(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) **公表特許公報**（Ａ）　(11)特許出願公表番号

特表2003－517295
(P2003－517295A)

(43)公表日 平成15年5月27日(2003.5.27)

(51)Int.Cl[7]	識別記号	ＦＩ	ﾃｰﾏｺｰﾄﾞ（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/09	ZNA	Ａ６１Ｋ 47/48	４Ｂ０２４
// Ａ６１Ｋ 38/00		Ａ６１Ｐ 25/00	４Ｃ０７６
47/48		31/00	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ 25/00		35/00	
31/00		35/04	

審査請求　未請求　予備審査請求（全194数）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001－513963(P2001－513963)

(86)(22)出願日　平成12年7月26日(2000.7.26)
(85)翻訳文提出日　平成14年1月29日(2002.1.29)
(86)国際出願番号　PCT/US00/20397
(87)国際公開番号　WO01/009156
(87)国際公開日　平成13年2月8日(2001.2.8)
(31)優先権主張番号　09/363,939
(32)優先日　平成11年7月29日(1999.7.29)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　ギリード・サイエンシズ・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国カリフォルニア州94404,フォスター・シティ,レークサイド・ドライブ　333
(72)発明者　パグラティス，ニコス
アメリカ合衆国コロラド州80301,ボールダー,ノース・オーチャード・クリーク・サークル　5813
(74)代理人　弁理士　社本　一夫　（外４名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　高アフィニティーＴＧＦβ核酸リガンドと阻害剤

(57)【要約】
ＴＧＦβ２に対する高アフィニティー核酸リガンドの同定及び製造の方法が記載される。本発明に含まれるのは、ＳＥＬＥＸ法により同定されるＴＧＦβ２に特異的なＲＮＡリガンドである。さらに含まれるのは、ＴＧＦβ２のその受容体との相互作用を阻害するＲＮＡリガンドである。

【特許請求の範囲】

【請求項１】　精製及び単離された、ＴＧＦβ２に対する非天然のＲＮＡリガンドであって、表５、表７、表８、表１１、表１３、表１４、表１６～表１９及び図９（配列番号２１～１０８及び配列番号１２８～１９３）に示される配列からなる群から選択される、前記リガンド。

【請求項２】　ＴＧＦβ２核酸リガンドと、非免疫原性の高分子量化合物又は親油性化合物から構成される複合体。

【請求項３】　前記リガンドと前記非免疫原性の高分子量化合物又は親油性化合物との間にリンカーをさらに含んでなる、請求項２に記載の複合体。

【請求項４】　前記非免疫原性の高分子量化合物がポリアルキレングリコールである、請求項２に記載の複合体。

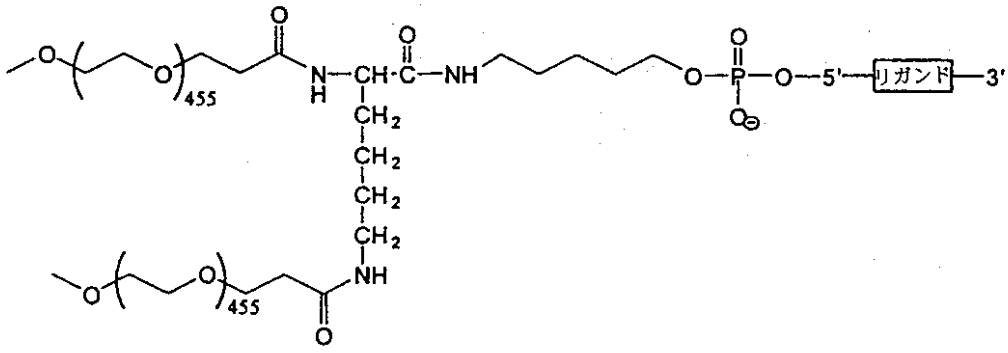
【請求項５】　前記ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコール（ＰＥＧ）である、請求項４に記載の複合体。

【請求項６】　前記ＰＥＧが約１０～８０ｋの分子量を有する、請求項５に記載の複合体。

【請求項７】　前記ＰＥＧが約２０～４５ｋの分子量を有する、請求項６に記載の複合体。

【請求項８】　前記複合体が

【化１】



リガンド＝
rGrGrArGrGfUfUrAfUfUrAfCrArGrArGfUfCfUrGfUfUrArGfCfUrGfUrAfCfUfCfC-3'-3'-dT

（配列番号１１５）であって、ｒＧが２’ＯＨ Ｇであり、ｒＡが２’ＯＨ Ａであり、ｆＵが２’Ｆ Ｕであり、及びｆＣが２’Ｆ Ｃである、請求項７に記載の

複合体。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

発明の技術分野

本明細書に記載されるのは、ヒトトランスフォーミング増殖因子β２（ＴＧＦβ２）に結合する高アフィニティー核酸リガンドを同定及び調製する方法である。そのような核酸リガンドを同定するのに本明細書で利用される方法は、ＳＥＬＥＸ（Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichmentの頭字語）と呼ばれる。本発明にはヒトＴＧＦβ２の高アフィニティー核酸が含まれる。さらに開示されるのはＴＧＦβ２に対するＲＮＡリガンドである。さらに含まれるのは、ピリミジンの２’位で修飾されたヌクレオチド誘導体を含有するオリゴヌクレオチドである。更に開示されるのは、血清中及び動物においてより高い安定性を有する可能性がある、２’－OCH_3プリン修飾を含有する、ＴＧＦβ２に対するリガンドである。本発明にはまた、ＴＧＦβ２の高アフィニティー核酸阻害剤が含まれる。本発明のオリゴヌクレオチドリガンドは、ＴＧＦβ２へ結合することが要求される任意の方法において有用である。これには、医薬品、診断薬、造影剤、及び免疫組織化学試薬としての使用が含まれるが、これらに限定されるものではない。

発明の背景

トランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦβ）は、インヒビン、アクチビン、骨形成因子及び骨形成タンパク質、増殖／分化因子、ミュラー管抑制物質、デカペンタプレジック（decapentaplegic）及び６０Ａ（ショウジョウバエ）、ｄａｆ－７及びｕｎｃ－１２９（Ｃ．エレガンス）、及びｖｇ１（アフリカツメガエル）を包含するタンパク質のスーパーファミリーの一部である（Schlunegger and Grutter (1992) Nature 358: 430-434）。哺乳動物には、３種のＴＧＦβのアイソタイプ、ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３が存在する。哺乳動物のＴＧＦβのどのペアにも約８０％の配列相同性が存在する。ＴＧＦβは少なくとも５種の受容体に結合するが、そのうちの２又は３種（Ｉ型、ＩＩ型、及びおそらくはV型）だけがシグナル伝達系受容体である。ＴＧＦβにより活性化される細胞内シグナル伝達経路にはＳＭＡＤタンパク質が含まれ、詳細に研究されている

（Padgett et al. (1998) Pharmacol Ther 78: 47-52）。このシグナル伝達系受容体は多種多様な細胞に見出される。また、多種多様な細胞がＴＧＦβを発現する。

【０００２】

ＴＧＦβは、アミノ末端の潜伏関連タンパク質（ＬＡＰ）とカルボキシル末端の成熟ＴＧＦβから構成される前駆体として合成される。この前駆体は切断され、ホモ二量体として組立てられる。ＴＧＦβは、ＬＡＰ及び潜伏ＴＧＦβ結合タンパク質（ＬＴＢＰ）に結合した細胞から分泌される。潜伏ＴＧＦβはＬＡＰ及びＬＴＢＰから遊離され、プラスミンによるタンパク質分解かトロンボスポンジンによる調節が関与し得る比較的特徴づけられていない機構により活性化される（Crawford et al. (1998) Cell 93: 1159-70）。遊離した成熟ＴＧＦβホモ二量体は、約２５０００ダルトン（各モノマーにつき１１２アミノ酸）の複合分子量を有する。ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ２はヘパリンに結合し、ヘパリン結合には第２６番目の塩基性アミノ酸が必要とされるという指摘がある（Lyon et al. (1997) Jour. Biol. Chem. 272: 18000-18006）。

【０００３】

ＴＧＦβ２の構造は、Ｘ線結晶解析法を使用して決定され（Daopin et al. (1992) Science 257: 369-373；Schlunegger and Grutter (1992) Nature 358: 430-434）、ＴＧＦβ１の構造に非常に似ている。ＴＧＦβは、血管内皮増殖因子、神経増殖因子、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン、及び血小板由来増殖因子を包含する、「システインノット」タンパク質と呼ばれる構造のタンパク質ファミリーに属する。上記のタンパク質は構造的に相同性があるが、一次配列の相同性は１０～２５％しか有さない。

【０００４】

ＴＧＦβの生物学的活性は多様である（Moses (1990) Growth Factors from Genes to Clinical Application 141-155；Wahl (1994) J. Exp. Med. 180: 1587-1590）。細胞増殖を阻害する場合もあれば（Robinson et al. (1991) Cancer Res. 113: 6269-6274）、それを刺激する場合もある（Fynan and Reiss (1993) Crit. Rev. Oncogenesis 4: 493-540）。細胞外マトリックスの形成とリモデリン

グを調節する場合もある（Koli and Arteaga (1996) Jour. Mammary Gland Biol. and Neoplasia 1: 373-380）。ＴＧＦβはまた非常に強力な免疫抑制剤である（Letterio and Roberts (1998) Ann. Rev. Immunol. 16: 137-161）。ＴＧＦβは、免疫系が腫瘍を拒絶しない線維症（Fakhrai et al. (1996) Proc. Natl. Acad. USA 93: 2090-2914）、癌細胞増殖（Koli and Arteaga (1996) J. Mammary Gland Biol. and Neoplasia 1: 373-380；Reiss and Barcellos-Hoff (1997) Breast Cancer Res. and Treatment 45: 81-85；Jennings and Pietenpol (1998) J. Neurooncol. 36: 123-140）、及び腫瘍転移において重要な役割を担うと考えられている。それはまた自己免疫疾患と感染症においても補助的な役割を有する可能性がある。発現されるアンチセンスＲＮＡにより（Fakhrai et al. (1996) Proc. Natl. Acad. USA 93: 2090-2914）、及び外因性アンチセンスオリゴヌクレオチドにより（Marzo et al. (1997) Cancer Research 57: 3200-3207）ＴＧＦβ２を阻害すると、ラットにおいて神経膠腫の形成を妨げることが報告されている。

【０００５】

マウスＴＧＦβ２の遺伝子が欠失された（Sanford et al. (1997) Development 124: 2659-2670）。ＴＧＦβ２の機能を欠くマウスは生後すぐに死亡し、心臓、眼、耳、肺、四肢、頭蓋顔面領域、脊髄、及び尿生殖路における発育障害につながる異常な上皮－間充織相互作用を有する。これらの障害は、多くの場合、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３のノックアウトマウスにおいて観察された異常とは重複しない。ＴＧＦβはまた種々の細胞株又はトランスジェニックマウスにおいて過剰発現されており（Koli and Arteaga (1996) J. Mammary Gland Biol. and Neoplasia 1: 373-380；Bottinger et al. (1997) Kidney Int. 51: 1355-1360；Bottinger and Kopp (1998) Miner Electrolyte Metab 24: 154-160）、多種多様な効果を有する。

【０００６】

ターゲット分子に対して高アフィニティー結合する核酸分子のインビトロ進化の方法が開発されている。この方法、即ちＳＥＬＥＸと呼ばれる「指数的濃縮によるリガンドの系統進化法」は、「指数的濃縮によるリガンドの系統進化法」と

題する、現在放棄された、米国特許出願第０７／５３６,４２８号（１９９０年６月１１日出願）、「核酸リガンド」と題する米国特許第５,４７５,０９６号、及び「核酸リガンドの同定法」と題する米国特許第５,２７０,１６３号（WO９１／１９８１３号も参照のこと）に記載されており、これらはいずれもそのまま明確に本明細書中に援用される。本明細書でＳＥＬＥＸ特許出願と総称される、上記出願のそれぞれは、所望のターゲット分子に対する核酸リガンドをつくるための根本的に新しい方法を説明する。

【０００７】

ＳＥＬＥＸ法は、混合物から候補オリゴヌクレオチドを選択し、同一の一般選択テーマを使用して結合、分離及び増幅を段階的に反復することを含み、結合アフィニティー及び選択性の所望される判断基準をほとんどすべて達成する。好ましくはランダム配列のセグメントを含んでなる、核酸の混合物から出発するＳＥＬＥＸ法には、結合に好ましい条件下でこの混合物をターゲットと接触させる工程、ターゲット分子と結合した核酸から非結合の核酸を分離する工程、この核酸－ターゲット複合体を解離させる工程、核酸－ターゲット複合体から解離した核酸を増幅させて、リガンドが濃縮した核酸の混合物を産生する工程、次いで、この結合、分離、解離及び増幅の工程を所望されるだけ多くのサイクルで繰り返し、ターゲット分子に対する高アフィニティー核酸リガンドを産生する工程が含まれる。

【０００８】

基本のＳＥＬＥＸ法は特定の目的を達成するために改良され得る。例えば、「構造に基づいた核酸の選択法」と題する、現在放棄された、米国特許出願第０７／９６０,０９３号（１９９２年１０月１４日出願）は、ゲル電気泳動と組み合わせて、折れ曲がりＤＮＡ（米国特許第５,７０７,７９６号を参照のこと）のような特定の構造的特徴を有する核酸分子を選択するためのＳＥＬＥＸ法の使用を説明する。「核酸リガンドの光選択」と題する、現在放棄された、米国特許出願第０８／１２３,９３５号（１９９３年9月１７日出願）は、ターゲット分子に結合する及び／又は光架橋する及び／又はそれを光不活性化することが可能な光反応基を含有する核酸リガンドを選択するためのＳＥＬＥＸをベースとした方法

を説明する。「テオフィリンとカフェインを判別する高アフィニティー核酸リガンド」と題する、現在放棄された、米国特許出願第０８／１３４,０２８号（１９９３年１０月７日出願）は、「カウンターＳＥＬＥＸ」（米国特許第５,５８０,７３７号を参照のこと）と命名された、近縁の分子を判別し得る高度に特異的な核酸リガンドを同定する方法を説明する。「指数的濃縮によるリガンドの系統進化法：溶液ＳＥＬＥＸ」と題する、現在放棄された、米国特許出願第０８／１４３,５６４号（１９９３年１０月２５日出願；米国特許第５,５６７,５８８号も参照のこと）と「フローセルＳＥＬＥＸ」と題する米国特許第５,８６１,２５４号は、ターゲット分子に対し高及び低アフィニティーを有するオリゴヌクレオチド間の高度に効率的な分離を達成する、ＳＥＬＥＸをベースとした方法を説明する。「ＨＩＶ－ＲＴ及びＨＩＶ－１ Ｒｅｖに対する核酸リガンド」と題する米国特許第５,４９６,９３８号は、ＳＥＬＥＸ法を実施した後で改善された核酸リガンドを入手する方法を説明する。「指数的濃縮によるリガンドの系統進化法：ケミ（Ｃｈｅｍｉ）－ＳＥＬＥＸ」と題する米国特許第５,７０５,３３７号は、リガンドをそのターゲットへ共有結合させる方法を説明する。

【０００９】

ＳＥＬＥＸ法には、改善されたインビボ安定性又はデリバリーのような、改善された特性をリガンドに与える修飾ヌクレオチドを含有する高アフィニティー核酸リガンドの同定が含まれる。そのような修飾の例には、リボース及び／又はリン酸及び／又は塩基の位置での化学的な置換が含まれる。修飾ヌクレオチドを含有する、特定のＳＥＬＥＸ法で同定された核酸リガンドが、「修飾ヌクレオチドを含有する高アフィニティー核酸リガンド」と題する、現在放棄された、米国特許出願第０８／１１７,９９１号（１９９３年9月8日出願）に記載されている。これは、ピリミジンの５－及び２’位で化学的に修飾されたヌクレオチド誘導体を含有するオリゴヌクレオチド、及び２’－アミノ修飾を含有する、トロンビンに対する特定ＲＮＡリガンドについて説明する（米国特許第５,６６０,９８５号を参照のこと）。上記の米国特許出願第０８／１３４,０２８号は、２’－アミノ（２’－NH_2）、２’－フルオロ（２’－Ｆ）、及び／又は２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）で修飾された１つ又はそれ以上のヌクレオチドを含有する

高度に特異的な核酸リガンドについて説明する。「分子内求核置換による既知及び新規の２’修飾ヌクレオシドの新規製造法」と題する、現在放棄された、米国特許出願第０８／２６４,０２９号（１９９４年6月２２日出願）は、様々な２’－修飾ピリミジンを含有するオリゴヌクレオチドについて説明する。「オリゴヌクレオチドのバイオコンジュゲーション」と題するＰＣＴ／ＵＳ９８／００５８９号（WO９８／１８４８０号）（１９９８年1月7日出願）は、ある分子実体を用いてその５’位だけを誘導化した核酸リガンドを含んでなる、あるターゲットに対するバイオコンジュゲートを同定する方法を説明する。

【００１０】

ＳＥＬＥＸ法には、「指数的濃縮によるリガンドの系統進化法：キメラＳＥＬＥＸ」と題する米国特許第５,６３７,４５９号と「指数的濃縮によるリガンドの系統進化法：混合ＳＥＬＥＸ」と題する米国特許第５,６８３,８６７号にそれぞれ記載されるように、選択されたオリゴヌクレオチドを他の選択されたオリゴヌクレオチド及び非オリゴヌクレオチドの機能ユニットと結合させることが含まれる。上記出願は、オリゴヌクレオチドの広範囲の形状や他の特性、及び効率的な増幅や複製の特性を、他の分子の所望の特性と組み合わせることを可能にする。ＳＥＬＥＸ法の定義及び説明を包含するがこれらに限定されない、上記の特許出願の全文は、そのまま本明細書中に明確に援用される。

発明の概要

本発明には、トランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦβ２）に対する核酸リガンドを同定及び産生する方法とそのように同定及び産生される核酸リガンドが含まれる。特に、ＴＧＦβ２と特異的に結合することが可能であるＲＮＡ配列が提供される。さらに含まれるのは、ピリミジンの２’位が修飾されたヌクレオチド誘導体を含有するオリゴヌクレオチドである。本発明に特別に含まれるのは、表5、表7、表8、表１１、表１３、表１４、表１６～表１９及び図９（配列番号２１～１０８及び配列番号１２８～１９３）に示されるＲＮＡリガンド配列である。本発明にはまた、ＴＧＦβ２の機能を阻害するＴＧＦβ２のＲＮＡリガンドが含まれる。本明細書にさらに記載されるのは、ＴＧＦβ１の２’ＯＭｅ修飾核酸リガンドである。

【００１１】

本発明にさらに含まれるのは、（ａ）核酸の候補混合物を調製する工程、（ｂ）この核酸の候補混合物をＴＧＦβ２と接触させる工程、（ｃ）前記候補混合物のメンバーをＴＧＦβ２に対するアフィニティーに基づいて分配する工程、及び（ｄ）選択された分子を増幅して、ＴＧＦβに対する結合アフィニティーが相対的により高い核酸配列について濃縮された核酸の混合物を産出する工程を含んでなる、ＴＧＦβ２に対する核酸リガンド及び核酸リガンド配列を同定する方法である。

【００１２】

より特定すると、本発明には、上記の方法により同定された、表５、表７、表８、表１１、表１３、表１４、表１６～表１９及び図９（配列番号２１～１０８及び配列番号１２８～１９３）に示されるリガンドを包含する、ＴＧＦβ２に対するＲＮＡリガンドが含まれる。また、上記リガンドのいずれかと実質的に相同であり、ＴＧＦβ２へ結合してＴＧＦβ２の機能を阻害する実質的に同一の能力を有する、ＴＧＦβ２に対する核酸リガンドが含まれる。本発明にさらに含まれるのは、本明細書に示されるリガンドと実質的に同一の構造形態を有し、ＴＧＦβ２へ結合してＴＧＦβ２の機能を阻害する実質的に同一の能力を有する、ＴＧＦβ２に対する核酸リガンドである。

【００１３】

本発明にはまた、本明細書で同定される核酸リガンドに基づいた他の修飾ヌクレオチド配列とその混合物も含まれる。

発明の詳細な説明

本出願は、ＳＥＬＥＸとして知られる方法を介して同定される、ＴＧＦβ２に対する高アフィニティー核酸リガンドを説明する。ＳＥＬＥＸは、「指数的濃縮によるリガンドの系統進化法」と題する、現在放棄された、米国特許出願第０７／５３６,４２８号、「核酸リガンド」と題する米国特許第５,４７５,０９６号、及び「核酸リガンドの同定法」と題する米国特許第５,２７０,１６３号（ＷＯ９１／１９８１３号も参照のこと）に記載されている。これらの出願はいずれもそのまま明確に本明細書中に援用され、ＳＥＬＥＸ特許出願と総称される。ＴＧＦ

βに対する核酸リガンドがＳＥＬＥＸ法を介して同定されている。これらのＴＧＦβ核酸リガンドは、いずれも「高アフィニティーＴＧＦβ核酸リガンド及び阻害剤」と題する米国特許第５,７３１,１４４号及び米国特許出願第０９／０４６,２４７号（１９９８年3月２３日出願）、並びに「切断型ＳＥＬＥＸ法」と題する米国特許出願第０９／２７５,８５０号（１９９９年3月２４日出願）に記載されている。これらの出願は、そのまま明確に本明細書中に援用される。

【００１４】

本明細書において本発明を説明するために使用されるいくつかの用語は以下のように定義される。

本明細書で使用されるような「核酸リガンド」は、ターゲットに対して所望される作用を有する、非天然の核酸である。核酸リガンドはまた本明細書では「アプタマー」とも言われる。所望される作用には、ターゲットに結合すること、ターゲットを接触的に変化させること、ターゲット又はターゲットの機能活性を修飾／変化させるやり方でターゲットと反応すること、自殺阻害剤中のようにターゲットへ共有結合すること、及びターゲットと他の分子との反応を促進することが含まれるが、これらに限定されない。好ましい態様では、この所望される作用はターゲット分子に特異的な結合であり、そのようなターゲット分子は、ワトソン／クリック塩基対合や三重らせん結合に主に依存する機序を介して核酸リガンドに結合するポリヌクレオチド以外の３次元化学構造体であり、ここで核酸リガンドはターゲット分子により結合される既知の生理学的機能を有する核酸ではない。核酸リガンドには核酸の候補混合物から同定される核酸が含まれ、前記核酸リガンドは以下を含んでなる方法によりあるターゲットのリガンドとなる：ａ）この候補混合物をターゲットと接触させること、その際、候補混合物と比較しターゲットに対してより増大したアフィニティーを有する核酸が候補混合物の残りから分配され得る；ｂ）増大したアフィニティーの核酸を候補混合物の残りから分配すること；及びｃ）増大したアフィニティーの核酸を増幅し、リガンドを濃縮した核酸の混合物を産生すること。

【００１５】

「候補混合物」は、そこから所望されるリガンドを選択するための、様々な配

列をもった核酸の混合物である。候補混合物の供給源は、天然の核酸又はそのフラグメント、化学合成した核酸、酵素的に合成した核酸、又は上記技術の組み合わせにより創出される核酸から得られるものであり得る。好ましい態様では、それぞれの核酸は、ランダム領域の周囲に、増幅法を促進する固定配列を有する。

【００１６】

「核酸」は、一本鎖又は二本鎖のいずれかのＤＮＡ、ＲＮＡ、及びその化学修飾物を意味する。修飾には、追加の電荷、分極率、水素結合、静電的相互作用、及び流動性を核酸リガンドの塩基又は核酸リガンド全体に取込ませる他の化学基を提供するものが含まれるが、これらに限定されない。そのような修飾には、２’位の糖修飾、５位のピリミジン修飾、８位のプリン修飾、環外アミンの修飾、４－チオウリジンの置換、５－ブロモ又は５－ヨード－ウラシルの置換、骨格修飾、メチル化、アイソ塩基のイソシチジン及びイソグアニジンのような稀な塩基対合の組み合わせ等が含まれるが、これらに限定されない。修飾には、キャッピングのような３’及び５’修飾も含まれる。

【００１７】

「ＳＥＬＥＸ」法には、所望のやり方、例えばタンパク質への結合でターゲットと相互作用する核酸リガンドの選択に、この選択された核酸の増幅を組み合わせることが含まれる。この選択／増幅工程のサイクルを反復的に繰り返すことにより、非常に多数の核酸を含有するプールから、そのターゲットと最も強く相互作用する１つ又は少数の核酸を選択することが可能になる。選択／増幅法のサイクルは選択した目標が達成されるまで続けられる。本発明では、ＳＥＬＥＸ法を利用してＴＧＦβ２に対する核酸リガンドを得る。ＳＥＬＥＸ法についてはＳＥＬＥＸ特許出願に説明されている。

【００１８】

「ターゲット」は、それに対するリガンドが所望される、関心対象のあらゆる化合物又は分子を意味する。ターゲットは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、多糖類、糖タンパク質、ホルモン、受容体、抗原、抗体、ウイルス、基質、代謝物、遷移状態類似体、補因子、阻害剤、薬物、色素、栄養素、増殖因子等であり得るが、これらに限定されない。本出願では、ターゲットはＴＧＦβ２である。

【００１９】

その最も基本的な形式において、ＳＥＬＥＸ法は以下の一連の工程により定義され得る：

１）様々な配列の核酸の候補混合物を調製する。一般に、この候補混合物には、固定配列の領域（即ち、候補混合物のメンバーのそれぞれが同じ位置に同一の配列を含有する）とランダム配列の領域が含まれる。固定配列の領域は、ａ）以下に記載の増幅工程を補助するため；ｂ）ターゲットに結合することが知られている配列を模倣するため；又はｃ）一定の構造配列をした核酸の候補混合物における濃度を高めるために選択される。ランダム配列は、全体的にランダムである（即ち、ある位置にある塩基を見出す確率は１／４である）か、又は部分的にのみランダムであり得る（即ち、ある位置にある塩基を見出す確率が０～１００％の任意のレベルで選択され得る）。

【００２０】

２）この候補混合物を、ターゲットと候補混合物のメンバーとが結合するのに好ましい条件下で、選択されたターゲットと接触させる。上記状況下でのターゲットと候補混合物の核酸との相互作用は、ターゲットとそのターゲットに対し最も強いアフィニティーを有する核酸との核酸－ターゲット対が形成されたとみなされる。

【００２１】

３）ターゲットに対し最も高いアフィニティーを有する核酸を、ターゲットに対しより低いアフィニティーを有する核酸から分離する。最高アフィニティーの核酸に相当する配列はごくわずかな数しか（１分子の核酸しかない可能性もある）候補混合物中に存在しないので、候補混合物にある有意な量（約５～５０％）の核酸が分離の間に保持されるように、分離の判定基準を設定することが概して望ましい。

【００２２】

４）次いで、ターゲットに対し相対的により高いアフィニティーを有するものとして分離の間に選択された核酸を増幅し、ターゲットに対する相対的に高いアフィニティーを有する核酸が濃縮された新たな候補混合物を創出する。

【００２３】

５）上記の分離及び増幅工程を繰り返すことによって、新たに形成される候補混合物は、弱く結合する配列をどんどん少なく含有するようになり、ターゲットに対する核酸の平均アフィニティー度合いは概して増加する。極端な場合、ＳＥＬＥＸ法は、元の候補混合物由来の核酸を代表する、ターゲット分子に対して最高のアフィニティーを有する独特な核酸を１つ又は少数含有する候補混合物を産生する。

【００２４】

ＳＥＬＥＸ特許出願は、この方法について詳述している。それには、この方法に使用され得るターゲット、候補混合物中にある核酸を分離する方法、及び分離された核酸を増幅して濃縮された候補混合物を産生する方法が含まれる。ＳＥＬＥＸ特許出願はまた、タンパク質が核酸結合タンパク質であるか又はそうでないタンパク質ターゲットを含め、多数のターゲット種に対して得られるリガンドについても説明する。

【００２５】

さらにＳＥＬＥＸ法には、米国特許第６,０１１,０２０号、「核酸リガンド複合体」に記載されるように、診断薬又は治療薬の複合体において、選択された核酸リガンドを親油性又は非免疫原性の高分子量化合物と組み合わせることが含まれる。「血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）核酸リガンド複合体」と題する米国特許第５,８５９,２２８号には、診断薬又は治療薬の複合体において、ジアシルグリセロール又はジアルキルグリセロールのような親油性化合物と会合しているＶＥＧＦ核酸リガンドが説明されている。さらに、「血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）核酸リガンド複合体」と題する米国特許出願第０８／８９７,３５１号（１９９７年7月２１日出願）には、グリセロール脂質のような親油性化合物、又はポリアルキレングリコールのような非免疫原性の高分子量化合物と会合しているＶＥＧＦ核酸リガンドが説明されている。さらにまた、「血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）核酸リガンド複合体」と題するＰＣＴ／ＵＳ９７／１８９４４号（WO９８／１８４８０号）（１９９７年１０月１７日出願）には、非免疫原性の高分子量化合物又は親油性化合物と会合しているＶＥＧＦ核酸リガンドが説明されている

。基本的なＳＥＬＥＸ法の改変を説明する上記特許出願は、いずれもそのまま明確に本明細書中に援用される。

【００２６】

本発明のある態様では、非免疫原性の高分子量化合物又は親油性化合物と共有結合した、ＴＧＦβ２に対する１つ又はそれ以上の核酸リガンドを含んでなる複合体を提供することが所望される。本明細書で使用されるような複合体は、非免疫原性の高分子量化合物への、ＴＧＦβ２の核酸リガンドの共有結合によって形成される分子実体を説明する。非免疫原性の高分子量化合物とは、通常は免疫原性の応答を産生しない、約１００Ｄａ～１,０００,０００Ｄａ、より好ましくは約１０００Ｄａ～５００,０００Ｄａ、及び最も好ましくは約１０００Ｄａ～２００,０００Ｄａの化合物である。本発明の目的では、免疫原性の応答とは、生体に抗体タンパク質をつくらせるものである。本発明の１つの好ましい態様では、非免疫原性の高分子量化合物はポリアルキレングリコールである。最も好ましい態様では、ポリアルキレングリコールはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）である。より好ましくは、ＰＥＧは約１０～８０ｋの分子量を有する。最も好ましくは、ＰＥＧは約２０～４５ｋの分子量を有する。本発明のある態様では、非免疫原性の高分子化合物はまた核酸リガンドであり得る。

【００２７】

本発明のもう１つの態様では、ＴＧＦβ２に対する核酸リガンドと親油性化合物が含まれる複合体を有することが望ましい。親油性化合物とは、実質的に親油性成分からなる構造を含む、脂質及び／又は低い誘電率を有する他の材料又は相と会合するか又はそれへ分配される傾向を有する化合物である。親油性化合物には、脂質、及び脂質（及び／又は低い誘電率を有する他の材料又は相）と会合する傾向を有する化合物を含有する非脂質が含まれる。コレステロール、リン脂質、及びジアルキルグリセロール、ジアシルグリセロール、及びグリセロールアミド脂質のようなグリセロール脂質が、親油性化合物のさらなる例である。好ましい態様では、親油性化合物はグリセロール脂質である。

【００２８】

非免疫原性の高分子量化合物又は親油性化合物は、ＴＧＦβ２に対する核酸リ

ガンドの、塩基上の環外アミノ基、ピリミジンヌクレオチドの５位、プリンヌクレオチドの８位、リン酸のヒドロキシル基、又は５’又は３’末端のヒドロキシル基又は他の基のような、ＴＧＦβ２に対する核酸リガンド上の多種多様な位置へ共有結合され得る。親油性化合物がグリセロール脂質であるか、又は非免疫原性の高分子量化合物がポリアルキレングリコール又はポリエチレングリコールである態様では、好ましくは、非免疫原性の高分子量化合物はそのリン酸基の５’又は３’ヒドロキシルへ結合している。最も好ましい態様では、親油性化合物又は非免疫原性の高分子量化合物は、核酸リガンドのリン酸基の５’ヒドロキシルへ結合している。非免疫原性の高分子量化合物又は親油性化合物の、ＴＧＦβの核酸リガンドに対する結合は、直接的にか、又はリンカー又はスペーサーの利用によりなし得る。

【００２９】

「リンカー」は、２種又はそれ以上の分子実体を共有結合又は非共有相互作用を介して連結させる分子実体であり、１種又はそれ以上の分子実体の機能特性を保存するやり方で、分子実体の空間的な分離を可能にし得る。リンカーはまたスペーサーとして知られる場合もある。

【００３０】

ＴＧＦβ２に対する核酸リガンドと非免疫原性の高分子量化合物又は親油性化合物を含んでなる複合体は、さらに脂質構築体と会合され得る。脂質構築体とは、脂質、リン脂質、又はそれらの誘導体を含有し、多種多様な異なる構造配置を含んでなり、その脂質が水性懸濁液に取込まれることが知られている構造体である。これらの構造体には、脂質二重層小胞、ミセル、リポソーム、エマルジョン、脂質リボン又はシートが含まれるがこれらに限定されず、製剤的に許容されることが知られている多種多様な薬物及び成分と複合され得る。好ましい態様では、脂質構築体はリポソームである。好ましいリポソームは単層であり、２００ｎｍ未満の相対サイズを有する。脂質構築体における共通の追加成分には、特に、コレステロール及びα－トコフェロールが含まれる。脂質構築体は単独で又は任意の組み合わせにおいて使用され得るが、当業者ならば特定の応用について所望される特徴を提供できることが認識されるであろう。さらに、脂質構築体とリポ

ソーム形成の技術的な側面は当該技術分野で周知であり、この技術分野で一般に実践される方法のいずれもが本発明に使用され得る。

【００３１】

ＳＥＬＥＸ法は、更にターゲットに対するバイオコンジュゲートを同定することを含む。「オリゴヌクレオチドのバイオコンジュゲーション」と題する同時係属中のＰＣＴ特許出願ＵＳ９８／００５８９号（ＷＯ９８／３０７２０号）（１９９８年１月７日出願）は、ある分子実体を用いて５’位のみを誘導化したＲＮＡを含んでなるバイオコンジュゲートを酵素的に合成する方法と、ある分子実体を用いて核酸リガンドの５’位のみを誘導化した核酸リガンドを含んでなる、ターゲットに対するバイオコンジュゲートを同定する方法を説明する。本明細書で使用されるような「バイオコンジュゲート」は、別の分子実体で誘導化された任意のオリゴヌクレオチドを意味する。好ましい態様では、分子実体は巨大分子である。本明細書で使用されるように、「巨大分子」は、大きな有機分子を意味する。巨大分子の例には、核酸、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、炭水化物、多糖類、糖タンパク質、コレステロール、リン脂質、ジアシルグリセロール及びジアルキルグリセロールのような親油性化合物、ホルモン、薬物、非免疫原性の高分子量化合物、蛍光性の、化学発光性の及び生物発光性のマーカー化合物、抗体及びビオチンなどが含まれるが、これらに限定されない。ある態様では、分子実体が、ＲＮＡの疎水性を高めること、及び結合、膜分画及び／又は膜透過性を強めることのような、ある種の所望される特徴を核酸リガンドへ提供し得る。さらに、ビオチン、フルオレセイン、又は診断放射核種へ取込むためのペプチジル金属キレートのようなレポーター分子も加えられる場合があり、それにより診断薬として使用され得るバイオコンジュゲートを提供する。

【００３２】

本明細書に記載の方法とそのような方法により同定される核酸リガンドは、治療と診断の両方の目的に有用である。治療用の使用には、ヒト患者における疾患又は医学的病態の治療又は予防が含まれる。治療用の使用には獣医学への応用も含まれ得る。

【００３３】

診断用の利用には、インビトロ又はインビボの両方の診断応用が含まれ得る。ＳＥＬＥＸ法全般、及び本明細書で明確に教示及び特許請求されるＳＥＬＥＸ法の特定の適用は、診断応用に特に適している。ＳＥＬＥＸでは高アフィニティーと驚くほどの特異性でターゲットに結合し得る核酸リガンドが同定される。これらの特徴は、当然ながら、当業者が診断用リガンドにおいて求める所望の特性である。

【００３４】

本発明の核酸リガンドは、当業者により又はＰＣＴ／ＵＳ９８／００５８９号（ＷＯ９８／３０７２０号）に記載の方法により利用される任意数の技術によって、診断目的のために日常的に適用され得る。診断薬は、ある一定のターゲットの存在を特定の場所又は濃度で使用者が同定することを可能にするものである必要がある。簡略に言えば、診断目的のためにポジティブシグナルを誘発するには、ターゲットと結合対を形成する能力があれば十分であり得る。当業者ならば、核酸リガンドの存在を追跡するために標識タグを取込ませる、当技術分野で公知の方法により、任意の核酸リガンドを適応することができるだろう。そのようなタグは、数多くの診断法において使用され得る。本明細書に記載のＴＧＦβ２に対する核酸リガンドは、ＴＧＦβ２タンパク質の同定のために特異的に使用され得る。

