(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2008-512098
(P2008-512098A)
(43)公表日　平成20年4月24日(2008.4.24)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	Z	4B063
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02		4C084
A61P 7/02	(2006.01)	A61P	7/02		
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	111	

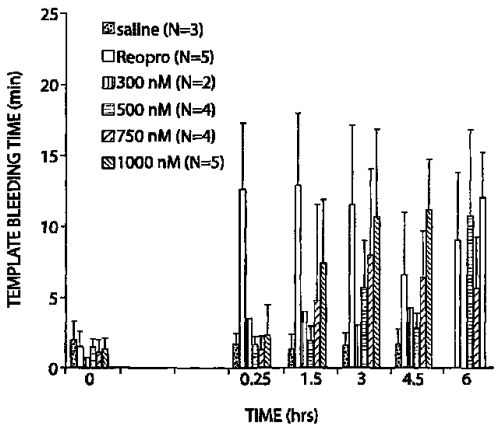
審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 148 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-530504 (P2007-530504)
(86)(22)出願日　平成17年9月7日 (2005.9.7)
(85)翻訳文提出日　平成19年5月7日 (2007.5.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2005/032134
(87)国際公開番号　WO2006/033854
(87)国際公開日　平成18年3月30日 (2006.3.30)
(31)優先権主張番号　60/608,047
(32)優先日　平成16年9月7日 (2004.9.7)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/661,950
(32)優先日　平成17年3月11日 (2005.3.11)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/678,427
(32)優先日　平成17年5月6日 (2005.5.6)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　504466487
アーケミックス　コーポレイション
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３９，　ケンブリッジ，　ワン　ハンプシャー　ストリート
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　ディーナー，　ジョン　エル.
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３９，　ケンブリッジ，　ブリストル　ストリート　８７，　ユニット　１ビー
最終頁に続く

(54)【発明の名称】フォン・ビルブラント因子に対するアプタマー、および血栓性疾患の処置剤としてのその使用

(57)【要約】
本発明は、一般に、核酸の分野に関する。より具体的には、本発明は、フォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集が関与している血栓性疾患もしくは血栓性障害および／または他の疾患もしくは他の障害の処置剤および診断剤として有用な、フォン・ビルブラント因子に結合可能であるアプタマーに関する。本発明はさらに、フォン・ビルブラント因子に結合可能であるアプタマーの投与のための物質およびフォン・ビルブラント因子に結合可能であるアプタマーの投与のための方法に関する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）、配列番号１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）からなる群より選択される配列に対して９５％同一である核酸配列を含む、アプタマー。
【請求項２】
前記アプタマーは、ＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）、配列番号１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）からなる群より選択される一次核酸配列に対して９５％同一である一次核酸配列を含む、請求項１に記載のアプタマー。
【請求項３】
前記アプタマー核酸配列が、化学的改変を含み、かつ該アプタマー核酸配列は、ＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）、配列番号１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）からなる群より選択される該化学的改変を含む核酸配列に対して９５％同一である、請求項１に記載のアプタマー。
【請求項４】
前記アプタマーが、高分子量の非免疫原性化合物または親油性化合物に結合体化されている、請求項１に記載のアプタマー。
【請求項５】
前記アプタマーが、ポリアルキレングリコールである非免疫原性高分子量化合物に結合体化されている、請求項４に記載のアプタマー。
【請求項６】
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である、請求項５に記載のアプタマー。
【請求項７】
前記ポリエチレングリコールが、５ｋＤａ、１０ｋＤＡ、２０ｋＤａおよび４０ｋＤａからなる群より選択される分子量を含む、請求項６に記載のアプタマー。
【請求項８】
前記アプタマーが、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）、ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）からなる群より選択される、請求項７に記載のアプタマー。
【請求項９】
治療有効量の請求項１に記載のアプタマーまたはその塩と、薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤とを含有する、組成物。
【請求項１０】
フォン・ビルブラント因子（ｖＷＦ）によって媒介される疾患を処置、予防または改善するための方法であって、
　請求項９に記載の組成物を哺乳動物に投与する工程；
を包含する、方法。
【請求項１１】
患者を処置するための方法であって、
　透析、ＣＡＢＧ手術、経皮的冠動脈介入または心臓弁置換の前、間および／または後に、請求項９に記載の組成物を、該組成物を必要とする患者に投与する工程；

を包含する、方法。
【請求項１２】
前記組成物が、２０ｋＤＡ　ＰＥＧに結合体化されたＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）またはそのフラグメントを含有する、請求項１０に記載の方法。
【請求項１３】
前記組成物が、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）を含有する、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記組成物が、２０ｋＤＡ　ＰＥＧに結合体化されたＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）またはそのフラグメントを含有する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１５】
前記組成物が、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）を含有する、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
治療有効量の請求項８に記載のアプタマーまたはその塩と、薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤とを含有する、組成物。
【請求項１７】
フォン・ビルブラント因子（ｖＷＦ）によって媒介される疾患を処置、予防または改善するための方法であって、
　請求項１６に記載の組成物を哺乳動物に投与する工程；
を包含する、方法。
【請求項１８】
フォン・ビルブラント因子標的に特異的に結合する、アプタマー。
【請求項１９】
前記フォン・ビルブラント因子標的が、ヒトフォン・ビルブラント因子である、請求項１８に記載のアプタマー。
【請求項２０】
前記アプタマーが、フォン・ビルブラント因子媒介性血小板凝集を調節する、請求項１８に記載のアプタマー。
【請求項２１】
フォン・ビルブラント因子全長標的とフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的とに特異的に結合する、請求項１８に記載のアプタマー。
【請求項２２】
前記フォン・ビルブラント因子全長標的と前記フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的とが、異なる種に由来する、請求項２１に記載のアプタマー。
【請求項２３】
診断方法であって、
　請求項１８に記載のアプタマーを、フォン・ビルブラント因子またはその改変体を含有すると疑われる組成物と接触させる工程；および
　フォン・ビルブラント因子またはその改変体の有無を検出する工程；
を包含する、方法。
【請求項２４】
アプタマー標的の生物学的機能を調節するアプタマーを同定するための方法であって、
　ａ）一本鎖核酸の候補混合物を調製する工程；
　ｂ）該候補混合物を、全長タンパク質標的および該全長タンパク質標的のドメインの両方と接触させる工程；
　ｃ）該全長タンパク質標的または該タンパク質標的ドメインに対する増大した親和性を有する核酸を分離する工程；ならびに
　ｄ）該増大した親和性の核酸をインビトロで増幅して、タンパク質標的特異的な富化アプタマー混合物を生じる工程；

を含む、方法。
【請求項２５】
請求項２４に記載の方法であって、該方法は、
ｅ）前記標的特異的な富化アプタマー混合物を前記全長タンパク質標的と接触させる工程；
ｆ）該全長タンパク質標的に対する増大した親和性を有する核酸を分離する工程；および
ｇ）該増大した親和性の核酸をインビトロで増幅して、標的特異的な富化アプタマー混合物を生じる工程；
ｈ）該標的特異的な富化アプタマー混合物を、前記タンパク質標的ドメインと接触させる工程、
ｆ）該タンパク質標的ドメインに対する増大した親和性を有する核酸を分離する工程；および
ｇ）該増大した親和性の核酸をインビトロで増幅して、タンパク質標的特異的な富化アプタマー混合物を生じる工程；
をさらに包含する、方法。
【請求項２６】
請求項２５に記載の方法であって、該方法は、
前記全長タンパク質標的の生物学的機能をインビボでブロックするアプタマーを選択する工程；
をさらに包含する、方法。
【請求項２７】
前記全長タンパク質標的が、第一の種由来であり、前記タンパク質標的ドメインが、第二の種由来である、請求項２５に記載の方法。
【請求項２８】
前記第一の種および第二の種の両方のタンパク質標的に結合可能であるアプタマーを選択する工程；
をさらに包含する、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
請求項２６に記載の方法によって同定される、アプタマー。
【請求項３０】
フォン・ビルブラント因子に特異的に結合するアプタマーであって、該アプタマーは、配列番号３１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）からなる群より選択される一次核酸配列のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％同一である一次核酸配列を含む、アプタマー。
【請求項３１】
治療有効量の請求項３０に記載のアプタマーまたはその塩と、薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤とを含有する、組成物。
【請求項３２】
フォン・ビルブラント因子（ｖＷＦ）によって媒介される疾患を処置、予防または改善す

るための方法であって、
　請求項３１に記載の組成物を哺乳動物に投与する工程；
を包含する、方法。
【請求項３３】
患者を処置するための方法であって、
　透析、ＣＡＢＧ手術、経皮的冠動脈介入または心臓弁置換の前、間および／または後に、請求項３１に記載の組成物を、該組成物を必要とする患者に投与する工程；
を包含する、方法。
【請求項３４】
診断方法であって、
　請求項３０に記載のアプタマーを、フォン・ビルブラント因子またはその改変体を含有すると疑われる組成物と接触させる工程；および
　フォン・ビルブラント因子またはその改変体の有無を検出する工程；
を包含する、方法。
【請求項３５】
インビトロ診断剤としての使用のための、請求項３０に記載のアプタマー。
【請求項３６】
インビボ診断剤としての使用のための、請求項３０に記載のアプタマー。
【請求項３７】
前記アプタマー標的が、フォン・ビルブラント因子である、請求項２４に記載の方法。
【請求項３８】
前記全長タンパク質標的のドメインが、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１である、請求項２４に記載の方法。
【請求項３９】
前記全長タンパク質標的が、フォン・ビルブラント因子である、請求項２５に記載の方法。
【請求項４０】
前記タンパク質標的ドメインが、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１である、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記第一の種および第二の種の両方のタンパク質標的が、フォン・ビルブラント因子である、請求項２８に記載の方法。
【請求項４２】
請求項４１に記載の方法に従って同定される、アプタマー。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（発明の分野）
　本発明は、一般に、核酸の分野に関し、より具体的には、フォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集が関与している血栓性疾患および／または他の疾患もしくは障害の処置および診断として有用な、フォン・ビルブラント因子に結合可能であるアプタマーに関する。本発明はさらに、フォン・ビルブラント因子に結合可能であるアプタマーの投与のための物質および方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
（発明の背景）
　アプタマーは、典型的なワトソン・クリック塩基対形成以外の相互作用を介して分子に対する特異的結合親和性を有する核酸分子である。
【０００３】
　アプタマーは、ファージディスプレイによって生じたペプチドまたはモノクローナル抗

体（「ｍＡｂ」）のように、選択された標的に特異的に結合すること、および標的の活性または結合相互作用を調節することができ、例えば、結合を介して、アプタマーはその標的が機能する能力をブロックし得る。ランダム配列オリゴヌクレオチドのプールからのインビトロセレクションプロセスによって発見され、アプタマーは、増殖因子、転写因子、酵素、免疫グロブリンおよび受容体を含む１３０を超えるタンパク質に関して生成されている。典型的なアプタマーは、大きさが１０～１５ｋＤａ（２０～４５ヌクレオチド）で、ナノモル～サブナノモルの親和性でその標的に結合し、密接に関連する標的に対して差別する（例えば、アプタマーは、典型的には、同じ遺伝子ファミリーの他のタンパク質に結合しない）。一連の構造研究から、アプタマーは、抗体抗原複合体において親和性および特異性を推進するのと同じタイプの結合相互作用（例えば水素結合、静電的相補性、疎水的接触、立体排除）を用いることができることが示されている。

【０００４】

アプタマーは、高い特異性および親和性、生物学的効果、ならびに優れた薬物動態学的特性を含む、処置および診断としての使用のための、多くの好ましい特徴を有する。また、アプタマーは、抗体および他のタンパク質生物製剤にまさる、特定の競合的な利点を提供する。例えば、

（１）速度および制御）　アプタマーは、完全にインビトロのプロセスによって生成され、処置上のリードを含む最初のリードが迅速に生じることができるようになる。インビトロセレクションによって、アプタマーの特異性および親和性が厳密に制御できるようになり、毒性および非免疫原性標的の両方に対するリードを含むリードが生じることができるようになる。

【０００５】

（２）毒性および免疫原性）　種類としてのアプタマーは、処置上許容され得る毒性、および免疫原性の欠如を示している。多くのモノクローナル抗体の効果は抗体自体に対する免疫応答によって厳しく制限され得るが、おそらく、アプタマーはＭＨＣを介してＴ細胞によって提示され得ないため、および免疫応答は一般に核酸フラグメントを認識しないように調整されているために、アプタマーに対する抗体を誘発するのは非常に困難である。

【０００６】

（３）投与）　最近最も認められている抗体処置は静脈内注入（典型的には２～４時間にわたる）によって投与されるが、アプタマーは皮下注射によって投与され得る（皮下投与を介したアプタマーのバイオアベイラビリティは、サルの研究において、８０％より大きい（非特許文献））。溶解度が高く（＞１５０ｍｇ／ｍＬ）分子量が比較的小さい（アプタマー：１０～５０ｋＤａ、抗体：１５０ｋＤａ）ので、アプタマーの週用量は、０．５ｍＬ未満の体積の注射によって送達され得る。また、アプタマーの大きさが小さいために、抗体または抗体フラグメントが侵入することができない構造的に圧縮された領域へアプタマーは侵入することができ、アプタマーベースの処置または予防の、さらに別の利点がもたらされる。

【０００７】

（４）スケーラビリティおよびコスト）　治療アプタマーは、化学的に合成され、結果として、生産需要を満たすよう必要に応じて容易に一定の割合で生成され得る。スケーリング生産が困難なために、現在いくつかの生物製剤の利用可能性が制限され、大規模なタンパク質生産工場の資本コストは莫大であるが、単一の大規模なオリゴヌクレオチドシンセサイザーは１００ｋｇ／年より多く生産し得、比較的大きくない初期投資を必要とする。キログラム規模でのアプタマー合成のための商品の現在のコストは５００ドル／ｇと見積もられ、高度に最適化された抗体のコストに匹敵する。プロセス開発の継続的な向上によって、商品のコストが５年のうちに１００ドル／ｇ未満まで低下すると期待される。

【０００８】

（５）安定性）　治療アプタマーは、化学的に強力である。治療アプタマーは、本来、熱および変性剤等の因子への曝露の後に活性を回復するよう適合しており、凍結乾燥粉末

として室温で長期間（＞１年）保存され得る。
【０００９】
（血栓性疾患）
正常な、制御された止血の間、血小板は健康な血管に粘着せず、むしろ血小板は、典型的には、損傷した血管の内皮下層に粘着する。血小板粘着は、最終的に血栓形成および出血の停止を生じる、一連の血小板活性化プロセスを引き起こす。フォン・ビルブラント因子（「ｖＷＦ」）は、血管損傷の部位での血小板粘着の媒介物質である。ｖＷＦは、主に血管内皮細胞によって生成される、巨大な、マルチサブユニットの多量体可溶性因子である。フォン・ビルブラント因子は、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ３と露出したコラーゲンとの間の相互作用を介して血管壁に固定されるようになる。血小板－受容体糖タンパク質Ｉｂ（「以下ＧＰＩｂ」）および固定されたフォン・ビルブラント因子のＡ１ドメインの一時的な相互作用によって、血管損傷の部位での血小板の癒着および活性化が促進される。非特許文献２。したがって、フォン・ビルブラント因子はプロトロンビン的であり、止血の間に、血管損傷の部位での血栓形成の促進においても、重要な役割を果たす。
【００１０】
逆に、フォン・ビルブラント因子は、同じ機構によって、心臓血管疾患等の、血小板凝集および血栓形成を伴う病的状態において重要な役割を果たす。抗血栓療法が現在利用可能であるが、依然として、さらなる療法に対する、大きな満たされていない必要性がある。米国心臓協会は、米国だけでも６千万人を超える人々が、１つ以上の形態の心臓血管疾患を有すると推定しており、心臓血管疾患のある人々の大部分は動脈血栓症のリスクがより高いと推定している。非特許文献３。
【００１１】
現在利用可能な療法の大きな問題は、効果が向上することによって安全性が低下することである。非特許文献３。したがって、出血副作用を最小限にしながら血管系における血小板凝集を予防することによって血栓性疾患を処置または予防することが有益であろう。本発明は、これらおよび他の必要性を満たすための物質および方法を提供する。
【非特許文献１】Ｔｕｃｋｅｒら、Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　Ｂ．（１９９９）７３２：２０３～２１２
【非特許文献２】Ｅ．Ｇ．Ｈｕｉｚｉｎｇａら、Ｓｃｉｅｎｃｅ（２００２）、２９７、１１７６
【非特許文献３】Ｓ．Ｐ．ＪａｃｋｓｏｎおよびＳ．Ｍ．Ｓｃｈｏｅｎｗａｅｌｄｅｒ、Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ（２００３）、２、１～１２
【発明の開示】
【課題を解決するための手段】
【００１２】
（発明の開示）
本発明は、フォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集を伴う血栓性障害の処置のための物質および方法を提供する。
【００１３】
本発明は、フォン・ビルブラント因子標的に特異的に結合するアプタマーを提供する。いくつかの実施形態において、フォン・ビルブラント因子標的は、ヒトフォン・ビルブラント因子である。いくつかの実施形態において、フォン・ビルブラント因子標的は、ヒトフォン・ビルブラント因子の機能と本質的に同じである生物学的機能を果たす、ヒトフォン・ビルブラント因子の改変体である。いくつかの実施形態において、フォン・ビルブラント因子標的またはその改変体の生物学的機能は、血小板凝集を媒介することである。いくつかの実施形態において、ヒトフォン・ビルブラント因子標的の改変体は、ヒトフォン・ビルブラント因子のものと実質的に同じ構造および実質的に同じの本発明のアプタマーへの結合能力を有する。いくつかの実施形態において、ｖＷＦ標的は、非ヒトフォン・ビルブラント因子である。いくつかの実施形態において、本発明のアプタマーは、配列番号

７（図４）に少なくとも７５％、８０％、９０％または９５％同一であるアミノ酸配列を含む、フォン・ビルブラント因子標的またはその改変体に結合する。ある実施形態において、フォン・ビルブラント因子標的は、配列番号７のアミノ酸配列を含む。

【００１４】

２つ以上の核酸またはタンパク質配列に関連する用語「配列同一性」または「同一性％」は、以下の配列比較アルゴリズムの１つを用いてまたは目視検査によって測定した最大一致に関して比較およびアラインメントした場合に、同じであるか、または特定されたパーセンテージの同じであるアミノ酸残基もしくはヌクレオチドを有する、２つ以上の配列または部分配列をいう。配列比較のために、典型的には１つの配列が、試験配列が比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験および参照配列はコンピュータにインプットされ、必要に応じて部分配列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。次いで、配列比較アルゴリズムは、参照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントを、指定されたプログラムパラメータに基づいて計算する。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、ＳｍｉｔｈおよびＷａｔｅｒｍａｎ、Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２頁（１９８１年）の局所的相同性アルゴリズムによって、ＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ、Ｊ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３頁（１９７０年）の相同性アラインメントアルゴリズムによって、ＰｅａｒｓｏｎおよびＬｉｐｍａｎ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：２４４４頁（１９８８年）の類似性検索方法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実行（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、ウィスコンシン州マディソン、サイエンスドライブ５７５のＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡおよびＴＦＡＳＴＡ）によって、または目視検査（一般には、Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃ．およびＷｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ発行（１９８７年）を参照）によって、行われ得る。

【００１５】

配列同一性パーセントを決定するのに適したアルゴリズムの一例は、ベーシック・ローカル・アラインメント・サーチ・ツール（以下「ＢＬＡＳＴ」）で用いられるアルゴリズムであり、例えばＡｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３～４１０頁（１９９０年）およびＡｌｔｓｃｈｕｌら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１５：３３８９～３４０２頁（１９９７年）を参照のこと。ＢＬＡＳＴ分析を行うためのソフトウエアは、国立バイオテクノロジー情報センター（以下「ＮＣＢＩ」）を通じて一般に入手可能である。ＮＣＢＩから入手可能なソフトウエア、例えばＢＬＡＳＴＮ（ヌクレオチド配列のため）およびＢＬＡＳＴＰ（アミノ酸配列のため）を用いた配列同一性の決定に用いられるデフォルトパラメータは、ＭｃＧｉｎｎｉｓら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、３２：Ｗ２０～Ｗ２５頁（２００４年）に記載されている。好ましい実施形態において、パーセント同一性は、ＡｌｔｓｃｈｕｌらのＢＬＡＳＴ実行アルゴリズム、および本明細書中でパーセントＢＬＡＳＴ同一性といわれ得るＭｃＧｉｎｎｉｓらのデフォルトパラメータを用いて、決定される。

【００１６】

ある実施形態において、本発明のｖＷＦアプタマーは、ヒトフォン・ビルブラント因子またはその改変体に対する、約１００ｎＭ以下、好ましくは５０ｎＭ以下、好ましくは１０ｎＭ以下、好ましくは５ｎＭ以下、好ましくは１ｎＭ以下、およびより好ましくは５００ｐＭ以下の解離定数を含む。解離定数は、下記で実施例１に記載されるように、マルチポイント滴定を用いたドットブロットアッセイ、および等式ｙ＝（最大値／（１＋Ｋ／タンパク質））＋ｙ切片を適合させることによって、決定され得る。

【００１７】

本発明はまた、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的に特異的に結合するアプタマーを提供する。いくつかの実施形態において、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１

標的は、ヒトフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的である。いくつかの実施形態において、ヒトフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的は、ヒトフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１の機能と本質的に同じ生物学的機能を果たす、ヒトフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１の改変体である。いくつかの実施形態において、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１またはその改変体の生物学的機能は、血小板に結合することである。いくつかの実施形態において、ヒトフォン・ビルブラント因子ドメイン標的の改変体は、ヒトフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１のものと実質的に同じ構造および実質的に同じの前記アプタマーへの結合能力を有する。他の実施形態において、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的は、非ヒトフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的、例えばウサギまたは非ヒト霊長類フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的である。

【００１８】

いくつかの実施形態において、本発明のフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的は、配列番号４～６からなる群より選択される配列のいずれか１つに少なくとも７５％、８０％、９０％または９５％同一であるアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態において、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的は、配列番号４～６からなる群より選択されるアミノ酸配列のいずれか１つを含む。

【００１９】

ある実施形態において、本発明のｖＷＦアプタマーは、ヒトフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１またはその改変体に対する、約１００ｎＭ以下、好ましくは５０ｎＭ以下、好ましくは１０ｎＭ以下、好ましくは５ｎＭ以下、好ましくは１ｎＭ以下、およびより好ましくは５００ｐＭ以下の解離定数を含む。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、非ヒトフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１またはその改変体に対する、約１００ｎＭ以下、好ましくは５０ｎＭ以下、好ましくは１０ｎＭ以下、好ましくは５ｎＭ以下、好ましくは１ｎＭ以下、およびより好ましくは５００ｐＭ以下の解離定数を含む。解離定数は、下記で実施例１に記載されるように、マルチポイント滴定を用いたドットブロットアッセイ、および等式ｙ＝（最大値／１＋Ｋ／タンパク質））ｙ切片を適合させることによって、決定され得る。

【００２０】

いくつかの実施形態において、本発明は、フォン・ビルブラント因子全長標的に特異的に結合するアプタマーを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、フォン・ビルブラント因子全長標的およびフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的に特異的に結合するアプタマーを提供する。いくつかの実施形態において、フォン・ビルブラント因子全長標的は、ヒトフォン・ビルブラント標的またはその改変体である。他の実施形態において、フォン・ビルブラント因子全長標的は、非ヒトフォン・ビルブラント標的またはその改変体である。いくつかの実施形態において、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的は、非ヒトフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的またはその改変体である。他の実施形態において、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的は、ヒトフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的またはその改変体である。いくつかの実施形態において、フォン・ビルブラント因子全長標的またはドメインＡ１標的は、ウサギ、モルモット、サル、イヌ、ヒツジ、マウスおよびラット、フォン・ビルブラント因子全長またはドメインＡ１標的からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、本発明のアプタマーが特異的に結合するフォン・ビルブラント因子全長標的およびフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的は、異なる種に由来する。

【００２１】

本発明は、リボ核酸もしくはデオキシリボ核酸またはリボ核酸およびデオキシリボ核酸の混合物である、フォン・ビルブラント因子標的に対するアプタマーを提供する。本発明のアプタマーは、一本鎖リボ核酸もしくはデオキシリボ核酸またはリボ核酸およびデオキシリボ核酸の混合物であり得る。いくつかの実施形態において、本発明のアプタマーは、少なくとも１つの化学的改変を含む。いくつかの実施形態において、化学的改変は、核酸の、糖部分での化学的置換、リン酸部分での化学的置換、および塩基部分での化学的置換

からなる群より選択される。他の実施形態において、化学的改変は、改変ヌクレオチドの取り込み、３’キャッピング、高分子量の非免疫原性化合物への結合体化、親油性化合物への結合体化、およびリン酸バックボーンへのホスホロチオエートの取り込みからなる群より選択される。好ましい実施形態において、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、より好ましくはポリエチレングリコールである。

【００２２】

本発明のいくつかの実施形態において、アプタマーがわずか４つ、わずか３つ、わずか２つまたはわずか１つのホスホロチオエートバックボーン改変を有するヌクレオチド配列を含み、アプタマーが標的に対して、同じヌクレオチド配列を有するがホスホロチオエートバックボーン改変を欠いた第二のアプタマーに関して結合親和性が増大している結合親和性を有する、標的に特異的に結合するアプタマー、例えばフォン・ビルブラント因子アプタマーが提供される。いくつかの実施形態において、標的は、核酸に結合する公知の機能を有さない、特に核酸に結合する公知の主要な機能を有さないタンパク質またはペプチドである。

【００２３】

いくつかの実施形態において、本発明のアプタマーは、フォン・ビルブラント因子標的、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的およびいずれかの標的の改変体からなる群のいずれか１つの機能を調節する。いくつかの実施形態において、調節される機能は、血小板凝集媒介である。いくつかの実施形態において、本発明のアプタマーは、インビボでのフォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集を阻害する。他の実施形態において、本発明のアプタマーは、血小板への、フォン・ビルブラント因子標的、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的およびそれらの改変体からなる群のいずれか１つの結合を妨げる。他の実施形態において、本発明のアプタマーは、血小板受容体タンパク質への、フォン・ビルブラント因子標的、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的およびいずれかの標的の改変体からなる群のいずれか１つの結合を妨げる。さらに他の実施形態において、本発明のアプタマーは、血小板受容体タンパク質ＧＰＩｂへの、フォン・ビルブラント因子標的、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的およびいずれかの標的の改変体からなる群のいずれか１つの結合を妨げる。いくつかの実施形態において、本発明のアプタマーは、出血時間を有意に増大させずに、ｖＷＦ因子媒介血小板凝集を妨げる。いくつかの実施形態において、出血時間の有意でない増大は、本発明のアプタマーで処置していない被験体の出血時間に関して、１５分未満、好ましくは１０分未満、より好ましくは５分未満であり、いくつかの実施形態においては、３分未満である。いくつかの実施形態において、出血時間は、皮膚（またはテンプレート）出血時間によって測定される。

【００２４】

いくつかの実施形態において、本発明のアプタマーは、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）からなる群より選択されるアプタマーのものと実質的に同じ、フォン・ビルブラント因子標的、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的およびそれらの改変体からなる群のいずれか１つに結合する能力を有する。他の実施形態において、本発明のアプタマーは、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列

番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）からなる配列の群より選択されるアプタマーのものと実質的に同じ構造、ならびに、実質的に同じ、フォン・ビルブラント因子標的、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的およびそれらの改変体からなる群のいずれか１つに結合する能力を有する。さらに他の実施形態において、本発明のアプタマーは、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）からなる群より選択される。

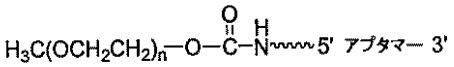
【００２５】

特定の実施形態において、本発明のアプタマーは、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）もしくはＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）もしくはＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）または配列番号２２０の一次核酸配列を含み、６～９、２０、２２、２４～２７、３０または３２～３３位に２’－Ｏ－Ｍｅ置換ヌクレオチドを含まない。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）もしくはＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）もしくはＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）または配列番号２２０の核酸配列を含み、１つ以上の位置、５つ以上の位置、１０個以上の位置、１５個以上の位置または２０個以上の位置に、２’－Ｏ－Ｍｅ置換ヌクレオチドを含む。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）もしくはＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）もしくはＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）または配列番号２２０の核酸配列を含み、１～５位、１０～１９位、２１位、２３位、２８～２９位および３４～４１位からなる群より選択される全ての位置に２’－Ｏ－Ｍｅ置換ヌクレオチドを含み、ここで位置の番号付けは核酸配列の５’末端で始まる。

【００２６】

本発明の特定の実施形態において、配列番号９５～９７および配列番号２１７～２１９からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供され、ここでＹ＝ＣまたはＴ／Ｕ、Ｒ＝ＡまたはＧ、Ｎ＝任意のヌクレオチドであるが、対になった領域ではワトソン／クリック塩基対の形をとり、Ｘ＝１～４であるとする。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、配列番号２１７および２２０からなる群より選択され、ここでＮｘ－Ｎｘ－Ｎｘ－Ｎｘ－またはＮ（３～１０）は、ＰＥＧリンカーで置換され得る。さらに別の実施形態において、本発明のアプタマーは、配列番号３２５～３２７からなる群より選択され、ここでＹ＝ＣまたはＴ、Ｒ＝ＡまたはＧである。

【００２７】
特定の実施形態において、フォン・ビルブラント因子に特異的に結合するアプタマーは、図１５に表される配列番号２２０のコンセンサス配列構造を有する三路のヘリックス連結二次構造モチーフを含む。別の特定の実施形態において、三路のヘリックス連結を有するアプタマーは、図１９Ａに表されるコンセンサス構造を含む（ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１））。別の実施形態において、三路のヘリックス連結を有するアプタマーは、図１９Ｂに表されるコンセンサス構造を含む（ＡＲＣ１５３４（配列番号３１５））。
【００２８】
別の実施形態において、フォン・ビルブラント因子に特異的に結合するアプタマーは、図１０に表される配列番号２１７のコンセンサス配列構造を有するステム－ループ－ステム－ループ二次構造モチーフを含む。別の実施形態において、フォン・ビルブラント因子に特異的に結合するアプタマーは、図１２に表される配列番号２１８のコンセンサス配列構造を有するステム－ループ－ループ二次構造モチーフを含む。別の実施形態において、フォン・ビルブラント因子に特異的に結合するアプタマーは、図１３に表されるように配列番号１９の２つのヘリックスステムおよび１つのステム－ループを有する三路連結二次構造モチーフを含む。いくつかの実施形態において、本発明のアプタマーの二次構造モチーフは、ＲＮＡｓｔｒｕｃｔｕｒｅ バージョン４．１（Ｍａｔｈｅｗｓ，Ｄ．Ｈ．；Ｄｉｓｎｅｙ，Ｍ．Ｄ．；Ｃｈｉｌｄｓ，Ｊ．Ｌ．；Ｓｃｈｒｏｅｄｅｒ，Ｓ．Ｊ．；Ｚｕｋｅｒ，Ｍ．；およびＴｕｒｎｅｒ，Ｄ．Ｈ．，「Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｉｎｇ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｃｏｎｓｔｒａｉｎｔｓ ｉｎｔｏ ａ ｄｙｎａｍｉｃ ｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ ａｌｇｏｒｉｔｈｍ ｆｏｒ ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ ｏｆ ＲＮＡ ｓｅｃｏｎｄａｒｙ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ」、２００４年。Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳ、１０１、７２８７～７２９２頁）によって予想される。
【００２９】
好ましい実施形態において、ヒトフォン・ビルブラント因子標的および非ヒトフォン・ビルブラント因子標的に特異的に結合するアプタマーが提供される。
【００３０】
ある実施形態において、以下の構造
【００３１】
【化１】



またはその塩を含むアプタマーが提供される。式中、ｎは約４５４個のエチレンオキシド単位（ＰＥＧ＝２０ｋＤａ）であり、
【００３２】
【化２】

はリンカーであり、アプタマーは本発明の抗ｖＷＦアプタマーである。特定の実施形態において、アプタマーは、
【００３３】
【化３】

mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmG-s-dTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T (SEQ ID NO 291)

の核酸配列またはそのフラグメントを含む。ここで、ｍは２’－ＯＭｅ置換をいい、「ｄ」はデオキシヌクレオチドをいい、「ｓ」はホスホロチオエート置換をいい、「３Ｔ」は逆方向デオキシチミジンをいう。別の実施形態において、アプタマーは、。

【００３４】
【化４】

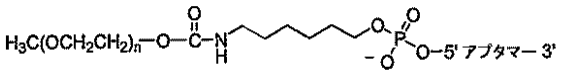
dGdGdCdGdTdGdCdAdGdTdGdCdCdTdTdCdGdGdCdCdGdTdGdCdGdGdTdGdCdCdTdC

dCdGdTdCdAdCdGdCdC-3T (SEQ ID NO 323)

の核酸配列またはそのフラグメントを含む。ここで、「ｄ」はデオキシヌクレオチドをいい、「３Ｔ」は逆方向デオキシチミジンをいう。本発明のこの局面のいくつかの実施形態において、リンカーは、アルキルリンカーである。特定の実施形態において、アルキルリンカーは、２～１８個の連続したＣＨ$_2$基を含む。好ましい実施形態において、アルキルリンカーは、２～１２個の連続したＣＨ$_2$基を含む。特に好ましい実施形態において、アルキルリンカーは、３～６個の連続したＣＨ$_2$基を含む。

【００３５】
特定の実施形態において、本発明のアプタマーは、以下の構造

【００３６】
【化５】



を含み、式中、ｎは約４５４個のエチレンオキシド単位（ＰＥＧ＝２０ｋＤａ）であり、アプタマー核酸配列は、本発明の抗ｖＷＦアプタマーである。特定の実施形態において、アプタマーは、

【００３７】
【化６】

mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmG-s-

dTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T (SEQ ID NO 291)

の核酸配列またはそのフラグメントを含む。ここでｍは２’－ＯＭｅ置換をいい、「ｄ」はデオキシヌクレオチドをいい、「ｓ」はホスホロチオエート置換をいい、「３Ｔ」は逆方向デオキシチミジンをいう。別の実施形態において、アプタマーは、

【００３８】
【化７】

dGdGdCdGdTdGdCdAdGdTdGdCdCdTdTdCdGdGdCdCdGdTdGdCdGdGdTdGdCdCdTdC

dCdGdTdCdAdCdGdCdC-3T (SEQ ID NO 323)

の核酸配列またはそのフラグメントを含む。ここで、「ｄ」はデオキシヌクレオチドをいい、「３Ｔ」は逆方向デオキシチミジンをいう。

【００３９】
別の実施形態において、本発明のアプタマーの塩が提供される。特定の実施形態において、以下のアプタマーの塩が提供される。
メトキシポリエチレングリコールが２０ｋＤａの分子量を含む、Ｎ－（メトキシ－ポリエチレングリコール）－６－アミノヘキシリル－（１→５’）－２’－ＯＭｅ－グアニリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－シチジリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－グアニリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－ウラシリル－（３’→５’）－２’－デオキシグアニリル－（３’→５’）－２’－デオキシシチジリル－（３’→５’）－２’－デオキシアデニリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－グアニリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－ウラシリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－グアニリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－シチジリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－シチジリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－ウラシリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－ウラシリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－シチジリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－グアニリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－グアニリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－シチジリル－（３

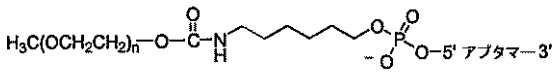
’→５’）－２’－デオキシシチジリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－Ｐ－チオグアニリル－（３’→５’）－２’－デオキシチミジリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－グアニリル－（３’→５’）－２’－デオキシシチジリル－（３’→５’）－２’－デオキシグアニリル－（３’→５’）－２’－デオキシグアニリル－（３’→５’）－２’－デオキシチミジリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－グアニリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－シチジリル－（３’→５’）－２’－デオキシシチジリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－ウラシリル－（３’→５’）－２’－デオキシシチジリル－（３’→５’）－２’－デオキシシチジリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－グアニリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－ウラシリル－（３’→５’）－２’－デオキシシチジリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－アデニリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－シチジリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－グアニリル－（３’→５’）－２’－ＯＭｅ－シチジリル－（３’→５’）－（３’→３’）－２’－デオキシチミジン４０ナトリウム塩。

【００４０】

さらに別の実施形態において、治療有効量の本発明のアプタマーまたはその塩のいずれか１つおよび薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈液を含有する薬学的組成物が提供される。特定の実施形態において、本発明の薬学的組成物は、ＡＲＣ１７７９を含有する。より特定の実施形態において、薬学的組成物は、

【００４１】

【化８】



の構造を有するアプタマーまたはその塩を含有する。式中、ｎは約４５４個のエチレンオキシド単位（ＰＥＧ＝２０ｋＤａ）であり、アプタマーは

【００４２】

【化９】

mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmG-s-

【００４３】

【化１０】

dTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T (SEQ ID NO 291)

の核酸配列またはそのフラグメントを含む。ここで、ｍは２’－ＯＭｅ置換をいい、「ｄ」はデオキシヌクレオチドをいい、「ｓ」はホスホロチオエート置換をいい、「３Ｔ」は逆方向デオキシチミジンをいう。

【００４４】

本発明は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトに、本発明のアプタマーまたは薬学的組成物を投与することを含む、フォン・ビルブラント因子によって媒介される疾患を処置、予防または改善する方法を提供する。いくつかの実施形態において、処置、予防または改善される疾患は、本態性血小板減少症、血栓性トロンボコペニック紫斑病（「ＴＴＰ」）、タイプＩＩｂフォン・ビルブラント病、偽性フォン・ビルブラント病、末梢動脈疾患、例えば末梢動脈閉塞性疾患、不安定狭心症、狭心症、動脈血栓性、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、急性冠症候群、心房細動、頸動脈狭窄症、脳梗塞、脳血栓症、虚血性脳卒中および一過性脳虚血発作からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、本発明の薬学的組成物は、透析、ＣＡＢＧ手術、経皮的冠動脈介入または心臓弁置換の前／間および／または後に投与される。

【００４５】

本発明のアプタマーのインビボ半減期の長さは、処置、改善および／または予防される疾患に依存して変化し得る。例えば、処置、改善および／または予防される疾患の特徴のために長期のアプタマー投与が好ましいいくつかの実施形態において、本発明のアプタマーは、比較的長い半減期、例えばヒトにおいて５時間より長い半減期を含み得る。

【００４６】
他の実施形態において、本発明のアプタマーは、所望の機能半減期または効果の持続期間を含む。機能半減期または効果の持続期間は、アプタマーの薬物動態学的半減期および薬力学的活性の両方の関数である。いくつかの実施形態において、抗ｖＷＦ治療アプタマーの所望のヒト機能半減期または効果の持続期間は、提案される指標の選択的経皮的冠動脈介入および急性冠症候群に関しておよそ１～５時間ぐらいである。かかる動態のアプタマーは、（１）総アプタマー用量を最小限にすること（より長い半減期によって達成される）および（２）処置の停止後の血小板機能の迅速な正常化を可能にすること（より短い半減期によって達成される）の二重の目的の間のバランスを表す。いくつかの実施形態において、血小板機能の迅速な正常化は、万一患者が処置に応答して安定できなかった場合に臨床家に迅速な介入（例えばＣＡＢＧ）の選択肢を与えるので、重要である。
【００４７】
したがって、いくつかの実施形態において、本発明の処置方法および／または薬学的組成物における使用のためのアプタマーは、比較的短い機能半減期、例えばヒトにおける約１～５時間の機能半減期を含む。いくつかの実施形態において、ヒトにおける機能半減期は、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間および約５時間以下である。いくつかの実施形態において、機能半減期または効果の持続期間は、アプタマーの分布半減期$T_{1/2\alpha}$とおよそ同じである。
【００４８】
いくつかの実施形態において、ヒトにおける短い機能半減期を含む本発明のアプタマーは、急性冠症候群等の潜在的に外科的介入を必要とし得る疾患の処置、改善または予防のための方法および組成物における使用のためである。いくつかの実施形態において、ヒトにおける短い機能半減期を含む本発明のこの局面のアプタマーは、ＰＥＧ、例えば５、１０または２０ｋＤａ　ＰＥＧに結合体化される。いくつかの実施形態において、ヒトにおける短い半減期を含む本発明のこの局面のアプタマーは、ＡＲＣ１７７９である。
【００４９】
本発明はまた、フォン・ビルブラント因子、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１またはそれらの改変体を含有する疑いのある組成物に本発明のアプタマーを接触させる工程、ならびにフォン・ビルブラント因子、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１またはそれらの改変体の存在または非存在を検出する工程を含む診断方法を提供する。いくつかの実施形態において、診断方法はインビトロでの使用のためであるが、他の実施形態においては、診断方法はインビボでの使用のためである。
【００５０】
本発明はまた、
ａ）一本鎖核酸の候補混合物を調製する工程、
ｂ）候補混合物を全長タンパク質標的および全長タンパク質標的のドメインの両方に接触させる工程、
ｃ）全長タンパク質標的またはタンパク質標的ドメインに対する増大した親和性を有する核酸を分離する工程、ならびに
ｄ）増大した親和性の核酸をインビトロで増幅し、タンパク質標的特異的な富化アプタマー混合物を生じる工程
を含む、インビボで生物学的機能をブロックするアプタマーを同定する方法を提供する。
【００５１】
いくつかの実施形態において、同定方法はさらに、
ｅ）標的特異的な富化アプタマー混合物を、全長タンパク質標的に接触させる工程、
ｆ）全長タンパク質標的に対する増大した親和性を有する核酸を分離する工程、および
ｇ）増大した親和性の核酸をインビトロで増幅し、標的特異的な富化アプタマー混合物を生じる工程、
ｈ）標的特異的な富化アプタマー混合物を、タンパク質標的ドメインに接触させる工程、

ｉ）タンパク質標的ドメインに対する増大した親和性を有する核酸を分離する工程、および
ｊ）増大した親和性の核酸をインビトロで増幅し、タンパク質標的特異的な富化アプタマー混合物を生じる工程
を含む。

【００５２】

いくつかの実施形態において、同定方法はさらに、インビボで全長タンパク質標的の生物学的機能をブロックするアプタマーを選択する工程を含むが、他の実施形態においては、この方法はさらに、インビボでタンパク質標的ドメインの生物学的機能をブロックするアプタマーを選択する工程を含む。本発明の同定方法のいくつかの実施形態において、全長タンパク質標的は第一の種に由来し、タンパク質標的ドメインは第二の種に由来する。本発明の同定方法のさらなる実施形態において、この方法はさらに、第一および第二の両方の種の両方のタンパク質標的に結合可能であるアプタマーを選択する工程、好ましくは第一および第二の両方の種においてタンパク質標的の生物学的機能をブロックするアプタマーを選択する工程を含む。本発明の同定方法のいくつかの実施形態において、全長標的タンパク質標的は、フォン・ビルブラント因子である。本発明の同定方法のいくつかの実施形態において、全長標的タンパク質標的は、フォン・ビルブラント因子であり、ここで、選択されたアプタマーがフォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集をブロックすることが好ましい。いくつかの実施形態において、タンパク質標的ドメインは、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１である。本発明はまた、本発明の同定方法によって同定されたアプタマーを提供する。

【００５３】

いくつかの実施形態において、本発明はまた、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）からなる群より選択される一次核酸配列のいずれか１つに少なくとも８０％同一、具体的には少なくとも９０％同一、およびより具体的には少なくとも９５％同一な一次核酸配列を含むフォン・ビルブラント因子に特異的に結合するアプタマーを提供する。いくつかの実施形態において、本発明のアプタマーの％配列同一性は、ＢＬＡＳＴ配列同一性である。

【００５４】

別の実施形態において、本発明のアプタマーは、化学的改変を含んで、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９～ＡＲＣ１７８

０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）からなる群より選択される核酸配列のいずれか１つに少なくとも８０％同一、具体的には９０％同一、およびより具体的には９５％同一である、化学的改変を有する核酸配列を含む。

【００５５】

さらに別の実施形態において、本発明は、フォン・ビルブラント因子標的を結合する際に、フォン・ビルブラント因子機能を好ましくはインビボで調節し、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）の群より選択されるいずれか１つに含まれる３０の連続したヌクレオチドの配列と同一である３０の連続したヌクレオチドの配列を含むアプタマーを提供する。さらに別の実施形態において、本発明のアプタマーは、フォン・ビルブラント因子標的を結合する際に、フォン・ビルブラント因子機能を好ましくはインビボで調節し、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）の群より選択されるいずれか１つのアプタマーの特有の配列領域中の２０の連続したヌクレオチドの配列に同一である２０の連続したヌクレオチドを含む。さらに別の実施形態において、本発明のアプタマーは、フォン・ビルブラント因子標的に結合する際に、フォン・ビルブラント因子機能を好ましくはインビボで調節し、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）の群より選択されるいずれか１つのアプタマーの特有の配列領域中の８つの連続したヌクレオチドの配列に同一である８つの連続したヌクレオチドを

含む。さらに別の実施形態において、本発明のアプタマーは、フォン・ビルブラント因子標的を結合する際に、フォン・ビルブラント因子機能を好ましくはインビボで調節し、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）の群より選択されるいずれか１つのアプタマーの特有の配列領域中の４つの連続したヌクレオチドの配列に同一である４つの連続したヌクレオチドを含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【００５６】

（発明の詳細な説明）

本発明の１つ以上の実施形態の詳細を、以下の付随する説明に示す。任意の方法および物質、または本明細書中に記載されるものと同様または同等なものが本発明の実施または試験において用いられ得るが、好ましい方法および物質を、ここに説明する。本発明の他の特徴、目的および利点は、説明から明らかになろう。本明細書において、文脈から他に明らかに規定されない限りは、単数形はまた、複数も含む。他に定義されない限りは、本明細書中で用いられる全ての技術的および科学的用語は、本発明の属する分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合には、本明細書が支配する。

【００５７】

（ＳＥＬＥＸ^{TM}法）

アプタマーの生成に適した方法は、図１に一般に描写される、「試験管内進化法」（「ＳＥＬＥＸ^{TM}」）と題されたプロセスを伴う。ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセスは、標的分子に対する高度に特異的な結合を有する核酸分子のインビトロ進化のための方法であり、例えば、現在放棄されている、１９９０年６月１１日に出願された米国特許出願第０７／５３６，４２８号、「Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｌｉｇａｎｄｓ」と題された米国特許第５，４７５，０９６号、および「Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｌｉｇａｎｄｓ」と題された米国特許第５，２７０，１６３号（国際公開第９１／１９８１３号も参照）に記載されている。それぞれのＳＥＬＥＸ^{TM}同定核酸リガンド、すなわち各アプタマーは、所定の標的化合物または分子の特異的リガンドである。ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセスは、核酸が種々の二次元および三次元構造を形成するのに十分な能力、ならびにそのモノマー内で利用可能な、モノマーであれポリマーであれ実質的に任意の化合物とともにリガンドとして作用する（すなわち、特異的結合対を形成する）十分な化学的多用性を有するという、独特の洞察に基づく。任意の大きさまたは組成の分子が、標的として機能し得る。

【００５８】

ＳＥＬＥＸ^{TM}は、開始点として、ランダム化配列を含む、一本鎖オリゴヌクレオチドの大きいライブラリーまたはプールに依存する。オリゴヌクレオチドは、改変または非改変のＤＮＡ、ＲＮＡ、またはＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドであり得る。いくつかの例において、プールは、１００％ランダムまたは部分的にランダムなオリゴヌクレオチドを含む。他の例において、プールは、ランダム化配列内に組み込まれた少なくとも１つの固定配列および／または保存配列を含む、ランダムまたは部分的にランダムなオリゴヌクレオチドを含む。他の例において、プールは、５’および／または３’末端に、オリゴヌクレオチドプールの全ての分子によって共有される配列を含み得る少なくとも１つの固定および

／または保存配列を含む、ランダムまたは部分的にランダムなオリゴヌクレオチドを含む。固定配列は、さらに後に記載されるＣｐＧモチーフ、ＰＣＲプライマーのためのハイブリダイゼーション部位、ＲＮＡポリメラーゼ（例えばＴ３、Ｔ４、Ｔ７およびＳＰ６）のためのプロモーター配列、制限酵素認識部位、またはポリＡもしくはポリＴ区域等のホモポリマー配列、触媒コア、アフィニティーカラムへの選択的結合のための部位、ならびに、目的のオリゴヌクレオチドのクローニングおよび／または配列決定を容易にする他の配列等の、予め選択された目的のために組み込まれた、プール中のオリゴヌクレオチドに共通の配列である。保存配列は、同じ標的に結合する多くのアプタマーによって共有される、これまでに記載した固定配列以外の配列である。

【００５９】

プールのオリゴヌクレオチドは、好ましくは、ランダム化配列部分ならびに効率的な増幅のための固定配列を含む。典型的には、開始プールのオリゴヌクレオチドは、３０～５０のランダムなヌクレオチドの内部領域に隣接する、固定５’および３’末端配列を含む。ランダム化ヌクレオチドは、化学合成、およびランダムに切断された細胞核酸からのサイズ選択を含む多くの方法で生成され得る。試験核酸における配列変化はまた、選択／増幅の繰り返しの前または間に、変異誘発によって導入または増大され得る。

