

明 細 書

発明の名称： 6 塩基 DNA アプタマーの作製方法

技術分野

[0001] 本発明は、核酸アプタマー、一本鎖核酸分子ライブラリー、一本鎖核酸分子ライブラリーの作製方法、核酸アプタマーの製造方法、及び非天然型塩基含有一本鎖核酸分子の塩基配列決定方法等に関する。

背景技術

[0002] 核酸アプタマーは、低分子、タンパク質、細胞等の標的に特異的に結合する核酸鎖である。通常、核酸アプタマーは、ランダム配列を有する核酸ライブラリーから、SELEX法 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) によって選択と増幅を繰り返すことで生成される。

[0003] SELEX法によって生成した核酸アプタマーは、塩基配列を決定した後、化学合成によって大量生産と修飾が行われる。核酸アプタマーは高純度で提供することが可能であるため、品質管理に優れた抗体代替品となり得る。

[0004] しかし、一般的に核酸は、タンパク質に基づく抗体と比較して親水性である。それ故、核酸アプタマーの標的タンパク質との疎水性相互作用は、抗体のそれと比較して弱いものになり得る。そのため、従来の核酸アプタマーでは、抗体を上回る結合力を提供することは困難であり、実用化には不十分であると考えられていた。

[0005] 核酸アプタマーの上記問題を解決するために、本発明者らは疎水性の非天然型塩基である7-(2-チエニル)イミダゾ[4,5-b]ピリジン (本明細書において「Ds」又は「Ds塩基」と表記する) を第5の塩基として核酸アプタマーに導入することで、標的タンパク質との疎水性相互作用を改善することができる新たなアプタマー生成法として、ExSELEX (genetic alphabet Expansion for SELEX) 法を開発した(非特許文献1)。Ds塩基は2-ニトロ-4-プロピニルピロール (本明細書において2-ニトロ-4-プロピニルピロール及びその類似体を「Px」又は「Px塩基」と表記する) と塩基対合する。よって、Ds塩基とPx塩基が

塩基対合して形成するDs-Px塩基対は、PCR増幅において第3の塩基対として高いフィデリティーで機能する(非特許文献1~6)。ExSELEX法では、核酸アプタマーを構成する塩基配列中のDs塩基に基づいて標的タンパク質との親和性を改善することが可能となった。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1 : W02007/066737

特許文献2 : W02009/123216

特許文献3 : W02013/073602

非特許文献

[0007] 非特許文献1 : Kimoto, M., et al., Nat. Biotechnol., 2013, 31: 453-457.

非特許文献2 : Kimoto, M., et al., Nucleic Acids Res., 2009, 37: e14.

非特許文献3 : Yamashige, R., et al., Nucleic Acids Res., 2012, 40:2793-2806.

非特許文献4 : Matsunaga, K., et al., J. Am. Chem. Soc., 2017, 139: 324-334.

非特許文献5 : Matsunaga, K., et al., Nucleic Acids Res., 2021, 49: 11407-11424.

非特許文献6 : Kimoto, M. and Hirao, I., Chem. Soc, Rev., 2020, 49: 7602-7626.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、標的物質に対して高い親和性を有する核酸アプタマーを効率よく生成するための新たな方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 上述のExSELEX法では、核酸アプタマーを構成する塩基配列中のDs塩基に基づいて標的タンパク質との親和性が改善された。しかしながら、標的タンパ

ク質との親和性を示す K_D 値がナノモル濃度以下の高い親和性を有する核酸アプタマーを生成する成功率は、依然として低いままである。

[0010] 本発明者らの過去の研究では、核酸アプタマーを構成する塩基配列においてDs塩基に加えてPx塩基をも含む6塩基DNAアプタマーとして、AptD2アプタマーが見出されている（W02020/256639）。AptD2アプタマーにおけるPx塩基は、ExSELEX法におけるPCR増幅の過程で偶発的変異として組み込まれたものである。

[0011] 本発明者らは、上記課題を解決するために、上記AptD2アプタマーにおけるPx塩基の意義を検証した。その結果、AptD2アプタマーでは、Ds塩基のみならずPx塩基も標的タンパク質との結合に重要であることを見出した。

[0012] 上記結果に基づいて、本発明者らは、天然型の4塩基、Ds塩基、及びPx塩基からなる6種類の塩基で構成されるDNAライブラリーをExSELEX法の出発材料とすれば、5種類の塩基に基づく従来のExSELEX法よりも効率よく、高い親和性を有する核酸アプタマーが生成され得ることを着想した。

[0013] しかしながら、ExSELEX法において、Px塩基を含む核酸鎖を含むDNAライブラリーを出発材料とすることは技術的に難しい。その理由は、Px塩基を含むヌクレオチドは、核酸鎖の化学合成に用いる塩基性条件では極めて不安定であるため、DNAライブラリーの構築が困難であるためである。

[0014] そこで本発明者らは、DNAライブラリーを化学合成するステップでは、Px塩基の代わりにその類似体である4-プロピニルピロール-2-カルバルデヒド（本明細書において4-プロピニルピロール-2-カルバルデヒド及びその類似体を「Pa'」又は「Pa' 塩基」と表記する）を用いることを着想した（図1）。Pa' 塩基は、Px塩基と同様にDs塩基と人工塩基対を形成することができるが、Px塩基とは異なり、塩基性条件で安定である。よって、DNAライブラリーの化学合成ではPa' 塩基を使用する一方で、PCR増幅では、Ds塩基との人工塩基対形成において高いフィデリティーを有するPx塩基を使用することとした（図2）。

[0015] 本発明者らは、Px塩基とPa' 塩基の使い分けに基づく新たな6塩基ExSELEX法をIFN γ 、トロンピン、CRP、IL-6、IL-8、及びHMGB1を含む様々な標的タンパ

ク質に適用し、いずれの標的についても極めて高い親和性を有する核酸アプタマーを効率よく生成できることを見出した。

[0016] また、本発明者らが従来のExSELEX法を用いて開発したヒトインターフェロニン γ (IFN γ) に結合する核酸アプタマーは、グリコシル化されたIFN γ に対する結合能が大幅に低いという問題があったが、本発明の6塩基ExSELEX法に基づいて新たに生成された核酸アプタマーは、グリコシル化の有無にかかわらず標的に結合できることも明らかになった。ヒト体内の標的タンパク質の多く (50~70%) がグリコシル化されていることから、本発明のIFN γ 標的核酸アプタマーは従来品と比べて生体内でもIFN γ を十分に検出できるという大きな利点を有する。

[0017] さらに本発明者らは、本発明の6塩基ExSELEX法に基づいて生成される6塩基核酸アプタマーにおいてDs塩基及びPx/Pa' 塩基の位置を決定してその塩基配列を決定するための新たな方法も開発し、本発明を完成するに至った。

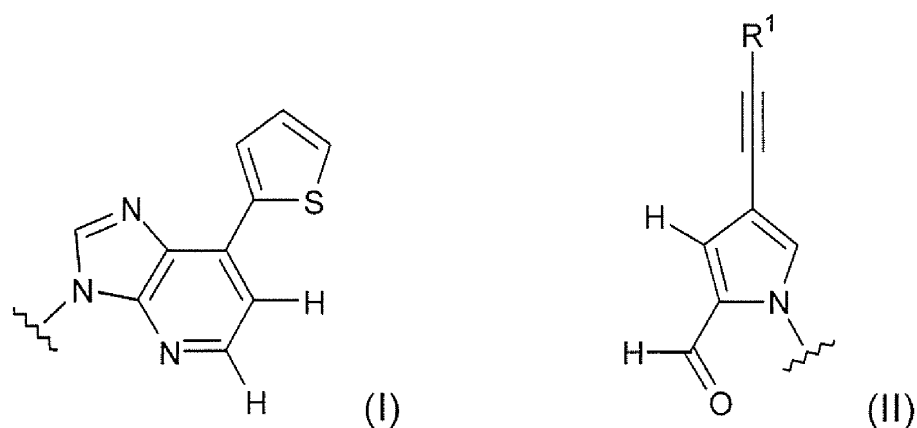
[0018] 本発明は上記新たな知見に基づくもので、以下を提供する。

[1] 複数の一本鎖核酸分子を含む一本鎖核酸分子ライブラリーであって、
前記複数の一本鎖核酸分子は、Ds/Pa' 含有一本鎖核酸分子を含み、
前記Ds/Pa' 含有一本鎖核酸分子は、その5' 末端及び3' 末端に位置する一対のプライマー結合領域、及び前記一対のプライマー結合領域間に位置する可変領域を含み、

前記一対のプライマー結合領域は、前記複数の一本鎖核酸分子の間で共通する塩基配列からなり、

前記可変領域は、以下の一般式 (I) で示す非天然型塩基Ds、及び以下の一般式 (II) で示す非天然型塩基Pa' を含む、前記一本鎖核酸分子ライブラリー
:

[化1]



[上記式中、R¹は、それぞれ独立に水素原子又は任意に置換されていてもよい炭化水素基を表す]。

[1-2] 複数の一本鎖核酸分子を含む一本鎖核酸分子ライブラリーであって、

前記複数の一本鎖核酸分子は、可変領域を含み、

前記可変領域は、上記一般式 (I) で示す非天然型塩基Ds、及び上記一般式 (II) で示す非天然型塩基Pa' を含む、前記一本鎖核酸分子ライブラリー

。

[2] 複数の一本鎖核酸分子を含む一本鎖核酸分子ライブラリーであって、

前記複数の一本鎖核酸分子は、Ds/Px含有一本鎖核酸分子を含み、

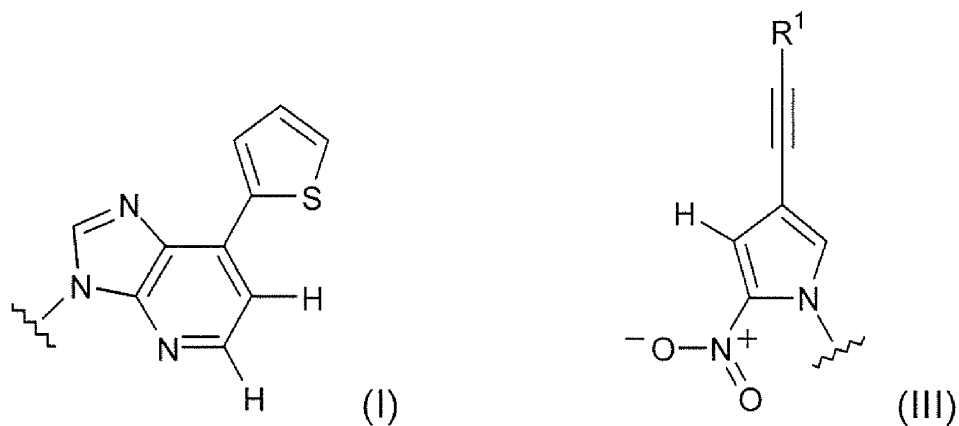
前記Ds/Px含有一本鎖核酸分子は、その5'末端及び3'末端に位置する一対のプライマー結合領域、及び前記一対のプライマー結合領域間に位置する可変領域を含み、

前記一対のプライマー結合領域は、前記複数の一本鎖核酸分子の間で共通する塩基配列からなり、

前記可変領域は、以下の一般式 (I) で示す非天然型塩基Ds、及び以下の一般式 (III) で示す非天然型塩基Pxを含む、前記一本鎖核酸分子ライブラリー

：

[化2]



〔上記式中、 R^1 は、それぞれ独立に水素原子又は任意に置換されていてもよい炭化水素基を表す〕。

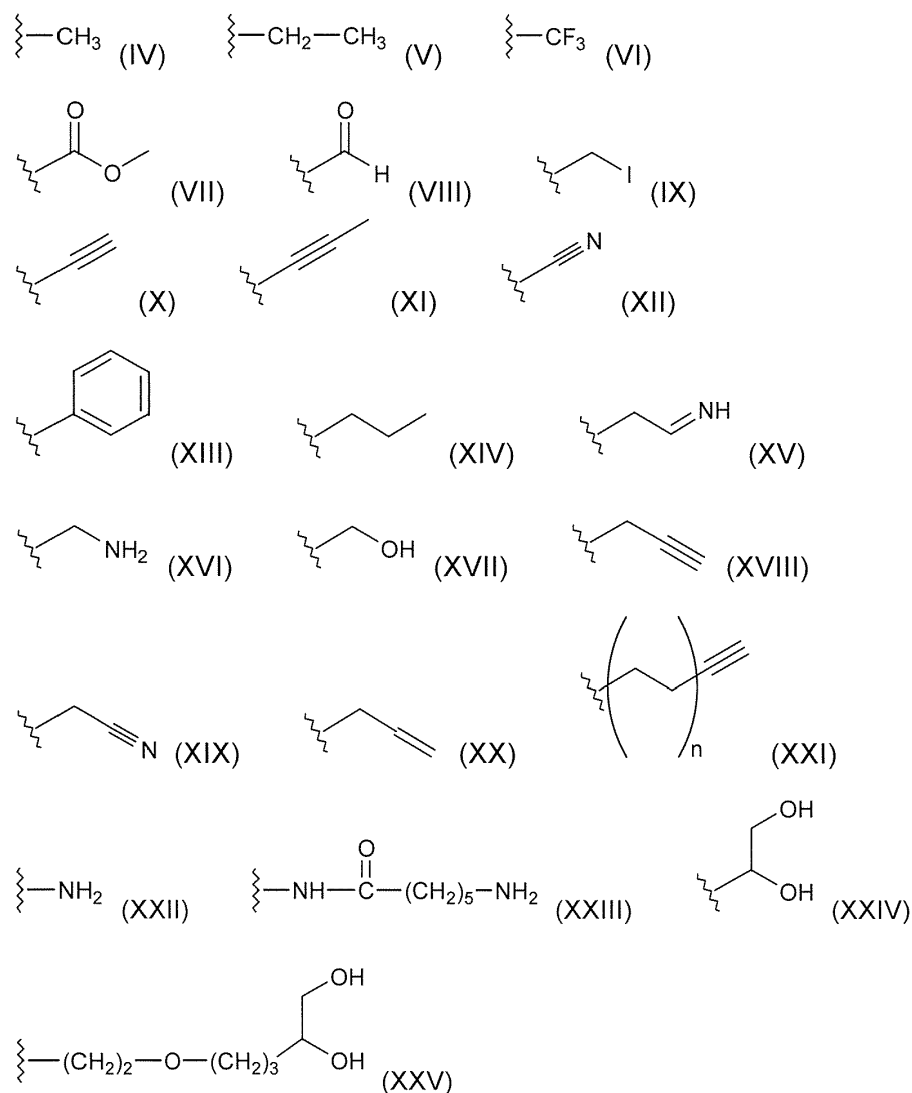
〔2-2〕複数の一本鎖核酸分子を含む一本鎖核酸分子ライブラリーであって、

前記複数の一本鎖核酸分子は、可変領域を含み、

前記可変領域は、上記一般式 (I) で示す非天然型塩基Ds、及び上記一般式 (III) で示す非天然型塩基Pxを含む、前記一本鎖核酸分子ライブラリー。

〔3〕前記 R^1 が、以下の式 (IV) ～式 (XXV) で示されるいずれか一の式を示す、〔1〕、〔1-2〕、〔2〕、又は〔2-2〕に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー：

[化3]



[上記式中、波線部分はアルキンへの結合を表し、nは1以上の整数を表す]。

[4] 前記可変領域が、前記Dsを1~10個含む、[1]、[1-2]、[2]、[2-2]、及び[3]のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[5] 前記可変領域が、前記Dsを1~4個含む、[1]、[1-2]、[2]、[2-2]、及び[3]のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

。

〔6〕前記可変領域が、前記Pa'又は前記Pxを平均して1個以上含む、〔1〕、〔1-2〕、〔2〕、〔2-2〕、及び〔3〕～〔5〕のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

〔7〕前記可変領域が、前記Dsを1～3個を含み、かつ前記Pa'又は前記Pxを平均して1～2個含む、〔1〕、〔1-2〕、〔2〕、〔2-2〕、及び〔3〕のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

〔8〕前記Ds/Pa'含有一本鎖核酸分子又は前記Ds/Px含有一本鎖核酸分子において、前記可変領域は、1以上の指定された位置に配置された前記Ds、並びに前記指定された1以上の位置を除いて、前記Pa'又は前記Px及び天然型塩基からなるランダム配列を含む、〔1〕、〔1-2〕、〔2〕、〔2-2〕、及び〔3〕～〔7〕のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

〔9〕前記可変領域において前記指定された位置が異なる複数の前記Ds/Pa'含有一本鎖核酸分子又は前記Ds/Px含有一本鎖核酸分子を含む、〔1〕、〔1-2〕、〔2〕、〔2-2〕、及び〔3〕～〔8〕のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

〔10〕前記可変領域が、10～300塩基長である、〔1〕、〔1-2〕、〔2〕、〔2-2〕、及び〔3〕～〔9〕のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

〔11〕前記可変領域が、14～100塩基長である、〔10〕に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

〔12〕前記複数の一本鎖核酸分子の各々が、5'末端に位置するプライマー結合領域と前記可変領域との間に配置された、天然型塩基からなる5'ウイング領域、及び前記可変領域と3'末端に位置するプライマー結合領域との間に配置された、天然型塩基からなる3'ウイング領域を含む、〔1〕、〔1-2〕、〔2〕、〔2-2〕、及び〔3〕～〔11〕のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

〔12-2〕前記複数の一本鎖核酸分子の各々が、前記可変領域の5'末端側

に配置された、天然型塩基からなる5' ウイング領域、及び前記可変領域の3' 末端側に配置された、天然型塩基からなる3' ウイング領域を含む、[1]、[1-2]、[2]、[2-2]、及び[3]～[11]のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[13] 前記5' ウイング領域及び／又は前記3' ウイング領域が、天然型塩基で構成されるランダム配列からなる、[12]に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[14] 前記天然型塩基で構成されるランダム配列が、3～20塩基長である、[13]に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[15] 前記5' ウイング領域及び前記3' ウイング領域が、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の相補配列を含む、[12]に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[16] 前記相補配列が、非ワトソンクリック型塩基対、及び／又は1塩基以上の、挿入配列及び／又は欠失を含む、[15]に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[17] 前記非ワトソンクリック型塩基対が、G-T塩基対を含む、[16]に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[18] 前記挿入配列が、バルジ構造又はバルジアウト構造を形成する、[16]又は[17]に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[19] 前記バルジ構造又はバルジアウト構造が、人工塩基を含む、[18]に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[20] 前記人工塩基が、前記Ds、前記Pa'、及び／又は前記Pxである、[19]に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[21] 前記一対の相補配列が、3～20塩基長である、[15]～[20]のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[22] 一本鎖核酸分子ライブラリーを作製する方法であって、

[1] 若しくは[1-2]、又は[1] 若しくは[1-2]を引用する[3]～[21]のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリーを鋳型とし

て、かつ

天然型ヌクレオチド、前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び前記非天然型塩基Pxを含有するPx含有ヌクレオチドを基質として、一本鎖核酸分子を増幅する、増幅工程を含む、前記方法。

[23] 一本鎖核酸分子ライブラリーを作製する方法であって、

[2] 若しくは[2-2]、又は[2] 若しくは[2-2]を引用する[3]～[21]のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリーを鋳型として、かつ

天然型ヌクレオチド、前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び前記非天然型塩基Pa'を含有するPa'含有ヌクレオチドを基質として、一本鎖核酸分子を増幅する、増幅工程を含む、前記方法。

[24] 一本鎖核酸分子からなる核酸アプタマーの製造方法であって、

[2] 若しくは[2-2]、又は[2] 若しくは[2-2]を引用する[3]～[21]のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリーと標的物質とを溶液中で混合して、前記一本鎖核酸分子ライブラリー中の一本鎖核酸分子と前記標的物質との複合体を形成させる、複合体形成工程、

前記複合体を回収する、複合体回収工程、並びに

天然型ヌクレオチド、前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び前記非天然型塩基Pxを含有するPx含有ヌクレオチドを基質として、前記複合体回収工程後の前記複合体に含まれる前記一本鎖核酸分子を核酸増幅法によって増幅することによって、前記一本鎖核酸分子からなる核酸アプタマーを製造する、増幅工程を含む前記方法。

[24-2] 一本鎖核酸分子からなる核酸アプタマーの製造方法であって、

[2] 若しくは[2-2]、又は[2] 若しくは[2-2]を引用する[3]～[21]のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリーと標的物質

とを溶液中で混合して、前記一本鎖核酸分子ライブラリー中の一本鎖核酸分子と前記標的物質との複合体を形成させる、複合体形成工程、及び

前記複合体を回収する、複合体回収工程
を含み、必要に応じて前記複合体形成工程及び前記複合体回収工程を複数回繰り返す、前記方法。

〔25〕前記増幅工程後の前記一本鎖核酸分子を新たな一本鎖核酸分子ライブラリーとして用いて、前記複合体形成工程から前記増幅工程までを新たに1回以上繰り返す反復工程をさらに含む、〔24〕に記載の方法。

〔26〕核酸アプタマーの製造方法であって、

天然型核酸、前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有核酸、及び前記非天然型塩基Pa'を含有するPa'含有核酸を反応させることによって、〔1〕若しくは〔1-1〕、又は〔1〕若しくは〔1-1〕を引用する〔3〕～〔21〕のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリーを合成するライブラリー合成工程、

前記ライブラリー合成工程後の一本鎖核酸分子ライブラリーを鋳型として、かつ

天然型ヌクレオチド、前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び前記非天然型塩基Pxを含有するPx含有ヌクレオチドを基質として、一本鎖核酸分子を増幅する、第1増幅工程、

前記第1増幅工程後の前記一本鎖核酸分子と標的物質とを溶液中で混合して前記一本鎖核酸分子と標的物質との複合体を形成させる、複合体形成工程、

前記複合体を回収する、複合体回収工程、並びに

天然型ヌクレオチド、前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び前記非天然型塩基Pxを含有するPx含有ヌクレオチドを基質として、前記複合体回収工程後の前記複合体に含まれる前記一本鎖核酸分子を核酸増幅法によって増幅することによって、前記一本鎖核酸分子からなる核酸アプタマーを製造する、第2増幅工程

を含む、前記方法。

〔27〕前記第2増幅工程後の前記一本鎖核酸分子に対して、前記複合体形成工程から前記第2増幅工程までを新たに1回以上繰り返す反復工程をさらに含む、〔26〕に記載の方法。

〔28〕核酸アプタマーの製造方法であって、

天然型核酸、前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有核酸、及び前記非天然型塩基Pa'を含有するPa'含有核酸を反応させることによって、〔1〕若しくは〔1-1〕、又は〔1〕若しくは〔1-1〕を引用する〔3〕～〔21〕のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリーを合成する、ライブラリー合成工程、

前記ライブラリー合成工程後の前記一本鎖核酸分子ライブラリーと標的物質とを溶液中で混合して前記一本鎖核酸分子ライブラリー中の一本鎖核酸分子と標的物質との複合体を形成させる、第1複合体形成工程、

前記第1複合体形成工程後の前記複合体を回収する、第1複合体回収工程、

前記第1複合体回収工程後の前記一本鎖核酸分子を鋳型として、かつ天然型ヌクレオチド、前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び前記非天然型塩基Pxを含有するPx含有ヌクレオチドを基質として、一本鎖核酸分子を増幅する、第1増幅工程、

前記第1増幅工程後の前記一本鎖核酸分子と前記標的物質とを溶液中で混合して前記一本鎖核酸分子と前記標的物質との複合体を形成させる、第2複合体形成工程、

前記第2複合体形成工程後の前記複合体を回収する、第2複合体回収工程、並びに

天然型ヌクレオチド、前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び前記非天然型塩基Pxを含有するPx含有ヌクレオチドを基質として、前記第2複合体回収工程後の前記複合体に含まれる前記一本鎖核酸分子を核酸増幅法によって増幅することによって、前記一本鎖核酸分子からなる核酸ア

プタマーを製造する、第2増幅工程を含む、前記方法。

[29] 前記第2増幅工程後の前記一本鎖核酸分子に対して、前記第2複合体形成工程から前記第2増幅工程までを新たに1回以上繰り返す反復工程をさらに含む、[28]に記載の方法。

[30] 非天然型塩基含有一本鎖核酸分子の塩基配列を決定する方法であって、

前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子は、その5'末端及び3'末端に位置する一対のプライマー結合領域、並びに前記一対のプライマー結合領域間に位置する中央領域を含み、

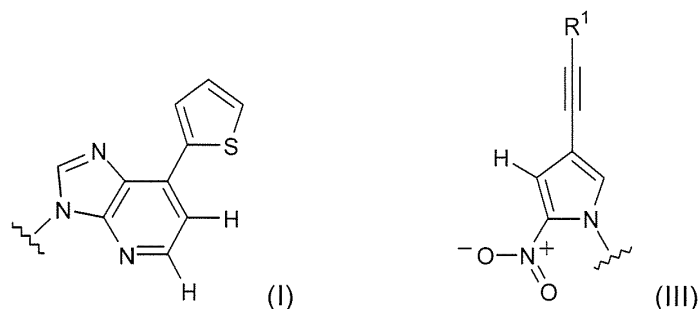
前記中央領域は、以下の一般式(I)で示す非天然型塩基Ds、及び以下の一般式(III)で示す非天然型塩基Pxを含み、

前記方法は、

天然型ヌクレオチドを基質として前記一対のプライマー結合領域の塩基配列に結合するプライマー対を用いて前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子を核酸増幅法により増幅する、第1増幅工程、及び

前記第1増幅工程後に得られる天然型ヌクレオチドのみで構成された増幅産物の塩基配列を決定する、塩基配列決定工程を含む、前記方法：

[化4]



[上記式中、R¹は、それぞれ独立に水素原子又は任意に置換されていてもよい炭素数1以上の炭化水素基を表す]。

〔30-2〕非天然型塩基含有一本鎖核酸分子の塩基配列を決定する方法であって、

前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子は、中央領域を含み、

前記中央領域は、上記一般式（I）で示す非天然型塩基Ds、及び上記一般式（III）で示す非天然型塩基Pxを含み、

前記方法は、

一対のプライマー結合領域からなる一対の核酸配列を前記中央領域の5'末端及び3'末端に連結させる、連結工程、

天然型ヌクレオチドを基質として前記一対のプライマー結合領域の塩基配列に結合するプライマー対を用いて前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子を核酸増幅法により増幅する、第1増幅工程、及び

前記第1増幅工程後に得られる天然型ヌクレオチドのみで構成された増幅産物の塩基配列を決定する、塩基配列決定工程を含む、前記方法。

〔31〕天然型ヌクレオチド、前記Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び前記Pxを含有するPx含有ヌクレオチドを基質として、前記一対のプライマー結合領域の塩基配列に結合し、異なる標識分子で標識されたプライマー対を用いて、前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子を核酸増幅法によって増幅する、第2増幅工程、

前記第2増幅工程後に増幅された、前記異なる標識分子が結合した、前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子及びその相補鎖を前記Pxの位置で完全又は部分的に切断する、切断工程、及び

前記切断工程後に前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子及びその相補鎖に由来する一本鎖核酸断片のサイズを前記標識分子の検出に基づいて決定し、前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子及びその相補鎖において前記Pxの位置を決定する、Px位置決定工程

をさらに含む、〔30〕に記載の方法。

〔32〕前記塩基配列決定工程で決定された塩基配列において天然型塩基A及

びTの両方が配列決定された塩基位置を前記Ds又は前記Pxの位置として決定する、Ds/Px位置決定工程、及び

前記Ds/Px位置決定工程において決定された前記Ds又は前記Pxの位置のうち、前記Px位置決定工程においてPxの位置として決定された位置を除いた位置を前記Dsの位置として特定する、Ds位置特定工程をさらに含む、[31]に記載の方法。

[33] 前記塩基配列決定工程で決定された塩基配列において天然型塩基A及びTの両方が配列決定された塩基位置を前記Ds又は前記Pxの位置として決定する、Ds/Px位置決定工程、

前記Ds/Px位置決定工程で決定された前記Ds又は前記Pxの位置に、前記Ds及び／又は前記Pxを複数の又は全ての組み合わせで含み、前記Ds又は前記Pxの位置を除いた配列が前記塩基配列決定工程において決定された塩基配列からなる、複数の一本鎖核酸分子を合成する、合成工程、

前記合成工程で合成された前記複数の一本鎖核酸分子と前記標的物質とを混合して前記複数の一本鎖核酸分子と標的物質との複合体を形成させる、複合体形成工程、

前記複合体形成工程後の複合体形成効率を測定する、測定工程、及び

前記測定工程後に、前記複数の一本鎖核酸分子のうち、より高い又は最も高い複合体形成効率を示す一本鎖核酸分子の塩基配列を前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子の塩基配列として選択する、選択工程をさらに含む、[30]に記載の方法。

[34] 前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子が、[2]若しくは[2-2]、又は[2]若しくは[2-2]を引用する[3]～[21]のいずれかに記載の一本鎖核酸分子ライブラリーに由来するものであるか、又は[24]～[29]のいずれかに記載の方法によって製造された一本鎖核酸分子である、[30]～[33]のいずれかに記載の方法。

[35] 前記異なる標識分子が、蛍光波長に基づいて区別可能である、[31]又は[32]に記載の方法。

〔36〕前記中央領域が、前記Dsを1～10個含む、〔30〕～〔35〕のいずれかに記載の方法。

〔37〕前記中央領域が、前記Dsを1～4個含む、〔36〕に記載の方法。

〔38〕前記中央領域が、前記Dsを1～3個を含み、かつ前記Pxを1～2個含む、〔30〕～〔37〕のいずれかに記載の方法。

〔39〕以下の（1）～（6）からなる群から選択される核酸アプタマー：

（1）本明細書において後述する（1-i-a）～（1-i-v-d）からなる群から選択される、インターフェロン γ （IFN γ ）に結合する核酸アプタマー；

（2）本明細書において後述する（2-i-a）～（2-v-i-d）からなる群から選択される、インターフェロン γ （IFN γ ）に結合する核酸アプタマー；

（3）本明細書において後述する（3-i-a）～（3-v-b）からなる群から選択される、C反応性タンパク質（CRP）に結合する核酸アプタマー；

（4）本明細書において後述する（4-i-a）～（4-v-i-d）からなる群から選択される、トロンビンに結合する核酸アプタマー；

（5）本明細書において後述する（5-i-a）～（5-i-i-d）からなる群から選択される、インターロイキン-6（IL-6）に結合する核酸アプタマー；

（6）本明細書において後述する（6-i-a）～（6-v-i-i-d）からなる群から選択される、インターロイキン-8（IL-8）に結合する核酸アプタマー；

（7）本明細書において後述する（7-a）～（7-d）からなる群から選択される、HMGB1タンパク質に結合する核酸アプタマー；

（8）本明細書において後述する（8-i-a）～（8-x-i-i-b）からなる群から選択される、インターフェロン γ （IFN γ ）に結合する核酸アプタマー。

〔40〕前記一对の塩基配列が、非相補的塩基対、及び／又は1塩基以上の、挿入配列及び／又は欠失を含む、〔39〕に記載の核酸アプタマー。

〔41〕前記非相補的塩基対が、G-T塩基対を含む、〔40〕に記載の核酸アプタマー。

〔42〕前記挿入配列が、バルジ構造又はバルジアウト構造を形成する、〔40〕又は〔41〕に記載の核酸アプタマー。

〔43〕前記バルジ構造又はバルジアウト構造が、人工塩基を含む、〔42〕に記載の核酸アプタマー。

〔44〕前記人工塩基が、前記Ds、前記Pa'、及び／又は前記Pxである、〔43〕に記載の核酸アプタマー。

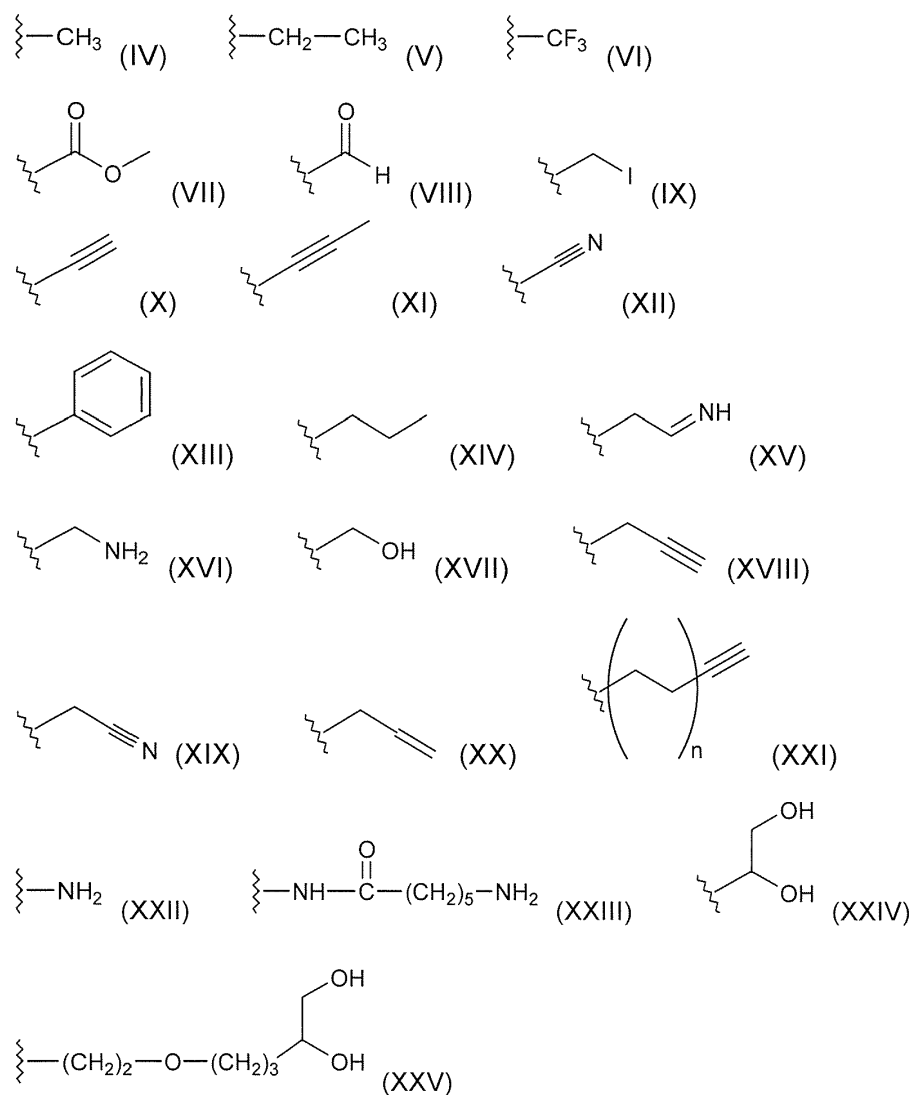
〔45〕前記一对の塩基配列が、配列番号51及び52；配列番号53（CTCCGCGTC）及び配列番号54（GACGCGGAG）；配列番号55（GTCCTCACG）及び配列番号56（CGTGAGGAC）；配列番号57及び58（配列番号57の9位のnで示す塩基は、前記Dsである）；配列番号59及び60（GGTCATGTGACAAGCAGC）；配列番号61及び62；配列番号63及び64；配列番号65（GCACGCTTT）及び配列番号66（AAAGCGTGCG）；配列番号67（GCTGTCAC）及び配列番号68（GTGACAGC）；配列番号69（GCGTTG）及び配列番号70（CAACGC）；配列番号71（GCTGATCT）及び配列番号72（AGATCAGC）；配列番号73及び74（配列番号74の3位のnで示す塩基は、前記Dsである）；配列番号75及び配列番号76（ACCACGTGC）；配列番号77及び78；配列番号79及び80；配列番号81及び82；配列番号79及び83（配列番号83の7位のnで示す塩基は、前記Dsである）；配列番号84及び85；配列番号86及び87；配列番号232（GCGCTTT）及び配列番号233（AAAGCGC）；配列番号234（GCGTT）及び配列番号235（AACGC）；配列番号239及び240；又は配列番号241及び242からなる、〔39〕～〔44〕のいずれかに記載の核酸アプタマー。

