

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6630273号
(P6630273)

(45) 発行日 令和2年1月15日 (2020.1.15)

(24) 登録日 令和1年12月13日 (2019.12.13)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/115 (2010.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)
A 6 1 K 31/7115 (2006.01)
A 6 1 P 27/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/115 Z N A Z
A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 31/7125
A 6 1 K 31/7115
A 6 1 P 27/02

請求項の数 24 (全 145 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-540463 (P2016-540463)
(86) (22) 出願日 平成26年9月8日 (2014.9.8)
(65) 公表番号 特表2016-529911 (P2016-529911A)
(43) 公表日 平成28年9月29日 (2016.9.29)
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/054561
(87) 国際公開番号 W02015/035305
(87) 国際公開日 平成27年3月12日 (2015.3.12)
審査請求日 平成29年9月5日 (2017.9.5)
(31) 優先権主張番号 61/875,660
(32) 優先日 平成25年9月9日 (2013.9.9)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

前置審査

(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 100118902
弁理士 山本 修
(74) 代理人 100140109
弁理士 小野 新次郎
(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】 安定性が向上したPDGF及びVEGFアプタマー並びにPDGF及びVEGF媒介性の疾患及
び障害の治療におけるそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

核酸配列

5'-C-G-A-C-A-G-C-A-Z-G-Z-A-Z-G-C-A-C-A-Z-C-Z-3' (配列番号830) を含む核酸分子であって、

ZがC-5修飾ピリミジンであり、前記核酸分子の位置4、9、10、11及び12の少なくとも1個がホスホロチオエート結合を含み、位置1が前記核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドである、前記核酸分子。

【請求項2】

前記核酸分子の位置1、4、6、7、14、15、16、17、18、20及び21の少なくとも1個が2'-O-メチル修飾を含み、位置1が前記核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドである、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項3】

前記核酸分子が配列番号545及び800~821から成る群から選択される、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項4】

前記核酸分子が、11個の2'-O-メチルヌクレオシド及び4または5個のホスホロチオエート結合を含む、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項5】

前記C-5修飾ピリミジンが、独立に、それぞれの出現について、

10

20

- 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）、 10
 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－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）
 dU）、
 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、 20
 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、及び
 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）

から成る群から選択される、請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項6】

前記C－5修飾ピリミジンが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1～4のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項7】

前記核酸分子が、10nM未満、5nM未満、2nM未満、1nM未満または0.1nM未満の結合親和性でPDGFタンパク質に結合する、請求項1、2、4、5または6に記載の核酸分子。 30

【請求項8】

前記核酸分子が、DNA、RNAまたはそれらの組み合わせを含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項9】

前記核酸分子の3'末端に逆位デオキシヌクレオチドをさらに含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項10】

前記デオキシヌクレオチドがデオキシチミジンである、請求項9に記載の核酸分子。

【請求項11】

核酸分子が、ホスホロチオエート結合を有さない同じ核酸分子と比較して、ヌクレアーゼに対する感受性が低い、請求項1～10のいずれか1項に記載の核酸分子。 40

【請求項12】

前記ヌクレアーゼがDNase酵素である、請求項11に記載の核酸分子。

【請求項13】

請求項1～12のいずれか1項に記載の核酸分子から成る群から選択される2つの核酸分子を含む組成物。

【請求項14】

前記2つの核酸分子が共有結合または非共有結合している、請求項13に記載の組成物。 50

【請求項 1 5】

前記核酸分子が P D G F 受容体の P D G F 媒介性リン酸化を阻害する、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 1 6】

請求項 1 ～ 1 2 および 1 5 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの核酸分子及び医薬的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

【請求項 1 7】

前記医薬組成物が硝子体内注射用である、請求項 1 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

黄斑変性症の治療用である、請求項 1 6 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 1 9】

黄斑変性症の予防用である、請求項 1 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 0】

眼の病気の治療用である、請求項 1 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 1】

前記眼の病気が、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、エイズ関連視力喪失、弱視、半盲、網膜静脈閉塞症、トラコーマ、円錐角膜、脈絡網膜の炎症、中心性漿液性網膜症、ブドウ膜炎、網膜ジストロフィー、浮腫、緑内障及び白内障から成る群から選択される、請求項 2 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

20

前記黄斑変性症が加齢性黄斑変性症である、請求項 1 8 または 1 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

前記黄斑変性症がドライ加齢性黄斑変性症またはウェット加齢性黄斑変性症である、請求項 2 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 4】

アプタマーである、請求項 1 ～ 1 2 および 1 5 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0 0 0 1】

30

〔0 0 0 1〕 関連出願の相互参照

本出願は、2 0 1 3 年 9 月 9 日に提出された U . S . 特許仮出願第 6 1 / 8 7 5 , 6 6 0 号に対して優先権を主張するものであり、この出願は、その全体が参照により組み込まれる。

【技術分野】

【0 0 0 2】

〔0 0 0 2〕 本開示は一般に核酸分野に関し、より詳細には、血小板由来増殖因子 (P D G F) に結合することができるアプタマー及び血管内皮増殖因子 (V E G F) に結合することができるアプタマーに関する。いくつかの実施形態では、そうしたアプタマーは、限定されないが、アテローム性動脈硬化症、黄斑変性症、線維症、癌並びに P D G F 及び／または V E G F が関与している他の障害を含めた増殖性障害を予防する、治療する及び／または改善するための治療剤として有用である。いくつかの実施形態では、本開示は、同時にまたは相互排他的に V E G F 及び P D G F に結合することができ、治療剤として有用であるアプタマー構築物に関する。

40

【0 0 0 3】

〔0 0 0 3〕 2 0 1 4 年 9 月 8 日に作成され、1 , 0 0 5 キロバイトのサイズの「 s e q u e n c e L i s t i n g . t x t 」と題する配列表は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 4】

50

〔0004〕 以下の説明は情報の概要を提供し、本明細書で提供される情報または本明細書で言及される刊行物のいずれも本開示に対する先行技術であることを認めるものではない。

【0005】

〔0005〕 血小板由来増殖因子 (PDGF-A、-B、-C及び-D) は、多くの結合組織細胞に対する遍在性の分裂促進因子及び走化性因子である (Fredriksson, L., et al. (2004) *Cytokine Growth Factor Rev.* 15 (4) : 197)。PDGFはジスルフィド結合した二量体として存在し、細胞表面上のPDGF受容体 α 及び β に対する結合を介して機能するシステインノットフォールド増殖因子ドメインを含む (Claesson-Welsh, L., et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 4917)。PDGFの結合は受容体の二量体化を誘導し、これによって、細胞内のチロシン残基での自己リン酸化が起こる (Claesson-Welsh, J. (1994) *Biol. Chem.* 269 : 32023)。PDGF-BBは、アテローム性動脈硬化症、線維症、黄斑変性症及び癌を含めた、いくつかの増殖性障害に関与する (Ostman, A., et al. (2001) *Adv. Cancer Res.* 80 : 1; Appelmann, I., et al. (2010) *Recent Results Cancer Res.* 180 : 51; Trojanowska, M., et al. (2008) *Rheumatology (Oxford)* 47 (Suppl 5) : 2; Rutherford et al. (1997) *Atherosclerosis* 130 : 45; Smits et al. (1992) *Am. J. Pathol.* 140 : 639; Heldin et al. (1991) *Endocrinology* 129 : 2187; Floege and Johnson (1995) *Miner. Electrolyte Metab.* 21 : 271; Raines et al. (1990) *Experimental Pharmacology, Peptide Growth Factors and Their Receptors*, Sporn & Roberts, pp. 173-262, Springer, Heidelberg)。

【0006】

〔0006〕 VEGFは分泌性のジスルフィド結合ホモ二量体であり、内皮細胞を選択的に刺激して、急増させ、遊走させ、マトリックス分解酵素を産生させ、これらのすべては、新しい血管の形成に必要とされるプロセスである (Conn, G., et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 1323; Ferrara, N. et al. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161 : 851; Gospodarowicz, D., et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 7311; Pepper, M. S., et al. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181 : 902; Unemori, E. N., et al. (1992) *J. Cell. Physiol.* 153 : 557)。唯一の既知の内皮細胞特異的分裂促進因子であることに加えて、VEGFは、高分子に対する血管透過性の一過的な増大を誘導する能力において、血管新生増殖因子の中でユニークである (Dvorak, H. F., et al. (1979) *J. Immunol.* 122 : 166; Senger, D. R., et al. (1983) *Science* 219 : 983; Senger, D. R., et al. (1986) *Cancer Res.* 46 : 5629)。血管透過性の増大及びその結果として生じた血管外スペースでの血漿タンパク質の沈着は、内皮細胞の遊走のための暫定的なマトリックスを提供することによって新しい血管の形成を促進する。透過性亢進は、実際、新しい血管の特徴である (Dvorak, H. F., et al. (1995) *Am. J. Pathol.* 146 : 1029)。さらに、組織の低酸素によって誘導される代償性血管新生もVEGFに媒介される (Levy, A. P., et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271 : 2746; Shweiki, D., et al. (1991) *Nature* 359 : 843)。低酸素誘導性タンパク質と

してのVEGFの同定は、高酸素がVEGFの発現の抑制を引き起こすという相補的な知見とともに、酸素需要を血管供給と調和させるための魅力的なメカニズムを提供する(Benjamin, L. E., et al. (1999) J. Clin. Invest. 103:159; Alon, T., et al. (1995) Nat. Med. 1:1024)。

【0007】

〔0007〕 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エクソンの選択的スプライシングの結果として生じる(Eming, S. A., et al. (2006) J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. 11:79)。最も広く認められるアイソフォームは、VEGF-121、VEGF-165及びVEGF-189である。VEGFのタンパク分解性プロセッシングによって、さらなるアイソフォームが生成され得る。VEGF-165は、プラスミンによってArg-110とAla-111の間で切断され得、これによってVEGF-110が生成され、これは、VEGF-121と機能的に同等である(Keyt, B. A., et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:7788)。VEGF-189は、ウロキナーゼによってエクソン6ドメイン内で切断され得、次いで、プラスミンによってさらに切断され得、これによってVEGF-110が生成される(Plouet, J., et al., (1997) J. Biol. Chem. 272:13390)。加えて、MMP-3、-7、-9及び-19を含めた、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)のサブセットは、連続的なステップでVEGF-165及びVEGF-189を切断することができ、これによってVEGF-113が生成され、これは、VEGF-110と機能的に同等である。したがって、所与の組織におけるVEGFのマトリックス結合性形態及び拡散性形態の相対的存在量は、組織の細胞で生じる選択的スプライシングとタンパク分解性プロセッシングの組み合わせによって決定される(Ferrara, N., et al. (2006) Retina 26:859)。

【0008】

〔0008〕 加齢性黄斑変性症(AMD)は、55歳を超える人々の失明の主因のままである。この疾患は、光受容体が最も高密度であり、中心視野に關与する網膜の部分である黄班内でのドルーゼンと呼ばれる不溶性沈着物の形成を特徴とする。AMDの初期段階では、沈着物は無血管性であり、この疾患は、一般にゆっくりと進行する。しかし、患者の約10%では、このいわゆる「ドライ」型のAMDは、血管新生化され、「ウェット」型のAMDになり、その間に、この疾患はより進行性になり、より速い速度で視力が悪化する。多くの場合、中心視野のぼやけから事実上の失明への進行が2年未満に生じる。この疾患の進行した段階である、滲出型またはウェット型のAMDでは、新しい血管が脈絡毛細管から網膜の中心部(黄班)に侵入し、中心視野を塞ぐ。米国では、ウェットAMDの患者数は約180万人であり、2020年までに増加して300万人に近いことが予想される。米国でのウェットAMDの発生率は、毎年約210,000人である。

【0009】

〔0009〕 最近、AMDは、VEGFに結合する高親和性アンタゴニストを眼に直接注射し、内皮細胞における細胞表面受容体とのVEGFの相互作用を防止することによってVEGF媒介性の血管新生及び血管漏出の誘導をブロックすることにより治療されている。

【0010】

〔0010〕 VEGFとPDGF-Bのシグナリングの二重阻害が、新しい血管の退縮と相まって、より効率的な血管新生のブロックにつながるというかなりの証拠がある。例えば、臨床的エビデンスは、VEGFとPDGF-Bの二重阻害が、AMD患者において、眼部の血管新生のより完全な阻害を達成することができることを示唆する。NeXstar Pharmaceuticalsで最初に発見された、PDGF-Bのアプタマーインヒビター(E10030)(Green, L. S., et al. (1996) Biochemistry 35:14413; U. S. 特許第6,207,816号;第

5, 731, 144号;第5, 731, 424号;及び第6, 124, 449号)は、O p h t h o t e c h C o r p o r a t i o nによって、AMDに対する治療薬として開発中である。E10030 (F o v i s t a (登録商標))は、約100 pMの K_d でPDGF-ABまたはPDGF-BBに結合し、インビトロ及びインビボの両方でPDGF-Bの機能を阻害する、DNAベースの修飾アプタマーである。

【0011】

〔0011〕 第1相試験において、Lucentis (登録商標) 抗VEGF療法と組み合わせて試験したE10030を用いる抗PDGF療法は、療法から12週後に、治療患者の59%において、3ラインの視力向上がもたらされた。これは、Lucentis 10
s単独で歴史的に観察された34~40%と比較して、視力が向上した患者に関してかなり高いパーセンテージである。加えて、この併用療法は、すべての試験参加者において新生血管の顕著な退縮を伴った。併用療法による有効性の増強は、ウェットAMDを有する449人の患者の第2相試験において最近確証された。Fovista (1.5mg)とLucentisの組み合わせを受けた患者は、Lucentis単独療法を受けた患者の6.5文字と比較して、24週間で平均10.6文字の視力が向上し ($p=0.019$)、これは、62%のさらなる視力の上昇 (benefit) を意味する。

【発明の概要】

【0012】

〔0012〕 本開示は、血小板由来増殖因子B (PDGF-BB及びPDGF-ABを含めたPDGF-B) に結合するアプタマー、血管内皮増殖因子 (VEGF-121及びVEGF-165を含めたVEGF) に結合するアプタマー並びにPDGF-Bに結合するアプタマー及び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及びアプタマー構築物は、限定されないが、アテローム性動脈硬化症、黄斑変性症、線維症、糖尿病性網膜症及び癌並びに／またはPDGF及び／もしくはVEGFが関与している他の疾患もしくは病気状態を含めた増殖性の疾患または病気を予防する、治療する及び／または改善するための治療剤として有用である。様々な実施形態では、アプタマー構築物は、VEGF及びPDGF-Bのそれぞれに独立に、並びに／またはVEGF及びPDGF-Bに同時に結合することができる。PDGFアプタマー、VEGFアプタマーもしくはVEGF/PDGF-Bアプタマー構築物または前述のいずれかの医薬的に許容可能な塩及び少なくとも1つの医薬的に許容可能な担体を含む、医薬組成物または製剤が含まれる。そうした組成物は、任意の適切な医薬的に許容可能な剤形で調製することができる。

【0013】

〔0013〕 一態様では、本開示は、核酸配列：5'-C-G-A-C-A-G-C-A-Z-G-Z-A-Z-G-C-A-C-A-Z-C-Z-3' (配列番号830) を含む核酸分子を提供し、ここでは、ZはC-5修飾ピリミジンであり、核酸分子の位置4、9、10、11及び12の少なくとも1個はホスホロチオエート結合または部分を含み、位置1は核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドである。関連した態様では、核酸分子の位置4、9、10、11及び12の少なくとも2、3、4または5個はホスホロチオエート結合または部分を含み、位置1は核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドである。

【0014】

〔0014〕 別の態様では、核酸分子は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の2'-O-メチルヌクレオシドを含む。関連した態様では、核酸分子の位置1、4、6、7、14、15、16、17、18、20及び21の少なくとも1個は、2'-O-メチル修飾を含み、位置1は核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドである。さらに別の関連した態様では、核酸分子の位置1、4、6、7、14、15、16、17、18、20及び21の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10または11個は、2'-O-メチル修飾を含み、位置1は核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドである。

【0015】

【0015】 別の態様では、C-5修飾ピリミジンは、独立に、それぞれの出現について、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'-フルオロウリジン及び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)から成る群から選択される。関連した態様では、C-5修飾ピリミジンは、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(NapdU)である。

10

20

【0016】

【0016】 別の態様では、核酸分子は、DNA、RNAまたはそれらの組み合わせを含む。

【0017】

【0017】 別の態様では、核酸分子は、10nM未満、5nM未満、2nM未満または1nM未満の結合親和性で、PDGFタンパク質に結合する。

【0018】

【0018】 別の態様では、核酸分子は、核酸分子の3'末端に逆位デオキシヌクレオチドをさらに含む。関連した態様では、デオキシヌクレオチドはデオキシチミジンである。

30

【0019】

【0019】 別の態様では、核酸分子は、ホスホロチオエート結合または部分を有さない同じ核酸分子と比較してヌクレアーゼに対する感受性が低い。関連した態様では、ヌクレアーゼはDNase酵素である。さらに別の関連した態様では、DNase酵素はDNase IまたはDNase II酵素である。

【0020】

【0020】 別の態様では、核酸分子は、ホスホロチオエート結合または部分を有さない同じ核酸分子と比較して、ニュージーランドホワイトウサギの硝子体液中でより安定である。

【0021】

【0021】 別の態様では、核酸分子は、以下のアプタマーID番号、146、150~159、172~182及び188を有する5169アプタマーから成る群から選択される。

40

【0022】

【0022】 関連した態様では、核酸分子は、11個の2'-O-メチルヌクレオシド及び4または5個のホスホロチオエート結合または部分を含む。

【0023】

【0023】 関連した態様では、核酸分子は、ホスホロチオエート結合または部分及び2'-O-メチル基を有する、少なくとも1つのヌクレオチドを含む。

【0024】

50

〔0024〕 別の態様では、本開示は、核酸配列：5'－C－C－G－Z－Z－C－A－A－G－Z－G－C－Z－Z－G－Z－A－G－G－A－Z－Z－Z－A－A－A－Z－G－G－3'（配列番号831）を含む核酸分子を提供し、ここでは、ZはC－5修飾ピリミジンであり、核酸分子の位置24、25及び26の少なくとも1個はホスホロチオエート結合または部分を含み、位置1は核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドである。関連した態様では、位置24、25及び26の少なくとも2または3個はホスホロチオエート結合または部分を含み、位置1は核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドである。

【0025】

〔0025〕 関連した態様では、核酸分子は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8または9個の2'－O－メチルヌクレオシドを含む。

10

【0026】

〔0026〕 別の態様では、核酸分子の位置1、6、9、12、15、17、18、22、28及び29の少なくとも1個は2'－O－メチル修飾を含み、位置1は核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドである。関連した態様では、核酸分子の位置1、6、9、12、15、17、18、22、28及び29の少なくとも2、3、4、5、6、7、8または9個は2'－O－メチル修飾を含み、位置1は核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドである。

【0027】

〔0027〕 別の態様では、C－5修飾ピリミジンは、独立に、それぞれの出現について、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）、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'－フルオロウリジン及び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）から成る群から選択される。関連した態様では、C－5修飾ピリミジンは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（NapdU）である。

20

30

【0028】

〔0028〕 別の態様では、核酸分子は、DNA、RNAまたはそれらの組み合わせを含む。

40

【0029】

〔0029〕 別の態様では、核酸分子は、10nM未満、5nM未満、2nM未満または1nM未満の結合親和性でVEGFタンパク質に結合する。

【0030】

〔0030〕 別の態様では、核酸分子は、核酸分子の3'末端に逆位デオキシヌクレオチドをさらに含む。関連した態様では、デオキシヌクレオチドはデオキシチミジンである。

【0031】

〔0031〕 別の態様では、核酸分子は、ホスホロチオエート結合または部分を有さ

50

ない同じ核酸分子と比較して、ヌクレアーゼに対する感受性が低い。関連した態様では、ヌクレアーゼはDNase酵素である。さらに別の関連した態様では、DNase酵素はDNase IまたはDNase II酵素である。

【0032】

【0032】 別の態様では、核酸分子は、ホスホロチオエート結合または部分を有さない同じ核酸分子と比較して、ニュージーランドホワイトウサギの硝子体液中でより安定的である。

【0033】

【0033】 別の態様では、核酸分子は、以下のアプタマーID番号、192、409～417、419～429、438～445及び475～483を有する4867-3 10
1アプタマーから成る群から選択される。

【0034】

【0034】 別の態様では、核酸分子は、9または10個の2'-O-メチルヌクレオシド及び1、2または3個のホスホロチオエート結合または部分を含む。

【0035】

【0035】 別の態様では、核酸分子は、ホスホロチオエート結合または部分及び2'-O-メチル基を有する、少なくとも1つのヌクレオチドを含む。

【0036】

【0036】 別の態様では、本開示は、核酸配列：5'-Z-Z''-A-C-H-G-Z-Z-A-C-V-C-G-C-G-Z'-Z-Z-A-Z-A-G-C-G-3 20
'（配列番号832）を含む核酸分子を提供し、ここでは、Z、Z'及びZ''は、独立に、それぞれの出現について、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)、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 30
'-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-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-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-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)及び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)から成る群から選択され； 40
；Vは3炭素リンカーであり、Hはヘキサエチレングリコールリンカーであり；核酸分子の位置8、9、15、16及び17の少なくとも1個はホスホロチオエート結合または部分を含み、位置1は核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドであり、H及びVは核酸分子の位置を数えるための単一の位置とみなされる。関連した態様では、Z及びZ'は、独立に、それぞれの出現について、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)、5-(N 50

ーイソブチルカルボキシアミド)ー2'ーOーメチルウリジン、5ー(Nーイソブチルカルボキシアミド)ー2'ーフルオロウリジン、5ー(Nートリプタミノカルボキシアミド)ー2'ーデオキシウリジン(Trp dU)、5ー(Nートリプタミノカルボキシアミド)ー2'ーOーメチルウリジン、5ー(Nートリプタミノカルボキシアミド)ー2'ーフルオロウリジン、5ー(Nー[1ー(3ートリメチルアンモニウム)プロピル]カルボキシアミド)ー2'ーデオキシウリジクロリド、5ー(Nーナフチルメチルカルボキシアミド)ー2'ーデオキシウリジン(Nap dU)、5ー(Nーナフチルメチルカルボキシアミド)ー2'ーOーメチルウリジン、5ー(Nーナフチルメチルカルボキシアミド)ー2'ーフルオロウリジン及び5ー(Nー[1ー(2, 3ージヒドロキシプロピル)]カルボキシアミド)ー2'ーデオキシウリジン)から成る群から選択される。別の関連した態様では、Zは、独立に、それぞれの出現について、5ー(Nーベンジルカルボキシアミド)ー2'ーデオキシウリジン(BndU)またはメチレンジオキシベンジルー dUから選択される。別の関連した態様では、Z'は5ー(Nーナフチルメチルカルボキシアミド)ー2'ーデオキシウリジン(Nap dU)である。

10

【0037】

〔0037〕 別の態様では、位置8、9、15、16及び17の少なくとも2または3個はホスホロチオエート結合または部分を含み、位置1は核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドであり、H及びVは核酸分子の位置を数えるための単一の位置とみなされる。

【0038】

20

〔0038〕 別の態様では、核酸分子は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7または8個の2'ーOーメチルヌクレオシドを含む。

【0039】

〔0039〕 別の態様では、核酸分子の位置3、7、12、13、18、19、21及び24の少なくとも1個は2'ーOーメチル修飾を含み、位置1は核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドであり、H及びVは核酸分子の位置を数えるための単一の位置とみなされる。関連した態様では、核酸分子の位置3、7、12、13、18、19、21及び24の少なくとも2、3、4、5、6、7または8個は2'ーOーメチル修飾を含み、位置1は核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドであり、H及びVは核酸分子の位置を数えるための単一の位置とみなされる。

30

【0040】

〔0040〕 別の態様では、Zは5ー(Nーベンジルカルボキシアミド)ー2'ーデオキシウリジン(BndU)である。

【0041】

〔0041〕 別の態様では、核酸分子は、DNA、RNAまたはそれらの組み合わせを含む。

【0042】

〔0042〕 別の態様では、核酸分子は、10 nM未満、5 nM未満、2 nM未満または1 nM未満の結合親和性で、PDGFタンパク質に結合する。別の態様では、核酸分子は、PDGF受容体のPDGF媒介性リン酸化を阻害する。

40

【0043】

〔0043〕 別の態様では、核酸分子は、核酸分子の3'末端に逆位デオキシヌクレオチドをさらに含む。関連した態様では、デオキシヌクレオチドはデオキシチミジンである。

【0044】

〔0044〕 別の態様では、核酸分子は、ホスホロチオエート結合または部分を有さない同じ核酸分子と比較して、ヌクレアーゼに対する感受性が低い。関連した態様では、ヌクレアーゼはDNase酵素である。さらに別の関連した態様では、DNase酵素はDNase IまたはDNase II酵素である。

【0045】

50

〔0045〕 別の態様では、核酸分子は、ホスホロチオエート結合または部分を有さない同じ核酸分子と比較して、ニュージーランドホワイトウサギの硝子体液中でより安定である。

【0046】

〔0046〕 別の態様では、核酸分子は、以下のアプタマーID番号、379、391、418～426、431～437及び453～459を有する4149-8アプタマーから成る群から選択される。

【0047】

〔0047〕 別の態様では、核酸分子は、7または8個の2'-O-メチルヌクレオシド及び4、5、6、7または8個のホスホロチオエート結合または部分を含む。

10

【0048】

〔0048〕 別の態様では、核酸分子は、ホスホロチオエート結合または部分及び2'-O-メチル基を有する、少なくとも1つのヌクレオチドを含む。

【0049】

〔0049〕 別の態様では、本開示は、本明細書に記載の核酸分子から選択される2つの核酸分子を含む組成物を提供する。

【0050】

〔0050〕 別の態様では、組成物は、溶液、粉末、ゲル及び乳濁液から選択される群から選択される形態である。

【0051】

20

〔0051〕 別の態様では、2つの核酸分子は共有結合または非共有結合している。

【0052】

〔0052〕 別の態様では、本開示は、本明細書に記載の核酸分子のいずれかの少なくとも1つの核酸分子及び医薬的に許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。

【0053】

〔0053〕 別の態様では、医薬組成物は硝子体内注射用である。

【0054】

〔0054〕 別の態様では、本開示は、黄斑変性症を有する対象に治療有効量の本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む、黄斑変性症の治療方法を提供する。

【0055】

30

〔0055〕 別の態様では、本開示は、黄斑変性症を発症する危険性がある対象に治療有効量の本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む、黄斑変性症の予防方法を提供する。

【0056】

〔0056〕 別の態様では、本開示は、眼の病気を有する対象に治療有効量の本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む、眼の病気の治療方法を提供する。関連した態様では、眼の病気は、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、エイズ関連視力喪失、弱視、半盲、網膜静脈閉塞症、トラコーマ、円錐角膜、脈絡網膜の炎症、中心性漿液性網膜症、ブドウ膜炎、網膜ジストロフィー、浮腫、緑内障及び白内障から成る群から選択される。

40

【0057】

〔0057〕 別の態様では、黄斑変性症は加齢性黄斑変性症である。関連した態様では、黄斑変性症はドライ加齢性黄斑変性症またはウェット加齢性黄斑変性症である。

【0058】

〔0058〕 別の態様では、本開示は、線維症を有する対象に治療有効量の本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む、線維症の治療方法を提供する。関連した態様では、線維症は、肺線維症、腎線維症及び嚢胞性線維症から選択される。

【0059】

〔0059〕 別の態様では、本開示は、心血管疾患を有する対象に治療有効量の本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む、心血管疾患の治療方法を提供する。関連

50

した態様では、心血管疾患は、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、心肥大関連状態及び血管障害から選択される。

【0060】

〔0060〕 別の態様では、本開示は、癌を有する対象に治療有効量の本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む、癌の治療方法を提供する。関連した態様では、癌は、膀胱癌、肺癌、乳癌、黒色腫、結腸及び直腸癌、リンパ腫、子宮内膜癌、膵臓癌、肝臓癌、腎臓癌、前立腺癌、白血病並びに甲状腺癌から選択される。

【0061】

〔0061〕 別の態様では、本開示は、核酸配列：5' - C¹ - G - A - C^{1, 2} - A - G¹ - C¹ - A - Z² - G² - Z² - A² - Z - G¹ - C¹ - A¹ - C¹ - A¹ - Z - C¹ - Z¹ - 3' (配列番号833) を含む核酸分子を提供し、ここでは、C¹は、独立に、それぞれの出現について、シチジン、デオキシシチジン及び2'-O-メチルシチジンから成る群から選択され；C^{1, 2}は、独立に、それぞれの出現について、シチジン、ホスホロチオエート結合を含むシチジン、デオキシシチジン、ホスホロチオエート結合を含むデオキシシチジン、2'-O-メチルシチジン及びホスホロチオエート結合を含む2'-O-メチルシチジンから成る群から選択され；G¹は、独立に、それぞれの出現について、グアノシン、デオキシグアノシン及び2'-O-メチルグアノシンから成る群から選択され；G²は、独立に、それぞれの出現について、グアノシン、ホスホロチオエート結合を含むグアノシン、デオキシグアノシン及びホスホロチオエート結合を含むデオキシグアノシンから成る群から選択され；Zは、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン及び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)から成る群から選択され；Z¹は、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン、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'-デオキシウリジン(NapdU)及び2'-O-メチル基を含む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)から成る群から選択され；Z²は、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、ホスホロチオエート結合を含むウリジン、デオキシウリジン、ホスホロチオエート結合を含むデオキシウリジン、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)及びホスホロチオエート結合を含む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)から成る群から選択され；A¹は、独立に、それぞれの出現について、アデノシン、デオキシアデノシン及び2'-O-メチルアデノシンから成る群から選択され；A²は、独立に、それぞれの出現について、アデノシン、ホスホロチオエート結合を含むアデノシン、デオキシアデノシン及びホスホロチオエート結合を含むデオキシアデノシンから成る群から選択され；ここでは、核酸分子は、少なくとも1、2、3、4または5個のホスホロチオエート結合を含む。

【0062】

〔0062〕 関連した態様では、C¹は、2'-O-メチルシチジンである。関連した態様では、C^{1, 2}は、ホスホロチオエート結合を含む2'-O-メチルシチジンである。関連した態様では、G¹は、2'-O-メチルグアノシンである。関連した態様では、G²は、ホスホロチオエート結合を含むデオキシグアノシンである。関連した態様では、Z¹は、2'-O-メチル基を含む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。関連した態様では、Z²は、ホスホロチオエート結合を含む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。関連した態様では、A¹は、2'-O-メチルアデノシンである。関連した態様では、A²は、ホスホロチオエート結合を含むデオキシアデノシンである。

【0063】

〔0063〕 別の態様では、本開示は、核酸配列：5' - C¹ - C - G - Z - Z - C¹ - A - A - G¹ - Z - G - C¹ - Z - Z - G¹ - Z - A¹ - G¹ - G - A - Z - Z¹ - Z - A² - A² - A² - Z - G¹ - G¹ - 3' (配列番号834) を含む核酸分子を提供

し、ここでは、 C^1 は、独立に、それぞれの出現について、シチジン、デオキシシチジン及び2'-O-メチルシチジンから成る群から選択され； G^1 は、独立に、それぞれの出現について、グアノシン、デオキシグアノシン及び2'-O-メチルグアノシンから成る群から選択され； G^1 は、独立に、それぞれの出現について、グアノシン、デオキシグアノシン及び2'-O-メチルグアノシンから成る群から選択され；Zは、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン及び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)から成る群から選択され； Z^1 は、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン、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'-デオキシウリジン(NapdU)及び2'-O-メチル基を含む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)から成る群から選択され； A^1 は、独立に、それぞれの出現について、アデノシン、デオキシアデノシン及び2'-O-メチルアデノシンから成る群から選択され； A^2 は、独立に、それぞれの出現について、アデノシン、ホスホロチオエート結合を含むアデノシン、デオキシアデノシン及びホスホロチオエート結合を含むデオキシアデノシンから成る群から選択され；ここでは、核酸分子は、少なくとも1、2、3、4または5個のホスホロチオエート結合を含む。

【0064】

【0064】 関連した態様では、 C^1 は、2'-O-メチルシチジンである。関連した態様では、 G^1 は、2'-O-メチルグアノシンである。関連した態様では、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。関連した態様では、 Z^1 は、2'-O-メチル基を含む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。関連した態様では、 A^1 は、2'-O-メチルアデノシンである。関連した態様では、 A^2 は、ホスホロチオエート結合を含むデオキシアデノシンである。

【0065】

別の態様では、本開示は、核酸配列：5'-Z-Z'-A¹-C-H-G-Z¹-Z²-A²-C-V-C¹-G¹-C-G²-Z'-Z²-Z¹-A¹-Z-A¹-G-C-G¹-3' (配列番号835)を含む核酸分子を提供し、ここでは、 C^1 は、独立に、それぞれの出現について、シチジン、デオキシシチジン及び2'-O-メチルシチジンから成る群から選択され； G^1 は、独立に、それぞれの出現について、グアノシン、デオキシグアノシン及び2'-O-メチルグアノシンから成る群から選択され； G^2 は、独立に、それぞれの出現について、グアノシン、ホスホロチオエート結合を含むグアノシン、デオキシグアノシン及びホスホロチオエート結合を含むデオキシグアノシンから成る群から選択され；Zは、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン、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-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-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)及び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)から成る群から選択され；Z'は、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)及び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)から成る群から選択され；Z'²は、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、ホスホロチオエート結合を含むウリジン、デオキシウリジン、ホスホロチオエート結合を含むデオキシウリジン、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)、ホスホロチオエート結合を含む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-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)、ホスホロチオエート結合を含む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-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)及びホスホロチオエート結合を含む

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) から成る群から選択され; Z¹は、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン、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'-デオキシウリジン (N a p d U)、2'-O-メチル基を含む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-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)、2'-O-メチル基を含む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)、メチレンジオキシベンジル-d U及び2'-O-メチル基を含むメチレンジオキシベンジル-d Uから成る群から選択され; Z²は、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、ホスホロチオエート結合を含むウリジン、デオキシウリジン、ホスホロチオエート結合を含むデオキシウリジン、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) 及びホスホロチオエート結合を含む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-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)、ホスホロチオエート結合を含む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)、メチレンジオキシベンジル-d U及びホスホロチオエート結合を含むメチレンジオキシベンジル-d Uから成る群から選択され; A¹は、独立に、それぞれの出現について、アデノシン、デオキシアデノシン及び2'-O-メチルアデノシンから成る群から選択され; A²は、独立に、それぞれの出現について、アデノシン、ホスホロチオエート結合を含むアデノシン、デオキシアデノシン及びホスホロチオエート結合を含むデオキシアデノシンから成る群から選択され; Vは3炭素リンカーであり; Hはヘキサエチレングリコールリンカーであり; ここでは、核酸分子は、少なくとも1、2、3、4または5個のホスホロチオエート結合を含む。

【0066】

〔0065〕 関連した態様では、C¹は、2'-O-メチルシチジンである。関連した態様では、G¹は、2'-O-メチルグアノシンである。関連した態様では、G²は、ホスホロチオエート結合を含むデオキシグアノシンである。関連した態様では、Zは、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) である。関連した態様では、Z¹は、ホスホロチオエート結合を含む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。関連した態様では、Z²は、ホスホロチオエート結合を含む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) である。関連した態様では、Z²は、ホスホロチオエート結合を含む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) である。関連した態様では、A¹は、2'-O-メチルアデノシンである。関連した態様では、A²は、ホスホロチオエート結合を含むデオキシアデノシンである。

【0067】

〔0066〕 別の態様では、本開示は、本明細書に記載の核酸分子のいずれか1つから成る群から選択される2つの核酸分子を含む組成物を提供する。

【0068】

〔0067〕 関連した態様では、組成物は、溶液、粉末、ゲル及び乳濁液から選択される群から選択される形態である。

【0069】

〔0068〕 関連した態様では、2つの核酸分子は共有結合または非共有結合している。

【0070】

〔0069〕 別の態様では、核酸分子は、PDGF受容体のPDGF媒介性リン酸化を阻害する。

【0071】

〔0070〕 別の態様では、本開示は、本明細書に記載の少なくとも1つの核酸分子

及び医薬的に許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。

【0072】

〔0071〕 関連した態様では、医薬組成物は硝子体内注射用である。

【0073】

〔0072〕 別の態様では、本開示は、黄斑変性症を有する対象に、本明細書に記載の少なくとも1つの核酸分子及び医薬的に許容可能な担体を含む治療有効量の医薬組成物を投与することを含む、黄斑変性症の治療方法を提供する。

【0074】

〔0073〕 別の態様では、本開示は、黄斑変性症を発症する危険性がある対象に、本明細書に記載の少なくとも1つの核酸分子及び医薬的に許容可能な担体を含む治療有効量の医薬組成物を投与することを含む、黄斑変性症の予防方法を提供する。

10

【0075】

〔0074〕 別の態様では、本開示は、眼の病気を有する対象に、本明細書に記載の少なくとも1つの核酸分子及び医薬的に許容可能な担体を含む治療有効量の医薬組成物を投与することを含む、眼の病気の治療方法を提供する。

【0076】

〔0075〕 関連した態様では、眼の病気は、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、エイズ関連視力喪失、弱視、半盲、網膜静脈閉塞症、トラコーマ、円錐角膜、脈絡網膜の炎症、中心性漿液性網膜症、ブドウ膜炎、網膜ジストロフィー、浮腫、緑内障及び白内障から成る群から選択される。

20

【0077】

〔0076〕 関連した態様では、黄斑変性症は加齢性黄斑変性症である。

【0078】

〔0077〕 関連した態様では、黄斑変性症はドライ加齢性黄斑変性症またはウェット加齢性黄斑変性症である。

【0079】

〔0078〕 別の態様では、本開示は、線維症を有する対象に、本明細書に記載の少なくとも1つの核酸分子及び医薬的に許容可能な担体を含む治療有効量の医薬組成物を投与することを含む、線維症の治療方法を提供する。

【0080】

〔0079〕 関連した態様では、線維症は、肺線維症、腎線維症及び嚢胞性線維症から選択される。

30

【0081】

〔0080〕 別の態様では、本開示は、心血管疾患を有する対象に、本明細書に記載の少なくとも1つの核酸分子及び医薬的に許容可能な担体を含む治療有効量の医薬組成物を投与することを含む、心血管疾患の治療方法を提供する。

【0082】

〔0081〕 関連した態様では、心血管疾患は、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、心肥大関連状態及び血管障害から選択される。

【0083】

〔0082〕 別の態様では、本開示は、癌を有する対象に、本明細書に記載の少なくとも1つの核酸分子及び医薬的に許容可能な担体を含む治療有効量の医薬組成物を投与することを含む、癌の治療方法を提供する。

40

【0084】

〔0083〕 関連した態様では、癌は、膀胱癌、肺癌、乳癌、黒色腫、結腸及び直腸癌、リンパ腫、子宮内膜癌、膵臓癌、肝臓癌、腎臓癌、前立腺癌、白血病並びに甲状腺癌から選択される。

【0085】

〔0084〕 関連した態様では、本明細書に記載の核酸分子のいずれか1つはアプタマーである。

50

【0086】

〔0085〕 別の態様では、本開示は、PDGF及び／またはVEGFによって媒介される疾患または病気を予防する、治療する及び／または改善する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、PDGFアプタマー、VEGFアプタマー及び／もしくはVEGF/PDGF-Bアプタマー構築物またはこれらのいずれかを含む医薬組成物を、哺乳動物などの対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。特に、線維症、アテローム性動脈硬化症、黄斑変性症、糖尿病性網膜症及び／または癌を治療する、予防する及び／または改善する方法が提供される。いくつかの実施形態では、PDGF及び／またはVEGFによって媒介される疾患または病気は、PDGF及び／またはVEGFの活性が、疾患または病気に直接的または間接的に寄与し得るものである。そうした疾患または病気としては、限定されないが、線維症、アテローム性動脈硬化症、黄斑変性症、糖尿病性網膜症及び癌が挙げられる。いくつかの実施形態では、治療、予防及び／または改善される疾患または病気は、加齢性黄斑変性症（AMD）、糖尿病性網膜症または他の眼部疾患、例えば、緑内障、慢性ドライアイ、エイズ関連視力喪失、弱視、半盲、網膜静脈閉塞症、トラコーマ、円錐角膜、脈絡網膜の炎症、中心性漿液性網膜症、ブドウ膜炎、網膜炎、高血圧性網膜症、網膜ジストロフィーなどである。いくつかの実施形態では、治療、予防及び／または改善される疾患または病気は、腎線維症または腎臓癌である。

10

【0087】

〔0086〕 いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるアプタマー及びアプタマー構築物は、バイオマーカーの発見及び診断（Ostroff, R. M., et al. (2010) PLoS One 5:e15003; Mehan, M., et al. (2012) PLoS One 7:e35157）から組織化学及びイメージング（Gupta, S., et al. (2011) Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 19:273）におよぶ潜在的用途を有する。

20

【0088】

〔0087〕 いくつかの実施形態では、治療効果（例えば、線維症、アテローム性動脈硬化症、黄斑変性症または癌などを治療する、予防する及び／または改善すること）は、PDGFアプタマー、VEGFアプタマー及び／またはPDGF/VEGFアプタマー構築物を投与し、その結果、アプタマーまたはアプタマー構築物がPDGF及び／またはVEGFに曝露され、PDGF及び／またはVEGFに結合することによって、達成され得る。いくつかの実施形態では、そうした結合は、治療を受ける対象へのアプタマーの送達方法にかかわらず生じる。いくつかの実施形態では、治療効果は、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投与し、その結果、それらが、PDGF及び／またはVEGFに曝露され、PDGF及び／またはVEGFに結合し、1つまたは複数の細胞受容体へのPDGF及び／またはVEGFの結合を防止するまたは低減することによって、達成され得る。

30

【0089】

〔0088〕 いくつかの実施形態では、PDGF-BBまたはPDGF-ABへのPDGFアプタマーの結合は、PDGF- α 受容体へのPDGF-BBまたはPDGF-ABの結合を妨げる。いくつかの実施形態では、PDGF-BBまたはPDGF-ABへのPDGFアプタマーの結合は、PDGF- β 受容体へのPDGF-BBまたはPDGF-ABの結合を妨げる。いくつかの実施形態では、PDGF-BBまたはPDGF-ABに対するPDGFアプタマーは、PDGF受容体（PDGF- α 受容体及び／またはPDGF- β 受容体など）のリン酸化を低減する。

40

【0090】

〔0089〕 いくつかの実施形態では、VEGF-121、VEGF-110、VEGF-165、VEGF-189またはVEGFの別の選択的スプライシングされたもしくは機能的に活性なタンパク質分解断片へのVEGFアプタマーの結合は、VEGFR-1（Flt-1）への増殖因子の結合を妨げる。いくつかの実施形態では、VEGF-1

50

21、VEGF-110、VEGF-165、VEGF-189またはVEGFの別の選択的スプライシングされたもしくは機能的に活性なタンパク質分解断片へのVEGFアプタマーの結合は、VEGFR-2 (KDR) への増殖因子の結合を妨げる。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、VEGF受容体 (VEGF-1受容体及び／またはVEGF-1受容体など) のリン酸化を低減する。

【0091】

【0090】 いくつかの実施形態では、PDGF/VEGFアプタマー構築物は、PDGF受容体 (PDGF- α 受容体及び／またはPDGF- β 受容体など) のリン酸化レベルを低減し、VEGF受容体 (VEGFR-1及び／またはVEGFR-2など) のリン酸化レベルを低減する。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマー、VEGFアプタマーまたはPDGF/VEGFアプタマー構築物は、PDGF受容体及び／またはVEGF受容体のシグナル伝達経路に沿ったシグナリングを低減する。

10

【0092】

【0091】 いくつかの実施形態では、PDGFアプタマー、VEGFアプタマーまたはPDGF/VEGFアプタマー構築物は、1種または複数のさらなる活性薬剤とともに投与される。そのような投与は、連続的でもよいし、組み合わせてもよい。

【0093】

【0092】 いくつかの実施形態では、インビトロ診断法は、PDGFを含む疑いがある試料にPDGFアプタマーを接触させることを含む。いくつかの実施形態では、インビボ診断法は、適切に標識されたPDGFアプタマーをPDGF媒介性の疾患または障害を有する疑いがある個体に投与することを含み、ここでは、標識されたPDGFアプタマーは、個体の健康状態を診断または評価する目的で検出される。使用されるイメージング様式に従って、使用される標識を選択することができる。

20

【0094】

【0093】 いくつかの実施形態では、インビトロ診断法は、VEGFを含む疑いがある試料にVEGFアプタマーを接触させることを含む。いくつかの実施形態では、インビボ診断法は、適切に標識されたVEGFアプタマーをVEGF媒介性の疾患または障害を有する疑いがある個体に投与することを含み、ここでは、標識されたVEGFアプタマーは、個体の健康状態を診断または評価する目的で検出される。使用されるイメージング様式に従って、使用される標識を選択することができる。

30

【0095】

【0094】 いくつかの実施形態では、インビトロ診断法は、PDGF/VEGFアプタマー構築物をPDGF及び／またはVEGFを含む疑いがある試料と接触させることを含む。別の態様では、本開示は、適切に標識されたPDGF/VEGFアプタマー構築物を得ること、標識されたPDGF/VEGFアプタマー構築物をPDGF/VEGF媒介性の疾患または障害を有する疑いがある個体に注射すること、及び個体の健康状態を診断または評価する目的で、標識されたPDGF/VEGFアプタマー構築物を検出することを含むインビボ診断法を提供する。使用されるイメージング様式に従って、使用される標識を選択することができる。

【0096】

【0095】 いくつかの実施形態では、本発明は、PDGFアプタマー及びVEGFアプタマーを含むアプタマー構築物を提供する。

40

【0097】

【0096】 いくつかの実施形態では、本開示は、主に疎水性相互作用を介して効率的にタンパク質に結合するアプタマーを提供する。

【0098】

【0097】 いくつかの実施形態では、本開示は、アプタマーが実質的に疎水性相互作用を介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。

【0099】

【0098】 いくつかの実施形態では、本開示は、タンパク質標的との共結晶複合体

50

を形成することができるアプタマーであって、複合体が7個より少ない水素結合を含む、アプタマーを提供する。

【0100】

〔0099〕 いくつかの実施形態では、本開示は、タンパク質標的との共結晶複合体を形成することができるアプタマーであって、複合体が、16個以下のヌクレオチドを含むシュドノットドメインを含む、アプタマーを提供する。

【0101】

〔00100〕 いくつかの実施形態では、本開示は、タンパク質標的に結合することができるアプタマーであって、 $100 \text{ \AA}^2$ の界面面積あたり1以下の極性接触でタンパク質標的に結合し、極性接触が、1つまたは複数の水素結合及び1つまたは複数の電荷－電荷相互作用を含み、界面面積が、アプタマーに占有されるタンパク質表面領域部分である、アプタマーを提供する。

