

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6591392号
(P6591392)

(45) 発行日 令和1年10月16日(2019.10.16)

(24) 登録日 令和1年9月27日(2019.9.27)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/115 Z N A Z
A 6 1 K 31/7115 (2006.01)	A 6 1 K 31/7115
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 39 (全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-501598 (P2016-501598)	(73) 特許権者	505373306 ソマロジック, インコーポレイテッド SomaLogic, Inc. アメリカ合衆国, 80301 コロラド州 、 ボウルダー, ウィルダネス プレイス 2945
(86) (22) 出願日	平成26年3月12日(2014.3.12)	(73) 特許権者	000206956 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(65) 公表番号	特表2016-517273 (P2016-517273A)	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(43) 公表日	平成28年6月16日(2016.6.16)	(72) 発明者	グプタ シャン アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールダー ワイルダネス プレイス 2945
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/024669		最終頁に続く
(87) 国際公開番号	W02014/159669		
(87) 国際公開日	平成26年10月2日(2014.10.2)		
審査請求日	平成29年2月6日(2017.2.6)		
(31) 優先権主張番号	61/782, 938		
(32) 優先日	平成25年3月14日(2013.3.14)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/789, 244		
(32) 優先日	平成25年3月15日(2013.3.15)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 IL-6に結合するアプタマー及びIL-6介在性状態の治療または診断におけるそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号10のアミノ酸配列を含むIL-6に特異的に結合するアプタマーであって、前記アプタマーが配列番号10のアミノ酸16~31により定義されるIL-6の領域に特異的に結合するアプタマーであって、

前記アプタマーが

5'-GG-ZZZ-GG-Qa-GG-Qb-GG-3'(III)(配列番号702)、

5'-GG-Qa-GG-ZZZ-GG-Qb-GG-3'(IV)(配列番号703)

、及び

5'-GG-Qa-GG-Qb-GG-ZZZ-GG-3'(V)(配列番号704)(

式中、各ZがU、T及び修飾ピリミジンから独立して選択され、各Qがリンカー、修飾ヌクレオチド、及び非修飾ヌクレオチドから独立して選択され、aが1~50であり、及びbが1~50である)

から選択される構造を含むGカルテットモチーフを含む、アプタマー。

【請求項2】

前記アプタマーが配列番号10のアミノ酸16~31及びアミノ酸117~125を含むIL-6のエピトープに特異的に結合する、請求項1に記載のアプタマー。

【請求項3】

IL-6への結合に対して請求項1または2に記載のアプタマーと特異的に競合するア

ブタマー。

【請求項 4】

前記アブタマーが I L - 6 への結合に対して配列番号 1 0 1 のアブタマーと競合する、請求項 1 または 2 に記載のアブタマー。

【請求項 5】

前記アブタマーが I L - 6 への結合に対して配列番号 4 0 0 のアブタマーと競合する、請求項 1 または 2 に記載のアブタマー。

【請求項 6】

前記アブタマーが少なくとも 1 つの修飾ピリミジンを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のアブタマー。

10

【請求項 7】

前記アブタマーが、5' - G G C A G G Z Z Z G G Z Q_a G Z G G - 3' (I) (配列番号 7 0 0)

(式中、各 Z が U、T 及び修飾ピリミジンから独立して選択され、各 Q がリンカー、修飾ヌクレオチド、及び非修飾ヌクレオチドから独立して選択され、a が 1 ~ 5 0 である) の配列を含む、請求項 1 に記載のアブタマー。

【請求項 8】

各 Q が置換または非置換の C₂ ~ C₂₀ のリンカー、アルキレングリコール、及びポリアルキレングリコールから独立して選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のアブタマー。

20

【請求項 9】

各 Q が、置換または非置換の C₂ ~ C₂₀ のリンカー、1, 3 - プロパンジオール、2 ~ 1 0 0 の 1, 3 - プロパンジオール単位を有するポリ (1, 3 - プロパンジオール)、エチレングリコール、及び 2 ~ 1 0 0 のエチレングリコール単位を有するポリエチレングリコールから独立して選択される、請求項 8 に記載のアブタマー。

【請求項 1 0】

5' - Y X A X G Y A R Q_a M G Y A A G S C G R Y - 3' (V I) (配列番号 7 0 5)、及び

5' - M G Y A A G S C G R Y Q_b Y X A X G Y A R - 3' (V I I) (配列番号 7 0 6)

30

(式中、各 Y が修飾ピリミジンから独立して選択され、各 X が修飾ピリミジンから独立して選択され、M が C 及び A から選択され、S が C 及び G から選択され、各 R が G 及び A から独立して選択され、各 Q がリンカー、修飾ヌクレオチド、及び非修飾ヌクレオチドから独立して選択され、a が 1 ~ 3 0 であり、及び b が 1 ~ 3 0 である)

から選択される配列を含む、I L - 6 に特異的に結合するアブタマー。

【請求項 1 1】

配列 5' - G G G Y X A X G Y A G C L_b G Z G C G Y A A G G C G G Y - 3' (I I) (配列番号 7 0 1)

(式中、Z が U、T 及び修飾ピリミジンから選択され、各 Y が修飾ピリミジンから独立して選択され、各 X が修飾ピリミジンから独立して選択され、各 L がリンカー、修飾ヌクレオチド、及び非修飾ヌクレオチドから独立して選択され、b が 1 ~ 2 0 である) を含む、請求項 1 0 に記載のアブタマー。

40

【請求項 1 2】

各 Q または L が、置換または非置換の C₂ ~ C₂₀ のリンカー、アルキレングリコール、及びポリアルキレングリコールから独立して選択される、請求項 1 0 または請求項 1 1 に記載のアブタマー。

【請求項 1 3】

各 Q または L が、置換または非置換の C₂ ~ C₂₀ のリンカー、1, 3 - プロパンジオール、2 ~ 1 0 0 の 1, 3 - プロパンジオール単位を有するポリ (1, 3 - プロパンジオール)、エチレングリコール、2 ~ 1 0 0 のエチレングリコール単位を有するポリエチレ

50

ングリコールから独立して選択される、請求項 12 に記載のアプタマー。

【請求項 14】

各 X が芳香族修飾ピリミジンから独立して選択される、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 15】

各 X が図 20 及び図 24 に示される芳香族修飾ピリミジンから独立して選択される、請求項 10 ~ 14 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 16】

各 X が図 24 の Nap、2 Nap、NE、BF、及び BT から独立して選択される、請求項 10 ~ 15 のいずれか一項に記載のアプタマー。

10

【請求項 17】

各 Y が図 20 及び図 24 に示される修飾ピリミジンから独立して選択される、請求項 10 ~ 16 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 18】

各 Y が図 24 に示される修飾ピリミジンから独立して選択される、請求項 10 ~ 17 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 19】

各 Z が、U、T、並びに図 20 及び図 24 に示される修飾ピリミジンから独立して選択される、請求項 1 ~ 9、及び 11 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 20】

各 Z が、U、T、及び図 24 に示される修飾ピリミジンから独立して選択される、請求項 1 ~ 9、11、及び 19 のいずれか一項に記載のアプタマー。

20

【請求項 21】

各置換または非置換の $C_2 \sim C_{20}$ のリンカーが、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_8$ のリンカー、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_6$ のリンカー、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_5$ のリンカー、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_4$ のリンカー、または置換若しくは非置換の C_3 のリンカーである、請求項 8、9 及び 12 ~ 20 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 22】

各修飾ピリミジンが、

- 5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BndU)、
- 5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、
- 5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、
- 5 - (N - フェネチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (PEDU)、
- 5 - (N - チオフェニルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ThdU)、
- 5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (iBudU)、
- 5 - (N - チロシルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (TyrdU)、
- 5 - (N - 3, 4 - メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (MBndU)、
- 5 - (N - 4 - フルオロベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (FBndU)、
- 5 - (N - 3 - フェニルプロピルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (PPdU)、
- 5 - (N - イミジゾイルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ImdU)、
- 5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、
- 5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、
- 5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (TrpdU)、
- 5 - (N - R - スレオニルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ThrdU)

30

40

50

-)、
 5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、
 5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウムプロピル) カルボキシアミド] - 2 ' -
 デオキシウリジנקロリド、
 5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N a p d U)
 、
 5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、
 5 - (N - [1 - (2 , 3 - ジヒドロキシプロピル)] カルボキシアミド) - 2 ' - デオ
 キシウリジン)、 10
 5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N a p
 d U)、
 5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、
 5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N E d U
)、
 5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、
 5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N E d 20
 U)、
 5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、
 5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (B
 F d U)、
 5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、 5
 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (
 B T d U)、
 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジ 30
 ン、及び
 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン
 から独立して選択される、請求項 6 ~ 21 のいずれか一項に記載のアブタマー。
【請求項 23】
 各 X が
 5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N a p d
 U)、
 5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、
 5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N a p 40
 d U)、
 5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、
 5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N E d U
)、
 5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、
 5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N E d
 U)、
 5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、 50

- 5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、
 5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (B F d U)、
 5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、 5 -
 (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (B T d U)、
 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、及び
 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン 10
 から独立して選択される、請求項 10 ~ 22 のいずれか一項に記載のアプタマー。
 【請求項 24】
 (a) 配列番号 7、8、11、19 ~ 22、26 ~ 39、100 ~ 239、300 ~ 356、400 ~ 446、500 ~ 572、及び 599 ~ 625 から選択されるヌクレオチド配列、または
 (b) 配列番号 7、8、11、19 ~ 22、26 ~ 39、100 ~ 239、300 ~ 356、400 ~ 446、500 ~ 572、及び 599 ~ 625 から選択され、1 ~ 5 のヌクレオチドが置換、欠失または挿入され、前記アプタマーが 20 n M 未満の親和性 (K_d) で I L - 6 に特異的に結合するヌクレオチド配列、または
 (c) 配列番号 7、8、11、19 ~ 22、26 ~ 39、100 ~ 239、300 ~ 356、400 ~ 446、500 ~ 572、及び 599 ~ 625 から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも 95 % 以上同一であり、前記アプタマーが 20 n M 未満の親和性 (K_d) で I L - 6 に特異的に結合するヌクレオチド配列 20
 から選択される配列を含むアプタマー。
 【請求項 25】
 前記アプタマーが 10 n M 未満の I L - 6 アンタゴニスト活性 (IC_{50}) を有する、請求項 24 に記載のアプタマー。
 【請求項 26】
 前記アプタマーが、少なくとも 2 ~ 6 の修飾ピリミジン及び / または 2 ' - O Me を含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のアプタマー。 30
 【請求項 27】
 少なくとも 1 つ、少なくとも 2 ~ 5 のヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載のアプタマー。
 【請求項 28】
 前記アプタマーが 20 n M 未満の親和性 (K_d) で I L - 6 に特異的に結合する、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載のアプタマー。
 【請求項 29】
 前記アプタマーが、I L - 6 受容体への I L - 6 結合、S T A T 3 リン酸化、及び S T A T - 媒介転写から選択される少なくとも 1 つの活性を阻害する、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載のアプタマー。 40
 【請求項 30】
 請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つのアプタマー、または薬学的に許容可能なその塩、及び薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。
 【請求項 31】
 I L - 6 によって媒介される疾患または状態を治療するための請求項 30 に記載の医薬組成物。
 【請求項 32】
 I L - 6 によって媒介される前記疾患または状態が、炎症性疾患、悪性疾患、感染症、及び自己免疫疾患から選択される、請求項 31 に記載の医薬組成物。
 【請求項 33】

IL - 6 によって媒介される前記疾患または状態が、キャッスルマン病、強直性脊椎炎、冠状動脈性心疾患、関節リウマチにおける心血管疾患、肺動脈高血圧症、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、アトピー性皮膚炎、乾癬、坐骨神経痛、II型糖尿病、肥満、巨細胞性動脈炎、急性移植片対宿主病（GVHD）、非ST上昇心筋梗塞、抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎、視神経脊髄炎、慢性糸球体腎炎、及び高安動脈炎から選択される、請求項32に記載の医薬組成物。

【請求項34】

IL - 6 によって媒介される前記疾患または状態が、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、全身型若年性特発性関節炎、骨関節炎、敗血症、喘息、間質性肺疾患、炎症性腸疾患、全身性硬化症、眼内炎症、グレーブス病、子宮内膜症、全身性硬化症、成人発症ステイル病、アミロイドAアミロイド症、リウマチ性多発筋痛症、寛解傾向があり圧痕を形成する浮腫を伴う血清反応陰性対称性膵膜炎、ベーチェット病、ブドウ膜炎、植片対宿主疾患、TNFR受容体関連周期性症候群から選択される炎症性疾患である、請求項32に記載の医薬組成物。

10

【請求項35】

IL - 6 によって媒介される前記疾患または状態が、癌及び癌に関連する状態から選択される悪性疾患である、請求項32に記載の医薬組成物。

【請求項36】

前記悪性疾患が、多発性骨髄腫、白血病、膵臓癌、乳癌、結腸直腸癌、悪液質、黒色腫、子宮頸癌、卵巣癌、リンパ腫、胃腸、肺癌、前立腺癌、腎細胞癌、転移性腎臓癌、固形腫瘍、神経膠腫、肝臓癌、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫、膀胱癌、口腔癌、骨髄増殖性新生物、B細胞リンパ増殖性疾患、及び形質細胞性白血病から選択される癌である、請求項35に記載の医薬組成物。

20

【請求項37】

前記悪性疾患が、非小細胞肺癌に関連する疲労及び癌に関連する食欲不振から選択される癌に関連する状態である、請求項35に記載の医薬組成物。

【請求項38】

IL - 6 によって媒介される前記疾患または状態が、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）、脳マラリア、尿路感染症、及び髄膜炎菌感染症から選択される感染症である、請求項32に記載の医薬組成物。

30

【請求項39】

IL - 6 によって媒介される前記疾患または状態が、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、多発性筋炎、巨細胞性動脈炎を含む血管炎症候群、高安動脈炎、クリオグロブリン血症、ミエロペルオキシダーゼ - 抗好中球細胞質抗体関連半月体形成性糸球体腎炎、リウマチ性血管炎、クローン病、再発性多発性軟骨炎、後天性血友病A、及び自己免疫性溶血性貧血から選択される自己免疫疾患である、請求項32に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、一般的に核酸の分野に関し、より具体的には、インターロイキン - 6（IL - 6）に結合可能なアプタマーに関する。或る実施形態では、かかるアプタマーは、炎症性疾患、悪性疾患、感染症、自己免疫疾患及びIL - 6が関与している他の疾患または状態の予防、治療及び/または改善のための治療薬として有用である。或る実施形態では、かかるアプタマーは、IL - 6関連疾患または状態を診断するのに有用である。

40

【背景技術】

【0002】

以下の記載は、要約、情報を提供するものであり、本明細書において提供されるいかなる情報または参照されるいかなる出版物も本開示に対する従来技術であることを認めるものではない。

【0003】

50

インターロイキン6 (IL-6) は、サイトカインファミリーに属し、長鎖4ヘリックスバンドル構造を特徴とする。このファミリーの他のメンバーとして、IL-11、IL-17、IL-27、オンコスタチン-M (OSM)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、白血球抑制因子 (LIF)、カルジオトロフィン-1 (CT-1) 及びカルジオトロフィン様サイトカイン (CLC) が挙げられる。IL-6 は、B細胞、T細胞、単球、線維芽細胞、及び他の細胞型により産生され、炎症誘発性または抗炎症性の両方の特性を有する。IL-6 は、正常細胞の炎症プロセス、宿主免疫防御機構、及び細胞成長の調節を含む幅広い生物学的活性において多面的な役割を果たす。また、IL-6 は、様々な悪性腫瘍細胞の増殖及び分化に参与する (Guo, Y., et al., *Cancer Treatment Reviews*, 2012. 38: 904-910)。或る急性炎症状態では、IL-6 の濃度は pg/ml から µg/ml へと劇的に増加する場合がある (Wage, A., et al., *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1989. 50: 394-398)。

10

【0004】

IL-6 は、細胞膜上に存在する非シグナリングIL-6受容体に結合することによって細胞を活性化する。このリガンド-受容体複合体は、その後、シグナル伝達タンパク質、gp130に結合し、janusチロシンキナーゼ (JAK) を活性化し、その結果、下流のシグナル伝達因子、及び転写タンパク質3 (STAT3) シグナル伝達経路の活性化因子を活性化する (Heinrich, P.C., et al., *Biochem J.*, 1998. 334: 297-314)。また、IL-6 は、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) 経路を活性化する (Heinrich, P.C., et al., *Biochem J.*, 2003. 374: 1-20)。IL-6R は、肝細胞、好中球、単球/マクロファージ、及び一部のリンパ球を含むほんのわずかな細胞型において膜結合タンパク質として発現されるのに対し、gp130 は、全ての細胞型に置いて広範に発現され、IL-6 サイトカインファミリーの他のメンバーに対するシグナリングタンパク質として作用する。膜結合IL-6Rを介するIL-6シグナル伝達は、文献において古典的なシグナル伝達経路として知られている。膜結合IL-6Rに加えて、可溶性形態のIL-6R (sIL-6R) がIL-6に対して同様の親和性を伴って、血液中及び他の体液中に高濃度で存在する (Honda 1992, Novick 1989)。IL-6との相互作用により、sIL-6Rは、アンタゴニストとしてはたらず、代わりにIL-6の循環半減期を増加し、同時にIL-6Rは発現されないがgp130が発現される細胞におけるシグナル伝達経路を活性化する。IL-6: sIL-6Rによって活性化されるこのシグナル伝達経路は、トランス-シグナリング機構として知られている。gp130の広範な発現は、IL-6トランス-シグナリング経路が体内の全てまたは大部分の細胞型を活性化することができることを示唆する。可溶性形態の細胞gp130は、IL-6シグナル伝達経路に対するアンタゴニストとして作用する。

20

30

【0005】

全臨床研究は、様々な炎症性疾患におけるサイトカインの役割を示し、したがって、これらが主要な治療標的となった。炎症を軽減するために幅広く使用される幾つかの市販の抗TNF-α剤が存在する。これらが全ての患者において有効であるとは限らないことから、IL-6等の炎症中のそれらの治療的役割について他のサイトカインを探索する必要がある。現在、抗IL-6R抗体であるトシリズマブが、関節リウマチの治療に使用されている。

40

【0006】

アプタマーは、高い親和性及び特異性でそれらの標的に結合するオリゴヌクレオチドである。アプタマーは、SELEX (指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化法: systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法を使用して選択されてもよい。スローオフレート (Slow off rate) 修飾アプタマー (SOMAmers) は、天然DNAに存在しない官能基を含有するランダムライブラリから選択される (Gold et al.,

50

2010, PLoS ONE 5(12): e15004)。或る例では、これらの新規な塩基修飾は、アプタマーと標的の間の疎水性相互作用を媒介して結合親和性の顕著な改善をもたらす場合がある。

【発明の概要】

【0007】

本開示は、インターロイキン-6 (IL-6) に結合するアプタマー、及びIL-6に結合するアプタマーを含む組成物を提供する。開示されるアプタマーは、炎症性疾患、悪性疾患、感染症、自己免疫疾患、及び/またはIL-6が関与する他の疾患若しくは状態を予防、治療、及び/または改善するための治療薬として有用である。また、本開示は、IL-6アプタマーまたはその薬学的に許容可能な塩と、少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物または製剤を提供する。かかる組成物を、任意の好適な薬学的に許容可能な剤形で調製することができる。

10

【0008】

IL-6によって媒介される疾患または状態を予防、治療及び/または改善するための方法及び医薬組成物または製剤が提供される。或る実施形態では、方法は、IL-6アプタマー、またはIL-6アプタマーを含む医薬組成物若しくは製剤を哺乳動物等の被験体に投与することを含む。或る実施形態では、被験体はヒトである。

【0009】

或る実施形態では、方法及び医薬組成物または製剤は、炎症性疾患、悪性疾患、感染症、自己免疫疾患、及び/またはIL-6が関与する他の疾患若しくは状態を予防、治療、及び/または改善するために提供される。本明細書に記載されるIL-6アプタマーにより治療され得る炎症性疾患の非限定的な例として、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、全身型若年性特発性関節炎、骨関節炎、敗血症、喘息、間質性肺疾患、炎症性腸疾患、全身性硬化症、眼内炎症、グレーブス病、子宮内膜症、全身性硬化症、成人発症ステイル病、アミロイドAアミロイド症、リウマチ性多発筋痛症、寛解傾向があり圧痕を形成する浮腫を伴う血清反応陰性対称性膵膜炎、ベーチェット病、ブドウ膜炎、植片対宿主疾患、TNFR受容体関連周期性症候群が挙げられる。本明細書に記載されるIL-6アプタマーで治療され得る悪性疾患として、癌及び癌に関連する状態が挙げられる。癌の非限定的な例として、多発性骨髄腫、白血病、膵臓癌、乳癌、結腸直腸癌、悪液質、黒色腫、子宮頸癌、卵巣癌、リンパ腫、胃腸、肺癌、前立腺癌、腎細胞癌、転移性腎臓癌、固形腫瘍、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫、膀胱癌、口腔癌、骨髄増殖性新生物、B細胞リンパ増殖性疾患、及び形質細胞性白血病が挙げられる。癌に関連する状態の非限定的な例として、非小細胞肺癌に関連する疲労及び癌に関連する食欲不振が挙げられる。本明細書に記載されるIL-6アプタマーで治療され得る感染症の非限定的な例として、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ヒトTリンパ球向性ウイルス(HTLV)、脳マラリア、尿路感染症、及び髄膜炎菌感染症が挙げられる。本明細書に記載されるIL-6アプタマーで治療され得る自己免疫疾患の非限定的な例として、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、多発性筋炎、巨細胞性動脈炎などの血管炎症候群、高安動脈炎、クリオグロブリン血症、ミエロペルオキシダーゼ-抗好中球細胞質抗体関連半月体形成性糸球体腎炎、リウマチ性血管炎、クローン病、再発性多発性軟骨炎、後天性血友病A、及び自己免疫性溶血性貧血が挙げられる。本明細書に記載されるIL-6アプタマーで治療され得る更なる疾患として、限定されないが、キャッスルマン病、強直性脊椎炎、冠状動脈性心疾患、関節リウマチにおける心血管疾患、肺動脈高血圧症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、アトピー性皮膚炎、乾癬、坐骨神経痛、II型糖尿病、肥満、巨細胞性動脈炎、急性移植片対宿主病(GVHD)、非ST上昇心筋梗塞、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎、視神経脊髄炎、慢性糸球体腎炎、及び高安動脈炎が挙げられる。

20

30

40

【0010】

或る実施形態では、IL-6アプタマーを被験体に投与することを含む関節リウマチの治療方法が提供される。或る実施形態では、IL-6アプタマーを被験体に投与することを含む多発性骨髄腫の治療方法が提供される。

50

【0011】

或る実施形態では、本明細書に開示されるアプタマーは、バイオマーカーの発見及び診断 (Ostroff, R. M., et al., PLoS One, 2010.5(12): p. e15003; Mehan, M., et al., PLoS One, 2012. 印刷中) から組織化学及び画像化 (Gupta, S., et al., Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2011.19(3): p. 273-8) に亘る適用可能性を有する。

【0012】

或る実施形態では、治療効果 (例えば、炎症性疾患、悪性疾患、感染症、自己免疫疾患、及びIL-6が関与する他の疾患または状態を治療、予防及び/または改善する) は、IL-6アプタマーがIL-6に対して暴露され、それに結合できるように少なくとも1つのIL-6アプタマーを投与することにより達成され得る。或る実施形態では、かかる結合は、治療されている被験体へのアプタマーの輸送方法に関わらず起こる。或る実施形態では、治療効果は、IL-6アプタマーがIL-6に対して暴露され、それに結合して1または複数の細胞受容体へのIL-6の結合を阻止または減少するように少なくとも1つのIL-6アプタマーを投与することによって達成され得る。

10

【0013】

或る実施形態では、IL-6に対するIL-6アプタマーの結合は、IL-6受容体に対するIL-6の結合を阻害する。或る実施形態では、IL-6アプタマーはIL-6受容体のシグナル伝達経路に沿ったシグナリングを減少する。そのような或る実施形態では、IL-6アプタマーは、JAKキナーゼの活性化を阻害し、及び/またはSTAT3及び/またはSHP2のリン酸化を阻害する。

20

【0014】

或る実施形態では、IL-6アプタマーを1または複数の追加の活性剤と共に投与する。かかる投与は、順次でもよく、組み合わせてもよい。追加の活性剤の非限定的な例として、TNF-阻害剤、IL-1阻害剤、IL-2/3阻害剤、IFN-阻害剤、IL-17阻害剤、IL-22阻害剤、IL-4/IL-13阻害剤、IL-13阻害剤、IL-5阻害剤、及びJAK阻害剤が挙げられる。TNF-阻害剤の非限定的な例として、インフリキシマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ、エタネルセプト、セルトリズマブ、AN0128 (Anacor)、ART621 (Arena Therapeutics)、及び抗-TNF-ナノボディ (ATN-103等、Pfizer) が挙げられる。IL-1阻害剤の非限定的な例として、アナキンラ、カナキヌマブ、XOMA052 (Xoma) 及びリロナセプトが挙げられる。IL-2/3阻害剤の非限定的な例として、ウスチキヌマブ、リアキヌマブ、アピリモドが挙げられる。IFN-阻害剤の非限定的な例は、AMG811 (Amgen) である。IL-17阻害剤の非限定的な例として、AIN457 (Novartis)、イキセキズマブ、AMG827 (Amgen)、及びRg4934 (Roche) が挙げられる。IL-22阻害剤の非限定的な例はフェザキヌマブである。IL-4/IL-13阻害剤の非限定的な例として、AMG317 (Amgen)、ピトラキンラ、Nuvance、及びAIR645 (Altair) が挙げられる。IL-13阻害剤の非限定的な例として、アンルキンズマブ、レプリキズマブ、CAT-354 (MedImmune)、及びIMA-026 (Wyeth) が挙げられる。IL-5阻害剤の非限定的な例は、メボリズマブである。JAK阻害剤の非限定的な例としてトファシチニブ及びルキソリチニブが挙げられる。

30

40

【0015】

或る実施形態では、IL-6アプタマーとIL-6を含むと疑われる試料とを接触させることを含む、in vitroまたはin vivoの診断方法が提供される。或る実施形態では、好適に標識化されたIL-6アプタマーをIL-6介在性疾患または障害を有すると疑われる個体に投与することを含むin vivo診断方法が提供され、上記標識化されたアプタマーは、当該個体の健康状態を診断または評価する目的で検出される。使用される標識は、使用される画像診断法にしたがって選択され得る。或る実施形態では

50

、 I L - 6 アプタマーを備えた診断キットまたは装置が提供される。

【 0 0 1 6 】

或る実施形態では、 I L - 6 に特異的に結合するアプタマーが提供される。或る実施形態では、アプタマーは、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む I L - 6 に特異的に結合する。或る実施形態では、アプタマーは、配列番号 1 0 のアミノ酸 1 6 ~ 3 1 によって定義される I L - 6 の領域に特異的に結合する。或る実施形態では、アプタマーは、配列番号 1 0 のアミノ酸 1 6 ~ 3 1、及びアミノ酸 1 1 7 ~ 1 2 5 を含む I L - 6 のエピトープに特異的に結合する。

【 0 0 1 7 】

或る実施形態では、 I L - 6 への結合に対して配列番号 1 0 1 のアプタマーと競合するアプタマーが提供される。或る実施形態では、 I L - 6 への結合に対して配列番号 4 0 0 のアプタマーと競合するアプタマーが提供される。

【 0 0 1 8 】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、アプタマーは少なくとも 1 つの修飾ピリミジンを含んでもよい。

【 0 0 1 9 】

或る実施形態では、アプタマーは G - カルテットモチーフを含む。或る実施形態では、 G カルテットモチーフは

5 ' - G G - Z Z Z - G G - Q_a - G G - Q_b - G G - 3 ' (I I I) (配列番号 7 0 2) ;

5 ' - G G - Q_a - G G - Z Z Z - G G - Q_b - G G - 3 ' (I V) (配列番号 7 0 3) ; 及び

5 ' - G G - Q_a - G G - Q_b - G G - Z Z Z - G G - 3 ' (V) (配列番号 7 0 4) から選択される構造を含む。

或る実施形態では、各 Z は U、T、及び修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各 Q はリンカー、修飾ヌクレオチド、及び非修飾ヌクレオチドから独立して選択される。或る実施形態では、a は 1 ~ 5 0、1 ~ 4 0、1 ~ 3 0、1 ~ 2 0、1 ~ 1 5、1 ~ 1 0、または 1 ~ 5 である。或る実施形態では、b は 1 ~ 5 0、1 ~ 4 0、1 ~ 3 0、1 ~ 2 0、1 ~ 1 5、1 ~ 1 0、または 1 ~ 5 である。或る実施形態では、アプタマーは、

配列 : 5 ' - G G C A G G Z Z Z G G Z Q_a G Z G G - 3 ' (I) (配列番号 7 0 0)

を含む。或る実施形態では、各 Z は U、T、及び修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各 Q はリンカー、修飾ヌクレオチド、及び非修飾ヌクレオチドから独立して選択される。或る実施形態では、a は 1 ~ 5 0、1 ~ 4 0、1 ~ 3 0、1 ~ 2 0、1 ~ 1 5、1 ~ 1 0、または 1 ~ 5 である。

【 0 0 2 0 】

或る実施形態では、 I L - 6 に特異的に結合するアプタマーが提供され、上記アプタマーは、

5 ' - Y X A X G Y A R Q_a M G Y A A G S C G R Y - 3 ' (V I) (配列番号 7 0 5) ; 及び

5 ' - M G Y A A G S C G R Y Q_b Y X A X G Y A R - 3 ' (V I I) (配列番号 7 0 6)

から選択される配列を含む。

或る実施形態では、各 Y は修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各 X は修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、M は C 及び A から選択され、S は C 及び G から選択され、各 R は G 及び A から独立して選択される。或る実施形態では、各 Q はリンカー、修飾ヌクレオチド、及び非修飾ヌクレオチドから独立して選択される。或る実施形態では、a は 1 ~ 3 0、1 ~ 2 0、1 ~ 1 5、1 ~ 1 0、または 1 ~ 5 である。或る実施形態では、b は 1 ~ 3 0、1 ~ 2 0、1 ~ 1 5、1 ~ 1 0 または 1 ~ 5 である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 1 】

或る実施形態、例えば、配列番号 7 0 0 及び配列番号 7 0 2 ~ 7 0 6 の実施形態では、各 Q は、置換または非置換の $C_2 \sim C_{20}$ のリンカー、アルキレングリコール、及びポリアルキレングリコールから独立して選択される。或る実施形態では、各 Q は、置換または非置換の $C_2 \sim C_{20}$ のリンカー、1, 3 - プロパンジオール、2 ~ 1 0 0 の 1, 3 プロパンジオール単位を有するポリ(1, 3 - プロパンジオール)、エチレングリコール、及び 2 ~ 1 0 0 のエチレングリコール単位を有するポリエチレングリコールから独立して選択される。或る実施形態では、各置換または非置換の $C_2 \sim C_{20}$ のリンカーは、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_8$ のリンカー、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_6$ のリンカー、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_5$ のリンカー、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_4$ のリンカー、または置換若しくは非置換の C_3 のリンカーである。

10

【 0 0 2 2 】

或る実施形態では、I L - 6 に特異的に結合するアプタマーが提供され、上記アプタマーは、配列：

5' - G G G Y X A X G Y A G C L_b G Z G C G Y A A G G C G G Y - 3' (I I) (配列番号：7 0 1)

を含む。或る実施形態では、Z は U、T 及び修飾ピリミジンから選択される。或る実施形態では、各 Y は修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各 X は修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各 L はリンカー、修飾ヌクレオチド、及び非修飾ヌクレオチドから独立して選択される。或る実施形態では、b は 1 ~ 2 0、1 ~ 1 5、1 ~ 1 0 または 1 ~ 5 である。

20

【 0 0 2 3 】

或る実施形態、例えば、配列番号 7 0 1 の実施形態では、各 L は置換または非置換の $C_2 \sim C_{20}$ のリンカー、アルキレングリコール、及びポリアルキレングリコールから独立して選択される。或る実施形態では、各 L は置換または非置換の $C_2 \sim C_{20}$ のリンカー、1, 3 - プロパンジオール、2 ~ 1 0 0 の 1, 3 - プロパンジオール単位を有するポリ(1, 3 - プロパンジオール)、エチレングリコール、及び 2 ~ 1 0 0 のエチレングリコール単位を有するポリエチレングリコールから独立して選択される。或る実施形態では、各置換または非置換の $C_2 \sim C_{20}$ のリンカーは、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_8$ のリンカー、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_6$ のリンカー、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_5$ のリンカー、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_4$ のリンカー、または置換若しくは非置換の C_3 のリンカーである。

30

【 0 0 2 4 】

本明細書に記載されるいずれかの実施形態では、各 X は芳香族修飾ピリミジンから独立して選択される。本明細書に記載されるいずれかの実施形態では、各 X は図 2 0 及び図 2 4 に示される芳香族修飾ピリミジンから独立して選択される。本明細書に記載されるいずれかの実施形態では、各 X は図 2 4 の N a p、2 N a p、N E、B F、及び B T から独立して選択され得る。

【 0 0 2 5 】

本明細書に記載されるいずれかの実施形態では、各 Y は図 2 0 及び図 2 4 に示される修飾ピリミジンから独立して選択される。本明細書に記載されるいずれかの実施形態では、各 Y は図 2 4 に示される修飾ピリミジンから独立して選択され得る。

40

【 0 0 2 6 】

本明細書に記載されるいずれかの実施形態では、各 Z は U、T、並びに図 2 0 及び図 2 4 に示される修飾ピリミジンから独立して選択される。本明細書に記載されるいずれかの実施形態では、各 Z は U、T、及び図 2 4 に示される修飾ピリミジンから独立して選択される。

【 0 0 2 7 】

本明細書に記載されるいずれかの実施形態では、各修飾ピリミジンは、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B n d U)、

50

- 5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、
 5 - (N - フェネチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (P E d U)、
 5 - (N - チオフェニルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T h d U)、
 5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (i B u d U)、
 5 - (N - チロシルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T y r d U)、
 5 - (N - 3, 4 - メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (M B n d U)、
 5 - (N - 4 - フルオロベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (F B n d U)、 10
 5 - (N - 3 - フェニルプロピルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (P P d U)、
 5 - (N - イミジゾイルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (I m d U)、
 5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、
 5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T r p d U)、
 5 - (N - R - スレオニニルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T h r d U) 20
 5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、
 5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウムプロピル)カルボキシアミド] - 2' - デオキシウリジンクロリド、
 5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N a p d U)、
 5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、
 5 - (N - [1 - (2, 3 - ジヒドロキシプロピル)]カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン) 30
 5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2 N a p d U)、
 5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、
 5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N E d U)、
 5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、
 5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2 N E d U) 40
 5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、
 5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B F d U)、
 5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、
 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B T d U)、
 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、及び 50

5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジンから独立して選択され得る。

【 0 0 2 8 】

本明細書に記載されるいずれかの実施形態では、各 X は、

5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N a p d U)、

5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、

5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、

5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N a p d U)、

5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、

5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、

5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N E d U)、

5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、

5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、

5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N E d U)、

5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、

5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、

5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (B F d U)、

5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、

5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、

5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (B T d U)、

5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、及び

5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジンから独立して選択され得る。

【 0 0 2 9 】

或る実施形態では、

(a) 配列番号 7、8、11、19 ~ 22、26 ~ 39、100 ~ 239、300 ~ 356、400 ~ 446、500 ~ 573、及び 599 ~ 625 から選択されるヌクレオチド配列、または (b) 配列番号 7、8、11、19 ~ 22、26 ~ 39、100 ~ 239、