【００６０】

オリゴヌクレオチドのランダム配列部分は、任意の長さであり得、リボヌクレオチドおよび／またはデオキシリボヌクレオチドを含み得、改変もしくは非天然ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み得る。例えば、米国特許第５，９５８，６９１号、米国特許第５，６６０，９８５号、米国特許第５，９５８，９６１号、米国特許第５，６９８，６８７号、米国特許第５，８１７，６３５号、米国特許第５，６７２，６９５号およびＰＣＴ公報国際公開第９２／０７０６５号を参照のこと。ランダムオリゴヌクレオチドは、当該分野で周知の固相オリゴヌクレオチド合成技術を用いて、リン酸ジエステル結合したヌクレオチドから合成され得る。例えば、Ｆｒｏｅｈｌｅｒら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１４：５３９９～５４６７頁（１９８６年）およびＦｒｏｅｈｌｅｒら、Ｔｅｔ．Ｌｅｔｔ．２７：５５７５～５５７８頁（１９８６年）を参照のこと。ランダムオリゴヌクレオチドはまた、トリエステル合成法等の溶液相法を用いて合成され得る。例えば、Ｓｏｏｄら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．４：２５５７頁（１９７７年）およびＨｉｒｏｓｅら、Ｔｅｔ．Ｌｅｔｔ．、２８：２４４９頁（１９７８年）を参照のこと。自動化ＤＮＡ合成装置で行われる典型的な合成は、殆どのＳＥＬＥＸ^{TM}実験に十分な数である、10^{14}～10^{16}個の個別の分子を生じる。配列設計におけるランダム配列の領域が十分に大きいと、各合成された分子が特有の配列を示すであろう見込みが増大する。

【００６１】

オリゴヌクレオチドの開始ライブラリーは、ＤＮＡシンセサイザーでの自動化化学合成によって生じ得る。ランダム化配列を合成するために、４種全てのヌクレオチドの混合物を、合成プロセス中の各ヌクレオチド添加工程で添加し、ヌクレオチドのランダムな取り込みを可能にする。上述のように、ある実施形態において、ランダムオリゴヌクレオチドは、完全にランダムな配列を含む。しかしながら、他の実施形態においては、ランダムオリゴヌクレオチドは、非ランダムまたは部分的にランダムな配列の範囲を含み得る。部分的にランダムな配列は、４種のヌクレオチドを各添加工程で異なるモル比で添加することによって作製され得る。

【００６２】

オリゴヌクレオチドの開始ライブラリーは、ＲＮＡもしくはＤＮＡのいずれか、または置換ＲＮＡもしくはＤＮＡであり得る。ＲＮＡライブラリーが開始ライブラリーとして用いられる場合、開始ライブラリーは典型的には、ＤＮＡライブラリーを合成する工程、任意にＰＣＲ増幅、次いでＴ７　ＲＮＡポリメラーゼまたは改変Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを用いてＤＮＡライブラリーをインビトロで転写する工程、および転写したライブラリーを精製する工程によって生じ得る。次いで、ＲＮＡまたはＤＮＡライブラリーは、結合に適した条件下で標的と混合され、同じ一般的選択計画を用いて結合、分離および増幅の段

階的繰り返しに供され、実質的に任意の所望の基準の結合親和性および選択性が得られる。より具体的には、核酸の開始プールを含む混合物から開始すると、ＳＥＬＥＸ^{TM}法は、（ａ）結合に適した条件下で混合物を標的と接触させる工程、（ｂ）非結合核酸を、標的分子に特異的に結合した核酸から分離する工程、（ｃ）核酸－標的複合体を解離させる工程、（ｄ）核酸－標的複合体から解離した核酸を増幅して、核酸のリガンド富化混合物を生じる工程、および（ｅ）所望される程多くのサイクルを通して結合、分離、解離および増幅の工程を繰り返して、標的分子に対して高度に特異的な高親和性核酸リガンドを生じる工程を含む。ＲＮＡアプタマーが選択される場合、ＳＥＬＥＸ^{TM}法はさらに、（ｉ）工程（ｄ）の増幅の前に核酸－標的複合体から解離した核酸を逆転写する工程、および（ｉｉ）プロセスを再開する前に工程（ｄ）の増幅した核酸を転写する工程を含む。

【００６３】

多数の可能な配列および構造を含む核酸混合物内に、所定の標的に対する広範な結合親和性がある。例えば２０ヌクレオチドのランダム化セグメントを含む核酸混合物は、4^{20}の候補可能性がある。標的に対して高い方の親和性（低い方の解離定数）を有するものは、標的に結合する可能性が最も高い。分離、解離および増幅の後に、第二の核酸混合物が生成され、高い方の結合親和性候補が富化される。さらなる回の選択は、得られる核酸混合物が１つだけまたは少数の配列で大部分構成されるまで、漸進的に最良のリガンドを選択する。次いでこれらは、純粋なリガンドまたはアプタマーとして、クローニング、配列決定され得、結合親和性に関して個々に試験され得る。

【００６４】

選択および増幅のサイクルは、所望の目的が達成されるまで繰り返される。最も一般的な場合において、選択／増幅は、サイクルの繰り返しの際に結合強度の有意な向上が得られなくなるまで継続される。この方法は、典型的には、およそ10^{14}の異なる核酸種をサンプリングするのに用いられるが、約10^{18}もの異なる核酸種をサンプリングするのにも用いられ得る。一般に、核酸アプタマー分子は、５～２０サイクルの手順で選択される。ある実施形態において、異質性は、最初の選択段階でのみ導入され、複製プロセス中は起こらない。

【００６５】

ＳＥＬＥＸ^{TM}のある実施形態において、選択プロセスは、選択された標的に最も強く結合する核酸リガンドの単離において、１サイクルの選択および増幅しか必要とされない程効率的である。かかる効率的な選択は、例えば、カラムに結合した標的に核酸が結合する能力が、カラムが最も高い親和性の核酸リガンドの分離および単離を可能にすることが十分できるように機能する、クロマトグラフィー型プロセスにおいて起こり得る。

【００６６】

多くの場合、単一の核酸リガンドが同定されるまでＳＥＬＥＸ^{TM}の繰り返し工程を行うことが必ずしも好ましいわけではない。標的特異的核酸リガンド溶液は、多くの保存配列、および標的に対する核酸リガンドの親和性に有意に影響することなく置換または付加され得る多くの配列を有する、核酸構造またはモチーフのファミリーを含み得る。完了の前にＳＥＬＥＸ^{TM}プロセスを終了することによって、核酸リガンド溶液ファミリーの多くのメンバーの配列を決定することが可能である。

【００６７】

種々の核酸一次、二次および三次構造が存在することが公知である。最も一般的に非ワトソン－クリック型相互作用に関係すると示されている構造またはモチーフは、ヘアピンループ、対称および非対称バルジ、シュードノットおよびそれらの無数の組み合わせと呼ばれる。かかるモチーフの殆ど全ての公知の場合から、かかるモチーフがわずか３０ヌクレオチドの核酸配列において形成され得ることが示唆される。この理由のために、連続したランダム化セグメントを用いたＳＥＬＥＸ^{TM}手順が、約２０～約５０ヌクレオチドの間、およびいくつかの実施形態においては約３０～約４０ヌクレオチドのランダム化セグメントを含む核酸配列で開始されることが、しばしば好ましい。ある例において、５’固定：ランダム：３’固定配列は、約３０～約５０ヌクレオチドのランダム配列を含む。

【００６８】
コアＳＥＬＥＸ™法は、多くの特定の目的を達成するよう修正されてきた。例えば、米国特許第５，７０７，７９６号は、ゲル電気泳動とともにＳＥＬＥＸ™を使用して、屈曲ＤＮＡ等の特定の構造的特徴を有する核酸分子を選択することを記載している。米国特許第５，７６３，１７７号は、標的分子に結合および／または光架橋および／または標的分子を光不活化することができる光反応性基を含む核酸リガンドを選択するための、ＳＥＬＥＸ™ベースの方法を記載している。米国特許第５，５６７，５８８号および米国特許第５，８６１，２５４号は、標的分子に対して高および低親和性を有するオリゴヌクレオチドの間の高度に効率的な分離を達成するＳＥＬＥＸ™ベースの方法を記載している。米国特許第５，４９６，９３８号は、ＳＥＬＥＸ™プロセスを行った後に改良された核酸リガンドを得るための方法が記載している。米国特許第５，７０５，３３７号は、リガンドをその標的に共有結合させる方法を記載している。

【００６９】
ＳＥＬＥＸ™を用いて、標的分子の１つより多い部位に結合する核酸リガンドを得ること、および標的の特異的部位に結合する非核酸種を含む核酸リガンドを得ることもできる。ＳＥＬＥＸ™は、核酸結合タンパク質およびその生物学的機能の一部として核酸に結合することが知られていないタンパク質ならびに補因子および他の小分子等の大きなおよび小さな生体分子を含む任意の想像可能な標的に結合する核酸リガンドを単離および同定する手段を提供する。例えば、米国特許第５，５８０，７３７号は、カフェインおよび密接に関連するアナログであるテオフィリンに高い親和性で結合可能である、ＳＥＬＥＸ™を通じて同定された核酸配列を開示している。

【００７０】
カウンターＳＥＬＥＸ™は、１つ以上の非標的分子に対する交差反応性を有する核酸リガンド配列を排除することによって、標的分子に対する核酸リガンドの特異性を向上させる方法である。カウンターＳＥＬＥＸ™は、（ａ）核酸の候補混合物を調製する工程、（ｂ）候補混合物を標的に接触させる工程であって、ここで候補混合物に関して標的に対する増大した親和性を有する核酸が残りの候補混合物から分離され得る工程、（ｃ）増大した親和性の核酸を残りの候補混合物から分離する工程、（ｄ）増大した親和性の核酸を標的から解離させる工程、（ｅ）非標的分子に対する特異的親和性を有する核酸リガンドが除去されるように、増大した親和性の核酸を１つ以上の非標的分子と接触させる工程、および（ｆ）標的分子に対してのみ特異的親和性を有する核酸を増幅して、標的分子への結合に関して比較的より高い親和性および特異性を有する核酸配列が富化された核酸の混合物を生じる工程で構成される。ＳＥＬＥＸ™に関して上述したように、選択および増幅のサイクルは、所望の目的が達成されるまで、必要に応じて繰り返される。

【００７１】
治療剤およびワクチンとしての核酸の使用において遭遇する、ある潜在的問題は、オリゴヌクレオチドは、そのホスホジエステル形態において、所望の効果が現れる前に体液中でエンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼ等の細胞内および細胞外酵素によって急速に分解され得るということである。このため、ＳＥＬＥＸ™法は、向上したインビボ安定性または向上した送達特性等の向上した特徴をリガンドに与える改変ヌクレオチドを含む高親和性核酸リガンドの同定を包含する。かかる改変の例としては、糖および／またはリン酸および／または塩基部分での化学的置換が挙げられる。改変ヌクレオチドを含むＳＥＬＥＸ™同定核酸リガンドは、例えば、リボースの２’位、ピリミジンの５位、およびプリンの８位に化学的に改変されたヌクレオチド誘導体を含むオリゴヌクレオチドを記載している米国特許第５，６６０，９８５号、種々の２’改変ピリミジンを含むオリゴヌクレオチドを記載している米国特許第５，７５６，７０３号、ならびに２’－アミノ（２’－NH_2）、２’－フルオロ（２’－Ｆ）、および／または２’－ＯＭｅ置換で改変された１つ以上のヌクレオチドを含む高度に特異的な核酸リガンドを記載している米国特許第５，５８０，７３７号に記載されている。

【００７２】

本発明において企図される核酸リガンドの改変としては、核酸リガンド塩基または核酸リガンド全体にさらなる電荷、分極率、疎水性、水素結合、静電的相互作用および流動性を組み込む他の化学基を提供するものが挙げられるが、これらに限定されない。ヌクレアーゼに耐性のあるオリゴヌクレオチド集団を生じるための改変としてはまた、１つ以上の置換ヌクレオチド間結合、変化した糖、変化した塩基またはそれらの組み合わせを挙げることもできる。かかる改変としては、２’位糖改変、５位ピリミジン改変、８位プリン改変、環外アミンでの改変、４－チオウリジンの置換、５－ブロモまたは５－ヨード－ウラシルの置換、バックボーン置換、ホスホロチオエートまたはリン酸アルキル改変、メチル化、およびアイソベースであるイソシチジンおよびイソグアニジン等の変わった塩基対形成の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。改変としてはまた、キャッピング等の３’および５’改変も挙げることができる。

【００７３】

ある実施形態において、Ｐ（Ｏ）Ｏ基がＰ（Ｏ）Ｓ（「チオエート」）、Ｐ（Ｓ）Ｓ（「ジチオエート」）、Ｐ（Ｏ）NR_2（「アミデート」）、Ｐ（Ｏ）Ｒ、Ｐ（Ｏ）ＯＲ’、ＣＯまたはCH_2（「ホルムアセタル」）または３’－アミン（－ＨＨ－CH_2－CH_2－）によって置換されたオリゴヌクレオチドが提供され、ここで各ＲまたはＲ’は、独立して、Ｈ、または置換もしくは非置換アルキルである。－Ｏ－、－Ｎ－または－Ｓ－結合を介して、隣接するヌクレオチドに連結基を付与し得る。オリゴヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。本明細書中で使用される場合、用語ホスホロチオエートは、１つ以上の硫黄原子で置換された、ホスホロジエステル結合中の１つ以上の非架橋酸素原子を包含する。

【００７４】

さらなる実施形態において、オリゴヌクレオチドは、改変糖基を含み、例えば、ヒドロキシル基の１つ以上がハロゲン、脂肪族基と置換されるか、またはエーテルもしくはアミンとして官能化される。ある実施形態において、フラノース残基の２’位が、Ｏ－メチル、Ｏ－アルキル、Ｏ－アリル、Ｓ－アルキル、Ｓ－アリルまたはハロ基のいずれかによって置換される。２’改変糖の合成の方法は、例えば、Ｓｐｒｏａｔら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．１９：７３３～７３８頁（１９９１年）、Ｃｏｔｔｅｎら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．１９：２６２９～２６３５頁（１９９１年）、およびＨｏｂｂｓら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　１２：５１３８～５１４５頁（１９７３年）に記載されている。他の改変は、当業者に公知である。かかる改変は、ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス前改変もしくはＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス後改変（これまでに同定された未改変リガンドの改変）であり得るか、またはＳＥＬＥＸ^{TM}プロセスへの組み込みによってなされ得る。

【００７５】

ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス前改変、またはＳＥＬＥＸプロセスへの組み込みによってなされるものは、そのＳＥＬＥＸ^{TM}標的に対する特異性および向上した安定性、例えばインビボ安定性の、両方を有する核酸リガンドを生じる。核酸リガンドに対してなされるＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス後改変は、核酸リガンドの結合能力に有害に影響することなく、結果として、向上した安定性、例えばインビボ安定性を生じ得る。

【００７６】

ＳＥＬＥＸ^{TM}法は、米国特許第５，６３７，４５９号および米国特許第５，６８３，８６７号に記載されるように、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および非オリゴヌクレオチド機能単位と組み合わせる工程を包含する。ＳＥＬＥＸ^{TM}法はさらに、例えば米国特許第６，０１１，０２０号、米国特許第６，０５１，６９８号およびＰＣＴ公報国際公開第９８／１８４８０号に記載されるように、選択された核酸リガンドを、診断または処置複合体中で親油性または非免疫原性高分子量化合物と組み合わせる工程を包含する。これらの特許および出願は、広範な形態および他の特性と、オリゴヌクレオチドの効率的な増幅および複製特性ならびに他の分子の所望の特性との組み合わせを教示している。

【００７７】

ＳＥＬＥＸ™法を介した、小さく柔軟性のあるペプチドに対する核酸リガンドの同定もまた、調査されている。小ペプチドは、柔軟な構造を有し、通常は複数の配座異性体の平衡で溶液中に存在し、そのため最初は、結合親和性が、柔軟性のあるペプチドの結合の際に失われる配座エントロピーによって制限され得ると考えられていた。しかしながら、溶液中の小ペプチドに対する核酸リガンドを同定することの実行可能性が、１１アミノ酸ペプチドである物質Ｐに対する高親和性ＲＮＡ核酸リガンドが同定された米国特許第５，６４８，２１４号において示された。

【００７８】

本発明の標的に対する特異性および結合親和性を有するアプタマーは、典型的には、本明細書中に記載されるようなＳＥＬＥＸ™プロセスによって選択される。ＳＥＬＥＸ™プロセスの一部として、標的に結合するよう選択された配列は、次いで任意に、所望の結合親和性を有する最小の配列を決定するように最小化される。選択されたアプタマー配列および／または最小化されたアプタマー配列は、任意に、配列のランダムまたは部位特異的変異誘発を行うことによって最適化されて、結合親和性を増大させるか、あるいは配列中のどの位置が結合活性に必須であるかを決定する。例えば、「ドープ再選択」を用いて、アプタマー内の配列要件を調査し得る。ドープ再選択の間に、単一の配列に基づいて設計された合成の縮合プールを用いて選択が行われる。縮合のレベルは、通常、７０％～８５％野生型ヌクレオチドで変化する。一般に、ドープ再選択の後、中立突然変異が観察されるが、いくつかの場合においては、配列変化は、結果として親和性の向上をもたらし得る。さらに、改変配列を組み込む配列を用いて選択を行い、インビボの分解に対してアプタマー分子を安定化させ得る。

【００７９】

（２’改変ＳＥＬＥＸ™）

アプタマーが処置としての使用に適するように、これは好ましくは合成するのが高価ではなく、インビボで安全および安定である。野生型ＲＮＡおよびＤＮＡアプタマーは、ヌクレアーゼによる分解に対するその感受性のために、典型的にはインビボで安定でない。ヌクレアーゼ分解に対する耐性は、所望により、２’位での改変基の組み込みにより、大きく増大し得る。

【００８０】

２’－フルオロおよび２’－アミノ基は、その後アプタマーが選択されるオリゴヌクレオチドライブラリーへの、組み込みが成功している。しかしながら、これらの改変は、得られるアプタマーの合成のコストを大きく増大させ、いくつかの場合においては、改変ヌクレオチドが改変オリゴヌクレオチドの分解およびそれに続くＤＮＡ合成のための基質としてのヌクレオチドの使用によって宿主ＤＮＡに回収され得る可能性のために、安全性に対する懸念を導き得る。

【００８１】

２’－Ｏ－メチル（「２’－ＯＭｅ」）ヌクレオチドを含むアプタマーは、本明細書中のいくつかの実施形態において提供されるように、これらの欠点の多くを克服する。２’－ＯＭｅヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ耐性であり、合成するのが安価である。２’－ＯＭｅヌクレオチドは生物系に遍在するが、天然のポリメラーゼは、生理的条件下で２’－ＯＭｅ　ＮＴＰを基質として受け入れず、そのため、宿主ＤＮＡへの２’－ＯＭｅヌクレオチドの回収の安全性の懸念がない。２’－改変アプタマーの生成に用いられるＳＥＬＥＸ™法は、例えば、２００２年１２月３日に出願された米国仮特許出願第６０／４３０，７６１号、２００３年７月１５日出願の米国仮特許出願第６０／４８７，４７４号、２００３年１１月４日出願の米国仮特許出願第６０／５１７，０３９号、２００３年１２月３日出願の米国特許出願第１０／７２９，５８１号、「Ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ ｉｎ ｖｉｔｒｏ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ２’－ＯＭｅ Ｓｕｂｓｔｉｔｕｔｅｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ」と題された２００４年６月２１日出願の米国特許出願第１０／８７３，８５６号、および「Ｉｍｐｒｏｖｅｄ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｆｕｌ

ｌｙ ２’－Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｓ」と題された２００５年６月３０日出願の米国仮特許出願第６０／６９６，２９５号に記載されており、そのそれぞれは、全体が参照によって本明細書中に援用される。

【００８２】

本発明は、酵素的および化学的分解ならびに熱的および物理的分解に対してオリゴヌクレオチドを未改変オリゴヌクレオチドよりも安定にするための改変ヌクレオチド（例えば、２’位に改変を有するヌクレオチド）を含む、フォン・ビルブラント因子に結合し、その機能を調節するアプタマーを含む。文献において、いくつかの２’－ＯＭｅ含有アプタマーの例があるが（例えばＲｕｃｋｍａｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ、１９９８年２７３、２０５５６～２０５６７～６９５参照）、これらは、ＣおよびＵ残基が２’－フルオロ（２’－Ｆ）置換されＡおよびＧ残基が２’－ＯＨである改変転写産物のライブラリーのインビトロセレクションによって生じた。一旦機能的配列が同定されると、次いで各ＡおよびＧ残基が２’－ＯＭｅ置換に対する耐性に関して試験され、アプタマーは２’－ＯＭｅ残基としての２’－ＯＭｅ置換に耐性のあった全てのＡおよびＧ残基を有して再合成された。この２段階様式で生じたアプタマーのＡおよびＧ残基の殆どは、２’－ＯＭｅ残基での置換に耐性があるが、平均して、およそ２０％は耐性がない。結果として、この方法を用いて生じたアプタマーは、２～４個の２’－ＯＨ残基を含む傾向があり、安全性および合成のコストは、結果として損なわれる。ＳＥＬＥＸ^{TM}（および／または本明細書中に記載されるものを含む、その変形および改良のいずれか）によってアプタマーが選択および富化されるオリゴヌクレオチドライブラリーに用いられる安定化オリゴヌクレオチドを生じる転写反応に、改変ヌクレオチドを組み込むことによって、本発明の方法は、（例えばアプタマーオリゴヌクレオチドを改変ヌクレオチドで再合成することによって）選択されたアプタマーオリゴヌクレオチドを安定化させる必要性を排除する。

【００８３】

ある実施形態において、本発明は、ＡＴＰ、ＧＴＰ、ＣＴＰ、ＴＴＰおよびＵＴＰヌクレオチドの２’－ＯＨ、２’－Ｆ、２’－デオキシおよび２’－ＯＭｅ改変の組み合わせ含むアプタマーを提供する。別の実施形態において、本発明は、ＡＴＰ、ＧＴＰ、ＣＴＰ、ＴＴＰおよびＵＴＰヌクレオチドの２’－ＯＨ、２’－Ｆ、２’－デオキシ、２’－ＯＭｅ、２’－NH_2および２’－メトキシエチル改変の組み合わせを含むアプタマーを提供する。別の実施形態において、本発明は、ＡＴＰ、ＧＴＰ、ＣＴＰ、ＴＴＰおよびＵＴＰヌクレオチドの２’－ＯＨ、２’－Ｆ、２’－デオキシ、２’－ＯＭｅ、２’－NH_2および２’－メトキシエチル改変の5^6の組み合わせを含むアプタマーを提供する。

本発明のいくつかの実施形態の２’改変アプタマーは、フラノース２’位にかさ高い置換基を有する改変ヌクレオチドの取り込みの速度が野生型ポリメラーゼよりも速い、改変されたポリメラーゼ、例えば改変Ｔ７ポリメラーゼを用いて作製される。例えば、６３９位のチロシン残基がフェニルアラニンに変化している単一変異Ｔ７ポリメラーゼ（Ｙ６３９Ｆ）は、２’デオキシ、２’アミノ－および２’フルオロ－ヌクレオチド三リン酸（ＮＴＰ）を基質として容易に利用し、種々の適用のための改変ＲＮＡの合成に広く用いられている。しかしながら、この変異Ｔ７ポリメラーゼは、報告によれば、２’－ＯＭｅまたは２’－アジド（２’－N_3）置換基等のかさ高い２’－置換基を有するＮＴＰを容易に利用（すなわち取り込み）できない。かさ高い２’置換基の取り込みのために、Ｙ６３９Ｆ変異に加えてアラニン残基に変化した７８４位のヒスチジンを有する二重Ｔ７ポリメラーゼ変異体（Ｙ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ）が記載されており、限られた環境において、改変ピリミジンＮＴＰの取り込みに使用されている。Ｐａｄｉｌｌａ，Ｒ．およびＳｏｕｓａ，Ｒ．、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、２００２年、３０（２４）：１３８頁を参照のこと。Ｙ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ／Ｋ３７８Ｒ変異Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼは、限られた環境において、改変プリンおよびピリミジンＮＴＰ、例えば２’－ＯＭｅ ＮＰＴの取り込みに使用されているが、転写に２’－ＯＨ ＧＴＰのスパイクを必要とする。Ｂｕｒｍｅｉｓｔｅｒら、Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｙ、２００５年、１

２：２５～３３頁を参照のこと。アラニン残基に変化した７８４位のヒスチジンを有する単一変異Ｔ７ポリメラーゼ（Ｈ７８４Ａ）もまた記載されている。Ｐａｄｉｌｌａら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、２００２年、３０：１３８頁を参照のこと。Ｙ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ二重変異体およびＨ７８４Ａ単一変異Ｔ７ポリメラーゼの両方において、アラニン等の、より小さいアミノ酸残基への変化によって、よりかさ高いヌクレオチド基質、例えば２’－Ｏメチル置換ヌクレオチドの取り込みが可能になる。Ｃｈｅｌｌｉｓｅｒｒｙ，Ｋ．およびＥｌｌｉｎｇｔｏｎ，Ａ．Ｄ．、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ、２００４年、９：１１５５～６０頁を参照のこと。さらなるＴ７ ＲＮＡポリメラーゼが、かさ高い２’－改変基質をより容易に取り込むＴ７ ＲＮＡポリメラーゼの活性部位における変異、例えばロイシンに変化した６３９位のチロシン残基（Ｙ６３９Ｌ）を有する単一Ｔ７変異ＲＮＡポリメラーゼとともに記載されている。しかしながら、かかる変異によって付与された増大した基質特異性のために、活性はしばしば犠牲になり、低い転写産物収量をもたらす。Ｐａｄｉｌｌａ ＲおよびＳｏｕｓａ，Ｒ．、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１９９９年、２７（６）：１５６１頁を参照のこと。

【００８４】

一般に、本明細書中に開示される条件下では、Ｙ６９３Ｆ単一変異体は、ＧＴＰを除く全ての２’－ＯＭｅ置換ＮＴＰの取り込みに用いられ得ることがわかっており、Ｙ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ、Ｙ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ／Ｋ３７８Ｒ、Ｙ６３９Ｌ／Ｈ７８４ＡおよびＹ６３９Ｌ／Ｈ７８４Ａ／Ｋ３７８Ｒ変異Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼはＧＴＰを含む全ての２’－ＯＭｅ置換ＮＴＰの取り込みに用いられ得る。Ｈ７８４Ａ単一変異体は、本明細書中に開示される条件下で用いられる場合、Ｙ６３９ＦおよびＹ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ変異体と同様の特性を有することが期待される。

２’改変オリゴヌクレオチドは、改変ヌクレオチドで完全に合成されるか、または改変ヌクレオチドの一部で合成され得る。全てのヌクレオチドが改変され得、全てが同じ改変を含み得る。全てのヌクレオチドが改変され得るが、異なる改変を含み得、例えば同じ塩基を含む全てのヌクレオチドが１つの型の改変を有し得る一方で、他の塩基を含むヌクレオチドが異なる型の改変を有し得る。全てのプリンヌクレオチドが１つの型の改変を有し得る（または未改変である）一方で、全てのピリミジンヌクレオチドは別の、異なる型の改変を有し得る（または未改変である）。このように、転写産物、または転写産物のライブラリーは、例えばリボヌクレオチド（２’－ＯＨ）、デオキシリボヌクレオチド（２’－デオキシ）、２’－Ｆおよび２’－ＯＭｅヌクレオチドを含む任意の組み合わせの改変を用いて生じる。２’－ＯＭｅ ＣおよびＵならびに２’－ＯＨ ＡおよびＧを含む転写混合物は、「ｒＲｍＹ」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアプタマーは、「ｒＲｍＹ」アプタマーと呼ばれる。デオキシＡおよびＧならびに２’－ＯＭｅ ＵおよびＣを含む転写混合物は「ｄＲｍＹ」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアプタマーは、「ｄＲｍＹ」アプタマーと呼ばれる。２’－ＯＭｅ Ａ、ＣおよびＵならびに２’－ＯＨ Ｇを含む転写混合物は「ｒＧｍＨ」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアプタマーは、「ｒＧｍＨ」アプタマーと呼ばれる。２’－ＯＭｅ Ａ、Ｃ、ＵおよびＧならびに２’－ＯＭｅ Ａ、ＵおよびＣならびに２’－Ｆ Ｇを交互に含む転写混合物は「交互混合物」と呼ばれ、そこから選択されたアプタマーは、「交互混合物」アプタマーと呼ばれる。２’－ＯＭｅ Ａ、Ｕ、ＣおよびＧを含み、１０％までのＧがリボヌクレオチドである転写混合物は「ｒ／ｍＧｍＨ」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアプタマーは、「ｒ／ｍＧｍＨ」アプタマーと呼ばれる。２’－ＯＭｅ Ａ、ＵおよびＣならびに２’－Ｆ Ｇを含む転写混合物は「ｆＧｍＨ」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアプタマーは、「ｆＧｍＨ」アプタマーと呼ばれる。２’－ＯＭｅ Ａ、ＵおよびＣならびにデオキシＧを含む転写混合物は「ｄＧｍＨ」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアプタマーは、「ｄＧｍＨ」アプタマーと呼ばれる。デオキシＡならびに２’－ＯＭｅ Ｃ、ＧおよびＵを含む転写混合物は「ｄＡｍＢ」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアプタマーは、「ｄＡｍＢ」アプタマーと呼ばれ、全ての２’－ＯＨヌクレオチドを含む転写混合物は「ｒＮ」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアプタマーは、「ｒＮ」、「ｒＲｒＹ」または「ＲＮＡ」アプ

タマーと呼ばれる。２’－ＯＨアデノシン三リン酸およびグアノシン三リン酸およびデオキシシチジン三リン酸およびチミジン三リン酸を含む転写混合物はｒＲｄＹ混合物と呼ばれ、そこから選択されたアプタマーは、「ｒＲｄＹ」アプタマーと呼ばれる。「ｍＲｍＹ」アプタマーは、２’－ヒドロキシである開始ヌクレオチドを除いて２’－ＯＭｅヌクレオチドのみを含むものである。

【００８５】

好ましい実施形態は、２’－ＯＨ、２’－デオキシおよび２’－ＯＭｅヌクレオチドの任意の組み合わせを含む。別の実施形態は、２’－デオキシおよび２’－ＯＭｅヌクレオチドの任意の組み合わせを含む。さらに別の実施形態は、ピリミジンが２’－ＯＭｅである、２’－デオキシおよび２’－ＯＭｅヌクレオチドの（ｄＲｍＹ、ｍＲｍＹまたはｄＧｍＨ等の）任意の組み合わせを含む。

【００８６】

本発明のアプタマーへの改変ヌクレオチドの取り込みは、選択プロセスの前（選択プロセス前）に達成され得る（例えばＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス前改変）。任意に、ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス前改変によって改変ヌクレオチドが取り込まれた本発明のアプタマーが、ＳＥＬＥＸ^{TM}改変後プロセス（すなわち、ＳＥＬＥＸ^{TM}前改変の後のＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス後改変）によってさらに改変され得る。ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス前改変は、ＳＥＬＥＸ^{TM}標的に対する特異性および向上したインビボ安定性も有する改変核酸リガンドを生じる。ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス後改変、すなわち改変（例えば、トランケーション、欠失、置換、または、これまでに同定された、ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス前改変によって取り込まれたヌクレオチドを有するリガンドの、さらなるヌクレオチド改変）は、ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス前改変によって取り込まれたヌクレオチドを有する核酸リガンドの結合能力に有害に影響することなく、結果として、インビボ安定性のさらなる向上をもたらし得る。

【００８７】

ポリメラーゼが２’－改変ＮＴＰを受け入れる条件において２’－改変（例えば２’－ＯＭｅ）ＲＮＡ転写産物のプールを生じるために、Ｙ６９３Ｆ、Ｙ６９３Ｆ／Ｋ３７８Ｒ、Ｙ６９３Ｆ／Ｈ７８４Ａ、Ｙ６９３Ｆ／Ｈ７８４Ａ／Ｋ３７８Ｒ、Ｙ６９３Ｌ／Ｈ７８４Ａ、Ｙ６９３Ｌ／Ｈ７８４Ａ／Ｋ３７８Ｒ　Ｙ６３９Ｌ、またはＹ６３９Ｌ／Ｋ３７８Ｒ変異Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼが使用され得る。好ましいポリメラーゼは、Ｙ６３９Ｌ／Ｈ７８４Ａ変異Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼである。別の好ましいポリメラーゼは、Ｙ６３９Ｌ／Ｈ７８４Ａ／Ｋ３７８Ｒ変異Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼである。他のＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ、特にかさ高い２’－置換基に高い耐性を示すものもまた、本発明において使用され得る。本明細書中に開示される条件を用いた鋳型特異的重合において使用される場合、Ｙ６３９Ｌ／Ｈ７８４ＡまたはＹ６３９Ｌ／Ｈ７８４Ａ／Ｋ３７８Ｒ変異Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼが、Ｙ６３９Ｆ、Ｙ６３９Ｆ／Ｋ３７８Ｒ、Ｙ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ、Ｙ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ／Ｋ３７８Ｒ、Ｙ６３９ＬまたはＹ６３９Ｌ／Ｋ３７８Ｒ変異Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを用いることによって達成されるよりも高い転写産物収量で、ＧＴＰを含む全ての２’－ＯＭｅ　ＮＴＰの取り込みに使用され得る。Ｙ６３９Ｌ／Ｈ７８４ＡおよびＹ６３９Ｌ／Ｈ７８４Ａ／Ｋ３７８Ｒ変異Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを使用し得るが、高収量の２’－改変、例えば２’－ＯＭｅ含有オリゴヌクレオチドを達成するのに２’－ＯＨ　ＧＴＰを必要としない。

【００８８】

多くの因子が、本明細書中に開示される方法において有用な転写条件に重要であると決定されている。例えば、リーダー配列がＤＮＡ転写鋳型の５’末端に組み込まれた場合に、改変転写産物の収量の増加が観察される。リーダー配列は、典型的には６～１５ヌクレオチド長であり、全てプリン、またはプリンおよびピリミジンヌクレオチドの混合物から構成され得る。

【００８９】

転写は２つの期に分けられ得る。第一期は開始であり、この間にＮＴＰがＧＴＰ（また

は別の置換グアノシン）の３’－ヒドロキシル末端に付加され、次いで約１０～１２ヌクレオチド伸長されるジヌクレオチドを生じる。第二期は伸長であり、この間に第一の約１０～１２ヌクレオチドの付加の範囲を超えて、転写が進行する。過剰な２’－ＯＭｅ　ＧＴＰを含む転写混合物に添加された少量の２’－ＯＨ　ＧＴＰは、ポリメラーゼが２’－ＯＨ　ＧＴＰを用いて転写を開始するのを可能にするのに十分であることが分かっているが、一旦転写が伸長期に入ると、２’－ＯＭｅと２’－ＯＨ　ＧＴＰとの間の減少した区別、および２’－ＯＨ　ＧＴＰより過剰な２’－ＯＭｅ　ＧＴＰによって、主として２’－ＯＭｅ　ＧＴＰの取り込みが可能になる。

【００９０】

転写産物への２’－ＯＭｅ置換ヌクレオチドの取り込みにおける別の重要な因子は、転写混合物中の二価マグネシウムおよびマンガンの両方の使用である。塩化マグネシウムおよび塩化マンガンの異なる組み合わせの濃度が２’－Ｏ－メチル化転写産物の収量に影響し、二価金属イオンを複合体化するＮＴＰの転写反応混合物中の濃度に塩化マグネシウムおよび塩化マンガンの最適濃度が依存することが分かっている。最大限２’－Ｏ－メチル化された転写産物（すなわち、全ての２’－ＯＭｅ　Ａ、ＣおよびＵならびに約９０％のＧヌクレオチド）の最も高い収量を得るために、各ＮＴＰが０．５ｍＭの濃度で存在する場合、およそ５ｍＭの塩化マグネシウム濃度および１．５ｍＭの塩化マンガン濃度が好ましい。各ＮＴＰの濃度が１．０ｍＭの場合、およそ６．５ｍＭの塩化マグネシウム濃度および２．０ｍＭの塩化マンガン濃度が好ましい。各ＮＴＰの濃度が２．０ｍＭの場合、およそ９．５ｍＭの塩化マグネシウム濃度および３．０ｍＭの塩化マンガン濃度が好ましい。いずれの場合においても、これらの濃度からの２倍までの逸脱も、相当な量の改変転写産物を生じる。

【００９１】

ＧＭＰもしくはグアノシン、または別の非２’－ＯＭｅ非三リン酸で転写をプライミングすることもまた、重要である。この効果は、開始するヌクレオチドに対するポリメラーゼの特異性から生じる。その結果、この様式で生じる任意の転写産物の５’末端ヌクレオチドは、２’－ＯＨ　Ｇである可能性が高い。ＧＭＰ（またはグアノシン）の好ましい濃度は０．５ｍＭ、さらにより好ましくは１ｍＭである。転写反応にＰＥＧ、好ましくはＰＥＧ－８０００を含むことが改変ヌクレオチドの取り込みを最大化するのに有用であることもまた、わかっている。

【００９２】

転写産物への２’－ＯＭｅ　ＡＴＰ（１００％）、ＵＴＰ（１００％）、ＣＴＰ（１００％）およびＧＴＰ（～９０％）（「ｒ／ｍＧｍＨ」）の最大の取り込みのためには、以下の濃度が好ましい：ＨＥＰＥＳバッファー２００ｍＭ、ＤＴＴ　４０ｍＭ、スペルミジン２ｍＭ、ＰＥＧ－８０００　１０％（ｗ／ｖ）、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００　０．０１％（ｗ／ｖ）、$MgCl_2$　５ｍＭ（各２’－ＯＭｅ　ＮＴＰの濃度が１．０ｍＭの場合、６．５ｍＭ）、$MnCl_2$　１．５ｍＭ（各２’－ＯＭｅ　ＮＴＰの濃度が１．０ｍＭの場合、２．０ｍＭ）、２’－ＯＭｅ　ＮＴＰ（それぞれ）５００μＭ（より好ましくは１．０ｍＭ）、２’－ＯＨ　ＧＴＰ　３０μＭ、２’－ＯＨ　ＧＭＰ　５００μＭ、ｐＨ７．５、Ｙ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ　Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ２００ｎＭ、無機ピロホスファターゼ５単位／ｍｌ、および少なくとも８ヌクレオチド長の全てプリンのリーダー配列。本明細書中で使用される場合、Ｙ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ変異Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ（または本明細書中で特定される任意の他の変異Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ）の１単位は、ｒ／ｍＧｍＨ条件下で１ナノモルの２’－ＯＭｅ　ＮＴＰを転写産物に取り込むのに必要とされる酵素の量として定義される。本明細書中で使用される場合、無機ピロホスファターゼの１単位は、ｐＨ７．２および２５℃で１分あたりに１．０モルの無機正リン酸塩を遊離させる酵素の量として定義される。

【００９３】

転写産物への２’－ＯＭｅ　ＡＴＰ、ＵＴＰおよびＣＴＰ（「ｒＧｍＨ」）の最大の取り込み（１００％）のためには、以下の条件が好ましい：ＨＥＰＥＳバッファー２００ｍ

M、ＤＴＴ　４０ｍＭ、スペルミジン２ｍＭ、ＰＥＧ－８０００　１０％（ｗ／ｖ）、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００　０．０１％（ｗ／ｖ）、$MgCl_2$　５ｍＭ（各２’－ＯＭｅ　ＮＴＰの濃度が２．０ｍＭの場合、９．５ｍＭ）、$MnCl_2$　１．５ｍＭ（各２’－ＯＭｅ　ＮＴＰの濃度が２．０ｍＭの場合、３．０ｍＭ）、２’－ＯＭｅ　ＮＴＰ（それぞれ）５００μＭ（より好ましくは２．０ｍＭ）、ｐＨ７．５、Ｙ６３９Ｆ　Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ２００ｎＭ、無機ピロホスファターゼ５単位／ｍｌ、および少なくとも８ヌクレオチド長の全てプリンのリーダー配列。

【００９４】

転写産物への２’－ＯＭｅ　ＡＴＰ（１００％）、２’－ＯＭｅ　ＵＴＰ（１００％）、２’－ＯＭｅ　ＣＴＰ（１００％）および２’－ＯＭｅ　ＧＴＰ（１００％）（「ｍＲｍＹ」）の最大の取り込みのためには、以下の条件が好ましい：ＨＥＰＥＳバッファー２００ｍＭ、ＤＴＴ４０ｍＭ、スペルミジン２ｍＭ、ＰＥＧ－８０００　１０％（ｗ／ｖ）、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００　０．０１％（ｗ／ｖ）、$MgCl_2$　８ｍＭ、$MnCl_2$　２．５ｍＭ、２’－ＯＭｅ　ＮＴＰ（それぞれ）１．５ｍＭ、２’－ＯＨ　ＧＭＰ　１ｍＭ、ｐＨ７．５、Ｙ６３９Ｌ／Ｈ７８４Ａ／Ｋ３７８Ｒ変異Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ２００ｎＭ、無機ピロホスファターゼ５単位／ｍｌ、および導かれる転写条件下で転写収量を増大させるリーダー配列。ある実施形態において、リーダー配列は、全プリンリーダー配列である。別の実施形態において、リーダー配列は、プリンおよびピリミジンの混合物である。本明細書中で使用される場合、無機ピロホスファターゼの１単位は、ｐＨ７．２および２５℃で１分あたりに１．０モルの無機正リン酸塩を遊離させる酵素の量として定義される。

【００９５】

転写産物への２’－ＯＭｅ　ＵＴＰおよびＣＴＰ（「ｒＲｍＹ」）の最大の取り込み（１００％）のためには、以下の条件が好ましい：ＨＥＰＥＳバッファー２００ｍＭ、ＤＴＴ　４０ｍＭ、スペルミジン２ｍＭ、ＰＥＧ－８０００　１０％（ｗ／ｖ）、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００　０．０１％（ｗ／ｖ）、$MgCl_2$　５ｍＭ（各２’－ＯＭｅ　ＮＴＰの濃度が２．０ｍＭの場合、９．５ｍＭ）、$MnCl_2$　１．５ｍＭ（各２’－ＯＭｅ　ＮＴＰの濃度が２．０ｍＭの場合、３．０ｍＭ）、２’－ＯＭｅ　ＮＴＰ（それぞれ）５００μＭ（より好ましくは２．０ｍＭ）、ｐＨ７．５、Ｙ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ　Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ２００ｎＭ、無機ピロホスファターゼ５単位／ｍｌ、および少なくとも８ヌクレオチド長の全てプリンのリーダー配列。

【００９６】

転写産物へのデオキシＡＴＰおよびＧＴＰならびに２’－ＯＭｅ　ＵＴＰおよびＣＴＰ（「ｄＲｍＹ」）の最大の取り込み（１００％）のためには、以下の条件が好ましい：ＨＥＰＥＳバッファー２００ｍＭ、ＤＴＴ　４０ｍＭ、スペルミン２ｍＭ、スペルミジン２ｍＭ、ＰＥＧ－８０００　１０％（ｗ／ｖ）、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００　０．０１％（ｗ／ｖ）、$MgCl_2$　９．５ｍＭ、$MnCl_2$　３．０ｍＭ、２’－ＯＭｅ　ＮＴＰ（それぞれ）２．０ｍＭ、ｐＨ７．５、Ｙ６３９Ｆ　Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ２００ｎＭ、無機ピロホスファターゼ５単位／ｍｌ、および少なくとも８ヌクレオチド長の全てプリンのリーダー配列。

【００９７】

転写産物への２’－ＯＭｅ　ＡＴＰ、ＵＴＰおよびＣＴＰならびに２’－Ｆ　ＧＴＰ（「ｆＧｍＨ」）の最大の取り込み（１００％）のためには、以下の条件が好ましい：ＨＥＰＥＳバッファー２００ｍＭ、ＤＴＴ４０ｍＭ、スペルミジン２ｍＭ、ＰＥＧ－８０００　１０％（ｗ／ｖ）、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００　０．０１％（ｗ／ｖ）、$MgCl_2$　９．５ｍＭ）、$MnCl_2$　３．０ｍＭ、２’－ＯＭｅ　ＮＴＰ（それぞれ）２．０ｍＭ、ｐＨ７．５、Ｙ６３９Ｆ　Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ２００ｎＭ、無機ピロホスファターゼ５単位／ｍｌ、および少なくとも８ヌクレオチド長の全てプリンのリーダー配列。

【００９８】

転写産物へのデオキシＡＴＰならびに２’－ＯＭｅ　ＵＴＰ、ＧＴＰおよびＣＴＰ（「

ｄＡｍＢ」）の最大の取り込み（１００％）のためには、以下の条件が好ましい：ＨＥＰＥＳバッファー２００ｍＭ、ＤＴＴ４０ｍＭ、スペルミジン２ｍＭ、ＰＥＧ－８０００１０％（ｗ／ｖ）、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００　０．０１％（ｗ／ｖ）、$MgCl_2$　９．５ｍＭ、$MnCl_2$　３．０ｍＭ、２’－ＯＭｅ　ＮＴＰ（それぞれ）２．０ｍＭ、ｐＨ７．５、Ｙ６３９Ｆ　Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ２００ｎＭ、無機ピロホスファターゼ５単位／ｍｌ、および少なくとも８ヌクレオチド長の全てプリンのリーダー配列。

【００９９】

上述のそれぞれについて、（ａ）転写は、好ましくは、約２０℃～約５０℃、好ましくは約３０℃～４５℃、およびより好ましくは約３７℃の温度で、少なくとも２時間の間行われ、そして（ｂ）５０～３００ｎＭの二本鎖ＤＮＡ転写鋳型が用いられ（２００ｎＭ鋳型が１サイクル目に用いられて多様性が増大する（ｄＲｍＹ転写では３００ｎＭ鋳型が用いられる））、それに続くサイクルでは、およそ５０ｎＭ、本明細書中に記載される条件を用いた最適化ＰＣＲ反応の１／１０希釈が用いられる）。好ましいＤＮＡ転写鋳型を以下に示す（ＡＲＣ２５４およびＡＲＣ２５６は全２’－ＯＭｅ条件下で転写し、ＡＲＣ２５５はｒＲｍＹ条件下で転写する）。

【０１００】

【化１１】

SEQ ID NO: 1
5’-CATCGATGCTAGTCGTAACGATCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATA
GTGAGTCGTATTA-3’

【０１０１】

【化１２】

SEQ ID NO: 2
5’-CATGCATCGCGACTGACTAGCCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATAG
TGAGTCGTATTA-3’

【０１０２】

【化１３】

SEQ ID NO 3:
5’-CATCGATCGATCGATCGACAGCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATAG
TGAGTCGTATTA–3’

本発明のｒＮ転写条件下では、転写反応混合物は、２’－ＯＨアデノシン三リン酸（ＡＴＰ）、２’－ＯＨグアノシン三リン酸（ＧＴＰ）、２’－ＯＨシチジン三リン酸（ＣＴＰ）および２’－ＯＨウリジン三リン酸（ＵＴＰ）を含有する。本発明のｒＮ転写混合物を用いて生成された改変オリゴヌクレオチドは、実質的に全て、２’－ＯＨアデノシン、２’－ＯＨグアノシン、２’－ＯＨシチジンおよび２’－ＯＨウリジンを含有する。ｒＮ転写の好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－ＯＨアデノシンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－ＯＨグアノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－ＯＨシチジンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－ＯＨウリジンである配列を含む。ｒＮ転写のより好ましい実施形態において、得られる本発明の改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－ＯＨアデノシンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－ＯＨグアノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－ＯＨシチジンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－ＯＨウリジンである配列を含む。ｒＮ転写の最も好ましい実施形態において、本発明の改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの１００％が２’－ＯＨアデノシンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの１００％が２’－ＯＨグアノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの１００％が２’－ＯＨシチジンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの１００％が２’－ＯＨウリジンである配列を含む。

【０１０３】
本発明のｒＲｍＹ転写条件下では、転写反応混合物は、２’－ＯＨアデノシン三リン酸、２’－ＯＨグアノシン三リン酸、２’－ＯＭｅシチジン三リン酸および２’－ＯＭｅウリジン三リン酸を含有する。本発明のｒＲｍＹ転写混合物を用いて生成された改変オリゴヌクレオチドは、実質的に全て、２’－ＯＨアデノシン、２’－ＯＨグアノシン、２’－ＯＭｅシチジンおよび２’－ＯＭｅウリジンを含む。好ましい実施形態において、得られる改変されたオリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－ＯＨアデノシンであり、全てのグアノシン三リン酸の少なくとも８０％が２’－ＯＨグアノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－ＯＭｅシチジンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－ＯＭｅウリジンである配列を含む。より好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－ＯＨアデノシンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－ＯＨグアノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－ＯＭｅシチジンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－ＯＭｅウリジンである配列を含む。最も好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの１００％が２’－ＯＨアデノシンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの１００％が２’－ＯＨグアノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの１００％が２’－ＯＭｅシチジンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの１００％が２’－ＯＭｅウリジンである配列を含む。

【０１０４】
本発明のｄＲｍＹ転写条件下では、転写反応混合物は、２’－デオキシアデノシン三リン酸、２’－デオキシグアノシン三リン酸、２’－Ｏ－メチルシチジン三リン酸および２’－Ｏ－メチルウリジン三リン酸を含有する。本発明のｒＲｍＹ転写条件を用いて生成された改変オリゴヌクレオチドは、実質的に全て、２’－デオキシアデノシン、２’－デオキシグアノシン、２’－Ｏ－メチルシチジンおよび２’－Ｏ－メチルウリジンを含む。好ましい実施形態において、得られる本発明の改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－デオキシアデノシンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－デオキシグアノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルウリジンである配列を含む。より好ましい実施形態において、得られる本発明の改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－デオキシアデノシンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－デオキシグアノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルウリジンである配列を含む。最も好ましい実施形態において、得られる本発明の改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの１００％が２’－デオキシアデノシンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの１００％が２’－デオキシグアノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルウリジンである配列を含む。