【0102】

〔00101〕 別の態様では、本開示は、核酸配列： $5' - C - C - G - Z - Z - C^1 - A - A - G^1 - Z - G - C^1 - Z - Z - G^1 - Z - A^1 - G^1 - G - A - Z - Z^1 - Z - A^2 - A^2 - A^2 - Z - G^1 - G^1 - 3'$ （配列番号836）を含む核酸分子を提供し、ここでは、 C^1 は、独立に、それぞれの出現について、シチジン、デオキシシチジン及び $2' - O - \text{メチルシチジン}$ から成る群から選択され； G^1 は、独立に、それぞれの出現について、グアノシン、デオキシグアノシン及び $2' - O - \text{メチルグアノシン}$ から成る群から選択され； Z は、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン及び $5 - (N - \text{ナフチルメチルカルボキシアミド}) - 2' - \text{デオキシウリジン}$ （NapdU）から成る群から選択され； Z^1 は、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン、 $2' - O - \text{メチルウリジン}$ 、 $5 - (N - \text{ナフチルメチルカルボキシアミド}) - 2' - \text{デオキシウリジン}$ （NapdU）及び $2' - O - \text{メチル基}$ を含む $5 - (N - \text{ナフチルメチルカルボキシアミド}) - 2' - \text{デオキシウリジン}$ （NapdU）から成る群から選択され； A^1 は、独立に、それぞれの出現について、アデノシン、デオキシアデノシン及び $2' - O - \text{メチルアデノシン}$ から成る群から選択され； A^2 は、独立に、それぞれの出現について、アデノシン、ホスホロチオエート結合を含むアデノシン、デオキシアデノシン及びホスホロチオエート結合を含むデオキシアデノシンから成る群から選択され；ここでは、核酸分子は、少なくとも1、2、3、4または5個のホスホロチオエート結合を含む。

【0103】

〔00102〕 関連した態様では、 C^1 は、 $2' - O - \text{メチルシチジン}$ である。関連した態様では、 G^1 は、 $2' - O - \text{メチルグアノシン}$ である。関連した態様では、 Z は、 $5 - (N - \text{ナフチルメチルカルボキシアミド}) - 2' - \text{デオキシウリジン}$ （NapdU）である。関連した態様では、 Z^1 は、 $2' - O - \text{メチル基}$ を含む $5 - (N - \text{ナフチルメチルカルボキシアミド}) - 2' - \text{デオキシウリジン}$ （NapdU）である。関連した態様では、 A^1 は、 $2' - O - \text{メチルアデノシン}$ である。関連した態様では、 A^2 は、ホスホロチオエート結合を含むデオキシアデノシンである。

【図面の簡単な説明】

【0104】

【図1-1】 (A) 3つの低オフ速度（slow off rate）修飾アプタマー及びアプタマーE10030に関する K_d 値の測定；(B) 本明細書に記載の3つのPDGFアプタマー及びスクランブルされた対照オリゴヌクレオチドによる、PDGFR β のPDGF-BB刺激性リン酸化の阻害；(C) 親アプタマー4149-8_130に対する修飾アプタマーの K_d 比（ここでは、親アプタマーと比較して、特定のBn-dU核酸塩基が別の修飾dU核酸塩基に置き換えられている）（1の値は、修飾アプタマーがPDGFR β のリン酸化を親と同様に阻害することを示すが、1超の値は、修飾アプタマーが親と比較して阻害活性が弱いことを示す）を示す図である。

【図1-2】 同上。

【図2-1】実施例2に記載されている、(A) アプタマー4149-8__260の分子内接触及びアプタマー-PDG F接触の表；(B) 非極性分子内接触及びアプタマー-PDG F接触の描写；及び(C) 極性分子接触内及びアプタマー-PDG F接触の描写を示す図である。疎水性（非極性）相互作用は、 π - π 相互作用（面-面と端-面の両方の芳香族相互作用）及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）及び電荷-電荷相互作用（実線を含む。ある種のアプタマー残基（例えば、dC4、dG6、dA9、dC10、dC12、dG13、dC14、dG15、dG22、dC23及び2'-O-メチルG24）は、B及びCで示すように、標準の塩基対合及び塩基スタッキングに関与し、2'-O-メチルA11は押し出されている。

【図2-2】同上。

10

【図3-1】実施例1に記載されている、(A) 454ピロシーケンシングによって決定されたSEL EXプールからの一連のクローンに対するコンセンサス配列、及び各位置でのヌクレオチドの出現頻度及びこれらのクローンのうちの6つに対する配列；並びに(B) 示されるように修飾された、親アプタマー4149-8に基づく修飾アプタマーに対する K_d 値を示す図である。

【図3-2】同上。

【図4】実施例2に記載されている、PDG F-BB：4149-8__260複合体のある種の立体像を図示する図である。

【図5】実施例3に記載されている、(A) 200nM tRNAの存在下及び非存在下での、異なるPDG F二量体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；及び(B) PDG F-A、-B、-C及び-Dの成熟型に対するアミノ酸配列のアライメントを示す図である。PDG F-Aに対する太字で示すアミノ酸残基はプロペプチド結合に関与し、PDG F-Bに対する太字で示すアミノ酸残基は、PDG FR β 結合に関与する（Shim et al, (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107(25):11307）。陰影付きボックスは、アプタマー4149-8__260の、PDG F-B鎖1（濃い陰影付き）及びPDG F-B鎖2（薄い陰影付き）への結合に関与する残基を示す。

20

【図6-1】実施例1に記載されている、(A) アプタマー4149-8__38（配列番号38）のそれぞれの示された位置を3つの炭素のC-3リンカーで置換することによって作製された修飾アプタマーの K_d 比、及びPDG F-BB結合、PDG F-AB結合に対する K_d 値、並びに親アプタマー4149-8に基づく5つの修飾アプタマーに対する細胞のIC₅₀；並びに(B) 親アプタマー4149-8__130（配列番号130）に基づく修飾アプタマーに対する K_d 比（ここでは、親アプタマーと比較して、特定のBn-dU核酸塩基が別の修飾dU核酸塩基に置き換えられている）（1未満の数は、修飾アプタマーが親アプタマーよりも親和性が高いことを示し、1超の数は、修飾アプタマーが親アプタマーよりも親和性が低いことを示す）を示す図である。

30

【図6-2】同上。

【図7-1】実施例2に記載されている、(A) アプタマー4149-8__260（配列番号211）に結合したPDG F-BBホモ二量体のリボン図；及び(B) PDG F-Bサブユニットに結合した場合のアプタマーコンフォメーションの模式的描写及び構造的描写を示す図である。非標準塩基対は、Leontis及びWesthofの命名法（Leontis N. B. et al. (2003) Curr. Opin. Struct. Biol. 13(3):300）に基づいてコード化される。ダークグレー=PDG F-B鎖1；ライトグレー=PDG F-B鎖2；Bn=Bn-dU、Pe=Pe-dU、Th=Th-dU。

40

【図7-2】同上。

【図8-1】図8A~Lは、実施例2に記載されている、PDG F-BB：4149-8__260アプタマー複合体の結晶構造からの、PDG Fアプタマーのある種の構造的特徴を図示する。図8Aは、ドメイン、塩基対合及びスタッキング相互作用を示す、アプタマー構造を図示する。ミニノットのステムは、かなりのバックリング及びプロペラ角度並び

50

にらせんの巻き方が少ない (underwinding) の理由から、B型DNAから著しく逸脱する。Bn20は、U8とのスタッキングを介して5'ステムと接続するヒンジである。図8Bは、ステム1 (S1) の端面図を図示する。図8Cは、S1及びL2の側面図を図示する。修飾ヌクレオチドは、ミニノットのBn16、Pe17、Th18及びBn20と相互作用する5'ステムのBn2、Bn7及びBn8と疎水性クラスターを形成する。Bn8は、Bn16及びBn20と端面 π - π 相互作用する。非標準dU-dU塩基対は、Bn20のアミドリンカーへH結合を利用する。図8Dは、Pe-dU17とBn-dU20の間の非標準塩基対の詳細を図示する。図8Eは、ミニノットS1の塩基を安定化させる芳香族相互作用を図示する。図8Fは、S1のC10-G15ワトソン-クリック対とL2ヌクレオチド、A21の間に形成される塩基トリプルを図示する。この塩基トリプルのLeontis-Westhof分類は、シスワトソン-クリック/ワトソン-クリック、トランス糖端/フーグスティーン (Leontis N. B. et al. (2003) Curr. Opin. Struct. Biol. 13:300) である。A21とG15の間に34°のプロペラねじり角度があり、ワトソン-クリック塩基対間にかかなりのバックリング及びプロペラのねじれがあるので(表5)、塩基トリプルは平面状ではない。図8Gは、L1中の単一の押し出された塩基である残基mA11及び骨格回転を図示する。図8Hは、S2の軸方向像である。図8Iは、B型DNAからの著しい逸脱を強調する、5'ステムモチーフの軸方向像を図示する。包括的なC1'-C1'らせんパラメーターは、dU-dU対が過度にねじれており(40°)、その結果、Bn-dU1とBn-dU2の間に直線近く(約172°)まで平らになる約124°の屈曲が骨格中に生じることを示す。Bn-dU7-Bn-dU8間の著しい半径方向変位(radial displacement)及びBn-dU2-dA3間の0に近い変位は、塩基2~4とび6~7の間により大きなスタッキングの重複をもたらす。図8Jは、Bn-dU2とBn-dU8の間の非標準塩基対を図示する。図8Kは、修飾ヌクレオチドによって形成されるドメイン間接合部を図示する。図8Lは、ドメイン間接合部のトポロジーを規定するBn16及びBn20との端面 π - π 相互作用を起こす、Bn8を図示する。アプタマー4149-8_260(配列番号211)の位置8のBn-dUをiB-dU(配列番号255)で置換することの有害な影響は、図8M及び図8Nに示す空間充填像で明らかである。Bn8(8M)は、隣接した芳香族基とエネルギー的に有利な π - π 相互作用を起こすことができ、SOMAmerをより密に充填させる。これに対して、iB8(8N)は芳香族ではないので、隣接した芳香族基と π -スタッキング相互作用する能力を欠く。さらに、iB基は、大きなものではなく、疎水性クラスターの中央に孔を残す。

【図8-2】同上。

【図8-3】同上。

【図9】実施例2に記載されている、ある種のタンパク質-アプタマー相互作用を図示する図である。図9Aでは、Bn-dU1は、ホモ二量体界面での塩橋下のポケットを占有する。U1塩基は、Val39でタンパク質骨格へ水素結合するが、一方でベンジル環は、Arg56の脂肪族側鎖とCys43-Cys52のジスルフィド結合の間に挟まれている。図9Bでは、Bn2はTrp40とのエッジワイズ相互作用を有し、Asn55及びLeu38のメチレン側鎖間に位置する。図9Cは、Bn7の芳香族環が、Asn54及びAsn55側鎖の脂肪族部分に対して折り重ねる(tucks up)ことを図示する。図9Dは、Leu38及びIle75の側鎖がBn-dU8のベンジル環に疎水性面を提供して、タンパク質と接触していることを図示する。図9Eは、Bn16が、Trp40との端面 π -スタッキング及びArg73の脂肪族領域とのファンデルワールス接触を有することを図示する。図9Fは、Pe17が、Leu38、Trp40、Arg73及びIle75の疎水性側鎖で取り囲まれていることを図示する。Arg73はPe-dU17のアミドリンカーと水素結合し、アプタマー骨格と電荷-電荷相互作用する。図9Gは、Arg73、Ile75及びPhe84の疎水性側鎖に取り囲まれたTh18を図示する。図9Hは、タンパク質とアプタマーの間のスタッキング相互作用が、Pro8

2とBn20とU8との間に存在し、Phe84がU20と端一面接触することを図示する。Bn20は、Ile77及びLys80へさらに疎水性接触する。

【図10】極性接触（水素結合プラス電荷－電荷相互作用）の数及び接触表面領域について解析された、従来のアプタマー（PDB ID: vWF、3HXO；トロンビン、3QLP；GlnRstRNA、1EXD；ヒトIgG、3AGV；MS2外被タンパク質、6MSF；NF-kB、1OOA）の6つの共結晶構造を示す図である。結果を、これら6つのアプタマー－標的複合体（ダークグレーの棒）について並びにPDGF-SL5（4149-8__260）複合体及び2つの未発表のSOMAmer－標的構造体を含めた3つのSOMAmer（ライトグレーの棒）について報告された結合親和性に対してプロットする。6つの従来のアプタマーに関する極性接触の数と接触表面領域の間の関連性を線形回帰によって解析し、99%信頼区間を図の底部にグレーの陰影で示す。図10Bは、Pe-dU17及びTh-dU18によって示される、PDGF-SOMAmer複合体の形状相補性を図示する。左、PDGF鎖1をダークグレー面として示し、Pe-dU17及びTh-dU18を空間充填表示として示す。右、スティック図としてPe-dU17を示す以外は、左のパネルと同じ図である。図10Cは、PDGFとのBn-dU1の相互作用の詳細を図示し、PDGF鎖1をダークグレー面として示し、PDGF鎖2をライトグレー面として示し、Bn-dU1を空間充填表示として示す。

10

【図11】PDGF-BBに結合しているSL5とPDGFR β の比較を示す図である。（A）PDGFホモ二量体（鎖1、ミディアムグレー；鎖2、ライトグレー）及びダークグレーで着色された受容体細胞外ドメインを示す受容体の共結晶（Shim, A. H., et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107(25):11307から）。（B）PDGFホモ二量体の複合体（鎖1、ミディアムグレー；鎖2、ライトグレー）及びSL5（ダークグレー）。（C）PDGF-B成熟型のアミノ酸配列。陰影付きボックスは、4149-8__260、PDGFR β または両方への接触残基を示す。4149-8__260と4Åの接触をするが、PDGFR β と接触しないPDGF残基を陰影なしで枠で囲む。PDGFR β と4Åの接触をするが、4149-8__260と接触しないPDGF残基をダークグレーの陰影付きで枠で囲む。4149-8__260とPDGFR β の両方と4Åの接触をするPDGF残基をミディアムグレーの陰影をつけて枠で囲む。

20

【図12-1】低オフ速度アプタマーなどのアプタマー中に組み込むことができるある種の例示的C-5ピリミジン修飾を図示する図である。

30

【図12-2】図12の続き。

【図12-3】図12の続き。

【図13】実施例4に記載されている、SOMAmer 4149-8__379（OH-4149-8__379として表示される）または5'アミノリンカー修飾されたSOMAmer 4149-8__379（N-4149-8__379として表示される）を用いた、Hs27線維芽細胞におけるPDGF-BB誘導性PDGFR β リン酸化の阻害の代表的なプロットを示す図である。

【図14】実施例5に記載されている、454ピロシーケンシングによって決定されたSELEXプールからの一連のPDGF-結合クローンに対するコンセンサス配列、及び各位置でのヌクレオチドの出現頻度を示す図である。

40

【図15-1】実施例7に記載されている、親アプタマー4867-31__143に基づく修飾アプタマーに対するK_d比を示す図である。特定のNap-dU核酸塩基が、親アプタマーと比較して、別の修飾dU核酸塩基に置き換えられている（1未満の数は、修飾アプタマーが親アプタマーよりも親和性が高いことを示し、1超の数は、修飾アプタマーが親アプタマーよりも親和性が低いことを示す）。

【図15-2】図15の続き。

【図16】実施例7に記載されている、454ピロシーケンシングによって決定されたSELEXプールからの一連のVEGF結合クローンに対するコンセンサス配列、及び各位置でのヌクレオチドの出現頻度を示す図である。

50

【図17】実施例9に記載されている、VEGF-121またはVEGF-165並びにVEGFアプタマー4867-31__43及び4867-31__192で刺激されたヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）における、VEGFR2のリン酸化パーセントを示す図である。

【図18】（A）実施例11に記載されている、PDGFアプタマー4149-8__379（白丸）及びPDGF/VEGFアプタマー構築物4149-8__401（黒丸）を用いた、Hs27線維芽細胞におけるPDGF誘導性PDGFR β リン酸化の阻害；並びに（B）VEGFアプタマー4867-31__192（白丸）及びPDGF/VEGFアプタマー構築物4149-8__401（黒丸）を用いた、HUVECにおけるVEGF誘導性VEGFR2リン酸化の阻害を示す図である。

10

【図19】実施例12に記載されている、（A）ビオチン標識PDGFを加えた、VEGFでコーティングされたマイクロタイタープレート及び（B）ビオチン標識VEGFを加えた、PDGFでコーティングされたマイクロタイタープレート上での、PDGF/VEGFアプタマー構築物SL1012（20kDa PEG-N-4149-8__401）による、PDGFとVEGFの同時結合を示す図である。

【図20】実施例12に記載されている、ビオチン標識VEGFを加えた、PDGFでコーティングされたマイクロタイタープレート上での、PDGF/VEGFアプタマー構築物（A）SL1012（20kDa PEG-N-4149-8__401）及び（B）SL1013（40kDa PEG-N-4149-8__401）による、PDGFとVEGFの同時結合を示す図である。

20

【図21】実施例12に記載されている、（A）ビオチン標識PDGFを加えた、VEGFでコーティングされたマイクロタイタープレート及び（B）ビオチン標識VEGFを加えた、PDGFでコーティングされたマイクロタイタープレート上での、様々なPDGF/VEGFアプタマー構築物による、PDGFとVEGFの同時結合を示す図である。

【図22-1】実施例2に記載されている、（A）極性接触の数（水素結合と電荷-電荷相互作用の合計と定義される）対従来のアプタマー（菱形）及びSOMAmer（円）に関する界面面積（線形回帰当てはめは、0.016の傾きを伴う $R^2=0.91$ を有する；破線は、このトレンドの99%信頼区間を表し、SOMAmerはこれらの境界の外側にある）のプロット、（B）自由エネルギー結合対従来のアプタマー（菱形）及びSOMAmer（円）に関する極性接触（線形回帰当てはめは、0.073の傾きを伴う $R^2=0.64$ を有する）のプロット、並びに（C）6つの以前のアプタマー-タンパク質結晶構造及びPDGF-BB：4149-8__260を含めた3つのSOMAmer-タンパク質結晶構造の様々な熱力学特質及び接触特性を示す表を示す図である。（C）タンパク質標的に結合したアプタマー及びSOMAmerに関する相互作用の特徴（図の参考文献：（a）Convery et al.（1998）Nat. Struct. Biol. 5（2）：133；（b）Nomura et al.（2010）Nucleic Acids Res. 38（21）：7822；（c）Pagano 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、以下の温度：MS2、トロンビン、NFkB、vWF及びGlnRs、室温（296K）；IgG、298K；SOMAmer、310Kを使用して、SOMAmerに対する測定した結合親和性または発表された K_d 値から決定した。SOMAmerは、より高い結合親和性へのトレンドを示し；結合の平均自由エネルギーまたは $-\Delta G$ 値は、6つのアプタマーについて 11.4 ± 1.3 kcal/molであり、3つのSOMAmerについて 14.3 kcal/mol ± 0.8 kcal/molである。各リガンドの4Å内のタンパク質接触原子をPyMOLにおいて決定した。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（

30

40

50

SOMAmers) (DeLano (2002) The Pymol Molecular Graphics System, Delano Scientific, San Carlos, CA) を用いて行った。結晶学的に評価された相互作用に関するこの比較的小さなデータセット内で、SOMAmer についての非水素接触原子あたり $0.16 \pm 0.04 \text{ kcal/mol}$ と比較して、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その標的に結合する。界面面積あたりの結合の自由エネルギーも同様であり、アプタマーに対して $0.017 \pm 0.009 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ 、及び SOMAmer に対して $0.012 \pm 0.001 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ という平均値を有する。表中の値から計算された、極性接触あたりの結合の自由エネルギーの値は、SOMAmer (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 $0.89 \pm 0.56 \text{ kcal/mol}$) の約 2 倍の大きさである。

10

【図 22-2】同上。

【図 23】実施例 14 に記載されている、残存全長アプタマー 4867-31_192 (250 nM の出発濃度) のパーセント対 $0.002 \text{ ユニット}/\mu\text{L}$ の DNase I (A) または $0.24 \text{ ユニット}/\mu\text{L}$ の DNase II (B) で、指定の時間数にわたって 37°C で消化した時間のプロットを示す図である。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって消化産物を全長アプタマーから分離し、バンドを SYBR Gold で可視化した。全長アプタマーバンドのパーセントをデンストメトリーによって決定した。

【図 24】実施例 14 に記載されている、残存全長アプタマー (250 nM の出発濃度) のパーセント対 $0.24 \text{ ユニット}/\mu\text{L}$ の DNase II とともに、指定の時間数にわたって 37°C でインキュベートした時間のプロットを示す図である。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって消化産物を全長アプタマーから分離し、バンドを SYBR Gold で可視化した。アプタマー識別番号 (アプタマー ID 番号) で示されるように、残存全長アプタマーのパーセントをデンストメトリーによって決定した。アプタマー ID 番号 4867-31_192 に対するプロットは、図 23 B で示すものと同じプロットである。

20

【図 25】実施例 14 に記載されている、残存全長アプタマー (500 nM の出発濃度) のパーセント対ニュージーランドホワイティウサギから得られた 90% 硝子体液において、指定の時間数にわたって 37°C でインキュベートした時間のプロットを示す図である。(アプタマーをポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、SYBR Gold で染色した。アプタマー識別番号 (アプタマー ID 番号) で示されるように、残存全長アプタマーのパーセントをデンストメトリーによって決定した。

30

【図 26】実施例 14 に記載されている、残存全長アプタマー 5169-4_146 (250 nM の出発濃度) のパーセント対 $0.01 \text{ ユニット}/\mu\text{L}$ の DNase I (A) または $0.12 \text{ ユニット}/\mu\text{L}$ の DNase II (B) で、指定の時間数にわたって 37°C で消化した時間のプロットを示す図である。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって消化産物を全長アプタマーから分離し、バンドを SYBR Gold で可視化した。全長アプタマーのパーセントをデンストメトリーによって決定した。

【図 27】実施例 14 に記載されている、残存全長アプタマー 5169-4_182 (250 nM の出発濃度) のパーセント対 $0.01 \text{ ユニット}/\mu\text{L}$ の DNase I とともに、指定の時間数にわたって 37°C でインキュベートした時間のプロットを示す図である。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって消化産物を全長アプタマーから分離し、バンドを SYBR Gold で可視化した。全長アプタマーのパーセントをデンストメトリーによって決定した。

40

【図 28】実施例 14 に記載されている、残存全長アプタマー (500 nM の出発濃度) のパーセント対ニュージーランドホワイティウサギから得られた 90% 硝子体液において、指定の時間数にわたって 37°C でインキュベートした時間のプロットを示す図である。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって消化産物を全長アプタマーから分離し、バンドを SYBR Gold で可視化した。アプタマー識別番号 (アプタマー ID 番号) で示されるように、全長アプタマーのパーセントをデンストメトリーによって決定した。

50

【図29】実施例14に記載されている、残存全長アプタマー（250 nMの出発濃度）のパーセント対0.01ユニット/ μ LのDNase Iとともに、指定の時間数にわたって37℃でインキュベートした時間のプロットを示す図である。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって消化産物を全長アプタマーから分離し、バンドをSYBR Goldで可視化した。アプタマー識別番号（アプタマーID番号）で示されるように、残存全長アプタマーのパーセントをデンストメトリーによって決定した。

【図30】実施例14に記載されている、残存全長アプタマー4149-8-379（250 nMの出発濃度）のパーセント対0.12ユニット/ μ LのDNase IIとともに、指定の時間数にわたって37℃でインキュベートした時間のプロットを示す図である。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって消化産物を全長アプタマーから分離し、バンドをSYBR Goldで可視化した。全長アプタマーのパーセントをデンストメトリーによって決定した。

10

【図31】実施例14に記載されている、残存全長アプタマー（250 nMの出発濃度）のパーセント対0.12ユニット/ μ LのDNase IIとともに、指定の時間数にわたって37℃でインキュベートした時間のプロットを示す図である。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって消化産物を全長アプタマーから分離し、バンドをSYBR Goldで可視化した。アプタマー識別番号（アプタマーID番号）で示されるように、全長アプタマーのパーセントをデンストメトリーによって決定した。アプタマーID番号4149-8-379に対するプロットは、図30で示すものと同じプロットである。

【発明を実施するための形態】

20

【0105】

〔00133〕次に、本発明の代表的な実施形態について詳細に言及する。列挙した実施形態とともに本発明を説明するが、本発明がそれらの実施形態に限定されることを意図するものではないことを理解されたい。それどころか、本発明は、特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内に含まれ得るすべての代替物、変更及び均等物をカバーすることが意図される。

【0106】

〔00134〕本発明の実施で使用する事ができ、本発明の実施の範囲内である、本明細書に記載のものと同様または均等な多くの方法及び材料を、当業者なら認識するであろう。本発明は、記載される方法及び材料に決して限定されるものではない。

30

【0107】

〔00135〕別段規定されない限りは、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野（複数可）の当業者が通常理解するものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様または均等ないかなる方法、装置及び材料も本発明の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法、装置及び材料を次に記載する。

【0108】

〔00136〕本開示で引用されるすべての刊行物、公開特許文献及び特許出願は、本開示が関係する分野（複数可）の技術レベルの指標となる。本明細書で引用されるすべての刊行物、公開特許文献及び特許出願は、あたかも、それぞれ個々の刊行物、公開特許文献または特許出願が参照により組み込まれると具体的に及び個々に示されたのと同じ程度で、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0109】

〔00137〕添付の特許請求の範囲を含めて、本開示で使用する場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈において特に明記しない限り、複数形の意味を含み、「少なくとも1つの」及び「1つまたは複数の」と互換的に使用される。したがって、「1つのアプタマー」に対する言及は、アプタマーの混合物などを含む。

【0110】

〔00138〕本明細書で使用する場合、用語「約」は、数値が関連する事項の基本的機能が変わらないような、数値のわずかな修正または変動を表す。

【0111】

50

〔00139〕 本明細書で使用する場合、用語「含む (comprises)」、「含むこと (comprising)」、「含む (includes)」、「含むこと (including)」、「含む (contains)」、「含むこと (containing)」及びそれらの任意の変形は、非排他的包含をカバーすることが意図され、したがって、要素または要素のリストを含む (comprises)、含む (includes) または含む (contains) プロセス、方法、プロセスによる生成物、または物質の組成物は、それらの要素のみを含むのではなく、明確に列挙されない他の要素、またはそうしたプロセス、方法、プロセスによる生成物または物質の組成物に固有の他の要素を含むことができる。

【0112】

10

〔00140〕 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れらの修飾型及びそれらの類似体を指す。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、及びそれらの誘導体及び類似体）並びにピリミジン（例えば、シトシン、ウラシル、チミン及びそれらの誘導体及び類似体）を含む種を含有する。

【0113】

〔00141〕 本明細書で使用する場合、「核酸」、「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」は、互換的に使用されて、ヌクレオチドのポリマーを指し、DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド並びにこれらの種類の核酸、オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの修飾体を含み、ここでは、任意の位置でのヌクレオチドユニットへの様々な実体または部分の結合が含まれる。用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」及び「核酸」は、二本鎖分子または一本鎖分子及び三重らせん分子を含む。核酸、オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドは、アプタマーという用語よりも広義の用語であり、したがって、核酸、オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドという用語は、アプタマーである、ヌクレオチドのポリマーを含むが、核酸、オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドという用語は、アプタマーに限定されない。

20

【0114】

〔00142〕 本明細書で使用する場合、用語「修飾する」、「修飾された」、「修飾」及びそれらの任意の変形は、オリゴヌクレオチドに関連して使用される場合、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及び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。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ抵抗性を与える。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、主にタンパク質標的とのアプタマーの疎水性相互作用を導き、その結果、高い結合効率及び安定な共結晶複合体をもたらす。C-5位に置換を有するピリミジンは、修飾ヌクレオチドの例である。修飾には、骨格修飾、メチル化、イソ塩基のイソシチジン及びイソグアニジンなどの異例な塩基対合の組み合わせなどが含まれ得る。修飾には、キャップ形成などの3'及び5'修飾も含まれ得る。他の修飾としては、類似体との天然に存在するヌクレオチドの1つまたは複数の置換、ヌクレオチド間修飾、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバミン酸など）を有するもの及び荷電結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を有するもの、インターカレーター（例えばアクリジン、ソラレンなど）を有するもの、キレート剤（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属など）を含むもの、アルキル化剤を含むもの、並びに修飾結合（例えばαアノマー核酸など）を有するものを挙げることができる。さらに、ヌクレオチドの糖に通常存在するヒドロキシル基のいずれかを、ホスホネート基もしくはリン酸基に置き換えることができ；標準的な保護基で保護することができ；またはさらなるヌクレオチドもしくは固体支持体へのさらなる結合を調製するように活性化することができる。5'末端及び3'末端のOH基をリン酸化することができ、またはアミン、約1から約20炭素原子の有機キャップ形成基部分、いくつかの実施形態では約10から約80 kDaにおよぶポリエチレングリコール (PEG) ポリマー、いくつかの実施形態では約20から約

30

40

50

60 kDaにおよぶPEGポリマー、もしくは他の親水性もしくは疎水性の生物学的ポリマーもしくは合成ポリマーで置換することができる。いくつかの実施形態では、修飾は、ピリミジンのC-5位のものである。これらの修飾は、C-5位での直接的なアミド結合を介して、または他のタイプの結合によって生成することができる。

【0115】

[00143] ポリヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-フルオローまたは2'-アジド-リボース、炭素環糖類似体、 α -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、セドヘプツロース、非環式類似体及び脱塩基ヌクレオシド類似体、例えばメチルリボシドを含めた、一般に当技術分野で既知であるリボース糖またはデオキシリボース糖の類似型を含むこともできる。上記のように、1つまたは複数のホスホジエステル結合を代替の連結基に置き換えることができる。これらの代替の連結基としては、リン酸が、P(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(O)NR₂(「アミデート」)、P(O)R、P(O)OR'、COまたはCH₂(「ホルムアセタール」)に置き換えられ、ここでは、各RまたはR'が、独立に、Hまたはエーテル(-O-)結合を任意に含む置換もしくは無置換のアルキル(1~20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニルもしくはアラルキルである実施形態が挙げられる。ポリヌクレオチド中のすべての結合が同一である必要はない。例えばポリアミド骨格のような代替の骨格構造と同様に、糖、プリン及びピリミジンの類似型の置換は、最終生成物の設計において有利であり得る。

【0116】

[00144] 本明細書で使用する場合、用語「ヌクレアーゼ」は、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ことができる酵素を指す。本明細書で使用する場合、用語「エンドヌクレアーゼ」は、オリゴヌクレオチドの内部の部位でホスホジエステル結合(複数可)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」は、オリゴヌクレオチドの末端ヌクレオチドを結合するホスホジエステル結合(複数可)を切断する酵素を指す。生体液は、一般的には、エンドヌクレアーゼとエキソヌクレアーゼの両方の混合物を含む。

【0117】

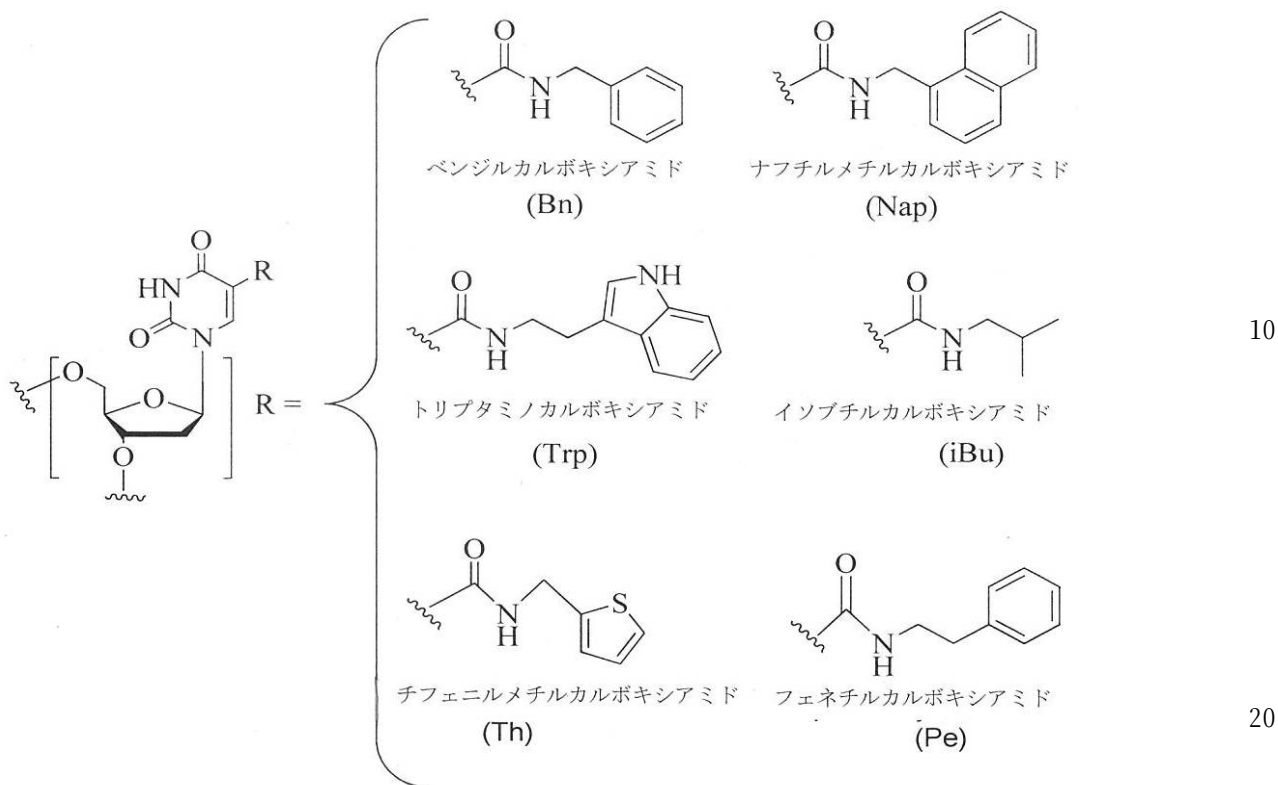
[00145] 本明細書で使用する場合、用語「ヌクレアーゼ抵抗性の」及び「ヌクレアーゼ抵抗性」は、オリゴヌクレオチドがエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼの基質として働く能力が低減し、その結果、そうした酵素と接触した場合に、オリゴヌクレオチドが分解されないか、未修飾ヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチドよりもゆっくりと分解されることを指す。

【0118】

[00146] 本明細書で使用する場合、用語「C-5修飾ピリミジン」は、限定されないが、図12に図示される部分を含めた、C-5位に修飾を有するピリミジンを指す。C-5修飾ピリミジンの例としては、U.S. 特許第5,719,273号及び第5,945,527号に記載されているものが挙げられる。C-5修飾の例としては、以下から独立に選択される置換基とのC-5位におけるデオキシウリジンの置換が挙げられる：真下に図示するような、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ニル)(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ニル)(Nap)、トリプタミノカルボキシアミド(あるいは、トリプタミノカルボニル)(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)及びイソブチ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)。

【0119】

【化 1】



【0120】

〔00147〕 C-5 修飾ピリミジンの化学修飾は、2' 位の糖修飾、環外アミンでの修飾及び 4-チオウリジンの置換などと、単独でまたは任意の組み合わせで組み合わせることができる。

【0121】

〔00148〕 代表的な C-5 修飾ピリミジンとしては、以下が挙げられる：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。

【0122】

〔00149〕ヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド合成の前または後のいずれかで修飾することができる。オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、1つまたは複数の非ヌクレオチド成分で中断されてもよい。修飾オリゴヌクレオチドを、例えば、任意の適切な標識成分とコンジュゲートさせることなどによって、重合の後にさらに修飾することができる。

【0123】

〔00150〕 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」は、核酸の修飾に言及する場合、核酸中の1つの、いくつかの、またはすべてのピリミジンを指し、核酸中のC、TまたはUのいずれかまたはすべての、いずれかまたはすべての出現が修飾されていても、されていなくてもよいことを示す。

【0124】

〔00151〕 本明細書で使用する場合、別段の指定がない限り、A、C、G、U及びTは、それぞれ、dA、dC、dG、dU及びdTを示す。

【0125】

〔00152〕 本明細書で使用する場合、「核酸リガンド」、「アプタマー」及び「クローン」は互換的に使用されて、標的分子に対して望ましい作用を有する、天然に存在しない核酸を指す。望ましい作用としては、限定されないが、標的の結合、標的を触媒的に変化させること、標的または標的の機能活性を修飾または変更する方法で標的と反応すること、標的に共有結合すること（自殺インヒビターと同様）、及び標的と別の分子の間の反応を促進することが挙げられる。いくつかの実施形態では、作用は標的分子に対する特異的結合親和性であり、そうした標的分子は、ワトソン／クリック塩基対合または三重らせん形成と無関係なメカニズム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、ここでは、アプタマーは、標的分子が結合するという既知の生理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は、アプタマーが標的のリガンドである場合、（a）候補混合物を標的に接触させること（ここでは、候補混合物の他の核酸と比べて標的に対して親和性が増大した核酸を候補混合物の残部から分割することができる）；（b）親和性が増大した核酸を候補混合物の残部から分割すること；及び（c）親和性が増大した核酸を増幅して、リガンドが豊富な核酸混合物を得て、それによって、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、核酸の候補混合物から同定される核酸を含む。親和性相互作用は程度の問題であることが認識されるが、この文脈では、標的に対するアプタマーの「特異的結合親和性」は、アプタマーが、一般に、混合物または試料中の他の非標的成分に結合するよりもはるかに高い親和性度で、標的に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」は、特定のヌクレオチド配列を有する1つのタイプまたは種の核酸分子のコピーのセットである。アプタマーは、任意の適切な数のヌクレオチドを含むことができる。「アプタマー」は、1を超えるそのような分子のセットを指す。異なるアプタマーは、同じまたは異なる数のヌクレオチドを有することができる。アプタマーはDNAでもRNAでもよく、一本鎖でも二本鎖でも、二本鎖または3本鎖領域を含んでいてもよい。

【0126】

〔00153〕 本明細書で使用する場合、「SOMAmer」または低オフ速度修飾アプタマーは、30分以上、60分以上、90分以上、120分以上、150分以上、180分以上、210分以上または240分以上のオフ速度（ $t_{1/2}$ ）を有するアプタマー（疎水性修飾を有する、少なくとも1つのヌクレオチドを含むアプタマーを含める）を指す。いくつかの実施形態では、SOMAmerは、「Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates」と題するU. S. 特許第7,947,447号に記載されている、改良SELEX方法を使用して生成される。

【0127】

〔00154〕 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」と同義に使用される。「精製された」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、アミノ酸配列が得られる細胞、組織もしくは無細胞の供給源からの細胞性物質もしくは他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、または化学的に合成される場合、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。

【0128】

〔00155〕 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」は、2つ以上の相互作用分子を含む結晶構造である。

【0129】

〔00156〕 本明細書で使用する場合、「心血管の病気または疾患」は、心臓及びその血管系に関する病気または疾患を意味する。そうした病気または疾患のいくつかの例は、動脈瘤、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、冠動脈心疾患、再狭窄、虚血、左室肥大、末梢血管疾患、心筋梗塞、高血圧、心臓弁膜症及び拘束性心疾患である。

【0130】

〔00157〕 本明細書で使用する場合、「線維症」は、結合組織の肥厚及び瘢痕をもたらす、それが器官の機能不全につながる、器官における過剰及び異常な量の線維性結合組織の形成によって引き起こされる、疾患または病気を意味する。そうした疾患及び病気の例は、肺線維症、腎線維症、肝線維症及び嚢胞性線維症である。

10

【0131】

〔00158〕 本明細書で使用する場合、「AMD」または「加齢性黄斑変性症」または「黄斑変性症」は、網膜への損傷によって引き起こされ、黄斑と呼ばれる視野の中心において視力喪失をもたらす、眼の病気を意味する。AMDは、「ウェット」及び「ドライ」型で生じる。「ウェット」AMDでは、血管は、網膜の後ろの脈絡膜から増殖する。「ドライ」AMDでは、細胞の残骸（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、網膜は剥離し得る。

【0132】

〔00159〕 本明細書で使用する場合、「眼科疾患」または「眼の病気」または「眼部疾患」または「眼部の病気」は、眼部の血管新生障害、例えば、黄斑変性症（「ウェット」及び「ドライ」）、未熟児網膜症、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度の段階）、ブドウ膜炎（黄斑浮腫につながることも多い眼の炎症状態）、白内障手術後の嚢胞様黄斑浮腫、近視性変性（強度の近視を有する患者が脈絡膜血管新生を発症する状態）、炎症性黄斑変性症（感染または他の原因により黄斑領域に炎症を有する患者が脈絡膜血管新生を発症する状態）、及び虹彩血管新生（虹彩表面の新しい血管増殖に関与する、糖尿病性網膜症または網膜静脈閉塞症の重篤な合併症）に影響を及ぼすまたは関与する、任意の疾患または病気を指す。

20

【0133】

〔00160〕 本明細書で使用する場合、「腎臓疾患」または「腎臓の病気」は、増殖性の腎臓障害、例えば、糸球体腎炎、メサングウム増殖性腎臓疾患、多発性嚢胞腎疾患、腎臓癌、急性腎不全、腎障害、アミロイド症、浮腫、線維症、糸球体疾患、腎梗塞及び腎炎に影響を及ぼすまたは関与する、任意の疾患または病気を指す。

30

【0134】

〔00161〕 本明細書で使用する場合、「癌」は、無秩序且つ異常な細胞増殖に関与する疾患または病気を意味する。一般的な癌のいくつかの例は、膀胱癌、肺癌、乳癌、黒色腫、結腸及び直腸癌、リンパ腫、子宮内膜癌、膵臓癌、肝臓癌、腎臓癌、前立腺癌、白血病並びに甲状腺癌である。

【0135】

〔00162〕 本明細書で使用する場合、「調節する」は、増大させ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レベルを変更すること、または増大させ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または活性を変更することを意味する。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。一実施形態では、調節または阻害されるタンパク質はPDGFである。

40

【0136】

〔00163〕 本明細書で使用する場合、用語「生物活性」は、生理学的または病態生理学的プロセスに影響を与えることができる（例えば、結合、シグナリングなどを介する）1つまたは複数の細胞内または細胞外のプロセスに対する効果を示す。

50

【0137】

〔00164〕 本明細書で使用する場合、用語「血小板由来増殖因子」及び「PDGF」は、PDGF A、B、C及びDアイソフォーム並びにそれらのホモまたはヘテロ二量体AA、BB、AB、CC及びDDを指す。場合によっては、文脈によって、PDGFのどのアイソフォーム及び／またはヘテロ二量体が意味されるかが決まる。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載のPDGFアプタマーは、PDGF-Bアイソフォーム並びにそのアイソフォームを含むホモ及びヘテロ二量体に結合するが、アプタマーは、PDGFへ結合すると記載される場合がある。天然に存在するヒトPDGF AA、AB及びBBアイソフォーム並びに変異体が、定義に特に含まれる。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、ウマ及びウシを含めた、すべての哺乳類種のPDGFが含まれる。非限定的な例示的ヒトPDGF-Bアイソフォーム前駆体は、Swiss-Prot受託番号P01127.1に示される配列を有する。非限定的な例示的ヒトPDGF-Bアイソフォーム成熟タンパク質は、Swiss-Prot受託番号P01127.1のアミノ酸82から241または82から190の配列を有し得る（PDGF-Bのアミノ酸1から160または1から109として、本明細書で言及される）。

10

【0138】

〔00165〕 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 α 及びPDGF受容体 β を指す。PDGF受容体には、限定されないが、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ウマ、霊長類及びウシを含めた、任意の哺乳類種の受容体が含まれる。非限定的な例示的ヒトPDGFR β 前駆体は、Swiss-Prot受託番号P09619.1に示される配列を有する。非限定的な例示的ヒトPDGFR β 成熟タンパク質は、Swiss-Prot受託番号P09619.1のアミノ酸33から1106の配列を有する。非限定的な例示的ヒトPDGFR α 前駆体は、Swiss-Prot受託番号P16234.1に示される配列を有する。非限定的な例示的ヒトPDGFR α 成熟タンパク質は、Swiss-Prot受託番号P16234.1のアミノ酸24から1089の配列を有する。

20

【0139】

〔00166〕 「PDGFアプタマー」は、PDGFに結合することができ、PDGFの活性を修正することができるアプタマーである。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、PDGFの活性をインビトロで阻害する。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、PDGFの活性をインビボで阻害する。PDGFの非限定的な例示的活性は、PDGF受容体、例えば、PDGF受容体 α （PDGFR α ）またはPDGF受容体 β （PDGFR β ）のPDGF媒介性リン酸化である。

30

【0140】

〔00167〕 いくつかの実施形態では、本明細書で定義される「VEGFアプタマー」は、任意にリンカーによって結合した、単量体、二量体または多量体構築物である。

【0141】

〔00168〕 本明細書で使用する場合、用語「血管内皮増殖因子」及び「VEGF」は、アイソフォーム及び変異体、例えば、VEGF-121、VEGF-145、VEGF-165、VEGF-183、VEGF-189及びVEGF-206を含めた、天然に存在するVEGFを指す。本明細書で使用する場合、VEGFには、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、霊長類、ウマ及びウシを含めた、すべての哺乳類種のVEGFが含まれる。非限定的な例示的ヒトVEGF前駆体は、Swiss-Prot受託番号P15692.2に示される配列を有する。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。

40

【0142】

〔00169〕 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及びVEGFR-2を指す

50

。VEGF受容体には、限定されないが、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ウマ、霊長類及びウシを含めた、任意の哺乳類種の受容体が含まれる。非限定的な例示的ヒトVEGFR-1前駆体は、Swiss-Prot受託番号P17948.2に示される配列を有する。非限定的な例示的ヒトVEGFR-1成熟タンパク質は、Swiss-Prot受託番号P17948.2のアミノ酸27から1338の配列を有する。非限定的な例示的ヒトVEGFR-2前駆体は、Swiss-Prot受託番号P35968.2に示される配列を有する。非限定的な例示的ヒトVEGFR-2成熟タンパク質は、Swiss-Prot受託番号P35968.2のアミノ酸20から1356の配列を有する。

【0143】

【00170】 「VEGFアプタマー」は、VEGFに結合することができ、VEGFの活性を修正することができるアプタマーである。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、VEGFの活性をインビトロで阻害する。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、VEGFの活性をインビボで阻害する。VEGFの非限定的な例示的活性としては、VEGF受容体、例えば、VEGFR-1またはVEGFR-2のVEGF媒介性リン酸化が挙げられる。いくつかの実施形態では、VEGF-121への結合についてアプタマー4867-31__183と競合するVEGFアプタマーが提供される。

【0144】

【00171】 いくつかの実施形態では、本明細書で定義される「VEGFアプタマー」は、任意にリンカーによって結合した、単量体、二量体または多量体構築物である。

【0145】

【00172】 用語「PDGF/VEGFアプタマー構築物」及び「VEGF/PDGFアプタマー構築物」は、互換的に使用されて、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」及び「VEGF/PDGFアプタマー構築物」における単語「PDGF」及び「VEGF」の順序は、どのようにアプタマーが結合されるかの指標とならず、例えば、順序は、どちらのアプタマーがアプタマー構築物の最も5'側の位置にあるか、及びどちらのアプタマーがアプタマー構築物の最も3'側の位置にあるかを示さない。いくつかの実施形態では、PDGF/VEGFアプタマー構築物は、PDGFとVEGFに同時に結合することができる。いくつかの実施形態では、PDGF/VEGFアプタマー構築物は、PDGF及びVEGFのそれぞれに別々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、例えばストレプトアビジン及びビオチンなどの結合対を介して、共有結合的または非共有結合的に結合され得る。PDGF/VEGFアプタマー構築物は、PDGFアプタマーとVEGFアプタマーの間にリンカーを含むことができる。

