

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/051569

発行日 令和1年6月27日 (2019.6.27)

(43) 国際公開日 平成30年3月22日 (2018.3.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/115 (2010.01)</b>	C 1 2 N 15/115	Z N A Z 4 B O 2 9
<b>C 1 2 Q 1/68 (2018.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	4 B O 6 3
<b>C 1 2 M 1/34 (2006.01)</b>	C 1 2 M 1/34	Z
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53	N
<b>G O 1 N 33/566 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/566	

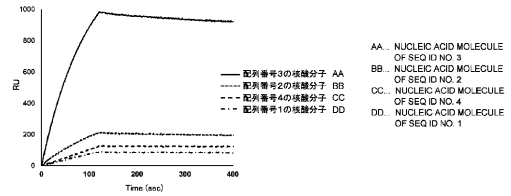
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)

出願番号 特願2018-539512 (P2018-539512)	(71) 出願人 000232092 NECソリューションイノベータ株式会社 東京都江東区新木場一丁目18番7号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/015934	
(22) 国際出願日 平成29年4月20日 (2017.4.20)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-180892 (P2016-180892)	(71) 出願人 504145364 国立大学法人群馬大学 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地
(32) 優先日 平成28年9月15日 (2016.9.15)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	
	(74) 代理人 100115255 弁理士 辻丸 光一郎
	(74) 代理人 100129137 弁理士 中山 ゆみ
	(74) 代理人 100154081 弁理士 伊佐治 創
	(72) 発明者 皆川 宏貴 東京都江東区新木場一丁目18番7号 N ECソリューションイノベータ株式会社内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分泌型免疫グロブリンA (s I g A) 結合核酸分子、s I g A分析用センサ、およびs I g Aの分析方法

(57) 【要約】

s I g Aの検出に利用可能な新たな分子を提供する。  
本発明のs I g A結合核酸は、分泌型免疫グロブリンA (s I g A) に対する解離定数が、37.7 nM以下の核酸分子であることを特徴とし、例えば、配列番号1から12のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド、またはその部分配列からなるポリヌクレオチドを含むことが好ましい。本発明の核酸分子によれば、唾液中におけるs I g Aを検出することができる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

分泌型免疫グロブリン A ( s I g A ) に対する解離定数が、 $37.7 \text{ nM}$  以下の核酸分子であることを特徴とする、s I g A 結合核酸分子。

## 【請求項 2】

前記核酸分子が、下記 ( a ) のポリヌクレオチド、またはその部分配列からなるポリヌクレオチドを含む、請求項 1 記載の s I g A 結合核酸分子。

( a ) 配列番号 1 ~ 12 のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド

## 【請求項 3】

前記部分配列からなるポリヌクレオチドが、下記 ( a 1 )、( a 2 )、( a 3 )、および ( a 4 ) からなる群から選択された少なくとも一つのポリヌクレオチドである、請求項 2 記載の s I g A 結合核酸分子。

( a 1 ) 配列番号 13、14、または 15 の塩基配列からなるポリヌクレオチド

( a 2 ) 配列番号 16 または 17 の塩基配列からなるポリヌクレオチド

( a 3 ) 配列番号 18 または 19 の塩基配列からなるポリヌクレオチド

( a 4 ) 配列番号 20 または 21 の塩基配列からなるポリヌクレオチド

## 【請求項 4】

前記結合核酸分子が、塩基が修飾基で修飾された修飾塩基を含む、請求項 2 または 3 記載の s I g A 結合核酸分子。

## 【請求項 5】

前記修飾塩基が、プリン塩基が修飾基で修飾された修飾プリン塩基である、請求項 4 記載の s I g A 結合核酸分子。

## 【請求項 6】

前記修飾基が、アデニン残基である、請求項 5 記載の s I g A 結合核酸分子。

## 【請求項 7】

前記修飾塩基が、チミン塩基が修飾基で修飾された修飾チミンである、請求項 4 記載の s I g A 結合核酸分子。

## 【請求項 8】

前記修飾基が、アデニン残基またはグアニン残基である、請求項 7 記載の s I g A 結合核酸分子。

## 【請求項 9】

前記ポリヌクレオチドが、DNA である、請求項 2 から 8 のいずれか一項に記載の s I g A 結合核酸分子。

## 【請求項 10】

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の分泌型免疫グロブリン A ( s I g A ) 結合核酸分子を含むことを特徴とする、s I g A 分析用センサ。

## 【請求項 11】

試料と核酸分子とを接触させ、前記試料中の分泌型免疫グロブリン A ( s I g A ) を検出する工程を含み、

前記核酸分子が、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の s I g A 結合核酸分子であり、前記検出工程において、前記試料中の s I g A と前記核酸分子とを結合させて、前記結合により、前記試料中の s I g A を検出することを特徴とする、s I g A の分析方法。

## 【請求項 12】

前記試料が、唾液、尿、血漿、および血清からなる群から選択された少なくとも一つである、請求項 11 記載の s I g A の分析方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、s I g A 結合核酸分子、s I g A 分析用センサ、および s I g A の分析方法に関する。

10

20

30

40

50

## 【背景技術】

## 【0002】

近年、ストレスが、疲労や鬱の一因となり得ることから、ストレスのチェックが重要視されている。しかしながら、ストレス状態か否かは、例えば、本人が気づいていない、または、主観的であるが故に他人によって判断することが難しいという問題がある。このため、ストレスを客観的に判断する方法の確立が求められている。

## 【0003】

ヒトは、ストレスを感じるにより、唾液中の s I g A の分泌が亢進することが知られている。そこで、前記唾液中の s I g A を測定することで、間接的にストレスを評価する方法が試みられている。具体的には、s I g A を抗原とする抗体を使用した E L I S A 法が報告されている（非特許文献 1）。

10

## 【0004】

しかし、抗体は、タンパク質であり、安定性に問題があるため、低コストで簡易な検査法に抗体を用いることが難しい。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0005】

【非特許文献 1】磯和 勅子、「看護師の職務ストレス、バーンアウトおよび身体的健康問題の関連：質問紙および免疫指標からの検討」、行動医学研究、Vol.10、No.1、25 - 33 頁

20

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

そこで、本発明は、s I g A の検出に利用可能な新たな分子の提供を目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明の s I g A 結合核酸分子は、分泌型免疫グロブリン A ( s I g A ) に対する解離定数が、37.7 n M 以下の核酸分子であることを特徴とする。

## 【0008】

本発明の s I g A 分析用センサは、前記本発明の s I g A 結合核酸分子を含むことを特徴とする。

30

## 【0009】

本発明の s I g A の分析方法は、試料と核酸分子とを接触させ、前記試料中の s I g A を検出する工程を含み、

前記核酸分子が、前記本発明の s I g A 結合核酸分子であり、

前記検出工程において、前記試料中の s I g A と前記核酸分子とを結合させて、前記結合により、前記試料中の s I g A を検出することを特徴とする。

## 【発明の効果】

## 【0010】

本発明の s I g A 結合核酸分子は、s I g A に対して前述のような解離定数で結合することができる。このため、本発明の s I g A 結合核酸分子によれば、例えば、試料中の s I g A との結合の有無によって、優れた精度で、s I g A を検出できる。したがって、本発明の s I g A 結合核酸分子は、例えば、予防医学、健康管理、感染症等の診断、およびストレスの診断等の分野における s I g A の検出に、極めて有用なツールといえる。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0011】

【図 1 A】図 1 A は、実施例 3 におけるアプタマーの s I g A に対する結合能を示すグラフである。

【図 1 B】図 1 B は、実施例 3 におけるアプタマーの s I g A に対する結合能を示すグラフである。

50

【図 1 C】図 1 C は、実施例 3 におけるアプタマーの s I g A に対する結合能を示すグラフである。

【図 1 D】図 1 D は、実施例 3 におけるアプタマーの s I g A に対する結合能を示すグラフである。

【図 1 E】図 1 E は、実施例 3 におけるアプタマーの s I g A に対する結合能を示すグラフである。

【図 1 F】図 1 F は、実施例 3 におけるアプタマーの s I g A に対する結合能を示すグラフである。

【図 2 A】図 2 A は、実施例 3 におけるアプタマーの s I g A への結合量の相対値 (Relative Unit) を示すグラフである。

10

【図 2 B】図 2 B は、実施例 3 におけるアプタマーの s I g A への結合量の相対値を示すグラフである。

【図 2 C】図 2 C は、実施例 3 におけるアプタマーの s I g A への結合量の相対値を示すグラフである。

【図 2 D】図 2 D は、実施例 3 におけるアプタマーの s I g A への結合量の相対値を示すグラフである。

【図 3】図 3 は、実施例 3 におけるアプタマーの結合量の相対値を示すグラフである。

【図 4】図 4 は、実施例 4 における SDS - PAGE の結果を示す写真である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

20

本発明の s I g A 結合核酸分子は、例えば、前記核酸分子が、下記 ( a ) のポリヌクレオチド、またはその部分配列からなるポリヌクレオチドを含む。

( a ) 配列番号 1 ~ 12 のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド

【0013】

本発明の s I g A 結合核酸分子は、例えば、前記部分配列からなるポリヌクレオチドが、下記 ( a 1 )、( a 2 )、( a 3 )、および ( a 4 ) からなる群から選択された少なくとも一つのポリヌクレオチドである。

( a 1 ) 配列番号 13、14、または 15 の塩基配列からなるポリヌクレオチド

( a 2 ) 配列番号 16 または 17 の塩基配列からなるポリヌクレオチド

( a 3 ) 配列番号 18 または 19 の塩基配列からなるポリヌクレオチド

30

( a 4 ) 配列番号 20 または 21 の塩基配列からなるポリヌクレオチド

【0014】

本発明の s I g A 結合核酸分子は、例えば、前記結合核酸分子が、塩基が修飾基で修飾された修飾塩基を含む。

【0015】

本発明の s I g A 結合核酸分子は、例えば、前記修飾塩基が、プリン塩基が修飾基で修飾された修飾プリン塩基である。前記修飾基が、好ましくは、アデニン残基である。

【0016】

本発明の s I g A 結合核酸分子は、例えば、前記修飾塩基が、チミン塩基が修飾基で修飾された修飾チミンである。前記修飾基が、好ましくは、アデニン残基またはグアニン残基である。

40

【0017】

本発明の s I g A 結合核酸分子は、例えば、前記ポリヌクレオチドが、DNA である。

【0018】

本発明の s I g A の分析方法は、例えば、前記試料が、唾液、尿、血漿、および血清からなる群から選択された少なくとも一つである。

【0019】

以下、本発明について、具体的に説明する。

【0020】

( 1 ) s I g A 結合核酸分子

50

本発明の s I g A 結合核酸分子（以下、「核酸分子」ともいう）は、前述のように、s I g A に対する解離定数が、37.7 nM 以下の核酸分子であることを特徴とする。

【0021】

本発明の核酸分子は、前述のように s I g A に結合可能である。本発明の核酸分子は、例えば、s I g A を構成する免疫グロブリンの重鎖に結合してもよいし、免疫グロブリンの軽鎖に結合してもよいし、両者に結合してもよいし、2つの I g A の架橋部（J 鎖）に結合してもよいし、s I g A と結合している分泌成分（secretory component）と結合してもよい。前記 s I g A は、特に制限されず、その由来は、例えば、ヒト、非ヒト動物等があげられる。前記非ヒト動物は、例えば、マウス、ラット、サル、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ等があげられる。ヒト I g - 1 鎖の C 領域（I g alpha-1 chain C region）のアミノ酸配列の情報は、例えば、U n i P r o t (<http://www.uniprot.org/>) アクセション番号 P 0 1 8 7 6 に登録されており、また、ヒト I g - 2 鎖の C 領域（I g alpha-2 chain C region）のアミノ酸配列の情報は、例えば、U n i P r o t (<http://www.uniprot.org/>) アクセション番号 P 0 1 8 7 7 に登録されている。

10

【0022】

本発明において、「s I g A に結合する」とは、例えば、s I g A に対する結合能を有している、または、s I g A に対する結合活性を有しているともいう。本発明の核酸分子と前記 s I g A との結合は、例えば、表面プラズモン共鳴分子相互作用（SPR；Surface Plasmon resonance）解析等により決定できる。前記解析は、例えば、P r o t e O N（商品名 BioRad社）が使用できる。本発明の核酸分子は、s I g A に結合することから、例えば、s I g A の検出に使用できる。

20

【0023】

本発明の核酸分子は、前記 s I g A に対する解離定数が、例えば、37.7 nM 以下、10 nM 以下、8 nM 以下、5 nM 以下である。本発明の核酸分子は、前記 s I g A の検出限界濃度が、例えば、50 nM、20 nM、10 nM である。

【0024】

本発明の核酸分子は、例えば、下記表 1 に示す、下記（a）のポリヌクレオチドを含む核酸分子があげられる。

（a）配列番号 1 ~ 12 のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド

【0025】

30



本発明の核酸分子は、例えば、前記 ( a ) のいずれかのポリヌクレオチドの部分配列からなるポリヌクレオチドを含む核酸分子があげられる。

【 0 0 2 7 】

前記部分配列からなるポリヌクレオチドとしては、例えば、下記 ( a 1 )、( a 2 )、( a 3 )、および ( a 4 ) からなる群から選択された少なくとも一つのポリヌクレオチドがあげられる。

( a 1 ) 配列番号 1 3、1 4、または 1 5 の塩基配列からなるポリヌクレオチド

( a 2 ) 配列番号 1 6 または 1 7 の塩基配列からなるポリヌクレオチド

( a 3 ) 配列番号 1 8 または 1 9 の塩基配列からなるポリヌクレオチド

( a 4 ) 配列番号 2 0 または 2 1 の塩基配列からなるポリヌクレオチド

10

【 0 0 2 8 】

前記 ( a 1 ) は、配列番号 5 の部分配列の例であり、前記 ( a 2 ) は、配列番号 8 の部分配列の例であり、前記 ( a 3 ) は、配列番号 1 1 の部分配列の例であり、前記 ( a 4 ) は、配列番号 1 2 の部分配列の例である。これらの配列を、下記表 2 に示す。

【 0 0 2 9 】

【 表 2 】

配列番号	修飾塩基	塩基配列
13	NG7	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAATCIGCTIGATGTTTGTATTTCAAATTAGCCGCAG-3'
14	NG7	5'-GCAATCTCCCTAATCIGCTIGATGTTTGTATTTCAAATTAGCCGCAG-3'
15	NG7	5'-GCAATCTCCCTAATCIGCTIGATGTTTGTATTTCAAATTAGC-3'
16	KS9	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAATCGTATATCAAGCAGATGIGTTCACITGGGGAG-3'
17	KS9	5'-GCAATCTCCCTAATCGTATATCAAGCAGATGIGTTCACITGGGGAG-3'
18	KS9	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAATCAAAGATAIGCTAAGATAGATAGTTTGGCTTG-3'
19	KS9	5'-GCAATCTCCCTAATCAAAGATAIGCTAAGATAGATAGTTTGGCTTG-3'
20	KS9	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAATCTTTATACGTAIGGACTTAGGCTTTGTTATAGAAAC-3'
21	KS9	5'-GCAATCTCCCTAATCTTTATACGTAIGGACTTAGGCTTTGTTATAGAAAC-3'

20

【 0 0 3 0 】

本発明の結合核酸分子において、前記ポリヌクレオチドは、例えば、下記 ( b ) ~ ( d ) からなる群から選択された少なくとも一つのポリヌクレオチドの意味を含む。

