

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5812478号  
(P5812478)

(45) 発行日 平成27年11月11日(2015.11.11)

(24) 登録日 平成27年10月2日(2015.10.2)

(51) Int.Cl.		F I			
<b>C07H</b>	<b>19/10</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C07H</b>	<b>19/10</b>	<b>CSP</b>
<b>C07H</b>	<b>21/04</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C07H</b>	<b>21/04</b>	<b>ZNAB</b>
<b>A61K</b>	<b>31/7115</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A61K</b>	<b>31/7115</b>	
<b>A61P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A61P</b>	<b>35/00</b>	

請求項の数 5 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2011-177072 (P2011-177072)	(73) 特許権者	504145364 国立大学法人群馬大学 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地
(22) 出願日	平成23年8月12日(2011.8.12)	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(65) 公開番号	特開2013-40118 (P2013-40118A)	(74) 代理人	100090516 弁理士 松倉 秀実
(43) 公開日	平成25年2月28日(2013.2.28)	(74) 代理人	100126505 弁理士 佐貫 伸一
審査請求日	平成26年8月8日(2014.8.8)	(72) 発明者	桑原 正靖 群馬県桐生市天神町一丁目5番1号 国立 大学法人群馬大学内
		審査官	中西 聡

最終頁に続く

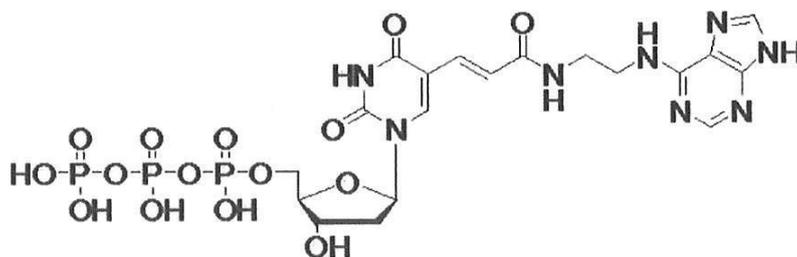
(54) 【発明の名称】 抗癌剤結合性核酸アプタマー及びその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記(1)の式で表される化合物又はその塩。

【化1】

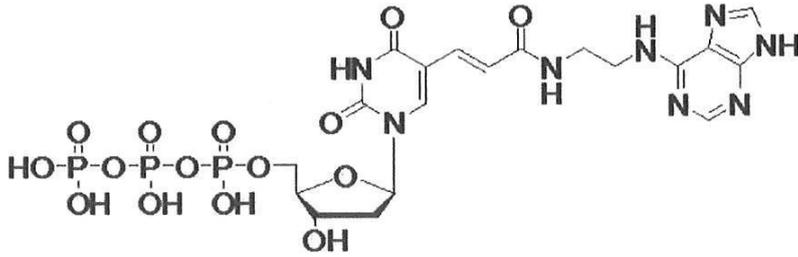


(I)

【請求項2】

下記(1)の式で表される化合物の残基を含む、ポリヌクレオチド。

## 【化 2】



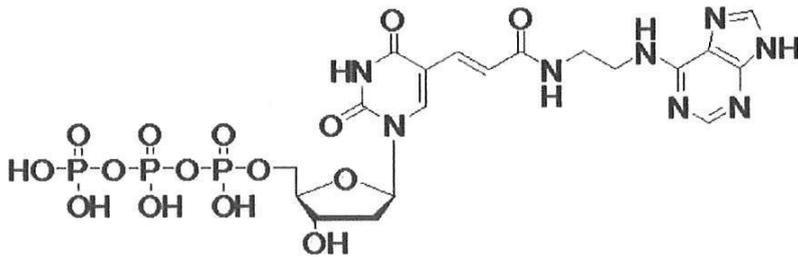
(I)

10

## 【請求項 3】

配列番号 28 ~ 32、35 ~ 43 および 45 ~ 59 のいずれかの塩基番号 21 ~ 50 の配列、配列番号 44 の塩基番号 21 ~ 51 の配列、または配列番号 60 の塩基番号 21 ~ 48 の配列を含む核酸アプタマーからなるカンプトテシン類結合剤（これらの配列における修飾 T とは下記の式 (I) で表される化合物の残基を示す。）。

## 【化 3】



(I)

20

## 【請求項 4】

核酸アプタマーが一本鎖 DNA である、請求項 3 に記載のカンプトテシン類結合剤。

## 【請求項 5】

請求項 3 に記載のカンプトテシン類結合剤と、カンプトテシン類とを含む抗癌剤。

## 【発明の詳細な説明】

30

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、新規な抗癌剤結合性核酸アプタマーおよびそれを含む抗癌剤並びに新規化合物に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

イリノテカンやトポテカンなどのカンプトテシン類は、広い抗がんスペクトルを有するため、非常に有効ながん治療薬の一つとして用いられている。しかし、一方で骨髄抑制や出血性膀胱炎などの副作用が報告され、投薬には専門的な注意を要する。種々のがん疾患に対して有効なカンプトテシン類について、副作用の少ない安全な投薬方法が開発されれば、がんで苦しむ多くの患者に福音がもたらされる。

40

## 【0003】

副作用低減には、疾患部位に必要な最小限のカンプトテシン類を送達することが有効であると考えられるが、そのためには、疾患部位に特異的に薬物送達を行う DDS 機能をカンプトテシン誘導体に結合でき、かつ、誘導体の活性を保持する必要がある。その方法として、カンプトテシン誘導体に共有結合でポリマーをつなぐ方法がある。しかし、この方法では、ドラッグ・リリース（疾患のある細胞組織に結合すると薬物を放出すること）が円滑に行い難いなどの課題がある。

一方で、核酸アプタマーを用いた分子標的医薬の開発も進められているが（非特許文献 1）、抗癌剤に直接結合することのできる核酸アプタマーは報告がない。

50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】宮川 伸，藤原 将寿，西山 道久：RNAアプタマーを用いた分子標的医薬の開発．DDS 23: 534-543. 2008．

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、カンプトテシン類に対し特異的に認識し結合する核酸アプタマーを提供することである。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は上記課題を解決するために鋭意検討を行った。その結果、配列番号1, 2等の特定の配列を含む核酸アプタマーがカンプトテシン類に特異的に結合することを見出し、それにより、抗癌剤やカンプトテシン類の薬理効果や薬物動態の測定に利用できることを見出して、本発明を完成させるに至った。

【0007】

すなわち、本発明は以下のいずれかの配列を含む核酸アプタマーからなるカンプトテシン類結合剤を提供する。

(i) GGGNGGGNGGGNGGG (配列番号1)

20

(ii) GGGNGGGNGGGNNGGG (配列番号2)

ここで、NはA,T,GまたはCを示す。

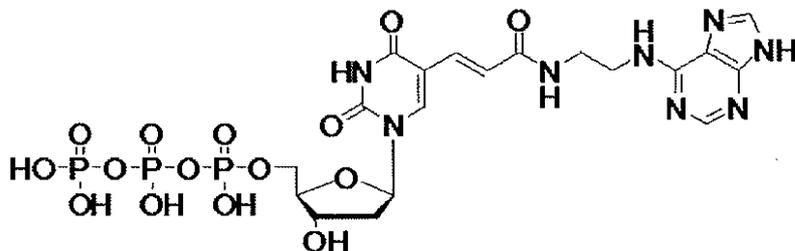
(i) または (ii) を含む配列としては、配列番号6～9および12～18のいずれかの塩基番号21～50の配列、配列番号10の塩基番号21～51の配列、配列番号11もしくは20の塩基番号21～49の配列、配列番号19の塩基番号21～52の配列、配列番号23の塩基番号14～40の配列、または配列番号21の塩基番号21～54の配列であることがより好ましい。

【0008】

また、核酸アプタマーは修飾塩基を含むものでもよい。すなわち、本発明はまた、配列番号28～32、35～43および45～59のいずれかの塩基番号21～50の配列、配列番号44の塩基番号21～51の配列、または配列番号60の塩基番号21～48の配列を含む核酸アプタマーからなるカンプトテシン類結合剤を提供する。なお、これらの配列における修飾Tとは下記の式(I)で表される化合物の残基を示す。

30

【化1】



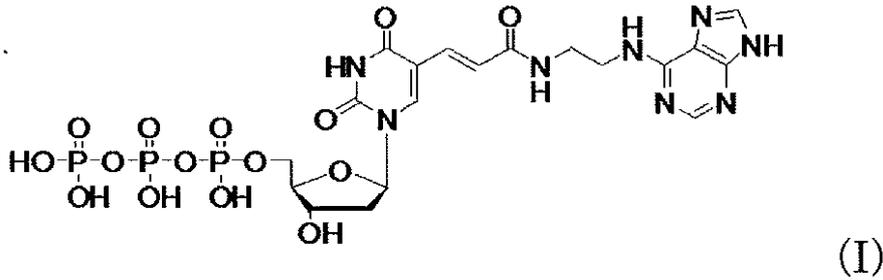
40

(I)

