結合する能力について試験するために、微量の5' - ³²P末端標識リガンドを、結合緩衝液において37℃で15分間PDGF-ABとともにインキュベートしてから照射した。この架橋混合物を37℃サーモスタット付き1cm長キュベットへ移し、XeCl充電したLumonics Model EX748エキシマレーザーを使用して、20Hzで25 ~ 400秒308 nmで照射した。集束レンズの焦点から24cm後方にキュベットを置き、焦点でのエネルギーは175ミリジュール/パルスと測定された。照射後、0.1% SDSを含有する等量のホルムアミドローディング緩衝液とアリコートを混合し、95℃で5分間インキュベートしてから、8%ポリアクリルアミド/7M尿素ゲルでフリー-リガンドからPDGF-リガンドの架橋複合体を分離した。

【0132】

リガンド20t-I4 (SEQ ID NO:92)について架橋結合したタンパク質の部位を同定するために、より大きなスケールで結合及び照射を実施した。PDGF-AB及び5' - ³²P末端標識リガンド（それぞれ1 μM/PBSTM）を、2つの1ml反応槽において、上記のようにインキュベートして照射（300秒）した。反応混合液を1つにし、エタノール沈殿して、トリス-HCl緩衝液 (100 mM, pH 8.5) 0.3 mlにおいて再懸濁した。PDGF-AB/リガンドの架橋複合体を、改良トリプシン（ペーリンガーマンハイム）0.17 μg/μlにより37℃で20時間消化した。消化混合物をフェノール/クロロホルム、クロロホルムで抽出し、次いでエタノール沈殿した。ペレットを水及び等量の5% (v/v) - メルカプトエタノール含有 (SDSなし) ホルム

アミドローディング緩衝液に再懸濁し、95度で5分間インキュベートし、40cmの8%ポリアクリルアミド／7M尿素ゲルで分離させた。フリーリガンドのバンドから約1.5cm上にある2つの近接したバンドとして泳動する架橋トリプシン分解ペプチド／リガンドをゲルから切出し、破碎浸漬法によって溶出させ、エタノール沈殿した。この架橋ペプチド（比活性に基づけば約160ピコモル）を乾燥し、エドマン分解（Midwest Analytical社、セントルイス、MO）によって配列を決定した。

受容体結合アッセイ。記載のようにして（Heldinら、(1988)EMBO J. 7: 1387-1394）、PDGF - 又は - 受容体でトランスフェクトしたブタ大動脈内皮（PAE）細胞へ¹²⁵I-PDGF-AA及び¹²⁵I-PDGF-BBを結合させた。1mlあたりウシ血清アルブミン1mgを補充したリン酸緩衝化生理食塩水0.2mLの細胞培養液（1.5cm²）へ様々な濃度のDNAリガンドを、¹²⁵I-PDGF-AA（2ng, 100,000cpm）又は¹²⁵I-PDGF-BB（2ng, 100,000cpm）とともに加えた。4、90分のインキュベーションの後、細胞培養液を洗浄し、細胞に結合した放射活性をg - カウンターで定量した（Heldinら、(1988)EMBO J. 7: 1387-1394）。

[³H]チミジン取込みアッセイ。PDGF-BB 20ng/ml又は10%胎仔血清に反応して様々な濃度のDNAリガンドの存在下でPDGF - 受容体を発現するPAE細胞への[³H]チミジン取込みを、記載（Morilà (1991) J. Biol. Chem. 266: 21158-21164）のようにして実施した。37度で24時間インキュベーションした後、DNAに取込まれた³H - 放射活性を、 - カウンターを用いて定量した。

実施例2. PDGFのssDNAリガンド

PDGF-ABに対する高アフィニティーDNAリガンドを、40個の連続位置（表1）（SEQ ID NO: 1）で無作為化した約3×10¹⁴個の分子（500ピコモル）の1本鎖DNAライブラリーからSELLEX法によって同定した。PDGF結合DNAを、第一ラウンドはポリアクリルアミドゲル電気泳動で、次のラウンドはニトロセルロースフィルター結合によって非結合DNAから分離した。12ラウンドのSELLEXの後では、アフィニティー濃縮化プールは、約50pMの見かけ解離定数（K_d）で（データ示さず）、PDGF-ABに結合した。これは当初の無作為化DNAライブラリーに比較してアフィニティーが約700倍向上したことを示した。このアフィニティー濃縮化プールを用いてクローニングライブラリーを產生し、それから39種を単離して配列決定した。これらリガンドの32個にユニーク配列が見出された（表2）（SEQ ID NOS: 4 - 35）。最小配列の決定に用いたリガンドにはカラム番号の隣に星印（*）が付いている。最小リガンドとして高アフィニティー結合性を保持していることが見出されたクローン番号をイタリック体で示す。表2に示した全リガンドを、ニトロセルロースフィルター結合法を使用して、PDGF-ABに対するその結合能力でスクリーニングした。この群から最良のリガンドを同定するために、タンパク質の濃度範囲においてPDGF-ABに結合する5' ³²P末端標識リガンドの分画を測定することによって、PDGF-ABに対する相対アフィニティーを決定した。PDGF-ABと高アフィニティーで結合したリガンドについては、PDGF-BB及びPDGF-AAに対するアフィニティーも試験した。いずれの場合も、PDGF-AB及びPDGF-BBに対するリガンドのアフィニティーは同等であったが、PDGF-AAに対するアフィニティーはかなり低かった（データ示さず）。

【0133】

32種のユニークリガンドのうち21種（SEQ ID NO: 4、5、7~9、14~24、26、31、32、34及び35）は、表3に示す配列ファミリーへ群分けし得る。最初の無作為化領域の配列（大文字）をコンセンサス3方向ヘリックス連結部モチーフによって並置する。配列の不变領域内のヌクレオチド（小文字）は、それらが予測される二次構造に参画する場合にのみ示す。いくつかのリガンドは、コンセンサスモチーフとの円順列を介した関連性を示すために「断続」（等号記号）された。塩基対合に参画すると

10

20

30

40

50

予測されたヌクレオチドを下線の逆矢印で示し、矢印の先端はヘリックス連結部分のほうを指す。これらの配列は、ヘリックス連結部の（5'末端から）最初の1本鎖ヌクレオチドに基づいて（ヘリックスII及びIIIの間のA又はG）、A及びBの2群へ分けられる。ヘリックス領域のミスマッチを、対応する文字の下にドットを付けて示す（G-T及びT-G塩基対は許容される）。単一のヌクレオチドバルジ（膨らみ）が起こるところでは、そのミスマッチヌクレオチドをその近隣配列内の残りの配列上に示す。

【0134】

上記の分類は、これらリガンド間の配列相同性に一部基づいているが、大部分は共有された二次構造モチーフ、即ち、分岐点に3ヌクレオチドループを有する3方向ヘリックス連結部（図1）（SEQ ID NO: 82）に基づいている。これらリガンドを2群へ細分した。A群のリガンドでは分岐点のループはAGCの不变配列を有し、B群ではその配列はG(T/G)(C/T)である。提唱されるコンセンサス二次構造モチーフを裏付けるのはヘリックス内の非保存ヌクレオチドにおける塩基対合の共変異である（表4）。3方向連結部は連続したDNA鎖でコードされるので、ヘリックスの2つは連結部からの遠位端ループで終わる。これらのループは長さと配列のいずれも高度に可変性である。さらに、コンセンサスモチーフの円順列により、このループは3つのヘリックスすべてで発生するが、最も頻繁に起こるのはヘリックスII及びIIIである。まとめると、上記の観察事実は、ヘリックス連結部から遠位の領域はPDGF-ABに対する高アフィニティー結合にとって重要ではないことを示唆する。実際、高度に保存された配列は、ヘリックス連結部の近くに見出される。

10

20

実施例3. 最小リガンドの決定

高アフィニティー結合に必要な最小配列をPDGF-ABに対する6個の最良リガンドについて決定した。一般に、3'及び5'の最小配列境界に関する情報は、核酸リガンドを部分的に切断し、次いでターゲットに対する高いアフィニティーを保持するフラグメントを選択して得られる。RNAリガンドについては、好便にも温和なアルカリ分解によってフラグメントが得られる（Tuerkら（1990）J. Mol. Biol. 213: 749-761；Jellinekら（1994）Biochemistry 33: 10450-10456；Jellinekら（1995）Biochemistry 34: 11363-11372；Greenら（1995）J. Mol. Biol. 247: 60-68）。DNAのほうが塩基に対してより抵抗するので、フラグメントを產生する別の方法がDNAには必要とされる。3'境界を決定するために、ジデオキシ配列決定法を用いて、DNAリガンドの3'不变配列にアニールしたプライマーの5'末端を伸張することによって、3'末端から連続的に先端切れしたリガンドフラグメントの集団を產生した。この集団をニトロセルロース濾過によってアフィニティー選択し、PDGF-ABに対する高アフィニティー結合を保持している（3'末端から先端切れしている）最も短いフラグメントをポリアクリルアミドゲル電気泳動によって同定した。5'境界も同様の方法で決定したが、5'末端で連続的に先端切れした3'末端標識リガンドフラグメントの集団は、エクソヌクレアーゼを用いた限定消化によって產生した。次いで、最小リガンドをこの2つの境界間の配列として定義する。上記実験から派生した情報は有用であるが、その境界がその時点で試験された1つの末端でしかない以上、示唆された境界は絶対ではないことを銘記すべきである。先端切れしていない（放射標識された）末端は、結合に対する効果を増強、減少するか又はそれに影響しない（Jellinekら（1994）Biochemistry 33: 10450-10456）。

30

40

【0135】

実験的に境界を決定した6つの最小リガンドのうち、2つ（20t（SEQ ID NO: 83）（図2A）及び41t（SEQ ID NO: 85）（図2C）；リガンド20及び41の先端切れバージョン）は、その完全長の類似体に匹敵するアフィニティー（1/2以内）で結合したが、4つはかなり低いアフィニティーを有した。PDGFに対する高アフィニティー結合を保持していたこの2つの最小リガンド、20t及び41tは、予測される3方向ヘリックス連結部の二次構造モチーフ（図2A～C）（SEQ ID N

50

O S : 8 3 - 8 5) を含有する。高アフィニティーで P D G F - A B に結合する第三の最小リガンドである 3 6 t (S E Q I D N O : 8 4) の配列はコンセンサスモチーフの知識から導いた(図 2 B)。後続の実験で、リガンド 2 0 t の 5' 末端にある 1 本鎖領域は高アフィニティー結合には重要でないことが判明した。さらに、リガンド 3 6 t にあるヘリックス II 及び III 上の 3 ヌクレオチドループ(G C A 及び C C A) は、ヘキサエチレングリコールのスペーサーで置換し得る(下記参照)。これらの実験は、P D G F - A B に対する高アフィニティー結合におけるヘリックス連結部領域の重要性のさらなる裏付けを提供する。

P D G F に対する最小リガンドの結合。様々な濃度の P D G F - A A 、 P D G F - A B 及び P D G F - B B に対する最小リガンド 2 0 t 、 3 6 t 及び 4 1 t の結合を図 3 A ~ 3 C に示す。その完全長の類似体が有する結合特性に一致して、この最小リガンドは、 P D G F - A A に対するよりも実質的に高いアフィニティーで P D G F - A B 及び P D G F - B B に結合する(図 3 A ~ 3 C 、表 4)。事実、 P D G F - A A に対するそれらのアフィニティーは、ランダム D N A のそれと同等である(データ示さず)。 P D G F - A A に対する結合が単相の結合式で十分記載されるのに対し、 P D G F - A B 及び P D G F - B B への結合は明らかに二相性である。以前の S E L E X 実験では、二相性の結合は、様々なアフィニティーでその標的タンパク質に結合する分離可能な核酸分子種が存在するためであることが判明している(J e l l i n e k r a (1 9 9 5) B i o c h e m i s t r y 3 4 : 1 1 3 6 3 - 1 1 3 7 2 、及び未発表結果)。この高アフィニティー分画と低アフィニティー分画との同一性は現時点では不明である。ここに記載されたこれらの D N A リガンドは化学的に合成されたので、 P D G F - A B 及び P D G F - B B により低いアフィニティーで結合する分画は化学的に不完全な D N A を表すのかもしれない。また、高アフィニティーと低アフィニティーの分子種は、異なるアフィニティーで P D G F - B 鎖に結合する安定なコンホメーションの異性体であるのかもしれない。いずれにせよ、より高いアフィニティー結合の成分は、いずれの場合でも最も多く存在するリガンド種である(図 3 A ~ 3 C)。比較のために、 0 . 5 n M の K_d でヒトのトロンビンに結合して予測されるステムループ構造を有する、 3 9 マー D N A リガンド(リガンド T 3 9 (S E Q I D N O : 8 8) : 5' - C A G T C C G T G G T A G G G C A G G T T G G G G T G A C T T C G T G G A A [3' T] ; ここで、 [3' T] は、 3' - エクソヌクレアーゼ分解を抑制するために追加した 3' - 3' 結合性のチミジンヌクレオチドを表す)は、 P D G F - A B に 0 . 2 3 μ M の K_d で結合する(データ示さず)。

最小リガンドの解離速度。 P D G F - A B / D N A 複合体の動態安定性を評価するために、最小リガンド 2 0 t (S E Q I D N O : 8 3) 、 3 6 t (S E Q I D N O : 8 4) 及び 4 1 t (S E Q I D N O : 8 5) と P D G F - A B との複合体の 3 7 における解離速度を、過剰量の非標識リガンド添加後の時間を関数として P D G F - A B (1 n M) に結合した放射標識リガンドの量(0 . 1 7 n M) を測定して決定した(図 4)。

上記のタンパク質及び D N A リガンド濃度では、 D N A リガンドの高アフィニティー分画のみが P D G F - A B に結合する。解離速度定数についての以下の数値は、図 4 のデータ点を 1 次速度式へフィッティングして得た: リガンド 2 0 t は $4 . 5 \pm 0 . 2 \times 1 0 ^{ - 3 } \text{ s} ^{ - 1 }$ ($t_{1/2} = 2 . 6 \text{ 分}$) 、リガンド 3 6 t は $3 . 0 \pm 0 . 2 \times 1 0 ^{ - 3 } \text{ s} ^{ - 1 }$ ($t_{1/2} = 3 . 8 \text{ 分}$) 及びリガンド 4 1 t は $1 . 7 \pm 0 . 1 \times 1 0 ^{ - 3 } \text{ s} ^{ - 1 }$ ($t_{1/2} = 6 . 7 \text{ 分}$)。解離定数と解離速度定数から算出した結合速度($k_{on} = k_{off} / K_d$)は、 2 0 t が $3 . 1 \times 1 0 ^{ 7 } \text{ M} ^{ - 1 } \text{ s} ^{ - 1 }$ 、 3 6 t が $3 . 1 \times 1 0 ^{ 7 } \text{ M} ^{ - 1 } \text{ s} ^{ - 1 }$ 、 4 1 t が $1 . 2 \times 1 0 ^{ 7 } \text{ M} ^{ - 1 } \text{ s} ^{ - 1 }$ である。

最小リガンドの融解温度。最小リガンドである 2 0 t 、 3 6 t 及び 4 1 t の温度に対する U V 吸収のプロフィール(図 5)から、融解温度(T_m)を決定した。この実験で用いたオリゴヌクレオチド濃度(3 2 0 ~ 4 4 0 n M)では、非変性ポリアクリルアミドゲル上で单一バンドとして観察されたのはモノマー分子種だけである。 T_m 値は、融解プロフィールの第一微分係数の再プロットから得た。リガンド 2 0 t 及び 4 1 t は、 4 4 及び 4 9 の T_m 値で单相の融解を示した。リガンド 3 6 t の融解プロフィールは二相性で、 T_m 値は第一(主要)転移で 4 4 、第二転移で約 6 3 であった。

10

20

30

40

50

5' - ヨード - 2' - デオキシリジンで置換された最小DNAリガンドのPDGF-ABに対する光架橋形成。ごく近接しているDNAリガンドとPDGFの部位を決定するために、5' - ヨード - 2' - デオキシリジン(I d U)で置換されたDNAリガンド、20t、36t及び41tを用いて、一連の光架橋形成実験を実施した。308nmで単色性の励起をすると、最初のnから^{*}遷移へのシステム内交叉の後で、5' - ヨード及び5' - プロモ置換されたピリミジンヌクレオチドが反応性の三重項状態を多く占めるようになる。次いで励起された三重項状態の分子種は、その近傍にある電子リッチなアミノ酸残基(例、Trp、Tyr及びHis)と反応して共有結合性の架橋を形成する。この方法が核酸-タンパク質相互作用の研究に広く使用されてきたのは、光損傷を最小化する300nm以上の光による照射が可能だからである(Williamsら(1994) Nucleic Acids Res. 22: 4947 - 4952; StumpとHall(1995) RNA 1: 55 - 63; Williamsら(1993) Science 262: 1255 - 1257; Jensenら(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 12220 - 12224)。すべてのチミジン残基をI d U残基で置換したリガンド20t、36t及び41tの類似体を、固相ホスホロアミダイト法を用いて合成した。これらI d U置換リガンドのPDGF-ABに対するアフィニティーは、非置換リガンドに比較してやや増強され、8%ポリアクリルアミド/7M尿素ゲル上でより遅い電気泳動度を有するバンドの外観によれば、3種の5'末端標識I d U置換リガンドはいずれも308nmで励起されるとPDGF-ABと架橋結合した(データ示さず)。最高の架橋効率が観察されたのはI d U置換リガンド20tである。観察される架橋の原因となる特定のI d U位置を同定するために、單一又は複数のI d Uで置換した7種の20t類似体(リガンド20t - I 1 ~ 20t - I 7: 5' - T G G G A G G G C G C G T¹T¹C T¹T¹C G T²G G T³T⁴A C T⁵T⁶T⁶A G T⁷C C C G - 3': SEQ ID NO: 89 - 95、ここで数字は7種のリガンドに対して指定したチミジンヌクレオチドのI d U置換位置を示す)を、PDGF-ABに対して光架橋する能力について試験した。上記7種のリガンドのなかで、PDGF-ABに対する効率的な架橋形成が観察されたのは、リガンド20t - I 4(SEQ ID NO: 92)だけである。この光反応性のI d U位置は、ヘリックス連結部のループにある3'近傍チミジンに相当する(図2)。