( b ) 前記 ( a ) のいずれかの塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、前記 s I g A に結合するポリヌクレオチド

30

( c ) 前記 ( a ) のいずれかの塩基配列に対して、80%以上の同一性を有する塩基配列からなり、前記 s I g A に結合するポリヌクレオチド

( d ) 前記 ( a ) のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに、相補的な塩基配列からなり、s I g A に結合するポリヌクレオチド

【 0 0 3 1 】

前記 ( b ) において、「1もしくは数個」は、例えば、前記 ( b ) のポリヌクレオチドが、s I g A に結合する範囲であればよい。前記「1もしくは数個」は、例えば、1~10個、1~7個、1~5個、1~3個、1または2個である。本発明において、塩基数および配列数等の個数の数値範囲は、例えば、その範囲に属する正の整数を全て開示するのである。つまり、例えば、「1~5塩基」との記載は、「1、2、3、4、5塩基」の全ての開示を意味する(以下、同様)。

40

【 0 0 3 2 】

前記 ( c ) において、「同一性」は、例えば、前記 ( c ) のポリヌクレオチドが、s I g A に結合する範囲であればよい。前記同一性は、例えば、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上である。前記同一性は、例えば、BLAST、FASTA等の解析ソフトウェアを用いて、デフォルトのパラメータにより算出できる(以下、同様)。

50

## 【0033】

前記(d)において、「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」は、例えば、前記(a)のポリヌクレオチドに対して、完全または部分的に相補的なポリヌクレオチドであり、前記s I g Aに結合する範囲であればよい。前記ハイブリダイズは、例えば、各種ハイブリダイゼーションアッセイにより検出できる。前記ハイブリダイゼーションアッセイは、特に制限されず、例えば、ザンブрук(Sambrook)ら編「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリーマニュアル第2版(Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> Ed.)」〔Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)〕等に記載されている方法を採用することもできる。

## 【0034】

前記(d)において、「ストリンジエントな条件」は、例えば、低ストリンジエントな条件、中ストリンジエントな条件、高ストリンジエントな条件のいずれでもよい。「低ストリンジエントな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、32 の条件である。「中ストリンジエントな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、42 の条件である。「高ストリンジエントな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、50 の条件である。ストリンジエンシーの程度は、当業者であれば、例えば、温度、塩濃度、プローブの濃度および長さ、イオン強度、時間等の条件を適宜選択することで、設定可能である。「ストリンジエントな条件」は、例えば、前述したザンブрук(Sambrook)ら編「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリーマニュアル第2版(Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> Ed.)」〔Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)〕等に記載の条件を採用することもできる。

## 【0035】

前記(a1)～(a4)のポリヌクレオチドは、それぞれ、前記(a)のポリヌクレオチドの部分配列であることから、例えば、前記(b)、(c)または(d)の一例ともいえる。また、本発明の核酸分子が、前記(a1)～(a4)のポリヌクレオチドである場合、前記(b)～(d)のポリヌクレオチドは、前記(a)の塩基配列が、それぞれ、前記(a1)～(a4)の塩基配列であってもよく、前記(b)～(d)のポリヌクレオチドの説明において、「(a)のいずれかの塩基配列」および「(a)のポリヌクレオチド」を、それぞれ、「(a1)のいずれかの塩基配列」および「(a1)のいずれかのポリヌクレオチド」、「(a2)のいずれかの塩基配列」および「(a2)のいずれかのポリヌクレオチド」、「(a3)のいずれかの塩基配列」および「(a3)のいずれかのポリヌクレオチド」、または「(a4)のいずれかの塩基配列」および「(a4)のいずれかのポリヌクレオチド」に読み替えてその説明を援用できる。

## 【0036】

本発明の核酸分子において、前記ポリヌクレオチドの構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基であり、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌクレオチド残基があげられる。前記ポリヌクレオチドは、後述するように、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基からなるDNA、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌクレオチド残基を含むDNAであり、さらに、非ヌクレオチド残基を含んでもよい。本発明のs I g A結合核酸分子は、例えば、以下、アダマーともいう。

## 【0037】

本発明の核酸分子は、例えば、前記いずれかのポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドを含む分子でもよい。後者の場合、本発明の核酸分子は、例えば、後述するように、前記いずれかのポリヌクレオチドを2つ以上含んでもよい。前記2つ以上のポリヌクレオチドは、同じ配列でもよいし、異なる配列でもよい。また、後者の場合、本発明の核酸分子は、例えば、さらに、リンカーおよび/または付加配列等を有してもよい。ここで、前記リンカーとは、例えば、ポリヌクレオチド間の配列であり、前記付加配列とは、例えば、末端に付加された配列である。

10

20

30

40

50

## 【0038】

本発明の核酸分子が、例えば、複数の前記ポリヌクレオチドを含む場合、前記複数のポリヌクレオチドの配列が連結して、一本鎖のポリヌクレオチドを形成していることが好ましい。前記複数のポリヌクレオチドの配列は、例えば、それぞれが直接的に連結してもよいし、リンカーを介して、それぞれが間接的に連結してもよい。前記ポリヌクレオチドの配列は、それぞれの末端において、直接的または間接的に連結していることが好ましい。前記ポリヌクレオチドの配列を複数含む場合、前記配列の数は、特に制限されず、例えば、2以上、2～20、2～10、2または3である。

## 【0039】

前記リンカーの長さは、特に制限されず、例えば、1～200塩基長、1～20塩基長、3～12塩基長、5～9塩基長である。前記リンカーの構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基であり、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌクレオチド残基等があげられる。前記リンカーは、特に制限されず、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基からなるDNA、リボヌクレオチド残基を含むDNA等のポリヌクレオチドがあげられる。前記リンカーの具体例として、例えば、ポリデオキシチミン(ポリdT)、ポリデオキシアデニン(ポリdA)、AとTの繰り返し配列であるポリdAdT等があげられ、好ましくはポリdT、ポリdAdTである。

10

## 【0040】

本発明の核酸分子において、前記ポリヌクレオチドは、一本鎖ポリヌクレオチドであることが好ましい。前記一本鎖ポリヌクレオチドは、例えば、自己アニーリングによりステム構造およびループ構造を形成可能であることが好ましい。前記ポリヌクレオチドは、例えば、ステムループ構造、インターナルループ構造および/またはバルジ構造等を形成可能であることが好ましい。

20

## 【0041】

本発明の核酸分子は、例えば、二本鎖でもよい。二本鎖の場合、例えば、一方の一本鎖ポリヌクレオチドは、前記(a)、その部分配列、前記(b)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドを含み、他方の一本鎖ポリヌクレオチドは、制限されない。前記他方の一本鎖ポリヌクレオチドは、例えば、前記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドに相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドがあげられる。本発明の核酸分子が二本鎖の場合、例えば、使用に先立って、変性等により、一本鎖ポリヌクレオチドに解離させることが好ましい。また、解離した前記(a)～(d)のいずれかの一本鎖ポリヌクレオチドは、例えば、前述のように、ステム構造およびループ構造を形成していることが好ましい。

30

## 【0042】

本発明において、「ステム構造およびループ構造を形成可能」とは、例えば、実際にステム構造およびループ構造を形成すること、ならびに、ステム構造およびループ構造が形成されていなくても、条件によってステム構造およびループ構造を形成可能なことも含む。「ステム構造およびループ構造を形成可能」とは、例えば、実験的に確認した場合、および、コンピュータ等のシミュレーションで予測した場合の双方を含む。

## 【0043】

本発明の核酸分子の構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基である。前記ヌクレオチド残基は、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌクレオチド残基があげられる。本発明の核酸分子は、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基のみから構成されるDNA、1もしくは数個のリボヌクレオチド残基を含むDNA等があげられる。後者の場合、「1もしくは数個」は、特に制限されず、例えば、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、1～91個、1～30個、1～15個、1～7個、1～3個、1または2個である。

40

## 【0044】

前記ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド残基における塩基として、天然塩基を含んでもよいし、修飾塩基を含んでもよい。前記天然塩基(非人工塩基)は、特に制限されず、例えば、プリン骨格を有するプリン塩基、ピリミジン骨格を有するピリミジン塩基等があげ

50

られる。前記プリン塩基は、特に制限されず、例えば、アデニン ( a )、グアニン ( g ) があげられる。前記ピリミジン塩基は、特に制限されず、例えば、シトシン ( c )、チミン ( t )、ウラシル ( u ) 等があげられ、好ましくは、シトシン ( c )、およびチミン ( t ) である。

【 0 0 4 5 】

前記ポリヌクレオチドが前記修飾塩基を有する場合、その部位および個数は、特に制限されない。前記 ( a ) のポリヌクレオチドまたはその部分配列が前記修飾塩基を有する場合、前記表 1 および表 2 のポリヌクレオチドにおいては、例えば、下線部のアデニンおよびチミンの一部または全部が、修飾塩基である。前記下線部のアデニンが修飾塩基の場合、前記修飾塩基は、プリン塩基が修飾基で修飾された修飾プリン塩基であることが好ましい。また、前記下線部のチミンが修飾塩基の場合、前記修飾塩基は、チミン塩基が修飾された修飾チミンであることが好ましい。

10

【 0 0 4 6 】

前記修飾塩基は、例えば、塩基が修飾基で修飾されたものである。前記修飾基により修飾される塩基 ( 被修飾塩基 ) は、例えば、前記天然塩基である。前記天然塩基は、例えば、プリン塩基、ピリミジン塩基等があげられる。前記修飾塩基は、特に制限されず、例えば、修飾アデニン、修飾グアニン、修飾シトシン、修飾チミン、修飾ウラシルがあげられる。

【 0 0 4 7 】

前記修飾塩基は、例えば、前記被修飾塩基が、直接、前記修飾基で修飾されてもよいし、前記被修飾塩基が、間接的に、前記修飾基で修飾されてもよい。後者の場合、例えば、前記被修飾塩基が、リンカーを介して、前記修飾基で修飾される形態があげられる。前記リンカーは、特に制限されない。

20

【 0 0 4 8 】

前記被修飾塩基の前記修飾基による修飾部位は、特に制限されない。前記塩基がプリン塩基の場合、前記プリン塩基の修飾部位は、例えば、前記プリン骨格の 7 位および 8 位があげられ、7 位が好ましい。前記プリン塩基の修飾部位が 7 位の場合、7 位の窒素原子は、炭素原子に置換されていることが好ましい。位前記塩基がピリミジン塩基の場合、前記ピリミジン塩基の修飾部位は、例えば、前記ピリミジン骨格の 5 位および 6 位があげられ、5 位が好ましい。前記ピリミジン塩基の 5 位が修飾される場合、チミンは、5 位の炭素にメチル基を有することから、例えば、5 位の炭素に、直接的または間接的に前記修飾基が結合してもよいし、5 位の炭素に結合したメチル基の炭素に、直接的または間接的に前記修飾基が結合してもよい。前記ピリミジン骨格において、4 位の炭素に「 = O 」が結合し、5 位の炭素に「 - C H <sub>3</sub> 」または「 - H 」以外の基が結合している場合、修飾ウラシルまたは修飾チミンといえることができる。

30

【 0 0 4 9 】

前記修飾塩基が修飾プリン塩基である場合、前記修飾基は、アデニン残基が好ましい。すなわち、前記修飾プリン塩基は、例えば、塩基が前記アデニン残基で修飾されている。前記アデニン残基が前記被修飾塩基を修飾する部位 ( 前記アデニン残基における被修飾塩基との結合部位 ) は、特に制限されず、前記アデニン残基における 6 位の炭素に結合するアミノ基があげられる。前記アデニン残基で修飾される前記被修飾塩基は、特に制限されないが、例えば、プリン塩基が好ましく、プリン塩基の 7 位の原子が、前記アデニン残基で修飾されていることが好ましい。前記修飾塩基が修飾チミンである場合、前記修飾基は、アデニン残基またはグアニン残基が好ましい。すなわち、前記修飾塩基は、例えば、塩基が前記アデニン残基またはグアニン残基で修飾されている。前記アデニン残基が前記被修飾塩基を修飾する部位は、特に制限されず、例えば、前記アデニン残基における 6 位の炭素に結合するアミノ基があげられる。前記グアニン残基が前記被修飾塩基を修飾する部位は、特に制限されず、例えば、前記グアニン残基における 2 位の炭素に結合するアミノ基があげられる。前記アデニン残基または前記グアニン残基で修飾される前記被修飾塩基は、特に制限されないが、例えば、チミンが好ましく、チミンの 5 位の炭素に結合したメ

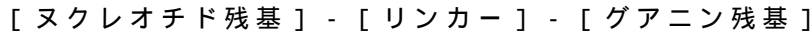
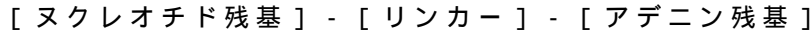
40

50

チル基の炭素が、前記アデニン残基または前記グアニン残基で修飾されていることが好ましい。

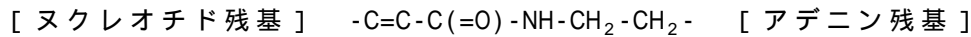
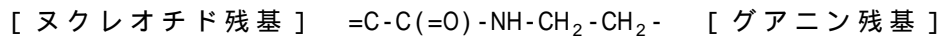
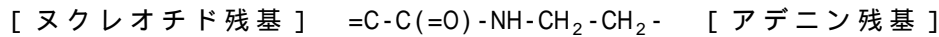
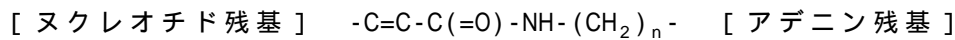
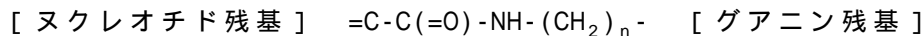
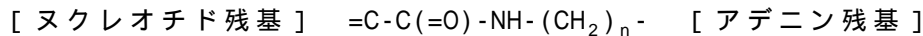
【0050】

前記修飾基が前記アデニン残基または前記グアニン残基の場合、例えば、以下に示すように、前記リンカーを介して、前記修飾基により前記被修飾塩基が修飾されていることが好ましい。



【0051】

前記リンカーは、特に制限されず、例えば、以下のように、前記ヌクレオチド残基と前記アデニン残基または前記グアニン残基との間の式で表されるが、これには限定されない。下記式において、 $(\text{CH}_2)_n$ における $n$ の数値は、例えば、 $1 \sim 10$ 、 $2 \sim 10$ 、 $2$ である。



【0052】

前記式において、前記リンカーの一端 $[=\text{C}]$ および $[-\text{C}]$ は、例えば、ヌクレオチド残基における被修飾塩基の炭素と、それぞれ、二重結合または単結合を形成し、前記リンカーの他端 $[\text{CH}_2-]$ は、例えば、アデニン残基またはグアニン残基のアミン $(-\text{NH})$ と結合している。

【0053】

前記ポリヌクレオチドにおける前記アデニン残基で修飾されたアデノシン(7位の窒素原子が炭素原子に置換されたプリン誘導体)ヌクレオチド残基の具体例として、例えば、下記化学式(1)に示す残基(以下、「MK4」ともいう)があげられる。また、前記ポリヌクレオチドにおける前記アデニン残基で修飾されたチミジンヌクレオチド残基の具体例として、例えば、下記化学式(2)に示す残基(以下、「KS9」ともいう)、前記ポリヌクレオチドにおける前記グアニン残基で修飾されたチミジンヌクレオチド残基の具体例として、例えば、下記化学式(3)に示す残基(以下、「NG7」ともいう)があげられる。なお、本発明は、これには限定されない。

