

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2011年3月3日(03.03.2011)

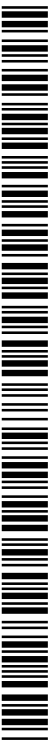


PCT



(10) 国際公開番号
WO 2011/024955 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)
A61K 31/7115 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) A61P 17/02 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) A61P 17/06 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/064612
- (22) 国際出願日: 2010年8月27日(27.08.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-198813 2009年8月28日(28.08.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 中村 義一 (NAKAMURA, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人 東京大学内 Tokyo (JP). 山村 康子 (YAMAMURA, Yasuko) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人 東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則 5.2(a))



WO 2011/024955 A1

(54) Title: NUCLEIC ACID CAPABLE OF BINDING TO TGF-BII-TYPE RECEPTOR, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: TGF-β I I型受容体に結合する核酸およびその使用

(57) Abstract: Disclosed is a substance which can be used for the elucidation of the physiological functions of TGF-β and a TGF-βII-type receptor and the analysis of mechanism of development of TGF-β-induced diseases and the diagnosis and treatment of TGF-β-induced diseases. Specifically disclosed are: an aptamer which is characterized by being capable of binding to a TGF-βII-type receptor and being capable of inhibiting the binding between TGF-β and a TGF-βII-type receptor; a method for detecting a TGF-βII-type receptor, which is characterized by using the aptamer; a medicinal agent comprising the aptamer; and others.

(57) 要約: 本発明は、TGF-βならびにTGF-β I I型受容体の生理機能の解明、およびTGF-βにより引き起こされる疾患の発症機構の解析、診断および治療に利用可能な物質の提供を目的とする。本発明は、TGF-β I I型受容体に結合し、かつTGF-βとTGF-β I I型受容体との結合を阻害することを特徴とするアプタマー; 当該アプタマーを用いることを特徴とするTGF-β I I型受容体の検出方法; 当該アプタマーを含む医薬などを提供する。

明 細 書

発明の名称：

TGF- β II型受容体に結合する核酸およびその使用

技術分野

[0001] 本発明は、TGF- β II型受容体に結合する核酸およびその使用方法に関するものである。

背景技術

[0002] Transforming Growth Factor- β （以下、「TGF- β 」と記載）は上皮細胞、血管内皮細胞、血球系細胞など多くの細胞に対し強い増殖抑制作用を示し、癌化初期においては癌細胞の増殖を抑制し癌化抑制因子として機能する。しかし、TGF- β は多機能性のサイトカインであり、癌化後期になると癌細胞が産生するTGF- β が癌組織周辺の正常組織細胞に作用し血管新生、上皮-間葉移行、免疫抑制、細胞外マトリックスの産生などを誘導し、癌の浸潤・転移を引き起こすことが明らかにされている。さらに、TGF- β は細胞外マトリックス産生を促進し組織の線維化を強く引き起こし、肺線維症、慢性腎不全、肝硬変に代表される慢性線維性疾患を誘発する重要な因子であることが見出されている。したがって、TGF- β およびTGF- β 受容体は、癌の浸潤・転移、組織線維化の分子機構の解明、創薬における重要な標的になると考えられる。

[0003] TGF- β 受容体は、ともに細胞内にセリン/スレオニンキナーゼ領域を有するTGF- β I型受容体（以下、「T β RI」と記載する場合がある）とTGF- β II型受容体（以下、「T β RII」と記載する場合がある）からなる複合体である。近年、TGF- β 受容体複合体の下流で機能するシグナル伝達分子であるSmad転写因子ファミリー（Smad2、Smad3およびSmad4）が同定され、TGF- β の主要なシグナル伝達経路が明らかにされつつある。TGF- β がT β RIIに結合すると、T β RIIのセリン/スレオニンキナーゼによりT β RIがリン酸化を受け活性化され

る。細胞質に存在する S m a d 2 または S m a d 3 は活性化された T β R I の細胞内ドメインに結合し、T β R I のセリン/スレオニンキナーゼによりリン酸化され活性化される。その後、S m a d 2 および S m a d 3 は T β R I から遊離し、細胞質内の S m a d 4 とヘテロ複合体を形成し核へと移行し転写因子として機能する。

[0004] このように、T β R I I は T G F - β との結合に不可欠な細胞表面分子であり、T β R I 単独では T G F - β に結合できない。したがって、T β R I I への T G F - β の結合を阻害できれば T G F - β により誘導される癌の浸潤・転移、組織線維化を抑制することも可能である。これまで T β R I I を標的とした乳癌転移の阻害剤として、可溶化型 T β R I I (以下、「s T β R I I」と記載する場合がある)、可溶化型 T β R I I と免疫グロブリン F c 領域との融合たんぱく質 (s T β R I I - F c) の開発が進められている。i n v i t r o 実験系でその阻害効果が確認され、また、M M T V - n e u トランスジェニックマウスを用いた i n v i v o 実験系でも乳癌の肺、肝臓、脾臓への転移が抑制されることが報告されている。しかし、s T β R I I や s T β R I I - F c は分子量が大きく、また、たんぱく質の翻訳後に糖鎖修飾が必要なことなどから、その大量精製は容易ではない。

[0005] ところで、i n v i t r o で標的分子と特異的に結合する R N A を選択かつ濃縮する手法として、S E L E X 法と呼ばれる手法が開発されている (非特許文献 1 参照)。S E L E X 法は、P C R プライマー用の配列 (一方には T 7 ポリメラーゼの配列を含む) を両端に含む適当な長さのランダム配列を持つ R N A を合成し、これを固相化し標的分子と結合させる。結合しなかった R N A を洗浄後、標的分子と結合した R N A を回収し、R T - P C R で増幅後、次のラウンドで用いる R N A のテンプレートとする。これを繰り返すことにより標的分子と特異的に結合する R N A アプタマーを取得する。この方法では、標的分子と特異的に結合する R N A 配列を明らかにできるだけでなく、標的分子の機能を促進、あるいは阻害するような生理活性を持つ R N A を取得することが可能である。このことは病因たんぱく質を標的とする

ことにより、得られたアプタマーが医薬品として応用できることを示唆している。従来の創薬に比べこのSELEX法を用いた創薬の優れている点として（１）従来の化学物質のスクリーニングより大規模の母集団よりスクリーニングを行える。（２）試験管内で容易に大量合成することができる。（３）免疫原性がない。（４）容易に化学的改良を行える。（５）保存性が高く抗体の作製が困難なたんぱく質を標的にできる。などがあげられる。例えば特許文献１には、SELEX法を用いて得られた、TGF- β III型受容体と特異的に結合するRNAアプタマーが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2007-43917号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：C. Tuerk & L. Gold, Science 249: 505-510, 1990

図面の簡単な説明

[0008] [図1] 収束したRNAの一部とヒト可溶化型TGF- β III型受容体との結合解析を示す図である。2RA5、2RA1、2RA6および2RA8は、それぞれ収束した20種類のRNAアプタマーの一部を示す。

[図2] 本発明のアプタマーと、ヒト可溶化型TGF- β III型受容体またはTGF- β /ヒト可溶化型TGF- β III型受容体の複合体との結合解析を示す図である。「sT β RII」はヒト可溶化型TGF- β III型受容体を示し、「T β -sT β RII」はTGF- β とヒト可溶化型TGF- β III型受容体との複合体を示す。

[図3] 本発明のアプタマーを短鎖化した欠失変異体の予想される二次構造を示す図である。配列番号1で表されるアプタマー（73塩基長：2RA5）、配列番号2で表されるアプタマー（2RA5を9塩基欠失させた2RA5S1）、および配列番号3で表されるアプタマー（2RA5を14塩基欠失さ

せた2RA5S2)それぞれの二次構造とTβRIIに対する結合のKd値を示した。

[図4]本発明のアプタマーがTGF-βの細胞増殖抑制作用を阻害することを示す図である。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、TGF-βII型受容体に結合し、かつTGF-βとTGF-βII型受容体との結合を阻害することを特徴とするアプタマーを得ることによって、TGF-βの生理機能の解明、ならびに過剰なTGF-βにより引き起こされる疾患の発症機構の解析、診断および治療に利用可能な物質を提供することなどを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、このような物質の候補としてTGF-β受容体の1つであるTGF-βII型受容体(TβRII)に対するRNAアプタマーを作製した。すなわち、TβRIIを標的としてSELEXを行い、得られたアプタマーと標的との結合活性を調べ、その有用性を示した。本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものである。

[0011] すなわち本発明の要旨は以下の通りである。

[1] TGF-βII型受容体に結合し、かつTGF-βとTGF-βII型受容体との結合を阻害することを特徴とするアプタマー；

[2] 配列番号1～3のいずれかから選択されるヌクレオチド配列の全部または一部を含む、[1]に記載のアプタマー；

[3] ピリミジンヌクレオチドの少なくとも一つが修飾ヌクレオチドである、[2]に記載のアプタマー；

[4] 以下(a)または(b)のいずれかである、[1]に記載のアプタマー；

(a) 配列番号1～3のいずれかから選択されるヌクレオチド配列の全部または一部を含むアプタマーであって、該アプタマーに含まれるピリミジンヌ

クレオチドのリボースの2'位が、同一または異なってフッ素原子であるか、あるいは水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群から選択される原子または基で置換されている、アプタマー；

(b) 配列番号1～3のいずれかから選択されるヌクレオチド配列において、1～5個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入または付加されたヌクレオチド配列の全部または一部を含むアプタマーであって、該アプタマーに含まれるピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位が、同一または異なってフッ素原子であるか、あるいは水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群から選択される原子または基で置換されている、アプタマー；