【0136】

PDGF-AB上で架橋形成したアミノ酸残基を同定するために、5'末端標識した20t - I 4とPDGF-ABの混合物を37℃で15分間インキュベートし、次いで308nmで照射した。次いでこの反応混合物を改良トリプシンで消化し、架橋形成フラグメントを8%ポリアクリルアミド/7M尿素ゲルにて分離した。フリーDNAの最も近くに泳動したバンドから回収したペプチドフラグメントをエドマン分解したところ、アミノ酸配列、KKPIXKK(SEQ ID NO: 96:ここでXは20種の誘導される標準アミノ酸では同定し得なかった被修飾アミノ酸を示す)が明らかになった。Xがフェニルアラニンであれば、このペプチド配列はPDGF-B鎖のアミノ酸80 - 86に相当し(Johanssonら(1984) EMBO J. 3: 921 - 928)、これはPDGF-BBの結晶構造において溶媒露出したループIIの一部を構成する(Oefnerら(1992) EMBO J. 11: 3921 - 3926)。PDGF-A鎖では、このペプチド配列は出現しない(Betsholtzら(1986) Nature 320: 695 - 699)。以上から、上記データは、リガンド20tの特定チミジン残基とPDGF-B鎖のフェニルアラニン84との点接触を立証する。

受容体結合アッセイ。培養細胞に対するPDGFイソ型の効果をPDGFに対するDNAリガンドが阻害し得るかどうかを決定するために、トランスフェクションによりブタ大動脈内皮(PAE)細胞において安定発現されているPDGF- - 及び - 受容体に対する¹²⁵I - 標識化PDGFイソ型の結合に対する効果を先ず定量した。リガンド20t、36t及び41tは、いずれもPDGF - 受容体(図6)又はPDGF - 受容体(データ示さず)に対する¹²⁵I - PDGF - BBの結合を効率的に阻害し、半最大効果のD

N A リガンド濃度は約 1 n M であった。トロンビンに対して向けられ、対照として包含される D N A リガンド T 3 9 (S E Q I D N O : 8 8) (上記参照) は効果を示さなかった。、¹²⁵I - P D G F - A A の P D G F - 受容体に対する結合を阻害し得たりガンドは 1 つもなく (データ示さず) 、 P D G F - B B 及び P D G F - A B に対するリガンド 2 0 t 、 3 6 t 及び 4 1 t の観察された特異性と矛盾しない。

最小リガンドによるマイトジェニック効果の阻害 . P D G F - 受容体を発現する P A E 細胞に対する P D G F - B B のマイトジェニック効果を阻害する D N A リガンドの能力を検討した。図 7 に示すように、 [³H] チミジン取込みに対する P D G F - B B の促進効果は、リガンド 2 0 t 、 3 6 t 及び 4 1 t によって中和された。リガンド 3 6 t の半最大阻害濃度は 2 . 5 n M であり、リガンド 4 1 t はそれよりやや効率的で、 2 0 t はやや非効率であった。対照リガンドの T 3 9 には効果がなかった。さらに、この細胞での [³H] チミジン取込みに対する胎仔血清の促進効果を阻害したリガンドは 1 つもなかった。このことは、阻害効果が P D G F 特異的であることを示している。

実施例 4 . S E L E X 後の修飾

ヌクレアーゼに対する核酸の安定性は、核酸をベースとする治療薬を開発する嘗為において重要な考察事項である。これまでの実験では、 S E L E X - 派生リガンドにおけるヌクレオチドの多くが、場合によってはそのほとんどが、ヌクレアーゼ消化に抵抗する修飾されたヌクレオチドによって、高アフィニティー結合性を低下させずに置換され得ることが示された (Green ら (1 9 9 5) C h e m i s t r y a n d B i o l o g y 2 : 6 8 3 - 6 9 5 ; Green ら (1 9 9 5) J . M o l . B i o l . 2 4 7 : 6 0 - 6 8) 。

【 0 1 3 7 】

2 ' - O - メチル (2 ' - O - M e) 又は 2 ' - フルオロ (2 ' - F) 置換を許容するリガンド 3 6 t 内のポジションを同定するために、一連の置換実験を実施した。表 6 と 7 、及び図 8 A と 8 B は、試験した置換及び、 P D G F - A B 又は P D G F - B B へのアフィニティーに対する修飾リガンドの効果をまとめる。 2 - フルオロピリミジンヌクレオシドホスホロアミダイトは J B L S c i e n t i f i c (サンルイスオビスポ、 C A) から入手した。 2 ' - O - メチルプリンホスホロアミダイトは、 P e r S e p t i v e B i o s y s t e m s (ボストン、 M A) から入手した。他のヌクレオシドホスホロアミダイトもすべて P e r S e p t i v e B i o s y s t e m s (ボストン、 M A) から入手した。必ずしもすべての置換の組み合わせを試験したわけではない。しかしながら、上記の実験は、 P D G F - A B 又は P D G F - B B に対する高アフィニティー結合に適合する 2 ' - O - M e 及び 2 ' - F 置換のパターンを同定するために用いられてきた。リガンド 3 6 t のヘリックス I I 及び I I I (図 2 B 及び 8 B) 上のトリヌクレオチドループがペントエチレングリコール (1 8 原子) スペーサー (S p a c e r P h o s p h o r a m i d i t e 1 8 、 G l e n R e s e a r c h , スターリング、 V A) (ペントエチレングリコール置換リガンドの合成に関する説明は実施例 5 を参照のこと) により、 P D G F - A B 又は - B B に対する高アフィニティー結合性を低下することなく置換し得ることは注目に値する。このことは、リガンドのヘリックス連結部ドメインが高アフィニティー結合に必要とされる構造モチーフの核心を表すという考え方の一一致している。実用的に述べると、 6 つのヌクレオチドを 2 つのペントエチレングリコールスペーサーで置換することは、リガンド合成に必要なカップリングの工程数を 4 つ減少させるという点で有利である。この置換実験に加えて、ヘリックス I の塩基から 4 つのヌクレオチドが結合活性を失うことなく除去し得ることが見出された (例えば、表 6 及び 7 で、リガンド 3 6 t (S E Q I D N O : 8 4) を 3 6 t a (S E Q I D N O : 1 4 1) と比較する、又はリガンド 1 2 6 6 (S E Q I D N O : 1 2 4) を 1 2 9 (S E Q I D N O : 1 2 7) と比較すること) 。

実施例 5 . P E G 修飾 P D G F 核酸リガンドの合成

A) 固体支持体における N X 3 1 9 7 5 (S E Q I D N O : 1 4 8) 合成の一般法
デオキシヌクレオシドホスホロアミダイト標準品、 2 ' - O - メチル - 5 ' - O - D M T

10

20

30

40

50

- N 2 - t e r t - プチルフェノキシアセチルグアノシン - ホスホロアミダイト、2' - O - メチル - 5' - O - D M T - N 6 - t e r t - プチルフェノキシアセチルアデノシン - ホスホロアミダイト、2' - デオキシ - 2' - フルオロ - 5' - O - D M T - ウリジン - ホスホロアミダイト、2' - デオキシ - 2' - フルオロ - 5' - O - D M T - N 4 - アセチルシチジン - 3' - N , N - ジイソプロピル - (2 - シアノエチル) - ホスホロアミダイト、1 8 - O - D M T - ヘキサエチレングリコール - 1 - [N , N - ジイソプロピル - (2 - シアノエチル) - ホスホロアミダイト] (図 9 C) 、及び 5 - トリフルオロアセトアミドペニタン - 1 - [N , N - ジイソプロピル - (2 - シアノエチル) - ホスホロアミダイト] (図 9 D) を使用して、ミリポア 8800 自動合成機において 1 ミリモルスケールで合成を実施した。5' - スクシニルチミジン 60 ~ 70 μ モル / g でロードした、孔サイズ 600 Å 、 80 ~ 120 メッシュの制御孔ガラス (C P G) 支持体上で、4 , 5 - ジシアノイミダゾールを活性化剤として用いて、合成を実施した。合成の後で、55 で 16 時間かけて、40% NH₄OH によりオリゴを脱保護化した。支持体を濾過し、水及び 1 : 1 アセトニトリル / 水で洗浄し、洗液を合わせて蒸発乾固した。骨格上のアンモニウムカウンターイオンを逆相塩交換によってトリエチルアンモニウムイオンに変換し、溶媒を蒸発させて粗オリゴをトリエチルアンモニウム塩として得た。

【 0138 】

ループ上のヘキサエチレングリコールスペーサーは、リン酸結合を介してヌクレオチドに付けられる。2つのループの構造を図 9 A 及び 9 B に示す。示された 5' リン酸基はヘキサエチレングリコールホスホロアミダイトに由来する。

B) P D G F 核酸リガンド上のアミノリンカーに対する 40 K P E G · N H S エステルの接合

5' - 1 級アミノ基を含有する N X 31975 の粗オリゴヌクレオチドを 100 mM のホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9) に溶かして 60 mg / ml の濃度にした。別の試験管に 2 当量の P E G · N H S エステル (図 9 E) (Shearwater Polymers 社) を乾燥 D M F (ホウ酸 : D M F = 1 : 1) に溶かし、この混合物を温めて P E G · N H S エステルを溶かした。次いで、オリゴ溶液を速やかに P E G 溶液へ加え、この混合物を室温で 10 分間激しく攪拌する。約 95% のオリゴが P E G · N H S エステルに接合した。

実施例 6 . 修飾されたリガンドの血清における安定性

D N A (36 t a) (S E Q I D N O : 141) 及び修飾された D N A (N X 21568) (S E Q I D N O : 146) リガンドのラット血清における安定性を 37 で比較した。上記実験に用いた血清はスプレーグ - ドーリーラットから入手し、0.45 μ m の酢酸セルロースフィルターで濾過し、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液で緩衝化した。この血清に被験リガンド (36 t a 又は N X 21568) を加え、最終濃度を 500 nM とした。血清の最終濃度は、緩衝液とリガンドを加えたために 85% となった。元のインキュベーション混合液 900 μ l から様々な時点で 100 μ l のアリコートを分取し、500 mM EDTA (pH 8.0) 10 μ l を加え、振盪し、ドライアイスで凍結し、実験終了まで -20 に保存した。各時点で残存している完全長オリゴヌクレオチドリガンドの量を H P L C 分析によって定量した。H P L C 注入サンプルを調製するには、ホルムアミド 30% 及び 1% アセトニトリル含有 25 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) 70% の混合液 200 μ l を各点サンプルの融解液 100 μ l へ加え、5 秒間振盪し、エッペンドルフ微量遠心管において 14,000 r p m で 20 分間遠心分離した。L i C l 勾配を適用する陰イオン交換クロマトグラフィーカラム (N u c l e o P a c , D i o n e x , P A - 100 , 4 × 50 mm) を用いて分析を実施した。各時点で残存している完全長オリゴヌクレオチドの量をピーク面積から決定した (図 10) 。修飾されたリガンド (N X 21568) の半減期は約 500 分であり、約 35 分の半減期で分解する D N A リガンド (36 t a) に比較して、ラット血清において実質的に優る安定性を示した (図 10) 。従って、血清における安定性の増加は 2' - 置換に由来するものである。

実施例 7 . N X 31975 - 40 K P E G (S E Q I D N O : 146) の再狭窄に

10

20

30

40

50

おける効果

ラット再狭窄モデルと効果の結果。核酸リガンドの血漿滞留時間は、ポリエチレングリコールのような大きな不活性官能基を加えることにより劇的に向上される（例えば、PCT/US97/18944を参照のこと）。in vivoの有効性実験のために、実施例5Bに記載のように（分子の説明については図9Aを参照のこと）、40K・PEGをNX31975へ接合してNX31975-40K・PEGを創出した。重要にも、結合実験に基づけば、リガンドの5'末端に40kDaのPEG基を加えても、PDGF-BBに対するその結合アフィニティーには影響しない。

【0139】

NX31975-40K・PEGによるPDGF-Bの選択阻害効果を3月齢の雄スブレーグ・ドーリーラット（370～450g）で試験した。ラットは1ケージあたり3匹収容し、標準実験食及び水を自由に摂取させた。人工照明を毎日14時間当てた。この実験は、ウプサラ大学（スウェーデン）大学病院外科部門、動物部の体系的なガイドラインに準拠して実施した。

10

【0140】

全30匹のラットを2処置群のいずれかへ無作為に割当てた：第1群のラット15匹にはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）に溶かしたNX31975-40K・PEGを体重kgあたり10mg、1日2回腹腔内（i.p.）注射して与え、第2群（対照群）のラット15匹には等量（約1ml）のPBSを与えた。処置期間は14日であった。両群の初回注射は動脈損傷の1時間前になされた。

20

【0141】

動脈性の損傷を発生させるために、全動物にフェンタニール・フルアニゾン（Hypnorm vet, フルアニゾン10mg/ml、フェンタニール0.2mg/ml、Janssen Pharmaceutica, ビアス、ベルギー）、ミダゾラム（Dormicum, ミダゾラム5mg/ml、F.ホフマン-ラ・ロシュAG、バーゼル、スイス）及び滅菌水の、1:1:2混合液をラット100gにつき0.33ml、i.p.注射して麻酔した。頸部正中切開により、遠位の左総頸動脈及び外頸動脈を露出させた。外頸動脈を介して導入した2FFogarty塞栓摘出カテーテルの管腔内通過によって左総頸動脈を傷つけた。蒸留水0.06mlで十分膨らませたバルーンを用いてカテーテルを3回通過させ、頸動脈自体を膨張させた。カテーテル除去後に外頸動脈を結紮し、創傷部を閉じた。すべての外科処置は、どれが処置群かを知らされない外科医によって実施された。

30

【0142】

カテーテルによる損傷から14日目に、動物を上記のように麻酔した。腹大動脈を露出する20分前に、0.5%エバンスブルー染料（Sigma Chemical社、セントルイス、MO）0.5mlを動物に静脈内注射し、内皮化しないままになっている血管部分が同定できるようにした。溶出液が下大静脈の静脈孔を経て透明になるまで、腹大動脈内に逆向きに置いた大力ニューレを介し、100mmHgにおいて、氷冷PBSで頸動脈をin situ灌流した。右及び左総頸動脈の分枝部までの遠位半分を切除し、液体窒素に凍らせた。すぐ後で残りの近位部分を、100mmHg圧において、2.5%グルタルアルデヒド/リン酸緩衝液（pH7.3）を用いて同じ大動脈カニューレを介して灌流固定した。PBSを用いた灌流を開始する前に、動物を過量のフェノバルビタールで屠殺した。灌流固定から約15分後、残りの近位右及び左総頸動脈を、大動脈弓及び無名動脈も含めて、次の調製のために回収した。

40

【0143】

左総頸動脈のエバンスブルー染色部分の中央から約0.5μm離れた5断面、及び対側性の非損傷動脈の1断面を動物ごとにコンピュータ支援プラニメトリーで解析した。以下の領域を測定した：外弾性内腔（EEL）に囲まれた領域、内弾性内腔（IEL）及び内腔内細胞層。中膜及び内膜の面積を算出した。すべての測定はどれが処置群かを知らされない実験者によってなされた。

50

【0144】

対照群と核酸リガンド処置群についての内膜 / 中膜比の数値に基づけば、P D G F 核酸リガンドは、内膜新形成の約 50 % を有意に ($p < 0.05$) 阻害した (図 11)。

実施例 8 . 糸球体腎炎における P D G F の N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G による拮抗作用

この実施例は以下に示す実施例 9 に組込まれる一般法を提供する。

材料と方法

すべての核酸リガンド及びその配列スクランブル (s c r a m b l e d) 対照物は、制御孔ガラス上の固相ホスホロアミダイト法により、8 8 0 0 M i l l i g e n · D N A 合成機を使用して合成し、水酸化アンモニウムを 55 °で 16 時間用いて脱保護化した。この実施例及び実施例 9 で説明する実験に用いた核酸リガンドは、N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G (S E Q I D N O : 1 4 6) (図 9 A) である。N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G は、N X 3 1 9 7 5 (S E Q I D N O : 1 4 8) (表 7) を実施例 5 に記載のように 4 0 K · P E G へ接合して創出した。配列スクランブル対照の核酸リガンドでは、N X 3 1 9 7 5 のヘリックス連結部領域にある 8 つのヌクレオチドを、コンセンサス二次構造を形式的には変化させることなく相互交換した (図 8 C 参照)。配列スクランブル対照核酸リガンドの P D G F - B B に対する結合アフィニティーは約 1 μ M であり、これは N X 2 1 6 1 7 (S E Q I D N O : 1 4 3) に比較して 10,000 倍低い。次いでこの配列スクランブル対照核酸リガンドを P E G に接合し、N X 3 1 9 7 6 - 4 0 K · P E G (S E Q I D N O : 1 4 7) (分子の説明については図 9 B を参照のこと) と命名した。P E G の核酸リガンド (又は配列スクランブル対照) に対する共有カップリングは、実施例 5 に記載のようにして達成した。