【0009】

本発明はまた、下記(I)の式で表される化合物又はその塩を提供する。塩としては金属塩が例示される。

## 【化2】



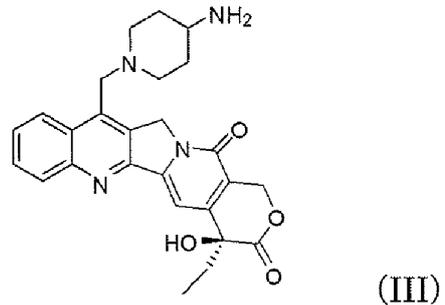
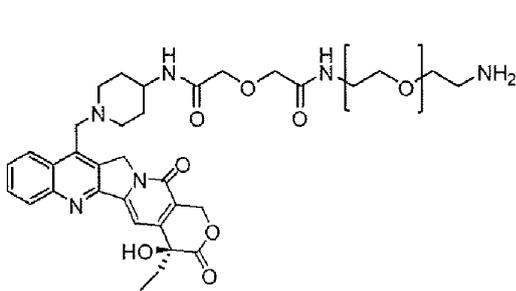
10

この化合物はチミジン三リン酸の誘導体である。したがって、修飾ポリヌクレオチドの作製などに使用することができる。

## 【0010】

本発明はまた、下記(II)または(III)の式で表される化合物又はその塩を提供する。塩としては酸付加塩が例示される。

## 【化3】



20

これらは抗癌剤として知られるカンプトテシンの誘導体である。したがって、これらの化合物は単独または薬学的に許容される担体と組み合わせて抗癌剤として使用することができる。投与量、投与経路、剤形、組み合わせる担体等は、抗癌剤としての使用態様は抗癌剤として公知のカンプトテシン誘導体に準じて決定することができる。

## 【0011】

30

なお、本発明において、カンプトテシン類とはカンプトテシンに限られず、カンプトテシンの骨格を含むものであればよいが、例えば、トポテカン、イリノテカン、DB67、BNP1350、エキサテカン、ルートテカン、ST1481、CKD602および上述した化合物(II)、(III)なども挙げられる。

## 【0012】

## 【化4】



40

核酸アプタマーとは好ましくはDNAであり、より好ましくは一本鎖DNAである。核酸アプタマーは修飾されたものであってもよい。例えば、核酸アプタマーの安定性を増加させるために、ホスホロチオエートまたはホスホロジチオエート修飾することも可能である。また、蛍光物質等で標識されたものでもよい。

核酸アプタマーの長さは、好ましくは15~100塩基であり、より好ましくは20~60塩基である。

## 【発明の効果】

50

## 【 0 0 1 3 】

本発明において新たに開発した核酸アプタマーは、カンプトテシン類を特異的に認識し結合することができるため、薬物検出のための分子プローブや、DDSの薬物キャリア分子として、抗がん剤の薬理効果や薬物動態などの検証研究や、DDSによるがん治療に応用されることが期待できる。

核酸は、(1) 生体の拒絶反応を抑制できる、(2) 細胞表面の特定の分子等の特異的に認識する他の核酸アプタマーや抗体などと容易に連結できる、(3) 核酸同士で連結する場合、ドラッグ・リリースなどのインテリジェント機能を容易に持たせることができる、などの点でポリマーを用いた方法より有利と考えられている。

## 【 図面の簡単な説明 】

10

## 【 0 0 1 4 】

【 図 1 】 実施例 2 で選択されたカンプトテシン類結合核酸アプタマーの配列を示す図。グループに分けてコンセンサス配列を示した。なお、カッコ内の数字は配列番号を示す。下線部はプライマーの配列である。

## 【 発明を実施するための形態 】

## 【 0 0 1 5 】

以下に本発明を詳しく説明する。

本発明のカンプトテシン類結合剤の一態様は、下記 (i) または (ii) の配列を含む。

(i) GGGNGGGNGGGNGGG (配列番号 1)

(ii) GGGNGGGNGGGNNGGG (配列番号 2)

20

ここで、NはA,T,GまたはCを示す。

## 【 0 0 1 6 】

具体的には配列番号 6 ~ 9 および 12 ~ 18 のいずれかの塩基番号 21 ~ 50 の配列、配列番号 10 の塩基番号 21 ~ 51 の配列、配列番号 11 もしくは 20 の塩基番号 21 ~ 49 の配列、配列番号 19 の塩基番号 21 ~ 52 の配列、配列番号 23 の塩基番号 14 ~ 40 の配列または配列番号 21 の塩基番号 21 ~ 54 の配列が挙げられる。なお、カンプトテシン類の少なくとも一種類に結合する能力が維持される限り、これらの配列において 1 ~ 数個、例えば、1、2 または 3 個の塩基が置換、欠失、挿入等されてよい。また、カンプトテシン類の少なくとも一種類に結合する能力が維持される限り、5' 側および / または 3' 側に任意の長さの任意の配列が付加されてよい。

30

## 【 0 0 1 7 】

また、本発明のカンプトテシン類結合剤の他の態様は、配列番号 28 ~ 32、35 ~ 43 および 45 ~ 59 のいずれかの塩基番号 21 ~ 50 の配列、配列番号 44 の塩基番号 21 ~ 51 の配列、または配列番号 60 の塩基番号 21 ~ 48 の配列を含む修飾塩基を含む核酸アプタマーであってもよい。なお、カンプトテシン類の少なくとも一種類に結合する能力が維持される限り、これらの配列において 1 ~ 数個、例えば、1、2 または 3 個の塩基が置換、欠失、挿入等されてよい。また、カンプトテシン類の少なくとも一種類に結合する能力が維持される限り、5' 側および / または 3' 側に任意の長さの任意の配列が付加されてよい。

## 【 0 0 1 8 】

40

また、図 1 より、下記のようなコンセンサスが抽出できるので、下記のような配列を含む核酸アプタマーもカンプトテシン類結合剤として使用可能である。

ACGtAGGGtGGtCAtAGtAtC

tGGGAAACGGGtGGttt

AAAGGtXXXXXXXXXXXXGttXC

AtCCCGtt...tAACC

GCCttAA

GtXAtGGCG...CCtXtGXA

CGCCAtCTTC

AAAAA...CttttC

50

AGGGGXAtXXXcA

ここで、Xは任意の塩基（好ましくはA,G,Cまたはt）を示し、tとは式(1)の化合物の塩基部分である。

【0019】

本発明のカンプトテシン類結合剤は、カンプトテシン類検出のための分子プローブとして使用することができる。例えば、核酸アプタマーを蛍光色素などで標識し、カンプトテシン類と複合体を形成させて、カンプトテシン類の体内動態などをトレースすることができる。

【0020】

また、本発明の核酸アプタマーとカンプトテシン類の複合体は、抗癌剤として使用することができる。好ましくは、DDS（薬剤伝達システム）のために、アプタマーに、標的癌組織にカンプトテシン類を特異的に集積させるための物質を結合させることが好ましい。標的癌組織にカンプトテシン類を特異的に集積させるための物質としては、標的癌組織の細胞表面に出ているタンパク質や糖鎖などに特異的に結合する物質が好ましく、抗体などのタンパク質や細胞表面の特定の分子等を特異的に認識する他の核酸アプタマーがより好ましい。

アプタマーにそのような物質を結合させる技術は公知であるが、例えば、カンプトテシン類との結合に関与する配列に、別の配列（結合に影響を与えない配列）を付加し、それにビオチンを結合させ、一方、抗体をアビジンで標識して、抗体とアプタマーを結合させ、アプタマー - カンプトテシン類 - 抗体の複合体を作製することができる。

【実施例】

【0021】

以下に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0022】

カンプトテシン誘導体の合成

以下の手順により、Camptothecin derivative1（化合物e）およびCamptothecin derivative2（化合物c）を合成した。

【0023】

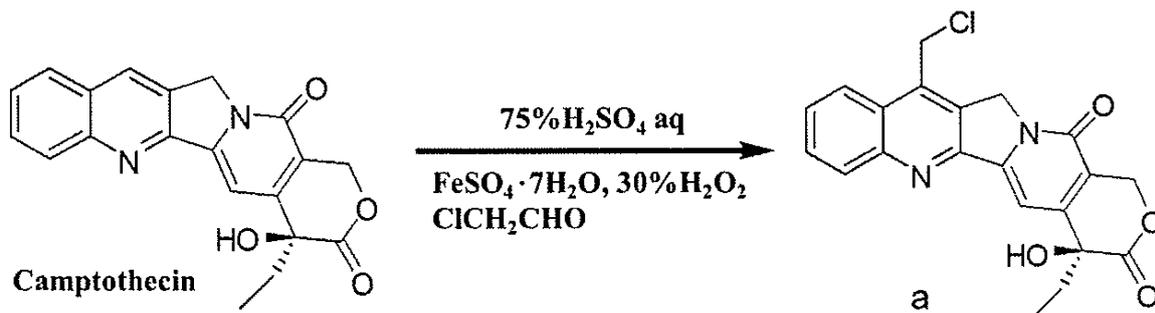
(S)-(+)-Camptothecin(200mg,  $5.7 \times 10^{-4}$ mol, 1.0eq)を75% $H_2SO_4$ (5ml)に氷冷下で溶解した。 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (250mg,  $9 \times 10^{-4}$ mol, 1.58eq)を水(1ml)に溶かし、氷冷下でCamptothecin溶液に加えた。 $ClCH_2CHO$ (3.2ml)を氷浴下でCamptothecin溶液に加えた。十分に溶液を攪拌後、氷冷下で30% $H_2O_2$ (1ml)を滴下し、5min氷冷下で攪拌後、室温で1.5h攪拌。氷冷下で冷水を反応液に加え、懸濁させた。セライトを用いて反応液を吸引ろ過し、残渣をDMFで回収し、減圧留去した。残渣をクロロホルム:ヘキサン=7:3溶液で懸濁させ、吸引ろ過を行うことにより、黄色の粉末状化合物1を得た。また、ろ液をシリカゲルクロマトグラフィー(Silica gel 60, 70-230mesh, 0~10%メタノール/クロロホルム)で精製することにより、化合物aを得た。