[5] [1]～[4]のいずれかーに記載のアプタマーおよび機能性物質を含む複合体；

[6] 機能性物質が、親和性物質、標識用物質、酵素、薬物送達媒体または薬物である、[5]に記載の複合体；

[7] [1]～[4]のいずれかーに記載のアプタマーあるいは[5]または[6]に記載の複合体を用いることを特徴とする、TGF- β I I型受容体を検出および/または定量する方法；

[8] [1]～[4]のいずれかーに記載のアプタマーあるいは[5]または[6]に記載の複合体を含む、TGF- β の作用に起因する疾患の予防または治療薬；

[9] [1]～[4]のいずれかーに記載のアプタマーあるいは[5]または[6]に記載の複合体を投与することを特徴とする、TGF- β の作用に起因する疾患の予防または治療方法；

[10] TGF- β の作用に起因する疾患の予防または治療のための、[1]～[4]のいずれかーに記載のアプタマーあるいは[5]または[6]に記載の複合体。

発明の効果

[0012] 本発明により、TGF- β I I型受容体に対する結合能を有し、TGF- β とTGF- β I I型受容体との結合を阻害するアプタマーが提供される。

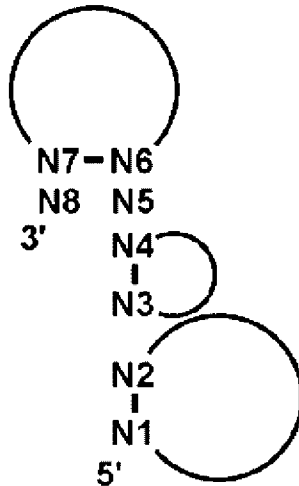
このようなアプタマーは、 $TGF-\beta$ の機能を阻害するアプタマーである。本発明のアプタマーは、過剰な $TGF-\beta$ 発現により引き起こされる疾患の治療等に有用である。

発明を実施するための形態

- [0013] 本発明は、 $TGF-\beta$ II型受容体に対する結合能を有し、 $TGF-\beta$ と $TGF-\beta$ II型受容体との結合を阻害するアプタマーを提供する。
- [0014] $TGF-\beta$ とは、細胞増殖抑制、血管新生、上皮-間葉移行、免疫抑制、細胞外マトリックス産生などを誘導する多機能性のサイトカインである。 $TGF-\beta$ が細胞表面の $TGF-\beta$ II型受容体に結合すると、 $TGF-\beta$ II型受容体により $TGF-\beta$ I型受容体がリン酸化され、活性化される。活性化された $TGF-\beta$ I型受容体により細胞内シグナル伝達分子がリン酸化され、活性化されると、細胞内へ $TGF-\beta$ のシグナルが伝えられる。
- [0015] 本発明で示される $TGF-\beta$ 、 $TGF-\beta$ I型受容体および $TGF-\beta$ II型受容体は、動物体内で作られるほか、マウスなどの哺乳細胞、昆虫細胞、大腸菌などの細胞を用いて作製することができ、化学合成によっても製造することができる。また培養細胞や化学合成によって作製する場合であれば、容易に変異体を作製することができる。ここで「変異体」とは、アミノ酸が1～数个置換されたものや各種タンパク質の一部分のアミノ酸配列を意味し、本来 $TGF-\beta$ 、 $TGF-\beta$ I型受容体および $TGF-\beta$ II型受容体が有している少なくとも一つ以上の活性を有しているタンパク質またはペプチドを意味する。アミノ酸が置換される場合、置換アミノ酸は天然または非天然のいずれのアミノ酸であってもよい。本発明で言う $TGF-\beta$ 、 $TGF-\beta$ I型受容体および $TGF-\beta$ II型受容体は、これらの変異体を含む。
- [0016] アプタマーとは、所定の標的分子に対する結合活性を有する核酸分子をいう。アプタマーは、所定の標的分子に対して結合することにより、所定の標的分子の活性を阻害し得る。本発明のアプタマーは、好ましくはRNAアプタマー、修飾RNAアプタマーまたはそれらの混合物であり得る。本発明のアプタマーはまた、直鎖状または環状の形態であり得る。

- [0017] 本発明のアプタマーはTGF- β II型受容体への結合能を有し、TGF- β とTGF- β II型受容体との結合を阻害することを特徴とする。具体的には、本発明のアプタマーはTGF- β II型受容体のTGF- β 結合領域に結合することで、TGF- β とTGF- β II型受容体との結合を競合的に阻害する。従って本発明のアプタマーはTGF- β とTGF- β II型受容体との結合を阻害することができる。このようなアプタマーとしては、例えば配列番号1～3のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーが挙げられる。ここで「TGF- β II型受容体への結合能を有する」とは、ランダム配列のRNAプールより高いTGF- β II型受容体への結合活性を有していることを意味する。
- [0018] また本発明のアプタマーは、TGF- β II型受容体に結合し、かつTGF- β とTGF- β II型受容体との結合を阻害することができる限り特に限定されず、既存のアプタマーを利用しやすくする目的で短鎖化したものであってもよく、そのようなアプタマーとしては、例えば「配列番号1～3のいずれかから選択されるヌクレオチド配列の一部を含むアプタマーであって、TGF- β II型受容体に結合し、かつTGF- β とTGF- β II型受容体との結合を阻害するアプタマー」が挙げられる。
- [0019] 本発明のアプタマーは、TGF- β II型受容体に結合し、かつTGF- β とTGF- β II型受容体との結合を阻害することができる限り、ヌクレオチドが置換、欠失、挿入または付加されたアプタマーも含むものである。置換、欠失、挿入または付加してもよいヌクレオチド数としては特に限定されないが、通常1～5個、好ましくは1～3個である。
- [0020] 本明細書中、「配列番号1～3のいずれかから選択されるヌクレオチド配列の一部を含むアプタマーであって、TGF- β II型受容体に結合し、かつTGF- β とTGF- β II型受容体との結合を阻害するアプタマー」の例としては、下記式
- [0021]

[化1]



[0022] (式中、

N 1 および N 2 は、互いに 3 塩基対の相補的塩基対合が可能な核酸塩基を示し、

N 3 および N 4 は、互いに 4 塩基対の相補的塩基対合が可能な核酸塩基を示し、

N 5 は、1 個の核酸塩基を示し、

N 6 および N 7 は、互いに 5 塩基対の相補的塩基対合が可能な核酸塩基を示し、

N 8 は、少なくとも 4 個の核酸塩基を示し、

N 2 の 3' 末端側塩基と N 3 の 5' 末端側塩基は連続し、

N 4 の 3' 末端側塩基と N 5 は連続し、

N 5 と N 6 の 5' 末端側塩基は連続し、

N 7 の 3' 末端側塩基と N 8 の 5' 末端側塩基は連続し、

N 1 ~ N 8 のそれぞれをつなぐ直線は、核酸塩基間の水素結合を示し、そして

N 1 ~ N 8 のそれぞれをつなぐ曲線は、ループ部分を示す。) で表される二次構造を採るヌクレオチド配列を含み、TGF- β II 型受容体に結合し、かつ TGF- β と TGF- β II 型受容体との結合を阻害するアプタマー

が挙げられる。

[0023] ここでN 1 およびN 2 で表される「互いに3塩基対の相補的塩基対合が可能な核酸塩基」とは、「ループ部分を挟んで互いに相補的塩基対を形成することができる3個の核酸塩基」を意味し、例えばN 1 がGGGの場合、N 2 はCCCである。N 3 およびN 4 で表される「互いに4塩基対の相補的塩基対合が可能な核酸塩基」とは、「ループ部分を挟んで互いに相補的塩基対を形成することができる4個の核酸塩基」を意味し、例えばN 3 がCGGGの場合、N 4 はCCCGである。N 6 およびN 7 で表される「互いに5塩基対の相補的塩基対合が可能な核酸塩基」とは、「ループ部分を挟んで互いに相補的塩基対を形成することができる5個の核酸塩基」を意味し、例えばN 6 がGGCCGの場合、N 7 はCGGCCである。

N 5 で表される「1個の核酸塩基」はどのような核酸塩基であってもよく、例えばA（アデニン）、C（シトシン）、G（グアニン）およびU（ウラシル）からなる群から選択される核酸塩基である。好ましくはAである。

N 8 で示される「少なくとも4個の核酸塩基」はどのような核酸塩基であってもよく、例えばA（アデニン）、C（シトシン）、G（グアニン）およびU（ウラシル）からなる群から選択される核酸塩基を4個以上結合させたものである。当該4個の核酸塩基のうち、はじめの4塩基は好ましくはGACAである。

連続する、N 2 の3'末端側塩基とN 3 の5'末端側塩基、N 4 の3'末端側塩基とN 5、N 5 とN 6 の5'末端側塩基およびN 7 の3'末端側塩基とN 8 の5'末端側塩基のそれぞれの結合態様は特に限定されず、例えば3'-5'ホスホジエステル結合、2'-5'ホスホジエステル結合などのホスホジエステル結合や、ホスホジエステル結合を構成する酸素の一部または全部を硫黄原子で置換したホスホロチオエート結合などが挙げられる。

[0024] 本発明のアプタマーは、任意の哺乳動物のTGF- β とTGF- β I I型受容体との結合を阻害する活性を有し得る。このような哺乳動物としては、例えば、霊長類（例、ヒト、サル）、げっ歯類（例、マウス、ラット、モル

モット)、並びにペット、家畜及び使役動物(例、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ)が挙げられる。

