(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7456643号
(P7456643)

(45)発行日　令和6年3月27日(2024.3.27)

(24)登録日　令和6年3月18日(2024.3.18)

(51)国際特許分類

		FI		
Ｃ１２Ｎ　15/115(2010.01)		Ｃ１２Ｎ	15/115	Ｚ ＺＮＡ
Ｃ１２Ｑ　1/68 (2018.01)		Ｃ１２Ｑ	1/68	

請求項の数　3　（全45頁）

(21)出願番号　特願2021-553692(P2021-553692)
(86)(22)出願日　令和2年10月29日(2020.10.29)
(86)国際出願番号　PCT/JP2020/040687
(87)国際公開番号　WO2021/085554
(87)国際公開日　令和3年5月6日(2021.5.6)
審査請求日　令和4年4月21日(2022.4.21)
(31)優先権主張番号　16/668,717
(32)優先日　令和1年10月30日(2019.10.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　PCT/JP2020/018142
(32)優先日　令和2年4月28日(2020.4.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　000232092
ＮＥＣソリューションイノベータ株式会社
東京都江東区新木場一丁目１８番７号
(73)特許権者　517278543
モザイク バイオサイエンシズ，インコーポレイティド
アメリカ合衆国，コロラド，ボールダー，コロラド アベニュー ３４１５
(74)代理人　100115255
弁理士　辻丸 光一郎
(74)代理人　100201732
弁理士　松縄 正登
(74)代理人　100154081
弁理士　伊佐治 創

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　核酸分子の製造方法、生体用材料、および生体用材料の製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

下記（ａ）または（ｂ）のいずれかのポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、ＶＥＧＦに結合する核酸分子：

（ａ）配列番号１の塩基配列または配列番号１の塩基配列の部分配列からなり、前記部分配列が、配列番号２、３、４、１４～２３からなる群から選択された少なくとも一つのポリヌクレオチドからなるポリヌクレオチド；

（ｂ）配列番号１９－２３からなる群から選択された少なくとも一つのポリヌクレオチドを含み、配列番号１、２、３、４の塩基配列に対して、９０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド。

【請求項２】

結合核酸分子と、担体とを含み、

前記結合核酸分子は、前記担体に結合しており、

前記結合核酸分子は、請求項１記載のＶＥＧＦに結合する前記核酸分子であることを特徴とする生体用材料。

【請求項３】

担体に、結合核酸分子を結合させる工程を含み、

前記結合核酸分子は、請求項１記載のＶＥＧＦに結合する前記核酸分子であることを特徴とする生体用材料の製造方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、核酸分子の製造方法、生体用材料、および生体用材料の製造方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
増殖因子は、細胞の増殖や分化を促進する内因性のタンパク質である。増殖因子の１つである血管内皮細胞増殖因子（Ｖａｓｃｕｌａｒ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ：ＶＥＧＦ）は、血管内皮細胞増殖因子受容体（ＶＥＧＦＲ）にリガンドとして結合し、血管新生等に関与することが知られている（非特許文献１）。
【０００３】
一方、タンパク質等のターゲットに対して、特異的に結合する核酸分子が注目されている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００４】
【文献】Ferrara N. et. al. Nat Med. 2003 Jun;9(6):669-76.
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
しかしながら、従来、前記核酸分子が、前記ターゲットに結合することで、前記ターゲットの機能を阻害する場合があった。
【０００６】
そこで、本発明は、ターゲットに結合し、且つ、前記ターゲットの機能を阻害しない核酸分子を取得可能な核酸分子の製造方法を提供することを目的とする。
【課題を解決するための手段】
【０００７】
前記目的を達成するために、本発明の核酸分子の製造方法は、下記（Ａ）工程および（Ｂ）工程を含むことを特徴とする、第１生体分子に結合し、且つ、前記第１生体分子の機能を阻害しない核酸分子の製造方法である。
（Ａ）候補核酸分子を前記第１生体分子と接触させ、前記第１生体分子に結合する核酸分子を、第１選択核酸分子として選択する工程
（Ｂ）前記第１選択核酸分子を、目的の核酸分子として選択する工程
【０００８】
本発明の核酸分子は、下記（ａ）または（ｂ）のいずれかのポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、ＶＥＧＦに結合する核酸分子である。
（ａ）配列番号１の塩基配列または配列番号１の塩基配列の部分配列からなるポリヌクレオチド
（ｂ）前記（ａ）の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド
【０００９】
本発明の生体用材料は、結合核酸分子と、担体とを含み、
前記結合核酸分子は、前記担体に結合しており、
前記結合核酸分子は、所定のタンパク質に結合し、且つ、前記所定のタンパク質の機能を阻害しないことを特徴とする。
【００１０】
本発明の生体用材料の製造方法は、担体に、結合核酸分子を結合させる工程を含み、
前記結合核酸分子は、所定のタンパク質に結合し、且つ、前記所定のタンパク質の機能を阻害しないことを特徴とする。
【発明の効果】

【００１１】
本発明によれば、ターゲットに結合し、且つ、前記ターゲットの機能を阻害しない核酸分子を取得可能な核酸分子の製造方法を提供できる。
【図面の簡単な説明】
【００１２】
【図１】図１は、アプタマー１～５の推定二次構造である。
【図２】図２は、それぞれ異なるＶＥＧＦアイソフォームをコードする、２つのｍＲＮＡスプライスバリアントを示す模式図である。エクソン７がコードする、ＨＢＤ（heparin binding domain）部分のアミノ酸配列が示されている。
【図３】図３は、本発明の実施例１における、ＶＥＧＦ１６５に対するアプタマー１～５の結合性を示すグラフである。
【図４】図４は、本発明の実施例２における、ＶＥＧＦ１６５に対するアプタマー１～５の結合性を示すグラフである。
【図５】図５は、本発明の実施例２における、カルシウムイオン存在下でのＶＥＧＦ１６５に対するアプタマー１～５の結合性を示すグラフである。
【図６】図６は、本発明の実施例３における、３７℃でのＶＥＧＦ１６５に対するアプタマー１～５の結合性を示すグラフである。
【図７】図７は、本発明の実施例３における、３７℃、カルシウムイオン存在下でのＶＥＧＦ１６５に対するアプタマー１～５の結合性を示すグラフである。
【図８】図８は、本発明の実施例４における、アプタマー１～５の結合性を示すグラフである。
【図９】図９は、本発明の実施例５における、ＶＥＧＦ濃度に応じたＶＥＧＦ受容体のリン酸化を示す用量反応曲線である。
【図１０】図１０は、本発明の実施例５における、ＶＥＧＦ受容体のリン酸化を示すグラフである。
【図１１】図１１は、本発明の実施例５における、各アプタマー存在下で細胞をＶＥＧＦ処理した場合における、ＶＥＧＦ受容体のリン酸化を示すグラフである。
【図１２】図１２は、本発明の実施例５における、各アプタマー存在下で細胞をＶＥＧＦ処理した場合における、ＶＥＧＦ受容体のリン酸化を示すグラフである。
【図１３】図１３は、本発明の実施形態２における、ターゲット物質および非ターゲット物質の一例を示す概略図である。
【図１４】図１４は、本発明の実施例６における、アプタマー２および６～１５の結合性を示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
つぎに、本発明の実施形態について説明する。なお、本発明は、以下の実施形態には限定されない。各実施形態の説明は、特に言及がない限り、互いの説明を援用できる。
【００１４】
［実施形態１］
（１）核酸分子
本発明の核酸分子は、前述のように、下記（ａ）または（ｂ）のいずれかのポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、ＶＥＧＦに結合する核酸分子である。
（ａ）配列番号１の塩基配列または配列番号１の塩基配列の部分配列からなるポリヌクレオチド
（ｂ）前記（ａ）の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド
【００１５】
本発明において、ターゲットは、ＶＥＧＦ（Ｖａｓｃｕｌａｒ Ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ：血管内皮増殖因子）である。本発明の核酸分子について、例えば、結合能を確認するためのＶＥＧＦとして、市販のＶＥＧＦが使用でき、具体例と

して、ＶＥＧＦ１６５（PeproTech社製、Cat:100-20）が例示できる。本発明において、以下、ＶＥＧＦ１６５は、単にＶＥＧＦともいう。VEGFは、例えば、VEGF-Aである。VEGFの由来は、特に制限されず、例えば、ヒトである。

【００１６】

本発明の核酸分子は、前述のように、ＶＥＧＦに結合可能である。本発明において、「ＶＥＧＦに結合する」とは、例えば、ＶＥＧＦに対する結合性を有している、または、ＶＥＧＦに対する結合活性を有しているともいう。本発明の核酸分子とＶＥＧＦとの結合は、例えば、表面プラズモン共鳴分子相互作用（ＳＰＲ；Ｓｕｒｆａｃｅ　Ｐｌａｓｍｏｎ　ｒｅｓｏｎａｎｃｅ）解析等により決定できる。前記解析は、例えば、ＢＩＡＣＯＲＥ３０００（商品名、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ＵＫ　Ｌｔｄ．）が使用できる。本発明の核酸分子は、ＶＥＧＦに結合することから、例えば、ＶＥＧＦの検出に使用できる。

【００１７】

本発明の核酸分子は、ＶＥＧＦに対する結合力を示す解離定数が、例えば、カルシウムイオン非存在下において、１．７１×１０$^{-17}$、４．７３×１０$^{-21}$、１．０７×１０$^{-10}$、７．３５×１０$^{-15}$、２．４５×１０$^{-17}$、９．０７×１０$^{-11}$、９．９３×１０$^{-11}$、１．４９×１０$^{-11}$、４．１７×１０$^{-6}$、２．７６×１０$^{-11}$、５．４５×１０$^{-11}$、３．４９×１０$^{-9}$、８×１０$^{-7}$、９．２７×１０$^{-8}$ｍｏｌ／Ｌ、または１．０×１０$^{-12}$ｍｏｌ／Ｌ未満であり、カルシウムイオン存在下において、１．４３×１０$^{-16}$、３．６６×１０$^{-17}$、２．１７×１０$^{-21}$、３．３２×１０$^{-16}$、２．１６×１０$^{-16}$ｍｏｌ／Ｌである。

【００１８】

本発明の核酸分子は、ＤＮＡ分子、またはＤＮＡアプタマーともいう。本発明の核酸分子は、例えば、前記（ａ）または（ｂ）のポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドを含む分子でもよい。

【００１９】

前記（ａ）のポリヌクレオチドは、例えば、前記配列番号１の塩基配列を含むポリヌクレオチドでもよいし、前記配列番号１の塩基配列からなるポリヌクレオチドでもよく、また、前記配列番号１の塩基配列の部分配列を含むポリヌクレオチドでもよいし、前記部分配列からなるポリヌクレオチドでもよい。前記配列番号１のポリヌクレオチドを以下に示す。なお、配列番号１、ならびに後述する配列番号２～４、１４～２３および７の塩基配列において、後述するモチーフ配列（配列番号５および６）に対応する配列に、下線を付している。

【００２０】

ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ１（配列番号１）

GGATTGCCCGATTCACCGTAAACAGTTCTGGTTCCTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAGGCATTCTGGAGCGGCATAAC

【００２１】

前記配列番号１は、例えば、ＳＥＬＥＸ法による核酸分子のセレクション後のシークエンス解析において、全配列中の６．２％の頻度で存在する配列である。前記シークエンス解析において、例えば、所定の配列が、全配列中の５％以上の頻度で存在する場合、前記配列は、セレクションで十分に濃縮されていると判断できる。

【００２２】

前記部分配列は、特に制限されないが、例えば、配列番号２～４および１４～２３の塩基配列があげられる。

【００２３】

ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ３１（配列番号２）

CCTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAGG

ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ４９（配列番号３）

CCGTAAACAGTTCTGGTTCCTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAGG

ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ６２（配列番号４）

TTCACCGTAAACAGTTCTGGTTCCTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAGGCATTCTGGA
ＶＥＧＦ＿Ｌ３０＿１（配列番号１４）
CTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAGG
ＶＥＧＦ＿Ｌ３０＿２（配列番号１５）
CCTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAG
ＶＥＧＦ＿Ｌ２９＿１（配列番号１６）
CTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAG
ＶＥＧＦ＿Ｌ２８＿１（配列番号１７）
TTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAG
ＶＥＧＦ＿Ｌ２８＿２（配列番号１８）
CTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAA
ＶＥＧＦ＿Ｌ２７＿１（配列番号１９）
TTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAA
ＶＥＧＦ＿Ｌ２６＿１（配列番号２０）
TAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAA
ＶＥＧＦ＿Ｌ２６＿２（配列番号２１）
TTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTA
ＶＥＧＦ＿Ｌ２５＿１（配列番号２２）
TAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTA
ＶＥＧＦ＿Ｌ２３＿１（配列番号２３）
AGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTT

【００２４】

前記（ｂ）において、「同一性」は、特に制限されず、例えば、前記（ｂ）のポリヌクレオチドが、ＶＥＧＦに結合する範囲であればよい。前記同一性は、例えば、８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９５％以上、９６％以上、９７％以上、特に好ましくは９８％以上、最も好ましくは９９％以上である。前記同一性は、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＦＡＳＴＡ等の解析ソフトウェアを用いて、デフォルトのパラメータにより算出できる（以下、同様）。

【００２５】

前記（ｂ）において、「ＶＥＧＦの機能」とは、例えば、前記ＶＥＧＦが、ＶＥＧＦ受容体に結合する機能である。前記ＶＥＧＦ受容体は、例えば、ＶＥＧＦＲ－１（ＦＬＴ－１）およびＶＥＧＦＲ－２（ＫＤＲ／ＦＬＫ－１）があげられる。また、「ＶＥＧＦの機能」とは、例えば、前記ＶＥＧＦが、前記ＶＥＧＦ受容体への結合により、前記ＶＥＧＦ受容体の活性を調節する機能であり、具体的には、前記ＶＥＧＦ受容体を活性化する機能、およびリン酸化する機能である。

【００２６】

前記（ｂ）のポリヌクレオチドは、例えば、下記（ｂ１）のポリヌクレオチドでもよい。この場合、本発明の核酸分子は、例えば、前記（ｂ１）のポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドを含む分子でもよい。

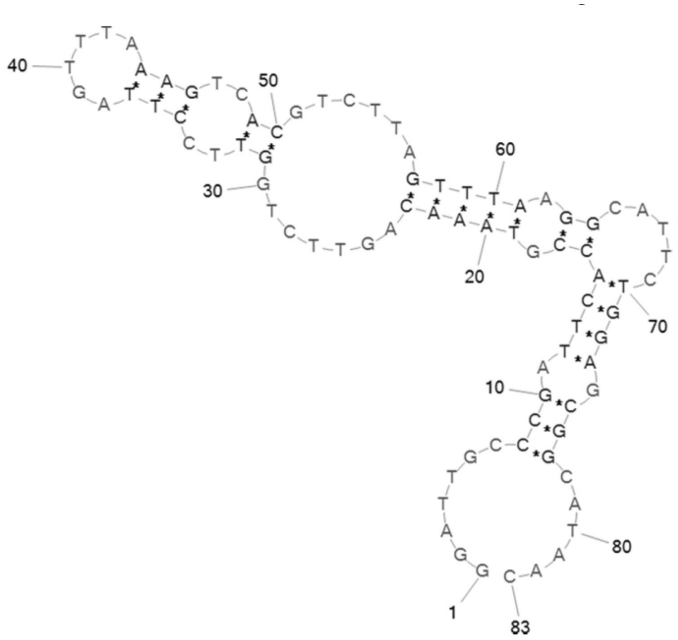
（ｂ１）前記（ａ）の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、配列番号２～４および１４から２３のいずれかの塩基配列を含み、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド

【００２７】

本発明の核酸分子における前記ポリヌクレオチドは、例えば、下記（ｂ２）のポリヌクレオチドでもよい。この場合、本発明の核酸分子は、例えば、前記（ｂ２）のポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドを含む分子でもよい。

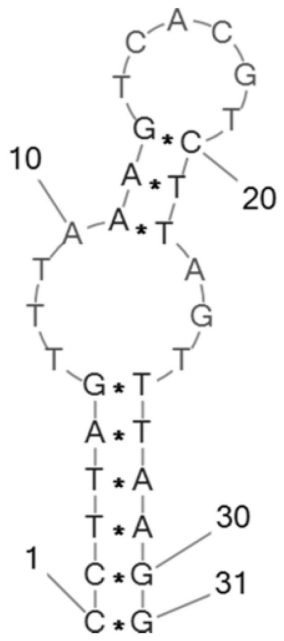
（ｂ２）前記（ａ）の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、それぞれ、下記式（１）～（５）で表される二次構造を形成可能であり、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド

【化１】



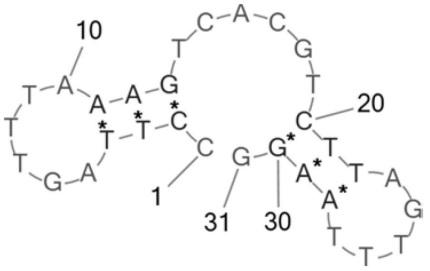
… (1)

【化２】



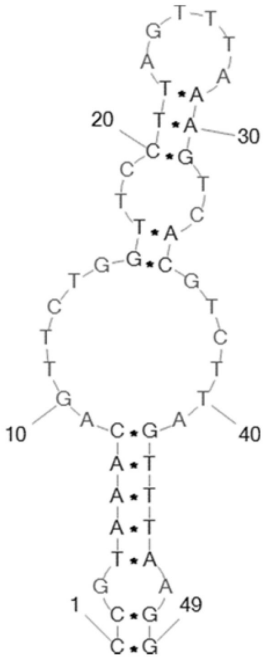
… (2)

【化３】



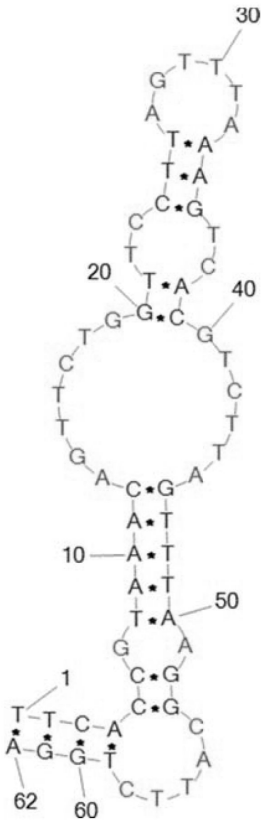
… (3)

