

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年2月2日(02.02.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/014890 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/115 (2010.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A61P 21/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/066962

(22) 国際出願日: 2011年7月26日(26.07.2011)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2010-167342 2010年7月26日(26.07.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): NEC ソフト株式会社 (NEC Soft, Ltd.) [JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 Tokyo (JP). 地方独立行政法人神奈川県立病院機構 (KANAGAWA PREFECTURAL HOSPITAL ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒2310005 神奈川県横浜市中区本町1-2 Kanagawa (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平林 直己 (HIRABAYASHI Naomi) [JP/JP]; 〒2418515 神奈川県横浜市旭区中尾1-1-2 地方独立行政法人神奈川県立病院機構内 Kanagawa (JP). 辻祥太郎 (TSUJI Shotaro) [JP/JP]; 〒2418515 神奈川県横浜市旭区中尾1-1-2 地方独立行政法人神奈川県立病院機構内 Kanagawa (JP). 秋富 穰 (AKITOMI Jou) [JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NEC ソフト株式会社内 Tokyo (JP). 加藤 信太郎 (KATOU Shintaro) [JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NEC ソフト株式会社内 Tokyo (JP). 和賀 巖 (WAGA Iwao) [JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NEC ソフト株式会社内 Tokyo (JP). 大津 敬 (OHTSU Takashi) [JP/JP]; 〒2418515 神奈川県横浜市旭区中尾1-1-2 地方独立行政法人神奈川県立病院機構内 Kanagawa (JP).

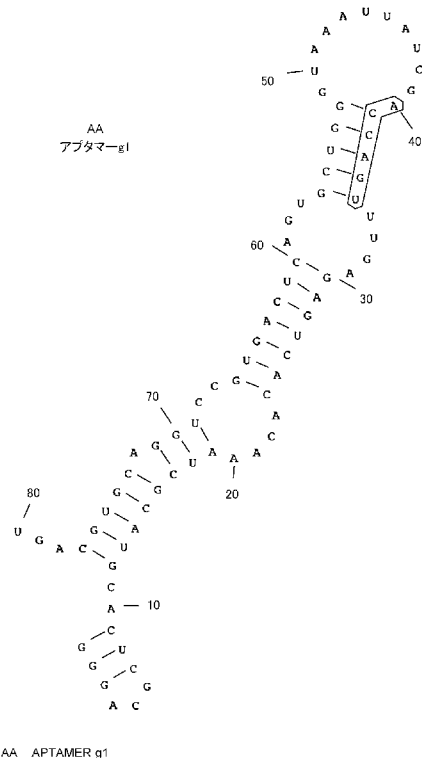
(74) 代理人: 辻丸 光一郎, 外 (TSUJIMARU Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町

[続葉有]

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULE CAPABLE OF BINDING TO c-Met AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: c-Met 結合核酸分子およびその用途

[図1]



(57) Abstract: Provided are: a nucleic acid molecule capable of binding to c-Met, which is a substance that can be used for analysis of the mechanism of development, diagnosis and treatment of diseases that are induced by c-Met; and use of the nucleic acid molecule capable of binding to c-Met. This nucleic acid molecule capable of binding to c-Met is any one of the following nucleic acid molecules (A1), (A2), (B1) and (B2). (A1) a nucleic acid molecule which comprises one of the nucleotide sequences represented by SEQ ID NOS: 1-38 (A2) a nucleic acid molecule which comprises a nucleotide sequence that is produced by substituting, deleting, adding or inserting one or more nucleotides in one of the nucleotide sequences represented by SEQ ID NOS: 1-38 and which is capable of binding to c-Met (B1) a nucleic acid molecule which comprises one of the nucleotide sequences represented by SEQ ID NOS: 39-76 (B2) a nucleic acid molecule which comprises a nucleotide sequence that is produced by substituting, deleting, adding or inserting one or more nucleotides in one of the nucleotide sequences represented by SEQ ID NOS: 39-76 and which is capable of binding to c-Met

(57) 要約: c-Met が関係して引き起こされる疾患の発症機構の解明、診断、および治療等に利用可能な物質として、c-Met に結合可能な核酸分子、ならびにその用途を提供する。本発明の c-Met 結合核酸分子は、下記 (A1)、(A2)、(B1) および (B2) のいずれかの核酸分子である。

[続葉有]



1 3 4 京都リサーチパーク 1 号館 3 0 1 号
室 Kyoto (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(A 1) 配列番号 1 ~ 3 8 のいずれかで表わされる塩基配列を含む核酸分子 (A 2) 配列番号 1 ~ 3 8 のいずれかで表わされる塩基配列において、1 または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列を含み、c-Me t に結合可能である核酸分子 (B 1) 配列番号 3 9 ~ 7 6 のいずれかで表わされる塩基配列を含む核酸分子 (B 2) 配列番号 3 9 ~ 7 6 のいずれかで表わされる塩基配列において、1 または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列を含み、c-Me t に結合可能である核酸分子

明 細 書

発明の名称 : c-Met 結合核酸分子およびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、c-Met タンパク質に結合する核酸分子およびその用途に関する。

背景技術

[0002] c-Met タンパク質 (hepatocyte growth factor receptor: HGFR、以下、「c-Met」という) は、受容体型チロシンキナーゼであり、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor: HGF) のレセプターとして知られている。c-Met は、 α 鎖と β 鎖とからなるヘテロ二量体の膜タンパク質であり、前記 β 鎖は、チロシンキナーゼドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインから構成されている。c-Met は、その細胞外ドメインにHGFが結合すると、前記チロシンキナーゼドメインがリン酸化され、シグナル伝達系が活性化される。このシグナル伝達系の活性化により、例えば、細胞の増殖、浸潤、移動等が制御されている。

[0003] c-Met は、例えば、肝臓、腎臓、膵臓、肺、膀胱、前立腺、精嚢、卵巣、乳房、乳腺、胃および結腸等の消化管等、多くの組織における癌細胞で、過剰発現していることが報告されている（非特許文献1）。このため、c-Met は、各種癌をはじめとする疾患のターゲットおよび診断マーカーとして、注目されている。このような背景から、c-Met に結合可能な物質を作製し、その作用を中和することで、前記疾患を予防および治療することが望まれている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1: Seminars in Oncology、Vol. 36、No. 2、suppl 1、2009年、pp. s52-s58

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、例えば、c-Met が関係して引き起こされる疾患の発症機構の解明、診断、および治療、c-Met シグナル伝達系の作用機構の解析等に利用可能な物質として、c-Met に結合可能な核酸分子、ならびにその用途を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明のc-Met 結合核酸分子は、下記(A1)～(A4)および(B1)～(B4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、c-Met に結合可能なc-Met 結合核酸分子である。

(A1) 配列番号1～38のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド

(A2) 配列番号1～38のいずれかで表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

(A3) 配列番号1～38のいずれかで表わされる塩基配列に対して、60%以上の同一性を有する塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

(A4) 配列番号1～38のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドと、ストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに相補的な塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

(B1) 配列番号39～76のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド

(B2) 配列番号39～76のいずれかで表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

(B3) 配列番号39～76のいずれかで表わされる塩基配列に対して、6

0%以上の同一性を有する塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

(B4) 配列番号39～76のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドと、ストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに相補的な塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

[0007] 本発明の中和剤は、前記本発明のc-Met 結合核酸分子を含み、c-Met と前記c-Met 結合核酸分子との結合により、c-Met の機能を中和することを特徴とする。

[0008] 本発明の阻害剤は、前記本発明のc-Met 結合核酸分子を含み、c-Met と前記c-Met 結合核酸分子との結合により、c-Met の機能を阻害することを特徴とする。

[0009] 本発明の医薬品は、前記本発明のc-Met 結合核酸分子を含むことを特徴とする。

[0010] 本発明の組成物は、本発明のc-Met 結合核酸分子を含むことを特徴とする。

[0011] 本発明の検出試薬は、前記本発明のc-Met 結合核酸分子を含むことを特徴とする、前記c-Met を検出するためのc-Met 検出試薬である。

発明の効果

[0012] 本発明のc-Met 結合核酸分子は、c-Met に結合可能である。このため、本発明のc-Met 結合核酸分子によれば、例えば、c-Met と結合してその機能を阻害することより、c-Met が原因となる前述のような疾患の予防および治療が可能となる。また、本発明のc-Met 結合核酸分子によれば、例えば、c-Met との結合の有無を確認することで、c-Met を検出でき、疾患の早期診断が可能となる。また、例えば、本発明のc-Met 結合核酸分子を培養細胞内で発現させることで、遺伝子転写の阻害実験が可能となる、本発明のc-Met 結合核酸分子を使用して、細胞外のc-Met とその受容体との結合阻害実験が可能となる等、本発明のc-M

e t 結合核酸分子は、c-Me t の機能解明にも使用できる。このため、本発明のc-Me t 結合核酸分子は、新たな研究用ツールとしても有用である。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、本発明におけるRNAアプタマーg1の推定二次構造を示す模式図である。

[図2]図2は、組換えc-Me t の概略を示す模式図である。

[図3]図3は、本発明の実施例1において、組換えc-Me t に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図4]図4は、本発明の実施例2において、組換えNGFRに対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図5]図5は、本発明の実施例2において、組換えc-Me t に対するRNAアプタマープールの結合能を示すグラフである。

[図6]図6は、本発明の実施例3において、組換えc-Me t に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図7]図7は、本発明の実施例4において、組換えc-Me t に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図8]図8は、本発明におけるRNAアプタマーg1-trAの推定二次構造を示す模式図である。

[図9]図9は、本発明の実施例5において、組換えc-Me t に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図10]図10は、本発明におけるRNAアプタマーg7の推定二次構造を示す模式図である。

[図11]図11は、本発明の実施例6において、組換えc-Me t に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図12]図12は、本発明の実施例7において、組換えc-Me t に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図13]図13は、本発明の実施例8において、RNAアプタマーの存在下に

おける、移動細胞の割合を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0014] <c-Met 結合核酸分子>

本発明のc-Met 結合核酸分子は、前述のように、下記(A1)～(A4)および(B1)～(B4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、c-Met に結合可能なc-Met 結合核酸分子である。

(A1) 配列番号1～38のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド

(A2) 配列番号1～38のいずれかで表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

(A3) 配列番号1～38のいずれかで表わされる塩基配列に対して、60%以上の同一性を有する塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

(A4) 配列番号1～38のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに相補的な塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

(B1) 配列番号39～76のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド

(B2) 配列番号39～76のいずれかで表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

(B3) 配列番号39～76のいずれかで表わされる塩基配列に対して、60%以上の同一性を有する塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

(B4) 配列番号39～76のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌク

レオチドに相補的な塩基配列からなり、c-Metに結合可能であるポリヌクレオチド

[0015] 本発明において、「c-Metに結合可能」とは、例えば、c-Metに対する結合能を有している、または、c-Metに対する結合活性（c-Met結合活性）を有しているともいう。本発明のc-Met結合核酸分子は、例えば、c-Metに特異的に結合する。前記c-Met結合核酸分子とc-Metとの結合は、例えば、表面プラズモン共鳴分子相互作用解析等により決定できる。前記解析は、例えば、ピアコアX（商品名、GE Healthcare Ltd.）が使用できる。

[0016] 本発明において、c-Metは、例えば、NCBIアクセッション番号42741655にアイソフォームbのアミノ酸配列（配列番号80）が開示されている。

[0017] 本発明のc-Met結合核酸分子は、例えば、c-Metアプタマーともいう。本発明の核酸分子は、例えば、前記（A1）～（A4）および（B1）～（B4）のいずれかのポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記（A1）～（A4）および（B1）～（B4）のいずれかのポリヌクレオチドを含む分子でもよい。

[0018] 前記（A1）のポリヌクレオチドを含む核酸分子について、説明する。以下、前記（A1）のポリヌクレオチドを含む核酸分子を、c-Met結合核酸分子（A1）という。また、前記c-Met結合核酸分子（A1）において、配列番号1～38のいずれかで表わされる塩基配列を、塩基配列（A1）ともいう。

（A1）配列番号1～38のいずれかで表わされる塩基配列を含むポリヌクレオチド

[0019] 前記塩基配列（A1）からなるポリヌクレオチド、および前記塩基配列（A1）のポリヌクレオチドを含むc-Met結合核酸分子（A1）は、それぞれ、以下に示すように、配列番号の前に示す名称で表わすこともある。

g1（配列番号1）

acacacugagaguuugaccagcuauaaaaugggucgugac

g 2 (配列番号 2)

accugggcgaucuccggccggauacgggagaacgagguac

g 3 (配列番号 3)

gggcgaaacugucgugacacgguuugacaugccggccuua

g 4 (配列番号 4)

uaccgugauucggggugguauccgguggacauccaggucg

g 5 (配列番号 5)

gccaacgaacauuuugaguuuuccaggcagcucauagaca

g 6 (配列番号 6)

uccagguguggcgagccacuguaagagucgccgugaggau

g 7 (配列番号 7)

cuugaagucaaggguaagagugaccaugcagcucguagaca

g 8 (配列番号 8)

gggcacuuaaaaccagaccgugauuugcggauuggucucgc

g 9 (配列番号 9)

gaugucucaauuggucgugauugugcugaccacacgaacc

g 10 (配列番号 10)

acacagcucugauggucgugauuagguugaccaccuaccu

g 11 (配列番号 11)

guuuagguggcaucgaccuucaugaaacgggugcacaggc

g 12 (配列番号 12)

cgcggccauccggcguuuggaacgggauguacaccugaca

g 13 (配列番号 13)

ucacucggacagccggagcgaaacgggcuguguaagacug

g 14 (配列番号 14)

ucaucgggacaucggauggaacgggugucaagaagcgugu

g 15 (配列番号 15)

gacgcggggccaccggcuagcgacggguagguaaaggguug

g 1 6 (配列番号 1 6)

ccgcuaccgggugcaacggguagacuguaaccaggugaua

g 1 7 (配列番号 1 7)

agugauggccggcuggagaaacggggccacucgauccagg

g 1 8 (配列番号 1 8)

ggcaccuuauaggauucagcccuuaacccgguguuuguaa

g 1 9 (配列番号 1 9)

guagccgugauuggguuggcugcccacaauuauccaggac

g 2 0 (配列番号 2 0)

acguuguggcgaacuucggcccgaacgggaguaacugca

g 2 1 (配列番号 2 1)

ccuuggugucauccgaccaaauagaacgggaugaggaag

g 2 2 (配列番号 2 2)

gcguguuucuucuuucgacgcuggccaacggaaaugcaa

g 2 3 (配列番号 2 3)

augggagugcgccucggcucuaacggagguaugcacguca

g 2 4 (配列番号 2 4)

gaguugucgcacagcgacucgaaaauaauucuguccgacac

g 2 5 (配列番号 2 5)

uagcaacaguucccagaggugaucaggcagccuuaagaca

g 2 6 (配列番号 2 6)

gcuccaccagguguagcuagccuguagacaucauguagca

g 2 7 (配列番号 2 7)

ccuau gcagaccgacauccggguauacgggaugaugcgac

g 2 8 (配列番号 2 8)

ccuggggguuccgcaggaau cgggaacuagauuggguguc

g 2 9 (配列番号 2 9)

acgagccgugauuggguuggcaaccugcuuaugugagga

g 3 0 (配列番号 3 0)

aaauugccgggaucugguguggcgaccaugcggcgugcau

g 3 1 (配列番号 3 1)

agagucuaugccgugagugaggguggcgccucgacugcca

g 3 2 (配列番号 3 2)

acaagaccgggauggggguuggucacacacaaagacugaa

g 3 3 (配列番号 3 3)

acuuuuggcgaucccgccgggauacgggagaacgaggua

g 3 4 (配列番号 3 4)

uuuggugaauuccgaccuuuugcaaacggggaucgggac

g 3 5 (配列番号 3 5)

gauuugugugauacccgacacucuaacgggguaagcagggc

g 3 6 (配列番号 3 6)

cuugauuggucgcaaccggacaaggacggguugaugcagu

g 3 7 (配列番号 3 7)

gguuugcuccgaccgacuaaaggagccucugucacgagu

g 3 8 (配列番号 3 8)

ccaggagcauuagaccggggaaagaaggaguaccgucugg

[0020] 前記 c-Met 結合核酸分子 (A 1) は、例えば、前記塩基配列 (A 1) からなるポリヌクレオチドを含む核酸分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子でもよい。