〔46〕5'末端及び／又は3'末端にミニヘアピン配列を含む、〔39〕～〔45〕のいずれかに記載の核酸アプタマー。

〔47〕前記インターフェロン γ （IFN γ ）は、グリコシル化されている、〔39〕～〔46〕のいずれかに記載の核酸アプタマー。

[48] 前記R¹が、以下の式(IV)～式(XXV)で示されるいずれかの式を示す、[39]～[46]のいずれかに記載の核酸アプタマー：

[化5]



[上記式中、波線部分はアルキンへの結合を表し、nは1以上の整数を表す]。

[49] [39]～[48]のいずれかに記載の核酸アプタマーを含む、インターフェロン γ 、C反応性タンパク質、トロロビン、インターロイキン-6、インターロイキン-8、又はHMGB1を検出するための検出キット。

〔50〕インターフェロン γ 、C反応性タンパク質、トロンビン、インターロイキン-6、インターロイキン-8、又はHMGB1を検出する方法であって、

〔39〕～〔48〕のいずれかに記載の核酸アプタマーを用いて、インターフェロン γ 、C反応性タンパク質、トロンビン、インターロイキン-6、インターロイキン-8、又はHMGB1を検出することを含み、前記方法。

〔51〕炎症又は炎症性疾患を検出するための、又はその炎症レベルを測定するための、〔49〕に記載の検出キット、又は〔50〕に記載の方法。

〔52〕前記炎症性疾患が、感染症、膠原病、心血管疾患、又は腫瘍であるか、又は

前記炎症が、組織損傷、壊死、又は外科手術に付随するものである、前記（3）の核酸アプタマーを含むか、又は前記（3）の核酸アプタマーを用いる、〔51〕に記載の検出キット又は方法。

〔53〕免疫療法においてT細胞及び／又はNK細胞の活性化レベルを測定するための、又は結核菌感染を検出するための、前記（1）、（2）、又は（8）の核酸アプタマーを含む、〔49〕に記載の検出キット、又は前記（1）、（2）、又は（8）の核酸アプタマーを用いる、〔50〕に記載の方法。

〔54〕〔39〕～〔48〕のいずれかに記載の核酸アプタマーを含む医薬組成物。

〔55〕抗炎症用である、〔54〕に記載の医薬組成物。

〔56〕前記（1）、（2）、又は（8）の核酸アプタマーを有効成分として含む、アフエレーシスに使用するための、〔54〕に記載の医薬組成物。

〔57〕前記（4）の核酸アプタマーを有効成分として含む、血液凝固を抑制又は阻害するための、〔54〕に記載の医薬組成物。

〔58〕前記（5）の核酸アプタマーを有効成分として含む、リウマチを治療するための〔54〕に記載の医薬組成物。

〔59〕前記（6）の核酸アプタマーを有効成分として含む、がんを治療するための、〔54〕に記載の医薬組成物。

〔60〕〔39〕～〔48〕のいずれかに記載の核酸アプタマーを対象に投

与することを含む、疾患を治療する方法。

〔61〕炎症性疾患を治療する、〔60〕に記載の方法。

〔62〕前記（１）、（２）、又は（８）の核酸アプタマーを用いるアフエレーシスによって血液からインターロン- γ を除去することを含む、〔60〕に記載の方法。

〔63〕前記（４）の核酸アプタマーを前記対象に投与して血液凝固を抑制又は阻害することを含む、〔60〕に記載の方法。

〔64〕前記（５）の核酸アプタマーを前記対象に投与することを含む、リウマチを治療するための〔60〕に記載の方法。

〔65〕前記（６）の核酸アプタマーを前記対象に投与することを含む、がんを治療するための〔60〕に記載の方法。

〔66〕前記（７）の核酸アプタマーを前記対象に投与することを含む、炎症性疾患、自己免疫疾患、がん、心血管疾患、又は神経疾患を治療するための〔60〕に記載の方法。

[0019] 本明細書は本願の優先権の基礎となる、シンガポール特許出願番号第10202300790X号の開示内容を包含する。なお、本願における配列番号1～87は、シンガポール特許出願番号第10202300790X号における配列番号1～87と同一である。

発明の効果

[0020] 本発明によれば、標的タンパク質に対して高い親和性を有する核酸アプタマーを効率よく生成するための新たな方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]疎水性の非天然型塩基であるDs塩基、Ds塩基と塩基対合するPx塩基及びPa'塩基、並びに4種類の天然型DNA塩基を示す図である。図1Aは、各塩基対の構造を示す。図1Bは、Px_(methyl)塩基及びPx_(diol)塩基を示す。図1Cは、Pa'_(methyl)塩基及びPa'_(diol)塩基を示す。図1Dは、Pa塩基を示す。

[図2]6塩基ExSELEX法の概要を示す図である。

[図3]AptD2アプタマー、及びAptD2アプタマーのPx_(diol)塩基を様々な塩基に置

換した改変型AptD2アプタマーのDEN2-NS1に対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す図である。

[図4]XL1ライブラリー又はXL2ライブラリーを対象とする6塩基ExSELEX法の概要を模式的に示す図である。図4Aは、XL1ライブラリーを対象とする6塩基ExSELEX法の概要を模式的に示す。図4BはXL2ライブラリーの構成を示す。なお、図中のPa' 塩基はPa' _(methyl) 塩基を示し、Px塩基はPx_(methyl) 塩基を示す（以降の図も同様である）。

[図5]6塩基ExSELEX法で選抜されたアプタマーにおける人工塩基の位置を決定する方法を模式的に示す図である。

[図6]XL1ライブラリーを対象とする6塩基ExSELEX法で得られたIFN γ 標的核酸アプタマーの解析結果を示す図である。図6Aは、リード数の多い上位のファミリーの配列を示す。図6Bは、図6Aにおけるファミリー 1 に属する核酸アプタマーにおける人工塩基の位置を解析した結果を示す。図 6 Cは、決定した人工塩基の位置を示す。

[図7]7種類の核酸アプタマー（AptIFN γ -1、AptIFN γ -2、AptIFN γ -3、AptIFN γ -4、AptIFN γ -5、AptIFN γ -6、及びBio-AptIFN γ -3）のヒトIFN γ に対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す図である。

[図8]5種類の核酸アプタマー（AptIFN γ -1、AptIFN γ -3、及びBio-AptIFN γ -3、並びに比較対照としたAptDs-IFN γ 及びBio-AptDs-IFN γ ）の非グリコシル化IFN γ 及びグリコシル化IFN γ に対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す図である。

[図9]XL2ライブラリーを対象とする6塩基ExSELEX法で得られたIFN γ 標的核酸アプタマーの解析結果を示す図である。図9Aは、リード数の多い上位のファミリーの配列を示す。図9Bは、グリコシル化されたヒトIFN γ に対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す。図9Cは、図9Aにおけるファミリー 1 に属する核酸アプタマーにおける人工塩基の位置を解析した結果を示す。図9Dは、決定した人工塩基の位置を示す。

[図10]10種類の核酸アプタマー（XL2-01a、XL2-01b、XL2-01c、XL2-01d、XL2

-01e、XL2-01h、XL2-01i、XL2-01j、XL2-01k、及びXL2-01l) の非グリコシル化IFN γ 及びグリコシル化IFN γ に対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す図である。図10Aは、XL2-01a～XL2-01eの結果を示す。図10Bは、XL2-01h～XL2-01lの結果を示す。

[図11]3種類の核酸アプタマー (Bio-XL2-01a、Bio-XL2-01i、及びBio-AptDs-IFN γ) のグリコシル化IFN γ に対する親和性をELONA法で解析した結果を示す図である。

[図12]6塩基ExSELEX法で得られたCRP標的核酸アプタマーの解析結果を示す図である。図12Aは、リード数の多い上位のファミリーの配列を示す。図12Bは、化学合成したCRP標的核酸アプタマーのCRPに対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す。

[図13]トロンピンを標的とする6塩基ExSELEX法において、リード数が多かった上位のファミリーの配列を示す。

[図14]9種類の核酸アプタマー (Thr101、Thr102、Thr104、Thr106、Thr201、Thr202、Thr203、Thr204、及びThr205) のヒトトロンピンに対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す図である。

[図15]7種類の核酸アプタマー (Thr104、Bio-Thr104b、Thr204、Bio-Thr204、Thr205、Bio-Thr205、及びBioMH-RE31) のヒトトロンピンに対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す図である。

[図16]4種類の核酸アプタマー (Bio-Thr104b、Bio-Thr204、Bio-Thr205、及びBioMH-RE31) のヒトトロンピンに対する親和性をELONA法で解析した結果を示す図である。

[図17]IL-6を標的とする6塩基ExSELEX法の結果を示す図である。図17Aは、リード数が多かった上位のファミリーの配列を示す。図17Bは、IL-6標的核酸アプタマーのIL-6に対する親和性をSPR法で解析した結果を示す。

[図18]IL-8を標的とする6塩基ExSELEX法において、リード数が多かった上位のファミリーの配列を示す。

[図19]6種類の核酸アプタマー (IL8-102DD、IL8-102PD、IL8-223DD、IL8-223

PD、IL8-201DDP、及びIL8-201DPD) のヒトIL-8に対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す図である。

[図20]6種類の核酸アプタマー (IL8-102PD、IL8-223PD、Bio-IL8-102PD、Bio-IL8-223PD、及びBio-IL8-223PDb) のヒトIL-8に対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す図である。

[図21]核酸アプタマーBio-HMGB1-301-DD及びBio-HMGB1-301-AAのヒトHMGB1タンパク質に対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す図である。

[図22]実施例5で作製した核酸アプタマーのグリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ に対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す図である。

[図23]実施例5で作製した核酸アプタマーのグリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ に対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す図である。

[図24]実施例5で作製した核酸アプタマーのグリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ に対する親和性をELISA法で解析した結果を示す図である。

[図25]実施例5で作製した核酸アプタマーのグリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ に対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す図である。

[図26]実施例5で作製した核酸アプタマーのグリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ に対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す図である。

[図27]実施例5で作製した核酸アプタマーのトロンビンに対する親和性をEMSA法で解析した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0022] <用語の定義>

本明細書で使用する一般的な用語の定義について以下で説明する。

[0023] 本明細書において、「核酸アプタマー」とは、核酸分子で構成されるアプタマーであって、水素結合等を介した一本鎖核酸分子の二次構造、さらに三次構造に基づいて形成される立体構造によって標的物質と強固、かつ特異的に結合するリガンド分子をいう。核酸アプタマーが標的物質の生理活性等の機能を特異的に阻害又は抑制する能力を持つ場合には、核酸アプタマーは標的分子物質機能阻害剤となり得る。本明細書において「標的物質の機能阻害」

とは、標的物質が有する機能、例えば触媒機能や遺伝子発現制御機能を阻害又は抑制することをいう。本明細書において核酸アプタマーを構成する核酸の種類は特に限定されず、例えばDNAのみで構成されるDNAアプタマー、RNAのみで構成されるRNAアプタマー、又はDNA及びRNAの組み合わせで構成される核酸アプタマーであってもよい。

[0024] 本明細書において「標的物質」とは、核酸アプタマーの結合対象となり得る物質をいう。標的物質の種類は、核酸アプタマーが結合し得る生体物質であれば、特に制限はしない。例えば、ペプチド（オリゴペプチド、又はポリペプチド）等のタンパク質、核酸、脂質、糖（糖鎖を含む）、低分子化合物が挙げられる。本発明の核酸アプタマーが標的として結合する物質は原則としてタンパク質であるため、本明細書において標的物質を「標的タンパク質」と表記する場合がある。

[0025] 本明細書において「核酸」又は「核酸分子」とは、原則としてヌクレオシドを構成単位とし、それらがヌクレオシド間結合によって連結した高分子をいう。

[0026] 本明細書において「天然型ヌクレオシド」とは、自然界に存在するヌクレオシドをいう。例えば、リボースとアデニン、シトシン、グアニン、又はウラシル等の塩基からなるリボヌクレオシドや、デオキシリボースと前記アデニン、シトシン、グアニン、又はチミン等の塩基からなるデオキシリボヌクレオシドが挙げられる。本明細書において「天然型ヌクレオチド」は、天然型ヌクレオシドで構成されるヌクレオチドである。

[0027] 本明細書において「非天然型ヌクレオシド」とは、天然ヌクレオシド以外の任意のヌクレオシドを指し、修飾ヌクレオシド及びヌクレオシド模倣体を含む。

[0028] 本明細書において「修飾ヌクレオシド」とは、修飾塩基及び／又は修飾糖部分等の修飾部分を有するヌクレオシドを意味する。

[0029] 本明細書において「ヌクレオチド」とは、ヌクレオシドの糖部分にリン酸基が共有結合した分子をいう。ペントフラノシル糖を含むヌクレオチドの場合

合、通常、糖の2'位、3'位、又は5'位のヒドロキシル基にリン酸基が連結されている。核酸合成の原料として用いられるアミダイト又はホスホロアミダイトは、ヌクレオチドに包含される。

[0030] 本明細書において「オリゴヌクレオチド」とは、隣接するヌクレオチド間で糖部分のヒドロキシル基とリン酸基が共有結合によって数個～数十個連結することによって形成される直鎖状のオリゴマーをいう。また「ポリヌクレオチド」とは、オリゴヌクレオチドよりも多数のヌクレオチドが前記共有結合によって数十個以上、好ましくは数百個以上連結することによって形成される直鎖状のポリマーをいう。天然型のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド構造の内部で、リン酸基は、一般にヌクレオシド間結合を形成する。

[0031] 本明細書において「天然型塩基」とは、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、及びウラシル、並びにそのいずれかの修飾塩基であって天然に存在するものを指す。なお、本明細書中の塩基配列において、アデニン及びグアニンから選択されるプリン塩基は「R」と表記し、シトシン、チミン、及びウラシルから選択されるピリミジン塩基は「Y」と表記する。

[0032] 本明細書において「非天然型塩基」又は「人工塩基」とは、天然型塩基以外の任意の核酸塩基を指す。非天然型塩基又は人工塩基は、天然型ヌクレオシドを構成する天然型塩基を置換することができる。なお、本明細書において非天然型塩基又は人工塩基は、人工塩基対を形成できるものであっても、人工塩基対を形成できないものであってもよい。

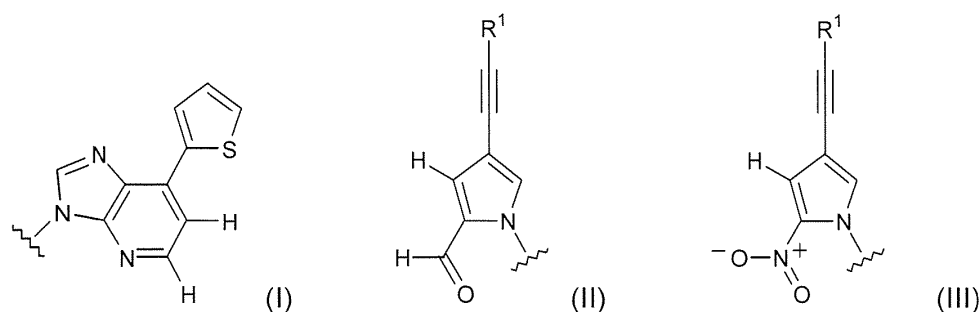
[0033] 本明細書において「人工塩基対」とは、天然型塩基のアデニンとチミン、アデニンとウラシル、又はグアニンとシトシンのように、塩基対合を形成することができる一対の人工塩基をいう。人工塩基対が形成する塩基対合は、天然型塩基間の塩基対合にも見られる水素結合や、疎水性相互作用を介したスタッキング効果等を含み得る。塩基対合可能な人工塩基対は、人工塩基間の相補性によって正確な複製や転写ができる場合があり、人工塩基を含む核酸鎖をPCR等の核酸増幅法によって増幅することも可能である。

[0034] 上記人工塩基の具体例として、Ds (7-(2-thienyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyri

dine-3-yl ; 後述する一般式 (I) で示す非天然型塩基 ; 本明細書では「非天然型塩基Ds」、又は単に「Ds塩基」若しくは「Ds」という)、Pa (2-formyl-1H-pyrrole-1-yl ; 本明細書では「Pa」とする)、Pa' (後述する一般式 (II) で示す非天然型塩基 ; 本明細書では「非天然型塩基Pa'」、又は単に「Pa'塩基」若しくは「Pa'」という)、Px (後述する一般式 (III) で示す非天然型塩基 ; 本明細書では「非天然型塩基Px」、又は単に「Px塩基」若しくは「Px」という)、Pn(2-nitropyrrole-1-yl ; 本明細書では「Pn」とする)、P(2-amino-imidazo[1,2-a]-1,3,5-triazin-4(8H)-one ; 本明細書では「P」とする)、Z(6-amino-5-nitro-2(1H)-pyridone ; 本明細書では「Z」とする)、5SICS (6-methylisoquinoline-1(2H)-thione ; 本明細書では「5SICS」とする)、NaM (3-methoxynaphthalen-2-yl ; 本明細書では「NaM」とする)、及びMM02 (2-methoxy-4-methylphenyl ; 本明細書では「MM02」とする) が挙げられる。これらの人工塩基において、Dsの相補的人工塩基には、Pa、Px、Pa'、及びPn等が挙げられる。Pの相補的人工塩基には、Zが挙げられる。5SICSの相補的人工塩基には、NaM及びMM02が挙げられる。

[0035] 本明細書において、非天然型塩基Dsは、以下の一般式(I)で示される。また、本明細書において、非天然型塩基Pa' は、以下の一般式(II)で示される。さらにまた、本明細書において、非天然型塩基Pxは、以下の一般式(III)で示される。

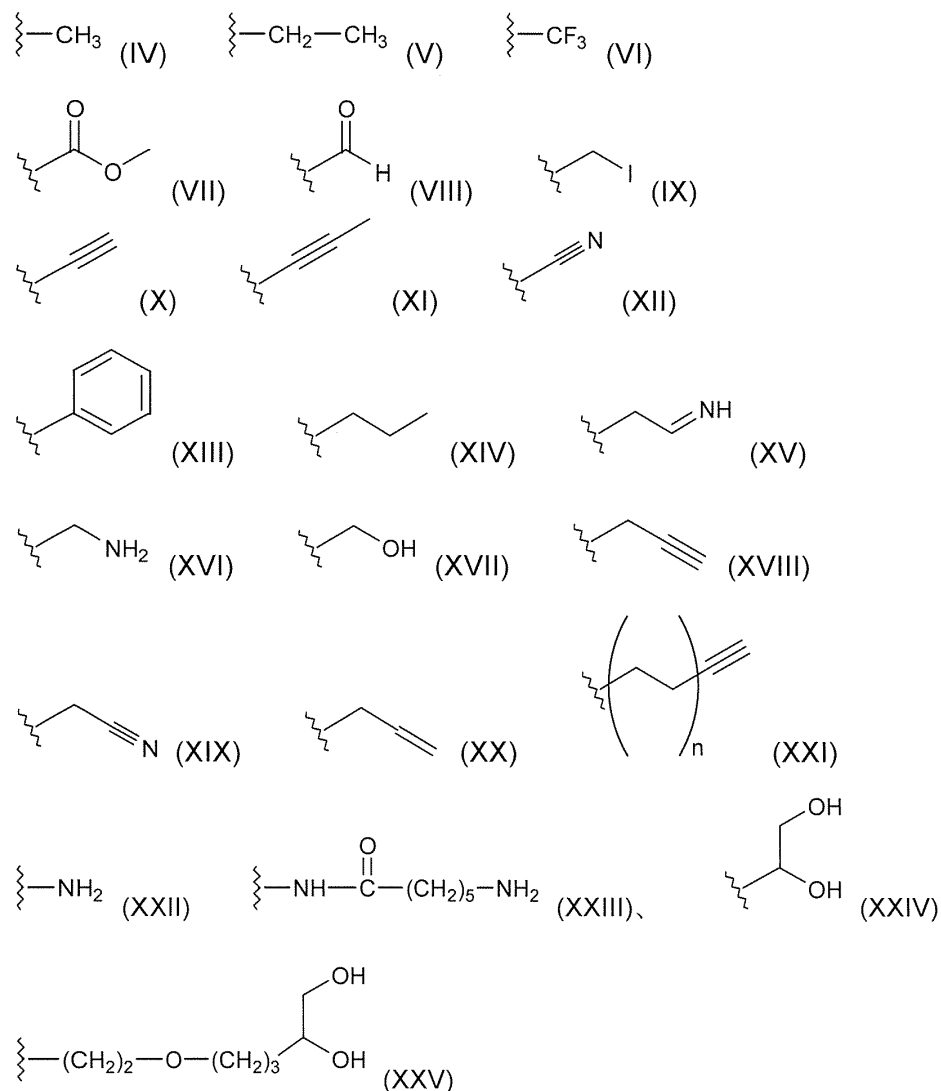
[化6]



[上記式中、R¹は、水素原子又は任意に置換されていてもよい炭化水素基を表す]。

- [0036] 上記の一般式(I)、一般式(II)、及び一般式(III)で示す非天然型塩基において、波線部分はヌクレオシド又はヌクレオチドにおける糖部分を示す。核酸アプタマーがDNAアプタマーである場合、ヌクレオシド又はヌクレオチドにおける糖部分はデオキシリボース部分であり、非天然型塩基はデオキシリボースにおける1'位の炭素原子に結合している。核酸アプタマーがRNAアプタマーである場合、ヌクレオシド又はヌクレオチドにおける糖部分はリボース部分であり、非天然型塩基はリボースにおける1'位の炭素原子に結合している。
- [0037] 上記の一般式(II)及び一般式(III)において、R¹は、水素原子又は任意に置換されていてもよい炭化水素基を表し、例えば任意に置換されていてもよいアルキル基であってもよい。本明細書において「アルキル」又は「アルキル基」とは、1つ以上の炭素原子を有する飽和炭化水素をいう。アルキル基の具体例として、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル等が挙げられる。また、アルキル基における水素基の置換の例としては、ヒドロキシル、カルボキシル、シアノ、ニトロ、ハロゲン（例えば、Cl、F、Br、又はI）、チオール、アルコキシ基、エステル、チオエーテル、チオエステル、ニトロ、又はアミン等による置換が挙げられる。アルキル基における水素基の置換の数は限定せず、例えば1又は2以上の置換であってもよい。
- [0038] R¹のさらなる例としては、以下の式(IV)～式(XXV)で示されるいずれか一の式で示される構造も挙げられる。

[化7]



なお、上記の式 (IV) ~ 式 (XXV) 中、波線部分は一般式 (II) 又は一般式 (I) におけるアルキンへの結合を表し、 n は 1 以上の整数を表す。

[0039] 本明細書において Pa' 塩基において R^1 基が上記式 (IV) で示すメチル基であるものを「 $\text{Pa}'_{(\text{methyl})}$ 」と称する。また、 Px 塩基において R^1 基が上記式 (IV) で示すメチル基であるものを「 $\text{Px}_{(\text{methyl})}$ 」と称する。さらにまた、 Pa' 塩基において R^1 基が上記式 (XXIV) で示すジオール基であるものを「 $\text{Pa}'_{(\text{diol})}$ 」と称し、 Px 塩基において R^1 基が上記式 (XXIV) で示すジオール基であるものを「 $\text{Px}_{(\text{diol})}$ 」と称す。

る。以下、本明細書では、Pa' 塩基は、上述のいずれのPa' 塩基であってもよいが、好ましくはPa' _(methyl) 塩基又はPa' _(diol) 塩基であり、より好ましくはPa' _(methyl) 塩基である。また、Px塩基は、上述のいずれのPx塩基であってもよいが、好ましくはPx_(methyl) 塩基又はPx_(diol) 塩基であり、より好ましくはPx' _(methyl) 塩基である。

[0040] 人工塩基は、複製や転写の際、その相補的人工塩基を有する非天然型ヌクレオシドが基質に含まれない場合には、その相補的人工塩基と構造的に及び／又は性質的に近い天然型塩基と代替的に塩基対合する場合がある。この場合、鋳型となった核酸分子における非天然型ヌクレオシドは、複製又は転写後に天然型ヌクレオシドに置換されることとなる。例えば、上述のDs、Px、Pa' 等の場合、A又はTに置換され得る。

[0041] 本明細書において、「修飾塩基」とは、化学修飾された塩基を意味する。修飾塩基として、例えば、修飾化ピリミジン（例えば、5-ヒドロキシシトシン、5-フルオロウラシル、4-チオウラシル、5-(3-インドール-2-エチル)ウラシル、5-(4-ヒドロキシフェニル-2-エチル)ウラシル）、修飾化プリン（例えば、6-メチルアデニン、6-チオグアノシン）及び他の複素環塩基等が挙げられる。

[0042] 本明細書において、「ステム構造」又は「ステム領域」とは、構成塩基の一部、例えば連続する2以上の塩基が互いに完全に又は部分的に塩基対合することによって形成される二本鎖構造を意味する。ステム構造の長さは、例えば1bp以上、2bp以上、3bp以上、4bp以上、又は5bp以上であり、かつ／又は30bp以下、25bp以下、20bp以下、15bp以下、10bp以下、9bp以下、又は8bp以下である。ステム構造の例として、配列番号51及び52；配列番号53及び54；配列番号55及び56；配列番号57及び58（配列番号57の9位のnで示す塩基は、前記Dsである）；配列番号59及び60；配列番号61及び62；配列番号63及び64；配列番号65及び66；配列番号67及び68；配列番号69及び70；配列番号71及び72；配列番号73及び74（配列番号74の3位のnで示す塩基は、前記Dsである）；配列番号75及び配列番号76；配列番号77及び78；配列番号79及び80；配列番

号81及び82；配列番号79及び83（配列番号83の7位のnで示す塩基は、前記Dsである）；配列番号84及び85；配列番号86及び87；配列番号232及び233；配列番号234及び235；配列番号239及び240；又は配列番号241及び242で示す2つの塩基配列が塩基対合して形成する構造が挙げられる。

[0043] 本明細書において、「ミニヘアピン構造」又は「ミニヘアピン」は、以下に述べる第1核酸領域、第2核酸領域、及び第3核酸領域の3つのDNA核酸領域がそれぞれ5'末端側から3'末端側に向かって順番に連結された構造を有する。「第1核酸領域」とは、2～5個の任意のヌクレオチドからなる核酸領域である。本核酸領域の塩基は、限定しないが、好ましくはグアニン又はシトシンである。「第2核酸領域」とは、5'-gna-3'又は5'-gnna-3'の塩基配列からなる核酸領域である。配列中の各nは、独立に、天然型塩基、前記塩基類似体又は修飾塩基のいずれかからなる。「第3核酸領域」とは、第1核酸領域に対して相補的な塩基配列を有する核酸領域である。したがって、第3核酸領域の塩基配列は、第1核酸領域の塩基配列によって定まり、また第1核酸領域と第3核酸領域は、分子内で塩基対を形成する。その結果、第1核酸領域と第3核酸領域は、互いに完全に塩基対合したステム部分を、また第1核酸領域と第3核酸領域の間に存在する第2核酸領域は、ループ部分をそれぞれ構成する。ミニヘアピン配列の一例として、5'-CGCGTAGCG-3'（配列番号133；塩基Tはデオキシ化されていてもよい）が挙げられる。ミニヘアピン構造は、核酸分解酵素に対する分解耐性を高め、及び／又はDNAアプタマーのT_m値を上げることでDNAアプタマーの熱安定性を増加させ得る。

[0044] 本明細書において、「インターナルループ構造」とは、ステム構造を形成する二本鎖双方の対応する位置に、塩基対を形成しない一以上の塩基が存在する場合に生じるステム構造内のループ構造を指す。

[0045] 本明細書において、「バルジ構造」とは、ステム構造を形成する二本鎖の対応する位置において一方のみに、塩基対を形成しない一以上の塩基が存在する場合に生じるステム構造内の突出構造を指す。

[0046] 本明細書において、「ループ構造」とは、ステム構造を構成する二本鎖間

に位置し、ステム構造の形成によって生じる、塩基対合しない核酸内部のループ状の構造を意味する。

[0047] 本明細書において、「ヘアピン構造」又は「ステムループ構造」は、一つのステム構造及び一つのループ構造（一組のステム構造及びループ構造）からなる構造を意味する。

[0048] 本明細書中で使用される用語「相補的」とは、核酸塩基が水素結合を介して、いわゆるワトソン-クリック塩基対(天然型塩基対)又は非ワトソン-クリック塩基対(フーグスティーン型塩基対等)を形成し得る関係を意味する。本発明においては、塩基配列が少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%(例えば、95%、96%、97%、98%、又は99%以上)の相補性を有していれば許容される。塩基配列の相補性は、BLASTプログラム等を使用することによって決定することができる。

[0049] 本明細書において「核酸プライマー」（単に「プライマー」と略記する場合もある）とは、核酸配列の一部に特異的に結合し、ポリメラーゼ酵素による核酸合成反応の起点を提供する核酸分子である。核酸プライマーは通常一本鎖であり、ポリメラーゼ反応の鋳型となる標的核酸配列の一部に相補的な塩基配列で構成される。プライマーとして、例えば6～100塩基長、10～70塩基長、12～50塩基長、15～40塩基長、18～30塩基長、又は20～25塩基長の核酸鎖を使用することができる。

[0050] 本明細書において「複数」とは、2以上の任意の整数、例えば、2～10¹⁰、2～10⁹、2～10⁸、2～10⁷、2～10⁶、2～10⁵、2～10⁴、2～1,000、2～900、2～800、2～700、2～600、2～500、2～400、2～300、2～200、2～100、2～90、2～80、2～70、2～60、2～50、2～40、2～30、2～20、2～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4、2～3、又は2である。

[0051] <Ds/Pa' 含有一本鎖核酸分子ライブラリー>

本発明の一態様において、複数の一本鎖核酸分子を含む、一本鎖核酸分子ライブラリーが提供される。本明細書において、一本鎖核酸分子ライブラリーが「複数の一本鎖核酸分子を含む」とは、一本鎖核酸分子ライブラリーを

構成する一本鎖核酸分子の塩基配列に基づく種類が2以上であることを意味する。本態様において、複数の一本鎖核酸分子は、Ds/Pa' 含有一本鎖核酸分子を含む。それ故、本態様の一本鎖核酸分子ライブラリーを「Ds/Pa' 含有一本鎖核酸分子ライブラリー」という。

[0052] 本明細書において「Ds/Pa' 含有一本鎖核酸分子」とは、天然型塩基に加えて、上述のDs塩基及びPa' 塩基をそれぞれ1個以上含む一本鎖の核酸分子である。Ds/Pa' 含有一本鎖核酸分子は、可変領域からなる、又は可変領域を必須領域として含む。また、Ds/Pa' 含有一本鎖核酸分子は、可変領域に加えて、その5'末端及び3'末端に位置する一対のプライマー結合領域を含んでもよい。例えば、Ds/Pa' 含有一本鎖核酸分子は、5'末端側から順に、5'末端側プライマー結合領域、可変領域、及び3'末端側プライマー結合領域を含む。

[0053] 本明細書において「プライマー結合領域」とは、一本鎖核酸分子ライブラリーを構成する一本鎖核酸分子を増幅するための核酸増幅反応において使用するプライマーが、一本鎖核酸分子において結合する領域である。プライマー結合領域を構成する塩基配列は、一本鎖核酸分子ライブラリーを構成する複数の一本鎖核酸分子において共通する配列であることが好ましい。プライマー結合領域は、一本鎖核酸分子の5'末端及び3'末端に原則としてそれぞれ1個ずつ配置されるため、5'末端及び3'末端に配置されるプライマー結合領域のペアを「一対のプライマー結合領域」と呼ぶ。一対のプライマー結合領域を構成する塩基配列及び各プライマー結合領域の長さは特に制限されず、核酸増幅法の増幅条件等に基づいて設計すればよい。例えば、各プライマー結合領域の長さは、2～150塩基長、6～100塩基長、10～70塩基長、12～50塩基長、15～40塩基長、18～30塩基長、又は20～25塩基長であってもよい。2塩基のみで構成されるプライマー結合領域は、ミニマルプライマーとして公知であり、本発明においても利用することができる。なお、本発明の一本鎖核酸分子ライブラリーは、プライマー結合領域を含まないものであってもよい。プライマー結合領域を含まないアプタマーは「Primer free DNA aptamer」等としても知られており、増幅工程の前にアプタマー配列の両端に (T4 RNA Li

gase 1又は熱耐性RNAリガーゼ等を用いて)プライマー結合配列が連結され、複合体形成工程前にプライマー結合配列が制限酵素等の切断酵素により除去される。

- [0054] 本明細書において「可変領域」とは、一本鎖核酸分子ライブラリーを構成する複数の一本鎖核酸分子間で互いに異なる塩基配列からなる領域をいう。本態様において可変領域は、天然型塩基（例えばA塩基、G塩基、T塩基/U塩基、及び／又はC塩基）、上述の一般式（I）で示す非天然型塩基Ds、及び上述の一般式（II）で示す非天然型塩基Pa'を含み、天然型塩基、Ds塩基、及び／又はPa'塩基の全部又は一部が、互いに異なる位置に配置された配列、例えばランダムに配置された配列を少なくともその一部に含む。
- [0055] 可変領域におけるDs塩基及びPa'塩基の数はそれぞれ1個以上であれば特に制限されない。例えば、Ds塩基及びPa'塩基の数は、それぞれ独立に1～15個、2～12個、又は3～10個であり、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、又は5個以下であってもよいが、好ましくは1～4個、1～3個、又は1～2個である。
- [0056] また、可変領域において塩基をランダムに配置する場合は、各位置に導入される塩基は確率的に決定されるため、各塩基の個数は平均値として表される。この場合、Ds塩基及びPa'塩基の数は、平均して少なくとも0.1個～1個であれば特に制限されない。例えば、Ds塩基及びPa'塩基の数は、それぞれ独立に、平均して、0.1～15個、0.5～12個、又は1～10個であり、平均して、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、又は5個以下であってもよいが、好ましくは平均して1～4個、1～3個、又は1～2個である。
- [0057] 一実施形態において、可変領域は、Ds塩基を1～3個含み、かつPa'塩基を平均して1～2個含む。また、別の実施形態において、可変領域は、Pa'塩基を1～3個を含み、かつDs塩基を平均して1～2個含む。
- [0058] 可変領域では、Ds塩基及び／又はPa'塩基は、指定された位置に配置してもよく、又はランダムな位置に配置されてもよい。例えば、Ds塩基及びPa'塩基の両方が、指定された位置に配置してもよく、又はランダムな位置に配置さ