【００３５】

ＳＥＬＥＸは、ターゲット分子の高アフィニティーリガンドを提供する。このことは、核酸研究の分野では先例がない並外れた業績であることを意味する。本発明はＳＥＬＥＸ法をＴＧＦβ２の特定ターゲットへ応用する。以下の実施例では、ＴＧＦβ２に対する核酸リガンドを単離及び同定するために使用される実験パラメータが説明される。

【００３６】

医薬品としての使用に望ましい核酸を製造するためには、核酸リガンドが、１）ターゲットに対して所望の効果を達成し得るやり方でターゲットへ結合し；２）所望の効果を得るのに可能な限り小さく；３）可能な限り安定であり；４）選択されたターゲットに対して特異的なリガンドであり得ることが好ましい。多く

の場合、核酸リガンドがそのターゲットに対して可能な限り最高のアフィニティーを有することが好ましい。

【００３７】

同時係属中で、一般的に指定された米国特許第５,４９６,９３８号（’９３８特許）には、ＳＥＬＥＸが実施された後で改善された核酸リガンドを得るための方法が説明されている。「ＨＩＶ－ＲＴ及びＨＩＶ－１ Ｒｅｖに対する核酸リガンド」と題するこの’９３８特許は、そのまま明確に本明細書中に援用される。

【００３８】

本発明では、ＴＧＦβ２に対し特異的な高アフィニティーを有するＲＮＡリガンドを３３、３４又は４０個のランダム位置（３３Ｎ、３４Ｎ又は４０Ｎ）（表１）を含有する縮重ライブラリーから同定するために、ＳＥＬＥＸ実験を実施した。本発明には、実施例１に記載の方法により同定された、表５、表７、表８、表１１、表１３、表１４、表１６～表１９及び図９（配列番号２１～１０８及び配列番号１２８～１９３）に示される、ＴＧＦβ２に対する特異的なＲＮＡリガンドが含まれる。さらに本発明は、おそらくはＴＧＦβ２とその受容体との相互作用を阻害することによってＴＧＦβ２の機能を阻害する、ＴＧＦβ２に対するＲＮＡリガンドが含まれる。本発明に包含されるリガンドの範囲は、ＳＥＬＥＸ法により同定される、修飾及び非修飾の、あらゆるＴＧＦβ２の核酸リガンドに及ぶ。より特定すると、本発明には、表５、表７、表８、表１１、表１３、表１４、表１６～表１９及び図９（配列番号２１～１０８及び配列番号１２８～１９３）に示されるリガンドと実質的に相同である核酸配列が含まれる。実質的に相同であるとは、７０％より多い、最も好ましくは８０％より多い、及びさらにより好ましくは９０％、９５％又は９９％より多い一次配列相同性の度合いを意味する。本明細書で記載されるような相同性の比率は、比較される配列内の同一ヌクレオチド残基と並置する２種の配列のうちより小さいほうに見出されるヌクレオチドの比率として算出され、その際、１０ヌクレオチドの長さに１つのギャップを導入して並置を補助してもよい。表５、表７、表８、表１１、表１３、表１４、表１６～表１９及び図９（配列番号２１～１０８及び配列番号１２８～１９

３）に示される、ＴＧＦβ２のリガンドの配列相同性を観察すると、ほとんど又は全く一次配列に相同性がないいくつかの配列が実質的に同一のＴＧＦβ２結合能力を有し得ることがわかる。これらの理由のために、本発明には、表５、表７、表８、表１１、表１３、表１４、表１６～表１９及び図９（配列番号２１～１０８及び配列番号１２８～１９３）に示される核酸リガンドと実質的に同一な構造及びＴＧＦβ２結合能力を有する核酸リガンドも含まれる。実質的に同一なＴＧＦβ２結合能力とは、そのアフィニティーが本明細書に記載されるリガンドのアフィニティーの１桁又は２桁以内にあることを意味する。本明細書に明確に記載されるものと実質的に相同性のある一定の配列が実質的に同一のＴＧＦβ２結合能力を有するかどうかを決定することは、十分に当業者の技量の範囲内にある。

【００３９】

本発明にはまた、実質的に同一な推定構造又は構造モチーフを有する核酸リガンドが含まれる。実質的に同一な構造又は構造モチーフは、Zukerfoldプログラム（Zuker (1989) Science 244: 48-52 を参照のこと）を使用する配列並置により推定され得る。当技術分野で知られているように、二次構造及び構造モチーフを予測するのに他のコンピュータプログラムも使用し得る。溶液中か又は結合した構造としての核酸リガンドの実質的に同一な構造又は構造モチーフもまた、ＮＭＲ又は当技術分野で知られているような他の技術を使用して推定され得る。

【００４０】

核酸の治療、予防及びインビボ診断用の使用において遭遇する１つの潜在的な問題は、オリゴヌクレオチドがそのホスホジエステルの形態では、所望の効果が現れないうちに、エンドヌクレアーゼ及びエクソヌクレアーゼのような細胞内及び細胞外の酵素により体液中で速やかに分解され得ることである。核酸リガンドのインビボ安定性を高めるか、又は核酸リガンドのデリバリーを強めるか又は仲介するために、核酸リガンドのある種の化学修飾をなし得る。例えば、「修飾ヌクレオチドを含有する高アフィニティー核酸リガンド」と題する、現在放棄された、米国特許出願第０８／１１７,９９１号（１９９３年９月８日出願）、及び「核酸リガンド複合体」と題する米国特許第６,０１１,０２０号を参照されたい

。これらはそのまま明確に本明細書中に援用される。本発明において考慮される核酸リガンドの修飾には、核酸リガンドの塩基又は核酸リガンド全体に対して、追加の電荷、分極率、疎水性、水素結合、静電的相互作用、及び流動性を取り込ませる他の化学基を提供するものが含まれるが、これらに限定されない。そのような修飾には、２’位の糖修飾、５位のピリミジン修飾、８位のプリン修飾、環外アミンの修飾、４－チオウリジンの置換、５－ブロモ又は５－ヨード－ウラシルの置換、骨格修飾、ホスホロチオエート又はリン酸アルキル修飾、メチル化、アイソ塩基のイソシチジン及びイソグアニジンのような稀な塩基対合の組み合わせ等が含まれるが、これらに限定されない。修飾には、キャッピングのような３’及び５’修飾も含まれる。

【００４１】

核酸リガンドがＳＥＬＥＸ法により抽出される場合、修飾はＳＥＬＥＸの前か又は後の修飾であり得る。ＳＥＬＥＸ前修飾は、そのＳＥＬＥＸターゲットに対する特異性と改善されたインビボ安定性の両方を有する核酸リガンドを産生する。２’－ＯＨ核酸リガンドに対してなされるＳＥＬＥＸ後修飾は、核酸リガンドの結合能力に悪影響を及ぼすことなく、改善されたインビボ安定性をもたらし得る。本発明の核酸リガンドの好ましい修飾は、５’及び３’ホスホロチオエートキャッピング及び／又は３’末端での３’－３’逆ホスホジエステル連結である。１つの好ましい態様では、核酸リガンドの好ましい修飾は、３’末端での３’－３’逆ホスホジエステル連結である。更にヌクレオチドの一部又は全部を２’－フルオロ（２’－Ｆ）及び／又は２’－アミノ（２’－NH_2）及び／又は２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ及び／又は２’－OCH_3）修飾することが好ましい。本明細書に記載されるのは、２’－Ｆ修飾されて、ＳＥＬＥＸ法へ組込まれた核酸リガンドである。本明細書にまた記載されるのは、ＳＥＬＥＸ法が実施された後で２’－OCH_3修飾された核酸リガンドである。

【００４２】

他の修飾も当業者に知られている。そのような修飾は、ＳＥＬＥＸ後（すでに同定された非修飾リガンドの修飾）に行うか、又はＳＥＬＥＸ法への組込みによりなされ得る。

【００４３】

上記のように、選択的にＴＧＦβ２へ結合するその能力のために、本明細書に記載のＴＧＦβ２に対する核酸リガンドは、医薬品として有用である。従って、本発明にはまた、ＴＧＦβ２へ結合し得る核酸リガンドの投与によりＴＧＦβ２介在性の病理状態を治療する方法が含まれる。

【００４４】

核酸リガンドの治療用組成物は注射により非経口的に投与され得るが、関節内注射、吸入ミスト、経口活性製剤、経皮イオン浸透療法又は坐剤のような他の有効な投与形態も想定される。１つの好ましい担体は生理食塩水であるが、他の製剤的に許容される担体も使用され得ることが考慮される。１つの好ましい態様では、担体とリガンドが生理学的に適合可能な徐放性製剤を構成することが想定される。そのような担体における一次溶媒は、性質において水性又は非水性のいずれかであり得る。さらに、担体は、製剤のｐＨ、浸透性、粘度、澄明性、色、無菌性、安定性、溶解速度、又はにおいを改変させるか又は維持するための他の薬理学的に許容される賦形剤を含有する場合がある。同様に、担体は、リガンドの安定性、溶解速度、放出、又は吸収を改変させるか又は維持するためのさらに他の薬理学的に許容される賦形剤を含有する場合がある。そのような賦形剤は、単位用量又は複数用量のいずれかの形態で非経口的に投与するための剤形を製剤化するために通常及び習慣的に利用されるような物質である。

【００４５】

治療用組成物が製剤化されたならば、それは、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固形物、又は脱水又は凍結乾燥された粉末として無菌バイアルに保存され得る。そのような製剤は、即時使用の形態か、又は投与直前に復元を必要とする形態のいずれかで保存され得る。核酸リガンドを含有する製剤を全身デリバリーのために投与するやり方は、皮下、筋肉内、静脈内、鼻腔内によるか、又は膣坐剤又は肛門坐剤であり得る。

【００４６】

以下の実施例は本発明を説明及び明示するために提供され、本発明を何ら限定するものではない。実施例１は、実施例２～５に使用される様々な材料と実験法

を説明する。実施例２は、ヒトＴＧＦβ２に結合する核酸リガンドの単離及び特徴を説明する。実施例３は、偏向ラウンド０ライブラリーを使用するＳＥＬＥＸ法により単離された核酸リガンド、偏向ＳＥＬＥＸ法から単離されたＴＧＦβ２核酸リガンドの配列、及び偏向ＳＥＬＥＸ法から単離された核酸リガンドの結合を説明する。実施例４は、ＮＸ２２２８４（配列番号１１５）及びＮＸ２２３８５（配列番号１８９）内において２’－ＯＨプリンを２’－OCH_3プリンで置換することを説明する。実施例５は、ＮＸ２２３２３（配列番号１２１）の薬物動態特性を説明する。実施例６は、リードＴＧＦβ１短鎖型リガンドであるＣＤ７０（配列番号２１６）の２’－ＯＭｅ修飾を説明する。実施例７は、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ２に対するＴＧＦβアプタマーのミンク肺上皮細胞（ＭＬＥＣ）ＰＡＩルシフェラーゼアッセイを説明する。

【００４７】

実施例

実施例１　実験方法

材料

ヒトＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２又はＴＧＦβ３を認識するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体は、R&D Systems社（ミネアポリス、MN）から購入した。ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、Operon社（アラメダ、ＣＡ）又はOligos社（レディングセンター、ＣＴ）から購入した。ＢＩＡｃｏｒｅ２０００及びＩＡｓｙｓ ｐｌｕｓの機器は、それぞれBiacore社（パラマス、ＮＪ）及びAffinity Sensors社（ケンブリッジ、Ｕ．Ｋ．）の製品である。ニトロセルロースフィルターと濾過マニホルドは、Millipore社（ベッドフォード、MA）から入手した。ミンク肺上皮細胞（＃ＣＣＬ６４）は、American Type Culture Collection（ロックビル、MD）から購入した。クローニングベクターのｐＣＲＳｃｒｉｐｔ及びｐＵＣ９は、それぞれ社内で、又はStratagene社（ラ・ホーヤ、ＣＡ）又はLife Technologies社（ゲーサーズバーグ、MD）から入手した。大腸菌株はStratagene社から入手した。ＱＩＡｐｒｅｐスピンミニプレップキットは、QIAGEN社（チャツワース、ＣＡ）から入手した。Ｂｉｇ Ｄｙｅシークエンシングキット及びモデル３７７シークエンサーは、Applied Biosystems社（フォスターシティ、

ＣＡ）から購入し得る。Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼ及びThermus aquaticus ＤＮＡポリメラーゼは、それぞれEnzyco社（デンバー、ＣＯ）及びPerkin Elmer社（ノーウォーク、ＣＴ）から購入した。制限酵素はすべてNew England Biolabs社から購入した。大腸菌ＲＮａｓｅＨは、Boehringer Mannheim社から入手した。「ＮＸ」で始まる名称を有するすべての合成核酸は、ＡＢＩモデル３９４ＤＮＡ／ＲＮＡシンセサイザー（Applied Biosystems社）を使用して、NeXstar Pharmaceuticals社（ボールダー、ＣＯ）で合成した。酵母ｔＲＮＡ（Ｘ－ＳＡ型）及びブタ腸粘膜由来ヘパリン（分子量５０００）は、それぞれSigma（セントルイス、ＭＯ）及びCalbiochem社（ラ・ホーヤ、ＣＡ）から購入した。

【００４８】

ラウンド０核酸ライブラリーの調製

ＴＧＦβ２核酸リガンドを単離するために使用される、リボ核酸分子の初期（ラウンド０）ライブラリーを以下のように産生した。２種のＤＮＡオリゴヌクレオチド（４０Ｎ７ラウンド０（Ｒ０）ＤＮＡテンプレート及び５’Ｎ７プライマー）をアニールし、クレノウでフィルインして、４０Ｎ７Ｒ０ ＤＮＡ転写テンプレート（表１）を産生した。Fitzwater and Polisky (1996) Meth. Enz. 267: 275-301に記載のように、Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼ、３ｍＭ ２－Ｆウリジン及びシトシン、１ｍＭ ２’－ＯＨグアノシン及びアデニン、並びにα^{32}Ｐ－ＡＴＰを使用してこのテンプレートを転写した。これにより、５’及び３’の「固定」領域と４０塩基長のランダム配列領域を有する、以下の配列のＲ０ ４０Ｎ７核酸プールを得た：

Ｒ０ ４０Ｎ７核酸

５’－GGGAGGACGAUGCGG－４０Ｎ－CAGACGACUCGCCCGA－３’

５’固定領域　ランダム領域　３’固定領域　（配列番号６）

A = 2’-OH A；C = 2’-F C；G = 2’-OH G；U = 2’-F U。（表１）

スポットＳＥＬＥＸ

「サイトカインの高アフィニティー核酸リガンド」と題する、そのまま本明細書中に援用されている米国特許第５,９７２,５９９号に記載のように、α^{32}Ｐ－ＡＴＰを使用して内部標識された核酸を使用して、スポットＳＥＬＥＸを実施し

た。このＳＥＬＥＸ実験の条件及び経過を表３に要約する。簡略に言うと、ヒトＴＧＦβ２（又は「タンパク質なし」）を、直径１３mmのニトロセルロースフィルターに付し、吸収させるが完全には乾燥しないようにした。このフィルターを、ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水、１mM $MgCl_2$中にてＲＮＡとともにインキュベートし、次いで表３に要約されるように洗浄した。フィルターに結合し、タンパク質に結合した核酸を、Instant Imager（Packard Instrument社、ダウナーズグローブ、ＩＬ）上で可視化して定量し、タンパク質結合核酸を５０％フェノール、４M尿素において、６５℃、４５分で溶出させた。溶出した核酸をエタノール沈澱させ、次いで、トリ骨髄芽球症ウイルスの逆転写酵素を使用して逆転写し、５’Ｎ７プライマー及び３’Ｎ７プライマーを使用する１５サイクルのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）に付した。この生じる転写テンプレートを、２’－Ｆピリミジンヌクレオチド、２’－ＯＨプリンリボヌクレオチド、及びα^{32}Ｐ－ＡＴＰの存在下で、Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼを用いて転写し、次のスポットラウンドに持ち越した。初回のスポットラウンドに由来するプールはまた、表面プラスモン共鳴バイオセンサーＳＥＬＥＸのラウンド２における使用のために、α^{32}Ｐ－ＡＴＰの非存在下で上記のように転写した。

【００４９】

表面プラスモン共鳴バイオセンサーＳＥＬＥＸ

ＢＩＡｃｏｒｅモデル２０００機器で表面プラスモン共鳴（surface plasmon resonance）バイオセンサー技術を使用して、２－ｓｐｒ～９－ｓｐｒラウンドを実施した。この実験には、１×ＤＰＢＳ、1mM $MgCl_2$、０．００５％Ｐ２０界面活性剤（カタログ番号ＢＲ－１０００－５４、Biacore社、ピスカタウェイ、ＮＪ）を泳動緩衝液として使用した。Ｂｉａｃｏｒｅアミンカップリングキット（カタログ番号ＢＲ－１０００－５０、Biacore社、ピスカタウェイ、ＮＪ）を製造業者の指示に従って使用して、CM5 ＢＩＡＣＯＲＥチップ（Biacore社、ピスカタウェイ、ＮＪ）上でＴＧＦβ２をアミンとカップルさせた。簡潔に言うと、ＴＧＦβ２のアリコート（３μＬ、１００μｇ／ｍＬの濃度で4mM ＨＣｌに溶解）を３０μＬの10mM CH_3COONa（ｐＨ５．０）で希釈し、様々な容量で、２５℃のＥＤＣ－ＮＨＳ活性化チップ上に注入し、反応ユ

ニット（ＲＵ）で測定されるように様々な負荷レベルを達成した。カップリングの後で、このチップを、３Ｍ ＮａＣｌで約１．５分間、１０μＬ／分で洗浄した。上記の実験条件の下で、１５ＲＵ／μＬのＴＧＦβ２負荷を達成することができた。フローセル１、２及び３にＴＧＦβ２を負荷し、フローセル４は対照及びバックグラウンドを差し引くためにブランクとした。チップは使用前にＬＡＰ及び／又は可溶性受容体ＩＩＩ（R&D Systems社、ミネアポリス、MN）の結合を３７℃で試験することによって活性を試験した。それぞれの試験注入の最後に、１０mM ＮａOHでの１分洗浄を使用して、チップを再生させた。ＳＥＬＥＸラウンドのために、標識ヌクレオチドを用いないインビトロ転写により産生されたＲＮＡプールを泳動緩衝液に溶かし、５μＬ／分、３７℃で、ＴＧＦβ２を負荷したＣＭ５チップ上に注入した。各ラウンドで使用されるＲＮＡプールの濃度及び容量は、表４に示される通りである。各ラウンドで、このＲＮＡプールを４０μＬの注入液に入れ、それぞれの注入サイクルの後に解離相が続き、そこで、ＤＰＢＳ、１mM $MgCl_2$を使用して２０μＬ／分でチップを洗浄し、３つの１００μＬ画分（各５分）を回収した。最後の注入－解離サイクルに続き、０．２５％ ＳＤＳでチップを処理し、溶出したＲＮＡを最終画分として回収した。各注入サイクルの第３画分とＳＤＳ溶出液をプールし、ＲＴ／ＰＣＲにより増幅して、次回のＳＥＬＥＸラウンド用のテンプレートプールを産生した。

【００５０】

共鳴ミラー光学バイオセンサーＳＥＬＥＸ

ＩＡＳＹＳプラス共鳴ミラー（resonant mirror）光学バイオセンサー機器を使用して、１０－ｒｍ～１３－ｒｍラウンドを実施した。表面プラスモン共鳴ＳＥＬＥＸ由来の９－ｓｐｒラウンドを出発材料として使用した。この実験には、１×ＤＰＢＳ、１mM $MgCl_2$、０．００５％ Ｐ２０界面活性剤（カタログ番号ＢＲ－１０００－５４、Biacore社、ピスカタウェイ、ＮＪ）を泳動緩衝液として使用した。製造業者のプロトコールに従い、ＣＭＤ ＩＡＳＹＳキュベット（Affinity Sensors社、ケンブリッジ、ＵＫ）上でＴＧＦβ２をアミンとカップルさせた。簡潔に言うと、ＣＭＤキュベットを０．２Ｍ ＥＤＣ、０．０５Ｍ ＮＨＳで１０分間活性化し、３５μＬの１０mM CH_3COONa（ｐＨ５．５

）に溶解させた３５μＬの０．４μＭ ＴＧＦβ２、１０mM CH_3COONa（ｐＨ５．５）を注入することにより、ＴＧＦβ２をカップリングさせた。このカップリング反応は２５℃、約１５分間であり、約２,０００Ａｒｃｓｅｃのシグナルを生じた。キュベットを１Mエタノールアミンに１～２分曝すことによって未反応部位をキャップした。カップリング及びキャッピングの後でキュベットを3Ｍ ＮａＣｌに１～２分間曝し、使用に備えた。キュベットは、ＬＡＰ及び／又は可溶性受容体ＩＩＩ（R&D Systems社、ミネアポリス、MN）の結合を３７℃で測定することによって活性について日常的に試験した。それぞれの試験注入の最後に、５０mM $NaCO_3$で１分間洗浄して、チップを再生させた。ＳＥＬＥＸラウンドのために、標識ヌクレオチドを用いないインビトロ転写により産生されたＲＮＡプールを泳動緩衝液に溶かした。ＴＧＦβ２を負荷したＣＭＤキュベットにそれらを注入し、１００％ステアリング下、３７℃で２７～６０分間（表６）インキュベートした。結合の後で、ＲＮＡを緩衝液で置換して、結合したＲＮＡがキュベット表面から解離することを観察した。３７℃で３０～１５０分間（表６）解離させながら、緩衝液を数回交換し蒸発を避けた。解離の後で、残存するＲＮＡをH_2O又は０．２５％ ＳＤＳで溶出させ、上記のようにＲＮＡを増幅させ、次のＳＥＬＥＸラウンドへ持ち越した。

【００５１】

フィルター分配及びポリアニオン競合を使用するＳＥＬＥＸ

ラウンド９ｂ～２２ａについては、１）非特異的に結合するリガンドを競合除外するためにヘパリン又は酵母ｔＲＮＡを含めたこと、２）結合緩衝液をＨＢＳＭＣＫ（５０mM ＨＥＰＥＳ，ｐＨ7．４、１４０mM ＮａＣｌ、1mM $MgCl_2$、1mM $CaCl_2$、3mM ＫＣｌ）としたこと、３）多大な努力をしてフィルター結合配列を減少させたこと（溶出及び転写後に核酸をフィルター上へ前吸着させる、ｔＲＮＡ及びウシ血清アルブミンで分配前にフィルターをブロックし、洗浄緩衝液へ０．５M尿素を加えること）、及び４）転写物をグアノシン：２’－フルオロヌクレオチドのモル比が５：１の混合物で開始したこと以外は、実質的にFitzwater and Polisky (1996) Meth. Enz. 267: 275-301に記載のように、フィルター分配を使用するＳＥＬＥＸを実施した。グアノシンを用いた

開始により、ＳＥＬＥＸ又は放射標識しない生物活性アッセイに核酸を使用することが可能になり、核酸が結合試験のために５’末端で放射標識される場合はホスファターゼ工程が軽減される。

【００５２】

表面プラスモン共鳴ＳＥＬＥＸのラウンド８－ｓｐｒを出発材料として使用した。ラウンド９ｂ～１４ｉでは、タンパク過剰の条件を使用してＳＥＬＥＸ法を実施した。核酸及びタンパク質の濃度はラウンド１５ｃにおいて等モルとした。ラウンド１６ａ～２２ａは核酸過剰の条件を使用した（表２）。ラウンド９ｂ～１４ｉでは競合剤（酵母ｔＲＮＡ及びヘパリン）を使用した。フィルターは、ラウンド９ｂ～１２ｄでは１０～１５ｍＬのＨＢＳＭＣＫ緩衝液で、ラウンド１３ｉ～２２ａでは増加量（５～５０ｍＬ）のＨＢＳＭＣＫ、０．５Ｍ尿素で洗浄した。

【００５３】

核酸リガンドプールの配列決定

核酸プールは、Fitzwater and Polisky (1996) Meth. Enz. 267: 275-301に記載の通りに配列決定した。

【００５４】

リガンド特異的逆転写ＰＣＲを使用する核酸リガンドプールのスクリーニング

様々なプール由来の核酸をクローン「特異的」プライマー（リガンド１４ｉ－１に対してＭＬ－８５（配列番号１６）及びリガンド２１ａ－２１に対してＭＬ－８１（配列番号１８））を用いて１２、１５又は１８サイクルの間、逆転写した。純粋な核酸リガンドと、１０％、３％、１％、０．３％又は０．１％のリガンドを含有するラウンド０の４０Ｎ７核酸の混合物を同じように処理し、核酸プールのＲＴ－ＰＣＲからのシグナルを定量するのに役立てた。

【００５５】

核酸リガンドのクローニング、スクリーニング及び配列決定

核酸リガンドは２種の方法を使用してクローニングした。１つの方法では、製造業者の教示に従いリガンドをｐＣＲＳｃｒｉｐｔへ直接クローニングし、大腸菌株のＸＬ－１ Ｂｌｕｅ ＭＲＦ’Ｋａｎを形質転換させた。他の方法では、プ

ライマーのＭＬ－３４（配列番号１１）及びＭＬ－７８（配列番号１２）を使用するＰＣＲにより二本鎖ＤＮＡ転写テンプレートを増幅させ、ＢａｍＨＩ及びＥｃｏＲＩ制限酵素で消化し、ＢａｍＨＩ及びＥｃｏＲＩで消化されたｐＵＣ９へクローニングした。この連結反応物で大腸菌株のＤＨ５αを形質転換させた。アンピシリンプレート上でコロニーを選択し、ベクター特異的プライマー（ＲＳＰ１（配列番号１３）及びＦＳＰ２（配列番号１４））を使用するＰＣＲにより挿入物についてスクリーニングした。典型的には、クローンの９０％～１００％が挿入物を有した。いくつかのコロニー又は核酸プールも、すでに単離されたものとは異なるクローンを同定する試みにおいて、１４ｉ－１、２１ａ－４又は２１ａ－２１のリガンド特異的プライマー（それぞれ、ＭＬ－７９（配列番号１７）、ＭＬ－８１（配列番号１８）及びＭＬ－８５（配列番号１６））を使用してスクリーニングされた。

【００５６】

ＱＩＡｐｒｅｐスピンミニプレップキット（QIAGEN社、バレンシア、ＣＡ）又はＰＥＲＦＥＣＴｐｒｅｐプラスミドＤＮＡキット（５’３’社、ボールダー、ＣＯ）を使用して、形質転換体由来のプラスミドミニプレップを調製した。Ｂｉｇ Ｄｙｅキット及び配列決定プライマー（ＲＳＰ２）を用いて配列決定反応を実施した。この配列決定用生成物をＡＢＩモデル３７７シークエンサーで分析した。

【００５７】

核酸リガンドの境界部分

ＴＧＦβ２に結合し得る最小リガンドの境界部分（５’及び３’末端）を実質的にFitzwater and Polisky (1996) Meth. Enz. 267: 275-301に記載の通りに決定した。用いたタンパク質の濃度は０、１ｎＭ及び１０ｎＭであり、核酸／タンパク質の比率は１であった。この実験に使用した結合緩衝液は、ＨＢＳＭＣ、０．０１％ ＨＳＡであった。結合反応物を３７℃で３０分間インキュベートし、０．４５μｍのニトロセルロースフィルター（１５mm）を介して濾過し、次いで１５ｍＬのＨＢＳＭＣで洗浄した。フェノール－尿素抽出によりＲＮＡを回収し、溶出されたＲＮＡをグリコーゲンの存在下でエタノール沈澱させ、H_2Oに

再懸濁し、等量の２×ホルムアミド色素を補充し、８％アクリルアミド、８M尿素配列決定用ゲル上で分析した。ＴＧＦβ２に結合した短鎖型ＲＮＡを、FUJIX BAS1000 phosphorimager（FUJI Medical Systems社、アメリカ）上で可視化して現像した。

【００５８】

核酸リガンドの切断

完全長の核酸リガンドの短鎖型バージョンを、３種の方法で産生した。第１の方法では、大腸菌ＲＮａｓｅＨとハイブリッド２’－OCH_3 RNA／ＤＮＡオリゴヌクレオチド（５’Ｎ７切断、３’Ｎ７切断；表１）を使用して、特定の部位で核酸を切断させた。切断ＳＥＬＥＸについては、「切断ＳＥＬＥＸ法」と題される、米国特許出願第０９／２７５,８５０号（１９９９年3月２４日出願）に説明されていて、これはそのまま本明細書中に援用される。第２の方法では、所望のリガンド配列をコードする重複したＤＮＡオリゴヌクレオチドをアニールし、クレノウＤＮＡポリメラーゼにより伸張させ、次いで転写した。第３の方法では、所望の配列を有するリガンドを化学合成した。

【００５９】

ヒトＴＧＦβ群への核酸リガンドの結合

標識化ＲＮＡのニトロセルロース画分をタンパク質濃度の関数として使用して平衡解離定数を測定することによって、個別リガンドの結合活性を決定した。ＲＮＡは本体を標識化するか又はグアニル化して、次いでγ－^{32}Ｐ ＡＴＰ及びＴ４ポリヌクレオチドキナーゼで５’末端を標識化した。結合反応は、標識化ＲＮＡの濃度を０．１nM未満で一定に保ちながら、様々なタンパク質濃度（典型的には、３倍又は１０倍の増加量）で設定し、３７℃で１０分間インキュベートした。ニトロセルロース／酢酸セルロース混合マトリックス（孔サイズ０．４５μmのフィルターディスク、ＨＡタイプ；Millipore社、ベッドフォード、MA）を介して結合反応物を濾過することによって、タンパク質－ＲＮＡ複合体を非複合化ＲＮＡから分画して離した。濾過のためには、真空マニホルド（１２穴、ミリポア、又は９６穴、ＢＲＬ）上にフィルターを置き、１～５mＬの結合緩衝液を吸引することによって湿らせた。この結合反応物をフィルターから吸引し、１

～５ｍＬの結合緩衝液で洗浄し、シンチレーションカウンター（Beckmann）において計数した。ｈＴＧＦβ２に対するＲＮＡリガンドの単相平衡解離定数を得るには、結合反応：　　K_D

Ｒ：Ｐ→Ｒ＋Ｐ

（ここで、Ｒ＝ＲＮＡ；Ｐ＝タンパク質、及びK_D＝解離定数）を、平衡状態で結合したＲＮＡの分画についての式へ変換する：

$q=(f/2R_T)(P_T+R_T+K_D-((P_T+R_T+K_D)^2-4P_TR_T)^{1/2})$

（ここで、ｑ＝結合ＲＮＡ画分；P_T＝全タンパク質濃度；R_T＝全ＲＮＡ濃度；及びｆ＝ＲＮＡ－タンパク質複合体の保持効率）。ＲＮＡ－ＴＧＦβ２複合体のニトロセルロースフィルター上での平均保持効率は、０．３～０．８である。Kaleidagraphソフトウェア（Synergy Software、レディング、ＰＡ）を使用するデータ点の最小二乗フィッティングによりＫｄ値を得た。

【００６０】

リガンド間の競合

１ｎＭの濃度の^{32}Ｐ－標識化試験リガンドを増加濃度の非標識ＮＸ２２２８３（配列番号１１４）と混合した。次いで、試験リガンドのＫｄに近いと推定されるＴＧＦβ２の量を加えた（ＮＸ２２２８３では１ｎＭ、２１ａ－２１では１ｎＭ、２１ａ－４では３ｎＭ、及び１４ｉ－１では１０ｎＭ）。この反応物をインキュベートし、濾過し、洗浄し、１回の結合反応について計数した。

【００６１】

ＮＸ２２２８３のオフ（解離）速度

１ｎＭの^{32}Ｐ－標識化ＮＸ２２２８３を１０ｎＭ ＴＧＦβ２とともに混合し、５分間インキュベートしてタンパク質を核酸へ結合させ、次いで１０００倍過剰（１μＭ）の非標識ＮＸ２２２８３を加えた。様々な時点で反応物を濾過し、洗浄して、依然として結合している^{32}Ｐ－標識化ＮＸ２２２８３の量を測定した。

【００６２】

偏向ＳＥＬＥＸ

核酸リガンド２１ａ－２１の３４merの短鎖型（ＮＸ２２２８４（配列番号１１

５））の配列に基づいて、配列のライブラリーを構築した。ＤＮＡテンプレート（３４Ｎ７．２１ａ－２１（配列番号７））の配列を表１に示す。ランダムな領域は３４塩基の長さである。それぞれの位置で、ランダム化領域は、６２．５％のＮＸ２２２８４配列と１２．５％の他の３ヌクレオチドから構成される。このように、ランダム化領域はそれぞれの位置（３７．５％）で突然変異を受けるが、同時に、ＮＸ２２２８４の配列の方へ偏る。固定領域（５’Ｎ７、３’Ｎ７）は、一次ＳＥＬＥＸについて使用されるのと同じであった。

【００６３】

３４Ｎ７．２１ａ－２１ラウンド０の核酸を産生するために、５’Ｎ７（配列番号２）及び３’Ｎ７（配列番号３）プライマー（表１）を使用するＰＣＲによりＤＮＡテンプレートを増幅した。このＰＣＲ産物を、上記のフィルター分画ＳＥＬＥＸの節で述べたように転写した。これにより、表１（配列番号１０）に示される配列をもった３４Ｎ７．２１ａ－２１ラウンド０核酸プールを生じた。

【００６４】

上記と、競合剤のない Fitzwater and Polisky (1996) (Meth. Enz. 267: 275-301）のフィルター分画を使用して、ヒトＴＧＦβ２へ最もよく結合する核酸リガンドを濃縮した。タンパク質濃度は約１５０～３００ｎＭから５０ｐＭへ低下させた。核酸濃度は、１μＭから１ｎＭへ低下させた。核酸／タンパク質の比は０．２５～１２５の範囲であった。ラウンド５ａのリガンドのプールをｐＵＣ９へクローン化し、上記のように配列決定した。

【００６５】

ＴＧＦβ２核酸リガンドの生物活性

ＴＧＦβ２核酸リガンドの生物活性を、ミンク肺上皮細胞を用いて測定した。これらの細胞の増殖はＴＧＦβ２により阻害される。ヒトＴＧＦβ２をこの細胞で滴定し、^{3}Ｈ－チミジンの取込みを測定した。細胞による^{3}Ｈ－チミジンの取込みが９０～１００％阻害される点（典型的には１～４ｐＭ）を決定した。このＴＧＦβ２の阻害量を様々な量の核酸リガンド（典型的には、３倍増加量の０．３又は１ｎＭから１又は３μＭ）とともに使用した。典型的には、１００μＬ ＭＥＭ、１０mM ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）、０．２％ ＦＢＳにおいて、９６穴

プレートに１０Ｅ５／ｍＬで、細胞をプレートした。４時間３７℃のインキュベーション後に細胞がウェルの表面に十分付着したとき、以下のように核酸リガンドと一緒か又は一緒でなく、ＴＧＦβ２を１～４ｐMで加えた：９６穴プレート全体でリガンドを３倍希釈工程で希釈し、次いでＴＧＦβ２を、対照を除くすべてのウェルへ１～４ｐMで加えた。細胞を１６～１８時間インキュベートした後に^{3}Ｈ－チミジンを加え、次いでインキュベーションを、０．２５μＣｉ／ウェルでの^{3}Ｈ－チミジン追加後、さらに２０時間継続した。インキュベーション後、１％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００で細胞を溶解し、パッカード９６穴プレートハーベスターにおいて、ＧＦ／Ｂフィルタープレート上で採取し、細胞ＤＮＡにおける^{3}Ｈ－チミジン取込みを、Packard Top-CountのMicroScint（Packard、マリデン、ＣＴ）におけるシンチレーション計数により定量した。ＲＮＡ濃度に対する最大^{3}Ｈ－チミジン取込みの比率としてデータをプロットし、Kaleidagraphソフトウェア（Synergy Software、レディング、ＰＡ）により式：ｍ３*（ｍ０＋ｍ１＋（ｍ２）－（（ｍ０＋ｍ１＋（ｍ２））*（ｍ０＋ｍ１＋（ｍ２））－４*（ｍ０）*（（ｍ２））））^０．５）／（２*（ｍ２））へ適合させた；ここでｍ０は競合剤ＲＮＡの濃度であり；ｍ１はＩＣ５０であり、ｍ２はＴＧＦβ２の濃度であり、ｍ３は最大^{3}Ｈ－チミジン取込み画分の安定水準値である。K_i値は、式：$K_i = IC_{50}/(1+([T]/K_{dT})$により、$IC_{50}$値から決定した（ここで、［Ｔ］はアッセイ中に存在するＴＧＦβ２のモル濃度であり、K_{dT}は、ＴＧＦβ２滴定実験により決定される、ＭＬＥＣ増殖の５０％阻害を引き起こすＴＧＦβ２の濃度である）。このアッセイはまた、ＲＮＡリガンドのアイソタイプ特異性を決定するためにも使用されたが、ここでは３種のＴＧＦβのアイソタイプをＭＬＥＣ複製の阻害剤として独立して使用した。