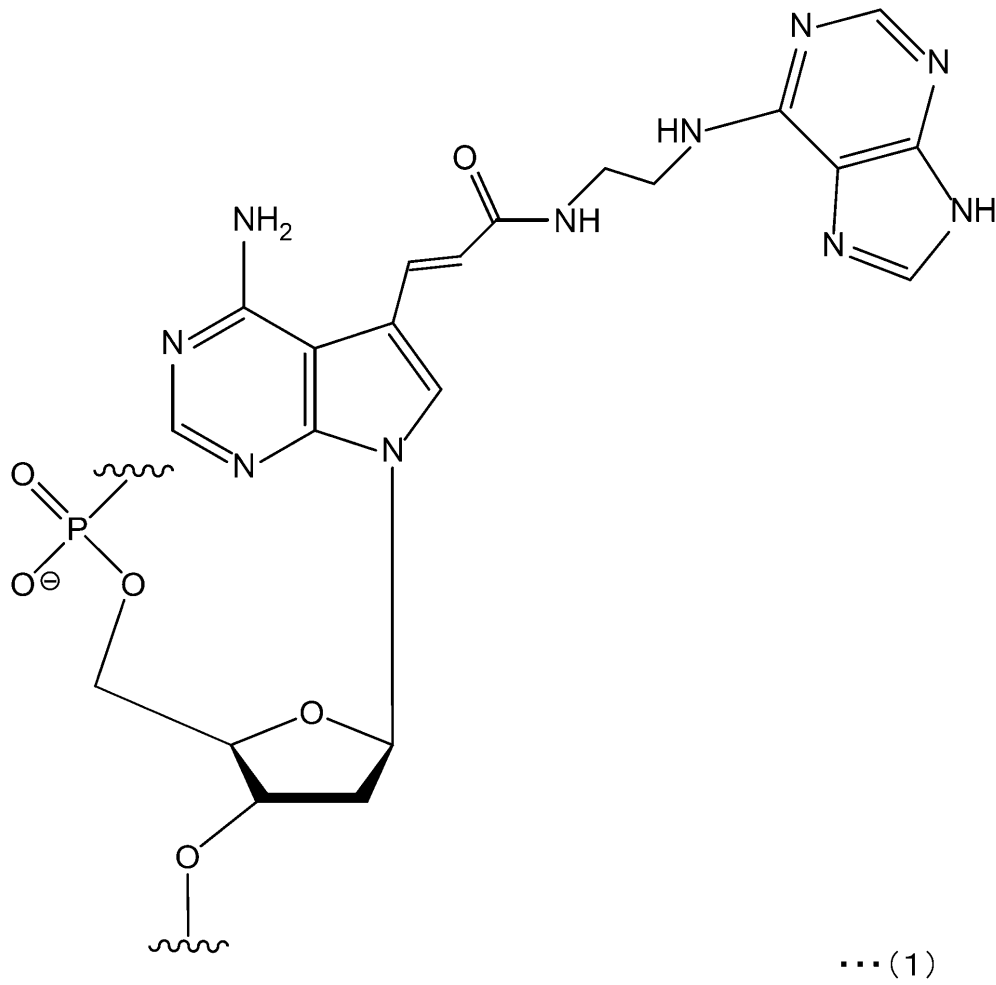
【0054】

10

20

30

【化 1】

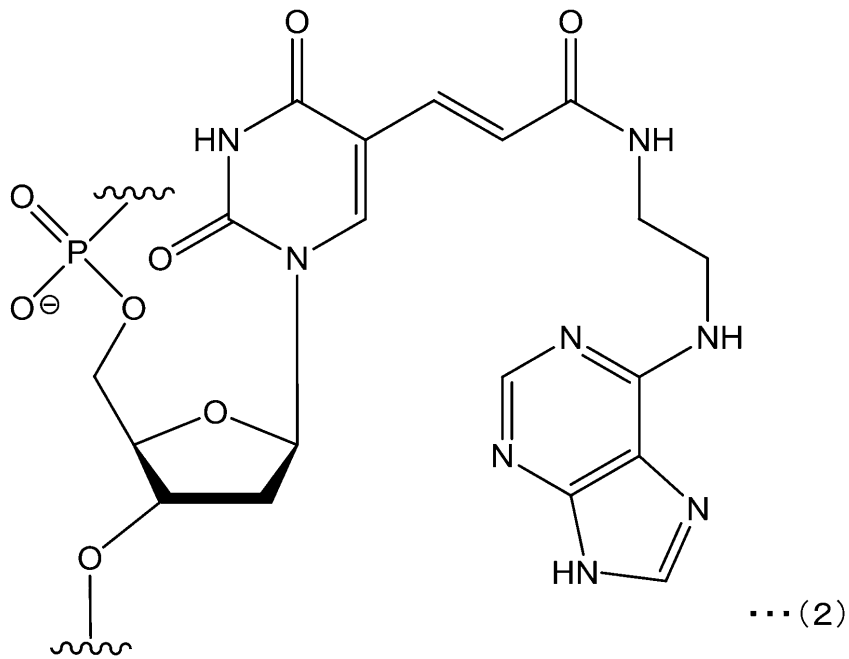


10

20

【 0 0 5 5 】

【化 2】

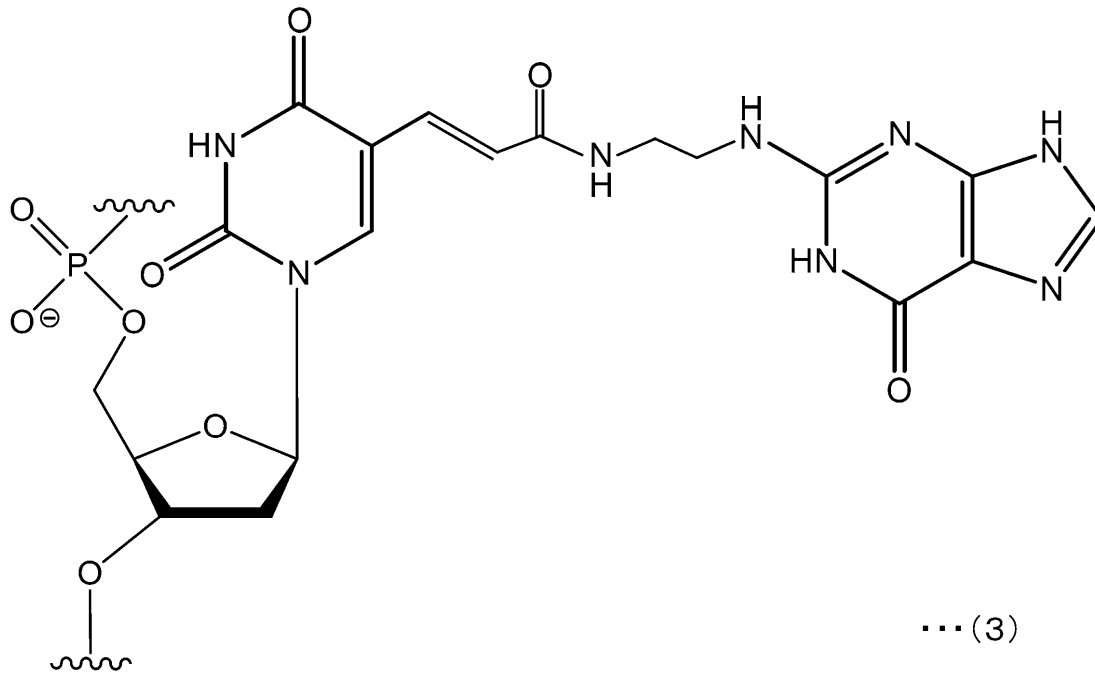


30

40

【 0 0 5 6 】

## 【化 3】



10

20

## 【0057】

前記表 1 のポリヌクレオチドにおいて、例えば、下線部のアデニンが、前記 M K 4 のヌクレオチド残基であることが好ましい。また、前記表 1 および表 2 のポリヌクレオチドにおいて、下線部のチミンが、前記 K S 9 および前記 N G 7 の少なくとも一方のヌクレオチド残基であることが好ましい。さらに、前記表 1 および表 2 のポリヌクレオチドにおいて、例えば、配列番号 5 ~ 7 および 13 ~ 15 の塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて、下線部のチミンが前記 N G 7 のヌクレオチド残基であることがより好ましい。前記表 1 および表 2 のポリヌクレオチドにおいて、例えば、配列番号 8 ~ 12 および 16 ~ 21 の塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて、下線部のチミンが前記 K S 9 のヌクレオチド残基であることがより好ましい。

30

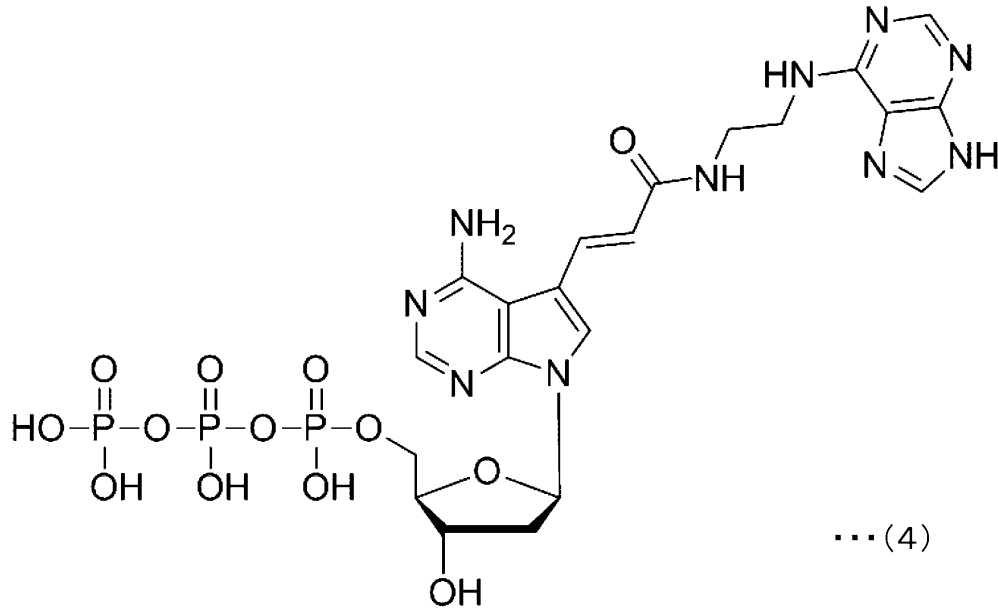
## 【0058】

本発明の核酸分子がアデノシンヌクレオチド残基を有する場合、前記ポリヌクレオチドの合成には、例えば、下記化学式 (4) で表されるヌクレオチド三リン酸 (以下、「M K 4 モノマー」ともいう) を、モノマー分子として使用することができる。本発明の核酸分子が、例えば、前記チミジンヌクレオチド残基を有する場合、前記ポリヌクレオチドの合成には、例えば、下記化学式 (5) に示すヌクレオチド三リン酸 (以下、「K S 9 モノマー」ともいう)、または、下記化学式 (6) に示すヌクレオチド三リン酸 (以下、「N G 7 モノマー」ともいう) を、モノマー分子として使用することができる。前記ポリヌクレオチドの合成において、例えば、前記モノマー分子は、ホスホジエステル結合により、他のヌクレオチド三リン酸と結合する。前記 M K 4 モノマーおよび前記 N G 7 モノマーの製造方法については、後述する。

40

## 【0059】

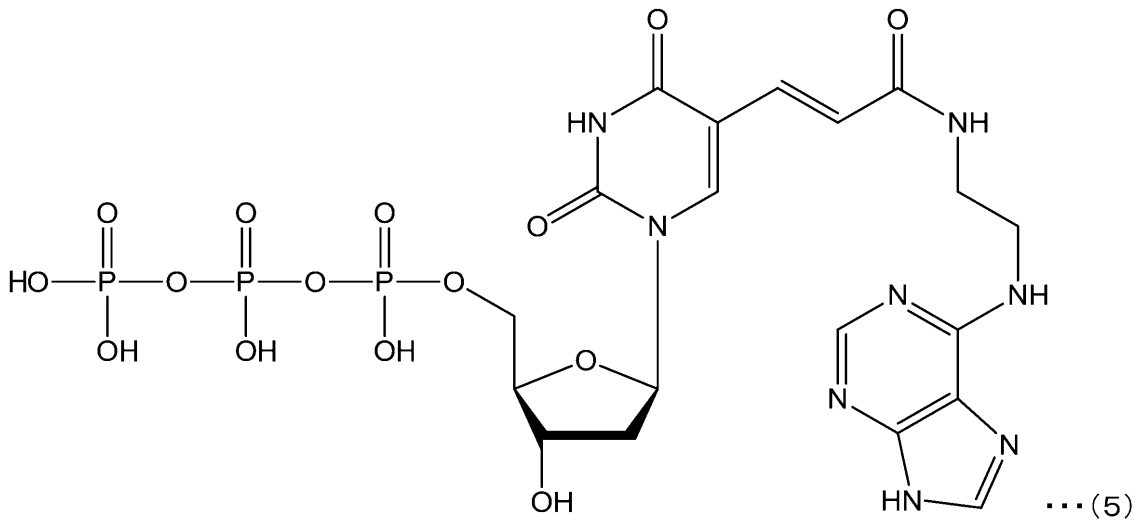
【化 4】



10

【 0 0 6 0】

【化 5】

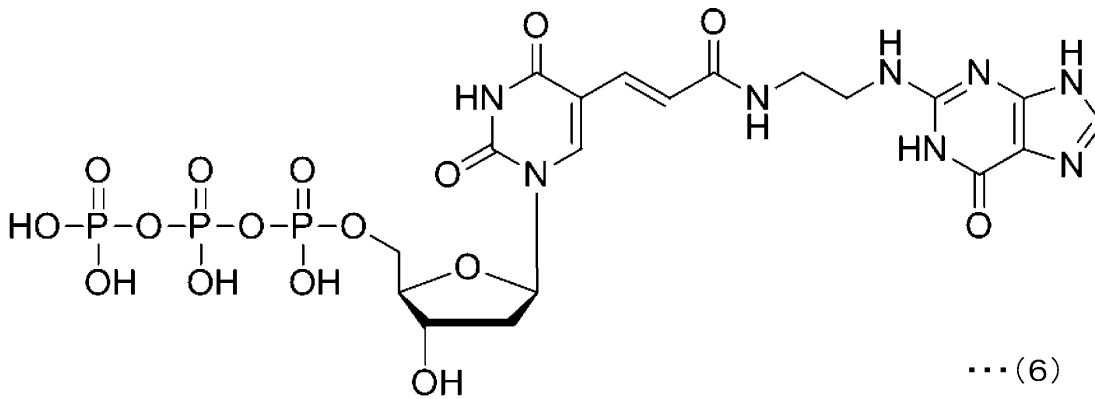


20

30

【 0 0 6 1】

【化 6】



40

【 0 0 6 2】

50

前記修飾基としては、この他に、例えば、メチル基、フルオロ基、アミノ基、チオ基、ベンジルアミノカルボニル基 (benzylaminocarbonyl)、トリプタミノカルボニル基 (tryptaminocarbonyl) およびイソブチルアミノカルボニル基 (isobutylaminocarbonyl) 等があげられる。

