明　細　書

発明の名称 ： ＩＬ－２１に対するアプタマーおよびその使用

技術分野

[0001] 本発明は、インターロイキン－２１に対するアプタマーに関する発明である。

背景技術

[0002] 肺動脈性肺高血圧症（以下「ＰＡＨ」と略記する場合がある）は肺動脈の中膜、内膜の過増殖を病態背景に有する疾患である。現在、肺高血圧症治療には、エンドセリン受容体拮抗薬（ボセンタン、アンブリセンタン等）、ホスホジエステラーゼ（ＰＤＥ）５阻害薬（シルデナフィル、タダラフィル等）、プロスタグランジンＩ２およびその誘導体（エポプロステノール、ベラプロスト等）などが使用されている。しかし、これらの治療による予後の改善は十分とは言えず、ＰＡＨは難病の１つに指定されている。それゆえ、ＰＡＨの新しい治療法の開発が要請されている。

[0003] 炎症がＰＡＨ病態の進行に関わると報告されており、特に炎症性サイトカインであるインターロイキン－６（ＩＬ－６）の関与が報告されている。さらに近年になってインターロイキン－２１（以下、「ＩＬ－２１」と記載）が、ＩＬ－６の作用によってヘルパーＴ細胞の一種であるＴｈ１７細胞から分泌されることで、ＰＡＨの発症に重要な役割を担うことが報告されている（非特許文献１）。具体的には、ＩＬ－２１が肺に存在するマクロファージをＭ２マクロファージ優位な状態に誘導して、Ｍ２マクロファージの肺組織への集積と相関して肺動脈平滑筋細胞の増殖が促進されることでＰＡＨ発症に至ると考えられている。

[0004] 特許文献１には、ＩＬ－２１からのシグナル伝達を阻害することによって、肺高血圧症の予防および治療が可能になることが記載されている。具体的には、抗ＩＬ－２１抗体が、ＩＬ－２１とＩＬ－２１受容体との相互作用を阻害することにより、ＩＬ－２１からのシグナル伝達が阻害されることに基

づく。しかしながら、特許文献１にはＩＬ－２１とＩＬ－２１受容体との相互作用を阻害することができる物質として、ＩＬ－２１抗体、ＩＬ－２１受容体抗体、ＩＬ－２１やＩＬ－２１受容体と結合するペプチドなどが挙げられているが、ＩＬ－２１アプタマーについては記載も示唆もされていない。

[0005] アプタマーは標的分子（タンパク質、糖鎖、ホルモン等）に特異的に結合する核酸であり、一本鎖のＲＮＡ（又はＤＮＡ）が形成する三次元立体構造を介して、標的分子に結合することができる。その取得にはＳＥＬＥＸ法（Ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ Ｌｉｇａｎｄｓ ｂｙ Ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ Ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ）と呼ばれるスクリーニング法が用いられる（特許文献２～４）。ＳＥＬＥＸ法で得られるアプタマーの鎖長は８０ヌクレオチド程度であり、その後標的分子の生理阻害活性を指標に短鎖化が図られる。さらに生体内での安定性向上を目的に化学修飾を加え、医薬品としての最適化が図られる。アプタマーは免疫排除を受けにくく、抗体特有の抗体依存性細胞障害（ＡＤＣＣ）や補体依存性細胞障害（ＣＤＣ）などの副作用は起こりにくいとされる。また同じ分子標的医薬である低分子化合物には難溶性の分子もあり、その製剤化には最適化が必要である場合もあるが、アプタマーは水溶性が高いため、その点でも有利である。さらに化学合成により生産されるので、大量生産すればコストダウンを図ることができる。その他、長期保存安定性や熱、溶媒耐性もアプタマーの優位な特徴である。一方で、一般にアプタマーの血中半減期は抗体よりも短い。しかし、この点も毒性の観点からはメリットとなる場合がある。２００４年１２月に米国で承認された初めてのＲＮＡアプタマー医薬品であるＭａｃｕｇｅｎ（対象疾患：加齢黄斑変性症）をはじめ、様々なアプタマー医薬品が開発されている。近年ではＲＮＡアプタマーだけでなく、生体内で安定かつ安価に製造可能なＤＮＡアプタマーの開発も進められている。

[0006] また、アプタマーが有する標的分子への親和性の高さを利用して、標的分子の精製や分子ターゲティングに用いられる試みも数多くなされている。アプタマーは同様な機能をもつ抗体と比較してもその親和性は高い場合が多い

。デリバリーの観点でも、アプタマーは抗体の１／１０程度の分子サイズであるため組織移行が起こりやすく、目的の部位まで薬物を送達させることがより容易である。したがって、抗体よりも有用な医薬品が開発できる可能性がある。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特許第６３５９９２１号公報

特許文献2：国際公開第９１／１９８１３号

特許文献3：国際公開第９４／０８０５０号

特許文献4：国際公開第９５／０７３６４号

非特許文献

[0008] 非特許文献1：ＰＮＡＳ　Ｍａｙ　１９，　２０１５　１１２　（２０）　Ｅ２６７７－Ｅ２６８６

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、ＩＬ－２１に対するアプタマーを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、ＩＬ－２１に結合するアプタマーの製造に成功した。またこのアプタマーがＩＬ－２１とＩＬ－２１受容体との結合を阻害することも明らかとした。さらに本ＩＬ－２１アプタマーは、特徴的なモチーフ配列を有するアプタマーであることも明らかにした。

[0011] 即ち、本発明は、以下のとおりである。

［１］インターロイキン－２１に結合するアプタマー。

［２］インターロイキン－２１とその受容体との結合を阻害する、［１］に記載のアプタマー。

［３］以下の式（１）：

ＣＧＲＹＫＡＣＹ　　（１）

（式中、Ｒは、ＡまたはＧを表し、Ｙは、ＣまたはＵを表し、Ｋは、ＧまたはＵを表す。）で表されるヌクレオチド配列を含む、［１］または［２］に記載のアプタマー。

［４］式（１）における１番目のＣにおいて、リボース２’位のヒドロキシ基がフルオロ基で置換されている、［３］に記載のアプタマー。

［５］以下の式（２）：

ＣＣＫＹＣ　　（２）

（式中、Ｋは、ＧまたはＵを表し、Ｙは、ＣまたはＵを表す。）で表されるヌクレオチド配列、および

以下の式（３）：

ＧＹＭＣＧ　　（３）

（式中、Ｙは、ＣまたはＵを表し、Ｍは、ＡまたはＣを表す。）で表されるヌクレオチド配列をさらに含む、［３］または［４］に記載のアプタマー。

［６］５’末端側から、式（２）、式（１）、式（３）の順で各ヌクレオチド配列を含む、［５］に記載のアプタマー。

［７］式（１）における４番目のＹがＣであり、Ｋおよび８番目のＹがそれぞれＵであり、

式（２）におけるＫおよびＹがそれぞれＵであり、

式（３）におけるＹおよびＭがそれぞれＣである、［５］または［６］に記載のアプタマー。

［８］以下の式（４）：

$ＣＣＫＹＣ－Ｎ_{1}－ＣＧＲＹＫＡＣＹ－Ｎ_{2}－ＧＹＭＣＧ$　　（４）

（式中、$Ｎ_{1}$は、５～９個の長さの任意のヌクレオチド配列であり、$Ｎ_{2}$は、５～１０個の長さの任意のヌクレオチド配列であり、Ｒは、ＡまたはＧを表し、Ｙは、ＣまたはＵを表し、Ｋは、ＧまたはＵを表し、Ｍは、ＡまたはＣを表す。）で表されるヌクレオチド配列を含む、［１］～［７］のいずれかに記載のアプタマー。

［９］以下の式（５）：

$X_1CCKYCX_2-N_{1a}-X_3CGRYKACYX_4-N_{2a}-X_5GYMCGX_6$　（５）

（式中、N_{1a}は、３～７個の長さの任意のヌクレオチド配列であり、N_{2a}は、３～８個の長さの任意のヌクレオチド配列であり、X_1とX_6、X_2とX_5、およびX_3とX_4はそれぞれ互いに相補的なヌクレオチドであり、Ｒは、ＡまたはＧを表し、Ｙは、ＣまたはＵを表し、Ｋは、ＧまたはＵを表し、Ｍは、ＡまたはＣを表す。）で表されるヌクレオチド配列を含む、［１］～［７］のいずれかに記載のアプタマー。

［１０］［１］～［９］のいずれかに記載のアプタマーにおいて、１又は数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を含むアプタマーであって、

（ａ）該アプタマーに含まれるヌクレオチドにおいて、

（ｉ）各ピリミジンヌクレオチドのリボースの２’位がフッ素原子であり、

（ｉｉ）各プリンヌクレオチドのリボースの２’位がヒドロキシ基である、アプタマー；

（ｂ）該（ａ）のアプタマーにおいて、

（ｉ）各ピリミジンヌクレオチドのリボースの２’位のフッ素原子が、それぞれ独立して、無置換であるか、水素原子、ヒドロキシ基およびメトキシ基からなる群より選ばれる原子又は基で置換されており、

（ｉｉ）各プリンヌクレオチドのリボースの２’位のヒドロキシ基が、それぞれ独立して、無置換であるか、水素原子、メトキシ基およびフッ素原子からなる群より選ばれる原子又は基で置換されている、アプタマー。

［１１］式（３）：ＧＹＭＣＧにおける４番目のＣにおいて、リボース２’位のヒドロキシ基がフルオロ基で置換されている、［５］～［９］のいずれかに記載のアプタマー。

［１２］ヌクレオチドの長さが６５ヌクレオチド以下である、［１］～［１

１］のいずれかに記載のアプタマー。

［１３］以下の（ａ）または（ｂ）のヌクレオチド配列を含む、［８］または［９］に記載のアプタマー。

（ａ）配列番号１～５、７、２０～２９および３１～４３のいずれかで表されるヌクレオチド配列（但し、ウラシル（Ｕ）はチミン（Ｔ）であってもよい）

（ｂ）上記（ａ）のヌクレオチド配列において、１又は数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列

［１４］［１］～［１３］のいずれかに記載のアプタマーおよび機能性物質を含む複合体。

［１５］機能性物質が、親和性物質、標識用物質、酵素、薬物送達媒体又は薬物である、［１４］に記載の複合体。

［１６］［１］～［１３］のいずれかに記載のアプタマーあるいは［１４］または［１５］に記載の複合体を含む医薬。

［１７］肺高血圧症の治療用又は予防用である、［１６］に記載の医薬。

発明の効果

[0012] 本発明のアプタマー又はアプタマーを含む複合体は、ＩＬ－２１が関与する疾患の予防または治療、特に肺高血圧症の予防または治療に有用であり得る。あるいは、ＩＬ－２１の精製および濃縮、ＩＬ－２１の標識、並びにＩＬ－２１の検出および定量にも有用であり得る。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図１は、配列番号１および２で表される各アプタマーの二次構造予測を示す。

[図2]図２は、配列番号１および２で表される各アプタマーがヒトＩＬ－２１に結合することを示すセンサーグラムである。

[図3]図３は、配列番号１で表されるアプタマーがヒトＩＬ－２１とその受容体との結合を阻害することを示すセンサーグラムである。

[図4]図４は、配列番号３～５および７で表される各アプタマーの二次構造予

測を示す。

[図5]図５は、配列番号２２で表されるアプタマーの二次構造予測を示す。

[図6]図６は、配列番号２５～３６で表される各アプタマーの二次構造予測を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明は、インターロイキン（ＩＬ）２１に結合するアプタマー、即ち、ＩＬ－２１に対して結合活性を有するアプタマー（以下、「本発明のアプタマー」と称する場合がある。）を提供する。

[0015] 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、ＲＮＡ、ＤＮＡ、修飾核酸又はそれらの混合物であり得る。また本発明のアプタマーは、直鎖状、環状又はステム‐ループ状の形態であり得るが、好ましくは後述するステム－ループ状の構造を採り得る。

[0016] 本発明のアプタマーは生理的な緩衝液中でＩＬ－２１へ結合する。緩衝液としては特に限定されるものではないが、ｐＨが約５．０～１０．０程度のものが好ましく用いられ、このような緩衝液としては、例えば後述する溶液Ａ（実施例１参照）が挙げられる。本発明のアプタマーは、以下のいずれかの試験により検出可能な程度の強度で、ＩＬ－２１へ結合するものである。

結合強度の測定にはＧＥヘルスケア社製のＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００を用いる。一つの測定方法としては、まずセンサーチップにアプタマーを固定化する。アナライト用のＩＬ－２１溶液は０．１μＭに調製したものをインジェクトし、ヒトＩＬ－２１のアプタマーへの結合を検出する。例えば、後述する実施例で用いられるようにヒトＩＬ－２１以外をターゲットとするアプタマー（以下、「非ヒトＩＬ－２１アプタマー」）をネガティブコントロールとし、該コントロール核酸と比較してヒトＩＬ－２１が有意に強くアプタマーに結合した場合、該アプタマーはヒトＩＬ－２１への結合能を有すると判定することができる。また一つの測定方法として、センサーチップにヒト

ＩＬ－２１を固定化し、アプタマー溶液をインジェクトして結合を検出することも可能である。

[0017] 本発明のアプタマーは、一実施態様において、ＩＬ－２１に結合し、ＩＬ－２１の活性を阻害し得る。すなわち、本発明のアプタマーは、ＩＬ－２１に対する阻害活性をも有し得る。

[0018] ＩＬ－２１に対する阻害活性とは、ＩＬ－２１が保有する任意の活性に対する阻害能を意味する。例えば、ＩＬ－２１はＩＬ－２１受容体発現細胞に作用してシグナル伝達を活性化し、各種細胞増殖因子やその受容体の産生を誘導する。従って、ＩＬ－２１に対する阻害活性とはＩＬ－２１受容体を介した細胞内シグナル伝達を阻害する活性のことであり得る。これら各種細胞増殖因子やその受容体の発現は、結果的に細胞の増殖活性や遊走活性の亢進を導く、あるいは各種細胞からの特定の液性因子の分泌を減少させる場合がある。したがって、ＩＬ－２１の阻害活性とはそれらの活性の阻害や、従来ＩＬ－２１の刺激により分泌される液性因子の減少を意味する。

よって、本発明のアプタマーがＩＬ－２１に結合しＩＬ－２１とＩＬ－２１受容体との結合を阻害した場合、ＩＬ－２１受容体を介した細胞内シグナル伝達経路の活性化に伴う作用、例えばＮＫ細胞におけるインターフェロンγの分泌などが阻害され得る。換言すると、本発明のアプタマーがＮＫ細胞におけるインターフェロンγの分泌を低減させた場合、本発明のアプタマーはＩＬ－２１に結合し、ＩＬ－２１とＩＬ－２１受容体との結合を阻害するアプタマーであるといえる。

[0019] ＩＬ－２１とは、ＣＤ４陽性Ｔ細胞やナチュラルキラーＴ細胞に強く発現するサイトカインであり、例えば、配列番号４４で表されるアミノ酸配列を持つタンパク質である。本発明におけるＩＬ－２１は、動物体内で作られる他、マウスなどの哺乳細胞、昆虫細胞、大腸菌などの培養細胞を用いても作製することができ、更に化学合成によっても作ることができる。培養細胞や化学合成によって作製する場合は、自体公知の方法で容易に変異体を作製することができる。ここでＩＬ－２１の「変異体」とは、公知のＩＬ－２１の

アミノ酸配列からアミノ酸が１～数個置換、欠失、付加等されたものや、公知のＩＬ－２１のアミノ酸配列の一部分のアミノ酸配列からなるものであって、本来ＩＬ－２１が有している活性の少なくとも一つ以上の活性を有しているタンパク質又はペプチドを意味する。アミノ酸が置換、付加される場合、当該アミノ酸は天然のアミノ酸であってもよいし非天然のアミノ酸であってもよい。本発明におけるＩＬ－２１はこれらの変異体を含む。