【０１０５】
本発明のｒＧｍＨ転写条件下では、転写反応混合物は、２’－ＯＨグアノシン三リン酸、２’－Ｏ－メチルシチジン三リン酸、２’－Ｏ－メチルウリジン三リン酸および２’－Ｏ－メチルアデノシン三リン酸を含有する。本発明のｒＧｍＨ転写混合物を用いて生成された改変オリゴヌクレオチドは、実質的に全て、２’－ＯＨグアノシン、２’－Ｏ－メチルシチジン、２’－Ｏ－メチルウリジンおよび２’－Ｏ－メチルアデノシンを含む。好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、全てのグアノシンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－ＯＨグアノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、全てのウリジンヌクレオチドの少

なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルウリジンであり、そして全てのアデノシンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルアデノシンである配列を含む。より好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、全てのグアノシンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－ＯＨグアノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、全てのウリジンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルウリジンであり、そして全てのアデノシンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルアデノシンである配列を含む。最も好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、全てのグアノシンヌクレオチドの１００％が２’－ＯＨグアノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、全てのウリジンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルウリジンであり、そして全てのアデノシンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルアデノシンである配列を含む。

【０１０６】

本発明のｒ／ｍＧｍＨ転写条件下では、転写反応混合物は、２’－Ｏ－メチルアデノシン三リン酸、２’－Ｏ－メチルシチジン三リン酸、２’－Ｏ－メチルグアノシン三リン酸、２’－Ｏ－メチルウリジン三リン酸および２’－ＯＨグアノシン三リン酸を含有する。本発明のｒ／ｍＧｍＨ転写混合物を用いて生成された、得られる改変オリゴヌクレオチドは、実質的に全て、２’－Ｏ－メチルアデノシン、２’－Ｏ－メチルシチジン、２’－Ｏ－メチルグアノシンおよび２’－Ｏ－メチルウリジンを含み、ここでグアノシンヌクレオチドの集団は、最大約１０％の２’－ＯＨグアノシンを有する。好ましい実施形態において、得られる本発明のｒ／ｍＧｍＨ改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルアデノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルグアノシンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルウリジンである配列を含み、全てのグアノシンヌクレオチドのわずか約１０％が２’－ＯＨグアノシンである。より好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルアデノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルグアノシンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルウリジンである配列を含み、全てのグアノシンヌクレオチドのわずか約１０％が２’－ＯＨグアノシンである。最も好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルアデノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの９０％が２’－Ｏ－メチルグアノシンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルウリジンである配列を含み、全てのグアノシンヌクレオチドのわずか約１０％が２’－ＯＨグアノシンである。

【０１０７】

本発明のｍＲｍＹ転写条件下では、転写混合物は、２’－Ｏ－メチルアデノシン三リン酸、２’－Ｏ－メチルシチジン三リン酸、２’－Ｏ－メチルグアノシン三リン酸、２’－Ｏ－メチルウリジン三リン酸のみを含有する。本発明のｍＲｍＹ転写混合物を用いて生成された、得られる改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルアデノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルグアノシンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルウリジンである配列を含む。

【０１０８】

本発明のｆＧｍＨ転写条件下では、転写反応混合物は、２’－Ｏ－メチルアデノシン三リン酸、２’－Ｏ－メチルウリジン三リン酸、２’－Ｏ－メチルシチジン三リン酸および

２’－Ｆグアノシン三リン酸を含有する。本発明のｆＧｍＨ転写条件を用いて生成された改変オリゴヌクレオチドは、実質的に全て、２’－Ｏ－メチルアデノシン、２’－Ｏ－メチルウリジン、２’－Ｏ－メチルシチジンおよび２’－Ｆグアノシンを含む。好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルアデノシンであり、全てのウリジンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルウリジンであり、全てのシチジンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、そして全てのグアノシンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｆグアノシンである配列を含む。より好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルアデノシンであり、全てのウリジンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルウリジンであり、全てのシチジンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、そして全てのグアノシンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｆグアノシンである配列を含む。最も好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルアデノシンであり、全てのウリジンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルウリジンであり、全てのシチジンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、そして全てのグアノシンヌクレオチドの１００％が２’－Ｆグアノシンである配列を含む。

【０１０９】

本発明のｄＡｍＢ転写条件下では、転写反応混合物は、２’－デオキシアデノシン三リン酸、２’－Ｏ－メチルシチジン三リン酸、２’－Ｏ－メチルグアノシン三リン酸および２’－Ｏ－メチルウリジン三リン酸を含有する。本発明のｄＡｍＢ転写混合物を用いて生成された改変オリゴヌクレオチドは、実質的に全て、２’－デオキシアデノシン、２’－Ｏ－メチルシチジン、２’－Ｏ－メチルグアノシンおよび２’－Ｏ－メチルウリジンを含む。好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－デオキシアデノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルグアノシンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの少なくとも８０％が２’－Ｏ－メチルウリジンである配列を含む。より好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－デオキシアデノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルグアノシンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの少なくとも９０％が２’－Ｏ－メチルウリジンである配列を含む。最も好ましい実施形態において、得られる本発明の改変オリゴヌクレオチドは、全てのアデノシンヌクレオチドの１００％が２’－デオキシアデノシンであり、全てのシチジンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルシチジンであり、全てのグアノシンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルグアノシンであり、そして全てのウリジンヌクレオチドの１００％が２’－Ｏ－メチルウリジンである配列を含む。

【０１１０】

それぞれの場合において、転写産物は、次いでＳＥＬＥＸ^{TM}プロセスへの投入に用いられて、アプタマーを同定および／または所定の標的に対する結合特異性を有する保存配列を決定し得る。得られる配列は、すでに部分的に安定化されており、ＳＥＬＥＸ^{TM}後プロセスからこの工程が排除され、最適化アプタマー配列に到達し、結果としてより高度に安定化されたアプタマーを与える。２’－ＯＭｅ　ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセスの別の利点は、得られる配列が、配列中に必要とされる２’－ＯＨヌクレオチドが、より少なく、おそらくはないであろうということである。２’ＯＨヌクレオチドが残る程度まで、２’－ＯＨヌクレオチドはＳＥＬＥＸ^{TM}後改変を行うことによって除かれ得る。

【０１１１】

後述するように、上述の最適化条件以外の条件下で、２’置換ヌクレオチドを完全に取

り込む、より低いが依然として有用な収量の転写産物を得ることができる。例えば、上述の転写条件に対する変化としては、以下のものが挙げられる。

【０１１２】

ＨＥＰＥＳバッファー濃度は、０～１Ｍの範囲であり得る。本発明はまた、例えばＴｒｉｓ－ヒドロキシメチル－アミノメタンを含む、５～１０の間のｐＫａを有する他の緩衝剤の使用を企図する。

【０１１３】

ＤＴＴ濃度は、０～４００ｍＭの範囲であり得る。本発明の方法はまた、例えばメルカプトエタノールを含む、他の還元剤の使用を提供する。

【０１１４】

スペルミジンおよび／またはスペルミン濃度は、０～２０ｍＭの範囲であり得る。

【０１１５】

ＰＥＧ－８０００濃度は、０～５０％（ｗ／ｖ）の範囲であり得る。本発明の方法はまた、例えば他の分子量のＰＥＧもしくは他のポリアルキレングリコールを含む、他の親水性ポリマーの使用を提供する。

【０１１６】

Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００濃度は、０～０．１％（ｗ／ｖ）の範囲であり得る。本発明の方法はまた、例えば、他のＴｒｉｔｏｎ－Ｘ界面活性剤を含めて他の界面活性剤を含む、他の非イオン性界面活性剤の使用を提供する。

【０１１７】

$MgCl_2$濃度は０．５ｍＭ～５０ｍＭの範囲であり得る。$MnCl_2$濃度は、０．１５ｍＭ～１５ｍＭの範囲であり得る。$MgCl_2$および$MnCl_2$の両方とも、記載される範囲内で存在しなくてはならず、好ましい実施形態においては、約１０対約３の比の$MgCl_2$：$MnCl_2$で存在し、好ましくは、比は約３～５：１であり、より好ましくは、比は約３～４：１である。

【０１１８】

２’－ＯＭｅ　ＮＴＰ濃度（各ＮＴＰ）は、５μＭ～５ｍＭの範囲であり得る。

【０１１９】

２’－ＯＨ　ＧＴＰ濃度は、０μＭ～３００μＭの範囲であり得る。

【０１２０】

２’－ＯＨ　ＧＭＰ濃度は、０～５ｍＭの範囲であり得る。

【０１２１】

ｐＨは、ｐＨ６～ｐＨ９の範囲であり得る。本発明の方法は、改変ヌクレオチドを取り込む殆どのポリメラーゼの活性のｐＨ範囲内で行われ得る。また、本発明の方法は、例えばＥＤＴＡ、ＥＧＴＡおよびＤＴＴを含む、転写反応条件におけるキレート剤の任意の使用を提供する。

【０１２２】

（アプタマー医薬品化学）

アプタマー医薬品化学は、改変体アプタマーの組が化学的に合成される、アプタマー改良技術である。これらの改変体の組は、典型的には、単一の置換基の導入によって親アプタマーと異なり、この置換基の配置によって互いに異なる。次いで、これらの改変体は互いに、および親と比較される。特徴の改良は、単一の置換基を含むことが特定の処置基準を達成するのに必要な全てであり得る程十分に意味深くあり得る。

【０１２３】

あるいは、単一の改変体の組から収集される情報を用いて、１つより多い置換基が同時に導入される改変体のさらなる組を設計し得る。ある設計戦略において、単一置換基改変体の全てが順位付けられ、上位４つが選択され、これらの４つの単一置換基改変体の全ての可能な二重（６）、三重（４）および四重（１）の組み合わせが合成およびアッセイされる。第二の設計戦略において、最良の単一置換基改変体は新しい親と考えられ、この最高順位の単一置換基改変体を含む全ての可能な二重置換基改変体が合成およびアッセイさ

れる。他の戦略が用いられ得、これらの戦略は、さらに改良された改変体の同定を継続しながら置換基の数が徐々に増加するように、繰り返し適用され得る。

【０１２４】

アプタマー医薬品化学は、特に、全体的というよりむしろ局所的な置換基の誘導を調査する方法として用いられ得る。アプタマーは、転写によって生じるライブラリー内で発見されるので、ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス中に導入される任意の置換基が全体的に導入されるはずである。例えば、ヌクレオチドの間にホスホロチオエート結合を導入することが所望される場合、ホスホロチオエート結合はＡごと（またはＧ、Ｃ、Ｔ、Ｕ等ごと）（全体的に置換される）にのみ導入され得る。いくつかのＡ（またはいくつかのＧ、Ｃ、Ｔ、Ｕ等）（局所的に置換される）でホスホロチオエートを必要とするが他のＡではそれに耐性のないアプタマーは、このプロセスでは容易に発見できない。

【０１２５】

アプタマー医薬品化学プロセスによって利用され得る置換基の種類は、置換基を固相合成試薬として生成し、置換基をオリゴマー合成計画に導入する能力によってのみ、制限される。このプロセスは、間違いなく、ヌクレオチドのみに限られない。アプタマー医薬品化学計画は、立体的容積、疎水性、親水性、親油性、疎油性、正電荷、負電荷、中性電荷、双性イオン、分極率、ヌクレアーゼ耐性、配座の剛性、配座の柔軟性、タンパク質結合特性、質量等を導入する置換基を含み得る。アプタマー医薬品化学計画は、塩基改変、糖改変またはホスホジエステル結合改変を含み得る。

【０１２６】

治療アプタマーの関係内で有益でありそうな置換基の種類を考慮する場合、以下のカテゴリーの１つ以上に分類される置換を導入することが望ましくあり得る。

（１）体内にすでに存在している置換基、例えば２’－デオキシ、２’－リボ、２’－Ｏ－メチルプリンもしくはピリミジンまたは５－メチルシトシン。

（２）すでに、承認された処置の一部である置換基、例えばホスホロチオエート結合オリゴヌクレオチド。

（３）上述の２つのカテゴリーの１つに加水分解または分解する置換基、例えばメチルホスホン酸結合オリゴヌクレオチド。

【０１２７】

本発明のｖＷＦアプタマーは、本明細書中に記載されるアプタマー医薬品化学を通じて開発されたアプタマーを含む。

【０１２８】

（フォン・ビルブラント因子特異的結合アプタマー）

本発明の物質としては、フォン・ビルブラント因子に特異的に結合する、長さ２９～７６ヌクレオチドの一連の核酸アプタマーを含む。ある実施形態において、本発明の物質は、フォン・ビルブラント因子に特異的に結合し、フォン・ビルブラント因子の活性をインビボおよび／または細胞ベースのアッセイで機能的に調節、例えばブロックする、長さ２９～７６ヌクレオチドの一連の核酸アプタマーを含む。

【０１２９】

全長フォン・ビルブラント因子および／またはフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１を特異的に結合、およびこれを調節することができるアプタマーを、本明細書中に示す。これらのアプタマーは、低毒性で安全かつ効率的な、心臓血管疾患または障害の処置および／または予防の様相を提供する。ある実施形態において、本発明のアプタマーは、フォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集によって引き起こされるか、そうでなければフォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集に関連することが公知である、不安定狭心症および心筋梗塞等の動脈血栓症および急性冠症候群からなる群より選択される障害のいずれか１つを含む冠動脈疾患を、処置および／または予防する方法において用いられる。特定の実施形態において、本発明のアプタマーは、出血副作用を最小限にしながら、フォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集によって引き起こされるか、そうでなければフォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集に関連することが公知である、不安定狭心症および心筋梗塞等の

動脈血栓症および急性冠症候群からなる群より選択される障害のいずれか１つを含む冠動脈疾患を、処置および／または予防する方法において用いられる。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、フォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集によって引き起こされるか、そうでなければフォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集に関連することが公知である末梢血管疾患を、処置および／または予防する方法において用いられる。特定の実施形態において、本発明のアプタマーは、好ましくは出血副作用を最小限にしながら、フォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集によって引き起こされるか、そうでなければフォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集に関連することが公知である末梢血管疾患を、処置および／または予防する方法において用いられる。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、好ましくは出血副作用を最小限にしながら、フォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集によって引き起こされるか、そうでなければフォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集に関連することが公知である、一過性脳虚血発作、脳卒中および頸動脈狭窄症からなる群より選択される障害のいずれか１つを含む脳血管疾患を、処置および／または予防する方法において用いられる。さらに、本発明のアプタマーは、被験体が血管形成、血栓溶解処置または冠動脈バイパス手術を含む経皮的冠動脈介入を経験する前、間および／または後に被験体においてフォン・ビルブラント因子媒介血小板凝集を阻害するのに有用である。本発明のアプタマーはまた、被験体が冠動脈バイパス手術を経験する前、間および／または後に被験体において血管開存性を維持するのに有用である。本発明のアプタマーはまた、透析を経験している患者を処置するのに有用である。本発明のアプタマーはまた、好ましくは出血副作用を最小限にしながら、被験体においてフォン・ビルブラント因子媒介血栓症を阻害するのに有用である。処置および／または阻害される血栓症は、炎症反応と関連し得る。

【０１３０】

ある実施形態において、処置および／または診断における使用のためのフォン・ビルブラント因子特異的結合アプタマーは、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）～ＡＲＣ１７８０およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）からなる群より選択される。

【０１３１】

別の実施形態において、処置および／または診断としての使用のためのフォン・ビルブラント因子特異的結合アプタマーは、以下の配列のいずれか１つを含む：配列番号２３、配列番号４４、配列番号４９、配列番号９８～１００、配列番号１０６、配列番号１０９、配列番号１１４～１１５、配列番号１１８、配列番号１２７、配列番号１３４、配列番号１６４、配列番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０８および配列番号２１２～２１４。いくつかの実施形態において、処置および／または診断としての使用のためのフォン・ビルブラント因子特異的結合アプタマーは、以下の配列のいずれか１つを含む：ＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）、ＡＲＣ１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）、ＡＲＣ１７８０（配

列番号３２１）、ＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）。

【０１３２】

フォン・ビルブラント因子を結合する本発明の他のアプタマーは、下記で実施例１および２に説明されている。

【０１３３】

これらのアプタマーは、例えば、親油性または高分子量化合物（例えばＰＥＧ）への結合体化、キャッピング部分の組み込み、改変ヌクレオチドの取り込み、およびリン酸バックボーン改変（リン酸バックボーンへのホスホロチオエートの取り込みを含む）を含む、本明細書中に記載される改変を含み得る。

【０１３４】

本発明のある実施形態において、フォン・ビルブラント因子に結合する、単離された非天然アプタマーが提供される。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、フォン・ビルブラント因子の機能を調節する。別の実施形態においては、本発明のアプタマーはフォン・ビルブラント因子の機能を阻害するが、別の実施形態においては、アプタマーはフォン・ビルブラント因子の機能を刺激する。本発明の別の実施形態において、アプタマーは、フォン・ビルブラント因子改変体に結合および／またはフォン・ビルブラント因子の機能を調節する。本明細書中で使用されるフォン・ビルブラント因子改変体は、フォン・ビルブラント因子機能と本質的に同じ機能を行う改変体を包含し、好ましくは実質的に同じ構造を含み、いくつかの実施形態においてはヒトフォン・ビルブラント因子のアミノ酸配列に少なくとも７０％配列同一性、好ましくは少なくとも８０％配列同一性、より好ましくは少なくとも９０％配列同一性、より好ましくは少なくとも９５％配列同一性を含む。

【０１３５】

本発明の別の実施形態において、アプタマーは、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）のいずれか１つを含むアプタマーと実質的に同じのフォン・ビルブラント因子への結合能力を有する。本発明の別の実施形態において、アプタマーは、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）のいずれか１つを含むアプタマーと実質的に同じ構造およびフォン・ビルブラント因子への結合能力を有する。別

の実施形態において、本発明のアプタマーは、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１３、ＡＲＣ１１１５、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）のいずれか１つの配列を含む。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）のいずれか１つの配列に少なくとも８０％同一、好ましくは少なくとも９０％同一、およびいくつかの実施形態においては少なくとも９５％同一である配列を含む。別の実施形態において、本発明のアプタマーはフォン・ビルブラント因子に特異的に結合し、配列番号１１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７２、配列番号１７４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１６３５、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）からなる群より選択されるアプタマーのいずれか１つの３０の連続したヌクレオチドと同一である、３０の連続したヌクレオチドの配列を含む。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、薬学的組成物中の有効成分として用いられる。別の実施形態において、本発明のアプタマーまたは本発明のアプタマーを含有する組成物を用いて、急性冠症候群、末梢動脈疾患、および脳卒中を含む脳血管障害を含む心臓血管障害等の血栓性疾患が処置される。いくつかの実施形態において、本発明のアプタマーまたは本発明のアプタマーを含有する組成物を用いて、本態性血小板減少症、血栓性トロンボコペニック紫斑病（「ＴＴＰ」）、タイプＩＩｂフォン・ビルブラント病、偽性フォン・ビルブラント病、末梢動脈疾患、例えば末梢動脈閉塞性疾患、不安定狭心症、狭心症、動脈血栓性、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、急性冠症候群、心房細動、頸動脈狭窄症、脳梗塞、脳血栓症、虚血性脳卒中および一過性脳虚血発作からなる群より選択される障害が処置、予防または改善される。いくつかの実施形態において、本発明の薬学的組成物は、透析、ＣＡ

ＢＧ手術、経皮的冠動脈介入または心臓弁置換の前／間および／または後に投与される。

【０１３６】

いくつかの実施形態において、本発明のアプタマー治療剤は、アプタマー治療剤が患者または被験体の体内で失敗に終わる場合に非天然ヌクレオチド置換に由来する有害な副作用を減少させながら、その標的に対して大きな親和性および特異性を有する。いくつかの実施形態において、本発明のアプタマー治療剤を含む治療組成物は、フッ素化ヌクレオチドを含まないか、減少した量を有する。

【０１３７】

本発明のアプタマーは、ともに当該分野で周知である固相オリゴヌクレオチド合成技術（例えばＦｒｏｅｈｌｅｒら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．１４：５３９９～５４６７頁（１９８６年）およびＦｒｏｅｈｌｅｒら、Ｔｅｔ．Ｌｅｔｔ．２７：５５７５～５５７８頁（１９８６年）参照）並びにトリエステル合成法等の液相法（例えばＳｏｏｄら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．４：２５５７頁（１９７７年）およびＨｉｒｏｓｅら、Ｔｅｔ．Ｌｅｔｔ．２８：２４４９頁参照）を含む、当該分野で公知の任意のオリゴヌクレオチド合成技術を用いて合成され得る。

【０１３８】

（薬学的組成物）

本発明はまた、フォン・ビルブラント因子に結合するアプタマー分子を含有する薬学的組成物を含む。いくつかの実施形態において、組成物は内用に安定性があり、有効量の、本発明の薬理学的に活性のある化合物を単独で、または１つ以上の薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせて含む。化合物は、あったとしても非常に低い毒性を有するという点で特に有用である。

【０１３９】

本発明の組成物を用いて、患者において、疾患もしくは障害等の病状を処置もしくは予防、またはかかる疾患もしくは障害の症状を軽減し得る。例えば、本発明の組成物を用いて、血小板凝集に関連した病状を処置または予防し得る。いくつかの実施形態において、処置、予防または改善される疾患は、本態性血小板減少症、血栓性トロンボコペニック紫斑病（「ＴＴＰ」）、タイプＩＩｂフォン・ビルブラント病、偽性フォン・ビルブラント病、末梢動脈疾患、例えば末梢動脈閉塞性疾患、不安定狭心症、狭心症、動脈血栓性、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、急性冠症候群、心房細動、頸動脈狭窄症、脳梗塞、脳血栓症、虚血性脳卒中および一過性脳虚血発作からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、本発明の薬学的組成物は、透析、ＣＡＢＧ手術、経皮的冠動脈介入または心臓弁置換の前、間および／または後に投与される。

【０１４０】

本発明の組成物は、本発明のアプタマーが特異的に結合する標的に関連または由来する疾患または障害に罹患した、または素因のある被験体への投与に有用である。

【０１４１】

本発明の組成物は、病状を有する患者または被験体を処置する方法において用いられ得る。この方法は、病状に関係するフォン・ビルブラント因子に結合するアプタマーまたはアプタマーを含有する組成物を患者または被験体に投与することを含み、標的へのアプタマーの結合によってフォン・ビルブラント因子の生物学的機能が変化し、それによって病状を処置する。

【０１４２】

病状を有する患者または被験体、すなわち本発明の方法によって処置される患者または被験体は、哺乳動物、より具体的には脊椎動物、またはより具体的にはヒトであり得る。

【０１４３】

実際には、アプタマーまたはその薬学的に受容可能な塩は、その所望の生物学的活性、例えばｖＷＦ依存的血小板凝集の予防を発揮するのに十分な量で投与される。

【０１４４】

本発明のある局面は、血栓関連障害の他の処置と組み合わせて、本発明のアプタマー組

成物を含む。本発明のアプタマー組成物は、例えば、１つより多いアプタマー、例えば抗トロンビンアプタマーおよび抗ｖＷＦアプタマーを含有し得る。いくつかの例において、１つ以上の本発明のアプタマーを含有する本発明のアプタマー組成物は、抗炎症剤、免疫抑制薬、抗ウイルス剤等の別の有用な組成物と組み合わせて投与される。一般に、かかる組み合わせに使用する現在入手可能な投薬形態の公知の処置剤が適するであろう。

【０１４５】

「併用療法」（または「同時療法」）は、本発明のアプタマー組成物、およびこれらの処置剤の相互作用由来の有益な効果を提供するよう意図された特定の処置養生法の一部としての少なくとも第二の薬剤の投与を含む。組み合わせの有益な効果としては、処置剤の組み合わせから生じる薬物動態学的または薬力学的相互作用が挙げられるが、これらに限定されない。組み合わせにおけるこれらの処置剤の投与は、典型的には、規定された時間（通常、選択される組み合わせに依存して数分、数時間、数日または数週）にわたって行われる。

【０１４６】

「併用療法」は、これらの処置剤の２つ以上の投与を、偶発的および任意に本発明の組み合わせを生じる別々の単剤療法養生法の一部として包含するよう意図されるが、一般的にはされない。「併用療法」は、連続した様式、すなわち各処置剤が異なる時間に投与される様式でのこれらの処置剤の投与、ならびに実質的に同時の様式でのこれらの処置剤または処置剤のうち少なくとも２つの投与を包含するよう意図される。実質的に同時の投与は、例えば、固定された比の各処置剤を有する単一のカプセル、または処置剤のそれぞれについて単一のカプセルを並行して被験体に投与することによって達成され得る。

【０１４７】

各処置剤の連続的または実質的に同時の投与は、局所経路、経口経路、静脈内経路、筋肉内経路、および粘膜組織を通した直接吸収を含む任意の適切な経路によって実施され得るがこれらに限定されない。処置剤は、同じ経路によって、または異なる経路によって投与され得る。例えば、選択された組み合わせの第一の処置剤は注射によって投与され得るが、組み合わせの他の処置剤は局所的に投与され得る。

【０１４８】

あるいは、例えば、全ての処置剤が局所的に投与され得るか、または全ての処置剤が注射によって投与され得る。処置剤が投与される順序は、別に言及がなければ、偏狭に重大ではない。「併用療法」はまた、他の生物学的有効成分とさらに組み合わせた上述の処置剤の投与を包含し得る。併用療法が非薬物処置をさらに含む場合、非薬物処置は、処置剤と非薬物処置との組み合わせの相互作用由来の有益な効果が達成される限り、任意の適した時間に行われ得る。例えば、適切な場合において、有益な効果は、おそらく数日またはさらには数週間、処置剤の投与から非薬物処置が一時的に除かれた場合であっても達成される。

【０１４９】

本発明の治療組成物または薬学的組成物は、一般に、薬学的に受容可能な媒質に溶解または分散された、療法の有効量の活性成分を含有するであろう。薬学的に受容可能な媒質またはキャリアとしては、ありとあらゆる溶媒、分散媒、被覆剤、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤等が挙げられる。医薬的活性物質へのかかる媒質および薬剤の使用は、当該分野で周知である。補足の有効成分もまた、本発明の治療組成物に組み込まれ得る。

【０１５０】

薬学的組成物または薬学的組成物の調製は、本開示に照らして、当業者に公知になろう。典型的には、かかる組成物は、注射可能物質として、液体溶液もしくは懸濁液として；注射前の液体中の溶液もしくは懸濁液に適した固形で；経口投与のための錠剤もしくは他の固体で；時限放出性カプセルとして；または目薬、クリーム、ローション剤、軟膏、吸入剤等を含めて現在使用されている任意の他の形態で調製され得る。手術現場において特定の領域を処置するための、外科医、内科医または健康管理職員による生理食塩水ベース

の洗浄等の無菌製剤の使用もまた、特に有用であり得る。組成物はまた、微小装置、微粒子またはスポンジを介して送達され得る。

【０１５１】

製剤の際には、投薬製剤に適合する様式で、および薬理学的に効果的な量で処置が施されよう。製剤は、種々の投薬形態で容易に投与される。好ましい実施形態において、本発明のアプタマーは、上述の注射可能溶液として製剤化されるが、薬物放出カプセル等もまた使用され得る。

【０１５２】

この関係において、有効成分の量および投与される組成物の体積は、処置される宿主動物に依存する。投与に必要な活性化合物の正確な量は従業者の判断に依存し、各個体に特有である。

【０１５３】

活性化合物を分散するのに必要な組成物の最小体積が、典型的には利用される。投与に適した養生法もまた変動するが、最初に化合物を投与し、結果をモニタリングし、次いでさらなる制御された用量をさらなる間隔で施すことによって典型的に表されよう。本発明の抗ｖＷＦアプタマーの投与の効果は、下記の実施例３に記載されるＰＦＡ－１００装置を用いたボトロセチン誘導血小板凝集（「ＢＩＰＡ」）および／またはせん断力誘導止血血栓形成の測定等の血小板凝集形成を測定することによってモニタリングされ得る。

【０１５４】

例えば、錠剤またはカプセル（例えばゼラチンカプセル）の形態での経口投与のために、活性薬物成分は、エタノール、グリセロール、水等の、経口の非毒性の薬学的に受容可能な不活性なキャリアと組み合わせられ得る。さらに、所望または必要とされる場合、適した結合剤、潤滑剤、崩壊剤および着色剤もまた、混合物に組み込まれ得る。適した結合剤としては、デンプン、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、デンプンペースト、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムならびに／またはポリビニルピロリドン、グルコースもしくはβ－乳糖等の天然の糖、コーンシロップ、アカシア、トラガカント等の天然および合成ゴム、またはアルギン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、ろう等が挙げられる。これらの投薬形態で用いられる潤滑剤としては、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩酸ナトリウム、シリカ、滑石、ステアリン酸、そのマグネシウムもしくはカルシウム塩および／またはポリエチレングリコール等が挙げられる。崩壊剤としては、限定されることなく、デンプン、メチルセルロース、寒天、ベントナイト、キサンゴムデンプン、寒天、アルギン酸もしくはそのナトリウム塩、または発泡性混合物等が挙げられる。希釈剤としては、例えば、乳糖、右旋糖、ショ糖、マンニトール、ソルビトール、セルロースおよび／またはグリシンが挙げられる。

【０１５５】

注射可能組成物は、好ましくは水性等張溶液または懸濁液であり、坐剤は脂肪性エマルションまたは懸濁液から有利に調製される。組成物は、滅菌され得、ならびに／または保存、安定化、湿潤または乳化剤、溶解促進剤、浸透圧の調節のための塩、および／もしくはバッファー等の佐剤を含み得る。また、それらは他の処置上価値のある物質も含有し得る。組成物は、それぞれ従来の混合、粒状化またはコーティング方法に従って調製され、典型的には、約０．１～７５％、好ましくは約１～５０％の有効成分を含有する。

【０１５６】

本発明の化合物はまた、時限放出および持続放出錠剤またはカプセル、丸剤、散剤、顆粒剤、エリキシル、チンキ、懸濁剤、シロップ剤および乳剤等の経口投薬形態でも投与され得る。

【０１５７】

液体、具体的には注射可能組成物は、例えば、溶解、分散等によって調製され得る。活性化合物は、例えば水、生理食塩水、水性右旋糖、グリセロール、エタノール等の薬学的に純粋な溶媒に溶解または混合されて、それによって注射可能溶液または懸濁液を形成す

る。また、注射の前の液体への溶解に適した固形が製剤化され得る。

【０１５８】

本発明の化合物は、静脈内（ボーラスおよび注入の両方）、腹腔内、皮下または筋肉内形態で投与され得、全て製薬分野の当業者に周知の形態を用いる。注射可能物質は、従来の形態で、液体溶液または懸濁液のいずれかとして調製され得る。

【０１５９】

非経口注射可能物質投与は、一般に、皮下、筋肉内または静脈内注射および注入に用いられる。また、非経口投与のためのあるアプローチは、本明細書中に参照によって援用される米国特許第３，７１０，７９５号に従って、徐放性（もしくは緩効性）または持続放出（もしくは特効性）システムの移植を使用し、これは、一定のレベルの投薬が維持されることを確実にする。

【０１６０】

さらに、本発明に好ましい化合物は、適した鼻内ビヒクル、吸入剤の局所的使用を介した鼻内形態で、または当業者に周知の経皮皮膚パッチの形態を用いた経皮経路を介して、投与され得る。経皮送達系の形態で投与されるために、投薬投与は、勿論、投薬養生法の間中、断続的よりむしろ継続的であろう。他の好ましい局所的製剤としては、クリーム、軟膏、ローション剤、エアロゾルスプレーおよびゲルが挙げられ、ここで有効成分の濃度は、典型的には，ｗ／ｗまたはｗ／ｖで０．０１％～１５％の範囲であろう。

【０１６１】

固体組成物に関して、賦形剤としては、医薬品グレードのマンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、滑石、セルロース、グルコース、ショ糖、炭酸マグネシウムが挙げられ、同様のものが用いられ得る。上記で定義された活性化合物もまた、例えばポリアルキレングリコール、例えばプロピレングリコールをキャリアとして用いて、坐剤として製剤化され得る。いくつかの実施形態において、坐剤は、脂肪性エマルションまたは懸濁液から有利に調製される。

【０１６２】

本発明の化合物はまた、小型単層ベシクル、大型単層ベシクルおよび多層ベシクル等のリポソーム送達系の形態で投与され得る。リポソームは、コレステロール、ステアリルアミンまたはホスファチジルコリンを含む種々のリン脂質から形成され得る。いくつかの実施形態において、米国特許第５，２６２，５６４号に記載されるように、脂質成分のフィルムが薬物の水溶液で水和され、薬物をカプセル化する脂質層を形成する。例えば、本明細書中に記載されるアプタマー分子は、親油性化合物との複合体、または当該分野で公知の方法を用いて構築された非免疫原性高分子量化合物として提供され得る。また、リポソームは、細胞障害性物質を内部に標的化および輸送して細胞殺滅を媒介するために、その表面にアプタマーを担持し得る。核酸関連複合体の例は、米国特許第６，０１１，０２０号にて提供される。

【０１６３】

本発明の化合物はまた、標的化可能な薬物キャリアとしての可溶性ポリマーとカップリングされ得る。かかるポリマーとしては、ポリビニルピロリドン、ピラン共重合体、ポリヒドロキシプロピル－メタクリルアミド－フェノール、ポリヒドロキシエチルアスパンアミドフェノール、またはパルミトイル残基で置換されたポリエチレンオキシドポリリシンを挙げることができる。さらに、本発明の化合物は、薬物の放出制御を達成するのに有用な種類の生分解性ポリマー、例えばポリ乳酸、ポリイプシロンカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアクリレート、およびハイドロゲルの架橋または両親媒性ブロック共重合体にカップリングされ得る。

【０１６４】

所望される場合、投与される薬学的組成物はまた、湿潤または乳化剤、ｐＨ緩衝剤、ならびに例えば酢酸ナトリウムおよびトリエタノールアミンオレイン酸塩等の他の物質等の少量の非毒性補助物質を含み得る。

【０１６５】
アプタマーを利用する投薬養生法は、患者の型、種、年齢、体重、性別および病状；処置される状態の重症度；投与の経路；患者の腎および肝機能；ならびに使用される特定のアプタマーまたはその塩を含む種々の要因に従って選択される。通常の知識を有する医師または獣医は、状態の進行を予防、相殺または阻止するのに必要な薬物の有効量を容易に決定および処方し得る。
【０１６６】
本発明の経口投与量は、指示された効果のために使用される場合、経口で約０．０５～７５００ｍｇ／日の間の範囲であろう。組成物は、好ましくは、０．５、１．０、２．５、５．０、１０．０、１５．０、２５．０、５０．０、１００．０、２５０．０、５００．０および１０００．０ｍｇの有効成分を含有する、刻み目のつけられた錠剤の形態で提供される。注入投薬、鼻内投薬および経皮投薬は、０．０５～７５００ｍｇ／日の間の範囲であろう。皮下、静脈内および腹腔内投薬は、０．０５～３８００ｍｇ／日の間の範囲であろう。
【０１６７】
本発明の化合物は、一日一回の用量で投与され得るか、または合計の一日量が、一日２、３または４回の用量に分けて投与され得る。
【０１６８】
本発明の化合物の効果的血中レベルは、０．００２ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬの範囲である。本発明の投薬において、質量は、ＰＥＧ結合体化によって付与される質量に関係なく、アプタマーのオリゴヌクレオチド部分の分子量のみをいう。
【０１６９】
（アプタマー治療剤の薬物動態学および生体内分布の調節）
アプタマーを含む全てのオリゴヌクレオチドベースの処置の薬物動態学的特性が、所望の医薬用途に適合するよう調整されることが重要である。細胞外標的に対して配向のあるアプタマーは細胞内送達に関連する困難性（アンチセンスおよびＲＮＡｉベースの処置と同様に）を被らないが、かかるアプタマーは、依然として、標的器官および組織に分布でき、所望の投与養生法に一致する時間にわたって、体内に残る（変更されない）べきである。
【０１７０】
したがって、本発明は、アプタマー組成物の薬物動態学、および具体的にはアプタマー薬物動態学を調整する能力に影響を及ぼす物質および方法を提供する。アプタマー薬物動態学の調整性（すなわち調節する能力）は、アプタマーへの改変部分（例えばＰＥＧポリマー）の結合体化および／または改変ヌクレオチド（例えば２’－フルオロまたは２’－Ｏ－メチル）の取り込みを通じて達成され、核酸の化学的組成を変化させる。アプタマー薬物動態学を調整する能力は、既存の処置用途の向上において、または、新しい処置用途の開発において用いられる。例えば、いくつかの処置用途において、例えば、迅速な薬物クリアランスまたは遮断が所望され得る抗腫瘍剤または救急処置設定において、循環におけるアプタマーの滞留時間を減少させることが望ましい。あるいは、他の処置用途、例えば処置の体循環が所望される維持療法において、循環におけるアプタマーの滞留時間を増大させることが望ましくあり得る。
【０１７１】
さらに、アプタマー薬物動態学の調整性を用いて、被験体中のアプタマー治療剤の生体内分布が変更される。例えば、いくつかの処置用途において、特定の型の組織または特定の器官（もしくは器官の組）を標的化しようとして、アプタマー治療剤の生体内分布を変化させることが望ましくあり得る。これらの用途において、アプタマー治療剤は、特定の組織または器官に選択的に蓄積する。他の処置用途において、冒された組織にアプタマー治療剤が選択的に蓄積するように、細胞マーカー、または所定の疾患に関連する症状、細胞損傷もしくは他の異常な病状を提示する組織を標的化することが好ましくあり得る。例えば、２００４年３月５日に出願され、「Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ

ｏｆ ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｂｉｏｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ ｏｆ Ａｐｔａｍｅｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ」と題された同時係属中の仮出願米国第６０／５５０７９０号に記載されているように、アプタマー治療剤のＰＥＧ化（例えば、２０ｋＤａ ＰＥＧポリマーでのＰＥＧ化）を用いて、炎症の起こった組織にＰＥＧ化アプタマー治療剤が選択的に蓄積するように、炎症の起こった組織が標的化される。

【０１７２】

アプタマー治療剤（例えば、アプタマー結合体化、または改変ヌクレオチド等の変化した化学的作用を有するアプタマー）の薬物動態学および生体内分布プロフィールを決定するために、種々のパラメータがモニタリングされる。かかるパラメータとしては、例えば、アプタマー組成物の、半減期（$t_{1/2}$）、血漿クリアランス（ＣＬ）、分布容積（Ｖｓｓ）、血中薬物濃度時間曲線下面積（ＡＵＣ）、最大観測血清中または血漿中濃度（Ｃｍａｘ）および平均滞留時間（ＭＲＴ）が挙げられる。本明細書中で使用される場合、用語「ＡＵＣ」は、アプタマー治療剤の血漿中濃度対アプタマー投与後の時間のプロットの下の面積をいう。ＡＵＣ値を用いて、所定のアプタマー治療剤の、バイオアベイラビリティ（すなわち、アプタマー投与後の循環における、投与されたアプタマー治療剤のパーセンテージ）および／または総クリアランス（ＣＬ）（すなわち、アプタマー治療剤が循環から除去される速度）が評価される。分布容積は、アプタマー治療剤の血漿中濃度を、体内に存在するアプタマーの量に関連付ける。Ｖｓｓが大きい程、血漿の外に多くのアプタマーが見られる（すなわち、より多くの管外遊出）。

【０１７３】

本発明は、アプタマーを小さな分子、ペプチドまたはポリマー末端基等の調節部分に結合体化することによって、または改変ヌクレオチドをアプタマーに取り込むことによって、制御された様式で、安定化アプタマー組成物の薬物動態学および生体内分布をインビボで調節する物質および方法を提供する。本明細書中に記載されるように、改変部分および／または変化するヌクレオチド化学組成物の結合体化は、循環におけるアプタマー滞留時間および組織への分布の基本的局面を変化させる。

【０１７４】

ヌクレアーゼによるクリアランスに加えて、オリゴヌクレオチド処置は、腎臓ろ過を介した排泄の影響を受けやすい。そのようなものとして、静脈内に投与されたヌクレアーゼ耐性オリゴヌクレオチドは、典型的には、ろ過がブロックされ得なければ、１０分未満のインビボ半減期を示す。これは、組織への血流外の迅速な分布を促進すること、またはオリゴヌクレオチドの見かけの分子量を糸球体の効果的サイズカットオフを超えて増大させることのいずれかによって達成され得る。後述のＰＥＧポリマーへの小型処置の結合体化（ＰＥＧ化）は、循環におけるアプタマーの滞留時間を劇的に延ばし得、それによって投薬頻度を減少させ、血管標的に対する効果を促進し得る。

【０１７５】

アプタマーは、高分子量ポリマー、例えばＰＥＧ、ペプチド、例えばＴａｔ（ＨＩＶ Ｔａｔタンパク質の１３アミノ酸のフラグメント（Ｖｉｖｅｓら、（１９９７年）、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２（２５）：１６０１０～７頁））、Ａｎｔ（キイロショウジョウバエアンテナペディアホメオティックタンパク質の第三のヘリックス由来の１６アミノ酸の配列（Ｐｉｅｔｅｒｓｚら、（２００１年）、Ｖａｃｃｉｎｅ １９（１１～１２）：１３９７～４０５頁））およびＡｒｇ$_7$（ポリアルギニン（Ａｒｇ$_7$）で構成される短い正電荷の細胞浸透ペプチド（Ｒｏｔｈｂａｒｄら、（２０００年）、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．６（１１）：１２５３～７頁、Ｒｏｔｈｂａｒｄ，Ｊら、（２００２年）、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４５（１７）：３６１２～８頁）等の種々の改変部分、ならびに小さな分子、例えばコレステロール等の親油性化合物に結合体化され得る。本明細書中に記載される種々の結合体化の間で、アプタマーのインビボ特性は、ＰＥＧ基との複合体化によって最も大いに変化する。例えば、２０ｋＤａ ＰＥＧポリマーとの、混合２’Ｆおよび２’－ＯＭｅ改変アプタマー治療剤の複合体化は、腎臓ろ過を妨げ、健康および炎症の起こった

組織の両方へのアプタマー分布を促進する。さらに、２０ｋＤａ　ＰＥＧポリマー－アプタマー結合体化は、アプタマーの腎臓ろ過の予防において、４０ｋＤａ　ＰＥＧポリマーとほぼ同じくらい効果的であることがわかる。ＰＥＧ化のある効果はアプタマークリアランスに対するものであるのに対し、２０ｋＤａ部分の存在によって与えられる長期の全身曝露もまた、組織、具体的には高度に灌流された器官のものおよび炎症の部位のものへのアプタマーの分布を促進する。アプタマー－２０ｋＤａ　ＰＥＧポリマー結合体化は、炎症の起こった組織にＰＥＧ化アプタマーが選択的に蓄積するように、アプタマー分布を炎症の部位へ方向付ける。いくつかの例において、２０ｋＤａ　ＰＥＧ化アプタマー結合体化は、例えば腎細胞等の細胞の内部に到達することができる。

【０１７６】

改変ヌクレオチドを用いて、アプタマーの血漿クリアランスを調節することもできる。例えば、２’－Ｆおよび２’－ＯＭｅ安定化化学的作用の両方を取り込む結合体化していないアプタマーは、インビトロおよびインビボで高程度のヌクレアーゼ安定性を示すので現世代のアプタマーに典型的であるが、未改変アプタマーと比較すると、血漿からの迅速な喪失（すなわち迅速な血漿クリアランス）、および組織、主として腎臓への迅速な分布を示す。

【０１７７】

（ＰＥＧ誘導体化核酸）

上述のように、高分子量非免疫原性ポリマーでの核酸の誘導は、核酸の薬物動態学的および薬力学的特性を変化させてそれらをより効果的な処置剤にする能力を有する。活性の望ましい変化としては、ヌクレアーゼによる分解に対する耐性の増大、腎臓を通るろ過の減少、免疫系への曝露の減少、および体を通じた処置の分布の変化を挙げることができる。

【０１７８】

本発明のアプタマー組成物は、ポリアルキレングリコール（ＰＡＧ）部分を用いて誘導され得る。ＰＡＧ誘導核酸の例は、本明細書中に全体が参照によって援用される、２００３年１１月２１日出願の米国特許出願第１０／７１８，８３３号に見られる。本発明において用いられる典型的なポリマーとしては、ポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）およびポリプロピレングリコール（ポリイソプロピレングリコールを含む）としても公知のポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）が挙げられる。また、異なるアルキレンオキシド（例えばエチレンオキシドおよびプロピレンオキシド）のランダムまたはブロック共重合体が、多くの用途で用いられ得る。その最も一般的な形態において、ＰＥＧ等のポリアルキレングリコールは、各末端がヒドロキシル基で終了した直鎖状ポリマー：ＨＯ－$CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-OH$である。このポリマー、α－、ω－ジヒドロキシルポリ（エチレングリコール）はまた、ＨＯ－ＰＥＧ－ＯＨとして表され得、ＰＥＧ－記号は構造単位：$-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$（式中、ｎは典型的には約４～約１０，０００の範囲である）を表すと理解される。

【０１７９】

示されるように、ＰＥＧ分子は二官能性であり、時には「ＰＥＧジオール」と呼ばれる。ＰＥＧ分子の末端部分は、化合物の反応性部位での他の化合物へのＰＥＧの結合のために活性化または官能性部分に転換され得る、比較的非反応性のヒドロキシル部分である－ＯＨ基である。かかる活性化ＰＥＧジオールは、本明細書中で二重活性化ＰＥＧと呼ばれる。例えば、ＰＥＧジオールの末端部分は、比較的非反応性のヒドロキシル部分、－ＯＨを、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド由来のスクシンイミジル活性エステル部分で置換することによるアミノ部分との選択的反応のために、活性炭酸エステルとして官能化されている。

【０１８０】

多くの用途において、ＰＥＧ分子が単官能性（または単活性化）であるように、ＰＥＧ分子の一端を本質的に非反応性の部分でキャップすることが好ましい。一般に活性化ＰＥＧに複数の反応部位を提示するタンパク質処置の場合、二官能性活性化ＰＥＧは、広範な

架橋につながり、不十分な官能性の集合体を生じる。単活性化ＰＥＧを生じるために、ＰＥＧジオール分子の末端の１つのヒドロキシル部分は、典型的には、非反応性メトキシ末端部分、－ＯＣＨ$_3$に置換される。もう一方の、ＰＥＧ分子のキャップされていない末端は、典型的には、表面上の反応性部位またはタンパク質等の分子での結合のために活性化され得る反応性末端部分に転換される。

【０１８１】

ＰＡＧは、典型的には、水および多くの有機溶媒への可溶性の特性を有し、毒性を欠き、免疫原性を欠くポリマーである。ＰＡＧのある使用は、ポリマーを不溶性分子に共有結合させて、得られたＰＡＧ－分子「結合体化」を可溶性にすることである。例えば、水不溶性薬物パクリタキセルは、ＰＥＧにカップリングされると水溶性になることが示されている。Ｇｒｅｅｎｗａｌｄら、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．、６０：３３１～３３６頁（１９９５年）。ＰＡＧ結合体化は、しばしば、可溶性および安定性を促進するためだけでなく、分子の血液循環半減期を延長するためにも用いられる。

【０１８２】

本発明のポリアルキル化化合物は、典型的には大きさが５～８０ｋＤａの間であるが、任意の大きさが用いられ得、選択はアプタマーおよび用途に依存する。本発明の他のＰＡＧ化合物は、大きさが１０～８０ｋＤａの間である。本発明のさらに他のＰＡＧ化合物は、大きさが１０～６０ｋＤａの間である。例えば、ＰＡＧポリマーは、大きさが少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０または８０ｋＤａであり得る。かかるポリマーは、直鎖または分枝であり得る。

【０１８３】

生物学的に発現されるタンパク質処置と対照的に、核酸処置は、典型的には、活性化モノマーヌクレオチドから化学的に合成される。ＰＥＧ－核酸結合体化は、同じ反復のモノマー合成を用いてＰＥＧを取り込むことによって調製され得る。例えば、ホスホルアミダイト形態への転換によって活性化されたＰＥＧが、固相オリゴヌクレオチド合成に取り込まれ得る。あるいは、オリゴヌクレオチド合成は、反応性ＰＥＧ結合部位の部位特異的取り込みによって完了され得る。最も一般的には、これは、５’－末端での遊離一級アミンの付加（固相合成の最後のカップリング工程で改変物質ホスホルアミダイトを用いて取り込まれた）によって達成されている。このアプローチを用いて、反応性ＰＥＧ（例えば、アミンと反応して結合を形成するように活性化されるもの）が、精製されたオリゴヌクレオチドと組み合わされ、溶液中でカップリング反応が行われる。

【０１８４】

ＰＥＧ結合体化が処置の生体内分布を変化させる能力は、結合体化の見かけの大きさ（例えば、流体力学的半径に関して測定される）を含む多くの要因に関係する。より大きい結合体化（＞１０ｋＤａ）は、腎臓を介したろ過をより効果的にブロックすること、および結果として小さな高分子（例えばペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド）の血清半減期を増大させることが公知である。ＰＥＧ結合体化がろ過をブロックする能力は、およそ５０ｋＤａまでのＰＥＧサイズを用いて増大することが示されている（半減期は腎臓を介した排泄よりむしろマクロファージ媒介代謝によって定義されるようになるので、さらなる増大は最小の有益な効果を有する）。