【0146】

【00173】 本明細書で使用する場合、「PDGFによって媒介される疾患または病気」は、PDGF活性が疾患または病気に直接的または間接的につながり得る疾患または病気を指す。非限定の例示的な、PDGFによって媒介される疾患または病気としては、心血管疾患、例えば、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、心肥大関連状態及び血管障害；眼科疾患、例えば、黄斑変性症；線維症；並びに癌が挙げられる。

【0147】

【00174】 本明細書で使用する場合、「VEGFに媒介される疾患または病気」は、VEGF活性が疾患または病気に直接的または間接的につながり得る疾患または病気を指す。非限定の例示的な、VEGFに媒介される疾患または病気としては、心血管疾患、自己免疫疾患、炎症性リウマチ疾患、眼科疾患及び疾患プロセスの様々な段階での癌が挙げられる。心血管疾患の非限定例は、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、心肥大関連状態及び血管障害である。眼科疾患の非限定例は、網膜炎、黄斑変性症、脈絡膜炎、網膜症、浮腫、緑内障及び白内障である。

【0148】

【00175】 本明細書で使用する場合、用語「医薬的に許容可能な」は、動物、より詳

細には、ヒトにおける使用について、連邦または州政府の規制当局によって承認されていること、または米国薬局方もしくは他の一般に認識される薬局方に列挙されていることを意味する。用語「担体」は、それとともに治療剤が投与される希釈剤、補助剤、賦形剤またはビヒクルを指し、限定されないが、水及び油などの滅菌した液体が挙げられる。

【0149】

〔00176〕 本明細書で使用する場合、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「医薬的に許容可能な塩」または「塩」という用語は、イオン結合を含み、一般的には、開示される化合物を酸または塩基と反応させることによって生成される、個体への投与に適した開示される化合物の生成物である。医薬的に許容可能な塩としては、限定されないが、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、乳酸塩及び酒石酸塩を含めた酸付加塩；Li、Na、Kなどのアルカリ金属カチオン、MgもしくはCaなどのアルカリ土類金属塩または有機アミン塩を挙げることができる。

10

【0150】

〔00177〕 本明細書で使用する場合、用語「医薬組成物」は、個体への投与に適した形態で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含む製剤である。医薬組成物は、一般的には、意図された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、限定されないが、経口及び非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、吸入、局所、経皮、経粘膜及び直腸内投与が挙げられる。

20

【0151】

〔00178〕 本明細書で使用する場合、用語「治療有効量」は、一般に、本明細書に記載のように予防、軽減、または治療される障害または病気の少なくとも1つの症状を改善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場合、語句「治療有効量」は、そうした治療を必要としている有意な数の個体においてアプタマーが投与されることに対して、特定の薬理学的応答を与えるアプタマー投薬量を意味する。特定の場合の特定の個体に投与される治療有効量のアプタマーは、当業者によってそうした投薬量が治療有効量であるとしても、本明細書に記載の病気／疾患の治療において必ずしも有効とは限らないことを強調する。

30

【0152】

〔00179〕 用語「SELEX」及び「SELEXプロセス」は、本明細書で互換的に使用されて、一般に、（１）望ましい方法で、例えば高親和性でタンパク質と結合することによって、標的分子と相互作用する核酸の選択と（２）それら選択された核酸の増幅との組み合わせを指す。SELEXプロセスは、特定の標的分子に高親和性であるアプタマーを同定するのに使用することができる。

【0153】

〔00180〕 SELEXは、一般に、核酸の候補混合物を調製すること、所望の標的分子に候補混合物を結合させて、親和性複合体を形成すること、未結合の候補核酸から親和性複合体を分離すること、親和性複合体から核酸を分離及び単離すること、核酸を精製すること、並びに特異的なアプタマー配列を同定することを含む。このプロセスは、選択されたアプタマーの親和性をさらに洗練させるために、複数ラウンドを含むことができる。このプロセスは、プロセスの1または複数の箇所を増幅ステップを含むことができる。例えば、「Nucleic Acid Ligands」と題するU. S. 特許第5, 475, 096号を参照されたい。SELEXプロセスは、標的に共有結合するアプタマー及び標的に非共有結合するアプタマーを生成するのに使用することができる。例えば、「Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX」と題するU. S. 特許第5, 705, 337号を参照されたい。

40

【0154】

50

〔00181〕 S E L E Xプロセスは、向上した特性、例えば、向上したインビボ安定性または向上した送達特性などをアプタマーに与える修飾ヌクレオチドを含む高親和性アプタマーを同定するのに使用することができる。そうした修飾の例としては、リボース及び／またはリン酸及び／または塩基の位置での化学的置換が挙げられる。修飾ヌクレオチドを含む、S E L E Xプロセスにより同定されたアプタマーは、「High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides」と題するU. S. 特許第5, 660, 985号に記載されており、これは、ピリミジンのC5及び／または2'位で化学的に修飾されたヌクレオチド誘導体を含むオリゴヌクレオチドを記載している。U. S. 特許第5, 580, 737号（上記を参照されたい）は、2'-アミノ（2'-NH₂）、2'-フルオロ（2'-F）及び／または2'-O-メチル（2'-OMe）で修飾された1つまたは複数のヌクレオチドを含む、非常に特異的なアプタマーを記載している。物理的及び化学的特質が拡大した核酸ライブラリー並びにS E L E X及びフォトS E L E Xにおけるその使用を記載する、「S E L E X and P H O T O S E L E X」と題するU. S. 特許公開第20090098549号も参照されたい。

【0155】

〔00182〕 S E L E Xは、望ましいオフ速度特性を有するアプタマーを同定するのに使用することもできる。標的分子に結合することができるアプタマーを生成するための改良S E L E X方法を記載する、「Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates」と題するU. S. 特許第7, 947, 447号を参照されたい。それぞれの標的分子からの解離速度がより低いアプタマー及びフォトアプタマーを生成する方法が記載されている。この方法は、候補混合物を標的分子に接触させること、核酸-標的複合体の形成を起こさせること、及び低オフ速度強化プロセスを実施することを含み、ここでは、速い解離速度を有する核酸-標的複合体が解離し、再形成しないが、一方で、低解離速度を有する複合体は、インタクトなままである。さらに、この方法は、オフ速度性能が向上したアプタマーを生成するために、候補核酸混合物の生成における修飾ヌクレオチドの使用を含む（「S E L E X及びP h o t o S E L E X」と題するU. S. 特許公開第2009/0098549号を参照されたい）。（U. S. 特許第7, 855, 054号及びU. S. 特許公開第2007/0166740号も参照されたい。）。これらの出願のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0156】

〔00183〕 いくつかの実施形態では、以下を含む、標的分子に結合するアプタマーを選択する方法が提供される：（a）核酸の候補混合物を調製すること（ここでは、候補混合物は、候補混合物の少なくとも1つのまたはそれぞれの核酸の少なくとも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核酸を含む）；（b）候補混合物を標的分子と接触させること（ここでは、候補混合物の他の核酸と比べて標的分子に対する親和性が増大した核酸が標的分子に結合し、核酸-標的分子複合体を形成する）；（c）親和性が増大した核酸を候補混合物の残部から分割すること；及び（d）親和性が増大した核酸を増幅して、親和性が増大した標的分子に結合することができる核酸配列が富化された核酸混合物を得て、これによって、標的分子に対するアプタマーを同定すること。ある種の実施形態では、この方法は、低オフ速度強化プロセスを実施することをさらに含む。

【0157】

〔00184〕 本明細書では、「標的（Target）」または「標的分子」または「標的（target）」は、核酸が望ましい方法で作用することができる任意の化合物を指す。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、有害物質、基質、代謝物、遷移状態類似体、補助因子、インヒビター、薬物、色素、栄養素、増殖因子、細胞、組織、前述のいずれかの任意の部分または断片であり得るが、これらに限定されない。事実上、任意の化学的または生物学的エフェクターは、適切な標的であり得る。任意のサイズの分子が標

的として働くことができる。標的と核酸の間の相互作用の可能性または強さを増強するために、標的をある種の方法で修飾することもできる。標的は、特定の化合物または分子の任意の軽微な変形、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、糖鎖付加、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは修飾、例えば標識成分とのコンジュゲーションにおける軽微な変形を含むこともでき、これらは、分子の同一性を実質的に変更しない。「1つの標的分子」または「1つの標的」は、アプタマーに結合することができる分子または多分子性構造体の1つのタイプまたは種のコピーのセットである。「複数の標的分子」または「複数の標的」は、1つを超える、そうした分子のセットを指す。標的がペプチドである S E L E X プロセスの実施形態は、「Modified S E L E X Processes Without Purified Protein」と題する、U. S. 特許第6, 376, 190号に記載されている。

10

【0158】

例示的PDGFアプタマー

[00185] 本開示のPDGFアプタマーは、低解離速度でPDGFに結合するアプタマーの選択及び生成のための代表的な方法を記載する実施例1に記載されているように、低オフ速度を有するアプタマーを同定するための改良S E L E X方法を使用して同定した。ベンジル-d U (B n -d U)、d A、d C及びd Gから成るランダムDNAライブラリーを使用して選択した。この方法を使用して、アプタマー4149-8__1 (配列番号1)と命名された、PDGF-BBに対するDNAアプタマーを同定した。

20

【0159】

[00186] アプタマー4149-8__1 (配列番号1)を使用して、PDGFに対して強い親和性を維持するのに必要とされる最小配列長を同定するために研究を行った。5'末端及び3'末端からの体系的なランケーションにより、29ヌクレオチド(4149-8__38; 配列番号38)から成るコアモチーフを同定した。アプタマー4149-8__38は、PDGF-BBに対して高親和性結合を示した(20 pMの K_d 値; 図6)。

【0160】

[00187] アプタマー4149-8__1 (配列番号1)を選択した配列プールについて、さらなるシーケンシング研究を行った。並行ピロシーケンシングを使用する大規模なハイスループット法である454シーケンシングは、偏りのない試料調製及び非常に正確な配列解析を提供する。図3で示すように、このシーケンシングデータを使用して、PDGFアプタマーに対するコンセンサス配列を同定した。さらに、図6に図示するヌクレオチド置換研究によって、コンセンサス配列におけるB n d Uの8個の位置のうちの6個がPDGF結合にとって望ましいが、B n d Uの4個の位置は、結合活性をほとんどまたは全く失うことなくd Tで置き換えることができることが発見された。アプタマー4149-8__1 (配列番号1)に対する各位置でのヌクレオチドの出現頻度のグラフィック描写とともに、コンセンサス配列を図3Aに示す。

30

【0161】

[00188] いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、配列：

40

5'-N Z V S L_n S' V' Z A C N N_m G C G Z Z Z A Z A G C G-3' (配列番号500)を含み、

ここでは、

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、V'はVに相補的であり；

S及びS'は、CまたはGから独立に選択され、SとS'は互いに相補的であり；

各Nは、任意の天然に存在するヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドから独立に選択され；

各Zは、修飾ピリミジンから独立に選択され；

Lは、任意の天然に存在するヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド、炭化水素リンカー

50

、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から20であり；mは0から20であり；ここでは、1つまたは複数のヌクレオチド挿入が任意に含まれる。

【0162】

〔00189〕 いくつかの実施形態では、PDGFアダプターは、配列：

5' - Z Z V S L_n S' V' Z A C N N_m G C G Z Z Z A Z A G C G - 3' (配列番号501)を含み、ここでは、V、V'、N、S、S'、Z、L、n及びmは上記で定義された通りである。

【0163】

〔00190〕 いくつかの実施形態では、PDGFアダプターは、配列：

5' - Z Z V C L_n 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、

ここでは、Z、V、V'、N、Z、L及びnは、上記で定義された通りであり、MはC及びAから選択される。

【0164】

〔00191〕 いくつかの実施形態では、PDGFアダプターは、配列：

5' - Z Z A C L_n 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、ここでは、Z、L及びnは上記で定義された通りである。

【0165】

〔00192〕 いくつかの実施形態では、PDGFアダプターは、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、ここでは、Zは上記で定義された通りである。

【0166】

〔00193〕 いくつかの実施形態では、PDGFアダプターは、配列：

5' - Z V S L_n S' V' Z A C N N_m G C G Z Z Z A Z A G - 3' (配列番号507)を含み、

ここでは、

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、V'はVに相補的であり；

S及びS'は、CまたはGから独立に選択され、SとS'は他方と相補的であり；

各Nは、修飾または未修飾ヌクレオチドから独立に選択され；

各Zは、修飾ピリミジンから独立に選択され；

Lは、置換または無置換のC₂～C₂₀リンカー及び修飾または未修飾ヌクレオチドから選択され；

nは1から50であり；mは0から50であり；

ここでは、1つまたは複数のヌクレオチド挿入が任意に含まれる。

【0167】

〔00194〕 いくつかの実施形態では、PDGFアダプターは、配列：

5' - Z' Z V S L_n S' V' Z A C N N_m G C G Z Z Z A Z A G C - 3' (配列番号508)を含み、ここでは、Z'は修飾ピリミジンまたはdTであり；V、V'、N、S、S'、Z、L、n及びmは上記で定義された通りである。

【0168】

〔00195〕 いくつかの実施形態では、PDGFアダプターは、配列：

5' - Z' Z V C L_n G V' Z A C N M G C G Z Z Z A Z A G C - 3' (配列番号509)を含み、

ここでは、Z、Z'、V、V'、Z、L及びnは、上記で定義された通りであり、MはC及びAから選択される。

【0169】

〔00196〕 いくつかの実施形態では、PDGFアダプターは、配列：

5' - Z' Z A C L_n G Z Z A C A C G C G Z Z Z A Z A G C - 3' (配列番号510)

10

20

30

40

50

)を含み、ここでは、Z、Z'、L及びnは上記で定義された通りである。

【0170】

〔00197〕 いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、配列：

5'-Z'ZACGACZACGZZACACGGZZZA ZAGC-3' (配列番号511)を含み、ここでは、Z及びZ'は上記で定義された通りである。

【0171】

〔00198〕 いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、配列：

5'-ZABL_pGYZABK_qGCGZZZYDYAG-3' (配列番号505)を含み、

ここでは、各Zは独立に、修飾ピリミジンであり；

各Bは、C及び置換または無置換のC₂~C₁₀リンカーから独立に選択され；

各Lは、置換または無置換のC₂~C₁₀リンカー、ヘキサエチレングリコールリンカー及び修飾または未修飾ヌクレオチドから独立に選択され、ここでは、pは1から10であり；

各Yは、修飾または未修飾ピリミジンから独立に選択され；

各Kは、置換または無置換のC₂~C₁₀リンカー、ヘキサエチレングリコールリンカー及び修飾または未修飾ヌクレオチドから独立に選択され、ここでは、qは1から5であり；

Dは、A及び置換または無置換のC₂~C₁₀リンカーから選択される。

【0172】

〔00199〕 いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、配列：

5'-XZABL_nGYZABL_nGCGZZZYDYAGBE-3' (配列番号506)を含み、

ここでは、Xは、修飾または未修飾ピリミジン及び置換または無置換のC₂~C₁₀リンカーから選択されるか、存在せず；Eは、G及び置換または無置換のC₂~C₁₀リンカーから選択されるか、存在しない。

【0173】

〔00200〕 配列NZVS (配列番号761)及びS'V'ZACNN_mGCGZZZA ZAGCG (配列番号762)含むをアプタマー構築物

ここでは、

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、V'は、C、GまたはZから選択され、V'はVに相補的であり；

S及びS'は、CまたはGから独立に選択され、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ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドから独立に選択され；

Zは、修飾ピリミジンから独立に選択され；

mは1から20であり；

1つまたは複数のヌクレオチド挿入が任意に含まれる)。

【0174】

〔00201〕 いくつかの実施形態では、Zは修飾ウリジンである。いくつかの実施形態では、各Zは、本明細書で定義されるC-5修飾ピリミジンから独立に選択される。いくつかの実施形態では、各Zは、以下から独立に選択される：

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-チロシルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン (TyrdU)、

10

20

30

40

50

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)、

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-R-スレオニンイ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' - デオキシウリジンのクロリド、

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 (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)、

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、

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、及び

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。

【0175】

[00202] ある種の実施形態では、PDGF及び／またはVEGFアプタマーの部分(Y)は、結合を維持するのに必要でない可能性があり、連続したPDGF及び／または

10

20

30

40

50

VEGFアプタマーのある部分は修飾され得、限定されないが、スペーサーまたはリンカー部分との置き換えが含まれる。これらの実施形態では、例えば、Yを $Y' - Q - Y'' - Q' - Y'''$ と表すことができ、ここでは、 Y' 、 Y'' 及び Y''' は、PDGF及び／またはVEGFアプタマーの一部であるか、異なるPDGF及び／またはVEGFアプタマーのセグメントであり、Q及び／または Q' は、元のPDGF及び／またはVEGFアプタマーのある種の核酸の特徴を修正するスペーサーまたはリンカー分子である。Q及び Q' が存在しない場合は、 Y' 、 Y'' 及び Y''' は、1つの連続したPDGF及び／またはVEGFアプタマー（Y）を表す。

【0176】

〔00203〕 本明細書で使用する場合、「リンカー」は、共有結合的または非共有結合的相互作用を介して2つ以上の分子実体を結合し、1つまたは複数の分子実体の機能的特質を保存する方法で分子実体の空間的な分離を可能にし得る、分子実体である。リンカーは、スペーサーとしても知られ得る。適切なリンカー配列は、本開示に基づいて、当業者によって容易に確認される。

10

【0177】

〔00204〕 本明細書で使用する場合、リンカーは、限定されないが、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芳香族炭素分子、ポリエチレングリコール（PEG）分子、細胞受容体、リガンド、脂質、これらの構築体の任意の断片または誘導体、前述の任意の組み合わせ、または任意の他の化学構造もしくは成分を含む群から選択される、1つまたは複数の分子または副成分を含むことができる。

20

【0178】

〔00205〕 いくつかの実施形態では、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。いくつかの実施形態では、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。いくつかの実施形態では、Lは置換または無置換の $C_2 \sim C_{10}$ リンカーである。いくつかの実施形態では、pは1、2、3、4、5、6、7または8である。いくつかの実施形態では、pは1、2または3である。いくつかの実施形態では、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。いくつかの実施形態では、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。いくつかの実施形態では、Kは置換または無置換の $C_2 \sim C_{10}$ リンカーである。いくつかの実施形態では、qは1または2である。いくつかの実施形態では、qは1である。

30

【0179】

〔00206〕 様々な実施形態では、mは、0から20、0から19、0から18、0から17、0から16、0から15、0から15、0から14、0から13、0から12、0から11、0から10、0から9、0から8、0から7、0から6、0から5、0から4または0から3でもよい。

【0180】

〔00207〕 いくつかの実施形態では、Lは、18原子ヘキサエチレングリコールリンカーなどのリンカーでもよい。いくつかの実施形態では、Lは、ヌクレオチドとリンカーの組み合わせでもよい。非限定例として、以下のアプタマー（配列番号67及び69）は、ヘキサエチレングリコール（Heg）リンカーを含む：

40

（配列番号67） $5' - B_n - B_n - A - C - H e g - G - B_n - B_n - A - C - A - C - G - C - G - B_n - B_n - B_n - A - B_n - A - G - C - G - 3'$

（配列番号69） $5' - B_n - B_n - A - C - G - H e g - C - G - B_n - B_n - A - C - A - C - G - C - G - B_n - B_n - B_n - A - B_n - A - G - C - G - 3'$

ここでは、 B_n はベンジル-dUであり、Hegはヘキサエチレングリコールリンカーである。

【0181】

〔00208〕 いくつかの実施形態では、以下のアプタマーのように、Nをリンカーに置き換えることができる：

50

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

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

ここでは、Bn はベンジル-dU 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 8 2】

[00209] さらに P D G F アプタマーを、低解離速度で P D G F に結合するアプタマーの選択及び生成のための代表的な方法を記載する実施例 5 に記載されているように、低オフ速度を有するアプタマーを同定するための改良 S E L E X 方法を使用して同定した。ナフチル-dU (N a p - d U)、d A、d C 及び d G から成るランダム DNA ライブラリーを使用して選択した。このスクリーニングで、P D G F アプタマー 5 1 6 9 - 4 _ 2 6 を同定した。

【0 1 8 3】

[00210] いくつかの実施形態では、P D G F に特異的に結合するアプタマーが提供され、ここでは、アプタマーは、P D G F への結合について P D G F アプタマー 5 1 6 9 - 4 _ 2 6 と競合する。いくつかのそのような実施形態では、アプタマーは、疎水性核酸塩基修飾を含む少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシドを含む。さらに、いくつかのそのような実施形態では、疎水性核酸塩基修飾は修飾ピリミジンである。いくつかの実施形態では、各修飾ピリミジンは、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 (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' - フルオロウリジン及び 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) から独立に選択され得る。

【0 1 8 4】

[00211] いくつかの実施形態では、P D G F に特異的に結合するアプタマーが提供され、ここでは、アプタマーは、配列：

5' - A C A L_n Z G Z A Z G L_m Z L Z - 3' (配列番号 5 1 2) を含み；

ここでは、各 Z は独立に、修飾ピリミジンであり；各 L は、置換または無置換の C₂ ~ C₅₀ リンカー、ポリエチレングリコールリンカー及び修飾または未修飾ヌクレオチドから独立に選択され；n は 1 から 5 であり；m は 1 から 10 である。

【0 1 8 5】

[00212] いくつかの実施形態では、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 (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

ー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' - デオキシウリジントクロリド、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 (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' - フルオロウリジン及び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) から独立に選択される。いくつかの実施形態では、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、または各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。いくつかの実施形態では、nは1、2、3、4または5である。いくつかの実施形態では、mは1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である。いくつかの実施形態では、nは3である。いくつかの実施形態では、mは4である。いくつかのそのような実施形態では、各Lは、修飾ヌクレオチド、未修飾ヌクレオチド及びC₃ リンカーから独立に選択される。

【0186】

[00213] C₂ ~ C₅₀ リンカーまたはスペーサーは、2から50個の炭素原子鎖 (C₂ ~ C₅₀) (飽和、不飽和、直鎖、分枝または環状)、0から10個のアリール基、0から10個のヘテロアリール基及び0から10個の複素環基の含む骨格でもよく、これは、任意に、エーテル (-O-) 結合 (例えば、限定されないが、1つまたは複数のエチレングリコールユニット-O-(CH₂CH₂O)-を含めた、1つまたは複数のアルキレングリコールユニット; 1つまたは複数の1, 3-プロパンジオールユニット-O-(CH₂CH₂CH₂O)-など); アミン (-NH-) 結合; アミド (-NC(O)-) 結合; 及びチオエーテル (-S-) 結合などを含み; ここでは、各骨格炭素原子は独立に、無置換 (すなわち、-H置換基を含む) でもよく、またはC₁ ~ C₃ アルキル、-OH、-NH₂、-SH、-O-(C₁ ~ C₆ アルキル)、-S-(C₁ ~ C₆ アルキル)、ハロゲン、-OC(O)-(C₁ ~ C₆ アルキル)、-NH-(C₁ ~ C₆ アルキル) などから選択される1つまたは複数の基で置換されていてもよい。いくつかの実施形態では、C₂ ~ C₅₀ リンカーは、C₂ ~ C₂₀ リンカー、C₂ ~ C₁₀ リンカー、C₂ ~ C₈ リンカー、C₂ ~ C₆ リンカー、C₂ ~ C₅ リンカー、C₂ ~ C₄ リンカーまたはC₃ リンカーであり、ここでは、各炭素は、上記のように、独立に置換されていてもよい。

【0187】

[00214] いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーの1つまたは複数のヌクレオシドは、2'位の糖修飾 (2'-アミノ (2'-NH₂)、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での修飾、ヌクレオシド間結合の修飾及び5-メチル-シトシンから選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、3'キャップ、5'キャップ及び/または3'末端での逆位デオキシチミジンを含む。

【0188】

[00215] いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合を含む。いくつかの実施形態では、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。

【0189】

[00216] いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、表1、2及び6から9 (配列番号1から499及び517から545) に示される配列から選択される配列を有する。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、10nM未満の親和性 (K_d) でPDGFに結合する、表1に示される配列及び表6から9に示される配列から選択される配列を有する。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、表1、2及び6から

9に示される配列（配列番号1から1から499及び517から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。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、10nM未満の親和性（ K_d ）でPDGFに結合する、表1に示される配列及び表6から9に示される配列と少なくとも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。

【0190】

[00217] 用語「配列同一性」、「配列同一性パーセント」、「同一性パーセント」、「%同一な」、「同一性%」、及びそれらの変形は、2つの核酸配列と関連して使用される場合、互換的に使用されて、最大一致について参照核酸と比較し、整列させ、（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）ヌクレオチド塩基を含むこれらのヌクレオチド塩基の間の、クエリー配列のヌクレオチド塩基の数、または（2）参照配列の全体の長さのいずれかのどちらか長い方で割った場合に、クエリー核酸またはクエリー核酸の一部のものと同一ヌクレオチド塩基の数を指す。比較のための例示的配列アライメントは、例えば、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482の局地的相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443の相同性アライメントアルゴリズム、Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性検索法、コンピュータによるこれらのアルゴリズムの実行（Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. のGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA）、または目視検査によって行うことができる（一般に、Ausubel, F. M. et al. (1987), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscienceを参照されたい）。

【0191】

[00218] 配列同一性パーセントを決定するのに適するアルゴリズムの一例は、ベーシック・ローカル・アライメント・検索ツール（basic local alignment search tool）（以下「BLAST」）で使用されるアルゴリズムである。例えば、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403及びAltschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 15:3389を参照されたい。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（以下「NCBI」）を通して公的に入手可能である。NCBIから入手可能なソフトウェア、例えばBLASTN（ヌクレオチド配列用）を使用して配列同一性を決定するのに使用されるデフォルトパラメーターは、McGinnis et al. (2004) Nucleic Acids Res. 32:W20に記載されている。

【0192】

[00219] 本明細書で使用する場合、PDGFアプタマーなどの核酸の同一性パーセントを記載する際に、その配列は、少なくとも、例えば、参照ヌクレオチド配列と約95%同一であるとは、核酸配列が参照核酸配列の100ヌクレオチドのそれぞれにつき5つの点変異まで含み得ることを除いて、核酸配列が参照配列と同一であることが意図される。換言すれば、参照核酸配列と少なくとも約95%同一である所望の核酸配列を得るために、参照配列中のヌクレオチドの5%までは、欠損されてもよいし、別のヌクレオチドで置換されてもよいし、または参照配列中のヌクレオチドの総数の5%までのいくつかの

数のヌクレオチドは、参照配列に挿入されてもよい（本明細書で挿入と言及する）。所望の配列を生成するための参照配列のこれらの変異は、参照ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端の位置で生じてよく、またはこれらの末端位置の間の任意の位置で、参照配列中のヌクレオチドの間に個々に分散して、もしくは参照配列内の1つもしくは複数の連続した群として分散して、これらの末端位置の間の任意の位置で生じてよい。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）参照配列のヌクレオチド塩基に由来する、または（3）参照配列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場合、同一性パーセントを決定する目的で、ヌクレオチド塩基は「同一」であるとなみなされることが意図される。例えば、同一性パーセント計算する目的で、5-メチルシトシンは、シトシンと「同一」であるとなみなされる。同様に、同一性パーセントを決定する目的で、図12に示す修飾ウリジンは互いに同一であるとなみなされる。参照配列は、配列番号1から437に示すヌクレオチド配列のうちのいずれか1つでもよい。

【0193】

〔00220〕 いくつかの実施形態では、本開示は、PDGFへ結合する際にPDGFの機能を調節するPDGFアプタマーを提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のPDGFアプタマーは、PDGF受容体、例えば、PDGF R α またはPDGF R β のPDGF媒介性リン酸化を阻害する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のPDGFアプタマーは、PDGF R β のPDGF媒介性リン酸化を阻害する。様々な実施形態では、PDGFアプタマーは、インビボでのPDGF媒介性受容体リン酸化の阻害など、PDGFの機能をインビボで調節する。様々な実施形態では、PDGFアプタマーは、配列番号1から437の配列から選択される配列を有する。様々な実施形態では、PDGFアプタマーは、表1及び2に示すアプタマーから選択される。様々な実施形態では、PDGFアプタマーは、表1に示すアプタマーから選択される。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、配列番号1から1から499及び517から545から選択される配列の少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、または少なくとも30個の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、配列番号1から1から499及び517から545から選択される配列と核酸塩基配列が同一である、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、または少なくとも30個の連続したヌクレオチドから成る。いくつかの実施形態では、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、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、または少なくとも30個の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、10nM未満の親和性（K_d）でPDGFに結合する、表1に示すアプタマーまたは表6から9の1つに示すアプタマーの、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、または少なくとも30個の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、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、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少

10

20

30

40

50

なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、または少なくとも30個の連続したヌクレオチドから成る。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、10nM未満の親和性(K_d)でPDGFに結合する、表1に示すアプタマーまたは表6から9の1つに示すアプタマーの、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、または少なくとも30個の連続したヌクレオチドから成る。

10

【0194】

[00221] いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、配列番号500から512；761及び762の配列から選択される核酸塩基配列を有する。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、配列番号1から1から499及び517から545のいずれか1つの配列を有する。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、配列番号1から499及び517から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。本明細書の実施形態のいずれかでは、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、さらなるヌクレオチドまたは他の化学的な部分を含むことができる。

20

【0195】

[00222] PDGFアプタマーは、PDGF結合領域に加えて、任意の数のヌクレオチドを含むことができる。様々な実施形態では、PDGFアプタマーは、約100ヌクレオチドまで、約95ヌクレオチドまで、約90ヌクレオチドまで、約85ヌクレオチドまで、約80ヌクレオチドまで、約75ヌクレオチドまで、約70ヌクレオチドまで、約65ヌクレオチドまで、約60ヌクレオチドまで、約55ヌクレオチドまで、約50ヌクレオチドまで、約45ヌクレオチドまで、約40ヌクレオチドまで、約35ヌクレオチドまで、約30ヌクレオチドまで、約25ヌクレオチドまで、または約20ヌクレオチドまで含むことができる。

【0196】

30

[00223] いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、配列番号1から499及び517から545から選択されるアプタマーと同様の結合特性を有する、及びPDGFに関連するアテローム性動脈硬化症、黄斑変性症、線維症または癌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。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、(PDGF-BBまたはPDGF-AB二量体に関連して)、表1、2及び6から9に示すアプタマーから選択されるアプタマーと同じ、PDGF-B単量体の領域に結合する。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、(PDGF-BBまたはPDGF-AB二量体に関連して)、表1に示すアプタマーから選択されるアプタマーと同じ、PDGF-B単量体の領域に結合する。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、(PDGF-BBまたはPDGF-AB二量体に関連して)、表6に示すアプタマーから選択されるアプタマーと同じ、PDGF-B単量体の領域に結合する。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、(PDGF-BBまたはPDGF-AB二量体に関連して)、表6に示すアプタマーから選択されるアプタマーと同じ、PDGF-B単量体の領域に結合する。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、(PDGF-BBまたはPDGF-AB二量体に関連して)、表6に示すアプタマーから選択されるアプタマーと同じ、PDGF-B単量体の領域に結合する。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、PDGF-Bの24から86を含むPDGF-Bの領域に結合する。いくつかのそのような実施形態では、PDGFアプタマーは、PDGFへの結合について、PDGFアプタマー4149-8_260と競合する。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、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、タンパク質接触原子に対する極性接触で、PDGF-Bに結合する。極性接触は、水素結合と電荷-電荷相互作用の合計と定義される。いくつかの実施形態では

40

50

、PDGFアプタマーは、0.01未満、0.009未満、0.008未満、0.007未満または0.006未満の、界面面積に対する極性接触の比で、PDGF-Bに結合する。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、(PDGF-BBまたはPDGF-AB二量体に関連して)、PDGFアプタマー5169-4__26と同じ、PDGF-B単量体の領域に結合する。

【0197】

〔00224〕 いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは以下の特性の任意の組み合わせを有する：

- (a) PDGF-Bのアミノ酸24から86を含むPDGF-Bの領域に結合する；
- (b) PDGFへの結合について、PDGFアプタマー4149-8__260と競合する；
- (c) PDGFへの結合について、PDGFアプタマー5169-4__26と競合する；
- (d) 0.01未満、0.009未満、0.008未満、0.007未満もしくは0.006未満の、界面面積に対する極性接触の比で、PDGF-Bに結合する；及び／または
- (e) 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、タンパク質接触原子に対する極性接触で、PDGF-Bに結合する。

【0198】

〔00225〕 PDGFに対して任意の適切な解離定数(K_d)を有するように、PDGFアプタマーを選択することができる。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、PDGFに対して、30nM未満、25nM未満、20nM未満、15nM未満、10nM未満、9nM未満、8nM未満、7nM未満、6nM未満、5nM未満、4nM未満、3nM未満、2nM未満または1nM未満の解離定数(K_d)を有する。解離定数は、以下の実施例3に記載されているように、多点タイトレーションを使用して結合アッセイを行い、式 $y = (\text{最大} - \text{最少}) \cdot (\text{タンパク質}) / (K_d + \text{タンパク質}) + \text{最少}$ 、に当てはめて、決定することができる。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、表1、2または6から9のいずれか1つに示すアプタマーの K_d 以下の K_d を有するアプタマーである。いくつかの実施形態では、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 以下の K_d を有するアプタマーである。

【0199】

〔00226〕 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は、その標的受容体との反応に必要とされる、密接なホモ二量体を形成するので、アプタマー4149-8__1の二量体または他の多量体型を使用して、より効率的なPDGF活性阻害が達成される可能性がある。したがって、いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーは、アプタマー4149-8__1、4149-8__379及び配列番号500から512の配列の任意の組み合わせの多量体化物である。いくつかの実施形態では、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1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2のアプタマーとを含み、ここでは、第1のアプタマーと第2のアプタマーは、同じでも異なっている。PDGFアプタマー構築物の第1のアプタマーと第2のアプタマーは、共有結合的または非共有結合的に結合され得る。非限定的な例示的結合は当技術分野で既知であり、及び／または本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマー構築物は、2つのPDGF単量体に同時に結合できる可能性がある。いくつかの実施形態では、PDGFアプタマー構築物は、10nM未満の親和性(K_d)でPDGFに結合する。

【0200】

例示的VEGFアプタマー

〔00227〕 本開示のVEGFアプタマーは、低解離速度を有するVEGFに結合するアプ

タマーの選択及び生成のための代表的な方法を記載する実施例7に記載されるように、低オフ速度を有するアプタマーを同定するための改良SELEX方法を使用して同定した。

【0201】

[00228] Nap-dU VEGF-121 SELEX実験からのクローンをトラ
ンケートして、29ヌクレオチドの最小配列にした。このSOMAmerは、高親和性（
それぞれ、90 pM及び20 pMの K_d 値）でVEGF-121とVEGF-165の両
方に結合する。SOMAmerはまた、両方のVEGFアイソフォームがヒト臍帯静脈内
皮細胞でのVEGFR2のリン酸化をインビトロで誘導する能力を強力に阻害し（実施例
9を参照されたい）、これは、SOMAmerがVEGFの受容体結合ドメインに結合し
、ブロックするという考えを支持する。

10

【0202】

[00229] 本開示は、VEGF-121に対する阻害性アプタマーの最初の同定を提
供する。したがって、本発明のVEGFアプタマーは、ベバシズマブ（Avastin（
登録商標））、ラニズマブ（Lucentis（登録商標））及びアフリベルセプト（
Eylea（登録商標））（Papadopoulos et al.（2012）Angiogenesis 15:171; Yu et al.（2011）Biochem
. Biophys. Res. Commun. 408:276のようなタンパク質ベースの
薬物と同様の、VEGFの広範なインヒビターに相当する。したがって、本発明のVEGF
アプタマーは、VEGF-165の選択的インヒビターであるMacugen（登録商
標）よりもVEGFシグナリングを効果的に阻害することができる。

20

【0203】

[00230] 成功したNap-dU VEGF-121 SELEX実験からのラン
ケートされたクローンは、29ヌクレオチドの配列を提供した。このアプタマー（または
SOMAmer）（4867-31は、高親和性（それぞれ、90 pM及び20 pMの K_d 値）でVEGF-121とVEGF-165の両方に結合する。このSOMAmerは
また、両方のVEGFアイソフォームがヒト臍帯静脈内皮細胞でのVEGFR2のリン酸
化をインビトロで誘導する能力を強力に阻害し、これは、SOMAmerがVEGFの受
容体結合ドメインに結合し、ブロックするという概念を支持する。

【0204】

[00231] アプタマー4867-31_192は、1:1の化学量論でVEGF単量
体と結合する。VEGFは、その標的受容体との反応に必要とされる、密接なホモ二量体
を形成するので、アプタマー4867-31_192の二量体または他の多量体型を使用
して、より効率的なVEGF活性阻害が達成される可能性がある。したがって、いくつか
の実施形態では、VEGFアプタマーは、アプタマー4867-31_192、配列番号
513から516の配列の任意の組み合わせの多量体化物である。いくつかの実施形態で
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1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2のア
プタマーとを含み、ここでは、第1のアプタマーと第2のアプタマーは、同じでも異なっ
てもよい。VEGFアプタマー構築物の第1のアプタマーと第2のアプタマーは、共有
結合的または非共有結合的に結合され得る。非限定的な例示的結合は当技術分野で既知で
あり、及び／または本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、VEGFア
プタマー構築物は、2つのVEGF単量体に同時に結合できる可能性がある。いくつかの実
施形態では、VEGFアプタマー構築物は、10 nM未満の親和性（ K_d ）でVEGFに
結合する。

30

40

【0205】

[00232] いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、10 nM未満の K_d で
VEGF-121に結合する。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、1つま
たは複数の修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、
疎水性修飾を含む1つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態で
は、VEGFアプタマーは、1つまたは複数の修飾ピリミジンを含む。いくつかの実施形態で

50

は、VEGFアプタマーは、1つまたは複数の、図12に示す修飾ピリミジンを含む。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、1つまたは複数の、図12の群IIからVに示す修飾ピリミジンを含む。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、1つまたは複数の、図12の群IIIからvに示す修飾ピリミジンを含む。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、1つまたは複数の、図12群のIII及びIVに示す修飾ピリミジンを含む。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、1つまたは複数の(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)を含む。

【0206】

[00233] いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、配列：

5'-GZZQAAEZECZZEZDRGAZZZAAAAGG-3' (配列番号513)を含み、

ここでは、各Zは修飾ピリミジンであり；

Qは、任意の修飾または未修飾ヌクレオチド及び置換または無置換のC₂~C₅₀リンカーから選択されるか、存在せず；

各Eは、G及び置換または無置換のC₂~C₅₀リンカーから独立に選択され；

Dは、A及び置換または無置換のC₂~C₅₀リンカーから選択され；

Rは、任意の修飾または未修飾ヌクレオチド及び置換または無置換のC₂~C₅₀リンカーから選択される。

【0207】

[00234] いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは以下から選択される配列を含み：

5'-CGZZQAAEZECZZEZDRGAZZZAAAAGG-3' (配列番号514)；

5'-GZZQAAEZECZZEZDRGAZZZAAAAGG-3' (配列番号513)；

5'-CGZZQAAEZECZZEZDRGAZZZAAAAGG-3' (配列番号515)；及び

5'-CCGZZQAAEZECZZEZDRGAZZZAAAAGG-3' (配列番号516)；

ここでは、Z、Q、E、D及びRは上記で定義された通りである。

【0208】

[00235] いくつかの実施形態では、Zは修飾ウリジンである。いくつかの実施形態では、各Zは、本明細書で定義されるC-5修飾ピリミジンから独立に選択される。いくつかの実施形態では、各Zは、以下から独立に選択される：

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-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)

10

20

30

40

50

- 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-R-スレオニンイ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 (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)、
- 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、
- 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、及び
- 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。

【0209】

[00236] いくつかの実施形態では、各Zは、図12の群I IからVに示す修飾ピリミジンから独立に選択される。いくつかの実施形態では、各Zは、図12の群I I IからVに示す修飾ピリミジンから独立に選択される。いくつかの実施形態では、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。いくつかの実施形態では、各Zは、図12の群I I IからI Vに示す修飾ピリミジンから独立に選択される。いくつかの実施形態では、各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。

【0210】

〔00237〕 $C_2 \sim C_{50}$ リンカーまたはスペーサーは、2から50個の炭素原子 ($C_2 \sim C_{50}$) (飽和、不飽和、直鎖、分枝または環状)、0から10個のアリール基、0から10個のヘテロアリール基及び0から10個の複素環基の鎖を含む骨格でもよく、これは、エーテル (—O—) 結合 (例えば、限定されないが、1つまたは複数のエチレングリコールユニット—O—(CH_2CH_2O)—を含めた、1つまたは複数のアルキレングリコールユニット；1つまたは複数の1,3-プロパンジオールユニット—O—($CH_2CH_2CH_2O$)—など)；アミン (—NH—) 結合；アミド (—NC(O)—) 結合；及びチオエーテル (—S—) 結合などを任意に含み；ここでは、各骨格炭素原子は独立に、無置換 (すなわち、—H置換基を含む) でもよく、または $C_1 \sim C_3$ アルキル、—OH、—NH₂、—SH、—O—($C_1 \sim C_6$ アルキル)、—S—($C_1 \sim C_6$ アルキル)、ハロゲン、—OC(O)—($C_1 \sim C_6$ アルキル)、—NH—($C_1 \sim C_6$ アルキル) などから選択される1つまたは複数の基で置換されていてもよい。いくつかの実施形態では、 $C_2 \sim C_{50}$ リンカーは、 $C_2 \sim C_{20}$ リンカー、 $C_2 \sim C_{10}$ リンカー、 $C_2 \sim C_8$ リンカー、 $C_2 \sim C_6$ リンカー、 $C_2 \sim C_5$ リンカー、 $C_2 \sim C_4$ リンカーまたは C_3 リンカーであり、ここでは、各炭素は、上記のように、独立に置換されていてもよい。

10

【0211】

〔00238〕 いくつかの実施形態では、各置換または無置換の $C_2 \sim C_{50}$ リンカーは、置換または無置換の $C_2 \sim C_{20}$ リンカー、置換または無置換の $C_2 \sim C_{10}$ リンカー、置換または無置換の $C_2 \sim C_8$ リンカー、置換または無置換の $C_2 \sim C_6$ リンカー、置換または無置換の $C_2 \sim C_5$ リンカー、置換または無置換の $C_2 \sim C_4$ リンカー及び置換または無置換の C_3 リンカーから独立に選択される。いくつかの実施形態では、各置換または無置換の $C_2 \sim C_{50}$ リンカーは、置換または無置換の $C_2 \sim C_{10}$ リンカーである。いくつかのそのような実施形態では、各置換または無置換の $C_2 \sim C_{10}$ リンカーは、置換または無置換の $C_2 \sim C_8$ リンカー、置換または無置換の $C_2 \sim C_6$ リンカー、置換または無置換の $C_2 \sim C_5$ リンカー、置換または無置換の $C_2 \sim C_4$ リンカーまたは置換または無置換の C_3 リンカーである。

20

【0212】

〔00239〕 いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーの1つまたは複数のヌクレオシドは、2'位の糖修飾 (2'-アミノ (2'-NH₂)、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での修飾、ヌクレオシド間結合の修飾及び5'-メチル-シトシンから選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、3'キャップ、5'キャップ及び/または3'末端での逆位デオキシチミジンを含む。

30

【0213】

〔00240〕 いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合を含む。いくつかの実施形態では、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。

【0214】

〔00241〕 いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、表10から14に示す配列から選択される配列を有する。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、10nM未満のK_dを有する表10から14に示す配列から選択される配列を有する。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、表10から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。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、10nM未満のK_dを有する表10から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%、

40

50

または100%同一の配列を有する。同一性パーセントは、参照配列が、10nM未満の K_d を有する配列のような、表10から14に示すVEGFアプタマー配列であることを除いて、PDGFアプタマーについて上で記載したように決定される。

【0215】

[00242] いくつかの実施形態では、本開示は、VEGFへ結合する際に、VEGFの機能を調節するVEGFアプタマーを提供する。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、VEGF受容体、例えば、VEGFR1またはVEGFR2のVEGF媒介性リン酸化を阻害する。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、VEGF受容体のVEGF媒介性リン酸化を阻害する。様々な実施形態では、VEGFアプタマーは、インビボでのVEGF媒介性受容体リン酸化の阻害など、VEGFの機能をインビボで調節する。様々な実施形態では、VEGFアプタマーは、表10から14に示す配列から選択される配列を有する。様々な実施形態では、VEGFアプタマーは10nM未満の K_d を有する表10から14に示すアプタマーから選択される。様々な実施形態では、VEGFアプタマーは表10から14に示すアプタマーから選択される。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、10nM未満の K_d を有する表10から14に示す配列の少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、または少なくとも30個の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、10nM未満の K_d を有する表10から14に示す配列と核酸塩基配列が同一である、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、または少なくとも30個の連続したヌクレオチドから成る。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、表10から14に示すアプタマーの少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、または少なくとも30個の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、10nM未満の K_d を有する表10から14に示すアプタマーの少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、または少なくとも30個の連続したヌクレオチドから成る。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、10nM未満の K_d を有する表10から14に示すアプタマーの少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、または少なくとも30個の連続したヌクレオチドから成る。

【0216】

[00243] 本明細書の実施形態のいずれかでは、VEGFアプタマーは、アプタマー

10

20

30

40

50

の5'末端、3'末端または5'末端と3'末端の両方に、さらなるヌクレオチドまたは他の化学的な部分を含むことができる。

【0217】

〔00244〕 VEGFアプタマーは、VEGF結合領域に加えて、任意の数のヌクレオチドを含むことができる。様々な実施形態では、VEGFアプタマーは、約100ヌクレオチドまで、約95ヌクレオチドまで、約90ヌクレオチドまで、約85ヌクレオチドまで、約80ヌクレオチドまで、約75ヌクレオチドまで、約70ヌクレオチドまで、約65ヌクレオチドまで、約60ヌクレオチドまで、約55ヌクレオチドまで、約50ヌクレオチドまで、約45ヌクレオチドまで、約40ヌクレオチドまで、約35ヌクレオチドまで、約30ヌクレオチドまで、約25ヌクレオチドまで、または約20ヌクレオチドまで含むことができる。

10

【0218】

〔00245〕 いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、10nM未満の K_d を有する表10から14に示すアプタマーと同様の結合特性を有する、及びこうしたアプタマーと同様の、VEGFに関連するアテローム性動脈硬化症、黄斑変性症、線維症及び癌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。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、10nM未満の K_d を有する表10から14に示すアプタマーから選択されるアプタマーと同じ、VEGF-121の領域に結合する。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、10nM未満の K_d を有する表10、11、12、13または14に示すVEGFアプタマーと同じVEGF-121の領域に結合する。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、VEGFアプタマー4867-31-183と同じ、VEGF-121の領域に結合する。