【化４】



… (4)

【化５】



… (5)

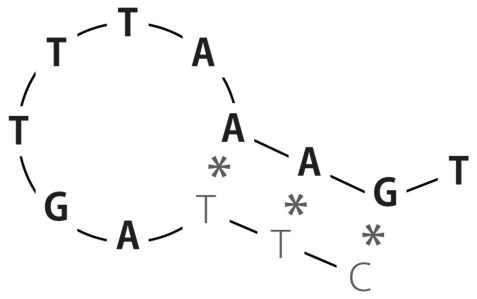
【００２８】

前記各式において、式（１）が、配列番号１に対応し、式（２）および式（３）が、配列番号２に対応し、式（４）が、配列番号３に対応し、式（５）が、配列番号４に対応する。なお、式（２）および式（３）は、平衡状態で存在すると推測されるが、これには限定されない。

【００２９】
前記（ｂ２）のポリヌクレオチドは、具体的には、例えば、配列番号１の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、前記式（１）で表される二次構造を形成可能であり、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド、配列番号２の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、前記式（２）または（３）で表される二次構造を形成可能であり、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド、配列番号３の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、前記式（４）で表される二次構造を形成可能であり、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド、および、配列番号４の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、前記式（５）で表される二次構造を形成可能であり、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチドである。
【００３０】
また、前記（ｂ２）のポリヌクレオチドは、具体的には、例えば、配列番号１の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、前記式（２）～（５）のいずれかで表される二次構造を形成可能であり、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチドである。
【００３１】
前記（ｂ２）において、「二次構造を形成可能」とは、例えば、前記（ｂ２）のポリヌクレオチドが、前記式におけるステム構造およびループ構造を形成可能であることをいう。ステム構造およびループ構造については、後述する。前記「二次構造」は、例えば、実際に形成される二次構造でもよいし、既知の手段によりシミュレーションを行った場合の二次構造でもよい。
【００３２】
本発明の核酸分子における前記ポリヌクレオチドは、例えば、下記（ｂ３）のポリヌクレオチドでもよい。この場合、本発明の核酸分子は、例えば、前記（ｂ３）のポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドを含む分子でもよい。
（ｂ３）前記（ａ）の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、それぞれ、配列番号５および６の少なくとも一方の塩基配列を含み、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド
配列番号５
AGTTTAAAGT
配列番号６
AGTTTWAD
上記配列中、Ｗは、アデニンまたはチミンを示し、Ｄは、アデニン、グアニン、またはチミンを示す。
【００３３】
前記（ｂ３）のポリヌクレオチドは、具体的には、例えば、配列番号１～４の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、それぞれ、配列番号５および６の少なくとも一方の塩基配列を含み、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチドである。
【００３４】
配列番号５および６は、例えば、配列番号１～４、１４～２３、および７の塩基配列における、モチーフ配列である。前記モチーフ配列は、前記ＳＥＬＥＸ法による核酸分子のセレクション後のシークエンス解析において、全配列中の５％以上の頻度で存在する配列について、アライメント解析を行うことにより、決定した。
【００３５】
本発明の核酸分子における前記ポリヌクレオチドは、例えば、下記（ｂ４）のポリヌクレオチドでもよい。この場合、本発明の核酸分子は、例えば、前記（ｂ４）のポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドを含む分子でもよい。

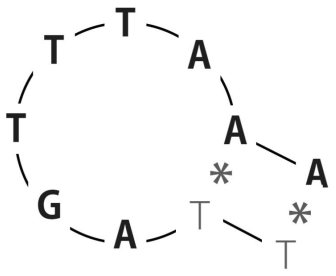
（ｂ４）前記（ａ）の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、下記式（６）～（８）のうち少なくとも一つの二次構造を形成可能であり、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド

【化６】



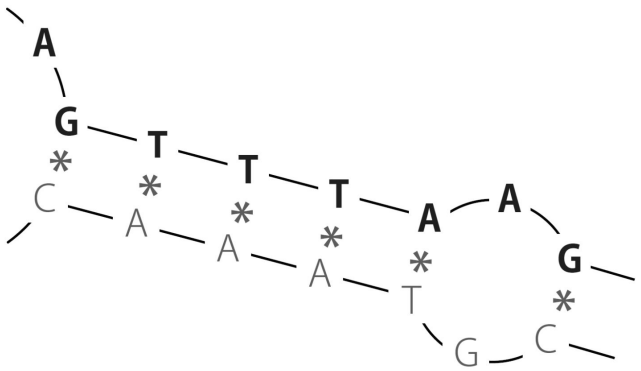
・・・（６）

【化７】



・・・（７）

【化８】



・・・（８）

【００３６】

前記式（６）は、配列番号５に対応する二次構造を示し、前記式（７）～（８）は、配列番号６に対応する二次構造を示す。前記式（６）～（８）において、配列番号５および６に対応する塩基を、太字で示す。

【００３７】

前記（ｂ４）のポリヌクレオチドは、具体的には、例えば、配列番号１の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、前記式（６）または（７）、および（８）の二次構造を形成可能であり、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド、配列番号２の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、前記式（６）または（７）の二次構造を形成可能であり、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド、配列番号３の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、前記式（６）または（７）、および（８）の二次構造を形成可能であり、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ

、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド、配列番号４の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、前記式（６）または（７）、および（８）の二次構造を形成可能であり、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチドである。

【００３８】

前記（ｂ）のポリヌクレオチドは、例えば、配列番号７の塩基配列からなるポリヌクレオチドでもよい。配列番号７の塩基配列は、配列番号１の塩基配列に対して、８９．５％の同一性を有する塩基配列である。

【００３９】

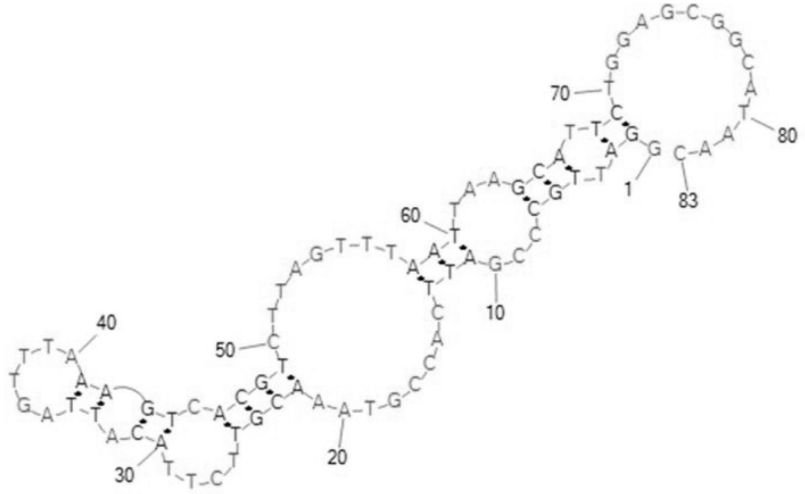
ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ４９（配列番号７）

GGATTGCCCGATTCACCGTAAACGTTCTTACATTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAT
TAAGCATTCTGGAGCGGCATAAC

【００４０】

配列番号７の塩基配列は、下記式（１０）の二次構造を形成可能である。また、配列番号７の塩基配列は、配列番号５および６の塩基配列を含む。配列番号７の塩基配列は、式（７）の二次構造を形成可能である。

【化１０】



... (10)

【００４１】

本発明の核酸分子における前記ポリヌクレオチドは、例えば、下記（ｃ）のポリヌクレオチドでもよい。この場合、本発明の核酸分子は、例えば、前記（ｃ）のポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドを含む分子でもよい。

（ｃ）前記（ａ）の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに相補的な塩基配列からなり、ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド

【００４２】

前記（ｃ）において、「ハイブリダイズするポリヌクレオチド」は、特に制限されず、例えば、前記（ａ）の塩基配列に対して、完全または部分的に相補的なポリヌクレオチドである。前記ハイブリダイズは、例えば、各種ハイブリダイゼーションアッセイにより検出できる。前記ハイブリダイゼーションアッセイは、特に制限されず、例えば、ザンブルーク（Ｓａｍｂｒｏｏｋ）ら編「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリーマニュアル第２版（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ２ｎｄ Ｅｄ.）」〔Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ （１９８９）〕等に記載されている方法を採用することもできる。

【００４３】

前記（ｃ）において、「ストリンジェントな条件」は、例えば、低ストリンジェントな条件、中ストリンジェントな条件、高ストリンジェントな条件のいずれでもよい。「低ストリンジェントな条件」は、例えば、５×ＳＳＣ、５×デンハルト溶液、０．５％ＳＤＳ、５０％ホルムアミド、３２℃の条件である。「中ストリンジェントな条件」は、例えば、５×ＳＳＣ、５×デンハルト溶液、０．５％ＳＤＳ、５０％ホルムアミド、４２℃の条件である。「高ストリンジェントな条件」は、例えば、５×ＳＳＣ、５×デンハルト溶液、０．５％ＳＤＳ、５０％ホルムアミド、５０℃の条件である。ストリンジェンシーの程度は、当業者であれば、例えば、温度、塩濃度、プローブの濃度および長さ、イオン強度、時間等の条件を適宜選択することで、設定可能である。「ストリンジェントな条件」は、例えば、前述したザンブルーク（Ｓａｍｂｒｏｏｋ）ら編「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリーマニュアル第２版（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ２ｎｄ Ｅｄ．）」〔Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ （１９８９）〕等に記載の条件を採用することもできる。

【００４４】

本発明の核酸分子における前記ポリヌクレオチドは、例えば、下記（ｄ）のポリヌクレオチドでもよい。この場合、本発明の核酸分子は、例えば、前記（ｄ）のポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドを含む分子でもよい。

（ｄ）前記（ａ）の塩基配列において、１もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入および／または付加された塩基配列からなり、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド

【００４５】

前記（ｄ）において、「１もしくは数個」は、例えば、前記（ｄ）のポリヌクレオチドが、ＶＥＧＦに結合する範囲であればよい。前記「１もしくは数個」は、前記（ａ）の塩基配列において、例えば、１～１０個、好ましくは１～７個、より好ましくは１～５個、さらに好ましくは１～３個、特に好ましくは１または２個である。本発明において、塩基数および配列数等の個数の数値範囲は、例えば、その範囲に属する正の整数を全て開示するものである。つまり、例えば、「１～５塩基」との記載は、「１、２、３、４、５塩基」の全ての開示を意味する（以下、同様）。

【００４６】

前記核酸分子は、例えば、前記（ａ）～（ｄ）のいずれかのポリヌクレオチドの配列を１つ含んでもよいし、前記ポリヌクレオチドの配列を複数含んでもよい。後者の場合、複数のポリヌクレオチドの配列が連結して、一本鎖のポリヌクレオチドを形成していることが好ましい。前記複数のポリヌクレオチドの配列は、例えば、それぞれが直接的に連結してもよいし、リンカーを介して、それぞれが間接的に連結してもよい。前記ポリヌクレオチドの配列は、それぞれの末端において、直接的または間接的に連結していることが好ましい。前記複数のポリヌクレオチドの配列は、例えば、同じでもよいし、異なってもよいが、好ましくは同じである。前記ポリヌクレオチドの配列を複数含む場合、前記配列の数は、特に制限されず、例えば、２以上であり、好ましくは２～１２であり、より好ましくは２～６であり、さらに好ましくは２である。

【００４７】

前記リンカーは、例えば、ポリヌクレオチドがあげられ、その構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基があげられる。前記ヌクレオチド残基は、例えば、リボヌクレオチド残基、デオキシリボヌクレオチド残基があげられる。前記リンカーの長さは、特に制限されず、例えば、１～２４塩基長であり、好ましくは１２～２４塩基長であり、より好ましくは１６～２４塩基長であり、さらに好ましくは２０～２４塩基長である。

【００４８】

前記核酸分子において、前記ポリヌクレオチドは、一本鎖ポリヌクレオチドであることが好ましい。前記一本鎖ポリヌクレオチドは、例えば、自己アニーリングによりステム構造およびループ構造を形成可能であることが好ましい。前記ポリヌクレオチドは、例えば

、ステムループ構造、インターナルループ構造および／またはバルジ構造等を形成可能であることが好ましい。

【００４９】

前記核酸分子は、例えば、二本鎖でもよい。二本鎖の場合、例えば、一方の一本鎖ポリヌクレオチドは、前記（ａ）～（ｄ）のいずれかのポリヌクレオチドであり、他方の一本鎖ポリヌクレオチドは、制限されない。前記他方の一本鎖ポリヌクレオチドは、例えば、前記（ａ）～（ｄ）のいずれかのポリヌクレオチドに相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドがあげられる。本発明の核酸分子が二本鎖の場合、例えば、使用に先立って、変性等により、一本鎖ポリヌクレオチドに解離させることが好ましい。また、解離した前記（ａ）～（ｄ）のいずれかの一本鎖ポリヌクレオチドは、例えば、前述のように、ステム構造およびループ構造を形成していることが好ましい。

【００５０】

本発明において、「ステム構造およびループ構造を形成可能」とは、例えば、実際にステム構造およびループ構造を形成すること、ならびに、ステム構造およびループ構造が形成されていなくても、条件によってステム構造およびループ構造を形成可能なことも含む。「ステム構造およびループ構造を形成可能」とは、例えば、実験的に確認した場合、および、コンピュータ等のシミュレーションで予測した場合の双方を含む。

【００５１】

前記核酸分子の長さは、特に制限されず、その下限は、例えば、１５塩基長、７５塩基長または８０塩基長であり、その上限は、例えば、１０００塩基長、２００塩基長、１００塩基長または９０塩基長である。

【００５２】

前記核酸分子の構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基である。前記ヌクレオチド残基は、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌクレオチド残基があげられる。本発明の核酸分子は、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基のみから構成されるＤＮＡ、１もしくは数個のリボヌクレオチド残基を含むＤＮＡ等があげられる。後者の場合、「１もしくは数個」は、特に制限されず、例えば、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、１～３個である。

【００５３】

前記ポリヌクレオチドは、例えば、修飾塩基を含んでもよい。前記修飾塩基は、特に制限されず、例えば、天然塩基（非人工塩基）が修飾された塩基があげられ、前記天然塩基と同様の機能を有することが好ましい。前記天然塩基は、特に制限されず、例えば、プリン骨格を有するプリン塩基、ピリミジン骨格を有するピリミジン塩基等があげられる。前記プリン塩基は、特に制限されず、例えば、アデニン（ａ）、グアニン（ｇ）があげられる。前記ピリミジン塩基は、特に制限されず、例えば、シトシン（ｃ）、チミン（ｔ）、ウラシル（ｕ）等があげられる。前記塩基の修飾部位は、特に制限されない。前記塩基がプリン塩基の場合、前記プリン塩基の修飾部位は、例えば、前記プリン骨格の７位および８位があげられる。前記塩基がピリミジン塩基の場合、前記ピリミジン塩基の修飾部位は、例えば、前記ピリミジン骨格の５位および６位があげられる。前記ピリミジン骨格において、４位の炭素に「＝Ｏ」が結合し、５位の炭素に「－CH_3」または「－Ｈ」以外の基が結合している場合、修飾ウラシルまたは修飾チミンということができる。

【００５４】

本発明の核酸分子は、例えば、１もしくは数個の人工核酸モノマー残基を含んでもよい。前記「１もしくは数個」は、特に制限されず、例えば、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、１～８０個、好ましくは１～７０個、より好ましくは１～５０個、さらに好ましくは１～４０個、特に好ましくは１～３０個、最も好ましくは１～２１個である。前記人工核酸モノマー残基は、例えば、ＰＮＡ（ペプチド核酸）、ＬＮＡ（Ｌｏｃｋｅｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ）、ＥＮＡ（２’－Ｏ，４’－Ｃ－Ｅｔｈｙｌｅｎｅｂｒｉｄｇｅｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ）等があげられる。前記モノマー残基における核酸は、例えば、前述と同様である。また、前記ポリヌクレオチドを含む前記核酸分子の全長における

前記人工核酸モノマー残基も、特に制限されず、例えば、前述の範囲と同様である。

【００５５】

前記核酸分子は、例えば、ヌクレアーゼ耐性であることが好ましい。本発明の核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性のため、例えば、前記修飾ヌクレオチド残基および／または前記人工核酸モノマー残基を有することが好ましい。本発明の核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性のため、例えば、５’末端または３’末端に、数１０ｋＤａのＰＥＧ（ポリエチレングリコール）またはデオキシチミジン等が結合してもよい。

【００５６】

前記核酸分子は、例えば、さらに付加配列を有してもよい。前記付加配列は、例えば、前記核酸分子の５’末端および３’末端の少なくとも一方に結合していることが好ましく、より好ましくは３’末端である。前記付加配列は、特に制限されない。前記付加配列の長さは、特に制限されず、例えば、１～２００塩基長であり、好ましくは１～５０塩基長であり、より好ましくは１～２５塩基長、さらに好ましくは１８～２４塩基長である。前記付加配列の構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基であり、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌクレオチド残基等があげられる。前記付加配列は、特に制限されず、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基からなるＤＮＡ、リボヌクレオチド残基を含むＤＮＡ等のポリヌクレオチドがあげられる。前記付加配列の具体例として、例えば、ポリｄＴ、ポリｄＡ等があげられる。

【００５７】

本発明の核酸分子は、例えば、担体に固定化して使用できる。前記本発明の核酸分子は、例えば、５’末端および３’末端のいずれかを固定化することができる。本発明の核酸分子を固定化する場合、例えば、前記核酸分子は、前記担体に、直接的に固定化してもよいし、間接的に固定化してもよい。後者の場合、本発明の核酸分子は、例えば、前記付加配列を介して、前記担体に固定化する。前記担体は、例えば、ビーズ、プレート、フィルター、カラム、基板、容器等があげられる。