【0063】

前記修飾アデニンの具体例としては、例えば、7'-デアザアデニン等があげられ、前記修飾グアニンの具体例としては、例えば、7'-デアザグアニン等があげられ、前記修飾シトシンの具体例としては、例えば、5'-メチルシトシン (5-Me-dC) 等があげられ、前記修飾チミンの具体例としては、例えば、5'-ベンジルアミノカルボニルチミン、5'-トリプタミノカルボニルチミン、5'-イソブチルアミノカルボニルチミン等があげられ、前記修飾ウラシルの具体例としては、例えば、5'-ベンジルアミノカルボニルウラシル (BndU)、5'-トリプタミノカルボニルウラシル (TrpdU) および5'-イソブチルアミノカルボニルウラシル等があげられる。例示した前記修飾ウラシルは、チミンの修飾塩基ということもできる。

10

【0064】

前記ポリヌクレオチドは、例えば、いずれか1種類の前記修飾塩基のみを含んでもよいし、2種類以上の前記修飾塩基を含んでもよい。

【0065】

本発明の核酸分子は、例えば、修飾ヌクレオチドを含んでもよい。前記修飾ヌクレオチドは、前述の前記修飾塩基を有するヌクレオチドでもよいし、糖残基が修飾された修飾糖を有するヌクレオチドでもよいし、前記修飾塩基および前記修飾糖を有するヌクレオチドでもよい。

20

【0066】

前記糖残基は、特に制限されず、例えば、デオキシリボース残基またはリボース残基があげられる。前記糖残基における修飾部位は、特に制限されず、例えば、前記糖残基の2'位または4'位があげられ、いずれか一方でも両方が修飾されてもよい。前記修飾糖の修飾基は、例えば、メチル基、フルオロ基、アミノ基、チオ基等があげられる。

【0067】

前記修飾ヌクレオチド残基において、塩基がピリミジン塩基の場合、例えば、前記糖残基の2'位および/または4'位が修飾されていることが好ましい。前記修飾ヌクレオチド残基の具体例は、例えば、デオキシリボース残基またはリボース残基の2'位が修飾された、2'-メチル化-ウラシルヌクレオチド残基、2'-メチル化-シトシンヌクレオチド残基、2'-フルオロ化-ウラシルヌクレオチド残基、2'-フルオロ化-シトシンヌクレオチド残基、2'-アミノ化-ウラシルヌクレオチド残基、2'-アミノ化-シトシンヌクレオチド残基、2'-チオ化-ウラシルヌクレオチド残基、2'-チオ化-シトシンヌクレオチド残基等があげられる。

30

【0068】

前記修飾ヌクレオチドの個数は、特に制限されず、例えば、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、1~100個、1~90個、1~80個、1~70個である。また、前記ポリヌクレオチドを含む前記核酸分子の全長における前記修飾ヌクレオチドも、特に制限されず、例えば、1~91個または1~78個、前述の範囲と同様である。

40

【0069】

本発明の核酸分子は、例えば、1もしくは数個の人工核酸モノマー残基を含んでもよい。前記「1もしくは数個」は、特に制限されず、例えば、前記ポリヌクレオチドにおいて、例えば、1~100個、1~50個、1~30個、1~10個である。前記人工核酸モノマー残基は、例えば、PNA (ペプチド核酸)、LNA (Locked Nucleic Acid)、ENA (2'-O, 4'-C-Ethylenebridged Nucleic Acids) 等があげられる。前記モノマー残基における核酸は、例えば、前述と同様である。

【0070】

50

本発明の核酸分子は、例えば、ヌクレアーゼ耐性であることが好ましい。本発明の核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性のため、例えば、前記修飾化ヌクレオチド残基および/または前記人工核酸モノマー残基を有することが好ましい。本発明の核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性のため、例えば、5'末端または3'末端に、数10kDaのPEG(ポリエチレングリコール)またはデオキシチミジン等が結合してもよい。

#### 【0071】

本発明の核酸分子は、例えば、さらに付加配列を有してもよい。前記付加配列は、例えば、前記核酸分子の5'末端および3'末端の少なくとも一方に結合していることが好ましく、より好ましくは3'末端である。前記付加配列は、特に制限されない。前記付加配列の長さは、特に制限されず、例えば、1~200塩基長、1~50塩基長、1~25塩基長、18~24塩基長である。前記付加配列の構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基であり、デオキシリボヌクレオチド残基およびリボヌクレオチド残基等があげられる。前記付加配列は、特に制限されず、例えば、デオキシリボヌクレオチド残基からなるDNA、リボヌクレオチド残基を含むDNA等のポリヌクレオチドがあげられる。前記付加配列の具体例として、例えば、ポリdT、ポリdA等があげられる。

10

#### 【0072】

本発明の核酸分子は、例えば、担体に固定化して使用できる。前記本発明の核酸分子は、例えば、5'末端および3'末端のいずれかを固定化することが好ましく、より好ましくは3'末端である。本発明の核酸分子を固定化する場合、例えば、前記核酸分子は、前記担体に、直接的に固定化してもよいし、間接的に固定化してもよい。後者の場合、例えば、前記付加配列を介して固定化することが好ましい。

20

#### 【0073】

本発明の核酸分子の製造方法は、特に制限されず、例えば、化学合成を利用した核酸合成方法等、遺伝子工学的手法、公知の方法により合成できる。本発明の核酸分子は、例えば、いわゆるSELEX法によっても得ることができる。この場合、ターゲットは、sIgAが好ましい。

#### 【0074】

本発明の核酸分子は、前述のように、前記sIgAに結合性を示す。このため、本発明の核酸分子の用途は、前記sIgAへの結合性を利用する用途であれば、特に制限されない。本発明の核酸分子は、例えば、前記sIgAに対する抗体に代えて、種々の方法に使用できる。

30

#### 【0075】

##### (2) sIgA分析用センサ

本発明の分析用センサは、前述のように、sIgAの分析用センサであって、前記本発明の核酸分子を含むことを特徴とする。本発明の分析用センサは、前記本発明の核酸分子を含んでいればよく、その他の構成は、特に制限されない。本発明の分析用センサを使用すれば、例えば、前記核酸分子と前記sIgAとを結合させることで、前述のように、前記sIgAを検出できる。

#### 【0076】

本発明の分析用センサは、例えば、さらに担体を有し、前記担体に前記核酸分子が配置されている。前記核酸分子は、前記担体に固定化されていることが好ましい。前記担体への前記核酸分子の固定化は、例えば、前述の通りである。本発明の分析用センサの使用方法は、特に制限されず、前記本発明の核酸分子および前記本発明の分析方法を援用できる。

40

#### 【0077】

##### (3) 分析方法

本発明の分析方法は、前述のように、試料と核酸分子とを接触させ、前記試料中のsIgAを検出する工程を含み、前記核酸分子が、前記本発明のsIgA結合核酸分子であり、前記検出工程において、前記試料中のsIgAと前記核酸分子とを結合させて、前記結合により、前記試料中のsIgAを検出することを特徴とする。本発明の分析方法は、前

50

記本発明の核酸分子を使用することが特徴であって、その他の工程および条件等は、特に制限されない。また、本発明の分析方法は、前記本発明の核酸分子として、前記本発明の s I g A 分析用センサを使用してもよい。

【0078】

本発明によれば、前記本発明の核酸分子が、s I g A に特異的に結合することから、例えば、s I g A と前記核酸分子との結合を検出することによって、試料中の s I g A を特異的に検出可能である。具体的には、例えば、試料中の s I g A の有無または s I g A の量を分析可能であることから、定性または定量も可能といえる。

【0079】

本発明において、前記試料は、特に制限されない。前記試料は、例えば、唾液、尿、血漿および血清等があげられる。

10

【0080】

前記試料は、例えば、液体試料でもよいし、固体試料でもよい。前記試料は、例えば、前記核酸分子と接触させ易く、取扱いが簡便であることから、液体試料が好ましい。前記固体試料の場合、例えば、溶媒を用いて、混合液、抽出液、溶解液等を調製し、これを使用してもよい。前記溶媒は、特に制限されず、例えば、水、生理食塩水、緩衝液等があげられる。

【0081】

前記検出工程は、例えば、前記試料と前記核酸分子とを接触させて、前記試料中の s I g A と前記核酸分子とを結合させる接触工程と、前記 s I g A と前記核酸分子との結合を検出する結合検出工程とを含む。また、前記検出工程は、例えば、さらに、前記結合検出工程の結果に基づいて、前記試料中の s I g A の有無または量を分析する工程を含む。

20

【0082】

前記接触工程において、前記試料と前記核酸分子との接触方法は、特に制限されない。前記試料と前記核酸分子との接触は、例えば、液体中で行われることが好ましい。前記液体は、特に制限されず、例えば、水、生理食塩水、緩衝液等があげられる。

【0083】

前記接触工程において、前記試料と前記核酸分子との接触条件は、特に制限されない。接触温度は、例えば、4 ~ 37、18 ~ 25 であり、接触時間は、例えば、10 ~ 120分、30 ~ 60分である。

30

【0084】

前記接触工程において、前記核酸分子は、例えば、担体に固定化された固定化核酸分子でもよいし、未固定の遊離した核酸分子でもよい。後者の場合、例えば、容器内で、前記試料と接触させる。前記核酸分子は、例えば、取扱いに優れることから、前記固定化核酸分子が好ましい。前記担体は、特に制限されず、例えば、基板、ビーズ、容器等があげられ、前記容器は、例えば、マイクロプレート、チューブ等があげられる。前記核酸分子の固定化は、例えば、前述の通りである。

【0085】

前記結合検出工程は、前述のように、前記試料中の s I g A と前記核酸分子との結合を検出する工程である。前記両者の結合の有無を検出することによって、例えば、前記試料中の s I g A の有無を分析（定性）でき、また、前記両者の結合の程度（結合量）を検出することによって、例えば、前記試料中の s I g A の量を分析（定量）できる。

40

【0086】

そして、前記 s I g A と前記核酸分子との結合が検出できなかった場合は、前記試料中に s I g A は存在しないと判断でき、前記結合が検出された場合は、前記試料中に s I g A が存在すると判断できる。

【0087】

前記 s I g A と前記核酸分子との結合の分析方法は、特に制限されない。前記方法は、例えば、物質間の結合を検出する従来公知の方法が採用でき、具体例として、前述の S P R 等があげられる。また、前記結合は、例えば、前記 s I g A と前記核酸分子との複合体

50

の検出でもよい。

【0088】

(4) 検出キット

本発明の検出キットは、前記本発明の s I g A 結合核酸分子を含むことを特徴とする。本発明の検出キットは、前記本発明の核酸分子を含んでいればよく、その他の構成は何ら制限されない。本発明の検出キットを使用すれば、前述のように、例えば、前記 s I g A の検出等を行うことができる。

【0089】

本発明の検出キットは、例えば、前記本発明の核酸分子として、前記本発明のセンサを含んでもよい。また、前記本発明の検出キットは、例えば、前記本発明の核酸分子の他に、その他の構成要素を含んでもよい。前記構成要素は、例えば、前記担体、緩衝液、使用説明書等があげられる。

10

【実施例】

【0090】

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

【0091】

[実施例1]

以下に示す合成例により、MK4を調製した。

20

【0092】

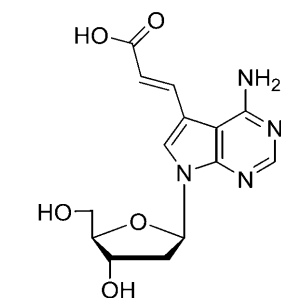
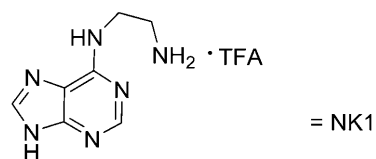
エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) は、質量分析装置 (API2000、販売元: Applied Biosystems社製) を用い、ポジティブイオンモードまたはネガティブイオンモードで実施した。<sup>1</sup>H NMRスペクトルは、核磁気共鳴装置 (JNM-ECS400、JEOL社製) を用い、取得した。化学シフトは、内部標準であるテトラメチルシラン (Me<sub>4</sub>Si) に対する相対値 (ppm) として表される。イオン交換クロマトグラフは、クロマトグラフシステム (ECONO system、Bio-Rad社製) を用いて実施した。前記イオン交換クロマトグラフでは、diethylaminoethyl (DEAE) A-25-Sephadex (Amershambiosciences社製) を充填したガラスカラム (25 × 500 mm) を使用した。

【0093】

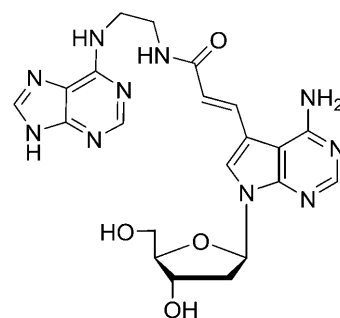
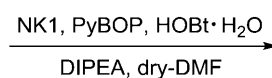
30

(合成例1) MK1の合成

【化7】



**AZ6** Exact Mass: 320.11  
Molecular Weight: 320.30



**MK1** Exact Mass: 480.20  
Molecular Weight: 480.49

40

スキーム 1

【0094】

50

AZ6 (290 mg,  $9.06 \times 10^{-4}$  mol) を真空乾燥させ、dry-DMF (N,N-ジメチルホルムアミド、3 mL) に溶かした。これにHOBt・H<sub>2</sub>O (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール・一水和物、176 mg,  $1.15 \times 10^{-5}$  mol, 1.2 eq.)、PyBOP (登録商標) (ヘキサフルオロリン酸 (ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノホスホニウム、579 mg,  $1.15 \times 10^{-5}$  mol, 1.2 eq.)、およびDIPEA (N,N-ジイソプロピルエチルアミン、4.6 mL,  $2.72 \times 10^{-2}$  mol, 30 eq.) を加え、さらにdry-DMF (1 mL) に溶かしたNK1 (493 mg,  $9.48 \times 10^{-4}$  mol, 1.1 eq.) を加え、撹拌した。前記撹拌開始40分後において、減圧留去し、残渣を水に溶かし、吸引ろ過で沈殿物を回収した。ろ液を逆相カラムクロマトグラフで粗精製した後、ろ物と共にカラムクロマトグラフで精製し、MK1を得た。MK1の物性値を以下に示す。

10

収量：261 mg 収率：60%

ESI-MS (positive ion mode) m/z, found = 481.2, calculated for [(M+H)+] = 481.2

found = 503.1, calculated for [(M+Na)+] = 503.2

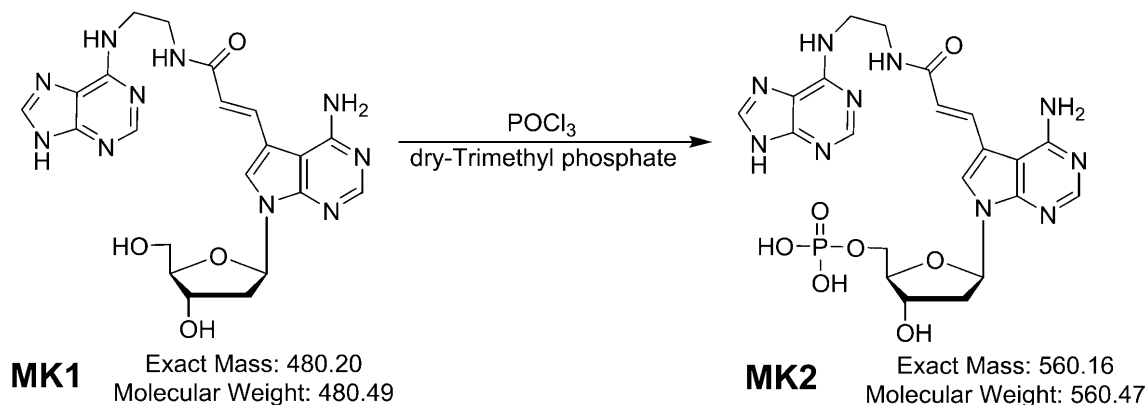
<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 8.22 (1H, m), 8.11 (1H, s), 8.10 (1H, s), 7.87 (1H, s), 7.63 (1H, d), 6.52 (1H, q), 6.35 (1H, d), 5.27 (1H, s), 3.82 (1H, m), 2.18 (1H, m)