れてもよい。また、Ds塩基は、指定された位置に配置され、Pa'塩基はランダムな位置に配置されてもよく、或いはPa'塩基は指定された位置に配置され、Ds塩基はランダムな位置に配置されてもよい。Ds塩基及び／又はPa'塩基を指定された位置に配置すれば、後述する塩基配列決定方法において人工塩基の位置を容易に決定できる利点がある。

[0059] 一実施形態において、Ds/Pa'含有一本鎖核酸分子における可変領域は、1以上の指定された位置に配置されたDs塩基、並びに前記指定された1以上の位置を除いて、Pa'塩基及び天然型塩基（例えばA塩基、G塩基、T塩基/U塩基、及び／又はC塩基）からなるランダム配列を含む。或いは、Ds/Pa'含有一本鎖核酸分子における可変領域は、1以上の指定された位置に配置されたPa'塩基、並びに前記指定された1以上の位置を除いて、Ds塩基及び天然型塩基（例えばA塩基、G塩基、T塩基/U塩基、及び／又はC塩基）からなるランダム配列を含む。

[0060] さらに実施形態において、本態様の一本鎖核酸分子ライブラリーを構成する複数のDs/Pa'含有一本鎖核酸分子では、可変領域においてDs塩基又はPa'塩基が配置される指定された位置が互いに異なる。後述する実施例では、この指定された位置における塩基が同一であり、それ以外の位置にはランダムな塩基が導入された一本鎖核酸分子の集団をサブライブラリーと呼ぶ。

[0061] <Ds/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリー>

本発明の一態様において、複数の一本鎖核酸分子を含む、一本鎖核酸分子ライブラリーが提供される。本態様では、複数の一本鎖核酸分子はDs/Px含有一本鎖核酸分子を含む。それ故、本態様の一本鎖核酸分子ライブラリーを「Ds/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリー」という。

[0062] 本明細書において「Ds/Px含有一本鎖核酸分子」とは、天然型塩基に加えて、上述のDs塩基及びPx塩基をそれぞれ1個以上含む一本鎖の核酸分子である。Ds/Px含有一本鎖核酸分子は、可変領域を必須領域として含む。また、Ds/Px含有一本鎖核酸分子は、可変領域に加えて、その5'末端及び3'末端に位置する一対のプライマー結合領域を含んでもよい。例えば、Ds/Px含有一本鎖核酸

分子は、5'末端側から順に、5'末端側プライマー結合領域、可変領域、及び3'末端側プライマー結合領域を含む。

- [0063] 本態様において可変領域は、天然型塩基（例えばA塩基、G塩基、T塩基/U塩基、及び／又はC塩基）、上述の一般式（I）で示す非天然型塩基Ds、及び上述の一般式（III）で示す非天然型塩基Pxを含み、天然型塩基、Ds塩基、及び／又はPx塩基の全部又は一部が、互いに異なる位置に配置された配列、例えばランダムに配置された配列を少なくともその一部に含む。
- [0064] 本態様では、可変領域におけるDs塩基及びPx塩基の数はそれぞれ1個以上であれば特に制限されない。例えば、Ds塩基及びPx塩基の数は、それぞれ独立に1～15個、2～12個、又は3～10個であり、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、又は5個以下であってもよいが、好ましくは1～4個、1～3個、又は1～2個である。
- [0065] また、可変領域において塩基をランダムに配置する場合は、Ds塩基及びPx塩基の数は、平均して少なくとも0.1個～1個であれば特に制限されない。例えば、Ds塩基及びPx塩基の数は、それぞれ独立に、平均して、0.1～15個、0.5～12個、又は1～10個であり、平均して、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、又は5個以下であってもよいが、好ましくは平均して1～4個、1～3個、又は1～2個である。
- [0066] 一実施形態において、可変領域は、Ds塩基を1～3個含み、かつPx塩基を平均して1～2個含む。また、別の実施形態において、可変領域は、Px塩基を1～3個含み、かつDs塩基を平均して1～2個含む。
- [0067] 可変領域では、Ds塩基及び／又はPx塩基は、指定された位置に配置してもよく、又はランダムな位置に配置されてもよい。例えば、Ds塩基及びPx塩基の両方が、指定された位置に配置してもよく、又はランダムな位置に配置されてもよい。また、Ds塩基は、指定された位置に配置され、Px塩基はランダムな位置に配置されてもよく、或いはPx塩基は、指定された位置に配置され、Ds塩基はランダムな位置に配置されてもよい。Ds塩基及び／又はPx塩基を指定された位置に配置すれば、後述する塩基配列決定方法において人工塩基

の位置を容易に決定できる利点がある。

- [0068] 一実施形態において、Ds/Px含有一本鎖核酸分子における可変領域は、1以上の指定された位置（例えば、1～10、2～9、3～8、4～7、又は5～6の位置）に配置されたDs塩基、並びに前記指定された1以上の位置を除いて、Px塩基及び天然型塩基（例えばA塩基、G塩基、T塩基/U塩基、及び／又はC塩基）からなるランダム配列を含む。或いは、Ds/Px含有一本鎖核酸分子における可変領域は、1以上の指定された位置（例えば、1～10、2～9、3～8、4～7、又は5～6の位置）に配置されたPx塩基、並びに前記指定された1以上の位置を除いて、Ds塩基及び天然型塩基（例えばA塩基、G塩基、T塩基/U塩基、及び／又はC塩基）からなるランダム配列を含む。
- [0069] さらに実施形態において、本態様の一本鎖核酸分子ライブラリーを構成する複数のDs/Px含有一本鎖核酸分子では、可変領域においてDs塩基又はPx塩基が配置される指定された位置が互いに異なる。
- [0070] 本発明のDs/Pa'含有一本鎖核酸分子ライブラリー又はDs/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリーでは、可変領域の長さは制限されず、例えば5塩基長以上、10塩基長以上、12塩基長以上、14塩基長以上、16塩基長以上、18塩基長以上、20塩基長以上、30塩基長以上、40塩基長以上、50塩基長以上、又は60塩基長以上、かつ／又は500塩基長以下、400塩基長以下、300塩基長以下、200塩基長以下、100塩基長以下、90塩基長以下、又は80塩基長以下であってもよい。
- [0071] 一実施形態において、本発明のDs/Pa'含有一本鎖核酸分子ライブラリー又はDs/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリーでは、複数の一本鎖核酸分子の各々が、5' ウィング領域及び／又は3' ウィング領域を含む。本明細書において「5' ウィング領域」とは、可変領域の5' 末端側に配置された、天然型塩基からなる領域、又は5' 末端に位置するプライマー結合領域と可変領域との間に配置された、天然型塩基からなる領域である。また、本明細書において「3' ウィング領域」とは、可変領域の3' 末端側に配置された、天然型塩基からなる領域、又は可変領域と3' 末端に位置するプライマー結合領域との間に配置され

た、天然型塩基からなる領域である。

[0072] 5' ウィング領域及び／又は3' ウィング領域の長さは特に制限されず、例えば2塩基長以上、4塩基長以上、6塩基長以上、8塩基長以上、10塩基長以上、12塩基長以上、又は15塩基長以上、かつ／又は80塩基長以下、60塩基長以下、40塩基長以下、30塩基長以下、25塩基長以下、20塩基長以下、又は18塩基長以下であってもよい。

[0073] 一実施形態において、5' ウィング領域及び／又は3' ウィング領域は、天然型塩基で構成されるランダム配列からなる。ランダム配列の長さは、例えば1～30塩基長、2～25塩基長、3～20塩基長、5～15塩基長、又は8～12塩基長であってもよい。

[0074] 一実施形態において、5' ウィング領域及び／又は3' ウィング領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の相補配列を含む。ステム構造の長さは、例えば1bp以上、2bp以上、3bp以上、4bp以上、又は5bp以上であり、かつ／又は30bp以下、25bp以下、20bp以下、15bp以下、10bp以下、又は8bp以下であってもよく、例示的な範囲としては3～20bp（3～20塩基長）が挙げられる。

[0075] さらに実施形態において、上述のステム構造を形成することができる相補配列は、非ワトソンクリック型塩基対、及び／又は1塩基以上の、挿入配列及び／又は欠失を含む。非ワトソンクリック型塩基対は、上述のワトソンクリック塩基対以外の任意の塩基対であってもよく、例えばG-T塩基対であってもよい。また、挿入配列は、バルジ構造又はバルジアウト構造を形成することもできる。バルジ構造又はバルジアウト構造は、天然型塩基で構成されていてもよく、或いは人工塩基（例えばDs塩基、Pa'塩基、及び／又はPx塩基）を含んでもよい。

[0076] <一本鎖核酸分子ライブラリー作製方法>

本発明の一態様において、一本鎖核酸分子ライブラリー作製方法が提供される。本態様の一本鎖核酸分子ライブラリー作製方法は、必須工程として増幅工程を含み、Ds/Pa' 含有一本鎖核酸分子ライブラリーからDs/Px含有一本鎖

核酸分子ライブラリーを作製すること（実施形態A）、及びDs/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリーからDs/Pa'含有一本鎖核酸分子ライブラリーを作製すること（実施形態B）ができる。

[0077] 上記実施形態Aでは、本態様の作製方法における増幅工程は、上述の＜Ds/Pa'含有一本鎖核酸分子ライブラリー＞に記載のいずれかのDs/Pa'含有一本鎖核酸分子ライブラリーを鋳型として、かつ天然型ヌクレオチド、Ds含有ヌクレオチド、及びPx含有ヌクレオチドを基質として、核酸増幅法により一本鎖核酸分子を増幅することにより、増幅産物としてDs/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリーを得ることができる。

[0078] また、実施形態Bでは、本態様の作製方法における増幅工程は、上述の＜Ds/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリー＞に記載のいずれかのDs/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリーを鋳型として、かつ天然型ヌクレオチド、Ds含有ヌクレオチド、及びPa'含有ヌクレオチドを基質として、核酸増幅法により一本鎖核酸分子を増幅することにより、増幅産物としてDs/Pa'含有一本鎖核酸分子ライブラリーを得ることができる。

[0079] 本態様の作製方法に用いる天然型ヌクレオチドは、天然型塩基のアデニン、シトシン、グアニン、チミン、及び／又はウラシルを含むヌクレオチドである。例えば、アデニン、シトシン、グアニン、及びチミンを含むデオキシリボヌクレオチドの組み合わせ（「dNTP」と呼ばれる場合がある）を使用することができる。

[0080] 本明細書において「Ds含有ヌクレオチド」、「Px含有ヌクレオチド」、又は「Pa'含有ヌクレオチド」とは、デオキシリボース又はリボース等の糖部分と、核酸塩基としてそれぞれDs、Px、又はPa'を含むヌクレオチドをいう。

[0081] 本発明では、増幅工程に用いる具体的な増幅方法として、公知の任意の核酸増幅法を使用することができる。本明細書において「核酸増幅法」とは、必要に応じてプライマーを用いて、核酸ポリメラーゼにより核酸を増幅させる方法をいう。例えば、PCR法、NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) 法、ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification) 法、

ation of Nucleic acids) 法 (等温遺伝子増幅法)、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) (登録商標) 法、RCA (Rolling-Cycle Amplification) 法が挙げられる。本発明で使用する核酸増幅法について限定はしないが、好ましくはPCR法であり、通常は熱耐性DNAポリメラーゼを使用する。各核酸増幅方法については、当該分野で公知であり、各種プロトコルに記載の条件を参考に行えばよい。プロトコル集の例として、Green, MR and Sambrook, J, (2012)、Domingues L. (2017) PCR: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Humana Press、又はPark DJ, (2010) PCR Protocols, Methods in Molecular Biology, Third Edition, Humana Press等が挙げられる。また、核酸増幅用のキットがライフサイエンスメーカーから市販されており、それらを利用することもできる。その場合、核酸増幅方法の条件等については、添付又は各メーカーが推奨するプロトコルに従えばよい。増幅工程では、例えばPCR法を用いて数回の増幅サイクル (例えば1~40サイクル、2~30サイクル、3~20サイクル、4~15サイクル、又は5~10サイクル) を行えばよい。

[0082] 本態様の作製方法により、化学合成したDs/Pa' 含有一本鎖核酸分子ライブラリーから、ExSELEX法に供するためのDs/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリーを作製することができる。また、ExSELEX法で濃縮されたDs/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリーから、塩基性条件下でも安定なDs/Pa' 含有一本鎖核酸分子ライブラリーを作製することができる。

[0083] <核酸アプタマー製造方法>

本発明の一態様において、核酸アプタマー製造方法が提供される。本態様の核酸アプタマー製造方法の具体的工程は、以下の3つの実施形態：ライブラリー合成工程を含まなくてもよい実施形態 (実施形態1)、ライブラリー合成工程を含み、ライブラリー合成工程で得られるDs/Pa' 含有一本鎖核酸分子ライブラリーから、標的物質との複合体形成を経ずにDs/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリーを増幅する実施形態 (実施形態2)、及びライブラリー合成工程を含み、ライブラリー合成工程で得られるDs/Pa' 含有一本鎖核酸分子

ライブラリーを標的物質との複合体形成に供した後、Ds/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリーを増幅する実施形態（実施形態3）によって異なるため、以下では各実施形態をそれぞれ説明する。

[0084] <核酸アプタマー製造方法：実施形態1>

本実施形態の製造方法は、必須工程として複合体形成工程、複合体回収工程、及び増幅工程を含むか、又は必須工程として複合体形成工程及び複合体回収工程を含む。増幅工程を含まない実施形態では、複合体回収工程後のDs/Px含有一本鎖核酸分子を増幅せず、例えば複合体形成工程及び複合体回収工程を複数回繰り返すことによって、1分子以上の最終的なアプタマーを得ることができる。そのような1分子のアプタマーでも、ナノポアシーケンス等の一分子塩基配列決定技術を使用して塩基配列を決定することができる。以下、各工程の構成について具体的に説明する。

[0085] （複合体形成工程）

複合体形成工程は、上述の<Ds/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリー>に記載のいずれかのDs/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリーと標的物質とを溶液中で混合して、Ds/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリー中のDs/Px含有一本鎖核酸分子と標的物質との複合体を形成させる工程である。

[0086] 本工程は、例えば標的物質とDs/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリーとを溶液中で混合することにより実施できる。一本鎖核酸分子ライブラリーと標的物質との混合比は、例えば100:1～1:100、好ましくは1:1である。本工程の条件は特に限定しないが、例えば常温を含む温度範囲（15～60℃又は25～40℃の温度）で、1秒～数日、数秒～数時間、例えば10秒～6時間、又は5分～3時間インキュベーションすることにより行うことができる。

[0087] 本工程で使用する溶液は、核酸と標的物質とが複合体を形成できる溶液であれば、その種類、性質は特に制限しない。好ましくは水又は水溶液である。水溶液の場合、pHは、5.0～9.0、好ましくは6.0～8.0、より好ましくは6.5～7.6の範囲であればよい。また、塩濃度は、最終濃度で20～500 mM、好ましくは50～300 mM、より好ましくは90～180 mMの範囲であればよい。水溶液は

、例えばリン酸バッファ、クエン酸ーリン酸バッファ、トリスー塩酸バッファ又はHEPESバッファ等のpH緩衝液であってもよい。また、上記溶液は、必要に応じて、さらに還元剤や界面活性剤を含んでもよい。本工程で形成された複合体は、次の複合体回収工程前に洗浄してもよい。

[0088] (複合体回収工程)

複合体回収工程は、複合体形成工程で形成したDs/Px含有一本鎖核酸分子と標的物質との複合体を回収する工程である。回収方法は、複合体を未結合のDs/Px含有一本鎖核酸分子から分離できる方法であればよく、例えば沈降、凝集、沈殿、濾過、遠心分離、電気泳動、又は磁力等によって複合体を回収すればよい。例えば、アクリルアミドゲルを用いた電気泳動後に、核酸に結合していない標的物質及び／又は標的物質と結合していない核酸よりも高分子量側にシフトしたバンドから複合体に対応する範囲を切り出すことができる。また、標的物質に対する抗体等の結合手段を用いて標的物質に結合した核酸鎖を回収してもよい。

[0089] (増幅工程)

増幅工程は、天然型ヌクレオチド、Ds含有ヌクレオチド、及びPx含有ヌクレオチドを基質として、複合体回収工程後の複合体に含まれる一本鎖核酸分子を核酸増幅法によって増幅する工程である。本工程により、増幅産物としてDs/Px含有一本鎖核酸分子からなる核酸アプタマーが製造される。増幅工程に用いる増幅方法として、公知の任意の核酸増幅法を使用することができる。例えばPCR法を用いて数回の増幅サイクル（例えば1～40サイクル、2～30サイクル、3～20サイクル、4～15サイクル、又は5～10サイクル）を行えばよい。

[0090] さらに一実施形態において、本態様の製造方法は、増幅工程後のDs/Px含有一本鎖核酸分子を新たなDs/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリーとして用いて、複合体形成工程から増幅工程までを新たに1回以上繰り返す反復工程をさらに含む。繰り返し回数は多いほど、標的物質に対する結合性が高い一本鎖核酸分子の割合が高くなるため、繰り返し回数の上限は特に制限されない。

。繰り返し回数は、例えば1回～10回、2回～9回、3回～8回以上、4回～7回、又は5回～6回であってもよい。

[0091] <核酸アプタマー製造方法：実施形態2>

本実施形態の製造方法は、必須工程としてライブラリー合成工程、第1増幅工程、複合体形成工程、複合体回収工程、及び第2増幅工程を含む。以下、各工程の構成について具体的に説明する。

[0092] (ライブラリー合成工程)

ライブラリー合成工程は、天然型核酸、Ds含有核酸、及びPa'含有核酸を反応させることによって、上記<Ds/Pa'含有一本鎖核酸分子ライブラリー>に記載のいずれかのDs/Pa'含有一本鎖核酸分子ライブラリーを合成する工程である。本明細書において「Ds含有核酸」とは、Ds塩基を含有するヌクレオシド又はヌクレオチド（例えば、アミダイト又はホスホロアミダイト）等の核酸である。また、「Pa'含有核酸」とは、Pa'塩基を含有するヌクレオシド又はヌクレオチド（例えば、アミダイト又はホスホロアミダイト）等の核酸である。

[0093] 本工程における合成方法は特に限定しない。本分野で公知の方法を用いればよい。例えば、Ds/Pa'含有一本鎖核酸分子ライブラリーは、上述のいずれかの文献に記載の方法に従ってDs塩基及びPa'塩基を合成した後、Ds含有核酸及びPa'含有核酸を合成し、さらに核酸鎖を公知の固相合成法に従って化学合成することができる。核酸の化学合成法については、例えば、Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Volume 1, Section 3を参照されたい。化学合成後のDs/Pa'含有一本鎖核酸分子ライブラリーは、使用前に当該分野で公知の方法によって精製することが好ましい。精製方法としては、例えば、ゲル精製法、アフィニティーカラム精製法、HPLC法等が挙げられる。また、公知の酵素的DNA合成（EDS）技術を用いて、Ds塩基及びPa'塩基含有ヌクレオチドの基質を用いて、Ds含有核酸及びPa'含有核酸を酵素的に合成することも可能である。

[0094] (第1増幅工程)

第1増幅工程は、ライブラリー合成工程後のDs/Pa'含有一本鎖核酸分子ライブラリーを鋳型として、かつ天然型ヌクレオチド、Ds含有ヌクレオチド、及びPx含有ヌクレオチドを基質として、一本鎖核酸分子を増幅する工程である。本工程により、増幅産物としてDs/Px含有一本鎖核酸分子が得られる。第1増幅工程に用いる増幅方法として、公知の任意の核酸増幅法を使用することができる。例えばPCR法を用いて数回の増幅サイクル（例えば1～40サイクル、2～30サイクル、3～20サイクル、4～15サイクル、又は5～10サイクル）を行えばよい。

[0095]（複合体形成工程）

複合体形成工程は、第1増幅工程後のDs/Px含有一本鎖核酸分子と標的物質とを溶液中で混合してDs/Px含有一本鎖核酸分子と標的物質との複合体を形成させる工程である。本工程は、上述の複合体形成工程に記載の方法に準じて行うことができる。

[0096]（複合体回収工程）

複合体回収工程は、複合体形成工程後の複合体を回収する工程である。本工程は、上述の複合体回収工程に記載の方法に準じて行うことができる。

[0097]（第2増幅工程）

第2増幅工程は、天然型ヌクレオチド、Ds含有ヌクレオチド、及びPx含有ヌクレオチドを基質として、複合体回収工程後の複合体に含まれる一本鎖核酸分子を核酸増幅法によって増幅する工程である。本工程により、Ds/Px含有一本鎖核酸分子からなる核酸アプタマーが製造される。第2増幅工程に用いる増幅方法として、公知の任意の核酸増幅法を使用することができる。例えばPCR法を用いて数回の増幅サイクル（例えば1～40サイクル、2～30サイクル、3～20サイクル、4～15サイクル、又は5～10サイクル）を行えばよい。

[0098] さらに一実施形態において、本態様の製造方法は、第2増幅工程後のDs/Px含有一本鎖核酸分子に対して、複合体形成工程から第2増幅工程までを新たに1回以上繰り返す反復工程をさらに含む。繰り返し回数が多いほど、標的物質に対する結合性が高い一本鎖核酸分子のライブラリーにおける割合が

高くなるため、繰り返し回数の上限は特に制限されない。繰り返し回数は、例えば1回～10回、2回～9回、3回～8回以上、4回～7回、又は5回～6回であってもよい。

[0099] <核酸アプタマー製造方法：実施形態3>

本実施形態では、本態様の製造方法は、必須工程としてライブラリー合成工程、第1複合体形成工程、第1複合体回収工程、第1増幅工程、第2複合体形成工程、第2複合体回収工程、及び第2増幅工程を含む。

[0100] 本実施形態におけるライブラリー合成工程の構成は、実施形態2のライブラリー合成工程に準じるため、ここでの詳細な説明は省略する。第1複合体回収工程は、第1複合体形成工程後の複合体を回収する工程であり、上述の複合体回収工程に記載の方法に準じて行うことができる。第2複合体形成工程は、第1増幅工程後のDs/Px含有一本鎖核酸分子と標的物質とを溶液中で混合してDs/Px含有一本鎖核酸分子と標的物質との複合体を形成させる工程であり、上述の複合体形成工程に記載の方法に準じて行うことができる。第2複合体回収工程は、第2複合体形成工程後の複合体を回収する工程であり、上述の複合体回収工程に記載の方法に準じて行うことができる。以下では、上記以外の工程の構成について具体的に説明する。

[0101] (第1複合体形成工程)

第1複合体形成工程は、ライブラリー合成工程後のDs/Pa'含有一本鎖核酸分子ライブラリーと標的物質とを溶液中で混合してDs/Pa'含有一本鎖核酸分子ライブラリー中のDs/Pa'含有一本鎖核酸分子と標的物質との複合体を形成させる工程である。本工程は、上述の複合体形成工程に記載の方法に準じて行うことができる。

[0102] (第1増幅工程)

第1増幅工程は、第1複合体回収工程後のDs/Pa'含有一本鎖核酸分子を鋳型として、かつ天然型ヌクレオチド、Ds含有ヌクレオチド、及びPx含有ヌクレオチドを基質として、一本鎖核酸分子を増幅する工程である。本工程によって、増幅産物としてDs/Px含有一本鎖核酸分子が得られる。第1増幅工程に

用いる増幅方法として、公知の任意の核酸増幅法を使用することができる。
例えばPCR法を用いて数回の増幅サイクル（例えば1～40サイクル、2～30サイクル、3～20サイクル、4～15サイクル、又は5～10サイクル）を行えばよい。

[0103] （第2増幅工程）

第2増幅工程は、天然型ヌクレオチド、Ds含有ヌクレオチド、及びPx含有ヌクレオチドを基質として、第2複合体回収工程後の複合体に含まれる一本鎖核酸分子を核酸増幅法によって増幅する工程である。本工程により、Ds/Px含有一本鎖核酸分子からなる核酸アダプターが製造される。第2増幅工程に用いる増幅方法として、公知の任意の核酸増幅法を使用することができる。
例えばPCR法を用いて数回の増幅サイクル（例えば1～40サイクル、2～30サイクル、3～20サイクル、4～15サイクル、又は5～10サイクル）を行えばよい。

[0104] さらに一実施形態において、本態様の製造方法は、第2増幅工程後のDs/Px含有一本鎖核酸分子に対して、第2複合体形成工程から第2増幅工程までを新たに1回以上繰り返す反復工程をさらに含む。繰り返し回数は多いほど、標的物質に対する結合性が高い一本鎖核酸分子のライブラリーにおける割合が高くなるため、繰り返し回数の上限は特に制限されない。繰り返し回数は、例えば1回～10回、2回～9回、3回～8回以上、4回～7回、又は5回～6回であってもよい。

[0105] ＜塩基配列決定方法＞

本発明の一態様において、非天然型塩基含有一本鎖核酸分子の塩基配列を決定する方法で（以下、「塩基配列決定方法」という）が提供される。本発明の塩基配列決定方法は、必須工程として第1増幅工程及び塩基配列決定工程を含む。

[0106] 本発明の塩基配列決定方法で塩基配列を決定する対象となる非天然型塩基含有一本鎖核酸分子は、その5'末端及び3'末端に位置する一対のプライマー結合領域、並びに一対のプライマー結合領域間に位置する中央領域を含む。なお、中央領域の5'末端及び3'末端に位置する一対のプライマー結合領域を含まない核酸アダプターであっても、その5'末端及び3'末端にプライマー結

合領域をライゲーション等により連結することによって、本態様の方法で塩基配列を決定することができる（本明細書では「連結工程」という）。中央領域は、Ds塩基及びPx塩基を含む。中央領域におけるDs塩基の個数は1個以上であり、例えば1～15個、1～12個、又は1～10個であり、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、又は5個以下であってもよいが、好ましくは1～4個、1～3個、又は1～2個である。また、中央領域におけるPx塩基の個数は1個以上であり、例えば1～15個、1～12個、又は1～10個であり、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、又は5個以下であってもよいが、好ましくは1～4個、1～3個、又は1～2個である。例えば、中央領域は、Ds塩基を1～3個を含み、かつPx塩基を1～2個含む。非天然型塩基含有一本鎖核酸分子は、例えば、上述の＜Ds/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリー＞に記載のいずれかのDs/Px含有一本鎖核酸分子ライブラリーであってもよく、或いは上述の＜核酸アプタマー製造方法＞に記載のいずれかの方法で製造されるDs/Px含有一本鎖核酸分子からなる核酸アプタマーであってもよい。

[0107] （第1増幅工程）

第1増幅工程は、天然型ヌクレオチドを基質として一対のプライマー結合領域の塩基配列に結合するプライマー対を用いて非天然型塩基含有一本鎖核酸分子を核酸増幅法により増幅する工程である。第1増幅工程に用いる増幅方法として、公知の任意の核酸増幅法を使用することができる。例えばPCR法を用いて数回の増幅サイクル（例えば1～40サイクル、2～30サイクル、3～20サイクル、4～15サイクル、又は5～10サイクル）を行えばよい。本工程により、非天然型塩基含有一本鎖核酸分子における非天然型塩基は、増幅後に天然型塩基に置換される。例えば、Ds、Px、及びPa'の場合、A又はTに置換される。

[0108] （塩基配列決定工程）

塩基配列決定工程は、第1増幅工程後に得られる天然型ヌクレオチドのみで構成された増幅産物の塩基配列を決定する工程である。本工程に用いる塩基配列決定法は、当該分野における公知の塩基配列決定法により実施すれば

よい。塩基配列決定法としては、サンガー法（ジデオキシ法）及び次世代シーケンス法が挙げられる。次世代シーケンス法は、第2世代のシーケンス法又は第3世代のシーケンス法であってもよい。第2世代のシーケンス法の例としては、パイロシーケンシング法、合成シーケンシング法、ライゲーションシーケンシング法、DNAナノボールベースのシーケンシング技術であるDNBSEQ法、及びイオン半導体シーケンシング法が挙げられる。第3世代のシーケンス法の例としては、1分子シーケンサー又はナノポアシーケンサーを用いるシーケンス法が挙げられる。これらの方法は、当該分野で公知であり、各種プロトコル集の他、各社Webサイトに開示された方法を参考にすることができる。本工程の塩基配列決定では、複数の核酸分子の塩基配列を同時に決定できる次世代シーケンス法を用いることが好ましい。本工程により、上述の増幅工程前の非天然型塩基含有一本鎖核酸分子におけるDs、Px、及びPa'の位置は、A及びT塩基の両方が読まれることで同定することができる。

[0109] 本発明の塩基配列決定方法は、選択的工程として以下の実施形態1及び実施形態2に述べる各工程を含むことができる。

[0110] <塩基配列決定方法：実施形態1>

本実施形態では、本発明の塩基配列決定方法は、上記必須工程に加えて、第2増幅工程、切断工程、及びPx位置決定工程を含む。本実施形態のさらなる実施形態において、本発明の塩基配列決定方法は、さらにDs/Px位置決定工程及びDs位置特定工程を含む。

[0111] （第2増幅工程）

第2増幅工程は、天然型ヌクレオチド、Ds含有ヌクレオチド、及びPx含有ヌクレオチドを基質として、一対のプライマー結合領域の塩基配列に結合し、異なる標識分子（例えば、蛍光波長に基づいて区別可能な標識分子）で標識されたプライマー対を用いて、非天然型塩基含有一本鎖核酸分子を核酸増幅法によって増幅する工程である。第2増幅工程に用いる増幅方法として、公知の任意の核酸増幅法を使用することができる。例えばPCR法を用いて数回

の増幅サイクル（例えば1～40サイクル、2～30サイクル、3～20サイクル、4～15サイクル、又は5～10サイクル）を行えばよい。本工程により、非天然型塩基含有一本鎖核酸分子及びその相補鎖が、異なる標識分子で標識される。

[0112] （切断工程）

切断工程は、第2増幅工程後に増幅された、異なる標識分子が結合した、非天然型塩基含有一本鎖核酸分子及びその相補鎖をPx塩基の位置で完全又は部分的に切断する工程である。核酸分子をPx塩基の位置で切断する方法として、例えば塩基性条件で処理する方法が挙げられる。塩基性条件は弱アルカリ性～強アルカリ性、例えばpH8～14、pH9～13、又はpH10～12等であってもよい。処理条件は、例えば10～95℃、20～80℃、30～60℃又は30～40℃で、数分～数時間、例えば5分～6時間、10分～3時間、又は20分～1時間であってもよい。

[0113] （Px位置決定工程）

Px位置決定工程は、切断工程後に非天然型塩基含有一本鎖核酸分子及びその相補鎖に由来する一本鎖核酸断片のサイズを標識分子の検出に基づいて決定し、非天然型塩基含有一本鎖核酸分子及びその相補鎖においてPx塩基の位置を決定する工程である。本工程では、例えばアガロースゲル電気泳動又はポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて核酸鎖のサイズを決定することができる。非天然型塩基含有一本鎖核酸分子及びその相補鎖に由来する一本鎖核酸断片は、プライマーに結合している標識分子を検出することにより、例えば異なる蛍光波長に基づいて別々に検出すればよい。

[0114] （Ds/Px位置決定工程）

Ds/Px位置決定工程は、塩基配列決定工程で決定された塩基配列において天然型塩基のA塩基及びT塩基の両方が配列決定された塩基位置をDs塩基又はPx塩基の位置として決定する工程である。

[0115] （Ds位置特定工程）

Ds位置特定工程は、Ds/Px位置決定工程において決定されたDs塩基又はPx塩基の位置のうち、Px位置決定工程においてPx塩基の位置として決定された位

置を除いた位置をDs塩基の位置として特定する工程である。

[0116] <塩基配列決定方法：実施形態2>

本実施形態では、本発明の塩基配列決定方法は、上記必須工程に加えて、Ds/Px位置決定工程、合成工程、複合体形成工程、測定工程、及び選択工程を含む。

[0117] (Ds/Px位置決定工程)

Ds/Px位置決定工程は、塩基配列決定工程で決定された塩基配列において天然型塩基のA塩基及びT塩基の両方がシーケンスされた塩基位置をDs塩基又はPx塩基の位置として決定する工程である。

[0118] (合成工程)

合成工程は、Ds/Px位置決定工程で決定されたDs塩基又はPx塩基の位置に、Ds塩基及び／又はPx塩基を複数の又は全ての組み合わせで含み、Ds塩基又はPx塩基の位置を除いた配列が塩基配列決定工程において決定された塩基配列からなる、複数の一本鎖核酸分子を合成する工程である。合成工程では、上述のライブラリー合成工程に記載の合成方法等を用いることができる。

[0119] (複合体形成工程)

複合体形成工程は、合成工程で合成された複数の一本鎖核酸分子と標的物質とを混合して複数の一本鎖核酸分子と標的物質との複合体を形成させる工程である。本工程は、上述の複合体形成工程に記載の方法に準じて行うことができる。

[0120] (測定工程)

測定工程は、複合体形成工程後の複合体形成効率を測定する工程である。本工程における測定方法は、一本鎖核酸分子と標的物質との結合を検出してその結合レベルを測定するものであれば特に限定せず、公知の方法を用いればよい。例えば、SPR法、水晶振動子マイクロバランス法、比濁法、比色法、蛍光法、EMSA法、ELISA法、又はサンドイッチ法等を利用することができる。