【００６６】

ＮＸ２２３２３（配列番号１２１）の薬物動態特性

ＴＧＦβ２リガンドのＮＸ２２３２３の薬物動態特性をスプレーグドーリーラットにおいて決定した。ＮＸ２２３２３を無菌ＰＢＳに懸濁させ、－２０℃以下で保存した。動物への投与に先立って、ＮＸ２２３２３を０．９２５ｍｇ／ｍＬ（１８μM，オリゴヌクレオチドの分子量と、オリゴ０．０３７ｍｇ／ｍｌの吸

光係数を有する２６０ｎｍでの紫外線吸収に基づく）の最終濃度になるまで無菌ＰＢＳで希釈した。スプレーグドーリーラット（ｎ＝２）に、尾静脈を介した静脈内ボーラス注射によりＮＸ２２３２３の単回用量を投与した。イソフルラン麻酔下の静脈穿刺により血液サンプル（約４００μＬ）を得て、ＥＤＴＡコーティング管に入れた。このＥＤＴＡ処理血液サンプルをすぐに遠心分離により処理して血清を得て、－２０℃以下に保存した。血液サンプル採取の時点は５～２８８０分に及んだ。

【００６７】

標準品と、ブランクラット血漿において調製した品質管理サンプル、及び血漿サンプルを、二重のハイブリダイゼーションアッセイにより分析した。ハイブリダイゼーション分析の血清サンプルを調製するために、血漿サンプル（又はサンプルの血漿希釈液）２５μＬを、４×ＳＳＣ、０．５％サルコシル（sarkosyl）１００μＬへ加えた。次いで、２５μＬのアリコートを、カバー付き９６穴プレートにおいて、磁気ビーズにコンジュゲートした２４μM捕捉オリゴヌクレオチドとビオチンにコンジュゲートした２８μM検出オリゴヌクレオチドを含有する４×ＳＳＣ、０．５％サルコシル２５μＬと混合した。この混合液を４５℃で１時間インキュベートした。非結合のオリゴヌクレオチドを除去し、ストレプタビジンアルカリホスファターゼ０．１ｎｇ／μＬ ＮＴＴ緩衝液（０．８M ＮａＣｌ、２０mM Ｔｒｉｓ pH７．５、０．５％ Ｔｗｅｅｎ２０）を各ウェルへ加えた後、室温で３０分インキュベーションした。ストレプタビジンアルカリホスファターゼを除去し、プレートをＮＴＴ緩衝液２００μＬで２回洗浄した。ＮＴＴ緩衝液を除去し、ＤＥＡ緩衝液（０．０２％ NaN_3、１mM $MgCl_2$、１％ジエタノールアミン（トロピクス社、ベドフォード、MA），pH１０）５０μＬで置換し、３４μＬ／mＬ ２５mMアルカリホスファターゼの化学発光基質（Tropix社、ベッドフォード、MA）、及び２０％サファイア（Sapphire）化学発光増幅剤（Tropix社、ベッドフォード、MA）／ＤＥＡ緩衝液（５０μＬ／ウェル）を加えた。このプレートを室温で２０分間インキュベートし、ルミノメーターで読み取った。可変スロープのＳ字状用量応答非線形回帰式（ＰＲＩＳＭ、バージョン２．００、GraphPad、サンディエゴ、ＣＡ）を使用して、ＮＸ２

２３２３の標準曲線を適合させた。この標準曲線からサンプル及び品質管理の濃度を外挿し、希釈について較正した。

【００６８】

各時点での平均血漿濃度を算出し、薬物動態分析に利用した。WinNonlinバージョン１．５（Scientific Consulting社）を使用して、非区画と区画の両方の薬物動態分析を実行した。非区画分析では、以下の変数を算出した：０時間の点で外挿される最大濃度（Ｃｍａｘ）、０時間から最終時点までの曲線下の面積（ＡＵＣラスト）、０時間から無限時間までの曲線下の面積（ＡＵＣＩＮＦ）、終末相の半減期（βｔ１／２）、クリアランス速度（ＣＩ）、０～無限時間から算出される平均貯留時間（ＭＲＴＩＮＦ）、定常状態での分布体積（Ｖｓｓ）、消失期の分布体積（Ｖｚ）。区画分析の場合は、データを十分適合させるモノ指数式の最小数に基づいて、以下の変数を算出した：０時間の点で外挿される最大濃度（Ｃｍａｘ）、０時間から無限時間までの曲線下の面積（ＡＵＣＩＮＦ）、分布相の半減期（αｔ１／２）、終末相の半減期（βｔ１／２）、分布相の指数定数（Ａ）、終末相の指数定数（Ｂ）、クリアランス速度（ＣＩ）、０～無限時間から算出される平均貯留時間（ＭＲＴＩＮＦ）、定常状態での分布体積（Ｖｓｓ）。

【００６９】

実施例２．ヒトＴＧＦβ２に結合する核酸リガンドの単離

ＴＧＦβ２に関するいくつかのＳＥＬＥＸ実験を図１に要約されるように試みた。ニトロセルロースを通す標準濾過、スポット、表面プラスモン共鳴バイオセンサー（BIAcore）、共鳴ミラーバイオセンサー（Iasys）、ポリスチレンビーズ、及びポリアクリルアミドゲルシフトを含む、いくつかの分画法をＳＥＬＥＸの経過の様々な段階で適用した。本明細書に記載されるスポットＳＥＬＥＸ、表面プラスモン共鳴バイオセンサーＳＥＬＥＸ、及びフィルター分画ＳＥＬＥＸ（競合剤を含む）の組み合わせがアフィニティーにおける最良の全体的な改善（約＞１０００倍）を有したので、詳しく説明する。さらに、共鳴ミラーバイオセンサー技術を利用する、このＳＥＬＥＸの派生法についても説明する。

【００７０】

スポットＳＥＬＥＸ条件

ヒトＴＧＦβ２についてのＳＥＬＥＸ法を開始するのにスポットＳＥＬＥＸを選択したのは、それにより多量のタンパク質及び核酸が相互作用することが可能になり得るからである。使用される条件を表３に示す。ラウンド１の結果は良好であった。バックグラウンドが非常に低く、ノイズに対するシグナルの比は５であった。この点で、第１ラウンド由来の集合物を、スポット分画法で継続することに加え、表面プラスモンＳＥＬＥＸに使用した。表３に要約されるように、１０ラウンドのスポットＳＥＬＥＸを完了させ、このプールのアフィニティーの約３０倍という適度な改善が観察された。これらのプールはそれ以上分析しなかった。

【００７１】

表面プラスモン共鳴バイオセンサー（ｓｐｒ）ＳＥＬＥＸ

表面プラスモン共鳴バイオセンサーを分画の中間として選択したのは、それにより、センサーへ結合するごく低いバックグラウンド核酸が提供され、それで高度な濃縮が獲得され得るからである。さらに、核酸の結合及び溶出がリアルタイムでモニターされ、定量され得る。

【００７２】

アミンカップリング化学を使用して、BIAcoreバイオセンサーへＴＧＦβ２をカップルさせた。このやり方でカップルしたＴＧＦβ２は、潜伏関連タンパク質、及び組換え可溶性ＴＧＦβ受容体に結合する。図２Ａ及び２Ｂは、ＬＡＰ及び組換えｓＲＩＩＩで得られた典型的なセンソグラム（sensogram）を示し、ここではアビド（avid）結合の指標であるk_{on}及びk_{off}率が観察された。表４に要約されるこのＳＥＬＥＸ実験の間、結合シグナルは、先ずラウンド（Ｒｄ）６のバイオセンサー上で観察され、ラウンド９まで増加し、次いでラウンド１０及び１１で減少した。図３は、０、４－ｓｐｒ、６－ｓｐｒ、８－ｓｐｒ、及び９－ｓｐｒでのセンソグラムを示す。図４は、競合剤ｔＲＮＡの存在下及び非存在下での、ｓｐｒ ＳＥＬＥＸ由来の代表的なプールについての典型的なフィルター結合曲線を示し、これらのデータから、ラウンド９は、二相性のやり方、つまりK_d＝３０ｎＭの高アフィニティーとK_d＝１６０ｎＭの低アフィニティーで結合

するらしい。

【００７３】

生物活性アッセイでは、ラウンド０プールのK_iは約２．６μMで、ラウンド９－ｓｐｒプールのK_iは約７１１nMであった（以下参照）。代表的なプールの配列分析は、そのようなプールがラウンド８までは有意な複雑性を維持する一方で、ラウンド９以後は、そのようなプールが単一の配列の方へ強く偏っていることを示した。

【００７４】

ラウンド８－ｓｐｒをクローン化して、分析した。５１種の異なる配列を表す全部で６９個のクローンを分析した。４種の配列（Ｎｏ．８．２（配列番号２２）、８．３（配列番号２３）、８．９（配列番号２７）、及び８．４８（配列番号５４）；表５参照）が１回以上表れ、６９個のクローンのうち２１個を占めた。これらの４種の配列はすべてＴＧＦβ２に結合し、フィルターＳＥＬＥＸから単離されるクローン（１４ｉ－１）の２又は３塩基変異体であった（以下参照）。他の２３種の配列は非結合性であるか又はフィルターに結合する配列であり（表５参照）、２５個のクローンについては結合性を試験しなかった。

【００７５】

共鳴ミラー（ｒｍ）光学バイオセンサーＳＥＬＥＸ

表面プラスモン共鳴バイオセンサーで選択された核酸プールのアフィニティーがラウンド９－ｓｐｒで最高だったので、共鳴ミラー（ｒｍ）光学バイオセンサー技術を試験して、それによりこの核酸リガンドのアフィニティーをさらに増進させることができるかどうかを判定した。共鳴ミラー光学バイオセンサー技術は表面プラスモンバイオセンサー技術と同一の利点を多く提供するが、さらに、その結合はフロー条件下のチップ表面全体よりは平衡条件下のキュベット内でなされる。キュベット内部では、結合を長時間の間延長し得る。従って、核酸／タンパク質の結合反応がよりストリンジェントで選択的になり得る。

【００７６】

共鳴ミラーＳＥＬＥＸでは、アミンカップリング化学を使用して、ＴＧＦβ２を２つのバイオセンサーキュベットへカップルさせた。一方のキュベットではＴ

ＧＦβ２をＳＤＳ変性により不活性化し、このキュベットをバックグラウンドの評価に役立てた。活性ＴＧＦβ２を含有する他のキュベットをＳＥＬＥＸに使用した。ラウンド９－ｓｐｒから開始し、共鳴ミラー光学バイオセンサー技術を使用して５ラウンド実施した。この共鳴ミラーＳＥＬＥＸに使用した条件とその結果を表６に示す。

【００７７】

各ラウンドにつきバイオセンサーシグナルを観察した。ラウンド１０－ｒｍから１２－ｒｍまでの核酸プールの結合を評価した（表６；図５）。プールK_dはラウンド１２－ｒｍまでは適度に改善したが、以降のラウンドではさらなる改善はなかった。ラウンド１２－ｒｍのプールは、それぞれ約２ｎM及び約１５０ｎMの高アフィニティー及び低アフィニティーＫｄで二相的に結合する。

【００７８】

生物活性アッセイでは、ラウンド１３－ｒｍプールのK_iは約５０５ｎMであった。サブクローニング及び配列分析にラウンド１３－ｒｍを選択した。配列決定した１５個のクローンのうち、全１５個（表７）が、もとはフィルターＳＥＬＥＸから単離した（以下参照）、クローン（１４ｉ－１）の１～５塩基変異体であった。

【００７９】

フィルター分画ＳＥＬＥＸ

フィルターＳＥＬＥＸの出発材料としてラウンド８－ｓｐｒを使用した。ラウンド８－ｓｐｒの諸特性を試験し、１）有意な分画（１０％）がニトロセルロースフィルターに結合すること、２）核酸過剰の条件を使用すると、ＴＧＦβ２に対する有意な核酸の結合（シグナル／ノイズ＞２として定義される）が検出されないこと、及び３）ポリアニオン性競合剤の存在又は非存在下では、ＴＧＦβ２に対するラウンド０の結合において有意な減少があるが、ラウンド８－ｓｐｒでは減少がないこと、が見出された。これらの知見は、以下に述べる意義を有していた。

【００８０】

競合剤の使用

ポリアニオン性競合剤（酵母ｔＲＮＡ）の存在下での、ラウンド８－ｓｐｒ核酸のＴＧＦβ２への結合を競合剤の核酸に対する様々な比率で試験した。ラウンド８－ｓｐｒ核酸では７５,０００倍過剰のｔＲＮＡが結合の５０％阻害を生じたのに対し、ラウンド０の核酸プールでは６,０００倍過剰のｔＲＮＡが結合の５０％阻害を生じた。ヘパリンもＴＧＦβ２への結合についてＲＮＡと競合したが、ＴＧＦβ２に対するＲＮＡの結合を、ｔＲＮＡを使用して観察されるものと同じ程度まで阻害するには約１０倍以上のヘパリンが必要とされた。ＴＧＦβ２／ＲＮＡ結合実験では、ＲＮＡに対して１００,０００倍過剰の酵母ｔＲＮＡを含ませることによって、ラウンド０とラウンド８－ｓｐｒの結合において１００倍の違いが検出されたが、競合剤の非存在下では、３倍の違いが観察された。このように、適量の競合剤の存在下では、選択される核酸プールの結合は影響を受けないが、ラウンド０核酸の結合は実質的に低下する。ＴＧＦβ２の核酸への結合を試験するときに競合剤を含めない場合、ＳＥＬＥＸ法を使用して選択された核酸のアフィニティーは全体に過小評価され得る。この点で、ＴＧＦβ２は、低アフィニティーの非特異的な核酸結合活性と高アフィニティーの特異的な核酸結合活性の両方を保有することにおいて、他の「専門」核酸結合タンパク質（例えば、制限酵素、ポリメラーゼ、転写因子、など）に似ている。これら２種の結合形式の違いは競合剤の存在下で明らかにされ得る。競合剤はしばしば転写因子の研究において使用される。例えば、ゲルシフト実験においては、ポリ［ｄＩ－ｄＣ］●ポリ［ｄＩ－ｄＣ］のような競合剤を結合反応のなかに含ませなければ、転写因子を含有する粗抽出物の、そのコグネイト部位を表すオリゴヌクレオチドへの特異的な結合を検出することは困難であり得る。

【００８１】

非特異的な結合により多数のタンパク質が１つの核酸にしばしば低アフィニティー部位で結合することで、偽の高アフィニティーの外観を与えることがあり得る。核酸又はタンパク質の集塊上にある多数の部位に１つのタンパク質が結合し、核酸に結合した単一タンパク質の形状になる場合もある。ＴＧＦβ２は、「粘着性」であることがよく知られている。非特異的な相互作用の競合剤の非存在下では、ＴＧＦβ２は、主に非特異的な相互作用が関わる核酸及びタンパク質の大

きなネットワーク及び複合体を形成し得る。競合剤非存在下でのＴＧＦβ２のゲルシフト分析が上記の考えを支持するのは、ＴＧＦβ２がゲル中で核酸と明確な（１対１の）複合体を形成せず、その代わりゲルの頂上でウェル内に留まるか、又は大きな不均一の核酸／タンパク質複合体を表し得るスミアーを形成するかのどちらかになるからである。

【００８２】

結合曲線をなすことの意義の他にも、ＴＧＦβ２の核酸結合特性はＳＥＬＥＸについて諸々の意義を有し得る。例えば、ＴＧＦβ２による核酸の高レベルの非特異結合は、特異的な相互作用を不明瞭にすること、又は特異的な結合の相互作用にのみ関わる核酸／タンパク質複合体の単離を妨げることによって、これまでのＳＥＬＥＸに干渉してきた可能性がある。つまり、特異的及び非特異的な核酸の相互作用の混在が形成される核酸／ＴＧＦβ２複合体のなかに存在する場合、非特異的な相互作用を消失させない限りは、特異的な相互作用についての選択が困難になり得る。いくつかのこれまでのＳＥＬＥＸ実験における進歩の不足は、特にＳＥＬＥＸの初期ラウンドにおいて、特異結合部位を含有するより少数（約１０～１０００）の高アフィニティー核酸とともに非特異的な結合部位を含有する大過剰（＞10^{12}～10^{14}）の低アフィニティー核酸による効率的な競合のためであった可能性がある。

【００８３】

タンパク質過剰又は核酸過剰の条件の使用

上記の考察を仮定すれば、ＴＧＦβ２のようなタンパク質では、タンパク質過剰又は核酸過剰のどちらの条件がよりよいのかという疑問が生じる。タンパク質過剰の条件は、非特異的な相互作用を促進する可能性がある。しかしながら、競合剤／核酸の比が、非特異的相互作用を十分消失させるが特異的相互作用を保持するほど十分に高い限りは、このことは問題になり得ない。タンパク質過剰を使用する１つの利点は、バックグラウンドに対する結合の比率がより良好で、バックグラウンドがより低いので、より良好なレベルの濃縮を生じ得るからである。

【００８４】

核酸過剰条件が非特異的な相互作用を抑制し得ないのは、ＳＥＬＥＸに使用さ

れる核酸プールの内部では、非特異結合核酸の特異結合核酸に対する比（これは最も重要なことである）が、核酸濃度がいくらであっても同じになってしまうからである。さらに、核酸過剰は競合剤／核酸の比を低下させることになり、それにより非特異的な相互作用を高める可能性がある。上記で論じたように、ｔＲＮＡの核酸に対する比は、アフィニティー濃縮が効率的であるためには、フィルターＳＥＬＥＸの初期ラウンドにおいて少なくとも１００,０００でなければならない。このことは、核酸濃度が典型的により高い場合、ＳＥＬＥＸの初期ラウンドにおいて技術的に困難になり得る。過剰核酸を使用する１つの利点は、一定配列のより多くのメンバーが１つのプールに示される場合があることである。しかしながら、フィルターＳＥＬＥＸに先行して十分な濃縮があった場合（例えば、表面プラスモン共鳴ＳＥＬＥＸのような方法を使用すること）、おそらくはある一定配列を有する多数の代表物が存在するので、このことは問題になり得ない。

【００８５】

フィルターＳＥＬＥＸ条件

フィルターＳＥＬＥＸの各ラウンドで使用される条件を表１５に示す。核酸／タンパク質の比、競合剤／核酸の比、フィルター洗浄緩衝液、及びフィルター洗浄容量を変化させる多数（１２まで）の条件を各ラウンドにおいて使用した。典型的には、最低のバックグラウンド（＜１％）と有意な結合／バックグラウンド比（＞２）を生じる条件を次のラウンドについて処理した。次のラウンドに使用したＳＥＬＥＸラウンドのデータだけを表１５に示す。

【００８６】

ラウンド８－ｓｐｒのＴＧＦβ２への結合を６０％阻害すると「ＳＥＬＥＸ反応」において決定された量のｔＲＮＡ競合剤（１００,０００倍過剰）を使用してＳＥＬＥＸを開始した。ラウンド９ｂ～１４ｉについて競合剤を含むＳＥＬＥＸ反応を実施した。ラウンド９においてもｔＲＮＡを含めることで、ラウンド８－ｓｐｒ核酸のニトロセルロースフィルターへの結合は、約１０～１５％から約１％へと劇的に低下した。ＳＥＬＥＸ反応では、「バックグラウンド」結合が高くなるほど、最大限可能な濃縮は低くなる。従って、フィルターＳＥＬＥＸの初期ラウンドにｔＲＮＡを含ませることは、二重の利益をもたらし得る。それはＴ

ＧＦβ２の核酸への非特異結合を消失させただけでなく、バックグラウンドを低下させることによってより高い濃縮を可能にしたのかもしれない。ラウンド１５ｃでは、より低いアフィニティーの競合剤には核酸の結合を低下させる効果がもはやないので、使用しなかった。このことは、おそらくは核酸プールが十分な特異性とアフィニティーでＴＧＦβ２に結合したためであろう。従って、ラウンド１６～２２では、より伝統的な核酸過剰条件を使用することによって、推定される特異核酸を互いに競合させた。

【００８７】

ラウンド１５ｃ及び１６ａでは、許容し得ないレベルまでバックグラウンドが増加した。この時点での代替分画法としてゲルシフト分画を検討したが、有効ではなかった。洗浄条件を変更することによって、ラウンド１７ａではバックグラウンドが０．２％まで低下した。ラウンド１８の後では、１ｎＭ未満のタンパク質濃度と核酸過剰条件の下でＳＥＬＥＸラウンドを実施することが可能になった。あるラウンドでは、１～５ｎＭ以上の核酸濃度がバックグラウンドを低下させるのに役立つことも見出された。

【００８８】

要約すると、フィルターＳＥＬＥＸの間に、タンパク質の濃度は３０,０００倍、つまりラウンド９ｂの３００ｎＭからラウンド２２ａの１０ｐＭまで低下した。フィルターに対するバックグラウンド結合は１０％から０．１％まで低下した。タンパク質過剰条件（約１００個のタンパク質／１個の核酸）を使用した場合にのみＴＧＦβ２に結合した核酸プールを、高核酸／タンパク質（＞１００／１）又は競合剤／核酸（＞10^7／１）過剰条件下で結合させるために選択した。

【００８９】

フィルターＳＥＬＥＸ由来の核酸プールの結合

選択された核酸プールへのＴＧＦβ２の結合は、着実に、しかしゆっくりと、かつ不規則に改善した。出発プール（ラウンド８－ｓｐｒ；K_d＝約５００ｎＭ）に比較して、ラウンド１０ｂ（K_d＝約１００ｎＭ）の結合には改善があった。ラウンド１１ａのアフィニティーは１０ｂと同じであり、ラウンド１２ｄのそ

れは約４０ｎＭまでやや改善した。ラウンド１３ｉ及び１５ｃはＴＧＦβ２とほぼ同じ（K_d＝約３０）に結合したが、ラウンド１４ｉはより悪く（K_d＝約７５）結合した可能性がある。ラウンド１６ａの核酸（K_d＝約１０ｎＭ）は、ラウンド１５ｃよりやや良好に結合した。ラウンド１６ａから１７ａ（K_d＝約５ｎＭ）由来の核酸プールのアフィニティーでは約２倍の改善があった。ラウンド１８ａの核酸のK_d（約５ｎＭ）はラウンド１７ａの核酸に等しかった。ラウンド１８ｂから１９ａ（K_d＝約２～３ｎＭ）でもアフィニティーにわずかな増加があった。ラウンド２０ａ、２１ａ及び２２ａのアフィニティーは約１ｎＭで安定していた。ＳＥＬＥＸをラウンド２２ａで止めたのは、結合／バックグラウンドの比が２未満であり、ラウンド２３においてタンパク質の濃度を１～３ｐＭへ低下させることが技術的に困難であったからからである。

【００９０】

要約すると、K_dはラウンド９ｂの約５００ｎＭからラウンド２１ａの約１ｎＭへ改善し、フィルターＳＥＬＥＸでは約５００倍、全ＳＥＬＥＸでは１０,０００倍を越える全体的な改善をもたらした。１ラウンドあたりの平均改善は約１．６倍であった。この改善速度は、表面プラスモン共鳴技術だけを使用すれば約５ラウンド、又はフィルター分画だけを使用すれば約１０ラウンドを要する場合がある平均的なＳＥＬＥＸ実験に比較すると、遅い。

【００９１】

核酸プールによる生物活性の阻害

ラウンド０、９－ｓｐｒ、１３－ｒｍ、１４ｉ、１８ｂ、１９ａ、及び潜伏関連タンパク質（ＬＡＰ）を、ミンク肺上皮細胞において、^{3}Ｈ－チミジン取込みのＴＧＦβ２仲介性阻害を逆転させるその能力について試験した。その結果は、ラウンド９－ｓｐｒプールのK_iが約７１１ｎＭであったということである。ラウンド１４ｉ、１８ｂ、１９ａ及び２１ａプールのK_iは、それぞれ約２３１ｎＭ、３０９ｎＭ、１５４ｎＭ及び１０ｎＭであった。ＬＡＰのK_iは約０．５ｎＭであった。

【００９２】

上記の結果から、ＴＧＦβ２の阻害剤がＴＧＦβ２　ＳＥＬＥＸの後半ラウン

ドにおいて濃縮されたと結論づけることができる。さらに、インビボで測定されたアフィニティーとインビボで測定された阻害活性の間には一貫した相関性がある：

ＬＡＰ＜ラウンド１９ａ＜ラウンド１４ｉ＜ラウンド１３－ｒｍ＜ラウンド８－ｓｐｒ＜ラウンド０．

フィルターＳＥＬＥＸから単離された核酸リガンドクローンの配列決定

いくつかの判定基準（プールK_d、フィルター結合バックグラウンド、結合／ノイズバックグラウンド、細胞アッセイにおける阻害活性、及びＳＥＬＥＸのＲＴ－ＰＣＲ工程の間に異常な生成物がないこと）に基づいて、配列分析のためにラウンド２１ａをサブクローン化した。ラウンド２１ａ由来の４８種のクローンを配列決定した。クローン２１ａ－４（配列番号８６）及び２１ａ－２１（配列番号８７）（前の数字はクローンが最初に単離されたＳＥＬＥＸラウンドを意味し、後の数字はクローン番号である）により代表される２つのユニークな配列を同定した（表８）。いくつかのクローンはクローン２１ａ－４及び２１ａ－２１のマイナー変異（１～６塩基異なる）であった。クローン２１ａ－４及び２１ａ－２１に特異的なプライマーを使用するＰＣＲにより１００個以上のクローンをスクリーニングした。このうち９０個はクローン２１ａ－２１様であり、９個はクローン２１ａ－４様であり、１個は第三のユニーク配列（２１ａ－４８）であったが、これはニトロセルロースフィルター結合性の配列であることが示された。まとめると、ラウンド２１ａはほとんどすべて２種の配列とその配列の変異体から構成される。ラウンド２１ａが最終ラウンド前のものであり、この核酸プールのアフィニティー全体が１９ａから２１ａでさして改善しなかったことからすれば、このことは驚くにあたらなかった。

【００９３】

ラウンド２１ａの配列多様性が制限されていたので、他の３ラウンド（１４ｉ、１６ａ及び１８ａ）も配列を決定した。単離されたより新規な配列（１４ｉ－１（配列番号７２）及び変異体）は１つだけである。２種のフィルター結合性配列も単離された（１６ａ－１と２１ａ－４８の変異体）。従って、ラウンド８－ｓｐｒ、１３－ｒｍ、及び２１ａについて言えば、これら３ラウンドも多様なＴ

ＧＦβ２－結合性核酸リガンドを含有しなかった。

【００９４】

１４ｉ－１、２１ａ－４及び２１ａ－２１の配列を表８に示す。ヒトＴＧＦβ２についての配列のアフィニティーは、それぞれ１０ｎＭ、３ｎＭ及び１ｎＭである。従って、これら３種の配列はヒトＴＧＦβ２と高アフィニティーで結合するリガンドである。

【００９５】

これらのリガンドを阻害性の生物活性について試験した。１４ｉ－１、２１ａ－４及び２１ａ－２１のK_iは、それぞれ約２００ｎＭ、３０ｎＭ及び１０ｎＭである。従って、これらのリガンドは阻害性リガンドでもある。これらのプールに関して言えば、結合アフィニティーは阻害活性とよく相関する。ＴＧＦβ受容体結合領域のごく近傍に存在するヘパリン結合部位の近くでＴＧＦβ２リガンドが結合する可能性がある以上、このことは驚くことではない。リガンド２１ａ－２１の阻害活性はまた抗体のそれにも匹敵した。

【００９６】

６つのラウンド（８－ｓｐｒ、１３－ｒｍ、１４ｉ、１６ａ、１８ａ、及び２１ａ）由来のクローンを単離し、配列を決定した。各配列のタイプの数を表９に要約する。配列決定により分析された２６４個のクローンとリガンド特異的プライマー（表１０）を使用するＰＣＲベースの分析により分析された１００個のクローンのうち、３種のみの異なるＴＧＦβ２リガンド配列（及びマイナー変異体）が得られた。１５種の配列はフィルター結合性の配列であり、３６種はフィルターにもＴＧＦβ２にもあまり結合しない核酸であった。このＳＥＬＥＸにおいて観察される、配列多様性における制限の程度はきわめて珍しいものである。一般には、数十の異なる核酸リガンドが単離され得るものであり、通常は、高アフィニティーの１つのリガンドはその集合の１０％未満であることを見出すものである。

【００９７】

１３ラウンドも離れているＳＥＬＥＸの６ラウンドを配列決定してスクリーニングしても多様な配列のセットを生じなかったので、このプールの諸特性をさら

に検討し、どこで配列多様性が制限されるのかを決定した。選択した核酸プールの配列を決定し、リガンド特異的プライマーを使用して、核酸プールについて半定量的ＲＴ－ＰＣＲを実施した。結果を（表１０）に示す。配列決定の結果とともに考慮すると、このＳＥＬＥＸ法の間で配列多様性の制限が起こった可能性があるのは、ラウンド６－ｓｐｒ又は７－ｓｐｒの付近であるようだ。

【００９８】

クローン１４ｉ－１はラウンド６－ｓｐｒで最初に検出され、ラウンド１４付近で最も多くなり、後期のラウンドで頻度が減少する。クローン２１ａ－４はラウンド１４ｉにおける配列決定により最初に検出され、ラウンド１６ａで最も多量になり、ラウンド２１ａまでに頻度が減少する。しかしながら、２１ａ－４は先行の数ラウンドに存在し得る。（クローン２１ａ－４に特異的なプライマーを使用する、プールのＲＴ－ＰＣＲ分析はしなかった。）クローン２１ａ－２１はラウンド１４ｉでは稀であり（配列決定によれば、１／１０４クローン未満であり；ＲＴ－ＰＣＲによれば１／２００～５００クローン未満と推定される）、ラウンド１６ａにおいてよリ多くなり、ラウンド１８ｂ及び２１ａのほとんどを構成する）。

【００９９】

高度な多様性制限をもたらしたのは表面プラスモンバイオセンサーＳＥＬＥＸであるらしいが、このことはこの技術を使用する以前にすでに観察されている。様々な後期ラウンドがほとんど１種の配列からなる理由は明らかではない。おそらく、使用した選択条件の下ではＴＧＦβ２に結合する配列がごくわずかな数しかないからであろう。ラウンド９で競合剤を含ませること、又はラウンド１６でタンパク質過剰の結合反応から核酸過剰の結合反応へスイッチすることのように選択条件を変えれば、ラウンド２１ａまでに優勢なクローンとしてクローン２１ａ－２１の出現を生じただろう。あるプールにおいて優勢なリガンドが２ラウンドでも変化しなかったのは、選択圧力が重要だったように思われる。

【０１００】

核酸リガンドの集合における変化のパターンは自然選択の理論に類似して説明され得る。初期のＳＥＬＥＸラウンドでは、多種多様な配列が存在するものであ

る。強い選択圧力は、配列変異を著しく、単一の配列が優勢になる点まで、狭める場合がある。しかしながら、稀なリガンドも依然として存在し、将来のラウンド、又は選択圧力における有意な変化の間に選択される可能性がある。このことはどんなＳＥＬＥＸ実験でも正しいが、本明細書に記載のＴＧＦβ２　ＳＥＬＥＸ実験は極端な例であるかもしれない。配列多様性に対する制限があっても、最終的にはより良好な結合リガンドが単離され得る。リガンド２１ａ－２１がラウンド１６ａにおける配列決定によって最初に同定されたことに注目されたい。従って、ラウンド２２にあっても、正確な選択条件の下でのみ優勢になり得る、稀な高アフィニティー核酸リガンドが存在する可能性がある。そのような稀な配列を単離する１つのアプローチは、後期ラウンドのＳＥＬＥＸの既知配列を（例えば、ハイブリッド選択、ＰＣＲ産物の制限酵素消化、核酸の部位特異的ＲＮａｓｅＨ切断により）特別に枯渇させることであろう。このアプローチは、後期ラウンドにはほとんど５種だけの異なる配列（３種のリガンドと２種のフィルター結合性配列）しか存在しなかったので、このＴＧＦβ　ＳＥＬＥＸに十分適している。１／１０００クローン未満において存在する配列を単離することは、枯渇法を使用すれば容易であろうが、配列決定又はＰＣＲスクリーニング法を使用すれば冗長であろう。

【０１０１】

これらの結果から、ＳＥＬＥＸがいつ完了されるのか、及びそれが完了されたことをいかに判定すべきかについての疑問が生じる。今回のＳＥＬＥＸでは、K_d改善、及びクローン又はバルク核酸プールの配列決定のような、ＳＥＬＥＸがいつ完了したかを判定するための標準的な判定基準は、ＳＥＬＥＸがその可能な限りまで進行したかを判定するための良好な判定基準ではないかもしれない。しばしば、いつＳＥＬＥＸを終了しなければならないかを決定する技術上の制限（バックグラウンド、反応量、大きな表面へ少量のタンパク質が損失すること）が存在するが、これらは人為的に制限している。おそらく、今日使用されている方法では単離することが困難であるリガンドの濃縮を試みるには、あらゆるＳＥＬＥＸの最後に「枯渇ＳＥＬＥＸ」のラウンドがなされるべきであろう。

【０１０２】

ヒトＴＧＦβ２リガンドの特異性

核酸リガンドが本明細書において特許請求される応用において最も有用であるためには、それらは特定のＴＧＦβのサブタイプについて高度に特異的であるべきである。以下に論じるようないくつかの方法により、ヒトＴＧＦβ２リガンドの特異性を検討した。

【０１０３】

細胞培養生物活性アッセイを使用してＴＧＦβ２リガンドの特異性を試験したが、ここではＴＧＦβ２（本明細書に記載）とＴＧＦβ１（「高アフィニティーのＴＧＦβ核酸リガンドと阻害剤」と題する、１９９８年3月２３日出願の米国特許出願第０９／０４６,２４７号を参照のこと、これはそのまま参照により本明細書に組込まれる）のアプタマーの特異性を抗体の特異性と比較した。２つのタイプの抗体、即ちモノクローナル抗体と免疫精製したポリクローナル抗体を使用した。ＴＧＦβ２リガンドのＮＸ２２２８３（配列番号１１４）は、ＴＧＦβ２タンパク質の生物活性を阻害する（$K_{i=}$＝１０ｎＭ）が、ＴＧＦβ１（$K_{i=}$＞１０００ｎＭ）又はＴＧＦβ３（$K_{i=}$＞１０００ｎＭ）の生物活性は阻害しないことが見出された（図６）。ＴＧＦβ２リガンドのＮＸ２２２８３はモノクローナル抗体のそれに同等な強度でＴＧＦβ２の生物活性を阻害するが、この実験でＴＧＦβ２生物活性の最も強力な阻害剤はアフィニティー精製されたポリクローナル抗体であった。

【０１０４】

ＴＧＦβ２リガンドの、ＴＧＦβ３に比較したＴＧＦβ２に対する特異性を、核酸結合アッセイでも分析した。ラウンド０の４０Ｎ７核酸又は完全長ＴＧＦβ２リガンドである２１ａ－２１のヒトＴＧＦβ２タンパク質へのアフィニティーは、それぞれ＞１０μＭ又は１ｎＭであった。ラウンド０の核酸又はリガンド２１ａ－２１のヒトＴＧＦβ３タンパク質へのアフィニティーは、それぞれ＞１０μＭ又は＞３０μＭであった。従って、このＴＧＦβ２リガンドはＴＧＦβ３へ有意には結合しない。

