

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6587934号  
(P6587934)

(45) 発行日 令和1年10月9日 (2019. 10. 9)

(24) 登録日 令和1年9月20日 (2019. 9. 20)

(51) Int. Cl.

F I

**C 1 2 N** 15/115 (2010. 01)  
**A 6 1 K** 31/7088 (2006. 01)  
**A 6 1 P** 27/02 (2006. 01)  
**A 6 1 K** 48/00 (2006. 01)

C 1 2 N 15/115 Z N A Z  
A 6 1 K 31/7088  
A 6 1 P 27/02  
A 6 1 K 48/00

請求項の数 6 (全 153 頁)

(21) 出願番号 特願2015-503617 (P2015-503617)  
(86) (22) 出願日 平成25年3月28日 (2013. 3. 28)  
(65) 公表番号 特表2015-517806 (P2015-517806A)  
(43) 公表日 平成27年6月25日 (2015. 6. 25)  
(86) 国際出願番号 PCT/US2013/034493  
(87) 国際公開番号 W02013/149086  
(87) 国際公開日 平成25年10月3日 (2013. 10. 3)  
審査請求日 平成28年1月7日 (2016. 1. 7)  
(31) 優先権主張番号 61/616, 881  
(32) 優先日 平成24年3月28日 (2012. 3. 28)  
(33) 優先権主張国・地域又は機関  
米国 (US)  
(31) 優先権主張番号 61/648, 394  
(32) 優先日 平成24年5月17日 (2012. 5. 17)  
(33) 優先権主張国・地域又は機関  
米国 (US)

(73) 特許権者 510016254  
ソマロジック・インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国コロラド州80301, ボ  
ールダー, ウィルダネス・プレイス 29  
45  
(74) 代理人 100140109  
弁理士 小野 新次郎  
(74) 代理人 100118902  
弁理士 山本 修  
(74) 代理人 100106208  
弁理士 宮前 徹  
(74) 代理人 100120112  
弁理士 中西 基晴  
(74) 代理人 100135415  
弁理士 中濱 明子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PDGFおよびVEGF結合アプタマー、および、PDGFおよびVEGFが介在する病気の治  
療へのそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 4 1 4、4 2 1 ~ 4 2 3、4 2 6、4 2 7、4 2 9、4 3 3、4 6 2、4 6 9、  
4 7 4、4 7 5、4 8 6 ~ 4 9 1、4 9 8、4 9 9、5 1 7 ~ 5 2 4、5 3 8、5 4 4 お  
よび 5 4 5 からなる群から選択される配列を含む、PDGF に結合可能なアプタマー。

【請求項 2】

前記アプタマーは PDGF が介在する PDGF 受容体のリン酸化を阻害する、請求項 1 に  
記載のアプタマー。

【請求項 3】

PDGF に結合可能な第一のアプタマーと PDGF に結合可能な第二のアプタマーを含む  
アプタマー構築物であって、前記第一のアプタマーと第二のアプタマーは独立して配列番  
号 4 1 4、4 2 1 ~ 4 2 3、4 2 6、4 2 7、4 2 9、4 3 3、4 6 2、4 6 9、4 7 4  
、4 7 5、4 8 6 ~ 4 9 1、4 9 8、4 9 9、5 1 7 ~ 5 2 4、5 3 8、5 4 4 および 5  
4 5 からなる群から選ばれ、前記第一のアプタマーと第二のアプタマーは同じであるかま  
たは異なる、前記アプタマー構築物。

【請求項 4】

前記第一のアプタマーと第二のアプタマーは共有結合されている、請求項 3 に記載のア  
プタマー構築物。

【請求項 5】

黄斑変性症を治療するおよび / または予防するために使用される、治療有効量の請求項 1

10

20

～ 4 のいずれか一項に記載のアプタマーを含む、医薬。

【請求項 6】

眼疾患を治療するために使用される、治療有効量の請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のアプタマーを含む、医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は概して核酸に関し、特に血小板由来成長因子 (PDGF) に結合する能力のあるアプタマーおよび血管内皮成長因子 (VEGF) に結合する能力のあるアプタマーに関する。いくつかの態様において、このようなアプタマーはアテローム性動脈硬化、線維症、黄斑変性症、ガン、および他の PDGF および / または VEGF が関与する疾患を含むがこれらに限定されない増殖性の疾患の予防、治療および / または回復の薬物療法として有用である。いくつかの態様において、本開示は同時にまたは相互排他的に VEGF および PDGF に結合することができるアプタマー構築物に関し、これらは薬物療法として有用である。

10

【背景技術】

【0002】

下記明細書は情報の概要を提供し、本開示で提供される情報または言及された刊行物が先行技術である事を認めるものではない。

【0003】

20

血小板由来成長因子 (PDGF - A、- B、- C および - D) は広く存在する有糸分裂促進因子であり多くの結合組織細胞の走化性因子である (非特許文献 1)。PDGF はジスルフィド結合した二量体で存在し、細胞表面の PDGF 受容体 および に結合する機能を持つ、システインで結ばれた成長因子領域を含む (非特許文献 2)。PDGF の結合は受容体の二量化を誘導し、細胞内チロシン残基での自己リン酸化を引き起こす (非特許文献 3)。PDGF - BB はアテローム性動脈硬化、線維症、黄斑変性症、およびガンを含むいくつかの増殖性疾患に関与している (非特許文献 4 - 11)。

【0004】

VEGF は分泌されたジスルフィド結合されたホモ二量体であり内皮細胞を選択的に刺激して増殖、移動させマトリックス分解酵素を生産させる。これらは全て新しい血管を作るために要求されるプロセスである (非特許文献 12 - 16)。知られている唯一の内皮細胞特異的有糸分裂促進因子である事に加え、VEGF は血管新生成因子の中でも高分子に対する血管の透過性の一過性増加を引き起こす能力において独特である (非特許文献 17 - 19)。増加した血管の透過性と結果としての血漿タンパク質の血管外スペースでの堆積は、内皮細胞の移動のための暫定的なマトリックスを供給することにより新しい血管の形成を促進する。透過性亢進は実際新しい血管特有の特徴である (非特許文献 20)。さらに、組織低酸素により引き起こされる代償性血管新生もまた VEGF により仲介される (非特許文献 21 - 22)。低酸素誘導タンパク質としての VEGF の同定は、低酸素は VEGF 発現の抑制を引き起こすという補完的な観察とともに、酸素要求と血管供給を整合する魅力的なメカニズムを提供する (非特許文献 23 - 24)。

30

40

【0005】

VEGF タンパク質のいくつかのアイソフォームは VEGF をコードする遺伝子の 8 つのエキソンの選択的スプライシングの結果として発生する (非特許文献 25)。最も広く存在するアイソフォームは VEGF - 121、VEGF - 165 および VEGF - 189 である。VEGF のタンパク質分解の工程で追加のアイソフォームが産生され得る。VEGF - 165 はプラスミンにより Arg - 110 と Ala - 111 の間で切断され得て VEGF - 110 を産生する、この VEGF - 110 は VEGF - 121 と機能的に同等である (非特許文献 26)。VEGF - 189 はウロキナーゼによりエキソン 6 領域内で切断され得、そして更にプラスミンにより切断され得て VEGF - 110 を産生する (非特許文献 27)。さらに、MMP - 3、- 7、- 9 および - 19 を含むマトリックスメタロ

50

プロテアーゼ (MMP) のサブセットは VEGF - 165 および VEGF - 189 を逐次段階的に切断して、VEGF - 110 と機能的に同等である VEGF - 113 を生じる能力がある。よって、与えられた組織内のマトリックスに結合した VEGF とジスルフィド型の VEGF の相対的な存在比は、組織の細胞内で起こる選択的スプライシングおよびタンパク質分解の組み合わせにより決定される (非特許文献 28)。

#### 【0006】

加齢に関連する黄斑変性症 (AMD) は依然として 55 歳を超える人々の失明の主な原因である。この病気はドルーゼと呼ばれる不溶性物質が黄斑に堆積することが特徴である。黄斑は網膜の一部であり、光受容体が最も高い密度で存在して中心視野に關与している。AMD の最初の段階では堆積物に血管がなく病気は一般的に進行が遅い。しかしながら、患者の 10% はいわゆる “乾燥” 型の AMD が血管形成されて “湿った” 型の AMD になり、病気がより進行性になってより速い速度で視力が低下する。多くの事例で、中心視野のぼやけから実質的な失明までの進行は 2 年よりも短い期間で起こる。この病気、滲出性または湿った型の AMD の進行した段階では、新生血管が脈絡毛細管から網膜の中央部分 (黄斑) に中央視野を塞ぎながら貫入する。アメリカ合衆国では滲出型 AMD の患者数は約 180 万人であり 2020 年までに 300 万人近くにまで増加すると予想されている。アメリカ合衆国における滲出型 AMD の発生率は毎年約 210000 人である。

#### 【0007】

最近 AMD は、VEGF に結合する拮抗薬を目に直接注入することで、VEGF の内皮細胞が細胞表面受容体と相互作用するのを阻止して VEGF が介在する血管新生と血管の漏出の誘導を遮断することで治療されてきている。

#### 【0008】

新しい血管の退縮に加えて、VEGF と PDGF - B の信号の二重阻害は血管新生のより効果的な遮断につながる証拠がある。例えば、臨床的証拠は VEGF と PDGF - B の二重阻害が AMD 患者における眼血管新生のより完全な阻害を達成できる事を示唆する。最初にネクスターファーマスティカルズ (NeXstar Pharmaceuticals) で発見された (非特許文献 29、特許文献 1 - 4) PDGF - B のアプタマー阻害剤 (E10030) は、AMD の治療薬としてオプトテックコーポレーション (Ophtotech Corporation) により開発されている。E10030 (Fovista (登録商標)) は、およそ 100 pM の  $K_d$  で PDGF - AB または PDGF - BB に結合し PDGF - B の機能を *in vitro* と *in vivo* の両方で阻害する、DNA に基づく修飾されたアプタマーである。

#### 【0009】

第 1 相試験において、Lucentis (登録商標) 抗 VEGF 療法との組み合わせで試験された E10030 による抗 PDGF 療法で、12 週間の治療後患者の 59% は 3 行列視力 (vision gain of three lines) が向上した。これは視力が改善した患者の割合として、Lucentis だけで過去に観察された 34 - 40% と比較し相当に高い。さらに、この組み合わせの療法は全ての被験者で顕著な新生血管の退縮を伴った。組み合わせ療法の改善された有効性は、最近滲出型 AMD を持つ患者 449 人の第 2 相試験で裏付けられた。Fovista (1.5 mg) と Lucentis の組み合わせの投与を受けている患者は 24 週間で平均 10.6 文字視力が向上し、Lucentis 単独の療法を受けた患者の 6.5 文字と比較して ( $p = 0.019$ ) 62% の更なる視力の改善を示した。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0010】

【特許文献 1】米国特許第 6207816 号

【特許文献 2】米国特許第 5731144 号

【特許文献 3】米国特許第 5731424 号

【特許文献 4】米国特許第 6124449 号

#### 【非特許文献】

#### 【0011】

10

20

30

40

50

【非特許文献 1】Fredriksson, L., et al. (2004) Cytokine Growth Factor Rev. 15(4):197

【非特許文献 2】Claesson-Welsh, L., et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 86:4917

【非特許文献 3】Claesson-Welsh, J. (1994) Biol. Chem. 269:32023

【非特許文献 4】Ostman, A., et al. (2001) Adv. Cancer Res. 80:1

【非特許文献 5】Appelmann, I., et al. (2010) Recent Results Cancer Res. 180:51

【非特許文献 6】Trojanowska, M., et al. (2008) Rheumatology (Oxford) 47(Suppl 5):2

【非特許文献 7】Rutherford et al. (1997) Atherosclerosis 130:45

10

【非特許文献 8】Smits et al. (1992) Am. J. Pathol. 140:639

【非特許文献 9】Heldin et al. (1991) Endocrinology 129:2187

【非特許文献 10】Floege and Johnson (1995) Miner. Electrolyte Metab. 21:271

【非特許文献 11】Raines et al. (1990) Experimental Pharmacology, Peptide Growth Factors and Their Receptors, Sporn & Roberts, pp. 173-262, Springer, Heidelberg

【非特許文献 12】Conn, G., et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1323

【非特許文献 13】Ferrara, N. et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 161:851

【非特許文献 14】Gospodarowicz, D., et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7311

20

【非特許文献 15】Pepper, M.S., et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181:902

【非特許文献 16】Unemori, E.N., et al. (1992) J. Cell. Physiol. 153:557

【非特許文献 17】Dvorak, H.F., et al. (1979) J. Immunol. 122:166

【非特許文献 18】Senger, D.R., et al. (1983) Science 219:983

【非特許文献 19】Senger, D.R., et al. (1986) Cancer Res. 46:5629

【非特許文献 20】Dvorak, H.F., et al. (1995) Am. J. Pathol. 146:1029

【非特許文献 21】Levy, A.P., et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:2746

【非特許文献 22】Shweiki, D., et al. (1991) Nature 359:843

30

【非特許文献 23】Benjamin, L.E., et al. (1999) J. Clin. Invest. 103:159

【非特許文献 24】Alon, T., et al. (1995) Nat. Med. 1:1024

【非特許文献 25】Eming, S.A., et al. (2006) J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.11:79

【非特許文献 26】Keyt, B.A., et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:7788

【非特許文献 27】Plouet, J., et al., (1997) J. Biol. Chem. 272:13390

【非特許文献 28】Ferrara, N., et al. (2006) Retina 26:859

【非特許文献 29】Green, L.S., et al. (1996) Biochemistry 35:14413

【発明の概要】

【0012】

40

本開示は血小板由来成長因子 B (PDGF-B、PDGF-BB および PDGF-AB を含む) に結合するアプタマー、血管内皮成長因子 (VEGF、VEGF-121 および VEGF-165 を含む) に結合するアプタマー、および、PDGF-B に結合するアプタマーおよび VEGF に結合するアプタマーを含むアプタマー構築物を提供する。開示されるアプタマーとアプタマー構築物は、アテローム性動脈硬化、黄斑変性症、線維症、糖尿病性網膜症およびがんを含むがこれらに限定されない PDGF および / または VEGF が関与する増殖性の病気または疾患の予防、治療および / または回復の薬物療法として有用である。いくつかの態様において、アプタマー構築物は VEGF および PDGF-B のそれぞれに独立して、および / または VEGF と PDGF-B に同時に結合することができる。PDGF アプタマー、VEGF アプタマー、または VEGF / PDGF-B アプタ

50

マー構築物、または前述のいずれかの薬剤的に許容できる塩、および少なくとも一つの薬剤的に許容できる担体を含む医薬組成物または製剤がこれらに含まれる。このような組成物は、薬剤的に許容できる適切な剤形で調製できる。

#### 【0013】

他の側面において、本開示はPDGFおよび/またはVEGFが介在する病気または疾患の予防、治療および/または回復させる方法を提供する。いくつかの態様において、方法はPDGFアプタマー、VEGFアプタマー、および/またはVEGF/PDGF-Bアプタマー構築物、または前述のいずれかを含む医薬組成物をほ乳類のような対象に投与することを含む。いくつかの態様において、対象はヒトである。特に、線維症、アテローム性動脈硬化、黄斑変性症、糖尿病性網膜症および/またはガンの治療、予防および/または回復の方法が提供される。いくつかの態様において、PDGFおよび/またはVEGFが介在する病気または疾患は、その中においてPDGFおよび/またはVEGF活性が直接的にまたは間接的に病気または疾患に寄与する。これらの病気または疾患は線維症、アテローム性動脈硬化、黄斑変性症、糖尿病性網膜症およびガンを含むがこれらに限定されない。いくつかの態様において、治療、予防および/または回復される病気または疾患は加齢に関連する黄斑変性症(AMD)、糖尿病性網膜症、または緑内障、慢性ドライアイ、エイズに関連した視力喪失、弱視、半盲、網膜静脈閉塞症、トラコーマ、円錐角膜、脈絡網膜炎、中心性漿液性網膜症、ぶどう膜炎、網膜炎、高血圧性網膜症、網膜ジストロフィーなどの他の眼疾患である。いくつかの態様において、治療、予防および/または回復される病気または疾患は腎線維症または腎臓がんである。

10

20

#### 【0014】

いくつかの態様において、本明細書で開示されるアプタマーおよびアプタマー構築物はバイオマーカーの発見および診断(Ostroff, R.M., et al. (2010) PLoS One 5:e15003; Mehan, M., et al. (2012) PLoS One 7:e35157)から組織化学およびイメージング(Gupta, S., et al. (2011) Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 19:273)にわたる潜在用途を持っている。

#### 【0015】

いくつかの態様において、治療効果(例えば線維症、アテローム性動脈硬化、黄斑変性症またはガンなどの治療、予防および/または回復)はPDGFアプタマー、VEGFアプタマーおよび/またはPDGF/VEGFアプタマー構築物を投与することにより達成され得る。これらのアプタマーまたはアプタマー構築物はPDGFおよび/またはVEGFに曝露され、結合できるようなアプタマーまたはアプタマー構築物である。いくつかの態様において、このような結合は治療の対象へのアプタマーの送達の方法にかかわらず起こる。いくつかの態様において、治療効果は、PDGFおよび/またはVEGFに曝露され結合し、PDGFおよび/またはVEGFの一つまたはそれより多い細胞受容体への結合を予防または減少させるPDGFアプタマー、VEGFアプタマー、またはPDGF/VEGFアプタマー構築物を投与することにより達成され得る。

30

#### 【0016】

いくつかの態様において、PDGFアプタマーのPDGF-BBまたはPDGF-ABへの結合は、PDGF-BBまたはPDGF-ABのPDGF-受容体への結合を阻害する。いくつかの態様において、PDGFアプタマーのPDGF-BBまたはPDGF-ABへの結合はPDGF-BBまたはPDGF-ABのPDGF-受容体への結合を阻害する。いくつかの態様において、PDGF-BBまたはPDGF-ABに対するPDGFアプタマーは(PDGF-受容体またはPDGF-受容体のような)PDGF受容体のリン酸化を減少させる。

40

#### 【0017】

いくつかの態様において、VEGFアプタマーの、VEGF-121、VEGF-110、VEGF-165、VEGF-189、または、他の選択的にスプライシングされたまたは機能的に活性なVEGFのタンパク質分解フラグメントへの結合は成長因子のVEGFR-1(Flt-1)への結合を阻害する。いくつかの態様において、VEGFアプ

50

タマーの、VEGF-121、VEGF-110、VEGF-165、VEGF-189、または、他の選択的にスプライシングされたまたは機能的に活性なVEGFのタンパク質分解フラグメントへの結合は成長因子のVEGFR-2(KDR)への結合を阻害する。いくつかの態様において、VEGFアプタマーは(VEGF-1受容体および/またはVEGF-1受容体のような)VEGF受容体のリン酸化を減少させる。

【0018】

いくつかの態様において、PDGF/VEGFアプタマー構築物は(PDGF-受容体および/またはPDGF-受容体のような)PDGF受容体のリン酸化のレベルを減少させ、(VEGFR-1および/またはVEGFR-1のような)VEGF受容体のリン酸化のレベルを減少させる。いくつかの態様において、PDGFアプタマー、VEGFアプタマー、またはPDGF/VEGFアプタマー構築物は、PDGF受容体および/またはVEGF受容体のシグナル伝達経路に沿った信号を減少させる。

10

【0019】

いくつかの態様において、PDGFアプタマー、VEGFアプタマー、またはPDGF/VEGFアプタマー構築物は1または2以上の付加的な活性物質と共に投与される。このような投与は逐次的でも組み合わせでも良い。

【0020】

いくつかの態様において、*in vitro*の診断法はPDGFアプタマーをPDGFを含むと疑われる試料に接触させることを含む。いくつかの態様において、*in vitro*の診断法は、適切に標識されたPDGFアプタマーをPDGFが介在する病気または疾患を持つと疑われる個体に投与することを含む。標識されたPDGFアプタマーは個体の健康状態の診断または評価の目的のために検出される。使用される標識は、用いられる画像診断法に従って選択される。

20

【0021】

いくつかの態様において、*in vitro*の診断法は、VEGFアプタマーをVEGFを含むと疑われる試料に接触させることを含む。いくつかの態様において、*in vitro*の診断法は、適切に標識されたVEGFアプタマーをVEGFが介在する病気または疾患を持つと疑われる個体に投与することを含む。標識されたVEGFアプタマーは個体の健康状態の診断または評価の目的のために検出される。使用される標識は、用いられる画像診断法に従って選択される。

30

【0022】

いくつかの態様において、*in vitro*の診断法は、PDGF/VEGFアプタマーをPDGF/VEGFを含むと疑われる試料に接触させることを含む。

他の側面において、本開示は適切に標識されたPDGF/VEGFアプタマー構築物を得、標識されたPDGF/VEGFアプタマー構築物をPDGF/VEGFが介在する病気または疾患を持つと疑われる個体に注射し、標識されたPDGF/VEGFアプタマー構築物を個体の健康状態の診断または評価の目的のために検出することを含む*in vitro*の診断法を提供する。使用される標識は、用いられる画像診断法に従って選択される。

【0023】

いくつかの態様において、本発明はPDGFアプタマーおよびVEGFアプタマーを含むアプタマー構築物を提供する。

40

【0024】

いくつかの態様において、本開示は、2.2 および2.3 の解像度で解析され、それぞれがPDGF-BBに結合したアプタマーの2つの複製物を含む2つの別々の共結晶構造を提供する。

【0025】

いくつかの態様において、本開示は、疎水性相互作用を通して主にタンパク質に効率的に結合するアプタマーを提供する。

【0026】

50

いくつかの態様において、本開示は、アプタマーが実質的に疎水性相互作用を通してタンパク質に結合するアプタマー - タンパク質複合体を提供する。

【0027】

いくつかの態様において、本開示は、複合体は7よりも少ない水素結合を含み、タンパク質標的と共結晶複合体を形成する能力を持つアプタマーを提供する。

【0028】

いくつかの態様において、本開示は、16かそれよりも少ないヌクレオチドを含むシュートノット領域を含み、タンパク質標的と共結晶複合体を形成する能力を持つアプタマーを提供する。

【0029】

いくつかの態様において、本開示は、タンパク質標的と界面面積100<sup>2</sup>あたり1に等しいかそれよりも少ない有極接点で結合し、タンパク質標的と共結晶複合体を形成する能力を持つアプタマーを提供する。有極接点は1かそれよりも多い水素結合および1かそれよりも多い電荷 - 電荷相互作用を含み、界面面積はアプタマーで占められたタンパク質表面範囲の部分である。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1 - 1】図1(A)は3つの低解離定数修飾型アプタマーおよびアプタマーE10030のK<sub>d</sub>値の測定を示し、(B)は本明細書で開示される3つのPDGFアプタマーおよびスクランブルされた対照オリゴヌクレオチドによるPDGF - BB刺激されたPDGFRのリン酸化阻害を示し、(C)は修飾されたアプタマーの、特定のBn - dU核酸塩基が別の修飾されたdU核酸塩基に置き換えられた親アプタマー4149 - 8\_\_130に対するK<sub>d</sub>比を、親アプタマーに対する相対値(1の値は修飾されたアプタマーが親と同等にPDGFRのリン酸化を阻害することを示し、>1の値は修飾されたアプタマーが親と比べて低い阻害活性を示す)で示す。

【図1 - 2】同上。

【図2 - 1】図2は、実施例2に述べられる(A)アプタマー4149 - 8\_\_260の分子内接触とアプタマー - PDGF接触の表、(B)非極性分子内接触およびアプタマー - PDGF接触の描写、(C)極性分子内接触およびアプタマー - PDGF接触の描写を示す。疎水性(非極性)相互作用は - 相互作用(面 - 面(face-to-face)および端 - 面(edge-to-face)両方の芳香族相互作用)およびファンデルワールス接触(vW)を含む。極性相互作用は水素結合(破線)および電荷 - 電荷相互作用(実線)を含む。BおよびCに示されるように、あるアプタマー残基(例えばdC4、dG6、dA9、dC10、dC12、dG13、dC14、dG15、dG22、dC23および2' - O - methyl G24)は標準塩基対形成および塩基のスタッキングに関与し、2' - O - methyl A11は押し出されている。

【図2 - 2】同上。

【図3】図3は、実施例1に述べられる、(A)それぞれの位置での454パイロシーケンシングおよびヌクレオチドの出現頻度により決定されたSELEXプールからのクローンのセットのコンセンサス配列、および6つのクローンの配列、(B)示されている通り修飾された親アプタマー4149 - 8に基づいて修飾されたアプタマーのK<sub>d</sub>値を示す。

【図4】図4は、実施例2に述べられるPDGF - BB、4149 - 8\_\_260複合体のある立体像を示す。

【図5】図5は、実施例3に述べられる(A)200nMのtRNAの存在下と非存在下における、異なるPDGF二量アイソフォームに対する様々なアプタマーの結合親和性、(B)PDGF - A、- B、- Cおよび- Dの成熟型のアミノ酸配列の配列比較を示す。太字で示されるPDGF - Aに対するアミノ酸残基はプロペプチド結合に関与する、太字で示されるPDGF - Bに対するアミノ酸残基はPDGFR結合に関与する(Shim et al, (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107(25):11307)。影付きの四角はアプタマー4

10

20

30

40

50

1 4 9 - 8 \_\_ 2 6 0 の P D G F - B 鎖 1 ( 濃い影付き ) への結合および P D G F - B 鎖 2 ( 薄い影付き ) への結合に關与する残基を示す。

【図 6】図 6 は、実施例 1 に述べられる、( A ) アプタマー 4 1 4 9 - 8 \_\_ 3 8 ( 配列番号 3 8 ) におけるそれぞれの示された位置を 3 つの炭素 C - 3 リンカーで置換して作られた、修飾されたアプタマーの  $K_d$  比、および P D G F - B B 結合、P D G F - A B 結合の  $K_d$  値、を親アプタマー 4 1 4 9 - 8 に基づいて修飾された 5 つのアプタマーの細胞の  $IC_{50}$  とともに示し、( B ) 特定の B n - d U 核酸塩基が別の修飾された d U 核酸塩基で置換されている、親アプタマー 4 1 4 9 - 8 \_\_ 1 3 0 ( 配列番号 1 3 0 ) に基づいて修飾されたアプタマーの  $K_d$  比を親アプタマーに対する相対値で示す ( < 1 の数字は修飾されたアプタマーが親アプタマーよりも高い親和性を持つことを示し、> 1 の数字は修飾されたアプタマーが親アプタマーよりも低い親和性を持つことを示す ) 。

10

【図 7 - 1】図 7 は、実施例 2 に述べられる ( A ) アプタマー 4 1 4 9 - 8 \_\_ 2 6 0 ( 配列番号 2 1 1 ) に結合した P D G F - B B ホモ二量体のリボンダイアグラム、および ( B ) P D G F - B サブユニットに結合したときのアプタマー立体構造の配置図および構造図を示す。非標準塩基対は Leontis および Westhof の命名法に基づいてコードされる (Leontis N.B. et al. (2003) Curr. Opin. Struct. Biol. 13(3):300)。濃い灰色 = P D G F - B 鎖 1、薄い灰色 = P D G F - B 鎖 2、B n = B n - d U、P e = P e - d U、T h = T h - d U である。

【図 7 - 2】同上。

【図 8】図 8 A - L は、実施例 2 に述べられる、P D G F - B B : 4 1 4 9 - 8 \_\_ 2 6 0 アプタマー複合体の結晶構造からの P D G F アプタマーのある構造の特徴を示す。図 8 A はアプタマー構造の領域、塩基対形成およびスタッキング相互作用を示す。ミニノットのステムはかなりの折込みおよびプロペラ角度、またらせん状の弛緩れじれ (helical underwinding) により、B 型 DNA から明らかに逸脱している。B n 2 0 はヒンジ部であり U 8 とのスタッキングを通して 5' ステムと相互作用する。図 8 B はステム 1 ( S 1 ) の端面像を示す。図 8 C は S 1 および L 2 の側面像を示す。修飾されたヌクレオチドは、ミニノットからの B n 1 6、P e 1 7、T h 1 8 および B n 2 0 と相互作用しながら 5' ステムからの B n 2、B n 7 および B n 8 と疎水性クラスターを形成する。B n 8 は B n 1 6 および B n 2 0 と端 - 面 - 相互作用を作る。非標準 d U - d U 塩基対は水素結合を B n 2 0 のアミドリリンカーとして利用する。図 8 D は P e - d U 1 7 と B n - d U 2 0 間の非標準塩基対の詳細を示す。図 8 E はミニノット S 1 の塩基を安定化する芳香族相互作用を示す。図 8 F は S 1 における C 1 0 - G 1 5 Watson-Crick 対と L 2 ヌクレオチド A 2 1 の間に形成された塩基トリプルを示す。この塩基トリプルの Leontis-Westhof 分類はシス Watson-Crick/Watson-Crick、トランス糖端/フーグスティーンである (Leontis N.B. et al. (2003) Curr. Opin. Struct. Biol. 13:300)。この塩基トリプルは平面ではなく A 2 1 と G 1 5 の間に 3 4 ° プロペラねじれ角度、また Watson-Crick 塩基対の間にかなりの折込とプロペラねじれがある (表 5 )。図 8 G は L 1 中単一の押し出された塩基である残基 m A 1 1 と骨格回転を示す。図 8 H は S 2 の軸方向像を示す。図 8 I は 5' ステムモチーフの軸方向像を示し、B 型 DNA からの明らかな逸脱を強調している。包括的 C 1' - C 1' らせんパラメータは、d U - d U 対は過度にねじれており ( 4 0 ° )、結果として B n - d U 1 と B n - d U 2 の間でリニア近くまで ( ~ 1 7 2 ° ) 平板化する骨格において ~ 1 2 4 ° 屈曲することを示す。B n - d U 7 - B n - d U 8 間の明らかな放射状の置換および B n - d U 2 - d A 3 間のゼロに近い置換は塩基 2 - 4 と 6 - 7 間のより大きなスタッキングオーバーラップをもたらす。図 8 J は B n - d U 2 と B n - d U 8 間の非標準塩基対を示す。図 8 K は修飾されたヌクレオチドにより形成された領域間の接合部を示す。図 8 L は、領域間接合部のトポロジーを定義する B n 1 6 および B n 2 0 と端 - 面 - 相互作用を作る B n 8 を示す。アプタマー 4 1 4 9 - 8 \_\_ 2 6 0 ( 配列番号 2 1 1 ) の位置 8 の B n - d U を i B - d U ( 配列番号 2 5 5 ) に置き換えることの有害な影響は図 8 M と図 8 N に示された空間充填像に明らかである。B n 8 ( 8 M ) は近接する芳香族基とエネルギー的に起こりやすい - 相互作用を作る能力があり S O M A m e r をより密に

20

30

40

50



充填させる。一方 i B 8 ( 8 N ) は芳香族でなく、よって近接する芳香族基との - スタッキング能力がない。さらに、i B 基はそれほど大きくなく疎水性クラスターの中に穴を残す。

【図 9】図 9 は、実施例 2 に述べられるあるタンパク質 - アプタマー相互作用を示す。図 9 A において、B n - d U 1 はホモ二量体界面の塩橋下のポケットを占める。ベンジル環は A r g 5 6 の脂肪族側鎖と C y s 4 3 - C y s 5 2 のジスルフィド結合の間に挟まれているのに対し、U 1 塩基は V a l 3 9 においてタンパク質骨格と水素結合を形成する。図 9 B において、B n 2 は T r p 4 0 と沿層方向の相互作用をもち A s n 5 5 のメチレン側鎖と L e u 3 8 の間に位置する。図 9 C は B n 7 の芳香環が A s n 5 4 の脂肪族部分と A s n 5 5 側鎖に対してたすき掛けしている様子を示す。図 9 D は L e u 3 8 と I l e 7 5 の側鎖が B n - d U 8 のベンジル環に対して疎水性表面を表しタンパク質に接触している様子を示す。図 9 E は、B n 1 6 が T r p 4 0 と端 - 面 - スタッキングを、A r g 7 3 の脂肪族部分とファンデルワールス接触を持つ様子を示す。図 9 F は P e 1 7 が L e u 3 8、T r p 4 0、A r g 7 3 および I l e 7 5 の疎水性側鎖に囲まれている様子を示す。A r g 7 3 は P e - d U 1 7 のアミドリinker と水素結合を、アプタマー骨格と電荷 - 電荷相互作用を形成する。図 9 G は A r g 7 3、I l e 7 5 および P h e 8 4 の疎水性側鎖に囲まれた T h 1 8 を示す。図 9 H はタンパク質とアプタマー間のスタッキング相互作用が P r o 8 2 と B n 2 0 と U 8 の間に存在すること、また P h e 8 4 が U 2 0 と e d g e - t o - f a c e 接触を形成する様子を示す。B n 2 0 は I l e 7 7 および L y s 8 0 と更なる疎水性接触を形成する。

【図 1 0】図 1 0 は極性接触（水素結合プラス電荷 - 電荷相互作用）の数と接触表面積のために解析された、従来のアプタマー（P D B I D s : v W F、3 H X O ; T h r o m b i n、3 Q L P ; G l n R s t R N A、1 E X D ; H u m a n I g G、3 A G V ; M S 2 c o a t p r o t e i n、6 M S F ; N F - k B、1 O O A）の 6 つの共結晶構造を示す。結果は、報告されたこれらの 6 つのアプタマー - 標的複合体（濃灰棒）および、P D G F - S L 5 ( 4 1 4 9 - 8 \_ 2 6 0 ) と 2 つの未発表の S O M A m e r - 標的構造を含む S O M A m e r ( 薄灰棒 ) への結合親和性に対してプロットされた。6 つの従来のアプタマーの極性接触の数と接触表面積の間の関係は線形回帰により分析され、9 9 % 信頼区間は図の底上に灰色の影として示されている。図 1 0 B は P e - d U 1 7 および T h - d U 1 8 として示された P D G F - S O M A m e r 複合体の形状相補性を表す。左、P D G F 鎖 1 は濃灰表面として示されており、P e - d U 1 7 および T h - d U 1 8 は空間を充填する描写として示されている。右、P e - d U 1 7 が棒描写として示されている以外は左のパネルと同じ図。図 1 0 C は B n - d U 1 と P D G F 鎖 1 の相互作用の詳細を濃灰表面で、P D G F 鎖 2 との相互作用の詳細を薄灰表面で示し、B n - d U 1 は空間を充填する描写として表されている。

【図 1 1】図 1 1 は P D G F - B B に結合した S L 5 および P D G F R の比較を示す。( A ) P D G F ホモ二量体 ( 鎖 1 : 中程度の灰色、鎖 2 : 薄灰色 ) および濃灰色で色づけられた受容体の細胞外領域を示す、受容体の共結晶 (from Shim, A.H., et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107(25):11307)。( B ) P D G F ホモ二量体 ( 鎖 1 : 中程度の灰色、鎖 2 : 薄灰色 ) および S L 5 ( 濃灰色 ) の複合体。( C ) P D G F - B 成熟型のアミノ酸配列。四角の影付きは 4 1 4 9 - 8 \_ 2 6 0、P D G F R または両方への接触残基を示す。4 1 4 9 - 8 \_ 2 6 0 と 4 接触を形成するが P D G F R とは接触しない P D G F 残基は影なしで囲まれている。P D G F R と 4 接触を形成するが 4 1 4 9 - 8 \_ 2 6 0 とは接触しない P D G F 残基は濃灰色の影付きで囲まれている。4 1 4 9 - 8 \_ 2 6 0 および P D G F R の両方と 4 接触を形成する P D G F 残基は中程度の灰色の影付きで囲まれている。

【図 1 2 - 1】図 1 2 は、遅い解離速度定数をもつアプタマーのようなアプタマーに組み入れられても良い、ある典型的な C - 5 ピリミジン修飾を示す。

【図 1 2 - 2】同上。

【図 1 2 - 3】同上。

【図 1 3】図 1 3 は、実施例 4 に述べられる通り、S O M E m e r 4 1 4 9 - 8 \_ 3 7 9 ( O H - 4 1 4 9 - 8 \_ 3 7 9 として標識) または 5' アミノリンカーで修飾された S O M A m e r 4 1 4 9 - 8 \_ 3 7 9 ( N - 4 1 4 9 - 8 \_ 3 7 9 として標識) による、H s 2 7 線維芽細胞における、P D G F - B B が誘導する P D G F R のリン酸化阻害の代表的なプロットを示す。

【図 1 4】図 1 4 は、実施例 5 に述べられる通り、4 5 4 パイロシークエンシングおよびそれぞれの位置でのヌクレオチド出現頻度により決定された S E L E X プールからの P D G F 結合クロンのセットのコンセンサス配列を示す。

【図 1 5 - 1】図 1 5 は、実施例 7 に述べられる通り、親アプタマー 4 8 6 7 - 3 1 \_ 1 4 3 に基づいて修飾されたアプタマーで特定の N a p - d U 核酸塩基が他の修飾された d U 核酸塩基に置き換えられているアプタマーの  $K_d$  比を、親アプタマーとの相対で示す (< 1 の数字は修飾されたアプタマーが親アプタマーよりも高い親和性を有することを示し、> 1 の数字は修飾されたアプタマーが親アプタマーよりも低い親和性を有することを示す)。

【図 1 5 - 2】同上。

【図 1 6】図 1 6 は、実施例 7 で述べられる通り、4 5 4 パイロシークエンシングおよびそれぞれの位置でのヌクレオチド出現頻度により決定された S E L E X プールからの V E G F 結合クロンのセットのコンセンサス配列を示す。

【図 1 7】図 1 7 は、実施例 9 に述べられる通り、V E G F - 1 2 1 または V E G F - 1 6 5、および V E G F アプタマー 4 8 6 7 - 3 1 \_ 4 3 および 4 8 6 7 - 3 1 \_ 1 9 2 で刺激されたヒト臍帯静脈内皮細胞 ( H U V E C s ) における V E G F R 2 のリン酸化率を示す。

【図 1 8】図 1 8 は、実施例 1 1 に述べられる通り、( A ) H s 2 7 線維芽細胞における、P D G F アプタマー 4 1 4 9 - 8 \_ 3 7 9 ( 白丸) および P D G F / V E G F アプタマー構築物 4 1 4 9 - 8 \_ 4 0 1 ( 黒丸) による、P D G F が誘導する P D G F R のリン酸化阻害、( B ) H U V E C s における、V E G F アプタマー 4 8 6 7 - 3 1 \_ 1 9 2 ( 白丸) および P D G F / V E G F アプタマー構築物 4 1 4 9 - 8 \_ 4 0 1 による、V E G F が誘導する V E G F R 2 のリン酸化阻害を示す。

【図 1 9】図 1 9 は、実施例 1 2 に述べられる通り、P D G F / V E G F アプタマー構築物 S L 1 0 1 2 ( 2 0 k D a P E G - N - 4 1 4 9 - 8 \_ 4 0 1 ) による、( A ) ビオチン標識された P D G F を加えた、V E G F でコートされたマイクロタイタープレート、および ( B ) ビオチン標識された V E G F を加えた、P D G F でコートされたマイクロタイタープレート上の P D G F および V E G F の同時結合を示す。

【図 2 0】図 2 0 は、実施例 1 2 に述べられる通り、P D G F / V E G F アプタマー構築物 ( A ) S L 1 0 1 2 ( 2 0 k D a P E G - N - 4 1 4 9 - 8 \_ 4 0 1 ) および ( B ) S L 1 0 1 3 ( 4 0 k D a P E G - N - 4 1 4 9 - 8 - 4 0 1 ) による、ビオチン標識された V E G F を加えた、P D G F でコートされたマイクロタイタープレート上の P D G F および V E G F の同時結合を示す。

【図 2 1】図 2 1 は、実施例 1 2 で述べられる通り、様々な P D G F / V E G F アプタマー構築物による、( A ) ビオチン標識された P D G F を加えた、V E G F でコートされたマイクロタイタープレート、および ( B ) ビオチン標識された V E G F を加えた、P D G F でコートされたマイクロタイタープレート上の P D G F および V E G F の同時結合を示す。

【図 2 2 - 1】図 2 2 は、実施例 2 に述べられる ( A ) 極性接触 ( 水素結合と電荷 電荷相互作用の合計として定義される ) 対従来のアプタマー ( ひし形) および S O M A m e r ( 丸) の界面面積のプロット ( 線形回帰フィットは傾き 0 . 0 1 6 の  $R^2 = 0 . 9 1$  であり、破線はこの傾向の 9 9 % 信頼区間を表し、S O M E m e r はこれらの境界の外にある )、( B ) 自由エネルギー結合対従来のアプタマー ( ひし形) および S O M A m e r ( 丸) の極性接触のプロット ( 線形回帰フィットは傾き 0 . 0 7 3 の  $R^2 = 0 . 6 4$  である )、( C ) 6 つの従来のアプタマー - タンパク質結晶構造および P D G F - B B : 4 1 4 9

10

20

30

40

50

- 8 \_\_ 2 6 0 を含む 3 つの S O M A m e r - タンパク質結晶構造の様々な熱力学的特性および接触特徴を示す表、を示す。(C) タンパク質標的に結合したアプタマーおよび S O M A m e r の相互作用の特徴(図の参照:(a) Convery et al. (1998) Nat. Struct. Biol. 5(2):133; (b) Nomura et al. (2010) Nucleic Acids Res. 38(21): 7822; (c) Pagan o et al. (2008) Biophys. J. 94(2):562; (d) Huang et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(16):9268; (e) Huang et al. (2009) Structure 17(11):1476; (f) Bullock et al. (2000) Nat. Struct. Biol. 7(6):497)。自由エネルギーの計算は測定された S O M A m e r の結合親和性、または公開された  $K_d$  値から決定された。次の温度を用いた。MS2、トロンプン、NFkB、vWF および GLnRs, 室温(296 K); IgG, 298 K; S O M A m e r, 310 K。S O M A m e r は結合親和性が高くなる傾向を示し、平均の結合自由エネルギーまたは  $- \Delta G$  値は、6 つのアプタマーに対して  $11.4 \pm 1.3 \text{ kcal/mol}$  であり 3 つの S O M A m e r に対して  $14.3 \text{ kcal/mol} \pm 0.8 \text{ kcal/mol}$  である。それぞれのリガンドの 4 以内のタンパク質接触原子は PyMOL で決定された。界面面積の計算は PISA (アプタマー) (Krissinel et al. (2007) J. Mol. Biol. 372(3):774) または PyMOL (S O M A m e r) (DeLano (2002) The Pymol Molecular Graphics System, DeLano Scientific, San Carlos, CA) で行われた。この比較的小さな結晶学的に評価された相互作用のデータセット内で、アプタマーは非水素接触原子あたり  $0.21 \pm 0.14 \text{ kcal/mol}$  の平均リガンド効率で標的と結合している。一方 S O M A m e r は非水素接触原子あたり  $0.16 \pm 0.04 \text{ kcal/mol}$  である。界面面積あたりの結合自由エネルギーもまた似ており、平均値はアプタマー  $0.017 \pm 0.009 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ 、S O M A m e r  $0.012 \pm 0.001 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$  である。表中の値から計算された極性接触あたりの結合自由エネルギーの値は、S O M A m e r (極性接触あたり平均  $1.75 \pm 0.36 \text{ kcal/mol}$ ) がアプタマー (極性接触あたり  $0.89 \pm 0.56 \text{ kcal/mol}$ ) よりも約 2 倍大きい。

【図 22 - 2】同上。

【発明を実施するための形態】

【0031】

以下に、本発明の代表的な態様を詳細に記載する。本発明を列挙した態様との関連にて説明するが、当然のことながら、本発明はそれらの態様に限定されるものではない。それどころか本発明は、特許請求の範囲で定義する本発明の範囲に含まれ得る全ての変異態様、修正態様、および均等物を含むものである。

【0032】

当業者であれば、本発明の実践の範囲で利用できる、および本発明の実践の範囲である方法および材料と、同様のまたは等価のたくさんの方方法および材料を認識するだろう。本発明は、記載の方法および材料に少しも限定されるものではない。

【0033】

別段の規定のない限り、本明細書で使用する技術的な用語および科学的な用語は、本発明が属する分野の当業者が、通常理解するものと同じ意味を有する。本発明の実践または試験においては、本明細書に記載の方法、装置および材料と同様のまたは等価な、任意の方法、装置および材料を使用することが可能であるが、好ましい方法、装置および材料を以下で説明する。

【0034】

本開示で引用する全ての出版物、公開された特許文書、および特許出願は、本開示に関連する、当該分野の技術レベルの指標である。本明細書で引用する全ての出版物、公開された特許文書、および特許出願は、あたかも個々の出版物、公開された特許文書、および特許出願が具体的に、かつ個別に参照により組み込まれるのと同様に、ここで参照により組み込まれる。

【0035】

添付の請求項を含めて本開示で使用する場合、単数形「1つ」、「1個の」および「そ

10

20

30

40

50

の」は、文脈からそうでないことが明かでない限り、複数形を含み、かつ、「少なくとも1つの」および「1つ以上」と同じ意味で使用される。従って、「1つのアダマー」に関する記載は、アダマーの混合物などを含む。

【0036】

本明細書で使用する場合、用語「約」は、ある数値が関連している事項の基本機能が変化しないような、その数値の僅かな修正または変動を表す。

【0037】

本明細書で使用する場合、用語「含む」、「含んでいる」、「含有する」、「含有している」、「包含する」、「包含している」、およびその全ての変異型は包括的な含有を表し、構成要素または構成要素の一覧を含む、含有する、または包含する対象のプロセス、方法、プロセスによる産物 (product-by-process) または組成物は、それらの構成要素のみを含むのではなく、明示されていない他の構成要素、または、そのようなプロセス、方法、プロセスによる産物または組成物に付随する他の構成要素を含み得る。

【0038】

本明細書で使用する場合、用語「ヌクレオチド」は、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチド、またはその修飾形態、ならびにその類似体を指す。ヌクレオチドは、プリン (例えば、アデニン、ヒポキサンチン、グアニン、およびそれらの誘導体および類似体) ならびにピリミジン (例えば、シトシン、ウラシル、チミン、およびそれらの誘導体および類似体) を含む種を含有する。

【0039】

本明細書で使用する場合、「核酸」、「オリゴヌクレオチド」、および「ポリヌクレオチド」は同じ意味で用いられ、ヌクレオチドの重合体を指し、かつ、DNA、RNA、DNAとRNAのハイブリッドおよびこれらの種の核酸、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの修飾形態を含み、様々な実体または部分とヌクレオチド単位との結合がいかなる位置のものも含まれる。用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、および「核酸」は、二本鎖分子または一本鎖分子ならびに三重らせん分子を含む。核酸、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドは、用語アダマーよりも広義であり、そのため、用語核酸、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドは、アダマーであるヌクレオチドの重合体を含むが、用語核酸、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドはアダマーには限定されない。