300 ~ 356、400 ~ 446、500 ~ 573、及び 599 ~ 625 から選択され、

1 ~ 20 のヌクレオチドが置換、欠失または挿入され、前記アプタマーが 20 nM 未満の親和性 (K_d) で IL - 6 に特異的に結合するヌクレオチド配列、または (c) 配列番号

7、8、11、19 ~ 22、26 ~ 39、100 ~ 239、300 ~ 356、400 ~ 446、500 ~ 573、及び 599 ~ 625 から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも

も 80 % 以上同一であり、前記アプタマーが 10 nM 未満の親和性 (K_d) で IL - 6 に特異的に結合するヌクレオチド配列から選択される配列を含むアプタマーが提供される。

或る実施形態では、上記アプタマーは、10 nM 未満の IL - 6 アンタゴニスト活性 (IC_{50}) を有する。

【 0 0 3 0 】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、上記アプタマーは、少なくとも 2 ~ 6 の修飾ピリミジン及び / または 2 ' - OMe を含んでもよい。本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、アプタマーは、少なくとも 1 つ、または少なくとも 2 ~ 5 のホスホロチオエート結合を含んでもよい。

【 0 0 3 1 】

10

20

30

40

50

或る実施形態では、上記アプタマーは、20 nM未満の親和性(K_d)でIL-6に結合する。或る実施形態では、上記アプタマーは、IL-6受容体に対するIL-6結合、STAT3リン酸化、及びSTAT媒介転写から選択される少なくとも1つの活性を阻害する。

【0032】

或る実施形態では、本明細書に記載されるアプタマーまたはその薬学的に許容可能な塩のいずれかと、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を提供する。或る実施形態では、上記医薬組成物は、IL-6によって媒介される疾患または状態を治療するためのものである。

【0033】

或る実施形態では、IL-6によって媒介される疾患または状態の治療方法が提供される。或る実施形態では、方法は、本明細書に記載されるアプタマーを投与することを含む。或る実施形態では、方法は、本明細書に記載されるアプタマーまたはその薬学的に許容可能な塩のいずれかと、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を投与することを含む。

【0034】

或る実施形態では、IL-6によって媒介される疾患または状態は、炎症性疾患、悪性疾患、感染症、及び自己免疫疾患から選択される。

【0035】

或る実施形態では、IL-6によって媒介される前記疾患または状態は、キャスルマン病、強直性脊椎炎、冠状動脈性心疾患、関節リウマチにおける心血管疾患、肺動脈高血圧症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、アトピー性皮膚炎、乾癬、坐骨神経痛、II型糖尿病、肥満、巨細胞性動脈炎、急性移植片対宿主病(GVHD)、非ST上昇心筋梗塞、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎、視神経脊髄炎、慢性糸球体腎炎、及び高安動脈炎から選択される。

【0036】

或る実施形態では、IL-6によって媒介される前記疾患または状態が、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、全身型若年性特発性関節炎、骨関節炎、敗血症、喘息、間質性肺疾患、炎症性腸疾患、全身性硬化症、眼内炎症、グレーブス病、子宮内膜症、全身性硬化症、成人発症スティル病、アミロイドAアミロイド症、リウマチ性多発筋痛症、寛解傾向があり圧痕を形成する浮腫を伴う血清反応陰性対称性膵膜炎、ベーチェット病、ブドウ膜炎、移植片対宿主疾患、TNFR関連周期性症候群から選択される炎症性疾患である。

【0037】

或る実施形態では、IL-6によって媒介される疾患または状態は、癌及び癌に関連する状態から選択される悪性疾患である。或る実施形態では、悪性疾患は、多発性骨髄腫、白血病、膵臓癌、乳癌、結腸直腸癌、悪液質、黒色腫、子宮頸癌、卵巣癌、リンパ腫、胃腸、肺癌、前立腺癌、腎細胞癌、転移性腎臓癌、固形腫瘍、神経膠腫、肝臓癌、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫、膀胱癌、口腔癌、骨髄増殖性新生物、B細胞リンパ増殖性疾患、及び形質細胞性白血病から選択される癌である。或る実施形態では、悪性疾患は、非小細胞肺癌と関連する疲労及び癌と関連する食欲不振から選択される癌に関連する状態である。

【0038】

或る実施形態では、IL-6によって媒介される疾患または状態は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ヒトTリンパ球向性ウイルス(HTLV)、脳マラリア、尿路感染症、及び髄膜炎菌感染症から選択される感染症である。

【0039】

或る実施形態では、IL-6によって媒介される疾患または状態は、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、多発性筋炎、巨細胞性動脈炎を含む血管炎症候群、高安動脈炎、クリオグロブリン血症、ミエロペルオキシダーゼ-抗好中球細胞質抗体関連半月体形成性糸球体腎炎、リウマチ性血管炎、クローン病、再発性多発性軟骨炎、後天性血友病A、及

10

20

30

40

50

び自己免疫性溶血性貧血から選択される自己免疫疾患である。

【0040】

或る実施形態では、本開示は、2.4 及び2.55 の分解能で解かれる、IL-6 に結合した2つの共結晶構造のアプタマーを提供する。

【0041】

或る実施形態では、本開示は、IL-6 に特異的に結合するアプタマーを提供し、前記アプタマーは、界面面積100² 当たり1以下の有極接点でIL-6 に結合し、前記有極接点は、1以上の水素結合及び1または複数の電荷-電荷相互作用で構成され、界面面積は上記アプタマーで占められるタンパク質の表面の分数である。非限定的な例として、アプタマー2573-20__136 (配列番号101) は、界面面積に対する有極接点の比率0.0072でIL-6 に結合する。そのため、或る実施形態では、本開示は、界面面積に対する有極接点の比率0.01未満、0.009未満、0.008未満、または約0.007でIL-6 に結合するアプタマーを提供する。

10

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】実施例2に記載されるIL-6を結合するアプタマーによるTF-1細胞増殖の阻害を示す図である。

【図2】実施例2に記載されるIL-6アプタマーによるSTAT制御型ルシフェラーゼ発現の阻害を示す図である。

【図3】実施例5において検討される特定のdU修飾及び骨格修飾を示す図である。

20

【図4】実施例5に記載される代替の5-dU修飾置換を有する2573-20__15 (配列番号22) 変異体の相対的親和性値を示す図である。各dU位について親和性率(K_d 変異体/ K_d 親)を示す。

【図5】実施例5に記載される2'-O-メチルまたはC3-スパーサーの置換を有する2573-20__15 (配列番号22) 変異体の相対的親和性値を示す図である。dA位、dC位またはdG位の各々について親和性率(K_d 変異体/ K_d 親)を示す。

【図6】実施例5に記載される2573-20 (配列番号7) の変異体(2573-20__15 (配列番号22); 2573-20__137 (配列番号573); 2573-20__136 (配列番号101)) の阻害活性を示す図である。

【図7】実施例6に記載される2574-49 (配列番号8) の変異体の阻害活性を示す(2574-49__3 (配列番号26); 2574-49__260 (配列番号400)) 。

30

【図8】図8A及び図8Bは、実施例7に記載される或る特定のdU含有アプタマー及びdT制御アプタマーの90%ヒト血清中における安定性を示す。図8Cは、実施例7に記載される、ヒト、ラット、及びカニクイザルの血清における或る特定の或る特定のdU含有アプタマー及びdT制御アプタマーの安定性を示す。

【図9】実施例8に記載される2573-20__136 (配列番号101) と2574-49__260 (配列番号400) との間の競合アッセイを示す図である(2573-20__136 (配列番号101); 2574-49__260 (配列番号400)) 。

【図10】実施例9に記載されるアプタマー2573-20__136 (配列番号101) による可溶性受容体sIL-6RへのIL-6結合の阻害を示す図である。

40

【図11】実施例13に記載されるヒトIL-6 (A及びBの2本の鎖を形成する) に結合したSOMAmer 2573-20__136 (配列番号101) の2.55 結晶構造を示す図である。

【図12】実施例13に記載されるSOMAmerとの複合体、またはIL-6/IL-6R/gp130構造(Boulangier, M. J., et al., Science. 2003. 300: 2101-2104) との複合体におけるヒトIL-6タンパク質の積層構造を示す図である。ヘリックスをN末端からC末端へと標識し(A~D)、青(濃い青色をSOMAmer、薄い青色を受容体複合体; ヘリックスA)、緑(ヘリックスB)、黄(ヘリックスC)及び赤(ヘリックスD)と着色した。図面を通してこの配色

50

を保持する。

【図13】実施例13に記載されるSOMAmerの構造を2つのドメインへと分割できることを示す図である。ドメイン1は、G-カルテットモチーフを含み、ドメイン2はステムループ立体配置を有する。修飾ヌクレオチドを色により標識する：Bn-dU（マゼンタ）、PE-dU（赤）及びNap-dU（緑）。2'-O-メチル置換を有する位置をシアンで示す。図面を通して同じ配色を保持する。

【図14】実施例13に記載されるG-カルテットモチーフ（ドメイン1）を示す図である。（A）G四分子は各々、syn（マゼンタ）及びantiの立体配座（白）で2つのG塩基を含有する。ワトソククリック面並びにフーグスティーン面を通して隣接するG塩基に対する塩基水素結合。各四分子は1つのNa⁺イオンを配位する。（B）SOMAmer構造におけるG四重鎖構造は3つの側面ループを伴うup-up-down-downである。（C）修飾塩基Bn-dU7、Bn-dU8、Nap-dU12及びBn-dU30により作られた疎水性ポケット。ピスタッキング相互作用がBn-dU7及びNap-dU12のウリジン環とBn8との間で生じる。積層された塩基とBn7及びBn30との間にはedge-to-face相互作用が存在する。（D）PE-dU9塩基はG32上に積層し、修飾基を溶媒に露出する。

【図15】実施例13に記載されるように、ドメイン1においてタンパク質-SOMAmer相互作用を示す図である。（A）G29のフーグスティーン面上のIL-6 N末端テイル水素結合上の残基R16。Bn-dU30のベンジル基はR16のメチレン側鎖に対して積層する。（B）IL-6のN末端テイルをSOMAmerの骨格の間で挟み、疎水性修飾ヌクレオチドを溶媒から保護する。（C）IL-6のヘリックスA上のR24は、G5~G6においてSOMAmer骨格に対して塩橋を形成し、更に、溶媒から疎水性ポケットを密閉する。（D）IL-6のヘリックスA上のY31は、Nap12と共に積層し、順にBn8及びBn-dU7のウリジン環と共に積層する。Bn7及びBn30は、積層した残基とedge-to-face相互作用を有する。（E）Nap12は、IL-6のヘリックスC上のM117のメチレン側鎖と疎水性相互作用を有する。また、ナフチル基はBn-dU8のウリジン環に対して積層する。（F）Bn7及びBn8はヘリックスC上のF125とedge-to-face相互作用を有し、Bn7はR24及びK27のメチレン側鎖と相互作用する。

【図16】実施例13に記載されるステムループモチーフ（ドメイン2）を示す図である。（A）ドメイン2のステムループの底は、Bn27及びC28において2つの不對塩基を含有する。Bn27のウリジン環はG26と共に積層するが、ベンジル基及びC28は突出する。（B）ステムループにおける塩基対合。Bn-dU14:A25、Bn-dU15:A24、Bn-dU23:A16、及びBn-dU22:C17の間にSOMAmerステムループに4つのワトソン-クリック塩基対が存在する。（C）SOMAmerループ領域は、4つの不對塩基C18~G21を含有する。A19及びC20は突出した塩基である。（D）Bn15、Bn22及びBn23に由来するベンジル基の疎水性クラスター。（E）Bn14のウリジン環は、Bn15のアミドと共に積層するのに対し、ベンジル基はBn15、Bn22及びBn23の疎水性クラスターの反対を指す。

【図17】実施例13に記載されるように、ドメイン2におけるタンパク質-SOMAmerの接触が主に疎水性であることを示す図である。（A）Bn15、Bn22及びBn23がIL-6タンパク質上のヘリックスA及びヘリックスD上の残基のメチレン側鎖と疎水性相互作用を有する。（B）Bn14はY31とedge-to-face相互作用を有し、同様に、K27及びR30の非極性側鎖とエッジワイズ相互作用を有する。（C）IL-6上のK27とR30との間の塩橋、及びA13及びBn-dU14におけるSOMAmer骨格。

【図18】実施例13に記載されるSOMAmerとIL-6上の受容体結合部位の重複を示す図である。IL-6と、SOMAmerとの相互作用（A）及びIL-6受容体IL-6Rとgp130との相互作用（B）の全体像。

【図19】実施例13に記載されるSOMAmer及び受容体結合部位の詳細を示す図で

10

20

30

40

50

ある。(A) IL-6R 上の残基 F279 及び SOMAmer 上の Bn22 は、IL-6 のヘリックス A 及びヘリックス D 上の結合部位を認識する(黄緑色は IL-6R を示し、他の色は他の図におけるのと同じである)。(B) SOMAmer 及び gp130 は IL-6 タンパク質上の同じ結合部位を認識する。gp130 の F169 及び Bn7、SOMAmer の Bn8 及び Nap12 は、Y31 及び IL-6 のヘリックス A 上の L19 及び R24 のメチレン側鎖と相互作用する(淡紅色 = gp130)。(C) IL-6-SOMAmer 構造における G6 と Bn7 の間の SOMAmer 骨格は、IL-6/IL-6R / gp130 構造における W142 として同じ空間を占める。

【図20】スローオフプレートアプタマー等のアプタマーへと組み込まれ得る修飾ピリミジンの或る特定の例を示す図である。

10

【図21】ヒト IL-6 前駆体(配列番号9)の例示的な配列を示す図である。シグナル配列(アミノ酸1~28)を下線で示す。例示的な成熟ヒト IL-6 は、配列番号9のアミノ酸29~212を含み、配列番号10に示される。

【図22】実施例13に記載される G-カルテットフラグメント((2573-20__324(配列番号319))における修飾ヌクレオチドの合成置換の要約を示す図である。示される値は、 K_d 値(K_d 変異体/ K_d 親)の比である。親フラグメント(2573-20__324(配列番号319))の K_d 値は 2.7×10^{-7} M である。

【図23】実施例14に記載される最終 S E L E X プールに由来する Gカルテットモチーフを有する独特の SOMAmer 配列のアラインメントを示す図である。

【図24】実施例15において検討される 5-dU 修飾の或る特定の例を示す図である。各修飾構造は、例えば、図3に示される dU の付着である。

20

【図25】実施例14に記載される SOMAmer 2574-49(配列番号8)と類似の配列モチーフを有する特有の SOMAmer 配列のアラインメントを示す図である。

【図26】コラーゲン誘発関節炎を伴うカニクイザルにおける関節の炎症に対する PEG-N-2573-20__136(5'末端に接合した40kDaのPEGを有する2573-20__136(配列番号101))の効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0043】

ここで、本発明の代表的な実施形態が詳細に参照される。本発明は、列挙される実施形態と併せて記載されるが、本発明はそれらの実施形態に限定されることを意図するものではないと理解される。対照的に、本発明は、特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲に含まれ得る全ての代替物、修飾及び等価物を包含することが意図される。

30

【0044】

当業者は、本発明の実施の範囲内で使用され、その範囲内にある、本明細書に記載されるものと類似または等価な多くの方法及び材料を認識するであろう。本発明は、記載される方法及び材料に何ら限定されない。

【0045】

別途規定されない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野(複数の場合がある)の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものに類似または等価な任意の方法、装置及び材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法、装置及び材料がここに記載される。

40

【0046】

本開示において引用される出版物、公開特許文献、及び特許出願は全て、本開示が属する分野(複数の場合がある)の当業者のレベルの指標である。本明細書において引用される出版物、公開特許文献、及び特許出願は全て、個々の出版物、公開特許文献、または特許出願が具体的且つ個別に参照により援用されるのと同じ程度に参照によって本明細書に援用される。

【0047】

添付の特許請求の範囲を含む本開示で使用される「一つの(a)」、「一つの(an)

50

」及び「その (t h e) 」の単数形は、文章の内容が明確に別段の指示をしない限り、複数の参照を含み、「少なくとも一つ」及び「1または複数」と同じ意味で使用される。そのため、「一つのアダマー (a n a p t a m e r) 」に対する参照は、アダマーの混合物等を包含する。

【 0 0 4 8 】

本明細書で使用される「約」の用語は、数値が関連する事項の基本的な関数を変化しないような、数値のわずかな修飾または変化を表す。

【 0 0 4 9 】

本明細書で使用される「含む (c o m p r i s e s) 」、「含んでいる (c o m p r i s i n g) 」、「含む、包含する (i n c l u d e s) 」、「含んでいる、包含している (i n c l u d i n g) 」、「含む、含有する (c o n t a i n s) 」、「含んでいる、含有している (c o n t a i n i n g) 」の用語、及びそれらの任意の変化は、プロセス、方法、プロダクトバイプロセス、または物質の組成物が、それらの要素のみならず、明示的に列挙されていない、またはかかるプロセス、方法、プロダクトバイプロセス、若しくは物質の組成物に固有の他の要素を包含してもよいように、要素の一覧を含み、包含しまたは含有するように、非排他的な包含を含むことが意図される。

【 0 0 5 0 】

本明細書で使用される「ヌクレオチド」の用語は、リボヌクレオチド若しくはデオキシリボヌクレオチド、またはそれらの修飾形態、並びにそれらの類縁体を指す。ヌクレオチドとして、プリン (例えば、アデニン、ヒポキサンチン、グアニン、並びにそれらの誘導体及び類縁体)、並びにピリミジン (例えば、シトシン、ウラシル、チミン、並びにそれらの誘導体及び類縁体) を含む種が挙げられる。塩基が「A」、「C」、「G」、「U」、または「T」として示される場合、リボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドの両方、並びにそれらの修飾形態及び類縁体を包含することが意図される。

【 0 0 5 1 】

本明細書で使用される「核酸」、「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチドのポリマーを指すため同じ意味で使用され、DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、並びにこれらの種の核酸、オリゴヌクレオチド、及びポリヌクレオチドの修飾を含み、任意の位置における様々な実体または部分のヌクレオチド単位への付着が包含される。「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、及び「核酸」の用語は、二本鎖または一本鎖の分子、並びにトリプルヘリックス分子を含む。核酸、オリゴヌクレオチド、及びポリヌクレオチドは、用語アダマーよりも広い用語であり、そのため、核酸、オリゴヌクレオチド、及びポリヌクレオチドの用語は、アダマーであるヌクレオチドのポリマーを含むが、核酸、オリゴヌクレオチド、及びポリヌクレオチドの用語は、アダマーに限定されない。

【 0 0 5 2 】

本明細書で使用される「修飾する」、「修飾された」、「修飾」の用語、及びそれらの任意の変化は、オリゴヌクレオチドに対する参照において使用される場合、オリゴヌクレオチドの4つの構成ヌクレオチド塩基 (すなわち、A、G、T/U、及びC) の少なくとも1つが天然由来のヌクレオチドの類縁体またはエステルであることを意味する。或る実施形態では、修飾ヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ耐性を与える。或る実施形態では、修飾ヌクレオチドは、主にアダマーとタンパク質標的との疎水性相互作用へと導き、高い結合効率及び安定な共結晶複合体を生じる。C-5位の置換を伴うピリミジンは、修飾ヌクレオチドの例である。修飾は、骨格修飾、メチル化、イソ塩基、イソシチジン及びイソグアニジン等の異常な塩基対の組合せ等を含んでもよい。また、修飾は、キャッピング等の3'及び5'の修飾を含んでもよい。他の修飾として、類縁体を有する1または複数の天然由来のヌクレオチド、例えば、非帯電結合 (例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメート等) 及び帯電結合 (例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等) を有するもの、インターカレーター (例えば、アクリジン、ソラレン等) を含むもの、キレート剤 (例えば、金属、放射性

10

20

30

40

50

金属、ホウ素、酸化金属等)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、並びに修飾結合(例えば、アルファ芳香族核酸等)を有するもの等のヌクレオチド間修飾が挙げられる。更に、ヌクレオチドの糖に通常存在するヒドロキシル基のいずれかは、ホスホン酸基またはリン酸基により置換されてもよく、標準的な保護基により保護されてもよく、または活性化されて追加のヌクレオチド若しくは固体支持体への追加の結合を調製してもよい。5'末端及び3'末端のOH基は、リン酸化されてもよく、またはアミン、約1~約20の炭素原子の有機キャッピング基部分、ポリエチレングリコール(PEG)ポリマーで置換されてもよく、或る実施形態では約10kDa~約80kDaの範囲でPEGポリマーで置換されてもよく、或る実施形態では約20kDa~約60kDaの範囲で、または他の親水性若しくは疎水性の生物学的または合成のポリマーで置換されてもよい。或る一つの実施形態では、修飾はピリミジンのC-5位の修飾である。これらの修飾を、C-5位での直接的なアミド結合または他のタイプの結合によって産生することができる。

10

【0053】

また、ポリヌクレオチドは、2'-O-メチル-、2'-O-アリル、2'-フルオロ-または2'-アジド-リボース、炭素環糖類縁体、-アノマー糖、アラビノース、キシロース、またはリキソース等のエピマー糖、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプトロース、非環式類縁体及びメチルリボース等の脱塩基ヌクレオシド類縁体を含む、当該技術分野において一般的に知られているリボースまたはデオキシリボース糖の類縁形態を含んでもよい。上述のように、1または複数のホスホジエステル結合が代替の結合基によって置換されてもよい。これらの代替結合基として、リン酸塩がP(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(O)NR₂(「アミデート」)、P(O)R、P(O)OR'、COまたはCH₂(「ホルムアセタール」)により置換され、式中、RまたはR'が各々、独立して、Hまたは任意にエーテル(-O-)結合、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、またはアラルキルを含む置換若しくは非置換のアルキル(1~20C)である実施形態が挙げられる。一つのポリヌクレオチドにおける全ての結合が同じである必要はない。糖、プリン、及びピリミジンの類縁形態の置換は、例えば、ポリアミド骨格等の代替骨格構造のように、最終製品の設計において有利な場合がある。

20

【0054】

本明細書で使用される「ヌクレアーゼ」の用語は、オリゴヌクレオチドのヌクレオチドサブユニット間のホスホジエステル結合を切断することができる酵素を指す。本明細書で使用される「エンドヌクレアーゼ」の用語は、オリゴヌクレオチド内の部位でホスホジエステル結合(複数の場合がある)を切断する酵素を指す。本明細書で使用される、「エクソヌクレアーゼ」の用語は、オリゴヌクレオチドの末端ヌクレオチドを連結するホスホジエステル結合(複数の場合がある)を切断する酵素を指す。体液は、典型的にはエンドヌクレアーゼ及びエクソヌクレアーゼの両方の混合物を含有する。

30

【0055】

本明細書で使用される「ヌクレアーゼ耐性の」及び「ヌクレアーゼ耐性」の用語は、エンドヌクレアーゼまたはエクソヌクレアーゼといった酵素と接触した場合に、オリゴヌクレオチドが分解されないか、または非修飾ヌクレオチドで構成されるオリゴヌクレオチドよりもゆっくりと分解されるいずれかであるように、エンドヌクレアーゼまたはエクソヌクレアーゼに対する基質としてはたらくオリゴヌクレオチドの能力の減少を指す。

40

【0056】

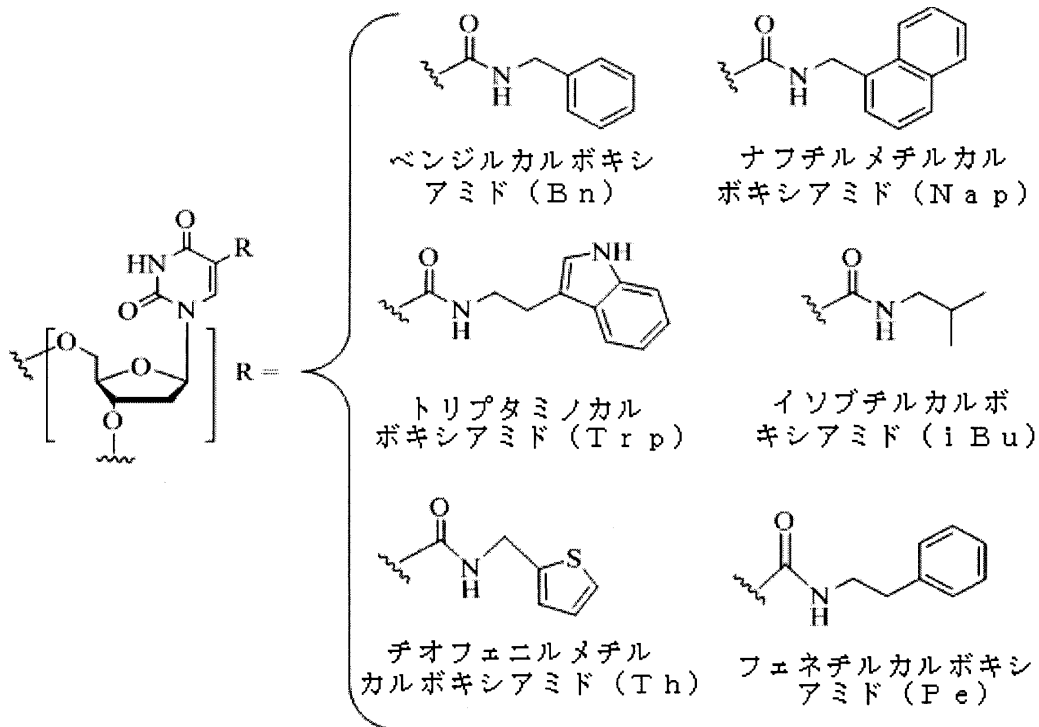
本明細書で使用される「C-5修飾ピリミジン」の用語は、C-5位における修飾を伴うピリミジンを指し、限定されないが、図20及び図24において説明されるそれらの部分が挙げられる。C-5修飾ピリミジンの例として、U.S. Pat. No. 5,719,273及びU.S. Pat. No. 5,945,527に記載されるものが挙げられる。C-5修飾の例として、すぐ下に説明されるベンジルカルボキシアミド(代替的には、ベンジルアミノカルボニル)(Bn)、ナフチルメチルカルボキシアミド(代替的には、ナフチルメチルアミノカルボニル)(Nap)、トリブタミノカルボキシアミド(代替的

50

には、トリプタミノカルボニル) (Trp)、フェネチルカルボキシアミド(代替的には、フェネチルアミノカルボニル) (Pe)、チオフェニルメチルカルボキシアミド(代替的には、チオフェニルメチルアミノカルボニル) (Th) 及びイソブチルカルボキシアミド(代替的には、イソブチルアミノカルボニル) (iBu) から独立して選択される置換基による C - 5 位におけるデオキシウリジンの置換が挙げられる。

【0057】

【化1】



10

20

【0058】

また、C - 5 修飾ピリミジンの化学修飾は、2' - 位の糖修飾、環外アミンにおける修飾、及び4 - チオウリジンの置換等の一つまたは任意の組合せと組み合わせてもよい。

【0059】

代表的な C - 5 修飾ピリミジンとして、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BndU)、5 - (N - ベンジカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ベンジカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (iBudU)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - フェネチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (PedU)、5 - (N - チオフェニルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ThdU)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (TrpdU)、5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - トリプタミノカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウム)プロピル]カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジンクロリド、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NapdU)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、または5 - (N - [1 - (2, 3 - ジヒドロキシプロピル)]カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン) が挙げられる。

【0060】

ヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド合成の前または後のいずれかに修飾され得る。オリゴヌクレオチド中のヌクレオチドの配列は、1または複数の非ヌクレオチド成分により中断されてもよい。修飾されたオリゴヌクレオチドを、重合の後、例えば、任意の好適な

30

40

50

標識化成分との連結による等、更に修飾してもよい。

【0061】

本明細書で使用される、「少なくとも1つのピリミジン」の用語は、核酸の修飾を指す場合には、核酸中の1つ、幾つかのまたは全てのピリミジンを指し、核酸中のいずれか、または全てのC、T、またはUの任意または全ての発生が修飾されてもよく、または修飾されなくてもよいことを示す。

【0062】

本明細書で使用される「核酸リガンド」、「アプタマー」、及び「クローン」は、標的分子に対して所望の作用を有する非天然由来の核酸を指すため同じ意味で使用される。所望の作用として、限定されないが、標的の結合、標的を触媒的に変化すること、標的との標的またはその標的の機能的活性を修飾または変化させる方法で反応させること、標的に共有結合的に付着すること（自殺型阻害剤におけるように）、及び標的と別の分子との反応を促進することが挙げられる。或る実施形態では、上記作用は標的分子に対する特異的な結合親和性であり、かかる標的分子はワトソン/クリック塩基対合またはトリプルヘリックス形成に依存しない機構により核酸リガンドに結合するポリヌクレオチド以外の三次元化学構造であって、ここで、アプタマーはその標的分子によって結合されている既知の生理学的機能を有する核酸ではない。所与の標的に対するアプタマーは、当該アプタマーはその標的のリガンドである場合、(a)候補混合物と標的を接触させ、ここで、当該候補混合物中の他の核酸と比較してその標的に対して増加した親和性を有する核酸を候補混合物の残りから分離することができ、(b)上記候補混合物の残りから親和性の増加した核酸を分離すること、及び(c)親和性が増加した核酸を増幅して核酸のリガンド濃縮混合物を得ることにより、上記標的分子のアプタマーを同定する方法によって、候補の核酸混合物から同定される。親和性相互作用は程度の問題として認識されるが、これに関連して、その標的に対するアプタマーの「特異的結合親和性」は、アプタマーが、一般的に、或る混合物または試料中の他の非標的成分に結合するよりも、一層高い親和性の程度によりその標的に結合することを意味する。「アプタマー」または「核酸リガンド」は、特定のヌクレオチド配列を有する核酸分子の一つのタイプまたは種の1組のコピーである。アプタマーは、任意の好適な数のヌクレオチドを含むことができる。「アプタマー」は、2以上の分子のかかるセットを指す。異なるアプタマーは、同一または異なった数のいずれかのヌクレオチドを有してもよい。アプタマーは、DNA若しくはRNAであってもよく、一本鎖、二本鎖であってもよく、または二本鎖若しくは三本鎖領域を含んでもよい。

【0063】

本明細書で使用される「SOMAmer」またはスローオフレート修飾アプタマーは、30分以上、60分以上、90分以上、120分以上、150分以上、180分以上、210分以上、または240分以上のオフレート($t_{1/2}$)を有するアプタマー(疎水性修飾を有する少なくとも1つのヌクレオチドを含むアプタマーを包含する)を指す。或る実施形態では、SOMAmerは、「改良されたオフレートを有するアプタマーの作製方法」と題されるU.S. Patent 7,947,447に記載される改良SELEX法を使用して作製される。

【0064】

本明細書で使用される「Gカルテット」は、各Gヌクレオチド対間に少なくとも1つのヌクレオチドまたはスペーサー基を有する4対のGヌクレオチドを含むヌクレオチド配列モチーフである。Gカルテットモチーフは、例えば、Lane, A.N., et al., NAR, 2008, 36(17):5482:5515に記載される。

【0065】

本明細書で使用される「タンパク質」は、「ペプチド」、「ポリペプチド」または「ペプチドフラグメント」と同じ意味で使用される。「精製した」ポリペプチド、タンパク質、ペプチド、またはペプチドフラグメントは、細胞物質、または細胞、組織若しくはそのアミノ酸配列が得られる無細胞起源に由来する他の汚染タンパク質を実質的に含まないか、または化学合成された場合に化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

本明細書で使用される「炎症性疾患」は、炎症反応を含む疾患または状態を指す。炎症反応は、急性及び/または慢性であってもよい。或る実施形態では、慢性炎症は、IL-6濃度の増加を含む。本明細書に記載されるIL-6アプタマーによって治療され得る炎症性疾患の非限定的な例として、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、全身型若年性特発性関節炎、骨関節炎、敗血症、喘息、間質性肺疾患、炎症性腸疾患、全身性硬化症、眼内炎症、グレーブス病、子宮内膜症、全身性硬化症、成人発症ステイル病、アミロイドAアミロイド症、リウマチ性多発筋痛症、寛解傾向があり圧痕を形成する浮腫を伴う血清反応陰性対称性膵膜炎、ベーチェット病、ブドウ膜炎、植片対宿主疾患、TNFR受容体関連周期性症候群が挙げられる。

10

【 0 0 6 7 】

本明細書で使用される「悪性疾患」は、癌及び癌に関連する状態を包含する。

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用される「癌」は、制御されていない、異常な細胞成長を含む疾患または状態を意味する。本明細書に記載されるIL-6アプタマーによって治療され得る癌の非限定的な例として、多発性骨髄腫、白血病、膵臓癌、乳癌、結腸直腸癌、悪液質、黒色腫、子宮頸癌、卵巣癌、リンパ腫、胃腸、肺癌、前立腺癌、腎細胞癌、転移性腎臓癌、固形腫瘍、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫、膀胱癌、口腔癌、骨髄増殖性新生物、B細胞リンパ増殖性疾患、及び形質細胞性白血病が挙げられる。癌に関連する状態の非限定的な例として、非小細胞肺癌に関連する疲労及び癌に関連する食欲不振が挙げられる。

20

【 0 0 6 9 】

本明細書で使用される「感染症」は、微生物、ウイルス、菌類等の病原体によって引き起こされる疾患または状態を指す。本明細書に記載されるIL-6アプタマーによって治療され得る感染症の非限定的な例として、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ヒトTリンパ球向性ウイルス(HTLV)、脳マラリア、尿路感染症、及び髄膜炎菌感染症が挙げられる。

【 0 0 7 0 】

本明細書で指標される「自己免疫疾患」は、組織及び他の成分等のその身体自体の成分に対する不適切な免疫応答に起因する疾患または状態を指す。或る実施形態では、IL-6濃度は自己免疫疾患において上昇される。本明細書に記載されるIL-6アプタマーによって治療され得る自己免疫疾患の非限定的な例として、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、多発性筋炎、巨細胞性動脈炎を含む血管炎症候群、高安動脈炎、クリオグロブリン血症、ミエロペルオキシダーゼ-抗好中球細胞質抗体関連半月体形成性糸球体腎炎、リウマチ性血管炎、クローン病、再発性多発性軟骨炎、後天性血友病A、及び自己免疫性溶血性貧血が挙げられる。

30

【 0 0 7 1 】

本明細書で使用される「IL-6が媒介する疾患または状態」は、その疾患または状態の少なくとも一部の症状及び/または進行がIL-6が媒介するシグナリングによって生じる疾患または状態を指す。IL-6が媒介する疾患または状態の非限定的な例として、炎症性疾患、悪性疾患(癌及び癌に関連する状態を含む)、感染症、及び自己免疫疾患が挙げられる。更に、IL-6が媒介する疾患の非限定的な例として、限定されないが、キャスルマン病、強直性脊椎炎、冠状動脈性心疾患、関節リウマチにおける心血管疾患、肺動脈高血圧症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、アトピー性皮膚炎、乾癬、坐骨神経痛、II型糖尿病、肥満、巨細胞性動脈炎、急性移植片対宿主病(GVHD)、非ST上昇心筋梗塞、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎、視神経脊髄炎、慢性糸球体腎炎、及び高安動脈炎が挙げられる。

40

【 0 0 7 2 】

本明細書で使用される「調節する」は、ペプチド若しくはポリペプチドの濃度を増加若しくは減少することのいずれかによって変更すること、またはペプチド若しくはポリペプチドの安定性または活性を増加若しくは減少することのいずれかによって変更することを

50

意味する。「阻害する」の用語は、ペプチド若しくはポリペプチドの濃度を減少するか、またはペプチド若しくはポリペプチドの安定性若しくは活性を減少することを意味する。本明細書に記載されるように、調節されるまたは阻害されるタンパク質はIL-6である。

【0073】

本明細書で使用される、「生物学的活性」は、生理学的または病態生理学的なプロセスに影響を与え得る1または複数の細胞または細胞外のプロセス(例えば、結合、シグナリング等を介する)に対する効果を示す。