【0095】

(合成例2) MK2の合成

20

【化8】



30

スキーム2

【0096】

MK1 (108 mg,  $2.25 \times 10^{-4}$  mol) を真空乾燥させ、Ar (アルゴン) で置換した。つぎに、dry-DMFで2回 (1回目: 40 mL, 2回目: 4 mL)、およびdry-MeCN (アセトニトリル) で3回 (1回目: 9 mL, 2回目: 5 mL, 3回目: 5 mL) 共沸した。dry-Trimethyl phosphate (6 mL) で懸濁させた後、dry-Tributyl amine (130 μL,  $5.44 \times 10^{-4}$  mol, 2.5 eq.) を加えた。そして、氷冷下でPhosphoryl chloride (42 μL,  $4.50 \times 10^{-4}$  mol, 2 eq.) を加え、撹拌した。前記撹拌開始40分後において、再びdry-Tributyl amine (250 μL,  $1.05 \times 10^{-3}$  mol, 5 eq.) およびPhosphoryl chloride (84 μL,  $4.50 \times 10^{-4}$  mol, 4 eq.) を加え、氷冷下で1時間撹拌した。前記撹拌後、冷1 mol/L TEAB (Triethylammonium bicarbonate) buffer (5 mL) を加え、5分間撹拌し、クエンチした。そして、減圧留去し、Etherで結晶化させ、吸引ろ過し、黄色固体を得た。前記固体を水に溶かし、陰イオン交換カラムクロマトグラフで精製し、凍結乾燥させ、MK2を得た。MK2の物性値を以下に示す。

40

50

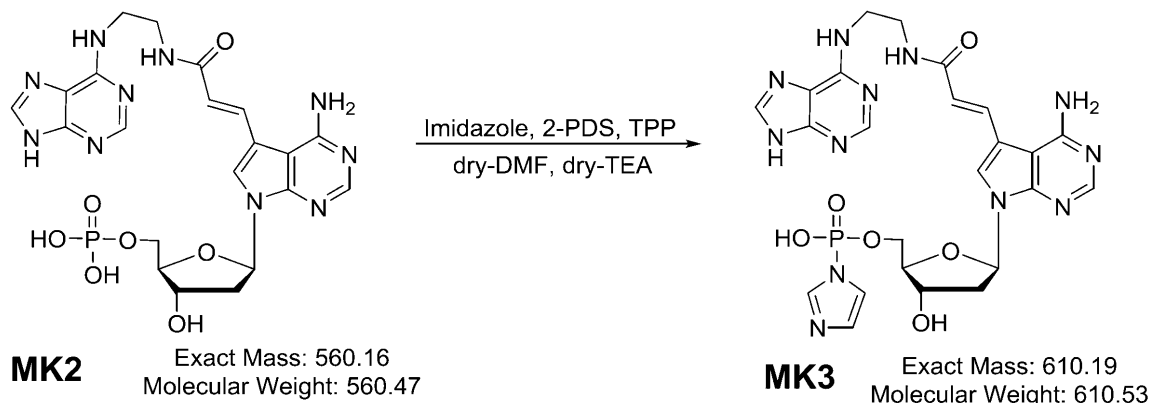
収量 : 30.0  $\mu\text{mol}$  収率 : 13.4%

ESI-MS (negative ion mode)  $m/z$ , found = 559.1, calculated for  $[(M-H)^-]$  = 559.2

【0097】

(合成例3) MK3の合成

【化9】



10

### スキーム3

【0098】

MK2 (30.03  $\mu\text{mol}$ ) を真空乾燥させ、dry-Pyridine (10 mL) で3回共沸し、一晚真空乾燥させた。前記乾燥後、Arで置換し、dry-DMF (2 mL) およびdry-TEA (トリエチルアミン、28  $\mu\text{L}$ 、 $1.98 \times 10^{-4}$  mol、6.6 eq.) で溶かした。さらに、Imidazole (16 mg、 $14.02 \times 10^{-4}$  mol、4 eq.)、2,2'-Dithiodipyridine (17 mg、 $7.72 \times 10^{-4}$  mol、1.6 eq.)、およびTriphenylphosphine (20 mg、 $7.63 \times 10^{-4}$  mol、1.6 eq.) を加え、室温で撹拌した。前記撹拌開始6.5時間後、得られた反応液を、Sodium perchlorate (39 mg、 $3.19 \times 10^{-4}$  mol、10 eq.) をdry-Acetone (18 mL)、dry-Ether (27 mL)、およびdry-TEA (2 mL) で溶かした溶液に加え、前記添加後4で30分静置した。そして、沈殿物をdry-Ether (12 mL) で5回デカンテーションした。これを真空乾燥させ、MK3をクルードとして得た。

20

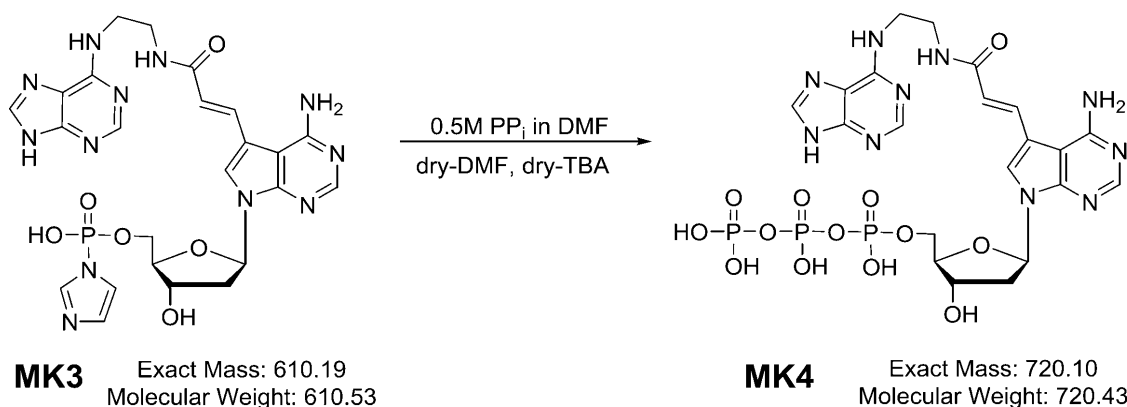
30

理論収量 : 30.03  $\mu\text{mol}$

【0099】

(合成例4) MK4の合成

【化10】



40

### スキーム4

【0100】

50

MK3 (30.03 μmol) を真空乾燥させ、Ar で置換し、dry-Pyridine (5 mL) で2回共沸した後、dry-DMF (1 mL) で懸濁させた。これに dry-n-Tributylamine (30 μL、 $1.25 \times 10^{-4}$  mol、4 eq.) および 0.5 mol/L n-Tributylamine pyrophosphate in DMF (310 μL、 $1.53 \times 10^{-4}$  mol、5 eq.) を加え、室温で撹拌した。前記撹拌開始6.5時間後、1 mol/L TEAB buffer (5 mL) を加え、30分間撹拌し、減圧留去した。これに水を加え、Ether で2回分液し、水層を陰イオン交換カラムクロマトグラフで精製し、凍結乾燥することでMK4を得た。MK4の物性値を以下に示す。

収量：3.33 μmol 収率：11.1%

ESI-MS (negative ion mode) m/z, found = 719.0, calculated for [(M-H)-] = 719.1

【0101】

[実施例2]

以下に示す合成例により、NG7を調製した。

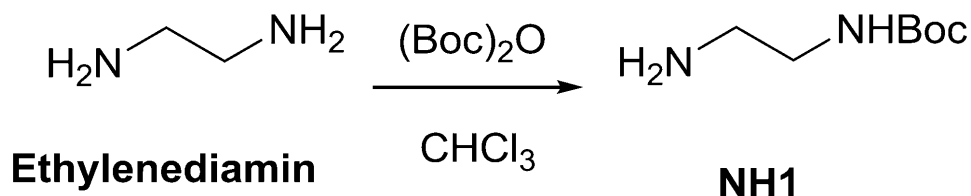
【0102】

エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) は、質量分析装置 (API2000、販売元：Applied Biosystems社製) を用い、ポジティブイオンモードまたはネガティブイオンモードで実施した。<sup>1</sup>H NMRスペクトルは、核磁気共鳴装置 (JNM-ECS400、JEOL社製) を用い、取得した。化学シフトは、内部標準であるテトラメチルシラン (Me<sub>4</sub>Si) に対する相対値 (ppm) として表される。イオン交換クロマトグラフは、クロマトグラフシステム (ECONO system、Bio-Rad社製) を用いて実施した。前記イオン交換クロマトグラフでは、diethylaminoethyl (DEAE) A-25-Sephadex (Amershambiosciences社製) を充填したガラスカラム (25 × 500 mm) を使用した。

【0103】

(合成例1) NH1の合成

【化11】



スキーム5

【0104】

Ethylenediamine (7 mL、105 mmol、1 eq.) を溶かしたCHCl<sub>3</sub> (120 mL) に、tert-butyl dicarbonate (5 g、22.9 mmol、0.2 eq.) を溶かしたCHCl<sub>3</sub> (20 mL) を、撹拌しながら滴下した。前記滴下から24時間後、吸引ろ過し、ろ液を減圧留去し、NH1を得た。NH1の物性値を以下に示す。

収量：3.573 g 収率：97.4%

ESI-MS (positive ion mode) m/z, found= 161.4, calculated for [(M+H)+] = 161.1

<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 3.13 (2H, q) 2.76 (2H, t) 1.41 (9H, s)

【0105】

(合成例2) NG1の合成

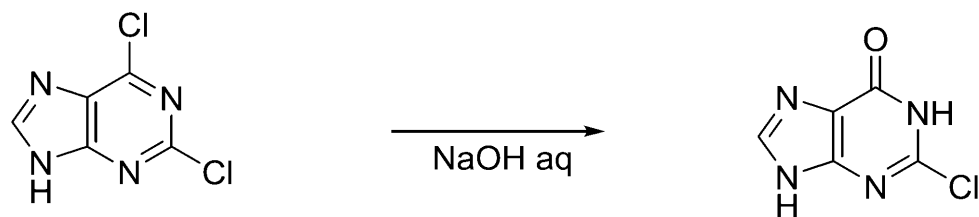
10

20

30

40

## 【化 1 2】

**2,6-Dichloropurine**

Exact Mass: 187.97  
Molecular Weight: 189.00

**NG1**

Exact Mass: 170.00  
Molecular Weight: 170.56

10

## スキーム 6

## 【 0 1 0 6】

2,6-Dichloropurine (1000 mg、 $5.29 \times 10^{-3}$  mol、1.0 eq.) を Ar (アルゴン) 置換し、水酸化ナトリウム水溶液 (10.6 mL、 $2.12 \times 10^{-2}$  mol、2 N) に溶かした後、90 で還流させ、反応を行った。前記反応後、室温に戻し、吸引ろ過した。得られたろ物を回収し、最小量の水に溶かし、pH を 3 ~ 4 に調製し、析出したろ物を吸引ろ過で回収することで、NG1 を得た。NG1 の物性値を以下に示す。

20

収量 : 720 mg 収率 : 79 %

ESI-MS (positive ion mode) m/z, found = 171.0, calculated for [(M+H)+] = 171.0

found = 193.1, calculated for [(M+Na)+] = 193.0

found = 209.1, calculated for [(M+K)+] = 209.0

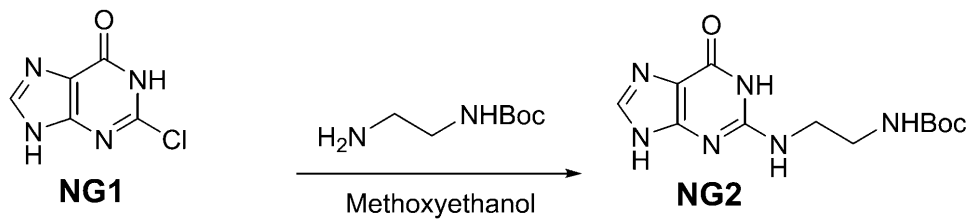
ESI-MS (negative ion mode) m/z, found = 169.0, calculated for [(M-H)-] = 518.0

<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 8.29 (1H, s)

## 【 0 1 0 7】

(合成例 3) NG2 の合成

## 【化 1 3】



Exact Mass: 170.00  
Molecular Weight: 170.56

Exact Mass: 294.14  
Molecular Weight: 294.32

30

## スキーム 7

## 【 0 1 0 8】

NG1 (870 mg、 $5.10 \times 10^{-3}$  mol) および NH1 (3.281 g、 $2.05 \times 10^{-2}$  mol、4 eq.) を、それぞれ真空乾燥させた後、Ar 置換した。NG1 を Methoxyethanol (5 mL) で懸濁させ、NH1 を Methoxyethanol (1 mL) に溶解させた。得られた NH1 の溶液を NG1 の入っているナスフラスコへ移し、130 で還流させ、反応を行った。前記反応後、室温に戻し、減圧留去した。さらに、クロロホルムで再沈後、吸引ろ過し、ろ物を回収することで、NG2 を得た。NG2 の物性値を以下に示す。

40

収量 : 1.117 mg 収率 : 74 %

ESI-MS (positive ion mode) m/z, found = 171.0, calculated for [(M+H)+] = 171.0,

found = 193.1, calculated for [(M+Na)+] = 193.0,

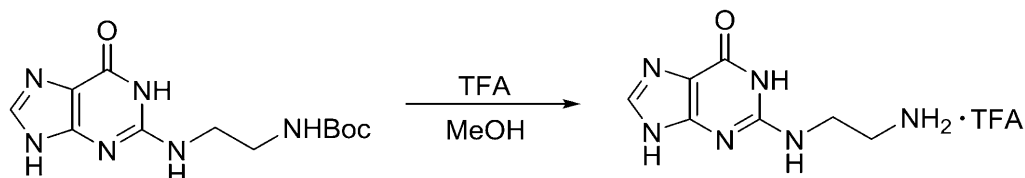
50

found = 209.1, calculated for [(M+K)+] = 209.0,  
ESI-MS (negative ion mode) m/z, found = 169.0, calculated for [(M-H)-] = 518.0  
1HNMR (400 MHz, CD3OD) 7.73 (1H, s), 3.45 (2H, m), 3.30 (2H, s), 1.39 (9H, s)

【0109】

(合成例4) NG3の合成

【化14】



**NG2**

Exact Mass: 294.14  
Molecular Weight: 294.32

**NG3**

Exact Mass: 194.09  
Molecular Weight: 194.20

10

### スキーム8

【0110】

NG2 (500 mg、 $1.70 \times 10^{-3}$  mol)を、メタノール(3 mL)で懸濁し、Tri fluoroacetate (15 mL)を加え、室温で攪拌し、反応を行った。前記反応後、減圧留去し、Etherで懸濁させた後、吸引ろ過し、ろ物を回収することで、NG3を得た。NG3の物性値を以下に示す。