20

【0219】

〔00246〕 VEGFアプタマーは、VEGFに対して任意の適切な解離定数(K_d)を有するように選択することができる。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマーは、VEGF-121に対して、30nM未満、25nM未満、20nM未満、15nM未満、10nM未満、9nM未満、8nM未満、7nM未満、6nM未満、5nM未満、4nM未満、3nM未満、2nM未満または1nM未満の解離定数(K_d)を有する。解離定数は、以下の実施例3に記載されているように、多点タイトレーションを使用する結合アッセイを行い、式 $y = (\text{最大} - \text{最少}) \cdot (K_d + \text{タンパク質}) + \text{最少}$ 、に当てはめて、決定することができる。

30

【0220】

〔00247〕 いくつかの実施形態では、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1のアプタマー及び本明細書に記載のVEGFアプタマーのいずれかを含む第2のアプタマーを含み、ここでは、第1のアプタマーと第2のアプタマーは、同じでも異なってもよい。VEGFアプタマー構築物の第1のアプタマー及び第2のアプタマーは、共有結合的または非共有結合的に結合され得る。非限定的な例示的結合は当技術分野で既知であり、及び／または本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマー構築物は、2つのVEGF単量体に同時に結合できる可能性がある。いくつかの実施形態では、VEGFアプタマー構築物は、10nM未満の親和性(K_d)でVEGFに結合する。

40

【0221】

例示的PDGF/VEGFアプタマー構築物

〔00248〕 腫瘍関連及び眼部の血管新生のより効率的なブロックが、新しい血管の退縮と相まって、VEGFとPDGF-Bのシグナリング経路を併せて阻害することによって可能であるというかなりの証拠がある(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、内皮細胞間の密接な細胞間会合を破壊することによって媒介され、これによって、初期の毛細血管の出芽及び周囲内皮細胞(または周皮細胞)が形成され、これらは、成熟するにつれて新しい血管を取

50

り囲み、VEGFインヒビターに対して血管を低感受性にする（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、そうした二重インヒビターの基礎を築き得る。

【0222】

〔00249〕 いくつかの実施形態では、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結合した、本明細書に記載のPDGFアプタマーのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、PDGF/VEGFアプタマー構築物は、10nM未満の K_d を有する表10から14に示すVEGFアプタマーのいずれかに結合した、表1に示すPDGFアプタマーのいずれかを含む。結合は、共有結合でもよく、共有結合でもよい。

10

【0223】

〔00250〕 PDGF/VEGFアプタマー構築物は、その3'末端もしくは3'末端近くで、PDGFアプタマーであって、VEGFアプタマーの5'末端もしくは5'末端近くの箇所に結合している、PDGFアプタマー、またはVEGFアプタマーであって、その3'末端もしくは3'末端近くで、PDGFアプタマーの5'末端もしくは5'末端近くの箇所に結合している、VEGFアプタマー、または構築物の各アプタマーの結合特質を保存する任意の他の配向などの、任意の配向でPDGFアプタマー及びVEGFアプタマーを含むことができる。

20

【0224】

〔00251〕 結合が共有結合であるいくつかの実施形態では、PDGF/VEGFアプタマー構築物は、リン酸またはホスホロチオエート結合を介して結合することができる。限定されないが、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、置換または無置換の炭化水素リンカーなどを含めた、様々なリンカー部分を介する結合などの、多くの他の共有結合も意図される。当業者なら、VEGFアプタマーにPDGFアプタマーを結合させるための適切な共有結合を選択することができる。

【0225】

〔00252〕 いくつかの実施形態では、PDGFアプタマーとVEGFアプタマーは、非共有結合を介して結合する。非共有結合としては、限定されないが、ビオチン/ストレプトアビジン；金属結合ペプチド/金属；ハイブリダイズ可能な修飾及び/または未修飾のオリゴヌクレオチドなどが挙げられる。当業者なら、VEGFアプタマーにPDGFアプタマーを結合させるための適切な非共有結合を選択することができる。

30

【0226】

アプタマー及びアプタマー構築物を含む医薬組成物

〔00253〕 いくつかの実施形態では、本明細書に記載の少なくとも1つのアプタマーまたはアプタマー構築物及び少なくとも1つの医薬的に許容可能な担体を含む医薬組成物が提供される。適切な担体は、Lippincott Williams & Wilkinsによって出版された「Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Twenty-first Edition」に記載されており、これは、参照によって本明細書に組み込まれる。本明細書に記載の少なくとも1つのアプタマーまたはアプタマー構築物及び少なくとも1つの医薬的に許容可能な担体を含む医薬組成物は、PDGFまたはVEGFインヒビターではない1種または複数の活性薬剤を含むこともできる。

40

【0227】

〔00254〕 本明細書に記載のアプタマーは、限定されないが、注射用剤形、分散液剤、ゲル剤、エアロゾル剤、軟膏剤、クリーム剤、凍結乾燥製剤、乾燥散剤、錠剤、カプセル剤、制御放出製剤、速溶性製剤、遅延放出製剤、持続放出製剤、パルス放出製剤、即時放出と制御放出の混合製剤などを含む、任意の医薬的に許容可能な剤形で利用可能である。特に、本明細書に記載のアプタマーは：（a）経口、肺、静脈内、動脈内、髄腔内、関

50

節内、直腸、眼、結腸、非経口、大槽内、腔内、腹腔内、局部、頬側、経鼻及び局所投与のいずれかから選択される投与用に；（b）分散液剤、ゲル剤、エアロゾル剤、軟膏剤、クリーム剤、錠剤、サシェ剤及びカプセル剤のいずれかから選択される剤形に；（c）凍結乾燥製剤、乾燥散剤、速溶性製剤、制御放出製剤、遅延放出製剤、持続放出製剤、パルス放出製剤及び即時放出と制御放出の混合製剤のいずれかから選択される剤形に；または（d）それらの任意の組み合わせで、製剤化することができる。

【0228】

〔00255〕 非経口、皮内、または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液は、以下の1つまたは複数の成分を含むことができる：（1）注射用水、生理食塩水、不揮発性油、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などの滅菌した希釈剤；（2）ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；（3）アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；（4）エチレンジアミンテトラ酢酸などのキレート剤；（5）酢酸、クエン酸またはリン酸などのバッファー；及び（5）塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの浸透圧調整用の薬剤。pHは、酸または塩基、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。非経口調製物は、アンプル、使い捨て注射器またはガラスもしくはプラスチック製の多回投与バイアルに封入することができる。

10

【0229】

〔00256〕 注射使用に適した医薬組成物は、滅菌注射液もしくは分散体を即時調製するための、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散剤及び滅菌粉末を含むことができる。静脈内投与については、適切な担体としては、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（BASF、Parsippany, N. J.）またはリン酸緩衝食塩水（PBS）が挙げられる。すべての場合において、組成物は滅菌である必要があり、容易に注射できる程度に流体である必要がある。医薬組成物は、製造及び貯蔵条件下で安定的である必要があり、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用から保護される必要がある。本明細書で使用する場合、用語「安定的」は、対象への投与に適した状況または状態のままであることを意味する。

20

【0230】

〔00257〕 担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液状ポリエチレングリコールなど）、並びにそれらの適切な混合物を含めた、溶媒でも、分散媒でもよい。例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散体の場合には必要とされる粒径の維持、及び界面活性剤の使用によって、適切な流動性を維持することができる。様々な抗菌剤及び抗真菌剤、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、チメロサルなどによって、微生物作用の防止を達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、マンニトールまたはソルビトールなどのポリアルコール及び塩化ナトリウムなどの無機塩を組成物に含むことが好ましい。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及びゼラチンを組成物に含めることによって、注射用組成物の長期吸収をもたらすことができる。

30

【0231】

〔00258〕 滅菌注射液は、活性試薬（例えば、アプタマー及び／またはアプタマー構築物）を、必要に応じて、上に列挙した成分の1つまたは組み合わせとともに、適切な量で適切な溶媒中に組み入れ、続いて濾過滅菌することによって、調製することができる。一般に、分散体は、基本的な分散媒及び任意の他の所望の成分を含む滅菌したビヒクルに、少なくとも1つのアプタマー及び／またはアプタマー構築物を組み入れることによって調製される。滅菌注射液調製用の滅菌粉末の場合には、例示的調製方法としては、真空乾燥及び凍結乾燥が挙げられ、これらの両方によって、アプタマー及び／またはアプタマー構築物プラス任意のさらなる所望の成分の粉末が、前もって滅菌濾過したそれらの溶液から得られる。

40

【0232】

〔00259〕 いくつかの実施形態では、アプタマー及び／またはアプタマー構築物は、

50

硝子体内注射用に製剤化される。硝子体内投与用の適切な製剤は、例えば、に記載されている。眼部薬物送達は、例えば、Rawas-Qalaji et al. (2012) Curr. Eye Res. 37:345; Bocho et al. (2012) J. Control Release 161:628; Yasukawa et al. (2011) Recent Pat. Drug Deliv. Formul. 5:1; 及び Doshi et al. (2011) Semin. Ophthalmol. 26:104に記載されている。いくつかの実施形態では、アプタマー及び／またはアプタマー構築物を含む医薬組成物は、1週に1回、2週に1回、3週に1回、4週に1回、5週に1回、6週に1回、7週に1回、8週に1回、9週に1回、10週に1回、11週に1回、12週に1回、または12週に1回より少ない頻度で、硝子体内注射によって投与される。

10

【0233】

〔00260〕 経口組成物は、一般に、不活性な希釈剤または食用担体を含む。これらは、例えばゼラチンカプセルに封入されるか、錠剤に圧縮され得る。治療的経口投与の目的で、アプタマー及び／またはアプタマー構築物を賦形剤と併合することができ、錠剤、トローチ剤またはカプセル剤の形で使用することができる。経口組成物はまた、口腔洗浄薬として使用するための液体担体として調製することができ、ここでは、液体担体中の化合物は、経口的に適用され、口の中で動かされ、吐き出されるか、飲み込まれる。医薬的に適合性の結合剤及び／または補助剤物質を、組成物の一部として含むことができる。

【0234】

20

〔00261〕 吸入による投与については、化合物は、適切な噴射剤（例えば、二酸化炭素などのガス）を含む加圧容器もしくはディスペンサーからのエアゾールスプレー、噴霧化液剤、または適切な装置からの乾燥散剤の形で送達される。経粘膜または経皮投与については、浸透すべきバリアに適切な浸透剤が、製剤中に使用される。そうした浸透剤は、一般に当技術分野で既知であり、例えば、経粘膜投与については、界面活性剤、胆汁酸塩及びフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、経鼻噴霧剤または坐剤を使用して達成することができる。経皮投与については、活性試薬は、一般に当技術分野で既知のように、軟膏剤、膏薬、ゲル剤またはクリーム剤に製剤化される。試薬は、（例えば、ココアバター及び他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を用いる）坐剤または直腸送達用の停留浣腸の形で調製することもできる。

30

【0235】

〔00262〕 いくつかの実施形態では、アプタマー及び／またはアプタマー構築物は、体からの急速な排除を防ぐ担体とともに調製される。例えば、埋め込み及びマイクロカプセル化送達系を含む、制御放出製剤を使用することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル及びポリ乳酸などの生分解性の生体適合性ポリマーを使用することができる。そうした製剤の調製方法は当業者には明白である。材料は、Alza Corporation及びOva Pharmaceuticals, Incから市販品として入手することもできる。

【0236】

〔00263〕 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、感染細胞を標的にするリポソームを含む）も医薬的に許容可能な担体として使用することができる。これらは、例えば、U. S. 特許第4, 522, 811号に記載されているような、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。

40

【0237】

〔00264〕 さらに、アプタマー及び／またはアプタマー構築物の懸濁液は、適切な油性の注射懸濁液として調製することができる。適切な親油性溶媒またはビヒクルとしては、脂肪油、例えばゴマ油、または合成脂肪酸エステル、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性アミノポリマーを、送達のために使用することもできる。任意に、懸濁液は、化合物の溶解度を増大させ、高濃度の溶液の調製を可能にするのに適切な安定化剤または薬剤を含むこともできる。

50

【0238】

〔00265〕 場合によっては、投与の容易さ及び投薬量の均一性の理由で、投薬単位剤形で経口または非経口組成物を製剤化するのが特に有利であり得る。本明細書で使用する場合、投薬単位剤形は、治療される対象に対する単位投薬量として適する、物理的に別々の単位を指し；各単位は、必要とされる医薬担体とともに、所望の治療効果をもたらすように計算された所定量のアプタマー及び／またはアプタマー構築物を含む。本明細書に記載のアプタマー及び／または構築物の投薬単位剤形に関する仕様は、特定のアプタマー及び／またはアプタマー構築物の特性並びに達成すべき特定の治療効果並びに個体を治療するためのそうした活性薬剤を調合する分野に固有の制限によって決まり、これらに直接依存する。

10

【0239】

〔00266〕 少なくとも1つのアプタマー及び／またはアプタマー構築物を含む医薬組成物は、1種または複数の医薬品賦形剤を含むことができる。そうした賦形剤の例としては、限定されないが、結合剤、充填剤、潤滑剤、懸濁化剤、甘味剤、着香剤、防腐剤、緩衝剤、湿潤剤、崩壊剤、発泡剤及び他の賦形剤が挙げられる。そうした賦形剤は当技術分野で既知である。例示的賦形剤としては、以下が挙げられる：（1）様々なセルロース及び架橋型ポリビニルピロリドン、微結晶セルロース、例えばA v i c e l（登録商標）P H 1 0 1及びA v i c e l（登録商標）P H 1 0 2、ケイ化微結晶セルロース（P r o S o l v S M C C（商標））、トラガカントゴム及びゼラチンを含めた結合剤；（2）充填剤、例えば、様々なデンプン、ラクトース、ラクトース一水和物及び無水ラクトース；（3）崩壊剤、例えば、アルギン酸、プリモゲル（P r i m o g e l）、コーンスターチ、軽度に架橋結合したポリビニルピロリドン、ジャガイモデンプン、トウモロコシデンプン及び修飾デンプン、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、デンプングリコール酸ナトリウム並びにそれらの混合物；（4）圧縮される粉末の流動性に作用する薬剤並びにステアリン酸マグネシウム、コロイド状二酸化ケイ素、例えばA e r o s i l（登録商標）2 0 0、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム及びシリカゲルを含めた、潤滑剤；（5）流動促進剤、例えばコロイド状二酸化ケイ素；（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、安息香酸及びその塩、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、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、例えば医薬的に許容可能な不活性なフィラー、例えば、微結晶セルロース、ラクトース、第2リン酸カルシウム、サッカリド及び／または前述のいずれかの混合物；希釈剤の例としては、微結晶セルロース、例えばA v i c e l（登録商標）P H 1 0 1及びA v i c e l（登録商標）P H 1 0 2が挙げられる；ラクトース、例えば、ラクトース一水和物、無水ラクトース及びP h a r m a t o s e（登録商標）D C L 2 1；第2リン酸カルシウム、例えばE m c o m p r e s s（登録商標）；マンニトール；デンプン；ソルビトール；スクロース；及びグルコース；（8）任意の天然または人工の甘味剤、例えば、スクロース、サッカリンスクロース、キシリトール、サッカリンナトリウム、シクラメート、アスパルテム及びアセスルファムを含めた甘味剤；（9）着香剤、例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、オレンジ香料、M a g n a s w e e t（登録商標）（M A F C Oの商標）、風船ガム香料、果実香料など；並びに（10）有機酸と炭酸または炭酸水素塩などの発泡性カップル（e f f e r v e s c e n t c o u p l e）を含めた発泡剤。適切な有機酸としては、例えば、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、フマル酸、アジピン酸、コハク酸及びアルギン酸並びに無水物及び酸性塩が挙げられる。適切な炭酸及び炭酸水素塩としては、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、炭酸マグネシウム、グリシン炭酸ナトリウム、L-リジン炭酸塩及びアルギニン炭酸塩が挙げられる。あるいは、発泡性カップルの炭酸水素ナトリウム成分のみが存在し得る。

20

30

40

【0240】

〔00267〕 様々な実施形態では、本明細書に記載の製剤は実質的に純粋である。本明

50

細書で使用する場合、「実質的に純粋」は、活性成分（例えば、アプタマー及び／またはアプタマー構築物）が存在する主な種である（すなわち、モル基準で、これらは、組成物中の任意の他の個々の種よりも豊富である）ことを意味する。いくつかの実施形態では、実質的に精製された画分は、活性成分が、存在するすべての高分子種の少なくとも約50パーセント（モル基準）を占める組成物である。一般に、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在するすべての高分子種の約80%より多くを含む。様々な実施形態では、実質的に純粋な組成物は、組成物中の存在するすべ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%を含む。様々な実施形態では、活性成分は、均一になるまで精製され（従来の検出方法によって組成物中に夾雑種が検出され得ない）、ここでは、組成物は、本質的に、単一の高分子種から成る。

10

【0241】

アプタマー及びアプタマー構築物を含むキット

〔00268〕 本開示は、本明細書に記載のアプタマー及び／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。そうしたキットは、例えば、（1）少なくとも1つのアプタマー及び／またはアプタマー構築物；並びに（2）少なくとも1つの医薬的に許容可能な担体、例えば、溶媒または溶液を含むことができる。さらなるキットの構成要素は、例えば、（1）本明細書で特定した医薬的に許容可能な適切な賦形剤、例えば、安定化剤、緩衝剤などのいずれか、（2）キットの成分を保持及び／または混合するための少なくとも1つの容器、バイアルまたは同様の器具、並びに（3）送達用器具を任意に含むことができる。

20

【0242】

治療方法

〔00269〕 本開示は、PDGFアプタマーもしくはアプタマー構築物、VEGFアプタマーもしくはアプタマー構築物及び／またはVEGF／PDGFアプタマー構築物の使用を介して医学的狀態を予防または治療する（例えば、医学的狀態の1つまたは複数の症状を緩和する）方法を提供する。この方法は、治療有効量のそうしたアプタマー及び／またはアプタマー構築物をそれらを必要とする対象に投与することを含む。記載されるアプタマーは、予防的療法に使用することもできる。いくつかの実施形態では、アプタマー及び／またはアプタマー構築物は、経口的にまたは静脈内に投与される。

30

【0243】

〔00270〕 治療方法で使用するアプタマー及び／またはアプタマー構築物は、本明細書に記載のPDGFアプタマーもしくはアプタマー構築物、VEGFアプタマーもしくはアプタマー構築物及び／またはVEGF／PDGFアプタマー構築物または医薬的に許容可能なそれらの塩またはそれらのプロドラッグでもよい。

【0244】

〔00271〕 個体または対象は、限定されないが、ネコ、イヌ、ウマ、ブタ及びウシを含めたいかなる動物（飼育動物、家畜または野生動物）でもよく、好ましくはヒトである。本明細書で使用する場合、患者、個体及び対象という用語は、互換的に使用され得る。

【0245】

〔00272〕 本明細書で使用する場合、「治療する」は、疾患、病気または障害を治療するための患者の管理及びケアを説明し、患者において、疾患、病気もしくは障害の症状もしくは合併症の発症を予防するため；疾患、病気もしくは障害の症状もしくは合併症を緩和するため；または疾患、病気もしくは障害の存在を排除するために、アプタマー及び／またはアプタマー構築物を投与することを含む。より具体的には、「治療する」は、疾患（障害）状況の少なくとも1つの有害な症状または影響、疾患の進行、疾患の原因因子または他の異常な状態を、回復させること、減弱させること、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を含む。治療は、一般に、症状及び／または病態が改善する限りにおいて継続される。

40

【0246】

〔00273〕 本明細書で使用する場合、「予防する」は、全体的または部分的に予防す

50

ること；改善することもしくは管理すること；低減させることもしくは低下させること；または遅延させることもしくは停止させることを意味する。

【0247】

〔00274〕 様々な実施形態では、開示される組成物及び方法は、心血管疾患、癌、線維症、腎臓疾患または眼科疾患を治療するのに使用される。

【0248】

〔00275〕 いくつかの実施形態では、開示される化合物もしくは医薬的に許容可能なその塩またはプロドラッグを、上記のような疾患状態を向上させるまたは根絶する他の治療と組み合わせて投与することができる。開示されるアプタマー及び／またはアプタマー構築物を含む組成物は、例えば1種を超えるアプタマーを含むことができる。いくつかの例では、1種または複数のアプタマーを含む組成物は、別の有用な心血管系薬剤または抗癌剤または抗線維化剤などと組み合わせて投与される。一般に、そうした組み合わせでの使用について知られている治療剤の現在利用可能な剤形が適切である。

10

【0249】

〔00276〕 「組み合わせ療法」（または「併用療法」）は、アプタマー及び／またはアプタマー構築物組成物と少なくとも1種の第2の薬剤を、これらの治療剤の共作用から有益効果をもたらすことが意図される特定の治療レジメンの一部として、投与することを含む。組み合わせの有益効果としては、限定されないが、治療剤の組み合わせから生じる、薬物動態的または薬力学的な共作用が挙げられる。これらの治療剤を組み合わせで投与することは、一般的に、規定された期間（選択される組み合わせに応じて、通常、数分、数時間、数日または数週）にわたって行われる。

20

【0250】

〔00277〕 「組み合わせ療法」は、偶発的に及び任意に本開示の組み合わせをもたらす別々の単独療法レジメンの一部として、2種以上のこれらの治療剤の投与を包含することが意図され得るが、一般的ではない。「組み合わせ療法」は、連続的な方法でのこれらの治療剤の投与（すなわち、各治療剤は異なる時間に投与される）、及び実質的に同時の方法での、これらの治療剤または治療剤の少なくとも2つの投与を含むことが意図される。実質的に同時の投与は、例えば、固定比率の各治療剤を有する単回用量を、または各治療剤に対する単回用量を複数で対象に投与することによって、達成することができる。

30

【0251】

〔00278〕 アプタマー及び／またはアプタマー構築物を利用する投薬レジメンは、例えば、対象のタイプ、種、年齢、体重、性別及び医学的状態；治療すべき病気の重症度；投与経路；対象の腎臓及び肝臓の機能；並びに用いられる特定のアプタマー及び／もしくはアプタマー構築物またはそれらの塩を含めた、様々な因子に従って選択される。通常の技術を有する医師または獣医師ならば、病気の進行を予防する、病気の進行に逆らう、または病気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し、処方することができる。

【0252】

〔00279〕 一般に、投薬量、すなわち治療有効量は、1日につき、治療を受ける対象の体重1kgあたり約1μgから約100mgの範囲にわたる。

40

【実施例】

【0253】

〔00280〕 以下の実施例は例示目的のみに提供され、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定することを意図するものではない。本明細書に記載のすべての実施例は、当業者にとって周知であり、慣例的である標準的な技法を使用して行われた。以下の実施例に記載されている慣例的な分子生物学的技法は、Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.) などの標準的な実験マニュアルに記載されているように行うことができる。

50

【実施例1】

【0254】

PDGFアプタマーの選択及び配列

〔00281〕候補混合物の調製：　ビオチン標識されたssDNA鋳型にアニールしたDNAプライマーのポリメラーゼ伸長によって、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を調製した。

〔00282〕SELEX条件：　PDGF-BBタンパク質に対するアプタマー（R&D Systems）は、Bn-dUでdTを置換した40ヌクレオチドのランダム領域を含むライブラリーから、記載されているように（Gold et al. (2010) *PLoS One* 5:e15004）、SomaLogic Incによって選択された。10
フォワードプライマーは5'-CGCCCTCGTCCCACTCTC（配列番号837）であり、リバープライマーは5'-CGTTCTCGGTGTTGTTTC（配列番号838）であった。PDGF-BBタンパク質をビオチン標識し、ストレプトアビジンMyOne-SA（Dynal）ビーズ上に分割した。動力学的負荷（kinetic challenge）を使用して低解離速度を有するアプタマーの優先的な選択を達成し、ここでは、逐次的なラウンドにおいて、インキュベーション時間を延ばし、タンパク質濃度を低下させて、タンパク質-DNA複合体を10mMデキストラン硫酸の存在下で37℃でインキュベートした。動力学的負荷は、以下のインキュベーション時間：ラウンド4は5分、ラウンド5～7は15分、ラウンド8は30分を用いて、選択のラウンド4で開始し、最終的な第8ラウンドまで継続した。20

〔00283〕プールシーケンシング：　第8ラウンドのプールからのオリゴヌクレオチド配列をクローニングし、いくつかのクローンをシーケンスした。これによって、4149-8__1で例示されるような、関連した配列のファミリーが同定された。

〔00284〕PDGF SELEXプールのディープシーケンシング：　4149-8__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に、第8ラウンドプールを454ピロシーケンシング技術を使用してシーケンスした。454プライマーを用いてプールDNAを増幅し、PCR産物を精製し、Sequal標準化プレート（Invitrogen、カタログ番号A10510-01）を使用して標準化した。溶出液をゲル上で泳動して、各増幅産物のサイズ及び純度を確認した。精製したPCR産物を454ピロシーケンシング施設（University of Colorado Health Science Center in Aurora CO）でシーケンスした。30

〔00285〕CLUSTAL解析によって、454シーケンスを4149-8__1と整列させた。プール由来の配列データセットは10,803個の全長配列（すなわち、両方のプライマー配列を含むそうした配列）を含んでおり、そのうちの3,839個がユニークであった。これら3,839個のユニークな配列を、モチーフ「5'-ZACNCGCGZZZAZAGCG」（同一性=0.65）（配列番号839）について検索し、次いでこれから上流にある「ZZ」（同一性=1.0）について検索した。これらのモチーフの両方を含む436個の配列が見つかった。加えて、58個の他の配列は、最初のパターンのみを含んでいたが、概して同一性が低く、上流に明らかなヘアピン構造がなかった。次いで、この436個の配列を以下のように整列させた。（1）「ZZ」に対して、（2）ループの中心に対して、及び（3）「ZACNCGCGZZZAZAGCG」（配列番号839）に対して。図3Aに列挙するように、すべての配列について、各位置での4149-8__1との同一性パーセンテージを計算した。表1及び2は、4149-8__1アプタマーファミリーの配列を代表する多数の配列を列挙する。40

〔00286〕アプタマー合成：　固相合成に使用される修飾デオキシウリジン-5-カルボキサミドアミダイト試薬は、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）の適切な一級アミンとの縮合（RNH₂、1.2当量；Et₃N、3当量；アセトニトリル；60℃；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の3'-O-ホスホ50

フィチジル化 (phosphitylation) (1.2 当量; iPr_2EtN 、3 当量; CH_2Cl_2 ; -10 から $0^\circ C$; 4 時間); 及び中性シリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィーによる精製 (Still, et al. (1978) J. Org. Chem. 43:2923) によって、調製した。アプタマーは、本明細書に記載のユニークな塩基修飾をもたらしようにプロトコールにいくらか調整を加えたホスホラミダイト法 (Beaucage and Caruthers (1981) Tetrahedron Lett. 22:1859) を使用して、固相合成によって調製した。トルエン中 10% ジクロロ酢酸を用いて 45 秒間脱トリチル化を行い; 5-ベンジルメルカプトテトラゾールによって活性化された 1:1 アセトニトリル:ジクロロメタン中 0.1 M ホスホラミダイトを用いて、3 回 5 分間反応させて、カップリングを達成し、; 機器供給業者の推奨に従って、キャップ形成及び酸化を行った。脱保護は、1:1:2 の t -ブチルアミン:メタノール:水 (Mullah 1998) を用いて、24 時間摂氏 37 度で反応させて、行った。200 nmol スケールでアプタマーを合成し、記載 (Fitzwater and Polisky (1996) Methods Enzymol. 267:275) されているように UV シャドウイングを使用して、製造者の推奨に従って Costar Spin-X (シリコン処理したガラスウールまたはスパンポリプロピレンプレフィルターを含まない) 及び Amicon YM3 濃度を用いて、ポリアクリルアミドゲルから精製した。

〔00287〕修飾ヌクレオチドの構造活性相関及び親和性成熟: 8 つのベンジル側鎖のそれぞれの、結合への寄与を検討するために、修飾 dU ホスホラミダイトの特注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って、別の一連の体系的な点置換を行った。この目的のために、サイズ、極性、H 結合のドナー及びアクセプターの配置、リンカーの長さ及び 5 位置置換基の配向を変えることによって各位置の微小環境を探ることが可能になるライブラリーを設計した。この解析のための官能基を選択する際に、元の修飾 (この場合ベンジル基)、(トリプトファン及びチロシンのような) 抗体の相補性決定領域 (CDR) で大きな比率を占めるアミノ酸側鎖 (Mian, IS, et al. (1991) J. Mol. Biol. 217:133; Ramaraj T. et al. (2012) Biochim. Biophys. Acta. 1824:520)、及び小分子薬物の「プリビレッジド (privileged)」断片 (Welsch et al. (2010) Curr. Opin. Chem. Biol. 14:347) というテーマに基づいて変異を含むことを目的とした。ある意味で、本発明者らは、医薬品化学において、抗体における親和性成熟の要素と構造活性相関 (SAR) の最適化を組み合わせようと努力した。SEL EX の間、単一修飾ヌクレオチドを利用したが、SEL EX 後の最適化は、修飾単量体の合成の容易さ及び固相合成との適合性のみに制約される。

【0255】

〔00288〕5 位における 14 の代替部分でのベンジル基の個々の置換の効果を、解離定数比として表される相対的亲和性及びホスホ-PDGF $R\beta$ 比パーセントとして表される相対的 PDGF $R\beta$ リン酸化とともに、図 1C 及び D 並びに図 6B にまとめる。5 位にメチル基のみを有する dT での置換は、最も激しい変化を示し、その意味で、タンパク質のアラニンスキャニング変異誘発 (Cunningham, B. C. et al. (1989) Science 243:1330) に匹敵する。驚くことではないが、これは、8 個の修飾ヌクレオチド位置のうちの 6 個において、最も許容されない置換であった。例外はヌクレオチド 1 及び 7 であり、この場所で、この置換は十分に許容された。これら 2 つの位置はまた、多くの他の置換を許容し、いくつかの置き換えは、結合親和性を 5 倍まで向上させた (図 6B)。これに対して、ヌクレオチド 8、17 及び 18 は、変化に対して最も高い感受性を示した。次いで、最もよい単一の置換を組み合わせ、4149-8_255 及び 4149-8_260 を含めたさらなる変異体を得た (図 6B)。ヌクレオチド 17 のフェネチル-dU (Pe-dU) とヌクレオチド 18 のチオフエン-dU (Th-dU) を組み合わせたアプタマー 4149-8_260 は、PDGF-BB 及び PDGF-AB の両方に対して優れた結合を示した (図 6B)。最初に選択された SOM

Amerの親和性が既に非常に高かった ($K_d = 20 \text{ pM}$) ので、親和性が結合アッセイの検出限界に近づき、そのため、親和性の向上度が過小評価される可能性があるということは注目すべきである。本発明者らは、初期結合がより弱い (例えば 100 pM から 10 nM 超に及ぶ K_d 値) 他の SOMAmer に同様の SEL EX 後の最適化ストラテジーを適用し、 100 倍までの親和性の向上を観察した。

【0256】

[00289] PDGF アプタマー 4149-8_260 (SL5) のホモ二量体: PDGF は共有結合性ホモ二量体を形成し、2つの SOMAmer は各 PDGF ホモ二量体に結合するので、ホモ二量体化した SOMAmer の結合に対する効果を測定した。結合活性効果の理由から、PDGF アプタマーのホモ二量体の親和性は、対応する単量体の親和性と比較して、実質的に向上することができた。結晶構造によって、SOMAmer の 5' 末端は $38 \text{ \AA}$ 離れており、一方で 3' 末端は $74 \text{ \AA}$ 離れていることが示された。2箇所の間の最も短いパスがタンパク質を二分するので、3' 末端へ 5' 末端を結合させるには、少なくとも $63 \text{ \AA}$ を必要とすると思われる。容易に利用可能な化学反応に基づいて、2タイプのホモ二量体を配列した。これらは、1) Heg あたり約 $20 \text{ \AA}$ の距離を与える2つから6つの Heg リンカーによって結合した頭-尾のホモ二量体、及び2) 1つから3つの Heg と組み合わせられた、合成ダブルサポートを介して結合した、3'-3' ホモ二量体であった。4149-8_260 のホモ二量体を、PDGF-BB Zorba x 結合アッセイで試験した。結合アッセイは限られた量の SOMAmer を用いて行い、タンパク質二量体あたり1つの SOMAmer の結合とタンパク質二量体あたり2つの SOMAmer の結合を区別しないと思われる。ホモ二量体の構造を表1 (配列 4149-8_334 から 4149-8_342 まで) に示す。表1aで示すように、Zorba x アッセイで得られた K_d 値によって、5'-3' の立体配置において、より長いリンカーが望ましく、結合親和性を 10 倍まで向上させることが示唆された。3'-3' 結合したホモ二量体では、より短いリンカーが、実際は長いリンカーよりもよく機能すると思われた。このことは、細胞性リン酸化の結果によって確証された。表1aを参照されたい。

【0257】

[00290] これらの配列に基づくと、例示的コンセンサス配列は:

5'-ZZVCL_nGV'ZACNMGGCZZZAZAGCG-3' (配列番号 502) であり、

ここでは

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、V' は V に相補的であり;

N は、任意の天然に存在するヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドから独立に選択され;

M は、C または A から選択され;

Z は、修飾ピリミジンから独立に選択され; L は、任意の天然に存在するヌクレオチドもしくは修飾ヌクレオチド、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るスペーサーであり;

n は 0 から 20 であり;

ここでは、1つまたは複数のヌクレオチド挿入が任意に含まれる。

【0258】

[00291] 配列トランケーション研究: 表3で示すように、4149-8_1 の 5' 末端及び 3' 末端からの体系的なトランケーションを行って、ヒト PDGF-BB に対するアプタマーの完全な結合活性を保持するのに必要とされる最小の長さを定めた。トランケーションのサブセットに関する K_d 値を示す。Z = ベンジルーデオキシウリジン (Bn-dU); A、C、G 及び T はデオキシリボヌクレオチドである。

【0259】

タンパク質の発現及び精製並びにアプタマー複合体の形成

[00292] 結晶学的研究のために、組換えヒト PDGF-BB タンパク質を Creati

10

20

30

40

50

ve BioMart (Shirley, NY) から購入した。組換えタンパク質は大腸菌 (*E. coli*) 細胞で発現された。アプタマー溶液を解凍し、次いで、約 95 °C まで 5 分間加熱し、次いで 40 °C で 5 分間インキュベートし、次いで室温まで冷却して、アニールさせた。アニールさせたアプタマー溶液を、1 : 1 の DNA 対タンパク質比でタンパク質と混合した。この複合体を、20 mM リン酸 Na/K (pH 7) 及び 100 mM NaCl を含むバッファーで 5 倍希釈した。得られた混合物を、1.5 mL の Amicon 遠心濾過器中で、約 4 mg/mL のタンパク質に濃縮した。終濃度を最終的な保持液量から推定した。

【実施例 2】

【0260】

PDGF-アプタマー複合体の結晶化及び構造

[00293] 16 °C に設定した Compact, Jr. プレート (Emerald BioSystems, WA) 中で、シッティングドロップ蒸気拡散法を使用して結晶を成長させた。データ収集用の結晶は、一次スクリーン (Proplex, Molecular Dimensions) から得た。PDGF-BB: 4149-8_255 複合体の結晶は、100 mM 酢酸マグネシウム、100 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.5) 及び 8 % (w/v) PEG 8000 から成長させた。PDGF-BB: 4149-8_260 複合体の結晶は、100 mM 酢酸マグネシウム、100 mM カコジル酸ナトリウム (pH 6.5) 及び 15 % (w/v) PEG 6000 から成長させた。結晶を Litho Looops を用いて回収し、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してから、液体窒素中に直接沈めることによって瞬間冷却した。

【0261】

[00294] データ収集及び構造決定: Advanced Photon Source (Argonne, IL) のビームライン 19-ID で、両方の構造に関するデータを収集した。XDS (Kabsch 2010) を使用してこのデータセットを処理した。PDGF-BB: 4149-8_260 複合体の構造は、検索モデルとして PDGF-BB: β タイプ PDGF 受容体複合体 (PDB エントリー 3MJG) の構造由来の PDGF のタンパク質モデルを用いて、CCP4 ソフトウェアスイート (CCP4, 1994) の Phaser を使用した分子置換によって、最初に位相決定した。分子置換によって、非対称ユニットあたりの単一タンパク質単量体の位置を特定した。REFMAC での制限された精密化 (restrained refinement) の初期ラウンドの後の電子密度マップを調べることによって、タンパク質モデルに隣接する核酸と一致した特徴が示された。続いてアプタマーのモデルを、「ブートストラッピング」のプロセス (すなわち部分的なモデルを精密化の反復ラウンドにかけた) を通して構築し; その結果、さらなるモデル構築を可能にするわずかに向上したマップが得られた。最初に、核酸骨格密度においてリン酸イオンを構築した。次に、リン酸を dT 残基で置き換えた。精密化に続いて、修飾された残基を、正の差分電子密度の突出によって識別することができた。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、最終ステップにおいて、dT 残基を正しい核酸塩基と置き換えた。すべてのマニュアル構築は、Crystallographic Object-Oriented Toolkit (Coot) (Emsley & Cowtan, 2004) を使用して行った。PDGF-BB: 4149-8_255 構造体の構造は、4149-8_260 複合体の完成モデルを使用した分子置換により解明した。

【0262】

[00295] 各構造では、Thr 88 及び Thr 90 残基の O γ 原子の電子密度に近接して、電子密度の突出が観察された。酵母で発現させた組換え PDGF-B について、これらの部位で O-マンノシル化報告されているが (Settineri, et al., (1990))、大腸菌で発現させた PDGF-B において同様の翻訳後修飾を予想する理由はほとんどない。観察された電子密度によって完全な占有に満たないことが示唆されたので、スレオニン残基は、いかなる翻訳後修飾もなしでモデル化した。

【0263】

[00296] 表4は、それぞれ4149-8__260（配列番号211）及び4149-8__255（配列番号207）との2つのアプタマーリガンドのデータ収集の統計及び精密化およびモデル統計を開示する。

【0264】

[00297] 表5は、B型DNAと比較した、PDGF BBアプタマーについての塩基対パラメーターを示す。PDGF BBアプタマーは、5'ステムループドメイン及びミニノットの両方のステムにおいて逸脱したB型コンフォメーションをとる。必要に応じて、平均値及び標準偏差（括弧内）を示す。アプタマーの値は、web3DNA（Zheng et al. (2009) Nucleic Acids Res. 37:W240）を使用した解析に基づき、（高分解能結晶構造で見られた）B-DNAの値は、Olson, et al. (2001) J. Mol. Biol. 313(1):229で記載及び報告されているように、3DNAを使用して決定した。

【0265】

[00298] PDGF-BBの単量体サブユニットは、タンパク質のシスチンノットファミリーに特有の逆平行の配向で二量体化する、ねじれたβシートを形成する（Oeffner et al. (1992) EMBO J. 11:3921）。SL5（4149-8__260）は、長軸の両端で2つの相同部位に結合し、ホモ二量体界面を交差し、3つのPDGFループのそれぞれに接触する（図7A）。SOMAmerは、疎水性芳香族相互作用のネットワークによって結合した2つのドメインから成る（図7B）。5'末端では、短いステムはHegループでキャップされている（結晶構造中で無秩序である）が、分子の残部は、異常に小さなHタイプシュードノットに折りたたまれ（Alberts, D. P. et al. (2005) Nucleic Acids Res. 33:2210）、修飾ヌクレオチドは、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。注目すべきことに、8つすべての修飾ヌクレオチドがPDGFと接触している。7つの修飾ヌクレオチドクラスターは、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しているが、BndU1は、PDGFホモ二量体界面のチャンネルに続いて、伸長したコンフォメーションをとる。2つの天然ヌクレオチドもPDGFに接触し、残りの天然ヌクレオチドは、内部構造に寄与する（図2及び図7）。SL5の二次構造要素であるステムループ及びシュードノットは、周知の核酸構造モチーフである。しかし、修飾ヌクレオチドとのある種の従来の塩基の置き換えは、別の相互作用のための新規な官能基を提供する。SL5のこの際立った特徴によって、タンパク質結合及び標準ヌクレオチドと修飾ヌクレオチドの間のユニークな分子内接触のための、広域な疎水性面がもたらされる。

【0266】

[00299] SL5の3'末端はHタイプシュードノットの顕著な特徴を示すが（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」モチーフの特殊な性質を軽視している。21ヌクレオチドを必要とする、構造的に報告された最小のHタイプシュードノット（Nonin-Lecomte S. et al. (2006) Nucleic Acids Res. 34:1847）と比較して、SL5のミニノットは、わずか16ヌクレオチドから成る（図7B）。さらに、ステム2（S2）の末端mG24:dC12塩基対の欠損は、結合親和性を低下させず（図3）、これは、14ヌクレオチドのミニノットの機能的完全性を示すものである。前例のない骨格のねじれ及びスタッキング相互作用とともに、このミニノットは、修飾ヌクレオチドの疎水性部分の充填による安定化を介して著しく小さなサイズを獲得した、新規なシュードノット変異体を示す。

【0267】

[00300] ミニノットステム1（S1）は、形式上ほんの2つのワトソン・クリック塩基対から成る（図8A）、ループ2（L2）は、名目上5塩基、すなわちPe-dU17、Th-dU18、dA19、BndU20及びmA21から成る。L2とS1の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、これは、一般的にはH結合に限

定される。これに対して、SOMAmerのミニノットは、特殊な塩基対合に支持された、非定型のループステムスタッキング相互作用を行う。特に、S1は、L2に由来する非標準Bn-dU17:Bn-dU20塩基対とのスタッキングによって安定化し(図8C及び図8B)、新規な骨格不連続性を有する3つの塩基対S1を効果的に作出する。以前に記載されたU:Uイミノカルボニル塩基対と対照的に、Pe-dU17:Bn-dU20塩基対は、Bn-dU17のN3とBn-dU20のアミドリンカーのカルボニル酸素との間の単一のH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コンホーメーションは、Bn-dU17とのH結合を妨害するが、Bn-dU8の糖との立体的衝突なしで、Bn20がBn-dU8塩基とスタックできるようにする。特殊なPe-dU17:Bn-dU20塩基対は、ヌクレオチド18及び20の間の骨格を280°回転させることによって可能となる(図8C)。この劇的な鎖の逆転によって、Bn-dU20塩基がdA9の糖とスタックできるようになり、Pe-dU17と水素結合を形成できるようになる。重要なことに、Pe-dU17:Bn-dU20塩基対は、修飾ヌクレオチドによって与えられる疎水性相互作用を介してさらなる安定化を引き出し; Pe-dU17側鎖のエチレン(リンカー)部分はBn16(CH:: π)に向けられているが、そのベンジル基は、 π - π 端面相互作用でBn2及びTh18とスタックされている(図8E)。1つのさらなるL2とS1の間の相互作用は、塩基トリプル(mA21:dG15:dC10; 図8F)、すなわちシュードノット中の反復性モチーフである(Chen, G. et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:12706)。これは、修飾ヌクレオチドを含まない、SL5における唯一の長距離三次相互作用である。

【0268】

[00301] ループ1(L1)は、mA11とdC12の間の鎖内のリン酸の距離をほんの5.9 Åに圧縮して、骨格を急な94°回転させる単一の押し出されたヌクレオチド、mA11から成る(図8G)。Hタイプシュードノットは、1つまたは2つのヌクレオチドをL1に有することが多く、これは、一般的には、S2と水素結合を形成し、らせん状の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'ステムドメインが修飾ヌクレオチドの疎水性部分を介してミニノットとの界面を有することができるように凝集された構造を保つのに必要である。予想通り、押し出された塩基は保存されておらず(図3)、単一のC3スパーサーで置き換えることができる(図6A)が、おそらくミニノット形成への干渉の理由から、その欠損は結合を抑止する。

【0269】

[00302] ミニノットS1のワトソン・クリック塩基対(dA9:Bn-dU16、dC10:dG15)は、S2の鎖1がS1の鎖2に直接的につながる好ましいHタイプシュードノット配置によって集まり、効率的なステムのスタッキングをもたらす(Klein, D. J. et al. (2009) Nat. Struct. Mol. Biol. 16:343)。S2の3つの塩基対は、完全にワトソン・クリック相互作用から成り、わずかにねじれが少ない(under-twisted)B型らせん(図8H)を形成する。このねじれが少ないことは、シュードノットポロジーについて予想されるような、A型らせんにより酷似しているらせんパラメーターをもたらす。しかし、この構造のらせんの長さが短いことを考えると、これらの計算の関連性は不確かである。S2は、S1と従来の同軸スタックを形成せず、これは、S1のdC10:dG15及びS2のdC14:dG22によって形成される接合部での極度ならせん状の巻過ぎ(70°のねじり角度)が理由である。それにもかかわらず、ステムの連続的なスタッキングは維持され、これは、dC14がdG15とスタックし、dG22が塩基トリプルのmA21とスタックするからである(図8H)。この接合部での広域ならせん状のねじれは、塩基トリプル形成のために副溝を広幅化すると同時に、mA21をS2の主溝に架橋させるのに必要である。こ

の立体配置は、1つまたは2つのヌクレオチドをL1に有する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)。

【0270】

〔00303〕 SL5の5'ステムは、2つのワトソン・クリック塩基対 (mA3:Bn-dU7及びdC4:dG6)並びにステムの基部の非標準Bn-dU2:Bn-dU8塩基対から成る (図8I)。Bn-dU2:Bn-dU8塩基対は、2つの水素結合、すなわち典型的な4-カルボニル-N3及びBn-dU2塩基からBn-dU8結合のアミドリリンカーへのユニークな4-カルボニルを含む (図8J)。親和性が強化されたプールにおける関連した配列の解析は、ステムの基部における不変のBn-dU:Bn-dUブレースという注目すべき例外はあるが、5'ステムの長さ及び塩基組成は可変であることを示し (図3A及びB)、これは、SL5の全体的な構造及び機能におけるこの非標準塩基対の重要性を強調するものである。5'ステムらせんの安定性は、DU8、Bn20及びPDGFのPro82のスタッキングによってさらに強化される (図9H)。SL5の5'ステムループ及びミニノットドメインは収束し、ここで、骨格は鋭く111°に曲がる。5'ステムの塩基対の著しいねじり角度及び半径方向変位によって、従来のB型らせんよりも大きなスタッキングの重複を有する塩基2-4及び6-7が生じる (らせんのねじれが少ないことが原因)が、Bn-dU8塩基は外側に出て、Bn-dU7塩基はBn-dU8のアミドリリンカーとスタックする (図8I)。この非定型のらせんは、SL5の残りの部分及びPDGFとの重要な相互作用を促進し; Bn-dU8塩基はBn20とスタックするが、Bn8は、連続したπ-π端一面相互作用におけるBn16とBn20の環の間に垂直に存在する。こうした長距離三次相互作用は、ミニノットとステムループドメインの間に正確なヒンジを規定する (図8L及び8K)。最初の2つのヌクレオチドの間の湾曲の欠如は、Bn2とのBn-dU1塩基の衝突を防止し、環のスタッキングを増大する (図8I)。Bn2は、Bn7及びBn8 (5'ステム由来)並びにBn16、Pe17及びBn20 (ミニノット由来)によって作出された疎水性クラスターの中央に位置する (図7B、図8I及び図8K)。この疎水性クラスターはSOMAmerの安定化に寄与し、これは、SL5が、修飾ヌクレオチドを欠くその類似体よりも30℃超高い64℃というT_mを示すという知見により支持された。