[0121] (選択工程)

測定工程は、測定工程後に、複数の一本鎖核酸分子のうち、より高い又は

最も高い複合体形成効率を示す一本鎖核酸分子の塩基配列を非天然型塩基含有一本鎖核酸分子の塩基配列として選択する工程である。本工程で選択される塩基配列が、非天然型塩基含有一本鎖核酸分子の塩基配列として決定される。

[0122] <核酸アプタマー>

本発明の一態様において、核酸アプタマーが提供される。

[0123] 本発明の核酸アプタマーは、上述のいずれかのDs塩基、上述のいずれかのPa'塩基、及び／又は上述のいずれかのPx塩基を少なくとも1つ含む。

[0124] 本発明の核酸アプタマーにおいてDs塩基、Pa'塩基、及び／又はPx塩基は、1以上であれば限定せず、例えば1個以上、2個以上、3個以上、若しくは4個以上であってもよく、かつ／又は20個以下、10個以下、8個以下、7個以下、6個以下、若しくは5個以下であってもよい。例えば、本発明の核酸アプタマーは、Ds塩基、Pa'塩基、及び／又はPx塩基を1つ～9つ、1つ～6つ、又は1つ～3つ、例えば1つ、2つ、3つ、又は4つ含む。

[0125] また、本発明の核酸アプタマーにおいてDs塩基、Pa'塩基、及び／又はPx塩基の位置は限定せず、例えば核酸アプタマーを構成する核酸鎖の5'末端及び／又は3'末端、及び／又は核酸鎖の内部に位置していてもよい。

[0126] 一実施形態において、本発明の核酸アプタマーは、Ds塩基及びPa'塩基、又はDs塩基及びPx塩基を含む。本実施形態では、Ds塩基及びPa'塩基、又はDs塩基及びPx塩基の数は、それぞれ1以上であれば限定せず、例えばそれぞれ1以上20以下であり、より具体的にはそれぞれ1つ、2つ、3つ、又は4つであってもよい。

[0127] 一実施形態において、本発明の核酸アプタマーにおいて上記一般式(II)で示すPa'塩基及び／又は一般式(III)で示すPx塩基におけるR¹基は、上述の式(IV)～式(XXV)で示されるいずれか一の式で示される構造であってもよいが、Pa'塩基は好ましくはPa'_(methyl)塩基又はPa'_(diol)塩基であり、より好ましくはPa'_(methyl)塩基であり、またPx塩基は好ましくはPx_(methyl)塩基又はPx_(diol)塩基であり、より好ましくはPx'_(methyl)塩基である。

- [0128] 一実施形態において、本発明の核酸アプタマーは、5'領域、中央領域、及び3'領域で構成される。本明細書において「5'領域」及び「3'領域」とは、核酸アプタマーのそれぞれ5'末端側及び3'末端側に配置され、ステム構造を形成し得るように互いに相補的な一対の塩基配列を含む領域である。本明細書において「中央領域」とは、前記5'領域及び3'領域の間に配置され、主として標的物質への結合を担う領域である。本発明の核酸アプタマーは、原則として少なくとも中央領域においてDs塩基及び／又はPa'塩基、又はDs塩基及び／又はPx塩基を含むことができるが、5'領域及び／又は3'領域がこれらの非天然型塩基を含むこともできる。
- [0129] 5'領域及び3'領域に含まれる上述の一対の塩基配列は、例えば1bp以上、2bp以上、3bp以上、4bp以上、又は5bp以上であり、かつ／又は50bp以下、40bp以下、30bp以下、25bp以下、20bp以下、15bp以下、10bp以下、又は8bp以下である、互いに相補的な任意の塩基配列で構成することができる。一対の塩基配列の具体例として、配列番号51及び52；配列番号53及び54；配列番号55及び56；配列番号57及び58（配列番号57の9位のnで示す塩基は、前記Dsである）；配列番号59及び60；配列番号61及び62；配列番号63及び64；配列番号65及び66；配列番号67及び68；配列番号69及び70；配列番号71及び72；配列番号73及び74（配列番号74の3位のnで示す塩基は、前記Dsである）；配列番号75及び76；配列番号77及び78；配列番号79及び80；配列番号81及び82；配列番号79及び83（配列番号83の7位のnで示す塩基は、前記Dsである）；配列番号84及び85；又は配列番号86及び87；配列番号232及び233；配列番号234及び235；配列番号239及び240；又は配列番号241及び242で示す2つの塩基配列が塩基対合して形成する構造が挙げられる。
- [0130] 一実施形態において、本発明の核酸アプタマーは、その5'末端側、3'末端側、及び／又はその配列内部、例えば3'末端側にミニヘアピン配列を含む。ミニヘアピン配列はビオチン等の修飾基が結合していてもよい。例えば、本発明の核酸アプタマーは、5'側から順に、上述の5'領域、中央領域、及び3'領域、並びにミニヘアピン配列を含むか、或いは、5'側から順に、ミニヘア

ピン配列、並びに上述の5'領域、中央領域、及び3'領域を含む。

- [0131] 一実施形態において、本発明の核酸アプタマーでは、5'領域及び3'領域に含まれる一対の塩基配列は、非相補的塩基対、及び／又は1塩基以上の、挿入配列及び／又は欠失を含む。非相補的塩基対は、上述のワトソンクリック塩基対以外の任意の塩基対であってもよく、例えばG-T塩基対であってもよい。
- [0132] また、一実施形態において、本発明の核酸アプタマーは、その標的タンパク質に対する結合能に影響しない部位、例えば5'領域及び／又は3'領域にインターナルループ構造、バルジ構造、バルジアウト構造、ループ構造、ヘアピン構造、及び／又はステムループ構造を含む。これらの構造は、天然型塩基で構成されていても、或いはDs塩基、Pa'塩基、及び／又はPx塩基等の人工塩基を含んでもよい。
- [0133] 本発明の核酸アプタマーの長さは、例えば、10mer以上、15mer以上、20mer以上、30mer以上、40mer以上、50mer以上、60mer以上、70mer以上、80mer以上、90mer以上、又は100mer以上、かつ／又は300mer以下、200mer以下、150mer以下、140mer以下、130mer以下、120mer以下、110mer以下、100mer以下、90mer以下、80mer以下、70mer以下、60mer以下、又は50mer以下である。
- [0134] 本発明の核酸アプタマーは、Ds塩基、Pa'塩基、及び／又はPx塩基に加えて、任意に塩基類似体、他の人工塩基、又は他の修飾塩基等を含んでもよい。
- [0135] 本発明の核酸アプタマーは、他の物質、例えばポリエチレングリコール（PEG）（例えば、約20～約60kDaのPEG重合体）、アミノ酸、ペプチド、invertedd dT、脂質、色素、蛍光物質、酵素、放射性物質、ビオチン等を付加することにより修飾されていてもよい。これらの物質は、必要に応じて公知のリンカーを介して連結してもよい。本明細書におけるリンカーの例として、ヌクレオチドリinker、ペプチドリinker、及びジスルフィド結合を含むリンカー等が挙げられる。PEGを連結することにより、一般にDNAアプタマーの半減期を伸ばすことができることが知られている。また、本発明の核酸アプタマーにおける修飾位置は制限されず、例えば5'末端部、3'末端部、又はアプタマー配列の内部であってもよい。例えばミニヘアピン配列が修飾されていて

もよい。

[0136] 本発明の核酸アプタマーの製造方法は特に限定しない。本分野で公知の方法を用いればよい。例えば、Ds塩基及びPa'塩基を含む核酸アプタマーは、上記の配列に基づいて公知の固相合成法に従って化学合成することができる。核酸の化学合成法については、例えば、Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Volume 1, Section 3を参照されたい。また例えば、核酸アプタマーの配列に基づいて幾つかの断片を合成した後に、分子内アニールやリガーゼによるライゲーション等によって断片を連結することにより核酸アプタマーを作製してもよい。また、Ds塩基及びPa'塩基及びPx塩基を含む核酸断片は、TdTや一塩基取り込む酵素的反応により合成し、その他の断片を連結することにより、核酸アプタマーを作製することも可能である。さらにまた、Ds塩基及びPx塩基を含む核酸アプタマーは、上述の方法でDs塩基及びPa'塩基を含む核酸アプタマーを化学合成した後、これを鋳型としてdPxTPとdDsTPを含む基質を用いて核酸増幅法（例えば、後述する置換PCR法）により増幅することで作製することができる。合成後の本発明の核酸アプタマーは、使用前に当該分野で公知の方法によって精製することが好ましい。精製方法としては、例えば、ゲル精製法、アフィニティーカラム精製法、HPLC法等が挙げられる。

[0137] 以下の（１）～（７）では、本発明の核酸アプタマーについて結合標的ごとの構成を具体的に説明する。

[0138] <（１）／（２）／（８）IFN γ に結合する核酸アプタマー>

本発明の核酸アプタマーのさらなる一態様において、IFN γ タンパク質に結合する核酸アプタマー（以下、「IFN γ 標的核酸アプタマー」と称する）が提供される。

[0139] 本明細書において、「IFN γ （インターフェロン γ ）」は、T細胞やNK細胞等の免疫細胞から分泌され、ウイルスや細菌等の感染に対する免疫応答において産生されるサイトカインである。本発明において、IFN γ の由来となる生物種は問わないが、例えば哺乳動物、例えばヒト及びチンパンジーなどの霊

長類、ラット及びマウス等の実験動物、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、及びヤギ等の家畜動物、並びにイヌ及びネコ等の愛玩動物、好ましくはヒトのIFN γ が挙げられる。IFN γ は、グリコシル化IFN γ 又は非グリコシル化IFN γ であってもよいが、本発明のIFN γ 標的核酸アプタマーは、好ましくはグリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ に結合する。

[0140] 一実施形態において、本発明のIFN γ 標的核酸アプタマーは、配列番号2、5、又は7で示す塩基配列、又は配列番号2、5、又は7で示す塩基配列の5'末端側及び3'末端側にステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列が付加した配列を含む。

[0141] 配列番号2で示す塩基配列は、実施例3におけるAptIFN γ -1及びAptIFN γ -3の塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号5で示す塩基配列は、実施例3におけるAptIFN γ -4の塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号7で示す塩基配列は、実施例3におけるAptIFN γ -5の塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。

[0142] 本態様のさらなる実施形態において、IFN γ 標的核酸アプタマーは、以下の(1-i-a)～(1-i-v-d)からなる群から選択される：

(1-i-a) 配列番号1で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において28位及び34位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、22位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(1-i-b) 配列番号1において22位、28位、及び34位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号1の28位及び34位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号1の22位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(1-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番

号 2 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 2 で示す塩基配列において 18 位及び 24 位の n で示す塩基は、非天然型塩基 D_s であり、前記配列番号 2 で示す塩基配列において 12 位の n で示す塩基は、非天然型塩基 Pa' 又は非天然型塩基 Px である、核酸アプタマー；

(1-i-d) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び 3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記 5' 領域及び 3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 において 12 位、18 位、及び 24 位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 の 18 位及び 24 位の n で示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基 D_s であり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 の 12 位の n で示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基 Pa' 又は非天然型塩基 Px である、前記核酸アプタマー；

(1-ii-a) 配列番号 3 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において 27 位及び 33 位の n で示す塩基は、非天然型塩基 D_s であり、21 位の n で示す塩基は、非天然型塩基 Pa' 又は非天然型塩基 Px である、前記核酸アプタマー；

(1-ii-b) 配列番号 3 において 21 位、27 位、及び 33 位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号 3 の 27 位及び 33 位の n で示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基 D_s であり、配列番号 3 の 21 位の n で示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基 Pa' 又は非天然型塩基 Px である、核酸アプタマー；

(1-iii-a) 配列番号 4 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において 27 位及び 33 位の n で示す塩基は、非天然型塩基 D_s である、核酸アプタマー；

(1-iii-b) 配列番号 4 において 27 位及び 33 位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号 4 の 27 位及び 33 位の n で示す塩基に対応する位置は、非

天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(1 - i i i - c) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号5で示す塩基配列を含み、前記配列番号5で示す塩基配列において18位及び24位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(1 - i i i - d) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号5において18位及び24位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号5の18位及び24位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(1 - i v - a) 配列番号6で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において33位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、21位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(1 - i v - b) 配列番号6において21位及び33位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号6の33位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号6の21位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(1 - i v - c) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号7で示す塩基配列を含み、前記配列番号7で示す塩基配列において24位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、前記配列番号7で示す塩基配列において12位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、

核酸アプタマー；

(1-iv-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号7において12位及び24位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号7の24位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号7の12位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー。

[0143] なお、上記の配列番号1、3、4、及び6は、それぞれ配列番号2、2、5、及び7の5'末端側及び3'末端側にステム構造を形成し得る互いに相補的な配列が追加された配列である。

[0144] 別の実施形態において、本発明のIFN γ 標的核酸アプタマーは、配列番号9、11、13、15、17、又は19で示す塩基配列、又は配列番号9、11、13、15、17、又は19で示す塩基配列の5'末端側及び3'末端側にステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列が付加した配列を含む。

[0145] 配列番号9で示す塩基配列は、実施例3におけるXL2-01aの塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号11で示す塩基配列は、実施例3におけるXL2-01hの塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号13で示す塩基配列は、実施例3におけるXL2-01iの塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号15で示す塩基配列は、実施例3におけるXL2-01cの塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号17で示す塩基配列は、実施例3におけるXL2-01dの塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号19で示す塩基配列は、実施例3におけるXL2-01a、XL2-01h、XL2-01i、XL2-01c及びXL2-01dを包含する塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。

[0146] 本態様のさらなる実施形態において、IFN γ 標的核酸アプタマーは、以下の

(2-i-a) ~ (2-v-i-d) からなる群から選択される：

(2-i-a) 配列番号 8 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において 24 位及び 37 位の n で示す塩基は、非天然型塩基Dsである、前記核酸アプタマー；

(2-i-b) 配列番号 8 において 13 位、24 位、31 位、及び 37 位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号 8 の 24 位及び 37 位の n で示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(2-i-c) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び 3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記 5' 領域及び 3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 9 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 9 で示す塩基配列において 15 位及び 28 位の n で示す塩基は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(2-i-d) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び 3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記 5' 領域及び 3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 9 において 4 位、15 位、22 位、及び 28 位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 9 の 15 位及び 28 位の n で示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(2-ii-a) 配列番号 10 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において 17 位、24 位、及び 37 位の n で示す塩基は、非天然型塩基Dsである、前記核酸アプタマー；

(2-ii-b) 配列番号 10 において 13 位、17 位、24 位、31 位、及び 37 位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号 10 の 17 位、24 位、及び 37 位の n で示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(2-ii-c) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び 3' 領域を含む

核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号11で示す塩基配列を含み、前記配列番号11で示す塩基配列において8位、15位、及び28位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(2-iii-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号11において4位、8位、15位、22位、及び28位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号11の8位、15位、及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(2-iii-a) 配列番号12で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において18位、24位、及び37位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、前記核酸アプタマー；

(2-iii-b) 配列番号12において13位、18位、24位、31位、及び37位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号12の18位、24位、及び37位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(2-iii-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号13で示す塩基配列を含み、前記配列番号13で示す塩基配列において9位、15位、及び28位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(2-iii-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配

列番号 1 3 において4位、9位、15位、22位、及び28位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 1 3 の9位、15位、及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(2-i v-a) 配列番号 1 4 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において24位及び37位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、17位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(2-i v-b) 配列番号 1 4 において13位、17位、24位、31位、及び37位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号 1 4 の24位及び37位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号 1 4 の17位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(2-i v-c) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 1 5 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 1 5 で示す塩基配列において15位及び28位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、前記配列番号 1 5 で示す塩基配列において8位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(2-i v-d) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 1 5 において4位、8位、15位、22位、及び28位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 1 5 の15位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列

において配列番号 1 5 の8位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(2-v-a) 配列番号 1 6 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において24位及び37位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、18位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(2-v-b) 配列番号 1 6 において13位、18位、24位、31位、及び37位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号 1 6 の24位及び37位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号 1 6 の18位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(2-v-c) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 1 7 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 1 7 で示す塩基配列において15位及び28位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、前記配列番号 1 7 で示す塩基配列において9位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(2-v-d) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 1 7 において4位、9位、15位、22位、及び28位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 1 7 の15位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 1 7 の9位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(2-v i - a) 配列番号 18 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において17位、18位、24位、及び／又は37位のnで示す塩基は、非天然型塩基Ds、非天然型塩基Pa'、及び／又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(2-v i - b) 配列番号 18 において13位、17位、18位、24位、31位、及び37位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号 18 の17位、18位、24位、及び／又は37位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Ds、非天然型塩基Pa'、及び／又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(2-v i - c) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 19 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 19 で示す塩基配列において8位、9位、15位、及び／又は28位のnで示す塩基は、非天然型塩基Ds、非天然型塩基Pa'、及び／又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(2-v i - d) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 19 において4位、8位、9位、15位、22位、及び28位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 19 の8位、9位、15位、及び／又は28位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Ds、非天然型塩基Pa'、及び／又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー。

[0147] なお、上記の配列番号8、10、12、14、16、及び18で示す塩基配列は、それぞれ配列番号9、11、13、15、17、及び19の5' 末端側及び3' 末端側にステム構造を形成し得る互いに相補的な配列が追加された配列である。

[0148] 別の実施形態において、本発明のIFN γ 標的核酸アプタマーは、配列番号213～231のいずれかで示す塩基配列、又は配列番号213～231のいずれかで示す

塩基配列の5'末端側及び3'末端側にステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列が付加した配列を含む。

[0149] 配列番号213で示す塩基配列は、実施例5におけるB-IFNg-701a及びB-IFNg-701bの塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号214で示す塩基配列は、実施例5におけるB-IFNg-703a～B-IFNg-703dの塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号215～219で示す塩基配列は、実施例5におけるB-IFNg-701-1～B-IFNg-701-4及びB-IFNg-701-9の塩基配列においてステム領域を除いた中央領域にそれぞれ対応する。配列番号220で示す塩基配列は、実施例5におけるB-IFNg-701-1(DPD)、B-IFNg-701-1a(APD)、B-IFNg-701-1b(DTD)、及びB-IFNg-701-1c(DPA)の塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号221～231で示す塩基配列は、実施例5におけるB-IFNg-701-21～B-IFNg-701-27、B-IFNg-701-31～B-IFNg-701-33、及びB-IFNg-701-42の塩基配列においてステム領域を除いた中央領域にそれぞれ対応する。

[0150] 本態様のさらなる実施形態において、IFN γ 標的核酸アプタマーは、以下の(8-i-a)～(8-xii-b)からなる群から選択される：

(8-i-a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号213で示す塩基配列を含み、前記配列番号213で示す塩基配列において10位及び26位のnで示す塩基は、Dsであり、前記配列番号213で示す塩基配列において16位のnで示す塩基は、Pa'、Px、又はT塩基である、核酸アプタマー；

(8-i-b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号213において10位、16位、及び26位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記

塩基配列において配列番号 2 の10位及び26位のnで示す塩基に対応する位置は、Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 の16位のnで示す塩基に対応する位置は、Pa'、Px、又はT塩基である、前記核酸アプタマー；

(8-i-i-a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 1 4 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 2 1 4 で示す塩基配列において2位のnで示す塩基は、Pa'、Px、又はT塩基であり、前記配列番号 2 1 4 で示す塩基配列において16位のnで示す塩基は、Ds、Pa'、又はPxであり、前記配列番号 2 1 4 で示す塩基配列において26位のnで示す塩基は、Pa'又はPxであり、前記配列番号 2 1 4 で示す塩基配列において31位のnで示す塩基は、Dsである、前記核酸アプタマー；

(8-i-i-b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 1 4 において2位、16位、26位、及び31位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 1 4 の2位のnで示す塩基に対応する位置は、Pa'、Px、又はT塩基であり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 1 4 の16位のnで示す塩基に対応する位置は、Ds、Pa'、又はPxであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 1 4 の26位のnで示す塩基に対応する位置は、Pa'又はPxであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 1 4 の31位のnで示す塩基に対応する位置は、Dsである、前記核酸アプタマー；

(8-i-i-i-a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配

列番号 2 1 5 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 2 1 5 で示す塩基配列において12位及び18位のnで示す塩基は、Ds又は塩基Aであり、前記配列番号 2 1 5 で示す塩基配列において18位のnで示す塩基は、Pa'、Px、又はT塩基である、前記核酸アプタマー；

(8-i i i-b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 1 5 において12位、18位、及び28位を除いて1若しくは複数の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 1 5 の12位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、Ds又は塩基Aであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 1 5 の18位のnで示す塩基に対応する位置は、Pa'、Px、又はT塩基である、前記核酸アプタマー；

(8-i v-a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 1 6～2 2 1 及び 2 2 7～2 2 8 のいずれかで示す塩基配列を含み、前記配列番号 2 1 6～2 2 1 及び 2 2 7～2 2 8 のいずれかで示す塩基配列において12位及び18位のnで示す塩基は、Dsであり、前記配列番号 2 1 6～2 2 1 及び 2 2 7～2 2 8 のいずれかで示す塩基配列において18位のnで示す塩基は、Pa' 又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-i v-b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 1 6～2 2 1 及び 2 2 7～2 2 8 のいずれかにおいて12位、18位、及び28位を除いて1若しくは複数の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 1 6～2 2 1 及び 2 2 7～2 2 8 のいずれかの12位及び28位のnで示す塩基に対応

する位置は、Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号216～221及び227～228のいずれかの18位のnで示す塩基に対応する位置は、Pa'又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-v-a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号222で示す塩基配列を含み、前記配列番号222で示す塩基配列において12位及び28位のnで示す塩基は、Dsであり、前記配列番号222で示す塩基配列において16位及び18位のnで示す塩基は、Pa'又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-v-b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号222において12位、16位、18位、及び28位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号222の12位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号222の16位及び18位のnで示す塩基に対応する位置は、Pa'又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-vi-a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号223で示す塩基配列を含み、前記配列番号223で示す塩基配列において12位及び28位のnで示す塩基は、Dsであり、前記配列番号223で示す塩基配列において18位及び34位のnで示す塩基は、Pa'又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-vi-b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成する

ことができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 2 3 において12位、18位、28位、及び34位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 2 3 の12位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 2 3 の18位及び34位のnで示す塩基に対応する位置は、Pa' 又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-v i i - a) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 2 4 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 2 2 4 で示す塩基配列において12位及び28位のnで示す塩基は、Dsであり、前記配列番号 2 2 4 で示す塩基配列において18位及び38位のnで示す塩基は、Pa' 又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-v i i - b) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 2 4 において12位、18位、28位、及び38位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 2 4 の12位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 2 4 の18位及び38位のnで示す塩基に対応する位置は、Pa' 又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-v i i i - a) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 2 5 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 2 2 5 で示す塩基配列において12位及び28位のnで示す塩基は、Dsであり、前記配列番号 2 2 5 で示

す塩基配列において18位、34位、及び38位のnで示す塩基は、Pa'又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-viii-b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号225において12位、18位、28位、34位、及び38位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号225の12位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号225の18位、34位、及び38位のnで示す塩基に対応する位置は、Pa'又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-ix-a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号226で示す塩基配列を含み、前記配列番号226で示す塩基配列において12位及び28位のnで示す塩基は、Dsであり、前記配列番号226で示す塩基配列において16位、18位、34位、及び38位のnで示す塩基は、Pa'又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-ix-b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号226において12位、16位、18位、28位、34位、及び38位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号226の12位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号226の16位、18位、34位、及び38位のnで示す塩基に対応する位置は、Pa'又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-x-a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核

酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号229で示す塩基配列を含み、前記配列番号229で示す塩基配列において11位及び27位のnで示す塩基は、Dsであり、前記配列番号229で示す塩基配列において17位のnで示す塩基は、Pa'又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-x-b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号229において11位、17位、及び27位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号229の11位及び27位のnで示す塩基に対応する位置は、Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号229の17位のnで示す塩基に対応する位置は、Pa'又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-x-i-a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号230で示す塩基配列を含み、前記配列番号230で示す塩基配列において11位及び27位のnで示す塩基は、Dsであり、前記配列番号230で示す塩基配列において15位及び17位のnで示す塩基は、Pa'又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-x-i-b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号230において11位、17位、及び27位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号230の11位及び27位のnで示す塩基に対応する

位置は、Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号230の15位及び17位のnで示す塩基に対応する位置は、Pa'又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-x i i - a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号231で示す塩基配列を含み、前記配列番号231で示す塩基配列において8位及び24位のnで示す塩基は、Dsであり、前記配列番号231で示す塩基配列において14位のnで示す塩基は、Pa'又はPxである、前記核酸アプタマー；

(8-x i i - b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号231において8位、14位、及び24位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号231の8位及び24位のnで示す塩基に対応する位置は、Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号231の14位のnで示す塩基に対応する位置は、Pa'又はPxである、前記核酸アプタマー。

[0151] < (3) CRPに結合する核酸アプタマー >

本発明の核酸アプタマーのさらなる一態様において、C反応性タンパク質 (CRP) に結合する核酸アプタマー (以下、「CRP標的核酸アプタマー」と称する) が提供される。

[0152] 本明細書において「C反応性タンパク質 (CRP)」は、生体内で炎症反応が生じる際に血中で検出されるため急性期反応タンパクとして知られている環状の5量体タンパク質である。本発明において、CRPの由来となる生物種は問わないが、例えば哺乳動物、例えばヒト及びチンパンジーなどの霊長類、ラット及びマウス等の実験動物、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、及びヤギ等の家

畜動物、並びにイヌ及びネコ等の愛玩動物、好ましくはヒトのCRPが挙げられる。

[0153] 一実施形態において、本発明のCRP標的核酸アプタマーは、配列番号21又は24で示す塩基配列、又は配列番号21又は24で示す塩基配列の5'末端側及び3'末端側にステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列が付加した配列を含む。

[0154] 配列番号21で示す塩基配列は、実施例4におけるAptCRP-01及びAptCRP-03の塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号24で示す塩基配列は、実施例4におけるAptCRP-06、AptCRP-07、及びAptCRP-08の塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。

[0155] 本態様のさらなる実施形態において、CRP標的核酸アプタマーは、以下の(3-i-a)～(3-i-b)からなる群から選択される：

(3-i-a) 配列番号20で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において9位及び20位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、32位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(3-i-b) 配列番号20において9位、20位、及び32位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号20の9位及び20位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号20の32位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(3-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号21で示す塩基配列を含み、前記配列番号21で示す塩基配列において2位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、14位のnで示す塩基は、天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(3-i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核

酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号21において2位及び14位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号21の2位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号21の14位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(3-i i-a) 配列番号22で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において20位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、32位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(3-i i-b) 配列番号22において20位及び32位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号22の20位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号22の32位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(3-i i i-a) 配列番号23で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において9位及び20位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、31位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(3-i i i-b) 配列番号23において9位、20位、及び31位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号23の9位及び20位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号23の31位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(3-i i i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成す

ることができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号24で示す塩基配列を含み、前記配列番号24で示す塩基配列において2位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、13位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(3-iii-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号24において2位及び13位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号24の2位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号24の13位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(3-iv-a) 配列番号25で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において14位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、26位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(3-iv-b) 配列番号25において14位及び26位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号25の14位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号25の26位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(3-v-a) 配列番号26で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において14位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、25位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(3-v-b) 配列番号26において14位及び25位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配

列において配列番号26の14位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号26の25位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー。

[0156] なお、上記の配列番号20、22、23、25、及び26で示す塩基配列は、それぞれ配列番号21、21、24、24、及び24の5'末端側及び3'末端側にステム構造を形成し得る互いに相補的な配列が追加された配列である。

[0157] <（4）トロンビンに結合する核酸アプタマー>

本発明の核酸アプタマーのさらなる一態様において、トロンビンに結合する核酸アプタマー（以下、「トロンビン標的核酸アプタマー」と称する）が提供される。

[0158] 本明細書において「トロンビン」は、フィブリノゲンのフィブリンへの変換を通じて、止血において中心的な役割を有するセリンプロテアーゼである。本発明において、トロンビンの由来となる生物種は問わないが、例えば哺乳動物、例えばヒト及びチンパンジーなどの霊長類、ラット及びマウス等の実験動物、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、及びヤギ等の家畜動物、並びにイヌ及びネコ等の愛玩動物、好ましくはヒトのトロンビンが挙げられる。

[0159] 一実施形態において、本発明のトロンビン標的核酸アプタマーは、配列番号27、29、31、33、35、又は37で示す塩基配列、又は配列番号28、30、32、34、36、又は38で示す塩基配列の5'末端側及び3'末端側にステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列が付加した配列を含む。

[0160] 配列番号28で示す塩基配列は、実施例4におけるThr204の塩基配列（配列番号27）においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号30で示す塩基配列は、実施例4におけるThr205の塩基配列（配列番号29）においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号32で示す塩基配列は、実施例4におけるThr101の塩基配列（配列番号31）においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号34で示す塩基配列は、実施例4におけるThr104の塩基配列（配列番号33）においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号36で示す塩基配列は、実施例4におけるThr106の塩基配列（配列番号35

）においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号38で示す塩基配列は、実施例4におけるThr201の塩基配列（配列番号37）においてステム領域を除いた中央領域に対応する。

[0161] 本態様のさらなる実施形態において、トロンプン標的核酸アプタマーは、以下の（4-i-a）～（4-v-i-d）からなる群から選択される：

（4-i-a）配列番号27で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において16位及び22位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、前記核酸アプタマー；

（4-i-b）配列番号27において16位及び22位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号27の16位及び22位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

（4-i-c）5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号28で示す塩基配列を含み、前記配列番号28で示す塩基配列において6位及び12位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

（4-i-d）5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号28において6位及び12位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号28の6位及び12位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

（4-ii-a）配列番号29で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において10位及び16位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、28位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(4-i-i-b) 配列番号29において10位、16位、及び28位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号29の10位及び16位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号29の28位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(4-i-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号30で示す塩基配列を含み、前記配列番号30で示す塩基配列において1位及び7位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、19位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(4-i-i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号30において1位、7位、及び19位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号30の1位及び7位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号30の19位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(4-i-i-i-a) 配列番号31で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において26位及び41位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、前記核酸アプタマー；

(4-i-i-i-b) 配列番号31において26位及び41位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号31の26位及び41位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(4-i-i-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含

む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号32で示す塩基配列を含み、前記配列番号32で示す塩基配列において18位及び33位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(4-i i i - d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号32において18位及び33位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号32の18位及び33位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(4-i v - a) 配列番号33で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において16位及び24位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、35位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(4-i v - b) 配列番号33において16位、24位、及び35位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号33の16位及び24位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号33の35位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(4-i v - c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号34で示す塩基配列を含み、前記配列番号34で示す塩基配列において10位及び18位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、29位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(4-i v - d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成する

ことができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号34において10位、18位、及び29位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号34の10位及び18位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号34の29位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(4-v-a) 配列番号35で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において17位及び24位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、36位及び39位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(4-v-b) 配列番号35において17位、24位、36位、及び39位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号35の17位及び24位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号35の36位及び39位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(4-v-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号36で示す塩基配列を含み、前記配列番号36で示す塩基配列において9位及び16位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、28位及び31位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(4-v-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号36において9位、16位、28位、及び31位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前

記塩基配列において配列番号36の9位及び16位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号36の28位及び31位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(4-v i - a) 配列番号37で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において29位及び38位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、前記核酸アプタマー；

(4-v i - b) 配列番号37において29位及び38位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号37の29位及び38位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(4-v i - c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号38で示す塩基配列を含み、前記配列番号38で示す塩基配列において19位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(4-v i - d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号38において19位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号38の19位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー。

[0162] なお、上記の配列番号27、29、31、33、35、及び37で示す塩基配列は、それぞれ配列番号28、30、32、34、36、及び38の5'末端側及び3'末端側にステム構造を形成し得る互いに相補的な配列が追加された配列である。

[0163] < (5) IL-6に結合する核酸アプタマー >

本発明の核酸アプタマーのさらなる一態様において、インターロイキン-6

(IL-6) に結合する核酸アプタマー（以下、「IL-6標的核酸アプタマー」と称する）が提供される。

[0164] 本明細書において「インターロイキン-6 (IL-6)」は、T細胞やマクロファージ等の細胞により産生され、液性免疫を制御するサイトカインの一つである。本発明において、IL-6の由来となる生物種は問わないが、例えば哺乳動物、例えばヒト及びチンパンジーなどの霊長類、ラット及びマウス等の実験動物、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、及びヤギ等の家畜動物、並びにイヌ及びネコ等の愛玩動物、好ましくはヒトのIL-6が挙げられる。

[0165] 一実施形態において、本発明のIL-6標的核酸アプタマーは、配列番号39又は41で示す塩基配列、又は配列番号40又は42で示す塩基配列の5'末端側及び3'末端側にステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列が付加した配列を含む。

[0166] 配列番号40で示す塩基配列は、実施例4におけるBio-IL6-201bの塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号42で示す塩基配列は、実施例4におけるBio-IL6-101の塩基配列においてステム領域を除いた中央領域に対応する。

[0167] 本態様のさらなる実施形態において、IL-6標的核酸アプタマーは、以下の(5-i-a)～(5-i-d)からなる群から選択される：

(5-i-a) 配列番号39で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において25位及び34位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、13位及び20位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(5-i-b) 配列番号39において13位、20位、25位、及び34位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号39の25位及び34位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号39の13位及び20位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(5-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号40で示す塩基配列を含み、前記配列番号40で示す塩基配列において14及び23位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、2位及び9位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(5-i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号40において2位、9位、14位、及び23位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号40の14位及び23位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号40の2位及び9位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(5-ii-a) 配列番号41で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において17位及び33位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、38位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(5-ii-b) 配列番号41において17位、33位、及び38位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号41の17位及び33位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号41の38位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(5-ii-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号42で示す塩基配列を含み、前記配列番号42で示す塩基配列において1

位及び17位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、22位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(5 - i i - d) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号42において1、17位、及び22位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号42の1位及び17位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号42の22位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー。

[0168] なお、上記の配列番号39及び41で示す塩基配列は、それぞれ配列番号40及び42の5' 末端側及び3' 末端側にステム構造を形成し得る互いに相補的な配列が追加された配列である。

[0169] < (6) IL-8に結合する核酸アプタマー >

本発明の核酸アプタマーのさらなる一態様において、インターロイキン-8 (IL-8) に結合する核酸アプタマー (以下、「IL-8標的核酸アプタマー」と称する) が提供される。

