

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5810356号  
(P5810356)

(45) 発行日 平成27年11月11日(2015.11.11)

(24) 登録日 平成27年10月2日(2015.10.2)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/115	(2010.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A H
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 N	9/50	(2006.01)	C 1 2 N	9/50	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	

請求項の数 17 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-518586 (P2011-518586)  
 (86) (22) 出願日 平成22年6月11日(2010.6.11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2010/059953  
 (87) 国際公開番号 W02010/143714  
 (87) 国際公開日 平成22年12月16日(2010.12.16)  
 審査請求日 平成25年5月28日(2013.5.28)  
 (31) 優先権主張番号 特願2009-140585 (P2009-140585)  
 (32) 優先日 平成21年6月11日(2009.6.11)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 505254175  
 株式会社リボミック  
 東京都港区白金台三丁目16番13号  
 (73) 特許権者 000206956  
 大塚製菓株式会社  
 東京都千代田区神田司町2丁目9番地  
 (74) 代理人 100080791  
 弁理士 高島 一  
 (74) 代理人 100125070  
 弁理士 土井 京子  
 (74) 代理人 100136629  
 弁理士 鎌田 光宜  
 (74) 代理人 100121212  
 弁理士 田村 弥栄子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キマーゼに対するアダマー及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

$X_1GAUAGAN_1N_2UAX_2$  (配列番号21; 式中、 $X_1$ 及び $X_2$ は、同一又は異なって、A又はGであり、 $N_1$ 及び $N_2$ は、同一又は異なって、A、G、C、UまたはTである)で表されるヌクレオチド配列を含み、キマーゼに結合しキマーゼの活性を阻害するアダマー。

【請求項2】

$N_1N_2$ がGA、GU、GC、UU、GT又はCUである、請求項1記載のアダマー。

【請求項3】

$X_1$ 及び $X_2$ が共にA、もしくは共にGである、請求項1記載のアダマー。

【請求項4】

ピリミジンヌクレオチドの少なくとも一つが修飾または改変されている、請求項2または3記載のアダマー。

【請求項5】

以下の(a)、(b)又は(c)のいずれかのヌクレオチド配列を含む、請求項1記載のアダマー:

(a) 配列番号4、13、14、25、26、30~32、34、38~50、53~57、59~65および69~72のいずれかから選択されるヌクレオチド配列(但し、ウラシルはチミンであってもよい);

(b) 配列番号 4、13、14、25、26、30～32、34、38～50、53～57、59～65 および 69～72 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであってもよい）において、1～5 個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列；又は

(c) 配列番号 4、13、14、25、26、30～32、34、38～50、53～57、59～65 および 69～72 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであってもよい）と 70% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列。

【請求項 6】

アプタマーに含まれる少なくとも 1 つのヌクレオチドが修飾または改変されている、請求項 5 記載のアプタマー。

10

【請求項 7】

以下の (a')、(b') 又は (c') のいずれかのヌクレオチド配列を含む、請求項 1 記載のアプタマー：

(a') 配列番号 56(1)～56(7)、56(9)、56(11)、56(12)、56(15)～56(52)、61(1)、69(1)、69(2)、及び 72(1)～72(8) のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであってもよい）；

(b') 配列番号 56(1)～56(7)、56(9)、56(11)、56(12)、56(15)～56(52)、61(1)、69(1)、69(2)、及び 72(1)～72(8) のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであってもよい）において、1～5 個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列；又は

20

(c') 配列番号 56(1)～56(7)、56(9)、56(11)、56(12)、56(15)～56(52)、61(1)、69(1)、69(2)、及び 72(1)～72(8) のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであってもよい）と 70% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列。

【請求項 8】

以下の (a)、(b) 又は (c) のいずれかのヌクレオチド配列を含み、キマーゼに結合しキマーゼの活性を阻害するアプタマー：

(a) 配列番号 5、6、8、9、11、12、15、17～20、22～24、28、33 および 51 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであってもよい）；

30

(b) 配列番号 5、6、8、9、11、12、15、17～20、22～24、28、33 および 51 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであってもよい）において、1～3 個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列；又は

(c) 配列番号 5、6、8、9、11、12、15、17～20、22～24、28、33 および 51 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであってもよい）と 90% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列。

【請求項 9】

40

アプタマーに含まれる各ピリミジンヌクレオチド又は各プリンヌクレオチドのリボースの 2' 位のヒドロキシル基が、同一又は異なって、無置換であるか、水素原子、フッ素原子及びメトキシ基からなる群より選ばれる原子又は基で置換されている、請求項 1 記載のアプタマー。

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載のアプタマー及び、親和性物質、標識用物質、酵素、薬物送達媒体又は薬物から選択される機能性物質を含む複合体。

【請求項 11】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項 10 記載の複合体を含む医薬。

50

## 【請求項 1 2】

循環器系疾患または線維症の予防もしくは治療用である、請求項 1 1 記載の医薬。

## 【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項 1 0 記載の複合体を含む診断薬。

## 【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項 1 0 記載の複合体を含むキマーゼ検出用プローブ。

## 【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項 1 0 記載の複合体を含む、キマーゼ精製用固相担体。

10

## 【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項 1 0 記載の複合体を用いることを特徴とする、キマーゼの検出方法。

## 【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項 1 0 記載の複合体を用いることを特徴とする、キマーゼの精製方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、キマーゼに対するアプタマー及びその利用方法などに関するものである。

20

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

ヒトキマーゼ ( E C . 3 . 4 . 2 1 . 3 9 ) はキモトリプシン様セリンプロテアーゼの一種で、肥満細胞の分泌顆粒中に貯蔵されている。肥満細胞が外的刺激を受けると脱顆粒を起こし、ヒトキマーゼは様々な炎症メディエーターと共に細胞外に放出される。放出されたヒトキマーゼは、基質である蛋白質やペプチドに含まれるフェニルアラニンやチロシンといった芳香族アミノ酸を特異的に認識し、そのアミノ酸に隣接するペプチド結合を切断する。ヒトキマーゼの代表的な基質として、アンジオテンシン I ( A n g I ) が挙げられる。ヒトキマーゼは A n g I を切断し、血管収縮因子であるアンジオテンシン I I ( A n g I I ) を産生する。

30

哺乳類のキマーゼは系統学的に と の 2 つのサブファミリーに分類される。ヒトを含む霊長類の発現するキマーゼは一種類のみで ファミリーに属している。一方で、げっ歯類は と 両方のキマーゼを発現する。マウスの場合、複数の種類のキマーゼが知られているが、基質特異性や組織における発現様式から、 ファミリーに属する mouse m a s t c e l l p r o t e a s e - 4 ( m M C P - 4 ) が最もヒトキマーゼに近いと考えられる。また、ハムスターでも ファミリーに属する h a m s t e r c h y m a s e - 1 がそれに対応する。一方で、ヒトキマーゼと同じ ファミリーに属する m M C P - 5 や h a m s t e r c h y m a s e - 2 はエラスターゼ様活性を持ち、基質特異性が異なる。

40

キマーゼはトランスフォーミング増殖因子 ( T G F - ) の活性化に深く関係している。 T G F - は上皮細胞や内皮細胞周辺の細胞外マトリックス中に潜在型 ( l a t e n t - T G F - ) として存在し、 l a r g e l a t e n t T G F - b i n d i n g p r o t e i n ( L T B P ) を介して細胞外マトリックスに保持されている。必要に応じて細胞外マトリックスから放出され、活性化された T G F - は細胞の増殖分化、組織障害後の修復や再生に関与するとされ、生体にとって極めて重要なサイトカインである。また、そのシグナルの破綻は、様々な疾患の発症及び進展に繋がることも知られている。この過程において、キマーゼは l a t e n t T G F - の細胞外マトリックスからの遊離、及び l a t e n t T G F - から活性型 T G F - への変換反応へ関与すると考えられている。

50

キマーゼは線維症、循環器疾患、炎症、アレルギー疾患、臓器癒着など様々な疾患と関係していることが知られている。線維症とは肺や心臓、肝臓、腎臓、皮膚などで細胞外基質の代謝異常が起こり、結合組織タンパク質が過剰に沈着する病気である。例えば肺線維症では肺にコラーゲンなどの結合組織タンパク質が過剰に沈着し、肺胞が硬く縮んでしまい呼吸困難に陥る。肺の線維化は、大量のほこりに曝露することで起こる塵肺、抗がん剤などの薬物使用によって起こる薬剤性肺炎、アレルギー性肺炎、肺結核、膠原病のような自己免疫疾患などが原因で起こることがわかっている。一方で原因不明のケースも少なくない。

線維症の分子レベルでの発症機序は未だ十分に解明されていない。一般に正常な状態においては線維芽細胞の増殖やその機能は十分に制御されているが、炎症や外傷が重篤あるいは持続的であった場合には、組織修復機構が過剰に働き、線維芽細胞の異常増殖や結合組織タンパク質の過剰生産が起こる。このような現象を引き起こす因子として TGF- $\beta$  が知られている。その関与を示唆するものとして、線維症動物モデルに抗 TGF- $\beta$  中和抗体を投与すると、コラーゲン発現が減少し、線維化が有意に抑制されることが報告されている。また、特発性肺線維症患者においては、TGF- $\beta$  やキマーゼ陽性肥満細胞の増加がみられる。

一方で、キマーゼが線維症に関係していることがモデル動物を用いた実験により示されている。ハムスターのプレオマイシン誘発性肺線維症モデルでは、キマーゼ活性の亢進、コラーゲン III mRNA の発現増加、組織の線維化といった現象が、キマーゼ阻害剤により有意に減少する。マウスのプレオマイシン誘発性肺線維症モデルにおいても同様で、キマーゼ阻害剤投与により、キマーゼ活性の抑制、ヒドロキシプロリン量の減少といった効果が得られている。

以上より、キマーゼ阻害剤は線維症などのキマーゼと関係する疾患の予防薬又は治療薬として利用可能である。キマーゼ阻害剤としては低分子化合物である TPC-806 や SUN-13834、SUN-C8257、SUN-C8077、JNJ-10311795 などが開発されている（特許文献1）。

#### 【0003】

ところで、近年、RNA アプタマーの治療薬、診断薬、試薬への応用が注目されており、いくつかの RNA アプタマーが臨床段階あるいは実用化段階に入っている。2004年12月には世界初の RNA アプタマー医薬である Macugen が加齢黄斑変性症の治療薬として米国で承認された。RNA アプタマーとはタンパク質などの標的物質に特異的に結合する RNA のことで、SELEX 法 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) を用いて作製することができる（特許文献2~4）。SELEX 法とは、 $10^{14}$  個程度の異なるヌクレオチド配列を持つ RNA のプールから、標的物質に特異的に結合する RNA を選別する方法である。使用される RNA は40ヌクレオチド程度のランダム配列をプライマー配列で挟み込んだ構造をしている。この RNA プールを標的物質と会合させて、フィルターなどを用いて標的物質に結合した RNA のみ回収する。回収した RNA は RT-PCR で増幅し、これを次のラウンドの鋳型として用いる。この作業を10回程度繰り返すことにより、標的物質と特異的に結合する RNA アプタマーを取得することができる場合がある。

アプタマー医薬は抗体医薬と同様に細胞外タンパク質を標的にすることができるが、既に公表されている多くの学術論文等を参考にすると、いくつかの点で抗体医薬を上回る可能性がある。例えば、アプタマーは抗体よりも標的分子に対して高い親和性や特異性を示す場合が多々ある。また、免疫排除を受けにくく、抗体特有の抗体依存性細胞障害 (ADCC) や補体依存性細胞障害 (CDC) などの副作用は起こりにくいとされる。デリバリーの観点では、アプタマーは抗体の  $1/10$  程度の分子サイズであるため組織移行が起こりやすく、目的の部位まで薬物を送達させることがより容易である。アプタマーは化学合成により生産されるので、部位選択的な化学修飾が可能であり、大量生産すればコストダウンを図ることができる。その他、長期保存安定性や熱・溶媒耐性もアプタマーの優位な

10

20

30

40

50

特徴である。一方で、一般にアプタマーの血中半減期は抗体よりも短い。しかし、この点も毒性を考慮した場合はメリットとなる場合がある。以上の点より、同じ分子を標的にした医薬品であっても、アプタマー医薬は抗体医薬に勝る可能性がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許公報6500835号

【特許文献2】国際公開WO91/19813号パンフレット

【特許文献3】国際公開WO94/08050号パンフレット

【特許文献4】国際公開WO95/07364号パンフレット

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、キマーゼに対するアプタマー及びその利用方法などを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討した結果、キマーゼに対する良質なアプタマーを作製することに成功し、もって本発明を完成するに至った。

【0007】

20

即ち、本発明は、以下の発明などを提供するものである：

[1] キマーゼに結合しキマーゼの活性を阻害するアプタマー。

[2]  $X_1GAUA GAN_1N_2UAA X_2$  (配列番号21；式中、 $X_1$ 及び $X_2$ は、同一又は異なって、A又はGであり、 $N_1$ 及び $N_2$ は、同一又は異なって、A、G、C、UまたはTである)で表されるヌクレオチド配列を含む、[1]記載のアプタマー。

[3]  $N_1N_2$ がGA、GU、GC、UU、GT又はCUである、[2]記載のアプタマー。

[4]  $X_1$ 及び $X_2$ が共にA、もしくは共にGである、[2]記載のアプタマー。

[5] ピリミジンヌクレオチドの少なくとも一つが修飾または改変されている、[3]または[4]記載のアプタマー。

30

[6] 以下の(a)、(b)又は(c)のいずれかのヌクレオチド配列を含む、[1]記載のアプタマー：

(a) 配列番号4~34、38~57、59~65および69~72のいずれかから選択されるヌクレオチド配列(但し、ウラシルはチミンであってもよい)；

(b) 配列番号4~34、38~57、59~65および69~72のいずれかから選択されるヌクレオチド配列(但し、ウラシルはチミンであってもよい)において、1~5個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列；又は

(c) 配列番号4~34、38~57、59~65および69~72のいずれかから選択されるヌクレオチド配列(但し、ウラシルはチミンであってもよい)と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列。

40

[7] アプタマーに含まれる少なくとも1つのヌクレオチドが修飾または改変されている、[6]記載のアプタマー。

[8] 以下の(a')、(b')又は(c')のいずれかのヌクレオチド配列を含む、[1]記載のアプタマー：

(a') 配列番号56(1)~56(7)、56(9)、56(11)、56(12)、56(15)~56(52)、61(1)、69(1)、69(2)、及び72(1)~72(8)のいずれかから選択されるヌクレオチド配列(但し、ウラシルはチミンであってもよい)；

(b') 配列番号56(1)~56(7)、56(9)、56(11)、56(12)、56(15)~56(52)、61(1)、69(1)、69(2)、及び72(1)~

50

72(8)のいずれかから選択されるヌクレオチド配列(但し、ウラシルはチミンであってもよい)において、1~5個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列;又は

(c')配列番号56(1)~56(7)、56(9)、56(11)、56(12)、56(15)~56(52)、61(1)、69(1)、69(2)、及び72(1)~72(8)のいずれかから選択されるヌクレオチド配列(但し、ウラシルはチミンであってもよい)と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列。

[9]アプタマーに含まれる各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位のヒドロキシル基が、同一又は異なって、無置換であるか、水素原子、フッ素原子及びメトキシ基からなる群より選ばれる原子又は基で置換されている、[1]記載のアプタマー。

[10]アプタマーに含まれる各プリンヌクレオチドのリボースの2'位のヒドロキシル基が、同一又は異なって、無置換であるか、水素原子、フッ素原子及びメトキシ基からなる群より選ばれる原子又は基で置換されている、[1]記載のアプタマー。

[11][1]~[10]のいずれかーに記載のアプタマー及び機能性物質を含む複合体。

[12]機能性物質が、親和性物質、標識用物質、酵素、薬物送達媒体又は薬物である、[11]記載の複合体。

[13][1]~[10]のいずれかーに記載のアプタマーあるいは[11]又は[12]記載の複合体を含む医薬。

[14]循環器系疾患または線維症の予防もしくは治療用である、[13]記載の医薬。

[15][1]~[10]のいずれかーに記載のアプタマーあるいは[11]又は[12]記載の複合体を含む診断薬。

[16][1]~[10]のいずれかーに記載のアプタマーあるいは[11]又は[12]記載の複合体を含むキマーゼ検出用プローブ。

[17][1]~[10]のいずれかーに記載のアプタマーあるいは[11]又は[12]記載の複合体を含む、キマーゼ精製用固相担体。

[18][1]~[10]のいずれかーに記載のアプタマーあるいは[11]又は[12]記載の複合体を用いることを特徴とする、キマーゼの検出方法。

[19][1]~[10]のいずれかーに記載のアプタマーあるいは[11]又は[12]記載の複合体を用いることを特徴とする、キマーゼの精製方法。

#### 【発明の効果】

#### 【0008】

本発明のアプタマー及び複合体は、例えば線維症や循環器系疾患などのキマーゼに起因する種々の疾患に対する医薬、あるいは診断薬、試薬として有用であり得る。本発明のアプタマー及び複合体はまた、キマーゼの精製及び濃縮、並びにキマーゼの検出及び定量に有用であり得る。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0009】

【図1】配列番号4、5、12~14、18で表されるアプタマーのMFOLDプログラムにより予想される二次構造を示す図である。配列番号21で表される共通配列を丸で示す。

【図2】配列番号22~27で表されるアプタマーのMFOLDプログラムにより予想される二次構造を示す図である。配列番号21で表される共通配列を丸で示す。

【図3】配列番号28~34で表されるアプタマーのMFOLDプログラムにより予想される二次構造を示す図である。配列番号21で表される共通配列を丸で示す。

【図4】配列番号12及び13で表されるアプタマーがキマーゼに結合する様子を示す図である。40Nは40ヌクレオチドのランダム配列を含んだRNAプールである。キャプチャー分子として、アプタマー又はネガティブコントロールの40Nを固定化し、アナライズとしてヒトキマーゼを流した。測定はGEヘルスケア社製のBiacore T100で行った。

10

20

30

40

50

【図5】配列番号38～40、43、48で表される配列のアプタマーのMFOLDプログラムにより予想される二次構造を示す図である。配列番号21で表される共通配列を丸で示す。