[0021] 前記 c-Met 結合核酸分子 (A 1) が、前記塩基配列 (A 1) からなるポリヌクレオチドを含む場合、例えば、前記塩基配列 (A 1) を X 領域として、さらに、Y 領域および／または Y' 領域を有してもよい。前記 c-Met 結合核酸分子 (A 1) において、前記 X 領域、前記 Y 領域、前記 Y' 領域は、例えば、5' 側から、前記 Y 領域、前記 X 領域および前記 Y' 領域の順で連結していることが好ましい。前記 Y 領域は、特に制限されず、例えば、

配列番号 77 または 78 の塩基配列からなる配列および前記塩基配列を含む配列があげられる。また、前記 Y' 領域は、特に制限されず、例えば、配列番号 79 の塩基配列からなる配列および前記塩基配列を含む配列があげられる。これらの配列は、一例であって、本発明を制限するものではない。

gggacgcucacguacgcuaa (配列番号 77)

acgcucacguacgcuaa (配列番号 78)

ucagugccuggacgugcagu (配列番号 79)

[0022] 前記 c-Met 結合核酸分子 (A1) において、前記 Y 領域は、例えば、前記塩基配列 (A1) の 5' 側に結合していることが好ましい。また、前記 c-Met 結合核酸分子 (A1) において、前記 Y' 領域は、例えば、前記塩基配列 (A1) の 3' 側に結合していることが好ましい。前記塩基配列 (A1) と前記 Y 領域、および前記塩基配列 (A1) と前記 Y' 領域とは、例えば、直接結合してもよいし、介在配列を介して結合してもよい。

[0023] 前記 Y 領域および前記 Y' 領域は、それぞれ、特に制限されない。前記 Y 領域および前記 Y' 領域は、それぞれ、例えば、プライマーがアニーリング可能なプライマー結合配列、および、ポリメラーゼが認識可能なポリメラーゼ認識配列等を有することが好ましい。核酸分子を大量に製造する場合、例えば、前述のような化学合成よりも、核酸増幅法により増幅させる方が、効率よい製造が可能である。そこで、前記 c-Met 結合核酸分子を核酸増幅法により増幅させる場合、前記 c-Met 結合核酸分子は、例えば、プライマーがハイブリダイズ可能なプライマー結合配列およびポリメラーゼが認識可能なポリメラーゼ認識配列を有することが好ましい。前記 c-Met 結合核酸分子は、例えば、前記 X 領域の 5' 側上流、すなわち前記 Y 領域と、前記 X 領域の 3' 側下流、すなわち前記 Y' 領域との少なくとも一方に、前記プライマー結合配列およびポリメラーゼ認識配列を有することが好ましい。前記ポリメラーゼ認識領域は、例えば、核酸増幅で使用するポリメラーゼの種類に応じて適宜決定できる。前記 c-Met 結合核酸分子が RNA の場合、前記ポリメラーゼの認識配列は、例えば、DNA 依存性 RNA ポリメラー

ぜの認識配列（以下、「RNAポリメラーゼ認識配列」ともいう）が好ましく、具体例としては、T7 RNAポリメラーゼの認識配列であるT7プロモーター等があげられる。前記c-Met結合核酸分子がRNAの場合、例えば、5'側の前記Y領域は、前記RNAポリメラーゼ認識配列と前記プライマー結合配列（以下、「5'側プライマー領域」ともいう）とを、この順序で有することが好ましい。そして、前記Y領域の3'側に、前記X領域が連結されていることが好ましい。さらに、前記X領域の3'側に、前記Y'領域が連結され、前記Y'領域が、プライマー結合配列（以下、「3'側プライマー領域」ともいう）を有することが好ましい。前記RNAにおける前記5'側プライマー領域は、例えば、前記RNAを鋳型として合成したDNAアンチセンス鎖の3'側に対して相補的な配列、つまり、前記アンチセンス鎖の3'側に結合可能なプライマーと同様の配列であることが好ましい。また、前記c-Met結合核酸分子は、例えば、さらに、c-Metへの結合を補助する領域を有してもよい。また、前記c-Met結合核酸分子は、例えば、前記Y領域と前記X領域、および、前記X領域と前記Y'領域が、それぞれ、直接隣接してもよいし、介在配列を介して間接的に隣接してもよい。

[0024] 前記Y領域およびY'領域の塩基数は、特に制限されず、それぞれ、例えば、10～50塩基であり、好ましくは15～40塩基であり、より好ましくは20～37塩基長、さらに好ましくは20～30塩基である。

[0025] 前記c-Met結合核酸分子(A1)が、前記塩基配列(A1)を含む場合、例えば、配列番号39～76のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む核酸分子、または前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子が例示できる。以下に示す配列番号39～76の塩基配列は、それぞれ、前記配列番号1～38の塩基配列(A1)を含み、下線部で表わされる領域が、それぞれ、前記配列番号1～38の塩基配列に相当する。前記配列番号39～76の塩基配列からなるポリヌクレオチド、および前記塩基配列のポリヌクレオチドを含む前記c-Met結合核酸分子(A1)は、それぞれ、以下に

示すように、配列番号の前に示す名称で表わすこともある。

[0026] g 1 (配列番号 3 9)

gggacgcucacguacgcuaaacacacugagaguuugaccagcuauuuaugggucgugacucagugccu
ggacgugcagu

g 2 (配列番号 4 0)

gggacgcucacguacgcuaaaccuuggcgaucccgccggauacgggagaacgagguacucagugccu
ggacgugcagu

g 3 (配列番号 4 1)

gggacgcucacguacgcuaaggcgaaacugucgugacacgguuugacaugccggccuuucagugccu
ggacgugcagu

g 4 (配列番号 4 2)

gggacgcucacguacgcuaauaccgugauucggggugguauccgguggacauccaggucgucagugccu
ggacgugcagu

g 5 (配列番号 4 3)

gggacgcucacguacgcuaagccaacgaacauuuugaguuuuccaggcagcucauagacaucagugccu
ggacgugcagu

g 6 (配列番号 4 4)

gggacgcucacguacgcuaauccagguguggcgagccacuguaagagucgccgugaggauucagugccu
ggacgugcagu

g 7 (配列番号 4 5)

gggacgcucacguacgcuaacuugaagucaaggguagagugaccaugcagcucguagacaucagugccu
ggacgugcagu

g 8 (配列番号 4 6)

gggacgcucacguacgcuaagggcacuuuuaaccagaccgugauuugcgguuggucucgcucagugccu
ggacgugcagu

g 9 (配列番号 4 7)

gggacgcucacguacgcuaagaugucucaauuggucgugauugugcugaccacacgaaccucagugccu
ggacgugcagu

g 1 0 (配列番号 4 8)

gggacgcucacguacgcuaaacacagcucugauggucgugauuagguugaccaccuaccuucagugccu
ggacgugcagu

g 1 1 (配列番号 4 9)

gggacgcucacguacgcuaaguuuaggugggcaucgaccuucaugaaacgggugcacaggcucagugccu
ggacgugcagu

g 1 2 (配列番号 5 0)

gggacgcucacguacgcuaacgcggccauccggcguuuggaacgggauguacaccugacaucagugccu
ggacgugcagu

g 1 3 (配列番号 5 1)

gggacgcucacguacgcuaaucacucggacagccggagcgaaacgggcuguguaagacugucagugccu
ggacgugcagu

g 1 4 (配列番号 5 2)

gggacgcucacguacgcuaaucaucgggacaucggauuggaacgggugucaagaagcguguucagugccu
ggacgugcagu

g 1 5 (配列番号 5 3)

gggacgcucacguacgcuaagacgcggggccaccggcuagcgacgggugguaaaagggcuuucagugccu
ggacgugcagu

g 1 6 (配列番号 5 4)

gggacgcucacguacgcuaaccgcuaccgggugcaacggguagacuguaaccaggugauaucagugccu
ggacgugcagu

g 1 7 (配列番号 5 5)

gggacgcucacguacgcuaaagugaugggccggcuggagaaacgggccacucgauccaggucagugccug
gacgugcagu

g 1 8 (配列番号 5 6)

gggacgcucacguacgcuaaggcacccuauaggauucagccccuaacccgguguuugugaaucagugccu
ggacgugcagu

g 1 9 (配列番号 5 7)

gggacgcucacguacgcuaaguagccgugauuggguuggcugcccacaauuauccaggacucagugccu
ggacgugcagu

g 2 0 (配列番号 5 8)

gggacgcucacguacgcuaaacguuguggcgaacuucggcccgaacgggaguaaacugcaucagugccug
gacgugcagu

g 2 1 (配列番号 5 9)

gggacgcucacguacgcuaaccuuggugucauccgaccaaauuagaacgggaugaggaagucagugccu
ggacgugcagu

g 2 2 (配列番号 6 0)

gggacgcucacguacgcuaagcguguuucuucuuucgacgcuggccaacggaaaugcaaucagugccu
ggacgugcagu

g 2 3 (配列番号 6 1)

gggacgcucacguacgcuaaaugggagugcgccucggcucuaacggagguaugcacgucaucagugccu
ggacgugcagu

g 2 4 (配列番号 6 2)

gggacgcucacguacgcuaagaguugucgcacagcgacucgaaaauaucuguccgacacucagugccu
ggacgugcagu

g 2 5 (配列番号 6 3)

gggacgcucacguacgcuaauagcaacaguucccagaggugaucaggcagccuuuagacaucagugccu
ggacgugcagu

g 2 6 (配列番号 6 4)

gggacgcucacguacgcuaagcuccaccagguguagcuagccuguagacaucaguagcaucagugccug
gacgugcagu

g 2 7 (配列番号 6 5)

gggacgcucacguacgcuaaccuaugcagaccgacauccggguauacgggaugaugcgacucagugccu
ggacgugcagu

g 2 8 (配列番号 6 6)

gggacgcucacguacgcuaaccugggguuccgcaggaaucgggaacuagauugggugucucagugccu

ggacgugcagu

g 2 9 (配列番号 6 7)

gggacgcucacguacgcuaaacgagccgugauuagguuggaacccugcuuauugugaggaucagugccu

ggacgugcagu

g 3 0 (配列番号 6 8)

gggacgcucacguacgcuaaaaaauugccgggaucugguugggcgaccaugcggcgugcauucagugccu

ggacgugcagu

g 3 1 (配列番号 6 9)

gggacgcucacguacgcuaaagagucuaugccgugagugaggguggcgccucgacugccaucagugccu

ggacgugcagu

g 3 2 (配列番号 7 0)

gggacgcucacguacgcuaaacaagaccgggauggggguuuggucacacacaaagacugaaucagugccu

ggacgugcagu

g 3 3 (配列番号 7 1)

gggacgcucacguacgcuaaacuuuuggcgaucuccggccggauacgggagaacagagguucagugccu

ggacgugcagu

g 3 4 (配列番号 7 2)

gggacgcucacguacgcuaauuuuggugaauuccgaccuuuuugcaaacgggaucgggacucagugccu

ggacgugcagu

g 3 5 (配列番号 7 3)

gggacgcucacguacgcuaagaauuugugugauacccgacacucuaacgggguaacaggggucagugccu

ggacgugcagu

g 3 6 (配列番号 7 4)

gggacgcucacguacgcuaacuugauuggucgcaaccggacaaggacgggugaugcaguucagugccu

ggacgugcagu

g 3 7 (配列番号 7 5)

gggacgcucacguacgcuaagguuugcuccgaccgacuaaagggagccucugucacgaguucagugccu

ggacgugcagu

g 3 8 (配列番号 7 6)

gggacgcucacguacgcuaaccaggagcauuagaccggggaaaagaaggaguaccgucuggucagugccu
ggacgugcagu

[0027] 前記 g 1 (配列番号 3 9) の推定二次構造を図 1 に示し、前記 g 7 (配列番号 4 5) の推定二次構造を図 1 0 に示す。図 1 および図 1 0 において、囲んでいる領域が、前述した c-Me t 結合核酸分子間における保存領域の一例である。

[0028] 前記 c-Me t 結合核酸分子 (A 1) の全塩基数は、特に制限されず、例えば、20~160 塩基であり、好ましくは 30~120 塩基であり、より好ましくは 40~100 塩基である。

[0029] つぎに、前記 (A 2) のポリヌクレオチドを含む核酸分子について、説明する。以下、前記 (A 2) のポリヌクレオチドを含む核酸分子を、c-Me t 結合核酸分子 (A 2) という。また、前記 c-Me t 結合核酸分子 (A 2) において、置換、欠失、付加または挿入を、以下「改変」といい、前記改変された下記塩基配列を、塩基配列 (A 2) ともいう。

(A 2) 配列番号 1~38 のいずれかで表わされる塩基配列において、1 または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列からなり、c-Me t に結合可能であるポリヌクレオチド

[0030] 前記 c-Me t 結合核酸分子 (A 2) は、例えば、前記改変された塩基配列 (A 2) を含む核酸分子でもよいし、前記改変された塩基配列 (A 2) からなる核酸分子でもよい。

[0031] 前記 (A 2) において、「1 または複数」は、特に制限されず、前記 (A 2) のポリヌクレオチドが、c-Me t に結合可能であればよい。前記「1 または複数」は、前記塩基配列 (A 1) において、例えば、1~5 個であり、好ましくは 1~4 個であり、より好ましくは 1~3 個であり、さらに好ましくは 1 個または 2 個であり、特に好ましくは 1 個である。また、「1 または複数」は、前記 c-Me t 結合核酸分子 (A 1) の全長配列において、例えば、1~5 個であり、好ましくは 1~4 個であり、より好ましくは 1~3

個であり、さらに好ましくは1個または2個であり、特に好ましくは1個である。

[0032] 前記 c-Met 結合核酸分子 (A2) の全塩基数は、特に制限されず、例えば、20～160塩基であり、好ましくは30～120塩基であり、より好ましくは40～100塩基である。

[0033] 前記 c-Met 結合核酸分子 (A2) は、例えば、前記 c-Met 結合核酸分子 (A1) と同様に、さらに、前記 Y 領域および／または前記 Y' 領域を有してもよい。この場合、例えば、前記塩基配列 (A2) を前記 X 領域とし、前記 Y 領域および前記 Y' 領域は、前述の通りである。

[0034] 前記 (A2) のポリヌクレオチドは、特に制限されず、具体例として、前記塩基配列 (A1) において、5' 側の4塩基目から3' 側の末端塩基までの塩基配列からなるポリヌクレオチドがあげられる。すなわち、前記 (A2) のポリヌクレオチドは、例えば、前記塩基配列 (A1) において、5' 末端の g g g を欠失したポリヌクレオチドがあげられる。

[0035] つぎに、前記 (A3) のポリヌクレオチドを含む核酸分子について、説明する。以下、前記 (A3) のポリヌクレオチドを含む核酸分子を、c-Met 結合核酸分子 (A3) という。また、前記 c-Met 結合核酸分子 (A3) において、下記同一性を有する塩基配列を、塩基配列 (A3) ともいう。
(A3) 配列番号1～38のいずれかで表わされる塩基配列に対して、60%以上の同一性を有する塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