【００５８】

本発明の核酸分子は、例えば、さらに標識物質を有してもよく、具体的には、前記核酸分子に前記標識物質が結合してもよい。前記標識物質が結合した前記核酸分子は、例えば、本発明の核酸センサということもできる。前記標識物質は、例えば、前記核酸分子の５’末端および３’末端の少なくとも一方に結合させてもよい。前記標識物質による標識化は、例えば、結合でもよいし、化学修飾でもよい。前記標識物質は、特に制限されず、例えば、酵素、蛍光物質、色素、同位体、薬物、毒素および抗生物質等があげられる。前記酵素は、例えば、ルシフェラーゼ、ＳＡ－Ｌｕｃｉａルシフェラーゼ等があげられる。前記蛍光物質は、例えば、ピレン、ＴＡＭＲＡ、フルオレセイン、Ｃｙ３色素、Ｃｙ５色素、ＦＡＭ色素、ローダミン色素、テキサスレッド色素、ＪＯＥ、ＭＡＸ、ＨＥＸ、ＴＹＥ等の蛍光団があげられ、前記色素は、例えば、Ａｌｅｘａ４８８、Ａｌｅｘａ６４７等のＡｌｅｘａ色素等があげられる。前記標識物質は、例えば、前記核酸分子に直接的に連結してもよいし、リンカーを介して、間接的に連結してもよい。前記リンカーは、特に制限されず、例えば、ポリヌクレオチドのリンカー等である。

【００５９】

本発明の核酸分子の製造方法は、特に制限されず、例えば、化学合成を利用した核酸合成方法、遺伝子工学的手法等の公知の方法等により合成できる。また、本発明の核酸分子は、例えば、後述する本発明の核酸分子の製造方法により製造できる。

【００６０】

本発明の核酸分子は、前述のように、ＶＥＧＦに結合性を示す。このため、本発明の核酸分子の用途は、ＶＥＧＦへの結合性を利用する用途であれば、特に制限されない。本発明の核酸分子は、例えば、ＶＥＧＦに対する抗体に代えて、種々の方法に使用できる。

【００６１】

本発明の核酸分子によれば、ＶＥＧＦを検出できる。ＶＥＧＦの検出方法は、特に制限されず、ＶＥＧＦと前記核酸分子との結合を検出することによって行える。

【００６２】
（２）検出試薬およびキット
本発明の検出試薬は、ＶＥＧＦの検出試薬であって、前記本発明の核酸分子を含むことを特徴とする。本発明の検出試薬は、前記本発明の核酸分子を含んでいればよく、その他の構成は何ら制限されない。本発明の検出試薬を使用すれば、前述のように、例えば、ＶＥＧＦの検出等を行うことができる。本発明の検出試薬は、例えば、ＶＥＧＦへの結合剤ともいえる。
【００６３】
本発明の検出試薬は、例えば、さらに、標識物質を有し、前記標識物質が、前記核酸分子に結合されてもよい。前記標識物質は、例えば、前記本発明の核酸分子における説明を援用できる。また、本発明の検出試薬は、例えば、担体を有し、前記担体に前記核酸分子が固定化されてもよい。前記担体は、例えば、前記本発明の核酸分子における説明を援用できる。
【００６４】
本発明の検出キットは、前記本発明の核酸分子または前記本発明の検出試薬を含む。本発明の検出キットは、例えば、さらに、その他の構成要素を含んでもよい。前記構成要素は、例えば、試料を調製するための緩衝液、使用説明書等があげられる。また、後述する本発明の検出方法に示す、前記核酸分子に標識物質であるルシフェラーゼを結合させた核酸センサと、標識化担体とを用いる方法の場合、本発明の検出キットは、例えば、前記核酸センサと、ＶＥＧＦ標識化担体とを含むキットとすることができる。
【００６５】
本発明の検出試薬および検出キットは、例えば、前記本発明の核酸分子の説明を援用でき、また、その使用方法についても、前記本発明の核酸分子および後述する前記本発明の検出方法を援用できる。
【００６６】
（３）検出方法
本発明のＶＥＧＦの検出方法は、前記本発明の核酸分子、または前記本発明の検出試薬と、試料とを接触させ、前記試料中のＶＥＧＦと、前記核酸分子または前記検出試薬との複合体を形成させる工程、および、前記複合体を検出する工程を含むことを特徴とする。本発明の検出方法は、前記本発明の核酸分子または前記検出試薬を使用することが特徴であって、その他の工程および条件等は、特に制限されない。以下、本発明の核酸分子の使用を例にあげて説明するが、本発明の核酸分子は、本発明の検出試薬と読み替え可能である。
【００６７】
本発明によれば、前記本発明の核酸分子が、ＶＥＧＦに特異的に結合することから、例えば、ＶＥＧＦと、前記核酸分子または前記検出試薬との結合を検出することによって、試料中のＶＥＧＦを特異的に検出可能である。具体的には、例えば、試料中のＶＥＧＦの量を分析可能であることから、定性分析または定量分析も可能といえる。
【００６８】
本発明において、前記試料は、特に制限されない。前記試料は、例えば、生物学的サンプルであり、具体的には、例えば、血漿、血清、リンパ液、全血、組織培養液等があげられる。
【００６９】
前記試料は、例えば、液体試料でもよいし、固体試料でもよい。前記試料は、例えば、前記核酸分子と接触させ易く、取扱いが簡便であることから、液体試料が好ましい。前記固体試料の場合、例えば、溶媒を用いて、混合液、抽出液、溶解液等を調製し、これを使用してもよい。前記溶媒は、特に制限されず、例えば、水、生理食塩水、緩衝液等があげられる。
【００７０】
前記複合体形成工程において、前記試料と前記核酸分子との接触方法は、特に制限され

ない。前記試料と前記核酸分子との接触は、例えば、液体中で行われることが好ましい。前記液体は、特に制限されず、例えば、水、生理食塩水、緩衝液等があげられる。

【００７１】

前記複合体形成工程において、前記試料と前記核酸分子との接触条件は、特に制限されない。接触温度は、例えば、４～３７℃であり、好ましくは１８～２５℃であり、接触時間は、例えば、１０～１２０分であり、好ましくは３０～６０分である。

【００７２】

前記複合体形成工程において、前記核酸分子は、例えば、担体に固定化された固定化核酸分子（固相担体）でもよいし、未固定の遊離した核酸分子でもよい。後者の場合、例えば、容器内で、前記試料と接触させる。前者の場合、前記担体は、特に制限されず、例えば、プレート、フィルター、カラム、基板、ビーズ、容器等があげられ、前記容器は、例えば、マイクロプレート、チューブ等があげられる。前記核酸分子の固定化は、例えば、前述の通りである。また、前記複合体形成工程において、例えば、前記試料を、担体に固定化してもよい。

【００７３】

前記検出工程は、前述のように、前記試料中のＶＥＧＦと前記核酸分子との結合を検出する工程である。前記両者の結合の有無を検出することによって、例えば、前記試料中のＶＥＧＦの有無を分析（定性）でき、また、前記両者の結合の程度（結合量）を検出することによって、例えば、前記試料中のＶＥＧＦの量を分析（定量）できる。

【００７４】

ＶＥＧＦと前記核酸分子との結合の検出方法は、特に制限されない。前記方法は、例えば、物質間の結合を検出する従来公知の方法が採用でき、具体例として、前述のＳＰＲ等があげられる。

【００７５】

そして、ＶＥＧＦと前記核酸分子との結合が検出できなかった場合は、前記試料中にＶＥＧＦは存在しないと推定でき、前記結合が検出された場合は、前記試料中にＶＥＧＦが存在すると判断できる。また、予め、ＶＥＧＦの濃度と結合量との相関関係を求めておき、前記相関関係に基づいて、前記結合量から、前記試料中のＶＥＧＦの濃度を分析することもできる。

【００７６】

ＶＥＧＦと前記核酸分子との結合の検出について、一例として、前記核酸分子に標識物質であるルシフェラーゼを結合させた核酸センサと、ＶＥＧＦ標識化担体とを用いる方法を、以下に示す。

【００７７】

まず、前記核酸センサと前記試料とを混合する。これにより、前記試料中にＶＥＧＦが存在する場合、前記核酸センサにおける前記核酸分子は、ターゲットであるＶＥＧＦと結合する。他方、前記試料中にＶＥＧＦが存在しない場合、前記核酸センサにおける核酸分子は、ターゲットと未結合の状態となる。

【００７８】

つぎに、前記混合物を、前記ＶＥＧＦ標識化担体に接触させた後、前記ＶＥＧＦ標識化担体を除去する。前記担体は、例えば、ビーズがあげられる。前記混合物において、前記核酸センサがＶＥＧＦと結合している場合、前記核酸センサにおける前記核酸分子は、前記ＶＥＧＦ標識化担体におけるＶＥＧＦとは結合できない。このため、前記ＶＥＧＦ標識化担体を除去した画分に対して、ルシフェラーゼの基質を添加して発光反応を行った場合、前記核酸センサにおけるルシフェラーゼの触媒反応によって、発光が生じる。他方、前記混合物において、前記核酸センサがＶＥＧＦと結合していない場合、前記核酸センサにおける前記核酸分子は、前記ＶＥＧＦ標識化担体におけるＶＥＧＦと結合する。このため、前記ＶＥＧＦ標識化担体の除去により、前記核酸センサも、前記ＶＥＧＦ標識化担体に結合した状態で除去されることになる。このため、前記ＶＥＧＦ標識化担体を除去した画分に対して、ルシフェラーゼの基質を添加して発光反応を行った場合、前記核酸センサが

存在していないことから、ルシフェラーゼの触媒反応による発光は生じない。このため、発光の有無によって、試料中のＶＥＧＦの有無を分析（定性分析）することができる。また、試料中のＶＥＧＦの量と、前記ＶＥＧＦ標識化担体を除去した後の前記画分に残存する前記核酸センサの量とは、相関関係を有するため、発光の強弱によって、試料中のＶＥＧＦの量も分析（定量分析）することができる。

【００７９】

［実施形態２］

本発明の核酸分子の製造方法は、前述のように、下記（Ａ）工程および（Ｂ）工程を含むことを特徴とする、第１生体分子に結合し、且つ、前記第１生体分子の機能を阻害しない核酸分子の製造方法である。

（Ａ）候補核酸分子を前記第１生体分子と接触させ、前記第１生体分子に結合する核酸分子を、第１選択核酸分子として選択する工程

（Ｂ）前記第１選択核酸分子を、目的の核酸分子として選択する工程

【００８０】

本発明の核酸分子の製造方法は、例えば、さらに、前記（Ａ）工程後、下記（Ｃ）工程を含み、前記（Ｃ）工程後、前記（Ｂ）工程において、第２生体分子の機能が検出された前記複合体の前記第１選択核酸分子を、目的の核酸分子として選択する。

（Ｃ）前記第１選択核酸分子と前記第１生体分子とが結合した複合体に、さらに、前記第２生体分子を接触させ、前記第２生体分子の機能を検出する工程

【００８１】

前記本発明の核酸分子の製造方法において、前記第１生体分子の機能は、例えば、前記第１生体分子が、前記第２生体分子に結合する機能である。前記第１生体分子の機能は、例えば、前記第１生体分子が、前記第２生体分子への結合により、前記第２生体分子の活性を調節する機能である。前記第２生体分子の活性を調節する機能は、例えば、前記第２生体分子を活性化する機能でもよいし、不活性化する機能でもよい。前記活性化は、例えば、リン酸化があげられる。

【００８２】

また、本発明の製造方法は、例えば、前記第１生体分子が、増殖因子であり、前記第２生体分子が、前記増殖因子が結合する受容体である。この場合、本発明の核酸分子の製造方法は、下記（Ａ）工程および（Ｂ）工程を含むことを特徴とする、増殖因子に結合し、且つ、前記増殖因子の機能を阻害しない核酸分子の製造方法である。

（Ａ）候補核酸分子を前記増殖因子と接触させ、前記増殖因子に結合する核酸分子を、第１選択核酸分子として選択する工程

（Ｂ）前記第１選択核酸分子を、目的の核酸分子として選択する工程

【００８３】

また、この場合、本発明の製造方法は、例えば、さらに、前記（Ａ）工程後、下記（Ｃ）工程を含み、前記（Ｃ）工程後、前記（Ｂ）工程において、前記増殖因子が結合する受容体の活性化が検出された前記複合体の前記第１選択核酸分子を、目的の核酸分子として選択する。

（Ｃ）前記第１選択核酸分子と前記増殖因子とが結合した複合体に、さらに、前記増殖因子が結合する受容体を接触させ、前記受容体の活性化を検出する工程

【００８４】

以下、前記第１生体分子が、増殖因子であり、前記第２生体分子が、前記増殖因子が結合する受容体である場合を例にあげて説明を行うが、本発明は前記形態には限定されない。前記第１生体分子および前記第２生体分子の組合せは、例えば、タンパク質および前記タンパク質の受容体の組合せであり、この場合、前記組合せは、例えば、いかなるタンパク質複合体における組合せでもよく、例えば、サイトカインおよびサイトカイン受容体の組合せ、ならびに酵素および酵素の受容体（基質）の組合せがあげられる。

【００８５】

本発明において、前記増殖因子は、例えば、ＶＥＧＦ（Ｖａｓｃｕｌａｒ　Ｅｎｄｏｔ

ｈｅｌｉａｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ：血管内皮増殖因子）、サイトカイン、ヘパリン結合性増殖因子である。本発明の核酸分子の製造方法において、例えば、候補核酸分子と接触させるためのＶＥＧＦとして、市販のＶＥＧＦが使用でき、具体例として、ＶＥＧＦ１６５（PeproTech社製、Cat:100-20）が例示できる。本発明において、以下、ＶＥＧＦ１６５は、単にＶＥＧＦともいう。

【００８６】

前記（Ａ）工程は、例えば、候補核酸分子を前記増殖因子と接触させ、前記増殖因子に結合する核酸分子を、第１選択核酸分子として選択する工程である。

【００８７】

本発明において、「増殖因子に結合する」とは、例えば、増殖因子に対する結合性を有している、または、増殖因子に対する結合活性を有しているともいう。

【００８８】

前記候補核酸分子は、特に制限されず、例えば、ランダムな配列を有する核酸を含むライブラリーを用いることができる。

【００８９】

前記（Ａ）工程において、前記候補核酸分子と前記増殖因子との接触方法は、特に制限されない。前記候補核酸分子と前記増殖因子との接触は、例えば、液体中で行われることが好ましい。前記液体は、特に制限されず、例えば、水、生理食塩水、緩衝液等があげられる。前記緩衝液は、例えば、ＳＢ１Ｔバッファーがあげられる。

【００９０】

前記（Ａ）工程において、前記候補核酸分子と前記増殖因子との接触条件は、特に制限されない。接触温度は、例えば、４～３７℃であり、好ましくは１８～２５℃であり、接触時間は、例えば、１０～１２０分、３０～６０分である。

【００９１】

前記候補核酸分子と前記増殖因子との接触において、前記候補核酸分子は、例えば、担体に固定化された固定化核酸分子（固相担体）でもよいし、未固定の遊離した核酸分子でもよい。後者の場合、例えば、容器内で、前記増殖因子と接触させる。前者の場合、前記担体は、特に制限されず、例えば、プレート、フィルター、カラム、基板、ビーズ、容器等があげられ、前記容器は、例えば、マイクロプレート、チューブ等があげられる。前記候補核酸分子の固定化は、例えば、前述の通りである。また、前記候補核酸分子と前記増殖因子との接触において、例えば、前記第１生体分子、前記第２生体分子、前記複合体、ならびに後述するターゲット物質および非ターゲット物質を、担体に固定化してもよい。

【００９２】

前記（Ａ）工程において、前記候補核酸分子と前記増殖因子との結合の検出方法は、特に制限されない。前記方法は、例えば、物質間の結合を検出する従来公知の方法が採用でき、具体例として、表面プラズモン共鳴分子相互作用（ＳＰＲ；Ｓｕｒｆａｃｅ Ｐｌａｓｍｏｎ ｒｅｓｏｎａｎｃｅ）解析等により決定できる。前記解析は、例えば、ＢＩＡＣＯＲＥ３０００（商品名、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ ＵＫ Ｌｔｄ．）が使用できる。

【００９３】

そして、例えば、前記候補核酸分子と前記増殖因子との結合が検出できなかった場合は、前記候補核酸分子は前記増殖因子に結合しないと判断でき、前記結合が検出された場合は、前記候補核酸分子は前記増殖因子に結合すると判断できる。

【００９４】

前記（Ａ）工程において、前記増殖因子に対する結合力を示す解離定数が、例えば、数ｎＭ以下である核酸分子を、第１選択核酸分子として選択できる。

【００９５】

前記（Ａ）工程において、例えば、前記候補核酸分子を、ターゲット物質である前記増殖因子および非ターゲット物質と、それぞれ接触させ、前記候補核酸分子のうち、前記ターゲット物質に結合し、且つ、前記非ターゲット物質に結合しない核酸分子を、前記第１選択核酸分子として選択してもよい。