収量:164mg 収率:72%

ESI-MS(POS) 実測値: 419.2 計算値: 419.1 [M+Na] (m/z)

$^1H$  NMR(DMSO) 8.42(1H,d) 8.27(1H,d) 7.94(1H,t) 7.83(1H,t) 6.56(1H,s)  
5.45-5.39(6H,m) 1.92(2H,m) 0.89(3H,t)

## 【化5】



## 【0024】

化合物a(300mg,  $7.56 \times 10^{-4}$ mol, 1.0eq)を真空乾燥させ、脱水 DMF(20ml)に溶解した。4-(tert-Butoxycarbonylamino)piperidine(757mg,  $3.78 \times 10^{-3}$ mol, 5.0eq)を脱水 DMF(15ml)に溶解し、脱水 Toluene(35ml)を加え、反応液に加え、2h撹拌した。溶液を減圧留去し、 $\text{CHCl}_3$ に溶解して、飽和食塩水を用いて洗浄し、有機相を $\text{MgSO}_4$ で乾燥させた。溶液を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(富士シリシアFL60D, クロロホルム 70%酢酸エチル/ヘキサン)によって精製し、化合物bを得た。

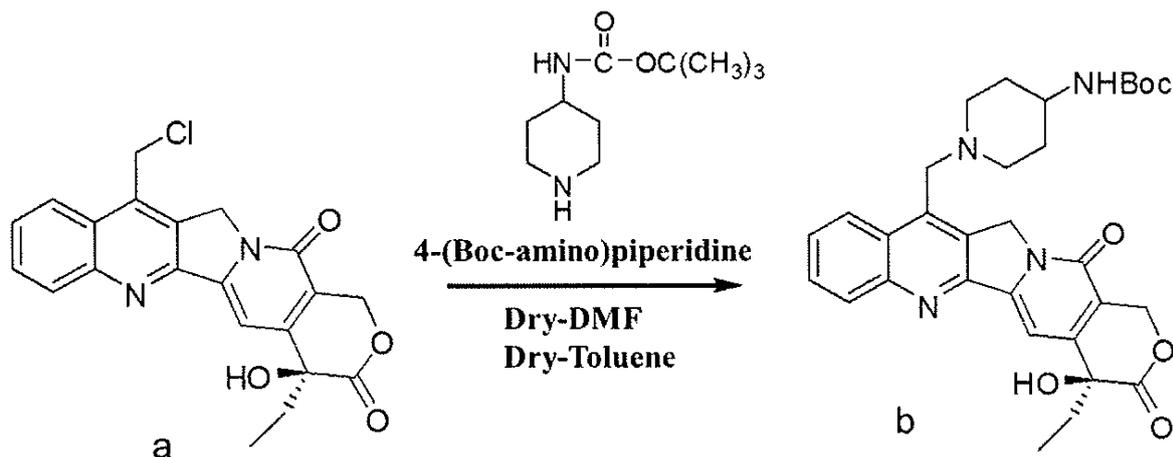
収量: 76.3mg 収率: 18%

ESI-MS(POS) 実測値: 583.3 計算値: 583.3 [M+Na] (m/z)

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$  8.31(1H, d) 8.19(1H, d) 7.80(1H, t) 7.65-7.60(2H, m)  
 5.77(ABquartet, 2H) 5.38(2H, s) 4.06(2H, s) 3.56(1H, m)  
 2.97(2H, m) 2.34(2H, t) 2.08-1.85(4H, m) 1.75(2H, m)  
 1.43(9H, m) 1.06(3H, t)

20

## 【化6】



## 【0025】

化合物b(150mg,  $2.68 \times 10^{-4}$ mol)を10%TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (18ml)に溶解し、1.5h撹拌した。MeCN(10ml  $\times$  8)で共沸して過剰のTFAを除き、化合物c(Camptothecin derivative2)を得た。

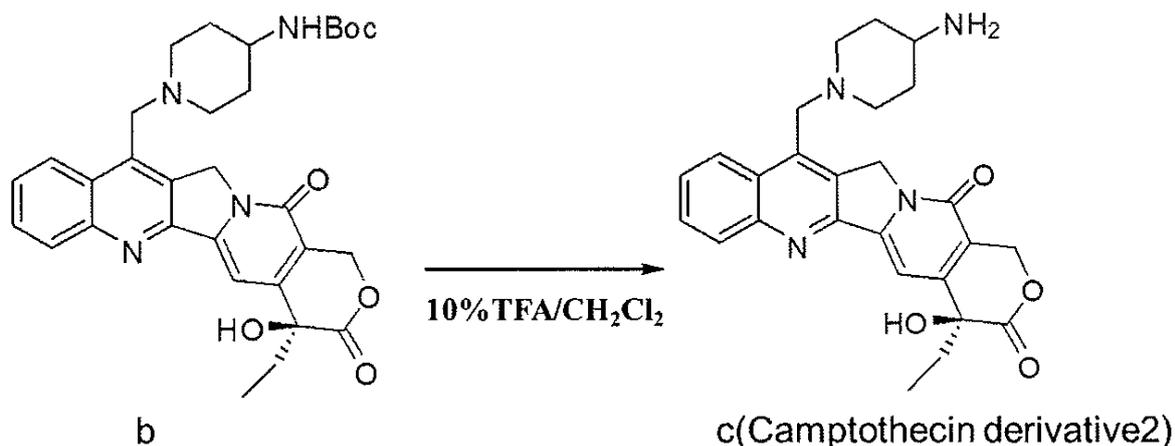
収量: 130mg (二トリフルオロ酢酸塩) 収率: 71%

ESI-MS(POS) 実測値: 461.4 計算値: 461.2 [M+H] (m/z)

$^1\text{H NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$  8.36(1H, d) 8.14(1H, d) 7.85(1H, t) 7.72(1H, t)  
 7.59(1H, s) 5.59(ABquartet, 2H) 5.43(2H, s) 4.59(2H, s)  
 3.40(1H, m) 2.90(2H, m) 2.15(2H, m) 1.96-1.91(4H, m)  
 1.41-1.28(2H, m) 1.02(3H, t)

40

## 【化7】



10

## 【0026】

化合物c(120mg,  $1.74 \times 10^{-4}$  mol, 1.0eq)を凍結乾燥させ、脱水 DMF(4ml)を加え溶解させた。O-[2-(Boc-amino)-ethyl]-O'-[2-(diglycolyl-amino)ethyl]decaethylene glycol (216mg,  $2.83 \times 10^{-4}$  mol, 1.6eq)を脱水 DMF(4ml)に溶解し、HBTU(148.8mg,  $3.92 \times 10^{-4}$  mol, 2.3eq)、HOBt·H<sub>2</sub>O(60mg,  $3.91 \times 10^{-4}$  mol, 2.2eq)、DIPEA(90.3 μl,  $5.20 \times 10^{-4}$  mol, 3.0eq)を順によく攪拌しながら加え、化合物cの溶液に加えた。室温で2h反応させた。

20

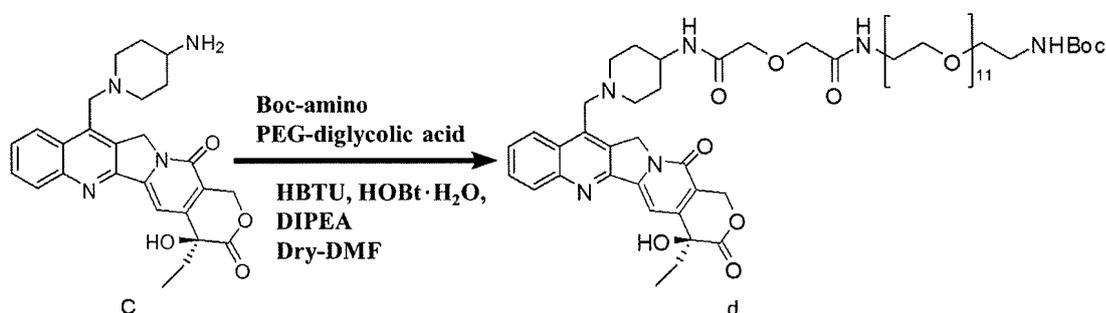
収量: 302mg (粗生成物)