【図6】配列番号49、51、55～57で表されるアプタマーのMFOLDプログラムにより予想される二次構造を示す図である。配列番号21で表される共通配列を丸で示す。

【図7】配列番号13、55、56で表されるアプタマーがキマーゼに結合する様子を示す図である。40Nは40ヌクレオチドのランダム配列を含んだRNAプールである。チップ表面にキマーゼを固定化し、アナライトとしてアプタマー又はネガティブコントロールの40Nを流した。測定はGEヘルスケア社製のBiacore T100で行った。

【図8】キマーゼによるLTBP-1分解と表9に含まれるアプタマーによるLTBP-1分解阻害の様子をウェスタンブロッティングで検出した結果を示す図である。レーン番号1、8、9、23、31はマーカー、レーン番号6、21、29はネガティブコントロール(阻害剤なし)、レーン番号7、22、30はキマーゼ不添加によるコントロールを示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明は、キマーゼに対して結合活性を有するアプタマーを提供する。本発明のアプタマーは、キマーゼの活性を阻害し得る。

【0011】

アプタマーとは、所定の標的分子に対する結合活性を有する核酸分子をいう。アプタマーは、所定の標的分子に対して結合することにより、所定の標的分子の活性を阻害し得る。本発明のアプタマーは、キマーゼに対して結合活性を有し、キマーゼの活性を阻害し得るアプタマーである。また本発明のアプタマーは、RNA、DNA、修飾核酸又はそれらの混合物であり得る。本発明のアプタマーはまた、直鎖状又は環状の形態であり得る。

【0012】

キマーゼは公知のセリンプロテアーゼの一つであり、肥満細胞の分泌顆粒内に貯蔵されている。キマーゼは、例えば生理活性ペプチドの産生・分解、細胞外マトリックスのリモデリング、サイトカインとのネットワーク、免疫等の肥満細胞が関与する様々な生体反応に深く関与している。本発明のアプタマーは、任意の哺乳動物に由来するキマーゼに対する阻害活性を有し得る。このような哺乳動物としては、例えば、霊長類(例、ヒト、サル)、げっ歯類(例、マウス、ラット、モルモット、ハムスター)、並びにペット、家畜及び使役動物(例、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ)が挙げられるが、好ましくはヒトである。ヒトキマーゼのアミノ酸配列はAccession Number AAB26828で表されるものであるが、1～数残基の変異が入ったものや、そのドメイン部分、ペプチド部分であってもよい。また、ヒトキマーゼの構造はモノマーだけでなくダイマーや多量体であってもよい。

【0013】

本発明のアプタマーは、生理的な緩衝液中でキマーゼへ結合する。緩衝液としては特に限定されるものではないが、pHが約5.0～10.0程度のものが好ましく用いられ、このような緩衝液としては、例えば後述する溶液Aや溶液C(実施例1及び2参照)が挙げられる。本発明のアプタマーは、以下のいずれかの試験により検出可能な程度の強度で、キマーゼへ結合するものである。

結合強度の測定にはGEヘルスケア社製のBiacore T100を用いる。一つの測定方法としては、まずセンサーチップにアプタマーを固定化する。固定化量は約1000RUとする。アナライト用のキマーゼ溶液は0.2µMに調製したものを20µLインジェクトし、キマーゼのアプタマーへの結合を検出する。30もしくは40ヌクレオチドからなるランダムなヌクレオチド配列を含むRNAをネガティブコントロールとし、該コントロールRNAと比較してキマーゼが同等もしくは有意に強くアプタマーに結合した場合、該アプタマーはキマーゼへの結合能を有すると判定することができる。

10

20

30

40

50

別の測定方法としては、まずセンサーチップにキマーゼを固定化する。固定化量は約4000RUとする。アナライト用のアプタマー溶液は0.01 $\mu$ g/ $\mu$ Lに調製したものを20 $\mu$ Lインジェクトし、アプタマーのキマーゼへの結合を検出する。30もしくは40ヌクレオチドからなるランダムなヌクレオチド配列を含むRNAをネガティブコントロールとし、該コントロールRNAと比較してキマーゼが同等もしくは有意に強くアプタマーに結合した場合、該アプタマーはキマーゼへの結合能を有すると判定する。

#### 【0014】

キマーゼに対する阻害活性とは、キマーゼが保有する任意の活性に対する阻害能を意味する。例えば、キマーゼの機能の一つに、ペプチド鎖を加水分解することにより切断する酵素活性があるが、それを阻害するということである。酵素活性に対する基質として許容されるのは、生体内に存在する蛋白質や生理活性ペプチド（例えばAng I、latent TGF- $\beta$  など）に限らず、それらのペプチドの一部のアミノ酸配列が含まれるペプチドに発色物質や蛍光物質が付加したペプチドも含まれる。発色物質や蛍光物質は、当業者に公知である。また、蛋白質や生理活性ペプチドの分解反応を介して起こる現象として、コラーゲンI/IIIの発現増加、ヒドロキシプロリン量の増加、IgE発現増加などが挙げられるが、これらに対する抑制効果もキマーゼに対する阻害活性に含まれる。その他、キマーゼに対する好中球、単球、好酸球の遊走活性を阻害する活性も、キマーゼに対する阻害活性に含まれる。さらに、キマーゼにより誘導されるヒスタミン遊離促進、肥満細胞数の増加、血管透過性の増大、組織の線維化、炎症、血管新生、血管内膜肥厚などに対する抑制効果も、キマーゼに対する阻害活性に含まれる。

#### 【0015】

キマーゼの基質とは、キマーゼにより加水分解を受け切断されるペプチドや蛋白質などを意味する。生体内に存在するキマーゼの基質としては、Ang I、latent TGF- $\beta$ 、stem cell factor (SCF)、プロコラーゲン、プロコラゲナーゼ、フィブロネクチン、プロマトリックスメタロプロテアーゼ-1 (pro-MMP-1)、pro-MMP-9、tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1)、アポリポrotein A-I (apoA-I)、apoE、phospholipid transfer protein、IL-1前駆体、big-endothelin-1 (big-ET-1)、big-ET-2、connective tissue-activating peptide III、IL-18前駆体、substance P、vasoactive intestinal peptide (VIP)、kallidin、bradykinin、C3aなどのペプチドや蛋白質が知られている。本明細書におけるキマーゼの基質としては、これらに限らず、それらの一部のアミノ酸配列としてキマーゼが特異的に認識するPheやTyrなどのアミノ酸残基を含む人工的に設計されたモデルペプチドや、このようなペプチドに発色物質や蛍光物質が付加されたペプチドも含まれる。

#### 【0016】

キマーゼの酵素活性をアプタマーが阻害するか否かは、以下の試験により評価することができる。例として三つの方法を以下に示す。

#### 【0017】

一つめに、合成基質を用いる評価方法を示す。キマーゼの基質としては、例えばキモトリプシン様プロテアーゼの標準基質である4アミノ酸ペプチド、「Ala-Ala-Pro-Phe」を含んでなる、Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA (4-メチルクマリル-7-アミド基) (ペプチド研究所社製)を用いる。

アッセイには、96ウェルプレート (F16 Black Maxisorp Fluoronunc、Nunc社製)を用い、反応液量を100 $\mu$ Lとし、緩衝液 (溶液C; 後述する実施例2参照)中で反応を行う。まず、核酸は溶液C中に調製したものを、50 $\mu$ L用意する。そこに、溶液C中に調製した1mMの基質を10 $\mu$ L添加した後、プレートをマイクロプレートリーダーSpectraMax 190 (モレキュラーデバイス社製)にセットし、37 $^{\circ}$ Cで5分間保温する。一方で、0.05 $\mu$ gのキマーゼ (recom

10

20

30

40

50

binant、SIGMA社製)を溶液C中に希釈したものを40 $\mu$ L用意し、37 $^{\circ}$ Cで5分間保温する。核酸及び基質からなる混合液に、キマーゼ溶液を加えて、酵素反応を開始させる。反応液を含むプレートを、マイクロプレートリーダーSpectraMax 190(モレキュラーデバイス社製)にセットし、37 $^{\circ}$ Cで5分間、蛍光強度の変化を経時的に測定(励起波長 380nm、検出波長 460nm)する。キマーゼ活性により、基質から放出されるAMC(7-アミノ-4-メチルクマリル)の蛍光増加の線形近似を求め、その傾きの値を初速度とする。コントロールとして、30もしくは40ヌクレオチドのランダム配列を含む核酸プールを用いた場合(ネガティブコントロール)、及び既知のキモトリプシン様セリンプロテアーゼ阻害剤であるキモスタチンを用いた場合(ポジティブコントロール)において、同様に処理し測定を行う。核酸、阻害剤を含まない場合の反応初速度を酵素活性100%とし、各被験物質の阻害率を算出し、酵素活性を50%阻害するのに要する阻害剤の濃度(IC<sub>50</sub>)を求める。IC<sub>50</sub>が既知の阻害剤であるキモスタチンに比べて低い値を示すアプタマーを、優れた阻害活性を持つアプタマーであると判定する。

10

#### 【0018】

二つめに、天然の基質を用いる評価方法を示す。キマーゼの天然の基質としては、例えばアンジオテンシンIを用いる。ここでは、アンジオテンシンIの分解により遊離するペプチド断片であるHis-Leuを蛍光誘導化し、その蛍光強度を定量的に測定する方法を説明する。

アッセイにおける酵素反応の溶液量は50 $\mu$ Lとし、溶液C中で反応を行う。まず、0.3~0.75ngのキマーゼ(recombinant、SIGMA社製、もしくはnative、Calbiochem社製)を溶液C中に希釈したものを5 $\mu$ L用意する。核酸は溶液C中に調製したものを、25 $\mu$ L用意する。キマーゼ溶液5 $\mu$ Lと核酸溶液25 $\mu$ Lを混和し、37 $^{\circ}$ Cで5分間保温する。一方で、溶液C中に調製した125 $\mu$ MアンジオテンシンI(ペプチド研究所社製)を20 $\mu$ L用意し、37 $^{\circ}$ Cで5分間保温する。キマーゼ及び核酸からなる混合液に、アンジオテンシンI溶液を加えて、酵素反応を開始させる。37 $^{\circ}$ Cで90分間反応させた後、氷冷した30%トリクロロ酢酸溶液を25 $\mu$ L添加し、反応を停止させる。混合液全体を4、1400rpmで10分間遠心し、その上清30 $\mu$ Lを次の蛍光誘導化反応に用いる。

20

上記の上清30 $\mu$ Lを96ウェルプレート(ブラック、Costar社製)に加え、各ウェルに対し、メタノールに溶解した2% o-フタルアルデヒド(SIGMA社製)溶液15 $\mu$ Lと、0.3M NaOH溶液170 $\mu$ Lを混和し、室温に10分間放置する。その後、3M HCl溶液を25 $\mu$ L添加し、反応を停止させる。プレートをマイクロプレートリーダーSpectraMax 190(モレキュラーデバイス社製)にセットし、励起波長355nm、蛍光波長460nmの条件で蛍光強度を測定する。

30

なお、コントロールとして、配列番号58を用いた場合(ネガティブコントロール)、及び既知のキモトリプシン様セリンプロテアーゼ阻害剤であるキモスタチンを用いた場合(ポジティブコントロール)で同様に処理し測定を行う。各条件において、反応時間0分における蛍光強度をブランクとする。キマーゼ酵素反応において、核酸を添加するかわりに溶液Cを同量添加した場合に検出される蛍光強度を100%とし、各被験物質の阻害率を算出し、酵素活性を50%阻害するのに要する阻害剤の濃度(IC<sub>50</sub>)を求める。IC<sub>50</sub>が既知の阻害剤であるキモスタチンに比べて低い値を示すアプタマーを、優れた阻害活性を持つアプタマーであると判定する。

40

#### 【0019】

三つめに、細胞培養上清中に含まれる天然の基質を用いる評価方法を示す。ここではキマーゼの基質であるLTBP-1の分解をウェスタンブロッティングにより検出する。凍結保存されたNHLF細胞(Cambrex Bio Science社製)を37 $^{\circ}$ Cのwater bathにて急速融解後、培地(10% FBS/F-12)に懸濁する。遠心分離(1200rpm、5分)後、上清を除去し、細胞を培地に再懸濁する。遠心分離された細胞に培地を加え全量を10mLとして、懸濁液を細胞培養用シャーレに移して

50

37、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養する。顕微鏡にて細胞の形態及び増殖状態を観察し、コンフルエントの状態になったところで無血清培地(0.2% BSA/F-12)に交換する。培地交換から2日後に培養上清を採取し、分注して-30で凍結保存する。

用時解凍したNH<sub>4</sub>LF培養上清40μLをチューブに分注し、溶液Cで希釈した核酸溶液を5μL添加する。ポジティブコントロールはキモスタチンを溶液Cで希釈し、同様に添加する。ネガティブコントロールは溶液Cのみ添加する。次に、溶液E(溶液C+0.1% BSA、0.05%アジ化ナトリウム)で100ng/mLに希釈したキマーゼを5μL添加する。コントロールとして、キマーゼを添加しないチューブを作製する。攪拌後37で1時間インキュベーションし、等量の電気泳動用Lysis bufferと混合して反応を終了する。次に示すウェスタンブロッティングにより、サンプル中のLTBP-1を検出する。

10

Lysis bufferと混合したサンプルを3分間煮沸し、5~20%アクリルアミドゲルに10μLのサンプルをアプライして電気泳動する。泳動終了後、ニトロセルロースフィルターにトランスファーした後、フィルターを5%スキムミルク、50mM Tris-HCl(pH8.0)、0.05%アジ化ナトリウムでブロックする。フィルターを2% BSA、PBS、0.05%アジ化ナトリウムで2μg/mLに希釈した抗LTBP-1モノクローナル抗体と室温で一晩反応させる。フィルターを3回洗浄し、2次抗体溶液(HRP標識抗マウスIgG抗体を0.1% BSA/PBSに10000倍希釈)と室温で2時間インキュベーションする。フィルターを5回洗浄し、化学発光基質で検出を行う。

20

LTBP-1のバンドの濃さおよび位置(分子量)から、キマーゼ不添加のウェルのバンドを陽性対照(+)、ネガティブコントロールのウェルのバンドを陰性対照(-)とし、各被験物質の阻害活性の有無を目視で判定する。

#### 【0020】

本発明のアプタマーは、キマーゼの任意の部分に結合し、その活性を阻害し得るものである限り特に限定されない。

#### 【0021】

本発明のアプタマーの長さは特に限定されず、通常、約10~約200ヌクレオチドであり得るが、例えば約100ヌクレオチド以下であり、好ましくは約50ヌクレオチド以下であり、より好ましくは約40ヌクレオチド以下であり、最も好ましくは約30ヌクレオチド以下であり得る。総ヌクレオチド数が少なければ、化学合成及び大量生産がより容易であり、かつコスト面でのメリットも大きい。また、化学修飾も容易であり、生体内安定性も高く、毒性も低いと考えられる。

30

#### 【0022】

本発明のアプタマーに含まれる各ヌクレオチドはそれぞれ、同一又は異なって、リボース(例、ピリミジンヌクレオチドのリボース、プリンヌクレオチドのリボース)の2'位においてヒドロキシル基を含むヌクレオチド(即ち、未置換であるヌクレオチド)であるか、あるいはリボースの2'位において、ヒドロキシル基が、任意の原子又は基で置換されているヌクレオチドであり得る。このような任意の原子又は基としては、例えば、水素原子、フッ素原子又は-O-アルキル基(例、-O-Me基)、-O-アシル基(例、-O-COMe基)、アミノ基(例、-NH<sub>2</sub>基)で置換されているヌクレオチドが挙げられる。

40

#### 【0023】

本発明のアプタマーは、X<sub>1</sub>GAUAGAN<sub>1</sub>N<sub>2</sub>UAX<sub>2</sub>(配列番号21;式中、X<sub>1</sub>及びX<sub>2</sub>は、同一又は異なって、A又はGであり、N<sub>1</sub>及びN<sub>2</sub>は、同一又は異なって、A、G、C、UまたはTである。但し、ウラシルはチミンであってもよい)で表される配列を有するアプタマーである。この配列を有するアプタマーは強くキマーゼに結合し、キマーゼの活性を阻害する。

#### 【0024】

上記式中、X<sub>1</sub>及びX<sub>2</sub>として好ましくは、共にA、もしくは共にGである。またN<sub>1</sub>

50

及び $N_2$ として好ましくは、 $N_1N_2$ がGA、GU、GC、UU、GT又はCUである（但し、ウラシルはチミンであってもよい）。

【0025】

本発明のアプタマーはまた、少なくとも1種（例、1、2、3又は4種）のヌクレオチドが、リボースの2'位において、ヒドロキシル基、又は上述した任意の原子又は基、例えば、水素原子、フッ素原子、ヒドロキシル基及びメトキシ基からなる群より選ばれる少なくとも2種（例、2、3又は4種）の基を含むヌクレオチドであり得る。

【0026】

本発明のアプタマーにおいてはまた、全てのピリミジンヌクレオチドが、リボースの2'位において、同一又は異なって、フッ素原子で置換されるヌクレオチドであるか、又は  
10 上述した任意の原子又は基、好ましくは、水素原子、ヒドロキシル基及びメトキシ基からなる群より選ばれる原子又は基で置換されているヌクレオチドであり得る。

【0027】

本発明のアプタマーにおいてはまた、全てのプリンヌクレオチドが、リボースの2'位において、同一又は異なって、ヒドロキシル基で置換されるヌクレオチドであるか、又は  
上述した任意の原子又は基、好ましくは、水素原子、メトキシ基及びフッ素原子からなる群より選ばれる原子又は基で置換されるヌクレオチドであり得る。

【0028】

本発明のアプタマーはまた、全てのヌクレオチドが、リボースの2'位において、ヒドロキシル基、又は上述した任意の原子又は基、例えば、水素原子、フッ素原子、ヒドロキ  
20 シル基及びメトキシ基からなる群より選ばれる同一の基を含むヌクレオチドであり得る。