【０１８５】

高分子量ＰＥＧ（＞１０ｋＤａ）の生成は、困難、非効率的および高価であり得る。高分子量ＰＥＧ－核酸結合体化の合成のための経路として、これまでの研究は、より高分子量の活性化ＰＥＧの生成に焦点を合わせてきた。かかる分子を生成するある方法は、活性化基を担持する中央のコアに２つ以上のＰＥＧが結合された分枝活性化ＰＥＧの形成を伴う。これらの高分子量ＰＥＧ分子の末端部分、すなわち比較的非反応性のヒドロキシル（－ＯＨ）部分は、化合物の反応性部位での他の化合物への１つ以上のＰＥＧの結合のために活性化または官能性部分に転換され得る。分枝活性化ＰＥＧは、２つより多い末端を有し得、２つ以上の末端が活性化された場合は、かかる活性化された、より高分子量のＰＥＧ分子は、本明細書中で、多重活性化ＰＥＧと呼ばれる。いくつかの場合においては、分

枝ＰＥＧ分子の全ての末端が活性化されるわけではない。分枝ＰＥＧ分子の任意の２つの末端が活性化される場合、かかるＰＥＧ分子は二重活性化ＰＥＧと呼ばれる。分枝ＰＥＧ分子の１つの末端だけが活性化されるいくつかの場合において、かかるＰＥＧ分子は、単活性化と呼ばれる。このアプローチの例として、その後反応のために活性化されるリシンコアへの２つのモノメチルＰＥＧの結合によって調製された活性化ＰＥＧが記載されている（Ｈａｒｒｉｓら、Ｎａｔｕｒｅ、２号：２１４～２２１頁、２００３年）。

【０１８６】

本発明は、複合的にＰＥＧ化された核酸を含む高分子量ＰＥＧ－核酸（好ましくはアプタマー）結合体化の合成の、別の費用効果の高い経路を提供する。本発明はまた、ＰＥＧ連結多量体オリゴヌクレオチド、例えば二量体化アプタマーを包含する。本発明はまた、ＰＥＧ安定化部分がアプタマーの異なる部分を分離するリンカーである高分子量組成物に関し、例えば、高分子量アプタマー組成物の直鎖状の配置が、例えば核酸－ＰＥＧ－核酸（－ＰＥＧ－核酸）$_n$でｎが１以上であるように、ＰＥＧが単一のアプタマー配列内に結合体化される。

【０１８７】

本発明の高分子量組成物としては、少なくとも１０ｋＤａの分子量を有するものが挙げられる。組成物は、典型的には、大きさが１０～８０ｋＤａの間の分子量を有する。本発明の高分子量組成物は、大きさが少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０または８０ｋＤａである。

【０１８８】

安定化部分は、分子、または分子の一部であり、本発明の高分子量アプタマー組成物の薬物動態学的および薬力学的特性を向上させる。いくつかの場合において、安定化部分は、２つ以上のアプタマーもしくはアプタマードメインを接近させるか、または本発明の高分子量アプタマー組成物の全体の回転自由度の減少を提供する分子または分子の一部である。安定化部分は、ポリアルキレングリコール、そのようなポリエチレングリコールであり得、直鎖状または分枝のホモポリマーまたはヘテロポリマーであり得る。他の安定化部分としては、ペプチド核酸（ＰＮＡ）等のポリマーが挙げられる。オリゴヌクレオチドもまた、安定化部分であり得る。かかるオリゴヌクレオチドは、改変ヌクレオチド、および／またはホスホロチオエート等の改変結合を含み得る。安定化部分は、アプタマー組成物と一体化した部分であり得、すなわち、アプタマーに共有結合されている。

【０１８９】

本発明の組成物としては、少なくとも１つのポリアルキレングリコール部分に２つ以上の核酸部分が共有結合により結合体化された高分子量アプタマー組成物が挙げられる。ポリアルキレングリコール部分は、安定化部分として機能する。ポリアルキレングリコール部分が核酸部分を１つの分子中で連結するようにポリアルキレングリコール部分がアプタマーのいずれかの端に共有結合した組成物において、ポリアルキレングリコール部分は連結部分であると言われている。かかる組成物において、共有結合分子の一次構造としては、直鎖状配列核酸－ＰＡＧ－核酸が挙げられる。ある例は、一次構造核酸－ＰＥＧ－核酸を有する組成物である。別の例は、核酸－ＰＥＧ－核酸－ＰＥＧ－核酸の直鎖状配列である。

【０１９０】

核酸－ＰＥＧ－核酸結合体化を生成するために、核酸は元々、単一の反応性部位を有する（すなわち、単活性化である）ように合成される。好ましい実施形態において、この反応性部位は、オリゴヌクレオチドの固相合成の最後の工程として改変物質ホスホルアミダイトの付加によって５’－末端に導入されたアミノ基である。改変オリゴヌクレオチドの脱保護および精製の後、活性化ＰＥＧの自然な加水分解を最小限にする溶液において高濃度で再形成される。好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドの濃度は１ｍＭであり、再形成溶液は２００ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$バッファー、ｐＨ８．３を含有する。結合体化の合成は、高度に精製された二官能性ＰＥＧの低速の段階的添加によって開始される。好ましい実施形態において、ＰＥＧジオールは、プロピオン酸スクシンイミジルでの誘導

によって両端で活性化される（二重活性化）。反応の後、ＰＥＧ－核酸結合体化は、ゲル電気泳動または液体クロマトグラフィーによって精製されて、完全、部分的および未結合体化種に分離される。つながった複数のＰＡＧ分子（例えば、ランダムまたはブロック共重合体として）またはより小さいＰＡＧ鎖が連結されて種々の長さ（または分子量）が達成され得る。非ＰＡＧリンカーは、多様な長さのＰＡＧ鎖の間に用いられ得る。

【０１９１】

２’－Ｏ－メチル、２’－フルオロおよび他の改変ヌクレオチド改変は、ヌクレアーゼに対してアプタマーを安定させ、インビボでのその半減期を増大させる。３’－３’－ｄＴキャップもまた、エキソヌクレアーゼ耐性を増大させる。例えば、全体が参照によって本明細書中に援用される、米国特許第５，６７４，６８５号、第５，６６８，２６４号、第６，２０７，８１６号および第６，２２９，００２号を参照のこと。

【０１９２】

（反応性核酸のＰＡＧ誘導体化）

単官能基活性化ＰＥＧと１つより多い反応性部位を含む核酸との反応によって、高分子量ＰＡＧ－核酸－ＰＡＧ結合体化が調製され得る。ある実施形態において、核酸は二反応性または二重活性化であり、従来のホスホルアミダイト合成、例えば図２に示されるような３’－５’－ジ－ＰＥＧ化を通じてオリゴヌクレオチドに導入された２つの反応性部位、５’－アミノ基および３’－アミノ基を含む。代替的な実施形態において、反応性部位は、例えばピリミジンの５位、プリンの８位、またはリボースの２’－位を一級アミンの結合のための部位として用いて、内部の位置で導入され得る。かかる実施形態において、核酸は、いくつかの活性化または反応性部位を有し得、複合的に活性化されていると言われている。合成および精製の後に、改変オリゴヌクレオチドは、自然な加水分解を最小限にしながら、オリゴヌクレオチド反応性部位との選択的反応を促進する条件下で単活性化ＰＥＧと組み合わされる。好ましい実施形態において、モノメトキシ－ＰＥＧはプロピオン酸スクシンイミジルを用いて活性化され、共役反応がｐＨ８．３で行われる。二置換ＰＥＧの合成を駆動させるために、化学量論的に過剰なＰＥＧがオリゴヌクレオチドに対して提供される。反応の後、ＰＥＧ－核酸結合体化が、ゲル電気泳動または液体クロマトグラフィーによって精製されて、完全、部分的および未結合体化種が分離される。

【０１９３】

連結ドメインはまた、そこに結合された１つ以上のポリアルキレングリコール部分を有し得る。かかるＰＡＧは多様な長さであり得、適切な組み合わせで用いられて、組成物の所望の分子量を達成することができる。

【０１９４】

特定のリンカーの効果は、その化学的組成および長さの両方によって影響され得る。長過ぎるか、短過ぎるか、または標的と好ましくない立体および／もしくはイオン相互作用を形成するリンカーは、アプタマーと標的との間の複合体の形成を妨げる。核酸の間の距離にかかるのに必要な長さよりも長いリンカーは、リガンドの効果的な濃度を減少させることによって結合安定性を減少させ得る。そのため、標的に対するアプタマーの親和性を最大化するために、しばしば、リンカー組成物および長さを最適化する必要がある。

【０１９５】

本明細書中で引用される全ての刊行物および特許文献は、各かかる刊行物または文献が具体的かつ個々に本明細書中に参照によって援用されることが示されたように、本明細書中に参照によって援用される。刊行物および特許文献の引用は、いずれかが関連する従来の技術であると認めることを意図せず、またその内容または年月日に関して認めることを全く構成しない。明細書により本発明を説明してきたが、当業者は、本発明が種々の実施形態で行われ得ること、ならびに上述の記載および以下の実施例は例示の目的のためであって、後に続く特許請求の範囲の制限を目的としないことを理解しよう。

【実施例】

【０１９６】

（実施例１：アプタマーの選択および配列）

（実施例１Ａ：ｒＲｆＹ　ｖＷＦドメインＡ１アプタマーの選択）
２’－ＯＨプリンおよび２’－Ｆピリミジンヌクレオチド（ｒＲｆＹ）からなるヌクレオチドプールを用いて、選択を行ってヒトまたはウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインに結合するアプタマーを同定した。選択戦略によって、疎水性プレートに固定されたヒトおよびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインに特異的な高親和性アプタマーが生じた。

【０１９７】

（プール調製）
配列

【０１９８】

【化１４】

GGAGCGCACTCAGCCACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

NNNNNNNTTTCGACCTCTCTGCTAGC 3’ (SEQ ID NO 8)

を有するＤＮＡ鋳型を、ＡＢＩ　ＥＸＰＥＤＩＴＥ^{TM}ＤＮＡシンセサイザーを用いて合成し、標準的な方法により脱保護した。ＤＮＡ鋳型（配列番号８）中のＮの連続は任意の組み合わせのヌクレオチドであり得、得られるアプタマーの独特の配列領域を生じる。プライマー

【０１９９】

【化１５】

5’ -TAATACGACTCACTATAGGAGCGCACTCAGCCAC -3'

（配列番号９）および

【０２００】

【化１６】

5'- GCTAGCAGAGAGGTCGAAA -3'

（配列番号１０）を用いて鋳型を増幅し、次いでＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ（Ｙ６３９Ｆ）を用いたインビトロ転写のための鋳型として用いた。転写は、典型的には、４０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．０、４０ｍＭ　ＤＴＴ、１ｍＭスペルミジン－ＨＣｌ、０．００２％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、４％（ｗ／ｖ）ＰＥＧ－８０００、１２ｍＭ　$MgCl_2$、３ｍＭ　２’－Ｆ－ＣＴＰ、３ｍＭ　２’－Ｆ－ＵＴＰ、３ｍＭ　ＧＴＰ、３ｍＭ　ＡＴＰ、０．５×無機ピロホスファターゼおよび１×Ｔ７ポリメラーゼ（Ｙ６３９Ｆ）、ならびにおよそ．５μＭ鋳型ＤＮＡを用いて、３７℃で一晩インキュベートした。

【０２０１】

（選択）
ヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン選択のために、１００μＬの１×ダルベッコＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬカタログ番号１４０４０－１３３、カリフォルニア州カールスバッド）中で２４ピコモルのヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号４、図４）をＮｕｎｃ　Ｍａｘｉｓｏｒｐ疎水性プレート（Ｎｕｎｃカタログ番号４４６６１２、ニューヨーク州ロチェスター）の表面に１時間室温で固定することによって最初の１０サイクルを開始した。１１サイクル目と１２サイクル目に関しては、１２ピコモルの全長ヒトｖＷＦ（配列番号７、受託番号ＶＷＨＵ、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍカタログ番号６８１３００、カリフォルニア州ラ・ホーヤから入手可能）を疎水性プレートに固定した。ウサギｖＷＦ選択のために、ヒトｖＷＦ　Ａ１ドメインと同じ条件下で２４ピコモルのウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号６：受託番号ＡＡＢ５１５５５、図３）を固定することによって各サイクルを開始した。

【０２０２】

全ての場合において、１時間のタンパク質固定の後に上清を除去し、１２０μＬ　１×ダルベッコＰＢＳでウェルを４回洗浄した。次いで、タンパク質固定ウェルを１００μＬブロッキングバッファー（１％ＢＳＡを含む１×ダルベッコＰＢＳ）において１時間室温

でブロックした。１サイクル目に、３３３ピコモルのプールＲＮＡ（２×１０^{14}の独特の分子）を、ＢＳＡブロックされた固定タンパク質標的を含むウェル中の１００μＬ　１×ダルベッコＰＢＳにおいて１時間室温でインキュベートした。次いで上清を除去し、１２０μＬ　１×ダルベッコＰＢＳでウェルを４回洗浄した。後のサイクルでは、さらなる洗浄を加えて、陽性選択工程のストリンジェンシーを増大させた（表１および２参照）。２サイクル目の開始時およびそれに続く全てのサイクルにおいて、陽性選択工程の前に２つの陰性選択工程を含んだ。まず、プールＲＮＡを、ブロックしていないウェル中で１時間室温でインキュベートし、いかなるプラスチック結合配列もプールから除去した。第二の陰性選択工程において、ＲＮＡをＢＳＡブロックされたウェル（タンパク質標的を含まない）に１時間室温で移し、陽性選択の前にいかなるＢＳＡ結合配列もプールから除去した。２サイクル目の開始時およびそれに続く全てのサイクルにおいて、０．１ｍｇ／ｍＬ　ｔＲＮＡおよび０．１ｍｇ／ｍＬサケ精子ＤＮＡを非特異的競合物質として陽性選択反応に加えた。全ての場合において、固定タンパク質標的に結合したプールＲＮＡを、ＲＴミックス（１サイクル目：１００ｕＬ、２＋サイクル目：５０ｕＬ、配列番号１０の３’－プライマーおよびＴｈｅｒｍｏｓｃｒｉｐｔ　ＲＴ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号１１１４６－０１６、カリフォルニア州カールスバッド）を含有する）の添加とそれに続く６５℃で１時間のインキュベーションによって選択プレート中で直接逆転写した。

【０２０３】

得られたｃＤＮＡをＰＣＲの鋳型として用いた（１サイクル目：５００ｕＬ、２＋サイクル目：２５０ｕＬ、（配列番号９）の５’－プライマー、（配列番号１０）の３’－プライマー、およびＴａｑポリメラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓカタログ番号ＭＯ２６７Ｌ、マサチューセッツ州ベバリー）を含有する）。ＰＣＲ反応を以下の条件下で行った。ａ）変性工程：９４℃２分間；ｂ）サイクル工程：９４℃３０秒間、６０℃３０秒間、７２℃１分間；ｃ）最終伸長工程：７２℃３分間。十分なＰＣＲ産物が生じるまでサイクルを繰り返した。十分なＰＣＲ産物が生じるのに必要なサイクルの最低数を表１および２に「ＰＣＲ閾値」として報告する。次いで、増幅したプール鋳型ＤＮＡをイソプロパノール沈殿させ、ＰＣＲ産物の半分を選択の次のサイクルのためのプールＲＮＡの転写の鋳型として用いた。転写されたＲＮＡプールを３サイクル目ごとに１０％ポリアクリルアミドゲルを用いてゲル精製した。ゲル精製されない場合は、転写されたＲＮＡプールを２つのＣｅｎｔｒｉ－Ｓｐｉｎ　１０カラム（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓカタログ番号ＣＳ－１０１、ニュージャージー州アデルフィア）を用いて脱塩した。全ての場合において、等量の、全転写産物の１０分の１を、選択の、それに続くサイクルの開始プールとして繰り越した。

【０２０４】

（表１　ｒＲｆＹプールを用いたヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン選択条件）

【０２０５】

【表１】

サイクル	標的	洗浄	PCR 閾値	精製
1	24 pmol hA1	4 x 120uL	16	脱塩 (2x)
2	24 pmol hA1	4 x 120uL	18	脱塩 (2x)
3	24 pmol hA1	4 x 120uL	16	ゲル精製
4	24 pmol hA1	8 x 120uL	15	脱塩 (2x)
5	24 pmol hA1	8 x 120uL	15	脱塩 (2x)
6	24 pmol hA1	8 x 120uL	15	ゲル精製
7	24 pmol hA1	8 x 120uL	12	脱塩 (2x)
8	24 pmol hA1	8 x 120uL	12	脱塩 (2x)
9	24 pmol hA1	8 x 120uL	10	ゲル精製
10	24 pmol hA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	10	脱塩 (2x)
11	12 pmol 全長 vWF	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	20	脱塩 (2x)
12	12 pmol 全長 vWF	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	15	ゲル精製

（表２　ｒＲｆＹプールを用いたウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン選択条件）

【０２０６】

【表２】

サイクル	標的	洗浄	PCR 閾値	精製
1	24 pmol rA1	4 x 120uL	16	脱塩 (2x)
2	24 pmol rA1	4 x 120uL	18	脱塩 (2x)
3	24 pmol rA1	4 x 120uL	16	ゲル精製
4	24 pmol rA1	8 x 120uL	15	脱塩 (2x)
5	24 pmol rA1	8 x 120uL	15	脱塩 (2x)
6	24 pmol rA1	8 x 120uL	15	ゲル精製
7	24 pmol rA1	8 x 120uL	12	脱塩 (2x)
8	24 pmol rA1	8 x 120uL	12	脱塩 (2x)
9	24 pmol rA1	8 x 120uL	10	ゲル精製
10	24 pmol rA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	10	脱塩 (2x)
11	24 pmol rA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	10	脱塩 (2x)
12	24 pmol rA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	10	ゲル精製

（ｖＷＦドメインＡ１結合分析）

選択の進行を、サンドイッチフィルター結合アッセイを用いてモニタリングした。５’－^{32}Ｐ標識プールＲＮＡ（極微量濃度）を、０．１ｍｇ／ｍＬ　ｔＲＮＡおよび０．１ｍｇ／ｍＬサケ精子ＤＮＡを含有する１×ダルベッコＰＢＳ（５０μＬの最終体積中）中の、標的タンパク質対照なし、１００ｎＭヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号４）または１００ｎＭウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号６）のいずれかとともに３０分室温でインキュベートし、次いでドットブロット装置（Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ　ａｎｄ　Ｓｃｈｕｅｌｌ、ニューハンプシャー州キーン）中のニトロセルロースおよびナイロンフィルターサンドイッチに適用した。ニトロセルロースに結合したプールＲＮＡのパーセンテージを、６、９および１２サイクル目の後に３点スクリーン（１００ｎＭヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン、１００ｎＭウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン、および標的対照なし）を用いて計算した。プール結合をナイーブプールＲＮＡ（０サイクル目）のものと比較した。ｒＲｆＹプール結合分析の結果は、表３に見られる。

【０２０７】

（表３　ｖＷＦ　Ａ１ドメインｒＲｆＹ選択プール結合アッセイ）

【０２０８】

【表３】

選択	プールサイクル	100nM ヒト A1	100nM ウサギ A1	タンパク質なし
ナイーブプール	0サイクル目	11.2%	14.3%	10.5%
ヒト vWF A1	6サイクル目	16.0%	16.9%	13.8%
ウサギ vWF A1	6サイクル目	15.2%	17.9%	14.7%
ヒト vWF A1	9サイクル目	14.7%	14.3%	10.5%
ウサギ vWF A1	9サイクル目	13.7%	14.7%	10.1%
ヒト vWF A1	12サイクル目	31.8%	33.1%	13.2%
ウサギ vWF A1	12サイクル目	24.1%	17.7%	10.3%

ヒトまたはウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン存在下対タンパク質の非存在下でのＲＮＡの結合の有意な陽性の比が見られた場合、製造業者の使用説明書に従って、ＴＯＰＯ　ＴＡクローニングキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号４５－０６４１、カリフォルニア州カールスバッド）を用いてプールをクローニングした。９および１２サイクル目のプール鋳型をクローニングおよび配列決定し（合計１２５配列）、４８の独特のクローンを生じた。全ての独特のクローンを転写、脱塩、５－^{32}Ｐ標識し、３点ドットブロットスクリーン（タンパク質標的対照なし、１００ｎＭヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号５、図３）または１００ｎＭウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号６、図３））においてアッセイした。データを、標的タンパク質存在下でニトロセルロースに結合したアプタマーの画分の、標的タンパク質非存在下で結合したアプタマーの画分に対する比として、下記の表４の第３および第４の縦列に示す。

【０２０９】

この最初のスクリーンに基づいて、ドットブロットアッセイを用いて１２の最高のｖＷＦ依存性結合配列に関してK_Dを決定し、下記の表４の縦列５に報告する。K_D決定のために、アプタマー転写産物を、１０％変性ポリアクリルアミドゲルにて精製し、γ－^{32}Ｐ　ＡＴＰで５’末端を標識した。ドットブロットアッセイにおいてヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号５）の８点滴定を用い（１ｕＭ、３００ｎＭ、１００ｎＭ、３０ｎＭ、１０ｎＭ、３ｎＭ、１ｎＭ、０ｎＭ）、ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈ（ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈバージョン３．５１、Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いて等式ｙ＝（最大値／（１＋Ｋ／タンパク質））＋ｙ切片を適合させることによってK_D値を計算した。本明細書中に記載される実施例において単一のクローンK_Dを決定するのに用いられた全てのドットブロットアッセイに関して、ろ過および定量の前に、標的タンパク質、例えばヒトｖＷＦ　Ａ１ドメインを、０．１ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡを含有する１×ダルベッコＰＢＳバッファーで希釈し、標識アプタマーとともに３０分間２４℃でインキュベートする。

【０２１０】

（表４　ヒトおよびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインｒＲｆＹアプタマー結合活性＊）
（ＮＤ＝行っていない）

【０２１１】

【表４】

アプタマー	スクリーン一 ヒト／タンパク質なし	スクリーン一 ウサギ／タンパク質なし	ヒト A1 K_D (nM)
(AMX201.B1) (SEQ ID NO 11)	ND	ND	19
(AMX198.G1)SEQ ID NO 12	1.89	1.90	45
(AMX201.H3)SEQ ID NO13	1.88	1.89	90
(AMX201.B3)SEQ ID NO 14	1.69	1.64	ND
(AMX201.G1)SEQ ID NO 15	2.14	2.20	190
(AMX198.C6)SEQ ID NO 16	3.03	4.62	249
(AMX201.B11)SEQ ID NO 17	1.55	1.52	ND
(AMX201.D10)SEQ ID NO 18	1.59	1.52	ND
(AMX198.C10)SEQ ID NO 19	1.40	3.39	555
(AMX201.H4) SEQ ID NO 20	1.79	1.86	ND
(AMX201.G9)SEQ ID NO 21	2.06	2.11	182

【０２１２】

【表４－２】

(AMX201.H11)SEQ ID NO 22	1.75	1.40	ND
(AMX201.C8)SEQ ID NO 23	2.47	1.50	0.2
(AMX201.H1)SEQ ID NO 24	2.61	2.46	189
(AMX198.E11)SEQ ID NO 25	1.03	2.37	1056
(AMX198.A10)SEQ ID NO 26	1.26	5.74	1860
(AMX201.D4)SEQ ID NO 27	2.23	2.46	ND
(AMX201.D3)SEQ ID NO 28	1.76	1.52	ND
(AMX201.A8)SEQ ID NO 29	1.82	1.51	ND
(AMX198.E5)SEQ ID NO 30	1.60	1.56	172

＊ヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン配列番号５をアプタマースクリーンおよびアプタマーK_Dに使用した。

【０２１３】

上記の表４に特徴付けられるｒＲｆＹアプタマーの核酸配列を下記に示す。下記の各アプタマーの独特の配列は、配列

【０２１４】

【化１７】

GGAGCGCACTCAGCCAC

（配列番号２２１）のすぐ後に続くヌクレオチド１８で始まり、３’固定核酸配列

【０２１５】

【化１８】

TTTCGACCTCTCTGCTAGC

（配列番号２２２）にぶつかるまで続く。

【０２１６】

別に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、５’から３’の方向で表し、プリン（ＡおよびＧ）が２’－ＯＨ（リボ）であり、ピリミジン（ＵおよびＣ）が２’－フルオロであるｒＲｆＹ　ＳＥＬＥＸ^{TM}条件下で選択した。

【０２１７】

【化１９】

(AMX201.B1) SEQ ID NO 11
GGAGCGCACUCAGCCACAGAGCCCUGAGUGUAUGAUCGCCUAGAUCUAUCGAUGCUUUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX198.G1) SEQ ID NO 12
GGAGCGCACUCAGCCACAACACUAAUGGGGAAAGUUCAAGGAUUCUUGACCGGUGCGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX201.H3) SEQ ID NO 13

【０２１８】
【化２０】

GGAGCGCACUCAGCCACUAACGGUUGAUCUCAGGACUAAAUAGUCAACAAGGAUGCGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX201.B3) SEQ ID NO 14
GGAGCGCACUCAGCCACAGAGCCCUGAGUGUAUGAUCGCCGAGAUCUAUCGAUGCUUUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX201.G1) SEQ ID NO 15
GGAGCGCACUCAGCCACGCUCGGUGGGGAAAUUUUAGCCUAAUUGGCUACUUGUGCGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX198.C6) SEQ ID NO 16
GGAGCGCACUCAGCCACGGUGGUCAGUCAGUGAUAUGAUUAAGUUCAGCUGUGGCUGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX201.B11) SEQ ID NO 17
GGAGCGCACUCAGCCACACCGAGGCUGGAUAUCUACGAGAGGAAGUGCUGCUUGAAUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX201.D10) SEQ ID NO 18
GGAGCGCACUCAGCCACACUGAGGCUGGAUAUCUACGAGAGGAAGUGCUGCUUGGAUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX198.C10) SEQ ID NO 19
GGAGCGCACUCAGCCACUGGUCCUUAGCUAGUUGUACUAGCGACGCGUUCAGGUGGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX201.H4) SEQ ID NO 20
GGAGCGCACUCAGCCACUAACGGUUGAUCUCAGGACUAAUAGUCAACAAGGAUGCGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX201.G9) SEQ ID NO 21
GGAGCGCACUCAGCCACUAACGGCUGAUCUCAGGACUAAAUAGUCAACAAGGAUGCGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX201.H11) SEQ ID NO 22
GGAGCGCACUCAGCCACCCUGUCGUCUUUUGGUAGUCAGCCAAAAGCUAGUUGGUUGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX201.C8) (ARC840) SEQ ID NO 23
GGAGCGCACU_CAGCCACCCUCGCAAG_CAUUUUAAGAAUGA_CUUGUGCCGCUGGCUG_UUUUCGACCUCUCUGCUAG
C

(AMX201.H1) SEQ ID NO 24
GGAGCGCACUCAGCCACUUUACGGUGAAAGUCUCUCGGGGUUCCGAGUUACGGUGCGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX198.E11) SEQ ID NO 25
GGAGCGCACUCAGCCACGGUAACAUUGUUUCCGGCGAUUCUUUGAACGCCGUCGUGGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX198.A10) SEQ ID NO 26
GGAGCGCACUCAGCCACCAGUUAUGCUGGCUUUGGUCUUUGACUGUCUGAGUGUUCGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX201.D4) SEQ ID NO 27
GGAGCGCACUCAGCCACUGGGGCUGAUCUCGCACGAUAGUUCGUGUCAAGGAUGCGUUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX201.D3) SEQ ID NO 28
GGAGCGCACUCAGCCACGCCCACGUCAAAUUAUAGUCUACUUUGAUGUGCCCGUGGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX201.A8) SEQ ID NO 29
GGAGCGCACUCAGCCACGCUGUACACUGAUGUUGUAACAUGUACCCCCUGGCUGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

(AMX198.E5) SEQ ID NO 30
GGAGCGCACUCAGCCACUUCGACUUUCAUGUCUGAAGUCCCUGCAGUGCGAGAGACGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

いかなる理論にも拘束されることを望まないが、このＳＥＬＥＸ^{TM}選択からの全長アプタマーおよび最小化アプタマー配列（下記の実施例２ａ参照）の両方に関しての上記の表４に示される結合データおよび下記の表２１に示される細胞アッセイにおける活性に基づいて、このアプタマー選択に由来する、予想される一般的な二次構造、および本発明の全ての実施形態のｖＷＦ標的への結合に必要な予想されるコア核酸配列を、配列番号２１７として図１０に示す（ＲＮＡｓｔｒｕｃｔｕｒｅ、バージョン４．１、Ｍａｔｈｅｗｓ，Ｄ．Ｈ．；Ｄｉｓｎｅｙ，Ｍ．Ｄ．；Ｃｈｉｌｄｓ，Ｊ．Ｌ．；Ｓｃｈｒｏｅｄｅｒ，Ｓ．Ｊ．；Ｚｕｋｅｒ，Ｍ．；およびＴｕｒｎｅｒ，Ｄ．Ｈ．、「Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔ

ｉｎｇ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｃｏｎｓｔｒａｉｎｔｓ ｉｎｔｏ ａ ｄｙｎａｍｉｃ ｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ ａｌｇｏｒｉｔｈｍ ｆｏｒ ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ ｏｆ ＲＮＡ ｓｅｃｏｎｄａｒｙ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ」、２００４年、Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳ、１０１、７２８７～７２９２頁）。ＡＲＣ８４０（配列番号２３）は、図１０に表される配列を有するアプタマーの一例であり、上記で列挙した配列中の太字で下線の領域は、必要な塩基を意味する。

【０２１９】

（実施例１Ｂ：ｒＲｄＹ ｖＷＦドメインＡ１アプタマーの選択）

２’－ＯＨプリンおよびデオキシ－ピリミジンヌクレオチド（ｒＲｄＹ）からなるヌクレオチドプールを用いて、選択を行って（１）ヒトｖＷＦ Ａ１ドメイン、（２）ウサギｖＷＦ Ａ１ドメイン、または（３）ヒトおよびウサギｖＷＦ Ａ１ドメインに結合するアプタマーを同定した。選択戦略によって、疎水性プレートに固定されたヒトおよびウサギｖＷＦ Ａ１ドメインに特異的な高親和性アプタマーが生じた。

【０２２０】

（プール調製）

配列

【０２２１】

【化２１】

5’-GGAGCGCACTCAGCCACNNN

これまでに記載されたように疎水性プレートに固定した。交互の選択のそれに続くサイクルにおいて、タンパク質標的は、ヒト全長ｖＷＦ（配列番号７）を用いた１１サイクル目を除いて、各サイクルをヒトおよびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン（それぞれ配列番号４および５）の間で交互にした。

【０２２４】

全ての場合において、１時間のタンパク質固定の後に上清を除去し、１２０μＬ　１×ダルベッコＰＢＳでウェルを４回洗浄した。次いで、タンパク質固定ウェルを１００ｕＬブロッキングバッファー（１％ＢＳＡを含む１×ダルベッコＰＢＳ）において１時間室温でブロックした。１サイクル目に、３３３ピコモルのプールＲＮＡ（2×10^{14}の独特の分子）を、ＢＳＡブロックされた固定タンパク質標的を含むウェル中の１００μＬ　１×ダルベッコＰＢＳにおいて１時間室温でインキュベートした。次いで上清を除去し、１２０μＬ　１×ダルベッコＰＢＳでウェルを４回洗浄した。後のサイクルでは、さらなる洗浄を加えて、陽性選択工程のストリンジェンシーを増大させた（表５、６および７参照）。２サイクル目の開始時およびそれに続く全てのサイクルにおいて、陽性選択工程の前に２つの陰性選択工程を含んだ。まず、プールＲＮＡを、ブロックしていないウェル中で１時間室温でインキュベートし、いかなるプラスチック結合配列もプールから除去した。第二の陰性選択工程において、ＲＮＡをＢＳＡブロックされたウェル（タンパク質標的を含まない）に１時間室温で移し、陽性選択の前にいかなるＢＳＡ結合配列もプールから除去した。２サイクル目の開始時およびそれに続く全てのサイクルにおいて、０．１ｍｇ／ｍＬ　ｔＲＮＡおよび０．１ｍｇ／ｍＬサケ精子ＤＮＡを非特異的競合物質として陽性選択反応に加えた。

【０２２５】

全ての場合において、固定タンパク質標的に結合したプールＲＮＡを、ＲＴミックス（１サイクル目：１００ｕＬ、２＋サイクル目：５０ｕＬ、（配列番号１０）の３’－プライマーおよびＴｈｅｒｍｏｓｃｒｉｐｔ　ＲＴ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号１１１４６－０１６、カリフォルニア州カールスバッド）を含有する）の添加とそれに続く６５℃で１時間のインキュベーションによって選択プレート中で直接逆転写した。得られたｃＤＮＡをＰＣＲの鋳型として用いた（１サイクル目：５００ｕＬ、２＋サイクル目：２５０ｕＬ、（配列番号９）の５’－プライマー、（配列番号１０）の３’－プライマー）およびＴａｑポリメラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号ＭＯ２６７Ｌ、マサチューセッツ州ベバリー）を含有する）。ＰＣＲ反応を以下の条件下で行った。ａ）変性工程：９４℃２分間；ｂ）サイクル工程：９４℃３０秒間、６０℃３０秒間、７２℃１分間；ｃ）最終伸長工程：７２℃３分間。十分なＰＣＲ産物が生じるまでサイクルを繰り返した。十分なＰＣＲ産物が生じるのに必要なサイクルの最低数を、表５、６および７に「ＰＣＲ閾値」として報告する。次いで、増幅したプール鋳型ＤＮＡをイソプロパノール沈殿させ、ＰＣＲ産物の半分を選択の次のサイクルのためのプールＲＮＡの転写の鋳型として用いた。転写されたＲＮＡプールを２サイクルごとに１０％ポリアクリルアミドゲルを用いてゲル精製した。ゲル精製されない場合は、転写されたＲＮＡプールを２つのＣｅｎｔｒｉ－Ｓｐｉｎ　１０カラム（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓカタログ番号ＣＳ－１０１、ニュージャージー州アデルフィア）を用いて脱塩した。全ての場合において、等量の、全転写産物の１０分の１を、選択の、それに続くサイクルの開始プールとして繰り越した。

【０２２６】

（表５　ｒＲｄＹプールを用いたヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン選択条件）

【０２２７】

【表５】

サイクル	標的	洗浄	PCR 閾値	精製
1	24 pmol hA1	4 x 120uL	13	脱塩 (2x)
2	24 pmol hA1	4 x 120uL	18	脱塩 (2x)
3	24 pmol hA1	4 x 120uL	16	ゲル精製
4	24 pmol hA1	8 x 120uL	15	脱塩 (2x)
5	24 pmol hA1	8 x 120uL	15	脱塩 (2x)
6	24 pmol hA1	8 x 120uL	15	ゲル精製
7	24 pmol hA1	8 x 120uL	12	脱塩 (2x)
8	24 pmol hA1	8 x 120uL	12	脱塩 (2x)
9	24 pmol hA1	8 x 120uL	10	ゲル精製
10	24 pmol hA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	10	脱塩 (2x)
11	12 pmol 全長 vWF	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	20	脱塩 (2x)
12	12 pmol 全長 vWF	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	20	ゲル精製

（表６　ｒＲｄＹプールを用いたウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン選択条件）

【０２２８】

【表６】

サイクル	標的	洗浄	PCR 閾値	精製
1	24 pmol rA1	4 x 120uL	13	脱塩 (2x)
2	24 pmol rA1	4 x 120uL	18	脱塩 (2x)
3	24 pmol rA1	4 x 120uL	10	ゲル精製
4	24 pmol rA1	8 x 120uL	15	脱塩 (2x)
5	24 pmol rA1	8 x 120uL	15	脱塩 (2x)
6	24 pmol rA1	8 x 120uL	15	ゲル精製
7	24 pmol rA1	8 x 120uL	15	脱塩 (2x)
8	24 pmol rA1	8 x 120uL	12	脱塩 (2x)
9	24 pmol rA1	8 x 120uL	10	ゲル精製
10	24 pmol rA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	10	脱塩 (2x)
11	24 pmol rA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	10	脱塩 (2x)
12	24 pmol rA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	10	ゲル精製

（表７　ｒＲｄＹプールを用いたヒト／ウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインの交互の選択条件）

【０２２９】

【表７】

サイクル	標的	洗浄	PCR 閾値	精製
1	12 pmol hA1/ 12pmol rA1	4 x 120uL	13	脱塩 (2x)
2	12 pmol hA1/ 12pmol rA1	4 x 120uL	18	脱塩 (2x)
3	24 pmol hA1	4 x 120uL	16	ゲル精製
4	24 pmol rA1	8 x 120uL	15	脱塩 (2x)
5	24 pmol hA1	8 x 120uL	15	脱塩 (2x)
6	24 pmol rA1	8 x 120uL	15	ゲル精製
7	24 pmol hA1	8 x 120uL	12	脱塩 (2x)
8	24 pmol rA1	8 x 120uL	12	脱塩 (2x)
9	24 pmol hA1	8 x 120uL	10	ゲル精製
10	24 pmol rA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	10	脱塩 (2x)
11	12 pmol 全長 vWF	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	20	脱塩 (2x)
12	24 pmol rA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	10	ゲル精製

（ｖＷＦ結合分析）

選択の進行を、サンドイッチフィルター結合アッセイを用いてモニタリングした。５’－^{32}Ｐ標識プールＲＮＡ（極微量濃度）を、０．１ｍｇ／ｍＬ　ｔＲＮＡおよび０．１ｍｇ／ｍＬサケ精子ＤＮＡを含有する１×ダルベッコＰＢＳ（５０ｕＬの最終体積中）中の、標的タンパク質対照なし、１００ｎＭヒトｖＷＦ　Ａ１ドメインまたは１００ｎＭウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインのいずれかとともに３０分室温でインキュベートし、次いでドットブロット装置（Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ　ａｎｄ　Ｓｃｈｕｅｌｌ、ニューハンプシャー州キーン）中のニトロセルロースおよびナイロンフィルターサンドイッチに適用した。ニトロセルロースに結合したプールＲＮＡのパーセンテージを、６、９および１２サイクル目の後に３点スクリーン（１００ｎＭヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン、１００ｎＭウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン、および標的対照なし）を用いて計算した。プール結合を、ナイーブプールＲＮＡ（０サイクル目）のものと比較した。ｒＲｄＹプール結合分析の結果は、表８に見られる。

【０２３０】

（表８　ｖＷＦ　Ａ１ドメインｒＲｄＹ選択プール結合アッセイ）

【０２３１】

【表８】

選択	プールサイクル	100nM hA1	100nM rA1	タンパク質なし
ナイーブプール	0 サイクル目	9.7%	10.4%	10.5%
ヒト vWF A1	6 サイクル目	19.6%	19.7%	15.3%
ウサギ vWF A1	6 サイクル目	14.3%	14.4%	12.3%
hA1/rA1	6 サイクル目	19.8%	19.8%	15.9%
ヒト vWF A1	9 サイクル目	23.8%	24.3%	15.6%
ウサギ vWF A1	9 サイクル目	24.4%	24.0%	16.6%
hA1/rA1	9 サイクル目	19.6%	19.4%	14.6%
ヒト vWF A1	12 サイクル 目	25.8%	23.0%	17.0%
ウサギ vWF A1	12 サイクル 目	20.7%	20.5%	13.8%
hA1/rA1	12 サイクル 目	25.2%	26.3%	16.8%

ヒトまたはウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン（それぞれ配列番号４および６）存在下対タンパク質の非存在下でのＲＮＡの結合の有意な陽性の比が見られた場合、製造業者の使用説明書に従って、ＴＯＰＯ　ＴＡクローニングキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号４５－０６４１、カリフォルニア州カールスバッド）を用いてプールをクローニングした。９および１２サイクル目のプール鋳型をクローニングおよび配列決定し（合計１８５配列）、３つの配列ファミリー内の７８の独特のクローンを生じた。全ての独特のクローンを転写、脱塩、５－^{32}Ｐ末端標識し、３点ドットブロットスクリーン（タンパク質標的対照なし、１００ｎＭヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号５）または１００ｎＭウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号６））においてアッセイした。データを、標的タンパク質存在下でニトロセルロースに結合したアプタマーの画分の、標的タンパク質非存在下で結合したアプタマーの画分に対する比として、下記の表９の第３および第４の縦列に示す。３つの配列ファミリーのうち、ファミリー＃１および＃２のメンバー、ならびに２つの個々の非ファミリーアプタマーは、ヒトｖＷＦドメインＡ１（配列番号５）およびウサギｖＷＦドメインＡ１（配列番号６）の両方に結合した。

【０２３２】

この最初のスクリーンに基づいて、ドットブロットアッセイを用いて１６の最高のｖＷＦ依存性結合配列に関してK_Dを決定した。K_D決定のために、アプタマーを変性ポリアクリルアミドゲルにて精製し、γ－^{32}Ｐ　ＡＴＰで５’末端を標識した。１×ＤＰＢＳ＋０．１ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡ中、室温で３０分間のドットブロットアッセイにおいて、ヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号５）の６点タンパク質滴定を用いた（３３３ｎＭ、１００ｎＭ、３３ｎＭ、１０ｎＭ、３ｎＭ、０ｎＭ）。ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈ（ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈバージョン３．５１、Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いて等式ｙ＝（最大値／（１＋Ｋ／タンパク質））＋ｙ切片を適合させることによってK_D値を計算した。

【０２３３】

タンパク質結合の特徴付けの結果を以下の表９の最後の縦列で表にする。

【０２３４】

（表９　ヒトおよびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインｒＲｄＹアプタマー結合活性＊）

【０２３５】

【表９】

#	アプタマー	スクリーン一 ヒト／タンパク質なし	スクリーン一 ウサギ／タンパク質なし	ヒト A1 K_D (nM)
1	(AMX203.D6) SEQ ID NO 31	1.92	1.57	523
2	(AMX205.H8) SEQ ID NO 32	2.04	2.84	788
3	(AMX205.H11) SEQ ID NO 33	2.18	2.41	144
4	(AMX205.A7) SEQ ID NO 34	1.24	1.37	ND
5	(AMX205.D11) SEQ ID NO 35	2.22	2.07	124
6	(AMX206.F9) SEQ ID NO 36	2.98	3.00	139
7	(AMX206.H9) SEQ ID NO 37	1.98	2.31	109
8	(AMX206.A10) SEQ ID NO 38	2.62	2.58	111
9	(AMX205.F9) SEQ ID NO 39	2.22	2.47	145
10	(AMX206.E7) SEQ ID NO 40	2.11	2.26	151
11	(AMX206.D7) SEQ ID NO 41	2.19	2.08	187
12	(AMX203.A6) SEQ	1.16	1.16	ND

【０２３６】

【表９－２】

	ID NO 42			
13	(AMX203.A1) SEQ ID NO 43	2.99	2.67	1148
14	(AMX203.G9) SEQ ID NO 44	1.65	1.35	1.3
15	(AMX205.H9) SEQ ID NO 45	2.36	3.14	178
16	(AMX206.D8) SEQ ID NO 46	2.80	3.76	370
17	(AMX203.F9) SEQ ID NO 47	1.45	1.29	ND
18	(AMX205.G9) SEQ ID NO 48	1.30	1.73	ND
19	(AMX205.F7) SEQ ID NO 49	3.13	2.37	1.5
20	(AMX205.H10) SEQ ID NO 50	1.88	2.47	397

＊ヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号５）をアプタマースクリーンおよびアプタマーK_Dに使用した
ＮＤ＝行っていない。
【０２３７】
上記の表９に特徴付けられるｒＲｄＹアプタマーの核酸配列を後述する。下記の各アプタマーの独特の配列は、
【０２３８】
【化２３】

GGAGCGCACTCAGCCAC (SEQ ID NO 221),

のすぐ後に続くヌクレオチド１８で始まり、３’固定核酸配列
【０２３９】
【化２４】

TTTCGACCTCTCTGCTAGC

（配列番号２２２）にぶつかるまで続く。
【０２４０】
別に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、５’から３’の方向で表し、アデノシン三リン酸およびグアノシン三リン酸が２’－ＯＨであり、シチジン三リン酸およびチミジン三リン酸がデオキシである、ｒＲｄＹ　ＳＥＬＥＸ^{TM}条件下で選択した。
【０２４１】
（ｖＷＦ　ｒＲｄＹ　ＳＥＬＥＸ^{TM}ファミリー＃１）
ｖＷＦ　ｒＲｄＹファミリー＃１のコア標的タンパク質結合モチーフを、以下の配列中の太字および下線で示す。
【０２４２】
【化２５】

(AMX203.G9) (ARC842) SEQ ID NO 44
GGAGCGCACT **CAGCCACGGGGTGGGTAGACGGCGGGTATGTGGCTG** GTGTCGAAGGGTTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX203.F9) SEQ ID NO 47
GGAGCGCACTCAGC **CACTGAAGGGTAAGGACGAGGAGGGTATACAGTG** TGCGCGTGTATTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX203.A6) SEQ ID NO 42
GGAGCGCACTCA **GCCACCACGGGGACGGGTAGGGCGGGCGAGGTGGTGGC** ATTAGCGTTTCGACCTCTCTGCTAGC

予想される二次構造および本発明のいくつかの実施形態のｖＷＦ標的への結合に必要なコア核酸配列を、図１２に配列番号２１８として表す。
【０２４３】
（ｖＷＦ　ｒＲｄＹ　ＳＥＬＥＸ^{TM}ファミリー＃２）
【０２４４】

【化２６】

(AMX203.D6) SEQ ID NO 31
GGAGCGCACTCAGCCACAGTTCTGTCGGTGATGAATTAGCGCGAGAGCTGTGGGACGTTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX205.H8), SEQ ID NO 32
GGAGCGCACTCAGCCACAAACGGACGGTGATGGATTAACGCGGGTTTATGGCAAGGTTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX205.H11), SEQ ID NO 33
GGAGCGCACTCAGCCACGGCACGACGGTGATGGATTAGCGCGGTGTCGGTGGTGTCATTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX205.D11), SEQ ID NO 35
GGAGCGCACTCAGCCACGGCACGACGGTGATGAATTAGCGCGGTGTCGGTGGTGTCATTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX206.F9), SEQ ID NO 36
GGAGCGCACTCAGCCACGGAGCGTCGGTGATGGATTAGCGCGGCTCCGTGGTACACATTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX206.H9), SEQ ID NO 37
GGAGCGCACTCAGCCACGGAGCGTCGGTGATGGATTAGCGCGGTTCCGTGGTACACCTTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX206.A10), SEQ ID NO 38
GGAGCGCACTCAGCCACGGCATGACGGTGATGAATTAGCGCGGTGTCGGTGGTGTCATTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX205.F9), SEQ ID NO 39
GGAGCGCACTCAGCCACGGAGCGTCGGTGATGGATTAGCGCGGCTCCGTGGTACGCCTTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX206.E7), SEQ ID NO 40
GGAGCGCACTCAGCCACGGAGCGTCGGTGATGGATTAGCGCGGCTCCGTGGTACACCTTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX206.D7), SEQ ID NO 41
GGAGCGCACTCAGCCACGGCACGACGGTGATGAATTAGCGCGGTGTCGGTGGTGTTATTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX203.A1), SEQ ID NO 43
GGAGCGCACTCAGCCACAGTTCTGTCGGTGATGAATTAGCGCGGGAGCTGTGGGACGTTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX205.H9), SEQ ID NO 45
GGAGCGCACTCAGCCACGACGGTGATGGATTAGCGCGGTGGAGAAGATGCGCTGTTGTTTCGACCTCTCTGCTAGC

【０２４５】

【化２７】

(AMX206.D8), SEQ ID NO 46
GGAGCGCACTCAGCCACGACGGTGATGGATTAGCGCGGTGGATCTTAACGTGCGAGTTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX205.G9), SEQ ID NO 48
GGAGCGCACTCAGCCACAACTGGTTGTCGGTGATGGCATTAACGCGGACCAGGCATGTTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX205.H10), SEQ ID NO 50
GGAGCGCACTCAGCCACTGTTGCCGACGGTGATGTATTAACGCGGGCAACGTTGGTGTTTCGACCTCTCTGCTAGC

（ｖＷＦ　ｒＲｄＹ　ＳＥＬＥＸ™単一配列）

配列番号４９の予想されるコア核酸結合モチーフを、以下に太字および下線で示す。

【０２４６】

【化２８】

(AMX205.F7) (ARC 841) SEQ ID NO 49
GGAGCGCACT**CAGCCACACGACATTGGCGGGTTGTAATTACCACGCATGGCTG**TTTGTTTCGACCTCTCTGCTAGC

(AMX205.A7), SEQ ID NO 34
GGAGCGCACTCAGCCACTCAAGGGGGTCGCGTGGGGACGAAGGGTTGCAGTGTGTCGTTTCGACCTCTCTGCTAGC

予想される、本発明のいくつかの実施形態のｖＷＦ標的への結合に必要なコア核酸配列および二次構造を、図１３に配列番号２１９として表す。

【０２４７】

（実施例１Ｃ：ＤＮＡ　ｖＷＦドメインＡ１アプタマーの選択＃１）

デオキシーヌクレオチド（ＤＮＡ）からなるヌクレオチドプールを用いて選択を行って（１）ヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン、（２）ウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン、または（３）ヒトおよびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインに結合するアプタマーを同定した。選択戦略によって、疎水性プレートに固定されたヒトおよびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインに特異的な高親和性アプタマーが生じた。