【0040】

本明細書で使用する場合、用語「修飾する」、「修飾した」、「修飾」、およびその全ての変異型は、オリゴヌクレオチドに関して使用される場合、そのオリゴヌクレオチドの4つの構成ヌクレオチド塩基 (すなわち、A、G、T/U、およびC) の少なくとも1つが、天然に存在するヌクレオチドの類似体またはエステルであることを意味する。いくつかの態様では、修飾されたヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性に寄与する。いくつかの態様では、修飾されたヌクレオチドは主に、アダマーとタンパク質標的との疎水性相互作用を誘導し、その結果、高い結合効率と安定な共結晶複合体 (co-crystal complex) を生じる。修飾されたヌクレオチドの例としては、C5位に置換の生じたピリミジンが挙げられる。修飾には、主鎖の修飾、メチル化、イソ塩基として (例えばイソシチジンとイソグアニンなどとして) の通常とは異なる塩基の対合などが含まれ得る。修飾には、カップリングなどの3'修飾および5'修飾が含まれる場合もある。他の修飾としては、1つ以上の天然に存在するヌクレオチドを類似体、例えば非荷電結合 (例えば、メチルホスホン酸、ホスホトリエステラーゼ、ホスホアミデート、カルバミン酸など)、荷電結合 (例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど)、干渉物質 (例えば、アクリジン、ソラレンなど)、キレート剤 (例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属など)、アルキル化剤、および修飾された結合 (例えば、アノマー核酸など) を含む類似体と置き換えることなどのヌクレオチド間修飾が含まれ得る。さらに、ヌクレオチドの糖部分に通常見られるヒドロキシル基のいずれかが、ホスホ

ン酸基またはリン酸基で置換されていても；標準的な保護基で保護されていても；または追加のヌクレオチドまたは固相支持体への追加の結合を準備するために活性化されていてもよい。5' および 3' 末端の OH 基をリン酸化することも、またはアミン類、炭素原子がおよそ 1 ~ およそ 20 個の有機カップリング基部分、ポリエチレングリコール (PEG) 重合体 (いくつかの態様では約 10 ~ 約 80 kDa の範囲)、PEG 重合体 (いくつかの態様では約 20 ~ 約 60 kDa の範囲)、または他の親水性もしくは疎水性の生体ポリマーまたは合成ポリマーで置換することも可能である。いくつかの態様において修飾は、ピリミジンの C-5 位での修飾である。これらの修飾は、直接 C-5 位のアミド結合によって、または他の種の結合によって生じる可能性がある。

#### 【0041】

ポリヌクレオチドは、当該分野において一般的に知られているリボース糖またはデオキシリボース糖の類似形態 (例えば 2' - O - メチル -、2' - O - アリル、2' - フルオロ - または 2' - アジド - リボース)、炭素環糖の類似体、 $\alpha$  - アノマー糖、エピマー糖 (例えばアラビノース、キシロースまたはリキソース)、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘブツロース、アクリル酸類似体および脱塩基ヌクレオシド類似体 (例えばメチルリボシド) も含み得る。上述したように、1 つ以上のホスホジエステル結合を、別の結合基で置き換えてもよい。これらの別の結合基としては、リン酸塩が P (O) S (「チオエート」)、P (S) S (「ジチオエート」)、(O) NR<sub>2</sub> (「アミデート」)、P (O) R、P (O) OR'、CO または CH<sub>2</sub> (「ホルムアセタール」) で置換されており、ここで R または R' がそれぞれ独立して H または置換もしくは非置換アルキル (1 - 20 C) (必要に応じてエーテル (- O - ) 結合、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニルまたはアラリジル (araldyl) を含む) である態様が含まれる。ポリヌクレオチドに含まれる全ての結合が同じである必要はない。類似形態の糖、プリン、およびピリミジンの置換は、例えば、ポリアミド主鎖のような別の主鎖構造をとることができるため、最終産物の設計の点で有利になる場合がある。

#### 【0042】

本明細書で使用する場合、用語「ヌクレアーゼ」とは、あるオリゴヌクレオチドのヌクレオチドサブユニット間のホスホジエステル結合を切断する酵素を指す。本明細書で使用する場合、用語「エンドヌクレアーゼ」とは、オリゴヌクレオチド内部にあるホスホジエステル結合を切断する酵素を指す。本明細書で使用する場合、用語「エキソヌクレアーゼ」とは、あるオリゴヌクレオチドの末端にあるヌクレオチドを繋いでいるホスホジエステル結合を切断する酵素を指す。体液は通常、エンドヌクレアーゼとエキソヌクレアーゼ両方の混合物を含む。

#### 【0043】

本明細書で使用する場合、用語「ヌクレアーゼ耐性」および「ヌクレアーゼ抵抗性」は、あるオリゴヌクレオチドに関し、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼの基質となる能力が低下していることを指す。そのため、そのオリゴヌクレオチドはそのような酵素と接触した場合、分解されないか、または未修飾のヌクレオチドから構成されているオリゴヌクレオチドよりもゆっくりと分解される。

#### 【0044】

本明細書で使用する場合、用語「C-5 修飾されたピリミジン」は、C-5 位に修飾を有するピリミジンを指し、その例としては、図 12 に図示する部分が挙げられるがこれらには限定されない。C-5 修飾されたピリミジンの例としては、米国特許第 5,719,273 号および同第 5,945,527 号に記載されているものなどが挙げられる。C-5 修飾の例としては、C-5 位のデオキシウリジンを、すぐ下で説明するように、ベンジルカルボキシアミド (あるいはベンジルアミノカルボキシ) (Bn)、ナフチルメチルカルボキシアミド (あるいはナフチルメチルアミノカルボキシ) (Nap)、トリプトアミノカルボキシアミド (あるいはトリプトアミノカルボニル) (Trp)、フェネチルカルボキシアミド (あるいはフェネチルアミノカルボニル) (Pe)、チオフエニルメチルカルボキシアミド (あるいはチオフエニルメチルアミノカルボニル) (Th) およびイソブチ

10

20

30

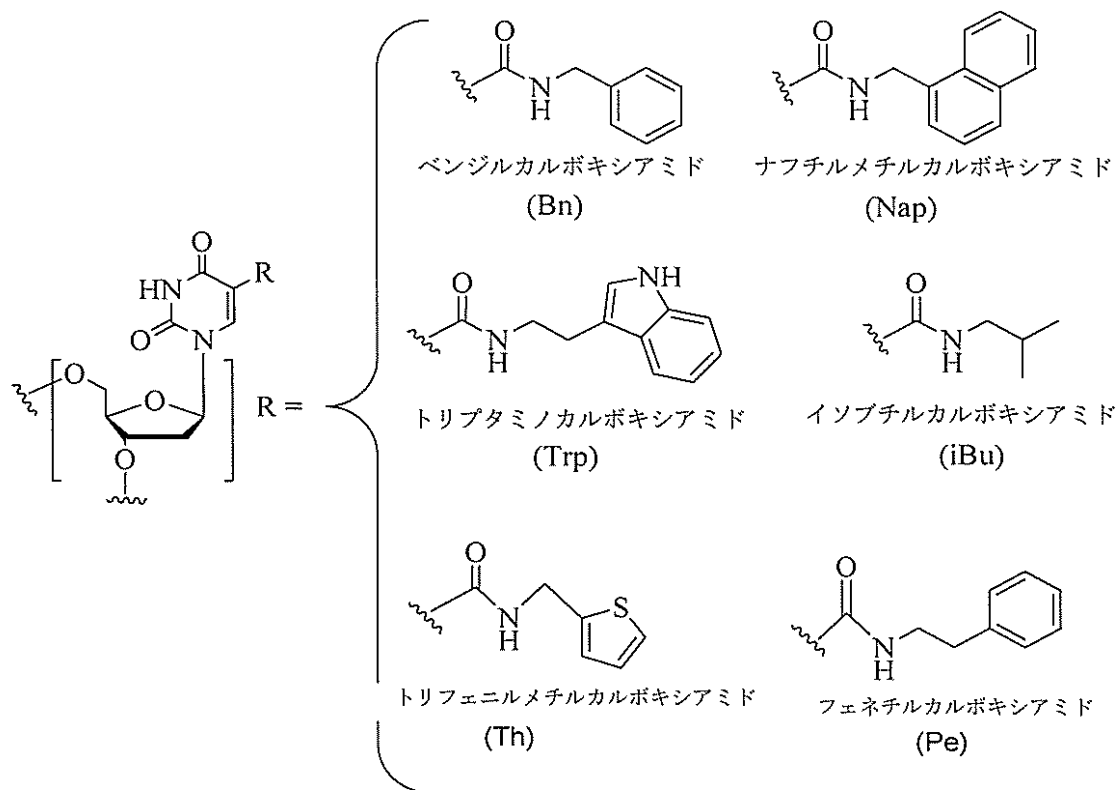
40

50

ルカルボキシアミド（あるいはイソブチルアミノカルボニル）（iBu）から独立して選択される置換基と置換することが含まれる。

【0045】

【化1】



10

20

【0046】

C-5 修飾されたピリミジンの化学修飾は、単独でまたはいずれの組み合わせにおいても、2'-位の糖修飾、環外アミンの修飾、および4-チオウリジンの置換などと組み合わせることが可能である。

30

【0047】

代表的なC-5修飾されたピリミジンとしては、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(iBudU)、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-フェネチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(PedU)、5-(N-チオフェニルメチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(ThdU)、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-トリプトアミノカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(TrpdU)、5-(N-トリプトアミノカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-トリプトアミノカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-[1-(3-トリメチルアンモニウム)プロピル]カルボキシアミド)-2'-デオキシウリジンクロリド、5-(N-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(NapdU)、5-(N-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジンまたは5-(N-[1-(2,3-ジヒドロキシプロピル)]カルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン)が挙げられる。

40

【0048】

オリゴヌクレオチドを合成する前にまたは合成した後に、ヌクレオチドを修飾することができる。オリゴヌクレオチドに含まれるヌクレオチドの配列は、1つ以上の非ヌクレオ

50

チド成分によって分断されていてもよい。修飾されたオリゴヌクレオチドを重合化の後に、例えば、好適な標識成分と連結することによって、さらに修飾してもよい。

【 0 0 4 9 】

本明細書で使用する場合、用語「少なくとも1つのピリミジン」とは、核酸の修飾に言及する場合、核酸に含まれる1つ、複数、または全てのピリミジンを指し、核酸に含まれるいくつかまたは全てのC、T、またはUのいずれかまたは全てを修飾しても修飾しなくてもよいことを表している。

【 0 0 5 0 】

別段の規定のない限り、本明細書で使用するA、C、G、UおよびTはそれぞれ、d A、d C、d G、d Uおよびd Tを意味する。

10

【 0 0 5 1 】

本明細書で使用する場合、「核酸リガンド」、「アプタマー」、および「クローン」は同じ意味で用いられ、標的分子に望ましい作用をもたらす天然には存在しない核酸を指す。望ましい作用としては、これらに限定されるものではないが、標的を結合させること、標的を触媒的に変化させること、標的もしくは標的の機能活性を修飾もしくは変化させるように標的と反応すること、標的と共有結合すること（自殺型阻害剤と同様に）、および標的と別の分子との反応を促進すること、が挙げられる。いくつかの態様においてこの作用は、標的分子に関する特定の結合親和性であり、そのような標的分子は、ワトソン/クリックの塩基対合または三重らせんの形成とは独立した機構を介して核酸リガンドに結合するポリヌクレオチド以外の三次元化学構造であり、ここでこのアプタマーは、標的分子が結合する、既知の生理学的な機能を有する核酸ではない。所与の標的に対するアプタマーとしては、このアプタマーが標的のリガンドである場合には、(a)候補混合物を標的と接触させること、ここで、候補混合物に含まれている他の核酸よりも標的に対して高い親和性を有する核酸を、候補混合物のその他の部分から分けることができ；(b)候補混合物のその他の部分から、親和性の高い核酸を分けること；および(c)親和性の高い核酸を増幅してリガンドに富む核酸混合物を得て、それにより、標的分子のアプタマーを同定すること、を含む方法によって、候補核酸混合物から同定された核酸が含まれる。親和性相互作用とは程度の問題だと認識されるが、本明細書中においては、アプタマーのその標的に対する「特定の結合親和性」とは、通常、アプタマーがその標的に、混合物または試料に含まれているその他の非標的、成分に結合するよりも非常に高い程度の親和性において結合することを意味する。「アプタマー」または「核酸リガンド」とは、特定のヌクレオチド配列を有する、1つの型または種の核酸分子のコピーの組みである。アプタマーは、任意の好適な数のヌクレオチドを含み得る。「アプタマー」とは、2以上の、そのような分子の組みを指す。別種のアプタマーは、同じ数または異なる数のヌクレオチドを有していてもよい。アプタマーはDNAであってもまたはRNAであってもよく、また、一本鎖であっても、二本鎖であっても、または二本鎖領域または三本鎖領域を含んでいてもよい。

20

30

【 0 0 5 2 】

本明細書で使用する場合、「SOMAm er」または低解離定数修飾型アプタマーは、解離定数( $t_{1/2}$ )が 30分、 60分、 90分、 120分、 150分、 180分、 210分、または 240分のアプタマー（疎水性修飾された少なくとも1つのヌクレオチドを含むアプタマーなど）を指す。いくつかの態様では、「改善された解離定数を有するアプタマーの生成方法(Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates)」という名称の米国特許第7,947,447号に記載されている、改良型SELEX法によって、SOMAm erを生成する。

40

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用する場合、「タンパク質」は、「ペプチド」、「ポリペプチド」、または「ペプチド断片」と同じ意味で用いられる。「精製した」ポリペプチド、タンパク質、ペプチド、またはペプチド断片は、細胞成分、またはそのアミノ酸配列を得た細胞、組織

50

、もしくは無細胞供給源に由来する他の混入タンパク質を実質的に含まないか、または化学的に合成する場合には、化学的な前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。

【 0 0 5 4 】

本明細書で使用する場合、「共結晶構造」または「共結晶複合体」とは、2つ以上の相互作用している分子を含む、結晶構造である。

【 0 0 5 5 】

本明細書で使用する場合、「心血管の状態または疾患」とは、心臓およびその血管系に関連する状態または疾患を意味する。そのような状態または疾患のいくつかの例としては、瘤、アングナ、不整脈、アテローム性動脈硬化症、心房細動、うっ血性心不全、心筋症、冠動脈性心疾患、再狭窄、虚血、左室肥大、末梢血管病、心筋梗塞、高血圧、心臓弁膜症および拘束性心臓疾患がある。

10

【 0 0 5 6 】

本明細書で使用する場合、「線維症」は、器官内に、過剰量かつ異常な量の線維性の結合組織が形成され、その結果、結合組織に肥大や瘢痕が生じ、その器官の機能不全が引き起こされるという疾患または状態を意味する。そのような疾患および状態の例としては、肺線維症、腎臓線維症、肝臓線維症および嚢胞性線維症がある。

【 0 0 5 7 】

本明細書で使用する場合、「AMD」または「加齢黄斑変性」または「黄斑変性」は、網膜の損傷によって引き起こされ、黄斑と呼ばれる、視野中心部における視力低下が生じる、眼の状態を意味する。AMDには、「滲出型」と「萎縮型」の2つの形態がある。「滲出型」AMDでは、網膜裏側の脈絡膜から血管が生じる。「萎縮型」AMDでは、細胞残渣(ドルーゼン)が網膜と脈絡膜の間に蓄積する。いずれの型においても、網膜剥離が起こり得る。

20

【 0 0 5 8 】

本明細書で使用する場合、「眼科疾患」もしくは「眼科状態」または「眼疾患」もしくは「眼状態」は、眼の血管新生障害に影響を及ぼすまたはそれらに伴う全ての疾患または状態を指し、眼の血管新生障害としては例えば、黄斑変性(「滲出型」および「萎縮型」)、未熟網膜症、糖尿病性網膜症、血管新生緑内障、角膜血管新生、増殖性糖尿病性網膜症(糖尿病性網膜症の最も重篤な段階)、ブドウ膜炎(黄斑浮腫を引き起こすことが多い、眼の炎症状態)、白内障手術後の嚢胞性黄斑浮腫、近視性変性(非常に近眼な患者において、脈絡膜新生血管が発症する状態)、炎症性黄斑変性(感染または他の原因によって黄斑領域に炎症を生じた患者が脈絡膜新生血管を発症する状態)、および虹彩血管新生(虹彩表面に新しい血管の発生を伴う、糖尿病性網膜症または網膜静脈閉塞の重篤な合併症)が挙げられる。

30

【 0 0 5 9 】

本明細書で使用する場合、「腎臓疾患」または「腎臓状態」とは、増殖性腎臓障害に影響を及ぼすまたはそれらに伴う全ての疾患または状態を指し、増殖性腎臓障害としては例えば、糸球体腎炎、メサンギウム増殖性腎臓疾患、多嚢胞性腎疾患、腎臓癌、急性腎不全、腎障害、アミロイドーシス、浮腫、線維症、糸球体疾患、腎臓梗塞および腎炎が挙げられる。

40

【 0 0 6 0 】

本明細書で使用する場合「癌」とは、制御できない、かつ、異常な細胞増殖を伴う疾患または状態を意味する。一般的な癌の数例としては、膀胱癌、肺癌、乳癌、黒色腫、結腸および直腸癌、リンパ腫、子宮内膜癌、膵癌、肝臓癌、腎臓癌、前立腺癌、白血病および甲状腺癌が挙げられる。

【 0 0 6 1 】

本明細書で使用する場合、「調節する」とは、高めるまたは低下させることによって、ペプチドもしくはポリペプチドのレベルを変化させること、または高めるもしくは低下させることによって、ペプチドもしくはポリペプチドの安定性もしくは活性を変化させることを意味する。用語「阻害する」は、ペプチドもしくはポリペプチドのレベルを低下させ

50



ること、またはペプチドもしくはポリペプチドの安定性もしくは活性を低下させることを意味する。本明細書に記載したように、調節されるまたは阻害されるタンパク質はPDGFである。

【0062】

本明細書で使用する場合、用語「生理活性」とは、生理学的な過程または病態生理学的な過程に影響を及ぼす可能性のある、1つ以上の細胞内もしくは細胞外プロセスに対する効果（例えば、結合、シグナル伝達などを介した）を表す。

【0063】

本明細書で使用する場合、用語「血小板由来成長因子」および「PDGF」は、PDGFのA、B、C、およびDイソ型ならびにそれらのホモ二量体またはヘテロ二量体であるAA、BB、AB、CCおよびDDを指す。ある場合には、文脈によって、PDGFのどのイソ型および/またはヘテロ二量体を指しているかが決定される。例えばいくつかの態様では、PDGFに結合するものとしてアプタマーを記載し得るが、本明細書に記載のPDGFアプタマーはPDGF-Bイソ型、ならびにそのイソ型を含むホモ二量体およびヘテロ二量体に結合する。この定義に特に含まれるものは、天然に存在するヒトPDGFのAA、AB、およびBBイソ型および変異体である。本明細書で使用する場合、PDGFには、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、霊長類、ウマ、およびウシなどの、全ての哺乳類の種のPDGFが含まれる。ヒトPDGF-Bイソ型前駆体の非限定的な例は、Swiss-Protの受入番号P01127.1に示される配列を有する。ヒトPDGF-Bイソ型成熟タンパク質の非限定的な例は、Swiss-Prot受入番号P01127.1の82~241番目または82~190番目のアミノ酸の配列を有し得る（本明細書においては、PDGF-Bの1~160番目または1~109番目のアミノ酸と呼ぶ）。

【0064】

本明細書で使用する場合、「PDGF受容体」は、PDGFが結合し、PDGFによって活性化される受容体、例えばPDGF受容体 およびPDGF受容体、を指す。PDGF受容体には、全ての哺乳類の種、これらには限定されないが、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ウマ、霊長類、およびウシ、の受容体が含まれる。ヒトPDGFR前駆体の非限定的な例は、Swiss-Prot受入番号P09619.1に示される配列を有する。ヒトPDGFR成熟タンパク質の非限定的な例は、Swiss-Prot受入番号P09619.1の33~1106番目のアミノ酸の配列を有する。ヒトPDGFR前駆体の非限定的な例は、Swiss-Prot受入番号P16234.1に示す配列を有する。ヒトPDGFR成熟タンパク質の非限定的な例は、Swiss-Prot受入番号P16234.1の24~1089番目のアミノ酸の配列を有する。

【0065】

「PDGFアプタマー」とは、PDGFに結合可能な、または、PDGFの活性を調節可能なアプタマーである。いくつかの態様では、PDGFアプタマーはPDGFの活性をインビトロで阻害する。いくつかの態様では、PDGFアプタマーはPDGFの活性をインビボで阻害する。PDGFの非限定的な活性例としては、PDGF介在性のPDGF受容体（例えばPDGF受容体（PDGFR）またはPDGF受容体（PDGFR））のリン酸化がある。

【0066】

いくつかの態様では、本明細書で定義する「VEGFアプタマー」は、単量体、二量体または多量体の構築物であり、場合により、リンカーによって連結されている。

【0067】

本明細書で使用する場合、用語「血管内皮成長因子」および「VEGF」は、イソ型および変異体を含む天然に存在するVEGF、例えばVEGF-121、VEGF-145、VEGF-165、VEGF-183、VEGF-189、およびVEGF-206を指す。本明細書で使用する場合VEGFは、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、霊長類、ウマ、およびウシを含む哺乳類の全ての種のVEGFを含む。ヒトVEGF前駆体の非限定的な例は、Swiss-Prot受入番号P15692.2に示す配列を有する。VEGF-

121は例えば、Tee et al. (2001) Biochem. J. 359:219; Bornes et al. (2004) J. Biol. Chem. 279:18717に記載されている。

【0068】

本明細書で使用する場合、「VEGF受容体」は、VEGFが結合し、VEGFによって活性化される受容体、例えばVEGFR-1およびVEGFR-2を指す。VEGF受容体には、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ウマ、霊長類、およびウシを含むがこれらには限定されない哺乳類の任意の種の受容体が含まれる。ヒトVEGFR-1前駆体の非限定的な例は、Swiss-Prot受入番号P17948.2に示す配列を有し得る。ヒトVEGFR-1成熟タンパク質の非限定的な例は、Swiss-Prot受入番号P17948.2の27~1338番目のアミノ酸の配列を有する。ヒトVEGFR-2前駆体の非限定的な例は、Swiss-Prot受入番号P35968.2に示す配列を有する。ヒトVEGFR-2成熟タンパク質の非限定的な例は、Swiss-Prot受入番号P35968.2の20~1356番目のアミノ酸の配列を有する。

10

【0069】

「VEGFアプタマー」とは、VEGFに結合可能で、かつ、VEGFの活性を調節可能なアプタマーである。いくつかの態様では、VEGFアプタマーはVEGFの活性をインビトロで阻害する。いくつかの態様では、VEGFアプタマーはVEGFの活性をインビボで阻害する。VEGFの活性の非限定的な例としては、VEGF介在性のVEGF受容体、例えばVEGFR-1またはVEGFR-2、のリン酸化が挙げられる。いくつかの態様では、VEGF-121とアプタマー4867-31\_183の結合を競合するVEGFアプタマーが提供される。

20

【0070】

いくつかの態様では、本明細書で定義する「VEGFアプタマー」は単量体、二量体または多量体の構築物であって、場合により、リンカーによって連結されている。

【0071】

用語「PDGF/VEGFアプタマー構築物」および「VEGF/PDGFアプタマー構築物」は同じ意味で用いられ、PDGFアプタマーとVEGFアプタマーを含む構築物を指す。「PDGF/VEGFアプタマー構築物」および「VEGF/PDGFアプタマー構築物」における語「PDGF」と「VEGF」の順序は、アプタマー同士がどのように繋がれているかを表すものではない。例えば、その順序は、どのアプタマーがアプタマー構築物の最も5'側に位置しているかを示すものでも、どのアプタマーがアプタマー構築物の最も3'側に位置しているかを示すものでもない。いくつかの態様では、PDGF/VEGFアプタマー構築物はPDGFとVEGFと同時に結合することができる。いくつかの態様では、PDGF/VEGFアプタマー構築物はPDGFとVEGFのそれぞれに、個別に結合することができる。PDGF/VEGFアプタマー構築物では、PDGFアプタマーとVEGFアプタマーは共有結合していても、または非共有結合していても、例えば、ストレプトアビジンおよびビオチンなどの結合対を介して結合していてもよい。PDGF/VEGFアプタマー構築物は、PDGFアプタマーとVEGFアプタマーとの間にリンカーを含んでいてもよい。

30

40

【0072】

本明細書で使用する場合、「PDGF介在性の疾患または状態」は、PDGF活性が直接または間接的にその疾患または状態を誘導し得る疾患または状態を指す。PDGF介在性の疾患または状態の非限定的な例としては、心血管疾患、例えばアテローム性動脈硬化症、再狭窄、心肥大に関連する状態、および血管障害；眼科疾患、例えば黄斑変性；線維症；ならびに癌が挙げられる。

【0073】

本明細書で使用する場合、「VEGF介在性の疾患または状態」は、VEGF活性が直接または間接的にその疾患または状態を誘導し得る疾患または状態を指す。VEGF介在性の疾患または状態の非限定的な例としては、心血管疾患、自己免疫疾患、炎症性リウマ

50

チ性疾患、眼科疾患、および疾患過程の様々な期における癌が挙げられる。心血管疾患の非限定的な例としては、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、心肥大に関連する状態、および血管障害がある。眼科疾患の非限定的な例としては、網膜炎、黄斑変性、脈絡膜炎、網膜症、浮腫、緑内障、および白内障がある。

【 0 0 7 4 】

本明細書で使用する場合、用語「薬学上許容可能な」とは、動物に、より具体的にはヒトに使用することが、連邦または州政府の規制当局によって認可されているか、あるいは米国薬局方でまたは他の一般的に知られている薬局方で定められていることを意味する。用語「担体」は、それらと共に治療が投与される希釈剤、助剤、賦形剤、または媒体を指し、担体には、水や油などの無菌的な液が含まれるがこれらには限定されない。

10

【 0 0 7 5 】

本明細書で使用する場合、用語「薬学上許容可能な塩」またはPDGFアプタマー、VEGFアプタマーまたはPDGF/VEGFアプタマー構築物の「塩」とは、イオン結合を含む、本開示の化合物の産物であり、一般的には本開示の化合物を、酸または塩基と反応させることによって生産される、患者に投与するのに適した産物である。薬学上許容可能な塩には、これらには限定されないが、酸付加塩（塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩、硫酸水素塩、アルキルスルホン酸塩、アリールスルホン酸塩、アリールアルキルスルホン酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、乳酸塩、および酒石酸塩など）；アルカリ金属カチオン（例えばLi、Na、K、MgまたはCaなどのアルカリ土類金属塩）、または有機アミン塩が挙げられる。

20

【 0 0 7 6 】

本明細書で使用する場合、用語「医薬組成物」とは、PDGFアプタマー、VEGFアプタマー、またはPDGF/VEGFアプタマー構築物を、患者に投与するのに適した形状で含んでいる製剤である。医薬組成物は一般的に、予定される投与経路に適合するように製剤化される。投与経路の例としては、これらには限定されないが、経口および非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、吸入、局所、経皮、経粘膜、および直腸投与が挙げられる。

【 0 0 7 7 】

本明細書で使用する場合、用語「治療上有効量」とは通常、本明細書に記載の予防、抑制、または治療される障害または状態の少なくとも1つの症状を回復するのに必要な量を意味する。本開示のPDGFアプタマー、VEGFアプタマー、またはPDGF/VEGFアプタマー構築物に関する句「治療上有効量」とは、アプタマーが投与される、そのような治療を必要とする相当数の患者に関し、特定の薬理学的反応を生じるアプタマーの用量を意味する。特定の症例において特定の個人に投与される治療上有効量のアプタマーが、本明細書に記載状態/疾患の治療に常に有効である訳では無いが、それでもなおそのような用量が、当業者によって治療上有効量と見なされることが強調される。

30

【 0 0 7 8 】

用語「SELEX」および「SELEX過程」は、本明細書においては同じ意味で用いられ、通常、(1) 標的分子と望ましい様式で（例えばタンパク質との高い親和性による結合）相互作用する核酸の選抜、と(2) 選抜した核酸の増幅、との組み合わせを指す。SELEX過程を利用して、特定の標的分子に対して高い親和性を有するアプタマーを同定することができる。

40

【 0 0 7 9 】

SELEXには通常、核酸の候補混合物を調製すること、候補混合物を所望の標的分子に結合させて親和性複合体を形成させること、親和性複合体を結合しなかった候補核酸から分離すること、親和性複合体から核酸を分離・単離すること、核酸を精製すること、および特定のアプタマー配列を同定すること、が含まれる。この過程には、選抜したアプタマーの親和性をより向上させるために、一連の操作を複数回実施すること、を含めてもよい。この過程は、過程の1つ以上の時点で、増幅する工程を含む場合もある。例えば、「核酸リガンド(Nucleic Acid Ligands)」という名称の、米国特許

50

第5,475,096号を参照のこと。SELEX過程を利用して、標的と共有結合するアプタマー、ならびに標的と非共有結合するアプタマーを生成することができる。例えば、「核酸の試験管内進化法：Chemical-SELEX (Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemical-SELEX)」という名称の、米国特許第5,705,337号を参照のこと。

#### 【0080】

SELEX過程を利用して、アプタマーによりよい特徴を、例えば高いインピボでの安定性またはより良い送達性のような特徴を付与する修飾されたヌクレオチドを含む、高親和性アプタマーを同定することができる。そのような修飾の例としては、リボースおよび/またはリン酸塩および/または塩基の位置における化学置換がある。SELEX過程によって同定された、修飾されたヌクレオチドを含むアプタマーについては「修飾されたヌクレオチドを含む高親和性核酸リガンド (High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides)」という名称の米国特許第5,660,985号に記載されており、ここでは、ピリミジンのC5位および/または2'位を化学的に修飾したヌクレオチド誘導体を含むオリゴヌクレオチドが説明されている。米国特許第5,580,737号(上記引用文献参照)では、2'-アミノ(2'-NH<sub>2</sub>)、2'-フルオロ(2'-F)、および/または2'-O-メチル(2'-OMe)で修飾したヌクレオチドを1つ以上含む、高度に特異的なアプタマーが説明されている。「SELEXおよびPHOTOSELEX (SELEX and photoSELEX)」という名称の米国特許公開公報第20090098549号も参照のこと。ここでは、多様な物理的および化学的特性を有する核酸ライブラリーと、それらのSELEXおよびphotoSELEXにおける使用が記載されている。

#### 【0081】

SELEXを利用して、所望の解離定数を特徴として有するアプタマーを同定することもできる。「改善された解離定数を有するアプタマーの生成方法 (Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates)」という名称の米国特許第7,947,447号を参照のこと。ここでは、標的分子に結合することが可能なアプタマーを生成するための、改良されたSELEX法が記載されている。それぞれの対応する標的分子からの解離定数が低いアプタマーとフォトアプタマーの生産方法が記載されている。この方法は、候補混合物と標的分子を接触させて、核酸-標的複合体の形成を起こすこと、および低解離定数濃縮過程を実施することを含み、この低解離定数濃縮過程では、高い解離定数を有する核酸-標的複合体は解離し、かつ、再構成されないが、低解離定数の複合体は完全な状態で維持される。加えて、この方法には、改善された解離定数を有するアプタマーを生成するための候補核酸混合物を生産する時点における、修飾されたヌクレオチドの使用も含まれる(SELEXおよびPHOTOSELEX (SELEX and photoSELEX)という名称の米国特許公開公報第2009/0098549号を参照のこと)。(また、米国特許第7,855,054号および米国特許公開公報第2007/0166740号も参照のこと)。これらの出願はそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0082】

いくつかの態様では、(a)核酸の候補混合物を調製すること、ここで、候補混合物は、候補混合物の核酸の少なくとも1つまたはそれぞれに含まれる少なくとも1つのピリミジンがC5位で化学的に修飾されている修飾された核酸を含み；(b)候補混合物と標的分子とを接触させること、ここで、候補混合物中の他の核酸よりも標的分子に対して高い親和性を有する核酸が標的分子に結合して核酸-標的分子複合体を形成し；(c)候補混合物のその他の部分から、高い親和性を有する核酸を分けること；および(d)高い親和性の核酸を増幅して、標的分子に高い親和性で結合することが可能な核酸配列に富んだ核酸混合物を得て、それによって標的分子に対するアプタマーを同定すること、を含む、標

10

20

30

40

50

的分子に結合するアプタマーの選抜方法を提供する。一定の態様においてこの方法は、さらに、低解離定数濃縮過程を実施することを含む。

#### 【0083】

「標的」または「標的分子」または「標的」は本明細書では、それらに対して、核酸が所望の様式で作用することが可能な全ての化合物を指す。標的分子は、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質、多糖、糖タンパク質、ホルモン、受容体、抗原、抗体、ウイルス、病原体、有毒物質、基質、代謝産物、移行期類似体、補因子、阻害剤、薬剤、色素、栄養分、成長因子、細胞、組織、前述したものの任意の部分または断片などであってよいが、これらには限定されない。実際には、任意の化学的または生物学的なエフェクターが好適な標的であってよい。どのような大きさの分子も標的となり得る。標的と核酸との相互作用の効率や強度を高めるために、特定の方法で、標的を修飾することもできる。標的は、特定の化合物または分子に任意の僅かな変異を含む場合もある。例えばタンパク質の場合には例えば、アミノ酸配列、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質付加、アセチル化、リン酸化、または、標識成分（分子の同一性の実質的な変化を及ぼさない）との結合などの任意の他の操作もしくは修飾に、僅かな変異を含み得る。「標的分子」または「標的」は、アプタマーに結合可能な分子もしくは多分子構造の1つの型もしくは1つの種のコピーの組みである。「標的分子」または「標的」は、2つ以上のそのような分子の組みを指す。標的がペプチドである S E L E X 過程の態様が、「精製したタンパク質を伴わない改善 S E L E X 過程 (Modified S E L E X Processes Without Purified Protein)」という名称の米国特許第 6, 3 7 6, 1 9 0 号に記載されている。

#### 【0084】

##### P D G F アプタマーの例

本開示の P D G F アプタマーを、実施例 1 に記載したように、低解離定数を有するアプタマーを同定するための改良 S E L E X 法によって同定した。実施例 1 では、低解離定数で P D G F に結合するアプタマーの選抜と生産に関する代表的な方法を記載した。選抜には、ベンジル - d U (B n - d U)、d A、d C および d G から構成したランダム DNA ライブラリーを使用した。この方法により、アプタマー 4 1 4 9 - 8 \_\_ 1 (配列番号 1) と命名した、P D G F - B B に対する DNA アプタマーを同定した。

#### 【0085】

アプタマー 4 1 4 9 - 8 \_\_ 1 (配列番号 1) を用い、P D G F に対する強い親和性を維持するのに必要とされる最少の長さの配列を同定するための試験を実施した。5' および 3' 末端から切断型を合成し、それにより、29 個のヌクレオチド (4 1 4 9 - 8 \_\_ 3 8 ; 配列番号 3 8) を含むコアモチーフが同定された。アプタマー 4 1 4 9 - 8 \_\_ 3 8 は、P D G F - B B に対する高い結合親和性を示した ( $K_d$  値: 20 pM ; 図 6)。

#### 【0086】

アプタマー 4 1 4 9 - 8 \_\_ 1 (配列番号 1) を選抜した配列プールに対し、配列決定試験を追加して行った。並列ピロシークエンシングを利用した大規模・高処理法である 4 5 4 配列決定では偏りのない試料が調製され、非常に正確な配列解析が行われる。図 3 に示すように、配列決定のデータを使用して、P D G F アプタマーに対する保存配列を同定した。さらに、図 6 に示したヌクレオチド置換試験により、P D G F との結合には、保存配列中の 6 番目と 8 番目の B n d U が望まれるが、4 番目の B n d U は d T と置換しても結合活性への影響は小さいかまたはなかった。保存配列を図 3 A に示す。同時に、それぞれの位置のヌクレオチド頻度をアプタマー 4 1 4 9 - 8 \_\_ 1 (配列番号 1) と比較したグラフを示した。

#### 【0087】

いくつかの態様において P D G F アプタマーは、  
5' - N Z V S L<sub>n</sub> S' V' Z A C N N<sub>m</sub> G C G Z Z Z A Z A G C G - 3' (配列番号 5 0 0)  
の配列を含み、

式中、

VはA、CまたはGから選択され；

V'はC、GまたはZから選択され、ここでV'はVに相補的であり；

SおよびS'はCまたはGから独立して選択され、ここでSとS'は互いに相補的であり；

Nはそれぞれ、任意の天然に存在するまたは修飾されたヌクレオチドから独立して選択され；

Zはそれぞれ、修飾されたピリミジンから独立して選択され；

Lは、任意の天然に存在するまたは修飾されたヌクレオチド、炭化水素リンカー、ポリエチレングリコールリンカーまたはそれらの組み合わせから選択され；

nは0～20であり；かつ、mは0～20であり；および、場合により1つ以上ヌクレオチドの挿入が含まれる。

【0088】

いくつかの態様においてPDGFアプタマーは、

5'-ZZVSL<sub>n</sub>S'V'ZACNN<sub>m</sub>GCGZZZA ZAGCG-3' (配列番号501)

の配列を含み、式中、V、V'、N、S、S'、Z、L、n、およびmは上で定義したのと同様である。

【0089】

いくつかの態様においてPDGFアプタマーは、

5'-ZZVCL<sub>n</sub>GV'ZACNMGCGZZZA ZAGCG-3' (配列番号502)

の配列を含み、

式中、Z、V、V'、N、Z、L、およびnは上で定義したのと同様であり、MはCおよびAから選択される。

【0090】

いくつかの態様においてPDGFアプタマーは、

5'-ZZACL<sub>n</sub>GZZACACGCGZZZA ZAGCG-3' (配列番号503)

の配列を含み、

式中、Z、L、およびnは上で定義したのと同様である。

【0091】

いくつかの態様においてPDGFアプタマーは、

5'-ZZACGACZACGZZACACGCGZZZA ZAGCG-3' (配列番号504) の配列を含み、

式中、Zは上で定義したのと同様である。

【0092】

いくつかの態様においてPDGFアプタマーは、

5'-ZVSL<sub>n</sub>S'V'ZACNN<sub>m</sub>GCGZZZA ZAG-3' (配列番号507)

の配列を含み、

式中、

VはA、CまたはGから選択され；

V'はC、GまたはZから選択され、ここでV'はVに相補的であり；

SおよびS'はCまたはGから独立して選択され、ここでSとS'は互いに相補的であり；

Nはそれぞれ、修飾されたまたは未修飾のヌクレオチドから独立して選択され；

Zはそれぞれ、修飾されたピリミジンから独立して選択され；

Lは置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>リンカーおよび修飾されたまたは未修飾のヌクレオチドから選択され；

nは1～50であり；かつ、mは0～50であり；および

場合により、1つ以上のヌクレオチドの挿入が含まれる。

## 【 0 0 9 3 】

いくつかの態様において P D G F アプタマーは、

5' - Z' Z V S L<sub>n</sub> S' V' Z A C N N<sub>m</sub> G C G Z Z Z A Z A G C - 3' (配列番号 5 0 8)

の配列を含み、

式中、Z' は修飾されたピリミジンまたは d T であり；および V、V'、N、S、S'、Z、L、n、および m は上で定義したのと同様である。

## 【 0 0 9 4 】

いくつかの態様において P D G F アプタマーは、

5' Z' Z V C L<sub>n</sub> G V' Z A C N M G C G Z Z Z A Z A G C - 3' (配列番号 5 0 9)

の配列を含み、

式中、Z、Z'、V、V'、N、Z、L、および n は上で定義したのと同様であり、かつ、M は C および A から選択される。

## 【 0 0 9 5 】

いくつかの態様において P D G F アプタマーは、

5' Z' Z A C L<sub>n</sub> G Z Z A C A C G C G Z Z Z A Z A G C - 3' (配列番号 5 1 0)

の配列を含み、

式中、Z、Z'、L、および n は上で定義したのと同様である。

## 【 0 0 9 6 】

いくつかの態様において P D G F アプタマーは、

5' - Z' Z A C G A C Z A C G Z Z A C A C G C G Z Z Z A Z A G C - 3' (配列番号 5 1 1)

の配列を含み、

式中、Z および Z' は上で定義したのと同様である。

## 【 0 0 9 7 】

いくつかの態様において P D G F アプタマーは、

5' - Z A B L<sub>p</sub> G Y Z A B K<sub>q</sub> G C G Z Z Y D Y A G - 3' (配列番号 5 0 5)

の配列を含み

式中、Z はそれぞれ独立して修飾されたピリミジンであり；

B はそれぞれ C および置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカーから独立して選択され；

L はそれぞれ独立して置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカー、ヘキサエチレングリコールリンカー、および修飾されたまたは未修飾のヌクレオチドから選択され、ここで p は 1 ~ 10 であり；

Y はそれぞれ独立して修飾されたまたは未修飾のピリミジンから選択され；

K はそれぞれ独立して置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカー、ヘキサエチレングリコールリンカー、および置換されたまたは未置換のヌクレオチドから選択され、ここで q は 1 ~ 5 であり；および

D は A および置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカーから選択される。

## 【 0 0 9 8 】

いくつかの態様において P D G F アプタマーは、

5' - X Z A B L<sub>n</sub> G Y Z A B L<sub>n</sub> G C G Z Z Y D Y A G B E - 3' (配列番号 5 0 6)

の配列を含み、

式中、X は修飾されたまたは未修飾のピリミジンおよび置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカーから選択されるかあるいは欠損しており；および E は G および置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカーから選択されるか、あるいは欠損している。

## 【 0 0 9 9 】

配列 N Z V S (配列番号 7 6 1) と S' V' Z A C N N<sub>m</sub> G C G Z Z Z A Z A G C G (配列番号 7 6 2) を含み、

式中、

10

20

30

40

50

V は A、C または G から選択され； V' は C、G または Z から選択され、ここで V' は C、G または Z から選択され、ここで V' は V に相補的であり；

S および S' は C または G から独立して選択され、ここで S と S' は互いに相補的であり；

N は任意の天然に存在するまたは修飾されたヌクレオチドから独立して選択され；

Z は修飾されたピリミジンから独立して選択され；

m は 1 ~ 20 であり；および

場合により、1 つ以上のヌクレオチドの挿入が含まれる、  
アプタマー構築物。

【0100】

10

いくつかの態様では、Z は修飾されたウリジンである。いくつかの態様では、Z はそれぞれ独立して、本明細書で定義した C-5 が修飾されたピリミジンから選択される。いくつかの態様では、Z はそれぞれ独立して、

5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BndU)、

5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、

5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、

5 - (N - フェネチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (PndU)、

5 - (N - チオフエニルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ThdU)、

5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ibudU)、

20

5 - (N - チロシルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (TyrdU)、

5 - (N - 3, 4 - メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (MBndU)、

5 - (N - 4 - フルオロベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (FBndU)、

5 - (N - 3 - フェニルプロピルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (PPdU)、

5 - (N - イミジゾリルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ImdU)、

5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、

30

5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、

5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (TrpdU)

、

5 - (N - R - トレオニルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ThrdU)、

5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、

5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、

5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウム) プロピル] カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジンクロリド、

5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NapdU)

40

、

5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、

5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、

5 - (N - [1 - (2, 3 - ジヒドロキシプロピル)] カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン)、

5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2NapdU)、

5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、

5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、

5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NEdU)

50



)、  
 5 - ( N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、  
 5 - ( N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、  
 5 - ( N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( 2 N E d U )、  
 5 - ( N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、  
 5 - ( N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、  
 5 - ( N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( B F d U )、  
 5 - ( N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、  
 5 - ( N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、  
 5 - ( N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( B T d U )、  
 5 - ( N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、および  
 5 - ( N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン  
 から選択される。

#### 【 0 1 0 1 】

一定の態様では、P D G F および / または V E G F アプタマーの一部分 ( Y ) は結合を維持するのに必要ではない場合があり、また、連続した P D G F および / または V E G F アプタマーの特定の部分を、例えばスペーサーまたはリンカー部分との置き換えを含むがこれらには限定されない修飾によって、修飾することができる。これらの態様では例えば、Y を Y ' - Q - Y ' ' - Q ' - Y ' ' ' と表すことができ、ここで Y ' 、Y ' ' および Y ' ' ' は P D G F および / または V E G F アプタマーの一部分であるか、または異なる P D G F および / または V E G F アプタマーのセグメントであり、Q および / または Q ' は、もとの P D G F および / または V E G F アプタマーの特定の核酸特性を修正するスペーサーまたはリンカー分子である。Q および Q ' が存在しない場合には、Y ' 、Y ' ' 、および Y ' ' ' は 1 つの連続した P D G F および / または V E G F アプタマー ( Y ) を表す。

#### 【 0 1 0 2 】

本明細書で使用する場合「リンカー」とは、2 つ以上の分子実体を共有結合または非共有相互作用で接続する分子実体であり、1 つ以上の分子実体の機能特性を保存する様式で、分子実体同士を空間的に隔てることもできる。リンカーはスペーサーとしても知られている。当業者は本開示に基づいて、適切なリンカー配列を容易に確認できる。

#### 【 0 1 0 3 】

本明細書で使用する場合、リンカーは、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド核酸、ロックド核酸、オリゴ糖、多糖、抗体、アフィボディ、抗体模倣物、脂肪族、芳香族もしくは複素環式芳香族炭素分子、ポリエチレングリコール ( P E G ) 分子、細胞受容体、リガンド、脂質、これらの構造の任意の断片または誘導体、前述したものの任意の組み合わせ、または任意の他の化学構造または要素を含むがこれらには限定されない群から選択される、1 つ以上の分子またはサブコンポーネントを含み得る。

#### 【 0 1 0 4 】

いくつかの態様では、少なくとも 1 つの L はポリエチレングリコールリンカーである。いくつかの態様では、少なくとも 1 つの L はヘキサエチレングリコールリンカーである。いくつかの態様では、L は置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカーである。いくつかの態様では、p は 1、2、3、4、5、6、7、または 8 である。いくつかの態様では、p は 1、2、または 3 である。いくつかの態様では、少なくとも 1 つの K はポリエチレングリコールリンカーである。いくつかの態様では、少なくとも 1 つの K はヘキサエチレングリコールリンカーである。いくつかの態様では、K は置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカーである。いくつかの態様では、q は 1 または 2 である。いくつかの態様では