【0271】

〔00304〕 SL5に加えて、イソブチル-dU (iB-dU)でのBn-dU8の置き換えを除いてはSL5と同一であるSL4 (4149-8_255)の構造も解明した。変異体SL4においてiB-dU8をPe-dU17及びTh-dU18と組み合わせた場合、SOMAmerは、大幅に弱い結合 (SL5に対して約20~50倍)及び75倍低いインビトロ阻害活性を示した (図1A、図1B及び図6B)。より小さな非芳香族のイソブチル側鎖は、SL5のBn-dU20、Bn-dU8及びBn-dU16のベンジル側鎖で見られるエネルギー的に有利なπ-π端一面スタッキングを形成することができない (図8M及び図8N)。これは、タンパク質界面における疎水性クラスターの中心に孔を作出し、5'ステムとミニノットドメインの間のヒンジを効果的に開放する。この置換の構造的な影響は、タンパク質の疎水性コアにおけるPheからLeuへの変異にまったく類似している。そうしたタンパク質変異は十分に説明されており (Kadonosono, T. et al. (2003) *Biochemistry* 42:10651; Lin, H. J. et al. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* 1649:16; Baase, W. A. et al. (2010) *Protein Sci.* 19:631)、通常、著しい不安定化作用がある。二次構造モチーフ間の接合部は、核酸の3次構造の決定において重要な役割を果たすことが知られている (Pyle, A. M. et al. (2011) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21:293)。

【0272】

〔00305〕 顕著に弱い標的結合親和性にもかかわらず、S L 4は、リガンドの非存在下でS L 5と同様の熱融解プロファイルを示す（それぞれ62°C及び64°CのT_m値）。これは、S L 4におけるi B-d U 8置換によって作出された、空洞及び変化した接合部トポロジーは、タンパク質結合界面を不安定化するが、S O M A m e rのドメイン内構造をインタクトなままにするという考えと一致する。溶液中の遊離S O M A m e rのコンフォメーションは、タンパク質との複合体におけるものと非常に異なる可能性が高く、これは、T_mと結合親和性の間の関連性を減らし得る。実際、S O M A m e rの大きな疎水性面を溶媒和させるエネルギーコストはかなりのものである可能性が高いので、複合体化していないS O M A m e rが疎水性側鎖の周囲で崩壊し、疎水性側鎖が溶媒から部分的に保護されたコンフォメーションをとることが予想される。

10

【0273】

〔00306〕 以前に記載されたタンパク質：アプタマー複合体と対照的に、疎水性相互作用が、S L 5とP D G Fの間の界面を支配する（図2、図4及び図9）。P D G F-B Bへの結合は、S O M A m e rあたり約1225 Å²の埋もれた表面領域を作出する。S L 5の8つの修飾ヌクレオチドは、P D G Fの13個の非極性アミノ酸（A l a 35、P h e 37、L e u 38、V a l 39、T r p 40、P r o 42、C y s 52、C y s 53、I l e 75、I l e 77、P r o 82、I l e 83及びP h e 84）と相互作用する広域な疎水性界面を作出し、これは、全非極性接触の約半分を占め、残部は、極性アミノ酸または荷電アミノ酸、例えば、G l u 24、A r g 27、A s n 36、A s n 54、A s n 55、A r g 56、A r g 73、L y s 74、L y s 80、L y s 85及びL y s 86の脂肪族領域を含む（図9）。完全に非極性の残基と荷電アミノ酸の非極性部分の間の同様の相互作用は、タンパク質で観察されることが多い。したがって、S O M A m e rの修飾ヌクレオチドによって与えられる構造的多様性により、これらが、タンパク質に接近しやすい相互作用の豊富なレパートリーを模倣することが可能になる。従来のアプタマーと比較した際の、S O M A m e rによって作られる疎水性接触の程度の著しい違いは、界面の原子が標的タンパク質の表面に提示される場合に明らかである。S L 5は、塩基性アミノ酸に近接しているにもかかわらず、著しく少ない極性相互作用を示し、P D G Fとほんの6つのH結合及び1つの電荷-電荷相互作用しか有さない（図4）。接触表面領域と比較して、これは、アプタマーに典型的なものよりも著しく低い。6つの従来のアプタマーに関するH結合及び電荷-電荷相互作用（すなわち極性接触）の総数は、0.91の相関係数及び100 Å²界面面積あたり平均1.9±0.4の極性接触で、界面面積に正比例してほぼ直線的に増加する（図10A、図22A）。S L 5及び他の共結晶構造の2つのさらなるS O M A m e rは、界面面積あたり半分未満の極性接触の数（100 Å²界面面積あたり平均0.7±0.2）で、このトレンドの99%信頼区間から明らかに外れるが、その標的に対するより高い結合親和性へのトレンドを示す（図22C）。リガンド効率（非水素接触原子あたりの結合の自由エネルギー）（K u n t z, I. D. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9997）の観点では、アプタマーとS O M A m e rは異なるように思われず（図22C）、タンパク質ベース及び少分子ベースのリガンドを用いて観察された様々な値（W e l l s, J. A. et al. (2007) Nature 450:1001）を包含する。界面面積あたりの結合の自由エネルギーも同様である（図22C）。しかし、異なる点は、極性接触あたりの結合の自由エネルギーの値であり、これは、S O M A m e rがアプタマーよりも約2倍大きく（図22B及びC）、これは、S O M A m e rは、結合へのより大きな助力を疎水性相互作用から引き出すという考えと一致する。

20

30

40

【0274】

〔00307〕 電荷-電荷相互作用は、折りたたまれたタンパク質の安定性に0.2 kcal/mol未満を寄与することが多い（S a l i, D. et al. (1991) J. Mol. Biol. 220:779。これに対して、単一のメチレン基だけを埋めると、球状タンパク質の安定性及び／または結合相互作用に約1~1.5 kcal/molが寄与されると推定される（K e l l i s, J. T., Jr. et al. (1988) Na

50

ture 333:784; Pace, C. N. et al. (2011) Mol. Biol. 408:514)。SOMAmerの構造によって、疎水性相互作用に強く依存していることが明らかになり、この意味で、タンパク質へのその結合は、典型的なタンパク質-タンパク質相互作用により酷似している。この知見に一致して、PDGFに対するSL5の親和性は、幅広い塩濃度(0.1から1.0M NaCl)またはpH値(5.0から8.8)にわたって事実上低下しないことを示し、これは、従来のアプタマーで見られる効果(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。

【0275】

[00308] SELEx後の最適化は、形状相補性の微調整及び疎水性充填相互作用を促進する。例えば、タンパク質界面における例外的なPe-dU17及びTh-dU18の形状相補性(図10B)は、構造活性相関で確認される(図6B)。Bn-dU1はまた、PDGF-BBとユニークな相互作用を形成し、ベンジル環が、Cys43-Cys52ジスルフィド結合及びPDGFの鎖1のGlu24と鎖2のArg56の間の塩橋によって形成されるトンネル内に位置する(図10C)。結晶構造によって、結合ポケットは、より大きな二環式置換基を含めた様々な側鎖を収容することができ、それによって、タンパク質と接触するこの箇所を増強することが示唆される。実際、本発明者らは、結合親和性を5から10倍増強する、いくつかの修飾ヌクレオチド置換をこの位置で同定した(図6B)。

【0276】

[00309] PDGF-BB:SL5構造の注目すべき特徴は、SOMAmerがPDGFR β を模倣する程度である。受容体は、PDGF界面の7つの疎水性アミノ酸を含む疎水性相互作用を主に介してPDGFに結合する(Shim, A. H. et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:11307)。SL5の結合部位は、タンパク質上の同じ疎水性の溝を占有するBn-dU芳香族環を有する受容体のものと大きく重複する(図11)。PDGFは受容体と24残基を有するSL5の両方に接触し、24残基のうちの10は共有されている。これらの共有されたまたは「プロミスキュスな(promiscuous)」残基は、PDGFの表面の結合エネルギーのホットスポットに相当する可能性がある(Wells, J. A. et al. (2007) Nature 450:1001; Clackson, T. et al. (1994) Science 267:383。しかし、PDGFR β と比較して、SL5は、PDGF-BBに対して10倍高い親和性を示す(Lokker, N. A. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:33037)。これらの知見に一致して、SL5はPDGF-BBの強力なインヒビターである(図1B及び図6B)。

【実施例3】

【0277】

結合親和性アッセイ

[00310] 標的結合親和性を決定するために、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(New England Biolabs)及び γ -³²P-ATP(Perkin Elmer)を使用して、SOMAmerを5'末端標識した。結合アッセイは、約0.03~0.05nMの濃度の放射標識されたSOMAmer(約20,000c.p.m)及び 10^{-7} から 10^{-12} Mに及ぶ濃度の標的タンパク質を、 $1\times$ SB18Tバッファー(40mM HEPES, pH7.5; 120mM NaCl; 5mM KCl; 5mM MgCl₂及び0.01%TWEEN-20)中で37℃で30分間インキュベートすることによって行った。結合した複合体を、Zorbax樹脂と混合し、Duraporeフィルタープレートで捕獲した。結合したSOMAmerの画分をPhosphorImager(FUJIFILM FLA-3000)で定量化した。生の結合データをZorbax樹脂への放射標識されたSOMAmerの非特異的なバックグラウンド結合に対して補正した。平衡解離定数(K_d)を、以前に記載されたように(Jellinek et al

10

20

30

40

50

．（１９９３）Proc. Natl. Acad. Sci. 91:11227）決定した。図５で示すように、２００ｎＭの濃度の競合物のｔＲＮＡをアイソフォームの特異性研究に含む。PDGF-BB/SOMAmerとE10030の相互作用に対する塩依存性を測定するために、結合親和性アッセイを、４０ｍＭ Hepes pH7.5、0.01%TWEEN-20及び１００ｍＭ、２５０ｍＭ、５００ｍＭ、７５０ｍＭまたは１.0MのいずれかのNaClの存在下で、上記のように行い、解析した。単純線形回帰を使用して、塩濃度対解離定数の両対数プロットを適合させた。プロットの傾きは、（Manning, G. S. (1969) J. Chem. Phys. 51:924）の対イオン凝集理論によって説明されているように、タンパク質結合の際にDNAから遊離した対イオンの数を表す。PDGFに対するアプタマー4149-8__260（配列番号211）の親和性は、幅広い塩濃度（0.1から1.0M NaCl）またはpH値（5.0から8.8）にわたってほとんど変化を示さず、これは、従来のアプタマーで見られる効果（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。

【実施例４】

【0278】

PDGF-BBの細胞性リン酸化アッセイ

〔00311〕PDGF-BB活性。PDGF-BB SOMAmerがPDGF Rβの活性化を阻害する能力を試験するために、Hs27ヒト包皮線維芽細胞（アメリカ培養細胞系統保存機関）を５０００細胞／ウェルで９６ウェルプレートに播種し、２４時間血清飢餓させた。SOMAmer（図で示す様々な濃度）を、PDGF-BB（２０ng/mL）（Creative BioMart）とともに血清フリー培地において３０分間３７℃でインキュベートし、次いで、血清飢餓させたHs27細胞にこの複合体を加えた。刺激してから５分後に、上清を捨て、溶解バッファー＃９（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アプロチニン及び10μg/mLロイペプチン）中で、細胞を氷上で５分間溶解した。製造者の指示書に従ってDuoSetホスホ-PDGF Rβキット（R&D Systems）を使用して、ホスホ-PDGF Rβのエライザ検出を行った。ホスホ-PDGF RβパーセントをOD₄₅₀で測定し、刺激なしの対照で、プレートの吸光度及びバックグラウンドシグナルについて補正した。実験は、一般に、２連または３連で行った。データをGraphPad Prism3.0でプロットし、非線形回帰を使用して部位競合曲線に当てはめた。SOMAmer4149-8__379及び5'アミノリンカー修飾されたSOMAmer4149-8__379についてIC₅₀測定の代表的なプロットを図13に示し、それぞれ1.6nM及び1.7nMのIC₅₀値である。

【0279】

〔00312〕クローン4149-8の変異体の活性スクリーニングのために、上記と同じ条件下であるが、単一濃度（一般に20nM）のSOMAmer変異体において、Hs27線維芽細胞におけるPDGF-BB誘導性PDGF Rβリン酸化の阻害パーセントを評価した。

【実施例５】

【0280】

Na p-dU修飾に基づくさらなるPDGFリガンド

〔00313〕高親和性でPDGF-BBに結合するアプタマーを同定するために、Na p-dU修飾ヌクレオチドを含むライブラリーを用いて別のSELEX実験を行った。選択は、上記の実施例1に記載されているものと実質的に類似した方法で行い、その結果、Na p-dUアプタマークローン5169-4を同定した。

【0281】

〔00314〕PDGF Na p-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に、454 ピロシーケンシング技術を使用して第7ラウンドのプールをシーケンスした。454 プライマーを用いてプールDNAを増幅し、PCR産物を精製し、Sequal標準化プレート (Invitrogen、カタログ番号A10510-01) を使用して標準化した。溶出液をゲル上で泳動して、各増幅産物のサイズ及び純度を確認した。精製したPCR産物を、454ピロシーケンシング施設 (University of Colorado Health Sciences Center in Aurora, CO) でシーケンスした。

【0282】

[00315] このプールからの配列データセットは8, 273個の全長配列 (すなわち、両方のプライマー配列を含むそうした配列) を含んでおり、そのうちの1, 629がユニークであった。これら1, 629ユニークな配列を使用して、配列セットにおいて、4-merから30-merまでのすべてのあり得るn-merを数えることによって、統計学的に有意なn-merパターンを見つけた。同定された各n-merの数を同じ組成のプールからランダムに予想される数と比較することによって、統計学的に有意なパターンが見つかった。この配列セット中で2つの主要なパターンを同定し、5169-4__1が、11個の配列で見つかった保存配列モチーフ「APGPAPGCACAPCP」によって定義された第2のパターン内に整列していることが分かった。このモチーフに対する、すべてのユニークな配列の検索 (同一性=0.75) によって、51個の配列が見つかり、次いで、これらをモチーフによって整列させた。図14に列挙するように、すべての配列について、アライメントの各位置での部分同一性 (fractional identity) を計算し、コンセンサス配列を示した。

【0283】

[00316] 配列トランケーション研究: 表6で示すように、50ヌクレオチドの5169-4クロンの5'末端及び3'末端からの体系的なトランケーションを行って、アプタマーのヒトPDGF-BBに対する完全な結合活性を保持するのに必要とされる最小の長さを定めた。これらのトランケーションに対する K_d 値を示す (P=ナフチルデオキシウリジン (Nap-dU); A、C、G及びTはデオキシリボヌクレオチド)。5169-4クロンは、トランケーションに非常に適していることが判明し、50-merと比較して向上した結合親和性 (それぞれ17 pM及び29 pM) でPDGF-BBに結合する21ヌクレオチド配列を同定した (5169-4__26)。5169-4__26の21-merは、50-merの9個のNap-dU修飾ヌクレオチドと対比して、5つのNap-dU修飾ヌクレオチドを含んでいた。

【0284】

[00317] 5169-4__26 (21-mer) におけるC3スぺーサー単一置換: Nap-dU PDGF-BBアプタマーのSELEX修飾後の第1ラウンドは、21-merの5169-4__26のすべての位置でのC3スぺーサーウォークを含んでいた。C3スぺーサーウォークは、完全に除去できる可能性があり、C3スぺーサーまたは他のリンカー、例えばヘキサエチレングリコール (Heg) またはポリエチレングリコール (PEG) リンカーで置き換えることができる、高親和性結合に必要とされない塩基を同定することを意図する。C3スぺーサー置換についての結果を表7に示す。この表では、「P」はNap-dUを示し、「C3」はC3スぺーサーを示し; A、C及びGはデオキシリボヌクレオチドを示し、「NB」は100 nM PDGF-BBまで結合がないことを示す。以下の3部位は、わずかな結合親和性の低下でC3置換を許容した: C1、G6及びC7 (以下に示すように、番号付けは21-merを参照する)。1つの位置、C15は、5169-4__26と比較して結合親和性に影響を及ぼさずに、C3スぺーサー置換を許容した。

【0285】

[00318] 5169-4__26 (21-mer) における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することができる位置を同定するために、すべて

の天然塩基において 2' オーメチル置換を行った。本発明者らの実験室で合成した 2' オーメチル Nap ホスホラミダイト (Nap-mU) を用いて、Nap-mU 単一置換を許容すると思われる Nap-dU の位置も評価した。加えて、各 Nap-dU の重要性を評価するために、デオキシチミジン (T) で Nap-dU を置換した。結合親和性の結果を表 8 に示し、これは、すべての位置が様々な程度に 2' オーメチル置換を許容したことを示す。各デオキシチミジンの位置 (C) での 2' オーメチル置換の影響は、結合親和性の 2 倍の低下までの 5169-4__26 と比較して、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 (G) は、2' オーメチルで置換した場合、5169-4__26 と比較して、G14 における 5.5 倍の結合親和性の増大から G10 における 5.5 倍の結合親和性の低下まで変動する結果を示した。6 つのデオキシアデノシン位置 (A) における 2' オーメチル置換は、結合親和性に対して 0 から 50 倍を超える悪影響があった。2' オーメチル置換に最も感受性である 3 つは、アプタマーの 5' 末端に向かうデオキシアデノシン (A3、A5 及び A8) であった。位置 21 の Nap-dU のみ、結合親和性に影響を及ぼさずに Nap-mU 置換を完全に許容したが、位置 11 の Nap-mU 置換は、5169-4__26 と比較して、2.5 倍の結合親和性の低下を示した。残りの Nap-mU 置換は、15 から 30 倍の結合親和性の低下をもたらした。(100 nM までの PDGF-BB の濃度で) 結合を完全に排除した唯一の置換は、位置 12 及び 21 でのデオキシチミジン置換であり、残りのデオキシチミジン置換は、結合親和性に対して著しい負の効果 (400 倍超) があった。表 8 では、P=5-ナフタレン修飾 dU であり、上付きの 1 は 2' -オーメチル修飾ヌクレオシドを示す。A、C、G 及び 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 100 nM PDGF-BB まで結合がないことを示す。

【0286】

[00319] 5169-4__26 (21-mer) における複数の 2' -オーメチル置換。5169-4__26 における 2' -オーメチル置換の組合せ効果は、変異体 5169-4__146 を含めた、結合親和性が向上したいくつかの変異体の同定につながる。この 21-mer は 2' オーメチルによってヌクレアーゼ保護された 11 の位置を有し、その結合親和性は親トランケート体、5169-4__26 よりも少なくとも 20 倍大きい (それぞれ 0.60 pM 対 17 pM)。多くの他の変異体も、3 から 10 個の 2' オーメチルの組み合わせにより、著しい結合親和性の向上 (約 3 倍) を有していた。表 9 では、P=5-ナフタレン修飾 dU であり、上付きの 1 は 2' -オーメチル修飾ヌクレオシドを示し、A、C 及び G は天然に存在するデオキシリボヌクレオチドを表し、「NB」は 3.2 nM の PDGF-BB まで結合がないことを示す。

【実施例 6】

【0287】

PDGF Nap-dU アプタマーの活性アッセイ

[00320] PDGF R β の活性化に対する PDGF Nap-dU アプタマーの阻害的影響を解析するために、実施例 4 に記載されるように細胞性リン酸化阻害アッセイを行った。試験した 4 つのアプタマー配列は、以下の IC₅₀ 値で PDGF R β の活性化を阻害した：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。

【実施例 7】

【0288】

VEGF アプタマーの選択及び配列

[00321] 候補混合物の調製： ビオチン標識された ssDNA 鋳型にアニールした DNA プライマーのポリメラーゼ伸長によって、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を調製した。

【0289】

[00322] VEGF SELEX の条件： 組換えヒト VEGF-121 タンパク質

に対するアプタマー（両方とも R&D Systems 製）は、Nap-dU で dT を置換した 40 スクレオチドのランダム領域を含むライブラリーから、記載されているように（Gold et al. (2010) PLoS One 5:e15004）Soma Logic Inc. によって選択された。VEGF-121 に対して、フォワードプライマーは 5'-GCCACACCTGCCCCCTC-3' であり、リバープライマーは 5'-GAGGACACAGACAGACAC-3' であった。VEGF-121 タンパク質をビオチン標識し、ストレプトアビジン MyOne-SA (Dyna1) ビーズ上に分割した。動力的負荷を使用して低解離速度を有するアプタマーの優先的な選択を達成し、ここでは、逐次的なラウンドにおいて、インキュベーション時間を延ばし、タンパク質濃度を低下させて、タンパク質-DNA 複合体を 10 mM デキストラン硫酸の存在下で 37℃ でインキュベートした。VEGF-121 SELEX では、ラウンド 4 及び 5 は、15 分の動力的負荷を含むが、ラウンド 6 及び 7（最終ラウンド）は 30 分の動力的負荷を含んでいた。

【0290】

[00323] 血管内皮増殖因子、VEGF-121 の最小の選択的スプライシング型は、SELEX にとって難しいタンパク質標的である。本発明者らは、天然に存在する DNA または RNA のライブラリーまたはリボースの 2' 位で修飾された核酸ライブラリーを用いて、わずかな程度の親和性度の向上さえも以前に得ることができなかった。これは、2つの理由で注目すべきことである。第1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 α 原子について 1.9 Å の平均二乗偏差で、PDGF-BB に対して最も高い構造的類似性を有する（Muller et al., 1997）。第2に、より大きく、最も広く認められる VEGF アイソフォーム、VEGF-165 は、SELEX の優れた標的であることが証明されている。例えば、（黄斑変性症治療のために）今までに規制当局の承認を受けた唯一のアプタマーベースの治療剤であるペガプタニブ（Macugen）は、ヘパリン結合性のエクソン 7 にコードされるドメイン（VEGF-121 で欠けている）を介して VEGF-165 のみに結合する（Lee et al., 2005; Ruckman et al., 1998）。VEGF-121、VEGF-165 と PDGF-BB の間の 1 つの相違点は全体の電荷であり、それぞれ 5.8、8.5 及び 10.1 という pI 値を有する。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 VEGF-121 に対する親和性強化は、SELEX Nap-dU ライブラリーで最終的に達成された。

【0291】

[00324] VEGF-121 Nap-dU アプタマー配列の同定： 上記のように行った Nap-dU SELEX 実験から、単一の位置が異なる非常に関連した 2 つの高親和性変異体（4867-15 及び 4867-31）を同定した。クローン 4867-31 は、一連の欠損実験で 29-mer にランケートされていた（表 7）。単一のヌクレオチドの違いは最小配列の 5' 境界の外側であるので、両方の高親和性クローン（4867-15 及び 4867-31）のランケーションが、同じ 29-mer をもたらすことは注目すべきである。高親和性結合を有するより短い配列を含むランケート変異体、すなわち 29-mer の 4867-31_143（5'-CCGPP CAAGP GCP PG PAGGA PPPAA APGG-3'；「P」は Nap-dU の一文字記号である）及びそれに近い変異体は、0.1~1 nM に及ぶ互角の親和性で、ヒト VEGF-121、ヒト VEGF-165、マウス VEGF-120 及びラット VEGF-164 に結合する（表 10）。この表では、「P」は Nap-dU を示し；A、C 及び G は天然に存在するデオキシリボヌクレオチドを示し、「NB」は 100 nM の VEGF まで結合がないことを示す。

【0292】

[00325] 4867-15_2（50-mer）における C3 スペーサー単一置換。VEGF-121 アプタマーの SELEX 修飾後の第 1 ラウンドは、50 mer の 4867-15_2（ランケートされた 50-mer）のすべての位置での C3 スペーサーウ

ォークであった。C 3 スペーサーウォークは、完全に除去できる可能性があり、C 3 スペーサーまたは他のリンカー、例えば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) リンカーで置き換えることができる、高親和性結合に必要とされない塩基を同定することを意図する。C 3 スペーサー置換についての結果を表 1 1 に示す。この表では、「P」はN a p - d Uを示し、「V」はC 3 スペーサーを示し；A、C 及びGは、天然に存在するデオキシリボヌクレオチドを示し、「NB」は1 0 0 n MのV E G Fまで結合がないことを示す。以下の少なくとも3つの内部部位はC 3 置換を許容した：C 1 7、G 2 6 及びG 2 9 (以下に示すように、番号付けは5 0 - m e rを参照する)。

【0 2 9 3】

[00326] 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。2' - O - メチル置換を、このヌクレアーゼ抵抗性置換を許容することができる位置を同定するために、天然塩基において行った。加えて、各N a p - d Uの重要性を評価するために、2' - O M e - ウリジン (2' - O M e U) でN a p - d Uを置換した。加えて、次に、この3 2 m e rに関して、押し出された塩基であると仮定されたある内部位置でC 3 スペーサーを試験した。内部欠損及び代替塩基も、3つの位置のそれぞれで試験した。選択したS O M A m e r (2 0 n Mの単一濃度) についての結合親和性及び細胞培養阻害データを以下に示す。結果を表 1 2 に示し、これは、C 8 (表 1 1 のC 1 7) は、より短いランケットにおいてC 3 への置換を完全に許容しなかったことを示す。他の2つの推定上の押し出された塩基 (G 1 7 及びG 2 0) は、この文脈におけるC 3 または代替塩基置換として、優れた結合及び機能活性を保持する。それらの位置での内部欠損は許容されなかった。この実験では、N a p - d U修飾のどれも2' - O M e - Uで置き換えることができなかった。しかし、いくつかの内部部位は2' - O M e 修飾を許容した。表 1 2 では、P = 5 - ナフタレン修飾d Uであり、上付きの1 は2' - O M e 修飾ヌクレオシドを示し、V = 3 炭素スペーサーであり、空のボックスはヌクレオシド欠損を示す。A、C、G 及びUは天然に存在するデオキシリボヌクレオチドを表す。

【0 2 9 4】

[00327] 4 8 6 7 - 3 1 _ 1 4 3 (2 9 - m e r) における2' - O - メチルN a p - d U置換及び複数の2' - O - メチル置換。本発明者らの実験室で合成した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、N a p - m U単一置換を許容すると思われるN a p - d Uの位置を評価した。加えて、各天然塩基において、2' - O M e とC 3 リンカー置換の組み合わせを試験した。選択したS O M A m e r (2 0 n Mの単一濃度) についての結合親和性及び細胞培養阻害データを以下に示す。以下の表 1 3 で示すように、N a p - d U残基の大部分はO M e 置換を許容しなかったが、位置2 2 でのN a p - d Uに対するN a p - m Uの置換は、親和性を1 0 倍増大させ、優れた阻害活性を与えた。この表では、上付きの「1」は2' - O - メチル置換を示し、「V」はC 3 スペーサーを示す。2' - O M e の組み合わせは、親和性に基づいて大部分は許容性に優れるが、ある種の組み合わせは著しい阻害活性の低下を示した。

【0 2 9 5】

[00328] 2' - O - メチルとC 3 置換の組合せ効果によって、変異体4 8 6 7 - 3 1 _ 1 8 8 を含めた、結合親和性が向上したいくつかの変異体が同定された。この2 9 - m e r は、2' - O M e またはC 3 のいずれかによってヌクレアーゼ保護された1 0 個の位置を有し、その結合親和性は、親ランケット体、4 8 6 7 - 3 1 _ 1 4 3 よりも約3 倍密接である (それぞれ3 8 p M対1 4 0 p M)。変異体4 8 6 7 - 3 1 _ 1 8 8 は、親S O M A m e rと比較して、互角の細胞性阻害活性を保持する。表 1 3 を参照されたい。

【0 2 9 6】

[00329] N a p - m Uを許容した唯一の位置はヌクレオチド2 2 (親配列として4 8 6 7 - 3 1 _ 1 4 3 ランケット体を使用) であった。このN a p - m U置換は、次に、最もよく組み合わせられた2' - O M e S O M A m e r、4 8 6 7 - 3 1 _ 1 8 8 のバックグラウンドに入れられた。加えて、ヌクレアーゼ保護された塩基が分子に強剛性を与え

10

20

30

40

50

、それによって結合が増大し得るという可能性を検討するために、位置15でのC3スパーサーとの元のdGの置換をその位置での2'-OMe置換と比較した。最もよい集計結果は、親の29-merトランケート変異体4867-31_143と比較して今や9個の保護された位置を有する変異体、4867-31_192で得られた（以下の表14を参照されたい；上付きの「1」は2'-O-メチル置換を示し、「V」はC3スパーサーを示す）。

【0297】

〔00330〕 修飾ヌクレオチドの構造活性相関及び親和性成熟： 10個のナフチル側鎖のそれぞれの、結合に対する寄与を検討するために、修飾dUホスホラミダイトの特注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って、別の一連の体系的な点置換を行った。この目的のために、サイズ、極性、H結合のドナー及びアクセプターの配置、リンカーの長さ及び5位置換基の配向を変えることによって各位置の微小環境を探ることが可能になるライブラリーを設計した。この解析のための官能基を選択する際に、元の修飾（この場合ナフチル基）、（トリプトファン及びチロシンのような）抗体の相補性決定領域（CDR）で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）、及び小分子薬物の「プリビレッジ」断片（17）というテーマに基づいて変異を含むことを目的とした。図15は、 K_d 値の比（置換／無置換）として表される、これらの置換の結果を示す。10個のNap-dUの位置のそれぞれを試験した17個の異なる修飾置換のうち、4つの置換（Trp-dU27、NE-dU16、MBn-dU10及びBT-dU16）だけが、ほとんどまたは全く結合親和性の影響がなかった。すべての他の置換は、様々な程度に結合親和性を弱くした。

【0298】

〔00331〕 VEGF SELEXプールのディープシーケンシング： 4149-8_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に、454ピロシーケンシング技術を使用して、富化されたプールをシーケンスした。454プライマーを用いてプールDNAを増幅し、PCR産物を精製し、Sequal標準化プレート（Invitrogen、カタログ番号A10510-01）を使用して標準化した。溶出液をゲル上で泳動して、各増幅産物のサイズ及び純度を確認した。精製したPCR産物を、454ピロシーケンシング施設（University of Colorado Health Sciences Center in Aurora, CO）でシーケンスした。

【0299】

〔00332〕 CLUSTAL解析によって454シーケンスを4867-31と整列させた。プールからの配列データセットは、13, 139個の全長配列（すなわち、両方のプライマー配列を含むそうした配列）を含んでおり、そのうちの2, 235個がユニークであった。これら2, 235個のユニークな配列を、モチーフ5'-CCGPP CAAGP GCPPG PAGGA PPPAA APGG-3'について検索した。このモチーフを含む86個の配列が見つかった。図16に列挙するように、すべての配列について、各位置での4867-31との同一性パーセンテージを計算した。

【実施例8】

【0300】

VEGFの結合親和性アッセイ

〔00333〕 標的結合親和性を決定するために、T4ポリヌクレオチドキナーゼ（New England Biolabs）及び γ - ^{32} P-ATP（Perkin Elmer）を使用して、SOMAmerを5'末端標識した。結合アッセイは、約0.03～0.05nMの濃度の放射標識されたSOMAmer（約20,000c.p.m）及び 10^{-7} から 10^{-12} Mに及ぶ濃度の標的タンパク質を、1XSB18Tバッファー（40mM HEPES, pH7.5; 120mM NaCl; 5mM KCl; 5mM MgCl₂及び0.01%TWEEN-20）中で、37℃で30分間インキュベートす

ることによって行った。結合した複合体を、Zorbax樹脂と混合し、Duraporeフィルタープレートで捕獲した。結合したSOMAmerの画分をPhosphorImager (FUJIFILM FLA-3000) で定量化した。生の結合データをZorbax樹脂への放射標識されたSOMAmerの非特異的なバックグラウンド結合に対して補正した。平衡解離定数 (K_d) を以前に記載されたように (Jellinek et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11227) 決定した。

【実施例9】

【0301】

VEGFの活性アッセイ

10

[00334] VEGFの-R2 (血管内皮増殖因子受容体2) の細胞性キナーゼ活性に対するVEGF121 SOMAmerの阻害的影響を解析するために、内生的に高レベルのVEGF R2を発現するヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUV EC) (Lonza、#CC-2519) を使用した。HUV EC細胞を、2% FBS、増殖因子 (hEGF、ヒドロコルチゾン、VEGF、HFGF-B、R3-IGF-1)、ヘパリン、アスコルビン酸及びGA-1000 (ゲンタマイシン、アンホテリシン-B) を含むEGM-2 Bullet Kit (#CC-3162) を補充したEGM-2 (内皮細胞増殖培地) に蒔いた。HUV EC細胞が70から80%コンフルエンスに達したら、この細胞を24ウェルプレートに蒔き (10^5 細胞/ウェル)、血清フリー培地で一晚飢餓させた。

【0302】

20

[00335] SOMAmer (20 nMの単一濃度またはある濃度範囲) を、1% BSAを含む20 ng/mL (1 nM) のVEGF-121 (R&D System、#4464-VS) を有する培養物に、37°Cで30分間加えた。細胞をPBS中で2回洗浄し、プレインキュベートしたVEGF-121/SOMAmer複合体で5分間刺激した。処理した細胞をPBSで2回再び洗浄し、Haltホスファターゼインヒビター (Thermo Scientific、#78428) を補充した氷冷の溶解バッファー (1% NP-40代替品、20 mM Tris (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 µg/mL アプロチニン及び10 µg/mL ロイペプチン) を加えた。ヒトホスホ-VEGF R2/KDRキット (R&D、DYC1766-2) を使用して、VEGF R2のリン酸化について細胞可溶化物を測定した。

30

【0303】

[00336] インビトロでの機能活性実験では、20 nMのスクリーニング濃度でのクローン4867-31の様々なトランケート変異体は、不死化したまたは初代のヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUV EC) においてVEGF-121またはVEGF-165 (1~4 nM) によって誘導されるVEGF R2のリン酸化を、本質的に完全に阻害することができる。VEGFアプタマー4867-31_43及び4867-31_192について、IC₅₀ 測定の代表的なプロットを図17に示し、それぞれ2.2 nM及び2.1 nMのIC₅₀ 値を有する。

【0304】

40

[00337] クローン4867-31の変異体の活性スクリーニングのために、単一濃度 (一般に20 nM) のSOMAmer変異体以外は上記と同じ条件下で、HUV ECにおけるVEGF誘導性VEGF R2リン酸化の阻害パーセントを評価した。

【実施例10】

【0305】

PDGF及びVEGFアプタマーのホモ二量体構築物

[00338] PDGF-BBとVEGFの両方とも、チロシンキナーゼ受容体を二量体させて受容体の自己リン酸化及びシグナル伝達を導くことによって生物学的効果を発揮する、ジスルフィド結合したホモ二量体である。PDGF-BBアプタマー4149-8_260の場合のように (結晶構造に基づく)、1つを超えるアプタマーがそのタンパク質

50

標的に結合することができる場合、そうしたアプタマーは、タンパク質への個々のアプタマーサブユニットの同時結合を可能にするように、多量体構築物において共有結合され得る。これは、結合活性効果を介して親和性の向上につながり得る。容易に利用可能な化学反応に基づいて、2つのタイプのホモ二量体を合成した。これらは、1) H e gあたり約20 Åの距離を与える0から6つのH e gリンカーによって結合した頭一尾のホモ二量体、及び2) それぞれの側で1つから3つのH e g (すなわち、二量体において2つ、4つまたは6つのH e g総数)と組み合わせられた、合成ダブラーサポートを介して結合した、3'-3'ホモ二量体。4149-8__379、5169-4__26及び4867-31__192のホモ二量体を競合結合アッセイで試験した。競合物の結合親和性の決定のために、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (New England Biolabs) 及び γ - ^{32} P-ATP (Perkin Elmer) を使用して、アプタマーリガンドを5'末端標識した。競合アッセイは、固定濃度の放射標識されたリガンド (1.0 nM) を様々な濃度の競合物のアプタマー (10^{-11} から 10^{-6} M) と前もって混合することによって行った。リガンドと競合物の希釈物を、標的タンパク質 (100 pM) とともに、1X SB18Tバッファー (40 mM HEPES、pH 7.5; 120 mM NaCl; 5 mM KCl; 5 mM MgCl₂ 及び0.01% TWEEN-20) 中で、37°Cで60分間インキュベートした。結合した複合体を、Zorbax樹脂と混合し、Duraporeフィルタープレートで捕獲した。結合したリガンドの画分をPhosphorImager (FUJIFILM FLA-3000) で定量化した。生の結合データを、競合物の添加なしの結合に対して標準化した。データをGraphPad Prism 3.0でプロットし、非線形回帰を使用して一部位競合曲線に当てはめて、競合物のアプタマー (K_i) について平衡解離定数を決定した。

PDGFホモ二量体：配列4149-8__379 (配列4149-8__438から4149-8__447まで) 及び5169-4__26 (配列5169-4__134から5169-4__143まで) のPDGFホモ二量体の構造を表15に示す。4149-8__379ベースのホモ二量体については、競合アッセイで得られた K_i 値によって、5'-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が示唆され、これは、H e gリンカーなしと比較して、5つのH e gリンカーで10倍を超える結合親和性の向上が測定された (それぞれ0.25 pM対4.2 pM) ためである。3'-3'結合した4149-8__379ホモ二量体では、より長い4つ及び6つのH e gリンカーも、リンカーなしより少なくとも10倍よく、2つのH e gリンカーよりも約2倍よく機能した。5169-4__26ベースのホモ二量体については、 K_i 値によって、より長いH e gリンカーは5'-3'の立体配置において有利であることが示され、これは、 K_i が、H e gリンカーなしについての28 pMから6つのH e gリンカーについての3.6 pMへ向上したからである。5'-3'の立体配置において、5つと6つのH e gリンカーについての K_i 値の違いはなかった。3'-3'結合した5169-4__26ベースのホモ二量体では、同じパターンが観察され、H e gリンカーの長さが伸びるに従って K_i が向上した。これら6つのH e gリンカーは、H e gリンカーなしと比較して5倍の K_i の向上を示した (それぞれ2.0 pM対1.1 pM)。表15及び16では、Z=ベンジルーデオキシウリジン (Bn-dU) であり、P=5-ナフタレン修飾dU (Nap-dU) であり、M=メチレンジオキシベンジルー-dU (MBn-dU) であり、上付きの1は2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを示し、上付なしはデオキシリボヌクレオチドを示し、「C3」は3炭素リンカーを示し、「H」はヘキサエチレングリコールリンカーを示す。

【実施例11】

【0306】

PDGF/VEGFヘテロ二量体アプタマー構築物

[00339] PDGFアプタマー4149-8及びVEGFアプタマー4867-31に基づくヘテロ二量体。

PDGF及びVEGFに対して特異性を有する構築物を開発することを目的として、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設計し、

試験した。試験した第1のアプタマー構築物は、PDGF変異体4149-8__273とVEGF 4867-31__183を組み合わせた。アプタマー構築物を頭一尾で合成し、両方の配向（5'末端にPDGFアプタマーまたは5'末端にVEGFアプタマーのいずれかを有する）で、0から3つのヘキサエチレングリコール（Heg）リンカーによって結合した。結果を以下の表17及び18に示す。表17では、「Z」はBn-dUを示し、「P」はNap-dUを示し、上付きの「1」は2'-O-メチル置換を示し、上付なしはデオキシリボヌクレオチドを示し、「V」はC3スペーサーを示し、「H」はヘキサエチレングリコール（Heg）リンカーを示す。表18では、残存活性パーセントは、対照（アプタマーなし）と比較した、20nMアプタマーの存在下でのHs27線維芽細胞における分画のPDGF-βRリン酸化レベルを示す。

10

【0307】

[00340] PDGF-BB、-AB、VEGF-121及びVEGF-165に対する結合親和性に基づく、アプタマー構築物4149-8__320は、この実験において最もよい結果をもたらすように思えた。表18で示すように、PDGF細胞性リン酸化アッセイでもアプタマー構築物を試験した。機能的アッセイのデータに基づく、試験したすべてのアプタマー構築物は、Hs27線維芽細胞において、PDGF-BB誘導性PDGF-βR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及び4149-8__320は、PDGF-BB誘導性PDGF-βRリン酸化を20nM未満のIC₅₀値で阻害した。アプタマー構築物4149-8__317及び4149-8__318は、約20nMのIC₅₀値を有していた。

20

【0308】

[00341] 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及びVEGFアプタマー4867-31__192を含む4149-8__401を合成した。表19を参照されたい。この表では、「Z」はBn-dUを示し、「P」はNap-dUを示し、MはMBn-dUを示し、上付きの「1」は2'-O-メチル置換を示し、上付なしはデオキシリボヌクレオチドを示し、「C3」はC3スペーサーを示し、「H」はヘキサエチレングリコール（Heg）リンカーを示す。アプタマー構築物4149-8__401は、その前駆体アプタマー構築物、4149-8__320と同等以上の、PDGF-BB及びVEGF121に対する結合親和性を示した。表20を参照されたい。

30

【0309】

[00342] アプタマー構築物4149-8__320及び4149-8__401は、Hs27線維芽細胞において、それぞれ約1nM及び5nMのIC₅₀値でPDGF-BB誘導性PDGF-Rβリン酸化を阻害した。さらに、20kDaまたは40kDaのPEGのいずれかにコンジュゲートした5'アミノリンカーを含むアプタマー構築物4149-8__401は、Hs27線維芽細胞において、約1nMのIC₅₀値でPDGF-BB誘導性PDGF-Rβリン酸化を阻害する能力を維持した。これらの結果は、アッセイにおけるすべてのPDGF（1nMの単量体）の化学量論的タイトレーション／阻害と一致する。

40

【0310】

[00343] アプタマー4149-8__379及び4867-31__192を含む別のセットのアプタマー構築物を試験して、全体的なリンカーの長さ並びにPDGF及びVEGFアプタマーの配向の影響を決定した。以下の表21を参照されたい。5'末端にVEGFを用いて、1つから6つのHegリンカーを試験した。5'末端にPDGFを用いて、3つのHegリンカーを有する4149-8__401を含めて、2つから6つのHegリンカーを試験した。1つのHegリンカー変異体は、関連した変異体である4149-8__318において、やや低減した結合を示したので、この配向で試験しなかった。結合データを表16に示す。PDGF-BBに対してやや弱い親和性を示した4149-8__408及び4149-8__409を除いて、アプタマー構築物の大部分はよく機能した。

50

比較のために、O p h t h o t e c hのアプタマーE10030 (F o v i s t a) の結合親和性を含める。

【0311】

〔00344〕 アプタマー構築物4149-8__401がインビトロでPDGF及びVEGFの両方の活性を阻害する能力を、上記の受容体リン酸化実験で試験した。アプタマー構築物4149-8__401は、PDGF単量体4149-8__379のものに匹敵する効力で（それぞれ2.4 nM及び1.7 nMのIC₅₀値）、Hs27線維芽細胞においてPDGF誘導性PDGFRβリン酸化を阻害した。同様に、アプタマー構築物4149-8__401は、VEGF単量体4867-31__192のものに匹敵する効力で（それぞれ0.7 nM及び2.1 nMのIC₅₀値）、HUVEC細胞においてVEGF誘導性VEGFR2リン酸化を阻害した。図18は、この実験の結果を示す。図18Aは、（A）PDGFアプタマー4149-8__379（白丸）及びPDGF/VEGFアプタマー構築物4149-8__401（黒丸）を用いた、Hs27線維芽細胞におけるPDGF誘導性PDGFRβリン酸化の阻害、並びに（B）VEGFアプタマー4867-31__192（白丸）及びPDGF/VEGFアプタマー構築物4149-8__401（黒丸）を用いた、HUVECにおけるVEGF誘導性VEGFR2リン酸化の阻害を示す。

【0312】

〔00345〕 PDGFアプタマー5169-4及びVEGFアプタマー4867-31に基づくヘテロ二量体。

PDGFアプタマー5169-4__26及びVEGFアプタマー4867-31__192の変異体に基づくさらなるヘテロ二量体構築物を設計し、試験した。アプタマー構築物を頭一尾で合成し、両方の配向（5'末端にPDGFアプタマーまたは5'末端にVEGFアプタマーのいずれかを有する）で、1つから6つのヘキサエチレングリコール（Heg）リンカーによって結合した。表22に結果を示す。5'末端にVEGFを用いると、3つから6つの間のHegリンカーが最も高い親和性をもたらした。VEGF-121アプタマー配列が3'末端にある時は一般に親和性はわずかに低く、56 pMのK_dを有していた5つのHegリンカー配列を除いて、大部分のK_d値は100~300 pMの範囲に入った。5'末端にPDGFを用いると、K_d値は、3つのHegリンカーに対する11 pMから4つのHegリンカーに対する0.54 pMまでに及び、残りのK_d値は、すべての他のHegリンカーの長さの間に入った。PDGFが3'末端にある場合は、リンカーの長さが伸びるに従って、より高い結合親和性に向かうトレンドがあり、1つのHegリンカーは5.3 pMのK_dを有し、6つのHegリンカーは0.20 pMのK_dを有していた。表22では、「P」はN a p - d Uを示し、上付きの「1」は2'-O-メチル置換を示し、上付なしはデオキシリボヌクレオチドを示し、「H」はヘキサエチレングリコール（Heg）リンカーを示す。

【実施例12】

【0313】

VEGF及びPDGFへのPDGF/VEGFアプタマー構築物の同時結合

〔00346〕 PDGF/VEGFアプタマー構築物が同時にVEGF及びPDGFに結合する能力を実証するために、サンドイッチアッセイを開発した。手短に言えば、Nunc Maxisorp（登録商標）プレートをヒトPDGF-BBまたはヒトVEGF-121（20 ng/mL）のいずれかでコーティングした。1% BSA溶液でウェルをブロッキングしてから、PDGF/VEGFアプタマー構築物を加え（10 nM）、吸着したタンパク質標的に結合させた。洗浄してから、ビオチン標識された相補的タンパク質（VEGF-121をコーティングしたプレートに対して2 nMのPDGF-BB及びPDGF-BBをコーティングしたプレートに対して2 nMのVEGF-121またはVEGF-165）を結合させて、3元複合体を形成した。さらに洗浄してから、西洋ワサビペルオキシダーゼをコンジュゲートしたストレプトアビジン（HRP-SA）を加えて、4元複合体を形成させた。最終的な洗浄の後、製造業者の指示に従って（Thermo Scientific TMB基質キット34021）発色性の西洋ワサビペルオキシダー

ゼ基質を加え、適切な時に1.6M H_2SO_4 を添加して反応を停止した。ウェルあたりの450nmでの吸光度を、Spectramax M5プレートリーダーを用いて自動検査(auto check on)で測定した。上記の方法と並行して、4元複合体を構成する4成分のうちの1つを除いた、一連の4つの対照実験を行った。