【００９６】
この場合、前記非ターゲット物質は、例えば、前記増殖因子が結合する受容体とすることができる。また、例えば、前記増殖因子が結合する受容体のアミノ酸配列における、前記増殖因子との結合部位に相当する配列を含むポリペプチドとすることができる。これにより、前記受容体に結合しない前記核酸分子を、前記第１選択核酸分子として選択することができる。
【００９７】
また、前記非ターゲット物質は、例えば、前記増殖因子のアミノ酸配列における、前記増殖因子の受容体との結合部位に相当する配列を含むポリペプチドとすることができる。これにより、前記増殖因子と前記核酸分子とが結合した場合に、前記結合した増殖因子がさらに受容体に結合する機能を阻害しない前記核酸分子を、前記第１選択核酸分子として選択することができる。
【００９８】
また、前記ターゲット物質が、目的の増殖因子である場合、前記非ターゲット物質は、例えば、目的以外の増殖因子とすることができる。これにより、目的の増殖因子に結合し、目的以外の増殖因子に結合しない前記核酸分子を、前記第１選択核酸分子として選択することができる。
【００９９】
また、図１３に示すように、前記ターゲット物質を、前記増殖因子のアミノ酸配列における、前記増殖因子の受容体との結合部位に相当する配列（S_R）を含み、且つ前記増殖因子の受容体との結合部位に相当する配列とは異なる配列である任意の核酸結合配列（S_A）を含むポリペプチドとし、前記非ターゲット物質を、前記増殖因子のアミノ酸配列における、前記増殖因子の受容体との結合部位に相当する配列（S_R）を含み、且つ前記任意の核酸結合配列（S_A）を含まないポリペプチドとすることができる。例えば、前記非ターゲット物質は、前記ターゲット物質と比較して、前記配列（S_A）を含まない点以外では共通する配列を有するポリペプチドとすることができる。前記ターゲット物質および前記非ターゲット物質において、前記配列（S_R）および前記配列（S_A）の位置および順番は、特に制限されない。前記ターゲット物質および前記非ターゲット物質は、例えば、互いにスプライシングバリアントの関係にあるタンパク質でもよい。この場合、前記配列（S_A）は、例えば、任意の１つのエクソンによりコードされるアミノ酸配列とすることができる。前記配列（S_A）は、例えば、後述するＨＢＤ（heparin binding domain）を含む配列とすることができる。これにより、目的の増殖因子における、前記配列（S_A）に結合し、前記配列（S_R）には結合しない前記核酸分子を、前記第１選択核酸分子として選択することができる。
【０１００】
前記目的の増殖因子が、例えば、後述するＨＢＤを含む配列を有する増殖因子である場合、前記目的以外の増殖因子は、例えば、ＨＢＤを含まない配列を有する増殖因子である。前記ＨＢＤを含む配列を有する増殖因子は、例えば、ＶＥＧＦ１６５であり、前記ＨＢＤを含まない配列を有する増殖因子は、例えば、後述するＶＥＧＦ１２１である。
【０１０１】
前記ターゲット物質が、例えば、ＶＥＧＦ１６５である場合、前記非ターゲット物質は、例えば、ＶＥＧＦ１６５が結合する受容体である。前記ＶＥＧＦ１６５が結合する受容体は、例えば、ＶＥＧＦＲ－１（ＦＬＴ－１）およびＶＥＧＦＲ－２（ＫＤＲ／ＦＬＫ－１）があげられる。ＶＥＧＦＲ－１のアミノ酸配列における、ＶＥＧＦ１６５との結合部位に相当する配列を含むポリペプチドは、例えば、下記配列番号８に示される、第２のＩｇ様ドメイン（ａａ：１２９－２２９）があげられる。また、ＶＥＧＦＲ－２のアミノ酸配列における、ＶＥＧＦ１６５との結合部位に相当する配列を含むポリペプチドは、例えば、下記配列番号９および１０に示される、第２のＩｇ様ドメイン（ａａ：１４１－２０７）、および第３のＩｇ様ドメイン（ａａ：２２４－３２０）があげられる。ＶＥＧＦ１６５のアミノ酸配列における、ＶＥＧＦＲ－１との結合部位に相当する配列を含むポリペ

プチドは、例えば、下記配列番号１１に示される、Ｅｘｏｎ３があげられる。ＶＥＧＦ１６５のアミノ酸配列における、ＶＥＧＦＲ－２との結合部位に相当する配列を含むポリペプチドは、例えば、下記配列番号１２に示される、Ｅｘｏｎ４があげられる。

【０１０２】

第２のＩｇ様ドメイン（配列番号８）

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTI

第２のＩｇ様ドメイン（配列番号９）

NKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDE

第３のＩｇ様ドメイン（配列番号１０）

DVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNST

Ｅｘｏｎ３（配列番号１１）

VKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEESNITMQ

Ｅｘｏｎ４（配列番号１２）

IMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECR

【０１０３】

前記（Ｃ）工程は、例えば、前記第１選択核酸分子と前記増殖因子とが結合した複合体に、さらに、前記増殖因子が結合する受容体を接触させ、前記受容体の活性化を検出する工程である。

【０１０４】

前記（Ｃ）工程において、例えば、前記第１選択核酸分子とＶＥＧＦとが結合した複合体に接触させるための受容体として、市販のＶＥＧＦ受容体が使用でき、具体例として、ＶＥＧＦ受容体（R&D systems社製、Cat.No:357-KD-050/CF）が例示できる。VEGFは、例えば、VEGF-Aである。VEGFの由来は、特に制限されず、例えば、ヒトである。

【０１０５】

前記（Ｃ）工程において、前記第１選択核酸分子と前記増殖因子とが結合した複合体と、前記増殖因子が結合する受容体との接触方法および接触条件は、特に制限されず、例えば、前記（Ａ）工程における前記候補核酸分子と前記増殖因子との接触方法および接触条件と同様である。

【０１０６】

前記（Ｃ）工程において、前記増殖因子が結合する受容体の活性化を検出する方法は、特に制限されない。前記検出は、例えば、前記増殖因子が結合する受容体のリン酸化を測定することにより行える。前記検出は、具体的には、例えば、ＥＬＩＳＡ、ウエスタンブロッティングにより行うことができる。

【０１０７】

そして、例えば、前記増殖因子が結合する受容体の活性化が検出できなかった場合は、前記複合体は前記受容体を活性化しないと判断でき、前記活性化が検出された場合は、前記複合体は前記受容体を活性化すると判断できる。

【０１０８】

前記（Ｃ）工程において、前記増殖因子が結合する受容体の活性化の検出は、例えば、前記第１選択核酸分子と前記増殖因子とが結合した複合体と、前記増殖因子が結合する受容体との結合を検出することにより、間接的に検出してもよい。

【０１０９】

前記結合の検出方法は、特に制限されず、例えば、ＳＰＲ、キャピラリー電気泳動、Ｎａｔｉｖｅ－ＰＡＧＥ等により行うことができる。

【０１１０】

以上、増殖因子ＶＥＧＦを用いて前記本発明の方法を説明した。この方法を他のタンパ

ク質に適用可能なことは、当業者であれば認識できることである。前記タンパク質としては、更に、以下に示す例があげられる。ただし、本発明は以下の例示には限定されない。
・選択的スプライシングによって生成されるＰＤＧＦ－Ａの長（ヘパリン結合性）および短（ヘパリン結合性でない）アイソフォーム（ＵＮＩＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ０４０８５－１およびＰ０４０８５－２）、ならびにヘパリン結合性ドメインの選択的切断型を含むＰｌＧＦの４つのスプライスバリアント（ＵＮＩＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ４９７６３－１、Ｐ４９７６３－２、Ｐ４９７６３－３、Ｐ４９７６３－４）等のヘパリン結合性ドメインを有する他の増殖因子；
・非構造化Ｃ末端ヘパリン結合ドメインを含むインターフェロンγ（ＩＦＮγ）（ＵＮＩＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ０１５７９－１）、ヒトＴＮＦ－α（ヘパリン結合性）およびＮ末端切断型非ヘパリン結合性ヒトＴＮＦ－α（Kenig、Met al.2008Journal of Chromatography B、867、pp.119-125）、ならびにヘパリン結合が分子クローニングによって除去可能なｐ４０サブユニット独立的にフォールディングするＣ末端ドメインに起因するＩＬ－１２（Garnier、Pet al.2018Cytokine 110、pp.159-168）等のヘパリン結合ドメインを有する他のサイトカイン；
・ＰＤＧＦ－Ａの短アイソフォームおよびＩＦＮγ由来のＣ末端ＨＢＤを有するリコンビナント体等のヘパリン結合ドメインを含むように操作された増殖因子；
・長アイソフォームＰＤＧＦ－Ａ由来のＩＬ－１およびＨＢＤを有するリコンビナント体、ならびに細胞表面Ｈｅｐ／ＨＳ相互作用タンパク質由来のＩＬ－２およびＨＢＤを有するリコンビナント体（Liu、S.、1997.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94、pp.1739-1744）等のヘパリン結合性ドメインを含むように操作されたサイトカイン；
・ヘパリン／ヘパラン硫酸（ＨＰ／ＨＳ）相互作用タンパク質（Liu et al.1997The Journal of Biological Chemistry 272、pp.25856-25862; Liu、S.、1997 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94、pp.1739-1744）等のヘパリン結合性ドメインを有する他の分泌タンパク質；
・操作されたヘパリン結合性ドメインを有する他の分泌タンパク質；
・受容体結合を失うことなくタンパク質分解的に除去可能なＣ末端Ｅペプチドの異なる変異体を含む選択的スプライシングによって生成されたヒトＩＧＦ－１の４つのアイソフォーム（ＵＮＩＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ０５０１９－１、Ｐ０５０１９－２、Ｐ０５０１９－３、Ｐ０５０１９－４）ならびに、選択的開始によって生成され、受容体結合に干渉しない異なるＮ末端ドメインを有するヒトＦＧＦ－２の４つのアイソフォーム（ＵＮＩＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ０９０３８－１、Ｐ０９０３８－２、Ｐ０９０３８－３、Ｐ０９０３８－４）等の所望の生物学的機能を有するドメインとは別個に標的化可能なドメインを有するタンパク質（増殖因子、サイトカイン、および分泌タンパク質を含む）；
・所望の生物学的機能を有するドメインとは別個に標的化可能なドメイン（例えば、アルブミン、ＦＣ　ＳＵＭＯ、ＧＳＯ、または当業者に周知の他のドメイン）を含むように操作されたタンパク質（増殖因子、サイトカイン、および分泌タンパク質を含む）。

【０１１１】
　前記（Ｂ）工程は、前記第１選択核酸分子を、目的の核酸分子として選択する工程である。

【０１１２】
　本発明の核酸分子の製造方法によれば、第１生体分子に結合し、且つ、前記第１生体分子の機能を阻害しない核酸分子を得ることができる。

【０１１３】
［実施形態３］
（１）生体用材料
　本発明の生体用材料は、前述のように、結合核酸分子と、担体とを含み、前記結合核酸分子は、前記担体に結合しており、前記結合核酸分子は、所定のタンパク質に結合し、且つ、前記所定のタンパク質の機能を阻害しないことを特徴とする。

【０１１４】

前記担体は、例えば、ポリマーである。前記ポリマーは、例えば、ゲル、粒子等があげられる。ポリマー担体は、例えば、光開始化学で生成されたポリ（エチレングリコール）系ゲルがあげられる。具体的には、１０％　ｗｔ／ｖｏｌ、分子量４６００のポリ（エチレングリコール）－ジアクリレート（ＰＥＧＤＡ）、０．０５％の光開始剤Ｉｒｇａｃｕｒｅ－２９５９（Ｉ２９５９）、および遊離チオールまたはアクリレート部分で官能化された結合核酸を含む水性緩衝液中で、モノマー溶液を調製する。ゲルの重合は、１００ＷＨｇのショートアークランプ（Ｏｍｎｉｃｕｒｅ（登録商標）１０００、ＥＸＦＯ社、カナダ）を、製造会社が供給する３６５ｎｍ露光用フィルターを使用して、試料に１０分間照射することによって行われる。重合反応の間、前記結合核酸は、ポリマーに共有結合的に組み込まれるようになる。この系において、各ＰＥＧＤＡモノマー内にエステル結合が存在することにより、得られるポリマーが加水分解を受けやすくなる。しかしながら、前記分解の速度は、一般的に、組織工学用途には遅すぎると考えられる。したがって、本開示では、ＰＥＧＤＡヒドロゲルは、非分解性であると考えられる。

前記ポリマー担体は、加水分解性であるように製剤化することもできる。加水分解的に分解可能なポリマー担体は、例えば、光開始化学で作製されたカプロラトン系のゲルがあげられる。具体的には、６％　ｗｔ／ｖｏｌのメタクリル化ヒアルロン酸（ＭｅＨＡ）およびメタクリル化カプロラクトンＨＡ（ＭｅＣＬＨＡ）を１：１の比で含み、０．０５％の光開始剤Ｉｒｇａｃｕｒｅ－２９５９（Ｉ２９５９）と、遊離チオールまたはアクリレート部分で官能化された結合核酸を含む水性緩衝液中で、モノマー溶液を調製する。ゲルの重合は、１００ＷＨｇのショートアークランプ（Ｏｍｎｉｃｕｒｅ（登録商標）１０００、ＥＸＦＯ社、カナダ）を、製造会社が供給する露光用フィルターを使用して、波長３６５ｎｍの光を試料に１０分間照射することによって行われる。この系において、カプロラクトン結合が存在することにより、ポリマー系が、上記のＰＥＧＤＡ系ポリマーよりも有意に速い速度で加水分解を受けやすくなる。

前記ポリマー担体は、酵素的に分解可能であるように製剤化することもできる。酵素的に分解可能なポリマー担体は、例えば、チオール－エン光開始化学で作製されたポリ（エチレングリコール）系のゲルである。具体的には、６％ｗｔ／ｖｏｌの２０Ｋの４アームポリ（エチレングリコール）－ノルボルネン（ＰＥＧ－ＮＢ）と、６ｍＭのジ－システイン酵素分解性架橋ペプチド（ＫＣＧＰＱＧＩＡＧＱＣＫ）と、０．０１％の光開始剤リチウムフェニル－２，４，６－トリメチルベンゾイルホスフィナート（ＬＡＰ）と、遊離チオールまたはノルボルネン部分で官能化された結合核酸を含む水性緩衝液中で、モノマー溶液を調製する。この系において、システイン含有ペプチドと、４－アームＰＥＧ－ＮＢモノマーと、官能化結合核酸とを、「チオール」および「エン」官能基に対して１：１の化学量論比で混合する。前記ＬＡＰ光開始剤の存在下、波長３６５ｎｍの光をサンプルに照射すると、チオール基がノルボルネンに付加され、ノルボルネン－チオエーテル結合を形成する。前記ヒドロゲルの重合は、手持ちＬＥＤフラッシュライトを用いて、前記溶液に波長３８５ｎｍの光を１分間照射することによって行われる。この系において、架橋ペプチドは、１つ以上の多アーム「エン」官能化ポリエチレングリコールと共有結合的に反応することを可能にする、少なくとも２つのシステイン（「チオール」部分を含むＲ基）の存在を必要とする。４－アームＰＥＧ－ＮＢは、天然に存在する細胞外マトリックスリモデリング酵素による酵素分解を受けやすいように設計されたジシステインペプチド架橋剤と反応する。具体的には、マトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ）による切断感受性が周知のコラーゲン系の配列、ＫＣＧＰＱＧ＊ＩＡＧＱＣＫが使用される。ここで、「＊」は酵素切断部位を示す。

本明細書に記載するポリマー担体系は、例としてあげられているにすぎず、特定の組成元素をポリマーマトリックスにどのように組み込んで、原料担体に特定の特性を付与することができるかを例示するために選択される。これらの例では、原料担体の異なる分解特性が達成される。結合核酸用の担体は、単独でまたは組み合わせて、分解の他のメカニズムを組み込んで、異なる分解プロファイルを有する広範囲の材料を作製するように設計可能であることが分かる。

細胞接着および細胞遊走用の基質を含む材料は、細胞および組織の足場機能も提供する核酸担体を作製するために使用可能である。細胞付着のための結合部位を提示するポリペプチド（例えば、ＣＲＧＤ）、全長タンパク質（例えば、フィブリノーゲン、コラーゲン、ラミニンなど）、またはそのタンパク質断片の組み込みは、結合核酸と組み合わせて使用されて、生物学的用途のさらなる機能性を有する原料担体を作製可能である。

結合核酸用担体を作製するために使用される分子成分は前述の例示に記載されるポリ（エチレングリコール）－ジアクリレート（ＰＥＧＤＡ）、メタクリル化ヒアルロン酸（ＭｅＨＡ）、メタクリル化カプロラクトンＨＡ（ＭｅＣＬＨＡ）、およびポリ（エチレングリコール）－ノルボルネン（ＰＥＧ－ＮＢ）に限定されない。核酸結合用原料担体を作製するために、複数の分子成分が使用可能なことは、当業者であれば理解できるものである。

結合核酸用担体を作製するために使用される化学物質および反応性基は、前述の例示に記載される光開始化学物質に限定されない。複数の反応性化学官能基を利用する複数の反応メカニズムが、核酸結合用原料担体を作製するために使用可能なことは、当業者であれば理解できるものである。

【０１１５】

前記担体に前記結合核酸分子を結合させる方法は、特に制限されず、既知の手法を用いることができる。前記結合核酸分子は、例えば、付加配列を介して、前記担体に結合させることができる。

【０１１６】

前記結合核酸分子は、所定のタンパク質に結合し、且つ、前記所定のタンパク質の機能を阻害しなければよく、特に制限されない。前記所定のタンパク質の機能は、例えば、前記タンパク質に対する受容体に結合する機能である。また、前記所定のタンパク質の機能は、例えば、前記受容体への結合により、前記受容体の活性を調節する機能である。前記受容体の活性を調節する機能は、例えば、前記受容体を活性化する機能でもよいし、不活性化する機能でもよい。前記活性化は、例えば、リン酸化があげられる。前記結合核酸分子は、例えば、前述の、前記本発明の核酸分子の製造方法により製造された核酸分子を用いることができる。

【０１１７】

前記所定のタンパク質は、例えば、増殖因子である。前記増殖因子としては、例えば、ＶＥＧＦがあげられる。前記増殖因子が、ＶＥＧＦである場合、前記結合核酸分子は、例えば、前述の、前記本発明のＶＥＧＦに結合する核酸分子を用いることができる。

【０１１８】

前記結合核酸分子は、例えば、前記生体用材料において、前記所定のタンパク質と結合した結合体として含まれてもよいし、前記所定のタンパク質と未結合でもよい。後者の場合、例えば、前記生体用材料を生体に配置することで、前記結合核酸分子は、前記生体における前記所定のタンパク質と結合することができる。

【０１１９】

本発明の生体用材料によれば、例えば、本発明の生体用材料を生体に接触させることで、前記生体に対し、前記結合核酸分子に結合した前記所定のタンパク質の機能を発揮させることができる。前記生体は、例えば、ヒト、非ヒト動物であり、前記非ヒト動物は、例えば、サル、イヌ、ウサギ、ウシ、ウマ等の哺乳類があげられる。前記接触は、特に制限されず、例えば、前記生体に前記生体用材料を配置してもよいし、前記生体に内服させてもよい。前記生体用材料を配置する前記生体の部位は、前記所定のタンパク質の機能を発揮させることが求められる部位であればよく、特に制限されず、例えば、皮膚である。

【０１２０】

本発明の生体用材料の使用形態について、具体的に説明する。第１の例として、本発明の生体用材料は、生体足場であり、前記生体足場は、ＶＥＧＦに結合した前記本発明の結合核酸分子と、前記結合核酸分子に結合した生分解性のゲルとを含む。そして、前記生体足場を、前記生体の創傷部位に配置すると、前記結合核酸分子に結合したＶＥＧＦが、前記創傷部位におけるＶＥＧＦ受容体に結合することにより、前記ＶＥＧＦ受容体を活性化

させることができる。これにより、例えば、前記創傷部位の治癒を促進することができる。
【０１２１】
第２の例として、本発明の生体用材料は、内服薬であり、前記内服薬は、前記所定のタンパク質に結合した前記結合核酸分子と、前記結合核酸分子に結合した生分解性の粒子とを含む。そして、前記内服薬を、前記生体に内服させると、前記生体内において、前記生分解性の粒子が分解することにより、前記結合核酸分子に結合した前記所定のタンパク質が遊離し、前記所定のタンパク質の機能を発揮させることができる。これにより、例えば、前記生体内における前記所定のタンパク質の機能を発揮させるタイミング等を調節することができる。
【０１２２】
このように、本発明の生体用材料によれば、例えば、生体に対し、任意の位置、および任意のタイミングで、前記所定のタンパク質の機能を発揮させることができる。
【０１２３】
本発明の生体用材料は、例えば、生体の治療方法に使用することができる。前記生体の治療方法は、例えば、生体に、本発明の生体用材料を接触させる工程を含む。前記接触は、例えば、前述の通りである。
【０１２４】
（２）生体用材料の製造方法
本発明の生体用材料の製造方法は、前述のように、担体に、結合核酸分子を結合させる工程を含み、前記結合核酸分子は、所定のタンパク質に結合し、且つ、前記所定のタンパク質の機能を阻害しないことを特徴とする。前記担体、前記結合核酸分子、および前記所定のタンパク質は、例えば、前述の通りである。
【０１２５】
前記担体に結合核酸分子を結合させる工程は、例えば、前記担体に付加配列を付加する工程、および前記付加配列に前記結合核酸分子を結合させる工程を含んでもよい。これらの工程は、例えば、既知の手法を用いて行うことができる。これにより、前記結合核酸分子を、付加配列を介して、前記担体に結合させることができる。
【０１２６】
本発明の生体用材料の製造方法は、例えば、さらに、前記結合核酸分子に、前記所定のタンパク質を結合させる工程を含んでもよい。前記結合核酸分子に前記所定のタンパク質を結合させる工程は、特に制限されず、既知の手法により、前記結合核酸分子と前記所定のタンパク質とを接触させることができる。
【実施例】
【０１２７】
つぎに、本発明の実施例について説明する。ただし、本発明は、下記実施例により制限されない。市販の試薬は、特に示さない限り、それらのプロトコルに基づいて使用した。
【０１２８】
［実施例１］
本発明のアプタマーについて、ＶＥＧＦに対する結合性を、ＳＰＲ解析により確認した。
【０１２９】
（１）アプタマー
下記ポリヌクレオチドのアプタマー１～５を、実施例１のアプタマーとして合成した。アプタマー２～４は、アプタマー１の小型化アプタマーである。アプタマー５は、アプタマー１の塩基配列に対して、８９．５％の同一性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドである。
【０１３０】
アプタマー１：ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ１（配列番号１）
GGATTGCCCGATTCACCGTAAACAGTTCTGGTTCCTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAGGCATTCTGGAGCGGCATAAC
アプタマー２：ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ３１（配列番号２）

CCTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAGG
アプタマー３：ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ４９（配列番号３）
CCGTAAACAGTTCTGGTTCCTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAGG
アプタマー４：ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ６２（配列番号４）
TTCACCGTAAACAGTTCTGGTTCCTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAGGCATTCT
GGA
アプタマー５：ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ４９（配列番号７）
GGATTGCCCGATTCACCGTAAACGTTCTTACATTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAA
TTAAGCATTCTGGAGCGGCATAAC

【０１３１】

アプタマー１～５の推定二次構造を、それぞれ、図１（Ａ）～（Ｅ）に示す。ただし、これには限定されない。

【０１３２】

前記アプタマーは、その３’末端に、２０塩基長のポリデオキシアデニン（ポリｄＡ）を付加し、ポリｄＡ付加アプタマーとして、後述するＳＰＲに使用した。

【０１３３】

（２）試料

ＶＥＧＦ１６５を使用し、以下のようにして、ＶＥＧＦ試料を調製した。前記ＶＥＧＦ１６５は、図２に示すように、ＶＥＧＦのアミノ酸配列におけるエクソン６によりコードされるアミノ酸配列を欠失している一方、下記配列番号１３により示されるエクソン７（ＨＢＤ（heparin binding domain）部分）によりコードされるアミノ酸配列を含む。

ＨＢＤ部分（配列番号１３）
ARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

【０１３４】

ＶＥＧＦ１６５（PeproTech社製、Cat:100-20）を、１ｍｇ／ｍＬとなるように滅菌済み蒸留水で溶解し、前記溶液を、ＶＥＧＦ試料とした。なお、下記結合性の解析等において、前記ＶＥＧＦ試料の希釈には、ＳＢ１Ｔバッファーを使用した。前記ＳＢ１Ｔバッファーの組成は、４０ｍｍｏｌ／Ｌ ＨＥＰＥＳ、１２５ｍｍｏｌ／Ｌ ＮａＣｌ、５ｍｍｏｌ／Ｌ ＫＣｌ、１ｍｍｏｌ／Ｌ $MgCl_2$および０．０５％ Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０とし、ｐＨは、７．５とした。

【０１３５】

また、コントロール１として、前記ＶＥＧＦ１６５に代えて、ＶＥＧＦ１２１（PeproTech社製、Cat:100-20A）を使用した以外は同様にして、試料を調製した。図２に示すように、ＶＥＧＦ１２１は、エクソン６およびエクソン７をコードする塩基配列を欠失したＶＥＧＦのアミノ酸配列を有する。さらに、コントロール２として、前記ＶＥＧＦ１６５に代えて、ＢＳＡ（Sigma社製、Cat.No:#A7906）を使用した以外は同様にして、試料を調製した。

【０１３６】

（３）ＳＰＲによる結合性の解析

結合性の解析には、ProteOn XPR36（BioRad社）を、その使用説明書にしたがって使用した。

【０１３７】

まず、前記ProteOn専用のセンサーチップとして、ストレプトアビジンが固定化されたチップ（商品名 ProteOn NLC Sensor Chip、BioRad社）を、前記ProteOn XPR36にセットした。前記センサーチップのフローセルに、超純水（ＤＤＷ）を用いて、５μｍｏｌ／Ｌのビオチン化ポリｄＴをインジェクションし、シグナル強度（ＲＵ：Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ Ｕｎｉｔ）が飽和するまで結合させた。前記ビオチン化ポリｄＴは、２０塩基長のデオキシチミジンの５’末端をビオチン化して調製した。そして、前記チップの前記フローセルに、ＳＢ１Ｔバッファーを用いて、２００ｎｍｏｌ／Ｌの前記ポリｄＡ付加アプタマーを、流速２５μＬ／ｍｉｎで８０秒間インジェクションし、シグナル強度が飽和

するまで結合させた。続いて、５ｎｍｏｌ／Ｌの前記試料を、それぞれ、ＳＢ１Ｔバッファーを用いて、流速５０μＬ／ｍｉｎで３００秒間インジェクションし、引き続き、同じ条件で、ＳＢ１Ｔバッファーを流して、洗浄を行った。前記試料のインジェクション開始を０秒として、前記試料のインジェクション後のシグナル強度を測定した。前記ＳＰＲは、２５℃の条件下で行った。

【０１３８】

この結果を図３に示す。図３は、５ｎｍｏｌ／ＬのＶＥＧＦ１６５に対するアプタマー１～５の結合性を示すグラフであり、（Ａ）は、アプタマー１（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ１）、（Ｂ）は、アプタマー２（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ３１）、（Ｃ）は、アプタマー３（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ４９）、（Ｄ）は、アプタマー４（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ６２）、（Ｅ）は、アプタマー５（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ４９）の結果を示す。横軸は、前記試料のインジェクション開始後の経過時間（秒）を示し、縦軸は、シグナル強度（ＲＵ）を示す。図３に示すように、アプタマー１～５は、ＶＥＧＦ１６５に対して、結合性を示した。一方、コントロール１（ＶＥＧＦ１２１）、およびコントロール２（ＢＳＡ）に対しては、いずれも、シグナル強度が０以下であり、結合性を示さなかった。この結果から、アプタマー１～５は、ＶＥＧＦ１６５に対して優れた特異性で結合すること、および、シグナル強度を測定することにより、前記結合を検出できることがわかった。

【０１３９】

前述のように、ＶＥＧＦ１６５は、ＶＥＧＦのアミノ酸配列におけるエクソン７（ＨＢＤ部分）を含むのに対し、ＶＥＧＦ１２１は、ＨＢＤ部分を欠失している。したがって、アプタマー１～５は、ＶＥＧＦのアミノ酸配列におけるエクソン７（ＨＢＤ部分）に結合すると考えられる。加えて、アプタマー１～５は、前記ＶＥＧＦ１６５だけでなく、例えば、前記ＨＢＤ部分に相当するアミノ酸配列を有する、タンパク質、サイトカイン、および増殖因子等に対しても、結合可能と考えられる。ただし、これらは推測であり、本発明はこの推測により限定および制限されない。

【０１４０】

［実施例２］

本発明のアプタマーについて、カルシウムイオン非存在下および存在下において、ＶＥＧＦに対する結合性を確認した。

【０１４１】

まず、カルシウムイオン非存在下におけるＶＥＧＦに対する結合性について、前記ＶＥＧＦ試料を使用し、アプタマー１については、前記試料におけるＶＥＧＦ１６５の濃度を、０．８、１．０、１．２、１．６、および２ｎｍｏｌ／Ｌとし、アプタマー２、３、および４については、前記試料におけるＶＥＧＦ１６５の濃度を、０．１、０．２、０．４、および０．６ｎｍｏｌ／Ｌとし、アプタマー５については、前記試料におけるＶＥＧＦ１６５の濃度を、０．２、０．４、０．６、および０．８ｎｍｏｌ／Ｌとした以外は実施例１と同様にして、結合性の解析を行った。

【０１４２】

この結果を図４に示す。図４は、カルシウムイオン非存在下におけるＶＥＧＦ１６５に対するアプタマー１～５の結合性を示すグラフであり、（Ａ）は、アプタマー１（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ１）、（Ｂ）は、アプタマー２（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ３１）、（Ｃ）は、アプタマー３（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ４９）、（Ｄ）は、アプタマー４（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ６２）、（Ｅ）は、アプタマー５（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ４９）の結果を示す。横軸は、前記試料のインジェクション開始後の経過時間（秒）を示し、縦軸は、シグナル強度（ＲＵ）を示す。図４に示すように、アプタマー１～５は、いずれも、ＶＥＧＦ１６５に対して、結合性を示した。また、アプタマー１～５は、ＶＥＧＦ１６５の濃度が増加するにつれて、シグナル強度が増加した。この結果から、本発明のアプタマー１～５を用い、シグナル強度を測定することで、試料中のＶＥＧＦ１６５濃度を定量分析できることがわかった。

【０１４３】
さらに、前記図４のＳＰＲ解析の結果から、動態パラメータを算出した。この結果、アプタマー１～５は、カルシウムイオン非存在下におけるＶＥＧＦ１６５に対する解離定数（ＫＤ）が、それぞれ、１．７１×１０$^{-17}$、４．７３×１０$^{-21}$、１．０７×１０$^{-10}$、７．３５×１０$^{-15}$、２．４５×１０$^{-17}$ｍｏｌ／Ｌであり、優れた結合性であることがわかった。また、アプタマー１の小型化アプタマーであるアプタマー２は、アプタマー１と比較して、ＶＥＧＦ１６５への結合力が高いことがわかった。
【０１４４】
つぎに、カルシウムイオン存在下におけるＶＥＧＦに対する結合性について、前記ＶＥＧＦ試料を使用し、アプタマー１～４については、前記試料におけるＶＥＧＦ１６５の濃度を、０．１、０．２、０．４、および０．６ｎｍｏｌ／Ｌとし、アプタマー５については、前記試料におけるＶＥＧＦ１６５の濃度を、０．２、０．４、０．６、および０．８ｎｍｏｌ／Ｌとし、前記ＳＢ１Ｔバッファーに代えて、ＳＢ１Ｔバッファー（Ｃａ$^{2+}$）とした以外は同様にして、結合性の解析を行った。前記ＳＢ１Ｔバッファー（Ｃａ$^{2+}$）の組成は、４０ｍｍｏｌ／Ｌ　ＨＥＰＥＳ、１２５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ、５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＫＣｌ、１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＭｇＣｌ$_2$、１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＣａＣｌ$_2$および０．０５％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０とし、ｐＨは、７．５とした。
【０１４５】
この結果を図５に示す。図５は、カルシウムイオン存在下におけるＶＥＧＦ１６５に対するアプタマー１～５の結合性を示すグラフであり、（Ａ）は、アプタマー１（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ１）、（Ｂ）は、アプタマー２（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ３１）、（Ｃ）は、アプタマー３（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ４９）、（Ｄ）は、アプタマー４（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ６２）、（Ｅ）は、アプタマー５（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ４９）の結果を示す。横軸は、前記試料のインジェクション開始後の経過時間（秒）を示し、縦軸は、シグナル強度（ＲＵ）を示す。図５に示すように、アプタマー１～５は、いずれも、カルシウムイオン存在下において、ＶＥＧＦ１６５に対して、結合性を示した。また、アプタマー１～５は、ＶＥＧＦ１６５の濃度が増加するにつれて、シグナル強度が増加した。このことから、アプタマー１～５は、いずれも、例えば、カルシウムイオン存在下においても、ＶＥＧＦ１６５に結合することが示された。
【０１４６】
さらに、前記図５のＳＰＲ解析の結果から、動態パラメータを算出した。この結果、アプタマー１～５は、カルシウムイオン存在下におけるＶＥＧＦ１６５に対する解離定数（ＫＤ）が、それぞれ、６．０２×１０$^{-17}$、３．６６×１０$^{-17}$、２．１７×１０$^{-21}$、３．３２×１０$^{-16}$、２．１６×１０$^{-16}$ｍｏｌ／Ｌであり、優れた結合性であることがわかった。
【０１４７】
［実施例３］
本発明のアプタマーについて、３７℃の条件下で、カルシウムイオン非存在下および存在下におけるＶＥＧＦに対する結合性を確認した。
【０１４８】
まず、前記ＶＥＧＦ試料を使用し、前記試料におけるＶＥＧＦ１６５の濃度を、１ｎｍｏｌ／Ｌとし、前記ＳＰＲを３７℃の条件下で行った以外は実施例１と同様にして、結合性の解析を行った。
【０１４９】
この結果を図６に示す。図６は、カルシウムイオン非存在下、３７℃におけるＶＥＧＦ１６５に対するアプタマー１～５の結合性を示すグラフであり、（Ａ）は、アプタマー１（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ１）、（Ｂ）は、アプタマー２（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ３１）、（Ｃ）は、アプタマー３（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ４９）、（Ｄ）は、アプタマー４（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ６２）、（Ｅ）は、アプタマー５（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ４９）の結果を示す。横軸は、前記試料のインジェクション開始

後の経過時間（秒）を示し、縦軸は、シグナル強度（ＲＵ）を示す。図６に示すように、アプタマー１～５は、いずれも、カルシウムイオン非存在下、３７℃の条件下において、ＶＥＧＦ１６５に対して、結合性を示した。

【０１５０】

つぎに、前記ＶＥＧＦ試料を使用し、前記試料におけるＶＥＧＦ１６５の濃度を、１ｎｍｏｌ／Ｌとし、前記ＳＰＲを３７℃の条件下で行った以外は実施例２と同様にして、結合性の解析を行った。

【０１５１】

この結果を図７に示す。図７は、カルシウムイオン存在下、３７℃におけるＶＥＧＦ１６５に対するアプタマー１～５の結合性を示すグラフであり、（Ａ）は、アプタマー１（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ１）、（Ｂ）は、アプタマー２（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ３１）、（Ｃ）は、アプタマー３（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ４９）、（Ｄ）は、アプタマー４（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ６２）、（Ｅ）は、アプタマー５（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ４９）の結果を示す。横軸は、前記試料のインジェクション開始後の経過時間（秒）を示し、縦軸は、シグナル強度（ＲＵ）を示す。図７に示すように、アプタマー１～５は、いずれも、カルシウムイオン存在下、３７℃の条件下において、ＶＥＧＦ１６５に対して、結合性を示した。

【０１５２】

以上から、アプタマー１～５は、いずれも、例えば、生体において使用する場合も、ＶＥＧＦ１６５に結合可能であることが示された。

【０１５３】

［実施例４］

本発明のアプタマーに結合したＶＥＧＦが、さらにＶＥＧＦ受容体に結合できることを、ＳＰＲ解析により確認した。

【０１５４】

アプタマーとして、前記アプタマー１～５を使用し、試料として、前記ＶＥＧＦ試料、およびＶＥＧＦ受容体試料を使用した。前記ＶＥＧＦ受容体試料の調製は、ＶＥＧＦ受容体（R&D systems社製、Cat.No:357-KD-050/CF）を使用し、前記ＶＥＧＦ試料の調製と同様にして行った。

【０１５５】

ＳＰＲによる結合性の解析は、以下のようにして行った。まず、実施例１と同様にして、ビオチン化ポリｄＴを、前記センサーチップに結合させ、その後、前記チップに、前記ポリｄＡ付加アプタマーを結合させた。続いて、５ｎｍｏｌ／Ｌの前記ＶＥＧＦ試料を、ＳＢ１Ｔバッファーを用いて、流速５０μＬ／ｍｉｎで２４０秒間インジェクションし（第１のインジェクション）、引き続き、同じ条件で、ＳＢ１Ｔバッファーを流して、洗浄を行った。その後、５ｎｍｏｌ／Ｌの前記ＶＥＧＦ受容体試料を、ＳＢ１Ｔバッファーを用いて、流速５０μＬ／ｍｉｎで２４０秒間インジェクションし（第２のインジェクション）、引き続き、同じ条件で、ＳＢ１Ｔバッファーを流して、洗浄を行った。前記第１のインジェクション開始を０秒として、前記試料のインジェクション後のシグナル強度を測定した。前記ＳＰＲは、２５℃の条件下で行った。また、前記第１のインジェクションおよび前記第２のインジェクションにおいて、前記ＶＥＧＦ試料および前記ＶＥＧＦ受容体試料に代えて、下記表１に示す組合せでインジェクションを行った以外は同様にして、ＳＰＲによる結合性の解析を行った。

［表１］

	First injection	Second injection
Example	5 nM VEGF	5 nM VEGF receptor
Control 1	5 nM VEGF	SB1T buffer
Control 2	5 nM VEGF receptor	SB1T buffer
Control 3	SB1T buffer	5 nM VEGF receptor

【０１５６】
この結果を図８に示す。図８は、前記試料に対するアプタマー１～５の結合性を示すグラフであり、（Ａ）は、アプタマー１（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ１）、（Ｂ）は、アプタマー２（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ３１）、（Ｃ）は、アプタマー３（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ４９）、（Ｄ）は、アプタマー４（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ６２）、（Ｅ）は、アプタマー５（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿Ｒ８ｍ４９）の結果を示す。横軸は、前記第１のインジェクション開始後の経過時間（秒）を示し、縦軸は、シグナル強度（ＲＵ）を示す。図８に示すように、アプタマー１～５は、前記第１のインジェクションにおいて、ＶＥＧＦ試料のインジェクションにより、シグナル強度が増加した。すなわち、アプタマー１～５は、ＶＥＧＦ１６５に対して、結合性を示した。さらに、前記第２のインジェクションにおいて、ＶＥＧＦ受容体試料のインジェクションにより、シグナル強度が増加した。すなわち、アプタマー１～５に結合したＶＥＧＦ１６５は、ＶＥＧＦ受容体に対して、結合性を示した。
【０１５７】
一方、表１に示すコントロール１の組合せでインジェクションを行った場合、アプタマー１～５は、前記第１のインジェクションにおいて、ＶＥＧＦ試料のインジェクションにより、シグナル強度が増加した。しかし、前記第２のインジェクションにおいて、ＳＢ１Ｔバッファーのインジェクションにより、シグナル強度が増加しなかった。すなわち、アプタマー１～５に結合したＶＥＧＦ１６５は、ＳＢ１Ｔバッファーに対して、結合性を示さなかった。
【０１５８】
表１に示すコントロール２の組合せでインジェクションを行った場合、アプタマー１～５は、前記第１のインジェクションにおいて、ＶＥＧＦ受容体試料のインジェクションにより、シグナル強度が増加しなかった。すなわち、アプタマー１～５は、ＶＥＧＦ受容体に対して、結合性を示さなかった。また、前記第２のインジェクションにおいて、ＳＢ１Ｔバッファーのインジェクションにより、シグナル強度が増加しなかった。
【０１５９】
表１に示すコントロール３の組合せでインジェクションを行った場合、アプタマー１～５は、前記第１のインジェクションにおいて、ＳＢ１Ｔバッファーのインジェクションにより、シグナル強度が増加しなかった。すなわち、アプタマー１～５は、ＳＢ１Ｔバッファーに対して、結合性を示さなかった。また、前記第２のインジェクションにおいて、ＶＥＧＦ受容体試料のインジェクションにより、シグナル強度が増加しなかった。
【０１６０】
以上の結果から、アプタマー１～５に結合したＶＥＧＦが、さらにＶＥＧＦ受容体に結合することがわかった。
【０１６１】
［実施例５］
本発明のアプタマーに結合したＶＥＧＦが、ＶＥＧＦ受容体をリン酸化可能であることを確認した。
【０１６２】

ＶＥＧＦ受容体のリン酸化の測定を、Phospho-VEGF R2/KDR（カタログ番号：DYC1766、R&D systems社製）を使用し、製造元のプロトコルに従って行った。下記抗体および基質溶液は、前記キットに添付のものを使用した。実験開始の２４時間前に、ＨＵＶＥＣ細胞（ATCC（登録商標）、PCS-100-010）の微小血管内皮細胞系添加物（ATCC（登録商標）、PCS-100-030）を含む培地（ATCC（登録商標）、PCS-100-040）を、血清抜きの培地に交換した。０．０１、０．０４、０．１２、０．３７、１．１１、３．３３、１０、３０ｎｍｏｌ／Ｌの前記ＶＥＧＦ１６５を、前記ＨＵＶＥＣ細胞の培地に加え、５分間処理を行った後、ＰＢＳで洗浄した。そして、前記Phospho-VEGF R2/KDRを使用し、前記製造元のプロトコルに従って、ＶＥＧＦ受容体のリン酸化を測定した。

【０１６３】

この結果を、図９に示す。図９は、ＶＥＧＦ１６５濃度に応じたＶＥＧＦ受容体のリン酸化を示す用量反応曲線であり、横軸は、ＶＥＧＦ１６５の濃度を示し、縦軸は、ＶＥＧＦ受容体全量に対するリン酸化されたＶＥＧＦ受容体の割合（リン酸化されたＶＥＧＦ受容体の測定値を全ＶＥＧＦ受容体の測定値で除算した値）を示す。図９に示すように、ＶＥＧＦ１６５の濃度が１０ｎｍｏｌ／Ｌ以下の場合、ＶＥＧＦ１６５の濃度の増加にともない、リン酸化されたＶＥＧＦ受容体の割合が増加した。一方、ＶＥＧＦ１６５の濃度が１０ｎｍｏｌ／Ｌを超えた場合、ＶＥＧＦ１６５の濃度の増加にともない、リン酸化されたＶＥＧＦ受容体の割合が減少した。

【０１６４】

つぎに、前記ＶＥＧＦ１６５試料を使用し、前記試料におけるＶＥＧＦ１６５の濃度を、０、０．５、１、および３ｎｍｏｌ／Ｌとした以外は同様にして、ＶＥＧＦ受容体のリン酸化を測定した。さらに、ＶＥＧＦ１６５に加え、１ｎｍｏｌ／Ｌの前記アプタマー２を使用し、前記ＶＥＧＦ１６５試料とアプタマー２とを３０分間混合することにより、前記サンプルを調製した以外は同様にして、ＶＥＧＦ受容体のリン酸化を測定した。また、コントロールとして、１ｎｍｏｌ／ＬのＰａｔ２２４（ＶＥＧＦアプタマー、米国特許５，８１１，５３３号公報に記載）、および１ｎｍｏｌ／ＬのＭａｃｕｇｅｎ（ＶＥＧＦ受容体阻害薬、ボシュロム（Bausch+Lomb）社製）を使用し、前記試料を調製した以外は同様にして、ＶＥＧＦ受容体のリン酸化を測定した。

【０１６５】

この結果を、図１０に示す。図１０は、ＶＥＧＦ１６５によるＶＥＧＦ受容体のリン酸化を示すグラフであり、横軸は、ＶＥＧＦ１６５の濃度を示し、縦軸は、ＶＥＧＦ受容体全量に対するリン酸化されたＶＥＧＦ受容体の割合を示す。図１０に示すように、ＶＥＧＦ１６５の濃度の増加にしたがい、リン酸化されたＶＥＧＦ受容体の割合が増加した。また、前記アプタマー２を加えた試料（Ｃａｐ５ｓ３１）において、リン酸化されたＶＥＧＦ受容体の割合は、ＶＥＧＦ１６５のみを加えた試料における前記割合と比較して、同程度であった。すなわち、前記アプタマー２は、ＶＥＧＦ１６５によるＶＥＧＦ受容体のリン酸化を阻害しないことが示された。一方、Ｍａｃｕｇｅｎを加えた試料において、リン酸化されたＶＥＧＦ受容体の割合は、ＶＥＧＦ１６５のみを加えた試料における前記割合と比較して、全てのＶＥＧＦ１６５の濃度において、大きく減少していた。すなわち、ＶＥＧＦ受容体阻害薬であるＭａｃｕｇｅｎは、ＶＥＧＦ１６５によるＶＥＧＦ受容体のリン酸化を阻害した。また、Ｐａｔ２２４を加えた試料において、リン酸化されたＶＥＧＦ受容体の割合は、ＶＥＧＦ１６５のみを加えた試料における前記割合と比較して、ＶＥＧＦ１６５の濃度が１、および０．５ｎｍｏｌ／Ｌにおいて、大きく減少していた。すなわち、ＶＥＧＦアプタマーであるＰａｔ２２４は、ＶＥＧＦ１６５の濃度が１ｎｍｏｌ／Ｌ以下において、ＶＥＧＦ１６５によるＶＥＧＦ受容体のリン酸化を阻害した。

【０１６６】

つぎに、前記ＶＥＧＦ１６５試料を使用し、前記試料におけるＶＥＧＦ１６５の濃度を、１ｎｍｏｌ／Ｌとし、ＶＥＧＦ１６５に加え、アプタマーとして、前記アプタマー１および前記アプタマー２を使用し、前記試料における各アプタマーの濃度を、７．８１、１５．６３、３１．２５、６２．５、１２５、２５０、５００、１０００ｎｍｏｌ／Ｌとし

た以外は同様にして、ＶＥＧＦ受容体のリン酸化を測定した。

【０１６７】

この結果を、図１１に示す。図１１は、各アプタマー存在下で細胞をＶＥＧＦ１６５処理した場合における、ＶＥＧＦ受容体のリン酸化を示すグラフであり、横軸は、各アプタマーの濃度を示し、縦軸は、ＶＥＧＦ受容体全量に対するリン酸化されたＶＥＧＦ受容体の割合を示す。

【０１６８】

図１１に示すように、ＶＥＧＦ１６５のみを加えた試料において、リン酸化されたＶＥＧＦ受容体の割合は、３．７８であり、ＶＥＧＦ１６５未添加の試料において、前記割合は、１．１６であった。前記アプタマー１を加えた試料において、前記割合は、全ての前記アプタマー１の濃度で、ＶＥＧＦ１６５のみを加えた試料における前記割合と比較して、同程度またはそれ以上であった。また、前記アプタマー２を加えた試料において、前記割合は、全ての前記アプタマー２の濃度で、ＶＥＧＦ１６５のみを加えた試料における前記割合と比較して、同程度またはそれ以上であった。

【０１６９】

また、前記ＶＥＧＦ１６５試料を使用し、アプタマーとして、前記アプタマー２および前記アプタマー３を使用し、前記試料における各アプタマーの濃度を、０．０１、０．０６、０．３２、１．６、８、４０、２００、１０００ｎｍｏｌ／Ｌとした以外は同様にして、ＶＥＧＦ受容体のリン酸化を測定した。

【０１７０】

この結果を、図１２に示す。図１２は、各アプタマー存在下で細胞をＶＥＧＦ１６５処理した場合における、ＶＥＧＦ受容体のリン酸化を示すグラフであり、横軸は、各アプタマーの濃度を示し、縦軸は、ＶＥＧＦ受容体全量に対するリン酸化されたＶＥＧＦ受容体の割合を示す。

【０１７１】

図１２に示すように、ＶＥＧＦ１６５のみを加えた試料において、リン酸化されたＶＥＧＦ受容体の割合は、３．０７であり、ＶＥＧＦ１６５未添加の試料において、前記割合は、１．６５であった。前記アプタマー２を加えた試料において、前記割合は、全ての前記アプタマー２の濃度で、ＶＥＧＦ１６５のみを加えた試料における前記割合と比較して、同程度またはそれ以上であった。また、前記アプタマー３を加えた試料において、前記割合は、すべての濃度において、ＶＥＧＦ１６５のみを加えた試料における前記割合と比較して、同程度またはそれ以上であった。

【０１７２】

以上の結果から、アプタマー１、２および３のそれぞれについて、すべてのＶＥＧＦ１６５が前記アプタマーに結合していると考えられる状態であっても、ＶＥＧＦ１６５は、細胞表面上のＶＥＧＦ受容体をリン酸化可能であることがわかった。

［実施例６］

【０１７３】

本発明のアプタマーについて、ＶＥＧＦに対する結合性を、ＳＰＲ解析により確認した。

【０１７４】

（１）アプタマー

下記ポリヌクレオチドのアプタマー６～１５を、実施例６のアプタマーとして合成した。アプタマー６～１５は、アプタマー１の小型化アプタマーである。

【０１７５】

アプタマー６：ＶＥＧＦ＿Ｌ３０＿１（配列番号１４）

CTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAGG

アプタマー７：ＶＥＧＦ＿Ｌ３０＿２（配列番号１５）

CCTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAG

アプタマー８：ＶＥＧＦ＿Ｌ２９＿１（配列番号１６）

CTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAG

アプタマー９：ＶＥＧＦ＿Ｌ２８＿１（配列番号１７）
TTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAAG
アプタマー１０：ＶＥＧＦ＿Ｌ２８＿２（配列番号１８）
CTTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAA
アプタマー１１：ＶＥＧＦ＿Ｌ２７＿１（配列番号１９）
TTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAA
アプタマー１２：ＶＥＧＦ＿Ｌ２６＿１（配列番号２０）
TAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTAA
アプタマー１３：ＶＥＧＦ＿Ｌ２６＿２（配列番号２１）
TTAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTA
アプタマー１４：ＶＥＧＦ＿Ｌ２５＿１（配列番号２２）
TAGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTTA
アプタマー１５：ＶＥＧＦ＿Ｌ２３＿１（配列番号２３）
AGTTTAAAGTCACGTCTTAGTTT

【０１７６】

つぎに、ＶＥＧＦに対する結合性について、アプタマー６～１５およびアプタマー２を使用し、ＶＥＧＦ１６５の濃度を、１０ｎｍｏｌ／Ｌ、７ｎｍｏｌ／Ｌ、３．４ｎｍｏｌ／Ｌとした以外は、実施例１と同様にして、結合性の解析を行った。前記ＳＢ１Ｔバッファーの組成は、４０ｍｍｏｌ／Ｌ　ＨＥＰＥＳ、１２５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ、５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＫＣｌ、１ｍｍｏｌ／Ｌ　$MgCl_2$および０．０１％　Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０とし、ｐＨは、７．４とした。

【０１７７】

この結果を図１４に示す。図１４は、ＶＥＧＦ１６５に対するアプタマー６～１５の結合性を示すグラフであり、（Ａ）は、アプタマー２（ＶＥＧＦ７４６ＣａＰ＿５ｓ３１）、（Ｂ）は、アプタマー６（ＶＥＧＦ＿Ｌ３０＿１）、（Ｃ）は、アプタマー７（ＶＥＧＦ＿Ｌ３０＿２）、（Ｄ）は、アプタマー８（ＶＥＧＦ＿Ｌ２９＿１）、（Ｅ）は、アプタマー９（ＶＥＧＦ＿Ｌ２８＿１）、（Ｆ）は、アプタマー１０（ＶＥＧＦ＿Ｌ２８＿２）、（Ｇ）は、アプタマー１１（ＶＥＧＦ＿Ｌ２７＿１）、（Ｈ）は、アプタマー１２（ＶＥＧＦ＿Ｌ２６＿１）、（Ｉ）は、アプタマー１３（ＶＥＧＦ＿Ｌ２６＿２）、（Ｊ）は、アプタマー１４（ＶＥＧＦ＿Ｌ２５＿１）、（Ｋ）は、アプタマー１５（ＶＥＧＦ＿Ｌ２３＿１）の結果を示す。図１４において、横軸は、前記試料のインジェクション開始後の経過時間（秒）を示し、縦軸は、シグナル強度（ＲＵ）を示す。

【０１７８】

図１４に示すように、アプタマー２および６～１５は、いずれも、ＶＥＧＦ１６５に対して、結合性を示した。また、アプタマー２および６～１５は、ＶＥＧＦ１６５の濃度が増加するにつれて、シグナル強度が増加した。この結果から、本発明のアプタマー２および６～１５を用い、シグナル強度を測定することで、試料中のＶＥＧＦ１６５濃度を定量分析できることがわかった。

【０１７９】

さらに、前記図１４のＳＰＲ解析の結果から、動態パラメータを算出した。この結果、アプタマー２および６～１５は、カルシウムイオン非存在下におけるＶＥＧＦ１６５に対する解離定数（ＫＤ）が、それぞれ、9.07×10^{-11}、1.0×10^{-12}未満、1.0×10^{-12}未満、9.93×10^{-11}、1.49×10^{-11}、4.17×10^{-6}、2.76×10^{-11}、5.45×10^{-11}、3.49×10^{-9}、8×10^{-7}、9.27×10^{-8}ｍｏｌ／Ｌであり、優れた結合性であることがわかった。

【０１８０】

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

【０１８１】

この出願は、２０１９年１０月３０日に出願された米国出願番号１６／６６８，７１７号および２０２０年４月２８日に出願された国際特許出願ＰＣＴ／ＪＰ２０２０／０１８１４２号を基礎とする優先権を主張し、その開示のすべてをここに取り込む。

【産業上の利用可能性】

【０１８２】

本発明によれば、ターゲットに結合し、且つ、前記ターゲットの機能を阻害しない核酸分子を取得可能な核酸分子の製造方法を提供できる。本発明は、例えば、医薬の分野等において、極めて有用なツールといえる。

【０１８３】

上記の実施形態の一部または全部は、以下の付記のようにも記載しうるが、以下には限定されない。

（付記１）

下記（Ａ）工程および（Ｂ）工程を含むことを特徴とする、第１生体分子に結合し、且つ、前記第１生体分子の機能を阻害しない核酸分子の製造方法。

（Ａ）候補核酸分子を前記第１生体分子と接触させ、前記第１生体分子に結合する核酸分子を、第１選択核酸分子として選択する工程

（Ｂ）前記第１選択核酸分子を、目的の核酸分子として選択する工程

（付記２）

さらに、前記（Ａ）工程後、下記（Ｃ）工程を含み、

（Ｃ）前記第１選択核酸分子と前記第１生体分子とが結合した複合体に、さらに、前記第２生体分子を接触させ、前記第２生体分子の機能を検出する工程

前記（Ｃ）工程後、前記（Ｂ）工程において、前記第２生体分子の機能が検出された前記複合体の前記第１選択核酸分子を、目的の核酸分子として選択する、付記１記載の製造方法。

（付記３）

前記第１生体分子の機能は、前記第１生体分子が、前記第２生体分子に結合する機能である、付記２記載の製造方法。

（付記４）

前記第１生体分子の機能は、前記第１生体分子が、前記第２生体分子への結合により、前記第２生体分子の活性を調節する機能である、付記３記載の製造方法。

（付記５）

前記第１生体分子が、タンパク質であり、前記第２生体分子が、受容体である、付記２から４のいずれかに記載の製造方法。

（付記６）

前記タンパク質が、増殖因子である、付記５記載の製造方法。

（付記７）

前記増殖因子が、ＶＥＧＦである、付記６記載の製造方法。

（付記８）

前記（Ａ）工程において、前記候補核酸分子を、ターゲット物質である前記第１生体分子および非ターゲット物質と、それぞれ接触させ、前記ターゲット物質に結合し、且つ、前記非ターゲット物質に結合しない核酸分子を、前記第１選択核酸分子として選択する、付記１から７のいずれかに記載の製造方法。