は、q は 1 である。

【 0 1 0 5 】

種々の態様において、m は 0 ~ 2 0、0 ~ 1 9、0 ~ 1 8、0 ~ 1 7、0 ~ 1 6、0 ~ 1 5、0 ~ 1 5、0 ~ 1 4、0 ~ 1 3、0 ~ 1 2、0 ~ 1 1、0 ~ 1 0、0 ~ 9、0 ~ 8、0 ~ 7、0 ~ 6、0 ~ 5、0 ~ 4、または 0 ~ 3 であってよい。

【 0 1 0 6 】

いくつかの態様では、L はリンカー、例えば 1 8 - 原子ヘキサエチレングリコールリンカーであってよい。いくつかの態様では、L はヌクレオチドとリンカーの組み合わせであってよい。非限定的な例として、以下のアプタマー（配列番号 6 7 および 6 9）は、ヘキサエチレングリコール（H e g）リンカーを含み：

（配列番号 6 7）5' B n - B n - A - C - H e g - G - B n - B n - A - C - A - C - G - C - G - B n - B n - B n - A - B n - A - G - C - G - 3'

（配列番号 6 9）5' B n - B n - A - C - G - H e g - C - G - B n - B n - A - C - A - C - G - C - G - B n - B n - B n - A - B n - A - G - C - G - 3'

式中、B n はベンジル - d U であり、H e g はヘキサエチレングリコールリンカーである。

【 0 1 0 7 】

いくつかの態様では、N を、以下のアプタマーでのように、リンカーで置き換えてもよい：

（配列番号 3 2 9）5' B n - B n - A - C - H e g - G - B n - B n - A - C - C 3 - G - C - G - B n - B n - B n - A - B n - A - G - C - 3'

（配列番号 4 0 8）5' B n - B n - A - C - H e g - G - B n - B n - A - C - C 3 - C - G - B n - B n - B n - A - B n - A - G - 3'

式中、B n はベンジル - d U であり、H e g はヘキサエチレングリコールリンカーであり、C 3 は 3 炭素リンカーである。

【 0 1 0 8 】

さらなる P D G F アプタマーを実施例 5 に記載したように、低解離定数を有するアプタマーを同定するための改良 S E L E X 法によって同定した。実施例 5 では、低解離定数で P D G F に結合するアプタマーの選抜・生産に関する代表的な方法を記載した。選抜には、ナフチル - d U（N a p - d U）、d A、d C および d G から構成したランダム D N A ライブラリーを使用した。スクリーニングから、P D G F アプタマー 5 1 6 9 - 4 \_\_ 2 6 を同定した。

【 0 1 0 9 】

いくつかの態様では P D G F に特異的に結合するアプタマーを提供し、ここでこのアプタマーは、P D G F への結合に関し、P D G F アプタマー 5 1 6 9 - 4 \_\_ 2 6 と競合する。そのような態様のいくつかにおいては、アプタマーは、疎水性の核酸塩基修飾を含有する少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチドを含む。さらにそのような態様のいくつかでは、疎水性の核酸塩基修飾は、修飾されたピリミジンである。いくつかの態様では、修飾されたピリミジンはそれぞれ独立して、5 - （N - ベンジルカルボキシアミド） - 2' - デオキシウリジン（B n d U）、5 - （N - ベンジルカルボキシアミド） - 2' - O - メチルウリジン、5 - （N - ベンジルカルボキシアミド） - 2' - フルオロウリジン、5 - （N - フェネチルカルボキシアミド） - 2' - デオキシウリジン（P e d U）、5 - （N - チオフェニルメチルカルボキシアミド） - 2' - デオキシウリジン（T h d U）、5 - （N - イソブチルカルボキシアミド） - 2' - デオキシウリジン（i B u d U）、5 - （N - イソブチルカルボキシアミド） - 2' - O - メチルウリジン、5 - （N - イソブチルカルボキシアミド） - 2' - フルオロウリジン、5 - （N - トリプトアミノカルボキシアミド） - 2' - デオキシウリジン（T r p d U）、5 - （N - トリプトアミノカルボキシアミド） - 2' - O - メチルウリジン、5 - （N - トリプトアミノカルボキシアミド） - 2' - フルオロウリジン、5 - （N - [ 1 - （3 - トリメチルアンモニウム）プロピル ] カルボキシアミド） - 2' - デオキシウリジクロリド、5 - （N - ナフチルメチルカル

10

20

30

40

50

ボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NapdU)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、および 5 - (N - [1 - (2, 3 - ジヒドロキシプロピル)]カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン) から選択することができる。

【0110】

いくつかの態様では PDGF に特異的に結合するアプタマーを提供し、ここでアプタマーは、

5' - ACAL<sub>n</sub>ZGZAZGL<sub>m</sub>ZLZ - 3' (配列番号 512)

の配列を含み、

式中、Z はそれぞれ独立して修飾されたピリミジンであり；L はそれぞれ独立して置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>50</sub> リンカー、ポリエチレングリコールリンカー、および置換されたまたは未置換のヌクレオチドから選択され；n は 1 ~ 5 であり；および m は 1 ~ 10 である。

【0111】

いくつかの態様では、それぞれ、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BndU)、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - フェネチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (PedU)、5 - (N - チオフェニルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ThdU)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (iBudU)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (TrpdU)、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウム)プロピル]カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジンクロリド、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NapdU)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、および 5 - (N - [1 - (2, 3 - ジヒドロキシプロピル)]カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン) から独立して選択される。いくつかの態様では、少なくとも 1 つの、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、またはそれぞれの Z は 5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NapdU) である。いくつかの態様では、n は 1、2、3、4、または 5 である。いくつかの態様では、m は 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 である。いくつかの態様では、n は 3 である。いくつかの態様では、m は 4 である。そのような態様のいくつかでは、L はそれぞれ独立して、修飾されたヌクレオチド、未修飾のヌクレオチド、および C<sub>3</sub> リンカーから選択される。

【0112】

C<sub>2</sub> - C<sub>50</sub> リンカーまたはスパーサーは、2 ~ 50 個の炭素原子 (C<sub>2</sub> - C<sub>50</sub>) (置換、非置換、直鎖、分岐鎖または環状)、0 ~ 10 個のアリール基、0 ~ 10 個のヘテロアリール基、および 0 ~ 10 個の複素環基の鎖を含む主鎖であってよく、場合により、エーテル (-O-) 結合、(例えば、1 つ以上のエチレングリコール単位 -O- (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) - を含むがこれらには限定されない、1 つ以上アルキレングリコール単位；1 つ以上の 1, 3 - プロパンジオール単位 -O- (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) - など)；アミン (-NH-) 結合；アミド (-NC(O)-) 結合；およびチオエーテル (-S-) 結合などを含み、ここで各骨格に含まれる炭素原子は独立して置換されていなくても (つまり -H 置換基を含む) または、C<sub>1</sub> ~ C<sub>3</sub> アルキル、-OH、-NH<sub>2</sub>、-SH、-O- (C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル)、-S- (C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル)、ハロゲン、-OC(O) (C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル)、-NH- (C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル) から選択される 1 つ以上の基などで置換されていてもよい。いくつかの態様において C<sub>2</sub> - C<sub>50</sub> リンカーは、C<sub>2</sub> - C<sub>20</sub> リンカー、C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リン

カー、 $C_2 - C_8$ リンカー、 $C_2 - C_6$ リンカー、 $C_2 - C_5$ リンカー、 $C_2 - C_4$ リンカー、または $C_3$ リンカーであり、ここでそれぞれの炭素は独立して、上述したように置換されていてもよい。

#### 【0113】

いくつかの態様では、PDGFアプタマーの1つ以上のヌクレオシドは、2位の糖修飾(2'-アミノ(2'-NH<sub>2</sub>)、2'-フルオロ(2'-F)、または2'-O-メチル(2'-OMe)など)、シトシン環外アミンの修飾、ヌクレオシド間結合の修飾、および5'-メチル-シトシンから選択される修飾を含む。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、3'キャップ、5'キャップ、および/または3'末端に逆位のデオキシシンジンを含む。

10

#### 【0114】

いくつかの態様においてPDGFアプタマーは、少なくとも1つの修飾されたヌクレオシド間結合を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つの、少なくとも2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、または少なくとも5つのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合である。

#### 【0115】

いくつかの態様においてPDGFアプタマーは、表1、2および6~9に示す配列から選択される配列を有する(配列番号1~499および517~545)。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、PDGFに10nM未満の親和性(K<sub>d</sub>)で結合する表1に示す配列および表6~9に示す配列から選択される配列を有する。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、表1、2、および6~9に示す配列(配列番号:1から1~499および517~545)と、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一の配列を有する。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、PDGFに10nM未満の親和性(K<sub>d</sub>)で結合する表1に示す配列および表6~9に示す配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一の配列を有する。

20

#### 【0116】

用語「配列同一性」、「パーセントの配列同一性」、「パーセントの同一性」、「%同一性」、「%同一」、およびそれらの変異型は、2つの核酸配列に関して使用される場合、同じ意味で用いられ、最大一致に関して参照核酸と比較・整列し、(1)最も5'側の対応する(すなわち整列した)ヌクレオチド塩基と最も3'側の対応する(すなわち整列した)ヌクレオチド塩基の間であって、かつ、これらを含めた、目的の配列に含まれるヌクレオチド塩基の数か、または(2)参照配列の全長、のいずれか大きい方で割った場合に、目的の核酸または目的の核酸の一部に含まれる同じヌクレオチド塩基の数を指す。比較するための配列アライメントの例は例えば、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482の局所相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443の相同性整列アルゴリズム、Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の相同性検索法、これらのアルゴリズムのコンピューターへの実装(Wisconsin Genetics Software PackageのGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA。Genetics Computer Group, 575 Science Dr., マジソン、ウィスコンシン)または目視による確認によって実施することができる(基本的に、Ausubel, F.M. et al. (1987), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscienceを参照のこと)。

30

40

50

## 【0117】

配列同一性(%)を決定するのに適したアルゴリズムの一例としては、ベーシック・ローカル・アライメント・ツール(basic local alignment search tool、以降「BLAST」とする)に用いられているアルゴリズムがある。例えばAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403およびAltschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 15:3389を参照のこと。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information、以降「NCBI」とする)で公開されている。NCBIから入手可能なソフトウェア、例えばヌクレオチド配列用のBLASTN、を利用した配列同一性の決定で使用されているデフォルトの指標については、McGinnis et al. (2004) Nucleic Acids Res. 32:W20に記載されている。

10

## 【0118】

本明細書で使用する場合、ある核酸、例えばPDGFアプタマーの配列が参照のヌクレオチド配列と、少なくとも、例えば、約95%同一であるとは、その核酸配列が、参照核酸配列の100個のヌクレオチドあたり5つまでの点突然変異を含み得るということを除いて、参照配列と同一であるということを用意している。言い換えると、参照核酸配列と少なくとも約95%同一の所望の核酸配列を得るためには、参照配列に含まれるヌクレオチドの5%までを欠損させてもよい、または別のヌクレオチドで置換してもよい、あるいは参照配列に含まれているヌクレオチドの数の5%までの数のヌクレオチドを挿入してもよいことを意図している(本明細書では挿入と呼ぶ)。所望の配列を生成するための、参照配列へのこのような突然変異は、参照ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端で、または末それら端の間にあるいずれかの位置で生じていても、あるいは参照配列のヌクレオチドに散在していても、または参照配列の1つ以上の連続した群の中にあってもよい。さらに、ヌクレオチド塩基が、(1)参照配列のヌクレオチド塩基と同じである、または(2)参照配列中のヌクレオチド塩基に由来するものである、または(3)参照配列中のヌクレオチド塩基の由来となったのと同じヌクレオチド塩基に由来するものである場合、パーセント同一性を決定する目的において、そのヌクレオチド塩基は「同一である」と見なされる。例えば、パーセント同一性を計算する目的においては、5-メチルシトシンはシトシンと「同一である」と見なされる。同様に、図12に示す修飾されたウリジンは、パーセント同一性を計算する目的においては、互いに同一であると思なされる。参照配列は配列番号1~437に示すヌクレオチド配列のいずれか1つであってよい。

20

30

## 【0119】

いくつかの態様において本開示は、PDGFに結合するとPDGFの機能を調節するPDGFアプタマーを提供する。いくつかの態様では、本明細書に記載のPDGFアプタマーは、PDGF受容体、例えばPDGF R またはPDGF R の、PDGF介在性リン酸化を阻害する。いくつかの態様では、本明細書に記載のPDGFアプタマーは、PDGF R のPDGF介在性リン酸化を阻害する。様々な態様では、PDGFアプタマーはインビボでのPDGFの機能、例えばインビボでのPDGF介在性受容体リン酸化の阻害、を調節する。様々な態様では、PDGFアプタマーは、配列番号1~437の配列から選択される配列を有する。様々な態様では、PDGFアプタマーは、表1および2で示すアプタマーから選択される。様々な態様では、PDGFアプタマーは、表1で示すアプタマーから選択される。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、配列番号1から1~499および517~545から選択される配列の、少なくとも12の、少なくとも13の、少なくとも14の、少なくとも15の、少なくとも16の、少なくとも17の、少なくとも18の、少なくとも19の、少なくとも20の、少なくとも21の、少なくとも21の、少なくとも22の、少なくとも23の、少なくとも24の、少なくとも25の、少なくとも26の、少なくとも27の、少なくとも28の、少なくとも29の、または少なくとも30の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、PDGFアプタマ

40

50

ーは、配列番号1から1～499および517～545から選択される配列と核酸配列が同一の、少なくとも12の、少なくとも13の、少なくとも14の、少なくとも15の、少なくとも16の、少なくとも17の、少なくとも18の、少なくとも19の、少なくとも20の、少なくとも21の、少なくとも21の、少なくとも22の、少なくとも23の、少なくとも24の、少なくとも25の、少なくとも26の、少なくとも27の、少なくとも28の、少なくとも29の、または少なくとも30の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、表1、2、6、7、8または9に示すアプタマーの、少なくとも12の、少なくとも13の、少なくとも14の、少なくとも15の、少なくとも16の、少なくとも17の、少なくとも18の、少なくとも19の、少なくとも20の、少なくとも21の、少なくとも21の、少なくとも22の、少なくとも23の、少なくとも24の、少なくとも25の、少なくとも26の、少なくとも27の、少なくとも28の、少なくとも29の、または少なくとも30の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、表1に示すアプタマーまたは、PDGFに10 nM未満の親和性 ( $K_d$ ) で結合する表6～9のいずれか1つに示すアプタマーの、少なくとも12の、少なくとも13の、少なくとも14の、少なくとも15の、少なくとも16の、少なくとも17の、少なくとも18の、少なくとも19の、少なくとも20の、少なくとも21の、少なくとも21の、少なくとも22の、少なくとも23の、少なくとも24の、少なくとも25の、少なくとも26の、少なくとも27の、少なくとも28の、少なくとも29の、または少なくとも30の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、表1、2、6、7、8または9に示すアプタマーの、少なくとも12の、少なくとも13の、少なくとも14の、少なくとも15の、少なくとも16の、少なくとも17の、少なくとも18の、少なくとも19の、少なくとも20の、少なくとも21の、少なくとも21の、少なくとも22の、少なくとも23の、少なくとも24の、少なくとも25の、少なくとも26の、少なくとも27の、少なくとも28の、少なくとも29の、または少なくとも30の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、表1に示すアプタマーまたは、PDGFに10 nM未満の親和性 ( $K_d$ ) で結合する表6～9のいずれか1つに示すアプタマーの、少なくとも12の、少なくとも13の、少なくとも14の、少なくとも15の、少なくとも16の、少なくとも17の、少なくとも18の、少なくとも19の、少なくとも20の、少なくとも21の、少なくとも21の、少なくとも22の、少なくとも23の、少なくとも24の、少なくとも25の、少なくとも26の、少なくとも27の、少なくとも28の、少なくとも29の、または少なくとも30の連続したヌクレオチドを含む。

#### 【0120】

いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、配列番号500～512、761および762の配列から選択される核酸塩基配列を有する。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、配列番号1から1～499および517～545のいずれか1つの配列を有する。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、配列番号1から1～499および517～545のいずれか1つと、少なくとも95%同一、少なくとも90%同一、少なくとも85%同一、少なくとも80%同一、または少なくとも75%同一である。本明細書の態様のいずれか1つでは、PDGFアプタマーは、アプタマーの5'末端、3'末端、または5'末端と3'末端の両方に、追加のヌクレオチドまたは他の化学部分を含んでもよい。

#### 【0121】

PDGFアプタマーは、PDGF結合領域に加えて、いかなる数のヌクレオチドを含んでもよい。様々な態様では、PDGFアプタマーは、約100までのヌクレオチド、約95までのヌクレオチド、約90までのヌクレオチド、約85までのヌクレオチド、約80までのヌクレオチド、約75までのヌクレオチド、約70までのヌクレオチド、約65までのヌクレオチド、約60までのヌクレオチド、約55までのヌクレオチド、約50までのヌクレオチド、約45までのヌクレオチド、約40までのヌクレオチド、約35までのヌクレオチド、約30までのヌクレオチド、約25までのヌクレオチド、または約2

10

20

30

40

50

0までのヌクレオチドを含み得る。

【0122】

いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、配列番号1から1～499および517～545から選択されるアプタマーと同様の結合特徴、ならびに配列番号1から1～499および517～545から選択されるアプタマーと同様の、PDGF関連性アテローム性動脈硬化症、黄斑変性、線維症、または癌の状態を治療するための能力を有するアプタマーから選択される。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、表1、2、および6～9に示すアプタマーから選択されるアプタマーと同様に、PDGF-B単量体の同じ領域に結合する(PDGF-BBまたはPDGF-AB二量体の場合)。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、表1に示すアプタマーから選択されるアプタマーと同様に、PDGF-B単量体の同じ領域に結合する(PDGF-BBまたはPDGF-AB二量体の場合)。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、表6に示すアプタマーから選択されるアプタマーと同様に、PDGF-B単量体の同じ領域に結合する(PDGF-BBまたはPDGF-AB二量体の場合)。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、PDGF-Bの24～86番目のアミノ酸を含むPDGF-Bの領域に結合する。そのような態様のいくつかでは、PDGFアプタマーはPDGFへの結合に関してPDGFアプタマー4149-8\_\_260と競合する。いくつかの態様では、PDGFアプタマーはPDGF-Bと、15%未満、14%未満、13%未満、12%未満、11%未満、10%未満、9%未満、8%未満、7%未満、または6%未満のタンパク質間の接触している原子に対する極性結合で結合する。極性結合とは、水素結合と電荷間相互作用の和として定義される。いくつかの態様では、PDGFアプタマーはPDGF-Bと、境界面領域に対する極性結合の比が0.01未満、0.009未満、0.008未満、0.007未満、または0.006未満で結合する。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、PDGFアプタマー5169-4\_\_26と同様に、PDGF-B単量体の同じ領域に結合する(PDGF-BBまたはPDGF-AB二量体の場合)。

【0123】

いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、以下の特徴を任意の組み合わせで有する：

- (a) PDGF-Bの24～86番目のアミノ酸を含むPDGF-Bの領域に結合する；
- (b) PDGFへの結合に関してPDGFアプタマー4149-8\_\_260と競合する；
- (c) PDGFへの結合に関してPDGFアプタマー5169-4\_\_26と競合する；
- (d) PDGF-Bと、境界面領域に対する極性結合の比が0.01未満、0.009未満、0.008未満、0.007未満、または0.006未満で結合する；および/または
- (e) PDGF-Bと、15%未満、14%未満、13%未満、12%未満、11%未満、10%未満、9%未満、8%未満、7%未満、または6%未満のタンパク質間の接触している原子に対する極性結合で結合する。

【0124】

PDGFアプタマーは、PDGFに関するいかなる好適な解離定数( $K_d$ )をも有するように選択することができる。いくつかの態様では、PDGFアプタマーが有するPDGFへの解離定数( $K_d$ )は、30 nM未満、25 nM未満、20 nM未満、15 nM未満、10 nM未満、9 nM未満、8 nM未満、7 nM未満、6 nM未満、5 nM未満、4 nM未満、3 nM未満、2 nM未満、または1 nM未満である。解離定数は下記実施例3に記載したように、多点での力価測定を用いた結合アッセイを行い、式： $y = (\text{最大} - \text{最少}) / (K_d + \text{タンパク質}) + \text{最少}$ 、に当てはめることで決定し得る。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、表1、2または6～9のいずれか1つに示すアプタマーの $K_d$ に満たないまたは同じ $K_d$ を有するアプタマーである。いくつかの態様では、PDGFアプタマーは、表1または表6に示すアプタマーの $K_d$ に満たないまたは同じ

$K_d$ を有するアプタマーである。

【0125】

アプタマー4149-8\_\_1はPDGF単量体と1:1の化学量論で結合する。PDGFがその標的受容体と反応するのに必要とされる密なホモ二量体を形成するため、二量体または他の多量体の形態のアプタマー4149-8\_\_1を用いることで、より効率的にPDGF活性を阻害することができると考えられる。従っていくつかの態様では、PDGFアプタマーは、アプタマー4149-8\_\_1、4149-8\_\_379、および配列番号500~512の任意の組み合わせによる多量体である。いくつかの態様では、アプタマー構築物は、本明細書に記載のPDGFアプタマーのいずれかから選択される第一のアプタマーと、本明細書に記載のPDGFアプタマーのいずれかを含む第二のアプタマーとを含み、ここで第一のアプタマーと第二のアプタマーは同じであってもまたは異なってもよい。PDGFアプタマー構築物の第一のアプタマーと第二のアプタマーは共有的に結合していても、または非共有的に結合していてもよい。結合の非限定的な例は当該分野において知られており、および/または本明細書に記載されている。いくつかの態様では、PDGFアプタマー構築物は2つのPDGF単量体に同時に結合することができ得る。いくつかの態様では、PDGFアプタマー構築物は、PDGFに10nM未満の親和性( $K_d$ )で結合する。

10

【0126】

VEGFアプタマーの例

本開示のVEGFアプタマーを、実施例7に記載したように、低解離定数を有するアプタマーを同定するための改良SELEX法によって同定した。実施例7では、低解離定数でVEGFに結合するアプタマーの選抜と生産に関する代表的な方法を記載した。

20

【0127】

Nap-dU VEGF-121 SELEX実験からのクローンを、29個のヌクレオチドの最少配列へと切断した。このSOMAmerはVEGF-121とVEGF-165の両方に、高い親和性( $K_d$ 値はそれぞれ、90pMおよび20pM)で結合する。SOMAmerはまた、ヒト臍帯静脈内皮細胞においてインビトロでは、VEGFR2のリン酸化を誘導するVEGFの両イソ型の能力を阻害する可能性があり(実施例9を参照のこと)、このことは、SOMAmerが、VEGFの受容体-結合ドメインに結合し、遮断するという概念を支持している。

30

【0128】

本開示では最初に、VEGF-121に対する阻害型アプタマーの同定を提供する。従って本発明のVEGFアプタマーは、ベバシズマブ(アバスチン(登録商標))、ラニズマブ(ルセンティス(登録商標))およびアフリベルセプト(アイリーア(登録商標))(Papadopoulos et al. (2012) Angiogenesis 15:171; Yu et al. (2011) Biochem. Biophys. Res. Commun. 408:276などのタンパク質ベースの薬剤と同様に、VEGFの広範な阻害剤となる。従って本発明のVEGFアプタマーは、VEGF-165の選択的阻害剤であるマクジェン(登録商標)よりも効率的にVEGFのシグナル伝達を阻害する可能性がある。

40

【0129】

成功したNap-dU VEGF-121 SELEX実験に由来する切断型クローンから、29ヌクレオチドの配列が得られた。このアプタマー(またはSOMAmer)4867-31は、VEGF-121とVEGF-165の両方に、高い親和性( $K_d$ 値はそれぞれ90pMおよび20pM)で結合する。このSOMAmerはまた、ヒト臍帯静脈内皮細胞においてインビトロでは、VEGFR2のリン酸化を誘導するVEGFの両イソ型の能力を阻害する可能性があり、このことは、SOMAmerが、VEGFの受容体-結合ドメインに結合し、遮断するという概念を支持している。

【0130】

アプタマー4867-31\_\_192はVEGF単量体と1:1の化学量論で結合する。

50



VEGFがその標的受容体と反応するのに必要とされる密なホモ二量体を形成するため、二量体または他の多量体の形態のアプタマー4867-31\_192を用いることで、より効率的にVEGF活性を阻害することができると考えられる。従っていくつかの態様では、VEGFアプタマーは、アプタマー4867-31\_192、配列番号513~516の配列の任意の組み合わせによる多量体である。いくつかの態様では、アプタマー構築物は、本明細書に記載のVEGFアプタマーのいずれかから選択される第一のアプタマーと、本明細書に記載のVEGFアプタマーのいずれかを含む第二のアプタマーとを含み、ここで第一のアプタマーと第二のアプタマーは同じであってもまたは異なってもよい。VEGFアプタマー構築物の第一のアプタマーと第二のアプタマーは共有的に結合していても、または非共有的に結合していてもよい。結合の非限定的な例は当該分野において知られており、および/または本明細書に記載されている。いくつかの態様では、VEGFアプタマー構築物は2つのVEGF単量体に同時に結合することができ得る。いくつかの態様では、VEGFアプタマー構築物は、VEGFに10nM未満の親和性( $K_d$ )で結合する。

#### 【0131】

いくつかの態様では、VEGFアプタマーはVEGF-121と10nM未満の $K_d$ で結合する。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、1つ以上の修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、疎水性修飾を含有する1つ以上の修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、1つ以上の修飾されたピリミジンを含む。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、1つ以上の、図12に示す修飾されたピリミジンを含む。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、1つ以上の、図12のII~V群に示す修飾されたピリミジンを含む。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、1つ以上の、図12のIII~V群に示す修飾されたピリミジンを含む。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、1つ以上の、図12のIIIおよびIV群に示す修飾されたピリミジンを含む。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、1つ以上(N-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(NapdUs)を含む。

#### 【0132】

いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、  
5'-GZZQAAEZECZZEZDRGAZZZAAAZGG-3' (配列番号513)  
の配列を含み、  
式中、Zはそれぞれ修飾されたピリミジンであり；  
Qは置換されたまたは未置換のヌクレオチドおよび置換されたまたは未置換の $C_2-C_{50}$ リンカーのいずれかから選択されるか、または欠損しており；  
Eはそれぞれ独立してGおよび置換されたまたは未置換の $C_2-C_{50}$ リンカーから選択され；  
DはAおよび置換されたまたは未置換の $C_2-C_{50}$ リンカーから選択され；および  
Rは置換されたまたは未置換のヌクレオチドおよび置換されたまたは未置換の $C_2-C_{50}$ リンカーのいずれかから選択される。

#### 【0133】

いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、  
5'-CGZZQAAEZECZZEZDRGAZZZAAAZG-3' (配列番号514)；  
5'-GZZQAAEZECZZEZDRGAZZZAAAZGG-3' (配列番号513)；  
5'-CGZZQAAEZECZZEZDRGAZZZAAAZGG-3' (配列番号515)；および  
5'-CCGZZQAAEZECZZEZDRGAZZZAAAZGG-3' (配列番号516)；

から選択される配列を含み、

式中、Z、Q、E、D、およびRは上で定義したのと同様である。

【 0 1 3 4 】

いくつかの態様では、Zは修飾されたウリジンである。いくつかの態様では、Zはそれぞれ独立して、本明細書で定義したC-5が修飾されたピリミジンから選択される。いくつかの態様では、Zはそれぞれ独立して、

- 5 - ( N - ベンジルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( B n d U ) 、
- 5 - ( N - ベンジルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、
- 5 - ( N - ベンジルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、
- 5 - ( N - フェネチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( P E d U ) 、 10
- 5 - ( N - チオフェニルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( T h d U ) 、
- 5 - ( N - イソブチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( i B u d U ) 、
- 5 - ( N - チロシルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( T y r d U ) 、
- 5 - ( N - 3 , 4 - メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( M B n d U ) 、
- 5 - ( N - 4 - フルオロベンジルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( F B n d U ) 、
- 5 - ( N - 3 - フェニルプロピルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( P P d U ) 、 20
- 5 - ( N - イミジゾリルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( I m d U ) 、
- 5 - ( N - イソブチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、
- 5 - ( N - イソブチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、
- 5 - ( N - トリプトアミノカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( T r p d U ) 、
- 5 - ( N - R - トレオニルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( T h r d U ) 、
- 5 - ( N - トリプトアミノカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、
- 5 - ( N - トリプトアミノカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、 30
- 5 - ( N - [ 1 - ( 3 - トリメチルアンモニウム ) プロピル ] カルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジנקロリド、
- 5 - ( N - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( N a p d U ) 、
- 5 - ( N - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、
- 5 - ( N - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、
- 5 - ( N - [ 1 - ( 2 , 3 - ジヒドロキシプロピル ) ] カルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ) 、
- 5 - ( N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( 2 N a p d U ) 、 40
- 5 - ( N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、
- 5 - ( N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、
- 5 - ( N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( N E d U ) 、
- 5 - ( N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、
- 5 - ( N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、
- 5 - ( N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( 2 N E d U ) 、
- 5 - ( N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、
- 5 - ( N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、 50

5 - ( N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( B F d U ) 、  
 5 - ( N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、  
 5 - ( N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、  
 5 - ( N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( B T d U ) 、  
 5 - ( N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、および  
 5 - ( N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジンから選択される。

10

## 【 0 1 3 5 】

いくつかの態様では、Zはそれぞれ独立して、図12のII~V群に示す修飾されたピリミジンから選択される。いくつかの態様では、Zはそれぞれ独立して、図12のIII~V群に示す修飾されたピリミジンから選択される。いくつかの態様では、少なくとも1つの、少なくとも2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、少なくとも5つの、少なくとも6つの、少なくとも7つの、または少なくとも8つのZは5 - ( N - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( N a p d U ) である。いくつかの態様では、Zはそれぞれ独立して、図12のIII~IV群に示す修飾されたピリミジンから選択される。いくつかの態様では、Zはそれぞれ、5 - ( N - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( N a p d U ) である。

20

## 【 0 1 3 6 】

C<sub>2</sub> - C<sub>50</sub> リンカーまたはスペーサーは、2 ~ 50 個の炭素原子 ( C<sub>2</sub> - C<sub>50</sub> ) ( 置換、非置換、直鎖、分岐鎖または環状 )、0 ~ 10 個のアリール基、0 ~ 10 個のヘテロアリール基、および0 ~ 10 個の複素環基の鎖を含む主鎖であってよく、場合により、エーテル ( - O - ) 結合、( 例えば、1つ以上のエチレングリコール単位 - O - ( C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> O ) - を含むがこれらには限定されない、1つ以上アルキレングリコール単位；1つ以上の1, 3 - プロパンジオール単位 - O - ( C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> O ) - など ) ; アミン ( - N H - ) 結合 ; アミド ( - N C ( O ) - ) 結合 ; およびチオエーテル ( - S - ) 結合などを含み、ここで各骨格に含まれる炭素原子は独立して置換されていなくても ( つまり - H 置換基を含む ) または、C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキル、- O H、- N H<sub>2</sub>、- S H、- O - ( C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル )、- S - ( C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル )、ハロゲン、- O C ( O ) ( C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル )、- N H - ( C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル ) から選択される1つ以上の基などで置換されていてもよい。いくつかの態様においてC<sub>2</sub> - C<sub>50</sub> リンカーは、C<sub>2</sub> - C<sub>20</sub> リンカー、C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカー、C<sub>2</sub> - C<sub>8</sub> リンカー、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> リンカー、C<sub>2</sub> - C<sub>5</sub> リンカー、C<sub>2</sub> - C<sub>4</sub> リンカー、またはC<sub>3</sub> リンカーであり、ここでそれぞれの炭素は独立して上述したように置換されていてもよい。

30

## 【 0 1 3 7 】

いくつかの態様では、置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub> - C<sub>50</sub> リンカーはそれぞれ独立して、置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub> - C<sub>20</sub> リンカー、置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカー置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub> - C<sub>8</sub> リンカー、置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> リンカー、置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub> - C<sub>5</sub> リンカー、置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub> - C<sub>4</sub> リンカー、および置換されたまたは未置換のC<sub>3</sub> リンカーから選択される。いくつかの態様では、置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub> - C<sub>50</sub> リンカーはそれぞれ、置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカーである。そのような態様のいくつかでは、置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカーはそれぞれ、置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub> - C<sub>8</sub> リンカー、置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> リンカー、置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub> - C<sub>5</sub> リンカー、置換されたまたは未置換のC<sub>2</sub> - C<sub>4</sub> リンカー、または置換されたまたは未置換のC<sub>3</sub> リンカーである。

40

## 【 0 1 3 8 】

いくつかの態様では、V E G F アプタマーの1つ以上のヌクレオシドは、2位の糖修飾

50

(2'-アミノ(2'-NH<sub>2</sub>))、2'-フルオロ(2'-F)、または2'-O-メチル(2'-OMe)など)、シトシン環外アミンの修飾、ヌクレオシド間結合の修飾、および5'-メチル-シトシンから選択される修飾を含む。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、3'キャップ、5'キャップ、および/または3'末端に逆位のデオキシチミジンを含む。

【0139】

いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、少なくとも1つの修飾されたヌクレオシド間結合を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つの、少なくとも2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、または少なくとも5つのヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合である。

【0140】

いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、表10~14に示す配列から選択される配列を有する。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、K<sub>d</sub>が10nM未満の、表10~14に示す配列から選択される配列を有する。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、表10~14に示す配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一の配列を有する。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、K<sub>d</sub>が10nM未満の、表10~14に示す配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一の配列を有する。パーセント同一性は、参照配列がK<sub>d</sub>が10nM未満の、表10~14に示すVEGFアプタマー配列である以外は、上でPDGFアプタマーに関して定義したのと同様に決定される。

【0141】

いくつかの態様において本開示は、VEGFと結合するとVEGFの機能を調節するVEGFアプタマーを提供する。いくつかの態様では、VEGFアプタマーはVEGF受容体、例えばVEGFR1またはVEGFR2の、VEGF介在性リン酸化を阻害する。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、VEGF受容体のVEGF介在性リン酸化を阻害する。様々な態様では、VEGFアプタマーは、VEGFのインビボでの機能、例えばインビボにおけるVEGF介在性の受容体のリン酸化の阻害、を調節する。様々な態様では、VEGFアプタマーは、表10~14に示す配列から選択される配列を有する。様々な態様では、VEGFアプタマーは、K<sub>d</sub>が10nM未満の、表10~14に示すアプタマーから選択される。様々な態様では、VEGFアプタマーは、表10~14に示すアプタマーから選択される。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、K<sub>d</sub>が10nM未満の、配列表10~14に示す少なくとも12の、少なくとも13の、少なくとも14の、少なくとも15の、少なくとも16の、少なくとも17の、少なくとも18の、少なくとも19の、少なくとも20の、少なくとも21の、少なくとも21の、少なくとも22の、少なくとも23の、少なくとも24の、少なくとも25の、少なくとも26の、少なくとも27の、少なくとも28の、少なくとも29の、または少なくとも30の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、K<sub>d</sub>が10nM未満の、表10~14に示す配列と核酸塩基配列が同一の、少なくとも12の、少なくとも13の、少なくとも14の、少なくとも15の、少なくとも16の、少なくとも17の、少なくとも18の、少なくとも19の、少なくとも20の、少なくとも21の、少なくとも21の、少なくとも22の、少なくとも23の、少なくとも24の、少なくとも25の、少なくとも26の、少なくとも27の、少なくとも28の、少なくとも29の、または少なくとも30の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、VEGFアプタマーは、表10~14に示すアプタマーの、少なくとも12の、少なくとも13の、少なくとも14の、少なくとも15の、少なくとも16の、少なくとも17の、少なくとも18の、少なくとも19の、少なくとも20の、少なくとも21の、少なくとも21の、少なくとも22の、少なくとも23の、少なくとも24の、少なくとも25の、少なくとも2

10

20

30

40

50

6 の、少なくとも 27 の、少なくとも 28 の、少なくとも 29 の、または少なくとも 30 の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、VEGF アプタマーは、 $K_d$  が 10 nM 未満の、表 10 ~ 14 に示すアプタマーの少なくとも 12 の、少なくとも 13 の、少なくとも 14 の、少なくとも 15 の、少なくとも 16 の、少なくとも 17 の、少なくとも 18 の、少なくとも 19 の、少なくとも 20 の、少なくとも 21 の、少なくとも 21 の、少なくとも 22 の、少なくとも 23 の、少なくとも 24 の、少なくとも 25 の、少なくとも 26 の、少なくとも 27 の、少なくとも 28 の、少なくとも 29 の、または少なくとも 30 の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、VEGF アプタマーは、表 10 ~ 14 に示すアプタマーの、少なくとも 12 の、少なくとも 13 の、少なくとも 14 の、少なくとも 15 の、少なくとも 16 の、少なくとも 17 の、少なくとも 18 の、少なくとも 19 の、少なくとも 20 の、少なくとも 21 の、少なくとも 21 の、少なくとも 22 の、少なくとも 23 の、少なくとも 24 の、少なくとも 25 の、少なくとも 26 の、少なくとも 27 の、少なくとも 28 の、少なくとも 29 の、または少なくとも 30 の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、VEGF アプタマーは、 $K_d$  が 10 nM 未満の、表 10 ~ 14 に示すアプタマーの少なくとも 12 の、少なくとも 13 の、少なくとも 14 の、少なくとも 15 の、少なくとも 16 の、少なくとも 17 の、少なくとも 18 の、少なくとも 19 の、少なくとも 20 の、少なくとも 21 の、少なくとも 21 の、少なくとも 22 の、少なくとも 23 の、少なくとも 24 の、少なくとも 25 の、少なくとも 26 の、少なくとも 27 の、少なくとも 28 の、少なくとも 29 の、または少なくとも 30 の連続したヌクレオチドを含む。

10

20

**【0142】**

本明細書に記載の態様のいずれか 1 つでは、VEGF アプタマーは、アプタマーの 5' 末端、3' 末端、または 5' 末端と 3' 末端の両方に、追加のヌクレオチドまたは他の化学部分を含んでいてもよい。

**【0143】**

VEGF アプタマーは、VEGF 結合領域に加えて、いかなる数のヌクレオチドを含んでいてもよい。様々な態様では、VEGF アプタマーは、約 100 までのヌクレオチド、約 95 までのヌクレオチド、約 90 までのヌクレオチド、約 85 までのヌクレオチド、約 80 までのヌクレオチド、約 75 までのヌクレオチド、約 70 までのヌクレオチド、約 65 までのヌクレオチド、約 60 までのヌクレオチド、約 55 までのヌクレオチド、約 50 までのヌクレオチド、約 45 までのヌクレオチド、約 40 までのヌクレオチド、約 35 までのヌクレオチド、約 30 までのヌクレオチド、約 25 までのヌクレオチド、または約 20 までのヌクレオチドを含み得る。

30

**【0144】**

いくつかの態様では、VEGF アプタマーは、 $K_d$  が 10 nM 未満の、表 10 ~ 14 に示すアプタマーと同様の結合特徴、ならびに  $K_d$  が 10 nM 未満の、表 10 ~ 14 に示すアプタマーと同様の VEGF 関連性アテローム性動脈硬化症、黄斑変性、線維症、および癌の状態を治療する能力を有するアプタマーから選択される。いくつかの態様では、VEGF アプタマーは、 $K_d$  が 10 nM 未満の、表 10 ~ 14 に示すアプタマーから選択されるアプタマーと同様に、VEGF - 121 の同じ領域に結合する。いくつかの態様では、VEGF アプタマーは、 $K_d$  が 10 nM 未満の、表 10、11、12、13 または 14 に示す VEGF アプタマーと同様に、VEGF - 121 の同じ領域に結合する。いくつかの態様では、VEGF アプタマーは、VEGF アプタマー 4867 - 31 \_\_ 183 と同様に、VEGF - 121 の同じ領域に結合する。

40

**【0145】**

VEGF アプタマーが VEGF に対して、いかなる好適な解離定数 ( $K_d$ ) を有するように選択することができる。いくつかの態様では、VEGF アプタマーの VEGF - 121 に対する解離定数 ( $K_d$ ) は、30 nM 未満、25 nM 未満、20 nM 未満、15 nM 未満、10 nM 未満、9 nM 未満、8 nM 未満、7 nM 未満、6 nM 未満、5 nM 未満、4 nM 未満、3 nM 未満、2 nM 未満、または 1 nM 未満である。解離定数は下記実施例

50

3に記載したように、多点での力価測定を用いた結合アッセイを行い、式： $y = (\text{最大} - \text{最少}) \times (\text{タンパク質}) / (K_d + \text{タンパク質}) + \text{最少}$ 、に当てはめることで決定し得る。

【0146】

いくつかの態様では、アプタマー構築物は、本明細書に記載のVEGFアプタマーのいずれかから選択される第一のアプタマーと、本明細書に記載のVEGFアプタマーのいずれかを含む第二のアプタマーを含み、ここで第一のアプタマーと第二のアプタマーは同じであってもまたは異なっているいてもよい。VEGFアプタマー構築物の第一のアプタマーと第二のアプタマーは、共有的に結合していても、または非共有的に結合していてもよい。結合の非限定的な例は当該分野において知られており、および/または本明細書に記載されている。いくつかの態様では、VEGFアプタマー構築物は2つのVEGF単量体に同時に結合することができ得る。いくつかの態様では、VEGFアプタマー構築物は、VEGFに10nM未満の親和性( $K_d$ )で結合する。

10

【0147】

PDGF/VEGFアプタマー構築物の例

VEGFとPDGF-Bのシグナル伝達経路を併せて阻害することで、新しい血管の退行を伴って、腫瘍関連性のおよび眼の血管新生をより効率的に遮断できるということの証拠が多くある(Bergers, G., et al. (2003) J. Clin. Invest. 111:1287; Jo, N., et al. (2006) Am. J. Pathol. 168:2036)。この効果は、内皮細胞の密な細胞同士の関連を破壊することによって仲介され、それによって最初の毛細血管や外膜細胞(または周細胞)が形成され、これらは成熟に伴って新しい血管を取り囲み、血管のVEGF阻害剤に対する感受性を弱める(Benjamin, L. E., et al. (1998) Development 125:1591; Benjamin, L. E., et al. (1999) J. Clin. Invest. 103:159)。本明細書に記載のアプタマーはそのような二重阻害剤の基礎となる可能性がある。

20

【0148】

いくつかの態様では、PDGF/VEGFアプタマー構築物は、本明細書に記載のVEGFアプタマーのいずれかに連結された、本明細書に記載のPDGFアプタマーのいずれかを含む。いくつかの態様では、PDGF/VEGFアプタマー構築物は、 $K_d$ が10nM未満の、表10~14に示すVEGFアプタマーのいずれかに連結された、表1に示すPDGFアプタマーのいずれかを含む。結合は共有結合であっても非共有結合であってもよい。

30

【0149】

PDGF/VEGFアプタマー構築物は、PDGFアプタマーとVEGFアプタマーをどのような向きで含んでもよい。例えば、PDGFアプタマーは3'末端もしくは3'末端の付近で、VEGFアプタマーの5'末端もしくは5'末端付近の位置で連結されていても、またはVEGFアプタマーは3'末端もしくは3'末端の付近で、PDGFアプタマーの5'末端もしくは5'末端の付近で連結されていても、または構築物のそれぞれのアプタマーの結合特性を保存する他のいかなる向きで連結されていてもよい。

40

【0150】

結合が共有結合であるいくつかの態様では、PDGF/VEGFアプタマー構築物はリン酸結合またはホスホロチオエート結合を介して連結されていてもよい。他の多くの共有結合、例えば種々のリンカー部分(ヘキサエチレングリコールリンカー、ポリエチレングリコールリンカー、置換されたまたは未置換の炭化水素リンカーなどを含むがこれらには限定されない)を介した結合が想定される。当業者であれば、PDGFアプタマーをVEGFアプタマーに連結するために適した共有結合を選択することができる。

【0151】

いくつかの態様では、PDGFアプタマーとVEGFアプタマーは非共有結合で連結されている。非共有結合には、これらには限定されないが、ビオチン/ストレプトアビジン

50

；金属結合性ペプチド／金属；ハイブリダイズ可能な修飾されたおよび／または未修飾のオリゴヌクレオチド；など、が挙げられる。当業者であれば、PDGFアプタマーをVEGFアプタマーに連結させるための、適した非共有結合を選択することができる。

#### 【0152】

アプタマーおよびアプタマー構築物を含む医薬組成物

いくつかの態様では、本明細書に記載のアプタマーまたはアプタマー構築物を少なくとも1つと、少なくとも1つの薬学上許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。好適な担体は、Lippincott Williams & Wilkinsから出版されている「レミントンの薬学(Remington: The Science and Practice of Pharmacy)第21版」に記載されており、この文献は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に記載のアプタマーまたはアプタマー構築物を少なくとも1つと、少なくとも1つの薬学上許容可能な担体を含む医薬組成物は、PDGFまたはVEGF阻害剤ではない1つ以上活性薬剤を含んでいてもよい。

10

#### 【0153】

本明細書に記載のアプタマーを、薬学上許容可能な剤形のいずれにおいて使用してもよく、そのような剤形には、注入可能な剤形、分散液、ゲル、エアロゾル、軟膏、クリーム、凍結乾燥剤、乾燥粉末、錠剤、カプセル、制御放出性剤、易溶性剤、遅延放出性剤、持続放出性剤、律動的放出性剤、即時放出性剤と制御放出性剤の組み合わせ、などが挙げられるがこれらには限定されない。具体的には、本明細書に記載のアプタマーは、(a)経口、経肺、静脈内、動脈内、鞘内、関節内、直腸内、眼内、結腸内、非経口、槽内、腔内、腹腔内、局部、頬内、経鼻、および局所投与のいずれかから選択される投与用；(b)分散液、ゲル、エアロゾル、軟膏、クリーム、錠剤、サシェおよびカプセルのいずれかから選択される剤形；(c)凍結乾燥剤、乾燥粉末、易溶性剤、制御放出性剤、遅延放出性剤、持続放出性剤、律動的放出性剤、および即時放出性剤と制御放出性剤の組み合わせのいずれかから選択される剤形；または(d)それらの任意の組み合わせ、として製剤化することができる。