【0145】

交叉反応結合実験に用いるラットの P D G F - B B は、ラットの P D G F - B B 配列を含有する s C R - S c r i p t · A m p · S K (+) プラスミドでトランスフェクトした大腸菌由来のものである。ラット P D G F - B B の配列は、ラット肺由来ポリ A + R N A (クローンテック、サンディエゴ、C A) から、P D G F - B B の成熟型をコードする配列を增幅するプライマーを用いた R T - P C R を介して導いた。ラット P D G F - B B タンパク質の発現及び精製は R & D S y s t e m s で実施した。

糸球体間質細胞の培養実験

ヒト糸球体間質細胞を、既報のようにして (R a d e k e l a (1 9 9 4) J . I mm u n o l . 1 5 3 : 1 2 8 1 - 1 2 9 2) 培養で確立し、特徴づけて維持した。この培養された糸球体間質細胞に対するリガンドの抗増殖効果を試験するために、細胞を 9 6 穴プレート (N u n c , ウィスバーデン、ドイツ) にまき、半集密状態まで増殖させた。次いM C D B 3 0 2 培地 (シグマ、ダイゼンホーフェン、ドイツ) で 4 8 時間増殖を停止させた。4 8 時間後、5 0 又は 1 0 μ g / m l の核酸リガンド N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G か、又は 5 0 又は 1 0 μ g / m l の配列スクランブル核酸リガンド (N X 3 1 9 7 6 - 4 0 K · P E G) のいずれかとともに以下の様々な刺激を加えた：培地のみ、ヒト組換え P D G F - A A 、 - A B 又は - B B (ドイツ、ヴュルツブルグ大学の J . H o p p e の厚意により提供された) 1 0 0 n g / m l 、ヒト組換え上皮増殖因子 (E G F ; C a l b i o c h e m , バッドソーデン、ドイツ) 1 0 0 n g / m l 又は組換えヒト纖維芽細胞増殖因子 - 2 (S y n e r g e n , ボウルダー、コロラドの厚意により提供された) 1 0 0 n g / m l 。7 2 時間インキュベーションした後に、記載のように (L o n n e m a n n (1 9 9 5) K i d n e y I n t . 5 1 : 8 3 7 - 8 4 4) 、2 , 3 - ピス [2 - メトキシ - 4 - ニトロ - 5 - スルホフェニル] - 2 H - テトラゾリウム - カルボキシアニリド (X T T ; シグマ) を用いて、生細胞の数を定量した。

実験デザイン

体重 1 5 0 ~ 1 6 0 g の雄ウィスターラット (チャールズリバー、ズルツフェルド、ドイツ) 3 3 匹に、モノクローナル抗 - T h y 1 . 1 抗体 (クローン O X - 7 ; European Collection of Animal Cell Cultures, ソー

10

20

30

40

50

ルズベリー、イギリス)を1mg/kg注射することによって、抗-Thy 1.1間質細胞増殖性糸球体腎炎を誘導した。疾患誘導後3~8日の間、ラットを核酸リガンド又はPEGで処置した(下記参照)。処置は、PBS(pH7.4)400μlに溶かした試験物質を1日2回i.v.ボーラス(bolus)注射することを含んだ。この処置期間を選択したのは、発症後第1日目から糸球体間質細胞増殖がピークに至るまでにラットを処置するためである(Fløegeら(1993)Kidney Int. Suppl. 39:S47-54)。試験したのは以下の4群である:1) NX31975-40K·PEG(SEQ ID NO:146)を受けたラット9匹(即ち、全体で40K·PEG15.7mgに接合したPDGF-Bリガンド4mg);2) 同量のPDGF接合スクランブル核酸リガンド(NX31976-40K·PEG)(SEQ ID NO:147)を受けたラット10匹;3) 同量(15.7mg)の40K·PEGだけを受けたラット8匹;4) PBSのみのボーラス注射400μlを受けたラット6匹。疾患誘導後6日目と9日目に、組織学的分析用の腎臓生検サンプルを得た。疾患誘導後5~6日目と8~9日目に、24時間かけて尿を採取した。9日目に屠殺する4時間前に、チミジン類似体の5'-プロモ-2'-デオキシウリジン(BrdU;シグマ、ダイゼンホーフェン、ドイツ)を腹腔内注射した。

【0146】

同年齢である10匹の未処置ウィスターラットでは、タンパク尿及び腎組織パラメーター(以下参照)が正常範囲にあることを確かめた。

腎臓の形態学

光学顕微鏡及び免疫ペルオキシダーゼ染色用に組織をメチルカルノイ液に固定し(Johnsonら(1990)Am. J. Pathol. 136:369-374)、パラフィンに埋め込んだ。4μmの断面を過ヨード酸シッフ(PAS)試薬で染色し、ヘマトキシリントリコントラストで観察した。PAS染色切片において、100個の腎糸球体における有糸分裂数を定量した。

免疫ペルオキシダーゼ染色

メチルカルノイ液で固定した生検組織の4mm切片を、記載のような間接免疫ペルオキシダーゼ技術によって処理した(Johnsonら(1990)Am. J. Pathol. 136:369-374)。1次抗体は既報のものと同一であり(Burgら(1997)Lab. Invest. 76:505-516; Yoshimuraら(1991)Kidney Int. 40:470-476)、-平滑筋アクチンに対するマウスモノクローナル抗体(クローン1A4);PDGF-B鎖に対するマウスモノクローナル抗体(クローンPGF-007);单球、マクロファージ及び樹状細胞に存在する細胞質抗原に対するマウスモノクローナルIgG抗体(クローンED1);ラット赤血球で前吸着させたアフィニティー精製ポリクローナルヤギ抗ヒト/ウシIV型コラーゲンIgG;ポリクローナルウサギ抗ラットフィブロネクチン抗体のアフィニティー精製IgG分画;既報のような好適な陰性対照物(Burgら(1997)Lab. Invest. 76:505-516; Yoshimuraら(1991)Kidney Int. 40:470-476)を包含した。全スライドに対する評価は、スライドの起源について知らない観察者によってなされた。

【0147】

糸球体に浸潤している白血球の平均数を得るために、20以上の別々の毛細管断片を含有する糸球体の50以上の連続した横断面を評価し、腎臓あたりの平均値を算出した。-平滑筋アクチン、PDGF-B鎖、IV型コラーゲン及びフィブロネクチンについて免疫ペルオキシダーゼ染色を評価するために、各糸球体領域を半定量的に等級づけし、生検ごとの平均スコアを算出した。各スコアは染色の強さというよりは程度の変化を主に反映し、焦点が強められたポジティブ染色を示す糸球体領域の比率に依存する:I=0~25%、II=25~50%、III=50~75%、IV=>75%。この半定量的な評点システムは種々の観察者の間で再現性があり、データはコンピュータ形態計測によって得られた結果と非常によく相關している(Klimekら(1996)Kidney Int.

10

20

30

40

50

49 : 666 - 678 ; Hugoら(1996) J. Clin. Invest. 97 : 2
499 - 2508)。

免疫組織化学的な二重染色

増殖細胞のタイプを同定するための二重免疫染色は、既報のように(Klimekら(1996) Kidney Int. 49 : 666 - 678 ; Hugoら(1996) J. Clin. Invest. 97 : 2499 - 2508)、先ず間接免疫ペルオキシダーゼ法を使用して、トリス緩衝化生理食塩水(Amersham, ブラウンシュヴァイク、ドイツ)にスクレアーゼを含有するプロモデオキシウリジンに対するマウスマノクローナル抗体(クローンBU-1)で増殖細胞断面を染色することによって実施した。次いで、IgG₁モノクローナル抗体である、-平滑筋アクチンに対する1A4及び单球/マクロファージに対するED1とともに断面をインキュベートした。BradUに対して陽性の核染色を示し、その核が-平滑筋アクチンに陽性な細胞質で完全に囲まれている細胞は、増殖している糸球体間質細胞か又は单球/マクロファージとして同定された。陰性対照にはいずれの1次抗体も含まれていないので、どの場合でも二重染色は認められなかった。
10

IV型コラーゲンmRNAに対するin situハイブリダイゼーション

既報のようにして(Yoshimuraら(1991) Kidney Int. 40 : 470 - 476)、緩衝化10%ホルマリンに固定された生検組織の4mm断面に対し、IV型コラーゲンに対するジゴキシゲニン標識アンチセンスRNAプローブを利用して(Eitnerら(1997) Kidney Int. 51 : 69 - 78)、in situハイブリダイゼーションを実施した。アルカリホスファターゼに共役した抗ジゴキシゲニン抗体(Genius Nonradioactive Nucleic Acid Detection Kit, ベーリングガーマンハイム、マンハイム、ドイツ)を用いた連続発色によってRNAプローブの検出を実施した。対照試験には、適合する連続断面に対するセンスプローブとのハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションの前にRNAアーゼとインキュベートした組織断面に対するアンチセンスプローブとのハイブリダイゼーション、又は記載された(Yoshimuraら(1991) Kidney Int. 40 : 470 - 476)プローブ、抗体又は発色液の省略が含まれた。糸球体mRNAの発現は、上記の評点システムを用いて半定量的に評価した。
20

その他の測定

尿タンパク質は、ウシ血清アルブミン(シグマ)を標準品として、Bio-Rad Protein Assay(Bio-Rad Laboratories社、ミュンヘン、ドイツ)を用いて測定した。
30

統計解析

数値はすべて平均値±SDとして表した。統計的有意差($p < 0.05$ として定義される)は、ANOVA及びBonferroniのt-検定を使用して評価した。

実施例9

ここで述べるすべての実験については、修飾したDNA核酸リガンドを、実施例5及び8、及び図9A及び9Bに記載のように、40K-PAGEへ接合した。ほとんどの核酸リガンドは8~12kDaに及ぶ分子量を有する(修飾されたPDGF核酸リガンドは10kDaの分子量を有する)ので、PEGのような大きな不活性分子成分を付加すると、in vivoにおける核酸リガンドの滞留時間が向上する(例えば、PCT/US97/18944を参照のこと)。重要にも、核酸リガンドの5'末端にPEG成分を加えても、PDGF-BBに対する核酸リガンドの結合アフィニティーには影響しない($K_d = 約 1 \times 10^{-10} M$)。
40

ラットPDGF-BBに対する核酸リガンドの交叉反応性

PDGFの配列は生物種間で高度に保存されていて、ヒト及びラットのPDGF-B鎖の配列は89%同一である(Herrrenら(1993) Biochim. Biophys. Acta 1173 : 294; Lindnerら(1995) Circ. Res. 76 : 951)。それでも、核酸リガンドの高い特異性に照らせば(Goldら(1995) Ann. Rev. Biochem. 64 : 763 - 797)、in vivo実験を正確
50

に解釈するには、核酸リガンドのラット P D G F - B 鎖に対する結合特性を理解することが必要とされる。従って、ラット P D G F - B B の成熟型をクローニングして大腸菌で発現させた。この P D G F 核酸リガンドは、ラット及びヒトの組換え P D G F - B B に同一の高アフィニティーで（データ示さず）結合した。

P D G F - B 鎖 D N A リガンドは、糸球体間質細胞の *i n v i t r o* 増殖を特異的に阻害する。

【 0 1 4 8 】

増殖停止した糸球体間質細胞において、N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G (S E Q I D N O : 1 4 6) 又はスクランブル核酸リガンド (N X 3 1 9 7 6 - 4 0 K · P E G) (S E Q I D N O : 1 4 7) の、増殖因子誘導性の増殖に対する効果を試験した。スクランブル核酸リガンドを加えても、促進された細胞の増殖速度は影響されなかった（図 12）。一方、N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G 5 0 μ g / m l で、P D G F - B B 誘導性の糸球体間質細胞増殖は有意に抑制された（図 12）。P D G F - A B 及び - A A 誘導性の糸球体間質細胞増殖も N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G により低下する傾向が認められたが、これらの違いは統計的に有意ではなかった（図 12）。対照的に、E G F 又は F G F - 2 誘導性の増殖に対する N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G の効果は認められなかった。核酸リガンドを 1 0 μ g / m l の濃度で用いた場合も同様の効果が認められた（データ示さず）。

抗 - T h y 1 . 1 腎炎を有するラットにおける P D G F - B 鎖 D N A リガンドの効果

抗 - T h y 1 . 1 抗体を注射した後で P B S 処置された動物は、初期の糸球体間質炎及び 20 6 日目と 9 日目に続く糸球体間質細胞増殖及びマトリックス蓄積のフェーズにより特徴づけられる、腎炎の典型的な経過をたどった (F l o e g e r a (1 9 9 3) K i d n e y I n t . S u p p l . 3 9 : S 4 7 - 5 4) 。核酸リガンド又は P E G を単独で何度も注射しても明らかに有害な効果は認められず、全ラットは試験終了まで生き続け、正常に見えた。

【 0 1 4 9 】

P A S 染色した腎臓断面では、疾患誘導後 6 日目と 9 日目に糸球体間質の増殖性変化が激しく、P B S 、 P E G 単独又はスクランブル核酸リガンドを受けたラットの間で区別がつかなかった（データ示さず）。この組織学的な変化は、N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G リガンド処置群では顕著に抑制され、ほとんど正常化された。この糸球体間質の増殖性変化を（半）定量的に評価するために、様々なパラメーターを分析した：

a) 糸球体間質細胞増殖の減少

糸球体の有糸分裂数を数えることによって評価される、糸球体細胞の増殖は、6 日目も 9 日目も 3 つの対照群間に有意な違いがなかった（図 13 A ）。スクランブル核酸リガンドを受けたラットに比較して、P D G F - B リガンドでの処置により、糸球体の有糸分裂は 6 日目 6 4 % 、 9 日目 7 8 % 減少した（図 13 A ）。糸球体間質細胞に対する処置の効果を評価するために、活性化された糸球体間質細胞だけで発現される - 平滑筋アクチンについて腎臓断面を免疫染色した (J o h n s o n ら (1 9 9 1) J . C l i n . I n v e s t . 8 7 : 8 4 7 - 8 5 8) 。やはり、6 日目も 9 日目も 3 つの対照群間に有意な違いがなかった。しかしながら、N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G 処置群では、6 日目と 9 日目に - 平滑筋アクチンの免疫染色スコアが有意に減少した（図 13 D ）。糸球体間質細胞の増殖が特異的に減少したのかどうかを判定するために、N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G 処置ラットとスクランブル核酸リガンド処置ラットを、細胞増殖マーカー (B r d U) 及び - 細胞平滑筋アクチンについて二重免疫染色した。データにより、疾患誘導後 9 日目に増殖性の糸球体間質細胞が顕著に減少していることが確かめられた：糸球体横断面での B r d U (+) / - 平滑筋アクチン (+) 細胞が、スクランブル核酸リガンドを受けたラットで 4 3 . 3 ± 1 2 . 4 であるのに対し、P D G F - B アプタマー処置ラットでは 2 . 2 ± 0 . 8 であり、糸球体間質細胞の増殖が 9 5 % 減少したことになる。対照的に、増殖している単球 / マクロファージに対する P D G F - B アプタマーの効果は、疾患誘導後 9 日目でも認められなかった (B r d U (+) / E D - 1 (+) 細胞 / 1 0 0 糸球体

10

20

30

40

50

横断面は、P D G F - B アプタマー処置ラット： 2.8 ± 1.1 に対し、スクランブルアプタマー処置ラット： 2.7 ± 1.8 であった)。

b) 内因性 P D G F - B 鎮の発現減少

免疫組織化学的では、以前の観察と同じように (Yoshimuraら(1991) Kindney Int. 40: 470 - 476)、3つの対照群すべてで糸球体 P D G F - B 鎮の発現が顕著にアップレギュレートされていた(図13B)。N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G 処置群では、増殖性糸球体間質細胞の減少に併行して、糸球体の P D G F - B 鎮の過剰発現が有意に減少した(図13B)。

c) 糸球体単球 / マクロファージ流入の減少

糸球体単球 / マクロファージ流入は、疾患誘導後 6 及び 9 日目で、スクランブル核酸リガンドを受けたラットに比較して、N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G 処置ラットにおいて有意に減少した(図13E)。

d) タンパク尿に対する効果

3つの対照群では、疾患誘導後 6 日目に $147 \text{ mg} / 24 \text{ 時間}$ までの中等度のタンパク尿が存在した(図13C)。N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G で処置すると、6日目に平均タンパク尿が減少したが、統計的有意差はなかった(図13C)。疾患誘導後 9 日目のタンパク尿は低く、全 4 群で同等であった(図13C)。

e) 糸球体マトリックスの産生と蓄積の減少

組織免疫化学的では、3つの対照群すべてにおいて、I V型コラーゲン及びフィブロネクチンが糸球体に蓄積していた(図14A ~ C)。I V型コラーゲン及びフィブロネクチンの糸球体での過剰発現は、N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G 処置ラットでは有意に減少した(図14A ~ C)。後者では、糸球体染色スコアは正常ラットで観察されるものに近かった(図14A ~ C)。in situハイブリダイゼーションにより、N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K · P E G 処置ラットにおいて I V型コラーゲンの糸球体発現が減少したのは、このコラーゲン型の糸球体での合成が減少したことに関連していることが示された(図14A ~ C)。