【0074】

本明細書で使用される「インターロイキン-6」及び「IL-6」の用語は、天然由来のアイソフォーム及び変異体を含む天然由来のIL-6を指す。本明細書で使用される、IL-6は、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ウマ、霊長類、及びウシを含む全ての哺乳動物種のIL-6を包含する。ヒトIL-6前駆体の非限定的な例は、図21に示されるSwiss-Protアクセッション番号P05231.1(配列番号9)の配列を有する。成熟ヒトIL-6の非限定的な例は、Swiss-Protアクセッション番号P05231.1のアミノ酸29~212(配列番号10)を含む。

【0075】

本明細書で使用される「IL-6受容体」は、IL-6受容体等のIL-6によって結合され、活性化される受容体を指し、2つのサブユニット、すなわちIL-6R(IL-6受容体サブユニットとも呼ばれる)及びgp130(IL-6受容体サブユニットとも呼ばれる)を含む。IL-6受容体は、限定されないが、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ウマ、霊長類、及びウシを含む任意の哺乳動物種の受容体を包含する。ヒトIL-6R前駆体の非限定的な例は、Swiss-Protアクセッション番号P08887.1に示される配列を有する。ヒトIL-6R成熟タンパク質の非限定的な例は、Swiss-Protアクセッション番号P08887.1のアミノ酸20~468の配列を有する。ヒトgp130前駆体の非限定的な例は、Swiss-Protアクセッション番号P40189.2に示される配列を有する。ヒトgp130成熟タンパク質の非限定的な例は、Swiss-Protアクセッション番号P40189.2のアミノ酸23~918の配列を有する。

【0076】

「IL-6アプタマー」は、IL-6に結合することができ、IL-6の活性を修飾することができるアプタマーである。或る実施形態では、IL-6アプタマーは、*in vitro*においてIL-6の少なくとも1つの活性を阻害する。或る実施形態では、IL-6アプタマーは*in vivo*においてIL-6の少なくとも1つの活性を阻害する。IL-6の活性の非限定的な例として、IL-6受容体への結合、細胞増殖の誘導(*in vitro*におけるTF-1細胞増殖等の)、STAT3リン酸化の誘導、及びSTAT3媒介転写の誘導が挙げられる。

【0077】

本明細書で利用される「薬学的に許容可能な」の用語は、連邦政府若しくは州政府の規制機関によって承認されるか、米国薬局方または動物より具体的にはヒトにおける使用について他の一般的に認められている薬局方に収載されていることを意味する。「担体」の用語は、治療薬がそれと共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指し、限定されないが、水及び油等の無菌液等を含む。

【0078】

IL-6アプタマーの「薬学的に許容可能な塩」または「塩」は、イオン結合を含む開示される化合物の製品であり、典型的には、開示される化合物と個体に投与するのに適した酸または塩基とを反応させることにより製造される。薬学的に許容可能な塩として、限定されないが、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩、硫酸水素塩、アルキルスルホン酸塩、アリールスルホン酸塩、アリールアルキルスルホン酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、乳酸塩、及び酒石酸塩を含む酸付

10

20

30

40

50

加塩；Li、Na、K等のアルカリ金属カチオン、Mg若しくはCa等のアルカリ土類金属塩、または有機アミン塩が挙げられる。

【0079】

「医薬組成物」は、個体への投与に適した形態でIL-6アプタマーを含む製剤である。医薬組成物は、典型的にはその意図される投与経路に適合性となるように製剤化される。投与経路の例として、限定されないが、経口及び非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、吸入、局所、経皮、経粘膜、及び直腸内投与が挙げられる。

【0080】

本明細書で使用される「治療的有効量」は、一般的には、本明細書に記載される予防、軽減、または治療される障害または状態の少なくとも1つの症状を改善するのに必要な量を意味する。本開示のIL-6アプタマーに関連する「治療的有効量」の文言は、かかる治療が必要な相当数の個体に上記アプタマーを投与することに対する具体的な薬理的応答を提供するアプタマーの用量を意味する。特定の場合に特定の個体に投与されるアプタマーの治療的有効量は、かかる用量が当業者によって治療的に有効な量と見なされても本明細書に記載される状態/疾患を治療するのに常に有効であるわけではないことが強調される。

10

【0081】

「SELEX」及び「SELEXプロセス」の用語は、一般的に、(1)所望の様式、例えば、タンパク質に対して高い親和性で結合する様式で標的分子と相互作用する核酸の選択と、(2)それらの選択された核酸の増幅との組合せを指すため、本明細書において同じ意味で使用される。SELEXプロセスは、特定の標的分子に対して高親和性を有するアプタマーを同定するために使用され得る。

20

【0082】

SELEXは、一般的に、核酸の候補混合物を調製すること、所望の標的分子に当該候補混合物を結合させて親和性複合体を形成すること、非結合候補核酸から当該親和性複合体を分離すること、当該親和性複合体から核酸を分離及び単離すること、当該核酸を精製すること、並びに具体的なアプタマー配列を同定することを含む。上記プロセスを選択したアプタマーの親和性を更に改善するため複数回行ってよい。上記プロセスは、上記プロセス中に1または複数の時点で増幅工程を含むことができる。例えば、「核酸リガンド」と題されるU.S. Patent No. 5,475,096を参照されたい。SELEXプロセスは、その標的に共有結合するアプタマー、並びにその標的に非共有結合するアプタマーを作製するために使用され得る。例えば、「指数関数的な濃縮による核酸リガンドの体系的進化：Chemical-SELEX」と題されるU.S. Patent No. 5,705,337を参照されたい。

30

【0083】

SELEXプロセスは、例えば、改善された*in vivo*安定性または改善された輸送特性等のアプタマーに対する改善された特性を与える修飾ヌクレオチドを含有する高親和性アプタマーを同定するために使用され得る。かかる修飾の例として、リボース及び/またはリン酸及び/または塩基の位置における化学的置換が挙げられる。修飾ヌクレオチドを含有するSELEXプロセスによって同定されたアプタマーは、C5及び/またはピリミジンの2'位において化学修飾されたヌクレオチド誘導体を含有するオリゴヌクレオチドに記載する、「修飾ヌクレオチドを含有する高親和性核酸リガンド」と題されるU.S. Patent No. 5,660,985に記載される。U.S. Patent No. 5,580,737は、2'-アミノ(2'-NH₂)、2'-フルオロ(2'-F)、及び/または2'-O-メチル(2'-OMe)で修飾された1または複数のヌクレオチドを含有する特異性の高いアプタマーに記載する(上記を参照されたい)。また、拡大された物理的及び化学的な特性を有する核酸ライブラリ、並びにSELEX及びphotoSELEXにおけるそれらの使用を記載する、「SELEX及びPHOTOSELEX」と題されたU.S. Patent Application Publication No. 20090098549も参照されたい。

40

50

【0084】

「ヌクレアーゼ耐性オリゴヌクレオチド」と題される、2009年11月25日付で出願されたU.S. Provisional Application Serial No. 61/264,545は、改良されたヌクレアーゼ耐性を有するオリゴヌクレオチドの製造方法を記載する。ヌクレアーゼ耐性オリゴヌクレオチドは、図20及び図24に述べられるものから選択された基によってC-5位で修飾された少なくとも1つのピリミジンを含む。様々な実施形態において、修飾として、上記されるベンジルカルボキシアミド(Bn)、フェネチル(Ph)、チオフェニルメチル(Th)、ナフチルメチルカルボキシアミド(Nap)、トリプタミノカルボキシアミド(Trp)、及びイソブチルカルボキシアミドから独立して選択される置換基によるC-5位におけるデオキシウリジンの置換が挙げられる。

10

【0085】

また、SELEXは、所望のオフレート特性を有するアプタマーを同定するために使用され得る。標的分子に結合し得るアプタマーを作製するための改良されたSELEX法を記載する、「改良されたオフレートを有するアプタマーの作製方法」と題されるU.S. Patent 7,947,447を参照されたい。それらの各標的分子からのより遅い解離速度を有するアプタマーの製造方法が記載される。上記方法は、標的分子と候補混合物を接触させて核酸-標的複合体の形成を生じさせ、核酸-標的複合体が早い解離速度で解離して再形成されないのに対して、遅い解離速度を有する複合体はインタクトのまま維持されるスローオフレート濃縮を行うことを含む。更に、上記方法は、改良されたオフレート性能を有するアプタマーを作製するため候補核酸混合物の産生において修飾ヌクレオチドの使用を含む(「SELEX及びphotoSELEX」と題されるU.S. Patent Publication No. 2009/0098549を参照されたい)。(また、U.S. Patent No. 7,855,054及びU.S. Patent Publication No. 2007/0166740も参照されたい)。これらの出版物の各々は、その全体において参照により本明細書に援用される。

20

【0086】

或る実施形態では、標的分子に結合するアプタマーの選択方法であって、(a)核酸の候補混合物を調製すること(ここで、候補混合物は、当該候補混合物の少なくとも1つまたはその各々において少なくとも1つのピリミジンがC5-位において化学修飾されている修飾核酸を含む)、(b)標的分子と上記候補混合物を接触させること(ここで、上記候補混合物中の他の核酸と比較して標的分子に対して増加した親和性を有する核酸が標的分子に結合し、核酸-標的分子複合体を形成する)、(c)上記候補混合物の残りから増加した親和性の核酸を分離すること、及び(d)増加した親和性の核酸を増幅して、増加した親和性で標的分子に結合できる核酸配列が濃縮された核酸の混合物を得て、それにより標的分子に対するアプタマーを同定すること、を含む。特定の実施形態では、上記方法は、スローオフレート濃縮プロセスを行うことを更に含む。

30

【0087】

本明細書において、「標的」、または「標的分子」、または「標的」は、核酸がそれに対して所望の様式で作用し得る任意の化合物を指す。標的分子は限定されず、タンパク質、ペプチド、核酸、糖、脂質、多糖、糖タンパク質、ホルモン、受容体、抗原、抗体、ウイルス、病原体、毒性物質、基質、代謝産物、遷移状態アナログ、補因子、阻害剤、薬物、色素、栄養素、成長因子、細胞、組織、上述の任意の部分またはフラグメント等であってもよい。実質的に、任意の化学的または生物学的なエフェクターが好適な標的であってもよい。任意のサイズの分子が標的としてはたらくことができる。また、標的は、標的と核酸との相互作用の可能性または強度を高めるために特定の方法で修飾されてもよい。また、標的は、タンパク質の場合、例えば、アミノ酸配列中のわずかな変化、ジスルフィド結合の形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化等の特定の化合物若しくは分子の任意のわずかな変化、または実質的にその分子の同一性を変更しない標識化合物との結合等の修飾を含むことができる。「標的分子」または「標的」は、分子の1つのタイプ

40

50

若しくは種、またはアダプターに結合可能な多分子構造の1セットのコピーである。「標的分子」または「標的」は、1より多いかかるとの分子を指す。標的がペプチドである S E L E X プロセスの実施形態は、「精製タンパク質を伴わない修飾 S E L E X プロセス」と題される U . S . Patent No . 6 , 3 7 6 , 1 9 0 に記載される。

例示的な I L - 6 アダプター

【 0 0 8 8 】

本開示の I L - 6 アダプターは、実施例 1 に記載されるように、スローオフレートを有するアダプターを同定するための改良された S E L E X 法を使用して同定された。B n - d U (5 - (N - ベンジルカルボキシアミド - 2 ' - デオキシウリジン)、d A、d C 及び d G で構成されるランダム DNA ライブラリを1つの選択に使用し、N a p d U (5 - (N - ナフチルカルボキシアミド - 2 ' - デオキシウリジン)、d A、d C 及び d G で構成されるランダム DNA ライブラリを別の選択に使用した。そのため、様々な実施形態において、本発明の I L - 6 アダプターは、少なくとも1つの修飾ピリミジンを含む。

10

【 0 0 8 9 】

B n - d U アダプター 2 5 7 3 - 2 0 を使用して、I L - 6 に対して強い親和性を保持している切断型配列を同定するために研究を行った。5 ' 末端及び 3 ' 末端からの規則正しい切断は、3 2 ヌクレオチド配列 (2 5 7 3 - 2 0 _ 1 5 ; 配列番号 2 2) の同定を導く。N a p - d U アダプター 2 5 7 4 - 4 9 (配列番号 8) を使用して、I L - 6 に対して強い親和性を保持している切断された配列を同定するために同様の研究を行った。5 ' 末端及び 3 ' 末端からの規則正しい切断は、3 0 ヌクレオチド配列 (2 5 7 4 - 4 9 _ 1 4 ; 配列番号 3 5) の同定を導く。

20

【 0 0 9 0 】

更に、実施例 1 5 に記載されるヌクレオチド置換の研究は、アダプター 2 5 7 3 - 2 0 _ 1 3 6 (配列番号 1 0 1) 及びアダプター 2 5 7 4 - 4 9 _ 2 6 0 (配列番号 4 0 0) における多くの位置が、I L - 6 結合活性のわずかな喪失またはその喪失を伴わずに修飾及び/または置換され得たことを示した。よって、或る実施形態では、I L - 6 アダプターは、配列：

I . 5 ' - G G C A G G Z Z Z G G Z Q 。 G Z G G - 3 ' (配列番号 7 0 0)
 (式中、各 Z は U、T、及び修飾ピリミジン (5 ' - 修飾ピリミジン等) から独立して選択され、各 Q はリンカー、修飾ヌクレオチド、及び非修飾ヌクレオチドから独立して選択され、a は 1 ~ 5 0 である) を含む。或る実施形態では、a は、2 ~ 5 0、1 ~ 4 0、2 ~ 4 0、1 ~ 3 0、2 ~ 3 0、1 ~ 2 0、2 ~ 2 0、1 ~ 1 5、2 ~ 1 5、1 ~ 1 0、2 ~ 1 0、1 ~ 5、または 2 ~ 5 である。或る実施形態では、各 Q は、置換または非置換の C₂ ~ C₂₀ のリンカー、アルキレングリコール、及びポリアルキレングリコールから独立して選択される。或る実施形態では、各 Q は、置換または非置換の C₂ ~ C₂₀ のリンカー、1, 3 - プロパンジオール、2 ~ 1 0 0 の 1, 3 - プロパンジオール単位を有するポリ (1, 3 - プロパンジオール)、エチレングリコール、及び 2 ~ 1 0 0 のエチレングリコール単位を有するポリエチレングリコールから独立して選択される。或る実施形態では、各 Z は、U、T、及び図 2 0 に示される修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各 Z は、U、T、及び図 2 4 に示される修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、I L - 6 アダプターの 1 または複数のヌクレオチドは、2 ' - O - メチル修飾を含む。或る実施形態では、I L - 6 アダプター中の 1 または複数のヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合である。

30

40

【 0 0 9 1 】

或る実施形態では、I L - 6 アダプターは、配列：

I I . 5 ' - G G G Y X A X G Y A G C L_b G Z G C G Y A A G G C G G Y - 3 ' (配列番号 7 0 1)

(式中、各 Z は U、T、及び修飾ピリミジン (5 ' - 修飾ピリミジン等) から独立して選択され、各 Y は修飾ピリミジン (5 ' - 修飾ピリミジン等) から独立して選択され、各 X は修飾ピリミジン (5 ' - 修飾ピリミジン等) から独立して選択され、各 L はリンカー、

50

修飾ヌクレオチド、及び非修飾ヌクレオチドから独立して選択され、 b は1～20である)を含む。或る実施形態では、 b は1～15、1～12、1～10、1～9、1～8、または1～7である。或る実施形態では、各 L は置換または非置換の $C_2 \sim C_{20}$ のリンカー、アルキレングリコール、及びポリアルキレングリコールから独立して選択される。或る実施形態では、各 L は置換または非置換の $C_2 \sim C_{20}$ のリンカー、1,3-プロパンジオール、2～100の1,3-プロパンジオール単位を有するポリ(1,3-プロパンジオール)、エチレングリコール、及び2～100のエチレングリコール単位を有するポリエチレングリコールから独立して選択される。或る実施形態では、各 L は C_3 リンカーであり、 b は2である。或る実施形態では、各 L は修飾または非修飾ヌクレオチドから独立して選択され、 b は1～10である。或る実施形態では、各 Z はU、T、及び図20に示される修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各 Z は、U、T、及び図24に示される修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各 Y は図20に示される修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各 Y は図24に示される修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各 X は図20に示される芳香族修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各 X は図24に示される芳香族修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各 X は図24のNap、2Nap、NE、BF及びBTから独立して選択される。或る実施形態では、各 X はNapである。或る実施形態では、 L は C_3 リンカーであり、 b は2である。或る実施形態では、IL-6アプタマーの1または複数のヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾を含む。或る実施形態では、IL-6アプタマー中の1または複数のヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合である。

10

20

【0092】

2573-20(配列番号7)を選択した配列プールについて更なるシーケンシング研究を行った。並列パイロシーケンシングを使用する大規模でハイスループット法の454のシーケンシングは、不偏性の試料調製及び非常に正確な配列分析を提供する。シーケンシングデータを使用して、IL-6結合に関与するコンセンサスモチーフを同定した。最終SELEXプールの多くのメンバーにおいて、保存されたGカルテットモチーフを同定した。実施例14及び図23に記載される配列、並びに実施例13の結晶構造より、IL-6に対する結合についてコンセンサスモチーフを同定し、このコンセンサスモチーフは、二対のGsが3つのU、T、または5'-修飾Uヌクレオチドに隣接するG-カルテット(すなわち、GGZZZGGであって、各ZがU、T、及び5'-修飾ピリミジンから独立して選択される)を含む。よって、或る実施形態では、IL-6はGカルテットモチーフを含む。或る実施形態では、IL-6アプタマーは、

30

IIII.5'-GG-ZZZ-GG-Q_a-GG-Q_b-GG-3'(配列番号702)

IV.5'-GG-Q_a-GG-ZZZ-GG-Q_b-GG-3'(配列番号703)、

及び

V.5'-GG-Q_a-GG-Q_b-GG-ZZZ-GG-3'(配列番号704)

(式中、各ZはU、T、及び修飾ピリミジン(5'-修飾ピリミジン等)から独立して選択され、各Qはリンカー、修飾ヌクレオチド、及び非修飾ヌクレオチドから独立して選択され、 a は1～50であり、 b は1～50である)から選択されるGカルテットモチーフを含む。或る実施形態では、 a は2～50、1～40、2～40、1～30、2～30、1～20、2～20、1～15、2～15、1～10、2～10、1～5、または2～5である。或る実施形態では、 b は2～50、1～40、2～40、1～30、2～30、1～20、2～20、1～15、2～15、1～10、2～10、1～5、または2～5である。或る実施形態では、各Qは置換または非置換の $C_2 \sim C_{20}$ のリンカー、アルキレングリコール、及びポリアルキレングリコールから独立して選択される。或る実施形態では、各Qは置換または非置換の $C_2 \sim C_{20}$ のリンカー、1,3-プロパンジオール、2～100の1,3-プロパンジオール単位を有するポリ(1,3-プロパンジオール)、エチレングリコール、及び2～100のエチレングリコール単位を有するポリエチレン

40

50

グリコールから独立して選択される。或る実施形態では、少なくとも1つまたは少なくとも2つのZヌクレオチドは修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、少なくとも1つまたは少なくとも2つのZヌクレオチドは図20の修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、少なくとも1つまたは少なくとも2つのZヌクレオチドは図24の修飾ピリミジンから独立して選択される。

【0093】

Nap SELEXプールの454のシーケンシングは、2つの保存されたモチーフを共有する独特の配列群を同定した。図25を参照されたい。当該モチーフは、いずれかの順序であることがわかった(例えば、2574-49(配列番号8)を2574-104(配列番号621)と比較)。或る実施形態では、IL-6アプタマーは

VI.5'-YXAXGYARQ_aMGYAAGSCGRY-3'(配列番号705)、または

VII.5'-MGYAAGSCGRYQ_bYXAXGYAR-3'(配列番号706)(式中、各Yは修飾ピリミジン(5'-修飾ピリミジン等)から独立して選択され、各Xは修飾ピリミジン(5'-修飾ピリミジン等)から独立して選択され、MはC及びAから選択され、SはC及びGから選択され、各RはG及びAから独立して選択され、各Qはリンカー、修飾ヌクレオチド、及び非修飾ヌクレオチドから独立して選択され、aは1~30であり、及びbは1~30である)から選択される配列を含む。或る実施形態では、aは1~20、1~10、4~10、または6~7である。或る実施形態では、bは1~20、または1~17である。或る実施形態では、各Qは、置換または非置換のC₂~C₂

のリンカー、アルキレングリコール、及びポリアルキレングリコールから独立して選択される。或る実施形態では、各Qは、置換または非置換のC₂~C₂のリンカー、1,3-プロパンジオール、2~100の1,3-プロパンジオール単位を有するポリ(1,3-プロパンジオール)、エチレングリコール、及び2~100のエチレングリコール単位を有するポリエチレングリコールから独立して選択される。或る実施形態では、各Yは図20に示される修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各Yは図24に示される修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各Xは図20に示される芳香族修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各Xは図24に示される芳香族修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、各Xは図24のNap、2Nap、NE、BF及びBTから独立して選択される。或る実施

形態では、各XはNapである。或る実施形態では、各NはA、C及びGから独立して選択される。或る実施形態では、各LはC₃リンカーであり、bは2である。或る実施形態では、IL-6アプタマーの1または複数のヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾を含む。或る実施形態では、IL-6アプタマー中の1または複数のヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合である。

【0094】

或る実施形態ではX、Y、及び/またはZは各々、修飾ウリジンである。或る実施形態では、X、Y、及び/またはZは各々、本明細書で定義されるC-5修飾ピリミジンから独立して選択される。或る実施形態では、X、Y、及び/またはZは各々、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-フェネチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(PedU)、5-(N-チオフェニルメチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(ThdU)、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(iBudU)、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-トリプタミノカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(TrpdU)、5-(N-トリプタミノカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-トリプタミノカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-[1-(3-トリメチルアモニウム)プロピル]カルボキシアミド)-2'-デオキシウリジンクロリド、5-

10

20

30

40

50

(N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N a p d U)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、及び 5 - (N - [1 - (2, 3 - ジヒドロキシプロピル)]カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン) から独立して選択される。或る実施形態では、各 Z は 5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B n d U) である。

【0095】

或る特定の実施形態では、IL - 6 アプタマー (Y) の部分は、結合を維持するために必ずしも必要ではなく、隣接する IL - 6 アプタマーの特定の部位は、限定されないが、スペーサーまたはリンカー部分による置換を含む修飾が行われてもよい。これらの実施形態では、例えば Y は、Y' - Q - Y'' - Q' - Y''' として表されてもよく、式中、Y'、Y'' 及び Y''' は、IL - 6 アプタマーの一部、または異なる IL - 6 アプタマーのセグメントであり、Q 及び / または Q' は本来の IL - 6 アプタマーの特定の核酸の特徴を修飾するスペーサーまたはリンカーである。Q 及び Q' が存在しない場合、Y'、Y'' 及び Y''' は、1 つの隣接する IL - 6 アプタマー (Y) を表す。

10

【0096】

本明細書で使用される「リンカー」は、2 以上の分子実体を共有結合または非共有的な相互作用により接続する分子実体であり、その 1 または複数の分子実体の官能特性を保存する様式で分子実体の空間的な分離を可能とし得る。また、リンカーは、スペーサーとしても知られている。適切なリンカー配列は、本開示に基づいて当業者により容易に確認される。

20

【0097】

本明細書で使用されるリンカーは、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド核酸、ロックド核酸、オリゴ糖、多糖、抗体、アフィボディ、抗体模倣物、脂肪族、芳香族、または複素芳香族の炭素分子、アルキレングリコール (例えば、エチレングリコール、1, 3 - プロパンジオール)、ポリアルキレングリコール (例えば、ポリエチレングリコール (PEG))、細胞受容体、リガンド、脂質、任意のフラグメントまたはこれらの構造の誘導体、上述の任意の組合せ、または任意の他の化学構造若しくは成分から選択される 1 または複数の分子またはサブコンポーネントを含むことができる。

30

【0098】

より具体的には、本明細書で使用されるリンカーまたはスペーサーは、2 ~ 20 炭素原子 (C₂ - C₂₀) (飽和、非飽和、直鎖、分岐鎖または環状) の鎖、0 ~ 10 アリール基、0 ~ 10 ヘテロアリール基、及び 0 ~ 10 複素環基を含む骨格であってもよく、任意に、エーテル (- O -) 結合 (例えば、1 または複数のアルキレングリコール単位、1 または複数のエチレングリコール単位 - O - (CH₂CH₂O) - ; 1 または複数の 1, 3 - プロパンジオール単位 - O - (CH₂CH₂CH₂O) - 等; 或る実施形態ではリンカーは 1 ~ 100 単位、1 ~ 50 単位、1 ~ 40 単位、1 ~ 30 単位、1 ~ 20 単位、1 ~ 12 単位、または 1 ~ 10 単位)、アミン (- NH -) 結合、アミド (- NC(O) -) 結合及び、チオエーテル (- S -) 結合等を含む骨格であってもよく、ここで、各骨格炭素原子は、独立して置換されてもよく (すなわち、- H 置換を含む)、または C₁ ~ C₃ アルキル、- OH、- NH₂、- SH、- O - (C₁ ~ C₆ アルキル)、- S - (C₁ ~ C₆ アルキル)、ハロゲン、- OC(O) (C₁ ~ C₆ アルキル)、- NH - (C₁ ~ C₆ アルキル) 等から選択される 1 または複数の基で置換されてもよいがこれらに限定されない。或る実施形態では、C₂ ~ C₂₀ リンカーは C₂ ~ C₈ リンカー、C₂ ~ C₆ リンカー、C₂ ~ C₅ リンカー、C₂ ~ C₄ リンカーまたは C₃ リンカーであり、各炭素は上述の通り独立して置換されてもよい。

40

【0099】

或る実施形態では、IL - 6 アプタマーの 1 または複数のヌクレオシドは、2' - 位糖修飾 (2' - アミノ (2' - NH₂)、2' - フルオロ (2' - F)、または 2' - O - メチル (2' - OMe) 等)、シトシン環外アミンにおける修飾、ヌクレオシド間結合

50

修飾、及び5 - メチル - シトシンから選択される修飾を含む。或る実施形態では、IL - 6 アプタマーは3' キャップ、5' キャップ、及び/または3' 末端における転化デオキシチミジンを含む。

【0100】

或る実施形態では、Lは18原子のヘキサエチレングリコールリンカー等のリンカーであってもよい。或る実施形態では、Lはヌクレオチドとリンカーの組合せであってもよい。或る実施形態では、IL - 6 アプタマーは、配列番号7、8、11、19 ~ 22、26 ~ 39、100 ~ 239、300 ~ 356、400 ~ 446、500 ~ 573、及び599 ~ 625の配列から選択される配列を有する。或る実施形態では、IL - 6 アプタマーは、配列番号7、8、11、19 ~ 22、26 ~ 39、100 ~ 239、400 ~ 446、573、及び599 ~ 625の配列から選択される配列を有する。或る実施形態では、IL - 6 アプタマーは、配列番号7、8、11、19 ~ 22、26 ~ 39、100 ~ 239、300 ~ 356、400 ~ 446、500 ~ 573、及び599 ~ 625から選択される配列に少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である配列を有する。或る実施形態では、IL - 6 アプタマーは、配列番号7、8、11、19 ~ 22、26 ~ 39、100 ~ 239、400 ~ 446、573、及び599 ~ 625から選択される配列に少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である配列を有する。配列番号7、8、11、19 ~ 22、26 ~ 39、100 ~ 239、300 ~ 356、400 ~ 446、500 ~ 573、及び599 ~ 625に示される少なくとも1つのヌクレオチド配列に対する配列同一性は、上記アプタマーが10 nM未満の親和性(K_d)でIL - 6に特的に結合する限り及び/または10 nM未満のIL - 6アンタゴニスト活性(IC_{50})を有する限り特に限定されない。

【0101】

「配列同一性」、「パーセント配列同一性」、「パーセント同一性」、「%同一」、「%同一性」及びそれらの変化形は、2つの核酸配列に関して使用される場合、照会核酸または照会核酸の部分において同じヌクレオチド塩基の数を指すため同じ意味で使用され、参照核酸に対する最大的一致について比較及び整列した場合、(1)ほとんどの5'の対応する(すなわち、整列された)ヌクレオチド塩基とほとんどの3'の対応する(すなわち、整列された)ヌクレオチド塩基間、及びそれらを含む照会配列におけるヌクレオチド塩基の数、または(2)参照配列の全長のいずれか大きい方によって除される。比較用配列の例示的な整列は、例えば、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., 2: 482, 1981による局所相同性アルゴリズムにより、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48: 443, 1970の相同性アラインメントアルゴリズムにより、Pearson and Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988の類似検索法により、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実施により(ウイスコンシン州マディソン、サイエンスドライブ575、Genetics Computer GroupのWisconsin Genetics Software PackageにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA)、または目視検査により(一般的には、Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, pub. by Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987)を参照されたい)行われ得る。

【0102】

パーセント配列同一性を決定するのに適したアルゴリズムの一例は、basic lo

cal alignment search tool (以下「BLAST」)において使用されるアルゴリズムであり、例えば、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990 及び Altschul et al., Nucleic Acids Res., 15: 3389-3402, 1997を参照されたい。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、国立生物工学情報センター(以下「NCBI」)を通じて公的に利用可能である。NCBIより利用可能なソフトウェア例えば、BLASTN(ヌクレオチド配列用)を使用する配列同一性の決定において使用されるデフォルトパラメーターは、McGinnis et al., Nucleic Acids Res., 32: W20-W25, 2004に記載される。

【0103】

本明細書で使用されるように、その配列が参照ヌクレオチド配列に少なくとも、例えば、約95%同一であるIL-6アプタマー等の核酸のパーセント同一性を記載する場合、核酸配列が参照核酸配列100ヌクレオチド毎に5つ以下の点突然変異を含み得る以外に、核酸配列が参照配列に対して同一であることが意図される。言い換えれば、その配列が参照核酸配列に少なくとも約95%同一である所望の核酸配列を得るため、参照配列中の5%以下のヌクレオチドが欠失され得るか、若しくは別のヌクレオチドで置換され得る、または参照配列中のヌクレオチド総数の5%以下の或る数のヌクレオチドが参照配列中に挿入され得る(本明細書で挿入と呼ぶ)。所望の配列を作製するための参照配列のこれらの突然変異は、参照ヌクレオチド配列の5'末端または3'末端の位置において生じてもよく、またはこれらの末端位置の間でどこで生じてもよく、参照配列中のヌクレオチド間で個別に散在するか、または参照配列内で1若しくは複数の連続する群で散在するかのいずれかであってもよい。更に、ヌクレオチド塩基は、(1)ヌクレオチド塩基が参照配列中のヌクレオチド塩基と同一である場合、または(2)ヌクレオチド塩基が参照配列中のヌクレオチド塩基に由来する場合、または(3)ヌクレオチド塩基が参照配列中のヌクレオチド塩基が由来するものと同じヌクレオチド塩基に由来する場合には、パーセント同一性を決定する目的で「同一」とされる。例えば、5-メチルシトシンは、パーセント同一性を計算する目的でシトシンと「同一」とであるとされる。同様に、図20及び図24に示される修飾ウリジンは、パーセント同一性を決定する目的で互いに同一であるとされる。或る実施形態では、参照配列は、配列番号7、8、11、19~22、26~39、100~239、400~446、573、及び599~625に示されるヌクレオチド配列のいずれか1つであってもよい。或る実施形態では、参照配列は、配列番号7、8、11、19~22、26~39、100~239、300~356、400~446、500~573、及び599~625に示されるヌクレオチド配列のいずれか1つであってもよい。

【0104】

或る実施形態では、IL-6アプタマーは、1~20、1~15、1~12、1~8、1~5、または1~3のヌクレオチドが置換、欠失、または挿入されている、配列番号7、8、11、19~22、26~39、100~239、300~356、400~446、500~573、及び599~625のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。置換、欠失、または挿入されるヌクレオチドの数は、当該アプタマーが20nM未満の親和性(K_d)でIL-6に特異的に結合し、及び/または10nM(10^{-8} M)未満のIL-6アンタゴニスト活性(IC_{50})を有する限り特に限定されない。或る実施形態では、IL-6アプタマーは、配列番号7、8、11、19~22、26~39、100~239、300~356、400~446、500~573、及び599~625のいずれか一つの配列に対して10以下、或る実施形態では4、3、2、または1のヌクレオチドの置換、欠失、及び/または挿入を含む。

【0105】

或る実施形態では、本開示は、IL-6結合時にIL-6機能を調節するIL-6アプタマーを提供する。或る実施形態では、本明細書に記載されるIL-6アプタマーはSTAT3のIL-6媒介リン酸化を阻害する。様々な実施形態において、上記アプタマーは

10

20

30

40

50

、 *in vivo* における IL-6 媒介 STAT3 リン酸化の阻害等の *in vivo* における IL-6 機能を調節する。様々な実施形態において、IL-6 アプタマーは配列番号 7、8、11、19~22、26~39、100~239、300~356、400~446、500~573、及び 599~625 から選択される配列を有する。様々な実施形態において、IL-6 アプタマーは、表 2~表 4、表 10~表 13、並びに図 23 及び図 25 (例えば、配列番号 7、8、11、19~22、26~39、100~239、300~356、400~446、500~573、及び 599~625) に示されるアプタマーから選択される。様々な実施形態において、IL-6 アプタマーは、表 2、表 10 又若しくは表 12、または図 23 若しくは図 25 に示されるアプタマー、または 20 nM 未満の親和性 (K_d) で IL-6 に特異的に結合する表 3 及び表 4 のアプタマーから選択される。様々な実施形態において、IL-6 アプタマーは、7、8、11、19~22、26~39、100~239、400~446、573、及び 599~625 から選択される配列を有する。或る実施形態では、IL-6 アプタマーは、表 2~表 4、表 10~表 13、並びに図 23 及び図 25 に示される特定の アプタマー (例えば、配列番号 7、8、11、19~22、26~39、100~239、300~356、400~446、500~573、及び 599~625) から選択されるアプタマーの 12~80、または 20~80、または 25~80、または 30~80 の連続するヌクレオチドを含み、当該アプタマーは 20 nM 未満の親和性 (K_d) で IL-6 に特異的に結合し、及び/または 10 nM (10^{-8} M) の IL-6 アンタゴニスト活性 (IC50) を有する。或る実施形態では、IL-6 アプタマーは、表 2~表 4、表 10~表 13、並びに図 23 及び図 25 に示される特定の アプタマー (例えば、配列番号 7、8、11、19~22、26~39、100~239、300~356、400~446、500~573、及び 599~625) から選択されるアプタマーの少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、少なくとも 22、少なくとも 23、少なくとも 24、少なくとも 25、少なくとも 26、少なくとも 27、少なくとも 28、少なくとも 29、少なくとも 30 の連続するヌクレオチドを含み、当該アプタマーは 20 nM 未満の親和性 (K_d) で IL-6 に特異的に結合し、及び/または 10 nM (10^{-8} M) の IL-6 アンタゴニスト活性 (IC50) を有する。或る実施形態では、IL-6 アプタマーは、配列番号 7、8、11、19~22、26~39、100~239、300~356、400~446、500~573、及び 599~625 から選択される配列に対してヌクレオ塩基配列で同一である少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、少なくとも 22、少なくとも 23、少なくとも 24、少なくとも 25、少なくとも 26、少なくとも 27、少なくとも 28、少なくとも 29、少なくとも 30 の連続するヌクレオチドからなり、当該アプタマーは 20 nM 未満の親和性 (K_d) で IL-6 に特異的に結合し、及び/または 10 nM (10^{-8} M) の IL-6 アンタゴニスト活性 (IC50) を有する。