20

#### 【0154】

非経口、皮内、または皮下に用いるための溶液または懸濁液は、以下の成分を1つ以上含む場合がある：(1)無菌的な希釈剤（例えば、注射用の水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒）；(2)抗菌剤（例えばベンジルアルコールまたはメチルパラベン）；(3)酸化防止剤（例えばアスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム）；(4)キレート剤（例えばエチレンジアミン四酢酸）；(5)緩衝剤（例えば酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩）；および(5)浸透圧調節剤（例えば塩化ナトリウムまたはデキストロース）。pHは、酸または塩、例えば塩酸または水酸化ナトリウムで調整することができる。非経口用剤は、アンプル、使い捨てのシリンジまたは複数回投与用のガラス製もしくはプラスチック製のバイアルに封入することができる。

30

#### 【0155】

注入に適した医薬組成物は、無菌的な水溶液（水溶性の場合）または分散剤と、無菌的な注射用溶液または分散系を即時調製するための無菌的な粉末とを含んでいてもよい。静脈内投与に好適な担体としたは、生理食塩水、静菌性水、クレモフォールEL(BASF、パーシッパニー、ニュージャージー)またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)が挙げられる。全ての例において、組成物は無菌的、かつ、容易に注入できる程度の液性を有していなければならない。医薬組成物は、製造と保存の条件で安定でなくてはならず、かつ、細菌や真菌などの微生物の汚染作用から保護されていなくてはならない。用語「安定な」とは、本明細書で使用する場合、対象に投与するのに適した段階または状態に維持されていることを意味する。

40

#### 【0156】

担体は例えば、水、エタノール、多価アルコール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール、など）、およびそれらの好適な混合物

50

を含む、溶媒または分散媒であってよい。例えば、レシチンなどのコーティングを使用すること、分散液の場合には、要求される粒子サイズを維持すること、および界面活性剤を使用することにより、適した液性が維持され得る。微生物による作用の予防は、種々の抗菌剤や抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどの使用によって達成され得る。多くの場合、等張剤、例えば糖類、多価アルコール類（マンニトールまたはソルビトールなど）、および無機塩（塩化ナトリウムなど）が組成物中に含まれることが好ましい。吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムやゼラチンを組成物に加えることによって、注入可能な組成物の吸収を長引かせることができる。

#### 【0157】

無菌的な注入可能な溶液は、活性薬剤（例えば、アプタマー、および/またはアプタマー構築物）を、必要に応じて、上に挙げた成分のうちの1つまたは成分の組み合わせと共に、適切な量の適切な溶媒に加え、その後、濾過滅菌することで調製することができる。分散液は通常、少なくとも1つのアプタマー、および/またはアプタマー構築物を、基礎となる分散媒と他の任意の必要とされる成分とを含む、無菌的な媒体に加えることによって調製される。無菌的で注入可能な溶液を調製するための、無菌的な粉末の場合の調製方法の例としては、アプタマーおよび/またはアプタマー構築物と任意の所望の付加的な成分とを含む溶液を予め濾過滅菌しておき、それを真空乾燥および凍結乾燥することが挙げられ、いずれによっても粉末が得られる。

#### 【0158】

いくつかの態様では、アプタマーおよび/またはアプタマー構築物は、硝子体内注入用に製剤化される。硝子体内投与に好適な製剤については、例えば、に記載されている。眼への薬剤送達については、例えば、Rawas - Qalaji et al. (2012) Curr. Eye Res. 37: 345; Bochot et al. (2012) J. Control Release 161: 628; Yasukawa et al. (2011) Recent Pat. Drug Deliv. Formul. 5: 1; および Doshi et al. (2011) Semin. Ophthalmol. 26: 104で議論されている。いくつかの態様では、アプタマーおよび/またはアプタマー構築物を含む医薬組成物は、硝子体内注入により、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、5週間に1回、6週間に1回、7週間に1回、8週間に1回、9週間に1回、10週間に1回、11週間に1回、12週間に1回、または12週間に1回より少ない頻度で投与される。

#### 【0159】

経口投与用の組成物は通常、不活性な希釈剤または食用に適した担体を含んでいる。それらを、例えばゼラチンカプセルの中に封入するか、または錠剤として打錠することができる。経口治療用投与の目的では、アプタマーおよび/またはアプタマー構築物を賦形剤と混合し、錠剤、トローチ、またはカプセルの剤形として使用することができる。経口用組成物はまた、洗口剤として使用するための液体担体を使用して調製することができ、この場合液体担体に含まれている化合物は、口に入れられ、音をたててすすぐようにして使用され、その後、吐き出されるかまたは飲み込まれる。組成物の一部として、薬学上適切な結合剤および/または補助的な成分が含まれる場合もある。

#### 【0160】

吸入による投与では、化合物は、好適な噴射剤、例えば、二酸化炭素などのガス、好適な装置に由来する霧状になった液体、または乾燥粉末を含む加圧容器から、エアロゾルスプレーの形態で送達される。経粘膜または経皮的投与の場合には、製剤中に、浸透する障壁に適した浸透剤が使用される。そのような浸透剤は当該分野において一般的に知られており、また、例えば、経粘膜投与用には、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は鼻スプレーまたは座剤で達成することができる。経皮的投与用には、活性薬剤は、当該分野で一般的に知られているように、軟膏、膏薬、ゲル、またはクリームに製剤化される。また、薬剤は、座剤（例えば、ココア脂や多のグリセリド



などの標準的な座剤基剤と共に)または直腸送達用の浣腸の形態に調製することもできる。

#### 【0161】

いくつかの態様では、アプタマーおよび/またはアプタマー構築物は、身体からの迅速な排出に抵抗する担体とともに調製される。例えば、植込錠や被包性マイクロカプセル送達系などの制御放出性製剤を用いることができる。生分解性の、生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸、を使用することができる。そのような製剤の調製方法は当業者には明かである。材料はまた、Alza CorporationやNova Pharmaceuticals, Incから市販されているものを購入することもできる。

10

#### 【0162】

リポソーム懸濁液(ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を用いた、感染した細胞を標的としたリポソームを含む)を薬学上許容可能な担体として使用することもできる。これらは、例えば米国特許第4,522,811号に記載されている、当業者に知られている方法に従って調製することができる。

#### 【0163】

加えて、アプタマーおよび/またはアプタマー構築物の懸濁液は、適した油性の注入用懸濁液として調製してもよい。好適な親油性溶媒または媒体としては、脂肪油(例えばゴマ油)、または合成の脂肪酸エステル(例えばオレイン酸エチル)、トリグリセリド、またはリポソームが挙げられる。非脂質ポリカチオンアミノポリマーを送達のために使用してもよい。場合により懸濁液は、化合物の溶解度を高め、かつ、高濃度の溶液の調製を可能にするのに好適な安定剤または薬剤を含み得る。

20

#### 【0164】

いくつかの例では、投与を容易にし、かつ、用量を均一にするため、経口または非経口組成物を単位用量形態に製剤化することが特に有効である。本明細書で使用する場合、単位用量形態とは、治療する対象に対する単位用量として適した物理的に別個の単位を指し、それぞれの単位は、必要とされる医薬担体と共に、所望の治療効果を生じるように計算された、予め決められた量のアプタマーおよび/またはアプタマー構築物を含んでいる。本明細書に記載のアプタマーおよび/または構築物の単位容量形態の仕様は、特定のアプタマーおよび/またはアプタマー構築物の特徴および達成される特定の治療効果ならびに患者の治療の目的で、そのような活性薬剤を配合する分野に固有の制限によって規定され、かつ、それらに直接依存する。

30

#### 【0165】

アプタマーおよび/またはアプタマー構築物を少なくとも1つ含む医薬組成物は、1つ以上医薬賦形剤を含む場合がある。そのような賦形剤の例としては、これらには限定されないが、結合剤、増量剤、滑沢剤、沈殿防止剤、甘味料、矯味剤、防腐剤、緩衝剤、湿潤剤、崩壊剤、起泡剤、および他の賦形剤が挙げられる。そのような賦形剤は当該分野において知られている。賦形剤の例としては、(1)結合剤、例えば種々のセルロースおよび架橋ポリビニルピロリドン、微結晶セルロース、例えばアビセル(Avicel)(登録商標)PH101およびアビセル(登録商標)PH102、ケイ化微結晶セルロース(P

40

roSolvo SMC(登録商標))、トラガカントゴムおよびゼラチンなど;(2)増量剤、例えば種々のデンプン、乳糖、乳糖一水和物、および無水乳糖など;(3)崩壊剤、例えばアルギン酸、プリモジェル(Primogel)、コーンスターチ、弱く架橋したポリビニルピロリドン、馬鈴薯デンプン、トウモロコシデンプン、および加工デンプン類、クロスカルメロースナトリウム、クロスボイドン、デンプングリコール酸ナトリウム、およびそれらの混合物;(4)滑沢剤、例えば打錠する粉末の流動性に影響を及ぼす薬剤や、ステアリン酸マグネシウム、コロイド二酸化ケイ素、例えばエアロジル(Aerosil)(登録商標)200、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、およびシリカゲルなど;(5)流動促進剤、例えばコロイド二酸化ケイ素など;(6)防腐剤、例えばソルビン酸カリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸およびその

50

塩、パラヒドロキシ安息香酸の他のエステル、例えばブチルパラベン、アルコール類、例えばエチルアルコールまたはベンジルアルコール、フェノール化合物、例えばフェノール、または第四級化合物、例えば塩化ベンザルコニウム；（７）希釈剤、例えば薬学上許容可能な不活性な充填剤、例えば微結晶セルロース、乳糖、リン酸二水素カルシウム、糖類、および／または前述したものの任意の混合物；希釈剤例は、微結晶セルロース、例えばアビセル（登録商標）PH101とアビセル（登録商標）PH102を含む；乳糖、例えば乳糖一水和物、無水乳糖、およびファルマトース（Pharmatose）（登録商標）DCL21；リン酸二水素カルシウム、例えばエンコンプレス（Emcompress）（登録商標）；マンニトール；デンプン；ソルビトール；ショ糖；およびグルコース；（８）甘味料、例えばショ糖、サッカリン、キシリトール、サッカリンナトリウム、シクラメート、アスパルテーム、およびアセスルファムなどの、天然の甘味料または人工甘味料のいずれをも含む；（９）矯味剤、例えばペパーミント、サリチル酸メチル、オレンジ香料、マグナスイート（Magnasweet）（登録商標）（MAFCOの商標）、風船ガム香料、果実香料など；および（１０）起泡剤、例えば有機酸と炭酸塩または重炭酸塩などの起泡性の組み合わせ。好適な有機酸としては、例えば、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、フマル酸、アジピン酸、コハク酸、およびアルギン酸ならびに無水物および酸性塩が挙げられる。好適な炭酸塩および重炭酸塩としては、例えば、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、グリシン炭酸塩、Ｌ－リシン炭酸塩、および炭酸アルギニンが挙げられる。あるいは、起泡剤混合物の重炭酸ナトリウム成分だけが存在してもよい。

10

20

#### 【０１６６】

様々な態様では、本明細書に記載の製剤は実質的に純粋である。本明細書で使用する場合、「実質的に純粋」とは、活性成分（例えば、アプタマーおよび／またはアプタマー構築物）が、存在する主な種であること（すなわち、モルを基準として、組成物中に含まれる他のいずれの個々の種よりも多量に含まれていること）を意味している。いくつかの態様では、実質的に精製した画分が組成物であり、この場合、活性成分が、存在する全ての高分子種の少なくとも約５０パーセント（モルを基準として）を構成している。実質的に純粋な組成物は通常、組織物中に存在する全ての高分子種の少なくとも約８０％を上回る。様々な態様において実質的に純粋な組成物は、組織物中に存在する全ての高分子種の少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または少なくとも約９９

30

#### 【０１６７】

アプタマーおよびアプタマー構築物を含むキット

本開示は、本明細書に記載のアプタマーおよび／またはアプタマー構築物のいずれかを含むキットを提供する。そのようなキットは例えば、（１）少なくとも１つのアプタマーおよび／またはアプタマー構築物；および（２）少なくとも１つの薬学上許容可能な担体、例えば溶媒または溶液、を含む場合がある。付加的なキットの構成要素は場合により、例えば（１）本明細書で同定した薬学上許容可能な賦形剤、例えば安定剤、希釈剤など、のいずれか；（２）少なくとも１つの容器、バイアルまたはキットの構成要素を保持するおよび／または混合するための同様の装置；および（３）送達器具、を含む場合がある。

40

#### 【０１６８】

治療方法

本開示は、PDGFアプタマーまたはアプタマー構築物、VEGFアプタマーまたはアプタマー構築物および／またはVEGF/PDGFアプタマー構築物の使用を介した、病状の予防法または治療法（例えば、１つ以上症状を緩和する方法）を提供する。この方法は、治療上有効量のそのようなアプタマーおよび／またはアプタマー構築物を、それを必要とする対象に投与することを含む。記載のアプタマーはまた、予防的治療にも使用できる。いくつかの態様では、アプタマーおよび／またはアプタマー構築物経口的にまたは静

50

脈内に投与される。

【0169】

方法に用いられるアプタマーおよび／またはアプタマー構築物は、本明細書に記載のPDGFアプタマーまたはアプタマー構築物、VEGFアプタマーまたはアプタマー構築物および／またはVEGF/PDGFアプタマー構築物、あるいはその薬学上許容可能な塩、またはそのプロドラッグである可能性がある。

【0170】

患者または対象は、いかなる動物であってよく（ペット、家畜または野生の）、これらには限定されないが、ネコ、イヌ、ウマ、ブタおよびウシが含まれ、好ましくはヒトである。本明細書で使用する場合、患者、個人、および対象という用語は同じ意味で用いられ得る。

10

【0171】

本明細書で使用する場合、「治療する」とは、疾患、状態、または障害を治療する目的で、患者を管理・看護することであり、かつ、疾患、状態または障害の症状または合併症の発症を予防するために；疾患、状態、または障害の症状または合併症を緩和するために；あるいは疾患、状態または障害の存在を排除するために、アプタマーおよび／またはアプタマー構築物を患者に投与することを含む。より具体的には、「治療する」には、疾患（障害）の状態、疾患の進行、疾患の原因または他の異常な状態の少なくとも1つの有害な症状または影響を反転させること、和らげること、緩和すること、最小限にすること、抑制することまたは停止させることが含まれる。治療は通常、症状および／または病理が回復する間にわたって継続される。

20

【0172】

本明細書で使用する場合、「予防する」とは、全体的にもしくは部分的に予防すること；緩和するもしくは制御すること；抑える、小さくする、もしくは低下させること；または遅らせるもしくは停止させることを意味する。

【0173】

様々な態様では、本開示の組成物および方法は、心血管疾患、癌、線維症、腎臓疾患または眼科疾患の治療に用いられる。

【0174】

いくつかの態様では、本開示の化合物もしくはその薬学上許容可能な塩、またはプロドラッグを、上述した疾患状態を改善または根治する治療と組み合わせて投与することができる。本開示のアプタマーおよび／またはアプタマー構築物を含有する組成物は、例えば、1を上回るアプタマーを含み得る。いくつかの例においては、1つ以上のアプタマーを含有する組成物を、別の有用な心血管治療薬または抗癌剤または線維症治療薬などと併用して投与する。一般的には、そのような併用が知られている治療薬の、現在利用可能な剤形が好適である。

30

【0175】

「併用療法」（または「併用治療」）は、アプタマーおよび／またはアプタマー構築物組成物と少なくとも1つの第二の薬剤を、これら治療薬の相互作用に由来する有益な効果をもたらすことを意図した特定の治療計画の一環として、投与することを含む。併用の有益な効果としては、これらには限定されないが、治療薬の併用によって生じる、薬物動態学的なまたは薬力学的な相互作用が挙げられる。これら治療薬の併用投与は通常、決められた期間（選択される併用によって、一般に、分、時間、日または週にわたる）にかけて行われる。

40

【0176】

「併用療法」は、2種類以上のこれら治療薬を、偶然におよび人為的に本開示の併用をもたらす別個の単一療法の一貫として投与することを包含し得るが、これは一般的ではない。「併用療法」とは、これらの治療薬を順次投与することを包含することを意図している。つまりこの場合、それぞれの治療薬は、異なる時点で投与され、ならびにこれらの治療薬、つまり少なくとも2種類の治療薬は実質的に同時の様式で投与される。実質的に同

50

時の投与は、例えば、それぞれの治療薬を決まった割合で含む単一用量、またはそれぞれの治療薬の単回用量を複数、対象に投与することで達成することができる。

【0177】

アプタマーおよび/またはアプタマー構築物を使用する投与計画は、様々な要因、例えば、対象の型、種、年齢、体重、ジェンダーおよび医学的状態、など；治療する状態の重篤度；投与経路；対象の腎臓および肝臓の機能；ならびに使用される具体的なアプタマーおよび/またはアプタマー構築物もしくはその塩に従って選択される。標準的な技能を有する医師または獣医師は、状態を予防する、対抗する、または状態の進行を停止させるのに必要とされる組成物の有効量を容易に決定・指示することができる。

【0178】

用量、すなわち治療上有効量は通常、1日あたり、治療を受ける患者の体重1キログラムに対して約1  $\mu$ g ~ 約100mgの範囲である。

【実施例】

【0179】

以下の実施例は例証目的のみで提供され、添付の請求項で定義される本発明の範囲を限定するものではない。本明細書で述べられる全ての実施例は、当業者にとって周知で通常である標準の技術を用いて行われた。下記の実施例で述べられる通常の分子生物学的技術は、Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)のような標準の実験説明書で述べられている通り行うことができる。

【0180】

実施例1 PDGFアプタマーの選択と配列

候補混合物の調製：部分的にランダム化されたssDNAオリゴヌクレオチドの候補混合物はビオチン標識されたDNAテンプレートにアニールされたssDNAプライマーのポリメラーゼ伸長により調製された。

【0181】

SELEX条件：PDGF-BBタンパク質に対するアプタマーは、(Gold et al. (2010) *PLoS One* 5:e15004)に述べられている通り、Bn-dUがdTに置換されている40-ヌクレオチドランダム領域を含むライブラリからソマロジック社(SomaLogic Inc)により選択された。順方向プライマーは5' CGCCCTCTGTCCTCCATCTTC、逆方向プライマーは5' CGTTCTCGGTGGTGTTCである。PDGF-BBタンパク質はビオチン標識されストレプトアビジンMyOne-SA(Dynal)ビーズ上に分割された。遅い解離速度をもつアプタマーの優先的選択は動力学的検証を用いてなされた。この動力学的検証ではタンパク質-DNA複合体は10mM硫酸デキストランの存在下37°Cでインキュベートされ、連続したラウンドでインキュベーション時間を増加させタンパク質濃度を低下させた。動力学的検証は選択のラウンド4で始められ、最後の8回目のラウンドまで続けられた。インキュベーション時間はラウンド4は5分、ラウンド5-7は15分、ラウンド8は30分であった。

【0182】

プール配列決定：8回目のラウンドプールからのオリゴヌクレオチド配列はクローン化されいくつかのクローンは配列決定された。これは4149-8\_\_1に例示されるように、関連する配列のファミリーの同定につながった。

【0183】

PDGF SELEXプールのディープ配列決定：4149-8\_\_1アプタマーファミリー内配列のより完全な評価を行うため、8回目のラウンドプールは454パイロシークエンシング技術を用いて配列決定された。プールDNAは454プライマーで増幅されPCRの生成物は精製されSequal normalization plate(インビトロジェン(Invitrogen)カタログ番号A10510-01))を用いて標準化された。溶出液はそれぞれの増幅産物の大きさと純度を確かめるためにゲル上に流された。精製されたPCR生成物はコロラド州オーロラのコロラド大学ヘルスサイエンスセンター(University of C

10

20

30

40

50

olorado Health Science Center in Aurora CO)の454パイロシーケンシング設備で配列決定された。

#### 【0184】

454配列はCLUSTAL分析により4149-8\_\_1と配列比較された。プールからの配列のデータセットは10,803の完全長配列(すなわち両方のプライマー配列を含むこれらの配列)を含み、そのうち3,839が独特であった。これら3,839の独特な配列は、“5'ZACNCGCGZZZAAGCG”(同一性=0.65)、そしてここよりも上流で“ZZ”(同一性=1.0)についてモチーフ検索された。これらのモチーフの両方を含む配列が436あった。さらに、58の他の配列が最初のパターンを含んでいたが、概して低い同一性であり上流に明らかなヘアピン構造をもたなかった。436の配列はそして次のように配列比較された。(1)“ZZ”に対して、(2)ループの中心に対して、(3)“ZACNCGCGZZZAAGCG”に対して。全ての配列について、4149-8\_\_1とのそれぞれの位置での同一性率は図3Aに記載された通り計算された。

表1および2は配列の4149-8\_\_1アプタマーファミリーの代表的な配列の数を記載する。

#### 【0185】

アプタマー合成：固相合成に用いられた、修飾されたデオキシウリジン-5-カルボキサミドアミダイト試薬は以下のように調製された。5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-5-トリフルオロエトキシカルボニル-2'-デオキシウリジン (Nomura et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25:2784)を適切な一級アミンと濃縮し(RNH<sub>2</sub>, 1.2当量、Et<sub>3</sub>N、3当量、アセトニトリル中60°C、4時間)、2-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイトと3'-O-ホスホフィチジル化し(1.2当量、iPr<sub>2</sub>EtN、3当量、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、-10から0°C、4時間)、中性シリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィーで精製した(Still, et al. (1978) J. Org. Chem. 43:2923)。アプタマーはホスホラミダイトメソッド(Beaucage and Caruthers (1981) Tetrahedron Lett. 22:1859)を用いた固相合成により調製された。本明細書で開示される独特の塩基修飾のためプロトコルをいくらか修正した。脱トリチル化はトルエン中10%ジクロロ酢酸で45秒行われた。カップリングは1:1アセトニトリル:ジクロロメタン0.1M中で5-ベンジルメルカプトテトラゾールにより活性化され、3回5分間反応させることで行われた。カップリングおよび酸化は装置ベンダーの推奨に従って行われた。脱保護はt-ブチルアミン:メタノール:水1:1:2(Mullah 1998)で摂氏37度にて24時間反応させて行われた。アプタマーは200nmolスケールで合成され、既述のUVシャドウイングを用いて(Fitzwater and Polisky (1996) Methods Enzymol. 267:275)、Costar Spin-X(シリコン処理したガラスウールまたは紡いだポリプロピレンプレフィルターを含まない)およびメーカーの推奨あたりのアミコンYM3濃縮でポリアクリルアミドゲルから精製された。

#### 【0186】

修飾されたヌクレオチド構造の活性関係および親和性成熟化。8つのベンジル側鎖それぞれの結合への寄与を調べるため、特別に作成した、修飾されたdUホスホラミダイトのライブラリーを用いて5位変異体を化学的に合成することにより、別の系統的なポイント置換を連続的に行った。この目的のために、大きさ、極性、水素結合ドナーおよびアクセプターの配置、リンカー長さおよび5位置換基の配向性を変えることによりそれぞれの位置の微環境を調べることができるライブラリーがデザインされた。この分析に用いる官能基を選択するにあたり、もともとの修飾(この場合ベンジル基)、抗体の相補性決定領域(CDRs)で大きな比率を占めるアミノ酸側鎖(トリプトファン及びチロシンのような)(Mian, IS, et al. (1991) J. Mol. Biol. 217:133; Ramaraj T. et al. (2012) Biochim. Biophys. Acta. 1824:520)、および低分子薬物の“特権を持つ”断片(Welsch et al. (2010) Curr. Opin. Chem. Biol. 14:347)、をテーマに変異体を含もうと試みた。ある意味で、我々は抗体における親和性成熟化の要素と構造-活性関係(SAR)の最適化を

医薬品化学において組み合わせようと努力した。S E L E Xの間は単一の修飾されたヌクレオチドを利用したが、S E L E X後の最適化は修飾された単量体の合成のしやすさと固相合成との適合性にのみ制約された。

#### 【0187】

5位における14の代替部によるベンジル基の置換の効果は、解離定数として表された相対的な親和性とホスホ-P D G F R比で表された相対的なP D G F Rリン酸化とともに図1C、Dおよび図6Bに要約されている。5位にメチル基だけを有するd Tによる置換は最も強い変化を表し、その意味でタンパク質のアラニン系統の変異導入法(Cunningham, B.C. et al. (1989) Science 243:1330)に匹敵する。予想通り、これは修飾されたヌクレオチドの8つの位置のうち6つで最も耐性のない置換であった。例外はヌクレオチド1および7で、この位置で置換は良い耐性があった。これら2つの位置は他の多くの置換でも耐性があり、いくつかの置換では最高5倍までの結合親和性向上が得られた(図6B)。対照的に、ヌクレオチド8、17および18は変化に対し最も高い感受性を示した。最も良い単一の置換が組み合わせられ、4149-8\_\_255および4149-8\_\_260を含む追加の変異体を得られた(図6B)。ヌクレオチド17のフェネチル-d U(Pe-d U)およびヌクレオチド18のチオフエン-d U(Th-d U)を組み合わせたアプタマー4149-8\_\_260はP D G F-B BとP D G F-A Bの両方に優れた結合を示した(図6B)。最初に選択されたS O M A m e rの親和性が既に高く( $K_d = 20$  pM)結合試験の検出限界に達し、よって結合の向上程度が過小評価されている可能性があるという事は特筆に値する。我々は類似したS E L E X後の最適化戦略を、より弱い最初の結合で(例えば $K_d$ 値100 pMから10 nMの範囲)他のS O M A m e rにあてはめたところ、最高100倍までの親和性の向上が観察された。

#### 【0188】

P D G Fアプタマー4149-8\_\_260(S L 5)ホモ二量体:P D G Fは共有結合したホモ二量体を形成し、2つのS O M A m e rがそれぞれのP D G Fホモ二量体に結合することから、我々はホモ二量化したS O M A m e rの結合に対する影響を測定した。P D G Fアプタマーホモ二量体の親和性は結合活性効果により、対応するモノマーの親和性と比較して実質的に向上した。結晶構造はS O M A m e rの5'末端は38離れている一方、3'末端は74離れていることを示した。2つの地点の最も短いパスはタンパク質を二等分しているため、5'末端を3'末端に結合させるには少なくとも63必要である。容易に利用できる化学に基づいて2つの型のホモ二量体が注文された。1)H e gあたり~20の距離を提供する2つから6つのH e gリンカーに結合した頭-尾(頭-尾)ホモ二量体、2)1つから3つのH e gと組み合わせられた、合成のダブルサポートを介して結合した3'-3'ホモ二量体である。4149-8\_\_260のホモ二量体はP D G F-B B Z o r b a x結合試験法でテストされた。結合試験は限られた量のS O M A m e rを用いて行われ、タンパク質二量体あたり1つのS O M A m e rの結合とタンパク質二量体あたり2つのS O M A m e rの結合を区別しない。ホモ二量体の構造を表1(配列4149-8\_\_334から4149-8\_\_342)に示す。表1aに示す通り、Z o r b a x試験で得られた $K_d$ 値は、5'から3'の立体配置において、より長いリンカーが望ましく、結合親和性が最高10倍まで向上することを示した。3'-3'結合したホモ二量体では、より短いリンカーが実は長いリンカーよりも良く働いた。これは細胞のリン酸化の結果により裏付けられた。表1aを参照。

#### 【0189】

これらの配列に基づいた典型的なコンセンサス配列は次の通り。

5'-Z Z V C L<sub>n</sub> G V' Z A C N M G C G Z Z Z A Z A G C G-3'(配列番号502),

配列中、

VはA、CまたはGから選ばれ、

V'はC、GまたはZから選ばれ、V'はVに相補的であり、

Nは独立して任意の天然に存在するまたは修飾されたヌクレオチドから選ばれ、

10

20

30

40

50

MはCまたはAから選ばれ、

Zは独立して修飾されたピリミジンから選ばれ、Lは任意の天然に存在するまたは修飾されたヌクレオチド、炭化水素リンカー、ポリエチレングリコールリンカーまたはそれらの組み合わせから選ばれるスペーサーであり、

nは0から20であり、

1つまたは2つ以上のヌクレオチド挿入を含んでも良い。

【0190】

#### 配列切断試験

表3に示される通り、ヒトPDGF-BBへのアプタマーの完全な結合活性を維持するのに必要な最長の長さを定義するため、4149-8\_\_1の5'および3'末端からの系統的な切断が行われた。切断のサブセットの $K_d$ 値が示されている。Z = ベンジル-デオキシウリジン (Bn-dU)、A、C、GおよびTはデオキシリボヌクレオチドである。

【0191】

#### タンパク質発現と精製およびアプタマー複合体形成

結晶試験のため、組換えヒトPDGF-BBタンパク質がクリエイティブバイオマート (Creative BioMart (Shirley, NY)) から購入された。組換えタンパク質はE.coli細胞内に発現された。アプタマー溶液は解凍され95°Cまで5分加熱することでアニールされ、5分間40°Cでインキュベートされた後、室温まで冷まされた。アニールされたアプタマー溶液はタンパク質とDNA対タンパク質1:1:1で混合された。複合体は20mMのリン酸Na/K (pH7) および100mMのNaClを含む緩衝液で5倍希釈された。得られた混合物は、アミコン1.5mL遠心フィルター内でタンパク質中~4mg/mLに濃縮された。最終濃度は最終残余量から推定された。

【0192】

#### 実施例2 PDGFアプタマー複合体の結晶化および構造

結晶はコンパクトジュニアプレート (Emerald BioSystems, WA) 中シットティングドロップ蒸気拡散法結晶で16°Cで成長した。データ収集のための結晶は一次選別 (ProPlex, Molecular Dimensions) から得られた。PDGF-BB: 4149-8\_\_255複合体の結晶は100mM酢酸マグネシウム、100mM酢酸ナトリウム、(pH4.5) および8% (w/v) PEG8000から得られた。PDGF-BB: 4149-8\_\_260複合体の結晶は100mM酢酸マグネシウム、100mM酢酸ナトリウム、(pH6.5) および15% (w/v) PEG6000から得られた。結晶はLitho Loopsで採取され、33% (v/v) エチレングリコールを含む貯蔵液に素早く移して凍結保護され、液体窒素に直接漬けて瞬間冷却された。

【0193】

データ収集と構造決定: 両方の構造データはAdvanced Photon Source (アルゴン、イリノイ (Argonne, IL)) のビームライン19-IDに集められた。データセットはXDS (Kabsch 2010) を用いて処理された。PDGF-BB: 4149-8\_\_260複合体の構造は最初CCP4の一揃いのソフトウェア (CCP4, 1994) からPhaserを用いた分子置換によりサーチモデルとしてPDGF-BBベータ型PDGF受容体複合体 (PDB entry 3MJG) からPDGFのタンパク質モデルを使って相分析された。分子置換は非対称ユニットあたり単一のタンパク質単量体の位置を定めた。REFMACにおける抑制されたリファインメントの最初のラウンドに続く電子密度マップを調べたところタンパク質モデルに隣接する核酸と一致する特徴を示した。続いて“不正コピー”、すなわち部分的なモデルが反復したリファインメントのラウンドにかけられ、プロセスを通じてアプタマーのモデルが構築され、結果としてわずかに改良されたマップとなって、それにより更なるモデルが構築された。最初に、リン酸イオンが核酸骨格密度中に構築された。二番目に、リン酸がdT残基に置き換えられた。リファインメントの後、修飾された残基は正の差分電子密度の突出により識別されることができた。修飾された残基の同定はアプタマーの配列登録の決定を促進し、最後の段階でdT残基は正しい核酸塩基に置き換えられた。全てのマニュアル構築はCrystal

10

20

30

40

50

lographic Object-Oriented Toolkit (Coot) (Emsley & Cowtan, 2004)を用いて行われた。PDGF-BB: 4149-8\_\_255の構造は4149-8\_\_260複合体の完成したモデルを用いた分子置換により解析された。

#### 【0194】

それぞれの構造において、電子密度の突出がThr88およびThr90残基のO原子の電子密度に隣接して観察された。酵母中PDGF-Bの発現について、これらの部位においてO-マンノシル化が報告されたが(Settineri, et al., (1990))、E.coli中に発現されたPDGF-Bに類似の翻訳後の修飾を予想する理由はあまりない。観察された電子密度は完全占有よりも低いことを示唆したので、スレオニン残基は翻訳後の修飾なしにモデルされた。

10

#### 【0195】

表4はデータ収集統計とリファインメントおよび4149-8\_\_260(配列番号211)と4149-8\_\_255(配列番号207)との2つのアプタマーリガンドをそれぞれ開示している。

#### 【0196】

表5はB型DNAと比較したPDGFBBアプタマー塩基対パラメーターを示す。PDGFBBアプタマーは5'ステムループ領域およびミニノットの両方のステムで偏位したB型立体構造をとる。必要に応じて、平均値および標準偏差(カッコ内)が与えられている。アプタマーの値はweb3DNA(Zheng et al. (2009) Nucleic Acids Res. 37:W240)を用いた分析に基づいており、B-DNA値(高分解能結晶構造で見られた)はOlson, et al. (2001) J. Mol. Biol. 313(1): 229に記述報告されている通り3DNAを用いて決定された。

20

#### 【0197】

PDGF-BBの単量体のサブユニットはねじれシートを形成し、ねじれシートはタンパク質のシスチンノットファミリーに特徴的な逆平衡の配向で(Oefner et al. (1992) EMBO J. 11:3921)二量化する。SL5(4149-8\_\_260)は2つの相同部位を長軸のどちらかの末端で結合し、ホモ二量体の界面を交差して3つのPDGFループのそれぞれに接触する(図7A)。SOMAmerは疎水性の芳香族相互作用のネットワークで繋がれた2つの領域を含む(図7B)。5'末端において、短いステムはHegループでキャップされている(結晶構造中無秩序である)が、分子の残りの部分は非常に小さいH型のシュードノットの中に折りたたまれており(Aalberts, D.P. et al. (2005) Nucleic Acids Res. 33:2210)、修飾されたヌクレオチドはステムループ/シュードノット接合部でクラスター化している。珍しいことに、8つの全ての修飾されたヌクレオチドはPDGFと接触している。7つの修飾されたヌクレオチドはタンパク質上の疎水性の溝に沿って一緒にクラスター化する一方、Bn-dU1は伸長した立体構造の形をとり、PDGFホモ二量体界面のチャネルに追従する。2つの天然のヌクレオチドもまたPDGFに接触し、残りの天然のヌクレオチドは内部構造に寄与する(図2および図7)。SL5の二次構造の要素であるステムループおよびシュードノットは良く知られた核酸の構造モチーフである。しかしながら、修飾されたヌクレオチドを持つある従来の塩基は別の相互作用をする新しい官能基を提供する。SL5のこの際立った特徴により、基準および修飾されたヌクレオチド間の独特な分子内接触とタンパク質結合のための広範な疎水性表面がもたらされる。

30

40

#### 【0198】

SL5の3'末端はH型シュードノットの顕著な特徴を表すが(Staple, D.W. et al. (2005) PLoS Biol. 3:e213)、この分類はこの特徴的な“ミニノット”モチーフの特殊性を控えめに表現している。構造として報告された最も小さいH型シュードノットは21のヌクレオチドを必要とするのに比べて(Nonin-Lecomte S. et al. (2006) Nucleic Acids Res. 34:1847)、SL5ミニノットはたった16のヌクレオチドである(図7B)。さらに、ステム2(S2)の末端のmG24:dC12塩基対の消去により結合親和性は低

50



下しない(図3)。これは14ヌクレオチドミニノットの機能的完全性を示している。前例のない骨格のねじれおよびスタッキング相互作用により、ミニノットは、修飾されたヌクレオチドの疎水性部分の充填により安定化されることで著しく小さいサイズを達成した新しいシュードノットの変異体を表している。

#### 【0199】

ミニノットステム1(S1)が正式にはたった2つのWatson-Crick塩基対を含む(図8A)一方、Loop2(L2)は通常Pe-dU17、Th-dU18、dA19、Bn-dU20およびmA21の5つの塩基を含む。L2とS1間の相互作用はシュードノットの決定的な特徴であるが、それらは典型的に水素結合に限られている。対照的に、SOMAmerミニノットは一般的ではない塩基対に支えられた特殊なループ-ステムスタッキング相互作用を形成する。特に、S1はL2に由来するBn-dU17:Bn-dU20非標準塩基対とのスタッキングにより安定化し、効果的に新しい骨格不連続を持つ3つの塩基対S1を作る(図8Cおよび図8B)。前述のU:Uイミノカルボニル塩基対とは対照的に、Pe-dU17:Bn-dU20塩基対はBn-dU17のN3とBn-dU20のアミドリンカー中カルボニル酸素の間の単一の水素結合を利用する(図8D)。Bn-dU20のグリコシル結合についてのシン構造はBn-dU17との水素結合を妨げるが、Bn-dU8の糖と立体的な衝突なくBn20をBn-dU8塩基とスタックさせる。一般的でないPe-dU17:Bn-dU20塩基対はヌクレオチド18および20間の骨格を280°回転させることにより可能になる(図8C)。この劇的な鎖の逆転はBn-dU20塩基をdA9の糖にスタックさせPe-dU17と水素結合を形成する。重要なことに、Pe-dU17:Bn-dU20塩基対は修飾されたヌクレオチドに与えられた疎水性相互作用を通して更なる安定化を得る。Pe-dU17側鎖のエチレン(リンカー)部分はBn16(CH::)に向かっており、そのベンジル基は-端-面相互作用でBn2およびTh18とスタックしている(図8E)。L2とS1間の更なるもう1つの相互作用は塩基トリプル(mA21:dG15:dC10;図8F)であり、シュードノットにおける反復性のモチーフである(Chen, G. et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:12706)。これはSL5中唯一の修飾されたヌクレオチドに関与しない長距離三次相互作用である。

#### 【0200】

Loop1(L1)は単一の逸脱したヌクレオチドmA11を含む。mA11はmA11とdC12間の鎖内のリン酸距離をたった5.9に圧縮しながら骨格を急な94°回転させる(図8G)。H型シュードノットはしばしばL1に1つか2つのヌクレオチドを持つ。これはS2と水素結合を形成してらせん接合部にスタックする(Nonin-Lecomte, S. et al. (2006) Nucleic Acids Res. 34:1847; Michiels, P.J. et al. (2001) J. Mol. Biol. 310:1109)。押し出されたL1ヌクレオチドは5'ステム領域が修飾されたヌクレオチドの疎水性部分を通してミニノットと相互作用するために凝縮された構造を保つために必要である。予想通り、押し出された塩基は保存されず(図3)単一のC3スパーサーで置換され得る(図6A)。しかし、この消去は、おそらくミニノットの形成との干渉により、結合を抑制する。

#### 【0201】

ミニノットS1(dA9:Bn-dU16、dC10:dG15)のWatson-Crick塩基対はS2の鎖1が直接S1の鎖2に入る有利なH型シュードノットの配置により集合し、効率的なステムのスタッキングを提供する(Klein, D.J. et al. (2009) Nat. Struct. Mol. Biol. 16:343)。S2の3つの塩基対は完全にWatson-Crick相互作用を含み、わずかに弛緩ねじれのB型らせんを形成する(図8H)。この弛緩ねじれの結果、シュードノットポロジに予想されるA型らせんにより似たらせん状のパラメータになる。しかしこの構造中のらせんは距離が短くこれらの計算の関連性は不確かである。S1のdC10:dG15およびS2のdC14:dG22により形成された、接合部の激しいらせん状の過度のねじれにより(ねじれ角度70°)、S2はS1と従来の同軸性スタックを形成しない。ステムの連続したスタッキングはそれでも維持されdC14はdG15と、dG22は

塩基トリプルからのmA21とスタックする(図8H)。この接合部の広範ならせん状ねじれは塩基トリプルの形成のために少数の溝を広くする一方でmA21をS2の主要な溝に架橋させるのに必要である。この立体配置はL1に1つまたは2つのヌクレオチドを持つシュードノットに典型的である(Nonin-Lecomte, S. et al. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34:1847; Michiels, P.J. et al. (2001) *J. Mol. Biol.* 310:1109)。

#### 【0202】

SL55'ステムは2つのWatson-Crick塩基対(mA3:Bn-dU7およびdC4:dG6)およびステムの基部の非標準Bn-dU2:Bn-dU8塩基対を含む(図8I)。Bn-dU2:Bn-dU8塩基対は二つの水素結合を含む。典型的な4-カルボニル-N3およびBn-dU2塩基からBn-dU8結合のアミドリンカーへの独特の4-カルボニルである(図8J)。親和性を向上させたプール中の関連する配列の分析により、ステム基部の不変のBn-dU:Bn-dUブレースという注目すべき例外を持ちながら5'ステムの長さや塩基構成は可変であることが示された(図3AおよびB)。全体構造とSL5の機能におけるこの非標準塩基対の重要性を強調している。5'ステムらせんの安定性はPDGFのdU8、Bn20およびPro82のスタッキングにより更に支持された(図9H)。5'ステムループおよびSL5のミニノット領域は集合し、そこで骨格は鋭く111°に曲がる。5'ステムにおける塩基対の明らかなねじれ角度と放射状の置換は従来のB型らせんより大きなスタッキングの重なりを持つ(アンダーツイスティング(undertwisting)のため)塩基2-4および6-7をもたらず一方、Bn-dU8塩基は外側に出てBn-dU7塩基はBn-dU8のアミドリンカーとスタックする(図8I)。この特殊ならせんはSL5の残りの部分およびPDGFとの決定的な相互作用を促進する。Bn-dU8塩基はBn20とスタックする一方、Bn8は連続した-端-面相互作用においてBn16とBn20の環の間に垂直に位置する。これらの長距離三次相互作用はミニノットとステムループ領域間の精密なヒンジを定義する(図8Lおよび8K)。最初の2つのヌクレオチドに湾曲が欠如していることで環のスタッキングが増大し、Bn-dU1塩基がBn2と衝突することを防いでいる(図8I)。Bn2はBn7およびBn8(5'ステムから)およびBn16、Pe17およびBn20(ミニノットから)により作られた疎水性集合の中央部に位置している(図7B、図8Iおよび図8K)。この疎水性集合はSOMAmerの安定化に寄与する。これはSL5が、修飾されたヌクレオチドのないSL5類似体よりも30°Cを超えて高い64°CのT<sub>m</sub>を示すことで裏付けられた。

#### 【0203】

SL5に加えて、Bn-dU8がイソブチル-dU(iB-dU)で置換された以外はSL5と同一であるSL4(4149-8\_\_255)の構造も解明した。異なるSL4内でiB-dU8はPe-dU17およびTh-dU18を組み合わせたとき、SOMAmerは相当により弱い結合(SL5に対し~20-50-倍)と75-倍低いin vitroでの阻害活性を示した(図1A、図1Bおよび図6B)。より小さい非芳香族イソブチル側鎖は、SL5のBn-dU20、Bn-dU8およびBn-dU16のベンジル側鎖で見られるエネルギー的に有利な-端-面スタッキングを形成することができない(図8Mおよび図8N)。これはタンパク質界面における疎水性集合の中心に穴を形成し、5'ステムとミニノット領域の間のヒンジを効果的に開放する。この置換の構造的な効果はタンパク質の疎水性核におけるPheからLeuの変異に直接類似している。このようなタンパク質の変異はきちんと説明されており(Kadonosono, T. et al. (2003) *Biochemistry* 42:10651; Lin, H.J. et al. (2003) *Biochim. Biophys. Acta.* 1649:16; Baas, W.A. et al. (2010) *Protein Sci.* 19:631)、通常明らかな不安定化効果を有する。二次構造モチーフ間の接合部は核酸の三次構造の決定に重要な役割を果たすことが良く知られている(Pyle, A.M. et al. (2011) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21:293)。

#### 【0204】

著しく弱い標的 結合親和性にも関わらず、SL4はリガンドの非存在下SL5に類似した熱融解特性を示す(それぞれT<sub>m</sub>値62°Cと64°C)。これはSL4のiB-dU8

の置換により形成された空洞と変化した接合部トポロジーがタンパク質 結合界面を非安定化させる一方、SOMAmerの内部領域構造をそのまま残すという概念と一致する。溶液中のフリーなSOMAmerの立体構造はタンパク質との複合体のものとは非常に異なるかもしれない、 $T_m$ と結合親和性の間の関係も消えるかもしれない。実際、SOMAmerの大きな疎水性表面を溶媒和するエネルギーコストは相当であると考えられ、我々は複合化していないSOMAmerが疎水性の側鎖の周囲で崩壊し疎水性の側鎖が部分的に溶媒から守られている立体構造をとると予想する。

#### 【0205】

前述のタンパク質：アプタマー複合物と対照的に疎水性相互作用はSL5とPDGFの間の界面を支配する(図2、図4および図9)。PDGF-BBへの結合はSOMAmerあたり $\sim 1225^{-2}$ の埋もれた表面領域を形成する。SL5の8つの修飾されたヌクレオチドは広範な疎水性界面を形成し、この界面はPDGFの13の非極性アミノ酸(Ala35、Phe37、Leu38、Val39、Trp40、Pro42、Cys52、Cys53、Ile75、Ile77、Pro82、Ile83およびPhe84)と相互作用する。これは全体の非極性接触のおよそ半分を占め、残りはGlu24、Arg27、Asn36、Asn54、Asn55、Arg56、Arg73、Lys74、Lys80、Lys85およびLys86のような(図9)、極性のまたは荷電したアミノ酸の脂肪族の領域を含む。完全に非極性の残基と荷電したアミノ酸の非極性部分の間の類似した相互作用がタンパク質でしばしば観察される。よって、SOMAmerの修飾されたヌクレオチドがもたらす構造多様性はそれらがタンパク質に届きやすい相互作用の豊富なレパートリーを模倣することを可能にする。SOMAmerに作られた疎水性接触の程度を従来のアプタマーと比べたときの著しい違いは、界面の原子が標的のタンパク質表面に呈示されたときに明白である。SL5は塩基性アミノ酸に近接しているにもかかわらず著しく少ない極性接触を示し、PDGFとたった6つの水素結合と1つの電荷-電荷相互作用しか持たない(図4)。接触表面積と比較して、これは明らかにアプタマーに典型的なものより低い。6つの従来のアプタマーの水素結合および電荷-電荷相互作用の総数(これが極性接触)は相関係数0.91、 $100^{-2}$ の界面面積あたり平均 $1.9 \pm 0.4$ の極性接触で界面の面積に正比例してほぼ直線的に増加する(図10A、図22A)。他の共結晶構造における2つの追加のSOMAmerと同様、SL5は界面面積あたり半分より少ない数の極性接触で( $100^{-2}$ 界面面積あたり平均 $0.7 \pm 0.2$ )明らかにこの傾向の99%信頼区間から外れている一方、標的への結合親和性は高くなる傾向を示す(図22C)。リガンド効率(非水素接触原子あたりの結合自由エネルギー)(Kuntz, I.D. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9997)の観点では、アプタマーとSOMAmerの違いは見られず(図22C)、タンパク質に基づいたリガンドおよび低分子に基づいたリガンドで観察された値の範囲を包含する(Wells, J.A. et al. (2007) Nature 450:1001)。界面面積あたりの結合の自由エネルギーもまた類似している(図22C)。しかしながら極性接触あたりの結合自由エネルギーの値が異なり、SOMAmerがアプタマーよりも約2倍大きい(図22BおよびC)。これはSOMAmerが疎水性相互作用よりも結合に大きく寄与するという概念と一致する。