[0170] 本明細書において「インターロイキン-8 (IL-8)」は、マクロファージ、上皮細胞、及び血管内皮細胞等によって産生されるケモカインである。本発明において、IL-8の由来となる生物種は問わないが、例えば哺乳動物、例えばヒト及びチンパンジーなどの霊長類、ラット及びマウス等の実験動物、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、及びヤギ等の家畜動物、並びにイヌ及びネコ等の愛玩動物、好ましくはヒトのIL-8が挙げられる。

[0171] 一実施形態において、本発明のIL-8標的核酸アプタマーは、配列番号43、45、又は49で示す塩基配列、又は配列番号44、46、又は50で示す塩基配列の5' 末端側及び3' 末端側にステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列が付加した配列を含む。

[0172] 配列番号44で示す塩基配列は、実施例4におけるIL8-102PD又はIL8-102DDの塩基配列(配列番号43)においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号46で示す塩基配列は、実施例4におけるIL8-223PD又はIL8-223DDの塩基配列(配列番号45)においてステム領域を除いた中央領域に対応する。配列番号50で示す塩基配列は、実施例4におけるIL8-201DPDの塩基配列(配列番号49)においてステム領域を除いた中央領域に対応する。

[0173] 本態様のさらなる実施形態において、IL-8標的核酸アプタマーは、以下の(6-i-a)～(6-vii-d)からなる群から選択される：

(6-i-a) 配列番号43で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において26位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、17位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(6-i-b) 配列番号43において17位及び26位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号43の26位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号43の17位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(6-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号44で示す塩基配列を含み、前記配列番号44で示す塩基配列において12位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、3位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(6-i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号44において3位及び12位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列にお

いて配列番号 4 4 の12位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 4 4 の3位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(6-i-i-a) 配列番号 4 5 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において26位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、17位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(6-i-i-b) 配列番号 4 5 において17位及び26位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号 4 5 の26位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号 4 5 の17位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(6-i-i-c) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 4 6 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 4 6 で示す塩基配列において12位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、3位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(6-i-i-d) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 4 6 において3位及び12位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 4 6 の12位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 4 6 の3位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa' 又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(6-i-i-i-a) 配列番号47で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において26位及び37位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、17位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(6-i-i-i-b) 配列番号47において17位、26位、及び37位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号47の26位及び37位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号47の17位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(6-i-i-i-a) 配列番号48で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において25位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、16位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(6-i-i-i-b) 配列番号48において16及び25位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号48の25位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号48の16位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(6-i-v-a) 配列番号43で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において17位及び26位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、前記核酸アプタマー；

(6-i-v-b) 配列番号43において17位及び26位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号43の17位及び26位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(6-i-v-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列

番号44で示す塩基配列を含み、前記配列番号44で示す塩基配列において3位及び12位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(6-i-v-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号44において3位及び12位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号44の3位及び12位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、前記核酸アプタマー；

(6-v-a) 配列番号45で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において17位及び26位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、前記核酸アプタマー；

(6-v-b) 配列番号45において17位及び26位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号45の17位及び26位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(6-v-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号46で示す塩基配列を含み、前記配列番号46で示す塩基配列において3位及び12位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(6-v-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号46において3位及び12位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号46の3位及び12位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー；

(6-v i-a) 配列番号49で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において17位及び30位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、23位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；

(6-v i-b) 配列番号49において17位、23位、及び30位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号49の17位及び30位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、配列番号49の23位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(6-v i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号50で示す塩基配列を含み、前記配列番号50で示す塩基配列において3位及び16位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsであり、9位のnで示す塩基は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー；

(6-v i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号50において3位、9位、及び16位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号50の3位及び16位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号50の9位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Pa'又は非天然型塩基Pxである、核酸アプタマー。

[0174] なお、上記の配列番号43、45、47、48、及び49で示す塩基配列は、それぞれ配列番号44、46、44、46、及び50で示す塩基配列の5'末端側及び3'末端側にステム構造を形成し得る互いに相補的な配列が追加された配列である。

[0175] <(7) HMGB1に結合する核酸アプタマー>

本発明の核酸アプタマーのさらなる一態様において、HMGB1に結合する核酸アプタマー（以下、「HMGB1標的核酸アプタマー」と称する）が提供される。

[0176] 本明細書において、「HMGB1」（High Mobility Group Box 1）は、クロマチンタンパク質として機能することに加えて、マクロファージや単球等の免疫細胞から分泌されて炎症のサイトカインメディエーターとしても機能する。本発明において、HMGB1の由来となる生物種は問わないが、例えば哺乳動物、例えばヒト及びチンパンジーなどの霊長類、ラット及びマウス等の実験動物、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、及びヤギ等の家畜動物、並びにイヌ及びネコ等の愛玩動物、好ましくはヒトのHMGB1が挙げられる。

[0177] 一実施形態において、本発明のHMGB1標的核酸アプタマーは、配列番号135で示す塩基配列、又は配列番号134で示す塩基配列の5'末端側及び3'末端側にステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列が付加した配列を含む。

[0178] 配列番号134で示す塩基配列は、実施例4におけるBio-HMGB1-301-DDの塩基配列(配列番号171)においてステム領域とミニヘアピン配列を除いた中央領域に対応する。

[0179] 本態様のさらなる実施形態において、HMGB1標的核酸アプタマーは、以下の（7-a）～（7-d）からなる群から選択される：

（7-a）配列番号135で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において22位及び33位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、前記核酸アプタマー；

（7-b）配列番号135において22位及び33位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号135の22位及び33位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、前記核酸アプタマー；

（7-c）5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号134

で示す塩基配列を含み、前記配列番号134で示す塩基配列において12位及び23位のnで示す塩基は、非天然型塩基Dsである、前記核酸アプタマー；

(7-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号134において12位及び23位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号134の12位及び23位のnで示す塩基に対応する位置は、非天然型塩基Dsである、核酸アプタマー。

[0180] なお、上記の配列番号135で示す塩基配列は、配列番号134の5'末端側及び3'末端側にステム構造を形成し得る互いに相補的な配列が追加された配列である。

[0181] <医薬組成物>

本発明の一態様において、上述のいずれかの核酸アプタマーを含む医薬組成物が提供される。発明の医薬組成物は、上述のいずれか1以上の核酸アプタマーを含み、抗炎症、リウマチ治療、がん治療等、任意の疾患を治療又は予防するために使用することができる。本発明の医薬組成物は、上述のいずれか2以上の核酸アプタマーを組み合わせて含むこともできる。また、医薬組成物は、本発明の核酸アプタマーが有する結合能を失わない範囲において、他の薬剤を一以上含有することもできる。

[0182] 上記(1)／(2)／(8) IFN γ に結合する核酸アプタマーを含む医薬組成物の予防及び／又は治療の対象となる疾患は、IFN γ の機能の抑制を必要とする疾患（本明細書では、以下「IFN γ 関連疾患」とも記載する）である。IFN γ 関連疾患の例として、例えば、自己免疫疾患又は炎症性障害等が挙げられる。自己免疫疾患又は炎症性障害は、例えばクローン病、全身性エリテマトーデス、乾癬、関節リウマチ、脈管炎、ぶどう膜炎、アトピー性皮膚炎、I型糖尿病、多発性硬化症、統合失調症、角膜移植拒絶反応、円形脱毛症、尋常

性乾癬、白斑、尋常性天疱瘡、表皮水疱症、尋常性ざ瘡、単純ヘルペスウイルス1型、又はハンナ型間質性膀胱炎であってもよい。また、上記（１）／（２）／（８）IFN γ に結合する核酸アプタマーを含む医薬組成物をアフエレーシスに使用することもできる。

[0183] 上記（３）CRPに結合する核酸アプタマーを含む医薬組成物の予防及び／又は治療の対象となる疾患は、CRPの機能の抑制を必要とする疾患（本明細書では、以下「CRP関連疾患」とも記載する）である。

[0184] 上記（４）トロンビンに結合する核酸アプタマーを含む医薬組成物の予防及び／又は治療の対象となる疾患は、トロンビンの機能の抑制を必要とする疾患（本明細書では、以下「トロンビン関連疾患」とも記載する）である。トロンビン関連疾患の例として、例えば、血栓性疾患等が挙げられる。血栓性疾患の例として、例えば静脈血栓症（例：深部静脈血栓症）、肺塞栓症、心房細動、心筋梗塞、動脈血栓症、脳卒中（例：血栓症誘発性脳卒中）、アテローム性動脈硬化症、及び散在性血管内凝固が挙げられる。本実施形態の医薬組成物は、血液凝固を抑制又は阻害するために使用することもできる。

[0185] 上記（５）IL-6に結合する核酸アプタマーを含む医薬組成物の予防及び／又は治療の対象となる疾患は、IL-6の機能の抑制を必要とする疾患（本明細書では、以下「IL-6関連疾患」とも記載する）である。IL-6関連疾患の例として、IL-6の過剰産生が関連する疾患が挙げられる。例えば、神経疾患、自己免疫疾患、がん、及び炎症性疾患等が挙げられ、具体例としては、中枢神経系疾患、リウマチ（例えば関節リウマチ）、白血病や固形がん、若年性特発性関節炎、成人スチル病、高安動脈炎、巨細胞性動脈炎、視神経脊髄炎スペクトラム障害、及びキャッスルマン病等が挙げられる。

[0186] 上記（６）IL-8に結合する核酸アプタマーを含む医薬組成物の予防及び／又は治療の対象となる疾患は、IL-8の機能の抑制を必要とする疾患（本明細書では、以下「IL-8関連疾患」とも記載する）である。IL-8関連疾患の例としては、以下に限定されるものではないが、例えば神経疾患、自己免疫疾患、がん、及び炎症性疾患等が挙げられ、具体例としては慢性関節性リウマチ

、痛風、乾癬、成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、喘息、及び子宮内膜症等が挙げられる。

[0187] 上記(7) HMGB1に結合する核酸アプタマーを含む医薬組成物の予防及び／又は治療の対象となる疾患は、HMGB1の機能の抑制を必要とする疾患（本明細書では、以下「HMGB1関連疾患」とも記載する）である。HMGB1関連疾患には、炎症性疾患、自己免疫疾患、がん、心血管疾患、神経疾患、及び感染症等が挙げられる。具体例として、関節リウマチ、炎症性腸疾患、敗血症、炎症性腸疾患、ループス、シェーグレン症候群、心筋梗塞、動脈硬化症、脳卒中、脳梗塞、脳浮腫、脳血管疾患、脳血管攣縮、多発性硬化症、外傷性脳傷害、アテローム性動脈硬化症、神経因性疼痛、関節炎、急性肺外傷、脳虚血、腎虚血、肝虚血、中枢神経系疾患及び末梢神経系疾患、神経変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病等）、神経因性疼痛、歯周病等が挙げられる。

[0188] 本発明の医薬組成物は、製薬上許容可能な担体を含むことができる。「製薬上許容可能な担体」とは、製剤技術分野において通常使用する医薬組成物の製剤化や生体への適用を容易にし、その作用を阻害又は抑制しない範囲で添加される物質をいう。担体には、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、充填剤、乳化剤、流動添加調節剤、潤滑沢剤、又は安定化剤が挙げられる。

[0189] 「賦形剤」としては、例えば、単糖、二糖類、シクロデキストリン及び多糖類のような糖（具体的には、限定はしないが、グルコース、スクロース、ラクトース、ラフィノース、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、デキストリン、マルトデキストリン、デンプン及びセルロースを含む）、金属塩（例えば、リン酸ナトリウム若しくはリン酸カルシウム、硫酸カルシウム、硫酸マグネシウム）、クエン酸、酒石酸、グリシン、低、中、高分子量のポリエチレングリコール（PEG）、プルロニック、或いはそれらの組み合わせが挙げられる。

[0190] 「結合剤」としては、例えば、トウモロコシ、コムギ、コメ、若しくはジャガイモのデンプンを用いたデンプン糊、ゼラチン、トラガカント、メチル

セルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム及び／又はポリビニルピロリドン等が挙げられる。

[0191] 「崩壊剤」としては、例えば、前記デンプンや、カルボキシメチルデンプン、架橋ポリビニルピロリドン、アガー、アルギン酸若しくはアルギン酸ナトリウム又はそれらの塩が挙げられる。

[0192] 「充填剤」としては、例えば、前記糖及び／又はリン酸カルシウム（例えば、リン酸三カルシウム、若しくはリン酸水素カルシウム）が挙げられる。

[0193] 「乳化剤」としては、例えば、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステルが挙げられる。

[0194] 「流動添加調節剤」及び「滑沢剤」としては、例えば、ケイ酸塩、タルク、ステアリン酸塩又はポリエチレングリコールが挙げられる。

[0195] 「安定化剤」としては、例えば、アスコルビン酸や亜硫酸塩等の酸化防止剤、トレハロースやブドウ糖等の糖類が挙げられる。

[0196] このような担体は、必要に応じて適宜使用すればよい。本発明の医薬組成物は、上記の添加剤の他、必要に応じて矯味矯臭剤、溶解補助剤（可溶化剤）、懸濁剤、希釈剤、界面活性剤、吸収促進剤（例えば、第4級アンモニウム塩類、ラウリル硫酸ナトリウム等）、増量剤、付湿剤、保湿剤（例えば、グリセリン、澱粉等）、吸着剤（例えば、澱粉、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等）、崩壊抑制剤（例えば、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油等）、コーティング剤、着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤、緩衝剤、等張化剤、無痛化剤、溶解補助剤等を含むこともできる。

[0197] 「界面活性剤」としては、例えば、リグノスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、フェノールスルホン酸、ジブチルナフタレンスルホン酸のアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩及びアンモニウム塩、アルキルアールスルホネート、アルキルスルフェート、アルキルスルホネート、脂肪アルコールスルフェート、脂肪酸及び硫酸化脂肪アルコールグリコールエーテル、さらに、

スルホン化ナフタレン及びナフタレン誘導体とホルムアルデヒドの縮合物、ナフタレン又はナフタレンスルホン酸とフェノール及びホルムアルデヒドの縮合物、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、エトキシ化イソオクチルフェノール、オクチルフェノール、ノニルフェノール、アルキルフェニルポリグリコールエーテル、トリブチルフェニルポリグリコールエーテル、トリステアリルフェニルポリグリコールエーテル、アルキルアリールポリエーテルアルコール、アルコール及び脂肪アルコール／エチレンオキシドの縮合物、エトキシ化ヒマシ油、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、エトキシ化ポリオキシプロピレン、ラウリルアルコールポリグリコールエーテルアセタール、ソルビトールエステル、リグノ亜硫酸廃液、及びメチルセルロースが該当する。

- [0198] 本実施形態の医薬組成物は、一医薬組成物中に上記担体を一以上包含することが可能である。
- [0199] 本発明の医薬組成物の剤形は、有効成分を不活化させない形態であって、投与後、生体内でその薬理効果を発揮し得る形態であれば特に限定しない。通常は、投与方法及び／又は処方条件によって異なる。
- [0200] 例えば、経口投与に適した剤形としては、固形剤（錠剤、丸剤、舌下剤、カプセル剤、ドロップ剤、トローチ剤を含む）、顆粒剤、粉剤、散剤、液剤等を挙げることができる。さらに固形剤は、必要に応じ、当該分野で公知の剤皮を施した剤形、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶錠、フィルムコーティング錠、二重錠、多層錠とすることができる。
- [0201] 非経口投与は、全身投与及び局所投与に細分され、局所投与は、組織内投与、経表皮投与、経粘膜投与及び経直腸的投与にさらに細分されるが、医薬組成物も、それぞれの投与方法に適した剤形にすることができる。全身又は組織内投与に適した剤形としては、例えば、液剤である注射剤が挙げられる。経表皮投与又は経粘膜投与に適した剤形としては、例えば、液剤（塗布剤、点眼剤、点鼻剤、吸引剤を含む）、懸濁剤（乳剤、クリーム剤を含む）、粉剤（点鼻剤、吸引剤を含む）、ペースト剤、ゲル剤、軟膏剤、硬膏剤等を

挙げることができる。経直腸的投与に適した剤形としては、例えば、坐剤等を挙げることができる。

[0202] なお、上記各剤形の具体的な形状、大きさについては、いずれもそれぞれの剤形において当該分野で公知の剤形の範囲内にあればよく、特に限定はしない。

[0203] 本発明の医薬組成物を製造するには、原則として当該分野で公知の製剤化方法を応用すればよい。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Merck Publishing Co., Easton, Pa.) に記載の方法を参照することができる。

[0204] 例えば、注射剤の場合には、本発明の核酸アプタマーを製薬上許容可能な溶媒に溶解し、必要に応じて製薬上許容可能な担体を加え、当該分野で慣用されている方法により製造することができる。

[0205] 「薬学的に許容可能な溶媒」としては、例えば、水、エタノール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等が挙げられる。これらは、必要に応じて血液と等張に調整されていることが好ましい。

[0206] 本発明の医薬組成物は、対象疾患の治療又は予防のために製薬上有効な量を生体に投与することができる。投与する対象となる生体は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。

[0207] 本発明の医薬組成物は、全身投与又は局所的投与のいずれにより投与されてもよい。疾患の種類、発症箇所又は進行度等に応じて適宜選択することができる。発症箇所が局所的な疾患であれば、注射などにより発症箇所及びその周辺に直接投与する局所的投与が好ましい。治療すべき箇所（組織又は器官）に本発明の核酸アプタマーを十分量投与することができ、また他の組織に影響を及ぼしにくいからである。一方、治療箇所を特定できない場合や発症が全身性の疾患の場合には、限定はしないが、静脈注射等による全身投与が好ましい。血流を介して本発明の核酸アプタマーを全身に行き渡らせるこ

とで、診断で発見できない病変部にも投与が可能となるからである。

[0208] 本発明の医薬組成物は、有効成分が失活しないあらゆる適当な方法で投与することができる。例えば、非経口（例えば、注射、エアロゾル、塗布、点眼、点鼻）又は経口のいずれであってもよい。好ましくは、注射である。

[0209] 注射による投与の場合、注入部位は、特に限定しない。有効成分であるDNAアプタマーが標的物質に結合することができれば、いずれの部位であってもよい。例えば、投与、筋肉内投与、皮下投与（埋め込み型持続皮下投与を含む）、皮内投与、静脈内、動脈内、肝臓内、筋肉内、関節内、骨髓内、髄腔内、心室内、経肺、経皮、皮下、皮内、眼内、腹腔内、及び膀胱内投与、並びに経膈内投与、直腸投与、吸入又は点鼻投与、及び気管／気管支投与等が挙げられる。

[0210] <治療及び／又は予防方法>

一態様において、本発明の核酸アプタマー又は上記医薬組成物を対象（被験体）に投与することを含む、疾患の治療及び／又は予防方法が提供される。

[0211] 本明細書において、「対象」又は「被験体」となり得る動物種は、例えば哺乳動物、例えばヒト及びチンパンジーなどの霊長類、ラット及びマウス等の実験動物、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、及びヤギ等の家畜動物、並びにイヌ及びネコ等の愛玩動物、好ましくはヒトである。

[0212] 本態様の治療及び／又は予防方法において、治療及び／又は予防の対象となる疾患や、対象に投与される核酸アプタマーの種類、投与方法は、上述の医薬組成物の記載に準じるため、ここでの詳細な説明は省略する。

[0213] <検出剤、検出用組成物、及び検出用キット>

本発明の一態様において、検出剤、検出用組成物、及び検出用キットも提供される。本発明の検出剤は、本発明の核酸アプタマーの標的タンパク質への結合能を利用して、in vivo又はin vitroにおいて標的タンパク質を検出するための薬剤である。標的タンパク質は、IFN γ 、CRP、トロンピン、IL-6、IL-8、又はHMGB1である。例えば、核酸アプタマーをあらかじめ蛍光試薬等で

標識し、これを投与することによって、生体内で上記いずれかの標的タンパク質の発現強度を決定し、またその局在を調べることができる。これによって、上記疾患の診断を補助することが可能となり得る。本発明の核酸アプタマーは、イメージング及び組織染色等においても有用である。

[0214] 一実施形態において、本発明は、本発明の核酸アプタマーを含む標的タンパク質の検出用組成物に関する。組成物の構成については上記医薬組成物と同様であるから、ここでは記載を省略する。

[0215] 一態様において、本発明は、本発明の核酸アプタマーを含む標的タンパク質の検出用キットに関する。本発明のキットは、本発明の核酸アプタマーに加えて、バッファー、標識試薬、及び／又は説明書等を含んでよい。

[0216] <検出方法>

一態様において、本発明は、上記いずれかの標的タンパク質を検出する方法に関する。本方法は、被験体から得られたサンプルを、本発明の核酸アプタマーと接触させる工程、及びサンプルと核酸アプタマーの結合に基づいて上記いずれかの標的タンパク質を検出する工程を含む。本方法によって、上記標的タンパク質に関連する疾患の診断を補助することが可能となり得る。

[0217] 本方法において用いるサンプルとしては、組織及び生体試料が挙げられる。組織の例として、病変部位、例えば、脳、心臓、肝臓、脾臓、肺、骨髄、リンパ節、及び脾臓等が挙げられ、例えばこれらの組織の生検サンプルを用いることができる。生体試料の例として、例えば、体液（例：血液、血漿、リンパ液、組織液、又は尿）、並びに細胞、例えば末梢血細胞、毛母細胞、口腔細胞、鼻腔細胞、腸管細胞、腔内細胞、粘膜細胞、及び喀痰（肺胞細胞又は気肝細胞等を含み得る）等が挙げられる。

[0218] 本発明の検出方法の検出工程は、サンプルと核酸アプタマーの結合を利用するものであれば特に限定せず、公知の方法を用いればよい。例えば、SPR法、水晶振動子マイクロバランス法、比濁法、比色法又は蛍光法を利用することができる。

[0219] SPR（表面プラズモン共鳴）は、金属薄膜にレーザー光を照射すると特定の

入射角度（共鳴角）において反射光強度が著しく減衰する現象をいう。SPR法は、この現象を利用した測定方法で、センサ部である金属薄膜表面上の吸着物を高感度に測定することができる。本発明においては、例えば、予め本発明の核酸アプタマーを金属薄膜表面上に固定化しておき、その金属薄膜表面上に試料を通過させ、当該核酸分子と標的物質との結合によって生じる試料通過前後の金属表面上の吸着物の差を検出することにより試料中の標的物質を検出することができる。SPR法には、置換法、間接競合法等が知られるがいろいろを用いてもよい。

[0220] QCM（水晶振動子マイクロバランス：Quartz Crystal Microbalance）法は、水晶振動子に取り付けた電極表面に物質が吸着すると、その質量に応じて水晶振動子の共振周波数が減少する現象を利用した方法である。この方法を用いたQCMセンサは、水共振周波数の変化量によって極微量な吸着物を定量的に捕らえることができる。本発明においては、電極表面に、前記SPR法と同様に予めDNAアプタマーを固定化しておき、試料を電極表面に接触させることによって、DNAアプタマーと標的物質との結合により生じる水共振周波数の変化量から試料中の標的物質を定量的に検出することができる。本技術は、当該分野において周知である。例えば、Christopher J., et al. (2005) Self-Assembled Monolayers of a Form of Nanotechnology, Chemical Review, 105:1103-1169を参照すればよい。

[0221] 比濁法は、溶液に光を照射し、溶液中に浮遊する物質によって散乱する散乱光の減衰又はその溶液を通過した透過光を、比色計等を用いて光学的に計測することにより溶液中の物質量を測定する方法である。本発明においては、試料中に本発明の核酸アプタマーを添加する前後の吸光度を計測することによって、試料中の標的物質を定量的に検出することができる。

[0222] また、標的物質に対する抗体と併用することにより標的物質を検出することもできる。例えば、ELISA法のサンドイッチ法を応用した方法を用いてもよい。この方法では、まず、固相担体に本発明の核酸アプタマーを固定しておき、次に試料を加えて、試料中に存在する標的物質と前記核酸アプタマーと

を結合させる。続いて、試料を洗い流した後、抗標的物質抗体を加えて標的物質に結合させる。洗浄後、適当な標識をした二次抗体を用いて抗標的物質抗体を検出することにより、試料中の標的物質を検出することができる。固相担体としては、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ラテックス、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース、ガラス、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなるビーズ、マイクロプレート、試験管、スティック又は試験片等の形状の不溶性担体を用いることができる。

[0223] また、標的物質に対する抗体と併用することにより標的物質を検出することもできる。例えば、ELISA法のサンドイッチ法を応用した方法を用いてもよい。

[0224] 本態様の検出工程により標的タンパク質が検出される場合、サンプルが由来する被験者が、標的タンパク質に関連する疾患に罹患していることが示される。

[0225] 一実施形態では、上述のいずれかの検出剤、検出用組成物、検出用キット、又は検出方法は、炎症又は炎症性疾患を検出することができる。また、炎症又は炎症性疾患における炎症レベルを測定するもできる。

[0226] さらに実施形態では、炎症性疾患は、感染症、膠原病、心血管疾患、又は腫瘍であってもよい。また、炎症は、組織損傷、壊死、又は外科手術に付随するものであってもよい。この場合、上述の検出剤、検出用組成物、検出用キットは、上記（３）のCRPに結合する核酸アプタマーを含むことができる。また、上述の検出方法は上記（３）のCRPに結合する核酸アプタマーを用いることができる。

[0227] 本発明のさらなる一態様において、ヒト等の被験体における疾患の治療及び／又は予防における使用のための、上記のいずれかの本発明の核酸アプタマーもまた提供される。さらに本発明によれば、疾患を治療及び／又は予防するための医薬の製造における、上記のいずれかの本発明の核酸アプタマー

も提供される。

[0228] さらに一態様において、本発明は、被験体において疾患の罹患の有無の診断を補助する方法に関する。本方法は、被験体に本発明の核酸アプタマーを投与する工程、及び核酸アプタマーを検出する工程を含む。例えば、生体内で特定の部位で核酸アプタマーが高濃度で検出された場合には、その部位において疾患が生じていると判断することができる。検出工程は、公知の方法を用いればよく、例えば上記蛍光法を用いることができる。

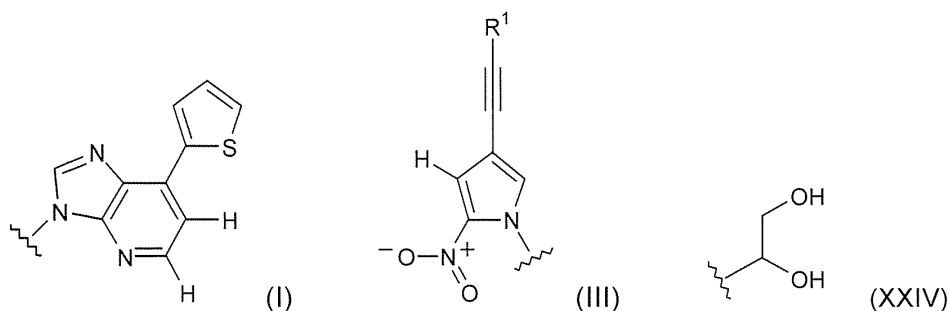
実施例

[0229] <実施例 1 : Px塩基及びPa' 塩基の互換性の検証>

(目的)

本発明者らが、過去に5塩基DNAライブラリーに基づくExSELEX法で開発した、デングウイルス2型NS1タンパク質（以下、「DEN2-NS1タンパク質」という）に結合するAptD2アプタマー（配列番号88）には、以下の一般式（I）で示す非天然型塩基（7-(2-thienyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-3-yl；以下、「Ds」という）に加えて、以下の一般式（III）で示す非天然型塩基においてR¹基が以下の一般式（XXIV）であるもの4-(4-pentyne-1,2-diol)-1-propynyl-2-nitropyrrole；以下、「Px_(diol)」という）が、ExSELEX法におけるPCR増幅の過程で、偶発的変異として組み込まれていた（図3、左； Matsunaga, K. et al., Nucleic Acids Res., 49, 11407-11424 (2021).）。

[化8]



[0230] 本実施例では、上記AptD2アプタマーのPx_(diol)塩基を様々な人工塩基及び天然型塩基に置換してDEN2-NS1タンパク質に対する結合能に対する影響につい

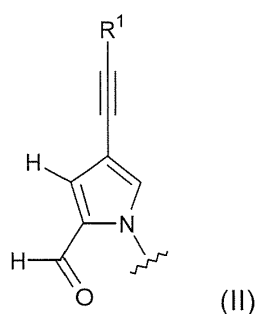
て検証する。

[0231] (方法と結果)

(1) 改変型AptD2アプタマーの作製

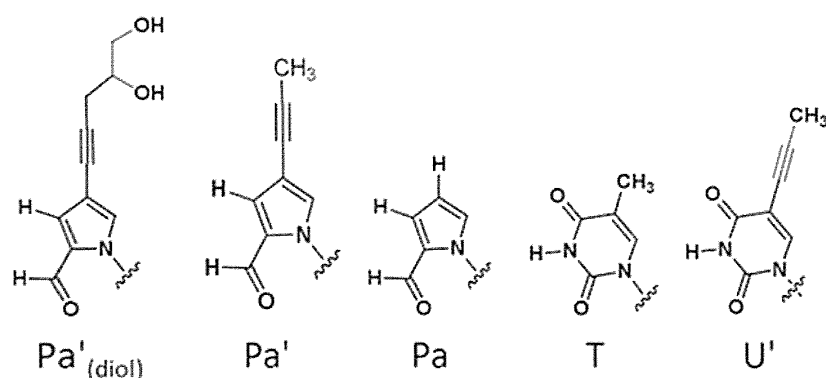
AptD2アプタマーの $Px_{(diol)}$ 塩基を(i)以下の一般式(II)で示す非天然型塩基において R^1 基が上記一般式(XXIV)であるもの(4-(4-pentyne-1,2-diol)-1-propynylpyrrole-2-carbaldehyde; 以下、「 $Pa'_{(diol)}$ 」という)、(ii)以下の一般式(II)で示す非天然型塩基において R^1 基がメチル基であるもの(4-propynylpyrrole-2-carbaldehyde; 以下、「 $Pa'_{(methyl)}$ 」という)、(iii)図1Dに示す人工塩基(pyrrole-2-carbaldehyde; 以下、「Pa」という)、(iv)チミジン塩基、又は(v)5-(1-propynyl)ウリジン塩基(以下、「U」という)に置換し、さらにビオチン結合ミニヘアピン配列5'-CGCG(Bio-T)AGCG-3'を3'-末端に結合させることによって、改変型AptD2アプタマーとしてAptD2- $Pa'_{(diol)}$ アプタマー、AptD2- $Pa'_{(methyl)}$ アプタマー、AptD2-Paアプタマー、AptD2-Tアプタマー、及びAptD2-Uアプタマーをそれぞれ作製した(図3、左)。なお、各塩基の合成、及び各塩基を含むヌクレオチド($dDsTP$ 、 $dPa'_{(diol)}TP$ 、 $dPa'_{(methyl)}TP$ 、 $dPx_{(diol)}TP$ 、 $dPaTP$ 、及び $dPx_{(methyl)}TP$ 等)の合成は、以下に挙げる文献に記載の方法等で行った: Hirao, I. et al., Nat. Methods, 3: 729-735 (2006); Kimoto, M. et al., Biopolymers, 112: e23407 (2021); Mitsui, T. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 13: 4515-4518 (2003); Mitsui, T. et al., J. Am. Chem. Soc., 125: 5298-5307 (2003)。

[化9]



[0232] 上記(i)～(v)の具体的構造を以下に示す。

[化10]



[0233] 各改変型AptD2アプタマーは、市販の天然塩基アミダイト、ピオチン-dTアミダイト、及び上記の文献に記載の方法等で合成した非天然型塩基アミダイトを用いて、ホスホルアミダイト化学を用いたDNA/RNA合成機により化学合成し、濃アンモニア溶液で脱保護した後、全長DNA断片を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した。

[0234] (2) EMSA法に基づく結合能の評価

各改変型AptD2アプタマーについて、標的タンパク質のDEN2-NS1タンパク質に対する結合能をEMSA法 (Electrophoresis gel-mobility shift assays) により解析した。具体的には、各改変型AptD2アプタマーを結合バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM MgCl_2 , 及び2.7mM KCl) で希釈し、90℃で5分間加熱した後、10分間冷却した。このDNA溶液をDEN2-NS1タンパク質と0.05%のNonidet P-40を添加した結合バッファー中で混合し、25℃にて30分間インキュベートすることによって、各アプタマー (50nM) をDEN2-NS1タンパク質 (0nM, 25nM, 50nM, 又は100nM) を結合させた。その後、サンプルを終濃度5%のグリセロールと混合し、ネイティブ4%アクリルアミドゲルに泳動した。ゲルをSYBR Goldで染色し、LAS-4000イメージャーで検出を行った。

[0235] 各改変型AptD2アプタマーのDEN2-NS1タンパク質への結合を評価した結果を図3に示す。AptD2- $\text{Pa}'_{(\text{diol})}$ アプタマー及びAptD2- $\text{Pa}'_{(\text{methyl})}$ アプタマーは、DEN2-NS1タンパク質との複合体に対応するバンドを示し、バンド密度の比較に基

づいてAptD2-Pa'_(methyl) アプタマーのバンドはAptD2-Pa'_(diol) アプタマーよりも強い結合を示した。一方、AptD2-Pa アプタマー、AptD2-T アプタマー、及びAptD2-U' アプタマーについては、DEN2-NS1タンパク質との結合は検出されなかった。

[0236] (3) SPR法に基づく結合親和性の評価

各改変型AptD2アプタマーについて、標的タンパク質のDEN2-NS1タンパク質に対する結合親和性プロファイルをSPR法（表面プラズモン共鳴法）により解析した。具体的には、Biacore T200 (Cytiva)を用いてSPR解析を実施した。1、2.5nM、2.5nM、5nM、10nM、又は20nMの標的タンパク質に対して0.5 nMの各核酸アプタマーの結合を25℃で評価することによって、K_D値を決定した。SPR法に基づく解析では、AptD2-Pa'_(diol) アプタマーのK_D値は115pM、AptD2-Pa'_(methyl) アプタマーのK_D値は69.5pMであり、AptD2-Pa'_(methyl) アプタマーの結合能が高いことが確認された。以上の結果から、ピロールに結合したプロピニル基が標的との結合に重要であることが明らかになった。

[0237] 上記結果から、互換性を有する2つの人工塩基の異なる利点を相互に組み合わせることに基づく、新たなExSELEX法が示唆された。Px_(methyl)塩基（2-nitro-4-propynylpyrrole；上記一般式（III）で示す非天然型塩基においてR'基がメチル基であるもの）を含むヌクレオチドは、核酸合成の工程で使用する塩基性条件下では不安定であるが、PCR増幅の工程についてはDs塩基との人工塩基対を形成に基づき高いフィデリティを有する。一方、Pa'_(methyl)塩基を含むヌクレオチドは、塩基性条件でも安定である。それ故、以降の実施例におけるExSELEX法で使用する6番目の塩基としては、核酸アプタマーの合成ではPa'_(methyl)塩基を使用し、PCR増幅ではPx_(methyl)を使用することとした。なお、以降の実施例では、Pa'_(methyl)塩基を「Pa'塩基」と略記し、Px_(methyl)塩基を「Px塩基」と略記する。