20

収量: 467 mg 収率: 89.1%

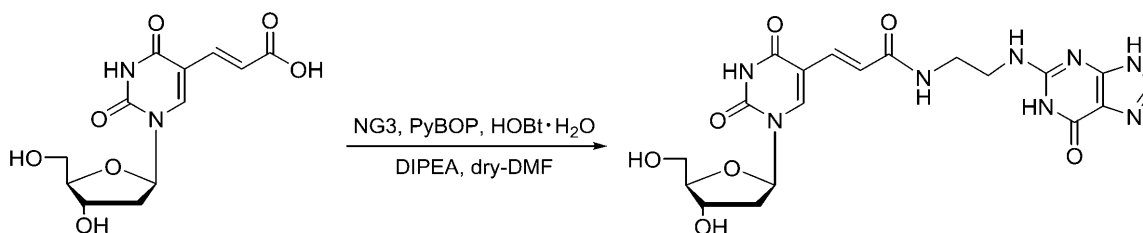
ESI-MS (positive ion mode) m/z, found = 195.1, calculated for [(M+H)+] = 195.1,  
found = 217.2, calculated for [(M+Na)+] = 217.1,  
found = 233.0, calculated for [(M+K)+] = 233.1

1HNMR (400 MHz, D2O) 7.83 (1H, s), 3.55 (2H, t), 3.11 (2H, t)

【0111】

(合成例5) NG4の合成

【化15】



**(E)-5-(2-Carboxyrynyl)-  
2'-deoxyuridine**

Exact Mass: 298.08  
Molecular Weight: 298.25

**NG4**

Exact Mass: 474.16  
Molecular Weight: 474.43

30

40

### スキーム9

【0112】

ナスフラスコAに、(E)-5-(2-Carboxyrynyl)-2'-deoxyuridine (101 mg、 $3.39 \times 10^{-4}$  mol)と攪拌子とを入れた。また、ナスフラスコBに、NG3 (171 mg、 $4.12 \times 10^{-4}$  mol、1.2 eq.)と攪拌子とを入れた。そして、ナスフラスコAおよびBについて、それぞれ、真空乾燥させた。つぎに、ナスフラスコAをAr置換し、HOBT·H<sub>2</sub>O (68 mg、 $4.44 \times 10^{-4}$  mol、1.3 eq.)およびPyBOP (登録商標) (ヘキサフルオロリン酸(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノホスホニウム、229 mg、 $4.40 \times 10$

50

$10^{-4}$  mol、 $1.3$  eq.)を加え、dry-DMF (N,N-ジメチルホルムアミド、 $1$  mL)で溶解した。さらに、ナスフラスコBをAr置換し、DRY-dmf ( $0.5$  mL)で溶かした。ナスフラスコAおよびBに、DIPEA (N,N-ジイソプロピルエチルアミン、ナスフラスコA： $0.79$  mL、 $4.51 \times 10^{-3}$  mol、 $13.3$  eq.、ナスフラスコB： $0.79$  mL、 $4.51 \times 10^{-3}$  mol、 $6.7$  eq.)をそれぞれ加えた後、ナスフラスコBの中身をナスフラスコAに素早く加え、室温で攪拌し、反応を行った。前記反応後、減圧留去し、 $CDCl_3$  (重水素化クロロホルム)で懸濁した。さらに、得られた懸濁液をソニケーションし、ろ過した。得られたる物を回収後、MeOHで懸濁し、さらに、ソニケーション後、ろ過した。得られたる物を回収することで、NG4を得た。NG4の物性値を以下に示す。

10

収量： $147$  mg 収率： $91\%$

ESI-MS (positive ion mode) m/z, found =  $475.1$ , calculated for [(M+H)+] =  $475.2$ , found =  $497.2$ , calculated for [(M+Na)+] =  $497.2$ ,

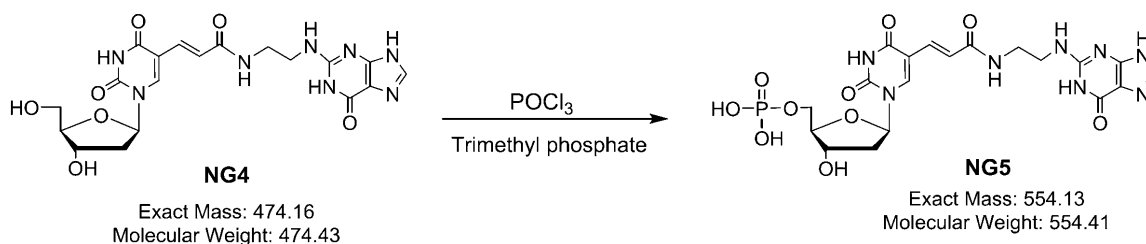
ESI-MS (negative ion mode) m/z, found =  $473.1$ , calculated for [(M-H)-] =  $473.2$   
 $^1H$ NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $8.27$  (1H, s),  $8.20$  (1H, s),  $7.10$  (1H, s),  $7.05$  (1H, s),  $6.13$  (1H, t),  $5.25$  (1H, d),  $5.16$  (1H, m),  $4.09$  (1H, m),  $3.79$  (1H, m),  $3.60$  (2H, m),  $3.16$  (2H, d),  $2.14$  (2H, m)

【0113】

(合成例6) NG5の合成

【化16】

20



スキーム10

【0114】

NG4 ( $101$  mg、 $2.13 \times 10^{-4}$  mol)を真空乾燥後、Ar下、dry-Pyridine ( $30$  mL)で2回共沸した。つぎに、dry-Trimethyl phosphate ( $21$  mL)で懸濁後、氷浴下でPhosphoryl chloride ( $400$   $\mu$ L、 $4.29 \times 10^{-3}$  mol、 $20$  eq.)を加え、 $2.5$ 時間攪拌した。前記攪拌後、Phosphoryl chloride ( $200$   $\mu$ L、 $2.15 \times 10^{-3}$  mol、 $10$  eq.)を追加し、 $8.5$ 時間攪拌した。その後、冷水 $10$  mLを加えクエンチし、 $10$ 分間攪拌した。TEA (トリエチルアミン、 $2.7$  mL、 $1.94 \times 10^{-2}$  mol、 $90$  eq.)を加え、 $15$ 分程攪拌した。そして、減圧留去後、EtherおよびMeCN (アセトニトリル)で結晶化させ、ろ過することにより、黄色沈殿物を回収した。得られた黄色沈殿物を水に溶かし、陰イオン交換カラムクロマトグラフにより精製し、凍結乾燥させることでNG5を得た。NG5の物性値を以下に示す。

30

収量： $41.49$   $\mu$ mol 収率： $19.5\%$

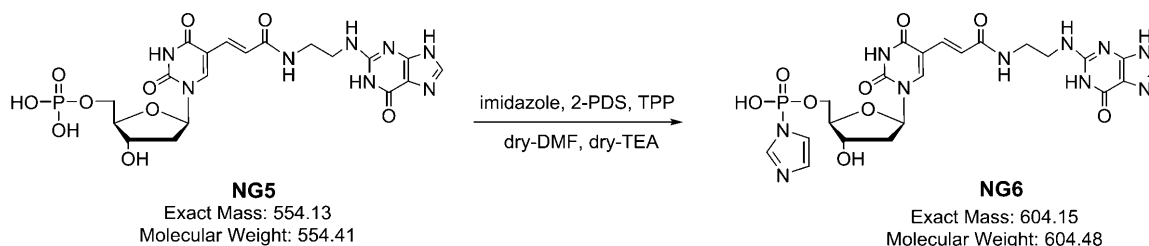
ESI-MS (negative ion mode) m/z, found =  $553.1$ , calculated for [(M-H)-] =  $553.1$

40

【0115】

(合成例7) NG6の合成

## 【化17】



スキーム11

10

## 【0116】

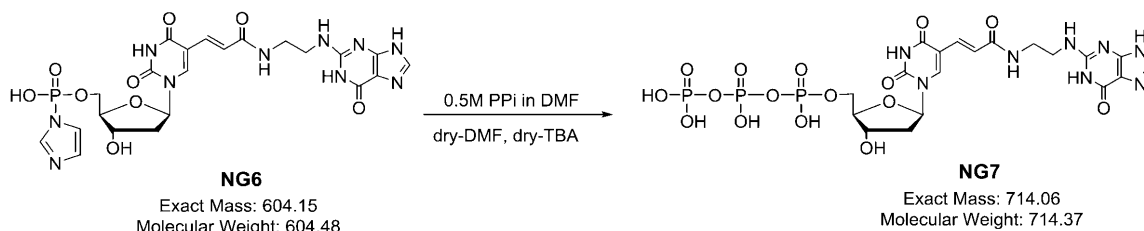
NG5 (78.65  $\mu\text{mol}$ ) を真空乾燥後、dry-Pyridine (5 mL) で3回共沸し、さらに一晩真空乾燥させた。前記乾燥後、これをArで置換し、dry-DMF (2 mL) およびdry-TEA (72  $\mu\text{L}$ 、 $5.19 \times 10^{-4}$  mol、4 eq.) で溶かし、さらに、Imidazole (24 mg、 $3.53 \times 10^{-4}$  mol、4 eq.)、2,2'-Dithiodipyridine (29 mg、 $1.32 \times 10^{-4}$  mol、1.6 eq.)、およびTriphenylphosphine (36 mg、 $1.37 \times 10^{-4}$  mol、1.6 eq.) を加えて室温で撹拌した。前記撹拌開始後8時間において、反応液を、Sodium perchlorate (97 mg、 $7.92 \times 10^{-4}$  mol、10 eq.) をdry-Acetone (18 mL)、dry-Ether (27 mL)、およびdry-TEA (2 mL) で溶かした溶液に入れ、4で30分静置した。前記静置後、沈殿物をdry-Ether (12 mL) で5回デカンテーションした。デカンテーション後の沈殿物を真空乾燥させ、NG6をクルードとして得た。理論収量：78.65  $\mu\text{mol}$

20

## 【0117】

(合成例8) NG7の合成

## 【化18】



30

スキーム12

## 【0118】

真空乾燥させたNG6 (78.65  $\mu\text{mol}$ ) を、Arで置換し、dry-Pyridine (5 mL) で2回共沸した後、dry-DMF (1 mL) で懸濁した。つぎに、得られた懸濁液に、dry-n-Tributylamine (75  $\mu\text{L}$ 、 $3.15 \times 10^{-4}$  mol、4 eq.) および0.5 mol/L n-Tributylamine pyrophosphate in DMF (0.8 mL、 $3.93 \times 10^{-4}$  mol、5 eq.) を加え、室温で撹拌した。前記撹拌開始後9時間において、1 mol/L TEAB (Triethylammonium bicarbonate) buffer (5 mL) を加えた後、30分撹拌し、減圧留去した。これに水を加え、Etherで2回分液後、水層を陰イオン交換カラムクロマトグラフおよび逆相カラムクロマトグラフを用いて精製し、凍結乾燥することで、NG7を得た。NG7の物性値を以下に示す。

40

収量：19.55  $\mu\text{mol}$  収率：24.9%

ESI-MS (negative ion mode) m/z, found = 712.9, calculated for [(M-H)-] = 713.1

## 【0119】

[実施例3]

50

本例では、配列番号 1 ~ 21 のアプタマーについて、s I g A に対する結合能および動態パラメータを、S P R により確認した。

【 0 1 2 0 】

( 1 ) アプタマー

下記ポリヌクレオチドを合成し、実施例のアプタマーとした。配列番号 1 ~ 4 のアプタマー（以下、「M K 4 アプタマー」ともいう）は、下記表 3 において下線で示すアデニンを含むヌクレオチド残基が、前記化学式（ 1 ）で示すヌクレオチド残基である。また、配列番号 8 ~ 12 および 16 ~ 21 のアプタマー（以下、「K S 9 アプタマー」ともいう）は、下記表 3 において下線で示すチミンを含むヌクレオチド残基が、前記化学式（ 2 ）で示すヌクレオチド残基であり、配列番号 5 ~ 7 および 13 ~ 15 のアプタマー（以下、「N G 7 アプタマー」ともいう）は、下記表 3 において下線で示すチミンを含むヌクレオチド残基が、前記化学式（ 3 ）で示すヌクレオチド残基である。

【 0 1 2 1 】

【表 3】

配列番号	修飾塩基	塩基配列
1	MK4	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCTACTACGATATCCAGATGGGAAGTGACCGTGAAACTACAATGGCGGGCTTATC-3'
2	MK4	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCAGATGATCGAGATGCGAAGCGACCGCATGAAACTACAATGGCGGGCTTATC-3'
3	MK4	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCAAGCCAGGAGTCCGAGGTGACCATTAAGCAGGAAACTACAATGGCGGGCTTATC-3'
4	MK4	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCGATCTGATGGTCTCGGGTATGGCTAGATAGAAACTACAATGGCGGGCTTATC-3'
5	NG7	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCGICGATGIIIGIATIIICAAAIAGCCGCAGAAACIACAATGGCGGGCTTATC-3'
6	NG7	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCTAAATAGATTTACAGTGGATCCCTTCAGAGGAAACTACAATGGCGGGCTTATC-3'
7	NG7	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCAGACAAIATAGAGIGIACCACCIIGIAGIAGAAACIACAATGGCGGGCTTATC-3'
8	KS9	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCGIATACAAGCAGATGTTCACIIIGGGGAGAAACIACAATGGCGGGCTTATC-3'
9	KS9	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCAAAGATAGCTAAGATAGATAGTIIIGGCTTGAACIACAATGGCGGGCTTATC-3'
10	KS9	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCACCIGIACIIGGIATIIAGCCIGCCAACAIGAAACIACAATGGCGGGCTTATC-3'
11	KS9	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCTIIATACGATGGACIIAGGCTIIIGTIIATAGAAACIACAATGGCGGGCTTATC-3'
12	KS9	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCTCAICIGIITIIATCAAIIGIAGCAAGTIIAGAAACIACAATGGCGGGCTTATC-3'
13	NG7	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCGCIGAIIGIIGIATIIICAAAIAGCCGCAG-3'
14	NG7	5'-GCAATCTCCCTAAATCGIAGIIGIATIIICAAAIAGCCGCAG-3'
15	NG7	5'-GCAATCTCCCTAAATCGIAGIIGIATIIICAAAIAGC-3'
16	KS9	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCGIATACAAGCAGATGTTCACIIIGGGAG-3'
17	KS9	5'-GCAATCTCCCTAAATCGIATACAAGCAGATGTTCACIIIGGGAG-3'
18	KS9	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCAAAGATAGCTAAGATAGATAGTIIIGGCTTG-3'
19	KS9	5'-GCAATCTCCCTAAATCAAAGATAGCTAAGATAGATAGTIIIGGCTTG-3'
20	KS9	5'-GGTTTGGACGCAATCTCCCTAAATCTIIATACGATGGACIIAGGCTIIIGTIIATAGAAAC-3'
21	KS9	5'-GCAATCTCCCTAAATCTIIATACGATGGACIIAGGCTIIIGTIIATAGAAAC-3'

10

20

30

40

【0122】

前記MK4アプタマーは、その3'末端に、20塩基長のポリデオキシチミン（ポリ d

50

T) を付加し、ポリ d T 付加アプタマーとして、後述する S P R に使用した。前記 K S 9 アプタマーおよび前記 N G 7 アプタマーは、その 3' 末端に、20 塩基長のポリデオキシアデニン (ポリ d A) を付加し、ポリ d A 付加アプタマーとして、後述する S P R に使用した。