[0025] 本発明のアプタマーの長さは特に限定されず、通常、約10~約200ヌクレオチドであり得るが、例えば約100ヌクレオチド以下であり、好ましくは約75ヌクレオチド以下であり得る。総ヌクレオチド数が少なければ、化学合成及び大量生産がより容易であり、かつコスト面でのメリットも大きい。また、化学修飾も容易であり、生体内安定性も高く、毒性も低いと考えられる。

[0026] 本発明のアプタマーに含まれる各ヌクレオチドは、それぞれリボース(例、ピリミジンヌクレオチドのリボース、プリンヌクレオチドのリボース)の2'位においてヒドロキシ基を含むヌクレオチド(即ち、未置換であるヌクレオチド)であるか、あるいは同一又は異なって、リボースの2'位において、ヒドロキシ基が、任意の原子又は基で置換(修飾)されているヌクレオチド(本発明において、「置換ヌクレオチド」または「修飾ヌクレオチド」と記載する場合がある)であり得る。

[0027] このような任意の原子又は基としては、例えば、水素原子、フッ素原子、 $-O-$ アルキル基(例、 $-O-Me$ 基)、 $-O-$ アシル基(例、 $-O-CHO$ 基)又はアミノ基(例、 $-NH_2$ 基)で置換されているヌクレオチドが挙げられる。本発明のアプタマーはまた、ピリミジンヌクレオチドの少なくとも一つが修飾ヌクレオチドであるようなアプタマーであり得る。

[0028] 本発明のアプタマーはまた、ピリミジンヌクレオチドの少なくとも一つ、好ましくは全てのピリミジンヌクレオチドが、リボースの2'位においてフッ素原子で置換されるヌクレオチドであるか、あるいは同一または異なって、上述した任意の原子又は基、好ましくは、水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群より選ばれる原子または基で置換されているヌクレオチドであり得る。

[0029] 本発明のアプタマーはまた、

(a) TGF- β I I型受容体に結合し、かつTGF- β とTGF- β I I

型受容体との結合を阻害することを特徴とするアプタマーであって、配列番号 1～3 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列の全部または一部を含み、該アプタマーに含まれるピリミジンヌクレオチドのリボースの 2' 位が、同一または異なってフッ素原子であるか、あるいは水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群から選択される原子または基で置換されている、アプタマー；

(b) TGF- β II 型受容体に結合し、かつ TGF- β と TGF- β II 型受容体との結合を阻害することを特徴とするアプタマーであって、配列番号 1～3 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列において、1～5 個（好ましくは 1～3 個、より好ましくは 1 または 2 個）のヌクレオチドが置換、欠失、挿入または付加されたヌクレオチド配列の全部または一部を含み、該アプタマーに含まれるピリミジンヌクレオチドのリボースの 2' 位が、同一または異なってフッ素原子であるか、あるいは水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群から選択される原子または基で置換されている、アプタマー；

(c) 上記 (a) の複数の連結物、上記 (b) の複数の連結物、上記 (a) 及び (b) の複数の連結物からなる群より選ばれる連結物；
であり得る。

[0030] 上記アプタマーのうち、(a) における「TGF- β II 型受容体に結合し、かつ TGF- β と TGF- β II 型受容体との結合を阻害することを特徴とするアプタマーであって、配列番号 1～3 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列の一部を含み、該アプタマーに含まれるピリミジンヌクレオチドのリボースの 2' 位が、同一または異なってフッ素原子であるか、あるいは水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群から選択される原子または基で置換されている、アプタマー」の例としては、前記した「配列番号 1～3 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列の一部を含むアプタマーであって、TGF- β II 型受容体に結合し、かつ TGF- β と TGF- β II 型受容体との結合を阻害するアプタマー」の例として記載したアプタ

マーのうち、該アプタマーに含まれるピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位が、同一または異なってフッ素原子であるか、あるいは水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群から選択される原子または基で置換されている、アプタマーが挙げられる。

[0031] また上記アプタマーのうち、(b)における「TGF- β I I型受容体に結合し、かつTGF- β とTGF- β I I型受容体との結合を阻害することを特徴とするアプタマーであって、配列番号1~3のいずれかから選択されるヌクレオチド配列において、1~5個（好ましくは1~3個、より好ましくは1または2個）のヌクレオチドが置換、欠失、挿入または付加されたヌクレオチド配列の一部を含み、該アプタマーに含まれるピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位が、同一または異なってフッ素原子であるか、あるいは水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群から選択される原子または基で置換されている、アプタマー」の例としては、前記した「配列番号1~3のいずれかから選択されるヌクレオチド配列の一部を含むアプタマーであって、TGF- β I I型受容体に結合し、かつTGF- β とTGF- β I I型受容体との結合を阻害するアプタマー」の例として記載したアプタマーから1~5個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入または付加されており、かつ該アプタマーに含まれるピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位が、同一または異なってフッ素原子であるか、あるいは水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群から選択される原子または基で置換されている、アプタマーが挙げられる。

[0032] 上記(b)のアプタマーは、(a)のアプタマーに変異を導入し、後述のSELEXを再度行うことでも得ることができる。このようにして得られるアプタマーは(a)のRNAよりも結合活性や生理活性が高い可能性がある。このようにRNAに変異を導入することにより、種々の目的に合ったアプタマーを作製することができる。

[0033] 上記(c)において連結はタンデム結合にて行われ得る。また、連結に際し、リンカーを利用してもよい。リンカーとしては、ヌクレオチド鎖（例、

1～約20ヌクレオチド)、非ヌクレオチド鎖(例、 $-(CH_2)_n$ -リンカー、 $-(CH_2CH_2O)_n$ -リンカー、ヘキサエチレングリコールリンカー、TEGリンカー、ペプチドを含むリンカー、 $-S-S-$ 結合を含むリンカー、 $-CONH-$ 結合を含むリンカー、 $-OPO_3-$ 結合を含むリンカー)が挙げられる。上記複数の連結物における複数とは、2以上であれば特に限定されないが、例えば2個、3個又は4個であり得る。

[0034] 本発明のアプタマーは、 $TGF-\beta II$ 型受容体に対する結合性、安定性、薬物送達性等を高めるため、各ヌクレオチドの糖残基(例、リボース)が修飾されたものであってもよい。糖残基において修飾される部位としては、例えば、糖残基の2'位、3'位及び/又は4'位の酸素原子を他の原子に置き換えたものなどが挙げられる。修飾の種類としては、例えば、フルオロ化、 O -アルキル化(例、 O -メチル化、 O -エチル化)、 O -アリル化、 S -アルキル化(例、 S -メチル化、 S -エチル化)、 S -アリル化、アミノ化(例、 $-NH_2$)が挙げられる。このような糖残基の改変は、自体公知の方法により行うことができる(例えば、Sproat et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973) Biochemistry 12, 5138-5145参照)。

[0035] 本発明のアプタマーはまた、 $TGF-\beta II$ 型受容体に対する結合性等を高めるため、核酸塩基(例、プリン、ピリミジン)が改変(例、化学的置換)されたものであってもよい。このような改変としては、例えば、5位ピリミジン改変、6および/または8位プリン改変、環外アミンでの改変、4-チオウリジンでの置換、5-プロモ又は5-ヨードウラシルでの置換が挙げられる。また、ヌクレアーゼ及び加水分解に対して耐性であるように、本発明のアプタマーに含まれるリン酸基が改変されていてもよい。例えば、 $P(O)O$ 基が、 $P(O)S$ (チオエート)、 $P(S)S$ (ジチオエート)、 $P(O)NR_2$ (アミデート)、 $P(O)R$ 、 $R(O)OR'$ 、 CO 又は CH

2 (ホルムアセタール) 又は 3' -アミン (-NH-CH₂-CH₂-) で置換されていてもよい [ここで各々の R 又は R' は独立して、H であるか、あるいは置換されているか、又は置換されていないアルキル (例、メチル、エチル) である]。

連結基としては、-O-、-N- 又は -S- が例示され、これらの連結基を通じて隣接するヌクレオチドに結合し得る。

改変はまた、キャッピングのような 3' 及び 5' の改変を含んでもよい。

[0036] 改変はさらに、ポリエチレングリコール、アミノ酸、ペプチド、*inverted dT*、核酸、ヌクレオシド、*Myristoyl*、*Lithocolic-oleyl*、*Docosanyl*、*Lauroyl*、*Stearoyl*、*Palmitoyl*、*Oleoyl*、*Linoleoyl*、その他脂質、ステロイド、コレステロール、カフェイン、ビタミン、色素、蛍光物質、抗癌剤、毒素、酵素、放射性物質、ビオチン、カラム担体などを末端に付加することにより行われ得る。核酸を付加する場合、付加される核酸の長さは特に限定されないが、100mer 以下であることが好ましく、30mer 以下であることが更に好ましい。上記カラム担体としては、例えばアガロースやセファロースが挙げられる。このような改変については、例えば、米国特許第 5,660,985 号、同第 5,756,703 号を参照のこと。

[0037] 本発明のアプタマーは、本明細書中の開示及び当該技術分野における自体公知の方法により化学合成することができる。アプタマーは、リン酸基の負電荷を利用したイオン結合、リボースを利用した疎水結合および水素結合、核酸塩基を利用した水素結合やスタッキング結合など多様な結合様式により標的物質と結合する。特に、構成ヌクレオチドの数だけ存在するリン酸基の負電荷を利用したイオン結合は強く、タンパク質の表面に存在するリジンやアルギニンの正電荷と結合する。このため、標的物質との直接的な結合に関わっていない核酸塩基は置換することができる。特に、ステム構造の部分は既に塩基対が作られており、また、二重らせん構造の内側を向いているので