[0238] <実施例2：6塩基DNAライブラリーの作製>

(目的)

天然型の4塩基に2種類の非天然型塩基を加えて用いるExSELEX法（以下、従

来の5塩基ExSELEX法と区別して「6塩基ExSELEX法」と呼ぶ)を実施するために、6種類の塩基を含むDNAライブラリーを作製する。

[0239] (方法と結果)

A塩基、G塩基、C塩基、及びT塩基に、Pa'塩基を加えた5種類の塩基からなる29塩基長のランダム領域において、2塩基のDs塩基が異なる位置に配置された2つのライブラリーとして、XL1ライブラリー及びXL2ライブラリーを作製した。なお、29塩基長のランダム領域において、2塩基のDs塩基を除いた27塩基では、A塩基、G塩基、C塩基、及びT塩基の導入率はそれぞれ24%ずつとし、Pa'塩基の導入率は4%とした。

[0240] XL1ライブラリーは、ランダム領域の5'側に配置された7塩基からなる領域、及びランダム領域の3'側に配置された6塩基からなる領域を含み、それらのさらに5'側及び3'側にそれぞれPCR増幅用のプライマー結合配列を含む。XL1ライブラリーの配列は、5'-TGATTAGCTGAGACCTGATGCT-N₄₂-GACAAGCGGAGTAGTTAGACCGT-3' (配列番号173) として表され、40種類のサブライブラリーからなる(図4A)。

[0241] XL2ライブラリーは、ランダム領域の5'側に配置された4塩基からなる領域、及びランダム領域の3'側に配置された3塩基からなる領域を含み、それらのさらに5'側及び3'側にはそれぞれ5塩基長の互いに相補的なステム配列、及びPCR増幅用のプライマー結合配列を含む。XL2ライブラリーの配列は、5'-GCTCATTCGCCTCTCCTATTCTCACG-N₃₆-CGTGACAAGCGGAGTAGTTAGACCGT-3' (配列番号174) として表され、46種類のサブライブラリーからなる(図4B)。

[0242] 各サブライブラリーは、天然型の4塩基、Ds、及びPa'のアミダイトを用いて標準的なホスホラミダイト法により化学合成し、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により精製した。以降の実施例におけるExSELEX法では、各サブライブラリーを等量混合したものを使用した。

[0243] <実施例3：ヒトIFN γ 標的核酸アプタマー>

(目的)

ヒトIFN γ に結合する核酸アプタマーの作出を目的として、6塩基ExSELEX法

を実施する。

[0244] (方法と結果)

以下、実施例2で作製したXL1ライブラリー及びXL2ライブラリーを6塩基ExSELEX法に供した。

[0245] (1) XL1ライブラリーを対象とする6塩基ExSELEX法

(a) 新規核酸アプタマーの単離

HEK293細胞で発現された市販のグリコシル化ヒトIFN γ (ACROBiosystems、IFG-H4211) を標的タンパク質として、XL1ライブラリーを用いて6塩基ExSELEXを行った。最初のセレクションには3.6nmolのライブラリーを使用し(6塩基からなる 2.2×10^{15} の異なる配列を含む)、50nM又は100nMのライブラリーを90℃から4℃まで急速に冷却してから、標的タンパク質との混合を行った。

[0246] 6塩基ExSELEXの各段階のライブラリーは結合バッファー中で標的タンパク質とインキュベートされ、標的タンパク質はNHS活性化ビオチン試薬でビオチン化された。DNA断片が結合したビオチン化タンパク質をストレプトアビジン結合磁気ビーズで捕捉し、ビーズ上の複合体中のDNA断片を150mM NaOHで溶出した。単離されたDNA断片は、dNTPに加えてdDsTP (Ds塩基を含むデオキシヌクレオシド三リン酸) とdPxTP (Px塩基を含むデオキシヌクレオシド三リン酸) を用いたPCRで増幅され、最初のライブラリーにおけるPa' 塩基は、PCR増幅中にPxに置換され、次のセレクションに使用された。5〜7回目のセレクション後にビーズ上のDNA-タンパク質複合体を2〜3M尿素で洗浄した。7回目のセレクション後、濃縮されたライブラリーが標的タンパク質に結合することをEMSA法で確認した。最終の8回目のセレクションとして、ゲル中でシフトしたバンドの複合体から結合DNA断片を単離した。

[0247] XL1ライブラリーから得られた7回のセレクション後の濃縮ライブラリー (R7) 及び8回のセレクション後の濃縮ライブラリー (R8) を、ライブラリー中の非天然型塩基を天然塩基に置き換える置換PCR法で増幅し、Ion-PGMシステムを用いたディープシーケンスでは87,013個 (R7) 及び78,581個 (R8) の抽出配列リードが得られた。類似配列を有するファミリーに分類し、リード数

の多い上位のファミリーを図6Aに示す。各配列では、5'末端側及び3'末端側に相補的な配列が認められた。人工塩基は上述の置換PCR法でA塩基及びT塩基に置換されること、並びに最初のサブライブラリーにおけるDs塩基の位置に基づいて、Pa'/Px塩基及びDs塩基の位置を決定することができた。図6Aに示す配列のうちファミリー1の配列について、図5に示す方法で、さらに解析を行った。

[0248] ファミリー1に属する核酸アプタマーをプローブで単離後、FAM標識フォワードプライマー及びTET標識リバースプライマーを用いて8回のセクション後の濃縮ライブラリー(R8)を鋳型としてPCR増幅を行った。さらに得られた増幅産物を塩基性条件によりPx塩基の位置で部分消化し、変性ゲルに泳動した後、FAM又はTETに結合した核酸断片を蛍光検出した(図6B)。図6Bに示す結果から、FAM結合鎖の48位、並びにTET結合鎖の33位及び39位がPx塩基であり、これらの相補塩基がDs塩基であることが分かった(図6C)。

[0249] (b) 核酸アプタマーの作製

上記で決定したファミリー1の配列をトリミングし、末端ステム領域を最適化し、Px塩基をPa'塩基に置換することによって、AptIFN γ -1及びAptIFN γ -3を作製した(表1)。さらにビオチン化ミニヘピンDNAを結合させることによってBio-AptIFN γ -3を作製し、人工塩基の全部又は一部を天然型塩基に置換した核酸アプタマーとしてAptIFN γ -2、AptIFN γ -4、AptIFN γ -5、及びAptIFN γ -6も作製した(表1)。

[0250]

[表1]

表 1 : XL1 ライブラリーに由来する IFN γ 標的核酸アプタマー

核酸アプタマー の名称	核酸アプタマーの塩基配列(5'-3')	配列 番号
AptIFN γ -1	<u>CTCCGC</u> AGTC TGTGGTGGGAC Pa' GGGCT Ds ATGTAD Ds GGGATCT GACAA <u>GCGGAG</u>	1
AptIFN γ -2	<u>CTCCGC</u> AGTC TGTGGTGGGACT GGGCT A ATGTAA GGGATCT GACAA <u>GCGGAG</u>	136
AptIFN γ -3	<u>CTCCGC</u> GTC TGTGGTGGGAC Pa' GGGCT Ds ATGTAD Ds GGGATCT GAC <u>GCGGAG</u>	3
AptIFN γ -4	<u>CTCCGC</u> GTC TGTGGTGGGACT GGGCT Ds ATGTAD Ds GGGATCT GAC <u>GCGGAG</u>	4
AptIFN γ -5	<u>CTCCGC</u> GTC TGTGGTGGGAC Pa' GGGCT A ATGTAD Ds GGGATCT GAC <u>GCGGAG</u>	6
AptIFN γ -6	<u>CTCCGC</u> GTC TGTGGTGGGAC Pa' GGGCT Ds ATGTAA GGGATCT GAC <u>GCGGAG</u>	137
Bio-AptIFN γ -3	<u>CTCCGC</u> GTC TGTGGTGGGAC Pa' GGGCT Ds ATGTAD Ds GGGATCT GAC <u>GCGGAG</u> <u>GCGGLAGCG</u>	138

* 下線はステム領域を形成する互いに相補的な配列を示し、黒枠はミニヘアピン配列を示し、配列中の「L」は Biotin-dT を示し、「Ds」は Ds 塩基を示し、「Pa'」は Pa' 塩基を示す。

[0251] (c) ヒトグリコシル化IFN γ に対する親和性の評価

上記の表1に示すIFN γ 標的核酸アプタマーのヒトグリコシル化IFN γ に対する親和性をEMSA法で解析した。核酸アプタマーを0.05% Nonidet P-40又はTween 20を添加した結合バッファー中でヒトグリコシル化IFN γ と25℃で30分間インキュベートした。サンプル溶液をグリセロール（終濃度5%）と混合し、複合体を26～28℃のネイティブ8%PAGEで分析した。他の条件は、実施例1の（2）と同様とした。

[0252] 結果を図7に示す。2個のDs及び1個のPa'を含む核酸アプタマー（AptIFN γ -1、AptIFN γ -3、及びBio-AptIFN γ -3）はグリコシル化IFN γ と強く結合したが、これらの人工塩基を含まない核酸アプタマーではバンドシフトが認めら

れなかった。

[0253] (d) 過去に開発された核酸アプタマーとの比較

次に、上記の新規核酸アプタマーを、過去に5塩基ExSELEX法で開発されたIFN γ 標的核酸アプタマーであるAptDs-IFN γ 及びそのビオチン化ミニヘアピンDNAコンジュゲート (Bio-AptDs-IFN γ) と比較した。AptDs-IFN γ 及びBio-AptDs-IFN γ は、大腸菌で発現された非グリコシル化ヒトIFN γ を標的タンパク質として5塩基ExSELEX法で単離されたアプタマーであり、その配列を以下の表2に示す。

[0254] [表2]

表 2：比較対照とした IFN γ 標的核酸アプタマー

核酸アプタマー の名称	核酸アプタマーの塩基配列(5'-3')	配列 番号
AptDs-IFN γ	<u>CCCCGC</u> CGGGTCCGCGAAGCGGTAGGT Ds TGGGCTAGGC Ds GCT <u>GGCGGG</u>	139
Bio-AptDs-IFN γ	<u>CCCCGC</u> CGGGTCCGCGAAGCGGTAGGT Ds TGGGCTAGGC Ds GCT <u>GGCGGG</u> <u>CGCGLAGCG</u>	140

* 下線はステム領域を形成する互いに相補的な配列を示し、黒枠はミニヘアピン配列を示し、配列中の「L」は Biotin-dT を示し、「Ds」は Ds 塩基を示す。

[0255] XL1ライブラリーに由来するAptIFN γ -1、AptIFN γ -3、及びBio-AptIFN γ -3、並びに比較対照としたAptDs-IFN γ 及びBio-AptDs-IFN γ について、上記の方法と同様にEMSA法を行った結果を図8に示す。なお、非グリコシル化IFN γ としては、大腸菌で発現したIFN γ (Peprotech, 300-02) を使用した。AptDs-IFN γ 及びBio-AptDs-IFN γ ではグリコシル化IFN γ への結合が大幅に減少した一方で、AptIFN γ -1、AptIFN γ -3、及びBio-AptIFN γ -3はグリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ の両方に効率的に結合することが示された。

[0256] (2) XL2ライブラリーを対象とする6塩基ExSELEX法

(a) 新規核酸アプタマーの単離

グリコシル化IFN γ を標的タンパク質として、XL2ライブラリーを対象として6塩基ExSELEX法を実施した。7回のセレクション後の濃縮されたライブラリーをIon-PGMシーケンサーシステムで配列決定した。リード数の多い上位のファミリーを図9Aに示す。このうちファミリー 1 のみがEMSA法による解析で標

的タンパク質に高い親和性を示したため（図9B）、上記（1）と同様の方法でファミリー1についてDs塩基及びPx塩基の位置を解析した（図9C）。その結果、ファミリー1は、38/39位及び45位にDs塩基を含み、58位にDs塩基又はPx塩基を含むことが分かった（図9D）。

（b）核酸アプタマーの作製

上記（a）の結果に基づいて、以下の表3に示す10種類の核酸アプタマーを作製した。

[0257] [表3]

表3：XL2 ライブラリーに由来する IFN γ 標的核酸アプタマー

核酸アプタマー の名称	核酸アプタマーの塩基配列(5'-3')	配列 番号
XL2-01a	<u>GTCCTCACG</u> CCGT CATA A TTGTTDs TTTTGAT CCTTGDs AGTGGGGA <u>CGTGAGGAC</u>	8
XL2-01b	<u>GTCCTCACG</u> CCGPa'CATA A TTGTTDs TTTTGAT CCTTGDs AGTGGGGA <u>CGTGAGGAC</u>	141
XL2-01c	<u>GTCCTCACG</u> CCGT CATPa'A TTGTTDs TTTTGAT CCTTGDs AGTGGGGA <u>CGTGAGGAC</u>	14
XL2-01d	<u>GTCCTCACG</u> CCGT CATA Pa'TTGTTDs TTTTGAT CCTTGDs AGTGGGGA <u>CGTGAGGAC</u>	16
XL2-01e	<u>GTCCTCACG</u> CCGT CATA A TTGTTDs TTTTGAPa'CCTTGDs AGTGGGGA <u>CGTGAGGAC</u>	142
XL2-01h	<u>GTCCTCACG</u> CCGT CATDs A TTGTTDs TTTTGAT CCTTGDs AGTGGGGA <u>CGTGAGGAC</u>	10
XL2-01i	<u>GTCCTCACG</u> CCGT CATA Ds TTGTTDs TTTTGAT CCTTGDs AGTGGGGA <u>CGTGAGGAC</u>	12
XL2-01j	<u>GTCCTCACG</u> CCGT CATA A TTGTTDs TTTTGAT CCTTGPa'AGTGGGGA <u>CGTGAGGAC</u>	143
XL2-01k	<u>GTCCTCACG</u> CCGT CATDs A TTGTTDs TTTTGAT CCTTGPa'AGTGGGGA <u>CGTGAGGAC</u>	144
XL2-01l	<u>GTCCTCACG</u> CCGT CATA DsTTGTTDs TTTTGAT CCTTGPa'AGTGGGGA <u>CGTGAGGAC</u>	145

* 下線はステム領域を形成する互いに相補的な配列を示し、配列中の「Ds」は Ds 塩基を示し、「Pa'」は Pa'塩基を示す。

[0258] 上記の表3に示すIFN γ 標的核酸アプタマーのグリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ に対する親和性をEMSA法で解析した。核酸アプタマーを0.05% Nonidet P-40又はTween 20を添加した結合バッファー中でIFN γ と25℃で3

0分間インキュベートした。サンプル溶液をグリセロール（終濃度5%）と混合し、複合体を26~28℃のネイティブ8%PAGEで分析した。他の条件は、実施例1の（2）と同様とした。

[0259] 結果を図10に示す。XL2-01a、XL2-01h、及びXL2-01iは、最も高い親和性を示し、3M尿素ゲルにおいてもグリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ に対して高い親和性を示した。

[0260] 次に、XL2-01a及びXL2-01iにビオチン結合ミニヘアピンを連結することにより、以下の表4に示すIFN γ 標的核酸アプタマーを作製した。

[0261] [表4]

表4：ビオチン結合ミニヘアピンを連結したIFN γ 標的核酸アプタマー

核酸アプタマーの名称	核酸アプタマーの塩基配列(5'-3')	配列番号
Bio-XL2-01a	<u>GTCCTCACG</u> CCGTCATAA TTGTTDs TTTTGATCCTTGDSAGTGGGGA <u>CGTGAGGAC</u> <u>CGCGLAGCG</u>	146
Bio-XL2-01i	<u>GTCCTCACG</u> CCGTCATADsTTGTTDs TTTTGATCCTTGDSAGTGGGGA <u>CGTGAGGAC</u> <u>CGCGLAGCG</u>	147
Bio-AptDs-IFN γ	CCCGCC CGGGTCCGCGAAGCGGTAGGTDsTGGGCTAGGCDsGCT GGCGGG <u>CGCGLAGCG</u>	148

* 下線はステム領域を形成する互いに相補的な配列を示し、黒枠はミニヘアピン配列を示し、配列中の「L」は Biotin-dT を示す。

[0262] 上記の表4に示すIFN γ 標的核酸アプタマーのグリコシル化IFN γ に対する親和性をELONA (enzyme-linked oligonucleotides assay) 法で解析した。具体的には、ヒトIFN γ (0~25nM) を96ウェルmaxisorpプレートに固定化し、1%BSAでブロッキングした。ビオチン化アプタマー (100nM/各ウェル100 μ L) をprimary detectorとして加えて1時間結合させた後、secondary detectorとしてSA-HRPを30分間結合させることにより、発色検出を行った。HRPとTMBの反応を30分間行った後、1N HClで反応を停止し、450nmの吸光度をNanoDropで測定した。

[0263] 結果を図11に示す。Bio-XL2-01a及びBio-XL2-01iでは、非グリコシル化IFN γ を標的として5塩基ExSELEX法で得られたBio-AptDs-IFN γ と比較して、顕著に高いシグナル強度が観測された。

[0264] <実施例4：CRP、トロンピン、IL-6、IL-8、又はHMGB1に結合する核酸アプ

タマー>

(目的)

ヒト由来のCRP (C-reactive protein)、トロンビン、IL-6、IL-8、又はHMGB1に結合する核酸アプタマーの作出を目的として、6塩基ExSELEX法を実施する。

[0265] (方法と結果)

(1) CRP標的核酸アプタマー

ヒト血漿から単離されたCRP (Sigma-Aldrich, C4063) を標的タンパク質として使用し、XL1ライブラリーを用いて、実施例3と同様の方法により6塩基ExSELEXを実施した。但し、洗浄では尿素溶液を使用しなかった。5回のセクション後にEMSA法で標的結合について検討し、濃縮されたライブラリーを置換PCRにより増幅した後、Ion PGMシステムで配列決定を行い、さらにDs及びPsの位置を決定した。61,906個の配列の多くが一对の相補的配列の間にコンセンサス配列CDsTT(T)CAGCCGGCPxTを有しており、51.3%の配列は図12Aに示すファミリー1配列に収束した。このファミリー1の配列に基づいて、以下の表5に示す核酸アプタマーを化学合成した。

[0266]

[表5]

表 5 : CRP 標的核酸アプタマー

核酸アプタマー の名称	核酸アプタマーの塩基配列(5'-3')	配列 番号
AptCRP-01	<u>GCTGCTT</u> <u>CDsGC</u> <u>CATGACC</u> <u>CDsTTTCAGCCGGCPa'T</u> <u>GGTCATG</u> <u>TGAC</u> <u>AAGCAGC</u>	20
AptCRP-02	<u>GCTGCTT</u> <u>CDsGC</u> <u>CATGACC</u> <u>CDsTTTCAGCCGGCDs T</u> <u>GGTCATG</u> <u>TGAC</u> <u>AAGCAGC</u>	149
AptCRP-03	<u>GCTGCTT</u> <u>CA GC</u> <u>CATGACC</u> <u>CDsTTTCAGCCGGCPa'T</u> <u>GGTCATG</u> <u>TGAC</u> <u>AAGCAGC</u>	22
AptCRP-04	<u>GCTGCTT</u> <u>CDsGC</u> <u>CATGACC</u> <u>CA TTTCAGCCGGCPa'T</u> <u>GGTCATG</u> <u>TGAC</u> <u>AAGCAGC</u>	150
AptCRP-05	<u>GCTGCTT</u> <u>CDsGC</u> <u>CATGACC</u> <u>CDsTTTCAGCCGGCT T</u> <u>GGTCATG</u> <u>TGAC</u> <u>AAGCAGC</u>	151
AptCRP-06	<u>GCTGCTT</u> <u>CDsGC</u> <u>CATGACC</u> <u>CDs TTCAGCCGGCPa'T</u> <u>GGTCATG</u> <u>TGAC</u> <u>AAGCAGC</u>	23
AptCRP-07	<u>CGCTGCATGACC</u> <u>CDsTTTCAGCCGGCPa'T</u> <u>GGTCATGCAGCG</u>	25
AptCRP-08	<u>CGCTGCATGACC</u> <u>CDs TTCAGCCGGCPa'T</u> <u>GGTCATGCAGCG</u>	26
AptCRP-09	<u>CGCTGCATGACC</u> <u>CDs TTCAGCCGGCDs T</u> <u>GGTCATGCAGCG</u>	152

* 下線はステム領域を形成する互いに相補的な配列を示し、
「Ds」は Ds 塩基を示し、「Pa'」は Pa'塩基を示す。

[0267] 上記の表5に示すCRP標的核酸アプタマーのCRPに対する親和性をEMSA法で解析した結果を図12Bに示す。AptCRP-01、AptCRP-03、AptCRP-06、AptCRP-07、及びAptCRP-08でバンドシフトが認められ、シフトしたバンドの強度はこの順で大きかった。特にAptCRP-01及びAptCRP-03は、CRPに強く結合することが明

らかになった。

[0268] (2) トロンビン標的核酸アプタマー

ヒト血漿から単離されたヒト（アルファ）トロンビン（Factor IIa）（Enzyme Research Lab, HT 1002a）を標的タンパク質として使用し、XL1ライブラリー及びXL2ライブラリーを用いて、実施例3と同様の方法により6塩基ExSELEXを実施した。5回のセレクション後に濃縮されたライブラリーをIon PGMシステムで配列決定し、リード数が多い上位のファミリーを解析した結果を図13に示す。いずれの配列も4つ以上のGトラクトを含み、グアニン4重鎖形成を示唆した。また、XL1及びXL2ライブラリーから得られた配列におけるコンセンサス配列としてTTADsTGG配列及びAAGGADsGGTGGG配列が見出された。得られた配列に基づいて、以下の表6に示す核酸アプタマーを化学合成した。

[0269]

[表6]

表 6 : トロンビン標的核酸アプタマー

核酸アプタマー の名称	核酸アプタマーの塩基配列(5'-3')	配列 番号
Thr101	<u>GCTGTCAC</u> GCAGCATGGAACCTTTAD s TGGCTAGGGGTGGG Ds GGAG <u>GTGACAGC</u>	31
Thr102	<u>GCTGTCC</u> CGCCGCGCAGATTAD s TGGTTTGAD s ATAGGGTGGTTA <u>GGACAGC</u>	153
Thr104	<u>GCGTTG</u> CGTGAAGTT Ds GGGTGGG Ds ATGTGATGGG Pa 'GGTAGATAGA <u>CAACGC</u>	33
Thr106	<u>GCTGATCT</u> CGGAAGGAD s GGTGGG Ds TCTGGGTGGG Pa 'GG Pa 'GCGT <u>AGATCAGC</u>	35
Thr201	<u>GCACGAGG CA</u> GGGTGGGAGGGTAAGGAD s GGTGGGT Ds <u>CCTCGTGC</u>	37
Thr202	<u>GTCCGTTACG</u> GCAAACGCACCTTTAD s TGGTG Ds GGGTGGGCT Pa 'GTCTT <u>CGTGAACGGAC</u>	154
Thr203	<u>GTCCTTTACG</u> TAGC Ds GGTCCGGTTAD s TGGG Pa 'GGGTGGCTTGGGGC <u>CGTGAAAGGAC</u>	155
Thr204	<u>GTCACGCGC</u> TGTGGT Ds GTTTT Ds TTGGGGGGGTGGTTAAG <u>GCGCGTGAC</u>	27
Thr205	<u>GCACGCTTT</u> Ds ACTTAD s TGGCTGGGTGG Pa 'CTGGGT <u>AAAGCGTGC</u>	29

* 下線はステム領域を形成する互いに相補的な配列を示し、
「Ds」は Ds 塩基を示し、「Pa」は Pa'塩基を示す。

[0270] 上記の表6に示すトロンビン標的核酸アプタマーのトロンビンに対する親和性をEMSA法で解析した結果を図14に示す。Thr104、Thr204、及びThr205は、トロンビンに対して高い親和性を示した。

[0271] 次に、Thr104、Thr204、及びThr205の3'末端側にビオチン化ミニヘアピン配列を連結した以下の表7に示すアプタマーを作製した。以下の表中でBioMH-RE31は、文献(Russo, K.I. et al., Nucleic Acids Res., 2016, 44: 983-991)に記載のDNAアプタマー(RE31)に由来する。

[0272] [表7]

表 7 : ビオチン化ミニヘアピン配列を連結したトロンビン標的核酸アプタマー

核酸アプタマー の名称	核酸アプタマーの塩基配列(5'-3')	配列 番号
Bio-Thr104b	<u>GCGT</u> GCGTGAAGTT Ds GGGTGGG Ds ATGTGATGGG Pa 'GGTAGA TACGCAACGC <u>CGCGLAGCG</u>	156
Bio-Thr204	<u>GTCACGCGC</u> TGTGGT Ds GTTTT Ds TTGGGGGGGTGGTTAAG GCGCGTGAC <u>CGCGLAGCG</u>	157
Bio-Thr205	<u>GCACGCTTT</u> Ds ACTTAD s TGGCTGGGTGG Pa 'CTGGGT AAAGCGTGC <u>CGCGLAGCG</u>	158
BioMH-RE31	GTGACG TAGGTTGGTGTGGTTGGGG CGTCAC <u>CGCGLAGCG</u>	159

* 下線はステム領域を形成する互いに相補的な配列を示し、黒枠はミニヘアピン配列を示し、配列中の「L」は Biotin-dT を示す。

[0273] 上記の表7に示すトロンビン標的核酸アプタマーのトロンビンに対する親和性をEMSA法、ELONA法、及びSPR法で解析した。結果を図15及び図16に示す。EMSA法及びELONA法では、Bio-Thr104b、Bio-Thr204、及びBio-Thr205は、BioMH-RE31と比較して顕著に高い親和性を示した。SPR法により測定した K_D 値は、Bio-Thr204は9.0pM、Bio-Thr205は7.3pMであった。

[0274] (3) IL-6標的核酸アプタマー

HEK293細胞で発現されたIL-6 (R&D Systems, 7270-IL) を標的タンパク質として使用し、XL1ライブラリー及びXL2ライブラリーを用いて、実施例3と同様の方法により6塩基ExSELEXを実施した。但し、洗浄では尿素溶液を使用しなかった。5回のセレクション後に濃縮されたライブラリーをIon PGMシステムで配列決定し、リード数が多い上位のファミリーを解析した結果を図17Aに示す。得られた配列（具体的には図17AにおけるXL1-01及びXL2-01）に基づいて、以下の表8に示す核酸アプタマーを化学合成した。

[0275]

[表8]

表 8 : ビオチン化ミニヘアピン配列を連結した IL-6 標的核酸アプタマー

核酸アプタマー の名称	核酸アプタマーの塩基配列(5'-3')	配列 番号
Bio-IL6-101	<u>GCTCCGC</u> <u>GCC</u> <u>GT</u> A <u>CAC</u> Ds A <u>GT</u> CCG <u>CT</u> AGACATG Ds C <u>AG</u> T Pa ' AC GA <u>GTG</u> G AC AA <u>GCGGAGC</u> <u>CGCGLAGCG</u>	160
Bio-IL6-201b	<u>GCACGT</u> GG <u>GGT</u> C Pa 'CCGATG Pa 'CCAT Ds ACCACAGG Ds ACCACGTGC <u>CGCGLAGCG</u>	161
Bio-IL6-201c	<u>GCGGTC</u> Pa 'C <u>CGATG</u> Pa 'CCAT Ds ACCACAGG Ds ACCA CATCG T <u>GACCGC</u> <u>CGCGLAGCG</u>	162
Bio-IL6-201d	<u>GTCCGATG</u> Pa 'CCAT Ds ACCACAGG Ds ACCA CATCGGAC <u>CGCGLAGCG</u>	163

* 下線はステム領域を形成する互いに相補的な配列を示し、
黒枠はミニヘアピン配列を示し、配列中の「L」は Biotin-dT を示す。

[0276] 上記の表8に示すIL-6標的核酸アプタマーのIL-6に対する親和性をSPR法で解析した。結果を図17Bに示す。Bio-IL6-101はnMレベルの比較的弱い結合を示した一方で、Bio-IL6-201bはサブnMレベル(sub-nM level)の比較的高い親和性を示した。

[0277] (4) IL-8標的核酸アプタマー

HEK293細胞で発現されたヒトIL-8 (Sino Biological Inc., 10098-HNCH1) を標的タンパク質として使用し、XL1ライブラリー及びXL2ライブラリーを用いて、実施例3と同様の方法により6塩基ExSELEXを実施した。但し、洗浄では尿素溶液を使用しなかった。5回のセレクション後に濃縮されたライブラリーをIon PGMシステムで配列決定し、リード数が多い上位のファミリーを解析した結果を図18に示す。XL1及びXL2ライブラリーから得られた配列におけるコンセンサス配列としてAANCCG(T/G)TGG(C/G)DsAGGC配列 (N = Ds or Pa')が見出された。得られた配列に基づいて、以下の表9に示す核酸アプタマーを化学合成した。

[0278]

[表9]

表 9 : IL-8 標的核酸アプタマー

核酸アプタマー の名称	核酸アプタマーの塩基配列(5'-3')	配列 番号
IL8-102DD	<u>GGAGATG</u> CT <u>AACTC</u> AADs CCGGTGGCDsAGGC <u>GAGTT</u> <u>GAA</u> <u>CATCTCC</u>	43
IL8-102PD	<u>GGAGATG</u> CT <u>AACTC</u> AAPa'CCGGTGGCDsAGGC <u>GAGTT</u> <u>GAA</u> <u>CATCTCC</u>	43
IL8-223DD	<u>GACTCCGCTTG</u> A <u>AC</u> AADs CCGGTGGGDsAGGC <u>GT</u> GA <u>CAAGCGGAGTC</u>	45
IL8-223PD	<u>GACTCCGCTTG</u> A <u>AC</u> AAPa'CCGGTGGGDsAGGC <u>GT</u> GA <u>CAAGCGGAGTC</u>	45
IL8-201DDP	<u>G TTCACGA</u> GAG <u>TGT</u> GCDsCCATADs CACGGGP a'AGGTG <u>ACA</u> TATA <u>TCGTGAAC</u>	164
IL8-201DPD	<u>G TTCACGA</u> GAG <u>TGT</u> GCDsCCATAPa'CACGGGDs AGGTG <u>ACA</u> TATA <u>TCGTGAAC</u>	49

* 下線はステム領域を形成する互いに相補的な配列を示す。

[0279] 上記の表9に示すIL-8標的核酸アプタマーのIL-8に対する親和性をEMSA法で解析した結果を図19に示す。IL8-102PD及びIL8-223PDは、IL-8に対して最も高い親和性を示した。

[0280] 次に、3'末端側にビオチン化ミニヘアピン配列を連結した以下の表10に示すアプタマーを作製した。

[0281]

[表10]

表 10：ビオチン化ミニヘアピン配列を連結した IL-8 標的核酸アプタマー

核酸アプタマー の名称	核酸アプタマーの塩基配列(5'-3')	配列 番号
IL8-102PD	<u>GGAGATG CT AACTC</u> <u>AAPa' CCGGTGGCDsAGGC</u> <u>GAGTT GA A CATCTCC</u>	43
Bio-IL8-102PD	<u>GGAGATG CT AACTC</u> <u>AAPa' CCGGTGGCDsAGGC</u> <u>GAGTT GA A CATCTCC</u> <u>CGCGLAGCG</u>	166
Bio-IL8-102PDb	<u>GGAGATG CT AACTC</u> <u>AAPa' CCGGTGGCDsAGGC</u> <u>GAGTT GDsA CATCTCC</u> <u>CGCGLAGCG</u>	167
IL8-223PD	<u>GACTCCGCTTG A AC</u> <u>AAPa' CCGGTGGGDsAGGC</u> <u>GT GA CAAGCGGAGTC</u>	168
Bio-IL8-223PD	<u>GACTCCGCTTG A AC</u> <u>AAPa' CCGGTGGGDsAGGC</u> <u>GT GA CAAGCGGAGT</u> <u>CGCGLAGCG</u>	169
Bio-IL8-223PDb	<u>GACTCCGCTTGAC</u> <u>AAPa' CCGGTGGGDsAGGC</u> <u>GTCAAGCGGAGT</u> <u>CGCGLAGCG</u>	170

* 下線はステム領域を形成する互いに相補的な配列を示し、
黒枠はミニヘアピン配列を示し、配列中の「L」は Biotin-dT を示す。

[0282] 上記の表10に示すIL-8標的核酸アプタマーのIL-8に対する親和性をEMSA法及びSPR法で解析した。結果を図19、図20に示す。末端領域にバルジ構造を追加したアプタマーでは親和性が上昇し、バルジループにDsを追加したアプタマーでも親和性が上昇した。SPR法の結果は、Bio-IL8-102PDでは $K_D = 163\text{pM}$ 、Bio-IL8-102PDbでは $K_D = 144\text{pM}$ 、Bio-IL8-223PDでは $K_D = 202\text{pM}$ 、Bio-IL8-223PDbでは $K_D = 640\text{pM}$ であり、Bio-IL8-102PDbの親和性が最も高かった。

[0283] (5) HMGB1標的核酸アプタマー

上記(1)～(4)と同様の方法により、HMGB1タンパク質を標的タンパク質として使用し、6塩基ExSELEXを実施し、リード数が多い上位のファミリーの配列解析結果から、以下の表11に示すBio-HMGB1-301-DDアプタマー(配列番号143)をデザインし、化学合成した。

[0284]

[表11]

表 11：HMGB1 標的核酸アプタマー

核酸アプタマーの名称	核酸アプタマーの塩基配列(5'-3')		配列番号
Bio-HMGB1-301-DD	<u>CTCCTTCAGC</u> <u>GCTGAAGGAG</u>	<u>GCCACCGTATG</u> Ds ACGCTCACAG Ds AGTTGCCGA <u>CGCGLAGCG</u>	171
Bio-HMGB1-301-AA	<u>CTCCTTCAGC</u> <u>GCTGAAGGAG</u>	<u>GCCACCGTATGA</u> ACGCTCACAGA AGTTGCCGA <u>CGCGLAGCG</u>	172

* 下線はステム領域を形成する互いに相補的な配列を示し、黒枠はミニヘアピン配列を示し、配列中の「L」は Biotin-dT を示し、「Ds」は Ds 塩基を示す。