#### 【0206】

電荷-電荷相互作用はしばしば折りたたまれたタンパク質の安定性に $0.2 \text{ kcal/mol}$ よりも小さく寄与する(Sali, D. et al. (1991) J. Mol. Biol. 220:779)。対照的に、単一のメチレン基1つだけを埋め込むと球状のタンパク質の安定性および/または結合相互作用に $\sim 1 - 1.5 \text{ kcal/mol}$ 寄与すると見積もられている(Kellis, J.T., Jr. et al. (1988) Nature 333:784; Pace, C.N. et al. (2011) Mol. Biol. 408:514)。SOMAmer構造は疎水性相互作用に強く依存していることを明らかにしており、この意味では、それらのタンパク質への結合は典型的なタンパク質-タンパク質相互作用により類似している。この観察に一致して、PDGFに対するSL5の親和性は広範囲の塩濃度( $0.1$ から $1.0 \text{ M NaCl}$ )またはpH値( $5.0$ から $8.8$ )にわたって事実上減少しないことを示し、従来のアプタマーに見られる効果(Ahmad, K.M. et al. (2011)

PLoS ONE 6:e27051; Tang, Q. et al. (2007) J. Colloid. Interface. Sci. 315:99)と対照的である。

#### 【 0 2 0 7 】

S E L E X 後の最適化は形状相補性の微調整と疎水性充填相互作用を促進する。例えば、タンパク質界面の例外的な P e - d U 1 7 および T h - d U 1 8 の形状相補性 ( 図 1 0 B ) は構造 - 活性の関係により裏付けられる ( 図 6 B )。B n - d U 1 もまた、C y s 4 3 - C y s 5 2 ジスルフィド結合、および P D G F 鎖 1 の G l u 2 4 および鎖 2 の A r g 5 6 間の塩架橋により形成されたトンネル内に位置するベンジル環 ( 図 1 0 C ) で P D G F - B B と独特の相互作用を形成する。結晶構造は結合ポケットがより大きい二環性置換基を含む様々な側鎖を収容でき、よってこの部分のタンパク質との接触を強くすることを示唆している。実際、我々は 5 から 1 0 倍結合親和性を強化するこの部分のいくつかの修飾されたヌクレオチド置換基を同定した ( 図 6 B )。

#### 【 0 2 0 8 】

P D G F - B B : S L 5 構造の注目すべき特徴は S O M A m e r が P D G F R を模倣する程度である。受容体は P D G F 界面の 7 つの疎水性アミノ酸を含む疎水性相互作用を通して主に P D G F に結合する (Shim, A.H. et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:11307)。S L 5 結合部位はタンパク質上の同じ疎水性の溝を占める B n - d U 芳香族環を持つ受容体のそれと大きく重なっている ( 図 1 1 )。P D G F の受容体および S L 5 の両方との接触は 2 4 残基のうち 1 0 が共有されている。これらの共有されたまたは “ 入り交じった ” 残基は P D G F 表面の結合エネルギーのホットスポットを表すと考えられる (Wells, J.A. et al. (2007) Nature 450:1001; Clackson, T. et al. (1994) Science 267:383)。しかしながら、P D G F R と比較して、S L 5 は P D G F - B B に対し 1 0 倍高い親和性を表す (Lokker, N.A. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272: 33037)。これらの観察に一致して、S L 5 は P D G F - B B の阻害剤である ( 図 1 B および 図 6 B )。

#### 【 0 2 0 9 】

##### 実施例 3 結合親和性試験

標的結合親和性の測定のために、S O M A m e r は T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ ( ニューイングランドバイオラボ (New England Biolabs) ) および  $^{-32}\text{P}$  - A T P ( パーキンエルマー (Perkin Elmer) ) を用いて 5 ' 末端標識された。結合試験は放射性標識された S O M A m e r (  $\sim 20,000$  c.p.m ) を  $\sim 0.03 - 0.05$  nM の濃度で、また標的タンパク質を  $10^{-7}$  から  $10^{-12}$  M の濃度で 1 X S B 1 8 T 緩衝液 ( 40 mM の H E P E S 、 pH 7.5、120 mM の N a C l 、5 mM の K C l 、5 mM の M g C l <sub>2</sub> および 0.01 % T W E E N - 20 ) 中 37 °C で 30 分間インキュベートして行われた。

結合した複合体は Z o r b a x 樹脂と混合され D u r a p o r e フィルタープレートで捕獲された。S O M A m e r が結合した画分は P h o s p h o r I m a g e r ( F U J I F L A - 3000 ) で定量された。生の結合データは放射性標識された S O M A m e r の Z o r b a x 樹脂への非特異的なバックグラウンド結合について補正された。平衡解離定数 ( K d ) は既述の通り測定された (Jellinek et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:11227)。図 5 に示される通り、200 nM の濃度の競合 t R N A がアイソフォーム特異性試験に含まれた。P D G F - B B / S O M A m e r と E 1 0 0 3 0 の相互作用への塩依存性を測定するために、結合親和性試験が 40 mM H e p e s pH 7.5、0.01 % T W E E N - 20 および、100 mM、250 mM、500 mM、750 mM または 1.0 M のいずれかの濃度の N a C l の存在下で、前述の通り行われ分析された。塩濃度対解離定数の  $\log - \log$  プロットは単純な線形回帰を用いてあてはめられた。Manning, G. S. (1969) J. Chem. Phys. 51:924 でカウンターイオン凝縮理論に説明されている通り、プロットの傾きはタンパク質結合の際 D N A から遊離したカウンターイオンの数を表す。従来のアプタマーでみられた効果 (Ahmad, K.M. et al. (2011) PLoS One 6:e27051; Tang, Q. et al. (2007) J. Colloid. Interface Sci. 315: 99) と対照的に、アプタマー 4 1 4 9 - 8 \_ 2 6 0 ( 配列番号 2 1 1 ) の P D G F に対する親和性は広範囲の塩濃度 ( 0.1 から 1.0 M N a C l ) または pH 値 ( 5.0 から 8.8 ) にわたりほとんど変化を示

さなかった。

【0210】

実施例4 PDGF-BB細胞リン酸化試験

PDGF-BB活性: PDGF-BBSOMAmerのPDGFR 活性阻害能力を試験するため、Hs27ヒト包皮線維芽細胞(アメリカンタイプカルチャーコレクション(American Type Culture Collection))は96ウェルプレートに5000細胞/ウェルで播種され、24時間血清飢餓培養された。SOMAmer(図に示された通りの異なる濃度)はPDGF-BB(20ng/mL)(クリエイティブバイオマート(Creative BioMart))と血清を含まない培地中30分間37°Cでインキュベートされ、血清飢餓培養されたHs27に複合体が加えられた。5分間の刺激の後、上清は捨てられ細胞は氷上で5分間溶解緩衝液#9(アールアンドディーシステムズ(R&D Systems): 1%NP-40代替品、20mM Tris(pH8.0)、137mM NaCl, 10%グリセロール、2mM EDTA、1mM活性化オルトバナジウム酸ナトリウム、10μg/mLアプロチニン、および10μg/mLロイペプチン)に溶解された。リン酸-PDGFR のイライザ検出はDuoSet Phospho-PDGFR kit(アールアンドディーシステムズ(R&D Systems))を用いてメーカーの説明に従って行われた。リン酸-PDGFR の割合はOD450で測定され、刺激物質の対照なしにプレートの吸収とバックグラウンドの信号について補正された。実験は通常2連または3連で行われた。データはGraphPad Prism 3.0でプロットされ線形回帰を用いて一部位競合曲線にあてはめられた。SOMAmer4149-8\_\_379およびアミノリンカーで修飾されたSOMAmer4149-8\_\_379のIC<sub>50</sub>測定の代表的なプロットを図13に示す。IC<sub>50</sub>値はそれぞれ1.6nMおよび1.7nMである。

【0211】

クローン4149-8の変異体の活性スクリーニングとして、Hs27線維芽細胞のPDGF-BB誘導PDGFR リン酸化の阻害率が、SOMAmer変異体の単一の濃度(通常20nM)以外は上述したものと同じ条件で評価された。

【0212】

実施例5 Nap-dU修飾に基づいた追加のPDGFRリガンド

PDGF-BBに高い親和性で結合する追加のアプタマーを同定するため、我々はNap-dU修飾されたヌクレオチドを含むライブラリで別のSELEX実験を行った。選別は実施例1で前述されたものと実質的に類似したやり方で行われ、Nap-dUアプタマーククローン5169-4を得た。

【0213】

PDGFNaP-dU SELEXプールのディープシーケンシング: 5169-4\_\_1アプタマーファミリー内の配列をより完全に評価するため、7回目のラウンドプールが454パイロシーケンシング技術を用いてシーケンスされた。プールDNAは454プライマーで増幅されPCR生成物は精製されSequal normalization plate(インビトロジェン(Invitrogen)カタログ番号A10510-01))を用いて標準化された溶出液はそれぞれの増幅産物の大きさと純度を確かめるためゲルに流された。精製されたPCR生成物は、コロラド州オーロラのコロラド大学ヘルスサイエンスセンター(University of Colorado Health Sciences Center in Aurora, CO)の454パイロシーケンシング設備で配列決定された。

【0214】

プールからのシーケンスのデータセットは8273の全長の配列を含んでおり(すなわちこれらの配列は両方のプライマーの配列を含む)、そのうち1629は独特であった。これらの1629の独特の配列は、4-merから30-merまで全ての有り得るn-merを数えることにより統計的に有意なn-merパターンを探すのに使われた。それぞれの同定されたn-merの数と、同じ構成のプールからのn-merとして無作為に予想された数を比較することにより、統計的に有意なパターンが見つかった。この配列セットで2つの主要なパターンが同定され、11の配列に見つかった保存されている配列

モチーフ “ A P G P A P G C A C A P C P ” により定義された 2 つのパターン内で 5 1 6 9 - 4 \_\_ 1 が整列しているのが見つかった。このモチーフ ( 同一性 = 0 . 7 5 ) の全ての独特の配列の探索により 5 1 の配列が見つかり、モチーフにより整列された。全ての配列に対して、整列のそれぞれの位置における小部分の同一性は図 1 4 に記載された通り示されたコンセンサス配列を用いて計算された。

#### 【 0 2 1 5 】

配列切断試験：表 6 に示される通り、アプタマーのヒト P D G F - B B への完全な結合活性を保持するのに必要な最短の長さを定義するため、5 0 ヌクレオチド 5 1 6 9 - 4 クロンの 5 ' および 3 ' 末端からの系統的な切断が行われた。これらの切断の K d 値が示されている ( P = ナフチルデオキシウリジン ( N a p - d U ) ; A、C、G および T はデオキシリボヌクレオチド)。5 1 6 9 - 4 クロンは切断にかなり適していることを証明し 5 0 - m e r と比べて向上した結合親和性で P D G F - B B に結合する 2 1 - ヌクレオチド配列 ( それぞれ 1 7 p M と 2 9 p M ) が同定された ( 5 1 6 9 - 4 \_\_ 2 6 )。5 1 6 9 - 4 \_\_ 2 6 2 1 - m e r は 5 N a p - d U 修飾されたヌクレオチドを含んでいたのに対し 5 0 m e r は 9 N a p - d U 修飾されたヌクレオチドを含んでいた。

#### 【 0 2 1 6 】

5 1 6 9 - 4 \_\_ 2 6 ( 2 1 - m e r ) における C 3 スペースー単一置換 N a p - d U P D G F - B B アプタマーの S E L E X 後の修飾最初のラウンドは、2 1 - m e r 5 1 6 9 - 4 \_\_ 2 6 中全ての位置に C 3 スペースー歩行 ( walk ) を含んでいた。C 3 スペースー歩行は、潜在的に一斉に除くことができ C 3 スペースーやヘキサエチレングリコール ( H e g ) またはポリエチレングリコール ( P E G ) のようなリンカーに置換される、高い親和性結合に必要でない塩基を同定することを意図されている。C 3 スペースー置換の結果は表 7 に示されている。この表中、“ P ” は N a p - d U、“ C 3 ” は C 3 スペースー、A、C および G はデオキシリボヌクレオチド、そして“ N B ” は最高 1 0 0 n M P D G F - B B まで結合がないことを表す。3 つのサイトが結合親和性のわずかな減少を伴いながら C 3 置換を許容した。C 1、G 6 および C 7 である ( 番号付けは下記に示す通り 2 1 - m e r を参照している )。1 つの位置、C 1 5 は 5 1 6 9 - 4 \_\_ 2 6 と比較して結合親和性に影響なく C 3 スペースー置換を許容した。

#### 【 0 2 1 7 】

5 1 6 9 - 4 \_\_ 2 6 ( 2 1 - m e r ) 中の 2 ' - O - メチル単一置換。このヌクレアーゼ - 抵抗性置換を許容できる位置を同定するため、全ての天然塩基において 2 ' - O - メチル置換がなされた。我々の研究所で合成された 2 ' - O - メチル N a p ホスホラミダイト ( N a p - m U ) を用いて、我々は N a p - m U 単一置換を許容するであろう N a p - d U の位置も評価した。加えて、それぞれの N a p - d U の重要性を評価するためデオキシチミジン ( T ) が N a p - d U に置換された。結合親和性の結果は表 8 に示され、全ての位置は異なる程度で 2 ' - O - メチル置換を許容したことを実証する。結合親和性が最高 2 倍まで減少した 5 1 6 9 - 4 \_\_ 2 6 に比べ、それぞれのデオキシチミジン位置 ( C ) における 2 ' - O - メチル置換の影響は結合親和性に変化をもたらさなかった。4 つのデオキシグアノシン位置 ( C ) は 2 ' - O - メチルで置換されたとき、5 1 6 9 - 4 \_\_ 2 6 と比較して、G 1 4 における 2 . 5 倍の親和性の増加から G 1 0 における 5 . 5 倍の親和性の減少まで異なる結果を示した。6 つのデオキシアデノシン位置 ( A ) における 2 ' - O - メチル置換はゼロから 5 0 倍よりも大きい結合親和性への有害作用を示した。最も 2 ' - O - メチル置換に感受性が高かったのはアプタマーの 5 ' 末端に向かうデオキシアデノシン ( A 3、A 5 および A 8 ) の 3 つであった。位置 1 1 における N a p - m U 置換が 5 1 6 9 - 4 \_\_ 2 6 と比較して 2 . 5 倍の結合親和性の減少を示した一方、位置 2 1 の N a p - d U だけが結合親和性に影響することなく N a p - m U 置換を完全に許容した。残りの N a p - m U 置換は 1 5 から 3 0 倍の結合親和性の減少をもたらした。完全に結合を除去した ( P D G F - B B 濃度最高 1 0 0 n M までにおいて ) 唯一の置換は位置 1 2 と 2 1 におけるデオキシチミジン置換で、残りのデオキシチミジン置換は結合親和性に明らかなネガティブ作用 ( > 4 0 0 倍 ) を示した。表 8 において、P = 5 ナフタレン修飾された d

U, 上付き文字 1 は 2' - O - メチル修飾されたヌクレオシドを示す。A、C、G および T は天然に存在するデオキシリボヌクレオチドを表し “NB” は最高 100 nM PDGF - BB まで結合がなかったことを示す。

#### 【0218】

5169 - 4\_\_26 (21-mer) における複数の 2' - O - メチル置換。5169 - 4\_\_26 における 2' - O - メチル置換の組み合わせられた効果は、向上した結合親和性をもついくつかの変異体の同定につながった。この 21-mer は 2' - O - メチルでヌクレアーゼ保護され結合親和性が親切断 5169 - 4\_\_26 より少なくとも 20 倍大きい (それぞれ 0.60 pM 対 17 pM) 11 位置を持つ。多くの他の変異体もまた、3 から 10 の 2' - O - メチルにより明らかな結合親和性の向上 (およそ 3 倍) を示す。表 9 中、P = 5 - ナフタレン修飾された dU, 上付き文字 1 は 2' - O - メチル修飾されたヌクレオシドを示し、A、C、G および T は天然に存在するデオキシリボヌクレオチドを表し “NB” は最高 3.2 nM PDGF - BB まで結合がなかったことを示す。

#### 【0219】

##### 実施例 6 PDGFNap - dU アプタマー活性試験

PDGFNap - dU アプタマーの PDGFR 活性化に対する阻害的影響を分析するため、細胞リン酸化阻害試験が実施例 4 に述べられた通り行われた。テストされた 4 つのアプタマー配列は PDGFR 活性化を阻害した。IC50 値は次の通り: 5169 - 4\_\_26, IC50 = 1.6 nM; 5169 - 4\_\_84, IC50 = 3.3 nM; 5169 - 4\_\_85, IC50 = 7.3 nM; 5169 - 4\_\_112, IC50 = 1.0 nM。

#### 【0220】

##### 実施例 7 VEGF アプタマーの選択と配列

候補混合物の調製: 部分的にランダム化された ssDNA オリゴヌクレオチドの候補混合物は、ビオチン標識された ssDNA テンプレートにアニールされた DNA プライマーのポリメラーゼ伸長により調製された。

#### 【0221】

VEGFSELEX 条件: 組換えヒト VEGF - 121 タンパク質に対するアプタマー (どちらもアールアンドディーシステムズ (R&D Systems)) はソマロジック社 (SomaLogic Inc) により既述の通り (Gold et al. (2010) PLoS One 5:e15004)、Nap - dU が dT に置換された 40 ヌクレオチドランダム領域を含むライブラリから選択された。VEGF - 121 について、順方向プライマーは 5' - GCCACACCCCTGCCCTC - 3'、逆方向プライマーは 5' - GAGGACACAGACAGACAC - 3' であった。VEGF - 121 タンパク質はビオチン標識されストレプトアビジン MyOne - SA (Dynal) ビーズ上に分割された。遅い解離速度を持つアプタマーの優先的選択は動力学的検証を用いて達成された。タンパク質 - DNA 複合体が 10 mM デキストラン硫酸の存在下 37°C で、連続的なラウンドでインキュベーション時間を増加させタンパク質濃度を減少させてインキュベートされた。VEGF - 121 SELEX 中、ラウンド 4 および 5 は 15 分間の動力学的検証を含み、ラウンド 6 および 7 (最終ラウンド) は 30 分間の動力学的検証を含んだ。

#### 【0222】

最も小さな血管内皮成長因子の選択的にスプライシングされた型である VEGF - 121 は SELEX にとって難しいタンパク質標的である。天然に存在する DNA または RNA のライブラリを用いて、または 2' 位置で修飾された核酸ライブラリを用いて、我々は以前わずかな程度の親和性の向上すら得ることができなかった。これは 2 つの理由から注目すべきである。最初に、シスチンノットスーパーファミリーのメンバーの中で VEGF - 121 は 124 C 原子に対し平均二乗偏差 1.9 (Muller et al., 1997) という最も高い PDGF - BB との構造的類似性を持つ。二番目に、より大きく最も蔓延している VEGF アイソフォームである VEGF - 165 は SELEX の良い標的であることを証明した。例えば、今までで規制認可を受けた唯一のアプタマーに基づく治療薬 (黄斑変性症の治療) である pegaptanib (Macugen) は、VEGF - 121 (Lee

et al., 2005; Ruckman et al., 1998)にはない、ヘパリンに結合しているエキソン 7 がエンコードする領域を通して V E G F - 1 6 5 にのみ結合する。V E G F - 1 2 1, V E G F - 1 6 5 および P D G F - B B の 1 つの違いは全体の電荷であり p I 値はそれぞれ 5.8, 8.5 および 10.1 である。これはアプタマー結合における極性相互作用の重要性を指摘する。成功した V E G F - 1 2 1 の親和性の強化は最終的に S E L E X N a p - d U ライブラリで達成された。

#### 【0223】

V E G F - 1 2 1 N a p - d U アプタマー配列：単一の位置が異なる 2 つの関連した高親和性変異体 (4 8 6 7 - 1 5 および 4 8 6 7 - 3 1) が上述の通り行われた N a p - d U S E L E X 実験から同定された。クローン 4 8 6 7 - 3 1 は一連の欠失実験で 2 9 - m e r に切断された (表 7)。単一のヌクレオチドの違いは最小配列の 5' 境界の外側であるため、両方の高親和性クローン (4 8 6 7 - 1 5 および 4 8 6 7 - 3 1) の切断は結果として同じ 2 9 - m e r になったことは注目に値する。高い親和性結合でより短い配列を囲む、切断された変異体 2 9 - m e r 4 8 6 7 - 3 1 \_ 1 4 3 (5' - C C G P P C A A G P G C P P G P A G G A P P P A A A P G G - 3'; "P" は N a p - d U を一文字で表す記号) およびそれに近い変異体は、0.1 - 1 n M (表 10) の範囲の同程度の親和性で、ヒト V E G F - 1 2 1、ヒト V E G F - 1 6 5、マウス V E G F - 1 2 0 およびラット V E G F - 1 6 4 と結合する。この表中、"P" は N a p - d U を示し、A, C および G は天然に存在するデオキシリボヌクレオチドを表し "N B" は最高 1 0 0 n M V E G F まで結合がなかったことを示す。

#### 【0224】

4 8 6 7 - 1 5 \_ 2 (5 0 - m e r) における C 3 スペースー単一置換。V E G F - 1 2 1 アプタマーの S E L E X 後の修飾の最初のラウンドは 5 0 m e r 4 8 6 7 - 1 5 \_ 2 (切断された 5 0 m e r) の全ての位置での C 3 スペースー歩行であった。C 3 スペースー歩行は潜在的に一齐に除くことができ C 3 スペースーやヘキサエチレングリコール (H e g) またはポリエチレングリコール (P E G) のような他のリンカーに置換される、高い親和性結合に必要なでない塩基を同定することを意図されている。C 3 スペースー置換の結果は表 11 に示されている。この表中、"P" は N a p - d U を示し、"V" は C 3 スペースーを示し、A, C および G は天然に存在するデオキシリボヌクレオチドを表し "N B" は最高 1 0 0 n M V E G F まで結合がなかったことを示す。少なくとも 3 つの内部部位が C 3 置換を許容した。C 1 7, G 2 6 および G 2 9 である (下記に示す通り番号付けは 5 0 - m e r を参照)。

#### 【0225】

4 8 6 7 - 3 1 \_ 4 3 (3 2 - m e r) における 2' - O - メチル単一置換。ヌクレオチド耐性置換を許容する位置を同定するため、天然の塩基に 2' - O - メチル置換がなされた。さらに、それぞれの N a p - d U の重要性を評価するため 2' - O M e - ウリジン (O M e U) が N a p - d U に置換された。さらに、C 3 スペースーが、現在 3 2 m e r のコンテキスト(context)中で、押し出された塩基であると仮定された内部の位置でテストされた。内部欠失および替わりの塩基も 3 つのそれぞれの位置でテストされた。選ばれた S O M A m e r (単一濃度 2 0 n M) の結合親和性および細胞培養阻害データは以下に示されている。結果は表 12 に示され、C 8 (表 11 中の C 1 7) はより短い切断のコンテキスト中で C 3 への置換を完全には許容しなかったことを表す。このコンテキスト中、他の 2 つの推定上の押し出された塩基 (G 1 7 および G 2 0) は、C 3 または替わりの塩基置換の際良好な結合および機能的活性を保持する。これらの位置での内部欠失は許容されなかった。この実験において 2' O M e - U 置換され得る N a p - d U 修飾はなかった。しかしいくつかの内部部位が 2' O M e 修飾を許容した。表 12 中、P = 5 - ナフタレン修飾された d U, 上付き文字 1 は 2' - O - メチル修飾されたヌクレオシド、V 3 = 炭素スペースー, および空の四角はヌクレオシドの欠失を示す。A, C, G および T は天然に存在するデオキシリボヌクレオチドを表す。

#### 【0226】



4 8 6 7 - 3 1 \_\_ 1 4 3 ( 2 9 - m e r ) の 2 ' - O - メチル N a p - d U 置換と複数の 2 ' - O - メチル置換。我々の研究所で合成された 2 ' - O - メチル N a p ホスホラミダイト ( N a p - m U ) を用いて、我々は N a p - m U 単一置換を許容するであろう N a p - d U 位置を評価した。さらに、天然塩基のそれぞれにおいて 2 ' O M e と C 3 リンカー置換の組み合わせをテストした。選択された S O M A m e r ( 単一濃度 2 0 n M ) の結合親和性と細胞培養阻害データを以下に示す。N a p - d U 残基のほとんどは O M e 置換を許容しなかったが、位置 2 2 での N a p - m U の N a p - d U 残基への置換は 1 0 倍親和性と阻害活性が素晴らしく向上した。この表中上付き文字 1 は 2 ' - O - メチル置換、“ V ” は C 3 スペースを表す。2 ' - O M e の組み合わせは親和性に基づいてほとんど良く許容されたが、いくつかの組み合わせでは著しく阻害活性が失われた。

10

## 【 0 2 2 7 】

2 ' - O - メチルと C 3 置換の組み合わせられた効果は、変異体 4 8 6 7 - 3 1 \_\_ 1 8 8 を含むいくつかの結合親和性が向上した変異体の同定につながった。この 2 9 - m e r は 2 ' O M e または C 3 でヌクレアーゼ保護され結合親和性は親切断 4 8 6 7 - 3 1 \_\_ 1 4 3 よりも 3 倍高い ( それぞれ 3 8 p M 対 1 4 0 p M ) 1 0 位置を持つ。変異体 4 8 6 7 - 3 1 \_\_ 1 8 8 は親 S O M A m e r に匹敵する阻害活性を保持する。表 1 3 参照のこと。

## 【 0 2 2 8 】

N a p - m U を許容した唯一の位置はヌクレオチド 2 2 ( 4 8 6 7 - 3 1 \_\_ 1 4 3 切断を親配列として使用 ) であった。この N a p - m U 置換は次に、最もよい 2 ' O M e S O M A m e r の組み合わせである 4 8 6 7 - 3 1 \_\_ 1 8 8 のバックグランドに入れられた。さらに、C 3 スペースを持つ位置 1 5 におけるももとの d G の置換はその位置で 2 ' O M e 置換と比較された。ヌクレアーゼ保護された塩基が分子に強剛性を与え、それにより結合が強くなる可能性を検証するためである。最も良い凝集結果は 4 8 6 7 - 3 1 \_\_ 1 9 2 で得られた。2 9 - m e r に切断された親変異体 4 8 6 7 - 3 1 \_\_ 1 4 3 と比較して、4 8 6 7 - 3 1 \_\_ 1 9 2 は 9 つの保護された位置を持つ ( 下記表 1 4 参照、上付き文字 1 は 2 ' - O - メチル置換、“ V ” は C 3 スペースを表す ) 。

20

## 【 0 2 2 9 】

修飾されたヌクレオチド構造と活性の関係および親和性成熟：結合に対する 1 0 のナフチル側鎖それぞれの寄与を調べるため、我々は、特別に作成した修飾された d U ホスホラミダイトのライブラリとともに化学的に合成した 5 - 位置変異体により他の一連の系統的なポイント置換を行った。この目的のため、我々は大きさ、極性、水素結合ドナーおよびアクセプターの配置、リンカーの長さ、および 5 - 位置置換を変化させることによりそれぞれの位置の微小環境を実証するライブラリをデザインした。この分析のための官能基を選択するうえで我々は、ももとの修飾 ( この場合ナフチル基 ) 、抗体の相補性決定領域 ( C D R ) において大きな比率を占めるアミノ酸側鎖 ( Mian, I. S. et al. (1991) J. Mol. Biol. 217:133; Ramaraj, T. et al. (2012) Biochim. Biophys. Acta. 1824:520 ) ( トリプトファンおよびチロシンのような ) 、および低分子薬物の “ 特権を持つ ” 断片 ( 1 7 ) 、というテーマの変異体を含むことを目的とした。図 1 5 はこれらの置換の結果を示す。結果は K d 値の比 ( 置換された / 置換されていない ) として表される。1 0 の N a p - d U position それぞれテストされた 1 7 の異なる修飾置換のうち、4 つの置換 ( T r p - d U 2 7 , N E - d U 1 6 , M B n - d U 1 0 および B T - d U 1 6 ) だけが結合親和性に殆どまたは全く影響しなかった。すべての他の置換は様々な程度で結合親和性を弱めた。

30

40

## 【 0 2 3 0 】

V E G F S E L E X のディーブシークエンシング：4 1 4 9 - 8 \_\_ 1 アプタマーファミリー中の配列をより完全に評価するため、濃縮されたプールは 4 5 4 パイロシークエンシング技術を用いて配列決定された。プール DNA は 4 5 4 プライマーで増幅され P C R 生成物は精製され S e q u a l n o r m a l i z a t i o n p l a t e ( インビトロジェン (Invitrogen) カタログ番号 A10510-01 ) を用いて標準化された。溶出液は増幅産物の大きさと純度確かめるためにゲル上に流された。精製された P C R 生成物はコロラド

50

州オーロラのコロラド大学ヘルスサイエンスセンター(University of Colorado Health Sciences Center in Aurora, CO)の454パイロシーケンシング設備でシーケンスされた。

#### 【0231】

454配列はCLUSTAL分析により4867-31と配列比較された。プールからのシーケンスのデータセットは13, 139の全長の配列を含んでおり(すなわちこれらの配列は両方のプライマー配列を含む)、そのうち2, 235は独特であった。これら2, 235の独特の配列は5'-CCGPP CAAGP GCPPG PAGGA PPPAA APGG-3'についてモチーフ検索された。このモチーフを含む86の配列が見つかった。すべての配列について、4867-31を持つそれぞれの位置における同一性率は図16に記載されている通り計算された。

10

#### 【0232】

##### 実施例8 VEGF結合親和性試験

標的結合親和性の決定のため、SOMAmerはT4ポリヌクレオチドキナーゼ(ニューイングランドバイオラボ(New England Biolabs))および $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP(パーキンエルマー(Perkin Elmer))を用いて5'末端標識された。結合試験は、 $\sim 0.03 - 0.05 \text{ nM}$ の濃度の放射性標識されたSOMAmer( $\sim 20,000 \text{ c.p.m.}$ )および $10^{-7}$ から $10^{-12} \text{ M}$ の範囲の濃度の標的タンパク質を1XSB18T緩衝液(40 mM HEPES, pH 7.5; 120 mM NaCl; 5 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>および0.01% TWEEN-20)中37°Cで30分間インキュベートすることにより行われた。結合した複合体はZorbax樹脂と混合されDuraporeフィルタープレートに捕獲された。SOMAmerが結合した画分はPhosphorImager(FUJIFILM FLA-3000)で定量された。生の結合データは放射性標識されたSOMAmerのZorbax樹脂への非特異的なバックグラウンド結合について補正された。平衡解離定数( $K_d$ )は既述の通り測定された(Jellinek et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:11227)。

20

#### 【0233】

##### 実施例9 VEGF活性試験

VEGF-R2(血管内皮成長因子受容体2)の細胞キナーゼ活性に対するVEGF 121 SOMAmerの阻害的影響を分析するため、我々は内因的にVEGF-R2を高いレベルで発現するヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)(ロンザ(Lonza)、番号CC-2519)を用いた。HUVEC細胞は2% FBSを含むEGM-2 Bullet Kit(番号CC-3162)、成長因子(hEGF、Hydrocortisone、VEGF、HFGF-B、R3-IGF-1)、ヘパリン、アスコルビン酸およびGA-1000(ゲンタマイシン、アンフォテリシン-B)が加えられたEGM-2(内皮細胞増殖培地)に蒔かれた。HUVECが70から80%のコンフルエンスに達したとき、24ウェルプレート(105細胞/ウェル)に蒔かれ血清を含まない培地中で一晩飢餓培養された。

30

#### 【0234】

SOMAmer(単一濃度20 nMまたは濃度の範囲)が、1% BSAを含む20 ng/mL(1 nM)のVEGF-121(アールアンドディーシステム(R&D System)番号4464-VS)の培養液に37°Cで30分間加えられた。細胞はPBSで2回洗浄され、プレートインキュベートされたVEGF-121/SOMAmer複合体で5分間刺激された。処理された細胞は再度PBSで2回洗浄され、Halt脱リン酸化酵素阻害剤(サーモサイエンティフィック(Thermo Scientific)番号78428)が添加された氷冷の溶解緩衝液(1% NP-40代替品、20 mM トリス(pH 8.0)、137 mM NaCl、10% グリセロール、2 mM EDTA、1 mM 活性化オルトバナジウム酸ナトリウム、10  $\mu\text{g/mL}$  アプロチニンおよび10  $\mu\text{g/mL}$  ロイペプチン)が加えられた。ヒトホスホ-VEGFR2/KDRキット(R&D, DYC 1766-2)を用いて細胞溶解物のVEGF-R2リン酸化を測定した。

40

#### 【0235】

50

*in vitro*の機能活性実験で、スクリーニング濃度20 nMでのクローン4867-31の様々な切断された変異体は、不死化または初代ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)においてVEGF-121またはVEGF-165(1-4 nM)に誘導されるVEGFR2のリン酸化を本質的に完全に阻害する能力がある。

VEGFアプタマー4867-31\_\_43および4867-31\_\_192のIC<sub>50</sub>測定の代表的なプロットを図17に示す。IC<sub>50</sub>の値はそれぞれ2.2 nMおよび2.1 nMである。

#### 【0236】

クローン4867-31の変異体の活性スクリーニングのため、我々はSOMAmer変異体の単一濃度(通常20 nM)以外は上述したものと同一条件下で、HUVECにおけるVEGFに誘導されるVEGFR2リン酸化の阻害率を評価した。

#### 【0237】

実施例10 PDGFおよびVEGFアプタマーのホモ二量体構築物

PDGF-BBおよびVEGFはどちらもジスルフィドで連結したホモ二量体であり、チロシンキナーゼ受容体の二量化が受容体の自己リン酸化とシグナル伝達につながってそれらの生物学的作用を発揮する。もし1つよりも多いアプタマーがそのタンパク質標的に結合できると、PDGF-BBアプタマー4149-8\_\_260(結晶構造に基づく)の場合のように、このようなアプタマーは多量体構築物において共有結合でき、いわば個々のアプタマーサブユニットのタンパク質への同時結合を可能にする。これは結合活性作用を通して親和性の向上につながる。容易に利用できる化学に基づいて2つの型のホモ二量体

が合成された。これらは1)ゼロから6のHegリンカーで結合しHegあたり~20の距離を提供する頭-尾ホモ二量体、および2)合成のダブラスポートを介して結合し、それぞれの側で1つから3つのHegと組み合わせられた(二量体中の総数2、4または6つのHeg)3'-3'ホモ二量体、である。4149-8\_\_379、5169-4\_\_26および4867-31\_\_192のホモ二量体は競合結合試験でテストされた。競合物の結合親性測定のため、アプタマーリガンドはT4ポリヌクレオチドキナーゼ(ニューイングランドバイオラボ(New England Biolabs))および-32P-ATP(パーキンエルマー(Perkin Elmer))で5'末端標識された。競合試験は固定した濃度の放射性標識されたリガンド(1.0 nM)と変動させた濃度の競合アプタマー(10<sup>-11</sup>から10<sup>-6</sup> M)を前もって混合することで行われた。リガンドと競合物は標的タンパク質(100 pM)と1XSB18T緩衝液(40 mM HEPES, pH 7.5; 120 mM NaCl; 5 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>および0.01% TWEEN-20)中で37°C 60分間インキュベートされた。結合した複合体はZorbax樹脂と混合されDuraporeフィルタープレートに捕獲された。リガンド結合した画分はPhosphorImager(FUJIFILM FLA-3000)で定量された。生の結合データは競合物の添加なしの結合に標準化された。競合アプタマー(K<sub>i</sub>)の平衡解離定数を決定するため、データはGraphPad Prism 3.0でプロットされ非線形回帰を用いて一部競合曲線にあてはめられた。PDGFホモ二量体:配列4149-8\_\_379(配列4149-8\_\_438から4149-8\_\_447)および5169-4\_\_26(配列5169-4\_\_134から5169-4\_\_143)のPDGFホモ二量体の構造を表15に示す。4149-8\_\_379に基づいたホモ二量体について、競合試験で得られたK<sub>i</sub>値は、Hegリンカーなしと比較して、5つのHegリンカーで結合親和性が10倍よりも高く向上する(それぞれ0.25 pM対4.2 pM)ため、5'から3'の立体配置においてより長いリンカーが望ましいことを示唆した。3'から3'結合した4149-8\_\_379ホモ二量体において、より長い4つおよび6つのHegリンカーもまた、リンカーなしより少なくとも10倍良く、2つのHegリンカーより2倍良く機能した。5169-4\_\_26に基づいたホモ二量体では、K<sub>i</sub>がHegリンカーなしの28 pMから6つのHegリンカーの3.6 pMに向上したため、K<sub>i</sub>値はより長いHegリンカーは5'から3'立体配置において有利であることを示した。5'から3'立体配置において5つおよび6つのHegリンカーについてK<sub>i</sub>値に違いがなかった。3'から3'結合した51

10

20

30

40

50

69 - 4\_\_26に基づいたホモ二量体において、Hegリンカーが長くなるに従って $K_i$ が向上するという同じパターンが観察された。6つのHegリンカーはHegリンカーなしと比べて5倍の $K_i$ の向上を示した(それぞれ2.0 pM対11 pM)。表15および16中で、Z = ベンジル - デオキシウリジン (Bn - dU)、P = 5 - ナフタレン修飾されたdU (Nap - dU)、M = メチレンジオキシベンジル - dU (MBn - dU)、上付き文字1は2' - O - メチル修飾されたヌクレオチドを表し、上付き文字なしはデオキシリボヌクレオチドを表し、“C3”は3炭素リンカーを表し、“H”はヘキサエチレングリコールリンカーを表す。

#### 【0238】

##### 実施例11 PDGF/VEGFヘテロ二量体アプタマー構築物

PDGFアプタマー4149 - 8およびVEGFアプタマー4867 - 31に基づいたヘテロ二量体。PDGFおよびVEGFに対する特異性をもつ構築物を開発するという目的で、我々はPDGFアプタマーに結合したVEGFアプタマーを含む様々なアプタマー構築物をデザインし試験した。最初のアプタマー構築物は組み合わされたPDGF変異体4149 - 8\_\_273およびVEGF4867 - 31\_\_183をテストした。アプタマー構築物は頭 - 尾合成され、ゼロから3のヘキサエチレングリコール(Heg)リンカーで両方の配向(5'末端にPDGFアプタマーもしくは5'末端にVEGFアプタマー)で結合された。結果を下記表17と18に示す。表17中“Z”はBn - dUを表し、“P”はNap - dUを表し、上付き文字s“1”は2' - O - メチル置換を表し、上付き文字なしはデオキシリボヌクレオチドを示し、“V”はC3スペーサーを表し、“H”はヘキサエチレングリコール(Heg)を表す。表18中、残存活性率は20 nMアプタマー存在下コントロール(アプタマーなし)と比較したHs27線維芽細胞における分画のPDGF Rリン酸化レベルを表す。

#### 【0239】

PDGF - BB、VEGF - 121およびVEGF - 165に対する結合親和性に基づいて、アプタマー構築物4149 - 8\_\_320がこの実験において最も良い結果を与えた。表18に示す通り、我々はPDGF細胞リン酸化試験でもアプタマー構築物をテストした。機能的試験データに基づいて、テストされた全てのアプタマー構築物はHs27線維芽細胞におけるPDGF - BBが誘導するPDGF Rリン酸化を阻害した。アプタマー構築物4149 - 8\_\_313, 4149 - 8\_\_314, 4149 - 8\_\_315, 4149 - 8\_\_316, 4149 - 8\_\_319および4149 - 8\_\_320はPDGF - BBが誘導するPDGF Rリン酸化をIC50値<20 nMで阻害した。アプタマー構築物4149 - 8\_\_317および4149 - 8\_\_318のIC50値は~20 nMであった。

#### 【0240】

我々は4149 - 8\_\_320(5' PDGF - 3Heg - VEGF3')の立体配置に基づいて、PDGFアプタマー4149 - 8\_\_379およびVEGFアプタマー4867 - 31\_\_192を含む4149 - 8\_\_401を合成した。表19を参照のこと。この表中、“Z”はBn - dUを表し、“P”はNap - dUを表し、MはMBn - dUを表し、上付き文字s“1”は2' - O - メチル置換を表し、上付き文字なしはデオキシリボヌクレオチドを示し、“C3”はC3スペーサーを表し、“H”はヘキサエチレングリコール(Heg)を表す。アプタマー構築物4149 - 8\_\_401はプリカーサーアプタマー構築物4149 - 8\_\_320の結合親和性と同等かより良いPDGF - BBおよびVEGF121への結合親和性を示した。表20を参照のこと。

#### 【0241】

アプタマー構築物4149 - 8\_\_320および4149 - 8\_\_401は、Hs27線維芽細胞におけるPDGF - BBが誘導するPDGF Rリン酸化をそれぞれIC50値1 nMと5 nMで阻害した。さらに、20 kDaもしくは40 kDaのPEGに結合した5'アミノリンカーを含むアプタマー構築物4149 - 8\_\_401は、Hs27線維芽細胞におけるPDGF - BBが誘導するPDGF Rリン酸化をIC50値約1 nMで阻害する能力を維持した。これらの結果はこの試験の全てのPDGF(1 nMモノマー)の化学量論

10

20

30

40

50

的測定 / 阻害に一致する。

#### 【 0 2 4 2 】

総合的なリンカーの長さやPDGFおよびVEGFアプタマーの配向の影響を決定するため、我々はアプタマー4149-8\_\_379および4867-31\_\_192を含む別のアプタマー構築物のセットをテストした。下記表21を参照のこと。

5'末端のVEGFで、我々は1つから6つのHegリンカーをテストした。5'末端のPDGFで、我々は3つのHegリンカーを持つ4149-8\_\_401を含む2つから6つのHegリンカーをテストした。1つのHegリンカー変異体は関連する変異体4149-8\_\_318においてやや減少した結合を示したため、この配向ではテストされなかった。結合データを表16に示す。PDGF-BBに対しやや弱い親和性を示した4149-8\_\_408および4149-8\_\_409以外、アプタマー構築物のほとんどは良く機能した。OphthotechアプタマーE10030(フォビスタ(Fovista))の結合親和性が比較のため含まれた。

#### 【 0 2 4 3 】

アプタマー構築物4149-8\_\_401が*in vitro*でPDGFおよびVEGFの両方の活性を阻害する能力が、上述の通り受容体リン酸化実験によりテストされた。アプタマー構築物4149-8\_\_401はHs27線維芽細胞におけるPDGFが誘導するPDGF Rリン酸化をPDGF単量体4149-8\_\_379に匹敵する強さで阻害した(それぞれIC<sub>50</sub>値2.4 nMおよび1.7 nM)。同様に、アプタマー構築物4149-8\_\_401はHUVEC細胞におけるVEGFが誘導するVEGFR2リン酸化をVEGF単量体4867-31\_\_192に匹敵する強さで阻害した(それぞれIC<sub>50</sub>値0.7 nMおよび2.1 nM)。図18は実験の結果を示す。図18Aは(A)PDGFアプタマー4149-8\_\_379(白丸)およびPDGF/VEGFアプタマー構築物4149-8\_\_401(黒丸)による、Hs27線維芽細胞におけるPDGFが誘導するPDGF Rリン酸化阻害、(B)VEGFアプタマー4867-31\_\_192(白丸)およびPDGF/VEGFアプタマー構築物4149-8\_\_401(黒丸)による、HUVECにおけるVEGFが誘導するVEGFR2リン酸化阻害を示す。

#### 【 0 2 4 4 】

PDGFアプタマー5169-4およびVEGFアプタマー4867-31に基づくヘテロ二量体。我々はPDGFアプタマー5169-4\_\_26およびVEGFアプタマー4867-31\_\_192の変異体に基づく更なるヘテロ二量体構築物をデザインしテストした。アプタマー構築物は頭-尾で合成され、ゼロから3のヘキサエチレングリコール(Heg)リンカーで両方の配向(5'末端にPDGFアプタマーもしくは5'末端にVEGFアプタマー)で結合された。結果を表22に示す。5'末端のVEGFに対し、3つから6つの間のHegリンカーが最も高い親和性を示した。通常親和性はVEGF-121アプタマー配列が3'末端にあるときわずかに低く、K<sub>d</sub>56 pMだった5つのHegリンカー配列を除いてほとんどのK<sub>d</sub>値は100-300 pMの範囲に入った。5'末端のPDGFに対しては、K<sub>d</sub>値は3つのHegリンカーの11 pMから4つのHegリンカーの0.54 pMの範囲であり、残りのK<sub>d</sub>値は他の全てのHegリンカーの長さの間に入った。PDGFが3'末端にあるとき、リンカーの長さが増すにつれて結合親和性が高くなる傾向があり、1つのHegリンカーのK<sub>d</sub>が5.3 pMで6つのHegリンカーのK<sub>d</sub>が0.20 pMであった。表22中、“P”はNap-dUを表し、上付き文字“1”は2'-O-メチル置換を表し、上付き文字なしはデオキシリボヌクレオチドを表し、“H”はヘキサエチレングリコール(Heg)を表す。

#### 【 0 2 4 5 】

実施例12 PDGF/VEGFアプタマー構築物のVEGFおよびPDGFへの同時結合

PDGF/VEGFアプタマー構築物がVEGFおよびPDGFに同時に結合する能力を実証するため、サンドイッチ試験が開発された。簡潔にいうと、Nunc Maxisorp(登録商標)はヒトPDGF-BBもしくはヒトVEGF-121(20ng/mL)で

10

20

30

40

50

コートされた。1% BSA 溶液でウェルをブロッキングした後、PDGF / VEGF アプタマー構築物を加え (10 nM)、吸着されたタンパク質標的と結合させた。洗浄後、ビオチン標識された補体タンパク質 (VEGF - 121 でコートされたプレートに 2 nM の PDGF - BB、および PDGF - BB でコートされたプレートに 2 nM の VEGF - 121) を三元複合体の形成のため結合させた。もう一度洗浄した後、西洋わさびペルオキシダーゼが結合したストレプトアビジン (HRP - SA) が加えられ、四元複合体が形成された。最終の洗浄の後、発色西洋わさびペルオキシダーゼ基質がメーカーの説明 (サーモサイエンティフィック TMB (Thermo Scientific TMB) substrate kit 34021) に従って加えられ、反応は適切な時に 1.6 M の  $H_2SO_4$  を加えて停止された。ウェルあたりの 450 nm における吸収が Spectramax M5 プレートリーダーを用いてオートチェックオンで測定された。上述の方法と並行して、四元複合体を形成する 4 つの構成成分のうち 1 つが除かれている 4 つのコントロール実験が行われた。

