

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5349323号

(P5349323)

(45) 発行日 平成25年11月20日 (2013.11.20)

(24) 登録日 平成25年8月30日 (2013.8.30)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 N 15/115 (2010.01) C 1 2 N 15/00 H

請求項の数 16 (全 76 頁)

(21) 出願番号	特願2009-542267 (P2009-542267)	(73) 特許権者	507272898
(86) (22) 出願日	平成19年12月28日 (2007.12.28)		アーケミックス コーポレイション
(65) 公表番号	特表2011-504357 (P2011-504357A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(43) 公表日	平成23年2月10日 (2011.2.10)		1 3 9, ケンブリッジ, シドニー ス
(86) 国際出願番号	PCT/IB2007/004146		トリート 1 4 8
(87) 国際公開番号	W02008/078180	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成20年7月3日 (2008.7.3)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成22年12月21日 (2010.12.21)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/879, 830		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成19年1月10日 (2007.1.10)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	トンプソン, クリスティン
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
			4 7 4, アーリントン, カレッジ ア
			ベニュー 1 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾ヌクレオチドを含む転写物を生成させるための材料および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸を転写する方法であり、

a) 転写反応混合物を調製するステップであって、前記転写反応混合物は、

(i) 2'-OMe ATP、2'-OMe GTP、2'-OMe CTP、2'-OMe TTP および 2'-OMe UTP より選択される 2'-OMe 修飾ヌクレオチド三リン酸 (2'-OMe NTP) のいずれかを導入することが可能な修飾 T7 RNA ポリメラーゼであり、前記修飾 T7 RNA ポリメラーゼが、対応する非修飾 RNA ポリメラーゼの 2'-修飾ヌクレオチド三リン酸 (2'-修飾 NTP) を導入する能力と比較して、前記 2'-修飾ヌクレオチド三リン酸 (2'-修飾 NTP) を導入する能力が増加しており、前記修飾 T7 RNA ポリメラーゼは、野生型 T7 RNA ポリメラーゼに対してアミノ酸 639 位および 784 位において変異を含み、前記 639 位におけるアミノ酸はロイシンに変化し、前記 784 位におけるアミノ酸はアラニンに変化している、修飾 T7 RNA ポリメラーゼと、

(ii) 少なくとも一つの核酸転写テンプレートと、

(iii) ヌクレオチド三リン酸の混合物であり、前記ヌクレオチド三リン酸がグアニジン三リン酸を含み、前記グアニジン三リン酸が全て 2'-OMe 修飾されており、前記ヌクレオチド三リン酸の混合物は、2'-デオキシシチジン三リン酸 (2'-デオキシ CTP)、2'-OMe アデノシン三リン酸 (2'-OMe ATP)、2'-OMe グアノシン三リン酸 GTP (2'-OMe GTP)、および 2'-OMe ウリジン三リン

10

20

酸（2'-OMe UTP）または2'-OMeチミジンヌクレオチド三リン酸（2'-OMe TTP）の混合物である、ヌクレオチド三リン酸の混合物とを含む、転写反応混合物を調製するステップと；

b) 一本鎖核酸が生じる条件下で、前記転写反応混合物を転写するステップであり、前記生じる一本鎖核酸の、最初のグアノシンヌクレオチドの後の全てのグアニジンヌクレオチドが、2'-OMe修飾されている、ステップと

を含む、方法。

【請求項2】

前記転写反応混合物が、側鎖で修飾された核酸塩基をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記核酸塩基が、ウリジンの5'および6'位、チミジンの5'および6'位、シチジンの5'および6'位および環外アミン、アデノシンの2'、7'および8'位および環外アミン、グアノシンの7'および8'位および環外アミンからなる群より選択される位置で修飾される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記側鎖が、疎水性芳香族側鎖である、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

前記側鎖が、ベンジルまたはインドリルである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記転写反応混合物が、マグネシウムイオン、マンガンイオン、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方、GMP、ポリエチレングリコール、または無機ピロホスファターゼの1または複数を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記核酸転写テンプレートが、少なくとも部分的に二本鎖である、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記少なくとも部分的に二本鎖の核酸転写テンプレートが、前記核酸転写テンプレートの5'末端の固定領域に導入されたリーダー配列をさらに含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

アダプターを同定する方法であり、前記アダプターが2'-OMe修飾ヌクレオチドを含む、方法であり、

a) 転写反応混合物を調製するステップであって、前記転写反応混合物は、

(i) 2'-OMe ATP、2'-OMe GTP、2'-OMe CTP、2'-OMe TTPおよび2'-OMe UTPより選択される2'-OMe修飾ヌクレオチド三リン酸（2'-OMe NTP）のいずれかを導入することが可能な修飾T7 RNAポリメラーゼであり、前記修飾T7 RNAポリメラーゼが、対応する非修飾RNAポリメラーゼの2'-修飾ヌクレオチド三リン酸（2'-修飾NTP）を導入する能力と比較して、前記2'-修飾ヌクレオチド三リン酸（2'-修飾NTP）を導入する能力が増加しており、前記T7 RNAポリメラーゼは、野生型T7 RNAポリメラーゼに対してアミノ酸639位および784位において変異を含み、前記639位におけるアミノ酸はロイシンに変化し、前記784位におけるアミノ酸はアラニンに変化している、修飾T7 RNAポリメラーゼと、

(ii) 少なくとも一つの核酸転写テンプレートと、

(iii) ヌクレオチド三リン酸の混合物であり、前記ヌクレオチド三リン酸がグアニジン三リン酸を含み、前記グアニジン三リン酸が全て2'-OMe修飾されており、前記ヌクレオチド三リン酸の混合物は、2'-デオキシシチジン三リン酸（2'-デオキシCTP）、2'-OMeアデノシン三リン酸（2'-OMe ATP）、2'-OMeグアノシン三リン酸GTP（2'-OMe GTP）、および2'-OMeウリジン三リン酸（2'-OMe UTP）または2'-OMeチミジンヌクレオチド三リン酸（2'-

10

20

30

40

50

OMe TTP)の混合物である、ヌクレオチド三リン酸の混合物とを含む、転写反応混合物を調製するステップと；

b) 前記修飾T7RNAポリメラーゼにより、一本鎖核酸の候補混合物の前記核酸分子に、少なくとも一つの修飾2'-OMeヌクレオチド三リン酸(2'-OMe NTP)が導入される条件下で、前記転写反応混合物を転写することにより、前記一本鎖核酸の候補混合物を調製するステップであり、前記候補混合物の前記一本鎖核酸分子の、最初のグアノシンヌクレオチドの後の全てのグアニジンヌクレオチドが、2'-OMe修飾されている、ステップと；

c) 前記候補混合物を前記標的分子と接触させるステップと、

d) 前記候補混合物の親和性と比較して、標的分子に対する親和性が増加した前記核酸を、前記候補混合物から分離するステップと、

e) アプタマーが濃縮された混合物を生じるために、前記親和性が増加した核酸を増幅するステップを含み、それによって、アプタマーの前記グアニジンヌクレオチドの一つを選択的に除いて、全て2'-OMe修飾されたグアニジンヌクレオチドを含む、前記標的分子に対する前記アプタマーが、同定される、方法。

【請求項10】

前記転写反応混合物が、側鎖で修飾された核酸塩基をさらに含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記核酸塩基が、ウリジンの5-および6-位、チミジンの5-および6-位、シチジンの5-および6-位および環外アミン、アデノシンの2-、7-および8-位および環外アミン、グアノシンの7-および8-位および環外アミンからなる群より選択される位置で修飾される、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記側鎖が、疎水性芳香族側鎖である、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

前記側鎖が、ベンジルまたはインドリルである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記転写反応混合物が、マグネシウムイオン、マンガンイオン、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方、GMP、ポリエチレングリコール、または無機ピロホスファターゼの1または複数をさらに含む、請求項9に記載の方法。

【請求項15】

前記核酸転写テンプレートが、少なくとも部分的に二本鎖である、請求項9に記載の方法。

【請求項16】

前記少なくとも部分的に二本鎖の核酸転写テンプレートが、前記核酸転写テンプレートの5'末端の固定領域に導入されたリーダー配列をさらに含む、請求項15に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への参照

この本特許出願は、米国特許法§119(e)の下、以下の仮出願への利益を主張する：2006年12月22日に出願された米国仮特許出願第60/876,780号および2007年1月10日に出願された米国仮特許出願第60/879,830号。これらの各々は、それらの全体が参考として本明細書に援用される。

【0002】

発明の分野

本発明は、核酸を転写するための材料および方法、特に、テンプレート指向性重合にお

10

20

30

40

50

いて修飾酵素を用いて核酸、特にアプタマーへの修飾ヌクレオチドの導入を増加させるための、修飾酵素および材料および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

アプタマーは、定義上、ワトソン・クリック塩基対合以外の相互作用を通じて、タンパク質等の標的に対して高特異性および親和性で結合する、単離された核酸分子である。アプタマーは核酸ベースの分子であるが、アプタマーと、遺伝子およびmRNA等の他の核酸分子との間には基本的に違いがある。後者においては、核酸構造が、その直鎖状塩基配列により情報をコードし、したがってこの配列は、情報保存の機能に重要な配列である。全く対照的に、標的分子の高特異性結合に基づくアプタマー機能は、保存直鎖状塩基配列ではなく、特定の二次構造／三次構造に依存する。すなわち、アプタマーは非コード配列である。アプタマーが有しうる一切のコード能力は、全く偶発的であり、アプタマーの関連標的に対する結合において一切何の役割も果たさない。したがって、同じ標的、さらには標的上の同じ部位に結合するアプタマーであっても、類似する直鎖状塩基配列を有することはあるが、ほとんどがそうではない。

10

【0004】

アプタマーは、一定のタンパク質に結合する天然核酸配列とも区別されなければならない。これらの後者の配列は、天然の核酸の転写、翻訳、および輸送に関係するタンパク質の特定のサブグループ、すなわち核酸結合タンパク質に結合する、生物のゲノム中に埋め込まれた天然の配列である。一方で、アプタマーは、短い、単離された、天然には存在しない核酸分子である。核酸結合タンパク質に結合するアプタマーを同定することができるが、ほとんどの場合には、そのようなアプタマーは、天然において核酸結合タンパク質により認識される配列に対する配列同一性をほとんどまたは全く持たない。さらに重要なことに、アプタマーは、（核酸結合タンパク質だけでなく）事実上任意のタンパク質、ならびに、小分子、炭水化物、ペプチド等を含むほぼすべての目的の標的に結合できる。ほとんどの標的では、タンパク質であっても、それが結合する天然の核酸配列が存在しない。そのような配列を有する標的、すなわち核酸結合タンパク質では、そのような配列は、天然で用いられる結合親和性が強力に結合するアプタマーと比較して相対的に低いために、アプタマーと異なる。

20

【0005】

アプタマーは、ファージディスプレイまたは抗体により生成されるペプチドと同様、選択された標的に高特異性で結合し、標的の活性または結合相互作用を調節できる。例えば、アプタマーの結合により、それらの標的の機能する能力をブロックできる。抗体と同様に、標的に対する高特異性結合のこの機能特性は固有の性質である。また、抗体と同様に、標的に対するアプタマーが有する正確な構造特性を当業者は知り得ないが、正確な構造定義の非存在下でかかる分子を同定、作製、および使用する方法を知っている。

30

【0006】

アプタマーは、単一の構造変化が、一見いかに軽微なものであっても、アプタマーの結合および／または他の活性（単数または複数）に劇的に（数桁の規模で）影響しうるという点で、小分子薬にも類似する。一方で、いくつかの構造変化は、ほとんどまたは全く影響がない。これは、アプタマーの二次構造／三次構造の重要性から生じる。換言すれば、アプタマーは、その所与の標的を高特異性で結合する化学的接触を提供する、固定されたコンホメーションに維持された三次元構造である。その結果、（１）いくつかの領域または特定の配列が、（a）標的との具体的接触点として、および／または（b）分子を標的と接触させる配列として、必須であり；（２）いくつかの領域または特定の配列が、例えばヌクレオチドXがピリミジンでなければならず、またはヌクレオチドYがプリンでなければならず、またはヌクレオチドXおよびYは相補的でなければならぬといった、様々の可変性を有し；（３）いくつかの領域または特定の配列は、任意のものでありうる、すなわちそれらは基本的にスペーシング要素であり、例えば任意の長さの任意ヌクレオチド列、またはPEG分子等の非ヌクレオチドスペーサーでもありうる。

40

50

【0007】

アプタマーは、ランダム配列オリゴヌクレオチドのプールからの *in vitro* 選択プロセスにより発見され、成長因子、転写因子、酵素、免疫グロブリン、およびレセプターを含めて、130を超えるタンパク質につき生成されている。典型的なアプタマーは、10～15 kDaのサイズ（20～45ヌクレオチド）であり、ナノモルからナノモル未満の親和性で標的を結合し、そして密接に関連する標的を区別する（例えばアプタマーは、同じ遺伝子ファミリーの他のタンパク質を通常結合しない）。一連の構造実験により、アプタマーが、抗体－抗原複合体における親和性および特異性を促進する同じタイプの結合相互作用（例えば水素結合、静電相補性、疎水的接触、立体排除）を利用できることが示されている。

10

【0008】

アプタマーは、意図する用途に応じて、高特異性および親和性、生物学的効力、ならびに優れた薬物動態特性を含めて、治療薬として使用するため、および親和性精製、検出および診断において使用するための多数の望ましい特徴を有する。さらに、それらは、抗体および他のタンパク質生物製剤に対して、例えば以下のような特定の競争的利点を提供する。

【0009】

1) 速度および制御。アプタマーは、完全な *in vitro* プロセスにより生産され、治療リード化合物を含む初期リード化合物の迅速な生成が可能になる。*in vitro* 選択により、アプタマーの特異性および親和性を厳しく制御でき、毒素標的および非免疫原性標的の両方に対するリード化合物を含むリード化合物の生成が可能となる。

20

【0010】

2) 毒性および免疫原性。アプタマーはクラスとして、治療上許容可能な毒性、または免疫原性の欠如を示している。多くのモノクローナル抗体の効力は、抗体自体に対する免疫応答により非常に制限され得るが、アプタマーに対する抗体を誘導することは、極めて困難である。それは、アプタマーがMHCを介してT細胞により提示され得ないこと、および、免疫応答が一般に核酸フラグメントを認識しないようになっていることによる可能性がもっとも高い。

【0011】

3) 投与。現在承認されている抗体薬の大半は、静脈内注入（典型的に2～4時間）により投与されるが、アプタマーは皮下注射により投与できる（皮下投与によるアプタマーの生物学的利用能は、サルの研究において>80%である（非特許文献1））。この差は主に、比較的低い溶解性と、そのために大半の治療用mAbが大量に必要となることが原因である。良好な可溶性（>150 mg/mL）と比較的低い分子量（アプタマー：10～15 kDa；抗体：150 kDa）を有するアプタマーでは0.5 mL未満の体積で、注射により1週間の用量を投与できる。さらに、アプタマーはサイズが小さいために、抗体または抗体フラグメントが浸透できないコンホメーションの狭窄領域に浸透でき、これもアプタマーベースの治療薬または予防薬のさらなる利点となる。

30

【0012】

4) 拡大縮小可能性およびコスト。治療用アプタマーは化学合成され、したがって、生産需要を満たすために、必要に応じて容易に拡大縮小できる。現在では、生産の拡大縮小困難が、一部の生物製剤の入手可能性を制限しており、大規模なタンパク質生産プラントの資本コストは膨大であるが、単一の大規模オリゴヌクレオチド合成装置は、少なくとも100 kg/年を生産でき、必要な初期投資も比較的少ない。キログラムスケールでのアプタマー合成のための品物の現在のコストは、\$500/gと概算され、高度に最適化された抗体のコストに匹敵する。プロセス開発の改善の継続により、品物のコストが五年間で<\$100/gに下がると期待される。

40

【0013】

5) 安定性。治療用アプタマーは化学的に強力である。それらは本質的に、熱および変性剤等のファクターへの曝露後に活性を回復するように構成され、凍結乾燥粉末として室

50

温で長時間 (> 1 年) 保存できる。これに対して抗体は、冷蔵保存されなければならない。

【0014】

アダマーの固有の安定性に加えて、アダマーへの修飾ヌクレオチド (例えば 2' -修飾ヌクレオチド) の導入により、酵素的、化学的、熱的、および物理的分解に対する抵抗を高めることができる。SEL EX (商標) プロセスの間の修飾ヌクレオチドの導入は、アダマーの同定後の修飾ヌクレオチドの導入より好ましいことが多いが、転写収率が低いために歴史的に困難となっている。さらに、アダマーが選択されるプールまたはライブラリの、化学的および構造的多様性を増加させることが有益である。本発明は、これおよび他のニーズを満たす、改良された材料および方法を提供する。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Tucker等、J. Chromatography B. (1999) 732: 203-212

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0016】

現在は、精製、単離、および／または組み換えであり得る、T7RNAポリメラーゼに関する。本明細書で使用されるところの、「単離」という用語は、細胞または組織において組み換え発現された場合の、本発明のポリメラーゼを含む。本明細書で使用されるところの、「単離」という用語は、細胞または組織中へと導入された本発明の核酸配列を含む。一実施形態においては、639位と784位で改変アミノ酸を含むT7RNAポリメラーゼであり、784位の改変アミノ酸がアラニンである場合には、639位の改変アミノ酸がフェニルアラニンではないものが、提供される。別の実施形態においては、378位に改変アミノ酸をさらに含む、上述のT7RNAポリメラーゼが提供される。別の実施形態においては、266位に改変アミノ酸をさらに含む、上述のT7RNAポリメラーゼが提供される。特定の実施形態においては、639位の改変アミノ酸はロイシンであり、784位の改変アミノ酸はアラニンである。さらなる実施形態においては、266位の改変アミノ酸はロイシンである。さらなる実施形態においては、378位の改変アミノ酸はアルギニンである。本明細書で用いられるところの、「改変アミノ酸」という用語は、指定の位置において対応する野生型アミノ酸に対して改変されている。

20

30

【0017】

好ましい実施形態においては、改変アミノ酸が、グアニジン三リン酸が2'-OMeグアニジン三リン酸であり、好ましくは全てのヌクレオチド三リン酸が2'-OMeヌクレオチド三リン酸である、ヌクレオチド三リン酸を含む転写反応物における、ポリメラーゼによる2'-OMe修飾を含む核酸の転写収率を増加させる。特定の実施形態においては、転写収率の増加は、同一の転写条件下で改変アミノ酸T7RNAポリメラーゼおよび改変アミノ酸を欠くT7RNAポリメラーゼの両方につき転写が行われる場合において、改変アミノ酸を欠くT7RNAポリメラーゼに対してである。別の実施形態においては、改変アミノ酸が、2'-OMeヌクレオチド三リン酸、特に2'-OMeグアニジン三リン酸に対する識別を減少させる。特定の実施形態では、2'-OMeヌクレオチド三リン酸に対する識別の低下は、両ポリメラーゼが同一の転写条件下で使用される場合において、改変アミノ酸を欠くT7RNAポリメラーゼに対して、特に野生型T7RNAポリメラーゼに対してである。この態様の特定の実施形態においては、改変アミノ酸を欠くT7RNAポリメラーゼは、639位のアミノ酸がフェニルアラニンに変更され、784位のアミノ酸がアラニンに変更されていることを除き、野生型T7RNAポリメラーゼ、または、639位でフェニルアラニンがチロシンと置換され、784位でアラニンがヒスチジンと置換され、アルギニン残基が378位でリジン残基と置換されている (Y639F/H784A/K378R) ことを除き、野生型アミノ酸配列を有する変異ポリメラーゼである

40

50

。

【0018】

特定の実施形態では、配列番号1、配列番号2、配列番号5および配列番号6からなる群より選択されるアミノ酸を含む単離されたポリペプチド。特定の実施形態では、本発明のT7RNAポリメラーゼを含む容器を含むキットが、提供される。

【0019】

いくつかの実施形態では、転写をもたらすために十分な反応条件下で、本発明の変異T7RNAポリメラーゼをテンプレート核酸とともにインキュベートするステップを含む、一本鎖核酸を転写する方法が、提供される。いくつかの実施形態においては、オリゴヌクレオチド転写テンプレートとも称されるテンプレート核酸は、少なくとも部分的に二本鎖である。例えば、テンプレート核酸は、テンプレートの全長にわたり少なくとも10%、25%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%二本鎖である。いくつかの実施形態においては、テンプレート核酸は、テンプレートの全長にわたり完全に二本鎖である。

【0020】

別の実施形態においては、本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸が提供される。特定の実施形態においては、配列番号1、配列番号2、配列番号5および配列番号6からなる群より選択されるアミノ酸を含むポリペプチドをコードする核酸が、提供される。特定の実施形態においては、配列番号34、配列番号35、配列番号36および配列番号37からなる群より選択される核酸配列が、提供される。いくつかの実施形態においては、本発明の単離された核酸配列を含むベクターが、提供される。特定の実施形態では、プロモータに操作可能に連結された本発明の核酸を含む発現ベクターが、提供される。本発明の別の実施形態においては、本発明の発現ベクターを含む細胞が、提供される。特定の実施形態では、本発明の変異T7RNAポリメラーゼが発現される細胞が、提供される。いくつかの実施形態においては、本発明のT7RNAポリメラーゼをコードする核酸を含む容器を含むキットが、提供される。いくつかの実施形態においては、本発明の変異T7ポリメラーゼ、例えば配列番号1、配列番号2、配列番号5および配列番号6からなる群より選択されるアミノ酸を含むポリメラーゼを製造する方法が、提供される。いくつかの実施形態においては、製造方法には、細胞において本発明の変異T7ポリメラーゼをコードする発現ベクターを発現するステップが含まれる。いくつかの実施形態においては、製造方法には、発現本発明の変異T7ポリメラーゼを精製するステップが、さらに含まれる。

【0021】

別の実施形態においては、a) 変異RNAポリメラーゼと、核酸転写テンプレートと、ヌクレオシド三リン酸とを含む条件下で反応混合物においてテンプレート核酸をインキュベートするステップであり、ヌクレオシド三リン酸が2'-OMeであるステップと、b) 一本鎖核酸を生じるために転写反応混合物を転写するステップであり、転写産物の最初のヌクレオチド(すなわち5'末端ヌクレオチド)が2'修飾されていなくてもよいことを除いて、一本鎖核酸の全てのヌクレオチドが2'-OMe修飾される、ステップとを含む、完全2'-OMe核酸を転写する方法が提供される。いくつかの実施形態においては、転写産物の最初のヌクレオシドは、2'-OHグアニジンでありうる。方法のいくつかの実施形態においては、変異RNAポリメラーゼは、639位および784位に改変アミノ酸を含む変異T7RNAポリメラーゼ、特に639位および784位に改変アミノ酸を含むT7RNAポリメラーゼであり、784位の改変アミノ酸がアラニンであるときには639位の改変アミノ酸がフェニルアラニンでないT7RNAポリメラーゼ、特に、378位の改変アミノ酸および/または266位の改変アミノ酸をさらに含むT7RNAポリメラーゼである。特定の実施形態においては、本発明の方法に用いられるポリメラーゼの639位の改変アミノ酸はロイシンであり、784位の改変アミノ酸はアラニンである。さらなる実施形態においては、本発明の方法に用いられるポリメラーゼの266位の改変

10

20

30

40

50

アミノ酸はロイシンである。さらなる実施形態においては、本発明の方法に用いられるポリメラーゼの378位の改変アミノ酸はアルギニンである。特定の実施形態では、配列番号1、配列番号2、配列番号5および配列番号6からなる群より選択されるアミノ酸を含む単離されたポリペプチドが、提供される。いくつかの実施形態においては、オリゴヌクレオチド転写テンプレートとも称されるテンプレート核酸は、少なくとも部分的に二本鎖である。例えば、テンプレート核酸は、テンプレートの全長にわたり少なくとも10%、25%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%二本鎖である。いくつかの実施形態においては、テンプレート核酸は、テンプレートの全長にわたり完全に二本鎖である。

10

【0022】

本発明の方法のいくつかの実施形態においては、転写反応物には、マグネシウムイオンがさらに含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、マンガンイオンがさらに含まれる。いくつかの実施形態においては、転写反応物には、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方がさらに含まれる。別の実施形態においては、マグネシウムイオンは、マンガンイオンより3.0~3.5倍高い濃度で転写反応物中に存在する。転写反応物中に各ヌクレオチド三リン酸が1.0mMの濃度で存在する別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度は6.5mMであり、マンガンイオンの濃度は2.0mMである。転写反応物中に各ヌクレオチド三リン酸が1.5mMの濃度で存在する別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度8mM、マンガンイオンの濃度は2.5mMである。転写反応物中に各ヌクレオチド三リン酸が2.0mMの濃度で存在する別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度9.5mM、マンガンイオンの濃度は3.0mMである。

20

【0023】

別の実施形態においては、転写反応物には、非2'-OMeグアノシン非三リン酸残基、特にグアノシンーリン酸、グアノシン二リン酸、2'-フルオログアノシンーリン酸、2'-フルオログアノシン二リン酸、2'-アミノグアノシンーリン酸、2'-アミノグアノシン二リン酸、2'-デオキシグアノシンーリン酸、および2'-デオキシグアノシン二リン酸からなる群より選択される非2'-OMeグアノシン非三リン酸残基が、さらに含まれる。別の実施形態においては、転写テンプレートには、T7RNAポリメラーゼプロモータが含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、ポリエチレングリコールがさらに含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、無機ピロホスファターゼが含まれる。

30

【0024】

本発明の別の態様においては、アプタマーを同定する方法が提供される。一実施形態においては、a)本発明の変異ポリメラーゼと、一つ以上の核酸転写テンプレートとを含む転写反応混合物を準備するステップと、b)一本鎖核酸の候補混合物を生じるために、転写反応混合物を転写するステップであり、一本鎖核酸のヌクレオチドの選択的に一つ以外の全てが2'修飾されている、ステップと、c)候補混合物を標的分子と接触させるステップと、d)候補混合物の親和性に対して標的分子に対する親和性が増加した核酸を、候補混合物から分離するステップと、e)アプタマーが濃縮された混合物を得るために、親和性の増加した核酸を増幅するステップであり、標的分子に対するアプタマーが、アプタマーの最初のヌクレオチドが2'-非修飾でありうることを除いては、全て2'-修飾されたヌクレオチドを含むが同定されるステップを含む、アプタマーを同定する方法が提供される。いくつかの実施形態においては、増幅ステップf)には、(i)親和性が増加した核酸を標的から選択的に解離させるステップと、i i)核酸-標的複合体から解離された親和性が増加した核酸を、逆転写するステップと、i i i)逆転写された親和性が増加した核酸を増幅するステップと；(i i)増幅された、逆転写された親和性が増加した核酸を転写テンプレートとして含む転写反応物混合物を調製し、転写混合物を転写するステップが含まれる。

40

50

【0025】

本発明のアプタマー同定方法のいくつかの実施形態においては、変異RNAポリメラーゼは、639位および784位に改変アミノ酸を含む変異T7RNAポリメラーゼ、特に639位および784位に改変アミノ酸を含むT7RNAポリメラーゼであり、784位の改変アミノ酸がアラニンであるときには639位の改変アミノ酸がフェニルアラニンでないT7RNAポリメラーゼ、特に、378位の改変アミノ酸および／または266位の改変アミノ酸をさらに含むT7RNAポリメラーゼである。特定の実施形態においては、本発明の方法に用いられるポリメラーゼの639位の改変アミノ酸はロイシンであり、784位の改変アミノ酸はアラニンである。さらなる実施形態においては、本発明の方法に用いられるポリメラーゼの266位の改変アミノ酸はロイシンである。さらなる実施形態においては、本発明の方法に用いられるポリメラーゼの378位の改変アミノ酸はアルギニンである。特定の実施形態では、配列番号1、配列番号2、配列番号5および配列番号6からなる群より選択されるアミノ酸を含む単離されたポリペプチドが、本発明のアプタマー同定方法において使用される。いくつかの実施形態においては、オリゴヌクレオチド転写テンプレートとも称されるテンプレート核酸は、少なくとも部分的に二本鎖である。例えば、テンプレート核酸は、テンプレートの全長にわたり少なくとも10%、25%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%二本鎖である。いくつかの実施形態においては、テンプレート核酸は、テンプレートの全長にわたり完全二本鎖である。

10

【0026】

いくつかの実施形態においては、転写反応物中の全てのヌクレオチド三リン酸は、2'-OMe修飾されている。一実施形態においては、一つ以上の核酸転写テンプレートは、T7RNAポリメラーゼプロモータおよびT7RNAポリメラーゼプロモータに対してすぐ3'側のリーダー配列を含む。この態様のいくつかの実施形態においては、方法には、ステップa)～e)を反復的に繰り返すステップが含まれる。

20

【0027】

いくつかの実施形態においては、転写反応物には、マグネシウムイオンがさらに含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、マンガンイオンがさらに含まれる。別の実施形態においては、マグネシウムイオンが、マンガンイオンより3.0～3.5倍高い濃度で転写反応物中に存在する。転写反応物中に各ヌクレオチド三リン酸が1.0mMの濃度で存在する、別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度は6.5mMであり、マンガンイオンの濃度は2.0mMである。転写反応物中に各ヌクレオチド三リン酸が1.5mMの濃度で存在する、別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度8mM、マンガンイオンの濃度は2.5mMである。転写反応物中に各ヌクレオチド三リン酸が2.0mMの濃度で存在する、別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度9.5mM、マンガンイオンの濃度は3.0mMである。

30

【0028】

この態様の別の実施形態においては、本発明のアプタマー同定方法において使用するための転写反応物には、非2'-OMeグアノシン非三リン酸残基、特にグアノシンーリン酸、グアノシン二リン酸、2'-フルオログアノシンーリン酸、2'-フルオログアノシン二リン酸、2'-アミノグアノシンーリン酸、2'-アミノグアノシン二リン酸、2'-デオキシグアノシンーリン酸、および2'-デオキシグアノシン二リン酸からなる群より選択される非2'-OMeグアノシン非三リン酸残基がさらに含まれる。別の実施形態においては、転写テンプレートには、T7RNAポリメラーゼプロモータが含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、ポリエチレングリコールがさらに含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、無機ピロホスファターゼが含まれる。いくつかの実施形態においては、転写反応物には、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方がさらに含まれる。