【０２４８】

（プール調製）

配列

【０２４９】

【化２９】

5’-

CTACCTACGATCTGACTAGCNNN

洗浄を加えて、陽性選択工程のストリンジェンシーを増大させた（表１０、１１および１２参照）。２サイクル目の開始時およびそれに続く全てのサイクルにおいて、陽性選択工程の前に２つの陰性選択工程を含んだ。まず、プールＤＮＡを、ブロックしていないウェル中で１時間室温でインキュベートし、いかなるプラスチック結合配列もプールから除去した。第二の陰性選択工程において、ＤＮＡをＢＳＡブロックされたウェル（タンパク質標的を含まない）に１時間室温で移し、陽性選択の前にいかなるＢＳＡ結合配列もプールから除去した。２サイクル目の開始時およびそれに続く全てのサイクルにおいて、０．１ｍｇ／ｍＬ　ｔＲＮＡおよび０．１ｍｇ／ｍＬサケ精子ＤＮＡを非特異的競合物質として陽性選択反応に加えた。

【０２５３】

全ての場合において、固定タンパク質標的に結合したプールＤＮＡを、溶出バッファー（９０℃に予熱、７Ｍ尿素、１００ｍＭ　ＮａＯＡｃ　ｐＨ５．３、３ｍＭ　ＥＤＴＡ）を含む２×１００μＬ洗浄液で５分間溶出した。両方の溶出物をプールし、エタノールの添加によって沈殿させ、次いで最初のＰＣＲ（配列番号５２の５’－プライマーおよび配列番号５３の３’－プライマー、ならびにＴａｑポリメラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｍ０２６７Ｌ、マサチューセッツ州ベバリー）を含む１００μＬ反応）において増幅した。以下の条件下でＰＣＲ反応を行った。ａ）変性工程：９４℃２分間；ｂ）サイクル工程：９４℃３０秒間、５２℃３０秒間、７２℃１分間；ｃ）最終的伸長工程：７２℃３分間。十分なＰＣＲ産物が生じるまでサイクルを繰り返した。十分なＰＣＲ産物を生じるのに必要なサイクルの最低数を、表１０、１１および１２に「ＰＣＲ閾値」として報告する。１０μＬのＰＣＲ産物を、プレップスケールＰＣＲ反応のために別の３００μＬのＰＣＲミックスに添加した。プレップスケールＰＣＲ産物をエタノール沈殿し、アルカリ加水分解（３３３ｍＭ　ＮａＯＨ、９０℃、１５分）に供した。１０％変性ポリアクリルアミドゲルにて鎖を分離し、より低い移動度で移動した一本鎖ＤＮＡプールをゲルから切除し、受動的に溶出し、イソプロパノールで沈殿させた。全ての場合において、等量の、全一本鎖ＤＮＡ産物の半分を、選択の、それに続くサイクルの、開始プールとして繰り越した。

【０２５４】

（表１０　ＤＮＡプールを用いたヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン選択条件）

【０２５５】

【表１０】

サイクル	標的	洗浄	PCR 閾値	精製
1	24 pmol hA1	4 x 120uL	10	ゲル精製
2	24 pmol hA1	4 x 120uL	15	ゲル精製

【０２５６】

【表１０－２】

3	24 pmol hA1	4 x 120uL	13	ゲル精製
4	24 pmol hA1	8 x 120uL	15	ゲル精製
5	24 pmol hA1	8 x 120uL	15	ゲル精製
6	24 pmol hA1	8 x 120uL	20	ゲル精製
7	24 pmol hA1	8 x 120uL	10	ゲル精製
8	24 pmol hA1	8 x 120uL	10	ゲル精製
9	24 pmol hA1	8 x 120uL	10	ゲル精製
10	24 pmol hA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	12	ゲル精製
11	12 pmol 全長 vWF	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	18	ゲル精製
12	12 pmol 全長 vWF	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	15	ゲル精製

（表１１　ＤＮＡプールを用いたウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン選択条件）

【０２５７】

【表１１】

サイクル	標的	洗浄	PCR 閾値	精製
1	24 pmol rA1	4 x 120uL	10	ゲル精製
2	24 pmol rA1	4 x 120uL	13	ゲル精製
3	24 pmol rA1	4 x 120uL	13	ゲル精製
4	24 pmol rA1	8 x 120uL	15	ゲル精製
5	24 pmol rA1	8 x 120uL	15	ゲル精製
6	24 pmol rA1	8 x 120uL	20	ゲル精製
7	24 pmol rA1	8 x 120uL	10	ゲル精製

【０２５８】

【表１１－２】

8	24 pmol rA1	8 x 120uL	10	ゲル精製
9	24 pmol rA1	8 x 120uL	10	ゲル精製
10	24 pmol rA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	12	ゲル精製
11	24 pmol rA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	10	ゲル精製
12	24 pmol rA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	10	ゲル精製

（表１２　ＤＮＡプールを用いたヒト／ウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインの交互の選択条件）

【０２５９】

【表１２】

サイクル	標的	洗浄	PCR 閾値	精製
1	12 pmol hA1/ 12pmol rA1	4 x 120uL	12	ゲル精製
2	12 pmol hA1/ 12pmol rA1	4 x 120uL	15	ゲル精製
3	24 pmol hA1	4 x 120uL	10	ゲル精製
4	24 pmol rA1	8 x 120uL	15	ゲル精製
5	24 pmol hA1	8 x 120uL	15	ゲル精製
6	24 pmol rA1	8 x 120uL	20	ゲル精製
7	24 pmol hA1	8 x 120uL	12	ゲル精製
8	24 pmol rA1	8 x 120uL	12	ゲル精製
9	24 pmol hA1	8 x 120uL	12	ゲル精製
10	24 pmol rA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	12	ゲル精製
11	12 pmol 全長 vWF	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	18	ゲル精製
12	24 pmol rA1	6 x 120uL; 2 x 120uL (それぞれ15分)	10	ゲル精製

（ｖＷＦ結合分析）

選択の進行を、サンドイッチフィルター結合アッセイを用いてモニタリングした。５’－^{32}Ｐ標識プールＤＮＡ（極微量濃度）を、０．１ｍｇ／ｍＬ　ｔＲＮＡおよび０．１ｍｇ／ｍＬサケ精子ＤＮＡを含有する１×ダルベッコＰＢＳ（５０ｕＬの最終体積中）中

の、標的タンパク質対照なし、１００ｎＭヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号４）または１００ｎＭウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号６）のいずれかとともに３０分間室温でインキュベートし、次いでドットブロット装置（Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ　ａｎｄ　Ｓｃｈｕｅｌｌ、ニューハンプシャー州キーン）中のニトロセルロースおよびナイロンフィルターサンドイッチに適用した。ニトロセルロースに結合したプールＤＮＡのパーセンテージを、６、９および１２サイクル目の後に３点スクリーン（タンパク質標的対照なし、１００ｎＭヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号５）、１００ｎＭウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号６））を用いて計算した。プール結合をナイーブプールＤＮＡ（０サイクル目）のものと比較した。ＤＮＡプール結合分析の結果は、表１３に見られる。

【０２６０】

（表１３　ｖＷＦ　Ａ１ドメインＤＮＡ選択プール結合アッセイ）

【０２６１】

【表１３】

選択	プールサイクル	100nM hA1	100nM rA1	タンパク質なし
ナイーブプール	0 サイクル目	30.1%	35.4%	29.4%
ヒト vWF A1	6 サイクル目	34.4%	36.4%	NA
ウサギ vWF A1	6 サイクル目	37.9%	36.8%	35.6%
hA1/rA1	6 サイクル目	47.9%	50.6%	49.0%
ヒト vWF A1	9 サイクル目	30.4%	43.7%	19.1%
ウサギ vWF A1	9 サイクル目	15.9%	35.0%	6.6%
hA1/rA1	9 サイクル目	40.8%	49.5%	34.7%
ヒト vWF A1	12サイクル目	36.7%	45.9%	33.0%
ウサギ vWF A1	12サイクル目	23.7%	38.7%	13.4%
hA1/rA1	12サイクル目	21.4%	34.2%	16.4%

ヒトまたはウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン存在下対タンパク質の非存在下でのＤＮＡの結合の有意な陽性の比が見られた場合、製造業者の使用説明書に従って、ＴＯＰＯ　ＴＡクローニングキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カリフォルニア州カールスバッド、カタログ番号４５－０６４１）を用いてプールをクローニングした。９および１２サイクル目のプール鋳型をクローニングおよび配列決定し（合計２４３配列）、８つの配列ファミリー内の１０６の独特のクローンを生じ、そのうち４１はｖＷＦ標的に結合し、以下に記載するファミリーに分類された。

【０２６２】

全ての独特のクローンを３点ドットブロットスクリーン（タンパク質標的対照なし、１００ｎＭヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号５）または１００ｎＭウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号６））においてアッセイした。データを、標的タンパク質の存在下でニトロセルロースに結合したアプタマーの画分の、標的タンパク質の非存在下で結合したアプタマーの画分に対する比として、下記の表１４の第３および第４の縦列に示す。

【０２６３】

この最初のスクリーンに基づいて、１０のｖＷＦ依存性結合配列に関してK_Dを決定した。K_D決定のために、アプタマーを$\gamma-^{32}P$　ＡＴＰで５’末端標識し、１００ｎＭの一定のタンパク質濃度、および１×ＤＰＢＳ＋０．１ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡ中、室温で３０分間の８点非放射性競合物質ＤＮＡ滴定（３３３ｎＭ、１００ｎＭ、３３ｎＭ、１０ｎＭ、３ｎＭ、１ｎＭ、３３ｐＭ、０ｐＭ）で競合ドットブロットアッセイを行った。ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈ（ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈバージョン３．５１、Ｓｙｎｅｒｇｙ

Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いて等式ｙ＝（最大値／（１＋Ｋ／タンパク質））＋ｙ切片を適合させることによってK_D値を計算した。タンパク質結合の特徴付けの結果を、表１４で表にする。

【０２６４】

（表１４　ヒトおよびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインＤＮＡアプタマー結合活性＊）

【０２６５】

【表１４】

#	アプタマー	スクリーンー ヒト／タンパク質 なし	スクリーンー ウサギ／ タンパク質なし	ヒト A1 K_D (nM)
1	1 (AMX199.B3) SEQ ID NO 54	1.76	1.99	30
2	(AMX199.D11) SEQ ID NO 55	4.19	3.42	30
3	(AMX200.G11) SEQ ID NO 56	1.73	1.28	ND
4	(AMX200.D11) SEQ ID NO 57	3.34	2.04	ND
5	(AMX200.D8) SEQ ID NO 58	2.86	1.61	ND
6	(AMX200.C11) SEQ ID NO 59	6.00	3.64	26
7	(AMX199.G10) SEQ ID NO 60	4.97	2.66	22
8	(AMX199.F7) SEQ ID NO 61	5.47	5.00	22
9	(AMX200.A7) SEQ ID NO 62	0.97	0.96	ND
10	(AMX200.B9) SEQ ID NO 63	2.54	2.06	ND
11	(AMX200.B1) SEQ ID NO 64	4.01	3.01	ND
12	(AMX199.C2) SEQ ID NO 65	5.09	4.61	17
13	(AMX200.B8) SEQ ID NO 66	4.13	3.13	ND
14	(AMX200.F11) SEQ	3.83	3.25	34

【０２６６】

【表１４－２】

	ID NO 67			
15	(AMX200.D1) SEQ ID NO 68	1.26	1.06	ND
16	(AMX200.F9) SEQ ID NO 69	0.97	0.99	ND
17	(AMX199.B7) SEQ ID NO 70	4.08	3.65	29
18	(AMX200.D3) SEQ ID NO 71	2.68	2.41	36
19	(AMX199.C4) SEQ ID NO 72	3.60	2.85	34
20	(AMX200.E8) SEQ ID NO 73	1.04	1.03	ND
21	(AMX199.F10) SEQ ID NO 74	1.17	1.24	ND
22	(AMX199.F6) SEQ ID NO 75	1.37	1.30	ND
23	(AMX199.G5) SEQ ID NO 76	1.41	1.34	ND
24	(AMX199.F11) SEQ ID NO 77	1.44	1.35	ND
25	(AMX199.H7) SEQ ID NO 78	1.32	1.14	ND
26	(AMX199.A10) SEQ ID NO 79	1.25	1.29	ND
27	(AMX199.G1) SEQ ID NO 80	1.19	1.26	ND
28	(AMX199.F1) SEQ ID NO 81	1.32	1.36	ND
29	(AMX199.G4) SEQ ID NO 82	1.19	1.11	ND
30	(AMX200.A11) SEQ ID NO 83	1.49	1.19	ND
31	DL.159.83.31 (AMX200.H8) SEQ ID NO 84	1.86	1.27	ND
32	(AMX199.F8) SEQ ID NO 85	1.78	1.79	ND
33	(AMX199.B6) SEQ ID NO 86	2.01	1.91	ND

【０２６７】

【表１４－３】

34	(AMX199.D8) SEQ ID NO 87	1.89	2.00	ND
35	(AMX200.E10) SEQ ID NO 88	1.69	1.82	ND
36	(AMX202.H10) SEQ ID NO 89	1.92	1.76	ND
37	(AMX202.B8) SEQ ID NO 90	1.66	1.41	ND
38	(AMX202.D6) SEQ ID NO 91	1.94	1.55	ND
39	(AMX202.A3) SEQ ID NO 92	2.28	2.10	ND
40	DL.159.83.98 (AMX202.A8) SEQ ID NO 93	1.27	1.27	ND
41	(AMX202.F6) SEQ ID NO 94	1.49	1.46	ND

＊ヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号５）をアプタマースクリーンおよびアプタマーK_Dに使用した
ＮＤ＝行っていない。
【０２６８】
上記の表１４に特徴付けられるＤＮＡアプタマーの核酸配列を以下に記載する。下記の各アプタマーの独特の配列は、配列
【０２６９】
【化３１】

CTACCTACGATCTGACTAGC (SEQ ID NO 52)

のすぐ後に続くヌクレオチド２１で始まり、３’固定核酸配列
【０２７０】
【化３２】

GCTTACTCTCATGTAGTTCC (SEQ ID NO 223)

にぶつかるまで続く。
【０２７１】
別に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、５’から３’の方向で表し、全てのヌクレオチドがデオキシであるＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}条件下で選択された。
【０２７２】
（ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}１、ファミリー＃１）
ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}１、ファミリー＃１の予想されるコア核酸結合配列を、以下のアプタマーＡＭＸ１９９．Ｂ３（配列番号５４）およびコンセンサス配列（配列番号９５）に関して太字および下線で示す。
【０２７３】

【化３３】

(AMX199.B3) SEQ ID NO 54
CTACCTACGATCTGACTAGCGGA **ATGAGAATGCTGATGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCAT**GTAGTTCC

(AMX200.C11) SEQ ID NO 59
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAGTGCTGATGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX200.G11) SEQ ID NO 56
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAACGAGAATGCTGATGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.D11) SEQ ID NO 55
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAATGCTGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX200.D8) SEQ ID NO 58
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAATGTTGATGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX200.D11) SEQ ID NO 57
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATAAGAATGCTGATGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.F7) SEQ ID NO 61
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAGTGCTGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX200.A7) SEQ ID NO 62
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAATGCTGATGGATTGTTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX202.D6) SEQ ID NO 91
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAAGGCTGATGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX200.B1) SEQ ID NO 64
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAATGCTGATGGATTGCCCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.G10) SEQ ID NO 60
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAATGTTGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX200.B8) SEQ ID NO 66
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAATGCTGATGGATTGCACAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX200.B9) SEQ ID NO 63
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAATGCTGATGGATTGCTCAGGTCTGCTGACTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX202.B8) SEQ ID NO 90
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGTATGCTGATGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX202.H10) SEQ ID NO 89
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAAGGCTGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX200.F9) SEQ ID NO 69
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGGATGCTGATGGATTGGTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX202.A3) SEQ ID NO 92
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAGCGCTGATGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.C2) SEQ ID NO 65
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAATGCTGGTGGATTGCCCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX200.F11) SEQ ID NO 67
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGGATGCTGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

【０２７４】

【化３４】

(AMX200.D1) SEQ ID NO 68
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAGTGCTGATGGATTGCTCAGGTCTACTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.C4) SEQ ID NO 72
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGGATGCTGATGGATTGCACAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX200.D3) SEQ ID NO 71
CTACCTACGATCTGACTAGCGCAATGAGGATGCTGATGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.B7) SEQ ID NO 70
CTACCTACGATCTGACTAGCGGGATGAGAGTGCTGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX200.E8) SEQ ID NO 73
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGGATGCTGGTGGATTGCTCAGGTCTGTTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}１、ファミリー＃１のコンセンサス配列は以下の通りである。

【０２７５】

【化３４－１】

SEQ ID NO 95
CTACCTACGATCTGACTAGCGGA**ATGAGRATGYTGRTGGATTGCHCAGGTCTRYTGRCTGCTTACTCTCAT**GTAGTTCC

配列中Ｙ＝ＣまたはＴ、Ｒ＝ＡまたはＧ、およびＨ＝Ａ、ＣまたはＴである。

【０２７６】

（ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}１ファミリー＃２）

【０２７７】

【化３５】

(AMX199.F10) SEQ ID NO 74
CTACCTACGATCTGACTAGCGAAACACTAGGTTGGTTAGGATTGGTGTGTTTCCGTTCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX199.F6) SEQ ID NO 75
CTACCTACGATCTGACTAGCGAAACACTAGGTTGGTTAGGATTGGTGTGTTCCCGCTCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.H7) SEQ ID NO 78
CTACCTACGATCTGACTAGCGAAACACTAGGTTGGTTAGGATTGGTGTGTTTCCGCTTTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.G5) SEQ ID NO 76
CTACCTACGATCTGACTAGCGAAACACTAGGTTGGTTAGGATTGGTGTGTTCCCGCCCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.F11) SEQ ID NO 77
CTACCTACGATCTGACTAGCGAAACACTAGGTTGGTTAGGATTGGTGTGTTTCTGCTCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.A10) SEQ ID NO 79
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAACACTAGGTTGGTTAGGATTGGTGTGTTCCCGTTTTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.G1) SEQ ID NO 80
CTACCTACGATCTGACTAGCGAAACACTAGGTTGGTTAGGATTGGTGTGTTCCCGCTTTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.G4) SEQ ID NO 82
CTACCTACGATCTGACTAGCGAAACACTAGGTTGGTTAGGGTTGGTGTGTTCCCGCTTTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.F1) SEQ ID NO 81
CTACCTACGATCTGACTAGCGAAACACTAGGTTGGTTAGGATTGGTGTGTTCCCGCTATGCTTACTCTCATGTAGTTCC

ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}ファミリー＃２のコンセンサス配列は以下の通りである。

【０２７８】

【化３６】

SEQ ID NO 96

CTACCTACGATCTGACTAGCGRAACACTAGGTTGGTTAGGRTTGGTGTGTTYCYGYYHGCTTACTCTCATGTAGTTCC

配列中Ｙ＝ＣまたはＴ、Ｒ＝ＡまたはＧ、およびＨ＝Ａ、ＣまたはＴである。

【０２７９】

（ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}１ファミリー＃３）

【０２８０】

【化３７】

(AMX199.B6) SEQ ID NO 86
CTACCTACGATCTGACTAGCAAGGGGATTGGCTCCGGGTCTGGCGTGCTTGGTACCTCCGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.D8) SEQ ID NO 87
CTACCTACGATCTGACTAGCAAGGGGATTGGCTCCGGGTCTGGCGTGCTTGGCATCTTCGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX199.F8) SEQ ID NO 85
CTACCTACGATCTGACTAGCAAGGGGATTGGCTCCGGGTCTGGCGTGCTTGGCACCTCTGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX200.E10) SEQ ID NO 88
CTACCTACGATCTGACTAGCAAGGGGATTGGCTCCGGGTCTGGCGTGCTCGGCACCTTTGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX202.F6) SEQ ID NO 94
CTACCTACGATCTGACTAGCAAGGGGATTGGCTCCGGGTCTGGCGTGCTCGGCACCTTCGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX202.A8) SEQ ID NO 93
CTACCTACGATCTGACTAGCAAGGGGATTGGCTCCGGGTCTGGCGTGCTCGGCACTTCCGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}１、ファミリー＃４

【０２８１】

【化３８】

(AMX200.A11) SEQ ID NO 83
CTACCTACGATCTGACTAGCTGAGTAGTTAGTAACTTTTTATTATGGTTTGGTGGGTCTGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

(AMX200.H8) SEQ ID NO 84
CTACCTACGATCTGACTAGCTGAGTAGTCAGTAATTTTTTATTATGGTTTGGTGGGCCTGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

（実施例１Ｄ：ＤＮＡ　ｖＷＦアプタマーの選択＃２）

全長ヒトｖＷＦおよびウサギｖＷＦドメインＡ１を交差選択において用いて、単一の組のＤＮＡ選択を行った。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、本発明者らの仮説は、かかる選択は、うまく選択されたアプタマーが全長ｖＷＦに結合すること、Ａ１ドメインに特異的に結合すること、並びにヒトおよびウサギタンパク質の間で交差反応することを必要とするというものである。この第二の組のＤＮＡ選択に由来する優性配列ファミリーは、全長ヒトｖＷＦ、ウサギｖＷＦドメインＡ１に結合し、下記の実施例３に記載されるＦＡＣＳおよびＢＩＰＡ生物学的アッセイの両方で機能的である。

【０２８２】

全長ヒトｖＷＦ／ウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインの交互の選択を用いて、選択を行って全長ヒトｖＷＦおよびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインに結合するアプタマーを同定した。この選択は、デオキシーヌクレオチド（ＤＮＡ）からなるヌクレオチドプールを用いた。選択戦略によって、疎水性プレートに固定された全長ヒトｖＷＦおよびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインに特異的な高親和性アプタマーが生じた。

プール調製

配列

【０２８３】
【化３９】

5’-
CTACCTACGATCTGACTAGCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGCTTACTCTCATGTAGTTCC -3’ (SEQ ID NO 51) (ARC 493)

を有するＤＮＡ鋳型を、ＡＢＩ　ＥＸＰＥＤＩＴＥ^{TM}ＤＮＡシンセサイザーを用いて合成し、標準的な方法により脱保護した。ＤＮＡ鋳型（配列番号５１）中のＮの連続は任意の組み合わせのヌクレオチドであり得、得られるアプタマーの独特の配列領域を生じる。標準的な条件下でプライマー
【０２８４】
【化４０】

(5’- CTACCTACGATCTGACTAGC -3')
(SEQ ID NO 52)および(5'- AGGAACTACATGAGAGTAAGC(OH) -3') (SEQ ID NO 53)

を用いて鋳型をＰＣＲ増幅した。ＰＣＲ産物をアルカリ加水分解（３３３ｍＭ　ＮａＯＨ、９０℃、１５分）とそれに続く沈殿に供した。１０％変性ポリアクリルアミドゲルにて鎖を分離し、より低い移動度で移動した一本鎖ＤＮＡプールをゲルから切除し、受動的に溶出し、イソプロパノールで沈殿させた。
【０２８５】
（選択）
最初の３サイクルの全長ヒトｖＷＦ／ウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインの交互の選択のために、２４ピコモルの全長ヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号７）および２４ピコモルのウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号６）を固定した。それに続くサイクルにおいて、タンパク質標的は、各サイクルでヒト全長ｖＷＦおよびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインの間を交互にした。全ての場合において、１時間のタンパク質固定の後に上清を除去し、１２０μＬ　１×ダルベッコＰＢＳでウェルを４回洗浄した。次いで、タンパク質固定ウェルを１００ｕＬブロッキングバッファー（１％ＢＳＡを含む１×ダルベッコＰＢＳ）において１時間室温でブロックした。１サイクル目に、３３３ピコモルのプールＤＮＡ（２×１０^{14}の独特の分子）を、ＢＳＡブロックされた固定タンパク質標的を含むウェル中の１００μＬ　１×ダルベッコＰＢＳにおいて１時間室温でインキュベートした。次いで上清を除去し、１２０μＬ　１×ダルベッコＰＢＳでウェルを４回洗浄した。後のサイクルでは、さらなる洗浄を加えて、陽性選択工程のストリンジェンシーを増大させた（表１５参照）。８サイクル目に、選択を分けて、ＳＥＬＥＸ^{TM}のストリンジェンシーを増大させる可能な手段として高塩濃度洗浄条件を含ませた（１×ダルベッコＰＢＳ＋４００ｍＭ　ＮａＣｌを用いる）（表１５参照）。２サイクル目の開始時およびそれに続く全てのサイクルにおいて、陽性選択工程の前に２つの陰性選択工程を含んだ。まず、プールＤＮＡを、ブロックしていないウェルにおいて１時間室温でインキュベートし、いかなるプラスチック結合配列もプールから除去した。第二の陰性選択工程において、ＤＮＡを、ＢＳＡブロックされたウェル（タンパク質標的を含まない）に１時間室温で移し、陽性選択の前にいかなるＢＳＡ結合配列もプールから除去した。２サイクル目の開始時およびそれに続く全てのサイクルにおいて、０．１ｍｇ／ｍＬ　ｔＲＮＡおよび０．１ｍｇ／ｍＬサケ精子ＤＮＡを、非特異的競合物質として陽性選択反応に加えた。
【０２８６】
全ての場合において、固定タンパク質標的に結合したプールＤＮＡを、溶出バッファー（９０℃に予熱、７Ｍ尿素、１００ｍＭ　ＮａＯＡｃ　ｐＨ５．３、３ｍＭ　ＥＤＴＡ）を含む２×１００μＬ洗浄液で５分間溶出した。両方の溶出物をプールし、エタノールの添加によって沈殿させ、次いで最初のＰＣＲ反応（配列番号５２の５’－プライマー、配列番号５３の３’－プライマー、およびＴａｑポリメラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ

Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｍ０２６７Ｌ、マサチューセッツ州ベバリー）を含む１００μＬ反応）において増幅した。以下の条件下でＰＣＲ反応を行った。ａ）変性工程：９４℃２分間；ｂ）サイクル工程：９４℃３０秒間、５２℃３０秒間、７２℃１分間；ｃ）最終的伸長工程：７２℃３分間。十分なＰＣＲ産物が生じるまで、サイクルを繰り返した。十分なＰＣＲ産物を生じるのに必要なサイクルの最低数を、表１５に「ＰＣＲ閾値」として報告する。１０μＬのＰＣＲ産物を、プレップスケールＰＣＲ反応のために別の３００μＬのＰＣＲミックスに添加した。プレップスケールＰＣＲ産物をエタノール沈殿し、アルカリ加水分解（３３３ｍＭ　ＮａＯＨ、９０℃、１５分）に供した。１０％変性ポリアクリルアミドゲルにて鎖を分離し、より低い移動度で移動した一本鎖ＤＮＡプールをゲルから切除し、受動的に溶出し、イソプロパノールで沈殿させた。全ての場合において、等量の、全一本鎖ＤＮＡ産物の半分を、選択の、それに続くサイクルの開始プールとして繰り越した。

【０２８７】

（表１５　ＤＮＡプールを用いた全長ヒトｖＷＦ／ウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインの交互の選択条件）

【０２８８】

【表１５】

サイクル	標的	洗浄		PCR 閾値		精製
1	24 pmol 全長ヒト / 24pmol rA1	4 x 120uL		15		ゲル精製
2	24 pmol 全長ヒト / 24 pmol rA1	4 x 120uL		13		ゲル精製
3	24 pmol 全長ヒト / 24 pmol rA1	4 x 120uL		10		ゲル精製
4	24 pmol 全長 ヒトvWF	4 x 120uL		10		ゲル精製
5	24 pmol rA1	4 x 120uL		10		ゲル精製
6	24 pmol 全長 ヒトvWF	8 x 120uL		10		ゲル精製
7	24 pmol rA1	8 x 120uL		10		ゲル精製
		通常の洗浄	高塩濃度洗浄	通常の洗浄	高塩濃度洗浄	
8	24 pmol 全長 ヒトvWF	8 x 120uL	8 x 120uL	10	10	ゲル精製
9	24 pmol rA1	8 x 120uL	8 x 120uL	10	13	ゲル精製
10	24 pmol 全長 ヒトvWF	8 x 120uL	8 x 120uL	10	10	ゲル精製
11	24 pmol rA1	8 x 120uL	8 x 120uL	10	10	ゲル精製

（ｖＷＦ結合分析）

選択の進行を、サンドイッチフィルター結合アッセイを用いてモニタリングした。５’－^{32}Ｐ標識プールＤＮＡ（極微量濃度）を、０．１ｍｇ／ｍＬ　ｔＲＮＡおよび０．１ｍｇ／ｍＬサケ精子ＤＮＡ、および０．１ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡを含有する１×ダルベッコＰＢＳ（５０ｕＬの最終体積中）中の、標的タンパク質対照なし、１００ｎＭ全長ヒトｖ

ＷＦ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍカタログ番号６８１３００、カリフォルニア州ラ・ホーヤ）または１００ｎＭウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインのいずれかとともに、３０分室温でインキュベートし、次いでドットブロット装置（Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ　ａｎｄ　Ｓｃｈｕｅｌｌ、ニューハンプシャー州キーン）中のニトロセルロースおよびナイロンフィルターサンドイッチに適用した。ニトロセルロースに結合したプールＤＮＡのパーセンテージを、７および９サイクル目の後に、タンパク質標的対照なし、３０ｎＭ／１００ｎＭ全長ヒトｖＷＦ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍカタログ番号６８１３００、カリフォルニア州ラ・ホーヤ）および３０ｎＭ／１００ｎＭウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号６）を用いてスクリーニングすることによって計算した。プール結合をナイーブプールＤＮＡ（０サイクル目）のものと比較した。ＤＮＡプール結合分析の結果は、下記の表１６に見られる。

【０２８９】

（表１６　全長ヒトｖＷＦ／ウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインＤＮＡ選択プール結合アッセイ）

【０２９０】

【表１６】

選択	プール サイクル	全長ヒト vWF		ウサギ vWF A1ドメイン		タンパク質なし
		30nM	100nM	30nM	100nM	
ナイーブプール	0 サイクル目	40.3%	39.8%	41.6%	45.5%	35.2%
ヒト vWF/rA1	7 サイクル目	59.4%	66.9%	58.9%	68.3%	39.9%
ナイーブプール	0 サイクル目	53.0%	55.1%	53.9%	56.9%	52.6%
ヒト vWF/rA1	9 サイクル目	70.9%	65.0%	71.7%	81.6%	54.5%
ヒト vWF/rA1 高塩濃度洗浄	9 サイクル目	72.1%	73.8%	74.5%	82.3%	59.7%

ヒトまたはウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン存在下対タンパク質の非存在下でのＤＮＡの結合の有意な陽性の比が見られた場合、製造業者の使用説明書に従って、ＴＯＰＯ　ＴＡクローニングキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号４５－０６４１、カリフォルニア州カールスバッド）を用いてプールをクローニングした。７および１１サイクル目のプール鋳型をクローニングおよび配列決定し（合計２１８配列）、６つのファミリー由来の配列はｖＷＦ標的結合活性を示す１２の配列ファミリー内の、１４６の独特のクローンを生じた。全ての独特のクローンを、３点ドットブロットスクリーン（タンパク質標的対照なし、２０ｎＭ全長ヒトｖＷＦ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍカタログ番号６８１３００、カリフォルニア州ラ・ホーヤ）、または２０ｎＭウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン）において２回アッセイした。データを、標的タンパク質存在下でニトロセルロースに結合したアプタマーの画分の、標的タンパク質非存在下で結合したアプタマーの画分に対する比として、下記の表１７の第３および第４の縦列に示す。

【０２９１】

この最初のスクリーンに基づいて、ドットブロットアッセイを用いて３つのｖＷＦ依存性結合配列に関してK_Dを決定した。K_D決定のために、アプタマーを、γ－^{32}ＰＡＴＰで５’末端標識し、全長ヒトｖＷＦおよびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインへの直接の結合に関して試験した。１×ＤＰＢＳ＋０．１ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡ中、室温で３０分間のド

ットブロットアッセイにおいて１２点タンパク質滴定（３００ｎＭ、１００ｎＭ、３０ｎＭ、１０ｎＭ、３ｎＭ、１ｎＭ、３００ｐＭ、１００ｐＭ、３０ｐＭ、１０ｐＭ、３ｐＭ、０ｐＭ）を用いた。ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈ（ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈバージョン３．５１、Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いて等式ｙ＝（最大値／（１＋Ｋ／タンパク質））＋ｙ切片を適合させることによってK_D値を計算した。タンパク質結合の特徴付けの結果を、以下の表１７で表にする。

【０２９２】

（表１７　全長ヒトｖＷＦおよびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインＤＮＡアプタマー結合活性＊）

【０２９３】

【表１７】

#	アプタマー	スクリーン－ヒト／タンパク質なし	スクリーン－ウサギ／タンパク質なし	全長ヒト vWF K_D (nM)	ウサギ vWF A1ドメイン K_D (nM)
1	AMX237.A11 (SEQ ID NO 98)	2.66	2.38	ND	ND
2	AMX237.A2 (SEQ ID NO 99)	2.60	2.34	ND	ND
3	AMX238.D12 (SEQ ID NO 100)	2.40	2.19	ND	ND
4	AMX237.H5 (SEQ ID NO 101)	1.63	1.61	ND	ND
5	AMX237.E2 (SEQ ID NO 102)	1.61	1.61	ND	ND
6	AMX237.B4 (SEQ ID NO 103)	1.42	1.38	ND	ND
7	AMX237.E9	2.13	2.06	ND	ND

【０２９４】

【表１７－２】

	(SEQ ID NO 104)				
8	AMX237.D11 (SEQ ID NO 105)	1.16	1.17	ND	ND
9	AMX238.G5 (SEQ ID NO 106)	3.06	2.68	ND	ND
10	AMX237.C7 (SEQ ID NO 107)	1.15	1.16	ND	ND
11	AMX238.D5 (SEQ ID NO 108)	1.46	1.40	ND	ND
12	AMX237.B11 (SEQ ID NO 109)	2.87	2.57	ND	ND
13	AMX237.F6 (SEQ ID NO 110)	1.20	1.21	ND	ND
14	AMX238.D8 (SEQ ID NO 111)	2.02	1.97	ND	ND
15	AMX238.G6 (SEQ ID NO 112)	1.25	1.22	ND	ND
16	AMX236.F8 (SEQ ID NO 113)	1.14	1.13	ND	ND
17	AMX237.G6 (SEQ ID NO 114)	3.80	3.63	0.20	47
18	AMX238.E9 (SEQ ID NO 115)	3.44	3.36	0.39	5.3
19	AMX238.E7 (SEQ ID NO 116)	3.02	2.83	ND	ND
20	AMX238.F3 (SEQ ID NO 117)	2.83	2.72	ND	ND
21	AMX238.H5	3.75	3.46	0.33	6.0

【０２９５】

【表１７－３】

	(SEQ ID NO 118)				
22	AMX237.C11 (SEQ ID NO 119)	2.04	1.95	ND	ND
23	AMX238.F2 (SEQ ID NO 120)	2.84	2.76	ND	ND
24	AMX237.F9 (SEQ ID NO 121)	2.21	2.31	ND	ND
25	AMX237.F12 (SEQ ID NO 122)	1.95	2.08	ND	ND
26	AMX237.C9 (SEQ ID NO 123)	2.05	2.19	ND	ND
27	AMX237.F10 (SEQ ID NO 124)	2.90	2.90	ND	ND
28	AMX236.H2 (SEQ ID NO 125)	2.12	2.06	ND	ND
29	AMX237.C5 (SEQ ID NO 126)	2.55	2.36	ND	ND
30	AMX236.A12 (SEQ ID NO 127)	2.64	2.41	ND	ND
31	AMX236.B8 (SEQ ID NO 128)	1.66	1.88	ND	ND
32	AMX236.A11 (SEQ ID NO 129)	2.02	2.02	ND	ND
33	AMX237.D5 (SEQ ID NO 130)	1.41	1.48	ND	ND
34	AMX236.E6 (SEQ ID NO	1.31	1.49	ND	ND

【０２９６】

【表１７－４】

	131)				
35	AMX236.C12 (SEQ ID NO 132)	1.99	2.24	ND	ND
36	AMX237.H10 (SEQ ID NO 133)	1.71	1.94	ND	ND
37	AMX237.G7 (SEQ ID NO 134)	2.68	2.54	ND	ND
38	AMX237.H8 (SEQ ID NO 135)	1.21	1.41	ND	ND
39	AMX236.G4 (SEQ ID NO 136)	1.70	1.72	ND	ND
40	AMX236.C1 (SEQ ID NO 137)	1.03	3.28	ND	ND
41	AMX237.E10 (SEQ ID NO 138)	1.12	6.04	ND	ND
42	AMX238.F5 (SEQ ID NO 139)	1.05	4.40	ND	ND
43	AMX237.C1 (SEQ ID NO 140)	0.76	3.47	ND	ND
44	AMX237.B12 (SEQ ID NO 141)	1.13	4.67	ND	ND
45	AMX238.A6 (SEQ ID NO 142)	0.92	3.47	ND	ND
46	AMX238.A11 (SEQ ID NO 143)	0.85	4.54	ND	ND
47	AMX236.C6 (SEQ ID NO 144)	1.06	5.77	ND	ND

【０２９７】

【表１７－５】

48	AMX238.F6 (SEQ ID NO 145)	1.18	5.36	ND	ND
49	AMX236.E2 (SEQ ID NO 146)	0.93	3.59	ND	ND
50	AMX238.G4 (SEQ ID NO 147)	1.09	1.39	ND	ND
51	AMX238.H9 (SEQ ID NO 148)	1.11	1.32	ND	ND
52	AMX237.B1 (SEQ ID NO 149)	2.00	2.10	ND	ND
53	AMX238.A3 (SEQ ID NO 150)	1.36	1.03	ND	ND
54	AMX237.C4 (SEQ ID NO 151)	0.97	1.31	ND	ND
55	AMX237.E5 (SEQ ID NO 152)	0.97	1.15	ND	ND
56	AMX237.F1 (SEQ ID NO 153)	0.98	1.22	ND	ND
57	AMX237.F5 (SEQ ID NO 154)	0.99	1.22	ND	ND
58	AMX238.H11 (SEQ ID NO 155)	0.98	1.14	ND	ND
59	AMX237.G2 (SEQ ID NO 156)	1.02	1.16	ND	ND
60	AMX238.A12 (SEQ ID NO 157)	1.23	0.99	ND	ND
61	AMX236.C9	1.24	1.00	ND	ND

【０２９８】

【表１７－６】

	(SEQ ID NO 158)				
62	AMX236.H1 (SEQ ID NO 159)	1.10	1.14	ND	ND
63	AMX236.F7 (SEQ ID NO 160)	1.18	1.20	ND	ND
64	AMX236.B3 (SEQ ID NO 161)	1.54	1.41	ND	ND
65	AMX238.D9 (SEQ ID NO 162)	1.22	0.97	ND	ND
66	AMX238.F7 (SEQ ID NO 163)	1.20	1.88	ND	ND
67	AMX236.G1 (SEQ ID NO 164)	1.47	1.51	ND	ND

＊全長ヒトｖＷＦ（配列番号７）およびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号６）をアプタマースクリーンおよびアプタマーK_Dに使用した
ＮＤ＝行っていない。
【０２９９】
上記の表１７で特徴付けられるＤＮＡアプタマーの核酸配列を以下に記載する。下記の各アプタマーの独特の配列は、配列
【０３００】
【化４１】

CTACCTACGATCTGACTAGC (SEQ ID NO 52),

のすぐ後に続くヌクレオチド２１で始まり、３’固定核酸配列
【０３０１】
【化４２】

GCTTACTCTCATGTAGTTCC (SEQ ID NO 223)

にぶつかるまで続く。
【０３０２】
別に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、５’から３’の方向で表し、全てのヌクレオチドがデオキシであるＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}下で選択された。
【０３０３】
（ｖＷＦ　ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}２、ファミリー１．１）
ファミリー１．１および１．２は、ＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）の親を生じた。下記のアプタマーＡＭＸ２３７．Ｅ９（配列番号１０４）およびＡＭＸ２３８．Ｈ５（配列番号１１８）に関して、標的フォン・ビルブラント因子への予想されるコア核酸結合配列に下線をし、太字で示す。
【０３０４】

【化４３】

AMX237.E9 (SEQ ID NO 104)
CTACCTACGATCTGACT**AGCTCCAGTGTTTTGTCTAATAACCGTGCGGTGCCTCCGTGAGCT**TACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.B11 (SEQ ID NO 109)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTTATCTAATAACCGTGCGGTGCCTCCGTGAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.A11 (SEQ ID NO 98)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTTATCCAATAACCGTGCGGTGCCTCCGTGAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.G5 (SEQ ID NO 106)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTTATTCAATAACCGTGCGGTGCCTCCGTGAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.D8 (SEQ ID NO 111)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTTATCCAACAACCGTGCGGTGCCTCCGTGAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.E2 (SEQ ID NO 102)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTCATCTAATAACCGTGCGGTGCCTCCGTGAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.H5 (SEQ ID NO 101)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTCATTTAATAACCGTGCGGTGCCTCCGTGAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.D5 (SEQ ID NO 108)
CTACCTACGATCTGAGTAGCTCCAGTGTTTTATTCAATAACCGTGCGGTGTCTCCGTGAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.A2 (SEQ ID NO 99)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTCATCCAATAACCGTGCGGTGCCTCCGTGAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.D12 (SEQ ID NO 100)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTCATTCAATAACCGTGCGGTGCCTCCGTGAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.F6 (SEQ ID NO 110)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTTATCTAATAACCGTGCGGTGCCTCCGTGATGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.D11 (SEQ ID NO 105)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTTATATAATAACCGTGCGGTGCCTCCGTGATGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.B4 (SEQ ID NO 103)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTCATCCAATAACCGTGCGGTGCTTCCGTGAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX236.F8 (SEQ ID NO 113)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTTATCCAATAACCGTGCGGTGCCTCCGTGATGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.C7 (SEQ ID NO 107)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTTATTCAATAACCGTGCGGTGCCTCCGTGATGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.G6 (SEQ ID NO 112)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTTATCCAATAACCGTGCGGGGCCTCCGTGATGCTTACTCTCATGTAGTTCC

vWF DNA SELEX™ 2, Family # 1.2

AMX238.H5 (SEQ ID NO 118)
CTACCTACGATCTGACT**AGCGTGCAGTGCCTATTCTAGGCCGTGCGGTGCCTCCGTCACGCT**TACTCTCATGTAGTTCC

【０３０５】

【化４４】

AMX237.C11 (SEQ ID NO 119)
CTACCTACGATCTGACTAGCGTGCAGTGCCTATTCTAGGCCGTGCGGTGCCTCCGTCATGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.E7 (SEQ ID NO 116)
CTACCTACGATCTGACTAGCGTGCAGTGCCTATTTTAGGCCGTGCGGTGCCTCCGTCACGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.G6 (SEQ ID NO 114)
CTACCTACGATCTGACTAGCGTGCAGTGCCTATTCCAGGCCGTGCGGTGCCTCCGTCACGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.F2 (SEQ ID NO 120)
CTACCTACGATCTGACTAGCATGCAGTGCCCATTCTAGGCCGTGCGGTGCCTCCGTCATGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.E9 (SEQ ID NO 115)
CTACCTACGATCTGACTAGCGTGCAGTGCCCATCTTAGGCCGTGCGGTGCCTCCGTCACGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.F3 (SEQ ID NO 117)
CTACCTACGATCTGACTAGCGTGCAGTGCCTATTTTAGGTCGTGCGGGGCCTCCGTCACGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.F10 (SEQ ID NO 124)
CTACCTACGATCTGACTAGCGTGCAGTGCCCATTCCAGGCCGTGCGGTATCCTCCGTCACGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.C5 (SEQ ID NO 126)
CTACCTACGATCTGACTAGCGTGCAGTGCCTATCTCAGGCCGTGCGGTATCCTCCGTCACGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX236.H2 (SEQ ID NO 125)
CTACCTACGATCTGACTAGCGTGCAGTGCCTATCCCAGGCCGTGCGGTAGCCTCCGTCACGCTTACTCTCATGTAGTTCC

このアプタマー選択のファミリー＃１に含まれた、予想される、本発明のいくつかの実施形態のｖＷＦ標的への結合に必要な二次構造およびコア核酸配列を、図１５に配列番号２２０として表す。

【０３０６】

（ｖＷＦ　ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}２、結合ファミリー＃２）

【０３０７】

【化４５】

AMX237.C9 (SEQ ID NO 123)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAGTGACTTTGTGGAGCTGCGGTTTGGTCGACGTCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.F12 (SEQ ID NO 122)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAGCGATTTTGTGGAGCTGCGGTTTGGTCGACGTCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.F9 (SEQ ID NO 121)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAGCGATTCTGTGGAGCTGCGGTTTGGTCGACGTCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.G7 (SEQ ID NO 134)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAGCGACTTTGTGGAGCTGCGGTTTGGTCGACGTCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX236.A12 (SEQ ID NO 127)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAGCGACTCTGTGGAGCTGCGGTTTGGTCGACGTCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX236.G4 (SEQ ID NO 136)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAGCGACTTTGTGGAGATGCGGTTTGGTTGACGTCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX236.C12 (SEQ ID NO 132)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAGCGACTCCGTGGAGCTGCGGTTTGGTCGACGTCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

【０３０８】

【化４６】

AMX236.A11 (SEQ ID NO 129)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAGCGACTCTGTGGAGCTGCGGTCTGGCCGACGTCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX236.E6 (SEQ ID NO 131)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAGCGACCCTGTGGAGCTGCGGTTTGGTCGACGTCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX236.B8 (SEQ ID NO 128)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAGCGACTCTGTGGAGCTGCGGTCTGGTCGACGTCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.H8 (SEQ ID NO 135)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAGCGACTTTGTGGAGCTGCGGTTTGGTCGACATCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.D5 (SEQ ID NO 130)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAGCGACACTGTGGAGCTGCGGTTTGGTTGACGTCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.H10 (SEQ ID NO 133)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAGCGACTCAGAGGAGCTGCGGTTTGGTCGACGTCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.B1 (SEQ ID NO 149)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAGCGACACAGTGGAGCTGCGGTTTGGTCGACGTCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}２ファミリーのコンセンサス配列は以下の通りである。

【０３０９】

【化４７】

SEQ ID NO 325

CTACCTACGATCTGACTAGCTTGGTAG Y GA Y (Y/A) Y (Y/A) G (T/A) GGAG (C/A) TGCGGT Y TGG YY GAC R
TCAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

配列中Ｙ＝ＣまたはＴ、Ｒ＝ＡまたはＧ、および（Ｙ／Ａ）＝Ｃ、ＴまたはＡであり、

（ｖＷＦ　ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}２、結合ファミリー＃３）

このファミリーは、両方のファミリーの配列が９０％を超えて同一であるという点で、上述のｖＷＦ　ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}１、ファミリー＃１と同等である。

【０３１０】

【化４８】

AMX238.A11 (SEQ ID NO 143)
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAGTGTTGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.C1 (SEQ ID NO 140)
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGGATGCTGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX236.C6 (SEQ ID NO 144)
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAGTGCTGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX236.C1 (SEQ ID NO 137)
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAATGTTGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.E10 (SEQ ID NO 138)
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAATGCTGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.F6 (SEQ ID NO 145)
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGTATGCTGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

【０３１１】

【化４９】

AMX236.E2 (SEQ ID NO 146)
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGTATGCTGATGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.B12 (SEQ ID NO 141)
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAATGCAGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.A6 (SEQ ID NO 142)
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAATGCAGATGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.F5 (SEQ ID NO 139)
CTACCTACGATCTGACTAGCGGAATGAGAAGCTGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

（ｖＷＦ　ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ™２、結合ファミリー＃４）

【０３１２】

【化５０】

AMX237.G2 (SEQ ID NO 156)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTTCAGTCTTTCATATTTATAGGGTTTGGCATTGGGTCTGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.C4 (SEQ ID NO 151)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTTCAGTCTTCCACATTTATAGGGTTTGGCATTGGGTCTGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.F5 (SEQ ID NO 154)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTTTAGTCTTCCACATTTATAGGGTTTGGCATTGGGTCTGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.H11 (SEQ ID NO 155)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTTCAGTCTTTCACATTTATAGGGTTTGGCATTGGGTCTGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.G4 (SEQ ID NO 147)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGTCGCACTTTTGGTTGGTCTGGTTGGTTCTAAGTGCGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.E5 (SEQ ID NO 152)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTTCAGTCTTCTACATTTATAGGGTTTGGCATTGGGTCTGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.H9 (SEQ ID NO 148)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTGTCGCACTTTTGGTTGGTCTGGTTGGTTTTAAGTGCGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX237.F1 (SEQ ID NO 153)
CTACCTACGATCTGACTAGCTTTCAGTCTTCCACGTTTATAGGGTTTGGCATTGGGTCTGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

（ｖＷＦ　ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ™２、ファミリー＃５）

【０３１３】

【化５１】

AMX236.G1 (SEQ ID NO 164)
CTACCTACGATCTGACTAGCCTCAGATTGACTCCGGCTGACTTGTTTTAATCTTCTGAGTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX236.B3 (SEQ ID NO 161)
CTACCTACGATCTGACTAGCCTTACCTATTCCCTTCTGCGGAATACGTCGAGTACTATGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX236.F7 (SEQ ID NO 160)
CTACCTACGATCTGACTAGCCCCCACTTATCGTGTACCTTATGATATGTCGAATACTCTTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX236.H1 (SEQ ID NO 159)
CTACCTACGATCTGACTAGCCTCAGATTGACTCCGGCCGACTTGTTTTAATCTTCTGAGTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ™２ファミリー＃５のコンセンサス配列は以下の通りである。