10

#### 【0246】

図 19 に示す通り、PDGF / VEGF アプタマー構築物 SL1012 (20 kDa PEG - N - 4149 - 8\_\_401) はヒト VEGF - 121 および PDGF - BB に同時に結合することができた。四元複合体のすべての構成成分が加えられたとき (完全) 強い信号が観察され、一方 4 つの構成成分のいずれか 1 つが存在しないとバックグラウンドまたはバックグラウンドに近い信号になった。PDGF および VEGF でコートされたプレートで同様の結果が得られ、アプタマー構築物へのタンパク質添加の順番は重要でないことを示した。図 19 に示す通り、SL1012 はヒト VEGF - 165 および PDGF - BB に同時に結合することができた。図 19 A は、ビオチン標識された PDGF を加えた、VEGF でコートされたマイクロタイタープレートを示す。19 B は、ビオチン標識された VEGF を加えた、PDGF でコートされたマイクロタイタープレートを示す。データは平均 + 95% 信頼区間 ( $n = 3$ ) で表される。四元複合体のすべての構成成分が加えられたとき (完全) 強い信号が観察され、一方 4 つの構成成分のいずれか 1 つが存在しないとバックグラウンドまたはバックグラウンドに近い信号になった。データはアプタマー構築物の 5' 末端への PEG 部分の付加は同時結合活性を妨げないことを実証する。

20

#### 【0247】

ヒト VEGF - 165 およびヒト PDGF - BB の (A) SL1012 又は及び (B) SL1013 (40 kDa PEG - N - 4149 - 8 - 401) への同時結合は図 20 に示される。マイクロタイタープレートは PDGF でコートされビオチン標識された VEGF が加えられた。完全は四元複合体のすべての構成成分の添加を意味し、4 つの構成成分のうち 1 つがないそれぞれの条件はグラフに示される。データは平均 + 95% 信頼区間 ( $n = 3$ ) で表される。

30

#### 【0248】

PEG 部分を含まない様々なアプタマー構築物で同様の実験が行われた。先の結果で複合体の他の要素に関しては信号を生じるのに必要であることが実証されたので、この実験ではアプタマーのないコントロールだけが含まれた。図 21 に示すように、アプタマー構築物 4149 - 8\_\_317, 4149 - 8\_\_318, 4149 - 8\_\_320, 4149 - 8\_\_401 および 4149 - 8\_\_414 が、タンパク質添加の順番に関わらず PDGF と VEGF に同時結合した。図 21 (A) はビオチン標識された PDGF を加えた、VEGF でコートされたマイクロタイタープレートを示し、図 21 (B) はビオチン標識された PDGF を加えた、PDGF でコートされたマイクロタイタープレートを示す。PDGF アプタマー 5169 - 4 および VEGF アプタマー 4867 - 31 の変異体に基づいたヘテロ二量体構築物の同時結合のデータを加えた。

40

#### 【0249】

##### 実施例 13 硝子体内薬物動態試験

アプタマーおよびアプタマー構築物が眼内でどのような振る舞いをするか理解するために最初の眼内薬物動態試験が行われた。表 23 に示す通り、4 つのアプタマー構築物がテストされた。

50

## 【 0 2 5 0 】

アプタマーまたはアプタマー構築物に対して、ニュージーランド白ウサギの両方の眼（10眼）に単一硝子体内注射が行われた。動物は0.5mg/眼の投与（SL1010およびSL1011）もしくは1.0mg/眼の投与（SL1012およびSL1013）のいずれかを受けた。これらの投与量はアプタマーまたはアプタマー構築物のみの重量を表す（PEG重量は計算から除外されている）。すべての試験物はリン酸緩衝生理食塩水中で調製された。それぞれのアプタマーまたはアプタマー構築物の試験物に対し、投与後2、24、48、96または192時間で、硝子体液試料が動物1個体の両方の眼から集められた。硝子体液試料は分析されるまで凍結保存された。

## 【 0 2 5 1 】

アプタマーまたはアプタマー構築物の硝子体液濃度は超高速液体クロマトグラフィー（UPLC）分析法により260ナノメートル（nm）での吸収による検出で測定された。簡潔に言うと、硝子体のヒドロゲルは20ゲージの針に数回通すことで剪断された。硝子体のタンパク質は2倍量の2-エトキシエタノールを加えて沈殿させられた。遠心分離後、上清は回収されAcquity（登録商標）C18カラム（0.2×100mm）に注入された。カラム温度は80℃で流速は0.2mL/minに保たれた。緩衝液AはTEA pH7.0および5%アセトニトリルを含む。緩衝液Bは100%アセトニトリルを含む。プログラムはサンプル注入後1分間50%の緩衝液Bを維持し、その後緩衝液Bは4分間かけて直線的に70%まで増やされた。検出は260nmにおける吸収で行われた。硝子体液中のアプタマーまたはアプタマー構築物の濃度（遊離酸当量）は未知のサンプル試料のピーク吸収ユニットを既知の濃度のアプタマーまたはアプタマー構築物で作成された検量線に内挿することで決定された。

## 【 0 2 5 2 】

この実験の結果を表24に示す。

## 【 0 2 5 3 】

硝子体濃度対時間の自然対数の通常の線形回帰フィットにより硝子体の半減期が推定された。SL1010、SL1011、SL1012、およびSL1013に対してそれぞれ105、47、69および92時間であった。表25は結果を95%信頼区間とともに示す。

## 【 0 2 5 4 】

これらの硝子体の半減期は、Macugen（83時間、Eyetechnology Study Group（2002）Retina 22:143）およびLucentis（70時間、Gaudreault et al.（2007）Retina 27:1260）のような同様の大きさの治療用VEGF阻害剤の、NZWウサギでの半減期と比べて遜色がない。よって、これらのアプタマーおよびアプタマー構築物はAMDおよび糖尿病性網膜症のような眼疾患の治療に役立つ。

## 出願時の請求の範囲

## 〔請求項1〕

配列5'-NZVSL<sub>n</sub>S'V'ZACNN<sub>m</sub>GCZZZAZAGCG-3'（配列番号500）を含むアプタマーであって、

VはA、CまたはGから選ばれ、

V'はC、GまたはZから選ばれ、V'はVに相補的であり、

SおよびS'は独立してCまたはGから選ばれ、SおよびS'は互いに相補的であり、

Nは独立して、任意の天然に存在するまたは修飾されたヌクレオチドから選ばれ、

Zは独立して修飾されたピリミジンから選ばれ、

Lは任意の天然に存在するまたは修飾されたヌクレオチド、炭化水素リンカー、ポリエチレングリコールリンカー、またはこれらの組み合わせから選ばれるスペーサーであり、

nは0から20であり、

mは0から20であり、

必要に応じて1つまたは2つ以上のヌクレオチド挿入が含まれても良い、前記アプタマー

## 〔請求項 2〕

配列 5' - Z Z V S L<sub>n</sub> S' V' Z A C N N<sub>m</sub> G C G Z Z Z A Z A G C G - 3' (配列番号 501) を含み、

V は A、C または G から選ばれ、

V' は C、G または Z から選ばれ、V' は V に相補的であり、

S および S' は独立して C または G から選ばれ、S および S' は互いに相補的であり、

N は独立して、任意の天然に存在するまたは修飾されたヌクレオチドから選ばれ、

Z は独立して修飾されたピリミジンから選ばれ、

L は任意の天然に存在するまたは修飾されたヌクレオチド、炭化水素リンカー、ポリエチレングリコールリンカー、またはこれらの組み合わせから選ばれるスペーサーであり、

n は 0 から 20 であり、

m は 0 から 20 であり、

必要に応じて 1 つまたは 2 つ以上のヌクレオチド挿入が含まれても良い、

請求項 1 に記載のアプタマー。

## 〔請求項 3〕

配列 5' - Z Z V C L<sub>n</sub> G V' Z A C N M G C G Z Z Z A Z A G C G - 3' (配列番号 502) を含み、

V は A、C または G から選ばれ、

V' は C、G または Z から選ばれ、V' は V に相補的であり、

N は独立して、任意の天然に存在するまたは修飾されたヌクレオチドから選ばれ、

M は C または A から選択され、

Z は独立して修飾されたピリミジンから選ばれ、

L は置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>20</sub> リンカーと修飾されたまたは未修飾のヌクレオチド、任意の天然に存在するまたは修飾されたヌクレオチド、炭化水素リンカー、ポリエチレングリコールリンカー、またはこれらの組み合わせから選ばれるスペーサーであり、

、

n は 0 から 20 であり、

必要に応じて 1 つまたは 2 つ以上のヌクレオチド挿入が含まれても良い、

請求項 1 に記載のアプタマー。

## 〔請求項 4〕

配列 5' - Z Z A C L<sub>n</sub> G Z Z A C A C G C G Z Z Z A Z A G C G - 3' (配列番号 503) を含み、

Z は独立して修飾されたピリミジンから選ばれ、

L は任意の天然に存在するまたは修飾されたヌクレオチド、炭化水素リンカー、ポリエチレングリコールリンカー、またはこれらの組み合わせから選ばれるスペーサーであり、

n は 0 から 20 であり、

必要に応じて 1 つまたは 2 つ以上のヌクレオチド挿入が含まれても良い、

請求項 3 に記載のアプタマー。

## 〔請求項 5〕

配列 5' - Z Z A C G A C Z A C G Z Z A C A C G C G Z Z Z A Z A G C G - 3' (配列番号 504) を含み、

Z は独立して修飾されたピリミジンから選ばれ、

必要に応じて 1 つまたは 2 つ以上のヌクレオチド挿入が含まれても良い、

請求項 4 に記載のアプタマー。

## 〔請求項 6〕

P D G F に特異的に結合するアプタマーであって、疎水性核酸塩基修飾を含む少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチドを含み、10 nM よりも小さい親和性で P D G F と結合し、P D G F への結合について P D G F アプタマー 4149 - 8\_\_260 (配列番号 211) と競合する、前記アプタマー。

## 〔請求項 7〕

10

20

30

40

50



疎水性核酸塩基修飾は修飾されたピリミジンである、請求項 6 に記載のアプタマー。

〔請求項 8〕

アプタマーは少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、少なくとも 5 つの、または少なくとも 6 つの修飾されたピリミジンを含む、請求項 7 に記載のアプタマー。

〔請求項 9〕

それぞれの修飾されたピリミジンは独立して 5 - ( N - ベンジルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( B n d U )、5 - ( N - ベンジルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - ( N - ベンジルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - ( N - フェネチルカルボキシアミド - 2 ' - デオキシウリジン ( P e d U )、5 - ( N - チオフェニルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( T h d U )、5 - ( N - イソブチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( i B u d U )、5 - ( N - イソブチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - ( N - イソブチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - ( N - トリプタミノカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( T r p d U )、5 - ( N - トリプタミノカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - ( N - トリプタミノカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - ( N - [ 1 - ( 3 - トリメチルアンモニウム ) プロピル ] カルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジンはクロライド、5 - ( N - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( N a p d U )、5 - ( N - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - ( N - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、および 5 - ( N - [ 1 - ( 2 , 3 - ジヒドロキシプロピル ) ] カルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ) から選ばれる、

請求項 7 または 8 に記載のアプタマー。

〔請求項 10〕

配列 5 ' - Z A B L p G Y Z A B K q G C G Z Z Y D Y A G - 3 ' ( 配列番号 505 ) を含み、

それぞれの Z は、独立して、修飾されたピリミジンであり、

それぞれの B は独立して C および、置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカーから選ばれ、

それぞれの L は独立して置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカー、ポリエチレングリコールリンカー、および、修飾されたまたは未修飾のヌクレオチドから選ばれ、p は 1 から 10 であり、

それぞれの Y は独立して修飾されたまたは未修飾のピリミジンから選ばれ、

それぞれの K は独立して置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカー、ポリエチレングリコールリンカー、および、修飾されたまたは未修飾のヌクレオチドから選ばれ、q は 1 から 5 であり、

D は A および、置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカーから選ばれる、

請求項 6 から 9 のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項 11〕

配列 5 ' - X Z A B L p G Y Z A B K q G C G Z Z Y D Y A G B E - 3 ' ( 配列番号 506 ) を含み、

X は修飾されたまたは未修飾のピリミジン、および、置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカーから選ばれるか不在であり、

E は G および置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカーから選ばれるか不在である、

請求項 10 に記載のアプタマー。

〔請求項 12〕

それぞれの修飾されたピリミジンは独立して 5 - ( N - ベンジルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( B n d U )、5 - ( N - ベンジルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - ( N - ベンジルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、

5 - (N - フェネチルカルボキシアミド - 2' - デオキシウリジン (P e d U)、5 - (N - チオフェニルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T h d U)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (i B u d U)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T r p d U)、5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウム) プロピル] カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジンをクロライド、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N a p d U)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、および 5 - (N - [1 - (2, 3 - ジヒドロキシプロピル)] カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン) から選ばれる、

請求項 10 または請求項 11 に記載のアプタマー。

〔請求項 13〕

それぞれの置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_{10}$  リンカーは、置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_8$  リンカー、置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_6$  リンカー、置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_5$  リンカー、置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_4$  リンカー、または、置換されたまたは未置換の  $C_3$  リンカーである、

請求項 10 から 12 のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項 14〕

少なくとも 1 つの L はポリエチレングリコールリンカーであり p は 1、2、3、4、5 または 6 である、

請求項 10 から 13 のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項 15〕

少なくとも 1 つの L はヘキサエチレングリコールリンカーである、

請求項 10 から 14 のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項 16〕

p は 1、2 または 3 である、

請求項 14 または 15 のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項 17〕

少なくとも 1 つの K はポリエチレングリコールリンカーであり q は 1 または 2 である、請求項 10 から 16 のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項 18〕

少なくとも 1 つの K はヘキサエチレングリコールリンカーである、請求項 10 から 17 のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項 20〕〔請求項 19〕

q は 1 である、請求項 10 から 18 のいずれか一項に記載のアプタマー。少なくとも 1 つの K は置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_{10}$  リンカーであり q は 1 または 2 である、請求項 10 から 18 のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項 21〕

前記置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_{10}$  リンカーは、置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_8$  リンカー、置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_6$  リンカー、置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_5$  リンカー、置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_4$  リンカー、または、置換されたまたは未置換の  $C_3$  リンカーである、請求項 20 に記載のアプタマー。

〔請求項 22〕

少なくとも 1 つの L は置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_{10}$  リンカーであり p は 1、2、3、4、5、6、7 または 8 である、請求項 10 から 21 のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項 23〕

前記置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_{10}$  リンカーは、置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_8$  リンカー、置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_6$  リンカー、置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_5$  リンカー、置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_4$  リンカー、または、置換されたまたは未置換の  $C_3$  リンカーである、請求項 22 に記載のアプタマー。

〔請求項 24〕

P D G F に特異的に結合するアプタマーであって、

配列 5' - A C A L n Z G Z A Z G L m Z L Z - 3' (配列番号 512) を含み、

それぞれの Z は、独立して、修飾されたピリミジンであり、

それぞれの L は独立して置換されたまたは未置換の  $C_2 - C_{50}$  リンカー、ポリエチレングリコールリンカー、および、修飾されたまたは未修飾のヌクレオチドから選ばれ、

n は 1 から 5 であり、

m は 1 から 10 である、前記アプタマー。

〔請求項 25〕

それぞれの Z は独立して 5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B n d U)、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - フェニルカルボキシアミド - 2' - デオキシウリジン (P e d U)、5 - (N - チオフェニルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T h d U)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (i B u d U)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T r p d U)、5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウム) プロピル] カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジンをクロライド、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N a p d U)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、および 5 - (N - [1 - (2, 3 - ジヒドロキシプロピル)] カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン) から選ばれる、

請求項 24 に記載のアプタマー。

〔請求項 26〕

少なくとも 1 つの、少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、またはそれぞれの Z は、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N a p d U) である、請求項 25 に記載のアプタマー。

〔請求項 27〕

n は 1、2、3、または 4 であり、

m は 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 である、

請求項 24 から 26 のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項 28〕

少なくとも 1 つの、少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、または少なくとも 5 つのヌクレオシドは 2' - O M e を含む、請求項 1 から 27 のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項 29〕

少なくとも 1 つの、少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、または少なくとも 5 つのヌクレオシド間の結合はホスホロチオエート結合である、請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項 30〕

前記アプタマーは 10 n M よりも小さい、5 n M よりも小さい、2 n M よりも小さい、または 1 n M よりも小さい親和性で P D G F に結合する、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載のアプタマー。

10

20

30

40

50

## 〔請求項 3 1〕

前記アプタマーは P D G F が介在する P D G F 受容体のリン酸化を阻害する、請求項 1 から 3 0 のいずれか一項に記載のアプタマー。

## 〔請求項 3 2〕

1 0 n M よりも小さい、5 n M よりも小さい、2 n M よりも小さい、または 1 n M よりも小さい親和性で V E G F - 1 2 1 に結合するアプタマーであって、少なくとも 1 つの、疎水性核酸塩基修飾を含む修飾されたヌクレオシドを含む、前記アプタマー。

## 〔請求項 3 3〕

前記疎水性核酸塩基修飾は修飾されたピリミジンである、請求項 3 2 に記載のアプタマー。

## 〔請求項 3 4〕

少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、少なくとも 5 つの、または少なくとも 6 つの修飾されたピリミジンを含む、請求項 3 3 に記載のアプタマー。

## 〔請求項 3 5〕

それぞれの修飾されたピリミジンは独立して 5 - ( N - ベンジルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( B n d U )、5 - ( N - ベンジルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - ( N - ベンジルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - ( N - フェネチルカルボキシアミド - 2 ' - デオキシウリジン ( P e d U )、5 - ( N - チオフェニルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( T h d U )、5 - ( N - イソブチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( i B u d U )、5 - ( N - イソブチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - ( N - イソブチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - ( N - トリプタミノカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( T r p d U )、5 - ( N - トリプタミノカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - ( N - トリプタミノカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - ( N - [ 1 - ( 3 - トリメチルアンモニウム ) プロピル ] カルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジнокロライド、5 - ( N - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( N a p d U )、5 - ( N - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - ( N - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - フルオロウリジン、および 5 - ( N - [ 1 - ( 2 , 3 - ジヒドロキシプロピル ) ] カルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ) から選ばれる、

請求項 3 3 または請求項 3 4 に記載のアプタマー。

## 〔請求項 3 6〕

少なくとも 1 つの、少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、少なくとも 5 つの、または少なくとも 6 つの修飾されたピリミジンは 5 - ( N - ナフチルメチルカルボキシアミド ) - 2 ' - デオキシウリジン ( N a p d U ) である、請求項 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載のアプタマー。

## 〔請求項 3 7〕

V E G F - 1 2 1 への結合についてアプタマー 4 8 6 7 - 3 1 \_ 1 9 2 と競合する、請求項 3 2 から 3 6 のいずれか一項に記載のアプタマー。

## 〔請求項 3 8〕

配列 5 ' - G Z Z Q A A E Z E C Z Z E Z D R G A Z Z Z A A A Z G - 3 ' を含み、それぞれの Z は修飾されたピリミジンであり、  
Q は任意の修飾されたまたは未修飾のヌクレオチド、および、置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>5,0</sub> リンカーから選ばれるかまたは不在であり、  
それぞれの E は独立して G および置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>5,0</sub> リンカーから選ばれ、  
D は A および置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>5,0</sub> リンカーから選ばれ、  
R は任意の修飾されたまたは未修飾のヌクレオチド、および、置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>5,0</sub> リンカーから選ばれる、  
請求項 3 2 から 3 7 のいずれか一項に記載のアプタマー。

10

20

30

40

50

## 〔請求項 39〕

5' - CGZZQAAEZECZZEZDRGAZZZAAAZG - 3'、  
 5' - GZZQAAEZECZZEZDRGAZZZAAAZGG - 3'、  
 5' - CGZZQAAEZECZZEZDRGAZZZAAAZGG - 3'、および  
 5' - CCGZZQAAEZECZZEZDRGAZZZAAAZGG - 3'  
 から選ばれる配列を含む、請求項 37 に記載のアプタマー。

## 〔請求項 40〕

それぞれの Z は独立して 5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BndU)、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、  
 5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - フェネチ  
 ルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (PedU)、5 - (N - チオフェニルメ  
 チルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ThdU)、5 - (N - イソブチル  
 カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (iBudU)、5 - (N - イソブチルカル  
 ボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド)  
 ) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - デオ  
 キシウリジン (TrpdU)、5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - O -  
 メチルウリジン、5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン  
 、5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウム) プロピル] カルボキシアミド) - 2'  
 ' - デオキシウリジンはクロライド、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2'  
 - デオキシウリジン (NapdU)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2'  
 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオ  
 ロウリジン、および 5 - (N - [1 - (2, 3 - ジヒドロキシプロピル)] カルボキシア  
 ミド) - 2' - デオキシウリジン) から選ばれる、  
 請求項 37 または請求項 38 に記載のアプタマー。

## 〔請求項 41〕

少なくとも 1 つの、少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、少なく  
 とも 5 つの、少なくとも 6 つの、少なくとも 7 つの、または少なくとも 8 つの Z は 5 - (N  
 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NapdU) である、  
 請求項 37 から請求項 39 のいずれか一項に記載のアプタマー。

## 〔請求項 42〕

それぞれの置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>50</sub> リンカーは独立して、置換されたまたは  
 未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>20</sub> リンカー、置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカー、置  
 換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>8</sub> リンカー、置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> リン  
 カー、置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>5</sub> リンカー、置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> -  
 C<sub>4</sub> リンカー、および、置換されたまたは未置換の C<sub>3</sub> リンカーから選ばれる、請求項 3  
 7 から請求項 40 のいずれか一項に記載のアプタマー。

## 〔請求項 43〕

それぞれの置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>50</sub> リンカーは、置換されたまたは未置換  
 の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカーである、請求項 42 に記載のアプタマー。

## 〔請求項 44〕

それぞれの置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> リンカーは、置換されたまたは未置換  
 の C<sub>2</sub> - C<sub>8</sub> リンカー、置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> リンカー、置換されたまたは  
 未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>5</sub> リンカー、置換されたまたは未置換の C<sub>2</sub> - C<sub>4</sub> リンカー、または  
 、置換されたまたは未置換の C<sub>3</sub> リンカーである、請求項 43 に記載のアプタマー。

## 〔請求項 45〕

少なくとも 1 つの、少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、または少  
 なくとも 5 つのヌクレオシドは 2' - OMe を含む、請求項 32 から請求項 39 のいずれ  
 か一項に記載のアプタマー。

## 〔請求項 46〕

少なくとも 1 つの、少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、または少

10

20

30

40

50

なくとも5つのヌクレオシド間の結合はホスホロチオエート結合である、請求項32から請求項45のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項47〕

前記アプタマーは10 nMよりも小さい、5 nMよりも小さい、2 nMよりも小さい、または1 nMよりも小さい親和性でVEGF-121に結合する、請求項32から請求項46のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項48〕

前記アプタマーはVEGF-121が介在するVEGF受容体のリン酸化を阻害する、請求項32から請求項47のいずれか一項に記載のアプタマー。

〔請求項49〕

10 nMよりも小さい親和性でVEGF-121に結合する、表10から14のいずれかに示されるアプタマー。

〔請求項50〕

請求項1から31のいずれかのアプタマーから選ばれる第一のアプタマーを含むアプタマーと請求項32から49のいずれかのアプタマーから選ばれる第二のアプタマーを含む、アプタマー構築物。

〔請求項51〕

前記第一のアプタマーと第二のアプタマーは非共有的に結合されている、請求項50に記載のアプタマー構築物。

〔請求項52〕

前記第一のアプタマーと第二のアプタマーは共有結合されている、請求項50に記載のアプタマー構築物。

〔請求項53〕

前記アプタマー構築物はPDGFおよびVEGF-121に同時に結合する能力を持つ、請求項50から52のいずれか一項に記載のアプタマー構築物。

〔請求項54〕

前記アプタマー構築物は10 nMより小さい親和性でPDGFに結合する、請求項50から53のいずれか一項に記載のアプタマー構築物。

〔請求項55〕

前記アプタマー構築物は10 nMより小さい親和性でVEGF-121に結合する、請求項50から53のいずれか一項に記載のアプタマー構築物。

〔請求項56〕

第一のアプタマーと第二のアプタマーを含むアプタマー構築物であって、前記第一のアプタマーと第二のアプタマーはそれぞれ独立して請求項1から31のいずれか一項に記載のアプタマーから選ばれる、前記アプタマー構築物。

〔請求項57〕

前記第一のアプタマーと第二のアプタマーは同じである、請求項56に記載のアプタマー構築物。

〔請求項58〕

前記第一のアプタマーと第二のアプタマーは異なる、請求項56に記載のアプタマー構築物。

〔請求項59〕

前記第一のアプタマーと第二のアプタマーは非共有的に結合されている、請求項56から58のいずれか一項に記載のアプタマー構築物。

〔請求項60〕

前記第一のアプタマーと第二のアプタマーは共有結合されている、請求項56から58のいずれか一項に記載のアプタマー構築物。

〔請求項61〕

前記アプタマー構築物は2つのPDGF単量体に同時に結合する能力を持つ、請求項56から60のいずれか一項に記載のアプタマー構築物。

10

20

30

40

50

〔請求項 6 2〕

前記アプタマー構築物は 10 nM より小さい親和性で PDGF に結合する、請求項 5 6 から 6 1 のいずれか一項に記載のアプタマー構築物。

〔請求項 6 3〕

第一のアプタマーと第二のアプタマーを含むアプタマー構築物であって、前記第一のアプタマーと第二のアプタマーはそれぞれ独立して請求項 3 2 から 4 9 のいずれか一項に記載のアプタマーから選ばれる、前記アプタマー構築物。

〔請求項 6 4〕

前記第一のアプタマーと第二のアプタマーは同じである、請求項 6 3 に記載のアプタマー構築物。

〔請求項 6 5〕

前記第一のアプタマーと第二のアプタマーは異なる、請求項 6 3 に記載のアプタマー構築物。

〔請求項 6 6〕

前記第一のアプタマーと第二のアプタマーは非共有的に結合されている、請求項 6 3 から 6 5 のいずれか一項に記載のアプタマー構築物。

〔請求項 6 7〕

前記第一のアプタマーと第二のアプタマーは共有結合されている、請求項 6 3 から 6 5 のいずれか一項に記載のアプタマー構築物。

〔請求項 6 8〕

前記アプタマー構築物は 2 つの VEGF 単量体に同時に結合する能力を持つ、請求項 6 3 から 6 7 のいずれか一項に記載のアプタマー構築物。

〔請求項 6 9〕

前記アプタマー構築物は 10 nM より小さい親和性で VEGF に結合する、請求項 6 3 から 6 8 のいずれか一項に記載のアプタマー構築物。

〔請求項 7 0〕

少なくとも 1 つの請求項 1 から 4 9 のいずれか一項に記載のアプタマーおよび薬剤的に許容できる担体を含む医薬組成物。

〔請求項 7 1〕

請求項 1 から 3 1 のいずれか一項に記載の第一のアプタマーと、請求項 3 2 から 4 9 のいずれかの第二のアプタマーを含む、請求項 7 0 に記載の医薬組成物。

〔請求項 7 2〕

請求項 4 9 から 6 9 のいずれか一項に記載のアプタマー構築物および薬剤的に許容できる担体を含む医薬組成物。

〔請求項 7 3〕

前記医薬組成物は硝子体内注射のためのものである、請求項 6 9 から 7 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔請求項 7 4〕

治療有効量の請求項 6 9 から 7 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物を、黄斑変性症を患う対象に投与することを含む、黄斑変性症を治療する方法。

〔請求項 7 5〕

治療有効量の請求項 6 9 から 7 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物を、黄斑変性症にかかるリスクがある対象に投与することを含む、黄斑変性症を予防する方法。

〔請求項 7 6〕

治療有効量の請求項 6 9 から 7 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物を、眼疾患を患う対象に投与することを含む、眼疾患を治療する方法。

〔請求項 7 7〕

前記眼疾患は、網膜炎、黄斑変性症、脈絡膜炎、網膜症、高血圧性網膜症、糖尿病性網膜症、慢性ドライアイ、エイズに関連した視力喪失、弱視、半盲、網膜静脈閉塞症、トラコーマ、円錐角膜、脈絡網膜炎、中心性漿液性網膜症、ぶどう膜炎、網膜ジストロフィー、

10

20

30

40

50

浮腫、緑内障、および白内障から選ばれる、請求項 7 6 に記載の方法。

〔請求項 7 8〕

前記黄斑変性症は加齢に関連する黄斑変性症である、請求項 7 4 または請求項 7 5 に記載の方法。

〔請求項 7 9〕

前記黄斑変性症は乾燥型の加齢に関連する黄斑変性症または滲出性の加齢に関連する黄斑変性症である、請求項 7 8 に記載の方法。

〔請求項 8 0〕

治療有効量の請求項 7 0 から 7 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物を、線維症を患う対象に投与することを含む、線維症を治療する方法。

10

〔請求項 8 1〕

前記線維症は肺線維症、腎線維症、および嚢胞性線維症から選ばれる、請求項 8 0 に記載の方法。

〔請求項 8 2〕

治療有効量の請求項 6 9 から 7 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物を、循環器疾患を患う対象に投与することを含む、循環器疾患を治療する方法。

〔請求項 8 3〕

前記循環器疾患はアテローム性動脈硬化、再狭窄、心肥大に関連する病気、および血管障害から選ばれる、請求項 8 2 に記載の方法。

〔請求項 8 4〕

20

治療有効量の請求項 6 9 から 7 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物を、ガンを患う対象に投与することを含む、ガン进行治疗する方法。

〔請求項 8 5〕

前記ガンは膀胱ガン、肺ガン、乳ガン、メラノーマ、結腸および直腸ガン、リンパ腫、子宮内膜ガン、膵臓ガン、肝臓ガン、腎臓ガン、前立腺ガン、白血病、および甲状腺ガンから選ばれる、請求項 8 4 に記載の方法。

【 0 2 5 5 】

前述の態様および実施例は例示のみを意図する。いかなる特定の態様、実施例、または特定の態様または実施例の要素も、どの請求項の決定的な、必須である、または不可欠の要素または特徴としても解釈されない。添付の請求項により定義される発明の範囲から離れず、開示された態様に様々な代替、修正、置換または他の変動がなされても良い。図および実施例を含む明細書は限定されるものでなく実例様式と見なされ、このような修正または置換は本発明の範囲内であると意図される。従って、本発明の範囲は上に挙げた実施例によってでなく添付の請求項およびそれらの法的な等価物で決定されるべきである。例えば、いずれかの方法または方法の請求項で列挙された段階はいかなる実行可能な順番で実行されても良く、いずれかの態様、実施例、請求項で表された順番に限定されない。

30

表 1 P D G F に対して 1 0 nM またはそれより少ない K d 値を持つ、4 1 4 9 - 8 1 および切断された変異体の配列代表



【表 1 - 1】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_1	C-G-C-C-C-T-C-G-T-C-C-C-A-T-C-T-C-Bn-Bn-A-C-G-A- C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A- G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G-A-G-Bn-G-A-A-C-A-C-C-A-A -C-C-G-A-G-A-A-C-G	1
4149-8_2	A-T-C-T-C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A- C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G- A-G-Bn-G-A-A-C-A	2
4149-8_4	A-T-C-T-C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A- C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G- A-G-Bn-G-A-A	3
4149-8_5	A-T-C-T-C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A- C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G- A-G-Bn-G	4
4149-8_6	A-T-C-T-C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A- C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G- A-G	5
4149-8_7	A-T-C-T-C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A- C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G	6
4149-8_8	A-T-C-T-C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A- C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C	7
4149-8_9	A-T-C-T-C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A- C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A	8
4149-8_10	A-T-C-T-C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A- C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C	9
4149-8_11	C-T-C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G- C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G-A-G- Bn-G-A-A-C-A	10
4149-8_12	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G-A-G-Bn-G -A-A-C-A	11

10

20

30

40

【表 1 - 2】

アプタマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_13	Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn -Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G-A-G-Bn-G-A-A- C-A	12
4149-8_20	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G-A-G-Bn-G -A-A-C	13
4149-8_21	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G-A-G-Bn-G -A-A	14
4149-8_22	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G-A-G-Bn-G -A	15
4149-8_23	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G-A-G-Bn-G	16
4149-8_24	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G-A-G-T	17
4149-8_25	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G-A-G	18
4149-8_26	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G-A	19
4149-8_27	C-T-C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G- C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C	20
4149-8_28	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C	21
4149-8_29	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-T	22
4149-8_30	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	23
4149-8_31	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C	24

10

20

30

40

【表 1 - 3】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_32	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G	25
4149-8_36	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C	26
4149-8_37	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-T	27
4149-8_38	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	28
4149-8_39	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C	29
4149-8_40	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G	30
4149-8_44	Bn-Bn-A'-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	31
4149-8_45	Bn-Bn-A-C'-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	32
4149-8_46	Bn-Bn-A-C-G'-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	33
4149-8_47	Bn-Bn-A-C-G-A'-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	34
4149-8_48	Bn-Bn-A-C-G-A-C'-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	35
4149-8_49	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A'-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	36
4149-8_50	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C'-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	37
4149-8_51	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G'-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	38
4149-8_52	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A'-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	39

10

20

30

40

【表 1 - 4】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_53	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C'-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	40
4149-8_54	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	41
4149-8_55	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C'-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	42
4149-8_56	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G'-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	43
4149-8_57	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C'-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	44
4149-8_58	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G'-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	45
4149-8_59	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A'-Bn-A-G-C-G	46
4149-8_60	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A'-G-C-G	47
4149-8_61	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G'-C-G	48
4149-8_62	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C'-G	49
4149-8_63	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G'	50
4149-8_64	C3-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	51
4149-8_67	Bn-Bn-A-C3-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	52
4149-8_68	Bn-Bn-A-C-C3-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	53
4149-8_69	Bn-Bn-A-C-G-C3-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	54

10

20

30

40

【表 1 - 5】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_70	Bn-Bn-A-C-G-A-C3-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	55
4149-8_71	Bn-Bn-A-C-G-A-C-C3-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	56
4149-8_72	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-C3-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	57
4149-8_73	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C3-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	58
4149-8_78	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C3-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	59
4149-8_79	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-C3-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	60
4149-8_80	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C3-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	61
4149-8_87	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-C3-Bn-A-G-C-G	62
4149-8_91	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C3-G	63
4149-8_92	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-C3	64
4149-8_93	Bn-Bn-A'-C-G-A'-C-Bn-A'-C-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G'-C-G -Bn-Bn-Bn-A'-Bn-A'-G'-C'-G'	65
4149-8_94	Bn-Bn-A'-C-G-A-C-Bn-A'-C-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A'-G-C-G'	66
4149-8_95	Bn-Bn-A-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A-G-C-G	67
4149-8_96	Bn-Bn-A-C-Heg-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-B n-A-Bn-A-G-C-G	68
4149-8_97	Bn-Bn-A-C-G-Heg-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-B n-A-Bn-A-G-C-G	69

10

20

30

40

【表 1 - 6】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_98	Bn-Bn-A-C-C3-C3-C3-C3-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C- G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	70
4149-8_99	Bn-Bn-A-C-C3-C3-C3-C3-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn- Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	71
4149-8_100	Bn-Bn-A-C-C3-C3-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A-G-C-G	72
4149-8_101	Bn-Bn-A'-C-G-C3-C-C3-C3-C-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G'-C-G -Bn-Bn-Bn-A'-Bn-A'-G'-C'-G'	73
4149-8_103	U'-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn- Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	74
4149-8_105	Bn-Bn-A-C-G-A-C-U'-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn- Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	75
4149-8_106	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-U'-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn- Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	76
4149-8_110	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-U'-A-Bn-A-G-C-G	77
4149-8_112	Bn-Nap-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	78
4149-8_113	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Nap-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	79
4149-8_114	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Nap-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	80
4149-8_115	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Nap-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	81
4149-8_116	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Na p-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	82
4149-8_117	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Nap-Bn-A-Bn-A-G-C-G	83
4149-8_118	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Nap-A-Bn-A-G-C-G	84

10

20

30

40

【表 1 - 7】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_119	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-Nap-A-G-C-G	85
4149-8_121	Nap-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	86
4149-8_122	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn -Bn-Bn-A-U <sup>1</sup> -A-G-C-G	87
4149-8_123	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn- Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	88
4149-8_124	Bn-Bn-A-C-Heg-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Nap-Bn- Bn-A-Bn-A-G-C-G	89
4149-8_125	Bn-Bn-A-C-Heg-Heg-G-U <sup>1</sup> -Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn -A-Bn-A-G-C-G	90
4149-8_126	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-Heg-G-U <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Nap-Bn- Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	91
4149-8_128	Bn-Nap-A <sup>1</sup> -C-Heg-Heg-G-Nap-Nap-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Nap- Nap-Bn-A-Nap-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	92
4149-8_130	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	93
4149-8_131	Bn-Bn-A-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Nap-Bn-Bn-A- Bn-A-G-C-G	94
4149-8_132	Bn-Bn-A-C-Heg-G-U <sup>1</sup> -Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-B n-A-G-C-G	95
4149-8_133	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-U <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Nap-Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	96
4149-8_135	Pe-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	97
4149-8_136	Bn-Pe-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	98
4149-8_137	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Pe-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	99

10

20

30

40

【表 1 - 8】

アダプター ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_138	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Pe-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	100
4149-8_139	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Pe-Bn-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	101
4149-8_140	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	102
4149-8_141	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Pe-A- Bn-A'-G-C-G'	103
4149-8_142	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Pe-A'-G-C-G'	104
4149-8_143	BT-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A -Bn-A'-G-C-G'	105
4149-8_144	Bn-BT-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A -Bn-A'-G-C-G'	106
4149-8_145	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-BT-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A -Bn-A'-G-C-G'	107
4149-8_146	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-BT-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A -Bn-A'-G-C-G'	108
4149-8_147	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-BT-Bn-Bn-A -Bn-A'-G-C-G'	109
4149-8_148	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-BT-Bn-A -Bn-A'-G-C-G'	110
4149-8_149	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-BT-A -Bn-A'-G-C-G'	111
4149-8_150	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- BT-A'-G-C-G'	112
4149-8_151	Th-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	113
4149-8_152	Bn-Th-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	114

10

20

30

40



【表 1 - 9】

アダプター ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_153	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Th-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	115
4149-8_154	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Th-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	116
4149-8_155	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Th-Bn-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	117
4149-8_156	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Th-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	118
4149-8_157	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Th-A- Bn-A'-G-C-G'	119
4149-8_158	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Th-A'-G-C-G'	120
4149-8_159	Nap-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A'-G-C-G'	121
4149-8_160	Bn-Nap-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A'-G-C-G'	122
4149-8_161	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Nap-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A'-G-C-G'	123
4149-8_162	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Nap-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A'-G-C-G'	124
4149-8_163	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Nap-Bn-Bn- A-Bn-A'-G-C-G'	125
4149-8_164	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Nap-Bn- A-Bn-A'-G-C-G'	126
4149-8_165	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Nap- A-Bn-A'-G-C-G'	127
4149-8_166	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Nap-A'-G-C-G'	128
4149-8_167	Ib-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	129

10

20

30

40

【表 1 - 10】

アプタマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_168	Bn-Ib-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	130
4149-8_169	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Ib-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	131
4149-8_170	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	132
4149-8_171	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Ib-Bn-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	133
4149-8_172	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Ib-Bn-A- Bn-A'-G-C-G'	134
4149-8_173	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Ib-A- Bn-A'-G-C-G'	135
4149-8_174	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Ib-A'-G-C-G'	136
4149-8_175	Trp-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- -Bn-A'-G-C-G'	137
4149-8_176	Bn-Trp-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- -Bn-A'-G-C-G'	138
4149-8_177	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Trp-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- -Bn-A'-G-C-G'	139
4149-8_181	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Trp-A- -Bn-A'-G-C-G'	140
4149-8_182	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Trp-A'-G-C-G'	141
4149-8_183	2Nap-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A'-G-C-G'	142
4149-8_184	Bn-2Nap-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A'-G-C-G'	143
4149-8_185	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-2Nap-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A'-G-C-G'	144

10

20

30

40

【表 1 - 1 1】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_187	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-2Nap-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	145
4149-8_188	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-2Nap-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	146
4149-8_189	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-2Nap-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	147
4149-8_190	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-2Nap-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	148
4149-8_191	2NE-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	149
4149-8_192	Bn-2NE-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	150
4149-8_193	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-2NE-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	151
4149-8_194	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-2NE-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	152
4149-8_195	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-2NE-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	153
4149-8_197	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-2NE-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	154
4149-8_198	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-2NE-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	155
4149-8_199	NE-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	156
4149-8_200	Bn-NE-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	157
4149-8_201	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-NE-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	158
4149-8_202	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-NE-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	159

10

20

30

40

【表 1 - 1 2】

アダプター ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_203	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-NE-Bn-Bn-A -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	160
4149-8_204	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-NE-Bn-A -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	161
4149-8_205	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-NE-A -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	162
4149-8_206	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A NE-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	163
4149-8_207	MBn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	164
4149-8_208	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	165
4149-8_209	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-MBn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	166
4149-8_210	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-MBn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	167
4149-8_211	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-MBn-Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	168
4149-8_212	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-MBn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	169
4149-8_213	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-MBn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	170
4149-8_214	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- MBn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	171
4149-8_215	PP-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	172
4149-8_216	Bn-PP-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	173
4149-8_217	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-PP-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	174

10

20

30

40

【表 1 - 13】

アダプター ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_218	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-PP-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	175
4149-8_219	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-PP-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	176
4149-8_220	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-PP-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	177
4149-8_221	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-PP-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	178
4149-8_222	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- PP-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	179
4149-8_223	Tyr-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	180
4149-8_224	Bn-Tyr-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	181
4149-8_225	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Tyr-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	182
4149-8_226	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Tyr-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	183
4149-8_227	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Tyr-Bn-Bn-A- -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	184
4149-8_228	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Tyr-Bn-A- -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	185
4149-8_229	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Tyr-A- -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	186
4149-8_230	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Tyr-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	187
4149-8_231	FBn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	188
4149-8_232	Bn-FBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	189

10

20

30

40

【表 1 - 1 4】

アダプター ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_233	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-FBn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	190
4149-8_234	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-FBn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	191
4149-8_235	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-FBn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	192
4149-8_236	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-FBn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	193
4149-8_237	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-FBn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	194
4149-8_238	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-FBn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	195
4149-8_239	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C <sup>0</sup> -Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	196
4149-8_240	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C <sup>0</sup> -A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	197
4149-8_241	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>0</sup> -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	198
4149-8_242	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C <sup>0</sup> -G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	199
4149-8_243	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C <sup>0</sup> -G <sup>1</sup>	200
4149-8_245	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	201
4149-8_246	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G <sup>1</sup> -Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	202
4149-8_247	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G <sup>1</sup> -C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	203
4149-8_248	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G <sup>1</sup> -Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	204

10

20

30

40

【表 1 - 15】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_249	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C-G <sup>1</sup>	205
4149-8_254	Tyr-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-FBn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-2Nap-Bn-B n-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	206
4149-8_255	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	207
4149-8_256	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-2Nap-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	208
4149-8_257	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-NE-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	209
4149-8_259	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Ib-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-B n-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	210
4149-8_260	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	211
4149-8_261	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Pe-Pe-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	212
4149-8_262	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Th-Th-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	213
4149-8_263	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-2Nap-Pe-Th- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	214
4149-8_264	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Th-Pe-Th-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	215
4149-8_265	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Ib-Pe-Th-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	216
4149-8_266	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Th-Pe-Th-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	217
4149-8_267	Bn-Ib-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Ib-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Ib-Bn-Bn-A-Bn -A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	218
4149-8_268	2Nap-2Nap-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-2Nap-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-2Nap- Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	219

10

20

30

40

【表 1 - 16】

アダプター ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_269	NE-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-NE-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A -NE-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	220
4149-8_270	Th-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Th-Bn-Th-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	221
4149-8_271	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C-G <sup>1</sup>	222
4149-8_272	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C-G <sup>1</sup>	223
4149-8_273	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	224
4149-8_274	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A -Bn-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C-G <sup>1</sup>	225
4149-8_275	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-2Nap-Pe-Th- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	226
4149-8_279	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Th-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	227
4149-8_280	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A <sup>1</sup> - Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	228
4149-8_281	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A- Bn-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C-G <sup>1</sup>	229
4149-8_282	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Th-A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	230
4149-8_283	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Th-A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C-G <sup>1</sup>	231
4149-8_284	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>0</sup> -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	232
4149-8_285	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Bn-Bn- A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	233
4149-8_286	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Bn-Bn- A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	234

10

20

30

40



【表 1 - 17】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_287	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C3-C3-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A'-Bn-A'-G-C-G'	235
4149-8_288	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C3--G-C-G-Bn-Bn-Bn-A'-Bn-A'-G-C-G'	236
4149-8_289	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C3-C'-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A'-Bn-A'-G-C-G'	237
4149-8_290	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C3-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A'-Bn-A'-G-C-G'	238
4149-8_291	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-Heg-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A'-Bn-A'-G-C-G'	239
4149-8_292	Bn-Bn-A-C-G-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	240
4149-8_293	Bn-Bn-A-C-C-A-C-G--G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	241
4149-8_294	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-T-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A'-G-C-G'	242
4149-8_295	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A'-G-C-G'	243
4149-8_296	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-G-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A'-G-C-G'	244
4149-8_297	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-T-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A'-G-C-G'	245
4149-8_298	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-A-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A'-G-C-G'	246
4149-8_299	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-G-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A'-G-C-G'	247
4149-8_300	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-T-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A'-G-C-G'	248
4149-8_301	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A'-G-C-G'	249