[0020] ＩＬ－２１受容体（以下、「ＩＬ－２１Ｒ」ともいう）とは、ＩＬ－２１が結合する細胞表面タンパク質を意味する。ＩＬ－２１受容体としては、例えば、配列番号４５で表されるアミノ酸配列を持つタンパク質が知られている。本発明におけるＩＬ－２１受容体とは、天然のアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよいしその変異体であってもよい。ここでＩＬ－２１受容体の「変異体」とは、公知のＩＬ－２１受容体のアミノ酸配列を構成するアミノ酸のうち１～数個が置換、欠失、付加等されたものや、公知のＩＬ－２１受容体のアミノ酸配列の一部分のアミノ酸配列からなるものであって、ＩＬ－２１に対して結合活性を有するタンパク質又はペプチドを意味する。一実施態様において、本発明はＩＬ－２１とＩＬ－２１受容体との結合を阻害するアプタマーを提供する。

[0021] 本発明のアプタマーは、ＩＬ－２１の任意の部分に結合するアプタマーである限り特に限定されない。また本発明のアプタマーは、ＩＬ－２１の任意の部分に結合し、その活性を阻害し得るものである限り特に限定されない。

[0022] 本発明のアプタマーの長さは特に限定されず、通常、約２００ヌクレオチド以下であり得るが、例えば約１００ヌクレオチド以下であり、好ましくは約７０ヌクレオチド以下であり、より好ましくは６５ヌクレオチド以下であり、さらに好ましくは５０ヌクレオチド以下であり、よりさらに好ましくは約４０ヌクレオチド以下であり、最も好ましくは３７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、化学合成およ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。本発明のアプタマー長の下限は、共通配列（ＣＧＲＹＫＡＣＹ）を含み、かつ後述するステム－ループ状の構造を採り得る限り特に制限はないが、該アプタマー長は、例えば２０ヌクレオチド以上、好ましくは３０ヌクレオチド以上、より好ましくは３５ヌクレオチド以上であり得る。以上のことから、本発明の特に好ましい実施態様において、本発明のアプタマーの長さは３５～４０ヌクレオチドである。

[0023] 好ましい一実施態様において、本発明のアプタマーは、式（１）：

ＣＧＲＹＫＡＣＹ （１）

（式中、Ｒは、ＡまたはＧを表し、Ｙは、ＣまたはＵを表し、Ｋは、ＧまたはＵを表す。）で表されるヌクレオチド配列を含む、ＩＬ－２１に結合するアプタマーである。

[0024] 本発明のアプタマーを構成する各ヌクレオチドは、それぞれ独立して、リボースであってもデオキシリボースであってもよい。以下、本発明のアプタマーにおいて、ヌクレオチドがデオキシリボースである場合、ウラシル（Ｕ）はチミン（Ｔ）に読み替えるものとする。

[0025] 式（１）において、４番目のＹは、Ｃであることが好ましく、Ｋは、Ｕであることが好ましく、８番目のＹはＵであることが好ましい。

[0026] さらに好ましい一実施態様において、本発明のアプタマーは、式（２）：

ＣＣＫＹＣ （２）

（式中、Ｋは、ＧまたはＵを表し、Ｙは、ＣまたはＵを表す。）で表されるヌクレオチド配列、および式（３）：

ＧＹＭＣＧ （３）

（式中、Ｙは、ＣまたはＵを表し、Ｍは、ＡまたはＣを表す。）で表されるヌクレオチド配列をさらに含む、ＩＬ－２１に結合するアプタマーである。

[0027] 式（２）において、Ｋは、Ｕであることが好ましく、Ｙは、Ｕであることが好ましい。また、式（３）において、Ｙは、Ｃであることが好ましく、Ｍは、Ｃであることが好ましい。

[0028] 上記式（１）、式（２）および式（３）は、本発明のアプタマーの配列に

おいて、５’末端側からどのような順で並んでいてもよいが、５’末端側から、式（２）、式（１）、式（３）の順で各ヌクレオチド配列が並んでいることが好ましい。この順で各配列が配置されることによって、本発明のアプタマーが良好にＩＬ－２１に結合することが可能になる。

[0029] また、式（１）、式（２）および式（３）の各ヌクレオチド配列は、リンカー（スペーサー）となるヌクレオチド配列を介して結合されていてもよい。リンカーとなるヌクレオチド配列は特に限定されず、本発明のアプタマーがＩＬ－２１に結合する限りどのような配列も採用することが可能である。

[0030] 本発明のアプタマーとして、より好ましくは、以下の式（４）：

ＣＣＫＹＣ－$Ｎ_1$－ＣＧＲＹＫＡＣＹ－$Ｎ_2$－ＧＹＭＣＧ　　（４）

（式中、$Ｎ_1$は、５～９個の長さの任意のヌクレオチド配列であり、$Ｎ_2$は、５～１０個の長さの任意のヌクレオチド配列であり、Ｒは、ＡまたはＧを表し、Ｙは、ＣまたはＵを表し、Ｋは、ＧまたはＵを表し、Ｍは、ＡまたはＣを表す。）で表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。

[0031] ここで、$Ｎ_1$および$Ｎ_2$は、上記リンカーとなるヌクレオチド配列に相当し、該リンカーを介して、５’末端側から、式（２）、式（１）、式（３）の順で各ヌクレオチド配列が並んでいることが分かる。

式（４）のような配置と位置関係で式（１）、式（２）および式（３）が並ぶことにより、本発明のアプタマーがＩＬ－２１により強く結合し、それゆえ高い効果を発揮することが可能となる。

[0032] 式（４）において、$Ｎ_1$の長さは、通常５～９ヌクレオチドであり、好ましくは５～７ヌクレオチドであり、最も好ましくは６ヌクレオチドである。$Ｎ_2$の長さは、通常５～１０ヌクレオチドであり、好ましくは５～８ヌクレオチドであり、最も好ましくは６または７ヌクレオチドである。$Ｎ_1$および$Ｎ_2$がこの範囲内のヌクレオチド長であることにより、本発明のアプタマーの機能が発揮される。

また、$Ｎ_1$と$Ｎ_2$の長さの差は０～２であることが好ましく、０または１であることがより好ましい。そして式（１）部分の両側に位置する$Ｎ_1$と$Ｎ_2$と

はステム構造を形成するが、このステム構造は全体としてステム構造が形成されている限りミスマッチによる部分的なバルジ構造やループ構造を含んでいてもよい。

[0033] さらにN_1およびN_2のヌクレオチド配列は、式（２）部分（ＣＣＫＹＣ）と式（３）部分（ＧＹＭＣＧ）とが、それぞれの両端で塩基対を形成してインターナルループを形成し、式（１）部分（ＣＧＲＹＫＡＣＹ）がループを形成し得る限り、いかなるヌクレオチド配列であってもよい。

ここで、式（１）部分は、全体（ＣＧＲＹＫＡＣＹ）でループを形成してもよいし、例えば、下線を付したＲとＹとの間で塩基対（例、Ａ－Ｕ）を形成することでループを形成してもよい。いずれのループを形成した場合であっても、前述の共通配列を保有する限りにおいて、本発明のアプタマーの機能が発揮される。なお後者の場合、N_2の５’末端側の２ヌクレオチドは、式（１）の５’末端側の「ＣＧ」とステム構造を形成することが望ましく、その配列としてはステム構造を形成する限り限定されないが、「ＣＧ」であることが望ましい。

なお、式（４）中、前記式（１）～（３）に相当する各部分配列における好ましいヌクレオチドは、式（１）～（３）について上記したとおりである。

[0034] また、本発明のアプタマーとして、より好ましくは、以下の式（５）：

X_1ＣＣＫＹＣX_2－N_{1a}－X_3ＣＧＲＹＫＡＣＹX_4－N_{2a}－X_5ＧＹＭＣＧX_6　（５）

（式中、N_{1a}は、３～７個の長さの任意のヌクレオチド配列であり、N_{2a}は、３～８個の長さの任意のヌクレオチド配列であり、X_1とX_6、X_2とX_5、およびX_3とX_4はそれぞれ互いに相補的なヌクレオチドであり、Ｒは、ＡまたはＧを表し、Ｙは、ＣまたはＵを表し、Ｋは、ＧまたはＵを表し、Ｍは、ＡまたはＣを表す。）で表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。

[0035] ここで、N_{1a}およびN_{2a}は、上記リンカーとなるヌクレオチド配列に相当

し、該リンカーを介して、５’末端側から、式（２）、式（１）、式（３）の順で各ヌクレオチド配列が並んでいることが分かる。

式（５）のような配置と位置関係で式（１）、式（２）および式（３）が並ぶことにより、本発明のアプタマーがＩＬ－２１にさらにより強く結合し、それゆえ高い効果を発揮することが可能となる。

[0036] 式（５）において、N_{1a}の長さは、通常３～７ヌクレオチドであり、好ましくは３～５ヌクレオチドであり、最も好ましくは４ヌクレオチドである。N_{2a}の長さは、通常３～８ヌクレオチドであり、好ましくは３～６ヌクレオチドであり、最も好ましくは４または５ヌクレオチドである。N_{1a}およびN_{2a}がこの範囲内のヌクレオチド長であることにより、本発明のアプタマーの機能が発揮される。また、N_{1a}とN_{2a}の長さの差は０～２であることが好ましく、０または１であることがより好ましい。ここで、N_{1a}とN_{2a}とは、それぞれX_2、X_3およびX_5、X_4と一緒になってステム構造を形成するが、このステム構造は全体としてステム構造が形成されている限り、N_{1a}とN_{2a}との間でのミスマッチによる部分的なバルジ構造やループ構造を含んでいてもよい。

[0037] さらには、X_1とX_6、X_2とX_5がそれぞれ塩基対を形成することによって、式（２）部分（ＣＣＫＹＣ）と式（３）部分（ＧＹＭＣＧ）とがインターナルループを形成するのをさらに安定化し、X_3とX_4が塩基対を形成することによって式（１）部分（ＣＧＲＹＫＡＣＹ）がループを形成することとなる。

なお、式（５）中、前記式（１）～（３）に相当する各部分配列における好ましいヌクレオチドは、式（１）～（３）について上記したとおりである。

[0038] 好ましい一実施態様において、本発明のアプタマーとしては、配列番号１～５、７、２０～２９および３１～４３で表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。以下に、配列番号１～５、７、２０～２９および３１～４３で表されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであって

もよい）を示す。下線は共通配列（5’末端側から順に、式（2）、式（1）および式（3））を示す。

[0039] 配列番号１：

ＧＧＧＡＧＡＡＧＡＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＵＣＵＧＡＧＣＣＣＡＧＡＣＧＣＵＣＵＧＣＧＣＵ

配列番号２：

ＧＧＧＡＧＡＡＧＡＡＣＣＵＵＣＣＡＣＧＡＣＣＧＡＣＵＡＣＵＧＵＣＡＡＵＧＧＣＣＣＧＵＵＣＵＵＵＧＣＣＣＡＧＡＣＧＣＵＣＵＧＣＧＣＵ

配列番号３：

ＧＧＧＡＧＡＡＧＡＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＵＣＵＧＡＧＣＣＣ

配列番号４：

ＧＧＡＧＡＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＵＣＵＣＣ

配列番号５：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号７：

ＧＧＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＣＣ

[0040] 配列番号２０：

ＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣ

配列番号２１：

ＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵ

配列番号２２：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＧＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号２３：

ＧＡＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＵＣ

配列番号２４：

ＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＧＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣ

配列番号２５：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＵＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号２６：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＡＧＣＧＡＵＵＡＣＵＣＵＵＧＡＵＵＧＣＡＣＧＵＣＣ

配列番号２７：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＣＣＧＣＧＡＵＵＡＣＵＣＧＧＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号２８：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＣＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＧＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号２９：

ＧＧＣＣＣＧＣＣＡＡＣＡＣＡＣＧＡＵＵＡＣＵＵＧＵＧＡＵＵＧＵＣＣＧＧＣＣ

[0041] 配列番号３１：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＧＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＣＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号３２：

ＧＧＡＣＣＧＣＣＡＡＣＡＣＡＣＧＡＵＵＡＣＵＵＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号３３：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＣＣＧＣＧＡＵＵＡＣＵＣＧＧＧＡＵＵＧＣＡＣＧＵＣＣ

配列番号３４：

ＧＧＡＣＣＧＣＣＡＡＣＡＣＡＣＧＡＣＵＡＣＵＵＧＵＧＡＵＵＧＵＣＣＧＵＣＣ

配列番号３５：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＵＣＡＣＧＣＧＡＵＵＡＣＵＣＧＵＧＡＡＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号３６：

ＧＧＡＣＣＧＣＣＡＡＣＡＡＡＣＧＡＵＵＡＣＵＵＵＵＧＡＵＵＧＵＣＣＧＵＣＣ

配列番号３７：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＣＣＧＣＧＧＣＵＡＣＵＣＧＧＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号３８：

ＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＣＣＧＣＧＧＣＵＡＣＵＣＧＧＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣ

配列番号３９：

ＧＧＡＣＣＧＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

[0042] 配列番号４０：

ＧＧＡＣＣＵＣＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号４１：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＧＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号４２：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＣＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣ

GUCC

配列番号４３：

GGACCUUCAACACGCGACUACUCGUGAUUGCACGUCC

[0043] 特に好ましい一実施態様において、本発明のアプタマーは、配列番号２４または３８で表される配列を含む。

[0044] 一実施態様において、本発明のアプタマーは、上記のいずれかのアプタマーにおいて、１又は数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を含み、かつＩＬ－２１との結合活性、好ましくは、さらにＩＬ－２１とその受容体との結合阻害活性を有するアプタマーである。

[0045] ここで、上記置換、欠失、挿入又は付加されるヌクレオチド数は、置換、欠失、挿入又は付加後も依然としてＩＬ－２１に結合する限り特に限定されないが、例えば１～約１０個、好ましくは１～６個、より好ましくは１～５個、さらに好ましくは１～４個、さらに好ましくは１～３個、最も好ましくは１個又は２個であり得る。ヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加される部位も、置換、欠失、挿入又は付加後も依然としてＩＬ－２１に結合する限り特に限定されないが、上記式（１）、（２）および（３）中においては、１～３か所、好ましくは１又は２か所、より好ましくは１か所においてヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加され得る（但し、式（１）、（２）および（３）中、複数種のヌクレオチドをとり得る部位（即ち、Ｒ、Ｙ、ＫまたはＭ）においては、選択肢に含まれるヌクレオチド間での置換は含まないものとする）。特に好ましくは、式（１）、（２）および（３）中には、ヌクレオチドの置換、欠失又は挿入は含まれない。一方、それ以外の部位では、より多くのヌクレオチド（例えば、１～約１０個、好ましくは１～６個、より好ましくは１～５個、さらに好ましくは１～４個）の置換、欠失、挿入又は付加も許容され得る。

[0046] 本発明のアプタマーはまた、上記いずれかの１種のアプタマーの複数の連結物、上記から選ばれる２種以上のアプタマーを、各々１個以上含む連結物

であり得る。これらの連結物も、ＩＬ－２１に結合し得る。

ここで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。

[0047] 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、同一又は異なって、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、天然のリボヌクレオチド）であるか、あるいはリボースの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（本明細書において、「修飾ヌクレオチド」と記載する場合がある）であり得る。