【０１０５】

ＴＧＦβ１のリガンドである４０－０３（「高アフィニティーのＴＧＦβ核酸

リガンドと阻害剤」と題する、１９９８年3月２３日出願の米国特許出願第０９／０４６,２４７号を参照のこと）は、ＴＧＦβ３と結合するが、１０００倍弱いことが見出された。これらの結果は、ＴＧＦβ１とＴＧＦβ３の間では共通していてＴＧＦβ２には見出されないアミノ酸が１つ又はそれ以上存在している可能性があり、それでＴＧＦβ１リガンドがＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３には結合し得るがＴＧＦβ２には結合し得ないこと、そしてＴＧＦβ２リガンドの２１ａ－２１がＴＧＦβ２には結合するが、ＴＧＦβ１又はＴＧＦβ３には結合し得ないことを示す。確かに、表１２において示されるように、ＴＧＦβ２に見出される１２２個のうち１９個のアミノ酸はＴＧＦβ１又はＴＧＦβ１には存在しない。これらの違いのうち3つ（ＴＧＦβ２におけるＬｙｓ－２５、Ａｒｇ－２６、及びＬｙｓ－９４）は推定ヘパリン結合領域の内部にあり、ＴＧＦβリガンドの結合特異性を決定するのに重要である可能性がある。

【０１０６】

核酸リガンドの切断

完全長の核酸リガンドの最小「短鎖型」を得ることは、それを最も少ないコストで効率的に合成し得るので、望ましい。この研究の目標は、元の長さの半分未満（＜３５塩基）であるが、それでも完全長リガンドとほぼ同一のアフィニティーを保持するリガンドを得ることであった。いくつかのアプローチを使用して3種のＴＧＦβ２リガンドの短鎖型を同定した。

【０１０７】

ＲＮａｓｅＨとハイブリッド２’－OCH_3 ＲＮＡ／ＤＮＡオリゴヌクレオチド（５’Ｎ７切断（配列番号１９）、３’Ｎ７切断（配列番号２０）、表1）を使用して、「切断ＳＥＬＥＸ法」と題される、１９９９年3月２４日出願の米国特許出願第０９／２７５,８５０号（これはそのまま本明細書中に援用される）に記載されるように、２’－Ｆピリミジン、２’－ＯＨプリンの核酸リガンドから、５’及び３’固定配列を除去した。

【０１０８】

次いで、すでに記載の方法（Fitzwater and Polisky (1996) Meth. in Enzymol 267: 275-301）を使用して、リガンドの「境界部分」を同定した。境界部分は

最小短鎖型の５’及び３’末端を確定する。しかしながら、境界決定では、なし得る内部欠失は同定されない。また、境界決定法の本質のために、境界が一連のピリミジンの内部にあるか、又は両端のごく近くにある場合、どちらのヌクレオチドがその境界であるかは他の方法（例えば、それぞれの候補境界位置で始まるか又は終わるリガンドの産生後にそのＴＧＦβ２への結合を分析すること）により決定しなければならない。

【０１０９】

使用した第三の方法は、仮定の配列境界部分を確定する推定構造モチーフに依存した。これらの境界部分に対応する人工オリゴヌクレオチドを合成し、ＴＧＦβ２への結合について試験した。

【０１１０】

ＴＧＦβ２リガンドの短鎖型を同定する第四のアプローチは、各リガンド中の配列変異の位置に注目することであった。リガンド２１ａ－４及び２１ａ－２１では、配列変異体において起こった変化はそれらの配列全体にランダムに分布していた。しかしながら、リガンド１４ｉ－１では、変異体における配列変化はきわめて局在化していた。このことは、リガンド１４－ｉの可変領域が結合に影響することなく変化を許容し得ること、及び可変領域全体がさして重要ではない可能性があることを暗示した。

【０１１１】

第五のアプローチは、予測される構造に基づいて内部欠失をつくることであった。予測されるステム内の推定バルジ、ループ、又は塩基対の部分を欠失し得る。この方法の成功は、構造モデルが真の構造にどのくらい近似しているかにまさに依存する。２１ａ－２１については、最も安定な構造は不正確であることが判明した。２１ａ－２１の内部欠失物を首尾よく作ることができたのは、真の構造により近似した構造が（偏向ＳＥＬＥＸ法を使用することによって）同定されたときだけである。

【０１１２】

リガンド１４ｉ－１の切断

ＲＮａｓｅＨ切断法を使用して、リガンド１４ｉ－１が３’ではなく５’の固

定配列を必要とする（表１３）ことが決定された。この結果に一致して、５’と３’の両方の固定配列が除去されると、リガンド１４ｉ－１はＴＧＦβ２に結合しなかった。

【０１１３】

従来の境界実験により、リガンド１４ｉ－１の３’末端が３９～４５位の内部にあることが画定された。同じ実験で、我々は、このリガンドの５’末端には明瞭な境界を観察し得なかった。リガンド１４ｉ－１の６０種の配列変異体のうち５４種は、選択される配列領域の３’末端の最終１６塩基の内部で起こるヌクレオチド変化を有する。この変異体のほとんどは単一塩基変化を有するが、６個もの塩基が変化したものも２、３ある。そのような変化は、結合に影響する場合もあればしない場合もある。それが結合に影響するならば、その領域は結合に重要である。より有り得るのは、それほど多くのクローンのその領域にそれほど多くの変化がある以上、それらの塩基はおそらく重要ではないということである。それらは、おそらくは隣接する３’固定領域とともに、結合に影響を及ぼすことなく欠失させることが可能であろうと推量された。この着想を以下の２つの実験結果により確認した：

１）この１６塩基領域内で変化し、異なる配列変化を有する８種の配列の結合性を試験した。それらはすべて１４ｉ－１リガンドと同じくらいよくＴＧＦβ２へ結合した。

２）３’固定領域と１６塩基の可変領域を欠く、１４ｉ－１の３８塩基長短鎖型（１４ｉ－１ｔ５－４１（配列番号１３１）；表１３）は、完全長（７１塩基長）リガンドと同様にＴＧＦβ２へ結合した。

【０１１４】

１４ｉ－１ｔ５－４１において除去したもの以上に、１４ｉ－１の末端から追加の塩基を除去して、４種の配列を作った［１４ｉ－１ｔ５－３８（配列番号１３２）、１４ｉ－１ｔ５－３５（配列番号１３３）、１４ｉ－１（ＭＬ－８７）（配列番号１３５）、及び１４ｉ－１（ＭＬ－８９）（配列番号１３６）］。さらに、１４ｉ－１ｔ５－４１の内部欠失物を１つ作った［１４ｉ－１（ＭＬ－８６）（配列番号１３４）］。これらのうちＴＧＦβ２へ結合するものは１つもな

かった（表１３）。これらの実験結果をまとめて考えると、リガンド１４Ｉ－１の境界部分は、５’末端の５～７位と３’末端の３９～４１位の内部に含まれることが示された。以上のすべての結果により、３８塩基長である、リガンド１４ｉ－１の短鎖型が画定された（表１３）。

【０１１５】

リガンド２１ａ－４（配列番号８６）の切断

ＲＮａｓｅＨ切断法を使用して、リガンド２１ａ－４が３’ではなく５’の固定配列を必要とする（表１４）ことが決定された。５’と３’の両方の固定配列が除去されると、リガンド２１ａ－４はＴＧＦβ２に結合しなかった。

【０１１６】

リガンド２１ａ－４の境界領域（図７）は、５’固定領域のＵ１１位と３’末端の５２～５６位の内部にあり、４２～４６塩基長の短鎖型（表８）を画定する。このことは、２１ａ－４がＴＧＦβ２へ結合するのに３’末端ではなく、５’末端を必要とすることを示すＲＮａｓｅＨ切断の結果に一致する。

【０１１７】

仮定の構造を試験することによって、２１ａ－４についての境界部分は５’末端のＧ１２位と３’末端のＣ４８位に生じると予測された。これらの位置は、境界法により画定される領域によく一致する。１２位で始まり、４８位で終わる（転写を開始させるのに必要とされる配列を除く）２１ａ－４の３７塩基長短鎖型［（２１ａ－４（ＭＬ－１１０）（配列番号１４４）；表１４）］は、完全長の２１ａ－４リガンドと同じくらいよくＴＧＦβ２に結合した。

【０１１８】

２１ａ－４（ＭＬ１１０）の３’末端からさらに４個の塩基を除去する、２１ａ－４（ＭＬ－１１１）と呼ばれる配列を作った。２１ａ－４（ＭＬ－１１１）の結合は２１ａ－４（ＭＬ－１１０）に比較して３０倍低下した。さらに、２１ａ－４（ＭＬ－１１０）の内部欠失物を３種［２１ａ－４（ＭＬ－９２（配列番号１４１）、ＭＬ－１０８（配列番号１４２）及びＭＬ－１０９（配列番号１４３）］作った。これらはいずれもＴＧＦβ２にあまり結合しなかった（表１４）。２１ａ－４（ＭＬ１１１）の３’末端へ２つの塩基を加えた配列［２１ａ－４

（ＭＬ－９１）（配列番号１４０）］は、２１ａ－４（ＭＬ１１０）に比較して、改善された結合を有さなかった。このようにして、結合性を保持し、４２塩基長である、リガンド２１ａ－４の最小短鎖型が同定された。

【０１１９】

リガンド２１ａ－２１（配列番号７２）の切断

ＲＮａｓｅＨ切断法を使用して、リガンド２１ａ－２１は、５’ではなく、３’固定配列を必要とする（表１１）と結論された。しかしながら、５’と３’の両方の固定配列を除去すると、リガンド２１ａ－２１はＴＧＦβ２へ結合した。このことは、３’末端だけの除去により結合性が消失するので、矛盾するように見える。しかしながら、このデータは、３’欠失によりＴＧＦβ２に結合しない構造へ折りたたまれるのに対し、両端を欠く短鎖型は行き止まりの（dead end）構造へは折りたたまれないことを意味すると解釈され得る。実際、Ｍフォールド構造の予測はこのことが起こり得ることを示す。

【０１２０】

リガンド２１ａ－２１の境界部分（図７）は、５’末端のＧ２１位と３’末端の５０～５５位の内部にあり、３０～３５塩基長である短鎖型を画定する。この結果は、２１ａ－２１がＴＧＦβ２へ結合するのに５’末端も３’末端も必要としないことを示すＲＮａｓｅＨ切断のデータに一致する。境界部分により同定される短鎖型は、ＲＮａｓｅＨ切断により画定されるそれの内部に完全に含まれる。

【０１２１】

推定構造に基づいた合成配列も表１１に要約されるように試験した。上記の実験からの結果は、ＲＮａｓｅＨと従来の境界実験の結果に一致している。

２１ａ－２１（ＭＬ－９５）の追加の末端短鎖型と内部欠失物をいくつか作った（表１１）。９種の末端短鎖型には、２１ａ－２１（ＭＬ－９６）、２１ａ－２１（ＭＬ－９７）、２１ａ－２１（ＭＬ－１０３）、２１ａ－２１（ＭＬ－１０４）、２１ａ－２１（ＭＬ－１０５）、ＮＸ２２２８６、ＮＸ２２３０１、ＮＸ２２３０２及びＮＸ２２３０３が含まれた。これらのなかで、２１ａ－２１（ＭＬ－９５）と同じくらいよく結合するのは、５’末端で１塩基除去した、ＮＸ

２２３０１だけである。内部欠失物には、２１ａ－２１（ＭＬ－９９）、２１ａ－２１（ＭＬ－１０１）、２１ａ－２１（ＭＬ－１０２）、２１ａ－２１（ＭＬ－１１４）、２１ａ－２１（ＭＬ－１１５）、２１ａ－２１（ＭＬ－１１６）、２１ａ－２１（ＭＬ－１１８）、２１ａ－２１（ＭＬ－１２０）、２１ａ－２１（ＭＬ－１２２）、２１ａ－２１（ＭＬ－１２８）、２１ａ－２１（ＭＬ－１３２）、２１ａ－２１（ＭＬ－１３４）、２１ａ－２１（ＭＬ－１３６）及び２１ａ－２１（ＭＬ－１３８）が含まれた。これら１４種の内部欠失物のなかで、２１ａ－２１（ＭＬ－９５）とほぼ同じくらいよく結合したのは２１ａ－２１（ＭＬ－１３０）だけである。

【０１２２】

２１ａ－２１（ＭＬ－９５）よりも長い３種の配列［２１ａ－２１（ＭＬ－９４）、ＮＸ２２２８３及びＮＸ２２２８５］を作った。これらのなかで、２１ａ－２１（ＭＬ－９５）よりも（かろうじて）よく結合したのはＮＸ２２２８５だけである。従って、ＴＧＦβ２に結合する最短のリガンドとして同定されたのは、３４マーのＮＸ２２２８４である。

【０１２３】

ＮＸ２２２８３及びＮＸ２２２８４は、それぞれ、転写されたリガンドである２１ａ－２１（ＭＬ－９４）及び２１ａ－２１（ＭＬ－９５）の合成類似体であり、同一のアフィニティーでＴＧＦβ２へ結合した（表１１）。この合成核酸はまた、その転写された類似体と同じ阻害性の生物活性を有する；一方、短い、３０塩基長のＮＸ２２２８６とその転写された類似体の２１ａ－２１（ＭＬ－９６）はＴＧＦβ２に結合せず、ＴＧＦβ２生物活性を阻害しない。従って、合成核酸はその転写対照物と同じ諸特性を有する。

【０１２４】

要約すると、完全長のリガンドと同じくらいよくＴＧＦβ２に結合する、短鎖型１４ｉ－１、２１ａ－４及び２１ａ－２１のリガンドが同定され、それぞれ３８、３７（転写収率を改善するために加えた５塩基を除く）、及び３２塩基長である。ＮＸ２２２８４短鎖型リガンドを短縮する試みにおいて、２４種の配列（８種の単一塩基欠失物と１６種の複数塩基欠失物）が作られた。これらのなかで

ＴＧＦβ２に結合するのは２種（２１ａ－２１（ＭＬ－１３０）及びＮＸ２２３０１）だけである。従って、ＮＸ２２２８４にある構造要素の配列及びスペーシングは、結合が起こるように維持されているに違いないと思われる。

ＴＧＦβ２への結合についてのリガンド間の競合

あるタンパク質への結合について様々なリガンドが互いに競合する能力を試験すると、リガンドがタンパク質の同一な（又は重複している）領域、又は明瞭に異なる領域のいずれに結合するのかを示すことができる。

【０１２５】

リガンド２１ａ－２１（配列番号８７）の短鎖型である、ＮＸ２２２８３（配列番号１１４）（表１１）が、４種のリガンド（１４ｉ－１（配列番号７２）、２１ａ－４（配列番号８６）、２１ａ－２１、及びＮＸ２２２８３）と競合する能力について試験した。結果は、ＮＸ２２２８３はそれ自身と最もよく競合し、次いで、２１ａ－２１、２１ａ－４及び１４ｉ－１と効果が減少して競合するということであった。このように、ＮＸ２２２８３の競合する能力は、その配列が試験リガンドの配列にどのくらい関連しているかに相関する。ＮＸ２２２８３はそれ自身に最も密接に関連していて、それ自身と最もよく競合する。ＮＸ２２２８３は２１ａ－２１の短鎖型であり、２１ａ－２１と二番目によく競合する。２１ａ－４の配列は２１ａ－２１にあまり関連していない可能性があり、ＮＸ２２２８３は２１ａ－４と三番目によく競合する。リガンド１４ｉ－１の配列はＮＸ２２２８３に関連していないので、ＮＸ２２２８３は、１４ｉ－１とまったく競合し得ない。

【０１２６】

他のリガンドの結合を５０％阻害するのに必要とされるＮＸ２２２８３の濃度範囲は１０倍であった。他のリガンドと競合するのに要するＮＸ２２２８３の量にこのような違いがあることはそのアフィニティーにおける違いに帰すことができるので、これらリガンドのＴＧＦβ２上の結合領域にはおそらく１つのタイプしか存在しない。しかしながら、ＴＧＦβ２のホモ二量体には１つ又はそれ以上の類似部位が存在し得る。（ＨＩＶ－１ ｇａｇタンパク質の場合のように；Lochrie et al. (1997) Nuc. Acids Res. 25: 2902-2910）ＴＧＦβ２上に、２つの

異なるタイプの核酸結合部位が存在するとすれば、第二の異なる部位で結合するリガンドを競合して追い出すには、１０００倍を越すだけの競合剤（即ち、ラウンド０の核酸のK_dとＮＸ２２２８３のK_dとの違い）を要するはずである。このことは観察されなかった。

【０１２７】

ＮＸ２２２８３のオフ速度（off-rate）

ＮＸ２２２８３－ＴＧＦβ２複合体の半減期は、２種の実験で０．５分又は３分と測定された。ほとんどすべてのリガンドは６０～７５分でＴＧＦβ２から解離した。上記の時間は短いように思われるが、それらは、フィルター分画ＳＥＬＥＸにより単離された核酸リガンドのインビトロオフ速度測定にはよくあることである。

【０１２８】

実施例３．偏向ラウンド０ライブラリーを使用するＳＥＬＥＸ法により単離された核酸リガンド

偏向ＳＥＬＥＸは、結果をあるアウトカムのほうへ偏らせるように核酸プール内の配列が変化されるものである。「偏向」ＳＥＬＥＸの主要な目標は、より高いアフィニティーを有するリガンドを得ることと、リガンドの推定二次構造がどんなものであり得るかを決定することである。ＴＧＦβ２の偏向ＳＥＬＥＸに使用される、出発の、ラウンド０核酸ライブラリー（３４Ｎ７．２１ａ－２１と呼ばれる）は、先行のＴＧＦβ２　ＳＥＬＥＸと同じ５’及び３’固定領域（５’Ｎ７及び３’Ｎ７）を有した（表１）。それは、２’－Ｆピリミジン、２’－ＯＨプリン核酸として作られた。しかしながら、実施例１に記載のように、ランダム領域は３４塩基長であった。このランダム化配列の内部で、ヌクレオチドの６２．５％は、各位置でＮＸ２２２８４（配列番号１１５）配列に対応する。残る３７．５％は、他の３種のヌクレオチドに対応する。このように、各位置を突然変異させ、このプールの配列をＮＸ２２２８４配列の方へ偏らせる。そのようなプールを使用してＴＧＦβ２へ結合するリガンドについて選択することによりＮＸ２２２８４の変異体を単離することが可能になり、そのなかには元の３０Ｎ７ラウンド０プールには存在しなかったかもしれないものがある。

【０１２９】

ラウンド０　３４Ｎ７．２１ａ－２１プールのバルクK_dは、タンパク質過剰の結合条件を使用すると、約８７０ｎＭ（表１５）であった。これは、予測されるように、非偏向ラウンド０　４０Ｎ７プールに対してより少なくとも１０倍良好である。このラウンド０核酸プールは小スケールのＳＥＬＥＸタイプ反応において核酸過剰の条件下でも結合したが、予測されるように、タンパク質過剰条件でよりも不良であった。この偏向ＳＥＬＥＸの進展を表１５に示す。

【０１３０】

偏向ＳＥＬＥＸにおいて使用された条件とその結果を表１５に示す。全部で９ラウンドを実施した。ラウンド４で開始し、競合剤を使用することによってより高いアフィニティーのリガンドを得るための試みがなされた。酵母ｔＲＮＡ（低アフィニティー）とＮＸ２２２８４（高アフィニティー）の両方が競合剤として使用された。いずれもＳＥＬＥＸのＰＣＲ工程の間は増幅不能である。「Ａ」系列を競合剤なしで実施したのに対し、「Ｂ」系列は競合剤とともに実施した。

【０１３１】

この核酸プールのＴＧＦβ２への結合性をラウンド０～８について測定し（表１５）、ラウンド０核酸ライブラリーの約８７０ｎＭからラウンド５ａ核酸プールの約１ｎＭへ改善したことが見出された。競合は、このＳＥＬＥＸ実験においては、アフィニティー改善に対してほとんど一貫した効果を及ぼさないように思われた。おそらく、競合はラウンド１のＮＸ２２２８４で開始されたはずである。プールアフィニティーにおけるピーク改善は、ラウンド５、６及び７、及び８で安定水準に達した。それ故に、最高アフィニティーを有する最も早いラウンドである、ラウンド５ａをサブクローン化し、配列を決定した。

【０１３２】

偏向ＳＥＬＥＸから得られたＴＧＦβ２核酸リガンドの配列

表１６に示されるように、２５種のユニーク配列を入手した。出発配列から１～９個の変化が見出された。このクローンはすべて選択される配列の内部で３４塩基長であって、種々の試験結果と一致し（上記の「リガンド２１ａ－２１の切断」を参照のこと）、内部の塩基を欠失させることが難しかった。

【０１３３】

位置の対間の共変異（covariance）を視察とコンセンサス構造マトリックスプログラム（Davis et al. (1995) Nucleic Acids Research 23: 4471-4479）を使用することによって分析した。２種の異なる領域の間に共変異が観察され、この構造に２つのステムが存在することを暗示した。共変異のパターンは、図８に示される構造モデルか、又はその構造に似た変異体（例えば、ループの内部でいくつかの塩基対合が起こり得るもの）を示唆する。この予測された構造は、Mフォールドプログラム（Zuker (1989) Science 244: 48-52）により予測される三番目に安定な構造である。可能な共変異の奇妙な例がループ領域の１５及び２５位に観察される。Ａ１５及びＧ２５は、２種のクローン（＃１８及び＃２９）においてＣ１５及びＵ２５へ共変異することが観察された。リガンド２１ａ－４も推定ループの底部にＣ／Ｕコンビネーションを有する。

【０１３４】

３４個の塩基のなかで、１１個はこれら２５種のクローンのなかで「不変」である（表１６）。この不変位置のすべては、最終ヌクレオチドであるＣ３４以外のループ及びバルジ領域に存在すると予測される。全３種の短鎖型ＴＧＦβ２リガンド（図８）の最終塩基はＣである。このＣを除去すると、結合性の喪失を生じる。不変位置が、ＴＧＦβ２がＮＸ２２２８４リガンドに結合する領域を示すならば、結合は主にバルジ及びステムループの領域で起こる可能性がある。このステムは塩基対合しているはずであるが、配列は変化する可能性があり、ステムの構造がその配列より重要である可能性があることを暗示する。このステムは、ＴＧＦβ２に結合するのに適切な配向においてバルジ、ループ及びＣ３４ヌクレオチドを提示するために使用される構造である可能性がある。

【０１３５】

偏向ＳＥＬＥＸ由来のクローン５ａ－１１は、特に偏向ＳＥＬＥＸ由来のクローンにおいて不変である位置において、一次ＳＥＬＥＸ由来のクローン２１－４に類似していて、新たな構造モデルと不変位置の重要性をさらに裏付ける。リガンド１４ｉ－１を類似の構造へ適合させることはできなかった。おそらく、それはＴＧＦβ２に結合し得る第二の配列モチーフを表すのだろう。

【０１３６】

偏向ＳＥＬＥＸから単離された核酸リガンドの結合性

偏向ＳＥＬＥＸ由来のクローンの結合性を完全長リガンドである２１ａ－２１の結合性と比較した。このクローンの大部分は２１ａ－２１と同じくらいよくＴＧＦβ２に結合した（表１６）。１つのクローン（＃２０（配列番号１６０））は、完全長リガンドの２１ａ－２１より約６倍不良に結合し、１つのクローン（＃１３（配列番号１５４））は、それより約５倍良好に結合した。これらクローンの（一回以上見出されたクローンを加重した）平均K_dは１．２ｎＭであり、ラウンド５ａプールのK_dである約１ｎＭに一致する。このように、上記の方法で単離されたリガンドは、アフィニティーにおいて、出発配列からさして大きく異なってはいなかった。

【０１３７】

より高いアフィニティーリガンドを生じる最適な変化数があることが期待される。ごくわずかな変化しか有さないクローンは、出発配列とほぼ同じくらいに結合し、閾値数の変化を有するクローンはより良好に結合する可能性があり、あまりに多くの変化を有するクローンはより不良に結合すると予測される。実際、変化数とアフィニティーとの間には相関性があるかもしれない。１～４個の変化を有するクローンはリガンド２１ａ－２１と同じか又はより不良に結合する傾向がある。５～８個の変化を有するクローンはリガンド２１ａ－２１より良好に結合する傾向がある。最も不良な結合物（＃２０）は、最も多くの変化（９個）をもつものであった。ＴＧＦβ２と最も良好に結合したクローン（クローン＃１３）は、出発配列に対して７個の変化を有していた。

【０１３８】

より良好に結合したクローンとより不良に結合したものとを並置すると（表１７）、より高いアフィニティー結合には５位のＡが重要である可能性がある。なぜなら、ＴＧＦβ２に最もよく結合するリガンドはすべて５位にＡを有し、５位にＡを有するすべてのクローンは少なくとも２１ａ－２１と同等に結合するからである。対照的に、５位にＵ、Ｃ又はＧを有するクローンは２１ａ－２１より不良に結合する傾向がある。推定ステムにおける塩基対変化のパターンに関しては

、より良好な結合に相関する単一の変化はない。さらに、より良好な結合物は、ＧＣリッチなステムを一貫して有するわけではない。しかしながら、不良な結合物のステムにおける変化のパターンは、より良好な結合物のステムに見られものと重複しない。このように、様々なステム配列が微妙な理由でより良好な結合をもたらす可能性がある。

【０１３９】

完全長２１－２１転写物（２１ａ－２１（ＭＬ－１０７）；表１１）の結合を消失させた点突然変異は、６位のＵをＧへ変化させる。偏向ＳＥＬＥＸ由来の３種のクローン（＃４、９及び３５）では６位にＧが見出され、そのうち１つ（クローン＃４）は他に１つしか塩基変化を有さないが、他のクローンには追加の変化があった。６位にＧを有する、偏向ＳＥＬＥＸ由来の３種のクローンはすべてＴＧＦβ２に結合する。従って、Ｕ６Ｇ変化だけで結合を消失させるが、この結合の欠損は、他の配列変化と組み合わされると復帰され得ると考えられる。

【０１４０】

要約すると、独立して作用し、それだけでより良好な結合を与え得る場合がある（５位のＡのような）変化もあれば、他の変化も存在することに依存する、より予測不能なやり方で結合に影響を及ぼし得る変化（例、６位での変化やステム内の変化）もあることになる。

【０１４１】

おそらく、「不変の」ヌクレオチドを欠く配列はＴＧＦβ２に結合しないだろう。不変塩基のいくつかを欠失させ、他のものは変化させた（表１１）。これら１０種の変更された配列［２１ａ－４（ＭＬ－１１１）；２１ａ－２１（ＭＬ－９６，９７，１０１，１０２，１０３，１０４，１０５，１２０，ＮＸ２２２８６］は、いずれもＴＧＦβ２に結合しない。

【０１４２】

実施例４．ＮＸ２２２８４において２’－ＯＨプリンを２’－OCH_3プリンで置換すること

２’－ＯＨプリンを２’－OCH_3プリンで置換すると、血清及び動物内でより長い半減期を有する核酸リガンドを時々生じる。本明細書に記載の核酸リガン

ドは最終的には診断薬、治療薬、造影剤、又は組織化学試薬としての使用に意図されるので、リガンドＮＸ２２２８４において２’－OCH_3プリンで置換され得る２’－ＯＨプリンの最大数を決定した。ＮＸ２２２８４は、７０塩基長の２１ａ－２１ＴＧＦβ２リガンドの３４ｍｅｒ短鎖型である（表１８）。ＮＸ２２２８４は１７個の２’－ＯＨプリンを有し、リガンド２１ａ－２１より約２倍不良に結合する。

【０１４３】

初めに、すべて２’－OCH_3プリンで置換した配列（ＮＸ２２３０４）を合成した。もう１つの配列は、その５’末端にある６個のプリン以外をすべて２’－OCH_3プリンで置換した２’－ＯＨを有する。いずれもＴＧＦβ２に結合しなかったし、測定し得る生物活性を有さなかった（表１８）。

【０１４４】

従って、３又は４個の２’－ＯＨプリンの群が２’－OCH_3プリンで置換されたような１組の配列（ＮＸ２２３５６～ＮＸ２２３６０；表１８）を合成した。ＮＸ２２３５７の結合は約２倍低下し、生物活性は１０倍低下した。ＮＸ２２３５６、ＮＸ２２３５８及びＮＸ２２３６０の結合性及び生物活性は影響を受けなかった。対照的に、ＮＸ２２３５９の結合性は１００倍以上低下し、その生物活性は３０倍以上低下した。従って、ＮＸ２２３５９内のどの個別プリンが２’－OCH_3プリンになり得ないかを決定するために、ＮＸ２２３５９の配列を１つの塩基で一度「脱らせん（deconvoluted）」させた。ＮＸ２２３７４、ＮＸ２２３７５及びＮＸ２２３７６はＮＸ２２３５９の脱らせん体（deconvolutions）である。これら３種の配列はすべて結合性及び生物活性が大きく低下した。このことは、Ｇ２０、Ａ２２、及びＡ２４が２’－OCH_3プリンになり得ないことを示唆する。

【０１４５】

中間数の２’－OCH_3プリンを有する配列がＴＧＦβ２に結合し、生物活性を保持し得るかを決定するために、ＮＸ２２３７７を設計した。ＮＸ２２３７７は、（ＮＸ２２３５６、ＮＸ２２３５７及びＮＸ２２３６０内の２’－OCH_3プリンを表す）１７個のうち１０個の２’－OCH_3プリンを有する。ＮＸ２２

３７７の結合性及び生物活性は、ＮＸ２２２８４と同一である。

【０１４６】

結合性及び生物活性を保持するにはＧ２０、Ａ２２及びＡ２４が２’－ＯＨプリンでなければならないという可能性を検証するためにＮＸ２２４１７を設計した。ＮＸ２２４１７では、Ｇ２０、Ａ２２及びＡ２４が２’－ＯＨであるが、他の１４個のプリンは２’－ＯＣＨ$_3$である。ＮＸ２２４１７はＮＸ２２２８４と同じくらい良好にＴＧＦβ２に結合するが、その生物活性は約１０倍低下している。Ｇ２０（ＮＸ２２３７４）又はＡ２４（ＮＸ２２３７６）の置換だけではＡ２２（ＮＸ２２３７５）の置換ほどは重大な効果を及ぼさなかったので、Ａ２２位（ＮＸ２２３８４を参照のこと）又はＧ２０及びＡ２２位（ＮＸ２２３８３を参照のこと）以外ですべて２’－ＯＣＨ$_3$プリンを有する核酸を合成した。ＮＸ２２３８３及びＮＸ２２３８４はＴＧＦβ２に結合することもそれを阻害することもなく、結合性及び生物活性を保持するには、２０、２２及び２４位の少なくとも３つのプリンが２’ＯＨでなければならないことを再び示唆した。

【０１４７】

質量分析法によりＮＸ２２３８４を分析し、その結合性及び阻害活性の不足が不完全な脱保護化や不正確な配列によるものではないことを確かめた。この結果は、ＮＸ２２３８３が予測される分子量より０．５～０．９ダルトン多い可能性があり、従ってそれがあるべきものである可能性がきわめて高いということである。

【０１４８】

ＮＸ２２３５７はＮＸ２２２８４よりもわずかに不良にＴＧＦβ２へ結合したが、１０倍も低下した生物活性を有したので、ＮＸ２２３５７にある３個の２’－ＯＣＨ$_3$プリン（Ｇ５、Ａ８又はＡ１１）の１つ又はそれ以上が生物活性にも必要とされ得ることが考えられた。ＮＸ２２４２０及びＮＸ２２４２１を合成することによって、この考えを検証した。ＮＸ２２４２１は、（２’－ＯＨ基を必要とする、Ｇ２０、Ａ２２及びＡ２４とともに）これら塩基の３つ（Ｇ５、Ａ８及びＡ１１）すべてを２’－ＯＨプリンとして有する。ＮＸ２２４２０は、（Ｇ２０、Ａ２２及びＡ２４とともに）Ａ８を２’－ＯＨプリンとして有する。ＮＸ

２２４２１は、（Ｇ２０、Ａ２２及びＡ２４とともに）Ｇ５、Ａ８及びＡ１１を２’－ＯＨプリンとして有する。ＮＸ２２４２０とＮＸ２２４２１の両方でＡ８を２’－ＯＨプリンとして保持したのは、偏向ＳＥＬＥＸ由来のクローンのなかでそれが不変であって、従って、（Ｇ２０、Ａ２２及びＡ２４の場合と同様に）２’リボース位置で変化することにＡ８が耐えられない可能性があると推量されたからである。実際、ＮＸ２２４２０とＮＸ２２４２１は両方ともＮＸ２２２８４とほぼ同じ結合性及び阻害活性を有した。要約すると、ＮＸ２２２８４配列は、４個のプリン（Ａ８、Ｇ２０、Ａ２２及びＡ２４）が２’－ＯＨであり、他のプリンが２’－OCH_3であるときに最大の結合性及び阻害活性を保持し得る。偏向ＳＥＬＥＸ法を使用して単離されたクローンのなかでこれら４個の位置がすべて不変であることに注目すること。

【０１４９】

ＮＸ２２２８４の２’－ＯＨプリンを置換することに関する試験がなされている間に、転写物のようにＴＧＦβ２へ良好に結合する、ＮＸ２２２８４のより短いバージョン２種（２１ａ－２１［ＭＬ－１３０］及び２１ａ－２１［ＭＬ－１３４］；表１１）が発見された。これらの配列へ、ＮＸ２２４２０の２’－OCH_3プリン置換パターンを移した。ＮＸ２２４２６は２１ａ－２１（ＭＬ－１３４）の２’－OCH_3プリン類似体であり、ＮＸ２２４２７は２１ａ－２１（ＭＬ－１３０）の２’－OCH_3プリン類似体である。ＮＸ２２４２６はＴＧＦβ２に良好に結合したが、２５倍低下した生物活性を有した。ＮＸ２２４２７はＮＸ２２２８４よりわずかに良好な結合性及び阻害活性を有した可能性がある。

【０１５０】

要約すると、アフィニティー、短い長さ、及び阻害活性の最良の組み合わせを有するスポット、ｓｐｒ、及びフィルターＳＥＬＥＸ法を合わせて使用することによって単離されたヒトＴＧＦβ２のリガンドはＮＸ２２４２７であり、全１６個のプリンのうち１２個で２’－OCH_3プリンを有する３２マーである。ＮＸ２２３８５において２’－ＯＨプリンを２’－OCH_3プリンで置換すること

偏向ＳＥＬＥＸ法を使用して単離されたリガンドのいくつか（例えば、クロー

ン１３）は、ＴＧＦβ２へより良好に結合した。

【０１５１】

短鎖型クローン１３の諸特性を短鎖型２１ａ－２１に比較するために、ＮＸ２２３８５を合成した。ＮＸ２２３８５（表１９）は３４塩基長で、偏向ＳＥＬＥＸクローン＃１３の２’－Ｆピリミジン、２’－ＯＨプリンバージョンである。それは、対応する３４塩基長の２１ａ－２１短鎖型であるＮＸ２２２８４より約２．５倍良好に結合するが、その阻害活性は約４倍不良である。

【０１５２】

前節で述べた理由により、短鎖型クローン１３ｔの諸特性が、２’－Ｆピリミジン、２’－OCH_3プリンの核酸として合成されたとき（どうなるかを）決定することは興味深かった。２１ａ－２１の短鎖型であるＮＸ２２４２０の２’－OCH_3パターンに基づいて、ＮＸ２２３８５の２種の２’－OCH_3プリンバージョン（ＮＸ２２４２４及びＮＸ２２４２５；表１９）を合成した。いずれの核酸でも、ＮＸ２２４２０におけるように、Ａ８、Ｇ２０、Ａ２２及びＡ２４は２’－ＯＨプリンとして保持された。ＮＸ２２４２４では、クローン１３にユニークであるプリン（Ａ５、Ａ６及びＧ１２）は２’－ＯＨプリンである。ＮＸ２２４２５では、それらのプリンは２’－OCH_3プリンである。Ａ２４（ＮＸ２２３８６）又はＧ２０及びＡ２４（ＮＸ２２３８７）が２’－OCH_3プリンである、ＮＸ２２４２４及びＮＸ２２４２５の類似体も合成した。ＮＸ２２３８６及びＮＸ２２３８７は、ＮＸ２２３８７のＧ２０又はＡ２４が２’－OCH_3であるバージョンが不活性だったので、陰性対照として役立つと予測された。予測されたように、ＮＸ２２３８６及びＮＸ２２３８７はＴＧＦβ２に結合せず、それを阻害もしなかった。ＮＸ２２４２４とＮＸ２２４２５はＮＸ２２２８４と同様にＴＧＦβ２に結合したが、生物活性においては１００倍より多く低下した（表１９）。従って、ＮＸ２２２８４と同じくらい良好に結合する他の配列が単離されたが、より良好な生物活性を有する他の配列は同定されなかった。