【0106】

或る実施形態では、IL-6 アプタマーは、表 2~表 4、表 10、表 12、並びに図 23 及び図 25 に示されるアプタマー (例えば、配列番号 7、8、11、19~22、26~39、100~239、400~446、573、及び 599~625) から選択される特定の アプタマーの 12~80、または 20~80、または 25~80、または 30~80 の連続するヌクレオチドを含み、当該アプタマーは 20 nM 未満の親和性 (K_d) で IL-6 に特異的に結合し、及び/または 10 nM (10^{-8} M) の IL-6 アンタゴニスト活性 (IC50) を有する。或る実施形態では、IL-6 アプタマーは、表 2~表 4、表 10、表 12、並びに図 23 及び図 25 に示される特定の アプタマーから選択されるアプタマー (例えば、配列番号 7、8、11、19~22、26~39、100~239、400~446、573、及び 599~625) の少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、

10

20

30

40

50

少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30の連続するヌクレオチドを含み、当該アプタマーは20 nM未満の親和性(Kd)でIL-6に特異的に結合し、及び/または10 nM(10^{-8} M)のIL-6アンタゴニスト活性(IC50)を有する。或る実施形態では、IL-6アプタマーは、配列番号7、8、11、19~22、26~39、100~239、400~446、573、及び599~625から選択される配列に対してヌクレオ塩基配列で同一である少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30の連続するヌクレオチドからなり、当該アプタマーは20 nM未満の親和性(Kd)でIL-6に特異的に結合し、及び/または10 nM(10^{-8} M)のIL-6アンタゴニスト活性(IC50)を有する。

10

【0107】

或る実施形態では、IL-6アプタマーは、表10または表12(配列番号100~239、573、及び400~446)に示されるアプタマーから選択されるアプタマーの12~80、または20~80、または25~80、または30~80の連続するヌクレオチドを含み、当該アプタマーは20 nM未満の親和性(Kd)でIL-6に特異的に結合し、及び/または10 nM(10^{-8} M)のIL-6アンタゴニスト活性(IC50)を有する。或る実施形態では、IL-6アプタマーは、表10または表12に示されるアプタマー(配列番号100~239、573、及び400~446)の少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30の連続するヌクレオチドを含み、当該アプタマーは20 nM未満の親和性(Kd)でIL-6に特異的に結合し、及び/または10 nM(10^{-8} M)のIL-6アンタゴニスト活性(IC50)を有する。或る実施形態では、IL-6アプタマーは、表10及び表12に示されるアプタマー(配列番号100~239、573、及び400~446)の少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30の連続するヌクレオチドからなり、当該アプタマーは20 nM未満の親和性(Kd)でIL-6に特異的に結合し、及び/または10 nM(10^{-8} M)のIL-6アンタゴニスト活性(IC50)を有する。

20

30

【0108】

本明細書の実施形態のいずれかにおいて、IL-6アプタマーは、当該アプタマーの5'末端、3'末端、または5'末端と3'末端の両方に追加のヌクレオチド、又他の化学部分を含んでもよい。

40

【0109】

IL-6アプタマーは、IL-6結合領域に加えて任意の数のヌクレオチドを含んでもよい。様々な実施形態において、IL-6アプタマーは、約100ヌクレオチド以下、約95ヌクレオチド以下、約90ヌクレオチド以下、約85ヌクレオチド以下、約80ヌクレオチド以下、約75ヌクレオチド以下、約70ヌクレオチド以下、約65ヌクレオチド以下、約60ヌクレオチド以下、約55ヌクレオチド以下、約50ヌクレオチド以下、約45ヌクレオチド以下、約40ヌクレオチド以下、約35ヌクレオチド以下、約30ヌクレオチド以下、約25ヌクレオチド以下、及び約20ヌクレオチドを含んでもよい。

【0110】

或る実施形態では、IL-6アプタマーは、類似の結合特性を有し、IL-6が関連す

50

る炎症性疾患、悪性疾患、感染症、自己免疫疾患、及びIL-6が配列番号7、8、11、19~22、26~39、100~239、400~446、573、及び599~625から選択されるアダプターとして関係する他の疾患または状態を治療する能力を有するアダプターから選択される。或る実施形態では、表2、表10、表12、並びに図23及び図25のいずれかに示されるアダプターから選択されるアダプターとしてIL-6の同じ領域に結合するIL-6アダプターが提供される。

【0111】

本発明のIL-6アダプターは、成熟IL-6（配列番号10）（配列番号9のアミノ酸29~212；図21を参照されたい）に特異的に結合する。或る実施形態では、IL-6アダプター2573-20__136（配列番号101）と同じ領域のIL-6に結合するIL-6アダプターが提供される。或る実施形態では、成熟タンパク質（配列番号10）のアミノ酸16~31（前駆体配列（配列番号9）のアミノ酸44~59；図21を参照されたい）を含むIL-6の領域（エピトープ）に結合するIL-6アダプターが提供される。この領域は、IL-6アダプター2573-20__136（配列番号101）の「ドメイン1」によって結合される相互作用面を含む。或る実施形態では、成熟タンパク質（配列番号10）のアミノ酸16~31及び117~125（前駆体配列（配列番号9）のアミノ酸44~59、及び145~153；図21を参照されたい）を含むIL-6エピトープに結合するIL-6アダプターが提供される。このエピトープは、IL-6アダプター2573-20__136（配列番号101）の「ドメイン1」と「ドメイン2」の両方によって結合される相互作用面を含む。有極接点は、水素結合の合計と電荷-電荷相互作用の合計として定義される。或る実施形態では、0.01未満、0.009未満、0.008未満、または約0.007の界面面積に対する有極接点の比でIL-6に結合するIL-6アダプターが提供される。

【0112】

或る実施形態では、IL-6アダプターは、配列番号10（図21を参照されたい）の配列を含むIL-6等の成熟IL-6への結合についてIL-6アダプター2573-20__136（配列番号101）と競合する。或る実施形態では、IL-6アダプター2574-49__260（配列番号400）と同じIL-6の領域に結合するIL-6アダプターが提供される。或る実施形態では、IL-6アダプターは、配列番号10の配列を含むIL-6（図21を参照されたい）等の成熟IL-6への結合についてIL-6アダプター2574-49__260（配列番号400）と競合する。

【0113】

或る実施形態では、以下の特性の任意の組合せを有するIL-6アダプターが提供される。

- (a) 成熟タンパク質のアミノ酸16~31を含む成熟IL-6（配列番号10）の領域に結合する；
- (b) 成熟タンパク質のアミノ酸16~31及びアミノ酸117~125を含む成熟IL-6（配列番号10）のエピトープに結合する；
- (c) IL-6アダプター2573-20__136（配列番号101）と競合して成熟IL-6（配列番号10）に結合する；及び/または
- (d) 0.01未満、0.009未満、0.008未満、または約0.007の界面面積に対する有極接点の比で成熟IL-6に結合する。

【0114】

或る実施形態では、IL-6アダプターは、IL-6受容体へのIL-6の結合を阻害すること、STAT3のリン酸化を阻害すること、STAT3によって制御される転写を阻害すること、及びIL-6誘導性細胞増殖を阻害することから選択される活性を有する。

【0115】

IL-6アダプターを、IL-6に対する任意の好適な解離定数（ K_d ）を有するように選択することができる。或る実施形態では、IL-6アダプターは、30 nM未満、2

10

20

30

40

50

5 nM未満、20 nM未満、15 nM未満、10 nM未満、9 nM未満、8 nM未満、7 nM未満、6 nM未満、5 nM未満、4 nM未満、3 nM未満、2 nM未満、または1 nM未満のIL-6に対する解離定数(K_d)を有する。解離定数を、マルチポイント滴定を使用する結合アッセイ、及び下記実施例1に記載される等式 $y = (\text{最大} - \text{最小}) / (K_d + \text{タンパク質}) + \text{最小}$ のフィッティングにより決定してもよい。或る実施形態では、IL-6アプタマーは、表10及び表12に示されるアプタマー(100~239、573、及び400~446)のアプタマーの K_d 以下の K_d を有するアプタマーである。或る実施形態では、IL-6アプタマーは、IL-6アプタマー2573-20__136(配列番号101)以下の K_d を有するアプタマーである。或る実施形態では、IL-6アプタマーは、IL-6アプタマー2574-49__260(配列番号400)の K_d 以下の K_d を有するアプタマーである。

10

【0116】

或る実施形態では、IL-6アプタマーは、 10^{-8} M未満(10 nM未満)、 10^{-9} M未満、 10^{-10} M未満、または 10^{-11} M未満のIL-6アンタゴニスト活性(IC50)を有する。様々な実施形態において、IL-6アンタゴニスト活性を、例えば、細胞増殖アッセイ及び/または遺伝子レポーターアッセイ(例えば、実施例2及び実施例11を参照されたい)を使用して測定してもよい。細胞増殖アッセイの例では、IL-6アプタマーによるIL-6応答性の細胞の細胞成長の阻害を測定する。遺伝子レポーターアッセイの例では、IL-6アプタマーをSTAT遺伝子で形質移入した細胞においてSTATリン酸化の阻害についてアッセイする。

20

アプタマーを含む医薬組成物

【0117】

或る実施形態では、本発明に記載される少なくとも1つのアプタマーと少なくとも1つの薬理的に許容可能な担体とを含む医薬組成物が提供される。好適な担体は、参照により本明細書に援用されるLippincott Williams & Wilkinsによって出版された「Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Twenty-first Edition」に記載される。また、本明細書に記載される少なくとも1つのアプタマーと少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物は、1または複数の他の有効成分を含んでもよい。

30

【0118】

本明細書に記載されるアプタマーは、注射用投薬形態、液体分散剤、ゲル、エアロゾル、軟膏、クリーム、凍結乾燥製剤、乾燥粉末、錠剤、カプセル剤、放出制御製剤、急速溶解製剤、遅延放出製剤、徐放性製剤、パルス放出製剤、即時放出及び制御放出の混合製剤等を含むがこれらに限定されない任意の薬学的に許容可能な投薬形態で利用され得る。具体的には、本明細書に記載されるアプタマーを、(a)経口、肺、静脈内、動脈内、髄腔内、関節内、直腸、眼、結腸、非経口、嚢内、腔内、腹腔内、局所(local)、舌下、鼻腔、及び局所(topical)の投与のいずれかから選択される投与用に、(b)液体分散剤、ゲル、エアロゾル、軟膏、クリーム、錠剤、サシェ及びカプセル剤のいずれかから選択される投薬形態に、(c)凍結乾燥製剤、乾燥粉末、急速溶解製剤、制御放出製剤、遅延放出製剤、徐放性製剤、パルス放出製剤、並びに即時放出及び制御放出の混合製剤のいずれかから選択される投薬形態に、または(d)それらの任意の組合せに製剤化することができる。

40

【0119】

非経口、皮内、または皮下の適用に使用される溶液または懸濁液は、1または複数の以下の成分、(1)注射用水、生理食塩溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒等の無菌希釈剤；(2)ベンジルアルコールまたはメチルパラベン等の抗菌剤；(3)アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤；(4)エチレンジアミン四酢酸等のキレート剤；(5)酢酸、クエン酸またはリン酸等の緩衝剤；及び(5)塩化ナトリウムまたはデキストロース等の浸透圧

50

の調整用薬剤を含んでもよい。pHを、塩酸または水酸化ナトリウム等の酸または塩基で調整することができる。非経口調製剤は、アンプル、使い捨てシリンジまたはガラス若しくはプラスチック製の頻回投与容器に封入され得る。

【0120】

注射用に適した医薬組成物として、無菌水溶液（水溶性の場合）、または無菌注射液または分散剤の即時調製用の分散剤及び無菌粉末が挙げられてもよい。静脈内投与について、好適な担体として、生理学的食塩水、静菌水、Cremophor EL（ニュージャージー州パーシッパニーのBASF）、またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合において、上記組成物は無菌であり、容易な注入可能性（syringability）が存在する程度に流動性でなくてはならない。医薬組成物は、製造及び保管の条件下で安定でなくてはならず、細菌及び菌類等の微生物の汚染作用から保護されなくてはならない。本明細書で使用される「安定な」の用語は、被験体への投与に適した状態または条件を保持することを意味する。

10

【0121】

上記担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）、及びそれらの好適な混合物を含む溶媒または分散媒であってもよい。適切な流動性は、例えば、レシチン等のコーティングの使用により、分散剤の場合に必要な粒子サイズの維持により、及び界面活性剤の使用により維持され得る。微生物の作用の阻止は、様々な抗生物質及び抗菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等によって達成され得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖、マンニトールまたはソルビトール等のポリアルコール、及び塩化ナトリウム等の無機塩を当該組成物中に含むことが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延する物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを当該組成物中に含むことによって行われ得る。

20

【0122】

無菌注射液を、上記列挙される原料の1つまたはそれらの組合せと共に、適切な溶媒中、適切な量で活性試薬（例えば、IL-6アプタマー）を組み込み、所望の場合、その後濾過滅菌することにより調製することができる。一般的に、分散剤は、少なくとも1つのIL-6アプタマーを、基本的な分散媒及び任意の他の所望の原料を含有する無菌ビヒクル中に組み込むことによって調製される。無菌注射液の調製用の無菌粉末の場合、調製方法の例として、真空乾燥及び凍結乾燥が挙げられ、これらはいずれもIL-6の粉末と、予め無菌濾過されたその溶液に由来する任意の追加の所望の構成要素を生じる。

30

【0123】

経口組成物は、一般的に不活性な希釈剤または可食性の担体を含む。それらを、例えば、ゼラチンカプセル中に封入するか、または錠剤へと圧縮することができる。経口治療薬の投与の目的で、IL-6アプタマーを賦形剤と共に組み込んで、錠剤、トローチ、またはカプセル剤の形態で使用することができる。また、経口組成物を、洗口剤として使用するための液体担体を使用して調製することができ、液体担体中の成分を経口適用して、口内ですすぐように回して、吐き出すか、飲み込む。薬学的に混合可能な結合剤、及び/またはアジュバント材料を上記組成物の一部として含むことができる。

40

【0124】

吸入による投与のため、好適な高圧ガス、例えば、二酸化炭素等の気体を含む圧縮容器またはディスペンサーからのエアロゾルスプレー、噴霧液、または好適なデバイスからの乾燥粉末の形態で輸送される。経粘膜または経皮投与のため、浸透されるバリアに適した透過剤を製剤中に使用する。かかる浸透剤は、一般的に当該技術分野で知られており、例えば、経粘膜投与用に洗浄剤、胆汁酸塩、及びフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、点鼻薬または坐剤の使用によりなされ得る。経皮投与のため、上記有効成分を当該技術分野で一般的に知られている軟膏、膏薬、ゲル、またはクリームに製剤化する。また、坐剤（例えば、カカオバター及び他のグリセリド等の従来の坐剤の基剤と共に）または直腸輸送のため停留浣腸剤の形態で上記試薬を調製することもできる。

50

【 0 1 2 5 】

或る実施形態では、IL-6 アプタマーは、身体からの急速な排除から保護する担体と共に調製される。例えば、インプラント、及びマイクロカプセル化輸送システムを含む制御放出製剤を使用することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸等の生分解性、生体適合性の高分子を使用することができる。かかる製剤の調製方法は、当業者に明らかである。また、上記材料を Alza Corporation 及び Nova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手することもできる。

【 0 1 2 6 】

また、リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体により感染した細胞を標的とするリポソームを含む）を薬学的に許容可能な担体として使用することができる。これらは、例えば、U.S. Pat. No. 4, 522, 811 に記載されるような当業者に既知の方法に従って調製され得る。

【 0 1 2 7 】

更に、IL-6 アプタマーの懸濁液を適切な油性注射用懸濁液として調製してもよい。好適な親油性溶媒またはビヒクルとして、ごま油などの脂肪油、またはオレイン酸エチル、トリグリセリド若しくはリポソーム等の合成脂肪酸エステルが挙げられる。また、非脂質ポリカチオン性アミノ高分子を輸送に使用してもよい。また、任意に、上記懸濁液は、上記化合物の溶解性を増加し、高濃縮溶液の調製を可能とするため好適な安定化剤または薬剤を含んでもよい。

【 0 1 2 8 】

或る場合では、投与及び均一な用量を容易にするため投薬単位形態で経口または非経口の組成物を製剤化することが特に有利な場合がある。本明細書で使用される投薬単位形態は、治療される被験体に対するための一体型剤形として適した物理的に別々の単位、すなわち、必要とされる薬学的担体と関連する所望の治療効果を生じるように計算された所定の量の IL-6 アプタマーを含有する各単位を指す。本明細書に記載される IL-6 アプタマーの投薬単位形態に関する仕様は、特定の IL-6 アプタマーの特性及び達成される特定の治療効果、並びに個体の治療のためのかかる活性剤を合成する分野に固有の制限により規定され、直接的にそれに依存する。

【 0 1 2 9 】

少なくとも1つの IL-6 アプタマーを含む医薬組成物は、1または複数の薬学的賦形剤を含むことができる。かかる賦形剤の例として、限定されないが、結合剤、充填剤、滑沢剤、懸濁剤、甘味料、風味剤、保存剤、緩衝剤、湿潤剤、崩壊剤、発泡剤、及び他の賦形剤が挙げられる。かかる賦形剤は当該技術分野で既知である。例示的な賦形剤として、(1) 様々なセルロース、並びに Avicel (登録商標) PH101 及び Avicel (登録商標) PH102 等の架橋ポリビニルピロリドン微結晶セルロース、シリサイド化微結晶セルロース (ProSolv SMCC (商標))、トラガカントガム、及びゼラチンを含む結合剤；(2) 様々なデンプン、ラクトース、ラクトースー水和物、及び無水ラクトース等の充填剤；(3) アルギン酸、プリモゲル、コーンスターチ、軽度架橋ポリビニルピロリドン、ジャガイモデンプン、トウモロコシデンプン、及び加工デンプン、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、デンプングリコール酸ナトリウム、及びそれらの混合物等の崩壊剤；(4) ステアリン酸マグネシウム、Aerosil (登録商標) 200 等のコロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、及びシリカゲルを含む圧縮される粉末の流動性に作用する薬剤を含む、滑沢剤；(5) コロイド状二酸化ケイ素等の流動促進剤；(6) ソルビン酸カリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸及びその塩、ブチルパラベン等のパラヒドロキシ安息香酸の他のエステル、エチルアルコール若しくはベンジルアルコール等のアルコール、フェノール等のフェノール化合物、または塩化ベンザルコニウム等の第四級化合物等の保存剤；(7) 微結晶性セルロース、ラクトース、二塩基性リン酸カルシウム、糖、及び/またはは上述のいずれかの混合物等の薬学的に許容可能な不活性な充填剤等の希釈剤；希釈剤の例

10

20

30

40

50

として、Avicel（登録商標）PH101及びAvicel（登録商標）PH102等の微結晶セルロース；ラクトース水和物、ラクトース無水物、及びPharmatose（登録商標）DCL21等のラクトース；Emcompress（登録商標）等の二塩基性リン酸カルシウム；マンニトール；デンプン；ソルビトール；ショ糖；及びブドウ糖が挙げられる；（8）ショ糖、サッカリン、スクロース、キシリトール、サッカリンナトリウム、シクラメート、アスパルテーム、及びアセスルファム等の任意の天然または人工の甘味料を含む、甘味剤；（9）ペパーミント、サリチル酸メチル、オレンジ香料、Magnasweet（登録商標）（MAFCOの商標）、バブルガムフレーバー、フルーツフレーバー等の風味剤；並びに（10）有機酸と炭酸塩または重炭酸塩等の一組の発泡剤を含む、発泡剤、が挙げられる。好適な有機酸として、例えば、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、フマル酸、アジピン酸、コハク酸、及びアルギン酸、並びに無水物及び酸塩が挙げられる。好適な炭酸塩及び重炭酸塩として、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、炭酸マグネシウム、グリシン炭酸ナトリウム、炭酸L-リジン及び炭酸アルギニンが挙げられる。代替的には、炭酸水素ナトリウム成分の一組の発泡剤のみが存在してもよい。

10

【0130】

様々な実施形態において、本明細書に記載される製剤は、実質的に純粋である。本明細書で使用される「実質的に純粋」は、有効成分（例えば、IL-6アプタマー）が存在する主な種（すなわち、モルベースでその組成物中のどの他の個別の種よりも豊富である）であることを意味する。或る実施形態では、実質的に精製された画分は、有効成分が存在する全ての高分子種の少なくとも約50パーセント（モルベースで）を含む組成物である。一般的に、実質的に純粋な組成物は、その組成物中に存在する全ての高分子種の約80%より多くを含む。様々な実施形態では、実質的に純粋な組成物は、その組成物中に存在する全ての高分子種の少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%を含む。様々な実施形態では、上記有効成分は、上記組成物が本質的に単一の高分子種からなる均一性（従来の検出方法によって上記組成物中に汚染種が検出され得ない）まで精製される。

20

アプタマーを含むキット

【0131】

本開示は、本明細書に記載されるIL-6アプタマーのいずれかを含むキットを提供する。かかるキットは、例えば、（1）少なくとも1つのIL-6アプタマー、及び（2）溶媒または溶液等の少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体を備える。追加のキット成分として、任意に、例えば、（1）安定化剤、緩衝剤等の本明細書で特定される薬学的に許容可能な賦形剤のいずれか等、（2）少なくとも1つの容器、バイアル、またはキット成分を保持及び/または混合するための類似の器具、並びに（3）輸送器具が挙げられる。キット成分として、任意に、例えば、（1）蛍光分子、色素等のアプタマーに結合される標的分子を検出するために使用され得る標識剤、（2）マイクロアレイ、ビーズ等の固体支持体、及び（3）インターカレーター性蛍光色素または蛍光DNAプローブ等のポリマーゼ連鎖反応生成物の定量に関する試薬が挙げられる。

30

治療方法

40

【0132】

本開示はIL-6アプタマーの使用による医学的状態の（例えば、その1または複数の症状を改善する）予防方法または治療方法を提供する。上記方法は、治療的有効量のIL-6アプタマーを、それを必要とする被検体に投与することを含む。また、記載されるアプタマーは予防的治療にも使用され得る。或る実施形態では、IL-6アプタマーは腹腔内投与される。或る実施形態では、IL-6アプタマーは経口投与または静脈内投与される。

【0133】

治療方法に使用されるIL-6アプタマーは、（1）本明細書に記載されるIL-6アプタマー、またはその薬学的に許容可能な塩、またはそのプロドラッグであってもよい。

50

【 0 1 3 4 】

個体または被験体は、限定されないが、ネコ、イヌ、ウマ、ブタ、及びウシを含む任意の動物（飼育動物、家畜、または野生動物）であってもよく、好ましくはヒト被験体であってもよい。本明細書で使用される、患者、個体、及び被験体の用語は、同じ意味で使用され得る。

【 0 1 3 5 】

本明細書で使用される「治療すること」は、疾患、状態、または障害の治療目的のための患者の管理及び世話を記載し、疾患、状態若しくは障害の症状若しくは併発の発症を予防するため、疾患、状態若しくは障害の症状若しくは合併を緩和するため、または患者において疾患、状態若しくは障害の存在を排除するための I L - 6 アプタマーの投与を含む。より具体的には、少なくとも 1 つの疾患（障害）状況の有害な症状または影響、疾患の進行、疾患の原因物質、または他の異常な状態を逆転させること、減弱すること、緩和すること、最小化すること、抑制すること、または治癒することを含む。治療は、一般的には、症状及び/または病態が改善されるまで継続される。

【 0 1 3 6 】

様々な実施形態において、開示される組成物及び方法は、炎症性疾患、悪性疾患、感染症、自己免疫疾患、及び/または I L - 6 が関与する他の疾患若しくは状態を予防、治療、及び/または改善のため使用される。本明細書に記載される I L - 6 アプタマーによって治療され得る非限定的な例として、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、全身型若年性特発性関節炎、骨関節炎、敗血症、喘息、間質性肺疾患、炎症性腸疾患、全身性硬化症、眼内炎症、グレーブス病、子宮内膜症、全身性硬化症、成人発症スティル病、アミロイド A アミロイド症、リウマチ性多発筋痛症、寛解傾向があり圧痕を形成する浮腫を伴う血清反応陰性対称性膵膜炎、ベーチェット病、ブドウ膜炎、植片対宿主疾患、及び T N F R 受容体関連周期性症候群が挙げられる。本明細書に記載される I L - 6 アプタマーにより治療され得る悪性疾患として、癌及び癌に関連する状態が挙げられる。癌の非限定的な例として、多発性骨髄腫、白血病、膵臓癌、乳癌、結腸直腸癌、悪液質、黒色腫、子宮頸癌、卵巣癌、リンパ腫、胃腸、肺癌、前立腺癌、腎細胞癌、転移性腎臓癌、固形腫瘍、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫、膀胱癌、口腔癌、骨髄増殖性新生物、B 細胞リンパ増殖性疾患、及び形質細胞性白血病が挙げられる。癌に関連する状態の非限定的な例として、非小細胞肺癌に関連する疲労及び癌に関連する食欲不振が挙げられる。本明細書に記載される I L - 6 アプタマーにより治療され得る感染症の非限定的な例として、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）、ヒト T リンパ球向性ウイルス（H T L V）、脳マラリア、尿路感染症、及び髄膜炎菌感染症が挙げられる。本明細書に記載される I L - 6 アプタマーにより治療され得る自己免疫疾患の非限定的な例として、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、多発性筋炎、巨細胞性動脈炎を含む血管炎症候群、高安動脈炎、クリオグロブリン血症、ミエロペルオキシダーゼ - 抗好中球細胞質抗体関連半月体形成性糸球体腎炎、リウマチ性血管炎、クローン病、再発性多発性軟骨炎、後天性血友病 A、及び自己免疫性溶血性貧血が挙げられる。本明細書に記載される I L - 6 アプタマーにより治療され得る更なる疾患として、限定されないが、キャッスルマン病、強直性脊椎炎、冠状動脈性心疾患、関節リウマチにおける心血管疾患、肺動脈高血圧症、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、アトピー性皮膚炎、乾癬、坐骨神経痛、I I 型糖尿病、肥満、巨細胞性動脈炎、急性移植片対宿主病（G V H D）、非 S T 上昇心筋梗塞、抗好中球細胞質抗体（A N C A）関連血管炎、視神経脊髄炎、慢性糸球体腎炎、及び高安動脈炎が挙げられる。

【 0 1 3 7 】

或る実施形態では、開示される化合物若しくはその薬学的に許容可能な塩、またはプロドラッグを、他の活性剤と組み合わせて投与することができる。開示される I L - 6 アプタマーを含む組成物は、例えば、1 より多いアプタマーを含有してもよい。或る実施形態では、炎症性疾患、悪性疾患、感染症、自己免疫疾患、及び/または I L - 6 が関与する他の疾患若しくは状態の予防、治療、及び/または改善のため、1 または複数の I L - 6 アプタマーを含有する組成物を 1 または複数の追加の薬剤と組み合わせて投与する。追加の

10

20

30

40

50

活性剤の非限定的な例として、TNF - 阻害剤、IL - 1 阻害剤、IL - 2 3 阻害剤、IFN - 阻害剤、IL - 1 7 阻害剤、IL - 2 2 阻害剤、IL - 4 / IL - 1 3 阻害剤、IL - 1 3 阻害剤、IL - 5 阻害剤、及びJAK阻害剤が挙げられる。TNF - 阻害剤の非限定的な例として、インフリキシマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ、エタネルセプト、セルトリズマブ、ANO128 (Anacor)、ART621 (Arena Therapeutics)、及び抗-TNF - ナノボディ(ATN - 103等、Pfizer)が挙げられる。IL - 1 阻害剤の非限定的な例として、アナキンラ、カナキヌマブ、XOMA052 (Xoma)及びリロナセプトが挙げられる。IL - 2 3 阻害剤の非限定的な例として、ウステキヌマブ、プリアキヌマブ、アピリモドが挙げられる。IFN - 阻害剤の非限定的な例は、AMG811 (Amgen)である。IL - 1 7 阻害剤の非限定的な例として、AIN457 (Novartis)、イキセキズマブ、AMG827 (Amgen)、及びRg4934 (Roche)が挙げられる。IL - 2 2 阻害剤の非限定的な例はフェザキヌマブである。IL - 4 / IL - 1 3 阻害剤の非限定的な例として、AMG317 (Amgen)、ピトラキンラ、Nuvance、及びAIR645 (Altair)が挙げられる。IL - 1 3 阻害剤の非限定的な例として、アンルキンズマブ、レプリキズマブ、CAT - 354 (MedImmune)、及びIMA - 026 (Wyeth)が挙げられる。IL - 5 阻害剤の非限定的な例は、メポリズマブである。JAK阻害剤の非限定的な例としてトファシチニブ及びルキシソリチニブが挙げられる。

10

【0138】

一般に、かかる組合せでの使用のための既知の治療剤の現在利用可能な剤形が好適である。

20

【0139】

「併用療法」(または「共同療法」)は、これらの治療薬の生物相互作用に由来する有利な効果を提供することが意図される具体的な治療計画の一部として、IL - 6 アプタマー組成物と少なくとも1つの第2の薬剤との投与を含む。上記組合せの有利な効果として、限定されないが、治療剤の組合せに由来する薬物動態または薬力学的な生物相互作用が挙げられる。これらの治療剤の併用は、典型的には、規定の期間(通常、選択される組合せに応じて、分、時間、日、または週)に亘り行われる。

【0140】

「併用療法」は、一般的には異なるが、偶然及び任意に本開示の組合せを生じる別々の単剤治療計画の一部として2以上のこれらの治療剤の投与を包含することを意図し得る。

30

「併用療法」は、これらの治療剤の順次の投与、すなわち、各治療剤は異なる時間に投与され、また同じく、これらの治療剤の投与、または当該治療剤の少なくとも2つは実質的に同時の投与を包含することが意図される。実質的に同時の投与は、例えば、各治療剤の固定された比率を有する単回投与、または各治療剤の複数回投与、単回投与で被験体に投与することによりなされ得る。

【0141】

IL - 6 アプタマーを利用する投薬計画は、例えば、被験体の種類、種、年齢、体重、性別及び医学的状態を含む様々な要因、治療される状態の重症度、投与経路、被験体の腎機能及び肝機能、並びに採用される特定のアプタマーまたはその塩に従って選択される。通常、知識を有する内科医または獣医は、この状態の進行を予防、阻止、または停止するのに必要な有効量の組成物を容易に決定し、処方することができる。

40

【0142】

一般に、用量、すなわち、治療的有効量は1日当たり、治療される被験体の体重1kg当たり約1ng~約1gの範囲であり、或る実施形態では、体重1kg当たり約1µg~約1gであり、或る実施形態では、体重1kg当たり約1µg~約100mgであり、或る実施形態では、体重1kg当たり約1µg~約10mgである。

診断方法または検出方法

【0143】

本明細書に記載されるIL - 6に結合可能なアプタマーは、*in vitro*または*i*

50

*n vivo*のいずれかにおいて診断試薬として使用され得る。本明細書で同定されるIL-6アプタマーは、限定されないが、任意の診断、検出、画像化、ハイスループットスクリーニング、またはアプタマー、オリゴヌクレオチド、抗体、及びリガンドに関する標的評価技術若しくは手順若しくはアッセイに使用することができる。例えば、本明細書で同定されるIL-6アプタマーは、その全体において本明細書に参照により援用される、「試験試料の多重化分析」と題されるU.S. Patent 7,855,054に詳述される方法に従って使用され得る。

【0144】

本明細書に記載されるIL-6に結合可能なアプタマーを、平面アレイ、ビーズ、及び他のタイプの固形支持体を使用するアッセイを含む、様々なアッセイに使用することができる。上記アッセイを、ライフサイエンス研究用途、臨床診断用途（例えば、疾患に関する診断検査、または予防医療のための「健康」検査）；ALONAアッセイ及びUPSアッセイ、*in vivo*画像化用途を含む様々な環境において使用してもよい。一部の用途について、記載されるIL-6アプタマーを利用する多重化アッセイを使用してもよい。

10

【0145】

或る実施形態では、IL-6アプタマーを、様々な*in vitro*診断方法またはキットに組み込むため非常に感受性の特異的な試薬として使用してもよい。或る実施形態では、IL-6アプタマーを、IL-6に対するアプタマーが検出可能な材料及び固定化または捕捉の成分のいずれかまたは両方を含む、多数の感染性の、または他のタイプの疾患の検出方法における抗体の代替として使用する。これらの実施形態では、キットに由来するアプタマーを臨床検体と混合した後、様々なアッセイフォーマットを利用してよい。或る一つの実施形態では、アプタマーは、蛍光色素分子などの検出可能標識も挙げられる。或る一つの実施形態では、アッセイフォーマットは、蛍光消光、ハイブリダイゼーション法、フローサイトメトリー、質量分析、阻害または競合法、酵素結合オリゴヌクレオチドアッセイ、SPR、エパネッセント波法等が挙げられる。或る実施形態では、アプタマーはキットにおいて溶液中に提供される。他の実施形態では、キットのアプタマーは、検体を検査するためのアッセイと併せて使用される固体支持体上に固定化される。様々な実施形態において、固体支持体は1または複数の目的の標的を検出するため設計される。他の実施形態では、キットは、目的の標的を抽出するための試薬、アプタマーを増幅するための試薬、洗浄を実施するための試薬、検出試薬等を更に含んでもよい。

20

30

【0146】

デバイスの固体表面に付着した1または複数のIL-6アプタマーを有する診断またはアッセイのデバイス、例えば、カラム、試験片またはバイオチップも提供される。アプタマー（複数の場合がある）を、デバイスの表面に付着したままのアプタマー-標的複合体を形成するため、固体表面と接触されるIL-6分子に結合可能とし、それにより標的を捕捉して検出及び任意に標的の定量を可能とするように配置してもよい。アプタマーのアレイ（同一でもよく異なってもよい）をかかるとデバイス上に提供してもよい。

【0147】

IL-6を検出するための或る一つの実施形態では、アプタマー親和性複合体またはアプタマー共有結合複合体を、IL-6に特異的な結合パートナーを含む標識剤と接触させる。特異的な結合パートナーは、抗体、抗体フラグメント、合成抗体模倣物、バイオミメティクス、アプタマー、分子インプリントリガンド等を含む任意の好適な部分であってもよい。特異的な結合パートナーは、別の標識剤成分、通常検出可能な部分または標識に結合されるか、または連結される。IL-6を検出するための或る一つの実施形態では、アプタマー親和性複合体またはアプタマー共有結合複合体を、結合パートナーを伴わずにIL-6を標識でき、検出可能な部分または標識を含む標識剤に接触させる

40

【0148】

検出可能な部分または標識は、直接的または間接的に検出され得る。一般に、検出可能な任意のレポーター分子は標識となり得る。標識として、例えば、(i)シグナルを発生

50

することによって直接検出され得るレポーター分子、(i i) レポーター分子を含有する同族のものへの後の結合により間接的に検出され得る特異的結合ペアメンバー、(i i i) 質量分析により検出可能な質量タグ、(i v) 増幅またはライゲーションのためのテンプレートを提供することが可能なオリゴヌクレオチドプライマー、並びに(v) リガンドとして作用し得る特異的なポリヌクレオチド配列または認識配列、例えば、リプレッサータンパク質等であって、後の2つの例において、オリゴヌクレオチドプライマーまたはリプレッサータンパク質は、レポーター分子を有するか、またはそれを有することができるようになる、前記特異的なポリヌクレオチド配列または認識配列等が挙げられる。レポーター分子は、酵素等の触媒、酵素をコードするポリヌクレオチド、プロモーター、色素、蛍光分子、量子ドット、化学発光分子、コエンザイム、酵素基質、放射性基、有機小分子、増幅可能なポリヌクレオチド配列、ラテックスまたは炭素粒子等の粒子、金属ゾル、微結晶、リボソーム、細胞等が挙げられ、これらは、色素、触媒または他の検出可能な基、質量分析の目的のため結合される分子の重量を変更する質量タグ等で更に標識されてもよく、またはそうでなくてもよい。標識を電磁性材料または電気化学的材料から選択することができる。或る一つの実施形態では検出可能な標識は蛍光色素である。他の標識及び標識機構は、本明細書の開示に基づいて当業者に明らかとなるであろう。