（付記９）

前記非ターゲット物質が、前記第１生体分子が結合する第２生体分子である、付記８記載の製造方法。

（付記１０）

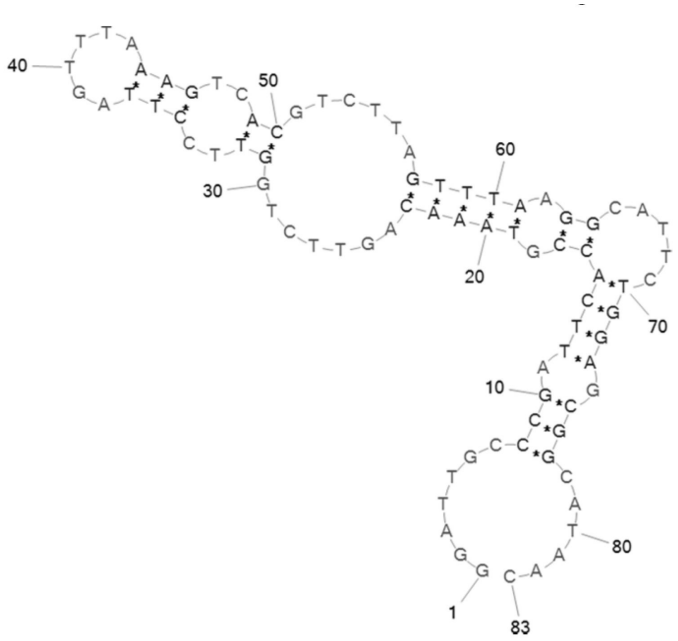
前記非ターゲット物質が、前記第２生体分子のアミノ酸配列における、前記第１生体分子との結合部位に相当する配列を含むポリペプチドである、付記９記載の製造方法。

（付記１１）

前記非ターゲット物質が、前記第１生体分子のアミノ酸配列における、前記第２生体分子

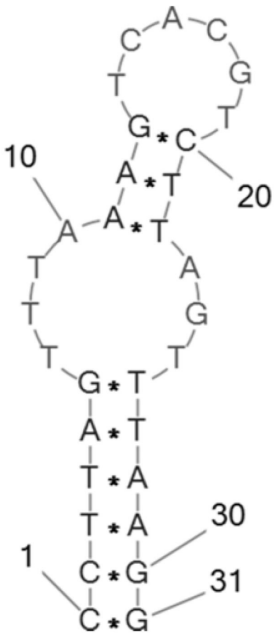
との結合部位に相当する配列を含むポリペプチドである、付記８記載の製造方法。
（付記１２）
前記ターゲット物質が、前記第１生体分子のアミノ酸配列における、前記第２生体分子との結合部位に相当する配列（S_R）を含み、且つ前記第２生体分子との結合部位に相当する配列とは異なる配列である任意の核酸結合配列（S_A）を含むポリペプチドであり、前記非ターゲット物質が、前記配列（S_R）を含み、且つ前記核酸結合配列（S_A）を含まないポリペプチドである、付記１１記載の製造方法。
（付記１３）
前記ターゲット物質および前記非ターゲット物質が、互いにスプライシングバリアントの関係にあるタンパク質である、付記１１または１２記載の製造方法。
（付記１４）
前記ターゲット物質が、目的のタンパク質であり、前記非ターゲット物質が、目的以外のタンパク質である、付記８から１３のいずれかに記載の製造方法。
（付記１５）
前記ターゲット物質が、目的の増殖因子であり、前記非ターゲット物質が、目的以外の増殖因子である、付記１４記載の製造方法。
（付記１６）
前記核酸結合配列（S_A）が、ＨＢＤ（heparin binding domain）を含む配列である、付記１５記載の製造方法。
（付記１７）
前記目的の増殖因子が、ＶＥＧＦ１６５であり、前記目的以外の増殖因子が、ＶＥＧＦ１２１である、付記１６記載の製造方法。
（付記１８）
下記（ａ）または（ｂ）のいずれかのポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、ＶＥＧＦに結合する核酸分子。
（ａ）配列番号１の塩基配列または配列番号１の塩基配列の部分配列からなるポリヌクレオチド
（ｂ）前記（ａ）の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド
（付記１９）
前記ＶＥＧＦの機能は、前記ＶＥＧＦが、ＶＥＧＦ受容体に結合する機能である、付記１８記載の核酸分子。
（付記２０）
前記ＶＥＧＦの機能は、前記ＶＥＧＦが、前記ＶＥＧＦ受容体への結合により、前記ＶＥＧＦ受容体の活性を調節する機能である、付記１９記載の核酸分子。
（付記２１）
前記配列番号１の塩基配列の部分配列が、配列番号２～４および１４～２３からなる群から選択された少なくとも一つの塩基配列である、付記１８から２０のいずれかに記載の核酸分子。
（付記２２）
前記（ｂ）のポリヌクレオチドが、配列番号７の塩基配列からなるポリヌクレオチドである、付記１８から２０のいずれかに記載の核酸分子。
（付記２３）
前記（ｂ）のポリヌクレオチドが、下記（ｂ１）のポリヌクレオチドである、付記１８から２０のいずれかに記載の核酸分子。
（ｂ１）前記（ａ）の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、配列番号２～４および１４から２３のいずれかの塩基配列を含み、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド
（付記２４）
前記（ｂ）のポリヌクレオチドが、下記（ｂ２）のポリヌクレオチドである、付記１８か

ら２０のいずれかに記載の核酸分子。
（ｂ２）前記（ａ）の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、式（１）～（５）のいずれかの二次構造を形成可能であり、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド
【化１】



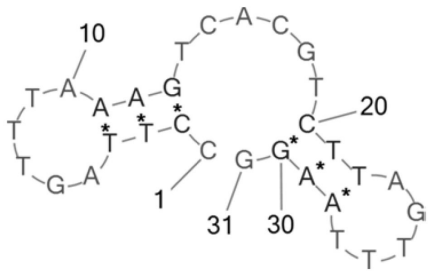
… (1)

【化２】



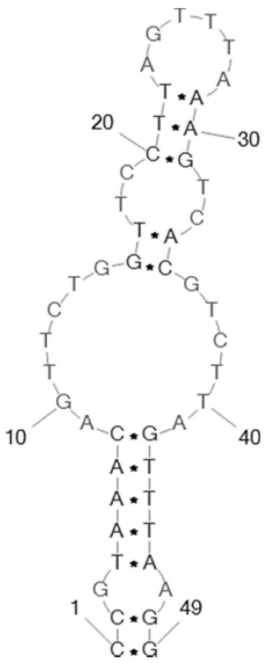
… (2)

【化３】



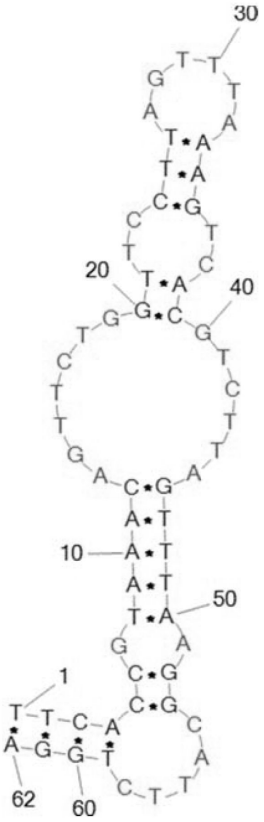
… (3)

【化４】



… (4)

【化５】



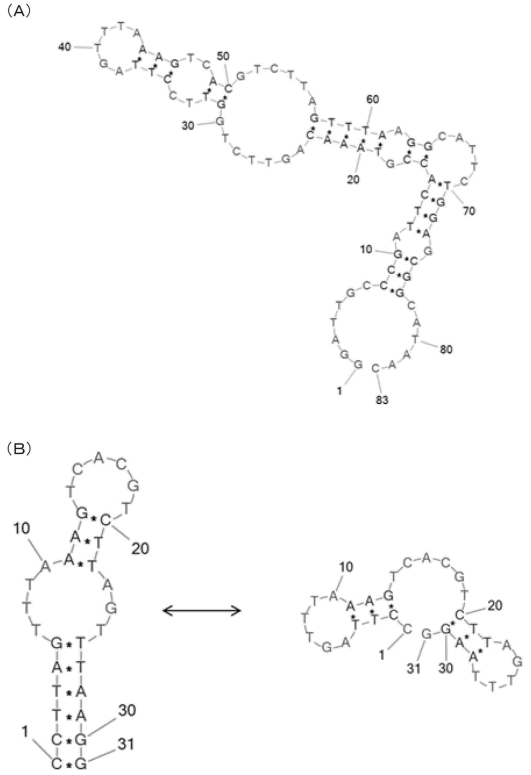
… (5)

（付記２５）
前記（ｂ）のポリヌクレオチドが、下記（ｂ３）のポリヌクレオチドである、付記１８から２０のいずれかに記載の核酸分子。
（ｂ３）前記（ａ）の塩基配列に対して、８０％以上の同一性を有する塩基配列からなり、配列番号５および６の少なくとも一方の塩基配列を含み、前記ＶＥＧＦに結合し、且つ、前記ＶＥＧＦの機能を阻害しないポリヌクレオチド
（付記２６）
前記ポリヌクレオチドが、ＤＮＡである、付記１８から２５のいずれかに記載の核酸分子。
（付記２７）
結合核酸分子と、担体とを含み、
前記結合核酸分子は、前記担体に結合しており、
前記結合核酸分子は、所定のタンパク質に結合し、且つ、前記所定のタンパク質の機能を阻害しないことを特徴とする生体用材料。
（付記２８）
前記所定のタンパク質の機能は、前記タンパク質に対する受容体に結合する機能である、付記２７記載の生体用材料。
（付記２９）
前記所定のタンパク質の機能は、前記受容体への結合により、前記受容体の活性を調節する機能である、付記２８記載の生体用材料。
（付記３０）
前記所定のタンパク質が、増殖因子である、付記２７から２９のいずれかに記載の生体用材料。
（付記３１）
前記増殖因子が、ＶＥＧＦである、付記３０記載の生体用材料。
（付記３２）

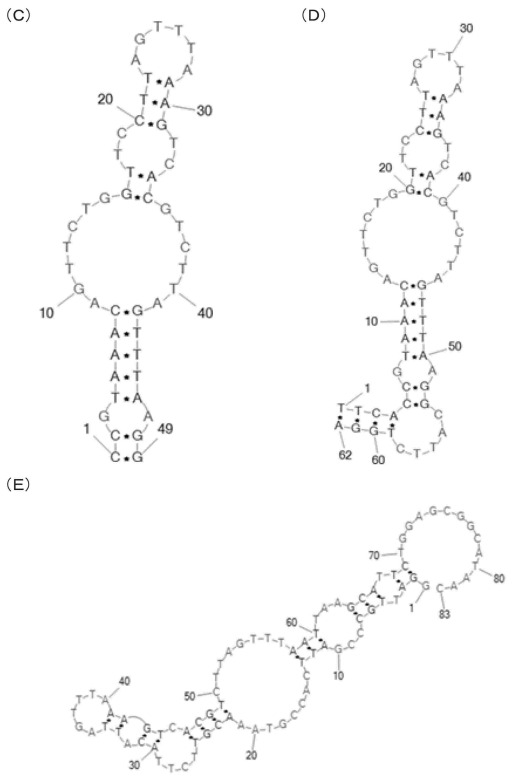
前記結合核酸分子が、付記１８から２６のいずれかに記載の核酸分子である、付記３１記載の生体用材料。
（付記３３）
前記結合核酸分子は、付加配列を介して、前記担体に結合している、付記２７から３２のいずれかに記載の生体用材料。
（付記３４）
前記担体が、ポリマーである、付記２７から３３のいずれかに記載の生体用材料。
（付記３５）
前記ポリマーが、ゲルである、付記３４記載の生体用材料。
（付記３６）
生体足場である、付記２７から３５のいずれかに記載の生体用材料。
（付記３７）
担体に、結合核酸分子を結合させる工程を含み、
前記結合核酸分子は、所定のタンパク質に結合し、且つ、前記所定のタンパク質の機能を阻害しないことを特徴とする生体用材料の製造方法。
（付記３８）
さらに、前記結合核酸分子に、前記所定のタンパク質を結合させる工程を含む、付記３７記載の製造方法。
（付記３９）
前記所定のタンパク質の機能は、前記タンパク質に対する受容体に結合する機能である、付記３７または３８記載の製造方法。
（付記４０）
前記所定のタンパク質の機能は、前記受容体への結合により、前記受容体の活性を調節する機能である、付記３９記載の製造方法。
（付記４１）
前記所定のタンパク質が、増殖因子である、付記３７から４０のいずれかに記載の製造方法。
（付記４２）
前記増殖因子が、ＶＥＧＦである、付記４１記載の製造方法。
（付記４３）
前記結合核酸分子が、付記１８から２６のいずれかに記載の核酸分子である、付記４２記載の製造方法。
（付記４４）
前記結合核酸分子を、付加配列を介して、前記担体に結合させる、付記３７から４３のいずれかに記載の製造方法。
（付記４５）
前記担体が、生分解性ポリマーである、付記３７から４４のいずれかに記載の製造方法。
（付記４６）
前記生分解性ポリマーが、ゲルである、付記４５記載の製造方法。
（付記４７）
前記生体用材料が、生体足場である、付記３７から４６のいずれかに記載の製造方法。