[0048] このような任意の原子又は基としては、例えば、水素原子、フッ素原子又は－Ｏ－アルキル基（例、－Ｏ－Ｍｅ基）、－Ｏ－アシル基（例、－Ｏ－ＣＨＯ基）、アミノ基（例、－NH_2基）などが挙げられる。本発明のアプタマーはまた、少なくとも１種（例、１、２、３又は４種）のヌクレオチドが、リボースの２’位において、ヒドロキシ基、又は上述した任意の原子又は基、例えば、水素原子、フッ素原子、－Ｏ－Ｍｅ基からなる群より選ばれる少なくとも２種（例、２、３又は４種）の原子又は基を含み得る。

[0049] 本発明のアプタマーにおいてはまた、全てのピリミジンヌクレオチドが、リボースの２’位がフッ素原子であるヌクレオチドであるか、あるいは該フッ素原子が、同一又は異なって、無置換であるか、上述した任意の原子又は基、好ましくは、水素原子、ヒドロキシ基およびメトキシ基からなる群より選ばれる原子又は基で置換されているヌクレオチドであり得る。特に本発明

のアプタマーの製造方法として、Ｔ７　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（自社製）を用いた製造方法を適用した場合、ピリミジンヌクレオチドのリボース２’位がフルオロ化したアプタマーが得られる。フッ素原子がその他の上記原子又は基で置換されているアプタマーは、後述の方法で製造することができる。

[0050] 本発明のアプタマーにおいてはまた、全てのプリンヌクレオチドが、リボースの２’位がヒドロキシ基であるヌクレオチドであるか、あるいは該ヒドロキシ基が、同一又は異なって、無置換であるか、上述した任意の原子又は基、好ましくは、水素原子、メトキシ基およびフッ素原子からなる群より選ばれる原子又は基で置換されるヌクレオチドであり得る。ヒドロキシ基がその他の上記原子又は基で置換されているアプタマーは、後述の方法で製造することができる。

[0051] 本発明のアプタマーにおいてはまた、全てのピリミジンヌクレオチドが、リボースの２’位のフッ素原子が上述した任意の原子又は基、例えば、水素原子、ヒドロキシ基および－Ｏ－Ｍｅ基からなる群より選ばれる同一の原子又は基で置換されているヌクレオチドであり得る。

本発明のアプタマーにおいてはまた、全てのプリンヌクレオチドが、リボースの２’位のヒドロキシ基が上述した任意の原子又は基、例えば、水素原子、フッ素原子および－Ｏ－Ｍｅ基からなる群より選ばれる同一の原子又は基で置換されているヌクレオチドであり得る。

[0052] 好ましい実施態様において、本発明のアプタマーに含まれる各ピリミジンヌクレオチドはいずれも、リボースの２’位においてフッ素原子を含むヌクレオチドであり、かつ各プリンヌクレオチドはいずれも、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である。別の実施態様において、上記各ピリミジンヌクレオチドのリボースの２’位のフッ素原子は、それぞれ独立して水素原子、ヒドロキシ基およびメトキシ基からなる群より選ばれる原子又は基で置換されていてもよく、かつ上記各プリンヌクレオチドのリボースの２’位のヒドロキシ基は、それぞれ独立して水素原子、メトキシ基

およびフッ素原子からなる群より選ばれる原子又は基で置換されていてもよい。

[0053] 尚、本明細書においては、アプタマーを構成するヌクレオチドをＲＮＡと仮定して（すなわち糖基をリボースと仮定して）、ヌクレオチド中の糖基への修飾の態様を説明するが、これは、アプタマーを構成するヌクレオチドからＤＮＡが除外されることを意味するものではなく、適宜ＤＮＡへの修飾として読み替えられる。例えば、アプタマーを構成するヌクレオチドがＤＮＡである場合、リボースの２’位のヒドロキシル基のＸへの置き換えは、デオキシリボースの２’位の水素原子のＸへの置き換えとして読み替えられる。

[0054] 本発明のアプタマーにおいてはまた、ヌクレオチドにおけるリン酸ジエステル結合の１又は数個、例えば、１～２個、１～３個、１～４個、１～５個のヌクレオチドが任意の置換基で修飾もしくは置換されていてもよい。例えば、リン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、アルキルホスホネート結合、ホスホロアミデート結合等に置換されていてもよい。ここで、例えば「ヌクレオチドがホスホロチオエート結合に置換されている」とは、隣接するヌクレオチド間の結合部位にあるリン酸基が硫黄化されている、すなわち、ホスホジエステル結合がホスホロチオエート結合に改変されていることを示す。

[0055] 本発明のアプタマーにおいてはまた、アプタマーを安定化し、その活性を向上させる目的で、１又は数個、例えば、１～２個、１～３個、１～４個、１～５個のヌクレオチドが架橋化核酸Ｂｒｉｄｇｅｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ（ＢＮＡ）又はＬｏｃｋｅｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ（ＬＮＡ）で置換されていてもよい。ここで、「架橋化核酸」とは、核酸の自由度を分子内架橋で拘束することにより、相補配列に対する結合親和性を高め、かつヌクレアーゼ耐性を獲得する構造を持つものをいい、例えば、２’，４’－ＢＮＡ（ＬＮＡ）、２’－Ｏ，４’－Ｃ－ｅｔｈｙｌｅｎｅ－ｂｒｉｄｇｅｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ（ＥＮＡ）などが挙げられるがこれらに限定されない。

[0056] 本発明のアプタマーは、ＩＬ－２１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’位および／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。他にも、４’位の酸素を硫黄に置き換えた４’－ＳＲＮＡ、２’位と４’位とをメチレンを介して架橋したＬＮＡ（Ｌｏｃｋｅｄ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ）、３’位の水酸基をアミノ基に置き換えた３’－Ｎ－ホスホロアミデート核酸などを例として挙げることができる。本発明のアプタマーは、その製造方法からピリミジンヌクレオチドのリボース２’位の酸素原子が一定の修飾をもって製造される場合があり、例えば、Ｔ７　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（自社製）を用いた製造方法を適用した場合、好ましくは全てのピリミジンヌクレオチドのリボース２’位がフルオロ化したアプタマーが製造される。したがって、得られたアプタマーに対しその後このような糖残基の改変を加えることで、塩基配列は同じであるが活性が高められた様々なバリエーションのアプタマーを製造することが可能である。以上のことから、本発明のアプタマーは、好ましくは少なくとも一つのヌクレオチドの糖残基が修飾されたアプタマーであり得る。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）。具体的には、全てのピリミジンヌクレオチドのリボース２’位の水酸基がフルオロ基に置換されたアプタマーをベースに、リボース２’位における水酸基を、水素原子、ヒドロキシル基およびメトキシ基からなる群

より選ばれる原子又は基で置換したアプタマーを製造することができる。

[0057] 好ましい一実施態様において、本発明のアプタマーは、式（１）における１番目のＣにおいて、リボース２’位のヒドロキシ基がフルオロ基で置換されている。あるいは／さらに、式（１）における２番目のＣにおいて、リボース２’位のヒドロキシ基がフルオロ基で置換されている。また、好ましい一実施態様において、本発明のアプタマーは、式（３）：ＧＹＭＣＧにおける４番目のＣにおいて、リボース２’位のヒドロキシ基がフルオロ基で置換されている。

[0058] 本発明のアプタマーはまた、ＩＬ－２１に対する結合性、多量体化の防止、安定性、薬物送達性等を高めるため、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／又は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－ブロモ又は５－ヨード－ウラシルでの置換が挙げられる。また、ヌクレアーゼおよ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）Ｎ（Ｒ）Ｒ’（アミデート）、Ｐ（Ｏ）Ｒ、Ｐ（Ｏ）ＯＲ、ＣＯ又はCH_2（ホルムアセタール）又は３’－アミン（－ＮＨ－CH_2－CH_2－）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’および５’の改変を含んでもよい。

[0059] 改変はさらに、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、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、ビオチンなどを末端に付加することにより行われ得る。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。

[0060] 特に、改変がＰＥＧの末端付加によって行われる場合、ＰＥＧの分子量は特に限定されないが、好ましくは１０００～１００００、より好ましくは３００００～９００００である。ＰＥＧは、直鎖状であってもよいし、二つ以上の鎖に分岐したもの（マルチアームＰＥＧ）であってもよい。ＰＥＧの末端付加は後述するアプタマーの多量体化の防止に有用である。

このようなＰＥＧとしては特に限定されず、当業者であれば市販あるいは公知のＰＥＧを適宜選択して用いることができる（例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｐｅｇ－ｄｒｕｇ．ｃｏｍ／ｐｅｇ＿ｐｒｏｄｕｃｔ／ｂｒａｎｃｈｅｄ．ｈｔｍｌを参照のこと）が、本発明のアプタマーに適用するＰＥＧの好適例として具体的には、分子量４００００の２分岐ＡＳ型（官能基：－CH_2－ＣＯＯ－ＮＨＳ）ＰＥＧ（Ｙ－ＮＨＳ－４０Ｋ　Ｊｅｎｋｅｍ製）、分子量４００００の２分岐ＧＳ型（官能基：－ＣＯ－（CH_2）$_3$－ＣＯＯ－ＮＨＳ）ＰＥＧ（ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ　ＧＬ２－４００ＧＳ　日油製）、分子量４００００の２分岐ＴＳ型（活性基：－ＣＯＯ－ＮＨＳ）ＰＥＧ（ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ　ＧＬ２－４００ＴＳ　日油製）、分子量４００００の４分岐ＴＳ型ＰＥＧ（ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ　ＧＬ４－４００ＴＳ　日油製）、分子量８００００の２分岐ＴＳ型ＰＥＧ（ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ　ＧＬ２－８００ＴＳ　日油製）、又は分子量８００００の４分岐ＴＳ型ＰＥＧ（ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ　ＧＬ４－８００ＴＳ　日油製）などが挙げられる。

[0061] この場合、本発明のアプタマーは、ＰＥＧが末端に直接付加されていてもよいが、その末端にＰＥＧと結合可能な基を有するリンカーなどが付加され、それを介してＰＥＧを本発明のアプタマーに付加することがより好ましい。

[0062] ＰＥＧと本発明に用いられるアプタマーのリンカーとしては特に限定されず、炭素鎖数や官能基などを結合部位やＰＥＧの種類などに応じて適宜選択することができる。このようなリンカーとしては、例えばアミノ基を有するリンカーが挙げられ、具体的には、５’末端に付加する場合は、ｓｓＨ Ｌｉｎｋｅｒ（ＳＡＦＣ）又はＤＭＳ（Ｏ）ＭＴ－ＡＭＩＮＯ－ＭＯＤＩＦＩＥＲ（ＧＬＥＮＲＥＳＥＡＲＣＨ）が、３’末端に付加する場合は、ＴＦＡ Ａｍｉｎｏ Ｃ－６ Ｉｃａａ ＣＰＧ（ＣｈｅｍＧｅｎｅｓ）などが例示される。このリンカーを選択した場合、ＰＥＧには、例えばＮ－ｈｙｄｒｏｘｙｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅの活性基を付加した上で、これをリンカー側のアミノ基と反応させることで、本発明に用いられるアプタマーとＰＥＧとをリンカーを介して結合することができる。

[0063] なおＰＥＧやリンカーとしては、市販のものを好ましく用いることができる。またＰＥＧ、リンカーおよび本発明に用いられるアプタマーの結合に関する反応条件などは、当業者であれば適宜設定することが可能である。

[0064] 本発明のアプタマーは、本明細書中の開示およ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又は削除しない限り、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。

[0065] アプタマーは、ＳＥＬＥＸ法およびその改良法（例えば、Ｅｌｌｉｎｇｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，（１９９０），Ｎａｔｕｒｅ，３４６，８１８－８２２；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、競合物質を使用したりすることで、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、および／又は競合状態を変化させたりすることで、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。

[0066] 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るが、そのことは必ずしも、それらのアプタマーが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。活性部位に結合しないアプタマーはその標的物質の活性に影響を及ぼさない可能性がある。例えば、ＢＩＮＫＬＥＹ ｅｔ ａｌ． Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ． ２３（１６）：３１９８－３２０５ （１９９５）には、ＳＥＬＥＸで得られた神経増殖因子（ＮＧＦ）に結合する数種のアプタマーが開示されているが、それらの中でもＮＧＦに対する親和性の高い３種のアプタマーについて、ＮＧＦとＮＧＦ受容体との結合阻害活性を試験したところ、いずれのアプタマーもＮＧＦとＮＧＦ受容体との結合を阻害しなかった（ＷＯ２０１０／０３５７２５９）。このことは、たとえＳＥＬＥＸ法によってＩＬ－２１に結

合するアプタマーが得られたとしても、ＩＬ－２１とＩＬ－２１受容体との結合を阻害して該受容体を介したシグナル伝達を抑制する活性を有するアプタマーを取得するためには、ＳＥＬＥＸの種々の条件について好適な組み合わせを見つけ出さなければならず、試行錯誤を要することを意味する。尚、ＳＥＬＥＸで得られたＩＬ－２１に対するアプタマーが、ＩＬ－２１の活性（例、ＩＬ－２１受容体との結合活性、ＩＦＮ－γの分泌誘導活性等）を阻害するか否かは、例えば、後記実施例に記載の各種アッセイ法を用いて検証することができる。

[0067] 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。

[0068] ＳＥＬＥＸで得られるアプタマーは８０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、試行錯誤を繰り返し、容易に化学合成ができる長さ（例えば、化学合成ができるのは約６０ヌクレオチド以下であり、より好ましくは約５０ヌクレオチド程度以下、さらに好ましくは４５ヌクレオチド以下）まで短くすることが好ましい。

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。うまくプライマーを設計しないと、ＳＥＬＥＸによって活性のあるアプタマーが選別できたとしても、その後の開発が不可能となる。

[0069] アプタマーは化学合成が可能であるので改変が容易である。アプタマーはＭＦＯＬＤプログラムを用いて二次構造を予測したり、Ｘ線解析やＮＭＲ解析によって立体構造を予測したりすることで、どのヌクレオチドを置換又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ある程度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を既

存のアッセイ系により確認することができる。

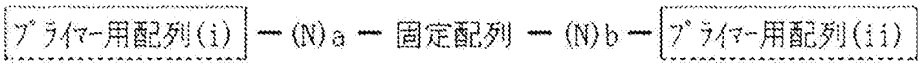
[0070] 得られたアプタマーの標的物質との結合に重要な部分が、上記のような試行錯誤を繰り返すことにより特定できた場合、その配列の両端に新しい配列を付加しても、多くの場合活性は変化しない。そして、新しい配列の長さは特に限定されるものではない。

[0071] さらに、既に述べたように、修飾に関しても配列と同様に高度に設計又は改変可能である。

[0072] 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およ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。

[0073] 例えば、このようなアプタマーの製造方法は、下記：

[0074] [化1]



[0075] 〔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およびＴ（好ましくは、Ａ、Ｇ、Ｃおよび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ー）、およ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。

[0076] 本発明はまた、本発明のアプタマーおよ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、又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、イホスファミド又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、テモゾロミド又はダカルバジンなどのアルキル化剤、メトトレキセート又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、クラドリビン又はフルダラビンなどのプリン類似体、フルオロウラシル、テガフール又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、ビンクリスチン又はビンオレルビンなどのビンカアルカロイドおよびその類似体、エトポシド、タキサン、ドセタキセル又はパクリタキセルなどのポドフィロトキシン誘導体、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシンおよびミトキサントロンなどのアントラサイクリン類および類似体、ブレオマイシンおよ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、カルボプラチンおよ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、イリノテカンおよびビカルタミド）、毒素（例、リシン毒素、リア毒素およびベロ毒素）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

ックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、ＦａｃｔｏｒＸ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。