【０１５３】

実施例５．ＮＸ２２３２３の薬物動態特性

ＮＸ２２３２３はＮＸ２２２８４の５’－ポリエチレングリコール修飾バージ

ョンである（表１１；図９を参照のこと）。ＮＸ２２３２３の血漿濃度をラットにおいて４８時間にわたり測定し、表２０及び２１の対応する薬物動態変数とともに図１１に示す。上記のデータは、ＮＸ２２３２３の血漿からの二相性クリアランスを明示し、初期クリアランス半減期（$\alpha T_{1/2}$）は１時間、終期クリアランス半減期（$\beta T_{1/2}$）は８時間である。定常状態での分布容積は約１４０ｍＬ／ｋｇであり、このアプタマーの大部分が血漿と細胞外の水に残存する、ごくわずかな分布であることを示唆した。コンパートメント分析により決定されたクリアランス速度は０．４０ｍＬ／（分*ｋｇ）であった。この値は同様の化学組成を有する他のアプタマー（５’－ＰＥＧ４０ｋ、３’－３’ｄＴ、２’Ｆピリミジン、２’－ＯＨプリンの核酸）と一致していた。上記のデータにより、有効性の評価にＮＸ２２３２３を毎日投与することが支持される。

実施例６．リード短鎖型リガンドであるＣＤ７０の２’ＯＭｅ修飾

ＴＧＦβ１の核酸リガンドは、「切断ＳＥＬＥＸ法」と題される、１９９９年３月２４日出願の米国特許出願第０９／２７５,８５０号（これはそのまま参照により本明細書に組込まれる）に開示されている。ハイブリダイゼーションによる切断ＳＥＬＥＸによりリードアプタマーを産生し（表１１、米国特許出願第０９／２７５,８５０号のファミリー４、リガンド＃７０を参照のこと）、本明細書ではＣＤ７０と呼んだ。表２２に要約されるように、様々な位置に２’ＯＭｅ修飾を含有する、ＣＤ７０の誘導体オリゴヌクレオチドを合成した。この結果は、１６個のプリンのうち１３個が、活性を失うことなく、その２’ＯＭｅ対照物で置換され得ることを示唆する。最大数の２’ＯＭｅ修飾を有する分子（ＣＤ７０－ｍ１３）も生物活性である（表２２）。図１０は、ＣＤ７０－ｍ１３（配列番号２０６）の推定構造と２’ＯＨヌクレオチドの存在を必要とする位置を示す。興味深いのは、この分子の３’末端にあるＡの位置であり、これは提起された構造によれば、二次構造に参加しない。この一本鎖のＡを欠失させるとこの分子の結合活性にやや影響を及ぼすが、それによりその生物活性が完全に消失される（表２２）。２’ＯＨ塩基と最終３’のＡはこの提起された構造においてごく近接している。このことは、ターゲット結合の原因となるこの分子のドメインを示唆する。上記の状況では、提起された構造（図１０）の頂点に示されるループは

結合に必要でないかもしれない。このことは、そのようなループをＰＥＧリンカーで置換し、そのような修飾された分子が結合性を保持することを示すことによって、確かめられた（表２２）。ＰＥＧリンカーは、「血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）核酸リガンド複合体」と題する、１９９７年１２月１６日出願の米国特許出願第０８／９９１,７４３号（これはそのまま参照により本明細書に組込まれる）に示されるように、このアプタマーとコンジュゲートしていた。上記の実験から同定された最短の結合アプタマーは、（ＰＥＧリンカーを含む）３４マーのＣＤ７０－ｍ２２（配列番号２１５）である。

【０１５４】

実施例７．ミンク肺上皮細胞（ＭＬＥＣ）ＰＡＩルシフェラーゼアッセイ

ＴＧＦβ２の生物学的活性にインビトロで干渉するＴＧＦβアプタマーの能力を試験するために、ＭＬＥＣ　ＰＡＩルシフェラーゼアッセイを実施した。ＴＧＦβによるＰＡＩプロモーターのアップレギュレーションの直接測定を可能にするＰＡＩ／ルシフェラーゼ構築体で、ミンク肺上皮細胞をトランスフェクトした。ＴＧＦβ１とＴＧＦβ２は両方ともＰＡＩプロモーターをアップレギュレートすることができる。ＰＡＩ／ルシフェラーゼの発現を刺激すると、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンが存在する場合に、定量可能な光放出を生じる。P_{6}～$_{15}$の間にあるＭＬＥＣ－ＰＡＩ－Ｌｕｃ細胞を、１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ及び０．２％ ＦＢＳを補充したＭＥＭ（ＭＥＭ－Ｓ）において、ウェルあたり３ｘ１０^{4}個の細胞でプレート培養し、４～５時間付着させた。ＭＬＥＣとのインキュベーション用に、阻害剤（抗体又はアプタマー）のＭＥＭ－Ｓでの連続希釈液（１：３）を調製した。２つのウェル列を、各ＴＧＦβと未処理対照群のために維持した。未処理対照細胞以外の各ウェルへＴＧＦβ（１又は２）を１０ｐＭ又は２０ｐＭまで加え、細胞を１５～１６時間インキュベートした。ＴＧＦβの刺激後に、ＭＥＭ－ＳをCa^{2+}及びMg^{2+}各１ｍＭ補充したＤＰＢＳに置き換えた。製造業者の指示により、細胞をＬｕｃ－ｌｉｔｅキット（パッカード・インスツルメンツ）で処理した。１０分間の暗順応の後で、相対ルシフェラーゼ活性を化学発光検出（Ｔｏｐ　Ｃｏｕｎｔ，パッカード・インスツルメンツ）により決定した。データはＣＰＳ（カウント／秒）として作成した。この結果を図１２及び

１３に示す。これらの図から、いずれのＴＧＦβアプタマーもそのそれぞれのサイトカインの生物活性に干渉することが明らかである。これらの実験における見かけのＫｉは約２００ｎＭである。

【０１５５】

【表１】

ＳＥＬＥＸの間に使用された配列

（いずれも５’から３’の方向で示され、１０塩基ごとにブランクによって区切られている）

ＳＥＬＥＸ法に関わる配列

（Ｐ０；スポットＳＥＬＥＸのラウンド０用ＤＮＡテンプレート）
TCGGGCGAGT CGTCTGNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNCCGC ATCGTCCTCC C 71 （配列番号１）
A=dA; C=dC; G=dG; T=dT; Ｎ＝ｄＡ、ｄＣ、ｄＧ又はｄＴの各２５％

（５’Ｎ７；ＳＥＬＥＸのＰＣＲ工程において使用したプライマー）
TAATACGACT CACTATAGGG AGGACGATGC GG 32（配列番号２）
A=dA; C=dC; G=dG; T=dT

（３’Ｎ７；ＳＥＬＥＸのＲＴ及びＰＣＲ工程において使用したプライマー）
TCGGGCGAGT CGTCTG 16（配列番号３）
A=dA; C=dC; G=dG; T=dT

（スポットＳＥＬＥＸのラウンド０用転写テンプレート）
TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG-40N-CAGACGACTCGCCCGA
（配列番号４）
ATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTGCTACGCC-40N-GTCTGCTGAGCGGGCT
（配列番号５）
A=dA; C=dC; G=dG; T=dT; Ｎ＝ｄＡ、ｄＣ、ｄＧ又はｄＴの各２５％

（Ｒ０　４０Ｎ７；スポットＳＥＬＥＸのラウンド０用核酸ライブラリー）
GGGAGGACGA UGCGGNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNCAGAC GACUCGCCCG A 71（配列番号６）
A=2'-OH A; C=2'-F C; G=2'-OH G; Ｎ＝２’－ＯＨ Ａ、２’－Ｆ Ｃ、２’－ＯＨ Ｇ及び２’－Ｆ Ｕの各２５％；Ｕ＝２’－Ｆ Ｕ

（３４Ｎ７．２１ａ－２１；偏向ＳＥＬＥＸのラウンド０用ＤＮＡテンプレート）
GGGAGGACGA TGCGGNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNC AGACGACTCG CCCGA 65（配列番号７）
A=dA; C=dC; G=dG; T=dT, Ｎ＝ＤＮＡとして６２．５％のＮＸ２２２８４配列、及び各位置に１２．５％の他の４種ヌクレオチド（ｄＡ、ｄＣ、ｄＧ又はｄＴ）

（偏向ＳＥＬＥＸのラウンド０用転写テンプレート）
TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG-34N-CAGACGACTCGCCCGA
（配列番号８）
ATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTGCTACGCC-34N-GTCTGCTGAGCGGGCT
（配列番号９）

A=dA; C=dC; G=dG; T=dT, Ｎ＝ＤＮＡとして６２．５％のＮＸ２２２８４配列、及び各位置に１２．５％の他の４種ヌクレオチド（ｄＡ、ｄＣ、ｄＧ又はｄＴ）

【０１５６】

表１．（続き）

（３４Ｎ７．２１ａ－２１；偏向ＳＥＬＥＸのラウンド０用核酸ライブラリー）
GGGAGGACGA UGCGGNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNC AGACGACUCG CCCGA 65（配列番号１０）
A=2'-OH A; C=2'-F C; G=2'-OH G; Ｎ＝６２．５％のＮＸ２２２８４配列、及び各位置に１２．５％の他の４種ヌクレオチド（２’－ＯＨ Ａ、２’－Ｆ Ｃ、２’－ＯＨ Ｇ又は２’－Ｆ Ｕ）；Ｕ＝２’－Ｆ Ｕ

リガンドをサブクローニング、スクリーニング、配列決定するのに使用した配列

（ＭＬ－３４；サブクローニングに使用）
CGCAGGATCC TAATACGACT CACTATA 27（配列番号１１）
A=dA; C=dC; G=dG; T=dT

（ＭＬ－７８；サブクローニングに使用）
GGCAGAATTC TCATCTACTT AGTCGGGCGA GTCGTCTG（配列番号１２）
A=dA; C=dC; G=dG; T=dT

（ＲＳＰ１；リガンドインサートについて形質転換体をスクリーニングするのに使用したベクター特異的プライマー）
AGCGGATAAC AATTTCACAC AGG 23（配列番号１３）
A=dA; C=dC; G=dG; T=dT

（ＦＳＰ２；リガンドインサートについて形質転換体をスクリーニングするのに使用したベクター特異的プライマー）
GTGCTGCAAG GCGATTAAGT TGG 23（配列番号１４）
A=dA; C=dC; G=dG; T=dT

（ＲＳＰ２；リガンドの配列決定用プライマー）
ACTTTATGCT TCCGGCTCG 19（配列番号１５）
A=dA; C=dC; G=dG; T=dT

特異的リガンドを検出するのに使用した配列
（リガンド１４１－１特異的プライマー；ＭＬ－８５）
GCCAAATGCC GAGAGAACG 19（配列番号１６）
A=dA; C=dC; G=dG; T=dT

（リガンド２１ａ－４特異的プライマー；ＭＬ－７９）
GGGGACAAGC GGACTTAG 18（配列番号１７）
A=dA; C=dC; G=dG; T=dT

（リガンド２１ａ－２１特異的プライマー；ＭＬ－８１）
GGGAGTACAG CTATACAG 18（配列番号１８）
A=dA; C=dC; G=dG; T=dT

【０１５７】

表１．（続き）

ＲＮａｓｅＨによる切断に使用した配列

（5’Ｎ７切断）

CCGCaugcuc cuccc 15（配列番号１９）

a=2'-OCH_3 A; c=2'-OCH_3 C; C=dC; g=2'-OCH_3 G; G=dG; u=2'-OCH_3 U

（3’Ｎ７切断）

ucgggcgagu cgTCTG 16（配列番号２０）

a=2'-OCH_3 A; c=2'-OCH_3 C; C=dC; g=2'-OCH_3 G; G=dG; u=2'-OCH_3 U; T=dT

【０１５８】

【表２】

【０１５９】

【表３】

フィルターＳＥＬＥＸの条件と結果

ラウンド[a]	[RNA][b], nM	[TGFβ2], nM	ＲＮＡ/タンパク質	［競合剤］	結合率（%）	ﾊﾞｯｸｸﾞﾗｳﾝﾄﾞ率（%）	結合／ﾊﾞｯｸｸﾞﾗｳﾝﾄﾞ	Kd (nM)
9b	1 nM	100 nM	0.01	100 μM tRNA	4.2	1.1	4	nd
10b	1 nM	30 nM	0.03	100 μM tRNA	4.3	0.13	33	100
11a	1 nM	30 nM	0.03	100 μM tRNA	1.5	0.2	8	75
12d	0.2 nM	20 nM	0.01	250 μM tRNA	2.2	0.3	7	40
13i	0.4 nM	10 nM	0.04	10 μM tRNA	2.6	0.16	16	30
14i	0.1 nM	10 nM	0.01	10 μM ヘパリン	14.5	0.55	20	75
15c	10 nM	10 nM	1.0	0	8.8	2.2	4	30
16a	55 nM	10 nM	5.5	0	9.6	2.1	5	10
17a	30 nM	3 nM	10	0	1.9	0.17	11	5
18b	15 nM	3 nM	5	0	2.3	0.6	4	5
19a	7 nM	0.1 nM	70	0	0.17	0.05	3	2
20a	0.33 nM	0.03 nM	11	0	0.1	0.04	3	1
21a	0.63 nM	0.03 nM	21	0	0.3	0.1	3	1
22a	0.07 nM	0.01 nM	7	0	0.12	0.09	1	1

[a]数字はＳＥＬＥＸのラウンド数を示し、英文字はそのラウンドに使用した条件を示す。

[b]ＮＡ：核酸ライブラリー

次のラウンドへ移行したラウンドだけを示す。

スポットＳＥＬＥＸの条件と結果

ラウンド	タンパク質（ピコモル）	RNA（ピコモル）	洗浄[1]（μｌ/分）	シグナル/ノイズ	インプット(%)	インキュベーション	前吸着[2]
1	*200	2000	2 (500/10)	4.90	ND[3]	4 hrs, 20°C	なし
2	*200	1500	2 (1000/10)	1.80	ND	0.5 hrs, 37°C	５層、０.７５時間
3	*200	1500	2 (1000/10)	5.50	ND	1 hr, 37°C	５層、１時間
4	200	1000	2 (1000/10)	11.20	0.18	1 hr, 37°C	５層、２.５時間
	*67	1000	2 (1000/10)	3.70	0.06	1 hr, 37°C	５層、２.５時間
	22	1000	2 (1000/10)	1.58	0.03	1 hr, 37°C	５層、２.５時間
5	67	100	2 (1000/20)	26.00	1.30	1 hr, 37°C	１０層、０.７５時間
	*22	100	2 (1000/20)	11.00	0.56	1 hr, 37°C	１０層、０.７５時間
	7.3	100	2 (1000/20)	2.70	0.10	1 hr, 37°C	１０層、０.７５時間
6	22	50	2 (1000/20)	20.70	1.00	1 hr, 37°C	１０層、０.７５時間
	*7.3	50	2 (1000/20)	4.00	0.20	1 hr, 37°C	１０層、０.７５時間
	2.4	50	2 (1000/20)	1.20	0.06	1 hr, 37°C	１０層、０.７５時間
7	22	7	3 (1000/50)	24.00	1.30	1 hr, 37°C	１０層、１.５時間
	*7.3	7	3 (1000/50)	7.50	0.40	1 hr, 37°C	１０層、１.５時間
	2.4	7	3 (1000/50)	1.50	0.07	1 hr, 37°C	１０層、１.５時間
8	*7.3	3	2 (1000/60)	77.00	0.41	0.75 hr, 37°C	１０層、１.５時間
	2.4	3	2 (1000/60)	8.50	0.04	0.75 hr, 37°C	１０層、１.５時間
	0.7	3	2 (1000/60)	1.00	ND	0.75 hr, 37°C	１０層、１.５時間
9	*7.3	1	2 (1000/20)	87.00	0.23	1 hr, 37°C	１０層、１.５時間
	2.4	1	2 (1000/20)	4.00	0.01	1 hr, 37°C	１０層、１.５時間
	0.7	1	2 (1000/20)	2.50	0.006	1 hr, 37°C	１０層、１.５時間
10	7.3	<1 (なしtRNA)	2 (1000/20)	13.70	ND	0.5 hr, 37°C	１０層、１.５時間
	7.3	<1 (10^1 tRNA)[4]	2 (1000/20)	10.50	ND	0.5 hr, 37°C	１０層、１.５時間
	7.3	<1 (10^2 tRNA)	2 (1000/20)	5.00	ND	0.5 hr, 37°C	１０層、１.５時間
	7.3	<1 (10^3 tRNA)	2 (1000/20)	1.80	ND	0.5 hr, 37°C	１０層、１.５時間

*次のラウンドへ移行したプール

[1]洗浄の回数、容量及び時間

[2]バックグラウンドの逆選択工程におけるフィルターの数とインキュベーション時間

[3]ＮＤ、測定せず

[4]アプタマープールに対する過剰ｔＲＮＡの倍率

【０１６０】

【表４】

表面プラスモン共鳴バイオセンサー（ｓｐｒ）ＳＥＬＥＸの条件と結果

ＴＧＦβ２を用いたＢＩＡ ＳＥＬＥＸの経過

ラウンド	TGFβ2, RU[1]				[RNA], μM[2]	注入（容積、μＬ）[3]	画分（各分）[4]	画分 FW[5]	ＳＤＳ後の ＲＵ[6]
	FC1	FC2	FC3	FC4					
2	1293	874	294	0	4	4 (40)	3 (5)	3rd & SDS	~100
3	1176	1178	1181	0	15	4 (40)	3 (5)	3rd & SDS	~50-100
4	3010	2037	1767	0	10	6 (40)	3 (5)	3rd & SDS	~80
5	5520	5334	4265	0	5	6 (40)	3 (5)	3rd & SDS	~100-150
6	4075	3143	298	0	5	6 (40)	3 (5)	3rd & SDS	~75-100
7	3773	2616	2364	0	2	6 (40)	3 (5)	3rd & SDS	~330-220
8	2574	1842	1461	0	5	4 (40)	3 (5)	3rd & SDS	~60-105
9	3180	2029	1688	0	3	4 (40)	3 (5)	3rd & SDS	~77-114
10	344	718	1692	0	1	4 (40)	6 (10)	6th & SDS	~50
11	217	675	386	0	5	2 (40)	6 (10)	6th & SDS	~50-62

[1]１ＲＵがタンパク質１ｐｇ／ｍｍ^{2}に対応する共鳴ユニットで表記される、固定化ＴＧＦβ２の量。タンパク質は１．２ｍｍ^{2}の範囲に固定化されている。

[2]ＲＮＡプールの濃度

[3]注入の回数と各注入の量

[4]各画分の数と時間（分）

[5]次のラウンドに移行した画分

[6]共鳴ユニットで表記される、ＳＤＳ処理後に溶出されたＲＮＡの量

ＦＣ１、ＦＣ２、ＦＣ３及びＦＣ４は、ＢＩＡチップの４種のフローセルを示す。

【０１６１】

【表５】

【０１６２】

表面プラスモン共鳴ＳＥＬＥＸのラウンド８から単離された配列

名称[a]	配列番号	配列[b]			結合[c]
8.1(1)	21	GGGAGGACGAUGCGG	UCCUCAAUG-AUCUU----------	UCCUGUUUAUGCUCCC	CAGACGACUCGCCCGA	フィルター
8.2(1)	22	GGGAGGACGAUGCGG	AAGUAACGUUUAAGUAAAAUUCGUUCUCUCGGUAUUUGGC		CAGACGACUCGCCCGA	TGFβ2
8.3(14)	23	GGGAGGACGAUGCGG	AAGUAACGUUGAAGUAAAAUUCGUUCUCUCGGCAUUUGGC		CAGACGACUCGCCCGA	TGFβ2
8.5(1)	24	GGGAGGACGAUGCGG	UCCUAACCAUCACAAUCUCAAUUCUUAUAUUUUCCCGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	なし
8.6(1)	25	GGGAGGACGAUGCGG	--AAACCAAAAGACCACAUCUCCAUACUCACGCUCUGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	なし
8.8(1)	26	GGGAGGACGAUGCGG	AUAGAUCGGUCCGAUAAGUCUUUCAUCUUUACCUGGCCCC		CAGACGACUCGCCCGA	なし
8.9(4)	27	GGGAGGACGAUGCGG	AAGUAACGUUGAAGUAAAAUUCGUUCUCUCGGUAUUUGGC		CAGACGACUCGCCCGA	TGFβ2
8.11(1)	28	GGGAGGACGAUGCGG	ACGAUCCUUUCCUUAACAUUUCAUCAUUUCUCCUGUGCCC		CAGACGACUCGCCCGG	フィルター
8.12(1)	29	GGGAGGACGAUGCGG	UCCAUCAACAAUCUUAUCAUUAUGUUUUUCCUUCCCGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	なし
8.13(1)	30	GGGAGGACGAUGCGG	UCCUCUGAGCCGAUCUUCUUCACUACUUCUUUUUCUGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	フィルター
8.15(2)	31	GGGAGGACGAUGCGG	UUCCUCAAUUCUUCCAUCUUCAUAAUGUUUCCCUUUGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	フィルター
8.18(1)	32	GGGAGGACGAUGCGG	UCUACCCUUUAGCAGUAUUUGUUUCCAUCGUUGUUUGCCC		CAGACGACUCGCCCGG	なし
8.20(1)	33	GGGAGGACGAUGCGG	UCUCAACGAAGAACAUCGUUGGAUACUGUUUGUCCCGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	なし
8.21(1)	34	GGGAGGACGAUGCGG	UUCAGUUUCCUUCAGUUUUCGUUUCUAAUUCUUGUGUCCC		CAGACGACUCGCCCGA	フィルター
8.22(1)	35	GGGAGGACGAUGCGG	----------	AGCGGAUUAAUUAGUCUGACUUCUUGUCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.23(1)	36	GGGAGGACGAUGCGG	AGACAUCUUUGUCUCGAUUAGUCAUGUUCCUUACCUGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	なし
8.24(1)	37	GGGAGGACGAUGCGG	--UCCUCUAGCAAGCAGCUUCUCAUCUUAUUUUUCCGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	
8.25(1)	38	GGGAGGACGAUGCGG	UGCACAGUGAUGGAUGACAUUGUAUAACGGUAUGCGUCCC		CAGACGACUCGCCCGA	
8.26(1)	39	GGGAGGACGAUGCGG	-ACCUAUCUUUCUUCCAAGUCAUAGUUUUACUUCCCGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	フィルター
8.28(1)	40	GGGAGGACGAUGCGG	AUGAGACCUAAUCAUCGAUCCGCUAUCUAAAACCUCACCC		CAGACGACUCGCCCGA	なし
8.29(1)	41	GGGAGGACGAUGCGG	UCCUCAGACAAAUCUUUCUUGAAUCUUUCCUUAACUGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	フィルター
8.31(1)	42	GGGAGGACGAUGCGG	-ACCGAUUCUCCAACUUGACAUUUAUUCCUCUUUCUGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	フィルター
8.33(1)	43	GGGAGGACGAUGCGG	UCCUCUGAGCCAAUCUUCUUCGCUACUUCUUUUUCUGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	フィルター
8.34(1)	44	GGGAGGACGAUGCGG	AUUCUUUCUCCAACGCUUUUCACUACCUACAUUUCUGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	フィルター
8.35(1)	45	GGGAGGACGAUGCGG	AUCCUAUCCUCUGAAUAUCAUUAAAUCAUCUUCUCCGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	なし
8.36(1)	46	GGGAGGACGAUGCGG	UUCAAUCAUCUUCACUCU-CAUUUCCUUUUUCCUACUCCC		CAGACGACUCGCCCGA	フィルター
8.38(1)	47	GGGAGGACGAUGCGG	CGAUAGAAUCUAGUCGUUCUAGAUGAUCUGGUACGUGCCC		CAGACGACUCGCCCGA	

表５．（続き）

8.39(1)	48	GGGAGGACGAUGCGG	UAGUAAUCCUUGUCUUCCAUUUCUCUUUACCCUUUUGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	フィルター
8.40(1)	49	GGGAGGACGAUGCGG	----CCCAUUAGUCCUCAUUAGU------CCCCUGUGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	なし
8.41(1)	50	GGGAGGACGAUGCGG	CAUCUUAUCCUCCCAUCAGUUACUCUUCGUUAUUCCCCGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.45(1)	51	GGGAGGACGAUGCGG	UCC-AAAUCCUCUUCCCCAUGUUAGCAUUCAGCCUUGUCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.46(1)	52	GGGAGGACGAUGCGG	-UUCCGACAAUUUCCUCCCACCAUUAGAUUUCUUGCUGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.47(1)	53	GGGAGGACGAUGCGG	UCUUGAUCCUCCCUUUGUGUCUUUCUUUGUCUUCCCUGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.48(2)	54	GGGAGGACGAUGCGG	AAGUAACGUUGAAGUAAAAUUCGUUCUCUCGGUAUU-GGC	CAGACGACUCGCCCGA	TGFβ2
8.49(1)	55	GGGAGGACGAUGCGG	-UCCGAUCAGUUCCUUCGAUUAAUCUUCUUUCCUGCCCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.51(1)	56	GGGAGGACGAUGCGG	AAUCCUUCUCCCCUGAUGAAUAUGACCUUUUUCUUGCUCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.52(1)	57	GGGAGGACGAUGCGG	AUGAUCUUUAAUGUCUGGUUUGAGGUCAAUGCGGGUGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.56(1)	58	GGGAGGACGAUGCGG	AGAUGGUACUCCCAUCUCCCUUUAUGUGCCCCAUCGCUGUCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.57(1)	59	GGGAGGACGAUGCGG	UCCUC-GAUUCU----------AAUUUACUCCCUUUUUCCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.61(1)	60	GGGAGGACGAUGCGG	UCUACCCUUUAGCAGUAUUUGUUUCCAUCGUUGUUUGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.62(1)	61	GGGAGGACGAUGCGG	-CACAAUAUUCUCCCUCUACUUCCACGUAUUUUCCUGUCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.64(1)	62	GGGAGGACGAUGCGG	UCCUCAACCUUAGACUUUCAUUUCUUCAGUUCUUCUGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.65(1)	63	GGGAGGACGAUGCGG	UAGUGGUCUGUCAAAGGAAUAGCUAGUAGUGUUUGGUCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.69(1)	64	GGGAGGACGAUGCGG	CAUCUUCCCUUAGCAUACCAGUUUAUUCCUUUUCCCUGUCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.71(1)	65	GGGAGGACGAUGCGG	AGCGACAGUAUAGUUAGUACUCUAGCUCUAGUGCUGUCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.72(1)	66	GGGAGGACGAUGCGG	ACCUCUCAUGAUCAGCAUCUCGCGUAAUCACGGUUCACCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.74(1)	67	GGGAGGACGAUGCGG	UCCGUACUCCCAUUUCCCUAUUUGAUUCCUUUUCCUCUGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.75(1)	68	GGGAGGACGAUGCGG	AACCCCACGACCUUACCUUAAUCAUGUAUUUCUCUCUGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.76(1)	69	GGGAGGACGAUGCGG	-------AGAUAAUGAGUGACGGUGAUUAUAGAUGCUGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.79(1)	70	GGGAGGACGAUGCGG	UUCCCUCAAUUCUUCCCAUCUUCAUAAUGUUUCCCUUUGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	
8.80(1)	71	GGGAGGACGAUGCGG	UUCCU--------UCCAACGUUAUCUACUUUCU----GCCC	CAGACGACUCGCCCGA	

[a]名称はラウンド8．クローン番号の形式で示し、かっこ内に単離された配列のクローン数を示す。

[b]－は、選択領域を有する４０塩基より短い配列を示すために導入されたギャップである。そのような配列を他の配列と並置させる試みがなされたが、この並置は必ずしも最適ではない。下線を施した塩基はリガンドｌ４ｉ－１（表７）から異なるものである。Ａ＝２'-ＯＨ Ａ；Ｃ＝２'-Ｆ Ｃ；Ｇ＝２'-ＯＨ Ｇ；Ｕ＝２'-Ｆ Ｕ

[c]フィルター：フィルター結合性配列；なし：ＴＧＦβ２にもフィルターにも結合しない配列；ＴＧＦβ２：リガンドｌ４ｉ－１と同様にＴＧＦβ２に結合する配列

【０１６３】

【表６】

共鳴ミラー（ｒｍ）光学バイオセンサーＳＥＬＥＸの条件と結果

ＴＧＦβ２を用いたＩＡＳＹＳ　ＳＥＬＥＸの経過

ラウンド	TGFβ2, Arcsec[1]		[RNA], μM[2]	容量、μＬ[3]	結合(分)[4]	解離（分）[5]	溶出[6]
	C1	C2					
10	1777	0	1	50	27	29	水
11	1777	0	10	50	30	60	水
12	1777	0	10	50	60	150	水
13	1893	0	0.05	50	37	73	水及びＳＤＳ
14	1721	0	3.5	50	30	35	水及びＳＤＳ

[1]Arcsecで示される固定化ＴＧＦβ２の量、１Arcsecは５pg／㎜[2]タンパク質である。
タンパク質はセル１（Ｃ１）の４ｍｍ[2]の範囲に固定化されている。

[2]ＲＮＡプールの濃度

[3]使用されたＲＮＡ溶液の容積

[4]結合相の長さ（分）

[5]解離相の長さ（分）

[6]使用された溶出液

【０１６４】

【表７】

【表８】

【０１６５】

共鳴ミラーＳＥＬＥＸのラウンド１３から単離された配列

名称[a]	配列番号	配列[b]
14i-1	72	GGGAGGACGAUGCGG AAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCGUUCUCUCGG-CAUUUGGC CAGACGACU-CGCCCGA
13.20(1)	73	GGGAGGACGAUGCGG AAGUAACGUUAUAGUAAAAUUCGUUCUCUCGG-UAUU_GGC CAGACGACU-CGCCCGA
13.22(2)	74	GGGAGGACGGUGCGG AAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCGUUCUCUCGG-CGUUUGGC CAGACGACU-CGCCCGA
13.24(2)	75	GGGAGGACGAUGCGG AAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCGUUCUCUCGG-CGUUUGGU CAGACGACU-CGCCCGA
13.30(1)	76	GGGAG_ACGAUGCGG AAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCGUUCUCUCGG-CAUUUGGC CAGACGACU-CGCCCGA
13.32(1)	77	GGGAGGACGAUGCGG AAGUAACGUUGAAGUAAAAUUCGUUCUCUCUG-CGUUUGGU CAGACGACU-CGCCCGA
13.34(1)	78	GGGAGGACGAUGCGG AAGUAACGUUGAAGUAAAAUUCGUUCUCCUGG-UA_UUGGC CAGACGACU-CGCCCGA
13.36(2)	79	GGGAGGACGAUGCGG AAGUAACGUUGAAGUAAAAUUCGUUCUCUCGG-CAUUUGGC CAGACGACU-CGCCCGA
13.40(1)	80	GGGAGGACGAUGCGG AAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCGUUCUCUUGG-CAUUU_GC CAGACGACU-CGCCCGA
13.42(1)	81	GGGAGGACGAUGCGG AAGUAACGUUAAAGUAAAAUUCGUUCUCUCGG-CGUUUGGC CAGACGACU-CGCCCGA
13.44(1)	82	GGGAGGACGAUGCGG AAGUAACGUUGAAGUAAAAUUCGUUCUCUCGG-CGUUUGGC CAGACGACU-CGCCCGA
13.48(1)	83	GGGAGGACGAUGCGG AAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCGUUCUCUCGG-UAUUUGGC CAGACGACU-CGCCCGA
13.50(1)	84	GGGAGGACGAUGCGG AAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCGUUCUCUUGG-UCUU_GGC CAGACGACU-CGCCCGA
13.54(1)	85	_GGAGGACGAUGCG_ AAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCGUUCUCUCGGGCAUUUGG_ CAGACGACUUCGCCCGA

[a]名称はラウンド１３．クローン番号の形式で示し、その後に単離された配列のクローン数を示す。

[b]下線を施した塩基はフィルターＳＥＬＥＸ由来のリガンド１４ｉ－１とは異なるものである。１４ｉ－１の配列を比較のために一番上に示す。Ａ＝２'-ＯＨ Ａ；Ｃ＝２'-Ｆ Ｃ；Ｇ＝２'-ＯＨ Ｇ；Ｕ＝２'-Ｆ Ｕ

【０１６６】

【表９】

フィルターＳＥＬＥＸのラウンド１４及び２１から単離された、ＴＧＦβ２リガンドの配列及び境界領域

名称[a]	配列番号	配列[b]	Kd (nM)	Ki (nM)
14i-1	72	**GGGA**GGACGAUGCGGAAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCG**UUCUCUC**GGCAUUUGGC**CAGACGACUCGCCCGA**	10	230
21a-4	86	**GGGAGGACGAUGCGG**CGUUGUUUAGUCGUAUGUAUAUACUAAGUCCGCUUG**UCCCCAGACGACUCGCCCGA**	3	30
21a-21	87	**GGGAGGACGAUGCGG**-UUCAG**G**AGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUA**CUCCCCAGACGACUCGCCCGA**	1	10
領域：		5’固定　選択　3’固定		

[a]名称は配列が単離されたラウンド－クローン数の形式で示す。

[b]境界部分には下線が施されている。固定領域は太字である。選択配列は普通文字である。

A＝2'-OH A；C＝2'-F C；G＝2'-OH G；U＝2'-F U

【０１６７】

【表１０】

ＳＥＬＥＸ法を使用して単離された配列の数

	ＳＥＬＥＸラウンド						
	8-spr	13-rm	14i	16a	18b	21a	合計
配列							
14i-1	0	0	75	2	0	0	77
14i-1 変異体	21	15	22	2	0	0	60
21a-4	0	0	0	0	0	3	3
21a-4 変異体	0	0	4	7	0	2	13
21a-21	0	0	0	1	11	38	50
21a-21 変異体	0	0	0	2	4	4	10
未同定	36	0	0	0	0	0	36
フィルター結合性	12	0	1	1	0	1	15
合計	69	15	102	15	15	48	264

ＳＥＬＥＸ法を使用して単離された核酸プールの特徴

ラウンド[a]	プールの配列[b]	プールの比率(%)[c]	形質転換体の比率(%)[d]	クローンの比率[e]
0	ランダム	14i-1: <0.03		
6-spr	ランダム	14i-1: ~1		
8-spr	やや非ランダム	14i-1: ~5		14i-1: 30 他： 70
9-spr	非ランダム			
9-rm	リガンド１４ｉ－１の配列が読み取れる			
10-rm	リガンド１４ｉ－１の配列が読み取れる			
11-rm	リガンド１４ｉ－１の配列が読み取れる			
12-rm	リガンド１４ｉ－１配列の変異体が読み取れる			
13-rm	リガンド１４ｉ－１配列の変異体が読み取れる	14i-1: 10-100 21a-21: <0.1		14i-1: 100
14i				14i-1: 93 21a-4: 4 21a-21: 0 他： 3
		21a-21: 0.2-0.5		
16a				14i-1: 27 21a-4: 47 21a-21: 20 他： 6
		21a-21: 3-100		
18b		21a-21: 3-100		21a-21: 100
21a			21a-4: 9 21a-21: 90 他： 1	21a-4: 10 21a-21: 84 他： 6
		21a-21: 3-100		

表１０．（続き）

[a] ｓｐｒ：表面プラスモン共鳴バイオセンサーＳＥＬＥＸ由来；
ｒｍ：共鳴ミラー光学バイオセンサーＳＥＬＥＸ由来。
[b] 3’Ｎ７プライマーを用いるバルク核酸プールのプライマー伸張により決定。
[c] リガンド特異的プライマーを用いるバルク核酸プールのＲＴ－ＰＣＲにより決定。
[d] リガンド特異的プライマーを用いる個別形質転換体のＰＣＲにより決定。
[e] クローンの配列決定により決定。リガンドの配列変異体を含む。

【０１６９】

【表１１】

【０１７０】

ヒトＴＧＦβ２核酸リガンド２１ａ－２１の短鎖型

名称	配列[a]	配列番号	結合性[b]	長さ[c]	生物活性[d]
21a-21	**GGGAGGACGAUGCGGUUCAGGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCCCC*AGACGACUCGCCCGA**	87	0.5	70	1
21a-21(U6G)	**GGGAGGACGAUGCGGUUCAGGAGGGUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCCCC*AGACGACUCGCCCGA**	88	250	34	
21a-21Δ5'	***GG*UUCAGGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCCCC*AGACGACUCGCCCGA**	89	0.5	56	
21a-21Δ3'	**GGGAGGACGAUGCGGUUCAGGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCCCC*A**	90	100	56	
21a-21Δ5',3'	***GG*UUCAGGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCCCC*A**	91	0.5	42	1
21a-21(ML-94)	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCCCC	92	0.5	36	
21a-21(ML-95)	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCC	93	1	34	
21a-21(ML-96)	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUA	94	1000	30	
21a-21(ML-97)	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGC	95	1000	26	
21a-21(ML-99)	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGC CUCC	96	1000	30	
21a-21(ML-101)	GGAGGUUAUU AGAGUCU AUAGCUGUACUCC	97	1000	30	
21a-21(ML-102)	GGAGGUUAUU AGAGUCU AUAGC CUCC	98	1000	26	
21a-21(ML-103)	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUC	99	50	33	