【0029】

尚、本明細書においては、アプタマーを構成するヌクレオチドをRNAと仮定して（すなわち糖基をリボースと仮定して）、ヌクレオチド中の糖基への修飾の態様を説明するが、これは、アプタマーを構成するヌクレオチドからDNAが除外されることを意味するものではなく、適宜DNAへの修飾として読み替えられる。例えば、アプタマーを構成するヌクレオチドがDNAである場合、リボースの2'位のヒドロキシル基のXへの置換は、  
デオキシリボースの2'位の一方の水素原子のXへの置換として読み替えられる。

【0030】

本発明のアプタマーはまた、  
30 (a) 配列番号4~34、38~57、59~65および69~72のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであってもよい）を含むアプタマー；  
(b) 配列番号4~34、38~57、59~65および69~72のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであってもよい）において1又は数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を含むアプタマー；  
又は  
(c) 配列番号4~34、38~57、59~65および69~72のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但し、ウラシルはチミンであってもよい）と70%以上（好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上）の同一性を有するヌクレオチド配列を含むアプタマー；  
40 であり得；或いは、本発明のアプタマーとしては、  
(d) 上記(a)の複数の連結物、上記(b)の複数の連結物、上記(c)の複数の連結物、上記(a)、(b)及び(c)の複数の連結物からなる群より選ばれる連結物も含まれる。

【0031】

上記(a)のアプタマーだけでなく(b)~(d)のアプタマーも、キマーゼに結合し且つ/又はキマーゼの活性（キマーゼの酵素活性等）を阻害し得る。

【0032】

本発明のアプタマーはまた、  
50 (a') 配列番号56(1)~56(7)、56(9)、56(11)、56(12)、

56(15)~56(52)、61(1)、69(1)、69(2)および72(1)~72(8)のいずれかから選択されるヌクレオチド配列(但し、ウラシルはチミンであってもよい)を含むアプタマー;

(b')配列番号56(1)~56(7)、56(9)、56(11)、56(12)、56(15)~56(52)、61(1)、69(1)、69(2)および72(1)~72(8)のいずれかから選択されるヌクレオチド配列(但し、ウラシルはチミンであってもよい)において、1~5個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を含むアプタマー;又は

(c')配列番号56(1)~56(7)、56(9)、56(11)、56(12)、56(15)~56(52)、61(1)、69(1)、69(2)および72(1)~72(8)のいずれかから選択されるヌクレオチド配列(但し、ウラシルはチミンであってもよい)と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含むアプタマー;

であり得;或いは、本発明のアプタマーとしては、

(d')上記(a')の複数の連結物、上記(b')の複数の連結物、上記(c')の複数の連結物、上記(a')、(b')及び(c')の複数の連結物からなる群より選ばれる連結物も含まれる。さらに、本発明のアプタマーとしては、

(e)上記(a)、(b)及び(c)からなる群より選ばれるアプタマーの一つ以上と(a')、(b')及び(c')からなる群より選ばれるアプタマーの一つ以上とからなる連結物も含まれる。

#### 【0033】

上記(a')~(d')および(e)のアプタマーも、キマーゼに結合し且つ/又はキマーゼの活性(キマーゼの酵素活性等)を阻害し得る。

#### 【0034】

上記(b)および(b')において、置換、欠失、挿入又は付加されるヌクレオチド数は、アプタマーがキマーゼに結合し且つ/又はキマーゼの活性(キマーゼの酵素活性等)を阻害し得る限り特に限定されないが、例えば約30個以下、好ましくは約20個以下、より好ましくは約10個以下、さらにより好ましくは5個以下、最も好ましくは4個、3個、2個又は1個であり得る。

#### 【0035】

上記(c)および(c')において、「同一性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのヌクレオチド配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント(好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである)における、オーバーラップする全ヌクレオチド残基に対する、同一ヌクレオチド残基の割合(%)を意味する。

#### 【0036】

本明細書において、ヌクレオチド配列における同一性は、例えば相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST-2(National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件(ギャップオープン=5ペナルティ;ギャップエクステンション=2ペナルティ;x\_\_ドロップオフ=50;期待値=10;フィルタリング=ON)にて2つのヌクレオチド配列をアラインすることにより、計算することができる。

#### 【0037】

上記(d)、(d')および(e)において連結はタンデム結合にて行われ得る。また、連結に際し、リンカーを利用してもよい。リンカーとしては、ヌクレオチド鎖(例、1~約20ヌクレオチド)、非ヌクレオチド鎖(例、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-リンカー、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-リンカー、ヘキサエチレングリコールリンカー、TEGリンカー、ペプチドを含むリンカー、-S-S-結合を含むリンカー、-CONH-結合を含むリンカー、-OPO<sub>3</sub>-結合を含むリンカー)が挙げられる。上記複数の連結物における複数とは、2以上であれば特に限定されないが、例えば2個、3個又は4個であり得る。上記(a

10

20

30

40

50

) ~ (d)、(a') ~ (d') および (e) における各ヌクレオチドはそれぞれ、同一又は異なって、リボース (例、ピリミジンヌクレオチドのリボース) の 2' 位においてヒドロキシル基を含むヌクレオチドであるか、あるいはリボースの 2' 位において、ヒドロキシル基が、任意の基 (例、水素原子、フッ素原子又は -O-Me 基) で置換されているヌクレオチドであり得る。

#### 【0038】

本発明のアプタマーは、キマーゼに対する結合性、安定性、薬物送達性等を高めるため、各ヌクレオチドの糖残基 (例、リボース) が修飾されたものであってもよい。糖残基において修飾される部位としては、例えば、糖残基の 2' 位、3' 位及び / 又は 4' 位の酸素原子を他の原子に置き換えたものなどが挙げられる。修飾の種類としては、例えば、フルオロ化、O-アルキル化 (例、O-メチル化、O-エチル化)、O-アリル化、S-アルキル化 (例、S-メチル化、S-エチル化)、S-アリル化、アミノ化 (例、-NH<sub>2</sub>) が挙げられる。このような糖残基の改変は、自体公知の方法により行うことができる (例えば、Sproat et al., (1991) Nucleic Acid Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991) Nucleic Acid Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973) Biochemistry 12, 5138-5145 参照)。

10

#### 【0039】

本発明のアプタマーはまた、キマーゼに対する結合活性等を高めるため、核酸塩基 (例、プリン、ピリミジン) が改変 (例、化学的置換) されたものであってもよい。このような改変としては、例えば、5位ピリミジン改変、6及び / 又は 8位プリン改変、環外アミンでの改変、4-チオウリジンでの置換、5-プロモ又は 5-ヨード-ウラシルでの置換が挙げられる。

20

また、ヌクレアーゼ及び加水分解に対して耐性であるように、本発明のアプタマーに含まれるリン酸基が改変されていてもよい。例えば、P(O)O基が、P(O)S (チオエート)、P(S)S (ジチオエート)、P(O)NR<sub>2</sub> (アミデート)、P(O)CH<sub>3</sub>、P(O)BH<sub>3</sub>、P(O)R、R(O)OR'、CO又はCH<sub>2</sub> (ホルムアセタール) 又は 3'-アミン (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) で置換されていてもよい [ここで各々の R 又は R' は独立して、Hであるか、あるいは置換されているか、又は置換されていないアルキル (例、メチル、エチル) である]。

30

連結基としては、-O-、-N- 又は -S- が例示され、これらの連結基を通じて隣接するヌクレオチドに結合し得る。

改変はまた、キャッピングのような 3' 及び 5' の改変を含んでもよい。

#### 【0040】

改変はさらに、ポリエチレングリコール、アミノ酸、ペプチド、inverted dT、核酸、ヌクレオシド、Myristoyl、Lithocolic-oleyl、Docosanyl、Lauroyl、Stearoyl、Palmitoyl、Oleoyl、Linoleoyl、その他脂質、ステロイド、コレステロール、カフェイン、ビタミン、色素、蛍光物質、抗癌剤、毒素、酵素、放射性物質、ビオチンなどを末端に付加することにより行われ得る。このような改変については、例えば、米国特許第 5,660,985号、同第 5,756,703号を参照して行うことができる。

40

#### 【0041】

本発明のアプタマーは、本明細書中の開示及び当該技術分野における自体公知の方法により合成することができる。合成方法の一つはRNAポリメラーゼを用いる方法である。目的の配列とRNAポリメラーゼのプロモーター配列を持つDNAを化学合成し、これをテンプレートにして既に公知の方法により転写することで目的のRNAを得ることができる。また、DNAポリメラーゼを用いることでも合成することができる。目的の配列を有したDNAを化学合成し、これをテンプレートにして、既に公知の方法であるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅する。これを既に公知の方法であるポリアクリルアミド電気泳動法や酵素処理法により一本鎖とする。修飾の入ったアプタマーを合成する場合は

50

、特定の位置に変異を導入したポリメラーゼを用いることで伸長反応の効率を上げることができる。このようにして得られたアプタマーは公知の方法により容易に精製することができる。

アプタマーはアミダイト法もしくはホスホアミダイト法などの化学合成法によって大量合成することができる。合成方法はよく知られている方法であり、Nucleic Acid (Vol. 2) [1] Synthesis and Analysis of Nucleic Acid (Editor: Yukio Sugiura, Hirokawa Publishing Company)などに記載のとおりである。実際にはGEヘルスケアバイオサイエンス社製のOligo Pilot 100やOligo Processなどの合成機を使用する。精製はクロマトグラフィー等の自体公知の方法により行われる。

10

アプタマーはホスホアミダイト法などの化学合成時にアミノ基などの活性基を導入することで、合成後に機能性物質を付加することができる。例えば、アプタマーの末端にアミノ基を導入することで、カルボキシル基を導入したポリエチレングリコール鎖を縮合させることができる。

アプタマーは、リン酸基の負電荷を利用したイオン結合、リボースを利用した疎水結合及び水素結合、核酸塩基を利用した水素結合やスタッキング相互作用など多様な結合様式により標的物質と結合する。特に、構成ヌクレオチドの数だけ存在するリン酸基の負電荷を利用したイオン結合は強く、タンパク質の表面に存在するリジンやアルギニンの正電荷と結合する。このため、標的物質との直接的な結合に関わっていない核酸塩基は置換することができる。特に、ステム構造の部分は既に塩基対が作られており、また、二重らせん構造の内側を向いているので、核酸塩基は、標的物質と直接結合し難い。従って、塩基対を他の塩基対に置換してもアプタマーの活性は減少しない場合が多い。ループ構造など塩基対を作っていない構造においても、核酸塩基が標的分子との直接的な結合に関与していない場合に、塩基の置換が可能である。リボースの2'位の修飾に関しては、まれにリボースの2'位の官能基が標的分子と直接的に相互作用していることがあるが、多くの場合無関係であり、他の修飾分子に置換可能である。このようにアプタマーは、標的分子との直接的な結合に関与している官能基を置換又は削除しない限り、その活性を保持していることが多い。また、全体の立体構造が大きく変わらないことも重要である。

20

#### 【0042】

30

アプタマーは、SELEX法及びその改良法(例えば、Ellington et al., (1990) Nature, 346, 818-822; Tuerk et al., (1990) Science, 249, 505-510)を利用することで作製することができる。SELEX法ではラウンド数を増やしたり、競合物質を使用したりして、選別条件を厳しくすることで、標的物質に対してより結合力の強いアプタマーが濃縮され、選別されてくる。よって、SELEXのラウンド数を調節したり、及び/又は競合状態を変化させたりすることで、結合力が異なるアプタマー、結合形態が異なるアプタマー、結合力や結合形態は同じであるが塩基配列が異なるアプタマーを得ることができる場合がある。また、SELEX法にはPCRによる増幅過程が含まれるが、その過程でマンガンイオンを使用するなどして変異を入れることで、より多様性に富んだSELEXを行うことが可能となる。

40

#### 【0043】

SELEXで得られるアプタマーは標的物質に対して親和性が高い核酸であるが、そのことは標的物質の生理活性を阻害することを意味しない。キマーゼは塩基性タンパク質であり、核酸が非特異的に結合しやすいと考えられるが、特定の部位に強く結合するアプタマー以外はその標的物質の活性に影響を及ぼさない。実際、ネガティブコントロールとして用いたランダム配列を含むRNAはキマーゼに弱く結合するものの、キマーゼの酵素活性を阻害しなかった。

#### 【0044】

このようにして選ばれた活性のあるアプタマーに基づき、より高い活性を有するアプタ

50

マーを獲得するための S E L E X を行うことが出来る。具体的な方法とは、ある配列が決まっているアプタマーの一部をランダム配列にしたテンプレートや 10 ~ 30 % 程度のランダム配列をドーブしたテンプレートを作製して、再度 S E L E X を行うものである。

【 0 0 4 5 】

S E L E X で得られるアプタマーは 80 ヌクレオチド程度の長さがあり、これをそのまま医薬にすることは難しい。そこで、試行錯誤を繰り返し、容易に化学合成ができる 50 ヌクレオチド程度以下の長さまで短くする必要がある。S E L E X で得られるアプタマーはそのプライマー設計に依存して、その後の最小化作業のしやすさが変わる。うまくプライマーを設計しないと、S E L E X によって活性のあるアプタマーが選別できたとしても、その後の開発が不可能となる。本発明では 23 ヌクレオチドでも活性を保持しているアプタマーを得ることができた。

10

【 0 0 4 6 】

アプタマーは化学合成が可能であるので改変が容易である。アプタマーは M F O L D プログラムを用いて二次構造を予測したり、X 線解析や N M R 解析によって立体構造を予測したりすることで、どのヌクレオチドを置換又は欠損することが可能か、また、どこに新たなヌクレオチドを挿入可能かなどを、ある程度予測することができる。予測された新しい配列のアプタマーは容易に化学合成することができ、そのアプタマーが活性を保持しているかどうかは、既存のアッセイ系により確認することができる。

【 0 0 4 7 】

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

20

【 0 0 4 8 】

修飾に関しても、配列と同様に当業者であれば自由に設計又は改変可能である。

【 0 0 4 9 】

以上のように、アプタマーは高度に設計又は改変可能である。本発明はまた、所定の配列（例、ステム部分、インターナルループ部分、バルジ部分、ヘアピンループ部分及び一本鎖部分から選ばれる部分に対応する配列：以下、必要に応じて固定配列と省略する）を含むアプタマーを高度に設計又は改変可能であるアプタマーの製造方法を提供する。

【 0 0 5 0 】

例えば、このようなアプタマーの製造方法は、下記：

30

【 0 0 5 1 】

【 化 1 】

プライマー用配列(i) — (N)<sub>a</sub> — 固定配列 — (N)<sub>b</sub> — プライマー用配列(ii)

【 0 0 5 2 】

〔上記において、(N)<sub>a</sub> は a 個の N からなるヌクレオチド鎖を示し、(N)<sub>b</sub> は、b 個の N からなるヌクレオチド鎖を示し、N はそれぞれ、同一又は異なって、A、G、C、U 及び T（好ましくは、A、G、C 及び U）からなる群より選ばれるヌクレオチドである。a、b はそれぞれ、同一又は異なって、任意の数であり得るが、例えば 1 ~ 約 100 個、好ましくは 1 ~ 約 50 個、より好ましくは 1 ~ 約 30 個、さらにより好ましくは 1 ~ 約 20 個又は 1 ~ 約 10 個であり得る。〕で表されるヌクレオチド配列からなる単一種の核酸分子又は複数種の核酸分子（例、a、b の数等が異なる核酸分子のライブラリ）、及びプライマー用配列 (i)、(ii) にそれぞれ対応するプライマー対を用いて、固定配列を含むアプタマーを製造することを含む。

40

【 0 0 5 3 】

本発明はまた、本発明のアプタマー及びそれに結合した機能性物質を含む複合体を提供する。本発明の複合体におけるアプタマーと機能性物質との間の結合は共有結合、又は非共有結合であり得る。本発明の複合体は、本発明のアプタマーと 1 以上（例、2 又は 3 個）の同種又は異種の機能性物質とが結合したものであり得る。機能性物質としては、本発

50

明のアプタマーに何らかの機能を新たに付加するもの、あるいは本発明のアプタマーが保持し得る何らかの特性を変化（例、向上）させ得るものである限り特に限定されない。機能性物質としては、例えば、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、糖質、単糖、ポリヌクレオチド、ヌクレオチドが挙げられる。機能性物質としてはまた、例えば、親和性物質（例、ビオチン、ストレプトアビジン、標的相補配列に対して親和性を有するポリヌクレオチド、抗体、グルタチオンセファロース、ヒスチジン）、標識用物質（例、蛍光物質、発光物質、放射性同位体）、酵素（例、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ）、薬物送達媒体（例、リポソーム、ミクロスフェア、ペプチド、ポリエチレングリコール類）、薬物（例、カリケアマイシンやデュオカルマイシンなどミサイル療法に使用されているもの、シクロフォスファミド、メルファラン、イホスファミド又はトロホスファミドなどのナイトロジェンマスタード類似体、チオテパなどのエチレンイミン類、カルムスチンなどのニトロソ尿素、テモゾロミド又はダカルバジンなどのアルキル化剤、メトトレキセート又はラルチトレキセドなどの葉酸類似代謝拮抗剤、チオグアニン、クラドリピン又はフルダラピンなどのプリン類似体、フルオロウラシル、テガフル又はゲムシタピンなどのピリミジン類似体、ピンブラスチン、ピンクリスチン又はピンオレルピンなどのピンカルカロイド及びその類似体、エトポシド、タキサン、ドセタキセル又はパクリタキセルなどのポドフィロトキシン誘導體、ドキシソルピシン、エピルピシン、イダルピシン及びミトキサントロンなどのアントラサイクリン類及び類似体、プレオマイシン及びミトマイシンなどの他の細胞毒性抗生物質、シスプラチン、カルボプラチン及びオキサリプラチンなどの白金化合物、ペントスタチン、ミルテフォシン、エストラムスチン、トポテカン、イリノテカン及びピカルタミド）、毒素（例、リシン毒素、リア毒素及びベロ毒素）が挙げられる。これらの機能性分子は最終的に取り除かれる場合がある。更に、トロンピンやマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、Factor Xなどの酵素が認識して切断することができるペプチド、ヌクレアーゼや制限酵素が切断できるポリヌクレオチドであってもよい。