[0285] 上記表11に示す核酸アプタマーのヒトHMGB1タンパク質に対する親和性をEMSA法で解析した結果を図21に示す。Bio-HMGB1-301-DDアプタマーはHMGB1に結合を示したのに対して、Ds塩基を天然のアデニン塩基に置換したBio-HMGB1-301-AAでは結合活性が著しく減少した。次にSPR法によりK_D値を決定した。Bio-HMGB1-301-DDのK_D値は、23.4 pMであった。

[0286] <実施例 5：さらなるヒトIFN γ 標的核酸アプタマー>
(目的)

グリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ の両方に結合するさらなる核酸アプタマーを作出する。

[0287] (方法と結果)

(1) 6塩基ExSELEX法

グリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ の両方に結合するさらなる核酸アプタマーを得るために、標的タンパク質としてグリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ の両方を使用した。具体的には、実施例3の「(1) XL1ライブラリーを対象とする6塩基ExSELEX法」に記載のXL1ライブラリーを対象として、1、2、4、及び6回目のセレクションでは標的タンパク質としてグリコシル化IFN γ (HEK293細胞で発現された市販のグリコシル化ヒトIFN γ (ACROBiosystems、IFG-H4211)) を使用し、3、5回目のセレクションでは非グリコシル化IFN γ (大腸菌で発現したIFN γ (Peprotech, 300-02)) を使用した。6回目のセレクション後に得られたライブラリーの配列を解析した結果、新規配列として以下の表12に示すIFNg-701及びIFNg-703が同定された。IFNg-70

1は、塩基配列GTCGCTGGDsCを可変領域内に2つ含んでいた。

[0288] [表12]

表 12 : IFNg-701 及び IFNg-703

配列の名称	塩基配列(5'-3')	配列番号
IFNg-701	<u>CTGATGCT</u> CCTAT <u>GTCGCTGGDsC</u> TGCA Px A <u>GTCGCTGGDsC</u> AAGGGATTAGG <u>GACAAGCG</u>	175
IFNg-703	<u>CTGATGCT</u> CGTGCG Px GTACGCGGCGTG GDs TGGTGCTGG N TGGG NCAGGCG <u>GACAAGCG</u>	176

* 下線付きの大文字はプライマー領域の一部を示し、「N」は Ds 塩基又は Px 塩基を示す。

[0289] (2) クローンの単離及び核酸アプタマーの合成

上記IFNg-701及びIFNg-703の塩基配列の相補配列を含むプローブを用いて、6回目のセレクション後のライブラリー（以下、「R6-library」という）から目的のクローンを単離し、PCR増幅した（各増幅産物を、以下では「701 isolate」及び「703 isolate」という）。また、この増幅産物の塩基配列を決定して、得られた配列に基づいて核酸アプタマーを合成した。増幅産物及び核酸アプタマーの名称と塩基配列を以下の表13に示す。

[表13]

表 13：増幅産物及び核酸アプタマーの配列

配列の名称	塩基配列(5'-3')	配列番号
701 isolate	(Primer) CCTAT GTCGCTGGD s C TGCAPxA GTCGCTGGD s C AAGGGATTAGGGACAAGCG (Primer)	177
B-IFNg-701a	GGCTCCTAT GTCGCTGGD s C TGCAPa'A GTCGCTGGD s C AAGG GATTAGGAGCC CGCGLAGCG	178
B-IFNg-701b	GGCTCCTAT GTCGCTGGD s C TGCATA GTCGCTGGD s C AAGGGA TTAGGAGCC CGCGLAGCG	179
703 isolate	(Primer) CGTGCGP x GTACGCGGCGTGGNTGGTGCTGGPa'TGG GDCAGGCG (Primer)	180
B-IFNg-703a	TGCTCCGCGPa'GTACGCGGCGTGGD s TGGTGCTGGPa'TGGGD s C AGGCGGACAAGCGGAGCA CGCGLAGCG	181
B-IFNg-703b	TGCTCCGCGPa'GTACGCGGCGTGGPa'TGGTGCTGGPa'TGGGD s CAGGCGGACAAGCGGAGCA CGCGLAGCG	182
B-IFNg-703c	TGCTCCGCGTGTACGCGGCGTGGD s TGGTGCTGGPa'TGGGD s CAG GCGGACAAGCGGAGCA CGCGLAGCG	183
B-IFNg-703d	TGCTCCGCGTGTACGCGGCGTGGPa'TGGTGCTGGPa'TGGGD s CA GGCGGACAAGCGGAGCA CGCGLAGCG	184

* 黒枠はミニヘアピン配列を示し、配列中の「L」は Biotin-dT を示し、「N」は Ds 塩基又は Px 塩基を示し、「(Primer)」は PCR 増幅に用いたプライマーの結合配列を示す。

[0290] (3) グリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ に対する親和性の評価

実施例3の(c)と同様の方法に基づくEMSA法を用いて、上記表13に記載の核酸、R6-library、並びに上述のB-I-Apt1及びB-IFNg-201AADについて、グリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ に対する親和性を解析した。結果を図22に示す。表13に記載の核酸は、グリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ の両方に対して、B-I-Apt1及びB-IFNg-201AADと同等以上の強い結合能を示すことが明らかになった。

[0291] (4) さらなる6塩基ExSELEX法による核酸アプタマーの生成

図22に示す結果では、R6-library及び701 isolateは強い結合を示したが、701 isolateの配列を短くした断片 (B-IFNg-701a/b) では結合能が低下した。以下では、この結果に基づき、701 isolateの塩基配列について最適化を行った。

[0292] 具体的には、上述の保存配列GTCGCTGGDsCを共通モチーフとして含む以下の

XL1(a)ライブラリーを作製した。XL1(a)ライブラリーは、5'側及び3'側のプライマー結合配列（5'-GCTCATTGCGCTCTCCTATTCT-3'及び5'-GACAAGCGGAGTAGTTAGACCGTC-3'）の間に以下の配列：NNNNNNNNGTCGCTGGDCTGNAPAGTCGCTGGDCNNNNNNNNNNNNNN（配列番号185；NはA、T、G、及びC塩基からランダムに選択される塩基を示し、PはPa'塩基を示し、DはDs塩基を示す）を含む。このXL1(a)ライブラリーを対象として5回のセクションを含む6塩基ExSELEX法を実施した。1～4回目のセクションでは標的タンパク質としてグリコシル化IFN γ を使用し、5回目のセクションでは非グリコシル化IFN γ を使用した。5回目のセクション後のライブラリーの塩基配列を解析し、リード数の多い上位100種類の配列を解析した結果に基づいて、以下の表14に示す核酸アプタマーを合成した。

[表14]

表 14：核酸アプタマーの配列

配列の名称	塩基配列(5'-3')	配列番号
B-IFNg701-1	<u>CTTGTC</u> AA GGT <u>GTCGCTGG</u> DsC TGGAPa'A <u>GTCGCTGG</u> DsC A GAACTTTAGCCA <u>TTGACAAG</u> <u>CGCGLAGCG</u>	186
B-IFNg701-2	<u>CTTGTC</u> A GGT <u>GTCGCTGG</u> DsC TGTA Pa 'A <u>GTCGCTGG</u> DsC AG TACCTTTGGCCA <u>TGACAAG</u> <u>CGCGLAGCG</u>	187
B-IFNg701-3	GGCTTGTC GT <u>GTCGCTGG</u> DsC TGAA Pa 'A <u>GTCGCTGG</u> DsC AA AAAGCTTTTTCGA <u>GACAAGCC</u> <u>CGCGLAGCG</u>	188
B-IFNg701-4	<u>CTGCTTGT</u> GGT <u>GTCGCTGG</u> DsC TGCA Pa 'A <u>GTCGCTGG</u> DsC A TGAAACCTTTGGCCG <u>ACAAGCAG</u> <u>CGCGLAGCG</u>	189
B-IFNg701-9	<u>CTTGTC</u> AA GGA <u>GTCGCTGG</u> DsC TGTA Pa 'A <u>GTCGCTGG</u> DsC T GTAGTTTACCCA <u>TTGACAAG</u> <u>CGCGLAGCG</u>	190
IFNg701-1 (DPD)	<u>CTTGTC</u> AA GGT <u>GTCGCTGG</u> DsC TGGAPa'A <u>GTCGCTGG</u> DsC A GAACTTTAGCCA <u>TTGACAAG</u>	191
IFNg701-1a (APD)	<u>CTTGTC</u> AA GGT <u>GTCGCTGG</u> AC TGGAPa'A <u>GTCGCTGG</u> DsC AG AACTTTAGCCA <u>TTGACAAG</u>	192
IFNg701-1b (DTD)	<u>CTTGTC</u> AA GGT <u>GTCGCTGG</u> DsC TGGATA <u>GTCGCTGG</u> DsC AGA ACTTTAGCCA <u>TTGACAAG</u>	193
IFNg701-1c (DPA)	<u>CTTGTC</u> AA GGT <u>GTCGCTGG</u> DsC TGGAPa'A <u>GTCGCTGG</u> AC AG AACTTTAGCCA <u>TTGACAAG</u>	194
IFNg701-1d (ATA)	<u>CTTGTC</u> AA GGT <u>GTCGCTGG</u> AC TGGATA <u>GTCGCTGG</u> AC AGAAC TTTAGCCA <u>TTGACAAG</u>	195

* 下線はステム領域を形成する互いに相補的な配列を示し、黒枠はミニヘアピン配列を示し、配列中の「L」は Biotin-dT を示す。

[0293] (5) グリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ に対する親和性の評価

上記(3)と同様のEMSA法を用いて、上記表14に記載の核酸アプタマーについて、グリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ に対する親和性を解析した。結果を図23に示す。図23に示す結果から、IF701-1a(ATA)を除く全ての核酸アプタマーが非グリコシル化IFN γ 及びグリコシル化IFN γ の両方に強く結合することが示された。一方、人工塩基の全てを天然型塩基に置換したIF701-1a(ATA)については結合能が低下した結果から、結合能が人工塩基に依存することも明らかになった。

[0294] 次に、B-I-Apt1及びB-IF701-1の各核酸アプタマーについて、ELISA法でIFN γ の検出感度を検討した。ELISA法には、市販のモノクローナル抗体としてB133.5抗体(Thermo Fisher Scientific)を使用した。IFN γ 捕捉用抗体としてB133.5抗体を使用し、検出用に1 nMの核酸アプタマーを使用し、ストレプトアビジン結合HRPで検出した結果を図24に示す。B-IF701-1は、非グリコシル化IFN γ 及びグリコシル化IFN γ の検出感度がB-I-Apt1よりも高いことが示された。

[0295] (6) さらなる核酸アプタマーの生成

上記IFN γ -701-1の塩基配列の一部をランダム化して得られるライブラリーを作製し、さらなる核酸アプタマーを生成するために6塩基ExSELEX法を実施した。具体的には、5'側及び3'側のプライマー結合配列(5'-TGATTAGCTGAGACCTGATGCT-3'及び5'-GGCGGGACAAGCGGAGTAGTTAGACCGTC-3')の間に以下の配列: GTCCCGCCTGTCGCTGGDCTG-N₃-AGTCGCTGGDCA-N_n(Nは、A、T、G、C、及びPa'塩基から、23: 23: 23: 23: 8の割合でランダムに選択される塩基を示し、DはDs塩基を示し、nは8、9、又は10を示す; 配列番号196~198)を含むXL1(b)ライブラリーを作製した。このXL1(b)ライブラリーを対象として5回のセクションを含む6塩基ExSELEX法を実施した。1~3回目のセクションでは標的タンパク質としてグリコシル化IFN γ を使用し、4~5回目のセクションでは非グリコシル化IFN γ を使用した。また、3回目のセクションでは、複合体形成時にライブラリー濃度に対して5倍量のIF701-1核酸アプタマーを添加し、4

～5回目のセレクションではライブラリー濃度に対して5倍量のB-I-Apt1核酸アプタマーを添加して、それぞれIFN γ への結合について競合させた。5回目のセレクション後のライブラリーの塩基配列を解析し、リード数の多い上位100種類の配列を解析した結果に基づいて、以下の表15に示す核酸アプタマーを合成した。

[表15]

表 15：核酸アプタマーの配列

配列の名称	塩基配列(5'-3')	配列番号
B-IFNg701-21	GGGCCCCG CCTG TCGCTGGDsCTGAAPa'AGTCGCTGGDs CAGG TTTCCTTCGG CGGGCCC CGCGLAGCG	199
B-IFNg701-22	GGGCCCCG CCTG TCGCTGGDsCTGPa'APa'AGTCGCTGGDs CAG GTTTCCTTCGG CGGGCCC CGCGLAGCG	200
B-IFNg701-23	GGGCCCCG CCTG TCGCTGGDsCTGAAPa'AGTCGCTGGDs CAGG TPa'TCCTTCGG CGGGCCC CGCGLAGCG	201
B-IFNg701-24	GGGCCCCG CCTG TCGCTGGDsCTGAAPa'AGTCGCTGGDs CAGGT TTCCPa'TCGG CGGGCCC CGCGLAGCG	202
B-IFNg701-25	GGGCCCCG CCTG TCGCTGGDsCTGAAPa'AGTCGCTGGDs CAGGT Pa'TCCPa'TCGG CGGGCCC CGCGLAGCG	203
B-IFNg701-26	GGGCCCCG CCTG TCGCTGGDsCTGPa'APa'AGTCGCTGGDs CAG GTPa'TCCPa'TCGG CGGGCCC CGCGLAGCG	204
B-IFNg701-27	GGGCCCCG CCTG TCGCTGGDsCTGAAPa'AGTCGCTGGDs CAGGT TTCCTTC CGGGCCC CGCGLAGCG	205
B-IFNg701-31	GCCGTCCCCG CCT GTCGCTGGDsc TGAAPa'A GTCGCTGGDsc AG CGGGACGGC CGCGLAGCG	206
B-IFNg701-32	GGCGGTCCCG CTGT CGCTGGDsCTGAAPa'AGTCGCTGGDs CA CGGGACGGCC CGCGLAGCG	207
B-IFNg701-33	GGCGGTCCCG CTGT CGCTGGDsCTGPa'APa'AGTCGCTGGDs C A CGGGACGGCC CGCGLAGCG	208
B-IFNg701-42	GGCCCGCCTG TCGCTGGDsCTGAAPa'AGTCGCTGGDs CAGGCCG GCC CGCGLAGCG	209

* 黒枠はミニヘアピン配列を示し、配列中の「L」は Biotin-dT を示す。

[0296] (7) グリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ に対する親和性の評価

上記(3)と同様のEMSA法を用いて、上記表15に記載の核酸アプタマーについて、グリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ に対する親和性を解析した。結果を図25に示す。図25に示す結果から、全ての核酸アプタマーが非

グリコシル化IFN γ 及びグリコシル化IFN γ の両方に強く結合することが示された。

[0297] 次に、B-IF701-1の標的タンパク質への結合を37℃にてSPR法で解析した結果、非グリコシルIFN γ への結合のKd値は53.2 pM、グリコシル化IFN γ への結合のKd値は87.5 pMであった。

[0298] <実施例 6：ステム領域の検討>

(目的)

IFN γ 又はトロロンビンに結合する核酸アプタマーにおけるステム領域の塩基配列及び配列長について検討する。

[0299] (方法と結果)

(1) IFN γ 標的核酸アプタマーのステム領域

IFN γ に結合する核酸アプタマーB-IFNg701-1において、ステム領域を異なる配列に置換した核酸アプタマーを化学合成した。本実施例で作製した核酸アプタマーを以下の表16に示す。

[表16]

表 16：様々な塩基配列からなるステム領域を含む核酸アプタマー

配列の名称	塩基配列(5'-3')	配列番号
B-IFNg 701-1	<u>CTTGTC</u> AAGG TGTCGCTGG <u>Ds</u> CTGGAPa'AGTCGCTGG <u>Ds</u> CAGAACTT TAG <u>CCATTG</u> ACAAG <u>CGCGL</u> AGCG	186
B-IFNg 701-1e	<u>CCCGGCA</u> AAGG TGTCGCTGG <u>Ds</u> CTGGAPa'AGTCGCTGG <u>Ds</u> CAGAACTT TAG <u>CCATTG</u> CCCGG <u>CGCGL</u> AGCG	236
B-IFNg 701-1f	<u>CCCGGCG</u> CGG TGTCGCTGG <u>Ds</u> CTGGAPa'AGTCGCTGG <u>Ds</u> CAGAACTT TAG <u>CCAGCG</u> CCCGG <u>CGCGL</u> AGCG	237
B-IFNg 701-1g	<u>CTTGTC</u> AAGG TGTCGCTGG <u>Ds</u> CTGGAT AGTCGCTGG <u>Ds</u> CAGAACTT TAG <u>CCATTG</u> ACAAG <u>CGCGL</u> AGCG	238

* 下線はステム領域を形成する互いに相補的な配列を示し、黒枠はミニヘアピン配列を示し、配列中の「L」は Biotin-dT を示す。

[0300] 実施例 3 の(c)と同様の方法に基づくEMSA法を用いて、上記表16に記載の核酸アプタマーについて、IFN γ に対する親和性を解析した。結果を図26に示す。ステム領域を異なる配列に置換した核酸アプタマーでもグリコシル化IFN γ 及び非グリコシル化IFN γ への結合は損なわれないことが明らかになった。

[0301] (2) トロンビン標的核酸アプタマーのステム領域

トロンビンに結合する核酸アプタマーThr205-ADPにおいて、9 bpのステム領域を7bp又は5bpに短く改変した核酸アプタマーを化学合成した。本実施例で作製した核酸アプタマーを以下の表17に示す。

[表17]

表 17：様々な長さのステム領域を含む核酸アプタマー

配列の名称	塩基配列(5'-3')	配列番号
Thr205-ADP-43	<u>GCACGCTTT</u> AACTTAD s TGGCTGGGTGG Pa 'CTGGGT <u>AAAGCGTGC</u>	210
Thr205-ADP-39	<u>GCGCTTT</u> AACTTAD s TGGCTGGGTGG Pa 'CTGGGT <u>AAAGCGC</u>	211
Thr205-ADP-35	<u>GCGTT</u> AACTTAD s TGGCTGGGTGG Pa 'CTGGGT <u>AACGC</u>	212

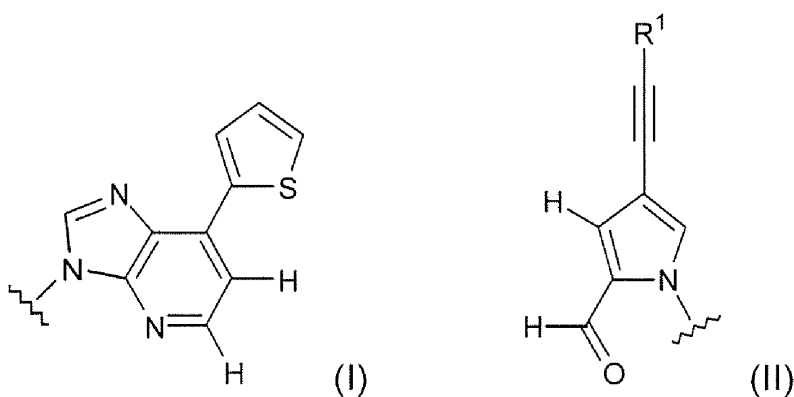
* 下線はステム領域を形成する互いに相補的な配列を示す。

[0302] 実施例3の(c)と同様の方法に基づくEMSA法を用いて、上記表17に記載の核酸アプタマーについて、トロンビンに対する親和性を解析した。結果を図27に示す。9塩基対のステム領域を、7塩基対又は5塩基対に短くした核酸アプタマーでもトロンビンの結合は損なわれないことが明らかになった。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 複数の一本鎖核酸分子を含む一本鎖核酸分子ライブラリーであって、
- 前記複数の一本鎖核酸分子は、Ds/Pa' 含有一本鎖核酸分子を含み、
前記Ds/Pa' 含有一本鎖核酸分子は、
- その5'末端及び3'末端に位置する一対のプライマー結合領域、及び
- 前記一対のプライマー結合領域間に位置する可変領域
- を含み、
- 前記一対のプライマー結合領域は、前記複数の一本鎖核酸分子の間で共通する塩基配列からなり、
- 前記可変領域は、
- 以下の一般式 (I) で示す非天然型塩基Ds (7-(2-thienyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-3-yl)、及び
- 以下の一般式 (II) で示す非天然型塩基Pa'
- を含む、前記一本鎖核酸分子ライブラリー：
- [化1]



[上記式中、R¹は、それぞれ独立に水素原子又は任意に置換されているもよい炭化水素基を表す]。

- [請求項2] 複数の一本鎖核酸分子を含む一本鎖核酸分子ライブラリーであって

、
 前記複数の一本鎖核酸分子は、Ds/Px含有一本鎖核酸分子を含み、
 前記Ds/Px含有一本鎖核酸分子は、
 その5'末端及び3'末端に位置する一対のプライマー結合領域、及び

前記一対のプライマー結合領域間に位置する可変領域
 を含み、

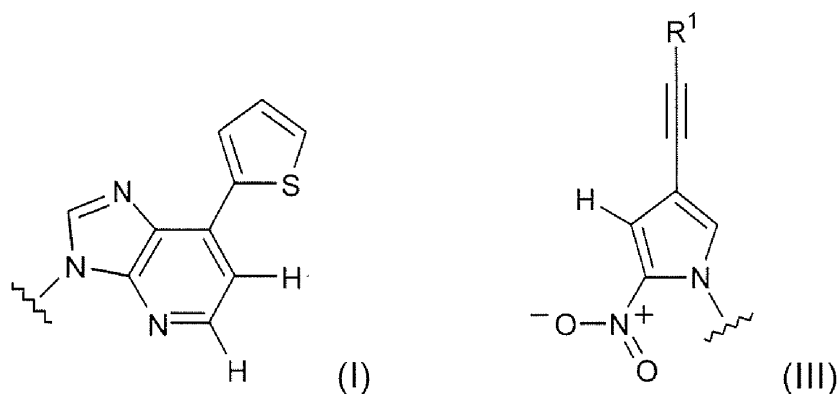
前記一対のプライマー結合領域は、前記複数の一本鎖核酸分子の間
 で共通する塩基配列からなり、

前記可変領域は、

以下の一般式 (I) で示す非天然型塩基Ds (7-(2-thienyl)-3H-im
 idazo[4,5-b]pyridine-3-yl)、及び

以下の一般式 (III) で示す非天然型塩基Px
 を含む、前記一本鎖核酸分子ライブラリー：

[化2]

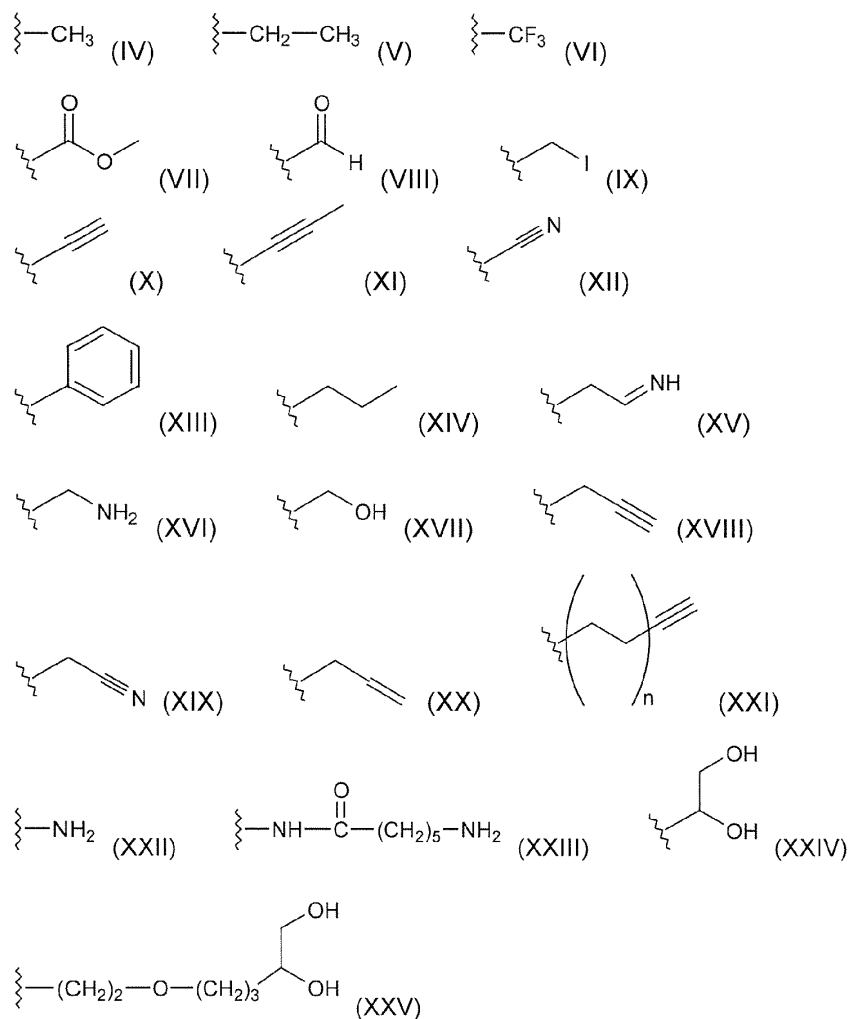


[上記式中、R¹は、それぞれ独立に水素原子又は任意に置換されて
 いてもよい炭化水素基を表す]。

[請求項3]

前記R¹が、以下の式 (IV) ～式 (XXV) で示されるいずれか一の式
 を示す、請求項1又は2に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー：

[化3]



[上記式中、波線部分はアルキンへの結合を表し、nは1以上の整数を表す]。

- [請求項4] 前記可変領域が、前記Dsを1~10個含む、請求項1又は2に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。
- [請求項5] 前記可変領域が、前記Dsを1~4個含む、請求項1又は2に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。
- [請求項6] 前記可変領域が、前記Pa'又は前記Pxを平均して1個以上含む、請求項1又は2に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

- [請求項7] 前記可変領域が、前記Dsを1～3個を含み、かつ前記Pa'又は前記Pxを平均して1～2個含む、請求項1又は2に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。
- [請求項8] 前記Ds/Pa'含有一本鎖核酸分子又は前記Ds/Px含有一本鎖核酸分子において、前記可変領域は、
1以上の指定された位置に配置された前記Ds、並びに
前記指定された1以上の位置を除いて、前記Pa'又は前記Px及び天然型塩基からなるランダム配列
を含む、請求項1又は2に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。
- [請求項9] 前記可変領域において前記指定された位置が異なる複数の前記Ds/Pa'含有一本鎖核酸分子又は前記Ds/Px含有一本鎖核酸分子を含む、請求項8に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。
- [請求項10] 前記可変領域が、10～300塩基長である、請求項1又は2に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。
- [請求項11] 前記可変領域が、14～100塩基長である、請求項1又は2に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。
- [請求項12] 前記複数の一本鎖核酸分子の各々が、
5'末端に位置するプライマー結合領域と前記可変領域との間に配置された、天然型塩基からなる5'ウイング領域、及び
前記可変領域と3'末端に位置するプライマー結合領域との間に配置された、天然型塩基からなる3'ウイング領域
を含む、請求項1又は2に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。
- [請求項13] 前記5'ウイング領域及び／又は前記3'ウイング領域が、天然型塩基で構成されるランダム配列からなる、請求項12に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。
- [請求項14] 前記天然型塩基で構成されるランダム配列が、3～20塩基長である、請求項13に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。
- [請求項15] 前記5'ウイング領域及び前記3'ウイング領域が、ステム構造を形成

することができる互いに相補的な一对の相補配列を含む、請求項 1 2 に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[請求項16] 前記相補配列が、非ワトソンクリック型塩基対、及び／又は1塩基以上の、挿入配列及び／又は欠失を含む、請求項 1 5 に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[請求項17] 前記非ワトソンクリック型塩基対が、G-T塩基対を含む、請求項 1 6 に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[請求項18] 前記挿入配列が、バルジ構造又はバルジアウト構造を形成する、請求項 1 6 に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[請求項19] 前記バルジ構造又はバルジアウト構造が、人工塩基を含む、請求項 1 8 に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[請求項20] 前記人工塩基が、前記Ds、前記Pa'、及び／又は前記Pxである、請求項 1 9 に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[請求項21] 前記一对の相補配列が、3~20塩基長である、請求項 1 5 に記載の一本鎖核酸分子ライブラリー。

[請求項22] 一本鎖核酸分子ライブラリーを作製する方法であって、
請求項 1 に記載の一本鎖核酸分子ライブラリーを鋳型として、かつ天然型ヌクレオチド、
前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び
前記非天然型塩基Pxを含有するPx含有ヌクレオチド
を基質として、一本鎖核酸分子を増幅する、増幅工程
を含む、前記方法。

[請求項23] 一本鎖核酸分子ライブラリーを作製する方法であって、
請求項 2 に記載の一本鎖核酸分子ライブラリーを鋳型として、かつ天然型ヌクレオチド、
前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び
前記非天然型塩基Pa' を含有するPa' 含有ヌクレオチド
を基質として、一本鎖核酸分子を増幅する、増幅工程

を含む、前記方法。

[請求項24] 一本鎖核酸分子からなる核酸アプタマーの製造方法であって、
請求項2に記載の一本鎖核酸分子ライブラリーと標的物質とを溶液中で混合して、前記一本鎖核酸分子ライブラリー中の一本鎖核酸分子と前記標的物質との複合体を形成させる複合体形成工程、
前記複合体を回収する複合体回収工程、並びに
天然型ヌクレオチド、
前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び
前記非天然型塩基Pxを含有するPx含有ヌクレオチド
を基質として、前記複合体回収工程後の前記複合体に含まれる前記一本鎖核酸分子を核酸増幅法によって増幅することによって、前記一本鎖核酸分子からなる核酸アプタマーを製造する、増幅工程を含む前記方法。

[請求項25] 前記増幅工程後の前記一本鎖核酸分子を新たな一本鎖核酸分子ライブラリーとして用いて、前記複合体形成工程から前記増幅工程までを新たに1回以上繰り返す反復工程をさらに含む、請求項24に記載の方法。

[請求項26] 核酸アプタマーの製造方法であって、
天然型核酸、
前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有核酸、及び
前記非天然型塩基Pa'を含有するPa'含有核酸
を反応させることによって、請求項1に記載の一本鎖核酸分子ライブラリーを合成するライブラリー合成工程、
前記ライブラリー合成工程後の一本鎖核酸分子ライブラリーを鋳型として、かつ
天然型ヌクレオチド、
前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び
前記非天然型塩基Pxを含有するPx含有ヌクレオチド

を基質として、一本鎖核酸分子を増幅する、第1増幅工程、

前記第1増幅工程後の前記一本鎖核酸分子と標的物質とを溶液中で混合して前記一本鎖核酸分子と標的物質との複合体を形成させる複合体形成工程、

前記複合体を回収する複合体回収工程、並びに

天然型ヌクレオチド、

前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び

前記非天然型塩基Pxを含有するPx含有ヌクレオチド

を基質として、前記複合体回収工程後の前記複合体に含まれる前記一本鎖核酸分子を核酸増幅法によって増幅することによって、前記一本鎖核酸分子からなる核酸アプタマーを製造する、第2増幅工程を含む、前記方法。

[請求項27] 前記第2増幅工程後の前記一本鎖核酸分子に対して、前記複合体形成工程から前記第2増幅工程までを新たに1回以上繰り返す反復工程をさらに含む、請求項26に記載の方法。

[請求項28] 核酸アプタマーの製造方法であって、
天然型核酸、
前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有核酸、及び
前記非天然型塩基Pa'を含有するPa'含有核酸
を反応させることによって、請求項1に記載の一本鎖核酸分子ライブラリーを合成するライブラリー合成工程、

前記ライブラリー合成工程後の前記一本鎖核酸分子ライブラリーと標的物質とを溶液中で混合して前記一本鎖核酸分子ライブラリー中の一本鎖核酸分子と標的物質との複合体を形成させる第1複合体形成工程、

前記第1複合体形成工程後の前記複合体を回収する第1複合体回収工程、

前記第1複合体回収工程後の前記一本鎖核酸分子を鋳型として、か

つ

天然型ヌクレオチド、
前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び
前記非天然型塩基Pxを含有するPx含有ヌクレオチドを基質として、
一本鎖核酸分子を増幅する、第1増幅工程、
前記第1増幅工程後の前記一本鎖核酸分子と前記標的物質とを溶液中で混合して前記一本鎖核酸分子と前記標的物質との複合体を形成させる第2複合体形成工程、
前記第2複合体形成工程後の前記複合体を回収する第2複合体回収工程、並びに

天然型ヌクレオチド、
前記非天然型塩基Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び
前記非天然型塩基Pxを含有するPx含有ヌクレオチド
を基質として、前記第2複合体回収工程後の前記複合体に含まれる前記一本鎖核酸分子を核酸増幅法によって増幅することによって、前記一本鎖核酸分子からなる核酸アプタマーを製造する、第2増幅工程を含む、前記方法。

[請求項29] 前記第2増幅工程後の前記一本鎖核酸分子に対して、前記第2複合体形成工程から前記第2増幅工程までを新たに1回以上繰り返す反復工程をさらに含む、請求項28に記載の方法。

[請求項30] 非天然型塩基含有一本鎖核酸分子の塩基配列を決定する方法であって、
前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子は、
その5'末端及び3'末端に位置する一対のプライマー結合領域、並びに
前記一対のプライマー結合領域間に位置する中央領域
を含み、
前記中央領域は、以下の一般式(I)で示す非天然型塩基Ds (7-(2

-thienyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-3-yl)、及び以下の一般式 (III) で示す非天然型塩基Pxを含み、

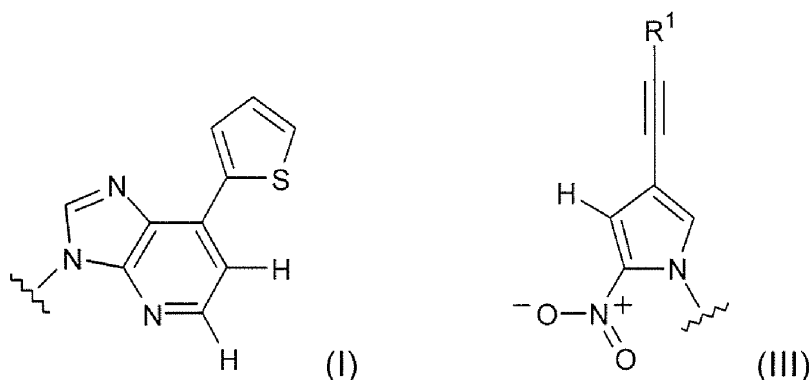
前記方法は、

天然型ヌクレオチドを基質として前記一対のプライマー結合領域の塩基配列に結合するプライマー対を用いて前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子を核酸増幅法により増幅する第1増幅工程、及び