【0314】

[00347] 図19で示すように、PDGF/VEGFアプタマー構築物SL1012(20kDa PEG-N-4149-8_401)は、ヒトVEGF-121及びPDGF-BBに同時に結合することができた。4元複合体のすべての成分が加えられた(完全)場合に強いシグナルが観察されたが、4成分のうちのいずれか1つを欠くと、バックグラウンドまたはバックグラウンド近くのシグナルになった。PDGFをコーティングしたプレート及びVEGFをコーティングしたプレートで同様の結果が得られ、これは、アプタマー構築物へのタンパク質添加の順序は問題とならなかったことを示す。図19で示すように、SL1012はヒトVEGF-165及びPDGF-BBに同時に結合することができた。図19Aは、ビオチン標識PDGFを加えた、VEGFでコーティングされたマイクロタイタープレートを示す。図19Bは、ビオチン標識VEGFを加えた、PDGFでコーティング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)として示す。4元複合体のすべての成分が加えられた(完全)場合に強いシグナルが観察されたが、成分のうちのいずれかを除くと、バックグラウンドまたはバックグラウンド近くのシグナルになった。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も示す。

【0315】

[00348] (A) SL1012または及び(B) SL1013(40kDaのPEG-N-4149-8-401)へのヒトVEGF-165及びヒトPDGF-BBの同時結合を図20に示す。マイクロタイタープレートを、ビオチン標識VEGFを加えてPDGFでコーティングした。完全は、4元複合体のすべての成分の添加を意味し、4成分のうちの1つがない各条件をグラフに示す。データは、平均+95%信頼区間(n=3)として示す。

【0316】

[00349] PEG部分を含まない様々なアプタマー構築物を用いて、同様の実験を行った。先の結果によって、シグナルを生成するのに複合体の他の成分が必要であることが示されたので、この実験では、アプタマーなしの対照のみを含む。図21で示すように、アプタマー構築物4149-8_317、4149-8_318、4149-8_320、4149-8_401及び4149-8_414は、タンパク質添加の順序にかかわらず、PDGFとVEGFに同時に結合した。図21(A)は、ビオチン標識PDGFを加えた、VEGFでコーティング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PDGFを加えた、PDGFでコーティング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及びVEGFアプタマー4867-31の変異体に基づくヘテロ二量体構築物の同時結合に関するデータを加える。

【実施例13】

【0317】

硝子体内薬物動態研究

[00350] アプタマー及びアプタマー構築物が眼の中でどのように挙動するかを理解するために、最初の眼薬物動態試験を行った。表23で示すように、4つのアプタマー及びアプタマー構築物を試験した。

【0318】

[00351] 各アプタマーまたはアプタマー構築物について、5匹のニュージーランドホワイトウサギの両眼(10個の眼)に単回の硝子体内注射を行った。0.5mg/眼の用量(SL1010及びSL1011)または1.0mg/眼の用量(SL1012及びSL1013)のいずれかを動物に与えた。これらの用量は、アプタマーまたはアプタマ

一構築物の重量のみに相当する（PEGの重量は計算から除外した）。すべての試験物は、リン酸緩衝食塩水に製剤化した。各アプタマーまたはアプタマー構築物の試験物について、投与後2、24、48、96または192時間目に1動物の両眼から硝子体液試料を収集した。硝子体液試料は、アッセイするまで凍結保存した。

【0319】

〔00352〕 アプタマーまたはアプタマー構築物の硝子体液濃度を、260ナノメートル（nm）の吸光度による検出で、超高速液体クロマトグラフィー（UPLC）アッセイ法によって測定した。手短に言えば、硝子体ヒドロゲルを、20ゲージの針を数回通過させることによって剪断した。2倍量の2-エトキシエタノールを添加することによって、硝子体タンパク質を沈殿させた。遠心分離に続いて、上清を回収し、Acquity（登録商標）C18カラム（0.2×100mm）に注入した。カラム温度は80℃であり、流速は0.2mL/分で維持した。バッファーAは、TEAA pH7.0及び5%アセトニトリルから成っていた。バッファーBは、100%アセトニトリルから成っていた。プログラムは試料注入後1分間50%バッファーBを保持し、次いで、バッファーBを4分にわたり直線的に70%まで増大させた。260nmの吸光度によって検出した。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よって得られたものに対して未知試料のピーク吸光度ユニットを補間することによって、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）を決定した。

【0320】

〔00353〕 この実験の結果を表24に示す。

【0321】

〔00354〕 硝子体濃度対時間の自然対数の通常の線形回帰当てはめにより、SL1010、SL1011、SL1012及びSL1013についてそれぞれ105、47、69及び92時間の硝子体半減期が推定された。表25は、結果を95%信頼区間とともに示す。

【0322】

〔00355〕 これらの硝子体半減期は、同様のサイズの治療的VEGFインヒビター、例えば、Macugen（83時間、Eyetechnology Study Group（2002）Retina 22:143）及びLucentis（70時間、Gaudreau et al.（2007）Retina 27:1260）のNZWウサギにおける半減期に引けを取らない。したがって、これらのアプタマー及びアプタマー構築物は、AMD及び糖尿病性網膜症などの眼部疾患の治療に有用であり得る。

【実施例14】

【0323】

材料及び方法

〔00356〕 本実施例は、続行する実施例で使用される一般的な方法及び材料の概要を提供する。

〔00357〕 質量分析（LCMS）に連結した液体クロマトグラフィーによるヌクレアーゼ感受性部位の決定： DNase Iによる消化のために、ポリアクリルアミドゲル精製したアプタマー（500nMの終濃度）を、150μLの全反応量で、ヌクレアーゼバッファー（510mM Tris HCl pH7.6、2.5mM MgCl₂、0.5mM CaCl₂）において37℃で、組換えヒトDNase I（Cell Sciences、カタログ番号CSI10719）（4149-8-379に対して0.3ユニット及び5169-4-146に対して3ユニット）とともにインキュベートした。0、30及び60分にアリコート（50μL）を収集し、95℃で5分間インキュベートして反応を終了した。DNase IIでの消化のために、500nMのゲル精製されたアプタマーを、150μLの全反応量で、ヌクレアーゼバッファー（100mM酢酸ナトリウムpH4.6、2mM MgCl₂、15mM NaCl）において37℃で、ブタDNase II（Worthington Biochemical Corporation）（4867-31-192に対して18ユニット、4149-8-379に対し

て1ユニット)とともにインキュベートした。アリコートを集し、上記のように反応を停止した。4867-31_192及び4149-8_379の5'-アミンを含むバージョン及び5169-4_146の5'-OHを含むバージョンをこれらの実験に利用した。

【0324】

〔00358〕ヌクレアーゼ消化に続いて、全長及びアプタマー断片を液体クロマトグラフィーによって分離し、紫外吸光度及び質量分析(LCMS)で検出した。手短に言えば、真空脱ガス装置(型番G1322A)、オートサンプラー(型番G1313A)、バイナリーポンプモジュール(型番G1312A)、温度コントロールを有するカラムマネージャー(型番G1316A)及び可変波長検出器(型番G1314A)を備えた、Br 10
uker Esquire 3000イオントラップ質量分析計に連結されたAgilent 1100 HPLCから成るLCMSシステムで試料を解析した。LCMSの実施は、Agilent Chemstation(登録商標)ソフトウェア(バージョンB.01.03)を用いて行った。クロマトグラフィーは、Hamilton PRP-3、2.1×150mmカラムを使用して80℃で行った。移動相Aは、10mMピペリジン及び10mMイミダゾール、pH約10(調整されていない)を含んでおり;移動相Bは、75/25のアセトニトリル/水中に10mMピペリジン及び10mMイミダゾールを含んでいた。流速は0.25mL/分であり、傾斜容出は0~1分:0%B;1~20分:0~53%Bであった。試料(20µL)を注入し、吸光度を254nmで測定した。典型的な質量分析検出のソース条件は以下のものであった:負イオンエレクトロスプレ 20
イオン化モード、50psiでのネブライザー圧力、7L/分での乾燥ガス、ソース温度を325℃に設定、及びキャピラリー電圧を3000Vに設定。トラップ条件は、スキャン範囲200から2200m/z、蓄積時間50ミリ秒、トラップドライブ92、平均化25スペクトルであった。

【0325】

〔00359〕Daltonics DataAnalysis(登録商標)2.0を使用してデータを処理した。TICにおいて観察されたピークの全域にわたって合計し、Svitsky-Golayアルゴリズム(スムージング幅=0.8m/z、サイクル=2)を使用してスムージングすることによって、マススペクトルを得た。Daltonics 30
ソフトウェア内のアルゴリズムを使用して、スペクトルをデコンヴォリューションした。パラメーターは、2000~30000Daの間の質量範囲、10%の存在量カットオフ(abundance cutoff)、3の成分の最小ピーク(minimum peaks in component of 3)及び0.05%の分子量の一致(molecular weight agreement)を含んでいた。

【0326】

〔00360〕DNase Iのアプタマー安定性アッセイ: 250nMの終濃度のポリアクリルアミドゲル精製アプタマーを、100µLの全反応量で、ヌクレアーゼバッファー(10mM Tris HCl pH7.6、2.5mM MgCl₂、0.5mM CaCl₂)において37℃で、2または10ユニット/mLの組換えヒトDNase I(Cell Sciences、カタログ番号CSI10719)とともにインキュ 40
ベートした。様々な時間で、20µLのアリコートを集し、等量の2×ゲルローディングバッファー(93.85%ホルムアミド、0.03%SDS、20mM Na₂EDTA、0.01%キシレンシラノール及び0.01%オレンジG)を加えて反応を停止し、95℃で2分間加熱した。試料を15%TBEポリアクリルアミド変性ゲル(8M尿素)にロードし、200Vで20分間電気泳動を行った。約2µMのSYBR(登録商標)Gold(Molecular Probes、カタログ番号S11494)で10分間ゲルを染色して、バンドを可視化した。FlourChem(登録商標)Q解析ソフトウェア(Alpha Innotech)を使用して、各時点での残存全長アプタマーの量を定量化した。必要に応じて、バックグラウンド除去の後に各バンドの強度を測定し、データを、0時点での全長投入DNAの残存パーセンテージとして示す。5'末端アミンを持つ 50

アプタマー 4149-8_379を除いて、5'末端にヒドロキシルを有するアプタマーをこれらの実験に利用した。

【0327】

[00361] DNase IIのアプタマー安定性アッセイ： 250 nMの終濃度のポリアクリルアミドゲル精製アプタマーを、100 μ Lの全反応量で、ヌクレアーゼバッファー (0.1 M NaOAc pH4.6、2.0 mM MgCl₂、15 mM NaCl) において37℃で、120ユニット/mLまたは240ユニット/mLのブタDNase II (Worthington Biochemical Corporation) とともにインキュベートした。様々な時間で、20 μ Lのアリコートを集集し、等量の2×ゲルローディングバッファー (93.85%ホルムアミド、0.03% SDS、20 mM Na₂EDTA、0.01%キシレンシラノール及び0.01%オレンジG) を加えて反応を停止し、95℃で2分間加熱した。試料を15%TBEポリアクリルアミド変性ゲル (8 M尿素) にロードし、200 Vで20分間電気泳動を行った。約2 μ MのSYBR (登録商標) Gold (Molecular Probes、カタログ番号S11494) で10分間ゲルを染色して、バンドを可視化した。FlourChem (登録商標) Q解析ソフトウェア (Alpha Innotech) を使用して、各時点での残存全長SOMAmerの量を、定量化した。必要に応じて、バックグラウンド除去後に各バンドの強度を測定し、データを、0時点での全長投入DNAの残存パーセンテージとして示す。5'末端アミンを持つアプタマー 4149-8_379を除いて、5'末端にヒドロキシルを有するアプタマーをこれらの実験に利用した。

【0328】

[00362] ウサギ硝子体液におけるSOMAmer安定性アッセイ： ニュージージーランドホワイトウサギ由来の90%のプールされた硝子体液 (Bioreclamation LLC、カタログ番号RAB-VITHUM中で、500 nMの終濃度のポリアクリルアミドゲル精製アプタマーをインキュベートした。試料を、200 μ Lの全反応量で、37℃でインキュベートした (試料は、0.067%の終濃度のリン酸緩衝食塩水も含んでいた)。様々な時点で、20 μ Lのアリコートを集集し、等量の2×ゲルローディングバッファー (93.85%ホルムアミド、0.03% SDS、20 mM Na₂EDTA、0.01%キシレンシラノール及び0.01%オレンジG) を加えて、反応を停止した。処理するまで試料を-20℃で貯蔵した。各試料に100 μ Lの水を加え、続いて、150 μ Lの25:24:1フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (AMRESCO) を加えた。試料を混合し、16,100×gで15分間遠心分離した。水相を集集し、ゲル解析まで-20℃で凍結した。試料 (15 μ L) を15%TBEポリアクリルアミド変性ゲル (8 M尿素) にロードし、電気泳動を約20分間200 Vで行った。約2 μ MのSYBR (登録商標) Gold (Molecular Probes、カタログ番号S11494) で10分間ゲルを染色して、バンドを可視化した。FlourChem (登録商標) Q解析ソフトウェア (Alpha Innotech) を使用して、各時点での残存全長SOMAmerの量を定量化した。必要に応じて、バックグラウンド除去後に各バンドの強度を測定し、データを、0時点での全長投入DNAの残存パーセンテージとして示す。

【0329】

[00363] 競合結合アッセイ法： T4ポリヌクレオチドキナーゼ (New England Biolabs) 及び γ -[³²P] ATP (Perkin Elmer) を使用して、競合結合アッセイでリガンドとして使用されるアプタマーを5'末端標識した。非標識競合物 (10⁻⁶ から10⁻¹¹ Mに及ぶ濃度) と等量の2 nMのリガンドとを1×SB18Tバッファー [40 mM Hepes (pH7.5)、120 mM NaCl、5 mM KCl、5 mM MgCl₂ 及び0.01% TWEEN-20] 中で混ぜることによって、競合アッセイを行った。1×SB18Tバッファーに入れた200 pMの濃度のヒトPDGF-BB (Creative Biomart) をリガンド/競合物の混合物に加え、反応物を37℃で40分間インキュベートした。結合した複合体を、Z o

rbax（登録商標）樹脂（Agilent Technologies）と混合し、Durapore（登録商標）フィルタープレートで捕獲した。各ウェルのシグナルをPhosphorImager（FUJIFL A-3000）で定量化した。生の結合データをバックグラウンドシグナルに対して補正し、競合物なしに関する結合画分に対して標準化した。阻害定数（ K_i ）を決定するために、GraphPad Prism（登録商標）6でデータをプロットし、一部位競合曲線に当てはめた。

【実施例15】

【0330】

ヌクレアーゼ安定性が向上したVEGFアプタマー

〔00364〕 本実施例は、アプタマーのヌクレアーゼ安定性を向上する、VEGFアプタマーに適用される化学修飾を提供する。本実施例では、アプタマーに関して以下の省略形を使用する：PはNapdUであり、2'-OMeは2'-O-メチルヌクレオチドである。ヒト血管内皮増殖因子（VEGF）に結合するように選択されたNapdU含有低オフ速度修飾アプタマー（SOMAmer）のヌクレアーゼ抵抗性を増強するために、VEGFタンパク質への結合が顕著に影響されないヌクレオチドの位置に2'-O-メチル（2'-OMe）基を付加した。これらの試みによって、29ヌクレオチド配列内に9個の2'-OMe基を含むアプタマー4867-31__192が発見された。4867-31__192におけるNap-dUヌクレオチド、2'-OMe置換及び3'末端での逆位デオキシチミジンの付加の使用は、共に、未修飾DNAと比較してかなりの程度のヌクレアーゼ保護を与える。それにもかかわらず、いくつかのヌクレアーゼの存在下で、4867-31__192はまだ十分に安定的でない。例えば、ヒト組換えDNase Iに対して安定的である一方（図23A）、4867-31__192はブタDNase IIによって消化される（図23B）。図23Bで示すように、全長アプタマーの量の経時的低下は、DNase IIによる消化に対する感受性を示す。

【0331】

〔00365〕 さらにホスホロチオエート結合を使用してアプタマーを安定化させることの実現可能性を判定するために、アプタマー4867-31__192のどの位置がVEGF121への結合に顕著に影響を与えることなくホスホロチオエート結合を受容することができるかを決定する目的で、個々のホスホジエステル結合の代わりにホスホロチオエートの体系的な置換（「ホスホロチオエートウォーク」実験）を行った。本実施例及び続行する実施例のすべての配列について、上付きの「1」を有するヌクレオチドは、ヌクレオチドが2'-O-メチル修飾を有することを示し、上付きの「2」を有するヌクレオチドは、ヌクレオチドが3'-ホスホロチオエート基を有し、そのヌクレオチドをその直ぐ3'側のヌクレオチドに結合させることを示す。上付きの「1」及び「2」の両方を有するヌクレオチドは、ヌクレオチドが2'-O-メチル修飾と3'-ホスホロチオエート基の両方を有し、そのヌクレオチドをその直ぐ3'側のヌクレオチドに結合させることを示す。すべてのアプタマーを、3'末端での逆位デオキシチミジンを含めて、結合について試験した。このウォークの結果を表26に示す。すべてではないがほとんどの試験した位置は、結合に極度に影響を与えることなくホスホロチオエート結合を受容することができた。重要な例外は位置3（4867-31__410）のグアニンであり、この場合、天然ホスホジエステル結合に対するホスホロチオエート結合の置換は、VEGF121に対する親和性を29、259倍低減した。

【0332】

〔00366〕 ヌクレアーゼ感受性部位を予測することができないので、DNase II感受性切断部位の位置（複数可）を、実施例14に記載されているようにブタDNase IIとともにインキュベーションした後に、質量分析によって同定した（データ非表示）。アプタマー4867-31__192（3'末端での逆位デオキシチミジンの付加を有する）については、2つの主な断片を同定した。断片1はヌクレオチド1から24までを含んでいたが、断片2はヌクレオチド1から25までを含んでいた。したがって、表27で示すように、ヌクレオチド位置24及び25、25及び26並びに26及び27の間

の様々な組み合わせでホスホロチオエート結合でホスホジエステル結合を置換した一連のアプタマーを作出した。顕著に影響を受けた結合がないので、これらの位置の3つすべてにおける置換は受け入れられた(表26)。位置1での2'-OMeシトシンの付加の有無にかかわらず、ホスホロチオエート置換を試験した(表27)。ヌクレアーゼ安定性実験については、その後のすべてのアプタマーは、3'末端の逆位デオキシチミジンを含めて、研究した。

【0333】

[00367] DNase IIに対する感受性を実施例14に記載されているように検討し、図24にデータを示す。位置24及び25並びに25及び26の間にホスホロチオエート結合を有する、試験したすべてのアプタマーは、これら2つの位置で修飾されていないアプタマーよりも、このアッセイで安定的であった。このトレンドは、位置1の2'-OMeを有するまたは有さないアプタマーについて観察された。

10

【0334】

[00368] アプタマー4867-31_192及び両方の重要な位置にホスホロチオエート結合を有するアプタマーのサブセットを、90%ウサギ硝子体液中での安定性について次に試験した(図25)。本発明者らは、眼部障害を治療するための、VEGF及びPDGFに対するアプタマーベースのアンタゴニストの開発を考えているので、硝子体液中における安定性は、その治療的有効性と関係がある。残存全長アプタマーのパーセント対インキュベーション時間のプロット(図25)に例示するように、ホスホロチオエート結合で修飾されたすべてのアプタマーは、4867-31_192(ホスホロチオエート結合を有さない)よりも、この生体マトリックスにおいて安定的(192時間)であった。

20

【0335】

[00369] これらの置換が結合に悪影響を及ぼさなかったことを確実にするために、実験を行って、ヒトVEGF121タンパク質への結合について各アプタマーを試験した。試験したすべての配列は、標的への高親和性結合を保持していた。この実験で得られた解離定数(K_d 値)を表27に示す。

【0336】

[00370] 図24は、実施例14に記載されている、残存全長アプタマーのパーセンテージ対DNase IIでのインキュベーション時間を示す。アプタマー識別番号(アプタマーID番号)で示されるアプタマー(すべて250nM)を、指定の時間数にわたって37℃で、0.24ユニット/ μ LのDNase IIとともにインキュベートし、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって消化産物を分離した。デンストメトリーで測定して、残存全長アプタマーのパーセンテージ対インキュベーション時間をプロットした。図24のアプタマーID番号4867-31_192に対するプロットは、図23Bで示すものと同じプロットである。

30

【0337】

[00371] 図25は、実施例14に記載されている、残存全長アプタマーのパーセンテージ対硝子体液中におけるインキュベーション時間を示す。アプタマー識別番号(アプタマーID番号)で示されるアプタマー(すべて500nM)をニュージーランドホワイトウサギから得られた90%硝子体液中において、指定の時間数にわたって37℃でインキュベートした。アプタマーをポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離した。図25は、デンストメトリーで測定した、各全長アプタマーバンドの残存パーセント対時間を示す。

40

【0338】

[00372] 要約すると、これらのデータは、概して、ホスホロチオエート結合(複数可)を有する4867-31アプタマーは、4867-31アプタマーホスホロチオエート結合(複数可)なしよりもヌクレアーゼ消化に対する感受性が低く、さらに、ホスホロチオエート結合(複数可)を有する4867-31アプタマーは、VEGFタンパク質標的に対する結合親和性を保持することを示す。

【実施例16】

50

【0339】

ヌクレアーゼ安定性が向上したPDGFアプタマー

〔00373〕 本実施例は、アプタマーのヌクレアーゼ安定性を向上する、PDGFアプタマー（例えば5169-4）に適用される化学修飾を提供する。本実施例では、アプタマーに関して以下の省略形を使用する：PはNapdUであり、2'-OMeは2'-O-メチルヌクレオチドである。

【0340】

〔00374〕 ヒト血小板由来増殖因子（PDGFB）に結合するように選択された、NapdU含有低オフ速度修飾アプタマー（SOMAmer）のヌクレアーゼ抵抗性を増強するために、2'-O-メチル基（2'-OMe）を、PDGFタンパク質への結合が影響を受けないか、最小限の影響しか受けないヌクレオチド位置に付加した。これらの試みによって、21ヌクレオチド配列内に11個の2'-OMe基を含むアプタマー5169-4__146が発見された。これらの11個の2'-OMe修飾及び3'末端の逆位デオキシチミジンを用いると、5169-4__146はDNase IIに対して安定的であるが、DNase Iに対しては安定的でない（図26）。したがって、DNase IよりもDNase IIに対して感受性である、実施例15に記載されているVEGFアプタマー4867-31__192と対照的に、PDGF-BBアプタマー5169-4__146は、DNase IIと比較してDNase Iに対してより高い感受性を示す。換言すれば、DNase IIではなくDNase Iに対する5169-4__146の感受性は、実施例15で見つかった結果と逆であり、ヌクレアーゼに対するアプタマーの感受性が予測不可能であることを示す。これは、特定のヌクレアーゼによる分解への固有の感受性を予測することができず、実験的に決定しなければならないことを示唆する。一旦特定のヌクレアーゼに対するこの感受性が決定されれば、残りの感受性の位置でのさらなるホスホロチオエート置換によって、さらなる安定性が達成される可能性がある。図26Aで示すように、全長アプタマーの経時的低下は、DNase Iによる消化に対する感受性を示す。

【0341】

〔00375〕 図26で示すように、アプタマー5169-4__146（250nM）を、実施例14に記載されているように、指定の時間数にわたって37℃で、0.01ユニット/μLのDNase I（図26A）または0.12ユニット/μLのDNase II（図26B）とともにインキュベートし、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって消化産物を分離した。デンシトメトリーで測定して、残存全長アプタマーのパーセンテージ対インキュベーション時間をプロットした。

【0342】

〔00376〕 さらにホスホロチオエート結合を使用してアプタマーを安定化させることの実現可能性を判定するために、どの位置がアプタマーPDGFへの結合に顕著に影響を与えることなくホスホロチオエートを受容することができるを決定する目的で、「ホスホロチオエートウォーク」実験を5169-4__146について行った。このウォークの結果を表28に示す。試験したすべてのアプタマーは、3'末端に逆位デオキシチミジンを含んでいた。ホスホロチオエート置換は、5169-4__146配列のすべての位置で許容性に優れていた。PDGFへの結合の最大の悪化は1.8倍の親和性の低減であった（5169-4__154）。

【0343】

〔00377〕 実施例15と同様に、5169-4__146（3'末端に逆位デオキシチミジンを有する）のDNase Iによる切断に対して感受性であるヌクレオチドの位置を質量分析によって同定し、これらの最も感受性の「ヌクレアーゼ部位」は、天然の3'-ホスホジエステル結合の代わりに3'-ホスホロチオエート結合の置換によって保護されていた。

【0344】

〔00378〕 アプタマー5169-4__146について、ヒト組換えDNase Iで

の消化後にいくつかの断片を同定した。これらの断片によって、ヌクレオチド位置 9 及び 10；10 及び 11；11 及び 12；並びに 12 及び 13 の間の、DNase I 感受性部位が明らかとなった。したがって、これらの 4 つの位置でホスホジエステルをホスホロチオエート結合で置換し、アプタマー 5169-4__182 と称されるアプタマーを作出した（表 29）。これらのアプタマーを、3' 末端での逆位デオキシチミジンを含めて、ヌクレアーゼ抵抗性について試験した。前の場合と同様に、DNase I に対する感受性を検討した（図 27）。ホスホロチオエート含有アプタマーは、5169-4__146 よりも明らかに安定的であった。

【0345】

〔00379〕 図 27 で示すように、アプタマー 5169-4__182（250 nM）を、実施例 14 に記載されているように、指定の時間数にわたって 37℃で、0.01 ユニット/μL の DNase I とともにインキュベートし、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって消化産物を分離した。SYBR gold でバンドを可視化し、デンシトメトリーで測定して、残存全長アプタマーのパーセンテージ対インキュベーション時間をプロットした。

【0346】

〔00380〕 同じアプタマーを、90%ウサギ硝子体液中での安定性についても試験した（図 28）。残存全長アプタマーのパーセント対インキュベーション時間のプロット（図 28）に図示するように、アプタマー 5169-4__182（ホスホロチオエート結合を有する）は、5169-4__146（ホスホロチオエート結合を有さない）よりも、この生体マトリックスにおいて安定的であった。

【0347】

〔00381〕 図 28 で示すように、実施例 14 に記載されているように、ニュージーランドホワイトウサギから得られた 90%硝子体液において、示されたアプタマー（500 nM）を指定の時間数にわたって 37℃でインキュベートした。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってアプタマーを可視化した。図 28 は、デンシトメトリーで測定した、各全長アプタマーバンドの残存パーセント（SOMAmer）対時間を示す。

【0348】

〔00382〕 5169-4__182 は 5169-4__146 より明らかに安定的であったが、5169-4__182 の DNase I 消化産物は、はっきりと見えた（データ非表示）。実施例 14 に記載されている質量分析を使用して、この主な消化産物の切断部位をヌクレオチド位置 4 と 5 の間として同定した。ヌクレオチドの位置 4 は 2'-OMe 部分によって既に保護されていたので、これは驚くべきことであった（表 29）。この結果は、2'-OMe 置換されたヌクレオチドに隣接するホスホジエステル結合を切断することができるヌクレアーゼが存在するという事実を示す。それにもかかわらず、3'-ホスホロチオエート結合で、5169-4__182 のヌクレオチド位置 4 と 5 の間の天然のホスホジエステル結合を置換して、アプタマー 5169-4__188 が作出された（表 29）。前の場合と同様に、DNase I に対する感受性を検討した（図 29）。アプタマー 5169-4__182 及び 5169-4__188 は、5169-4__146 より安定的であった。5169-4__188 のヌクレオチド 4 と 5 の間のホスホロチオエート結合の付加によって、5169-4__182（データ非表示）について観察された安定的消化産物の出現が排除され、これによって、DNase I に対してより安定になった（図 29）。

【0349】

〔00383〕 図 29 で示すように、アプタマー識別番号（アプタマー ID 番号）で示されるアプタマーを、実施例 14 に記載されているように、指定の時間数にわたって 37℃で 0.01 ユニット/μL の DNase I とともにインキュベートし、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって消化産物を分離した。SYBR gold でバンドを可視化し、デンシトメトリーで測定して、残存全長アプタマーのパーセンテージ対インキュベーション時間をプロットした。

【0350】

〔00384〕 これらの置換が結合に悪影響を及ぼさなかったことを確実にするために、実験を行って、ヒトPDGFBタンパク質に対する各アプタマーの親和性を決定した。試験したすべての配列は、標的への高親和性結合を保持していた。この実験で得られた解離定数 (K_d 値) を表29に示す。

【0351】

〔00385〕 要約すると、これらのデータは、概して、ホスホロチオエート結合（複数可）を有する5169-4アプタマーは、ホスホロチオエート結合（複数可）を有さない5169-4アプタマーよりもヌクレアーゼ消化に対する感受性が低く、さらに、ホスホロチオエート結合（複数可）を有する5169-4アプタマーは、PDGFタンパク質標的に対する結合親和性を保持することを示す。

【実施例17】

【0352】

ヌクレアーゼ安定性が向上したさらなるPDGFアプタマー

〔00386〕 本実施例は、アプタマーのヌクレアーゼ安定性を向上する、PDGFアプタマー（例えば、4149-8）に適用される化学修飾を提供する。本実施例では、アプタマーに関して以下の省略形を使用する：PはNapdUであり；2'-OMeは2'-オームチルヌクレオチドであり；BnはベンジルdU（BndU）であり；Mはメトキシベンジル（MBndU）であり；Vは3炭素スパーサーであり；iはiBudUである。

【0353】

〔00387〕 ヒト血小板由来増殖因子（PDGFB）に結合するように選択されたBndU含有低オフ速度修飾アプタマー（SOMamer）のヌクレアーゼ抵抗性を増強するために、2'-オームチル（2'-OMe）基を、PDGFタンパク質への結合が顕著に影響されないヌクレオチド位置に付加した。これらの試みによって、24ヌクレオチド配列内に7個の2'-OMe基を含むアプタマー4149-8_379が発見された。これら7個の2'-OMe修飾を用いてさえも、4149-8_379は、まだヌクレアーゼ消化に耐性でない。例えば、組換えヒトDNase I（データ非表示）及びブタDNase II（図30）で4149-8_379を消化することができる。図30で示すように、全長アプタマーの経時的低下は、DNase IIによる消化に対する感受性を示す。4149-8_379についての、DNase I及びDNase IIの両方に対するこの感受性は、実施例15及び16に関して見られたものと異なり、これは、再びアプタマーのヌクレアーゼ安定性が予測不可能であることを示すものである。

【0354】

〔00388〕 図30で示すように、アプタマー4149-8_379（250nM）を、実施例14に記載されているように、指定の時間数にわたって37℃で、0.12ユニット/μLのDNase IIとともにインキュベートし、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって消化産物を分離した。SYBR Goldでバンドを可視化し、デンシトメトリーで測定して、残存全長アプタマーのパーセンテージ対インキュベーション時間をプロットした。

【0355】

〔00389〕 このアプタマーのヌクレアーゼ抵抗性をさらに増強するために、DNase I及びDNase IIの作用に対する感受性ヌクレオチドの位置を、実施例14に記載されている方法によって質量分析により同定した。ヌクレオチド位置15と16の間及びヌクレオチド位置16及び17間にDNase I感受性部位を同定した。ヌクレオチド位置9と10の間にDNase II感受性の部位を同定した。したがって、これらの3つの位置で、ホスホジエステル結合をホスホロチオエート結合で置換した。加えて、ホスホロチオエート結合でヌクレオチド17と18の間のホスホジエステル結合を置換した。最後に、位置2の3, 4メチレンジオキシベンジルー dUヌクレオチド（すなわちMBndU；表30及び31においてMで表される）をBndUで置き換え、位置16のBndUをNapdUで置き換えた。このアプタマーを4149-8_454と称した（表

30)。4149-8__454の修飾に加えて、アプタマー4149-8__455を作出し、これはまた、位置13として2'-OMe Gを、及びヌクレオチド8と9の間の天然のホスホジエステル結合の代わりにホスホロチオエート結合を含んでいた(表30)。完全なホスホロチオエートウォークは行わなかったが、いくつかの配列を作出し、PDGFBBに対する親和性について試験した(表31)。アプタマーを作出するためのガイドとして働いたこれらの配列のいくつかを表31に示す。

【0356】

[00390] すべてのアプタマーが3'末端に逆位デオキシチミジンを含んでいる場合には、前の場合と同様に、DNase IIに対する感受性を検討した(図31)。結果は、アプタマー4149-8__455が、4149-8__379よりも安定的である4149-8__454よりも安定的であったことを示す。

10

【0357】

[00391] アプタマー4149-8__379及び3'末端に逆位デオキシチミジンの付加を有する4149-8__454を、90%ウサギ硝子体液における安定性について試験した(データ非表示)。しかし、この生体マトリックスにおいて、4149-8__379と比較して、さらなる安定性は4149-8__454で得られなかった。

【0358】

[00392] これらの置換が結合に悪影響を及ぼさなかったことを確実にするために、実験を行って、ヒトPDGFBBタンパク質に対する各アプタマーの親和性を決定した。試験したすべての配列は、標的に対する結合親和性を保持していた。この実験で得られた解離定数(K_d 値)を表30に示す。

20

【0359】

[00393] 図31で示すように、アプタマーID番号(すなわち、4149-8__379; 4149-8__454及び4149-8__455)で示したアプタマーを、指定の時間数にわたって37℃でDNase IIとともにインキュベートし、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって消化産物を分離した。ゲル画像からデンストメトリーで測定して、全長アプタマーのパーセント対インキュベーション時間をプロットした。図31のアプタマーID番号4149-8__379に対するプロットは、図30で示すものと同じプロットである。

【0360】

30

[00394] 前述の実施形態及び実施例は、例としてのみ意図される。特定の実施形態、実施例または特定の実施形態もしくは実施例の要素は、特許請求の範囲のいずれかの重要な、必要とされるまたは必須の要素または特徴として解釈されない。添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を逸脱することなく、開示される実施形態に対して様々な変更、修飾、置換及び他の変形を行うことができる。図面及び実施例を含む本明細書は、制限するものではなく、例示的に考慮されるべきであり、すべてのそうした修飾及び置換は、本発明の範囲内に含まれることが意図される。したがって、本発明の範囲は、上述の実施例ではなく、添付の特許請求の範囲及びその法的均等物によって決定されるべきである。例えば、方法または方法クレームのいずれかに記載されるステップは、いかなる実行可能な順序でも実施することができ、実施形態、実施例または特許請求の範囲のいずれかに提示される順序に限定されるものではない。

40

国際出願時の特許請求の範囲(請求項1~66)

[項1]

核酸配列

5'-C-G-A-C-A-G-C-A-Z-G-Z-A-Z-G-C-A-C-A-Z-C-Z-3'(配列番号830)を含む核酸分子であって、

ZがC-5修飾ピリミジンであり、前記核酸分子の位置4、9、10、11及び12の少なくとも1個がホスホロチオエート結合または部分を含み、位置1が前記核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドである、前記核酸分子。

[項2]

50

前記核酸分子の位置 4、9、10、11 及び 12 の少なくとも 2、3、4 または 5 個がホスホロチオエート結合または部分を含み、位置 1 が前記核酸分子の 5' 末端からの最初のヌクレオシドである、請求項 1 に記載の核酸分子。

〔項 3〕

前記核酸分子の位置 1、4、6、7、14、15、16、17、18、20 及び 21 の少なくとも 1 個が 2'-O-メチル修飾を含み、位置 1 が前記核酸分子の 5' 末端からの最初のヌクレオシドである、請求項 1 に記載の核酸分子。

〔項 4〕

前記核酸分子の位置 1、4、6、7、14、15、16、17、18、20 及び 21 の少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10 または 11 個が 2'-O-メチル修飾を含み、位置 1 が前記核酸分子の 5' 末端からの最初のヌクレオシドである、請求項 1 に記載の核酸分子。

〔項 5〕

前記核酸分子が配列番号 545 及び 800～821 から成る群から選択される、請求項 1 に記載の核酸分子。

〔項 6〕

前記核酸分子が、11 個の 2'-O-メチルヌクレオシド及び 4 または 5 個のホスホロチオエート結合または部分を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

〔項 7〕

核酸配列

5'-C-C-G-Z-Z-C-A-A-G-Z-G-C-Z-Z-G-Z-A-G-G-A-Z-Z-Z-A-A-A-Z-G-G-3' (配列番号 831) を含む核酸分子であって、

Z が C-5 修飾ピリミジンであり、前記核酸分子の位置 24、25 及び 26 の少なくとも 1 個がホスホロチオエート結合または部分を含み、位置 1 が前記核酸分子の 5' 末端からの最初のヌクレオシドである、前記核酸分子。

〔項 8〕

位置 24、25 及び 26 の少なくとも 2 または 3 個がホスホロチオエート結合または部分を含み、位置 1 が前記核酸分子の 5' 末端からの最初のヌクレオシドである、請求項 7 に記載の核酸分子。

〔項 9〕

前記核酸分子の位置 1、6、9、12、15、17、18、22、28 及び 29 の少なくとも 1 個が 2'-O-メチル修飾を含み、位置 1 が前記核酸分子の 5' 末端からの最初のヌクレオシドである、請求項 7 に記載の核酸分子。

〔項 10〕

前記核酸分子の位置 1、6、9、12、15、17、18、22、28 及び 29 の少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個が 2'-O-メチル修飾を含み、位置 1 が前記核酸分子の 5' 末端からの最初のヌクレオシドである、請求項 7 に記載の核酸分子。

〔項 11〕

前記 C-5 修飾ピリミジンが、独立に、それぞれの出現について、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)、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

10

20

30

40

50

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 (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 - 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)、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 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン及び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) から成る群から選択される、請求項1~10のいずれか1項に記載の核酸分子。

[項12]

10

前記C-5修飾ピリミジンが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1~10のいずれか1項に記載の核酸分子。

[項13]

前記核酸分子が配列番号706及び763~799から成る群から選択される、請求項7に記載の核酸分子。

[項14]

前記核酸分子が、9または10個の2' - O - メチルヌクレオシド及び1、2または3個のホスホロチオエート結合または部分を含む、請求項7に記載の核酸分子。

[項15]

20

核酸配列

5' - Z - Z' - A - C - H - G - Z - Z - A - C - V - C - G - C - G - Z' - Z - Z - A - Z - A - G - C - G - 3' (配列番号832) を含む核酸分子であって、

Z、Z' 及びZ'' が、独立に、それぞれの出現について、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 - チオフエ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 (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 - 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)、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 - 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 - 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) 及び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) から成る群から選択され；Vが3炭素リンカーであり、Hがヘキサエチレングリコールリンカーであり；

30

40

前記核酸分子の位置8、9、15、16及び17の少なくとも1個がホスホロチオエート結合または部分を含み、位置1が前記核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドであり、H及びVが前記核酸分子の位置を数えるための単一の位置とみなされる、前記核酸分子。

[項16]

位置8、9、15、16及び17の少なくとも2、3、4または5個がホスホロチオエ

50

ート結合または部分を含み、位置1が前記核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドであり、H及びVが前記核酸分子の位置を数えるための単一の位置とみなされる、請求項15に記載の核酸分子。

〔項17〕

前記核酸分子の位置3、7、12、13、18、19、21及び24の少なくとも1個が2'-O-メチル修飾を含み、位置1が前記核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドであり、H及びVが前記核酸分子の位置を数えるための単一の位置とみなされる、請求項15に記載の核酸分子。

〔項18〕

前記核酸分子の位置3、7、12、13、18、19、21及び24の少なくとも2、3、4、5、6、7または8個が2'-O-メチル修飾を含み、位置1が前記核酸分子の5'末端からの最初のヌクレオシドであり、H及びVが前記核酸分子の位置を数えるための単一の位置とみなされる、請求項15に記載の核酸分子。

〔項19〕

Zが5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)であり、Z'が、独立に、それぞれの出現について、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)または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)であり、Z'が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)または5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)である、請求項15に記載の核酸分子。

〔項20〕

核酸分子が配列番号306、317、330~344、409及び822~828から成る群から選択される、請求項15に記載の核酸分子。

〔項21〕

前記核酸分子が、10nM未満、5nM未満、2nM未満、1nM未満または0.1nM未満の結合親和性でPDGFタンパク質に結合する、請求項1~4、6、11、12、14または15~19に記載の核酸分子。

〔項22〕

前記核酸分子が、10nM未満、5nM未満、2nM未満、1nM未満または0.1nM未満の結合親和性でVEGFタンパク質に結合する、請求項7~12または14のいずれか1項に記載の核酸分子。

〔項23〕

前記核酸分子が、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8または9個の2'-O-メチルヌクレオシドを含む、請求項1、2、7、8、11、12、15、16、19、21または22に記載の核酸分子。

〔項24〕

前記核酸分子が、DNA、RNAまたはそれらの組み合わせを含む、請求項1~23のいずれか1項に記載の核酸分子。

〔項25〕

前記核酸分子の3'末端に逆位デオキシヌクレオチドをさらに含む、請求項1~24のいずれか1項に記載の核酸分子。

〔項26〕

前記デオキシヌクレオチドがデオキシチミジンである、請求項25に記載の核酸分子。

〔項27〕

核酸分子が、ホスホロチオエート結合または部分を有さない同じ核酸分子と比較して、スクレアーゼに対する感受性が低い、請求項1~26のいずれか1項に記載の核酸分子。

〔項28〕

前記スクレアーゼがDNase酵素である、請求項27に記載の核酸分子。

〔項29〕

10

20

30

40

50

前記DNase酵素がDNase IまたはDNase II酵素である、請求項28に記載の核酸分子。

〔項30〕

核酸分子が、ホスホロチオエート結合または部分を有さない同じ核酸分子と比較して、ニュージーランドホワイトウサギの硝子体液中でより安定的である、請求項1～29のいずれか1項に記載の核酸分子。

〔項31〕

核酸配列

5' - C¹ - G - A - C¹, 2' - A - G¹ - C¹ - A - Z² - G² - Z² - A² - Z - G¹ - C¹ - A¹ - C¹ - A¹ - Z - C¹ - Z¹ - 3' (配列番号833) を含む核酸分子であって、

10

C¹が、独立に、それぞれの出現について、シチジン、デオキシシチジン及び2'-O-メチルシチジンから成る群から選択され；

C¹, 2'が、独立に、それぞれの出現について、シチジン、ホスホロチオエート結合を含むシチジン、デオキシシチジン、ホスホロチオエート結合を含むデオキシシチジン、2'-O-メチルシチジン及びホスホロチオエート結合を含む2'-O-メチルシチジンから成る群から選択され；

G¹が、独立に、それぞれの出現について、グアノシン、デオキシグアノシン及び2'-O-メチルグアノシンから成る群から選択され；

G²が、独立に、それぞれの出現について、グアノシン、ホスホロチオエート結合を含むグアノシン、デオキシグアノシン及びホスホロチオエート結合を含むデオキシグアノシンから成る群から選択され；

20

Z¹が、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン、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'-デオキシウリジン(NapdU)及び2'-O-メチル基を含む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)から成る群から選択され；

Z²が、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、ホスホロチオエート結合を含むウリジン、デオキシウリジン、ホスホロチオエート結合を含むデオキシウリジン、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)及びホスホロチオエート結合を含む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)から成る群から選択され；

30

Zが、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン及び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)から成る群から選択され；

A¹が、独立に、それぞれの出現について、アデノシン、デオキシアデノシン及び2'-O-メチルアデノシンから成る群から選択され；

A²が、独立に、それぞれの出現について、アデノシン、ホスホロチオエート結合を含むアデノシン、デオキシアデノシン及びホスホロチオエート結合を含むデオキシアデノシンから成る群から選択され；

少なくとも1、2、3、4または5個のホスホロチオエート結合を含む、前記核酸分子

40

。〔項32〕

C¹, 2'が、ホスホロチオエート結合を含む2'-O-メチルシチジンである、請求項31に記載の核酸分子。

〔項33〕

Z¹が、2'-O-メチル基を含む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72に記載の核酸分子。

〔項34〕

Z²が、ホスホロチオエート結合を含む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31に記載の核酸分子。

50

〔項 3 5〕

核酸配列

5' - C¹ - C - G - Z - Z - C¹ - A - A - G¹ - Z - G - C¹ - Z - Z - G¹ - Z - A¹ - G¹ - G - A - Z - Z¹ - Z - A² - A² - A² - Z - G¹ - G¹ - 3' (配列番号 8 3 4) を含む核酸分子であって、

C¹ が、独立に、それぞれの出現について、シチジン、デオキシシチジン及び 2' - O - メチルシチジンから成る群から選択され；

G¹ が、独立に、それぞれの出現について、グアノシン、デオキシグアノシン及び 2' - O - メチルグアノシンから成る群から選択され；

Z が、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン及び 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) から成る群から選択され；

Z¹ が、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン、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' - デオキシウリジン (N a p d U) 及び 2' - O - メチル基を含む 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) から成る群から選択され；

A¹ が、独立に、それぞれの出現について、アデノシン、デオキシアデノシン及び 2' - O - メチルアデノシンから成る群から選択され；

A² が、独立に、それぞれの出現について、アデノシン、ホスホロチオエート結合を含むアデノシン、デオキシアデノシン及びホスホロチオエート結合を含むデオキシアデノシンから成る群から選択され；

少なくとも 1、2、3、4 または 5 個のホスホロチオエート結合を含む、前記核酸分子。

〔項 3 6〕

Z が、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 1 または 3 5 に記載の核酸分子。

〔項 3 7〕

Z¹ が、2' - O - メチル基を含む 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 5 に記載の核酸分子。

〔項 3 8〕

核酸配列

5' - Z - Z' - A¹ - C - H - G - Z¹ - Z² - A² - C - V - C¹ - G¹ - C - G² - Z' - Z² - Z¹ - A¹ - Z - A¹ - G - C - G¹ - 3' (配列番号 8 3 5) を含む核酸分子であって、

C¹ が、独立に、それぞれの出現について、シチジン、デオキシシチジン及び 2' - O - メチルシチジンから成る群から選択され；

G¹ が、独立に、それぞれの出現について、グアノシン、デオキシグアノシン及び 2' - O - メチルグアノシンから成る群から選択され；

G² が、独立に、それぞれの出現について、グアノシン、ホスホロチオエート結合を含むグアノシン、デオキシグアノシン及びホスホロチオエート結合を含むデオキシグアノシンから成る群から選択され；

Z が、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン、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 - 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)、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) 及び 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) から成る群から選択され；

Z' が、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン、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) 及び 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

10

20

30

40

50

d U) から成る群から選択され；

Z² が、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、ホスホロチオエート結合を含むウリジン、デオキシウリジン、ホスホロチオエート結合を含むデオキシウリジン、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)、ホスホロチオエート結合を含む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-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)、ホスホロチオエート結合を含む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-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) 及びホスホロチオエート結合を含む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) から成る群から選択され；

10

Z¹ が、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、デオキシウリジン、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'-デオキシウリジン(NapdU)、2'-O-メチル基を含む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-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)、2'-O-メチル基を含む5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)、メチレンジオキシベンジル-dU 及び 2'-O-メチル基を含むメチレンジオキシベンジル-dU から成る群から選択され；

Z² が、独立に、それぞれの出現について、ウリジン、ホスホロチオエート結合を含むウリジン、デオキシウリジン、ホスホロチオエート結合を含むデオキシウリジン、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) 及びホスホロチオエート結合を含む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-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)、ホスホロチオエート結合を含む5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)、メチレンジオキシベンジル-dU (MBndU) 及びホスホロチオエート結合を含むメチレンジオキシベンジル-dU (MBndU) から成る群から選択され；