【0054】

本発明のアプタマー及び複合体は、例えば、医薬又は診断薬、検査薬、試薬として使用され得る。

【0055】

本発明のアプタマー及び複合体は、キマーゼの機能を阻害する活性を有し得る。上述のように、キマーゼは線維症や循環器系疾患と深く関わっている。従って、本発明のアプタマー及び複合体は、線維症や循環器系疾患を伴う疾患を治療又は予防するための医薬として有用である。

【0056】

本発明のアプタマー及び複合体は、キマーゼに特異的に結合し得る。従って、本発明のアプタマー及び複合体は、キマーゼ検出用プローブとして有用である。該プローブは、キマーゼのインピボイメージング、血中濃度測定、組織染色、ELISA等に有用である。また、該プローブは、キマーゼが関与する疾患（線維症や循環器系疾患を伴う疾患等）の診断薬、検査薬、試薬等として有用である。

【0057】

また、そのキマーゼへの特異的結合に基づき、本発明のアプタマー及び複合体はキマーゼの分離精製用リガンドとして使用され得る。

【0058】

また、本発明のアプタマー及び複合体は、薬物送達剤として使用され得る。

【0059】

臓器又は組織の線維化が関与する疾患としては、肺線維症、前立腺肥大、心筋線維化、心筋線維症、筋骨格線維症、骨髄線維症、子宮筋腫、強皮症、外科手術後の癒着、手術後の癒着、熱傷性癒着、肥厚性癒着、ケロイド、アトピー性皮膚炎、腹膜硬化症、喘息、肝硬変、慢性膵炎、スキルス胃癌、肝線維症、腎線維症、線維性血管病、糖尿病の合併症である線維性微小血管炎による網膜症、神経症、腎症、糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎、遺

10

20

30

40

50

伝性腎疾患、動脈硬化末梢動脈炎などが挙げられる。

【0060】

循環器系疾患としては、血管障害、大動脈瘤、腎不全、高血圧症、動脈硬化、心筋梗塞、心肥大、心不全、経皮経管冠動脈形成術などによる血管障害後の再狭窄、糖尿病性及び非糖尿病性の腎障害、末梢循環障害などが挙げられる。

【0061】

キマーゼは酵素活性を保有し、基質となる生理活性物質を切断する。その基質としては、例えばAng I、latent TGF- $\beta$ 、SCF、プロコラーゲン、プロコラゲナーゼ、pro-MMP-9、IL-1前駆体などが知られており、これら生理活性ペプチドの産生・分解反応を介して、細胞外マトリックスのリモデリング、サイトカインとのネットワーク、免疫、血管収縮といった生理作用を発揮する。一方、キマーゼそのものが肥満細胞を活性化したり、ヒスタミン遊離を促進したりする作用があり、炎症と関連深い。従って、本発明のアプタマー及び複合体は、上記に挙げた基質に限定されるものではないが、キマーゼに許容される基質が媒介する生体機能に関係した疾患及びキマーゼそのものが関与する疾患の医薬又は診断薬、検査薬、試薬として使用され得る。

【0062】

本発明の医薬は、医薬上許容される担体が配合されたものであり得る。医薬上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニト、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウム-グリコール-スターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

【0063】

本発明の医薬の投与経路としては特に限定されるものではないが、例えば経口投与、非経口投与が挙げられる。

経口投与に好適な製剤としては、水、生理食塩水、オレンジジュースのような希釈液に有効量のリガンドを溶解させた液剤、有効量のリガンドを固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤又は錠剤、適当な分散媒中に有効量の有効成分を懸濁させた懸濁液剤、有効量の有効成分を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤、水溶性物質の吸収を促進させるC10等が挙げられる。

【0064】

また、本発明の医薬は必要により、味のマスクング、腸溶性あるいは持続性などの目的のため、自体公知の方法でコーティングすることができる。コーティングに用いられるコーティング剤としては、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリオキシエチレングリコール、ツイーン80、プルロニックF68、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシメチルセルロースアセテートサクシネート、オイドラギット（ローム社製、ドイツ、メタアクリル酸・アクリル酸共重合体）及び色素（例、ベンガラ、二酸化チタンなど）などが用いられる。当該医薬は、速放性製剤、徐放性製剤のいずれであってもよい。

【0065】

非経口的な投与（例えば、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、局所投与、腹腔内投与

10

20

30

40

50

、経鼻投与など)に好適な製剤としては、水性及び非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性及び非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分及び医薬上許容される担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌の溶媒に溶解又は懸濁すればよい状態で保存することもできる。

#### 【0066】

また、徐放製剤も好適な製剤として挙げることができる。徐放製剤の剤形としては、人工骨や生体分解性基材もしくは生体非分解性スポンジ、バッグなど、体内に埋め込まれた担体もしくは容器からの徐放形態が挙げられる。あるいは薬剤ポンプ、浸透圧ポンプなど、体外から継続的もしくは断続的に体内もしくは局所に送達されるデバイス等も徐放製剤に含む。生体分解性の基材としては、リポソーム、カチオニックリポソーム、Poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)、アテロコラーゲン、ゼラチン、ヒドロキシアパタイト、多糖シゾフィランなどが挙げられる。

更に注射液剤、懸濁液剤や徐放製剤以外にも、経肺投与に適した吸入剤、経皮投与に適した軟膏剤なども可能である。

吸入剤の場合、凍結乾燥状態の有効成分を微細化し適当な吸入デバイスを用いて吸入投与する。吸入剤には、更に必要に応じて使用されている界面活性剤、油、調味料、シクロデキストリン又はその誘導體等を適宜配合することができる。吸入剤は常法に従って製造することができる。すなわち、本発明のアプタマー又は複合体を粉末状又は液状にして、吸入噴射剤及び/又は担体中に配合し、適当な吸入容器に充填することにより製造することができる。また上記本発明のアプタマー又は複合体が、粉末状の場合は通常の機械的粉末吸入器を、液状の場合はネブライザー等の吸入器をそれぞれ使用することもできる。ここで吸入噴射剤としては従来公知のものを広く使用でき、フロン-11、フロン-12、フロン-21、フロン-22、フロン-113、フロン-114、フロン-123、フロン-142c、フロン-134a、フロン-227、フロン-C318、1,1,1,2-テトラフルオロエタン等のフロン系化合物、プロパン、イソブタン、n-ブタン等の炭化水素類、ジエチルエーテル等のエーテル類、窒素ガス、炭酸ガス等の圧縮ガス等を例示

#### 【0067】

界面活性剤としては、例えばオレイン酸、レシチン、ジエチレングリコールジオレエート、テトラヒドロフルフリルオレエート、エチルオレエート、イソプロピルミリステート、グリセリルトリオレエート、グリセリルモノラウレート、グリセリルモノオレエート、グリセリルモノステアレート、グリセリルモノリシノエート、セチルアルコール、ステアリルアルコール、ポリエチレングリコール400、セチルピリジニウムクロリド、ソルビタントリオレエート(商品名スパン85)、ソルビタンモノオレエート(商品名スパン80)、ソルビタンモノラウエート(商品名スパン20)、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(商品名HCO-60)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(商品名ツイーン20)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート(商品名ツイーン80)、天然資源由来のレシチン(商品名エピクロン)、オレイルポリオキシエチレン(2)エーテル(商品名ブリジ92)、ステアリルポリオキシエチレン(2)エーテル(商品名ブリジ72)、ラウリルポリオキシエチレン(4)エーテル(商品名ブリジ30)、オレイルポリオキシエチレン(2)エーテル(商品名ゲナポール0-020)、オキシエチレンとオキシプロピレンとのブロック共重合体(商品名シンペロニック)等が挙げられる。油としては、例えばトウモロコシ油、オリーブ油、綿実油、ヒマワリ油等が挙げられる。また、軟膏剤の場合、適当な医薬上許容される基剤(黄色ワセリン、白色ワセリン、パラフィン、プラスチックベース、シリコーン、白色軟膏、ミツロウ、豚油、植物油、親水軟膏、親水ワセリン、精製ラノリン、加水ラノリン、吸水軟膏、親水プラスチックベース、マクロゴール軟膏等)を用い、有効成分である本発明のアプタマーと混合し製剤化し使用

する。

【0068】

本発明の医薬の投与量は、有効成分の種類・活性、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、通常、成人1日あたり有効成分量として約0.0001～約100mg/kg、例えば約0.0001～約10mg/kg、好ましくは約0.005～約1mg/kgであり得る。

【0069】

本発明はまた、本発明のアプタマー及び複合体が固定化された固相担体を提供する。固相担体としては、例えば、基板、樹脂、プレート（例、マルチウェルプレート）、フィルター、カートリッジ、カラム、多孔質材が挙げられる。基板は、DNAチップやプロテインチップなどに使われているものなどであり得、例えば、ニッケル-PTFE（ポリテトラフルオロエチレン）基板やガラス基板、アパタイト基板、シリコン基板、アルミナ基板などで、これらの基板にポリマーなどのコーティングを施したものが挙げられる。樹脂としては、例えば、アガロース粒子、シリカ粒子、アクリルアミドとN,N'-メチレンビスアクリルアミドの共重合体、ポリスチレン架橋ジビニルベンゼン粒子、デキストランをエピクロロヒドリンで架橋した粒子、セルロースファイバー、アリルデキストランとN,N'-メチレンビスアクリルアミドの架橋ポリマー、単分散系合成ポリマー、単分散系親水性ポリマー、セファロース、トヨパールなどが挙げられ、また、これらの樹脂に各種官能基を結合させた樹脂も含まれる。本発明の固相担体は、例えば、キマーゼの精製、及びキマーゼの検出、定量に有用であり得る。

【0070】

本発明のアプタマー及び複合体は、自体公知の方法により固相担体に固定できる。例えば、親和性物質（例、上述したもの）や所定の官能基を本発明のアプタマー及び複合体に導入し、次いで当該親和性物質や所定の官能基を利用して固相担体に固定化する方法が挙げられる。本発明はまた、このような方法を提供する。所定の官能基は、カップリング反応に供することが可能な官能基であり得、例えば、アミノ基、チオール基、ヒドロキシル基、カルボキシル基が挙げられる。本発明はまた、このような官能基が導入されたアプタマーを提供する。

【0071】

本発明はまた、キマーゼの精製及び濃縮方法を提供する。特に本発明はキマーゼを他のファミリータンパク質から分離することが可能である。本発明の精製及び濃縮方法は、本発明の固相担体にキマーゼを吸着させ、吸着したキマーゼを溶出液により溶出させることを含み得る。本発明の固相担体へのキマーゼの吸着は自体公知の方法により行うことができる。例えば、キマーゼを含有する試料（例、細菌又は細胞の培養物又は培養上清、血液）を、本発明の固相担体又はその含有物に導入する。キマーゼの溶出は、中性溶液等の溶出液を用いて行うことができる。中性溶出液は特に限定されるものではないが、例えばpH約6～約9、好ましくは約6.5～約8.5、より好ましくは約7～約8であり得る。中性溶液はまた、例えば、尿素、キレート剤（例、EDTA）、ナトリウム塩（例、NaCl）、カリウム塩（例、KCl）、マグネシウム塩（例、MgCl<sub>2</sub>）、界面活性剤（例、Tween 20、Triton、NP40）、グリセリンを含むものであり得る。本発明の精製及び濃縮方法はさらに、キマーゼの吸着後、洗浄液を用いて固相担体を洗浄することを含み得る。洗浄液としては、例えば、尿素、キレート剤（例、EDTA）、Tris、酸、アルカリ、Transfer RNA、DNA、Tween 20などの表面活性剤、NaClなどの塩を含むものなどが挙げられる。本発明の精製及び濃縮方法はさらに、固相担体を加熱処理することを含み得る。かかる工程により、固相担体の再生、滅菌が可能である。

【0072】

本発明はまた、キマーゼの検出及び定量方法を提供する。特に本発明はキマーゼを他のファミリータンパク質と区別して検出及び定量することができる。本発明の検出及び定量方法は、本発明のアプタマーを利用して（例、本発明の複合体及び固相担体の使用により

10

20

30

40

50

キマーゼを測定することを含み得る。キマーゼの検出及び定量方法は、抗体の代わりに本発明のアプタマーを用いること以外は、免疫学的方法と同様の方法により行われ得る。従って、抗体の代わりに本発明のアプタマーをプローブとして用いることにより、酵素免疫測定法（EIA）（例、直接競合ELISA、間接競合ELISA、サンドイッチELISA）、放射免疫測定法（RIA）、蛍光免疫測定法（FIA）、ウエスタンブロット法、免疫組織化学的染色法、セルソーティング法等の方法と同様の方法により、検出及び定量を行うことができる。また、PET等の分子プローブとしても、使用することができる。このような方法は、例えば、生体又は生物学的サンプルにおけるキマーゼ量の測定、キマーゼが関連する疾患の診断に有用であり得る。

#### 【0073】

本明細書中で挙げられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、本明細書での引用により、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

#### 【0074】

以下に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明するが、本発明は下記実施例等に何ら制約されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0075】

実施例1：キマーゼに特異的に結合するRNAアプタマーの作製（1）

キマーゼに特異的に結合するRNAアプタマーはSELEX法を用いて作製した。SELEXはEllingtonらの方法（Ellington and Szostak, Nature 346, 818-822, 1990）及びTuerkらの方法（Tuerk and Gold, Science 249, 505-510, 1990）を参考にして行った。標的物質としてNHS-activated Sepharose 4 Fast Flow（GEヘルスケア社製）の担体に固相化したキマーゼ（Human Skin, Calbiochem社製）を用いた。担体へのキマーゼの固相化方法はGEヘルスケア社の仕様書に沿って行った。固相化量は、固相化前のキマーゼ溶液と固相化直後の上清をSDS-PAGEにより調べることで確認した。SDS-PAGEの結果、上清からはキマーゼのバンドは検出されず、使用したキマーゼのほぼ全てがカップリングされたことが確認された。約167 pmolのキマーゼが約3 µLの樹脂に固相化されたことになる。

#### 【0076】

最初のラウンドで用いたRNA（40N）は、化学合成によって得られたDNAをDuraScribe<sup>TM</sup> T7 Transcription Kit（Epicentre社製）を用いて転写して得た。この方法によって得られたRNAはピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位がフルオロ化されたものである。DNA鋳型としては、以下に示す40ヌクレオチドのランダム配列の両端にプライマー配列を持った長さ70ヌクレオチドのDNAを用いた。DNA鋳型とプライマーは化学合成によって作製した。

#### 【0077】

DNA鋳型：5' - GCGGCCGCTCTTCTATGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGAATTCCTACCGT - 3'（配列番号1）

プライマーFwd：5' - TAATACGACTCACTATAGGGACGGTAGGAATTC - 3'（配列番号2）

プライマーRev：5' - GCGGCCGCTCTTCTATG - 3'（配列番号3）

#### 【0078】

DNA鋳型（配列番号1）中のNの連続は任意の組み合わせの40個のヌクレオチド（40N：それぞれのNは、A、G、C又はTである）であり、得られるアプタマー独特の配列領域を生じる。プライマーFwdはT7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含んでいる。最初のラウンドで用いたRNAプールのバリエーションは理論上 $10^{14}$ で

10

20

30

40

50

あった。

【0079】

キマーゼが固相化された担体にRNAプールを加え、30分室温で保持した後、キマーゼに結合しないRNAを取り除くために、溶液Aで樹脂を洗浄した。ここで溶液Aは145 mM 塩化ナトリウム、5.4 mM 塩化カリウム、1.8 mM 塩化カルシウム、0.8 mM 塩化マグネシウム、20 mM トリス (pH 7.6) の混合溶液である。キマーゼに結合したRNAは、溶出液として溶液Bを加えて95℃で10分間熱処理を行い、その上清から回収した。ここで溶液Bは7 M Urea、3 mM EDTA、100 mM Tris-HCl (pH 6.6) の混合液である。回収されたRNAはRT-PCRで増幅し、DuraScribe<sup>TM</sup> T7 Transcription Kitで転写して次のラウンドのプールとして用いた。以上を1ラウンドとし、同様の作業を複数回繰り返して行った。SELEX終了後、PCR産物をpGEM-T Easyベクター (Promega社製) にクローニングし、大腸菌株DH5 (Toyobo社製) をトランスフォーメーションした。シングルコロニーからプラスミドを抽出後、DNAシーケンサー (3130xl Genetic Analyzer、ABI社製) でクローンの塩基配列を調べた。

10

【0080】

SELEXを8ラウンド行った後に44クローンの配列を調べたところ、配列に収束が見られた。それらクローンの一部の配列を配列番号4~20に示す。そのうち、配列番号4で表される配列は6配列存在した。配列番号5は2配列存在した。配列番号6~20で表される配列は1配列であった。配列番号6と8は配列中の一塩基のみが異なる。配列番号4、13、及び14の配列には配列番号21で表される共通配列が含まれていた。配列番号21で表される共通配列は44クローン中9クローンに含まれていた。これらの配列の二次構造をMFOLDプログラム (M. Zuker, Nucleic Acids Res. 31 (13), 3406-3415, 2003) を用いて予測したところ、共通配列の部分がよく似たループ構造となった。配列番号4、5、12~14、18で表される配列のアプタマーの二次構造予測を図1に示す。配列番号21で表される共通配列を丸( )で囲った。

20

【0081】

以下にそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表すものとし、プリン塩基 (A及びG) は2'-OH体であり、ピリミジン塩基 (U及びC) は2'-フルオロ修飾体である。また、配列中のN (N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub>) はA、G、C、Uのうちの任意のヌクレオチドを示し、X (X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>) は共にA、もしくは共にGを示す。

30

【0082】

配列番号4:

GGGACGGUAAGGA AUUCGUCCAUUCUACAGAUAGAGAUAAA  
GUAGAAUUUAACAACAUAAGAAAGAGCGGCCGC

配列番号5:

GGGACGGUAAGGA AUUC CCA CUUGUCUUUGAGGCAAGAAAU  
UGUAUUCCGAAGAAAGCAUAAGAAAGAGCGGCCGC

40

配列番号6:

GGGACGGUAAGGA AUUCUACGGUCUGUGUGAAAUUGAAACA  
CACAAAGAAACAUAAGACAUAAGAAAGAGCGGCCGC

配列番号7:

GGGACGGUAAGGA AUUCACCUUUCCAAUUGUGAAAGAAACA  
CAAAAAGAAAUGACAUAAGAAAGAGCGGCCGC

配列番号8:

GGGACGGUAAGGA AUUCUACGGUCUGUGUGAAAUUGAAACA  
CACAAAGAAACAUAACAUAAGAAAGAGCGGCCGC

50

配列番号 9 :

G G G A C G G U A G G A A U U C C C G A A A A G C A A C A A G C U U G C U A A A  
A U G A U U C C G A A A A A C A C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号 10 :

G G G A C G G U A G G A A U U C C G C C G C C U A A A A A C G A C G A U A U U  
A C A G A A A C G U C A A A U A C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号 11 :

G G G A C G G U A G G A A U U C C C G A C A C G A A A U G U G U G A U U A A U U  
C C G A A C A A C A A A G U A A C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号 12 :

G G G A C G G U A G G A A U U C G C C G U C A A C G U U A C A U A A U G U A U A  
U A C C A G G G U A A C U A A A C A U A G A A G A G C G G C C G C

10

配列番号 13 :

G G G A C G G U A G G A A U U C C G C A A C C A U C C C G U A A C U A U G G U U  
A G A U A G A G U U A A A A A C C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号 14 :

G G G A C G G U A G G A A U U C U C G U U C C U G A C A G C A U U U G A G A U A  
G A U U U A A A C A A A C G C A C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号 15 :

G G G A C G G U A G G A A U U C C C A G A A A A U A A A U U C C G A A G A A A A  
C A A C A A U U U U G C A A A C A U A G A A G A G C G G C C G C

20

配列番号 16 :

G G G A C G G U A G G A A U U C C C A U G A C U G A A A A A C G U C A G U A A A  
A U C C G A A A A U C A U A U C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号 17 :

G G G A C G G U A G G A A U U C C G U U C G C A G A A A C G A A C U U U U A A A  
A A A U G U A C G U G G G A G C A C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号 18 :

G G G A C G G U A G G A A U U C G A A C G A C A A A U U A U A G A A C U U C G U  
U U G A C A U U C C A C A C C A C A U A G A A G A G C G G C C G C

30

配列番号 19 :

G G G A C G G U A G G A A U U C C C A C U G C A A U U C A G C A G A A A A A A U  
U C C G A A A A A C A C A C A C C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号 20 :

G G G A C G G U A G G A A U U C A A A A U C A G C U G A U U U G U A A U U U U U  
U U A C A C A G G C A A A A C A C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号 21 :

$X_1$  G A U A G A N<sub>1</sub> N<sub>2</sub> U A A X<sub>2</sub>

【 0 0 8 3 】

8 ラウンドまで行った上記 S E L E X を同様の条件で継続し、11 ラウンド目に93 クロ  
ローンの配列を調べた。それらクローンの一部の配列を配列番号 22 ~ 27 に示す。8 ラ  
ウンド後の配列と同配列であったものとして、配列番号 4 で表される配列が 22 配列、配  
列番号 14 で表される配列が 4 配列存在した。これは配列番号 21 で表される共通配列が  
濃縮されたことを意味する。また、配列番号 5 で表される配列が 1 配列存在した。その他  
に、配列番号 22 で表される配列が 3 配列、配列番号 23 及び 24 で表される配列は 2 配  
列存在した。配列番号 25 ~ 27 で表される配列は 1 配列であった。配列番号 22 と 11  
は配列中の一塩基のみが異なる。配列番号 26 と 4 は配列中の一塩基のみが異なる。配列  
番号 21 で表される共通配列は 93 クローン中 35 クローンに含まれていた。11 ラウン  
ドで新しく出現した配列中では、配列番号 25、及び 26 の配列に配列番号 21 で表され  
る共通配列が含まれていた。配列番号 22 ~ 27 で表される配列のアプタマーの二次構造

40

50

予測を図2に示す。配列番号21で表される共通配列の部分を丸( )で囲った。それらは図1同様、全て特徴的なループ構造となった。

【0084】

以下にそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表すものとし、プリン塩基(A及びG)は2'-OH体であり、ピリミジン塩基(U及びC)は2'-フルオロ修飾体である。

【0085】

配列番号22:

G G G A C G G U A G G A A U U C C C G A C A C A A A A U G U G U G A U U A A U U  
C C G A A C A A C A A A G U A A C A U A G A A G A G C G G C C G C

10

配列番号23:

G G G A C G G U A G G A A U U C A U A U G U A C U C C G U C C U G A C A A A A U  
G U C A A U G A C A A A C G U U C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号24:

G G G A C G G U A G G A A U U C C C U U C A U A G U A G A A U G U U G G U U U C  
U A C A A A A G C G A C A A G C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号25:

G G G A C G G U A G G A A U U C A G C U G A C U C C A A U G C A C A C G U A G A  
U A G A G U U A A A A C G U U G C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号26:

G G G A C G G U A G G A A U U C G U C G A U U C U A C A G A U A G A G A U A A A  
G U A G A A U U U A A C A A A A C A U A G A A G A G C G G C C G C

20

配列番号27:

G G G A C G G U A G G A A U U C C G U C A U C G G U U G C A A A U U G A A A A U  
A C A A A A C A A G G A C A A C C A U A G A A G A G C G G C C G C

【0086】

上記8ラウンドのSELEXの後、標的物質としてHeparin Sepharose 6 Fast Flow (GEヘルスケア社製)の担体に固相化したキマーゼ(Human Skin、Calbiochem社製)を用いて、さらにSELEXを継続した。キマーゼ溶液を担体に加え、室温で30分保持することで、キマーゼを担体に固相化した。固相化量は、固相化前のキマーゼ溶液と固相化直後の上清をSDS-PAGEにより調べることで確認した。SDS-PAGEの結果、上清からはキマーゼのバンドは検出されず、使用したキマーゼのほぼ全てが固相化されたことが確認された。約100 pmolのキマーゼが約3 µLの樹脂に固相化されたことになる。

30

【0087】

11ラウンド目のプールをクローニングし、79クローンの配列を決定した。それらクローンの一部の配列を配列番号28~34に示す。上記8ラウンド後の配列と同配列であったものとして、配列番号4で表される配列が9配列、配列番号19で表される配列が1配列存在し、上記11ラウンド後の配列と同配列であったものとして、配列番号27で表される配列が2配列存在した。その他に、配列番号28で表される配列が4配列、配列番号29で表される配列が2配列存在した。配列番号30~34で表される配列は1配列であった。配列番号30と31は配列中の一塩基のみが異なる。配列番号32は配列番号31が一塩基欠失した配列である。配列番号21で表される共通配列は79クローン中14クローンに含まれていた。11ラウンドで新しく出現した配列中では、配列番号30~32、及び34の配列に配列番号21で表される共通配列が含まれていた。配列番号28~34で表される配列のアプタマーの二次構造予測を図3に示す。配列番号21で表される共通配列の部分を丸( )で囲った。配列番号21で表される共通配列の部分は、配列番号34で表されるクローン以外、全て図1同様の特徴的なループ構造となった。

40

【0088】

以下に配列番号28~34で表されるそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及が

50

なければ、以下に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表すものとし、プリン塩基(A及びG)は2'-OH体であり、ピリミジン塩基(U及びC)は2'-フルオロ修飾体である。

配列番号28:

G G G A C G G U A G G A A U U C A A U U U C U U U C U A U U C U C A C C U G A G  
U A U A U C A G G C A C A G U A C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号29:

G G G A C G G U A G G A A U U C A C G A C C G C C C A A A A A U G G U G A C A  
U U U U A G A A A C A C C G A A C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号30:

G G G A C G G U A G G A A U U C G U C C C U C U U G U C U A U U U U G C A G A U  
A G A C U U A A A G C A A A C A U A G A A G A G C G G C C G C

10

配列番号31:

G G G A C G G U A G G A A U U C G U C C C U C A U G U C U A U U U U G C A G A U  
A G A C U U A A A G C A A A C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号32:

G G G A C G G U A G G A A U U C G U C C U C A U G U C U A U U U U G C A G A U A  
G A C U U A A A G C A A A C A U A G A A G A G C G G C C G C

配列番号33:

G G G A C G G U A G G A A U U C C U G U C U U U U C C C A C G C A A C A A A U U  
A C A G A G C U U U G C A A A A C A U A G A A G A G C G G C C G C

20

配列番号34:

G G G A C G G U A G G A A U U C U G C C G C A A C C C A A U G A A A A C G A A G  
A U A G A G A U A A A U C G A A C A U A G A A G A G C G G C C G C

【0089】

配列番号4~20と22~34で表される核酸のキマーゼに対する結合活性を表面プラズモン共鳴法により評価した。測定にはGEヘルスケア社製のBiacore T100を用いた。センサーチップにはストレプトアビジンが固定化されているSAチップを用いた。これに、5'末端にビオチンが結合している16ヌクレオチドのPoly dTを1500RU程度結合させた。リガンドとなる核酸は、3'末端に16ヌクレオチドのPoly Aを付加し、TとAのアニールリングによりSAチップに固定化した。流速20μL/minで核酸を20μLインジェクトし、約1000RUの核酸を固定化した。アナライズ用のキマーゼは0.2μMに調製し、20μLインジェクトした。ランニングバッファーには溶液Aを用いた。

30

【0090】

測定の結果、測定した全ての配列がキマーゼと結合することがわかった(表1)。しかし、ネガティブコントロールとして用いた40ヌクレオチドのランダム配列を含む1ラウンド目に使用した核酸プール(40N)もキマーゼと弱い結合活性を示すことがわかった。そこで、表1では40Nよりも結合活性が高いアプタマーを++、40Nと同等のものを+で示した。また、配列番号12及び13で表されるアプタマーがキマーゼと結合する様子を示すセンサーグラムを図4に示す。

40

配列番号21で表される共通配列の有無にかかわらず、40Nよりも結合活性が高いものと、40Nと同等なものが存在した。この共通配列を含む配列番号4、13、14、25、26、30は40Nよりも結合活性が高かったが、同様の共通配列を含む配列番号31、32、34は40Nと同等であった。配列番号21の配列中に含まれるN<sub>1</sub>N<sub>2</sub>はGA、GU、UU、CUでよいことがわかった。配列番号21の配列中に含まれるX<sub>1</sub>とX<sub>2</sub>は共にAでよいことがわかった。

【0091】



の配列領域を生じる。プライマー Fwd は T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を含んでいる。最初のラウンドで用いた RNA プールのバリエーションは理論上  $10^{14}$  であった。

【0096】

キマーゼが固相化された担体に RNA プールを加え、30分室温で保持した後、キマーゼに結合しない RNA を取り除くために、溶液 C で樹脂を洗浄した。ここで溶液 C は 145 mM 塩化ナトリウム、5.4 mM 塩化カリウム、1.8 mM 塩化カルシウム、0.8 mM 塩化マグネシウム、20 mM トリス (pH 7.6)、0.05% Tween 20 の混合溶液である。キマーゼに結合した RNA は、溶出液として溶液 D を加えて室温で 10 分間攪拌することで回収した。ここで溶液 D とは、溶液 C に 6 M グアニジン塩酸塩を加え、pH 7.6 に調製したものである。溶出操作は 3 回行った。回収された RNA は RT-PCR で増幅し、DuraScribe<sup>TM</sup> T7 Transcription Kit で転写して次のラウンドのプールとして用いた。以上を 1 ラウンドとし、同様の作業を複数回繰り返し行った。SELEX 終了後、PCR 産物を pGEM-T Easy ベクター (Promega 社製) にクローニングし、大腸菌株 DH5 (Toyobo 社製) をトランスフォーメーションした。シングルコロニーからプラスミドを抽出後、DNA シーケンサー (3130xl Genetic Analyzer、ABI 社製) でクローンの塩基配列を調べた。

SELEX 8 ラウンド終了後に配列を調べたところ、まだ配列に収束は見られなかった。そこで、競合剤として 2 mg/mL のヘパリンを加えて 11 ラウンドまで進めた。40 クローンの配列を決定したところ、収束が見られ、40 クローンすべての配列に配列番号 21 で表される共通配列が含まれていた。これらのクローンの一部の配列を配列番号 38 ~ 48 に示す。配列番号 38 で表される配列は 6 配列存在し、配列番号 39 で表される配列は 2 配列存在した。配列番号 40 ~ 48 は 1 配列存在した。

配列番号 38 ~ 40、43、48 で表される配列のアプタマーの二次構造予測を図 5 に示す。図 5 中、配列番号 21 で表される共通配列は丸 ( ) で囲んだ。配列番号 21 で表される共通配列の多くは図 1 で示したものと同様の特徴的なループ構造を形成した。

【0097】

以下に配列番号 38 ~ 48 で表されるそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5' から 3' の方向で表すものとし、プリン塩基 (A 及び G) は 2' - OH 体であり、ピリミジン塩基 (U 及び C) は 2' - フルオロ修飾体である。

【0098】

配列番号 38 :

G G G A G C A G G A G A G A G G U C A G A U G G A U A G A G U U A A G A U C U G  
G C U G G C G C A U U A G C C U A U G C G U G C U A G U G U G A

配列番号 39 :

G G G A G C A G G A G A G A G G U C A G A U G G U U A C G G A U A G A G U U A A  
G G U A A C G G U A C G G C C U A U G C G U G C U A G U G U G A

配列番号 40 :

G G G A G C A G G A G A G A G G U C A G A U G A A C G G A U A G A G C U A A G A  
G U U C G U C A G A G G G C C U A U G C G U G C U A G U G U G A

配列番号 41 :

G G G A G C A G G A G A G A G G U C A G A U G G U G A G A U A G A G U U A A A C  
A C C A C A A U A G U A G C C U A U G C G U G C U A G U G U G A

配列番号 42 :

G G G A G C A G G A G A G A G G U C A G A U G C G U G A U C G U G C A A G G C G  
G A U A G A G U U A A G G C C U A U G C G U G C U A G U G U G A

配列番号 43 :

G G G A G C A G G A G A G A G G U C A G A U G A U G C C A A G A U A G A U U U A

10

20

30

40

50

A A U G G C G U U U G G G C C U A U G C G U G C U A G U G U G A

配列番号 44 :

G G G A G C A G G A G A G A G G U C A G A U G U U A G A C C A A A G C A U A G G  
A G A U A G A G U U A A A C C U A U G C G U G C U A G U G U G A

配列番号 45 :

G G G A G C A G G A G A G A G G U C A G A U G G A C C A C C G A U G G G C A A G  
A U A G A G U U A A A U G C C U A U G C G U G C U A G U G U G A

配列番号 46 :

G G G A G C A G G A G A G A G G U C A G A U G G G A C A G A U A G A G U U A A A  
G U C C G U U A C G U G G C C U A U G C G U G C U A G U G U G A

10

配列番号 47 :

G G G A G C A G G A G A G A G G U C A G A U G G U G A U A G A U A G A G U U A A  
A A U C G C U G A A U G G C C U A U G C G U G C U A G U G U G A

配列番号 48 :

G G G A G C A G G A G A G A G G U C A G A U G U G A A G A U A G A G A U A A A U  
C A C A U A C A G U C G G C C U A U G C G U G C U A G U G U G A

【 0 0 9 9 】

配列番号 38 ~ 48 で表される核酸のキマーゼに対する結合活性を表面プラズモン共鳴法により評価した。配列番号 38 ~ 48 の評価においては、測定は実施例 1 で示した方法と同様の方法を用いて測定した。ランニングバッファーには溶液 C を用いた。測定の結果を表 2 に示す。

20

配列番号 38 ~ 48 で表される核酸は 30 N よりも有意にキマーゼに結合するアプタマーであることが示された。共通配列である配列番号 21 に含まれる X<sub>1</sub> 及び X<sub>2</sub> は共に A もしくは、共に G でよいことがわかった。これら共通配列に含まれる N<sub>1</sub> N<sub>2</sub> は G U、G C、G A、U U でよいことがわかった。

【 0 1 0 0 】

【表 2】

配列番号	長さ	Biacore での結合活性
38	72	++
39	72	++
40	73	++
41	72	++
42	72	++
43	72	++
44	72	++
45	72	++
46	72	++
47	72	++
48	72	++

30

【 0 1 0 1 】

表 2 : キマーゼに対する結合活性。“ ++ ” はネガティブコントロールの 30 N よりも有意にキマーゼに結合するものを表す。ここで 30 N とは 30 ヌクレオチドのランダム配列を含む、1 ラウンド目に使用した核酸プールのことである。

40

【 0 1 0 2 】

実施例 3 : 合成基質を用いたキマーゼ阻害活性の測定

配列番号 4 ~ 20、22 ~ 34、38 ~ 48 で表される核酸がキマーゼの酵素活性を阻害するかどうかを、下記の方法により評価した。キマーゼの基質としてキモトリプシン様プロテアーゼの標準基質である 4 アミノ酸ペプチド Ala - Ala - Pro - Phe を含む Suc - Ala - Ala - Pro - Phe - MCA (ペプチド研究所社製) を選択した。ここで Suc は保護基であるスクシニル基、MCA は 4 - メチルクマリル - 7 - アミド