ESI-MS(POS) 実測値: 1224.9 計算値: 1225.6 [M+Na] (m/z)

<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) 8.39(1H, d) 8.23(1H, d) 7.82(1H, t) 7.73(1H, m) 7.40(4H, m)  
5.61(2H, m)  
5.29(1H, m) 5.11(1H, s) 4.05(4H, m) 3.64(40H, m) 3.30(5H, m)  
3.13(6H, m)  
2.97(1H, d) 2.82(1H, m) 2.00(2H, m) 1.91-1.84(4H, m)  
1.49(9H, m) 1.06(3H, t)

30

## 【化8】



40

## 【0027】

化合物d(117mg)を10%TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(8ml)に溶解し、2h攪拌した。MeCN(10ml × 8)で共沸して過剰のTFAを除いた後、HPLCで精製し、化合物e(Camptothecin derivative1)を得た。

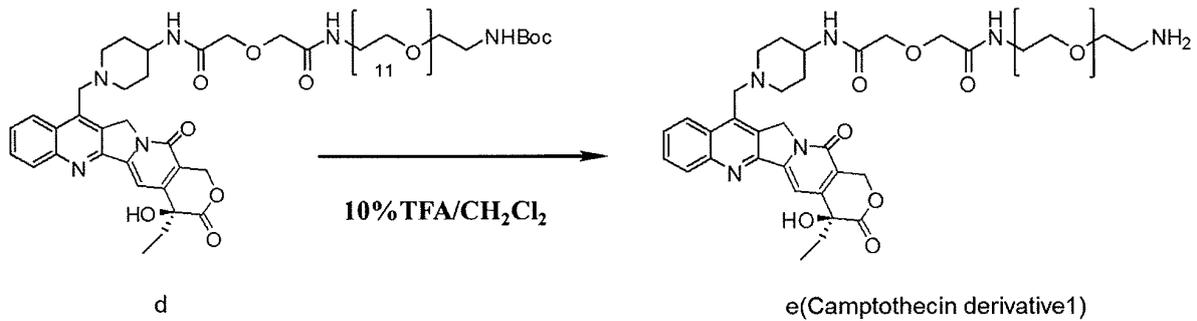
収量: 79.1mg 収率: 88% (from b)

ESI-MS(POS) 実測値: 1103.3 計算値: 1103.6 [M+H] (m/z)

<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) 8.40(1H, d) 8.21(1H, d) 7.83(1H, t) 7.71(1H, t)  
7.64(1H, s) 5.75(ABquartet, 2H) 5.49(2H, s) 4.10(4H, s)  
3.82(2H, s) 3.71(2H, m) 3.64(40H, m) 3.50(3H, m)  
3.19-3.13(4H, m) 2.02-1.86(10H, m) 1.76(2H, m)  
1.05(3H, t)

50

## 【化9】



10

## 【0028】

## 実施例1

## Camptothecin derivative1をターゲットとしたSelection(天然型DNA)

&lt; Selectionで使用したBuffer &gt;

・ LC-AT

(10mM リン酸, 138mM NaCl, 2.7mM KCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween#20) pH 7.4

・ LC-A

(10mM リン酸, 138mM NaCl, 2.7mM KCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>) pH 7.4

・ LC-B

(7M Urea, 10mM リン酸, 138mM NaCl, 2.7mM KCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>) pH 7.4

・ LC-B2

(0.2mM Camptothecin derivative2, 10mM リン酸, 138mM NaCl, 2.7mM KCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>) pH 7.4

・ SC-N

(0.05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% NaN<sub>3</sub>) pH 7.0

・ 1 × CB-NO

(0.2M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5M NaCl) pH8.3

・ 洗浄Buffer A

(0.5M ethanolamine, 0.5M NaCl) pH8.3

・ 洗浄Buffer B

(0.1M acetic acid, 0.5M NaCl) pH4.0

20

30

## 【0029】

&lt; 使用したDNA &gt;

・ MRC#T1F (5'末端FAM標識      これが蛍光滴定の時のRnd#70に該当)

5' -GGTCAGCACGCTCCGGACTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTGTGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号3

・ MRC#P1F (5'末端FAM標識)

5' -GGTCAGCACGCTCCGGACTT-3' 配列番号4

・ MRC#P2P (5'末端リン酸化)

5' -GTTGGCAGGCTCAGCGACAC-3' 配列番号5

・ MRC#P1N

5' -GGTCAGCACGCTCCGGACTT-3' 配列番号4

・ MRC#P2N

5' -GTTGGCAGGCTCAGCGACAC-3' 配列番号5

40

## 【0030】

&lt; アフィニティーゲルの調製 &gt;

・ ポジティブセレクション用ゲルの調製

Hitrap NHS-activated HP Columns (GE HealthCare Life Sciences) に1mM HClを2ml × 3加え、Camptothecin derivative1溶液(1 × CB-NOに溶解, 2.5 μmol, total 3.2ml)を1ml加え塩酸を除去し、残りの2.2mlを1h何度も繰り返し流す。3mlの1 × CB-NOを加え、続いて

50

。洗淨Buffer Aを2ml × 3、洗淨Buffer Bを2ml × 3、洗淨Buffer Aを2ml × 3加え、30min静置した。その後、洗淨Buffer Bを2ml × 3、洗淨Buffer Aを2ml × 3、洗淨Buffer Bを2ml × 3加えた。1mM HClを1ml × 3加え、SC-Nを2ml × 2加えゲルを保存した。

【 0 0 3 1 】

・ネガティブセレクション用ゲルの調製

Hitrap NHS-activated HP Columnsに1mM HClを2ml × 3加え、洗淨Buffer Aを2ml × 3、洗淨Buffer Bを2ml × 3、洗淨Buffer Aを2ml × 3加え、30min静置した。その後、洗淨Buffer Bを2ml × 3、洗淨Buffer Aを2ml × 3、洗淨Buffer Bを2ml × 3加えた。1mM HClを1ml × 3加え、SC-Nを2ml × 2加えゲルを保存した。

【 0 0 3 2 】

< Affinity Chromatographyによるスクリーニング >

化学合成DNAライブラリー(180pmol : 1ラウンド目)もしくは前ラウンドの結合活性を示す溶出液から調製したDNAライブラリー(100pmol : 2ラウンド目以降)を1 × LC-AT(400 μ l)に溶解し、UV測定後リフォールディング[94 , 30sec 25 (0.5 /min)]した。ネガティブセレクション用ゲル、ポジティブセレクション用ゲルを1 × LC-AT 400 μ l × 4回でBufferを置換し、ネガティブセレクション用ゲルにDNAをインキュベート(37 , 10rpm, 1h)した。上澄みを回収し、UV測定後、ポジティブセレクション用のゲルにインキュベート(37 , 10rpm, 1h)した。上澄みを回収し、UVを測定した。ポジティブセレクション用のゲルにLC-Aを400 μ l × 4回でBufferの置換と未結合DNAの除去を行った。9ラウンド以降はLC-Aを400 μ l入れてインキュベート(37 , 10rpm, 5min)し、上澄みを除去( × 5回)

ポジティブセレクション用のゲルに溶出バッファー(5ラウンドまではLC-B、6ラウンド以降はLC-B2)を400 μ l加え、ポジティブセレクション用のゲルに結合しているDNAを溶出させた(5ラウンドまでは3回、6ラウンド以降は1回)。溶出した溶液をスピナラムで脱塩し、凍結乾燥した後、162 μ lの蒸留水と18 μ lの10 × KOD Dash Bufferを加えて、DNAを溶解した。この溶液を用いてPCRを行った。

ポジティブセレクション用ゲルにインキュベートしたDNA量をUVで測定し、溶出されたDNA量を変性PAGEで測定し、その割合からセレクションの進捗状況を確認した。

【 0 0 3 3 】

< 溶出DNAの増幅 >

37 で溶出した結合活性を示すDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことにより増幅した。反応後のサンプルを少量とり、7M Urea 3mM EDTAを含む0.1%BPB溶液を加え、Denature(94 , 5min)し、10%変性PAGEを用いたゲル電気泳動(200V, 35min, 45 )により反応の進行を確認した。PCRでは、プライマーにMRC#P1FおよびMRC#P2Pを、酵素にKOD Dash DNAポリメラーゼを用いた。

【 0 0 3 4 】

< 一本鎖DNAの調製 > \*1

PCR反応液を、ローターバックを用いて凍結乾燥した後、蒸留水に溶解した。3M CH<sub>3</sub>COO Naを加え軽く混ぜ、EtOHを加え、エタノール沈澱を行った。冷凍庫で10min静置した後、遠心(12000rpm, 15min, 4 )し、上澄みを除去し、残渣を一本のマイクロチューブに回収し、凍結乾燥した。残渣の二重鎖DNAを exonuclease で、37 で30min反応させた。反応後の溶液を少量分取し、7M Urea 3mM EDTAを含む0.1%BPB溶液を加え、Denature(94 , 5min)し、10%変性PAGEを用いたゲル電気泳動(200V, 35min, 45 )を行い、SYBR Goldで染色することにより反応の進行を確認した。

exonucleaseによって一本鎖にしたDNA溶液をエタノール沈澱させた。残渣の一本鎖DNAを蒸留水に再び溶解し、変性PAGE (7M Urea)により精製し、これを次のラウンドのライブラリーに用いた。