[0036] 前記 c-Met 結合核酸分子 (A3) は、例えば、前記同一性を有する塩基配列 (A3) からなるポリヌクレオチドを含む核酸分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子でもよい。

[0037] 前記 (A3) において、前記同一性は、例えば、前記塩基配列 (A1) に対して、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上である。また、前記同一性は、例えば、前記 c-Met 結合核酸分子 (A3) の全長配列が、

前記 c-Met 結合核酸分子 (A1) の全長配列に対して、70%以上でもよく、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上である。前記同一性は、例えば、BLAST等を用いてデフォルトの条件で計算することにより、算出できる。

[0038] 前記 c-Met 結合核酸分子 (A3) の全塩基数は、特に制限されず、例えば、20~160塩基であり、好ましくは30~120塩基であり、より好ましくは40~100塩基である。

[0039] 前記 c-Met 結合核酸分子 (A3) は、例えば、前記 c-Met 結合核酸分子 (A1) と同様に、さらに、前記 Y 領域および／または前記 Y' 領域を有してもよい。この場合、例えば、前記塩基配列 (A3) を前記 X 領域とし、前記 Y 領域および前記 Y' 領域は、前述の通りである。

[0040] つぎに、前記 (A4) のポリヌクレオチドを含む核酸分子について、説明する。以下、前記 (A4) のポリヌクレオチドを含む核酸分子を、c-Met 結合核酸分子 (A4) という。また、前記 c-Met 結合核酸分子 (A4) において、下記相補的な塩基配列を、塩基配列 (A4) ともいう。

(A4) 配列番号1~38のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに相補的な塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

[0041] 前記 c-Met 結合核酸分子 (A4) は、例えば、前記塩基配列 (A4) からなるポリヌクレオチドを含む前記核酸分子 (A4) でもよいし、前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子でもよい。前記 (A4) のポリヌクレオチドは、例えば、前記塩基配列 (A1) からなるポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、c-Met に結合可能なポリヌクレオチドでもよい。

[0042] 前記 (A4) において、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、例えば、当該技術分野の当業者において、周知のハイブリダイゼ

ーションの実験条件である。具体的には、「ストリンジेंटな条件」とは、例えば、 $0.7 \sim 1 \text{ mol/L}$ の NaCl 存在下、 $60 \sim 68^\circ\text{C}$ でハイブリダイゼーションを行った後、 $0.1 \sim 2$ 倍の SSC 溶液を用い、 $65 \sim 68^\circ\text{C}$ で洗浄することにより同定することができる条件をいう。 $1 \times \text{SSC}$ とは、 150 mmol/L の NaCl 、 15 mmol/L クエン酸ナトリウムからなる。また、前記 $c\text{-Met}$ 結合核酸分子(A4)は、例えば、前記 $c\text{-Met}$ 結合核酸分子(A1)の全長配列とストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含み、 $c\text{-Met}$ に結合可能である核酸分子でもよい。

[0043] 前記 $c\text{-Met}$ 結合核酸分子(A4)の全塩基数は、特に制限されず、例えば、 $20 \sim 160$ 塩基であり、好ましくは $30 \sim 120$ 塩基であり、より好ましくは $40 \sim 100$ 塩基である。

[0044] 前記 $c\text{-Met}$ 結合核酸分子(A4)は、例えば、前記 $c\text{-Met}$ 結合核酸分子(A1)と同様に、さらに、前記Y領域および／または前記Y'領域を有してもよい。この場合、例えば、前記塩基配列(A4)を前記X領域とし、前記Y領域および前記Y'領域は、前述の通りである。

[0045] つぎに、前記(B1)のポリヌクレオチドを含む核酸分子について、説明する。以下、前記(B1)のポリヌクレオチドを含む核酸分子を、 $c\text{-Met}$ 結合核酸分子(B1)という。また、前記 $c\text{-Met}$ 結合核酸分子(B1)において、配列番号39～76のいずれかで表わされる塩基配列を、塩基配列(B1)ともいう。

(B1)配列番号39～76のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド

[0046] 配列番号39～76のいずれかで表わされる塩基配列は、前述の通りである。配列番号39～76のいずれかで表わされる塩基配列(B1)からなるポリヌクレオチド、および前記塩基配列(B1)を含む $c\text{-Met}$ 結合核酸分子(B1)は、それぞれ、前述した配列番号の前に示す名称で表わすこともある。

[0047] 前記 c-Met 結合核酸分子 (B 1) は、例えば、前記塩基配列 (B 1) からなるポリヌクレオチドを含む核酸分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子でもよい。

[0048] 前記 c-Met 結合核酸分子 (B 1) の全塩基数は、特に制限されない。その全長の上限は、例えば、160塩基であり、好ましくは120塩基であり、より好ましくは100塩基である。

[0049] 前記 c-Met 結合核酸分子 (B 1) は、例えば、前記 c-Met 結合核酸分子 (A 1) と同様に、さらに、前記 Y 領域および／または前記 Y' 領域を有してもよい。この場合、例えば、前記塩基配列 (B 1) を前記 X 領域とし、前記 Y 領域および前記 Y' 領域は、前述の通りである。

[0050] 前記 c-Met 結合核酸分子 (B 1) は、例えば、中でも、下記 (b 1) のポリヌクレオチドを含む核酸分子であることが好ましい。以下、前記 (b 1) のポリヌクレオチドを含む核酸分子を、c-Met 結合核酸分子 (b 1) ともいう。前記 c-Met 結合核酸分子 (b 1) は、例えば、配列番号 39 の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む核酸分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子でもよい。

(b 1) 配列番号 39 で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド

[0051] つぎに、前記 (B 2) のポリヌクレオチドを含む核酸分子について、説明する。以下、前記 (B 2) のポリヌクレオチドを含む核酸分子を、c-Met 結合核酸分子 (B 2) という。また、前記 c-Met 結合核酸分子 (B 2) において、置換、欠失、付加または挿入を、以下「改変」といい、前記改変された下記塩基配列を、塩基配列 (B 2) ともいう。

(B 2) 配列番号 39～76 のいずれかで表わされる塩基配列において、1 または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

[0052] 前記 c-Met 結合核酸分子 (B 2) は、例えば、前記改変された塩基配列 (B 2) を含む核酸分子でもよいし、前記改変された塩基配列 (B 2) からなる核酸分子でもよい。

- [0053] 前記（B 2）において、「1または複数」は、特に制限されず、前記（B 2）のポリヌクレオチドが、c-Me tに結合可能であればよい。前記置換された塩基の数は、前記塩基配列（B 1）において、例えば、1～5個であり、好ましくは1～4個であり、より好ましくは1～3個であり、さらに好ましくは1個または2個であり、特に好ましくは1個である。前記付加または挿入された塩基の数は、前記塩基配列（B 1）において、例えば、1～5個であり、好ましくは1～4個であり、より好ましくは1～3個であり、さらに好ましくは1個または2個であり、特に好ましくは1個である。前記欠失された塩基の数は、前記塩基配列（B 1）において、例えば、1～40個、1～20個、1～4個、1～3個、2個または1個である。
- [0054] 前記c-Me t結合核酸分子（B 2）の長さは、特に制限されず、その全長は、例えば、20～160塩基長であり、好ましくは30～120塩基長であり、より好ましくは40～100塩基長である。
- [0055] 前記c-Me t結合核酸分子（B 2）のうち、例えば、前記塩基配列（B 1）において、1または複数の塩基が、欠失された塩基配列からなるポリヌクレオチドを含み、c-Me tに結合可能である核酸分子は、前記c-Me t結合核酸分子（B 1）を小型化した核酸分子ともいえる。前記小型化した核酸分子を、小型化c-Me t結合核酸分子（B 2）ともいう。
- [0056] 前記小型化c-Me t結合核酸分子（B 2）において、前記欠失された塩基配列を、小型化塩基配列（B 2）ともいう。前記小型化塩基配列（B 2）は、例えば、前記塩基配列（B 1）において、1または複数の塩基が欠失するだけでなく、例えば、さらに、1または複数の塩基が、置換、付加または挿入された塩基配列でもよい。前記小型化c-Me t結合核酸分子は、例えば、前記小型化塩基配列（B 2）からなるポリヌクレオチドを含む核酸分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子でもよい。
- [0057] 前記小型化c-Me t結合核酸分子（B 2）は、前述のように、前記欠失された前記小型化塩基配列（B 2）からなるポリヌクレオチドを含む核酸分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子でもよい。

[0058] 前記小型化塩基配列（B 2）のポリヌクレオチドは、特に制限されず、具体例として、前記塩基配列（B 1）において、5'側の4塩基目から3'側の末端塩基までの塩基配列からなるポリヌクレオチドがあげられる。すなわち、前記塩基配列（B 2）のポリヌクレオチドは、例えば、前記塩基配列（B 1）において、5'末端のg g gを欠失したポリヌクレオチドがあげられる。

[0059] 前記小型化c-Me t結合核酸分子（B 2）の長さは、特に制限されず、その全長は、例えば、20～160塩基長であり、好ましくは30～120塩基長であり、より好ましくは40～100塩基長である。

[0060] 前記c-Me t結合核酸分子（B 2）は、例えば、前記c-Me t結合核酸分子（B 1）と同様に、さらに、前記Y領域および／または前記Y'領域を有してもよい。この場合、例えば、前記塩基配列（B 2）を前記X領域とし、前記Y領域および前記Y'領域は、前述の通りである。

[0061] 前記小型化c-Me t結合核酸分子（B 2）は、例えば、中でも、下記（b 2）のポリヌクレオチドを含む核酸分子が好ましい。以下、前記（b 2）のポリヌクレオチドを含む核酸分子を、小型化c-Me t結合核酸分子（b 2）ともいう。前記c-Me t結合核酸分子（b 2）は、例えば、配列番号39の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む核酸分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子でもよい。

（b 2）配列番号39で表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が、欠失された塩基配列からなり、c-Me tに結合可能であるポリヌクレオチド

[0062] 配列番号39で表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が欠失された塩基配列を、以下、欠失塩基配列ともいう。前記欠失塩基配列は、例えば、配列番号81～89のいずれかで表わされる塩基配列があげられる。これらの塩基配列を下記表1に示す。下記表1において、各塩基配列は、配列番号39の塩基配列と対応するように示す。各塩基配列について、配列番号39の塩基配列と対比して、欠失する部分は空欄で示す。配列番号81～

８９の塩基配列からなるポリヌクレオチド、および前記ポリヌクレオチドを含む前記小型化 c-Met 結合核酸分子（b 2）は、それぞれ、下記表 1 に示す名称で表わすこともある。

[0063] [表1]

Aptamer	配列			SEQ No.
g1	GGGACGCUCACGUACGCUAA	ACACACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	39
g1-u5del	GGG CACGUACGCUAA	ACACACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUGCCUGGACGUGCAG	81
g1-u10del	GGG ACGCUAA	ACACACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUGCCUGGACGUGC	82
g1-u20del	GGG	CACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUGCCUGGACGUG	83
g1-d5del	GGGACGCUCACGUACGCUAA	ACACACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUGCCUGGACGU	84
g1-d10del	GGGACGCUCACGUACGCUAA	ACACACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUGCCUG	85
g1-u20del-d14del	GGG	CACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUG	86
g1-u21del-d15del	GGG	ACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGU	87
g1-u22del-d16del	GGG	CUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAG	88
g1-u23del-d17del	GGG	UGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCA	89

[0064] 前記小型化 c-Met 結合核酸分子（b 2）は、例えば、配列番号 81～89 のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む核酸分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子でもよい。

[0065] 前記小型化塩基配列（B 2）は、特に制限されず、具体例として、前記配列番号 39 の塩基配列および配列番号 81～89 のいずれかの塩基配列（b 2）において、5' 側の 4 塩基目から 3' 側の末端塩基までの塩基配列からなるポリヌクレオチドがあげられる。すなわち、前記小型化塩基配列（B 2）は、例えば、配列番号 39 の塩基配列および配列番号 81～89 のいずれかの塩基配列（b 2）において、5' 末端の g g g を欠失したポリヌクレオチドがあげられる。

[0066] 前記小型化 c-Met 結合核酸分子（b 2）の長さは、特に制限されず、その全長は、例えば、20～160 塩基長であり、好ましくは 30～120 塩基長であり、より好ましくは 40～100 塩基長である。

[0067] 前記 c-Met 結合核酸分子（b 2）は、例えば、前記 c-Met 結合核酸分子（B 1）と同様に、さらに、前記 Y 領域および／または前記 Y' 領域を有してもよい。この場合、例えば、前記塩基配列（b 2）を前記 X 領域とし、前記 Y 領域および前記 Y' 領域は、前述の通りである。

[0068] つぎに、前記（B 3）のポリヌクレオチドを含む核酸分子について、説明する。以下、前記（B 3）のポリヌクレオチドを含む核酸分子を、c-Met 結合核酸分子（B 3）という。また、前記 c-Met 結合核酸分子（B 3

）において、下記同一性を有する塩基配列を、塩基配列（B 3）ともいう。

（B 3）前記配列番号 38～76 のいずれかで表わされる塩基配列に対して、60%以上の同一性を有する塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

[0069] 前記 c-Met 結合核酸分子（B 3）は、前記同一性を有する塩基配列（B 3）からなるポリヌクレオチドを含む核酸分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子でもよい。

[0070] 前記（B 3）において、前記同一性は、例えば、前記塩基配列（B 1）に対して、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上である。また、前記同一性は、例えば、前記 c-Met 結合核酸分子（B 3）の全長配列が、前記 c-Met 結合核酸分子（B 1）の全長配列に対して、70%以上でもよく、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上である。前記同一性は、例えば、BLAST等を用いてデフォルトの条件で計算することにより、算出できる。

[0071] 前記 c-Met 結合核酸分子（B 3）の全塩基数は、特に制限されず、例えば、20～160塩基であり、好ましくは30～120塩基であり、より好ましくは40～100塩基である。

[0072] 前記 c-Met 結合核酸分子（B 3）は、例えば、前記 c-Met 結合核酸分子（B 1）と同様に、さらに、前記 Y 領域および／または前記 Y' 領域を有してもよい。この場合、例えば、前記塩基配列（B 3）を前記 X 領域とし、前記 Y 領域および前記 Y' 領域は、前述の通りである。

[0073] つぎに、前記（B 4）のポリヌクレオチドを含む核酸分子について、説明する。以下、前記（B 4）のポリヌクレオチドを含む核酸分子を、c-Met 結合核酸分子（B 4）という。また、前記 c-Met 結合核酸分子（B 4）において、下記相補的な塩基配列を、塩基配列（B 4）ともいう。

（B 4）前記配列番号 38～76 のいずれかで表わされる塩基配列からなる

ポリヌクレオチドと、ストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに相補的な塩基配列からなり、c-Metに結合可能であるポリヌクレオチド

[0074] 前記c-Met結合核酸分子(B4)は、例えば、前記塩基配列(B4)からなるポリヌクレオチドを含む前記核酸分子(B4)でもよいし、前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子でもよい。前記(B4)のポリヌクレオチドは、例えば、前記塩基配列(B1)からなるポリヌクレオチドと、ストリンジントな条件下でハイブリダイズする、c-Metに結合可能なポリヌクレオチドでもよい。

[0075] 前記(B4)において、「ストリンジントな条件下でハイブリダイズする」とは、例えば、当該技術分野の当業者において、周知のハイブリダイゼーションの実験条件である。前記「ストリンジントな条件」とは、前述と同様である。また、前記c-Met結合核酸分子(B4)は、例えば、前記c-Met結合核酸分子(B1)の全長配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含み、c-Metに結合可能である核酸分子でもよい。

[0076] 前記c-Met結合核酸分子(B4)の全塩基数は、特に制限されず、例えば、20～160塩基であり、好ましくは30～120塩基であり、より好ましくは40～100塩基である。