10

【 0 1 4 9 】

別の実施形態では、アプタマー共有結合複合体及びアプタマー共有結合複合体は、Q - P C Rを使用して検出及び/または定量される。本明細書で使用される「Q - P C R」は、アッセイの結果が定量的であり、すなわち、アッセイが試験試料中に存在するアプタマーの量または濃度を定量可能であるような方法またはそのような制御された条件下で行われるP C R反応を指す。試験試料中に存在し得るI L - 6の検出及び/または定量の例示的な方法では、試験試料をI L - 6アプタマーと接触させる。I L - 6に結合したアプタマーを含むアプタマー親和性複合体を形成させる。試験試料がI L - 6を含有する場合、アプタマー親和性複合体が、通常、試験試料中に形成される。アプタマー親和性複合体は、任意に、採用されるアプタマーに適した方法を使用して、I L - 6に共有結合したアプタマーを含むアプタマー共有結合複合体へと転換される。本明細書において更に記載されるように、アプタマー親和性複合体の形成及びアプタマー共有結合複合体への任意の変換に続いて、その後、試験試料中に存在し得るあらゆる遊離アプタマーをアプタマー親和性複合体またはアプタマー共有結合複合体から分離する。その後、アプタマー親和性複合体またはアプタマー共有結合複合体を、ポリヌクレオチドの定量的複製のための既知の技術を使用して定量する。

20

30

【 0 1 5 0 】

或る一つの実施形態では、試験試料中のアプタマー親和性複合体またはアプタマー共有結合複合体の量または濃度は、T a q M a n (登録商標) P C Rを使用して決定する。この技術は、一般的に、オリゴヌクレオチド複製酵素の5' - 3' エクソヌクレアーゼ活性に依存して標的とされた配列からシグナルを発生する。T a q M a nプロンプを、定量されるアプタマーの配列に基づいて選択し、一般的に、アプタマー配列がポリメラーゼ連鎖反応(P C R)を使用して増幅されるにつれてシグナルを発生するように、例えば、6 - カルボキシフルオレセイン等の5' - 末端蛍光、及び6 - カルボキシテトラメチルフルオレセイン等の例えば、3' 末端クエンチャーを含む。ポリメラーゼがアプタマー配列をコピーするにつれて、エクソヌクレアーゼ活性は、P C Rプライマーから下流でアニールするプロンプから蛍光を解放し、それによりシグナルを発生する。シグナルは、複製生成物が産生するにつれて増加する。P C R産物の量は、行われる複製サイクルの数、またアプタマーの開始濃度の両方に依存する。

40

【 0 1 5 1 】

別の実施形態では、アプタマー親和性複合体またはアプタマー共有結合複合体の量または濃度は、複製過程にインターカラー蛍光色素を使用して決定される。例えば、S Y B R (登録商標) グリーン等のインターカラー色素は、一本鎖D N Aの存在下で発生される蛍光シグナルと比較して、二本鎖D N Aの存在下において大きな蛍光シグナルを

50

発生する。二本鎖DNA生成物がPCR中に形成されるにつれて、色素によって産生されるシグナルは増加する。産生されるシグナルの強度は、PCRサイクル数とアプタマーの開始濃度の両方に依存する。

【0152】

別の実施形態では、アプタマー親和性複合体またはアプタマー共有結合複合体の量または濃度は、複製過程中的「分子ビーコン」を使用して決定される（例えば、Tyagi et al., Nat. Biotech. 16: 495-498, 1998; U.S. Pat. No. 5,925,517を参照されたい）。分子ビーコンは、ヘアピンループへと折り畳まれる特異的核酸プローブであり、ヘアピンが形成される場合に蛍光によってシグナルをわずかに発生するか、または全く発生しないように、ヘアピン構造の一方の末端に蛍光を含み、他方の末端にクエンチャーを含む。ループ配列は、標的ポリヌクレオチド配列に特異的であり、アプタマー配列に対してハイブリダイズすることにより、ヘアピンは展開されて、それにより蛍光シグナルを生じる。

10

【0153】

実施例

以下の実施例は解説の目的でのみ提供され、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲を限定することを意図するものではない。本明細書に記載される全ての実施例は、当業者によく知られている標準的な技術を使用して行われた。以下の実施例に記載される通例の分子生物学の技術は、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (2001)等の標準的な実験室のマニュアルに記載されるように行われ得る。

20

【0154】

実施例1. アプタマー選択及び配列

A. 候補混合物の調製

部分的にランダム化されたssDNAオリゴヌクレオチドの候補混合物を、表1に示されるピオチン化ssDNAテンプレートにアニールしたDNAプライマーのポリメラーゼ伸長により調製した。候補混合物は、dATP、dGTP、dCTP及びBndUTP（5-(N-ベンジルカルボキシアミド-2'-デオキシウリジントリホスフェート)またはNapdUTP（5-(N-ナフチルカルボキシアミド-2'-デオキシウリジントリホスフェート)のいずれかを含有する40ヌクレオチドのランダム化カセットを含有した。

30

【0155】

2つのピオチン残基（配列中B'と表記される）を持つ4nmolのテンプレート1（配列番号1）及び40のランダム化された位置（配列中Nと表記される）、並びにCys3フルオロフォアを含む4.8nmolのプライマー1（配列番号2）を100μLの1xKOD DNA Polymerase Buffer（Novagen）中で合わせ、95℃で8分間加熱した後、氷上で冷却した。100μLのプライマー：テンプレート混合物を、1xKOD DNA Polymerase Buffer、0.125 U/μL KOD XL DNA Polymerase、及びそれぞれ0.5mMのdATP、dCTP、dGTP、及びBndUTPまたはNapdUTPのいずれかを含有する400μLの伸長反応に添加し、70℃で30分間インキュベートした。1mLのストレプトアビジン被覆磁性ビーズ（PierceのMagnaBind Streptavidin、0.05%TWEEN-20を含有する3M NaCl中5mg/mL）を添加し、混合しながら25℃で10分間インキュベートすることにより、二本鎖産物をテンプレート鎖のピオチンを介して捕捉した。ビーズを0.75mL SB17T Buffer（40mM HEPES、pH7.5、102mM NaCl、5mM KCl、5mM MgCl₂、1mM EDTA、0.05%TWEEN-20）で3回洗浄した。アプタマー鎖を1.2mLの20mM NaOHでビーズから溶離し、0.3mLの80

40

50

mM HClで中和し、15 μ Lの1M HEPES、pH7.5で緩衝した。候補混合物をCentricon-30によりおよそ0.2 mLまで濃縮し、UV吸収分光法により定量した。

【0156】

【表1】

表1. テンプレート及びプライマーの配列

オリゴヌクレオチド記号	配列 (5' → 3')	配列番号
テンプレート1	AB' AB' TTTTTTTGGTCTTGTTCTTCTCTGTG-(N) ₄₀ -CTCGTCACACACTCACATC	1
プライマー1	Cy3-GATGTGAGTGTGTGACGAG	2
プライマー2	ATATATATGATGTGAGTGTGTGACGAG	3
プライマー3	AB' AB' TTTTTTTGGTCTTGTTCTTCTCTGTG	4

B' = ビオチン

【0157】

B. 標的タンパク質の調製

タグ付けしていないヒトIL-6 (R&D Systems) をリジン残基へのNHS-PEO4-ビオチン (Pierce) の共有結合的な連結によりビオチン化した。タンパク質 (50 μ L中300 pmol) をSephadex G-25マイクロスピナラムでSB17Tへと交換した。NHS-PEO4-ビオチンを1.5 mMまで添加し、反応物を4 で16時間インキュベートした。未反応のNHS-PEO4-ビオチンをSephadex G-25マイクロスピナラムで除去した。

【0158】

C. 標的タンパク質の固定化

ラウンド1のSELEXのため、標的タンパク質をMyOne-SA常磁性ビーズ (InvitrogenのMyOne SA、または以下SAビーズと呼ぶ) 上に固定化した。IL-6を0.5 mL SB17T中で0.2 mg/mLまで希釈し、0.5 mL SAビーズ (予め20 mM NaOHで2回、SB17Tで1回洗浄した) に添加した。その混合物を25 で30分間回転し、使用するまで4 で保存した。

【0159】

D. スローオフレート濃縮プロセスによるアプタマーの選択

候補混合物を用い、標的タンパク質を有する試料 (シグナルS) と標的タンパク質を含まない試料 (バックグラウンドB) の間の結合を比較して選択を行った。親和性及びスローオフレートに関する選択を含む、合計8回のSELEXプロセスを完了した。

【0160】

各試料について、90 μ LのDNA混合物を10 pmol ~ 20 pmolの候補混合物 (第1ラウンドにおいておよそ100 pmol) を含むSB17T中に調製した。試料を95 で3分間加熱し、0.1 C/秒の速度で37 まで冷却した。試料を10 μ Lのタンパク質競合混合物 (SB17T中0.1% HSA、10 μ Mカゼイン、及び10 μ Mプロトロンビン) と合わせ、0.5 mgのSAビーズに添加し、混合しながら37 で5分間インキュベートした。ビーズを磁気分離により除去した。

【0161】

結合反応を10 μ Lの標的タンパク質(SB17T中0.5 μ M)またはSB17Tを40 μ LのDNA混合物に添加し、37 で30分間インキュベートすることによって行った。スローオフレート濃縮プロセスを異なる方式で採用した。ラウンド2~ラウンド5において、950 μ LのSB17T(37 に予熱)を添加することにより試料を20倍希釈し、複合体を捕捉する前に37 で15分間インキュベートした。ラウンド6~ラウンド7において、950 μ LのSB17T(37 に予熱)を添加することにより試料を20倍希釈した。各50 μ Lの希釈試料を950 μ LのSB17T(37 に予熱)に移すことによって再度希釈し、全体で400倍希釈として、複合体を捕捉する前に37 で60分間インキュベートした。ラウンド8において、950 μ LのSB17T(37 に予熱)を添加することによって試料を20倍希釈した。各50 μ Lの希釈試料を、10mM硫酸デキストラン(5kDa)を含有する950 μ LのSB17T(37 に予熱)に移すことによって再度希釈し、全体で400倍希釈として、複合体を捕捉する前に37 で60分間インキュベートした。

【0162】

0.25mgのMyOne-SAビーズ(Invitrogen)を添加し、混合しながら25 で15分間インキュベートすることによってタンパク質ビオチンを介してSAビーズ上に複合体を捕捉した。SB17Tでビーズを5回洗浄することにより遊離DNAを除去した。指示がない限り、全ての洗浄は、100 μ Lの洗浄溶液にビーズを再懸濁し、25 で30秒間混合し、磁石からビーズを分離し、洗浄溶液から除去することにより行われた。85 μ Lの20mM NaOHを添加し、混合しながら37 で1分間インキュベートすることによってビーズからアプタマー鎖を溶離した。80 μ Lのアプタマー溶離物を磁気分離の後新しい管に移し、20 μ Lの80mM HClで中和し、1 μ L 0.5M Tris-HCl、pH7.5で緩衝した。

【0163】

E. アプタマー増幅及び精製

選択したアプタマーDNAをQPCRにより増幅し、定量した。12 μ LのQPCRミックス(5 \times KOD DNA Polymerase Buffer、25mM MgCl₂、10 μ MフォワードPCRプライマー(プライマー2、配列番号3)、10 μ Mビオチン化リバースPCRプライマー(プライマー3、配列番号4)、5 \times SYBR Green I、0.125U/ μ L KOD XL DNAポリメラーゼ、並びに各1mMのdATP、dCTP、dGTP、及びdTTP)に48 μ LのDNAを添加し、Bio-Rad MyIQ QPCR機器において、以下のプロトコル: 99.9 で15秒間を1サイクル、55 で10秒間、68 で30分間、99.9 で15秒間を30サイクル、72 で1分間の熱サイクルに供した。機器のソフトウェアを用いて定量を行い、標的タンパク質を有するまたは有しない、選択したDNAのコピー数を比較してシグナル/バックグラウンド比を決定した。

【0164】

増幅の後、ビオチン化アンチセンス鎖を介してPCR産物をSAビーズ上に捕捉した。1.25mLのSAビーズ(10mg/mL)を0.5mLの20mM NaOHで2回洗浄し、0.5mL SB17Tで1回洗浄して、1.25mLの3M NaCl+0.05% Tweenに再懸濁して4 で保存した。25 μ LのSAビーズ(3M NaCl中10mg/mL)を50 μ Lの二本鎖QPCR産物に添加し、混合しながら25 で5分間インキュベートした。ビーズをSB17Tで1回洗浄し、200 μ Lの20mM NaOHを添加して、混合しながら37 で1分間インキュベートすることによりビーズから「センス」鎖を溶離した。溶離した鎖を廃棄し、ビーズをSB17Tで3回洗浄し、16mM NaClで1回洗浄した。

【0165】

適切な修飾dUTP(BndUTPまたはNapdUTP)を用いて、固定化されたアンチセンス鎖からプライマー伸長によりアプタマーセンス鎖を調製した。ビーズを20 μ Lのプライマー伸長反応混合物(1 \times プライマー伸長緩衝液、1.5mMのMgCl₂、

5 μ M フォワードプライマー（プライマー 1、配列番号 2）、0.5 mM の各 dATP、dCTP、dGTP、及び BndUTP または NapdUTP のいずれか、並びに 0.125 U/ μ L KOD XL DNA ポリメラーゼ）に再懸濁し、混合しながら 68 で 30 分間インキュベートした。ビーズを SB17T で 3 回洗浄し、85 μ L の 20 mM NaOH を添加し、混合しながら 37 で 1 分間インキュベートすることによってビーズからアプタマー鎖を溶離した。80 μ L のアプタマー溶離物を磁気分離の後新しい管に移し、20 μ L の 80 mM HCl で中和し、5 μ L の 0.1 M HEPES、pH 7.5 で緩衝した。

【0166】

F. 選択ストリンジェンシー及びフィードバック

10

選択工程の標的タンパク質の相対濃度を、以下のように S/B 比に応じて各回で低下した（式中、シグナル S 及びバックグラウンド B は上記 D 欄で規定される）。

$S/B < 10$ の場合、 $[P]_{(i+1)} = [P]_i$

$10 \leq S/B < 100$ の場合、 $[P]_{(i+1)} = [P]_i / 3.2$

$S/B \geq 100$ の場合、 $[P]_{(i+1)} = [P]_i / 10$

式中、 $[P]$ = タンパク質濃度、及び i = 現在のラウンド数。

【0167】

各選択回の後、濃縮された DNA 混合物の収束状態を決定した。10 μ L の二本鎖 QPCR 産物を 1 x SYBR Green I を含有する 4 mM MgCl₂ で 200 μ L まで希釈した。試料を 75 μ L のシリコン油で覆い、二本鎖オリゴヌクレオチドの複合体混合物に関するハイブリダイゼーション時間を測定する、C₀t 分析を使用して収束を分析した。試料を以下のプロトコル：98、1 分で 3 サイクル、85 で 1 分、93、1 分で 1 サイクル、85 で 15 分の熱サイクルに供した。85 で 15 分間の間、5 秒間隔で蛍光画像を測定した。蛍光強度を log（時間）の関数としてプロットし、各 SELEX ラウンドによるハイブリダイゼーション比率の増加が観察され、配列収束を示した。

20

【0168】

G. クローンスクリーニングプロセス及びアプタマーの同定

8 回の SELEX の後、収束したプールをクローニングし、シーケンシングした。非ピオチン化 SELEX プライマーを用いて選択した DNA を PCR で増幅し、AGCT DNA を作製し、QIAquick 96 PCR Purification Kit (Cat # 28181) を使用して精製し、Stratagene PCR-Script Cloning Kit (Cat # 211189) を使用して製造業者のプロトコルの通りに精製した挿入物をクローニングした。リガンド SELEX プールを形質転換、96 ウェルプレートへの配列、DNA prep 及びシーケンシングのためシーケンシングベンダー（テキサス州ヒューストンの Cogenics）に送った。約 42 のクローンの配列が得られ、配列数/コピー数を決定し、ローカル-アラインメントアルゴリズムを使用する共通の収束パターンを同定する特注ソフトウェアを使用して収束を分析した。約 42 クローンのうち 16 についてストレプトアビジンに結合することがわかった。残りのクローンについては、プール中で最も多い表示/コピー数を有する配列及び共通の結合モチーフに収束された配列を更なる特性評価のため選択した。2 つの配列（1 つの BndU 及び 1 つの NapdU）を更なる分析のため選択し、PCR 増幅用テンプレートとして Cogenics から得たプラスミド DNA を使用して酵素学的に調製した。

30

40

【0169】

H. 平衡結合定数を (K_d) の測定

選択した配列の平衡結合定数を親和性アッセイにおいて測定した。放射性標識した DNA を SB17T-0.002 緩衝液（40 mM HEPES、pH 7.5、125 mM NaCl、5 mM KCl、5 mM MgCl₂、0.002% TWEEN-20）中で 95 にて 3 分間加熱し、徐々に 37 まで冷却した。SB17T-0.002 緩衝液中で低濃度の放射性標識した DNA（約 1×10^{-11} M）と、或る濃度範囲の標的タンバ

50

ク質 ($1 \times 10^{-7} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-12} \text{ M}$) とを混合し、 37°C で30分間インキュベートすることにより複合体を形成した。各反応の一部をナイロン膜に転写し、乾燥して各反応における総数を決定した。複合体をZORBAX樹脂 (Agilent) 上に捕捉し、真空下でMultiScreen HV Plate (Millipore) を通し、 $200 \mu\text{L}$ のSB17T-0.002緩衝液で洗浄して結合していないDNAからタンパク質結合複合体を分離した。ナイロン膜及びMultiScreen HV Plateをホスホイメジャーで画像化し、FUJIFL A-3000を使用して各試料中の放射能の量を定量した。捕捉したDNAの画分をタンパク質濃度 (P_t) の関数としてプロットし、 $y = (\text{最大} - \text{最小}) (P_t) / (K_d + P_t) + \text{最小}$ を使用して平衡結合定数 (K_d) を決定した。2つの選択されたSOMAmerの配列及びIL-6に対するそれらの結合親和性を表2に列挙する。

10

【0170】

【表2】

表2. Bn-dU SOMAmer及びNap-dU SOMAmerの例

オリゴ	配列 (5' → 3')	配列番号	K_d (nM)
2573-20	GATGTGAGTG TGTGACGAGZ GGGCAGGZZZ GGZAZZAACA CGZZAAGZCG ZGGGGZCGCA CAGAGAAGAA ACAAGACC	7	3
2574-49	GATGTGAGTG TGTGACGAGG GGGPPAPGPA GCGAGPGCGP AAGGCGGPGG GCGAGGGAPC ACAGAGAAGA AACAAGACC	8	2

20

Z = Bn-dU ; 及び P = Nap-dU

【0171】

実施例2. 細胞に基づくアンタゴニスト活性アッセイ

in vitro細胞アッセイにおけるIL-6活性の阻害についてIL-6アプタマーをスクリーニングした。

【0172】

A. 細胞増殖アッセイ

IL-6はヒト赤白血病TF-1細胞の増殖を誘導する。10% FBSを含有するRPMI 1640培地に96ウェルプレートにおいて1ウェル当たり 1×10^4 細胞でTF-1細胞を懸濁し、5% CO₂ インキュベータにおいて 37°C で1日培養した。IL-6 (0または10 ng/mL) を、水またはSB18T緩衝液中でIL-6アプタマー (2 μM) と共に、またはIL-6なしで 37°C にて30分間インキュベートし、0.5% FBSを含有するRPMI 1640培地中の細胞に適用した。 37°C で5日後、Alamar Blue (商標) を添加し、細胞を 37°C で更に3時間インキュベートした。蛍光 (560 nmで励起、590 nmで発光) をルミノメーター (Wallac 1420 ARVO Light, Perkin Elmer) で測定した。結果を図1に示し、各バーは4つの実験の平均 + 標準偏差を表し、SOMAmerなし対照に対して標準化した。Bn-dU 2573-20 (配列番号7) 及びNap-dU 2574-49 (配列番号8) の両方が、IL-6誘導を伴わない対照のレベルまでTF-1細胞のIL-6誘導性増殖を阻害した。

30

40

【0173】

B. 遺伝子レポーターアッセイ

転写因子STAT3によるIL-6シグナル。L4細胞はSTATの制御のもと、IL-6による誘導によってルシフェラーゼを発現し、蛍光シグナルを発生するルシフェラーゼ遺伝子で遺伝子導入されたHeLa細胞である。L4細胞を10% FBSを含有するDMEMに96ウェル白色プレート (Costar, No. 3903) 1ウェル当たり 5×10^4 細胞で播種し、CO₂ インキュベータにおいて 37°C で1日培養した。IL-6 (10 ng/mL) を水またはSB18T中でIL-6アプタマー (10 μM) と共に、またはIL-6アプタマーなしで 37°C にて30分間インキュベートし、0.5% FBS

50

を含有するフェノール不含DMEM中の細胞に適用した。CO₂インキュベータにおいて37℃で5時間後、培地を廃棄し、ルシフェラーゼ基質試薬(Perkin Elmer #6016769)を周囲温度で1分間に亘って細胞に付加した。SpectraMax Plus(Molecular Devices)を使用して発光を測定した。図2に示される結果は、各バーが3つの実験の平均を表し、SOMAmerなし対照に対して標準化した。これらの結果は、TF-1増殖アッセイと一致する。Bn-dU 2573-20(配列番号7)及びNap-dU 2574-49(配列番号8)は、IL-6媒介ルシフェラーゼ発現を阻害した。

【0174】

実施例3. 配列切断研究

IL-6 SOMAmer 2573-20(配列番号7)は78ヌクレオチド長であり、Bn-dU修飾及び $K_d = 3 \times 10^{-9}$ Mを有する。より短い配列が効率の良いIL-6結合を維持するかどうかを決定するため、2573-20(配列番号7)の切断を生じさせた。或る例では、より短いアダプターは、*in vivo*で組織穿通及び/またはヌクレアーゼ活性に対する安定性の増加を示した。また、より短いアダプターは製造費用を削減し得る。

【0175】

5'末端及び/または3'末端からの1または複数の欠失により、2573-20(配列番号7)の一連の切断変異体を合成した。特定の切断型アダプターの配列を表3に列挙する。ZはBn-dUを表す。切断型アダプターを上記の親和性結合アッセイにおいてIL-6に対する親和性について試験した。

【0176】

【表3】

表3. SOMAmer 2573-20(配列番号7)及び切断変異体の配列及び親和性値(K_d)

オリゴ	配列(5' → 3')	配列番号	K_d (nM)
2573-20_3	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	11	1.5
2573-20_5	GCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	12	>1000
2573-20_6	CAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	13	>1000
2573-20_7	AGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	14	>1000
2573-20_8	GGZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	15	>1000
2573-20_9	GZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	16	>1000
2573-20_10	ZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	17	>1000
2573-20_11	ZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	18	>1000
2573-20_12	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZ	19	1.4
2573-20_13	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGG	20	1.9
2573-20_14	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGG	21	2.8
2573-20_15	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGG	22	1.0
2573-20_16	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZG	23	>1000
2573-20_17	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZ	24	>1000
2573-20_18	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCG	25	>1000

【0177】

変異体2573-20__3(配列番号11)はIL-6結合活性を保持し、5'末端の21ヌクレオチド(2573-20(配列番号7)の1位~21位)はIL-6を結合するのに必要でないことを示唆する。同様に、変異体2573-20__15(配列番号22)はIL-6結合活性を保持し、3'末端の25ヌクレオチド(2573-20(配列番

10

20

30

40

50

号7)の54位~78位)はIL-6を結合するのに必要でないことを示唆する。変異体2573-20__15(配列番号22)を更なる特性評価のため選択した。

【0178】

IL-6 SOMAmer 2574-49(配列番号8)は79ヌクレオチド長であり、Nap-dU修飾及び、 $K_d = 2 \times 10^{-9}$ Mを有する。2574-49(配列番号8)の切断を生じさせ、より短い配列が効率的なIL-6結合を維持するかどうかを特定した。特定の切断型変異体の配列を表4に示す。PはNap-dUを表す。

【0179】

【表4】

表4. SOMAmer 2574-49及び切断型変異体の配列及び親和性値(K_d)

オリゴ	配列(5' → 3')	配列番号:	K_d (nM)
2574-49_3	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGGA	26	4.1
2574-49_6	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGG	27	3.5
2574-49_7	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGG	28	2.6
2574-49_8	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAG	29	1.2
2574-49_9	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGA	30	1.8
2574-49_10	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCG	31	1.9
2574-49_11	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGC	32	1.5
2574-49_12	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGG	33	1.1
2574-49_13	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGG	34	1.1
2574-49_14	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPG	35	0.7
2574-49_15	GGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGGA	36	2.1
2574-49_16	GPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGGA	37	3.9
2574-49_17	PAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGGA	38	17
2574-49_18	PPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGGA	39	19
2574-49_19	PAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGGA	40	>1000
2574-49_20	APGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGGA	41	>1000

【0180】

2574-49__14(配列番号35)はIL-6結合活性を保持し、2574-49(配列番号8)の少なくとも3'末端の30ヌクレオチド(ヌクレオチド50~79)はIL-6を結合するのに必要ではないことを示唆する。2574-49__18(配列番号39)はIL-6結合活性を保持し(約10倍減少するが)、2574-49(配列番号8)の少なくとも5'末端の23ヌクレオチド(ヌクレオチド1~23)はIL-6を結合するのに必要ではないことを示唆する。切断型変異体2574-49__14(配列番号35)を更なる特性評価のため選択した。

【0181】

実施例4. SELEXプールの大規模シーケンシング

2573-20及び2574-49のSOMAmerファミリー内の配列をより完全に評価するため、454パイロシーケンシング技術を使用して濃縮プールをシーケンシングした。各プールについて、上記の454プライマーを用いてDNAを増幅し、PCR産物を精製し、SequalPrep normalization plate(Invitrogen, Cat# A10510-01)を使用して標準化した。遊離物をゲルに流して、各アンプリコンのサイズ及び純度を確認した。精製したPCR産物を、コロラド州オーロラのコロラド大学ヘルスサイエンスセンターの454パイロシーケンシング設備においてシーケンシングした。

【0182】

実施例5. BndU SOMAmer 2573-20__15(配列番号22)の修飾

A．代替U修飾による単一置換

或る例では、U修飾はIL-6アプタマーがIL-6上の芳香族アミノ酸と疎水性結合ポケットとの好ましい相互作用に携わることができることを可能とする。アプタマー2573-20__15(配列番号22)を、種々の末端基及びリンカー長を有する類縁体のライブラリを使用して様々なBn-dU位置で修飾した。図3を参照されたい。或る実施形態では、より長いリンカーは、更なる回転自由性及びタンパク質表面下の疎水性領域へのより良好な接近を可能とし得る。

【0183】

結合親和性に対する、フェニルエチル-dU(PE-dU)、フェニルプロピル-dU(PP-dU)、またはナフチルメチル-dU(Nap-dU)によるBn-dUの単一置換の効果を評価した。結果を図4に示す。親和性において顕著な改善は観察されなかったのに対し、PE-dUは8及び14以外の全てのBn-dU位置で耐容性良好であり、PP-dUは22位、27位及び30位で耐容性良好であり、Nap-dUは7位、9位及び12位で耐容性良好であり、親和性におけるわずかな改善が観察された。

【0184】

B．2'-O-メチル修飾による単一置換

原形質中の主なヌクレアーゼであるDNase Iは、配列非依存性にDNAのホスホジエステル骨格を加水分解できる。リボースの2'位での骨格修飾または非架橋酸素は、DNase Iによるヌクレアーゼ切断に対する耐性を提供する。RNAアプタマーにおける2'-F、2'-O-メチル、及びホスホロチオエート修飾によってヌクレアーゼ安定性及び原形質滞留時間の顕著な向上が達成された。2573-20__15(配列番号22)の各dA、dG及びdC位置における2'-O-メチル置換の耐容性を評価した。

【0185】

その実験の結果を図5に示す。2'-O-メチル修飾は、dC3、dG6、dA16-dC20、及びdC28の位置において耐容性良好であり、dC3、dG6、及びdC28の位置では親和性の改善をもたらした。

【0186】

C．C3-スパーサー修飾による単一置換

ヌクレオチドと同じ距離に及ぶが、リボース糖または塩基を欠く3-炭素-リンカーで構成されるC3-スパーサーは、DNase I耐性を提供し、また、タンパク質に関するアラニンスキャンのように、各位置においてヌクレオチド塩基相互作用をプローブするために使用され得る。2573-20__15(配列番号22)の各dA、dG及びdCの位置におけるC3-スパーサー置換の耐容性を評価した。

【0187】

その実験結果を図5に示す。dC18位~dG21位及びdC28位においてC3-スパーサー修飾が許容された。この同じ領域は、2'-O-メチル修飾に比較的影響を受けず、この領域は顕著なタンパク質接触に参与していない可能性を示唆する。

【0188】

D．許容された修飾の複数の置換

2'-O-メチル及びC3-スパーサーの置換を有する特定の変異体の結合及び阻害に基づき、耐容性を示した2'-O-メチルとC-3スパーサーの置換とを組み合わせ一連の変異体を作製した。これらの配列を遺伝子レポーターアッセイにおいて結合及び阻害活性について試験した。変異体2573-20__137(配列番号573)のdC3、dG6、dA16、dA19、dC20及びdC28の位置における6つの2'-O-メチル置換は、結合親和性を5倍改善した。更なる2'-O-メチルまたはC3-スパーサーの置換は、この実験において結合活性の喪失をもたらした。また、変異体2573-20__136(配列番号101)におけるPE-dUによるBn-dU9の置換及びNap-dUによるBn-dU12の置換が阻害活性の改善をもたらした。遺伝子レポーターアッセイにおいてIL-6の最大の阻害をほぼ100%に増加し、IC₅₀値を5×10⁻¹⁰Mまで増加した。図6(2573-20__15(配列番号22); 2573-20__13

10

20

30

40

50

7 (配列番号 573) ; 2573 - 20__136 (配列番号 101)) を参照されたい。2573 - 136 の 12 位における Nap d U (2573 - 20__137 (配列番号 573)) における B n - d U) 以外は同一である、変異体 2573 - 20__137 (配列番号 573)) 及び変異体 2573 - 20__136 (配列番号 101)) は、12 位における Nap d U 置換が改善された最大の阻害をもたらすことを示す。

【0189】

実施例 6 . Nap d U SOMA mer 2574 - 49__14 (配列番号 35) の修飾切断型 Nap d U SOMA mer 2574 - 49__14 (配列番号 35) を実施例 5 に記載される戦略を使用して修飾した。アプタマー 2574 - 49__260 (配列番号 400) は、3 つの C3 - スペース修飾 (1 位、14 位及び 15 位) を有する 2574 - 49__14 (配列番号 35) の変異体であり、2574 - 49__3 (配列番号 26) よりもおおよそ 30 倍高い効力で IL - 6 を阻害する。図 7 を参照されたい (2574 - 49__3 (配列番号 26) ; 2574 - 49__260 (配列番号 400))。2574 - 49__260 (配列番号 400) の組成物を下記表 12 に示す。

10

【0190】

実施例 7 . 血清中のアプタマー安定性の評価

血清ヌクレアーゼへの感受性に対する S E L E X 後アプタマーの切断及び修飾の効果を、新鮮な血清にアプタマーを暴露し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により時間の関数としてアプタマー加水分解の程度を定量することにより評価した。全ての B n - d U 残基が d T で置き換えられた B n - d U SOMA mer 2573 - 20__15 (配列番号 22) の変異体 (2573 - 20__116 (配列番号 300))、及び全ての Nap - d U 残基が d T で置き換えられた Nap - d U SOMA mer 2574 - 49__14 (配列番号 35) の変異体 (2574 - 49__456 (配列番号 572)) を、ヌクレアーゼ安定性に対する修飾 d U 位置の効果を測定するため、対照として本研究に含めた。このアッセイで試験した全てのアプタマーは、3' ~ 5' のエクソヌクレアーゼ活性からアプタマーを保護するため 3' inverted d T を含んだ。

20

【0191】

各アプタマーを SB17 中 0.5 μM まで希釈し 37 °C で 90% 血清と共にインキュベートした。0 時間 ~ 48 時間の様々な時間点でアリコートを採取し、フェノールで 1 回、クロロホルムで 1 回抽出し、YM - 10 分子量カットオフフィルタを用いて濃縮した。10% ポリアクリルアミドゲル / 尿素ゲルを使用する変性 PAGE により試料を分析し、アプタマーを SYBR ゴールドで染色した。染色した DNA を FUJI Fluorescent Image Analyzer FLA - 3000 を用いて画像化し、Image Gauge ソフトウェアパッケージを使用して定量し、各時間点におけるインタクトアプタマーの画分を特定した。

30

【0192】

37 °C で 48 時間の 90% ヒト血清への暴露は SOMA mer 2573 - 20__136 (配列番号 101)) に対してわずかな効果 (95% 超のインタクト) を有するのに対し、対称 d T 変異体 2573 - 20__116 (配列番号 300)) はほとんど完全に分解され (5% 未満のインタクト) 、SOMA mer 2573 - 20__15 (配列番号 22)) は部分的に分解された (50% のインタクト) 。図 8 A (2573 - 20__136 (配列番号 101)) () 、2573 - 20__15 (配列番号 22)) () 、2573 - 20__116 (配列番号 300)) () を参照されたい。同様に、Nap - d U SOMA mer 2574 - 49__260 (配列番号 400)) はこの処理によって大部分は影響を受けなかった (95% 超のインタクト) のに対し、対称 d T 変異体 2574 - 49__456 (配列番号 572)) (5% 未満のインタクト) は顕著に加水分解された。Nap - d U 変異体 2574 - 49__14 (配列番号 35)) (60% のインタクト) もまた、ある程度加水分解された。図 8 B (2574 - 49__260 (配列番号 400)) () 、2574 - 49__14 (配列番号 35)) () 、2574 - 49__456 (配列番号 572)) () を参照されたい。これらの結果は、d U 修飾がエンドヌクレアーゼ切断に対して顕著なレベ

40

50

ルの保護を提供することができ、追加の骨格 2' - O - メチル修飾はこれら SOMAmer を更に安定化することを示す。同様の結果がラット及びカニクイザルの血清で観察された。図 8 C を参照されたい。

【 0 1 9 3 】

実施例 8 . 2 5 7 3 - 2 0 __ 1 3 6 (配列番号 1 0 1) 及び 2 5 7 4 - 4 9 __ 2 6 0 (配列番号 4 0 0) は I L - 6 への結合に対して競合する

別々の S E L E X 実験で得られた S O M A m e r 2 5 7 3 - 2 0 __ 1 3 6 (配列番号 1 0 1) 及び 2 5 7 4 - 4 9 __ 2 6 0 (配列番号 4 0 0) が I L - 6 上の重複する部位に結合するかどうかを判定するため、結合競合実験を行った。I L - 6 タンパク質を受動的な吸着によりマイクロタイタープレート (N u n c M a x i s o r p) の表面に連結した。ピオチン化 S O M A m e r 2 5 7 3 - 2 0 __ 1 3 6 (配列番号 1 0 1) (1 0 0 p M) を、S B 1 8 T バッファー (4 0 m M H E P E S , p H 7 . 5 , 1 0 2 m M N a C l , 5 m M K C l , 5 m M M g C l 2 , 0 . 0 5 % T W E E N - 2 0) 中の種々の濃度の競合物 (非ピオチン化 S O M A m e r 2 5 7 3 - 2 0 - 1 3 6 (配列番号 1 0 1) または 2 5 7 4 - 4 9 __ 2 6 0 (配列番号 4 0 0) , 0 . 0 2 ~ 2 0 n M) と混合し、プレートに添加した。5 0 0 R P M で振蕩しながら 2 5 度 6 0 分間インキュベートした後、結合していない S O M A m e r を洗浄により除去し、プレートをセイヨウワサビペルオキシダーゼに連結したストレプトアビジン (1 μ g / m L) とインキュベートした。標準的な手順に従って、残存するピオチン化 2 5 7 3 - 2 0 __ 1 3 6 (配列番号 1 0 1) の量をセイヨウワサビペルオキシダーゼ基質 (T M B , 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン) を用いて測定した。I L - 6 に結合したピオチン化 2 5 7 3 - 2 0 __ 1 3 6 (配列番号 1 0 1) の割合 (非競合対照に対する) を競合 S O M A m e r 濃度の関数としてプロットした。図 9 (2 5 7 3 - 2 0 __ 1 3 6 (配列番号 1 0 1) ; 2 5 7 4 - 4 9 __ 2 6 0 (配列番号 4 0 0)) を参照されたい。2 5 7 4 - 4 9 __ 2 6 0 (配列番号 4 0 0) の濃度が増加するにつれて、結合した 2 5 7 3 - 2 0 __ 1 3 6 (配列番号 1 0 1) は減少し、2 つの S O M A m e r が I L - 6 上の共通の部位または重複する部位への結合に対して競合することを示す。