実施例 10 . 2 ' - フルオロ - 2 ' - デオキシピリミジン R N A リガンドを伸展させて P D G F 及び R N A 配列を得るための実験法

2 ' - フルオロ - 2 ' - デオキシピリミジン R N A の S E L E X

P D G F - A B をターゲットにする 2 ' - フルオロ - 2 ' - デオキシピリミジン R N A を用いた S E L E X を、表8に示したようなプライマー鑄型セット (SEQ ID NO: 36 ~ 39) を使用して、ほとんど既報のようにして実施した(上記参照、及びJelinekら(1993, 1994: 上記))。簡略に言うと、アフィニティー選択用の 2 ' - フルオロ - 2 ' - デオキシピリミジン R N A を、T 7 R N A ポリメラーゼを使用して合成 D N A 鑄型から in vitro 転写によって製造した(Milliganら(1987) Nucleic Acids Res. 15: 8783)。既報(Jelinekら(1994)同上)により詳しく説明されている in vitro 転写の条件を使用したが、ただし A T P 及び G T P (1 mM) に比較してより高濃度 (3 mM) の 2 ' - フルオロ - 2 ' - デオキシピリミジンヌクレオシド三リン酸 (2 ' - F - U T P 及び 2 ' - F - C T P) を使用した。アフィニティー選択は、P D G F - A B を 2 ' - フルオロ - 2 ' - デオキシピリミジン R N A と、0.01%ヒト血清アルブミンを含有する P B S において 37 °C で少なくとも 15 分間インキュベートして実施した。タンパク質結合 R N A からフリー R N A を分離するには、記載(Jelinekら(1993, 1994: 上記))のようにニトロセルロース濾過を使用した。アフィニティー選択された R N A の逆転写及び P C R による增幅は、既報のように実施した(Jelinekら(1994)同上)。19ラウンドの S E L E X を実施し、典型的にはインプット R N A の 1 ~ 12 % を選択した。最初 8 ラウンドの選択には、スラミン (3 ~ 15 μM) を選択緩衝液に含ませ、選択圧力を高めた。アフィニティー濃縮されたプール (19ラウンド) をクローン化し、記載のように配列決定した(Schneiderら(1992)同上)。同定された 46 種のユニーク配列を、表9に示す (SEQ ID NO: 39 ~ 81)。このユニーク配列

10

20

30

40

50

リガンドをその P D G F - A B との高アフィニティー結合能力についてスクリーニングした。ランダム 2' - フルオロピリミジン R N A (表 8) が 35 ± 7 n M の解離定数 (K_d) で P D G F に結合したのに対し、アフィニティー選択されたリガンドの多くはそれより約 100 倍高い親和性で P D G F - A B に結合した。このユニークリガンドのなかで P D G F - A B に対して最高のアフィニティーを示したのは、クローン 9 ($K_d = 91 \pm 16$ p M)、11 ($K_d = 120 \pm 21$ p M)、16 ($K_d = 116 \pm 34$ p M)、23 ($K_d = 173 \pm 38$ p M)、25 ($K_d = 80 \pm 22$ p M)、37 ($K_d = 97 \pm 29$ p M)、($K_d = 74 \pm 39$ p M) 及び 40 ($K_d = 91 \pm 32$ p M) である (これら全リガンドの P D G F - A B に対する結合は二相性であり、より高いアフィニティー結合成分の K_d を示す)。

10

【 0 1 5 0 】

【表 1 】

表 1. ssDNA SELEX 実験用の開始D N A 及び PCR プライマー

	SEQ ID NO:
開始 ssDNA:	
5'-ATCCGCCTGATTAGCGATACT[-40N-]ACTTGAGCAAAATCACCTGCAGGG-3'	1
PCR プライマー-3N2*:	
5'- <u>BBBCCCCTGCAAGGTGATTTGCTCAAGT</u> -3'	2
PCR プライマー-5N2**:	
5'-CCGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGG <u>ATCCGCCTGATTAGCGATACT</u> -3'	3

*B=ビオチンホスホロアミダイト (例, Glen Research, スターリング, VA)

**10, 11 及び 12 ラウンドでは先端切れ PCR プライマー-5N2 (下線部) を用いて録型を増幅した。

20

【 0 1 5 1 】

【表 2 】

表2. PDGFに対するssDNA高アフィニティーガンドのユニーク配列

	5'-ATCCGCCTGATTAGCGATACT [40N] ACTTGAGCAAAATCACCTGCAGGGG-3'	SEQ ID NO:
*14	AGGCTTGACAAAGGGCACCATGGCTTAGTGGTCCTAGT	4
*41	CAGGGCACTGCAAGCAATTGTGGTCCCAATGGGCTGAGT	5
6	CCAGGCAGTCATGGTCATTGTTACAGTCGGAGTAGGT	6
23	AGGTGATCCCTGCAAAGGCAGGATAACGTCTGAGCATC	7
2	ATGTGATCCCTGAGAGGGAGGANACGTCTGAGCATC	8
34	CACGTGATCCCATAAAGGGCTGCGAAAAATAGCAGAGCATC	9
8	GGTGGACTAGAGGGCAGCAAACGATCCTGGTTAGCGTC	10
1	GGTGCAGCAGGGCTTACACAAACGTACACGTTCCCCGC	11
5	TGTCGGAGCAGGGCGTACGAAAACTTACAGTTCCCCCG	12
*40	AGTGGAACAGGGCACGGAGAGTCAAACTTGGTTCCCCC	13
47	GTGGGTAGGGATCGGTGGATGCCCTCGTACTCTAGTCCC	14
18	GGCGCCCTAAACAAAGGGTGGTCACTTCTAGTCCCAGGA	15
30	TCCGGCTCGGGATTCTGTGGTCACTTCAGTCCCAGGATATA	16
*20	ATGGGAGGGCGTTCTTCGTGGTTACTTTAGTCCC	17
35	ACGGGAGGGCACGTTCTCGTGGTTACTTTAGTCCC	18
13	GCTCGAGGGCGATTCTTCGCCGTTACTTCCAGTCT	19
16	GAGGCATGTTAACATGAGCATCGTCTCACGATCCTAGCC	20
*36	CCACAGGCTACGGCACGTAGAGCATACCATGATCCTGTG	21
50	GCGGGCATGGCACATGAGCATCTCTGATCCCGCAATCTC	22
4	ACCGGGCTACTTCGTAGAGCATCTCTGATCCCGGTGCTG	23
44	AAAGGGCGAACGTAGGTGCGAGGCATCCATTGGATCCCTTC	24
24	ACGGGCTCTGTCACTGTGGCACTAGCAATAGTCCCGTCGC	25
7	GGGCAGACCTTCTGGACGAGCATCACCTATGTGATCCC	26
*26	AGAGGGGAAGTAGGGTGCCTGACTCGAGAGAGTCCTCCC	27
19	AGGGGTGCGAAACACATAATCCTCGCGGATTCCCATCGCT	28
48	GGGGGGCGAATGGCGGTACCTCTGGTCCCCCTAAATAC	29
46	GC GGCTCAAAGTCCCTGCTACCCG CAGCACATCTGTGGTC	30
25	TTGGGCGTGAATGTCCACGGGTACCTCCGGTCCAAAGAG	31
31	TCCGGCGAACGTCCCTGGTAAAGGGCAGCCCTAACTGGTC	32
12	CAAGTTCCCCACAAGACTGGGGCTGTTCAAACCGCTAGTA	33
15	CAAGTAGGGCGCGACACACGTCCGGGCACCTAAGGTCCA	34
*38	AAAGTCGTGCAGGGTCCCCCTGGAAAGCATCTCCGATCCCAG	35

*境界実験を実施したものを示す。

例では、最少ガンドとして高アフィニティ結合性を保持することが見出されたクロ-ンを示す。

【0 1 5 2】

【表3】

表 3

		A群			
SEQ ID NO:					
8	2	=AGCG---AGGA---TACG---TCTG-AGC-ATCAC3'			
23	4	ACCGGG---CTAC---TTC---GTAG-AGC-ATC---TCT---GAT-CCGGGTGCTCG			
26	7	TGGG---QGACG-TTCT---GGACG-AGC-ATCAC---CTAT---GAT-CCGGGTGCTCG			
16	16	CTGAGG---CATG---TTAA---CATG-AGC-ATCGT---CTC---ACGAT-CCTAGGCC			
20	36	CCACAGG---CTACG-GCA---CGTAG-AGC-ATCA---CCA---TGAT-QCTGTG			
21	38	AAAAGTUCGTGAGGG---TCC---CCT---GGA-AGC-ATC---TCC---GAT-CCAGactt			
35					
24	44	AAAGCG---QGAAC-GTA---GGTGS-AGGCATCC---ATT---GGAT-QCCCTTC			
22	50	GGGG---CATG---GCA---CATG-AGC-ATC---TCT---GAT-CCGCAATCTCT			
7	23	=AGG---QAGATAAC---GTCTG-AGC-ATCAC3' 5' AGGTGATCCGTGCAA=			
9	34	=GGG---CTGC---GCAAATA---GCA-GAG-ATCAC3' 5' CACGTGAT-CCCATAA=			
SEQ ID NO:		B群			
19	13	GCTCTGAGG---GGCGA-TTCTT---TCGCC-GTT-ACT---TCC---AGT-QCTAC			
4	14	TactAGG---CTT---GACA---AAG-GGC-ACCAT---GGCTTAGTGGT-QCTAGTA			
34	15	ctaAAGTAGGG---CGGAC-ACAC---GTCGG-GGC-ACC---TAA---GGT-CCCAacttag			
15	18	cTCGG---QCCCTAAACAA---AGGGTG-GTC-ACT---TCT---AGT-CCCAGGA			
17	20	ATGGAGGG---QGGG---TTCTT---CTGT-GTT-ACT---TTT---AGT-QCCCG			
31	25	CTTGGG---CTGT---AATGTC---CACG-GGT-ACC---TCC---GGT-CCCAAAGAG			
16	30	TCCGG---CTCGG-GAT---CTGTG-GTC-ACT---TTC---AGT-CCGGATATA			
32	31	5' TCCGGCGAACGT-CCCTGGTAA=			
		=AGGG---QAG---CCCTAA---CTG-GTC-acttggag3'			
18	35	ACGGGAGGG---QACG---TTCRT---CTGT-GTT-ACT---TTT---AGT-QCCCG			
5	41	=GG---CTGAGTA3' 5' tactcaG-GGC-ACTGCAAGCAATTGTGCT-CCCAAT=			
14	47	CTGGGGGGGATCCGGG---ATG---CCTG-GTC-ACT---TCT---AGT-CCCAact			

【0 1 5 3】

【表4】

表4. 図1に示されたコンセンサスモチーフのヘリックス領域における塩基対の頻度

位置 ^a	塩基対 ^b						
	AT	TA	GC	CG	TG	GT	他
I-1	0	0	21	0	0	0	0
I-2	0	0	21	0	0	0	0
I-3	5	0	16	0	0	0	0
I-4	3	5	1	4	1	0	7
I-5	2	3	3	4	0	0	9
							10
II-1	0	1	2	17	0	0	1
II-2	5	5	5	1	0	4	1
II-3	3	4	7	6	0	0	1
II-4	3	0	8	5	0	0	4
III-1	21	0	0	0	0	0	0
III-2	0	10	0	11	0	0	0
III-3	0	7	0	13	1	0	0

^aヘリックスは図1に示すようにローマ数字で番号付ける。各塩基対はアラビア数字で番号付け、ヘリックス連結部の1位から始めて連結部からの距離が増えるにつれて増加する。

^bこの分析にはワトソン-クリック型の塩基対に TG 及び GT 塩基対も含めた。
各セットには全部で 21 の配列がある。

【0154】

【表5】

表5. PDGF-AA, PDGF-AB 及び PDGF-BB に対する最少 DNA リガンドのアフィニティ-

リガンド	K _d , nM		
	PDGF AA ^a	PDGF-AB ^b	PDGF BB ^b
20t	47 ± 4	0.147 ± 0.011	0.127 ± 0.031
36t	72 ± 12	0.094 ± 0.011	0.093 ± 0.009
41t	49 ± 8	0.138 ± 0.009	0.129 ± 0.011

^a図3 A に示したデータ点を式(1)に適合させた(実施例1)。

^b図3及び3Cのデータ点を式(2)に適合させた。示した解離定数(K_d)値は、より高いアフィニティ結合成分のものである。高アフィニティ成分として PDGF-AB 又は PDGF-BB に結合する DNA のモル画分は 0.58~0.88 の範囲に及ぶ。より低いアフィニティ相互作用の K_d 値は、13~78 nM の範囲に及ぶ。

【0155】

【表6】

10

20

30

40

表6. リガンド36t変異体のPDGF-ABへの相対アフィニティー

リガンド	SEQ	ID NO:	組成*	Kd リガンド / Kd ^{36t**}
36t	84	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		1.0
1073	97	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T] <u>GUG</u> [3' T]		11.8
1074	98	CACAGGCT <u>ACGGCACGU</u> AGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		3.1
1075	99	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCAT <u>ACCAU</u> GTACCATGATCCTGTG[3' T]		10
1076	100	<u>CACAGGCTA</u> CGGCACGUAGAGCAT <u>ACCAU</u> GTACCATGATCCTGTG[3' T]		440
1145	101	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		0.27
1148	102	<u>CACAGGCUA</u> CGGCACGTAGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		281
1144	103	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATACCAT <u>GAUCCUG</u> TG[3' T]		994
1142	104	CACAGGCTACGGCACGUAGAGCA <u>U</u> ACCATGATCCTGTG[3' T]		12.9
1149	105	CACAGGCTACGGCACGTAG <u>A</u> GGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		2.9
EV1	106	CACAGGCTACGGCACGTAG <u>G</u> AGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		35.1
EV2	107	CACAGGCT <u>ACGGCACGU</u> AGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		5.3
EV3	108	CACAGGCT <u>ACGGCACGT</u> AGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		1.5
EV4	109	<u>CACAGGCTACGGCACGT</u> AGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		4.5
EV5	110	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATACCATGAT <u>CCU</u> <u>GUG</u> [3' T]		2.3
1157	111	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		1.0
1160	112	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		1.4
1161	113	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		0.22
1162	114	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		0.52
1165	115	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		0.61
1164	116	CACAGGCU <u>ACGGCACGT</u> AGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		0.45
1166	117	CACAGGCTACGGCACGUAGAGCATACCATGATCCTGTG[3' T]		0.76
1159	118	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCA <u>U</u> ACCATGATCCTGTG[3' T]		0.37
1163	119	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATACCA <u>U</u> GTACCATGATCCTGTG[3' T]		1.3
1158	120	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATACCAT <u>GAUCC</u> <u>GTG</u> [3' T]		2.4
1255	121	CACAGGCU <u>ACGGCACGU</u> AGAGCA <u>U</u> ACCATGATCCTGTG[3' T]		24.2
1257	122	<u>CACAGGCTACGGCACGT</u> AGAGCAT <u>ACCA</u> <u>T</u> GTACCATGATCCTGTG[3' T]		1.3
1265	123	<u>CACAGGCTACGGCACGT</u> AGAGCAT <u>ACCA</u> <u>T</u> GTACCATGAT <u>CCU</u> <u>GUG</u> [3' T]		1.4
1266	124	CACAGGCU <u>ACGGCACGT</u> AGAGCA <u>U</u> ACCATGAT <u>CCU</u> <u>GUG</u> [3' T]		1.0
1267	125	CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATACCATGAT <u>CCU</u> <u>GUG</u> [3' T]		4.2
1269	126	<u>CACAGGCUACGGCACGT</u> AGAGCATACCATGAT <u>CCU</u> <u>GUG</u> [3' T]		0.87
1295	127	CAGGU <u>ACGGCACGT</u> AGAGCA <u>U</u> ACCATGAT <u>CCU</u> <u>G</u> [3' T]		0.9
1296	128	CAGGU <u>-CGGCACG-AGAGCAU</u> <u>CCA-GATCCUG</u> [3' T]		2.1
1297	129	CAGGU <u>-CGGCACG-AGAGCAU</u> <u>CCA-GATCCUG</u> [3' T]		2.9
1303	130	CAGGU <u>ACGGCACGT</u> AGAGCA <u>U</u> ACCATGAT <u>CCU</u> <u>G</u> [3' T]		5.8
1304	131	<u>CAGGUACGGCACGT</u> AGAGCA <u>U</u> ACCATGAT <u>CCU</u> <u>G</u> [3' T]		607
1305	132	<u>CAGGUACGGCACGT</u> AGAGCA <u>U</u> ACCATGAT <u>CCU</u> <u>G</u> [3' T]		196
1306	133	<u>CAGGUACGGCACGT</u> AGAGCA <u>U</u> ACCATGAT <u>CCU</u> <u>G</u> [3' T]		4.4
1327	134	<u>CAGGUACGGCACGT</u> AGAGCA <u>U</u> ACCATGAT <u>CCU</u> <u>G</u> [3' T]		0.63

【0 1 5 6】

【表7】

リガンド	SEQ	ID NO:	組成*	Kd リガンド / Kd ^{36t**}
1328	135	CAGGU <u>ACGGCACGT</u> AGAGCA <u>U</u> ACCATGAT <u>CCU</u> <u>G</u> [3' T]		2.2
1329	136	CAGGU <u>ACGGCACGT</u> AGAGCA <u>U</u> ACCATGAT <u>CCU</u> <u>G</u> [3' T]		0.72
1369	137	CAGGU <u>ACGGCACGT</u> AGAGCA <u>U</u> ACCATGAT <u>CCU</u> <u>G</u> [3' T]		0.37
1374	138	CAGGU <u>ACGGCACGT</u> AGAGCA <u>U</u> ACCATGAT <u>CCU</u> <u>G</u> [3' T]		1.5
1358	139	CAGGU <u>ACG-S-CGTAGAGCAUCA-S-TGATCCUG</u> [3' T]		0.54
1441	140	CAGGU <u>ACG-S-CGTAGAGCAUCA-S-TGATCCUG</u> [3' T]		0.33

*A,C,G,T=デオキシ-A,C,G,T; A,C,G,U=2'-OMe-A,C,G,T; C,U=2'-フルオロ-C,U; S=ヘキサエチレングリコール・スペーサー;
[3' T]=逆向きの(3'-3')T.