【図面】

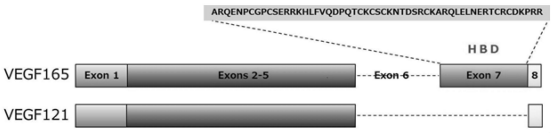
【図１Ａ】



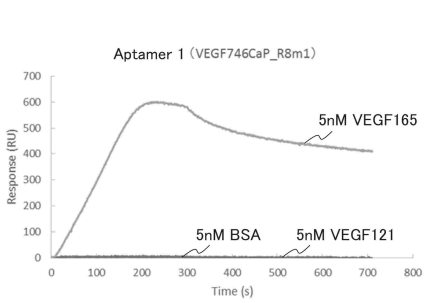
【図１Ｂ】

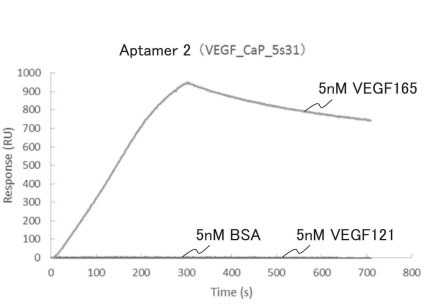


【図２】

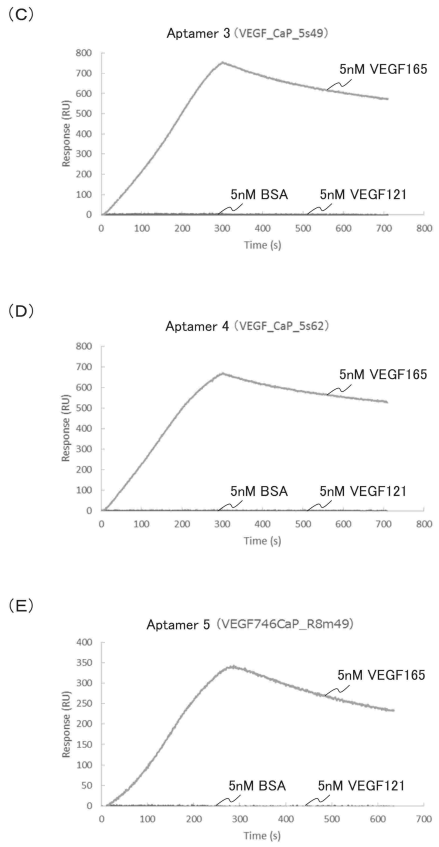


【図３Ａ】

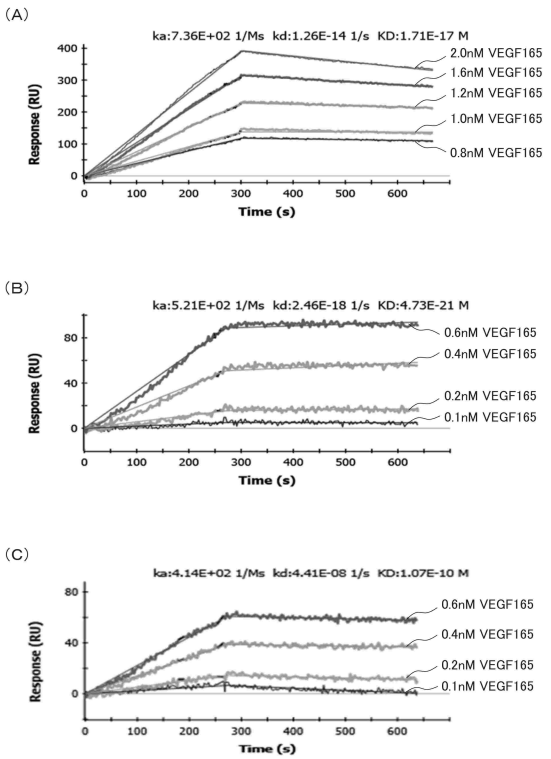




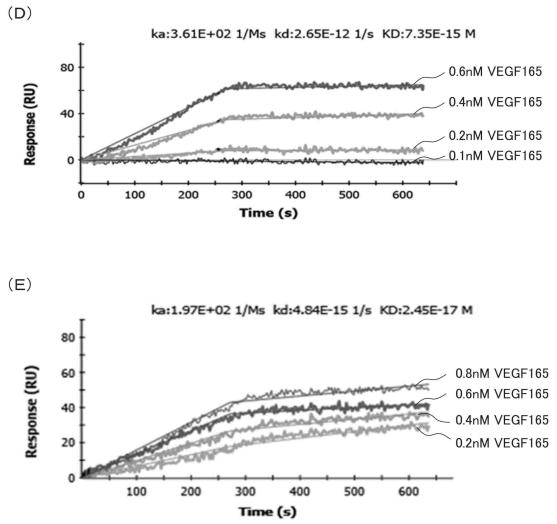
【図３Ｂ】



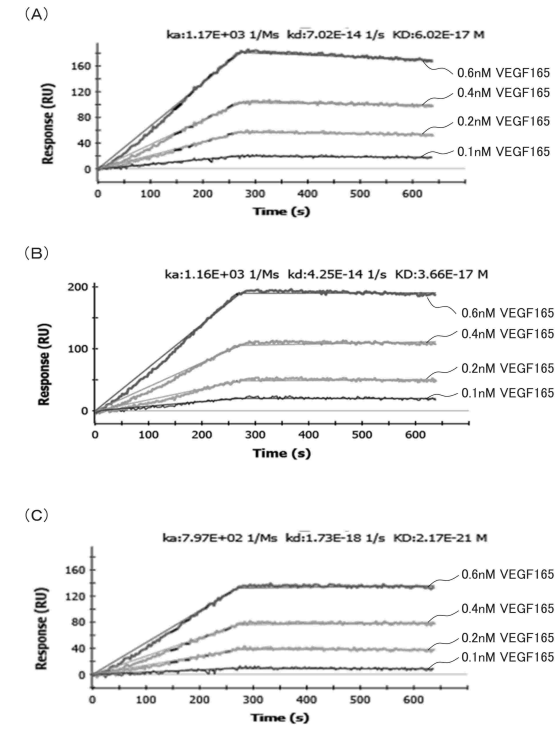
【図４Ａ】



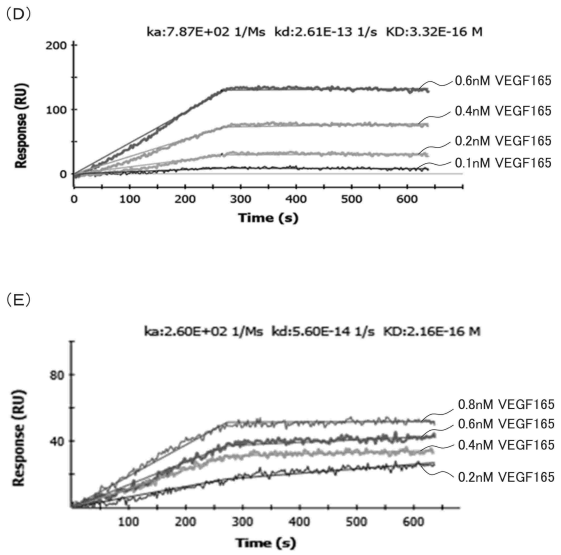
【図４Ｂ】



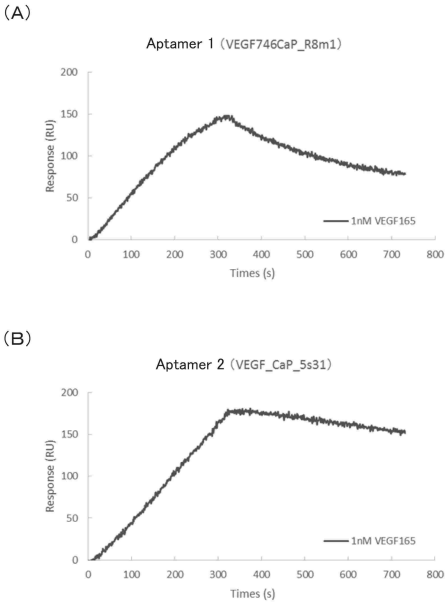
【図５Ａ】



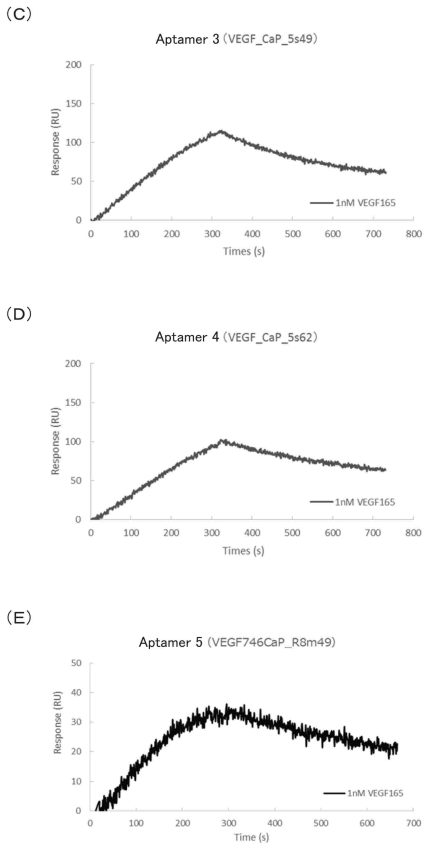
【図５Ｂ】



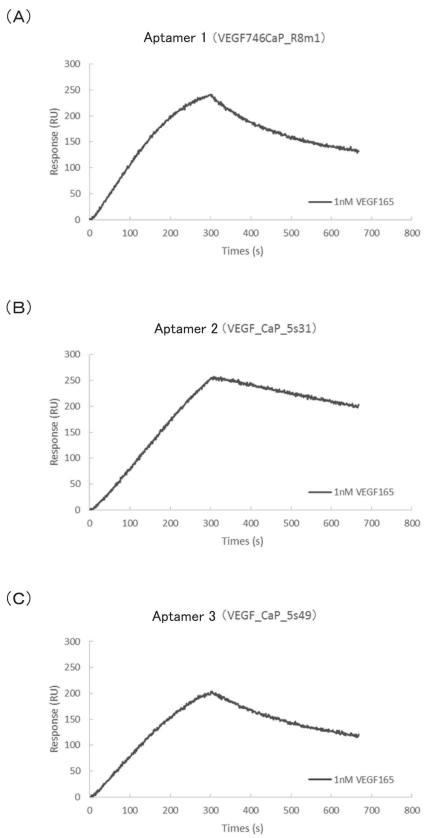
【図６Ａ】



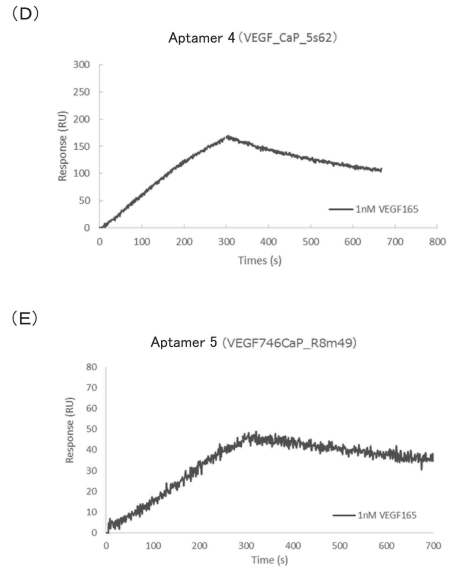
【図６Ｂ】



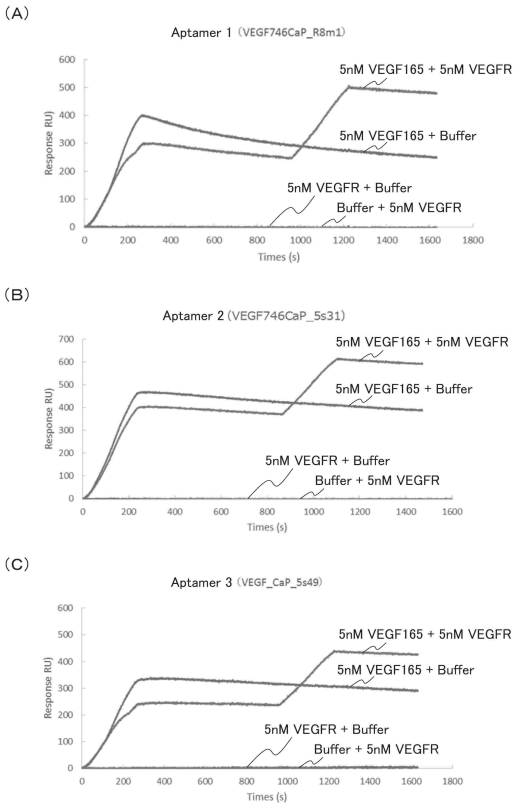
【図７Ａ】



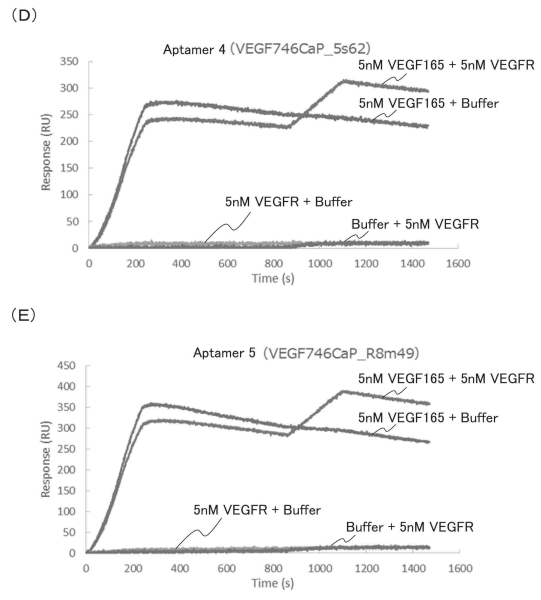
【図７Ｂ】



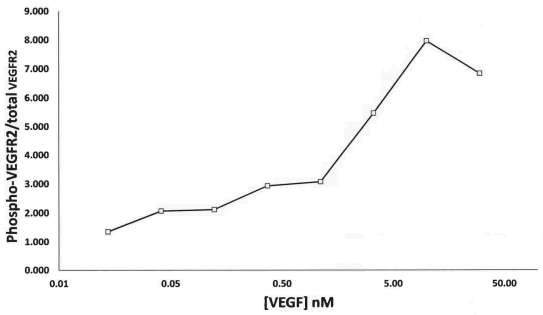
【図８Ａ】



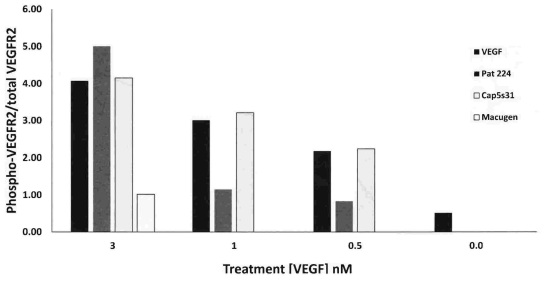
【図８Ｂ】



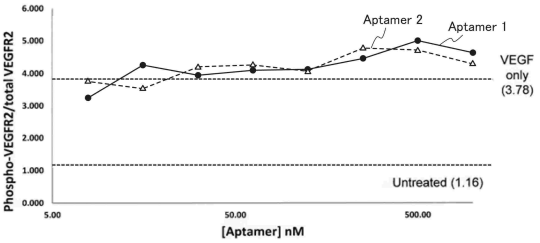
【図９】



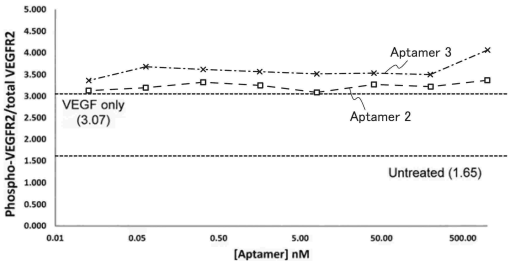
【図１０】



【図１１】



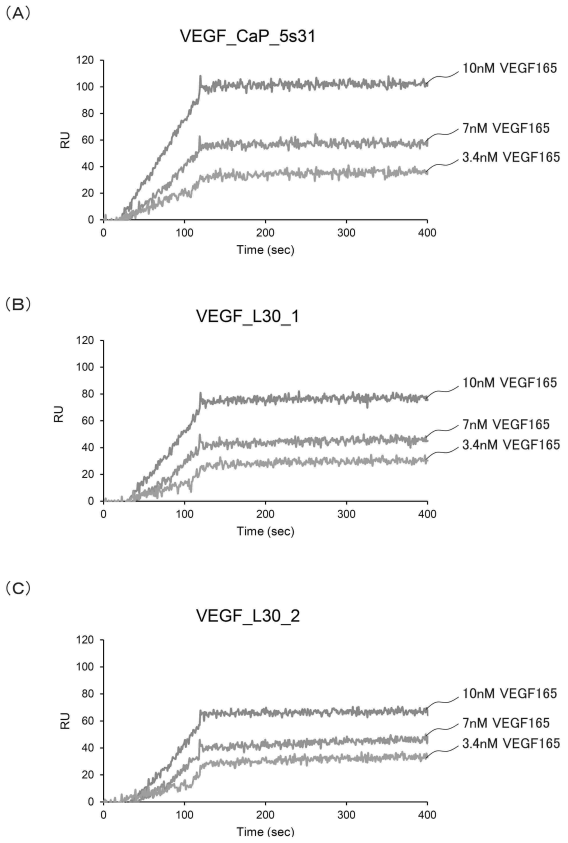
【図１２】



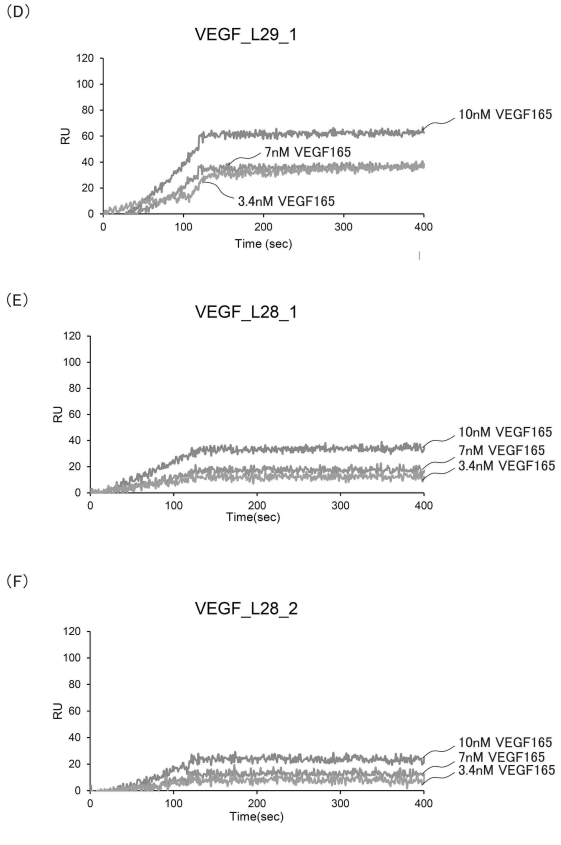
【図１３】



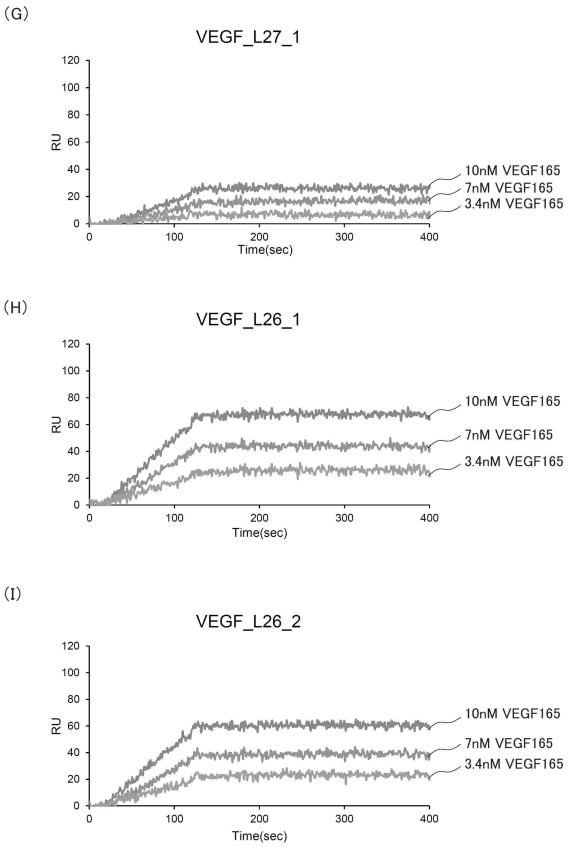
【図１４Ａ】



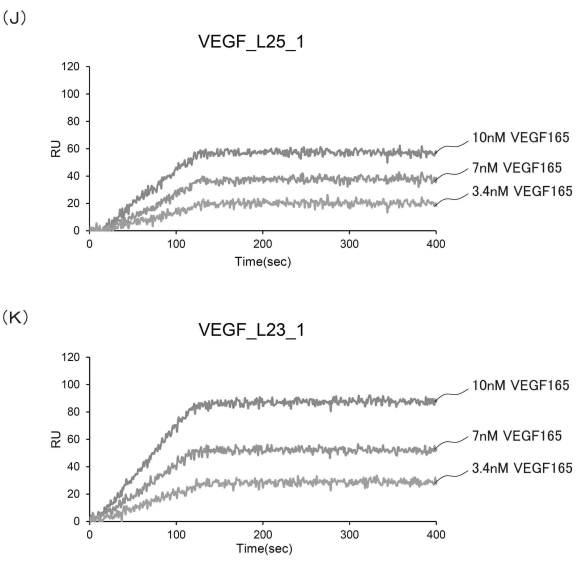
【図１４Ｂ】



【図１４Ｃ】



【図１４Ｄ】



【配列表】
0007456643000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　藤田 智子
東京都江東区新木場一丁目１８番７号 ＮＥＣソリューションイノベータ株式会社内
(72)発明者　和賀 巌
東京都江東区新木場一丁目１８番７号 ＮＥＣソリューションイノベータ株式会社内
(72)発明者　堀井 克紀
東京都江東区新木場一丁目１８番７号 ＮＥＣソリューションイノベータ株式会社内
(72)発明者　加藤 信太郎
東京都江東区新木場一丁目１８番７号 ＮＥＣソリューションイノベータ株式会社内
(72)発明者　スタントン マーティン
アメリカ合衆国，コロラド ８０３０３，ボールダー，コロラド アベニュー ３４１５，モザイク バイオサイエンシズ，インコーポレイティド内
(72)発明者　ダルビー アンドリュー
アメリカ合衆国，コロラド ８０３０４，ボールダー，アスペン コート ３６４０
審査官　中野 あい

(56)参考文献　国際公開第２０１４／１２８２８９（WO，Ａ１）
Biomaterials，2017年07月10日，vol. 142，pp. 52-61
森下裕貴，２０１６年度実績報告書 機能性材料の開発を加速させる新規RNAアプタマー修飾医用材料の創出（研究課題／領域番号 15J10771)，KAKENHI-PROJECT [online]，2018年01月16日，retrieved 2020/12/23, KAKEN, which retrieved from the internet，〈URL: https://kaken.nii.ac.jp/report/KAKENHI-PROJECT-15J10771/15J107712016jisseki/〉
森下裕貴他，血管内皮細胞増殖因子を特異的に補足するRNAアプタマー修飾材料の機能評価，第３９回日本バイオマテリアル学会大会予稿集，2017年11月13日，vol. 39，p. 157 (1P-103-I)

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