【 0 1 9 4 】

実施例 9 . アプタマー 2 5 7 3 - 2 0 __ 1 3 6 (配列番号 1 0 1) は I L - 6 受容体への I L - 6 の結合を阻止する

可溶性 I L - 6 受容体 (s I L - 6 R) への I L - 6 の結合に対する S O M A m e r 2 5 7 3 - 2 0 __ 1 3 6 (配列番号 1 0 1) の効果をサンドイッチアッセイフォーマットにおいて判定した。s I L - 6 R (1 0 0 n g) を受動的な吸着によりマイクロタイタープレートの表面に連結した。ピオチン化 I L - 6 (5 0 n g / m L) を P B S T バッファー (0 . 0 5 % T W E E N - 2 0 を含む P B S) 中の種々の濃度の 2 5 7 3 - 2 0 __ 1 3 6 (配列番号 1 0 1) (0 μ g ~ 1 0 μ g) と混合し、プレートに添加した。2 0 0 R P M で振蕩しながら 2 5 度 1 2 0 分間インキュベートした後、結合していない I L - 6 を洗浄により除去し、標準的な手順に従い、ストレプトアビジンセイヨウワサビペルオキシダーゼを用いて残存するピオチン化 I L - 6 の量を測定した。s I L - 6 R に結合したピオチン化 I L - 6 の割合 (非競合対照に対する) を S O M A m e r 濃度の関数としてプロットした。図 1 0 を参照されたい。2 5 7 3 - 2 0 __ 1 3 6 (配列番号 1 0 1) の濃度が増加するにつれて、結合した s I L - 6 R の量は減少し、その受容体である s I L - 6 R への I L - 6 の結合を S O M A m e r が阻害することを示す。

【 0 1 9 5 】

実施例 1 0 . アプタマー 2 5 7 3 - 2 0 __ 1 3 6 (配列番号 1 0 1) はサル I L - 6 を阻害するがラット I L - 6 を阻害しない

カニクイザル及びラットの I L - 6 に対する結合特性及び阻害特性を比較することにより、2 5 7 3 - 2 0 __ 1 3 6 (配列番号 1 0 1) のオースログ交差反応性を評価した。ヒト I L - 6 とカニクイザル I L - 6 の間のアミノ酸同一性は 9 6 % であるのに対し、ヒト I L - 6 とラット I L - 6 ではわずか 3 9 . 9 % が同一である。サル I L - 6 を 6 - H i

10

20

30

40

50

s タグを用いてCHO細胞における発現により調製し、標準的なプロトコルに従ってNTAカラムを使用して精製した。IL-6タンパク質の濃度をELISAにより決定した。ラットIL-6を購入した(R&D Systems)。

【0196】

2573-20__136(配列番号101)は、 $K_d = 2 \times 10^{-9}$ MでサルIL-6と結合し、ラットIL-6とは $K_d = 6 \times 10^{-7}$ Mで結合した。更に、2573-20__136(配列番号101)は遺伝子レポーターアッセイにおいて $IC_{50} = 9.7 \times 10^{-9}$ MでサルIL-6活性を阻害した。

【0197】

実施例11. アプタマー及び抗体の阻害効力の比較

PEG-N-2573-20__136(5'末端に結合した40kDaのPEGを有する2573-20__136(配列番号101))及び抗IL-6R抗体であるトシリズムブのIL-6阻害の効力を細胞増殖アッセイにおいて比較した。96ウェルプレートにおいて1ウェル当たり 1×10^4 細胞で10%FBSを含有するRPMI1640培地に、PEG-N-2573-20__136またはトシリズムブ(0µg/mL、1µg/mL、10µg/mLまたは100µg/mL)と共にU266B1細胞を懸濁し、5%CO₂インキュベータにおいて37℃で30分間培養した。IL-6(100ng/mL)を37℃で2日間細胞に添加した。Alamar Blue(商標)を添加し、細胞を37℃で更に3時間インキュベートした。蛍光(励起560nm、発光590nm)をルミノメーター(Wallac 1420 ARVO Light、Perkin Elmer)を用いて測定した。表5に結果を示す。値は、各濃度での3つの実験(1つの実験当たり3ウェル)の平均±標準誤差を表す。阻害剤を含まない対照群(0.0±15.7%、n=3)とPEG-N-2573-20__136またはトシリズムブとの間で、統計学的な有意差が観察された。(Dunnett検定、両側、* p<0.05、** p<0.01)。PEG-N-2573-20__136は1µg/mL(8.3×10^{-8} M)でIL-6の完全な阻害を達成し、一方、トシリズムブはほぼ等量のモル濃度(6.7×10^{-8} M)で60%の阻害を達成した。

【0198】

【表5】

表5. PEG-N-2573-20__136(5'末端に結合した40kDaのPEGを有する2573-20__136(配列番号101))及びトシリズムブによるIL-6依存性細胞増殖の阻害

阻害剤	濃度 (µg/mL)	濃度 (M)	相対 IL-6 阻害(%)
PEG-N-2573-20_136	1	8.3×10^{-8}	101.2 ± 3.8**
	10	8.3×10^{-7}	121.2 ± 6.2**
	100	8.3×10^{-6}	126.9 ± 4.9**
トシリズムブ	1	6.7×10^{-9}	15.1 ± 8.0
	10	6.7×10^{-8}	60.7 ± 21.6*
	100	6.7×10^{-7}	57.0 ± 4.7

【0199】

実施例12. IL-6 応答性腫瘍細胞に対する2573-20__136(配列番号101)のアンタゴニスト活性

脳、前立腺、及び腎臓を含む多くの癌に対してIL-6受容体を過剰発現させ、上昇したIL-6リガンド及び受容体発現は患者の低い生存率と関連する。IL-6シグナリングの阻害は、腫瘍細胞の成長、生存、及び/または転移の可能性を抑制し得る。PEG-N-2573-20__136(その5'末端に結合した40kDaのポリエチレングリコールを有する2573-20__136(配列番号101))による腫瘍細胞増殖の阻害を

PC3前立腺癌、HepG2肝臓癌、及びU87MG神経膠腫細胞について測定した。10% FBSを含有するF12K培地(PC3細胞)または10% FBSを含有するDMEM培地(HepG2細胞及びU87MG細胞)に96ウェルプレートにおいて1ウェル当たり 1×10^4 細胞で播種し、5% CO₂インキュベータにおいて37℃で1日培養した。7日間に亘り37℃でPEG-N-2573-20__136(配列番号101)(10 µg/mL)を各培地に適用した。Alamar Blue(商標)を添加し、細胞を37℃で更に1時間~3時間インキュベートした。蛍光(励起560nm、発光590nm)をルミノメーター(Perkin ElmerのWallac 1420 ARVO Light)を用いて測定した。結果を表6に示す。値は、3つの実験(1つの実験当たり2ウェル)の平均±標準誤差を表す。PEG-N-2573-20__136は、3種類全ての細胞の増殖を抑制した。

10

【0200】

【表6】

表6. 腫瘍細胞増殖のPEG-N-2573-20__136(5'末端に結合した40kDaのPEGを有する2573-20__136(配列番号101))阻害

細胞種	略称	相対増殖(%)
前立腺癌	PC3	74.4 ± 1.0
肝臓癌	HepG2	85.0 ± 6.6
神経膠腫	U87MG	87.3 ± 4.9

20

【0201】

同じ実験条件下で、12のアプタマー(10 µg/mLまたは100 µg/mL)または抗IL-6受容体抗体トシリズマブ(150 µg/mLまたは1500 µg/mL)は、腫瘍細胞増殖を阻害した。結果を表7に示す。値は、各アプタマーまたはトシリズマブに対する3つの実験(1つの実験当たり3ウェル)の平均±標準誤差を表す。対照(U87MG:それぞれ、100.0 ± 3.7%、HepG2:100.0 ± 6.7%)とアプタマーまたはトシリズマブの間で統計学的有意差が観察された(Dunnett検定、両側、* p < 0.05、** p < 0.01)。

【0202】

【表 7】

表 7. 腫瘍細胞増殖のアプタマー阻害

阻害剤	配列番号	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	相対増殖(%)	
			U87MG	HepG2
なし	N/A	0	100.0 \pm 3.7	100.0 \pm 6.7
トシリズマブ	N/A	150	99.0 \pm 3.2	88.5 \pm 2.8
		1500	77.5 \pm 4.6*	79.8 \pm 3.9
PEG-N-2573-20_136	101	10	87.3 \pm 4.9	85.0 \pm 6.6
		100	70.6 \pm 1.9**	69.1 \pm 0.4*
PEG-N-2573-20_745	218	100	62.6 \pm 3.4**	68.5 \pm 0.4*
PEG-N-2573-20_746	219	100	68.2 \pm 1.0**	79.8 \pm 2.9*
PEG-N-2573-20_772	221	100	85.7 \pm 3.3*	89.0 \pm 8.0
PEG-N-2573-20_773	222	100	67.8 \pm 1.2**	72.1 \pm 1.6*
PEG-N-2573-20_780	224	100	67.1 \pm 3.2**	75.6 \pm 2.1*
PEG-N-2573-20_834	232	100	84.9 \pm 4.6	88.8 \pm 8.6
PEG-N-2573-20_835	233	100	80.5 \pm 3.0*	79.9 \pm 3.4*
PEG-N-2573-20_836	234	100	67.6 \pm 2.5**	77.6 \pm 2.8*
PEG-N-2573-20_837	235	100	71.4 \pm 2.5**	84.6 \pm 2.8
PEG-N-2573-20_838	236	100	76.2 \pm 2.0**	84.2 \pm 6.1
PEG-N-2574-49_260	400	100	76.3 \pm 3.8*	72.4 \pm 1.6*

10

20

【0203】

実施例 13 : IL-6 に結合したアプタマー 2573-20__136 (配列番号 101) の結晶構造

全長 IL-6 (配列番号 9) は、29 アミノ酸の N 末端シグナルペプチド及び up-down-down トポロジーで配置された 4 つのヘリックスバンドルを含む 212 アミノ酸で構成される (Somers et al., EMBO J. 1997: 989-997)。ヘリックスは、歴史的に N 末端から C 末端へと A~D とされ、ヘリックスを接続する長いループを有し、1 つのヘリックス当たり 20~25 の残基を含む。N 末端の 20 残基は何らの二次構造も採用せず、この可動性ループの最後の 7 残基のみが結晶構造中にはっきりと認められる。また、4 つのヘリックスバンドルタンパク質の長鎖ファミリーにおける共通の特徴である、ヘリックス C とヘリックス D の間の長いループに存在する 11 残基 (アミノ酸 141~152) の第 5 の短いヘリックスがある (Mott, H. R. and Campbell, I. D., Current Opinion in Str. Bio., 1995. 5: 114-121)。この短いヘリックスに従い、C-D ループの残存する残基 (アミノ酸 131~140) は無秩序化され、結晶構造中に見ることができない。同様に、長い A-B ループ (アミノ酸 43~79) は、17 の欠損した残基 (アミノ酸 44~60) を含む。本発明者らの結晶化研究で使用したフォームは、全長ヒト IL-6 に基づいてアミノ酸残基 30~212 を含む。

30

40

【0204】

結晶化研究のため、本発明者らは以下に示される SOMAmer 2573-20__136 (配列番号 101) :

5' - G₁G₂C₃A₄G₅G₆Z₇Z₈E₉G₁₀G₁₁P₁₂A₁₃Z₁₄Z₁₅A₁₆A₁₇C₁₈A₁₉C₂₀G₂₁Z₂₂Z₂₃A₂₄A₂₅G₂₆Z₂₇C₂₈G₂₉Z₃₀G₃₁G₃₂-3' (配列番号 101) ;

(式中、Z は Bn-dU、E は PE-dU、P は Nap-dU、及びヌクレオチド 3、6、16、19、20、及び 28 は 2'-OMe 修飾を含む) を使用した。表 10 を参照されたい。

50

【0205】

本発明者らは、SOMAmer 2573-20_136 (配列番号101) に結合したヒトIL-6タンパク質の2つの結晶構造(フォーム1及びフォーム2と呼ぶ)(番号は成熟形態に基づく)を得た。フォーム1は2.40 Åまで解かれ、1つの非対称単位当たり1つのIL-6分子及び1つのSOMAmer分子を含有した。フォーム2は2.55 Åまで解かれ、1つの非対称単位当たり2分子のIL-6(鎖A及び鎖C)及び2分子のSOMAmer(鎖B及び鎖D)を含有した。2つの構造は全体に非常に類似し、空間群P32とすることができた。フォーム1複合体を、0.431 Åの平均二乗偏差(RMSD)で898原子に及ぶ鎖A(IL-6)及び鎖B(SOMAmer)、並びに0.456 ÅのRMSDで945原子に及ぶ鎖C(IL-6)及び鎖D(SOMAmer)を有するフォーム2に由来する両方の複合体と共に重ねる。同様に、フォーム2の2つのSOMAmer分子は、655原子に亘って0.537 ÅのRMSDで良好に配列する。フォーム1及びフォーム2のいずれの構造もIL-6の非切断型N末端の最初の13~15残基、また同じくヘリックスを接続するループ領域及びC末端(フォーム1においてアミノ酸130~135、及びフォーム2においてアミノ酸135~140)の残基を欠く。更に、SOMAmerのヌクレオチド19及び20はフォーム1で欠如しているが、フォーム2において解かれる。フォーム1及びフォーム2の構造がほぼ同じであることから、ここに報告される分析の大部分をフォーム2の完全なIL-6:SOMAmer構造、具体的には鎖A及び鎖Bを使用して行った。鎖A(IL-6)及び鎖B(SOMAmer)で構成されるIL-6:SOMAmerを図11に示す。SOMAmerは、IL-6の4つのヘリックスバンドルのN末端極及びC末端極と相互作用し、ヘリックスの長軸に対して垂直にタンパク質の周りを取り囲む。SOMAmer結合構造におけるIL-6の立体配座は、IL-6/IL-6R/gp130六量体構造、PDB ID 1P9Mで観察されたものと本質的に同じである(Boulangier, M. J., et al., Science, 2003, 300: 2101-2104)。832原子に亘り0.717 ÅのRMSDでこれら2つのIL-6構造を重ねることができる。図12を参照されたい。

10

20

【0206】

SOMAmer内の立体配座の優先性に関して、全ての塩基は、シン配座である2'-O-メチルC28、G1、G5、G10及びG31を除いてアンチヌクレオシド配座である。ほとんどのリボースはC2'-エンド配座(18/32)であり、残りは、C1'-エクソ配座(6/32)、C3'-エクソ配座(3/32)、C3'-エンド(2/32)、O4'-エンド配座(2/32)及びC4'-エクソ配座(1/32)である。下記表8を参照されたい。全ての修飾塩基は、シス配座であるBn-dU22を除いてトランス配座である。

30

【0207】

【表 8】

表 8 : SOMAmer リボース立体配座

バックカー	残基	バックカー	残基
C2'-エンド	G1	C2'-エンド	A17
C1'-エクソ	G2	C3'-エンド	C18
C3'-エンド	C3	C3'-エクソ	A19
C2'-エンド	A4	C2'-エンド	C20
C3'-エクソ	G5	C2'-エンド	G21
C2'-エンド	G6	O4'-エンド	Z22
C3'-エクソ	Z7	C4'-エクソ	Z23
C2'-エンド	Z8	C2'-エンド	A24
C2'-エンド	E9	C2'-エンド	A25
C2'-エンド	G10	C2'-エンド	G26
C2'-エンド	G11	C1'-エクソ	Z27
C2'-エンド	P12	C2'-エンド	C28
C1'-エクソ	A13	C2'-エンド	G29
O4'-エンド	Z14	C1'-エクソ	Z30
C1'-エクソ	Z15	C2'-エンド	G31
C2'-エンド	A16	C1'-エクソ	G32

10

20

【0208】

SOMAmer は、IL-6 の N 末端 - ヘリックス (ヘリックス A) において本質的に分裂した、IL-6 のヘリックス A 及びもう一つのヘリックスと相互作用する各 SOMAmer ドメインを有する、2 つの構造的に異なるドメインへと分割され得る。図 1 1 を参照されたい。ドメイン 1 は、ヌクレオチド 1 ~ 12 及び 29 ~ 32 を含み、2 つの G 四分子、また 5' 末端及び 3' 末端で構成される G - カルテットモチーフを含む。ドメイン 2 は、ヌクレオチド 13 ~ 28 で構成されるステムループモチーフを採用する。図 1 3 を参照されたい。

【0209】

ドメイン 1 : G - カルテット

30

ドメイン 1 にはワトソン - クリック塩基対は存在せず、構造一体性の大部分が G - カルテットに由来する。各 G 四分子は、四分子の平面に位置するナトリウムイオンによって配位される。四分子 1 は G 1、G 6、G 10 及び G 32 を含むのに対し、四分子 2 は G 2、G 5、G 11 及び G 31 を含む。図 1 4 A を参照されたい。各 G - カルテットは、シン配座における 2 つの塩基及びアンチ配座における 2 つの塩基を含む。これは、各グアノシン塩基が、ワトソン - クリック面、また同様にフーグスティーン面の隣接するグアノシンと 2 つの水素結合を作ることを可能とする。その後、ナトリウムイオンは C 6 上のカルボニル酸素により配位される。

【0210】

G - カルテットは、鎖の配向性及びグリコシドの立体配座により分類される。SOMAmer G - カルテットにおける鎖は、「up-down-up-down」に走って、3 つの側面またはエッジワイズのループを有するアンチパラレル G 四分子コアを形成する。図 1 4 B を参照されたい。連続する G - 四重鎖を有する 3 つのループに関する 26 の可能性のあるトポロジーのうち、わずか 6 つが実験的に特定された。この特異的なトポロジーは、以前にトロンピン結合 DNA アプタマーにおいて見られた (Macaya, R. F., et al., PNAS, 1993, 90(8): 3745-3749)。

40

【0211】

G - カルテットドメインには 5 つの修飾塩基が存在し、そのうち 4 つはタンパク質と接触する疎水性表面を形成する。この疎水性ポケットは、一連の - スタッキング相互作用を作る方式で G - カルテットの全体的なスキャフォールドにより互いに近接される B n - d

50

U7、Bn-dU8、Nap-dU12及びBn-dU30の残基に由来する側鎖の不連続なクラスターとして作られる。図14Cを参照されたい。Bn-dU8ウリジン環はNap12とのπ-スタッキング相互作用を形成するのに対し、Bn8はNap-dU12及びBn-dU7のウリジン環の間に挟まれて更なるπ-スタッキング相互作用を形成する。また、Bn8は、共にedge-to-faceπ-スタッキング相互作用を形成するBn7、Nap12及びBn30により囲まれる。或る意味で、Bn-dU8ヌクレオチドは、2つの塩基と同じく3つの他の修飾ヌクレオチド側鎖を同時に関与させる疎水性クラスターのコアとしてはたらくようである。ドメイン2に隣接するG29は、G-カルテットのG11と順に積層するBn-dU30の塩基と積層する。このドメイン中の残りの修飾ヌクレオチドであるPE-dU9はタンパク質と相互作用せずに、G-カルテットの下に挟み込まれ、ウリジン環はG32と積層して、修飾側鎖PE9を溶媒へと突き出す。図14Dを参照されたい。概して、ドメイン1のB因子は、ドメイン2のものよりもはるかに低く、G-カルテットはSOMAmer構造のこの半分に対して剛性を提供する可能性が高い(データは示されていない)

【0212】

ドメイン1におけるIL-6：SOMAmer相互作用

IL-6タンパク質上の7つの残基は、SOMAmerのドメイン1と分子間接触を有する。N末端テイルにおいて、R16は、G29に対してフーグスティーン面で水素結合する。図15Aを参照されたい。更に、R16はアルギニンメチレン側鎖に対して積層するBn30と疎水性接触を有する。疎水性分子間力は、表面のアミノ酸のメチレン側鎖と相互作用する修飾ヌクレオチドのこの繰り返される主題からわかるように、タンパク質-DNA相互作用において重要な役割を果たす。IL-6タンパク質のN末端テイルは、DNAの異常な湾曲によって造り出されるポケットに位置し、DNA骨格の間に挟まれて溶媒からBn7、Bn8、Nap12及びBn30の疎水性クラスターを保護する。図15Bを参照されたい。リン酸基が互いに近接し、修飾塩基が溶媒から離れるように溶媒に向けられてタンパク質様の疎水性コアを形成するようにSOMAmer骨格の不定型の湾曲を歪めて、共にクラスター化する。IL-6ヘリックスAのN末端のR24と、G5とG6の間のSOMAmer骨格リン酸との間の塩橋は、疎水性ヌクレオチドに対して溶媒からの更なる保護を与える。図15Cを参照されたい。7位、8位、12位、及び30位で構成される修飾ヌクレオチドクラスターは、明らかにSOMAmerそれ自体、また同じくタンパク質と接触する疎水性表面に対して分子内構造の土台の二重機能を果たす。Bn8及びBn-dU7の塩基も含むπ-スタッキング相互作用のストリングに第4の方向感を付加するNap-dU12のウリジン環の頂部においてIL-6ヘリックスA上でY31が積層する。図15Dを参照されたい。Nap-dU12のアミドアームは、Bn-dU8のウリジン環のπ-スタッキング相互作用に加えて、ナフチル基がM117のメチレン側鎖と疎水性相互作用を有する、IL-6上のヘリックスCに手を伸ばす。図15B及び図14Cを参照されたい。更に、Bn7はR24の側鎖に対して積層し、K27とのエッジワイズ相互作用及び、R30に対するアミドリナーのカルボニル酸素による水素結合を有する。また、Bn7及びBn8は、ヘリックスC上のF125とのedge-to-face相互作用に関与する。図15Fを参照されたい。

【0213】

ドメイン2：ステムループ

SOMAmerのドメイン2は、主にB型DNAであるがループ領域においてわずかに左側に捻れたステムループを含む。3'末端上のステムの底に2つの非対塩基、Bn-dU27及びC28が存在する。形式上はドメイン2に指定されたが、これら2つの非対塩基を、当該ステムの5'末端上のG26及びA13に沿って、2つのドメイン間の可動性ヒンジとして考えることができる。Bn-dU27のG26及びウリジン環は、Bn-dU27(Bn27)ベンジル基が完全に溶媒に暴露される間、弱いスタッキング相互作用を有する。図16Aを参照されたい。同様に、C28は、分子内または分子間の接触を生じず、また溶媒中へと突出される。これら2つの非対塩基に続いて、G26とA13との

10

20

30

40

50

間でsheared型G-A塩基対(シアー: 6.2 ; バックル: -34° ; プロペラ: -11°)、並びにBn-dU14とA25、Bn-dU15とA24、及びA16とBn-dU23、並びにB型ヘリックス立体配座を採用するA17とBn-dU22との間の4つのワトソクリック塩基対が存在する。図16Bを参照されたい。また、ワトソクリック塩基対は、-14°の平均バックリング(標準偏差(s.d.)26)及び-11°の平均プロペラ捻れ(s.d.9.2)を有する理想的なB型角度とは異なる、様々なバックリング及びプロペラ捻れのパラメーターを呈する。上記ステムの上部でC18、A19、C20及びG21とテトラループを形成する。形式上は上記テトラループ内で、C18及びG21は、不規則なシアリング(1.1)、ストレッチング(3.4)、スタグガー(1.4)、バックリング(32°)、プロペラ(-52°)、及び開口(-61°)のパラメーターを有する2つの伸縮H結合(3.5及び3.8)を特徴とする実質的に捻れた塩基対を形成する。H結合がC18のワトソクリック面とG21のフーグスティーン末端との間で形成されるのに対し、G21のワトソクリック面は、対称合致のC20との結晶コンタクトに関与している。更に、G21のシン配座は、A17:Bn-dU21とG18:G21塩基対との間で幾分左撚り(-18°)を生じる。G21塩基はステムにおいてBn-dU22と共に積層されるが、C18、A19及びC20はいずれの分子内接触及び分子間接触にも関与しない。C20塩基は部分的に溶媒中へと突出されるのに対し、A19は完全に溶媒に露出される。図16Cを参照されたい。

【0214】

ドメイン2ステムループ構造は、14位、15位、22位、23位及び27位に5つの修飾ベンジルヌクレオチドを含む。これらのうち、ヒンジ領域におけるBn-dU27のみがタンパク質と接触しない。残りの修飾ヌクレオチドは全てウリジン環による塩基対合に参加するのに対し、ベンジル基はヘリックスの外、タンパク質へと向けられる。ベンジルの非スタッキングのクラスター化配置によりBn22、Bn23及びBn15から疎水性ポケットが作られる。図16Dを参照されたい。Bn14のウリジン環は、Bn15のアミドと共に積層し、ベンジル基はBn22、Bn23及びBn15のベンジルクラスターから離れるが、IL-6タンパク質を向く。図16Eを参照されたい。Bn-dU14ヌクレオチドは、ドメイン1とドメイン2のタンパク質相互作用を仲立ちするが、疎水性クラスターのいずれにも参加しない。

【0215】

ドメイン2におけるIL-6:SOMAmer相互作用

SOMAmerのドメイン2とのIL-6の相互作用の大半は、本質的に疎水性である。Bn15、Bn22及びBn23のベンジル基は、側鎖の非極性部分のヘリックスA上のR30、L33及びD34、並びにヘリックスD上のQ175、L178、及びR179によって作り出された疎水性ポケットにおいてIL-6上のヘリックスに寄りそう。図17Aを参照されたい。疎水性クラスターの外側にあるBn14のベンジル基は、Y31とのedge-to-face相互作用を有し、K27及びR30のメチレン側鎖とのエッジワイズ相互作用を有する。図17Bを参照されたい。また、A13リン酸とK27との間及びBn-dU14リン酸とR30との間のこのドメインに2つの塩架橋が存在し、いずれのアミノ酸残基もヘリックスAに由来する。図17Cを参照されたい。全てのIL-6:SOMAmer相互作用の完全な一覧を表9に要約する。IL-6タンパク質について算出された溶媒露出面積(S.A.S)は8696²であり、SOMAmerについて6672²であり、複合体について12872²である。界面の溶媒除外面積は、したがって、1248²であり、[(S.A.S_{IL-6} + S.A.S_{SOMAmer}) - S.A.S_{複合体}] / 2として算出される。この値は、以前報告された1225²のPDGF-BB SOMAmerの除外面積に類似する(Davies et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. 109: 19971-19976)。

【0216】

【表 9】

表 9 : タンパク質-SOMAmer 相互作用

タンパク質-SOMAmer 相互作用		
塩橋		
1.	G 5~G 6におけるリン酸SOMAmer骨格に対するArg 2 4	
2.	Z 1 4におけるリン酸SOMAmer骨格に対するArg 3 0	
3.	A 1 3におけるリン酸SOMAmer骨格に対するLys 2 7	
水素結合		
1.	Arg 1 6に対するG 2 9フーグスティーン面	
2.	Arg 3 0に対するBndU 7カルボニル	
疎水性相互作用		
1.	BndU 7	Arg 2 4のメチレン側鎖 Lys 2 7のメチレン側鎖 Phe 1 2 5を有するedge-to-face
2.	BndU 8	Phe 1 2 5を有するedge-to-face
3.	NapdU 1 2	Tyr 3 1を有するウリジン積層 Met 1 1 7のメチレン側鎖に対するベンジル
4.	BndU 1 4	Lys 2 7のメチレン側鎖 Arg 3 0のメチレン側鎖 Tyr 3 1を有するedge-to-face
5.	BndU 1 5	Arg 3 0のメチレン側鎖 Leu 1 7 8のメチレン側鎖
6.	BndU 2 2	Gln 1 7 5のメチレン側鎖 Leu 1 7 8のメチレン側鎖 Arg 1 7 9のメチレン側鎖
7.	BndU 2 3	Arg 3 0のメチレン側鎖 Asp 3 4のメチレン側鎖
8.	BndU 3 0	Arg 1 6のメチレン側鎖

【 0 2 1 7】

受容体模倣

SOMAmerにより関与されるIL-6上の結合面は、その2つの細胞表面受容体IL-6R及びgp130へのIL-6結合に関与する領域と広範囲に重複する。SOMAmerのドメイン1は、gp130への結合に広範囲に関与する結合部位を占有するのに対し、ドメイン2はIL-6Rに対する結合部位を占有する。図18A及び図18Bを参照されたい。SOMAmerが、受容体に似た方式でIL-6を関与させる程度は、結合表面の全体的な重複を考慮する場合に部分的に明らかであるに過ぎない。具体的な相互作用の判断は、より大きな程度の受容体模倣を説明する。

【 0 2 1 8】

IL-6R 受容体及びシグナリング受容体gp130に結合したIL-6の六量体構

10

20

30

40

50

造は、タンパク質 - タンパク質相互作用に關与する I L - 6 上の 3 つの表面を同定した (B o u l a n g e r , M . J . , e t a l . , S c i e n c e . 2 0 0 3 . 3 0 0 : p 2 1 0 1 - 2 1 0 4) 。部位 I はヘリックス A 及び D からなり、これらは I L - 6 R と相互作用して約 1200^2 埋まれる。この界面における I L - 6 R 上の主要な残基は F 2 2 9 及び F 2 7 9 である。F 2 2 9 は、I L - 6 のヘリックス D 上の R 1 7 9 及び Q 1 8 3 のメチレン側鎖とエッジワイズ相互作用を有する。また、F 2 7 9 も反対面の R 1 7 9 のメチレン側鎖と相互作用し、ヘリックス D 上の R 1 7 9、Q 1 7 5、L 1 7 8、並びにヘリックス A 上の L 3 3 及び R 3 0 の非極性側鎖により作られる疎水性ポケットに位置する。これは、S O M A m e r 構造のドメイン 1 内の B n 2 2 によって占有される疎水性ポケットと同じであり、唯一の違いは、F 2 7 9 と比較して B n 2 2 のベンジル基の約 7 0 の回転である。図 1 9 A を参照されたい。F 2 2 9 と同じ I L - 6 の表面上で相互作用する S O M A m e r 中のヌクレオチドは存在しない。

【 0 2 1 9 】

I L - 6 / I L - 6 R ヘテロ二量体は、最初に形成される複合体であり、その後、I L - 6 及び I L - 6 R の I I a / b 部位にそれぞれ g p 1 3 0 が結合する。また、I I a 部位も約 1200^2 埋まり、I L - 6 のヘリックス A 及びヘリックス C を含む。g p 1 3 0 上の残基 F 1 6 9 は、L 1 9、R 2 4、K 2 7、及び Y 3 1 を含むヘリックス A 上の表面と相互作用し、主に非極性側鎖と疎水性相互作用する。これらは、I L - 6 に対する S O M A m e r 結合に關与するのと多くが同じ残基である。更に、F 1 6 9 は、I L - 6 - S O M A m e r 構造中の B n 7、B n 8 及び N a p 1 2 と同じ I L - 6 / I L - 6 R / g p 1 3 0 構造における同結合ポケットを占有する。図 1 9 B を参照されたい。I L - 6 : S O M A m e r 構造中の G 6 と B n - d U 7 の間の S O M A m e r 骨格は、六量体構造中の g p 1 3 0 上の W 1 4 2 との同じ部位を占有する。図 1 9 C を参照されたい。W 1 4 2 は、I L - 6 の F 1 2 5 と e d g e - t o - f a c e 相互作用を有し、また、ヘリックス C 上の Q 1 2 4 及び K 1 2 8 の非極性側鎖と疎水性相互作用を有する。図 1 9 C を参照されたい。六量体構造中の第 2 の g p 1 3 0 分子は、4 つのヘリックスバンドルの反対極に位置する I L - 6 上の I I I 部位に結合し、S O M A m e r と重複する結合部位は含まない。S O M A m e r 及び受容体により關与される I L - 6 上の表面の広範囲な重複は、I L - 6 により媒介される効果を阻害する S O M A m e r の觀察された能力と一致する。

【 0 2 2 0 】

G - カルテットドメインフラグメントの活性及びその S E L E X 後修飾

S O M A m e r において觀察された 2 つのドメインが独立した結合単位であるのかどうかを特定するため、本発明者らはドメイン 1 及びドメイン 2 の幾つかの変異体を合成した。ステムループドメインの様々な形態を表すフラグメントは、 $1 \mu\text{M}$ 以下のタンパク質濃度では I L - 6 に対して明らかな結合親和性を示さなかった (データは示されていない) 。対照的に、2 つの配列領域を接続する C 3 スペーサーを含み 1 位 ~ 1 2 位及び 2 9 位 ~ 3 2 位で構成される G - カルテットドメインを含むフラグメント (2 5 7 3 - 2 0 _ 3 2 4 (配列番号 3 1 9)) は、およそ 200 nM の I L - 6 に対する結合親和性を呈した。この 1 6 ヌクレオチドフラグメントは G - カルテットドメイン全体に相当し、C 3 スペーサーは全長 S O M A m e r における G - カルテットの 2 つの領域を接続するステムループドメインを置き換える。この G - カルテットフラグメントの結合親和性は、全長 S O M A m e r に比べて約 1 0 0 0 倍低い。それにもかかわらず、全長 S O M A m e r について -13.7 kcal/mol であり、G - カルテットフラグメントについて -9.5 kcal/mol である、結合エネルギー、G に関して、G - カルテットドメインは、全長 S O M A m e r の全体的な結合親和性に主に寄与するようである。G - カルテットフラグメントの配列スクランブル類縁体は、 $1 \mu\text{M}$ の I L - 6 まで結合を示さなかった。

【 0 2 2 1 】

かなりの割合の結合親和性を維持することを除いて、G カルテットフラグメントは、上記の遺伝子レポーターアッセイにおいて、*in vitro* での I L - 6 が媒介する効果

10

20

30

40

50

を阻害する能力も維持する。

【0222】

2573 - 20__324 (配列番号319)により開始して、本発明者らは、5つの修飾ヌクレオチドの各々を代替の5位置換の収集物により置換することの効果进行调查した。5つの修飾dU残基の各々において導入された15の代替5位置換の効果を図22に要約し、図中、参照(親)配列からの親和性の変化は解離定数の比(参照リガンド2573 - 20__324 (配列番号319)の K_d 値で除した変異体の K_d 値)として表される。一組の15の代替部分のうち、Gカルテットフラグメントの5つの修飾ヌクレオチド位置は置換に対するそれらの感受性に依りて変化する。9位は置換に対して最も耐容性であり、15の置換のうち13が本質的に中立であり、結合親和性に対する2倍未満の効果を示す。9位の修飾ヌクレオチド側鎖はタンパク質と接触しておらず、代わりに溶媒に露出されているという事実を考慮すると、これは予想外である。しかしながら、8位及び12位では、ほとんどの置換は幾分不利であり、いずれも親和性の改善をもたらさなかった(3573 - 20 (配列番号7)に対して2573 - 20__324 (配列番号319)において12位は既にベンジルからナフチルへと変更されている)。また、これは、約6倍の親和性の改善をもたらす、より小さなイソブチル基によるベンジル基の置き換えを除いて、30位でも同様である。対照的に、7位は修飾に幾分感受性であり、有利及び不利な方向の両方において著しい親和性の変化が観察される。非芳香族側鎖による芳香族ベンジル基の置き換えは、一般的には7位では好ましくなく、100倍超の親和性の減少をもたらす。一方、より大きな芳香族官能基による置き換えは、親和性の改善をもたらす。一つのかかる置換(MBn - dU)により、100倍の親和性の改善が観察される。絶対親和性に関して、これは K_d 値1nMに換算される。また、結合親和性の改善は、*in vitro*での阻害活性の20倍の改善に反映される。