50

基であり、フェニルアラニンのC末端側が切断されるとAMC(7-アミノ-4-メチルクマリン)が遊離する。このAMCの蛍光を検出することで、キマーゼの酵素活性を測定することができる。アッセイには、96ウェルプレート(F16 Black Maxisorp Fluoronunc、Nunc社製)を用い、反応液量を100 $\mu$ Lとし、溶液Cの緩衝液中で実施した。まず、核酸は溶液C中に0.0027~2 $\mu$ Mの濃度に段階希釈したものを、50 $\mu$ Lずつ用意した。そこに、溶液C中に調製した1mMの基質を10 $\mu$ L添加した後、プレートをマイクロプレートリーダーSpectraMax190(モレキュラーデバイス社製)にセットし、37 $^{\circ}$ Cで5分間保温した。一方で、0.05 $\mu$ g(もしくは0.005 $\mu$ g)のキマーゼ(recombinant、SIGMA社製)を溶液C中に希釈したものを40 $\mu$ L用意し、37 $^{\circ}$ Cで5分間保温した。核酸及び基質からなる混合液に、キマーゼ溶液を加えて、酵素反応を開始させた。反応溶液中の最終キマーゼ濃度は16.7nM(もしくは1.67nM)、最終基質濃度は100 $\mu$ Mである。反応液を含むプレートを、マイクロプレートリーダーSpectraMax190(モレキュラーデバイス社製)にセットし、37 $^{\circ}$ Cで5分間(もしくは30分間)、蛍光強度の変化を経時的に測定した(励起波長380nm、検出波長460nm)。キマーゼ活性により、基質から放出されるAMCの蛍光増加の線形近似を求め、その傾きの値を初速度( $V_{max}$ )とした。コントロールとして、30Nもしくは40N(30個もしくは40個の連続したヌクレオチド; Nは、A、G、C又はTである)の核酸プールを用いた場合(ネガティブコントロール)、及び既知のキモトリプシン様セリンプロテアーゼ阻害剤であるキモスタチンを用いた場合(ポジティブコントロール)において、同様に処理し測定を行った。核酸、阻害剤を含まない場合の反応初速度( $V_0$ )を酵素活性100%とし、各被験物質の阻害率を次式を用いて算出した。

$$\text{阻害率}(\%) = (1 - V_{max} / V_0) \times 100$$

酵素活性を50%阻害するのに要する阻害剤の濃度( $IC_{50}$ )を求めた。その結果を表3に示す。

【0103】

【表3】

配列番号	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	配列番号	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]
4	0.049 $\pm$ 0.003	25	0.079 $\pm$ 0.028
5	0.080 $\pm$ 0.039	26	0.106 $\pm$ 0.004
6	0.456 $\pm$ 0.261	27	>0.5
7	>0.5	28	0.045 $\pm$ 0.004
8	0.453 $\pm$ 0.463	29	>0.5
9	0.273 $\pm$ 0.069	30	0.147 $\pm$ 0.044
10	>0.5	31	0.155 $\pm$ 0.039
11	0.145 $\pm$ 0.036	32	0.235 $\pm$ 0.055
12	0.128 $\pm$ 0.023	33	0.145 $\pm$ 0.088
13	0.058 $\pm$ 0.024	34	0.137 $\pm$ 0.009
14	0.061 $\pm$ 0.053	38	0.050 $\pm$ 0.012
15	0.285 $\pm$ 0.021	40	0.140 $\pm$ 0.085
16	>0.5	41	0.060 $\pm$ 0.017
17	0.092 $\pm$ 0.042	42	0.124 $\pm$ 0.026
18	0.058 $\pm$ 0.021	43	0.081 $\pm$ 0.050
19	0.163 $\pm$ 0.001	44	0.049 $\pm$ 0.013
20	0.282 $\pm$ 0.013	45	0.074 $\pm$ 0.011
22	0.105 $\pm$ 0.009	46	0.038 $\pm$ 0.004
23	0.238 $\pm$ 0.060	47	0.058 $\pm$ 0.012
24	0.092 $\pm$ 0.003	48	0.095 $\pm$ 0.018

【0104】

表3:キマーゼに対する阻害活性( $IC_{50}$ )。“>0.5”は0.5 $\mu$ Mまで濃度範囲で阻害活性が見られなかったことを示す。 $IC_{50}$ 値は2~3回測定の平均値を示す。

## 【 0 1 0 5 】

ネガティブコントロールである30Nもしくは40Nは阻害活性を示さなかった ( $IC_{50} > 0.5 \mu M$ )。また、ポジティブコントロールであるキモスタチンの  $IC_{50}$  値は  $0.1 \mu M \sim 0.2 \mu M$  の値を示した。

以上の結果より、表3に記載されたアプタマーの多くはキマーゼに対する阻害活性を示した。特に  $0.1 \mu M$  以下の  $IC_{50}$  値を示したアプタマーは優れた阻害効果を示したと言える。配列番号21で表される共通配列を含むアプタマーは全て阻害活性示した。またこの結果から、これら共通配列に含まれる  $X_1$ 、 $X_2$  は共にAもしくは、共にGでよく、 $N_1$ 、 $N_2$  はGA、GU、GC、UU又はCUのどれでもよいことが示された。

## 【 0 1 0 6 】

## 実施例4：アプタマーの短鎖化

配列番号4、12、13、14で表されるアプタマーの短鎖化を行った。配列番号4、13、14で表されるアプタマーは配列番号21で表される共通配列を含む。配列番号12はこの共通配列を含まないアプタマーである。短鎖化した配列を配列番号49～57に示す。配列番号49、51、55～57で表されるアプタマーの二次構造予測を図6に示す。図6中、配列番号21で表される共通配列を丸( )で囲った。

## 【 0 1 0 7 】

以下に配列番号49～57で表されるそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表すものとし、プリン塩基(A及びG)は2'-OH体であり、ピリミジン塩基(U及びC)は2'-フルオロ修飾体である。

## 【 0 1 0 8 】

配列番号49：

(配列番号4で表されるクローンを共通配列を含む29ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

G G U U C U A C A G A U A G A G A U A A A G U A G A A C C

配列番号50：

(配列番号4で表されるクローンを共通配列を含む35ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

G G C A U U C U A C A G A U A G A G A U A A A G U A G A A U U U A A C

配列番号51：

(配列番号12で表されるクローンを45ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

C G U U A C A U A A U G U A U A U A C C A G G G U A A C U A A A C A U A G A A G A G C G G

配列番号52：

(配列番号12で表されるクローンを26ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

C C G U A U A U A C C A G G G U A A C U A A A C G G

配列番号53：

(配列番号13で表されるクローンを共通配列を含む42ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

G G G U A A C U A U G G U U A G A U A G A G U U A A A A C C A U A G A A G A C C C

配列番号54：

(配列番号13で表されるクローンを共通配列を含む36ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

U A A C U A U G G U U A G A U A G A G U U A A A A C C A U A G A A G A

配列番号55：

(配列番号13で表されるクローンを共通配列を含む29ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

C U A U G G U U A G A U A G A G U U A A A A C C A U A G

10

20

30

40

50

配列番号 56 :

(配列番号 13 で表されるクローンを共通配列を含む 23ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

G G G U U A G A U A G A G U U A A A A C C C

配列番号 57 :

(配列番号 14 で表されるクローンを共通配列を含む 27ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

G C A U U U G A G A U A G A U U U A A A C A A A C G C

【0109】

配列番号 49 ~ 57 の核酸は全て化学合成により作製した。

これらの核酸がキマーゼと結合するかどうかを、表面プラズモン共鳴法により評価した。測定には、GEヘルスケア社製のBiacore T100を用い、以下に示す方法で測定を行った。CM5チップのセンサーチップ表面に、アミンカップリングキットを使用し、約4000RUのキマーゼ(recombinant、SIGMA社製)を固定化した。流速20 $\mu$ L/minで、アナライトとして0.3 $\mu$ Mに調製した核酸を20 $\mu$ Lインジェクトした。ランニングバッファーには溶液Cを用いた。測定の結果を表4に示す。評価方法は実施例1と同様である。

その結果、配列番号52以外の核酸がコントロールの40Nよりも有意にキマーゼに結合するアプタマーであることが示された(表4)。配列番号13、55、56で表されるアプタマーがキマーゼと結合する様子を示すセンサーグラムを図7に示す。

【0110】

また、キマーゼ阻害活性の測定は、実施例3と同様の方法で行った。それぞれのIC<sub>50</sub>値を表4に示す。

配列番号52以外の核酸に強い阻害活性が認められた(表4)。配列番号51と52の結果より、共通配列を含まない配列番号12で表されるアプタマーは45ヌクレオチドに短鎖化したものでは活性を維持しているが、26ヌクレオチドに短鎖化したものでは活性が消失することがわかった。

一方で、配列番号56の結果より、共通配列を含む配列番号13で表されるアプタマーはより短い23ヌクレオチドの長さまで短鎖化できた。これは、配列番号21で表される共通配列がキマーゼに対する結合及び阻害活性に重要であることを示している。

また、配列番号49と57も阻害活性を示したことより、共通配列に含まれるN<sub>1</sub>N<sub>2</sub>はGUに限らないこと、図6の配列番号56のステム構造に含まれる配列はステム構造を維持する限り特に限定されないことが示された。

これらのアプタマーはキマーゼ阻害剤として使用可能であると考えられる。

【0111】

【表4】

配列番号	親クローンの配列番号	長さ	Biacoreでの結合活性	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]
49	4	29	++	0.117 $\pm$ 0.066
50	4	35	++	0.138 $\pm$ 0.093
51	12	45	++	0.024 $\pm$ 0.009
52	12	26	+	>1
53	13	42	++	0.066 $\pm$ 0.024
54	13	36	++	0.051 $\pm$ 0.033
55	13	29	++	0.055 $\pm$ 0.023
56	13	23	++	0.046 $\pm$ 0.031
57	14	27	++	0.099 $\pm$ 0.013

【0112】

表4: キマーゼに対する結合活性と阻害活性(IC<sub>50</sub>)。 “++” はネガティブコントロールの40Nよりも有意にキマーゼに結合するもの、“+” はネガティブコントロールの40Nと同程度の結合のものを表す。ここで40Nとは40ヌクレオチドのランダム配

列を含む、実施例 1 で使用した 1 ラウンド目の核酸プールである。“> 1” は 1  $\mu$ M までの濃度範囲で阻害活性が見られなかったことを示す。IC<sub>50</sub> 値は 2 ~ 3 回測定の平均値を示す。

【0113】

ネガティブコントロールである 40N は 1  $\mu$ M までの濃度範囲で阻害活性を示さなかった (IC<sub>50</sub> > 1  $\mu$ M)。また、ポジティブコントロールであるキモスタチンの IC<sub>50</sub> 値は 0.1  $\mu$ M ~ 0.2  $\mu$ M の値を示した。

以上の結果より、表 4 に含まれる配列番号 52 以外の核酸はキマーゼに対する阻害活性を示した。特に 0.1  $\mu$ M 以下の IC<sub>50</sub> 値を示した核酸は優れた阻害効果を示したと言える。

【0114】

実施例 5：短鎖化したアプタマーの塩基の置換、欠損の効果

配列番号 56 で表されるアプタマーに変異、欠損を導入し、結合活性及び阻害活性に対する影響を調べた。配列を配列番号 58 ~ 68 に示す。

【0115】

以下に配列番号 58 ~ 68 で示される各アプタマーのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5' から 3' の方向で表すものとし、ヌクレオチドにおける括弧はそのリボースの 2' 位の修飾を示し (例えば、U (F) と表記する場合、ウラシルのリボースの 2' 位が F で修飾されることを示す)、F はフッ素原子を示す。

【0116】

配列番号 58：

(配列番号 56 で表されるクローンの共通配列に含まれる 13 個の核酸塩基をランダムに配置した配列)

G G G U ( F ) U ( F ) G A A G A U ( F ) A U ( F ) U ( F ) A A A G A A C ( F ) C ( F ) C ( F )

配列番号 59：

(配列番号 56 で表されるクローンの共通配列に含まれる N<sub>2</sub> を置換した配列)

G G G U ( F ) U ( F ) A G A U ( F ) A G A G A U ( F ) A A A A A C ( F ) C ( F ) C ( F )

配列番号 60：

(配列番号 56 で表されるクローンの共通配列に含まれる N<sub>2</sub> を置換した配列)

G G G U ( F ) U ( F ) A G A U ( F ) A G A G C ( F ) U ( F ) A A A A A C ( F ) C ( F ) C ( F )

配列番号 61：

(配列番号 56 で表されるクローンの共通配列に含まれる N<sub>1</sub> を置換した配列)

G G G U ( F ) U ( F ) A G A U ( F ) A G A U ( F ) U ( F ) U ( F ) A A A A A C ( F ) C ( F ) C ( F )

配列番号 62：

(配列番号 56 で表されるクローンの共通配列に含まれる X<sub>1</sub> 及び X<sub>2</sub> を置換した配列)

G G G U ( F ) U ( F ) G G A U ( F ) A G A G U ( F ) U ( F ) A A G A A C ( F ) C ( F ) C ( F )

配列番号 63：

(配列番号 56 で表されるクローンの共通配列以外に含まれる塩基配列を置換した配列)

G C ( F ) U ( F ) A C ( F ) A G A U ( F ) A G A G U ( F ) U ( F ) A A A G U ( F ) A G C ( F )

配列番号 64：

(配列番号 56 で表されるクローンの共通配列以外に含まれる塩基配列を置換した配列)

G U ( F ) C ( F ) A C ( F ) A G A U ( F ) A G A G U ( F ) U ( F ) A A A G U ( F ) G A C ( F )

10

20

30

40

50

配列番号 65 :

(配列番号 56 で表されるクローンの共通配列以外に含まれる塩基配列を一部置換させ、一部欠損させた配列)

G G C ( F ) A G A U ( F ) A G A G U ( F ) U ( F ) A A A G C ( F ) C ( F )

配列番号 66 :

(配列番号 56 で表されるクローンの共通配列に含まれるプリン塩基をピリミジン塩基に置換した配列)

G G G U ( F ) U ( F ) A G A U ( F ) C G A G U ( F ) U ( F ) A A A A A C ( F ) C ( F ) C ( F )

配列番号 67 :

(配列番号 56 で表されるクローンの共通配列に含まれるプリン塩基をピリミジン塩基に置換した配列)

G G G U ( F ) U ( F ) A G A U ( F ) A C A G U ( F ) U ( F ) A A A A A C ( F ) C ( F ) C ( F )

配列番号 68 :

(配列番号 56 で表されるクローンの共通配列に含まれるプリン塩基をピリミジン塩基に置換した配列)

G G G U ( F ) U ( F ) A G A U ( F ) A G U G U ( F ) U ( F ) A A A A A C ( F ) C ( F ) C ( F )

【 0 1 1 7 】

配列番号 58 ~ 68 の核酸は全て化学合成により作製した。これらの核酸がキマーゼと結合するかどうかについて、実施例 4 と同様にして、表面プラズモン共鳴法により評価した。キマーゼに対する阻害活性の測定は、実施例 3 と同様に行った。測定結果を表 5 に示す。

その結果、表 5 に含まれる核酸のうち配列番号 59 ~ 65 の核酸が強い結合力と阻害活性を保持していることがわかった。

【 0 1 1 8 】

配列番号 58 は、結合活性、阻害活性共に、実施例 1 や 2 で用いた 40 N / 30 N と同程度まで低下したことから、配列番号 21 で表される共通配列がキマーゼに対する結合及び阻害活性に重要であることが示された。またこの結果より、これ以降の実施例 (実施例 5 ~ 9 ) においては、短鎖化したアプタマーのネガティブコントロールとして配列番号 58 を用いることにした。

配列番号 59 ~ 61 の結果より、共通配列に含まれる  $N_1$  及び  $N_2$  は任意のヌクレオチドであってよいが、好ましくは G U、G A、G C、U U であることが示された。配列番号 62 の結果より、 $X_1$  及び  $X_2$  は任意のヌクレオチドであってよいが、好ましくは A または G であり、より好ましくは共に A もしくは共に G であることが示された。

配列番号 63 ~ 65 の結果より、共通配列以外に含まれるステム構造の塩基対配列は (例 : 図 6 の配列番号 56 )、ステム構造を保つ限り任意のヌクレオチドであってよく、長さは 3 塩基対以上が好ましいことが示された。

配列番号 66 ~ 68 の結果より、共通配列に変異を導入すると活性が低下することから、共通配列の重要性が改めて示された。

【 0 1 1 9 】

10

20

30

40

【表5】

配列番号	Biacore での結合活性	IC <sub>50</sub> [μM]
58	+	>1
59	++	0.038±0.009
60	++	0.026±0.006
61	++	0.023±0.006
62	++	0.029±0.004
63	++	0.023±0.003
64	++	0.020±0.005
65	++	0.056±0.046
66	+	>1
67	+	>1
68	+	>1

10

## 【0120】

表5：キマーゼに対する結合活性と阻害活性（IC<sub>50</sub>）。結合活性において、“++”はネガティブコントロールである配列番号58よりも有意にキマーゼに結合するもの、“+”はネガティブコントロールである配列番号58と同程度の結合のものを表す。阻害活性において、“>1”は1 μMまでの濃度範囲で阻害活性が見られなかったことを示す。IC<sub>50</sub>値は2回測定の平均値を示す。

20

## 【0121】

配列番号58は1 μMまでの濃度範囲で阻害活性を示さなかった（IC<sub>50</sub> > 1 μM）。また、ポジティブコントロールであるキモスタチンのIC<sub>50</sub>値は0.1 μM ~ 0.2 μMの値を示した。以上の結果より、表5に記載のあるアプタマーのうち、配列番号59 ~ 65で表されるアプタマーはキマーゼに対する強い阻害活性（IC<sub>50</sub> < 0.1 μM）を有していることがわかる。

## 【0122】

実施例6：短鎖化したアプタマーの改変1

配列番号56で表されるアプタマーのヌクレアーゼ耐性を高めるために、末端修飾した改変体、配列中のプリン塩基のリボースの2'位にO-メチル基あるいはF修飾を導入した改変体、その他に、ホスホロチオエートを導入した改変体を作製した。配列を配列番号56(1) ~ 56(14)、56(17) ~ 56(19)に示す。また、配列番号56で表されるアプタマーの共通配列に含まれるピリミジンヌクレオチドの修飾(2'-F; リボース2位のF修飾)を天然型(2'-OH)に置換した改変体を作製し、修飾の必要性について評価した。それらの配列を配列番号56(15)、56(16)に示す。

30

## 【0123】

以下にそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表すものとし、ヌクレオチドにおける括弧はそのリボースの2'位の修飾を示し、Fはフッ素原子、MはO-メチル基を示す。また、各配列末端におけるidTはinverted-dTによる修飾を示し、PEGは40kDaの分岐型ポリエチレングリコールによる修飾を示す。配列中におけるsはヌクレオチド同士を結合するリン酸基がホスホロチオエート化されたことを示す。

40

## 【0124】

配列番号56(1)：

(配列番号56で表されるクローンの両末端にidT修飾を導入した配列)

idT - GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC  
(F)C(F)C(F) - idT

50

配列番号 56 ( 2 ) :

( 配列番号 56 で表されるクローンの共通配列以外の配列のうち三か所に修飾を導入した配列 )

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

配列番号 56 ( 3 ) :