[0077] 本発明のアプタマー又は複合体は、例えば、医薬又は診断薬、検査薬、試薬として使用され得る。特に、肺高血圧症の治療用又は予防用の医薬、あるいは診断薬、検査薬、試薬として有用である。

[0078] 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－グリコール－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。

[0079] 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。

[0080] また、本発明の医薬は必要により、味のマスキング、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。徐放性製剤の基材としては、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。

[0081] 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、水性およ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、水性およ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、有効成分およ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又はその誘導体等を適宜配合することができる。

[0082] ここで界面活性剤としては、例えばオレイン酸、レシチン、ジエチレングリコールジオレエート、テトラヒドロフルフリルオレエート、エチルオレエート、イソプロピルミリステート、グリセリルトリオレエート、グリセリル

モノラウレート、グリセリルモノオレエート、グリセリルモノステアレート、グリセリルモノリシノエート、セチルアルコール、ステアリルアルコール、ポリエチレングリコール４００、セチルピリジニウムクロリド、ソルビタントリオレエート（商品名Ｓｐａｎ（スパン）８５）、ソルビタンモノオレエート（商品名Ｓｐａｎ（スパン）８０）、ソルビタンモノラウエート（商品名Ｓｐａｎ（スパン）２０）、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（商品名ＨＣＯ－６０）、ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノラウレート（商品名Ｔｗｅｅｎ（ツイーン）２０）、ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノオレエート（商品名Ｔｗｅｅｎ（ツイーン）８０）、天然資源由来のレシチン（商品名Ｅｐｉｃｌｏｎ（エピクロン））、オレイルポリオキシエチレン（２）エーテル（商品名Ｂｒｉｊ（ブリジ）９２）、ステアリルポリオキシエチレン（２）エーテル（商品名Ｂｒｉｊ（ブリジ）７２）、ラウリルポリオキシエチレン（４）エーテル（商品名Ｂｒｉｊ（ブリジ）３０）、オレイルポリオキシエチレン（２）エーテル（商品名Ｇｅｎａｐｏｌ（ゲナポル）０－０２０）、オキシエチレンとオキシプロピレンとのブロック共重合体（商品名Ｓｙｎｐｅｒｏｎｉｃ（シンペロニック））等が挙げられる。Ｓｐａｎ（スパン）、Ｔｗｅｅｎ（ツイーン）、Ｅｐｉｃｌｏｎ（エピクロン）、Ｂｒｉｊ（ブリジ）、Ｇｅｎａｐｏｌ（ゲナポル）およびＳｙｎｐｅｒｏｎｉｃ（シンペロニック）は商標である。

油としては、例えばトウモロコシ油、オリーブ油、綿実油、ヒマワリ油等が挙げられる。また、軟膏剤の場合、適当な医薬上許容される基剤（黄色ワセリン、白色ワセリン、パラフィン、プラスチベース、シリコーン、白色軟膏、ミツロウ、豚油、植物油、親水軟膏、親水ワセリン、精製ラノリン、加水ラノリン、吸水軟膏、親水プラスチベース、マクロゴール軟膏等）を用い、有効成分と混合し製剤化し使用する。

[0083] 吸入剤は常法に従って製造することができる。すなわち、上記本発明のアプタマー又は複合体を粉末又は液状にして、吸入噴射剤および／又は担体中に配合し、適当な吸入容器に充填することにより製造することができる。ま

た上記本発明のアプタマー又は複合体が粉末の場合は通常の機械的粉末吸入器を、液状の場合はネブライザー等の吸入器をそれぞれ使用することもできる。ここで噴射剤としては従来公知のものを広く使用でき、フロン－１１、フロン－１２、フロン－２１、フロン－２２、フロン－１１３、フロン－１１４、フロン－１２３、フロン－１４２ｃ、フロン－１３４ａ、フロン－２２７、フロン－Ｃ３１８、１，１，１，２－テトラフルオロエタン等のフロン系化合物、プロパン、イソブタン、ｎ－ブタン等の炭化水素類、ジエチルエーテル等のエーテル類、窒素ガス、炭酸ガス等の圧縮ガス等を例示できる。

[0084] 本発明の医薬を上記疾患の予防および治療用医薬として用いる場合、本発明の医薬は病変部位に直接投与するだけでなく、上記した他の方法によっても投与することができる。

本発明のアプタマーは１本鎖の核酸であるため、相補配列を含むヌクレオチドの投与による解毒も可能であり、投与後の動態制御が困難な中和抗体より安全性の高い医薬品となる可能性が高い。これは、抗体医薬治療などで起こりうる、体内における抗体の長い滞留時間に起因する感染症の問題を鑑みても極めて有利な点と言える。特に本発明の医薬を上記疾患の予防又は治療用医薬として用いる場合、疾患の重篤性と副作用のリスクとを考えると、体内動態を制御しやすいアプタマーを利用する方がより高い安全性を有する医薬を得られることは明白である。

[0085] 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日あたり有効成分量として約０．０００１～約１００ｍｇ／ｋｇ、例えば約０．０００１～約１０ｍｇ／ｋｇ、好ましくは約０．００５～約１ｍｇ／ｋｇであり得る。

[0086] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0087] 実施例１：ヒトＩＬ－２１に特異的に結合するＲＮＡアプタマーの作製（１）

ヒトＩＬ－２１に特異的に結合するＲＮＡアプタマーはＳＥＬＥＸ法を用いて作製した。ＳＥＬＥＸはＥｌｌｉｎｇｔｏｎらの方法（Ｅｌｌｉｎｇｔｏｎ ａｎｄ Ｓｚｏｓｔａｋ，Ｎａｔｕｒｅ ３４６，８１８－８２２，１９９０）およびＴｕｅｒｋらの方法（Ｔｕｅｒｋ ａｎｄ Ｇｏｌｄ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９，５０５－５１０，１９９０）を参考にして行った。標的物質としてヒトＩＬ－２１（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ社製）ならびにマウスＩＬ－２１（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ社製）を用いた。ヒトＩＬ－２１およびマウスＩＬ－２１をそれぞれ別々にＮＨＳ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ４ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（ＧＥヘルスケア社製）の担体に固相化した。担体へのＩＬ－２１の固相化方法はＧＥヘルスケア社の仕様書に沿って行った。固相化量は、固相化前のＩＬ－２１溶液と固相化直後の上清をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより調べることで確認した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果、上清からはＩＬ－２１のバンドは検出されず、使用したＩＬ－２１のほぼ全てが固相化されたことが確認された。

最初のラウンドで用いたＲＮＡ（３５Ｎ）は、化学合成によって得られたＤＮＡ鋳型をＦｗｄプライマーを用いて２本鎖にし、Ｔ７ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｋｉｔ（自社製）を用いて転写して得た。この方法によって得られたＲＮＡはピリミジンヌクレオチドのリボースの２’位がフルオロ化されたものである。ＤＮＡ鋳型としては、以下に示す３５ヌクレオチドのランダム配列の両端にプライマー配列を持った長さ８４ヌクレオチドのＤＮＡを用いた。ＤＮＡ鋳型とプライマーは化学合成によって作製した。

[0088] ＤＮＡ鋳型：５’－ＡＧＣＧＣＡＧＡＧＣＧＴＣＴＧＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＧＡＡＧＧＴＴＣＴＴＣＴＣＣＣＴＡＴＡＧＴＧＡＧＴＣＧＴＡＴＴＡＧＧ－３’（配列番号４６）

プライマーＦｗｄ：5’－ＣＣＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＧＡＡＧＡＡＣＣＴＴＣ－3’（配列番号４７）

プライマーＲｅｖ：5’－ＡＧＣＧＣＡＧＡＧＣＧＴＣＴＧ－3’（配列番号４８）

[0089] ＤＮＡ鋳型（配列番号４６）中のＮの連続は任意の組み合わせの３５個のヌクレオチド（３５Ｎ：それぞれのＮは、Ａ，Ｃ，Ｇ又はＴである）であり、得られるアプタマー独特の配列領域を生じる。プライマーＦｗｄはＴ７ＲＮＡポリメラーゼのプロモーター配列を含んでいる。

最初のラウンドではヒトＩＬ－２１とマウスＩＬ－２１がそれぞれ固相化してある担体を混合して使用し、その後は２ラウンドずつ交互に使用してＳＥＬＥＸを実施した。ＩＬ－２１が固相化された担体にＲＮＡプールを加え、２０分間３７℃でゆっくりと攪拌しながら保持した後、ＩＬ－２１に結合しないＲＮＡを取り除くために、溶液Ａで樹脂を洗浄した。ここで、溶液Ａは１４５ｍＭ　塩化ナトリウム、５．４ｍＭ　塩化カリウム、１．８ｍＭ　塩化カルシウム、０．８ｍＭ　塩化マグネシウム、２０ｍＭ　トリス（ｐＨ７．６）、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０の混合溶液である。ＩＬ－２１に結合したＲＮＡは、溶出液として６Ｍ　Ｕｒｅａを加えて８５℃で２分間熱処理を行い、その上清から回収した。回収されたＲＮＡは逆転写ＰＣＲで増幅し、Ｔ７　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｋｉｔで転写して次のラウンドのプールとして用いた。以上を１ラウンドとし、同様の作業を複数回繰り返し行った。５ラウンド以降は、樹脂へ弱く結合しているＲＮＡも取り除くために、溶液Ａ’（溶液Ａの１４５ｍＭ　塩化ナトリウムを２９５ｍＭ　塩化ナトリウムに変更した溶液）で樹脂を洗浄した。ＳＥＬＥＸ終了後、次世代シーケンサーを用いて塩基配列の解析を行った。次世代シーケンサーには、Ｉｏｎ　ＰＧＭ™システム（Ｔｈｅｒｍｏ社製）を用い、解析はＴｈｅｒｍｏ社の仕様書に沿って行った。

[0090] ＳＥＬＥＸを９ラウンド実施した後、次世代シーケンサーによって４４，

４２３のクローン配列を特定し、３２，８９１種類の配列に収束していることを確認した。それらのクローンの一部の配列を配列番号１～２に示す。配列番号１で表される配列は１８２配列存在した。配列番号２で表される配列は６９配列存在した。配列番号１と２に存在する共通配列をそれぞれの配列中に下線で示す。なお、各末端の１５塩基はプライマー領域のため配列が共通している。

以下にそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は5’から3’の方向で表すものとし、プリン塩基（ＡおよびG）は2’－ＯＨ体であり、ピリミジン塩基（ＵおよびＣ）は2’－フルオロ修飾体である。また両配列番号で表されるアプタマーの二次構造予測を図１に示す。当該二次構造は、ＭＦＯＬＤプログラム（M．　Ｚｕｋｅｒ，　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．　３１　（１３），　３４０６－３４１５，　２００３）を用いて予測した（図４～６についても同様）。

[0091] 配列番号１：

ＧＧＧＡＧＡＡＧＡＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＵＣＵＧＡＧＣＣＣＡＧＡＣＧＣＵＣＵＧＣＧＣＵ

配列番号２：

ＧＧＧＡＧＡＡＧＡＡＣＣＵＵＣＣＡＣＧＡＣＣＧＡＣＵＡＣＵＧＵＣＡＡＵＧＧＣＣＣＧＵＵＣＵＵＵＧＣＣＣＡＧＡＣＧＣＵＣＵＧＣＧＣＵ

[0092] 配列番号１と２で表されるアプタマーのヒトＩＬ－２１に対する結合活性を表面プラズモン共鳴法により評価した。測定にはＧＥヘルスケア社製のＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００を用いた。センサーチップにはＣＭ基を導入したデキストランが固定化されているＣＭ４チップを用いた。これに、リガンドであるヒトＩＬ－２１を１０００ＲＵ程度固定化した。アナライトとなるＲＮＡは溶液Ａを用いて０．１μＭに調製し、流速２０μＬ／ｍｉｎで６０秒間インジェクトした。ランニングバッファーにも溶液Ａを用いた。

測定の結果、配列番号１と２で表されるアプタマーはヒトＩＬ－２１に結合することが判った。これらのアプタマーがヒトＩＬ－２１に結合する様子を示すセンサーグラムを図２に示す。ネガティブコントロールとして用いたヌクレオチド配列（非ヒトＩＬ－２１アプタマー、５１ｍｅｒ（ＧＧＧＡＡＧＣＵＣＣＧＵＣＧＡＧＣＵＵＵＣＣＵＧＣＡＵＡＡＧＣＵＧＵＡＵＵＧＣＡＧＣＣＡＧＣＡＵＵＵＡ；配列番号４９））はヒトＩＬ－２１との結合が認められなかった。以上のことから、配列番号１と２で表されるアプタマーが配列特異的にヒトＩＬ－２１に結合していることが示された。

[0093] 配列番号１で表されるアプタマーがヒトＩＬ－２１とその受容体ＩＬ－２１Ｒとの結合を阻害するかどうか、表面プラズモン共鳴法により評価した。測定にはＧＥヘルスケア社製のＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００を用いた。センサーチップにはＣＭ基を導入したデキストランが固定化されているＣＭ５チップを用いて、これにＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ（Ｐｉｅｒｃｅ社製）を１５００ＲＵ程度固定化した。リガンドとなるヒトＩＬ－２１Ｒ／Ｆｃキメラタンパク質（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を溶液Ａで０．１μＭに調製し、流速１０μＬ／ｍｉｎで６０秒間インジェクトして、７００ＲＵ程度固定化した。ここに０．０２μＭに調製したヒトＩＬ－２１を流速１０μＬ／ｍｉｎで３０秒間インジェクトすると、３５ＲＵ程度の結合が見られる。この結合がアプタマーによって阻害されるかを評価するため、ヒトＩＬ－２１とアプタマーを混合した溶液を同条件でインジェクトした。該混合溶液は、溶液中のヒトＩＬ－２１濃度が０．０２μＭ、アプタマー濃度が０．２μＭとなるよう、溶液Ａで調製した。ランニングバッファーにも溶液Ａを用いた。

[0094] 測定により得られたセンサーグラムを図３に示す。ヒトＩＬ－２１と配列番号１の混合溶液では受容体ＩＬ－２１Ｒに対する結合が見られず、配列番号１で表されるアプタマーがヒトＩＬ－２１とＩＬ－２１Ｒとの結合を阻害することが示された。

[0095] 配列番号１と２で表されるアプタマーが、細胞評価系のような血液中の環境を模した条件でもヒトＩＬ－２１の機能を阻害するかどうか、下記の細胞

評価系を用いて評価した。ヒトＮＫ（ナチュラルキラー）様細胞株のＮＫ９２細胞（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ社より購入）は、ヒトＩＬ－２１の刺激によりサイトカインの一種であるインターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）を分泌する。ＮＫ９２細胞を添付の仕様書に従って数日間培養した後、標準培地からＩＬ－２（ロシュ社製）を抜いた培地を使用して細胞を継代した。これは、ＩＬ－２によるＩＦＮ－γ分泌を抑制するためである。

一晩培養した後、同様の培地を用いて試験用に１ウェルあたり２ｘ１０^{4}細胞ずつに播種した。そこに、ヒトＩＬ－２１のみ、もしくはヒトＩＬ－２１とアプタマーを混合した溶液を添加して、１６時間培養した。ヒトＩＬ－２１の最終濃度は０．０５ｎＭとなるよう調製した。１６時間後に培養上清を回収して、上清中に含まれるＩＦＮ－γをサンドウィッチＥＬＩＳＡ法により定量した。定量にはＲ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ社製またはＤｉａｃｌｏｎｅ社製のＥＬＩＳＡ　Ｋｉｔを用いた。定量後、下記の式を用いて阻害率を算出した。

[0096] 阻害率（％）＝（$C_{IL-21}-C_{apt}$）／（$C_{IL-21}-C_0$）ｘ１００

[0097] ここで、C_{IL-21}はヒトＩＬ－２１のみを添加した際の単位容量あたりのＩＦＮ－γ濃度であり、C_{apt}はヒトＩＬ－２１とアプタマーの同時添加時のＩＦＮ－γ濃度、C_0はヒトＩＬ－２１非添加時のＩＦＮ－γ濃度である。

[0098] 試験の結果、配列番号１と２で表されるアプタマーはいずれも、ヒトＩＬ－２１刺激によるＮＫ９２細胞からのＩＦＮ－γ分泌を阻害することが判った。ネガティブコントロールとして用いた７２塩基のヌクレオチド配列（非ヒトＩＬ－２１アプタマー、７２ｍｅｒＧＧＧＡＡＧＣＵＣＣＧＵＣＧＡＧＣＵＵＵＣＣＵＧＣＡＵＡＡＧＣＵＧＵＡＵＵＧＣＡＧＣＣＡＧＣＡＵＵＵＡＵＵＧＵＡＣＧＣＣＵＧＣＧＵＡＧＣＵＣＣＵ；（配列番号５０））は阻害活性を示さなかった（阻害率－７．５％）。

[0099] 以上の配列番号１と２で表されるアプタマーの評価結果を、表１にまとめて示す。表１中、結合の“＋＋”は、ＣＭ４チップへ固定化されたヒトＩＬ

－２１に対するアプタマーの結合量（ＲＵ値）が１００以上であることを表す。また、“ｎ．ｄ．”は未測定を表す。

[0100] [表1]

配列番号	長さ	Biacoreでの結合活性	ヒトIL-21とIL-21Rの結合阻害活性	細胞評価系での阻害率（%）（10 nMアプタマー）
1	６５	++	++	８０．８
2	６５	++	n．d．	８２．４

[0101] 配列番号１と２で表されるアプタマーは、ヒトＩＬ－２１に結合してその受容体ＩＬ－２１Ｒとの作用を阻害する。その効果は細胞評価系のような血液中の環境を模した条件でも発揮され、ヒトＩＬ－２１を阻害する優れたアプタマーであることが示された。

[0102] 実施例２：アプタマーの短鎖化（１）

図１で得られた二次構造予測から、配列番号１で表されるアプタマーの短鎖化を行った。短鎖化により作製したアプタマーのヌクレオチド配列を以下に配列番号３～１９として示す。各配列における下線は共通配列（５’末端側から順に、式（２）、式（１）および式（３）に対応する（配列番号６における下線は式（１）に対応する））を示す。

特に言及がなければ、以下に挙げる個々の配列は、５’から３’の方向に表すものとし、プリン塩基（ＡおよびＧ）は２’－ＯＨ体であり、ピリミジン塩基（ＵおよびＣ）は２’－フルオロ修飾体である。

[0103] 配列番号３（配列番号１で表される配列を、５１ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：

ＧＧＧＡＧＡＡＧＡＡ<u>ＣＣＵＵＣ</u>ＡＡＣＡＣＧ<u>ＣＧＡＣＵＡＣＵ</u>ＣＧＵＧＡＵＵ<u>ＧＣＣＣＧ</u>ＵＵＣＵＧＡＧＣＣＣ

配列番号４（配列番号１で表される配列を、４３ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：

ＧＧＡＧＡＡ<u>ＣＣＵＵＣ</u>ＡＡＣＡＣＧ<u>ＣＧＡＣＵＡＣＵ</u>ＣＧＵＧＡＵＵ<u>ＧＣＣＣＧ</u>ＵＵＣＵＣＣ

配列番号５（配列番号１で表される配列を、３７ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

[0104] 配列番号６（配列番号１で表される配列を、２７ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：

ＧＧＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣ

配列番号７（配列番号５で表される配列の３番目と３５番目の塩基からなるＡＵ塩基対を欠失させて、３５ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：

ＧＧＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＣＣ

配列番号８（配列番号７で表される配列の３番目と３３番目の塩基からなるＣＧ塩基対（共通配列中の塩基）をＡＵ塩基対に置換した、３５ヌクレオチドの配列）：

ＧＧＡＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＵＣＣ

配列番号９（配列番号５で表される配列の５番目のＣ（共通配列中の塩基）を欠失させて、３６ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：

ＧＧＡＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号１０（配列番号５で表される配列の６番目のＵ（共通配列中の塩基）を欠失させて、３６ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：

ＧＧＡＣＣＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵ

ＣＣ

[0105] 配列番号１１（配列番号５で表される配列の１５番目のＣ（共通配列中の塩基）を欠失させて、３６ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：
ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号１２（配列番号５で表される配列の１６番目のＧ（共通配列中の塩基）を欠失させて、３６ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：
ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号１３（配列番号５で表される配列の１７番目のＡ（共通配列中の塩基）を欠失させて、３６ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：
ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号１４（配列番号５で表される配列の１８番目のＣ（共通配列中の塩基）を欠失させて、３６ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：
ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号１５（配列番号５で表される配列の１９番目のＵ（共通配列中の塩基）を欠失させて、３６ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：
ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

[0106] 配列番号１６（配列番号５で表される配列の２０番目のＡ（共通配列中の塩基）を欠失させて、３６ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：
ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵ

ＣＣ

配列番号１７（配列番号５で表される配列の２１番目のＣ（共通配列中の塩基）を欠失させて、３６ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：
ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号１８（配列番号５で表される配列の２２番目のＵ（共通配列中の塩基）を欠失させて、３６ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：
ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号１９（配列番号５で表される配列の３１番目のＣ（共通配列中の塩基）を欠失させて、３６ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）：
ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＧＵＣＣ

[0107] これらのアプタマーがヒトＩＬ－２１に結合してその機能を阻害するか、実施例１と同様の方法で評価した。アプタマーは、二本鎖ＤＮＡを鋳型として転写により得た。その結果を表２に示す。表中、Ｂｉａｃｏｒｅでの結合活性における“＋＋”は結合量（ＲＵ値）が１００以上、“＋”は結合量が２０以上で１００未満、“－”は結合量が２０未満であることを表す。阻害活性の“＋”は細胞評価系における阻害率（％）において濃度１０ｎＭのアプタマーで２０％以上阻害したことを示し、基準に満たないものを“－”で示す。また、“ｎ．ｄ．”は未測定を表す。

[0108]

[表2]

配列番号	長さ	Biacoreでの結合活性	細胞評価系での阻害率（%）（10 nMアプタマー）	阻害活性
3	51	++	83．5	+
4	43	++	75．8	+
5	37	++	65．1	+
6	27	−	15．5	−
7	35	++	58．3	+
8	35	n．d．	8．3	−
9	36	n．d．	−6．4	−
10	36	n．d．	−4．2	−
11	36	n．d．	−1．0	−
12	36	n．d．	−7．6	−
13	36	n．d．	−14．0	−
14	36	+	13．3	−
15	36	+	10．7	−
16	36	+	10．7	−
17	36	−	7．4	−
18	36	n．d．	−6．5	−
19	36	n．d．	−9．8	−

[0109] 細胞評価系で阻害活性を示した配列番号３～５および７で表されるアプタマーの二次構造予測を図４に示す。これらの結果から、配列番号１で表されるアプタマーから末端側を欠失させて３７塩基まで短鎖化しても、活性を維持できることが判った。加えて、配列番号７で表されるアプタマーの結果から、配列番号５で表される３７塩基のアプタマーからは３番目と３５番目からなるＡＵ塩基対の欠失により３５塩基まで短鎖化可能であることが示された。

一方、配列番号８で表されるアプタマーの結果から、共通配列中の塩基同士からなるＣＧ塩基対をＡＵ塩基対に置換すると、活性が大幅に低下することが示された。さらに、共通配列中の塩基を一塩基ずつ欠失させた配列番号９～１９で表されるアプタマーの結果から、共通配列部分は一塩基でも欠失すると阻害活性が大幅に低下することが示された。したがって、本実施例から共通配列部分の重要性が示された。

[0110] 実施例３：アプタマーの改変と末端修飾の検討（１）

配列番号４で表されるアプタマー（ピリミジンヌクレオチドのリボースの２’位はフルオロ化されている）のヌクレアーゼ耐性を高めるために、３’末端へｉｄＴを付加して、２’－Ｏ－メチル基を導入した改変体を作製した。改変を施した配列を配列番号４（１）～４（１３）に示す。

また、アプタマーの５’末端への修飾が可能か調べるため、配列番号４と５および５をさらに短鎖化した配列の５’末端にＰＥＧを付加した修飾体を作製した。これらを配列番号４（１４）、５（１）、２０、２１に示す。

[0111] 以下に配列番号４（１）～４（１４）、５（１）、２０、２１で表されるアプタマーそれぞれのヌクレオチド配列を修飾と共に示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、５’から３’の方向で表すものとし、大文字はＲＮＡを示す。ヌクレオチドにおける括弧はリボースの２’位の修飾を示し、Ｆはフッ素原子、ＭはＯ－メチル基を示す。配列末端におけるｉｄＴはｉｎｖｅｒｔｅｄ－ｄＴによる修飾を示し、ＰＥＧは４０ｋＤａの分岐型ポリエチレングリコールによる修飾を示す。また各配列における下線は共通配列（５’末端側から順に、式（２）、式（１）および式（３）に対応する）を示し、［　］は２’－Ｏ－メチル修飾の導入など、その配列番号において修飾や変異を導入した塩基を示す。

[0112] 配列番号４（１）（配列番号４で表される配列の３’末端にｉｄＴを付加した配列）：

ＧＧＡＧＡＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号４（２）（配列番号４で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：

ＧＧＡＧＡＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）［Ａ（Ｍ）］ＡＣ

（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号４（３）（配列番号４で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＧＡＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ［Ａ（Ｍ）］Ｃ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号４（４）（配列番号４で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＧＡＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）［Ａ（Ｍ）］Ｃ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号４（５）（配列番号４で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＧＡＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）［Ｇ（Ｍ）］Ｃ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

[0113] 配列番号４（６）（配列番号４で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＧＡＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）［Ｇ（Ｍ）］ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（

Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号４（７）（配列番号４で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＧＡＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｇ［Ａ（Ｍ）］Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号４（８）（配列番号４で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＧＡＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）［Ａ（Ｍ）］Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号４（９）（配列番号４で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＧＡＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）［Ｇ（Ｍ）］Ｕ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号４（１０）（配列番号４で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＧＡＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（

Ｆ）［Ｇ（Ｍ）］ＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

[0114] 配列番号４（１１）（配列番号４で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＧＡＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｇ［Ａ（Ｍ）］Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号４（１２）（配列番号４で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＧＡＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）［Ｇ（Ｍ）］Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号４（１３）（配列番号４で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＧＡＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）［Ｇ（Ｍ）］Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号４（１４）（配列番号４で表される配列の５’末端にＰＥＧ、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＰＥＧ－ＧＧＡＧＡＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）

Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

[0115] 配列番号５（１）（配列番号５で表される配列の５’末端にＰＥＧ、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：

ＰＥＧ－ＧＧＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号２０（配列番号５で表される配列の各末端の塩基からなるＧＣ塩基対を欠失させて短鎖化した３５塩基に、５’末端へＰＥＧ、３’末端へｉｄＴを付加した配列）：

ＰＥＧ－ＧＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号２１（配列番号２０で表される配列の各末端の塩基からなるＧＣ塩基対を欠失させて短鎖化した３３塩基に、５’末端へＰＥＧ、３’末端へｉｄＴを付加した配列）：

ＰＥＧ－ＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）－ｉｄＴ

[0116] これらのアプタマーがヒトＩＬ－２１に結合してその機能を阻害するか、アプタマーを化学合成により作製し、実施例１と同様の方法で評価した。細胞評価系での阻害評価は核酸最終濃度１ｎＭおよび０．２ｎＭで実施した。その結果を表３に示す。表中、Ｂｉａｃｏｒｅでの結合活性における“＋＋”は、ＣＭ４チップへ固定化されたヒトＩＬ－２１に対するアプタマーの結合量（ＲＵ値）が１００以上であることを表す。阻害活性における“＋”は

１ｎＭで４０％以上阻害かつ０．２ｎＭで１５％以上阻害したことを示し、基準に満たないものを“－”で示す。表中、“ｎ．ｄ．”は未測定を表す。

[0117] [表3]

配列番号	長さ	Biacoreでの結合活性	細胞評価系での阻害率（%）		阻害活性
			1 nMアプタマー	0.2 nMアプタマー	
4（1）	43	++	69．3	28．6	+
4（2）	43	n．d．	63．6	28．9	+
4（3）	43	n．d．	79．7	43．2	+
4（4）	43	n．d．	69．5	23．8	+
4（5）	43	n．d．	67．4	28．4	+
4（6）	43	n．d．	49．7	18．3	+
4（7）	43	n．d．	22．0	2．3	－
4（8）	43	++	81．1	47．4	+
4（9）	43	n．d．	72．3	29．5	+
4（10）	43	n．d．	73．0	40．0	+
4（11）	43	n．d．	72．0	39．0	+
4（12）	43	n．d．	58．8	25．6	+
4（13）	43	n．d．	72．3	35．6	+
4（14）	43	++	79．7	53．6	+
5（1）	37	++	86．5	62．1	+
20	35	++	78．9	50．9	+
21	33	++	40．6	24．4	+

[0118] これらの結果から、本発明のアプタマーの３’末端にｉｄＴを付加することが可能であることが示された。実施例２で行った配列番号４の転写品の阻害活性よりも本実施例での配列番号４（１）の合成品での阻害活性が高くなっており、これは化学合成によって目的とする核酸配列の純度が高まったことと、ｉｄＴの付加によって３’エキソヌクレアーゼによる分解への耐性が向上したためと考えられる。

[0119] またこれらの結果から、配列番号４（２）～（１３）で表されるアプタマーの内、配列番号４（７）を除く全てのアプタマーがヒトＩＬ－２１に対する阻害活性を保持しており、様々な箇所の塩基に２’－Ｏ－メチル修飾を導入しても機能することも判った。配列番号４（３）や４（８）では配列番号

４（１）で表されるアプタマーよりも阻害活性が向上した。

一方で、共通配列（ＣＧＡＣＵＡＣＵ：式（１））中の３番目のＡを２’－Ｏ－メチル修飾した配列番号４（７）で表されるアプタマーは、阻害活性が低下した。

[0120] 配列番号４（１４）、５（１）、２０および２１で表されるアプタマーの結果から、５’末端のＰＥＧ修飾が可能であることが示された。配列番号２０と２１で表されるアプタマーの結果から、配列番号５（１）から末端を１塩基対欠失させた３５塩基では阻害活性が維持されており、末端を２塩基対欠失させた３３塩基でも阻害活性を有していることが示された。

[0121] 実施例４：アプタマーの改変（２）

配列番号５で表されるアプタマー（ピリミジンヌクレオチドのリボースの２’位はフルオロ化されている）のヌクレアーゼ耐性を高めるために、２’－Ｏ－メチル基を導入した改変体を作製した。作製した改変体のヌクレオチド配列を、以下に配列番号５（２）～５（１８）として修飾と共に示す。

また、配列を最適化するため、配列の一部を置換した改変体を作製した。配列置換により作製した改変体のヌクレオチド配列を、以下に配列番号２２、２３として修飾とともに示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、５’から３’の方向で表すものとし、大文字はＲＮＡを示す。ヌクレオチドにおける括弧はリボースの２’位の修飾を示し、Ｆはフッ素原子、ＭはＯ－メチル基を示す。配列末端におけるｉｄＴはｉｎｖｅｒｔｅｄ－ｄＴによる修飾を示す。また各配列における下線は共通配列（５’末端側から順に、式（２）、式（１）および式（３）に対応する）を示し、［ ］は２’－Ｏ－メチル修飾の導入など、その直近の配列番号に対して新たに修飾や変異を導入した塩基を示す。

[0122] 配列番号５（２）（配列番号５で表される配列の３’末端にｉｄＴを付加した配列）：

ＧＧＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｇ

ＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号５（３）（配列番号５で表される配列に、配列番号４（３）、（８）～（１１）、（１３）の２’－Ｏ－メチル修飾を反映させる様に修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ［Ａ（Ｍ）］Ｃ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）［Ａ（Ｍ）］Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）［Ｇ（Ｍ）］Ｕ（Ｆ）［Ｇ（Ｍ）］［Ａ（Ｍ）］Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）［Ｇ（Ｍ）］Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

[0123] 配列番号２２（配列番号５（３）で表される配列の１７番目のＡ（共通配列中の塩基）をＧに置換した配列）：
ＧＧＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｇ［Ｇ］Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

[0124] 配列番号５（４）（配列番号５（３）で表される配列に、配列番号４（４）の２’－Ｏ－メチル修飾を反映させる様に修飾を導入した配列）：
ＧＧＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）［Ａ（Ｍ）］Ｃ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号５（５）（配列番号５（４）で表される配列に、配列番号４（５）の２’－Ｏ－メチル修飾を反映させる様に修飾を導入した配列）：
ＧＧＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）［Ｇ（Ｍ）］Ｃ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）

U（F）C（F）G（M）U（F）G（M）A（M）U（F）U（F）GC（F）C（F）C（F）G（M）U（F）C（F）C（F）－ｉｄＴ

配列番号５（６）（配列番号５（５）で表される配列に、配列番号４（２）の２’－Ｏ－メチル修飾を反映させる様に修飾を導入した配列）：
ＧＧＡC（F）C（F）U（F）U（F）C（F）［A（M）］A（M）C（F）A（M）C（F）G（M）C（F）GAC（F）U（F）A（M）C（F）U（F）C（F）G（M）U（F）G（M）A（M）U（F）U（F）GC（F）C（F）C（F）G（M）U（F）C（F）C（F）－ｉｄＴ

配列番号５（７）（配列番号５（６）で表される配列に、配列番号４（１２）の２’－Ｏ－メチル修飾を反映させる様に修飾を導入した配列）：
ＧＧＡC（F）C（F）U（F）U（F）C（F）A（M）A（M）C（F）A（M）C（F）G（M）C（F）GAC（F）U（F）A（M）C（F）U（F）C（F）G（M）U（F）G（M）A（M）U（F）U（F）［G（M）］C（F）C（F）C（F）G（M）U（F）C（F）C（F）－ｉｄＴ

配列番号５（８）（配列番号５（３）で表される配列の両末端３塩基ずつ（３塩基対）に２’－Ｏ－メチル修飾を導入した配列）：
［G（M）］［G（M）］［A（M）］C（F）C（F）U（F）U（F）C（F）AA（M）C（F）AC（F）GC（F）GAC（F）U（F）A（M）C（F）U（F）C（F）G（M）U（F）G（M）A（M）U（F）U（F）GC（F）C（F）C（F）G（M）［U（M）］［C（M）］［C（M）］－ｉｄＴ

[0125] 配列番号２３（配列番号５（８）で表される配列の２番目と３６番目の塩基からなるＧＣ塩基対をＡＵ塩基対に置換した配列）：
G（M）［A（M）］A（M）C（F）C（F）U（F）U（F）C（F）

ＡＡ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）［Ｕ（Ｍ）］Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

[0126] 配列番号５（９）（配列番号５で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡ［Ｃ（Ｍ）］Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号５（１０）（配列番号５で表される配列の二か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡ［Ｃ（Ｍ）］Ａ［Ｃ（Ｍ）］ＧＣ（Ｆ）ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号５（１１）（配列番号５で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｇ［Ｃ（Ｍ）］ＧＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）ＧＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）－ｉｄＴ

配列番号５（１２）（配列番号５で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡＣ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）

GC（F）GA［C（M）］U（F）AC（F）U（F）C（F）GU（F）GAU（F）U（F）GC（F）C（F）C（F）GU（F）C（F）C（F）－idT

配列番号５（１３）（配列番号５で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
GGAC（F）C（F）U（F）U（F）C（F）AAC（F）AC（F）GC（F）GAC（F）［U（M）］AC（F）U（F）C（F）GU（F）GAU（F）U（F）GC（F）C（F）C（F）GU（F）C（F）C（F）－idT

配列番号５（１４）（配列番号５で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
GGAC（F）C（F）U（F）U（F）C（F）AAC（F）AC（F）GC（F）GAC（F）U（F）A［C（M）］U（F）C（F）GU（F）GAU（F）U（F）GC（F）C（F）C（F）GU（F）C（F）C（F）－idT

配列番号５（１５）（配列番号５で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
GGAC（F）C（F）U（F）U（F）C（F）AAC（F）AC（F）GC（F）GAC（F）U（F）AC（F）U（F）C（F）G［U（M）］GAU（F）U（F）GC（F）C（F）C（F）GU（F）C（F）C（F）－idT

配列番号５（１６）（配列番号５で表される配列の二か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
GGAC（F）C（F）U（F）U（F）C（F）AAC（F）AC（F）

GC（F）GAC（F）U（F）AC（F）U（F）C（F）GU（F）GA［U（M）］［U（M）］GC（F）C（F）C（F）GU（F）C（F）C（F）－ｉｄＴ

配列番号５（１７）（配列番号５で表される配列の二か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡC（F）C（F）U（F）U（F）C（F）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）GC（F）GAC（F）U（F）AC（F）U（F）C（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）G［C（M）］［C（M）］C（F）GU（F）C（F）C（F）－ｉｄＴ

配列番号５（１８）（配列番号５で表される配列の一か所に２’－Ｏ－メチル修飾を導入し、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：
ＧＧＡC（F）C（F）U（F）U（F）C（F）ＡＡＣ（Ｆ）ＡＣ（Ｆ）GC（F）GAC（F）U（F）AC（F）U（F）C（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）ＧＡＵ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）GC（F）C（F）［C（M）］GU（F）C（F）C（Ｆ）－ｉｄＴ

[0127] これらのアプタマーがヒトＩＬ－２１に結合してその機能を阻害するか、アプタマーを化学合成により作製し、実施例１と同様の方法で評価した。細胞評価系での阻害評価は核酸最終濃度１ｎＭおよび０．２ｎＭで実施した。その結果を表４に示す。表中、Ｂｉａｃｏｒｅでの結合の“＋＋”は、ＣＭ４チップへ固定化されたヒトＩＬ－２１に対するアプタマーの結合量（ＲＵ値）が１００以上であることを表す。阻害の“＋”は１ｎＭで４０％以上阻害かつ０．２ｎＭで１５％以上阻害したことを示し、基準に満たないものを“－”で示す。表中、“ｎ．ｄ．”は未測定を表す。

[0128]

[表4]

配列番号	長さ	Biacoreでの結合活性	細胞評価系での阻害率（%）		阻害活性
			1 nMアプタマー	0.2 nMアプタマー	
5（2）	37	++	51．2	19．5	+
5（3）	37	n．d．	78．6	50．3	+
22	37	n．d．	86．1	63．1	+
5（4）	37	n．d．	80．9	51．2	+
5（5）	37	n．d．	84．1	59．0	+
5（6）	37	n．d．	83．9	56．3	+
5（7）	37	++	76．5	49．0	+
5（8）	37	n．d．	80．9	55．3	+
23	37	n．d．	76．8	50．6	+
5（9）	37	n．d．	44．3	23．2	+
5（10）	37	n．d．	56．2	32．4	+
5（11）	37	n．d．	17．6	11．9	−
5（12）	37	n．d．	20．1	9．5	−
5（13）	37	n．d．	31．8	14．9	−
5（14）	37	n．d．	66．0	40．1	+
5（15）	37	n．d．	63．8	37．1	+
5（16）	37	n．d．	52．3	29．4	+
5（17）	37	++	85．8	59．8	+
5（18）	37	n．d．	13．9	8．6	−

[0129] 配列番号５（３）～５（７）で表されるアプタマーの結果から、配列番号４で表されるアプタマーで一塩基ずつ導入した２’－Ｏ－メチル修飾は、組み合わせて導入してもアプタマーの阻害活性に影響がなく、むしろ活性が向上することが判った。新たに２’－Ｏ－メチル修飾を検討した箇所については、配列番号５（９）～５（１０）および５（１４）～５（１７）で表されるアプタマーでは活性が維持又は向上することが示された。

一方で、配列番号５（１１）～５（１３）および５（１８）で表されるアプタマーの阻害活性が低下した。実施例３の結果と合わせると、配列番号５で表されるアプタマーの１５番目から１９番目の塩基（ＣＧＡＣＵ）が２’－Ｏ－メチル修飾により活性低下していることになる。この配列は共通配列（ＣＧＡＣＵＡＣＵ：式（１））の一部であり、本実施例の結果からも、共通配列部分が阻害活性に重要であることが示された。

配列番号２２で表されるアプタマーでは配列番号５の共通配列（ＣＧＡＣＵＡＣＵ：式（１））中の３番目のＡをＧに置換したが、この塩基置換は阻害活性に影響しないことが判った。また、この塩基置換によりアプタマーの二次構造予測が変化した。配列番号２２で表されるアプタマーの二次構造予測を図５に示す。配列番号２３で表されるアプタマーの結果から、配列番号５で表される配列の２番目と３６番目の塩基からなるＧＣ塩基対をＡＵ塩基対に置換しても活性に影響しないことが判った。

[0130] 実施例５：アプタマーの改変（３）

配列番号２２で表されるアプタマーのヌクレアーゼ耐性を高めるために、２’－Ｏ－メチル基を導入した改変体、一部の塩基をＲＮＡからＤＮＡに置換した改変体を作製した。作製した改変体を配列番号２２（１）～２２（１４）に示す。これらの内から配列番号２２（２）については５’末端のＰＥＧ修飾を実施し、さらにその配列を２塩基短鎖化して同様の末端修飾を施した改変体も作製した。これらを配列番号２２（１５）、２４に示す。

[0131] 以下に配列番号２２（１）～２２（１５）、２４で表されるアプタマーそれぞれのヌクレオチド配列を修飾と共に示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、５’から３’の方向で表すものとし、大文字はＲＮＡを示し、小文字はＤＮＡを示す。ヌクレオチドにおける括弧はリボースの２’位の修飾を示し、Ｆはフッ素原子、ＭはＯ－メチル基を示す。配列末端におけるｉｄＴはｉｎｖｅｒｔｅｄ－ｄＴによる修飾を示し、ＰＥＧは４０ｋＤａの分岐型ポリエチレングリコールによる修飾を示す。また各配列における下線は共通配列（５’末端側から順に、式（２）、式（１）および式（３）に対応する）を示し、［　］は２’－Ｏ－メチル修飾の導入など、その直近の配列番号に対して新たに修飾や変異を導入した塩基を示す。

[0132] 配列番号２２（１）（配列番号２２で表される配列に、配列番号５（７）、（８）、（１２）、（１６）、（１８）、（２０）の２’－Ｏ－メチル修飾を組み合わせて反映させる様に修飾を導入した配列）：

［Ｇ（Ｍ）］［Ｇ（Ｍ）］［Ａ（Ｍ）］Ｃ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）

C（F）［A（M）］A（M）［C（M）］［A（M）］［C（M）］［G（M）］C（F）GGC（F）U（F）A（M）［C（M）］U（F）C（F）G（M）［U（M）］G（M）A（M）U（F）U（F）［G（M）］［C（M）］［C（M）］C（F）G（M）［U（M）］［C（M）］［C（M）］－ｉｄＴ

配列番号２２（２）（配列番号２２（１）で表される配列に、配列番号５（９）、（１９）の2’－Ｏ－メチル修飾を反映させる様に修飾を導入した配列）：
G（M）G（M）A（M）［C（M）］C（F）U（F）U（F）C（F）A（M）A（M）C（M）A（M）C（M）G（M）C（F）GGC（F）U（F）A（M）C（M）U（F）C（F）G（M）U（M）G（M）A（M）［U（M）］［U（M）］G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号２２（３）（配列番号２２（１）で表される配列で2’位がフルオロ化されている内、一か所に2’－Ｏ－メチル修飾を導入した配列）：
G（M）G（M）A（M）C（F）［C（M）］U（F）U（F）C（F）A（M）A（M）C（M）A（M）C（M）G（M）C（F）GGC（F）U（F）A（M）C（M）U（F）C（F）G（M）U（M）G（M）A（M）U（F）U（F）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号２２（４）（配列番号２２（１）で表される配列で2’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所に2’－Ｏ－メチル修飾を導入した配列）：
G（M）G（M）A（M）C（F）C（F）［U（M）］U（F）C（F）A（M）A（M）C（M）A（M）C（M）G（M）C（F）GGC（F）

U（F）A（M）C（M）U（F）C（F）G（M）U（M）G（M）A（M）U（F）U（F）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号２２（５）（配列番号２２（１）で表される配列で2’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所に2’－Ｏ－メチル修飾を導入した配列）：

G（M）G（M）A（M）C（F）C（F）U（F）［U（M）］C（F）A（M）A（M）C（M）A（M）C（M）G（M）C（F）GGC（F）U（F）A（M）C（M）U（F）C（F）G（M）U（M）G（M）A（M）U（F）U（F）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号２２（６）（配列番号２２（１）で表される配列で2’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所に2’－Ｏ－メチル修飾を導入した配列）：

G（M）G（M）A（M）C（F）C（F）U（F）U（F）［C（M）］A（M）A（M）C（M）A（M）C（M）G（M）C（F）GGC（F）U（F）A（M）C（M）U（F）C（F）G（M）U（M）G（M）A（M）U（F）U（F）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号２２（７）（配列番号２２（１）で表される配列で2’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所に2’－Ｏ－メチル修飾を導入した配列）：

G（M）G（M）A（M）C（F）C（F）U（F）U（F）C（F）A（M）A（M）C（M）A（M）C（M）G（M）C（F）GGC（F）U（F）A（M）C（M）［U（M）］C（F）G（M）U（M）G（M）A（

M）U（F）U（F）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号２２（８）（配列番号２２（１）で表される配列で2’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所に2’－Ｏ－メチル修飾を導入した配列）：

G（M）G（M）A（M）C（F）C（F）U（F）U（F）C（F）A（M）A（M）C（M）A（M）C（M）G（M）C（F）GGC（F）U（F）A（M）C（M）U（F）［C（M）］G（M）U（M）G（M）A（M）U（F）U（F）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号２２（９）（配列番号２２（２）で表される配列に、配列番号２２（４）、（６）、（８）の2’－Ｏ－メチル修飾を組み合わせて反映させる様に修飾を導入した配列）：

G（M）G（M）A（M）C（M）C（F）［U（M）］U（F）［C（M）］A（M）A（M）C（M）A（M）C（M）G（M）C（F）GGC（F）U（F）A（M）C（M）U（F）［C（M）］G（M）U（M）G（M）A（M）U（M）U（M）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号２２（１０）（配列番号２２（９）で表される配列の未修飾のＲＮＡの一ヶ所に、2’－Ｏ－メチル修飾を導入した配列）：

G（M）G（M）A（M）C（M）C（F）U（M）U（F）C（M）A（M）A（M）C（M）A（M）C（M）G（M）C（F）［G（M）］GC（F）U（F）A（M）C（M）U（F）C（M）G（M）U（M）G（M）A（M）U（M）U（M）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号２２（１１）（配列番号２２（１０）で表される配列に、配列番号２２（３）、（５）の2’－Ｏ－メチル修飾を組み合わせて反映させる様に修飾を導入した配列）：
Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）［Ｃ（Ｍ）］Ｕ（Ｍ）［Ｕ（Ｍ）］Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）ＧＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

配列番号２２（１２）（配列番号２２（２）で表される配列中の未修飾のＲＮＡの一ヶ所を、ＤＮＡに置換した配列）：
Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）［ｇ］ＧＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

配列番号２２（１３）（配列番号２２（２）で表される配列中の未修飾のＲＮＡの一ヶ所を、ＤＮＡに置換した配列）：
Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ［ｇ］Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

配列番号２２（１４）（配列番号２２（２）で表される配列中の未修飾のＲＮＡの二ヶ所を、ＤＮＡに置換した配列）：

Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）［ｇ］［ｇ］Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

配列番号２２（１５）（配列番号２２（２）で表される配列の５’末端へＰＥＧを付加した配列）：
ＰＥＧ－Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）ＧＧＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

配列番号２４（配列番号２２（１５）で表される配列の、両末端を一塩基ずつ欠失させて３５塩基に短鎖化し、同様の末端修飾を施した配列）：
ＰＥＧ－Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）ＧＧＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

[0133] これらのアプタマーがヒトＩＬ－２１に結合してその機能を阻害するか、アプタマーを化学合成により作製し、実施例１と同様の方法で評価した。細胞評価系での阻害評価は核酸最終濃度１ｎＭおよび０．２ｎＭで実施した。その結果を表５に示す。表中、Ｂｉａｃｏｒｅでの結合の“＋＋”は、ＣＭ４チップへ固定化されたヒトＩＬ－２１に対するアプタマーの結合量（ＲＵ値）が１００以上であることを表す。阻害の“＋”は１ｎＭで４０％以上阻害かつ０．２ｎＭで１５％以上阻害したことを示し、基準に満たないものを

“－”で示す。表中、“ｎ．ｄ．”は未測定を表す。

[0134] [表5]

配列番号	長さ	Biacoreでの結合活性	細胞評価系での阻害率（%）		阻害活性
			1 nMアプタマー	0.2 nMアプタマー	
２２（１）	３７	＋＋	１００．０	１００．０	＋
２２（２）	３７	＋＋	１００．０	１００．０	＋
２２（３）	３７	＋＋	１００．０	７３．６	＋
２２（４）	３７	＋＋	１００．０	９２．５	＋
２２（５）	３７	＋＋	７７．５	３９．５	＋
２２（６）	３７	＋＋	１００．０	９９．３	＋
２２（７）	３７	＋＋	１０．５	－７．６	－
２２（８）	３７	＋＋	１００．０	８７．７	＋
２２（９）	３７	＋	８４．４	５０．０	＋
２２（１０）	３７	＋	７０．２	２９．１	＋
２２（１１）	３７	－	－１１．５	ｎ．ｄ．	－
２２（１２）	３７	＋＋	１００．０	９９．７	＋
２２（１３）	３７	＋＋	９８．６	８１．２	＋
２２（１４）	３７	＋＋	９０．６	６０．３	＋
２２（１５）	３７	＋＋	１００．０	１００．０	＋
２４	３５	＋＋	１００．０	９９．０	＋

[0135] 配列番号２２（１）と２２（２）で表されるアプタマーを評価した結果、実施例４で一塩基ずつ検討した２’－Ｏ－メチル修飾を組み合わせることで、さらに阻害活性が向上していた。配列番号２２（７）で表されるアプタマーの結果から、共通配列（ＣＧＧＣＵＡＣＵ：式（１））の８番目のＵは２’－Ｏ－メチル修飾により活性が低下することが判った。

配列番号２２（３）～２２（６）で表されるアプタマーで修飾を検討した配列（ＣＵＵＣ（共通配列：式（２）の一部））については、一塩基ずつ修飾した際には活性に大きな影響はなかったが、配列番号２２（１１）で表されるアプタマーのように四塩基全てに修飾を導入するとＩＬ－２１への結合活性が消失することが判った。

[0136] 配列番号２２（１２）～２２（１４）で表されるアプタマーの結果から、共通配列（ＣＧＧＣＵＡＣＵ：式（１））の２番目のＧおよび３番目のＧはＤＮＡであっても機能することが判った。

配列番号２２（１５）で表されるアプタマーの結果から、５’末端にＰＥＧを修飾しても活性に影響はなく、さらにこのアプタマーの末端を１塩基対短鎖化して３５塩基にした配列番号２４で表されるアプタマーも活性を維持していることが判った。

[0137] 実施例６：ヒトＩＬ－２１に特異的に結合するＲＮＡアプタマーの作製（２）

ランダム配列とプライマー配列が実施例１で用いたものとは異なる鋳型を用いて、実施例１と同様のＳＥＬＥＸを行った。標的物質としてＮＨＳ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥヘルスケア社製）の担体に固相化したヒトＩＬ－２１（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ社製）を用いた。使用した鋳型とプライマーの配列を以下に示す。ＤＮＡ鋳型とプライマーは化学合成により作製した。鋳型ＤＮＡには配列番号４の配列を基に変異が導入されている。

[0138] ＤＮＡ鋳型：５’－ＧＣＡＧＡＧＣＴＣＧＴＧＣＴＣ（Ａ）（Ｇ）（Ａ）（Ａ）（Ｃ）（Ｇ）（Ｇ）（Ｇ）（Ｃ）（Ａ）（Ａ）（Ｔ）（Ｃ）（Ａ）（Ｃ）（Ｇ）（Ａ）（Ｇ）（Ｔ）（Ａ）（Ｇ）（Ｔ）（Ｃ）（Ｇ）（Ｃ）（Ｇ）（Ｔ）（Ｇ）（Ｔ）（Ｔ）（Ｇ）（Ａ）（Ａ）（Ｇ）（Ｇ）（Ｔ）（Ｔ）（Ｃ）（Ｔ）ＴＣＴＣＡＣＴＧＴＧＡＧＣＣＣ－３’（配列番号５１）

プライマーＦｗｄ：５’－ＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＣＴＣＡＣＡＧＴＧＡＧＡ－３’（配列番号５２）

プライマーＲｅｖ：５’－ＧＣＡＧＡＧＣＴＣＧＴＧＣＴＣ－３’（配列番号５３）

ＤＮＡ鋳型（配列番号５１）中の括弧は変異導入を表しており、括弧内に示されたヌクレオチドが７６％、その他の３種類のヌクレオチドが各８％ずつ含まれるようにデザインされている。プライマーＦｗｄはＴ７　ＲＮＡポリメラーゼのプロモーター配列を含んでいる。

[0139] ヒトＩＬ－２１が固相化された担体にＲＮＡプールを加え、２０分間３７℃でゆっくりと攪拌しながら保持した後、ヒトＩＬ－２１に結合しないＲＮＡを取り除くために、溶液Ａで樹脂を洗浄した。ここで溶液Ａは１４５ｍＭ　塩化ナトリウム、５．４ｍＭ　塩化カリウム、１．８ｍＭ　塩化カルシウム、０．８ｍＭ　塩化マグネシウム、２０ｍＭ　トリス（ｐＨ７．６）、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０の混合溶液である。ヒトＩＬ－２１に結合したＲＮＡは、超純水（ＥＬＧＡ水）を加えて９０℃で２分間熱処理を行い、その上清から回収した。回収されたＲＮＡは逆転写ＰＣＲで増幅し、Ｔ７　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｋｉｔで転写して次のラウンドのプールとして用いた。以上を１ラウンドとし、同様の作業を複数回繰り返し行った。４ラウンド以降は、樹脂へ弱く結合しているＲＮＡも取り除くために、溶液Ａ’（溶液Ａの１４５ｍＭ　塩化ナトリウムを２９５ｍＭ　塩化ナトリウムに変更した溶液）で樹脂を洗浄した。ＳＥＬＥＸ終了後、次世代シーケンサーを用いて塩基配列の解析を行った。次世代シーケンサーには、Ｉｏｎ　ＰＧＭ™システム（Ｔｈｅｒｍｏ社製）を用い、解析はＴｈｅｒｍｏ社の仕様書に沿って行った。

[0140] ＳＥＬＥＸを６ラウンド実施した後、次世代シーケンサーによって５４６，９５４のクローン配列を特定し、６７，０１３種類の配列に収束していることを確認した。この時、元となった配列番号４の配列を含むクローンは２，７６５配列存在し、全体で１４番目に多かった。解析したクローンの一部の配列を配列番号２５～３６に示す。なお、ここに示す配列はＳＥＬＥＸで取得した６９塩基の配列を、配列番号５の配列と同様の構造になるように３７塩基に短鎖化した配列である。各配列における下線は共通配列（5’末端側から順に、式（２）、式（１）および式（３）に対応する）を示す。また、これらのクローン配列の二次構造予測を図６に示す。配列番号５と配列が異なる塩基を矢印（黒三角形）で示す。

[0141] 以下に配列番号２５～３６で表されるアプタマーそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5’か

ら3’の方向で表すものとし、プリン塩基（ＡおよびＧ）は2’－ＯＨ体であり、ピリミジン塩基（ＵおよびＣ）は2’－フルオロ修飾体である。

[0142] 配列番号２５：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＵＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号２６：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＡＧＣＧＡＵＵＡＣＵＣＵＵＧＡＵＵＧＣＡＣＧＵＣＣ

配列番号２７：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＣＣＧＣＧＡＵＵＡＣＵＣＧＧＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号２８：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＣＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＧＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号２９：

ＧＧＣＣＣＧＣＣＡＡＣＡＣＡＣＧＡＵＵＡＣＵＵＧＵＧＡＵＵＧＵＣＣＧＧＣＣ

配列番号３０：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＵＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＡＣＣＧＵＣＣ

[0143] 配列番号３１：

ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＧＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＣＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号３２：
ＧＧＡＣＣＧＣＣＡＡＣＡＣＡＣＧＡＵＵＡＣＵＵＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号３３：
ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＣＣＧＣＧＡＵＵＡＣＵＣＧＧＧＡＵＵＧＣＡＣＧＵＣＣ

配列番号３４：
ＧＧＡＣＣＧＣＣＡＡＣＡＣＡＣＧＡＣＵＡＣＵＵＧＵＧＡＵＵＧＵＣＣＧＵＣＣ

配列番号３５：
ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＵＣＡＣＧＣＧＡＵＵＡＣＵＣＧＵＧＡＡＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号３６：
ＧＧＡＣＣＧＣＣＡＡＣＡＡＡＣＧＡＵＵＡＣＵＵＵＵＧＡＵＵＧＵＣＣＧＵＣＣ

[0144] これらのアプタマーがヒトＩＬ－２１に結合してその機能を阻害するか、実施例１と同様の方法で評価した。アプタマーは、二本鎖ＤＮＡを鋳型として転写により得た。細胞評価系での阻害評価は核酸最終濃度３０ｎＭおよび１０ｎＭで実施した。その結果を表６に示す。表中、Ｂｉａｃｏｒｅでの結合の“＋＋”は、ＣＭ４チップへ固定化されたヒトＩＬ－２１に対するアプタマーの結合量（ＲＵ値）が１００以上であることを表す。阻害の“＋”は３０ｎＭで５０％以上阻害かつ１０ｎＭで２０％以上阻害したことを示し、基準に満たないものを“－”で示す。

[0145] [表6]

配列番号	長さ	Biacoreでの結合活性	細胞評価系での阻害率（%）		阻害活性
			30 nMアプタマー	10 nMアプタマー	
5	37	++	76.5	42.9	+
25	37	++	64.6	27.0	+
26	37	++	64.8	23.9	+
27	37	++	76.9	34.1	+
28	37	++	92.3	68.6	+
29	37	++	67.4	22.9	+
30	37	++	24.1	−12.7	−
31	37	++	74.1	25.8	+
32	37	++	69.3	30.1	+
33	37	++	65.0	20.9	+
34	37	++	92.9	62.2	+
35	37	++	71.4	39.8	+
36	37	++	81.6	46.5	+

[0146] 配列番号２５～３６で表されるアプタマーは、配列番号３０で表されるアプタマーを除いて、いずれもヒトＩＬ－２１の機能を強く阻害した。図６に示したように、複数のクローンで同一の塩基置換が起こっていた箇所もあった。共通配列（ＣＧＡＣＵＡＣＵ：式（１））においては、４番目のＣがＵに置換しているクローンが複数存在した。また、共通配列（ＣＣＵＵＣ：式（２））中の３番目のＵと４番目のＵが、それぞれＧとＣに置換しているクローンも複数存在した。同じく共通配列（ＧＣＣＣＧ：式（３））中の２番目のＣがＵに、３番目のＣがＡに置換しているクローンも存在しており、式（２）部分と式（３）部分によって形成されるインターナルループにおいても、阻害活性を維持したまま塩基置換が可能な箇所があることが判った。ステム部分の塩基においては各クローンで様々な種類の塩基置換が起こっており、様々な組み合わせが許容されることが判った。

[0147] 実施例７：アプタマーの改変（４）

配列番号２８で表されるアプタマーのヌクレアーゼ耐性を高めるために、２’－Ｏ－メチル基を導入した改変体を作製した。また、短鎖化した後、５’末端のＰＥＧ修飾も実施した。作製した改変体のヌクレオチド配列を、以

下に配列番号３７、３８、３８（１）として修飾と共に示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、５’から３’の方向で表すものとし、大文字はＲＮＡを示す。ヌクレオチドにおける括弧はリボースの２’位の修飾を示し、Ｆはフッ素原子、Ｍは０－メチル基を示す。配列末端におけるｉｄＴはｉｎｖｅｒｔｅｄ－ｄＴによる修飾を示し、ＰＥＧは４０ｋＤａの分岐型ポリエチレングリコールによる修飾を示す。また各配列における下線は共通配列（５’末端側から順に、式（２）、式（１）および式（３）に対応する）を示し、［　］は２’－０－メチル修飾の導入など、その直近の配列番号に対して新たに修飾や変異を導入した塩基を示す。

[0148] 配列番号３７（配列番号２８で表される配列の１７番目のＡをＧに置換し、配列番号２２（２）の２’位の修飾を反映させる様に２’－０－メチル修飾を導入して、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：

［Ｇ（Ｍ）］［Ｇ（Ｍ）］［Ａ（Ｍ）］［Ｃ（Ｍ）］Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）［Ａ（Ｍ）］［Ａ（Ｍ）］［Ｃ（Ｍ）］［Ｃ（Ｍ）］［Ｃ（Ｍ）］［Ｇ（Ｍ）］Ｃ（Ｆ）Ｇ［Ｇ］Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）［Ａ（Ｍ）］［Ｃ（Ｍ）］Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）［Ｇ（Ｍ）］［Ｇ（Ｍ）］［Ｇ（Ｍ）］［Ａ（Ｍ）］［Ｕ（Ｍ）］［Ｕ（Ｍ）］［Ｇ（Ｍ）］［Ｃ（Ｍ）］［Ｃ（Ｍ）］［Ｃ（Ｆ）］［Ｇ（Ｍ）］［Ｕ（Ｍ）］［Ｃ（Ｍ）］［Ｃ（Ｍ）］－ｉｄＴ

配列番号３８（配列番号３７で表される配列の両末端を一塩基ずつ欠失させて３５ヌクレオチドの長さに短鎖化して、３’末端にｉｄＴを付加した配列）：

Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）ＧＧＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

配列番号３８（１）（配列番号３８で表される配列の５’末端にＰＥＧを付加した配列）：

ＰＥＧ－Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）ＧＧＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