10

20

【0223】

実施例14. 結合コンセンサスを決定するためのSELEXプールの分析

2573 - 20 SOMAmerファミリー及び2574 - 49 SOMAmerファミリー内の配列をより完全に評価するため、実施例4に記載される454のピロシーケンシング技術を使用して濃縮プールをシーケンシングした。

【0224】

その後、配列を分析して2573 - 20__136 (配列番号101)におけるモチーフに類似のGカルテットモチーフを有する更なるIL - 6結合SOMAmerを同定した。Gカルテットモチーフを有すると思われる幾つかの特有のSOMAmerを同定し、これらの多くは複数のコピーで最終SELEXプール中に存在した。図23は、最終SELEXプール中の1600を超えるクローンを表す、Gカルテットモチーフを有すると思われる特有のSOMAmer配列の例を示す。各SOMAmerについて、ランダム領域の配列のみを示す。

30

【0225】

図25は、2574 - 49に類似の特有のSOMAmer配列の例を示す。各SOMAmerについて、ランダム領域の配列のみを示す。

【0226】

実施例15. コラーゲン誘発関節炎を有するカニクイザルにおける関節の炎症に対するSOMAmer 2573 - 20__136 (配列番号101)の効果

IL - 6は、関節リウマチと関連する炎症反応の主なメディエーターである。コラーゲン誘発関節炎(CIA)は、カニクイザルにおいて関節リウマチを研究するための確立された自己免疫モデルである。関節の炎症の重症度に対するPEG - N - 2573 - 20__136 (5'末端に結合された40kDaのPEGを有する2573 - 20__136 (配列番号101))の効果はこのモデルにおいて評価した。

40

【0227】

3歳~5歳の雌カニクイザル(Macaca fascicularis)をGuanxi Grandforest Scientific Primate Compa

50

ny, Ltd (中国、広西)から購入した。動物に関する全ての手順は、研究所の実験動物委員会により承認された。ウシII型コラーゲン(日本、東京のCollagen Research CenterのK41S II型コラーゲン4mg/mL)及びフロイント完全アジュバント(米国ジョージア州グレイソンのBecton Dickinson)を等比率で混合し、冷却したシリンジを使用して懸濁し、乳状液を調製した。乳状液を背部の19の部位、及び尾の付け根の1部位に皮内注射した(合計2mL/体)。第1の感作の21日後に2mLの乳状液を再度投与した。第2の感作を第1の感作と同じ方式で行った。PEG-N-2573-20__136(5'末端に結合された40kDaのPEGを有する2573-20__136(配列番号101))(1mg/mL/kgまたは10mg/mL/kg)を、第1の感作後、前腕橈側皮静脈に1日当たり4回、11日半の間注射した(合計46注射)。対照群にPEG-N-2573-20__136の投薬溶液に使用したビヒクルを同じ方式で投与した(1mL/kg)。

10

【0228】

第1感作の6日前、及び6日後、13日後、20日後、27日後及び34日後、関節炎スコア(関節の腫脹及び硬さ)を全てのカニクイザルについて評価した。調査した関節として、中手指、近位指節間、遠位指節間、手首、足首、肘、及び膝(合計64関節/体)が挙げられる。塩酸ケタミン(Kamud Drugs Pvt., Ltd., 0.2mL/kg、10mg/kg)の筋肉内注射により麻酔した後、以下に示される腫脹及び硬さに関する評価基準に従って調査を行った:スコア0:異常なし、スコア1:腫脹は可視的ではないが、触れると特定され得る、スコア2:腫脹はわずかに可視的であり、触れると確認され得る、スコア3:腫脹は目視で明らかであり、関節を完全に曲げられる、スコア4:腫脹は目視で明らかであるが、関節は完全には曲げられない、スコア5:関節が硬い。各動物の関節炎スコアは、64の関節の個々のスコアの合計であった。関節炎スコアを指定した技術者によって盲検法で判定した。

20

【0229】

関節炎スコアの結果を図26に解説する。各バーは、各群における関節スコアの平均±標準誤差(N=4)を意味する。反復測定ANOVAの後のDunnett検定(P<0.05対0mg/kg/時間群)により、PEG-N-2573-20__136(5'末端に結合された40kDaのPEGを有する2573-20__136(配列番号101))の10mg/kg/時間群において、統計学的に有意な減少が注目された。

30

【0230】

実施例16.ヌクレアーゼ安定性及びアンタゴニスト活性を改善するための2573-20__136(配列番号101)の更なる修飾

或る例では、ヌクレアーゼ保護は、2'-O-メチル、2'-フルオロ、及びホスホロチオエート(PS)結合によって達成され得る。2'-O-メチルU、ホスホロチオエート、C3-スパーサー、及びHEGの置換の組合せを有する2573-20__136(配列番号101)の変異体を親和性及び阻害活性についてスクリーニングし、更なる活性なIL-6阻害剤を同定した。また、代替のU修飾を特定の位置で試験した。図24を参照されたい。表10は、 10^{-11} M~ 10^{-8} Mの範囲のIC₅₀を有することがわかった変異体の一覧を示す。SOMAmer 2573-20__745(配列番号218)は、全ての位置において(18 2'-O-メチル、12ホスホロチオエート、及びdA19及びdC20を置換するHEG)保護骨格の置換を有し、IL-6アンタゴニスト活性(遺伝子レポーターアッセイにおいてIC₅₀= 4×10^{-9} M)を保持する。表11は、 10^{-8} Mよりも大きいIC₅₀を有することがわかった変異体の一覧を示す。

40

【0231】

【表 10】

表 10. $10^{-11}M \sim 10^{-8}M$ の範囲の IC_{50} を有する 2573-20__136 (配列番号 101) の変異体

アプタマー	配列	IC_{50} (M)	配列番号	
2573-20_135	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Bn-G-G-Bn-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	2.4E-10	100	
2573-20_136	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.0E-10	101	
2573-20_137	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Bn-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.0E-10	573	10
2573-20_197	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-C3-C ¹ -G-Bn-G-G	6.5E-10	102	
2573-20_198	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.2E-10	103	
2573-20_199	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C3-G-Bn-G-G	2.7E-10	104	
2573-20_200	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-C3-C3-G-Bn-G-G	5.5E-10	105	20
2573-20_202	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Heg-G-Bn-G-G	6.9E-10	106	
2573-20_203	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- Heg-G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	2.2E-10	107	
2573-20_204	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	4.9E-10	108	
2573-20_205	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C3 -C3-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.1E-10	109	
2573-20_208	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- Heg-BT-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.1E-10	110	30
2573-20_209	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- Heg-MBn-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.5E-10	111	
2573-20_210	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- Heg-NE-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	6.1E-10	112	
2573-20_217	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.6E-10	113	
2573-20_235	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Pe-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	4.1E-10	114	
2573-20_258	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -U ¹ -Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1.5E-10	115	40
2573-20_259	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-U ¹ -Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	4.2E-09	116	
2573-20_263	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-U ¹ -A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1.4E-09	117	

【 0 2 3 2 】

2573-20_264	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-U ¹ -Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1.5E-09	118	
2573-20_265	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-U ¹ -A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1.6E-09	119	
2573-20_268	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.9E-09	120	
2573-20_273	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	5.6E-10	121	
2573-20_274	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Bn-Tyr-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.7E-09	122	10
2573-20_278	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-FBn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	4.4E-10	123	
2573-20_280	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-FBn-Tyr-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	3.4E-10	124	
2573-20_282	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.2E-11	125	
2573-20_283	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-H eg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.1E-11	126	
2573-20_284	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-H eg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	8.9E-11	127	20
2573-20_285	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-H eg-G-FBn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	2.2E-09	128	
2573-20_286	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-H eg-G-Bn-Tyr-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	3.8E-10	129	
2573-20_287	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-H eg-G-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	3.9E-10	130	
2573-20_288	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-H eg-G-FBn-Tyr-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	6.0E-10	131	30
2573-20_289	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	1.1E-10	132	
2573-20_290	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	6.9E-10	133	
2573-20_291	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	6.8E-11	134	
2573-20_292	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-H eg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	1.4E-09	135	
2573-20_293	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	1.1E-09	136	40
2573-20_297	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Heg-G-Bn-G-G	5.1E-09	137	
2573-20_300	G ⁰ -G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	7.4E-09	138	

2573-20_301	G-G ⁰ -C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	4. 1E-09	139	
2573-20_304	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G ⁰ -Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1. 3E-09	140	
2573-20_305	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G ⁰ -Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	4. 3E-09	141	
2573-20_306	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G ⁰ -Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	2. 6E-09	142	
2573-20_307	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G ⁰ -Bn-G-G	4. 2E-09	143	10
2573-20_309	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G ⁰	2. 0E-09	144	
2573-20_310	G-G-C ¹ -A ⁰ -G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	2. 6E-09	145	
2573-20_311	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A ⁰ -Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5. 1E-09	146	
2573-20_312	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	8. 3E-10	147	
2573-20_313	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1. 3E-09	148	20
2573-20_314	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ⁰ - A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	3. 9E-10	149	
2573-20_334	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Tyr-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1. 9E-09	150	
2573-20_337	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	4. 3E-09	151	
2573-20_340	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -He g-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	5. 8E-10	152	
2573-20_341	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Tyr-Bn-A ¹ -A ¹ -G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1. 4E-09	153	30
2573-20_348	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C3-G-Bn-G-G	6. 1E-09	154	
2573-20_351	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G ¹	2. 4E-09	155	
2573-20_354	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	2. 4E-09	156	
2573-20_355	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	3. 7E-09	157	40
2573-20_359	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1. 4E-09	158	
2573-20_362	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Tyr-Tyr-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	5. 7E-10	159	

2573-20_363	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	6.9E-10	160	
2573-20_364	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Tyr-G-G	8.0E-10	161	
2573-20_365	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -He g-Tyr-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	7.8E-11	162	
2573-20_366	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -He g-Tyr-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Tyr-G-G ¹	1.8E-10	163	
2573-20_367	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -He g-Tyr-Tyr-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	9.0E-11	164	10
2573-20_368	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Tyr-A ¹ -A ¹ -H eg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Tyr-G-G ¹	2.9E-10	165	
2573-20_369	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -He g-Tyr-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	3.1E-10	166	
2573-20_370	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Tyr-A ¹ -A ¹ -H eg-Tyr-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Tyr-G-G ¹	9.0E-09	167	
2573-20_375	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	7.0E-09	168	
2573-20_376	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Tyr-G-G	4.4E-09	169	20
2573-20_377	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C3-G-Bn-G-G ¹	1.8E-10	170	
2573-20_378	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C- A ¹ -C ¹ -G-Tyr-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C3-G-Bn-G-G ¹	7.6E-10	171	
2573-20_379	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Tyr-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C3-G-Bn-G-G ¹	5.2E-10	172	
2573-20_380	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C- A ¹ -C ¹ -G-Tyr-Tyr-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C3-G-Bn-G-G ¹	1.9E-10	173	30
2573-20_381	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Tyr-A ¹ -A ¹ -C- -A ¹ -C ¹ -G-Tyr-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C3-G-Tyr-G-G ¹	2.2E-09	174	
2573-20_382	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C3-G-Bn-G-G ¹	1.3E-09	175	
2573-20_386	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ - Heg-G ¹ -Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	3.9E-10	176	
2573-20_387	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ - Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	3.3E-10	177	
2573-20_388	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C- Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	7.1E-10	178	40
2573-20_389	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ - Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	5.6E-11	179	
2573-20_390	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ - -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	2.6E-10	180	

【 0 2 3 5 】

2573-20_391	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	2.8E-10	181	
2573-20_392	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ - Heg-G-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	8.6E-10	182	
2573-20_393	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-H eg-G ¹ -Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.9E-09	183	
2573-20_394	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ - Heg-G ¹ -Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	2.1E-10	184	
2573-20_395	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	8.6E-11	185	10
2573-20_396	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	4.7E-11	186	
2573-20_399	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -C- A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	3.3E-09	187	
2573-20_407	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -C- Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	2.4E-10	188	
2573-20_408	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ - Heg-G ⁰ -Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	7.2E-10	189	20
2573-20_409	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	3.2E-09	190	
2573-20_410	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	9.8E-10	191	
2573-20_452	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G ² -Bn-G-G	4.1E-10	192	
2573-20_455	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ²	2.6E-10	193	
2573-20_478	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-He g-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn ² -G-G	7.4E-11	194	30
2573-20_489	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Bn ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ -A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	3.6E-09	195	
2573-20_625	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ - Heg-Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.2E-09	196	
2573-20_626	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ - Heg-Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	3.7E-09	197	
2573-20_627	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ - Heg-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.3E-09	198	
2573-20_628	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ - Heg-Bn ¹ -Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	4.1E-09	199	40
2573-20_629	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ - Heg-Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.5E-09	200	
2573-20_630	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Bn ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -Heg-Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.4E-09	201	

2573-20_633	$G^2-G^2-C^1-A^1-G^2-G^1-Bn^2-Bn^2-Bn^2-G-G^2-Nap^2-A^2-Bn^2-Bn^2$ $-A^1-A^1-Heg^2-Bn^2-Bn^1-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G^2-Bn^2-G^2-G^1$	3.0E-09	202	
2573-20_634	$G^2-G^2-C^1-A^1-G^2-G^1-Bn^2-Bn^2-Bn^2-G^2-G^2-Nap^2-A^2-Bn^2-Bn^2$ $-A^1-A^1-Heg^2-Bn^2-Bn^1-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G^2-Bn^2-G^2-G^1$	3.8E-09	203	
2573-20_635	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn^1-A^1-A^1-$ $C^1-Heg-G^1-Bn^1-Bn^1-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn-G-G^1$	5.4E-10	204	
2573-20_636	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn^1-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-$ $C^1-Heg-G^1-Bn^1-Bn^1-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn-G-G^1$	7.0E-09	205	
2573-20_637	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn^1-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn^1-A^1-A^1-$ $C^1-Heg-G^1-Bn-Bn^1-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn-G-G^1$	9.0E-10	206	10
2573-20_638	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn^1-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn^1-A^1-A^1-$ $C^1-Heg-G^1-Bn^1-Bn-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn-G-G^1$	6.6E-10	207	
2573-20_639	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn^1-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn^1-A^1-A^1-$ $C^1-Heg-G^1-Bn^1-Bn^1-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn-G-G^1$	1.3E-09	208	
2573-20_640	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn^1-Bn-Bn^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn^1-A^1-A^1$ $-C^1-Heg-G^1-Bn^1-Bn^1-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn-G-G^1$	2.9E-09	209	
2573-20_643	$G^2-G^2-C^1-A^1-G^2-G^1-Bn^2-Bn^2-Bn^2-G-G^2-Nap^2-A^2-Bn^2-Bn^2$ $-A^1-A^1-C^1-Heg^2-G^1-Bn^2-Bn^1-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G^2-Bn^2-G^2-$ G^1	1.7E-09	210	20
2573-20_644	$G^2-G^2-C^1-A^1-G^2-G^1-Bn^2-Bn^2-Bn^2-G^2-G^2-Nap^2-A^2-Bn^2-Bn^2$ $-A^1-A^1-C^1-Heg^2-G^1-Bn^2-Bn^1-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G^2-Bn^2-G^2-$ G^1	1.2E-09	211	
2573-20_700	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn^1-Bn-Bn^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn^1-A^1-A^1$ $-C^1-Heg-G^1-U^1-Bn^1-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn-G-G^1$	1.0E-08	212	
2573-20_702	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn-Bn-U^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-C^1$ $-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn-G-G^1$	6.8E-09	213	
2573-20_711	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn-Bn-U^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-C^1$ $-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn^2-G^2-G^1$	6.5E-09	214	30
2573-20_719	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-MBn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-$ $C^1-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-Bn-C^1-G-Bn-G-G^1$	6.1E-10	215	
2573-20_720	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-C$ $^1-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-Bn-C^1-G-Ib-G-G^1$	1.2E-09	216	
2573-20_722	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-MBn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-$ $C^1-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-Bn-C^1-G-Ib-G-G^1$	8.3E-09	217	
2573-20_745	$G^2-G^2-C^1-A^1-G^2-G^1-Bn^1-Bn^2-U^1-G^2-G^2-Nap^2-A^2-Bn^2-Bn^1-$ $A^1-A^1-C^1-Heg-G^1-Bn^1-Bn^1-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G^2-Bn^2-G^2-G^1$	4.3E-09	218	40
2573-20_746	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn^1-Bn^2-U^1-G-G-Nap-A-Bn^2-Bn^1-A^1-A^1$ $-C^1-Heg-G^1-Bn^1-Bn^1-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G^2-Bn^2-G^2-G^1$	9.8E-10	219	
2573-20_771	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn-Bn-U^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-C^1$ $-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn-G-G^1$	2.2E-10	220	

【 0 2 3 7 】

2573-20_772	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	5.7E-11	221	
2573-20_773	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Bn ² -G ² -G ¹	1.1E-10	222	
2573-20_779	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn ² -U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A-C ¹ -A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G ² -Bn ² -G ² -G ¹	6.3E-11	223	
2573-20_780	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe ² -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ -A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn ² -A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn ² -G-G	8.7E-11	224	
2573-20_802	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn ² -G-G ¹	1.6E-10	225	10
2573-20_803	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn ² -G-G ¹	2.6E-10	226	
2573-20_804	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn ² -G-G ¹	1.1E-10	227	
2573-20_806	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn ² -G-G	6.3E-10	228	
2573-20_807	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A-C ¹ -A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn ² -G-G	1.2E-09	229	20
2573-20_808	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -A-C ¹ -A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn ² -G-G	2.7E-09	230	
2573-20_809	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe ² -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ -A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn ² -A-A-G-Bn-C ¹ -G ² -Bn ² -G ² -G	1.8E-10	231	
2573-20_834	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -U ¹ -G-G-Nap-A-Bn ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Tyr ² -G ² -G ¹	2.7E-11	232	
2573-20_835	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -U ¹ -G-G-Tyr-A-Bn ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Tyr ² -G ² -G ¹	1.1E-10	233	30
2573-20_836	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -U ¹ -G-G-Tyr-A-Nap ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Tyr ² -G ² -G ¹	4.2E-10	234	
2573-20_837	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -U ¹ -G-G-Nap-A-Nap ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Tyr ² -G ² -G ¹	6.9E-11	235	
2573-20_838	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -U ¹ -G-G-Nap-A-Bn ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Tyr ² -G-G ¹	4.8E-11	236	
2573-20_898	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -U ¹ -G-G-Nap ² -A ² -Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Bn ² -G ² -G ¹	1.6E-10	237	40
2573-20_899	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -U ¹ -G-G-Nap ² -A ² -Bn ² -MOE ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -MOE ¹ -MOE ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -MOE ² -G ² -G ¹	3.3E-09	238	

2573-20_901 G-G-C¹-A²-G-G¹-MBn¹-Bn²-MOE¹-G-G-Nap²-A²-Bn²-MOE¹ 3.1E-09 239
 -A¹-A¹-C¹-Heg-G¹-MOE¹-MOE¹-A¹-A¹-G¹-U¹-C¹-G²-MOE²-
 G²-G¹

上付きなしはデオキシリボースを示す

上付き-oは2'-フルオロを示す

上付き-1は2'-O-メチルを示す

上付き-2はホスホロチオエート- (デオキシリボース) を示す

C3=-3-炭素-リンカー

Heg=-ヘキサエチレン-グリコール-リンカー

Nap=-ナフチル-dU

Pe=-フェネチル-dU

BT=-ベンゾチオフェニル dU

Ib=-イソブチル-dU

2Nap=-2-ナフチル-dU

NE=-ナフチルエチル-dU

MBn=-メチレンジオキシベンジル-dU

Tyr=-チロシル-dU

FBn=-フルオロベンジル-dU

Bn=-ベンジル-dU

Trp=-トリプトタミニル-dU

Th=-チオフェニル dU

2NE=-2-ナフチルエチル-dU

PP=-フェンプロピル-dU

Im=イミダゾリル-dU

Thr=スレオニニル-dU

CHM=シクロヘキシルメチル-dU

Pyr=ピリジル-dU

RTM=R-テトラヒドロフラニル-dU

MOE=モルフォリノエチル

【0239】

10

20

30

【表 1 1】

表 1 1. 10^{-8} Mよりも大きい IC_{50} を有する 2573-20__136 (配列番号101)の変異体

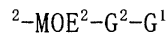
アプタマ —	配列	IC_{50} (M)	配列番 号
2573-20_1 16	— G-G-C-A-G-G-T-T-T-G-G-T-A-T-T-A-A-C- A-C-G-T-T-A-A-G-T-C-G-T-G-G	>1.0E-06	300
2573-20_2 62	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-U ¹ -Bn-A ¹ -A -C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	>1.0E-06	301
2573-20_2 67	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-U ¹ -G-G	4.0E-08	302
2573-20_2 69	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -Heg-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.1E-08	303
2573-20_2 70	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -Heg-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	6.8E-08	304
2573-20_2 71	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	3.6E-08	305
2573-20_2 72	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -Heg-Bn-Tyr-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	3.6E-08	306
2573-20_2 75	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.7E-08	307
2573-20_2 76	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -Heg-Bn-Tyr-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	5.8E-08	308
2573-20_2 77	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -Heg-FBn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	>1.0E-06	309
2573-20_2 79	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -Heg-FBn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	>1.0E-06	310
2573-20_2 81	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -Heg-FBn-Tyr-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	>1.0E-06	311
2573-20_2 94	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -Heg-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	6.7E-08	312
2573-20_2 95	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -Heg-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Heg-G-Bn-G-G	>1.0E-06	313
2573-20_2 96	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -Heg-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Heg-G-Bn-G-G	>1.0E-06	314
2573-20_2 98	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -C-Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Heg-G-Bn-G-G	>1.0E-06	315
2573-20_3 02	G-G-C ¹ -A-G ⁰ -G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ - A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	2.3E-08	316
2573-20_3 03	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G ⁰ -G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ - A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1.6E-08	317
2573-20_3 08	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G ⁰ -G	1.9E-08	318

【 0 2 4 0 】

2573-20_3 24	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-C3-G-Bn-G-G	1. 9E-07	319
2573-20_3 35	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G ¹ -Bn-G-G	5. 1E-08	320
2573-20_3 38	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ - A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1. 6E-08	321
2573-20_3 39	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A ¹ -Bn-Bn-A ¹ - A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	>1. 0E-06	322
2573-20_3 42	G ¹ -G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	1. 1E-08	323
2573-20_3 49	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G ¹ -Bn-G-G	6. 2E-08	324
2573-20_3 52	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	6. 7E-08	325
2573-20_3 56	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -C ¹ -A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	1. 1E-08	326
2573-20_3 61	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G ¹ -G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A -C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-U ¹ -A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	>1. 0E-06	327
2573-20_3 83	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Tyr-A ¹ - A ¹ -C-A ¹ -C ¹ -G-Tyr-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C3-G-Tyr-G-G ¹	>1. 0E-06	328
2573-20_4 88	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Bn ¹ -G ¹ -G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ - A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	3. 4E-08	329
2573-20_6 66	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -U ¹ -Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	8. 3E-08	330
2573-20_6 69	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -U ¹ -U ¹ -A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1. 0E-06	331
2573-20_6 72	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -U ¹ -Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1. 3E-07	332
2573-20_6 75	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -U ¹ -U ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1. 6E-07	333
2573-20_6 97	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -U ¹ -Bn-Bn ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ - A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	5. 2E-07	334
2573-20_6 98	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Bn ¹ -G-G-U ¹ -A-Bn-Bn ¹ -A ¹ - A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1. 1E-07	335
2573-20_6 99	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Bn ¹ -G-G-Nap-A-Bn-U ¹ -A ¹ - A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	4. 6E-08	336
2573-20_7 01	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Bn ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -U ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1. 4E-08	337
2573-20_7 03	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -U ¹ -Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1. 8E-07	338

【 0 2 4 1 】

2573-20_7 04	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-U ¹ -A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ - C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	2. 9E-07	339	
2573-20_7 05	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-U ¹ -A ¹ -A ¹ - -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	2. 6E-07	340	
2573-20_7 06	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -U ¹ -Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	6. 1E-08	341	
2573-20_7 07	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-U ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	9. 4E-08	342	
2573-20_7 18	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -BF-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ - A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -Bn-C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1. 1E-08	343	10
2573-20_7 21	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -BF-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ - A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -Bn-C ¹ -G-Ib-G-G ¹	3. 8E-08	344	
2573-20_7 23	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -BF-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -Bn-C ¹ -G-Bn-G-G ¹	>1. 0E-06	345	
2573-20_7 24	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ - A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -Bn-C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1. 1E-08	346	
2573-20_7 25	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -Bn-C ¹ -G-Ib-G-G ¹	>1. 0E-06	347	20
2573-20_7 26	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -BF-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -Bn-C ¹ -G-Ib-G-G ¹	>1. 0E-06	348	
2573-20_7 27	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ - A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -Bn-C ¹ -G-Ib-G-G ¹	3. 3E-03	349	
2573-20_7 76	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ - A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Bn ² -G ² -G 1	>1. 0E-06	350	
2573-20_8 10	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn ² -Bn ¹ -A ¹ - A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn ² -G-G ¹	1. 8E-08	351	30
2573-20_8 82	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-MOE-A ¹ - -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -MOE-MOE-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-MOE-G- G ¹	>1. 0E-06	352	
2573-20_8 83	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-MOE-A ¹ - -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -MOE-MOE-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-MOE-G- G ¹	2. 5E-08	353	
2573-20_8 87	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -MBn-Bn-MOE-G-G-Nap-A-Bn-MOE-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -MOE-MOE-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-MOE-G -G ¹	5. 0E-07	354	40
2573-20_8 88	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn-Bn-MOE-G-G-Nap-A-Bn-MOE- A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -MOE-MOE-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-MOE- G-G ¹	4. 6E-07	355	
2573-20_9 00	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -MOE ¹ -G-G-Nap ² -A ² -Bn ² - MOE ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -MOE ¹ -MOE ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G	7. 8E-08	356	



上付きなしはデオキシリボースを示す

上付き-oは2'-フルオロを示す

上付き-1は2'-O-メチルを示す

上付き-2はホスホロチオエート- (デオキシリボース) を示す

C3=-3-炭素-リンカー

Heg=-ヘキサエチレン-グリコール-リンカー

Nap=-ナフチル-dU

Pe=-フェネチル-dU

BT=-ベンゾチオフェニル dU

Ib=-イソブチル-dU

2Nap=-2-ナフチル-dU

NE=-ナフチルエチル-dU

MBn=-メチレンジオキシベンジル-dU

Tyr=-チロシル-dU

FBn=-フルオロベンジル-dU

Bn=-ベンジル-dU

Trp=-トリプトミニル-dU

Th=-チオフェニル-dU

2NE=-2-ナフチルエチル-dU

PP=-フェンプロピル-dU

Im=イミダゾリル-dU

Thr=スレオニル-dU

CHM=シクロヘキシルメチル-dU

Pyr=ピリジル-dU

RTM=R-テトラヒドロフラニル-dU

MOE=モルフォリノエチル

【0243】

実施例17. 2574-49__260 (配列番号101) の追加の修飾

Nap dU SOMA mer 2574-49__260 (配列番号400) を、実施例16に記載される戦略を使用して更に修飾した。表12は、 $10^{-11} \text{M} \sim 10^{-8} \text{M}$ の範囲の IC_{50} を有することがわかった変異体の一覧を示す。2574-49__411 (配列番号443) は、28merであり、3つ以外の全ての位置 (13の2'-O-メチル、10のホスホロチオエート、及び2のC3-スパーサー) における保護骨格置換を有し、IL-6アンタゴニスト活性を保持する (遺伝子レポーターアッセイにおいて $\text{IC}_{50} = 6 \times 10^{-9} \text{M}$)。表13は、 10^{-8}M よりも大きい IC_{50} を有することがわかった変異体の一覧を示す。

【0244】

10

20

30

40

【表 1 2】

表 1 2. $10^{-11}M \sim 10^{-8}M$ の範囲の IC_{50} を有する 2574-49__260 (配列番号 400) の変異体

アダプター	配列	IC_{50} (M)	配列番号
2574-49_260	C3-G-G-G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3 -G-Nap-G-C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap-G	9.0E-10	400
2574-49_261	C3-G-G-G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3 -G-Nap-G-C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	5.6E-09	401
2574-49_276	C3-G ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap-Nap-A ¹ -Nap-G ¹ -Nap-A ¹ -G ¹ - C ¹ -C3-C3-G ¹ -Nap-G ¹ -C ¹ -G ¹ -Nap-A ¹ -A ¹ -G ¹ -G ¹ - -C ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap-G ¹	5.0E-09	402
2574-49_286	C3-G-G-G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A ⁰ -G ⁰ -C ⁰ -C3- C3-G ⁰ -Nap-G-C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	6.3E-09	403
2574-49_289	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C 3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	2.2E-10	404
2574-49_290	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C 3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	8.3E-11	405
2574-49_293	C3-G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3- C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	2.5E-10	406
2574-49_296	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3- C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	7.4E-10	407
2574-49_297	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C 3-G-Nap ¹ -G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	7.0E-10	408
2574-49_298	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C 3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	4.0E-10	409
2574-49_299	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C 3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap ¹	5.6E-09	410
2574-49_300	C3-G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ¹ -A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3- -C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	9.8E-09	411
2574-49_302	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C 3-G-Nap ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	1.6E-10	412
2574-49_304	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3- C3-G-Nap ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Na p	2.4E-10	413
2574-49_305	C3-G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3- C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap ¹	1.9E-09	414
2574-49_306	G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G -Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	2.1E-09	415
2574-49_313	G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	2.9E-09	416
2574-49_316	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap-A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3 -G-Nap ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap ¹	3.9E-09	417
2574-49_317	G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3- -	3.0E-09	418

【 0 2 4 5】

	G-Nap ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap ¹		
2574-49_318	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap-A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3 -G-Nap ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	2. 0E-09	419
2574-49_326	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap-A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3 -G-U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap ¹	1. 1E-10	420
2574-49_338	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C 3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2. 0E-11	421
2574-49_339	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C 3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Na p ¹	1. 1E-10	422
2574-49_340	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3- C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -N ap ¹	6. 9E-10	423
2574-49_374	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-MOE ¹ -A-G-C-C3- C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -N ap ¹	4. 3E-09	424
2574-49_375	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3- C3-G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	3. 8E-10	425
2574-49_381	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-RTM ¹ -A-G-C-C3- C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -N ap ¹	4. 7E-09	426
2574-49_382	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3- C3-G ¹ -RTM ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	5. 5E-10	427
2574-49_387	G-G ¹ -G-Pyr ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3- C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -N ap ¹	6. 4E-09	428
2574-49_389	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3- C3-G ¹ -Pyr ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2. 8E-09	429
2574-49_390	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3- C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Pyr ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -N ap ¹	3. 3E-09	430
2574-49_394	G-G ¹ -G-MBn ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3- C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -N ap ¹	4. 5E-09	431
2574-49_395	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-MBn ¹ -A-G-C-C3- C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -N ap ¹	3. 3E-09	432
2574-49_396	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3- C3-G ¹ -MBn ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	4. 2E-10	433

2574-49_397	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3- C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-MBn ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -N ap ¹	3. 5E-09	434	
2574-49_398	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3- C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -M Bn ¹	3. 0E-10	435	
2574-49_402	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C 3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	1. 6E-09	436	10
2574-49_404	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G ¹ -Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ - C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2. 8E-09	437	
2574-49_406	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C 3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2. 4E-09	438	
2574-49_407	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C 3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A-A-G-G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2. 1E-09	439	
2574-49_408	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C 3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ - G ¹ -Nap ¹	9. 2E-09	440	20
2574-49_409	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C 3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	7. 5E-09	441	
2574-49_410	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C 3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	3. 8E-09	442	
2574-49_411	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G-Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	5. 8E-09	443	30
2574-49_413	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C 3 ² -C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	8. 6E-09	444	
2574-49_416	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C 3-C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	3. 1E-09	445	
2574-49_417	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G-Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	4. 4E-09	446	40

上付きなしはデオキシリボースを示す

上付き-oは2'-フルオロを示す

上付き-1は2'-メチルを示す

上付き-2はホスホロチオエート- (デオキシリボース) を示す

C 3 = - 3 - 炭素 - リンカー
 H e g = - ヘキサエチレン - グリコール - リンカー
 N a p = - ナフチル - d U
 P e = - フェネチル - d U
 B T = - ベンゾチオフェニル d U
 I b = - イソブチル - d U
 2 N a p = - 2 - ナフチル - d U
 N E = - ナフチルエチル - d U
 M B n = - メチレンジオキシベンジル - d U 10
 T y r = - チロシル - d U
 F B n = - フルオロベンジル - d U
 B n = - ベンジル - d U
 T r p = - トリプタミニル - d U
 T h = - チオフェニル - d U
 2 N E = - 2 - ナフチルエチル - d U
 P P = - フェンプロピル - d U
 I m = イミダゾリル - d U
 T h r = スレオニニル - d U
 C H M = シクロヘキシルメチル - d U 20
 P y r = ピリジル - d U
 R T M = R - テトラヒドロフラニル - d U
 M O E = モルフォリノエチル

【 0 2 4 8 】

【表 13】

表 13. $10^{-8}M$ よりも大きい IC_{50} を有する 2574-49__260 (配列番号400)の変異体

アダプター	配列	IC_{50} (M)	配列番号
2574-49_27 7	C3-C3-C3-C3-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3- C3-G-Nap-G-C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	1. 2E-08	500
2574-49_28 1	C3-G ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3- C3-G-Nap-G-C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	1. 1E-07	501
2574-49_28 2	C3-G-G-G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A ¹ -G ¹ -C ¹ -C3- C3-G ¹ -Nap-G-C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	1. 4E-08	502
2574-49_28 5	C3-G ⁰ -G ⁰ -G ⁰ -Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C 3-G-Nap-G-C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap-	1. 0E-08	503
2574-49_28 7	C3-G-G-G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3- G-Nap-G ⁰ -C ⁰ -G ⁰ -Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	1. 1E-08	504
2574-49_28 8	C3-G-G-G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3- G-Nap-G-C-G-Nap-A ⁰ -A ⁰ -G ⁰ -G ⁰ -C ⁰ -G ⁰ -G ⁰ -Nap	>1. 0E-06	505
2574-49_29 1	G ¹ -G ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹ -Nap ¹ -A ¹ -Nap ¹ -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ - G ¹ -C ¹ -G ¹ -A ¹ -G ¹ -Nap ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1. 0E-06	506
2574-49_29 2	G ¹ -G ¹ -G ¹ -G ¹ -U ¹ -U ¹ -A ¹ -U ¹ -G ¹ -U ¹ -A ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ - -A ¹ -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -U ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -G ¹ -U ¹	>1. 0E-06	507
2574-49_29 4	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap ¹ -A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C 3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	2. 8E-08	508
2574-49_29 5	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap ¹ -G-Nap-A-G-C-C3-C 3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	1. 8E-08	509
2574-49_30 1	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap ¹ -G-Nap ¹ -A-G-C-C3- C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	7. 2E-08	510
2574-49_30 3	C3-G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ¹ -A-Nap ¹ -G-Nap-A-G-C-C3 -C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	2. 4E-07	511
2574-49_30 7	G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Na p-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	2. 5E-08	512
2574-49_30 8	C3-G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ¹ -A-Nap ¹ -G-Nap ¹ -A-G-C-C 3-C3-G-Nap ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -N ap ¹	8. 8E-08	513
2574-49_30 9	G-G ¹ -G-U ¹ -Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-N ap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	>1. 0E-06	514
2574-49_31 0	G-G ¹ -G-Nap-U ¹ -A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-N ap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	>1. 0E-06	515
2574-49_31 1	G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-U ¹ -G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-N ap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	>1. 0E-06	516
2574-49_31	G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-U ¹ -A-G-C-C3-C3-G-N	>1. 0E-06	517