10

20

30

40

【表 1 - 18】

アダプター ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_302	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-G-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn -A'-G-C-G'	250
4149-8_303	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn -A'-G-C-G'	251
4149-8_307	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn'-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A -Bn-A'-G-C-G'	252
4149-8_308	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn'-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A -Bn-A'-G-C-G'	253
4149-8_311	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn'-A -Bn-A'-G-C-G'	254
4149-8_312	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn'-A'-G-C-G'	255
4149-8_321	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Bn-A- MBn-A'-G-C-G'	256
4149-8_322	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A- MBn-A'-G-C-G'	257
4149-8_323	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C'-G-C-G-Bn-Pe-Th-A '-Bn-A'-G-C-G'	258
4149-8_324	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C'-G-C-G-Th-Pe-Th-A' -Bn-A'-G-C-G'	259
4149-8_325	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn'-Bn-A-C-A'-C'-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A'-Bn-A'-G-C-G'	260
4149-8_326	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C'-G-C-G-Bn-Bn-Bn'- A'-Bn-A'-G-C-G'	261
4149-8_327	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn'-Bn-A-C-A'-C'-G-C-G-Bn-Bn-Bn'- A'-Bn-A'-G-C-G'	262
4149-8_328	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C'-G-C-G-Bn-Pe-Bn'- A'-Bn-A'-G-C-G'	263
4149-8_329	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C'-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A '-MBn-A'-G-C-G'	264

10

20

30

40

【表 1 - 19】

アダプター ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_330	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C'-G-C-G-Bn-Pe-Bn-A '-MBn-A'-G-C-G'	265
4149-8_331	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C'-G-C-G-Bn-Pe-Th-A '-MBn-A'-G-C-G'	266
4149-8_332	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C3-C'-G-C-G-Bn-Pe-Bn-A '-MBn-A'-G-C-G'	267
4149-8_333	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C3-C'-G-C-G-Bn-Pe-Th-A '-MBn-A'-G-C-G'	268
4149-8_334	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A- Bn-A'-G-C-G'-Heg-Heg-Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A '-C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A'-G-C-G'	269
4149-8_335	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A- Bn-A'-G-C-G'-Heg-Heg-Heg-Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A -C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A'-G-C-G'	270
4149-8_336	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A- Bn-A'-G-C-G'-Heg-Heg-Heg-Heg-Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn- Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A'-G-C-G'	271
4149-8_337	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A- Bn-A'-G-C-G'-Heg-Heg-Heg-Heg-Heg-Bn-Bn-A'-C-Heg-G -Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A'-G-C-G'	272
4149-8_338	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A- Bn-A'-G-C-G'-Heg-Heg-Heg-Heg-Heg-Heg-Bn-Bn-A'-C-H eg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A'-G-C-G'	273
4149-8_339	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A- Bn-A'-G-C-G'-C3-(3'-Doubler)-T	274
4149-8_340	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A- Bn-A'-G-C-G'-Heg-(3'-Doubler)-T	275
4149-8_341	Bn-Bn-A'-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A'-C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A- Bn-A'-G-C-G'-Heg-Heg-(3'-Doubler)-T	276

10

20

30

40

【表 1 - 2 0】

アプタマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_342	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -Heg-Heg-Heg-(3'-Doubler)-T	277
4149-8_343	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	278
4149-8_344	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G <sup>0</sup> -Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	279
4149-8_345	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G <sup>0</sup> -C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	280
4149-8_346	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>0</sup> -Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	281
4149-8_347	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G <sup>0</sup> -C-G <sup>1</sup>	282
4149-8_349	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C <sup>0</sup> -Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	283
4149-8_352	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C <sup>0</sup> -G <sup>1</sup>	284
4149-8_353	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A <sup>0</sup> -C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	285
4149-8_354	2Nap-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	286
4149-8_355	FBn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	287
4149-8_356	NE-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	288
4149-8_357	2NE-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	289
4149-8_358	PP-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	290
4149-8_359	Ib-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> - Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	291

10

20

30

40

【表 1 - 2 1】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_360	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	292
4149-8_361	T-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	293
4149-8_362	Bn-T-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	294
4149-8_363	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-T-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	295
4149-8_369	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A <sup>2</sup> -C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	296
4149-8_370	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A <sup>2</sup> -C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	297
4149-8_371	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	298
4149-8_372	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	299
4149-8_373	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A <sup>2</sup> -C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	300
4149-8_374	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A <sup>2</sup> -C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	301
4149-8_375	FBn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Bn-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	302
4149-8_376	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Bn-B n <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	303
4149-8_377	FBn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Bn- Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	304
4149-8_378	FBn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Bn-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	305
4149-8_379	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Bn-B n <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	306

10

20

30

40

【表 1 - 2 2】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_380	FBn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Bn- Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	307
4149-8_381	FBn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	308
4149-8_382	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	309
4149-8_383	FBn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	310
4149-8_384	FBn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	311
4149-8_385	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	312
4149-8_386	FBn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	313
4149-8_388	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A <sup>2</sup> -C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Bn-Bn <sup>1</sup> - -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	314
4149-8_389	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A <sup>2</sup> -C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Bn-Bn <sup>1</sup> - -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	315
4149-8_390	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A <sup>2</sup> -C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	316
4149-8_391	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A <sup>2</sup> -C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Bn-Bn <sup>1</sup> - -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	317
4149-8_392	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A <sup>2</sup> -C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Bn-Bn <sup>1</sup> - -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	318
4149-8_393	FBn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A <sup>2</sup> -C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	319
4149-8_394	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A <sup>2</sup> -C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	320
4149-8_395	FBn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A <sup>2</sup> -C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> - -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	321

10

20

30

40

【表 1 - 2 3】

アダプター ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番 号
4149-8_396	FBn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A <sup>2</sup> -C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Pe-B n <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	322
4149-8_397	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A <sup>2</sup> -C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Pe-B n <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	323
4149-8_398	FBn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A <sup>2</sup> -C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Pe- Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	324
4149-8_399	FBn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A <sup>2</sup> -C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Bn -Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	325
4149-8_400	FBn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A <sup>2</sup> -C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>2</sup> -Bn-Bn -Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	326
4149-8_402	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-G-C-G--Bn- Bn-Bn-A-Bn-A-G-C	327
4149-8_403	Bn-Bn-A-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A-G-C-G--Bn-Bn-Bn-A-Bn -A-G-C	328
4149-8_404	Bn-Bn-A-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C3-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-B n-A-G-C	329
4149-8_418	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -Bn-Bn- Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	330
4149-8_419	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -Nap-Bn- Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	331
4149-8_420	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -2Nap-B n-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	332
4149-8_421	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C-G-Bn-Bn- Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	333
4149-8_422	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C-G <sup>1</sup> -Bn-Bn- Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	334
4149-8_423	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C-G-Nap -Bn-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	335
4149-8_424	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-Bn-Bn- Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	336

10

20

30

40

【表 1 - 2 4】

アダプター ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_425	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Bn-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	337
4149-8_431	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A2-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G2-Nap-Bn2-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	338
4149-8_432	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A2-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G2-Bn-Bn2-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	339
4149-8_433	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A2-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G2-Nap-Bn-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	340
4149-8_434	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A2-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G2-Bn-Bn-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	341
4149-8_435	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A2-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G2-Nap-Bn2-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	342
4149-8_436	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A2-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G2-Bn-Bn2-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	343
4149-8_437	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A2-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G2-Nap-Bn-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	344

上付き文字なしはデオキシリボースを表す

上付き文字 o は 2' - フルオロを表す。

上付き文字 1 は 2' - O - メチルを表す。

上付き文字 2 はホスホロチオエート (デオキシリボース) を表す。

C 3 = 3 炭素リンカー

H e g = ヘキサエチレングリコールリンカー

N a p = ナフチル - d U

P e = フェネチル - d U

B T = ベンゾチオフェニル - d U

T h = チオフェニル - d U

I b = イソブチル - d U

T r p = トリプタミニル - d U

2 N a p = 2 - ナフチル - d U

2 N E = 2 - ナフチルエチル - d U

N E = ナフチルエチル - d U

M B n = メチレンジオキシベンジル - d U

P P = フェンプロピル - d U

T y r = チロシル - d U

F B n = フルオロベンジル - d U

B n = ベンジル - d U

3' - ダブラー = シンメトリックダブラーホスホラミダイト (グレンリサーチ (Glen Rese

10

20

30

40

50



arch) カタログ番号 10-1920-02)

【表 1 - 2 5】

表 1 a PDGF アプタマー 4 1 4 9 - 8 \_ 2 6 0 (S L 5) のホモ二量体 :

			SOMAmer (2.5 nM) PDGF-BB (1nM) 二連	
Seq1	K <sub>d</sub> (M)	4149-8_38 との比	相対的 PDGFRb リン酸化	
4149-8_38	3.00E-11	1.0	5.4%	3.6%
4149-8_334	4.92E-11	1.6	1.7%	1.7%
4149-8_335	5.46E-11	1.8	1.5%	1.5%
4149-8_336	1.84E-11	0.61	1.7%	2.3%
4149-8_337	3.79E-12	0.1		
4149-8_338	2.84E-11	0.93	1.4%	1.3%
4149-8_339 3'DBLR	6.20E-12	0.2	2.7%	3.6%
4149-8_340 3'DBLR	1.89E-11	0.6	1.7%	3.2%
4149-8_341 3'DBLR	2.72E-11	0.9	1.5%	1.9%
4149-8_342 3'DBLR	1.81E-11	0.6	1.6%	1.5%

10

20

30

【表 2 - 1】

表 2 10 nM より多いPDGFに対する $K_d$ 値をもつ切断された変異体の配列  
代表

アダプター ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_14	C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G-A-G-Bn-G-A-A-C-A	345
4149-8_15	A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn -A-G-C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G-A-G-Bn-G-A-A-C-A	346
4149-8_16	Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G -C-G-Bn-C-A-A-C-C-C-G-A-G-Bn-G-A-A-C-A	347
4149-8_17	C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G- Bn-C-A-A-C-C-C-G-A-G-Bn-G-A-A-C-A	348
4149-8_18	Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C -A-A-C-C-C-G-A-G-Bn-G-A-A-C-A	349
4149-8_19	A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G-Bn-C-A-A-C -C-C-G-A-G-Bn-G-A-A-C-A	350
4149-8_33	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G -Bn-Bn-Bn-A-Bn-A	351
4149-8_34	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G -Bn-Bn-Bn-A-T	352
4149-8_35	C-Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G -Bn-Bn-Bn-A	353
4149-8_41	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A	354
4149-8_42	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-T	355
4149-8_43	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A	356
4149-8_65	Bn-C3-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	357

10

20

30

40

【表 2 - 2】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_66	Bn-Bn-C3-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	358
4149-8_74	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-C3-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	359
4149-8_75	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-C3-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	360
4149-8_76	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-C3-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	361
4149-8_77	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-C3-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	362
4149-8_81	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-C3-C-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	363
4149-8_82	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C3-G- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	364
4149-8_83	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-C3- Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	365
4149-8_84	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-C 3-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	366
4149-8_85	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-C3-Bn-A-Bn-A-G-C-G	367
4149-8_86	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-C3-A-Bn-A-G-C-G	368
4149-8_88	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-C3-A-G-C-G	369
4149-8_89	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-C3-G-C-G	370
4149-8_90	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-C3-C-G	371
4149-8_102	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-G-C3-C-C3-C3-C-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C- G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	372

10

20

30

40

【表 2 - 3】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_104	Bn-U <sup>1</sup> -A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	373
4149-8_107	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-U <sup>1</sup> -A-C-A-C-G-C-G-B n-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	374
4149-8_108	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-U <sup>1</sup> -Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	375
4149-8_109	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-B n-U <sup>1</sup> -Bn-A-Bn-A-G-C-G	376
4149-8_111	Nap-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G- Bn-Bn-Bn-A-U <sup>1</sup> -A-G-C-G	377
4149-8_127	Bn-Nap-A-C-Heg-Heg-G-U <sup>1</sup> -Nap-A-C-A-C-G-C-G-Nap- Nap-Bn-A-Nap-A-G-C-G	378
4149-8_129	Bn-Nap-A <sup>1</sup> -C-Heg-Heg-G-U <sup>1</sup> -Nap-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Nap- Nap-Bn-A-Nap-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	379
4149-8_134	Bn-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn- A-G-C-G	380
4149-8_178	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Trp-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	381
4149-8_179	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Trp-Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	382
4149-8_180	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Trp-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	383
4149-8_186	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-2Nap-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-B n-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	384
4149-8_196	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-2NE-Bn -A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	385
4149-8_244	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	386
4149-8_250	Tyr-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-FBn-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-2Nap-Pe -Th-A-NE-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	387

10

20

30

40

【表 2 - 4】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_251	Tyr-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-FBn-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-2Nap-P e-Th-A <sup>1</sup> -NE-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C-G <sup>1</sup>	388
4149-8_252	Trp-Ib-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-NE-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Th-Pe-Th-A -MBn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	389
4149-8_253	Trp-Ib-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-NE-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Th-Pe-Th- A <sup>1</sup> -MBn-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C-G <sup>1</sup>	390
4149-8_258	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-U <sup>1</sup> -Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	391
4149-8_276	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-FBn-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Pe-Th- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	392
4149-8_277	Tyr-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	393
4149-8_278	Tyr-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-FBn-Ib-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-2Nap-Pe-T h-A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	394
4149-8_304	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-C3-G-Bn-Bn-A-C-C3--G-C-G-Bn-Bn-Bn-A- Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	395
4149-8_305	Bn <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	396
4149-8_306	Bn-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	397
4149-8_309	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	398
4149-8_310	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn <sup>1</sup> -Bn- A-Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	399
4149-8_348	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A <sup>0</sup> -C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	400
4149-8_350	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C <sup>0</sup> -A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	401
4149-8_351	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C <sup>0</sup> -G-Bn-Pe-Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	402

10

20

30

40

【表 2 - 5】

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_364	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-T-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	403
4149-8_365	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-T-Bn-Bn-A -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	404
4149-8_366	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-T-Bn-A -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	405
4149-8_367	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-T-A -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	406
4149-8_368	Bn-Bn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A <sup>1</sup> -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn- A-T-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	407
4149-8_405	Bn-Bn-A-C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C3-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn- A-G	408
4149-8_426	Bn-MBn-A <sup>1</sup> -C-Heg-G-Bn <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -Bn-Bn -Bn <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Bn-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	409

上付き文字なしはデオキシリボースを表す

上付き文字 o は 2' - フルオロを表す。

上付き文字 1 は 2' - O - メチルを表す。

上付き文字 2 はホスホロチオエート (デオキシリボース) を表す。

C 3 = 3 炭素リンカー

H e g = ヘキサエチレングリコールリンカー

N a p = ナフチル - d U

P e = フェネチル - d U

B T = ベンゾチオフェニル - d U

T h = チオフェニル - d U

I b = イソブチル - d U

T r p = トリプタミニル - d U

2 N a p = 2 - ナフチル - d U

2 N E = 2 - ナフチルエチル - d U

N E = ナフチルエチル - d U

M B n = メチレンジオキシベンジル - d U

P P = フェンブロピル - d U

T y r = チロシル - d U

F B n = フルオロベンジル - d U

B n = ベンジル - d U

【表 3 - 1】

表 3 PDGF アプタマークローン 4149-8\_\_1 の切断

アプタマ ーID 番号	配列 (5' → 3')	長さ	K <sub>d</sub> (nM)	配列 番号
4149-8_2	A-T-C-T-C-Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a- c-g-c-g-z-z-z-a-z-a-g-c-g-z-c-a-a-c-c-c-g-a-g-z- g-a-a-c-a	50	0.05	2
4149-8_5	A-T-C-T-C-Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a- c-g-c-g-z-z-z-a-z-a-g-c-g-z-c-a-a-c-c-c-g-a-g-z- g	46	0.02	4
4149-8_7	A-T-C-T-C-Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a- c-g-c-g-z-z-z-a-z-a-g-c-g-z-c-a-a-c-c-c-g	42	0.02	6
4149-8_9	A-T-C-T-C-Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a- c-g-c-g-z-z-z-a-z-a-g-c-g-z-c-a-a	38	0.03	8
4149-8_1 0	A-T-C-T-C-Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a- c-g-c-g-z-z-z-a-z-a-g-c-g-z-c	36	0.05	9
4149-8_1 1	C-T-C-Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c- -g-z-z-z-a-z-a-g-c-g-z-c-a-a-c-c-c-g-a-g-z-g-a-a- -c-a	48	0.03	10
4149-8_1 2	C-Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z- z-z-a-z-a-g-c-g-z-c-a-a-c-c-c-g-a-g-z-g-a-a-c-a	46	0.04	11
4149-8_1 3	Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z-z-a- -z-a-g-c-g-z-c-a-a-c-c-c-g-a-g-z-g-a-a-c-a	44	0.8	12
4149-8_1 4	C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z-z-a-z-a- g-c-g-z-c-a-a-c-c-c-g-a-g-z-g-a-a-c-a	42	13	345
4149-8_1 6	z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z-z-z-a-z-a-g-c-g-z-c- a-a-c-c-c-g-a-g-z-g-a-a-c-a	38	22	347
4149-8_1 8	z-z-a-c-a-c-g-c-g-z-z-z-a-z-a-g-c-g-z-c-a-a-c-c- c-g-a-g-z-g-a-a-c-a	34	13	349
4149-8_1 9	a-c-a-c-g-c-g-z-z-z-a-z-a-g-c-g-z-c-a-a-c-c-c-g- a-g-z-g-a-a-c-a	32	74	350

10

20

30

40

【表 3 - 2】

4149-8_2 6	C-Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z- z-z-a-z-a-g-c-g-z-c-a-a-c-c-c-g-a	39	0.08	19
4149-8_2 7	C-T-C-Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c -g-z-z-z-a-z-a-g-c-g-z-c	34	0.09	20
4149-8_2 9	C-Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z- z-z-a-z-a-g-c-g-T	31	0.07	22
4149-8_3 0	C-Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z- z-z-a-z-a-g-c-g	30	0.07	23
4149-8_3 1	C-Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z- z-z-a-z-a-g-c	29	0.30	24
4149-8_3 2	C-Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z- z-z-a-z-a-g	28	6	25
4149-8_3 3	C-Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z- z-z-a-z-a	27	>1000	351
4149-8_3 7	Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z-z-z -a-z-a-g-c-g-T	30	0.04	27
4149-8_3 8	Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z-z-z -a-z-a-g-c-g	29	0.05	28
4149-8_3 9	Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z-z-z -a-z-a-g-c	28	.11	29
4149-8_4 0	Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z-z-z -a-z-a-g	27	1.5	30
4149-8_4 1	Z-Z-A-C-G-A-c-z-a-c-g-z-z-a-c-a-c-g-c-g-z-z-z -a-z-a	26	>1000	354

10

20

30



【表 4】

表 4 データ収集、リファインメントおよびモデル統計

データ収集		
リガンド	4149-8_260	4149-8_255
空間群	P41212	P41212
単位格子 パラメータ: a, b, c(Å)	59.10, 59.10, 167.01	59.40, 59.40 168.2
波長 (Å)	0.97918	0.97918
分解能範囲 (Å)	50.0-2.20 (2.26-2.20)	50.0-2.30 (2.36-2.30)
独特の反射	15629	13750
完全性(%)	96.8 (99.1)	97.2 (98.4)
R <sub>merge</sub>	4.0 (57.8)	6.4 (57.2)
平均 I/σ(I)	25.3 (3.4)	19.3 (2.6)
リファインメント		
リガンド	4149-8_260	4149-8_255
分解能範囲(Å)	50.0-2.20 (2.26-2.20)	50.0-2.30 (2.36-2.30)
R <sub>cryst</sub>	0.225(0.329)	0.239(0.366)
R <sub>free</sub>	0.262 (0.353)	0.279 (0.526)
R.m.s.d. 結合 (Å)	0.018	0.018
R.m.s.d. 角度 (°)	1.882	2.017
原子総数	1382	1355
平均 B ファクター (Å <sup>2</sup> )	43.68	43.86
favored 領域の残基(%)	98.9	98.9
allowed 領域の残基(%)	100.0	100.0
Molprobability スコア (百分 位数)	1.45 (99th)	1.41 (99th)
PDB ID	4HQU	4HQX

かっこ内の値は 20 のうちの最外部分解能値を示す。

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(h)}$$

$$R_{\text{free}} = \frac{\sum_h ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum_h |F_{\text{obs}}|}$$

フリー R ファクターはリファインメントから除かれた反射の 5 % を用いて計算された。(CCP4 suite: タンパク質結晶学のためのプログラム, 1994)。

\* リガンド B ファクターはタンパク質単量体の活性部位のリガンドのものである。溶媒 (PEG、グリセロールなど) からのリガンドは計算に含まれない。

【表 5】

表 5 B型DNAと比較したPDGFB Bアプタマー塩基対パラメータ

パラメータ	B-DNA	5'ステムループ		ミニノット S1		ミニノット S2	
相補的塩基対パラメータ							
Buckle (°)	0.5 (6.7)	-5.67 (7.90)		0.32 (22.8)		-0.74 (15.3)	
Propeller (°)	-11.4 (5.3)	-9.84 (6.10)		7.43 (10.4)		2.42 (7.75)	
Opening (°)	0.60 (3.1)	-8.13 (25.2)		7.86 (12.5)		0.35 (0.40)	
Shear (Å)	0.00 (0.21)	1.12 (1.42)		1.29 (2.52)		-0.03 (0.42)	
Stretch (Å)	-0.15 (0.12)	-0.38 (0.66)		1.96 (3.55)		-0.12 (0.42)	
Stagger (Å)	0.09 (0.19)	0.04 (0.61)		-0.45 (0.69)		0.28 (0.05)	
塩基対ステップパラメータ		U2, A3/ U7, U8	A3, G4/ G6, U7	C10, A9/ U16, G15	A9, U20/ U17, U16	C12, G13/ C23, G24	G13, C14/ G22, C23
Tilt (°)	-0.1 (2.5)	-0.80	-1.45	-4.65	-5.83	-2.39	3.86
Roll (°)	0.6 (5.2)	0.34	0.55	6.12	-5.64	4.19	3.94
Twist (°)	36 (6.8)	24.1	33.3	25.3	15.9	29	33.9
Shift (Å)	-0.02 (0.45)	3.20	-0.12	-0.90	-1.45	-0.17	0.78
Slide (Å)	0.23 (0.81)	0.25	-0.24	0.27	-4.49	0.21	-0.4
Rise (Å)	3.32 (0.19)	2.68	3.28	2.98	3.58	2.73	3.13
局所的ならせん状パラメータ							
Inclination (°)	2.1 (9.2)	0.81	0.96	13.6	-18.9	8.28	6.72
Tip (°)	0.0 (4.3)	1.92	2.52	10.4	19.5	4.72	-6.57
Helical twist (°)	36.5 (6.6)	24.1	33.4	26.3	17.8	29.4	34.3
x-displacement (Å)	0.05 (1.28)	0.52	-0.5	-0.97	-9.84	-0.34	-1.28
y-displacement (Å)	0.02 (0.87)	-7.89	-0.03	0.81	-0.12	-0.09	-0.73
Helical rise (Å)	3.29 (0.21)	2.58	3.28	3.07	5.08	2.73	3.13

10

20

【表 6 - 1】

表 6 PDGF アプタマークローン 5169-4 の切断

アプタマー ID 番号	配列 (5' → 3')	K <sub>d</sub> (nM)	配列 番号
5169-4_3	C-T-G-C-C-P-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G- C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G-C-P-A-C-C-C-A-G- P-G-A-A-P-G-A-G-G-A	0.029	410
5169-4_4	C-C-P-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C- A-P-C-P-A-G-A-G-G-C-P-A-C-C-C-A-G-P-G-A- A-P-G-A-G-G-A	0.027	411
5169-4_5	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C- P-A-G-A-G-G-C-P-A-C-C-C-A-G-P-G-A-A-P-G- A-G-G-A	0.031	412
5169-4_6	C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G- A-G-G-C-P-A-C-C-C-A-G-P-G-A-A-P-G-A-G-G- -A	67	413
5169-4_7	C-T-G-C-C-P-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G- C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G-C-P-A-C-C-C-A-G- P-G-A-A-P-G-A	0.014	414
5169-4_8	C-T-G-C-C-P-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G- C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G-C-P-A-C-C-C-A-G- P-G-A-A	0.036	415
5169-4_9	C-T-G-C-C-P-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G- C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G-C-P-A-C-C-C-A-G- P	0.72	416
5169-4_10	C-T-G-C-C-P-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G- C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G-C-P-A-C-C-C	0.63	417
5169-4_11	C-T-G-C-C-P-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G- C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G-C-P-A	0.60	418
5169-4_12	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C- P-A-G-A-G-G-C-P-A-C-C-C-A-G-P-G-A-A	0.064	419

10

20

30

40

【表 6 - 2】

5169-4_13	G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G-C-P-A-C-C-C-A-G-P-G-A-A	0.027	420
5169-4_14	A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G-C-P-A-C-C-C-A-G-P-G-A-A	0.17	421
5169-4_15	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G-C-P-A-C-C-C-A-G-P-G-A	0.019	422
5169-4_16	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G-C-P-A-C-C-C-A-G-P-G	0.016	423
5169-4_17	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G-C-P-A-C-C-C-A-G-P	0.020	424
5169-4_18	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G-C-P-A	0.026	425
5169-4_19	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G-C-P	0.012	426
5169-4_20	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G-C	0.014	427
5169-4_21	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G-G	0.021	428
5169-4_22	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G	0.015	429
5169-4_23	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G-A	0.020	430
5169-4_24	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G	0.021	431
5169-4_25	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A	0.020	432
5169-4_26	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.017	433
5169-4_27	G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G-A	0.062	434

10

20

30

40

【表 6 - 3】

5169-4_28	G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G	0.048	435
5169-4_29	G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A	0.062	436
5169-4_30	G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.062	437
5169-4_32	G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-A-G-A-G	0.053	438

10

【表 7】

表 7 5169-4\_26の全ての位置におけるC3スペーサー置換

アダプター ID 番号	配列 (5' → 3')	K <sub>d</sub> (nM)	配列 番号
5169-4_59	C3-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.053	439
5169-4_60	C-C3-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	27	440
5169-4_61	C-G-C3-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	NB	441
5169-4_62	C-G-A-C3-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	42	442
5169-4_63	C-G-A-C-C3-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	29	443
5169-4_64	C-G-A-C-A-C3-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.054	444
5169-4_65	C-G-A-C-A-G-C3-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.074	445
5169-4_66	C-G-A-C-A-G-C-C3-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	8.5	446
5169-4_67	C-G-A-C-A-G-C-A-C3-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	NB	447
5169-4_68	C-G-A-C-A-G-C-A-P-C3-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	NB	448
5169-4_69	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-C3-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	NB	449
5169-4_70	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-C3-P-G-C-A-C-A-P-C-P	NB	450
5169-4_71	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-C3-G-C-A-C-A-P-C-P	NB	451
5169-4_72	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-C3-C-A-C-A-P-C-P	230	452
5169-4_73	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C3-A-C-A-P-C-P	0.015	453
5169-4_74	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-C3-C-A-P-C-P	0.37	454
5169-4_75	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C3-A-P-C-P	0.14	455
5169-4_76	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-C3-P-C-P	1.3	456
5169-4_77	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-C3-C-P	NB	457
5169-4_78	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C3-P	0.28	458
5169-4_79	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-C3	NB	459

20

30

40

【表 8】

表 8 5169-4\_26における2' オーメチルおよびデオキシチミジン置換

アダマー ID 番号	配列 (5' → 3')	K <sub>d</sub> (nM)	配列 番号
5169-4_33	C <sup>I</sup> -G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.027	460
5169-4_34	C-G-A-C <sup>I</sup> -A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.033	461
5169-4_35	C-G-A-C-A-G-C <sup>I</sup> -A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.016	462
5169-4_36	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C <sup>I</sup> -A-C-A-P-C-P	0.028	463
5169-4_37	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C <sup>I</sup> -A-P-C-P	0.041	464
5169-4_38	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C <sup>I</sup> -P	0.022	465
5169-4_39	C-G <sup>I</sup> -A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.058	466
5169-4_40	C-G-A-C-A-G <sup>I</sup> -C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.024	467
5169-4_41	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G <sup>I</sup> -P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.097	468
5169-4_42	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G <sup>I</sup> -C-A-C-A-P-C-P	0.0069	469
5169-4_43	C-G-A <sup>I</sup> -C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.16	470
5169-4_44	C-G-A-C-A <sup>I</sup> -G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.53	471
5169-4_45	C-G-A-C-A-G-C-A <sup>I</sup> -P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.93	472
5169-4_46	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A <sup>I</sup> -P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.093	473
5169-4_47	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A <sup>I</sup> -C-A-P-C-P	0.016	474
5169-4_48	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A <sup>I</sup> -P-C-P	0.014	475
5169-4_49	C-G-A-C-A-G-C-A-P <sup>I</sup> -G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.53	476
5169-4_50	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P <sup>I</sup> -A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.047	477
5169-4_51	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P <sup>I</sup> -G-C-A-C-A-P-C-P	0.32	478
5169-4_52	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P <sup>I</sup> -C-P	0.31	479
5169-4_53	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P <sup>I</sup>	0.022	480
5169-4_54	C-G-A-C-A-G-C-A-T-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	44	481
5169-4_55	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-T-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	7.8	482
5169-4_56	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-T-G-C-A-C-A-P-C-P	NB	483
5169-4_57	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-T-C-P	120	484
5169-4_58	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-T	NB	485

10

20

30

40

【表 9 - 1】

表 9 PDGF アプタマー 5169-4\_26 における複数の 2'-O-メチル置換

アプタマー ID 番号	配列 (5' → 3')	K <sub>d</sub> (nM)	配列番号
5169-4_80	C-G-A-C-A-G-C <sup>1</sup> -A-P-G-P-A-P-G-C-A <sup>1</sup> -C-A <sup>1</sup> -P-C-P	0.0061	486
5169-4_81	C-G-A-C-A-G-C <sup>1</sup> -A-P-G-P-A-P-G <sup>1</sup> -C-A <sup>1</sup> -C-A <sup>1</sup> -P-C-P	0.0049	487
5169-4_82	C-G-A-C-A-G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A-P-G-P-A-P-G <sup>1</sup> -C-A <sup>1</sup> -C-A <sup>1</sup> -P-C <sup>1</sup> -P <sup>1</sup>	0.0016	488
5169-4_83	C <sup>1</sup> -G-A-C-A-G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A-P-G-P-A-P-G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C-A <sup>1</sup> -P-C <sup>1</sup> -P <sup>1</sup>	0.0021	489
5169-4_84	C <sup>1</sup> -G-A-C <sup>1</sup> -A-G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A-P-G-P-A-P-G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C-A <sup>1</sup> -P-C <sup>1</sup> -P <sup>1</sup>	0.0053	490
5169-4_85	C <sup>1</sup> -G-A-C <sup>1</sup> -A-G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A-P-G-P <sup>1</sup> -A-P-G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P-C <sup>1</sup> -P <sup>1</sup>	0.0062	491
5169-4_86	C <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -A-C <sup>1</sup> -A-G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A-P-G-P <sup>1</sup> -A-P-G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P-C <sup>1</sup> -P <sup>1</sup>	0.064	492
5169-4_87	C <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -A-C <sup>1</sup> -A-G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A-P-G <sup>1</sup> -P <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P-G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P-C <sup>1</sup> -P <sup>1</sup>	NB	493
5169-4_88	C <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A-G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A-P-G <sup>1</sup> -P <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P-G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P-C <sup>1</sup> -P <sup>1</sup>	NB	494
5169-4_89	C <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A-G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A-P-G <sup>1</sup> -P <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -P <sup>1</sup>	NB	495
5169-4_90	C <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A-P <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -P <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -P <sup>1</sup>	NB	496
5169-4_91	C <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -P <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -P <sup>1</sup>	NB	497
5169-4_92	C <sup>1</sup> -G-A-C-A-G-C <sup>1</sup> -A-P-G-P-A-P-G-C <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -C-A <sup>1</sup> -P-C <sup>1</sup> -P <sup>1</sup>	0.0052	498
5169-4_105	C-G-A-C-A-G <sup>1</sup> -C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A <sup>1</sup> -P-C <sup>1</sup> -P	0.0061	499
5169-4_106	C <sup>1</sup> -G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A <sup>1</sup> -P-C <sup>1</sup> -P	0.016	517
5169-4_107	C <sup>1</sup> -G-A-C-A-G <sup>1</sup> -C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A <sup>1</sup> -P-C-P	0.013	518

10

20

30

40

【表 9 - 2】

5169-4_108	C <sup>I</sup> -G-A-C-A-G <sup>I</sup> -C-A-P-G-P-A-P-G <sup>I</sup> -C-A-C-A-P-C-P	0.012	519
5169-4_109	C <sup>I</sup> -G-A-C-A-G <sup>I</sup> -C-A-P-G-P-A-P-G-C-A <sup>I</sup> -C-A-P-C-P	0.011	520
5169-4_110	C <sup>I</sup> -G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G <sup>I</sup> -C-A <sup>I</sup> -C-A-P-C-P	0.0050	521
5169-4_111	C-G-A-C-A-G-C <sup>I</sup> -A-P-G-P-A-P-G <sup>I</sup> -C-A <sup>I</sup> -C-A-P-C-P	0.0048	522
5169-4_112	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G <sup>I</sup> -C-A <sup>I</sup> -C-A-P-C-P <sup>I</sup>	0.0062	523
5169-4_113	C-G-A-C-A-G-C <sup>I</sup> -A-P-G-P-A-P-G-C-A <sup>I</sup> -C-A-P-C-P <sup>I</sup>	0.012	524
5169-4_114	C-G-A-C-A-G-C <sup>I</sup> -A-P-G-P-A-P-G-C-A-C <sup>I</sup> -A-P-C-P <sup>I</sup>	0.038	525
5169-4_115	C-G-A-C <sup>I</sup> -A-G-C <sup>I</sup> -A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P <sup>I</sup>	0.024	526
5169-4_116	C-G-A-C <sup>I</sup> -A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C <sup>I</sup> -A-P-C-P <sup>I</sup>	0.093	527
5169-4_117	C-G-A-C <sup>I</sup> -A-G-C-A-P-G-P-A <sup>I</sup> -P-G-C-A-C <sup>I</sup> -A-P-C-P	0.71	528
5169-4_118	C-G <sup>I</sup> -A-C <sup>I</sup> -A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C <sup>I</sup> -A-P-C-P	0.56	529
5169-4_119	C-G <sup>I</sup> -A-C <sup>I</sup> -A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C <sup>I</sup> -A-P-C-P	NB	530
5169-4_120	C-G <sup>I</sup> -A-C-A-G-C-A-P-G-P-A <sup>I</sup> -P-G-C <sup>I</sup> -A-C-A-P-C-P	NB	531
5169-4_121	C-G <sup>I</sup> -A-C-A-G-C-A-P-G <sup>I</sup> -P-A <sup>I</sup> -P-G-C-A-C-A-P-C-P	NB	532
5169-4_122	C-G <sup>I</sup> -A-C-A-G-C-A-P-G <sup>I</sup> -P-A-P-G-C <sup>I</sup> -A-C-A-P-C-P	NB	533
5169-4_123	C <sup>I</sup> -G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C <sup>I</sup> -P <sup>I</sup>	0.030	534
5169-4_124	C-G-A-C-A <sup>I</sup> -G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C <sup>I</sup> -P <sup>I</sup>	0.60	535
5169-4_125	C <sup>I</sup> -G-A-C-A <sup>I</sup> -G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C <sup>I</sup> -P	1.0	536
5169-4_126	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P <sup>I</sup> -C <sup>I</sup> -P <sup>I</sup>	NB	537
5169-4_127	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A <sup>I</sup> -C <sup>I</sup> -A <sup>I</sup> -P-C-P	0.010	538
5169-4_128	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -C <sup>I</sup> -A-C-A-P-C-P	0.099	539
5169-4_129	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G <sup>I</sup> -P <sup>I</sup> -A <sup>I</sup> -P-G-C-A-C-A-P-C-P	NB	540
5169-4_130	C-G-A-C-A-G-C <sup>I</sup> -A <sup>I</sup> -P <sup>I</sup> -G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	4.5	541
5169-4_131	C-G-A-C <sup>I</sup> -A <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.64	542
5169-4_132	C <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -A <sup>I</sup> -C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.42	543
5169-4_144	C <sup>I</sup> -G-A-C-A-G-C <sup>I</sup> -A-P-G-P-A-P-G <sup>I</sup> -C-A <sup>I</sup> -C-A <sup>I</sup> -P-C-P <sup>I</sup>	0.0005 0	544
5169-4_146	C <sup>I</sup> -G-A-C <sup>I</sup> -A-G <sup>I</sup> -C <sup>I</sup> -A-P-G-P-A-P-G <sup>I</sup> -C <sup>I</sup> -A <sup>I</sup> -C <sup>I</sup> -A <sup>I</sup> -P-C <sup>I</sup> -P <sup>I</sup>	0.0006 0	545

10

20

30

40



表 10 VEGFアミノ酸配列 4867-31 クローン切断

アミノ酸ID 番号	長さ	配列 5' → 3'	K <sub>d</sub> (nM) hVEGF165	K <sub>d</sub> (nM) rVEGF164	K <sub>d</sub> (nM) hVEGF12 1	配列番号
OH-4867-31- 22	38	T-C-A-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P- C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G- G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.26	0.54	0.82	546
OH-4867-31- 23	37	T-C-A-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P- C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G- G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G	0.30	0.66	1.3	547
OH-4867-31- 24	36	T-C-A-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P- C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G- G-A-P-P-P-A-A-A-P-G	2.8	4.2	36	548
OH-4867-31- 25	35	T-C-A-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P- C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G- G-A-P-P-P-A-A-A-P	26	16	70	549
OH-4867-31-2 6	39	C-A-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C- A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G- A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P	0.075	0.07	0.49	550

10

20

30

40

【表 10 - 2】

OH-4867-31-2 7	38	A-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P	0.11	0.07	0.59	551
OH-4867-31-2 8	37	A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P	0.10	0.07	0.97	552
OH-4867-31-2 9	36	P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P	0.13	0.08	0.96	553
OH-4867-31-3 0	35	C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P	0.20	0.15	1.4	554
OH-4867-31-3 1	34	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P	0.17	0.12	1.0	555
OH-4867-31-3 2	38	C-A-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A	0.10	0.06	0.51	556

10 20 30 40

【表 1 0 - 3】

OH-4867-31-3 3	37	A-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A	0.11	0.04	0.55	557
OH-4867-31-3 4	36	A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A	0.35	0.05	0.47	558
OH-4867-31-3 5	35	P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A	0.11	0.05	flat	559
OH-4867-31-3 6	34	C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A	0.11	0.06	0.39	560
OH-4867-31-3 7	33	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A	0.092	0.04	0.21	561
OH-4867-31-3 8	37	C-A-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.17	0.09	0.81	562

【表 10 - 4】

OH-4867-31-3 9	36	A-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.20	0.09	0.62	563
OH-4867-31-4 0	35	A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.14	0.10	0.70	564
OH-4867-31-4 1	34	P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.13	0.08	0.63	565
OH-4867-31-4 2	33	C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.071	0.05	0.20	566
OH-4867-31-4 3	32	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-P-G-G-A	0.050	0.05	0.29	567
OH-4867-31-4 4	32	C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G	0.13	0.38	0.14	568

10

20

30

40

【表 10 - 5】

OH-4867-31-4 5	31	C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P- G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-A -A-A-P-G	1.1	4.5	3.3	569
OH-4867-31-4 6	30	C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P- G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A -A-A-P	5.9	9.6	NB	570
OH-4867-31-4 7	29	C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P- G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A -A-A	NB	83	NB	571
OH-4867-31-4 8	28	C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P- G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A -A	NB	142	NB	572
OH-4867-31-4 9	27	C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P- G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A	NB	NB	NB	573
OH-4867-31-5 0	26	C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P- G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P	NB	NB	NB	574
OH-4867-31-5 1	31	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G- C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A -A-P-G-G	0.11	0.074	0.20	575

10

20

30

40

10 20 30 40

【表 1 0 - 6】

OH-4867-31-5 2	30	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G- C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A -A-P-G	0.17	0.58	2.8	576
OH-4867-31-5 3	29	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G- C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A -A-P	3.2	NB	19	577
OH-4867-31-5 4	28	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G- C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A -A	NB	NB	NB	578
OH-4867-31-5 5	27	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G- C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A	NB	NB	NB	579
OH-4867-31-5 6	26	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G- C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A	NB	NB	NB	580
OH-4867-31-5 7	25	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G- C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P	NB	NB	NB	581
OH-4867-31-5 8	31	G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C- P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A -P-G-G-A	0.10	0.21	0.15	582

【表 10 - 7】

OH-4867-31-5 9	30	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P -G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P- G-G-A	0.16	0.20	0.14	583
OH-4867-31-6 0	29	C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G -P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G- G-A	0.61	1.4	2.2	584
OH-4867-31-6 1	28	G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G- A	2.9	13	33	585
OH-4867-31- 143	29	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P -G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P- G-G			0.17	586
OH-4867-31- 144	30	G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C- P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A- -P-G-G			0.20	587

10

20

30

40

表 1 1 4 8 6 7 - 1 5 \_ 2 の全ての位置における C 3 スペーサー置換

アプタマーID 番号	配列 5' → 3'	K <sub>d</sub> (mM)	親との 比	配列番号
OH-4867-31_2	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.15	1	588
OH-4867-15-24	V-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.11	0.72	589
OH-4867-15-25	C-V-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.13	0.84	590
OH-4867-15-26	C-C-V-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.20	1.3	591
OH-4867-15-27	C-C-C-V-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.40	2.7	592
OH-4867-15-28	C-C-C-T-V-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.34	2.3	593
OH-4867-15-29	C-C-C-T-C-V-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.20	1.4	594
OH-4867-15-30	C-C-C-T-C-C-V-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.11	0.76	595

【表 1 1 - 1】



【表 1 1 - 2】

OH-4867-15-31	C-C-C-T-C-C-A-V-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.095	0.64	596
OH-4867-15-32	C-C-C-T-C-C-A-P-V-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.079	0.53	597
OH-4867-15-33	C-C-C-T-C-C-A-P-C-V-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.12	0.83	598
OH-4867-15-34	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-V-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.14	0.95	599
OH-4867-15-35	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-V-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	3.4	23	600
OH-4867-15-36	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-V-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	23	153	601
OH-4867-15-37	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-V-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	30	205	602
OH-4867-15-38	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-V-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	NB	-	603
OH-4867-15-39	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-V-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	NB	-	604

10

20

30

40

OH-4867-15-40	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-V-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.17	1.1	605
OH-4867-15-41	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-V-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	13	85	606
OH-4867-15-42	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-V-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	31	207	607
OH-4867-15-43	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-V-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	9.2	62	608
OH-4867-15-44	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-V-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	NB	-	609
OH-4867-15-45	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-V-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	3.5	24	610
OH-4867-15-46	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-V-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	NB	-	611
OH-4867-15-47	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-V-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	NB	-	612
OH-4867-15-48	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-V-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	NB	-	613

10

20

30

40

OH-4867-15-49	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-V-P-A-G-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.079	0.54	614
OH-4867-15-50	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-V-A-G-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	3.5	24	615
OH-4867-15-51	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-V-G-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	1.6	11	616
OH-4867-15-52	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-V-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.20	1.3	617
OH-4867-15-53	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-V-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	23	157	618
OH-4867-15-54	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-V-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	NB	-	619
OH-4867-15-55	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-V-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	NB	-	620
OH-4867-15-56	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-V-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	NB	-	621
OH-4867-15-57	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-V-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	NB	-	622

【表 1 1 - 4】

10 20 30 40

OH-4867-15-58	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-V-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	NB	-	623
OH-4867-15-59	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-V-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	NB	-	624
OH-4867-15-60	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-V-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	NB	-	625
OH-4867-15-61	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-V-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	NB	-	626
OH-4867-15-62	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-V-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	53	361	627
OH-4867-15-63	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-V-A-A-P-P-G-G-A-G-G-A	15	101	628
OH-4867-15-64	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-V-A-P-P-G-G-A-G-G-A	0.22	1.5	629
OH-4867-15-65	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-V-P-P-G-G-A-G-G-A	0.13	0.88	630
OH-4867-15-66	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-V-P-G-G-A-G-G-A	0.11	0.72	631

【表 1 1 - 5】

10 20 30 40

OH-4867-15-67	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-V-G-G-A-G-G-A	0.15	0.99	632
OH-4867-15-68	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-V-G-A-G-G-A	0.32	2.1	633
OH-4867-15-69	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-V-A-G-G-A	0.77	5.2	634
OH-4867-15-70	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-V-G-G-A	0.68	4.6	635
OH-4867-15-71	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-V-G-A	0.24	1.6	636
OH-4867-15-72	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-V-A	0.19	1.3	637
OH-4867-15-73	C-C-C-T-C-C-A-P-C-A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P -A-G-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-V	0.17	1.1	638

【表 1 1 - 6】

【表 1 2 - 1】

表 1 2 VEGF アプタマー 4 8 6 7 - 3 1 \_ 4 3 における 2' - O - メチル置換

アプタマー ID 番号	配列 5' → 3'	K <sub>d</sub> (nM)	親との比	配列番 号
OH-4867-31- 43	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A -P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.29	1.0	567
OH-4867-31_ 65	A <sup>I</sup> -G-C-C-G-P-P-C-A-A- G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G- A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	NB	-	639
OH-4867-31_ 66	A-G <sup>I</sup> -C-C-G-P-P-C-A-A- G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G- A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.17	0.6	640
OH-4867-31_ 67	A-G-C <sup>I</sup> -C-G-P-P-C-A-A- G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G- A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.33	1.2	641
OH-4867-31_ 68	A-G-C-C <sup>I</sup> -G-P-P-C-A-A- G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G- A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	7.55	26.0	642
OH-4867-31_ 69	A-G-C-C-G <sup>I</sup> -P-P-C-A-A- G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G- A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	NB	-	643
OH-4867-31_ 70	A-G-C-C-G-U <sup>I</sup> -P-C-A-A- G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G- A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	NB	-	644
OH-4867-31_ 71	A-G-C-C-G-P-U <sup>I</sup> -C-A-A- G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G- A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	NB	-	645
OH-4867-31_ 72	A-G-C-C-G-P-P-C <sup>I</sup> -A-A- G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G- A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.21	0.7	646

10

20

30

40

【表 1 2 - 2】

OH-4867-31_73	A-G-C-C-G-P-P-C-A <sup>1</sup> -A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	5.99	20.7	647
OH-4867-31_74	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A <sup>1</sup> -G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	3.14	10.8	648
OH-4867-31_75	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.15	0.5	649
OH-4867-31_76	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-U <sup>1</sup> -G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	22.90	79.0	650
OH-4867-31_77	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G <sup>1</sup> -C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	6.64	22.9	651
OH-4867-31_78	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.24	0.8	652
OH-4867-31_79	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-U <sup>1</sup> -P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	NB	-	653
OH-4867-31_80	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-U <sup>1</sup> -G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	NB	-	654
OH-4867-31_81	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G <sup>1</sup> -P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.44	1.5	655
OH-4867-31_82	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-U <sup>1</sup> -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	NB	-	656