【０１７１】

表１１．（続き）

名称	配列[a] 配列番号 結合性[b]	長さ[c]	生物活性[d]
21a-21(ML-104)	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACU 100 70	32	
21a-21(ML-105)	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUAC 101 1000	31	
21a-21(ML-114)	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGC GUACUCC 102 1000	33	
21a-21(ML-115)	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGU CUCC 103 1000	33	
21a-21(ML-116)	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCU ACUCC 104 1000	32	
21a-21(ML-118)	GGAGGUUAU ACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCC 105 1000	33	
21a-21(ML-120)	GGAGGUUAUUACAGA UCUGUAUAGCUGUACUCC 106 1000	33	
21a-21(ML-122)	GGAGGUUAUUACA AGU UGUAUAGCUGUACUCC 107 1000	32	
21a-21(ML-128)	GGAGGUUAUUACAGAGU UGUAUAGCUGUACUCC 108 1000	33	
21a-21(ML-130)	GG GGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUAC CC 109 2	32	
21a-21(ML-132)	GGAGGUUAUUAC GAGUCUGUAUAGC GUACUCC 110 1000	32	
21a-21(ML-134)	GGAGA UAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCC 111 10	33	
21a-21(ML-136)	GG GGUUAUU CAGAGUCUGUAUAGCUG AC CC 112 10000	30	
21a-21(ML-138)	GG GGUUAUUA AGAGUCUGUAUAGCU UAC CC 113 10000	30	

【０１７２】

【表１２】

表１１．（続き）

名称	配列[a]	配列番号	結合性[b]	長さ[c]	生物活性[d]
NX22283	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCCCC[3'T]	114	0.6	36	0.5
NX22284	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCC [3'T]	115	1	34	1
NX22285	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCCCCA	116	2	37	
NX22286	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUA	117	130	30	>20
NX22301	GAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCC [3'T]	118	1	33	2
NX22302	AGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCC [3'T]	119	100	32	
NX22303	GGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCC [3'T]	120	>100	31	>100
NX22323	PEG-GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCC [3'T]	121	nt	34	3

[a]固定領域を太字で示す。２１ａ－２１の点突然変異（Ｕ６Ｇ）に下線を施し、太字で示す。

Ａ＝2'-ＯＨ Ａ；Ｃ＝2'-Ｆ Ｃ；Ｇ＝2'-ＯＨ Ｇ；Ｕ＝2'-Ｆ Ｕ

5’RNaseH切断産物の5’末端にあるイタリック文字Gは、この時間の切断物の約５０％が２つのGを残すこと、５０％で１つのGが残ることを示す。２１ａ－２１の境界部分に下線を施す。

[b]結合性を、リガンドのK_d／ＮＸ２２２８４のK_dの比として表す。ＮＸ２２２８４のK_dは約２ｎＭである。

[c]長さは塩基数で示す。

[d]生物活性を、リガンドのK_i／ＮＸ２２２８４のK_iの比として表す。ＮＸ２２２８４のK_iは約１０ｎＭである。

ヒトトランスフォーミング増殖因子βのアミノ酸配列の並置

配列番号

TGFß1: ALDTNYCFSS TEKNCCVRQL YIDFRKDLGW KWIHEPKGYH ANFCLGPCPY IWSLDTQYSK 60 122

TGFß2: ALDAAYCFRN VQDNCCLRPL YIDFKRDLGW KWIHEPKGYN ANFCAGACPY LWSSDTQHSR 60 123

TGFß3: ALDTNYCFRN LEENCCVRPL YIDFRQDLGW KWVHEPKGYY ANFCSGPCPY LRSADTTHST 60 124

TGFβ2特異的: AA VQD L KR N A A S R

TGFß1: VLALYNQHNP GASAAPCCVP QALEPLPIVY YVGRKPKVEQ LSNMIVRSCK CS 112 125

TGFß2: VLSLYNTINP EASASPCCVS QDLEPLTILY YIGKTPKIEQ LSNMIVKSCK CS 112 126

TGFß3: VLGLYNTLNP EASASPCCVP QDLEPLTILY YVGRTPKVEQ LSNMVVKSCK CS 112 127

TGFβ2特異的: S I S I K I

【０１７３】

【表１３】

【０１７４】

【表１４】

ヒトＴＧＦβ２核酸リガンド１４ｉ－１の短鎖型

名称	配列[a]	配列番号	結合性[b]	長さ[c]
14i-1	**GGGA**GGACGAUGCGGAAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCG**UUCUCUC**GGCAUUUGGCCAGACGACUCGCCCGA	72	1	71
14i-1Δ5'[d]	*GG*AAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCGUUCUCUCGGCAUUUGGCCAGACGACUCGCCCGA	128	>100	56
14i-1Δ3'[d]	GGGAGGACGAUGCGGAAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCGUUCUCUCGGCAUUUGGCCA	129	3	57
14i-1Δ5,3'[d]	*GG*AAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCGUUCUCUCGGCAUUUGGCCA	130	>100	42
14i-1t5-41	gGGAgGAUGCGGAAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCcUUC	131	1	38
14i-1t5-38	gGGAgGAUGCGGAAGUAACGUUGUAGUAAAAUUCc	132	>100	35
14i-1t5-35	gGGAgGAUGCGGAAGUAACGUUGUAGUAAAAU	133	>100	32
14i-1(ML-86)	gGGAgGAUGCGGAAGUAACGUUGUAGU UCcUUC	134	>100	33
14i-1(ML-87)	gGGAgGAUGCGGAAGUAACGUUGUAGU	135	>100	27
14i-1(ML-89)	gGgaGgAGUAACGUUGUAGU	136	>100	20

[a]小文字は、完全長リガンドのその位置には見出されず、転写効率を維持するために付加又は変化させた塩基を示す。境界部分に下線を施す。固定領域を太字で示す。５’RNaseH切断産物の５’末端にあるイタリック文字Ｇは、この時間の切断物の約５０％が２つのＧを残すこと、５０％で１つのＧが残ることを示す。

Ａ＝2'-OH Ａ；Ｃ＝2'-F Ｃ；Ｇ＝2'-OH Ｇ；Ｕ＝2'-F Ｕ

[b]結合性を、K_d（リガンド）／K_d（１４ｉ－１）の比として表す。１４ｉ－１のK_dは約１０ｎＭである。

[c]長さは塩基数で示す。

[d]RNaseH消化により産生

【０１７５】

【表１５】

ヒトＴＧＦβ２核酸リガンド２１ａ－４の短鎖型

名称	配列[a]	配列番号	結合性[b]	長さ[c]
21a-4	GGGAGGACGAUGCGGCGUUGUUUAGUCGUAUGUAUAUACUAAGUCCGCUUGUCCCCAGACGACUCGCCCGA	86	1	71
21a-4Δ5'[d]	*GG*CGUUGUUUAGUCGUAUGUAUAUACUAAGUCCGCUUGUCCCCAGACGACUCGCCCGA	137	>100	56
21a-4Δ3'[d]	GGGAGGACGAUGCGGCGUUGUUUAGUCGUAUGUAUAUACUAAGUCCGCUUGUCCCCA	138	1	57
21a-4Δ5',3'[d]	*GG*CGUUGUUUAGUCGUAUGUAUAUACUAAGUCCGCUUGUCCCCA	139	>100	42
21a-4(ML-91)	ggGgaGCGGCGUUGUUUAGUCGUAUGUAUAUACUAAGUCCGCUU	140	1	44
21a-4(ML-92)	ggGgaGCGGCGUUGUU gaaa AGUCCGCUU	141	>100	27
21a-4(ML-108)	ggGgaGCGGCGUUGUUU CGUAUGUAUAU AAGUCCGCUU	142	>100	38
21a-4(ML-109)	ggGgaGCGGCGUUGUUU AUGUAU AAGUCCGCUU	143	>100	33
21a-4(ML-110)	ggGgaGCGGCGUUGUUUAGUCGUAUGUAUAUACUAAGUCCGC	144	1	42
21a-4(ML-111)	ggGgaGCGGCGUUGUUUAGUCGUAUGUAUAUACUAAGU	145	30	38

[a]小文字は、完全長リガンドのその位置には見出されない塩基を示す。下線は境界位置を示す。固定領域の配列を太字で示す。５’RNaseH切断産物の５’末端にあるイタリック文字Ｇは、この時間の切断物の約５０％が２つのＧを残すこと、５０％で１つのＧが残ることを示す。　Ａ＝2'-OH Ａ；Ｃ＝2'-F Ｃ；Ｇ＝2'-OH Ｇ；Ｕ＝2'-F Ｕ

[b]結合性を、K_d（リガンド）／K_d（２１ａ－４）の比として表す。２１ａ－４のK_dは約３ｎＭである。

[c]長さは塩基数で表す。

[d]これらのリガンドは２１ａ－４のRnaseH消化により産生した。

【０１７６】

【表１６】

偏向ＳＥＬＥＸの条件と結果

ラウンド[a]	[RNA][b], Nm	[TGFβ2], nM	RNA[b]/タンパク質	[競合剤]	結合率 (%)	バックグラウンド率 (%)	結合／バックグラウンド	Kd (nM)[c]
３４Ｎ７．２１ａ－２１　ラウンド０　核酸								870
1a	1000	150	7	0	1.4	1.4	1.0	395
2a	450	300	1.5	0	1.7	1.0	1.7	186
3a	10	50	0.2	0	17.5	1.0	17.5	25
4a	50	10	5	0	11.0	0.9	12.3	17
4b	50	10	5	333 nM NX22284	2.2	1.3	1.7	8
5a	8	1	8	0	1.4	0.9	1.5	1
5b	8	1	8	100 nM NX22284	0.8	0.7	1.1	17
6a	4	0.5	8	0	2.9	2.9	1.0	1
6b	6	0.5	12	100 nM NX22284	1.8	1.3	1.4	1
7a	5	0.25	20	0	0.5	0.14	3.4	1
7b	5	0.25	20	200 nM NX22284 5 mM tRNA	0.15	0.1	1.5	0.5
8a	1	0.05	20	0	1.05	1.1	0.9	1
8b	1	0.05	20	100 nM NX22284 5 mM tRNA	0.6	0.5	1.2	3
9a	125	1	125	0	0.6	0.5	1.2	nd
9b	0.9	0.01	90	0	0.15	0.14	1.0	nd

[a] ａ系列：競合剤なし；ｂ系列：競合剤あり

[b] 核酸リガンドライブラリー

[c] ｎｄ、測定せず

ヒトＴＧＦβ２の偏向ＳＥＬＥＸのラウンド５ａから単離された核酸リガンド

名称[a]	5’固定	選択[b]	3’固定	A = 配列番号 B = 変化[c] C = 結合性[d]		
				A	B	C
推定構造要素：		S1 B S2 L S2 S1				
21a-21:	GGGAGGACGAUGCGGUUCA	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCCC	CAGACGACUCGCCCGA	72	0	1.0
1: (2)	GGGAGGACGAUGCGG	GGUGAUUAUUACAGAGUAUGUAUAGCUGUACCCC	CAGACGACUCGCCCGA	146	4	0.8
2: (1)	GGGAGGACGAUGCGG	AGGCGUUAUUAGAGAGUCUGUAUAGCUCUAGCCC	CAGACGACUCGCC-GA	147	7	0.6
4: (1)	GGGAGGACGAUGCGG	GGAGGGUAUUACAGAGUAUGUAUAGCUGUACUCC	CAGACGACUCGCCCGA	148	2	1.4
6 :(2)	GGGAGGACGAUGCGG	GGAGGUUAUUAUAGAGUCUGUAUAGCUAUACCCC	CAGACGACUCGCCCGA	149	3	1.6
7: (1)	GGGAGGACGAUGCGG	GAGGGUUAUUAUAGAGUCUGCAUAGCUAUACCCC	CAGACGACUCGCCCGA	150	5	0.3
9: (1)	GGGAGGACGAUGCGG	UGAGAGUAUUACGGAGUAUGUAUAGCCGUACCCC	CAGACGACUCGCCCGA	151	7	0.3
10:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	GGGCAUUAUUUCAGAGUCUGUAUAGCUGUAGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	152	6	0.3
11:(2)	GGGAGGACGAUGCGG	GCGGAUUAUCACAGAGUAUGUAUAGCUGUGCCGC	CAGACGACUCGCCCGA	153	8	0.4
13:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	UGUGAAUAUUAGAGAGUCUGUAUAGCUCUACCCC	CAGACGACUCGCCCGA	154	7	0.2
14:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	CGGGAUUAUUACUGAGUCUGUAUAGCAGUACCCC	CAGACGACUCGCCCGA	155	6	0.4
15:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	GUGGAAUAUUACGGAGUCUGUAUAGCCGUACUCC	CAGACGACUCGCCCGA	156	6	0.4
17:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	GGGGACUAUUAGUGAGUCUGUAUAGCACUACCCC	CAGACGACUCGCCCGA	157	8	0.8
18:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	GUGGAUUAUUACAGCGUCUGUAUAUCUGUACCCC	CAGACGACUCGCCCGA	158	6	1.0
19:(2)	GGGAGGACGAUGCGG	GCAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUGC	CAGACGACUCGCCCGA	159	2	1.0
20:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	GGUAGAUAUCACUGAGUCUGUAUAGCAGUGUCCC	CAGACGACUCGCCCGA	160	9	5.7
21:(2)	GGGAGGACGAUGCGG	AGGGAUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACCCC	CAGACGACUCGCCCGA	161	4	0.7
22:(4)	GGGAGGACGAUGCGG	GUGGAUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACCCC	CAGACGACUCGCCCGA	162	4	1.1
25:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	GGGCGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUAGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	163	4	1.0
26:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	GGUGGUUAUUACACAGUAUGUAUAGGUGUACCCC	CAGACGACUCGCCCGA	164	4	3.1
28:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	AGGGAAUAUUACAGAGUAUGUAUAGCUGUACCCC	CAGACGACUCGCCCGA	165	6	1.0
29:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	GGAGUUUAUUACAGCGUCUGUAUAUCUGUAGCCC	CAGACGACUCGCCCGA	166	5	1.0

【０１７８】

【表１７】

表１６．（続き）

名称[a]	5’固定	選択[b]	3’固定	A＝配列番号 B＝変化[c] C＝結合性[d]		
				A	B	C
30:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	UGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCC	CAGACGACUCGCCCGA	167	1	2.4
34:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	GGUGGUUAUUAGAGAGUCUGUAUAGCUCUACGCC	CAGACGACUCGCCCGA	168	4	1.7
35:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	GGGGAGUAUUAAAGAGUCUGUAUAGCUUUACCCC	CAGACGACUCGCCCGA	169	6	0.8
36:(1)	GGGAGGACGAUGCGG	GGAGGAUAUUAUAGAGUCUGUAUAGCUAUACCCC	CAGACGACUCGCCCGA	170	4	1.9
不変：		UAU GU UG AUA C				

[a]各配列について単離されたクローンの数を括弧内に示す。

[b]出発配列とは異なるヌクレオチドを太字で示す。A＝2'-OH A；C＝2'-F C；G＝2'-OH G；U＝2'-F U。
推定構造要素：Ｓ１、ステム１；Ｂ、バルジ；Ｓ２、ステム２；Ｌ、ループ。リガンド２１ａ－２１の配列を比較のために一番上に示す。

[c]出発配列からの変化数。

[d]結合性を、K_d（リガンド）／K_d（２１ａ－２１）として表す。２１ａ－２１のK_dは約１ｎＭである。

【０１７９】

【表１８】

偏向ＳＥＬＥＸに由来する最高及び最低アフィニティーのＴＧＦβ２核酸リガンド

名称	5’固定	選択[a] 配列番号	3’固定 結合性[b]	変化[c]
最高アフィニティーリガンド：				
13：	GGGAGGACGAUGCGG	UGUGAAUAUUAGAGAGUCUGUAUAGCUCUACCCC 154	CAGACGACUCGCCCGA 0.2	7
14：	GGGAGGACGAUGCGG	CGGGAUUAUUACUGAGUCUGUAUAGCAGUACCCC 155	CAGACGACUCGCCCGA 0.4	6
21：	GGGAGGACGAUGCGG	AGGGAUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACCCC 161	CAGACGACUCGCCCGA 0.7	4
35：	GGGAGGACGAUGCGG	GGGGAGUAUUAAAGAGUCUGUAUAGCUUUACCCC 169	CAGACGACUCGCCCGA 0.8	6
推定構造要素：		S1 B S2 L S2 S1		
21a-21：	GGGAGGACGAUGCGGUUCAGGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCCC 72		CAGACGACUCGCCCGA 1.0	0
最低アフィニティーリガンド：				
36：	GGGAGGACGAUGCGG	GGAGGAUAUUAUAGAGUCUGUAUAGCUAUACCCC 170	CAGACGACUCGCCCGA 2.0	4
30：	GGGAGGACGAUGCGG	UGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCC 167	CAGACGACUCGCCCGA 2.4	1
26：	GGGAGGACGAUGCGG	GGUGGUUAUUACACAGUAUGUAUAGGUGUACCCC 164	CAGACGACUCGCCCGA 3.1	4
6：	GGGAGGACGAUGCGG	GGAGGUUAUUAUAGAGUCUGUAUAGCUAUACCCC 149	CAGACGACUCGCCCGA 3.3	3
20：	GGGAGGACGAUGCGG	GGUAGAUAUCACUGAGUCUGUAUAGCAGUGUCCC 160	CAGACGACUCGCCCGA 5.7	9
不変：		UAU GU UG AUA C		

[a]出発配列とは異なるヌクレオチドを太字で示す。A＝2'-OH A；C＝2'-F C；G＝2'-OH G；U＝2'-F U。

推定構造要素：Ｓ１、ステム１；Ｂ、バルジ；Ｓ２、ステム２；Ｌ、ループ。

[b]結合性を、K_d（リガンド）／K_d（２１ａ－２１）として表す。２１ａ－２１のK_dは１ｎＭである。

[c]出発配列からの変化数。

【０１８０】

【表１９】

ＮＸ２２２８４リガンドにおける２’－ＯＨプリンの２’－ＯＣＨ$_3$プリンによる置換

名称	配列[a]	配列番号	結合性[b]	長さ[c]	生物活性[d]
NX22284	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCC[3'T]	115	1	34	1
NX22304	ggaggUUaUUaCagagUCUgUaUagCUgUaCUCC[3'T]	171	>100	34	>100
NX22355	GGAGGUUAUUaCagagUCUgUaUagCUgUaCUCC[3'T]	172	>100	34	>100
NX22356	ggagGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCC[3'T]	173	1	34	1
NX22357	GGAGgUUaUUaCAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCC[3'T]	174	2	34	10
NX22358	GGAGGUUAUUACagagUCUGUAUAGCUGUACUCC[3'T]	175	1	34	1
NX22359	GGAGGUUAUUACAGAGUCUgUaUaGCUGUACUCC[3'T]	176	>100	34	>30
NX22360	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAgCUgUaCUCC[3'T]	177	1	34	1
NX22374	GGAGGUUAUUACAGAGUCUgUAUAGCUGUACUCC[3'T]	178	25	34	>100
NX22375	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUaUAGCUGUACUCC[3'T]	179	>100	34	>300
NX22376	GGAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUaGCUGUACUCC[3'T]	180	50	34	>100
NX22377	ggaggUUaUUaCAGAGUCUGUAUAgCUgUaCUCC[3'T]	181	1	34	1
NX22383	ggaggUUaUUaCagagUCUGUAUagCUgUaCUCC[3'T]	182	500	34	>100
NX22384	ggaggUUaUUaCagagUCUgUAUagCUgUaCUCC[3'T]	183	10000	34	>100
NX22417	ggaggUUaUUaCagagUCUGUAUAgCUgUaCUCC[3'T]	184	1	34	10
NX22420	ggaggUUAUUaCagagUCUGUAUAgCUgUaCUCC[3'T]	185	1	34	1
NX22421	ggagGUUAUUACagagUCUGUAUAgCUgUaCUCC[3'T]	186	2	34	1
NX22426	ggaga-UAUUaCagagUCUGUAUAgCUgUaCUCC[3'T]	187	1	33	25
NX22427	gg-ggUUAUUaCagagUCUGUAUAgCUgUaC-CC[3'T]	188	0.3	32	0.7

[a] A, 2'-OH A; C, 2'-F C; G, 2'-OH G; U, 2'-F U; **a**, 2'-OCH$_3$ A; **g**, 2'-OCH$_3$ G. ［3'T］は、3’，3’ｄＴキャップを示す。

[b] 結合性を、リガンドのＫ$_d$／ＮＸ２２２８４のＫ$_d$の比として表す。ＮＸ２２２８４のＫ$_d$は約１ｎＭである。

[c] 長さは塩基数で示す。

[b] 生物活性を、リガンドのＫ$_i$／ＮＸ２２２８４のＫ$_i$の比として表す。ＮＸ２２２８４のＫ$_i$は約１０ｎＭである。

【０１８１】

【表２０】

偏向ＳＥＬＥＸに由来する核酸リガンド＃１３の短鎖型及び２’－ＯＣＨ$_3$プリン修飾物

名称	配列[a]	配列番号	結合性[b]	長さ[c]	生物活性[d]
NX22385	UGUGAAUAUUAGAGAGUCUGUAUAGCUCUACCCC[3'T]	189	0.4	34	4
NX22386	UgUgaAUaUUaGagagUCUGUAUagCUCUaCCCC[3'T]	190	3000	34	>100
NX22387	UgUgaaUaUUagagagUCUgUAUagCUCUaCCCC[3'T]	191	3000	34	30
NX22424	UgUgAAUAUUaGagagUCUGUAUAgCUCUaCCCC[3'T]	192	0.6	34	>100
NX22425	UgUgaaUAUUagagagUCUGUAUAgCUCUaCCCC[3'T]	193	1.5	34	>100

a A, 2'-OH A; C, 2'-F C; G, 2'-OH G; U, 2'-F U; **a**, 2'-OCH_3 A; **g**, 2'-OCH_3 G. ［3'T］は、3', 3'ｄＴキャップを示す。
b 結合性を、リガンドのK_d／ＮＸ２２２８４のK_dの比として表す。ＮＸ２２２８４のK_dは２ｎＭである。
c 長さは塩基数で示す。
d 生物活性を、リガンドのK_i／ＮＸ２２２８４のK_iの比として表す。ＮＸ２２２８４のK_iは１０ｎＭである。

非区画分析を用いたラットにおけるＮＸ２２３２３の薬物動態特性

パラメータ	単位	推定値
Cmax	(μg/mL)	27.1
AUCラスト	((μg*min)/mL)	3028.0
AUCINF	((μg*min)/mL)	3058.0
β-t 1/2	(min)	630.9
Cl	(mL/(min*kg))	0.33
MRTINF	(min)	350.4
Vss	(mL/kg)	115.0
Vz	(mL/kg)	298.0

【０１８２】

【表２１】

区画分析を用いたラットにおけるＮＸ２２３２３の薬物動態特性

パラメータ	単位	推定値	標準誤差	誤差（%）
Cmax	(μg/mL)	16.3	3.3	20.2
AUCINF	((μg*min)/mL)	2486	274	11.0
α-t 1/2	(min)	63.5	19.1	30.2
β-t 1/2	(min)	467.2	83.2	17.8
A	(μg/mL)	14.63	3.21	21.9
B	(μg/mL)	1.70	0.84	49.1
Cl	(mL/(min*kg)	0.402	0.044	11.0
MRTINF	(min)	360.3	35.6	9.9
Vss	(mL/kg)	144.9	23.1	15.9

【０１８３】

【表２２】

リードＴＧＦβ１短鎖型リガンドＣＤ７０の２’－Ｏメチル－及びＰＥＧ－修飾物の結合性及び阻害活性

		配列番号	結合性	生物活性	
ChD70	GGGUGCCUUUUGCCUAGGUUGUGAUUUGUAACCUUCUGCCCA	216	+++	+++	
ChD70-m1	**ggg**U**g**CCUUUUGCCUAGGUUGUGAUUUGUAACCUUCUGCCCA	194	+		
ChD70-m2	GGGUGCCUUUU**g**CC**U**a**gg**UUGUGAUUUGUAACCUUCUGCCCA	195	++		
ChD70-m3	GGGUGCCUUUUGCCUAGGUU**g**U**g**a**U**UU**g**UAACCUUCUGCCCA	196	+++		
ChD70-m4	GGGUGCCUUUUGCCUAGGUUGUGAUUUGU**aa**CCUUCU**g**CCC**a**	197	++		
ChD70-m5	**g**GGUGCCUUUUGCCUAGGUU**g**U**g**a**U**UU**g**UAACCUUCUGCCCA	198	+++		
ChD70-m6	G**g**GUGCCUUUUGCCUAGGUU**g**U**g**a**U**UU**g**UAACCUUCUGCCCA	199	+++		
ChD70-m7	GG**g**UGCCUUUUGCCUAGGUU**g**U**g**a**U**UU**g**UAACCUUCUGCCCA	200	+++		
ChD70-m8	GGGU**g**CCUUUUGCCUAGGUU**g**U**g**a**U**UU**g**UAACCUUCUGCCCA	201	+		
ChD70-m9	GGGUGCCUUUU**g**CCUAGGUU**g**U**g**a**U**UU**g**UAACCUUCUGCCCA	202	+		
ChD70-m10	GGGUGCCUUUUGCCU**a**GGUU**g**U**g**a**U**UU**g**UAACCUUCUGCCCA	203	+++		
ChD70-m11	GGGUGCCUUUUGCCUA**g**GUU**g**U**g**a**U**UU**g**UAACCUUCUGCCCA	204	+++		
ChD70-m12	GGGUGCCUUUUGCCUAG**g**UU**g**U**g**a**U**UU**g**UAACCUUCUGCCCA	205	+++		
ChD70-m13	GGGUGCCUUUUGCCUAGGUU**g**U**g**a**U**UU**g**U**a**ACCUUCUGCCCA	206	+++		
ChD70-m14	GGGUGCCUUUUGCCUAGGUU**g**U**g**a**U**UU**g**U**Aa**CCUUCUGCCCA	207	+++		
ChD70-m15	GGGUGCCUUUUGCCUAGGUU**g**U**g**a**U**UU**g**UAACCUUCU**g**CCCA	208	+++		
ChD70-m16	GGGUGCCUUUUGCCUAGGUU**g**U**g**a**U**UU**g**UAACCUUCUGCCC**a**	209	+++		
ChD70-m17	**ggg**UGCCUUUUGCCU**agg**UU**g**U**g**a**U**UU**g**U**aa**CCUUCUGCCC**a**3’-3’U	210	+++	+++	
ChD70-m18	**ggg**UGCCUUUUGCCU**agg**UU**g**U**g**a**U**UU**g**U**a**ACCUUCUGCCC**a**3’-3’U	211	+++		
ChD70-m19	**ggg**UGCCUUUUGCCU**agg**UU**g**U**g**a**U**UU**g**U**aa**CCUUCUGCCC3’-3’U	212	++	-	
ChD70-m20	**ggg**UGCCUUUUGCCU**agg**UU**g**U-----**g**U**aa**CCUUCUGCCC**a**3’-3’U	213	++		
ChD70-m21	**ggg**UGCCUUUUGCCU**agg**UU**g**-------U**aa**CCUUCUGCCC**a**3’-3’U	214	++		
ChD70-m22	**ggg**UGCCUUUUGCCU**agg**UU---------**aa**CCUUCUGCCC**a**3’-3’U	215	+++		

SEQUENCE LISTING

<110> NeXstar Pharmaceuticals, Inc.

<120> High Affinity TGFBeta Nucleic Acid Ligands and Inhibitors

<130> NEX87/PCT

<140>
<141>

<150> 09/046,247
<151> 1998-03-23

<150> 08/458,424
<151> 1995-06-02

<150> 07/714,131
<151> 1991-06-10

<150> 07/931,473
<151> 1992-08-17

<150> 07/964,624
<151> 1992-10-21

<150> 08/117,991
<151> 1993-09-08

<150> 07/536,428
<151> 1990-06-11

<150> 09/363,939
<151> 1999-07-29

<150> 08/434,465
<151> 1995-05-04

<160> 216

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> Feature N at positions 17-56 is A, C, G or T.

<400> 1
tcgggcgagt cgtctgnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnccgc 60
atcgtcctcc c 71

<210> 2
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 2
taatacgact cactataggg aggacgatgc gg 32

<210> 3
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 3
tcgggcgagt cgtctg 16

<210> 4
<211> 88
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base

<222> (1)..(88)
<223> Feature N at positions 33-72 is A, C, G or T.

<400> 4
taatacgact cactataggg aggacgatgc ggnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnnnnnn nncagacgac tcgcccga 88

<210> 5
<211> 88
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> Feature N at positions 33-72 is A, C, G or T.

<400> 5
attatgctga gtgatatccc tcctgctacg ccnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnnnnnn nngtctgctg agcgggct 88

<210> 6
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F; feature N at positions
16-55 is A, 2'-FC, G or 2'-FU.

<400> 6
gggaggacga ugcggnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnncagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 7
<211> 65
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> Feature N at positions 16-49 is SEQ ID NO: 115
and A, C, G or T.

<400> 7
gggaggacga tgcggnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnc agacgactcg 60
cccga 65

<210> 8
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(82)
<223> Feature N at positions 33-66 is SEQ ID NO: 115 and
A, C, G or T.

<400> 8
taatacgact cactataggg aggacgatgc ggnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnncaga cgactcgccc ga 82

<210> 9
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(82)
<223> Feature N at positions 33-66 is SEQ ID NO: 115 and
A, C, G or T.

<400> 9
attatgctga gtgatatccc tcctgctacg ccnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnngtct gctgagcggg ct 82

<210> 10
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F; feature N at positions
16-49 is SEQ ID NO: 115 and A, 2'-FC, G or 2'-FU.

<400> 10
gggaggacga ugcggnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 11
cgcaggatcc taatacgact cactata 27

<210> 12
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 12
ggcagaattc tcatctactt agtcgggcga gtcgtctg 38

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 13
agcggataac aatttcacac agg 23

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 14
gtgctgcaag gcgattaagt tgg 23

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 15
actttatgct tccggctcg 19

<210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 16
gccaaatgcc gagagaacg 19

<210> 17
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 17
ggggacaagc ggacttag 18

<210> 18
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 18
gggagtacag ctatacag 18

<210> 19
<211> 15
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(15)
<223> Bases at positions 5-15 are 2'-OMe.

<400> 19
ccgcaugcuc cuccc 15

<210> 20
<211> 14
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(12)
<223> Bases at positions 1-12 are 2'-OMe.

<400> 20
ucgggcgagu cgcg 14

<210> 21
<211> 61
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 21
gggaggacga ugcgguccuc aaugaucuuu ccuguuuaug cucccagac gacucgcccg 60
a 61

<210> 22
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 22
gggaggacga ugcggaagua acguuuaagu aaaauucguu cucucgguau uuggccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 23
<211> 71

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 23
gggaggacga ugcggaagua acguugaagu aaaauucguu cucucggcau uuggccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 24
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 24
gggaggacga ugcgguccua accaucacaa ucucaauucu uauauuuucc cgccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 25
<211> 69
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(69)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 25
gggaggacga ugcggaaacc aaaagaccac aucuccauac ucacgcucug ccccagacga 60
cucgcccga 69

<210> 26
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 26
gggaggacga ugcggauaga ucgguccgau aagucuuuca ucuuuaccug gcccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 27
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 27
gggaggacga ugcggaagua acguugaagu aaaauucguu cucucgguau uuggccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 28
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 28
gggaggacga ugcggacgau ccuuuccuua acauuucauc auuucuccug ugccccagac 60
gacucgcccg g 71

<210> 29
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 29
gggaggacga ugcgguccau caacaaucuu aucauuaugu uuuuccuucc cgccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 30
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 30
gggaggacga ugcgguccuc ugagccgauc uucuucacua cuucuuuuuc ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 31
<211> 71

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 31
gggaggacga ugcgguuccu caauucuucc aucuucauaa uguuucccuu ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 32
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 32
gggaggacga ugcggucuac ccuuuagcag uauuuguuuc caucguuguu ugccccagac 60
gacucgcccg g 71

<210> 33
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 33
gggaggacga ugcggucuca acgaagaaca ucguuggaua cuguuugucc cgccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 34
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 34
gggaggacga ugcgguucag uuuccuucag uuuucguuuc uaauucuugu gucccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 35
<211> 61
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 35
gggaggacga ugcggagcgg auuaauuagu cugacuucuu gucccagac gacucgcccg 60
a 61

<210> 36
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 36
gggaggacga ugcggagaca ucuuugucuc gauuagucau guuccuuacc ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 37
<211> 69
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(69)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 37
gggaggacga ugcgguccuc uagcaagcag cuucucaucu uauuuuuccg ccccagacga 60
cucgcccga 69

<210> 38
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 38
gggaggacga ugcggugcac agugauggau gacauuguau aacgguaugc gucccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 39
<211> 70

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 39
gggaggacga ugcggaccua ucuuucuucc aagucauagu uuuacuuccc gccccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 40
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 40
gggaggacga ugcggaugag accuaaucau cgauccgcua ucuaaaaccu caccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 41
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 41
gggaggacga ugcgguccuc agacaaaucu uucuugaauc uuuccuuaac ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 42
<211> 70
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 42
gggaggacga ugcggaccga uucuccaacu ugacauuuau uccucuuucu gccccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 43
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 43
gggaggacga ugcgguccuc ugagccaauc uucuucgcua cuucuuuuuc ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 44
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 44
gggaggacga ugcggauucu uucuccaacg cuuuucacua ccuacauuuc ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 45
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 45
gggaggacga ugcggauccu auccucugaa uaucauuaaa ucaucuucuc cgccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 46
<211> 70
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 46
gggaggacga ugcgguucaa ucaucuucac ucucauuucc uuuuuccuac uccccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 47
<211> 71

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 47
gggaggacga ugcggcgaua gaaucuaguc guucuagaug aucugguacg ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 48
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 48
gggaggacga ugcgguagua auccuugucu uccauuucuc uuuacccuuu ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 49
<211> 61
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 49
gggaggacga ugcggcccau uaguccucau uaguccccug ugccccagac gacucgcccg 60
a 61

<210> 50
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 50
gggaggacga ugcggcaucu uauccuccau caguuacucu ucguuauucc cgccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 51
<211> 70
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 51
gggaggacga ugcgguccaa auccucuucc cauguuagca uucagccuug uccccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 52
<211> 70
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 52
gggaggacga ugcgguuccg acaauuuccu ccaccauuag auuucuugcu gccccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 53
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 53
gggaggacga ugcggucuug auccuccuuu gugucuuucu uugucuuccc ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 54
<211> 70
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 54
gggaggacga ugcggaagua acguugaagu aaaauucguu cucucgguau uggccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 55
<211> 70

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 55
gggaggacga ugcgguccga ucaguuccuu cgauuaaucu ucuuuccugc cccccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 56
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 56
gggaggacga ugcggaaucc uucucccuga ugaauaugac cuuuuucuug cucccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 57
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 57
gggaggacga ugcggaugau cuuuaauguc ugguuugagg ucaaugcggg ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 58
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 58
gggaggacga ugcggagaug guacuccauc uccuuuaugu gcccaucgcu gucccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 59
<211> 61
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 59
gggaggacga ugcgguccuc gauucuaauu uacuccuuuu ucccccagac gacucgcccg 60
a 61

<210> 60
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 60
gggaggacga ugcggucuac ccuuuagcag uauuuguuuc caucguuguu ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 61
<211> 70
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 61
gggaggacga ugcggcacaa uauucuccuc uacuuccacg uauuuuccug uccccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 62
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 62
gggaggacga ugcggcccuc aaccuuagac uuucauuucu ucaguucuuc ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 63
<211> 71

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 63
gggaggacga ugcgguagug gucugucaaa ggaauagcua guaguguuug gucccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 64
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 64
gggaggacga ugcggcaucu uccuuagcau accaguuuau uccuuucccu gucccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 65
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 65
gggaggacga ugcggagcga caguauaguu aguacucuag cucuagugcu gucccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 66
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 66
gggaggacga ugcggaccuc ucaugaucag caucucgcgu aaucacgguu caccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 67
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 67
gggaggacga ugcgguccgu acuccauuuc cuauuugauu ccuuuuccuc ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 68
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 68
gggaggacga ugcggaaccc acgaccuuac cuuaaucaug uauuucucuc ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 69
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 69
gggaggacga ugcggagaua augagugacg gugauuauag augcugcccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 70
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 70
gggaggacga ugcgguuccu caauucuucc aucuucauaa uguuucccuu ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 71
<211> 60