、核酸塩基は、標的物質と直接結合し難い。従って、塩基対を他の塩基対に置換してもアプタマーの活性は減少しない場合が多い。ループ構造など塩基対を作っていない構造においても、核酸塩基が標的分子との直接的な結合に関与していない場合に、塩基の置換が可能である。リボースの2'位の修飾に関しては、まれにリボースの2'位の官能基が標的分子と直接的に相互作用していることがあるが、多くの場合無関係であり、他の修飾分子に置換可能である。このようにアプタマーは、標的分子との直接的な結合に関与している官能基を置換または削除しない限り、その活性を保持していることが多い。また、全体の立体構造が大きく変わらないことも重要である。

[0038] アプタマーは、SELEX法及びその改良法（例えば、A. D. Ellington et al., (1990) Nature, 346, 818-822; C. Tuerk et al., (1990) Science, 249, 505-510）を利用することで作製することができる。SELEX法ではラウンド数を増やしたり、競合物質を使用することで、標的物質に対してより結合力の強いアプタマーが濃縮され、選別されてくる。よって、SELEXのラウンド数を調節したり、及び／又は競合状態を変化させることで、結合力が異なるアプタマー、結合形態が異なるアプタマー、結合力や結合形態は同じであるが塩基配列が異なるアプタマーを得ることができる場合がある。また、SELEX法にはPCRによる増幅過程が含まれるが、その過程でマンガンイオンを使用するなどして変異を入れることで、より多様性に富んだSELEXを行うことが可能となる。

[0039] SELEXで得られるアプタマーは標的物質に対して親和性が高い核酸であり、そのことは標的物質の活性部位に結合することを意味しない。従って、SELEXで得られるアプタマーは必ずしも標的物質の機能に作用するとは限らないことに注意すべきである。このようにして選ばれた活性のあるアプタマーは、最適化SELEXを行うことで、更に高性能化することが可能である。最適化SELEXとは、ある配列が決まっているアプタマーの一部をランダム配列にしたテンプレートや10～30%程度のランダム配列をド

ープしたテンプレートを作製して、再度SELEXを行うものである。

[0040] SELEXで得られるアプタマーは70ヌクレオチド程度の長さがあり、これをそのまま医薬にすることは難しい。そこで容易に化学合成ができる50ヌクレオチド程度以下の長さまで短くする場合がある。このような本発明のアプタマーとしては、TGF- β II型受容体に結合し、かつTGF- β とTGF- β II型受容体との結合を阻害することができる限り特に限定されるものではないが、例えば、配列番号1~3のいずれかから選択されるヌクレオチド配列の一部を含む、TGF- β とTGF- β II型受容体との結合を阻害するアプタマーが挙げられる。すなわち本発明のアプタマーには、TGF- β II型受容体に結合し、かつTGF- β とTGF- β II型受容体との結合を阻害するアプタマーであって、配列番号1~3のいずれかから選択されるヌクレオチド配列の全部または一部を含むアプタマーも含まれる。

SELEXで得られるアプタマーはそのプライマー設計に依存して、その後の最小化作業のしやすさが変わる場合がある。

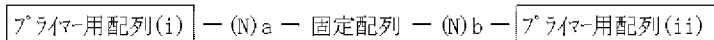
[0041] アプタマーは化学合成が可能であるので容易に改変することができる。アプタマーはMFOLDプログラムを用いてその二次構造を予測することができる。またX線解析やNMR解析により立体構造を予測することも可能である。これらの構造予測により、どのヌクレオチドを置換または欠損することが可能か、また、どこに新たなヌクレオチドを挿入可能か否かを予測することができる。予測された新しい配列のアプタマーは容易に化学合成することができ、そのアプタマーが活性を保持しているかどうかは、既存のアッセイ系により確認することができる。また、修飾に関しても配列の長さと同様に高度に設計又は改変可能である。

[0042] 以上のように、アプタマーは高度に設計又は改変可能である。本発明はまた、所定の配列（例、ステム部分、インターナルループ部分、ヘアピンループ部分及び一本鎖部分から選ばれる部分に対応する配列：以下、必要に応じて固定配列と省略する）を含むアプタマーを高度に設計又は改変可能である

アプタマーの製造方法を提供する。

[0043] 例えば、このようなアプタマーの製造方法は、下記：

[0044] [化2]



[0045] [上記において、(N) aはa個のNからなるヌクレオチド鎖を示し、(N) bは、b個のNからなるヌクレオチド鎖を示し、Nはそれぞれ、同一又は異なって、A、G、C、U及びT（好ましくは、A、G、C及びU）からなる群より選ばれるヌクレオチドである。a、bはそれぞれ、同一又は異なって、任意の数であり得るが、例えば1～約100、好ましくは1～約50、より好ましくは1～約30、さらにより好ましくは1～約20又は1～約10であり得る。]で表されるヌクレオチド配列からなる単一種の核酸分子又は複数種の核酸分子（例、a、bの数等が異なる核酸分子のライブラリ）、及びプライマー用配列(i)、(ii)にそれぞれ対応するプライマー対を用いて、固定配列を含むアプタマーを製造することを含む。

[0046] 本発明はまた、本発明のアプタマー及びそれに結合した機能性物質を含む複合体を提供する。本発明の複合体におけるアプタマーと機能性物質との間の結合は共有結合、または非共有結合であり得る。本発明の複合体は、本発明のアプタマーと1以上（例、2又は3個）の同種又は異種の機能性物質とが結合したものであり得る。機能性物質は、本発明のアプタマーに何らかの機能を新たに付加するもの、あるいは本発明のアプタマーが保持し得る何らかの特性を変化（例、向上）させ得るものである限り特に限定されない。機能性物質としては、例えば、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、糖質、単糖、ポリヌクレオチド、ヌクレオチドが挙げられる。機能性物質としてはまた、例えば、親和性物質（例、ビオチン、ストレプトアビジン、標的相補配列に対して親和性を有するポリヌクレオチド、抗体、グルタチオンセファロース、ヒスチジン）、標識用物質（例、蛍光物質、発光物質、放射性同位体）、酵素（例、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ）、薬物送達媒体（例、リポソーム、ミクロスフェア、ペプチド、ポリエチ

レングリコール類)、薬物(例、カリケアマイシンやデュオカルマイシンなどミサイル療法に使用されているもの、シクロフォスファミド、メルファラン、イホスファミドまたはトロホスファミドなどのナイトロジェンマスタード類似体、チオテパなどのエチレンイミン類、カルムスチンなどのニトロソ尿素、テモゾロミドまたはダカルバジンなどのリースト剤、メトトレキセートまたはラルチトレキセドなどの葉酸類似代謝拮抗剤、チオグアニン、クラドリビンまたはフルダラビンなどのプリン類似体、フルオロウラシル、テガフルまたはゲムシタビンなどのピリミジン類似体、ビンブラスチン、ビンクリスチンまたはビンオレルビンなどのビンカアルカロイド及びその類似体、エトポシド、タキサン、ドセタキセルまたはパクリタキセルなどのポドフィロトキシン誘導体、ドキシソルビシン、エピルビシン、イダルビシン及びミトキサントロンなどのアントラサイクリン類及び類似体、ブレオマイシン及びミトマイシンなどの他の細胞毒性抗生物質、シスプラチン、カルボプラチン及びオキザリプラチンなどの白金化合物、ペントスタチン、ミルテフォシン、エストラムスチン、トポテカン、イリノテカン及びビカルタミド)、毒素(例、リシン毒素、リア毒素及びベロ毒素)が挙げられる。これらの機能性分子は最終的に取り除かれる場合がある。更に、トロンビンやマトリックスメタルプロテアーゼ(MMP)、Factor Xなどの酵素が認識して切断することができるペプチド、ヌクレアーゼや制限酵素が切断できるポリヌクレオチドであってもよい。

[0047] 本発明のアプタマーまたは複合体は、医薬又は診断薬、検査薬、試薬として使用され得る。特に本発明のアプタマーまたは複合体はTGF- β II型受容体を介したTGF- β の細胞内シグナル伝達を阻害するので、例えばTGF- β の作用に起因する種々の疾患、TGF- β の作用により惹起される各種臓器での組織繊維症、または組織繊維症を伴う種々の疾患の医薬、診断薬、検査薬、試薬などとして有用である。

[0048] ここで、「TGF- β の作用に起因する種々の疾患」としては、腎疾患(例、腎繊維症、腎炎、腎不全、腎硬化症など)、肺疾患(例、肺繊維症、肺

炎など）、肝臓疾患（例、肝臓組織繊維症、肝硬変、肝炎など）、皮膚疾患（例、創傷、強皮症、乾癬、ケロイドなど）、関節炎（例、慢性関節リウマチ、変形性関節症など）、血管疾患（例、血管再狭窄、リウマチ性血管炎など）が挙げられる。また「組織繊維症を伴う種々の疾患」としては、種々臓器における癌（特に癌の浸潤、転移）、動脈硬化症などが挙げられる。

[0049] 本発明の医薬は、医薬上許容される担体が配合されたものであり得る。医薬上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウムグリコーラスターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

[0050] 経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水、オレンジジュースのような希釈液に有効量のリガンドを溶解させた液剤、有効量のリガンドを固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤又は錠剤、適当な分散媒中に有効量の有効成分を懸濁させた懸濁液剤、有効量の有効成分を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等である。

[0051] また、本発明の医薬は必要により、味のマスクング、腸溶性あるいは持続

性などの目的のため、自体公知の方法でコーティングすることができる。コーティングに用いられるコーティング剤としては、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリオキシエチレングリコール、ツイーン 80、プルロニック F68、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシメチルセルロースアセテートサクシネート、オイドラギット（ローム社製、ドイツ、メタアクリル酸・アクリル酸共重合体）および色素（例、ベンガラ、二酸化チタンなど）などが用いられる。当該医薬は、速放性製剤、徐放性製剤のいずれであってもよい。徐放の基材としては、例えば、リポソーム、アテロコラーゲン、ゼラチン、ヒドロキシアパタイト、PLGAなどが挙げられる。

[0052] 非経口的な投与（例えば、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、局所投与、腹腔内投与、経鼻投与、経肺投与など）に好適な製剤としては、水性及び非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性及び非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分及び医薬上許容される担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌の溶媒に溶解又は懸濁すればよい状態で保存することもできる。更に注射液剤以外にも、吸入剤、軟膏剤も可能である。吸入剤の場合、凍結乾燥状態の有効成分を微細化し適当な吸入デバイスを用いて吸入投与する。吸入剤には、更に必要に応じて従来より使用されている界面活性剤、油、調味料、シクロデキストリンまたはその誘導体等を適宜配合することができる。

[0053] 本発明の医薬の投与量は、有効成分の種類・活性、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、通常、成人1日あたり有効分量として約0.0001～約100mg/kg、例えば約0.0001～約10mg/kg、好ましくは約0.005～

約 1 mg / kg であり得る。

[0054] 本発明はまた、本発明のアプタマーまたは複合体が固定化された固相担体を提供する。固相担体としては、例えば、基板、樹脂、プレート（例、マルチウェルプレート）、フィルター、カートリッジ、カラム、多孔質材が挙げられる。基板は、DNAチップやプロテインチップなどに使われているものなどであり得、例えば、ニッケル-PTFE（ポリテトラフルオロエチレン）基板やガラス基板、アパタイト基板、シリコン基板、アルミナ基板などで、これらの基板にポリマーなどのコーティングを施したものが挙げられる。樹脂としては、例えば、アガロース粒子、シリカ粒子、アクリルアミドとN, N'-メチレンビスアクリルアミドの共重合体、ポリスチレン架橋ジビニルベンゼン粒子、デキストランをエピクロロヒドリンで架橋した粒子、セルロースファイバー、アリルデキストランとN, N'-メチレンビスアクリルアミドの架橋ポリマー、単分散系合成ポリマー、単分散系親水性ポリマー、セファロース、トヨパールなどが挙げられ、また、これらの樹脂に各種官能基を結合させた樹脂も含まれる。本発明の固相担体は、例えばTGF- β I I型受容体の精製、TGF- β I I型受容体の検出、TGF- β I I型受容体の定量などに有用であり得る。

[0055] 本発明のアプタマーまたは複合体は、自体公知の方法により固相担体に固定できる。例えば、親和性物質（例、上述したもの）や所定の官能基を本発明のアプタマーまたは複合体に導入し、次いで当該親和性物質や所定の官能基を利用して固相担体に固定化する方法が挙げられる。本発明はまた、このような方法を提供する。所定の官能基は、カップリング反応に供することが可能な官能基であり得、例えば、アミノ基、チオール基、ヒドロキシ基、カルボキシル基が挙げられる。本発明はまた、このような官能基が導入されたアプタマーを提供する。

[0056] 本発明はまた、TGF- β I I型受容体の検出及び定量方法を提供する。本発明の検出及び定量方法は、本発明のアプタマーを利用して（例、本発明の複合体及び固相担体の使用により）TGF- β I I型受容体を測定するこ

とを含み得る。TGF- β I I型受容体の検出及び定量方法は、抗体の代わりに本発明のアプタマーを用いること以外は、免疫学的方法と同様の方法により行われ得る。従って、抗体の代わりに本発明のアプタマーを用いることにより、酵素免疫測定法（E I A）（例、直接競合E L I S A、間接競合E L I S A、サンドイッチE L I S A）、放射免疫測定法（R I A）、蛍光免疫測定法（F I A）、ウエスタンブロット法（例、ウエスタンブロット法における二次抗体の代わりとしての使用）、免疫組織化学的染色法、セルソーティング法等の方法と同様の方法により、検出及び定量を行うことができる。このような方法は、例えば、生体又は生物学的サンプルにおけるTGF- β I I型受容体量の測定に有用であり得る。

[0057] 本明細書中で挙げられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、本明細書での引用により、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

実施例

[0058] 以下、本発明の実験の手法を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

[0059] [実施例 1] 組換えTGF- β I I型受容体の精製

細胞内ドメインおよび細胞膜貫通ドメインを欠失させ、C末端をヒスチジン（His）標識したヒト可溶化型TGF- β I I型受容体（sT β R I I-8His）の発現ベクターを構築した。次いでこの発現ベクターを、293fectin-トランスフェクション試薬（Invitrogen社製）を用いて、FreeStyle 293細胞へ導入した。次いで培養上清からTALON Metal Affinity Resins（Clontech社製）を用いて、組換えsT β R I I-8Hisを精製した。

[0060] [実施例 2] 細胞培養

FreeStyle 293細胞株は、FreeStyle 293発現培地（Invitrogen社製）を用いて培養した。293T細胞株はD

MEM (Invitrogen社) に、Hep3B細胞株はMEM (Invitrogen社) に、SNU-16細胞株はRPMI1640 (Invitrogen社) に10%ウシ胎児血清 (JRHBiosciences社)、100単位/mlペニシリン-100 μ g/mlストレプトマイシン (Invitrogen社) を添加して培養した。

[0061] [実施例3] RNAアプタマーの選択

SELEX法によるRNAアプタマーの取得はEllingtonらの方法 (Ellington A. D. and Szostak J. W., *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*, *Nature*, 346: 818-822, 1990)、およびTuerkらの方法 (Tuerk C. and Gold L., *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*, *Science*, 249: 505-510, 1990) を改良した方法、すなわち精製したsT β RII-8Hisを、TALON Metal Affinity ResinsまたはNi-NTA Agaroseに固相化し、40塩基のランダム配列を持つRNAプール (N40ランダムRNAプール) に対するSELEX法を行うことで得た。具体的には、以下のとおりである。

まずSELEX法に用いたN40ランダムRNAプールは、化学合成した下記のF1プライマーと40塩基のランダム配列を持つテンプレート (オペロンバイオテクノロジー社、Invitrogen社に合成依頼) より作製した。ランダム配列テンプレートはEx Taq Hot Start Version (タカラバイオ社製) をもちいたPCRによって増幅させ、このDNA断片を転写のテンプレートとして、F1プライマーに含まれるT7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列により、DuraScribe T7 Transcription Kits (Epicentre Te

chnologies社製)をもちいて*in vitro*で転写し、フェノール抽出とゲルろ過により精製し、N40ランダムRNAプールとした。

[0062] TALON Metal Affinity ResinsまたはNi-NTA Agarose (Qiagen社製)に固相化したsTβRII-8HisとN40ランダムRNAプール内のRNAの結合は、バッファーA [20mM Tris-HCl, 80mM potassium acetate, 2.5mM magnesium acetate, 1mM dithiothreitol] 中で行った。

TALON Metal Affinity ResinsまたはNi-NTA AgaroseをバッファーAで洗浄した後、300mMイミダゾールを用いてsTβRII-8Hisとこれに結合したRNAを遊離させた。このRNAを基にRT-PCRを行ってDNAテンプレートを増幅した後、*in vitro*で転写を行い、次のラウンドのRNAプールを作製した。

[0063] 6ラウンドまでこのサイクルを回した後、濃縮されてきたRNAに対応するcDNAをpGEM T-EASY Vector (Promega社製)にクローン化し、大腸菌株DH5α (東洋紡績社製)を形質転換して単一クローンを得た。プラスミドDNAを抽出後、以下のシーケンスプライマーを用いてDNAシーケンサーModel 3100 (ABI社製)により塩基配列を決定した。その結果、20種類の収束したRNAが得られた。

[0064] (配列番号4) F1プライマー:

5' - TAATACGACTCACTATAGGGACACAATGGAC
G-3' (T7プロモーター配列を下線で示した)

(配列番号5) ランダム配列テンプレート:

5' - CTCTCATGTCGGCCGTTA-N40-CGTCCATT
GTGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

(配列番号6) シーケンスプライマー:

5' - GTTTTTCCCAGTCACGAC-3'

[0065] 得られた塩基配列に対してMFOLDプログラムを適用し、RNAの二次構造予測を行った。

[0066] [実施例4] 表面プラズモン共鳴による結合反応速度の解析

収束したRNAのTβRIIへの結合活性を表面プラズモン共鳴解析により検討した。poly(dT)₁₆オリゴヌクレオチドの5'末端をビオチン化し、ストレプトアビジンセンサーチップ(GEヘルスケアバイオサイエンス社)上に固定化した。さらに3'末端にpoly(A)₁₆を付加した、収束RNAを添加して固定化した。

次いで、sTβRII(R&D Systems社製)、あるいはTβ-sTβRIIを添加し、BIACORE 2000(Biacore AB社製)を用いて表面プラズモン共鳴解析を行うことで、結合反応速度を測定した(図1)。RNAとsTβRII、あるいはTβ-sTβRIIが結合すると光学的な変化が起こり、センサーグラム上でResonance Unitsの上昇が観察される。N40ランダムRNAプールとsTβRII、あるいはTβ-sTβRIIとの非特異的な結合をバックグラウンドとして測定を行った。得られたセンサーグラムをBIAevaluation(BIACORE社製)ソフトウェアで解析し、解離定数(Kd値)を算出した。収束したRNAのうち、13種類がsTβRIIに対し結合能を有する抗TβRIIRNAアプタマーであった。算出した結合解離定数(Kd)は、 $2.9 \times 10^{-9} \text{M} \sim 10.4 \times 10^{-9} \text{M}$ であった。

[0067] [実施例5] 蛍光標識RNA、あるいは蛍光標識抗体による細胞染色

次に、抗TβRIIRNAアプタマーが細胞膜上で発現されるTβRIIに結合できるか検討した。

N40ランダムRNAプールおよびRNAアプタマーは、ULYSIS Nucleic Acid Labeling Kits(Invitrogen社製)を用いてAlexa Fluor 488で標識した。

次いで標識されたアプタマーが、表面プラズモン共鳴解析により非標識RNAアプタマーと同様にsTβRIIに結合することを確認した。

Poly-D-Lysine BioCoat culture slides (BD Biosciences社製) 上で培養したヒト胎児腎細胞株293Tに対して、FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Applied Science社製) を用いてヒトTβRIIの発現プラスミドを一過性に導入し、ヒトTGF-βII型受容体を発現させた。48時間後に細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した。さらに、10%BSA-PBSでブロッキングした後、Alexa Fluor 488標識RNA、あるいは抗ヒトTβRII抗体 (SantaCruz社製) とAlexa Fluor 488標識抗ウサギIgG抗体 (Invitrogen社製) を用いて細胞を染色した。細胞核DNAはDAPI Nucleic Acid Stain (Invitrogen社製) で染色した。VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories社製) を用いて包埋し、倒立型リサーチ顕微鏡IX71 (オリンパス社) で蛍光を観察した。

Alexa Fluor 488標識抗TβRIIRNAアプタマーを用いてヒトTβRII発現293T細胞を染色すると、抗ヒトTβRII抗体を用いた免疫染色と同様に蛍光が観察されたが、親株である293T細胞を染色しても蛍光は観察されなかった。一方、Alexa Fluor 488標識N40ランダムRNAを用いてヒトTβRII発現293T細胞、親株293T細胞を染色したが、どちらも蛍光は観察されなかった。これらの結果から、得られた抗TβRIIRNAアプタマーが、抗ヒトTβRII抗体と同様に、細胞表面に発現するTβRIIを特異的に認識し、結合することが示された。

[0068] [実施例6] TGF-β結合領域を認識する抗TβRIIRNAアプタマーの探索

s TβRIIに対し結合能を有する13種類の抗TβRIIRNAアプタマーの中に、TβRIIのTGF-β結合領域を認識するRNAアプタマーがあるか否かを検索した。

上述のようにストレプトアビジンセンサーチップにRNAアプタマーを固定化し、sTβRII、あるいは予めTGF-βを結合させたsTβRII (Tβ-sTβRII) を添加し表面プラズモン共鳴解析を行った(図2)。13種類のアプタマーのうち、2RA5と名づけられたRNAアプタマーはsTβRIIに結合したが、Tβ-sTβRIIとは結合しなかった。一方、2RA1と名づけられたアプタマーを含む他の12種類のアプタマーは、sTβRIIおよびTβ-sTβRIIの両方と結合した。

以上の結果、2RA5のみがTβRIIのTGF-β結合領域を認識しこの領域に結合していることがわかった。2RA5は配列番号1で示されるヌクレオチド配列からなるRNAアプタマーである(以下、配列番号1で示されるヌクレオチド配列からなるRNAアプタマーを「2RA5」と記載する場合がある)。

[0069] 〔実施例7〕 RNAアプタマーによるTβRII、Tβ-TβRIIの沈降

さらに、実施例6で得られたRNAアプタマーである2RA5が、細胞可溶化物からTβRII、あるいはTGF-βとTβRIIの複合体(Tβ-TβRII)を分離できるか否かを検討した。

N40ランダムRNA、RNAアプタマー(2RA1、2RA5)のそれぞれの3'末端にpoly(A)₁₆を付加し、Oligo(dT)₃₀を固定化したラテックス粒子、Oligotex-dT30 Super(タカラバイオ社製)に塩基対合を介して固定化した。次いでヘムアグルチニン(HA)標識ヒトTβRII(TβRII-HA)を発現させた293T細胞を、未刺激で、あるいはTGF-βで刺激した後、2mM DSS(Pierce社製)で処理して結合したTGF-βとTβRIIとを架橋し、細胞可溶化物とした。RNAを固定化したOligotex-dT30 Superと細胞可溶化物とを混合し、反応させた後、PBSで洗浄した。Oligotex-dT30 SuperからRNAとそれに結合するたんぱく質を回収し、SDS-PAGEおよびペルオキシダーゼ(HRP)標識抗HAMONOクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。当該

ウェスタンブロットニングでは、Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GEヘルスケア社製)とHRPを反応させ、LAS-1000 Plus (富士フィルム社製)で検出し、 $T\beta R I I$ 、 $T\beta-T\beta R I I$ がRNAアプタマーにより沈降されたか解析した。

その結果、2RA5は $T\beta R I I$ を分離したが、 $T\beta-T\beta R I I$ は分離できなかった。一方、2RA1は $T\beta R I I$ のみならず $T\beta-T\beta R I I$ も分離し、N40ランダムRNAはどちらも分離しなかった。以上の結果から2RA5が $T\beta R I I$ のTGF- β 結合領域に結合していることが明らかとなり、2RA5がTGF- β と $T\beta R I I$ との結合を阻害しTGF- β の生理作用を抑制する可能性が示唆された。

[0070] 〔実施例8〕 RNAアプタマーによるTGF- β シグナル伝達の抑制

次に、本発明のRNAアプタマーが*in vitro*においてTGF- β と $T\beta R I I$ との結合を阻害し、TGF- β のシグナル伝達を抑制するか検討した。

TGF- β が $T\beta R I I$ に結合すると、細胞質内に存在するTGF- β のシグナル伝達分子であるSmad2、Smad3が活性化される。活性化されたSmad2、Smad3はSmad4とヘテロ複合体を形成し、細胞質から核へと移行し転写因子として機能するようになる。FLAG標識Smad3 (FLAG-Smad3)、Smad4、 $T\beta R I$ 、 $T\beta R I I$ の発現プラスミドを293T細胞へ、FLAG-Smad3の発現プラスミドをヒト肝癌細胞株Hep3Bへ導入、発現させ、TGF- β で刺激すると、FLAG-Smad3の核内移行が観察された。そこで、細胞をs $T\beta R I I$ 、N40ランダムRNA、RNAアプタマー(2RA1、2RA5)それぞれの存在下でTGF- β で刺激し、FLAG-Smad3の核内移行を抗FLAGモノクローナル抗体とAlexa Fluor 568標識抗マウスIgG抗体を用いて観察した。

その結果、s $T\beta R I I$ と同様に、2RA5存在下においてFLAG-S

mad3の核内移行が著明に阻害された。これに対し、N40ランダムRNA、2RA1存在下ではFLAG-Smad3の核内移行は阻害されなかった。以上の結果から、2RA5はTβRIIへのTGF-βの結合を阻害することで、TGF-βを介したシグナル伝達経路を阻害し、TGF-β由来の生理作用を抑制できることがわかった。

[0071] 〔実施例9〕RNAアプタマーの短鎖化

標的物質に対する結合能を維持したまま塩基数を減らし、分子量を減少させる目的で、2RA5の小型化を試みた。

2RA5のMFOLDプログラムによって予想された二次構造をもとに、2RA5の複数の欠損変異体を作製し、表面プラズモン共鳴解析により各欠損変異体のsTβRIIに対する結合能を調べた。73塩基長の2RA5から9塩基欠失させた「2RA5S1」と名づけられたRNAアプタマー、そして14塩基欠失させた「2RA5S2」と名づけられたRNAアプタマーは、2RA5とよく似た二次構造と同様の結合活性を有していた(図3)。

2RA5S1、2RA5S2の塩基配列は、配列番号2、配列番号3にそれぞれ示される。

[0072] 〔実施例10〕RNAアプタマーによるTGF-β細胞増殖抑制作用の阻害試験

ヒト胃癌細胞株SNU-16はTGF-βに対する反応性を維持しており、TGF-βで刺激すると強く細胞増殖が抑制される。そこで、anti-human TβRII抗体、N40ランダムRNA、2RA1、2RA5、あるいは2RA5S1存在下でSNU-16細胞をTGF-βで刺激し、TGF-βの細胞増殖抑制作用が阻害されるか検討した(図4)。

細胞を96穴プレートに播種し、培地、anti-human TβRII抗体(R&D Systems社)、N40ランダムRNAプール、あるいはRNAアプタマーを加え、37℃、5%CO₂で1時間静置した。その後、培地、あるいは40pMのTGF-βを加え、16時間培養した。Cell Proliferation Reagent WST-1(Roch

e Applied Science社)を加え、37°C、5%CO₂で4時間静置した後、マイクロプレートリーダーを用いてサンプルの吸光度を450nmの波長で測定した。リファレンス波長は655nmとした。

その結果、anti-human TβRII抗体と同様に、2RA5または2RA5S1存在下で、TGF-βにより誘導される細胞増殖抑制が著明に阻害された。一方、N40ランダムRNA、あるいは2RA1存在下ではこのような細胞増殖抑制の阻害は見られなかった。これらの結果から、2RA5、2RA5S1が*in vitro*においてTGF-βの細胞増殖抑制作用を阻害することが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0073] 本発明により、TGF-β I I型受容体に対する結合能を有し、TGF-βとTGF-β I I型受容体との結合を阻害するアプタマーが提供される。このようなアプタマーは、TGF-βの機能を阻害するアプタマーである。本発明のアプタマーは、過剰なTGF-β発現により引き起こされる疾患の治療等に有用である。

[0074] 本願は、日本で出願された特願2009-198813（出願日：2009年8月28日）を基礎としており、それらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

配列表フリーテキスト

[0075] 配列番号1は、TGF-β I I型受容体に対する結合能を有する核酸である。

配列番号2は、TGF-β I I型受容体に対する結合能を有する核酸である。

配列番号3は、TGF-β I I型受容体に対する結合能を有する核酸である。

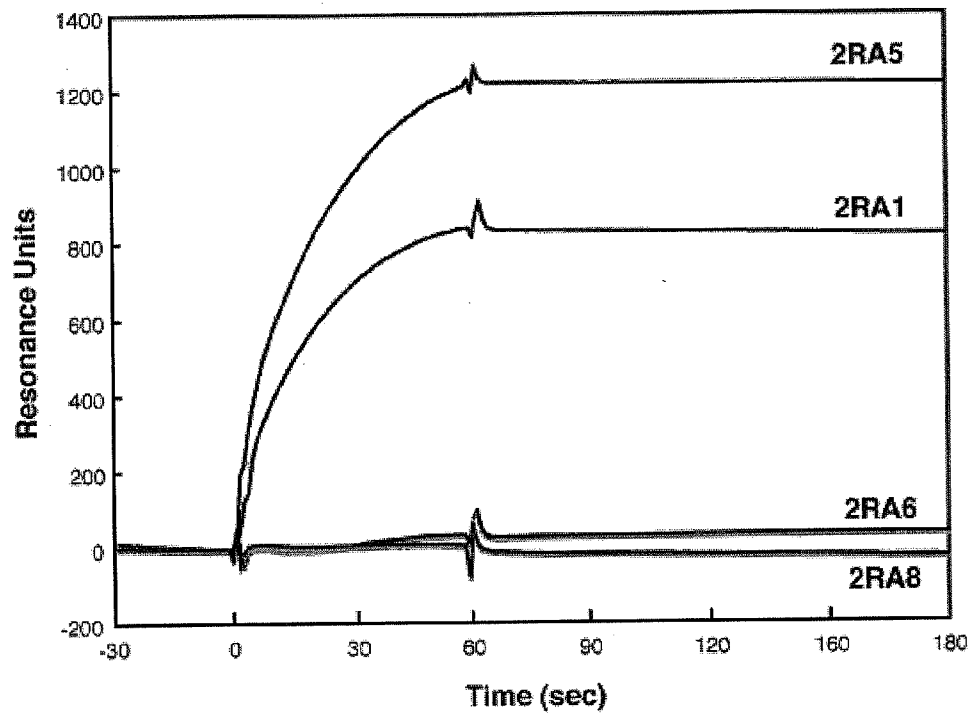
請求の範囲

- [請求項1] TGF- β I I型受容体に結合し、かつTGF- β とTGF- β I I型受容体との結合を阻害することを特徴とするアプタマー。
- [請求項2] 配列番号1～3のいずれかから選択されるヌクレオチド配列の全部または一部を含む、請求項1に記載のアプタマー。
- [請求項3] ピリミジンヌクレオチドの少なくとも一つが修飾ヌクレオチドである、請求項2に記載のアプタマー。
- [請求項4] 以下(a)または(b)のいずれかである、請求項1に記載のアプタマー：
(a) 配列番号1～3のいずれかから選択されるヌクレオチド配列の全部または一部を含むアプタマーであって、該アプタマーに含まれるピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位が、同一または異なってフッ素原子であるか、あるいは水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群から選択される原子または基で置換されている、アプタマー；
(b) 配列番号1～3のいずれかから選択されるヌクレオチド配列において、1～5個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入または付加されたヌクレオチド配列の全部または一部を含むアプタマーであって、該アプタマーに含まれるピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位が、同一または異なってフッ素原子であるか、あるいは水素原子、ヒドロキシ基及びメトキシ基からなる群から選択される原子または基で置換されている、アプタマー。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれか一項に記載のアプタマーおよび機能性物質を含む複合体。
- [請求項6] 機能性物質が、親和性物質、標識用物質、酵素、薬物送達媒体または薬物である、請求項5に記載の複合体。
- [請求項7] 請求項1～4のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項5または6に記載の複合体を用いることを特徴とする、TGF- β I I

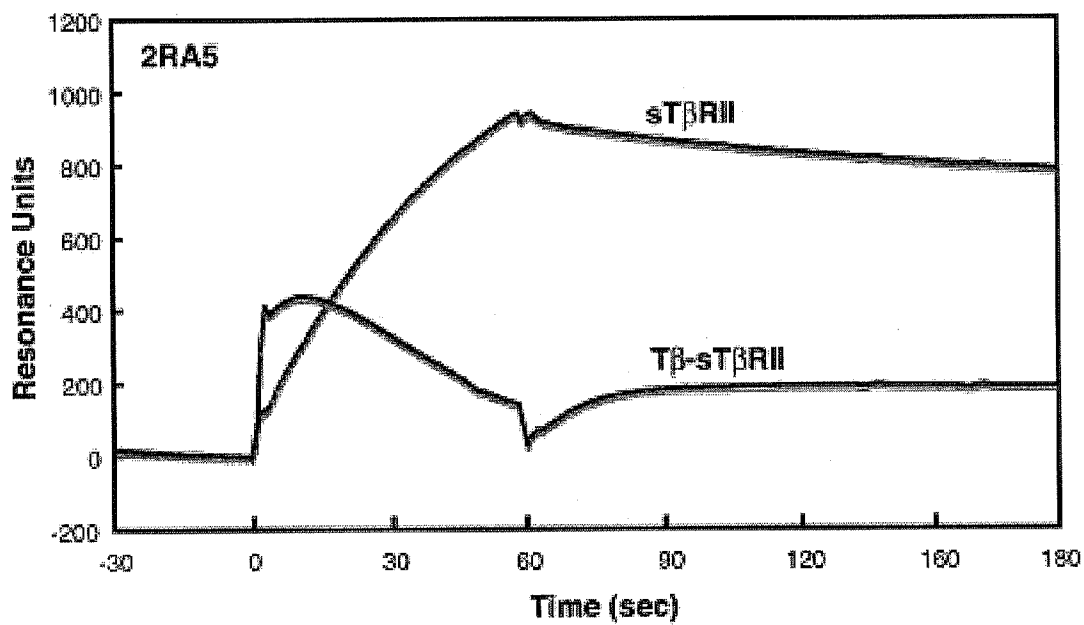
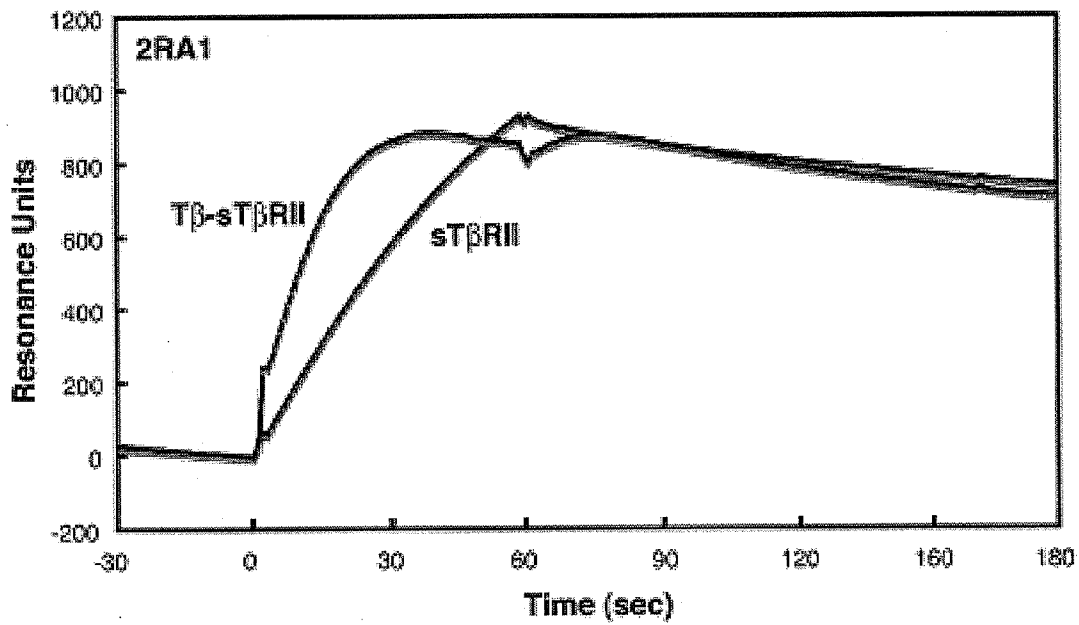
型受容体を検出および／または定量する方法。

- [請求項8] 請求項1～4のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項5または6に記載の複合体を含む、 $TGF-\beta$ の作用に起因する疾患の予防または治療薬。
- [請求項9] 請求項1～4のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項5または6に記載の複合体を投与することを特徴とする、 $TGF-\beta$ の作用に起因する疾患の予防または治療方法。
- [請求項10] $TGF-\beta$ の作用に起因する疾患の予防または治療のための、請求項1～4のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項5または6に記載の複合体。

[1]