配列番号３２６

【０３１４】

【化５２】

ファミリー5.1＝SEQ ID NO 164およびSEQ ID NO 159

CTACCTACGATCTGACTAGCCTCAGATTGACTCCGGCYGACTTGTTTTAATCTTCTGAGTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

配列中Ｙ＝ＣまたはＴ
配列番号３２７
【０３１５】
【化５３】

ファミリー5.2＝SEQ ID NO 161およびSEQ ID NO 160

CTACCTACGATCTGACTAGCC YY AC Y TAT Y (C/G) Y (C/G) T (T/A) C Y (G/T) Y R (G/T) R ATA Y GTCGA R TACT (A/C)
TGCTTACTCTCATGTAGTTCC

配列中Ｙ＝ＣまたはＴ、Ｒ＝ＡまたはＧ
（ｖＷＦ　ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}２、ファミリー＃６）
【０３１６】
【化５４】

AMX238.A3 (SEQ ID NO 150)
CTACCTACGATCTGACTAGCTCAAAGTATTACTTATTGGCAATAAGTCGTTTACTCTATAGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.F7 (SEQ ID NO 163)
CTACCTACGATCTGACTAGCAAGGGGATTGGCTCCGGGTCTGGCGTGCTTGGCATCTTTGGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX236.C9 (SEQ ID NO 158)
CTACCTACGATCTGACTAGCCAGTTCTGGGAAAAATTATTTTTTTATTTCGATCGTATTTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.D9 (SEQ ID NO 162)
CTACCTACGATCTGACTAGCCAGTTCTGGGAAAAATCATTTTTTATTTCGATCGTATTTGCTTACTCTCATGTAGTTCC

AMX238.A12 (SEQ ID NO 157)
CTACCTACGATCTGACTAGCCAGTTCTGGGAAAAATTATTTTTTTATTTCGATCGTATATGCTTACTCTCATGTAGTTCC

（実施例２：組成および配列最適化ならびに配列）
（実施例２Ａ：ｒＲｆＹ　ｖＷＦアプタマーのトランケーション）
上述の実施例１に記載されるｖＷＦ結合分析および下記の実施例３に記載される細胞ベースのアッセイデータに基づいて、さらなる特徴付けのために、ｒＲｆＹ選択からアプタマーＡＲＣ８４０（ＡＭＸ２０１．Ｃ８）（配列番号２３）を選択した。
【０３１７】
ｖＷＦ結合に必要なコア構造要素を同定するために、ＡＲＣ８４０（ＡＭＸ２０１．Ｃ８）（配列番号２３）の３’－境界を決定した。全長ＲＮＡ転写産物を５’－末端でγ－^{32}Ｐ　ＡＴＰおよびＴ４ポリヌクレオチドキナーゼで標識した。放射性同位元素標識リガンドを部分的アルカリ加水分解に供し、次いで、ニトロセルロースフィルターを通過させる前に、溶液中でヒトフォン・ビルブラント因子Ａ１ドメイン（配列番号５）に５００ｎＭで選択的に結合させた。保持されたオリゴヌクレオチドおよび保持されなかったオリゴヌクレオチドの両方を、８％変性ポリアクリルアミドゲル上で別々に分離した。ｖＷＦに結合した最小のオリゴヌクレオチドが３’－境界を限定した。境界実験ならびに予想される折りたたみの目視検査に基づいて、一団の最小化配列を設計した。本発明の全ての核酸配列の折りたたみは、ロチェスター大学からダウンロードしたＲＮＡｓｔｒｕｃｔｕｒｅ、バージョン４．１を用いて予想した。ＲＮＡｓｔｒｕｃｔｕｒｅは、自由エネルギー最小化に基づくＲＮＡ二次構造予想のためのＺｕｋｅｒアルゴリズムの、Ｗｉｎｄｏｗｓ（登録商標）での実行である（Ｍａｔｈｅｗｓ，Ｄ．Ｈ．；Ｄｉｓｎｅｙ，Ｍ．Ｄ．；Ｃｈｉｌｄｓ，Ｊ．Ｌ．；Ｓｃｈｒｏｅｄｅｒ，Ｓ．Ｊ．；Ｚｕｋｅｒ，Ｍ．；およびＴｕｒｎｅｒ，Ｄ．Ｈ．、「Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｉｎｇ　ｃｈｅｍｉｃａｌ　ｍｏｄｉｆｉ

cation constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure」、２００４年、Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳ、１０１、７２８７～７２９２頁）。ＲＮＡｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ４．１は、Ｔｕｒｎｅｒ研究室からの最新の熱力学的パラメータを使用する。

【０３１８】

後述する最小化ｒＲｆＹアプタマーのために、プリンは２’－ＯＨを含み、ピリミジンは２’－Ｆ改変を含むが、鋳型およびプライマーは未改変デオキシリボヌクレオチドを含む。

【０３１９】

【化５５】

最小化 rRfY アプタマー 5’-

GGAGCGCACUCAGCCACCCUCGCAAGCAUUUUAAGAAUGACUUGUGCCGCUGGCUG-3’ (SEQ ID NO 165)について、5’ PCR プライマー5’- GATCGATCTAATACGACTCACTATA-3’ (SEQ ID NO 166)および3’ PCR プライマー5’- CAGCCAGCGGCACAAGTC -3’ (SEQ ID NO 167)を用いて鋳型 5’-

TCGATCTAATACGACTCACTATAGGAGCGCACTCAGCCACCCTCGCAAGCATTTTAAGAATGACTTGTGCCGCTGGCTG-3’ (SEQ ID NO 168)を増幅した。

【０３２０】

【化５６】

最小化アプタマー 5’-

GGACCACCCUCGCAAGCAUUUUAAGAAUGACUUGUGCCGCUGGUCC -3’(SEQ ID

【０３２１】

【化５６－２】

NO 169) について、5' PCR プライマー 5'- GATCGATCTAATACGACTCACTATA -3' (SEQ ID NO 166)および3' PCR プライマー 5'- GGACCAGCGGCACAAGTC -3' (SEQ ID NO 170) を用いて

鋳型 5'-

GATCGATCTAATACGACTCACTATAGGACCACCCTCGCAAGCATTTTAAGAATGACTTGTGCCGCTGGTCC -3'(SEQ ID NO171)を増幅した。

最小化 アプタマー 5'-

GGACCACCCUCGCAAGCAUUGAGAAAUGACUUGUGCCGCUGGUCC -3' (SEQ ID NO 172)について、5' PCRプライマー5'- GATCGATCTAATACGACTCACTATA -3' (SEQ ID NO 166) および3' PCR プライマー5'- GGACCAGCGGCACAAGTC -3' (SEQ ID NO 170) を用いて

鋳型 5'-

GATCGATCTAATACGACTCACTATAGGACCACCCTCGCAAGCATTGAGAAATGACTTGTGCCGCTGGTCC -3'(SEQ ID NO 173)を増幅した。

最小化 アプタマー 5'-

GGACCACCCUCGCAACGAGAGUUGUGCCGCUGGUCC -3' (SEQ ID NO 174)について、5' PCR プライマー5'- GATCGATCTAATACGACTCACTATA -3' (SEQ ID NO166)および3' PCR プライマー5'- GGACCAGCGGCACAACTC -3' (SEQ ID NO 175) を用いて

鋳型 5'-

GATCGATCTAATACGACTCACTATAGGACCACCCTCGCAACGAGAGTTGTGCCGCTGGTCC -3' (SEQ ID NO 176)を増幅した。

上記の最小化アプタマー配列の全てを転写し、１５％変性ポリアクリルアミドゲルにてゲル精製し、γ^{32}Ｐ　ＡＴＰで５－^{32}Ｐ末端標識し、次いで２つのＣｅｎｔｒｉ－Ｓｐｉｎ　１０カラム（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓカタログ番号ＣＳ－１０１、ニュージャージー州アデルフィア）を用いて脱塩した。これらのミニマーを、下記の実施例３に記載される細胞アッセイにおいて最初に特徴付けた。

【０３２２】

（実施例２Ｂ：ｒＲｄＹ　ｖＷＦアプタマーのトランケーション）

上述の実施例１に記載されるｖＷＦ結合分析および下記の実施例３に記載される細胞ベースのアッセイデータに基づいて、さらなる特徴付けのために、アプタマーＡＭＸ２０３．Ｇ９（配列番号４４）およびＡＭＸ２０５．Ｆ７（配列番号４９）をそれぞれ同定した。

【０３２３】

ｖＷＦ結合に必要なコア構造要素を同定するために、アプタマーＡＭＸ２０３．Ｇ９（配列番号４４）およびＡＭＸ２０５．Ｆ７（配列番号４９）の３’－境界を決定した。全長ＲＮＡ転写産物を５’－末端でγ－^{32}Ｐ　ＡＴＰおよびＴ４ポリヌクレオチドキナーゼで標識した。放射性同位元素標識リガンドを部分的アルカリ加水分解に供し、次いで、ニトロセルロースフィルターを通過させる前に、溶液中でヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号５）に５００ｎＭで選択的に結合させた。保持されたオリゴヌクレオチドを８％変性ポリアクリルアミドゲルにて分離した。ｖＷＦに結合した最小のオリゴヌクレオチドが３’－境界を限定した。境界実験ならびにＲＮＡｓｔｒｕｃｔｕｒｅ、バージョン４．１を用いた予想される折りたたみの目視検査に基づいて、一団の最小化配列を設計した。

【０３２４】

後述する最小化ｒＲｄＹアプタマーのために、プリンは２’－ＯＨプリンであり、ピリミジンはデオキシ－ピリミジンであるが、鋳型およびプライマーは未改変デオキシリボヌクレオチドを含む。以下の３つの最小化アプタマー配列は、ＤＬ．１５９．８７．７０（配列番号４４）に由来した。

【０３２５】

【化５７】

最小化アプタマー配列 5’-

GGAGCGCACTCAGCCACGGGGTGGGTAGACGGCGGGTATGTGGCT -3’(SEQ ID NO 177)について、5’ PCRプライマー5’- GATCGATCTAATACGACTCACTATA -3’ (SEQ ID NO 166) および3’ PCRプライマー 5’-AGCCACATACCCGCCGTC -3’ (SEQ ID NO 178) を用いて

鋳型 5’-

GATCGATCTAATACGACTCACTATAGGAGCGCACTCAGCCACGGGGTGGGTAGACGGCGGGTATGTGGCT -3’ (SEQ ID NO179)を増幅した。

最小化アプタマー配列 5’-

GGAGCCACGGGGTGGGTAGACGGCGGGTATGTGGCTCC -3’(SEQ ID NO 180)について、5’ PCRプライマー 5’- GATCGATCTAATACGACTCACTATA -3’(SEQ ID NO 166)および3’ PCRプライマー 5’-GGAGCCACATACCCGCCG -3’ (SEQ ID NO 181)を用いて

鋳型 5’-

GATCGATCTAATACGACTCACTATAGGAGCCACGGGGTGGGTAGACGGCGGGTATGTGGCTCC -3’ (SEQ ID NO182)を増幅した。

最小化アプタマー配列

【０３２６】

【化５８】

5’- GGGACGGGGTGGGTAGACGGCGGGTATGTCCC -3’(SEQ ID NO 183)について、5’ PCR プライマー 5’- GATCGATCTAATACGACTCACTATA -3’ (SEQ ID NO 166)および3’ PCR プライマー 5’-GGGACATACCCGCCG -3’(SEQ ID NO 184)を用いて

鋳型 5’-

GATCGATCTAATACGACTCACTATAGGGACGGGGTGGGTAGACGGCGGGTATGTCCC -3’ (SEQ ID NO 185)を増幅した。

以下の7つの最小化アプタマー配列は、配列番号49のアプタマーに由来した。

最小化アプタマー配列 5’-

GGAGCGCACTCAGCCACACGACATTGGCGGGTTGTAATTACCACGCATGGCTG -3’(SEQ ID NO 186)について、5’ PCRプライマー5’- GATCGATCTAATACGACTCACTATA -3’ (SEQ ID NO 166)および3’ PCR プライマー 5’- CAGCCATGCGTGGTAATT-3’ (SEQ ID NO 187),

を用いて鋳型 5’-

GATCGATCTAATACGACTCACTATAGGAGCGCACTCAGCCACACGACATTGGCGG GTTGTAATTACCACGCATGGCTG -3’(SEQ ID NO188)を増幅した。

最小化アプタマー配列 5’-

GGAGCCACACGACATTGGCGGGTTGTAATTACCACGCATGGCTCC-3’ (SEQ ID NO 189)について、5’ PCRプライマー5’- GATCGATCTAATACGACTCACTATA -3’ (SEQ ID NO 166)および3’ PCR プライマー5’- GGAGCCATGCGTGG-3’ (SEQ ID NO190)を用いて

鋳型 5’-

GATCGATCTAATACGACTCACTATAGGAGCCACACGACATTGGCGGGTTGTAATT ACCACGCATGGCTCC-3’ (SEQ ID NO191)を増幅した。

最小化アプタマー配列 5’-

GGAGCCACACGACATTGGCGGGCGAGAGCCACGCATGGCTCC-3’ (SEQ ID NO192)について、5’ PCRプライマー b 5’- GATCGATCTAATACGACTCACTATA -3’ (SEQ ID NO 166)および3’ PCR プライマー5’- GGAGCCATGCGTGG-3’ (SEQ ID NO190) を用いて

鋳型 5’-

GATCGATCTAATACGACTCACTATAGGAGCCACACGACATTGGCGGGCGAGAGC CACGCATGGCTCC-3’(SEQ ID NO 193)を増幅した。

【０３２７】

【化５９】

最小化アプタマー配列 5’-

GGAGCCACACGACATTGGCGAGAGCCACGCATGGCTCC-3’(SEQ ID NO 194)について、5’ PCRプライマー 5’- GATCGATCTAATACGACTCACTATA -3’ (SEQ ID NO 166)および3’ PCRプライマー 5’- GGAGCCATGCGTGG-3’(SEQ ID NO 190)を用いて鋳型 5’-GATCGATCTAATACGACTCACTATAGGAGCCACACGACATTGGCGAGAGCCACGCATGGCTCC-3’ (SEQ ID NO 195)を増幅した。

最小化アプタマー配列 5’-

GGAGCCACACGAGAGTGGCGGGTTGTAATTACCACGCATGGCTCC-3’(SEQ ID NO 196)について、5’ PCRプライマー 5’- GATCGATCTAATACGACTCACTATA -3’(SEQ ID NO 166)および3’ PCRプライマー 5’- GGAGCCATGCGTGG-3’ (SEQ ID NO 190)を用いて

鋳型 5’-

GATCGATCTAATACGACTCACTATAGGAGCCACACGAGAGTGGCGGGTTGTAATTACCACGCATGGCTCC-3’ (SEQ ID NO 197)を増幅した。

最小化アプタマー配列 5’-

GGCCACACGACATTGGCGGGCGAGAGCCACGCATGGCC-3’ (SEQ ID NO 198)について、5’ PCRプライマー 5’- GATCGATCTAATACGACTCACTATA -3’ (SEQ ID NO 166)および3’ PCRプライマー 5’- GGCCATGCGTGGCTCTC -3’(SEQ ID NO 199)を用いて鋳型

5’-

GATCGATCTAATACGACTCACTATAGGCCACACGACATTGGCGGGCGAGAGCCACGCATGGCC-3’(SEQ ID NO 200)を増幅した。

最小化アプタマー配列 5’-

GGAGCCACACGACATTGGCGCGAGAGCGCATGGCTCC-3’(SEQ ID NO 201)について、5’ PCRプライマー 5’- GATCGATCTAATACGACTCACTATA -3’ (SEQ ID NO 166)および3’ PCRプライマー 5’- GGAGCCATGCGCTCTCG -3’(SEQ ID NO 202)を用いて鋳型

5’-

GATCGATCTAATACGACTCACTATAGGAGCCACACGACATTGGCGCGAGAGCGCATGGCTCC-3’(SEQ ID NO 203)を増幅した。

（ｒＲｄＹ　ｖＷＦミニマー結合）

全てのミニマー配列を転写し、１５％変性ポリアクリルアミドゲルにてゲル精製し、γ^{32}Ｐ　ＡＴＰで５－^{32}Ｐ末端標識し、次いで２つのＣｅｎｔｒｉ－Ｓｐｉｎ　１０カラム（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓカタログ番号ＣＳ－１０１、ニュージャージー州アデルフィア）を用いて脱塩した。K_D決定のために、０．１ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡを含有する１×ダルベッコＰＢＳ（最終体積５０ｕＬ）中０～３００ｎＭ（３倍希釈物）からの、３０分間、室温での８点タンパク質滴定を用いて、全長ヒトｖＷＦ（配列番号７）、ヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号５）およびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号６）への直接の結合に関してミニマー転写産物を試験し、次いでドットブロット装置（Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ　ａｎｄ　Ｓｃｈｕｅｌｌ、ニューハンプシャー州キーン）中のニトロセルロースおよびナイロンフィルターサンドイッチに適用した。Ｋａｌｅｉ

ｄａＧｒａｐｈ（ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈバージョン３．５１、Ｓｙｎｅｒｇｙ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いて等式ｙ＝（最大値／（１＋Ｋ／タンパク質））＋ｙ切片に適合することによって、K_D値を計算した。タンパク質結合の特徴付けの結果を、表１８で表にする。

【０３２８】

（表１８：ｒＲｄＹアプタマーミニマー結合データ、細胞アッセイにおいて強力な活性を示したアプタマーのみ、その結合親和性を測定した。（ＮＤ＝行っていない））

【０３２９】

【表１８】

#	ミニマー	全長ヒト vWF K_D (nM)	ヒト vWF A1 ドメイン K_D (nM)	ウサギ vWF A1 ドメイン K_D (nM)
1	SEQ ID NO 177	ND	ND	ND
2	SEQ ID NO 180	1	11	14
3	SEQ ID NO 183	10±5	ND	14±7
4	SEQ ID NO 186	ND	ND	ND
5	SEQ ID NO 189	1	ND	ND
6	SEQ ID NO 192	2±0.2	4±1	8±1
7	SEQ ID NO 194		ND	
8	SEQ ID NO 196	ND	ND	ND
9	SEQ ID NO 198	3±0.6	5±2	11±2

【０３３０】

【表１８－２】

10	SEQ ID NO 201	ND	ND	ND

（実施例２Ｃ：ＤＮＡ ＳＥＬＥＸ^{TM}＃１ ｖＷＦアプタマーのトランケーション）

上述の実施例１に記載されるｖＷＦ結合分析ならびに予想される折りたたみの目視検査に基づいて、ファミリー＃１由来のバインダーの最高の種類に関して、一団の最小化配列を設計した。この場合、ファミリー＃１由来のバインダーの全ては、構造的に関係があり、分子の５’－および３’－末端につけられる塩基対形成の束縛によって決定される、４つの相互排除的な折りたたみ（ＲＮＡｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ４．１によって予想される）の１つに分類される。本発明者らは、４つの予想される折りたたみのそれぞれを合成および試験した。合成した最小化ＤＮＡアプタマーのそれぞれの配列は、以下の通りである。

【０３３１】

【化６０】

SEQ ID NO 204
5'-CCAGCGGAATGAGAATGCTGATGGATTGCTCAGGTCTGCTGG -3'

ARC 845 (SEQ ID NO 205)
5' ATGAGAGTGCTGGTGGATTGCTCAGGTCTGCTGGCTGCTTACTCTCAT -3'

SEQ ID NO 206
5'- CGATCTGACTAGCGGAATGAGAATGCTGGTGGATCG -3'

SEQ ID NO 207
5'- GATCTGACTAGCGCAATGAGGATGCdTGATGGATTGCTCAGGTC -3'

全てのミニマーＤＮＡ配列を化学的に合成し、γ－^{32}Ｐ　ＡＴＰで５－^{32}Ｐ末端標識し、次いで２つのＣｅｎｔｒｉ－Ｓｐｉｎ　１０カラム（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓ、カタログ番号ＣＳ－１０１、ニュージャージー州アデルフィア）を用いて脱塩した。K_D決定のために、０．１ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡを含有する１×ダルベッコＰＢＳ（５０ｕＬの最終体積）中、３０分間室温での、１０ｎＭの一定のタンパク質濃度および１２点非放射性競合物質ＤＮＡ滴定（３ｕＭ、１ｕＭ、３３３ｎＭ、１００ｎＭ、３３ｎＭ、１０ｎＭ、３．３ｎＭ、１ｎＭ、３３３ｐＭ、１００ｐＭ、３３．３ｐＭ、０ｐＭ）を用いた競合ドットブロットアッセイを用いて、ヒトｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号５）への結合に関してミニマーを試験した。ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈ（ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈバージョン３．５１、Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いて等式ｙ＝（最大値／（１＋Ｋ／タンパク質））＋ｙ切片を適合させることによって、K_D値を計算した。タンパク質結合の特徴付けの結果を、以下の表１９で表にする。示されるように、最小化コンストラクトのＡＲＣ８４５のみが、ヒトまたはウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインのいずれかに結合する能力を保持した。

【０３３２】

（表１９：ＤＮＡ　１ミニマー結合データ（ＮＤ＝行っていない））

【０３３３】

【表１９】

#	ミニマー	全長ヒト vWF K_D (nM)	ヒト vWF A1 ドメイン K_D (nM)	ウサギ vWI ドメイン K_D (
1	ARC845 = SEQ ID NO 205	結合なし	10	
2	SEQ ID NO 204	ND	結合なし	結合なし
3	SEQ ID NO 206	ND	結合なし	
4	SEQ ID NO 207	ND	結合なし	

これらの結合結果に基づくと、ＡＲＣ８４５（配列番号２０５）は、ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ^{TM}１、ファミリー１アプタマーのコア核酸結合配列を表す。

【０３３４】

（実施例２Ｄ：ＤＮＡ　ｖＷＦ交互選択アプタマー最小化）

上述の実施例１に記載されるｖＷＦ結合分析および下記の実施例３に記載される細胞ベースのアッセイデータならびにアプタマーＡＭＸ２３７．Ｂ１１（配列番号１０９）およびＡＭＸ２３６．Ａ１２（配列番号１２７）の予想される折りたたみの目視検査に基づいて、一連の最小化配列を設計した。また、細胞アッセイにおいてアプタマーＡＭＸ２３７

．Ｇ６（配列番号１１４）、ＡＭＸ２３８．Ｅ９（配列番号１１５）およびＡＭＸ２３８．Ｈ５（配列番号１１８）がわずかに能力が高いようであった観察に基づいて、一連の最小化配列ＡＲＣ１０２７～１０３１（配列番号２１２～２１６）を合成した。配列番号２０８および配列番号２０９の最小化配列は、全長アプタマーＡＭＸ２３７．Ｂ１１（配列番号１０９）から予想される２つの相互排除的な折りたたみを表す。

【０３３５】

上述の最小化ＤＮＡアプタマーの核酸配列は、以下の通りである。

【０３３６】

【化６１】

(SEQ ID NO 208)
5'- GGACGATCTGACTAGCTCCAGTGTTTTATCTAATAACCGTCC -3'

(SEQ ID NO 209)

【０３３７】

【化６１－２】

5'- GGAGCTCCAGTGTTTTATCTAATAACCGTGCGGTGCCTCCGTGAGCTCC -3'

(SEQ ID NO 210)
5'- GGAGCTGCGGTTTGGTCGACGTCAGCTCC -3'

(SEQ ID NO 211)
5'- GGTAGCGACTCTGTGGAGCTGCGGTTTGG -3'

ARC1027 (SEQ ID NO 212)
5'-GGCGTGCAGTGCCTATTCTAGGCCGTGCGGTGCCTCCGTCACGCC-3T-3'

ARC1028 (SEQ ID NO 213)
5'-dGCGTGCAGTGCCT-[PEG]-AGGCCGTGCGGTGCCTCCGTCACGCC-3T-3'

ARC1029 (SEQ ID NO 214)
5'-GGCGTGCAGTGCC-[PEG]-GGCCGTGCGGTGCCTCCGTCACGCC-3T -3'

ARC1030 (SEQ ID NO 215)
5'- GGCGTGCAGTGCCTATTCTAGGCCGTGCGG-[PEG]-CCGTCACGCC-3T -3'

ARC1031 (SEQ ID NO 216)
5'- GGCGTGCAGTGCCT-[PEG]-AGGCCGTGCGG-[PEG]-CCGTCACGCC-3T -3'

標準的な方法および技術を用いて、上記の最小化アプタマー配列の全てを化学的に合成し、１５％変性ポリアクリルアミドゲルにてゲル精製し、次いで２つのＣｅｎｔｒｉ－Ｓｐｉｎ　１０カラム（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓカタログ番号ＣＳ－１０１、ニュージャージー州アデルフィア）を用いて脱塩した。下記の実施例３に記載されるように、細胞アッセイにおいて、最小化配列を特徴付けた。

【０３３８】

最初の系列、配列番号２０８～配列番号２１１のうち、配列番号２０８のみが、細胞アッセイにおいて活性を示した（下記の実施例３参照）。アプタマーＡＭＸ２３７．Ｂ１１（配列番号１０９）およびＡＭＸ２３７．Ｇ６（配列番号１１４）、ＡＭＸ２３８．Ｅ９（配列番号１１５）およびＡＭＸ２３８．Ｈ５（配列番号１１８）の配列の比較によって、それらが密接に関連し、最小化アプタマー（配列番号２０８）の予想される二次構造を支持することが明らかになった（図１４および１５参照）。これらの分子、ＡＲＣ１０２

７～１０３１（配列番号２１２～２１６）は、アプタマーＡＭＸ２３７．Ｇ６（配列番号１１４）、ＡＭＸ２３８．Ｅ９（配列番号１１５）およびＡＭＸ２３８．Ｈ５（配列番号１１８）の折りたたみおよび二次構造についての本発明者らの仮説をさらに試験した（図５、１４および１５参照）。

【０３３９】

K_D決定のために、下記の実施例３に記載されるように細胞アッセイにおいて強力な活性を示した最小化配列をγ^{-32}Ｐ　ＡＴＰで５－^{32}Ｐ末端標識し、次いで２つのＣｅｎｔｒｉ－Ｓｐｉｎ　１０カラム（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓカタログ番号ＣＳ－１０１、ニュージャージー州アデルフィア）を用いて脱塩した。０．１ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡを含有する１×ダルベッコＰＢＳ（最終体積５０ｕＬ）中、３０分間、室温での９点タンパク質滴定（１００ｎＭ、３０ｎＭ、１０ｎＭ、３ｎＭ、１ｎＭ、３００ｐＭ、１００ｐＭ、３０ｐＭ、０ｐＭ）を用いて、全長ヒトｖＷＦ（配列番号７）およびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメイン（配列番号６）への直接の結合に関してミニマーを試験し、次いでドットブロット装置（Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ　ａｎｄ　Ｓｃｈｕｅｌｌ、ニューハンプシャー州キーン）中のニトロセルロースおよびナイロンフィルターサンドイッチに適用した。ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈ（ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈバージョン３．５１、Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いて等式ｙ＝（最大値／（１＋Ｋ／タンパク質））＋ｙ切片を適合させることによってK_D値を計算した。タンパク質結合の特徴付けの結果を、表２０で表にする。

【０３４０】

（表２０：ＤＮＡ　２アプタマーミニマー結合データ、細胞アッセイにおいて強力な活性を示したアプタマーミニマーのみ、その結合親和性を測定した（下記の実施例３参照）（「ＮＤ」＝行っていない））

【０３４１】

【表２０】

#	ミニマー	全長ヒト vWF K_D (nM)	ヒト ドメイン vWF A1 K_D (nM)	ウサギ ドメイン vWF A1 K_D (nM)
1	SEQ ID NO 208	ND	ND	ND
2	SEQ ID NO 209	ND	ND	ND
3	SEQ ID NO 210	ND	ND	ND
4	SEQ ID NO 211	ND	ND	ND
5	ARC 1027 (SEQ ID NO 212)	0.8	ND	4.6
6	ARC1028 (SEQ ID NO 213)	1.1	ND	3.8
7	ARC1029 (SEQ ID NO 214)	1.4 ± 0.2	ND	6.5 ± 1.5
8	ARC1030 (SEQ ID NO 215)	結合なし	ND	結合なし
9	ARC1031 (SEQ ID NO 216)	結合なし	ND	結合なし

（実施例２Ｅ：アプタマー医薬品化学を通じたＡＲＣ１０２９の最適化）

ＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）の、高度に安定で強力な改変体を、５段階のアプタ

マー合成、精製および結合活性のアッセイを含む体系的合成改変アプローチを通じて同定した。アプタマー改変の間の化学合成の容易さを促進するために、ＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）ＰＥＧスペーサーを短いオリゴヌクレオチド配列ｄＴｄＴｄＣに置換し、結果として、図１６および下記の表２１に見られるようなＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）を生じる。高度に安定化させる３’－逆方向ｄＴを、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）３プライム末端で合成し、結果として、同様に図１６および下記の表２１に見られるように、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）（配列番号２２２）を生じた。一旦ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）およびＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）（配列番号２２２）の両方がヒトｖＷＦに結合することが示されると、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）（配列番号２２２）を、下記の実施例に記載される改変のための基本的鋳型として用いた。

【０３４２】

改変プロセスの第１段階において、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）中のそれぞれの個々の残基を対応する２’－Ｏメチル含有残基（他に指定されなければ、ｄＴがｍＵによって置換されている）によって置換し、結果として、下記の表２１および図１６に示されるＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２３４を生じた。また、第１段階において、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）のステム領域において一組の複合の置換を行い、結果として、同様に表２１および図１６に示されるＡＲＣ１２３５～１２４３を生じた。

【０３４３】

本明細書中に記載されるように、例えば実施例１、２および３を参照すると、クローンスのクリーニング、およびＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）につながるトランケーションのプロセスの間、結合（ドットブロット）、ＦＡＣＳおよびＢＩＰＡアッセイにおいて、アプタマーの相対的能力の間に優れた一致があった。それにしたがって、ドットブロットアッセイ結合アッセイで測定された、測定された全長ヒトｖＷＦに対する親和性を用いて、合成したアプタマー試験改変体の大部分の相対的親和性を特徴付けた。

【０３４４】

K_D決定のために、化学的に合成したアプタマーを、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて精製し、γ－^{32}Ｐ　ＡＴＰで５’末端標識し、全長ヒトｖＷＦ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍカタログ番号６８１３００、カリフォルニア州ラ・ホーヤ）への直接の結合に関して試験した。０．１　ＢＳＡを含有する１×ダルベッコＰＢＳ（５０ｕＬの最終体積）中３０分間、室温でのドットブロットアッセイにおいて、８点タンパク質滴定を用いた（１００ｎＭ、３０ｎＭ、１０ｎＭ、３ｎＭ、１ｎＭ、３００ｐＭ、１００ｐＭ、０ｐＭ）。ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈ（ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈバージョン３．５１、Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いて等式ｙ＝（最大値／（１＋Ｋ／タンパク質））＋ｙ切片を適合させることによってK_D値を計算した。合成し、精製し、全長ヒトｖＷＦへの結合に関してアッセイしたＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）誘導体の配列、ならびにタンパク質結合の特徴付けの結果を下記の表２１で表にし、結合親和性（K_D）を第４の縦列に示し、１００ｎＭ　ｖＷＦでのアプタマー結合の程度を表２１の最後の縦列に示す。

【０３４５】

（表２１：第１段階改変結合結果）

【０３４６】

【表２１】

SEQ ID NO:	ARC #	配列（5'→3'）、（NH2＝5'－ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト）、（3T＝逆方向dT）、（T＝dT）、（s＝ホスホロチオエート）、（mN＝2'－Oメチル含有残基）、（PEG＝ポリエチレングリコール）、（dN＝デオキシ残基）	K_D (nM)	100nM vWFでの%結合
221	ARC1115	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCdGdCdC	2	36
222	ARC1172	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCdGdCdC-3T	2	37
223	ARC1194	mGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCdGdCdC-3T	3	46
224	ARC1195	dGmGdCdGTdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCdGdCdC-3T	1	55
225	ARC1196	dGdGmCdGTdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCdGdCdC-3T	2	46

【０３４７】

【表２１－２】

226	ARC1197	dGdGdCmGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	2	46
227	ARC1198	dGdGdCdGmUdGdCdAdGTdGdC dCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	0.9	50
228	ARC1199	dGdGdCdGTmGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	19	28
229	ARC1200	dGdGdCdGTdGmCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	5	25
230	ARC1201	dGdGdCdGTdGdCmAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	0.9	6
231	ARC1202	dGdGdCdGTdGdCdAmGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	0.4	56
232	ARC1203	dGdGdCdGTdGdCdAdGmUdGdC dCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	3	40
233	ARC1204	dGdGdCdGTdGdCdAdGTmGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	2	45
234	ARC1205	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGmCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	1	50
235	ARC1206	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCm CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	2	50

【０３４８】

【表２１－３】

236	ARC1207	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CmUTdCdGdGdCdCdGTdGdCdG dGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	2	54
237	ARC1208	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTmUdCdGdGdCdCdGTdGdCdG dGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	2	45
238	ARC1209	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTmCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	2	44
239	ARC1210	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCmGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	2	49
240	ARC1211	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGmGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	2	47
241	ARC1212	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGmCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	2	49
242	ARC1213	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCmCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	6	43
243	ARC1214	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCmGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	3	39
244	ARC1215	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGmUdGdCdG dGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	3	2
245	ARC1216	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTmGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	0.6	40

【０３４９】

【表２１－４】

246	ARC1217	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGmCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	14	18
247	ARC1218	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCmGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	32	2
248	ARC1219	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGm GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	3	33
249	ARC1220	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GmUdGdCdCTdCdCdGTdCdAdC dGdCdC-3T	11	17
250	ARC1221	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTmGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	1	43
251	ARC1222	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGmCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	0.9	40
252	ARC1223	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCmCTdCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	36	26
253	ARC1224	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCmUdCdCdGTdCdAdC dGdCdC-3T	0.5	47
254	ARC1225	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTmCdCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	11	16
255	ARC1226	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCmCdGTdCdAdCd GdCdC-3T	12	25

【０３５０】

【表２１－５】

256	ARC1227	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCmGTdCdAdCd GdCdC-3T	3	40
257	ARC1228	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGmUdCdAdC dGdCdC-3T	2	43
258	ARC1229	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTmCdAdCd GdCdC-3T	5	37
259	ARC1230	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCmAdCd GdCdC-3T	3	46
260	ARC1231	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAmCd GdCdC-3T	1	50
261	ARC1232	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCm GdCdC-3T	1	51
262	ARC1233	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GmCdC-3T	2	39
263	ARC1234	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCd CTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGd GTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCd GdCmC-3T	2	42
264	ARC1235	mGmGdCmGTmGdCdAdGTdGd CdCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCd GdGTdGdCdCTdCdCdGTdCmAd CmGdCdC-3T	13	23
265	ARC1236	dGdGmCdGmUdGdCdAdGTdGd CdCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCd GdGTdGdCdCTdCdCdGTmCdA mCdGmCmC-3T	3	32

【０３５１】

【表２１－６】

266	ARC1237	mGmGmCmGmUmGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTmCmAmCmGmCmC-3T	41	9
267	ARC1238	dGdGdCdGTdGdCdAdGTmGdCdCTTdCmGmGdCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCdGdCdC-3T	2	43
268	ARC1239	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGmCmCTTdCdGdGmCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCdGdCdC-3T	5	37
269	ARC1240	dGdGdCdGTdGdCdAdGTmGmCmCTTdCmGmGmCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCdGdCdC-3T	4	40
270	ARC1241	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCmGmGTdGdCdCTdCdCmGTdCdAdCdGdCdC-3T	結合なし	結合なし
271	ARC1242	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTdGmCdGdGTdGdCdCTmCmCdGTdCdAdCdGdCdC-3T	結合なし	結合なし
272	ARC1243	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTdGmCmGmGTdGdCdCTmCmCmGTdCdAdCdGdCdC-3T	結合なし	結合なし

表２１の結合データからわかるように、２’－Ｏメチル残基へのデオキシ残基の置換に最も容易に耐性のある位置は、図１５に示されるＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）の二次構造上にマッピングされた配列保存と十分相関性があり、そのため、提案されるアプタマーの構造に、さらなる独立した支持を提供する。２’－Ｏ－Ｍｅ改変に耐性のないＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）の位置ならびに耐性のある位置を図１５Ｂに示す。

【０３５２】

第１段階改変プロセスのすぐ上に記載した個々および複合のデオキシからメトキシアプタマーへの構造活性相関（ＳＡＲ）結果に基づいて、第二の系列のアプタマーを設計、合成、精製し、ｖＷＦへの結合に関して試験した。これらのおよびそれに続く全てのアプタマーに関して、１０ｎＭ以下またはそれ以上の親和性（K_D）ならびに１００ｎＭ ｖＷＦで少なくとも３５％の結合の程度を保持した分子を目的とした。改変プロセスの第２段階の間に、図１７および表２１に示されるＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４８（配列番号２８３）を合成した。第１段階改変からの耐性のあった個々の置換に基づくブロック改変を用いて、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～１３４２を合成した。ＡＲＣ１３４３（配列番号２７８）～ＡＲＣ１３４５を、それぞれ異なるホスホロチオエートリン酸バックボーン改変を用いて合成した（図１７および下記の表２２参照）。最後に、ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）～ＡＲＣ１３４８（配列番号２８３）を合成し、図１７および以下の表２２に示されるＡＲＣ１３４２のステム１、ステム２および両方の

ステムからの単一の塩基対の除去を試験した。

【０３５３】

（表２２：第２段階改変結合結果）

【０３５４】

【表２２】

SEQ ID NO：	ARC #	配列（5’→3’）、（NH2＝5’－ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト）、（3T＝逆方向dT）、（T＝dT）、（s＝ホスホロチオエート）、（mN＝2’－Oメチル含有残基）、（PEG＝ポリエチレングリコール）、（dN＝デオキシ残基）	K_D (nM)	100nM vWFでの%結合
273	ARC1338	mGmGmCmGmUdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCmAmCmGmCmC-3T	7.4	21
274	ARC1339	dGdGdCdGTdGdCdAmGmUdGdCdCTTdCdGdGdCdCmGTmGdCdGdGTdGdCdCTdCdCmGmUmCdAdCdGdCdC-3T	2.4	39
275	ARC1340	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCdAdCdGdCdC-3T	7.4	43
276	ARC1341	mGmGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCmAmCmGmCmC-3T	22.5	26

【０３５５】

【表２２－２】

277	ARC1342	mGmGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCmAmCmGmCmC-3T	15.6	33
278	ARC1343	mGmGmCmGmUdG-s-dCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmC-s-dCmGTmGdCdG-s-dGTmGmCdCmUdC-s-dCmGmUmCmAmCmGmCmC-3T	23.9	21
279	ARC1344	mGmGmCmGmUdG-s-dC-s-dAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmC-s-dCmGTmGdC-s-dG-s-dGTmGmCdCmUdC-s-dCmGmUmCmAmCmGmCmC-3T	4.8	17
280	ARC1345	mGmGmCmGmU-s-dG-s-dC-s-dAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmC-s-dCmG-s-TmG-s-dC-s-dG-s-dG-s-TmGmC-s-dCmU-s-dC-s-dCmGmUmCmAmCmGmCmC-3T	12.1	29
281	ARC1346	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCmAmCmGmC-3T	11	51
282	ARC1347	mGmGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmUmUmCmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCmAmCmGmCmC-3T	結合なし	結合なし
283	ARC1348	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmUmUmCmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCmAmCmGmC-3T	結合なし	結合なし

表２２に見られるように、アプタマー改変の第２段階からの結果から、ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）が、これまでに生じた高度に置換されたＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）誘導体アプタマーで最も能力があることが明らかになった。興味深いことに、ＡＲＣ１３４７（配列番号２８２）およびＡＲＣ１３４８（配列番号２８３）での結果によって示されるように、ステム２からの塩基対の除去は、この高度に改変された関係においては耐性を示されなかった。

【０３５６】

表２３および図１７に示されるＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）を、アプタマー改変プロセスの第３段階の間に合成した。第１段階アプタマー改変における試験改変体においては６位でのｄＧからｍＧの置換には耐性が不十分であり、６位のグアノシンは３６位のシチジンと対になるので、３６位でのｍＣからｄＣの置換を用いてＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）を合成し、結果として、以下の表２３に示されるＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）を生じた。ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）は、同様に以下の表２３に示される、ＡＲＣ１３６２～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）を生じる単一のホスホロチオエートリン酸バックボーン改変の導入のための塩基配列として機能した。

【０３５７】

（表２３：第３段階改変結合結果）

【０３５８】

【表２３】

SEQ ID NO :	ARC #	配列（5'→3'）、（NH2＝5'－ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト）、（3T＝逆方向dT）、（T＝dT）、（s＝ホスホロチオエート）、（mN＝2'－Oメチル含有残基）、（PEG＝ポリエチレングリコール）、（dN＝デオキシ残基）	K_D (nM)	100nM vWF での%結合
222	ARC1172	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCdGdCdC-3T	2	37
284	ARC1361	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	7.9	38.5
285	ARC1362	mGmCmGmU-s-dGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	9.9	34.3
286	ARC1363	mGmCmGmUdG-s-dCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	12.7	32.7

【０３５９】

【表２３－２】

287	ARC1364	mGmCmGmUdGdC-s-dAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	8.2	36.9
288	ARC1365	mGmCmGmUdGdCdA-s-mGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	10.8	35.4
289	ARC1366	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmC-s-dCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	15.5	28.9
290	ARC1367	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdC-s-mGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	13.9	30.4
291	ARC1368	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	1.8	38.2
292	ARC1369	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGT-s-mGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	16.3	26.2
293	ARC1370	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmG-s-dCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	10.1	22.5
294	ARC1371	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdC-s-dGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	8.4	32.1
295	ARC1372	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdG-s-dGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	23.5	35.2

【０３６０】

【表２３－３】

296	ARC1373	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdG-s-TmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	7.1	33.0
297	ARC1374	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGT-s-mGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	9.5	27.2
298	ARC1375	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmC-s-dCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	8.8	25.5
299	ARC1376	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdC-s-mUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	4.4	31.3
300	ARC1377	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmU-s-dCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	7.4	30.9
301	ARC1378	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdC-s-dCmGmUdCmAmCmGmC-3T	9.1	31.1
302	ARC1379	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdC-s-mGmUdCmAmCmGmC-3T	10.4	31.3
303	ARC1380	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmU-s-dCmAmCmGmC-3T	12.0	32.5
304	ARC1381	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdC-s-mAmCmGmC-3T	8.7	35.8

上記の表２３に示されるように、第３段階で試験された改変の大部分は有益な効果が殆どまたは全くなかったが、ｍＧ－２０およびｄＴ－２１の間に単一のホスホロチオエート改変を含むＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）は、親化合物ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）のものと同一な親和性（実験誤差の範囲内）でヒトｖＷＦに結合する。

【０３６１】

第４および第５段階アプタマー改変の間に、図１８に示される、ＡＲＣ１５２４（配列

番号３０５）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）およびＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）を合成した。図１９に示されるようにステム１を閉じステム２を開いた円順列の配列を合成した。

【０３６２】

下記の表２４に示されるように、これらのアプタマーの多くはｖＷＦに結合したが、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）ほど強力なものはなかった。興味深いことに、アプタマー改変の第１段階で生じたＳＡＲと一致するが、２７位のｄＴからｍＴへの単一の変化のみを含むＡＲＣ１５２５は、ｖＷＦへの結合を全く示さなかった。ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）がその後試験される生物学的アッセイの多くにおいて、ＡＲＣ１５２５を陰性対照として用いた。また、アプタマー改変の第３段階からのＳＡＲデータと一致するが、２１位のＧと２２位のＴとの間で単一のホスホロチオエート置換を有する以外はＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）と同一であるＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）は、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）に関して、測定可能な親和性の向上を示した。

【０３６３】

（表２４：第４および第５段階アプタマー改変結合結果）

【０３６４】

【表２４】

SEQ ID NO:	ARC #	配列（5'→3'）、（NH2＝5'－ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト）、（3T＝逆方向dT）、（T＝dT）、（s＝ホスホロチオエート）、（mN＝2'－Oメチル含有残基）、（PEG＝ポリエチレングリコール）、（dN＝デオキシ残基）	K_D (nM)	100nM vWF での%結合
222	ARC1172	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCdGdCdC-3T	2	37
291	ARC1368	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	1.8	38.2
305	ARC1524	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCmAmCmGmC-3T	5.7	26.5
306	ARC1525	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmGmTmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCmAmCmGmC-3T	結合なし	結合なし
307	ARC1526	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmUmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCmAmCmGmC-3T	4.7	29.0
308	ARC1527	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCPEGmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T	3.4	14.1
309	ARC1528	mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCPEGmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCmAmCmGmC-3T	4.2	10.2
310	ARC1529	mCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCmAmCmG-3T	12.3	22.6

【０３６５】

【表２４－２】

311	ARC1530	mCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmUmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCmAmCmG-3T	15.0	19.2
312	ARC1531	mCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCPEGmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmG-3T	1.5	20.0
313	ARC1532	mCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCPEGmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCmAmCmG-3T	2.6	19.3
314	ARC1533	mCmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCmAmCPEGmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmG-3T	4.0	31.7
315	ARC1534	mCmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCmAmCmUmUmUmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmG-3T	62.8	25.6
316	ARC1535	mCmCmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUmCmAmCmUmUmUmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmGmG-3T	27.1	48.3
317	ARC1546	mCmCmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmUmUmCmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmGmG-3T	24	26

【０３６６】

【表２４－３】

318	ARC1759	dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdG-s-TdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCdGdCdC-3T	0.7	46

（実施例２Ｆ：改変アプタマーへのＰＥＧ部分の結合体化）

アミン反応性化学作用を介してＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）およびＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）の５’末端にポリエチレングリコール部分を結合体化した。オリゴヌクレオチド

【０３６７】

【化６２】

ARC1635 NH2-

mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmG-s-

dTmGdCdGdGdTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T (5’ヘキシルアミン改変のある

ARC1368 (SEQ ID NO 291))および ARC1884 (SEQ ID NO 322) NH2-

dGdGdCdGdTdGdCdAdGdTdGdCdCTdTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCd

GTdCdAdCdGdCdC-3T (5’ヘキシルアミン改変のあるARC1172 (SEQ ID NO 222))

を、化学的に合成した。

【０３６８】

以下の表２５に示されるように、合成後に、アミン改変アプタマーを異なるＰＥＧ部分に結合体化した。

【０３６９】

（表２５：ヘキシルアミン改変またはＰＥＧ結合体化アプタマー）

【０３７０】

【表２５】

SEQ ID NO:	ARC #	配列(5’→3’)、(NH2＝5’－ヘキシルアミンリンカーホスホルアミダイト)、(3T＝逆方向dT)、(T＝dT)、(s＝ホスホロチオエート)、(mN＝2’－Oメチル含有残基)、(PEG＝ポリエチレングリコール)、(dN＝デオキシ残基)
319	ARC1635	NH2-mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGdTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T

【０３７１】

【表２５－２】

320	ARC1779	PEG20K-NH2-mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T
321	ARC1780	PEG40K-NH2-mGmCmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCmGmGmCdCmG-s-TmGdCdGdGTmGmCdCmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC-3T
322	ARC1884	NH2-dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCdGdCdC-3T
323	ARC1885	PEG20K-NH2-dGdGdCdGTdGdCdAdGTdGdCdCTTdCdGdGdCdCdGTdGdCdGdGTdGdCdCTdCdCdGTdCdAdCdGdCdC-3T

（実施例３：機能的細胞アッセイ）

（生物学的ｖＷＦ依存性アッセイ）

いくつかの生物学的アッセイにおけるｖＷＦ機能のブロッキングにおける種々のアプタマーの効果を本実施例に記載する。

【０３７２】

あるアッセイにおいては、ボトロセチンを用いる。ボトロセチンは、ヘビ毒から単離されるタンパク質であり、生きた、および固定された血小板上のｇｐＩｂ受容体へのフォン・ビルブラント因子結合を誘導することが公知である。この反応は、ｖＷＦ多量体化を介して、固定された血小板の懸濁液の凝集反応を引き起こす。多血小板血漿（以下「ＰＲＰ」）の調製物において、凝集反応のｖＷＦ／ボトロセチン誘導の後に、血小板の代謝活性化によって引き起こされた血小板凝集の第２段階が続く。固定された血小板へのｖＷＦ結合およびｖＷＦ媒介血小板凝集の２つの反応を用いて、本発明のアプタマーの活性を測定し得る。

【０３７３】

固定された血小板に結合したｖＷＦの量は、ｖＷＦに対する抗体を用いて測定し得る。次いで、フルオレセイン結合二次抗体とともにインキュベートした、結合した抗体からの蛍光シグナルを、フローサイトメトリーによって検出および定量する。本発明のアプタマーが血小板へのｖＷＦ結合をブロックする能力は、蛍光シグナルの減少と相関がある。

【０３７４】

ボトロセチンは、血小板へのｖＷＦのＡ１ドメインの結合ならびに全長タンパク質を誘導する。本発明者らは、ボトロセチンを用いて６－ヒスチジンタグウサギＡ１ドメインｖＷＦ精製タンパク質がヒト凍結乾燥血小板への結合を誘導され得ることを確定した。血小板に結合しているウサギＡ１は、抗ポリ－Ｈｉｓ抗体と、それに続くフィコエリトリン結合二次抗体とのインキュベーションを用いて測定される。結合の程度は、フローサイトメトリー分析によって定量し得る。アプタマーがヒト固定血小板へのウサギＡ１の結合をブロックする能力は、減少した蛍光シグナルと相関があった。

【０３７５】

新鮮なヒト血液から単離された多血小板血漿において、ボトロセチンはｖＷＦを介した血小板凝集を誘導する。血小板の凝集によって血漿が澄むので、血小板凝集物形成は、Ｃｈｒｏｎｏｌｏｇモデル４９０－４Ｄ血小板凝集計で％光透過率の増大として光学的に測定し得る。本発明のアプタマーを、ヒト血液におけるボトロセチン誘導血小板凝集（「ＢＩＰＡ」）を阻害するその能力に関して分析した。本発明のアプタマーは、ボトロセチン添加後６分間凝集物形成が防げた場合に活性があると見なした。