【 0 0 3 5 】

< アプタマーの単離および配列解析 >

通常のクローニング法により、濃縮したライブラリーからアプタマーの単離を行った。ベクターに挿入するDNA断片を濃縮したライブラリーからPCRで調製する際のプライマーに

10

20

30

40

50

は、MRC#P1N およびMRC#P1Nを用いた。プライマーベクターにはpT7Blue(タカラバイオ)を、コンピテントセルにはCompitent high E.coil DH5 (東洋紡)を用いた。生成した各コロニーからプラスミドを取り出し、それぞれ、シーケンサーで配列解析を行った。

【 0 0 3 6 】

<Gel affinity assay >

得られたDNA(60pmol)を1×LC-AT 70 μlに溶かし、アニーリング[94 , 30sec 25 (0.5 /min)]をした。そのうち5 μlを別のマイクロチューブに分注した(分注1)。ネガティブセクション用ゲルとポジティブセクション用ゲルそれぞれに1×LC-ATを400 μl加え、ボルテックス、遠心を行い、上澄みを除去した。この操作を4回繰り返すことにより、B  
ufferを置換した。それぞれのゲルに30 μlずつDNA溶液をインキュベートし37 、1200rpm 10  
、1h振とうした。ボルテックスと遠心を行い、上澄みを5 μl回収した。インキュベート前  
のサンプル(分注1)、ネガティブセクション用ゲルの上澄みのサンプル、ポジティブセ  
クション用ゲルの上澄みのサンプルに、7M Urea 3mM EDTAを含む0.1%BPB溶液を加え、D  
enature(94 , 5min)し10%変性PAGEを用いたゲル電気泳動(200V, 35min, 45 )を行い、  
バンド強度を次式に導入することにより、標的分子への結合割合を算出した。

【 0 0 3 7 】

Binding ratio (%)= { (NEG-POS) / NI } × 100

ここで、NEGはネガティブセクション用ゲルの上澄み、POSはポジティブセクション用  
ゲルの上澄み、NIはインキュベート前の液(分注1)中のそれぞれのDNA量を示す。

【 0 0 3 8 】

セクションを11ラウンド行った後に、得られた配列を解析したところ、表1の結果が  
得られた。

【 0 0 3 9 】

【表1】

表1

Number	Sequence
Apt1#70	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTGATCCCGGGAGGGCGGGTGGGTAGCATCAAGTGTGCGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号6
Apt2#70	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTGGTGGGTGGGATGGGGTACGGTGCCTAATGTGTCGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号7
Apt3#70	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTCGACCTCGGAGGGGGGTGGGAAAAGTCCGTGTCGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号8
Apt4#70	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTGGTGGGTGGGTTGGGGTACGGTGCCTAATGTGTCGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号9
Apt5#71	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTAGCATGGGTGGTGGGTTGGGGCGTGTCCGAGTGTGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号10
Apt7#69	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTGGTGGGTGGGAGGGTACAGTCCGACGGGTGTGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号11
Apt8#70	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTACGTGGGAGGGAGGGTGGGGTAAAGTACAGTGTGTCGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号12
Apt10#70	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTACATAACGGGTGGGAGGGTGGGTATGTTATGTGTCGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号13
Apt11#70	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTACGTGGGGGGGAGGGTGGGGTAAAGTACAGCGTGTGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号14
Apt13#70	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTGATGGGGGGTGGGTGGGACAAGTCCAGCGTGTGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号15
Apt14#70	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTACGTGGGAGGGAGGGTGGGGTAAAGTACGGCGTGTGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号16
Apt17#70	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTGGTGGGTGGGATGGGGTACGATGCGTGATGTGTCGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号17
Apt20#70	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTGGTGGGTGGGTTGGGGTACGGTGCCTATCGTGTGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号18
Apt21#72	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTACGTGGGGGGGAGGGTGGGAGTGGTCCGTAGAGTGTGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号19
Apt22#69	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTGTGGCGGGTGGGTGGGAAAGAATCGGAGTGTGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号20
Apt23#74	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTGACAATCGGCGGGCGGGTGGGGTTGATTGTGGGTGTGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号21

P1: GGTCAGCACGCTCCGGACTT 配列番号4 P2rev: GTGTCGCTGAGCCTGCCAAC 配列番号22

【 0 0 4 0 】

次に、表1で取得できた配列のうちApt4#70、Apt14#70、Apt22#69およびApt4#40、Apt4  
#20(コア配列)とRnd#70(ライブラリー)について、蛍光滴定によりカンプトテシ  
ン類に対する結合を調べた。

## 【表 2】

表 2

Name	Sequence
Apt4#70	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTGGGTGGGTGGGTGGGGTACGGTGCCTAATGTGTGCGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号 9
Apt4#40	5'-ACGCTCCGGACTTGGGTGGGTGGGTGGGGTACGGTGCCT-3' 配列番号 2 3
Apt4#20	5'-TGGGTGGGTGGGTGGGGTA-3' 配列番号 2 4
Apt14#70	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTACGTGGGAGGAGGGTGGGGTAAGTACGGCCTGTCGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号 1 6
Apt22#69	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTGTGGGCGGGTGGGTGGGAAAGAATCGGAGTGTGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号 2 0
Rnd#70	5'-GGTCAGCACGCTCCGGACTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTGTGCTGAGCCTGCCAAC-3' 配列番号 3

## 【 0 0 4 1 】

## &lt; 蛍光滴定のプロトコル &gt;

10

## ・ DNA の調製

滅菌水に溶解したそれぞれのDNAと5×のSelection bufferを混ぜ、finalで1×のSelection bufferに溶けているDNA溶液を調製した。

## 【 0 0 4 2 】

## 【表 3】

表 3

## 5×Selection bufferの組成

試薬	Finalの濃度
0.2M phosphate buffer	50mM
NaCl	690mM
KCl	13.5mM
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	12.5mM
Tween#20	0.25%

20

## 【 0 0 4 3 】

## 【表 4】

表 4

## 1×Selection bufferの組成

試薬	Finalの濃度
0.2M phosphate buffer	10mM
NaCl	138mM
KCl	2.7mM
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2.5mM
Tween#20	0.05%

30

## 【 0 0 4 4 】

## ・ 化合物溶液の調製

それぞれの化合物を滅菌水に溶解し、(溶けきれない場合はミリポアフィルターでろ過し、その濾液を使用)上記の5×のSelection bufferと混ぜ、finalで1×のSelection bufferに溶けている化合物の溶液 2 μMを調製した。

40

## 【 0 0 4 5 】

## 【表 5】

表 5

## ・ 蛍光滴定の濃度条件 1 (finalで以下の濃度になるように調製した)

DNA/μM	0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0	2.0	5.0	10
化合物/μM	1.0	→	→	→	→	→	→	→	→
DNA/化合物	0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0	2.0	5.0	10

## 【 0 0 4 6 】

## 【表 6】

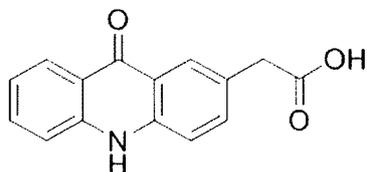
表6

この条件で測定した組み合わせ

DNA	化合物
Apt4#70	Camptothecin derivativel,2、Fluorescein、Acridon derivative
Apt4#40	Camptothecin derivativel,2、Camptothecin
Apt4#20	Camptothecin derivativel,2、Camptothecin

使用したAcridon derivativeの構造は以下の通りである。

## 【化 1 0】



10

## 【 0 0 4 7 】

## 【表 7】

表7

・蛍光滴定の濃度条件2 (finalで以下の濃度になるように調製した)

DNA/ $\mu$ M	0	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10
化合物/ $\mu$ M	1.0	→	→	→	→	→	→	→	→
DNA/化合物	0	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10

20

## 【 0 0 4 8 】

## 【表 8】

表8

この条件で測定した組み合わせ

DNA	化合物
Apt4#70	Camptothecin
Apt14#70	Camptothecin derivativel,2、Camptothecin
Apt22#69	Camptothecin derivativel,2、Camptothecin
Rnd#70	Camptothecin derivativel,2、Camptothecin

30

## 【 0 0 4 9 】

・測定の手順

1. 各濃度に調製したDNAをアニーリングした。[94℃, 30sec 25 (0.5℃/min)]
2. 2 $\mu$ Mに調製した化合物溶液を、予めマイクロチューブに50 $\mu$ Lずつ入れておき、そこへアニーリングした各濃度のDNAを50 $\mu$ Lずつ添加し、ボルテックスと遠心を3回行った。(インキュベート)
3. 低い濃度のものから蛍光を測定した。