40

【0029】

別の実施形態では、a)変異ポリメラーゼと、核酸転写テンプレートと、ヌクレオシド

50

三リン酸とを含む反応混合物において、テンプレート核酸をインキュベートするステップであり、グアニジン三リン酸が2'-OMeであるステップと、b) 一本鎖核酸を生じる条件下で転写反応混合物を転写するステップであり、転写産物の最初のヌクレオチドを除いて、得られる一本鎖核酸の全てのグアニジンヌクレオチドが2'-OMe修飾されている、ステップとを含む、核酸を転写する方法が提供される。

【0030】

方法のいくつかの実施形態においては、変異RNAポリメラーゼは、639位および784位に改変アミノ酸を含む変異T7RNAポリメラーゼ、特に639位および784位に改変アミノ酸を含むT7RNAポリメラーゼであり、784位の改変アミノ酸がアラニンであるときには639位の改変アミノ酸がフェニルアラニンでないT7RNAポリメラーゼ、特に、378位の改変アミノ酸および/または266位の改変アミノ酸をさらに含むT7RNAポリメラーゼである。特定の実施形態においては、本発明の方法に用いられるポリメラーゼの639位の改変アミノ酸はロイシンであり、784位の改変アミノ酸はアラニンである。さらなる実施形態においては、266位の改変アミノ酸はロイシンである。さらなる実施形態においては、本発明の方法に用いられるポリメラーゼの378位の改変アミノ酸はアルギニンである。特定の実施形態では、本発明の転写方法は、配列番号1、配列番号2、配列番号5および配列番号6からなる群より選択されるアミノ酸を含む単離されたポリペプチドを使用する。いくつかの実施形態においては、オリゴヌクレオチド転写テンプレートとも称されるテンプレート核酸は、少なくとも部分的に二本鎖である。例えば、テンプレート核酸は、テンプレートの全長にわたり少なくとも10%、25%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%二本鎖である。いくつかの実施形態においては、テンプレート核酸は、テンプレートの全長にわたり完全二本鎖である。

【0031】

反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、転写方法のいくつかの実施形態においては、反応混合物中のシチジン三リン酸は2'-デオキシである。反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、反応混合物中のチミジン三リン酸は2'-デオキシである。反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、反応混合物中のウリジン三リン酸は2'-OHである。反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、反応混合物中のウリジン三リン酸は2'-デオキシである。反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、シチジン三リン酸は2'-デオキシであり、チミジンおよびアデノシン三リン酸は2'-OMeである。反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、シチジン三リン酸は2'-デオキシであり、ウリジンおよびアデノシン三リン酸は2'-OMeである。反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、チミジン三リン酸2'-デオキシであり、ウリジンおよびアデノシン三リン酸は2'-OMeである。反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、ウリジン三リン酸は2'-デオキシであり、ウリジンおよびアデノシン三リン酸は2'-OMeである。反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、ウリジン三リン酸は2'-OHであり、ウリジンおよびアデノシン三リン酸は2'-OMeである。

【0032】

本発明の転写方法のいくつかの実施形態においては、転写反応混合物には、マグネシウムイオンがさらに含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、マンガンイオンがさらに含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方がさらに含まれる。別の実施形態においては、マグネシウムイオンが、

マンガンイオンより3.0～3.5倍高い濃度で、転写反応物中に存在する。転写反応混合物中に各ヌクレオチド三リン酸が1.0mMの濃度で存在する、別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度は6.5mMであり、マンガンイオンの濃度は2.0mMである。転写反応混合物中に各ヌクレオチド三リン酸が、1.5mMの濃度で存在する、別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度8mM、マンガンイオンの濃度は2.5mMである。転写反応混合物中に各ヌクレオチド三リン酸が2.0mMの濃度で存在する、別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度9.5mM、マンガンイオンの濃度は3.0mMである。

【0033】

別の実施形態においては、転写反応混合物には、非2'-OMeグアノシン非三リン酸残基、特にグアノシンーリン酸、グアノシンニリン酸、2'-フルオログアノシンーリン酸、2'-フルオログアノシンニリン酸、2'-アミノグアノシンーリン酸、2'-アミノグアノシンニリン酸、2'-デオキシグアノシンーリン酸、および2'-デオキシグアノシンニリン酸からなる群より選択される非2'-OMeグアノシン非三リン酸残基が含まれる。別の実施形態においては、転写テンプレートには、T7RNAポリメラーゼプロモータが含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、ポリエチレングリコールがさらに含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、無機ピロホスファターゼが含まれる。いくつかの実施形態においては、転写反応物には、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方がさらに含まれる。

【0034】

別の実施形態においては、a)変異ポリメラーゼと、一つ以上の核酸転写テンプレートと、ヌクレオチド三リン酸とを含む転写反応混合物を調製するステップであり、グアニジン三リン酸が2'-OMeであるステップと、b)一本鎖核酸の候補混合物を生じる条件下で、転写反応混合物を転写するステップであり、一本鎖核酸のグアノシンヌクレオチドの選択的に一つ以外の全てが2'修飾されている、ステップと、c)候補混合物を標的分子と接触させるステップと、d)候補混合物の親和性に対して標的分子に対する親和性が増加した核酸を、候補混合物から分離するステップと、e)アプタマーが濃縮された混合物を得るために、親和性の増加した核酸を増幅するステップであり、アプタマーの最初のヌクレオチドを除いて全て2'-修飾されたグアニジンヌクレオチドを含む標的分子に対するアプタマーが同定されるステップを含む、アプタマーを同定する方法が提供される。一実施形態においては、増幅ステップには、(i)親和性が増加した核酸を標的から選択的に解離させるステップと、ii)核酸-標的複合体から解離された親和性が増加した核酸を、逆転写するステップと、iii)逆転写された親和性が増加した核酸を増幅するステップと；(ii)増幅された逆転写された親和性が増加した核酸を転写テンプレートとして含む転写反応物混合物を調製し、転写混合物を転写するステップが含まれる。

【0035】

本発明のアプタマー同定方法のいくつかの実施形態においては、変異RNAポリメラーゼは、639位および784位に改変アミノ酸を含む変異T7RNAポリメラーゼ、特に639位および784位に改変アミノ酸を含むT7RNAポリメラーゼであり、784位の改変アミノ酸がアラニンであるときには639位の改変アミノ酸がフェニルアラニンでないT7RNAポリメラーゼ、特に、378位の改変アミノ酸および／または266位の改変アミノ酸をさらに含むT7RNAポリメラーゼである。特定の実施形態においては、本発明の方法に用いられるポリメラーゼの639位の改変アミノ酸はロイシンであり、784位の改変アミノ酸はアラニンである。さらなる実施形態においては、266位の改変アミノ酸はロイシンである。さらなる実施形態においては、378位の改変アミノ酸はアルギニンである。特定の実施形態では、本発明のアプタマー同定方法は、配列番号1、配列番号2、配列番号5および配列番号6からなる群より選択されるアミノ酸を含むポリメラーゼを使用する。いくつかの実施形態においては、オリゴヌクレオチド転写テンプレートとも称されるテンプレート核酸は、少なくとも部分的に二本鎖である。例えば、テンプレート核酸は、テンプレートの全長にわたり少なくとも10%、25%、50%、60%

、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%二本鎖である。いくつかの実施形態においては、テンプレート核酸は、テンプレートの全長にわたり完全二本鎖である。

【0036】

反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、アプタマー同定方法のいくつかの実施形態においては、反応混合物中のシチジン三リン酸は2'-デオキシである。反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、反応混合物中のチミジン三リン酸は2'-デオキシである。反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、反応混合物中のウリジン三リン酸は2'-OHである。反応混合物中の全てのグ
10
アニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、反応混合物中のウリジン三リン酸は2'-デオキシである。反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、シチジン三リン酸は2'-デオキシであり、チミジンおよびアデノシン三リン酸は2'-OMeである。反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、シチジン三リン酸は2'-デオキシであり、ウリジンおよびアデノシン三リン酸は2'-OMeである。反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、チミジン三リン酸2'-デオキシであり、ウリジンおよびアデノシン三リン酸は2'-OMeである。反応混合物中の全てのグ
20
アニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、ウリジン三リン酸は2'-デオキシであり、ウリジンおよびアデノシン三リン酸は2'-OMeである。反応混合物中の全てのグアニジン三リン酸が2'-OMeである、方法のいくつかの実施形態においては、ウリジン三リン酸は2'-OHであり、ウリジンおよびアデノシン三リン酸は2'-OMeである。

【0037】

本発明のアプタマー同定方法のいくつかの実施形態においては、転写反応混合物には、マグネシウムイオンがさらに含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、マンガニオンがさらに含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、マグネシウムおよびマンガニオンの両方がさらに含まれる。別の実施形態においては、マグネシウムイオンは、マンガニオンより3.0~3.5倍高い濃度で転写反応物中に存在する。転
30
写反応混合物中に各ヌクレオチド三リン酸が1.0mMの濃度で存在する、別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度は6.5mMであり、マンガニオンの濃度は2.0mMである。転写反応混合物中に各ヌクレオチド三リン酸が、1.5mMの濃度で存在する、別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度8mM、マンガニオンの濃度は2.5mMである。転写反応混合物中に各ヌクレオチド三リン酸が2.0mMの濃度で存在する、別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度9.5mM、マンガニオンの濃度は3.0mMである。

【0038】

別の実施形態においては、転写反応混合物には、非2'-OMeグアノシン非三リン酸残基、特に、グアノシンーリン酸、グアノシン二リン酸、2'-フルオログアノシンーリン
40
酸、2'-フルオログアノシン二リン酸、2'-アミノグアノシンーリン酸、2'-アミノグアノシン二リン酸、T-デオキシグアノシンーリン酸、および2'-デオキシグアノシン二リン酸からなる群より選択される非2'-OMeグアノシン非三リン酸残基が、さらに含まれる。別の実施形態においては、転写テンプレートには、T7RNAポリメラーゼプロモータが含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、ポリエチレングリコールがさらに含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、無機ピロホスファターゼが含まれる。いくつかの実施形態においては、転写反応物には、マグネシウムおよびマンガニオンの両方がさらに含まれる。

【0039】

別の実施形態においては、a)変異T7RNAポリメラーゼと、少なくとも一つの核酸

10

20

30

40

50

転写テンプレートと、ヌクレオチド三リン酸とを含む転写反応混合物を調製するステップであり、ヌクレオチド三リン酸がグアニジン三リン酸を含み、全てのグアニジン三リン酸が2'-OMe修飾されている、ステップと；b) 一本鎖核酸を生じる条件下で、転写反応混合物を転写するステップであり、得られる一本鎖核酸の全てのグアニジンヌクレオチドが、選択的に一つを除いて、2'-OMe修飾されている、ステップを含む、核酸を転写する方法が提供される。別の実施形態においては、a) 変異T7RNAポリメラーゼと、少なくとも一つの核酸転写テンプレートと、ヌクレオチド三リン酸とを含む転写反応混合物を準備するステップであり、ヌクレオチド三リン酸がグアニジン三リン酸を含み、全てのグアニジン三リン酸が2'-OMe修飾されている、ステップと；b) 一本鎖核酸の候補混合物を生じる条件下で、転写反応混合物を転写するステップであり、一本鎖核酸のグアニジンヌクレオチドの選択的に一つ以外の全てが2'修飾されている、ステップと、c) 候補混合物を標的分子と接触させるステップと、d) 候補混合物の親和性に対して標的分子に対する親和性が増加した核酸を、候補混合物から分離するステップと、；e) アプタマーが濃縮された混合物を得るために、親和性の増加した核酸を増幅するステップであり、アプタマーのグアニジンヌクレオチドの一つを選択的に除いて全て2'-OMe修飾されたグアニジンヌクレオチドを含む標的分子に対するアプタマーが、同定されるステップを含む、アプタマーを同定する方法が提供される。いくつかの実施形態においては、増幅ステップには、(i) 親和性が増加した核酸を標的から選択的に解離させるステップと、i i) 核酸-標的複合体から解離された、親和性が増加した核酸を逆転写するステップと、i i i) 逆転写された親和性が増加した核酸を、増幅するステップと；(i i) 増幅された逆転写された親和性が増加した核酸を転写テンプレートとして含む転写反応物混合物を調製し、転写混合物を転写するステップがさらに含まれる。いくつかの実施形態においては、方法には、ステップa)～e)を反復的に繰り返すステップがさらに含まれる。

10

20

【0040】

本発明の方法のこの態様のいくつかの実施形態においては、変異T7RNAポリメラーゼは、野生型T7ポリメラーゼに対して、639位および784位に改変アミノ酸を含み、784位の改変アミノ酸がアラニンであるときには639位の改変アミノ酸がフェニルアラニンでなく、特に変異T7RNAポリメラーゼは、639位にロイシンおよび784位にアラニンを含む。いくつかの実施形態においては、変異T7RNAポリメラーゼは、野生型に対して、378位および／または266位に改変アミノ酸をさらに含む。さらなる実施形態においては、266位の改変アミノ酸はロイシンである。さらなる実施形態においては、378位の改変アミノ酸はアルギニンである。特定の実施形態では、配列番号1、配列番号2、配列番号5および配列番号6からなる群より選択されるアミノ酸を含む単離されたポリペプチドが、本発明の方法において使用される。いくつかの実施形態においては、オリゴヌクレオチド転写テンプレートとも称されるテンプレート核酸は、少なくとも部分的に二本鎖である。例えば、テンプレート核酸は、テンプレートの全長にわたり少なくとも10%、25%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%二本鎖である。いくつかの実施形態においては、テンプレート核酸は、テンプレートの全長にわたり完全二本鎖である。

30

40

【0041】

いくつかの実施形態においては、転写反応混合物は、シチジン三リン酸、ウリジン三リン酸、チミジン三リン酸およびアデノシン三リン酸からなる群より選択される少なくとも二つの追加的な異なる種類のヌクレオチド三リン酸をさらに含み、特に、少なくとも二つの追加的な異なる種類のヌクレオチド三リン酸が2'-OMe修飾され、特に、転写反応混合物に含まれる異なる種類のヌクレオチド三リン酸の全てが、2'-OMe修飾されている。

【0042】

本発明の方法のこの態様のいくつかの実施形態においては、少なくとも一種のヌクレ

50

オチド三リン酸が、側鎖で修飾された核酸塩基を含む。本明細書で用いられるところの、側鎖には、少なくとも一つの原子が炭素であり、少なくとも一つの他の原子が一価でない、少なくとも二つの原子を含む有機側鎖が含まれる。一実施形態においては、核酸塩基は、ウリジンの5-および6-位、チミジンの5-および6-位、シチジンの5および6-位および環外アミン、アデノシンの2-、7-および8-位および環外アミン、グアノシンの7-および8-位および環外アミンからなる群より選択される位置で修飾され、特に核酸塩基、例えばピリミジンが、5位で修飾され、特に修飾核酸塩基がウラシルまたはシトシンである。いくつかの実施形態においては、側鎖は、疎水性および／または芳香族側鎖、特にベンジルまたはインドリル側鎖である。

【0043】

10

いくつかの実施形態においては、核酸塩基が側鎖で直接修飾されるが、いくつかの実施形態においては、核酸塩基は、側鎖に共有結合するリンカーにより修飾され、リンカーは、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $-CO-$ （カルボキシ）および $-CH_2-$ 、 $-CO-O-$ および $-CO-NH-$ および $-CH_2-CO-NH-(CH_2)_n-NH-$ からなる群より選択され、 n が1～6であり、特にリンカーが、 $-CO-$ （カルボキシ）および $-CH_2-$ および $-CO-NH-$ からなる群より選択される。

【0044】

いくつかの実施形態においては、修飾核酸塩基を含むヌクレオチドは、2'-OMeである。特定の実施形態においては、転写反応混合物に含まれる全ての異なる種類のヌクレオチド三リン酸が、修飾核酸塩基を含む種類のヌクレオチドを含めて、2'-OMe修飾される。特定の実施形態では、修飾核酸塩基を含むヌクレオチドは、2'-O-メチル-5-インドリルメチレンUまたは2'-O-メチル(methyl)-5-ベンジルUである。他の実施形態においては、修飾核酸塩基を含むヌクレオチドは、2'-デオキシまたは2'-OHである。

20

【0045】

いくつかの実施形態においては、転写反応物には、マグネシウムイオンがさらに含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、マンガンイオンがさらに含まれる。いくつかの実施形態においては、転写反応物には、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方がさらに含まれる。別の実施形態においては、マグネシウムイオンは、マンガンイオンより3.0～3.5倍高い濃度で転写反応物中に存在する。転写反応物中に各ヌクレオチド三リン酸が1.0mMの濃度で存在する、別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度は6.5mMであり、マンガンイオンの濃度は2.0mMである。転写反応物中に各ヌクレオチド三リン酸が1.5mMの濃度で存在する、別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度8mM、マンガンイオンの濃度は2.5mMである。転写反応物中に各ヌクレオチド三リン酸が2.0mMの濃度で存在する、別の実施形態においては、マグネシウムイオンの濃度9.5mM、マンガンイオンの濃度は3.0mMである。

30

【0046】

いくつかの実施形態においては、転写反応混合物には、非2'-OMeグアノシン非三リン酸残基、特に、グアノシン-リン酸、グアノシン二リン酸、2'-フルオログアノシン-リン酸、2'-フルオログアノシン二リン酸、2'-アミノグアノシン-リン酸、2'-アミノグアノシン二リン酸、2'-デオキシグアノシン-リン酸、および2'-デオキシグアノシン二リン酸からなる群より選択される非2'-OMeグアノシン非三リン酸残基が含まれる。別の実施形態においては、転写テンプレートには、T7RNAポリメラーゼプロモータが含まれる。いくつかの実施形態においては、転写反応混合物に含まれる核酸転写テンプレートには、T7RNAポリメラーゼプロモータ、およびT7RNAポリメラーゼプロモータに対してすぐ3'側のリーダー配列が含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、ポリエチレングリコールがさらに含まれる。別の実施形態においては、転写反応物には、無機ピロホスファターゼがさらに含まれる。いくつかの実施形態においては、転写反応物には、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方がさらに含まれる。

40

【0047】

50

本発明の方法のこの態様のいくつかの実施形態においては、転写のステップにより、一本鎖核酸の転写収率がもたらされ、転写収率は、同一の転写反応物が野生型 T7 RNA ポリメラーゼを含むことを除いては同一の転写反応物の収率より高い。転写収率は、電気泳動および可視化により定量し、転写産物コピー数および／または濃度、例えば μM または $\mu\text{g}/\text{ml}$ で表せる。本発明の方法のこの態様においては、野生型 T7 ポリメラーゼは、配列番号 33 によるアミノ酸配列を含む。

本発明はまた、以下の項目を提供する。

(項目 1)

核酸を転写する方法であり、

a) (i) 2'-OMe ATP、2'-OMe GTP、2'-OMe CTP、2'-OMe TTP および 2'-OMe UTP より選択される 2'-OMe 修飾ヌクレオチド三リン酸 (2'-OMe NTP) のいずれかを導入することが可能な修飾 T7 RNA ポリメラーゼであり、上記修飾 RNA ポリメラーゼが、対応する非修飾 RNA ポリメラーゼの 2'-修飾 NTP を導入する能力と比較して、上記 2'-修飾ヌクレオチド三リン酸 (2'-修飾 NTP) を導入する能力が増加している、修飾 T7 RNA ポリメラーゼと、(ii) 少なくとも一つの核酸転写テンプレートと、(iii) ヌクレオチド三リン酸であり、上記ヌクレオチド三リン酸がグアニジン三リン酸を含み、上記グアニジン三リン酸が全て 2'-OMe 修飾されている、ヌクレオチド三リン酸とを含む、転写反応混合物を調製するステップと；

b) 一本鎖核酸が生じる条件下で、上記転写反応混合物を転写するステップであり、上記生じる一本鎖核酸の、最初のグアニジンヌクレオチドの後の全てのグアニジンヌクレオチドが、2'-OMe 修飾されている、ステップと

を含む、方法。

(項目 2)

上記転写反応混合物が、マグネシウムイオン、マンガンイオン、またはマグネシウムおよびマンガンイオンの両方をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

上記核酸転写テンプレートが、少なくとも部分的に二本鎖である、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

上記核酸転写テンプレートが、完全二本鎖である、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

上記生じた一本鎖核酸における最初のグアニジンヌクレオチドが、2'-OMe 修飾されている、項目 1 に記載の方法。

(項目 6)

上記修飾 T7 RNA ポリメラーゼが、野生型 T7 ポリメラーゼに対して 639 位および 784 位で改変されたアミノ酸を含み、上記 784 位の改変アミノ酸がアラニンであるときには、上記 639 位の改変アミノ酸がフェニルアラニンでない、項目 1 に記載の方法。

(項目 7)

上記修飾 T7 RNA ポリメラーゼが、639 位にロイシン、784 位にアラニンを含む、項目 6 に記載の方法。

(項目 8)

上記二本鎖オリゴヌクレオチド転写テンプレートが、上記オリゴヌクレオチド転写テンプレートの 5' 末端の固定領域に導入されたリーダー配列をさらに含む、項目 3 に記載の方法。

(項目 9)

上記リーダー配列が、全てプリンのリーダー配列である、項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

上記全てプリンのリーダー配列が、少なくとも 8 ヌクレオチド長、少なくとも 10 ヌクレオチド長；少なくとも 12 ヌクレオチド長；および少なくとも 14 ヌクレオチド長より

10

20

30

40

50

選択される長さを有する、項目 9 に記載の方法。

(項目 1 1)

上記反応転写条件が、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方を含み、マグネシウムイオンの濃度が、マンガンイオンの濃度より 3.0 ～ 3.5 倍高い、項目 2 に記載の方法。

(項目 1 2)

各 NTP、2'-修飾 NTP または 2'-OMe NTP が、約 0.5 mM の濃度で存在し、上記反応転写条件が、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方を含み、マグネシウムイオンの濃度が約 5.0 mM であり、マンガンイオンの濃度が約 1.5 mM である、項目 2 に記載の方法。

10

(項目 1 3)

各 NTP、2'-修飾 NTP または 2'-OMe NTP が、約 1.0 mM の濃度で存在し、上記反応転写条件が、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方を含み、マグネシウムイオンの濃度が約 6.5 mM であり、マンガンイオンの濃度が約 2.0 mM である、項目 2 に記載の方法。

(項目 1 4)

各 NTP、2'-修飾 NTP または 2'-OMe NTP が、約 2.0 mM の濃度で存在し、上記反応転写条件が、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方を含み、マグネシウムイオンの濃度が約 9.6 mM であり、マンガンイオンの濃度が約 2.9 mM である、項目 2 に記載の方法。

20

(項目 1 5)

上記転写反応混合物が、置換グアノシンまたはグアノシンをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 6)

上記置換グアノシンまたはグアノシンが、GMP である、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

上記転写反応混合物が、ポリアルキレングリコールをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 8)

上記ポリアルキレングリコールが、ポリエチレングリコールである、項目 1 7 に記載の方法。

30

(項目 1 9)

上記転写反応混合物が、無機ピロホスファターゼをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 0)

上記転写反応混合物が、2'-デオキシシチジン三リン酸 (2'-デオキシCTP)、2'-OMe アデノシン三リン酸 (2'-OMe ATP)、2'-OMe グアノシン三リン酸 GTP (2'-OMe GTP)、および 2'-OMe ウリジン三リン酸 (2'-OMe UTP) または 2'-OMe チミジンヌクレオチド三リン酸 (2'-OMe TTP) の混合物をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 1)

上記転写反応混合物が、2'-デオキシチミジン三リン酸 (2'-デオキシTTP) または 2'-デオキシウリジン三リン酸 (2'-デオキシUTP) および 2'-OMe アデノシン三リン酸 (2'-OMe ATP)、2'-OMe グアノシン三リン酸 GTP (2'-OMe GTP)、および 2'-OMe シチジン三リン酸 (2'-OMe CTP) の混合物をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

40

(項目 2 2)

上記転写反応混合物が、2'-OH チミジン三リン酸 (2'-OH TTP) または 2'-OH ウリジン三リン酸 (2'-OH UTP) および 2'-OMe アデノシン三リン酸 (2'-OMe ATP)、2'-OMe グアノシン三リン酸 GTP (2'-OMe GTP)、および 2'-OMe シチジン三リン酸 (2'-OMe CTP) の混合物を

50

さらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

上記転写反応混合物が、側鎖で修飾された核酸塩基をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 4)

上記核酸塩基が、ウリジンの 5- および 6- 位、チミジンの 5- および 6- 位、シチジンの 5 および 6- 位および環外アミン、アデノシンの 2-、7- および 8- 位および環外アミン、グアノシンの 7- および 8- 位および環外アミンからなる群より選択される位置で修飾される、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 5)

修飾核酸塩基が、ウラシル、シトシンまたはチミジンである、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 6)

上記側鎖が、疎水性芳香族側鎖である、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 7)

上記側鎖が、ベンジルまたはインドリルである、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 8)

アダプターを同定する方法であり、上記アダプターが 2'-OMe 修飾ヌクレオチドを含む、方法であり、

a) (i) 2'-OMe ATP、2'-OMe GTP、2'-OMe CTP、2'-OMe TTP および 2'-OMe UTP より選択される 2'-OMe 修飾ヌクレオチド三リン酸 (2'-OMe NTP) のいずれかを導入することが可能な修飾 T7 RNA ポリメラーゼであり、上記修飾 RNA ポリメラーゼが、対応する非修飾 RNA ポリメラーゼの 2'-修飾 NTP を導入する能力と比較して、上記 2'-修飾ヌクレオチド三リン酸 (2'-修飾 NTP) を導入する能力が増加している、修飾 T7 RNA ポリメラーゼと、(ii) 少なくとも一つの核酸転写テンプレートと、(iii) ヌクレオチド三リン酸であり、上記ヌクレオチド三リン酸がグアニジン三リン酸を含み、上記グアニジン三リン酸が全て 2'-OMe 修飾されている、ヌクレオチド三リン酸とを含む、転写反応混合物を調製するステップと；

b) 上記修飾 T7 RNA ポリメラーゼにより、一本鎖核酸の候補混合物の上記核酸分子に、少なくとも一つの修飾 2'-OMe ヌクレオチド三リン酸 (2'-OMe NTP) が導入される条件下で、上記転写反応混合物を転写することにより、上記一本鎖核酸の候補混合物を調製するステップであり、上記候補混合物の上記一本鎖核酸分子の、最初のグアノシンヌクレオチドの後の全てのグアニジンヌクレオチドが、2'-OMe 修飾されている、ステップと；

c) 上記候補混合物を上記標的分子と接触させるステップと、

d) 上記候補混合物の親和性と比較して、標的分子に対する親和性が増加した上記核酸を、上記候補混合物から分離するステップと、

e) アダプターが濃縮された混合物を生じるために、上記親和性が増加した核酸を増幅するステップを含み、それによって、アダプターの上記グアニジンヌクレオチドの一つを選択的に除いて、全て 2'-OMe 修飾されたグアニジンヌクレオチドを含む、上記標的分子に対する上記アダプターが、同定される、

方法。

(項目 2 9)

上記転写反応混合物が、マグネシウムイオン、マンガンイオンまたはマグネシウムおよびマンガンイオンの両方をさらに含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

上記核酸転写テンプレートが、少なくとも部分的に二本鎖である、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 1)

上記核酸転写テンプレートが、完全二本鎖である、項目 2 8 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 3 2)

上記生じた一本鎖核酸における最初のグアノシヌクレオチドが、2'-OMe修飾されている、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 3)

上記修飾 T 7 RNA ポリメラーゼが、野生型 T 7 ポリメラーゼに対して 6 3 9 位および 7 8 4 位で改変されたアミノ酸を含み、上記 7 8 4 位の改変アミノ酸がアラニンであるときには、上記 6 3 9 位の改変アミノ酸がフェニルアラニンでない、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 4)

上記修飾 T 7 RNA ポリメラーゼが、6 3 9 位にロイシン、7 8 4 位にアラニンを含む、項目 3 3 に記載の方法。

10

(項目 3 5)

上記二本鎖オリゴヌクレオチド転写テンプレートが、上記オリゴヌクレオチド転写テンプレートの 5' 末端の固定領域に導入されたリーダー配列をさらに含む、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 6)

上記リーダー配列が、全てプリンのリーダー配列である、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 7)

上記全てプリンのリーダー配列が、少なくとも 8 ヌクレオチド長、少なくとも 1 0 ヌクレオチド長；少なくとも 1 2 ヌクレオチド長；および少なくとも 1 4 ヌクレオチド長より選択される長さを有する、項目 3 6 に記載の方法。

20

(項目 3 8)

上記反応転写条件が、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方を含み、マグネシウムイオンの濃度が、マンガンイオンの濃度より 3. 0 ~ 3. 5 倍高い、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 9)

各 NTP、2'-修飾 NTP または 2'-OMe NTP が、約 0. 5 mM の濃度で存在し、上記反応転写条件が、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方を含み、マグネシウムイオンの濃度が約 5. 0 mM であり、マンガンイオンの濃度が約 1. 5 mM である、項目 2 9 に記載の方法。

30

(項目 4 0)

各 NTP、2'-修飾 NTP または 2'-OMe NTP が、約 1. 0 mM の濃度で存在し、上記反応転写条件が、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方を含み、マグネシウムイオンの濃度が約 6. 5 mM であり、マンガンイオンの濃度が約 2. 0 mM である、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

各 NTP、2'-修飾 NTP または 2'-OMe NTP が、約 2. 0 mM の濃度で存在し、上記反応転写条件が、マグネシウムおよびマンガンイオンの両方を含み、マグネシウムイオンの濃度が約 9. 6 mM であり、マンガンイオンの濃度が約 2. 9 mM である、項目 2 9 に記載の方法。

40

(項目 4 2)

上記転写反応混合物が、置換グアノシンまたはグアノシンをさらに含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 4 3)

上記置換グアノシンまたはグアノシンが、GMP である、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

上記転写反応混合物が、ポリアルキレングリコールをさらに含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 4 5)

上記ポリアルキレングリコールが、ポリエチレングリコールである、項目 4 4 に記載の

50

方法。

(項目 4 6)

上記転写反応混合物が、無機ピロホスファターゼをさらに含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 4 7)

上記転写反応混合物が、2'-デオキシシチジン三リン酸 (2'-デオキシCTP)、2'-O-Me アデノシン三リン酸 (2'-OMe ATP)、2'-OMe グアノシン三リン酸 GTP (2'-OMe GTP)、および 2'-OMe ウリジン三リン酸 (2'-OMe UTP) または 2'-OMe チミジンヌクレオチド三リン酸 (2'-OMe TTP) の混合物をさらに含む、項目 2 8 に記載の方法。

10

(項目 4 8)

上記転写反応混合物が、2'-デオキシチミジン三リン酸 (2'-デオキシTTP) または 2'-デオキシウリジン三リン酸 (2'-デオキシUTP) および 2'-O-Me アデノシン三リン酸 (2'-OMe ATP)、2'-OMe グアノシン三リン酸 GTP (2'-OMe GTP)、および 2'-OMe シチジン三リン酸 (2'-OMe CTP) の混合物をさらに含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 4 9)

上記転写反応混合物が、2'-OH チミジン三リン酸 (2'-OH TTP) または 2'-OH ウリジン三リン酸 (2'-OH UTP) および 2'-O-Me アデノシン三リン酸 (2'-OMe ATP)、2'-OMe グアノシン三リン酸 GTP (2'-OMe GTP)、および 2'-OMe シチジン三リン酸 (2'-OMe CTP) の混合物をさらに含む、項目 2 8 に記載の方法。

20

(項目 5 0)

上記転写反応混合物が、側鎖で修飾された核酸塩基をさらに含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 5 1)

上記核酸塩基が、ウリジンの 5- および 6- 位、チミジンの 5- および 6- 位、シチジンの 5 および 6- 位および環外アミン、アデノシンの 2-、7- および 8- 位および環外アミン、グアノシンの 7- および 8- 位および環外アミンからなる群より選択される位置で修飾される、項目 5 0 に記載の方法。

30

(項目 5 2)

修飾核酸塩基が、ウラシル、シトシンまたはチミジンである、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 3)

上記側鎖が、疎水性芳香族側鎖である、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 4)

上記側鎖が、ベンジルまたはインドリルである、項目 5 3 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図 1】ランダム配列オリゴヌクレオチドのプールからの、*in vitro* アプタマー選択 (SELEX (商標)) プロセスの概略図である。

40

【図 2】標準的モノPEG化、多重PEG化、およびPEG化による二量体化を表す、様々なPEG化戦略を示した図である。

【図 3 A】核酸 (配列番号 3 2) である。

【図 3 B】野生型 T7 RNA ポリメラーゼのアミノ酸配列 (配列番号 3 3) である。

【図 4 A】変異 T7 RNA ポリメラーゼ Y639L/H784A の核酸配列 (配列番号 3 4) である。

【図 4 B】T7 変異ポリメラーゼ Y639L/H784A/K378R の核酸配列 (配列番号 3 5) である。

【図 4 C】変異 T7 ポリメラーゼ P266L/Y639L/H784A の核酸配列 (配列番号 3 6) である。

50

【図4D】変異T7ポリメラーゼP266L／639L／H784A／K378Rの核酸配列（配列番号37）である。

【図5】転写混合物中にY639L／H784A／K37SR変異T7RNAポリメラーゼと、rGTP（2'-OH GTP）の滴定を用いた、ARC2118およびARC2119の、PAGEゲル分析のUV-シャドウイングから定量された相対的転写産物収率を示す。＊は、与えられた収率が、UV-シャドウにより最も高い収率が定量された、20μM rGTPで転写されたARC2118に対するものである。

【図6】転写混合物中にY639L／H784A／K37SR変異T7RNAポリメラーゼと、様々な濃度の2'-OMe NTPs（2'-OMe ATP、2'-OMe UTP、2'-OMe CTP、および2'-OMe GTP）、MgCl₂およびMnCl₂を伴い、rGTP（2'-OH GTP）を伴わない、ARC2119の、PAGEゲル分析のUV-シャドウイングから定量された相対的転写産物収率を示す。与えられた収率は、各1mMの2'-OMe NTP、6.5mMのMgCl₂、および2mMのMnCl₂の転写条件に対するものである。

【図7】Y639F／K378R変異T7RNAポリメラーゼを用いた全RNAまたは2'-OMe転写の忠実度と比較した、Y639L／H784A／K378R変異T7RNAポリメラーゼによる完全2'-OMe転写（100% 2'-OMe ATP、2'-OMe UTP、2'-OMe CTP、および2'-OMe GTP）のヌクレオチド挿入、欠失および置換の分析を示す表である。表において、（1）は、FAR T7変異ポリメラーゼで転写が行われた、“Direct in Vitro Selection of a 2'-O-Methyl Aptamer to VEGF” Burmeister等、（2005）Chemistry and Biology, 12:25-33からのデータを示し、（2）は、LAR T7変異体ポリメラーゼで転写が行われたことを示す。

【図8】Y639L／H784A／K378R変異T7RNAポリメラーゼを用いたラウンドの完全2'-OMe転写、その後のDNアーゼ処置、逆転写、スプリンテッドライゲーション、およびPCR増幅を行った前後の、完全2'-OMe転写物（100% 2'-OMe ATP、2'-OMe UTP、2'-OMe CTP、および2'-OMe GTP）の%ヌクレオチド組成の分析を示す表である。

【図9】3'-末端にキャップを有する（暗色のボール）、5'から3'方向に示される、最小化MNA抗IgEアプタマーの略図である。

【図10】最小化MNA抗IgEアプタマー、二つのデオキシ置換を有する最小化MNA抗IgEアプタマー、および一つのデオキシ置換とホスホロチオエート置換とを有する最小化MNA抗IgEアプタマーの略図であり、各々が5'～3'方向に示され、各々が3'-末端にキャップを有する（黒色のボール）。

【図11】修飾および野生型T7ポリメラーゼを用いて2'-OMe UTP、2'-OMe ATP、2'-OMe GTP、2'-OMe CTPまたは2'-OH NTPsを導入する転写のレベルを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0049】

本発明の一つ以上の実施形態の詳細が、以下の付随の記述に記載される。本発明の実行または試験においては、本明細書に記載のものに類似するか同等の任意の方法または材料を使用できるが、好ましい方法および材料を以下に記載する。本発明の他の特徴、目的および利点は、記載から明らかになる。明細書においては、文脈が逆を明示しない限り、単数形には複数も含まれる。本明細書において用いられる全ての技術的および科学的用語は、特に断りがない限り、本発明が属する技術の当業者により一般に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾が生じる場合には、本明細書が優先する。

【0050】

SELEX（商標）方法

アプタマーを生成する好ましい方法は、概して図1に示され、in vitro選択と

10

20

30

40

50

呼もばれる、“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (試験管内人工進化法)”(「SELEX (商標)」)と称されるプロセスによる。SELEX (商標) プロセスは、標的分子に対する高特異性結合をもつ核酸分子の *in vitro* 進化のための方法であり、例えば、1990年6月11日出願の、現在は放棄されている米国特許出願第07/536428号、“Nucleic Acid Ligands”という題の米国特許第5,475,096号、および“Nucleic Acid Ligands”という題の米国特許第5,270,163号(WO91/19813も参照)に記載されている。SELEX (商標) は、選択および増幅の反復的サイクルを実行することにより、任意の所望のレベルの標的結合親和性をもつ、本明細書において「核酸リガンド」とも称されるアダプターを得るために使用できる。

10

【0051】

SELEX (商標) プロセスは、核酸が様々な二次元および三次元構造を形成するための十分な能力と、モノマーかポリマーかを問わず事実上任意の化学化合物とのリガンドとして働く(すなわち特異的結合対を形成する)ために利用可能な十分な化学的可転性をそれらのモノマーの中に有するという、固有の洞察に基づく。任意のサイズまたは組成の分子が、標的となりうる。

【0052】

SELEX (商標) プロセスは、標的を結合する能力に基づく。したがって、SELEX (商標) 手順から得られたアダプターは、標的に結合する特性を有する。しかし、単なる標的結合からは、アダプター結合作用により標的に及ぼされうる機能効果に関する情報が、仮にあるとしても提供されない。

20

【0053】

標的分子の特性の変更には、アダプターが標的の特性の変化をもたらすために標的上の一定の位置で結合することが必要である。理論的には、SELEX (商標) 法により、各アダプターが標的の異なる部位に結合する、多数のアダプターの同定がもたらされうる。実行においては、アダプター-標的結合相互作用は、相互作用のための安定的で利用可能な構造的インターフェイスを提供する、標的上の一つまたは比較的少数の好ましい結合部位で生じることが多い。さらに、SELEX (商標) 法が生理的標的分子に実行される場合には、技術者は通常、標的に対するアダプターの位置を制御できない。したがって、標的上のアダプター結合部位の位置が、所望の効果につながりうる、あるいは標的分子に影響し得ない、複数の潜在的結合部位の一つまたはその付近である可能性も、そうでない可能性もある。

30

【0054】

アダプターが、その標的結合能力によって、効果をもつことが認められる場合でも、その効果の存在を予測し、または効果がどのようなものになるかを予知する方法はない。SELEX (商標) 実験の実施においては、技術者は、アダプターが、標的に対するアダプターを得ることができる範囲で、標的を結合する特性を有するという事実しか確実に分らない。同定されるアダプターの一部が標的に結合する以上の効果も有することを期待してSELEX (商標) を行うことはできるが、それは不確実である。

40

【0055】

SELEX (商標) プロセスは、開始点としてランダム化配列を含む一本鎖オリゴヌクレオチドの大きなライブラリまたはプールに依存する。オリゴヌクレオチドは、修飾または非修飾DNA、RNAまたはDNA/RNAハイブリッドでありうる。いくつかの例においては、プールは、100%縮重または部分的縮重オリゴヌクレオチドを含む。他の例においては、プールは、ランダム化された配列に導入された少なくとも一つの固定配列および/または保存配列を含む、縮重または部分的縮重オリゴヌクレオチドを含む。他の例においては、プールは、オリゴヌクレオチドプールの全ての分子により共有される配列を含みうる少なくとも一つの固定配列および/または保存配列を、5'および/または3'末端に含む、縮重または部分的縮重オリゴヌクレオチドを含む。固定配列は、後述のCp

50

Gモチーフ、PCRプライマのハイブリダイゼーション部位、RNAポリメラーゼ（例えばT3、T4、T7、およびSP6）のプロモータ配列、制限部位、またはポリA領域またはポリT領域等のホモポリマー配列、触媒核、アフィニティークラムへの選択的結合の部位、転写を促進するリーダー配列、および目的のオリゴヌクレオチドのクローニングおよび／または配列決定を容易にする他の配列等、予め選択された目的のために導入された、プールのオリゴヌクレオチドに共通の配列である。

【0056】

プールのオリゴヌクレオチドは、効率的な増幅に必要な固定配列ならびに縮重配列部分を含むのが好ましい。典型的には、開始プールのオリゴヌクレオチドは、30～40のランダムなヌクレオチドの内部領域に隣接する固定5'および3'末端配列を含む。縮重ヌクレオチドは、ランダムに切断された細胞核酸から、化学合成およびサイズ選択を含む多数の方法により作成できる。選択／増幅の反復の前または間に、突然変異誘発によりテスト核酸において配列変異を導入または増加することもできる。

【0057】

オリゴヌクレオチドの縮重配列部分は、任意の長さであり得、リボヌクレオチドおよび／またはデオキシリボヌクレオチドを含み得、修飾または非天然ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を含みうる。例えば、米国特許第5,958,691号；第5,660,985号；第5,958,691号；第5,698,687号；第5,817,635号；第5,672,695号、および国際公開第92/07065号を参照。縮重オリゴヌクレオチドは、当該分野で周知のオリゴヌクレオチド固相合成技術を使用してホスホジエステル結合ヌクレオチドから合成されうる。例えば、Froehler等、Nuc l. A c i d R e s. 14:5399-5467(1986)およびFroehler等、T e t. L e t t. 27:5575-5578(1986)を参照。トリエステル合成法等の液相法を用いて、ランダムオリゴヌクレオチドを合成することもできる。例えば、Sood等、Nuc l. A c i d R e s. 4:2557(1977)およびHirose等、T e t. L e t t. , 28:2449(1978)を参照。自動DNA合成装置で行われる典型的な合成は、ほとんどのSELEX（商標）実験に十分な数である、 10^{16} ～ 10^{17} の個々の分子を生じる。配列設計における十分に大きな縮重配列の領域により、各合成分子が固有の配列を表わす可能性が増加する。

【0058】

オリゴヌクレオチドの開始ライブラリは、DNA合成装置での自動化された化学合成により生成されうる。縮重配列を合成するために、四つ全てのヌクレオチドの混合物を、合成プロセスの間に各ヌクレオチド添加ステップにおいて加え、ヌクレオチドの確率的導入を可能にする。前述の通り、一実施形態においては、ランダムオリゴヌクレオチドは完全縮重配列を含むが、他の実施形態では、縮重オリゴヌクレオチドは非ランダムまたは部分的にランダムな配列の連なりを含みうる。各添加ステップで四つのヌクレオチドを異なるモル比で加えることにより、部分的にランダムな配列が生成されうる。

【0059】

RNAライブラリが開始ライブラリとして用いられる場合には、典型的に、DNAライブラリを合成し、選択的PCR増幅してから、T7RNAポリメラーゼまたは修飾T7RNAポリメラーゼを用いてDNAライブラリを*in vitro*で転写し、転写されたライブラリを精製することにより、それが生成される。そして、RNAまたはDNAライブラリが、結合に好ましい条件下で標的と混合され、同じ一般的選択スキームを用いて結合、分離および増幅の段階的な反復が行われ、結合能および選択性の事実上任意の所望の基準が達成される。より詳しくは、SELEX（商標）法は、核酸の開始プールを含む混合物から開始し、（a）結合に好ましい条件下で混合物を標的と接触させるステップと；（b）標的分子に特異的に結合した核酸から、未結合核酸を分離するステップと；（c）核酸-標的複合体を選択的に解離させるステップと；（d）リガンドが濃縮された核酸の混合物を得るために、核酸-標的複合体から解離された核酸を増幅するステップと；（e）標的分子に対する高特異性、高親和性核酸リガンドを得るために、結合、分離、解離、

10

20

30

40

50

および増幅のステップを、必要な回数のサイクルで繰り返すステップを含む。RNAアプタマーが選択される場合においては、S E L E X（商標）法は、（i）ステップ（d）の増幅の前に、核酸一標的複合体から解離された核酸を逆転写するステップと；（i i）プロセスを再開する前に、ステップ（d）からの増幅された核酸を転写するステップをさらに含む。

【0060】

多数の可能性のある配列および構造を含む核酸混合物の中においては、所与の標的に対する様々な結合親和性がある。標的に対する親和性が高い（解離定数が低い）ものは、最も標的と結合しやすい。分離、解離および増幅の後、第二核酸混合物が生成され、結合親和性がより高い候補が濃縮される。得られた核酸混合物が一つまたは数個の配列のみから主に構成されるまで、追加的な選択のラウンドにより次第に最適なりガンドが選ばれる。そして、これらがクローニングされ、配列決定され、リガンドまたはアプタマーとして1）標的結合親和性；および／または2）標的機能に影響する能力につき個々に試験されう

10

【0061】

所望の目標が達成されるまで、選択および増幅のサイクルが繰り返される。最も一般的な場合においては、サイクルの反復により結合強度に有意な改善が達成されなくなるまで、選択／増幅が継続される。方法は、典型的には、約 10^{-14} の異なる核酸種のサンプリングに使用されるが、約 10^{-18} もの数の異なる核酸種のサンプリングにも使用されうる。一般に、5～20サイクルの手順において、核酸アプタマー分子が選択される。一実施形態においては、最初の選択ステージにおいてのみ不均質性が導入され、複製プロセスの全体にわたって生じることではない。

20

【0062】

S E L E X（商標）法の一実施形態においては、選択プロセスが、選択された標的に最も強く結合する核酸リガンドを単離することにおいて非常に効率的であるために、選択および増幅のサイクルが一度で足りる。そのような効率的な選択は、例えば、カラムに結合した標的と結びつく核酸の能力が、カラムが最も親和性の高い核酸リガンドの分離および単離を十分に許容できるような態様で働く、クロマトグラフィタイプのプロセスにおいて生じうる。

【0063】

多くの場合には、単一の核酸リガンドが同定されるまでS E L E X（商標）プロセスの反復的ステップを行うことが、必ずしも望ましいとは限らない。標的特異的核酸リガンド溶液は、多数の保存配列、および標的に対する核酸リガンドの親和性に大きく影響せずに置換または加えられうる多数の配列を有する、核酸構造またはモチーフのファミリーを含む。S E L E X（商標）プロセスを完了前に終了することにより、核酸リガンド溶液ファミリーの多数のメンバーの配列を決定することが可能である。

30

【0064】

種々の核酸の一次構造、二次構造および三次構造が存在することが知られている。非ワトソン・クリック型の相互作用に参与することが最も一般的に示されている構造またはモチーフは、ヘアピンループ、対称および非対称のバルジ、シュードノットおよびこれらの無数の組み合わせと呼ばれる。このようなモチーフの公知の場合のほぼ全てが、それらがわずか30ヌクレオチド以内の核酸配列において形成されうることを示唆する。この理由から、連続したランダム化セグメントを用いたS E L E X（商標）手順が、約20～50、いくつかの実施形態においては約30～40の間のヌクレオチドのランダム化セグメントを含む核酸配列で開始されることが好ましいことが多い。一実施例においては、5'—固定：ランダム：3'—固定配列は、約30～約40ヌクレオチドのランダム配列を含む。

40

【0065】

多くの特定の目的を達成するために、基本的なS E L E X（商標）法が改変されている。例えば、米国特許第5,707,796号は、曲がったDNA等の特定の構造特性を有

50

する核酸分子を選択するための、ゲル電気泳動と合わせた S E L E X (商標) プロセスの利用を記載する。米国特許第 5, 763, 177 号は、標的分子に結合および／または光架橋および／またはこれを光不活性化しうる光反応性基を含む核酸リガンドを選択するための、S E L E X (商標) ベースの方法を記載する。米国特許第 5, 567, 588 号および第 5, 861, 254 号は、標的分子に対して高い親和性および低い親和性を持つオリゴヌクレオチドの非常に効率的な分離を達成する、S E L E X (商標) ベースの方法を記載する。米国特許第 5, 496, 938 号は、S E L E X (商標) プロセスが実施された後に、改善された核酸リガンドを得るための方法を記載する。米国特許第 5, 705, 337 号は、リガンドを標的に共有結合するための方法を記載する。

【0066】

10

S E L E X (商標) 法を用いて、標的分子上の一つ以上の部位に結合する核酸リガンドを得ること、および、標的上の特定の部位に結合する非核酸種を含む核酸リガンドを得ることもできる。S E L E X (商標) 法は、核酸結合タンパク質およびその生物学的機能の一部として核酸に結合することが知られていないタンパク質、ならびに補因子および他の小分子等の、巨大分子および小分子を含む任意の想定可能な標的に結合する核酸リガンドを単離および同定するための手段を提供する。例えば、米国特許第 5, 580, 737 号は、カフェインとその密接に関連するアナログ、テオフィリンに対して高い親和性で結合し得る、S E L E X (商標) 法により同定される核酸配列を開示する。

【0067】

C o u n t e r - S E L E X (商標) プロセスは、一つ以上の非標的分子への交差反応性をもつ核酸リガンド配列を排除することにより、標的分子に対する核酸リガンドの特異性を改善する方法である。C o u n t e r - S E L E X (商標) プロセスには、(a) 核酸の候補混合物を調製するステップと；(b) 候補混合物を標的に接触させるステップであり、候補混合物と比較して標的に対する親和性が増加している核酸が、候補混合物の残部から分離され得る、ステップと；(c) 候補混合物の残部から親和性が増加した核酸を分離するステップと；(d) 標的から親和性が増加した核酸を選択的に解離するステップと；(e) 非標的核酸分子(単数または複数)に対する特異的親和性をもつ核酸リガンドが除去されるように、親和性の増加した核酸の一つ以上の非標的分子と接触させる、ステップと；(f) 標的分子への結合につき比較的高い親和性および特異性を有する核酸配列が濃縮された核酸の混合物を得るために、標的分子だけに対して特異的親和性をもつ核酸を増幅する、ステップが含まれる。S E L E X (商標) 法について上述したように、所望の目標が達成されるまで、選択および増幅のサイクルが必要に応じて繰り返される。

20

30

【0068】

治療剤およびワクチンとしての核酸の使用において直面する一つの潜在的な問題は、そのホスホジエステル形態におけるオリゴヌクレオチドが、所望の効果が現れる前に、エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼ等の細胞内酵素および細胞外酵素により体液中で急速に分解されうることである。したがって、S E L E X (商標) 法は、リガンドに、i n v i v o 安定性の改善または送達特性の改善等の特性の改善を与える修飾ヌクレオチドを含む高親和性核酸リガンドの同定を含む。このような修飾の例には、糖位および／またはリン酸位および／または塩基位での化学的置換が含まれる。修飾ヌクレオチドを含む S E L E X (商標) 一同定核酸が、例えば、リボースの 2' 位、ピリミジンの 5 位、およびプリン の 8 位で化学的に修飾されたヌクレオチド誘導体を含むオリゴヌクレオチドを記載する米国特許第 5, 660, 985 号、様々な 2' 修飾ピリミジンを含むオリゴヌクレオチドを記載する米国特許第 5, 756, 703 号、および、2'-アミノ(2'-NH₂)、2'-フルオロ(2'-F)、および／または 2'-オームチル(2'-OMe)置換基で修飾された一つ以上のヌクレオチドを含む、高特異的核酸リガンドを記載する米国特許第 5, 580, 737 号に記載されている。

40

【0069】

本発明において意図される核酸リガンドの修飾には、核酸リガンド塩基または全体としての核酸リガンドに追加的電荷、極性、疎水性、水素結合、静電相互作用、および流動性

50

を導入する他の化学基を提供するものが含まれるが、これらに限定されない。ヌクレアーゼに対して抵抗性のオリゴヌクレオチド集団を生成するための修飾には、一つ以上の置換ヌクレオチド間結合、改変された糖、改変された塩基、またはそれらの組み合わせも含まれる。このような修飾には、2'-位糖修飾、5'-位ピリミジン修飾、8'-位プリン修飾、環外アミンでの修飾、4-チオウリジンの置換、5-ブロモもしくは5-ヨードウラシルの置換；骨格修飾、ホスホロチオエートまたはアルキルホスフェート修飾、メチル化、および、イソ塩基のイソシチジンおよびイソグアノシン等の異常な塩基対の組み合わせが含まれるが、これに限られない。修飾には、キャッピング等の3'修飾および5'修飾も含まれる。修飾には、キャッピング、例えばエキソヌクレアーゼ抵抗性を増加させるための3'-3'-d Tキャップの付加等の、3'修飾および5'修飾も含まれる（例えば、各々参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第5,674,685号；第5,668,264号；第6,207,816号；および第6,229,002号を参照。）

10

一実施形態においては、P(O)O基がP(O)S（「チオエート」）、P(S)S（「ジチオエート」）、P(O)NR₂（「アミデート」）、P(O)R、P(O)OR'、COまたはCH₂（「ホルムアセタール」）、または3'-アミン（-NH-CH₂-CH₂-）により置換されたオリゴヌクレオチドが提供され、各RまたはR'は、独立してHであるか置換もしくは非置換アルキルである。-O-、-N-、または-S-結合を介して、隣接するヌクレオチドに結合基が結合され得る。オリゴヌクレオチドにおける全ての結合が同一である必要はない。

20

【0070】

さらなる実施形態においては、オリゴヌクレオチドは修飾糖基を含み、例えば一つ以上のヒドロキシル基が、ハロゲン、脂肪族基で置換されるか、エーテルまたはアミンとして官能化される。一実施形態においては、フラノース残基の2'位が、O-メチル、O-アルキル、O-アリル、S-アルキル、S-アリル、またはハロ基のいずれかにより置換される。2'-修飾糖の合成方法が、例えばSproat等、Nuc l. Acid Res. 19:733-738 (1991)；Cotton等、Nuc l. Acid Res. 19:2629-2635 (1991)；およびHobbs等、Biochemistry 12:5138-5145 (1973)に記載される。他の修飾は、当技術分野の技術者に公知である。このような修飾は、SELEX（商標）プロセス前修飾またはSELEX（商標）プロセス後修飾（先に同定された未修飾リガンドの修飾）であるか、SELEX（商標）プロセスへの組み込みによりなされる。

30

【0071】

SELEX（商標）プロセス前修飾またはSELEX（商標）プロセスへの組み込みによりなされるものは、そのSELEX（商標）標的に対する特異性と、安定性の改善、例えばin vivo安定性の両方を有する核酸リガンドを生じる。核酸リガンドに対するSELEX（商標）プロセス後修飾（例えばSELEX（商標）プロセス前修飾によりヌクレオチドが導入された、先に同定されたリガンドの切断、欠失、置換または追加的なヌクレオチド修飾）は、核酸リガンドの結合能に悪影響を与えることなく、安定性、例えばin vivo安定性の改善をもたらしうる。選択的に、修飾ヌクレオチドがSELEX（商標）プロセス前修飾により導入されたアプタマーが、SELEX（商標）プロセス後修飾（すなわちSELEXの後のSELEX（商標）後修飾プロセス）により、さらに修飾される。

40

【0072】

SELEX（商標）法は、米国特許第5,637,459号および第5,683,867号に記載されるように、選択されたオリゴヌクレオチドを他の選択されたオリゴヌクレオチドおよび非オリゴヌクレオチドの機能単位と組み合わせるステップを含む。SELEX（商標）法は、例えば米国特許第6,011,020号、第6,051,698号、および国際公開第98/18480号に記載されるように、選択された核酸リガンドを、診断用または治療用複合体において親油性または非免疫原性の高分子量化合物と組み合わせ

50

るステップをさらに含む。これらの特許および特許出願は、広範囲の形および他の特性の組み合わせを、オリゴヌクレオチドの効率的増幅および複製特性、および他の分子の所望の特性とともに教示する。

【0073】

SELLEX (商標) 法による、小さなフレキシブルペプチドに対する核酸リガンドの同定も調査されている。小ペプチドは、フレキシブルな構造を有し、通常は複数のコンホマーの平衡状態で溶液中に存在し、そのため、フレキシブルペプチドを結合する際のコンホメーションのエントロピーの損失により結合親和性が制限されうると当初は考えられた。しかし、溶液中における小ペプチドに対する核酸リガンドの同定の実現可能性が、米国特許第5,648,214号において示された。この特許においては、11アミノ酸ペプチドのサブスタンスPに対する高親和性RNA核酸リガンドが同定された。

10

【0074】

SELLEX (商標) プロセスの一部として、標的と結合するように選択された配列は、その後、所望の結合親和性を有する最小の配列を決定するために、選択的に最小化される。選択された配列および/または最小化された配列は、例えば結合親和性を増加し、あるいは配列中のどの位置が結合活性に必須であるか決定するために、配列のランダムまたは定方向突然変異誘発を行うことにより選択的に修飾される。

【0075】

修飾ヌクレオチド SELLEX (商標) 法

アダプターが、治療薬および/または特定の種類の診断薬としての使用に適するためには、合成が安価であり、*in vivo*で安全および安定していることが好ましい。野生型RNAおよびDNAアダプターは通常、ヌクレアーゼにより分解されやすいため、*in vivo*で安定してない。2'一位における修飾基の導入により、ヌクレアーゼ分解に対する抵抗が大きく高められうる。

20

【0076】

さらに、アダプターが選択されるオリゴヌクレオチドライブラリへの化学修飾の導入により、オリゴヌクレオチドライブラリの構造的および化学的多様性が増加し、特に望ましい特性を有する高親和性および高特異的アダプターが得られる標的数が、潜在的に増加する。例えば、多くの用途においては、完全2'-OMeアダプターを得ることが望ましいが、そのようなアダプターを、標的の機能を所与の用途において十分な程度に調節、例えば阻害するアダプターをもたらす単一のプールの組成物、例えば最初のヌクレオチド以外の全てが2'-OMeであるオリゴヌクレオチドから得ることは必ずしも可能でないだろう。この場合には、dCmD転写組成物から得られるライブラリなど、一つ以外の全てのヌクレオチドが2'-OMeであるオリゴヌクレオチドを含むプール等の他のプール組成物からアダプターを選択することが望ましいだろう。それはまた望ましい、および、別の実施形態においては、本発明は、2'-OMe修飾ならびに核酸塩基の位置に側鎖修飾を有するオリゴヌクレオチドを含むプール組成物からアダプターを選択する方法を提供する。

30

【0077】

2'-フルオロおよび2'-アミノ基がオリゴヌクレオチドプールに良好に導入され、そこからその後アダプターが選択されている。しかし、これらの修飾は、得られるアダプターの合成費用を大きく増加させ、また、修飾オリゴヌクレオチドの分解およびその後のDNA合成の基質としてのヌクレオチドの使用により、修飾ヌクレオチドがホストDNAに再利用される可能性があるために、一部の場合には安全性の問題をもたらさう。

40

【0078】

本明細書に提供される、2'-O-メチル(「2'-OMe」)ヌクレオチドを含むアダプターは、これらの欠点の多くを克服する。2'-OMeヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ抵抗性であり、合成が安価である。2'-OMeヌクレオチドは、生物系に遍在するが、天然のポリメラーゼは2'-OMe NTPsを生理学的条件下で基質として受け入れず、したがって、2'-OMeヌクレオチドのホストDNAへ

50

の再利用に関する安全性の問題がない。2' -修飾アダマーを生成するために使用される S E L E X (商標) 法が、例えば、2002年12月3日に出願の米国特許仮出願第60/430, 761号、2003年7月15日に出願の米国特許仮出願第60/487, 474号、2003年11月4日に出願の米国特許仮出願第60/517, 039号、2003年12月3日に出願の米国特許出願第10/729, 581号、2004年6月21日に出願の、"Method for in vitro Selection of 2'-O-methyl Substituted Nucleic Acids"と題した米国特許出願第10/873, 856号、2005年6月30日に出願の、Materials and Methods for the Generation of Fully 2'-Modified Nucleic Acid Transcriptsと題した米国特許仮出願第60/696, 292号、および2006年6月30日に
10
出願の、Materials and Methods for the Generation of Fully 2'-Modified Nucleic Acid Transcriptsと題した米国特許出願第11/480, 188号に記載されており、これらの各々は参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【0079】

本発明は、アダマー標的に結合してその機能を調節するアダマーであり、オリゴヌクレオチドを非修飾オリゴヌクレオチドよりも酵素的および化学的分解、ならびに熱的および物理的分解に対してより安定させるために修飾されたヌクレオチド（例えば2' -位に修飾を有するヌクレオチド）を含む、アダマーを含む。本発明には、アダマー標的に結合してその機能を調節するアダマーであり、2' 位、例えば2' -OMe修飾、および核酸塩基の位置、例えばピリミジンの5位の側鎖修飾で修飾されたヌクレオチドを含む、アダマーも含まれる。2' -OMeを含むアダマーのいくつかの例が文献にあるが（例えばRuckman等、J. Biol. Chem, 1998 273, 20556-20567-695）、これらは、CおよびU残基が2' -フルオロ（2' -F）置換され、AおよびG残基が2' -OHである修飾された転写産物のライブラリの in vitro 選択により生成された。機能的配列が同定されると、各AおよびG残基の2' -OMe置換に対する寛容性が試験され、2' -OMe残基としての2' -OMe置換に寛容な全てのAおよびG残基を有するアダマーが再合成された。この二段階様式で生成されるアダマーのほとんどのAおよびG残基は、2' -OMe残基による置換に寛容であるが、平均的に約20%は許容しない。したがって、この方法を用いて生成されるアダマーは、2~4の2' -OH残基を含む傾向があり、安定性および合成費用が結果的に損なわれる。本発明の方法は、S E L E X (商標) 法（および/または本明細書に説明されるものを含むその任意の変化形および改善形態）によりアダマーが選択および濃縮されるオリゴヌクレオチドプールにおいて使用される、安定化されたオリゴヌクレオチドを生成する、転写反応物への修飾ヌクレオチドの導入により、アダマーオリゴヌクレオチドを2' -OMe修飾ヌクレオチドにより再合成することにより、選択されたアダマーオリゴヌクレオチドを安定化する必要性をなくす。
20
30

【0080】

一実施形態においては、本発明は、ATP、GTP、CTP、TTP、およびUTPヌクレオチドの2' -OH、2' -F、2' -デオキシ、および2' -OMe修飾の組み合わせを含むアダマーを提供する。別の実施形態においては、本発明は、ATP、GTP、CTP、TTP、およびUTPヌクレオチドの2' -OH、2' -F、2' -デオキシ、2' -OMe、2' -NH₂、およびT-メトキシエチル修飾の組み合わせを含むアダマーを提供する。好ましい実施形態においては、本発明は、全てまたは実質的に全て2' -OMe修飾されたATP、GTP、CTP、TTP、および/またはUTPヌクレオチドを含むアダマーを提供する。別の好ましい実施形態においては、本発明は、全てのヌクレオチド三リン酸基、ATP、GTP、CTP、TTPおよび/またはUTPが、一つを除いて2' -OMe修飾されたアダマーを提供する。例えば、2' -OMe ATP、GTP、TTPを含むが、CTPがデオキシであるアダマーである。本発明は、任
40
50

意の先行する2'修飾の組み合わせとの組み合わせにおける、側鎖による核酸塩基修飾を含むアプタマーをさらに提供する。

【0081】

別の好ましい実施形態においては、本発明は、開始ヌクレオチドが2'修飾である必要がないことを除いて、三つの2'-OMe修飾ヌクレオチド三リン酸基および一つのデオキシまたは2'-OHヌクレオチド三リン酸基を含むアプタマーを提供する。特定の実施形態では、アプタマーはデオキシシチジンヌクレオチド三リン酸を含み、残りのヌクレオチド三リン酸は、開始ヌクレオチドが2'修飾である必要がないことを除いて、2'-OMe修飾される。別の実施形態では、アプタマーはデオキシチミジンヌクレオチド三リン酸を含み、残りのヌクレオチド三リン酸は、開始ヌクレオチドが2'修飾である必要がないことを除いて、2'-OMe修飾されている。別の実施形態では、アプタマーは2'-OHウリジンヌクレオチド三リン酸を含み、残りのヌクレオチド三リン酸は、開始ヌクレオチドが2'修飾である必要がないことを除いて、2'-OMe修飾されている。別の実施形態では、アプタマーはデオキシグアノシンヌクレオチド三リン酸を含み、残りのヌクレオチドは、開始ヌクレオチドが2'修飾である必要がないことを除いて、2'-OMeが修飾される。別の実施形態では、アプタマーはデオキシアデノシンヌクレオチド三リン酸を含み、残りのヌクレオチドは、開始ヌクレオチドが2'修飾である必要がないことを除いて、2'-OMe修飾されている。

【0082】

修飾ポリメラーゼ

本発明の2'修飾アプタマーは、野生型ポリメラーゼ、例えば野生型T7ポリメラーゼより高い、フラノース2'位に大きな置換基を有する修飾ヌクレオチドの導入率を有する修飾ポリメラーゼ、例えば変異T7ポリメラーゼを用いてつくられる。例えば、639位のチロシン残基がフェニルアラニンに変えられている(Y639F)変異T7ポリメラーゼは、2'デオキシ、2'アミノ、および2'フルオロヌクレオチド三リン酸(NTPs)を容易に基質として利用し、様々な用途のために修飾RNAsを合成するために広く使われている。しかし、この変異T7ポリメラーゼは、2'-OMeまたは2'-アジド(2'-N₃)置換基等の大きな2'-置換基を伴うNTPsを容易に利用(すなわち導入)できないことが報告されている。大きな2'置換基の導入のために、Y639F変異に加えて、784位のヒスチジンがアラニン残基に変えられた変異T7ポリメラーゼが、記載されており(Y639F/H784A)、修飾ピリミジンNTPsを導入するために、限られた状況において使われている。Padilla, R. および Sousa, R., *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30(24):138を参照。639位のチロシン残基がフェニルアラニンに変えられ、784位のヒスチジン残基がアラニンに変えられ、378位のリジン残基がアルギニンに変えられている変異T7RNAポリメラーゼ(Y639F/H784A/K378R)が、修飾プリンおよびピリミジンNTPs、例えば2'-OMe NTPsを導入するために、限られた状況において使用されているが、転写のための2'-OH GTPのスパイクを含む。Burmeister等、(2005) *Chemistry and Biology*, 12:25-33を参照。転写のための2'-OH GTPスパイクの包含により、完全に2'-OMeではなく2'-OH GTPの存在に依存しうるアプタマーが生じうる。

【0083】

784位のヒスチジンがアラニン残基に変えられた(H784A)変異T7ポリメラーゼも、説明されている。Padilla等、*Nucleic Acids Research*, 2002, 30:138。Y639F/H784A変異およびH784A変異T7ポリメラーゼの両方において、アラニン等のより小さなアミノ酸残基への変更により、より大きなヌクレオチド基質、例えば2'-OMe置換ヌクレオチドの導入が可能になる。Chelliser, K. および Ellington, A. D., (2004) *Nature Biotech*, 9:1155-60を参照。大きな2'修飾基質をより容易に導入する、T7RNAポリメラーゼの活性部位に変異を伴う追加的なT7RNAポリメ

ラーゼ、例えば639位のチロシン残基がロイシンに変えられた(Y639L)変異T7 RNAポリメラーゼが、記載されている。しかし、そのような変異により与えられる基質特異性の増加のために活性が犠牲になり、転写収率が低下することが多い。Padilla RおよびSouza, R., (1999) *Nucleic Acids Res.*, 27(6):1561を参照。T7 RNAポリメラーゼ変異P266Lが、プロモータクリアランスを促進することが記載されている(Guillerez等(2005) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 102(17)5958)。ポリメラーゼは、プロモータに結合された開始コンホメーションから、結合されていない伸長コンホメーションへと変化する。以上の変異ポリメラーゼのいずれも、完全2'-OMe転写産物をもたらすことが報告されていない。

10

【0084】

本発明は、オリゴヌクレオチドの転写収率を増加させる材料および方法を提供する。一実施形態においては、本発明は、オリゴヌクレオチドに修飾ヌクレオチドを酵素的に導入するために、修飾T7 RNAポリメラーゼ(T7 RNAポリメラーゼの修飾は、野生型T7 RNAポリメラーゼ、配列番号33に対するもの)を使用するための、方法および条件を提供する。好ましい実施形態においては、本発明の転写方法で使用される変異T7 RNAポリメラーゼは、2'-OH GTPの存在を要しない。好ましい実施形態においては、修飾ポリメラーゼは、639位のチロシン残基がロイシン残基に変えられ、784位のヒスチジン残基がアラニン残基に変えられた(Y639L/H784A)、変異T7 RNAポリメラーゼである。別の好ましい実施形態においては、修飾ポリメラーゼは、639位のチロシン残基がロイシン残基に変えられ、784位のヒスチジン残基がアラニン残基に変えられ、378位のリジン残基がアルギニン残基に変えられた(Y639L/H784A/K378R)、変異T7 RNAポリメラーゼである。別の実施形態においては、本発明の方法に用いられる修飾ポリメラーゼは、639位のチロシン残基がロイシン残基に変えられ(Y639L)、さらに別の実施形態においては、変異T7 RNAポリメラーゼは、639位のチロシン残基がロイシン残基に変えられ、378位のリジン残基がアルギニン残基に変えられ(Y639L/K378R)ている。いかなる理論にも拘束されるものではないが、K378R変異は、ポリメラーゼの活性部位の近くでなく、したがってサイレント変異であると考えられる。別の実施形態においては、本発明の方法に用いられる修飾ポリメラーゼは、266位のプロリン残基がロイシンに変えられ、639位のチロシン残基がロイシンに変えられ、784位のヒスチジン残基がアラニン残基に変えられた(P266L/Y639L/H784A)変異T7 RNAポリメラーゼであり、さらに別の実施形態においては、変異T7 RNAポリメラーゼは、266位のプロリン残基がロイシンに変えられ、639位のチロシン残基がロイシン残基に変えられ、784位のヒスチジン残基がアラニン残基に変えられ、378位のリジン残基がアルギニン残基に変えられている(P266L/Y639L/H784A/K378R)。

20

30

【0085】

変異T7 RNAポリメラーゼのアミノ酸配列が、以下に示される。

【0086】

【化 1】

Y639L/H784A (配列番号1):

MNTINIAKNDFSDEIAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAGEVADN
AAAKPLITTTLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLACLTSAADNTTVQAV
ASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKKNVEEQLNKRVGHVYKKAQFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQP
CVVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVL
VANVITKWKHCPVEDIPAIEEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLE
QANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLVKIHGANC
AGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCEYAGVQHHGLSYNCSLP
LAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDE
NTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLALGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLM
FTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHVWVTPD
GFPVWQYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVAQSQDGS HLRKTVVW
AHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMDVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPAL
PAKGNLNLRDILESDFafa

10

Y639L/H784A/K378R (配列番号2):

MNTINIAKNDFSDEIAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAGEVADN
AAAKPLITTTLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLACLTSAADNTTVQAV
ASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKKNVEEQLNKRVGHVYKKAQFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQP
CVVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVL
VANVITKWKHCPVEDIPAIEEREELPMKPEDIDMNPEALTAWRRAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLE
QANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLVKIHGANC
AGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCEYAGVQHHGLSYNCSLP
LAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDE
NTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLALGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLM
FTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHVWVTPD
GFPVWQYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVAQSQDGS HLRKTVVW
AHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMDVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPAL
PAKGNLNLRDILESDFafa

20

Y639L (配列番号3):

MNTINIAKNDFSDEIAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAGEVADN
AAAKPLITTTLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLACLTSAADNTTVQAV
ASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKKNVEEQLNKRVGHVYKKAQFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQP
CVVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVL
VANVITKWKHCPVEDIPAIEEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLE
QANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLVKIHGANC
AGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCEYAGVQHHGLSYNCSLP
LAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDE
NTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLALGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLM

30

【 0 0 8 7 】

【化 2】

FTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHVWVTPD
 GFPVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSRLRKT VVW
 AHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPAL
 PAKGNLNLRDILESDFafa

Y639L/K378R (配列番号4):

MNTINIAKNDFSDIELAAPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAGEVADN
 AAKPLITTLTPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLACLTADNTTVQAV
 ASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVEEQLNKRVGHVYKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
 WHKEDSIHVGVRCEIEMLIESTGMVSLHRQNAAGVVGQDSETIELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQP
 CVVPPKPWTGTITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLA
 VANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPEALTAWRRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLE
 QANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLVKIHGANC
 AGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCEYAGVQHHGLSYNCSLP
 LAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDE
 NTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLALGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLM
 FTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHVWVTPD
 GFPVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSRLRKT VVW
 AHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPAL
 PAKGNLNLRDILESDFafa

10

20

P266L/Y639L/H784A (配列番号5)

MNTINIAKNDFSDIELAAPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAGEVADN
 AAKPLITTLTPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLACLTADNTTVQAV
 ASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVEEQLNKRVGHVYKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
 WHKEDSIHVGVRCEIEMLIESTGMVSLHRQNAAGVVGQDSETIELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQP
 CVVPPKPWTGTITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLA
 VANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLE
 QANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLVKIHGANC
 AGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCEYAGVQHHGLSYNCSLP
 LAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDE
 NTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLALGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLM
 FTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHVWVTPD
 GFPVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSRLRKT VVW
 AHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPAL
 PAKGNLNLRDILESDFafa

30

P266L/Y639L/H784A/ K378R (配列番号6)

MNTINIAKNDFSDIELAAPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAGEVADN
 AAKPLITTLTPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLACLTADNTTVQAV
 ASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVEEQLNKRVGHVYKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
 WHKEDSIHVGVRCEIEMLIESTGMVSLHRQNAAGVVGQDSETIELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQP
 CVVPPKPWTGTITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLA
 VANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPEALTAWRRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLE
 QANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLVKIHGANC
 AGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCEYAGVQHHGLSYNCSLP
 LAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDE
 NTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLALGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLM
 FTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHVWVTPD

40

【0088】

【化 3-1】

GFPVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSRLRKT VVW
 AHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPAL
 PAKGNLNLRDILESDFafa

2'修飾(例えば2'-OMeまたは2'-OMeおよび核酸塩基側鎖修飾)RNA転写物のプールを生成するために、変異ポリメラーゼが2'-修飾NTPsを許容する条件下における、Y639F、Y639F/K378R、Y639F/H784A、Y639

50

F/H784A/K378R、Y639L/H784A、Y639L/H784A/K378R、Y639L、Y639L/K378R、P266L/Y639L/H784AまたはP266L/Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼが使用されう。好ましいポリメラーゼは、Y639L/H784A変異T7RNAポリメラーゼである。別の好ましいポリメラーゼは、Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼである。本発明における別の好ましいポリメラーゼは、P266L/Y639L/H784AまたはP266L/Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼである。他のT7RNAポリメラーゼ、特に大きな2'-置換基に対する高い寛容性をもつものも、本発明の方法で使用できる。本明細書に開示される条件を用いたテンプレート指向性重合において使用される場合には、Y639L/H784A、Y639L/H784A/K378R、P266L/Y639L/H784AまたはP266L/Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼが、Y639F、Y639F/K378R、Y639F/H784A、Y639F/H784A/K378R、Y639L、またはY639L/K378R変異T7RNAポリメラーゼを用いて達成されるより高い転写収率で、2'-OMe GTPを含み、核酸塩基の位置で側鎖修飾もされた2'-OMe NTPsも含む、全て2'-OMeのNTPsの導入のために使用されう。Y639L/H784A、Y639L/H784A/K378R、P266L/Y639L/H784AまたはP266L/Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼは、2'-修飾、例えば2'-OMeを含むオリゴヌクレオチドの高収率を達成するために、2'-OH GTPを伴って使用されうがその必要はない。

【0089】

好ましい実施形態においては、本発明のY639L/H784AまたはY639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼが、より高い完全2'-OMe転写収率を促進するために、MNA転写混合物とともに使用される。いくつかの実施形態においては、MNA転写混合物の少なくとも一つのオリゴヌクレオチドは、核酸塩基の位置における側鎖変更も含む。別の好ましい実施形態においては、本発明のY639L/H784AまたはY639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼが、転写産物の最初のヌクレオチド以外の全てのグアノシン三リン酸が2'-OMeである、より高い転写収率を促進するために、dCmD、dTmV、rTmV、rUmVまたはdUmV転写混合物とともに使用される。いくつかの実施形態においては、本発明のY639L/H784AまたはY639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼが、dCmD、dTmV、rTmV、rUmVまたはdUmV転写混合物とともに使用され、転写産物の最初のヌクレオチド以外の全てのグアノシン三リン酸が2'-OMeである、より高い転写収率を促進するために、混合物中の少なくとも一つヌクレオチドタイプがその核酸塩基の位置の側鎖修飾も含み、一つのヌクレオチドタイプが核酸塩基の側鎖修飾も含む。いくつかの実施形態においては、Y639L/H784AまたはY639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼが、rRmY、dRmY、rGmH、fGmH、dGmH、dAmB、rRdY、dRdYまたはrN転写混合物とともに使用されう。いくつかの実施形態においては、Y639L/H784A、Y639L/H784A/K378R、P266L/Y639L/H784AまたはP266L/Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼのいずれか一つが、dCmD、dTmV、rUmV、dUmV、dGmH、rGmH、交互混合物、fGmH、rAmBまたはdAmB転写反応混合物において使用されう。特定の実施形態においては、Y639L/H784A、Y639L/H784A/K378R、P266L/Y639L/H784AまたはP266L/Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼのいずれか一つが、dCmD、dTmV、rUmVまたはdUmV転写反応混合物において使用されう。

【0090】

本明細書で使用されるところでは、2'-OMe A、G、CおよびU三リン酸(2'

-OMe ATP、2'-OMe UTP、2'-OMe CTP、および2'-OMe GTP) だけを含む転写混合物が、MNA混合物と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーはMNAアプタマーと呼ばれ、2'-O-メチルヌクレオチドだけを含む。2'-OMe CおよびU、ならびに2'-OH AおよびGを含む転写混合物は「r RmY」混合物と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーは「r RmY」と呼ばれる。デオキシAおよびG、ならびに2'-OMe UおよびCを含む転写混合物は「d RmY」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアプタマーは「d RmY」アプタマーと呼ばれる。2'-OMe A、CおよびU、ならびに2'-OH Gを含む転写混合物は「r GmH」混合物と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーは「r GmH」アプタマーと呼ばれる。2'-OMe A、C、UおよびG、ならびに2'-OMe A、UおよびC、ならびに2'-F 10
 Gを交互に含む転写混合物は「交互混合物」と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーは「交互混合物」アプタマーと呼ばれる。2'-OMe A、U、およびC、ならびに2'-F Gを含む転写混合物は「f GmH」混合物と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーは「f GmH」アプタマーと呼ばれる。2'-OMe A、U、およびC、ならびにデオキシGを含む転写混合物は「d GmH」混合物と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーは「d GmH」アプタマーと呼ばれる。デオキシA、ならびに2'-OMe C、GおよびUを含む転写混合物は「d AmB」混合物と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーは「d AmB」アプタマーと呼ばれる。2'-OH Aならびに2'-OMe C、GおよびUを含む転写混合物は「r AmB」混合物と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーは「r AmB」アプタマーと呼ばれる。2'-OH アデノシン三リン酸およびグアノシン三リン酸およびデオキシシチジン三リン酸およびチミジン三リン酸を含む転写混合物は 20
 r R d Y混合物と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーは「r R d Y」アプタマーと呼ばれる。2'-OMe A、UまたはT、およびG、ならびにデオキシCを含む転写混合物は「d CmD」混合物と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーは「d CmD」アプタマーと呼ばれる。2'-OMe A、G、およびC、ならびにデオキシTを含む転写混合物は「d TmV」混合物と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーは「d TmV」アプタマーと呼ばれる。2'-OMe A、C、およびG、ならびに2'-OH Uを含む転写混合物は「r UmV」混合物と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーは「r UmV」アプタマーと呼ばれる。2'-OMe A、C、およびG、ならびに2'-デオキシUを含む転写混合物は「d UmV」混合物と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーは「d Um 30
 V」アプタマーと呼ばれる。全2'-OHのヌクレオチドを含む転写混合物は「r N」混合物と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーは「r N」、「r R r Y」またはRNAアプタマーと呼ばれ、全デオキシヌクレオチドを含む転写混合物は「d N」混合物と呼ばれ、そこから選択されるアプタマーは「d N」または「d R d Y」またはDNAアプタマーと呼ばれる。

【0091】

2'-修飾オリゴヌクレオチドは、完全に修飾ヌクレオチドから、または修飾ヌクレオチドのサブセットから合成できる。全てのヌクレオチドが修飾され、全てが同じ修飾を含みうる。全てのヌクレオチドが修飾されるが、異なる修飾を含みうる。例えば、同じ塩基を含む全てのヌクレオチドが、一つのタイプの修飾を有し、他の塩基を含むヌクレオチド 40
 は、異なるタイプの修飾を有しうる。全てのプリンヌクレオチドは、一つのタイプの修飾を有し（または修飾されず）、全てのピリミジンヌクレオチドは別の、異なるタイプの修飾を有しうる（または修飾されない）。この様式で、例えばリボヌクレオチド（2'-OH）、デオキシリボヌクレオチド（2'-デオキシ）、2'-F、および2'-OMeヌクレオチドを含め、任意の修飾の組み合わせを用いて、転写産物または転写産物のプールが生成される。さらに、修飾オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド間結合（例えばホスホロチオエート）および糖（例えば2'-OMe）および塩基（例えばイノシン）での修飾等、同時に二つ以上の修飾をもつヌクレオチドを含みうる。別の実施形態においては、同時に二つ以上の修飾をもつヌクレオチドは、例えば2'-OMe修飾および側鎖修飾を核酸塩基の位置で含む。

【0092】

転写条件

2'-修飾 SELEX (商標) 法の転写条件に、多数の因子が重要であると決定されている。2'-修飾、特に2'-OMe修飾ヌクレオチドを含む転写混合物による転写条件のために記載される因子は、2'-修飾および側鎖核酸塩基修飾ヌクレオチド三リン酸を含む転写混合物による本発明の転写方法と関連しても用いられる。本発明に用いられる側鎖修飾ヌクレオチド三リン酸が、説明されている。例えば、各々が参照により全体として本明細書に組み込まれる、Vaught JD, Dewey T, Eaton BE. *J Am Chem Soc.* 2004; 126: 11231-11237; Nieuwlandt D, West M, Cheng X, Kirshenheuter G, Eaton BE. *Chembiochem.* 2003, 4, 651-654; Ito T, Ueno Y, Komatsu Y, Matsuda A. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31, 2514-2523; Dewey, TM, Mundt, AA, Crouch, GJ, Zyzniowski, MC, Eaton, BE. *J Am Chem Soc* 1995, 117, 8474-8475; Jager S, Rasched G, Kornreich-Leshem H, Engeser M, Thum O, Famulok M. *J Am Chem Soc.* 2005, 127, 15071-15082; Tarasow TM, Tarasow SL, Eaton BE. *Nature.* 1997, 389, 54-57; Liu D, Gugliotti LA, Wu T, Dolska M, Tkachenko AG, Shipton MK, Eaton BE, Feldheim DL. *Langmuir.* 2006, 22, 5862-5866; Gugliotti LA, Feldheim DL, Eaton BE. *J Am Chem Soc.* 2005, 127, 17814-17818; Gugliotti LA, Feldheim DL, Eaton BE. *Science.* 2004, 304, 850-852; Kuwahara M, Hanawa K, Ohsawa K, Kitagata R, Ozaki H, Sawai H. *Bioorg Med Chem.* 2006, 14, 2518-2526; Saitoh H, Nakamura A, Kuwahara M, Ozaki H, Sawai H. *Nucleic Acid Res Suppl.* 2002, 2, 215-216; Kuwahara M, Ohbayashi T, Hanawa K, Shoji A, Ozaki AN, Ozaki H, Sawai H. *Nucleic Acids Res Suppl.* 2002, 2, 83-84. Mehedi Masud M, Ozaki-Nakamura A, Kuwahara M, Ozaki H, Sawai H. *Chembiochem.* 2003, 4, 584-548; Masud MM, Ozaki-Nakamura A, Satou F, Ohbayashi T, Ozaki H, Sawai H. *Nucleic Acids Res Suppl.* 2001; (1): 21-2; Obayashi T, Masud MM, Ozaki AN, Ozaki H, Kuwahara M, Sawai H. *Bioorg Med Chem Lett.* 2002, 12, 1167-70; Sawai H, Ozaki-Nakamura A, Mine M, Ozaki H. *Bioconj Chem.* 2002, 2, 309-316; Ohbayashi T, Kuwahara M, Hasegawa M, Kasamatsu T, Tamura T, Sawai H. *Org Biomol Chem.* 2005, 3, 2463-2468; Shoji A, Hasegawa T, Kuwahara M, Ozaki H, Sawai H. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006 Oct 28; [Epub ahead of print] Kuwahara M, Nagashima J, Hasegawa M, Tamura T, Kitagata R, Hanawa K, Hososhima S, Kasamatsu T, Ozaki H, Sawai H. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, 5383-5394; Ito Y. *Nucleic Acids Symp Ser.* 997, 37, 259-260; Schoetzau T, Langner J,

10

20

30

40

50

Moyroud E, Roehl I, Vonhoff S, Klussmann S. Bioconj Chem. 2003, 5, 919-926; Mehedi Masud M, Ozaki-Nakamura A, Kuwahara M, Ozaki H, Sawai H. Chembiochem. 2003, 4, 584-588; および Ebara Y, Kaihatsu K, Uejii S. Nucleic Acids Symp Ser. 1999, 42, 175-176 を参照。

【0093】

例えば、特定のリーダー配列／変異ポリメラーゼの組み合わせが使用されるいくつかの条件下で、修飾転写産物の収率の増加が観察できる。リーダー配列は、DNA転写テンプレートの5'末端の固定配列の3'末端に導入されうる配列である。リーダー配列は典型的に、6～15ヌクレオチド長であり、所定のヌクレオチド組成により構成され、例えば全てプリンであるか、プリンおよびピリミジンヌクレオチドの特定の混合物でありうる。

10

【0094】

特にY639L/H784A、Y639L/H784A/K378R、P266L/Y639L/H784AまたはP266L/Y639L/H784A/K378Rと組み合わせて、本発明の変異ポリメラーゼおよび転写条件とともに使用されうるテンプレートの例は、ARC2118（配列番号7）、ARC2119（配列番号31）、および以下の実施例に示されるとおりである。これらの変異ポリメラーゼとともに使用されるテンプレートのリーダー配列は、選択的である。

【0095】

さらに、2'-OH GTPの存在は、修飾ヌクレオチドを導入した転写産物を得る上で歴史的に重要な因子となっている。転写は、二相に分割されうる：第一相は開始であり、その間に、NTPがGTP（または別の置換グアノシン）の3'-末端に加えられて、ジヌクレオチドが得られ、これが約10～12ヌクレオチド延長される；第二相は伸長であり、その間に、転写が最初の約10～12ヌクレオチドの添加を越えて進む。Y639F/K378R変異またはY639F/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼを含む転写混合物に加えられた少量の2'-OH GTPおよび過量の2'-OMe GTPが、ポリメラーゼによる2'-OH GTPを用いた転写の開始を可能にするために十分であることが以前に分かった（また、2'-OH GTPを伴わない場合よりも高い、2'-OMeを含む転写産物の転写収率をもたらした）が、転写が伸長相に入ると、2'-OMeおよび2'-OH GTPの間の選別の減少、および2'-OH GTPに対する過量の2'-OMe GTPにより、主に2'-OMe GTPの導入が許容される。

20

30

【0096】

本発明は、GTPが開始ヌクレオチドを除いて2'-OMeである転写産物をもたらす、高収率の2'-OMe転写のために転写混合物において2'-OH GTPを必要としない変異T7RNAポリメラーゼ、例えばY639L/H784A、Y639L/H784A/K378R、P266L/Y639L/H784AまたはP266L/Y639L/H784A/K378Rを提供する。一実施形態において、高収率は、平均して投入転写テンプレートにつき少なくとも一つの転写産物である。

40

【0097】

転写産物への2'-OMe置換ヌクレオチドの導入における別の因子は、転写混合物における二価マグネシウムおよびマンガン（ Mn^{2+} ）の使用である。塩化マグネシウムおよび塩化マンガンの濃度の異なる組み合わせが、2'-O-メチル化転写産物の収率に影響することがわかっており、塩化マグネシウムおよび塩化マンガンの最良の濃度は、二価金属イオンと複合体を形成する転写反応混合物中のNTPsの濃度に依存する。全て2'-O-メチル化された転写産物（すなわち全2'-OMe ATP、2'-OMe UTP、2'-OMe CTP、および2'-OMe GTPヌクレオチド）の最も高い収率を得るためには、各NTPが0.5mMの濃度で存在するときには、約5mMの濃度の塩化マグネシウムおよび約1.5mMの濃度の塩化マンガンが好ましい。各NTPの濃度が

50

1. 0 mMであるときには、約 6. 5 mMの濃度の塩化マグネシウムおよび 2. 0 mMの濃度の塩化マンガンが好ましい。各 NTP が 1. 5 mMの濃度で存在するときには、約 8 mMの濃度の塩化マグネシウムおよび 3. 0 mMの濃度の塩化マンガンの濃度が好ましい。各 NTP の濃度が 2. 0 mMであるときには、約 9. 5 mMの濃度の塩化マグネシウムおよび 3. 0 mMの濃度の塩化マンガンが好ましい。いずれのケースにおいても、これらの濃度からの最大二倍の逸脱は、なお有意な量の修飾転写産物を与える。

【0098】

2'-OH GMP、グアノシン、または 2'-OH糖位以外の位置で置換された他の 2'-OHグアノシンを転写に入れることも、2'-OH GTPを含まない転写混合物に重要である。この効果は、開始ヌクレオチドに対するポリメラーゼの特異性から生じる。その結果、この様式で生成される任意の転写産物の 5'-末端ヌクレオチドは、2'-OHグアノシン (2'-OH G) である可能性が高い。GMP (またはグアノシン) の好ましい濃度は 0. 5 mMであり、より好ましくは 1 mMである。PEG、好ましくは PEG-8000 を転写反応物に含むことが、修飾ヌクレオチドの導入を最大化するのに有用であることも分かっている。

10

【0099】

転写産物への 2'-OMe ATP (100%)、2'-OMe UTP (100%)、2'-OMe CTP (100%) および 2'-OMe GTP (100%) (「MNA」) の最大限の導入のために、以下の条件が使用されうる: HEPES バッファー 200 mM、DTT 40 mM、スペルミジン 2 mM、PEG-8000 10% (w/v)、Triton X-100 0. 01% (w/v)、MgCl₂ 8 mM、MnCl₂ 3. 0 mM、2'-OMe NTP (各) 1. 5 mM、2'-OH GMP 1 mM、pH 7. 5、Y639L/H784A/K378R変異 T7 RNAポリメラーゼ 200 nM、無機ピロホスファターゼ 0. 025 単位/ml、および DNA テンプレート。いくつかの実施形態においては、DNA テンプレートは、好ましくは約 5~500 nMの濃度で存在しうる。

20

【0100】

転写産物への 2'-OMe ATP (100%)、2'-OMe UTP (100%) または 2'-OMe TTP (100%)、2'-OMe GTP (100%) および 2'-デオキシCTP (100%) (「dCmD」) の最大限の導入のために、以下の条件が使用されうる: HEPES バッファー 200 mM、DTT 40 mM、スペルミジン 2 mM、PEG-8000 10% (w/v)、Triton X-100 0. 01% (w/v)、MgCl₂ 8 mM、MnCl₂ 3. 0 mM、2'-OMe NTP (ATP、UTP または TTP、GTP) 1. 5 mM、2'-デオキシCTP 1. 5 mM、2'-OH GMP 1 mM、pH 7. 5、Y639L/H784A/K378R変異 T7 RNAポリメラーゼ 200 nM、無機ピロホスファターゼ 0. 025 単位/ml、および DNA テンプレート。いくつかの実施形態においては、DNA テンプレートは、好ましくは約 5~500 nMの濃度で存在しうる。

30

【0101】

転写産物への 2'-OMe ATP (100%)、2'-OMe CTP (100%)、2'-OMe GTP (100%) および 2'-デオキシTTP (100%) (「dTmV」) の最大限の導入のために、以下の条件が使用されうる: HEPES バッファー 200 mM、DTT 40 mM、スペルミジン 2 mM、PEG-8000 10% (w/v)、Triton X-100 0. 01% (w/v)、MgCl₂ 8 mM、MnCl₂ 2. 5 mM、2'-OMe NTP (ATP、CTP、GTP) 1. 5 mM、2'-デオキシTTP 1. 5 mM、2'-OH GMP 1 mM、pH 7. 5、Y639L/H784A/K378R変異 T7 RNAポリメラーゼ 200 nM、無機ピロホスファターゼ 5 単位/ml、および DNA テンプレート。いくつかの実施形態においては、DNA テンプレートは、好ましくは約 5~500 nMの濃度で存在しうる。

40

【0102】

50

転写産物への2'-OMe ATP (100%)、2'-OMe CTP (100%)、2'-OMe GTP (100%) および2'-デオキシUTP (100%) (「dU mV」) の最大限の導入のために、以下の条件が使用されうる: HEPESバッファー200mM、DTT40mM、スペルミジン2mM、PEG-8000 10% (w/v)、TritonX-100 0.01% (w/v)、MgCl₂ 8mM、MnCl₂ 3.0mM、2'-OMe NTP (ATP、CTP、GTP) 1.5mM、2'-デオキシUTP 1.5mM、2'-OH GMP 1mM、pH7.5、Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼ200nM、無機ピロホスファターゼ0.025単位/ml、およびDNAテンプレート。いくつかの実施形態においては、DNAテンプレートは、好ましくは約5~500nMの濃度で存在しうる。

10

【0103】

転写産物への2'-OMe ATP (100%)、2'-OMe CTP (100%)、2'-OMe GTP (100%) および2'-OH UTP (100%) (「rU mV」) の最大限の導入のために、以下の条件が使用されうる: HEPESバッファー200mM、DTT40mM、スペルミジン2mM、PEG-8000 10% (w/v)、TritonX-100 0.01% (w/v)、MgCl₂ 8mM、MnCl₂ 3.0mM、2'-OMe NTP (ATP、CTP、GTP) 1.5mM、2'-OH UTP 1.5mM、2'-OH GMP 1mM、pH7.5、Y639L/H784A/K378R変異T7RNAテンプレート200nM、無機ピロホスファターゼ0.025単位/ml、およびDNAテンプレート。いくつかの実施形態においては、DNAテンプレートは、好ましくは約5~500nMの濃度で存在しうる。

20

【0104】

選択的に、上述の転写条件で使用されるDNAテンプレートは、両方のテンプレートが同一の条件下で転写されたときに、そのようなリーダー配列を含まないテンプレートに対して転写収率を増加させる、全てプリンのリーダー配列を含む。別の実施形態においては、リーダー配列は、両方が同一の条件下で転写されたときに、そのようなリーダー配列を含まないテンプレートに対して転写収率を増加させる、プリンおよびピリミジンの混合物である。本明細書で使用されるところの、一単位の無機ピロホスファターゼは、pH7.2および25℃で一分あたり1.0モルの無機オルトリン酸塩を遊離させる酵素の量として定義される。反応は、約1~24時間行われうる。

30

【0105】

各場合においてその後、転写産物が、アプタマーを同定および/または所与の標的に対する結合特異性を有する保存配列を決定するために、SELEX (商標) プロセスへのインプットに使用されうる。得られる配列はすでに安定化され、SELEX (商標) 後修飾プロセスからこのステップが除去され、結果的により安定化されたアプタマーが得られる。

【0106】

後述するように、2'置換ヌクレオチドを導入した有用な収率の転写産物は、上述の条件以外の条件下で得ることもできる。例えば、上述の転写条件に対する変更には、以下が含まれる。

40

【0107】

HEPESバッファーの濃度は、0~1Mの範囲でありうる。本発明は、例えばトリス-ヒドロキシメチル-アミノメタンを含む、5~10の間のpKaを有する他のバッファーの使用も予定する。

【0108】

DTTの濃度は、0~400mMの範囲でありうる。本発明の方法は、例えばメルカプトエタノールを含む他の還元剤の使用も提供する。

【0109】

スペルミジンおよび/またはスペルミンの濃度は、0~20mMの範囲でありうる。

【0110】

50

P E G-8 0 0 0 の濃度は、0 ~ 5 0 % (w/v) の範囲でありうる。本発明の方法は、例えば他の分子量の P E G または他のポリアルキレングリコールを含む他の親水性ポリマーの使用も提供する。

【0 1 1 1】

T r i t o n X-1 0 0 の濃度は、0 ~ 0. 1 % (w/v) の範囲でありうる。本発明の方法は、例えば他の T r i t o n-X 界面活性剤を含む他の界面活性剤を含む他の非イオン性界面活性剤の使用も提供する。

【0 1 1 2】

M g C l₂ の濃度は、0. 5 m M ~ 5 0 m M の範囲でありうる。M n C l₂ の濃度は、0. 1 5 m M ~ 1 5 m M の範囲でありうる。M g C l₂ および M n C l₂ の両方が記載の範囲内になければならず、好ましい実施形態では、M g C l₂ : M n C l₂ が約 1 0 対約 3 の比率で存在し、好ましくは、比率は約 3 ~ 5 : 1、より好ましくは比率は約 3 ~ 4 : 1 である。

10

【0 1 1 3】

2'-O M e N T P の濃度 (各 N T P) は、5 μ M ~ 5 m M の範囲でありうる。

【0 1 1 4】

デオキシ N T P の濃度 (各 N T P) は、5 μ M ~ 5 m M の範囲でありうる。

【0 1 1 5】

2'-O H N T P の濃度 (各 N T P) は、5 μ M ~ 5 m M の範囲でありうる。

【0 1 1 6】

2'-O H G T P の濃度 (2'-O M e G T P が反応混合物中 5 μ M ~ 5 m M の範囲である場合) は、0 μ M ~ 3 0 0 μ M の範囲でありうる。好ましい実施形態においては、2'-O H G T P の非存在下 (0 μ M) で転写が生じる。

20

【0 1 1 7】

2'-糖の位置以外の位置で置換された 2'-O H G M P、グアノシンまたは他の 2'-O H G の濃度は、0 ~ 5 m M の範囲でありうる。2'-O H G T P が反応物に含まれない場合は、2'-O H G M P が必要であり、5 μ M ~ 5 m M の範囲でありうる。

【0 1 1 8】

D N A テンプレートの濃度は、5 n M ~ 5 μ M の範囲でありうる。

【0 1 1 9】

変異ポリメラーゼの濃度は、2 n M ~ 2 0 μ M の範囲でありうる。

30

【0 1 2 0】

無機ピロホスファターゼは、0 ~ 1 0 0 単位 / m l の範囲でありうる。

【0 1 2 1】

p H は、p H 6 ~ p H 9 の範囲でありうる。本発明の方法は、修飾ヌクレオチドを導入した大半のポリメラーゼの活性の p H の範囲内で実施されうる。

【0 1 2 2】

転写反応は、約一時間 ~ 数週間、好ましくは約 1 ~ 約 1 0 0 時間行われうる。

【0 1 2 3】

さらに、本発明の方法は、例えば E D T A、E G T A、および D T T を含めて、転写反応条件におけるキレート剤の選択的使用を提供する。

40

【0 1 2 4】

A p t a m e r M e d i c i n a l C h e m i s t r y (アプタマー医薬品化学)
所望の標的に結合するアプタマーが同定されたら、同定されたアプタマー配列の結合および / または機能的特性をさらに増加させるために、いくつかの技術が選択的に実行されうる。S E L E X (商標) プロセス (例えば 2'-修飾 S E L E X (商標)) により同定される所望の標的に結合するアプタマー、例えば M N A、d C m D、d T m V、r U m V、d U m V アプタマーが、所望の結合および / または機能的特性を有する最小のアプタマー配列 (本明細書において「最小化コンストラクト」とも称される) を得るために、選択的に切断されうる。これを達成する一つの方法は、最小化コンストラクトのデザインを知

50

るための、フォールディングプログラムおよび配列分析（例えば保存モチーフおよび／または共変動を探すための、選択から得られるクローン配列のアライニング）の使用による。最小化コンストラクトのデザインを知るために、アダプター配列の5'および3'境界を決定するために、生化学的プロービング実験も行われうる。その後、最小化コンストラクトが化学合成され、それらが得られた非最小化配列と比較して、結合および機能的特性につき試験されうる。一連の5'、3'および／または内部欠損を含むアダプター配列の変異体も、直接化学合成され、それらが得られた非最小化アダプター配列と比較して、結合および／または機能的特性につき試験されうる。

【0125】

さらに、ドープ再選択を用いて、MNA、dCmD、dTmV、rUmVまたはdUmVアダプター等の単一の活性アダプター配列（すなわち、（2'-修飾SELEX（商標）プロセスを含むSELEX（商標）プロセスにより同定される、所望の標的に結合するアダプター）または単一の最小化アダプター配列の範囲内の配列要件を調査できる。目的の単一の配列に基づいて設計されている合成の縮重プールを用いて、ドープ再選択が行われる。縮重のレベルは通常、野生型ヌクレオチド、すなわち目的の単一の配列から70%～85%変動する。一般に、中立変異を伴う配列がドープ再選択プロセスにより同定されるが、場合によっては、配列変化が親和性の改善をもたらしうる。そして、ドープ再選択を用いて同定されるクローンからの合成配列情報を用いて、最小結合モチーフを同定し、医薬品化学研究をたすけうる。

【0126】

MNA、dCmD、dTmV、rUmVまたはdUmVアダプター等、（2'-修飾SELEXプロセスおよびドープ再選択含む）SELEX（商標）プロセスを用いて同定されるアダプター配列および／または最小化アダプター配列は、配列のランダムまたは定方向突然変異を行って結合親和性および／または機能的特性を高めるため、あるいは配列のどの位置が結合活性および／または機能的特性に必須であるかを決定するために、アダプター医薬品化学を用いてSELEX（商標）後選択により選択的に修飾されてもよい。

【0127】

アダプター医薬品化学は、一連の変異アダプターが化学合成されるアダプター改善技術である。これらの一連の変異体は典型的に、単一の置換基の導入により親アダプターと異なり、この置換基の位置により互いに異なる。そして、これらの変異体が互いと親に対して比較される。特性の改善は十分に大きくなりうるため、特定の治療基準を達成するのに、単一の置換基の包含だけで足りうる。

【0128】

あるいは、単一の変異体組から収集された情報を用いて、二つ以上の置換基が同時に導入されたさらなる変異体組を設計できる。一つの設計戦略においては、全ての単一置換基の変異体がランク付けされ、トップ4が選択され、これら4つの単一置換基変異体の全ての可能な二重（6）、三重（4）および四重（1）の組み合わせが合成および検定される。第二の設計戦略においては、最良の単一置換基変異体が新しい親と考えられ、この最高ランクの単一置換基変異体を含む全ての可能な二重置換基変異体が合成および検定される。他の戦略が用いられてもよく、さらに改良された変異体の同定を続けながら置換基の数が段階的に増加するように、これらの戦略が繰り返し行われうる。

【0129】

アダプター医薬品化学は特に、全体的でなく局所的な置換基の導入を調査する方法として用いることができる。アダプターが転写により生成されるライブラリの中に発見されるため、SELEX（商標）プロセスの間に導入される任意の置換基は、全体的に導入されなければならない。例えば、ヌクレオチド間にホスホロチオエート結合を導入することが望ましい場合には、全てのA（または全てのG、C、T、U等）に導入することしかできない（全体的に置換される）。ホスホロチオエートがいくつかのA（またはいくつかのG、C、T、U等）（局地的に置換）に必要であるが他のAでは寛容性がないアダプターは、このプロセスにより容易に発見できない。

【0130】

アプタマー医薬品化学プロセスにより利用されうる置換基の種類は、それらを固相合成試薬として生成し、オリゴマー合成スキームに導入する能力によってのみ制限される。プロセスは、もちろんヌクレオチドだけに限られない。アプタマー医薬品化学スキームには、立体的大きさ、疎水性、親水性、親油性、疎油性、正電荷、負電荷、中性電荷、双性イオン、分極率、ヌクレアーゼ抵抗性、構造的剛性、構造的柔軟性、タンパク質結合特性、質量等を導入する置換基が含まれうる。アプタマー医薬品化学スキームには、塩基修飾、糖修飾またはホスホジエステル結合修飾が含まれうる。

【0131】

治療用アプタマーの文脈で有益となりうる置換基の種類を考える際には、以下の一つ以上のカテゴリに入る置換を導入することが望ましい：

10

(1)すでに体内に存在する置換基、例えば2'-デオキシ、2'-リボ、2'-O-メチルプリンまたはピリミジンまたは5-メチルシトシン。

【0132】

(2)既に承認された治療薬の一部である置換基、例えばホスホロチオエート結合オリゴヌクレオチド。

【0133】

(3)上の二つのカテゴリのうち一つに加水分解または分解する置換基、例えばメチルホスホネート結合オリゴヌクレオチド。

【0134】

20

本発明のアプタマーは、本明細書に記載されるアプタマー医薬品化学により開発されるアプタマーを含む。

【0135】

本発明のアプタマーの標的結合親和性は、アプタマーと標的（例えばタンパク質）の間の一連の結合反応により評価でき、トレース^{3 2}P-標識アプタマーが緩衝培地において標的の希釈系とともにインキュベートされ、その後真空濾過マニホールドを用いてニトロセルロース濾過により分析される。本明細書においてドットブロット結合アッセイと称されるこの方法は、（上から下に）ニトロセルロース、ナイロンフィルタ、およびゲルブロット紙からなる三層濾過媒体を使用する。標的に結合したRNAがニトロセルロースフィルタに捕らえられ、標的に結合していないRNAがナイロンフィルタに捕らえられる。ゲルブロット紙は、他のフィルタの支持媒体として含まれる。濾過の後に、濾過層が分離され、乾燥させられて蛍光スクリーンに曝露され、リン光画像化システムを使用して定量される。定量結果を用いてアプタマー結合曲線を生成でき、そこから解離定数(K_D)を計算できる。好ましい実施形態においては、結合反応を実行するために用いられる緩衝培地は、1X DulbeccoのPBS (Ca^{++} および Mg^{++})と0.1mg/mL BSAである。

30

【0136】

一般に、標的の機能的活性を調節するアプタマーの能力、すなわちアプタマーの機能的活性は、標的の生物学的機能に応じたin vitroおよびin vivoモデルを使用して評価できる。いくつかの実施形態においては、本発明のアプタマーは、標的の生物学的機能を阻害でき、他の実施形態では、本発明のアプタマーは、標的の生物学的機能を刺激しうる。アプタマー標的の公知の機能を測定するために設計されたin vitroおよびin vivoモデルを使用して、本発明のアプタマーの機能的活性を評価できる。

40

【0137】

本発明のアプタマーは、当業者により用いられる任意の数の技術により、診断目的にルーチン的に採用されうる。診断への利用には、in vivoおよびin vitroの両方の診断用途が含まれうる。診断薬は、利用者が特定の場所または濃度での所与の標的の存在を同定することを可能にするだけで足りる。単に標的と結合対を形成する能力が、診断目的でプラスのシグナルを誘発するために十分でありうる。当業者は、そのような

50

ガンドの存在を追跡するために標識タグを導入するために、公知技術の方法により任意のアプタマーを適応させることもできる。そのようなタグは、多数の診断法において用いられうる。

【0138】

免疫賦活性モチーフを有するアプタマー

脊椎動物の免疫系による細菌DNAの認識は、特定の配列コンテキストにおける非メチル化CpGジヌクレオチドの認識に基づく（「CpGモチーフ」）。このようなモチーフを認識する一つのレセプターは、異なる微生物成分を認識することにより先天性の免疫反応に関与するToll-likeレセプター（～10メンバー）のファミリーのメンバー、Toll-likeレセプター9（「TLR9」）である。TLR9は、非メチル化オリゴデオキシヌクレオチド（「ODN」）CpG配列を配列特異的様式で結合する。CpGのモチーフの認識が防御機構を誘発し、先天性および最終的に後天性の免疫反応につながる。例えばマウスにおけるTLR9の活性化は、抗原提示細胞の活性化、MHCクラスIおよびII分子のアップレギュレーション、および重要な共刺激分子およびIL-12およびIL-23を含むサイトカインの発現を誘導する。この活性化は、TH1サイトカインIFN-γの強いアップレギュレーションを含めて、直接および間接的にBおよびT細胞反応を増強する。CpG配列に対する反応は、集合的に、感染症からの保護、ワクチンに対する免疫反応の改善、喘息に対する有効な反応、および抗体依存性細胞媒介細胞傷害の改善につながる。したがって、CpG ODNsは、感染症からの保護を提供し、免疫アジュバントまたは癌治療薬（単独療法またはmAbや他の療法と組み合わせて）として機能し、喘息およびアレルギー反応を減少させうる。

【0139】

本発明のアプタマー、例えばMNA、dCmD、dTmV、rUmVまたはdUmVアプタマーは、一つ以上のCpGまたは他の免疫賦活性配列を含みうる。このようなアプタマーは、例えば本明細書に説明されるSELEX（商標）プロセスを用いて、様々な戦略により同定または生成されうる。一般に、戦略は二つの群に分けられうる。群一においては、戦略は、標的のための結合部位ならびにCpGモチーフまたは他の免疫賦活性配列の両方を含むアプタマーを同定または生成することを目指し、標的（以下「非CpG標的」）は、CpGモチーフまたは他の免疫賦活性配列を認識することが知られており、CpGモチーフに結合するときに免疫反応を刺激することが知られているもの以外の標的である。この群の第一戦略は、CpGモチーフが固定領域またはその一部としてプールの各メンバーに導入されているオリゴヌクレオチドプールを用いて（例えば、いくつかの実施形態においては、プールメンバーのランダム化領域が、CpGモチーフが導入された固定領域を含む）、SELEX（商標）を行って特異的非CpG標的に対するアプタマーを得るステップと、CpGモチーフを含むアプタマーを同定するステップを含む。この群の第二戦略は、SELEX（商標）を行って特異的非CpG標的、好ましくは標的に対するアプタマーを得、選択の後CpGモチーフを5'および/または3'末端に加えるかCpGモチーフをアプタマーの領域、好ましくは非必須領域に組み込むステップを含む。この群の第三の戦略は、SELEX（商標）を行って特異的非CpG標的に対するアプタマーを得るステップであり、プールの合成の間に、プールの各メンバーのランダム化領域のCpGモチーフが濃縮されるように、一つ以上のヌクレオチド添加ステップにおいて様々なヌクレオチドのモル比が偏らせられる、ステップと、CpGモチーフを含むアプタマーを同定するステップを含む。この群の第四の戦略は、SELEX（商標）を行って特異的非CpG標的に対するアプタマーを得るステップと、CpGモチーフを含むアプタマーを同定するステップを含む。この群の第五の戦略は、SELEX（商標）を行って特異的非CpG標的に対するアプタマーを得るステップと、結合時に免疫反応を刺激するがCpGモチーフを含まないアプタマーを同定するステップを含む。

【0140】

群二においては、戦略は、CpGモチーフのレセプター（例えばTLR9または他のtoll-likeレセプター）により結合され、結合時に免疫反応を刺激する、CpGモ

チーフおよび／または他の配列を含むアプタマーの同定または生成を目指す。この群の第一戦略は、C p Gモチーフがプールの各メンバーに、固定領域またはその一部として導入されているオリゴヌクレオチドプールを用いて（例えばいくつかの実施形態においては、プールメンバーのランダム化領域は、C p Gモチーフが導入された固定領域を含む）、S E L E X（商標）を行ってC p Gモチーフまたは他の免疫賦活性配列に結合し、結合時に免疫反応を刺激することが知られている標的に対するアプタマーを得るステップと、C p Gモチーフを含むアプタマーを同定するステップを含む。この群の第二戦略は、S E L E X（商標）を行って、C p Gモチーフまたは他の免疫賦活性配列に結合し、結合時に免疫反応を刺激することが知られている標的に対するアプタマーを得てから、C p Gモチーフを5'および／または3'末端に加えるかC p Gモチーフをアプタマーの領域、好ましくは非必須領域に組み込むステップを含む。この群の第三の戦略は、S E L E X（商標）を行って、C p Gモチーフまたは他の免疫賦活性配列に結合し、結合時に免疫反応を刺激することが分かっている標的に対するアプタマーを得るステップであり、プールの合成の間に、プールの各メンバーのランダム化された領域がC p Gモチーフにおいて濃縮されるように、一つ以上のヌクレオチド添加ステップにおいて様々なヌクレオチドのモル比が偏らせられるステップと、C p Gモチーフを含むアプタマーを同定するステップを含む。この群の第四の戦略は、S E L E X（商標）を行って、C p Gモチーフまたは他の免疫賦活性配列に結合し、結合時に免疫反応を刺激することが知られている標的に対するアプタマーを得るステップと、C p Gモチーフを含むアプタマーを同定するステップを含む。この群の第五の戦略は、S E L E X（商標）を行って、C p Gモチーフまたは他の免疫賦活性配列に結合することが知られている標的に対するアプタマーを得るステップと、結合時に免疫反応を刺激するがC p Gモチーフを含まないアプタマーを同定するステップを含む。

【0141】

各々が異なるイベントのカスケードにおける認識、サイトカインおよび他の分子の放出、一定の細胞型の活性化により生じる、多様なC p Gモチーフのクラスが同定されている。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、C p G Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects, Annu. Rev. Immunol. 2002, 20:709-760を参照。追加的な免疫賦活性モチーフは、参照により各々が本明細書に組み込まれる以下の米国特許において開示される：米国特許第6,207,646号；第6,239,116号；第6,429,199号；第6,214,806号；第6,653,292；第6,426,434号；第6,514,948号および第6,498,148号。これらのC p Gまたは他の免疫賦活性モチーフが、アプタマーに導入されうる。アプタマーの選択は、治療される病気または疾患に依存する。好ましい免疫賦活性モチーフは以下の通りであり（左から右に5'から3'で示される）、「r」がプリンを表わし、「y」はピリミジンを表わし、「X」は任意のヌクレオチドを表わす：

【0142】

【化3-2】

AACGTTTCGAG(配列番号8); AACGTT; ACGT

, rCGy; rrCGyy, XCGX, XXCGXX, およびX₁がGまたはAであり、X₂がCでなく、Y₁がGでなく、Y₂が好ましくはTであるX₁X₂CGY₁Y₂。

【0143】

C p Gモチーフに結合し、結合時に免疫反応を刺激することが知られている標的以外の特異的標的（「非C p G標的」）に結合するアプタマーにC p Gモチーフが導入される場合においては、C p Gは、アプタマーの非必須領域に位置するのが好ましい。アプタマーの非必須領域は、部位特異的変異誘発、欠失分析および／または置換分析により同定されうる。しかし、非C p G標的に結合するアプタマーの能力を大きく妨げない任意の位置が使用されうる。C p Gモチーフは、アプタマー配列に埋め込まれるのに加えて、5'および3'末端のいずれかまたは両方に加えられるなど、アプタマーに付着されうる。非C p G標的に結合するアプタマーの能力が大きく妨げられない限り、任意の付着の位置または

手段が使用されうる。

【0144】

本明細書で使用されるところの、「免疫反応の刺激」は、(1) 特異的反応 (例えば T_h1 反応の誘発) または一定の分子の産生の誘発、または (2) 特異的反応 (例えば T_h2 反応の阻害または抑制) または一定の分子の阻害または抑制を意味しうる。

【0145】

アプタマー治療薬の薬物動態および体内分布の調節

アプタマーを含む全てのオリゴヌクレオチドベースの治療薬の薬物動態学的特性が、所望の薬学的用途に適合するように調整されることが重要である。細胞外標的に対するアプタマーには (アンチセンスおよび RNA i ベースの治療薬の場合のように) 細胞内送達と関連した問題がないが、このようなアプタマーはなお、標的器官および組織に分布され、所望の薬剤投与計画と整合した一定期間体内にとどまることが可能でなければならない。

【0146】

したがって、本発明は、アプタマー組成物の薬物動態、および、特にアプタマー薬物動態を調整する能力に影響を及ぼすための、材料および方法を提供する。アプタマー薬物動態の調整可能性 (すなわち調節の可能性) は、アプタマーに対する修飾部分 (例えば PEG ポリマー) の結合および/または修飾ヌクレオチド (例えば 2'-フルオロまたは 2'-O-メチル) の導入により核酸の化学組成を変更することにより達成される。アプタマー薬物動態の調整可能性は、既存の治療的応用の改善、あるいは新しい治療用途の開発において用いられる。例えば、迅速な薬物クリアランスまたはターンオフが求められうる抗腫瘍または救急処置の場合等、いくつかの治療用途においては、循環中のアプタマーの滞留時間を減少させることが望ましい。あるいは、他の治療用途、例えば治療薬の全身循環が求められる維持療法においては、循環中のアプタマーの滞留時間を増加させることが望まれうる。

【0147】

さらに、アプタマー薬物動態の調整可能性は、対象におけるアプタマー治療薬の生体分布を改変するために用いられる。例えば、いくつかの治療用途においては、特定のタイプの組織または特定の臓器 (または一連の臓器) を標的とする努力においてアプタマー治療薬の生体分布を変更することが望まれうる。これらの用途においては、アプタマー治療薬は、優先的に特定の組織または臓器 (単数または複数) に蓄積する。他の治療用途においては、アプタマー治療薬が患部組織に優先的に蓄積するように、所与の病気、細胞傷害または他の異常な症状と関連した細胞マーカーまたは症状を示す組織を標的とすることが望まれうる。例えば、2004年3月5日出願の、“Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics” と題した米国特許仮出願第 60/550790 号、および 2005年3月7日出願の、“Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics” と題した米国特許出願第 10/—, — 号に記載されるように、アプタマー治療薬の PEG 化 (例えば 20 kDa の PEG ポリマーによる PEG 化) が、PEG 化されたアプタマー治療薬が炎症組織に優先的に蓄積するように、炎症組織の標的化に使用される。

【0148】

アプタマー治療薬 (例えばアプタマー結合体または修飾ヌクレオチド等、化学的に変更されたアプタマー) の薬物動態学的および生体分布プロフィールを決定するために、様々なパラメータがモニタされる。このようなパラメータには、例えば半減期 ($t_{1/2}$)、血漿クリアランス (CL)、分布体積 (V_{ss})、濃度-時間曲線下面積 (AUC)、血清または血しょう中濃度の最大値 (C_{max}) の観察、およびアプタマー組成物の平均滞留時間 (MRT) が含まれる。本明細書において使用されるところの「AUC」という用語は、アプタマー投与後の時間に対するアプタマー治療薬の血しょう中濃度のプロット下

の面積を指す。AUC値を用いて、所与のアプタマー治療薬の生物学的利用能（すなわちアプタマー投与後の循環中の投与アプタマー治療薬の割合）および／または総クリアランス（CL）（すなわちアプタマー治療薬が循環から除去される速度）が推定される。分布体積は、アプタマー治療薬の血しょう中濃度を体内に存在するアプタマーの量に関連させる。Vssが大きいほど、アプタマーが血漿外でより多く見られる（すなわち血管外遊出が多い）。

【0149】

本発明は、アプタマー、例えばMNA、dCmD、dTmV、rUmVまたはdUmVアプタマーを小分子、ペプチドまたはポリマー末端基等の調節部分に結合することにより、または修飾ヌクレオチドをアプタマーに導入することにより、in vivoで、安定化されたアプタマー組成物、例えばMNA、dCmD、dTmV、rUmVまたはdUmVアプタマーの薬物動態および生体分布を、制御された様式で調節する材料および方法を提供する。本明細書に記載されるように、修飾部分の結合および／またはヌクレオチド（単数または複数）化学組成の変更は、循環におけるアプタマー滞留時間および組織への分布の基本的側面を変更する。

【0150】

ヌクレアーゼによるクリアランスに加えて、オリゴヌクレオチド治療薬は、腎臓の濾過により除去される。そのようなものとして、静脈内投与されるヌクレアーゼ耐性オリゴヌクレオチドは、濾過を遮断できない限り、典型的に<10分のin vivo半減期をもつ。これは、血流から組織への迅速分布を促進すること、またはオリゴヌクレオチドの見掛けの分子量を糸球体の有効なカットオフサイズより上に増加させることにより達成できる。後述されるPEGポリマーに対する小さな治療薬の結合（PEG化）は、循環中のアプタマーの滞留時間を劇的に延長し、これにより投与頻度を減少させ、血管標的に対する有効性を高めうる。

【0151】

アプタマーは、高分子量ポリマー、例えばPEG；ペプチド、例えばTat（HIV Tatタンパク質の13-アミノ酸フラグメント（Vives等（1997），J. Biol. Chem. 272（25）：16010-7））、Ant（ショウジョウバエアンテナペディアホメオチックタンパク質の第三のらせんに由来する16-アミノ酸配列（Pieters等（2001），Vaccine 19（11-12）：1397-405））およびArg₇（ポリアルギニン（Arg₇）で構成される短い正に帯電する細胞浸透ペプチド（Rothbard等（2000），Nat. Med. 6（11）：1253-7；Rothbard，J等（2002），J. Med. Chem. 45（17）：3612-8））；および小分子、例えばコレステロール等の脂肪親和性化合物等、様々な修飾部分に結合されうる。本明細書に説明される様々な結合体の中で、アプタマーのin vivo特性は、PEG基との錯体形成により最も大きく変更される。例えば、20 kDaのPEGポリマーとの、混合2'-Fおよび2'-OMe修飾アプタマー治療薬の錯体化は、腎臓濾過を妨げ、健常および炎症組織へのアプタマー分布を促進する。さらに、20 kDaのPEGポリマー-アプタマー結合体は、アプタマーの腎臓濾過を防止する上で、40 kDaのPEGポリマーとほぼ同じくらい有効である。PEG化の一つの効果はアプタマークリアランスにあるが、20 kDa部分の存在により生じる全身的曝露の延長により、組織、特に高灌流臓器および炎症部位の組織へのアプタマーの分布も促進される。アプタマー-20 kDa PEGポリマー結合体は、PEG化されたアプタマーが炎症組織に優先的に蓄積するように、アプタマー分布を炎症部位に導く。いくつかの場合には、20 kDaのPEG化アプタマー結合体は、例えば腎臓細胞等の細胞の内部にアクセスできる。

【0152】

修飾ヌクレオチドを用いて、アプタマーの血漿クリアランスを調節することもできる。例えば、in vivoおよびin vitroで高いヌクレアーゼ安定性をもつために現世代のアプタマーに典型的である、2'-Fおよび2'-OMe安定化化学を導入する

非結合アプタマーは、非修飾アプタマーと比較して、血漿からの迅速な減少（すなわち迅速な血漿クリアランス）、および組織、主に腎臓への迅速な分布を示す。

【0153】

PEG誘導体化核酸

上述の通り、高分子量の非免疫原性ポリマーによる核酸の誘導体化は、核酸の薬物動態学および薬力学的特性を変更し、それらをより有効な治療剤とする可能性を有する。活性の好ましい変化には、ヌクレアーゼによる分解に対する抵抗の増加、腎臓による濾過の減少、免疫系に対する曝露の減少、および治療薬の体内分布の変更を含みうる。

【0154】

本発明のアプタマー組成物は、ポリアルキレングリコール（「PAG」）部分により誘導体化されうる。PAG-誘導体化核酸の例は、参照により全体として本明細書に組み込まれる、2003年11月21日出願の米国特許出願第10/718,833号に見られる。本発明で使用される典型的なポリマーには、ポリエチレンオキシド（「PEO」）としても知られるポリエチレングリコール（「PEG」）およびポリプロピレングリコール（ポリイソプロピレングリコールを含む）が含まれる。さらに、異なるアルキレンオキシド（例えばエチレンオキシドおよびプロピレンオキシド）のランダムまたはブロックコポリマーが、多くの用途において使用されうる。その最も一般的な形において、PEG等のポリアルキレングリコールは、各末端でヒドロキシル基で終了する直鎖状ポリマーである： $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ 。このポリマー、アルファー、オメガージヒドロキシルポリエチレングリコールは、 $\text{HO}-\text{PEG}-\text{OH}$ としても表わすことができ、 $-\text{PEG}-$ 記号は以下の構造単位を表すと理解され： $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 n が典型的に約4～約10,000の範囲である。

【0155】

示されるように、PEG分子は二機能であり、「PEGジオール」と呼ばれることもある。PEG分子の終末部は、化合物の反応部位における他の化合物に対するPEGの付着のために、活性化または機能的部分に転換されうる、比較的非反応性のヒドロキシ部分、 $-\text{OH}$ 基である。このような活性化されたPEGジオールは、本明細書において二活性化されたPEGsと称される。例えば、PEGジオールの末端部分は、アミノ部分との選択反応のために、比較的非反応性のヒドロキシ部分、 $-\text{OH}$ を、 N -ヒドロキシスクシンイミドからのスクシンイミジル活性エステル部分と置換することにより、活性カルボネートエステルとして官能化されている。

【0156】

多くの用途においては、PEG分子が単官能性（または単活性化）であるように、一端のPEG分子を本質的に非反応性の部分でキャップすることが望ましい。一般に活性化PEGsのための複数の反応位置をもつタンパク質治療薬の場合には、二官能性の活性化PEGsは広範な架橋に至り、機能性が低い凝集物を生成する。単活性化PEGsを生成するために、PEGジオール分子の末端上の一つのヒドロキシ部分が、典型的に非反応性メトキシ末端部分、 $-\text{OCH}_3$ と置換される。PEG分子の他方のキャップされていない末端は、典型的に、表面またはタンパク質等の分子上の反応部位における付着のために活性化されうる反応性末端部分に転換される。

【0157】

PAGsは、水および多くの有機溶媒中における溶解性、無毒性、および非免疫原性の性質を典型的に有するポリマーである。PAGsの一つの使用は、ポリマーを不溶性分子に共有結合させて、得られるPAG-分子「結合体」を可溶性にすることである。例えば、水不溶性薬物パクリタキセルは、PEGに連結されると水溶性になることが示されている。Greenwald等、J. Org. Chem., 60:331-336 (1995)。PAG結合体は、溶解性および安定性を高めるためだけでなく、分子の血液循環半減期を延長するためにも用いられることが多い。

【0158】

本発明のポリアルキル化化合物は、典型的には5～80 kDaのサイズであるが、任意のサイズを使用でき、その選択はアダプターおよび用途に依存する。本発明の他のPAG化合物は、10～80 kDaのサイズである。本発明のさらに他のPAG化合物は、10～60 kDaのサイズである。例えば、PAGポリマーは、少なくとも10、20、30、40、50、60、または80 kDaのサイズでありうる。このようなポリマーは直鎖状または分枝ポリマーでありうる。いくつかの実施形態においては、ポリマーは、PEGである。

【0159】

生物学的に発現されたタンパク質治療薬に対して、核酸治療薬は典型的に、活性化されたモノヌクレオチドから化学合成される。同じ反復的モノマー合成を用いてPEGを導入することにより、PEG-核酸結合体が調製されうる。例えば、ホスホラミダイト形態への変換により活性化されたPEGsが、固相オリゴヌクレオチド合成に導入されうる。あるいは、オリゴヌクレオチド合成は、反応性PEG付着部位の部位特異的導入により完了されうる。最も一般的には、これは、5'-末端における遊離一級アミンの添加により達成されている（固相合成の最後のカップリングステップにおいて修飾因子ホスホラミダイトを用いて導入される）。このアプローチを用いて、反応性PEG（例えば、反応してアミンと結合を形成するように活性化されたもの）が精製オリゴヌクレオチドと組み合わせられ、溶液中で共役反応が行われる。

【0160】

治療薬の生体分布を変更するPEG結合の能力は、結合体の見掛け上のサイズ（例えば流体力学的半径に関して測定される）を含む、多数のファクターに関連する。より大きな結合体（>10 kDa）は、腎臓を介した濾過をより効果的に遮断し、その結果小さな高分子（例えばペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド）の血中半減期を増加させることが知られている。濾過を遮断するPEG結合体の能力は、約50 kDaまでのPEGのサイズとともに増加することが分かっている（半減期が腎臓による除去よりマクロファージ媒介性代謝により定められるため、さらなる増加による有益な効果は最小限である）。

【0161】

高分子量のPEGs（>10 kDa）の産生は困難で、非効率的で高価でありうる。高分子量PEG-核酸結合体の合成へのルートとして、過去の研究は、より高分子量の活性化PEGsの生成に集中している。このような分子を生成する一方法は、活性化された基を担持する中心コアに二つ以上のPEGsが付着する、分枝した活性化PEGの形成を伴う。これらの高分子量のPEG分子の末端部、すなわち比較的非反応性のヒドロキシル（-OH）部分は、他の化合物に対する化合物上の反応部位における一つ以上のPEGsの付着のために、活性化または機能的部分に転換されうる。分枝活性化PEGsは、二つ以上の末端を有し、二つ以上の末端が活性化されている場合においては、このような活性化された高分子量PEG分子は、本明細書において多活性化PEGsと呼ばれる。いくつかの場合には、分岐PEG分子の全ての末端が活性化されるわけではない。分岐PEG分子の任意の二つの末端が活性化される場合においては、このようなPEG分子は、二活性化PEGsと呼ばれる。分岐PEG分子の一つの末端だけが活性化されるいくつかの場合においては、このようなPEG分子は単活性化と呼ばれる。このアプローチの例として、反応のためにその後活性化される、リシンコアに対する二つのモノメトキシPEGsの付着により調製される、活性化PEGが説明されている（Harris等、Nature, vol. 2: 214-221, 2003）。

【0162】

本発明は、多重PEG化核酸を含む高分子量PEG-核酸（好ましくは、アダプター）結合体の合成に、別の費用効果的ルートを提供する。本発明は、PEG-連結多量体オリゴヌクレオチド、例えば二量体化アダプターも含む。本発明は、PEG安定化部分が、例えばアダプターの異なる部分を隔てるリンカーである、例えば高分子量アダプター組成物の線形配置が、例えば、nが1以上である核酸-PEG-核酸（-PEG-核酸）_nであるように、PEGが単一のアダプター配列中に結合されている、高分子量組成物にも関す

る。

【0163】

本発明の高分子量組成物は、少なくとも10kDaの分子量を有するものを含む。組成物は典型的に、10～80kDaのサイズの分子量を有する。本発明の高分子量組成物は、少なくとも10、20、30、40、50、60、または80kDaのサイズである。

【0164】

安定化部分は、本発明の高分子量アプタマー組成物の薬物動態学的および薬力学的特性を改善する分子または分子の部分である。いくつかの場合においては、安定化部分は、二つ以上のアプタマーまたはアプタマードメインを近づけるか、本発明の高分子量アプタマー組成物の全体的な回転自由度の減少を提供する、分子または分子の部分である。安定化部分は、ポリアルキレングリコール、線形または分枝、ホモポリマーまたはヘテロポリマーでありうるようなポリエチレングリコールでありうる。他の安定化部分には、ペプチド核酸（PNA）等のポリマーが含まれる。オリゴヌクレオチドも安定化部分になりうる；このようなオリゴヌクレオチドには、修飾ヌクレオチド、および／またはホスホロチオエート等の修飾結合を含みうる。安定化部分は、アプタマー組成物の一体的部分、すなわちアプタマーに共有結合された部分でありうる。

【0165】

本発明の組成物には、二つ以上の核酸部分が少なくとも一つのポリアルキレングリコール部分に共有結合される、高分子量アプタマー組成物を含む。ポリアルキレングリコール部分は、安定化部分として働く。ポリアルキレングリコールが核酸部分を一つの分子において結合するように、ポリアルキレングリコールがアプタマーのいずれかの末端で共有結合された組成物においては、ポリアルキレングリコール部分は連結部分であると言われる。このような組成物においては、共有結合分子の一次構造には、線形配置の核酸－PAG－核酸が含まれる。一つの例は、核酸－PEG－核酸の一次構造を有する組成物である。別の例は、線形配置：核酸－PEG－核酸－PEG－核酸である。

【0166】

核酸－PEG－核酸結合体を生成するために、核酸が、単一の反応部位を持つように（例えば単活性化）最初に合成される。好ましい実施形態においては、この反応部位は、オリゴヌクレオチドの固相合成の最終ステップにおける修飾因子ホスホラミダイトの添加により5'－末端に導入されるアミノ基である。修飾オリゴヌクレオチドの脱保護および精製の後、それは、活性化PEGの自発的加水分解を最小化する溶液において高濃度で再構築される。好ましい実施形態においては、オリゴヌクレオチドの濃度は1mMであり、再構築された溶液はpH8.3の200mM NaHCO₃－バッファー、を含む。結合体の合成は、高度に精製された二官能性PEGのゆっくりとした段階的添加により開始される。好ましい実施形態においては、PEGジオールが、スクシンイミジルプロピオン酸による誘導体化により、両末端で活性化（二活性化）される。反応の後、完全一、部分一、および非一結合種を分離するために、PEG－核酸結合体が、ゲル電気泳動または液体クロマトグラフィにより精製される。（例えばランダムまたはブロックコポリマーとして）連結された複数のPAG分子または小さなPAG鎖が連結されて、様々な長さ（または分子量）が達成されうる。様々な長さのPAG鎖の間に、非PAGリンカーが使用されうる。

【0167】

2'－O－メチル、2'－フルオロおよび他の修飾ヌクレオチド修飾は、ヌクレアーゼに対してアプタマーを安定化し、そのin vivo半減期を増加させる。3'－3'－dTキャップも、エキソヌクレアーゼ抵抗を増加させる。例えば、参照により各々が全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第5,674,685号；第5,668,264号；第6,207,816号；および第6,229,002号を参照。

【0168】

反応性核酸のPAG－誘導体化

高分子量PAG－核酸－PAG結合体は、二つ以上の反応部位を含む核酸と単官能性活

10

20

30

40

50

性化 P E G の反応により調製されうる。一実施形態においては、核酸は二反応性または二活性化され、二つの反応部位：従来のホスホラミダイト合成によりオリゴヌクレオチドに導入された 5' - アミノ基および 3' - アミノ基、例えば図 2 に示されるような 3' - 5' - ジー P E G 化を含む。代替的实施形態では、例えばピリミジンの 5 - 位、プリン の 8 - 位またはリボースの 2' - 位を一級アミンの付着のための部位として用いて、内部の位置に反応部位が導入されうる。このような実施形態においては、核酸がいくつかの活性化または反応性部位を有することができ、多重活性化されていると言われる。合成および精製の後、修飾オリゴヌクレオチドは、自発的加水分解を最小化しながら、オリゴヌクレオチド反応部位との選択反応を促進する条件下で、単活性化 P E G と組み合わせられる。好ましい実施形態においては、モノメトキシ P E G がスクシンイミジルプロピオン酸で活性化され、p H 8 . 3 で共役反応が行われる。二置換 P E G の合成を誘発するために、オリゴヌクレオチドに対して化学量論的過剰の P E G が提供される。反応の後、完全、部分的、および非結合種を分離するために、P E G - 核酸結合体がゲル電気泳動または液体クロマトグラフィにより精製される。

10

【0169】

連結ドメインは、それに付着した一つ以上のポリアルキレングリコール部分も有しうる。このような P A G s は、様々な長さであり得、組成物の所望の分子量を達成するために、適切な組み合わせにおいて用いられうる。

【0170】

特定のリンカーの効果は、その化学組成および長さの両方により影響されうる。長すぎる、短すぎる、または標的と好適でない立体化学的および／またはイオン相互作用を形成するリンカーは、アダプターと標的の間の複合体形成を妨げる。核酸の間の距離をつなぐのに必要であるより長いリンカーは、リガンドの有効濃度を減ずることにより、結合安定性を減じうる。したがって、標的に対するアダプターの親和性を最大化するために、リンカー組成物および長さを最適化することが必要である場合が多い。

20

【0171】

本明細書にあげられる全ての刊行物および特許文献は、そのような刊行物および文献の各々が特に個々に参照により本明細書に組み込まれるものと示されるのと同様に、参照により本明細書に組み込まれる。刊行物および特許文献の引用は、いずれかが関連する従来技術であるとの承認を意図するものでなく、内容または同の日付に関するいかなる承認も構成しない。以上本発明を記述してきたが、当業者には当然のことながら、本発明は様々な実施形態において実施でき、以上の記載および以下の実施例は説明を目的としたものであり、後続の請求の範囲を制限するものではない。

30

【実施例】

【0172】

(実施例 1) ポリメラーゼ発現および精製

本発明の方法に用いられる変異 T 7 R N A ポリメラーゼは、以下のように調製されうる。T 7 R N A ポリメラーゼ (図 3 A および 3 B にそれぞれ示され、B u l l , J . J 等、J . M o l . E v o l . , 5 7 (3) , 2 4 1 - 2 4 8 (2 0 0 3) に記載される核酸およびアミノ酸配列を変異させて、L A 変異体 (Y 6 3 9 L / H 7 8 4 A) 、L A R 変異体 (Y 6 3 9 L / H 7 8 4 A / K 3 7 8 R) 、L L A 変異体 (P 2 6 6 L / Y 6 3 9 L / H 7 8 4 A) または L L A R 変異体 P 2 6 6 L / Y 6 3 9 L / H 7 8 4 A / K 3 7 8 R) を生じうる。T 7 R N A ポリメラーゼが、発現ベクター (T 7 R N A ポリメラーゼ発現ベクターの例が、参照により全体として本明細書に組み込まれるに米国特許出願第 5 , 8 6 9 , 3 2 0 号に記載される) に含まれ、または変異誘発後に発現ベクターに挿入されうる。変異 T 7 R N A ポリメラーゼは、タンパク質精製の間の容易性のために H i s - t a g を選択的に含むために、操作されうる。

40

【0173】

6 3 9 位のロイシンの変異を含む相補的オリゴヌクレオチド配列

【0174】

50

【化 3 - 3】

(agtcatgacgctggctCTGgggtccaaagagttcg (配列番号 9) および

gaactctttggacccCAGagccagcgtcatgact (配列番号 10)

が、合成されうる。P 2 6 6 L 変異のための相補的オリゴヌクレオチド配列

【 0 1 7 5】

【化 3 - 4】

(ggctggcatctctcTgatgtccaaccttgc (配列番号

11) および gcaaggttggaacatcAgagagatgccagcc (配列番号 12)

10

が、合成されうる。H 7 8 4 A 変異のための相補的オリゴヌクレオチド配列

【 0 1 7 6】

【化 3 - 5】

(cgctcctaactttgtaGCcagccaagacggttagc (配列番号 13) および

gctaccgtcttggctgGCtacaagttaggagcg (配列番号 14))

が、合成されうる。K 3 7 8 R 変異のための相補的オリゴヌクレオチド配列

【 0 1 7 7】

【化 3 - 6】

(gctctcaccgctggaGacgtgctgccgctgct (配列番号 15) および

20

agcagcggcagcacgtCtccacgcggtgagagc (配列番号 16)

が、合成されうる。部位特異的変異誘発が、Quick Change (登録商標) Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene、カリフォルニア州ラホーヤ) を用いて、製造者の指示に従って実行されて、上述の変異の組み合わせをもつ変異ポリメラーゼをコードする核酸配列 (図 4) を生じうる。本発明の変異ポリメラーゼをコードする得られた核酸配列が、発現および精製のための標準的な技術を用いて、所望の発現ベクターに挿入されうる。

【 0 1 7 8】

発現および精製

30

変異 T 7 ポリメラーゼ核酸配列を含む発現ベクターは、BL 2 1 (DE 3) コンピテン細胞 (Stratagene、カリフォルニア州) に形質転換され、20 分間氷上でインキュベートされる。チューブを 2 分間 4 2 °C に入れることにより、熱ショックが行われる。チューブを 1 分間氷に置いた後、1 ml の L ブロス (「LB」) が加えられ、3 7 °C のシェーカーで 4 5 分間インキュベートされる。1 0 0 u l の培養液が、LB + Amp 寒天プレートにプレートされ、一晚 3 7 °C でインキュベートされる。

【 0 1 7 9】

一晚培養されたプレートからの単一のコロニーが、1 0 0 m l の LB - Amp + (1 5 0 u g / m l) に 3 7 °C で一晚植えつけられる。2 日目に、2 リットルの予熱された LB + Amp を含む二つの 4 リットルフラスコに、5 0 m l の一晚培養物が植えつけられ、OD 6 0 0 が 0 . 6 ~ 0 . 8 の間に達するまで 3 7 °C で成長させられる。2 0 0 u l の 1 M

40

I P T G が各 2 L の細胞培養に 1 0 0 u M の最終濃度で加えられ、3 7 °C でさらに 3 時間成長させられる。1 0 分間の 5 0 0 0 r p m のスピニングにより、細胞がペレット化される。細胞は、2 0 0 m l の溶解バッファーの中に再懸濁され (溶解バッファー: 5 0 m M T r i s - C l , p H 8 . 0 , 1 0 0 m M N a C l , 5 % グリセロール、1 m M イミダゾール、ベータメルカプトエタノール (「BME」) 5 m M) 、6 つの 5 0 m l 円錐チューブに分割される。各チューブにつき、細胞がパワーレベル 8、3 × 3 0 ' ' で超音波破壊され、6 0 分間 1 1 , 0 0 0 r p m で細菌細片が沈降され、上清が 0 . 2 2 u M フィルタで濾過される。イミダゾールが、1 0 m M の最終濃度でフィルタに加えられる。

【 0 1 8 0】

50

濾過液は、サンプルポンプで5mlのNi-NTAカラム (GE Healthcare Bio-Sciences、ニュージャージー州) にロードされる。カラムが、20mMのイミダゾールを含む10カラム体積 (CV) のバッファーAで洗浄される (バッファーA: 50mM Tris-Cl、pH 8.0、100mM NaCl、5%グリセロール、10mMイミダゾール、BME 10mM)。その後、カラムは、バッファーA中40mM~70mMのイミダゾールの直線濃度勾配を伴う10CVのバッファーで洗浄される。タンパク質が、6CVのバッファーBにより溶出される (バッファーB: 50mM Tris-Cl、pH 8.0、100mM NaCl、5%グリセロール、250mMイミダゾール、BME 10mM)。収集画分を4~12%のSDS-PAGE上で5µlの試料と照合した後、全ての目的の画分が合わせられ、1Lの透析バッファー中 (透析バッファー: 50mM Tris-Cl、pH 7.9、100mM NaCl、50%グリセロール、0.1mM EDTA、0.1% Triton X-100、BME 20mM) で一晩透析される (透析管: Spectrum Spectra/por Molecular 多孔膜 (VWR) MWCO: 12~14000)。透析バッファーは12時間後に交換され、透析はさらに4時間行われる。T7 RNAポリメラーゼの濃度が、Bradford, M. M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248に記載されるBradfordアッセイを用いて測定される。

10

【0181】

(実施例2) 100% 2'-O-メチルヌクレオチドを導入する転写

実施例2A: 2'-OH GTPを伴わない2'-O-メチル転写

20

2'-OH GTPの滴定を用いて、2'-OH GTPの濃度に対するY639L/H784A/K378R変異ポリメラーゼの感受性をテストするために、実験が行われた。

【0182】

Y639L/H784A/K378R変異T7 RNAポリメラーゼとともに使用されたときに高い転写収率を示した二つのライブラリ、ARC2118およびARC2119を用いて、2'-OH GTPの濃度に対するY639L/H784A/K378R変異T7 RNAポリメラーゼの転写の感受性がテストされた。ARC2118の配列が以下の実施例2Cに与えられ、ARC2119の配列がすぐ下に、5'から3'方向に与えられる。

30

【0183】**【化4】****ARC2119 (配列番号31)**

TAATACGACTCACTATAGGGGGTGATATTGACGTTCTCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGATCGTTAC
GACTAGCATCGATG

1X転写バッファー (HEPES 200mM、DTT 40mM、スペルミジン 2mM、Triton X-100 0.01% w/v)、~200nMテンプレート、2'-OMe ATP、CTP、UTP、およびGTP各1mM、MgCl₂ 6.5mM、MnCl₂ 2.0mM、PEG-8000 w/v 10%、GMP 1mM、無機ピロホスファターゼ5単位/mL、Y639L/H784A/K378R変異T7 RNAポリメラーゼ200nMと、2'-OH GTP (0~160uM) の滴定を用いて、一晩37℃で転写が行われた。

40

【0184】

各条件下の転写産物が、200uLの反応混合物を用いてPAGEゲル分析によりアッセイされ、ImageQuant 5.2版ソフトウェア (Molecular Dynamics) を用いて、PAGEゲル分析のUV-シャドウイングから、各条件の転写産物が定量された。図5は、PAGEゲル分析の定量結果をまとめ、バックグラウンドに対する各条件による転写収率の増加倍率を示す。図5にみられるように、2'-OH GTPを含まない全ての条件下でY639L/H784A/K378Rにより転写されるARC2118およびARC2119、および2'-OH GTPの非存在下での収率は

50

、反応混合物に2'-OH-GTPが含まれる場合の転写収率と同等だった。これらの結果は、転写のために2'-OH-GTPを必要とするY639F/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼ（データは示されない）と対照的に、Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼが、転写収率増加のために2'-OH-GTPの存在を必要としないことを示す。

【0185】

その後、Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼで使用される最適な転写条件を決定するために実験が行われた。2'-OMe-NTP、マグネシウムおよびマンガン濃度の変更の転写収率への影響をテストするために、ARC2119が、Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼとともに用いられた。

10

【0186】

1X転写バッファー（HEPES 200mM、DTT 40mM、スぺルミジン 2mM、Triton X-100 0.01%）、~200nMテンプレート、2'-OMe-ATP、CTP、UTP、およびGTP（それぞれ0.5mM、1mM、1.5mM、および2mM）、MgCl₂（5mM、6.5mM、8mM、および9.5mM）、MnCl₂（1.5mM、2mM、2.5mM、3mM）、PEG-8000 w/v 10%、GMP 1mM、無機ピロホスファターゼ 5単位/mL、Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼ 200nMを用いて、一晩 37℃で転写が行われた。

【0187】

20

各条件下の転写産物が、200uLの反応混合物を用いてPAGE-ゲル分析によりアッセイされ、各条件の転写産物がImageQuant 5.2版ソフトウェア（Molecular Dynamics）を用いて、PAGE-ゲル分析のUV-シャドウイングから定量された。図6は、PAGE-ゲル分析の定量結果をまとめ、バックグラウンドに対する各条件による転写収率の増加倍率を示す。2'-OMe-NTPsのコストおよびこの実験の結果に基づき、各1.5mMの2'-OMe-NTP（および8mM MgCl₂、2.5mM MnCl₂）が、ARC2119および本発明のY639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼのための好ましい条件として採用された。

【0188】

実施例2B：Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼを用いたMNA転写の忠実度およびバイアス：

30

Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼを用い、2'-OH-GTPを用いないMNA転写の忠実度およびバイアスを評価するために、追加的な実験が行われた。忠実度をテストするために、単一のクローン配列がPCRにより増幅され、Y639L/H784A/K378Rポリメラーゼを用いた2'-OH-GTPを伴わないMNA転写をプログラムするために使用され、PAGEにより精製され、RQ1 DNアーゼを用いて残りのDNAテンプレートが消化され（そしてDNAテンプレートの非存在がPCRによりアッセイされ）、転写物が逆転写され（Thermoscript、Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド）、PCRにより増幅された。このPCR産物が配列決定された後、欠失、挿入および置換の数が計算された。この実験で配列決定された1300の塩基のうちに、欠失および挿入は観察されず、三つの置換が観察された（図7を参照）。これらの数は、30-ヌクレオチド縮重領域内にコードされる配列情報がSELEX（商標）の次のラウンドに忠実に伝達されるチャンスが、93%であることを示唆し、この数は非常に高いため、野生型RNAにつき測定される数を上回る。

40

【0189】

ヌクレオチドのバイアスをテストするために、ライブラリARC2118が、以下の条件下：HEPES 200mM、DTT 40mM、スぺルミジン 2mM、Triton X-100 0.01% w/v、~200nMテンプレート、2'-OMe-ATP、CTP、UTP、およびGTP各1mM（2'-OH-GTPなし）、MgCl₂（6.5mM

50

)、 $MnCl_2$ (2 mM)、PEG-8000 w/v 10%、GMP 1 mM、無機ピロホスファターゼ 5 単位/mL、Y639L/H784A/K378R 変異 T7 RNA ポリメラーゼ 200 nM で、37℃で一晩転写され、PAGE により精製され、残りの DNA テンプレートが RQ1 DNアーゼを用いて消化され(その後 DNA テンプレートの非存在が PCR によりアッセイされ)、転写物が逆転写され、クローニングおよび配列決定の前に PCR を用いて増幅された。増幅ライブラリからの 48 のクローンおよび開始ライブラリからの 48 のクローンが、配列決定された。バイアスが生じたかを見るために、縮重領域におけるヌクレオチド頻度の値が検査された。図 8 により示されるように、転写後のヌクレオチド組成の割合は、各ヌクレオチド (A、T、C および G) の割合がほぼ等しい開始ライブラリのヌクレオチド組成の割合と非常に類似しており、Y639L/H784A/K378R 変異 T7 RNA ポリメラーゼを転写に用いてヌクレオチドバイアスが生じないことが示された。

10

【0190】

実施例 2C: P266L/Y639L/H784A/K378R 変異 T7 RNA ポリメラーゼを用いた MNA 転写

二本鎖転写テンプレートを生成するために、ポリメラーゼ連鎖反応をプログラムするために以下の DNA テンプレートおよびプライマが用いられた。N は、ATGC の各々である確率がほぼ等しい縮重位置を示し、全ての配列が 3' から 5' 方向にリストされる: PCR テンプレート (ARC2118)

【0191】

20

【化 5】

TAATACGACTCACTATAGGGGAGTACAATAACGTTCTCGNNNNNNNNNN

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGATCGTTACGACTAGCATCGATG (配列

番号 7)

【0192】

【化 6】

5'-プライマ

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAATACGACTCACTATAGGGGAGTA

CAATAACGTTCTCG (配列番号 17)

30

【0193】

【化 7】

3'-プライマ CATCGATGCTAGTCGTAACG (配列番号 18)