【0123】

(2) 試料

市販のヒト s I g A (IgA (Secretory), Human, MP Biomedicals, LLC-Cappel Products 社製、カタログ番号: #55905) を、試料として、以下の試験に使用した。

【0124】

(3) S P R による結合能の解析

結合能の解析には、ProteON XPR36 (BioRad社) を、その使用説明書にしたがって使用した。

【0125】

まず、前記 ProteON 専用のセンサーチップとして、ストレプトアビジンが固定化されたチップ (商品名 ProteON NLC Sensor Chip, BioRad社) を、前記 ProteON XPR36 にセットした。前記センサーチップのフローセルに、超純水 (DDW) を用いて、5  $\mu$ mol/L のビオチン化ポリ d A をインジェクションし、シグナル強度 (RU: Resonance Unit) が約 900 RU になるまで結合させた。前記ビオチン化ポリ d A は、20 塩基長のデオキシアデノシンの 5' 末端をビオチン化して調製した。そして、前記チップの前記フローセルに、S P R バッファーを用いて、200 nmol/L の前記ポリ d T を付加した M K 4 アプタマーを、流速 25  $\mu$ L/min で 80 秒間インジェクションし、シグナル強度が約 800 RU になるまで結合させた。この結果を、アプタマーのセンサーチップへの固層化量を示すシグナルとして、アプタマー固層化測定値 (A) という。続いて、前記試料を、S P R バッファーを用いて、流速 50  $\mu$ L/min で 120 秒間インジェクションし、引き続き、同じ条件で、S P R バッファーを流して洗浄を 300 秒間行った。前記試料における前記ヒト s I g A 濃度は、400 nmol/L とした。前記試料のインジェクションおよび前記 S P R バッファーによる洗浄に並行して、シグナル強度の測定を行った。インジェクション開始を 0 秒として、115 ~ 125 秒の間におけるシグナル強度の平均値を求め、これを、前記アプタマーとタンパク質との結合量を示すシグナルとして、タンパク質結合測定値 (B) という。そして、タンパク質結合測定値 (B) をアプタマー固層化測定値 (A) で割った値 (B/A) を、相対値 (Relative Unit) として求めた。また、前記 K S 9 アプタマーおよび前記 N G 7 アプタマーは、前記ビオチン化ポリ d A に代えて、20 塩基長のデオキシチミジンの 5' 末端をビオチン化して調製したビオチン化ポリ d T を、前記 M K 4 アプタマーに代えて、前記 K S 9 アプタマーまたは前記 N G 7 アプタマーを用いた以外は、同様にして測定した。さらに、比較例 3-1 は、前記 M K 4 アプタマーに代えて、s I g A に結合性を示さないネガティブコントロールの核酸分子 (配列番号 22) を用い、比較例 3-2 は、ヒト s I g A に代えて B S A (Bovine Serum Albumin, SIGMA 社製、カタログ番号: #A7906) を含む試料を用いた以外は同様にして、シグナル強度の測定を行った。

【0126】

ネガティブコントロールの核酸分子 (N30-0 pool)

5' -GGTAACGCCAGCTCTAGGTCATTTG-(N)<sub>30</sub>-GTTACGGGAGCCTGCACTTAATG-3' (配列番号 22)

【0127】

前記 S P R バッファーの組成は、40 mmol/L H E P E S、125 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl、1 mmol/L MgCl<sub>2</sub> および 0.01% Tween (登録商標) 20 とし、pH は、7.4 とした。

【0128】

各アプタマーと s I g A との結合の結果を図 1 A ~ F に示す。図 1 A ~ F は、各アプタマーの s I g A に対する結合能を示すグラフである。図 1 において、横軸は、試料をインジェクション後の経過時間を示し、縦軸は、結合力の相対値 (RU) を示す。図 1 A ~ F

に示すように、いずれのアプタマーも、s I g A に結合した。

【 0 1 2 9 】

つぎに、タンパク質結合測定値 ( B ) をアプタマー固層化測定値 ( A ) で割った値 ( B / A ) を、相対値 ( Relative Unit ) の結果を図 2 A ~ D に示す。図 2 A ~ D は、各アプタマーの s I g A への結合量の相対値 ( Relative Unit ) を示すグラフである。図 2 において、横軸は、アプタマーの種類を示し、縦軸は、相対値を示す。図 2 A ~ D に示すように、B S A を用いた比較例 3 - 2 では結合が確認できなかった。また、ネガティブコントロールの核酸分子を用いた比較例 3 - 1 では、s I g A への結合が確認されなかった。これに対し、いずれのアプタマーも、s I g A に結合した。中でも、配列番号 1 5 および配列番号 2 1 の核酸分子が、極めて高い結合性を示した。

10

【 0 1 3 0 】

( 4 ) 解離定数の測定

前記試料中の s I g A の濃度を、1 2 . 5、2 5、5 0、1 0 0、または 2 0 0 n m o l / L とした以外は、前記 ( 3 ) と同様にして、結合量の相対値 ( R U ) を測定した。そして、前記結合量の相対値に基づき、前記 s I g A 結合核酸分子と前記 s I g A との解離定数を算出した。この結果を下記表 4 に示す。下記表 4 に示すように、いずれのアプタマーも解離定数が 3 7 . 7 n M 以下であり、特に、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 9、配列番号 1 1、配列番号 1 5、配列番号 1 9、および配列番号 2 1 の核酸分子は、解離定数が、8 n M 以下であり、極めて優れた s I g A との結合能を有することがわかった。

20

【 0 1 3 1 】

【表 4】

配列番号	解離定数(Kd (nM))
1	8.6
2	7.6
3	7.6
4	17.4
5	11.8
6	11.6
7	37.7
8	10
9	4.8
10	30.2
11	1.3
12	9
14	10
15	2.59
17	12.9
19	8
21	2.1

30

【 0 1 3 2 】

40

( 5 ) 公差性の確認

配列番号 3、5 および 9 のアプタマーを用い、試料として、4 0 0 n m o l / L となるように s I g A、ヒト I g G - F c ( 比較例 3 - 3、BETHYL 社製、カタログ番号 : P-80-104 )、未標識ヒト I g G ( 比較例 3 - 4、BECKMAN COULTER 社製、カタログ番号 : 731696 )、未標識ヒト I g G - F c ( 比較例 3 - 5、BECKMAN COULTER 社製、カタログ番号 : 731703 ) またはヒト I g G 1 ( 比較例 3 - 6、Southern Biotech 社製、カタログ番号 : 0151K-01 ) を含む試料を用いた以外は、前記 ( 3 ) と同様にして、結合量の相対値を求めた。

【 0 1 3 3 】

この結果を図 3 に示す。図 3 は、結合量の相対値を示すグラフである。図 3 において、

50

横軸は、試料の種類を示し、縦軸は、結合量の相対値 (RU) を示す。図 3 に示すように、いずれのアプタマーも、s I g A 以外の免疫グロブリンには結合しなかった。これらのことから、本発明の核酸分子が、s I g A 特異的であることがわかった。

【0134】

[実施例 4]

本例では、配列番号 5、9 および 11 のアプタマーについて、s I g A に対する結合能を、磁気ビーズによるプルダウンにより確認した。

【0135】

(1) アプタマー結合ビーズ

磁気ビーズの表面にストレプトアビジン (SA) が結合した SA ビーズ (Invitrogen 社製、商品名: MyOne-SA C1) に、前記配列番号 5、9 または 11 のアプタマーを結合させ、アプタマー結合ビーズを作製した。具体的には、まず、前記アプタマーに 100% 相補的な相補鎖を調製した。他方、前記アプタマーの 5' 領域の配列 (配列番号 23、5' -GGATACCTTAACGCCGCTATTG-3') を準備し、その 5' 末端をピオチン化して、ピオチン化プライマーを調製した。そして、前記相補鎖を鋳型として、前記ピオチン化プライマーを用い、PCR による増幅を行い、5' 末端がピオチン化された前記アプタマーを合成した。前記合成された前記アプタマーと前記相補鎖とからなる二本鎖に対して、前記 SA ビーズを反応させ、前記二本鎖におけるピオチンと前記 SA ビーズのアビジンとを結合させた。つぎに、前記二本鎖と SA ビーズとが結合した複合体を、NaOH でアルカリ処理し、前記二本鎖の解離を行うことによって、前記相補鎖を除去した。これによって、前記 SA ビーズに、ピオチン-アビジン結合により前記ピオチン化アプタマーが結合した、前記アプタマー結合ビーズを作製した。

10

20

【0136】

(2) 試料

5  $\mu$ g のヒト s I g A またはヒトの唾液を、試料として、以下の実験に使用した。

【0137】

(3) プルダウンアッセイ

前記アプタマー結合ビーズ (終濃度 10 mg/ml) と前記試料 (s I g A : 終濃度 50  $\mu$ g/ml、唾液 : 終濃度 90%) とを、SB1T 緩衝液 (40 mmol/L HEPES、125 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl、1 mmol/L MgCl<sub>2</sub> および 0.01% Tween (登録商標) 20、pH 7.4) 中で混合し、この反応液を、室温で 30 分間反応させた。前記反応液を遠心して前記ビーズを回収し、前記 SB1T 緩衝液で 3 回遠心洗浄した。前記アプタマーが s I g A に結合する場合、前記ビーズには、前記アプタマーを介して s I g A が結合していることになる。そこで、前記ビーズを SDS バッファー緩衝液に混合し、95 で 10 分間、加熱処理することによって、前記ビーズから s I g A を遊離させた。そして、加熱処理後の前記 SDS 緩衝液から、前記ビーズを除去して、PAGE (C520L、アトー社) を用いて SDS-PAGE に供した。泳動用のバッファーは、前記 SDS バッファーを使用した。前記 SDS バッファーの組成は、25 mmol/L Tris、192 mmol/L グリシン、0.1% SDS とした。

30

40

【0138】

つぎに、SDS-PAGE 後のゲルについて、Gel Code Blue Stain Reagent (Thermo Scientific 社) を用いて染色を行った。なお、分子量マーカーとして、Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen 社) を使用した。また、コントロール 1 として、前記アプタマー結合ビーズに代えて、前記ピオチン化プライマーを結合させた前記 SA ビーズを使用した以外は、同様にして、SDS-PAGE と検出とを行った。また、コントロール 2 として、前記ヒト s I g A について、SDS-PAGE と検出とを行った。

【0139】

これらの結果を図 4 に示す。図 4 (A) および (B) は、前記アプタマー結合ビーズか

50

ら遊離させたタンパク質の SDS - PAGE の結果を示す写真である。図 4 ( A ) は、s I g A を含む試料を用いた結果を示し、( B ) は、唾液を用いた結果を示す。図 4 ( A ) および ( B ) において、写真の左側が、分子量を示し、レーン M は、分子量マーカー ( M )、レーン 1 は、配列番号 5 のアプタマーを結合させた前記アプタマー結合ビーズを用いた結果、レーン 2 は、配列番号 9 のアプタマーを結合させた前記アプタマー結合ビーズを用いた結果、レーン 3 は、配列番号 11 のアプタマーを結合させた前記アプタマー結合ビーズを用いた結果、レーン C 1 は、前記プライマーを結合させた前記 S A ビーズを用いた結果、レーン I g A は、ヒト s I g A の結果である。

【 0 1 4 0 】

図 4 ( A ) および ( B ) に示すように、前記アプタマー結合ビーズを用いたレーン 1 ~ 3 は、s I g A を示すレーン I g A と同じ部位にバンドが確認された ( 図において矢印で示すバンド )。他方、前記プライマー結合ビーズを用いた場合、s I g A と同じ部位にバンドは確認できなかった。

10

【 0 1 4 1 】

これらの結果から、本発明のアプタマーは、前記ヒト s I g A に対して、結合性を示すことがわかった。

【 0 1 4 2 】

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

20

【 0 1 4 3 】

この出願は、2016年9月15日に提出された日本出願特願 2016 - 180892 を基礎とする優先権を主張し、その開示のすべてをここに取り込む。

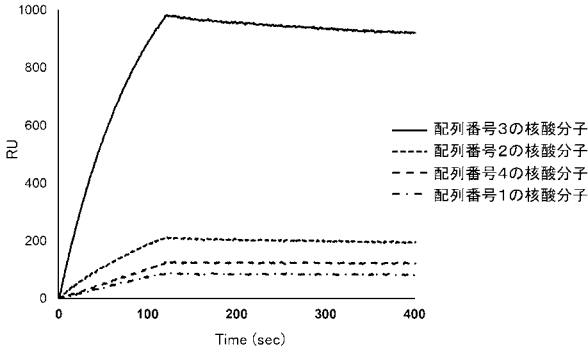
【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 4 4 】

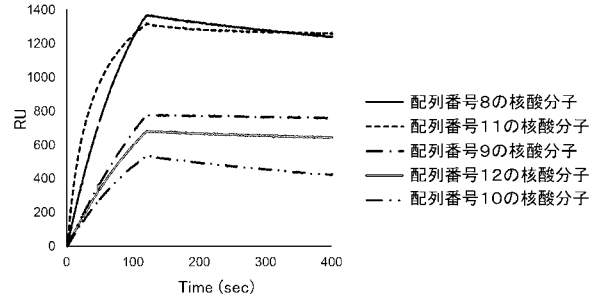
本発明の s I g A 結合核酸分子は、s I g A に対して前述のような解離定数で結合することができる。このため、本発明の s I g A 結合核酸分子によれば、例えば、試料中の s I g A との結合の有無によって、優れた精度で、s I g A を検出できる。したがって、本発明の s I g A 結合核酸分子は、例えば、予防医学、健康管理、感染症等の診断、およびストレスの診断等の分野における s I g A の検出に、極めて有用なツールといえる。

30

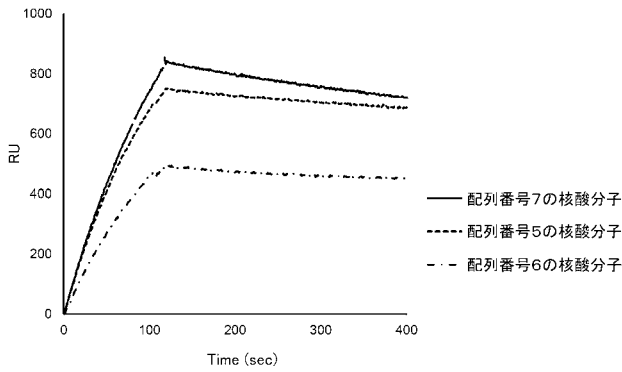
【図 1 A】



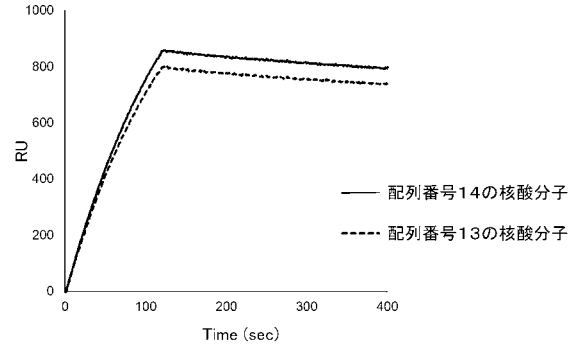
【図 1 C】



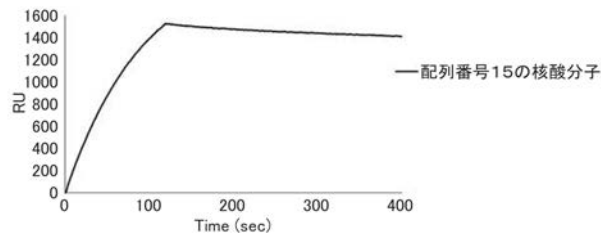
【図 1 B】



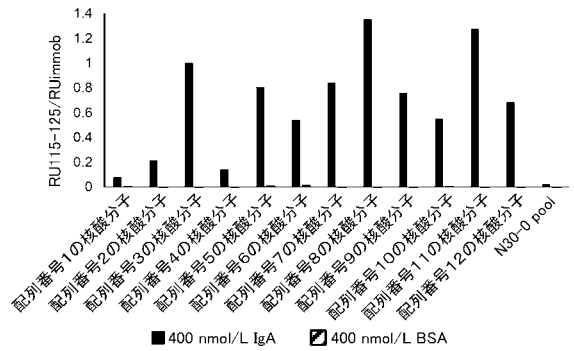
【図 1 D】



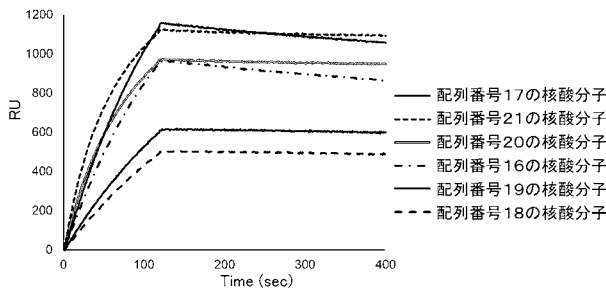
【図 1 E】



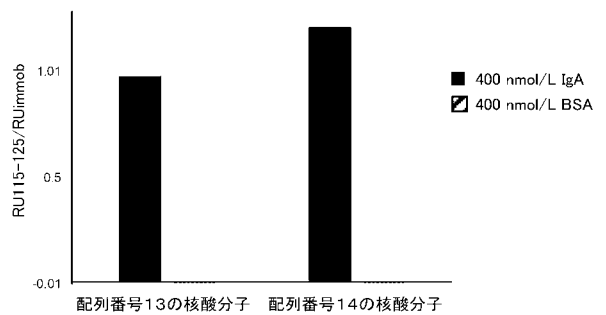
【図 2 A】



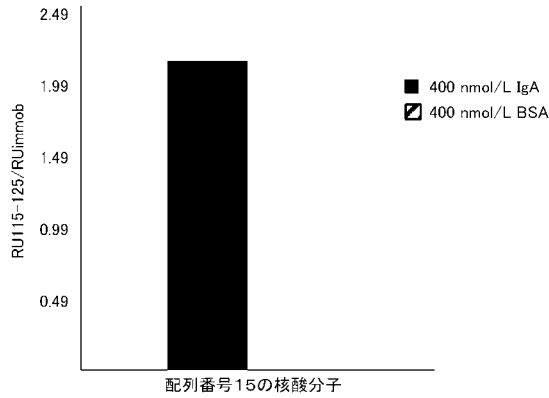
【図 1 F】



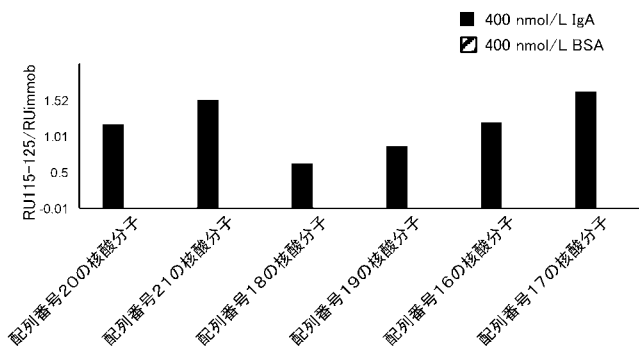
【図 2 B】



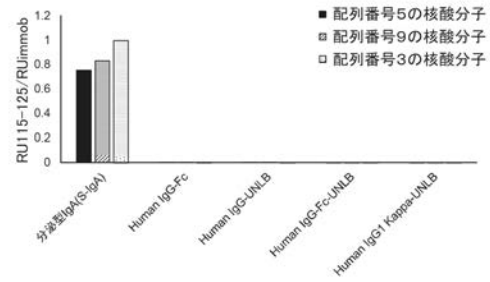
【図 2 C】



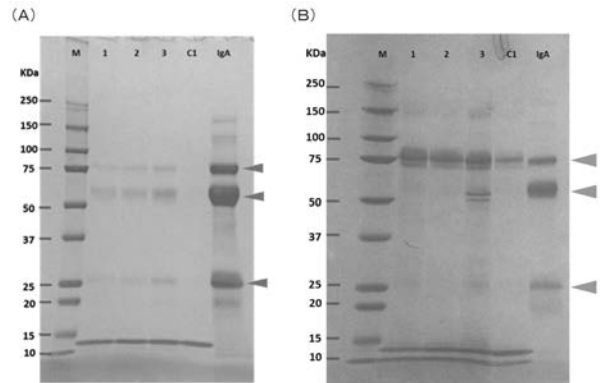
【図 2 D】



【図 3】



【図 4】



## 【配列表】

2018051569000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成31年3月13日(2019.3.13)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

分泌型免疫グロブリンA (sIgA) に対する解離定数が、 $37.7 \text{ nM}$ 以下の核酸分子であることを特徴とする、sIgA結合核酸分子。

## 【請求項2】

前記核酸分子が、下記(a)または(c)のポリヌクレオチドを含む、請求項1記載のsIgA結合核酸分子。

(a) 配列番号1~12のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド

(c) 前記(a)のいずれかの塩基配列に対して、90%以上の同一性を有する塩基配列からなり、前記sIgAに結合するポリヌクレオチド

## 【請求項3】

前記核酸分子が、下記(a)または(c)のポリヌクレオチドを含む、請求項1記載のsIgA結合核酸分子。

(a) 下記(a1)、(a2)、(a3)、または(a4)のポリヌクレオチド

(a1) 配列番号13、14、または15の塩基配列からなるポリヌクレオチド

(a2) 配列番号16または17の塩基配列からなるポリヌクレオチド

( a 3 ) 配列番号 1 8 または 1 9 の塩基配列からなるポリヌクレオチド

( a 4 ) 配列番号 2 0 または 2 1 の塩基配列からなるポリヌクレオチド

( c ) 前記 ( a ) のいずれかの塩基配列に対して、95%以上の同一性を有する塩基配列  
からなり、前記 s I g A に結合するポリヌクレオチド

【請求項 4】

前記結合核酸分子が、塩基が修飾基で修飾された修飾塩基を含む、請求項 2 または 3 記載の s I g A 結合核酸分子。

【請求項 5】

前記修飾塩基が、プリン塩基が修飾基で修飾された修飾プリン塩基である、請求項 4 記載の s I g A 結合核酸分子。

【請求項 6】

前記修飾基が、アデニン残基である、請求項 5 記載の s I g A 結合核酸分子。

【請求項 7】

前記修飾塩基が、チミン塩基が修飾基で修飾された修飾チミンである、請求項 4 記載の s I g A 結合核酸分子。

【請求項 8】

前記修飾基が、アデニン残基またはグアニン残基である、請求項 7 記載の s I g A 結合核酸分子。

【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の分泌型免疫グロブリン A ( s I g A ) 結合核酸分子を含むことを特徴とする、s I g A 分析用センサ。

【請求項 10】

試料と核酸分子とを接触させ、前記試料中の分泌型免疫グロブリン A ( s I g A ) を検出する工程を含み、

前記核酸分子が、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の s I g A 結合核酸分子であり、前記検出工程において、前記試料中の s I g A と前記核酸分子とを結合させて、前記結合により、前記試料中の s I g A を検出することを特徴とする、s I g A の分析方法。

## 【国際調査報告】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2017/015934
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N15/115(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/115, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/53  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	CN 105738633 A (YANG, L.), 06 July 2016 (06.07.2016), claims; example 5; paragraphs [0012], [0038]; SIGA ap-1 to SIGA ap-15 & CN 106636109 A & CN 106636110 A & CN 106636111 A & CN 106636112 A & CN 106636113 A & CN 106636114 A & CN 106701769 A & CN 106701770 A & CN 106701771 A & CN 106701772 A & CN 106701773 A & CN 106754939 A	1-3, 9-11 1-12
Y A	IMAIZUMI, Y. et al., Efficacy of Base- Modification on Target Binding of Small Molecule DNA Aptamers, Journal of the American Chemical Society, 2013, Vol.135, No.25, pp. 9412-9419, Summary, fig. 1, page 9413, left column, lines 2 to 14	4-12 1-3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 July 2017 (10.07.17)		Date of mailing of the international search report 18 July 2017 (18.07.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/015934

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2016-056136 A (National University Corporation Gunma University), 21 April 2016 (21.04.2016), claims; fig. 2 to 5; paragraph [0021] (Family: none)	4-12 1-3
Y A	Masayasu KUWAHARA, "Kobunshi no Reprogramming Hi Tennen Bunshi o Donyu shita Kakusan Aptamer no Seisei", Kobunshi, 2014, vol.63, no.10, pages 730 to 731, page 731, left column, 2nd paragraph	4-12 1-3
Y A	WO 2015/064223 A1 (National University Corporation Gunma University), 07 May 2015 (07.05.2015), claims 1, 10, 11; paragraphs [0001], [0006] & US 2016/0311845 A1 claims 1, 10, 11; paragraphs [0001], [0009]	4-12 1-3
Y A	Tokiko ISOWA, "Relationship between Job Stressor, Burnout and Physical Health Problem in Nurses: A Study Using Questionnaire and Immunological Parameter", The Japanese Society of Behavioral Medicine, 2003, 10 (1), pages 25 to 33, abstract, page 26, paragraph extending from left column to right column, page 27, right column, '3. S-IgA no Sokutei'	12 1-11
A	JP 2013-040118 A (National University Corporation Gunma University), 28 February 2013 (28.02.2013), claims (Family: none)	1-12
A	Masayasu KUWAHARA et al., "Modified nucleic acid aptamer selections using capillary electrophoresis", Electrophoresis Letters, 2015, 59 (2), pages 88 to 90, fig. 2, 3	1-12
A	Naoto HONDA et al., "Capillary Denki Eido Selection-ho ni yoru Kekkan Naihi Saibo Zoshoku Inshi Ketsugosei Enki Shushoku DNA Aptamer no Selection", 95th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan in Spring (2015) Koen Yokoshu III, 11 March 2015 (11.03.2015), page 877, 2 J5-02	1-12

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 5 9 3 4									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/115(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/115, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2017年										
日本国実用新案登録公報	1996-2017年										
日本国登録実用新案公報	1994-2017年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	CN 105738633 A (YANG, L.) 2016.07.06, 請求の範囲、実施例5、[0012]、[0038]、SIgA ap-1~SIgA ap-15 & CN 106636109 A & CN 106636110 A & CN 106636111 A & CN 106636112 A & CN 106636113 A & CN 106636114 A & CN 106701769 A & CN 106701770 A & CN 106701771 A & CN 106701772 A & CN 106701773 A & CN 106754939 A	1-3, 9-11 1-12									
☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 10.07.2017		国際調査報告の発送日 18.07.2017									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 吉田 知美 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3335								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 5 9 3 4
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	IMAIZUMI, Y. et al., Efficacy of Base-Modification on Target Binding of Small Molecule DNA Aptamers, Journal of the American Chemical Society, 2013, Vol. 135, No. 25, pp. 9412-9419, 要旨、図 1、9413 頁左欄 2-14 行	4-12 1-3
Y A	JP 2016-056136 A (国立大学法人群馬大学) 2016. 04. 21, 請求の範囲、図 2 ~ 図 5、[0021] (ファミリーなし)	4-12 1-3
Y A	桑原正靖, 高分子のリプログラミング 非天然分子を導入した核酸アプタマーの創製, 高分子, 2014, Vol. 63, No. 10, pp. 730-731, 731 頁左欄 2 段落目	4-12 1-3
Y A	WO 2015/064223 A1 (国立大学法人群馬大学) 2015. 05. 07, 請求項 1、10、11、[0001]、[0006] & US 2016/0311845 A1, 請求項 1、10、11、[0001]、[0009]	4-12 1-3
Y A	磯和 勲子, 看護師の職務ストレス、バーンアウトおよび身体的健康問題の関連: 質問紙および免疫指標からの検討, 行動医学研究, 2003, 10 (1), p. 25-33, 要約、26 頁左欄から右欄にわたる段落、27 頁右欄の「3. S-IgA の測定」	12 1-11
A	JP 2013-040118 A (国立大学法人群馬大学) 2013. 02. 28, 請求の範囲 (ファミリーなし)	1-12
A	桑原正靖, 外 3 名, キャピラリー電気泳動法を用いた修飾核酸アプタマーのセレクション, 電気泳動, 2015, 59 (2), pp. 88-90, 図 2、図 3	1-12
A	本田直渡, 外 3 名, キャピラリー電気泳動セレクション法による血管内皮細胞増殖因子結合性塩基修飾 DNA アプタマーのセレクション, 日本化学会第 95 春季年会 (2015) 講演予稿集 III, 2015. 03. 11, p. 877, 2 J5-02	1-12

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(出願人による申告)平成29年度、国立研究開発法人科学技術振興機構、研究成果展開事業研究成果最適プログラム シーズ育成タイプ「人工核酸によるバイオマーカー簡易検出センサの技術開発」に係る委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

- (72)発明者 堀井 克紀  
東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソリューションイノベータ株式会社内
- (72)発明者 秋富 穰  
東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソリューションイノベータ株式会社内
- (72)発明者 金子 直人  
東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソリューションイノベータ株式会社内
- (72)発明者 和賀 巖  
東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソリューションイノベータ株式会社内
- (72)発明者 桑原 正靖  
群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 国立大学法人群馬大学内

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB17 BB20 CC03 FA12  
4B063 QA01 QQ03 QQ17 QQ42 QQ79 QR32 QR48 QR72 QR82 QS15  
QS36 QX01

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	分泌型免疫球蛋白A ( sIgA ) 结合核酸分子 , 用于sIgA分析的传感器和分析sIgA的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2018051569A1</a>	公开(公告)日	2019-06-27
申请号	JP2018539512	申请日	2017-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	日本电气方案创新株式会社 国立大学法人群馬大学		
申请(专利权)人(译)	NEC软件有限公司 国立大学法人群馬大学		
[标]发明人	皆川宏貴 堀井克紀 秋富穰 金子直人 和賀巖 桑原正靖		
发明人	皆川 宏貴 堀井 克紀 秋富 穰 金子 直人 和賀 巖 ▲桑▼原 正靖		
IPC分类号	C12N15/115 C12Q1/68 C12M1/34 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12N2310/16 C12N2310/333 C12N2310/335 C12N15/09 C12N15/115 C12Q1/68 G01N33/53 C12N2310/336		
FI分类号	C12N15/115.ZNA.Z C12Q1/68 C12M1/34.Z G01N33/53.N G01N33/566		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB17 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QQ03 4B063/QQ17 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR82 4B063/QS15 4B063/QS36 4B063/QX01		
代理人(译)	TsujiMaru 一郎		
优先权	2016180892 2016-09-15 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供可用于sIgA检测的新分子。本发明的结合sIgA的核酸具有针对分泌型免疫球蛋白A ( sIgA ) 的解离常数，其特征在于它是具有37.7nM或更小的分子量的核酸分子。优选包括包含核苷酸或其部分序列的多核苷酸。根据本发明的核酸分子，可以检测唾液中的sIgA。