## 【 0 0 5 0 】

## 【表9】

表9

各基質に対する $K_d$ 値 (50%が結合する濃度:  $\mu\text{M}$ )

Name	Camptothecin derivative1	Camptothecin derivative2	Camptothecin	Acridon derivative	Fluorescein
Apt4#70	1.8	3.6	4.6	NB	NB
Apt4#40	3.1	3	5.6	—	—
Apt4#20	NB	NB	NB	—	—
Apt14#70	4	2.6	18	—	—
Apt22#69	2.9	2.9	8.1	—	—
Rnd#70	NB	NB	NB	—	—

NB: No Binding, —: 未測定

## 【0051】

その結果、表9に示されるように、Apt4#70、Apt14#70、Apt22#69およびApt4#40はカンプトテシン類に特異的な結合を示したが、Apt4#20とRnd#70は結合しなかった。

## 【0052】

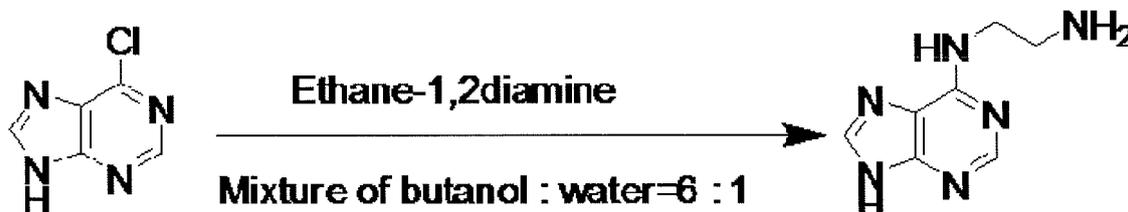
## 実施例2: 修飾塩基を含むDNAアプタマーのスクリーニング

まず、修飾塩基を合成した。

## 【0053】

KS5の合成

## 【化11】



6-chloro-9H-purine(300mg, 1.94mmol, F.W.154.56)を butanol:water-6:1混合液(7mL)に溶かし、ethane-1,2diamine(1.3mL, 0.19mmol, F.W.60.10)を加え、還流管を設置し、オイルバスで80 にし、2時間撈拌した。反応液の減圧留去後、残渣をwater(1mL)に溶かし、更にmethanol(1mL)、butanol(6mL)を加えよく混ぜ、その後、減圧留去により濃縮し、結晶を析出させた。これを吸引濾過し目的物1を得た。

## 【0054】

収量 306mg 収率 88.5%

$^1\text{H}$  NMR(300MHz  $\text{D}_2\text{O}$ )

3.11(2H, t, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)

3.69(2H, t, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)

7.94(H, s, =N-CH=N-)

8.05(H, s, -HN-CH=N-)

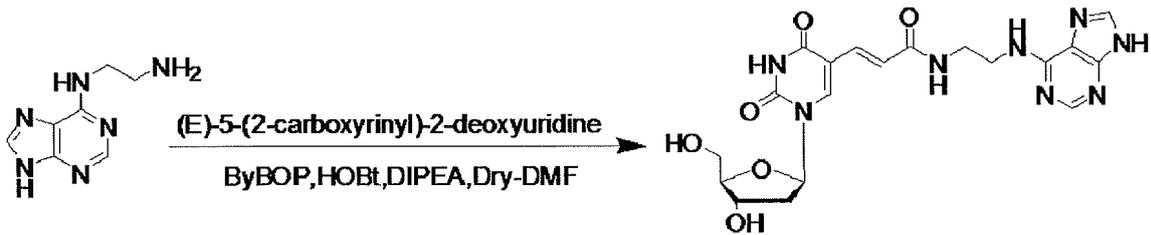
ESI-MS(POS)m/z[帰属]

Found: 179.1 Calc 179.1 [(M+H)<sup>+</sup>]

## 【0055】

KS6の合成

## 【化12】



(E)-5-(2-carboxyrinyl)-2-deoxyuridine(335.3  $\mu$ mol、100mg、F.W.298.25)を脱水DMF(2mL)に溶かし、PyBOP(403.5  $\mu$ mol、210mg、F.W.520.39)、HOBT(423.6  $\mu$ mol、65mg、F.W.153.44)、DIPEA(3.44mmol、600  $\mu$ L、F.W.129.25 d=0.742g/mL)を加え、軽く混ぜた。更に、真空乾燥させた1(404.0  $\mu$ mol、72mg、F.W.178.2)を脱水DMF(24mL)に懸濁させたものを加え、1.5時間撹拌した。反応終了後、減圧留去で濃縮し、吸引濾過した。濾液を濃縮後、chloroformを加え沈殿を析出させ、吸引濾過を行い、目的物2を得た。

## 【0056】

収量204.4mg 収率87.7%

$^1\text{H}$  NMR(300MHz DMSO)

- 8.28(H, s, -C=CH-N-)
- 8.19(H, s, =N-CH=N-)
- 8.09(H, s, -N=CH-NH-)
- 7.10(1H, s, -C-CH=CH-)
- 7.03(1H, s, -CH=CH-C-)
- 6.15(1H, t, -O-CH-CH<sub>2</sub>-)
- 5.27(1H, m, -O-CH-CHOH-)
- 5.17(1H, m, -CH-CHOH-CH<sub>2</sub>-)
- 4.26(1H, m, -OH-CH<sub>2</sub>-C-)
- 3.80(1H, m, -OH-CH<sub>2</sub>-C-)
- 2.16(2H, m, -CH-CH<sub>2</sub>-CHOH-)

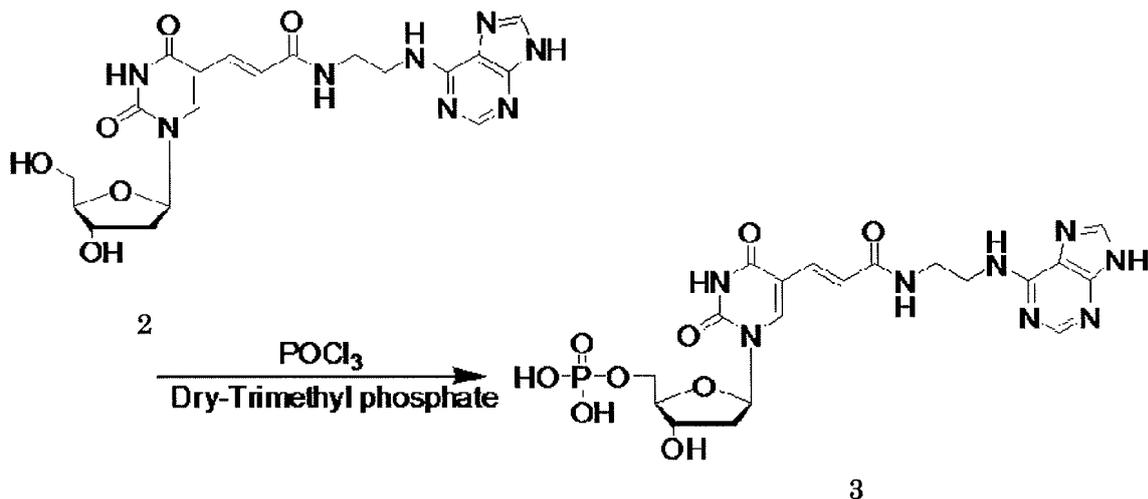
ESI-MS(POS)m/z[帰属]

Found:480.8 Calc481.2[(M+Na)<sup>+</sup>]

## 【0057】

KS7の合成

## 【化13】



真空乾燥させた2(50mg、109.1  $\mu$ mol、F.W.458.4)を、脱水pyridine(30mL)で二回共沸し

、脱水Trimethyl phosphate(30mL)に溶かし、氷冷下でPhosphoryl chloride(1.61mmol、150  $\mu$ L、F.W.153.33、 $d=1.645\text{g/mL}$ )を加え、4時間攪拌した。反応終了後、冷水(15mL)、TEA(4.91mmol、680  $\mu$ L、F.W.101.19、 $d=0.73\text{g/mL}$ )を加え、10分間攪拌し、クエンチした。減圧留去で濃縮し、acetonitrileとdiethyl etherを加え、沈殿物を析出させ吸引濾過で濾物を目的物として回収した。その後、少量の蒸留水に溶かし、陰イオン交換カラムで精製した。

収率は、2のモル吸光係数( $\epsilon_{260\text{nm}}=22200\text{mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$ )を用いて計算した。