20

A¹ が、独立に、それぞれの出現について、アデノシン、デオキシアデノシン及び 2'-O-メチルアデノシンから成る群から選択され；

30

A² が、独立に、それぞれの出現について、アデノシン、ホスホロチオエート結合を含むアデノシン、デオキシアデノシン及びホスホロチオエート結合を含むデオキシアデノシンから成る群から選択され

V が 3 炭素リンカーであり；

H がヘキサエチレングリコールリンカーであり；

少なくとも 1、2、3、4 または 5 個のホスホロチオエート結合を含む、前記核酸配列。

〔項 39〕

C¹ が 2'-O-メチルシチジンである、請求項 31、35 または 38 に記載の核酸分子。

40

〔項 40〕

G¹ が 2'-O-メチルグアノシンである、請求項 31、35 または 38 に記載の核酸分子。

〔項 41〕

G² が、ホスホロチオエート結合を含むデオキシグアノシンである、請求項 31 または 38 に記載の核酸分子。

〔項 42〕

Z が 5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU) である、請求項 38 に記載の核酸分子。

〔項 43〕

50

Z²が、ホスホロチオエート結合を含む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38に記載の核酸分子。

[項44]

Z¹が、2'-O-メチル基を含む5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)である、請求項38に記載の核酸分子。

[項45]

Z²が、ホスホロチオエート結合を含む5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)である、請求項38に記載の核酸分子。

[項46]

A¹が2'-O-メチルアデノシンである、請求項31、35または38に記載の核酸分子。

[項47]

A²が、ホスホロチオエート結合を含むデオキシアデノシンである、請求項31、35または38に記載の核酸分子。

[項48]

請求項1～47のいずれか1項に記載の核酸分子から成る群から選択される2つの核酸分子を含む組成物。

[項49]

溶液、粉末、ゲル及び乳濁液から選択される群から選択される形態である、請求項48に記載の組成物。

[項50]

前記2つの核酸分子が共有結合または非共有結合している、請求項48に記載の組成物。

[項51]

前記核酸分子がPDGF受容体のPDGF媒介性リン酸化を阻害する、請求項1～6、15～21、31～34、38または41～45のいずれか1項に記載の核酸分子。

[項52]

請求項1～51のいずれか1項に記載の少なくとも1つの核酸分子及び医薬的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

[項53]

前記医薬組成物が硝子体内注射用である、請求項52に記載の医薬組成物。

[項54]

黄斑変性症を有する対象に治療有効量の請求項52に記載の医薬組成物を投与することを含む、黄斑変性症の治療方法

[項55]

黄斑変性症を発症する危険性がある対象に治療有効量の請求項52に記載の医薬組成物を投与することを含む、黄斑変性症の予防方法。

[項56]

眼の病気を有する対象に治療有効量の請求項52に記載の医薬組成物を投与することを含む、眼の病気の治療方法。

[項57]

前記眼の病気が、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、エイズ関連視力喪失、弱視、半盲、網膜静脈閉塞症、トラコーマ、円錐角膜、脈絡網膜の炎症、中心性漿液性網膜症、ブドウ膜炎、網膜ジストロフィー、浮腫、緑内障及び白内障から成る群から選択される、請求項56に記載の方法。

[項58]

前記黄斑変性症が加齢性黄斑変性症である、請求項54または55に記載の方法。

[項59]

前記黄斑変性症がドライ加齢性黄斑変性症またはウェット加齢性黄斑変性症である、請求項58に記載の方法。

〔項 6 0〕

線維症を有する対象に治療有効量の請求項 5 2 に記載の医薬組成物を投与することを含む、線維症の治療方法。

〔項 6 1〕

前記線維症が、肺線維症、腎線維症、眼部線維症、角膜線維症、後眼部線維化眼疾患、血管結合組織網膜瘢痕及び嚢胞性線維症から選択される、請求項 6 0 に記載の方法。

〔項 6 2〕

心血管疾患を有する対象に治療有効量の請求項 5 2 に記載の医薬組成物を投与することを含む、心血管疾患の治療方法。

〔項 6 3〕

前記心血管疾患が、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、心肥大関連状態及び血管障害から選択される、請求項 6 2 に記載の方法。

〔項 6 4〕

癌を有する対象に治療有効量の請求項 5 2 に記載の医薬組成物を投与することを含む、癌の治療方法。

〔項 6 5〕

前記癌が、膀胱癌、肺癌、乳癌、黒色腫、結腸癌、直腸癌、眼部の癌、リンパ腫、子宮内膜癌、膵臓癌、肝臓癌、腎臓癌、前立腺癌、白血病並びに甲状腺癌から選択される、請求項 6 4 に記載の方法。

〔項 6 6〕

アプタマーである、先行する請求項のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【 0 3 6 1 】

表 1. PDGF に対して 10 nM 以下の K_d 値を有する 4 1 4 9 - 8 __ 1 及びトランケート変異体の配列の代表

【 0 3 6 2 】

10

20

【表 1 - 1】

アダプター I D 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-G-A-G-Bn-G-A-A-C-A-C-C-G-A-G-Bn-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
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
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

10

20

30

40

【表 1 - 2】

アダプター I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	39
4149-8_53	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹	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-Bn-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-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	53

【 0 3 6 4 】

10

20

30

40

【表 1 - 3】

アダマー I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_69	Bn-Bn-A-C-G-C3-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	54
4149-8_70	Bn-Bn-A-C-G-A-C3-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-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-Bn-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-Bn-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-Bn-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-Bn-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-Bn-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-Bn-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-Bn-A-Bn-A-G-C-G	69
4149-8_98	Bn-Bn-A-C-C3-C3-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-Bn-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-Bn-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-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	80

【 0 3 6 5 】

10

20

30

40

【表 1 - 4】

アダマー I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_115	Bn-Bn-A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Nap-A-C-A-C-G-C-G-Bn-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-Nap-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
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-Bn-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 ¹ -A-G-C-G	87
4149-8_123	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	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 ¹ -Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	90
4149-8_126	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-Heg-G-U ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Nap-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	91
4149-8_128	Bn-Nap-A ¹ -C-Heg-Heg-G-Nap-Nap-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Nap-Nap-Bn-A-Nap-A ¹ -G-C-G ¹	92
4149-8_130	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	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 ¹ -Bn-A-C-A-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	95
4149-8_133	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-U ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Nap-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	96
4149-8_135	Pe-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	97
4149-8_136	Bn-Pe-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	98
4149-8_137	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Pe-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	99
4149-8_138	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Pe-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	100
4149-8_139	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Pe-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	101
4149-8_140	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	102
4149-8_141	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Pe-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	103
4149-8_142	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Pe-A ¹ -G-C-G ¹	104
4149-8_143	BT-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	105
4149-8_144	Bn-BT-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	106
4149-8_145	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-BT-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	107

【 0 3 6 6 】

10

20

30

40

【表 1 - 5】

アダマー I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_146	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-BT-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	108
4149-8_147	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-BT-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	109
4149-8_148	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-BT-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	110
4149-8_149	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-BT-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	111
4149-8_150	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-BT-A ¹ -G-C-G ¹	112
4149-8_151	Th-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	113
4149-8_152	Bn-Th-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	114
4149-8_153	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Th-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	115
4149-8_154	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Th-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	116
4149-8_155	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Th-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	117
4149-8_156	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Th-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	118
4149-8_157	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	119
4149-8_158	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Th-A ¹ -G-C-G ¹	120
4149-8_159	Nap-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	121
4149-8_160	Bn-Nap-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	122
4149-8_161	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Nap-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	123
4149-8_162	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Nap-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	124
4149-8_163	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Nap-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	125
4149-8_164	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Nap-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	126
4149-8_165	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Nap-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	127
4149-8_166	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Nap-A ¹ -G-C-G ¹	128
4149-8_167	Ib-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	129
4149-8_168	Bn-Ib-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	130
4149-8_169	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Ib-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	131
4149-8_170	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	132
4149-8_171	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Ib-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	133
4149-8_172	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Ib-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	134

【 0 3 6 7 】

10

20

30

40

【表 1 - 6】

アダプター I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_173	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Ib-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	135
4149-8_174	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Ib-A ¹ -G-C-G ¹	136
4149-8_175	Trp-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	137
4149-8_176	Bn-Trp-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	138
4149-8_177	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Trp-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	139
4149-8_181	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Trp-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	140
4149-8_182	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Trp-A ¹ -G-C-G ¹	141
4149-8_183	2Nap-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	142
4149-8_184	Bn-2Nap-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	143
4149-8_185	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-2Nap-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	144
4149-8_187	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-2Nap-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	145
4149-8_188	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-2Nap-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	146
4149-8_189	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-2Nap-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	147
4149-8_190	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-2Nap-A ¹ -G-C-G ¹	148
4149-8_191	2NE-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	149
4149-8_192	Bn-2NE-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	150
4149-8_193	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-2NE-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	151
4149-8_194	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-2NE-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	152
4149-8_195	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-2NE-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	153
4149-8_197	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-2NE-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	154
4149-8_198	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-2NE-A ¹ -G-C-G ¹	155
4149-8_199	NE-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	156
4149-8_200	Bn-NE-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	157
4149-8_201	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-NE-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	158
4149-8_202	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-NE-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	159
4149-8_203	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-NE-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	160
4149-8_204	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-NE-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	161

【 0 3 6 8 】

10

20

30

40

【表 1 - 7】

アダプター I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_205	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-NE-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	162
4149-8_206	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-NE-A ¹ -G-C-G ¹	163
4149-8_207	MBn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	164
4149-8_208	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	165
4149-8_209	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-MBn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	166
4149-8_210	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-MBn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	167
4149-8_211	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-MBn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	168
4149-8_212	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-MBn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	169
4149-8_213	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-MBn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	170
4149-8_214	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-MBn-A ¹ -G-C-G ¹	171
4149-8_215	PP-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	172
4149-8_216	Bn-PP-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	173
4149-8_217	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-PP-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	174
4149-8_218	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-PP-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	175
4149-8_219	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-PP-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	176
4149-8_220	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-PP-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	177
4149-8_221	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-PP-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	178
4149-8_222	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-PP-A ¹ -G-C-G ¹	179
4149-8_223	Tyr-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	180
4149-8_224	Bn-Tyr-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	181
4149-8_225	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Tyr-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	182
4149-8_226	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Tyr-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	183
4149-8_227	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Tyr-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	184
4149-8_228	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Tyr-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	185
4149-8_229	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Tyr-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	186
4149-8_230	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Tyr-A ¹ -G-C-G ¹	187
4149-8_231	FBn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	188

【 0 3 6 9 】

10

20

30

40

【表 1 - 8】

アブタマー I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_232	Bn-FBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	189
4149-8_233	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-FBn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	190
4149-8_234	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-FBn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	191
4149-8_235	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-FBn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	192
4149-8_236	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-FBn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	193
4149-8_237	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-FBn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	194
4149-8_238	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-FBn-A ¹ -G-C-G ¹	195
4149-8_239	Bn-Bn-A ¹ -C ⁰ -Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	196
4149-8_240	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C ⁰ -A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	197
4149-8_241	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ⁰ -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	198
4149-8_242	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C ⁰ -G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	199
4149-8_243	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C ⁰ -G ¹	200
4149-8_245	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	201
4149-8_246	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G ¹ -Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	202
4149-8_247	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G ¹ -C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	203
4149-8_248	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G ¹ -Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	204
4149-8_249	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G ¹ -C-G ¹	205
4149-8_254	Tyr-Bn-A ¹ -C-Heg-G-FBn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-2Nap-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	206
4149-8_255	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	207
4149-8_256	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-2Nap-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	208
4149-8_257	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-NE-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	209
4149-8_259	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Ib-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	210
4149-8_260	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	211
4149-8_261	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Pe-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	212
4149-8_262	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Th-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	213
4149-8_263	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-2Nap-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	214
4149-8_264	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Th-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	215

【 0 3 7 0 】

10

20

30

40

【表 1 - 9】

アダマー I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_265	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Ib-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	216
4149-8_266	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Th-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	217
4149-8_267	Bn-Ib-A ¹ -C-Heg-G-Ib-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Ib-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	218
4149-8_268	2Nap-2Nap-A ¹ -C-Heg-G-2Nap-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-2Nap-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	219
4149-8_269	NE-Bn-A ¹ -C-Heg-G-NE-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-NE-A ¹ -G-C-G ¹	220
4149-8_270	Th-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Th-Bn-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	221
4149-8_271	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A ¹ -Bn-A ¹ -G ¹ -C-G ¹	222
4149-8_272	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A ¹ -Bn-A ¹ -G ¹ -C-G ¹	223
4149-8_273	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	224
4149-8_274	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G ¹ -C-G ¹	225
4149-8_275	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-2Nap-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	226
4149-8_279	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	227
4149-8_280	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	228
4149-8_281	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G ¹ -C-G ¹	229
4149-8_282	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Th-A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	230
4149-8_283	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Th-A ¹ -Bn-A ¹ -G ¹ -C-G ¹	231
4149-8_284	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ⁰ -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	232
4149-8_285	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C ¹ -A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A ¹ -Bn-A ¹ -G-C ¹ -G ¹	233
4149-8_286	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C ¹ -A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A ¹ -Bn-A ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹	234
4149-8_287	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C3-C3-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	235
4149-8_288	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C3--G-C-G-Bn-Bn-Bn-A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	236
4149-8_289	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	237
4149-8_290	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C3-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	238
4149-8_291	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-Heg-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	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-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 ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-T-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	242

【 0 3 7 1 】

【表 1 - 1 0】

アダマー I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_295	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	243
4149-8_296	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-G-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	244
4149-8_297	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -T-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	245
4149-8_298	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -A-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	246
4149-8_299	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -G-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	247
4149-8_300	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-T-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	248
4149-8_301	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	249
4149-8_302	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-G-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	250
4149-8_303	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	251
4149-8_307	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	252
4149-8_308	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn ¹ -A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	253
4149-8_311	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn ¹ -A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	254
4149-8_312	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn ¹ -A ¹ -G-C-G ¹	255
4149-8_321	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Bn-A-MBn-A ¹ -G-C-G ¹	256
4149-8_322	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-MBn-A ¹ -G-C-G ¹	257
4149-8_323	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Th-A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	258
4149-8_324	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Th-Pe-Th-A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	259
4149-8_325	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	260
4149-8_326	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	261
4149-8_327	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	262
4149-8_328	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	263
4149-8_329	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn-A ¹ -MBn-A ¹ -G-C-G ¹	264
4149-8_330	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn-A ¹ -MBn-A ¹ -G-C-G ¹	265
4149-8_331	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Th-A ¹ -MBn-A ¹ -G-C-G ¹	266
4149-8_332	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn-A ¹ -MBn-A ¹ -G-C-G ¹	267
4149-8_333	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Th-A ¹ -MBn-A ¹ -G-C-G ¹	268
4149-8_334	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹ -Heg-Heg-Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	269

【表 1 - 1 1】

アダマー I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_335	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹ -Heg-Heg-Heg-Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	270
4149-8_336	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹ -Heg-Heg-Heg-Heg-Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	271
4149-8_337	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹ -Heg-Heg-Heg-Heg-Heg-Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	272
4149-8_338	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹ -Heg-Heg-Heg-Heg-Heg-Heg-Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	273
4149-8_339	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹ -C3-(3'-ダブラー)-T	274
4149-8_340	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹ -Heg-(3'-ダブラー)-T	275
4149-8_341	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹ -Heg-Heg-(3'-ダブラー)-T	276
4149-8_342	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹ -Heg-Heg-Heg-(3'-ダブラー)-T	277
4149-8_343	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	278
4149-8_344	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G ⁰ -Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	279
4149-8_345	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G ⁰ -C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	280
4149-8_346	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G ⁰ -Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	281
4149-8_347	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G ⁰ -C-G ¹	282
4149-8_349	Bn-Bn-A ¹ -C ⁰ -Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	283
4149-8_352	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C ⁰ -G ¹	284
4149-8_353	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A ⁰ -C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	285
4149-8_354	2Nap-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	286
4149-8_355	FBn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	287
4149-8_356	NE-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	288
4149-8_357	2NE-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	289
4149-8_358	PP-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	290
4149-8_359	Ib-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	291
4149-8_360	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	292
4149-8_361	T-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	293
4149-8_362	Bn-T-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	294

【表 1 - 1 2】

アダマー I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_363	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-T-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	295
4149-8_369	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A ² -C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	296
4149-8_370	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	297
4149-8_371	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G ² -Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	298
4149-8_372	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G ² -Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	299
4149-8_373	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A ² -C-A ¹ -C ¹ -G-C-G ² -Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	300
4149-8_374	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-A ¹ -C ¹ -G-C-G ² -Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	301
4149-8_375	FBn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	302
4149-8_376	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	303
4149-8_377	FBn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	304
4149-8_378	FBn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	305
4149-8_379	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	306
4149-8_380	FBn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	307
4149-8_381	FBn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	308
4149-8_382	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	309
4149-8_383	FBn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	310
4149-8_384	FBn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	311
4149-8_385	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	312
4149-8_386	FBn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	313
4149-8_388	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A ² -C-A ¹ -C ¹ -G-C-G ² -Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	314
4149-8_389	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-A ¹ -C ¹ -G-C-G ² -Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	315
4149-8_390	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-C3-C ¹ -G-C-G ² -Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	316
4149-8_391	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A ² -C-C3-C ¹ -G-C-G ² -Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	317
4149-8_392	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-C3-C ¹ -G-C-G ² -Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	318
4149-8_393	FBn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A ² -C-A ¹ -C ¹ -G-C-G ² -Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	319
4149-8_394	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A ² -C-A ¹ -C ¹ -G-C-G ² -Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	320
4149-8_395	FBn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A ² -C-A ¹ -C ¹ -G-C-G ² -Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	321

【 0 3 7 4 】

10

20

30

40

【表 1 - 1 3】

アダマー I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_396	FBn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A ² -C-C3-C ¹ -G-C-G ² -Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	322
4149-8_397	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A ² -C-C3-C ¹ -G-C-G ² -Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	323
4149-8_398	FBn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A ² -C-C3-C ¹ -G-C-G ² -Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	324
4149-8_399	FBn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-C3-C ¹ -G-C-G ² -Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	325
4149-8_400	FBn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-A ¹ -C ¹ -G-C-G ² -Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	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-Bn-A-G-C	329
4149-8_418	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-C3-C ¹ -G-C-G ¹ -Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	330
4149-8_419	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-C3-C ¹ -G-C-G ¹ -Nap-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	331
4149-8_420	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-C3-C ¹ -G-C-G ¹ -2Nap-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	332
4149-8_421	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-C3-C ¹ -G ¹ -C-G-Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	333
4149-8_422	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-C3-C ¹ -G ¹ -C-G ¹ -Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	334
4149-8_423	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-C3-C ¹ -G ¹ -C-G-Nap -Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	335
4149-8_424	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-C3-C ¹ -G ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	336
4149-8_425	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ¹ -C-C3-C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	337
4149-8_431	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-C3-C ¹ -G-C-G ² -Nap-Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	338
4149-8_432	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-C3-C ¹ -G-C-G ² -Bn-Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	339
4149-8_433	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-C3-C ¹ -G-C-G ² -Nap-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	340
4149-8_434	Bn-MBn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-C3-C ¹ -G-C-G ² -Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	341
4149-8_435	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-C3-C ¹ -G-C-G ² -Nap-Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	342
4149-8_436	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-C3-C ¹ -G-C-G ² -Bn-Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	343
4149-8_437	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-C3-C ¹ -G-C-G ² -Nap-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	344

【 0 3 7 5】

上付なしはデオキシリボースを示す

上付きの o は 2' -フルオロを示す

上付きの 1 は 2' -O-メチルを示す

上付きの 2 はホスホロチオエート (デオキシリボース) を示す

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

10

20

30

40

50

I b = イソブチル-d U

T r p = トリプトタミニル-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

10

3'-ダブラー=シンメトリックダブラーホスホラミダイト (G l e n R e s e a r c h、カタログ番号 10-1920-02)

表 1 a. P D G F アプタマー 4149-8_260 (S L 5) のホモ二量体:

【0376】

【表 1-14】

Seq1	Kd (M)	4149-8_38 との比	SOMAmer(2.5nM) PDGF-BB(1nM)二 連	
			相対的 P D G F R b 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%

20

30

【0377】

表 2. P D G F に対して 10 nM を超える K_d 値を有するトランケート変異体の配列の代表

【0378】

【表 2 - 1】

アダマー I D 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-Bn-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-Bn-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-Bn-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-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-G-C-G	357
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-Bn-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-Bn-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-C3-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-Bn-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-Bn-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-Bn-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-Bn-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-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A-C3-C-G	371

【 0 3 7 9 】

10

20

30

40

【表 2 - 2】

アダマー I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_102	Bn-Bn-A ¹ -C-G-C3-C3-C3-C-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	372
4149-8_104	Bn-U ¹ -A-C-G-A-C-Bn-A-C-G-Bn-Bn-A-C-A-C-G-C-G-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 ¹ -A-C-A-C-G-C-G-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 ¹ -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-Bn-U ¹ -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 ¹ -A-G-C-G	377
4149-8_127	Bn-Nap-A-C-Heg-Heg-G-U ¹ -Nap-A-C-A-C-G-C-G-Nap-Nap-Bn-A-Nap-A-G-C-G	378
4149-8_129	Bn-Nap-A ¹ -C-Heg-Heg-G-U ¹ -Nap-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Nap-Nap-Bn-A-Nap-A ¹ -G-C-G ¹	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 ¹ -C-Heg-G-Bn-Trp-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	381
4149-8_179	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Trp-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	382
4149-8_180	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Trp-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	383
4149-8_186	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-2Nap-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	384
4149-8_196	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-2NE-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	385
4149-8_244	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	386
4149-8_250	Tyr-MBn-A ¹ -C-Heg-G-FBn-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-2Nap-Pe-Th-A-NE-A ¹ -G-C-G ¹	387
4149-8_251	Tyr-MBn-A ¹ -C-Heg-G-FBn-Ib-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-2Nap-Pe-Th-A ¹ -NE-A ¹ -G ¹ -C-G ¹	388
4149-8_252	Trp-Ib-A ¹ -C-Heg-G-NE-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Th-Pe-Th-A-MBn-A ¹ -G-C-G ¹	389
4149-8_253	Trp-Ib-A ¹ -C-Heg-G-NE-Ib-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Th-Pe-Th-A ¹ -MBn-A ¹ -G ¹ -C-G ¹	390
4149-8_258	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-U ¹ -Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	391
4149-8_276	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-FBn-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	392
4149-8_277	Tyr-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	393
4149-8_278	Tyr-Bn-A ¹ -C-Heg-G-FBn-Ib-A-C-A ¹ -C-G-C-G-2Nap-Pe-Th-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	394
4149-8_304	Bn-Bn-A ¹ -C-C3-G-Bn-Bn-A-C-C3--G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	395
4149-8_305	Bn ¹ -Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	396
4149-8_306	Bn-Bn ¹ -A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	397
4149-8_309	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn ¹ -Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	398

10

20

30

40

【 0 3 8 0 】

【表 2 - 3】

アダプター I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号
4149-8_310	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn ¹ -Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	399
4149-8_348	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ⁰ -C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	400
4149-8_350	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C ⁰ -A ¹ -C ¹ -G-C-G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	401
4149-8_351	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C ⁰ -G-Bn-Pe-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	402
4149-8_364	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-T-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	403
4149-8_365	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-T-Bn-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	404
4149-8_366	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-T-Bn-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	405
4149-8_367	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-T-A-Bn-A ¹ -G-C-G ¹	406
4149-8_368	Bn-Bn-A ¹ -C-Heg-G-Bn-Bn-A-C-A ¹ -C-G-C-G-Bn-Bn-Bn-A-T-A ¹ -G-C-G ¹	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 ¹ -C-Heg-G-Bn ¹ -Bn-A ¹ -C-C3-C ¹ -G-C-G ¹ -Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	409

10

20

【0381】

上付なしはデオキシリボースを示す

上付きの o は 2' -フルオロを示す

上付きの 1 は 2' -O-メチルを示す

上付きの 2 はホスホロチオエート（デオキシリボース）を示す

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

30

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

40

F B n = フルオロベンジル - d U

B n = ベンジル - d U

表 3. PDGF アプタマークローン 4149-8_1 のトランケーション

【0382】

【表 3】

アダプター ID番号	配列 (5' → 3')	長さ	K _d (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_10	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_11	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_12	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_13	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	44	0.8	12
4149-8_14	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	42	13	345
4149-8_16	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_18	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_19	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
4149-8_26	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_27	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_29	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_30	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_31	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_32	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_33	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_37	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_38	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_39	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_40	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_41	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

【0383】

10

20

30

40

【表 4】

表 4. データ収集、精密化及びモデル統計

データ収集		
リガンド	4149-8_260	4149-8_255
空間群	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2
単位格子パラメーター: 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)
独立反射	15629	13750
完全性 (%)	96.8 (99.1)	97.2 (98.4)
R _{merge}	4.0 (57.8)	6.4 (57.2)
平均 I / σ (I)	25.3 (3.4)	19.3 (2.6)
精密化		
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 _{cryst}	0.225(0.329)	0.239(0.366)
R _{free}	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 因子 (Å ²)	43.68	43.86
支持される (f a v o r e d) 領域の残基 (%)	98.9	98.9
許容される (a l l o w e d) 領域の残基 (%)	100.0	100.0
M o l p r o b i t y スコア (パーセンタイル)	1.45 (99 パーセンタイル)	1.41 (99 パーセンタイル)
PDB I D	4HQU	4HGX

括弧内の値は、20の分解能シエルの内の最も高い値を示す。

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

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

フリーR因子は、精密化から除かれた反射の5%を使用して計算した (The CCP4 suite: programs for protein crystallography, 1994)。

*リガンドB-因子は、タンパク質単量体の活性部位のリガンドに関してである。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。

【0384】

表 5. B型DNAと比較した、PDGF BBアプタマーの塩基対パラメーター

【0385】

【表 5】

パラメーター	B-DNA	5' ステムループ		ミニノット S 1		ミニノット S 2	
相補塩基対							
パラメーター							
バックル (度)	0.5 (6.7)	-5.67 (7.90)		0.32 (22.8)		-0.74 (15.3)	
プロペラ (度)	-11.4 (5.3)	-9.84 (6.10)		7.43 (10.4)		2.42 (7.75)	
開口 (度)	0.60 (3.1)	-8.13 (25.2)		7.86 (12.5)		0.35 (0.40)	
剪断 (Å)	0.00 (0.21)	1.12 (1.42)		1.29 (2.52)		-0.03 (0.42)	
ストレッチ (Å)	-0.15 (0.12)	-0.38 (0.66)		1.96 (3.55)		-0.12 (0.42)	
スタガー (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ー		U2, A3/ U7, U8	A3, C4/ G6, U7	C10, A9/ U16, G15	A9, U20/ U17, U16	C12, G13/ C23, G24	G13, C14/ G22, C23
傾き (度)	-0.1 (2.5)	-0.80	-1.45	-4.65	-5.83	-2.39	3.86
回転 (度)	0.6 (5.2)	0.34	0.55	6.12	-5.64	4.19	3.94
ねじれ (度)	36 (6.8)	24.1	33.3	25.3	15.9	29	33.9
シフト (Å)	-0.02 (0.45)	3.20	-0.12	-0.90	-1.45	-0.17	0.78
スライド (Å)	0.23 (0.81)	0.25	-0.24	0.27	-4.49	0.21	-0.4
ライズ (Å)	3.32 (0.19)	2.68	3.28	2.98	3.58	2.73	3.13
局所らせんパラメーター							
傾斜 (度)	2.1 (9.2)	0.81	0.96	13.6	-18.9	8.28	6.72
先端 (度)	0.0 (4.3)	1.92	2.52	10.4	19.5	4.72	-6.57
らせんのねじれ (度)	36.5 (6.6)	24.1	33.4	26.3	17.8	29.4	34.3
x-変位 (Å)	0.05 (1.28)	0.52	-0.5	-0.97	-9.84	-0.34	-1.28
y-変位 (Å)	0.02 (0.87)	-7.89	-0.03	0.81	-0.12	-0.09	-0.73
らせんライズ (Å)	3.29 (0.21)	2.58	3.28	3.07	5.08	2.73	3.13

10

20

【0 3 8 6】

【表 6】

表 6. PDGF アプタマークローン 5169-4 のトランケーション

アプタマー ID 番号	配列 (5' → 3')	K _d (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
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
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

【0387】

10

20

30

【表 7】

表 7. 5169-4_26 のすべての位置での C3 スペーサー置換

アダプター ID 番号	配列 (5' → 3')	K _d (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

【0388】

【表 8】

表 8. 5169-4_26 における 2' オーメチル及びデオキシチミジン置換

アダプター ID 番号	配列 (5' → 3')	K _d (nM)	配列番号
5169-4 33	C ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -P	0.022	465
5169-4 39	C-G ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -C-A-C-A-P-C-P	0.0069	469
5169-4 43	C-G-A ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -P-C-P	0.014	475
5169-4 49	C-G-A-C-A-G-C-A-P ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹	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

【0389】

【表 9】

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 _d (nM)	配列番号
5169-4_80	C-G-A-C-A-G-C ¹ -A-P-G-P-A-P-G-C-A ¹ -C-A ¹ -P-C-P	0.0061	486
5169-4_81	C-G-A-C-A-G-C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C-A ¹ -C-A ¹ -P-C-P	0.0049	487
5169-4_82	C-G-A-C-A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C-A ¹ -C-A ¹ -P-C ¹ -P ¹	0.0016	488
5169-4_83	C ¹ -G-A-C-A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C-A ¹ -P-C ¹ -P ¹	0.0021	489
5169-4_84	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C-A ¹ -P-C ¹ -P ¹	0.0053	490
5169-4_85	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P ¹ -A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	0.0062	491
5169-4_86	C ¹ -G ¹ -A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P ¹ -A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	0.064	492
5169-4_87	C ¹ -G ¹ -A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G ¹ -P ¹ -A ¹ -P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	NB	493
5169-4_88	C ¹ -G ¹ -A ¹ -C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G ¹ -P ¹ -A ¹ -P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	NB	494
5169-4_89	C ¹ -G ¹ -A ¹ -C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G ¹ -P ¹ -A ¹ -P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P ¹ -C ¹ -P ¹	NB	495
5169-4_90	C ¹ -G ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -G ¹ -C ¹ -A-P ¹ -G ¹ -P ¹ -A ¹ -P ¹ -G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P ¹ -C ¹ -P ¹	NB	496
5169-4_91	C ¹ -G ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -G ¹ -C ¹ -A ¹ -P ¹ -G ¹ -P ¹ -A ¹ -P ¹ -G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P ¹ -C ¹ -P ¹	NB	497
5169-4_92	C ¹ -G-A-C-A-G-C ¹ -A-P-G-P-A-P-G-C ¹ -A ¹ -C-A ¹ -P-C ¹ -P ¹	0.0052	498
5169-4_105	C-G-A-C-A-G ¹ -C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A ¹ -P-C ¹ -P	0.0061	499
5169-4_106	C ¹ -G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A ¹ -P-C ¹ -P	0.016	517
5169-4_107	C ¹ -G-A-C-A-G ¹ -C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A ¹ -P-C-P	0.013	518
5169-4_108	C ¹ -G-A-C-A-G ¹ -C-A-P-G-P-A-P-G ¹ -C-A-C-A-P-C-P	0.012	519
5169-4_109	C ¹ -G-A-C-A-G ¹ -C-A-P-G-P-A-P-G-C-A ¹ -C-A-P-C-P	0.011	520
5169-4_110	C ¹ -G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G ¹ -C-A ¹ -C-A-P-C-P	0.0050	521
5169-4_111	C-G-A-C-A-G-C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C-A ¹ -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 ¹ -C-A ¹ -C-A-P-C-P ¹	0.0062	523
5169-4_113	C-G-A-C-A-G-C ¹ -A-P-G-P-A-P-G-C-A ¹ -C-A-P-C-P ¹	0.012	524
5169-4_114	C-G-A-C-A-G-C ¹ -A-P-G-P-A-P-G-C-A-C ¹ -A-P-C-P ¹	0.038	525
5169-4_115	C-G-A-C ¹ -A-G-C ¹ -A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P ¹	0.024	526
5169-4_116	C-G-A-C ¹ -A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C ¹ -A-P-C-P ¹	0.093	527
5169-4_117	C-G-A-C ¹ -A-G-C-A-P-G-P-A ¹ -P-G-C-A-C ¹ -A-P-C-P	0.71	528
5169-4_118	C-G ¹ -A-C ¹ -A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C ¹ -A-P-C-P	0.56	529
5169-4_119	C-G ¹ -A-C ¹ -A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C ¹ -A-P-C-P	NB	530
5169-4_120	C-G ¹ -A-C-A-G-C-A-P-G-P-A ¹ -P-G-C ¹ -A-C-A-P-C-P	NB	531
5169-4_121	C-G ¹ -A-C-A-G-C-A-P-G ¹ -P-A ¹ -P-G-C-A-C-A-P-C-P	NB	532
5169-4_122	C-G ¹ -A-C-A-G-C-A-P-G ¹ -P-A-P-G-C ¹ -A-C-A-P-C-P	NB	533
5169-4_123	C ¹ -G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C ¹ -P ¹	0.030	534
5169-4_124	C-G-A-C-A ¹ -G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C ¹ -P ¹	0.60	535
5169-4_125	C ¹ -G-A-C-A ¹ -G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C ¹ -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 ¹ -C ¹ -P ¹	NB	537
5169-4_127	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P-G-C-A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C-P	0.010	538
5169-4_128	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G-P-A-P ¹ -G ¹ -C ¹ -A-C-A-P-C-P	0.099	539
5169-4_129	C-G-A-C-A-G-C-A-P-G ¹ -P ¹ -A ¹ -P-G-C-A-C-A-P-C-P	NB	540
5169-4_130	C-G-A-C-A-G-C ¹ -A ¹ -P ¹ -G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	4.5	541
5169-4_131	C-G-A-C ¹ -A ¹ -G ¹ -C-A-P-G-P-A-P-G-C-A-C-A-P-C-P	0.64	542
5169-4_132	C ¹ -G ¹ -A ¹ -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 ¹ -G-A-C-A-G-C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C-A ¹ -C-A ¹ -P-C-P ¹	0.00050	544
5169-4_146	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	0.00060	545

【0390】

10

20

30

【表 10-1】

表 10. VEGF アプタマークローン 4867-31 のトランケーション

アプタマー ID 番号	長さ	配列 (5' → 3')	K _d (nM) hVEGF165	K _d (nM) rVEGF164	K _d (nM) hVEGF121	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-4867-31-26	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
OH-4867-31-27	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-4867-31-28	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-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P	0.10	0.07	0.97	552
OH-4867-31-29	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-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P	0.13	0.08	0.96	553
OH-4867-31-30	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-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P	0.20	0.15	1.4	554
OH-4867-31-31	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-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P	0.17	0.12	1.0	555
OH-4867-31-32	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
OH-4867-31-33	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-4867-31-34	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-4867-31-35	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-4867-31-36	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-4867-31-37	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-4867-31-38	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
OH-4867-31-39	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-4867-31-40	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-4867-31-41	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

【表 10-2】

OH-4867-31-42	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-4867-31-43	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-A-P-G-G-A	0.050	0.05	0.29	567
OH-4867-31-44	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
OH-4867-31-45	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-P-A-A-A-P-G	1.1	4.5	3.3	569
OH-4867-31-46	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-4867-31-47	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-4867-31-48	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-4867-31-49	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-4867-31-50	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-4867-31-51	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
OH-4867-31-52	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-4867-31-53	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-4867-31-54	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-4867-31-55	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-4867-31-56	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-4867-31-57	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-4867-31-58	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
OH-4867-31-59	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-4867-31-60	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-4867-31-61	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

【0392】

表 11 : 4 8 6 7 - 1 5 _ 2 のすべての位置での C 3 スペース置換

【0393】

10

20

30

40

【表 1 1 - 1】

表 1 1 : 4 8 6 7 - 1 5 _ 2 のすべての位置での C 3 スペーサー置換

アダプター ID 番号	配列 5' → 3'	K _d (nM)	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
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
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

【 0 3 9 4 】

10

20

30

40

【表 1 1 - 2】

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-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	-	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
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-P-V-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	0.54	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-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-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-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-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-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-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
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-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-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

【表 1 1 - 3】

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
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-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-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-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-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-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-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-P-A-A-A-P-G-G-A-A-P-P-G-G-A-G-G-V	0.17	1.1	638

10

20

【0 3 9 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 I D 番号	配列 5' → 3'	K _d (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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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
OH-4867-31_73	A-G-C-C-G-P-P-C-A ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -P-G-P-A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	NB	-	653

30

40

【0 3 9 7】

50

【表 1 2 - 2】

OH-4867-31_80	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-U ¹ -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 ¹ -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 ¹ -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G-A	NB	-	656
OH-4867-31_83	A-G-C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -P-G-G-A	8.87	30.6	666
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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹	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-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
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-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-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

【表 1 3】

表 1 3 : VEGF アプタマー 4 8 6 7 - 3 1 _ 1 4 3 における単一の 2' - O - メチル N a p - U 置換及び複数の 2' - O - メチル置換

アプタマー I D 番号	配列 5' → 3'	K _d (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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -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 ¹ -A-G-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G-G	5.6E-10	4.1	7%, 64%	692
4867-31_160	C-C-G-P-P-C-A-A-G-P-G-C-P-P-G-P-A-G-G-A-P ¹ -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 ¹ -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-P ¹ -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-P-A-A-A-P ¹ -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-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 ¹ -P-G-C-P-P-V-P-A ¹ -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 ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-V-P-A ¹ -V-G-A-P-P-P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	2.6E-10	1.9	50%	699
4867-31_186	C ¹ -C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-V-P-A ¹ -V-G-A-P-P-P-A-A ¹ -A-P-G ¹ -G ¹	1.6E-09	12	77%	700
4867-31_187	C-C-G-P-P-C-A-A-G ¹ -P-G-C-P-P-V-P-A ¹ -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 ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-V-P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P-P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	3.8E-11	0.28	-2%	702
4867-31_189	C ¹ -C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-V-P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P-P-A-A ¹ -A-P-G ¹ -G ¹	9.0E-10	6.6	13%	703

【 0 3 9 9 】

【表 1 4】

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

アプタマー I D 番号	配列 5' → 3'	K _d (M)	4 8 6 7 - 3 1 _ 1 8 8 と の比	配列番号
4867-31_188	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-V-P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P-P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	4.8E-11	1.0	702
4867-31_190	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-V-P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	8.9E-11	1.9	704
4867-31_191	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P-P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	1.0E-10	2.1	705
4867-31_192	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	3.5E-11	0.7	706

【 0 4 0 0 】

10

20

30

40

【表 15】

表 15. 4149-8_379及び5169-4_26のPDGFホモ二量体

アダプター I D 番号	配列 (5' → 3')	K _i (pM)	配列番号
4149-8_438	Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹	4.2	707
4149-8_439	Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -H-Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹	3.5	708
4149-8_440	Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -H-H-Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹	1.4	709
4149-8_441	Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -H-H-H-Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹	0.78	710
4149-8_442	Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -H-H-H-H-Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹	0.51	711
4149-8_443	Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -H-H-H-H-H-Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹	0.25	712
4149-8_444	Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -H-H-H-H-H-H-Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹	0.61	713
4149-8_379D	Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -G ¹ -C-G-A ¹ -Z-A ¹ -Z ¹ -Z-Z-G-C-G-C ¹ -C3-C-A-Z-Z ¹ -G-H-C-A ¹ -M-Z	11	714
4149-8_445	Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -H-H-G ¹ -C-G-A ¹ -Z-A ¹ -Z ¹ -Z-Z-G-C-G-C ¹ -C3-C-A-Z-Z ¹ -G-H-C-A ¹ -M-Z	1.1	715
4149-8_446	Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -H-H-H-H-G ¹ -C-G-A ¹ -Z-A ¹ -Z ¹ -Z-Z-G-C-G-C ¹ -C3-C-A-Z-Z ¹ -G-H-C-A ¹ -M-Z	0.61	716
4149-8_447	Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -H-H-H-H-H-H-H-G ¹ -C-G-A ¹ -Z-A ¹ -Z ¹ -Z-Z-G-C-G-C ¹ -C3-C-A-Z-Z ¹ -G-H-C-A ¹ -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
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

【0401】

10

20

30

40

【表 16】

表 16. 4867-31_192 の VEGF ホモ二量体

アダプター I D 番号	配列 (5' → 3')	K _i (pM)	配列番号
4867-31_395	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹ -C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	6.8	729
4867-31_396	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹ -H-C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	50	730
4867-31_397	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹ -H-H-C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	43	731
4867-31_398	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹ -H-H-H-C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	29	732
4867-31_399	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹ -H-H-H-H-C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	22	733
4867-31_400	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹ -H-H-H-H-C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	14	734
4867-31_401	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹ -H-H-H-H-H-H-C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	21	735
4867-31_192D	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹ -G ¹ -G ¹ -P-A-A-A-P-P ¹ -P-A-G-G ¹ -A ¹ -P-G ¹ -P-P-C ¹ -G-P-G ¹ -A-A-C ¹ -P-P-G-C-C	32	736
4867-31_402	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹ -H-H-G ¹ -G ¹ -P-A-A-A-P-P ¹ -P-A-G-G ¹ -A ¹ -P-G ¹ -P-P-C ¹ -G-P-G ¹ -A-A-C ¹ -P-P-G-C-C	27	737
4867-31_403	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹ -H-H-H-H-G ¹ -G ¹ -P-A-A-A-P-P ¹ -P-A-G-G ¹ -A ¹ -P-G ¹ -P-P-C ¹ -G-P-G ¹ -A-A-C ¹ -P-P-G-C-C	20	738
4867-31_404	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹ -H-H-H-H-H-H-G ¹ -G ¹ -P-A-A-A-P-P ¹ -P-A-G-G ¹ -A ¹ -P-G ¹ -P-P-C ¹ -G-P-G ¹ -A-A-C ¹ -P-P-G-C-C	33	739

10

20

30

【0402】

【表 17】

表 17 : PDGF-VEGF アプタマー構築物

アプタマー 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 ¹ -C-H-G-Z-Z-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z-A ¹ -Z-A ¹ -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 ¹ -C-H-G-Z-Z-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z-A ¹ -Z-A ¹ -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 ¹ -C-H-G-Z-Z-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z-A ¹ -Z-A ¹ -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-H-Z-Z-A ¹ -C-H-G-Z-Z-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z-A ¹ -Z-A ¹ -G-C	743
4149-8_317	Z-Z-A ¹ -C-H-G-Z-Z-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z-A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -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 ¹ -C-H-G-Z-Z-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z-A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -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 ¹ -C-H-G-Z-Z-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z-A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -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 ¹ -C-H-G-Z-Z-A-C-A ¹ -C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z-A ¹ -Z-A ¹ -G-C-G ¹ -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

【0403】

表 18 : PDGF-VEGF アプタマー構築物の結合親和性及びインビトロ活性

【0404】

【表 18】

		PDGF-BB	Hs27 PDGFRβ	PDGF-AB	VEGF	VEGF121
標的	配列 ID	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

10

20

30

40

50

【0405】

【表19】

表19. PDGF/VEGFアプタマー構築物4149-8__401

アプタマー I D 番号	配列 5' → 3'	配列番号
4149-8_401	Z-M-A ¹ -C-H-G-Z ¹ -Z-A-C-C3-C ¹ -G-C-G-Z-Z-Z ¹ -A ¹ -Z-A ¹ - G-C-G ¹ -H-H-H-C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P- A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	748

【0406】

【表20】

10

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 I D	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

【0407】

【表 2 1】

表 2 1 : 4 1 4 9 - 8 _ 3 7 9 及び 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

アプタマー I D 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

【 0 4 0 8 】

【表 2 2】

表22. 5169-4__26及び4867-31__192を含むPDGF/VEGFアプタマー構築物の結合親和性

[illegible]

10

20

30

【 0 4 0 9 】

【表 2 3】

表 23. 眼部 PK 研究で試験したアプタマー及びアプタマー構築物

試験物	配列番号	標的 (複数可)	PEG
SL1010	4867-31_192	VEGF	40 kDa
SL1011	4149-8_379	PDGF	40 kDa
SL1012	4149-8_401	VEGF 及び PDGF	20 kDa
SL1013	4149-8_401	VEGF 及び PDGF	40 kDa

【 0 4 1 0 】

【表 2 4】

表 2 4. 眼部薬物動態研究における硝子体液中のアプタマー及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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	SL1011 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	SL1012 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	SL1013 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
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

【0 4 1 1】

【表 2 5】

表 2 5 N Z Wウサギに対する両眼硝子体内単回投与後のアプタマー及びアプタマー構築物の硝子体液半減期

試験物	半減期 (時間)	9 5 %信頼区間
SL1010	105	90- 128
SL1011	47	42 - 55
SL1012	69	58- 85
SL1013	92	81- 106

【0 4 1 2】

10

20

【表 2 6】

表 2 6. アプタマー 4 8 6 7-3 1-1 9 2 に沿ったホスホロチオエートワーク

アプタマー I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号	K _d (M)	親との比
4867-31_192	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	706	1.1E-11	1
4867-31_409	C ² -C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	763	1.1E-11	0.97
4867-31_410	C-C ² -G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	764	1.6E-11	1.5
4867-31_411	C-C-G ² -P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	765	3.2E-07	29,259
4867-31_412	C-C-G-P ² -P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	766	2.2E-11	2.1
4867-31_413	C-C-G-P-P ² -C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	767	1.5E-11	1.4
4867-31_414	C-C-G-P-P-C ¹ -A ² -A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	768	1.5E-11	1.4
4867-31_415	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A ² -G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	769	1.1E-11	1.0
4867-31_416	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P ² -G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	770	9.3E-12	0.86
4867-31_417	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G ² -C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	771	9.4E-12	0.87
4867-31_419	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P ² -P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	772	データなし	データなし
4867-31_420	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P ² -G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	773	1.8E-11	1.6
4867-31_421	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P ² -A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	774	1.5E-11	1.4
4867-31_422	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G ² -A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	775	9.5E-12	0.88
4867-31_423	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A ² -P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	776	1.8E-11	1.7
4867-31_424	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P ² -P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	777	1.1E-11	1.1
4867-31_425	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P ² -A-A-A-P-G ¹ -G ¹	778	1.6E-11	1.5
4867-31_426	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A ² -A-A-A-P-G ¹ -G ¹	779	1.2E-11	1.1
4867-31_427	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A ² -A-P-G ¹ -G ¹	780	8.1E-12	0.75
4867-31_428	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A ² -P-G ¹ -G ¹	781	8.4E-12	0.78
4867-31_429	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P ² -G ¹ -G ¹	782	1.2E-11	1.1
4867-31_438	C-C-G-P-P-C ^{1,2} -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	783	1.3E-11	1.2
4867-31_439	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ^{1,2} -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	784	2.4E-11	2.2
4867-31_440	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ^{1,2} -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	785	9.9E-12	0.91
4867-31_441	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ^{1,2} -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	786	1.7E-11	1.6
4867-31_442	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ^{1,2} -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	787	1.5E-11	1.4
4867-31_443	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ^{1,2} -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	788	8.5E-12	0.79
4867-31_444	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ^{1,2} -G ¹	789	7.5E-12	0.70
4867-31_445	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ^{1,2}	790	1.0E-11	0.96

