

大 生 大 發 明 專 利 說 明 書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96142969

※申請日期：96.11.14

※IPC 分類：

C12N^{15/11} (2006.01)

C07K^{14/435} (2006.01)

A61K^{38/16} (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

對中期因子之適體及其使用

APTAMER FOR MIDKINE AND USE THEREOF

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：(中文/英文)

力博美科股份有限公司

RIBOMIC INC.

代表人：(中文/英文) 西山道久/NISHIYAMA, MICHIHISA

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國東京都港區白金台三丁目16番13號

16-13, Shirokanedai 3-chome, Minato-ku, Tokyo, Japan

國 籍：(中文/英文) 日本國/JAPAN

三、發明人：(共5人)

姓 名：(中文/英文)

1. 宮川伸 / MIYAKAWA, SHIN

2. 藤原將壽(藤原将寿) / FUJIWARA, MASATOSHI

3. 中村義一 / NAKAMURA, YOSHIKAZU

4. 松井隆 / MATSUI, TAKASHI

5. 佐久間貞俊 / SAKUMA, SADATOSHI

國 籍：(中文/英文) 1.至5. 日本國/JAPAN

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本國 2006 年 11 月 14 日 特願 2006-308482 (主張優先權)

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明提供對中期因子之良質適體。

對中期因子具有阻礙活性之適體；含有對中期因子具有結合活性或阻礙活性之適體及機能性物質(例如親和性物質、標識用物質、酵素、藥物送達介質或藥物等)之複合體；含有對中期因子具有結合活性或阻礙活性之適體或該適體及機能性物質之複合體的醫藥、細胞遊走阻礙劑、診斷藥及標識劑等。

六、英文發明摘要：

This invention provides a quality aptamer for midkine.

This invention provides an aptamer having inhibition activity for midkine; a composite containing an aptamer having binding activity or inhibition activity for midkine and a functional material (such as affinity material, labeled material, enzyme, drug delivery medium or drug, etc.); a medicine, a cell migration inhibitor, a diagnostic drug and a labeled agent and the like, containing an aptamer having binding activity or inhibition activity for midkine and a composite containing the said aptamer and functional material.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：無。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關對中期因子(midkine)之適體(aptamer)及其利用方法等。

【先前技術】

中期因子(midkine：以下，必要時省略為「MK」)為在因肺性腫瘍細胞(EC)之視黃酸(retinoic acid)分化誘導過程中，作為暫時性表現之基因之產物而被發現之增殖·分化因子，為富含鹼性胺基酸及半胱胺酸之分子量 13kDa 之多肽(參照例如非專利文獻 1 及非專利文獻 2)。

有經由 NMR 決定 MK 之立體構造之報告(參照例如非專利文獻 3)。MK 根據構造上之特徵，係由 2 個區域(domain)為主構成。具體而言，MK 係由編號 1 至 52 之胺基酸組成之 N 末端側之片段(以下，稱為「N-片段」、編號 62 至 121 之胺基酸組成之 C 末端側之片段(以下，稱為「C-片段」)及結合該等之環區域(編號 53 至 61 之胺基酸)所形成。各各區域之外側係結合富含鹼性胺基酸之尾端(tail)。MK 分子中 N-片段及 C-片段各各主要具有 3 條由逆 β 片構造形成之立體構造(以下稱為「區域」，由編號 15 至 52 之胺基酸組成之 N-片段中之區域稱為「N-區域」，由編號 62 至 104 之胺基酸組成之 C-片段中之區域稱為「C-區域」)及自由變動作不具有特定構造之構造(以下稱為「尾端」，由編號 1 至 14 之胺基酸組成之 N-片段中之尾端稱為「N-尾端」，由編號 105 至 121 之胺基酸組成之 C-片段中之尾端

稱為「C-尾端」)。

MK 之接受體已知有接受體型蛋白質酪胺酸磷酸酯酶 ζ (PTP ζ)、LRP(低密度脂蛋白接受體-相關蛋白質, low density lipoprotein receptor-related protein)、ALK(未分化白血病激酶 anaplastic leukemia kinase)、整合素(integrin)及黏結蛋白聚糖(syndecan)等。MK 含有甚多鹼性胺基酸離胺酸(K)及精胺酸(R), 為正帶電強之蛋白質。已知在 C 區域具有肝素結合部位, 與肝素或硫酸軟骨素 E 等帶負電之分子強力結合。變異導入解析及 NMR 解析之結果認為與肝素之結合, 以 K79、R81、K102 構成之群簇(cluster)I 及以 K86、K87、R89 構成之群簇 II 為重要。另一方面有認為與硫酸軟骨素 E 之結合只有群簇 I 為重要之報告。若將群簇 I 之 R81 變更為 A, 則與肝素之結合能降低。其結果, 對 PTP ζ 之結合能降低, 而抑制因 MK 引起之神經細胞之突起伸長及移動。

纖維芽細胞增殖因子(bFGF)或血管內皮細胞增殖因子(VEGF)等數種增殖因子具有肝素結合部位。咸認為該等增殖因子結合於細胞外基質之乙醯肝素硫酸蛋白多糖, 停留在適當地方, 在必要時釋放出。又, 已知與在神經細胞或血管內皮細胞表現之乙醯肝素硫酸結合, 賦予神經突起之伸長及線溶活性之提升。若先將培養皿用 MK 包覆, 在其上面將小鼠胚胎之神經細胞罩起來, 則神經突起伸長。此時, 若以肝素酶消化神經細胞, 則可抑制神經突起之伸長。另一方面, 若培養血管內皮細胞並添加 MK, 則細胞

血纖維溶酶原活性化酵素之活性上昇。此時若將細胞用肝素酶消化，則抑制血纖維溶酶原活性之上昇。

咸認為 MK 與 PTP ζ 在二個地方結合。一個地方為與硫酸軟骨素高親和性之結合 ($K_d=0.58\text{nM}$)。該結合用軟骨素酶消化而消失。另一個地方為與蛋白質結合，以軟骨素酶消化後亦殘餘之低親和性結合 ($K_d=3\text{nM}$)。已知 MK 促進表現 PTP ζ 之胎仔神經細胞之遊走，若將神經細胞以軟骨素酶 ABC 處理，則抑制遊走。成骨樣細胞 (Osteoblastic-like cell) UMR106 細胞係表現 PTP ζ ，經由軟骨素酶 ABC 處理，抑制 MK 依存性遊走。巨噬細胞之 MK 依存性遊走亦經由軟骨素酶 ABC、軟骨素酶 B、肝素酶處理而被抑制。由於巨噬細胞未表現 PTP ζ ，咸認為有另外之接受體參予。

不管帶負電者為何物，並非結合於 MK 之肝素結合部位。將 MK 經由胺基酸偶合固定，進行表面電漿 (plasmon) 共振解析，獲得硫酸軟骨素 E 與肝素在 MK 強力結合，硫酸軟骨素 A、B、C、D 則未結合之結果。

已知 MK 具有種種生物活性。例如，已知在人類癌細胞，MK 之表現增大。確認在食道癌、甲狀腺癌、膀胱癌、大腸癌、胃癌、胰臟癌、胸部癌、肝臟癌、肺癌、乳癌、神經芽細胞腫、神經母細胞瘤 (neuroblastoma)、神經膠母細胞瘤 (glioblastoma)、子宮癌、卵巢癌、威爾姆氏腫瘤 (Wilms tumor) 等種種癌，該表現增大 (參照例如專利文獻 1 及非專利文獻 3)。又，認為 MK 促進癌細胞之生存及移動，促進血管新生，幫助癌進展。

已知，MK 在炎症像形成之過程為占有中核之分子之一。例如已知在血管受傷害時形成新生內膜及虛血傷害時之腎炎發病。在 MK 基因欠缺之剔除小鼠(knockout mice)可減輕。又，已知風濕症模型、手術後癒合，在剔除小鼠亦大大減輕(參照例如專利文獻 2、專利文獻 3 及專利文獻 4)。經由此得知 MK 參予關節炎、自體免疫疾病、風濕性關節炎(慢性風濕性關節炎(RA)、變形性關節炎(OA))、多發性硬化症、手術後之癒合、炎症性大腸炎、乾癬、狼瘡、氣喘、嗜中性球機能異常等炎症性疾病。又，已知 MK 促進稱為巨噬細胞或嗜中性球之炎症性細胞之移動(遊走)。該移動在炎症像之成立為必要，所以中期因子若缺乏，則不易引起以炎症為基礎之疾病(參照例如專利文獻 5)。

在進行性子宮內膜異位症之女性腹腔液中，從 MK 水平增加及 MK 刺激培養子宮內膜間質細胞之增殖得知 MK 參予子宮內膜異位症之發症或進行(參照例如專利文獻 6)。

由於 MK 具有血管內膜肥厚作用，已知參予血管再建術後再狹窄、心臟冠動脈血管閉塞性疾病、腦血管閉塞性疾病、腎血管閉塞性疾病、末梢血管閉塞性疾病、動脈硬化、腦梗塞等血管閉塞性疾病(參照例如專利文獻 2)。

已知細胞遊走在癌細胞之浸潤、轉移、於動脈硬化巢之內膜肥厚、血管新生等機序中為重要。又，已知在狹心症、心肌梗塞、腦梗塞、腦出血、高血壓等循環器疾病，炎症性細胞之遊走有很深之關連。

多效生長因子(Pleiotrophin)(PTN 或 HB-GAM)為 MK

唯一之家族蛋白質，具有約 50% 之同系物。MK 及 PTN 都為含多量半胱胺酸及鹼性胺基酸之蛋白質。所有 10 個之半胱胺酸用 MK 及 PTN 保存，在構造上同樣可分為 N-區域及 C-區域。NMR 分析之結果明瞭該等 2 個分子之三次元構造非常相似。各各之區域由 3 個 β 片形成，在可連結體 (linker, 本文中亦稱為連接基) 區域連結。咸認為與硫酸軟骨素或肝素之結合為重要之 K79、R81、K102 係保存於兩蛋白質之間。K79 與 R81 存在於同一個 β 片上，而 K102 則存在於另一個 β 片上。MK 及 PTN 形成立體構造時，該等鹼性胺基酸在蛋白質表面附近出現。

近年來 RNA 適體在治療藥、診斷藥、試藥之應用廣受注目，有數個 RNA 適體已進入臨床階段或實用化階段。於 2004 年 12 月，美國承認世界最初之 RNA 適體醫藥 Macugen 作為老年黃斑變性症之治療藥。RNA 適體為特異性結合於蛋白質等標的物質之 RNA，可使用 SELEX 法 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 製作 (非專利文獻 5、6)。SELEX 法為從具有約 10^{14} 個不同核苷酸序列之 RNA 池挑選與標的物質特異性結合之 RNA 之方法。使用之 RNA 為約 40 殘基之隨機序列 (random sequence) 以引子序列挾住之構造。將該 RNA 池與標的物質會合，使用過濾器等只回收結合於標的物質之 RNA。回收之 RNA 用 RT-PCR 放大，將此作為下回之模板使用。反覆操作該作業約 10 次，可取得與標的物質特異性結合之 RNA 適體。

[專利文獻 1]日本特開平 6-172218 號公報

[專利文獻 2]國際公開第 2000/10608 號說明書

[專利文獻 3]國際公開第 2004/078210 號說明書

[專利文獻 4]國際公開第 2004/085642 號說明書

[專利文獻 5]國際公開第 1999/03493 號說明書

[專利文獻 6]國際公開第 2006/016571 號說明書

[專利文獻 7]特開 2002-300885 號公報

[非專利文獻 1]Kadomatsu, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 151:p.1312-1318

[非專利文獻 2]Tomokura, M. et al.,: J.Biol. Chem, 265: p.10765-10770

[非專利文獻 3]Iwasaki, W. et al., (1997) EMBO J. 16, p.6936-6946

[非專利文獻 4]Muramatsu, T., (2002) J. Biochem. 132, p.359-371

[非專利文獻 5]Ellington et al., (1990) Nature, 346, 818-822

[非專利文獻 6]Tuerk et al., (1990) Science, 249, 505-510

【發明內容】

[發明欲解決之課題]

本發明以提供對中期因子之適體及其利用方法為目的。

[解決課題之方法]

本發明人等為了解決上述課題，進行深入研究結果成功地製作對中期因子為良質之適體，因而完成本發明。

亦即，本發明係提供以下之發明等：

[1]對中期因子具有阻礙活性之適體、

[2]適體係對多效生長因子不具有阻礙活性之[1]記載之適體、

[3]對中期因子之 N-片段具有結合能之[1]記載之適體、

[4]對中期因子之 C-片段具有結合能之[1]記載之適體、

[5]對中期因子之 N-片段具有結合能之[2]記載之適體、

[6]對中期因子之 C-片段具有結合能之[2]記載之適體、

[7]藉由阻礙中期因子與 PTP ζ 之結合，而對中期因子顯示阻礙活性之適體、

[8] [1]記載之適體，係以下(a)或(b)之任一者：

(a)含有選自序列編號 1 至 70 中任何一個核苷酸序列(惟，尿嘧啶可為胸腺嘧啶)之適體：

其中在該適體所含之核苷酸中

(i)各嘧啶核苷酸之 2'位可為相同或不同，為氟原子或經選自氫原子、羥基及甲氧基所成組群之原子或基取代、

(ii)各嘌呤核苷酸之 2'位為相同或不同，為羥基或

經選自氫原子、甲氧基及氟原子所成組群之原子或基取代；

(b)含有在選自序列編號 1 至 70 中任何一個核苷酸序列(惟，尿嘧啶可為胸腺嘧啶)中，1 個或數個核苷酸經取代、缺失、插入或附加之核苷酸序列之適體、

其中在該適體所含之核苷酸中，

(i)各嘧啶核苷酸之 2'位為相同或不同，為氟原子或經選自氫原子、羥基及甲氧基所成組群之原子或基取代、

(ii)各嘌呤核苷酸之 2'位為相同或不同，為羥基或經選自氫原子、甲氧基及氟原子所成組群之原子或基取代、

[9]適體中所含之核苷酸係經修飾之[1]至[8]中任一項記載之適體、

[10]含有[1]至[9]中任何一項記載之適體及機能性物質之複合體、

[11]機能性物質為親和性物質、標識用物質、酵素、藥物送達介質或藥物之[10]記載之複合體、

[12]含有[1]至[9]項中任何一項記載之適體或[10]、[11]記載之複合體之醫藥、

[13]含有[1]至[9]項中任何一項記載之適體或[10]、[11]記載之複合體之細胞遊走阻礙劑、

[14]含有[1]至[9]項中任何一項記載之適體或[10]、[11]記載之複合體之診斷藥、

[15]含有[1]至[9]項中任何一項記載之適體或[10]、[11]記載之複合體之標識劑、

[16]檢測[1]至[9]項中任何一項記載之適體或[10]、[11]記載之複合體之方法。

[發明之效果]

本發明之適體及複合體可作為對於自體免疫疾病、癌症、術後癒合、子宮內膜炎等種種疾病之醫藥或診斷藥等試藥使用。本發明之適體及複合體亦可用於MK之精製及濃縮、MK之檢測及定量。

【實施方式】

[實施發明之最佳形態]

本發明係提供對於中期因子(MK)具有結合活性之適體。本發明之適體可阻礙MK之活性。

適體係指對於規定之標的分子具有結合活性之核酸分子。適體係藉由與預定之標的分子結合，而可阻礙預定之標的分子之活性。本發明之適體可為RNA、DNA、修飾核酸或該等之混合物。本發明之適體可為直鏈狀或環狀之形態。

對MK之阻礙活性係指對MK保有之任意活性之阻礙能。MK保有之活性可列舉例如細胞(例如巨噬細胞、嗜中性球、嗜酸性球、血管平滑肌細胞、腫瘍細胞、成骨細胞、神經細胞及該等之前驅細胞)之遊走活性(Takada et al., 1997, J. Biochem. 122, 453-458, Horiba et al., 2000, J. Clin. Invest. 105, 489-495, Maeda et al., 1999, J. Biol. Chem. 274,

12474-12479, Qi et al., 2001, J. Biol. Chem. 276, 15868-15875)、細胞(例如腫瘍細胞、纖維芽細胞、角質細胞、神經細胞、軟骨細胞及該等之前驅細胞)之增殖及分化促進活性(Muramatsu and Muramatsu, 1991, Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 652-658, Muramatsu et al., 1993, Dev. Biol. 159, 392-402, Takei et al., 2001, Cancer Res. 61, 8486-8491)、調節性 T 細胞之增殖及機能阻礙活性、神經細胞神經突起之伸長促進活性、細胞(例如腫瘍細胞、神經細胞)之凋亡(apoptosis)阻礙活性、細胞(例如腫瘍細胞)之血管新生之誘導活性、肌原細胞之突觸形成誘導活性、血管內皮細胞之線溶系促進活性、血管平滑肌細胞 IL-8 產生促進活性等。因此，對於 MK 之阻礙活性可列舉例如對於該等活性之阻礙活性。

本發明之適體對於源自任意哺乳動物之 MK 具有阻礙活性。該等哺乳動物可列舉例如靈長類(例如人類、猴子)、啮齒類(例如小鼠、大鼠、天竺鼠)及寵物、家畜及使役動物(例如狗、貓、馬、牛、山羊、羊、豬)。

本發明之適體只要是結合於 MK 之任意部分，阻礙其活性者即可，並無特別限制，例如藉由結合於 MK 之 N-片段或 C-片段，而可阻礙 MK 之活性。人類 MK 之胺基酸序列為基因庫序列編號 BC011704 表示者，分泌蛋白質係由第 23 之離胺酸至第 143 之天冬胺酸之 121 個胺基酸構成。通常，以第 23 之離胺酸作為第 1 個胺基酸表示。人類 MK 為由第 1 至 52 之胺基酸形成之 N-片段、由第 62 至 121

之胺基酸形成之 C-片段及將該等結合之環區域所組成，惟，N-片段及 C-片段之邊界只要為 MK(53-61)之環部分即可，非可嚴密定義者。

本發明適體之長度並無特別限制，通常為約 15 至約 200 個核苷酸，例如在約 100 個核苷酸以下，較好在約 80 個核苷酸以下，更好在約 60 個核苷酸以下，最好在約 45 個核苷酸以下。本發明適體之長度亦可為例如約 18、20 或 25 個核苷酸以上。總核苷酸數若少，則化學合成及大量生長更容易且在成本上之利點大。又，化學修飾亦容易，在生體內之安定性亦高，毒性亦低。

本發明之適體中所含之各核苷酸各各可為相同或不同，為在核糖(例如嘧啶核苷酸之核糖)之 2'位含有羥基之核苷酸(亦即，未取代之核苷酸)或是在核糖之 2'位，羥基經任意原子或基取代之核苷酸。該等可列舉以任意原子或基例如氫原子、氟原子或-O-烷基(例如-O-Me 基)、-O-醯基(例如-O-CHO 基)、胺基(例如-NH₂ 基)取代之核苷酸。本發明適體之至少 1 種(例如 1、2、3 或 4 種)核苷酸係在核糖之 2'位含有至少 2 種(例如 2、3 或 4 種)選自羥基或由上述之任意原子或基，例如氫原子、氟原子、羥基及-O-Me 基所成組群之基之核苷酸。本發明之適體係所有之核苷酸為在核糖之 2'位含有羥基或上述之任意原子或基，例如選自由氫原子、氟原子、羥基及-O-Me 基所成組群之同一基之核苷酸。

本發明適體之一例為具有含有 1 個以上選自由單股部

分(例如 gggagaggaac)、第一主幹部分(例如 gacg 及其相輔鏈)、內環部分(例如 aggagua 及 gg)、第二主幹部分(例如 gcc 及其互補鏈)、內環部分(例如 ggaaagaa)所成組群之部分的潛在性二次構造。本發明適體之另一例為具有含有 1 個以上選自由單股部分(例如 gggaaggaggaa)、第一主幹部分(例如 gugcac 及其互補鏈)、內環部分(例如 ag 及 gg)、第二主幹部分(例如 gg 及其互補鏈)、內環部分(例如 guuggug)所成組群之部分的潛在性二次構造。

在本說明書中使用時，「潛在性二次構造」係指在生理條件下可安定存在之二次構造，例如是否具有潛在性二次構造可根據實施例記載之構造預測程式決定。主幹部分係指經由 2 個以上連續核苷酸之鹼基對合(例如 G-C、A-U、A-T)而形成雙股(double-strands)之部分。內環部分係指在 2 個不同主幹部分之間所形成之非主幹部分。髮夾環(hairpin loop)部分係指經由 1 個主幹部分所形成之部分構造，在適體鏈 5' 末端及 3' 末端之相對側形成之環部分。單股部分係指聚核苷酸鏈之末端部分，無上述之主幹部分、內環部分及髮簪般環之部分。

本發明之適體對於 MK 之 N-片段及 / 或 C-片段具有結合能。序列編號 39 表示之適體及其改變體與肝素或硫酸軟骨素 E 相同，對於 C-片段具有高結合活性。咸認為肝素係結合於 C-片段之群簇-I 及群簇-II 部分。又，硫酸軟骨素 E 咸認為係結合於 C-片段之群簇-I 部分。已知 MK 係與含有作為硫酸軟骨素構成分子之 PTP ζ 相互作用。PTP ζ

表現於胎仔之神經細胞或成骨樣細胞，在 MK 存在下促進該等細胞之遊走。本發明提供此種結合於 C-片段，可阻礙細胞遊走之適體及主要結合於 N-片段，阻礙細胞遊走之適體。

本發明之適體具有可阻礙 MK 之活性(例如 MK 之細胞遊走活性)，而不會阻礙 PTN 之活性(例如 PTN 之細胞遊走活性)之特徵。PTN 為同系 50% MK 之唯一家族蛋白質，三次元構造非常相似，又，在與硫酸軟骨素或肝素結合中保存重要之胺基酸。

本發明之適體為(a)含有選自序列編號 1 至 70 中任何一個核苷酸序列(惟，尿嘧啶可為胸腺嘧啶)之適體、(b)含有在選自序列編號 1 至 70 中任何一個核苷酸序列中，有 1 個或數個核苷酸經取代、缺失、插入或附加之核苷酸序列之適體、(c)為上述(a)之複數連結物、上述(b)之複數連結物、選自由上述(a)及(b)之複數連結物所成組群之連結物。於上述(b)中，經取代、缺失、插入或附加之核苷酸數只要是數個即可，並無特別限制，可為例如約 30 個以下、較好約 20 個以下、更好約 10 個以下，最好約 5 個以下，再更好為 4 個、3 個、2 個或 1 個。上述(c)中之連結可用串聯(tandem)結合進行。又，在連結時可利用連結體。連結體可列舉核苷酸鏈(例如 1 至約 20 個核苷酸)、非核苷酸鏈(例如 $-(CH_2)_n$ -連結基、 $-(CH_2CH_2O)_n$ -連結基、六甘醇連結基、TEG 連結基、含有肽之連結基、含有-S-S-結合之連結基、含有-CONH-結合之連結基、含有-OPO₃-結合之連結基)。

上述複數之連結物中之複數係指 2 個以上即可，並無特別限制，例如可為 2 個、3 個或 4 個。上述(a)至(c)中之各核苷酸各各可相同或不同，為在核糖(例如嘧啶核苷酸之核糖)之 2'位含有羥基之核苷酸或是在核糖之 2'位，羥基係以任意基(例如氫原子、氟原子或-O-Me 基)取代之核苷酸。

在特定之局面，本發明之適體以其構造為基礎分為 3 大類。第 1 類適體為由序列編號 61 表示之核苷酸序列組成之適體及其變異體。由序列編號 61 表示之核苷酸序列組成之適體，經由 MFOLD 程式預測二次構造則係具有如第 9 圖表示之潛在性二次構造，係由單股部分、第一主幹部分、內環部分、第二主幹部分、髮夾環部分所構成。本適體在單股部分、第一主幹部分、內環部分、第二主幹部分、髮夾環部分，容許數個核苷酸之取代、缺失、插入及／或附加。例如本適體容許對單股部分插入數個核苷酸，對第一主幹部分插入數個核苷酸，對 3'末端之單股部分附加數個核苷酸(例如序列編號 5)。該等適體與 MK 之 N-片段之結合較 C-片段更強。

第 2 類適體為由序列編號 20 表示之核苷酸序列組成之適體及其變異體。由序列編號 20 表示之核苷酸序列組成之適體經由 MFOLD 程式預測二次構造則具有如第 8 圖表示之潛在性二次構造，係由單股部分、第一主幹部分、內環部分、第二主幹部分、髮夾環部分所構成。本適體在單股部分、第一主幹部分、內環部分、第二主幹部分、髮夾環部分係容許數個核苷酸之取代、缺失、插入及／或附加。

例如本適體容許對單股部分、第一主幹部分及／或 3' 末端附加數個核苷酸(例如序列編號 4)。該等適體對於 MK 之 N-片段幾乎無親和性，與 C-片段之結合強。

第 3 類適體為由序列編號 1 表示之核苷酸序列組成之適體及其變異體。

本發明之適體為了提高對於 MK 之結合性、安定性、藥物送達性等，可為將各核苷酸之糖殘基(例如核糖)加以修飾者。糖殘基之修飾部位可列舉例如將糖殘基之 2' 位、3' 位及／或 4' 位之氧原子以其他原子取代者。修飾之種類列舉例如氟化、O-烷基化(例如 O-甲基化、O-乙基化)、O-烯丙基化、S-烷基化(例如 S-甲基化、S-乙基化)、S-烯丙基化、胺基化(例如 $-\text{NH}_2$)。該等糖殘基之改變可根據本身公知之方法進行(參照例如 Sproat et al., (1991) *Nucleic Acid. Res.* 19, 733-738; Cotton et al., (1991) *Nucl. Acid. Res.* 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973) *Biochemistry* 12, 5138-5145)。

為了提高本發明適體對於 MK 之結合性等，亦可為使核酸鹼基(例如嘌呤、嘧啶)改變(例如化學取代)者。該等改變列舉例如 5 位嘧啶改變、6 及／或 8 位嘌呤改變、經由環外胺改變、經由 4-硫代尿苷取代、經由 5-溴或 5-碘尿苷取代。又，亦可改變含於本發明適體之磷酸基，使對於核酸酶及水解具有耐性。例如 $\text{P}(\text{O})\text{O}$ 基可用 $\text{P}(\text{O})\text{S}$ (硫代酸(thioate))、 $\text{P}(\text{S})\text{S}$ (二硫代酸(dithioate))、 $\text{P}(\text{O})\text{NR}_2$ (醯胺酸(amidate))、 $\text{P}(\text{O})\text{R}$ 、 $\text{R}(\text{O})\text{OR}'$ 、 CO 或 CH_2 (甲縮醛)或 3'-

胺(-NH-CH₂-CH₂-)取代[此處，各各 R 或 R' 獨立為氫原子，或可經取代或未經取代之烷基(例如甲基、乙基)]。

連結基例示 -O-、-N- 或 -S-，通過該等連結基可結合於鄰接的核苷酸。

改變亦可包含加帽(capping)之 3' 及 5' 之改變。

改變更可將聚乙二醇、胺基酸、肽、倒轉 dT(inverted dT)、核酸、核苷酸、肉豆蔻醯、石膽酸-油醯、二十二烷醯、月桂醯、硬脂醯、棕櫚醯、油醯、亞油醯、其他脂質、類固醇、膽固醇、咖啡因、維生素、色素、螢光物質、抗癌劑、毒素、酵素、放射性物質、生物素等附加於末端而進行。該等改變參照例如美國專利第 5,660,985 號、美國專利第 5,756,703 號。

本發明之適體可根據本說明書中之揭示及在該技術區域本身公知之方法化學合成。適體經由利用磷酸基負電荷之離子結合、利用核糖之疏水性結合及氫結合、利用核酸鹼基之氫結合或堆積結合等多種結合形態與標的物質結合。又，利用只有構成核苷酸數存在之磷酸基負電荷之離子結合係強力地與存在於蛋白質表面之離胺酸或精胺酸之正電荷結合。因此，與標的物質直接結合無關之核酸鹼基可進行取代。又，主幹構造之部分作成鹼基對，由於面向雙螺旋構造之內側，核酸鹼基不易與標的物質直接結合。因此即使將鹼基對置換為其他之鹼基對，適體活性亦大都不會減少。在未作成環構造等鹼基對之構造中，核酸鹼基與標的物質直接結合無關時，鹼基可被取代。關於核糖 2'

位之修飾，雖然核糖之 2' 位官能基亦有與標的分子直接相互作用者，但大部分情況下並無關係，而可置換為其他之修飾分子。該等適體只要不將參予與標的分子直接結合之官能基取代或削除，大都保持其活性。又，全體立體構造無重大變化亦很重要。

適體可利用 SELEX 法及其改良法(例如 Ellington et al., (1990) Nature, 346, 818-822 ; Tuerk et al., (1990) Science, 249, 505-510)製作。在 SELEX 法增加回合數、使用競爭物質，將對標的物質結合力強之適體濃縮、挑選。因此，邊調節 SELEX 之回合數及／或改變競爭狀態，可獲得結合力不同之適體、結合形態不同之適體、結合力或結合形態相同而鹼基序列不同之適體。又，SELEX 法包含經由 PCR 之放大步驟，在該步驟，使用錳離子等，導入變異，可進行更富於多樣性之 SELEX。

用 SELEX 獲得之適體為對標的物質親和性高之核酸，此情形不意味結合於標的物質之活性部位。因此，SELEX 獲得之適體未必限於作用於標的物質之機能。MK 在 N 末端及 C 末端之尾端部分存在有離胺酸豐富之部分，咸認為核酸為非特異性結合。該尾端部分在與肝素或硫酸軟素之結合中不認為是重要的。在此種環境中要製作有效阻礙 MK 活性之適體並不容易。實際上本發明研究 23 種適體之細胞遊走阻礙活性，保持 50% 以上活性之適體只有 4 種。

由此操作選出之具有活性之適體進行最適化

SELEX，可使更高性能化。最適化 SELEX 係指將已決定某一序列之適體之一部分與隨機序列化之模板(template)或約 10 至 30% 之隨機配列摻雜而製作模板，再次進行 SELEX 者。

SELEX 獲得之適體為約 80 個核苷酸長度，要將此以原樣作成醫藥有困難。因此反覆進行試誤(try and error)，而必需變短至可容易化學合成之約 50 個核苷酸以下之長度。

SELEX 獲得之適體係依存於其引子設計，而其後之最小化作業之容易度改變。若未好好設計引子，則即使可經由 SELEX 挑選具有活性之適體，之後之開發亦不可能。

適體可由化學合成，因此容易改變。適體使用 MFOLD 程式預測二次構造、經由 X 線解析或 NMR 解析預測立體構造，在某一範圍內可預測那個核苷酸係可取代或缺失或可在何處插入新核苷酸。預測之新序列適體可容易地由化學合成。經由既存之分析系列可確認該適體是否保持活性。

在獲得之適體與標的物質結合之重要部分可經由上述反覆試誤操作特定之情況，在該序列之兩端即使附加新的序列，大多數場合活性未變化。新序列之長度並無特別限制。

關於修飾與序列相同，可高度設計或改變。

如上所述，適體可高度設計或改變。本發明提供可將含有規定序列(例如對應於選自主幹部分、內環部分、髮夾環部分及單股部分之序列：以下，必要時簡稱為固定序列)

之適體高度設計或改變之適體之製造方法。

例如，該等適體之製造方法包括使用下述式表示之核苷酸序列組成之單一種核酸分子或複數種核酸分子(例如 a、b 之數等不同之核酸分子之資料庫)及分別對應引子用序列(i)、(ii)之引子對，製造含有固定序列之適體。

引子用序列(i) - (N)_a - 固定序列 - (N)_b - 引子用序列(ii)

[於上述式中，(N)_a 表示由 a 個 N 組成之核苷酸鏈，(N)_b 表示由 b 個 N 組成之核苷酸鏈，N 各自相同或不同，為選自由 A、G、C、U 及 T(較好為 A、G、C 及 U)所成組群之核苷酸，a、b 各各為相同或不同之任意數，例如為 1 至約 100 個，較好為 1 至約 50 個，更好為 1 至約 30 個，最好為 1 至約 20 個或 1 至約 10 個]

本發明亦提供本發明之適體及含有結合於該適體之機能性物質之複合體。在本發明複合體之適體與機能性物質間之結合為共價結合或非共價結合。本發明之複合體為本發明之適體與 1 個以上(例如 2 或 3 個)之同種或不同種機能性物質結合者。機能性物質只要是在本發明之適體新附加任何機能者或可保持本發明適體而其任何特性加以變化(例如提昇)者即可，並無特別限制。機能性物質列舉例如蛋白質、肽、胺基酸、脂質、糖質、單糖、聚核苷酸、核苷酸。機能性物質可為例如親和性物質(例如生物素、鏈抗生物素蛋白(streptavidin)、對於標的互補序列具有親和性之聚核苷酸、抗體、谷胱甘肽瓊脂糖(sepharose)、組胺酸)、

標識用物質(例如螢光物質、發光物質、放射性同位素)、
酵素(例如西洋山葵過氧化酶、鹼性磷酸酶)、藥物送達介
質(例如核糖核蛋白體、微小球(microsphere)、肽、聚乙二
醇類)、藥物(例如加里剎黴素(Calicheamicin)或迪卡黴素
(duocarmicin)等導彈(missile)療法使用者，環磷醯胺、消旋
苯丙胺酸氮芥(merphalan)、異環磷醯胺或曲磷胺等氮芥類
似體，三胺硫磷(thio-TEPA)等次乙亞胺類，卡氮芥等亞硝
基尿素，替莫唑胺(Temozolomide)或達卡巴嗪(Dacarbazine)
等目錄劑(list agent)，甲基蝶啶胺(methotrexate)或雷替曲
塞(Raltitrexed)等葉酸類似代謝拮抗劑，硫代鳥嘌呤
(Thioguanine)、卡德利賓(kladribin)或福達賓(Fludrabin)等
嘌呤類似體，氟嘧啶二酮(5-Fluorouracil)、替加氟(Tegafur)
或吉西他汀(Gemcitabine)等嘧啶類似體，長春鹼
(vinblastine)、長春新鹼(vincristine)或長春花(vinorelbine)
等長春花生物鹼基(vinca alkaloid)及其類似體，依托泊苷
(Etoposide)、紫杉醇(Taxane)、多烯紫杉醇(Docetaxel)或太
平洋紫杉醇(Paclitaxel)等鬼臼毒素(Podophyllotoxin)誘導
體，杜薩魯比辛(Doxorubicin)、表柔吡星(Epirubicin)、依
達比星(Idarubicin)及米托蒽醌(Mitoxantrone)等蒽環類
(anthracyclines)及其類似物，博來黴素(Bleomycin)及絲列
黴素(Mitomycin)等其他細胞毒性抗生物質，順鉑
(Cisplatin)、佳鉑帝(Carboplatin)及草酸鉑(Oxaliplatin)等鉑
化合物，噴司他丁(Pentostatin)、米替福新(Miltefosine)、
磷雌氮芥(Estramustine)、拓撲替康(Topotecan)、依利特康

(Irinotecan)及必卡他胺(Bicalutamide))，毒素(例如離胺酸毒素、利亞毒素(Riatoxin)及蕪羅毒素(Verotoxin)。該等機能性分子亦有在最後除去者。又，亦可為凝血酶(thrombin)或間質金屬結合蛋白酶(Matrix Metalloproteinase, MMP)、Factor X等酵素可辨識並切斷之肽，核酸酶或限制酵素可切斷之聚核苷酸。

本發明之適體及複合體可作為例如醫藥或試藥(例如診斷藥、檢查藥(包括實驗用試藥))使用。例如，本發明之適體及複合體可使用作為細胞遊走阻礙劑、調節性T細胞之增殖促進劑、調節性T細胞之抑制機能之促進劑、細胞壞死阻礙抑制劑、細胞增殖阻礙劑、細胞分化阻礙劑、藥物送達劑、體內影象用探針、MK血中濃度測定用探針、組織染色用探針、ELISA用探針、MK分離精製用配位體。

本發明之適體及複合體亦可用於預防或治療自體免疫疾病(例如多發性硬化症、全身性紅斑狼瘡(SLE)、謝格烈症候群、多發性肌炎(PM)、皮膚肌炎(DM)、風濕性關節炎(慢性風濕性關節炎(RA)、變形性關節症(OA))、炎症性腸炎(克隆氏症等)、進行性全身性硬化症(PSS)、結節性動脈周圍炎(PN)、甲狀腺疾病(巴塞多氏症(Basedow's disease)等)、吉朗·巴雷症候群、原發性膽汁性肝硬變(PBC)、特發性血小板減少性紫斑症、自體免疫溶血性貧血、重症肌無力症(MG)、肌萎縮性側索硬化症(ALS)、I型糖尿病、乾癆、氣喘、嗜中性球機能異常)、癌(例如食道癌、甲狀腺癌、膀胱癌、大腸癌、胃癌、胰臟癌、胸部癌、肝臟癌、

肺癌、乳癌、神經芽細胞腫瘍、神經母細胞瘤(neuroblastoma)、膠狀母細胞瘤(glioblastoma)、子宮癌、卵巢癌、病毒腫瘍、前列腺癌)、術後癒合、子宮內膜炎、移植時之排斥反應、過敏、血管再建術後再狹窄、心臟冠狀動脈血管閉塞性疾病、腦血管閉塞性疾病、腎血管閉塞性疾病、末梢血管閉塞性疾病、動脈硬化、腦梗塞等種種疾病。本發明之適體由於阻礙 MK 之細胞遊走活性，可用於多發性硬化症、術後癒合、子宮內膜炎、慢性風濕性關節炎、血管狹窄之預防或治療。

本發明之醫藥可配合醫藥上容許之載體。醫藥上容許之載體列舉例如蔗糖、澱粉、甘露糖醇、山梨糖醇、乳糖、葡萄糖、纖維素、滑石粉、磷酸鈣、碳酸鈣等賦形劑，纖維素、甲基纖維素、羥丙基纖維素、聚丙基吡咯啉酮、明膠、阿拉伯膠、聚乙二醇、蔗糖、澱粉等結合劑，澱粉、羧甲基纖維素、羥丙基澱粉、二醇-澱粉-鈉、碳酸氫鈉、磷酸鈣、檸檬酸鈣等崩解劑，硬脂酸鎂、氣凝膠(Aerogel)、滑石粉、月桂基硫酸鈉等潤滑劑，檸檬酸、薄荷、甘胺醯離胺酸·銨鹽、甘胺酸、橘子粉等芳香劑，苯甲酸鈉、亞硫酸氫鈉、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯等保存劑，檸檬酸、檸檬酸鈉、乙酸等安定劑、甲基纖維素、聚乙炔吡咯啉酮、硬脂酸鋁等懸濁劑，界面活性劑等分散劑、水、生理食鹽水、橘子汁等稀釋劑，可可亞脂、聚乙二醇、白色煤油等底臘(base wax)等，惟，不只限於此等。

適合經口投予之製劑為將有效量之配位體溶解於

水、生理食鹽水、橘子汁等稀釋液中之液劑，含有將有效量之配位體作成固體或顆粒之膠囊劑、散劑或錠劑，將有效量之有效成分懸濁於適當分散媒中之懸濁液劑，將有效量之有效成分溶解而得之溶液分散於適當分散媒中使分散並乳化之乳劑等。

本發明之醫藥必要時，為了遮蓋味道、作成腸溶性或持續性等目的，可用本身公知之方法進行包覆。包覆時使用之包覆劑可使用例如羥丙基甲基纖維素、乙基纖維素、羥甲基纖維素、羥丙基纖維素、聚氧伸乙基二醇、吐恩(Tween)80、Fluronic F68、纖維素乙酸酯苯二甲酸酯、羥丙基甲基纖維素苯二甲酸酯、羥甲基纖維素乙酸酯琥珀酸酯、歐德奇特(Eudragit)(羅姆公司製造，德國，甲基丙烯酸·丙烯酸共聚物)及色素(例如氧化鐵紅、二氧化鈦等)等。該醫藥可為速放性製劑、徐放性製劑中之任何一種。徐放之基材列舉例如微脂粒(liposome)、去端膠原(Atelocollagen)、明膠、羥基磷灰石、PLGA等。

非經口投予(例如靜脈內投予、皮下投予、肌肉內投予、局部投予、腹腔內投予、經鼻投予、經肺投予等)之理想製劑為水性及非水性之等張無菌注射液劑，該等亦可含有抗氧化劑、緩衝液、制菌劑、等張化劑等。又，可列舉如水性及非水性之無菌懸濁液劑，該等亦可含有懸濁劑、可溶化劑、增黏劑、安定化劑、防腐劑等。該製劑亦可將單位投予量或複數次投予量各自封入如安瓿或小瓶之容器。又可將有效成分及醫藥上容許之載體凍結乾燥，而以

在使用前方以適當之無菌溶劑溶解或懸濁之狀態保存。又，除了注射劑以外亦可為吸入劑、乾膏劑。吸入劑之情況係將凍結乾燥狀態之有效成分微細化，使用適當之吸入裝置吸入投予。吸入劑必要時可適當配合以往使用之界面活性劑、油、調味劑、環糊精或其衍生物等。

該界面活性劑列舉例如油酸、卵磷脂、二甘醇二油酸酯、四氫糠基油酸酯、乙基油酸酯、異丙基肉豆蔻酸酯、甘油三油酸酯、甘油單月桂酸酯、甘油單油酸酯、甘油單硬酸酯、甘油單蓖麻酸酯、鯨蠟醇、硬脂醇、聚乙二醇 400、氯化十六烷基吡啶鎊、山梨糖醇酐三油酸酯(商品名斯畔(Span)85)、山梨糖醇酐單油酸酯(商品名斯畔 80)、山梨糖醇酐單月桂酸酯(商品名斯畔 20)、聚氧乙烯硬化蓖麻油(商品名 HCO-60)、聚氧乙烯(Polyoxyethylene)(20)山梨糖醇酐單月桂酸酯(商品名吐恩 20)、聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐單油酸酯(商品名吐恩 80)、源自天然資源之卵磷脂(商品名伊比庫隆)、油基聚氧乙烯(2)醚(商品名卜利茲 92)、硬脂基聚氧乙烯(2)醚(商品名卜利茲 72)、月桂基聚氧乙烯(4)醚(商品名卜利茲 30)、油基聚氧乙烯(2)醚(商品名給娜普魯 0-020)、氧乙烯與氧丙烯之嵌段共聚物(商品名辛佩洛尼克)等。油可列舉例如玉米油、橄欖油、棉籽油、向日葵油等。又，軟膏劑時可使用適當之醫藥上容許之基劑(黃色凡士林、白色凡士林、石蠟、增塑基劑、聚矽氧、白色軟膏、蜜蠟、豬油、植物油、親水軟膏、親水凡士林、精製羊毛脂、加水羊毛脂、吸水軟膏、親水增塑基劑、聚乙二醇軟

膏等)，與有效成分混合並製劑化使用。

吸入劑可根據常法製造。亦即，可將上述本發明之適體及複合體作成粉末或液狀，配合於吸入噴射劑及／或載體中，填充於適當之吸入容器即可製造。上述本發明之適體及複合體為粉末時可使用通常之機械性粉末吸入器，為液狀時可使用噴霧器等吸入器。噴射劑可廣泛使用以往公知者，可例示弗龍-11、氟龍-12、氟龍-21、氟龍-22、氟龍-113、氟龍-114、氟龍-123、氟龍-142c、氟龍-134a、氟龍-227、氟龍-C318、1,1,2,2-四氟乙烷等氟龍系化合物，丙烷、異丁烷、正丁烷等烴類，乙醚等醚類，氮氣氣體、二氧化碳氣體等壓縮氣體等。

本發明醫藥之投予量根據有效成分之種類、活性、疾病之嚴重度、投予對象之動物類、投予對象之藥物受容性、體重、年齡等而異，通常成人1日之有效分量為約0.0001至約100mg/kg，例如約0.0001至約10mg/kg，較好約0.005至約1mg/kg。

本發明亦提供將本發明之適體及複合體固定化之固相載體。固相載體列舉例如基板、樹脂、盤(例如多洞盤)、過濾器、筒、管柱、多孔質材。基板可為DNA晶片或蛋白質晶片等所使用者等，可列舉例如以鎳-PTFE(聚四氟乙烯)基板或玻璃基板、磷灰石基板、矽基板、氧化鋁基板等，在該等基板上實施聚合物等之包覆者。樹脂可列舉例如瓊脂糖粒子、二氧化矽粒子、丙烯醯胺與N,N'-甲撐雙丙烯醯胺之共聚物、聚苯乙烯交聯二乙烯苯粒子、將葡聚糖用

環氧氯丙烷交聯之粒子、纖維素纖維、烯丙基葡聚糖與 N,N'-甲撐雙丙烯醯胺之交聯聚合物、單分散系合成聚合物、單分散系親水性聚合物、瓊脂糖東洋珠粒等，亦包括將各種官能基結合於該等樹脂之樹脂。本發明之固相載體可用於例如 MK 之精製及 MK 之檢測、定量。

本發明之適體及複合體可根據本身公知之方法固定於固相載體。例如將親和性物質(例如上述者)或規定之官能基導入本發明之適體及複合體，接著利用該親和性物質或規定之官能基，固定於固相載體之方法。本發明提供該等方法。規定之官能基為可供偶合反應之官能基，列舉例如胺基、硫醇基、羥基、羧基。本發明提供導入該等官能基之適體。

本發明提供 MK 之精製及濃縮方法。本發明之精製及濃縮方法包括將 MK 吸附於本發明之固相載體，將吸附之 MK 藉由溶出液溶出。MK 對本發明固相載體之吸附可根據本身公知之方法進行。例如將含有 MK 之試料(例如細菌或細胞培養物或培養上澄液、血液)導入本發明之固相載體或其含有物中。MK 之溶出可使用中性溶液等溶出液進行。中性溶出液不只限於該等，可為例如 pH 約 6 至約 9，較好約 6.5 至約 8.5，更好約 7 至約 8 者。中性溶液包括例如鉀鹽(例如氯化鈉、氯化鉀)、鎂鹽(例如氯化鎂)、界面活性劑(例如吐恩 20、Triton、NP40)、甘油。本發明之精製及濃縮方法另包括在 MK 吸附後使用洗淨液將固相載體洗淨。洗淨液列舉例如尿素、螯合劑(例如 EDTA)、Tris、酸、

鹼等。本發明之精製及濃縮方法包括將固相載體進行加熱處理。經由相關之步驟，固相載體可再生、滅菌。

本發明又提供 MK 之檢測及定量方法。本發明之檢測及定量方法包括利用本發明之適體(例如使用本發明之複合體及固相載體)測定 MK。MK 之檢測及定量方法除了使用本發明之適體替代抗體之外，可根據與免疫學之方法相同之方法進行。因而，藉由使用本發明之適體替代抗體，經由與酵素免疫測定法(EIA)(例如直接競爭 ELISA、間接競爭 ELISA、夾心 ELISA)、放射免疫測定法(RIA)、螢光免疫測定法(FIA)、西方點墨法(Western blot)(例如在西方點墨法中替代二次抗體使用)、免疫組織化學染色法、細胞分選法等方法相同之方法即可進行檢測及定量。該等方法可用於例如活體或生物學試樣中 MK 量之測定、診斷與 MK 有關之疾病。

在包含本說明書中列舉之專利及專利申請說明書之所有刊物記載之內容經由在本說明書之引用，以與所示相同之程度編入於本說明書中。

以下，列舉實施例對於本發明作更詳細之說明，惟，本發明並不只限於下述之實施例等。

【實施方式】

[實施例 1]與中期因子特異性結合之核酸之製作 1

與中期因子特異性結合之核酸係使用 SELEX 法製作。SELEX 為將 Ellington 等人之方法(Ellington and Szostak, Nature 346, 818-822, 1990)及 Tuerk 等人之方法

(Tuerk and Gold, Science 249, 505-510, 1990)加以改良進行。作為標的物質之人類中期因子係參考 Murasugi 人等之方法 (Murasugi and Tohma-Aiba, Protein Expression and Purification 27, 244-252, 2003), 使用酵母製作。以下若未特別記載, 中期因子係指人類中期因子。中期因子經由胺基偶合化固定於瓊脂糖樹脂 (NHS-activated Sepharose, Amersham Bioscience 公司製造)。胺基偶合化係依照 Amersham Bioscience 公司之說明書進行。固定化量係以 SDS-PAGE 檢測固定化前之中期因子溶液與固定化後之上清液確認之。SDS-PAGE 之結果確認從上清液未檢測出中期因子之帶, 確認所使用之中期因子幾乎全部被偶合。約 175 μ g 之中期因子固定於約 70 μ L 之樹脂。

在最初回使用之 RNA(40N-RNA)係將經由化學合成獲得之 DNA 使用 DuraScribe™ T7 Transcription Kit (Epicentre 公司製造)轉錄而獲得。經由該方法獲得之 RNA 為嘧啶核苷酸之核糖之 2'位經氟化者。DNA 模板係使用如下所示之 40 個核苷酸隨機序列而兩端具有引子序列之長度 94 個核苷酸之 DNA。DNA 模板與引子係經由化學合成製作(Operon 公司製造)。

DNA 模板 : 5'-tcctcattcctgtcctcta-40N-ttctcttctcctctccc-3'

(序列編號 71)

引子-Fwd : 5'-taatacgactcactatagggagaggagaagaggaa-3'

(序列編號 72)

引子-Rev : 5'-tcctcattcctgtcctcta-3'(序列編號 73)

N 表示 A、G、C 或 T 中之任何一個。引子-Fwd 為含有 T7 RNA 聚合酶之起動子(promoter)序列。最初回使用之 RNA 池之變動，理論上為 10^{14} 。

於經中期因子固定化之樹脂中添加 RNA 池，於室溫保持 30 分鐘。30 分鐘後為了除去未與中期因子結合之 RNA，用溶液 A 將樹脂洗淨。溶液 A 為 145mM 氯化鈉、5.4mM 氯化鉀、1.8mM 氯化鈣、0.8mM 氯化鎂、20mM Tris(pH7.6)之混合溶液。結合於中期因子之 RNA 係以添加溶出液，於 95°C 加熱 10 分鐘進行回收。溶出液使用將 7M 尿素、3mM EDTA、100mM Tris 之混合溶液調製為 pH6.6 者。回收之 RNA 以 RT-PCR 放大，用 DuraScribe™ T7 Transcription Kit 轉錄，作為下一回之 RNA 池使用。將以上作為 1 回，同樣之操作進行 7 回。SELEX 完成後將 PCR 產物於 pGEM-T Easy 媒介(vector)(Promega 公司製造)進行選殖，轉形至大腸菌株 DH5 α (Toyobo 公司製造)。將從單一菌落(single wlong)萃取質體後用 DNA 定列儀(ABI PRISM3100、ABI 公司製造)決定 48 個純系(clone)之鹼基序列。

進行 SELEX 7 回後檢視序列時，在序列看到集束。序列編號 1 表示之序列存在有 20 序列，2 鹼基取代體存在有 1 序列。序列編號 2 表示之序列存在有 2 序列。序列編號 3 至 5 表示之序列存在有 1 序列。將序列編號 1 至 5 表示之 RNA 之二次構造用 MFOLD 程式(M.Zuker,Nucleic Acids Res.31(13),3406-3415,2003)預測。其結果看到與序列編號

2,3,4 表示之 RNA 形狀非常相似之內環-主幹-髮夾環構造 (第 1 圖至第 5 圖)。髮夾環全來自 8 核苷酸，對序列編號 4 而言，2 及 3 為 1 鹼基取代體。有關主幹，序列編號 2 係由 2 個鹼基對構成，序列編號 3 及 4 係由 3 個鹼基對構成。

以下分別表示各核苷酸序列。又，在核苷酸中之括弧表示其 2' 位之修飾，F 表示氟原子(以下相同)。

序列編號 1：

gggagaggagaagaggaaau(F)agu(F)u(F)aaggggu(F)gaau(F)u(F)u(F)gc(F)gaaagc(F)u(F)au(F)u(F)u(F)u(F)agu(F)c(F)gc(F)agu(F)agaggac(F)aggaau(F)gagga

序列編號 2：

gggagaggagaagaggaaggac(F)u(F)aagu(F)aagagaac(F)ac(F)c(F)ggaau(F)gaaggac(F)u(F)u(F)ac(F)gu(F)gu(F)agaggac(F)aggaau(F)gagga

序列編號 3：

gggagaggagaagaggaaagc(F)c(F)u(F)u(F)c(F)u(F)ac(F)c(F)ga aagu(F)gggaaagc(F)ac(F)ac(F)au(F)aaau(F)c(F)u(F)ggu(F)agaggac(F)aggaau(F)gaga

序列編號 4：

gggagaggagaagaggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gu(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggu(F)gu(F)gu(F)agaggac(F)aggaau(F)gaga

序列編號 5：

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)gg

u(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)agu(F)au(F)aagau(F)agaggac(F)aggaau(F)gaga

髮夾環序列

序列編號 2 -ggaaugaa-

序列編號 3 -ggaaagca-

序列編號 4 -ggaaagaa-

[實施例 2]

與中期因子特異性結合之核酸之製作 2

為了製作結合於中期因子但未結合於中期因子家族蛋白質之多效生長因子之適體，進行包括使用多效生長因子之預減算(presubtraction)之 SELEX。首先，與中期因子相同地，經由胺基偶合化將多效生長因子固定在瓊脂糖樹脂。接著，將 RNA 池加入結合有多效生長因子之樹脂中，於室溫保持 30 分鐘後只回收上清液。該上清液理論上不含未結合於多效生長因子之 RNA。將該上清液加入結合有中期因子之樹脂中，與實施例 1 相同，進行 SELEX。多效生長因子係使用根據 Murasugi 等人之方法(Murasugi, Kido, Kumai, and Asami, Biosci, Biotech. Biochem. 67(10),2288-2290,2003)用酵母表現者。DNA 模板及引子係使用與實施例 1 所用相同者。

在 7 回完成後確認 48 個純系之序列，看到集束。其中，與實施例 1 獲得之序列編號 3 相同之序列有 10 序列存在，其 1 鹼基取代體存在有 1 序列。與序列編號 2 相同之序列存在有 6 序列，其 1 鹼基取代體存在有 2 序列。與序

列編號 5 相同之序列存在有 1 序列。

[實施例 3]

與中期因子特異性結合之核酸之製作 3

若將中期因子經由胺基偶合化固定，則視胺基偶合化之處，重要部位可能被破壞。所以使用在載體不會伴隨固定化之硝基纖維素膜之過濾器結合 SELEX 進行。利用蛋白質容易結合於硝基纖維素膜，而核酸不易結合之性質，將結合於標的蛋白質之核酸與未結合之核酸分離。將 RNA 池與中期因子混合，於室溫保持 30 分鐘後用硝基纖維素膜過濾。硝基纖維素膜用溶液 A 充分洗淨後將該硝基纖維素膜浸在溶出液 B 中，於 90°C 加熱 5 分鐘後與實施例 1 相同，經以乙醇沉澱法回收 RNA，用 RT-PCR 放大、轉錄，作為下一回之 RNA 池。DNA 模板及引子係使用與實施例 1 相同者。又，溶出液 B 為 50% 苯酚(phenol)與 6M 尿素之混合液。

6 回完成後確認 48 個純系之序列，惟，未獲得充分之集束。此處再進行 3 回 SELEX，於 9 回完成後確認 48 個純系之序列，看到充分之集束。在該序列中，與序列編號 2 相同序列者存在有 21 序列，其 1 鹼基取代體存在有 4 序列。與序列編號 4 相同序列者存在有 10 序列。新的序列雖看到 3 序列，惟，任何一個均未集束。

[實施例 4]

經由表面電漿共振法評估結合活性

根據表面電漿共振法檢測對序列編號 1 至 5 表示之

RNA 之中期因子之結合活性。測定係使用 BIAcore 公司製造之 BIA core2000。傳感器晶片係使用將鏈抗生物素蛋白 (streptavidin) 固定之 SA 晶片。此處，在 5' 末端將結合生物素之 16 個核苷酸之 Poly dT 以約 1000RU 程度結合。成為配位體 (ligand) 之 RNA 係在 3' 末端附加 16 個核苷酸之 Poly A，經由 dT 與 A 之結合固定於 SA 晶片。固定化量約為 1000RU。分析物用之中期因子為將調製成 $0.5 \mu\text{M}$ 者噴射 $70 \mu\text{L}$ 。BIAcore 之流動緩衝液係使用溶液 A。由測定結果明瞭序列編號 1 至 5 表示之 RNA 全部結合於中期因子 (第 6 圖)。將含有 40 個核苷酸隨機序列之 40N-RNA 固定作為陰性對照 (negative control)，進行同樣之測定。由其結果明瞭 40N-RNA 亦對中期因子具有親和性。其程度係與序列編號 1 至 5 表示之 RNA 之親和性同程度的高。由於中期因子富含離胺酸等鹼性胺基酸，預測與帶負電荷之核酸係非特異性結合。

使用在 BIAcore 之流動緩衝液係使用將溶液 A 之氯化鈉濃度作成 500mM 之高鹽濃度緩衝液 (溶液 B) 進行測定。使用高鹽濃度之緩衝液，預測可減低離子結合性之非特異性吸附。從測定之結果明瞭 40N-RNA 幾乎未結合於中期因子。另一方面，序列編號 2 至 5 表示之 RNA 與中期因子之結合比 40N-RNA 優先 (第 7 圖)。在高鹽濃度下結合，該結合為疏水結合之可能性高，啟示該等 RNA 於離胺酸部分不是非特異性結合，而是特異性地辨識中期因子。

接著，將中期因子經由胺基偶合化固定於 CM4 傳感

器晶片，噴射作為分析物之序列編號 4 或 5 表示之 RNA，進行確認 RNA 與中期因子親和性之實驗。中期因子之固定化係根據 BIAcore 公司之說明書，使用 N-羥基琥珀醯亞胺 (N-hydroxysuccinimide)(NHS，11mg / L) 及 N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基) 碳二亞胺鹽酸鹽 (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)(EDC，75mg / L) 進行。中期因子用 HBS-EP 緩衝液 (BIAcore 公司製造) 稀釋，以 20 μ g / mL 之濃度使用。封鎖 (blocking) 係使用 1M 乙醇胺鹽酸鹽 (ethanolamine hydrochloride)(pH8.5)。在一個傳感器晶片之流動池 (flowcell) 2 將 MK(1-59，MK-N，肽研究所製造) 固定，在流動池 3 將 MK(60-121，MK-C，肽研究所製造) 固定，在流動池 4 將中期因子之全長 (MK-NC) 固定。流動池 1 作為對照用池使用。將 3 種中期因子及中期因子片段固定在一個傳感器晶片，可 1 次測定對於 3 種配位體基之親和性。由測定之結果明瞭序列編號 4 表示之 RNA 雖結合於中期因子之全長 (以下以 MK-NC 記載) 及中期因子之 C-區域 (以下以 MK-C 記載)，但不結合於中期因子之 N-區域 (以下以 MK-N 記載) (表 1)。另一方面，序列編號 5 表示之 RNA 雖與 MK-NC、MK-N、MK-C 之任一者都結合，但與 MK-N 之親和性比 MK-C 高。

[表 1]

中期因子與各種分析物之親和性

	中期因子		
	全長	MK-N	MK-C
序列編號 4	+++	-	++
序列編號 5	+++	++	+
肝素	+++	+	+++
硫酸軟骨素 E	+++	+	+++
硫酸軟骨素 C	+	-	+
tRNA	+++	-	+++

根據表面電漿共振法測定，將中期因子固定於 CM4 傳感器晶片，以各種分析物進行噴射。親和性之高低依序為+++、++、+、-。

分析物係使用肝素鈉(Heparin Sodium Salt, Porcine Intestinal Mucosa, Low Molecular Weight, Mw:5000, Calbiochem 公司製造)、硫酸軟骨素 E(源自鯊魚軟骨，生化學工業公司製造)、硫酸軟骨素 C(源自鯊魚軟骨，Mw:40,000-80,000，生化學工業公司製造)、tRNA(Sigma 公司製造)替代 RNA，進行相同之試驗。其結果明瞭該等所有之分析物與 MK-N 之親和性低，主要結合於 MK-C(表 1)。

根據以上可明瞭序列編號 4 表示之 RNA 與肝素等相同，結合於中期因子之 C 區域。另一方面，序列編號 5 表示之 RNA 與 C 區域之親和性低，與 N 區域之結合較強。表示序列編號 4 及 5 表示之 RNA 結合於中期因子之不同部位。已知中期因子在 C 區域具有為肝素結合部位之活性

部位(Muramatsu H et al.,Biochem Biophys Res Commun, 1994 Sep 15; 203(2): 1131-9.,106.: Iwasaki W et al., EMBO J.1997 Dec 1;16(23):6936-46.)。

與上述相同，根據表面電漿共振法檢測序列編號 5 表示之 RNA 對中期因子家族蛋白質之多效生長因子是否具有結合活性。將 RNA 固定於 SA 傳感器晶片，噴射 $0.5 \mu\text{M}$ 之多效生長因子。為了減低非特異性吸附，在多效生長因子溶液中加入 $0.4\text{mg}/\text{mL}$ 之 tRNA。由測定結果明瞭序列編號 5 表示之 RNA 對於多效生長因子具有結合活性，惟，其程度比對中期因子者低。對配位體使用 40N-RNA，進行相同之測定。雖然中期因子及多效生長因子都結合於 40N-RNA，惟，其程度較對序列編號 5 表示之 RNA 低。又，40N-RNA 對於中期因子之親和性高於多效生長因子。根據以上可明瞭多效生長因子與中期因子相同，具有容易與核酸結合之性質。又，序列編號 5 表示之 RNA 對於中期因子具有高於多效生長因子之親和性。

接著，對於序列編號 4 及 5 表示之 RNA 對於其他蛋白質是否具有親和性進行檢測。蛋白質係使用人類 IgG1(Calbiochem 公司製造)及人類白蛋白(Sigma 公司製造)。使用 SA 傳感器晶片，以上述相同之方法將 RNA 固定，噴射作為分析物之蛋白質。其結果明瞭對序列編號 4 及 5 表示之 RNA，人類 IgG1 及人類白蛋白完全未結合。根據以上可明瞭，序列編號 4 及 5 表示之 RNA 係未與在血中多量存在之人類白蛋白或人類 IgG 結合。

測定序列編號 2 至 7、31、32、36、40、40-1 及 40-2 表示之 RNA 與 MK 之結合活性。與上述相同，將 MK 固定於 CM4 傳感器晶片進行測定。其結果可明瞭任一者對於 MK 都具有親和性。

[實施例 5]

根據細胞遊走阻礙實驗評估 RNA 適體

已知中期因子具有成骨細胞前驅細胞之細胞浸潤作用 (Qi et al., J. Biol. Chem. 276(19), 15868-15875, 2001)。使用大鼠成骨細胞前驅細胞之 UMR106 細胞 (ATCC No. CRL1661) 檢測所製作之 RNA 適體是否阻礙中期因子之細胞遊走活性。在 Chemotaxicell (膜孔徑 $8\ \mu\text{m}$ ，克拉堡公司製造) 之膜外面塗抹 $1.5\ \mu\text{M}$ 之中期因子 $30\ \mu\text{L}$ ，將中期因子固定在膜外面。在添加有含有 RNA 適體 100Nm 之 $500\ \mu\text{L}$ 培養基 (添加 0.3% 牛血清白蛋白，Dulbecco's Modified Eagle's medium) 之 24 洞培養盤中設置將中期因子固定之 chemotaxicell。於 Chemotaxicell 室內層放入 $1 \times 10^6\ \text{cell}/\text{mL}$ 濃度之 UMR106 細胞 $200\ \mu\text{L}$ ，於 37°C 培養 4 小時。除去殘存在 chemotaxicell 室內層之細胞，浸潤於中期因子塗抹面，將黏著之細胞用甲醇固定。將 chemotaxicell 室在 1% 結晶紫 (crystal violet) 水溶液浸漬 30 分鐘，將細胞染色。用蒸餾水將 chemotaxicell 室洗淨、乾燥後用 $200\ \mu\text{L}$ 之 1% SDS 及 1% tritonX100 之混合液萃取色素。將萃取液之 $150\ \mu\text{L}$ 移至 96 洞微盤，測定 590nm 之吸光度。

從測定之結果可明瞭序列編號 1、2、4、5 表示之 RNA

具有顯著之細胞遊走阻礙活性。其結果表示於表 2。序列編號 5 表示之適體顯示最高之阻礙活性，14 次測定之平均值為 76%。又，作為陰性對照使用之 40N-RNA 幾乎未顯示阻礙活性。

[表 2]

所製作之適體對於中期因子及多效生長因子之細胞遊走阻礙活性

序列編號	中期因子		多效生長因子	
	阻礙活性%	測定次數	阻礙活性%	測定次數
1	36	4	0	2
2	45	4	-	-
4	63	6	8	2
5	76	14	17	6
40N-RNA	8	6	28	2

RNA 濃度：100nM

阻礙活性%係指以未加入適體時移動之細胞數(染色細胞萃取液之吸光度)作為 100，從 100 減去加入適體時移動之細胞數所得之值。表中之%為表中所示測定次數之平均值。

接著檢測序列編號 4 及 5 表示之適體對於多效生長因子是否具有細胞遊走阻礙活性。實驗除了使用多效生長因子替代中期因子之外，全以與上述相同之方法進行。實驗結果可明瞭該等適體對於多效生長因子未顯示顯著之阻礙活性(表 2)。

接著研究肝素、硫酸軟骨素 E、硫酸軟骨素 C 是否具

有阻礙中期因子及多效生長因子之細胞遊走活性。實驗除了使用肝素、硫酸軟骨素 E、硫酸軟骨素 C 替代適體之外，全以與上述相同之方法進行。肝素使用奈良科技公司製造者。硫酸軟骨素 E 及 C 使用與實施例 4 使用相同者。肝素與硫酸軟骨素 E 之濃度為 0.1、1、10、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。實驗結果，肝素在 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阻礙中期因子及多效生長因子之細胞遊走活性。又，在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之濃度阻礙中期因子及多效生長因子 80% 以上之細胞遊走活性。另一方面，硫酸軟骨素 E 在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之濃度阻礙中期因子 49%，多效生長因子 69%。將硫酸軟骨素 C 分子量假設為 40,000，以 500nM (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 進行實驗。其結果，將序列編號 4 表示之適體 (500nM) 之阻礙活性作為 100，則硫酸軟骨素 C 之阻礙活性為 44。

綜上可明瞭序列編號 1、2、4、5 表示之適體對中期因子特異性結合，阻礙其細胞遊走活性。40N-RNA 係靜電非特異性吸附於中期因子，惟不阻礙細胞遊走活性。此顯示由 SELEX 獲得之 RNA 不是非特異吸附者，而是結合於與細胞遊走活性有關之重要部位。肝素與硫酸軟骨酸 E 不區別中期分子及多效生長因子，同等地阻礙細胞遊走活性。另一方面，序列編號 4 及 5 表示之適體只阻礙中期因子之活性。中期因子與多效生長因子之一致性為 50%，尤其是肝素結合部位高度保存著，因而適體之特異性高是可理解的。

[實施例 6]

序列編號 4 表示之適體之小型化及安定化

序列編號 4 表示之適體為 77 個核苷酸之長度，在嘧啶核苷酸之核糖 2' 位經氟化。為了期望可化學合成、減低毒性及提昇血中安定性，將該適體小型化及安定化。小型化及安定化作業以根據 MFOLD 程式預測之二次構造為基礎進行，其活性係根據細胞遊走阻礙實驗進行評估。細胞遊走阻礙實驗中 RNA 之濃度為 100nM 或 500nM。由於依細胞之狀態，實驗結果會產生少許誤差，在各測定中包含以前測定過之試樣作為陽性對照(positive control)。RNA 之濃度為 500nM 時之阻礙活性示於表 3(表 3-1 及表 3-2)。阻礙活性係明確顯示改變體間活性之不同，以序列編號 4 表示之適體活性作為 100 之相對值表示。序列編號 4 表示之適體之阻礙活性%(以未加入適體時移動之細胞數作為 100，從 100 減去加入適體時移動之細胞數所得之值)在 500nM 時為 73%。該等為 4 次測定之平均值。100nM 時阻礙活性%之 6 次測定平均值為 63%。

[表 3-1]

序列編號 4 表示之 RNA 改變體對中期因子之細胞遊走阻礙活性

序列編號	活性	測定次數	長度(nt)
4	100	2	77
	57(小鼠)	2	
6	110	2	67
7	91	2	64
8	100	2	69
9	57	2	66
10	81	2	73
11	100	2	77
12	100	2	58
13	100	2	50
14	100	2	54
15	75	2	56
16	61	2	57
17	68	2	46
18	88	2	37
19	94	2	44
20	97	2	42
20-1	109	2	42
20-2	84	2	42
20-3	60	2	42
20-4	60	2	42
20-5	88	2	42
20-6	69	2	42
20-7	88	2	42
20-8	99	2	42
20-9	130	2	42
20-10	86	2	42
20-11	76	2	42
20-12	53	2	42
20-13	89	2	42

[表 3-2]

序列編號	活性	測定次數	長度(nt)
21	0	2	44
22	70	6	33
23	66	2	38
24	65	2	38
25	81	2	41
26	18	2	41
27	78	2	41
28	71	2	31
29	74	2	31
Cond-C	44	2	

RNA 之濃度為 500nM。活性係以序列編號 4 表示之 RNA 活性為 100，以相對值表示。序列編號 4 表示之 RNA 阻礙活性%為 73%。該值為 4 次測定之平均值。(小鼠(mouse)) 表示對小鼠中期因子之值。Cond-C 表示硫酸軟骨素 C。

以下，對於改變體之改變部分(序列編號 6 至 29)加以說明。

序列編號 6：以序列編號 4 表示之 RNA 為基礎，將 3' 末端側之單股部分刪除 10 個核苷酸者。

gggagaggagaagaggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gu(F)ac(F)
gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggu(F)gu(F)gu(F)agag
gac(F)a

序列編號 7：以序列編號 4 表示之 RNA 為基礎，將 5' 末端側之單股部分刪除 14 個核苷酸，而為轉錄附加一個 G 者。

gggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gu(F)ac(F)gaggagu(F)agc(

F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggu(F)gu(F)gu(F)agaggac(F)aggaau(F)
)gagga

序列編號 8：以序列編號 4 表示之 RNA 為基礎，刪除末端側主幹中之 4 個鹼基對者。

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)gu(F)ac(F)gaggagu(F)agc
 (F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggu(F)gu(F)gu(F)agc(F)aggaau(F)ga
 gga

序列編號 9：以序列編號 4 表示之 RNA 為基礎，刪除內環之 8 個核苷酸及其相對側之 CGG 者。

gggagaggagaagaggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gu(F)ac(F)
 gc(F)c(F)ggaaagaaggu(F)gu(F)gu(F)agaggac(F)aggaau(F)ga
 gga

序列編號 10：以序列編號 4 表示之 RNA 為基礎，將環部分作成 GAAA 四環(tetra-loop)者。

gggagaggagaagaggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gu(F)ac(F)
 gaggagu(F)agc(F)c(F)gaaaggc(F)ggu(F)gu(F)gu(F)agaggac(
 F)aggaau(F)gagga

序列編號 11：以序列編號 4 表示之 RNA 為基礎，將末端側主幹中 3 個地方之 G-U 鹼基對改變為 G-C 鹼基對者。

gggagaggagaagaggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gc(F)ac(F)
 gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)gc(F)agag
 gac(F)aggaau(F)gagga

序列編號 12：以序列編號 8 表示之 RNA 為基礎，將末端側主幹中 3 個地方之 G-U 鹼基對改變為 G-C 鹼基對，將 3'

末端側之單股刪除 11 個核苷酸者。

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)gc(F)ac(F)gaggagu(F)agc
(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)gc(F)agc(F)

序列編號 13：以序列編號 12 表示之 RNA 為基礎，將 5' 末端側單股部分之 11 個核苷酸刪除，而為了轉錄附加 GGG 者。

gggagaggaac(F)gc(F)u(F)gc(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)g
gaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)gc(F)agc(F)

序列編號 14：以序列編號 12 表示之 RNA 為基礎，將末端側主幹中之 1 個 G-C 及 1 個 C-G 鹼基對刪除者。

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)
(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)agc(F)

序列編號 15：以序列編號 12 表示之 RNA 為基礎，刪除環部分之 A36 及 A37 者。

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)gc(F)ac(F)gaggagu(F)agc
(F)c(F)ggaaagggc(F)ggc(F)gu(F)gc(F)agc(F)

序列編號 16：以序列編號 12 表示之 RNA 為基礎，刪除內環部分之 A23 者。

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)gc(F)ac(F)gagggu(F)agc(F)
(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)gc(F)agc(F)

序列編號 17：以序列編號 13 表示之 RNA 為基礎，刪除末端側主幹中之 1 個 G-C 及 1 個 C-G 鹼基對者。

gggagaggaac(F)gc(F)u(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaag
aaggc(F)ggc(F)gu(F)agc(F)

序列編號 18：以序列編號 17 表示之 RNA 為基礎，將 5' 末端之單股部分刪除 11 個核苷酸，而為了轉錄附加 GG 者。

gggc(F)u(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)agc(F)

序列編號 19：以序列編號 17 表示之 RNA 為基礎，刪除末端側主幹中之 1 個 C-G 鹼基對者。

gggagaggaac(F)gu(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)ac(F)

序列編號 20：以序列編號 17 表示之 RNA 為基礎，刪除末端側主幹中之 1 個 C-G 及 1 個 U-A 鹼基對者。

gggagaggaac(F)gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

序列編號 20-1：序列編號 20 表示之 RNA 單股部分全部經 OMe 修飾者。

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

序列編號 20-2：序列編號 20 表示之 RNA 之第一個主幹部分經 OMe 修飾者。

gggagaggaac(F)g(M)a(M)c(F)g(M)aggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)g(M)u(F)c(F)

序列編號 20-3：序列編號 20 表示之 RNA 之第二個主幹部分經 OMe 修飾者。

gggagaggaac(F)gac(F)gaggagu(F)ag(M)c(F)c(F)ggaaagaag(M)g(M)c(F)ggc(F)gu(F)c(F)

序列編號 20-4：序列編號 20 表示之 RNA 之環部分之 G 經 OMe 修飾者。

gggagaggaac(F)gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)g(M)g(M)aaag(M)aaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

序列編號 20-5：序列編號 20-1 表示之 RNA 突出部分之 A 經 OMe 修飾者。

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)gac(F)ga(M)gga(M)gu(F)a(M)gc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

序列編號 20-6：序列編號 20-1 表示之 RNA 突出部分之 G 經 OMe 修飾者。

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)gac(F)gag(M)g(M)ag(M)u(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

序列編號 20-7：序列編號 20-1 表示之 RNA 環部分之 A 經 OMe 修飾者。

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)gga(M)aa(M)gaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

序列編號 20-8：序列編號 20-5 表示之 RNA 環部分之 A 經 OMe 修飾者。

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)gac(F)ga(M)gga(M)gu(F)a(M)gc(F)c(F)gga(M)aa(M)gaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

序列編號 20-9：序列編號 20-5 表示之 RNA 之第一個主幹經 OMe 修飾者。

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)g(M)a(M)c(F)ga(M)gga(M)gu(F)a(M)gc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)g(M)u(F)c(F)

序列編號 20-10：序列編號 20-5 表示之 RNA 之一部分經 OMe 修飾者。

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)gac(F)ga(M)gga(M)gu(F)a(M)gc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)g(M)g(M)c(F)gu(F)c(F)

序列編號 20-11：序列編號 20-5 表示之 RNA 之一部分經 OMe 修飾者。

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)g(M)a(M)c(F)ga(M)gga(M)gu(F)a(M)gc(F)c(F)gga(M)aa(M)gaaggc(F)g(M)g(M)c(F)g(M)u(F)c(F)

序列編號 20-12：序列編號 20-5 表示之 RNA 之一部分經 OMe 修飾者。

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)g(M)a(M)c(F)ga(M)gga(M)gu(F)a(M)gc(F)c(F)gga(M)aa(M)g(M)aggc(F)ggc(F)g(M)u(F)c(F)

序列編號 20-13：序列編號 20-5 表示之 RNA 之一部分經 OMe 修飾者。

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)g(M)a(M)c(F)ga(M)gga(M)gu(F)a(M)gc(F)c(F)gga(M)aa(M)gaagc(F)ggc(F)g(M)u(F)c(F)

M)gc(F)ggc(F)g(M)u(F)c(F)

序列編號 21：以序列編號 17 表示之 RNA 為基礎，刪除環側主幹部分之一個 G-C 鹼基對者。

gggagaggaac(F)gc(F)u(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)ggaaagaagc(F)ggc(F)gu(F)agc(F)

序列編號 22：以序列編號 20 表示之 RNA 為基礎，將 5' 末端之單股部分刪除 11 個核苷酸，而為了轉錄附加二個 G 者。

gggac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

序列編號 23：以序列編號 20 之 RNA 為基礎，將環部分 GAAA 四環化(tetra-looped)者。

gggagaggaac(F)gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)gaaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

序列編號 24：以序列編號 20 之 RNA 為基礎，將環部分 UUCG 四環化者。

gggagaggaac(F)gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)u(F)u(F)c(F)gggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

序列編號 25：以序列編號 20 表示之 RNA 為基礎，將內環部分替換為序列編號 2 表示之適體之內環者。

gggagaggaac(F)gac(F)gagaac(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)gggc(F)gu(F)c(F)

序列編號 26：以序列編號 20 表示之 RNA 為基礎，刪除內環之 G18 者。

gggagaggaac(F)gac(F)gagagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)g
gc(F)gu(F)c(F)

序列編號 27：以序列編號 20 表示之 RNA 為基礎，刪除內
環之 A19 者。

gggagaggaac(F)gac(F)gaggggu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)g
gc(F)gu(F)c(F)

序列編號 28：將序列編號 22 表示之 RNA 5' 末端之 2 個 G
去除，並將第二個鹼基對 A-U 替換為 G-C 者。

ggc(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gc(F)c(F)

序列編號 29：將序列編號 22 表示之 RNA 5' 末端之 2 個 G
去除者。

gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

又，檢測序列編號 4 表示之適體對於小鼠中期因子之
細胞遊走阻礙活性。實驗方法係與上述對人類中期因子之
實驗相同。實驗結果本適體之阻礙活性%為 50%。該等在
以本適體對人類中期因子之阻礙活性為 100 時，為約 57，
與對人類中期因子之阻礙活性比較，其活性明顯落後。據
此可明瞭本發明之適體係對人類中期因子具更高阻礙活性
之適體。

如表 3 所示，為 77 個核苷酸之序列編號 4 表示之適
體，可在活性不會大幅度降低下小型化至 31 個核苷酸(序
列編號 28、29)。所獲得之本適體之髮夾環部分不一定必
需為 GGAAAGAA，即使為 GAAA 或 UUCG 四環，亦保持

活性(序列編號 23、24)。內環部分即使換成序列編號 2 表示之適體之內環部分，亦保持有活性(序列編號 25)。又，即使刪除 A19，亦保持活性，惟，若刪除 G18，則活性極端降低(序列編號 26、27)。另一方面明瞭若刪除環側主幹之 C-G 鹼基對，則二次構造大幅度改變，導至阻礙活性消失(序列編號 21)。根據上述，序列編號 20 表示之 42 個核苷酸之適體(第 8 圖)若基本構造無大幅度變化，則即使將一部分核苷酸用其他核苷酸取代、刪除，亦保持有活性。

[實施例 7]

序列編號 5 表示之適體之小型化及安定化

序列編號 5 表示之適體為 77 個核苷酸之長度，嘧啶核苷酸之核糖之 2' 位被氟化。為了可化學合成、降低毒性及提昇血中安定性，企望進行該適體之小型化及安定化。小型化及安定化作業係根據 MFOLD 程式，以預測的二次構造為基礎進行，根據細胞遊走阻礙實驗評估其活性。細胞遊走阻礙實驗中 RNA 之濃度為 100nM 或 500nM。依細胞之狀態，實驗結果產生少許誤差，在各測定中包含以前測定過之試樣作為陽性對照(positive control)。RNA 之濃度為 100nM 時之阻礙活性示於表 4-1。阻礙活性係明確顯示改變體間之活性不同，以序列編號 5 表示之適體活性作為 100，以其相對值表示。序列編號 5 表示之適體之阻礙活性%(以未加入適體時移動之細胞數作為 100，從 100 減去加入適體時移動之細胞數之值)在 100nM 時為 76%。該等為 14 次測定之平均值。以 RNA 之濃度為 500nM，進行

相同之實驗。其結果表示於表 4-2(表 4-2-1、表 4-2-2)。活性係以序列編號 40 表示之適體活性作為 100，以其相對值表示。序列編號 40 表示之適體阻礙活性%為 82%。該等為 4 次測定之平均值。

[表 4-1]

序列編號	中期因子		多效生長因子		長度(nt)
	活性	測定次數	活性	測定次數	
5	100	14	13	6	77
30	44	2	-	-	71
31	94	6	17	4	67
32	100	6	11	4	57
33	40	6	5	4	61
34	0	2	-	-	46
35	90	4	0	2	51
36	91	4	27	2	53
36-1	60	4	0	2	53
37	0	2	-	-	49
38	0	2	-	-	57
39	52	2	-	-	45
40	98	4	0	2	49
40-1	80	2	-	-	49
40-3	65	2	-	-	49
41	97	4	8.1	2	52
42	110	4	8.7	2	52
43	42	2	-	-	52

RNA 之濃度為 100nM。活性係以序列編號 5 表示之 RNA 對中期因子之阻礙活性作為 100，以其相對值表示。序列編號 5 表示之 RNA 對中期因子之阻礙活性為 76%。該值為 14 次測定之平均值。

[表 4-2-1]

序列編號	活性	測定次數	長度 (nt)
40	100	2	49
40-1	99	2	49
40-2	88	2	49
40-3	100	2	49
44	100	2	47
45	100	2	45
45-1	100	2	45
45-2	100	2	45
45-3	56	2	45
45-4	100	2	45
45-4-1	98*	2	45
45-4-1-1	85*	2	45
46	92	2	49
47	84	2	48
48	60	2	48
49	69	2	48
50	91	2	43
51	100	2	51
52	100	2	51
53	100	2	51
54	100	2	45
55	100	2	43
56	100	2	43
57	100	2	43
58	100	2	43
59	53	2	29
60	70	2	35

[表 4-2-2]

序列編號	活性	測定次數	長度 (nt)
61	100	2	39
61-1	45*	2	39
61-2	55*	2	39
61-3	80	2	39
61-4	86	2	39
61-5	40	4	39
61-6	57	4	39
61-7	46	2	39
61-8	54	2	39
61-9	39	4	39
62	44	2	39
63	97	2	45
64	55*	2	37
65	0	2	39
66	51	2	38
67	110	2	38
68	72	2	39
69	60	2	39
70	110	2	39
tRNA	28	2	
Thrombin-S	0	2	
HIV-S	48	2	

RNA 之濃度為 500nM。活性係以序列編號 40 表示之 RNA 對中期因子之阻礙活性作為 100，以其相對值表示。序列編號 40 表示之 RNA 對中期因子之阻礙活性%為 82%。該等值為 4 次測定之平均值。

*表示概算值。

以下，對於改變體之改變部分(序列編號 30 至 70)加以說明。

序列編號 30：將序列編號 5 表示之 RNA 之 5' 末端側之單股部分刪除 6 個核苷酸，而為了轉錄附加一個 G 者。

ggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)agu(F)au(F)aagau(F)agaggac(F)aggaau(F)gagga

序列編號 31：將序列編號 5 表示之 RNA 之 3' 末端側之單股部分刪除 10 個核苷酸者。

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)agu(F)au(F)aagau(F)agaggac(F)a

序列編號 32：將序列編號 5 表示之 RNA 之 3' 末端側之單股部分刪除 20 個核苷酸者。

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

序列編號 33：將序列編號 5 表示之 RNA 之 5' 末端側之單股部分刪除 6 個核苷酸，將 3' 末端側之單股部分刪除 10 個核苷酸者。

ggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)agu(F)au(F)aagau(F)agaggac(F)a

序列編號 34：將序列編號 5 表示之 RNA 之 5' 末端側之單股部分刪除 12 個核苷酸，將 3' 末端側之單股部分刪除 10 個核苷酸者。

ggaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)

)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

序列編號 35：將序列編號 32 表示之 RNA 之 3' 末端側之單股部分刪除 6 個核苷酸者。

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)gg
u(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)ag

序列編號 36：將序列編號 32 表示之 RNA 末端側之主幹刪除 2 鹼基對者。

gggagaggagaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)g
u(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

序列編號 36-1：將序列編號 36 表示之 RNA 之 5' 末端側之單股部分全部以 OMe 修飾者。

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)a(M)g
(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)g
gu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

序列編號 37：將序列編號 32 表示之 RNA 末端側之主幹刪除 4 個鹼基對者。

gggagaggagaagaggaagc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(
F)gggu(F)gc(F)agu(F)au(F)aag

序列編號 38：將序列編號 32 表示之 RNA 之 5' 末端側之單股部分作成 polyU 者。U 為核糖 2' 位經氟化者。

gggu(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)
u(F)u(F)gu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)
)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

序列編號 39：將序列編號 36 表示之 RNA 之 3' 末端側之單

股部分刪除 6 個核苷酸，末端側主幹刪除 1 鹼基對者。

gggagaggagaagaggaaggc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)
c(F)gggu(F)gc(F)c(F)ag

序列編號 40：將序列編號 36 表示之 RNA 之 3' 末端側之單股部分刪除 8 個核苷酸者。

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)gg
u(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)

序列編號 40-1：在序列編號 40 表示之 RNA 之 5' 末端附加包挾 C12 連接體，分子量為 2000 之聚乙二醇，在 3' 末端附加 idT 者。

PEG2000-C12-gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)ag
gggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)-idT

序列編號 40-2：將序列編號 40 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 G 全經 OMe 修飾者。

g(M)g(M)g(M)ag(M)ag(M)g(M)ag(M)aag(M)ag(M)g(M)aag
u(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)g
c(F)au(F)ac(F)

序列編號 40-3：將序列編號 40 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 A 全部以 OMe 修飾者。

ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)gu(F)gu(
F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(
F)ac(F)

序列編號 41：將序列編號 36 表示之 RNA 之 5' 末端側單股部分之 G5 刪除者。

gggaaggagaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

序列編號 42：將序列編號 36 表示之 RNA 之 5' 末端側單股部分之 A11 刪除者。

gggagaggagagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

序列編號 43：將序列編號 36 表示之 RNA 之 5' 末端側單股部分之 A17 刪除者。

gggagaggagaagaggagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

序列編號 44：將序列編號 40 表示之 RNA 末端側主幹之 1 鹼基對刪除者。

gggagaggagaagaggaagu(F)u(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)aac(F)

序列編號 45：將序列編號 40 表示之 RNA 末端側主幹之 2 鹼基對刪除者。

gggagaggagaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 45-1：在序列編號 45 表示之 RNA 之 5' 末端附加包挾 C12 連接體，分子量為 2000 之聚乙二醇，在 3' 末端附加 idT 者。

PEG2000-C12-ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)-idT

序列編號 45-2：將序列編號 45 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 A 及環部分之 G 全部以 OMe 修飾者。

ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)gu(F)gc(F)ac(F)agggg(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 45-3：將序列編號 45 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 A 及內環部分之 A 及 G 全部以 OMe 修飾者。

ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)gu(F)gc(F)ac(F)a(M)g(M)gggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)g(M)g(M)gu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 45-4：將序列編號 45 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 A 及末端側主幹部分之 A 及 G 全部以 OMe 修飾者。

ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)gu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

序列編號 45-4-1：將序列編號 45-4 表示之 RNA 之環部分之 G 全部以 OMe 修飾者。

ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

序列編號 45-4-1-1：將序列編號 45-4-1 表示之 RNA 之 C24 作成 RNA 核苷酸者。

ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)caggg(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)

c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

序列編號 46：將序列編號 40 表示之 RNA 末端側主幹之 A-U 鹼基對改變為 G-C 鹼基對者。

gggagaggagaagaggaagu(F)gc(F)gc(F)gc(F)aggggu(F)u(F)gg
u(F)gu(F)c(F)gggc(F)gc(F)gu(F)ac(F)

序列編號 47：刪除序列編號 40 表示之 RNA 之環之 U32 者。

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)ggu(F)
gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)

序列編號 48：將序列編號 40 表示之 RNA 之環之 G34 刪除者。

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)gu(
F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)

序列編號 49：將序列編號 40 表示之 RNA 之環之 U36 刪除者。

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)gg
gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)

序列編號 50：將序列編號 45 表示之 RNA 之環 5' 末端單股部分之 G4 及 G10 刪除者。

gggaaggaaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)
)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 51：將序列編號 36 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 G5 及 A11 刪除者。

gggaaggagagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(
F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

序列編號 52: 將序列編號 36 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 G1 及 G5 刪除者。

ggaaggagaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)agggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

序列編號 53: 將序列編號 36 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 G5 及 G10 刪除者。

gggaaggaaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)agggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

序列編號 54: 將序列編號 45 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 G 全部以 F 修飾，A 全部以 OMe 修飾者。

g(F)g(F)g(F)a(M)g(F)a(M)g(F)g(F)a(M)g(F)a(M)a(M)g(F)a(M)g(F)g(F)a(M)a(M)gu(F)gc(F)ac(F)agggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 55: 將序列編號 45 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 A11 及 A12 刪除者。

gggagaggaggaagu(F)gc(F)ac(F)agggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 56: 將序列編號 45 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 G13 及 A14 刪除者。

gggagaggagaaggaagu(F)gc(F)ac(F)agggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 57: 將序列編號 45 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 G15 及 G16 刪除者。

gggagaggagaagaaagu(F)gc(F)ac(F)agggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)

)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 58: 將序列編號 45 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 A17 及 A18 刪除者。

gggagaggagaagagggu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)gggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 59: 將序列編號 45 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分刪除 18 個核苷酸，而為了轉錄附加二個 G 者。

gggu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)gggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 60: 將序列編號 45 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分作成 GGGAAGGA 者。

gggaaggagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)gggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 61: 將序列編號 45 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 G5、G10、A11、A12、G13、A14 刪除者。

gggaaggaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)gggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 61-1: 將序列編號 61 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 G 以 DNA 核苷酸修飾，A 以 OMe 修飾，環部分之 G 以 OMe 修飾者。

g(H)g(H)g(H)a(M)a(M)g(H)g(H)a(M)g(H)g(H)a(M)a(M)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)gggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 61-2: 將序列編號 61 表示之 RNA 之 5' 末端單股

序列編號 61-7：在序列編號 61 表示之 RNA 之一部分加入 OMe 修飾者。

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)
aggg(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)g(M)g(M)
gu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

序列編號 61-8：在序列編號 61 表示之 RNA 之一部分加入 OMe 修飾者。

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)
a(M)g(M)gg(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gg
gu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

序列編號 61-9：在序列編號 61 表示之 RNA 之一部分加入 OMe 修飾，5' 末端附加 2kDa 之聚乙二醇者。

PEG2000-ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)
)a(M)c(F)a(M)gg(M)g(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u
(F)c(F)ggg(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

序列編號 62：將序列編號 45 表示之 RNA 之 5' 末端單股部分之 G13、A14、G15、G16、A17、A18 刪除者。

gggagaggagaagu(F)gc(F)ac(F)agggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)
)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 63：將序列編號 45 表示之 RNA 之 A25 及 G26 作為 C，以內環作為主幹者。

gggagaggagaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)c(F)c(F)gggu(F)u(F)gg
u(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 64：將序列編號 61 表示之 RNA 之 5' 末端側主幹

之 U-A 刪除者。

gggaaggaggaaggc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)ggg
u(F)gc(F)c(F)

序列編號 65：將序列編號 61 表示之 RNA 之內環內之 A19
及 G20 作成 C 者。

gggaaggaggaagu(F)gc(F)ac(F)c(F)c(F)gggu(F)u(F)ggu(F)gu
(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

序列編號 66：在序列編號 61 表示之 RNA 之一部分加入
OMe 修飾，另在 G 中加入 F 修飾者。

g(F)g(F)a(M)a(M)g(F)g(F)a(M)g(F)g(F)a(M)a(M)g(M)u(F)g
(M)c(F)a(M)c(F)a(M)gg(M)g(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)
)g(M)u(F)c(F)g(F)g(F)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

序列編號 67：將序列編號 66 表示之 RNA 之修飾加以改變
者。

gga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)a
ggg(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)
)c(F)a(M)c(F)

序列編號 68：在序列編號 61 表示之 RNA 之一部分加入
OMe 修飾，將 U28 作成 A(M)者。

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)
aggg(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)a(M)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(
M)c(F)a(M)c(F)

序列編號 69：在序列編號 61 表示之 RNA 之一部分加入
OMe 修飾，將 U25 作成 A(M)者。

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)
 aggg(M)g(M)u(F)a(M)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

序列編號 70：在序列編號 61 表示之 RNA 之一部分加入 OMe 修飾，並將 U24 作成 A(M)者。

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)
 aggg(M)g(M)a(M)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

此處，n(M)為將核糖之 2'位以 OMe 修飾者，n(F)為核糖之 2'位經 F 修飾者，n(H)為去氧核糖，PEG2000 為 2000Da 之聚乙二醇，PEG40k 為經分枝之 40kDa 聚乙二醇，PEG30k 為 30kDa 之聚乙二醇，C12 為 C12 連接體，idT 為反(inverted) dT。

對序列編號 5 表示之適體及其改變體之多效生長因子進行細胞遊走阻礙實驗。實驗方法除了使用多效生長因子替代中期因子外，與上述相同。適體之濃度為 100nM，以序列編號 5 表示之適體對中期因子之阻礙活性為 100。實驗結果，對多效生長因子之阻礙活性為 13(表 4-1)。該等為 6 次測定之平均值。關於改變體，對多效生長因子未確認顯著之阻礙活性。

檢測序列編號 35 表示之適體對老鼠中期因子之細胞遊走阻礙活性。實驗係與使用人類中期因子之上述實驗方法相同。實驗結果，本適體之阻礙活性%為 84%。據此可明瞭本適體對老鼠中期因子具有與對人類中期因子阻礙活

性同等之活性。

使用咸認為與中期因子不易特異性結合之 tRNA(Sigma 公司製造)、Thrombin-S、HIV-S 替代適體，進行與上述相同之對人類中期因子之細胞遊走阻礙實驗。此處，Thrombin-S 為 t'ggttggtgtggttg'taaaaaaaaaaaaaaaaa (序列編號 74)，HIV-S 為 g'tggtgggtgggtggg't(序列編號 75) 之 DNA 適體。' 表示硫代磷酸酯(phosphorothioate)結合。硫代磷酸酯結合係為了提昇核酸酶耐性而添加。該等 RNA 係以 500nM 使用。以序列編號 45 表示之適體對人類中期因子之阻礙活性為 100 時，tRNA 為 28、Thrombin-S 為 0、HIV-S 為 48。啟示本研究製作之適體係於與中期因子之細胞遊走活性有關之重要部位特異性結合。

77 個核苷酸之序列編號 5 表示之適體，可在活性不會降低下小型化至 39 個核苷酸(序列編號 61)。5' 末端之單股部分不能完全刪除，推測該單股部分參予適體立體構造之形成。該單股部分之 G 可為經 F 修飾之核苷酸，惟，已知經 OMe 修飾之核苷酸活性會降低(序列編號 40-2、54、61-2)。另一方面，A 即使為 OMe 修飾之核苷酸，活性亦不會改變(序列編號 40-3)。5' 末端側之主幹即使一部分之 A-U 鹼基對改變為 G-C 鹼基對，對活性亦幾乎不會有影響(序列編號 46)。該主幹部分之 A 及 G 即使作成經 OMe 修飾之核苷酸，亦保持活性(序列編號 45-4)。內環部分即使經由核苷酸取代，作成 G-C 主幹構造，活性亦不會改變(序列編號 63)，將單股部分變短則活性降低(序列編號 59)。

內環之 G 及 A 若置換為 OMe 修飾核苷酸，則活性降低(序列編號 45-3)。環部分若缺損 1 個核苷酸，則活性降低(序列編號 47 至 49)。即使將環部分之 G 作成 OMe 修飾核苷酸，活性亦保持(序列編號 45-2)。

根據以上可明瞭所獲得之本發明適體，即使置換一部分鹼基、改變修飾，亦不會影響活性。又，亦明瞭其係與中期因子特異性結合而阻礙細胞遊走活性。另一方面，家族蛋白質之多效生長因子雖亦結合，但不具有顯著之細胞遊走阻礙活性。

[實施例 8]

適體對術後臟器黏合小鼠模型之臟器黏合防止效果

將正常小鼠之腹部打開，在腹膜用手術刀等製造傷口，將內臟乾燥後將腹部縫合，觀察 5 日以內臟器之黏合情況(Am J.Obstet Gynecol 179,438-443,1998)。有報告指出若使用引起術後臟器黏合之本方法，處置中期因子剔除小鼠(knockout mice)，則術後臟器不會發生黏合(Biochemical and Biophysical Research Communication, 317, 108-113, 2004)。使用術後臟器黏合老鼠模型，研究序列編號 76 表示之適體對於術後臟器黏合之防止效果。在麻醉下將 8 週齡之 C57BL/6 小鼠(手術刀)之腹部開腹，用脫脂棉擦拭腹膜後用剪刀在 5 個部位製造約 2cm 之裂傷。用脫脂棉止血 10 分鐘後用縫針及線縫合。醒來後以 1mg/25mL/kg 之投予量腹腔內投予序列編號 76 表示之適體。對照群同樣的在腹腔內以 25mL/kg 之投予量投予含有 1mM MgCl₂ 之

生理食鹽水。投予後 1 日 1 次，在術後當天、第 1 天、第 2 天共計實施 3 次後，在第 3 天，在麻醉下開腹，以下述之評估基準評估在傷創部臟器之黏合程度。

0：無黏合

1：有黏合，弱黏合(mild)

2：有黏合，中度黏合(moderate)

3：有黏合，即使將黏合部臟器用力拉扯亦無法拉開，為強度黏合(severe)

結果係以一群 9 至 10 隻之黏合程度之得分之平均值及標準誤差表示(表 5)。該結果，生理食鹽水投予群之得分均為 3，相對的，序列編號 76 表示之適體投予群之平均得分為 2.4。序列編號 76 表示之適體投予群與生理食鹽投予群比較，確認統計學上有意義差($p < 5\%$)。統計學的處理係使用 Mann-Whitney U 檢定。根據以上之結果明瞭序列編號 76 表示之適體具有防止術後臟器黏合之活性。

又，序列編號 76 表示之適體如下所述。

序列編號 76：將序列編號 40 表示之 RNA 之 5' 末端之單股部分之 A 全部以 OMe 修飾，且在 5' 末端附加包挾碳原子數 12 之飽和煙鏈(C12)連接體之膽固醇(Chol)，於 3' 末端附加反 dT(idT)者。

Chol-C12-ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)gu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)-idT

[表 5]

使用模型小鼠之臟器黏合阻礙實驗之結果

投予	得分
生理食鹽水	3.0+/-0.0
序列編號 40-4-1	2.4+/-0.3*

* : $p < 0.05$ Mann-Whitney U test

本專利申請以在日本提出專利申請 2006-308482(申請日：2006 年 11 月 14 日)為基礎，其內容全部包含於本說明書中。

【圖式簡單說明】

第 1A 圖為序列編號 1 表示之 RNA 根據 MFOLD 程式預測之 2 個二次構造中之一者之圖。

第 1B 圖為序列編號 1 表示之 RNA 根據 MFOLD 程式預測之 2 個二次構造中之另一者之圖。

第 2A 圖為序列編號 2 表示之 RNA 根據 MFOLD 程式預測之 2 個二次構造中之一者之圖。以四方形圍起之部分表示共有領域。

第 2B 圖為序列編號 2 表示之 RNA 根據 MFOLD 程式預測之 2 個二次構造中之一者之圖。以四方形圍起之部分表示共有領域。

第 3A 圖為序列編號 3 表示之 RNA 根據 MFOLD 程式預測之 2 個二次構造中之另一者之圖。

第 3B 圖為序列編號 3 表示之 RNA 根據 MFOLD 程式預測之 2 個二次構造中之另一者之圖。以四方形圍起之部分表示共有領域。

第 4 圖為序列編號 4 表示之 RNA 根據 MFOLD 程式預測之二次構造之圖。以四方形圍起之部分表示共有領域。

第 5 圖為序列編號 5 表示之 RNA 根據 MFOLD 程式預測之二次構造之圖。

第 6 圖為序列編號 5 表示之 RNA 與中期因子及人類 IgG1 相互作用之圖(使用 BIAcore2000 獲得之感測曲線)。

第 7 圖為序列編號 4 表示之 RNA 與中期因子相互作用之圖(使用 BIAcore2000 獲得之感測曲線)。

第 8 圖為序列編號 20 表示之 RNA 根據 MFOLD 程式預測之二次構造之圖。

第 9 圖為序列編號 61 表示之 RNA 根據 MFOLD 程式預測之二次構造之圖。

序列表

<110> 力博美科股份有限公司

<120> 對中期因子之適體及其使用

<130> 091160

<150> JP 2006-308482

<151> 2006-11-14

<160> 76

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 對中期因子之適體

<400> 1

GGGAGAGGAG AAGAGGAAAU AGUUAAGGGU GAAUUUGCGA AAGCUAUUUU AGUCGCAGUA 60

GAGGACAGGA AUGAGGA 77

<210> 2

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 對中期因子之適體

<400> 2

GGGAGAGGAG AAGAGGAAGG ACUAAGUAAG AGAACACCGG AAUGAAGGGA CUUACGUGUA 60

GAGGACAGGA AUGAGGA 77

<210> 3

<211> 75

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 對中期因子之適體

<400> 3

GGGAGAGGAG AAGAGGAAAG CCUUCUACCG AAAGUGGGAA AGCACACAUA AAUCUGGUAG 60

AGGACAGGAA UGAGA 75

<210> 4

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 對中期因子之適體

<400> 4

GGGAGAGGAG AAGAGGAACG UGCUCUGUAO GAGGAGUAGC CGGAAGAAG GCGGUGUGUA 60

GAGGACAGGA AUGAGA 76

<210> 5

<211> 76

<212> RNA

<213>	人工	
<220>		
<223>	對中期因子之適體	
<400>	5	
	ggagaggag aagaggaagu ggcacaggg guuggugugc ggugcauaca guauaagaua	60
	gaggacagga augaga	76
<210>	6	
<211>	67	
<212>	RNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	對中期因子之適體	
<400>	6	
	gggaggagg aagaggaacg ugucucuguac gaggaguagc cggaaagaag gcggugugua	60
	gaggaca	67
<210>	7	
<211>	64	
<212>	RNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	對中期因子之適體	
<400>	7	
	gggaacgugc ucuguacgag gaguagccgg aaagaaggcg guguguagag gacaggaaug	60
	agga	64
<210>	8	
<211>	69	
<212>	RNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	對中期因子之適體	
<400>	8	
	gggaggagg aagaggaacg cuguacgagg aguagccgga aagaaggcgg uguguagcag	60
	gaaugagga	69
<210>	9	
<211>	66	
<212>	RNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	對中期因子之適體	
<400>	9	
	gggaggagg aagaggaacg ugucucuguac gccggaaaga agguguguag aggacaggaa	60
	ugagga	66
<210>	10	
<211>	73	
<212>	RNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	對中期因子之適體	

<400> 10
 EGGAGAGGAG AAGAGGAACG UGCUCUGUAC GAGGAGUAGC CGAAAGGCGG UGUGUAGAGG 60
 ACAGGAUGA GGA 73

<210> 11
 <211> 77
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 11
 EGGAGAGGAG AAGAGGAACG UGCUCUGCAC GAGGAGUAGC CGGAAAGAAG GCGGCGUGCA 60
 GAGGACAGGA AUGAGGA 77

<210> 12
 <211> 58
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 12
 EGGAGAGGAG AAGAGGAACG CUGCACGAGG AGUAGCCGGA AAGAAGGCGG CGUGCAGC 58

<210> 13
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 13
 EGGAGAGGAA CGCUGCACGA GGAGUAGCCG GAAAGAAGGC GCGUGCAGC 50

<210> 14
 <211> 54
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 14
 EGGAGAGGAG AAGAGGAACG CUACGAGGAG UAGCCGAAA GAAGGCGGCG UAGC 54

<210> 15
 <211> 56
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 15
 EGGAGAGGAG AAGAGGAACG CUGCACGAGG AGUAGCCGGA AAGGCGGCGG UGCAGC 56

<210> 16
 <211> 57
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
<223> 對中期因子之適體

<400> 16
 EEEAGAGGAG AAGAGGAACG CUGCACGAGG GUAGCCGGAA AGAAGGCGGC GUGCAGC 57

<210> 17
 <211> 46
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
<223> 對中期因子之適體

<400> 17
 EEEAGAGGAA CGCUACGAGG AGUAGCCGGA AAGAAGGCGG CGUAGC 46

<210> 18
 <211> 37
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
<223> 對中期因子之適體

<400> 18
 EEECUACGAG GAGUAGCCGG AAAGAAGGCG GCGUAGC 37

<210> 19
 <211> 44
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
<223> 對中期因子之適體

<400> 19
 EEEAGAGGAA CGUACGAGGA GUAGCCGGAA AGAAGGCGGC GUAC 44

<210> 20
 <211> 42
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
<223> 對中期因子之適體

<400> 20
 EEEAGAGGAA CGACGAGGAG UAGCCGGAAA GAAGGCGGCG UC 42

<210> 21
 <211> 44
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
<223> 對中期因子之適體

<400> 21
 EEEAGAGGAA CGCUACGAGG AGUAGCCGGA AAGAAGGCGG UAGC 44

<210> 22
 <211> 33
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
<223> 對中期因子之適體

<400> 22
 gggacgagga guagccggaa agaaggoggc guc 33

<210> 23
 <211> 38
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 23
 gggagaggaa cgacgaggag uagccgaaag gcggcguc 38

<210> 24
 <211> 38
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 24
 gggagaggaa cgacgaggag uagccuucgg gcggcguc 38

<210> 25
 <211> 41
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 25
 gggagaggaa cgacgagaac agccggaaag aaggcggcgu c 41

<210> 26
 <211> 41
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 26
 gggagaggaa cgacgagagu agccggaaag aaggcggcgu c 41

<210> 27
 <211> 41
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 27
 gggagaggaa cgacgagggu agccggaaag aaggcggcgu c 41

<210> 28
 <211> 31
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 28

EECGAGGAGU AGCCGGAAAG AAGGCGGCGC C	31
<210> 29	
<211> 31	
<212> RNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 對中期因子之適體	
<400> 29	
EGCGAGGAGU AGCCGGAAAG AAGGCGGCGU C	31
<210> 30	
<211> 71	
<212> RNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 對中期因子之適體	
<400> 30	
EGAGAAGAGG AAGUGUGCAC AAGGGUUGGU GUCGGGUGCA UACAGUAUA GAUAGAGGAC	60
AGGAUGAGG A	71
<210> 31	
<211> 67	
<212> RNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 對中期因子之適體	
<400> 31	
EGGAGAGGAG AAGAGGAAGU GUGCACAGGG GUUGGUGUCG GGUGCAUACA GUUAAGAU	60
GAGGACA	67
<210> 32	
<211> 57	
<212> RNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 對中期因子之適體	
<400> 32	
EGGAGAGGAG AAGAGGAAGU GUGCACAGGG GUUGGUGUOG GGUGCAUACA GUUAAG	57
<210> 33	
<211> 61	
<212> RNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 對中期因子之適體	
<400> 33	
EGAGAAGAGG AAGUGUGCAC AAGGGUUGGU GUCGGGUGCA UACAGUAUA GAUAGAGGAC	60
A	61
<210> 34	
<211> 46	
<212> RNA	
<213> 人工	

- <220>
 <223> 對中期因子之適體
 <400> 34
 ggaggagug ugcacagggg uuggugcgg gugcauacag uauaag 46
- <210> 35
 <211> 51
 <212> RNA
 <213> 人工
- <220>
 <223> 對中期因子之適體
 <400> 35
 gggagaggag aagaggaagu ggcacagggg guuggugcgg ggugcauaca g 51
- <210> 36
 <211> 53
 <212> RNA
 <213> 人工
- <220>
 <223> 對中期因子之適體
 <400> 36
 gggagaggag aagaggaagu gcacaggggu uggugcggg ugcacaguau aag 53
- <210> 37
 <211> 49
 <212> RNA
 <213> 人工
- <220>
 <223> 對中期因子之適體
 <400> 37
 gggagaggag aagaggaagc acagggguug gugcgggug caguauaag 49
- <210> 38
 <211> 57
 <212> RNA
 <213> 人工
- <220>
 <223> 對中期因子之適體
 <400> 38
 ggguuuuuuuu uuuuuuuuuuu ggcacagggg guuggugcgg ggugcauaca guauaag 57
- <210> 39
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> 人工
- <220>
 <223> 對中期因子之適體
 <400> 39
 gggagaggag aagaggaagg cacagggguu ggugcgggu gccag 45
- <210> 40
 <211> 49
 <212> RNA
 <213> 人工
- <220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 40
 gggagaggag aagaggaagu ggcacaggg guugguugc ggugcauac 49

<210> 41
 <211> 52
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 41
 gggagaggaga agaggaagug cacagggguu ggugucgggu gcacaguaua ag 52

<210> 42
 <211> 52
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 42
 gggagaggag agaggaagug cacagggguu ggugucgggu gcacaguaua ag 52

<210> 43
 <211> 52
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 43
 gggagaggag aagaggaagug cacagggguu ggugucgggu gcacaguaua ag 52

<210> 44
 <211> 47
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 44
 gggagaggag aagaggaagu ugcacagggg uugguugcg gugcaac 47

<210> 45
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 45
 gggagaggag aagaggaagu ggcacaggggu uggugcggg ugcac 45

<210> 46
 <211> 49
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 46

EEGAGAGGAG aagaggaagu GCGCACAGGG GUUGGUGUCG GCGCGUAC	49
<210> 47	
<211> 48	
<212> RNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 對中期因子之適體	
<400> 47	
EEGAGAGGAG aagaggaagu GUGCACAGGG GUGGUGUCGG GUGCAUAC	48
<210> 48	
<211> 48	
<212> RNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 對中期因子之適體	
<400> 48	
EEGAGAGGAG aagaggaagu GUGCACAGGG GUUGGUGUCGG GUGCAUAC	48
<210> 49	
<211> 48	
<212> RNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 對中期因子之適體	
<400> 49	
EEGAGAGGAG aagaggaagu GUGCACAGGG GUUGGUGUCGG GUGCAUAC	48
<210> 50	
<211> 43	
<212> RNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 對中期因子之適體	
<400> 50	
EEGAAGGAAA gaggaagugc ACAGGGGUUG GUGUCGGGUG CAC	43
<210> 51	
<211> 51	
<212> RNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 對中期因子之適體	
<400> 51	
EEGAAGGAGA gaggaagugc ACAGGGGUUG GUGUCGGGUG CACAGAUAA G	51
<210> 52	
<211> 51	
<212> RNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 對中期因子之適體	
<400> 52	
EEGAAGGAGAA gaggaagugc ACAGGGGUUG GUGUCGGGUG CACAGAUAA G	51

<210> 53
 <211> 51
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 53
 EEEAAGGAAA GAGGAAGUGC ACAGGGGUUG GUGUCGGGUG CACAGUAAA G 51

<210> 54
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 54
 EEEAGAGGAG AAGAGGAAGU GCACAGGGUUG UGGUCGGGG UGCAC 45

<210> 55
 <211> 43
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 55
 EEEAGAGGAG GAGGAAGUGC ACAGGGGUUG GUGUCGGGUG CAC 43

<210> 56
 <211> 43
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 56
 EEEAGAGGAG AAGGAAGUGC ACAGGGGUUG GUGUCGGGUG CAC 43

<210> 57
 <211> 43
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 57
 EEEAGAGGAG AAGAAAGUGC ACAGGGGUUG GUGUCGGGUG CAC 43

<210> 58
 <211> 43
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 對中期因子之適體

<400> 58
 EEEAGAGGAG AAGAGGGUGC ACAGGGGUUG GUGUCGGGUG CAC 43

<210> 59

- <211> 29
 <212> RNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 對中期因子之適體
 <400> 59
 gggUgcacag gggUggugu cgggUgcac 29
- <210> 60
 <211> 35
 <212> RNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 對中期因子之適體
 <400> 60
 gggaaaggagu gcacaggggu uggugcggg Ugcac 35
- <210> 61
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 對中期因子之適體
 <400> 61
 gggaaaggagg aagUgcacag gggUggugu cgggUgcac 39
- <210> 62
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 對中期因子之適體
 <400> 62
 gggaaaggagg aagUgcacag gggUggugu cgggUgcac 39
- <210> 63
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 對中期因子之適體
 <400> 63
 gggagaggag aagaggaagu gcacccgggu uggugcggg Ugcac 45
- <210> 64
 <211> 37
 <212> RNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 對中期因子之適體
 <400> 64
 gggaaaggagg aaggcacagg gguUggugc gggUgcc 37
- <210> 65
 <211> 39
 <212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 對中期因子之適體

<400> 65

EGGAAGGAGG AAGUGCACCC EGGUUGGUGU CEGGUGCAC 39

<210> 66

<211> 38

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 對中期因子之適體

<400> 66

EGGAAGGAGG AAGUGCACAGG EGUUGGUGUC EGGUGCAC 38

<210> 67

<211> 38

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 對中期因子之適體

<400> 67

EGGAAGGAGG AAGUGCACAGG EGUUGGUGUC EGGUGCAC 38

<210> 68

<211> 39

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 對中期因子之適體

<400> 68

EGGAAGGAGG AAGUGCACAG EGUUGGAGU CEGGUGCAC 39

<210> 69

<211> 39

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 對中期因子之適體

<400> 69

EGGAAGGAGG AAGUGCACAG EGUUGGUGU CEGGUGCAC 39

<210> 70

<211> 39

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 對中期因子之適體

<400> 70

EGGAAGGAGG AAGUGCACAG EGUUGGUGU CEGGUGCAC 39

<210> 71

<211> 77

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 用以產生對中期因子之適體的DNA模板

<220>

<221> misc_feature

<223> n is a, c, g or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(59)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 71

tcctcattcc tgtcctctan nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnt 60

.tcctcttctc ctctccc

77

<210> 72

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 用以產生對中期因子之適體的引子

<400> 72

taatagcact cactataggg agaggagaag aggaa 35

<210> 73

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 用以產生對中期因子之適體的反引子

<400> 73

tcctcattcc tgtcctcta 19

<210> 74

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 對凝血酶之DNA適體 (Thrombin-S)

<400> 74

tggttggtgt gggttgtaaa aaaaaaaaaaaa aaa 33

<210> 75

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 對HIV(HIV-S)之DNA適體

<400> 75

gtggtgggtg ggtgggt 17

<210> 76

<211> 49

<212> RNA

<213> 人工

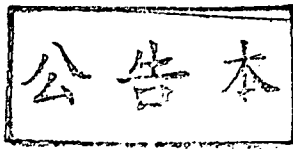
<220>

<223> 對中期因子之適體

<400> 76

gggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guuggugucg ggugcauac

49



(本)

P1~3

十、申請專利範圍：

1. 一種適體 (aptamer)，其係對中期因子具有阻礙活性，且該適體係以下 (a) 或 (b) 之任一者：

(a) 含有選自序列編號 1、2、4 至 20、22 至 33、35、36、39 至 64 及 66 至 70 中之任一核苷酸序列 (惟，尿嘧啶可為胸腺嘧啶) 之適體：

其中，在該適體所含之核苷酸中

(i) 各嘧啶核苷酸之 2' 位係相同或不同，為氟原子或經選自氫原子、羥基及甲氧基所成組群之原子或基取代、

(ii) 各嘌呤核苷酸之 2' 位係相同或不同，為羥基或經選自氫原子、甲氧基及氟原子所成組群之原子或基取代；

(b) 含有在選自序列編號 1、2、4 至 20、22 至 33、35、36、39 至 64 及 66 至 70 中任一核苷酸序列 (惟，尿嘧啶可為胸腺嘧啶) 中，1 至 3 個之核苷酸經取代、缺失、插入或附加之核苷酸序列之適體，

其中在該適體所含之核苷酸中：

(i) 各嘧啶核苷酸之 2' 位係相同或不同，為氟原子或經選自氫原子、羥基及甲氧基所成組群之原子或基取代、

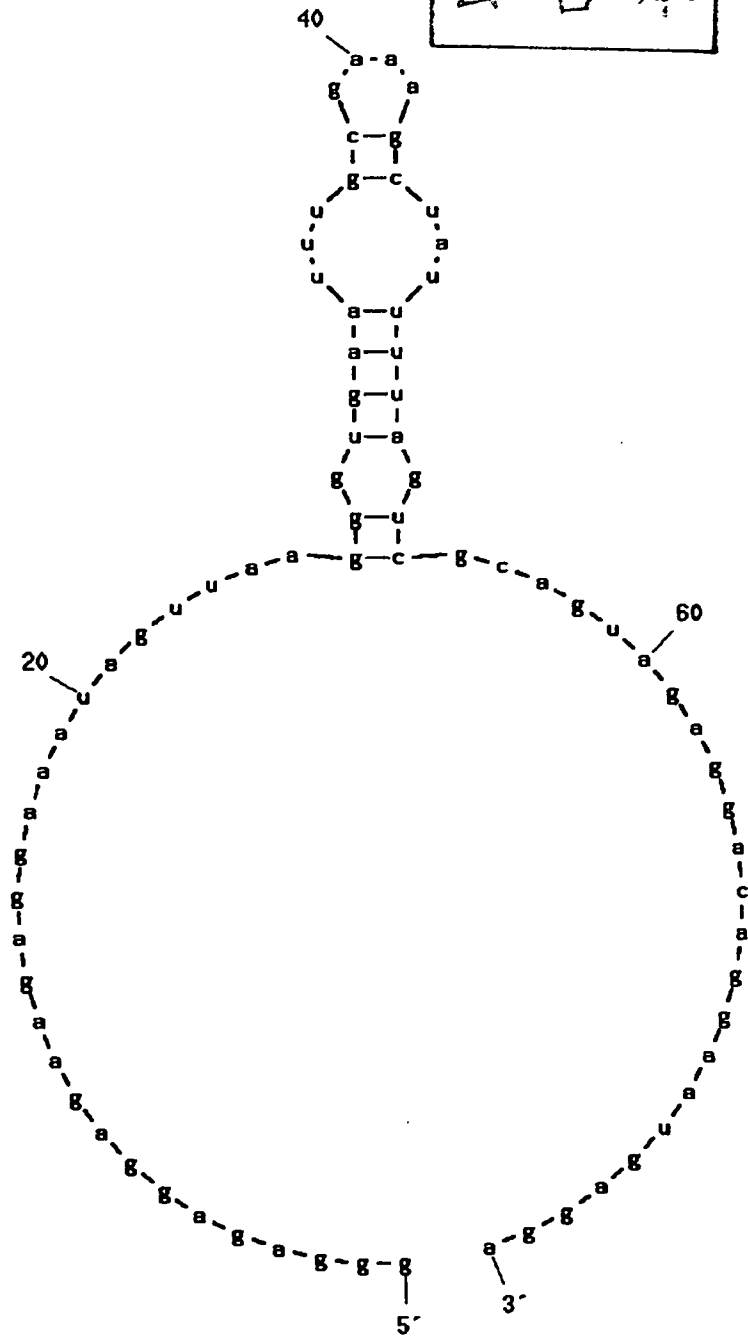
(ii) 各嘌呤核苷酸之 2' 位係相同或不同，為羥基或經選自由氫原子、甲氧基及氟原子所成組群之原子或基取代。

2. 如申請專利範圍第 1 項之適體，其中，該(a)或(b)之核苷酸序列係選自序列編號 4 至 8、10 至 20、22 至 25、27 至 29、31、32、35、36、40 至 42、44 至 58、60、63 或 67 至 70 中之任一者。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之適體，其中，該適體係對多效生長因子不具有阻礙活性者。
4. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之適體，其中，該適體係對中期因子之 N-片段具有結合能者。
5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之適體，其中，該適體係對中期因子之 C-片段具有結合能者。
6. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之適體，其係以阻礙中期因子與 PTP ζ 之結合而呈現對中期因子之阻礙活性。
7. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之適體，其中，該適體所含之核苷酸係經修飾者。
8. 一種複合體，係含有如申請專利範圍第 1 項至第 7 項中任一項之適體；以及機能性物質者。
9. 如申請專利範圍第 8 項之複合體，其中，該機能性物質為親和性物質、標識用物質、酵素、藥物送達介質或藥物者。
10. 一種醫藥組合物，係含有如申請專利範圍第 1 項至第 7 項中任一項之適體或如申請專利範圍第 8 項或第 9 項之複合體者。
11. 一種細胞遊走阻礙劑，係含有如申請專利範圍第 1 項至第 7 項中任一項之適體或如申請專利範圍第 8 項或

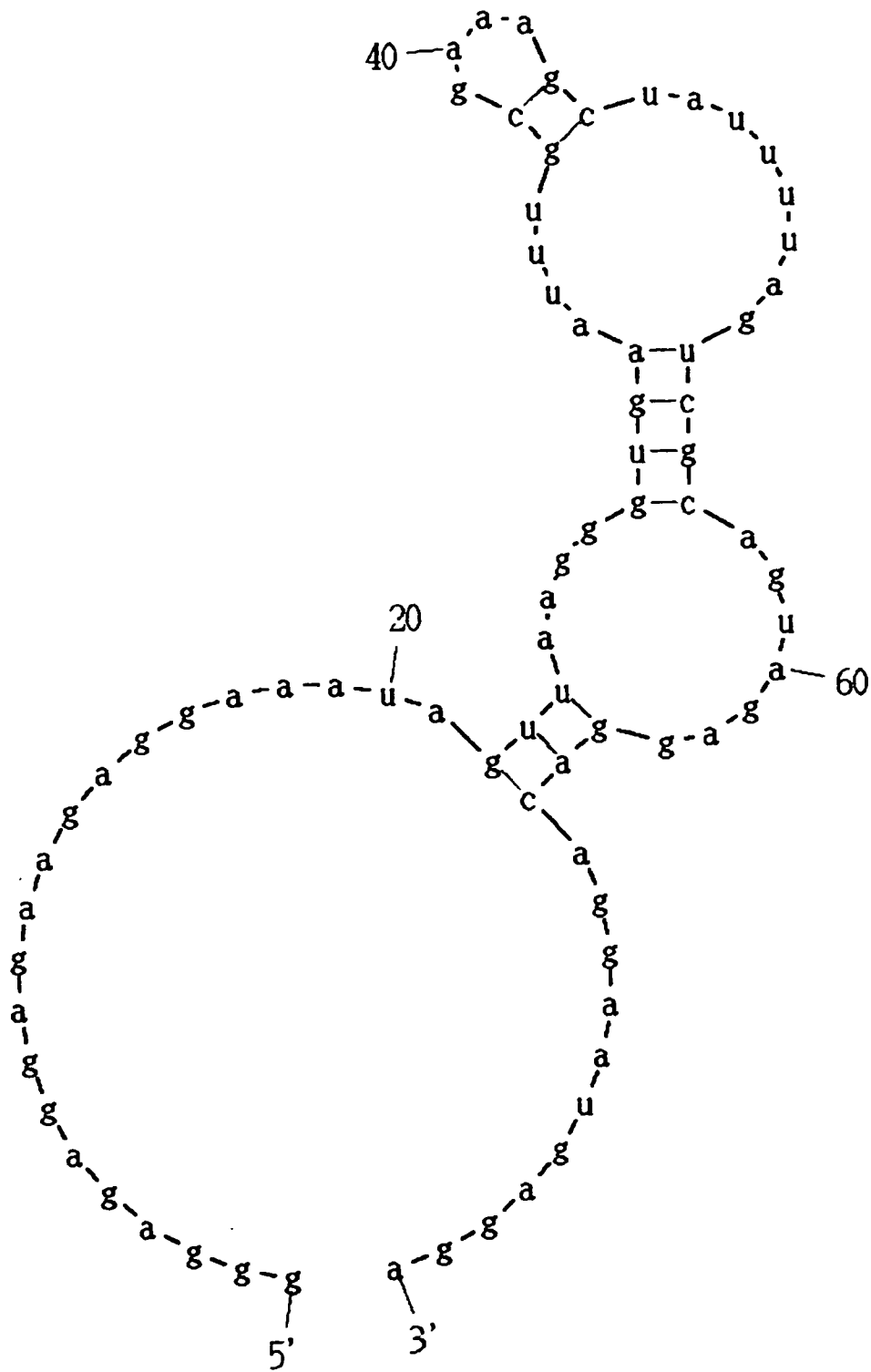
第 9 項之複合體者。

12. 一種診斷藥劑，係含有如申請專利範圍第 1 項至第 7 項中任一項之適體或如申請專利範圍第 8 項或第 9 項之複合體者。
13. 一種標識劑，係含有如申請專利範圍第 1 項至第 7 項中任一項之適體或如申請專利範圍第 8 項或第 9 項之複合體者。
14. 一種生物學試樣中之中期因子的檢測方法，係使用如申請專利範圍第 1 項至第 7 項中任一項之適體或如申請專利範圍第 8 項或第 9 項之複合體替代抗體，經由與酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、螢光免疫測定法(FIA)、西方點墨法、免疫組織化學染色法或細胞分選法為相同之方法，檢測生物學試樣中之中期因子。

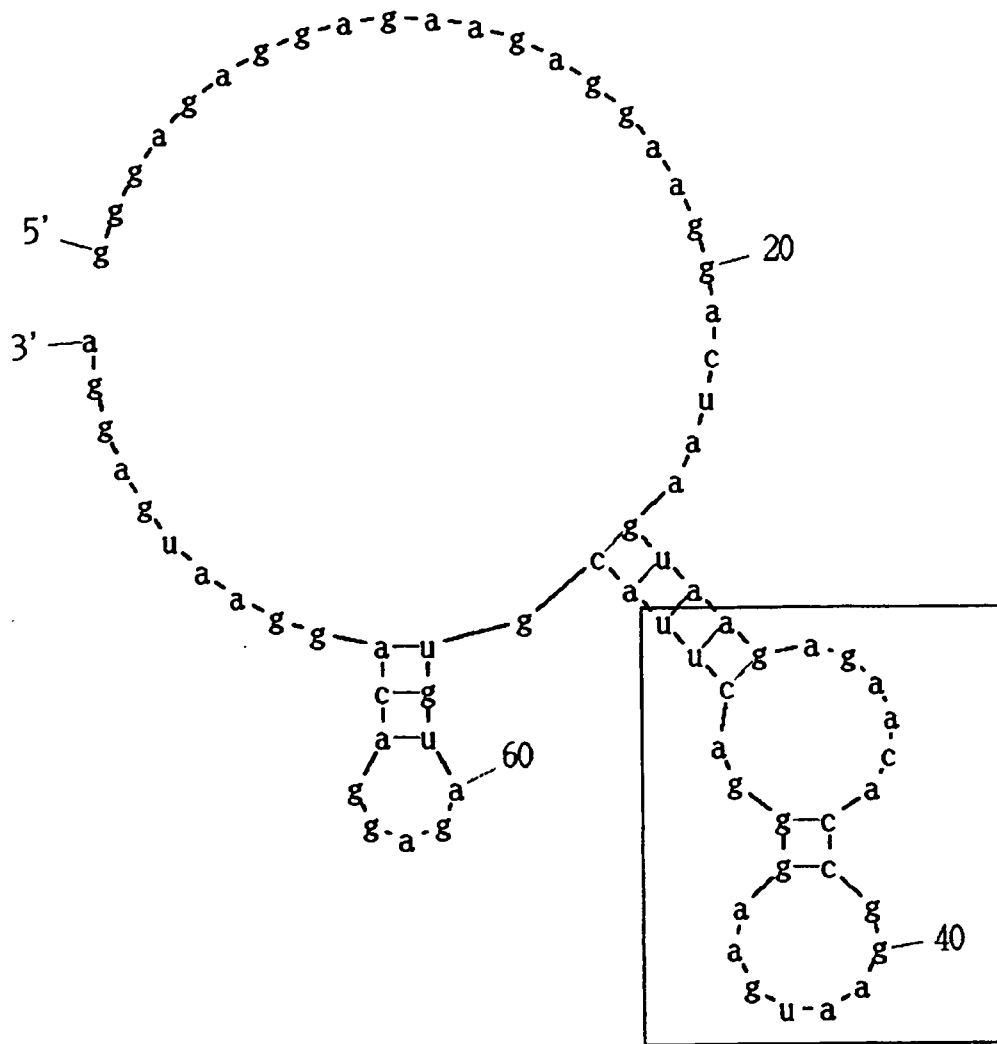
公告本



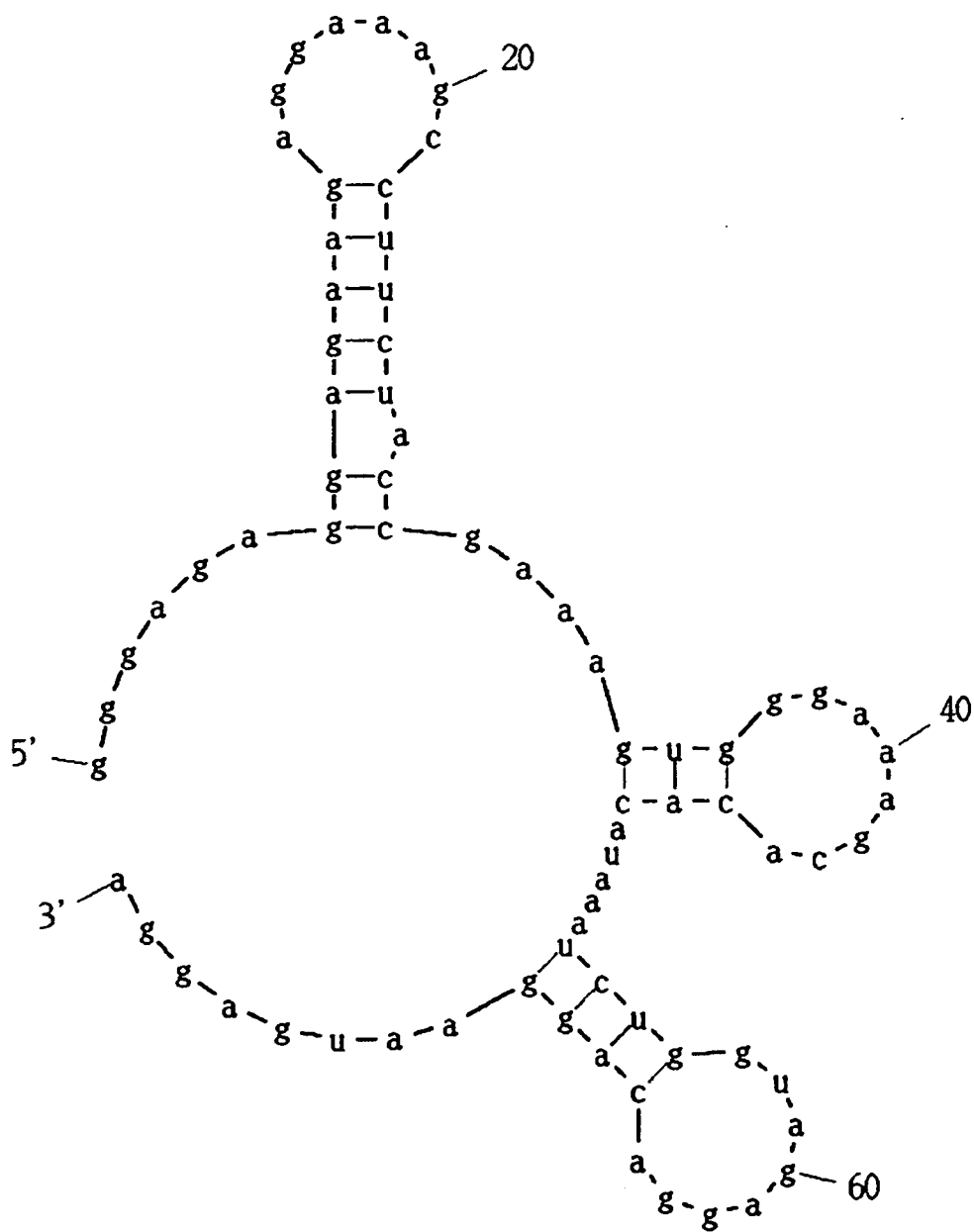
第1A圖



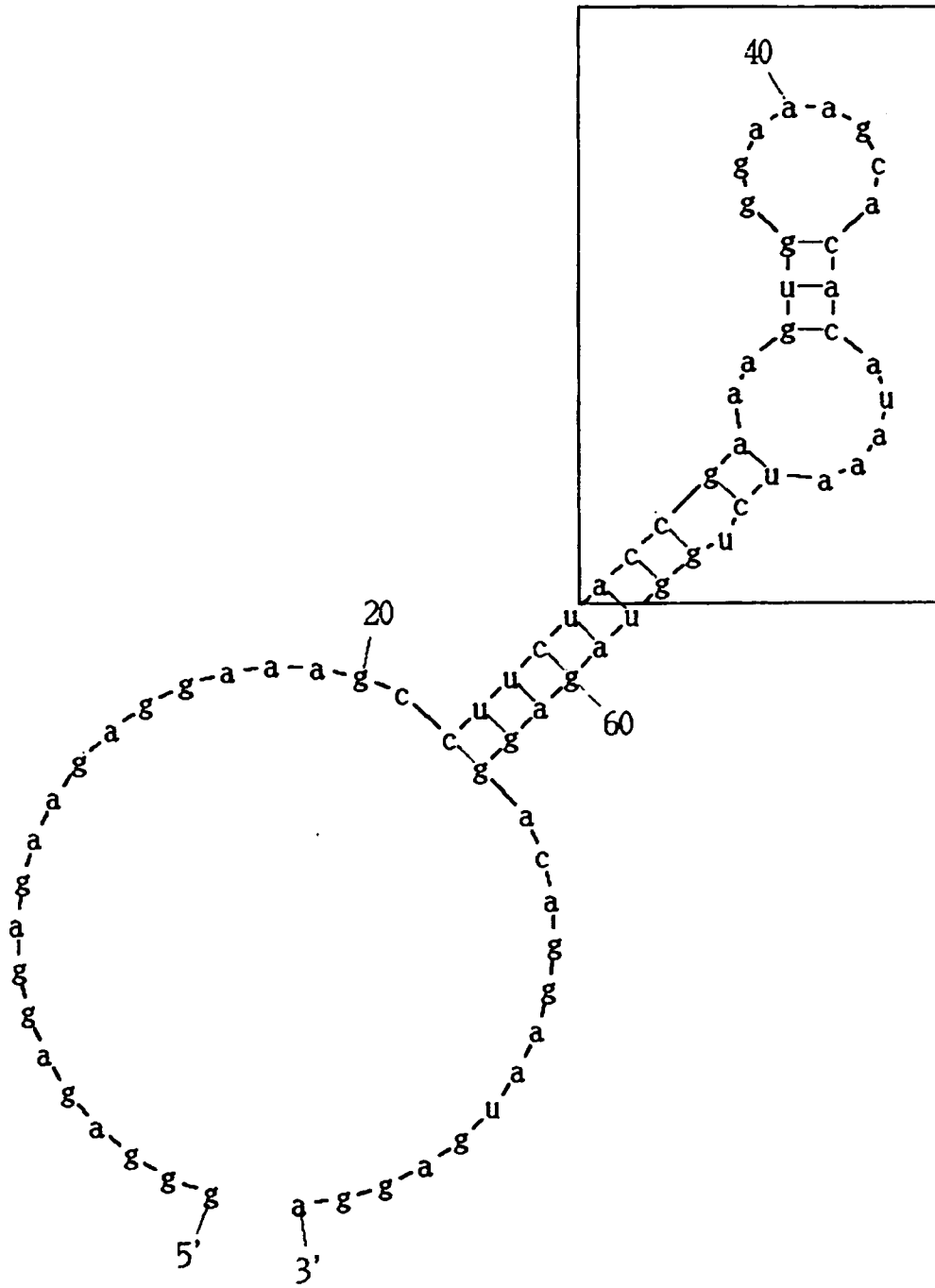
第1B圖



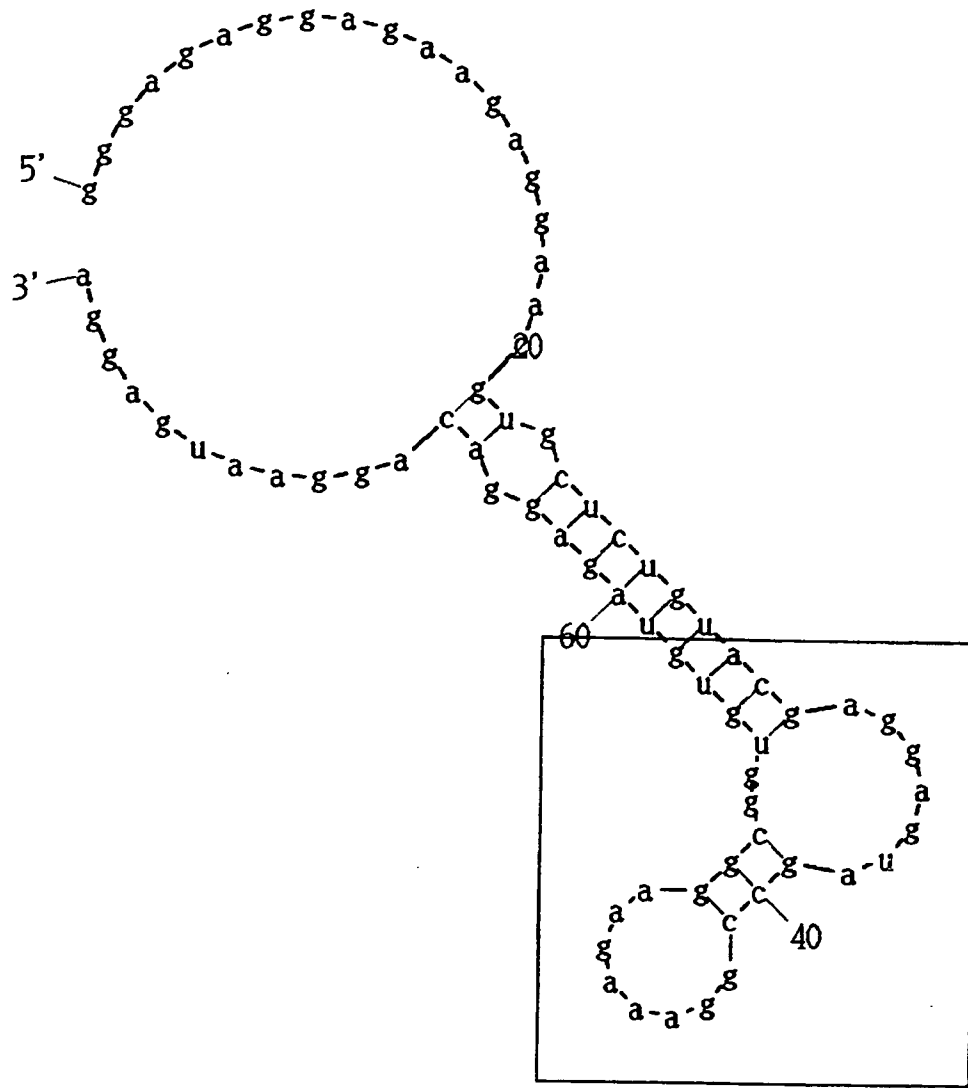
第2B圖



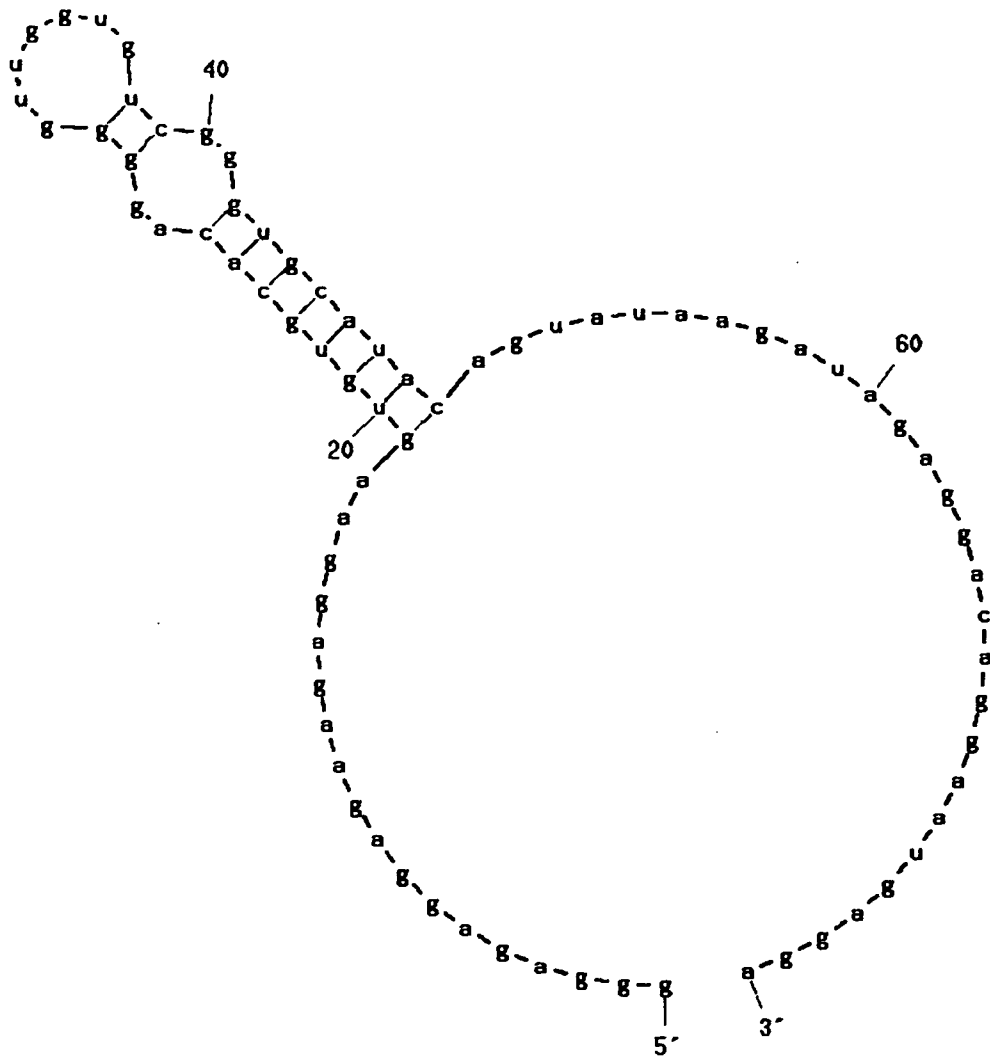
第3A圖



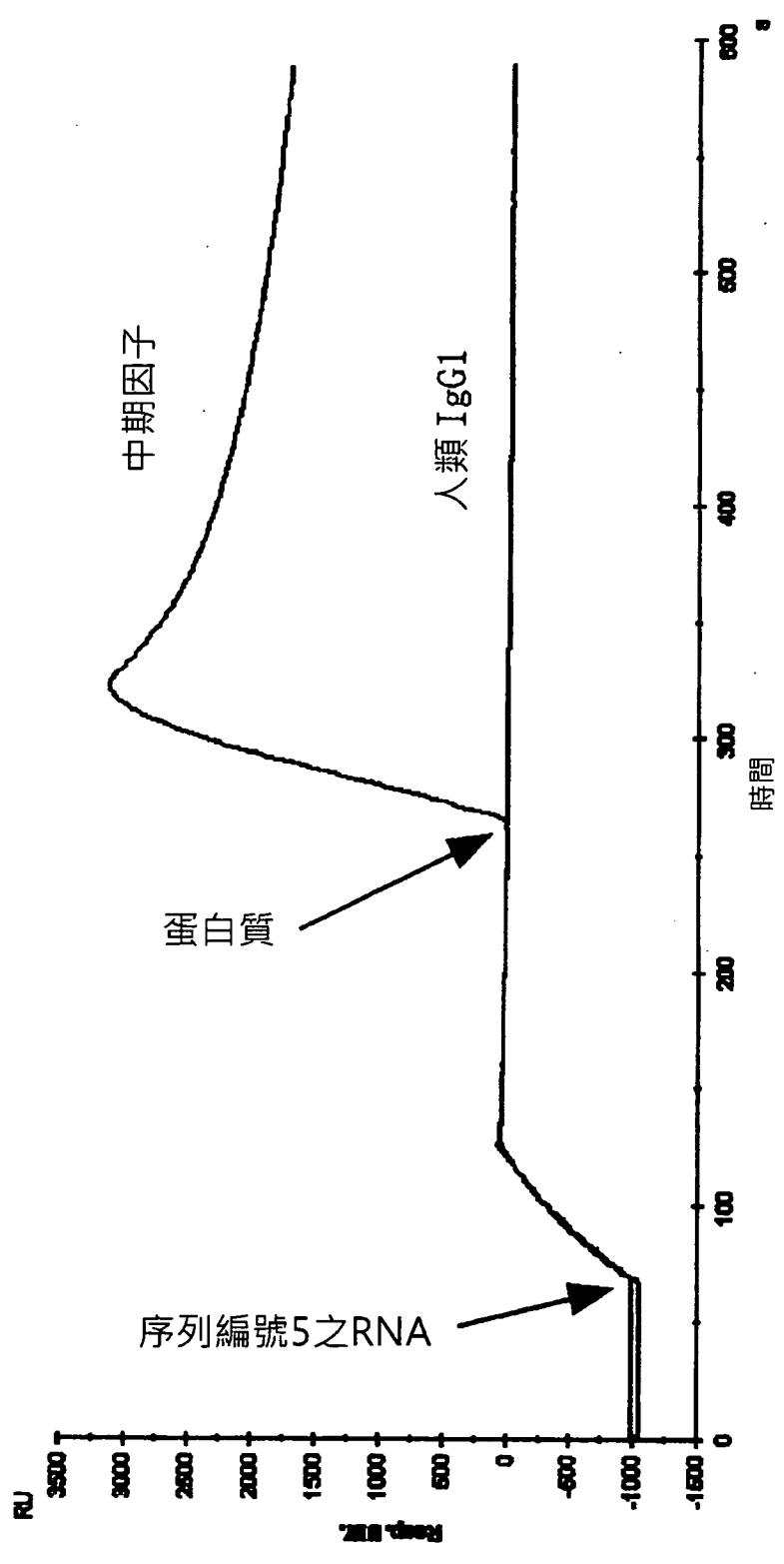
第3B圖



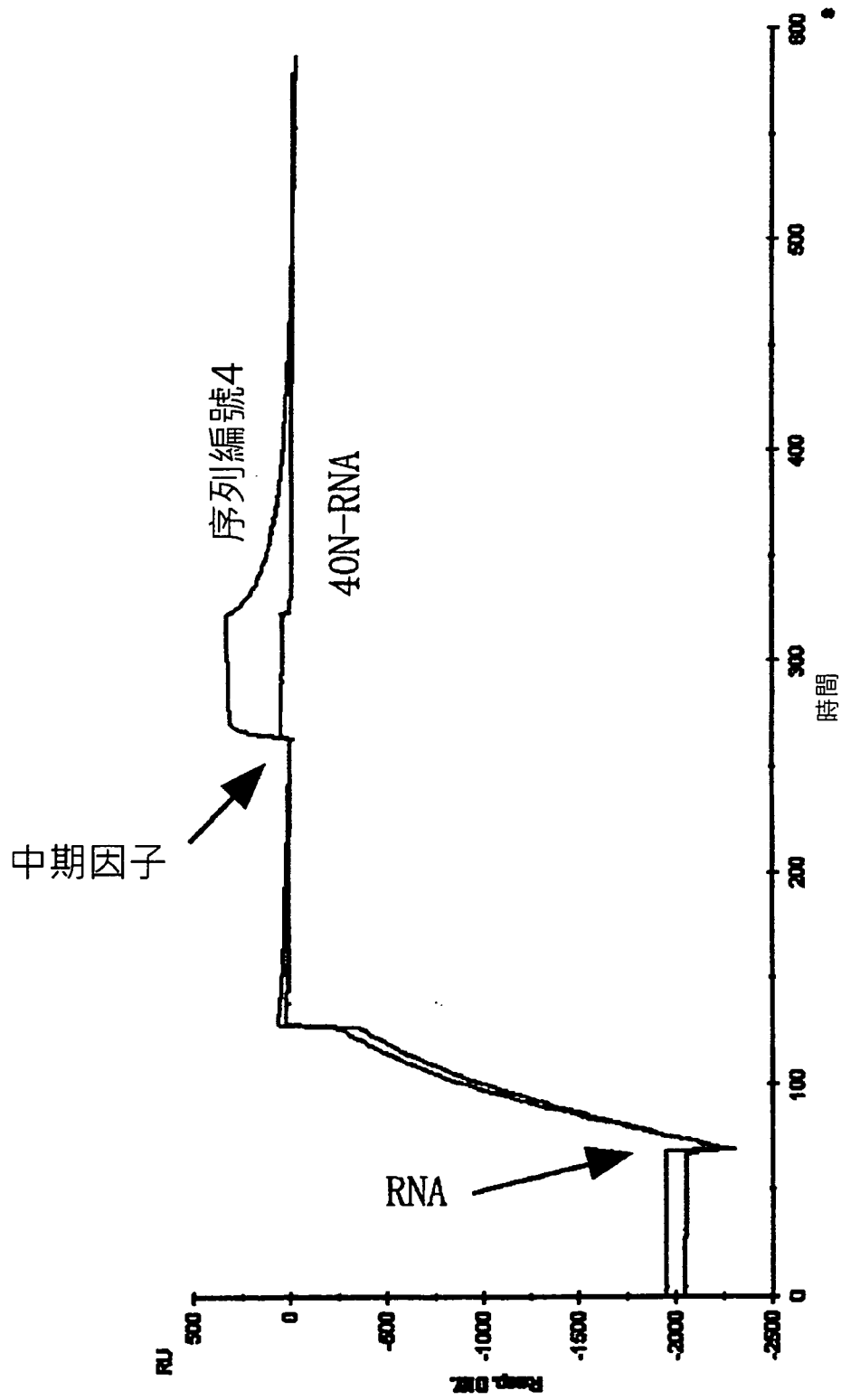
第4圖



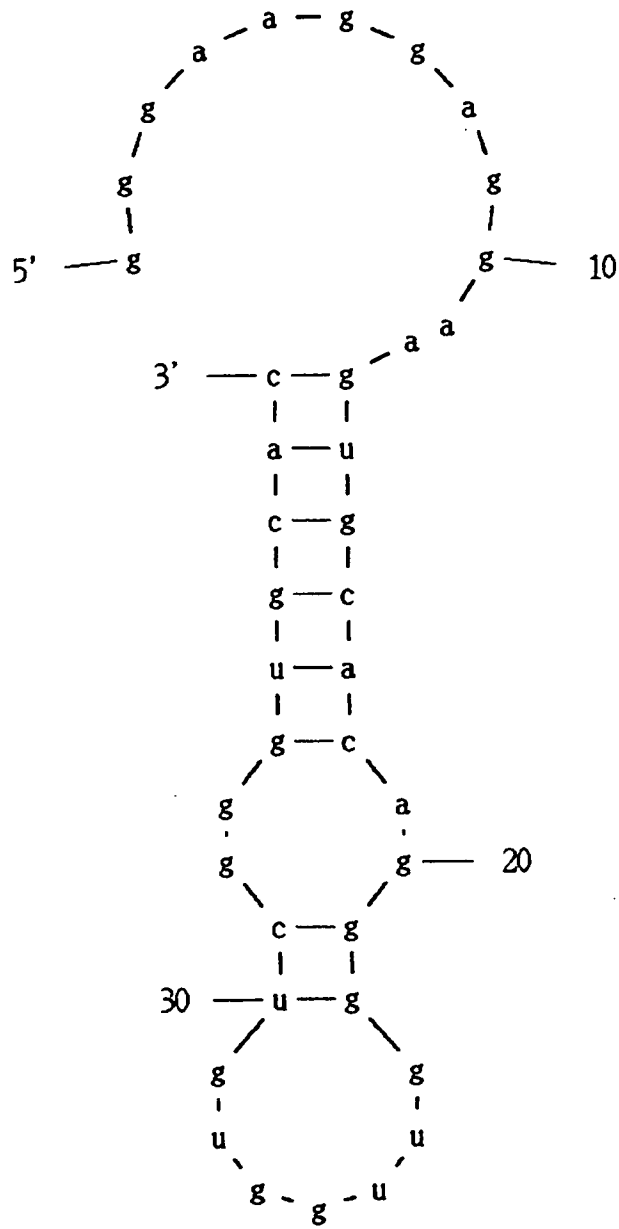
第5圖



第6圖



第7圖



第9圖