【0058】

収量9700D 収率40.0%

10

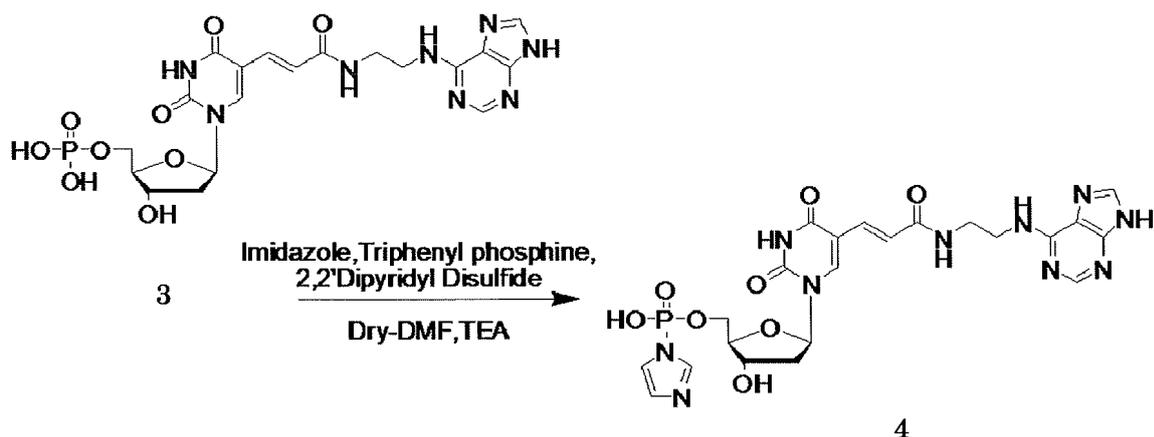
ESI-MS(NEG)m/z[帰属]

Found: 536.7 Calc:537.4[(M-H)<sup>-</sup>]

【0059】

KS8の合成

【化14】



20

真空乾燥させた3(78.89  $\mu$ mol、42.47mg、F.W.538.1)を、脱水pyridine(1.5mL)で二回共沸し、脱水DMF(600  $\mu$ L)に溶かし、TEA(4526.6  $\mu$ mol、73  $\mu$ L、F.W.101.19、 $d=0.73\text{g/mL}$ )を加え、5分間攪拌し、Imidazole(318.7  $\mu$ mol、21.7mg、F.W.68.08)、Triphenyl phosphine(126.2  $\mu$ mol、33.1mg、F.W.262.29)、2,2'-Dipyridyl Disulfide(128.4  $\mu$ mol、28.3mg、F.W.220.32)を加え、室温で3時間攪拌した。反応終了後、sodium perchlorate、脱水aceton混合溶液に、反応液を加え、4で30分間静置した。沈殿物を脱水acetonで洗浄し、クルードの状態に目的物として得た。

30

【0060】

収量57mg 収率137%

ESI-MS(NEG)m/z[帰属]

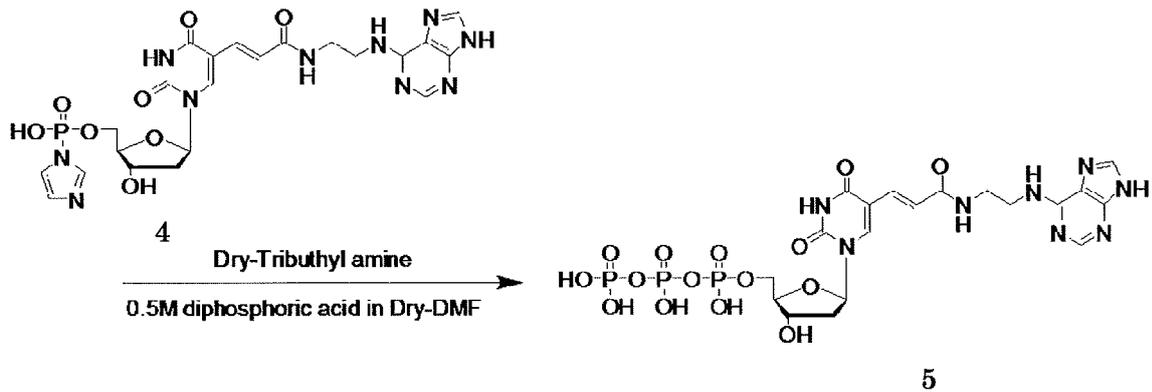
Found: 568.9 Calc:588.5[(M-H)<sup>-</sup>]

【0061】

KS9の合成

40

## 【化15】



10

真空乾燥させた4(57mg、96.9  $\mu$ mol、F.W.588.5)を、脱水pyridine(1.5mL)で二回共沸し、脱水DMF(900  $\mu$ L)に懸濁させ、脱水Tributyl amine(393.0  $\mu$ mol、94  $\mu$ L、F.W.185.35、 $d=0.775$ g/mL)、0.5M Diphosphoric acid inDMF(485  $\mu$ mol、970  $\mu$ L、F.W.177.98)を加え、室温で10時間攪拌した。反応終了後、クエンチのためTEAB(3.7mL)を加え、減圧留去によって濃縮した。diethyl etherで洗浄し、水相を減圧留去した。少量の蒸留水に溶かし、陰イオンカラムで精製した。更に、HPLC精製、中圧カラム、陽イオンカラムで精製を行った。

## 【0062】

20

収量2320D 収率10.8%

ESI-MS(NEG)m/z[帰属]

Found: 697.0 Calc:698.4[(M-H)<sup>-</sup>]

## 【0063】

Camptothecin derivative1をターゲットとしたSelection(修飾型DNA)

< Selectionで使用したbuffer >

天然型DNAアダプターのスクリーニングに用いたものと同じ。

## 【0064】

< 使用したDNA >

30

・VIT#T1-H(5'末端HEX標識 これを鋳型として調製した修飾DNAがRnd'#70に該当。ゲルアフィニティ・アッセイに使用)

5' - CACCAGAGGCACGCCAGACANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCttCGCCGtGcTAgCCGtGt -3' 配列番号 2 5

NはA,G,Cまたは修飾T(上記で合成した化合物5)を示す。

・VIT#P1-F(5'末端FAM標識)

5' -CACCAGAGGCACGCCAGACA-3' 配列番号 2 6

・VIT#P2-H(5'末端HEX標識)

5' -ACACGGCTAGCACGGCGAAG-3' 配列番号 2 7

・VIT#P1-P(5'末端リン酸標識)

40

5' -CACCAGAGGCACGCCAGACA-3' 配列番号 2 6

・VIT#P1-N

5' -CACCAGAGGCACGCCAGACA-3' 配列番号 2 6

・VIT#P2-N

5' -ACACGGCTAGCACGGCGAAG-3' 配列番号 2 7

## 【0065】

< アフィニティゲルの調製 >

天然型DNAアダプターのスクリーニングの場合と同じ。

## 【0066】

< 初期ライブラリーの合成 > \*2

50

初期ライブラリーは、VIT#T1-Hを鋳型鎖、VIT#P1-Fをプライマー鎖としたプライマー伸長反応により調製した。基質のヌクレオシド三リン酸には天然型のdATP、dCTP、dGTPおよび修飾dTTP(5)を、ポリメラーゼにはKOD Dash DNAポリメラーゼを用いた。生成した修飾DNAの一本鎖は、変性PAGEにより、鋳型鎖のVIT#T1-Hから分離精製することが可能である。

【0067】

<Affinity Chromatographyによるスクリーニング>

PAGE精製によって得られた修飾DNA(110pmol)を1×LC-AT(400μl)に溶解し、UV測定後リフォールディング[94℃, 30sec 25℃(0.5℃/min)]した。ネガティブセクション用ゲル、ポジティブセクション用ゲルを1×LC-AT 400μl×4回でBufferを置換し、ネガティブセクション用ゲルにDNAをインキュベート(37℃, 10rpm, 1h)した。上澄みを回収し、UV測定後、ポジティブセクション用のゲルにインキュベート(37℃, 10rpm, 1h)した。上澄みを回収し、UVを測定した。ポジティブセクション用のゲルにLC-Aを400μl×4回でBufferの置換と未結合DNAの除去を行った。(8ラウンド以降は400μl×4回でBufferの置換と未結合DNAの除去を行った。)

10

ポジティブセクション用のゲルに溶出バッファー(7ラウンドまではLC-B、8ラウンド以降はLC-B2)を400μl加え、ポジティブセクション用のゲルに結合しているDNAを溶出させた(7ラウンドまでは3回、8ラウンド以降は2回)。溶出した溶液をスピンカラムで脱塩し、凍結乾燥した後、162μlの蒸留水と18μlの10×KOD Dash Bufferを加えて、DNAを溶解した。この溶液を用いてPCRを行った。

ポジティブセクション用ゲルにインキュベートしたDNA量をUVで測定し、溶出されたDNA量を変性PAGEで測定し、その割合からセクションの進捗状況を確認した。

20

【0068】

<溶出DNAの増幅>

37℃で溶出した結合活性を示す修飾DNAを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことにより増幅した。反応後のサンプルを少量とり、7M Urea 3mM EDTAを含む0.1%BPB溶液を加え、Denature(94℃, 5min)し、10%変性PAGEを用いたゲル電気泳動(200V, 35min, 45℃)により反応の進行を確認した。PCRでは、プライマーにVIT#P1-PおよびVIT#P2-Hを、酵素にKOD Dash DNAポリメラーゼを用いた。