【 0 4 1 3 】

10

20

30

40

【表 27】

表 27. ヌクレアーゼ抵抗性を増強するために作出された VEGF アプタマーの配列。結合解離定数 (K_d 値) を、2' -OMe 部分 (# OMe ; 上付きの「1」はヌクレオチドが 2' -O-メチルを有することを示す) 及び 3' -ホスホロチオエート結合 (# P=S ; 上付きの「2」はヌクレオチドがホスホロチオエート結合を有することを示す) の数とともに示す。

アプタマー I D 番号	配列 (5' → 3')	配列番号	K_d (M)	# OMe	# P=S
4867-31_192	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A-P-G ¹ -G ¹	706	3.1E-11	9	0
4867-31_475	C ¹ -C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A ² -A-P-G ¹ -G ¹	791	2.6E-11	10	1
4867-31_476	C ¹ -C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A-A ² -P-G ¹ -G ¹	792	2.1-11	10	1
4867-31_477	C ¹ -C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A ² -A ² -P-G ¹ -G ¹	793	2.4E-11	10	2
4867-31_478	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A-A ² -A ² -P-G ¹ -G ¹	794	1.9E-11	9	2
4867-31_479	C ¹ -C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A ² -A-A-P-G ¹ -G ¹	795	2.6E-11	10	1
4867-31_480	C ¹ -C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A ² -A ² -A-P-G ¹ -G ¹	796	2.8E-11	10	2
4867-31_481	C ¹ -C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A ² -A ² -A ² -P-G ¹ -G ¹	797	2.6E-11	10	3
4867-31_482	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A ² -A ² -A ² -P-G ¹ -G ¹	798	2.4E-11	9	3
4867-31_483	C-C-G-P-P-C ¹ -A-A-G ¹ -P-G-C ¹ -P-P-G ¹ -P-A ¹ -G ¹ -G-A-P-P ¹ -P-A ² -A ² -A-P-G ¹ -G ¹	799	3.2E-11	9	2

【0 4 1 4】

10

20

【表 28】

表 28. アプタマー 5169-4_146 に沿ったホスホロチオエートワーク

アプタマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番号	K _d (M)	親との比
5169-4_146	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	545	1.5E-11	1.0
5169-4_150	C ¹ -G ² -A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	800	1.3E-11	0.89
5169-4_151	C ¹ -G-A ² -C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	801	6.0E-12	0.42
5169-4_152	C ¹ -G-A-C ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	802	1.5E-11	1.0
5169-4_153	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A ² -P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	803	1.3E-11	0.92
5169-4_154	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P ² -G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	804	2.6E-11	1.8
5169-4_155	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G ² -P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	805	6.9E-12	0.48
5169-4_156	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P ² -A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	806	7.8E-12	0.54
5169-4_157	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A ² -P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	807	1.8E-11	1.2
5169-4_158	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P ² -G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	808	1.9E-11	1.3
5169-4_159	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P ² -C ¹ -P ¹	809	1.5E-11	1.0
5169-4_172	C ^{1,2} -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	810	1.3E-11	0.90
5169-4_173	C ¹ -G-A-C ^{1,2} -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	811	9.1E-12	0.63
5169-4_174	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ^{1,2} -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	812	1.8E-11	1.2
5169-4_175	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ^{1,2} -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	813	6.9E-12	0.48
5169-4_176	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ^{1,2} -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	814	1.4E-11	0.93
5169-4_177	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ^{1,2} -P ¹	815	7.2E-12	0.50
5169-4_178	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ^{1,2} -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	816	1.1E-11	0.76
5169-4_179	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ^{1,2} -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	817	7.7E-12	0.53
5169-4_180	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ^{1,2} -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	818	2.0E-11	1.4
5169-4_181	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ^{1,2} -P-C ¹ -P ¹	819	2.1E-11	1.4

【0415】

【表 29】

表 29. スクレアーゼ抵抗性を増強するために作出された PDGFB アプタマーの配列。結合解離定数 (K_d 値) を、2'-OMe 部分 (#OMe ; 上付きの「1」はヌクレオチドが 2'-O-メチルを有することを示す) 及び 3'-ホスホロチオエート結合 (#P=S ; 上付きの「2」はヌクレオチドがホスホロチオエート結合を有することを示す) の数とともに示す。

アプタマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番号	K _d (M)	# OMe	# P=S
5169-4_146	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P-G-P-A-P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	545	2.6E-11	11	0
5169-4_182	C ¹ -G-A-C ¹ -A-G ¹ -C ¹ -A-P ² -G ² -P ² -A ² -P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	820	3.9E-11	11	4
5169-4_188	C ¹ -G-A-C ^{1,2} -A-G ¹ -C ¹ -A-P ² -G ² -P ² -A ² -P-G ¹ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -A ¹ -P-C ¹ -P ¹	821	8.6E-12*	11	5

*実施例 14 に記載されているように競合結合アッセイを使用して決定した K_i 値

【0416】

10

20

30

40

【表 30】

表 30. ヌクレアーゼ抵抗性を増強するために作出された PDGF アプタマーの配列。結合解離定数 (K_d 値) を、2' -OMe 部分 (#OMe ; 上付きの「1」はヌクレオチドが 2' -O-メチルを有することを示す) 及び 3' -ホスホロチオエート結合 (#P=S ; 上付きの「2」はヌクレオチドがホスホロチオエート結合を有することを示す) の数とともに示す。

アプタマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番号	K_d (M)	# OMe	# P=S
4149-8_379	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A-C-V-C ¹ -G-C-G-Bn ¹ -Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	306	1.6E-11	7	0
4149-8_453	Bn-Bn-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-V-C ¹ -G ¹ -C-G ² -P ² -Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	822	2.0E-12	8	4
4149-8_454	Bn-Bn-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-V-C ¹ -G-C-G ² -P ² -Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	823	1.3E-12	7	4
4149-8_455	Bn-Bn-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn ² -A ² -C-V-C ¹ -G ¹ -C-G ² -P ² -Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	824	1.7E-11	8	5
4149-8_456	Bn-Bn-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn ² -A ² -C-V-C ¹ -G-C-G ² -P ² -Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	825	2.7E-11	7	5
4149-8_457	Bn-Bn-A ¹ -C ² -H-G-Bn ¹ -Bn ² -A ² -C ² -V-C ¹ -G ¹ -C-G ² -P ² -Bn ² -Bn ^{1,2} -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	826	4.3E-11*	7	5
4149-8_458	Bn-Bn-A ¹ -C ² -H-G-Bn ¹ -Bn ² -A ² -C ² -V-C ¹ -G ¹ -C ² -G ² -P ² -Bn ² -Bn ^{1,2} -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	827	4.6E-11*	8	8
4149-8_459	Bn-Bn-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn ² -A ² -C ² -V-C ¹ -G ¹ -C-G ² -P ² -Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	828	1.3E-11*	8	6

*実施例 14 に記載されているように競合結合アッセイを使用して決定された K_i 値

【0417】

10

20

【表 3 1】

表 3 1. スクレアーゼ抵抗性を増強するために作出された PDGF アプタマーの配列

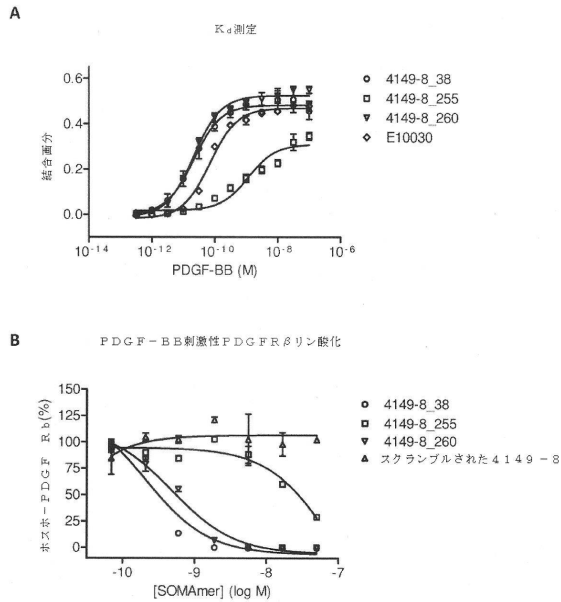
アプタマー ID 番号	配列 (5' → 3')	配列番号	K _d (M)
4149-8_379	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A-C-V-C ¹ -G-C-G-Bn -Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	306	5.2E-11
4149-8_391	Bn-Bn-A ¹ -C-H-G-Bn-Bn-A ² -C-V-C ¹ -G-C-G ² -Bn -Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	317	1.2E-11
4149-8_418	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A-C-V-C ¹ -G-C-G ¹ -Bn -Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	330	2.1E-10
4149-8_419	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A-C-V-C ¹ -G-C-G ¹ -P-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	331	1.3E-9
4149-9_420	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A-C-V-C ¹ -G-C-G ¹ -i-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	829	1.4E-9
4149-8_421	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A-C-V-C ¹ -G ¹ -C-G-Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	333	1.9E-11
4149-8_422	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A-C-V-C ¹ -G ¹ -C-G ¹ -Bn -Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	334	2.7E-10
4149-8_423	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A-C-V-C ¹ -G ¹ -C-G-P -Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	335	3.3E-11
4149-8_424	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A-C-V-C ¹ -G ¹ -C ¹ -G-Bn -Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	336	6.6E-9
4149-8_425	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A ¹ -C-V-C ¹ -G-C-G-Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	337	9.1E-10
4149-8_426	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A ¹ -C-V-C ¹ -G-C-G ¹ -Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	409	4.2E-8
4149-8_431	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-V-C ¹ -G-C-G ² -P-Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	338	4.3E-11
4149-8_432	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-V-C ¹ -G-C-G ² -Bn-Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	339	2.9E-11
4149-8_433	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-V-C ¹ -G-C-G ² -P-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	340	6.6E-11
4149-8_434	Bn-M-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-V-C ¹ -G-C-G ² -Bn-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	341	3.2E-11
4149-8_435	Bn-Bn-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-V-C ¹ -G-C-G ² -P-Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	342	1.6E-11
4149-8_436	Bn-Bn-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-V-C ¹ -G-C-G ² -Bn-Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	343	7.7E-12
4149-8_437	Bn-Bn-A ¹ -C-H-G-Bn ¹ -Bn-A ² -C-V-C ¹ -G-C-G ² -P-Bn-Bn ¹ -A ¹ -Bn-A ¹ -G-C-G ¹	344	7.4E-12

10

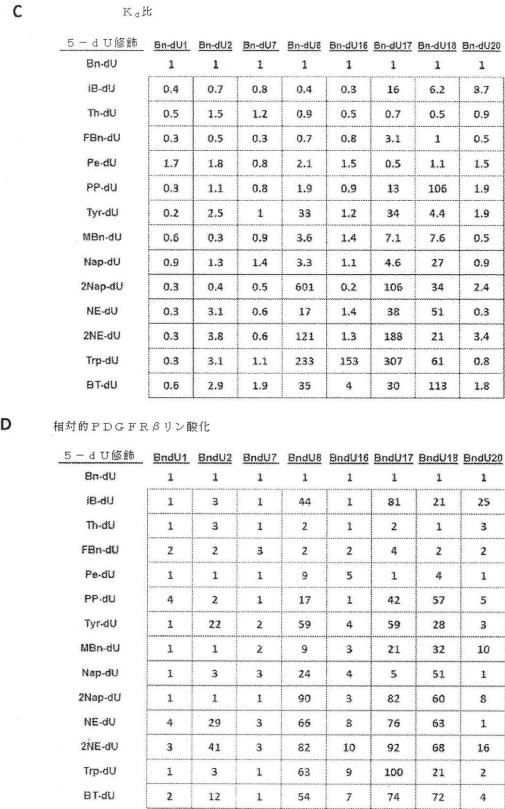
20

30

【図 1 - 1】



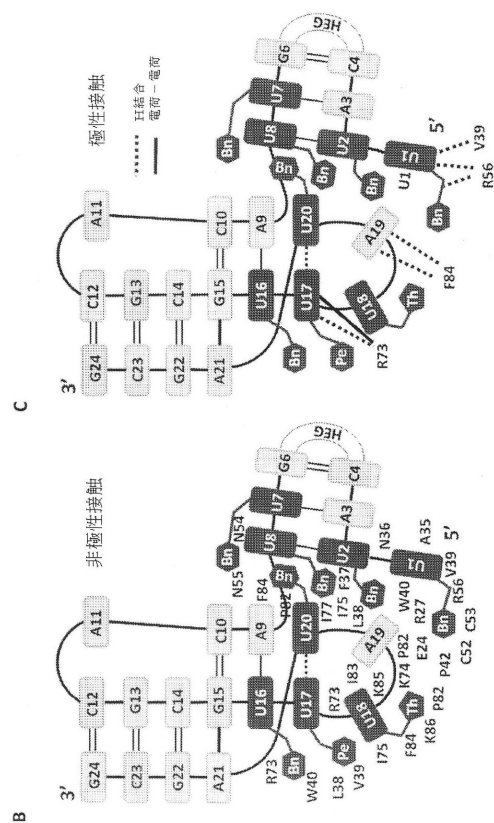
【图 1-2】



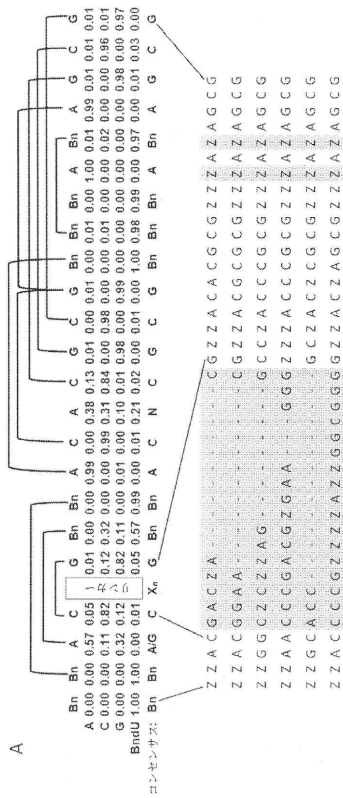
【図 2-1】

ヌクレオチド	SOMamer の分子内接触	SOMamer - PDGF 接触	接触 原子数
Bnd01	ππ: U1-Bn2 wW: Bn2-Bn6; Bn2-Bn7 互結合: U1-V39; U1-R56 (2)	wW, 鎖 1: GU24, Arg27, Leu38, Val39, Trp40, Pro42 wW, 鎖 2: Cys52*, Cys53, Asn54, Asn55, Arg56 互結合 (3): U1-Val39 (1) & U1-Arg56 (2)	24
Bnd02	ππ: U2-A3; Bn2-U1 wW: Bn2-Bn6; Bn2-Bn7 互結合: U2-BndU8 (2)	wW, 鎖 1: Arg27, Ala35, Asn36, Phe37, Leu38, Ile77 wW, 鎖 2: Asn54	12
2'OMe A3	ππ: C3-A4, A3-U2 互結合: A3 - U1, 2 塩基対	wW, 鎖 1: Asn36	1
Bnd07	ππ: U7-G6, U7-U8 wW: Bn7-Bn2; Bn7-Bn16 互結合: U7-A3 塩基対	wW, 鎖 2: Asn54, Asn55	3
BndU8	ππ: U8-Bn20, Bn8-Bn16, Bn8-Bn20 互結合: U8-BndU2 (2)	wW, 鎖 1: Leu38, Ile75, Lys80	3
BndU16	ππ: U16-G15, U16-U17 wW: Bn16-Bn7, Bn16-Bn8, Bn16-PE17 互結合: U16 - A3 塩基対	ππ: Bn16-Trp40 wW, 鎖 1: Arg73	4
PEU07	ππ: U17-U16 wW: PE17-Bn8, PE17-Th18 互結合: U17-Bnd U20 リンカー	wW, 鎖 1: Leu38, Val39, Trp40, Arg73, Ile75, Phe84 互結合 (1): PドU20 リンカー - Arg73 電荷 - 電荷 (1): 非接触 O - A r g 7 3	18
ThdU18	wW: Th18-PE17, Th18-U17	wW, 鎖 1: Lys85, Lys86, Arg73, Phe84, Pro82, Lys74, Ile75	15
dA19	ππ: A - 19 - 糖18 wW: 糖19 - U20 骨格	wW, 鎖 1: Ile83, Pro82, Phe84 互結合 (2): A19 N3-Phe84 NH & A19 N6H-Phe84 C=O	5
BndU20	ππ: U20-A9, Bnd20-U8, Bnd20-Bn8 互結合: Bn4 U20 リンカー - U17 N3	wW, 鎖 1: Ile77, Lys80, Pro82, Phe84	11

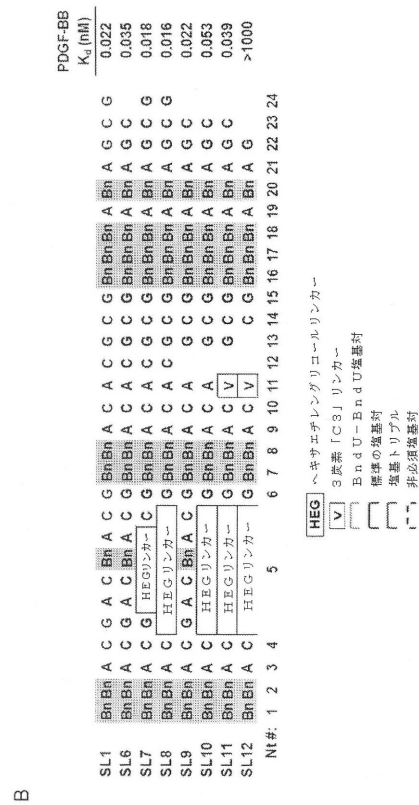
【図 2-2】



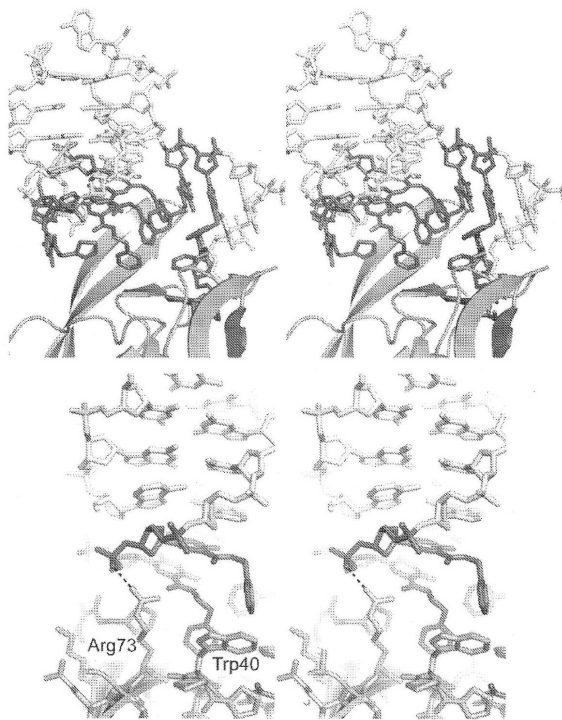
【図 3 - 1】



【図 3-2】



【図 4】

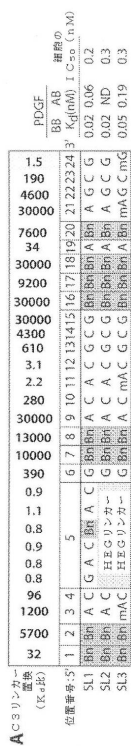


【図 5】

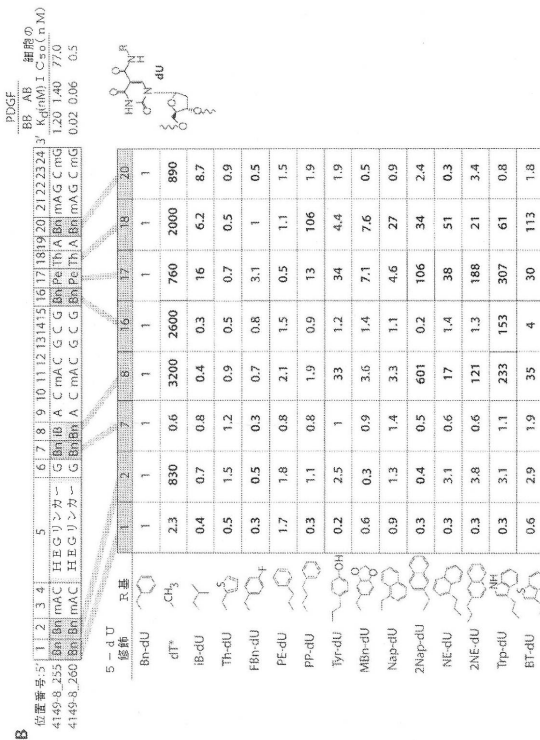
A

	SOMamer	PDGF-BB +HNA	PDGF-BB -HNA	PDGF-AB +HNA	PDGF-AB -HNA	PDGF-AA +HNA	PDGF-AA -HNA	PDGF-CC +HNA	PDGF-CC -HNA	PDGF-DD +HNA	PDGF-DD -HNA
		K _d (nM)									
PDGF-B	SL1	0.02	0.05	0.08	6.0	1.6	>1000	>1000	>1000	100	>1000
PDGF-A	4149-8_38	SL1									
PDGF-C	4149-8_130	SL3	0.02	0.05	0.24	1.6	8.7	>1000	>1000	290	>1000
PDGF-D	4149-8_255	SL4	0.43	1.2	2.0	25	3.4	460	>1000	>1000	>1000
PDGF-E	4149-8_260	SL5	0.02	0.13	0.08	3.9	8.0	420	>1000	710	>1000
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B	SL5										
PDGF-A	SL5										
PDGF-C	SL5										
PDGF-D	SL5										
PDGF-E	SL5										
PDGF-B											

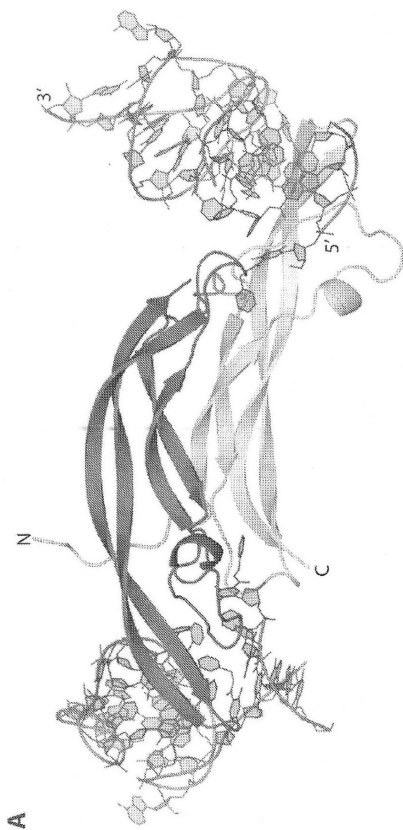
【图 6-1】



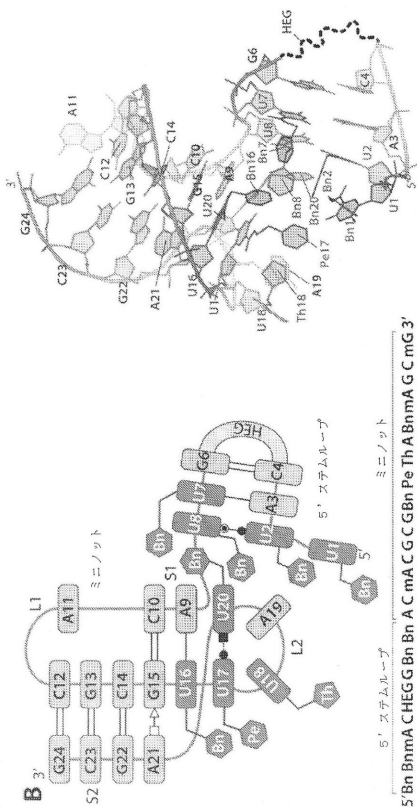
【图 6-2】



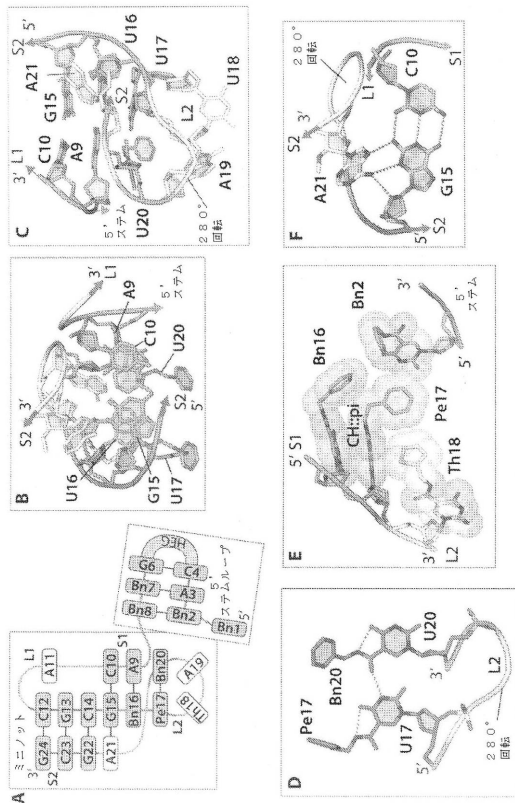
【图 7-1】



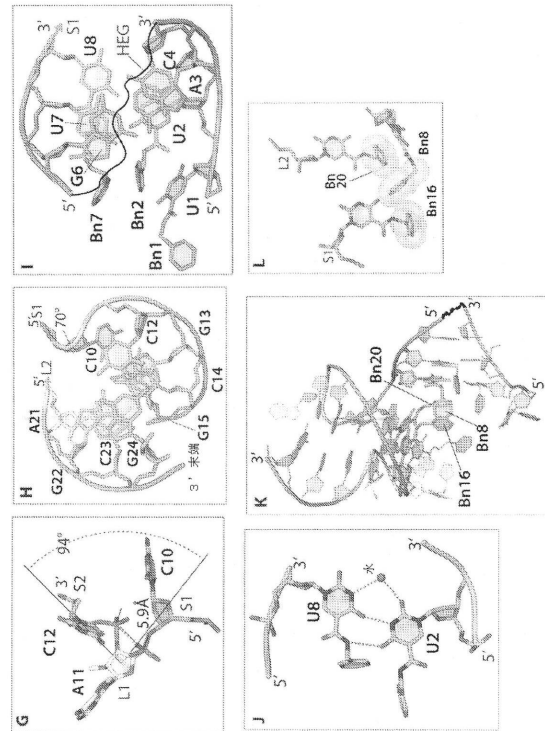
【图 7-2】



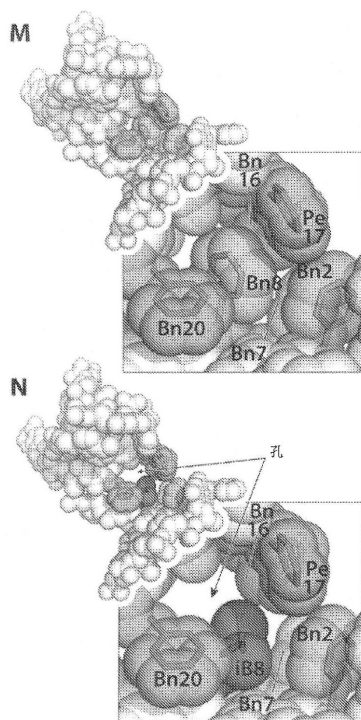
【図 8 - 1】



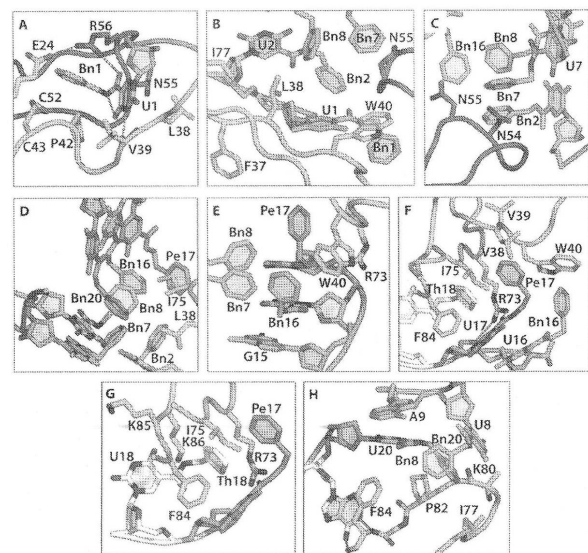
【図 8 - 2】



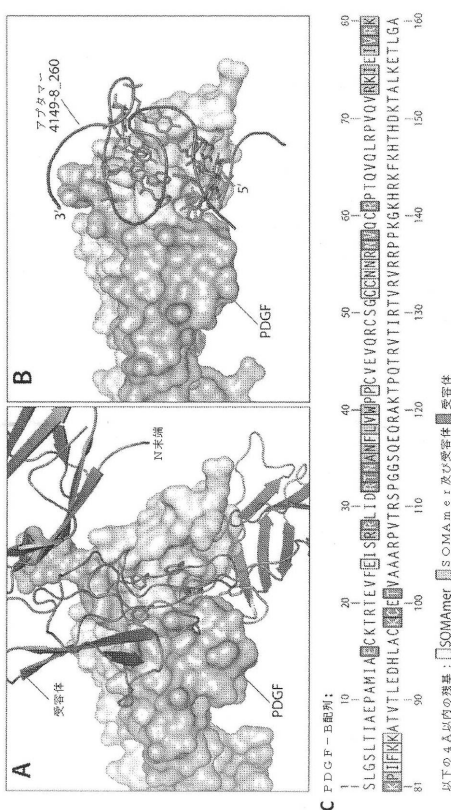
【図 8 - 3】



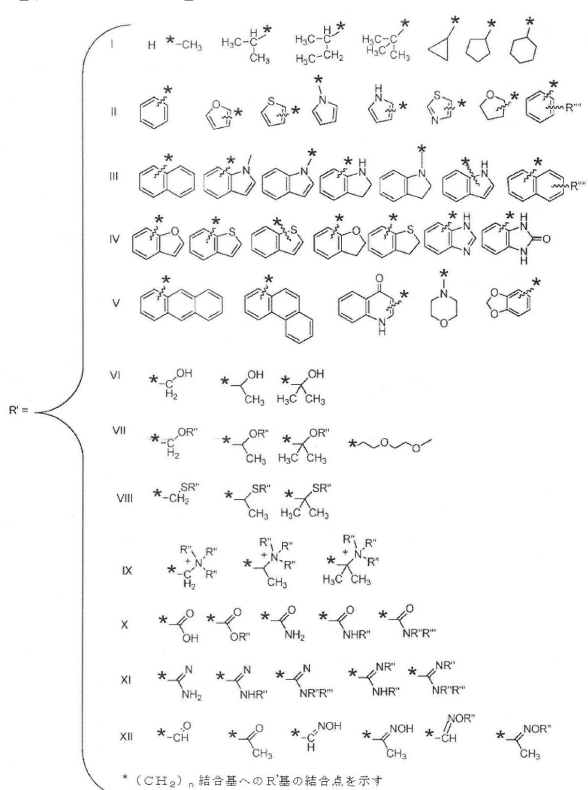
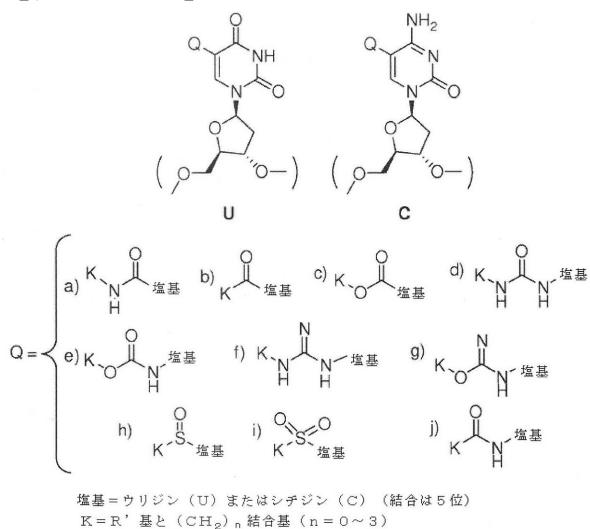
【図 9】



【图 1-1】



【図 1 2 - 2】



【図 12-3】

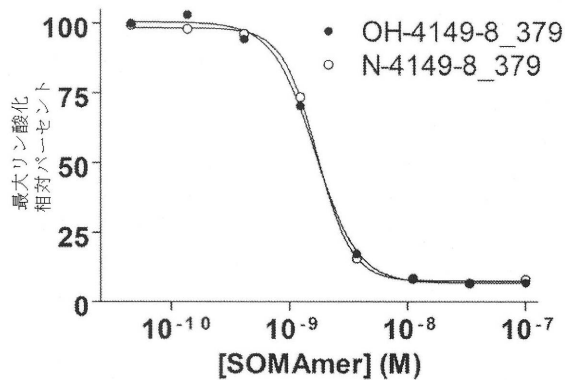
ここでは、

R'、R' は、分枝または直鎖の低級アルキル (C1~C20)；ヒドロキシル (OH)、ハロゲン (F、Cl、Br、I)；ニトリル (CN)；ボロン酸 (BO₂H₂)；カルボン酸 (COOH)；カルボン酸エステル (COOR')；一級アミド (CONH₂)；二級アミド (CONHR')；三級アミド (CONR'R')；スルホンアミド (SO₂NH₂)；N-アルキルスルホンアミド (SONHR') からなる群から選択され；

ここでは、

R'、R' は、分枝または直鎖の低級アルキル (C1~C2)；フェニル (C₆H₅)；R' 置換フェニル環 (R' C₆H₄)；(R' は上記で定義される)；カルボン酸 (COOH)；カルボン酸エステル (COOR')；(R' は上記で定義される)；分枝または直鎖の低級アルキル (C1~C20) である；及びシクロアルキルからなる群から独立に選択され；R' = R' = (CH₂)_n であり；
n = 2~10 である。

【図 13】



【図 14】

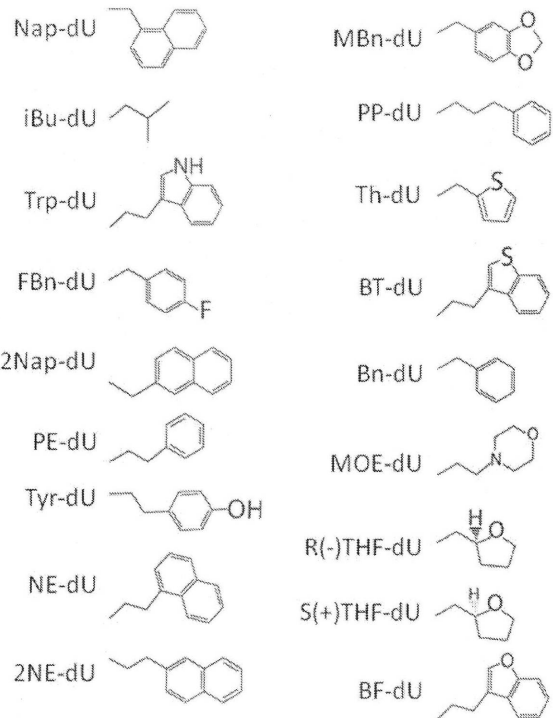
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
コンセンサス	V	R	M	S	N	N	V	K	P	G	P	A	P	G	V	A	V	R	P	C	P
頻度	0.15	0.14	0.80	0.04	0.67	0.20	0.35	0.78	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.32	0.14	0.86	0.00	0.04
A	0.39	0.02	0.10	0.78	0.10	0.12	0.51	0.12	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.55	0.08	0.68	0.00	0.02	0.98
C	0.27	0.78	0.04	0.10	0.14	0.59	0.10	0.06	0.06	0.98	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.10	0.00	0.00
G	0.04	0.00	0.07	0.06	0.10	0.10	0.04	0.04	0.92	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.06	0.00	0.06	0.04	0.98	0.02
P																					

5169-4772 ママ-プアミリーについてのタタレオキドの位置及びコンセンサス配列を上記に示す。行A、C、G及びP (PはNap-dUである) は、5169-4772 ママ-プアミリーにおいて、高頻度と低頻度の両方に必要とされる21個の位置のそれぞれでこれらのタタレオキドが観察される頻度を示す。コンセンサス配列では、以下の一次元コードで複数のタタレオキドのコンセンサスを示す：R=AまたはG；K=C；E=AまたはG；V=A、CまたはG；N=いずれかのタタレオキド。

【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	1650
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】

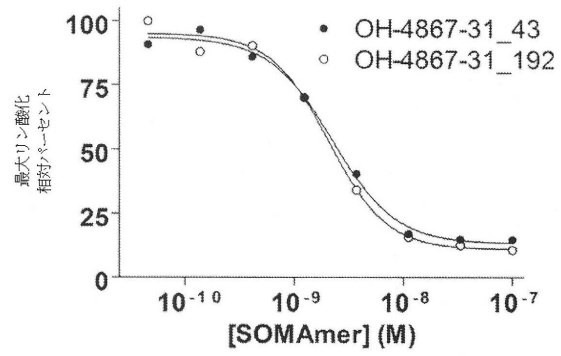


【図 16】

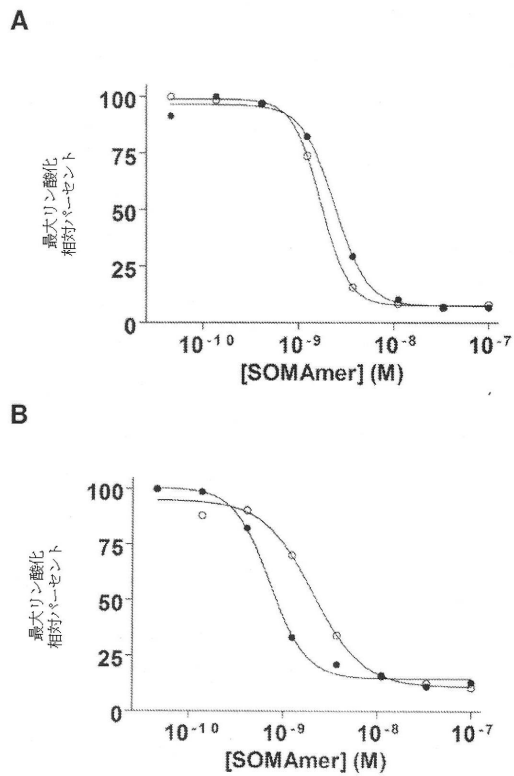
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
コンセンサス	C	C	G	C	G	C	A	G	A	G	C	G	C	C	G	C	A	G	A	G	A	C	A	A	A	A	A	C	G
頻度	A	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
C	0.99	1.00	0.00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

4867-31アブダマープアミリリーについてのヌクレオチドの位置及びコンセンサス配列を上二列に示す。行A、C、G及びT/Zは、4867-31アブダマープアミリリーにおいて、29番の位置でこれらのヌクレオチドが観察される頻度を示す。

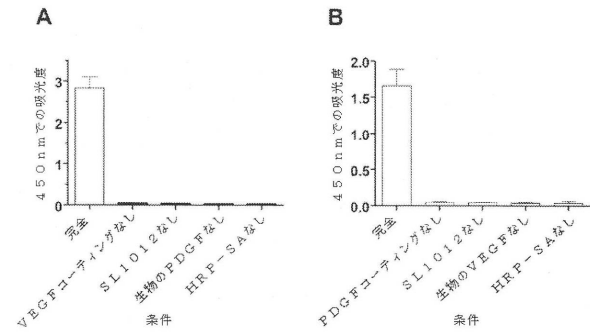
【図 17】



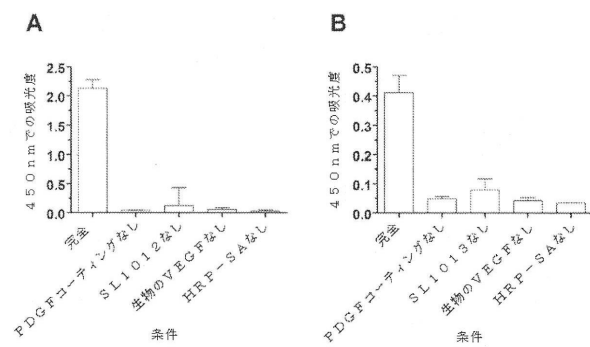
【図 18】



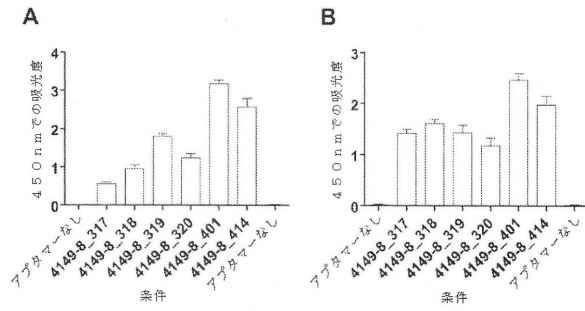
【図 19】



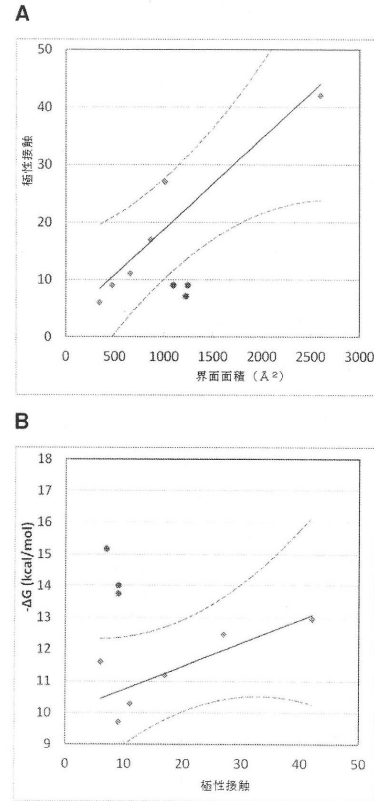
【図 20】



【図 2 1】



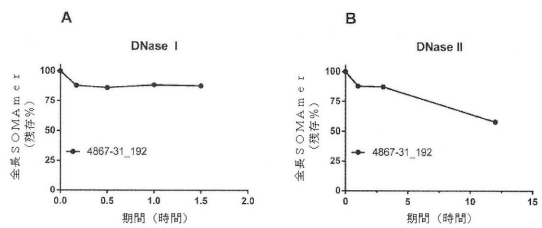
【図 2 2 - 1】



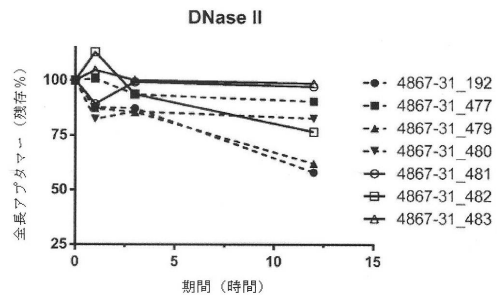
【図 2 2 - 2】

	PDB コード	参照	リガンド結合 (接合原子 あたりの kcal/mol)	界面面積(Å²)	結合性能	接合原子	-ΔG (kcal/mol)	-log (Ka)	タンパク 質的 タンパク質
	6MSF	(a)	0.464	348	6	25	11.6	8.6	MS2 外膜 タンパク質
	3AGV	(b)	0.262	477	9	37	9.7	7.1	IgG
	3QLP	(c)	0.166	657	11	62	10.3	7.6	トロンピン
	100A	(d)	0.196	870	17	57	11.2	8.3	NFκB
	3HXO	(e)	0.115	1011	27	109	12.5	9.2	VWF
	1EXD	(f)	0.064	2599	42	203	13.0	9.6	GlnRS
	4HQU	(g)	0.116	1225	7	131	15.2	10.7	PDGF-BB
		(g)	0.180	1097	9	78	14.0	9.9	標準 1
		(g)	0.183	1248	9	75	13.7	9.7	標準 2

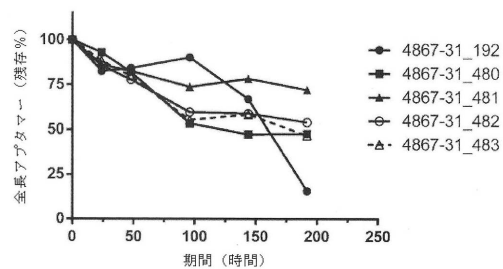
【図 2 3】



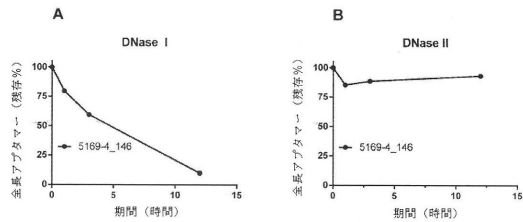
【図 2 4】



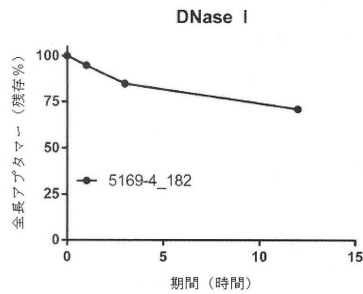
【図 2 5】



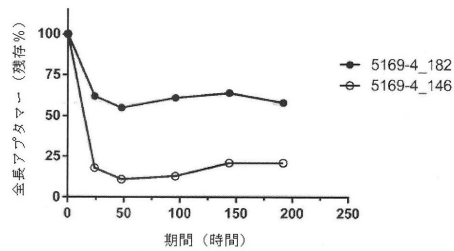
【図 26】



【図 27】



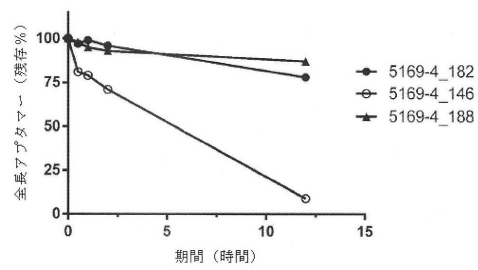
【図 28】



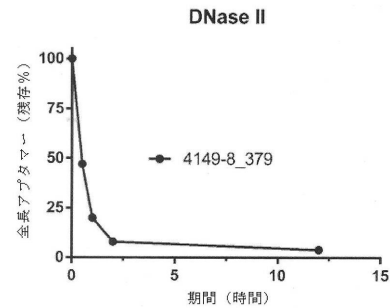
【配列表】

0006630273000001.app

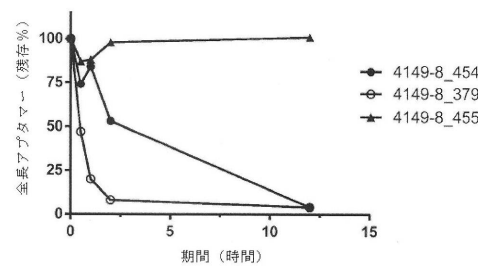
【図 29】



【図 30】



【図 31】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 27/06 (2006.01)		A 6 1 P 27/06
A 6 1 P 27/12 (2006.01)		A 6 1 P 27/12
C 0 7 K 14/705 (2006.01)		C 0 7 K 14/705

(72)発明者 ジャニック, ネボイサ
アメリカ合衆国コロラド州80301, ボルダー, カーター・トレイル 6973

(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 ジュリナス, 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 ツァン, チ
アメリカ合衆国コロラド州80027, スーペリア, アルマ・レーン 1851

(72)発明者 ボークリャン, マイケル
アメリカ合衆国コロラド州80542, ミード, フロンティア・ロード 17915

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 特表2013-502218 (JP, A)
特表2012-526130 (JP, A)
特表2006-516151 (JP, A)
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
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq