

(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



(10) 国際公開番号

WO 2011/007876 A1

(43) 国際公開日

2011年1月20日(20.01.2011)

PCT

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/062104
- (22) 国際出願日: 2010年7月16日(16.07.2010)
- (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 2009-167622 2009年7月16日(16.07.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): NECソフト株式会社(NEC Soft, Ltd.) [JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 Tokyo (JP). 地方独立行政法人神奈川県立病院機構(KANAGAWA PREFECTURAL HOSPITAL ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒2310005 神奈川県横浜市中区本町1-2 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 竹中 洋美 (TAKENAKA Hiromi) [JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソフト

株式会社内 Tokyo (JP). 秋富 穰(AKITOMI Jou) [JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソフト株式会社内 Tokyo (JP). 加藤 信太郎 (KATOU Shintarou) [JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソフト株式会社内 Tokyo (JP). 辻 祥太郎(TSUJI Shotaro) [JP/JP]; 〒2410815 神奈川県横浜市旭区中尾1-1-2 神奈川県立がんセンター臨床研究所内 Kanagawa (JP). 大津 敬(OHTSU Takashi) [JP/JP]; 〒2410815 神奈川県横浜市旭区中尾1-1-2 神奈川県立がんセンター臨床研究所内 Kanagawa (JP). 和賀 巖(WAGA Iwao) [JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソフト株式会社内 Tokyo (JP).

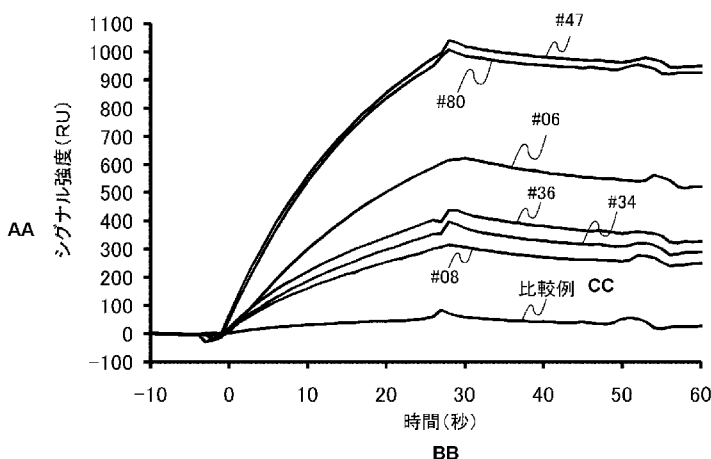
- (74) 代理人: 辻丸 光一郎, 外(TSUJIMARU Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町134 京都リサーチパーク1号館301号室 Kyoto (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,

[続葉有]

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULE CAPABLE OF BINDING TO HMGB1, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: HMGB1結合核酸分子およびその用途

[図1]



AA SIGNAL INTENSITY (RU)
BB TIME (SECOND)
CC COMPARATIVE EXAMPLE

(57) Abstract: Disclosed are a nucleic acid molecule which is capable of binding to HMGB1 protein, and a use of the nucleic acid molecule. Specifically, a nucleic acid molecule having a dissociation constant for HMGB1 protein of 5×10^{-7} or less can be used as a nucleic acid molecule that is capable of binding to HMGB1 protein. Since the nucleic acid molecule capable of binding to HMGB1 protein is able to bind to HMGB1 protein, which is known as a cause of diseases such as cancers and inflammation, preventive and curative effects on such diseases can be attained by having the nucleic acid molecule bound to HMGB1 protein in vivo.

(57) 要約: HMGB1タンパク質に結合可能な核酸分子、ならびにその用途を提供する。HMGB1タンパク質との解離定数が 5×10^{-7} 以下である核酸分子が、HMGB1タンパク質に結合可能な核酸分子として使用できる。前記HMGB1結合核酸分子は、癌、炎症等の疾患の原因として知られるHMGB1タンパク質に結合可能であることから、前記疾患の予防効果および治療効果

生体内において、HMGB1タンパク質と結合させることにより、を得ることが可能である。



WO 2011/007876 A1



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.

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).

(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,

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))

明 細 書

発明の名称： HMGB1結合核酸分子およびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、HMGB1タンパク質に結合する核酸分子およびその用途に関する。

背景技術

[0002] high-mobility group box 1 protein、すなわち、HMGB1タンパク質（以下、「HMGB1」という）は、生存に必須なタンパク質であり（非特許文献1）、細胞核内では、転写開始に必要なクロマチン構造を形成するタンパク質として機能する（非特許文献2）。HMGB1は、細胞外に漏出、分泌されると、炎症反応、細胞の形態変化および細胞の移動を促進するサイトカインとして機能する（非特許文献3）。近年、細胞外におけるHMGB1の機能解析が進み、自己免疫疾患、敗血症、外傷性ショック、虚血および虚血再灌流障害が起こる際、炎症反応を悪化させたり、細胞死を誘導することが明らかとなった。このことから、HMGB1が、これら疾患の治療の標的物質および診断マーカーとなることが示されている（非特許文献4）。また、癌に関しても、乳癌、大腸癌、メラノーマ、前立腺癌、膵臓癌および肺癌等の増殖および転移浸潤に関与し、正常組織と比較して、HMGB1発現量が増加することが報告されている（非特許文献5）。このような背景から、HMGB1に結合可能な物質を作製し、その作用を中和することで、前記疾患を予防および治療することが望まれている。しかし、現在までに有効性が示されているものは、単クローン抗HMGB1抗体を利用した診断法および実験動物での脳梗塞モデル治療のみである（特許文献1、2、非特許文献6）。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特許第3876325号公報

特許文献2：特開2008-520552号公報

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Calogero, S. et al. Nat. Genet. (1999) 22, 276-280.

非特許文献2：Bustin, M. Mol. Cell Biol. (1999) 19, 5237-5246.

非特許文献3：Andersson, U. et al. J. Leukoc. Biol. (2002) 72, 1084-1091.

非特許文献4：Klune, J. R. et al. Mol. Med. (2008) 14, 476-484.

非特許文献5：Ellerman, J. E. et al. Clin. Cancer Res. (2007) 13, 2836-2848.

非特許文献6：Liu, K. et al. FASEB J. (2007) 21, 3904-16.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、例えば、HMGB1が関係して引き起こされる疾患の発症機構の解明、前記疾患の診断および治療に利用可能な物質として、HMGB1に結合可能な核酸分子、ならびにその用途を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] そこで、本発明者らは、市販の精製HMGB1を標的物質として、*in vitro selection*法によりRNAを作製した。本発明のHMGB1結合核酸分子は、HMGB1タンパク質（以下、HMGB1という）との解離定数が 5×10^{-7} 以下であることを特徴とする、HMGB1に結合可能な結合核酸分子である。

[0007] 本発明の組成物は、本発明のHMGB1結合核酸分子を含むことを特徴とする組成物である。

[0008] 本発明の検出試薬は、前記本発明のHMGB 1結合核酸分子を含むことを特徴とする、前記HMGB 1を検出するためのHMGB 1検出試薬である。

発明の効果

[0009] 本発明のHMGB 1結合核酸分子は、HMGB 1に結合可能である。このため、本発明のHMGB 1結合核酸分子によれば、例えば、HMGB 1と結合してその機能を阻害することより、HMGB 1が原因となる前述のような疾患の予防および治療が可能となる。また、本発明のHMGB 1結合核酸分子によれば、例えば、HMGB 1との結合の有無を確認することで、HMGB 1を検出でき、疾患の早期診断が可能となる。また、例えば、本発明のHMGB 1結合核酸分子を培養細胞内で発現させることで、遺伝子転写の阻害実験が可能となる、本発明のHMGB 1結合核酸分子を使用して、細胞外のHMGB 1とその受容体との結合阻害実験が可能となる等、本発明のHMGB 1結合核酸分子は、HMGB 1の機能解明にも使用できる。このため、本発明のHMGB 1結合核酸分子は、新たな研究用ツールとしても有用である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] 図1は、本発明の実施例1において、His-tag付加HMGB 1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図2] 図2は、本発明の実施例1において、HMGB 1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図3] 図3は、本発明の実施例1において、His-tag付加MIFタンパク質に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図4] 図4は、本発明の実施例1において、生理条件下におけるHMGB 1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図5] 図5は、本発明の実施例2において、His-tag付加HMGB 1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図6] 図6は、本発明の実施例3において、His-tag付加HMGB 1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図7] 図7は、本発明の実施例4において、His-tag付加HMGB1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図8] 図8は、本発明の実施例5において、His-tag付加HMGB1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図9] 図9は、本発明の実施例6において、HMGB1とTLR-2との結合を示すプルダウンアッセイの写真である。

[図10] 図10は、本発明の実施例7において、His-tag付加HMGB1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図11] 図11は、本発明におけるRNAアプタマーR8c6__1およびR8c6__18の推定二次構造を示す図である。

[図12] 図12は、本発明の実施例9において、His-tag付加HMGB1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図13] 図13は、本発明の実施例9において、His-tag付加HMGB1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図14] 図14は、本発明の実施例10において、His-tag付加HMGB1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図15] 図15は、本発明の実施例11において、His-tag付加HMGB1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図16] 図16は、本発明の実施例12において、His-tag付加HMGB1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図17] 図17は、本発明の実施例12において、His-tag付加HMGB1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。

[図18] 図18は、本発明におけるRNAアプタマーR8c6__1の推定二次構造を示す図である。

[図19] 図19は、本発明におけるRNAアプタマーR8c6__1-18の推定二次構造を示す図である。

[図20] 図20は、本発明におけるRNAアプタマーR8c6__1-25-S6の推定二次構造を示す図である。

[図21] 図 2 1 は、本発明の実施例 1 3 において、HMGB 1 と RNA アプタマーとの相互作用を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0011] < HMGB 1 結合核酸分子 >

本発明の HMGB 1 結合核酸分子は、前述のように、HMGB 1 との解離定数が 5×10^{-7} 以下であることを特徴とする、HMGB 1 に結合可能な核酸分子である。本発明の HMGB 1 結合核酸分子は、例えば、HMGB 1 アプタマーともいう。

[0012] 本発明において、「HMGB 1 に結合可能」とは、例えば、HMGB 1 に対する結合能を有している、または、HMGB 1 に対する結合活性 (HMGB 1 結合活性) を有しているともいう。本発明の HMGB 1 結合核酸分子は、例えば、HMGB 1 に特異的に結合する。前記 HMGB 1 結合核酸分子と HMGB 1 との結合は、例えば、表面プラズモン共鳴分子相互作用解析等により決定できる。前記解析は、例えば、ピアコア X (商品名、GE Healthcare UK Ltd.) が使用できる。

[0013] 本発明の HMGB 1 結合核酸分子は、HMGB 1 との解離定数が 5×10^{-7} 以下であればよく、その他の構成は、制限されない。前記 HMGB 1 に対する解離定数は、特に制限されないが、その上限が、例えば、 10^{-8} オーダーであり、より好ましくは 10^{-10} オーダーであり、さらに好ましくは 10^{-12} オーダーである。また、前記解離定数の範囲は、例えば、 $10^{-14} \sim 10^{-8}$ オーダーであり、好ましくは $10^{-14} \sim 10^{-10}$ オーダーであり、より好ましくは $10^{-14} \sim 10^{-12}$ オーダーである。

[0014] 本発明の HMGB 1 結合核酸分子は、例えば、その構成単位は、特に制限されない。前記構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基であり、前記ヌクレオチド残基は、例えば、リボヌクレオチド残基、デオキシリボヌクレオチド残基があげられる。本発明の HMGB 1 結合核酸分子は、例えば、リボヌクレオチド残基から構成される RNA でもよいし、デオキシリボヌクレオチド残基から構成される DNA でもよく、RNA が好ましい。本発明の HMGB

1結合核酸分子は、例えば、DNAの構成単位であるデオキシリボヌクレオチドと、RNAの構成単位であるリボヌクレオチドの両方を含んでもよい。この場合、本発明のHMGB1結合核酸分子は、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基を含むRNAでもよいし、リボヌクレオチド残基を含むRNAでもよい。

[0015] 前記ヌクレオチド残基は、例えば、修飾化されたヌクレオチド残基でもよい。前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、前記ヌクレオチド残基における糖残基が修飾されているものがあげられる。前記糖残基は、例えば、リボース残基またはデオキシリボース残基があげられる。前記ヌクレオチド残基における修飾部位は、特に制限されないが、例えば、前記糖残基の2'位および/または4'位があげられる。前記修飾は、例えば、メチル化、フルオロ化、アミノ化、チオ化等があげられる。前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、塩基としてピリミジン塩基（ピリミジン核）を有するヌクレオチド残基が修飾されたもの、または、塩基としてプリン塩基（プリン核）を有するヌクレオチド残基が修飾されたものがあげられ、好ましくは前者である。以下、ピリミジン塩基を有するヌクレオチド残基をピリミジンヌクレオチド残基といい、修飾されたピリミジンヌクレオチド残基を修飾化ピリミジンヌクレオチド残基といい、プリン塩基を有するヌクレオチド残基をプリンヌクレオチド残基といい、修飾されたプリンヌクレオチド残基を修飾化プリンヌクレオチド残基という。前記ピリミジンヌクレオチド残基は、例えば、ウラシルを有するウラシルヌクレオチド残基、シトシンを有するシトシンヌクレオチド残基、チミンを有するチミンヌクレオチド残基等があげられる。前記修飾化ヌクレオチド残基において、塩基がピリミジン塩基の場合、例えば、前記糖残基の2'位および/または4'位が修飾されていることが好ましい。前記修飾化ヌクレオチド残基の具体例としては、例えば、リボース残基の2'位が修飾された、2'-メチルウラシル（2'-メチル化-ウラシルヌクレオチド残基）、2'-メチルシトシン（2'-メチル化-シトシンヌクレオチド残基）、2'-フルオロウラシル（2'-フルオロ化-ウラシルヌ

クレオチド残基)、2'-フルオロシトシン(2'-フルオロ化-シトシンヌクレオチド残基)、2'-アミノウラシル(2'-アミノ化ウラシルヌクレオチド残基)、2'-アミノシトシン(2'-アミノ化-シトシンヌクレオチド残基)、2'-チオウラシル(2'-チオ化-ウラシルヌクレオチド残基)、2'-チオシトシン(2'-チオ化-シトシンヌクレオチド残基)等があげられる。

[0016] 本発明のHMGB1結合核酸分子は、前記構成単位として、例えば、PNA(ペプチド核酸)、LNA(Locked Nucleic Acid)、ENA(2'-O, 4'-C-Ethylenebridged Nucleic Acids)等のモノマー残基があげられる。本発明のHMGB1結合核酸分子は、例えば、PNA、LNAおよびENAの少なくともいずれかのモノマー残基を含むRNAまたはDNAがあげられる。本発明のHMGB1結合核酸分子が、前記モノマー残基を含む場合、その数は、特に制限されない。

[0017] 本発明のHMGB1結合核酸分子は、例えば、一本鎖核酸でもよいし、二本鎖核酸でもよい。前記一本鎖核酸は、例えば、一本鎖RNAおよび一本鎖DNAがあげられる。前記二本鎖核酸は、例えば、二本鎖RNA、二本鎖DNA、およびRNAとDNAとの二本鎖核酸があげられる。本発明のHMGB1結合核酸分子が二本鎖核酸の場合、例えば、使用に先立って、変性等により一本鎖にしてもよい。

[0018] 本発明のHMGB1結合核酸分子において、各塩基は、例えば、アデニン(a)、シトシン(c)、グアニン(g)、チミン(t)およびウラシル(u)の天然塩基(非人工核酸)でもよいし、人工塩基(非天然塩基)でもよい。前記人工塩基は、例えば、修飾塩基および改変塩基等があげられ、前記天然塩基(a、c、g、tまたはu)と同様の機能を有することが好ましい。前記同様の機能を有する人工塩基は、例えば、グアニン(g)に代えて、シトシン(c)に結合可能な人工塩基、シトシン(c)に代えて、グアニン(g)に結合可能な人工塩基、アデニン(a)に代えて、チミン(t)また

はウラシル（u）に結合可能な人工塩基、チミン（t）に代えて、アデニン（a）に結合可能な人工塩基、ウラシル（u）に代えて、アデニン（a）に結合可能な人工塩基等があげられる。前記修飾塩基は、例えば、メチル化塩基、フルオロ化塩基、アミノ化塩基、チオ化塩基等があげられる。前記修飾塩基の具体例としては、例えば、2'-メチルウラシル、2'-メチルシトシン、2'-フルオロウラシル、2'-フルオロシトシン、2'-アミノウラシル、2'-アミノシトシン、2-チオウラシル、2-チオシトシン等があげられる。本発明において、例えば、a、g、c、tおよびuで表わされる塩基は、前記天然塩基の他に、前記天然塩基のそれぞれと同様の機能を有する前記人工塩基の意味も含む。

[0019] 本発明のHMGB1結合核酸分子は、例えば、ヌクレアーゼに耐性であることが好ましい。前記ヌクレアーゼは、特に制限されないが、例えば、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ等があげられ、具体例として、例えば、RNA分解酵素であるリボヌクレアーゼ（RNase）、DNA分解酵素であるデオキシリボヌクレアーゼ（DNase）、RNAおよびDNAの両方に作用するヌクレアーゼ等があげられる。本発明のHMGB1結合核酸分子は、前述のように、RNAが好ましい。本発明のHMGB1結合核酸分子がRNAの場合、例えば、RNA分解酵素、すなわち、RNaseに耐性であることが好ましい。前記ヌクレアーゼ耐性にする手法は、特に制限されず、例えば、前記核酸分子を構成するヌクレオチド残基を修飾する方法があげられる。具体的には、本発明のHMGB1結合核酸分子について、例えば、前記核酸分子を構成するヌクレオチド残基または一部のヌクレオチド残基が、修飾化ヌクレオチド残基であることが好ましい。前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、前述の修飾化ヌクレオチド残基があげられる。前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、前記メチル化ヌクレオチド残基、前記フルオロ化ヌクレオチド残基、前記アミノ化ヌクレオチド残基、前記チオ化ヌクレオチド残基等があげられ、中でも前記フルオロ化ヌクレオチド残基が好ましい。前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、塩基としてピリミジン塩基を

有する前記ピリミジンヌクレオチド残基であり、前記糖残基（リボース残基またはデオキシリボース残基）が修飾されていることが好ましい。

[0020] 前記ヌクレアーゼ耐性にする手法は、この他に、例えば、前記核酸分子を構成するヌクレオチド残基をLNA化する方法があげられる。具体的には、本発明のHMGB1結合核酸分子について、例えば、前記核酸分子を構成する全ヌクレオチド残基または一部のヌクレオチド残基が、前記LNA残基であることが好ましい。前記ヌクレアーゼ耐性にする手法は、この他に、例えば、前記核酸分子であるRNAを構成するヌクレオチド残基をDNA化する方法があげられる。具体的には、本発明のHMGB1結合核酸分子がRNAの場合、例えば、RNAを構成する全ヌクレオチド残基のうち、ウラシルを有するヌクレオチド残基の全てまたは一部が、チミンを有するヌクレオチド残基に置換されてもよく、具体的には、前記チミンを有するデオキシリボヌクレオチド残基に置換されてもよい。また、前記核酸分子がRNAの場合、RNAを構成する全ヌクレオチド残基または一部のヌクレオチド残基が、デオキシリボヌクレオチド残基および前記LNA残基であってもよい。

[0021] 前記ヌクレアーゼ耐性にする手法は、この他に、例えば、5'末端および/または3'末端に、ポリエチレングリコール（PEG）またはデオキシチミジンを結合させる方法があげられる。前記PEGは、例えば、数十kDaであることが好ましい。

[0022] 本発明のHMGB1結合核酸分子の長さは、特に制限されないが、その全長は、例えば、20～160塩基長であり、好ましくは30～120塩基長であり、より好ましくは40～100塩基長である。

[0023] 本発明のHMGB1結合核酸分子は、例えば、下記（A1）、（A2）、（B1）および（B2）のいずれかの核酸分子があげられる。
（A1）配列番号1～42のいずれかで表わされる塩基配列を含む核酸分子
（A2）配列番号1～42のいずれかで表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子

(B 1) 配列番号 4 5 ~ 8 1 のいずれかで表わされる塩基配列を含む核酸分子

(B 2) 配列番号 4 5 ~ 8 1 のいずれかで表わされる塩基配列において、1 または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列を含み、且つ、HMGB 1 に結合可能である核酸分子

[0024] 前記 (A 1) の核酸分子について説明する。以下、前記 (A 1) の核酸分子を、HMGB 1 結合核酸分子 (A 1) という。また、前記 HMGB 1 結合核酸分子 (A 1) において、配列番号 1 ~ 4 2 で表わされる塩基配列を、塩基配列 (A 1) ともいう。前記配列番号 1 ~ 4 2 で表わされる塩基配列 (A 1) および前記塩基配列 (A 1) を含む HMGB 1 結合核酸分子 (A 1) は、それぞれ、以下に示すように、配列番号の前に示す名称で表わすこともある。

(A 1) 配列番号 1 ~ 4 2 のいずれかで表わされる塩基配列を含む核酸分子

[0025] C_0 (配列番号 1)

mmhbuaagmcacguagmaccag

C_1 (配列番号 2)

accguaagacacguagaaccag

C_2 (配列番号 3)

aauuuaagccacguagaaccag

C_3 (配列番号 4)

acaguaagacacguagcaccag

C_4 (配列番号 5)

cauguaagccacguagaaccag

#04 (配列番号 6)

ucccaugauuguucaggcacggccuuucgguucccucaa

#08 (配列番号 7)

agucccuugacacguccguuuucuaacuggaauagaggcc

#12 (配列番号 8)

gggcugcaccucuccgcuacguugucguuggaggcaccau

#43 (配列番号 9)

gguauuaaaacuccucguaggucuccgcccggccuagc

#49 (配列番号 10)

cauccuuaucaucauggucuccgcccggccaugcaauguu

#32 (配列番号 11)

cauucuaaaauucuaucaagggucauccgcccggcccgc

#58 (配列番号 12)

cauucuaaaauucuaucaagggucauccgcccggccgcgcucgccaguca

#01 (配列番号 13)

uggcauccuugcucacuccaggcuaaaccucucgguuccc

#26 (配列番号 14)

ccaagcacuucacugucuaaggcaauugccucucgguaccc

#73 (配列番号 15)

ccacaagcucgcacuaguuccaggcuuccucucgguaccc

#77 (配列番号 16)

cauguauuucugcacguuccagagaauccucucgguaccc

#06 (配列番号 17)

uacacugcacgcuccgcuuugaacaucaauaggaggcccug

#22 (配列番号 18)

gcgucgcucacauagucaaggugaaaacccccauagagacu

#10 (配列番号 19)

uagucaaggugaaaacccccauagagacu

#21 (配列番号 20)

ggccugugcuaacaugagucuccgucggcucgcaacuc

#36 (配列番号 21)

ccuagcacguccguuucuggaucugucaguuagaggccua

#15 (配列番号 22)

gcaucaaccucuguaagagcgcgcuuugcuucacccaaaaa

#23 (配列番号 2 3)

acgguccuuaaaaucuuccuuuaaccacgccaggaucuuu

#34 (配列番号 2 4)

auucaccucagcauguccgcuugugacgauggaggcacccu

#40 (配列番号 2 5)

gguccuuaaaaucuucaaucuaaacgauccagacacggc

#47 (配列番号 2 6)

aaaaacuacugccgaaccguaagacacguagaaccaggca

#79 (配列番号 2 7)

gaccagguuccugacaucucugaacuauaccuccaaaaacg

#80 (配列番号 2 8)

caucugaauuuuagccacguagaaccaggcccuccacgcg

#82 (配列番号 2 9)

uaauacgacucacuauagggacgcucacguacgcucagug

R4_1 (配列番号 3 0)

aaugagggcccacuuccggauuuugguuugcuuccuugc

R4_4 (配列番号 3 1)

ucgcuuauuggaugcccacuuccacucacuguccugcgcaa

R4_10 (配列番号 3 2)

uaauaauaccucagcccucucucuuagucuggugccgau

R4_11 (配列番号 3 3)

ucucuuuucgaauuccguucuggcucacuccuuggguauu

R4_12 (配列番号 3 4)

cugacaucuuuuacacugauuuucuguuggcccacuuucugu

R8c6_1 (配列番号 3 5)

gaguacaguaagacacguagcaccagucugacguuuugucg

R8c6_14 (配列番号 3 6)

／またはＹ’領域を有してもよい。前記Ｘ領域、前記Ｙ領域および前記Ｙ’領域は、例えば、後述する通りである。前記Ｙ領域は、特に制限されず、例えば、配列番号４３または１１５で表わされる塩基配列を含む配列および前記塩基配列からなる配列があげられる。また、前記Ｙ’領域は、特に制限されず、例えば、配列番号４４で表わされる塩基配列を含む配列および前記塩基配列からなる配列があげられる。なお、これらの配列は、一例であって、本発明を制限するものではない。

gggacgcucacguacgcuca (配列番号４３)

acgcucacguacgcuca (配列番号１１５)

ucagugccuggacgugcagu (配列番号４４)

[0029] 前記HMGB1結合核酸分子(A1)が前記Ｙ領域を含む場合、前記Ｙ領域は、例えば、前記塩基配列(A1)の5’側に結合していることが好ましい。前記HMGB1結合核酸分子(A1)が前記Ｙ’域を含む場合、前記Ｙ’領域は、例えば、前記塩基配列(A1)の3’側に結合していることが好ましい。前記塩基配列(A1)と前記Ｙ領域および前記Ｙ’領域とは、例えば、直接結合してもよいし、介在配列を介して結合してもよい。

[0030] 前記HMGB1結合核酸分子(A1)が、前記配列番号1~42のいずれかの塩基配列(A1)を含む場合、例えば、配列番号45~81のいずれかで表わされる塩基配列からなる核酸分子または前記塩基配列を含む核酸分子が例示できる。以下に示す配列番号45~81の塩基配列は、それぞれ、前記配列番号6~42の塩基配列(A1)を含み、下線部で表わされる領域が、それぞれ、前記配列番号6~42の塩基配列に相当する。前記配列番号45~81の塩基配列および前記塩基配列を含む前記HMGB1結合核酸分子(A1)は、それぞれ、以下に示すように、配列番号の前に示す名称で表わすこともある。

#04 (配列番号45)

gggacgcucacguacgcucauCCcaUGaUUgUUCagggCaCggCCUuuCggUuCCCUcaauucagugccu
ggacgugcagu

#08 (配列番号 4 6)

gggacgcucacguacgcucaagucccuugacacguccgUUUUUCUaacUggaaUagaggCCUCagugccu
ggacgugcagu

#12 (配列番号 4 7)

gggacgcucacguacgcucagggCUGcaccUCUCCGCUacGUUGUCGUUggaggCaccaUUCagugccu
ggacgugcagu

#43 (配列番号 4 8)

gggacgcucacguacgcucaggUauUaaaaCUCCCUCGUaggUCAUCCGCCGGCCUagCUCagugccu
ggacgugcagu

#49 (配列番号 4 9)

gggacgcucacguacgcucacaUCCUUAUCacaUggUCAUCCGCCGGCCaUgcaauGUUUCagugccu
ggacgugcagu

#32 (配列番号 5 0)

gggacgcucacguacgcucacaUUCUaaaUUCUaUCAaggGUCAUCCGCCGGCCGcaUUCagugccu
ggacgugcagu

#58 (配列番号 5 1)

gggacgcucacguacgcucacaUUCUaaaUUCUaUCAaggGUCAUCCGCCGGCCGCGCUCGCCaGUca
ucagugccuggacgugcagu

#01 (配列番号 5 2)

gggacgcucacguacgcucauggcaUCCUUGCUCaCUCcaggCUaaaCCUCUCggUUCCCUCagugccu
ggacgugcagu

#26 (配列番号 5 3)

gggacgcucacguacgcucaccaagcacuUCAUCGUCUaggcaauUGCCUCUCggUaCCCCUCagugccu
ggacgugcagu

#73 (配列番号 5 4)

gggacgcucacguacgcucaccacaagCUCGCaCUagUUCcaggCUUCCUCUCggUaCCCCUCagugccu
ggacgugcagu

#77 (配列番号 5 5)

gggacgcucacguacgcucacauguauuuucugcacguuccagagaauccucucgguaaccucagugccu
ggacgugcagu

#06 (配列番号 5 6)

gggacgcucacguacgcucauacacugcacgcuccgcuuuugaacaUCAauggaggccucagugccu
ggacgugcagu

#22 (配列番号 5 7)

gggacgcucacguacgcucaagcgcucgcucauagUCAaaggUGaaaaacccccauagagacucagugccu
ggacgugcagu

#10 (配列番号 5 8)

gggacgcucacguacgcucauagUCAaaggUGaaaaacccccauagagacucagugccuggacgugcagu
#21 (配列番号 5 9)

gggacgcucacguacgcucaggccugugcuaacaUGagUCAuccgucggcucgcaacucagugccu
ggacgugcagu

#36 (配列番号 6 0)

gggacgcucacguacgcucaccuagcacguccguuuucuggaUCUGUcaguuagaggccuucagugccu
ggacgugcagu

#15 (配列番号 6 1)

gggacgcucacguacgcucagcaucaaccucuguaagagcgcgcuuuugcuucaccaaaaaucagugccu
ggacgugcagu

#23 (配列番号 6 2)

gggacgcucacguacgcucaacgguccuuaaaaUCUuccuuAACcagcccaggauCUUucagugccu
ggacgugcagu

#34 (配列番号 6 3)

gggacgcucacguacgcucaauucaccucagcaUGuccgcuugugacgauggaggaccucagugccu
ggacgugcagu

#40 (配列番号 6 4)

gggacgcucacguacgcucagguccuuaaaaUCUuccaaUCUaaaCgaUCCagacacggcucagugccu
ggacgugcagu

#47 (配列番号 6 5)

gggacgcucacguacgcucaaaaaaacuacugccgaaccgUaagacacgUagaaccaggcaucagugccu
ggacgugcagu

#79 (配列番号 6 6)

gggacgcucacguacgcucagaccaggUuccugacaucucUgaacUaUaccUccaaaacgucagugccu
ggacgugcagu

#80 (配列番号 6 7)

gggacgcucacguacgcucacaucugaaUUUaagccacgUagaaccaggccUccacgcgucagugccu
ggacgugcagu

#82 (配列番号 6 8)

gggacgcucacguacgcucauaauacgacucacUaUagggacgcUcagUacgcUcagugccuggacgu
gcagu

R4_1 (配列番号 6 9)

gggacgcucacguacgcucaaaUgagggcccacUuccggaucUUUgUUUgCUuccUUGcUcagugccu
ggacgugcagu

R4_4 (配列番号 7 0)

gggacgcucacguacgcucaucgcUUaUggauGCCacUuccacUcagUccUgCGcaUcagugccu
ggacgugcagu

R4_10 (配列番号 7 1)

gggacgcucacguacgcucauaUUaaUaccUcagcccUcUUCUcUUagUcUgUgCCgaUcagugccu
ggacgugcagu

R4_11 (配列番号 7 2)

gggacgcucacguacgcucaucUcUUUcgaauUCCgUUCUggcUcagUccUUGgUaUUcagugccu
ggacgugcagu

R4_12 (配列番号 7 3)

gggacgcucacguacgcucacugacaucUUUUacacUgaaUUcUgUUGGCCacUUCUgUcagugccu
ggacgugcagu

R8c6_1 (配列番号 7 4)

’ 末端の g g g を欠失してもよい。

[0032] 前記塩基配列 (A 1) は、例えば、配列番号 1 1 4 で表わされるモチーフ配列を含んでもよい。下記塩基配列において、n は、アデニン (a)、シトシン (c)、グアニン (g)、ウラシル (u)、チミン (t) であり、5 塩基目の n はアデニン (a)、1 3 塩基目の n はシトシン (c)、1 7 塩基目の n はアデニン (a) が好ましい。前記モチーフ配列を含む塩基配列 (A 1) は、例えば、# 4 7 (配列番号 6 5)、# 8 0 (配列番号 6 7)、R 8 c 6__1 (配列番号 7 4)、R 8 c 6__1 4 (配列番号 7 5) があげられる。モチーフ配列 (配列番号 1 1 4)

uaagnacacguagnaccng

[0033] 前記 HMGB 1 結合核酸分子 (A 1) において、各塩基は、例えば、前述と同様である。すなわち、前記塩基は、例えば、アデニン (a)、シトシン (c)、グアニン (g)、チミン (t) およびウラシル (u) の前記天然塩基 (非人工塩基) でもよいし、前記人工塩基 (非天然塩基) でもよい。前記人工塩基は、例えば、前述の通りである。前記 HMGB 1 結合核酸分子 (A 1) において、例えば、a、g、c、t および u で表わされる塩基は、前記天然塩基の他に、前記天然塩基のそれぞれと同様の機能を有する前記人工塩基の意味も含む。

[0034] 前記 HMGB 1 結合核酸分子 (A 1) は、例えば、その構成単位は、特に制限されず、前述と同様である。すなわち、前記構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基であり、前記ヌクレオチド残基は、例えば、リボヌクレオチド残基、デオキシリボヌクレオチド残基があげられる。前記 HMGB 1 結合核酸分子 (A 1) は、例えば、リボヌクレオチド残基から構成される RNA でもよいし、デオキシリボヌクレオチド残基から構成される DNA でもよく、好ましくは RNA である。また、前記 HMGB 1 結合核酸分子 (A 1) は、DNA の構成単位であるデオキシリボヌクレオチドと、RNA の構成単位であるリボヌクレオチドとの両方を含んでもよい。前記配列番号 1 ~ 4 2 および配列番号 4 5 ~ 8 1 の塩基配列は、例えば、それぞれ、前述のような塩基

が連続する配列であればよく、リボヌクレオチド残基から構成されるRNAでもよいし、デオキシリボヌクレオチド残基から構成されるDNAでもよいし、デオキシリボヌクレオチド残基を含むRNAでもよいし、リボヌクレオチド残基を含むRNAでもよい。

[0035] 前記HMGB1結合核酸分子(A1)は、前述と同様に、前記構成単位として、例えば、PNA、LNA、ENA等のモノマー残基があげられる。前記HMGB1結合核酸分子(A1)は、例えば、PNA、LNAおよびENAの少なくともいずれかのモノマー残基を含むRNAまたはDNAがあげられる。前記HMGB1結合核酸分子(A1)が、前記モノマー残基を含む場合、その数は、特に制限されない。

[0036] 前記HMGB1結合核酸分子(A1)は、例えば、前述のように、ヌクレアーゼに耐性であることが好ましい。前記ヌクレアーゼ耐性にする手法は、特に制限されず、前述と同様である。前記HMGB1結合核酸分子(A1)は、前述のように、RNAが好ましい。前記HMGB1結合核酸分子(A1)がRNAの場合、例えば、RNA分解酵素耐性であることが好ましい。RNA分解酵素耐性にする手法は、特に制限されず、前述と同様である。

[0037] 前記HMGB1結合核酸分子(A1)がRNAの場合、例えば、前述と同様に、RNAを構成する全ヌクレオチド残基または一部のヌクレオチド残基が、前記修飾化ヌクレオチド残基であることが好ましい。前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、前述の修飾化ヌクレオチド残基があげられる。また、前記HMGB1結合核酸分子(A1)がRNAの場合、例えば、前述と同様に、RNAを構成する全ヌクレオチド残基または一部のヌクレオチド残基が、前記デオキシリボヌクレオチド残基および/または前記LNA残基であることが好ましい。また、前記HMGB1結合核酸分子(A1)がRNAの場合、前述と同様に、例えば、RNAを構成するヌクレオチド残基のうち、ウラシルを有するヌクレオチド残基の全てまたは一部が、チミンを有するヌクレオチド残基に置換されてもよく、具体的には、前記チミンを有するデオキシリボヌクレオチド残基に置換されてもよい。また、前記HMGB1結合

核酸分子（A1）がRNAの場合、例えば、前述と同様に、その5'末端および／または3'末端に、前記PEGまたは前記デオキシチミジンを含むことが好ましい。このようにチミンに置換された塩基配列からなる核酸分子または前記塩基配列を含む核酸分子は、例えば、後述する（A2）の核酸分子として例示できる。

[0038] 前記HMGB1結合核酸分子（A1）の長さは、特に制限されないが、その全長は、例えば、20～160塩基長であり、好ましくは30～120塩基長であり、より好ましくは40～100塩基長である。

[0039] つぎに、前記（A2）の核酸分子について、説明する。以下、前記（A2）の核酸分子を、HMGB1結合核酸分子（A2）という。

（A2）配列番号1～42のいずれかで表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子

[0040] 前記HMGB1結合核酸分子（A2）は、前記置換等された塩基配列を含む核酸分子でもよいし、前記置換等された前記塩基配列からなる核酸分子でもよい。前記HMGB1結合核酸分子（A2）において、前記置換等された塩基配列を、塩基配列（A2）ともいう。

[0041] 「1または複数」とは、特に制限されない。「1または複数」は、前記配列番号1～42のいずれかの塩基配列において、例えば、1～5個であり、好ましくは1～4個であり、より好ましくは1～3個であり、さらに好ましくは1個または2個であり、特に好ましくは1個である。また、「1または複数」は、前記HMGB1結合核酸分子（A1）の全長配列において、例えば、1～5個であり、好ましくは1～4個であり、より好ましくは1～3個であり、さらに好ましくは1個または2個であり、特に好ましくは1個である。前記置換、付加または挿入に使用する塩基は、特に制限されず、例えば、前記天然塩基でもよいし、前記人工塩基でもよい。前記塩基の置換、付加または挿入は、例えば、前記ヌクレオチド残基を用いてもよいし、前記モノマー残基を用いてもよい。

[0042] 本発明のHMGB1結合核酸分子は、例えば、下記(A3)の核酸分子でもよい。以下、前記(A3)の核酸分子を、HMGB1結合核酸分子(A3)という。

(A3)配列番号1~42のいずれかで表わされる塩基配列において、60%以上の相同性を有する塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子

[0043] 前記HMGB1結合核酸分子(A3)は、前記相同性を有する塩基配列を含む核酸分子でもよいし、前記相同性を有する塩基配列からなる核酸分子でもよい。前記HMGB1結合核酸分子(A3)において、前記相同性を有する塩基配列を、塩基配列(A3)ともいう。

[0044] 前記相同性は、例えば、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上である。前記HMGB1結合核酸分子(A3)は、例えば、前記HMGB1結合核酸分子(A1)の全長配列において、60%以上の相同性を有する塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能な核酸分子でもよい。この場合、前記相同性は、例えば、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上である。前記相同性は、例えば、BLAST等を用いてデフォルトの条件で計算することにより、算出できる。

[0045] 本発明のHMGB1結合核酸分子は、例えば、下記(A4)の核酸分子でもよい。以下、前記(A4)の核酸分子を、HMGB1結合核酸分子(A4)という。

(A4)配列番号1~42のいずれかで表わされる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列または前記塩基配列に相補的な塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子

[0046] 前記HMGB1結合核酸分子(A4)は、前記ハイブリダイズする塩基配列からなる核酸分子でもよいし、前記塩基配列を含む核酸分子でもよい。また、前記HMGB1結合核酸分子(A4)は、前記相補的な塩基配列からな

る核酸分子でもよいし、前記相補的な塩基配列を含む核酸分子でもよい。前記HMGB1結合核酸分子(A4)において、前記ハイブリダイズする塩基配列および前記相補的な塩基配列を、塩基配列(A4)ともいう。

[0047] 前記HMGB1結合核酸分子(A4)において、「ストリンジентな条件下でハイブリダイズする」とは、例えば、当該技術分野の当業者において、周知のハイブリダイゼーションの実験条件である。具体的には、「ストリンジентな条件」とは、例えば、0.7~1mol/LのNaCl存在下、60~68°Cでハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍のSSC溶液を用い、65~68°Cで洗浄することにより同定できる条件をいう。1×SSCとは、150mmol/LのNaCl、15mmol/Lクエン酸ナトリウムからなる。また、前記HMGB1結合核酸分子(A4)は、例えば、前記HMGB1結合核酸分子(A1)の全長塩基とストリンジентな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子でもよい。

[0048] 前記HMGB1結合核酸分子(A2)~(A4)において、例えば、塩基、構成単位、長さ、ヌクレアーゼ耐性の付与等、特に示さない限り、前記HMGB1結合核酸分子(A1)と同様である。

[0049] つぎに、前記(B1)の核酸分子について、説明する。以下、前記(B1)の核酸分子を、HMGB1結合核酸分子(B1)という。前記HMGB1結合核酸分子(B1)において、配列番号45~81で表わされる塩基配列を、塩基配列(B1)ともいう。

(B1)配列番号45~81のいずれかで表わされる塩基配列を含む核酸分子

[0050] 配列番号45~81で表わされる塩基配列は、前述の通りである。配列番号45~81で表わされる塩基配列を含むHMGB1結合核酸分子(B1)は、それぞれ、前述した配列番号の前に示す名称で表わすこともある。前記HMGB1結合核酸分子(B1)は、例えば、配列番号45~81のいずれかの配列番号で表わされる塩基配列(B1)からなる核酸分子でもよいし、

前記塩基配列（B 1）を含む核酸分子でもよい。

[0051] 前記HMGB 1結合核酸分子（B 1）は、例えば、前記配列番号45～81のいずれかの塩基配列（B 1）において、5'側の4塩基目から3'側の末端塩基までの塩基配列からなる核酸分子または前記塩基配列を含む核酸分子であってもよい。すなわち、前記HMGB 1結合核酸分子（B 1）は、例えば、前記配列番号45～81のいずれかの塩基配列（A 1）において、5'末端のg g gを欠失してもよい。

[0052] 前記塩基配列（B 1）は、例えば、配列番号114で表わされるモチーフ配列を含んでもよい。下記塩基配列において、nは、アデニン（a）、シトシン（c）、グアニン（g）、ウラシル（u）、チミン（t）であり、5塩基目のnはアデニン（a）、13塩基目のnはシトシン（c）、17塩基目のnはアデニン（a）が好ましい。前記モチーフ配列を含む塩基配列（B 1）は、例えば、#47（配列番号65）、#80（配列番号67）、R8c6__1（配列番号74）、R8c6__14（配列番号75）があげられる。モチーフ配列（配列番号114）

uaagncacguagnaccng

[0053] 前記R8c6__1（配列番号74）の推定二次構造を図11に示す。同図において、丸で囲んだ塩基が、前記モチーフ配列に該当する。図11の前記推定二次構造において、前記モチーフ配列における「n」に該当する塩基は、丸を省略している。

[0054] 前記HMGB 1結合核酸分子（B 1）において、各塩基は、例えば、前述と同様である。すなわち、前記塩基は、例えば、アデニン（a）、シトシン（c）、グアニン（g）、チミン（t）およびウラシル（u）の前記天然塩基（非人工塩基）でもよいし、前記人工塩基（非天然塩基）でもよい。前記人工塩基は、例えば、前述の通りである。前記HMGB 1結合核酸分子（B 1）において、例えば、a、g、c、tおよびuで表わされる塩基は、前記天然塩基の他に、前記天然塩基のそれぞれと同様の機能を有する前記人工塩基の意味も含む。

- [0055] 前記HMGB1結合核酸分子(B1)は、例えば、その構成単位は、特に制限されず、前述と同様である。すなわち、前記構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基であり、前記ヌクレオチド残基は、例えば、リボヌクレオチド残基、デオキシリボヌクレオチド残基があげられる。前記HMGB1結合核酸分子(A1)は、例えば、リボヌクレオチド残基から構成されるRNAでもよいし、デオキシリボヌクレオチド残基から構成されるDNAでもよく、好ましくはRNAである。また、前記HMGB1結合核酸分子(A1)は、DNAの構成単位であるデオキシリボヌクレオチドと、RNAの構成単位であるリボヌクレオチドとの両方を含んでもよい。前記配列番号45~81の塩基配列は、例えば、それぞれ、前述のような塩基が連続する配列であればよく、リボヌクレオチド残基から構成されるRNAでもよいし、デオキシリボヌクレオチド残基から構成されるDNAでもよいし、デオキシリボヌクレオチド残基を含むRNAでもよいし、リボヌクレオチド残基を含むRNAでもよい。
- [0056] 前記HMGB1結合核酸分子(B1)は、前述と同様に、前記構成単位として、例えば、PNA、LNA、ENA等のモノマー残基があげられる。前記HMGB1結合核酸分子(B1)は、例えば、PNA、LNAおよびENAの少なくともいずれかのモノマー残基を含むRNAまたはDNAがあげられる。前記HMGB1結合核酸分子(B1)が、前記モノマー残基を含む場合、その数は、特に制限されない。
- [0057] 前記HMGB1結合核酸分子(B1)は、例えば、前述のように、ヌクレアーゼに耐性であることが好ましい。前記ヌクレアーゼ耐性にする手法は、特に制限されず、前述と同様である。前記HMGB1結合核酸分子(B1)は、前述のように、RNAが好ましい。前記HMGB1結合核酸分子(B1)がRNAの場合、例えば、RNA分解酵素耐性であることが好ましい。RNA分解酵素耐性にする手法は、特に制限されず、前述と同様である。
- [0058] 前記HMGB1結合核酸分子(B1)がRNAの場合、例えば、前述と同様に、RNAを構成する全ヌクレオチド残基または一部のヌクレオチド残基

が、前記修飾化ヌクレオチド残基であることが好ましい。前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、前述の修飾化ヌクレオチド残基があげられる。また、前記HMGB1結合核酸分子(B1)がRNAの場合、例えば、前述と同様に、RNAを構成する全ヌクレオチド残基または一部のヌクレオチド残基が、前記デオキシリボヌクレオチド残基および/または前記LNA残基であることが好ましい。また、前記HMGB1結合核酸分子(B1)がRNAの場合、前述と同様に、例えば、RNAを構成するヌクレオチド残基のうち、ウラシルを有するヌクレオチド残基の全てまたは一部が、チミンを有するヌクレオチド残基に置換されてもよく、具体的には、前記チミンを有するデオキシリボヌクレオチド残基に置換されてもよい。また、前記HMGB1結合核酸分子(B1)がRNAの場合、例えば、前述と同様に、その5'末端および/または3'末端に、前記PEGまたは前記デオキシチミジンを含むことが好ましい。このようにチミンに置換された塩基配列からなる核酸分子または前記塩基配列を含む核酸分子は、例えば、後述する(B2)の核酸分子として例示できる。

[0059] 前記HMGB1結合核酸分子(B1)の長さは、特に制限されないが、その全長は、例えば、20~160塩基長であり、好ましくは30~120塩基長であり、より好ましくは40~100塩基長である。

[0060] 前記HMGB1結合核酸分子(B1)は、中でも、下記(b1)の核酸分子であることが好ましい。以下、前記(b1)の核酸分子を、HMGB1結合核酸分子(b1)ともいう。前記HMGB1核酸分子(b1)は、例えば、配列番号74の塩基配列からなる核酸分子でもよいし、前記塩基配列からなる核酸分子でもよい。

(b1) 配列番号74で表わされる塩基配列を含む核酸分子

[0061] つぎに、前記(B2)の核酸分子について、説明する。以下、前記(B2)の核酸分子を、HMGB1結合核酸分子(B2)という。

(B2) 配列番号45~81のいずれかで表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列を含み、

且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子

[0062] 前記HMGB1結合核酸分子(B2)は、前記置換等された塩基配列を含む核酸分子でもよいし、前記置換等された前記塩基配列からなる核酸分子でもよい。前記HMGB1結合核酸分子(B2)において、前記置換等された塩基配列を、塩基配列(B2)ともいう。

[0063] 「1または複数」は、特に制限されず、前記HMGB1結合核酸分子(B2)が、HMGB1に結合可能であればよい。前記置換された塩基の数は、配列番号45~81のいずれかの塩基配列において、例えば、1~5個であり、好ましくは1~4個であり、より好ましくは1~3個であり、さらに好ましくは1個または2個であり、特に好ましくは1個である。前記付加または挿入された塩基の数は、配列番号45~81のいずれかの塩基配列において、例えば、1~5個であり、好ましくは1~4個であり、より好ましくは1~3個であり、さらに好ましくは1個または2個であり、特に好ましくは1個である。前記欠失された塩基の数は、特に制限されないが、例えば、配列番号45~81のいずれかの塩基配列において、1~46個、1~43個、1~21個、~1~18個、1~4個、1~3個、2個または1個である。

[0064] 前記HMGB1結合核酸分子(B2)の長さは、特に制限されないが、その全長は、例えば、20~160塩基長であり、好ましくは30~120塩基長であり、より好ましくは40~100塩基長である。

[0065] 前記HMGB1結合核酸分子(B2)のうち、例えば、配列番号45~81のいずれかで表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が、欠失された塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子は、前記HMGB1結合核酸分子(B1)を小型化した核酸分子ともいえる。前記小型化した核酸分子を、小型化HMGB1結合核酸分子(B2)ともいう。前記小型化HMGB1結合核酸分子は、前記(B2)に示すように、配列番号45~81のいずれかで表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が、欠失するだけでなく、例えば、1または複数の塩基が、置換、付加ま

たは挿入された塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子でもよい。

[0066] 前記小型化HMGB1結合核酸分子(B2)は、前述のように、前記欠失された塩基配列を含む核酸分子でもよいし、前記欠失された前記塩基配列からなる核酸分子でもよい。前記小型化HMGB1結合核酸分子(B2)において、前記欠失された塩基配列を、小型化塩基配列ともいう。前記欠失された塩基の数は、特に制限されず、例えば、前述の通りである。

[0067] 前記小型化HMGB1結合核酸分子(B2)は、例えば、配列番号45～81の塩基配列において、5'側の4塩基目から3'側の末端塩基まで塩基配列からなる核酸分子または前記塩基配列を含む核酸分子があげられる。すなわち、前記小型化HMGB1結合核酸分子(B2)は、例えば、配列番号45～81のいずれかの塩基配列(B1)において、5'末端のgggを欠失した塩基配列からなる核酸分子または前記塩基配列を含む核酸分子があげられる。

[0068] 前記小型化HMGB1結合核酸分子(B2)の長さは、特に制限されないが、その全長は、例えば、20～160塩基長であり、好ましくは30～120塩基長であり、より好ましくは40～100塩基長である。

[0069] 前記小型化HMGB1結合核酸分子(B2)としては、例えば、配列番号74で表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が、欠失された塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子が好ましく、具体的には、下記(b2)の核酸分子が好ましい。以下、前記(b2)の核酸分子を、小型化HMGB1結合核酸分子(b2)ともいう。

(b2) 配列番号74で表わされる塩基配列における連続する11塩基以上の部分配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子

[0070] 前記小型化HMGB1結合核酸分子(b2)において、前記連続する11塩基以上の部分配列を、以下、連続部分配列ともいう。前記小型化HMGB1結合核酸分子(b2)は、前記連続部分配列からなる核酸分子でもよいし、前記連続部分配列を含む核酸分子でもよい。前記小型化HMGB1結合核

酸分子（b 2）は、例えば、前述のように、配列番号 7 4 の塩基配列において、1 または複数の塩基が、欠失するだけでなく、例えば、1 または複数の塩基が、置換、付加または挿入された塩基配列を含み、且つ、HMGB 1 に結合可能である核酸分子でもよい。

[0071] 前記小型化 HMGB 1 結合核酸分子（b 2）は、例えば、前記配列番号 7 4 の塩基配列における前記連続する 1 1 塩基以上の連続部分配列を、1 配列含んでもよいし、2 配列以上有してもよい。

[0072] 前記連続部分配列の長さは、前述のように、1 1 塩基以上である。前記連続部分配列の長さは、特に制限されず、例えば、1 2 塩基以上でもよく、1 4 塩基以上でもよく、1 6 塩基以上でもよい。前記連続部分配列の長さの上限は、特に制限されず、8 0 塩基以下であり、好ましくは 7 9 塩基以下である。

[0073] 前記連続部分配列は、特に制限されないが、例えば、以下に示す y 配列、x 配列または y' 配列があげられる。前記 y 配列は、例えば、前記配列番号 7 4 の塩基配列における、1 番目～2 0 番目、4 番目～2 0 番目の領域があげられる。前記 x 配列は、例えば、前記配列番号 7 4 の塩基配列における、2 1 番目～6 0 番目、2 2 番目～6 0 番目、2 4 番目～6 0 番目、2 5 番目～6 0 番目、2 9 番目～6 0 番目、3 4 番目～6 0 番目、3 8 番目～6 0 番目、2 2 番目～4 8 番目、2 2 番目～4 7 番目、2 5 番目～4 7 番目、2 6 番目～4 7 番目、2 7 番目～4 7 番目、2 8 番目～4 7 番目、2 9 番目～4 7 番目、3 0 番目～4 7 番目、3 1 番目～4 7 番目、3 4 番目～4 7 番目、2 9 番目～4 4 番目、2 9 番目～4 0 番目、2 9 番目～4 6 番目、2 5 番目～4 6 番目、2 6 番目～4 6 番目、2 7 番目～4 6 番目、2 8 番目～4 6 番目、2 9 番目～4 6 番目の領域があげられる。前記 y' 配列は、例えば、前記配列番号 7 4 の塩基配列における、6 1 番目～8 0 番目、6 1 番目～7 9 番目、6 1 番目～7 7 番目、6 1 番目～7 6 番目、6 1 番目～7 8 番目、6 4 番目～8 0 番目、6 5 番目～8 0 番目、7 0 番目～8 0 番目、6 4 番目～7 7 番目の領域があげられる。

[0074] 前記連続部分配列からなる塩基配列および前記連続部分配列を含む塩基配列を、以下、塩基配列（b2）ともいう。前記小型化HMGB1結合核酸分子（b2）は、例えば、前記塩基配列（b2）からなる核酸分子でもよいし、前記塩基配列（b2）を含む核酸分子でもよい。前記塩基配列（b2）は、例えば、前記x配列と前記y'配列とを含む塩基配列、前記y配列と前記x配列と前記y'配列とを含む塩基配列があげられる。前記塩基配列（b2）において、例えば、前記x配列の5'側に前記y配列、前記x配列の3'側に前記y'配列を含むことが好ましい。また、前記塩基配列（b2）は、例えば、前記y配列における5'末端のgggを欠失してもよい。

[0075] 前記塩基配列（b2）は、例えば、配列番号83～113で表わされる塩基配列があげられる。これらの塩基配列を、下記表1に示す。下記表1において、各塩基配列は、配列番号74の塩基配列と対応するように示す。各塩基配列について、配列番号74の塩基配列と対比して、欠失する部分は空欄で示し、異なる塩基は下線を付す。配列番号83～113の塩基配列を含む、前記小型化HMGB1結合核酸分子（b2）は、それぞれ、下記表1に示す名称で表わすこともある。

[0076] [表1]

Aptamer	配列			SEQ No.
R8c6_1	GGGACGCUCACGUACGCUCA	GAGUACAGUAAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	74
R8c6_1-1	GGGACGCUCACGUACGCUCA	GAGUACAGUAAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAG	83
R8c6_1-3	GGGACGCUCACGUACGCUCA	GAGUACAGUAAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGC	84
R8c6_1-4	GGGACGCUCACGUACGCUCA	GAGUACAGUAAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGU	85
R8c6_1-15	GGG CA	GAGUACAGUAAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	86
R8c6_1-18	GGG	AGUACAGUAAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	87
R8c6_1-20	GGG	UACAGUAAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	88
R8c6_1-21	GGG	ACAGUAAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	89
R8c6_1-25	GGG	UAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	90
R8c6_1-30	GGG	CACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	91
R8c6_1-34CC	GGG	UAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGC	92
R8c6_1-18	GGG	AGUACAGUAAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	87
R8c6_1-18-S2	GGG	AGUACAGUAAAGACACGUAGCACCAGUC G CGUUUGUCG	C GUGCCUGGACGUGCAGU	93
R8c6_1-18-S4	GGG	AGUACAGUAAAGACACGUAGCACCAGUC GUUUUGUCG	UGCCUGGACGUGCAGU	94
R8c6_1-18-S6	GGG	AGUACAGUAAAGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	95
R8c6_1-21-S6	GGG	ACAGUAAAGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	96
R8c6_1-22-S6	GGG	CAGUAAAGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	97
R8c6_1-23-S6	GGG	AGUAAAGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	98
R8c6_1-24-S6	GGG	GUAAGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	99
R8c6_1-25-S6	GGG	UAAGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	100
R8c6_1-26-S6	GGG	AAGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	101
R8c6_1-27-S6	GGG	AGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	102
R8c6_1-25-S6A	GGG	UAAG CACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	103
R8c6_1-25-S6A2	GGG	UAAGACACGUAGCACC GU	GUGCC GGACGUGCAGU	104
R8c6_1-25-S6A3	GGG	UAAGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGC GU	105
R8c6_1-25-S6C	GGG	UAAGACACGUAG ACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	106
R8c6_1-25-S6C2	GGG	UAAGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGA GUGCAGU	107
R8c6_1-21-S8	GGG	ACAGUAAAGACACGUAGCACCAG	UGCCUGGACGUGCAGU	108
R8c6_1-22-S8	GGG	CAGUAAAGACACGUAGCACCAG	UGCCUGGACGUGCAGU	109
R8c6_1-23-S8	GGG	AGUAAAGACACGUAGCACCAG	UGCCUGGACGUGCAGU	110
R8c6_1-24-S8	GGG	GUAAGACACGUAGCACCAG	UGCCUGGACGUGCAGU	111
R8c6_1-25-S8	GGG	UAAGACACGUAGCACCAG	UGCCUGGACGUGCAGU	112
R8c6_1-25-S8CA	GGG	UAAGACACGUAGAACCAG	UGACUGGAAGUGCAGU	113

- [0077] 前記小型化HMGB1結合核酸分子（b2）は、例えば、配列番号83～113のいずれかの配列番号で表わされる塩基配列からなる核酸分子でもよいし、配列番号83～113のいずれかの配列番号で表わされる塩基配列を含む核酸分子でもよい。
- [0078] 前記小型化HMGB1結合核酸分子（b2）は、例えば、配列番号74および前記配列番号83～113のいずれかの塩基配列（b2）において、5'側の4塩基目から3'側の末端塩基までの塩基配列からなる核酸分子または前記塩基配列を含む核酸分子であってもよい。すなわち、前記小型化HMGB1結合核酸分子（b2）は、例えば、配列番号74および配列番号83～113のいずれかの塩基配列において、5'末端のgggを欠失してもよい。
- [0079] 前記塩基配列（b2）は、例えば、配列番号114で表わされるモチーフ配列を含んでもよい。下記塩基配列において、nは、アデニン（a）、シトシン（c）、グアニン（g）、ウラシル（u）、チミン（t）であり、5塩基目のnはアデニン（a）、13塩基目のnはシトシン（c）、17塩基目のnはアデニン（a）が好ましい。前記モチーフ配列を含む塩基配列（b2）は、例えば、R8c6__1-1（配列番号83）、R8c6__1-3（配列番号84）、R8c6__1-4（配列番号85）、R8c6__1-15（配列番号86）、R8c6__1-18（配列番号87）、R8c6__1-20（配列番号88）、R8c6__1-21（配列番号89）、R8c6__1-25（配列番号90）、R8c6__1-18-S2（配列番号93）、R8c6__1-18-S4（配列番号94）、R8c6__1-18-S6（配列番号95）、R8c6__1-21-S6（配列番号96）、R8c6__1-22-S6（配列番号97）、R8c6__1-23-S6（配列番号98）、R8c6__1-24-S6（配列番号99）、R8c6__1-25-S6（配列番号100）、R8c6__1-25-S6A3（配列番号105）、R8c6__1-25-S6C2（配列番号107）、R8c6__1-21-S8（配列番号108）、R8c6__1-22-S8（配列番号109）

、R8c6__1-23-S8（配列番号110）、R8c6__1-24-S8（配列番号111）、R8c6__1-25-S8（配列番号112）等があげられる。また、前記モチーフ配列の一部を含む塩基配列（B1）は、例えば、R8c6__1-30（配列番号91）、R8c6__1-34CC（配列番号92）、R8c6__1-26-S6（配列番号101）、R8c6__1-25-S6A2（配列番号104）、R8c6__1-25-S6C（配列番号106）等があげられる。

モチーフ配列（配列番号114）

uaagncaaguagnacng

[0080] 前記R8c6__1-18（配列番号74）の推定二次構造を図11に示す。同図において、丸で囲んだ塩基が、前記モチーフ配列に該当する。前記推定二次構造において、前記モチーフ配列における「n」に該当する塩基は、丸を省略している。前記R8c6__1-25-S6（配列番号100）の推定二次構造を図20に示す。同図において、丸で囲んだ塩基が、前記モチーフ配列に該当する。前記推定二次構造において、前記モチーフ配列における「n」に該当する塩基は、丸を省略している。

[0081] 前記小型化HMGB1結合核酸分子（b2）の長さは、特に制限されないが、その全長は、例えば、20～160塩基長であり、好ましくは30～120塩基長であり、より好ましくは40～100塩基長である。また、前記小型化HMGB1結合核酸分子（b2）において、前記塩基配列（b2）は、その全長は、特に制限されないが、その下限が、例えば、20塩基長以上、30塩基長以上、34塩基長以上、37塩基長以上、40塩基長以上であり、その上限が、例えば、160塩基以下、120塩基以下、100塩基以下、80塩基以下であり、好ましくは79塩基長以下である。

[0082] 前記小型化HMGB1結合核酸分子（B2）は、例えば、前記小型化HMGB1結合核酸分子（b2）の前記連続部分配列において、1または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子でもよい。具体例としては、配列番号83～

1 1 3のいずれかの配列番号で表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子があげられる。前記置換等の塩基の数は、特に制限されず、配列番号83～113のいずれかの塩基配列において、例えば、1～5個であり、好ましくは1～4個であり、より好ましくは1～3個であり、さらに好ましくは1個または2個であり、特に好ましくは1個である。

[0083] 本発明のHMGB1結合核酸分子は、例えば、下記(B3)の核酸分子でもよい。以下、前記(B3)の核酸分子を、HMGB1結合核酸分子(B3)という。

(B3) 配列番号45～81のいずれかで表わされる塩基配列において、60%以上の相同性を有する塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子

[0084] 前記HMGB1結合核酸分子(B3)は、前記相同性を有する塩基配列を含む核酸分子でもよいし、前記相同性を有する塩基配列からなる核酸分子でもよい。前記相同性は、例えば、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上である。前記HMGB1結合核酸分子(B3)は、例えば、前記HMGB1結合核酸分子(B1)の全長配列において60%以上の相同性を有する塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能な核酸分子でもよい。この場合、前記相同性は、例えば、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上である。前記相同性は、例えば、BLAST等を用いてデフォルトの条件で計算することにより、算出できる。

[0085] 本発明のHMGB1結合核酸分子は、例えば、下記(B4)の核酸分子でもよい。以下、前記(B4)の核酸分子を、HMGB1結合核酸分子(B4)という。

(B4) 配列番号45～81のいずれかで表わされる塩基配列とストリンジ

ェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列または前記塩基配列に相補的な塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子

[0086] 前記HMGB1結合核酸分子(B4)は、前記ハイブリダイズする塩基配列からなる核酸分子でもよいし、前記塩基配列を含む核酸分子でもよい。また、前記HMGB1結合核酸分子(B4)は、前記相補的な塩基配列からなる核酸分子でもよいし、前記相補的な塩基配列を含む核酸分子でもよい。

[0087] 前記HMGB1結合核酸分子(B4)において、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、例えば、当該技術分野の当業者において、周知のハイブリダイゼーションの実験条件である。具体的には、「ストリンジェントな条件」とは、例えば、0.7~1mol/LのNaCl存在下、60~68℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍のSSC溶液を用い、65~68℃で洗浄することにより同定できる条件をいう。1×SSCとは、150mmol/LのNaCl、15mmol/Lクエン酸ナトリウムからなる。また、前記HMGB1結合核酸分子(B4)は、例えば、前記HMGB1結合核酸分子(B1)の全長塩基とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含み、且つ、HMGB1に結合可能である核酸分子でもよい。

[0088] 前記HMGB1結合核酸分子(B2)~(B4)において、例えば、塩基、構成単位、長さ、ヌクレアーゼ耐性の付与等、特に示さない限り、前記HMGB1結合核酸分子(B1)と同様である。

[0089] 本発明のHMGB1結合核酸分子は、前述のように、例えば、一本鎖核酸でもよいし、二本鎖核酸でもよい。本発明のHMGB1結合核酸分子が、前記二本鎖核酸の場合、例えば、一方の一本鎖が、前記(A1)~(A4)および前記(B1)~(B4)のいずれかの核酸分子であり、他方の一本鎖が、前記(A1)~(A4)および前記(B1)~(B4)のいずれかの核酸分子に相補的な塩基配列からなる核酸分子または前記塩基配列を含む核酸分子であることが好ましい。

[0090] 本発明のMGB1結合核酸分子は、例えば、使用時において、前記HMGB

B 1 への結合性に影響を与えない範囲で、さらに、ポリアデニン等のリンカー配列等が結合されてもよい。

[0091] 本発明のHMGB 1 結合核酸分子の製造方法は、何ら制限されず、化学合成を利用した核酸合成方法等、公知の方法により合成できる。

[0092] 本発明のHMGB 1 結合核酸分子は、例えば、前述のように、前記配列番号 1 ~ 4 2 のいずれかの配列番号で表わされる塩基配列からなる核酸分子でもよいし、前記塩基配列を含む核酸分子でもよい。後者の場合、本発明のHMGB 1 結合核酸分子は、例えば、前記配列番号 1 ~ 4 2 のいずれかの配列番号で表わされる塩基配列以外の塩基配列を含んでもよい。このような本発明のHMGB 1 結合核酸分子の一形態としては、例えば、Y 領域、X 領域および Y' 領域を含み、5' 末端から、前記 Y 領域、前記 X 領域および前記 Y' 領域が連結した核酸分子があげられる。この形態の前記 HMGB 1 結合核酸分子において、前記 X 領域は、前記配列番号 1 ~ 4 2 のいずれかの配列番号で表わされる塩基配列を含み、前記 Y 領域および前記 Y' 領域は、それぞれ任意の塩基配列からなることが好ましい。

[0093] 前記 X 領域の塩基数は、特に制限されないが、例えば、10 ~ 60 塩基であり、好ましくは 15 ~ 50 塩基であり、より好ましくは 20 ~ 40 塩基である。前記 Y 領域および Y' 領域の塩基数は、特に制限されないが、それぞれ、例えば、10 ~ 50 塩基であり、好ましくは 15 ~ 40 塩基であり、より好ましくは 20 ~ 30 塩基である。本発明の HMGB 1 結合核酸分子の全塩基数は、特に制限されないが、例えば、20 ~ 160 塩基であり、好ましくは 30 ~ 120 塩基であり、より好ましくは 40 ~ 100 塩基である。

[0094] 前記 Y 領域の塩基配列および Y' 領域の塩基配列は、それぞれ、特に制限されないが、例えば、プライマーがアニーリング可能なプライマー結合配列、および、ポリメラーゼが認識可能なポリメラーゼ認識配列等を含むことが好ましい。ターゲットに結合可能な核酸分子を大量に製造する場合、例えば、前述のような化学合成よりも、核酸増幅法により増幅させる方が、効率よい製造が可能である。そこで、本発明の HMGB 1 結合核酸分子を核酸増幅

法により増幅させる場合、本発明のHMGB 1結合核酸分子は、例えば、プライマーがハイブリダイズ可能なプライマー結合配列およびポリメラーゼが認識可能なポリメラーゼ認識配列を含むことが好ましい。本発明のHMGB 1結合核酸分子は、例えば、前記X領域の5'側上流、すなわち、前記Y領域、および前記X領域の3'側下流、すなわち、前記Y'領域の少なくとも一方に、前記プライマー結合配列およびポリメラーゼ認識配列を含むことが好ましい。前記ポリメラーゼ認識領域は、例えば、核酸増幅で使用するポリメラーゼの種類に応じて適宜決定できる。本発明のHMGB 1結合核酸分子がRNAの場合、前記ポリメラーゼの認識配列は、例えば、DNA依存性RNAポリメラーゼの認識配列（以下、「RNAポリメラーゼ認識配列」ともいう）が好ましく、具体例としては、T7RNAポリメラーゼの認識配列であるT7プロモーター等があげられる。本発明のHMGB 1結合核酸分子がRNAの場合、例えば、5'側の前記Y領域は、前記RNAポリメラーゼ認識配列と前記プライマー結合配列（以下、「5'側プライマー領域」ともいう）とを、この順序で含むことが好ましい。そして、前記Y領域の3'側に、前記X領域が連結されていることが好ましい。さらに、前記X領域の3'側に、前記Y'領域が連結され、前記Y'領域が、プライマー結合配列（以下、「3'側プライマー領域」ともいう）を含むことが好ましい。前記RNAにおける前記5'側プライマー領域は、例えば、前記RNAを鋳型として合成したDNAアンチセンス鎖の3'側に対して相補的な配列、つまり、前記アンチセンス鎖の3'側に結合可能なプライマーと同様の配列であることが好ましい。また、本発明のHMGB 1結合核酸分子は、例えば、さらに、HMGB 1への結合を補助する領域を有してもよい。また、本発明のHMGB 1結合核酸分子は、例えば、前記Y領域と前記X領域、および、前記X領域と前記Y'領域が、それぞれ、直接隣接してもよいし、介在配列を介して間接的に隣接してもよい。

[0095] 本発明のHMGB 1結合核酸分子を核酸増幅により調製する方法は、特に制限されない。本発明のHMGB 1結合核酸分子がRNAの場合、例えば、

DNAを鋳型として調製できる。以下、RNAの鋳型となるDNA鎖をアンチセンス鎖、前記RNAのウラシル（u）をチミン（t）に置換した配列を含むDNA鎖をセンス鎖ともいう。前記鋳型DNAは、例えば、前記RNAにおける前記X領域の相補鎖のウラシル（u）をチミン（t）に置換したDNA（アンチセンス鎖）、および、前記X領域のウラシル（u）をチミン（t）に置換した配列を含むDNA（センス鎖）のいずれか一方を含むことが好ましい。これらのDNAを鋳型として、DNA依存性DNAポリメラーゼを用いて核酸増幅を行った後、得られたDNA増幅産物を鋳型として、さらに、DNA依存性RNAポリメラーゼを用いてRNAを転写することにより、前記RNAを増幅できる。また、前記RNAを鋳型として、RNA依存性DNAポリメラーゼを用いた逆転写反応によりcDNAを調製し、前記cDNAを鋳型としてPCR等によりDNAの核酸増幅を行い、得られたDNA増幅産物を鋳型として、さらに、DNA依存性RNAポリメラーゼを用いてRNAを転写することにより、前記RNAを増幅してもよい。

[0096] また、本発明のHMGB1結合核酸分子がDNAの場合、例えば、DNAをポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）法等によって、増幅できる。

[0097] 本発明のHMGB1結合核酸分子において、前記X領域は、例えば、前述したx配列が例示できる。

[0098] 本発明のHMGB1結合核酸分子において、前述のように、前記Y領域およびY'領域の塩基配列は、それぞれ、特に制限されず、任意に決定できる。前記Y領域の配列の一例としては、例えば、配列番号43および配列番号115のいずれかで表わされる塩基配列を含む配列および前記塩基配列からなる配列があげられる。また、前記Y領域は、例えば、前述したy配列が例示できる。なお、これらの配列は、一例であって、本発明を制限するものではない。

gggacgcucacguacgcuca（配列番号43）

acgcucacguacgcuca（配列番号115）

[0099] 前記 Y' 領域の配列の一例としては、例えば、配列番号 44 で表わされる塩基配列を含む配列および前記塩基配列からなる配列があげられる。また、前記 Y' 領域は、例えば、前述した y' 配列が例示できる。なお、これらの配列は、一例であって、本発明を制限するものではない。

ucagugccuggacgugcagu (配列番号 44)

[0100] 本発明の HMGB1 結合核酸分子は、例えば、自己アニーリングによる二次構造を有してもよい。前記二次構造は、例えば、ステムループ構造があげられる。前記ステムループ構造は、例えば、前記 Y 領域、前記 X 領域および前記 Y' 領域のいずれかが二本鎖を形成することによって、形成されてもよい。具体例としては、例えば、前記 Y 領域の一部が、前記 X 領域の一部と二本鎖を形成することにより、ステムループ構造を形成してもよいし、前記 Y' 領域の一部が、前記 X 領域の一部と二本鎖を形成することにより、ステムループ構造を形成してもよい。また、前記 Y 領域の一部および前記 Y' 領域の一部が、それぞれ、前記 X 領域の一部と二本鎖を形成することにより、ステムループ構造を形成してもよい。また、前記 Y 領域の内部で二本鎖を形成することにより、ステムループ構造を形成してもよいし、前記 Y' 領域の内部で二本鎖を形成することにより、ステムループ構造を形成してもよいし、前記 Y 領域および前記 Y' 領域の内部において、ステムループ構造を形成してもよい。

[0101] 本発明の HMGB1 結合核酸分子は、HMGB1 と結合可能であることから、例えば、HMGB1 との結合により HMGB1 の機能を中和する中和剤として使用できる。

[0102] 本発明の HMGB1 結合核酸分子は、前述のように、HMGB1 と結合可能であることから、例えば、HMGB1 との結合により HMGB1 の機能を阻害する阻害剤として使用できる。

[0103] 本発明の HMGB1 結合核酸分子は、前述のように、HMGB1 と結合可能であることから、HMGB1 の発現が原因となる疾患を予防または治療するための医薬品として使用できる。前記本発明の医薬品は、例えば、抗癌剤

、抗炎症剤、抗脳卒中剤等として使用できる。

[0104] 本発明の中和剤、本発明の阻害剤および本発明の医薬品は、本発明のHMGB1結合核酸分子を含んでいればよく、その他の構成は、何ら制限されない。本発明の中和剤、本発明の阻害剤および本発明の医薬品は、それぞれ、本発明のHMGB1結合核酸分子の他に、例えば、キャリアー等を含んでもよく、例えば、以下に示す組成物と同様の構成があげられ、同様にして使用できる。

[0105] <組成物>

本発明の組成物は、前述のように、前記本発明のHMGB1結合核酸分子を含むことを特徴とする。本発明の組成物は、前記本発明のHMGB1結合核酸分子を含んでいればよく、その他の構成は、何ら制限されない。

[0106] 本発明の組成物は、前述のように、HMGB1と結合可能であることから、例えば、HMGB1との結合によりHMGB1の機能を中和する中和剤として使用できる。

[0107] 本発明の組成物は、前述のように、HMGB1と結合可能であることから、例えば、HMGB1との結合によりHMGB1の機能を阻害する阻害剤として使用できる。

[0108] 本発明の組成物は、前述のように、HMGB1と結合可能であることから、HMGB1の発現が原因となる疾患を予防または治療するための医薬品として使用できる。前記本発明の医薬品は、例えば、抗癌剤、抗炎症剤、抗脳卒中剤等として使用できる。

[0109] 本発明の組成物の適用対象は、特に制限されず、その用途に応じて適宜決定できる。前記適用対象は、例えば、細胞、組織および生体等があげられる。前記細胞および組織の由来、ならびに生体の種類は、特に制限されない。前記生体は、例えば、HMGB1遺伝子および／またはHMGB1オーソログ遺伝子を有する生物があげられ、具体例としては、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類、鳥類、魚類等の動物があげられる。生体に投与する場合、投与方法は、特に制限されず、例えば、経口投与および非経口投与があげ

られる。前記非経口投与は、例えば、静脈投与、動脈投与、リンパ管への投与、筋肉投与、皮下投与、直腸投与、経皮投与、腹腔内投与、局所投与等があげられる。

[0110] 本発明の組成物は、前記本発明のHMGB1結合核酸分子の他に、例えば、各種添加剤を含んでもよい。前記添加剤は、特に制限されず、例えば、本発明の組成物の用途に応じて、適宜決定できる。

[0111] 本発明のHMGB1結合核酸分子を、例えば、細胞、組織または生体内等にデリバリーする場合、本発明の組成物は、さらに、前記添加剤として、キャリアーを含むことが好ましい。前記キャリアーは、特に制限されないが、例えば、ナノ粒子、リポソーム、ミセル、逆ミセル、ポリカチオン、細胞膜透過性ペプチド、磁気粒子、リン酸カルシウム等があげられる。前記ナノ粒子は、特に制限されないが、例えば、カーボンナノホーンおよびカーボンナノチューブ等のナノカーボンがあげられる。これらのキャリアーは、いずれか一種類を使用してもよいし、二種類以上を併用してもよい。また、前記添加剤は、例えば、緩衝剤、金属塩、界面活性剤等があげられる。

[0112] <検出試薬>

本発明の検出試薬は、前記本発明のHMGB1結合核酸分子を含むことを特徴とする、前記HMGB1を検出するためのHMGB1検出試薬である。本発明は、前記本発明のHMGB1結合核酸分子を含んでいればよく、その他の構成は何ら制限されない。

[0113] 本発明のHMGB1結合核酸分子は、前述のように、HMGB1に結合可能である。このため、例えば、本発明の検出試薬を用いて、本発明のHMGB1結合核酸分子とHMGB1との結合の有無を確認することにより、試料中におけるHMGB1を定性または定量可能となる。前記HMGB1結合核酸分子とHMGB1との結合の有無の確認方法は、特に制限されず、核酸とタンパク質との結合を検出する公知の方法を利用できる。このように本発明の検出試薬を用いれば、HMGB1を容易に検出できることから、例えば、生化学や臨床の分野に有用である。

[0114] <治療方法>

本発明の治療方法は、前記HMGB1が関与する疾患の対象に、本発明のHMGB1結合核酸分子を投与する工程を含むことを特徴とする。前記HMGB1が関与する疾患は、特に制限されないが、例えば、癌、炎症および脳卒中からなる群から選択された少なくとも一つの疾患があげられる。前記癌は、例えば、乳癌、大腸癌、メラノーマ、前立腺癌、膵臓癌および肺癌等があげられる。本発明の治療方法によれば、例えば、前記疾患の予防、前記疾患の進行の抑制または前記疾患の治療等が可能である。本発明の治療方法は、予防方法の意味も含み、前記疾患の危険性がある対象に、本発明のHMGB1結合核酸分子を投与する工程を含んでもよい。本発明のHMGB1結合核酸分子の投与方法、投与条件等は、特に制限されず、前述の通りである。また、前記投与対象（例えば、患者）も、特に制限されない。前記生体は、例えば、HMGB1遺伝子および／またはHMGB1オソログ遺伝子を有する生物があげられ、具体例としては、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類、鳥類、魚類等の動物があげられる。前記投与工程において、例えば、本発明の組成物を投与してもよい。

[0115] 本発明は、前記HMGB1が関与する疾患の治療に使用するための核酸分子であることを特徴とする。前記核酸分子は、前記本発明のHMGB1結合核酸分子である。前記本発明のHMGB1結合核酸分子は、前述の通りである。また、本発明は、前記HMGB1が関与する疾患の治療に使用するための組成物であることを特徴とする。前記組成物は、前記本発明のHMGB1結合核酸分子を含む前記本発明の組成物である。前記本発明の組成物は、前述の通りである。

実施例

[0116] つぎに、本発明の実施例について説明する。ただし、本発明は、下記実施例により制限されない。市販の試薬は、特に示さない限り、それらのプロトコールに基づいて使用した。

[0117] [実施例1]

ションし、シグナル強度が約1000RUになるまで結合させた。続いて、675nmol/Lの前記His-tag付加HMGB1を、前記ランニングバッファーを用いて、流速20 μ L/minで30秒間インジェクションし、引き続き、同じ条件で前記ランニングバッファーを流して洗浄を行った。前記His-tag付加HMGB1のインジェクションおよび前記ランニングバッファーによる洗浄に並行して、シグナル強度の測定を行った。前記ランニングバッファーの組成は、20mmol/L HEPES、500mmol/L NaCl、0.1mmol/L MgCl₂、0.1% Triton X-100（登録商標）とし、そのpHは、7.2とした。また、非特異結合を抑えるためのブロッキング剤として、tRNAを1mg/mL濃度で使用した。比較例は、前記実施例のRNAアプタマーに代えて、前記比較例のRNAを使用した以外は、同様にして、シグナル強度の測定を行った。これらの結果を図1に示す。

[0121] 図1は、前記His-tag付加HMGB1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。図1のグラフにおいて、縦軸は、前記BIACORE（登録商標）Xで測定したシグナル強度（RU）を示し、横軸は、解析時間（秒）を示す。横軸において、-10秒~0秒が、前記ランニングバッファーによるプレ洗浄の時間であり、0秒が、前記His-tag付加HMGB1のインジェクション開始時点であり、0秒~30秒が、前記His-tag付加HMGB1のインジェクション時間であり、30秒以降が、前記ランニングバッファーによる洗浄の時間である。

[0122] 図1に示すように、前記比較例のRNAを使用した場合、シグナル強度の増加が見られないことから、前記His-tag付加HMGB1と結合していないことがわかった。これに対して、実施例の各RNAアプタマーによれば、シグナル強度の増加が見られたことから、前記His-tag付加HMGB1と結合していることがわかった。

[0123] そして、得られたシグナル強度から、各RNAアプタマーと前記His-tag付加HMGB1との解離定数を求めた。この結果を下記表2に示す。

レ洗浄の時間であり、0秒が、前記HMGB1のインジェクション開始時点であり、0秒～60秒が、前記HMGB1のインジェクション時間であり、60秒以降が、前記ランニングバッファーによる洗浄の時間である。

[0127] 図2に示すように、His-tagを付加していないHMGB1についても、実施例の各RNAアプタマーは高い結合能を示した。この結果から、実施例のRNAアプタマーが、His-tagではなく、HMGB1に結合するRNAアプタマーであることがわかった。

[0128] (4) His-tagに対する結合能

前記各RNAアプタマーについて、His-tagに対する結合能を確認した。前記結合能の解析は、前記His-tag付加HMGB1に代えて、300nmol/Lの前記His-tag付加MIFタンパク質を使用した以外は、前記(2)と同様にして、結合能の解析を行った。これらの結果を、図3に示す。

[0129] 図3は、前記His-tag付加MIFタンパク質に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。図3のグラフにおいて、縦軸は、前記BIACORE(登録商標)Xで測定したシグナル強度(RU)を示し、横軸は、解析時間(秒)を示す。横軸において、-10秒～0秒が、前記ランニングバッファーによるプレ洗浄の時間であり、0秒が、前記His-tag付加MIFタンパク質のインジェクション開始時点であり、0秒～30秒が、前記His-tag付加MIFタンパク質のインジェクション時間であり、30秒以降が、前記ランニングバッファーによる洗浄の時間である。

[0130] 図3に示すように、実施例の各RNAアプタマーは、His-tag付加MIFタンパク質のインジェクション中(0秒～30秒)に若干のシグナル強度の増加が見られたが、経時的に増加することはなく、30秒以降の洗浄により、シグナル強度の急速な減少が見られ、最終的にはシグナル強度が0となった。このことから、実施例の各RNAアプタマーは、His-tagに結合するものではないことが確認された。

[0131] (5) 生体の生理条件下におけるHMGB1に対する結合能

生理条件下でのHMGB 1に対する前記各RNAアプタマーの結合能を確認した。前記ランニングバッファーにおけるNaCl濃度500mmol/Lを、生体の生理条件である150mmol/Lに設定し、前記His-tag付加HMGB 1のインジェクション時間を45秒とした以外は、前記(2)と同様にして、結合能の解析を行った。これらの結果を、図4に示す。

[0132] 図4は、生理条件下における、前記HMGB 1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。図4のグラフにおいて、縦軸は、前記BIACORE (登録商標) Xで測定したシグナル強度(RU)を示し、横軸は、解析時間(秒)を示す。横軸において、-20秒~0秒が、前記ランニングバッファーによるプレ洗浄の時間であり、0秒が、前記HMGB 1のインジェクション開始時点であり、0秒~45秒が、前記HMGB 1のインジェクション時間であり、45秒以降が、前記ランニングバッファーによる洗浄の時間である。

[0133] 図4に示すように、実施例の各RNAアプタマーは、生理条件下においても、前記HMGB 1に対して高い結合能を示した。この結果から、実施例のRNAアプタマーが、生理条件下においても、HMGB 1に結合するアプタマーであることがわかった。このため、本発明のRNAアプタマーによれば、例えば、生体に投与しても、生体中のHMGB 1と優れた結合能で結合できるといえる。

[0134] [実施例2]

HMGB 1に結合可能なRNAアプタマーを作製し、各RNAアプタマーについて、HMGB 1に対する結合能を確認した。

[0135] (1) RNAアプタマー

R8c6__1 (配列番号74) およびR8c6__14 (配列番号75) の各RNAアプタマーを、公知の核酸合成方法により作製し、実施例のRNAアプタマーとして使用した。

[0136] (2) His-tag付加HMGB 1に対する結合能

前記(1)で調製したRNAアプタマーを使用し、前記His-tag付

加HMGB1の濃度を1 μmol/L、インジェクション時間を60秒とした以外は、前記実施例1の前記(2)と同様にして、His-tag付加HMGB1に対する結合能の解析を行った。これらの結果を、図5に示す。

[0137] 図5は、前記His-tag付加HMGB1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。図5のグラフにおいて、縦軸は、前記BIACORE(登録商標) Xで測定したシグナル強度(RU)を示し、横軸は、解析時間(秒)を示す。横軸において、-20秒~0秒が、前記ランニングバッファーによるプレ洗浄の時間であり、0秒が、前記His-tag付加HMGB1のインジェクション開始時点であり、0秒~60秒が、前記His-tag付加HMGB1のインジェクション時間であり、60秒以降が、前記ランニングバッファーによる洗浄の時間である。

[0138] 図5に示すように、実施例の各RNAアプタマーによれば、シグナル強度の増加が見られたことから、前記HMGB1と結合していることがわかった。また、R8c6__1およびR8c6__14のRNAアプタマーの解離定数は、それぞれ 7.52×10^{-14} および 1.06×10^{-13} と極めて低く、非常に優れた結合能を示した。

[0139] [実施例3]

R8c6__1(配列番号74)のRNAアプタマーを、さらに小型化し、HMGB1に対する結合能を確認した。

[0140] (1) RNAアプタマー

下記表3に示す各RNAアプタマーを、公知の核酸合成方法により作製し、実施例のRNAアプタマーとして使用した。前記RNAアプタマーは、それぞれ、R8c6__1の5'側の領域または3'側の領域を欠失した塩基配列とした。

[0141] [表3]

Aptamer	配列			SEQ No.
R8c6_1	GGGACGCUCACGUACGCUCA	GAGUACAGUAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	74
R8c6_1-1	GGGACGCUCACGUACGCUCA	GAGUACAGUAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAG	83
R8c6_1-3	GGGACGCUCACGUACGCUCA	GAGUACAGUAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGC	84
R8c6_1-4	GGGACGCUCACGUACGCUCA	GAGUACAGUAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUG	85
R8c6_1-15	GGG	CA GAGUACAGUAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	86
R8c6_1-18	GGG	AGUACAGUAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	87
R8c6_1-20	GGG	UACAGUAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	88
R8c6_1-21	GGG	ACAGUAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	89

[0142] (2) His-t ag 付加HMGB 1に対する結合能

前記RNAアプタマーを使用し、前記His-t ag 付加HMGB 1の濃度を635nmol/Lとし、前記His-t ag 付加HMGB 1のインジェクション時間を60秒とした以外は、前記実施例1の前記(2)と同様に、His-t ag 付加HMGB 1に対する結合能の解析を行った。また、比較例として、前記40Nについても、同様に解析を行った。これらの結果を、図6に示す。

[0143] 図6は、前記His-t ag 付加HMGB 1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。図6のグラフにおいて、縦軸は、前記B I A C O R E (登録商標) Xで測定したシグナル強度(RU)を示し、横軸は、解析時間(秒)を示す。横軸において、-20秒~0秒が、前記ランニングバッファーによるプレ洗浄の時間であり、0秒が、前記His-t ag 付加HMGB 1のインジェクション開始時点であり、0秒~60秒が、前記His-t ag 付加HMGB 1のインジェクション時間であり、60秒以降が、前記ランニングバッファーによる洗浄の時間である。

[0144] 図6に示すように、R8c6__1を小型化したRNAアプタマーは、それぞれ、シグナル強度の増加が見られたことから、前記HMGB 1と結合していることがわかった。中でも、R8c6__1の5'側を欠失させたR8c6__1-15、R8c6__1-18、R8c6__1-20およびR8c6__1-21は、R8c6__1よりも優れた結合能を示した。

[0145] [実施例4]

R8c6__1(配列番号74)の小型化RNAアプタマーをフルオロ化して、HMGB 1に対する結合能を確認した。

[0146] (1) RNAアプタマー

リボース残基の2'位がフルオロ化された2'-フルオロ-CTPおよび2'-フルオロ-UTP(以下、同様)を用いて、前記実施例3の前記表3に示す各RNAアプタマーを、公知の核酸合成方法により作製し、実施例のフルオロ化RNAアプタマーとして使用した。前記フルオロ化RNAアプタ

マーは、前記表 3 に示す塩基配列において、シトシンヌクレオチド残基およびウラシルヌクレオチド残基がフルオロ化されている。各フルオロ化 RNA アプタマーは、それぞれ、2' F-R8c6__1、2' F-R8c6__1-1、2' F-R8c6__1-4、2' F-R8c6__1-15、2' F-R8c6__1-18、2' F-R8c6__1-21 と表わす。また、前記 N40 について、シトシンヌクレオチド残基およびウラシルヌクレオチド残基がフルオロ化し、フルオロ化 N40 (2' F-N40) を作製し、比較例として使用した (以下、同様)。

[0147] (2) His-tag 付加 HMGB1 に対する結合能

前記フルオロ化 RNA アプタマーを使用し、His-tag 付加 HMGB1 の濃度を 200 nmol/L とし、前記 His-tag 付加 HMGB1 のインジェクション時間を 60 秒とした以外は、前記実施例 1 の前記 (2) と同様にして、HMGB1 に対する結合能の解析を行った。また、前記 2' F-N40、フルオロ化していない未修飾の R8c6__1 についても、同様に解析を行った。これらの結果を、図 7 に示す。

[0148] 図 7 は、前記 HMGB1 に対する各フルオロ化 RNA アプタマーの結合能を示すグラフである。図 7 のグラフにおいて、縦軸は、前記 BIACORE (登録商標) X で測定したシグナル強度 (RU) を示し、横軸は、解析時間 (秒) を示す。横軸において、-20 秒~0 秒が、前記ランニングバッファーによるプレ洗浄の時間であり、0 秒が、前記 HMGB1 のインジェクション開始時点であり、0 秒~60 秒が、前記 HMGB1 のインジェクション時間であり、60 秒以降が、前記ランニングバッファーによる洗浄の時間である。

[0149] 図 7 に示すように、R8c6__1 を小型化した前記フルオロ化 RNA アプタマーは、それぞれ、シグナル強度の増加が見られたことから、前記 HMGB1 と結合していることがわかった。中でも、2' F-R8c6__1-18 は、未修飾の R8c6__1 と同等の優れた結合能を示した。フルオロ化した RNA アプタマーは、通常、RNase 耐性を示すことが知られている。こ

のため、HMGB1に結合能を有する前記フルオロ化RNAアプタマーは、例えば、生体内に投与されても分解され難いため、例えば、医薬品等に有用であるといえる。

[0150] [実施例5]

R8c6__1（配列番号74）およびその小型化RNAアプタマーであるR8c6__1-18（配列番号87）を、それぞれフルオロ化して、HMGB1に対する結合能を確認した。

[0151] (1) RNAアプタマー

前記2'-フルオロ-CTPおよび前記2'-フルオロ-UTPを用いて、前記R8c6__1および前記R8c6__1-18の各RNAアプタマーを、公知の核酸合成方法により作製し、実施例のフルオロ化RNAアプタマーとして使用した。前記フルオロ化RNAアプタマーは、R8c6__1（配列番号74）およびR8c6__1-18（配列番号87）の塩基配列において、シトシンヌクレオチド残基およびウラシルヌクレオチド残基がフルオロ化されている。各フルオロ化RNAアプタマーは、それぞれ、2'-F-R8c6__1、2'-F-R8c6__1-18と表わす。

[0152] (2) His-tag付加HMGB1に対する結合能

前記フルオロ化RNAアプタマーを使用し、His-tag付加HMGB1の濃度を200nmol/Lとし、前記ランニングバッファーにおけるNaClの濃度を150mmol/Lとし、前記His-tag付加HMGB1のインジェクション時間を60秒とした以外は、前記実施例1の前記(2)と同様にして、His-tag付加HMGB1に対する結合能の解析を行った。また、前記2'-F-N40、フルオロ化していない未修飾のR8c6__1についても、同様に解析を行った。これらの結果を、図8に示す。

[0153] 図8は、前記His-tag付加HMGB1に対する各フルオロ化RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。図8のグラフにおいて、縦軸は、前記BIACORE（登録商標）Xで測定したシグナル強度（RU）を示し、横軸は、解析時間（秒）を示す。横軸において、-20秒~0秒が、前記

ランニングバッファーによるプレ洗浄の時間であり、0秒が、前記H i s - t a g付加HMGB1のインジェクション開始時点であり、0秒～60秒が、前記H i s - t a g付加HMGB1のインジェクション時間であり、60秒以降が、前記ランニングバッファーによる洗浄の時間である。

[0154] 図8に示すように、前記フルオロ化RNAアプタマーは、それぞれ、シグナル強度の増加が見られたことから、前記HMGB1と結合していることがわかった。中でも、2' F-R8c6__1-18は、未修飾のR8c6__1と同等の優れた結合能を示した。

[0155] [実施例6]

R8c6__1-18（配列番号87）による、HMGB1とレセプターTLR-2との結合阻害を確認した。

[0156] (1) プルダウンアッセイ

N末端にH i s - t a gが付加されたTLR-2（H i s - t a g付加TLR-2）を使用した。2 μ gのH i s - t a g付加TLR-2、2 μ gのHMGB1および所定量のR8c6__1-18を、50 μ Lのバインディングバッファーに添加し、この混合液を、4°Cで20分間インキュベートした。R8c6__1-18の添加量は、1 μ g、2 μ gおよび4 μ gとした。前記バインディングバッファーの組成は、前記ランニングバッファーと同じであり、1 mg/mL tRNA添加またはtRNA未添加とした。前記混合液に、Co²⁺が結合したアガロースビーズ1 μ L（製品名BD TALON（登録商標）Metal Affinity Resin: BD バイオサイエンス社製）を加えて、4°Cで20分間インキュベートした。インキュベート後、前記アガロースビーズを洗浄し、抗HMGB1抗体（製品名Rabbit polyclonal to HMGB1: abcam社製）を用いて、ウェスタンブロッティングを行った。また、比較例として前記40Nについても、同様に解析を行った。これらの結果を、図9に示す。

[0157] 図9は、HMGB1とTLR-2との結合を示すプルダウンアッセイの写真である。図9において、tRNA「-」は、tRNA未添加の前記バイン

ディングバッファの使用を示し、tRNA「+」は、tRNA添加の前記バイディングバッファの使用を示す。図9において、左から、レーン「M」は、分子量マーカー、レーン「-」は、tRNA未添加且つRNAアプタマー未添加の結果、レーン「+」は、tRNA添加且つRNAアプタマー未添加の結果、レーン「40N」は、それぞれ、添加量4 μ g、2 μ g、1 μ gの結果、レーン「R8c6__1-18」は、それぞれ、添加量4 μ g、2 μ g、1 μ gの結果を示す。また、各レーンの結果について、検出したHMGB1量をTLR-2量で補正し、レーン「+」の補正值を100とした相対値を、各レーンの下に示す。

[0158] 図9に示すように、比較例の40Nを添加した場合、添加量の増加によっても、HMGB1の量は変化しなかった。これに対して、R8c6__1-18を添加した場合、添加量の増加によって、HMGB1量が低下した。この結果から、R8c6__1-18によって、HMGB1とTLR-2との結合が阻害されていることがわかる。このため、本発明のHMGB1結合核酸分子は、例えば、HMGB1が関与する疾患の治療に有用であるといえる。

[0159] [実施例7]

RNAアプタマーをフルオロ化して、HMGB1に対する結合能を確認した。

[0160] (1) RNAアプタマー

前記2'-フルオロ-CTPおよび前記2'-フルオロ-UTPを用いて、下記表4に示す各RNAアプタマーを、公知の核酸合成方法により作製し、実施例のフルオロ化RNAアプタマーとして使用した。前記フルオロ化RNAアプタマーは、下記表4に示す塩基配列において、シトシンヌクレオチド残基および/またはウラシルヌクレオチド残基がフルオロ化されている。ウラシルヌクレオチド残基およびシトシンヌクレオチド残基がフルオロ化されたRNAアプタマーを、それぞれ、2'-F-CU-R8c6__1、2'-F-CU-#06、2'-F-CU-CU#80、2'-F-CU-R4__9068と表わす。シトシンヌクレオチド残基のみがフルオロ化されたRNAアプ

タマーを、それぞれ、2' F-C-R8c6__1、2' F-C-#06、2' F-C-#80、2' F-C-R4__9068と表わす。ウラシルヌクレオチド残基のみがフルオロ化されたRNAアプタマーを、それぞれ、2' F-U-R8c6__1、2' F-U-#06、2' F-U-#80、2' F-U-R4__9068と表わす。

[0161] [表4]

Aptamer	配列	SEQ No.
R8c6_1	GGGACGCUCACGUACGCUCA GAGUACAGUAAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	74
#06	GGGACGCUCACGUACGCUCA UACACUGCAGCUCUCCGCUUUGAACAUCAAUGGAGGCCUCG UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	56
#80	GGGACGCUCACGUACGCUCA CAUCUGAAUUUAAAGCCACGUAGAACCAGGCCUCCACGCG UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	67
HMGB1R4_9068	GGGACGCUCACGUACGCUCA UGAUAAUUUAAAUUUGGCCGCUUUAACAUCCCCUACGA UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	79
HMGB1R4_2478	GGGACGCUCACGUACGCUCA GAUUCGCUUGCCUUCGCUUGAACUGGCCAGGCUUUUUG UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	80

[0162] (2) His-tag付加HMGB1に対する結合能

前記フルオロ化RNAアプタマーを使用し、前記His-tag付加HMGB1 (Sigma社製) の濃度を200nmol/Lとし、前記ランニングバッファーにおけるNaClの濃度を150mmol/Lとし、前記His-tag付加HMGB1のインジェクション時間を60秒とした以外は、前記実施例1の前記(2)と同様にして、前記His-tag付加HMGB1に対する結合能の解析を行った。また、フルオロ化していない未修飾のR8c6__1についても、同様に解析を行った。また、比較例として、フルオロ化していない前記40Nについても、同様に解析を行った。これらの結果を、図10に示す。

[0163] 図10は、前記His-tag付加HMGB1に対する各フルオロ化RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。図10のグラフにおいて、縦軸は、His-tag付加HMGB1のインジェクション終了時における、前記BIACORE (登録商標) Xで測定したシグナル強度 (RU) を示す。前記グラフは、左から、40N、#06、#80、R8c6__1、HMGB1R4__9068の結果を示す。前記グラフにおいて、「2' F-CU-modified」は、シトシンヌクレオチド残基およびウラシルヌクレオチド残基の両方がフルオロ化されたRNAアプタマーの結果であり、「2' F-C-modified」は、シトシンヌクレオチド残基のみがフルオロ化

されたRNAアプタマーの結果であり、「2' F-U-modified」は、ウラシルヌクレオチド残基のみがフルオロ化されたRNAアプタマーの結果であり、「non-modified」は、未修飾のRNAアプタマー R8c6__1 および未修飾のN40の結果である。

[0164] 図10に示すように、各フルオロ化RNAアプタマーは、それぞれ、比較例の未修飾の40Nよりも高いシグナル強度の増加が見られたことから、前記HMGB1と結合していることがわかった。中でも、2' F-CU-R8c6__1、2' F-C-R8c6__1および2' F-U-R8c6__1は、優れた結合能を示し、特に、2' F-CU-R8c6__1は、未修飾のR8c6__1と同等の結合能を示した。

[0165] [実施例8]

R8c6__1 (配列番号74) およびR8c6__1-18 (配列番号87) の二次構造を推定した。これらの二次構造を、図11に示す。

[0166] [実施例9]

R8c6__1 (配列番号74) のRNAアプタマーを、さらに小型化し、HMGB1に対する結合能を確認した。

[0167] (1) RNAアプタマー

下記表5および下記表6に示す各RNAアプタマーを、公知の核酸合成方法により作製し、実施例のRNAアプタマーとして使用した。

[0168] [表5]

Aptamer	配列			SEQ No.
R8c6_1	GGGACGCUCACGUACGCUCA	GAGUACAGUAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	74
R8c6_1-25	GGG	UAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	90
R8c6_1-30	GGG	CACGUAGCACCAGUCUGACGUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	91
R8c6_1-34CC	GGG	UAGCACCAGUCUGACGUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGC	92
R8c6_1-18	GGG	AGUACAGUAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	87
R8c6_1-18-S2	GGG	AGUACAGUAAGACACGUAGCACCAGUC	G CGUUUGUCG C GUGCCUGGACGUGCAGU	93
R8c6_1-18-S4	GGG	AGUACAGUAAGACACGUAGCACCAGUC	GUUUGUCG UGCCUGGACGUGCAGU	94
R8c6_1-18-S6	GGG	AGUACAGUAAGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	95

[0169] 前記表5のRNAアプタマーは、R8c6__1を小型化したアプタマーである。図18に、R8c6__1、図19に、R8c6__1-18の推定二次構造の概略図を示す。前記表5において、R8c6__1-25およびR8c6__1-18は、それぞれ、R8c6__1から、その5'側の領域を欠失し

た塩基配列とした。R8c6__1-18-S2、R8c6__1-18-S4 およびR8c6__1-18-S6は、それぞれ、R8c6__1から、R8c6__1-18と同様に、その5'側の領域を欠失し、さらに、図18に示すS2、S4またはS6の領域を欠失した塩基配列とした。R8c6__1の推定二次構造において、S2およびS4は、それぞれ、ステム構造を形成する塩基対領域であり、S6は、ステムループ構造の領域である。

[0170] [表6]

Aptamer	配列	SEQ No.
R8c6_1-25	GGG UAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUGUCG UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	90
R8c6_1-25-S6	GGG UAAGACACGUAGCACCAGU GUGCCUGGACGUGCAGU	100
R8c6_1-25-S6A	GGG UAAG CACGUAGCACCAGU GUGCCUGGACGUGCAGU	103
R8c6_1-25-S6A2	GGG UAAGACACGUAGCACC GU GUGCC GGACGUGCAGU	104
R8c6_1-25-S6A3	GGG UAAGACACGUAGCACCAGU GUGCCUGGACGUGC GU	105
R8c6_1-25-S6C	GGG UAAGACACGUAG ACCAGU GUGCCUGGACGUGCAGU	106
R8c6_1-25-S6C2	GGG UAAGACACGUAGCACCAGU GUGCCUGGA GUGCAGU	107
R8c6_1-25-S8	GGG UAAGACACGUAGCACCAG UGCCUGGACGUGCAGU	112
R8c6_1-26-S6	GGG AAGACACGUAGCACCAGU GUGCCUGGACGUGCAGU	101
R8c6_1-27-S6	GGG AGACACGUAGCACCAGU GUGCCUGGACGUGCAGU	102

[0171] 前記表6のRNAアプタマーは、前記表5のR8c6__1-25-S6をさらに小型化したアプタマーである。図20に、R8c6__1-25-S6の推定二次構造の概略図を示す。R8c6__1-25-S6A2、R8c6__1-25-S6C、R8c6__1-25-S8は、それぞれ、図20に示すA2、CおよびS8の領域を欠失した塩基配列とした。また、R8c6__1-26-S6は、それぞれ、R8c6__1-25-S6の5'側の1塩基を欠失した塩基配列とした。

[0172] (2) His-tag付加HMGB1に対する結合能

前記RNAアプタマーを使用し、前記His-tag付加HMGB1の濃度を160nmol/Lとした以外は、前記実施例1の前記(2)と同様にして、His-tag付加HMGB1に対する結合能の解析を行った。また、比較例として、前記40Nについても、同様に解析を行った。これらの結果を、図12および図13に示す。

[0173] 図12および図13は、それぞれ、前記His-tag付加HMGB1に対する各RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。図12および図13のグラフにおいて、縦軸は、前記BIACORE（登録商標）Xで測定したシグナル強度（RU）を示し、横軸は、解析時間（秒）を示す。横軸にお

いて、-10秒~0秒が、前記ランニングバッファーによるプレ洗浄の時間であり、0秒が、前記His-tag付加HMGB1のインジェクション開始時点であり、0秒~30秒が、前記His-tag付加HMGB1のインジェクション時間であり、30秒以降が、前記ランニングバッファーによる洗浄の時間である。

[0174] 図12に示すように、R8c6__1を小型化したRNAアプタマーは、それぞれ、シグナル強度の増加が見られたことから、前記HMGB1と結合していることがわかった。中でも、R8c6__1-18-S2、R8c6__1-25は、R8c6__1よりも優れた結合能を示した。

[0175] また、図13に示すように、R8c6__1の小型化したRNAアプタマーであるR8c6__1-25を、さらに小型化した各RNAアプタマーは、それぞれ、シグナル強度の増加が見られたことから、前記HMGB1と結合していることがわかった。

[0176] [実施例10]

RNAアプタマーをフルオロ化して、HMGB1に対する結合能を確認した。

[0177] (1) RNAアプタマー

前記2'-フルオロ-CTPおよび前記2'-フルオロ-UTPを用いて、下記表7に示す各RNAアプタマーを、公知の核酸合成方法により作製し、実施例のフルオロ化RNAアプタマーとして使用した。前記フルオロ化RNAアプタマーは、前記表7に示す塩基配列において、シトシンヌクレオチド残基およびウラシルヌクレオチド残基がフルオロ化されている。ウラシルヌクレオチド残基およびシトシンヌクレオチド残基がフルオロ化されたRNAアプタマーを、それぞれ、2' F-R8c6__1-18-S6、2' F-R8c6__1-25、2' F-R8c6__1-25-S6、2' F-R8c6__1-25-S6A、2' F-R8c6__1-25-S6A2、2' F-R8c6__1-25-S6A3、2' F-R8c6__1-25-S6C、2' F-R8c6__1-25-S6C2、2' F-R8c6__1-25-S8

と表わす。また、前記N40についても、同様に、前記2'-フルオロ-C
TPおよび前記2'-フルオロ-UTPを用いてフルオロ化を行った。

[0178] [表7]

Aptamer	配列		SEQ No.	
R8c6_1-18-S6	GGG	AGUACAGUAAGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	95
R8c6_1-25	GGG	UAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUCG	UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	90
R8c6_1-26-S6	GGG	AAGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	101
R8c6_1-25-S6A	GGG	UAAG CACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	103
R8c6_1-25-S6A2	GGG	UAAGACACGUAGCACC GU	GUGCC GGACGUGCAGU	104
R8c6_1-25-S6A3	GGG	UAAGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGACGUGC GU	105
R8c6_1-25-S6C	GGG	UAAGACACGUAG ACCAGU	GUGCCUGGACGUGCAGU	106
R8c6_1-25-S6C2	GGG	UAAGACACGUAGCACCAGU	GUGCCUGGA GUGCAGU	107
R8c6_1-25-S8	GGG	UAAGACACGUAGCACCAG	UGCCUGGACGUGCAGU	112

[0179] (2) His-t ag 付加HMGB1に対する結合能

前記RNAアプタマーを使用し、前記His-t ag 付加HMGB1の濃度を150500nmol/Lとした以外は、前記実施例1の前記(2)と同様にして、His-t ag 付加HMGB1に対する結合能の解析を行った。これらの結果を、図14に示す。

[0180] 図14は、前記His-t ag 付加HMGB1に対する各フルオロ化RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。図14のグラフにおいて、縦軸は、前記BIACORE(登録商標)Xで測定したシグナル強度(RU)を示し、横軸は、解析時間(秒)を示す。横軸において、-10秒~0秒が、前記ランニングバッファーによるプレ洗浄の時間であり、0秒が、前記His-t ag 付加HMGB1のインジェクション開始時点であり、0秒~30秒が、前記His-t ag 付加HMGB1のインジェクション時間であり、30秒以降が、前記ランニングバッファーによる洗浄の時間である。

[0181] 図14に示すように、小型化した前記フルオロ化RNAアプタマーは、それぞれ、シグナル強度の増加が見られたことから、前記HMGB1と結合していることがわかった。中でも、2'-F-R8c6__1-18-S6および2'-R8c6__1-25は、優れた結合能を示した。

[0182] [実施例11]

R8c6__1(配列番号74)のRNAアプタマーを、さらに小型化し、HMGB1に対する結合能を確認した。

[0183] (1) RNAアプタマー

下記表 8 に示す各 RNA アプタマーを、公知の核酸合成方法により作製し、実施例の RNA アプタマーとして使用した。

[0184] [表8]

Aptamer	配列	SEQ No.
R8c6_1-18	GGG AGUACAGUAAGACACGUAGCACCAGUCUGACGUUUUGUG UCAGUGCCUGGACGUGCAGU	87
R8c6_1-18-S6	GGG AGUACAGUAAGACACGUAGCACCAGU	95
R8c6_1-21-S6	GGG ACAGUAAGACACGUAGCACCAGU	96
R8c6_1-22-S6	GGG CAGUAAGACACGUAGCACCAGU	97
R8c6_1-23-S6	GGG AGUAAGACACGUAGCACCAGU	98
R8c6_1-24-S6	GGG GUAAGACACGUAGCACCAGU	99
R8c6_1-21-S8	GGG ACAGUAAGACACGUAGCACCAG	108
R8c6_1-22-S8	GGG CAGUAAGACACGUAGCACCAG	109
R8c6_1-23-S8	GGG AGUAAGACACGUAGCACCAG	110
R8c6_1-24-S8	GGG GUAAGACACGUAGCACCAG	111
R8c6_1-25-S8CA	GGG UAAGACACGUAGCACCAG	113

[0185] 前記表 8 の RNA アプタマーは、R 8 c 6 _ 1 を小型化したアプタマーである。R 8 c 6 _ 1 - 2 1 - S 6、R 8 c 6 _ 1 - 2 2 - S 6、R 8 c 6 _ 1 - 2 3 - S 6、R 8 c 6 _ 1 - 2 4 - S 6 は、それぞれ、前記 R 8 c 6 _ 1 - 1 8 - S 6 から、その 5' 側の領域を欠失した塩基配列とした。また、R 8 c 6 _ 1 - 2 1 - S 8、R 8 c 6 _ 1 - 2 2 - S 8、R 8 c 6 _ 1 - 2 3 - S 8、R 8 c 6 _ 1 - 2 4 - S 8 は、それぞれ、5' 側の配列が、R 8 c 6 _ 1 - 2 1 - S 6、R 8 c 6 _ 1 - 2 2 - S 6、R 8 c 6 _ 1 - 2 3 - S 6、R 8 c 6 _ 1 - 2 4 - S 6 と同じであり、前記図 2 0 に示す前記 S 8 と同じ領域を欠失する塩基配列とした。

[0186] (2) H i s - t a g 付加 HMGB 1 に対する結合能

前記 RNA アプタマーを使用し、前記 H i s - t a g 付加 HMGB 1 の濃度を 1 5 0 n m o l / L とした以外は、前記実施例 1 の前記 (2) と同様にして、H i s - t a g 付加 HMGB 1 に対する結合能の解析を行った。また、比較例として、前記 4 0 N についても、同様に解析を行った。これらの結果を、図 1 5 に示す。

[0187] 図 1 5 は、前記 H i s - t a g 付加 HMGB 1 に対する各 RNA アプタマーの結合能を示すグラフである。図 1 5 のグラフにおいて、縦軸は、前記 B I A C O R E (登録商標) X で測定したシグナル強度 (R U) を示し、横軸は、解析時間 (秒) を示す。横軸において、- 1 0 秒 ~ 0 秒が、前記ランニングバッファーによるプレ洗浄の時間であり、0 秒が、前記 H i s - t a g

付加HMGB 1のインジェクション開始時点であり、0秒～30秒が、前記 His-tag付加HMGB 1のインジェクション時間であり、30秒以降が、前記ランニングバッファーによる洗浄の時間である。

[0188] 図15に示すように、R8c6__1を小型化したRNAアプタマーは、それぞれ、シグナル強度の増加が見られたことから、前記HMGB 1と結合していることがわかった。

[0189] [実施例12]

RNAアプタマーをフルオロ化して、HMGB 1に対する結合能を確認した。

[0190] (1) RNAアプタマー

前記2'-フルオロ-CTPおよび前記2'-フルオロ-UTPを用いて、下記表9および下記表10に示す各RNAアプタマーを、公知の核酸合成方法により作製し、実施例のフルオロ化RNAアプタマーとして使用した。前記フルオロ化RNAアプタマーは、前記表9および前記表10に示す塩基配列において、シトシンヌクレオチド残基およびウラシルヌクレオチド残基がフルオロ化されている。ウラシルヌクレオチド残基およびシトシンヌクレオチド残基がフルオロ化されたRNAアプタマーを、それぞれ、2' F-R8c6__1-21-S6、2' F-R8c6__1-22-S6、2' F-R8c6__1-23-S6、2' F-R8c6__1-24-S6、2' F-R8c6__1-25-S6、2' F-R8c6__1-26-S6、2' F-R8c6__1-27-S6、2' F-R8c6__1-21-S8、2' F-R8c6__1-22-S8、2' F-R8c6__1-23-S8、2' F-R8c6__1-24-S8、2' F-R8c6__1-25-S8、2' F-R8c6__1-25-S8CAと表わす。

[0191] [表9]

Aptamer	配列	SEQ No.
R8c6_1-21-S6	GGG ACAGUAAGACACGUAGCACCAGU GUGCCUGGACGUGCAGU	96
R8c6_1-22-S6	GGG CAGUAAGACACGUAGCACCAGU GUGCCUGGACGUGCAGU	97
R8c6_1-23-S6	GGG AGUAAGACACGUAGCACCAGU GUGCCUGGACGUGCAGU	98
R8c6_1-24-S6	GGG GUAAGACACGUAGCACCAGU GUGCCUGGACGUGCAGU	99
R8c6_1-25-S6	GGG UAAGACACGUAGCACCAGU GUGCCUGGACGUGCAGU	100
R8c6_1-26-S6	GGG AAGACACGUAGCACCAGU GUGCCUGGACGUGCAGU	101
R8c6_1-27-S6	GGG AGACACGUAGCACCAGU GUGCCUGGACGUGCAGU	102

[0192] [表10]

Aptamer	配列	SEQ No.
R8c6_1-21-S8	GGG ACAGUAAGACACGUAGCACCAG UGCCUGGACGUGCAGU	108
R8c6_1-22-S8	GGG CAGUAAGACACGUAGCACCAG UGCCUGGACGUGCAGU	109
R8c6_1-23-S8	GGG AGUAAGACACGUAGCACCAG UGCCUGGACGUGCAGU	110
R8c6_1-24-S8	GGG GUAAGACACGUAGCACCAG UGCCUGGACGUGCAGU	111
R8c6_1-25-S8	GGG UAAGACACGUAGCACCAG UGCCUGGACGUGCAGU	112
R8c6_1-25-S8CA	GGG UAAGACACGUAGAACCCAG UGCCUGGACGUGCAGU	113

[0193] (2) His-tag付加HMGB1に対する結合能

前記RNAアプタマーを使用し、前記His-tag付加HMGB1の濃度を150nmol/Lとした以外は、前記実施例1の前記(2)と同様に、His-tag付加HMGB1に対する結合能の解析を行った。また、比較例として、未修飾の前記40Nについても、同様に解析を行った。これらの結果を、図16および図17に示す。図16および図17において、各RNAアプタマーの名称は、R8c6__1を省略して表わした。

[0194] 図16および図17は、前記His-tag付加HMGB1に対する各フルオロ化RNAアプタマーの結合能を示すグラフである。図16および図17のグラフにおいて、縦軸は、前記BIACORE（登録商標）Xで測定したシグナル強度（RU）を示し、横軸は、解析時間（秒）を示す。横軸において、-10秒～0秒が、前記ランニングバッファーによるプレ洗浄の時間であり、0秒が、前記His-tag付加HMGB1のインジェクション開始時点であり、0秒～30秒が、前記His-tag付加HMGB1のインジェクション時間であり、30秒以降が、前記ランニングバッファーによる洗浄の時間である。

[0195] 図16および図17に示すように、小型化した前記フルオロ化RNAアプタマーは、それぞれ、シグナル強度の増加が見られたことから、前記HMGB1と結合していることがわかった。中でも、2' F-R8c6__1-21-S6および2' F-R8c6__1-21-S8は、優れた結合能を示した。

[0196] [実施例13]

ELISA法により、RNAアプタマーR8c6__1-18-S6（配列番号95）とHMGB1との相互作用を確認した。

- [0197] 炭酸バッファー（pH9.0）を用いて、Anti-his antibody（製品名Penta-His Antibody：QIAGEN社）を、 $4\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように希釈した。この希釈抗体液を、96ウェルプレート（製品名96ウェルエライサプレート：旭テクノグラス社）の各ウェルに、 $50\mu\text{L}$ ずつ分注し、室温で2時間静置した。さらに、前記プレートの各ウェルに、1%BSA/TBSを $50\mu\text{L}$ ずつ分注し、一晩静置した。前記TBSの組成は、 $20\text{mmol}/\text{L}$ Tris-HCl（pH7.6）、0.9%NaClとした。このようにして、前記プレートのブロッキング処理を行った。ブロッキング処理を行った前記プレートのウェルを、バッファー $200\mu\text{L}$ で3回洗浄した。前記バッファーの組成は、 $10\text{mmol}/\text{L}$ HEPES、 $500\text{mmol}/\text{L}$ NaCl、 $0.1\text{mmol}/\text{L}$ MgCl_2 、0.1% Triton X-100（登録商標）とし、そのpHは、7.2とした。
- [0198] HMGB1（製品名 HMG-1：Sigma社）を、tRNAを含む前記バッファーで、所定濃度（ $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ）となるように希釈し、前記HMGB1希釈液を調製した。
- [0199] 他方、前記RNAアプタマーを前記バッファーで希釈し、前記RNAアプタマー希釈液を 95°C で5分間加熱処理した後、室温に戻した。そして、前記RNAアプタマー希釈液に、RNase阻害剤（製品名 RNase Inhibitor：TOYOBO社）およびビオチン化デオキシチミジンを混合し、RNAアプタマー混合液を調製した。前記ビオチン化デオキシチミジンは、5'末端をビオチン化した20塩基長のデオキシチミジンを使用した。前記RNAアプタマー混合液において、前記RNAアプタマーの濃度は、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。また、前記RNAアプタマー混合液は、 $50\mu\text{L}$ あたり（すなわち、1ウェルあたり）、前記RNase阻害剤が $0.2\mu\text{L}$ 、前記ビオチン化デオキシチミジンが $0.2\mu\text{L}$ となるように設定した。
- [0200] そして、前記洗浄後の前記プレートの各ウェルに、前記HMGB1希釈液

を50 μ Lずつ分注し、4°Cで2時間静置した後、前記バッファー200 μ Lで3回洗浄した。つぎに、前記各ウェルに、さらに、前記RNAアプタマー混合液を50 μ Lずつ分注し、4°Cで2時間反応させた。前記各ウェルに添加した前記HMGB1希釈液(50 μ L)の濃度と前記RNAアプタマー混合液(50 μ L)の濃度との比率は、1:20、2:20、1:10、2:10とした。

[0201] 続いて、各ウェルに、アビジン付加したHRP(製品名Streptavidin-Biotinylated Horseradish Peroxidase Complex: GEヘルスケア社)を、前記バッファーで1000倍希釈し、各ウェルに50 μ Lずつ分注し、4°Cで1時間反応させた。前記プレートを、前記バッファー200 μ Lで3回洗浄し、常温のTMB(製品名1-Step(TM) Ultra TMB-ELISA: Thermo SCIENTIFIC社)を、各ウェルに、100 μ Lずつ分注した。前記プレートを遮光した状態で、室温で30分静置した。各ウェルに2 mol/L硫酸を100 μ Lずつ分注して、反応を停止させた。そして、前記各ウェルについて、450 nmの吸光度を測定した。また、対照例として、RNAアプタマーを添加しない以外は、同様にして処理を行い、吸光度の測定を行った。これらの結果を、図21に示す。

[0202] 図21は、HMGB1と前記RNAアプタマーとの相互作用を示すグラフであり、縦軸は、吸光度を示す。図21に示すように、HMGB1と前記RNAアプタマーとの結合を示す吸光度が増加したことから、HMGB1に前記RNAアプタマーが結合することが確認できた。また、前記RNAアプタマー濃度に対するHMGB1濃度を増加させることで、前記吸光度が増加した。このことから、本発明のHMGB1結合核酸分子によれば、HMGB1の定量が可能であるといえる。

[0203] 以上、実施形態および実施例を参照して本願発明を説明したが、本願発明は、上記実施形態および実施例に限定されるものではない。本願発明の構成や詳細には、本願発明の範囲内で当業者が理解しうる様々な変更をでき

る。

[0204] この出願は、2009年7月16日に提出された日本出願特願2009-167622を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

産業上の利用可能性

[0205] 本発明のアプタマーによれば、例えば、HMGB1と結合することより、HMGB1が原因となる前述のような疾患の予防および治療が可能となる。また、本発明のアプタマーによれば、例えば、HMGB1との結合の有無を確認することで、HMGB1を検出でき、また、HMGB1の機能解明にも使用できることから、新たな研究用ツールとしても有用である。

請求の範囲

- [請求項1] HMGB 1タンパク質との解離定数が 5×10^{-7} 以下の核酸分子である、HMGB 1タンパク質に結合可能なHMGB 1結合核酸分子。
- [請求項2] 下記（A 1）、（A 2）、（B 1）および（B 2）のいずれかの核酸分子である、請求項 1 記載のHMGB 1結合核酸分子。
- （A 1）配列番号 1～4 2のいずれかで表わされる塩基配列を含む核酸分子
- （A 2）配列番号 1～4 2のいずれかで表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列を含み、且つ、HMGB 1タンパク質に結合可能である核酸分子
- （B 1）配列番号 4 5～8 1のいずれかで表わされる塩基配列を含む核酸分子
- （B 2）配列番号 4 5～8 1のいずれかで表わされる塩基配列において、1または複数の塩基が、置換、欠失、付加または挿入された塩基配列を含み、且つ、HMGB 1タンパク質に結合可能である核酸分子
- [請求項3] 前記（B 2）の核酸分子が、配列番号 4 5～8 1のいずれかで表わされる塩基配列において、5'側の4塩基目から3'側の末端塩基までの塩基配列を含む核酸分子である、請求項 2 記載のHMGB 1結合核酸分子。
- [請求項4] 前記（B 1）の核酸分子が、下記（b 1）の核酸分子であり、前記（B 2）の核酸分子が、下記（b 2）の核酸分子である、請求項 2 または 3 記載のHMGB 1結合核酸分子。
- （b 1）配列番号 7 4で表わされる塩基配列を含む核酸分子
- （b 2）配列番号 7 4で表わされる塩基配列における連続する 1 1塩基以上の部分配列を含み、且つ、HMGB 1タンパク質に結合可能である核酸分子
- [請求項5] 前記（b 2）の核酸分子が、配列番号 8 3～1 1 3のいずれかで表わされる塩基配列を含む核酸分子である、請求項 4 記載のHMGB 1結

合核酸分子。

- [請求項6] 前記（b2）の核酸分子が、配列番号83～113のいずれかで表わされる塩基配列において、5'側の4塩基目から3'側の末端塩基までの塩基配列を含む核酸分子である、請求項4記載のHMGB1結合核酸分子。
- [請求項7] 前記核酸分子が、修飾化ヌクレオチド残基を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載のHMGB1結合核酸分子。
- [請求項8] 前記修飾化ヌクレオチド残基が、メチル化ヌクレオチド残基、フルオロ化ヌクレオチド残基、アミノ化ヌクレオチド残基およびチオ化ヌクレオチド残基からなる群から選択された少なくとも一つである、請求項7記載のHMGB1結合核酸分子。
- [請求項9] 前記修飾化ヌクレオチド残基が、シトシンを有するヌクレオチド残基およびウラシルを有するヌクレオチド残基の少なくとも一方である、請求項7または8記載のHMGB1結合核酸分子。
- [請求項10] 前記修飾化ヌクレオチド残基が、リボース残基が修飾されたヌクレオチド残基である、請求項7から9のいずれか一項に記載のHMGB1結合核酸分子。
- [請求項11] Y領域、X領域およびY'領域を含み、
5'末端から前記Y領域、前記X領域および前記Y'領域が連結し、前記X領域が、前記配列番号1～42のいずれかの配列番号で表わされる塩基配列を含み、
前記Y領域および前記Y'領域が、それぞれ任意の塩基配列からなる、請求項1～10のいずれか一項に記載のHMGB1結合核酸分子。
- [請求項12] 前記X領域の塩基数が、20～40塩基である、請求項11記載のHMGB1結合核酸分子。
- [請求項13] 前記Y領域の塩基数および前記Y'領域の塩基数が、それぞれ、20～30塩基である、請求項11または12記載のHMGB1結合核酸分子。

[請求項14] 前記Y領域の配列が、配列番号43および配列番号115のいずれかで表わされる塩基配列を含む、請求項11から13のいずれか一項に記載のHMGB1結合核酸分子。

gggacgcucacguacgcuca (配列番号43)

acgcucacguacgcuca (配列番号115)

[請求項15] 前記Y'の配列が、配列番号44で表わされる塩基配列を含む、請求項11から14のいずれか一項に記載のHMGB1結合核酸分子。

ucagugccuggacgugcagu (配列番号44)

[請求項16] 前記核酸分子の全塩基数が、40~100塩基である、請求項1から15のいずれか一項に記載のHMGB1結合核酸分子。

[請求項17] 前記核酸分子が、ステムループ構造を有する、請求項1から16のいずれか一項に記載のHMGB1結合核酸分子。

[請求項18] 前記Y領域および前記Y'領域の少なくとも一方において、一部が、前記X領域の一部と二本鎖を形成することにより、ステムループ構造を形成している、請求項10から17のいずれか一項に記載のHMGB1結合核酸分子。

[請求項19] 前記Y'領域および前記Y'領域の少なくとも一方において、内部で二本鎖を形成することにより、ステムループ構造を形成している、請求項10から18のいずれか一項に記載のHMGB1結合核酸分子。

[請求項20] 請求項1から19のいずれか一項に記載のHMGB1結合核酸分子を含み、HMGB1タンパク質と前記HMGB1結合核酸分子との結合により、HMGB1タンパク質の機能を中和することを特徴とする中和剤。

[請求項21] 請求項1から19のいずれか一項に記載のHMGB1結合核酸分子を含み、HMGB1タンパク質と前記HMGB1結合核酸分子との結合により、HMGB1タンパク質の機能を阻害することを特徴とする阻害剤。

[請求項22] 請求項1から19のいずれか一項に記載のHMGB1結合核酸分子を

含むことを特徴とする医薬品。

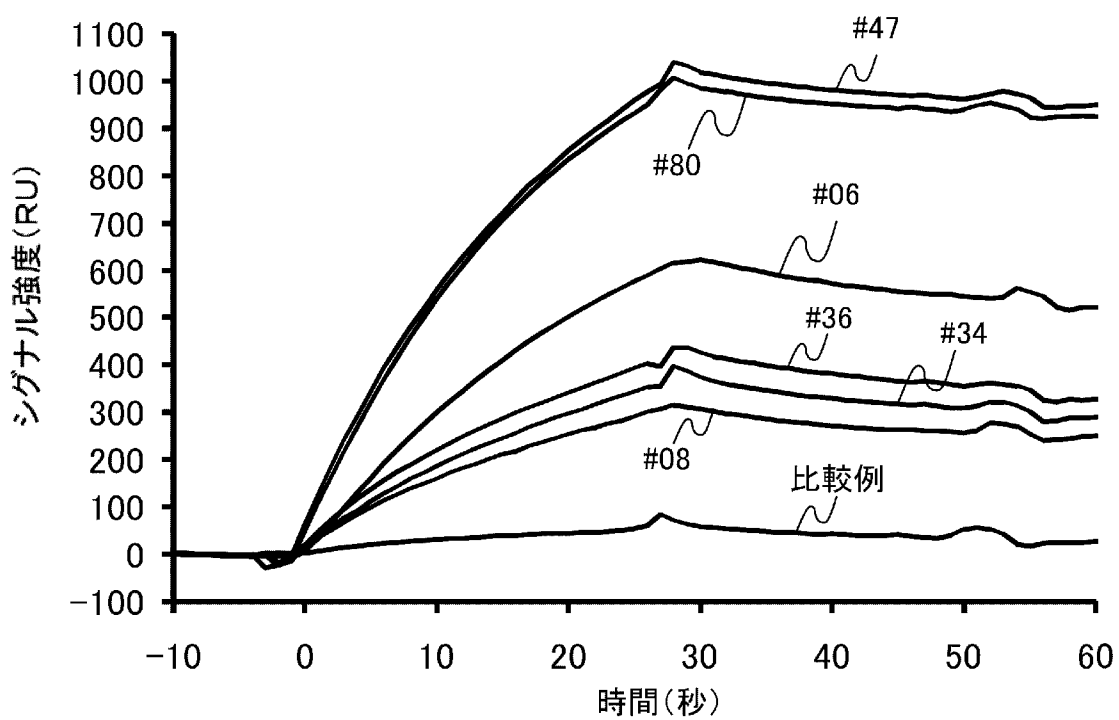
[請求項23] 前記医薬品が、抗癌剤、抗炎症剤、抗脳卒中剤からなる群から選択された少なくとも一つである、請求項22記載の医薬品。

[請求項24] 請求項1から19のいずれか一項に記載のHMGB1結合核酸分子を含む、組成物。

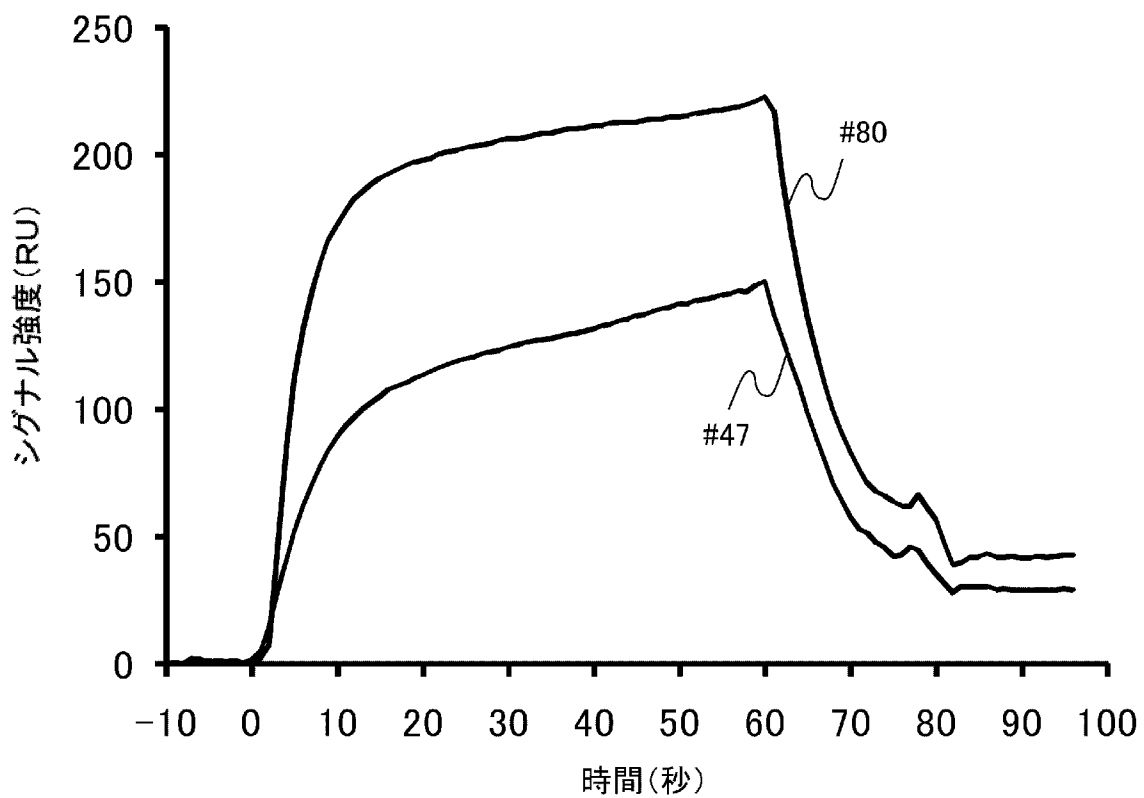
[請求項25] さらに、キャリアーを含む、請求項24記載の組成物。

[請求項26] 請求項1から19のいずれか一項に記載のHMGB1結合核酸分子を含む、HMGB1タンパク質を検出するためのHMGB1検出試薬。

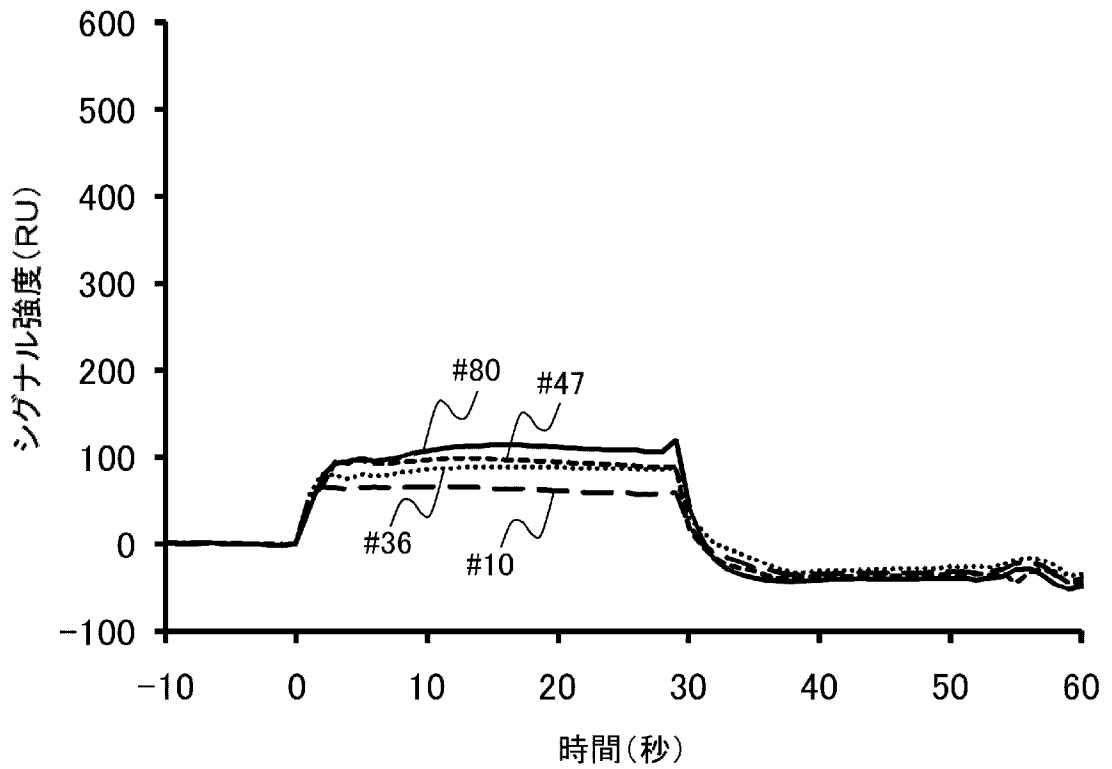
[図1]



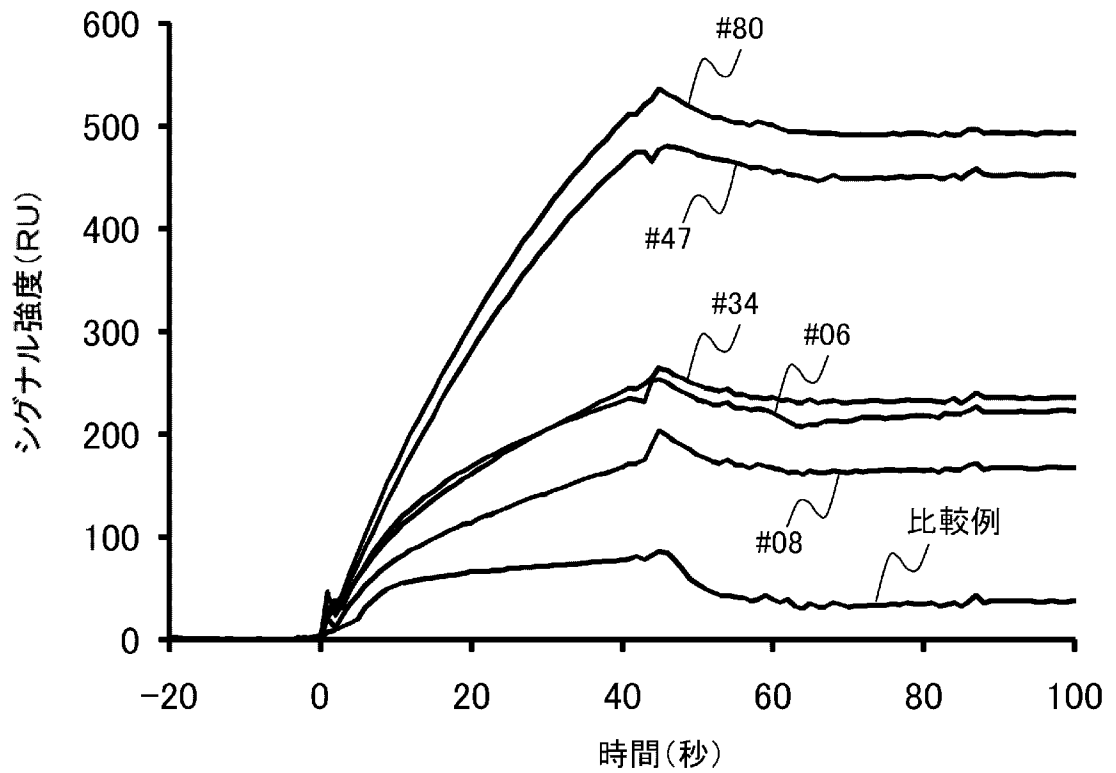
[図2]



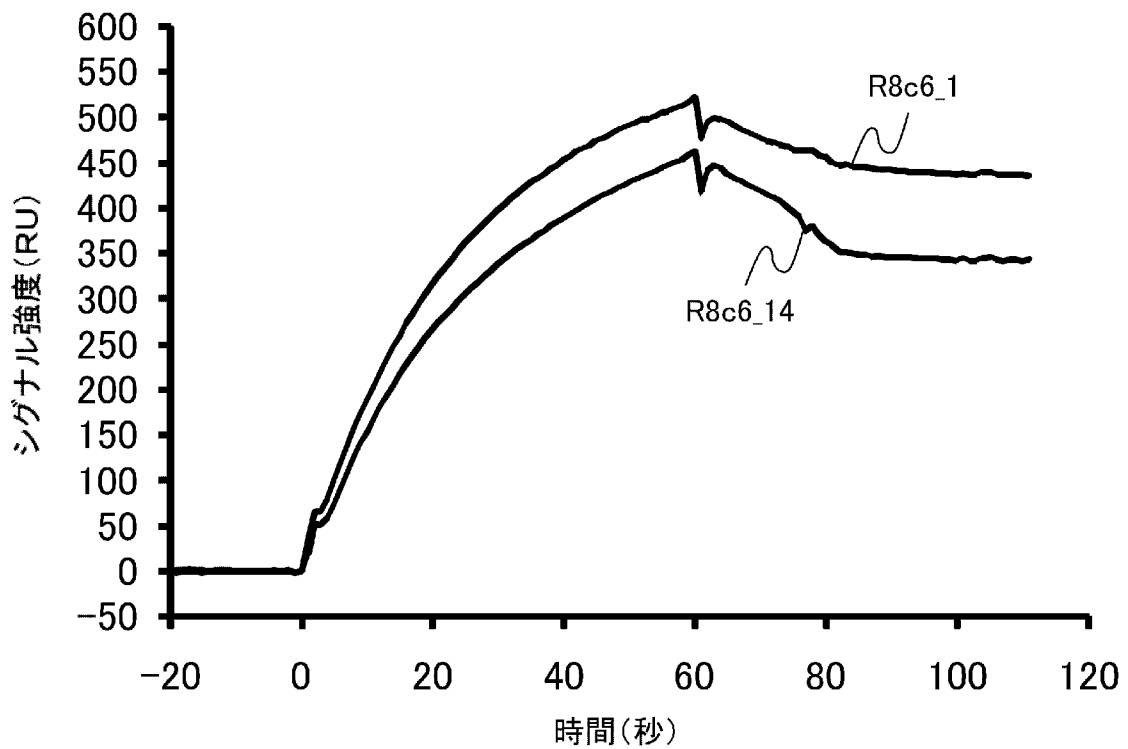
[図3]



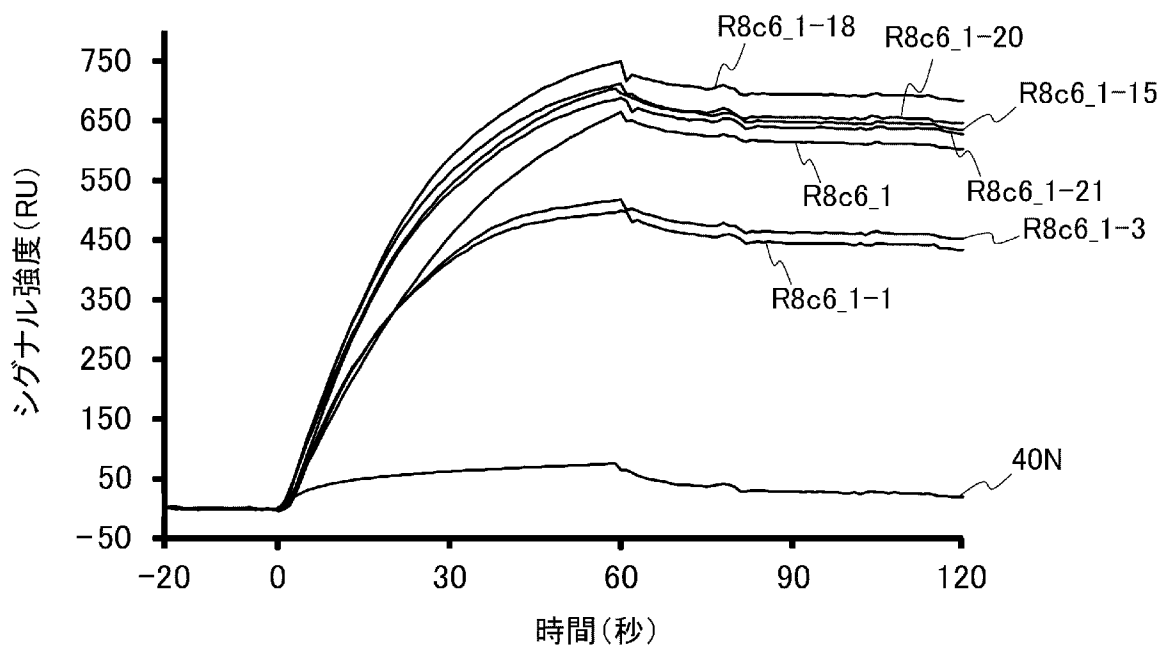
[図4]



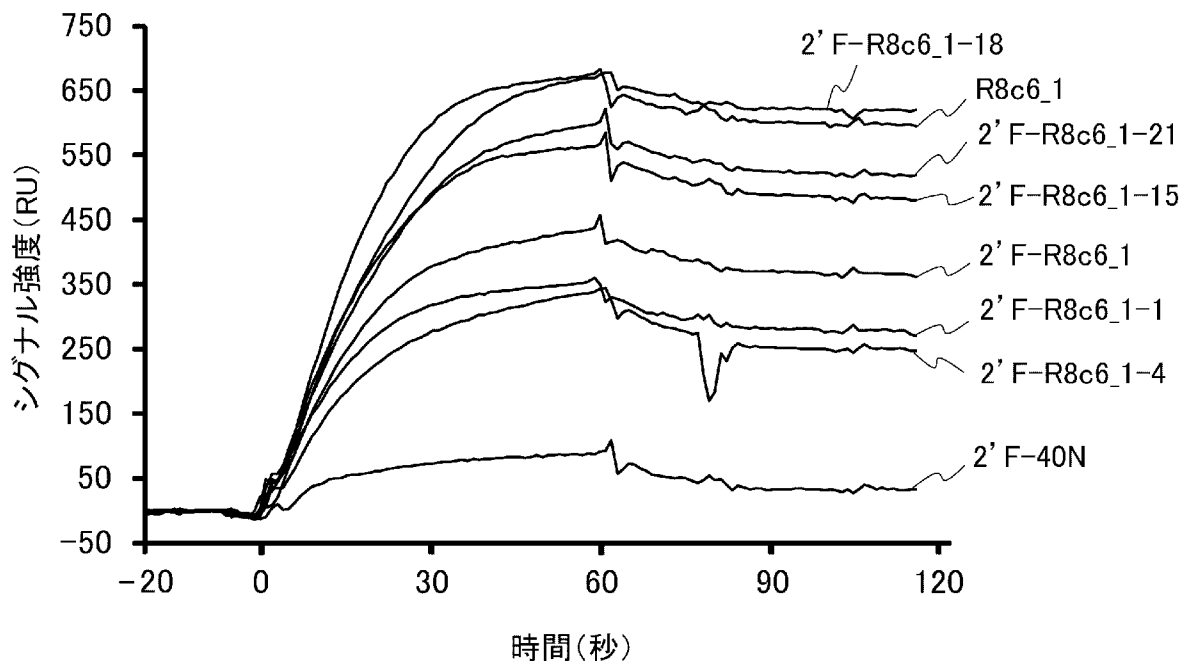
[図5]



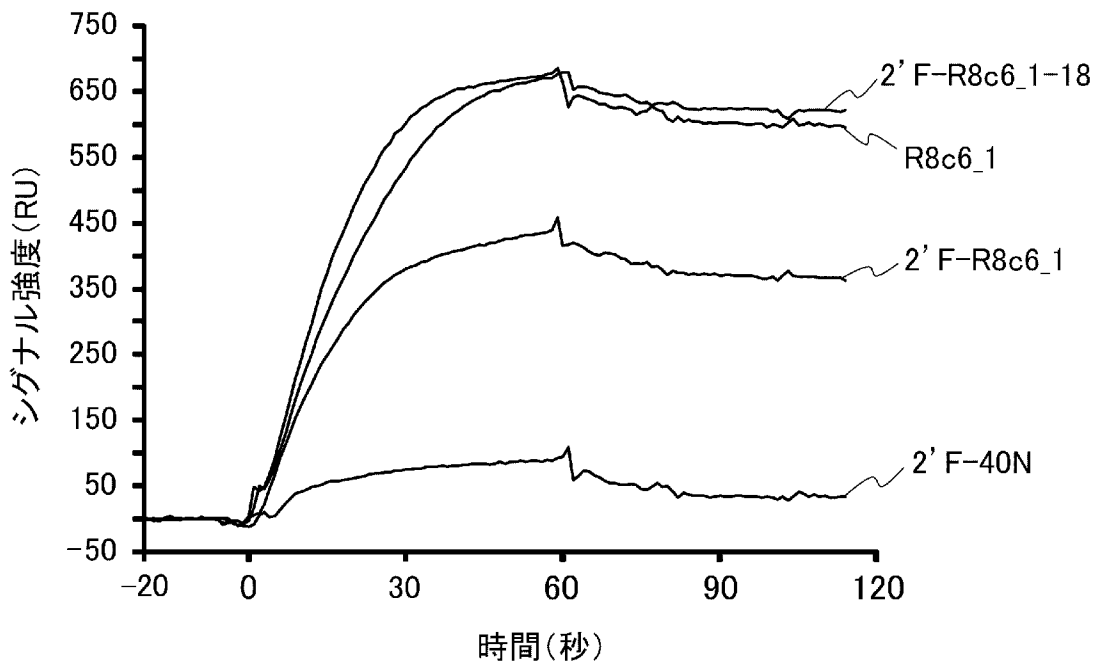
[図6]



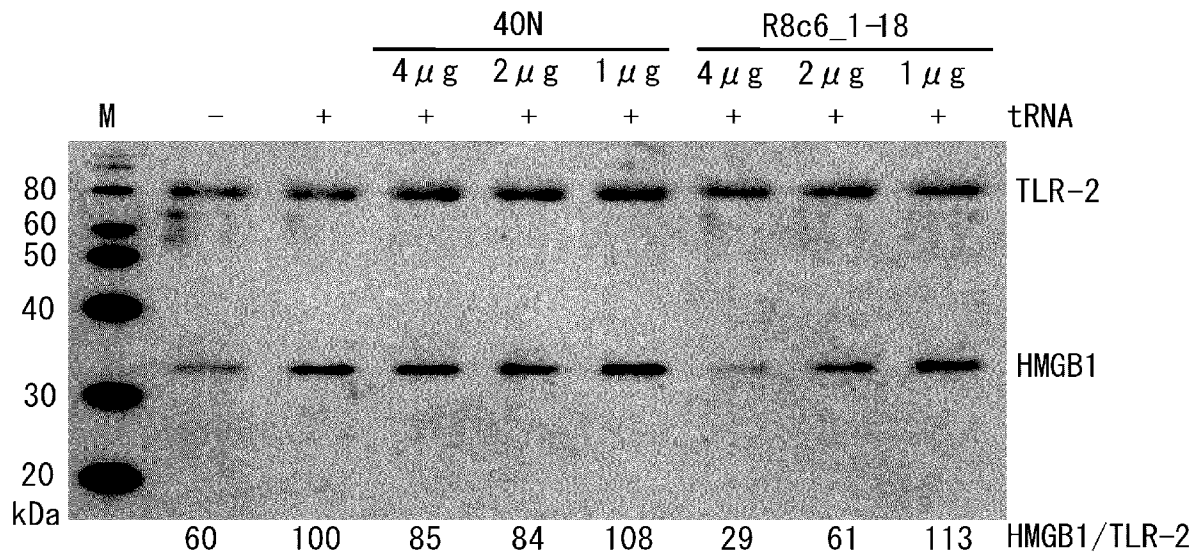
[図7]



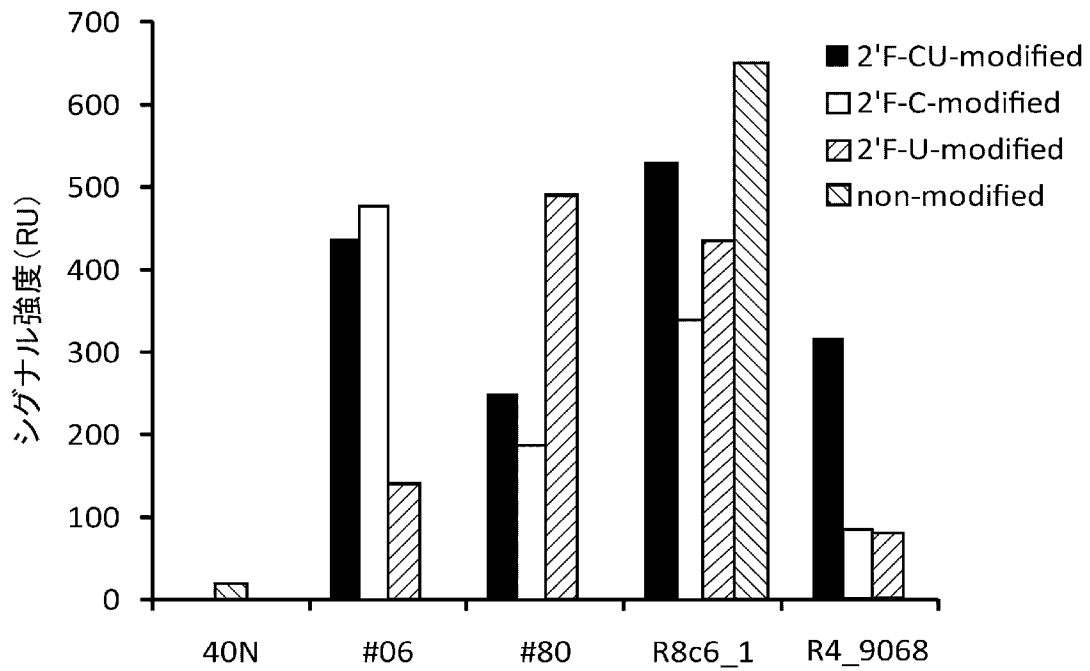
[図8]



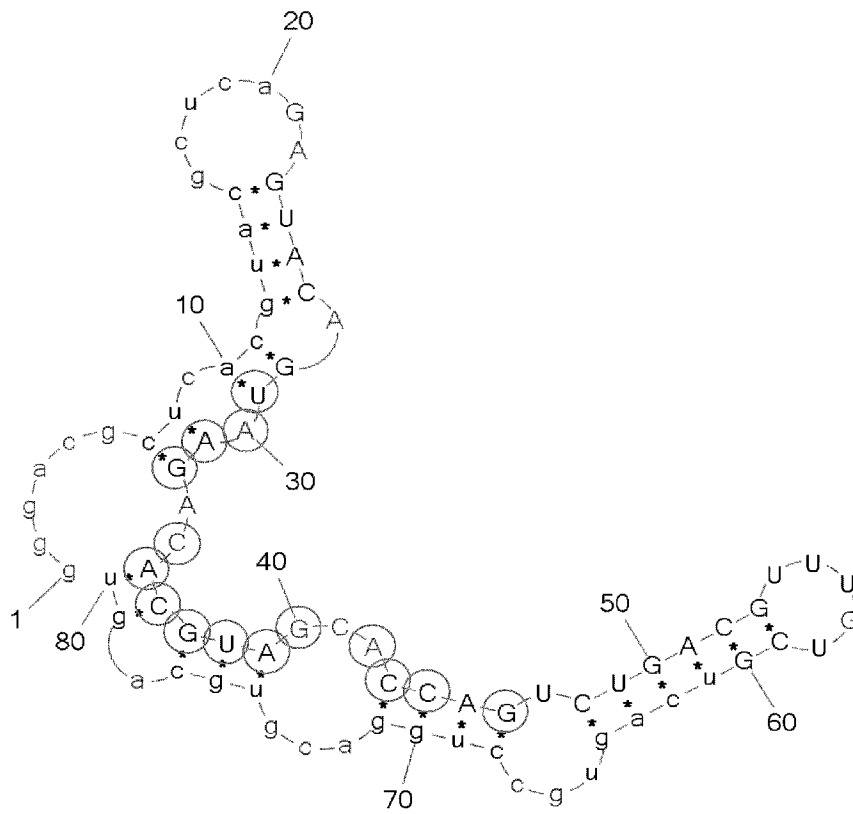
[図9]



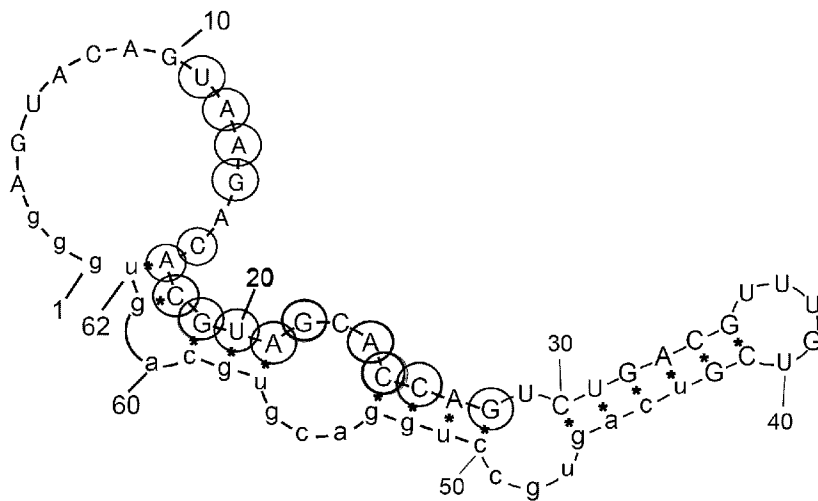
[図10]



[圖11]

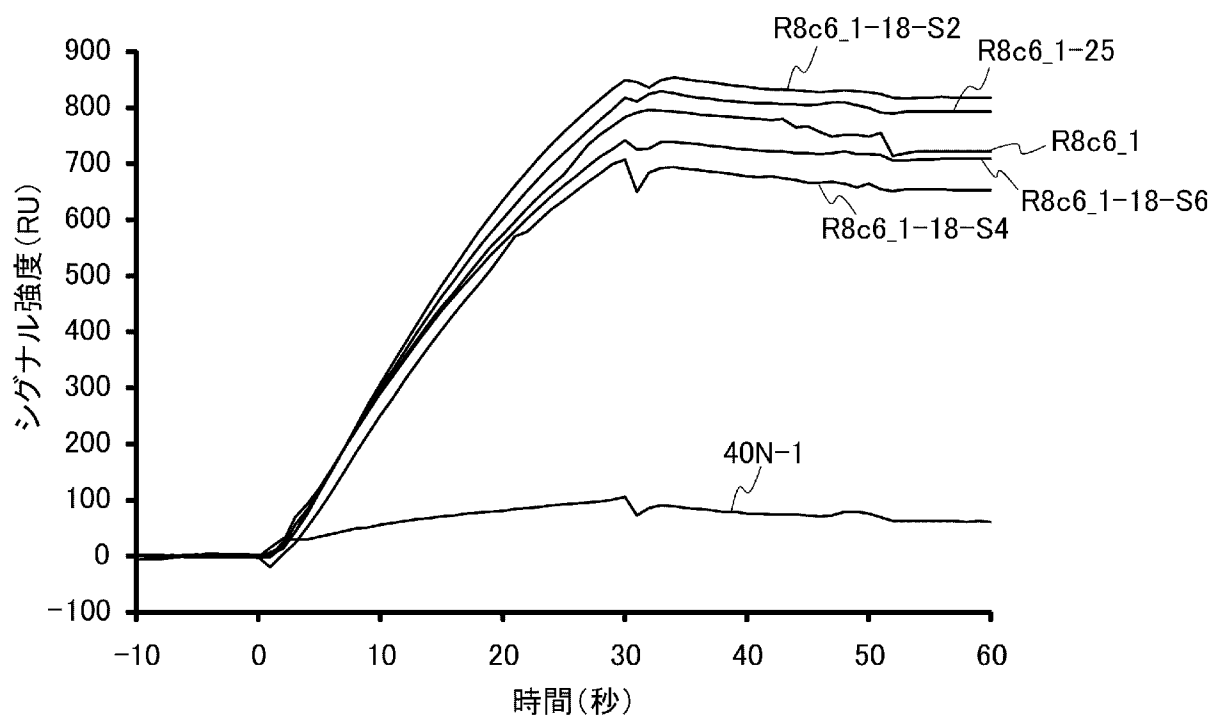


R8c6_1: (-18.5kcal/mol)

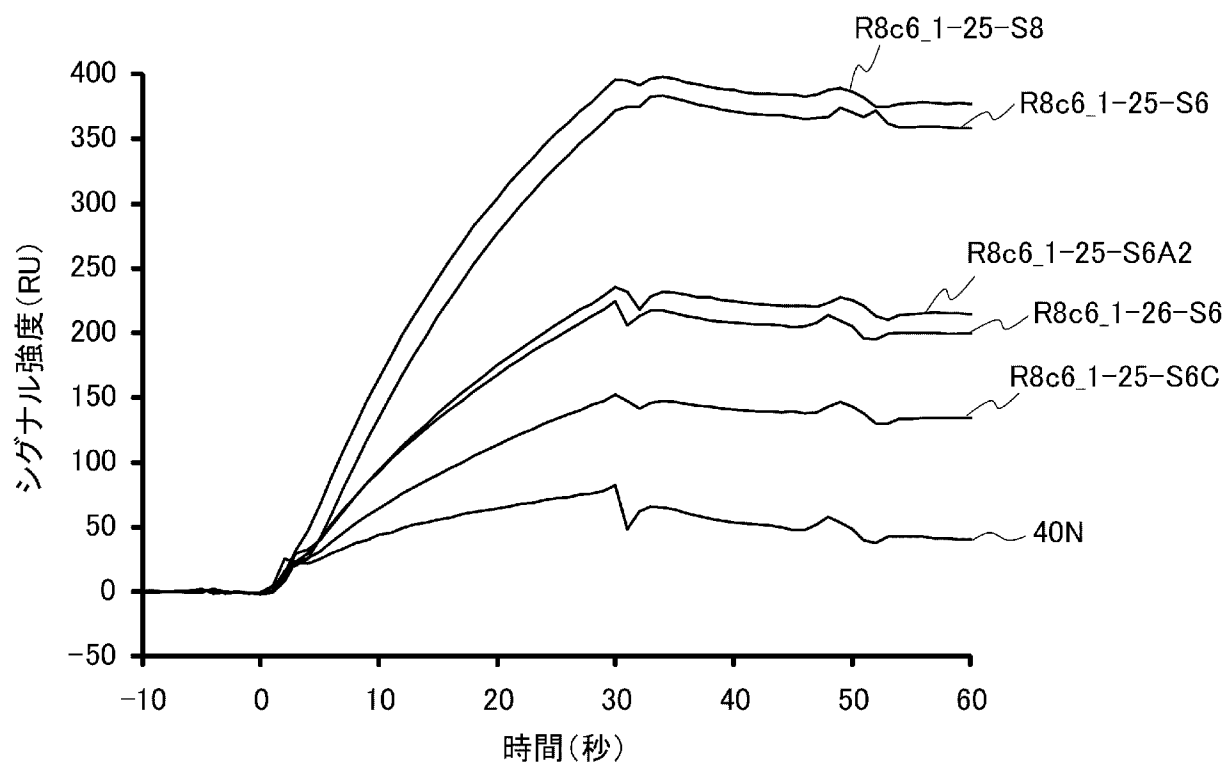


R8c6_1-18: (-14.0kcal/mol)

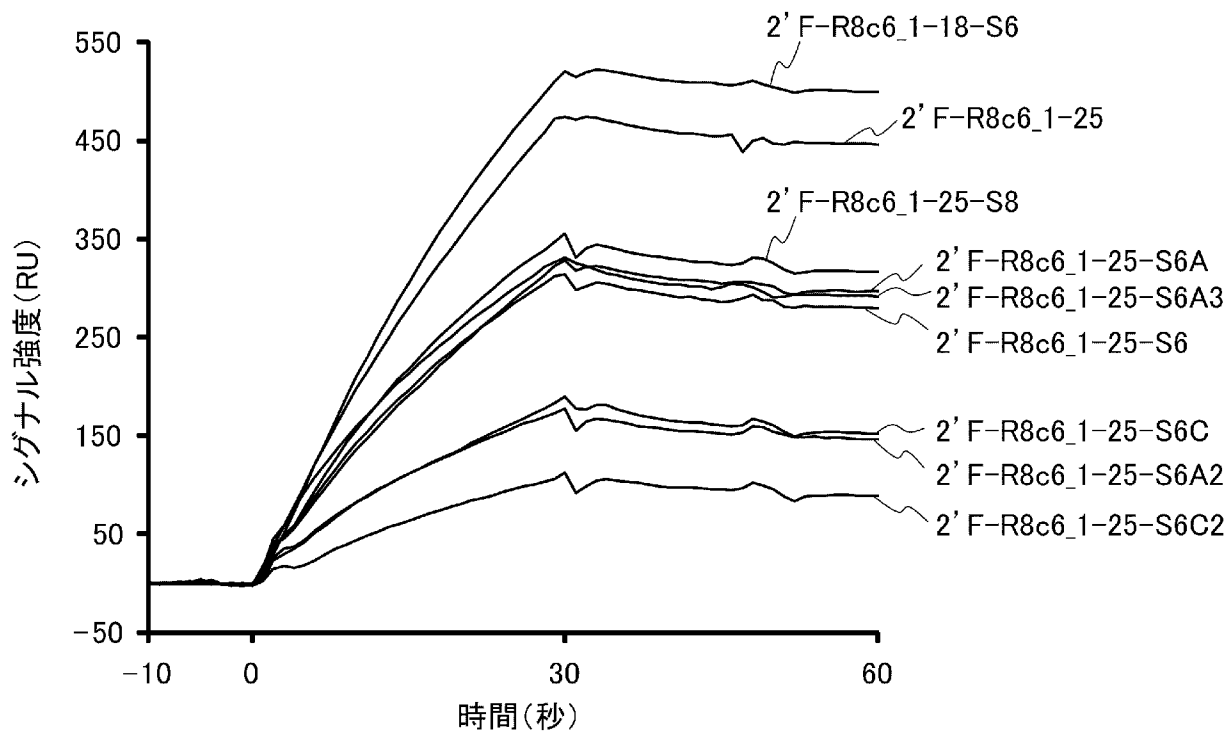
[図12]



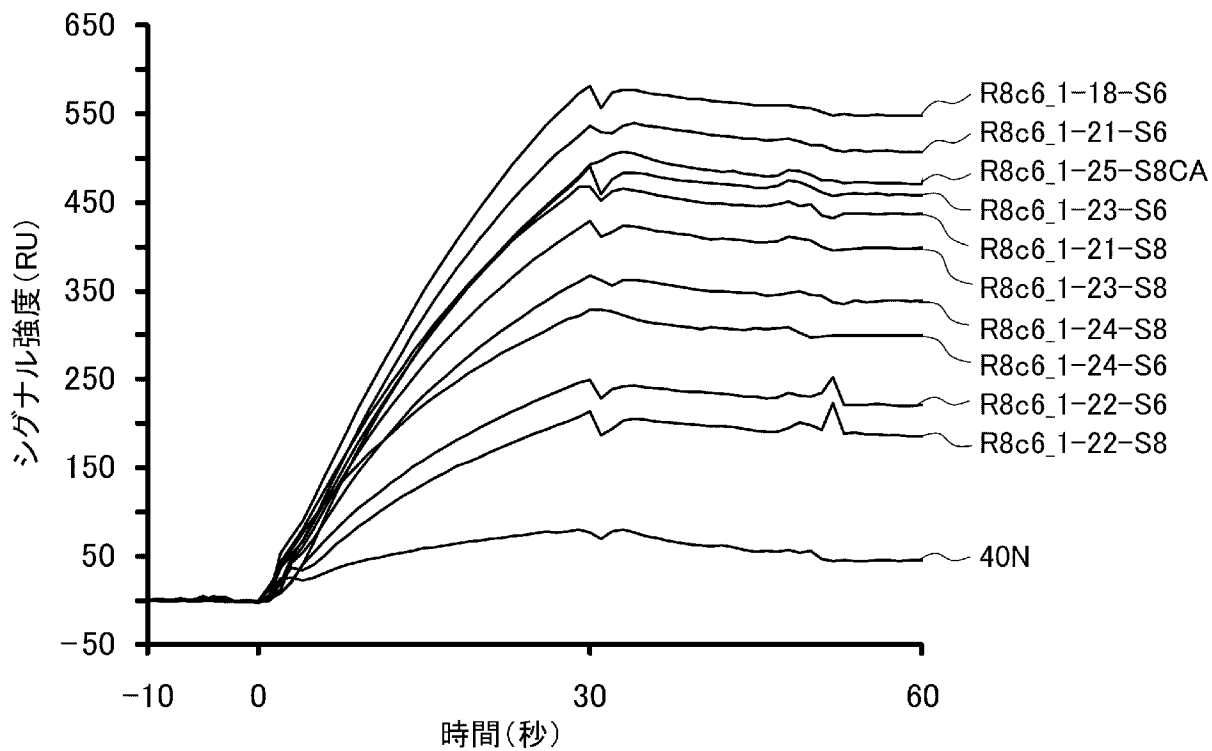
[図13]



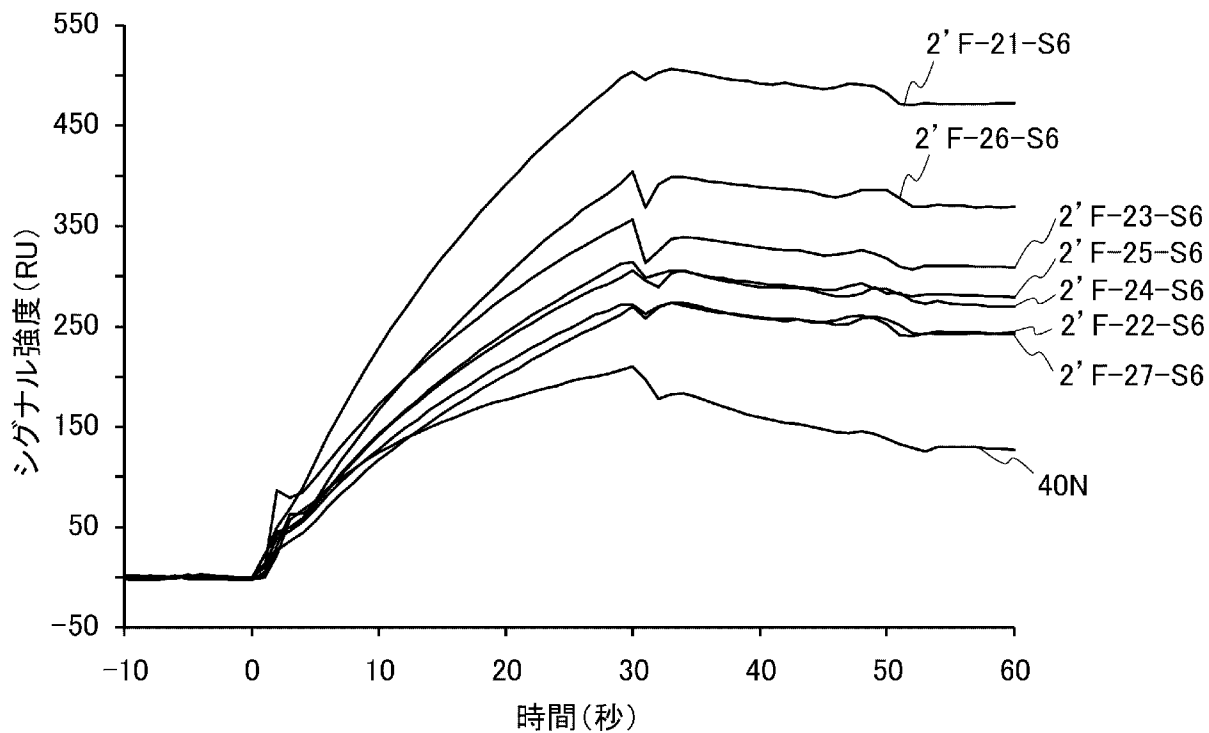
[図14]



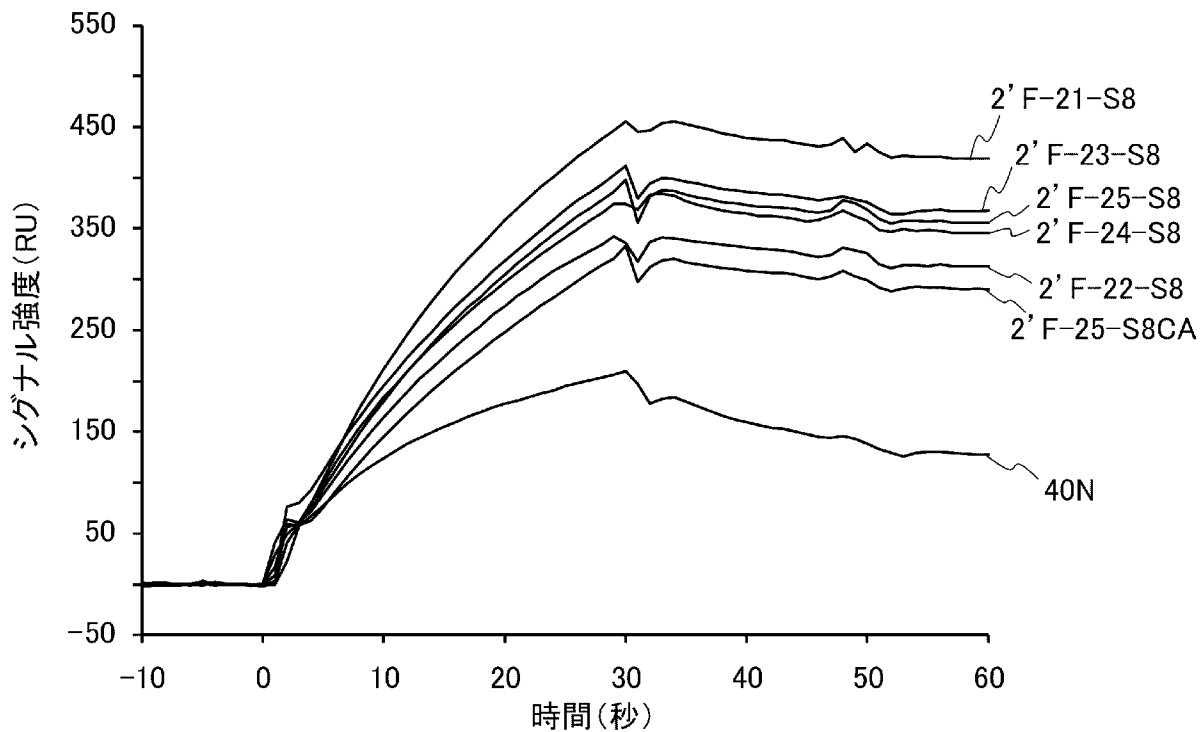
[図15]



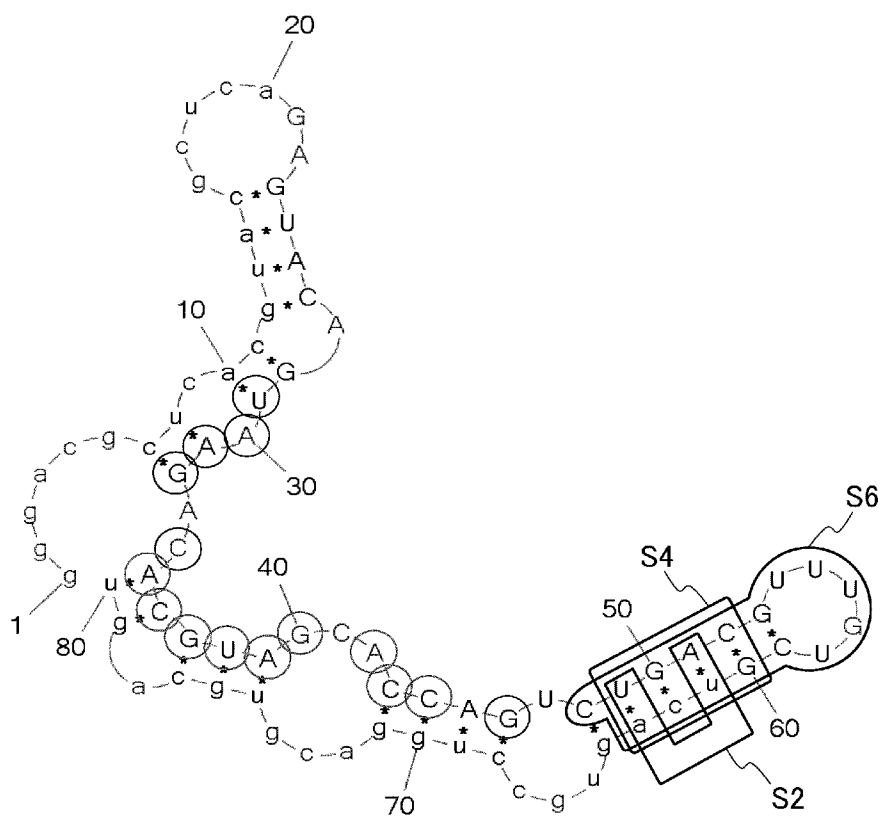
[図16]



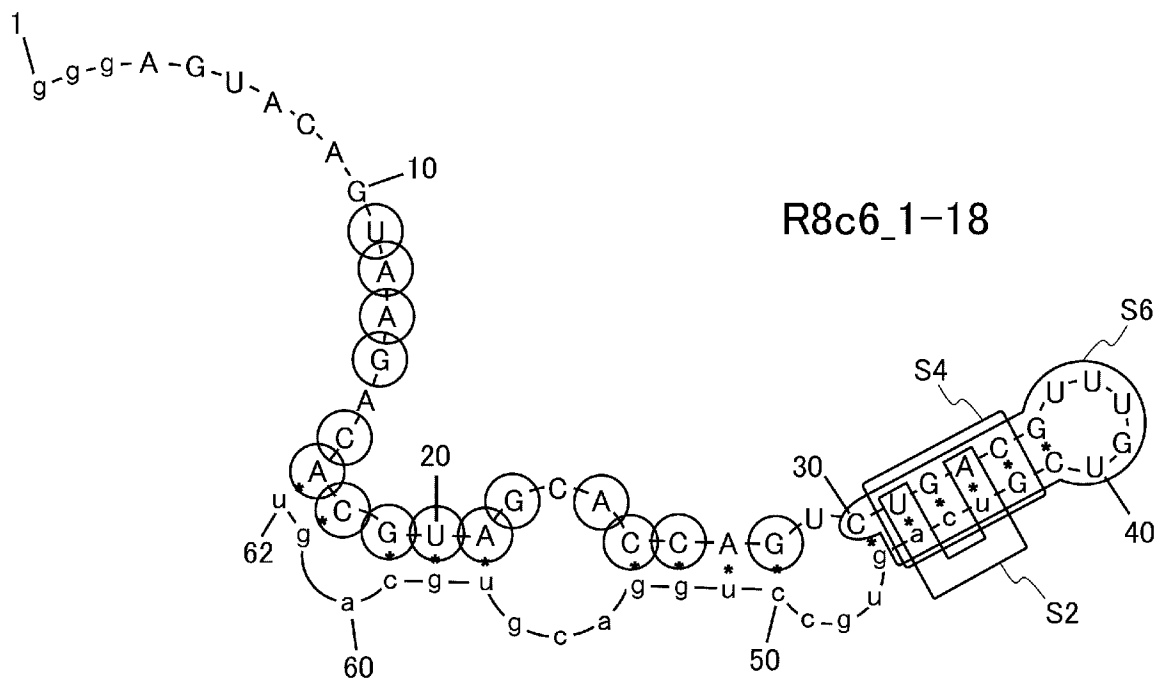
[図17]



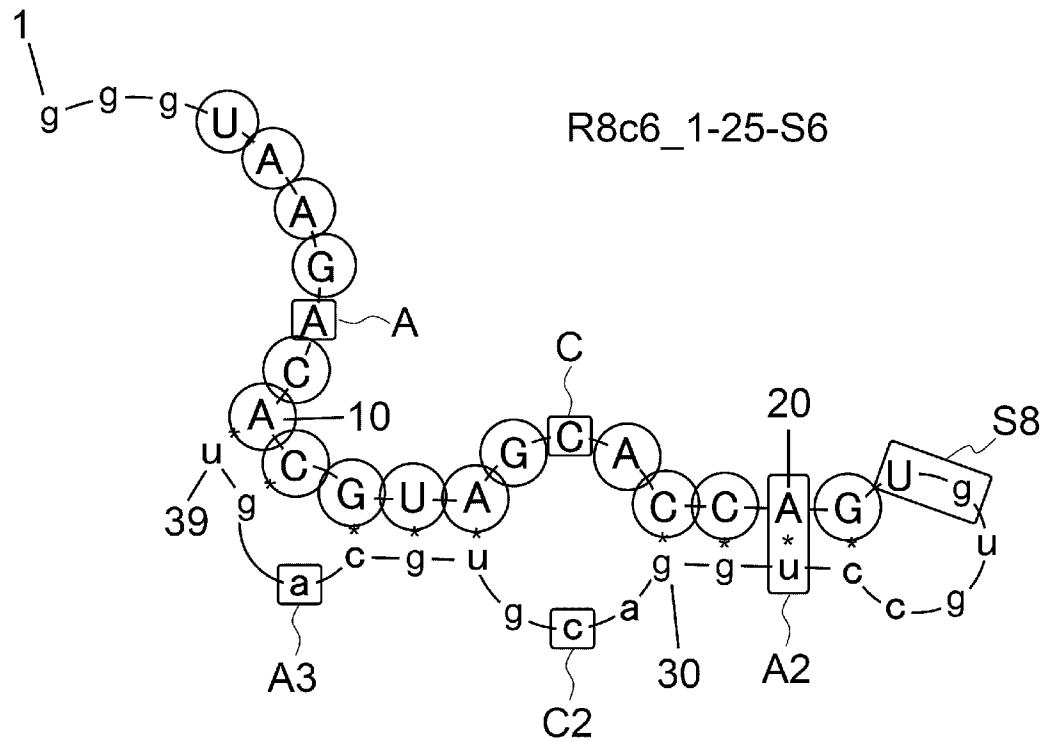
[圖18]



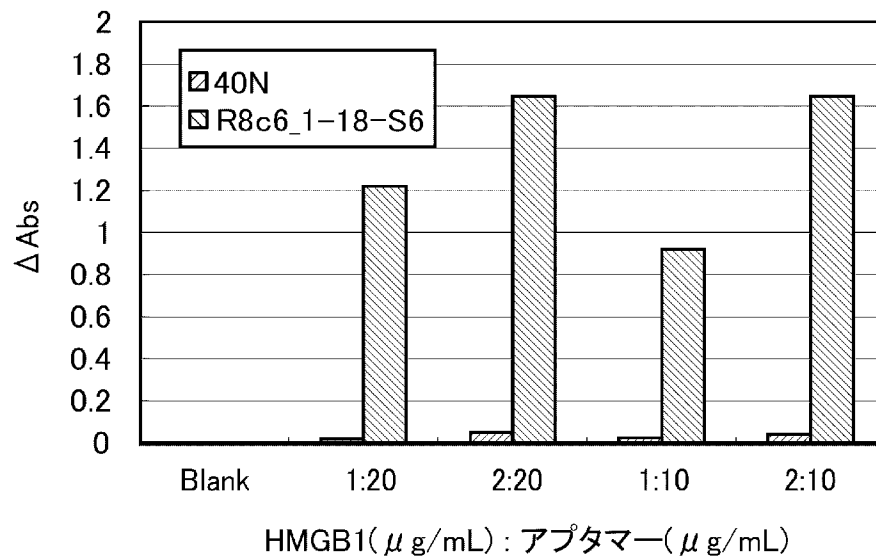
[圖19]



[図20]



[図21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/062104

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N15/09(2006.01) i, A61K31/7088(2006.01) i, A61K31/7105(2006.01) i, A61P9/00(2006.01) i, A61P29/00(2006.01) i, A61P35/00(2006.01) i, A61P35/04(2006.01) i, C12Q1/68(2006.01) i, G01N33/68(2006.01) i</i> 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) <i>C12N15/09, A61K31/7088, A61K31/7105, A61P9/00, A61P29/00, A61P35/00, A61P35/04, C12Q1/68, G01N33/68</i>												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <table border="0"> <tr> <td>Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1922-1996</td> <td>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</td> <td>1996-2010</td> </tr> <tr> <td>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1971-2010</td> <td>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1994-2010</td> </tr> </table>			Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010	Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010		
Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010									
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010									
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>CA/MEDLINE/BIOSIS (STN), WPI, JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)</i>												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	JAOUEN S., DE KONING, L., GAILLARD, C., MUSELIKOVA-POLANSKA, E., STROS, M., STRAUSS, F., Determinants of Specific Binding of HMGB1 Protein to Hemicatenated DNA Loops., J. Mol. Biol., 2005.11.04, Vol.353, No.4, pages 822-837, Summary, tables 1, 2	1, 24										
X	WEBB M., PAYET D., LEE K.B., TRAVERS A.A., THOMAS J.O., Structural requirements for cooperative binding of HMGB1 to DNA minicircles., J. Mol. Biol., 2001.05.25, Vol.309 No.1, pages 79-88, Summary	1, 24										
<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: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 13 August, 2010 (13.08.10)		Date of mailing of the international search report 24 August, 2010 (24.08.10)										
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.										
Facsimile No.		Telephone No.										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/062104

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/076200 A2 (MEDIMUNE, INC.), 05 July 2007 (05.07.2007), paragraphs [0007], [0045], [0064], [0142] to [0143] & JP 2009-517404 A & US 2008/0311122 A1 & EP 1959997 A2 & CA 2631212 A1 & AU 2006330807 A1	1-26
Y	JAYASENA, S., Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics., Clin. Chem., 1999.07, Vol.45 No.9, pages 1628- 1650, page 1631, left column, lines 5 to 23	1-26
Y	KEEFE, A.D., CLOAD, S.T., SELEX with modified nucleotides., Curr. Opin. Chem. Biol., 2008.08, Vol.12 No.4, pages 448-456, entire text	7-26
P,Y,O	OHTSU, T., TSUJI, S., KATO, S., WAGA, I., RNA aptamers against HMGB1 - the possibility to inhibit the cancer cell proliferation., Proceedings of the Japanese Cancer Association, 2009.08.31, 68th, page 494, "P-1247"	1-26

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/04(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09, A61K31/7088, A61K31/7105, A61P9/00, A61P29/00, A61P35/00, A61P35/04, C12Q1/68, G01N33/68</p>											
<p>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</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2010年 日本国実用新案登録公報 1996-2010年 日本国登録実用新案公報 1994-2010年</p>											
<p>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)</p> <p>CA/MEDLINE/ BIOSIS(STN), WPI, JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JAOUEN S., DE KONING, L., GAILLARD, C., MUSELIKOVA-POLANSKA, E., STROS, M., STRAUSS, F., Determinants of Specific Binding of HMGB1 Protein to Hemicatenated DNA Loops., J. Mol. Biol., 2005. 11. 04, Vol. 353, No. 4, pages 822-837, 要旨、表1、表2</td> <td>1、24</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WEBB M., PAYET D., LEE K. B., TRAVERS A. A., THOMAS J. O., Structural requirements for cooperative binding of HMGI to DNA minicircles., J. Mol. Biol., 2001. 05. 25, Vol. 309 No. 1, pages 79-88, 要旨</td> <td>1、24</td> </tr> </tbody> </table>			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	X	JAOUEN S., DE KONING, L., GAILLARD, C., MUSELIKOVA-POLANSKA, E., STROS, M., STRAUSS, F., Determinants of Specific Binding of HMGB1 Protein to Hemicatenated DNA Loops., J. Mol. Biol., 2005. 11. 04, Vol. 353, No. 4, pages 822-837, 要旨、表1、表2	1、24	X	WEBB M., PAYET D., LEE K. B., TRAVERS A. A., THOMAS J. O., Structural requirements for cooperative binding of HMGI to DNA minicircles., J. Mol. Biol., 2001. 05. 25, Vol. 309 No. 1, pages 79-88, 要旨	1、24
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									
X	JAOUEN S., DE KONING, L., GAILLARD, C., MUSELIKOVA-POLANSKA, E., STROS, M., STRAUSS, F., Determinants of Specific Binding of HMGB1 Protein to Hemicatenated DNA Loops., J. Mol. Biol., 2005. 11. 04, Vol. 353, No. 4, pages 822-837, 要旨、表1、表2	1、24									
X	WEBB M., PAYET D., LEE K. B., TRAVERS A. A., THOMAS J. O., Structural requirements for cooperative binding of HMGI to DNA minicircles., J. Mol. Biol., 2001. 05. 25, Vol. 309 No. 1, pages 79-88, 要旨	1、24									
<p><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。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p>											
<p>国際調査を完了した日</p> <p>13. 08. 2010</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>24. 08. 2010</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>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</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>長井 啓子</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	<p>4 B 4 6 7 0</p>									

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	WO 2007/076200 A2 (MEDIMUNE, INC.) 2007.07.05, 段落[0007], [0045], [0064], [0142]-[0143] & JP 2009-517404 A & US 2008/0311122 A1 & EP 1959997 A2 & CA 2631212 A1 & AU 2006330807 A1	1 - 2 6
Y	JAYASENA, S., Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics., Clin. Chem., 1999.07, Vol.45 No.9, pages 1628-1650, 第1631頁左欄第5-23行	1 - 2 6
Y	KEEFE, A.D., CLOAD, S.T., SELEX with modified nucleotides., Curr. Opin. Chem. Biol., 2008.08, Vol.12 No.4, pages 448-456, 全文	7 - 2 6
P, Y, O	OHTSU, T., TSUJI, S., KATO, S., WAGA, I., RNA aptamers against HMGB1 - the possibility to inhibit the cancer cell proliferation., 日本癌学会学術総会記事, 2009.08.31, 68th, page 494, "P-1247"	1 - 2 6