( 配列番号 56 で表されるクローンの共通配列以外の配列のうち二か所に修飾を導入した配列 )

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

10

配列番号 56 ( 4 ) :

( 配列番号 56 で表されるクローンの共通配列のうち一か所に修飾を導入した配列 )

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

配列番号 56 ( 5 ) :

( 配列番号 56 で表されるクローンの共通配列のうち二か所に修飾を導入した配列 )

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

配列番号 56 ( 6 ) :

( 配列番号 56 で表されるクローンの共通配列のうち一か所に修飾を導入した配列 )

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

20

配列番号 56 ( 7 ) :

( 配列番号 56 で表されるクローンの共通配列のうち一か所に修飾を導入した配列 )

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

配列番号 56 ( 8 ) :

( 配列番号 56 で表されるクローンの共通配列のうち一か所に修飾を導入した配列 )

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

30

配列番号 56 ( 9 ) :

( 配列番号 56 で表されるクローンの共通配列のうち一か所に修飾を導入した配列 )

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

配列番号 56 ( 10 ) :

( 配列番号 56 で表されるクローンの共通配列のうち一か所に修飾を導入した配列 )

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

配列番号 56 ( 11 ) :

( 配列番号 56 で表されるクローンの共通配列のうち一か所に修飾を導入した配列 )

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

40

配列番号 56 ( 12 ) :

( 配列番号 56 で表されるクローンの共通配列のうち一か所に修飾を導入した配列 )

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

配列番号 56 ( 13 ) :

( 配列番号 56 で表されるクローンの共通配列のうち一か所に修飾を導入した配列 )

G G G U ( F ) U ( F ) A G A U ( F ) A G ( F ) A G U ( F ) U ( F ) A A A A A C ( F )  
C ( F ) C ( F )

50

配列番号 56 (14) :

(配列番号 56 で表されるクローンの共通配列のうち一か所に修飾を導入した配列)

G G G U ( F ) U ( F ) A G A U ( F ) A G A ( F ) G U ( F ) U ( F ) A A A A A C ( F ) C ( F ) C ( F )

配列番号 56 (15) :

(配列番号 56 で表されるクローンの 9 番目のヌクレオチド U ( F ) を U に置換した配列)

G G G U ( F ) U ( F ) A G A U A G A G U ( F ) U ( F ) A A A A A C ( F ) C ( F ) C ( F )

配列番号 56 (16) :

(配列番号 56 で表されるクローンの 15 番目のヌクレオチド U ( F ) を U に置換した配列)

G G G U ( F ) U ( F ) A G A U ( F ) A G A G U ( F ) U A A A A A C ( F ) C ( F ) C ( F )

配列番号 56 (17) :

(配列番号 56 で表されるクローンの末端に PEG と i d T 修飾を導入した配列)

P E G - G G G U ( F ) U ( F ) A G A U ( F ) A G A G U ( F ) U ( F ) A A A A A C ( F ) C ( F ) C ( F ) - i d T

配列番号 56 (18) :

(配列番号 56 で表されるクローンの共通配列のうち一か所のリン酸基をホスホロチオエート化した配列)

G G G U ( F ) U ( F ) s A G A U ( F ) A G A G U ( F ) U ( F ) A A A A A C ( F ) C ( F ) C ( F )

配列番号 56 (19) :

(配列番号 56 で表されるクローンの共通配列のうち一か所のリン酸基をホスホロチオエート化した配列)

G G G U ( F ) U ( F ) A s G A U ( F ) A G A G U ( F ) U ( F ) A A A A A C ( F ) C ( F ) C ( F )

#### 【 0 1 2 5 】

配列番号 56 (1) ~ 56 (19) の核酸は全て化学合成により作製した。これらの核酸がキマーゼと結合するかどうかを、実施例 4 と同様にして、表面プラズモン共鳴法により評価した。結果を表 6 に示す。

その結果、配列番号 56 (8)、56 (10)、56 (13)、56 (14) 以外の核酸は、ネガティブコントロールである配列番号 58 よりも有意にキマーゼに対する結合活性を示した。

#### 【 0 1 2 6 】

キマーゼに対する阻害活性の測定は、実施例 3 と同様の方法で行った。I C<sub>50</sub> 値を表 6 に示した。配列番号 56 (8)、56 (10)、56 (13)、56 (14) 以外の核酸は、阻害活性の強弱はあるものの、これらのアプタマーに阻害活性があることがわかった。I C<sub>50</sub> 値を比較すると、配列番号 56 (1) ~ 56 (7)、56 (11)、56 (12) の阻害活性は配列番号 56 とほぼ同程度に保持されていた。一方で配列番号 56 (9)、56 (15)、56 (16)、56 (17) の阻害活性は配列番号 56 と比べて減弱し、配列番号 56 (8)、56 (10)、56 (13)、56 (14) の阻害活性は消失することが示された。さらに、配列番号 56 (18)、56 (19) の阻害活性は配列番号 56 よりも向上することが示された。

配列番号 56 (1)、56 (17) の結果より、末端修飾による活性の影響は少ないことがわかった。配列番号 56 (2)、56 (3) の結果より、ステム配列の修飾による活性の影響はないことが示された。共通配列に含まれるヌクレオチドに関しては、56 (4) ~ 56 (7)、56 (11)、56 (12) のように修飾しても阻害活性を保持できた場合と、配列番号 56 (8)、56 (9)、56 (10)、56 (13)、56 (14)

10

20

30

40

50

のように、修飾により阻害活性が低下（あるいは消失）した場合があった。

【 0 1 2 7 】

以上より、配列番号 5 6 で表されるアプタマーは安定性を向上させるため、少なくとも一つのヌクレオチドに修飾を導入したものであってもよいことがわかった。ヌクレオチドの修飾としては、2' - O - メチル修飾以外にも、例えば 2' - アミノ修飾などが挙げられる。

一方で配列番号 5 6 ( 1 5 )、5 6 ( 1 6 ) の結果より、配列番号 5 6 で表されるクローンの共通配列に含まれるヌクレオチド修飾体 ( U ( F ) ) のうちいずれか ( 9 番目もしくは 1 5 番目 ) を天然型のリボヌクレオチド ( U ) にすると阻害活性が低下することがわかった。一般に、修飾体が含まれることでアプタマーのヌクレアーゼ耐性は向上する。したがって、共通配列に含まれるピリミジンヌクレオチド ( 配列番号 5 6 で表されるクローンの 9 番目と 1 5 番目の U ) の少なくともどちらか一方は修飾体であることが好ましい。

また、配列番号 5 6 ( 8 )、5 6 ( 9 )、5 6 ( 1 0 )、5 6 ( 1 3 )、5 6 ( 1 4 ) の結果より、配列番号 5 6 で表されるクローンの共通配列に含まれる天然のプリン塩基のうち、6 番目の A、1 1 番目の G、1 2 番目の A は修飾を導入すると阻害活性が低下するため、少なくともひとつは天然のリボヌクレオチドであることが好ましい。

その他に、配列番号 5 6 ( 1 8 )、5 6 ( 1 9 ) の結果より、糖残基の修飾以外にリン酸基の修飾として、少なくとも一か所にホスホロチオエートを導入すると阻害活性が向上することが分かった。

【 0 1 2 8 】

【 表 6 】

配列番号	Biacore での結合活性	IC <sub>50</sub> [μM]
56	++	0.027±0.002
56(1)	++	0.026±0.007
56(2)	++	0.024±0.003
56(3)	++	0.025±0.002
56(4)	++	0.027±0.005
56(5)	++	0.029±0.001
56(6)	++	0.031±0.001
56(7)	++	0.038±0.001
56(8)	+	>1
56(9)	++	0.111±0.003
56(10)	+	>1
56(11)	++	0.028±0.003
56(12)	++	0.035±0.003
56(13)	+	>1
56(14)	+	>1
56(15)	++	0.061±0.014
56(16)	++	0.058±0.002
56(17)	n.d.	0.058±0.000
56(18)	++	0.012±0.001
56(19)	++	0.008±0.001

【 0 1 2 9 】

表 6 : キマーゼに対する結合活性と阻害活性 ( IC<sub>50</sub> )。結合活性において、“ ++ ”

はネガティブコントロールの配列番号58よりも有意にキマーゼに結合するものを示し、“+”はネガティブコントロールの配列番号58と同程度に結合するものを示す。“n.d.”は未測定を表す。“>1”は1 μMまでの濃度範囲で阻害活性が見られなかったことを示す。IC<sub>50</sub>値は2回測定の平均値を示す。

【0130】

ネガティブコントロールである配列番号58は1 μMまでの濃度範囲で阻害活性を示さなかった(IC<sub>50</sub>>1 μM)。また、ポジティブコントロールであるキモスタチンのIC<sub>50</sub>値は0.1 μM~0.2 μMの値を示した。

【0131】

以上の結果より、表6に含まれる核酸のうち、特に0.1 μM以下のIC<sub>50</sub>値を示したものは、キマーゼに対する強い阻害活性を有し、キマーゼ阻害剤として使用可能であることが示された。

10

【0132】

実施例7：短鎖化したアプタマーの改変2

実施例6の結果を踏まえて、配列番号56で表されるアプタマーのさらなる改変を行った。2'-O-メチル基の導入、様々な末端修飾、ホスホロチオエートの導入、リボヌクレオチドのDNAへの置換等について検討した改変体、またそれらの組み合わせによる改変体を作製した。配列を配列番号56(20)~56(47)、61(1)、69、69(1)、69(2)、70~74、74(1)、75~77、77(1)、77(2)、78~82に示す。

20

【0133】

以下にそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表すものとし、大文字はRNAを示し、小文字はDNAを示す。ヌクレオチドにおける括弧はそのリボースの2'位の修飾を示し、Fはフッ素原子、MはO-メチル基を示す。また、各配列末端におけるidTはinverted-dTによる修飾を示し、PEGは40kDaの分岐型ポリエチレングリコールによる修飾を示し、Choはコレステロールによる修飾を示し、Bはビオチンによる修飾を示す。Peptide1はPhe-CysがC末端側で、Peptide2はCys-PheがN末端側で、それぞれジスルフィド結合を介して核酸の5'末端に結合していることを示す。配列中におけるsはヌクレオチド同士を結合するリン酸基がホスホロチオエート化されたことを示す。

30

【0134】

配列番号56(20)：

G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG  
U(F)U(F)A(M)A(M)AA(M)A(M)C(F)C(F)C(F)

配列番号56(21)：

G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG  
(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)C(F)C(F)C  
(F)

配列番号56(22)：

G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)sAG(M)A(M)U(F)A(M)GA  
G(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)C(F)C(F)  
C(F)

40

配列番号56(23)：

G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AsG(M)A(M)U(F)A(M)GA  
G(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)C(F)C(F)  
C(F)

配列番号56(24)：

idT-G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AGA(U)AGAGU(F)U  
(F)AAA(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

50

配列番号 56 ( 25 ) :

i d T - G G G U ( F ) U ( F ) A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M ) G A G U ( F ) U  
( F ) A A A A C ( F ) C ( F ) C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 26 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M )  
) G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C  
( F ) C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 27 ) :

P E G - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M )  
) G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C  
( F ) C ( F ) - i d T

10

配列番号 56 ( 28 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A s G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M )  
) G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F )  
C ( F ) C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 29 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) s A s G ( M ) A ( M ) U ( F ) A  
( M ) G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F )  
) C ( F ) C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 30 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G A ( M ) U ( F ) A ( M ) G A  
G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F )  
C ( F ) - i d T

20

配列番号 56 ( 31 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) A U ( F ) A ( M ) G A  
G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F )  
C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 32 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G A U ( F ) A ( M ) G A G ( M )  
) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F ) C ( F )  
) - i d T

30

配列番号 56 ( 33 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A s G A ( M ) U ( F ) A ( M ) G  
A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F )  
) C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 34 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A s G ( M ) A U ( F ) A ( M ) G  
A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F )  
) C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 35 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A s G A U ( F ) A ( M ) G A G ( M )  
) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F ) C ( F )  
C ( F ) - i d T

40

配列番号 56 ( 36 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G s A U ( F ) A ( M ) G A G ( M )  
) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F ) C ( F )  
C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 37 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A s G s A U ( F ) A ( M ) G A G  
( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F ) C

50

( F ) - i d T

配列番号 56 ( 38 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) s A s G A U ( F ) A ( M ) G A G  
( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F ) C  
( F ) - i d T

配列番号 56 ( 39 ) :

P E G - G G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M ) G A  
G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F )  
C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 40 ) :

i d T - G G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M ) G A  
G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F )  
C ( F ) - i d T

10

配列番号 56 ( 41 ) :

i d T - G G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A s G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M ) G  
A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F )  
) C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 42 ) :

C h o - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M )  
) G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C  
( F ) C ( F ) - i d T

20

配列番号 56 ( 43 ) :

P e p t i d e 1 - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) A ( M ) U ( F )  
( F ) A ( M ) G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M )  
C ( F ) C ( F ) C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 44 ) :

P e p t i d e 2 - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) A ( M ) U ( F )  
( F ) A ( M ) G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M )  
C ( F ) C ( F ) C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 45 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M )  
) G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C  
( F ) C ( F ) - P E G

30

配列番号 56 ( 46 ) :

B - i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A  
( M ) G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F )  
) C ( F ) C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 47 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M )  
) G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C  
( F ) C ( F ) - i d T - B

40

配列番号 56 ( 48 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M )  
) G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) c c c - i  
d T

配列番号 56 ( 49 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) a G ( M ) A U ( F ) A ( M ) G A  
G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F )  
C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 50 ) :

50

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) a U ( F ) A ( M ) G A  
G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F )  
C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 51 ) :

B - i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) a U ( F ) A ( M )  
G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F ) C ( F )  
C ( F ) - i d T

配列番号 56 ( 52 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A g a U ( F ) A ( M ) G A G ( M )  
) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F ) C ( F )  
) - i d T

10

配列番号 61 ( 1 ) :

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

配列番号 69 :

P E G - A ( M ) A ( M ) A ( M ) G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M )  
) A ( M ) U ( F ) A ( M ) G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A  
( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F ) C ( F ) - i d T

20

配列番号 69 ( 1 ) :

i d T - A ( M ) A ( M ) A ( M ) G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A s G ( M )  
M ) A ( M ) U ( F ) A ( M ) G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M )  
A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F ) C ( F ) - i d T

配列番号 69 ( 2 ) :

i d T - A ( M ) A ( M ) A ( M ) G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M )  
) A ( M ) U ( F ) A ( M ) G A G ( M ) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A  
( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F ) C ( F ) - i d T

配列番号 70 :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) t t A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M ) G A G ( M )  
) U ( F ) U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F ) C ( F )  
) - i d T

30

配列番号 71 :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) U ( F ) U ( F ) A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M )  
) G A G ( M ) t U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) C ( F ) C ( F )  
C ( F ) - i d T

配列番号 72 :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) t t A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M ) G A G ( M )  
) t U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) c c c - i d T

配列番号 72 ( 1 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) t t A G ( M ) a U ( F ) A ( M ) G A G ( M ) t U  
( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) c c c - i d T

40

配列番号 72 ( 2 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) t t A s G ( M ) a U ( F ) A ( M ) G A G ( M ) t  
U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) c c c - i d T

配列番号 72 ( 3 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) t t A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M ) G A g t U  
( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) c c c - i d T

配列番号 72 ( 4 ) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) t t A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M ) G A G ( M )  
) t U ( F ) a A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) c c c - i d T

50

配列番号 72 (5) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) t t A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M ) G A G ( M )  
t U ( F ) A ( M ) a A ( M ) A ( M ) A ( M ) c c c - i d T

配列番号 72 (6) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) t t A G ( M ) A ( M ) U ( F ) A ( M ) G A G ( M )  
t U ( F ) A ( M ) A ( M ) a A ( M ) A ( M ) c c c - i d T

配列番号 72 (7) :

i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) t t A G ( M ) a U ( F ) A ( M ) G A G ( M ) t U  
( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) c c c - P E G

配列番号 72 (8) :

B - i d T - G ( M ) G ( M ) G ( M ) t t A G ( M ) a U ( F ) A ( M ) G A G ( M )  
t U ( F ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) A ( M ) c c c - i d T

10

【 0 1 3 5 】

配列番号 56 (20) ~ 56 (52)、61 (1)、69、69 (1)、69 (2)、70 ~ 72、72 (1) ~ 72 (8) の核酸は全て化学合成により作製した。これらの核酸がキマーゼと結合するかどうかについて、実施例 4 と同様にして、表面プラズモン共鳴法により評価した。結果を表 7 に示す。

その結果、すべての核酸 (一部、未測定である核酸は除く) はネガティブコントロールよりも有意にキマーゼに結合した。

キマーゼに対する阻害活性の測定は、実施例 3 と同様に行った。IC<sub>50</sub> 値を表 7 に示す。その結果、表 7 に含まれる核酸のすべてに強い阻害活性が認められた。

20

配列番号 56 (27) および 56 (45) の結果より、例えば PEG のような末端修飾は 5' 末端、3' 末端のいずれであってもよいことが示された。

また配列番号 56 (43)、56 (44)、56 (46)、および 56 (47) の結果より、末端修飾としては、実施例 6 で示した i d T や PEG 以外にペプチド、アミノ酸、あるいはビオチンなどの化合物であってもよいことがわかった。

さらに配列番号 56 (26) と 69 (2)、56 (27) と 69、そして 56 (28) と 69 (1) の結果より、i d T や PEG のような末端修飾はポリヌクレオチド鎖を介して結合させても阻害活性に影響がないことがわかった。このようなスペーサーとしては、任意のポリヌクレオチド鎖以外に、例えばアルキル型スペーサーを用いてもよい。