**この計算に用いた Kd^{36t} 値 0.178±88 pM は、4回の独立した測定 (94±11, 161±24, 155±30 及び 302±32 pM) の平均値±標準偏差である。

【0 1 5 7】

【表8】

表7. リガンド 36ta 変異体の PDGF-BB への相対アフィニティー

リガンド 36ta の PDGF-BB へのアフィニティーに対する様々な置換の効果

リガンド	組成*	Kd リガンド / Kd ^{36ta} **	SEQ ID NO:	
36ta	CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG[3'T]	1.0	141	
NX21568	CAGGC <u>UACG</u> -S-CGTAG <u>GAGCAUC</u> A-S-TGATCCU <u>G</u> [3'T]	0.63	142	
NX21617	[L1]CAGGC <u>UACG</u> -S-CGTAG <u>GAGCAUC</u> A-S-TGATCCU <u>G</u> [3'T]	0.54	143	
NX21618	[L1]CAGGC <u>UACG</u> -S-CGTAG <u>GAGCAUC</u> A-S-TGAUCCTG[3'T]	418	144	
NX31975	[L2] CAGGC <u>UACG</u> -S-CGTAG <u>GAGCAUC</u> A-S-TGATCCU <u>G</u> [3'T]	0.54	148	10
NX31976	[L2] CAG <u>CGUACG</u> -S-CGTACCGATU <u>CA</u> S-TGAAG <u>CU</u> <u>G</u> [3'T]		149	

*A,C,G,T=デオキシ-A,C,G,T; A,G=2'-OMe-A,G; C,U=2'-F-C,U; S=ヘキサエチレンギリコール・スペーサー (Glen Research, スターリング, VA の Spacer Phosphoramidite 18 より); [3'T]=逆向きの(3'-3') T; [L1]=dT アミン (Glen Research, スターリング, VA); [L2]=ベンチルアミノリンカー

**Kd^{36ta} = 0.159±13 pM.

【0 1 5 8】

【表9】

表8. 2'-フルオロピリミジン RNA の SELEX 実験用の開始 RNA 及び PCR プライマー

20

開始 2'-フルオロピリミジン RNA :	SEQ ID NO:
開始 RNA :	
5'-GGGAGACAAGAAUACGUCAA(-50 N)UUCGACAGGAGGCUCACAAACAGGC-3'	36
PCR プライマー 1 :	
5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACAAGAATAACGCTCAA-3'	37
PCR プライマー 2 :	
5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTCGAA-3'	38

【0 1 5 9】

30

【表10】

表9. PDFGF-ABへの2'フルオロピリミジンRNA高アフィニティーリガンドの進展領域の配列。固定領域の配列(表8)は示さない。

	SEQ ID NO:
1	CGGUGGCCUUUCUUCACUUCUUCUCGCUUUCUCGGGUUGGCNCGA
2	CCAACCUUCUGUCGGCGUUCUUJUGGACGGCACUCAGGCUCCA
3	UCGAUCGGGUUGUGUGCCGACAGCCUUAACCAGGGCUGGGACGGC
4	CUGAGUAGGGAGGAAGUUGAACAGUUGUGGGCGCCUCAUUCGC
5	CAGCACUUUCGCUUUCAUCAUUTUUUCUUCACUGUUGGGCGCGAA
6	UCAGUGCUGGCGUCAUGUCUCGAUGGGGAAUUUUUCUUCAGCACUUUGCCA
7	UCUACUUUCCAUUUCUUCUUCACGAGCGGGUUUCAGUGAACCA
8	CGAUAGUGACUACGAUGACGAAGGCCGGUUGGAUGCCGCAUUGA
10	GUCGAUCACUGGCGACUUGCUCCAUUGGCCGAUUAACGAUUCGGUCAG
13	GUGCAAACUUAACCGGGAACCGCGGUUCGAUCAGCAUUCUCCAUUCCA
15	AUUCCGCGUUCCGAUJAAUCCUGUGCGUCGGAAAUCGGUAGGCCAUAGUGCA
16	CGAACGAGGGAGGGAGUGGCAAGGGAGGUUGGUAGGCUCUACGCUCU
17	GCGAACUGGCGACUUCGCUCCAUUUGGCCGAUUAACGAUUCGGUUCAU
18	CGAACCGAGGGAGGGAGUCGCAAGGGAUUGGUUGGAUGGCUCUACGCUCAA
19	CGAGAAAGUGACUACGAUGACGAAGGCCGGGUUGAAUCCCUCAUUGA
20	AAGCAACGAGACCUGACGCCUGAUGUGACUQUGCUUUGCACCAGAUUCUG
21	GUGAUUCUCAUUCUCAUUGCUUUCACAAACUUIUUCCACUUCAGCGUGA
22	AAGCAACGAGACUGACGCGCUGAUGUGACUGUGCUUUGCACCCGAUUCU
23	UCGAUCGGGUUGUGUGCCGGACAGGUUGACAUAGAGCUGGGACCGAGGCC
24	NGACGNUGGACCUGACUAUAUCGACUGAUCAAAGAUCCCGCCCAGAUGGG
26	CACUGCGACUUGCAGAACGCCUUGUGUGGGCGGUACCCCCUUUGGCCUCG
27	GGUGGCCAUUUCUCAUUUUCCUUCUGCUUUCUCCGGCGUUGGGCGCG
29	CCUGAGUAGGGGGAAAGUUGAACAGUUGUGGGCGCUCUACUCAUUCGCC
30	GUCGAAACUGGCGACUUGCUCCAUUGGCCGAUUAACGAUUCGGUCA
31	GCGAUACUGGCGACUUGCUCCAUUGGCCGAUUAACGAUUCGGCUCAG
32	ACGUGGGCACAGGACCGAGAGUCCCUCGGCAAUAGGCCUACCCACC
33	CACAGCCUNANAGGGGGAAAGUUGAACAGUUGUGGGCGCUCUACUCAUUCGC
34	ANGGNIUAUGGUGACUUGCUCAUUGGCCGAUUAACGAUUCGGUCAG
35	CCUGCGUAGGGNGGGAAAGUUGAACAGUUGUGGGCGCUCUACUCAUUCGCC
39	CGAACGAGGGAGGGAGUGGCAAGGGAGGUUGGUAGGCUCUACGCUCU
41	GUGCAAACUUAACCGGGAACCGCGCUUUCGAUUCGUUUCNUAUUCCA
42	CGAACGAGGGAGGGAGUGGCAAGGGACGGUNNAUAGGCUCUACGCUCU
43	UCGGUGGGCGACAGAACUGACCGCGUGAGCCUUCGCAACACAUUCUGC
44	UAUCGCUUUUCAUCAAUUCCACUJUUUCACUCUNUAACUUGGGCGUGCA
45	GUGCAAACUUAACCGGGAACCGCGCUUUCGAUUCGUUUCUCAAGGCACAUUGAGGGU
46	UCGNUCGGUUGUGUGCCGGCAGCUUUGUCCAGCGUUGGGCGAGGCC
47	AGUACCAUCUCAUCUUIUCCUJUCCUJUCAAGGCACAUUGAGGGU
49	CCUGAGUAGGGGGAAAGUUGAACCGAGUUGUGGCNGCCUACUCAUUCNCA
51	CCNNCCUNCUGUCGGCGCUUGUCUUUJUGGACGGCAACCCAGGGCUC
52	CCAACCCUNCUGUCGGCGCUUGUCUUUJUGGACGGCAACUCAAGGCUCGU
53	CCAGCGCAGAACCCGGGCGUGAAGUGACUGCCGGCAACCCGGCUCCA
54	UUCCCGUAACAACUUIUCAUJJUCACUJJUCAUCCAACCAGUGAGCAGCA
55	UAUCGCUUUCAUCAAUJUCCACUCCUJUCAUCUUUACUUGGGCGUGCA

【0160】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: NEBOJSA JANJIC, LARRY GOLD
(ii) TITLE OF THE INVENTION: PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR (PDGF) NU
CLEIC ACID LIGANDS

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 149

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: Swanson and Bratschun, L.L.C.
(B) STREET: 8400 East Prentice Avenue, Suite #200
(C) CITY: Denver
(D) STATE: Colorado
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 80111

10

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Diskette, 3.5 inch, 1.4 Mb storage
(B) COMPUTER: IBM compatible
(C) OPERATING SYSTEM: MS-DOS
(D) SOFTWARE: WordPerfect 6.1

20

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: PCT/US98/09050
(B) FILING DATE:

(C) CLASSIFICATION:

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: 08/991,743
(B) FILING DATE: 16-DECEMBER-1997

(viii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: 08/618,693

(B) FILING DATE: 20-MARCH-1996

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: 08/479,783

(B) FILING DATE: 7-JUNE-1995

(viii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: 08/479,725

(B) FILING DATE: 7-JUNE-1995

(ix) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Barry J. Swanson

(B) REGISTRATION NUMBER: 33,215

(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: NEX66/PCT

10

(x) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (303) 793-3333

(B) TELEFAX: (303) 793-3433

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN

50

NNNNNNNNN NACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG

86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 28 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: N at positions 1-3 is biotin
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

NNNCCCCCTGC AGGTGATTT GCTCAAGT

28

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 49 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGGGAT CCGCCTGATT AGCGATACT

49

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 84 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAGGCTTGAC AAAGGGCACC ATGGCTTAGT
GGTCCTAGTA CTTGAGAAA ATCACCTGCA GGGG

50

84

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 85 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

ATCCGCTGA TTAGCGATAC TCAGGGCACT GCAAGCAATT GTGGTCCAA	50
TGGGCTGAGT ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG	85

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

ATCCGCTGA TTAGCGATAC TCCAGGCAGT CATGGTCATT GTTTACAGTC	50
GTTGGAGTAGG TACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	86

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 85 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TAGGTGATCC CTGCAAAGGC AGGATAACGT	50
CCTGAGCATC ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG	85

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 83 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TATGTGATCC CTGCAGAGGG AGGANACGTC	50
TGAGCATCAC TTGAGCAAA TCACCTGCAG GGG	83

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TCACGTGATC CCATAAGGGC TGCGCAAAAT	50
AGCAGAGCAT CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 86 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGGTGGACTA GAGGGCAGCA AACGATCCTT 50
GGTAGCGTC CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG 86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:

10

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 85 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGGTGCACG AGGCTTACAC AAACGTACAC 50
GTTCCCCGC ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG 85

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 86 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TTGTCGGAGC AGGGCCGTAC GAAAACTTA 50

CAGTTCCCCC GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG

86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAGTGGAAACA GGGCACGGAG AGTCAAACTT

50

TGGTTTCCCC CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG

86

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 14:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGTGGGTAGG GATCGGTGGA TGCCTCGTCA

50

CTTCTAGTCC CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG

86

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 15:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGGCGCCCT AAACAAAGGG TGGTCACTTC 50
TAGTCCCAGG AACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG 86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 87 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 16:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TTCCGGGCTC GGGATTCTGTG GTCACTTCA 50
GTCCCGGATA TAACTTGAGC AAAATCACCT GCAGGGG 87

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 84 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 17:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TATGGGAGGG CGCGTTCTTC GTGGTTACTT 50
TTAGTCCCGA CTTGAGCAA ATCACCTGCA GGGG 84

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 84 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 18:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TACGGGAGGG CACGTTCTTC GTGGTTACTT	50
TTAGTCCCGA CTTGAGCAA ATCACCTGCA GGGG	84

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 19:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGCTCGTAGG GGGCGATTCT TTCGCCGTTA	50
CTTCCAGTCC TACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	86

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 20:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAc TGAGGCATGT TAACATGAGC ATCGTCTCAC 50
GATCCTCAGC CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG 86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 21:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAc TCCACAGGCT ACGGCACGTA GAGCATCACC 50
ATGATCCTGT GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG 86

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 22:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAc TGCGGGCATG GCACATGAGC ATCTCTGATC 50
CCGCAATCCT CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG 86

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 23:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TACCGGGCTA CTTCTGAGAG CATCTCTGAT 50
CCCGGTGCTC GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG 86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 24:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAAAGGGCGA ACGTAGGTCG AGGCATCCAT 50
TGGATCCCTT CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG 86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 25:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TACGGGCTCT GTCACTGTGG CACTAGCAAT 50
AGTCCCGTCG CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG 86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 85 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 26:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TGGGCAGACC TTCTGGACGA GCATCACCTA	50	
TGTGATCCCG ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG	85	10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 27:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAAC TAGAGGGAA GTAGGCTGCC TGACTCGAGA	50	
GAGTCCTCCC GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	86	20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 28:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAGGGGTGCG AAACACATAA TCCTCGCGGA 50
TTCCCATCGC TACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGG 86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 29:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 83 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 29:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGGGGGGGCA ATGGCGGTAC CTCTGGTCCC 50
CTAAATACAC TTGAGCAAAA TCACCTGCAG GGG 83

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 30:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 85 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 30:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGCGGCTCAA AGTCCTGCTA CCCGCAGCAC 50
ATCTGTGGTC ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG 85

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 31:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 31:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TTTGGGCGTG AATGTCCACG GGTACCTCCG 50
GTCCCAAAGA GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG 86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 85 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 32:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TTCCCGCGCAA GTCCCTGGTA AAGGGCAGCC 50
CTAACTGGTC ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG 85

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 86 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 33:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TCAAGTTCCC CACAAGACTG GGGCTGTTCA 50
AACCGCTAGT AACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG 86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 34:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 34:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TCAAGTAGGG CGCGACACAC GTCCGGGCAC	50
CTAAGGTCCC AACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	86

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 35:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 86 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 35:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAAAGTCGTG CAGGGTCCCC TGGAAGCATC	50
TCCGATCCCA GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG	86

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 36:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 96 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 36:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AANNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	50
	96

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 39 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 37:

TAATACGACT CACTATAGGG AGACAAGAAT AACGCTCAA	39
--	----

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 38:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 38:

GCCTGTTGTG AGCCTCCTGT CGAA	24
----------------------------	----

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 39:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 93 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 39:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGGUGGCA UUUCUUCACU UCCUUUCUCGC 50

UUUCUCGCGU UGGGCNCGAU UCGACAGGAG GCUCACAAACA GGC 93

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 40:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 91 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 40:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACCAACCUU CUGUCGGCGU UGCUUUUUGG 50

ACGGCACUCA GGCUCCAUUC GACAGGAGGC UCACAACAGG C 91

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 41:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 95 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 41:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCGAUCGG UUGUGUGCCG GACAGCCUUA 50

ACCAGGGCUG GGACCGAGGC CUUCGACAGG AGGCCUCACAA CAGGC 95

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 42: 10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 92 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 42: 20

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACUGAGUAG GGGAGGAAGU UGAAUCAGUU 50

GUGGCGCCUC UCAUUCGCUU CGACAGGAGG CUCACAACAG GC 92

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 43:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 95 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 43:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACAGCACUU UCGCUUUUCA UCAUUUUUUC UUUCCACUGU UGGGCGCGGA AUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC	50 95
---	----------

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 44:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 96 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 44:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCAGUGCU GGCGUCAUGU CUCGAUGGG AUUUUUUCUUC AGCACUUUGC CAUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	50 96
--	----------

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 45:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 96 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 45:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCUACUUU CCAUUUCUCU UUUUCUUCUCA	50
CGAGCGGGUUU UCCAGUGAAC CAUUCGACAG GAGGCUCACCA ACAGGC	96

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 46:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 94 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 46:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAUAGUG ACUACGAUGA CGAAGGCCGC	50
GGGUUGGAUG CCCGCAUUGA UUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC	94

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 47:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 93 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

10

20

ed

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 47:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUGCAUAC UGGCGACUUG CUCCAUUGGC 50
CGAUUAACGA UUCGGUCAGU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC 93

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 48:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 95 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modifi

ed

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 48:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUGCAAAC UUAACCCGGG AACCGCGGU 50
UUCGAUCGAC UUUCCUUUCC AUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC 95

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 49:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 96 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modifi

ed

10

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 49:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAAUCCGCG UUCCGAUUAACUCCUGUGCUC	50
GGAAAUUCGGU AGCCAUAGUG CAUUCGACAG GAGGCUCACACACAGGC	96