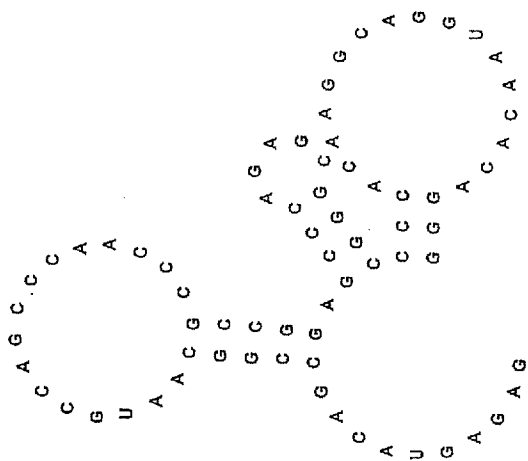


[図2]

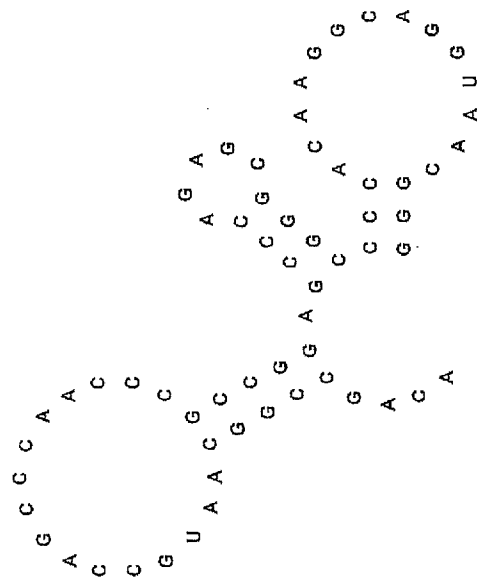


[3]

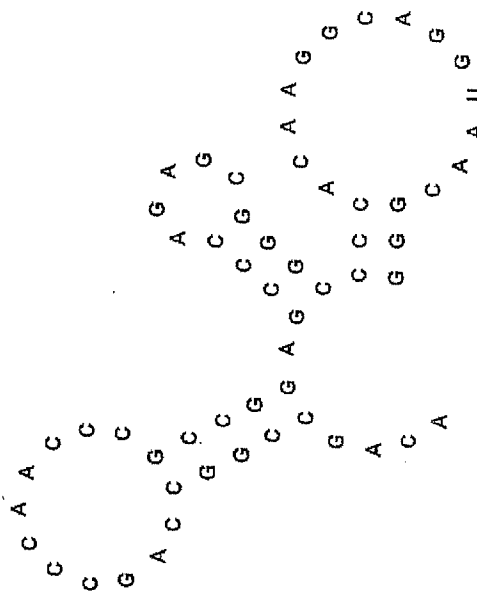
2RA5
(Kd=2.9nM)



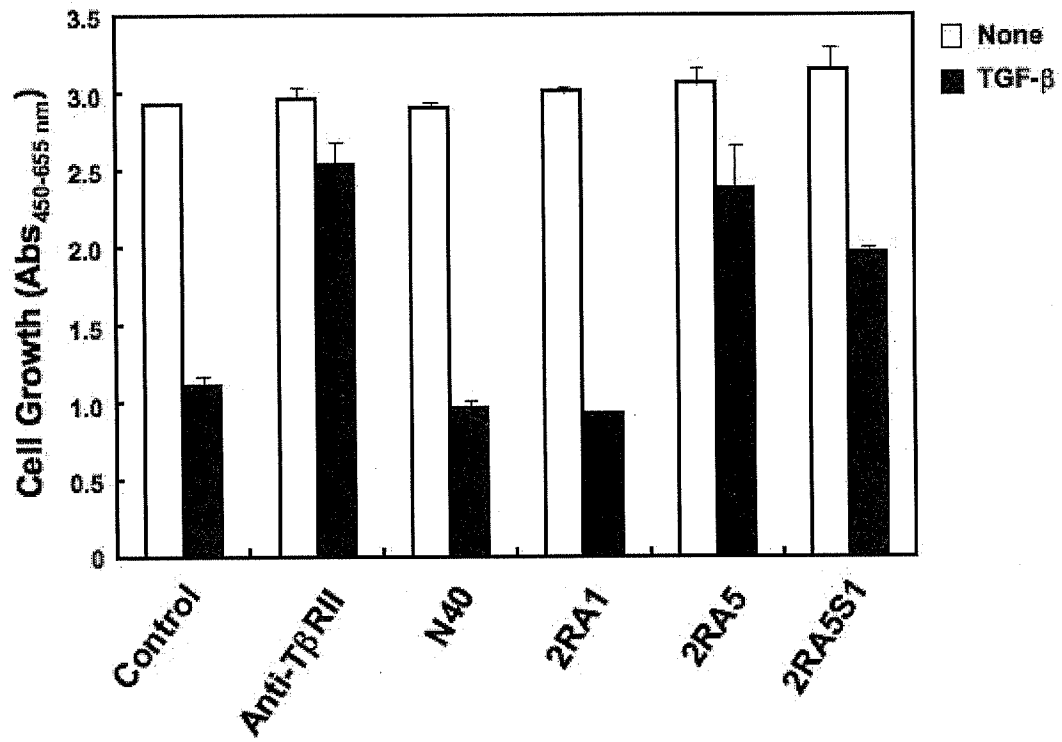
2RA5S1
(Kd=5.3nM)



2RA5S2
(Kd=9.5nM)



[圖4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/064612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/00, A61K31/7088, A61K31/7115, A61P43/00, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/53, A61P1/16, A61P9/00, A61P9/10, A61P11/00, A61P13/12, A61P17/00, A61P17/02, A61P17/06, A61P19/02, A61P29/00, A61P35/00, A61P35/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii, WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-206899 A (Japan Tobacco Inc.), 31 July 2001 (31.07.2001), entire text & WO 2001/036642 A1 & EP 1245676 A1 & EP 1245676 B1 & US 7579186 B1	1-10
Y	JP 2004-121001 A (Japan Tobacco Inc.), 22 April 2004 (22.04.2004), entire text (Family: none)	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 September, 2010 (09.09.10)		Date of mailing of the international search report 21 September, 2010 (21.09.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/064612

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2006-055164 A (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH), 02 March 2006 (02.03.2006), entire text & WO 93/009228 A1 & EP 610427 A1 & JP 07-501212 A & US 6001969 A & US 6008011 A & US 6010872 A & US 6046157 A & US 6086867 A & US 6201108 B1 & EP 1149908 A1 & EP 610427 B1 & US 2005/260579 A1 & US 2006/247198 A1 & JP 4124815 B2 & US 2008/234216 A1 & JP 4185512 B2	1-10
Y	JP 2007-043917 A (Ribomic Inc.), 22 February 2007 (22.02.2007), entire text (Family: none)	1-10
Y	JP 2006-211905 A (The University of Tokyo), 17 August 2006 (17.08.2006), entire text (Family: none)	1-10
Y	US 2005/239134 A1 (UNIV TEXAS SYSTEM, US), 27 October 2005 (27.10.2005), entire text & WO 2005/113811 A2 & EP 1747227 A2	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/064612

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N15/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/7115(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i,
G01N33/53(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)n, A61P9/00(2006.01)n,
A61P9/10(2006.01)n, A61P11/00(2006.01)n, A61P13/12(2006.01)n,
A61P17/00(2006.01)n, A61P17/02(2006.01)n, A61P17/06(2006.01)n,
A61P19/02(2006.01)n, A61P29/00(2006.01)n, A61P35/00(2006.01)n,
A61P35/04(2006.01)n

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00, A61K31/7088, A61K31/7115, A61P43/00, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/53, A61P1/16, A61P9/00, A61P9/10, A61P11/00, A61P13/12, A61P17/00, A61P17/02, A61P17/06, A61P19/02, A61P29/00, A61P35/00, A61P35/04		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/BIOSIS/MEDLINE/REGISTRY (STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)、GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq、PubMed、Cinii、WPI		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2001-206899 A (日本たばこ産業株式会社) 2001. 07. 31, 全文 & WO 2001/036642 A1 & EP 1245676 A1 & EP 1245676 B1 & US 7579186 B1	1-10
Y	JP 2004-121001 A (日本たばこ産業株式会社) 2004. 04. 22, 全文 (ファミリーなし)	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 09. 09. 2010	国際調査報告の発送日 21. 09. 2010	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 白井 美香保 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 4 5 0 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2006-055164 A (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 2006. 03. 02, 全文 & WO 93/009228 A1 & EP 610427 A1 & JP 07-501212 A & US 6001969 A & US 6008011 A & US 6010872 A & US 6046157 A & US 6086867 A & US 6201108 B1 & EP 1149908 A1 & EP 610427 B1 & US 2005/260579 A1 & US 2006/247198 A1 & JP 4124815 B2 & US 2008/234216 A1 & JP 4185512 B2	1-10
Y	JP 2007-043917 A (株式会社リボミック) 2007. 02. 22, 全文 (ファミリーなし)	1-10
Y	JP 2006-211905 A (国立大学法人 東京大学) 2006. 08. 17, 全文 (ファミリーなし)	1-10
Y	US 2005/239134 A1 (UNIV TEXAS SYSTEM, US) 2005. 10. 27, 全文 & WO 2005/113811 A2 & EP 1747227 A2	1-10

発明の属する分野の分類

C12N15/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/7115(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i,
A61P1/16(2006.01)n, A61P9/00(2006.01)n, A61P9/10(2006.01)n, A61P11/00(2006.01)n,
A61P13/12(2006.01)n, A61P17/00(2006.01)n, A61P17/02(2006.01)n, A61P17/06(2006.01)n,
A61P19/02(2006.01)n, A61P29/00(2006.01)n, A61P35/00(2006.01)n, A61P35/04(2006.01)n