【０３７６】

ＰＦＡ－１００装置を用いる、本実施例の別のアッセイは、ＰＦＡ－１００装置を用いる、アゴニスト非依存性だがｖＷＦ依存性のアッセイである（Ｈａｒｒｉｓｏｎら、Ｃｌｉｎ．Ｌａｂ．Ｈａｅｍ．２４号、２２５～３２頁（２００２年））。ＰＦＡ－１００は、血小板が凝集してコラーゲンおよびエピネフリンまたはＡＤＰのいずれかで覆われた膜の微視的開口部を通したクエン酸塩加全血の流出を凝集およびブロックするのに必要な時間を記録することによって、インビボの高せん断力の条件下の止血血栓の形成をシミュレートする。微視的開口部を通る血液の引き抜きによって誘導されるせん断力のために、高分子量ｖＷＦマルチマーが膜上の固定されたコラーゲンに結合し、次いで血小板に結合して血小板を活性化するので、この活性はフォン・ビルブラント因子依存性である。このため、このアッセイは、ｖＷＦ依存的である点でＢＩＰＡおよびＦＡＣＳアッセイを称賛するが、しかしながら、ｖＷＦアゴニストボトロセチンの添加を必要とせず、多血小板血漿の代わりに全血を使用する点で、いくらかの利点を有する。

【０３７７】

本実施例の別のアッセイはＡＤＰを使用して血小板凝集を誘導した。多血小板血漿（ＰＲＰ）の凝集は、複数の方法で誘導され得る。ヘビ毒タンパク質ボトロセチンは上述のようにｖＷＦに作用し、血小板受容体ｇｐＩｂとのその相互作用を安定させ、それによって血小板凝集を誘導する。ｇｐＩｂへのｖＷＦの結合は、血小板凝集の早期の段階であり、そのため、凝集プロセスの下流の成分をブロックする阻害剤（すなわちＩＩｂＩＩＩａアンタゴニストＩｎｔｅｇｒｅｌｉｎ™およびＲｅｏＰｒｏ™）がボトロセチン誘導血小板凝集も防ぐであろうという期待がある。しかしながら、直接血小板に作用して凝集を誘導するアゴニストの場合（例えばＡＤＰ）、アゴニストの上流のアンタゴニストが効果的でないと予想するであろうが（例えば抗ｖＷＦアプタマー）、血小板に直接作用するアンタゴニスト（ＩＩｂＩＩＩａアンタゴニスト）は能力があるままである。ＩＩｂＩＩＩａアンタゴニストに関するｖＷＦアンタゴニストの特異性は、処置に関連する出血時間を減少させることによって、抗ｖＷＦアンタゴニストの安全性を増大させる。狭窄した動脈にアテローム斑を有する患者に関しては、血小板が斑の表面上のコラーゲン固定ｖＷＦに結合すると血小板凝集が起こる。したがって、ｖＷＦ／ｇｐＩｂ相互作用の阻害ならびにフィブリンに結合するＩＩｂＩＩＩａ受容体のブロッキングの両方ともが、血小板凝集を防ぐであろう。ｖＷＦを標的化することによって付与される生物学的特異性によって、抗ＩＩｂＩＩＩａ処置とは異なり血小板自体が直接標的化されずに、他の手段によって依然として活性化され得ることを確実にすることが確実になり、そのため抗血小板療法に関連する潜在的な出血合併症が減少する。

【０３７８】

後述の実施例３Ａ～３Ｄにおいて、次の物質を用いた。ヒトフォン・ビルブラント因子（ｖＷＦ）（配列番号７）およびウシ血清アルブミンをＣａｌｂｉｏｃｈｅｍから購入した（それぞれカタログ番号６８１３００および１２６５９３）（カリフォルニア州ラ・ホーヤ）。標準的な方法および条件を用いて、ドメインＡ１ウサギｖＷＦ（配列番号６）を発現および精製した。凍結乾燥したヒト血小板（Ｐ／Ｎ２９９－２）、キュベット（Ｐ／Ｎ３１２）、スターバー（Ｐ／Ｎ３１１）、血小板凝集計（モデル４９０－４Ｄ）およびＡＧＧＲＯ／ＬＩＮＫソフトウエアを、Ｃｈｒｏｎｏｌｏｇ（ペンシルバニア州ハヴァートン）から購入した。ボトロセチン（１２２０１－１００Ｕ－Ｂ）はＰｅｎｔａｐｈａｒｍ製であった（スイス、バーゼル）。新鮮な血液を、外見上健康な、非ステロイド性抗炎症性薬（「ＮＳＡＩＤ」）フリーのドナーから得、５ｍＬの０．１０５Ｍクエン酸ナトリ

ウムバキュテイナーチューブ（カタログ番号３６９７１４）（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ－ニュージャージー州フランクリンレークス）に引き入れた。生理学的食塩水は、Ａｌｄｏｎ製であり（カタログ番号９４２０３０６）（ニューヨーク州エイヴォン）、リン酸緩衝生理食塩水（カタログ番号２１－０４０－ＣＶ）はＣｅｌｌｇｒｏ（バージニア州ハーンドン）から購入した。ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　ＦＡＣＳＣＡＮ装置でフローサイトメトリー実験を行い、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウエア（カリフォルニア州サンノゼ）で分析した。抗フォン・ビルブラント因子マウスモノクローナル抗体（カタログ番号ＧＴＩ－Ｖ１Ａ）をＧＴＩ（ウィスコンシン州ウォーキシャ）から購入した。ペンタ－ＨＩＳ－ビオチン結合モノクローナル抗体（カタログ番号３４４４０）をＱｉａｇｅｎ（ドイツ）から購入した。抗マウスＩｇＧ２ａ－ＦＩＴＣ結合体化（カタログ番号５５３３９０）は、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（カリフォルニア州サンディエゴ）から購入した。抗マウスＩｇＧ－ＰＥ結合抗体（カタログ番号７１５－１１６－１５０）は、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（ペンシルバニア州ウエストグローブ）から購入した。

【０３７９】

（実施例３Ａ：全長ヒトフォン・ビルブラント因子血小板結合アッセイ）

凍結乾燥した血小板へのヒトｖＷＦ結合をブロックするアプタマーの能力を、フローサイトメトリー分析によって評価した。アプタマーの滴定（０ｎＭ、０．１ｎＭ～１０００ｎＭ）を、ＦＡＣＳバッファー（ＰＢＳ＋０．５％ウシ血清アルブミン）中、室温で、５０ｕＬの体積で５ｎＭの全長ヒトｖＷＦとともに一時的にプレインキュベートした。ＦＡＣＳバッファー中、５ｕＬの凍結乾燥した血小板＋１ｕＬの０．１Ｕ／ｕＬのボトロセチンを含有するさらなる５０ｕＬをアプタマー／ｖＷＦに添加した。この反応を１５分間３７℃で進行させ、その後２００ｕＬのＦＡＣＳバッファーを添加した。１４７０ＲＣＦで６分間の回転によって血小板を収集し、上清を廃棄した。抗ｖＷＦ抗体の１：１００溶液を含有する１００ｕＬのＦＡＣＳバッファーにペレットを再懸濁し、室温で３０分間インキュベートした。２００ｕＬのＦＡＣＳバッファーでの希釈の後、血小板を１４７０ＲＣＦで６分間回転させ、上清を廃棄した。抗ＩｇＧ２ａ－ＦＩＴＣ抗体の１：１００希釈物にペレットを再懸濁し、暗黒下で３０分間、室温でインキュベートした。１００ｕＬ全体を２００ｕＬのＦＡＣＳバッファー中に希釈し、ＦＡＣＳＣＡＮ中のフローサイトメトリー分析によって直ちに分析した。単一および凝集した血小板の集団の周りにゲートを引き抜くことによって、混入している残屑由来の人為現象的データを分析から排除した。平均蛍光強度（「ＭＦＩ」）示数を、フローサイトメトリーによって分析した各試料について定量した。バックグラウンドＭＦＩを全てのデータポイントから引いた。所定の濃度でのアプタマー存在下での血小板への全長ヒトｖＷＦの結合のパーセント値を、任意のアプタマー非存在下での結合に関して計算することによって、パーセント阻害を報告した（図７参照）。血小板へのｖＷＦ結合のパーセント阻害をアプタマー濃度の関数として等式：

$$\%\text{阻害} = \%\text{阻害}_{max} / (1 + IC_{50} / \text{アプタマー濃度})$$

に適合させることによって、IC_{50}値を決定した。

【０３８０】

ボトロセチン誘導ｖＷＦ結合の特徴付けの結果を、下記の表２６で表にする。

【０３８１】

（実施例３Ｂ：ウサギフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１血小板結合アッセイ）

凍結乾燥した血小板へのウサギｖＷＦドメインＡ１結合をブロックする本発明のアプタマーの能力もまた、フローサイトメトリー分析によって評価した。アプタマーの滴定（０、０．１ｎＭ～１０００ｎＭ）を、ＦＡＣＳバッファー（ＰＢＳ＋０．５％ウシ血清アルブミン）中、室温で、５０ｕＬの体積で４ｎＭのウサギＡ１　ｖＷＦとともに一時的にプレインキュベートした。ＦＡＣＳバッファー中、５ｕＬの凍結乾燥した血小板＋１ｕＬの０．１Ｕ／ｕＬのボトロセチンを含有するさらなる５０ｕＬをアプタマー／ｖＷＦに添加した。この反応を１５分間３７℃で進行させ、その後２００ｕＬのＦＡＣＳバッファーを添加した。１４７０ＲＣＦで６分間の回転で血小板を収集し、上清を廃棄した。抗ペンタ

－ＨＩＳ－ビオチン結合抗体の１：２００希釈物を含有する１００ｕＬのＦＡＣＳバッファーにペレットを再懸濁し、室温で３０分間インキュベートした。２００ｕＬのＦＡＣＳバッファーでの希釈の後、血小板を１４７０ＲＣＦで６分間回転させ、上清を廃棄した。抗ＩｇＧ－ＰＥ抗体の１：１００溶液にペレットを再懸濁し、暗黒下で３０分間、室温でインキュベートした。１００ｕＬ全体を２００ｕＬのＦＡＣＳバッファー中に希釈し、ＦＡＣＳＣＡＮ中のフローサイトメトリー分析によって直ちに分析した。単一および凝集した血小板の集団の周りにゲートを引き抜くことおよび１００００の事象からデータを収集することによって、混入している残屑を分析から排除した。平均蛍光強度（「ＭｅｄＦＩ」）示数（比較の目的のために、一般に、上述の実施例３ａに記載されるＭＦＩ示数と同等である）を、フローサイトメトリーによって分析した各試料について定量した。バックグラウンドＭｅｄＦＩを全てのデータポイントから引いた。所定の濃度でのアプタマー存在下での血小板への全長ヒトＶＷＦの結合のパーセント値を、アプタマー非存在下での結合に関して計算することによって、パーセント阻害を報告した（図７参照）。血小板へのｖＷＦ結合のパーセント阻害をアプタマー濃度の関数として等式：

％阻害＝％阻害$_{max}$／（１＋ＩＣ$_{50}$／アプタマー濃度）

に適合させることによって、ＩＣ$_{50}$値を決定した。

【０３８２】

ボトロセチン誘導ウサギＡ１　ｖＷＦ結合の特徴付けの結果を、下記に表２６で表にする。

【０３８３】

（表２６：ＦＡＣＳおよびＢＩＰＡアッセイの結果（「ＮＤ」＝行っていない））

【０３８４】

【表２６】

アプタマー ID	FACSアッセイにおける全長ヒトVWF結合の阻害		FACSアッセイにおけるウサギVWF A1ドメイン結合の阻害		200nM以下のアプタマーが6分で90%を超えるBIPAのブロッキングを生じる
	IC_{50} 範囲	平均 IC_{50}	IC_{50} 範囲	平均 IC_{50}	
rRdY アプタマー アプタマー					
(AMX203.D6) SEQ ID NO 31	活性なし		ND		ND
(AMX205.H8) SEQ ID NO 32	活性なし		ND		ND
(AMX205.H11) SEQ ID NO 33	活性なし		ND		ND
(AMX205.D11) SEQ ID NO 35	活性なし		ND		ND
(AMX206.F9) SEQ ID NO 36	活性なし		ND		ND
(AMX206.H9) SEQ ID NO 37	活性なし		ND		ND
(AMX206.A10) SEQ ID NO 38	活性なし		ND		ND
(AMX205.F9) SEQ ID NO 39	活性なし		ND		ND
(AMX206.E7) SEQ ID NO 40	活性なし		ND		ND

【０３８５】

【表２６－２】

(AMX206.D7) SEQ ID NO 41	活性なし		ND		ND
(AMX203.A1) SEQ ID NO 43	活性なし		ND		ND
(AMX203.G9) SEQ ID NO 44 = ARC 842	1.2nM ~ 8.5nM	4.7nM	152pM ~ 1.6nM	592pM	生じる
(AMX205.H9) SEQ ID NO 45	活性なし		ND		ND
(AMX206.D8) SEQ ID NO 46	活性なし		活性なし		ND
(AMX205.F7) SEQ ID NO 49 = ARC 841	321pM ~ 1.6nM	818pM	1.5nM ~ 7.1nM	4.7nM	生じる
(AMX205.H10) SEQ ID NO 50	活性なし		活性なし		ND
rRdY アプタマーミニマー					
SEQ ID NO 177	1.6nM ~ 5.4nM	3nM	ND		ND
SEQ ID NO 180	731pM ~ 3.8nM	2nM	8.2nM ~ 10.5nM	9.3nM	生じる
SEQ ID NO 183	6.6nM ~ 99nM	26.5nM	ND		ND
SEQ ID NO 186	971pM ~ 2.2nM	1.3nM	ND		ND
SEQ ID NO 189	564pM ~ 1.6nM	1.1nM	ND		ND
SEQ ID NO 192	1.1nM ~ 5.3nM	2.6nM	2nM ~ 2.3nM	2.2nM	生じる
SEQ ID NO 194	活性なし		ND		ND
SEQ ID NO 196	活性なし		ND		ND
SEQ ID NO 198	14nM ~ 25nM	20.6nM	8.5nM ~ 16.8nM	12.6nM	ND
SEQ ID NO 201	1.3nM ~ 370nM	150nM	ND		活性なし
rRfY アプタマーアプタマー					
(AMX201.B1) SEQ ID NO 11	活性なし		ND		生じる
(AMX198.G1) SEQ ID NO 12	活性なし		ND		ND
(AMX201.H3) SEQ ID NO 13	活性なし		ND		生じる
(AMX201.G1) SEQ ID NO 15	活性なし		ND		ND
(AMX201.C8) SEQ ID NO 23 = ARC 840	24pM ~ 1.8nM	528pM	141pM ~ 704pM	682pM	生じる
rRfY アプタマーミニマー					
SEQ ID NO 165	562pM ~ 14.4nM	6.4nM	ND		ND
SEQ ID NO 169	103pM ~ 17nM	6.9nM	ND		ND
SEQ ID NO 172	1.8nM ~ 7.4nM	4.3nM	ND		ND
SEQ ID NO 174	1.3nM ~ 12.7nM	6.6 nM	4.9nM ~	6.8nM	生じる

【０３８６】

【表２６－３】

			5nM		
DNA SELEX 1, ミニマー					
ARC845 SEQ ID NO 205	活性なし	活性なし	活性なし	活性なし	活性なし
DNA SELEX 2 アプタマー－アプタマー					
AMX237.E10 SEQ ID NO 138	活性なし		ND		ND
AMX237.G7 SEQ ID NO 134	2.3nM ～ 14nM	6.5nM	12.3nM		ND
AMX.236.G1 SEQ ID NO 164	8.6nM ～ 72nM	46nM			ND
AMX237.A11 SEQ ID NO 98	466pM ～ 5.6nM	2.2nM	4.7nM		ND
AMX237.A2 SEQ ID NO 99	815pM ～ 7.3nM	3.5nM	7nM		ND
AMX238.D12 SEQ ID NO 100	684pM ～ 3.4nM	2nM	7.2nM		ND
AMX238.G5 SEQ ID NO 106	273pM ～ 2.6nM	1.1nM	5.5nM		ND
AMX238.E9 SEQ ID NO 115	772pM ～6.5nM	3.4nM	ND		ND
AMX238.H5 SEQ ID NO 118	514pM ～ 860pM	658pM	ND		ND
AMX237.G6 SEQ ID NO 114	1.5nM ～ 2.5nM	1.9nM	ND		生じる
AMX237.B11 SEQ ID NO 109	151pM ～ 4.8nM	2.5nM	5.7nM		ND
AMX236.A12 SEQ ID NO 127	1.2nM ～ 17nM	10.7nM	14.5nM		ND
DNA SELEX 2 アプタマー－ミニマー					
SEQ ID NO 208	1.6nM ～ 10.2nM	4.3nM	ND		ND
SEQ ID NO 209	活性なし		ND		ND
SEQ ID NO 210	活性なし		ND		ND
SEQ ID NO 211	活性なし		ND		ND
ARC1027 SEQ ID NO 212	208pM ～ 4.2nM	1.5nM	462pM ～ 4.2nM	2nM	生じる
ARC1028 SEQ ID NO 213	473pM ～ 2.7nM	1.2nM	526pM ～ 2.7nM	1.5nM	生じる
ARC1029 SEQ ID NO 214	333pM ～ 1.1nM	609pM	490pM ～ 979pM	754pM	生じる
ARC1030 SEQ ID NO 215	活性なし		ND		ND
ARC1031	活性なし		ND		ND

【０３８７】

【表２６－４】

SEQ ID NO 216					

（実施例３Ｃ：ボトロセチン誘導血小板凝集の阻害（ＢＩＰＡアッセイ））

生きているヒト血小板に対するアプタマーの活性を測定するために、新たに調製された多血小板血漿を用いてＢＩＰＡアッセイを行った。少なくとも５日間の間ＮＳＡＩＤＳを摂取していない健康なヒトドナーから血液を得た。Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎの２１$^{3}/_{4}$ゲージ翼状針（カタログ番号３６７２８７）を用いて０．１０５Ｍクエン酸ナトリウムバキュテイナーチューブに血液を吸い込んだ。収集した血液を１５ｍＬコニカルチューブにプールし、２００ｇで２０分間回転させた。多血小板血漿（「ＰＲＰ」）の濁った黄色の層をチューブから抜き取り、プールし、室温でとっておいた。残存する血液を２５００ｇで１０分間回転させた。乏血小板血漿（「ＰＰＰ」）として公知の、血漿の澄んだ層を抜き取り、室温でとっておいた。ＰＲＰを、４７０ｕＬの体積で、スターバーを含むキュベットに等分した。５００ｕＬのＰＰＰの試料をキュベットに等分し、血小板凝集計のＰＰＰ比較セルに配置した。ＢＩＰＡアッセイで使用する前に、ＰＲＰの試料を血小板凝集計中３７℃で３～５分間予熱した。まず、それぞれの個々のドナーについて、血小板凝集を誘導するのに必要なボトロセチンの濃度を滴定によって測定した。このボトロセチンの濃度を残りの実験に用いた。次に、予熱したＰＲＰにアプタマーの滴定（０、１ｎＭ～１０００ｎＭ）を１分間加え、次いでボトロセチンを添加することによって、アプタマーをアッセイした。血小板凝集とともに、光透過率の大きさの増大が見られる（図８）。６分後に血小板凝集が９０％以上ブロックされる濃度を、表２６の最後の縦列に示す。Ａｇｇｒｏ／ＬＩＮＫソフトウエアを用いて、血小板凝集計トレースから曲線下面積（「ＡＵＣ」）が生成され得、アプタマーＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）については図９に見られるように、ボトロセチン誘導血小板凝集に対する、任意の所定の濃度でのアプタマーのパーセント阻害の計算に用いられ得る。

【０３８８】

（実施例３Ｄ：一連の生物学的アッセイにおける、選択された改変アプタマーの生物学的活性）

上述の実施例２に記載されるメドケム化学改変プロセスにおいて同定された、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）、ＡＲＣ１５２５（陰性対照）、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）、ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）を、一連の生物学的アッセイにおいて試験した。これらのアッセイは、（実施例３Ａおよび３Ｂに記載されるような）ＦＡＣＳおよび（実施例３Ｃに記載されるような）ＢＩＰＡアッセイ、ならびに後述の血小板ＰＦＡ－１００アッセイを含んだ。

【０３８９】

（材料）

血小板機能分析装置（ＰＦＡ）アッセイにおいて、以下の材料を用いた。新鮮な全血を、健康な非ステロイド性抗炎症性薬（ＮＳＡＩＤ）フリーのドナーから、２１$^{3}/_{4}$ゲージ翼状針（カタログ番号３６７２８７、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）を用いて、５ｍｌの０．１０５Ｍクエン酸ナトリウムチューブ（カタログ番号３６９７１４、Ｂｅｃｋｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）へ収集した。新鮮な全血を、健康な非ステロイド性抗炎症性薬（ＮＳＡＩＤ）フリーのカニクイザルから収集した。アプタマーを、添加物なしのバキュテイナーチューブ（カタログ番号３６６４３４、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）中、Ａｌｄｏｎの生理学的食塩水（カタログ番号９４２０３０６）で希釈した。試料を、ＰＦＡ－１００装置（Ｄａｄｅ　Ｂｅｈｒｉｎｇ）中で用いられたコラーゲン／エピネフリン試験カートリッジ（カタログ番号Ｂ４１７０－２０Ａ、Ｄａｄｅ　Ｂｅｈｒｉｎｇ）にロードした。セルフテストにおいて、および試験カートリッジを予め湿潤させるために、トリガー溶液（カタログ番号Ｂ４１７０－５０、Ｄａｄｅ　Ｂｅｈｒｉｎｇ）を用いた。セルフテストおよびＯリングクリーニングプロセスにおいて、Ｏリングクリーニングパッド（カタログ番号Ｂ４１７０－７３、Ｄａｄｅ　Ｂｅｈｒｉｎｇ）を用いた。

【０３９０】

（ＰＦＡアッセイ）

セルフテストは、Ｏリングクリーニングプロセスを含んだが、装置の正しい機能を確実

にするために、任意の試料を流す前に常にＰＦＡ－１００装置上で行った。

【０３９１】

新鮮な全血を、下記の表２７に示されるように、少なくとも３日間の間ＮＳＡＩＤを摂取していない健康なドナーまたはカニクイザルから収集した。２１$^{3}/_{4}$ゲージ翼状針を用いて、ヒトドナー由来の血液を５ｍｌの０．１０５Ｍクエン酸ナトリウムチューブに収集し、チューブを穏やかに３回逆さにして、血液とクエン酸ナトリウムが確実に混合されるようにした。実験全体の間中、沈降を防ぐために、５分ごとに全血のチューブを穏やかに逆さにした。

【０３９２】

全血中のアプタマーの滴定をアッセイするために、添加物なしのバキュテイナーチューブにアプタマーを加え、最終体積が６０μｌであるように、生理学的食塩水を用いて所望の濃度まで希釈した（例えば０ｎＭ、１ｎＭ～１０００ｎＭ）。ＰＦＡ－１００が次の組の試料を流す準備ができたら、ある濃度のアプタマーを含むチューブに１９４０μｌの全血を加えた。このチューブを３回穏やかに逆さにして、アプタマーと血液を完全に混合した。試料は常に二連でＰＦＡ－１００装置に流した。この血液混合物の８００μｌをコラーゲン／エピネフリン試験カートリッジにロードした。試験カートリッジをＰＦＡ－１００装置にロードした。ＰＦＡ－１００によって開口部の閉塞の時間を測定し、最大の時間は３００秒であった。本発明者らは、このアッセイにおけるIC_{95}を、閉鎖時間を３００秒まで延長するアプタマーの最低濃度と推定した。

【０３９３】

図２０は、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）および陰性対照ＡＲＣ１５２５について、ヒト全血における凝固時間を、ＰＦＡ－１００アッセイにおけるアプタマー濃度の関数として示す。ＦＡＣＳ、ＢＩＰＡおよびＰＦＡ－１００アッセイのさらなる結果を、以下の表２７で表にする。

【０３９４】

（表２７：ＦＡＣＳ、ＢＩＰＡおよびＰＦＡ－１００結果

【０３９５】

【表２７】

ARC #	FACS IC_{50} 対 ヒト全長 vWF (nM)	FACS IC_{50} 対 ウサギ A1 ドメイン (nM)	ヒト多血小板血漿での ~IC_{90} BIPA (nM)	クエン酸塩加ヒト全血での ~IC_{95} PFA-100 (nM)	クエン酸塩加カニクイザル全血での ~IC_{95} PFA-100 (nM)
ARC1172 (SEQ ID NO 222)	2	2	~200	~100	ND
ARC1346	50	180	> 1000	ND	ND
ARC1368	2	4.0	~200	~100	~100
ARC1525	ND	ND	阻害なし	阻害なし	ND
ARC1779	ND	ND	~100	~100	ND
ARC1780	ND	ND	~100	~100	ND
ARC1885	ND	ND	~50	~100	ND

期待されるように、上述の実施例２に記載される結合アッセイにおける、観察されたｖ

ＷＦに対するアプタマーの親和性および生物学的アッセイにおけるそれらの相対的能力の間に強い相関があった。非結合陰性対照ＡＲＣ１５２５は、試験されたいかなるアッセイにおいても活性を示さなかった。

【０３９６】

（実施例３Ｅ：ＢＩＰＡ、ＰＦＡ－１００およびＡＩＰＡアッセイにおけるＡＲＣ１３６８、Ｉｎｔｅｇｒｉｌｉｎ^{TM}およびＲｅｏＰｒｏ^{TM}）

ＰＦＡ－１００においてヒト全血中で、ＢＩＰＡにおいてヒトＰＲＰ中で（それぞれ実施例３Ｄおよび３Ｃに上述されるように）、およびＡＤＰ誘導血小板凝集（ＡＩＰＡ）アッセイにおいて、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）、Ｉｎｔｅｇｒｉｌｉｎ^{TM}およびＲｅｏＰｒｏ^{TM}の能力を評価した。ボトロセチンを添加する代わりに１０ミリモルのＡＤＰ（Ｃｈｒｏｎｏｌｏｇ、ペンシルバニア州ハヴァートン）を添加して血小板凝集を誘導した点を除いて、実施例３Ｃで上述したＢＩＰＡで行われたのと正確に同じように、ヒトＰＲＰを用いてＡＩＰＡを行った。ＰＦＡ－１００結果を図２１に示す。ＢＩＰＡ結果を図２２に示す。ＡＩＰＡ結果を図２３に示す。図２１および２２に見られるように、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）は、ＰＦＡ－１００およびＢＩＰＡアッセイにおけるＲｅｏＰｒｏ^{TM}に匹敵する能力を示す。上述のｖＷＦ依存的機構と一致して、図２３に示されるように、抗ｖＷＦアプタマーはＡＩＰＡをブロックするそのアッセイにおいて能力を示さないが、ＩＩｂＩＩＩａアンタゴニストは能力があるままである。

【０３９７】

（実施例４：薬物動態学的研究）

実施例４および５において、全ての質量ベースの濃度データは、ＰＥＧ結合体化によって付与される質量にかかわらず、アプタマーのオリゴヌクレオチド部分の分子量のみに言及する。

【０３９８】

（実施例４Ａ：ヒトおよびラット血漿における抗ｖＷＦアプタマーの安定性）

ヒトおよびラット血漿の両方におけるヌクレアーゼ安定性に関して、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）およびＡＲＣ１５３３をアッセイした。後述するように、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、血漿ヌクレアーゼ分解を測定した。簡潔に述べると、血漿安定性測定のために、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて、化学的に合成したアプタマーを精製し、γ－^{32}Ｐ　ＡＴＰで５’末端標識し、次いで再びゲル精製した。極微量の３２－Ｐ標識アプタマーを、２００マイクロリットル結合反応において、９５％ヒトまたはラット血漿中１００ｎＭ未標識アプタマーの存在下でインキュベートした。０時点の反応を、血漿がＰＢＳで置換された以外は同じ成分を用いて別に行った。これによって、ゲルにロードされた量または放射活性が全ての実験にわたって一貫することが確実になった。他に指定されなければ、反応をサーモサイクラー中３７℃で１、３、１０、３０および１００時間インキュベートした。各時点で、２０マイクロリットルの反応を除去し、２００マイクロリットルのホルムアミドローディング色素と組み合わせ、液体窒素中で急速冷凍し、－２０℃で保存した。最後の時点を調べた後、凍結試料を解凍し、各時点から２０マイクロリットルを除いた。次いで少量の試料にＳＤＳを終濃度０．１％まで添加した。次いで試料を９０℃で１０～１５分間インキュベートし、１５％変性ＰＡＧＥゲルに直接ロードし、１２Ｗで３５分間流した。Ｓｔｏｒｍ　８６０ホスホイメージャーシステムを用いてゲル上の放射活性を定量した。全長アプタマーのバンドを定量することおよびレーンの総数で割ることによって、各時点での全長アプタマーのパーセンテージを測定した。次いで、各時点での全長アプタマーの割合を、０時間時点の全長アプタマーのパーセンテージに対して正規化した。時間の関数としての全長アプタマーの割合を、等式：

$$m1 * e^{(-m2 * m0)}$$

（式中ｍ１は最大％全長アプタマー（ｍ１＝１００）であり、ｍ２は分解の速度である）に適合した。アプタマーの半減期（$T_{1/2}$）は（ｌｎ２）／ｍ２に等しい。

【０３９９】

ヒト血漿についての試料データを図２４に示し、試験したアプタマーについての結果を表２８に要約する。本発明者らの予想と一致して、アプタマーはラット血漿よりもヒト血漿において安定性が高く、２’－ＯＭｅ改変の数の増加は血漿安定性の増大と相関がある。

【０４００】

（表２８：アプタマー血漿安定性半減期）

【０４０１】

【表２８】

ARC #	T1/2 ヒト血漿（時間）	T1/2 ラット血漿（時間）
ARC1172 (SEQ ID NO 222)	17	3
ARC1346	行っていない	19
ARC1368	63	21
ARC1533	93	行っていない

（実施例４Ｂ：カニクイザルにおけるＡＲＣ１３６８のＰＥＧ化誘導体の薬物動態学／薬力学）

ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）、１７７９（配列番号３２０）および１７８０（配列番号３２１）（上述の実施例２に記載される）を、推定の有効量よりおよそ３０倍高い３ｕＭの瞬間的血漿中濃度を生じると期待される３ｍｇ／ｋｇの投薬で、カニクイザル（ｎ＝３／群）に静脈内注射した。その後、規則的な間隔でクエン酸塩加血液試料を収集し、血漿に関して処理した。

【０４０２】

アプタマーがインビボで薬理学的に活性があることを証明するために、投与５分後に、推定される血漿C_{max}でボトロセチン誘導血小板凝集（ＢＩＰＡ）を行った。全ての動物は、この時点でＢＩＰＡの完全な阻害を有し、アプタマーがインビボで機能的であることが証明された。

【０４０３】

その後Ｏｌｉｇｒｅｅｎアッセイ（Ｇｒａｙら、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ａｎｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ７（３）：１３３～１４０頁（１９９７年）を用いて血漿中アプタマー濃度を測定した。その後、プログラムＷｉｎＮｏｎｌｉｎを用いてデータを分析し、下記の表２９～３１に列挙される薬物動態学的パラメータを生じた。

【０４０４】

また、時間の関数としてプロットした霊長類血漿中アプタマー濃度を、図２５のグラフに示す。ＯｌｉＧｒｅｅｎ^{TM}アッセイに基づく平均濃度－時間プロフィールから、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）、ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１７７

９（配列番号３２０）の薬物動態学的プロフィールが主に単相であるということが示された。非ＰＥＧ化アプタマー（ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１））は、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）およびＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）と比較して、迅速な分布段階を示した。ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）とは異なって、４０ｋＤａ　ＰＥＧ結合体化ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）は、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）と比較して、長期の分布段階を示した。ＡＲＣ１７７９（２０ｋＤａ　ＰＥＧ）は、α－半減期が２時間以下である分布段階を示した。

【０４０５】

（表２９－Ｏｌｉｇｒｅｅｎアッセイデータに基づく、サルにおける３ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ投与後のＡＲＣ１３６８のノンコンパートメント薬物動態学的パラメータ推定値）

【０４０６】

【表２９】

PKパラメータ	単位	1101	1102	1103	平均値	標準偏差
Tmax	時間	0.08	0.08	0.08	0.08	0.00
Cmax	ng/mL	26409	19170	23301	22960	3632
AUC0～最終	時間*ng/mL	23096	31926	20650	25224	5932
MRT最終	時間	4.50	5.46	3.48	4.48	0.99

（表３０－Ｏｌｉｇｒｅｅｎアッセイデータに基づく、サルにおける３ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ投与後のＡＲＣ１７７９のノンコンパートメント薬物動態学的パラメータ推定値）

【０４０７】

【表３０】

PKパラメータ	単位	2101	2103	2104	平均値	標準偏差
Tmax	時間	0.25	0.50	0.25	0.33	0.14
Cmax	ng/mL	69065	65717	70344	68375	2389
AUC最終	時間*ng/mL	309245	336590	235503	293779	52288
MRT最終	時間	5.27	4.66	2.69	4.21	1.35

（表３１－Ｏｌｉｇｒｅｅｎアッセイデータに基づく、サルにおける３ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ投与後のＡＲＣ１７８０のノンコンパートメント薬物動態学的パラメータ推定値）

【０４０８】

【表３１】

PKパラメータ	単位	3101	3102	3103	平均値	標準偏差
Tmax	時間	2.00	2.00	0.25	1.42	1.01
Cmax	ng/mL	55965	37320	50690	47992	9611
AUC最終	時間*ng/mL	740559	613180	899455	751065	143426
AUC全体	時間*ng/mL	740559	613180	899455	751065	143426
MRT最終	時間	8.69	9.54	14.11	10.78	2.91

ＯｌｉＧｒｅｅｎアッセイ分析に続いて、バリデートされたＨＰＬＣベースのアッセイを用いて、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）を投与した動物について、血漿中アプタマー濃度を測定した。プログラムＷｉｎＮｏｎｌｉｎを用いたノンコンパートメントおよび２－コンパートメント分析を介して、ＨＰＬＣデータを分析した。より感度の高いＨＰＬＣ法を用いたサル試料の再分析から、分布および排出相の両方を示す二相であるＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）の濃度－時間プロフィールが生じた。ＯｌｉＧｒｅｅｎアッセイを用いて観察された結果と一致して、ＨＰＬＣベースの結果から、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）の分布半減期（$t_{1/2\alpha}$）が１．４時間であり、排出半減期が１２．９（$t_{1/2\beta}$）であることが示された。

【０４０９】

（実施例４Ｃ：カニクイザルにおけるＡＲＣ１７７９の薬物動態学／薬力学）

ＡＲＣ１７７９の薬物動態学的／薬力学的相関を、０．５ｍｇ／ｋｇでの単回静脈内（ＩＶ）ボーラス投与後の３匹のカニクイザルにおいて評価した。血漿中のＡＲＣ１７７９レベルは、血小板機能の阻害または皮膚出血時間（ＣＢＴ）の延長において、ＡＲＣ１７７９の薬力学的効果に相関があった。

【０４１０】

ＩＶ投与の後、薬物動態学的および薬力学的分析のために、投与後種々の時点で経皮的に血液を収集した。血小板機能に対するＡＲＣ１７７９の薬力学的効果をＰＦＡ－１００アッセイによって決定し、出血に対するＡＲＣ１７７９の効果をＣＢＴ時間によって測定した。また、ＡＲＣ１７７９レベルの定量のために、血漿試料をＨＰＬＣによって分析した。薬物動態学的パラメータ推定値を、２－コンパートメント分析によって決定した。結果を図２６に示す。

【０４１１】

個々のサルについて生じた濃度－時間プロフィールから、ＡＲＣ１７７９薬物動態学の分布段階が主に示された。分布半減期を、およそ１．０時間（$t_{1/2\alpha}$）と決定した。排出半減期（$t_{1/2\beta}$）は、入手可能なデータから十分に決定されなかった。

【０４１２】

ＰＦＡ－１００アッセイによって測定された血小板凝集に対するＡＲＣ１７７９の薬力学的効果を、図２６に示す。ＡＲＣ１７７９の血漿中濃度が３００ｎＭを超えた場合、ＰＦＡ－１００装置によって評価すると、血小板機能は阻害された。しかしながら、血漿中アプタマー濃度がおよそ７７ｎＭまで減少した場合、血小板機能は正常に戻った。

【０４１３】

同様に図２６に見られるように、出血時間延長に対するＡＲＣ１７７９の薬力学的効果は、これらの研究において最小であることがわかった。

【０４１４】

要約すると、ＡＲＣ１７７９は、およそ３００ｎＭの血漿中濃度で、インビボで血小板機能を阻害した。このインビボ濃度は、血小板機能をインビトロで阻害するのに必要な、アプタマーの観察された濃度よりもおよそ３倍高かった。対照的に、高い血漿中濃度（１０００ｎＭ）でも、ＡＲＣ１７７９は、単回ボーラス投与の後、皮膚出血時間に対して最小の効果を示した。

【０４１５】

（実施例５：機能的動物アッセイ）

本明細書中に記載される実施例４および５において、全ての質量ベースの濃度データは、ＰＥＧ結合体化によって付与される質量にかかわらず、アプタマーのオリゴヌクレオチド部分の分子量のみに言及する。

【０４１６】

（実施例５Ａ：カニクイザルにおけるＡＲＣ１７７９の薬力学）

カニクイザルに０．５ｍｇ／ｋｇ　ＩＶボーラスでＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）を投与した。ＰＦＡ－１００閉鎖時間、ＢＩＰＡおよび皮膚出血時間（「ＣＢＴ」）を、研究を通して、全て時間の関数として測定した。ＢＩＰＡおよびＰＦＡ－１００閉鎖時間を、これまでに実施例３に記載したように測定した。以下のように記載される標準的プロトコールを用いて、皮膚出血時間を測定した。

【０４１７】

試験される前腕の二頭領域に血圧計カフをあてがい、膨張させて４０ｍｍＨｇの一定の圧力を維持した。Ｓｕｒｇｉｃｕｔｔ（登録商標）自動化切開装置（ＩＴＣ、ニュージャージー州エディソン）を用いて、前肘のしわの遠位の前腕の手掌表面の外側面にわたって、縦切開を行った。切開の時間にストップウォッチを開始した。切開後１５～３０秒に、切開との直接の接触を避けながら、Ｓｕｒｇｉｃｕｔｔ（登録商標）出血時間ブロッティングペーパー（ＩＴＣ、ニュージャージー州エディソン）を用いて血液を逃がした。１５～３０秒ごとに、ブロッティングペーパーを回転させ、ペーパーの新しい部位で再ブロットさせた。血液がペーパーに逃がされなくなるまで、または３０分後の、いずれか早い方

までブロッティングを繰り返した。出血時間を、血液がペーパーに逃がされなくなる時間の３０秒以内までと決定する。

【０４１８】

図２７の表は、３匹の異なる動物に対するＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）投与に関して、縦列１に示される種々の時点の皮膚出血時間を分で、ＢＩＰＡ　ＩＣ$_{90}$をｎＭで、およびＰＦＡ　ＩＣ$_{95}$をｎＭで示す。図２８は、投与の後種々の時点で採取された３匹のＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）処理カニクイザルの血液からの平均ＰＦＡ－１００閉鎖時間のグラフを示す。図２９は、投与の後種々の時点で調べられた、３匹のＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）処理カニクイザルの皮膚出血時間を示す。図３０は、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）処理カニクイザルにおける平均皮膚出血時間（左の垂直軸）の、ＰＦＡ－１００閉鎖時間（右の垂直軸）に対する相互関係を示す。図２７～３０に示されるように、ＢＩＰＡおよびＰＦＡ－１００閉鎖時間が最大に阻害されている２時間までおよび２時間を含む時点では、皮膚出血時間に非常にわずかな増大しかない。エクスビボで血小板凝集の同様の阻害を生じる抗ｇｐＩＩｂＩＩＩａアンタゴニストＩｎｔｅｇｒｉｌｎ^{TM}の濃度で、鋳型または皮膚出血時間は、２０～３０分の間である。例えば、Ｐｈｉｌｌｉｐｓ，Ｄ．Ｒ．およびＳｃａｒｂｏｒｏｕｇｈ，Ｒ．Ｍ．、Ａｍ　Ｊ　Ｃａｒｄｉｏｌ、８０（４Ａ）：１１Ｂ～２０Ｂ頁（１９９７年）を参照のこと。いかなる特定の理論にも拘束されることを望まないが、これらのデータは、抗ｖＷＦ　Ａ１ドメインアプタマーアンタゴニストが、血管損傷の部位に固定されたｖＷＦへ血小板が結合するのをブロックすることによって、血小板機能を阻害することなく、そのため皮膚出血時間を増大させることなく、インビボで血小板活性をブロックするであろうという本発明者らの仮説と一致し、これを支持する。

【０４１９】

（実施例５Ｂ：カニクイザル電解血栓症モデルにおけるＡＲＣ１７７９の評価）

十分詳細に記録されている非ヒト霊長類電解血栓症モデルにおいて、動脈内血栓症の阻害におけるＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）の効果を試験するために研究を行った。例えば、Ｒｏｔｅら、Ｓｔｒｏｋｅ、１９９４年：２５、１２２３～１２３３頁を参照のこと。１３匹のカニクイザルを、以下の表３０に示すように４つの群に分け、処置養生法に割り振った。

【０４２０】

（表３２：電解血栓症研究設計）

【０４２１】

【表３２】

群番号	動物の数	試験項目	用量 (mg/kg)	投与養生法	用量体積	剖検日
1	3	ビヒクル（生理食塩水）	群3へのDVE	IVボーラス、電気的損傷の開始前約15分、続いて0日目に継続的注入	≤10mL	0 日目
2	1	ReoPro™ (キメラ　7E3)	0.25 mg/kg	IVボーラス、0日目、電気的損傷の開始前約15分に1回		
3	5	ARC1779	0.61 mg/kg ボーラス ＋ 0.0037 mg/kg/分 注入	IVボーラス、電気的損傷の開始前約15分、続いて0日目に継続的注入		
4	4	ReoPro™ (キメラ　7E3)	0.25 mg/kg ボーラス +0.125 μg/kg/分 注入	IVボーラス、電気的損傷の開始前約15分、続いて0日目に継続的注入		

ＤＶＥ＝投与体積等価物、ＩＶ＝静脈内。

【０４２２】

外科的調製の前に各動物を麻酔し、体積調節呼吸器を介して送達される効果に対して無感覚なイソフルラン吸入剤での麻酔中で、挿管および維持した。手順の間に、乳酸化リンガー溶液の投与のために、静脈内カテーテルもまた、末梢静脈内に配置した。

【０４２３】

動脈血圧の継続的モニタリングのために、カテーテルを各動物の大腿動脈に配置した。同様に、血液試料収集のために、大腿静脈にカテーテルを配置した。各頸動脈に、フローメーターに接続したドップラーフロープローブを備えた。動脈内電極の挿入および狭窄の近位の地点で、フロープローブを動脈の周りに配置した。平均血流を変化させることなく血流がおよそ５０％～６０％減少するように、各頸動脈の周りに狭窄を配置した。観察期間を通して継続的に、頸動脈における血流をモニタリングおよび記録した。

【０４２４】

各頸動脈の内膜表面への電気的損傷を、静脈内電極の配置を通じて達成した。各電極を、定電流装置の陽極、および離れた皮下部位に接続された陰極に接続した。各血管に、３時間または完全な閉塞後３０分間のいずれか短い方の間にわたって、連続した電流を送達した。

【０４２５】

一旦電極を右頸動脈（「ＲＣＡ」）に配置すると、上記の表３２に示されるように、動物に試験項目を投与した。試験項目投与のおよそ１５分後、１００μＡで電流をかけた。図３１に示される血液試料収集スケジュールに規定される時点で、血液試料およびＣＢＴ測定値を収集した。血流シグナルが０流量で安定に維持された後３０分以内（閉塞性血栓がその部位で形成されたことを示す）または電気的刺激の１８０分後に、電流を終了させた。試験項目を投与したおよそ１９５分後、ＲＣＡについてこれまでに記載したのと同様の様式で、左頸動脈（「ＬＣＡ」）に電流を施した。全ての外科的手順および試料収集の終了後、各動物を安楽死させた。

【０４２６】

処置群３の各動物についての経時的なＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）血漿中濃度（ＨＰＬＣによって測定）を、図３２に示す。各処置群についてドップラーフローを通じて測定された閉塞までの時間を、図３３に示す。図３３から決定され得るように、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）は、この動物血栓症モデルにおいてカニクイザルの頸動脈への段階的な１８０分の電気的損傷の間に血栓形成を阻害した。

【０４２７】

（実施例５Ｃ：カニクイザル電解血栓症モデルにおける種々の用量でのＡＲＣ１７７９の評価）

より低いアプタマー投薬レベルでの非ヒト霊長類電解血栓症モデルにおいて、上述の実施例５Ｂに記載される研究を拡張して、動脈内血栓の阻害におけるＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）の効果を試験した。

【０４２８】

さらなる１０匹のカニクイザル（２．５～３．５ｋｇ）を処置群５～７に分離し、以下の表３３に示される養生法に従って処置した。

【０４２９】

（表３３：研究設計）

【０４３０】

【表３３】

群番号	動物の番号	試験項目	投薬レベル	用量体積	投与養生法	剖検日
1	3	ビヒクル （生理食塩水）	群3への DVE	≤10 mL	IVボーラス、電気的損傷の開始前約15分、続いて0日目の継続的注入	0 日目
2	1	アブシキシマブ (ReoPro)	0.25 mg/kg		IVボーラス、0日目、電気的損傷の開始前約15分に1回	
4	5	アブシキシマブ (ReoPro)	0.25 mg/kg ボーラス および 0.125 μg/kg/分		IVボーラス、電気的損傷の開始前約15分、続いて0日目の継続的注入	
3	5	ARC1779	0.61 mg/kg ボーラス および 0.0037 mg/kg/分 注入 (1000 nM)	≤10 mL	IVボーラス、電気的損傷の開始前約15分、続いて0日目の継続的注入	0 日目
5	2	ARC1779	0.123 mg/kg ボーラス および 0.001 mg/kg/分 注入 (300 nM)	≤10 mL	IVボーラス、電気的損傷の開始前約15分、続いて0日目の継続的注入	0 日目
6	4	ARC1779	0.2 mg/kg ボーラスおよび 0.00165 mg/kg/分 注入 (500 nM)	≤10 mL	IVボーラス、電気的損傷の開始前約15分、続いて0日目の継続的注入	0 日目
7	4	ARC1779	0.298 mg/kg ボーラス および 0.00248 mg/kg/分 注入 (750 nM)	≤10 mL	IVボーラス、電気的損傷の開始前約15分、続いて0日目の継続的注入	0 日目

表３３における各処置群への動物手順を、実施例５Ｂで動物について報告しているように実施した。各処置群についてドップラーフローを通じて測定された閉塞までの時間を、図３３に示す。

【０４３１】

いかなる血小板アンタゴニスト療法もなしに（対照動物）、１００％の頸動脈が６０分以内に閉塞性血栓を発症する。対照的に、Ｒｅｏｐｒｏで処置した動物においては、２０％のみまたは動脈が閉塞性血栓を発症した。１０００ｎＭ、７５０ｎＭ、５００ｎＭおよび３００ｎＭの一定の血漿レベルに到達することを目標とした注入速度でのＡＲＣ１７７９処置群において、０％、２５％、６３％および１００％の頸動脈が、閉塞性血栓を発症した。閉塞性血栓形成に加えて、本発明者らはまた、図３４に示される皮膚出血時間に対するＡＲＣ１７７９の効果を評価した。図３４に見られるように、この動物モデルにおけるいくつかの用量および／または時点で長期のＣＢＴが観察されたが、他の用量および時点ではＣＢＴは延長されなかった。

【０４３２】

本発明を明細書および実施例によって記載してきたが、当業者は、本発明が種々の実施形態で実行され得ること、ならびに上述の記載および実施例が例解の目的のためのみであって、これに続く特許請求の範囲の限定を目的としないことを理解しよう。

【図面の簡単な説明】

【０４３３】

【図１】図１は、ランダム配列オリゴヌクレオチドのプールからのインビトロアプタマーセレクション（ＳＥＬＥＸ^{TM}）プロセスの略図である。

【図２】図２は、標準的モノＰＥＧ化、多重ＰＥＧ化、およびＰＥＧ化を介したオリゴマー化を表す、種々のＰＥＧ化戦略を表す図解である。

【図３】図３は、本発明の実験で用いたフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１タンパク質のアミノ酸配列を記載した表である。