前記第1増幅工程後に得られる天然型ヌクレオチドのみで構成された増幅産物の塩基配列を決定する塩基配列決定工程

を含む、前記方法：

[化4]



[上記式中、R¹は、それぞれ独立に、水素原子又は任意に置換されていてもよい炭素数1以上の炭化水素基を表す]。

[請求項31]

天然型ヌクレオチド、

前記Dsを含有するDs含有ヌクレオチド、及び

前記Pxを含有するPx含有ヌクレオチド

を基質として、前記一対のプライマー結合領域の塩基配列に結合し、異なる標識分子で標識されたプライマー対を用いて、前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子を核酸増幅法によって増幅する第2増幅工程、

前記第2増幅工程後に増幅された、前記異なる標識分子が結合した、前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子及びその相補鎖を前記Pxの位置で完全又は部分的に切断する切断工程、及び

前記切断工程後に前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子及びその相補鎖に由来する一本鎖核酸断片のサイズを前記標識分子の検出に基づいて決定し、前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子及びその相補鎖において前記Pxの位置を決定するPx位置決定工程をさらに含む、請求項30に記載の方法。

[請求項32] 前記塩基配列決定工程で決定された塩基配列において天然型塩基A及びTの両方が配列決定された塩基位置を前記Ds又は前記Pxの位置として決定するDs/Px位置決定工程、及び
前記Ds/Px位置決定工程において決定された前記Ds又は前記Pxの位置のうち、前記Px位置決定工程においてPxの位置として決定された位置を除いた位置を前記Dsの位置として特定するDs位置特定工程をさらに含む、請求項31に記載の方法。

[請求項33] 前記塩基配列決定工程で決定された塩基配列において天然型塩基A及びTの両方が配列決定された塩基位置を前記Ds又は前記Pxの位置として決定するDs/Px位置決定工程、
前記Ds/Px位置決定工程で決定された前記Ds又は前記Pxの位置に、前記Ds及び／又は前記Pxを複数の又は全ての組み合わせで含み、前記Ds又は前記Pxの位置を除いた配列が前記塩基配列決定工程において決定された塩基配列からなる、複数の一本鎖核酸分子を合成する合成工程、
前記合成工程で合成された前記複数の一本鎖核酸分子と前記標的物質とを混合して前記複数の一本鎖核酸分子と標的物質との複合体を形成させる複合体形成工程、
前記複合体形成工程後の複合体形成効率を測定する測定工程、及び
前記測定工程後に、前記複数の一本鎖核酸分子のうち、より高い又は最も高い複合体形成効率を示す一本鎖核酸分子の塩基配列を前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子の塩基配列として選択する選択工程をさらに含む、請求項30に記載の方法。

- [請求項34] 前記非天然型塩基含有一本鎖核酸分子が、
請求項2に記載の一本鎖核酸分子ライブラリーに由来するものであるか、又は
請求項24に記載の方法によって製造された一本鎖核酸分子である、請求項30に記載の方法。
- [請求項35] 前記異なる標識分子が、蛍光波長に基づいて区別可能である、請求項31又は32に記載の方法。
- [請求項36] 前記中央領域が、前記Dsを1～10個含む、請求項30に記載の方法。
- [請求項37] 前記中央領域が、前記Dsを1～4個含む、請求項36に記載の方法。
- [請求項38] 前記中央領域が、前記Dsを1～3個を含み、かつ前記Pxを1～2個含む、請求項30に記載の方法。
- [請求項39] 以下の(1)～(6)からなる群から選択される核酸アプタマー：
(1) 以下の(1-i-a)～(1-i-v-d)からなる群から選択される、インターフェロン γ (IFN γ) に結合する核酸アプタマー：
(1-i-a) 配列番号1で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において28位及び34位のnで示す塩基は、以下の一般式(I)で示す非天然型塩基Dsであり、22位のnで示す塩基は、以下の一般式(II)で示す非天然型塩基Pa'又は以下の一般式(III)で示す非天然型塩基Pxである、前記核酸アプタマー；
(1-i-b) 配列番号1において22位、28位、及び34位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号1の28位及び34位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号1の22位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；
(1-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を

含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号2で示す塩基配列を含み、前記配列番号2で示す塩基配列において18位及び24位のnで示す塩基は、前記Dsであり、前記配列番号2で示す塩基配列において12位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(1-i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号2において12位、18位、及び24位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号2の18位及び24位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号2の12位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(1-ii-a) 配列番号3で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において27位及び33位のnで示す塩基は、前記Dsであり、21位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(1-ii-b) 配列番号3において21位、27位、及び33位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号3の27位及び33位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号3の21位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(1-iii-a) 配列番号4で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において27位及び33位のnで示す塩基は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(1-i-i-i-b) 配列番号4において27位及び33位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号4の27位及び33位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(1-i-i-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号5で示す塩基配列を含み、前記配列番号5で示す塩基配列において18位及び24位のnで示す塩基は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(1-i-i-i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号5において18位及び24位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号5の18位及び24位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(1-i-v-a) 配列番号6で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において33位のnで示す塩基は、前記Dsであり、21位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(1-i-v-b) 配列番号6において21位及び33位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号6の33位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号6の21位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(1-i-v-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構

造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 7 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 7 で示す塩基配列において 24 位の n で示す塩基は、前記Dsであり、前記配列番号 7 で示す塩基配列において 12 位の n で示す塩基は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(1 - i v - d) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び 3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記 5' 領域及び 3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 7 において 12 位及び 24 位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 7 の 24 位の n で示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 7 の 12 位の n で示す塩基に対応する位置は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(2) 以下の (2 - i - a) ~ (2 - v i - d) からなる群から選択される、インターフェロン γ (IFN γ) に結合する核酸アプタマー：

(2 - i - a) 配列番号 8 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において 24 位及び 37 位の n で示す塩基は、前記Dsである、前記核酸アプタマー；

(2 - i - b) 配列番号 8 において 13 位、24 位、31 位、及び 37 位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号 8 の 24 位及び 37 位の n で示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(2 - i - c) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び 3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記 5' 領域及び 3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 9 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 9 で示す塩基配列において 15 位及び 28 位の n で示す塩基は、前記Dsである、

核酸アプタマー；

(2-i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号9において4位、15位、22位、及び28位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号9の15位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(2-i-i-a) 配列番号10で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において17位、24位、及び37位のnで示す塩基は、前記Dsである、前記核酸アプタマー；

(2-i-i-b) 配列番号10において13位、17位、24位、31位、及び37位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号10の17位、24位、及び37位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(2-i-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号11で示す塩基配列を含み、前記配列番号11で示す塩基配列において8位、15位、及び28位のnで示す塩基は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(2-i-i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号11において4位、8位、15位、22位、及び28位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された

塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 1 1 の8位、15位、及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(2-i i i-a) 配列番号 1 2 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において18位、24位、及び37位のnで示す塩基は、前記Dsである、前記核酸アプタマー；

(2-i i i-b) 配列番号 1 2 において13位、18位、24位、31位、及び37位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号 1 2 の18位、24位、及び37位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(2-i i i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 1 3 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 1 3 で示す塩基配列において9位、15位、及び28位のnで示す塩基は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(2-i i i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 1 3 において4位、9位、15位、22位、及び28位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 1 3 の9位、15位、及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(2-i v-a) 配列番号 1 4 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において24位及び37位のnで示す塩基は、前記Dsであり、17位のnで示す塩基は、前記Pa' 又は前記Pxである、

前記核酸アプタマー；

(2-i v-b) 配列番号14において13位、17位、24位、31位、及び37位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号14の24位及び37位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号14の17位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(2-i v-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号15で示す塩基配列を含み、前記配列番号15で示す塩基配列において15位及び28位のnで示す塩基は、前記Dsであり、前記配列番号15で示す塩基配列において8位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(2-i v-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号15において4位、8位、15位、22位、及び28位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号15の15位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号15の8位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(2-v-a) 配列番号16で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において24位及び37位のnで示す塩基は、前記Dsであり、18位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(2-v-b) 配列番号 16 において13位、18位、24位、31位、及び37位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号 16 の24位及び37位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号 16 の18位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(2-v-c) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 17 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 17 で示す塩基配列において15位及び28位のnで示す塩基は、前記Dsであり、前記配列番号 17 で示す塩基配列において9位のnで示す塩基は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(2-v-d) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 17 において4位、9位、15位、22位、及び28位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 17 の15位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 17 の9位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(2-v-i-a) 配列番号 18 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において17位、18位、24位、及び／又は37位のnで示す塩基は、前記Ds、前記Pa'、及び／又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(2-v-i-b) 配列番号 18 において13位、17位、18位、24位

、31位、及び37位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号18の17位、18位、24位、及び／又は37位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Ds、前記Pa'、及び／又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(2-v i -c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号19で示す塩基配列を含み、前記配列番号19で示す塩基配列において8位、9位、15位、及び／又は28位のnで示す塩基は、前記Ds、前記Pa'、及び／又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(2-v i -d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号19において4位、8位、9位、15位、22位、及び28位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号19の8位、9位、15位、及び／又は28位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Ds、前記Pa'、及び／又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(3) 以下の(3-i-a)～(3-v-b)からなる群から選択される、C反応性タンパク質(CRP)に結合する核酸アプタマー：

(3-i-a) 配列番号20で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において9位及び20位のnで示す塩基は、前記Dsであり、32位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(3-i-b) 配列番号20において9位、20位、及び32位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配

列を含み、前記塩基配列において配列番号 20 の9位及び20位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号 20 の32位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(3-i-c) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 21 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 21 で示す塩基配列において2位のnで示す塩基は、前記Dsであり、14位のnで示す塩基は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(3-i-d) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 21 において2位及び14位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 21 の2位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 21 の14位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(3-ii-a) 配列番号 22 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において20位のnで示す塩基は、前記Dsであり、32位のnで示す塩基は、前記Pa' 又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(3-ii-b) 配列番号 22 において20位及び32位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号 22 の20位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号 22 の32位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(3-i i i-a) 配列番号23で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において9位及び20位のnで示す塩基は、前記Dsであり、31位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(3-i i i-b) 配列番号23において9位、20位、及び31位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号23の9位及び20位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号23の31位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(3-i i i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号24で示す塩基配列を含み、前記配列番号24で示す塩基配列において2位のnで示す塩基は、前記Dsであり、13位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(3-i i i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号24において2位及び13位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号24の2位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号24の13位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(3-i v-a) 配列番号25で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において14位のnで示す塩基は、前記Dsであり、26位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸

アプタマー；

(3-i-v-b) 配列番号25において14位及び26位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号25の14位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号25の26位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(3-v-a) 配列番号26で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において14位のnで示す塩基は、前記Dsであり、25位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(3-v-b) 配列番号26において14位及び25位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号26の14位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号26の25位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(4) 以下の(4-i-a)～(4-v-i-d)からなる群から選択される、トロンピンに結合する核酸アプタマー；

(4-i-a) 配列番号27で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において16位及び22位のnで示す塩基は、前記Dsである、前記核酸アプタマー；

(4-i-b) 配列番号27において16位及び22位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号27の16位及び22位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(4-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号28で示す塩基配列を含み、前記配列番号28

で示す塩基配列において6位及び12位のnで示す塩基は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(4-i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号28において6位及び12位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号28の6位及び12位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(4-ii-a) 配列番号29で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において10位及び16位のnで示す塩基は、前記Dsであり、28位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(4-ii-b) 配列番号29において10位、16位、及び28位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号29の10位及び16位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号29の28位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(4-ii-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号30で示す塩基配列を含み、前記配列番号30で示す塩基配列において1位及び7位のnで示す塩基は、前記Dsであり、19位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(4-ii-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構

造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号30において1位、7位、及び19位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号30の1位及び7位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号30の19位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(4-i-i-i-a) 配列番号31で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において26位及び41位のnで示す塩基は、前記Dsである、前記核酸アプタマー；

(4-i-i-i-b) 配列番号31において26位及び41位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号31の26位及び41位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(4-i-i-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号32で示す塩基配列を含み、前記配列番号32で示す塩基配列において18位及び33位のnで示す塩基は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(4-i-i-i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号32において18位及び33位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号32の18位及び33位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(4-i v-a) 配列番号 33 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において16位及び24位のnで示す塩基は、前記Dsであり、35位のnで示す塩基は、前記Pa' 又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(4-i v-b) 配列番号 33 において16位、24位、及び35位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号 33 の16位及び24位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号 33 の35位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(4-i v-c) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 34 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 34 で示す塩基配列において10位及び18位のnで示す塩基は、前記Dsであり、29位のnで示す塩基は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(4-i v-d) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 34 において10位、18位、及び29位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 34 の10位及び18位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 34 の29位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(4-v-a) 配列番号 35 で示す塩基配列を含む核酸アプタマ

一であって、前記塩基配列において17位及び24位のnで示す塩基は、前記Dsであり、36位及び39位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(4-v-b) 配列番号35において17位、24位、36位、及び39位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号35の17位及び24位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号35の36位及び39位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(4-v-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号36で示す塩基配列を含み、前記配列番号36で示す塩基配列において9位及び16位のnで示す塩基は、前記Dsであり、28位及び31位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(4-v-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号36において9位、16位、28位、及び31位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号36の9位及び16位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号36の28位及び31位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(4-v-i-a) 配列番号37で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において29位及び38位のnで示す塩基は

、前記Dsである、前記核酸アプタマー；

(4-v i -b) 配列番号37において29位及び38位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号37の29位及び38位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(4-v i -c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号38で示す塩基配列を含み、前記配列番号38で示す塩基配列において19位のnで示す塩基は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(4-v i -d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号38において19位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号38の19位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(5) 以下の(5-i -a)～(5-i i -d)からなる群から選択される、インターロイキン-6(IL-6)に結合する核酸アプタマー：

(5-i -a) 配列番号39で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において25位及び34位のnで示す塩基は、前記Dsであり、13位及び20位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(5-i -b) 配列番号39において13位、20位、25位、及び34位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号39の25位及び34位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号39の13

位及び20位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(5-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号40で示す塩基配列を含み、前記配列番号40で示す塩基配列において14及び23位のnで示す塩基は、前記Dsであり、2位及び9位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(5-i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号40において2位、9位、14位、及び23位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号40の14位及び23位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号40の2位及び9位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(5-ii-a) 配列番号41で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において17位及び33位のnで示す塩基は、前記Dsであり、38位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(5-ii-b) 配列番号41において17位、33位、及び38位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号41の17位及び33位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号41の38位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

タマー；

(5-i-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号42で示す塩基配列を含み、前記配列番号42で示す塩基配列において1位及び17位のnで示す塩基は、前記Dsであり、22位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(5-i-i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号42において1、17位、及び22位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号42の1位及び17位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号42の22位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(6) 以下の(6-i-a)～(6-v-i-i-d)からなる群から選択される、インターロイキン-8(IL-8)に結合する核酸アプタマー：

(6-i-a) 配列番号43で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において26位のnで示す塩基は、前記Dsであり、17位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(6-i-b) 配列番号43において17位及び26位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号43の26位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号43の17位のnで示す塩基に対応

する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(6-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号44で示す塩基配列を含み、前記配列番号44で示す塩基配列において12位のnで示す塩基は、前記Dsであり、3位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(6-i-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号44において3位及び12位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号44の12位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号44の3位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(6-ii-a) 配列番号45で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において26位のnで示す塩基は、前記Dsであり、17位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(6-ii-b) 配列番号45において17位及び26位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号45の26位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号45の17位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(6-ii-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前

記中央領域は、配列番号 4 6 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 4 6 で示す塩基配列において12位のnで示す塩基は、前記Dsであり、3位のnで示す塩基は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(6-i-i-d) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 4 6 において3位及び12位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 4 6 の12位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 4 6 の3位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(6-i-i-i-a) 配列番号 4 7 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において26位及び37位のnで示す塩基は、前記Dsであり、17位のnで示す塩基は、前記Pa' 又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(6-i-i-i-b) 配列番号 4 7 において17位、26位、及び37位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号 4 7 の26位及び37位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号 4 7 の17位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(6-i-i-i-a) 配列番号 4 8 で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において25位のnで示す塩基は、前記Dsであり、16位のnで示す塩基は、前記Pa' 又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(6-i-i-i-b) 配列番号 4 8 において16及び25位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含

み、前記塩基配列において配列番号48の25位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号48の16位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(6-i v-a) 配列番号43で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において17位及び26位のnで示す塩基は、前記Dsである、前記核酸アプタマー；

(6-i v-b) 配列番号43において17位及び26位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号43の17位及び26位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(6-i v-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号44で示す塩基配列を含み、前記配列番号44で示す塩基配列において3位及び12位のnで示す塩基は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(6-i v-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号44において3位及び12位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号44の3位及び12位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、前記核酸アプタマー；

(6-v-a) 配列番号45で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において17位及び26位のnで示す塩基は、前記Dsである、前記核酸アプタマー；

(6-v-b) 配列番号45において17位及び26位を除いて1若

しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号45の17位及び26位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(6-v-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号46で示す塩基配列を含み、前記配列番号46で示す塩基配列において3位及び12位のnで示す塩基は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(6-v-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号46において3位及び12位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号46の3位及び12位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(6-v-i-a) 配列番号49で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において17位及び30位のnで示す塩基は、前記Dsであり、23位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(6-v-i-b) 配列番号49において17位、23位、及び30位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号49の17位及び30位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、配列番号49の23位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(6-v-i-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構

造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号50で示す塩基配列を含み、前記配列番号50で示す塩基配列において3位及び16位のnで示す塩基は、前記Dsであり、9位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(6-vi-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号50において3位、9位、及び16位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号50の3位及び16位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号50の9位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、核酸アプタマー；

(7) 以下の(7-a)～(7-d)からなる群から選択される、HMGB1タンパク質に結合する核酸アプタマー：

(7-a) 配列番号135で示す塩基配列を含む核酸アプタマーであって、前記塩基配列において22位及び33位のnで示す塩基は、前記Dsである、前記核酸アプタマー；

(7-b) 配列番号135において22位及び33位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記塩基配列において配列番号135の22位及び33位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、前記核酸アプタマー；

(7-c) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号134で示す塩基配列を含み、前記配列番号134で示す塩基配列において12位及び23位のnで示す塩基は、前記Dsであ

る、前記核酸アプタマー；

(7-d) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号134において12位及び23位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号134の12位及び23位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、核酸アプタマー；

(8) 以下の(8-i-a)～(8-x i i-b)からなる群から選択される、インターフェロン γ (IFN γ)に結合する核酸アプタマー；

(8-i-a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号213で示す塩基配列を含み、前記配列番号213で示す塩基配列において10位及び26位のnで示す塩基は、前記Dsであり、前記配列番号213で示す塩基配列において16位のnで示す塩基は、前記Pa'、前記Px、又はT塩基である、核酸アプタマー；

(8-i-b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号213において10位、16位、及び26位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号213の10位及び26位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号213の16位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'、前記Px、又はT塩基である、前記核酸アプタマー；

(8-i i-a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号214で示す塩基配列を含み、前記配列番号214で示す塩基配列において2位のnで示す塩基は、前記Pa'、前記Px、又はT塩基であり、前記配列番号214で示す塩基配列において16位のnで示す塩基は、前記Ds、前記Pa'、又は前記Pxであり、前記配列番号214で示す塩基配列において26位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxであり、前記配列番号214で示す塩基配列において31位のnで示す塩基は、前記Dsである、前記核酸アプタマー；

(8-i i-b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号214において2位、16位、26位、及び31位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号214の2位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'、前記Px、又はT塩基であり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号214の16位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Ds、前記Pa'、又は前記Pxであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号214の26位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号214の31位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsである、前記核酸アプタマー；

(8-i i i-a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号215で示す塩基配列を含み、前記配列番

号 2 1 5 で示す塩基配列において12位及び18位のnで示す塩基は、前記Ds又は塩基Aであり、前記配列番号 2 1 5 で示す塩基配列において18位のnで示す塩基は、前記Pa'、前記Px、又はT塩基である、前記核酸アプタマー；

(8 - i i i - b) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 1 5 において12位、18位、及び28位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 1 5 の12位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Ds又は塩基Aであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 1 5 の18位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'、前記Px、又はT塩基である、前記核酸アプタマー；

(8 - i v - a) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 1 6 ~ 2 2 1 及び 2 2 7 ~ 2 2 8 のいずれかで示す塩基配列を含み、前記配列番号 2 1 6 ~ 2 2 1 及び 2 2 7 ~ 2 2 8 のいずれかで示す塩基配列において12位及び18位のnで示す塩基は、前記Dsであり、前記配列番号 2 1 6 ~ 2 2 1 及び 2 2 7 ~ 2 2 8 のいずれかで示す塩基配列において18位のnで示す塩基は、前記Pa' 又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(8 - i v - b) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記5' 領域及び3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 1 6 ~ 2 2 1 及び 2 2 7 ~ 2 2 8 のいずれかにおいて12位、18位、及び28位を除いて1若しくは複数個の塩基が

欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 1 6 ~ 2 2 1 及び 2 2 7 ~ 2 2 8 のいずれかの 12 位及び 28 位の n で示す塩基に対応する位置は、前記 Ds であり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 1 6 ~ 2 2 1 及び 2 2 7 ~ 2 2 8 のいずれかの 18 位の n で示す塩基に対応する位置は、前記 Pa' 又は前記 Px である、前記核酸アプタマー；

(8-v-a) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び 3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記 5' 領域及び 3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 2 2 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 2 2 2 で示す塩基配列において 12 位及び 28 位の n で示す塩基は、前記 Ds であり、前記配列番号 2 2 2 で示す塩基配列において 16 位及び 18 位の n で示す塩基は、前記 Pa' 又は前記 Px である、前記核酸アプタマー；

(8-v-b) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び 3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記 5' 領域及び 3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 2 2 において 12 位、16 位、18 位、及び 28 位を除いて 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 2 2 の 12 位及び 28 位の n で示す塩基に対応する位置は、前記 Ds であり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 2 2 の 16 位及び 18 位の n で示す塩基に対応する位置は、前記 Pa' 又は前記 Px である、前記核酸アプタマー；

(8-vi-a) 5' 側から順に、5' 領域、中央領域、及び 3' 領域を含む核酸アプタマーであって、前記 5' 領域及び 3' 領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号 2 2 3 で示す塩基配列を含み、前記配列番号 2 2 3 で示す塩基配列において 12 位及び 28 位の n で示す塩基は、前記 D

sであり、前記配列番号223で示す塩基配列において18位及び34位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(8-v i -b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号223において12位、18位、28位、及び34位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号223の12位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号223の18位及び34位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(8-v i i -a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号224で示す塩基配列を含み、前記配列番号224で示す塩基配列において12位及び28位のnで示す塩基は、前記Dsであり、前記配列番号224で示す塩基配列において18位及び38位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(8-v i i -b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一对の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号224において12位、18位、28位、及び38位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号224の12位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号224の

18位及び38位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(8-v i i i -a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号225で示す塩基配列を含み、前記配列番号225で示す塩基配列において12位及び28位のnで示す塩基は、前記Dsであり、前記配列番号225で示す塩基配列において18位、34位、及び38位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(8-v i i i -b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号225において12位、18位、28位、34位、及び38位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号225の12位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号225の18位、34位、及び38位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(8-i x -a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号226で示す塩基配列を含み、前記配列番号226で示す塩基配列において12位及び28位のnで示す塩基は、前記Dsであり、前記配列番号226で示す塩基配列において16位、18位、34位、及び38位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(8-i-x-b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号226において12位、16位、18位、28位、34位、及び38位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号226の12位及び28位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号226の16位、18位、34位、及び38位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(8-x-a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号229で示す塩基配列を含み、前記配列番号229で示す塩基配列において11位及び27位のnで示す塩基は、前記Dsであり、前記配列番号229で示す塩基配列において17位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(8-x-b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号229において11位、17位、及び27位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号229の11位及び27位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号229の17位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(8-x-i-a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域

を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号230で示す塩基配列を含み、前記配列番号230で示す塩基配列において11位及び27位のnで示す塩基は、前記Dsであり、前記配列番号230で示す塩基配列において15位及び17位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

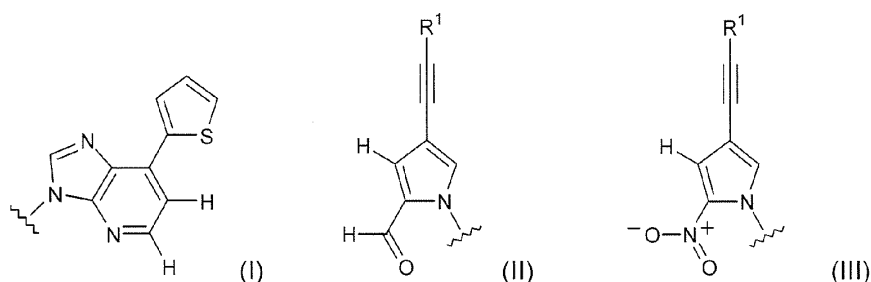
(8-x i -b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号230において11位、17位、及び27位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号230の11位及び27位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号230の15位及び17位のnで示す塩基に対応する位置は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(8-x i i -a) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号231で示す塩基配列を含み、前記配列番号231で示す塩基配列において8位及び24位のnで示す塩基は、前記Dsであり、前記配列番号231で示す塩基配列において14位のnで示す塩基は、前記Pa'又は前記Pxである、前記核酸アプタマー；

(8-x i i -b) 5'側から順に、5'領域、中央領域、及び3'領域を含む核酸アプタマーであって、前記5'領域及び3'領域は、ステム構造を形成することができる互いに相補的な一対の塩基配列を含み、前記中央領域は、配列番号231において8位、14位、及び24位を除いて1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配

列を含み、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 3 1 の 8 位及び 24 位の n で示す塩基に対応する位置は、前記Dsであり、前記中央領域における前記塩基配列において配列番号 2 3 1 の 14 位の n で示す塩基に対応する位置は、前記Pa' 又は前記Pxである、前記核酸アプタマー、

[化5]



[上記式中、 R^1 は、それぞれ独立に、水素原子又は任意に置換されていてもよい炭素数 1 以上の炭化水素基を表す]。

- [請求項40] 前記一対の塩基配列が、非相補的塩基対、及び／又は1塩基以上の、挿入配列及び／又は欠失を含む、請求項 3 9 に記載の核酸アプタマー。
- [請求項41] 前記非相補的塩基対が、G-T塩基対を含む、請求項 4 0 に記載の核酸アプタマー。
- [請求項42] 前記挿入配列が、バルジ構造又はバルジアウト構造を形成する、請求項 4 0 又は 4 1 に記載の核酸アプタマー。
- [請求項43] 前記バルジ構造又はバルジアウト構造が、人工塩基を含む、請求項 4 2 に記載の核酸アプタマー。
- [請求項44] 前記人工塩基が、前記Ds、前記Pa'、及び／又は前記Pxである、請求項 4 3 に記載の核酸アプタマー。
- [請求項45] 前記一対の塩基配列が、配列番号51及び52；配列番号53及び54；配列番号55及び56；配列番号57及び58（配列番号57の9位の n で示す塩基は、前記Dsである）；配列番号59及び60（GGTCATGTGACAAGCAGC）；配

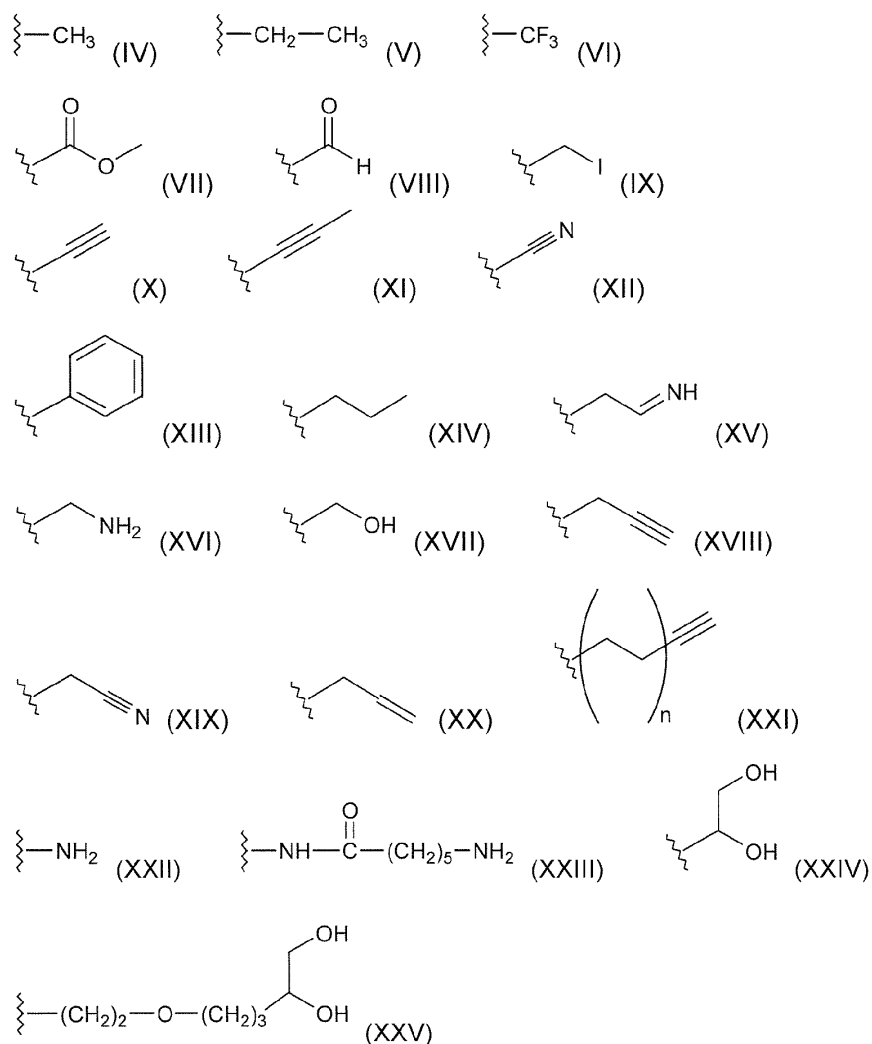
列番号61及び62；配列番号63及び64；配列番号65及び66；配列番号67及び68；配列番号69及び70；配列番号71及び72；配列番号73及び74（配列番号74の3位のnで示す塩基は、前記Dsである）；配列番号75及び配列番号76；配列番号77及び78；配列番号79及び80；配列番号81及び82；配列番号79及び83（配列番号83の7位のnで示す塩基は、前記Dsである）；配列番号84及び85；配列番号86及び87；配列番号232（GCGCTT）及び配列番号233（AAAGCGC）；配列番号234（GCGTT）及び配列番号235（AACGC）；配列番号239及び240；又は配列番号241及び242からなる、請求項39に記載の核酸アプタマー。

[請求項46] 5'末端及び／又は3'末端にミニヘアピン配列を含む、請求項39に記載の核酸アプタマー。

[請求項47] 前記インターフェロン γ （IFN γ ）は、グリコシル化されている、請求項39に記載の核酸アプタマー。

[請求項48] 前記R¹が、以下の式（IV）～式（XXV）で示されるいずれか一の式を示す、請求項39に記載の核酸アプタマー：

[化6]



[上記式中、波線部分はアルキンへの結合を表し、nは1以上の整数を表す]。

[請求項49] 請求項39に記載の核酸アプタマーを含む、インターフェロン γ 、C反応性タンパク質、トロニン、インターロイキン-6、インターロイキン-8、又はHMGB1を検出するための検出キット。

[請求項50] インターフェロン γ 、C反応性タンパク質、トロニン、インターロイキン-6、インターロイキン-8、又はHMGB1を検出する方法であって、

請求項 39 に記載の核酸アプタマーを用いて、インターフェロン γ 、C反応性タンパク質、トロンビン、インターロイキン-6、インターロイキン-8、又はHMGB1を検出することを含む、前記方法。

[請求項51] 炎症又は炎症性疾患を検出するための、又はその炎症レベルを測定するための、請求項 49 に記載の検出キット、又は請求項 50 に記載の方法。

[請求項52] 前記炎症性疾患が、感染症、膠原病、心血管疾患、又は腫瘍であるか、又は

前記炎症が、組織損傷、壊死、又は外科手術に付随するものである、前記 (3) の核酸アプタマーを含むか、又は前記 (3) の核酸アプタマーを用いる、請求項 51 に記載の検出キット又は方法。

[請求項53] 免疫療法においてT細胞及び／又はNK細胞の活性化レベルを測定するための、又は結核菌感染を検出するための、前記 (1)、(2)、又は (8) の核酸アプタマーを含む、請求項 49 に記載の検出キット、又は前記 (1)、(2)、又は (8) の核酸アプタマーを用いる、請求項 50 に記載の方法。

[請求項54] 請求項 39 に記載の核酸アプタマーを含む医薬組成物。

[請求項55] 抗炎症用である、請求項 54 に記載の医薬組成物。

[請求項56] 前記 (1)、(2)、又は (8) の核酸アプタマーを有効成分として含む、アフエレーシスに使用するための、請求項 54 に記載の医薬組成物。

[請求項57] 前記 (4) の核酸アプタマーを有効成分として含む、血液凝固を抑制又は阻害するための、請求項 54 に記載の医薬組成物。

[請求項58] 前記 (5) の核酸アプタマーを有効成分として含む、リウマチを治療するための請求項 54 に記載の医薬組成物。

[請求項59] 前記 (6) の核酸アプタマーを有効成分として含む、がんを治療するための、請求項 54 に記載の医薬組成物。

[請求項60] 請求項 39 に記載の核酸アプタマーを対象に投与することを含む、

疾患を治療する方法。

- [請求項61] 炎症性疾患を治療する、請求項60に記載の方法。
- [請求項62] 前記（１）、（２）、又は（８）の核酸アプタマーを用いるアフエレーシスによって血液からインターロン- γ を除去することを含む、請求項60に記載の方法。
- [請求項63] 前記（４）の核酸アプタマーを前記対象に投与して血液凝固を抑制又は阻害することを含む、請求項60に記載の方法。
- [請求項64] 前記（５）の核酸アプタマーを前記対象に投与することを含む、リウマチを治療するための請求項60に記載の方法。
- [請求項65] 前記（６）の核酸アプタマーを前記対象に投与することを含む、がんを治療するための請求項60に記載の方法。
- [請求項66] 前記（７）の核酸アプタマーを前記対象に投与することを含む、炎症性疾患、自己免疫疾患、がん、心血管疾患、又は神経疾患を治療するための請求項60に記載の方法。