その後、得られた二本鎖転写テンプレートを用いて、以下のように各サンプルの 200 μ L 転写混合物がプログラムされた: HEPES (200 mM)、DTT (40 mM)、スペルミジン (2 mM)、Triton X-100 (0.01% w/v)、 $MgCl_2$ (8 mM)、 $MnCl_2$ (2.5 mM)、PEG-8000 (10% w/v)、各 1.5 mM の 2'-OMe NTP、GMP 1 mM、100-200 nM 転写テンプレート、無機ピロホスファターゼ (1 単位)、pH 7.5、T7 変異ポリメラーゼ P266L/Y639L/H784A/K378R が下記のように希釈された。転写混合物は、37℃で一晩インキュベートされた (16 h)。

40

【0194】

インキュベーション後、混合物は、イソプロパノールにより沈殿され、得られたペレットが溶解され、変性 PAGE (12.5% アクリルアミド) を用いて 60 分間 25 W で定量された。サンプルが UV シャドウにより 260 nm で視覚化および定量された。転写率が下表 1 に与えられる。

【0195】

【表 1】

表1:転写収率

酵素	酵素濃度	正規化した MNA転写収率
K378R/Y639L/H784A	2.1 µg/ml	100
P266L/K378R/Y639L/H784A	11 µg/ml	130
P266L/K378R/Y639L/H784A	2.6 µg/ml	65
P266L/K378R/Y639L/H784A	0.66 µg/ml	13
P266L/K378R/Y639L/H784A	0.16 µg/ml	8.3

10

(実施例 3) 2'-O-メチル ATP、GTP、および UTP スクレオチド、および 2'-デオキシ CTP スクレオチドを導入する転写

in vitro 転写を用いて 2'-O-メチルスクレオチドおよび 2'-デオキシスクレオチドの両者を導入する Y639L/H784A/K378R 変異ポリメラーゼの能力をテストするために実験が行われた。

【0196】

DNA テンプレート ARC4206 および ARC4212、およびその各々のプライマ (下記に 5' から 3' 方向に配列が与えられる) を用いて、一つの 2'-デオキシ CTP スクレオチドと、2'-O-メチル ATP、GTP、および UTP である他の三つのスクレオチドを導入する Y639L/H784A/K378R 変異 T7 RNA ポリメラーゼの転写能力がテストされた。200 mM HEPES、40 mM DTT、2.0 mM スペルミジン、0.01 % w/v Triton X-100、10 % PEG-8000、8 mM MgCl₂、2.5 mM MnCl₂、1.5 mM dCTP、1.5 mM mUTP、1.5 mM mGTP、1.5 mM mA TP、1 mM GMP、0.01 単位/µL 無機ピロホスファターゼおよび ~9 µg/mL 変異 T7 ポリメラーゼ (Y639L/H784A/K378R) および 0.3 µM テンプレート DNA を用いて、37 °C で一晩転写が行われて、2'-OMe ATP、GTP、および UTP スクレオチドおよび 2'-デオキシ CTP スクレオチドからなる ARC4206 および ARC4212 プールが生成された (以下に「dCmD」)。同時に、50 mM HEPES、10 mM DTT、0.5 mM スペルミジン、0.0025 % Triton X-100、10 % PEG-8000、8 mM MgCl₂、2.5 mM MnCl₂、1.5 mM mCTP、1.5 mM mUTP、1.5 mM mGTP、1.5 mM mA TP、1 mM GMP、0.01 単位/µL 無機ピロホスファターゼおよび ~9 µg/mL 変異 T7 ポリメラーゼ (Y639L/H784A/K378R) および 0.3 µM テンプレート DNA を用いて 37 °C で一晩転写が行われて、2'-OMe プリンおよびピリミジンスクレオチドからなる ARC4206 および ARC4212 プールが生成された (以下に「MNA」)。各条件組下の転写産物が、400 µL の反応混合物を用いて PAGE-ゲル分析によりアッセイされ、各条件の転写産物が PAGE-ゲルの UV-シャドウイングから視覚化された。表 2 は、300 mM NaOAc、20 mM EDTA 中 37 °C での一晩の PAGE-ゲルからの溶出、エタノール沈殿、その後の UV 分光法による定量化後に単離されたプールに基づいて、転写収率の定量結果をまとめる。

【0197】

20

30

40

表2: 転写収率

10

20

【表 3】

表3: 転写収率

30

【化 8】

40

テンプレートは、その各々のDNAプライマにより増幅された：

【 0 2 0 0 】

【化 9】

ARC4206
 5'プライマ ARC4207
 TAATACGACTCACTATAGGGAGAATTCCGACCAGAAGCTT (配列番号 21)
 3'プライマ ARC4208
 TGAGGATCCATGTAGACGCACATATG (配列番号 22)

ARC4212
 5'プライマ ARC4213
 TAATACGACTCACTATAGGGAGAGACAAGCTTGGGTC (配列番号 23)
 3'プライマ ARC4214
 CTGAGGATCCCTAATTAACCTTCTCTTTCTCTTCT (配列番号 24)

10

(実施例 4) Y 6 3 9 L / H 7 8 4 A / K 3 7 8 R 変異 T 7 R N A ポリメラーゼを用いたアプタマー選択

2'-OMe プリンおよびピリミジンヌクレオチド (以下に「MNA」) からなるプールを用いて、ヒト Ang 2 (以下に「h-Ang 2」) に対するアプタマーを同定するために、選択が実行された。選択戦略は、h-Ang 2 に特異的な高親和性アプタマーをもたらした。

【0201】

ヒト Ang 2 は、R & D Systems, Inc. (ミネソタ州ミネアポリス) から購入された。上の実施例 1 に記載したように、T 7 R N A ポリメラーゼ (Y 6 3 9 L / H 7 8 4 A / K 3 7 8 R) が発現され、精製された。2'-OMe プリンおよびピリミジンヌクレオチドは、TriLink BioTechnologies (カリフォルニア州サンディエゴ) から購入された。

20

【0202】

Ang 2 アプタマーの選択

プール調製

配列

【0203】

【化 10】

5'-

TAATACGACTCACTATAGGGGAGTACAATAACGTTCTCGNNNNNNNNNNNNNNNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNGGATCGTTACGACTAGCATCGATG ARC2118 (配列番号
 7)

30

の DNA テンプレートが、ABI EXPEDITE (商標) (Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ) DNA 合成装置を用いて合成され、標準法により脱保護された。テンプレートは、プライマ

【0204】

【化 11】

(5'-

(GATCGATCGATCGATCGATCTAATACGACTCACTATAGGGGAGTACAATAACG
 TTCTCG-3') (配列番号 26) および (5'-CATCGATGCTAGTCGTAACGATCC-3') (配列
 番号 27)

40

により増幅されてから、T 7 R N A ポリメラーゼ (Y 6 3 9 L / H 7 8 4 A / K 3 7 8 R) による in vitro 転写のためのテンプレートとして使用された。200mM Hepes、40mM DTT、2mM スペルミジン、0.01% w/v Triton X-100、10% PEG-8000、8mM MgCl₂、2.5mM、MnCl₂、1.5mM mCTP、1.5mM mUTP、1.5mM mGTP、1.5mM mATP、1mM GMP、0.01 単位 / μL 無機ピロホスファターゼ、および ~9 μg /

50

mL T7ポリメラーゼ (Y639L/H784A/K378R) および0.5 μMテンプレートDNAを用いて転写が行われて、ARC2118mRmYプールが生成された。

【0205】

選択

100 μLの最終的体積の選択バッファー (1X DulbeccoのPBS (DPBS)) において100 pmolのタンパク質と330 pmol (2×10^{14} 分子)のMNA ARC2118プールを1時間室温でインキュベートすることにより、選択が開始された。RNA-タンパク質複合体および未結合RNA分子が、0.45ミクロンニトロセルローススピンカラム (Schleicher and Schuell、ニューハンプシャー州キーン) を用いて分離された。カラムはKOHで前処置され (1mL 0.5 M KOH中にカラムフィルタ浸漬、15分RT; スピン)。1mL dH₂O中にフィルタ浸漬 5分RT; スピン)、1mL 1X PBSで二回洗浄されてから、プール: Ang 2複合体を含む溶液がカラムに加えられ、2分間1500 x gで遠心分離された。フィルタは、非特異的結合物を除去するために、500 μL DPBSにより二回洗浄された。2 × 100 μL溶離バッファー (7M尿素、100 mM酢酸ナトリウム、3 mM EDTA、95℃に予熱) の添加によりRNAが溶出されてから、エタノールにより沈殿させられた。プライマ配列番号27を用いて、製造者の指示に従って、ThermoScript RT-PCR (商標) システム (Invitrogen、カリフォルニア州カルズバッド) により、RNAが逆転写された。配列番号26および配列番号27を用いて、製造者の指示に従って、Taqポリメラーゼ (New England Biolabs、マサチューセッツ州ベヴァリー) によるPCRにより、cDNAが増幅された。プール調製のために上述のようにテンプレートが転写され、変性ポリアクリルアミドゲルで精製された。

【0206】

ラウンド2は、ラウンド1と同じ方法により実行された。ラウンド3-12は、疎水性プレートに固定されたh-Ang 2により行われた。各選択ラウンドは、100 μLの1X DPBS中で室温で1時間Nunc Maxi sorp疎水性プレートの表面に20 pmolのh-Ang 2を固定することにより開始された。プレートは、120 μL DPBSで5 × 洗浄された後、ブロッキングバッファー (1X DPBS、および0.1 mg/mL BSA) で1時間インキュベートされた。そして、上清が除去され、ウェルが120 μL 1X DPBSで5回洗浄された。プールRNAは、1時間室温で空のウェルでインキュベートされてから、100 μLのブロッキングバッファーで先にブロックされたウェルで1時間インキュベートされた。ラウンド3から先は、標的が固定されたウェルが、ポジティブ選択ステップの前に100 μLブロッキングバッファー (1X PBS、0.1 mg/mL tRNA、0.1 mg/mL ssDNAおよび0.1 mg/mL BSA) 中で、1時間室温でブロックされた。全ての場合において、固定h-Ang 2に結合したプールRNAは、逆転写 (「RT」) 混合物 (3'プライマ、配列番号27、およびThermoScript RT、Invitrogen、カリフォルニア州カルズバッド) の添加により、選択プレートにおいて直接逆転写された後、1時間65℃でインキュベートされた。ラウンド1につき記載されるように、得られたcDNAがPCR (Taqポリメラーゼ、New England Biolabs、マサチューセッツ州ベヴァリー) および転写のテンプレートとして使用された。各ラウンドの条件が、表4にある。

【0207】

【表 4】

表4. ラウンドまとめ

ラウンド	プール(nM)	プラット フォーム	陰性	バッファー	競合	標的 (nM)
1	3300	KOH フィルタ	なし	1X DPBS	なし	1000
2	1000	KOH フィルタ	KOH フィルタ	1X DPBS	なし	1000
3	1000	プレート	プレート; BSA プレート	1X DPBS	なし	200
4	1000	プレート	プレート; BSA プレート	1X DPBS	なし	200
5	1000	プレート	プレート; BSA プレート	1X DPBS	なし	200
6	1000	プレート	プレート; BSA プレート	1X DPBS	なし	200
7	1000	プレート	プレート; BSA プレート	1X DPBS	なし	200
8	1000	プレート	プレート; BSA プレート	1X DPBS	なし	200
9	1000	プレート	プレート; BSA プレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA	200
10	1000	プレート	プレート; BSA プレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA	200
11	1000	プレート	プレート; BSA プレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA	200
12	1000	プレート	プレート; BSA プレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA	200

MNAアプタマー結合分析

プールのタンパク質結合親和性をモニタするために、選択の全体にわたりドットブロット結合アッセイが行われた。トレース^{3 2}P-エンド標識したプールRNAが、h-Ang 2と組み合わされ、DPBSバッファー中で30 μLの最終的体積で、30分間室温でインキュベートされた。混合物がドットブロット装置に適用され(Minifold-1 Dot Blot, Acrylic, Schleicher and Schuell、ニューハンプシャー州キーン)、(上から下へ)ニトロセルロース、ナイロン、およびゲルブロット膜とアSEMBルされた。タンパク質に結合されたRNAはニトロセルロースフィルタに捕らえられ; 非タンパク結合RNAはナイロンフィルタに捕らえられる。ラウンド9でh-Ang 2結合の濃縮の開始が見られた。ラウンド9、10および12のプールテンプレートが、TOPO TAクロニングキット(Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド)を使用して製造者の指示に従ってクロニングされ、化学合成のために26のユニーククローンが選択され、解離定数(K_D)が決定された。簡単にいうと、合成RNAsがγ-^{3 2}P ATPで5'末端標識され、ドットブロットアッセイおよび1X DPBS(w/Ca²⁺およびMg²⁺) (Gibco、Catalog # 14040、Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド)のバッファー条件を用いてK_D値が決定された。式: RNA結合画分=振幅*(((Apt Conc+[h-Ang 2]+K_D)-SQRT((Apt Conc+[h-Ang 2]+K_D)²-4(Apt Conc*[h-Ang 2])))/(2*Apt Conc))+バックグラウンドにデータをあてはめてK_Dsが推定された。結果は、下表5にレポートされる。

【0208】

26のユニーク配列の中で、8つが類似のモチーフを共有し、類似の結合および阻害活性を有した。これらの配列は、ファミリーIとして同定される。ファミリーIIは、類似の結合および阻害活性を有した、モチーフを共有する二つの配列を含む。

【0209】

MNAアプタマー機能の分析

ELISAアッセイ

いくつかのアプタマーが、Tie2レセプターに対するAng2結合を妨げる能力を測定するために準備されたELISAアッセイにおいてテストされた。Tie2レセプターを捕捉するために、100μLのPBS (pH7.4)中の150ngのTie2-Fc (R&D systems 313-TI-100-CF、ミネソタ州ミネアポリス)が、96ウェルMaxisorbプレート(NUNC#446612、ニューヨーク州ロチェスター)に置かれ、4℃で一晩インキュベートされた。捕捉の間、様々な濃度の合成RNA 50μLが、50μLの3.6nM Ang2 (200ng/mL) (R&D systems、623-AN-025/CF、ミネソタ州ミネアポリス) (0.2% BSAを伴うPBS中)と、0.1% BSAを伴うPBS中1.8nM (100ng/mL)の最終Ang2濃度で混合され、1時間室温でインキュベートされた。一晩のインキュベーション後に捕捉溶液が除去され、200μLのTBST (25mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaClおよび0.01% Tween20)によりプレートが三回洗浄された。そして、プレートが、5%脱脂粉ミルクを含む200μL TBSTにより室温で30分間ブロックされた。ブロッキングの後、プレートが200μLのTBSTで再び室温で三回洗浄され、合成RNA:Ang2混合物がプレートに加えられ、1時間室温でインキュベートされた。そして、プレートが200μLのTBSTで三回洗浄され、100μLのビオチン化ヤギ抗Ang2抗体 (1:1000; R&D Systems BAF623、ミネソタ州ミネアポリス)が加えられ、室温で1時間インキュベートされた。200μLのTBSTにより三回洗浄したあと、100μLのHRP連結ストレプトアビジン (1:200; R&D systems #DY998、ミネソタ州ミネアポリス)が加えられ、0.5時間室温でインキュベートされた。そして、プレートが再び200μLのTBSTにより三回洗浄され、100μLのTMP溶液 (Pierce、#34028)が加えられ、暗所で、室温で5分間インキュベートされた。2N H₂SO₄を含む100μLの溶液が加えられて反応が停止され、プレートがSpectromaxで、450nmで読み取られた。結果は、下表5の最終的欄に与えられる。

【0210】

FACSアッセイ

ヒト臍静脈内皮細胞 (「HUVEC」) (ATCC) およびK293細胞、ヒトTie2レセプターを過剰発現する細胞系統を用いて、細胞膜上のTie2レセプターに対するAng2の結合を阻害する特異的MNA Ang2アプタマーのIC₅₀が決定された。簡単にいうと、組換え哺乳類発現ベクターpCDNA3.1-Tie2が293細胞 (ATCC、ヴァージニア州マナサス) にトランスフェクションされ、G418 (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) による選択の後、安定したクローンが得られた。フローサイトメトリは、HUVECおよびK293細胞の両方のTie2タンパク質の発現を示した。Ang2滴定アッセイにより、HUVECおよびK293細胞に対する細胞アプタマー阻害アッセイのAng2 (R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス)の量がさらに決定され、それぞれ1および0.1μg/mLであった。

【0211】

フローサイトメトリ結合アッセイにおいては、HUVECおよびK293細胞 (2×10⁵細胞/ウェル)が、V底96ウェルプレートにペレット化され、その後MNAアプタマー/Ang2溶液中に再懸濁され、2時間インキュベートされた。アプタマー/Ang2溶液は、FACバッファー (PBS中1% BSA、0.2% アジ化ナトリウム)中のAng2と異なる用量のアプタマー (100nM、33.3nM、11.1nM、3.7nM、1.2nM、0.411nM、0.137nM、および0.0456nM)を氷上で

30分間ブレインキュベーションすることにより調製された。FACSバッファーによる三度の洗浄のあと、細胞はビオチン化抗ヒトAng2抗体(5 μ g/mL; R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス)で30分間インキュベートされた後、ストレプトアビジンPE(1:10; BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ)によるもう30分間のインキュベーションが行われた。FACSscan(BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ)を用いて、FACS分析が完了された。結果は、下表5にレポートされる。

【0212】

【表5-1】

表5: 抗Ang2 MNAアプタマーの結合および機能的結果のまとめ:

MNA アプタマー	選択 ラウンド	ファミリー	K _D (nM)	IC ₅₀ (293-Tie2 FACs) (nM)	IC ₅₀ ELISA (nM)
1	10 & 12	I	0.7	0.7	テストせず
2	10 & 12	I	テストせず	0.5	テストせず
3	12	I	0.2	0.5	テストせず
4	10 & 12	I	20.0	1.0	テストせず
5	12	I	34.0	0.7	テストせず
6	10 & 12	I	9.0	0.5	1.0

【0213】

【表5-2】

7	12	I	17.0	0.5	0.3
8	10	II	19.0	1.6	1.5
9	10	I	120.0	テストせず	テストせず
10	12	I	70.0	テストせず	テストせず
11	12	I	結合なし	テストせず	テストせず
12	12	I	170.0	テストせず	テストせず
13	12	I	82.0	テストせず	テストせず
14	12	I	結合なし	テストせず	テストせず
15	12	I	結合なし	テストせず	テストせず
16	12	I	結合なし	阻害なし	テストせず
17	12	I	20.0	阻害なし	テストせず
18	12	I	90.0	テストせず	テストせず
19	12	II	25.0	1.1	2.4
20	12	I	結合なし	阻害なし	テストせず
21	12	I	2.9	0.5	テストせず
22	12	I	17.0	0.6	テストせず
23	12	I	結合なし	テストせず	テストせず
24	12	I	結合なし	テストせず	テストせず
25	12	I	結合なし	阻害なし	テストせず
26	12	I	結合なし	テストせず	テストせず

(実施例5) Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼを用いたアプタマー選択

2'-OMeプリンおよびピリミジンヌクレオチドからなるプール(以下に「mRmY」)を用いて、ヒトIgE(以下に「h-IgE」)に対するアプタマーを同定するために、選択が行われた。選択戦略は、h-IgEに特異的な高親和性アプタマーをもたらした。

【0214】

ヒトIgEは、Athens Research & Technology (Cat. #16-16-090705 ジョージア州アセンズ) から購入された。実施例1に上述したように、T7RNAポリメラーゼ (Y639L/H784A/K378R) が発現され、精製された。2'-OMeプリンおよびピリミジンヌクレオチドは、TriLink BioTechnologies (カリフォルニア州サンディエゴ) から購入された。

【0215】

IgEアプタマーの選択
プール調製
配列

10

【0216】

【化12】

5'-

TAATACGACTCACTATAGGGGAGTACAATAACGTTCTCGNNNNNNNNNNNNNNNN

【0217】

【化13】

NNNNNNNNNNNNNNNNNGGATCGTTACGACTAGCATCGATG -3' ARC2118 (配列

番号7)

20

のDNAテンプレートが、ABI EXPEDITE (商標) (Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ) DNA合成装置を用いて合成され、標準法により脱保護された。テンプレートは、プライマ

【0218】

【化14】

(5'-

(GATCGATCGATCGATCGATCTAATACGACTCACTATAGGGGAGTACAATAACG

TTCTCG-3') (配列番号26)および(5'-CATCGATGCTAGTCGTAACGATCC-3') (配列

番号27)

30

により増幅され、T7RNAポリメラーゼ (Y639L/H784A/K378R) によるin vitro転写のテンプレートとして使用された。200mM HEPES、40mM DTT、2.0mM スペルミジン、0.01%w/v Triton X-100、10% PEG-8000、8mM MgCl₂、2.5mM MnCl₂、1.5mM mCTP、1.5mM mUTP、1.5mM mGTP、1.5mM mATP、1mM GMP、0.01単位/μL無機ピロホスファターゼ、および~9μg/mL変異T7ポリメラーゼ (Y639L/H784A/K378R) および0.3μMテンプレートDNAを用いて転写が行われ、ARC2118 MNAプールが生成された。

【0219】

選択

40

330pmol (2×10^{14} 分子) のMNA ARC2118プールを、BSAブロックされた疎水性プレート (Maxisorpプレート、Nunc、ニューヨーク州ロチェスター) に結合した24pmolのタンパク質とともに100μLの最終体積の選択バッファー (1X DulbeccoのPBS (DPBS)) 中で、室温で1時間インキュベートすることにより選択が開始された。ウェルは、非特異的結合物を除去するために、120μL DPBSにより四回洗浄された。RNAが溶出され、プライマ配列番号27を用いて、ThermoScript RT-PCR (商標) システム (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) により、製造者の指示に従って逆転写された。配列番号26および配列番号27を用いて、製造者の指示に従って、Taqポリメラーゼ (New England Biolabs、マサチューセッツ州ベヴァリー) を使

50

用したPCRによりcDNAが増幅された。プール調製で上述したようにテンプレートが転写され、変性ポリアクリルアミドゲルで精製された。

【0220】

全てのラウンドは、疎水性プレートに固定されたh-IgEにより行われた。各選択ラウンドが、Nunc Maxisorp疎水性プレートの表面に24 pmolのh-IgEを100 µLの1X DPBS中で、室温で1時間固定することにより開始された。プレートが120 µL DPBSにより四回洗浄されてから、ブロッキングバッファー（1X DPBS、および0.1 mg/mL BSA）で1時間インキュベートされた。そして、上清が除去され、120 µL 1X DPBSによりウェルが四回洗浄された。ラウンド2から開始して、プールRNAは空のウェルで、室温で1時間インキュベートされた。100 µLのブロッキングバッファーで先にブロックされたウェルで1時間インキュベートされた。ラウンド2から先は、非特異的競合物が、正の選択ステップに加えられた（0.1 mg/mL tRNA、および0.1 mg/mL ssDNA）。全ての場合において、固定されたh-IgEに結合したプールRNAは、逆転写（「RT」）混合物（3'プライマ、配列番号27、およびThermoscript RT、Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド）の添加後65℃で1時間インキュベートすることにより、直接選択プレートにおいて逆転写された。得られたcDNAは、ラウンド1につき記載されるように、PCR（Taqポリメラーゼ、New England Biolabs、マサチューセッツ州ベヴァリー）および転写のテンプレートとして使用された。各ラウンドの条件が、表6にある。

【0221】

【表6】

表6. ラウンドまとめ

ラウンド	プール (nM)	プラット フォーム	陰性	バッファー	競合物	洗浄	標的
1	3300	プレート	なし	1X DPBS	なし	4 x 120 µL	24 pモル
2	500	プレート	プレート; BSAプレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA ; 0.1 mg/mL ssDNA	4 x 120 µL	24 pモル
3	1000	プレート	プレート; BSAプレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA ; 0.1 mg/mL ssDNA	4 x 120 µL	24 pモル
4	1000	プレート	プレート; BSAプレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA ; 0.1 mg/mL ssDNA	4 x 120 µL	24 pモル
5	1000	プレート	プレート; BSAプレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA ; 0.1 mg/mL ssDNA	4 x 120 µL	24 pモル
6	1000	プレート	プレート; BSAプレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA ; 0.1 mg/mL ssDNA	4 x 120 µL	24 pモル
7	1000	プレート	プレート; BSAプレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA ; 0.1 mg/mL ssDNA	4 x 120 µL	24 pモル
8	1000	プレート	プレート; BSAプレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA ; 0.1 mg/mL ssDNA	4 x 120 µL	24 pモル
9	1000	プレート	プレート; BSAプレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA ; 0.1 mg/mL ssDNA	4 x 120 µL	24 pモル
10	1000	プレート	プレート; BSAプレート	1X DPBS	1.0 mg/mL tRNA ; 1.0 mg/mL ssDNA	8 x 120 µL (最終洗浄 =15分)	24 pモル
11	500	プレート	プレート; BSAプレート	1X DPBS	1.0 mg/mL tRNA ; 1.0 mg/mL ssDNA	8 x 120 µL (最終洗浄 =15分)	24 pモル
12	500	プレート	プレート; BSAプレート	1X DPBS	1.0 mg/mL tRNA ; 1.0 mg/mL ssDNA	8 x 120 µL (最終洗浄 =15分)	24 pモル

MNAアプタマー結合分析

プールのタンパク質結合親和性をモニタするために、選択の全体にわたりドットプロット結合アッセイが行われた。トレース³²P-エンド標識したプールRNAが、h-IgEと組み合わせられ、DPBSバッファー中で30 µLの最終体積で、30分間室温でイン

キュベートされた。混合物がドットブロット装置に適用され (Mini fold-1 Dot Blot、Acrylic、Schleicher and Schuell、ニューハンプシャー州キーン)、(上から下へ) ニトロセルロース、ナイロン、およびゲルブロット膜とアSEMBLされた。タンパク質に結合されたRNAは、ニトロセルロースフィルタに捕らえられ; 非タンパク結合RNAは、ナイロンフィルタに捕らえられる。ラウンド8でh-IgE結合の濃縮の開始が見られた。ラウンド5、8および12のプールテンプレートが、TOPO TAクローニングキット (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) を使用して製造者の指示に従ってクローニングされた。配列決定データから、ラウンド8のプールが全配列の59%を含む単一の主要クローンに収束したことが明らかになった。この主要クローンと三つの可能性のあるミニマーが化学合成のために選択され、解離定数 (K_D) が決定された。簡単にいうと、合成RNAsが γ - ^{32} P ATPで5'末端標識され、ドットブロットアッセイおよび1X DPBS (w/Ca²⁺およびMg²⁺) (Gibco、Catalog #14040、Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) のバッファー条件を用いてKD値が決定された。式: RNA結合画分=振幅*(((AptConc+[h-IgE])+KD)-SQRT(((AptConc+[h-IgE])+KD)²-4(AptConc*[h-IgE])))/(2*AptConc))+バックグラウンドにデータをあてはめてKDsが推定された。主要クローンは、約800pMの K_D を有した。最善の結合のミニマーの、サルIgE(m-IgE)に対する結合もテストされたが、サルIgEタンパク質に対する交差反応結合は示されなかった。この交差反応性の欠如は、ELISAによっても確認された。3'末端に逆方向dTを伴うミニマーが、医薬品化学プロセスの親分子として用いられた。

【0222】

医薬品化学

IgE特異的MNAミニマーの一つの化学組成(図9)が、化合物の血漿安定性を維持しながら親和性および能力を改善するために変更された。プロセスは、最小化IgEアプタマーの一連の誘導体の設計、合成および評価を含み、一連の各誘導体は、いずれの残基が置換に耐えるかを決定するため、各所定のヌクレオチドで単一の修飾を含んだ。第一修飾組は、各ユニーク2'-OMeヌクレオチドへのデオキシヌクレオチドの置換であった。別個の修飾ラウンドにおいては、各誘導体が異なるヌクレオチド間結合位置で単一のホスホロチオエート修飾を含む一連の誘導体が合成された。これらの修飾の最初の段階において生成されたデータを用いて、最小化アプタマーの構造活性相関(SAR)が確立された。後の修飾段階においては、最初のSARデータに基づいて設計された複合置換組でアプタマーが合成され、テストされた。複合置換パネルから、2'-OMeから2'-デオキシへの置換がその組成に導入された、39ヌクレオチドの長さのアプタマーが同定された。さらに、2'-OMeから2'-デオキシへの一つの置換およびリン酸塩からホスホロチオエートへの四つの置換がその組成に導入された、39ヌクレオチドの長さの、得られた最小化修飾アプタマーが同定された。図10に示すように、このデオキシ/ホスホロチオエート修飾アプタマーは、最小化非修飾親アプタマーならびに二つの2'-OMeからデオキシへの置換を有する最小化親アプタマーの両方と比較して、結合親和性の増加を示す。

【0223】

血清安定性

最小化非修飾親アプタマーおよびデオキシ/ホスホロチオエート修飾アプタマーが、ヒト、ラットおよびサル血清における安定性を決定するためにアッセイされた。各アプタマーが、90%血清中5 μ Mの最終濃度になるように、1mlのプール血清に加えられた。アプタマーは振盪を伴って37℃でインキュベートされ、0、0.5、1、4、24、48、72、および98時間でタイムポイントがとられた。各タイムポイントで、インキュベート試料からの90 μ lのストックが、10 μ lの0.5M EDTAに加えられ、BIACORE 2000システムを用いた後の安定性分析のために-20℃で冷凍された

。

【0224】

全てのバイオセンサ結合測定が、研究等級のCM5バイオセンサチップを備えたBIA CORE 2000 (BIA CORE Inc.、ニュージャージー州ピスカタウェイ) を使用して、25℃で行われた。精製された組換えヒトIgE (Athens Research & Technology、ジョージア州アセンズ) が、アミノ-カップリング化学を用いてバイオセンサ表面に固定された。これを達成するために、二つのフローセルの表面が、まず0.1M NHS (Nヒドロキシスクシンイミド) および0.4M EDC (3-(N,Nジメチルアミン) プロピル-N-エチルカルボジイミド) の1:1混合物で、5μl/分の流速で7分間活性化された。表面活性化の後、活性化された表面に 10