【図４】図４は、本発明の実験で用いた全長ヒトフォン・ビルブラント因子タンパク質のアミノ酸配列を記載した表である。
【図５】図５は、ＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）の、提案される二次構造を表す図解である。
【図６】図６は、全長ｖＷＦおよびウサギｖＷＦドメインＡ１に対する、ＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）のドットブロット結合曲線のグラフである。この表中の黒い四角は、欠失を示す。
【図７】図７は、ＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）が凍結乾燥ヒト血小板へのヒトｖＷＦおよびウサギｖＷＦ　Ａ１ドメインの結合を阻害することを示す、ＦＡＣＳデータのグラフである。
【図８】図８は、ボトロセチン誘導血小板凝集を阻害するＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）を経時的に示す、血小板凝集計トレースのグラフである。
【図９】図９は、ボトロセチン誘導血小板凝集を阻害するＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）のグラフ表示である。
【図１０】図１０は、配列番号２１７の提案される二次構造を表す図解であり、図中Ｃ＝ｆＣ、Ｔ＝ｆＵ、Ｎ＝任意のヌクレオチドであるが、対になった領域ではワトソン／クリック塩基対の形をとり、Ｘ＝１～４ヌクレオチドであるか、またはＮｘ－Ｎｘ－Ｎｘ－ＮｘはＰＥＧスペーサーで置換され得る。
【図１１】図１１は、ｖＷＦ　ｒＲｄＹ　ＳＥＬＥＸ™ファミリー＃１の３つのアプタマーについての配列アラインメントを表す図解である。
【図１２】図１２は、配列番号２１８の提案される二次構造を表す図解である。
【図１３】図１３は、配列番号２１９の提案される二次構造を表す図解である。
【図１４】図１４は、ｖＷＦ　ＤＮＡ　ＳＥＬＥＸ™２ファミリー＃１の２６個のアプタマーについての配列アラインメントを説明する図解である。アラインメントの上部の黒い線は、提案される、フォン・ビルブラント因子標的を結合するのに必要なコア核酸結合配列を表す。
【図１５】図１５は、配列番号２２０の提案される二次構造を表す図解である。図１５Ｂは、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）の二次構造を表す図解であり、その残基は２’－ＯＭｅ置換に耐性がある。
【図１６】図１６は、ＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）およびＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４３（配列番号２７２）の、任意の改変を含む核酸配列を表す表である。
【図１７】図１７は、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４８（配列番号２８３）およびＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）の、任意の改変を含む核酸配列を表す表である。この表中の黒い区画は、欠失を示す。ヌクレオチド表示（例えばＴまたはｄＡ）の前の「ｓ」は、示されるヌクレオチドの５’側のリン酸バックボーンにおけるホスホロチオエート置換を示す。
【図１８】図１８は、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）およびＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）の、任意の改変を含む核酸配列を表す表である。この表中の黒い区画は、欠失を示す。
【図１９】図１９は、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）およびＡＲＣ１５３４（配列番号３１５）の二次構造の図解である。
【図２０】図２０は、ＰＦＡ－１００アッセイにおける、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）またはＡＲＣ１５２５（配列番号３０６）で処理したヒト全血の凝固時間を、アプタマー濃度の関数として表すグラフである。
【図２１】図２１は、ＰＦＡ－１００アッセイにおける、Ｉｎｔｅｇｒｉｌｉｎ™、ＲｅｏＰｒｏ™またはＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）で処理したヒト全血の閉塞時間を、薬物濃度の関数として表すグラフである。

【図２２】図２２は、ＢＩＰＡにおける、Ｉｎｔｅｇｒｉｌｉｎ™、ＲｅｏＰｒｏ™またはＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）で処理したヒトＰＲＰのパーセント阻害を、薬物濃度の関数として表すグラフである。
【図２３】図２３は、ＡＩＰＡにおける、Ｉｎｔｅｇｒｉｌｉｎ™、ＲｅｏＰｒｏ™またはＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）で処理したヒトＰＲＰのパーセント阻害を、薬物濃度の関数として表すグラフである。
【図２４】図２４は、ヒト血漿中で検出された全長ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）またはＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）のパーセンテージを、時間の関数として表すグラフである。
【図２５】図２５は、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）またはＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）の投与後の時間の関数としてプロットした、霊長類血漿中アプタマー濃度（Ｏｌｉｇｒｅｅｎ分析を用いて測定した）を表すグラフである。
【図２６】図２６は、水平軸上に、試験のための血液を３匹のカニクイザルから採取した時点、垂直軸の上三分の一に沿ってＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）血漿中濃度（ｎＭで）、垂直軸の真ん中の三分の一に沿ってＰＦＡ－１００閉鎖時間（秒で）、および垂直軸の下部三分の一に沿ってテンプレートまたは皮膚出血時間（分で）を示すグラフである。血漿中アプタマー濃度、ＰＦＡ－１００閉鎖時間および皮膚出血時間の、３匹全ての動物からの平均を、それぞれグラフの上三分の一、真ん中の三分の一および下三分の一にプロットする。
【図２７】図２７は、皮膚出血時間（ＣＢＴ）を分で示し、縦列１に示される種々の時点の未処理のＢＩＰＡデータおよびＰＦＡ－１００閉鎖時間（秒）を、３匹の異なるカニクイザルにおけるＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）投薬に関して示す表である。
【図２８】図２８は、カニクイザルのＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）投薬後の種々の時点での平均ＰＦＡ－１００閉鎖時間を示すグラフである。
【図２９】図２９は、投薬後の種々の時点で得られた、３匹のＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）処理カニクイザルの平均出血時間を示すグラフである。
【図３０】図３０は、ＰＦＡ－１００閉鎖時間に対するＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）処理カニクイザルにおける平均出血時間（左の垂直軸）の相関関係を示すグラフである。
【図３１】図３１は、カニクイザル電解血栓症モデルにおけるＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）の評価に用いた血液試料収集スケジュールを表す概略図である。
【図３２】図３２は、電解血栓症モデルにおいて試験した処置群３の各カニクイザルにおける、時間の関数としてのＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）血漿中濃度（垂直軸）のグラフである。
【図３３】図３３は、カニクイザル電解血栓症モデルにおいて試験した各処置群の各カニクイザルにおける、右（斜線の入った棒）または左頸動脈（無地の棒で示す）の閉塞までの時間のグラフである。棒の対１、８および９は、処置群１（ビヒクルのみ）を示す。棒の対２、１０、１１、１２および１３は、処置群２および４（ＲｅｏＰｒｏ）を示す。棒の対３～７は、処置群３（１０００ｎＭアプタマー血漿中濃度標的群）を示す。棒の対２０、２２、１６および１８は、処置群７（７５０ｎＭ血漿中アプタマー濃度標的群）を示す。棒の対１９、２１、２３および２４は、処置群６（５００ｎＭ血漿中アプタマー濃度標的群）を示す。棒の対１５および１７は、処置群５（３００ｎＭ血漿中アプタマー濃度標的群）を示す。
【図３４】図３４は、水平軸上に示される時点で得られた電気的損傷モデルにおける種々のカニクイザル処置群の皮膚出血時間を分で（垂直軸）示すグラフである。

【図１】

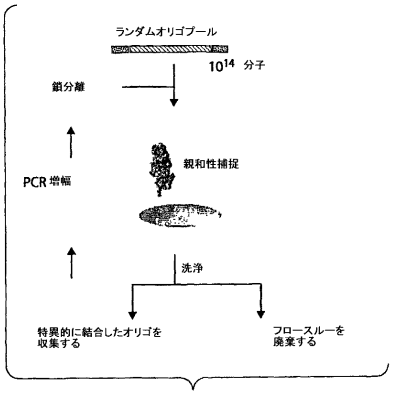


Fig. 1

【図２】

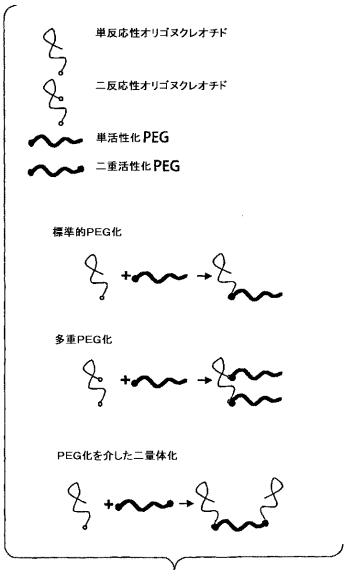


Fig. 2

【図３】

ヒトvWFドメインA1のアミノ酸配列

MGHHHHHHEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVVDMMEQLRISQK
WVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKYTLFQIFSK
IDRPEASRIALLLMASQEPQRMSRNFVRYVQGLKKKKVIVIPVGIGPHANLKQIRLIEKQ
APENKAFVLSSVDELEQQRDEIVSYLCDLAPEAPPPT (配列番号 4)

ヒトvWFドメインA1のアミノ酸配列

MRGSHHHHHHGSQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLD
GSSRLSEAEFEVLKAFVVDMMERLRISQKWVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSELR
RIASQVKYAGSQVASTSEVLKYTLFQIFSKIDRPEASRIALLLMASQEPQRMSRNFVRY
VQGLKKKKVIVIPVGIGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSSVDELEQQRDEIVSYLCDLA
PEAPPPTLPP (配列番号 5)

ウサギvWFドメインA1のアミノ酸配列

MGHHHHHHEPPLHDFYWSNLMDLVFLLDGSAQLSEAEFGVLKAFVVSVMERLHISQK
RIRVAVVEYHDGSHSYISLKDRKRPSELRRIASQVKYAGGPVASTSEVLKYTLFHIFSNV
DRPEASRIALLLSASQETPRMVRNLVRYAQGLKKEKVIVIPVGIGPHVSLRQIHLIEKQA
PENKAFVLSGVDELEQRRDEIISYLCDLGPEAPVPT (配列番号 6)

Fig. 3

【図４】

全長ヒトvWFのアミノ酸配列

MIPARFAGVLLALALILPGTLCAEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSMYSFAGYCSYLLAGG
CQKRSFSIIGDFQNGKRVSLSVYLGEFFDIHLFVNGTVTQGDQRVSMPYASKGLYLETEAGYYK
LSGEAYGFVARIDGSGNFQVLLSDRYFNKTCGLCGNFNIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSW
ALSSGEQWCERASPPSSSCNISSGEMQKGLWEQCQLLKSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKT
LCECAGGLECACPALLEYARTCAQEGMVLYGWTDHSACSPVCPAGMEYRQCVSPCARTCQS
LHINEMCQERCVDGCSCPEGQLLDEGLCVESRECPCVHSGKRYPPGTSLSRDCNTCICRNSQ
WICSNEECPGECLVTGQSHFKSFDNRYFTFSGICQYLLARDCQDHSFSIVIETVQCADDRDAVC
TRSVTVRLPGLHNSLVKLKHGAGVAMDGQDIQLPLLKGDLRIQHTVTASVRLSYGEDLQMDWD
GRGRLLVKLSPVYAGKTCGLCGNYNGNQGDDFLTPSGLAEPRVEDFGNAWKLHGDCQDLQK
QHSDPCALNPRMTRFSEEACAVLTSPTFEACHRAVSPLPYLRNCRYDVCSCSDGRECLCGAL
ASYAAACAGRGVRVAWREPGRCELNCPKGQVYLQCGTPCNLTCRSLSYPDEECNEACLEGC
FCPPGLYMDERGDCVPKAQCPCYYDGEIFQPEDIFSDHHTMCYCEDGFMHCTMSGVPGSLLP
DAVLSSPLSHRSKRSLSCRPPMVKLVCPADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMSMGCVSGCLCP
PGMVRHENRCVALERCPCFHQGKEYAPGETVKIGCNTCVCRDRKWNCTDHVCDATCSTIGM
AHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHPSVKCKKRVTILVEGGEIEL
FDGEVNVKRPMKDETHFEVVESGRYIILLLGKALSVVWDRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFD
GIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRIL
TSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHGKVVTWRTATLC
PQSCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELL
QTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCEACQEPGGLVVPPTD
APVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVVDMMERLRISQKW
VRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKYTLFQIFSKIDRPEAS
RIALLLMASQEPQRMSRNFVRYVQGLKKKKVIVIPVGIGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSSV
DELEQQRDEIVSYLCDLAPEAPPPTLPPHMAQVTVGPGLLGVSTLGPKRNSMVLDVAFVLEGS
DKIGEADFNRSKEFMEEVIQRMDVGQDSIHVTVLQYSYMVTVEYPFSEAQSKGDILQRVREIRY
QGGNRTNTGLALRYLSDHSFLVSQGDREQAPNLVYMVTGNPASDEIKRLPGDIQVVPIGVGPN
ANVQELERIGWPNAPILIQDFETLPREAPDLVLQRCCSGEGLQIPTLSPAPDCSQPLDVILLLDG
SSSFPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSITTIDVPWNVVPEKAHLLSLVDVMQR
EGGPSQIGDALGFAVRYLTSEMHGARPGASKAVVILVTDVSVDSVDAAADAARSNRVTVFPIGI
GDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRIEDLPTMVTLGNSFLHKLCSGFVRICMDEDGNEKRPG
DVWTLPDQCHTVTCQPDGQTLLKSHRVNCDRGLRPSCPNSQSPVKVEETCGCRWTCPCVCT
GSSTRHIVTFDGQNFKLTGSCSYVLFQNKEQDLEVILHNGACSPGARQGCMKSIEVKHSALSV
ELHSDMEVTVNGRLVSVPYVGGNMEVNVYGAIMHEVRFNHLGHIFTFTPQNNEFQLQLSPKTF
ASKTYGLCGICDENGANDFMLRDGTVTTDWKTLVQEWTVQRPGQTCQPILEEQCLVPDSSHC
QVLLLPLFAECHKVLAPATFYAICQQDSCHQEQVCEVIASTAHLCRTNGVCVDWRTPDFCAMS
CPPSLVYNHCEHGCPRHCDGNVSSCGDHPSEGCFCPPDKVMLEGSCVPEEACTQCIGEDGV
QHQFLEAWVPDHQPCQICTCLSGRKVNCTTQPCPTAKAPTCGLCEVARLRQNADQCCPEYEC
VCDPVSCDLPPVPHCERGLQPTLTNPGECRPNFTCACRKEECKRVSPPSCPPHRLPTLRKTQ
CCDEYECACNCVNSTVSCPLGYLASTATNDCGCTTTTCLPDKVCVHRSTIYPVGQFWEEGCD
VCTCTDMEDAVMGLRVAQCSQKPCEDSCRSGFTYVLHEGECCGRCLPSACEVVTGSPRGDS
QSSWKSVGSQWASPENPCLINECVRVKEEVFIQQRNVSCPQLEVPVCPSGFQLSCKTSACCP
SCRCERMEACMLNGTVIGPGKTVMIDVCTTCRCMVQVGVISGFKLECRKTTCNPCPLGYKEEN
NTGECCGRCLPTACTIQLRGGQIMTLKRDETLQDGCDTHFCKVNERGEYFWEKRVTGCPPFD
EHKCLAEGGKIMKIPGTCCDTCEEPECNDITARLQYVKVGSCKSEVEVDIHYCQGKCASKAMY
SIDINDVQDQCSCCSPTRTEPMQVALHCTNGSVVYHEVLNAMECKCSPRKCSK
(配列番号 7)

Fig. 4

【図５】

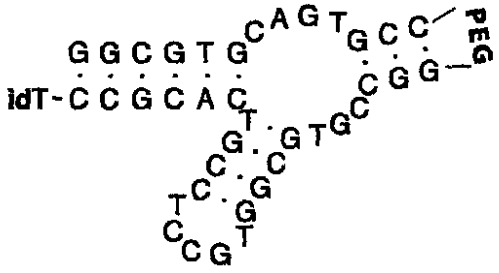


Fig. 5

【図６】

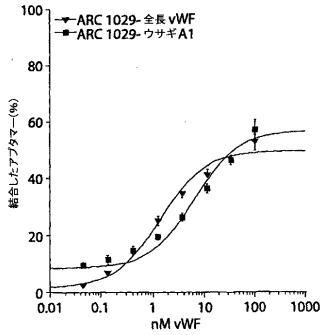


Fig. 6

【図７】

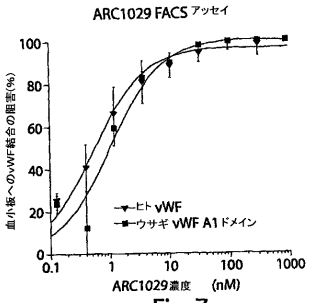


Fig. 7

【図８】

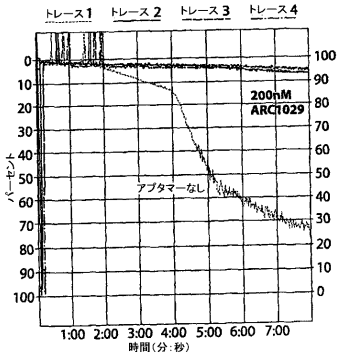


Fig. 8

【図９】

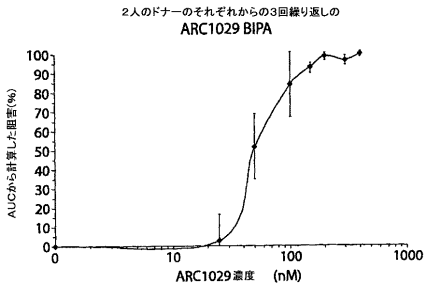
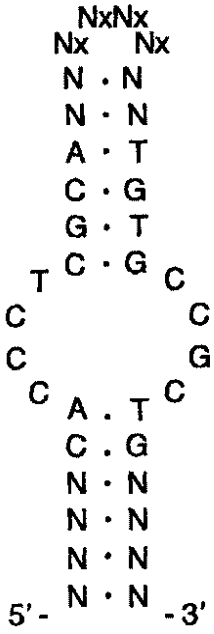


Fig. 9

【図１０】



配列番号 217

Fig. 10

【図１１】

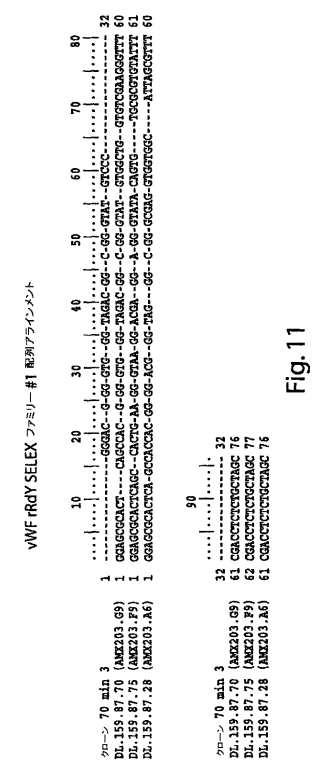


Fig. 11

【図１２】

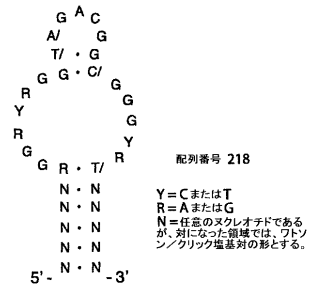


Fig. 12

【図１３】

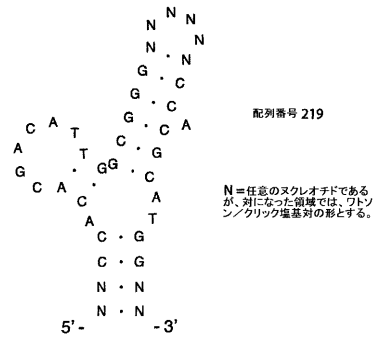


Fig. 13

【図１４】

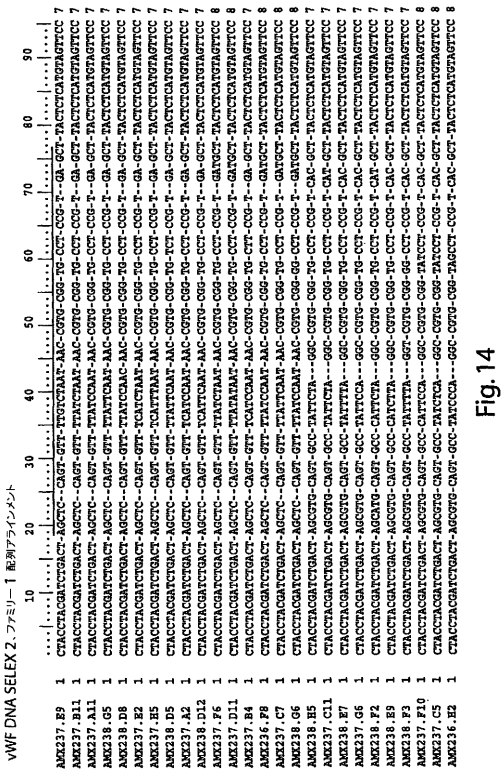


Fig. 14

【図１５】

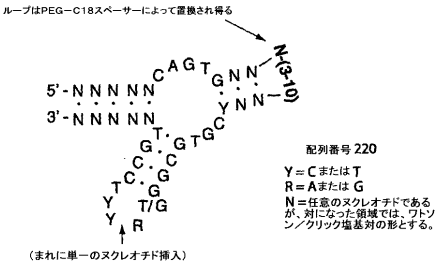


Fig. 15A

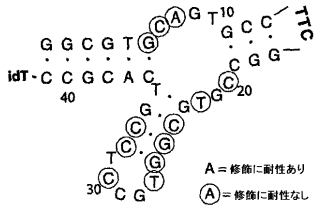


Fig. 15B

【図１６】

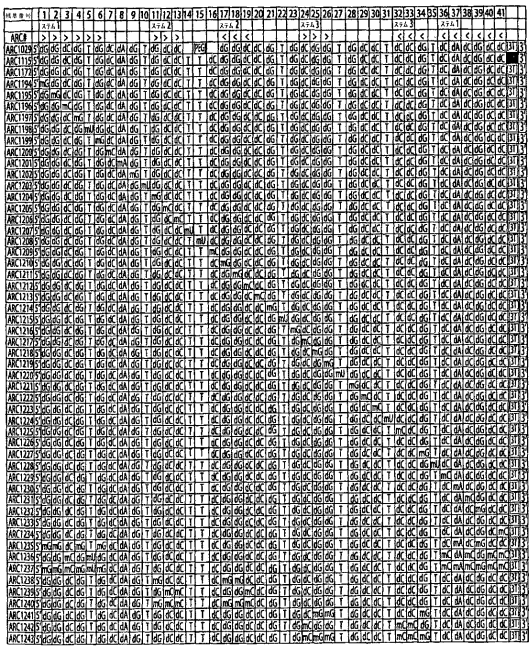


Fig. 16

【図１７】

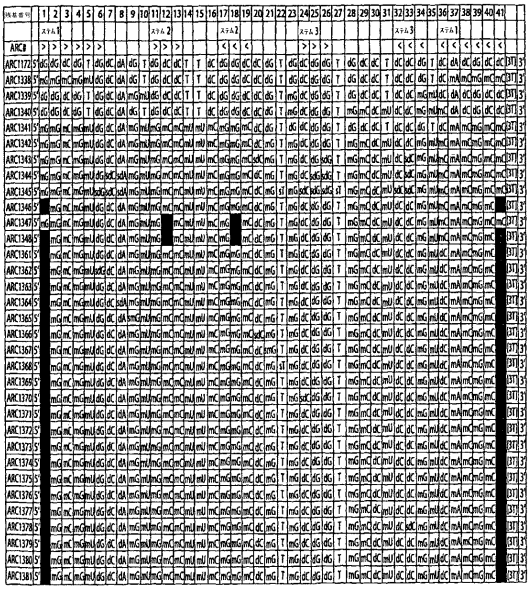


Fig. 17

【図１８】

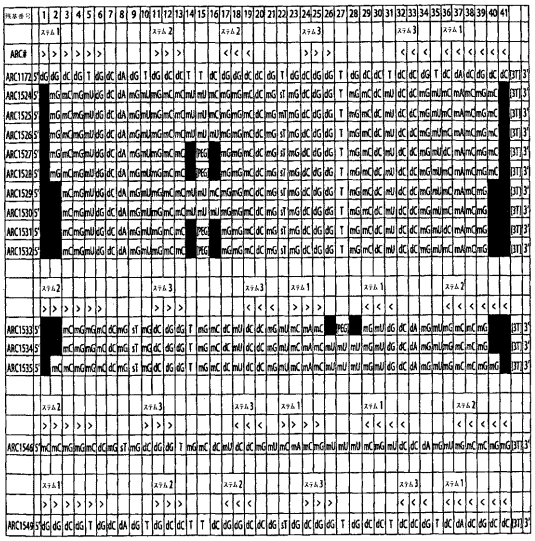


Fig. 18

【図１９】

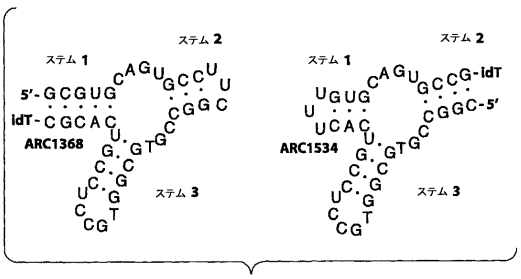


Fig. 19

【図２０】

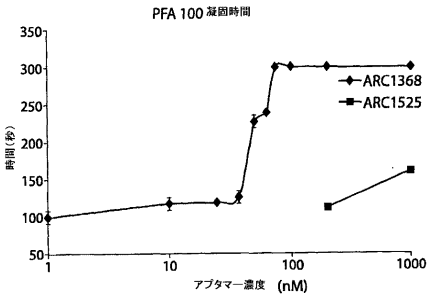


Fig. 20

【図２１】

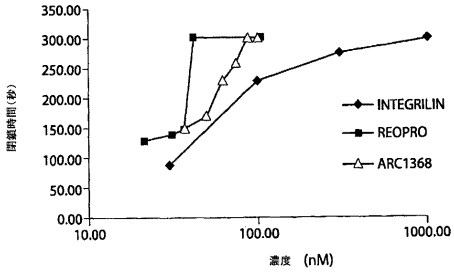


Fig. 21

【図２２】

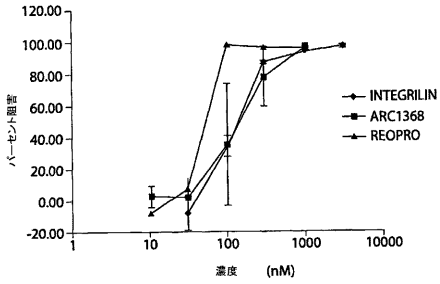


Fig. 22

【図２３】

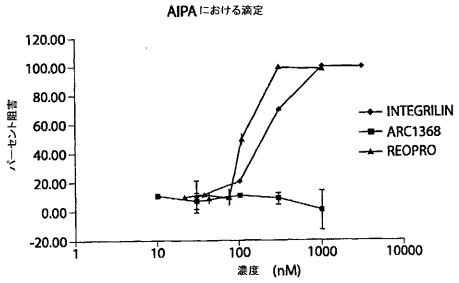


Fig. 23

【図２４】

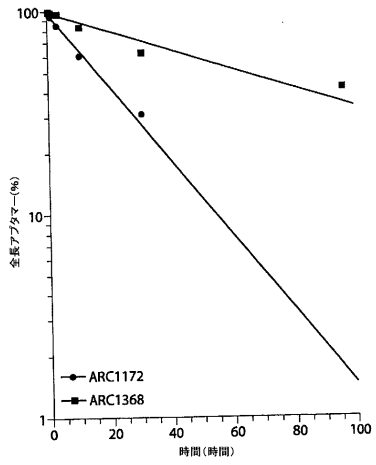


Fig. 24

【図２５】

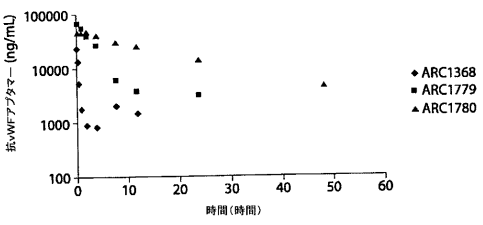


Fig. 25

【図２６】

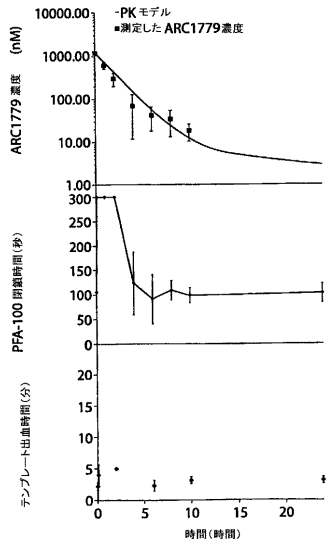


Fig. 26

【図２７】

	動物 1001			動物 1101			動物 1102		
	CBT	BIPA	PFA-100	CBT	BIPA	PFA-100	CBT	BIPA	PFA-100
前	1	30	79	3	36	124	2	34	120
5分	3.2	>>	>>	6.8	>>	>>	4.8	>>	>>
6時間	1		119	1.3		107	2.3		163
10時間	2.4		99	3		107	3.5		155
24時間	2.3	47	92	2.3	51	106	1.8	NA	NA

>> = 100% 阻害

Fig. 27

【図２８】

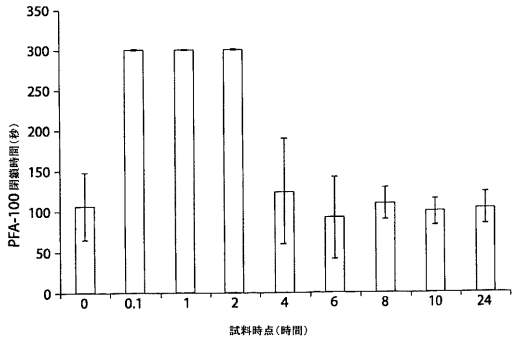


Fig. 28

【図２９】

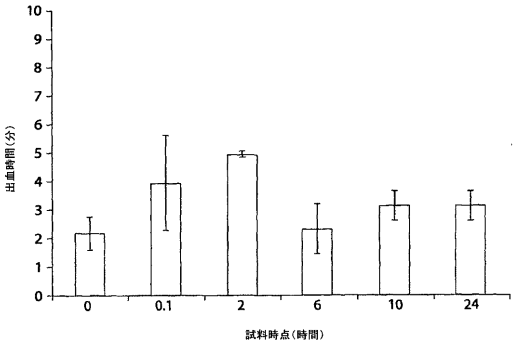


Fig. 29

【図３０】

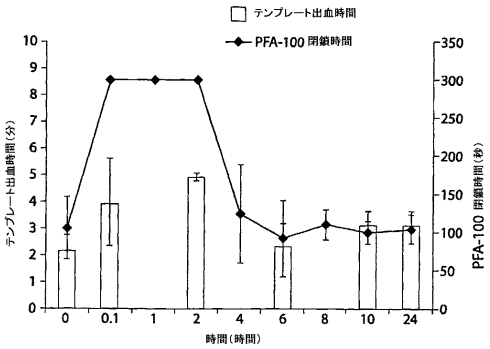


Fig. 30

【図３１】

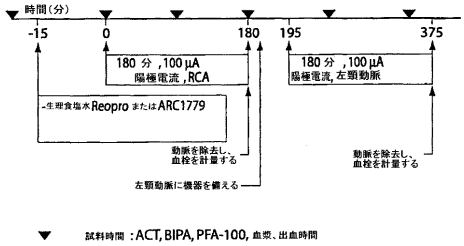


Fig. 31

【図３２】

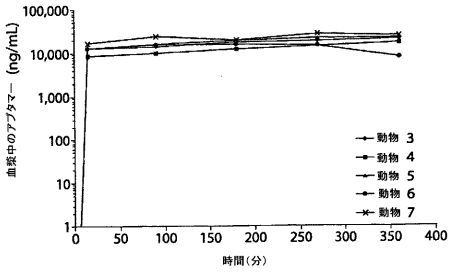


Fig. 32

【図３３】

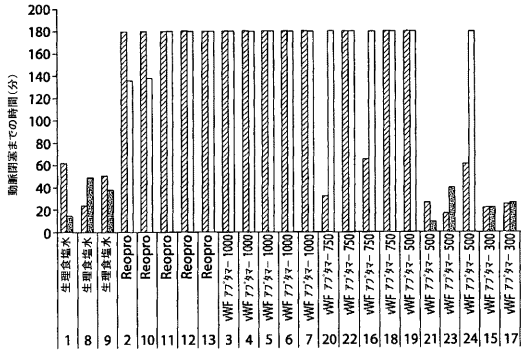


Fig. 33

【図３４】

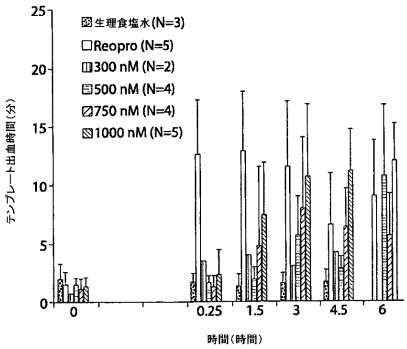


Fig. 34

【配列表】
2008512098000001.xml
【手続補正書】
【提出日】平成19年5月29日(2007.5.29)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）、配列番号１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）からなる群より選択される配列に対して９５％同一である核酸配列を含む、アプタマー。
【請求項２】
前記アプタマーは、ＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）、配列番号１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）からなる群より選択される一次核酸配列に対して９５％同一である一次核酸配列を含む、請求項１に記載のアプタマー。
【請求項３】
前記アプタマー核酸配列が、化学的改変を含み、かつ該アプタマー核酸配列は、ＡＲＣ１０２９（配列番号２１４）、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）、ＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）、配列番号１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）からなる群より選択される該化学的改変を含む核酸配列に対して９５％同一である、請求項１に記載のアプタマー。
【請求項４】
前記アプタマーが、高分子量の非免疫原性化合物または親油性化合物に結合体化されている、請求項１に記載のアプタマー。
【請求項５】
前記アプタマーが、ポリアルキレングリコールである非免疫原性高分子量化合物に結合体化されている、請求項４に記載のアプタマー。
【請求項６】
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である、請求項５に記載のアプタマー。
【請求項７】
前記ポリエチレングリコールが、５ｋＤａ、１０ｋＤＡ、２０ｋＤａおよび４０ｋＤａからなる群より選択される分子量を含む、請求項６に記載のアプタマー。
【請求項８】
前記アプタマーが、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）、ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）からなる群より選択される、請求項７に記載のアプタマー。
【請求項９】
治療有効量の請求項１に記載のアプタマーまたはその塩と、薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤とを含有する、組成物。

【請求項１０】
フォン・ビルブラント因子（ｖＷＦ）によって媒介される疾患を処置、予防または改善するための請求項９に記載の組成物であって、
該組成物は、哺乳動物に投与するために適している、組成物。
【請求項１１】
患者を処置するための請求項９に記載の組成物であって、
該組成物は、透析、ＣＡＢＧ手術、経皮的冠動脈介入または心臓弁置換の前、間および／または後に、該組成物を必要とする患者に投与するために適している、組成物。
【請求項１２】
前記組成物が、２０ｋＤＡ　ＰＥＧに結合体化されたＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）またはそのフラグメントを含有する、請求項１０に記載の組成物。
【請求項１３】
前記組成物が、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）を含有する、請求項１２に記載の組成物。
【請求項１４】
前記組成物が、２０ｋＤＡ　ＰＥＧに結合体化されたＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）またはそのフラグメントを含有する、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１５】
前記組成物が、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）を含有する、請求項１４に記載の組成物。
【請求項１６】
治療有効量の請求項８に記載のアプタマーまたはその塩と、薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤とを含有する、組成物。
【請求項１７】
フォン・ビルブラント因子（ｖＷＦ）によって媒介される疾患を処置、予防または改善するための請求項１６に記載の組成物であって、
該組成物は、哺乳動物に投与するために適している、組成物。
【請求項１８】
フォン・ビルブラント因子標的に特異的に結合する、アプタマー。
【請求項１９】
前記フォン・ビルブラント因子標的が、ヒトフォン・ビルブラント因子である、請求項１８に記載のアプタマー。
【請求項２０】
前記アプタマーが、フォン・ビルブラント因子媒介性血小板凝集を調節する、請求項１８に記載のアプタマー。
【請求項２１】
フォン・ビルブラント因子全長標的とフォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的とに特異的に結合する、請求項１８に記載のアプタマー。
【請求項２２】
前記フォン・ビルブラント因子全長標的と前記フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１標的とが、異なる種に由来する、請求項２１に記載のアプタマー。
【請求項２３】
診断を補助するための方法であって、
請求項１～８に記載のアプタマーを、フォン・ビルブラント因子またはその改変体を含有すると疑われる組成物と接触させる工程；および
フォン・ビルブラント因子またはその改変体の有無を検出する工程；
を包含する、方法。
【請求項２４】
アプタマー標的の生物学的機能を調節するアプタマーを同定するための方法であって、
ａ）一本鎖核酸の候補混合物を調製する工程；

ｂ）該候補混合物を、全長タンパク質標的および該全長タンパク質標的のドメインの両方と接触させる工程；
ｃ）該全長タンパク質標的または該タンパク質標的ドメインに対する増大した親和性を有する核酸を分離する工程；ならびに
ｄ）該増大した親和性の核酸をインビトロで増幅して、タンパク質標的特異的な富化アプタマー混合物を生じる工程；
を含む、方法。
【請求項２５】
請求項２４に記載の方法であって、該方法は、
ｅ）前記標的特異的な富化アプタマー混合物を前記全長タンパク質標的と接触させる工程；
ｆ）該全長タンパク質標的に対する増大した親和性を有する核酸を分離する工程；および
ｇ）該増大した親和性の核酸をインビトロで増幅して、標的特異的な富化アプタマー混合物を生じる工程；
ｈ）該標的特異的な富化アプタマー混合物を、前記タンパク質標的ドメインと接触させる工程、
ｆ）該タンパク質標的ドメインに対する増大した親和性を有する核酸を分離する工程；および
ｇ）該増大した親和性の核酸をインビトロで増幅して、タンパク質標的特異的な富化アプタマー混合物を生じる工程；
をさらに包含する、方法。
【請求項２６】
請求項２５に記載の方法であって、該方法は、
前記全長タンパク質標的の生物学的機能をインビボでブロックするアプタマーを選択する工程；
をさらに包含する、方法。
【請求項２７】
前記全長タンパク質標的が、第一の種由来であり、前記タンパク質標的ドメインが、第二の種由来である、請求項２５に記載の方法。
【請求項２８】
前記第一の種および第二の種の両方のタンパク質標的に結合可能であるアプタマーを選択する工程；
をさらに包含する、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
請求項２６に記載の方法によって同定される、アプタマー。
【請求項３０】
フォン・ビルブラント因子に特異的に結合するアプタマーであって、該アプタマーは、配列番号３１～５０、配列番号５４～９４、配列番号９８～１６４、配列番号１７７、配列番号１８０、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９２、配列番号１９８、配列番号２０１、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１２～２１４、ＡＲＣ１１１５（配列番号２２１）、ＡＲＣ１１７２（配列番号２２２）、ＡＲＣ１１９４（配列番号２２３）～ＡＲＣ１２４０（配列番号２６９）、ＡＲＣ１３３８（配列番号２７３）～ＡＲＣ１３４６（配列番号２８１）、ＡＲＣ１３６１（配列番号２８４）～ＡＲＣ１３８１（配列番号３０４）、ＡＲＣ１５２４（配列番号３０５）、ＡＲＣ１５２６（配列番号３０７）～ＡＲＣ１５３５（配列番号３１６）、ＡＲＣ１５４６（配列番号３１７）、ＡＲＣ１７５９（配列番号３１８）、ＡＲＣ１６３５（配列番号３１９）、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）～ＡＲＣ１７８０（配列番号３２１）およびＡＲＣ１８８４（配列番号３２２）～ＡＲＣ１８８５（配列番号３２３）からなる群より選択される一次核酸配列のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％同一である一次核酸配列

を含む、アプタマー。
【請求項３１】
治療有効量の請求項３０に記載のアプタマーまたはその塩と、薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤とを含有する、組成物。
【請求項３２】
フォン・ビルブラント因子（ｖＷＦ）によって媒介される疾患を処置、予防または改善するための請求項３１に記載の組成物であって、
該組成物は、哺乳動物に投与するために適している、組成物。
【請求項３３】
患者を処置するための請求項３１に記載の組成物であって、
該組成物は、透析、ＣＡＢＧ手術、経皮的冠動脈介入または心臓弁置換の前、間および／または後に、該組成物を必要とする患者に投与するために適している、組成物。
【請求項３４】
診断を補助するための方法であって、
請求項３０に記載のアプタマーを、フォン・ビルブラント因子またはその改変体を含有すると疑われる組成物と接触させる工程；および
フォン・ビルブラント因子またはその改変体の有無を検出する工程；
を包含する、方法。
【請求項３５】
インビトロ診断剤としての使用のための、請求項３０に記載のアプタマー。
【請求項３６】
インビボ診断剤としての使用のための、請求項３０に記載のアプタマー。
【請求項３７】
前記アプタマー標的が、フォン・ビルブラント因子である、請求項２４に記載の方法。
【請求項３８】
前記全長タンパク質標的のドメインが、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１である、請求項２４に記載の方法。
【請求項３９】
前記全長タンパク質標的が、フォン・ビルブラント因子である、請求項２５に記載の方法。
【請求項４０】
前記タンパク質標的ドメインが、フォン・ビルブラント因子ドメインＡ１である、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記第一の種および第二の種の両方のタンパク質標的が、フォン・ビルブラント因子である、請求項２８に記載の方法。
【請求項４２】
請求項４１に記載の方法に従って同定される、アプタマー。
【請求項４３】
フォン・ビルブラント因子（ｖＷＦ）によって媒介される疾患を処置、予防または改善するための医薬の製造における、請求項９に記載の組成物の使用であって、
該医薬は、哺乳動物に投与するために適している、使用。
【請求項４４】
患者を処置するための医薬の製造における、請求項９に記載の組成物の使用であって、
該医薬は、透析、ＣＡＢＧ手術、経皮的冠動脈介入または心臓弁置換の前、間および／または後に、該医薬を必要とする患者に投与するために適している、使用。
【請求項４５】
前記組成物が、２０ｋＤＡ　ＰＥＧに結合体化されたＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）またはそのフラグメントを含有する、請求項４３に記載の使用。
【請求項４６】

前記組成物が、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）を含有する、請求項４５に記載の使用。
【請求項４７】
前記組成物が、２０ｋＤＡ　ＰＥＧに結合体化されたＡＲＣ１３６８（配列番号２９１）またはそのフラグメントを含有する、請求項４４に記載の使用。
【請求項４８】
前記組成物が、ＡＲＣ１７７９（配列番号３２０）を含有する、請求項４７に記載の使用。
【請求項４９】
フォン・ビルブラント因子（ｖＷＦ）によって媒介される疾患を処置、予防または改善するための医薬の製造における、請求項１６に記載の組成物の使用であって、
該医薬は、哺乳動物に投与するために適している、使用。
【請求項５０】
診断剤の製造における請求項１～８に記載のアプタマーの使用であって、
該診断剤は、フォン・ビルブラント因子またはその改変体を含有すると疑われる組成物と接触させるために適している、使用。
【請求項５１】
フォン・ビルブラント因子（ｖＷＦ）によって媒介される疾患を処置、予防または改善するための医薬の製造における、請求項３１に記載の組成物の使用であって、
該医薬は、哺乳動物に投与するために適している、使用。
【請求項５２】
患者を処置するための医薬の製造における請求項３１に記載の組成物の使用であって、
該医薬は、透析、ＣＡＢＧ手術、経皮的冠動脈介入または心臓弁置換の前、間および／または後に、該医薬を必要とする患者に投与するために適している、使用。
【請求項５３】
診断剤の製造における請求項３０に記載のアプタマーの使用であって、
該診断剤は、フォン・ビルブラント因子またはその改変体を含有すると疑われる組成物と接触させるために適している、使用。
【請求項５４】
請求項１～８に記載のアプタマーを含む診断剤であって、フォン・ビルブラント因子またはその改変体を含有すると疑われる組成物と接触させるために適している、診断剤。
【請求項５５】
請求項３０に記載のアプタマーを含む診断剤であって、フォン・ビルブラント因子またはその改変体を含有すると疑われる組成物と接触させるために適している、診断剤。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
2008512098000001.app

【国際調査報告】

60700470016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/32134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: C12Q 1/68(2006.01);C12P 19/34(2006.01);A61K 38/00(2006.01);C07H 21/02(2006.01),21/04(2006.01);C12N 15/88(2006.01)

USPC: 435/6,91.1,455,458;514/44;536/23.1,24.5
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. : 435/6, 91.1, 455,458; 514/44; 536/23.1, 24.5

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, Seq Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HWANG et al. Inhibition of gene expression in human cells through small molecule-RNA interactions, Proc. Nat'l. Acad. Sci. 9 November 1999, Vol. 96, No. 23, pages 12997-13002, see entire document.	1-7, 9-11, 18-26 and 37-42

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 March 2007 (19.03.2007)

Date of mailing of the international search report
10 APR 2007

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer
Jane Zara Felicia D. Roberts for
Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

13. 7. 2007

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/32134

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-7,9-11,18-26 and 37-42

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(2)) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/32134

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

The inventions listed as Groups 1-213 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: because.

This international searching authority has found 213 inventions claimed in the International Application covered by the claim(s) indicated below:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid. Each sequence listed in the claims is a distinct invention for the reasons cited below.

Claims 1-42 are generic, and include 213 different sequences among SEQ ID NOs.31 though 323. Each sequence comprises a separate invention. SEQ ID NO: 214, listed in claims 1-3 and in generic claims 4-7, 9-11, 18-26, and 37-42 comprise the first invention.

Nucleotide sequences among the SEQ ID NOs. 31-323, listed in claims 1, 44 comprise the second through the 213th invention.

This international searching authority considers that the international application does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2, and 13.3) for the reasons indicated below:

According to the guidelines in Section (f)(i)(a) of Annex B of the PCT Administrative Instructions, the special technical feature as defined by PCT Rule 13.2 shall be considered to be met when all the alternatives of a Markush-group are of similar nature. For chemical alternatives, such as the claimed nucleotide and polypeptide sequences, the Markush group shall be regarded as being of similar nature when
(A) all alternatives have a common property or activity and
(B)(1) a common structure is present, i.e, a significant structure is shared by all of the alternatives or
(B)(2) in cases where the common structure cannot be the unifying criteria, all alternatives belong to an art recognized class of compounds in the art to which the invention pertains.

The instant sequences are considered to be each separate inventions for the following reasons:
The various nucleotide or polypeptide sequences do not meet the criteria of (A), common property or activity or (B)(2), art recognized class of compounds. Each sequence behaves in a different way in the context of the claimed invention. Each member of the class cannot be substituted, one for the other, with the expectation that the same intended result would be achieved.
Further, the sequences do not meet the criteria of (B)(1), as they do not share, one with another, a common core structure. Accordingly, unity of invention between the different sequences is lacking and each sequence claimed is considered to constitute a special technical feature.

41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/32134

For PCTs: If the sequences are recited in the first claimed invention, Applicants will obtain a search of the first sequence listed in the claim. For every other sequence applicants wish to have searched, applicants need to elect the sequence and pay an additional fee.

If the sequences are recited in the second or subsequent claimed invention, Applicants will need to elect the group and pay the fee to obtain a search of the first sequence listed in the claims encompassed by the second or subsequent group. For every other sequence in the second/subsequent group that applicants wish to have searched, applicants need to elect the sequence and pay an additional fee.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　7/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/08	
Ａ６１Ｐ　41/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	41/00	
Ｇ０１Ｎ　33/53	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ

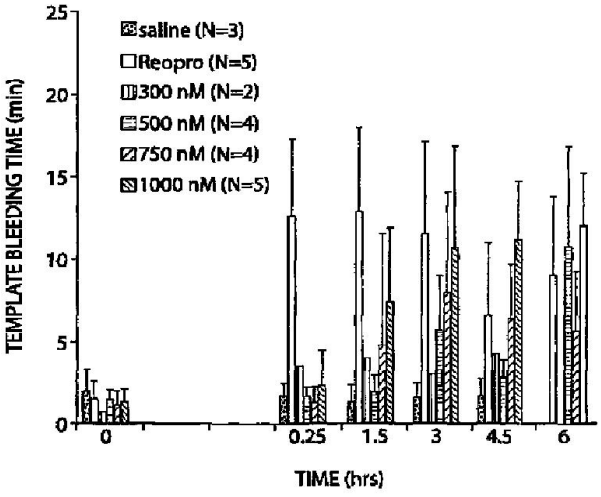
(31)優先権主張番号　60/690,231
(32)優先日　平成17年6月13日(2005.6.13)
(33)優先権主張国　米国(US)

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者　ラガッセ，　ダニエル　エイチ．　エー．
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４３，　サマービル，　ハイランド　アベニュー　１１２，　アパートメント　エフ

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 CA11 HA17
4B063 QA18 QQ52 QQ79 QR35 QR48 QR62 QS25
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 CA18 CA53 DC10 DC15 NA14
ZA54 ZC02 ZC42

专利名称(译)	抗von Willebrand因子的适体及其作为血栓性疾病治疗剂的用途		
公开(公告)号	JP2008512098A	公开(公告)日	2008-04-24
申请号	JP2007530504	申请日	2005-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	阿克组合公司		
申请(专利权)人(译)	阿克组合公司		
[标]发明人	ディーナージョンエル ラガッセダニエルエイチエー		
发明人	ディーナー, ジョン エル. ラガッセ, ダニエル エイチ. エー.		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 A61K38/00 A61P7/02 A61P43/00 A61P7/08 A61P41/00 G01N33/53 C12N15/115		
CPC分类号	A61P7/02 A61P7/08 A61P41/00 A61P43/00 C12N15/115 C12N2310/16 C12N2310/315 C12N2310/317 C12N2310/318 C12N2310/321 C12N2310/3521 C12N15/09		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.Z A61K37/02 A61P7/02 A61P43/00.111 A61P7/08 A61P41/00 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/CA11 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QS25 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/DC10 4C084/DC15 4C084/NA14 4C084/ZA54 4C084/ZC02 4C084/ZC42		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/608047 2004-09-07 US 60/661950 2005-03-11 US 60/678427 2005-05-06 US 60/690231 2005-06-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明总体上涉及核酸领域，并且更具体地涉及能够与von Willebrand Factor结合的适体，其可用作血栓性疾病和/或其他涉及von Willebrand Factor介导的血小板凝集的疾病或疾病的治疗和诊断方法。 本发明进一步涉及用于施用能够结合冯·威兰布兰德因子的适体的材料和方法。