10

20

30

40

【表 1 2 - 3】

OH-4867-31_ 83	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A <sup>1</sup> -G-G- A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.10	0.3	657
OH-4867-31_ 84	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G <sup>1</sup> -G- A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.21	0.7	658
OH-4867-31_ 85	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G <sup>1</sup> - A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	25.80	89.0	659
OH-4867-31_ 86	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A <sup>1</sup> -P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	6.21	21.4	660
OH-4867-31_ 87	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A -U <sup>1</sup> -P-P-A-A-A-P-G-G-A	NB	-	661
OH-4867-31_ 88	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A -P-U <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G-G-A	NB	-	662
OH-4867-31_ 89	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A -P-P-U <sup>1</sup> -A-A-A-P-G-G-A	NB	-	663
OH-4867-31_ 90	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A -P-P-P-A <sup>1</sup> -A-A-P-G-G-A	2.85	9.8	664
OH-4867-31_ 91	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A -P-P-P-A-A <sup>1</sup> -A-P-G-G-A	0.35	1.2	665
OH-4867-31_ 92	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A -P-P-P-A-A-A <sup>1</sup> -P-G-G-A	8.87	30.6	666

10

20

30

40



【表 1 2 - 4】

OH-4867-31_ 93	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A -P-P-P-A-A-A-U <sup>l</sup> -G-G-A	NB	-	667
OH-4867-31_ 94	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A -P-P-P-A-A-A-P-G <sup>l</sup> -G-A	0.21	0.7	668
OH-4867-31_ 95	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A -P-P-P-A-A-A-P-G-G <sup>l</sup> -A	0.19	0.7	669
OH-4867-31_ 96	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A -P-P-P-A-A-A-P-G-G-A <sup>l</sup>	0.13	0.4	670
OH-4867-31_ 97	A-G-C-C-G-P-P-V-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A -P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	7.30	25.2	671
OH-4867-31_ 98	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-V-P-A-G-G-A -P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.10	0.3	672
OH-4867-31_ 99	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-V-G-A -P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	0.22	0.8	673
OH-4867-31_ 100	A-G-C-C-G-P-P-V-A-A-G -P-G-C-P-P-V-P-A-V-G-A -P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	NB	-	674
OH-4867-31_ 101	A-G-C-C-G-P-P-A-A-G-P -G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P -P-P-A-A-A-P-G-G-A	5.89	20.3	675
OH-4867-31_ 102	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-P-A-G-G-A-P -P-P-A-A-A-P-G-G-A	NB	-	676

10

20

30

40

【表 1 2 - 5】

OH-4867-31_ 103	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G -P-G-C-P-P-G-P-A-G-A-P -P-P-A-A-A-P-G-G-A	NB	-	677
OH-4867-31_ 145	C-C-G-P-P-A-A-A-G-P-G -C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P -P-A-A-A-P-G-G-A	3.08	10.6	678
OH-4867-31_ 146	C-C-G-P-P-G-A-A-G-P-G -C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P -P-A-A-A-P-G-G-A	5.98	20.6	679
OH-4867-31_ 147	C-C-G-P-P-T-A-A-G-P-G -C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P -P-A-A-A-P-G-G-A	3.28	11.3	680
OH-4867-31_ 148	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G -C-P-P-A-P-A-G-G-A-P-P -P-A-A-A-P-G-G-A	0.53	1.8	681
OH-4867-31_ 149	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G -C-P-P-C-P-A-G-G-A-P-P -P-A-A-A-P-G-G-A	0.27	0.9	682
OH-4867-31_ 150	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G -C-P-P-T-P-A-G-G-A-P-P -P-A-A-A-P-G-G-A	0.24	0.8	683
OH-4867-31_ 151	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G -C-P-P-G-P-A-A-G-A-P-P -P-A-A-A-P-G-G-A	0.16	0.6	684
OH-4867-31_ 152	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G -C-P-P-G-P-A-C-G-A-P-P -P-A-A-A-P-G-G-A	0.32	1.1	685
OH-4867-31_ 153	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G -C-P-P-G-P-A-T-G-A-P-P -P-A-A-A-P-G-G-A	0.21	0.7	686

10

20

30

40

10

20

30

40

表 1 3 V E G F アデナー 4 8 6 7 - 3 1 \_ 1 4 3 における単一の 2' - オーメチル N a p - U 置換、および複数の 2' - オーメチル置換

アダマーID 番号	配列 5' → 3'	K <sub>d</sub> (M)	親 との 比	%残 存活 性	配 列 番 号
4867-31_143	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G	1.4E-10	1.0	12%, 7%	586
4867-31_154	C-C-G-P <sup>i</sup> -P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G	5.9E-09	44		687
4867-31_155	C-C-G-P-P <sup>i</sup> -C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G	3.3E-09	24		688
4867-31_156	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P <sup>i</sup> -G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G	6.8E-10	5.0	52%, 74%	689
4867-31_157	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P <sup>i</sup> -P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G	1.5E-09	11	54%, 101%	690
4867-31_158	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P <sup>i</sup> -G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G	1.7E-09	12	59%, 106%	691
4867-31_159	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P <sup>i</sup> -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G	5.6E-10	4.1	7%, 64%	692

【表 1 3 - 1】

10 20 30 40

4867-31_160	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P <sup>1</sup> -P-P-A-A-A-P-G-G	1.5E-09	11	52%, 95%	693
4867-31_161	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G-G	6.4E-11	0.47	5%, 4%, -2%	694
4867-31_162	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P <sup>1</sup> -A-A-A-P-G-G	8.9E-09	65	84%, 117%	695
4867-31_163	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P-P-A-A-A-P <sup>1</sup> -G-G	2.6E-10	1.9	53%, 45%	696
4867-31_183	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-V-P-A-V-G-A-P-P-A-A-A-P-G-G	9.1E-11	0.67	15%	697
4867-31_184	C-C-G-P-P-C-A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C-P-P-V-P-A <sup>1</sup> -V-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G	8.4E-11	0.62	7%	698
4867-31_185	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-V-P-A <sup>1</sup> -V-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	2.6E-10	1.9	50%	699
4867-31_186	C <sup>1</sup> -C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-V-P-A <sup>1</sup> -V-G-A-P-P-P-A-A <sup>1</sup> -A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	1.6E-09	12	77%	700
4867-31_187	C-C-G-P-P-C-A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C-P-P-V-P-A <sup>1</sup> -G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G	3.2E-11	0.24	-2%	701
4867-31_188	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-V-P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P-P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	3.8E-11	0.28	-2%	702
4867-31_189	C <sup>1</sup> -C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-V-P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P-P-A-A <sup>1</sup> -A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	9.0E-10	6.6	13%	703

【表 1 3 - 2】

10

20

30

40

表 1 4 V E G F ア ヲ タ ヲ ヲ ー 4 8 6 7 - 3 1 \_ 1 4 3 における複数の 2 ' - O - メ チ ル 置 換

ア ヲ タ ヲ ヲ ID 番 号	配 列 5 ' → 3 '	K <sub>d</sub> (M)	4867-31_188 と の 比	配 列 番 号
4867-31_188	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-V-P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P-P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	4.8E-11	1.0	702
4867-31_190	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-V-P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	8.9E-11	1.9	704
4867-31_191	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P-P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	1.0E-10	2.1	705
4867-31_192	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	3.5E-11	0.7	706

【 表 1 4 】

【表 15 - 1】

表 15 4149-8\_\_379および5169-4\_\_26のPDGFホモ二量体

アダマー ID 番号	配列 5' → 3'	K <sub>i</sub> (pM)	配列 番号
4149- 8_438	Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> - Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C -G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	4.2	707
4149-8_439	Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> - Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -H-Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G -C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	3.5	708
4149-8_440	Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> - Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -H-H-Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	1.4	709
4149-8_441	Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> - Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -H-H-H-Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3- C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	0.78	710
4149-8_442	Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> - Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -H-H-H-H-Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C- C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	0.51	711
4149-8_443	Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> - Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -H-H-H-H-H-Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A- C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	0.25	712
4149-8_444	Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> - Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -H-H-H-H-H-H-Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z- A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup>	0.61	713
4149-8_379 D	Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> - Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C-G-A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -Z <sup>1</sup> -Z-Z-G-C-G-C <sup>1</sup> -C 3-C-A-Z-Z <sup>1</sup> -G-H-C-A <sup>1</sup> -M-Z	11	714
4149-8_445	Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> - Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -H-H-G <sup>1</sup> -C-G-A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -Z <sup>1</sup> -Z-Z-G-C-G- C <sup>1</sup> -C3-C-A-Z-Z <sup>1</sup> -G-H-C-A <sup>1</sup> -M-Z	1.1	715

10

20

30

40

【表 1 5 - 2】

4149-8_446	Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> - Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -H-H-H-H-G <sup>1</sup> -C-G-A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -Z <sup>1</sup> -Z-Z-G- C-G-C <sup>1</sup> -C3-C-A-Z-Z <sup>1</sup> -G-H-C-A <sup>1</sup> -M-Z	0.61	716
4149-8_447	Z-M-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z <sup>1</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-Z <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> - Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -H-H-H-H-H-H-G <sup>1</sup> -C-G-A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -Z <sup>1</sup> -Z- Z-G-C-G-C <sup>1</sup> -C3-C-A-Z-Z <sup>1</sup> -G-H-C-A <sup>1</sup> -M-Z	0.88	717
5169-4_134	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P- C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	28	718
5169-4_135	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P- H-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C- P	9.3	719
5169-4_136	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P- H-H-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P- C-P	8.7	720
5169-4_137	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P- H-H-H-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A- P-C-P	5.1	721
5169-4_138	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P- H-H-H-H-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C- A-P-C-P	4.9	722
5169-4_139	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P- H-H-H-H-H-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A- C-A-P-C-P	3.6	723
5169-4_140	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P- H-H-H-H-H-H-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C- A-C-A-P-C-P	3.6	724
5169-4_26D	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P- P-C-P-A-C-A-C-G-P-A-P-G-P-A-C-G-A-C-A-G-C	11	725
5169-4_141	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P- H-H-P-C-P-A-C-A-C-G-P-A-P-G-P-A-C-G-A-C-A- G-C	13	726

10

20

30

40

【表 1 5 - 3】

5169-4_142	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P- H-H-H-H-P-C-P-A-C-A-C-G-P-A-P-G-P-A-C-G-A- C-A-G-C	5.5	727
5169-4_143	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P- H-H-H-H-H-H-P-C-P-A-C-A-C-G-P-A-P-G-P-A-C- G-A-C-A-G-C	2.0	728



【表 16 - 1】

表 16 4867-31\_192のVEGFホモ二量体

アダプター ID 番号	配列 5' → 3'	K <sub>i</sub> (pM )	配列番号
4867-31_395	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	6.8	729
4867-31_396	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -H-C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	50	730
4867-31_397	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -H-H-C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	43	731
4867-31_398	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -H-H-H-C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	29	732
4867-31_399	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -H-H-H-H-C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	22	733
4867-31_400	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -H-H-H-H-H-C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	14	734

10

20

30

40

【表 16 - 2】

4867-31_401	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -H-H-H-H-H-H-C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	21	735
4867-31_192 D	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-G-G <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P-G <sup>1</sup> -P-P-C <sup>1</sup> -G-P-G <sup>1</sup> -A-A-C <sup>1</sup> -P-P-G-C-C	32	736
4867-31_402	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -H-H-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-G-G <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P-G <sup>1</sup> -P-P-C <sup>1</sup> -G-P-G <sup>1</sup> -A-A-C <sup>1</sup> -P-P-G-C-C	27	737
4867-31_403	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -H-H-H-H-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-G-G <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P-G <sup>1</sup> -P-P-C <sup>1</sup> -G-P-G <sup>1</sup> -A-A-C <sup>1</sup> -P-P-G-C-C	20	738
4867-31_404	C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -H-H-H-H-H-H-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-G-G <sup>1</sup> -A <sup>1</sup> -P-G <sup>1</sup> -P-P-C <sup>1</sup> -G-P-G <sup>1</sup> -A-A-C <sup>1</sup> -P-P-G-C-C	33	739

10

20

30

表 17 : P D G F - V E G F フタ ヲ ー 構築物

フタ ヲ ー ID 番号	配列 5' → 3'	配列番号
4149-8_313	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-C3-P-A-C3-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-Z-Z-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z-Z-A <sup>1</sup> -C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C	740
4149-8_314	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-C3-P-A-C3-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-H-Z-Z-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z-Z-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C	741
4149-8_315	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-C3-P-A-C3-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-H-H-Z-Z-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z-Z-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C	742
4149-8_316	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-C3-P-A-C3-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-H-H-Z-Z-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z-Z-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C	743
4149-8_317	Z-Z-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z-Z-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-C3-P-A-C3-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G	744
4149-8_318	Z-Z-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z-Z-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -H-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-C3-P-A-C3-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G	745
4149-8_319	Z-Z-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z-Z-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -H-H-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-C3-P-A-C3-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G	746
4149-8_320	Z-Z-A <sup>1</sup> -C-H-G-Z-Z-A-C-A <sup>1</sup> -C <sup>1</sup> -G-C-G-Z-Z-A <sup>1</sup> -Z-A <sup>1</sup> -G-C-G <sup>1</sup> -H-H-H-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-C3-P-A-C3-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G	747

【 表 1 7 】

10

20

30

表 18：PDGF-VEGF受容体構築物の結合親和性およびin vitro 活性

標的	配列番号	PDGF-BB	Hs27 PDGFR $\alpha$	PDGF-AB	VEGF	VEGF121
		Kd (M)	%残存活性	Kd (M)	Kd (M)	Kd (M)
PDGF-BB	4149-8_39	8.75E-11		4.76E-11	1.00E-06	1.00E-06
PDGF-BB	4149-8_130	7.59E-11		1.41E-10	1.00E-06	1.00E-06
PDGF-BB	4149-8_273	6.14E-11		1.89E-10	1.00E-06	1.00E-06
VEGF121	4867-31_51	1.26E-07		1.48E-08	1.96E-10	7.28E-10
VEGF121	4867-31_183	1.95E-07		1.45E-08	1.38E-10	6.65E-10
両方	4149-8_313	9.33E-11	5%	1.65E-10	2.58E-10	4.31E-09
両方	4149-8_314	1.36E-10	2%	1.11E-10	1.43E-10	1.55E-09
両方	4149-8_315	1.19E-10	2%	1.23E-10	8.60E-11	7.58E-10
両方	4149-8_316	8.97E-11	2%	1.37E-10	1.57E-10	5.00E-10
両方	4149-8_317	6.38E-11	58%			8.09E-11
両方	4149-8_318	4.31E-11	43%	8.18E-11	2.70E-10	2.47E-09
両方	4149-8_319	2.42E-11	17%	3.02E-11	1.25E-10	1.07E-09
両方	4149-8_320	1.50E-11	13%	4.93E-11	7.68E-11	4.22E-10

【表 18】

【表 19】

表 19 PDGF/VEGF アプタマー構築物 4149-8\_401

アプタ マーID 番号	配列 5' → 3'	配列 番号
4149-8 _401	Z-M-A <sup>I</sup> -C-H-G-Z <sup>I</sup> -Z-A-C-C3-C <sup>I</sup> -G-C-G-Z-Z- Z <sup>I</sup> -A <sup>I</sup> -Z-A <sup>I</sup> -G-C-G <sup>I</sup> -H-H-H-C-C-G-P-P-C <sup>I</sup> -A- A-G <sup>I</sup> -P-G-C <sup>I</sup> -P-P-G <sup>I</sup> -P-A <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -G-A-P-P <sup>I</sup> -P-A- A-A-P-G <sup>I</sup> -G <sup>I</sup>	748

10

【表 20】

表 20 PDGF/VEGF アプタマー構築物 4149-8\_401 の結合親和性

		PDGF-BB	PDGF-AB	VEGF165	VEGF121
標的	配列番号	Kd (M)	Kd (M)	Kd (M)	Kd (M)
両方	4149-8_320	1.50E-11	4.93E-11	7.68E-11	4.22E-10
両方	4149-8_401	1.51E-11	1.93E-10	2.77E-10	3.74E-11

20

【表 2 1】

表 2 1 4 1 4 9 - 8 \_ 3 7 9 および 4 8 6 7 - 3 1 \_ 1 9 2 を含む PDGF /  
VEGF アプタマー構築物の結合親和性

4149-8_401	PDGF_379	HHH	VEGF_192
4149-8_408	VEGF_192	H	PDGF_379
4149-8_409	VEGF_192	HH	PDGF_379
4149-8_410	VEGF_192	HHH	PDGF_379
4149-8_411	VEGF_192	HHHH	PDGF_379
4149-8_412	VEGF_192	HHHHH	PDGF_379
4149-8_413	VEGF_192	HHHHHH	PDGF_379
4149-8_414	PDGF_379	HH	VEGF_192
4149-8_415	PDGF_379	HHHH	VEGF_192
4149-8_416	PDGF_379	HHHHH	VEGF_192
4149-8_417	PDGF_379	HHHHHH	VEGF_192

10

20

アプタマー ID 番号	Kd (M)		
	PDGF-BB	VEGF121	VEGF165
E10030	4.7E-11	NB	NB
OH-4149-8_379	2.0E-11	NB	NB
OH-4867-31_192	5.7E-08	2.3E-11	4.1E-11
N-4149-8_401	5.6E-12	2.7E-11	2.5E-11
OH-4149-8_408	4.3E-11	4.4E-11	4.1E-11
OH-4149-8_409	6.0E-10	2.6E-11	2.9E-11
OH-4149-8_410	2.0E-11	2.6E-11	3.3E-11
OH-4149-8_411	7.2E-12	2.0E-11	4.5E-11
OH-4149-8_412	8.6E-12	2.0E-11	4.5E-11
OH-4149-8_413	1.0E-11	4.0E-11	6.3E-11
OH-4149-8_414	1.0E-11	2.3E-11	5.1E-11
OH-4149-8_415	8.1E-12	4.0E-11	3.0E-11
OH-4149-8_416	8.9E-12	4.1E-11	3.0E-11
OH-4149-8_417	1.1E-11	4.3E-11	6.5E-11

30

【表 2 2 - 1】

表 2 2 5 1 6 9 - 4 \_ 2 6 および 4 8 6 7 - 3 1 \_ 1 9 2 を含む PDGF / VEGF アプタマー構築物の結合親和性

アプタマー ID 番号	配列 (5' → 3')	K <sub>d</sub> (nM) PDGF	K <sub>d</sub> (nM) VEGF 121	配列番号
5169-4_93	C-C-G-P-P-C <sup>I</sup> -A-A-G <sup>I</sup> -P-G-C <sup>I</sup> -P-P-G <sup>I</sup> -P-A <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -G-A-P-P <sup>I</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -H-H-H-H-H-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.00020	0.052	749
5169-4_94	C-C-G-P-P-C <sup>I</sup> -A-A-G <sup>I</sup> -P-G-C <sup>I</sup> -P-P-G <sup>I</sup> -P-A <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -G-A-P-P <sup>I</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -H-H-H-H-H-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.00050	0.066	750
5169-4_95	C-C-G-P-P-C <sup>I</sup> -A-A-G <sup>I</sup> -P-G-C <sup>I</sup> -P-P-G <sup>I</sup> -P-A <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -G-A-P-P <sup>I</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -H-H-H-H-H-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.0012	0.043	751
5169-4_96	C-C-G-P-P-C <sup>I</sup> -A-A-G <sup>I</sup> -P-G-C <sup>I</sup> -P-P-G <sup>I</sup> -P-A <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -G-A-P-P <sup>I</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -H-H-H-H-H-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.0045	0.076	752
5169-4_97	C-C-G-P-P-C <sup>I</sup> -A-A-G <sup>I</sup> -P-G-C <sup>I</sup> -P-P-G <sup>I</sup> -P-A <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -G-A-P-P <sup>I</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -H-H-H-H-H-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.0037	0.10	753
5169-4_98	C-C-G-P-P-C <sup>I</sup> -A-A-G <sup>I</sup> -P-G-C <sup>I</sup> -P-P-G <sup>I</sup> -P-A <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -G-A-P-P <sup>I</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>I</sup> -G <sup>I</sup> -H-H-H-H-H-C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.0053	0.14	754

10

20

30

40

【表 2 2 - 2】

5169-4_9	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-H-H-H-H-H-C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	0.0021	0.120	755
5169-4_100	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-H-H-H-H-H-C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	0.0015	0.056	756
5169-4_101	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-H-H-H-H-H-C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	0.00050	0.13	757
5169-4_102	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-H-H-H-H-H-C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	0.011	0.14	758
5169-4_103	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-H-H-H-H-H-C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	0.0061	0.12	759
5169-4_104	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P-H-H-H-H-H-C-C-G-P-P-C <sup>1</sup> -A-A-G <sup>1</sup> -P-G-C <sup>1</sup> -P-P-G <sup>1</sup> -P-A <sup>1</sup> -G <sup>1</sup> -G-A-P-P <sup>1</sup> -P-A-A-A-P-G <sup>1</sup> -G <sup>1</sup>	0.0046	0.28	760

【表 2 3】

表 2 3 眼内 P K 試験でテストされたアプタマーおよびアプタマー構築物

被験物質	配列 I D	標的	P E G
SL1010	4867-31_192	VEGF	40 kDa
SL1011	4149-8_379	PDGF	40 kDa
SL1012	4149-8_401	VEGF および PDGF	20 kDa
SL1013	4149-8_401	VEGF および PDGF	40 kDa

10

20

30

40



【表 2 4】

表 2 4 眼内薬物動態試験における、硝子体液内のアプタマーおよびアプタマー構築物の濃度

時点 (時間)	眼 (OS または OD)	SL1010 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	SL1011 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	SL1012 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	SL1013 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
2	OS	296	280	538	563
2	OD	296	298	682	634
24	OS	195	164	330	520
24	OD	198	165	433	493
48	OS	188	131	359	376
48	OD	207	116	267	336
96	OS	146	96.3	227	307
96	OD	139	97.8	204	277
192	OS	70.2	16.8	92.8	145
192	OD	82.4	18.2	67.8	132

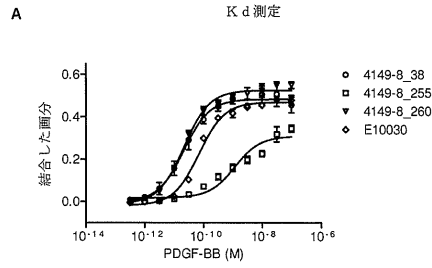
OS－左眼；OD－右眼

【表 2 5】

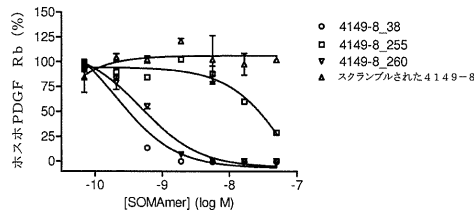
表 2 5 NZWウサギの両側の硝子体内への単回投与に続くアプタマーおよびアプタマー構築物のガラス体液半減期

試験物	半減期 (時間)	95%信頼区間
SL1010	105	90- 128
SL1011	47	42 - 55
SL1012	69	58- 85
SL1013	92	81- 106

【図 1 - 1】



B PDGF-BBに刺激されたPDGFRβのリン酸化



【図 1 - 2】

C K<sub>d</sub>比

5-d U 修飾	BndU1	BndU2	BndU3	BndU4	BndU5	BndU6	BndU7	BndU8	BndU9
BndU	1	1	1	1	1	1	1	1	1
IB-dU	0.4	0.7	0.8	0.4	0.2	1.6	6.2	8.7	
Th-dU	0.5	1.5	1.2	0.9	0.5	0.7	0.5	0.9	
FBr-dU	0.3	0.5	0.3	0.7	0.8	3.1	1	0.5	
Pe-dU	1.7	1.8	0.8	2.1	1.5	0.5	1.3	1.3	
PP-dU	0.3	1.1	0.8	1.9	0.9	13	106	1.9	
Tyr-dU	0.2	2.5	1	33	1.2	34	4.4	1.9	
MEB-dU	0.6	0.3	0.9	3.6	1.4	7.1	7.6	0.5	
Nap-dU	0.9	1.3	1.4	3.3	1.1	4.5	27	0.9	
2Nap-dU	0.3	0.4	0.5	601	0.2	306	34	2.4	
NE-dU	0.3	3.1	0.6	17	1.4	38	51	0.3	
2NE-dU	0.3	3.8	0.6	121	1.3	188	21	3.4	
Trp-dU	0.3	3.1	1.1	233	153	307	61	0.8	
BT-dU	0.8	2.6	1.9	35	4	20	113	1.8	

D 相対的なPDGFRリン酸化

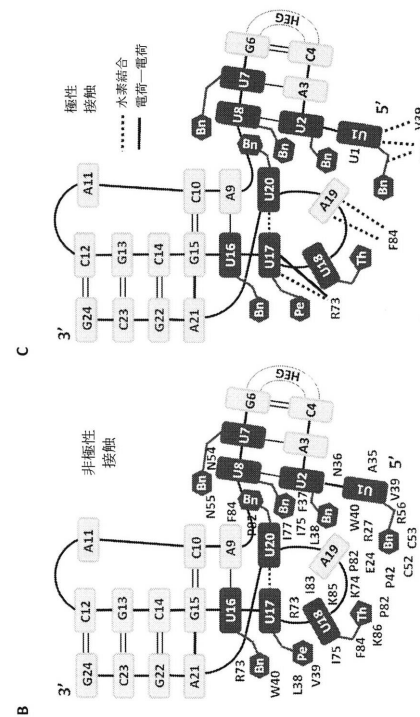
5-d U 修飾	BndU1	BndU2	BndU3	BndU4	BndU5	BndU6	BndU7	BndU8	BndU9
BndU	1	1	1	1	1	1	1	1	1
IB-dU	1	3	1	44	1	81	21	23	
Th-dU	1	3	1	2	1	2	1	5	
FBr-dU	2	2	3	2	2	4	2	2	
Pe-dU	1	1	1	9	5	3	4	1	
PP-dU	4	2	1	17	1	42	57	5	
Tyr-dU	1	22	2	39	4	39	28	3	
MEB-dU	1	1	2	9	3	21	32	10	
Nap-dU	1	3	3	24	4	5	51	1	
2Nap-dU	1	1	1	90	3	82	60	8	
NE-dU	4	29	3	66	8	76	63	1	
2NE-dU	3	41	3	82	10	92	68	16	
Trp-dU	1	3	1	63	5	100	21	2	
BT-dU	2	12	1	54	7	74	72	4	

【図 2 - 1】

A

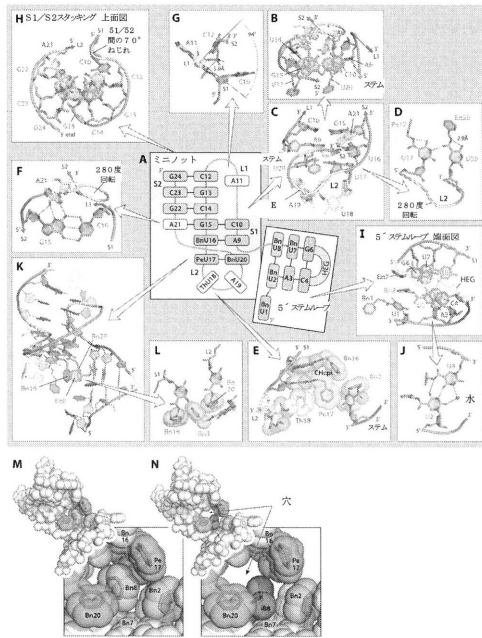
スクレオチド	SOMamer の分子内接触	SOMamer - PDGFR 接触	接触原子番号
BndU1	mt: U1-Bn2 vw: Bn2-Bn6, Bn2-Bn7 水素結合: U1-V39, U1-R56 (2)	vw, 鎖 1: Glu24, Arg27, Leu38, Val39, Trp40, Pro42 vw, 鎖 2: Cys52*, Cys53, Asn54, Asn55, Arg56 水素結合 (B): U1-V39 (1) & U1-Arg56 (2)	24
BndU2	mt: U2-A3; Bn2-U1 vw: Bn2-Bn6, Bn2-Bn7 水素結合: U2-BndU8 (2)	vw, 鎖 1: Arg27, Ala35, Asn54, Phe37, Leu38, Ile77 vw, 鎖 2: Asn54	12
2OMe-A3	mt: A3-C4, A3-U2 水素結合: A3-U12, 塩基対	vw, 鎖 1: Asn36	1
BndU7	mt: U7-G6, U7-U8 vw: Bn7-Bn2, Bn7-Bn16 水素結合: U7-A3, 塩基対	vw, 鎖 2: Asn54, Asn55	3
BndU8	mt: U8-Bn20, Bn8-Bn16, Bn8-Bn20 水素結合: U8-BndU2 (2)	vw, 鎖 1: Leu38, Ile75, Lys80	3
BndU16	mt: U16-C15, U16-U17 vw: Bn16-Bn7, Bn16-Bn6, Bn16-Pe17 水素結合: U16-C15, 塩基対	mt: Bn16-Trp40 vw, 鎖 1: Arg73	4
PeU17	mt: Pe17-Bn8, Pe17-Tr18 vw: Pe17-Bn8, Pe17-Tr18 水素結合: U17-BndU20, リンカー	vw, 鎖 1: Leu38, Val39, Trp40, Arg73, Ile75, Phe84 水素結合 (1): PeU17-Lin-Arg73 電荷-電荷 (1): 非局所線, O-to-Arg73	18
ThU18	mt: Th18-Pe17, Th18-U17 vw: Th18-Pe17, Th18-U17	vw, 鎖 1: Lys85, Arg73, Phe84, Pro82, Lys74, Ile75	15
dA19	mt: A19-糖 18 vw: 糖 19-U120 所格	vw, 鎖 1: Ile83, Pro82, Phe84 水素結合 (2): A19-N3-Phe84 NH & A19-N6H4-Phe84 C=O	5
BndU20	mt: U20-A9, Bn20-U8, Bn20-Bn8 水素結合: BndU20-Lin-U17 N3	vw, 鎖 1: Ile77, Lys80, Pro82, Phe84	11

【図 2 - 2】

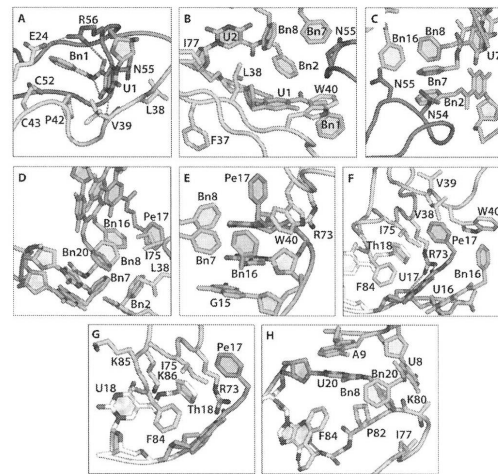




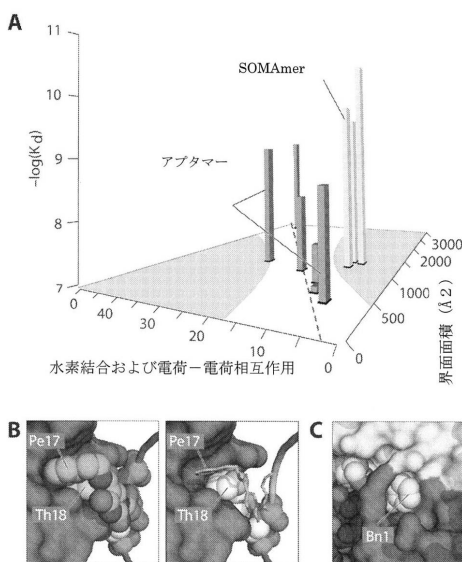
【図 8】



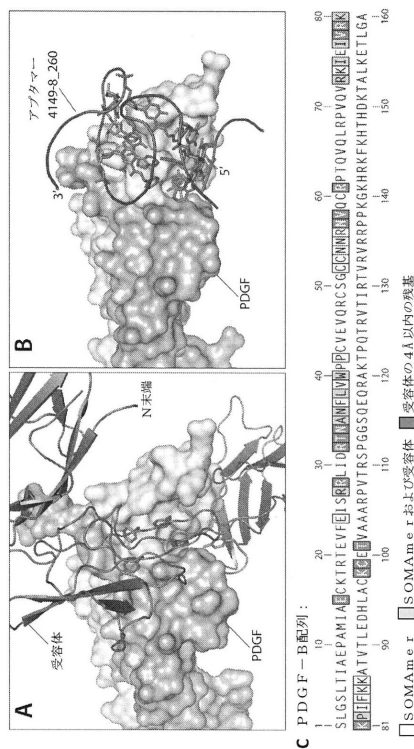
【図 9】



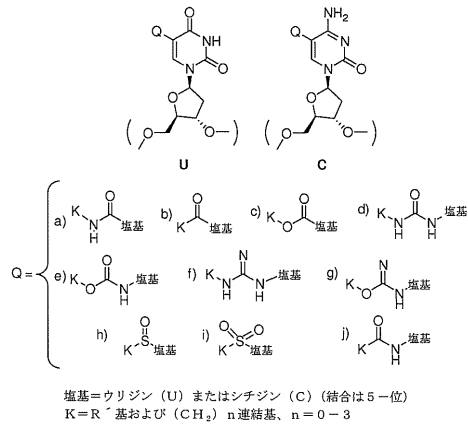
【図 10】



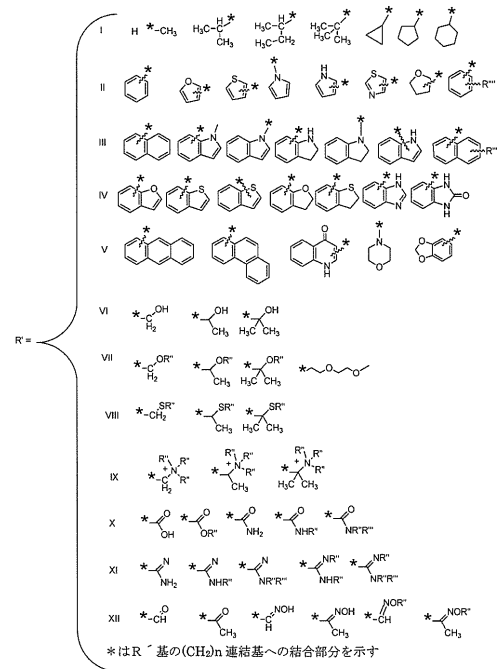
【図 11】



【図 12 - 1】



【図 12 - 2】

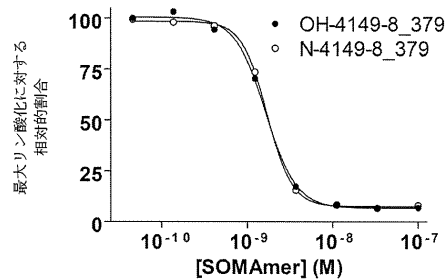


【図 12 - 3】

R''', R'' は、分岐または直鎖低級アルキル (C1-C20)、水酸基 (OH)、ハロゲン (F, Cl, Br, I)、ニトリル (CN)、ボロン酸 (BO<sub>2</sub>H<sub>2</sub>)、カルボン酸 (COOH)、カルボン酸エステル (COOR'), 一級アミド (CONH<sub>2</sub>)、二級アミド (CONHR'), 三級アミド (CONR''), R''', R'' は分岐または直鎖低級アルキル (C1-C20)、およびシクロアルキルからなる基から選ばれ、

R'', R''' は独立して分岐または直鎖低級アルキル (C1-C2)、フェニル (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)、R''', R'' で置換されたフェニル環 (R''', C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, R'' は上述の通り定義)、カルボン酸 (COOH)、カルボン酸エステル (COOR''), R''', R'' は分岐または直鎖低級アルキル (C1-C20)、およびシクロアルキルからなる基から選ばれ、R'' = R''' = (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> であり、n＝2-10である。

【図 13】



【図 14】

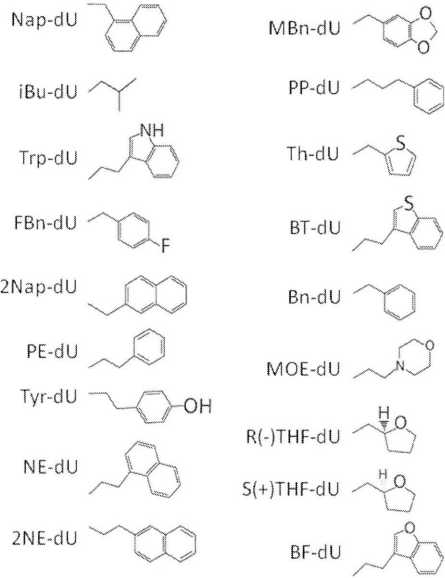
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
コンセンサス	V	R	M	S	N	N	N	V	K	P	G	P	A	P	G	V	A	V	R	P	C	
出典順																						
A	0.18	0.14	0.80	0.04	0.67	0.20	0.35	0.78	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.29	0.92	0.14	0.86	0.00	0.04	
C	0.39	0.02	0.10	0.78	0.10	0.12	0.31	0.12	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.55	0.08	0.63	0.00	0.02	0.98	0.00
G	0.27	0.78	0.04	0.10	0.14	0.59	0.10	0.06	0.98	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.18	0.10	0.00	0.00	0.00
P	0.04	0.00	0.02	0.06	0.10	0.10	0.04	0.04	0.92	0.00	1.00	0.00	0.00	0.04	0.06	0.00	0.06	0.04	0.04	0.98	0.02	0.96

5169-4アブタマーファミリーの位置およびコンセンサス配列を上二列に示す。列A、C、GおよびP (PはN a p-d U) は、高い親和性結合に必要な配列を定義する21位置のそれぞれで5169-4アブタマーファミリーにおいてこれらのヌクレオチドコンセンサス配列を示す。コンセンサス配列において、複数のヌクレオチドコンセンサスは次の一文字の順序で示される。N=AまたはG、M=AまたはC、K=GまたはP、V=A、C、またはG、N=任意のヌクレオチド。

【図 15 - 1】

Mod	Nap-dU4	Nap-dU5	Nap-dU10	Nap-dU13	Nap-dU14	Nap-dU16	Nap-dU21	Nap-dU22	Nap-dU23	Nap-dU27
Nap-dU	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
iBu-dU	1700	1900	110	28	20800	13	25	20800	1050	20800
Trp-dU	135	45	18	20800	870	15	180	81	16	1.4
FBn-dU	28	4	8.3	12	130	3.9	28	210	42	20800
2Nap-dU	13	20800	12	37	63	72	nd	20	27	420
PE-dU	340	130	57	44	170	7.3	210	34	350	240
Tyr-dU	20800	13000	42	210	2900	50	570	1600	38	64
NE-dU	85	10	8	17	23	1.3	51	34	30	1850
2NE-dU	59	97	164	91	490	13	1020	190	48	330
MBn-dU	140	78	1	9.6	56	4.1	20800	2.4	19	540
PP-dU	110	59	67	20	337	34	57	1800	20800	20800
Th-dU	300	370	8.9	67	510	4.6	169	157	23	20800
BT-dU	14	23	4.8	26	28	1.3	170	nd	16	130
Bn-dU	nd	nd	nd	8.3	nd	nd	34	74	61	310
MOE-dU	20800	20800	20	1440	20800	38	140	586	1040	20800
R(-)THF-dU	840	110	300	6090	24	110	1700	960	20800	nd
S(+)-THF-dU	20800	3700	290	120	20800	40	440	20800	740	20800
BF-dU	1600	210	20800	180	225	104	3600	41	75	7900

【図 15 - 2】

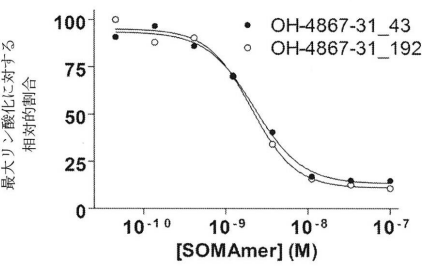


【図 16】

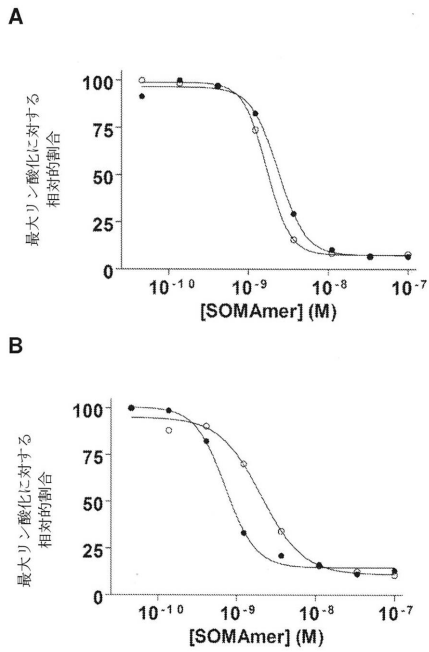
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
コンセンサス	C	C	G	Z	C	A	A	G	Z	G	C	Z	G	C	Z	G	Z	A	G	A	Z	Z	A	A	A	Z	G	G	
A 出現度	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.99	1.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	
C	0.99	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	
G	0.00	0.00	0.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	
TZ	0.01	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.99	0.00	0.00	

4 8 6 7-3 1 アプタマーファミリのスケルトンの位置およびコンセンサス配列を上二列に示す。A、C、GおよびT/Zの列は、2 9 の保存された位置のそれぞれで4 8 6 7-3 1 アプタマーファミリにおいてこれらのスケルトンが観察された出現度を示す。

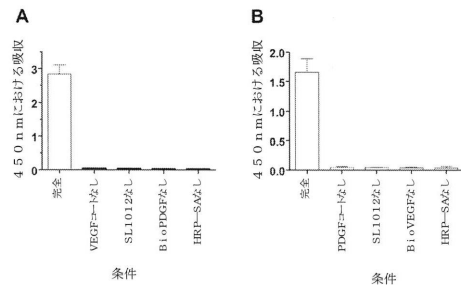
【図 17】



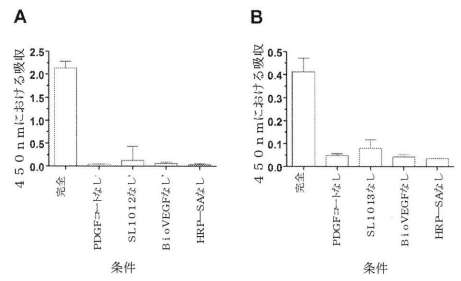
【図 18】



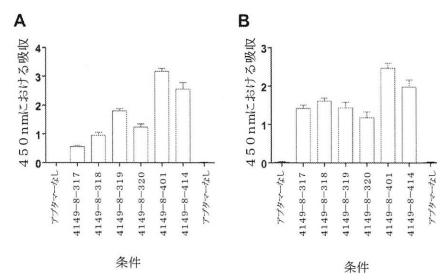
【図 19】



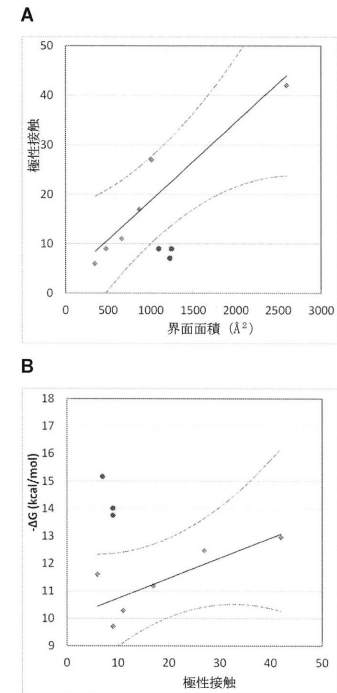
【図 20】



【図 21】



【図 22 - 1】



【 図 2 2 - 2 】

C

	タンパク質 標的	-Log (K <sub>d</sub> )	-ΔG (kcal/mol)	接触原子	極性接触	界面 領域 (Å <sup>2</sup> )	リガンド効率 (接触原子あ たりの kcal /mol)	参照	PDB コード
アプタマー	MS2コート タンパク質	8.6	11.6	25	6	348	0.464	(a)	6MSF
	IgG	7.1	9.7	37	9	477	0.262	(b)	3AGV
	トロンビン	7.6	10.3	62	11	657	0.166	(c)	3QLP
	NFκB	8.3	11.2	57	17	870	0.196	(d)	100A
	VWF	9.2	12.5	109	27	1011	0.115	(e)	3HXO
	GlnRS	9.6	13.0	203	42	2599	0.064	(f)	1EXD
SOMAmers	PDGF-BB	10.7	15.2	131	7	1225	0.116	(g)	4HQU
	標的 1	9.9	14.0	78	9	1097	0.180		
	標的 2	9.7	13.7	75	9	1248	0.183	(g)	



## フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/719,354  
(32)優先日 平成24年10月26日(2012.10.26)  
(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/722,099  
(32)優先日 平成24年11月2日(2012.11.2)  
(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

## 前置審査

- (72)発明者 ジャービス, ターレ・シー  
アメリカ合衆国コロラド州80305, ボルダー, ダートマス・アベニュー 2265  
(72)発明者 ローロフ, ジョン・シー  
アメリカ合衆国コロラド州80303, ボルダー, メドールック・ドライブ 605  
(72)発明者 ジェリナス, エイミー・ディー  
アメリカ合衆国コロラド州80026, ラファイエット, トーラス・サークル 1285  
(72)発明者 チャン, チ  
アメリカ合衆国コロラド州80027, スペリオル, アルマ・レーン 1851  
(72)発明者 ドロレ, ダニエル・ダブリュー  
アメリカ合衆国コロラド州80301, ボルダー, ブグル・コート 6844  
(72)発明者 ウォー, シーラ・エム  
アメリカ合衆国コロラド州80516, エリー, オデル・ドライブ 2763  
(72)発明者 ジャンジク, ネヴォイシャ  
アメリカ合衆国コロラド州80301, ボルダー, カーター・トレイル 6973

審査官 小倉 梢

- (56)参考文献 特表2006-516151(JP, A)  
特表2007-525177(JP, A)  
国際公開第2005/052121(WO, A1)  
国際公開第2006/050498(WO, A1)  
特表2004-533861(JP, A)  
国際公開第2011/130195(WO, A1)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012年12月 4日, Vol. 109, No. 49, p. 19971-19976

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90  
A61K 31/00 - 31/80  
A61K 48/00  
A61P 27/02  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
WPIDS/WPIX(STN)