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 50:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 94 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

ed

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 50:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAACGAG GAGGGAGUGG CAAGGGAUUGG	50
UUGGAUAGGC UCUACGCUCA UUCCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC	94

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 51:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 94 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

ed

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 51:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGCGAAACU GGCACUUGC UCCAUUGGCC 50
GAUAUAAACGA UUCGGUUUCAU UUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC 94

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 52:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 95 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 52:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAACGAG GAGGGAGUCG CAAGGGAUUGG 50
UUGGAUAGGC UCUACGCUCA AUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC 95

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 53:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 94 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 53:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAGAAGU GACUACGAUG ACGAAGGCCG 50

10

20

CGGGUUGAAU CCCUCAUUGA UUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC 94

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 54:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 95 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 54:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAAAGCAACG AGACCUGACG CCUGAUGUGA 50
CUGUGCUUGC ACCCGAUUCU GUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC 95

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 55:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 95 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: RNA

20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

ed

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 55:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUGAUUCU CAUUCUCAAU GCUUUCUCAC 50
AACUUUUUCC ACUUCAGCGU GAUUCGACAG GAGGCUCACCA CAGGC 95

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 56:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 94 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

10

ed

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 56:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAAAGCAACG AGACUCGACG CCUGAUGUGA 50

CUGUGCUUGC ACCCGAUUCU UUCCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC 94

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 57:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 96 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

20

ed

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 57:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCGAUCGG UUGUGUGCCG GACAGCUUUG 50

ACCAUGAGCU GGGACCGAGG CCUUCGACAG GAGGCUCACAAAC ACAGGC 96

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 58:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 96 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

ed

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 58:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AANGACGNLU GGACCUGACU AAUCGACUGA 50

UCAAAGAUCC CGCCCAGAUG GGUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC 96

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 59:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 94 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

ed

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 59:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACACUGCGA CUUGCAGAAAG CCUUGUGUGG 50

CGGUACCCCC UUUGGCCUCG UUUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC 94

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 60:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 94 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 60:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGGUGGCAU UUCUUCAUUU UCCUUUCUCGC 50
UUUCUCCGCC GUUGGGCGCG UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC 94

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 61:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 96 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 61:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACUGAGUA GGGGGAAAG UUGAAUCAGU 50
UGUGGGCGCUC UACUCAUUCG CCUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC 96

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 62:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 94 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 62:
GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUCGAAAC UGGCGACUUG CUCCAUUGGC 50
CGAUUAACG AUUCGGGUUCA UUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC 94

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 63:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 94 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 63:
GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGCGAUACU GGCGACUUGC UCCAUUGGCC 50
GAUUAACGA UUCGGCUCAG UUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC 94

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 64:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 96 base pairs

- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAACGUGGGG CACAGGACCG AGAGUCCUC	50
CGGCAAUAGC CGCUACCCCCA CCUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	96
	10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 64:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 98 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 64:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACACAGCCU NANAGGGGGG AAGUUGAAUC	50
AGUUGUGGCG CUCUACUCAU UCGCUUCGAC AGGAGGCUCA CAACAGGC	98

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 65:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 94 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

ed

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 66:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAANGGNUA UGGUGACUUG CUCCAUUGGC 50
CGAUUAACG AUUCGGUCAG UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC 94

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 67:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 96 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

ed

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 67:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACUGCGUA GGGNGGGAAG UUGAAUCAGU 50
UGUGGCGCUC UACUCAUUCG CCUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC 96

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 68:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 94 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 68:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAACGAG GAGGGAGUGG CAAGGGAU⁵⁰GG

UUGGAUAGGC UCUACGCUCA UUUCGACAGGA GGCUCACAAAC AGGC⁹⁴

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 69:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 97 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 69:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUGCAAAC UUAACCCGGG AACCGCGCGU⁵⁰

UUCGAUUCGC UUUCCNUAUU CCAUUCGACA GGAGGCUCAC AACAGGC⁹⁷

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 70:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 93 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 70:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAACGAG GAGGGAGUGG CAAGGGACGG 50
UNNAUAGGCCU CUACGCUCAU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC 93

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 71:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 93 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 71:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCGGUGUG GCUCAGAAC UGACACCGU 50
GAGCUUUCGCA CACAUCUGCU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC 93

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 72:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 95 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 72:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUAUCGUU UUCAUCAAU CCACUUUUUC	50
ACUCUNUAAC UUGGGCGUGC AUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC	95

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 73:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 96 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 73:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUGCAAAC UUAACCCGGG AACCGCGCGU	50
UUCGAUCCUG CAUCCUUUUU CCUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	96

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 74:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 93 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 74:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCGNCUCGG UUGUGUGGCCG GCAGCUUUGU 50
CCAGCGUUGG GCCGAGGCCU UCGACAGGAG GCUCACAAACA GGC 93

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 75:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 95 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 75:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAAGUACCCA UCUCAUCUUU UCCUUUCCUU 50
UCUUCAAGGC ACAUUGAGGG UUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC 95

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 76:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 97 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

10

20

ed

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 76:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACUGAGUA GGGGGGGAAG UUGAACCGU 50
UGUGGCNGCC UACUCAUUCN CCAUUCGACA GGAGGCUCAC AACAGGC 97

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 77:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 94 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modifi

ed

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 77:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACNNCCUN CUGUCGGCGC UUGUCUUUU 50
GGACGGCAA CCCAGGGCUC UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC 94

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 78:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 96 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modifi

ed

10

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 78:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACCAACCUN CUGUCGGCGC UUUGUCUUUUU	50
GGACGAGCAA CUCAAGGCUC GUUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	96

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 79:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 93 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

ed

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 79:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACCAAGCGCA GAUCCCGGGC UGAAGUGACU	50
GCCGGCAACG GCCGCUCCAU UCGACAGGAG GCUCACAAACA GGC	93

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 80:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 96 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

ed

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 80:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUUCCCGUA ACAACUUUUC AUUUUCACUU	50
UUCAUCCAAC CAGUGAGCGAG CAUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	96

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 81:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 96 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA

(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: All pyrimidines are 2'-F modified

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 81:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUAUCGCUU UCAUCAAUU CCACUCCUUC	50
ACUUCUUUA CUUGGGCGUG CAUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC	96

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 82:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 23 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: N at positions 1 and 23
is any base pair.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: N at positions 5 and 10

10

20

is any base pair.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: N at positions 6 and 9 is any base pair.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: N at positions 7 and 8 is any base pair.

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 82:

NGGCNNNNNN GRKYAYYRRT CCN

23

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 83:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 38 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 38 is an inverted orientation T (3'-3'-linked)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 83:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTTT AGTCCCGT

38

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 84:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 84:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 85:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 45 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 45 is an inverted orientation T (3'-3'-linked)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 85:

TACTCAGGGC ACTGCAAGCA ATTGTGGTCC CAATGGGCTG AGTAT

45

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 86:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 36 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 11, 25 and 26 is

10

20

2'-0-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 10, 17, 19 and 35 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 12, 24 and 27 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6, 22 and 34 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 8, 23, 32 and 33 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 36 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 86:

CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT 36

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 87:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 15, 17 and 31 is 2'-0-methyl-2'-deoxyguanosine.

10

20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 22 is 2'-0-methyl
-2'-deoxyadenine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6, 20 and 30 is
2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 8, 21, 28 and 29
is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: N at positions 10 and 23 is hex
ethylene glycol phosphoramidite spacer.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 32 is an inverted or
ientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 87:

CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT

32

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 88:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 39 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 39 is an inverted or
ientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 88:

CAGTCCGTGG TAGGGCAGGT TGGGGTGACT TCGTGGAAT

39

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 89:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 37 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: T at positions 13, 14, 16 and 1
7 is substituted with IdU.

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 89:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTT AGTCCCG

37

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 90:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 37 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: T at position 20 is substituted
with IdU.

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 90:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTT AGTCCCG

37

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 91:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 37 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: DNA

- (ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: T at position 23 is substituted
with IdU.

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 91:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTT AGTCCCG 37

10

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 92:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 37 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: DNA

- (ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: T at position 24 is substituted
with IdU.

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 92:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTT AGTCCCG 37

20

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 93:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 37 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: T at position 27 is substituted with IdU.

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 93:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTT AGTCCCG 37

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 94: 10

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 37 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: T at positions 28-30 is substituted with IdU.

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 94:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTT AGTCCCG 37 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 95:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 37 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: T at position 33 is substituted
with IdU.

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 95:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTTACTTT AGTCCCG

37

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 96:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 7 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Peptide

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Xaa at position 5 is a modified
amino acid that could not be identified.

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 96:

Lys Lys Pro Ile Xaa Lys Lys

5

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 97:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 1 and 3 is 2'-0-

20

Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 2 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 37 and 39 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 38 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 97:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGUGT

40

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 98:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 40 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 10, 13 and 15 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 11, 12 and 16 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 14 is 2'-0-Methyl
-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 17 is 2'-0-Methyl
-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted or
orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 98:

CACAGGCTAC GGCACGUAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT

40

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 99:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 26 and 29 is 2'-
0-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 27 and 28 is 2'-
0-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 30 is 2'-0-Methyl
-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

20

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 99:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAU GATCCTGTGT

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 100:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 1, 3, 10, 13, 15, 27, and 28 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 2, 14, 26 and 29 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 11, 12 and 16 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 17 and 30 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 100:

CACAGGCTAC GGCACGUAGA GCATCACCAU GATCCTGTGT

40

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 101:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 25, 27 and 28 is
2'-0-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 26 and 29 is 2'-
0-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 101:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT

40

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 102:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 4 and 9 is 2'-0-

20

Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 5 and 6 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at position 7 is 2'-0-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 8 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 102:

CACAGGUAC GGCACGTTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 103:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at position 31 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 32 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyadenosine.

10

20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 33 and 36 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 34 and 35 is 2'-0-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 103:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GAUCCUGTGT

40

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 104:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 17 and 24 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 23 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 104:

20

CACAGGCTAC GGCACGUAGA GCAUCACCAT GATCCTGTGT

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 105:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 19 and 21 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 20 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at position 22 is 2'-0-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 105:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 106:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single

20

- (D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: A at position 20 is 2'-0-Methyl
-2'-deoxyadenosine.
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: G at position 21 is 2'-0-Methyl
-2'-deoxyguanosine.
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: C at position 22 is 2'-0-Methyl
-2'-deoxycytidine. 10
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted or
ientation T (3'-3'-linked).
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 106:
CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 107:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 40 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid 20
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: G at positions 12 and 16 is 2'-
0-Methyl-2'-deoxyguanosine.
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: C at positions 13 and 15 is 2'-

0-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 14 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 17 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 107:

CACAGGCTAC GGCACGUAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT

40

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 108:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 10 and 13 is 2'-0-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 11 and 12 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 14 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 108:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 109:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 1 and 3 is 2'-0-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 2 and 4 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 109:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 110:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

10

20

- (C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: U at positions 36 and 38 is 2'-
0-Methyl-2'-deoxyuridine.
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: G at positions 37 and 39 is 2'-
0-Methyl-2'-deoxyguanosine.
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted or
ientation T (3'-3'-linked). 10
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 110:
CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCUGUGT 40
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 111:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 40 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear 20
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: C at position 7 is 2'-fluoro-2'
-deoxycytidine.
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted or
ientation T (3'-3'-linked).
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 111:
CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 112:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at position 22 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 112:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT

40

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 113:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at position 25 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 113:

20

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 114:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at position 34 is 2'-fluoro-2
'-deoxycytidine.

10

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 114:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 115:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at position 35 is 2'-fluoro-2
'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 115:

CACAGGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 116:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 8 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 116:

CACAGGCUAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 117:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 17 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted or

10

20

ientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 117:

CACAGGCTAC GGCACGUAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 118:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 24 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 118:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCAUCACCAT GATCCTGTGT

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 119:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 30 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

10

20

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 119:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAU GATCCTGTGT

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 120:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 33 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 120:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GAUCCTGTGT

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 121:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 7, 22, 25, 34 and 35 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

10

20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 8, 17, 24, 33 and 36 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 121:

CACAGGUAC GGCACGUAGA GCAUCACCAT GAUCCUGTGT 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 122: 10

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 10, 13, 27 and 28 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 11, 12, 37 and 39 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine. 20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 14, 26 and 29 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at position 34 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 38 is 2'-O-Methyl

-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 122:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGUGT

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 123:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 10, 13, 25, 27 and 28 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 11, 12, 37 and 39 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 14, 26 and 29 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at position 34 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 36 and 38 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

10

20

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 123:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCUGUGT

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 124:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 8 and 24 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 10, 13, 27 and 28 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 11, 12, 37 and 39 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 14, 26 and 29 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 25, 34 and 35 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 36 and 38 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine.

10

20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 124:

CACAGGUAC GGCACGTAGA GCAUCACCAT GATCCUGUGT 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 125:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 40 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 10, 13, 25, 27 and 28 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 11, 12, 37 and 39 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 14, 26 and 29 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 34 and 35 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 36 and 38 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted or

10

20

ientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 125:
CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCUGUGT 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 126:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 8 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 10, 13, 25, 27 and 28 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 11, 12, 37 and 39 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 14, 26 and 29 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at position 34 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 36 and 38 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

10

20

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 40 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 126:
CACAGGCUAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCUGUGT 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 127:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 36 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6 and 22 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 8, 11, 25 and 26 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 10, and 35 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 12, 24 and 27 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 23, 32 and 33 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 34 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine.

10

20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 36 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 127:

CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT

36

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 128:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 34 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6 and 20 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 7, 10, 23 and 24 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 8, 9, and 33 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 11, 22 and 25 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 21, 30 and 31 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 32 is 2'-O-Methyl

10

20

-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 34 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 128:

CAGGCUCGGC ACGAGAGCAU CACCATGATC CUGT

34

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 129:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6 and 20 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 7, 10, 22 and 23 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 8, 9, and 31 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 11 and 24 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 21, 28 and 29 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

10

20

(D) OTHER INFORMATION: U at position 30 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 32 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 129:

CAGGCUCGGC ACGAGAGCAU CCCAGATCCU GT

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 130:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10

(A) LENGTH: 36 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 8, 11, 23, 25, 26, 32 and 33 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 10, and 35 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 12, 24 and 27 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 6 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 22 and 34 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 36 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 130:

CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT 36

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 131:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 36 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 5, 8, 11, 23, 25, 26, 32 and 33 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6, 22 and 34 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 7, 12, 24 and 27 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 10, and 35 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 36 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 131:

CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT 36

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 132:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 36 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 5, 8, 11, 23, 25
, 26, 32 and 33 is 2'-0-Methyl-2'-deoxycytidine.

10

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6, 22 and 34 is
2'-0-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 12, 18, 24 and 2
7 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 10, and 35 is
2'-0-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 36 is an inverted or
ientation T (3'-3'-linked).

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 132:

CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT

36

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 133:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 36 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 5, 8, 11, 23, 25
, 26, 32 and 33 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6, 22 and 34 is
2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 10, 19 and 35
is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

10

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 12, 24 and 27 is
2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 36 is an inverted or
ientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 133:

CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT

36

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 134:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 36 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6 and 22 is 2'-f
luoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 8, 11, 25 and 26
is 2'-0-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 10, 19 and 35
is 2'-0-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 12, 24 and 27 is
2'-0-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 23, 32 and 33 is
2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 34 is 2'-0-Methyl
-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 36 is an inverted or
ientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 134:

CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT

36

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 135:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 36 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

- (D) OTHER INFORMATION: U at positions 6 and 22 is 2'-f

luoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 8, 11, 20, 25 and 26 is 2'-0-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 10, 19 and 35 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 12, 24 and 27 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 23, 32 and 33 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 34 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 36 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 135:

CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT

36

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 136:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 36 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6 and 22 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 8, 11, 20, 25 and 26 is 2'-0-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 10, 17, 19 and 35 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 12, 24 and 27 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyadenosine.

10

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 23, 32 and 33 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 34 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 36 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 136:

CAGGUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT

36

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 137:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 36 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6 and 22 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 8, 11, 25 and 26 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 10, 17, 19 and 35 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at positions 12, 24 and 27 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 23, 32 and 33 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 34 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 36 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 137:

CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT

36

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 138:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 36 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single

10

20

(D) TOPOLOGY: linear
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6 and 22 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: A at positions 7, 12, 24 and 27 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: C at positions 8, 11, 25 and 26 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine. 10
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 10, 17, 19 and 35 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: C at positions 23, 32 and 33 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: U at position 34 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine. 20
(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 36 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 138:
CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT 36

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 139:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 32 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid

- (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ix) FEATURE:
- (D) OTHER INFORMATION: U at positions 6 and 20 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.
- (ix) FEATURE:
- (D) OTHER INFORMATION: C at position 8 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.
- (ix) FEATURE:
- (D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 17, and 31 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.
- (ix) FEATURE:
- (D) OTHER INFORMATION: S at positions 10 and 23 is a hexaethyleneglycol spacer.
- (ix) FEATURE:
- (D) OTHER INFORMATION: C at positions 21, 28 and 29 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.
- (ix) FEATURE:
- (D) OTHER INFORMATION: A at position 22 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.
- (ix) FEATURE:
- (D) OTHER INFORMATION: U at position 30 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine.
- (ix) FEATURE:
- (D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 32 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 139:
- CAGGCUACGS CGTAGAGCAU CASTGATCCU GT

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 140:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6 and 20 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at position 8 is 2'-O-Methyl-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 15, 17, and 31 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: S at positions 10 and 23 is a hexaethyleneglycol spacer.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 21, 28 and 29 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 22 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at position 30 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 32 is an inverted or

10

20

ientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 140:

CAGGCUACGS CGTAGAGCAU CASTGATCCU GT

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 141:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 36 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 36 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 141:

CAGGCTACGG CACGTAGAGC ATCACCATGA TCCTGT

36

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 142:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6, 20 and 30 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 8, 21, 28 and 29 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

10

20

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 15, 17, and 3
1 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: S at positions 10 and 23 is a h
exaethyleneglycol spacer.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 22 is 2'-0-Methyl
-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 32 is an inverted or
10 orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 142:

CAGGCUACGS CGTAGAGCAU CASTGATCCU GT

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 143:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6, 20 and 30 is
2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 8, 21, 28 and 29
is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 15, 17, and 3
1 is 2'-0-Methyl-2'-deoxyguanosine.

20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: N at positions 10 and 23 is a b
exaethyleneglycol spacer.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 22 is 2'-O-Methyl
-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 32 is an inverted or
ientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 143:

CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT

10

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 144:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 3, 4, 12, and 25
is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6, 20 and 27 is
2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: N at positions 10 and 23 is a b
exaethyleneglycol spacer.

(ix) FEATURE:

- (D) OTHER INFORMATION: C at positions 11, 18, 21 and 2

9 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 16 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 32 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 144:

CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGAUCCT GT

32

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 145:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 4, 8, 21 and 29 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6, 20 and 30 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 5, 9, 17, and 31 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 22 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: N at positions 10 and 23 is a h exaethylene glycol phosphoramidite.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 32 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 145:

CAGCGUACGN CGTACCGATU CANTGAAGCU GT

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 146:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10

(A) LENGTH: 32 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6, 20 and 30 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 8, 21, 28, and 29 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 15, 17, and 31 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 22 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: N at positions 10 and 23 is a h exaethylene glycol phosphoramidite.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 32 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 146:

CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 147:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 4, 8, 21 and 29 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6, 20 and 30 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 5, 9, 17, and 31 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 22 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: N at positions 10 and 23 is a hexaethylene glycol phosphoramidite.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 32 is an inverted or

10

20

ientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 147:

CAGCGUACGN CGTACCGATU CANTGAAGCU GT

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 148:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6, 20 and 30 is 2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 8, 21, 28 and 29 is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 9, 15, 17, and 31 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: S at positions 10 and 23 is a hexaethyleneglycol spacer.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 22 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 32 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 148:

10

20

CAGGUACGS CGTAGAGCAU CASTGATCCU GT

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 149:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: C at positions 4, 8, 21 and 29
is 2'-fluoro-2'-deoxycytidine.

10

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: G at positions 5, 9, 17, and 31
is 2'-O-Methyl-2'-deoxyguanosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: U at positions 6, 20 and 30 is
2'-fluoro-2'-deoxyuridine.

20

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: N at positions 10 and 23 is a hexaethylene glycol spacer.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: A at position 22 is 2'-O-Methyl-2'-deoxyadenosine.

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: Nucleotide 32 is an inverted orientation T (3'-3'-linked).

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 149:

CAGGUACGN CGTACCGATU CANTGAAGCU GT

32

30

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、表3に示される配列のコンセンサス二次構造を示す。RはAまたはG、YはCまたはT、KはGまたはT、NおよびN'はいかなる塩基対も示す。

【図2】 図2A - 2Cは、コンセンサス二次構造モチーフにしたがい、フォールディングされている最小リガンド20t (SEQ ID No: 83)、36t (SEQ ID No: 84) および41t (SEQ ID No: 85) を示す。[3'T]は、3' - エキソキナーゼ分解を減少させるため添加された3' - 3' 連結チミジンヌクレオチドを表す。

【図3】 図3A - 3Cは、それぞれ、PDGF-AA、PDGF-AB、およびPDGF-BBに対する高親和性最小リガンドの結合を示す。異なる濃度のPDGFに結合している³²P 5' 端標識DNAリガンドの比を、ニトロセルロースフィルター結合法により測定した。試験した最小リガンドは、20t (白丸)、36t (白三角)、および41t (白四角) であった。これらの実験におけるオリゴヌクレオチド濃度は、~10 pM (PDGF-AB および PDGF-BB) および ~50 pM (PDGF-AA) であった。データ点は、非直線最小二乗法を用い、等式1 (PDGF-AAに対するDNAリガンドの結合) または等式2 (PDGF-AB および -BBに対する結合) に当てはめた。結合反応は、37°Cで、結合緩衝液 (0.01% HSAを含むPBSM) 中で行った。

40

【図4】 図4は、最小DNAリガンドおよびPDGF-ABの間の高親和性相互作用に関する解離速度測定を示す。PDGF-AB (1 nM) に結合している、すべて0.17 nMの、5' ³²P末端標識DNAリガンド、20t (白丸)、36t (白三角)、

50

および 41 t (白四角) の比を、500 倍過剰の未標識競合剤の添加後、示された時点でニトロセルロースフィルター結合により測定した。データ点を、実施例 1 の等式 3 に当てはめることにより、解離速度定数 (K_{off}) 値を決定した。実験は、37 で、結合緩衝液中で行った。

【図 5】 図 5 は、PDGF - AB に対する高親和性最小 DNA の熱変性プロフィールを示す。リガンド、20 t (白丸)、36 t (白三角)、および 41 t (白四角) に対する温度作用として、260 nm での吸光度の変化を、1 mM MgCl₂ を含む PBS 中で測定した。

【図 6】 図 6 は、¹²⁵I - PDGF - BB の、PAE 細胞で発現された PDGF 受容体への結合に対する、DNA リガンドの効果を示す。
10

【図 7】 図 7 は、PDGF 受容体を発現している PAE 細胞に対する、PDGF - BB の分裂促進性効果に対する、DNA リガンドの効果を示す。

【図 8】 図 8 A - 8 B は、PDGF - AB に対する高親和性結合に適合する置換パターンを示す。図 8 A - 8 C において、下線記号は、2' - O - メチル - 2' - デオキシヌクレオチドを示し；斜字記号は、2' - フルオロ - 2' - デオキシヌクレオチドを示し；通常フォントは 2' - デオキシリボヌクレオチドを示し；[3' T] は逆方向 (3' 3') チミジンヌクレオチド (Glen Research、バージニア州スタークリング) を示し；図 8 B のらせん (ヘリックス) II および III のループ内の PEG はペンタエチレングリコールスペーサー ホスホロアミダイト (Glen Research、バージニア州スタークリング) を示す (分子の描写には図 9 を参照されたい)。図 8 C は、実施例 8 および 9 のコントロールとして用いたスクランブル核酸リガンド配列の予測される二次構造を示す。スクランブル領域は、図 8 B に示される核酸リガンドに対するスクランブル核酸リガンドの全体的な類似性を強調するため、囲んでいる。
20

【図 9】 図 9 A - 9 E は、NX 31975 - 40 K PEG (SEQ ID No: 146) (図 9 A)、NX 31976 - 40 K (SEQ ID No: 147) (図 9 B)、ヘキサエチレングリコールホスホロアミダイト (図 9 C)、ペンチルアミノリンカー (図 9 D)、および 40 K PEG NHS エステル (図 9 E) の分子の描写を示す。図 9 A および 9 B の PEG スペーサーに示される 5' リン酸基はヘキサエチレングリコールホスホロアミダイト由来である。

【図 10】 図 10 は、37 での時間経過に渡る、DNA (36 ta) および修飾 DNA (NX 21568) 核酸リガンドのラット血清中の安定性を示す。36 ta は、記号黒丸で示され；そして NX 21568 は記号黒三角で示される。
30

【図 11】 図 11 は、コントロール (PBS) および NX 31975 - 40 K PEG 群に対する内膜 / 中膜比に基づき、NX 31975 - 40 K PEG が、ラットにおいて新規内膜形成の約 50 % を有意に阻害した (p < 0.05) ことを示す。

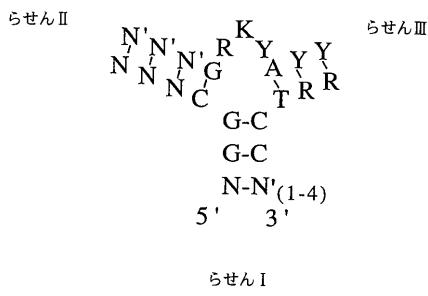
【図 12】 図 12 は、NX 31975 - 40 K PEG の、培養中のメサンギウム細胞の分裂促進剤刺激増殖に対する効果を示す (分裂促進剤はすべて、最終濃度 100 ng / ml で添加された)。スクランブル核酸リガンド NX 31976 および 40 K PEG もまた、試験した。データは XTT アッセイで測定した光学密度であり、そしてベースライン、すなわち 200 µg / ml の 40 K PEG (すなわち、50 µg / ml の核酸リガンドに付着している PEG と同等の量) を加えた培地で刺激した細胞のパーセンテージとして表す。結果は、5 つの別個の実験 (40 K PEG を加えた培地の場合、n = 3 ; したがって統計的評価は、NX 31975 およびスクランブル核酸リガンド群に限られる) 平均 ± SD を意味する。
40

【図 13】 図 13 A - 13 E は、NX 31975 - 40 K PEG の、糸球体細胞増殖 (図 13 A)、糸球体 PDGF - B 鎮発現 (図 13 B)、抗 Thy 1.1 腎炎のラットにおける蛋白尿 (図 13 C)、メサンギウム細胞活性化 (平滑筋アクチンの糸球体 de novo 発現により評価されるものとして) (図 13 D)、および単球 / マクロファージ流入 (図 13 E) に対する効果を示す。NX 31975 - 40 K PEG は黒で示され、そして NX 31976 - 40 K PEG は交差斜線で示され、40 K PEG は白で示さ
50

れ、P B S は斜線で示され、そして正常範囲は点描で示されている。

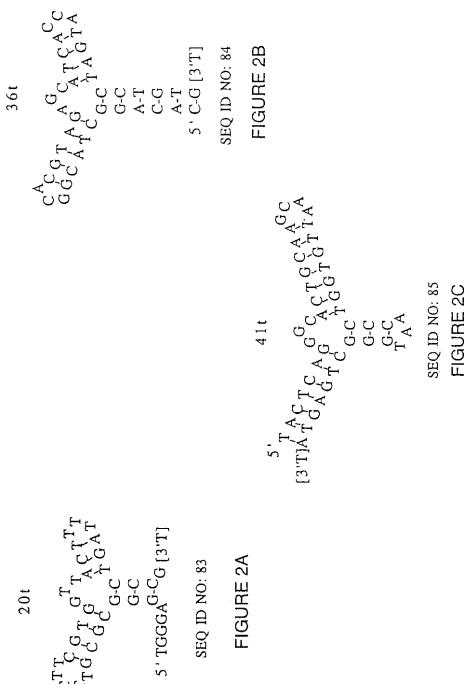
【図14】 図14A - Cは、N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K P E Gの糸球体マトリックス集積に対する効果を示す。フィプロネクチンおよびIV型コラーゲンに対する糸球体免疫染色スコアと共にIV型コラーゲンm R N A発現(in situハイブリダイゼーション)に関する糸球体スコアを示す。N X 3 1 9 7 5 - 4 0 K P E Gは黒で示され、N X 3 1 9 7 6 - 4 0 K P E Gは交差斜線で示され、4 0 K P E Gは白で示され、P B S は斜線で示され、そして正常範囲は点描で示されている。

【図1】



SEQ ID NO: 82

【図2】



【図3】

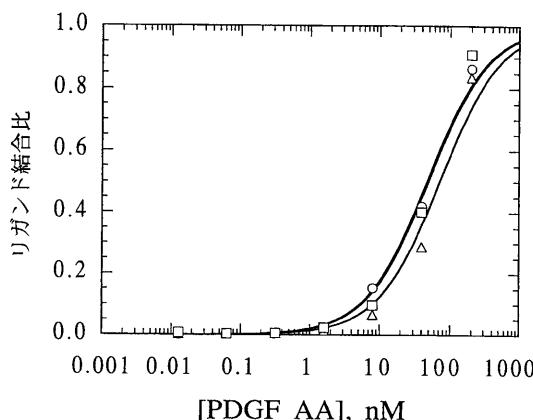


FIGURE 3A

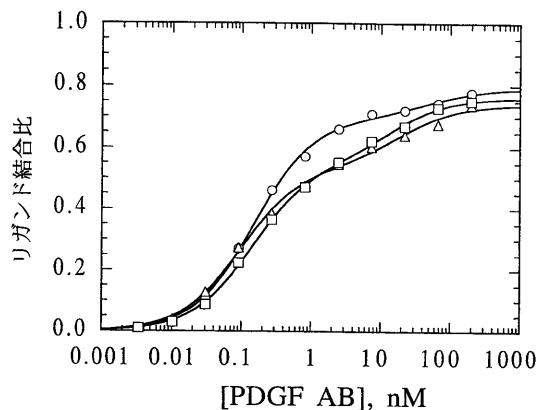


FIGURE 3B

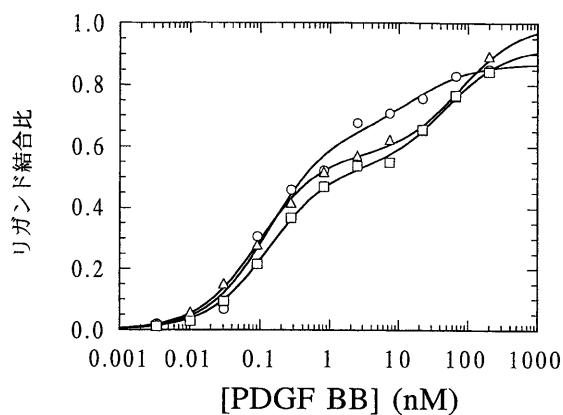
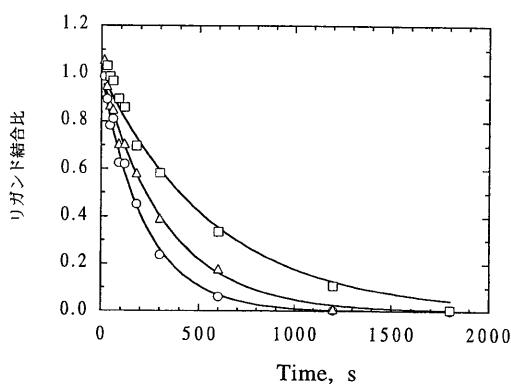
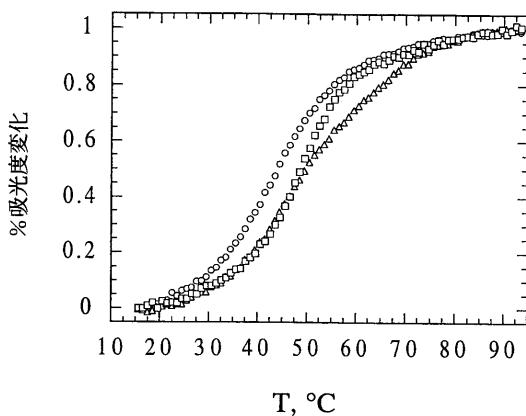


FIGURE 3C

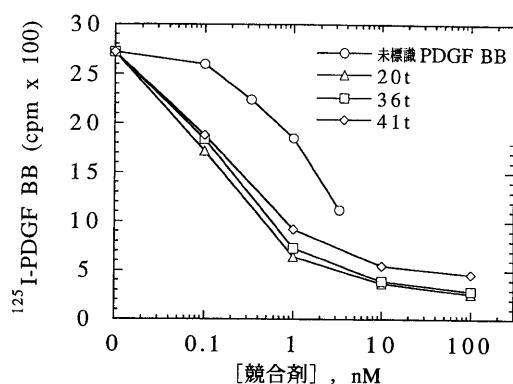
【図4】



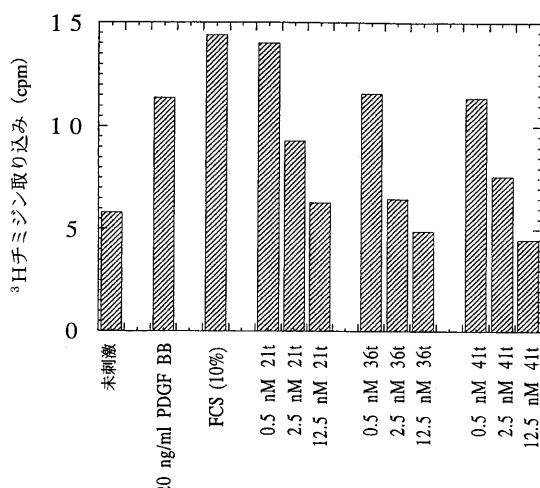
【図5】



【図6】



【図7】



【図8】

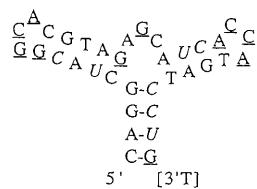
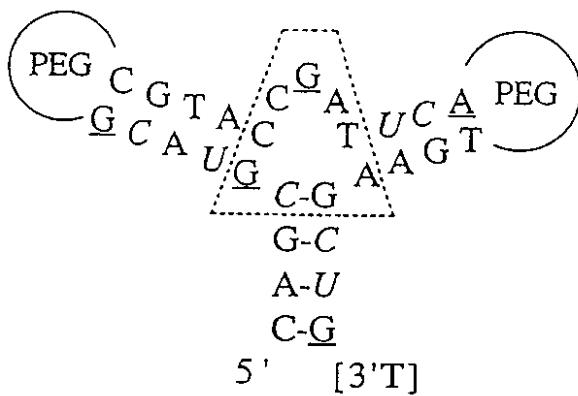


FIGURE 8A

$$K_d = 0.065 \text{ nM}$$

SEQ ID NO: 86



The diagram illustrates a siRNA duplex (left) linked via its 5' ends to a PEG chain (right). The siRNA backbone is shown as a zigzag line with phosphate groups at the 5' ends. The sequence is 5'-[3' T] for the bottom strand and 5'-[3' G-C] for the top strand. The PEG chain is represented by a circle containing the letters 'PEG' and a zigzag line extending from the 5' end of the siRNA.

FIGURE 8B

$$K_d = 0.097 \text{ nM}$$

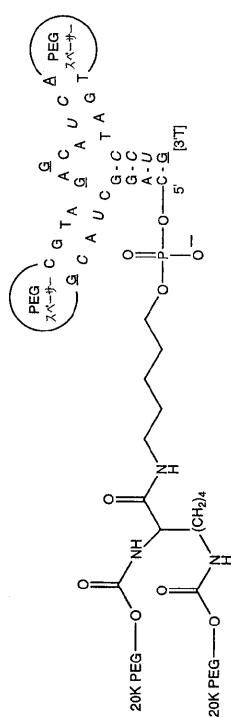
NX21568

SEQ ID NO: 87

SEQ ID NO: 145

FIGURE 8C

【 図 9 】



X31975 40K PEG
SEQ ID NO: 146

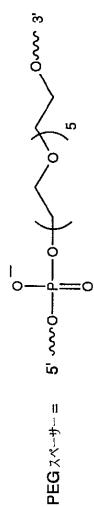


Figure 9A

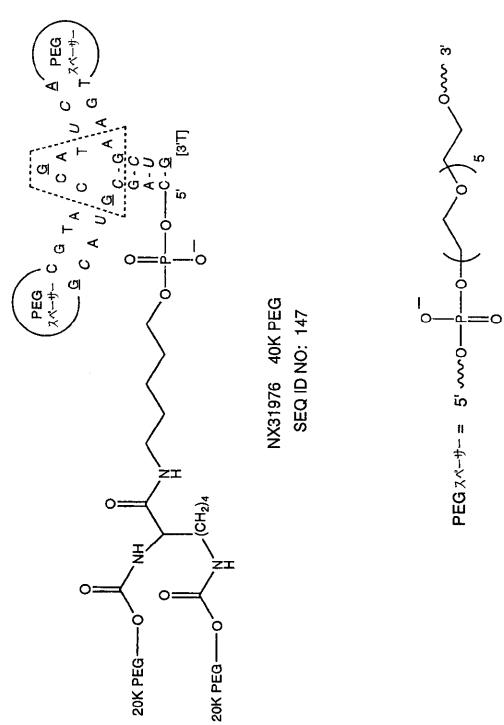


Figure 9B

Figure 9C

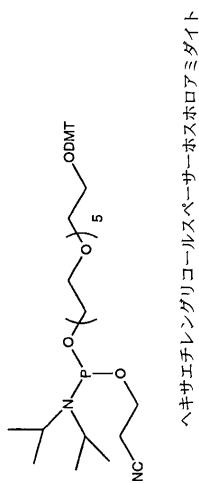


Figure 9D

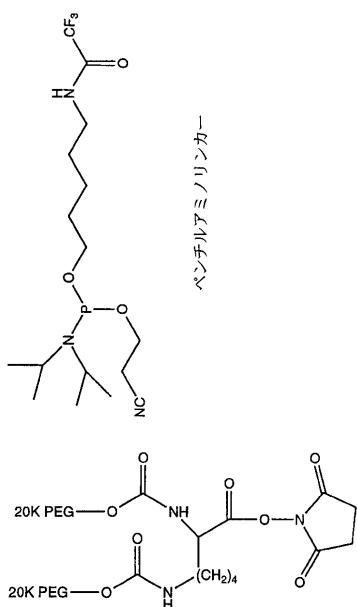
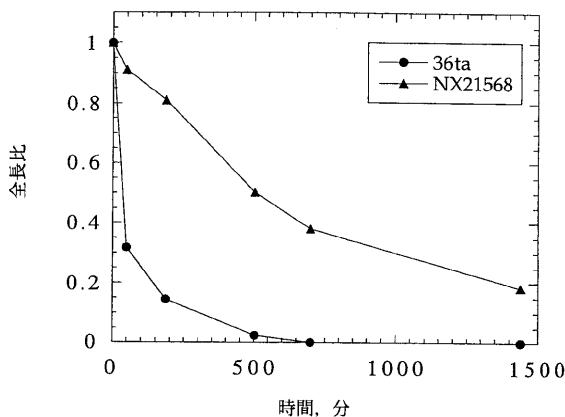
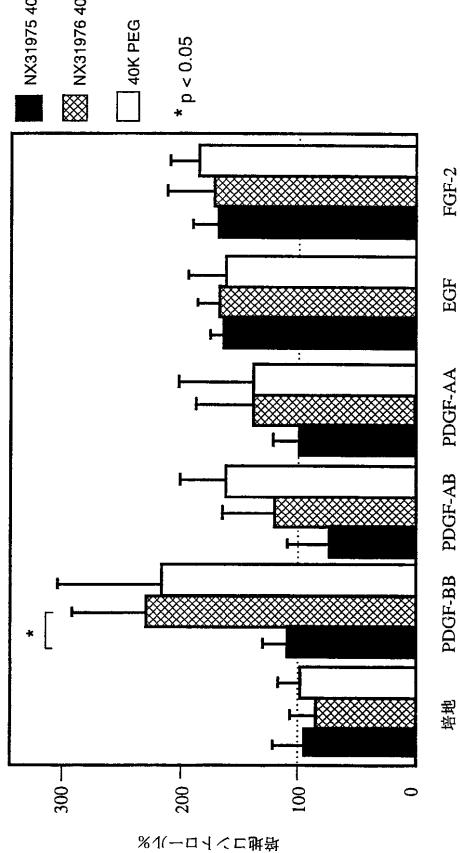


Figure 9E

【図 10】



【図 12】



【図 11】

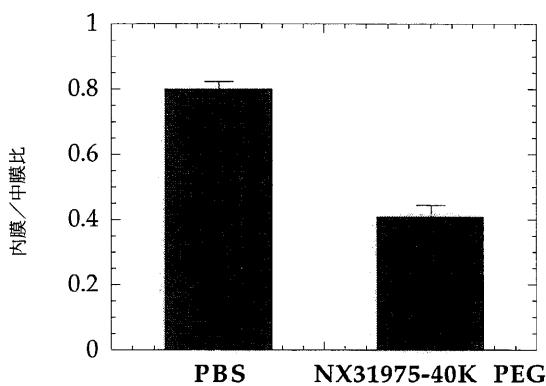


図 13】

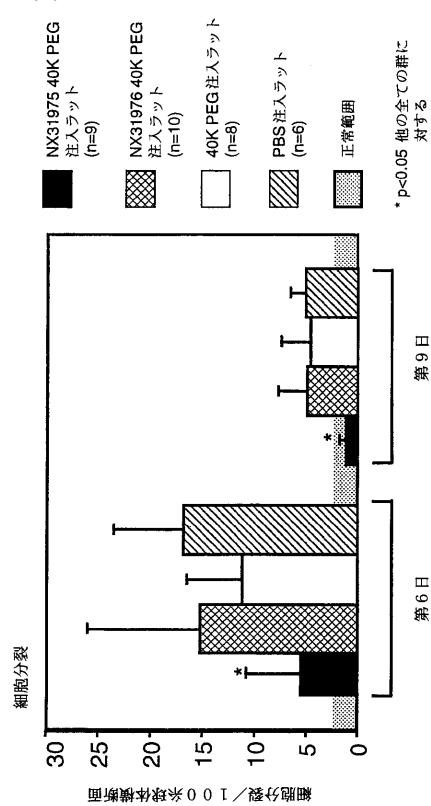


Figure 13A

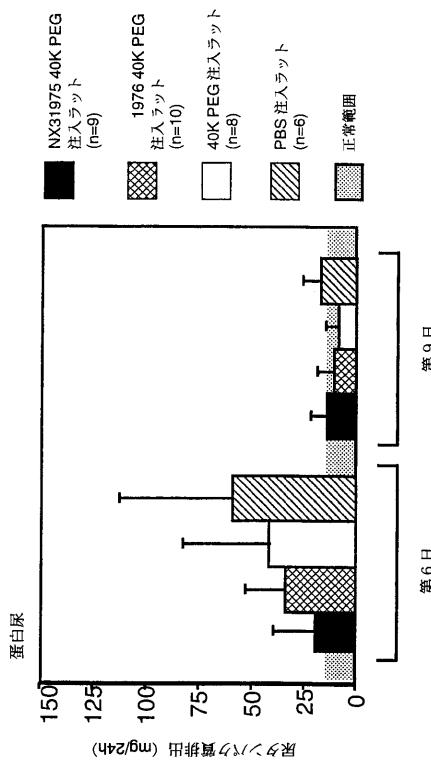


Figure 13C

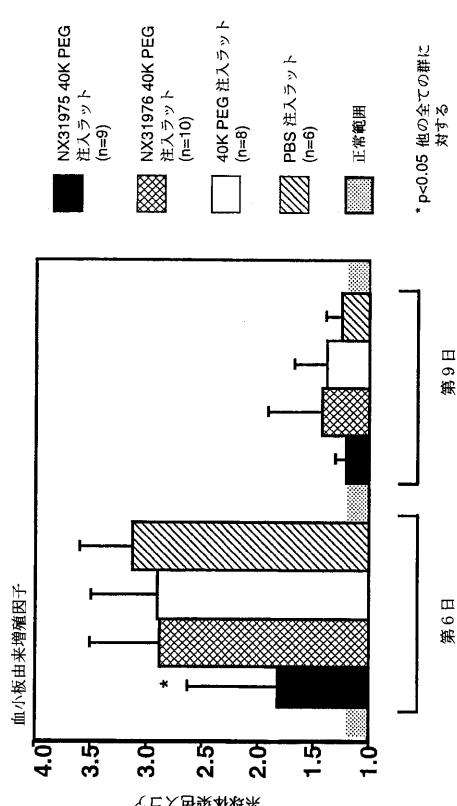


Figure 13B

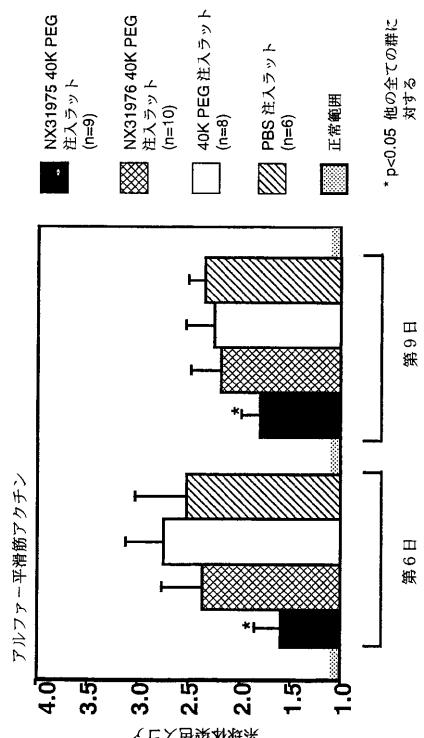


Figure 13D

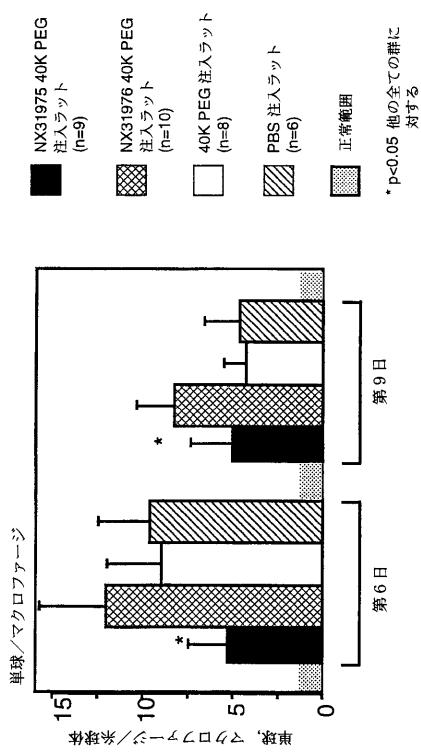


Figure 13E

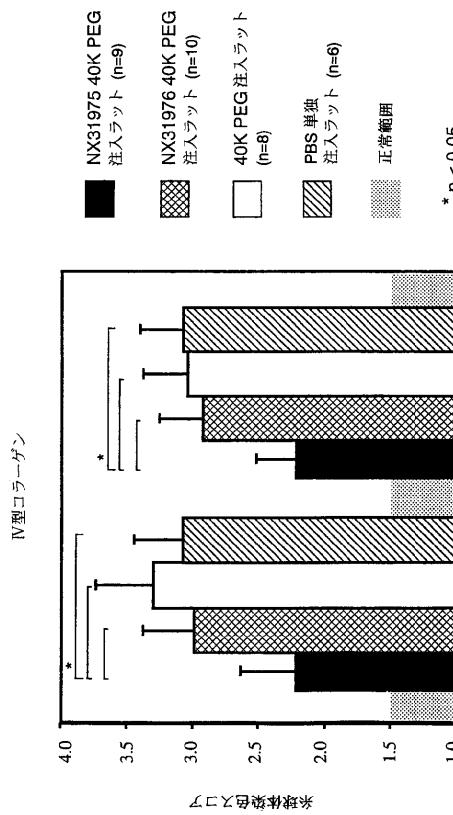


Figure 14B

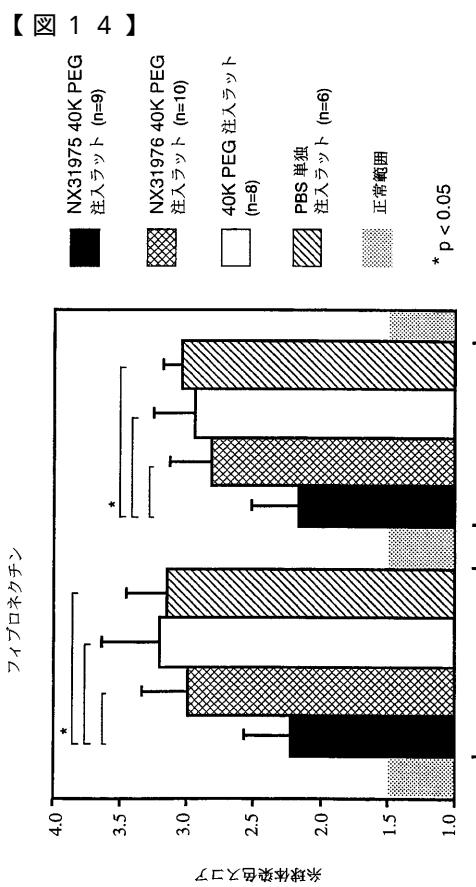


Figure 14A

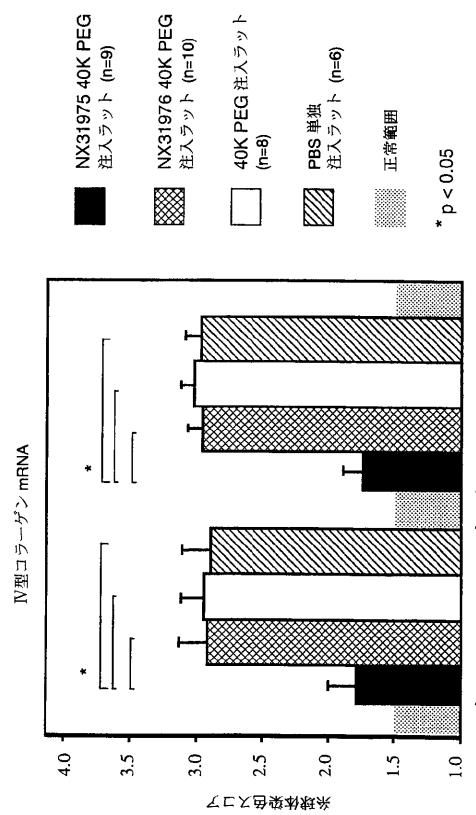


Figure 14C

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 1 2 P 19/34 (2006.01)	C 1 2 P 19/34
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z

(74)代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 ジャニック , ネボイサ

アメリカ合衆国コロラド州 80301 , ボールダー , カーター・トレイル 6973

(72)発明者 ゴールド , ラリー

アメリカ合衆国コロラド州 80302 , ボールダー , フィフス・ストリート 1033

審査官 今村 玲英子

(56)参考文献 国際公開第 96 / 038579 (WO , A 1)

国際公開第 96 / 034876 (WO , A 1)

Circulation , 1994年 , vol.90 , p.2710-2715

Chest , 1997年 , vol.111 , No.6, supplement , p.105S

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

BIOSIS(STN)

CA/REGISTRY(STN)

PubMed