[0149] これらのアプタマーがヒトＩＬ－２１に結合してその機能を阻害するか、アプタマーを化学合成により作製し、実施例１と同様の方法で評価した。表中、Ｂｉａｃｏｒｅでの結合活性における“＋＋”は、ＣＭ４チップへ固定化されたヒトＩＬ－２１に対するアプタマーの結合量（ＲＵ値）が１００以上であることを表す。細胞評価系での阻害評価は核酸最終濃度１ｎＭおよび０．２ｎＭで実施した。また、細胞評価系において、ＩＬ－２１刺激によるＩＦＮ－γ分泌が５０％阻害される際のアプタマー濃度（IC_{50}）を求めた。その結果を表７に示す。表中、“ｎ．ｄ．”は未測定を表す。

[0150] [表7]

配列番号	長さ	Biacoreでの結合活性	細胞評価系での阻害率（%）		細胞評価系でのIC_{50}（nM）
			1 nMアプタマー	0.2 nMアプタマー	
３７	３７	＋＋	１００．０	１００．０	０．０２
３８	３５	＋＋	９９．６	n．d．	n．d．
３８（１）	３５	＋＋	１００．０	１００．０	０．０２

[0151] 配列番号３７で表されるアプタマーの結果から、配列番号２８で表されるアプタマーは配列番号５で表されるアプタマーと同様に、１７番目のＡをＧへ置換できることが示された。また、様々な箇所の塩基に２’－Ｏ－メチル修飾を導入しても活性に影響しないことが判った。配列番号３８と３８（１）で表されるアプタマーの結果から、３５塩基に短鎖化しても活性が維持されており、５’末端へのＰＥＧ修飾も可能であった。

[0152] 実施例８：アプタマーの改変と末端修飾（５）

配列番号３８で表されるアプタマーのヌクレアーゼ耐性を高めるために、

一部の塩基をＲＮＡからＤＮＡに置換した改変体、ホスホロチオエートを導入した改変体を作製した。さらに、末端修飾についても検討するため、５’末端に脂肪酸を付加した配列を作製した。作製した改変体のヌクレオチド配列を、以下に配列番号３８（２）～３８（２１）として修飾と共に示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、５’から３’の方向で表すものとし、大文字はＲＮＡを示し、小文字はＤＮＡを示す。ヌクレオチドにおける括弧はリボースの２’位の修飾を示し、Ｆはフッ素原子、ＭはＯ－メチル基を示す。配列末端におけるｉｄＴはｉｎｖｅｒｔｅｄ－ｄＴによる修飾を示し、ＰＥＧは４０ｋＤａの分岐型ポリエチレングリコールによる修飾を示す。脂肪酸修飾として、Ｍｙｒはミリスチン酸を示し、Ｐａｌはパルミチン酸を示す。配列中におけるｓはヌクレオチド同士を連結するリン酸基がホスホロチオエート化されたことを示す。また各配列における下線は共通配列（５’末端側から順に、式（２）、式（１）および式（３）に対応する）を示し、［　］はＤＮＡへの置換など、その直近の配列番号に対して新たに修飾や変異を導入した塩基を示す。

[0153] 配列番号３８（２）（配列番号３８で表される配列の２’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所をＤＮＡに置換した配列）：

Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）［ｃ］Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）ＧＧＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

配列番号３８（３）（配列番号３８で表される配列の２’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所をＤＮＡに置換した配列）：

Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）［ｕ］Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）ＧＧＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ

（M）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号３８（４）（配列番号３８で表される配列の２’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所をＤＮＡに置換した配列）：
G（M）A（M）C（M）C（F）U（F）［u］C（F）A（M）A（M）C（M）C（M）C（M）G（M）C（F）GGC（F）U（F）A（M）C（M）U（F）C（F）G（M）G（M）G（M）A（M）U（M）U（M）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号３８（５）（配列番号３８で表される配列の２’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所をＤＮＡに置換した配列）：
G（M）A（M）C（M）C（F）U（F）U（F）［c］A（M）A（M）C（M）C（M）C（M）G（M）C（F）GGC（F）U（F）A（M）C（M）U（F）C（F）G（M）G（M）G（M）A（M）U（M）U（M）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）－ｉｄＴ

[0154] 配列番号３８（６）（配列番号３８で表される配列の２’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所をＤＮＡに置換した配列）：
G（M）A（M）C（M）C（F）U（F）U（F）C（F）A（M）A（M）C（M）C（M）C（M）G（M）［c］GGC（F）U（F）A（M）C（M）U（F）C（F）G（M）G（M）G（M）A（M）U（M）U（M）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号３８（７）（配列番号３８で表される配列の２’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所をＤＮＡに置換した配列）：

G（M）A（M）C（M）C（F）U（F）U（F）C（F）A（M）A（M）C（M）C（M）C（M）G（M）C（F）GG［c］U（F）A（M）C（M）U（F）C（F）G（M）G（M）G（M）A（M）U（M）U（M）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号３８（８）（配列番号３８で表される配列の２’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所をＤＮＡに置換した配列）：
G（M）A（M）C（M）C（F）U（F）U（F）C（F）A（M）A（M）C（M）C（M）C（M）G（M）C（F）GGC（F）［u］A（M）C（M）U（F）C（F）G（M）G（M）G（M）A（M）U（M）U（M）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号３８（９）（配列番号３８で表される配列の２’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所をＤＮＡに置換した配列）：
G（M）A（M）C（M）C（F）U（F）U（F）C（F）A（M）A（M）C（M）C（M）C（M）G（M）C（F）GGC（F）U（F）A（M）C（M）［u］C（F）G（M）G（M）G（M）A（M）U（M）U（M）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号３８（１０）（配列番号３８で表される配列の２’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所をＤＮＡに置換した配列）：
G（M）A（M）C（M）C（F）U（F）U（F）C（F）A（M）A（M）C（M）C（M）C（M）G（M）C（F）GGC（F）U（F）A（M）C（M）U（F）［c］G（M）G（M）G（M）A（M）U（M）U（M）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）－ｉｄ

Ｔ

[0155] 配列番号３８（１１）（配列番号３８で表される配列の２’位がフルオロ化されている塩基の内、一か所をＤＮＡに置換した配列）：

Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）ＧＧＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）［ｃ］Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

配列番号３８（１２）（配列番号３８で表される配列の２’位がフルオロ化されている全ての塩基をＤＮＡに置換して、５’末端にＰＥＧを付加した配列）：

ＰＥＧ－Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）［ｃ］［ｕ］［ｕ］［ｃ］Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）［ｃ］ＧＧ［ｃ］［ｕ］Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）［ｕ］［ｃ］Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）［ｃ］Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

配列番号３８（１３）（配列番号３８（１）で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列）：

ＰＥＧ－Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）［Ｃ（Ｆ）ｓ］ＧＧＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

配列番号３８（１４）（配列番号３８（１）で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列）：

ＰＥＧ－Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（

M）A（M）C（M）C（M）C（M）G（M）C（F）［Gs］GC（F）U（F）A（M）C（M）U（F）C（F）G（M）G（M）G（M）A（M）U（M）U（M）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号３８（１５）（配列番号３８（１）で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列）：

ＰＥＧ－G（M）A（M）C（M）C（F）U（F）U（F）C（F）A（M）A（M）C（M）C（M）C（M）G（M）C（F）G［Gs］C（F）U（F）A（M）C（M）U（F）C（F）G（M）G（M）G（M）A（M）U（M）U（M）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）－ｉｄＴ

[0156] 配列番号３８（１６）（配列番号３８（１）で表される配列の二か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列）：

ＰＥＧ－G（M）A（M）C（M）C（F）U（F）U（F）C（F）A（M）A（M）C（M）C（M）C（M）G（M）［C（F）s］［Gs］GC（F）U（F）A（M）C（M）U（F）C（F）G（M）G（M）G（M）A（M）U（M）U（M）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号３８（１７）（配列番号３８（１）で表される配列の二か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列）：

ＰＥＧ－G（M）A（M）C（M）C（F）U（F）U（F）C（F）A（M）A（M）C（M）C（M）C（M）G（M）［C（F）s］G［Gs］C（F）U（F）A（M）C（M）U（F）C（F）G（M）G（M）G（M）A（M）U（M）U（M）G（M）C（M）C（M）C（F）G（M）U（M）C（M）－ｉｄＴ

配列番号３８（１８）（配列番号３８（１）で表される配列の二か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列）：

ＰＥＧ－Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）［Ｇｓ］［Ｇｓ］Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

配列番号３８（１９）（配列番号３８（１）で表される配列の三か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列）：

ＰＥＧ－Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）［Ｃ（Ｆ）ｓ］［Ｇｓ］［Ｇｓ］Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

配列番号３８（２０）（配列番号３８で表される配列の５’末端にＭｙｒを付加した配列）：

Ｍｙｒ－Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）ＧＧＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

[0157] 配列番号３８（２１）（配列番号３８で表される配列の５’末端にＰａｌを付加した配列）：

Ｐａｌ－Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）ＧＧＣ（Ｆ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）

Ｕ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｆ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

[0158] これらのアプタマーがヒトＩＬ－２１に結合してその機能を阻害するか、アプタマーを化学合成により作製し、実施例１と同様の方法で評価した。細胞評価系での阻害評価は核酸最終濃度１ｎＭおよび０．１ｎＭで実施した。その結果を表８に示す。表中、Ｂｉａｃｏｒｅでの結合の“＋＋”は、ＣＭ４チップへ固定化されたヒトＩＬ－２１に対するアプタマーの結合量（ＲＵ値）が１００以上であることを表す。阻害の“＋”は１ｎＭで４０％以上阻害かつ０．１ｎＭで１５％以上阻害したことを示し、基準に満たないものを“－”で示す。表中、“ｎ．ｄ．”は未測定を表す。

[0159] [表8]

配列番号	長さ	Biacoreでの結合活性	細胞評価系での阻害率（%）		阻害活性
			1 nMアプタマー	0.1 nMアプタマー	
３８	３５	＋＋	９９．６	９３．０	＋
３８（２）	３５	＋＋	９８．８	８６．０	＋
３８（３）	３５	＋＋	９７．６	８１．６	＋
３８（４）	３５	＋＋	８５．０	３５．４	＋
３８（５）	３５	＋＋	９９．０	８７．９	＋
３８（６）	３５	＋＋	９８．６	８７．２	＋
３８（７）	３５	＋＋	９３．１	６１．１	＋
３８（８）	３５	＋＋	９９．２	９２．８	＋
３８（９）	３５	＋＋	８７．２	４３．８	＋
３８（１０）	３５	＋＋	９９．０	８９．２	＋
３８（１１）	３５	＋＋	９４．２	６３．６	＋
３８（１２）	３５	－	n．d．	n．d．	n．d．
３８（１３）	３５	n．d．	１００．０	９８．０	＋
３８（１４）	３５	n．d．	１００．０	１００．０	＋
３８（１５）	３５	n．d．	１００．０	１００．０	＋
３８（１６）	３５	n．d．	１００．０	９８．０	＋
３８（１７）	３５	n．d．	１００．０	９６．６	＋
３８（１８）	３５	n．d．	１００．０	１００．０	＋
３８（１９）	３５	n．d．	１００．０	９６．４	＋
３８（２０）	３５	＋＋	１００．０	n．d．	＋
３８（２１）	３５	＋＋	１００．０	n．d．	＋

[0160] 配列番号３８（２）～３８（１１）で表されるアプタマーは、阻害活性の強弱はあるがいずれもヒトＩＬ－２１に対して阻害活性を示した。これらの

結果から、配列番号３８で表されるアプタマーの２’位がフルオロ化されている塩基の内、少なくとも一ヶ所をＤＮＡに置換しても活性が保持できることが判った。ただし、配列番号３８（１２）で表されるアプタマーの結果から、全ての箇所をまとめてＤＮＡに置換すると結合活性が消失する。配列番号３８（１３）～３８（１９）で表されるアプタマーはいずれも高い阻害活性を維持しており、今回検討した三ヶ所については、リン酸基がホスホロチオエート化されていても活性に影響がないことが判った。

配列番号３８（２０）と３８（２１）で表されるアプタマーの結果から、５’末端への修飾はＰＥＧに限らず、脂肪酸などでも可能であることが判った。

[0161] 実施例９：アプタマーの塩基置換検討

これまでの実施例の結果から、ヒトＩＬ－２１の機能を阻害する上では共通配列部分の塩基配列が重要であるが、塩基置換可能な箇所が存在することも判った。そこで、配列番号５で表されるアプタマーの共通配列部分の一部を塩基置換した配列を作製した。作製した塩基置換体の一部のヌクレオチド配列を、以下に配列番号３９～４３として示す。特に言及がなければ、以下に挙げる個々の配列は、５’から３’の方向に表すものとし、プリン塩基（ＡおよびＧ）は２’－ＯＨ体であり、ピリミジン塩基（ＵおよびＣ）は２’－フルオロ修飾体である。また各配列における下線は共通配列（５’末端側から順に、式（２）、式（１）および式（３）に対応する）を示し、［　］は配列番号５で表される配列からの塩基置換を示す。

[0162] 配列番号３９（配列番号５で表される配列の６番目のＵをＧに置換した配列）：

ＧＧＡＣＣ［Ｇ］ＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号４０（配列番号５で表される配列の７番目のＵをＣに置換した配列）：

ＧＧＡＣＣＵ［Ｃ］ＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号４１（配列番号５で表される配列の１９番目のＵをＧに置換した配列）：
ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣ［Ｇ］ＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号４２（配列番号５で表される配列の２２番目のＵをＣに置換した配列）：
ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣ［Ｃ］ＣＧＵＧＡＵＵＧＣＣＣＧＵＣＣ

配列番号４３（配列番号５で表される配列の３２番目のＣをＡに置換した配列）：
ＧＧＡＣＣＵＵＣＡＡＣＡＣＧＣＧＡＣＵＡＣＵＣＧＵＧＡＵＵＧＣ［Ａ］ＣＧＵＣＣ

[0163] これらのアプタマーがヒトＩＬ－２１に結合してその機能を阻害するか、実施例１と同様の方法で評価した。アプタマーは、二本鎖ＤＮＡを鋳型として転写により得た。細胞評価系での阻害評価は核酸最終濃度１０ｎＭで実施した。その結果を表９に示す。表中、Ｂｉａｃｏｒｅでの結合の“＋＋”は、ＣＭ４チップへ固定化されたヒトＩＬ－２１に対するアプタマーの結合量（ＲＵ値）が１００以上であることを表す。阻害の“＋”は１０ｎＭで２０％以上阻害したことを示し、基準に満たないものを“－”で示す。表中、“ｎ．ｄ．”は未測定を表す。

[0164]

[表9]

配列番号	長さ	Biacoreでの結合活性	細胞評価系での阻害率（%）（10 nMアプタマー）	阻害活性
5	37	++	62．9	+
39	37	n．d．	56．1	+
40	37	n．d．	42．0	+
41	37	n．d．	32．4	+
42	37	n．d．	39．0	+
43	37	n．d．	43．7	+

[0165] 配列番号３９～４３で表されるアプタマーは、配列番号５で表されるアプタマーと同様に、いずれもヒトＩＬ－２１の機能を阻害した。

これらの結果から、共通配列（ＣＧＡＣＵＡＣＵ：式（１））の内、５番目のＵはＧに、８番目のＵはＣに、それぞれ置換可能であることが判った。同様に、式（２）部分（ＣＣＵＵＣ）はＣＣＧＵＣもしくはＣＣＵＣＣでも可能であり、式（３）部分（ＧＣＣＣＧ）はＧＣＡＣＧでも可能であることが判った。

産業上の利用可能性

[0166] 本発明のアプタマーは、肺高血圧症の治療用又は予防用の医薬、あるいは診断薬、検査薬、試薬として有用である。本出願は、日本で出願された特願２０２０－１０４８３１（出願日：令和２年６月１７日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。