【0225】

全てのタイムポイントが分析される前に、調製されたチップに一連のアプタマースタANDARDが通されて、標準曲線が生成された。標準曲線を確認するために、アプタマーが、4%ヒト血清および50mM EDTAが添加されたHBS-Pバッファー (10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、0.005% Surfactant 20) に、連続的に希釈された (200nMから12.5nMへ)。全ての希釈サンプルがBiacore 2000に注入されて20μl/分で5分間結合され、3分間置かれた。チップを再生させるために、1N NaClが30μl/分で60秒間注入された。結合段階の最後のRUピーク反応がアプタマー濃度に対してプロットされ、Four-Parameterロジスティック関数を用いて標準曲線が生成された。ヒト、ラット、およびサル血清における活性アプタマー濃度を測定するために、タイムポイントサンプルが、Biacore 2000への注入の直前に最終血清濃度が4%となるように、HBS-P中22.5倍に希釈された。上で生成された標準曲線を用いてRU反応単位から濃度に変換することにより、各血清インキュベーションピリオドの機能的アプタマー濃度が計算された。追加的な品質制御措置として、二つのアプタマースタANDARDが実験の最後に 30

独立してテストされて、BIA COREで測定された濃度のスタンダードからの逸脱が20%未満であることが確認された。最小化非修飾親アプタマーおよびデオキシ/ホスホロチオエート修飾アプタマーは、ヒト、ラット、およびサル血清中でいずれも98時間で90%以上活性であることが決定された。

【0226】

(実施例6) Y639L/H784A/K378R変異T7RNAポリメラーゼを用いたアプタマー選択

2'-OMe ATP、GTP、およびUTPヌクレオチド、および2'-デオキシCTPヌクレオチド (以下に「dCMD」) からなるプールを用いて、ヒトフォンビルブラント因子 (以下に「h-vWF」) に対するアプタマーを同定するために、選択が行われた。選択戦略から、h-vWFに特異的な高親和性アプタマーが生じた。 40

【0227】

ヒトvWFは、EMD Biosciences Inc. (Cat. #681300、カリフォルニア州ラホーヤ) から購入された。ヒトvWF A1ドメインが発現および精製された。変異ポリメラーゼ (Y639L/H784A/K378R) が、上述の実施例1に記載したように発現および精製された。2'-OMe ATP、GTP、およびUTPヌクレオチド、および2'-デオキシCTPヌクレオチドは、TriLink Bio Technologies (カリフォルニア州サンディエゴ) から購入された。

【0228】

vWFアプタマーの選択

全てのラウンドが、疎水性プレートに固定された h-vWF により行われた。10 pmol の h-vWF および 10 pmol の ヒト vWF A1ドメインを、Nunc Maxi sorp 疎水性プレートの表面に 100 μL の 1X DPBS 中で、室温で 30 分間固定することにより、最初の三つの選択ラウンドが開始された。ラウンド 4 で開始して、20 pmol の h-vWF が疎水性プレートに 2 ラウンド固定された後、20 pmol のヒ

50

ト vWF A1ドメインが疎水性プレートに一ラウンド固定された。プレートは、200 μ L DPBSにより三回洗浄されてから、ブロッキングバッファー (1X DPBS および 5% HSA) で 30 分間インキュベートされた。それから上清が除去され、200 μ L DPBSによりウェルが三回洗浄された。ラウンド 2 から始まり、プール RNA が室温で 30 分間空のウェルでインキュベートされてから、100 μ L ブロッキングバッファーにより先にブロックされたウェルで 30 分間インキュベートされた。ラウンド 2 から先は、正の選択ステップに非特異的競争物が加えられた (0.1 mg/mL tRNA)。いずれの場合も、固定標的に結合されたプール RNA が、逆転写 (「RT」) 混合物 (3' プライマ、配列番号 30、および Thermoscript RT、Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) の添加およびその後の 65 °C での 1 時間のインキュベートにより、直接選択プレートにおいて逆転写された。ラウンド 1 につき記載されるように、得られた cDNA が、PCR (Taq ポリメラーゼ、New England Biolabs、マサチューセッツ州ベヴァリー) および転写のテンプレートとして用いられた。各ラウンドの条件が、表 7 にある。

【0233】

【表 7】

表 7. ラウンドまとめ

ラウンド	プール (nM)	プラット フォーム	陰性	バッファー	競合物	洗浄	標的
1	3300	プレート	なし	1X DPBS	なし	5 x 200 μ L	10 pモル vWF, 10 pモル A1ドメイン
2	200	プレート	プレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA	5 x 200 μ L	10 pモル vWF, 10 pモル A1ドメイン
3	200	プレート	プレート:HSAプレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA	5 x 200 μ L	10 pモル vWF, 10 pモル A1ドメイン
4	200	プレート	プレート:HSAプレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA	5 x 200 μ L	20 pモル vWF
5	200	プレート	プレート:HSAプレート	1X DPBS	1 mg/mL tRNA	5 x 200 μ L	20 pモル vWF
6	200	プレート	プレート:HSAプレート	1X DPBS	1 mg/mL tRNA	5 x 200 μ L	20 pモル A1ドメイン

d C m D アプタマー結合分析

プールのタンパク質結合親和性をモニタするために、選択の全体にわたりドットプロット結合アッセイが行われた。トレース ^{32} P-エンド標識したプール RNA が、h-vWF と組み合わされ、DPBS バッファー中で 30 μ L の最終体積で、室温で 30 分間インキュベートされた。混合物がドットプロット装置に適用され (Minifold-1 Dot Blot、Acrylic、Schleicher and Schuell、ニューハンプシャー州キーン)、(上から下へ) ニトロセルロース、ナイロン、およびゲルプロット膜とアセンブルされた。タンパク質に結合された RNA は、ニトロセルロースフィルタに捕らえられ；非タンパク結合 RNA は、ナイロンフィルタに捕らえられる。ラウンド 5 で h-vWF 結合の濃縮の開始が見られた。ラウンド 5 およびラウンド 6 プールの解離定数 (K_D) が決定された。簡単にいうと、プール RNA s が γ - ^{32} P ATP で 5' 末端標識され、ドットプロットアッセイおよび 1X DPBS (w/Ca²⁺ および Mg²⁺) (Gibco、Catalog # 14040、Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) のバッファー条件を用いて K_D 値が決定された。式: RNA 結合画分 = 振幅 * ((Apt Conc + [h-vWF] + K_D) - SQRT((Apt Conc + [h-vWF] + K_D)² - 4(Apt Conc * [h-vWF]))) / (2 * Apt Conc) + バックグラウンドにデータをあてはめて K_D s が推定された。ラウンド 6 プールは、約 2 nM の K_D を有した。プールは、A1ドメインに対する結合についてもテストされ、約 4 nM の K_D を有した。

【0234】

(実施例 7) Y639L/H784A/K378R 変異 T7 RNA ポリメラーゼを用いたアプタマー選択

【 0 2 3 5 】

10

【 0 2 3 6 】

プール調製

配列

【 0 2 3 7 】

【化 1 7】

[illegible]

20

NNNNNNNNNCATATGTGCGTCTACATGGATCCTCA -3' ARC4218 (配列番号

28)

のDNAテンプレートが、ABI EXPEDITE (商標) (Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ) DNA合成装置用いて合成され、標準法により脱保護された。テンプレートは、プライマ

【 0 2 3 8 】

【化 1 8】

(5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAATTCCGACCACAAG-3')

ARC4219 (配列番号29)および(5'-TGAGGATCCATGTAGACGCACATATG-3')

30

ARC4208 (配列番号30)

により増幅されてから、T7 RNAポリメラーゼ（Y639L/H784A/K378R）による *in vitro* 転写のテンプレートとして使用された。200 mM HEPES、40 mM DTT、2.0 mM スペルミジン、0.01 % w/v Triton X-100、10 % PEG-8000、8 mM MgCl₂、2.5 mM MnCl₂、1.5 mM dCTP、1.5 mM mUTP、1.5 mM mGTP、1.5 mM mATP、1 mM GMP、0.01 単位/μL 無機ピロホスファターゼ、および ~9 μg/mL 変異 T7 ポリメラーゼ（Y639L/H784A/K378R）および 0.3 μM テンプレート DNA を用いて転写が行われ、ARC4218 dCmD プールが生成された。

40

【 0 2 3 9 】

選擇

330 pmol (2×10^{14} 分子) の dCmD ARC4218 プールを、HSA ブロックされた疎水性プレート (Maxisorp プレート、Nunc、ニューヨーク州 ロchester) に結合した 20 pmol のタンパク質とともに 100 μ L の最終体積の選択バッファー (1X Dulbecco の PBS (DPBS)) 中で、室温で 1 時間インキュベートすることにより選択が開始された。ウェルは、非特異的結合物を除去するために、200 μ L DPBS により五回洗浄された。RNA が溶出され、プライマ ARC4208 (配列番号 30) を用いて、ThermoScript RT-PCR (商標) システム (Invitrogen、カリフォルニア州 カールズバッド) により、製造者の指

50

示に従って逆転写された。プライマARC4219（配列番号29）およびARC4208（配列番号30）を用いて、製造者の指示に従って、Taqポリメラーゼ（New England Biolabs、マサチューセッツ州ベヴァリー）を用いたPCRにより、cDNAが増幅された。プール調製につき上述したように、テンプレートが転写された。エタノール沈殿によりテンプレートが精製された後、Micro Bio-spinカラム（Cat. #732-6250、Bio-Rad Laboratories、カリフォルニア州ハーキュリーズ）を用いて脱塩ステップが行われた。

【0240】

全てのラウンドが、疎水性プレートに固定されたh-IgEにより行われた。各選択ラウンドが、Nunc Maxisorp疎水性プレートの表面に20 pmolのh-IgEを100 μ Lの1X DPBS中で、室温で30分間固定することにより開始された。プレートは、200 μ L DPBSにより三回洗浄されてから、ブロッキングバッファー（1X DPBS、および5% HSA）で30分間インキュベートされた。そして上清が除去され、200 μ L DPBSによりウェルが三回洗浄された。ラウンド2から開始して、プールRNAが空のウェルにおいて室温で30分間インキュベートされてから、100 μ Lのブロッキングバッファーで先にブロックされたウェルで30分間インキュベートされた。ラウンド2から先は、非一特異的競合物が正の選択ステップに加えられた（0.1 mg/mL tRNA）。全ての場合において、固定されたh-IgEに結合したプールRNAは、逆転写（「RT」）混合物（3'プライマ、配列番号30、およびThermoscript RT、Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド）の添加と、その後の65℃での1時間のインキュベーションにより、直接選択プレートにおいて逆転写された。得られたcDNAが、ラウンド1につき記載されるように、PCR（Taqポリメラーゼ、New England Biolabs、マサチューセッツ州ベヴァリー）および転写のテンプレートとして使用された。各ラウンドの条件が、表8にある。

【0241】

【表8】

表8. ラウンドまとめ

ラウンド	プール (nM)	プラット フォーム	陰性	バッファー	競合物	洗浄	標的
1	3300	プレート	なし	1X DPBS	なし	5 x 200 μ L	20 pモル
2	200	プレート	プレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA	5 x 200 μ L	20 pモル
3	200	プレート	プレート; HSAプレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA	5 x 200 μ L	20 pモル
4	200	プレート	プレート; HSAプレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA	5 x 200 μ L	20 pモル
5	200	プレート	プレート; HSAプレート	1X DPBS	0.1 mg/mL tRNA	5 x 200 μ L	20 pモル
6	200	プレート	プレート; HSAプレート	1X DPBS	1 mg/mL tRNA	5 x 200 μ L	20 pモル

d CmDアプタマー結合分析

プールのタンパク質結合親和性をモニタするために、選択の全体にわたりドットブロット結合アッセイが行われた。トレース^{3 2}P-エンド標識したプールRNAが、h-IgEと組み合わされ、DPBSバッファー中で30 μ Lの最終体積で、室温で30分間インキュベートされた。混合物がドットブロット装置に適用され（Minifold-1 Dot Blot、Acrylic、Schleicher and Schuell、ニューハンプシャー州キーン）、（上から下へ）ニトロセルロース、ナイロン、およびゲルブロット膜とアセンブルされた。タンパク質に結合されたRNAはニトロセルロースフィルタに捕らえられ；非タンパク結合RNAはナイロンフィルタに捕らえられる。ラウンド5でh-IgE結合の濃縮の開始が見られた。ラウンド5および6プールの解離定数（ K_D ）が決定された。簡単にいうと、プールRNAが γ -^{3 2}P-ATPで5'末端標識され、ドットブロットアッセイおよび1X DPBS（w/Ca²⁺およびMg²⁺）（Gibco、Catalog #14040、Invitrogen、カリフォルニア州カ

ールズバッド)のバッファー条件を用いて K_D 値が決定された。式： $RNA結合画分 = 振幅 * ((Apt Conc + [h-IgE] + KD) - SQRT((Apt Conc + [h-IgE] + KD)^2 - 4(Apt Conc * [h-IgE]))) / (2 * Apt Conc)$ +バックグラウンドにデータをあてはめて K_D sが推定された。ラウンド6プールは、約80 nMの K_D を有した。

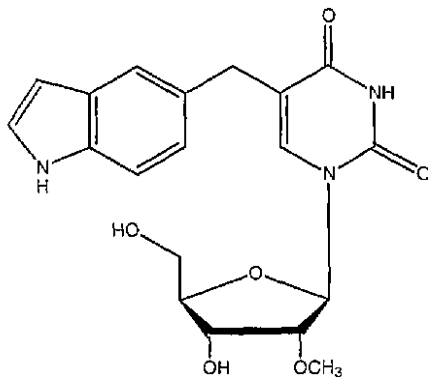
【0242】

(実施例8) 2'-O-メチルATP、CTP、GTPおよび2'-O-メチル-5-インドリルメチレンUTPヌクレオチドを導入する転写

Y639L/H784A/K378R変異ポリメラーゼが、*in vitro*転写を用いて2'-O-メチルA、C、Gおよび2'-O-メチル-5-インドリルメチレンUを転写産物に導入するために用いられる。修飾ウリジンが、以下にヌクレオシドとして示される：

【0243】

【化19】



200 mM HEPES、40 mM DTT、2 mM スペルミジン、0.01 % w/v Triton X-100、10 % PEG-8000、8 mM $MgCl_2$ 、2.5 mM $MnCl_2$ 、1.5 mM mCTP、1.5 mM 5-インドリル-mUTP、1.5 mM mGTP、1.5 mM mATP、1 mM GMP、0.01 単位/ μ L 無機ピロホスファターゼ、および $\sim 9 \mu$ g/mL 変異T7ポリメラーゼ(Y639L/H784A/K378R)および0.3 μ M テンプレートDNAを用いて、37℃で一晩転写が行われて、5'-末端に単一の2'-ヒドロキシGMPを伴う2'-OMe A、2'-OMe G、2'-OMe Cおよび2'-OMe-5-インドリルメチレンUからなる転写産物が生成される(以下に「MNA-I」)。各条件下の転写産物が、400 μ Lの反応混合物を用いてPAGEゲル分析によりアッセイされ、各条件での転写産物が、PAGEゲルのUV-シャドウイングから視覚化される。

【0244】

(実施例9) Y639L/H784A/K378R変異T7 RNAポリメラーゼおよび2'-O-メチル-5-インドリルメチレンウリジンを用いたSELEX

治療目的のタンパク質標的に対するSELEXが、複数の縮重位置および上の実施例7に記載のMNA-I転写条件を含む転写テンプレートを用いて実行される。

【0245】

最終体積100 μ Lの選択バッファー(1X DulbeccoのPBS (DPBS))において、HSAブロックされた疎水性プレート(Maxisorpプレート、Nunc、ニューヨーク州ロチェスター)に結合した20 pmolのタンパク質とともに330 pmol (2×10^{14} 分子)のMNA-I転写ライブラリを1時間室温でインキュベートすることにより、選択ステップが開始される。非特異的結合物を除去するために、200 μ L DPBSによりウェルが五回洗浄される。製造者の指示に従ってThermoScript RT-PCR (商標) (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバ

ッド)を用いて、選択ウェル中でRNAが逆転写される。得られたcDNAが、T7RNAポリメラーゼプロモータをコードする5'プライマを用いて、製造者の指示に従って、Taqポリメラーゼ(New England Biolabs、マサチューセッツ州ベヴァリー)によるPCRにより増幅される。得られた転写テンプレートが、MNA-I条件下で上述のように転写される。エタノール沈殿により、得られた転写産物が精製され、その後Micro Bio-spinカラム(Cat. #732-6250、Bio-Rad Laboratories、カリフォルニア州ハーキュリーズ)を用いた脱塩ステップが行われる。

【0246】

10ラウンドのSELEXの後、得られた転写産物ライブラリが逆転写され、PCRにより増幅され、クローニングおよび配列決定される。個々のクローンがMNA-I条件下で転写され、標的タンパク質を結合および阻害する能力につきアッセイされる。

【0247】

(実施例10) 2'-OMe TTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTP、2'-OMe GTPヌクレオチドを導入する転写(mTmV組成物)

200nMの40ヌクレオチドの内側の連続縮重領域を伴う二本鎖転写テンプレート、200mM HEPES、40mM DTT、2mMスベルミジン、0.01% Triton X-100、各1.5mMの2'-OMe TTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTP、2'-OMe GTP、8mM MgCl₂、2.5mM MnCl₂、1mM GMP、10% PEG 8000、2.5単位/ml無機ピロホスファターゼ、pH7.5およびK378R/Y639F/H784A変異T7ポリメラーゼにより、400ul転写が準備された。溶液が37℃で一晩インキュベートされ、沈殿され、変性ローディングバッファーに溶解され、変性PAGEを用いて分析された後、UVシャドウイングを用いて蛍光板上で可視化された。隣接するウェルにロードされた対応するMNA転写産物と共に移動したバンドが観察された。2'-OMe TTPを伴わずにインキュベートされた陰性対照転写物は、観察可能なバンドを生成しなかった。

【0248】

(実施例11) デオキシTTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTP、2'-OMe GTPヌクレオチドを導入する転写(dTmV組成物)

200nMの二本鎖転写テンプレートARC3205、200mM HEPES、40mM DTT、2mMスベルミジン、0.01% Triton X-100、各1.5mMの2'-デオキシTTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTP、2'-OMe GTP、8mM MgCl₂、2.5mM MnCl₂、1mM GMP、10% PEG 8000、2.5単位/ml無機ピロホスファターゼ、pH7.5およびK378R/Y639F/H784A変異T7ポリメラーゼにより、400ul転写が準備された。溶液が37℃で一晩インキュベートされ、沈殿され、変性ローディングバッファーに溶解され、変性PAGEを用いて分析された後、UVシャドウイングを用いて蛍光板上で可視化された。隣接するウェルにロードされた対応するMNA転写産物と共に移動したバンドが観察された。2'-デオキシTTPを伴わずにインキュベートされた陰性対照転写物は、観察可能なバンドを生成しなかった。

【0249】

(実施例12) 2'-OH TTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTP、2'-OMe GTPヌクレオチドを導入する転写(rTmV組成物)

200nMの40ヌクレオチドの内側の連続縮重領域を伴う二本鎖転写テンプレート、200mM HEPES、40mM DTT、2mMスベルミジン、0.01% Triton X-100、各1.5mMの2'-OH TTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTP、2'-OMe GTP、8mM MgCl₂、2.5mM MnCl₂、1mM GMP、10% PEG 8000、無機ピロホスファターゼ2.5単位/ml、pH7.5およびK378R/Y639F/H784A変異T7ポリメラーゼにより、400ul転写が準備された。溶液が37℃で一晩インキュベートされ、沈殿され、変性ロー

ディングバッファーに溶解され、変性PAGEを用いて分析された後、UVシャドウイングを用いて蛍光板上で可視化された。隣接するウェルにロードされた対応するMNA転写産物と共に移動したバンドが観察された。2'-OH UTPを伴わずにインキュベートされた陰性対照転写物は、観察可能なバンドを生成しなかった。

【0250】

(実施例13) デオキシUTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTP、2'-OMe GTPヌクレオチドを導入する転写 (dUmV組成物)

200 nMの二本鎖転写テンプレートARC3205、200 mM HEPES、40 mM DTT、2 mM スペルミジン、0.01% Triton X-100、各1.5 mMの2'-デオキシUTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTP、2'-OMe GTP、8 mM MgCl₂、2.5 mM MnCl₂、1 mM GMP、10% PEG 8000、無機ピロホスファターゼ2.5単位/ml、pH 7.5およびK378R/Y639F/H784A変異T7ポリメラーゼにより、400 µl転写が準備された。溶液が37℃で一晩インキュベートされ、沈殿され、変性ローディングバッファーに溶解され、変性PAGEを用いて分析された後、UVシャドウイングを用いて蛍光板上で可視化された。隣接するウェルにロードされた対応するMNA転写産物と共に移動したバンドが観察された。2'-デオキシUTPを伴わずにインキュベートされた陰性対照転写物は、観察可能なバンドを生成しなかった。

【0251】

(実施例14) 2'-OH UTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTP、2'-OMe GTPヌクレオチドを導入する転写 (rUmV組成物)

200 nMの二本鎖転写テンプレートARC3205、200 mM HEPES、40 mM DTT、2 mM スペルミジン、0.01% Triton X-100、各1.5 mMの2'-OH UTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTP、2'-OMe GTP、8 mM MgCl₂、2.5 mM MnCl₂、1 mM GMP、10% PEG 8000、無機ピロホスファターゼ2.5単位/ml、pH 7.5およびK378R/Y639F/H784A変異T7ポリメラーゼにより、400 µl転写が準備された。溶液が37℃で一晩インキュベートされ、沈殿され、変性ローディングバッファーに溶解され、変性PAGEを用いて分析された後、UVシャドウイングを用いて蛍光板上で可視化された。隣接するウェルにロードされた対応するMNA転写産物と共に移動したバンドが観察された。2'-OH UTPを伴わずにインキュベートされた陰性対照転写物は、観察可能なバンドを生成しなかった。

【0252】

(実施例15) 2'-OH GTP、デオキシTTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTPヌクレオチドを導入する転写 (rGdTM組成物)

200 nMの二本鎖転写テンプレートARC3205、200 mM HEPES、40 mM DTT、2 mM スペルミジン、0.01% Triton X-100、各1.5 mMの2'-デオキシTTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTP、2'-OH GTP、8 mM MgCl₂、2.5 mM MnCl₂、1 mM GMP、10% PEG 8000、無機ピロホスファターゼ2.5単位/ml、pH 7.5およびK378R/Y639F/H784A変異T7ポリメラーゼにより、400 µl転写が準備された。溶液が37℃で一晩インキュベートされ、沈殿され、変性ローディングバッファーに溶解され、変性PAGEを用いて分析された後、UVシャドウイングを用いて蛍光板上で可視化された。隣接するウェルにロードされた対応するMNA転写産物と共に移動したバンドが観察された。2'-デオキシTTPを伴わずにインキュベートされた陰性対照転写は、観察可能なバンドを生成しなかった。

【0253】

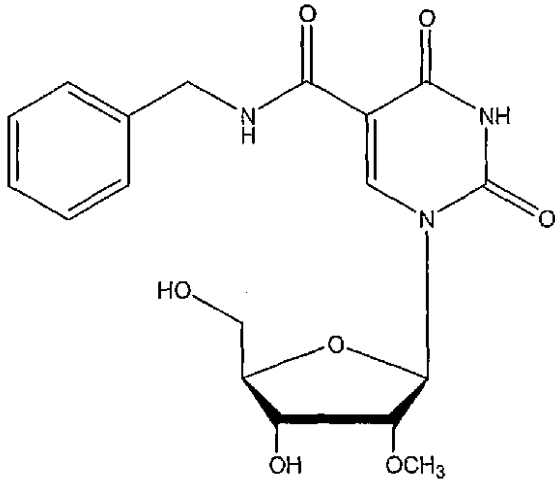
(実施例16) 2'-OMe QTP、2'-OH GTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTPヌクレオチドを導入する転写 (mQrGM組成物)

200 nMの40ヌクレオチドの内側の連続縮重領域を伴う二本鎖転写テンプレート、

200mM HEPES、40mM DTT、2mMスぺルミジン、0.01% Triton X-100、各1.5mMの2'-OMe QTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTP、2'-OH GTP、8mM MgCl₂、2.5mM MnCl₂、1mM GMP、10%PEG8000、無機ピロホスファターゼ2.5単位/ml、pH7.5およびK378R/Y639F/H784A変異T7ポリメラーゼにより、400ul転写が準備された。2'-OMe QTP (mQ) が下に示される：

【0254】

【化20】



10

20

溶液が37℃で一晩インキュベートされ、沈殿され、変性ローディングバッファーに溶解され、変性PAGEを用いて分析された後、UVシャドウイングを用いて蛍光板上で可視化された。隣接するウェルにロードされた対応するMNA転写産物と共に移動した明らかなバンドが観察された。2'-OMe QTPを伴わずにインキュベートされた陰性対照転写物は、観察可能なバンドを生成しなかった。

【0255】

(実施例17) 修飾および野生型T7ポリメラーゼを用いて2'-OMe UTP、2'-OMe ATP、2'-OMe GTP、2'-OMe CTPまたは2'-OH NTPsを導入する転写 (rGdTmM組成物)

30

50nMの30ヌクレオチドの内側の連続縮重領域を伴う二本鎖転写テンプレート、200mM HEPES、40mM DTT、2mMスぺルミジン、0.01% Triton X-100、各1.5mMの2'-OMe UTP、2'-OMe ATP、2'-OMe CTPおよび2'-OMe GTP、または各1.5mMの2'-OH UTP、2'-OH ATP、2'-OH CTPおよび2'-OH GTP、8mM MgCl₂、2.5mM MnCl₂、1mM GMP、10%PEG8000、無機ピロホスファターゼ2.5単位/ml、pH7.5および以下に示される変異または野生型T7ポリメラーゼ (WTがK378R、FがK378R/Y639F、LがK378R/Y639L、FAがK378R/Y639F/H784A、LAがK378R/Y639L/H784A) により、400ulの転写が準備された。溶液が37℃で一晩インキュベートされ、沈殿され、変性ローディングバッファーに溶解され、変性PAGEを用いて分析された後、UVシャドウイングを用いて蛍光板上で可視化された。図11に示されるように、異なる転写の収率が観察された。

40

【0256】

説明および実施例により本発明を記載してきたが、当業者には当然のことながら、本発明は様々な実施形態において実施することができ、以上の説明および実施例は説明を目的としたものであり、以下の請求の範囲を制限するためのものではない。

【図 5】

相対的転写収率*	ARC2118	ARC2119
[rGTP] 0uM	40	49
[rGTP] 5uM	74	62
[rGTP] 10uM	94	21
[rGTP] 20uM	100	30
[rGTP] 40uM	95	36
[rGTP] 80uM	93	41
[rGTP] 160uM	95	32

Fig. 5

【図 6】

転写物成分濃度	転写条件1	転写条件2	転写条件3	転写条件4
[MgCl2]	5mM	6.5mM	8mM	9.5mM
[MnCl2]	1.5mM	2mM	2.5mM	3mM
[2'-OMe NTP] (各)	0.5mM	1mM	1.5mM	2mM
相対的収率	0.8	1.0	1.5	1.6

Fig. 6

【図 7】

	欠失	挿入	置換	完全 N30	N
2'-OH RNA1	0.7%	0.0%	0.3%	74%	1936
2'-OMe RNA1	0.6%	0.6%	1.2%	49%	1584
2'-OMe RNA2	0.0%	0.0%	0.23%	93%	1300

Fig. 7

【図 8】

	合計	A	G	C	T	N
開始ライブラリ	1206	21.9%	28.3%	24.1%	25.0%	0.66%
転写後ライブラリ	1386	25%	25.3%	21.5%	28.1%	0.0%

Fig. 8

【図 9】

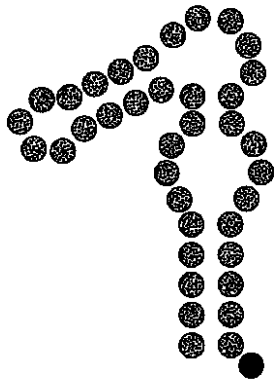


Fig. 9

【図 11】

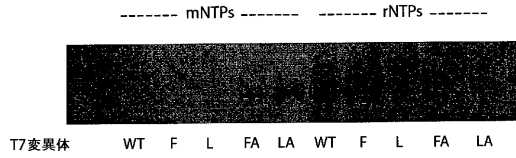


Fig. 11

【図 10】

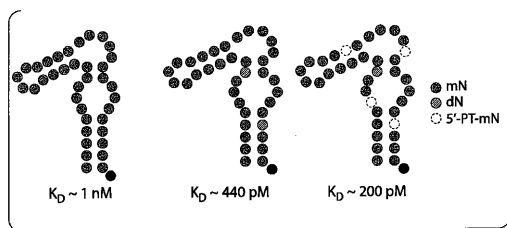


Fig. 10

【配列表】

0005349323000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ディーナー, ジョン エル.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, ブリストル ストリート
87, ユニット 1 ビー
- (72)発明者 キーフ, アンソニー ドミニク
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02140, ケンブリッジ, ベリス サークル 9 ナ
ンバー 6

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 国際公開第2006/033854 (WO, A1)
特許第5015923 (JP, B2)
特表2006-508688 (JP, A)
国際公開第2005/010150 (WO, A1)
Database GenBank, [online], Accession No. 2PI5_A, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/150261384?sat=11&satkey=3701067>>, 公知日: 2007年6月19日, [平成24年12月20日検索], DEFINITION: Chain A, T7 Rna Polymerase Complexed With A Phi10 Promoter.
Database GenBank, [online], Accession No. BAB69431, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/15824083?sat=43&satkey=2149660>>, 公知日: 2004年10月19日, [平成24年12月20日検索], DEFINITION: T7 bacteriophage-type single subunit RNA polymerase [Nicotiana sylvestris].
Database GenBank, [online], Accession No. BAC98395, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/37360973?sat=43&satkey=815238>>, 公知日: 2004年10月30日, [平成24年12月20日検索], DEFINITION: T7 bacteriophage-type single subunit RNA polymerase (mitochondrion) [Oryza sativa Japonica Group].
Chem. Biol., 2005年 1月, vol.12, no.1, pp.25-33
Nat. Biotechnol., 2004年, vol.22, no.9, pp.1155-1160
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005年 4月, vol.102, no.17, pp.5958-5963

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C12Q 1/68
WPI
PubMed
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)