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 71
gggaggacga ugcgguuccu uccaacguua ucuacuuucu gccccagacg acucgcccga 60

<210> 72
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 72
gggaggacga ugcggaagua acguuguagu aaaauucguu cucucggcau uuggccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 73
<211> 70
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 73

gggaggacga ugcggaagua acguuauagu aaaauucguu cucucgguau uggccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 74
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 74
gggaggacgg ugcggaagua acguuguagu aaaauucguu cucucggcgu uuggccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 75
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 75
gggaggacga ugcggaagua acguuguagu aaaauucguu cucucggcgu uuggucagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 76
<211> 70
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 76
gggagacgau gcggaaguaa cguuguagua aaauucguuc ucucggcauu uggccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 77
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 77
gggaggacga ugcggaagua acguugaagu aaaauucguu cucucugcgu uuggucagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 78
<211> 70
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 78
gggaggacga ugcggaagua acguugaagu aaaauucguu cuccugguau uggccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 79
<211> 71
<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 79
gggaggacga ugcggaagua acguugaagu aaaauucguu cucucggcau uuggccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 80
<211> 70
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 80
gggaggacga ugcggaagua acguuguagu aaaauucguu cucuuggcau uugccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 81
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 81

gggaggacga ugcggaagua acguuaaagu aaaauucguu cucucggcgu uuggccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 82
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 82
gggaggacga ugcggaagua acguugaagu aaaauucguu cucucggcgu uuggccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 83
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 83
gggaggacga ugcggaagua acguuguagu aaaauucguu cucucgguau uuggccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 84
<211> 70
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 84
gggaggacga ugcggaagua acguuguagu aaaauucguu cucuuggucu uggccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 85
<211> 70
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 85
ggaggacgau gcgaaguaac guuguaguaa aauucguucu cucgggcauu uggcagacga 60
cuucgcccga 70

<210> 86
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(71)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 86
gggaggacga ugcggcguug uuuagucgua uguauauacu aaguccgcuu gucccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 87
<211> 70
<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 87
gggaggacga ugcgguucag gagguuauua cagagucugu auagcuguac uccccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 88
<211> 70
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(70)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 88
gggaggacga ugcgguucag gaggguauua cagagucugu auagcuguac uccccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 89
<211> 57
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(57)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 89

gguucaggag guuauuacag agucuguaua gcuguacucc ccagacgacu cgcccga 57

<210> 90
<211> 56
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(56)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 90
gggaggacga ugcgguucag gagguuauua cagagucugu auagcuguac ucccca 56

<210> 91
<211> 43
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(43)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 91
gguucaggag guuauuacag agucuguaua gcuguacucc cca 43

<210> 92
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(36)

<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 92
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucccc 36

<210> 93
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 93
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 94
<211> 30
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(30)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 94
ggagguuauu acagagucug uauagcugua 30

<210> 95
<211> 26
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(26)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 95
ggagguuauu acagagucug uauagc 26

<210> 96
<211> 30
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(30)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 96
ggagguuauu acagagucug uauagccucc 30

<210> 97
<211> 30
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(30)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 97
ggagguuauu agagucuaua gcuguacucc 30

<210> 98
<211> 26
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(26)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 98
ggagguuauu agagucuaua gccucc 26

<210> 99
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(33)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 99
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cuc 33

<210> 100
<211> 32
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(32)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 100
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cu 32

<210> 101
<211> 31
<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(31)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 101
ggagguuauu acagagucug uauagcugua c 31

<210> 102
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(33)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 102
ggagguuauu acagagucug uauagcguac ucc 33

<210> 103
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(33)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 103
ggagguuauu acagagucug uauagcuguc ucc 33

<210> 104
<211> 32
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(32)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 104
ggagguuauu acagagucug uauagcuacu cc 32

<210> 105
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(33)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 105
ggagguuaua cagagucugu auagcuguac ucc 33

<210> 106
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(33)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 106
ggagguuauu acagaucugu auagcuguac ucc 33

<210> 107
<211> 32
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(32)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 107
ggagguuauu acaaguugua uagcuguacu cc 32

<210> 108
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(33)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 108
ggagguuauu acagaguugu auagcuguac ucc 33

<210> 109
<211> 32
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base

<222> (1)..(32)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 109
gggguuauua cagagucugu auagcuguac cc 32

<210> 110
<211> 32
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(32)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 110
ggagguuauu acgagucugu auagcguacu cc 32

<210> 111
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(33)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 111
ggagauauua cagagucugu auagcuguac ucc 33

<210> 112
<211> 30
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(30)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 112
gggguuauuc agagucugua uagcugaccc 30

<210> 113
<211> 30
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(30)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 113
gggguuauua agagucugua uagcuuaccc 30

<210> 114
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(36)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 114
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucccc 36

<210> 115
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 115
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 116
<211> 37
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(37)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 116
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucccca 37

<210> 117
<211> 30
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(30)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 117
ggagguuauu acagagucug uauagcugua 30

<210> 118
<211> 33

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(33)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 118
gagguuauua cagagucugu auagcuguac ucc 33

<210> 119
<211> 32
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(32)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 119
agguuauuac agagucugua uagcuguacu cc 32

<210> 120
<211> 31
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(31)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 120
gguuauuaca gagucuguau agcuguacuc c 31

<210> 121
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 121
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 122
<211> 60
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 122
Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys
50 55 60

<210> 123
<211> 60
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Sequence

<400> 123
Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg
50 55 60

<210> 124
<211> 60
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 124
Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr
50 55 60

<210> 125
<211> 52
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 125
Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro
1 5 10 15

Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val
20 25 30

Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser
35 40 45

Cys Lys Cys Ser
50

<210> 126
<211> 52
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 126
Val Leu Ser Leu Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro
1 5 10 15

Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile
20 25 30

Gly Lys Thr Pro Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser
35 40 45

Cys Lys Cys Ser
50

<210> 127
<211> 52
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 127
Val Leu Gly Leu Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro

```
  1               5                  10                  15

Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val
             20                  25                  30

Gly Arg Thr Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser
         35                  40                  45

Cys Lys Cys Ser
     50


<210> 128
<211> 58
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:  Synthetic
      Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(58)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 128
ggaaguaacg uuguaguaaa auucguucuc ucggcauuug gccagacgac ucgcccga   58

<210> 129
<211> 57
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:  Synthetic
      Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(57)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 129
gggaggacga ugcggaagua acguuguagu aaaauucguu cucucggcau uuggcca    57

<210> 130
<211> 44
```

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(44)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 130
ggaaguaacg uuguaguaaa auucguucuc ucggcauuug gcca 44

<210> 131
<211> 38
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(38)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 131
gggaggaugc ggaaguaacg uuguaguaaa auuccuuc 38

<210> 132
<211> 35
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 132
gggaggaugc ggaaguaacg uuguaguaaa auucc 35

<210> 133
<211> 32
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(32)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 133
gggaggaugc ggaaguaacg uuguaguaaa au 32

<210> 134
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(33)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 134
gggaggaugc ggaaguaacg uuguaguucc uuc 33

<210> 135
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(27)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 135
gggaggaugc ggaaguaacg uuguagu 27

<210> 136
<211> 20
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 136
gggaggagua acguuguagu 20

<210> 137
<211> 58
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(58)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 137
ggcguuguuu agucguaugu auauacuaag uccgcuuguc cccagacgac ucgcccga 58

<210> 138
<211> 57
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>

<221> modified_base
<222> (1)..(57)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 138
gggaggacga ugcggcguug uuuagucgua uguauauacu aaguccgcuu gucccca 57

<210> 139
<211> 44
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(44)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 139
ggcguuguuu agucguaugu auauacuaag uccgcuuguc ccca 44

<210> 140
<211> 44
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(44)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 140
ggggagcggc guuguuuagu cguauguaua uacuaagucc gcuu 44

<210> 141
<211> 29
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(29)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 141
ggggagcggc guuguugaaa aguccgcuu 29

<210> 142
<211> 38
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(38)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 142
ggggagcggc guuguuucgu auguauauaa guccgcuu 38

<210> 143
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(33)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 143
ggggagcggc guuguuuaug uauaaguccg cuu 33

<210> 144
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 144
ggggagcggc guuguuuagu cguauguaua uacuaagucc gc 42

<210> 145
<211> 38
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(38)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 145
ggggagcggc guuguuuagu cguauguaua uacuaagu 38

<210> 146
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 146
gggaggacga ugcgggguga uuauuacaga guauguauag cuguaccccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 147
<211> 64
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(64)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 147
gggaggacga ugcggaggcg uuauuagaga gucuguauag cucuagcccc agacgacucg 60
ccga 64

<210> 148
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 148
gggaggacga ugcggggagg guauuacaga guauguauag cuguacuccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 149
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)

<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 149
gggaggacga ugcggggagg uuauuauaga gucuguauag cuauaccccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 150
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 150
gggaggacga ugcgggaggg uuauuauaga gucugcauag cuauaccccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 151
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 151
gggaggacga ugcggugaga guauuacgga guauguauag ccguaccccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 152
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 152
gggaggacga ugcgggggca uuauuucaga gucuguauag cuguagcccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 153
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 153
gggaggacga ugcgggcgga uuaucacaga guauguauag cugugccgcc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 154
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 154
gggaggacga ugcgguguga auauuagaga gucuguauag cucuaccccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 155
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 155
gggaggacga ugcggcggga uuauuacuga gucuguauag caguaccccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 156
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 156
gggaggacga ugcgggugga auauuacgga gucuguauag ccguacuccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 157
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)

<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 157
gggaggacga ugcgggggga cuauuaguga gucuguauag cacuaccccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 158
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 158
gggaggacga ugcgggugga uuauuacagc gucuguauau cuguaccccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 159
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 159
gggaggacga ugcgggcagg uuauuacaga gucuguauag cuguacugcc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 160
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 160
gggaggacga ugcgggguag auaucacuga gucuguauag caguguccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 161
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 161
gggaggacga ugcggaggga uuauuacaga gucuguauag cuguaccccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 162
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 162
gggaggacga ugcgggugga uuauuacaga gucuguauag cuguaccccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 163
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 163
gggaggacga ugcgggggcg uuauuacaga gucuguauag cuguagcccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 164
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 164
gggaggacga ugcggggugg uuauuacaca guauguauag guguaccccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 165
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)

<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 165
gggaggacga ugcggaggga auauuacaga guauguauag cuguaccccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 166
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 166
gggaggacga ugcggggagu uuauuacagc gucuguauau cuguagcccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 167
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 167
gggaggacga ugcggugagg uuauuacaga gucuguauag cuguacuccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 168
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 168
gggaggacga ugcggggugg uuauuagaga gucuguauag cucuacgccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 169
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 169
gggaggacga ugcgggggga guauuaaaga gucuguauag cuuuaccccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 170
<211> 65
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> All pyrimidines are 2'F.

<400> 170
gggaggacga ugcggggagg auauuauaga gucuguauag cuauaccccc agacgacucg 60
cccga 65

<210> 171
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions 1-5, 8, 11, 13-16, 20, 22, 24-25, 28 and 30 are 2'-OCH3; linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 171
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 172
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions 11, 13-16, 20, 22, 24-25, 28 and 30 are 2'OCH3; linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 172
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 173
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>

<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions
1-4 are 2'OCH3; linkage at positions 34 and 35 is
3'-3'.

<400> 173
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 174
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions
5, 8, and 11 are 2'OCH3; linkage at positions 34
and 35 is 3'-3'.

<400> 174
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 175
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a' and g's at positions
13-16 are 2'-OCH3; linkage at positions 34 and 35
is 3'-3'.

<400> 175
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 176

<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions 20, 22 and 24 are 2'-OCH3; linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 176
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 177
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions 25, 28 and 30 are 2'-OCH3; linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 177
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 178
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base

<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; g at position 20 is
2'-OCH3; linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 178
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 179
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a at position 22 is
2'-OCH3; linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 179
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 180
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a at position 24 is
2'-OCH3; linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 180
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 181
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions 1-5, 8, 11, 25 and 30 are 2'-OCH3; linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 181
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 182
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions 1-5, 8, 11, 13-16, 24-25, 28 and 30 are 2'-OCH3; linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 182
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 183
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions 1-5, 8, 11, 13-16, 20, 24-25, 28 and 30 are 2'-OCH3; linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 183
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 184
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions 1-5, 8, 11, 13-16, 25, 28 and 30 are 2'-OCH3; linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 184
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 185
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions 1-5, 11, 13-16, 25, 28, and 30 are 2'-OCH3; linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 185
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 186
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions 1-4, 13-16, 25, 28 and 30 are 2'-OCH3; linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 186
ggagguuauu acagagucug uauagcugua cucc 34

<210> 187
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(33)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions 1-5, 10, 12-15 24, 27 and 29 are 2'-OCH3; linkage at positions 33 and 34 is 3'-3'.

<400> 187
ggagauauua cagagucugu auagcuguac ucc 33

<210> 188
<211> 32
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(32)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions 1-4, 10, 12-15, 24, 27 and 29 are 2'-OCH3; linkage at positions 32 and 33 is 3'-3'.

<400> 188
gggguuauua cagagucugu auagcuguac cc 32

<210> 189
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 189
ugugaauauu agagagucug uauagcucua cccc 34

<210> 190
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions 2, 4-5, 8, 11, 13-16, 24-25 and 30 are 2'-OCH3; linkage at positons 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 190
ugugaauauu agagagucug uauagcucua cccc 34

<210> 191
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions
2, 4-6, 8, 11-16, 20, 24-25, and 30 are 2'-OCH3;
linkage at positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 191
ugugaauauu agagagucug uauagcucua cccc 34

<210> 192
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions
2, 4, 11, 13-16, 25 and 30 are 2'-OCH3; linkage at
positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 192
ugugaauauu agagagucug uauagcucua cccc 34

<210> 193
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> All pyrimidines are 2'F; a's and g's at positions
2, 4-6, 11-16, 25 and 30 are 2'-OCH3; linkage at
positions 34 and 35 is 3'-3'.

<400> 193
ugugaauauu agagagucug uauagcucua cccc 34

<210> 194
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 1-3 and 5 are 2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 194
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 195
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 12 and 16-18 are 2'OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 195
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 196
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 21, 23-24 and 28 are 2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Sequence

<400> 196
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 197
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 30-31, 38 and 42 are 2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 197
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 198
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 1, 21, 23-24 and 28 are 2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 198
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 199
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base

<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 2, 21, 23-24 and 28 are
2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 199
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 200
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 3, 21, 23-24 and 28 are
2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 200
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 201
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 5, 21, 23-24 and 28 are
2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 201
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 202

<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 12, 21, 23-24 and 28 are
2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 202
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 203
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 16, 21, 23-24 and 28 are
2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 203
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 204
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 17, 21, 23-24 and 28 are
2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Sequence

<400> 204
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 205
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 18, 21, 23-24, and 28 are 2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 205
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 206
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 21, 23-24, 28 and 30 are 2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 206
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 207
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base

<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 21, 23-24, 28 and 31 are
2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 207
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 208
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 21, 23-24, 28 and 38 are
2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 208
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 209
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 21, 23-24, 28 and 42 are
2'-OMe.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 209
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 210

<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 1-3, 16-18, 21, 23-24, 28, 30-31 and 42 are 2'-OMe; linkage at positions 42 and 43 is 3'-3'.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 210
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 211
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> A's and g's at positions 1-3, 16-18, 21, 23-24, 28, 30 and 42 are 2'-OMe; linkage at positions 42 and 43 is 3'-3'.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 211
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

<210> 212
<211> 41
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(41)
<223> A's and g's at positions 1-3, 16-18, 21, 23-24, 28 and 30-31 are 2'-OMe; linkage at positions 41 and 42 are 3'-3'.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 212
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc c 41

<210> 213
<211> 37
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(37)
<223> A's and g's at positions 1-3, 16-18, 21, 23, 25-26 and 37 are 2'-OMe; linkage at positions 37 and 38 is 3'-3'.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 213
gggugccuuu ugccuagguu guguaaccuu cugccca 37

<210> 214
<211> 35
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> A's and g's at positions 1-3, 16-18, 21, 23-24 and 35 are 2'-OMe; linkage at positions 35 and 36 is 3'-3'.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Sequence

<400> 214
gggugccuuu ugccuagguu guaaccuucu gccca 35

<210> 215
<211> 33

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(33)
<223> A's and g's at positions 1-3, 16-18, 21-22, and 33
are 2'-OMe; linkage at positions 33 and 34 is
3'~3'.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 215
gggugccuuu ugccuagguu aaccuucugc cca 33

<210> 216
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 216
gggugccuuu ugccuagguu gugauuugua accuucugcc ca 42

【図面の簡単な説明】

【図１】　図１は、ＴＧＦβ２についてなされる様々なＳＥＬＥＸ実験を要約するフローチャートである。矢印の長さは左に示されるラウンド回数に対応する。連結された矢印は、ＳＥＬＥＸ実験における分枝を示し、ここでは新たな分枝を開始するのにプールを使用した。それぞれの矢印の下に、アフィニティーの改善倍率も示す。

【図２】　図２は、ＢＩＡｃｏｒｅカルボキシメチルセルロース（ＣＭ５）チップ上でアミンカップリングした後のＴＧＦβ２の活性を示す。実施例１に記載されるようにＮＨＳ－ＥＤＣカップリングを使用して、フローセル（ＦＣ）１、２及び３について、それぞれ約１８、７１８及び１６９２反応ユニットで、ＣＭ５チップにＴＧＦβ２を負荷した。ＦＣ－４は対照としてブランクのままにし、他のＦＣからのシグナルを正規化するのに使用した。次いでこのチップを、１０ｎＭの潜伏関連ペプチド（ＬＡＰ）（図２Ａ）又はＴＧＦβ可溶性受容体ＩＩ

Ｉ（ｓＲＩＩＩ）（図２Ｂ）のいずれかへ、結合緩衝液２０μＬ／分で曝露した。図示されるように、会合相及び解離相についてのデータを収集した。ＦＣ－４由来のシグナルを他のＦＣから差引いた。

【図３】　図３は、ｓｐｒ　ＳＥＬＥＸの間のアフィニティー改善を示す。実施例１に記載されるようにＮＨＳ－ＥＤＣカップリングを使用して、フローセル（ＦＣ）１、２及び３について、それぞれ約１８、７１８及び１６９２反応ユニットで、ＣＭ５チップにＴＧＦβ２を負荷した。ＦＣ－４は対照としてブランクのままにし、他のＦＣからのシグナルを正規化するのに使用した。次いでこのチップを、図示されるようにＳＥＬＥＸラウンド（Ｒｄ）由来の１μＭのＲＮＡプールへ、結合緩衝液２０μＬ／分で曝露した。図示されるように、会合相及び解離相についてのデータを収集した。ＦＣ－４由来のシグナルを他のＦＣから差引いた。

【図４】　図４は、ｓｐｒ　ＳＥＬＥＸ由来のプールを用いたニトロセルロースフィルター結合曲線を示す。図示されるように、各ラウンド（Ｒ）由来の高比活性の内部標識ＲＮＡを使用した。標識ＲＮＡを、約１００,０００倍モル過剰の非標識ｔＲＮＡの存在下で、様々な濃度のＴＧＦβ２とともにインキュベートした。結合したＲＮＡをニトロセルロース濾過により分配し、定量した。実施例１に記載のようにデータを分析した。

【図５】　図５は、様々なプールを用いたニトロセルロースフィルター結合曲線を示す。図示されるように、各ラウンド（Ｒ）由来の高比活性の内部標識ＲＮＡを使用した。標識ＲＮＡを、様々な濃度のＴＧＦβ２とともに（競合剤のｔＲＮＡは使用しない）インキュベートした。結合したＲＮＡをニトロセルロース濾過により分配し、定量した。実施例１に記載のようにデータを分析した。

【図６】　図６は、リードＴＧＦβ１アプタマー及びＴＧＦβ２アプタマーの生物活性の特異性と市販の抗体調製物との比較を示す。ＲＮＡはホスホロアミダイト化学（ＮＸ２２２８３）（配列番号１１４）によるか又はインビトロ転写のいずれかにより合成した。指示細胞（ミンク肺上皮細胞）を、ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２又はＴＧＦβ３のいずれかとＲＮＡ又は抗体の希釈液とともに、記載のようにインキュベートした。細胞増殖の程度を^{3}Ｈ－チミジン取込みにより測定

し、記載のようにデータを分析した。点はｎ＝２～６の平均を表し、誤差の棒線は標準誤差である。ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２又はＴＧＦβ３により示される記号は、それぞれＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２又はＴＧＦβ３のいずれかで処理した細胞から得られるデータを示す。ＭＡＢとｐＡＢは、それぞれモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を示す。ランダム、ＮＸ２２２８３、及び４０－０３は、それぞれ、ランダムＲＮＡ、ＴＧＦβ２、又はＴＧＦβ１のリードアプタマーを示す。アプタマー４０－０３は、「高アフィニティーＴＧＦβ核酸リガンド及び阻害剤」と題する米国特許出願第０９／０４６,２４７号（１９９８年3月２３日出願）に記載された。

【図７】　図７は、ＴＧＦβ２リガンド１４－１（配列番号７２）、２１－２１（配列番号８７）、及び２１－４（配列番号８６）の境界部分を示す。ＲＮＡアプタマーは、５’末端（３’Ｂ）又は３’末端（５’Ｂ）で末端標識し、高ｐＨで部分的に加水分解し、実施例１に記載のようにニトロセルロース濾過によりＴＧＦβ２に対する結合について分配した。結合分配に用いたＴＧＦβ２の量は示される通りである。回収したＲＮＡを高解像配列決定ゲル上で分析し、オートラジオグラフィーにより可視化した。非選択的に加水分解されたＲＮＡをマーカー（Ａｌｋ．ｈｙｄｒ．）として使用し、バンド形成パターンを各リガンドの配列へ並置した。観察された境界のバンドを（*）で示し、配列パターン内におけるそれらの位置を矢印で示す。「タンパク質なし」と「インプット」のレーンは、ニトロセルロースと最初の非加水分解ＲＮＡに対するバックグラウンドの結合を示す。各リガンドについて観察された境界を図の下に要約する。

【図８】　図８は、ＴＧＦβ２アプタマーの推定構造を示す。必要とされる最小の配列は類似の構造を示した。リガンド１４ｉ－１ｔ５－４１（配列番号１３１）及び２１ａ－４（ＭＬ－１１０）（配列番号１４４）はインビトロ転写され、効率的なインビトロ転写を可能にする過剰な塩基をその５’末端（小文字で示す）に含有した。太字は、２１－２１配列（配列番号９３）を用いた偏向ＳＥＬＥＸの不変位置と同一な位置を示す。

【図９】　図９は、ＮＸ２２３２３　４０ｋ　ＰＥＧ（配列番号１１５）の分子構造を示す。ｒＧ＝２’ＯＨ　Ｇ；ｒＡ＝２’－ＯＨ　Ａ；ｆＵ＝２’ＦＵ；ｆ

Ｃ＝２’ＦＣ。

【図１０】　図１０は、リード短鎖型リガンドのＣＤ７０（配列番号２１６）の推定構造を示す。小文字は２’ＯＨを必要とする位置を示し、●はＧＵ塩基対合を示す。

【図１１】　図１１は、スプレーグドーリーラットにおけるＴＧＦβアプタマー（用量１ｍｇ／ｋｇ）の薬物動態を示す。

【図１２】　図１２は、ＴＧＦβ１とＴＧＦβ１アプタマーのＭ２２（配列番号２１５）を用いてＭＬＥＣについて実施した３種の個別ＰＡＩ－ルシフェラーゼアッセイの結果を示す。陰性対照は関連のないアプタマーである。ＴＧＦβ濃度は１６時間２０ｐＭで一定に保った。

【図１３】　図１３は、ＴＧＦβ２とＴＧＦβ２アプタマーのＮＸ２２４２１（配列番号１８６）を用いてＭＬＥＣについて実施した３種の個別ＰＡＩ－ルシフェラーゼアッセイの結果を示す。陰性対照は関連のないアプタマーである。ＴＧＦβ濃度は１６時間１０ｐＭで一定に保った。

【図１】

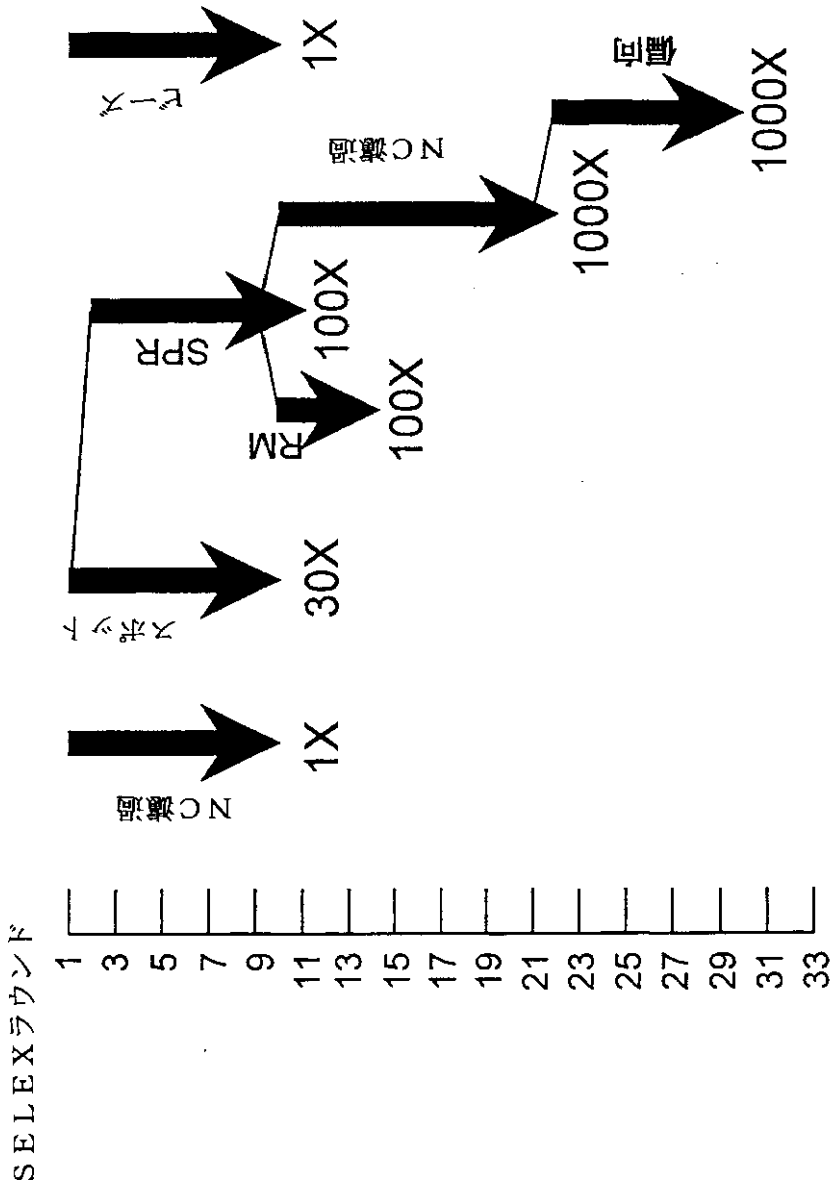

SELEXラウンド
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31
33
NC濾過
1X
スポット
30X
SPR
100X
RM
100X
NC濾過
1000X
偏向
1000X
ビーズ
1X

図１

【図２】

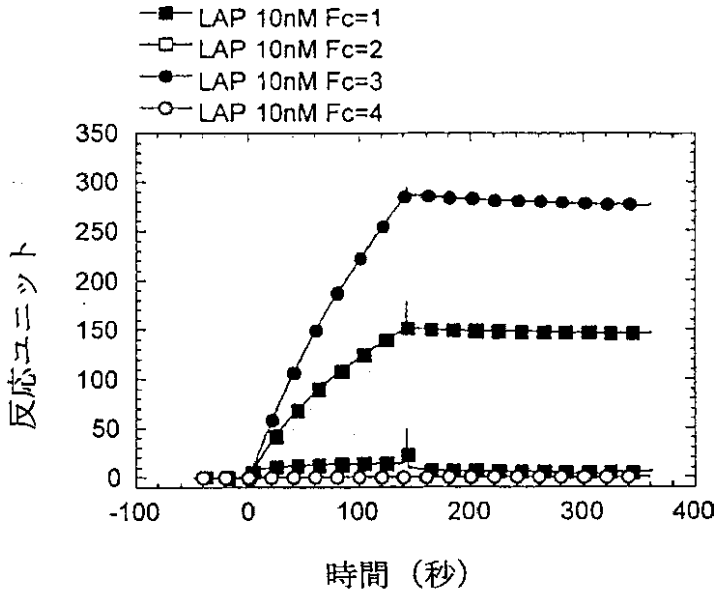

LAP 10nM Fc=1
LAP 10nM Fc=2
LAP 10nM Fc=3
LAP 10nM Fc=4
反応ユニット
350
300
250
200
150
100
50
0
-100
0
100
200
300
400
時間（秒）

図２Ａ

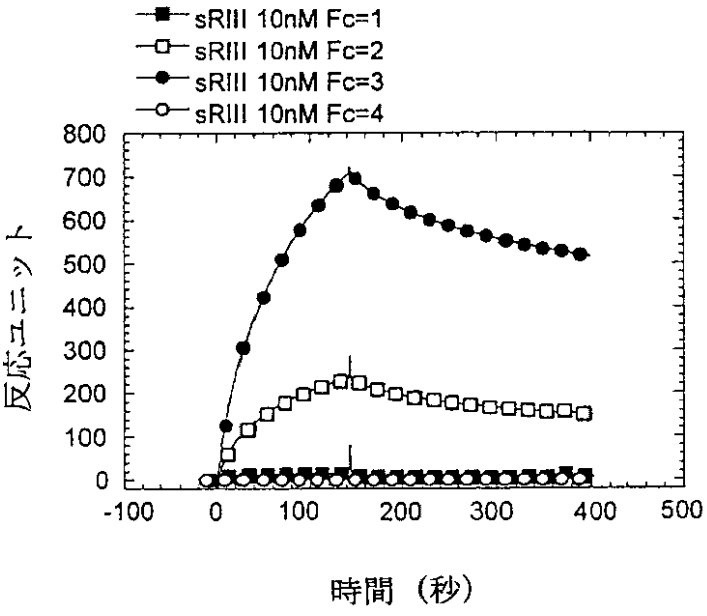
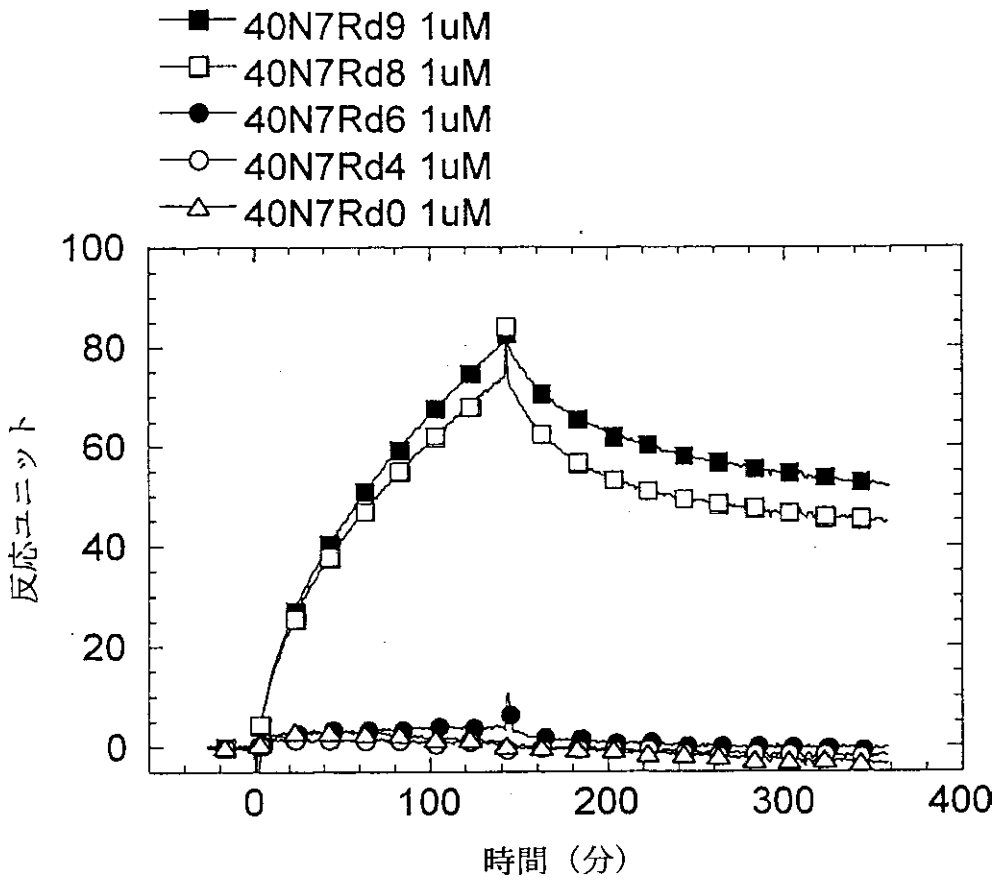
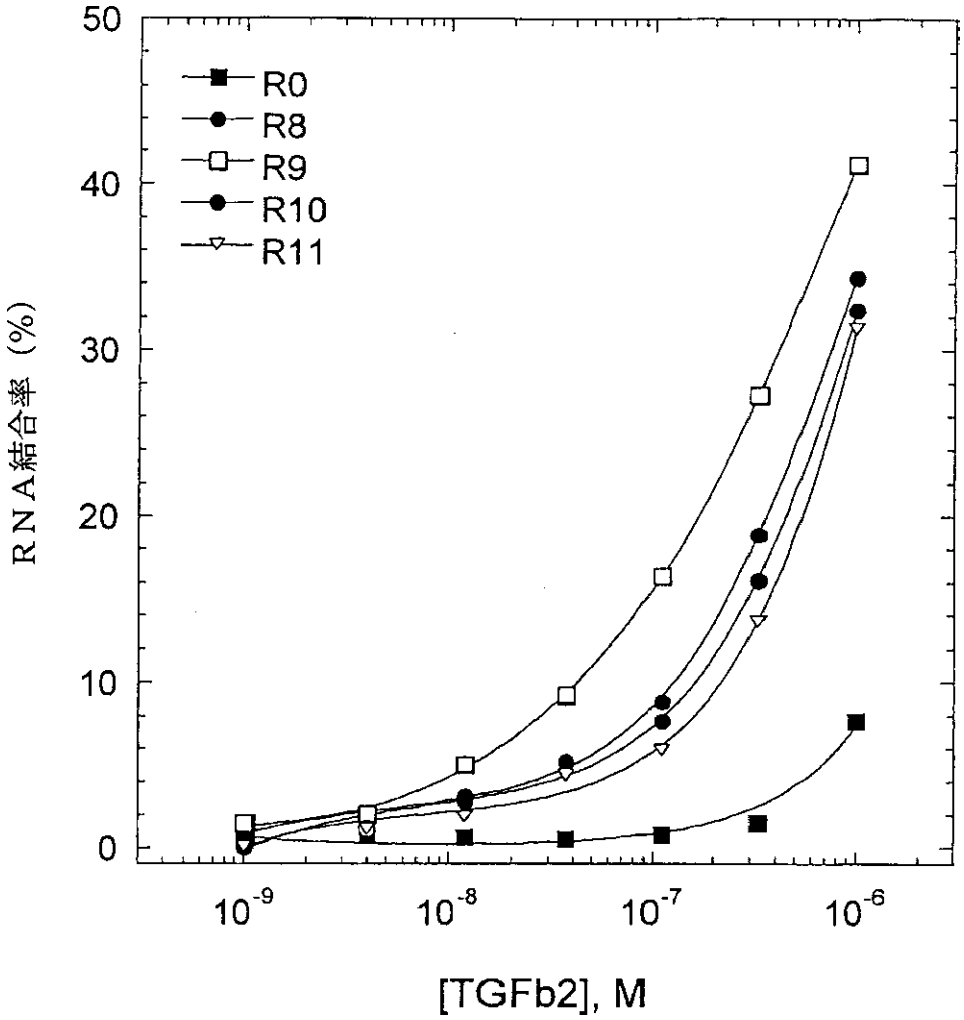

sRIII 10nM Fc=1
sRIII 10nM Fc=2
sRIII 10nM Fc=3
sRIII 10nM Fc=4
反応ユニット
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
0
100
200
300
400
500
時間（秒）

図２Ｂ

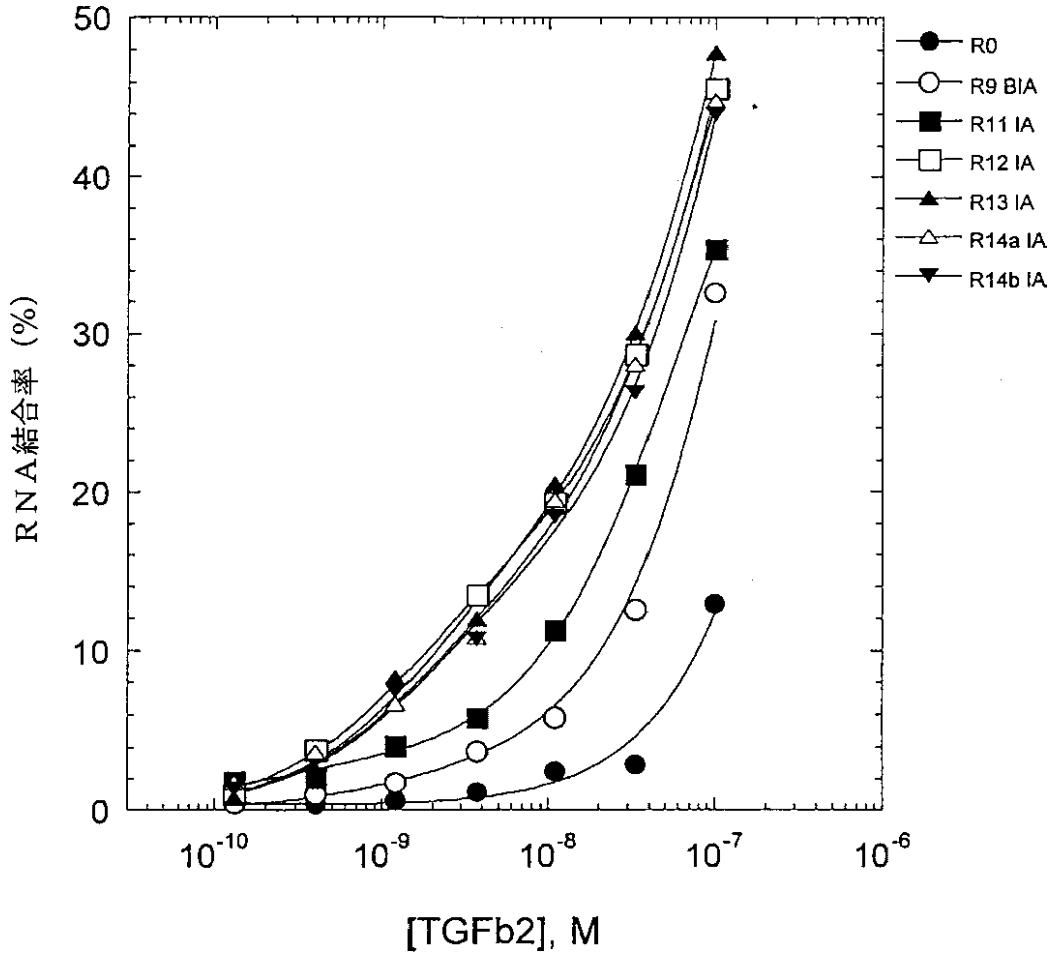
【図３】


40N7Rd9 1uM
40N7Rd8 1uM
40N7Rd6 1uM
40N7Rd4 1uM
40N7Rd0 1uM
100
80
60
40
20
0
反応ユニット
0
100
200
300
400
時間（分）

【図４】



【図５】


50
40
30
20
10
0
RNA結合率（%）
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[TGFb2], M
R0
R9 BIA
R11 IA
R12 IA
R13 IA
R14a IA
R14b IA

【図６】

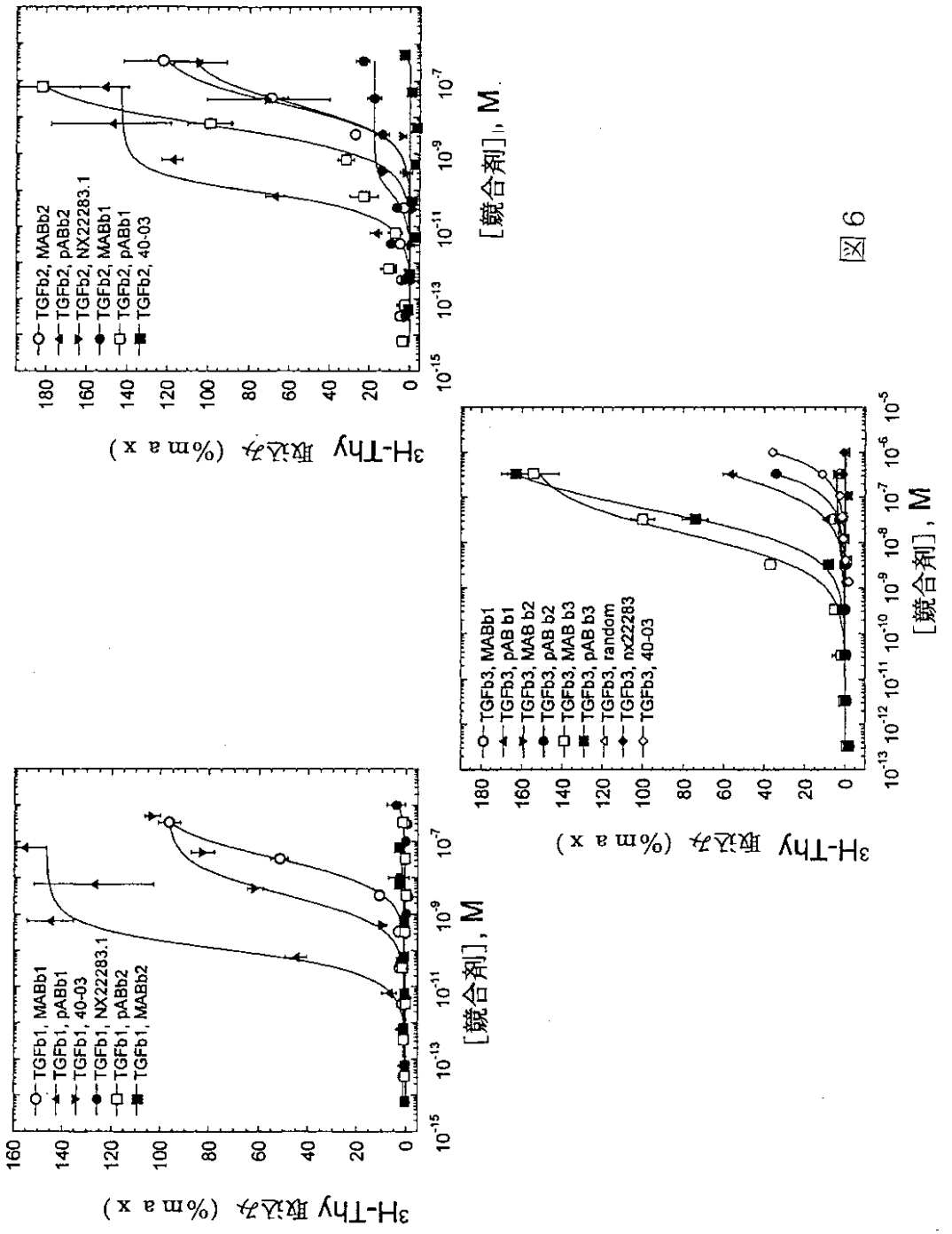
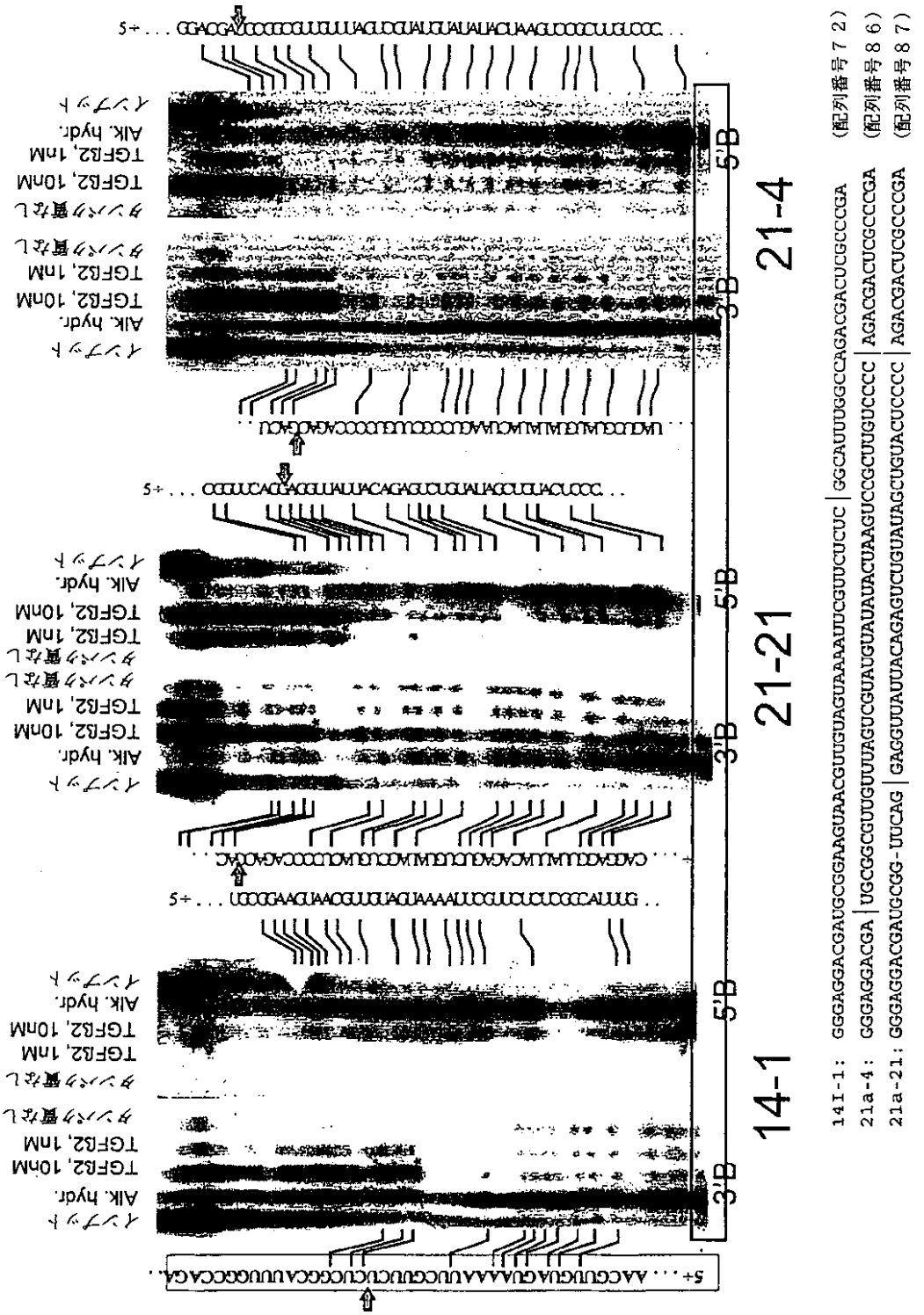

TGFb1, MABb1
TGFb1, pABb1
TGFb1, 40-03
TGFb1, NX22283.1
TGFb1, pABb2
TGFb1, MABb2
3H-Thy 取込み (%max)
[競合剤], M
TGFb2, MABb2
TGFb2, pABb2
TGFb2, NX22283.1
TGFb2, MABb1
TGFb2, pABb1
TGFb2, 40-03
3H-Thy 取込み (%max)
[競合剤], M
TGFb3, MABb1
TGFb3, pAB b1
TGFb3, MAB b2
TGFb3, pAB b2
TGFb3, MAB b3
TGFb3, pAB b3
TGFb3, random
TGFb3, nx22283
TGFb3, 40-03
3H-Thy 取込み (%max)
[競合剤], M

図６

【図７】



14I-1: GGGAGGACGAUGCGGPAAGUAAACGUUGUAGUAAAAUUCGUUCUCUUC | GGCAUUUGGCCAGACGACUCGCCCGA (配列番号７２)

21a-4: GGGAGGACGA | UGCGGCGUUGUUUAGUCGUAUGUAUAUACUAAGUCCGCUUGUCCCC | AGACGACUCGCCCGA (配列番号８６)

21a-21: GGGAGGACGAUGCGG-UUCAG | GAGGUUAUUACAGAGUCUGUAUAGCUGUACUCCCC | AGACGACUCGCCCGA (配列番号８７)

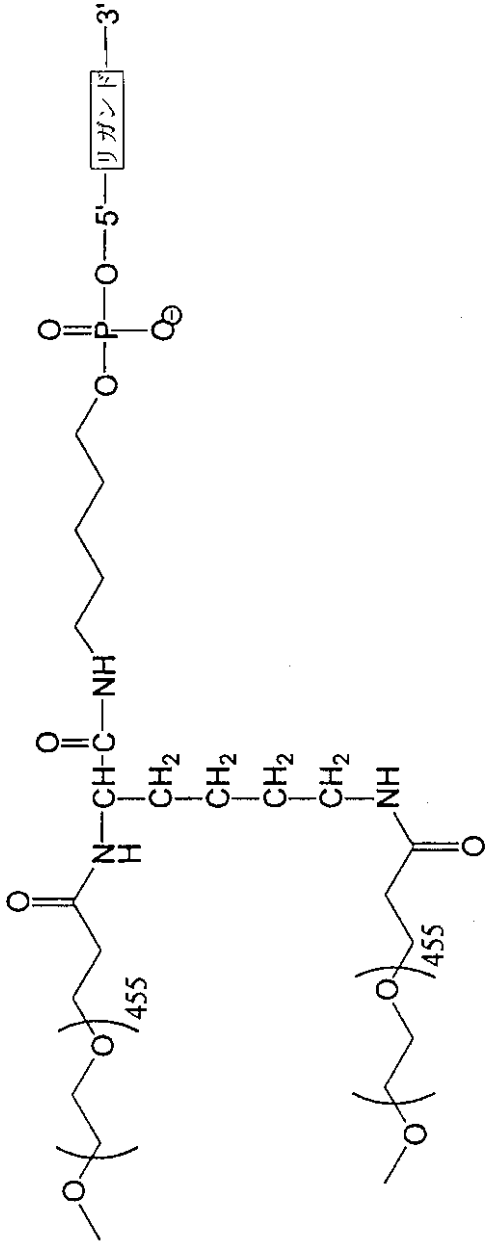
図７

【図８】

14i-1t5-41
配列番号１３１
21a-4(ML-110)
配列番号１４４
21a-21 (ML-95) 又は
NX22284
配列番号９３

図８

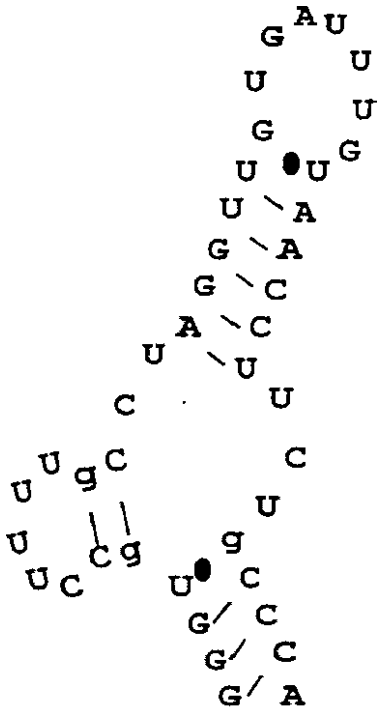
【図９】



TGFβ2 リガンド＝
rGrGrArGrGfUfUrAfUfUrAfCrArGrArGfUfCfUrGfUfUrArGfCfUrGfUrAfCfUfCfC-3'-3'-dT
配列番号１１５

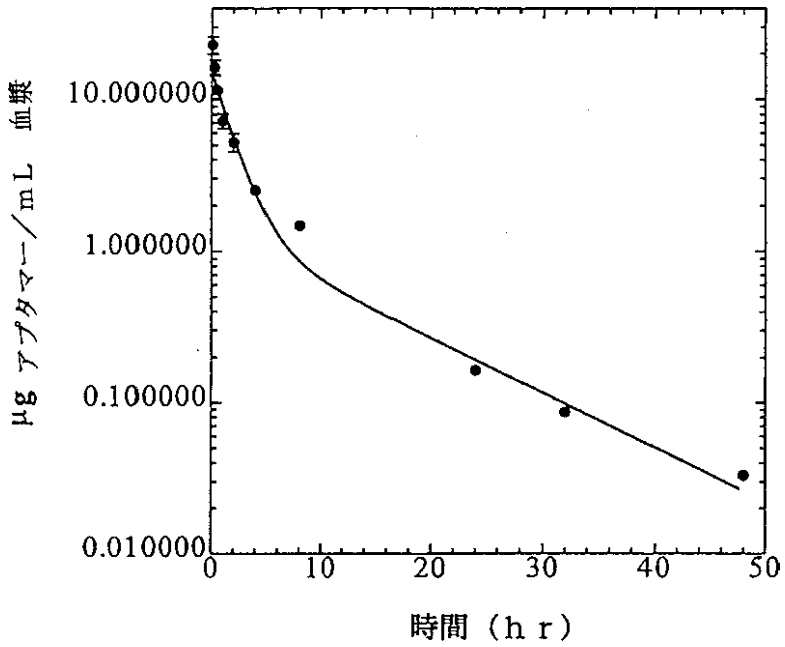
図９

【図１０】

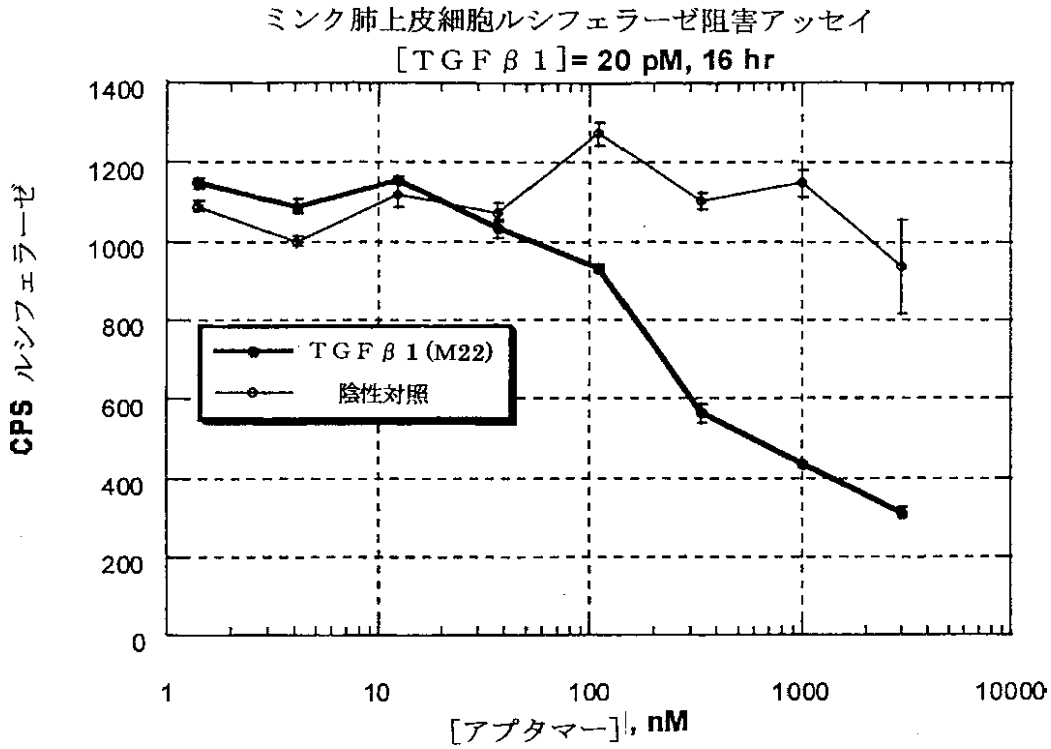


配列番号２１６

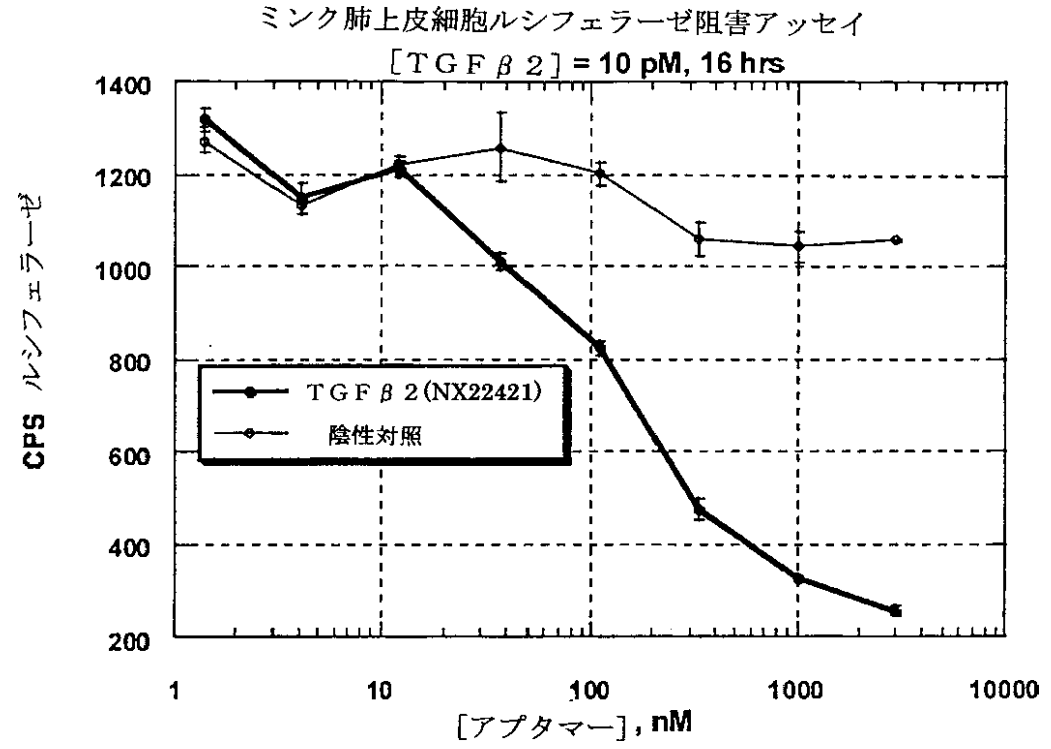
【図１１】



【図１２】


ミンク肺上皮細胞ルシフェラーゼ阻害アッセイ
[ＴＧＦβ１]= 20 pM, 16 hr
CPS ルシフェラーゼ
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
1
10
100
1000
10000
[アプタマー], nM
ＴＧＦβ１(M22)
陰性対照

【図１３】


ミンク肺上皮細胞ルシフェラーゼ阻害アッセイ
[ＴＧＦβ２] = 10 pM, 16 hrs
CPS ルシフェラーゼ
1400
1200
1000
800
600
400
200
1
10
100
1000
10000
[アプタマー], nM
ＴＧＦβ２(NX22421)
陰性対照

【手続補正書】

【提出日】平成１４年3月２８日（２００２．３．２８）

【手続補正１】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項１】　精製及び単離された、ＴＧＦβ２に対する非天然のＲＮＡリガンドであって、表5、表7、表8、表１１、表１３、表１４、表１６～表１９及び図９（配列番号２１～１２１及び配列番号１２８～１９３）に示される配列からなる群から選択される、前記リガンド。

【請求項２】　ＴＧＦβ２核酸リガンドと、非免疫原性の高分子量化合物又は親油性化合物から構成される複合体。

【請求項３】　前記リガンドと前記非免疫原性の高分子量化合物又は親油性化合物との間にリンカーをさらに含んでなる、請求項２に記載の複合体。

【請求項４】　前記非免疫原性の高分子量化合物がポリアルキレングリコールである、請求項２に記載の複合体。

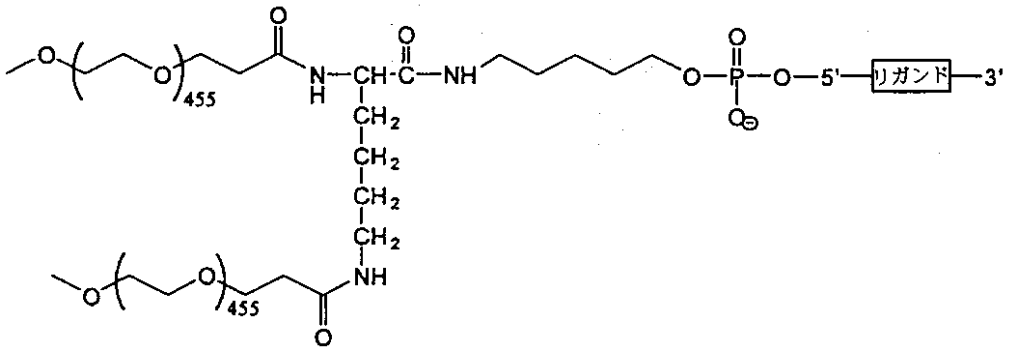
【請求項５】　前記ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコール（ＰＥＧ）である、請求項４に記載の複合体。

【請求項６】　前記ＰＥＧが約１０～８０ｋの分子量を有する、請求項５に記載の複合体。

【請求項７】　前記ＰＥＧが約２０～４５ｋの分子量を有する、請求項６に記載の複合体。

【請求項８】　前記複合体が

【化１】



リガンド＝
rGrGrArGrGfUfUrAfUfUrAfCrArGrArGfUfCfUrGfUfUrArGfCfUrGfUrAfCfUfCfC-3'-3'-dT

（配列番号１１５）であって、ｒGが２’ＯＨ Ｇであり、ｒＡが２’ＯＨ Ａであり、ｆＵが２’Ｆ Ｕであり、及びｆＣが２’Ｆ Ｃである、請求項７に記載の複合体。

【請求項９】　ＴＧＦβ２核酸リガンドと、非免疫原性の高分子量化合物又は親油性化合物から構成される複合体であって、前記リガンドが表５、表７、表８、表１１、表１３、表１４、表１６～表１９及び図９（配列番号２１～１２１及び配列番号１２８～１９３）に示される配列からなる群から選択される、前記複合体。

【請求項１０】　前記リガンドと前記非免疫原性の高分子量化合物又は親油性化合物との間にリンカーをさらに含んでなる、請求項９に記載の複合体。

【請求項１１】　前記非免疫原性の高分子量化合物がポリアルキレングリコールである、請求項９に記載の複合体。

【請求項１２】　前記ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコール（ＰＥＧ）である、請求項１１に記載の複合体。

【請求項１３】　前記ＰＥＧが約１０～８０ｋの分子量を有する、請求項１２に記載の複合体。

【請求項１４】　前記ＰＥＧが約２０～４５ｋの分子量を有する、請求項１３に記載の複合体。

【請求項１５】　精製及び単離された、トランスフォーミング増殖因子β１（ＴＧＦβ１）に対する非天然のＲＮＡリガンドであって、表２２（配列番号１

９４～２１５）に示される配列からなる群から選択される、前記リガンド。

【請求項１６】　ＴＧＦβ１核酸リガンドと、非免疫原性の高分子量化合物又は親油性化合物から構成される複合体であって、前記リガンドが請求項１５に示される配列からなる群から選択される、前記複合体。

【請求項１７】　前記リガンドと前記非免疫原性の高分子量化合物又は親油性化合物との間にリンカーをさらに含んでなる、請求項１６に記載の複合体。

【請求項１８】　前記非免疫原性の高分子量化合物がポリアルキレングリコールである、請求項１６に記載の複合体。

【請求項１９】　前記ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコール（ＰＥＧ）である、請求項１８に記載の複合体。

【請求項２０】　前記ＰＥＧが約１０～８０ｋの分子量を有する、請求項１９に記載の複合体。

【請求項２１】　前記ＰＥＧが約２０～４５ｋの分子量を有する、請求項１９に記載の複合体。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/20397

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) :C07H 21/02, 21/04
US CL :536/22.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 536/22.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST, DIALOG ONESEARCH; search terms: nucleic ligand, aptamer, TGFbeta2, polyethylene glycol, lipophilic, nonimmunogenic, polyalkylene glycol

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,731,424 A (TOOTHMAN et al.) 24 March 1998, claims 1-9; col. 5, line 66-col. 6, line 1.	2-7
Y	US 5,859,228 A (JANJIC et al.) 12 January 1999; see entire document.	2-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"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
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"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
"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)	"&"	document member of the same patent family
"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		

Date of the actual completion of the international search 26 OCTOBER 2000	Date of mailing of the international search report 24 NOV 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer STEPHANIE ZITOMER, PHD Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)★

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	FI		ﾃｰﾏｺｰﾄﾞ(参考)
Ａ６１Ｐ	35/00	Ａ６１Ｐ	37/02	
	35/04		43/00	１１１
	37/02	Ｃ１２Ｎ	15/00	ＺＮＡＡ
	43/00 １１１	Ａ６１Ｋ	37/02	

(81)指定国　ＥＰ(ＡＴ, ＢＥ, ＣＨ, ＣＹ, ＤＥ, ＤＫ, ＥＳ, ＦＩ, ＦＲ, ＧＢ, ＧＲ, ＩＥ, ＩＴ, ＬＵ, ＭＣ, ＮＬ, ＰＴ, ＳＥ), ＯＡ(ＢＦ, ＢＪ, ＣＦ, ＣＧ, ＣＩ, ＣＭ, ＧＡ, ＧＮ, ＧＷ, ＭＬ, ＭＲ, ＮＥ, ＳＮ, ＴＤ, ＴＧ), ＡＰ(ＧＨ, ＧＭ, ＫＥ, ＬＳ, ＭＷ, ＭＺ, ＳＤ, ＳＬ, ＳＺ, ＴＺ, ＵＧ, ＺＷ), ＥＡ(ＡＭ, ＡＺ, ＢＹ, ＫＧ, ＫＺ, ＭＤ, ＲＵ, ＴＪ, ＴＭ), ＡＥ, ＡＧ, ＡＬ, ＡＭ, ＡＴ, ＡＵ, ＡＺ, ＢＡ, ＢＢ, ＢＧ, ＢＲ, ＢＹ, ＢＺ, ＣＡ, ＣＨ, ＣＮ, ＣＲ, ＣＵ, ＣＺ, ＤＥ, ＤＫ, ＤＭ, ＤＺ, ＥＥ, ＥＳ, ＦＩ, ＧＢ, ＧＤ, ＧＥ, ＧＨ, ＧＭ, ＨＲ, ＨＵ, ＩＤ, ＩＬ, ＩＮ, ＩＳ, ＪＰ, ＫＥ, ＫＧ, ＫＰ, ＫＲ, ＫＺ, ＬＣ, ＬＫ, ＬＲ, ＬＳ, ＬＴ, ＬＵ, ＬＶ, ＭＡ, ＭＤ, ＭＧ, ＭＫ, ＭＮ, ＭＷ, ＭＸ, ＭＺ, ＮＯ, ＮＺ, ＰＬ, ＰＴ, ＲＯ, ＲＵ, ＳＤ, ＳＥ, ＳＧ, ＳＩ, ＳＫ, ＳＬ, ＴＪ, ＴＭ, ＴＲ, ＴＴ, ＴＺ, ＵＡ, ＵＧ, ＵＳ, ＵＺ, ＶＮ, ＹＵ, ＺＡ, ＺＷ

(72)発明者　ロチュリー, マイケル
アメリカ合衆国カリフォルニア州94541－3581, ヘイワード, クリークビュー・コート　3374

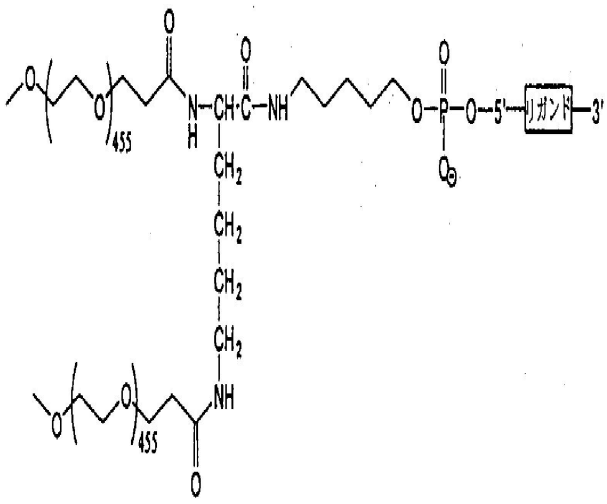
(72)発明者　ゴールド, ラリー
アメリカ合衆国コロラド州80302, ボールダー, フィフス・ストリート　1033

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 AA11 CA11 HA03
4C076 AA01 AA09 AA12 AA13 AA17 AA19 AA22 AA25 AA29 BB01 BB13 BB15 BB16 BB25 BB27 BB29 BB30 BB31 CC01 CC07 CC15 CC27 CC31 EE59N EE59Q FF34 FF63
4C084 AA02 AA03 AA07 AA17 BA44 MA13 MA17 MA22 MA23 MA24 MA28 MA31 MA34 MA44 MA52 MA56 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA012 ZA592 ZB072 ZB262 ZB312 ZC412

专利名称(译)	高亲和力TGFβ核酸配体和抑制剂		
公开(公告)号	JP2003517295A	公开(公告)日	2003-05-27
申请号	JP2001513963	申请日	2000-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	吉利德科学公司		
申请(专利权)人(译)	Girido科学公司		
[标]发明人	パグラティスニコス ロチュリーマイケル ゴールドラリー		
发明人	パグラティス,ニコス ロチュリー,マイケル ゴールド,ラリー		
IPC分类号	C12N15/09 A61K9/127 A61K38/00 A61K47/48 A61P25/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P43/00 C07B61/00 C07H19/06 C07H19/10 C07H21/00 C07K14/00 C07K14/49 C07K14/495 C07K14/50 C12N9/12 C12N15/10 C12N15/113 C12N15/115 C12Q1/37 C12Q1/68 C12Q1/70 F02B75/02 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/535 G01N33/569 G01N33/68 G01N33/76		
CPC分类号	A61K9/1271 A61K9/1272 A61K38/00 A61K47/547 A61K47/549 A61P25/00 A61P31/00 A61P35/00 B82Y5/00 C07H19/06 C07H19/10 C07H21/00 C07K14/001 C07K14/49 C07K14/495 C07K14/50 C12N9/1276 C12N15/1048 C12N15/1136 C12N15/115 C12N2310/13 C12N2310/322 C12N2310/53 C12Q1/37 C12Q1/6804 C12Q1/6811 C12Q1/6876 C12Q1/70 C12Q1/703 C40B40/00 F02B2075/027 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/535 G01N33/56988 G01N33/68 G01N33/76 G01N2333/16 G01N2333/163 G01N2333/503 G01N2333/575 G01N2333/62 G01N2333/8125 G01N2333/96433 G01N2333/96455 G01N2333/966 G01N2333/9726 G01N2333/974 G01N2333/976 C12Q2525/101		
FI分类号	A61K47/48 A61P25/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P43/00.111 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA11 4B024/HA03 4C076/AA01 4C076/AA09 4C076/AA12 4C076/AA13 4C076/AA17 4C076/AA19 4C076/AA22 4C076/AA25 4C076/AA29 4C076/BB01 4C076/BB13 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076/BB25 4C076/BB27 4C076/BB29 4C076/BB30 4C076/BB31 4C076/CC01 4C076/CC07 4C076/CC15 4C076/CC27 4C076/CC31 4C076/EE59N 4C076/EE59Q 4C076/FF34 4C076/FF63 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA24 4C084/MA28 4C084/MA31 4C084/MA34 4C084/MA44 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA592 4C084/ZB072 4C084/ZB262 4C084/ZB312 4C084/ZC412		
优先权	09/363939 1999-07-29 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了鉴定和产生对TGFβ2的高亲和力核酸配体的方法。 本发明包括通过SELEX方法鉴定的TGFβ2特异性RNA配体。 还包括抑制TGFβ2与其受体相互作用的RNA配体。


O
O
O
455
N
H
CH
C
NH
O
P
O
5'
リガンド
3'
O⊖
CH2
CH2
CH2
CH2
NH
O
O
455
O