【0069】

<一本鎖鋳型DNAの調製>

PCRで調製した二重鎖DNAを exonucleaseにより一本鎖にした。前述<sup>\*1</sup>と同様に変性PAGEにより精製した。

30

【0070】

<一本鎖修飾DNAの調製>

調製した一本鎖の鋳型鎖とプライマー鎖VIT#P1-Fを用いて、前述<sup>\*2</sup>と同様にプライマー伸長反応を行い、一本鎖修飾DNAを調製した。これを次のラウンドのライブラリーに用いた。

【0071】

<アダプターの単離および配列解析>

天然型DNAアダプターのスクリーニングの場合と同じ。

40

【0072】

<Gel affinity assay>

天然型DNAアダプターのスクリーニングの場合と同じ。

【0073】

9ラウンドのセクションの結果、下記の配列が得られた。



【表 1 2】

表 1 2

Name	Sequence
Apt1m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAtttACCCCCCACGGGAtGGGtACtAAGCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号35
Apt2m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAAAAtGAAAGtAGGAAAGGtGtGGtttCACttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号28
Apt4m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGtAGGtGGtCAAtAGtAtCAGAGtAACTACttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号29
Apt6m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGAGAAAtCCCGttAGtAACtAGGGCCAtCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号36
Apt7m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGAAGAAGAttAtGGGAAACGGtGGtttCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号37
Apt8m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAtAGCGAAAGtGCtAAACGAGAGtttCCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号30
Apt9m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAAAAGtCAttAACAtCCCGttCCttAACCCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号38
Apt10m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGtAGGtGGtCAAtAGtAtCAGAGtAACTCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号31
Apt14m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGAGtGGtAtCtGAACtAGAGACAGtAAGCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号39
Apt15m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGAGtAGGtGGtCAAtAGtAtCGCAACCGtCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号40
Apt16m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGAGCGCtAAAGGACGAAACGGtGCtttCCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号41
Apt17m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAAACCGAtGcAGGGGAAAtCCGtAGGGCCAtCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号42
Apt18m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGGAtttGGtGtCCtAGtCCtCAAAGtGCGCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号43
Apt20m#72	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAtAAAGGGGAAAtAGGtCCtAAAtGGAGCGCCAtCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号44
Apt23m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGtAACGtCAAtGGCGtGtCGGAGCtGtGAACttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号45
Apt28m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGtttGtACACtCCAAGGGGAtGtCCtAtACttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号46
Apt29m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGtAGGAtGGtGAtAGtAtGCCGAGCtGtCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号47
Apt30m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAttAAAtCGtAtAGtGCtAAACACGtCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号48
Apt31m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAAAAGtCAttAACAtCCtGtCCtAACCCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号32
Apt34m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGtAtGGCGCCCCtCGAGtGCGACtttCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号49
Apt4' m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGGtAGtCCtAAAACAGCtttCCttAACttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号50
Apt6' m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAAACGCGtAGCGCAtCttCCAAtCAGAAAtAGCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号51
Apt7' m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAtGCCGtGGAAGACtGGACCCtGCAtGtCGCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号52
Apt8' m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGAAtAGCGGtCAAtGGtGtACGCGCCAtCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号53
Apt9' m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAtCCGtGCCtAAGACCCtCCtGGGAGtCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号54
Apt13' m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAtCACGtCGAAAtAGtGGACACCCACGCCAtCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号55
Apt16' m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACACAGAGCGAAAtAGtGCCGAtACGCACGCCAtCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号56
Apt17' m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGCCtAGCtGtAGtAAAtGCAGtACCGtCACttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号57
Apt19' m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGGAAAAGtGACtGACttttCGAAGtCCAGCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号58
Apt20' m#70	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAAAtAGCCtGtAGGtGCtAAACAGCCAGtCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号59
Apt39m#68	5'-CACCAGAGGCACGCCAGACAGAAGAAGGAttGGGAAACGGtGGtttCttCGCCGtGctAGCCGtGt-3' 配列番号60

10

20

P1: CACCAGAGGCACGCCAGACA配列番号 2 6 P2rev: CttCGCCGtGctAGCCGtGt 配列番号 3 3

30

【 図 1 】

Group 1-A-1.1 Apt4m#70 (29)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACACGtAGGGtGGtCAAtAGtAtCAGAGtAACTtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 1-A-1.2 Apt10m#70 (31)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACACGtAGGGtGGtCAAtAGtAtCAGAGtAACTtCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 1-A-2 Apt15m#70 (40)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAGGtAGGGtGGtCAAtAGtAtCGCAACGCTtCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 1-B-1.1 Apt7m#70 (37)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAGAAAGGAttAtGGGAAACGGGtGGtCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 1-B-1.2 Apt39m#68 (60)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAGAAAGGAttGGGAAACGGGtGGtCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 2-A Apt8m#70 (30)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAtAGCGAAAGGtGCCtAAACAGAGAGtCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 2-B Apt2m#70 (28)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAAtGAAAGGtAGGAAAGGtGGtCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 2-C-1.1 Apt9m#70 (38)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAAAGGtCAttAAAGtCCCGtCCtAAACCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 2-C-1.2 Apt31m#70 (32)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAAAGGtCAttAAACtCCtGtCCtAAACCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 2' -C-1.1 Apt6m#70 (36)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAGACGAAtCCCGtAGtAAACCtAGGGGCCAtCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 2' -A-1.1 Apt16m#70 (41)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAGGGCCtAAAGGACGAAACGGtGCtCCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 2' -A-1.2.1 Apt30m#70 (48)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAtAAAtCGtAtAGGtGCCtAAACAGCtCCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 2' -A-1.2.2 Apt20' m#70 (59)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAtAGCCtGtAGGtGCCtAAACAGCCAGtCCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 2' -A-1.3 Apt9' m#70 (54)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAtCCCGtGCCtAAAGACCCtCCtGGGAGtCCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 2'' -A-1.3 Apt7' m#70 (52)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAtGCCtGGAAGACtGGACCCtGCAtCGCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 3 Apt18m#70 (43)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAGGAAttGGtGtCCtAGtCCtCAAAGtGCGCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 4-A-1 Apt34m#70 (49)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAGtAtGGGCCCCtCGGAGtGCGACtCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 4-A-2 Apt23m#70 (45)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAGtAACGtCAAtGGCGtGtCGGAGCCtGtGAACtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 4' -A-2 Apt14m#70 (39)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAGAGtGGtAtCGtGAACtGtAGAACAGtAAGCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 4-A-1 Apt20m#72 (44)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAtAACGGGAAAtAGGtCCtAAAtGGAGCGCCAtCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 4-A-2 Apt6' m#70 (51)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAACCGGtAGCGCCAtCtCCAtCAGAAAtAGCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 4-A-3 Apt8' m#70 (53)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAGAAAtAGCGGtCAAtGGGtGtACGCGCCAtCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 4-A-3.1 Apt13' m#70 (55)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAAtCAGtCGAAAtAGtGGACAACCCAGCCAtCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 4-A-3.2 Apt16' m#70 (56)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAGAGCGAAAtAGtGCCGAtACGCAOCCAtCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 5-A-1 Apt1m#70 (35)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAttACCtCCCCACGGGAtGGGtACtAAGCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 5-A-2 Apt29m#70 (47)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAGtAGGAtGGtGAtAGtAtGCCGAGCtGtCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 5' -A-2 Apt17' m#70 (57)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAGCCtAGCtGtAGtAAAAtGCAGtACCGtCACtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 6-A-1 Apt4' m#70 (50)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAGGtAGtCCtAAAAACAGCtCtCCtAAAtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 6-A-2 Apt19' m#70 (58)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAGGAAAAAGtGACtGACtCtCGAAGtCCAGCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 7-A-1 Apt17m#70 (42)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAACCGGAtGCAGGGGAAAtCCCGtAGGGCCAtCtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'
Group 7-A-2 Apt28m#70 (46)	5' -CACCAGAGGCACGCCAGACAGtGtACACtCCAAGGGGAtGtCCtAtACtCGCCGtGCtAGCCGtGt-3'

【 配列表 】

0005812478000001.app

## フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第2011/019031(WO, A1)

特開2007-056001(JP, A)

ASTROM, H. et al, Oligonucleotide based artificial nuclease (OBAN) systems. Bulge size dependence and positioning of catalytic group in cleavage of RNA-bulges, Organic & Biomolecular Chemistry, 2003年, Vol.1, No.9, p.1461-1465

ADAMCZYK, M. et al, Synthesis of hapten-phosphoramidites from 2'-deoxyuridine, Tetrahedron, 2003年, Vol.59, No.30, p.5749-5761

桑原正靖, 人工核酸を用いたポリメラーゼ反応と人工核酸アプタマーの創製, 生化学, 2010年, 第82巻, 第4号, 第318-323頁

IMAZUMI, Y. et al, Efficacy of Base-Modification on Target Binding of Small Molecule DNA Aptamers, Journal of the American Chemical Society, 2013年, Vol.135, No.25, p.9412-9419

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H, A61K, A61P, C07D

CAplus/REGISTRY(STN)

JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)