[0077] 前記c-Met結合核酸分子(B4)は、例えば、前記c-Met結合核酸分子(B1)と同様に、さらに、前記Y領域および／または前記Y'領域を有してもよい。この場合、例えば、前記塩基配列(B4)を前記X領域とし、前記Y領域および前記Y'領域は、前述の通りである。

[0078] 本発明の核酸分子は、例えば、前記(A1)～(A4)および(B1)～(B4)のいずれかのポリヌクレオチドを1つ含んでもよいし、前記ポリヌクレオチドを複数含んでもよい。後者の場合、複数のポリヌクレオチドが連結して、一本鎖のポリヌクレオチドを形成していることが好ましい。前記複数のポリヌクレオチドの配列は、例えば、それぞれが直接的に連結してもよ

いし、リンカーを介して、それぞれが間接的に連結してもよい。前記ポリヌクレオチドの配列は、それぞれの末端において、直接的または間接的に連結していることが好ましい。前記複数のポリヌクレオチドの配列は、例えば、同じでもよいし、異なってもよいが、好ましくは同じである。前記ポリヌクレオチドの配列を複数含む場合、前記配列の数は、特に制限されず、例えば、2以上であり、好ましくは2である。

[0079] 前記リンカーの長さは、特に制限されず、例えば、1～80塩基長であり、好ましくは5～60塩基長であり、より好ましくは5～40塩基長であり、さらに好ましくは5～30塩基長である。

[0080] 本発明のc-Met結合核酸分子は、例えば、一本鎖核酸が好ましい。前記一本鎖核酸は、例えば、自己アニーリングによりステム構造およびループ構造を形成可能であることが好ましい。前記ポリヌクレオチドは、例えば、ステム構造、ループ構造、インターナルループ構造および／またはバルジ構造等を形成可能であることが好ましい。

[0081] 本発明のc-Met結合核酸分子は、例えば、前記二本鎖核酸の場合、例えば、一方の一本鎖が、前記(A1)～(A4)および前記(B1)～(B4)のいずれかの核酸分子であり、他方の一本鎖が、前記(A1)～(A4)および前記(B1)～(B4)のいずれかの核酸分子に相補的な塩基配列からなる核酸分子または前記塩基配列を含む核酸分子であることが好ましい。前記二本鎖核酸の場合、例えば、使用に先立って、変性等により一本鎖に解離させてもよい。また、解離した前記一本鎖核酸は、例えば、前述のように、ステム構造およびループ構造等を形成していることが好ましい。

[0082] 本発明のc-Met結合核酸分子は、例えば、その構成単位は、特に制限されない。前記構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基である。前記ヌクレオチド残基は、例えば、リボヌクレオチド残基およびデオキシリボヌクレオチド残基があげられる。本発明のc-Met結合核酸分子は、例えば、リボヌクレオチド残基のみから構成されるRNA、デオキシリボヌクレオチド残基を含むRNA等があげられる。後者の場合、RNAにおけるデオキシリボ

ヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、「１もしくは数個」であり、具体的には、例えば、１～２０個、好ましくは１～１０個、より好ましくは１～５個、さらに好ましくは１～３個、特に好ましくは１または２個である。

[0083] 本発明の c-Met 結合核酸分子は、例えば、修飾化ヌクレオチド残基を含んでもよい。前記核酸分子における前記修飾化ヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、「１もしくは数個」であり、具体的には、例えば、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、１～５０個、好ましくは１～４０個、より好ましくは１～２０個、さらに好ましくは１～１０個、特に好ましくは１～３個、最も好ましくは１または２個である。

[0084] 前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、修飾化リボヌクレオチド残基および修飾化デオキシリボヌクレオチド残基があげられる。前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、前記ヌクレオチド残基における糖残基が修飾されているものがあげられる。前記糖残基は、例えば、リボース残基またはデオキシリボース残基があげられる。前記ヌクレオチド残基における修飾部位は、特に制限されず、例えば、前記糖残基の 2' 位および／または 4' 位があげられる。前記修飾は、例えば、メチル化、フルオロ化、アミノ化、チオ化等があげられる。前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、塩基としてピリミジン塩基（ピリミジン核）を有するヌクレオチド残基が修飾されたもの、または、塩基としてプリン塩基（プリン核）を有するヌクレオチド残基が修飾されたものがあげられ、好ましくは前者である。以下、ピリミジン塩基を有するヌクレオチド残基をピリミジンヌクレオチド残基といい、修飾されたピリミジンヌクレオチド残基を修飾化ピリミジンヌクレオチド残基といい、プリン塩基を有するヌクレオチド残基をプリンヌクレオチド残基といい、修飾されたプリンヌクレオチド残基を修飾化プリンヌクレオチド残基という。前記ピリミジンヌクレオチド残基は、例えば、ウラシルを有するウラシルヌクレオチド残基、シトシンを有するシトシンヌクレオチド残基、チミンを有するチミンヌクレオチド残基等があげられる。前記修飾化ヌクレオチド残基に

において、塩基がピリミジン塩基の場合、例えば、前記糖残基の2'位の炭素および／または4'位の炭素が修飾されていることが好ましい。前記修飾化ヌクレオチド残基の具体例は、例えば、リボース残基の2'位が修飾された、2'-メチルウラシル（2'-メチル化-ウラシルヌクレオチド残基）、2'-メチルシトシン（2'-メチル化-シトシンヌクレオチド残基）、2'-フルオロウラシル（2'-フルオロ化-ウラシルヌクレオチド残基）、2'-フルオロシトシン（2'-フルオロ化-シトシンヌクレオチド残基）、2'-アミノウラシル（2'-アミノ化-ウラシルヌクレオチド残基）、2'-アミノシトシン（2'-アミノ化-シトシンヌクレオチド残基）、2'-チオウラシル（2'-チオ化-ウラシルヌクレオチド残基）、2'-チオシトシン（2'-チオ化-シトシンヌクレオチド残基）等があげられる。

[0085] 前記ヌクレオチド残基における塩基は、例えば、アデニン（a）、シトシン（c）、グアニン（g）、チミン（t）およびウラシル（u）の天然塩基（非人工核酸）でもよいし、人工塩基（非天然塩基）でもよい。前記人工塩基は、例えば、修飾塩基および改変塩基等があげられ、前記天然塩基（a、c、g、tまたはu）と同様の機能を有することが好ましい。前記同様の機能を有する人工塩基は、例えば、グアニン（g）に代えて、シトシン（c）に結合可能な人工塩基、シトシン（c）に代えて、グアニン（g）に結合可能な人工塩基、アデニン（a）に代えて、チミン（t）またはウラシル（u）に結合可能な人工塩基、チミン（t）に代えて、アデニン（a）に結合可能な人工塩基、ウラシル（u）に代えて、アデニン（a）に結合可能な人工塩基等があげられる。前記修飾塩基は、例えば、メチル化塩基、フルオロ化塩基、アミノ化塩基、チオ化塩基等があげられる。前記修飾塩基の具体例としては、例えば、2'-メチルウラシル、2'-メチルシトシン、2'-フルオロウラシル、2'-フルオロシトシン、2'-アミノウラシル、2'-アミノシトシン、2'-チオウラシル、2'-チオシトシン等があげられる。本発明において、例えば、a、g、c、tおよびuで表わされる塩基は、前記天然塩基の他に、前記天然塩基のそれぞれと同様の機能を有する前記人

工塩基の意味も含む。

[0086] 本発明の c-Met 結合核酸分子は、例えば、前記構成単位として人工核酸モノマー残基を含んでもよい。前記核酸分子における前記人工核酸モノマー残基の個数は、特に制限されず、例えば、「1もしくは数個」であり、具体的には、例えば、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～3個、特に好ましくは1または2個である。前記人工核酸モノマー残基は、例えば、PNA（ペプチド核酸）、LNA（Locked Nucleic Acid）、ENA（2'-O, 4'-C-Ethylenebridged Nucleic Acids）等があげられる。前記モノマー残基における塩基は、例えば、前述と同様である。本発明の c-Met 結合核酸分子は、例えば、PNA、LNAおよびENAの少なくともいずれかのモノマー残基を含むRNAまたはDNAがあげられ、好ましくはRNAである。

[0087] 本発明の c-Met 結合核酸分子は、例えば、ヌクレアーゼ耐性であることが好ましい。前記ヌクレアーゼは、特に制限されず、例えば、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ等があげられ、具体例として、例えば、RNA分解酵素であるリボヌクレアーゼ（RNase）、DNA分解酵素であるデオキシリボヌクレアーゼ（DNase）、RNAおよびDNAの両方に作用するヌクレアーゼ等があげられる。前記ヌクレアーゼ耐性にする手法は、特に制限されない。

[0088] 本発明の c-Met 結合核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性のため、例えば、構成単位として、前記修飾化ヌクレオチド残基を有することが好ましい。前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、前述の通りであり、前記メチル化ヌクレオチド残基、前記フルオロ化ヌクレオチド残基、前記アミノ化ヌクレオチド残基、前記チオ化ヌクレオチド残基等があげられ、中でも前記フルオロ化ヌクレオチド残基が好ましい。前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、前記ピリミジンヌクレオチド残基であり、前記糖残基（リボース残基またはデオキシリボース残基）が修飾されていることが好ましい。前記修飾化ヌク

レオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、前述の通りである。

[0089] 本発明の c-Met 結合核酸分子は、前記ヌクレアーゼ耐性のため、例えば、構成単位として、前記人工核酸モノマー残基を有してもよい。前記人工核酸モノマー残基は、特に制限されず、前述のとおりであって、中でも、LNA 残基が好ましい。前記修飾化ヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、前述の通りである。

[0090] 本発明の c-Met 結合核酸分子は、前述のように、RNA が好ましく、例えば、RNA 分解酵素耐性、すなわち、RNase 耐性であることが好ましい。この場合、本発明の c-Met 結合核酸分子は、RNA 分解酵素耐性のため、例えば、前記デオキシリボヌクレオチド残基を有することが好ましい。具体的には、前記 c-Met 結合核酸分子が RNA の場合、例えば、RNA を構成する全ヌクレオチド残基のうち、ウラシルを有するヌクレオチド残基の全てまたは一部が、チミンを有するヌクレオチド残基に置換されてもよく、具体的には、前記チミンを有するデオキシリボヌクレオチド残基に置換されてもよい。また、前記 c-Met 結合核酸分子が RNA の場合、例えば、RNA を構成する全ヌクレオチド残基または一部のヌクレオチド残基が、デオキシリボヌクレオチド残基でもよい。

[0091] 本発明の c-Met 結合核酸分子は、RNA 分解酵素耐性のため、例えば、5' 末端または 3' 末端に、PEG（ポリエチレングリコール）またはデオキシチミジン等が結合してもよい。前記 PEG は、例えば、数十 kDa であることが好ましい。

[0092] 本発明の c-Met 結合核酸分子は、例えば、使用時において、c-Met への結合性に影響を与えない範囲で、さらに付加配列（リンカーともいう）を有してもよい。前記付加配列は、例えば、前記核酸分子の 5' 末端および 3' 末端の少なくとも一方に結合していることが好ましく、より好ましくは 3' 末端である。前記付加配列は、例えば、ポリ（A）配列、ポリ（T）配列等があげられる。前記付加配列の構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基であり、リボヌクレオチド残基およびデオキシリボヌクレオチド残基があ

げられ、リボヌクレオチド残基が好ましい。本発明の核酸分子を、例えば、担体に固定化する場合、前記付加配列を介して、前記担体に前記核酸分子を固定化することが好ましい。

[0093] 本発明の c-Met 結合核酸分子の c-Met に対する結合活性は、例えば、前記 c-Met 結合核酸分子と c-Met との解離定数で表わすことができる。本発明の c-Met 結合核酸分子の解離定数は、特に制限されず、例えば、 $5 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 以下であり、好ましくは、 $8 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 以下である。前記 c-Met は、例えば、ヒト由来 c-Met である。

[0094] 本発明の c-Met 結合核酸分子は、例えば、単独の c-Met に結合する他、c-Met を含む融合ペプチドに、c-Met を介して結合可能である。前記融合ペプチドは、例えば、N末端側に c-Met を含む融合ペプチド、C末端側に c-Met を含む融合ペプチド、内部に c-Met を含む融合ペプチド等があげられる。前記融合ポリペプチドは、例えば、c-Met と他のペプチドとを含んでもよい。前記他のペプチドは、例えば、タンパク質でもよい。前記融合ペプチドは、例えば、融合タンパク質の意味も含む。

[0095] 本発明の c-Met 結合核酸分子の製造方法は、何ら制限されず、化学合成を利用した核酸合成方法等、公知の方法により合成できる。

[0096] 本発明の c-Met 結合核酸分子は、例えば、核酸増幅により調製することもできる。前記核酸増幅による調製方法は、特に制限されない。本発明の c-Met 結合核酸分子が RNA の場合、例えば、DNA を鋳型として調製できる。以下、前記 RNA の鋳型となる DNA 鎖をアンチセンス鎖、前記 RNA のウラシル (u) をチミン (t) に置換した配列を含む DNA 鎖をセンス鎖ともいう。前記鋳型 DNA は、例えば、前記 RNA における前記 X 領域の相補鎖のウラシル (u) をチミン (t) に置換した DNA (アンチセンス鎖)、および、前記 X 領域のウラシル (u) をチミン (t) に置換した配列を含む DNA (センス鎖) のいずれか一方を含むことが好ましい。これらの DNA を鋳型として、DNA 依存性 DNA ポリメラーゼを用いて核酸増幅を行った後、得られた DNA 増幅産物を鋳型として、さらに、DNA 依存性 R

N Aポリメラーゼを用いてRNAを転写する。これによって、前記RNAを増幅できる。また、前記RNAを鋳型として、RNA依存性DNAポリメラーゼを用いた逆転写反応によりcDNAを調製し、前記cDNAを鋳型としてPCR等によりDNAの核酸増幅を行い、得られたDNA増幅産物を鋳型として、さらに、DNA依存性RNAポリメラーゼを用いてRNAを転写する。これによって、前記RNAを増幅してもよい。

[0097] また、本発明のc-Met結合核酸分子がDNAの場合、例えば、DNAをポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）法等によって、増幅できる。

[0098] 本発明のc-Met結合核酸分子は、c-Metと結合可能であることから、例えば、c-Metとの結合によりc-Metの機能を中和する中和剤として使用できる。

[0099] 本発明のc-Met結合核酸分子は、前述のように、c-Metと結合可能であることから、例えば、c-Metとの結合によりc-Metの機能を阻害する阻害剤として使用できる。

[0100] 本発明のc-Met結合核酸分子は、c-Metと結合可能であることから、例えば、c-Metの発現が原因となる疾患を、予防または治療するための医薬品として使用できる。前記疾患は、例えば、癌、肝障害、筋委縮性側索硬化症、感染性炎症等があげられ、前記肝障害は、例えば、慢性肝炎、脂肪肝、肝硬変等、前記感染性炎症は、例えば、細菌感染症、マラリア感染等があげられる。前記本発明の医薬品は、例えば、抗癌剤、抗肝障害剤、抗筋委縮性側索硬化症剤、抗炎症剤等として使用できる。

[0101] 本発明の中和剤、本発明の阻害剤および本発明の医薬品は、本発明のc-Met結合核酸分子を含んでいればよく、その他の構成は、何ら制限されない。本発明の中和剤、本発明の阻害剤および本発明の医薬品は、それぞれ、本発明のc-Met結合核酸分子の他に、例えば、キャリアー等を含んでもよく、例えば、以下に示す組成物と同様の構成があげられ、同様にして使用できる。

[0102] 本発明の c-Met 結合核酸分子は、例えば、細胞の移動（遊走）および／または浸潤を抑制でき、例えば、HGFで促進される細胞の移動および／または浸潤を抑制できる。本発明の c-Met 結合核酸分子は、例えば、細胞の移動抑制、細胞の遊走抑制剤または細胞の浸潤抑制剤として使用することもできる。また、本発明の c-Met 結合核酸分子は、例えば、細胞の移動等を抑制できることから、癌の転移抑制剤としても使用できる。

[0103] <組成物>

本発明の組成物は、前述のように、前記本発明の c-Met 結合核酸分子を含むことを特徴とする。本発明の組成物は、前記本発明の c-Met 結合核酸分子を含んでいればよく、その他の構成は、何ら制限されない。

[0104] 本発明の組成物は、前述のように、c-Met と結合可能であることから、例えば、c-Met との結合により c-Met の機能を中和する中和剤として使用できる。

[0105] 本発明の組成物は、前述のように、c-Met と結合可能であることから、例えば、c-Met との結合により c-Met の機能を阻害する阻害剤として使用できる。

[0106] 本発明の組成物は、前述のように、c-Met と結合可能であることから、例えば、c-Met が原因となる疾患を予防または治療するための医薬品として使用できる。前記本発明の医薬品は、例えば、抗癌剤等として使用できる。

[0107] 本発明の組成物の適用対象は、特に制限されず、その用途に応じて適宜決定できる。前記適用対象は、例えば、細胞、組織および生体等があげられる。前記細胞および組織の由来、ならびに生体の種類は、特に制限されない。前記生体は、例えば、c-Met 遺伝子および／または c-Met オートログ遺伝子を有する生物があげられ、具体例としては、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類、鳥類、魚類等の動物があげられる。生体に投与する場合、投与方法は、特に制限されず、例えば、経口投与および非経口投与があげられる。前記非経口投与は、例えば、静脈投与、動脈投与、リンパ管への投

与、筋肉投与、皮下投与、直腸投与、経皮投与、腹腔内投与、局所投与等があげられる。

[0108] 本発明の組成物は、前記本発明の c-Me t 結合核酸分子の他に、例えば、各種添加剤を含んでもよい。前記添加剤は、特に制限されず、例えば、本発明の組成物の用途に応じて、適宜決定できる。前記添加剤は、例えば、薬学上許容される添加剤が好ましい。

[0109] 本発明の組成物は、例えば、前記 c-Me t 結合核酸分子を、細胞、組織または生体内等にデリバリーする場合、さらに、前記添加剤として、キャリアを含むことが好ましい。前記キャリアは、特に制限されず、例えば、ナノ粒子、リポソーム、ミセル、逆ミセル、ポリカチオン、細胞膜透過性ペプチド、磁気粒子、リン酸カルシウム等があげられる。前記ナノ粒子は、特に制限されず、例えば、カーボンナノホーンおよびカーボンナノチューブ等のナノカーボンがあげられる。これらのキャリアは、いずれか一種類を使用してもよいし、二種類以上を併用してもよい。また、前記添加剤は、例えば、緩衝剤、金属塩、界面活性剤等があげられる。

[0110] <検出試薬・キット>

本発明の検出試薬は、前記本発明の c-Me t 結合核酸分子を含むことを特徴とする、前記 c-Me t を検出するための c-Me t 検出試薬である。本発明は、前記本発明の c-Me t 結合核酸分子を含んでいればよく、その他の構成は何ら制限されない。

[0111] 本発明の c-Me t 結合核酸分子は、前述のように、c-Me t に結合可能である。このため、例えば、本発明の検出試薬を用いて、本発明の c-Me t 結合核酸分子と c-Me t との結合の有無を確認することにより、試料中における c-Me t を、検出可能となる。前記検出は、例えば、定性または定量のいずれも可能である。前記 c-Me t 結合核酸分子と c-Me t との結合の有無の確認方法は、特に制限されず、核酸とタンパク質との結合を検出する公知の方法を利用できる。このように本発明の検出試薬を用いれば、c-Me t を容易に検出できることから、例えば、生化学や臨床の分野に

有用である。

[0112] 本発明のキットは、前記本発明の c-Me t 結合核酸分子を含むことを特徴とする。本発明のキットによれば、例えば、前述のように、c-Me t を検出できる。

[0113] 本発明のキットは、例えば、必要に応じて、各種添加剤、使用説明書等を含んでもよい。

[0114] <治療方法>

本発明の治療方法は、前記 c-Me t が関与する疾患の対象に、本発明の c-Me t 結合核酸分子を投与する工程を含むことを特徴とする。前記 c-Me t が関与する疾患は、特に制限されず、例えば、癌、肝障害、筋委縮性側索硬化症、感染性炎症からなる群から選択された少なくとも一つの疾患があげられる。前記癌は、例えば、肝臓、腎臓、脾臓、肺、膀胱、前立腺、精嚢、卵巣、乳房、乳腺、胃および結腸等の消化管等の癌があげられる。前記肝障害は、例えば、慢性肝炎、脂肪肝、肝硬変等があげられ、前記感染性炎症は、例えば、細菌感染症、マラリア感染等があげられる。本発明の治療方法によれば、例えば、前記疾患の予防、前記疾患の進行の抑制または前記疾患の治療等が可能である。本発明の治療方法は、例えば、予防方法の意味も含み、前記疾患の危険性がある対象に、本発明の c-Me t 結合核酸分子を投与する工程を含んでもよい。本発明の c-Me t 結合核酸分子の投与方法、投与条件等は、特に制限されず、前述の通りである。また、前記投与対象（例えば、患者）も、特に制限されない。前記生体は、例えば、c-Me t 遺伝子および／または c-Me t オーソログ遺伝子を有する生物があげられ、具体例としては、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト動物があげられ、前記非ヒト動物は、例えば、ヒトを除く非ヒト哺乳類、鳥類、魚類等があげられる。前記投与工程において、例えば、本発明の組成物を投与してもよい。

[0115] 本発明は、前記 c-Me t が関与する疾患の治療に使用するための核酸分子であることを特徴とする。前記核酸分子は、前記本発明の c-Me t 結合核酸分子である。前記本発明の c-Me t 結合核酸分子は、前述の通りであ

る。また、本発明は、前記 c-Met が関与する疾患の治療に使用するための組成物であることを特徴とする。前記組成物は、前記本発明の c-Met 結合核酸分子を含む前記本発明の組成物である。前記本発明の組成物は、前述の通りである。

[0116] 本発明の細胞移動の抑制方法は、細胞に、本発明の c-Met 結合核酸分子を投与する工程を含む。特に示さない限り、例えば、前述の記載を援用できる。前記投与は、例えば、in vivoおよびin vitroのいずれで行ってもよい。前記細胞の種類は、何ら制限されず、例えば、前述した癌の細胞、その培養細胞、患者からの単離細胞等があげられる。また、本発明の細胞移動の抑制方法は、例えば、細胞遊走の抑制方法、細胞浸潤の抑制方法ということもできる。また、本発明の c-Met 結合核酸分子は、例えば、細胞の移動等を抑制できることから、本発明の細胞移動の抑制方法は、例えば、癌の転移抑制方法ともいえる。

実施例

[0117] つぎに、本発明の実施例について説明する。本発明は、下記実施例により制限されない。市販の試薬は、特に示さない限り、それらのプロトコールに基づいて使用した。

[0118] [実施例 1]

c-Met 結合核酸分子として、c-Met に結合可能な RNA アプタマーを作製し、各 RNA アプタマーについて、c-Met に対する結合能を確認した。

[0119] (1) RNA アプタマー

下記表 2 における、配列番号 39～48 のいずれかで表わされる塩基配列からなる RNA アプタマーを、公知の核酸合成方法により作製し、実施例 1 の RNA アプタマーとして使用した。比較例 1 の RNA として、40 塩基長のランダム配列を有する下記配列番号 90 で表わされるオリゴヌクレオチドからなる RNA を複数含む RNA ライブラリー (40N) を使用した (以下、同様)。配列番号 90 において、「n」は、アデニン、グアニン、シトシ

s-タグが、この順序で連結している。

[0122] (3) 改良ELISA法

抗IgG抗体（製品名Human IgG-Fc Antibody: Bethyl Laboratories社製）を96穴プレート（Iwaki、AGCテクノガラス社、日本）に吸着させ、1%のウシ血清アルブミンでブロッキングを行った。次いで、前記プレートに、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の前記rec-cMetを $50\mu\text{L}$ 添加し、さらに、かっこ内に示す終濃度となるように、Tris ($20\text{mmol}/\text{L}$)、塩化ナトリウム ($100\text{mmol}/\text{L}$)、酢酸マグネシウム ($0.1\text{mmol}/\text{L}$) およびTriton（登録商標）-X100 (0.2%)を加えた。前記プレートを、室温で3時間インキュベートし、前記プレートに前記rec-cMetを結合させた。インキュベート後、前記プレートを洗浄液で3回洗浄した。前記洗浄液の組成は、 $20\text{mmol}/\text{L}$ Tris、 $100\text{mmol}/\text{L}$ 塩化ナトリウム、 $0.1\text{mmol}/\text{L}$ 酢酸マグネシウムおよび 0.2% Triton（登録商標）-X100とした。コントロールは、 $50\mu\text{L}$ の前記rec-cMetに代えて、 $50\mu\text{L}$ の前記洗浄液を添加し、同様に、インキュベートならびに洗浄を行った。

[0123] 次いで、前記RNAアプタマーの3'末端に20塩基のポリアデニン（ポリA）を付加して、ポリA付加RNAアプタマーを調製した。前記ポリA付加RNAアプタマーを変性した後、5'末端をビオチン化した20塩基のビオチン化ポリチミン ($740\text{nmol}/\text{L}$)、tRNA ($100\mu\text{g}/\text{mL}$) およびRNaseインヒビター ($0.16\text{units}/\text{mL}$)と混合した。これにより、前記ポリA付加RNAアプタマーのポリAと、前記ビオチン化ポリチミンのポリチミン（ポリT）との相補的な結合により、ビオチン標識RNAアプタマーを作製した。前記ビオチン標識RNAアプタマーを、前記プレートに添加し、 4°C で30分間インキュベートした。続いて、前記プレートを洗浄し、 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ のHRP-ストレプトアビジン（Thermo Fisher Scientific Inc., 社、USA）を添加し

た。さらに、前記プレートを洗浄した後、1-Step Ultra™ B基質(Thermo Fisher Scientific Inc., 社、USA)を加えて発色させ、450nmの吸光度を測定した。

[0124] これらの結果を、図3に示す。図3は、RNAアプタマーg1～g9について、前記rec-cMetに対する結合能を示すグラフである。図3において、縦軸は、前記rec-cMetへの結合能を示す450nmの吸光度であり、3回の測定に基づく平均値±偏差(SD)を示す。図3において、各バーは、左から順に、N40、RNAアプタマーg1～g9の結果である。

[0125] 図3に示すように、前記RNAアプタマーg1～g9は、いずれも、前記N40よりも高い吸光度を示した。この結果から、前記RNAアプタマーg1～g9は、前記rec-cMetに結合することがわかる。中でも、前記RNAアプタマーg1、g5、g6、g7およびg8は、高い結合能を示し、特に前記RNAアプタマーg7は、極めて優れた結合能を示した。

[0126] [実施例2]

前記実施例1の各RNAアプタマーについて、前記rec-cMetへの結合が、前記rec-cMetにおけるc-Metの領域に対する特異的な結合であることを確認した。

[0127] ターゲットタンパク質として、N末端側から、NGFRタンパク質のペプチド配列(配列番号96)、7アミノ酸残基からなるペプチド配列(DIEGRMD:配列番号97)、ヒトIgGのペプチド配列(配列番号94)およびHis-タグ(配列番号95)が連結した組換えタンパク質(6His)を使用した。前記組換えタンパク質は、市販品である、製品名Recombinant Human NGF R/TNFRSF16/Fc Chimera(CF:R&D Systems社)を使用した(以下、rec-NGFRという)。前記rec-NGFRにおいて、NGFRタンパク質のペプチド配列は、NGFRタンパク質(NCBIアクセッション番号P08138)の29番目Lysから250番目Asnのペプチド配列(配列番号9

6) であり、7 アミノ酸残基からなるペプチド配列は、A s p - I l e - G l u - G l y - A r g - M e t - A s p の7 アミノ酸残基からなるペプチド配列（配列番号97）であり、ヒト I g G のペプチド配列は、ヒト I g G における100番目 P r o から330番目 L y s のペプチド配列（配列番号94）であり、H i s - タグは、H i s - タグは、6個のH i s が連結したペプチド配列である。

[0128] 前記 r e c - N G F R を前記プレートに結合させた以外は、前記実施例1と同様にして、前記 r e c - N G F R に対する前記RNAアプタマーの結合能を確認した。また、比較例として、前記N40を使用し、同様にして結合能を確認した。

[0129] これらの結果を、図4に示す。図4は、RNAアプタマーg1～g9の前記 r e c - N G F R に対する結合能を示すグラフである。図4において、縦軸は、前記 r e c - N G F R への結合能を示す450nmの吸光度であり、3回の測定に基づく平均値±偏差（SD）を示す。図4において、各バーは、左から順に、N40、RNAアプタマーg1～g9の結果である。

[0130] 図4に示すように、前記RNAアプタマーg1～g9は、いずれも、前記N40よりも低い吸光度であり、前記 r e c - N G F R に結合していないことがわかった。この結果から、前記実施例1において、前記各RNAアプタマーは、前記 r e c - c M e t におけるc-Met領域に特異的に結合していることが確認された。

[0131] また、前記RNAアプタマーg1～g9を含むアプタマープールについて、図5に、前記 r e c - c M e t に対する結合能および前記 r e c - N G F R に対する結合能を合わせて示す。図5は、前記アプタマープールの前記 r e c - c M e t に対する結合能および前記 r e c - N G F R に対する結合能を示すグラフである。図5において、縦軸は、前記各組換えタンパク質への結合能を示す450nmの吸光度であり、3回の測定に基づく平均値±偏差（SD）を示す。図5において、各バーは、左から順に、N40の前記 r e c - c M e t に対する結合能、前記アプタマープールの前記 r e c - c M e

t に対する結合能、前記アプタマー pool の前記 *rec-NGFR* に対する結合能の結果である。

[0132] 図5に示すように、前記RNAアプタマー pool は、前記 *rec-cMet* に対して、前記N40よりも高い吸光度を示し、前記 *rec-NGFR* に対して、極めて低い吸光度を示した。この結果から、前記RNAアプタマー pool は、NGFRではなく、*c-Met* に対して特異的に結合することが確認された。

[0133] [実施例3]

前記RNAアプタマー g1（配列番号39）を小型化したアプタマーを作製し、*c-Met* に対する結合能を確認した。

[0134] (1) RNAアプタマー

図1に、前記RNAアプタマー g1 の推定二次構造の概略図を示す。前記小型化RNAアプタマーは、前記RNAアプタマー g1 の配列において、5'側の4塩基目～8塩基目（5塩基長）を欠失する g1-u5del、前記4塩基目から13塩基目（10塩基長）を欠失する g1-u10del、3'末端の1塩基目から5塩基目（5塩基長）を欠失する g1-d5del、3'末端の1塩基目から10塩基目（10塩基長）を欠失する g1-d10del を作製した。これらの小型化アプタマーの配列を下記表3に示す。

[0135] [表3]

Aptamer	配列			SEQ No.
g1	GGGACGCUCACGUACGCUAA	ACACACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	39
g1-u5del	GGG CACGUACGCUAA	ACACACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUGCCUGGACGUGCAG	81
g1-u10del	GGG ACGCUAA	ACACACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUGCCUGGACGUGC	82
g1-d5del	GGGACGCUCACGUACGCUAA	ACACACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUGCCUGGACGU	84
g1-d10del	GGGACGCUCACGUACGCUAA	ACACACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUGCCUG	85

[0136] 前記小型化RNAアプタマーを使用した以外は、前記実施例1と同様にし、前記 *rec-cMet* に対する前記RNAアプタマーの結合能を確認した。また、前記RNAアプタマー g1 についても、同様に結合能を確認した。比較例として、前記N40を使用し、同様にして結合能を確認した。

[0137] これらの結果を、図6に示す。図6は、前記小型化アプタマー g1-u10del、g1-u5del、g1-d5del、g1-d10del の前

記 *rec-cMet* に対する結合能を示すグラフである。図6において、縦軸は、前記 *rec-cMet* への結合能を示す450nmの吸光度であり、3回の測定に基づく平均値±偏差（SD）を示す。図6において、各バーは、左から順に、N40、RNAアプタマーg1、小型化RNAアプタマーg1-u10del、g1-u5del、g1-d10del、g1-d5delの結果である。

[0138] 図6に示すように、前記小型化RNAアプタマーg1-u10del、g1-u5del、g1-d10del、g1-d5delは、それぞれ、RNAアプタマーg1よりも高い吸光度を示した。この結果から、前記RNAアプタマーg1を小型化することにより、より*cMet*に対する結合能が向上することがわかった。

[0139] [実施例4]

前記RNAアプタマーg1（配列番号39）を、小型化したアプタマーを作製し、*cMet*に対する結合能を確認した。

[0140] (1) RNAアプタマー

図1に、前記RNAアプタマーg1の推定二次構造の概略図を示す。前記小型化RNAアプタマーは、前記RNAアプタマーg1の配列において、5'側の4塩基目から23塩基目（20塩基長）を欠失するg1-u20delおよび5'側の4塩基目から23塩基目（20塩基長）および3'側の1塩基目から14塩基目（14塩基長）を欠失するg1-trAを作製した。これらの小型化アプタマーの配列を下記表4に示す。

[0141] [表4]

Aptamer	配列			SEQ No.
g1	GGGACGCUCACGUACGCUAA	ACACACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	39
g1-u20del	GGG	CACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUGCCUGGACGUG	83
g1-trA	GGG	CACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUG	86

[0142] 前記小型化RNAアプタマーを使用した以外は、前記実施例1と同様にし、前記 *rec-cMet* に対する前記RNAアプタマーの結合能を確認した。また、前記RNAアプタマーg1についても、同様に結合能を確認した。比較例として、前記N40を使用し、同様にして結合能を確認した。

[0143] これらの結果を、図7に示す。図7は、前記小型化アプタマーg1-trAおよびg1-u20delの前記rec-cMetに対する結合能を示すグラフである。図7において、縦軸は、前記rec-cMetへの結合能を示す450nmの吸光度であり、3回の測定に基づく平均値±偏差(SD)を示す。図7において、各バーは、左から順に、N40、RNAアプタマーg1、小型化RNAアプタマーg1-trA、g1-u20delの結果である。

[0144] 図7に示すように、前記小型化RNAg1-trAおよびg1-u20delは、それぞれ、RNAアプタマーg1よりも高い吸光度を示した。この結果から、前記RNAアプタマーg1を小型化することにより、よりc-Metに対する結合能が向上することがわかった。

[0145] [実施例5]

RNAアプタマーg1-trA（配列番号86）をさらに小型化したRNAアプタマーを作製し、各RNAアプタマーについて、c-Metに対する結合能を確認した。

[0146] (1) RNAアプタマー

図8に、前記RNAアプタマーg1-trAの推定二次構造の概略図を示す。前記小型化RNAアプタマーは、前記RNAアプタマーg1-trAの配列において、5'側の4塩基目および3'末端の1塩基目を欠失するg1-miniA、5'側の4塩基目から5塩基目（2塩基長）および3'側の1塩基目から2塩基目（2塩基長）を欠失するg1-miniB、5'側の4塩基目から6塩基目（3塩基長）および3'側の1塩基目から3塩基目（3塩基長）を欠失するg1-miniCを作製した。図8に示すように、前記RNAアプタマーg1-trAから、前記RNAアプタマーg1-miniAは、ステム領域の1塩基対を欠失させ、前記RNAアプタマーg1-miniBは、ステム領域の2塩基対を欠失させ、前記RNAアプタマーg1-miniCは、ステム領域の3塩基対を欠失させた。これらの塩基配列を下記表5に示す。

[0147] [表5]

Aptamer	配列			SEQ No.
g1-trA	GGG	CACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGUG	86
g1-miniA	GGG	ACUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAGU	87
g1-miniB	GGG	CUGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCAG	88
g1-miniC	GGG	UGAGAGUUUGACCAGCUAUUAAAUGGGUCGUGAC	UCA	89

[0148] これらの小型化RNAアプタマーを使用し、前記 *rec-cMet* に対する前記RNAアプタマーの結合能を確認した。前記結合能の解析には、B I A C O R E（登録商標）X（GEヘルスケア社製）を、その使用説明書にしたがって使用し、前記 *rec-cMet* 濃度は、 175 nmol/L とした。また、前記RNAアプタマーg1およびg1-trAについても、同様に結合能を確認した。比較例として、前記N40を使用し、同様にして結合能を確認した。

[0149] これらの結果を、図9に示す。図9は、前記小型化アプタマーの前記 *rec-cMet* に対する結合能を示すグラフである。図9において、縦軸は、前記B I A C O R E（登録商標）Xで測定したシグナル強度（RU）を示し、横軸は、解析時間（秒）を示す。

[0150] 図9に示すように、前記小型化RNAは、それぞれ、前記 *rec-cMet* に対する結合能を示した。中でも、g1-miniAは、優れた結合能を示した。前記g1-trA、g1-miniAおよびg1-miniBの解離定数（KD）は、それぞれ、 $8.18 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 、 $7.98 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 、 $2.64 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ であり、結合能に優れることがわかった。

[0151] [実施例6]

以下に示すRNAアプタマーを作製し、各RNAアプタマーについて、*c-cMet* に対する結合能を確認した。

[0152] (1) RNAアプタマー

g1（#6：配列番号39）、g28（#56：配列番号66）、g6（#18：配列番号44）、g21（#25：配列番号59）、g34（#73：配列番号72）、g37（#71：配列番号75）、g5（#20：配列

番号43)、g7(#32:配列番号45)、g25(#51:配列番号63)

g2(#28:配列番号40)、g33(#64:配列番号71)、g27(#43:配列番号65)、g20(#35:配列番号58)、g11(#21:配列番号49)、g35(#63:配列番号73)、g23(#44:配列番号61)、g15(#39:配列番号53)、g14(#23:配列番号52)、g17(#26:配列番号55)、g13(#14:配列番号51)

g4(#16:配列番号42)、g31(#95:配列番号69)、g29(#49:配列番号67)、g19(#27:配列番号57)、g9(#8:配列番号47)、g10(#1:配列番号48)、g8(#33:配列番号46)、g32(#88:配列番号70)、g30(#70:配列番号68)

g3(#47:配列番号41)、g16(#24:配列番号54)、g26(#65:配列番号64)、g36(#87:配列番号74)、g38(#50:配列番号76)、g18(#17:配列番号56)、g22(#30:配列番号60)、g12(#36:配列番号50)、g24(#89:配列番号62)

[0153] 前記RNAアプタマーを使用した以外は、前記実施例5と同様にして、前記rec-cMetに対する前記RNAアプタマーの結合能を確認した。前記rec-cMet濃度は、100nmol/Lとし、チップへの前記rec-cMetの導入開始を0秒とし、60秒後からバッファーを導入した。前記比較例は、前記rec-cMetに特異的な結合を示さないRNAをネガティブコントロールとして使用し、同様にして結合能を確認した。

[0154] これらの結果を、図11に示す。図11は、前記RNAアプタマーの前記rec-cMetに対する結合能を示すグラフである。図11において、縦軸は、前記BIACORE(登録商標)Xで測定したシグナル強度(RU)を示す。前記シグナル値は、前記バッファーを導入した60秒の値である。

図 1 1 に示すように、いずれの RNA アプタマーも結合力を示した。なお、いずれの RNA アプタマーも、60 秒以後においても、同等のシグナル値を維持しており、結合能の減少が見られないことは確認済みである。

[0155] [実施例 7]

以下に示す修飾化 RNA アプタマーを作製し、各 RNA アプタマーについて、c-Met に対する結合能を確認した。

[0156] (1) 修飾化 RNA アプタマー

前記 2'-フルオロ-CTP および前記 2'-フルオロ-UTP を用いて、前記実施例 6 に示す RNA アプタマーと同じ塩基配列からなるフルオロ化 RNA アプタマーを合成した。前記フルオロ化 RNA アプタマーは、前記塩基配列において、シトシンヌクレオチド残基およびウラシルヌクレオチド残基がフルオロ化されている。

[0157] 前記フルオロ化 RNA アプタマーを使用した以外は、前記実施例 5 と同様にして、前記 rec-cMet に対する前記 RNA アプタマーの結合能を確認した。前記 rec-cMet 濃度は、60 nmol/L とし、チップへの前記 rec-cMet の導入開始を 0 秒とし、60 秒後からバッファーを導入した。前記比較例は、前記実施例 6 と同じネガティブコントロールを使用した。

[0158] これらの結果を、図 1 2 に示す。図 1 2 は、前記 RNA アプタマーの前記 rec-cMet に対する結合能を示すグラフである。図 1 2 において、縦軸は、前記 BIACORE (登録商標) X で測定したシグナル強度 (RU) を示す。前記シグナル値は、前記バッファーを導入した 60 秒の値である。図 1 2 に示すように、いずれの RNA アプタマーも結合力を示した。中でも、フルオロ化した g29 (#49)、g38 (#50) および g25 (#51)、特に g38 (#50) が優れた結合能を示した。フルオロ化によって、RNase 耐性が付与され、且つ、c-Met への結合力も維持していることから、これらのフルオロ化 RNA アプタマーは、特に、in vivo および in vitro での使用に適していることがわかる。なお、いずれ

のRNAアプタマーも、60秒以後においても、同等のシグナル値を維持しており、結合能の減少が見られないことは確認済みである。

[0159] [実施例8]

修飾化RNAアプタマーが細胞移動に与える影響を確認した。

[0160] (1) 修飾化RNAアプタマー

前記2'-フルオロ-C T Pおよび前記2'-フルオロ-U T Pを用いて、前記実施例7と同様に、g 3 8 (# 5 0)の塩基配列からなるフルオロ化RNAアプタマーを合成した。前記フルオロ化RNAアプタマーは、前記塩基配列において、シトシンヌクレオチド残基およびウラシルヌクレオチド残基がフルオロ化されている。

[0161] (2) 細胞移動の確認

市販のセルカルチャーインサート（商品名セルカルチャーインサート、B D F a l c o n社製）を使用して、その使用説明書にしたがって、ヒトのグリオーマ細胞由来T 9 8 G株の細胞移動を確認した。具体的には、まず、T 9 8 G株を、貧栄養条件である0.1% B S A含有無血清培地を用いて、37℃で48時間培養した。そして、インサートの下部に、培地を入れ、培養後のT 9 8 G株を、前記インサートのメンブラン（ポアサイズ8 μ m）上に捲き、37℃で16時間培養した。培養後、前記メンブレンを通過して前記メンブレンの裏側に移動した細胞数をカウントした。前記培地は、50 n g / m L H G Fおよび1 μ g / m L 修飾化RNAアプタマーを含む0.1% B S A含有無血清培地（H G F + 修飾化g 3 8）を使用した。また、比較例として、前記H G Fのみを含む培地（H G F）、前記H G Fおよび1 μ g / m L コントロールRNAを含む培地（H G F + c o n t r o l）を使用し、コントロールとして、前記H G Fおよび修飾化RNAアプタマー未添加の培地（-）を使用した。前記コントロールRNAは、前記実施例6と同じネガティブコントロールRNAを使用した。

[0162] これらの結果を、図13に示す。図13は、前記修飾化RNA存在下における、T 9 8 G株の移動を示すグラフであり、縦軸は、前記メンブレンを通

過して裏側に移動した細胞数の割合を示す。前記割合は、HGFおよび修飾化RNAアプタマー未添加の培地（－）において移動した細胞数を1として算出した。

[0163] 図13に示すように、HGF未添加の培地（－）では、細胞移動はほとんどみられなかったが、HGF添加培地（HGF）では、細胞移動が促進された。これに対して、前記修飾化RNAアプタマー添加した培地（HGF＋修飾化g38）では、細胞の移動が抑制された。なお、ネガティブコントロールRNAを添加した場合（HGF＋control）では、細胞移動の抑制は起こらなかった。このように、in vivoと同様の状態である前記セルカルチャーインサートにおいて、前記修飾化RNAアプタマーの添加により、細胞の移動が抑制されたことから、本発明のRNAアプタマーによれば、in vivoにおいても同様に、細胞の移動および浸潤を抑制できるといえる。

[0164] 以上、実施形態を参照して本願発明を説明したが、本願発明は、上記実施形態に限定されるものではない。本願発明の構成や詳細には、本願発明のスコープ内で当業者が理解しうる様々な変更をすることができる。

[0165] この出願は、2010年7月26日に提出された日本出願特願2010-167342を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

産業上の利用可能性

[0166] 本発明のc-Met結合核酸分子は、c-Metに結合可能である。このため、本発明のc-Met結合核酸分子によれば、例えば、c-Metと結合してその機能を阻害することより、c-Metが原因となる前述のような疾患の予防および治療が可能となる。また、本発明のc-Met結合核酸分子によれば、例えば、c-Metとの結合の有無を確認することで、c-Metを検出でき、疾患の早期診断が可能となる。また、例えば、本発明のc-Met結合核酸分子を培養細胞内で発現させることで、遺伝子転写の阻害実験が可能となる、本発明のc-Met結合核酸分子を使用して、細胞外の

c-Met とその受容体との結合阻害実験が可能となる等、本発明の c-Met 結合核酸分子は、c-Met の機能解明にも使用できる。このため、本発明の c-Met 結合核酸分子は、新たな研究用ツールとしても有用である。

請求の範囲

[請求項1] 下記（A 1）～（A 4）および（B 1）～（B 4）のいずれかのポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、c-Met に結合可能なc-Met 結合核酸分子。

（A 1）配列番号 1～38 のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド

（A 2）配列番号 1～38 のいずれかで表わされる塩基配列において、1 または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

（A 3）配列番号 1～38 のいずれかで表わされる塩基配列に対して、60%以上の同一性を有する塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

（A 4）配列番号 1～38 のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに相補的な塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

（B 1）配列番号 39～76 のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド

（B 2）配列番号 39～76 のいずれかで表わされる塩基配列において、1 または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

（B 3）配列番号 39～76 のいずれかで表わされる塩基配列に対して、60%以上の同一性を有する塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

（B 4）配列番号 39～76 のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに相補的な塩基配列からなり、c-Met に結合可能であるポリヌクレオチド

- [請求項2] 前記（B 2）のポリヌクレオチドが、配列番号 39～76 のいずれかで表わされる塩基配列において、3' 末端の 3 塩基を欠失した塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項 1 記載の c-Met 結合核酸分子。
- [請求項3] 前記（B 2）のポリヌクレオチドが、配列番号 81～89 のいずれかで表わされる塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項 1 または 2 記載の c-Met 結合核酸分子。
- [請求項4] 前記（B 2）のポリヌクレオチドが、配列番号 81～89 のいずれかで表わされる塩基配列において、3' 末端の 3 塩基を欠失した塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の c-Met 結合核酸分子。
- [請求項5] 前記核酸分子が、修飾化ヌクレオチド残基を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の c-Met 結合核酸分子。
- [請求項6] 前記修飾化ヌクレオチド残基が、メチル化ヌクレオチド残基、フルオロ化ヌクレオチド残基、アミノ化ヌクレオチド残基およびチオ化ヌクレオチド残基からなる群から選択された少なくとも一つである、請求項 5 記載の c-Met 結合核酸分子。
- [請求項7] 前記修飾化ヌクレオチド残基が、シトシンを有するヌクレオチド残基およびウラシルを有するヌクレオチド残基の少なくとも一方である、請求項 5 または 6 記載の c-Met 結合核酸分子。
- [請求項8] 前記修飾化ヌクレオチド残基が、リボース残基が修飾されたヌクレオチド残基である、請求項 5 から 7 のいずれか一項に記載の c-Met 結合核酸分子。
- [請求項9] 前記核酸分子の全塩基数が、40～100 塩基である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の c-Met 結合核酸分子。
- [請求項10] 前記核酸分子が、ステムループ構造を形成可能である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の c-Met 結合核酸分子。
- [請求項11] 請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の c-Met 結合核酸分子を

含み、c-Met タンパク質と前記 c-Met 結合核酸分子との結合により、c-Met タンパク質の機能を中和することを特徴とする中和剤。

[請求項12] 請求項1から10のいずれか一項に記載のc-Met 結合核酸分子を含み、c-Met タンパク質と前記 c-Met 結合核酸分子との結合により、c-Met タンパク質の機能を阻害することを特徴とする阻害剤。

[請求項13] 請求項1から10のいずれか一項に記載のc-Met 結合核酸分子を含むことを特徴とする医薬品。

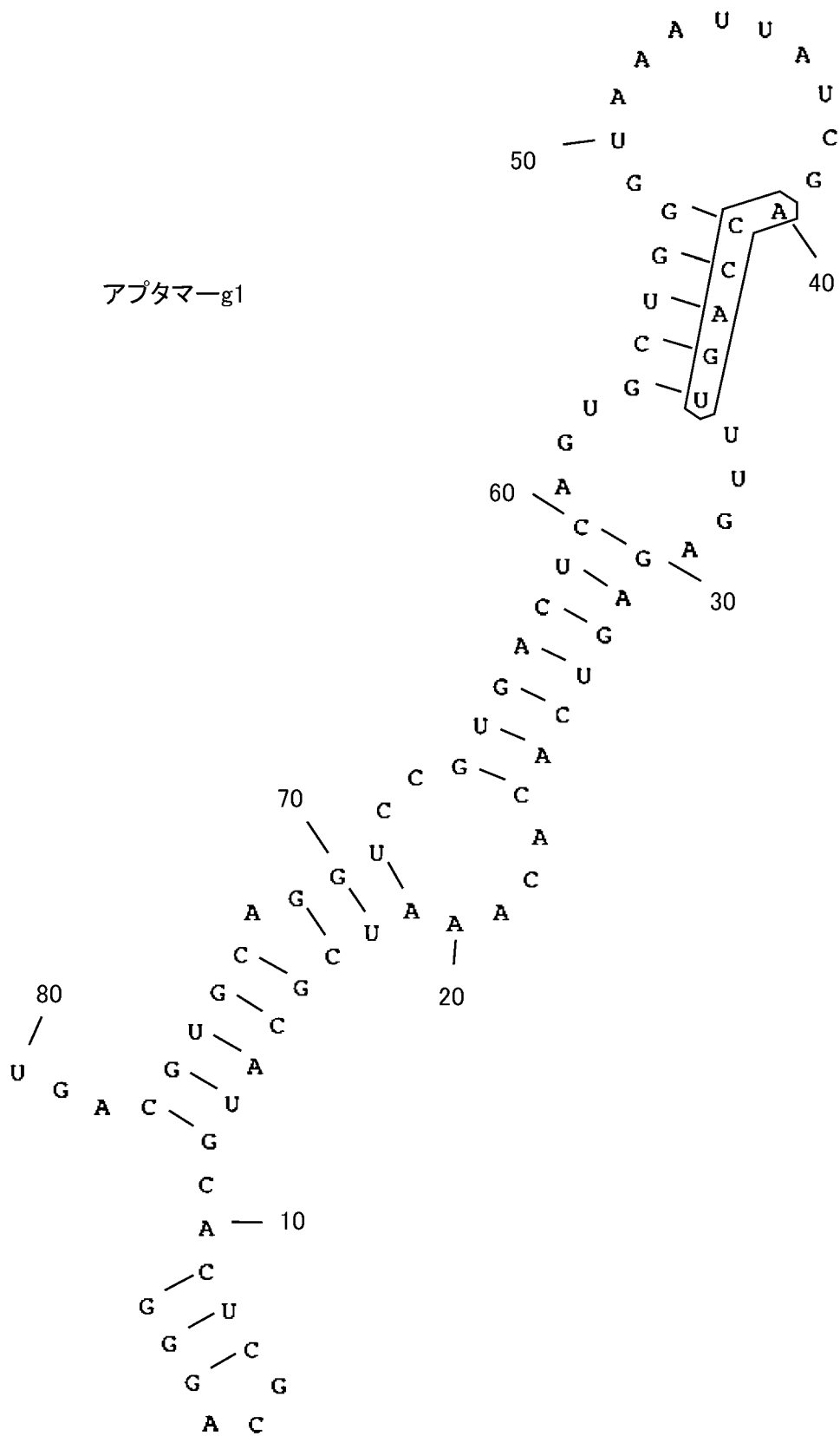
[請求項14] 前記医薬品が、抗癌剤、抗炎症剤、抗肝障害剤および抗筋委縮性側索硬化症剤からなる群から選択された少なくとも一つである、請求項13記載の医薬品。

[請求項15] 請求項1から14のいずれか一項に記載のc-Met 結合核酸分子を含むことを特徴とする組成物。

[請求項16] さらに、キャリアーを含む、請求項15記載の組成物。

[請求項17] 請求項1から10のいずれか一項に記載のc-Met 結合核酸分子を含むことを特徴とする、前記 c-Met タンパク質を検出するための c-Met 検出試薬。

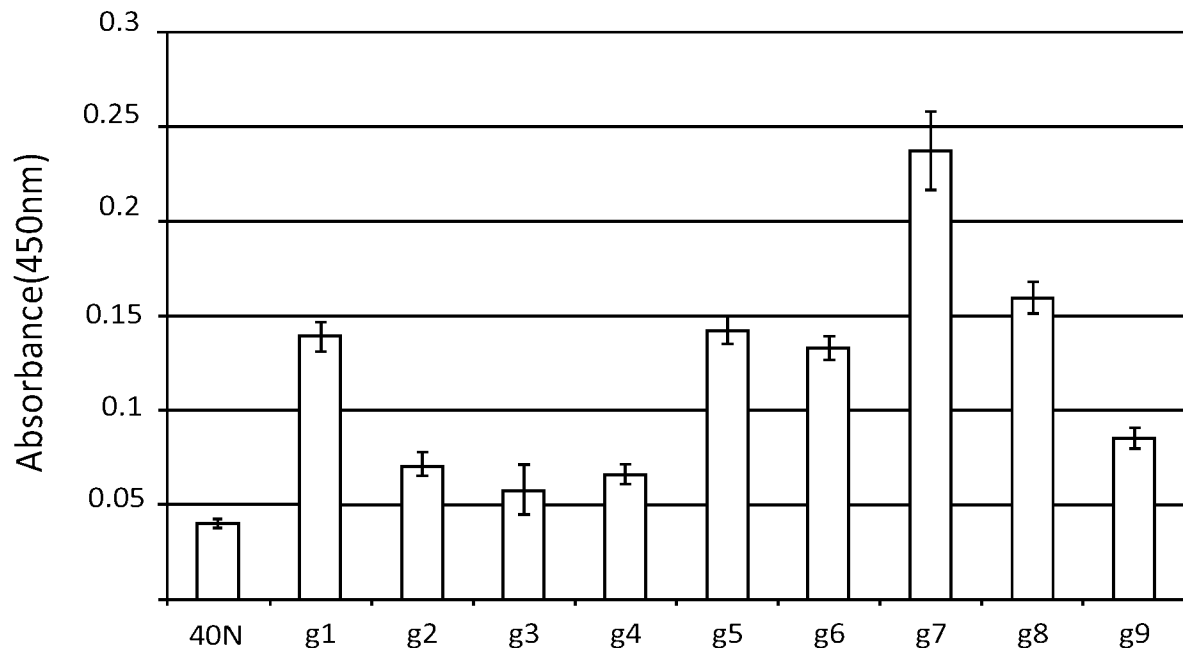
アプタマー-g1



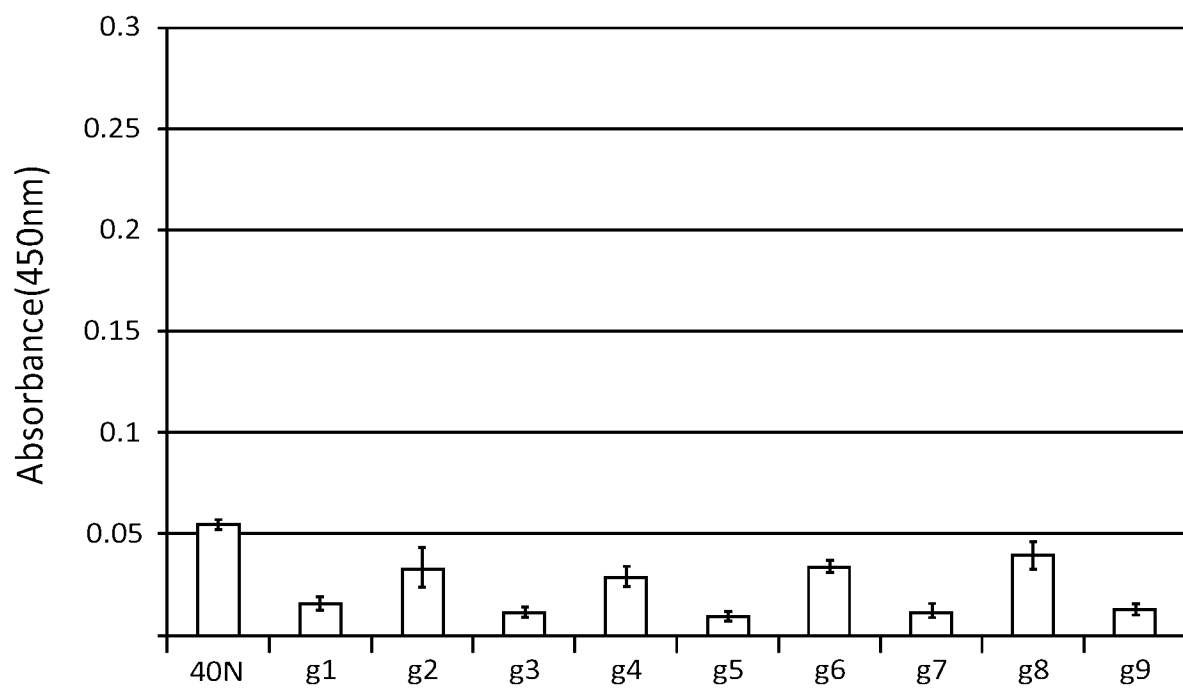
[図2]

cMet α Glu25-Arg307			
cMet β Ser308-Thr932	HIEGRMD	IgG Pro100-Lys330	6 His tag

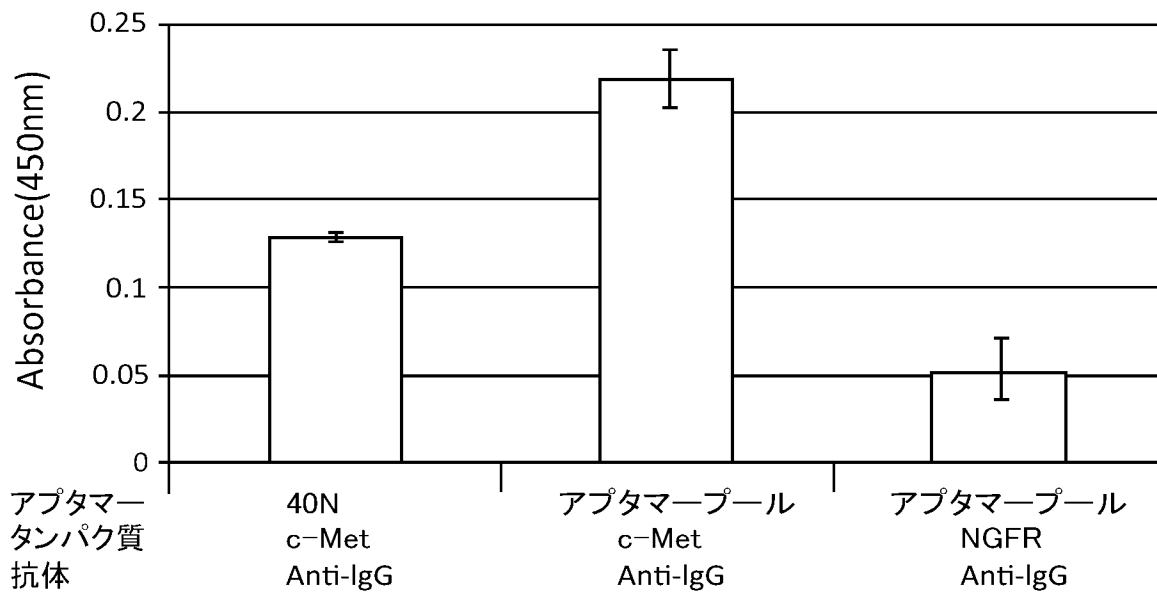
[図3]



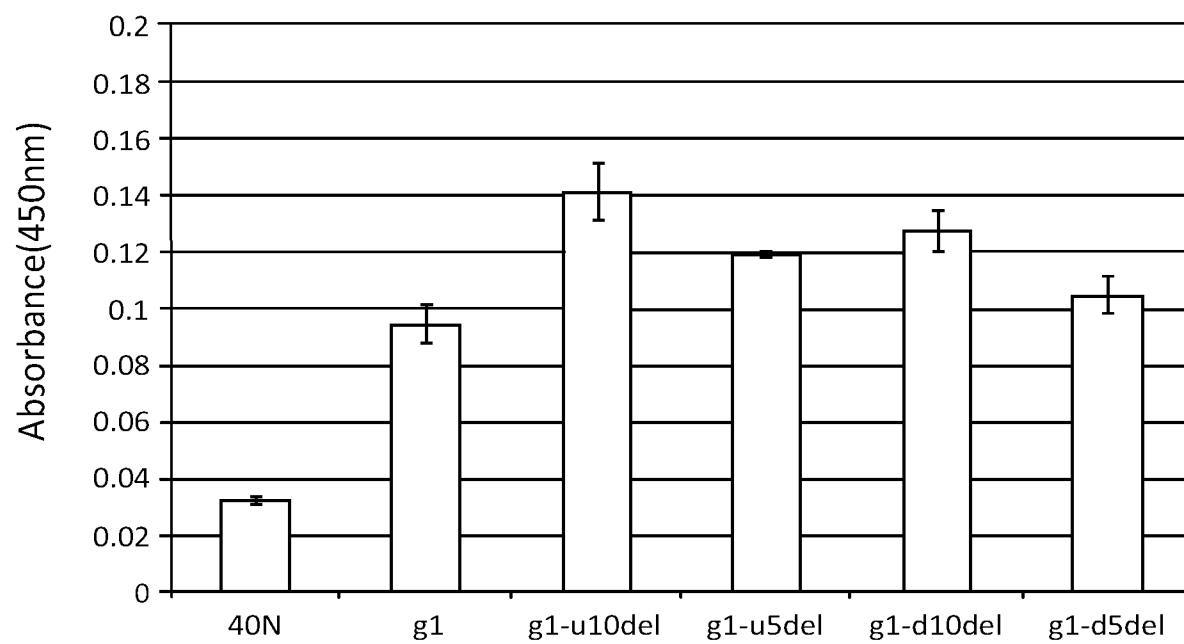
[図4]



[図5]



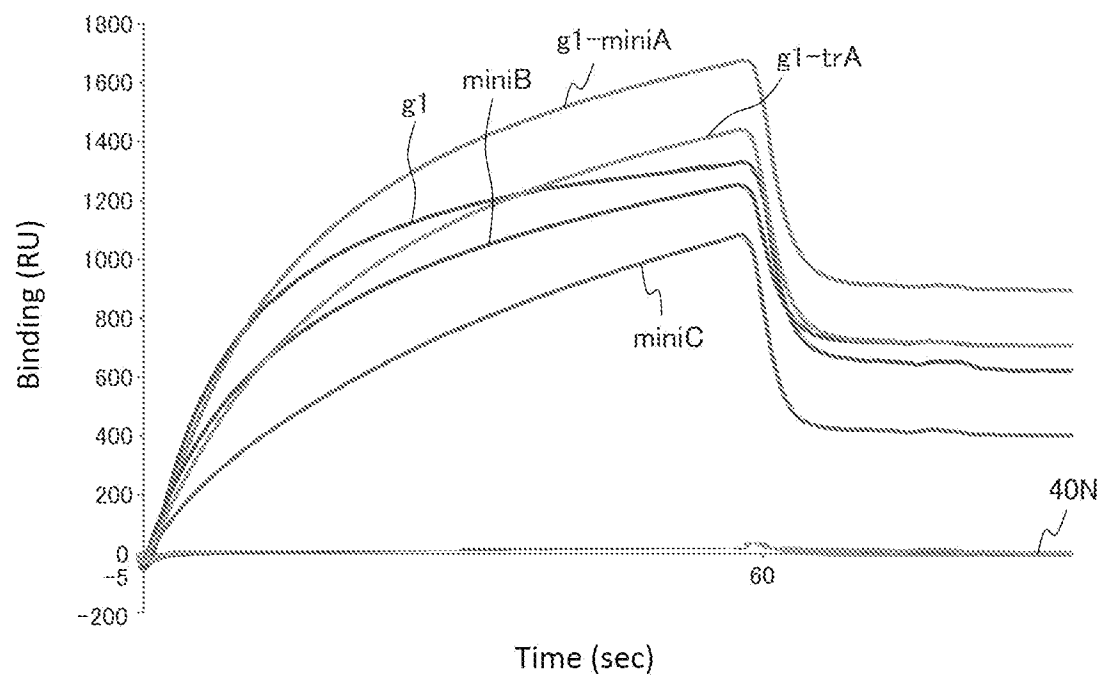
[図6]



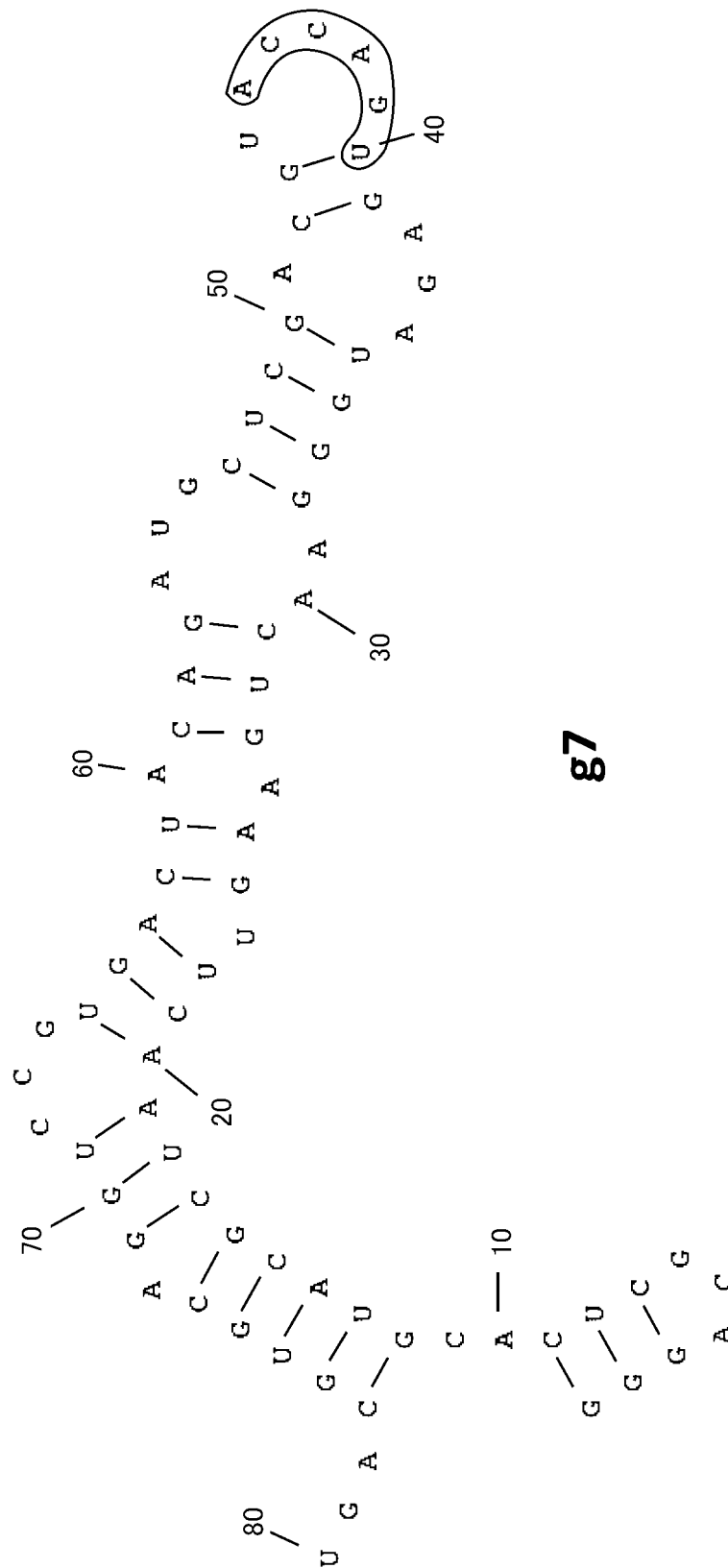
Condition	Absorbance(450nm)
40N	~0.13
g1	~0.67
g1-trA	~0.72
g1-u20del	~0.75

[illegible]

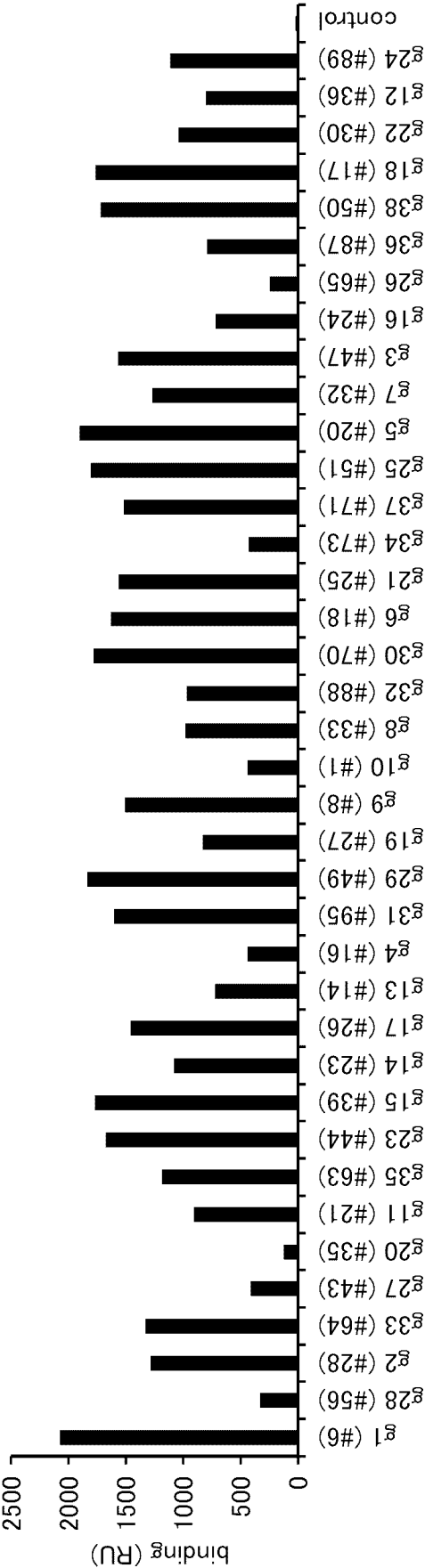
[図9]



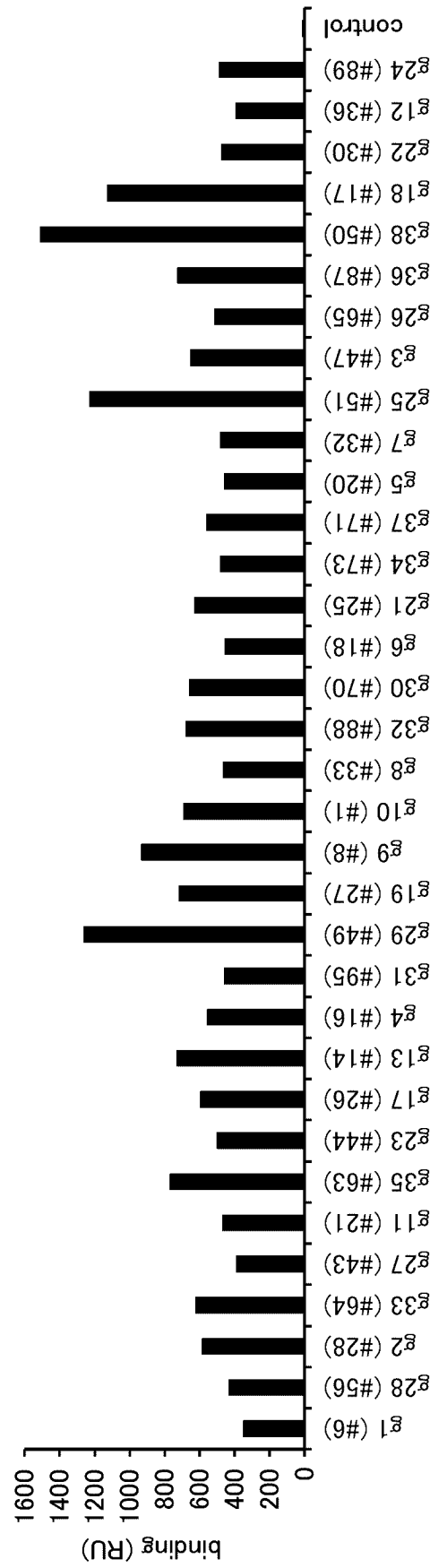
[図10]



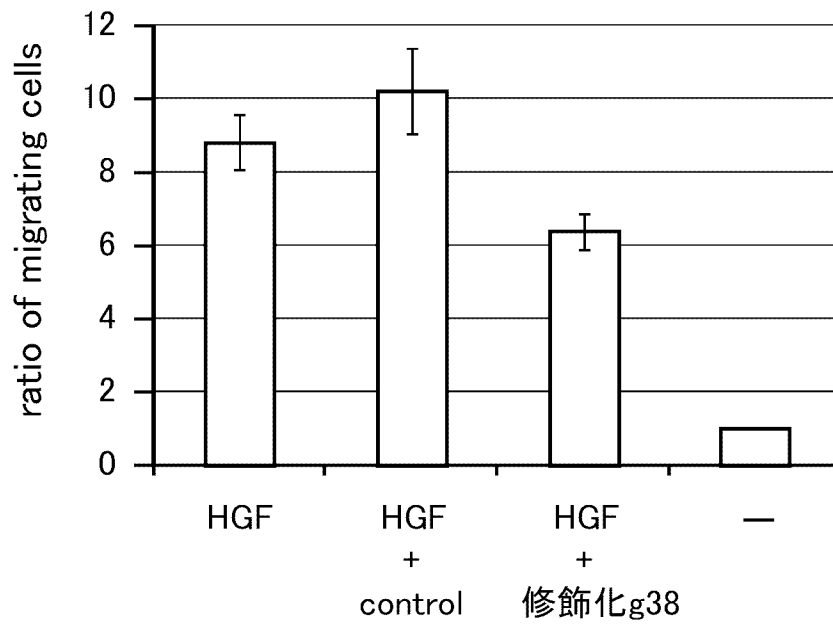
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/066962

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/115(2010.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i,
A61P1/16(2006.01)i, A61P21/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00
(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/115, A61K31/7088, A61K48/00, A61P1/16, A61P21/02, A61P29/00,
A61P35/00, A61P43/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII),
GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-506024 A (Gilead Sciences, Inc.), 18 February 2003 (18.02.2003), claims 20 to 37; paragraphs [0051], [0079], [0080]; example 3 & AU 6234900 A & AU 783347 B & EP 1203007 A & US 2006/0148748 A1 & US 2007/0010473 A1 & US 2009/0075922 A1 & US 6344321 B1 & WO 2001/009159 A1	1-17
Y	TSUJI, Shoutaro et al., Effective isolation of RNA aptamer through suppression of PCR bias., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009, Vol. 386, p. 223-226, entire text	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 August, 2011 (24.08.11)

Date of mailing of the international search report
06 September, 2011 (06.09.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/066962

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Naomi HIRABAYASHI, Takashi OTSU, "c-Met Ketsugo RNA Aptamer no Shutoku", Dai 12 Kai The RNA Society of Japan Nen kai (12th RNA Meeting in Tokyo) Yoshishu, 27 July 2010 (27.07.2010), page 236	1-17
P,X	Naomi HIRABAYASHI et al., "Analysis of c-Met binding aptamer", Dai 83 Kai Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and Dai 33 Kai Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Godo Taikai, received date 10 December 2010 (10.12.2010), Shoroku CD, 2P-1258	1-17
A	TSUJI, Shoutaro et al., RNA aptamer binding to polyhistidine-tag., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009, Vol. 386, p. 227-231	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/115(2010.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P21/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/115, A61K31/7088, A61K48/00, A61P1/16, A61P21/02, A61P29/00, A61P35/00, A61P43/00, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2003-506024 A (ギリード・サイエンシズ・インコーポレーテッド) 2003.02.18, 請求項 20-37, 段落 【0051】 【0079】 【0080】, 実施例 3 & AU 6234900 A & AU 783347 B & EP 1203007 A & US 2006/0148748 A1 & US 2007/0010473 A1 & US 2009/0075922 A1 & US 6344321 B1 & WO 2001/009159 A1	1 - 1 7
Y	TSUJI, Shoutaro et al., Effective isolation of RNA aptamer through suppression of PCR bias., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009, Vol. 386, p. 223-226, 全文	1 - 1 7

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 4 . 0 8 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

0 6 . 0 9 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小倉 梢

4 B

4 5 0 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	平林直己、大津敬, c-Me t 結合RNAアプタマーの取得, 第12回日本RNA学会年会 (12th RNA Meeting in Tokyo) 要旨集, 2010.07.27, p. 236	1-17
P, X	平林直己他, がん治療への応用を目指したc-Me t 結合RNAアプタマーの解析, 第83回日本生化学会大会 第33回日本分子生物学会年会 合同大会, 2010.12.10 (受入日), 抄録CD, 2P-1258	1-17
A	TSUJI, Shoutaro et al., RNA aptamer binding to polyhistidine-tag., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009, Vol. 386, p. 227-231	1-17