【 0 2 4 9 】

2	ap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap		
2574-49_31	G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-	1. 9E-08	
4	Nap-G ¹ -C-G-U ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap		518
2574-49_31	G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-	>1. 0E-06	
5	Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -U ¹		519
2574-49_31	G ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹ -Nap ¹ -A ¹ -Nap ¹ -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -G ¹ -	2. 2E-07	
9	C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -G ¹ - C ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹		520
2574-49_32	G ⁰ -G ⁰ -G ⁰ -Nap ¹ -Nap ¹ -A ⁰ -Nap ¹ -G ⁰ -Nap ¹ -A ⁰ -G ⁰ -C ⁰ -	9. 2E-08	
5	C3-C3-G ⁰ -U ¹ -G ⁰ -C ⁰ -G ⁰ -Nap ¹ -A ⁰ -A ⁰ -G ⁰ -G ⁰ -C ⁰ -G ⁰ - G ⁰ -Nap ¹		10 521
2574-49_33	G ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹ -Nap ¹ -A ¹ -Nap ¹ -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -G ¹ -	6. 2E-08	
5	C ¹ -G ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -G ¹ - C ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹		522
2574-49_34	G ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹ -Nap ² -A ¹ -Nap ² -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -G ¹ -C	4. 3E-08	
1	¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹		523
2574-49_34	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C3-	1. 4E-08	
2	C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A ¹ -A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Na p ¹		20 524
2574-49_37	G-G ¹ -G-MOE ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3	1. 5E-08	
3	-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹		525
2574-49_37	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3	>1. 0E-06	
6	-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-MOE ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹		526
2574-49_37	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3	1. 8E-08	
7	-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -MOE ¹		527
2574-49_37	G-G ¹ -G-Nap ¹ -MOE ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3	>1. 0E-06	
8	-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹		528 30
2574-49_37	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-MOE ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3	>1. 0E-06	
9	-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹		529
2574-49_38	G-G ¹ -G-RTM ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3	1. 8E-08	
0	-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹		530
2574-49_38	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3	>1. 0E-06	
3	-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-RTM ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹		531
2574-49_38	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3	5. 7E-08	
4	-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -RTM ¹		532
2574-49_38	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Pyr ¹ -A-G-C-C3-C3	9. 7E-08	
8	-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹		533 40
2574-49_39	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3	1. 2E-08	
1	-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Pyr ¹		534
2574-49_39	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Pyr ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3	2. 9E-08	
2	-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹		535
2574-49_39	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Pyr ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3	>1. 0E-06	536

3	$-G^1-U^1-G^1-C-G-Nap^1-A-A-G-G^2-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		
2574-49_39	$G-G^1-G-Nap^1-MBn^2-A-Nap^2-G-Nap^1-A-G-C-C3-C3$	4. 9E-07	
9	$-G^1-U^1-G^1-C-G-Nap^1-A-A-G-G^2-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		537
2574-49_40	$G-G^1-G-Nap^1-Nap^2-A-MBn^2-G-Nap^1-A-G-C-C3-C3$	>1. 0E-06	
0	$-G^1-U^1-G^1-C-G-Nap^1-A-A-G-G^2-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		538
2574-49_40	$G^1-G^1-G^1-Nap^1-Nap^2-A-Nap^2-G-Nap^1-A-G^1-C^1-C$	4. 9E-08	
3	$3-C3-G^1-U^1-G^1-C-G-Nap^1-A-A-G-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		539
2574-49_40	$G^1-G^1-G^1-Nap^1-Nap^2-A-Nap^2-G^1-Nap^1-A-G^1-C^1-C$	4. 4E-08	10
5	$C3-C3-G^1-U^1-G^1-C-G-Nap^1-A-A-G-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		540
2574-49_41	$G^2-G^1-G^2-Nap^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^2-Nap^1-A^2-G^1-C^1$	7. 7E-08	
2	$-C3^2-C3^2-G^1-U^1-G^1-C^2-G^2-Nap^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		541
2574-49_41	$G^2-G^1-G^2-Nap^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^2-Nap^1-A^2-G^1-C^1$	2. 7E-08	
4	$-C3-C3^2-G^1-U^1-G^1-C^2-G^2-Nap^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		542
2574-49_41	$G-G^1-G-Nap^1-Nap^2-A-Nap^2-G-Nap^1-A-G^1-C^1-C3^2$	1. 7E-08	
5	$-C3^2-G^1-U^1-G^1-C-G-Nap^1-A-A-G-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		20 543
2574-49_41	$G-G^1-G-Nap^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^1-Nap^1-A^2-G^1-C^1-C$	4. 0E-08	
8	$C3-C3-G^1-U^1-G^1-C^2-G^2-Nap^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		544
2574-49_41	$G-G^1-G-Nap^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^1-Nap^1-A^2-G^1-C^1-C$	4. 0E-08	
9	$C3-C3^2-G^1-U^1-G^1-C^2-G^2-Nap^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		545
2574-49_42	$G^2-G^1-G^2-Nap^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^1-Nap^1-A^2-G^1-C^1-C$	8. 0E-08	
0	$-C3-C3-G^1-U^1-G^1-C^2-G^2-Nap^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		30 546
2574-49_42	$G^2-G^1-G^2-Nap^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^1-Nap^1-A^2-G^1-C^1-C$	9. 7E-08	
1	$-C3-C3^2-G^1-U^1-G^1-C^2-G^2-Nap^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		547
2574-49_42	$G-G^1-G-Nap^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^1-MOE^1-A^2-G^1-C^1-C$	2. 6E-07	
2	$C3-C3-G^1-U^1-G^1-C^2-G^2-Nap^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		548
2574-49_42	$G-G^1-G-Nap^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^1-MOE^1-A^2-G^1-C^1-C$	2. 4E-07	
3	$C3-C3-G^1-MOE^1-G^1-C^2-G^2-Nap^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		40 549
2574-49_42	$G-G^1-G-Pyr^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^1-MOE^1-A^2-G^1-C^1-C$	>1. 0E-06	
4	$C3-C3-G^1-U^1-G^1-C^2-G^2-Nap^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		550
2574-49_42	$G-G^1-G-Nap^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^1-MOE^1-A^2-G^1-C^1-C$	>1. 0E-06	
5	$C3-C3-G^1-U^1-G^1-C^2-G^2-Pyr^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1$		551

	-G ¹ -Nap ¹		
2574-49_42 6	G-G ¹ -G-Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ - -G ¹ -Nap ¹	>1. 0E-06	552
2574-49_42 7	G-G ¹ -G-Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - C3-C3-G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² - G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1. 0E-06	553
2574-49_42 8	G-G ¹ -G-Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - C3-C3-G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² - G ¹ -G ¹ -MBn ¹	>1. 0E-06	554
2574-49_42 9	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ - -G ¹ -MBn ¹	5. 4E-08	555
2574-49_43 0	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ - -G ¹ -Nap ¹	6. 1E-07	556
2574-49_43 1	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - -C3-C3-G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² - -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1. 0E-06	557
2574-49_43 2	G ² -G ¹ -G ² -Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ - -G ¹ -Nap ¹	>1. 0E-06	558
2574-49_43 3	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ - -G ¹ -Nap ¹	>1. 0E-06	559
2574-49_43 4	G ² -G ¹ -G ² -Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ - -G ¹ -Nap ¹	>1. 0E-06	560
2574-49_43 5	G ² -G ¹ -G ² -Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - -C3-C3-G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² - -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1. 0E-06	561
2574-49_43 6	G ² -G ¹ -G ² -Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - -C3-C3-G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² - -G ¹ -G ¹ -MBn ¹	>1. 0E-06	562
2574-49_43 7	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ - -G ¹ -MBn ¹	1. 3E-07	563
2574-49_43 8	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - -C3-C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² - G ¹ -G ¹ -Nap ¹	7. 8E-07	564
2574-49_43 9	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ - -C3-C3 ² -G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² - -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1. 0E-06	565

2574-49_44	$G^2-G^1-G^2-Pyr^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^1-MOE^1-A^2-G^1-C^1$	>1.0E-06	
0	$-C3-C3^2-G^1-U^1-G^1-C^2-G^2-Nap^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		566
2574-49_44	$G^2-G^1-G^2-Nap^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^1-MOE^1-A^2-G^1-C^1$	>1.0E-06	
1	$-C3-C3^2-G^1-U^1-G^1-C^2-G^2-Pyr^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		567
2574-49_44	$G^2-G^1-G^2-Pyr^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^1-MOE^1-A^2-G^1-C^1$	>1.0E-06	
2	$-C3-C3^2-G^1-U^1-G^1-C^2-G^2-Pyr^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		568
2574-49_44	$G^2-G^1-G^2-Pyr^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^1-MOE^1-A^2-G^1-C^1$	>1.0E-06	10
3	$-C3-C3^2-G^1-MOE^1-G^1-C^2-G^2-Pyr^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-Nap^1$		569
2574-49_44	$G^2-G^1-G^2-Pyr^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^1-MOE^1-A^2-G^1-C^1$	>1.0E-06	
4	$-C3-C3^2-G^1-MOE^1-G^1-C^2-G^2-Pyr^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-MBn^1$		570
2574-49_44	$G^2-G^1-G^2-Nap^1-Nap^2-A^2-Nap^2-G^1-Nap^1-A^2-G^1-C^1$	1.4E-07	
5	$-C3-C3^2-G^1-U^1-G^1-C^2-G^2-Nap^1-A^2-A^2-G^2-G^1-C^2-G^1-G^1-MBn^1$		571
2574-49_45	$-G-G-G-G-T-T-A-T-G-T-A-G-C-G-A-G-T-$	>1.0E-06	20
6	$G-C-G-T-A-A-G-G-C-G-G-T-G$		572

上付きなしはデオキシリボースを示す

上付き-oは2'-フルオロを示す

上付き-1は2'-O-メチルを示す

上付き-2はホスホロチオエート(デオキシリボース)を示す

C3=-3-炭素-リンカー

He g=-ヘキサエチレングリコール-リンカー

Na p=-ナフチル-d U

Pe=-フェネチル-d U

BT=-ベンゾチオフェニル-d U

I b=-イソブチル-d U

2Na p=-2-ナフチル-d U

NE=-ナフチルエチル-d U

MBn=-メチレンジオキシベンジル-d U

Tyr=-チロシル-d U

FBn=-フルオロベンジル-d U

Bn=-ベンジル-d U

Trp=-トリプトタミニル-d U

Th=-チオフェニル-d U

2NE=-2-ナフチルエチル-d U

PP=-フェンプロピル-d U

Im=イミダゾリル-d U

Thr=スレオニル-d U

CHM=シクロヘキシルメチル-d U

【0253】

Pyr=ピリジル-d U

RTM=R-テトラヒドロフラニル-d U

MOE=モルフォリノエチ

30

40

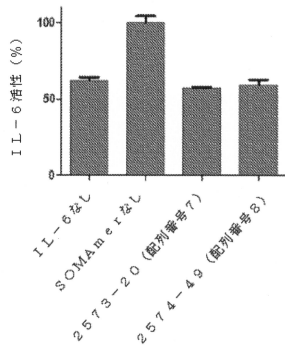
50

【 0 2 5 4 】

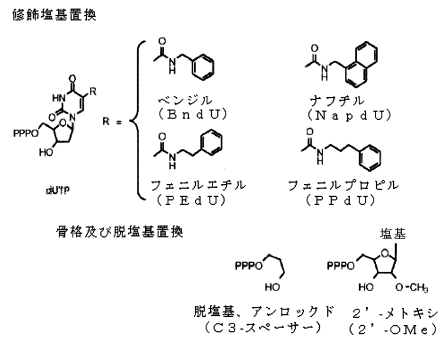
上述の実施形態及び実施例は、例として意図されるに過ぎない。いかなる特定の形態、実施例、または特定の形態若しくは実施例の要素も、特許請求の範囲のいずれかの重要な、必要とされる、または必須の要素として解釈されるものではない。添付の特許請求の範囲により規定される本発明の範囲から逸脱することなく、様々な変更、修飾、置換、及び他の変化を開示された実施形態に対して行うことができる。図面及び実施例を含む明細書は、制限的ではなく例示的なものとされ、全てのかかる修飾及び置換は全て、本発明の範囲内に含まれることが意図される。したがって、本発明の範囲は、上記所与の実施例によってではなく、添付の特許請求の範囲及びそれらの法律上の等価物により規定されるべきである。例えば、方法またはプロセスの特許請求の範囲のいずれかにおいて記載される工程は、任意の実行可能な順序で実施されてもよく、実施形態、実施例、または特許請求の範囲のいずれにおいて提示される順序にも限定されない。

10

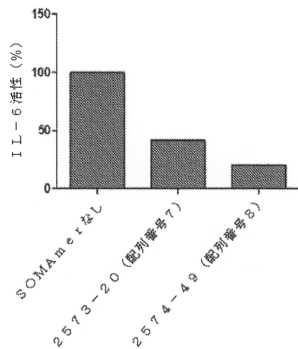
【 図 1 】



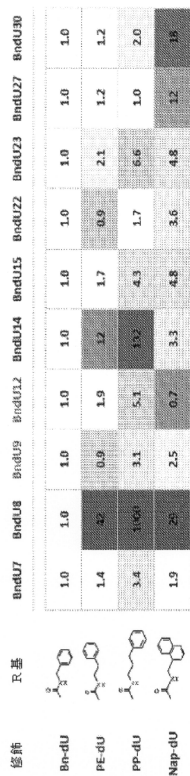
【 図 3 】



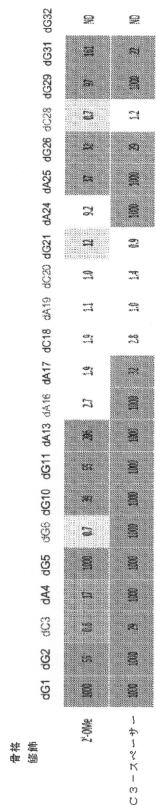
【 図 2 】



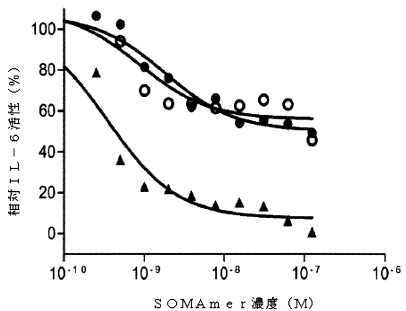
【 図 4 】



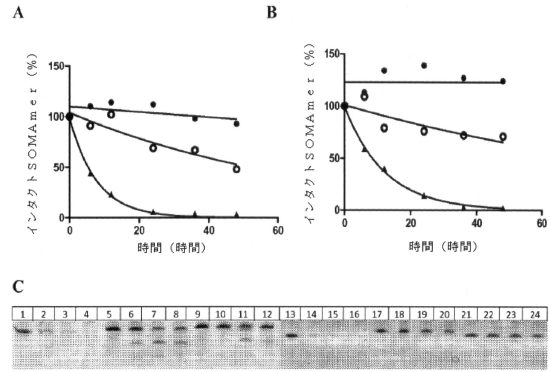
【 図 5 】



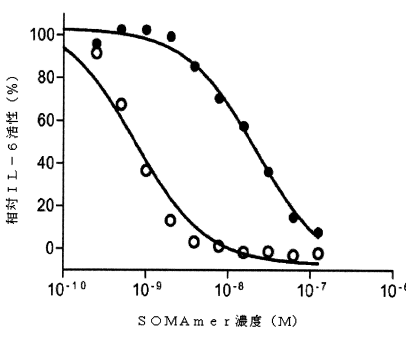
【 図 6 】



【 図 8 】

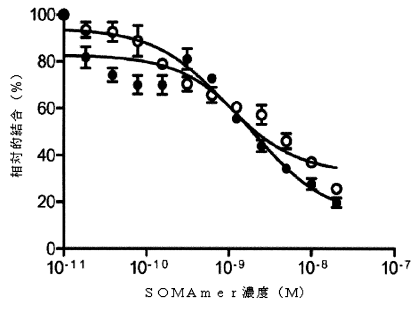


【 図 7 】

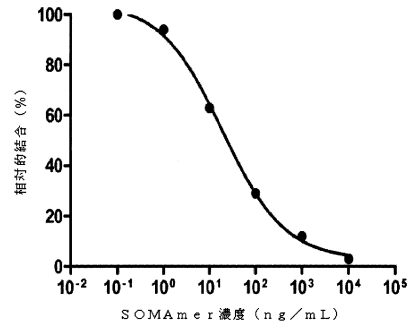


- レシ1: 2573-20_116 (配列番号: 300) - 血清暴露なし
- レシ2: 2573-20_116 (配列番号: 300) - ヒト血清に2.4時間暴露
- レシ3: 2573-20_116 (配列番号: 300) - ラット血清に2.4時間暴露
- レシ4: 2573-20_116 (配列番号: 300) - サル血清に2.4時間暴露
- レシ5: 2573-20_15 (配列番号: 22) - 血清暴露なし
- レシ6: 2573-20_15 (配列番号: 22) - ヒト血清に2.4時間暴露
- レシ7: 2573-20_15 (配列番号: 22) - ラット血清に2.4時間暴露
- レシ8: 2573-20_15 (配列番号: 22) - サル血清に2.4時間暴露
- レシ9: 2573-20_136 (配列番号: 101) - 血清暴露なし
- レシ10: 2573-20_136 (配列番号: 101) - ヒト血清に2.4時間暴露
- レシ11: 2573-20_136 (配列番号: 101) - ラット血清に2.4時間暴露
- レシ12: 2573-20_136 (配列番号: 101) - サル血清に2.4時間暴露
- レシ13: 2574-49_456 (配列番号: 572) - 血清暴露なし
- レシ14: 2574-49_456 (配列番号: 572) - ヒト血清に2.4時間暴露
- レシ15: 2574-49_456 (配列番号: 572) - ラット血清に2.4時間暴露
- レシ16: 2574-49_456 (配列番号: 572) - サル血清に2.4時間暴露
- レシ17: 2574-49_14 (配列番号: 35) - 血清暴露なし
- レシ18: 2574-49_14 (配列番号: 35) - ヒト血清に2.4時間暴露
- レシ19: 2574-49_14 (配列番号: 35) - ラット血清に2.4時間暴露
- レシ20: 2574-49_14 (配列番号: 35) - サル血清に2.4時間暴露
- レシ21: 2574-49_260 (配列番号: 400) - 血清暴露なし
- レシ22: 2574-49_260 (配列番号: 400) - ヒト血清に2.4時間暴露
- レシ23: 2574-49_260 (配列番号: 400) - ラット血清に2.4時間暴露
- レシ24: 2574-49_260 (配列番号: 400) - サル血清に2.4時間暴露

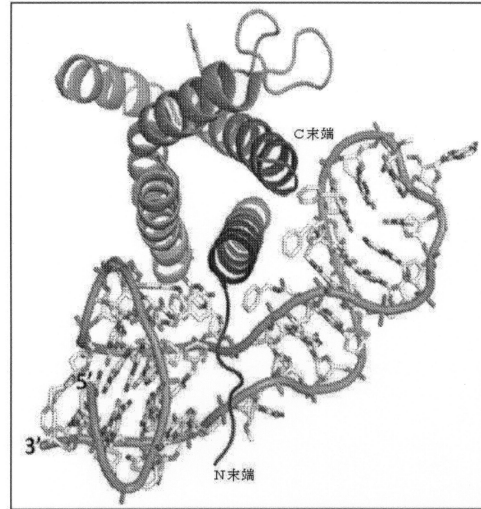
【 図 9 】



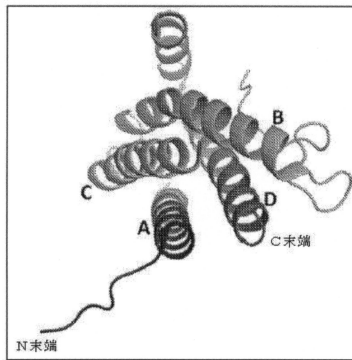
【 図 10 】



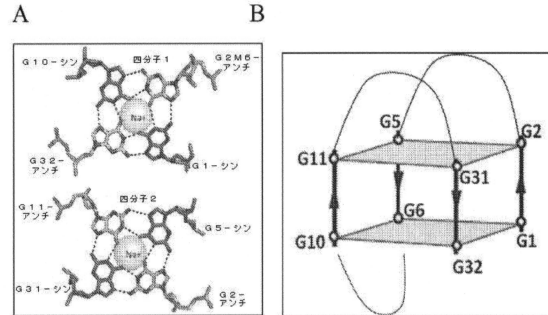
【 図 11 】



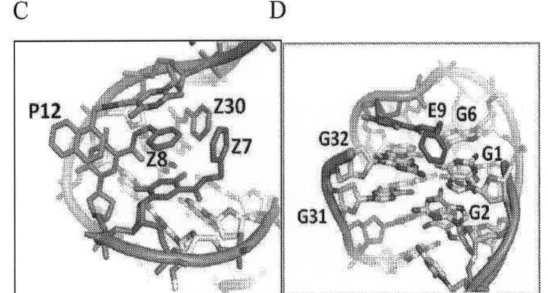
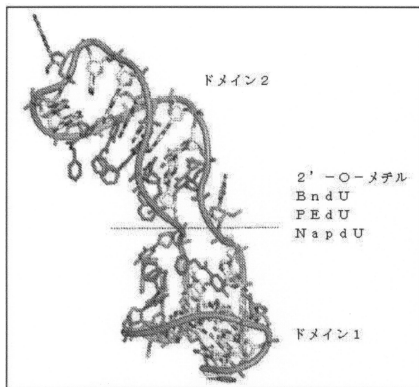
【 図 12 】



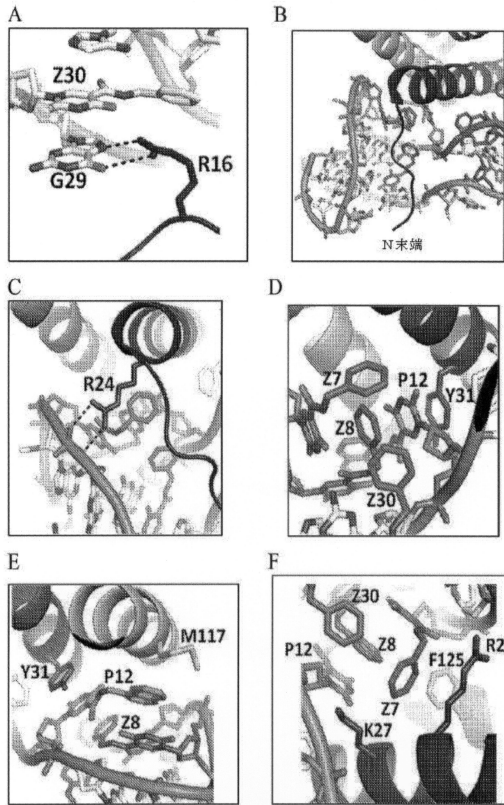
【 図 14 】



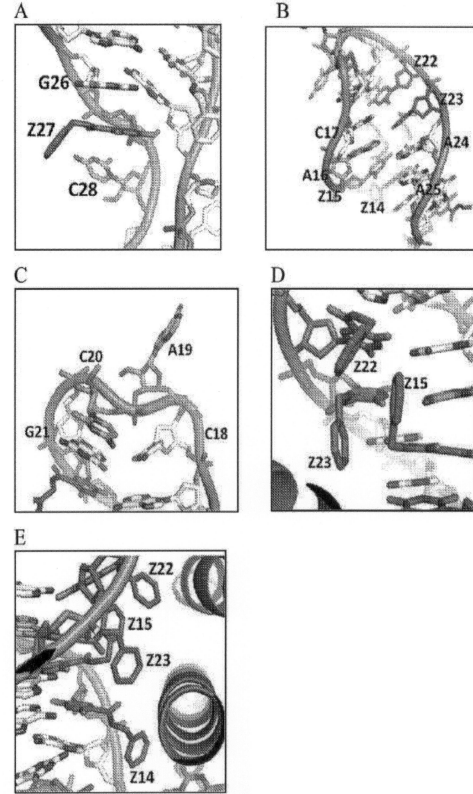
【 図 13 】



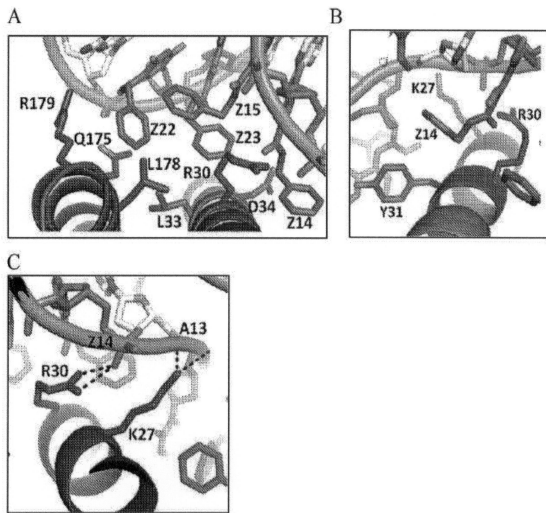
【 図 15 】



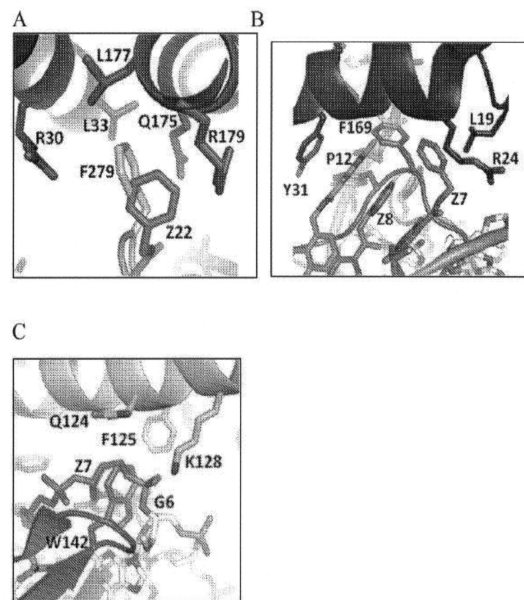
【 図 16 】



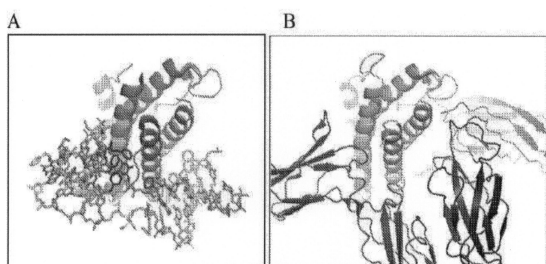
【 図 17 】



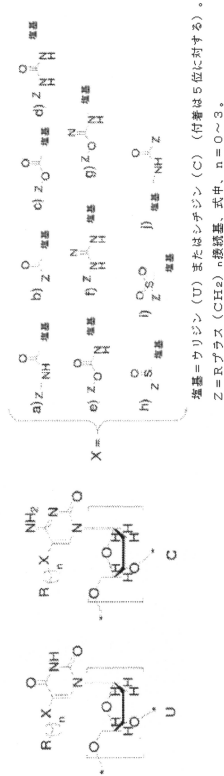
【 図 19 】



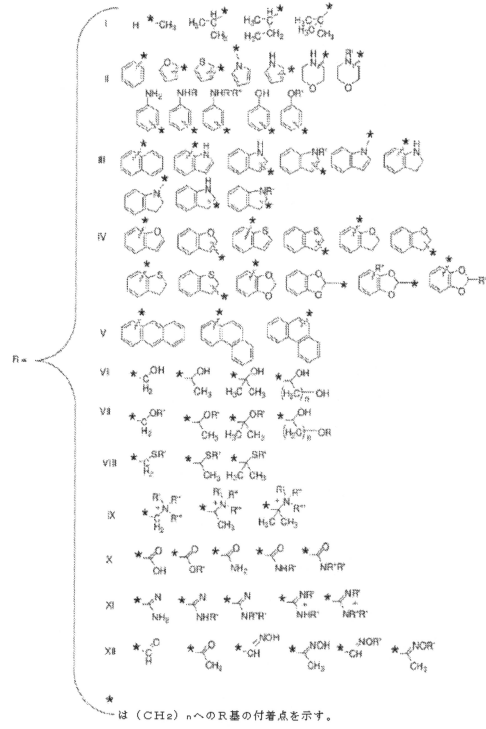
【 図 18 】



【図20-1】



【図20-2】



【図21】

ヒトIL-6前駆体配列 (Swiss-Protアクセッション番号P05231.1)

MNSFSTSAFG PVAFSLGLLL VLPAAFPAPV PPGEDSKDVA APHRQPLTSS
 ERIDKQIRYI LDGIALRKE TCNKSNCES SKEALAENNL NLPKMAEKDG
 CFQSGFNEET CLVKIITGLL EFEVYLEYLQ NRFESSEEQA RAVQMSTKVL
 IQFLQKKAKN LDAITTPDPT TNASLLTKLQ AQNQWLQDMT THLILRSFKE
 FLQSSLRALR QM (配列番号9)

ヒトIL-6成熟配列 (Swiss-Protアクセッション番号P05231.1の
アミノ酸29~212)

FV PPGEDSKDVA APHRQPLTSS ERIDKQIRYI LDGIALRKE TCNKSNCES
 SKEALAENNL NLPKMAEKDG CFQSGFNEET CLVKIITGLL EFEVYLEYLQ
 NRFESSEEQA RAVQMSTKVL IQFLQKKAKN LDAITTPDPT TNASLLTKLQ
 AQNQWLQDMT THLILRSFKE FLQSSLRALR QM (配列番号10)

【図22】

修飾	5'dU	記号	BndU7	BndU8	PEdU9	NapdU12	BndU30
NapdU		P	0.05	>100	1.3	1.0	3.4
iBudU		I	>100	>100	1.5	>100	0.15
TrpdU		W	0.35	>100	0.82	>100	2.4
FbndU		F	4.2	1.3	1.4	>100	1.2
2NapdU		i	0.57	>100	0.65	1.2	0.72
PEdU		E	0.64	>100	1.0	>100	2.5
TyrdU		Y	3.8	>100	1.6	>100	>100
NEdU		e	0.45	>100	0.8	2.5	1.3
MBndU		M	0.01	0.71	1.3	1.1	2.9
PPdU		J	1.8	>100	1.2	>100	1.3
MOEdU		n	>100	>100	1.4	>100	>100
BTdU		s	0.23	1.1	>100	1.1	>100
BEdu		f	0.04	>100	0.99	>100	1.8
RTHFdU		f ¹	>100	>100	1.3	>100	2.5
STHdU		f ²	>100	>100	2.5	>100	3.9

【 図 2 3 】

配列番号	数	配列番号	数
2573-108	1	ZADGCA	7
2573-103	1	CG	7
2573-105	447	ZAGGZGG	600
2573-100	217	ZAGGZGG	600
2573-107	3	ZAGGZGG	600
2573-104	3	ZAGGZGG	600
2573-106	3	ZAGGZGG	600
2573-102	2	ZAGGZGG	600
2573-101	1	ZAGGZGG	600
2573-109	1	ZAGGZGG	600
2573-115	11	ZAGGZGG	600
2573-111	84	ZAGGZGG	600
2573-113	16	ZAGGZGG	600
2573-114	1	ZAGGZGG	600
2573-112	1	ZAGGZGG	600
2573-110	1	ZAGGZGG	600
2573-109	1	ZAGGZGG	600
2573-111	1	ZAGGZGG	600
2573-112	1	ZAGGZGG	600
2573-113	1	ZAGGZGG	600
2573-114	1	ZAGGZGG	600
2573-115	1	ZAGGZGG	600

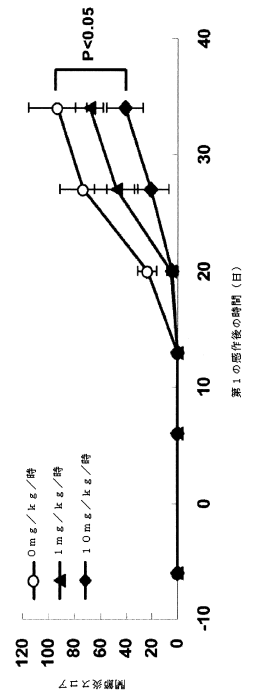
【 図 2 5 】

配列番号	数	配列番号	数
2574-49	316	CG	8
2574-103	57	CG	8
2574-101	11	CG	8
2574-100	1	CG	8
2574-99	5	CG	8
2574-97	1	CG	8
2574-98	2	CG	8

【 図 2 4 】

略語	5-d 修饰	化学構造
Bn	ベンジルメチル	<chem>Cc1ccccc1</chem>
Nap	1-ナフチルメチル	<chem>Cc1cccc2ccccc12</chem>
PE	2-フェニルエチル	<chem>Cc1ccccc1CC</chem>
PP	3-フェニルプロピル	<chem>Cc1ccccc1CCC</chem>
Ib	イソブチル	<chem>CC(C)CC</chem>
FBn	4-フルオロベンジルメチル	<chem>Cc1ccc(F)cc1</chem>
2Nap	2-ナフチルメチル	<chem>Cc1cccc2c1cccc2</chem>
Tyr	チロシル	<chem>Cc1ccc(cc1)C(=O)O</chem>
NE	1-ナフチルエチル	<chem>Cc1cccc2ccccc12CC</chem>
MBn	3,4-メチレンジオキシベンジル	<chem>Cc1ccc2c(c1)OCO2</chem>
MOE	モルホリノエチル	<chem>Cc1ccncc1CC</chem>
BF	3-ベンゾフランエチル	<chem>Cc1ccc2ccccc12CC</chem>
BT	3-ベンゾチオフェニルエチル	<chem>Cc1ccc2c(c1)S=C2CC</chem>

【 図 2 6 】



【配列表】

0006591392000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P 17/04	(2006.01)	A 6 1 P 17/04
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 25/04	(2006.01)	A 6 1 P 25/04
A 6 1 P 9/12	(2006.01)	A 6 1 P 9/12
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 3/04	(2006.01)	A 6 1 P 3/04
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P 1/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/00
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 P 15/00	(2006.01)	A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
C 0 7 K 14/54	(2006.01)	C 0 7 K 14/54

- (72)発明者 廣田 雅生
大阪府大阪市中央区大手通3 - 2 - 27
- (72)発明者 シュナイダー ダニエル ジェイ .
アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールダー ワイルダーネス プレイス 2945
- (72)発明者 鈴木 智樹
大阪府大阪市中央区大手通3 - 2 - 27
- (72)発明者 ジャーヴィス ターレ シー .
アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールダー ワイルダーネス プレイス 2945
- (72)発明者 石川 優一
大阪府大阪市中央区大手通3 - 2 - 27
- (72)発明者 村上 育郎
大阪府大阪市中央区大手通3 - 2 - 27
- (72)発明者 ジェリナス エイミー
アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールダー ワイルダーネス プレイス 2945
- (72)発明者 ウォー シーラ
アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールダー ワイルダーネス プレイス 2945
- (72)発明者 ジャニック ネボイサ
アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールダー ワイルダーネス プレイス 2945

審査官 星 功介

- (56)参考文献 国際公開第2013/021284 (WO, A1)
PLOS ONE, 2010年, Vol.5, No.12, e15004, pp.1-17

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q