30

また一部の F 体を DNA 体にすることで阻害活性が向上することが分かった。

【 0 1 3 6 】

【表 7】

配列番号	Biacore での結合活性	IC <sub>50</sub> [μM]	配列番号	Biacore での結合活性	IC <sub>50</sub> [μM]
56(20)	++	0.102±0.009	56(44)	++	0.042±0.007
56(21)	++	0.045±0.006	56(45)	n.d.	0.059±0.006
56(22)	++	0.052±0.002	56(46)	++	0.049±0.002
56(23)	++	0.032±0.003	56(47)	++	0.037±0.006
56(24)	++	0.038±0.003	56(48)	++	0.036±0.003
56(25)	++	0.070±0.009	56(49)	++	0.069±0.000
56(26)	++	0.054±0.002	56(50)	++	0.027±0.002
56(27)	n.d.	0.084±0.006	56(51)	++	0.029±0.003
56(28)	++	0.044±0.002	56(52)	++	0.052±0.001
56(29)	++	0.036±0.003	61(1)	++	0.078±0.004
56(30)	++	0.034±0.003	69	n.d.	0.091±0.019
56(31)	++	0.023±0.001	69(1)	++	0.044±0.002
56(32)	++	0.017±0.000	69(2)	++	0.048±0.002
56(33)	++	0.035±0.002	70	++	0.027±0.004
56(34)	++	0.031±0.006	71	++	0.028±0.005
56(35)	++	0.024±0.005	72	++	0.020±0.002
56(36)	++	0.097±0.017	72(1)	++	0.013±0.003
56(37)	++	0.046±0.007	72(2)	++	0.014±0.002
56(38)	++	0.019±0.005	72(3)	++	0.050±0.004
56(39)	n.d.	0.086±0.018	72(4)	++	0.065±0.002
56(40)	++	0.051±0.001	72(5)	++	0.027±0.002
56(41)	++	0.053±0.013	72(6)	++	0.041±0.002
56(42)	++	0.071±0.001	72(7)	n.d.	0.055±0.002
56(43)	++	0.035±0.003	72(8)	n.d.	0.018±0.001

10

20

## 【 0 1 3 7 】

表 7：キマーゼに対する結合活性と阻害活性（IC<sub>50</sub>）。結合活性において、“++”はネガティブコントロールの配列番号 58 よりも有意にキマーゼに結合するものを示す。“n.d.”は未測定を表す。IC<sub>50</sub> 値は 2 回測定の平均値を示す。

## 【 0 1 3 8 】

ネガティブコントロールである配列番号 58 は 1 μM までの濃度範囲で阻害活性を示さなかった（IC<sub>50</sub> > 1 μM）。また、ポジティブコントロールであるキモスタチンの IC<sub>50</sub> 値は 0.1 μM ~ 0.2 μM の値を示した。

30

## 【 0 1 3 9 】

以上の結果より、表 7 に含まれるすべての核酸はキマーゼに対する強い阻害活性を有し、キマーゼ阻害剤として使用可能であることが示された。

## 【 0 1 4 0 】

以上、実施例 1 から 7 の結果をまとめると、キマーゼ阻害剤として有効なアプタマーは、特に以下の条件の一つ以上を満足するようなアプタマーであるといえる。

(1) 配列番号 21 で表される共通配列（X<sub>1</sub>GAUAGAN<sub>1</sub>N<sub>2</sub>UAAX<sub>2</sub>）を含む。

40

(2) 共通配列に含まれるピリミジンヌクレオチドは、天然型ヌクレオチドであってよいが、好ましくは一部のピリミジンヌクレオチドが修飾ヌクレオチドまたは DNA である。

(3) N<sub>1</sub>N<sub>2</sub> は任意のヌクレオチドであってよいが、好ましくは GU、GA、GC、UU、CU 又は GT である。

(4) X<sub>1</sub> 及び X<sub>2</sub> は任意のヌクレオチドであってよいが、好ましくは同一または異なって、A または G であり、より好ましくは共に A、もしくは共に G である。

(5) ステム構造の塩基対配列（例：図 6 の配列番号 56）は、ステム構造を保つ限り任意のヌクレオチドであってよいが、好ましくは長さが 3 塩基対以上である。

(6) 一部のヌクレオチド（配列番号 56 において、6 番目の A、11 番目の G、12 番目の A）を除き、各ヌクレオチドは部分的に修飾されているか、または部分的に DNA に

50

置換されている。

(7) 末端修飾が導入されている。

(8) ヌクレオチド間のリン酸基の一部が、ホスホロチオエート化されている。

【0141】

実施例8：アンジオテンシンIを基質として用いたキマーゼ阻害活性の測定

本発明の核酸の阻害活性についてさらに評価するため、キマーゼの天然基質であるアンジオテンシンIを用いて、下記の方法によりキマーゼの酵素活性を測定した。アンジオテンシンIはキマーゼによりアンジオテンシンIIに変換され、その際にペプチド断片であるHis-Leuが遊離する。このペプチドHis-Leuはo-フタルアルデヒドにより蛍光誘導体化されるため、その蛍光強度を定量的に測定することが可能である。

10

アッセイにおける酵素反応の溶液量は50 $\mu$ Lとし、溶液Cの緩衝液中で実施した。まず、0.3~0.75ngのキマーゼ(recombinant、(SIGMA社製)もしくはnative(Calbiochem社製))を溶液C中に希釈したものを5 $\mu$ L用意した。ここでrecombinantとは酵母を用いて発現させたキマーゼであり、nativeとはヒト皮膚肥満細胞から精製したキマーゼである。核酸は溶液C中に0.0027~2 $\mu$ Mの濃度で段階希釈したものを、25 $\mu$ Lずつ用意した。キマーゼ溶液5 $\mu$ Lと核酸溶液25 $\mu$ Lを混和し、37 $^{\circ}$ Cで5分間保温した。一方で、溶液C中に調製した125mMアンジオテンシンI(ペプチド研究所社製)を20 $\mu$ L用意し、37 $^{\circ}$ Cで5分間保温した。キマーゼ及び核酸からなる混合液に、アンジオテンシンI溶液を加えて、酵素反応を開始させた。反応溶液中の最終キマーゼ濃度は0.2~0.5nM、最終基質濃度は50 $\mu$ Mである。37 $^{\circ}$ Cで90分間反応させた後、氷冷した30%トリクロロ酢酸溶液を25 $\mu$ L添加し、反応を停止させた。混合液全体を4 $^{\circ}$ C、14000rpmで10分間遠心し、その上清30 $\mu$ Lを次の蛍光誘導化反応に用いた。

20

上記の上清30 $\mu$ Lを96ウェルプレート(ブラック、Costar社製)に加え、各ウェルに対し、メタノールに溶解した2% o-フタルアルデヒド(SIGMA社製)溶液15 $\mu$ Lと、0.3M NaOH溶液170 $\mu$ Lを混和し、室温に10分間放置した。その後、3M HCl溶液を25 $\mu$ L添加し、反応を停止させた。プレートをマイクロプレートリーダーSpectraMax 190(モレキュラーデバイス社製)にセットし、励起波長355nm、蛍光波長460nmの条件で蛍光強度を測定した。

30

【0142】

なお、コントロールとして、配列番号58を用いた場合(ネガティブコントロール)、及び既知のキモトリプシン様セリンプロテアーゼ阻害剤であるキモスタチンを用いた場合(ポジティブコントロール)で同様に処理し測定を行った。各条件において、反応時間0分における蛍光強度をブランクとした。キマーゼ酵素反応において、核酸を添加するかわりに溶液Cを同量添加した場合に検出される蛍光強度を100%とし、各被験物質の阻害率を次式を用いて算出した。

阻害率(%) = [ 1 - { (被験物質の蛍光強度 - 被験物質のブランクの蛍光強度) / (被験物質を含まない場合の蛍光強度 - 被験物質を含まない場合のブランクの蛍光強度) } ]  
× 100

40

【0143】

酵素活性を50%阻害するのに要する阻害剤の濃度(IC<sub>50</sub>)を求めた。その結果を表8に示す。

【0144】

【表 8】

配列番号	Native chymase に対する IC <sub>50</sub> [μM]	Recombinant chymase に対する IC <sub>50</sub> [μM]	配列番号	Native chymase に対する IC <sub>50</sub> [μM]	Recombinant chymase に対する IC <sub>50</sub> [μM]
4	0.031	0.003	56(34)	0.162	0.057
13	0.074	0.041	56(35)	0.120	0.039
14	0.063	0.022	56(42)	0.601	0.687
53	0.764	0.446	56(43)	0.591	0.328
54	0.614	0.397	56(44)	0.643	0.414
55	0.606	0.354	56(45)	0.303	0.377
56	0.508	0.235	56(46)	0.742	0.426
65	0.878	0.274	56(47)	0.542	0.419
56(1)	0.404	0.207	56(48)	0.621	0.394
56(17)	0.613	0.456	56(50)	0.325	0.153
56(18)	0.174	0.108	56(51)	0.429	0.310
56(19)	0.130	0.055	69	>1	0.628
56(21)	0.722	0.361	69(1)	0.480	0.125
56(22)	0.563	0.237	69(2)	0.752	0.289
56(23)	0.360	0.119	70	0.478	0.239
56(26)	0.743	0.326	71	0.341	0.161
56(27)	>1	0.724	72	0.120	0.065
56(28)	0.410	0.137	72(1)	0.103	0.036
56(29)	0.366	0.080	72(2)	0.076	0.037
56(30)	0.521	0.210	72(5)	0.377	0.201
56(31)	0.266	0.089	72(6)	0.573	0.370
56(32)	0.185	0.078	72(7)	0.312	0.158
56(33)	0.291	0.085	72(8)	0.097	0.043

10

20

## 【0145】

表 8：アンジオテンシン I を基質として用いた場合のキマーゼに対する阻害活性 (IC<sub>50</sub>)。IC<sub>50</sub> は一回測定値を示す。

## 【0146】

ネガティブコントロールとして用いた配列番号 58 は阻害活性を示さなかった (IC<sub>50</sub> > 1 μM)。また、ポジティブコントロールであるキモスタチンの IC<sub>50</sub> 値は 0.35 ~ 0.5 μM (Native)、0.45 ~ 0.6 μM (Recombinant) の値を示した。PEG 結合アダプターの活性は PEG が結合していないアダプターと比べて相対的に低い。これは PEG (分子量約 40,000) がアダプター (分子量約 10,000) よりも大きいために起こることで、一般的によく見られる現象である。PEG を結合することで *in vivo* の薬物体内動態が大きく改善されるので、*in vitro* で薬効が多少低下しても *in vivo* で効果を示すことが期待できる。

30

## 【0147】

以上の結果より、表 8 に含まれるすべての核酸は、天然の基質であるアンジオテンシン I を用いた場合でもキマーゼに対する強い阻害活性を有するため、アンジオテンシンが関与する各種疾患の予防および/または治療薬として期待される。

40

## 【0148】

実施例 9：正常ヒト肺線維芽細胞 (Normal Human Lung Fibroblast: NHLF) を用いた LTBP-1 分解阻害活性の測定

キマーゼは線維症を引き起こす重要な因子の一つである TGF-β の活性化に深く関係している。TGF-β 活性化の過程において、キマーゼは LTBP-1 を分解することにより、細胞外マトリックス中に潜在型として存在する latent TGF-β を遊離させ、さらに、latent TGF-β を活性型 TGF-β へ変換させる反応にも関与することが示唆されている。本発明に係わる核酸が、キマーゼによる LTBP-1 分解に対する阻害活性を有するかどうかを下記に示す方法で評価した。

50

凍結保存されたNHLF細胞(Cambrex Bio Science社製)を37℃のwater bathにて急速融解後、培地(10% FBS / F-12)に懸濁した。遠心分離(1200 rpm、5分)後、上清を除去し、細胞を培地に再懸濁した。培地で全量を10 mLとして、細胞培養用シャーレに移して37℃、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養した。顕微鏡にて細胞の形態及び増殖状態を観察し、コンフルエントの状態になったところで無血清培地(0.2% BSA / F-12)に交換した。培地交換から2日後に培養上清を採取し、分注して-30℃で凍結保存した。

用時解凍したNHLF培養上清40 µLをチューブに分注し、溶液Cで50 µMに希釈した核酸溶液を5 µLずつ添加した。ポジティブコントロールとしてはキモスタチンを溶液Cで希釈したものを用い、同様に添加した。ネガティブコントロールとしては溶液Cのみを用い、同様に添加した。次に、溶液E(溶液C + 0.1% BSA、0.05% アジ化ナトリウム)で100 ng/mLに希釈したキマーゼを5 µL添加した。反応溶液中の最終キマーゼ濃度は10 ng/mL(0.33 nM)、最終核酸濃度は5 µMであった。コントロールとして、キマーゼを添加しないチューブを作製した。ピペティングの後37℃で1時間インキュベーションし、等量の電気泳動用Lysis bufferと混合して反応を終了した。次に示すウェスタンブロッティングにより、サンプル中のLTBP-1を検出した。

Lysis bufferと混合したサンプルを3分間煮沸し、5~20%アクリルアミドゲルに10 µLのサンプルをアプライして電気泳動した。泳動終了後、ニトロセルロースフィルターにトランスファーした後、フィルターを5%スキムミルク、50 mM Tris-HCl(pH 8.0)、0.05%アジ化ナトリウムでブロッキングした。フィルターを2% BSA、PBS、0.05%アジ化ナトリウムで2 µg/mLに希釈した抗LTBP-1モノクローナル抗体と室温で一晩反応させた。フィルターを3回洗浄し、2次抗体溶液(HRP標識抗マウスIgG抗体を0.1% BSA / PBSに10000倍希釈)と室温で2時間インキュベーションした。フィルターを5回洗浄し、化学発光基質で検出を行った。

各被験物質の阻害活性の有無はLTBP-1のバンドの濃さおよび位置(分子量)で判定した。分析は3回に分けておこなった。キマーゼ不添加のウェルのバンドを陽性対照(+)、ネガティブコントロールのウェルのバンドを陰性(-)とし、各被験物質のウェルのバンドから阻害活性の有無を目視で判定した。ウェスタンブロッティングによる分析結果を図8に、阻害活性の判定結果を表9に示す。

【0149】

10

20

30

【表 9】

配列番号	図 8 におけるレーン番号	阻害活性の有無
56	4, 10, 16, 24	+
56(1)	2	+
56(17)	12	+
56(19)	14	+
56(23)	15	+
56(26)	13, 25	+
56(27)	11	+
56(28)	17	+
56(29)	19	+
58	3, 27	-
69(1)	18	+
72(1)	26	+
その他	図 8 におけるレーン番号	阻害活性の有無
マーカー	1, 8, 9, 23, 31	
Chymostatin	5, 20, 28	+
ネガティブコントロール	6, 21, 29	-
コントロール(キマーゼ不添加)	7, 22, 30	+

10

20

## 【 0 1 5 0 】

表 9 : L T B P - 1 分解に対する阻害活性の有無。 “ + ” はコントロールにおける L T B P - 1 のバンドと同程度の濃さのバンドが検出されたもの、 “ - ” はネガティブコントロールのように L T B P - 1 のバンドが明確に検出されなかったものを表す。

## 【 0 1 5 1 】

配列番号 5 8 は阻害活性を示さなかった ( - )。また、ポジティブコントロールであるキモスタチンは阻害活性を示した ( + )。表 9 に含まれる配列番号 5 8 以外のアプタマーすべてに、L T B P - 1 分解に対する阻害活性が認められた。

以上の結果より、本発明に係わるアプタマーはキマーゼによる L T B P - 1 分解を阻害することが分かった。従って、例えば線維症のように T G F - の活性化が関与する各種疾患の予防および / または治療に使用可能であることが示された。

30

## 【産業上の利用可能性】

## 【 0 1 5 2 】

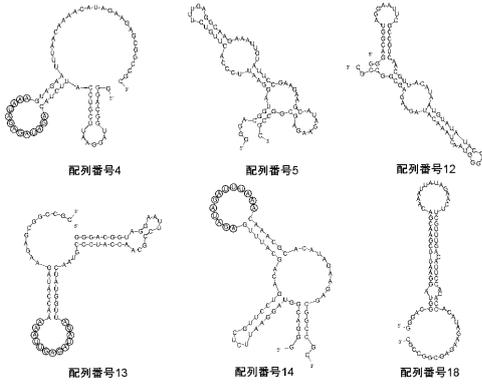
本発明のアプタマー及び複合体は、循環器系疾患や線維症などの疾患に対する医薬、あるいは診断薬、試薬として有用であり得る。本発明のアプタマー及び複合体はまた、キマーゼの精製及び濃縮、並びにキマーゼの検出及び定量に有用であり得る。

## 【 0 1 5 3 】

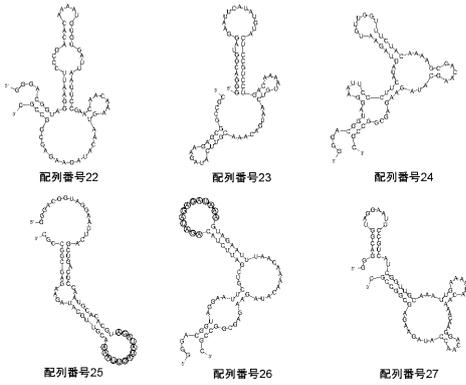
本出願は、日本国で出願された特願 2 0 0 9 - 1 4 0 5 8 5 を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

40

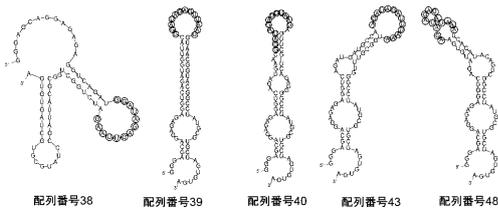
【 図 1 】



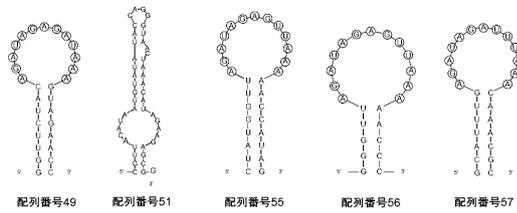
【 図 2 】



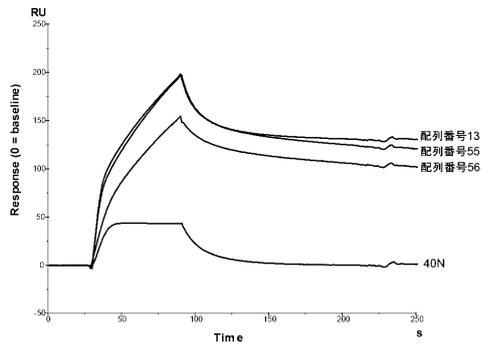
【 図 5 】



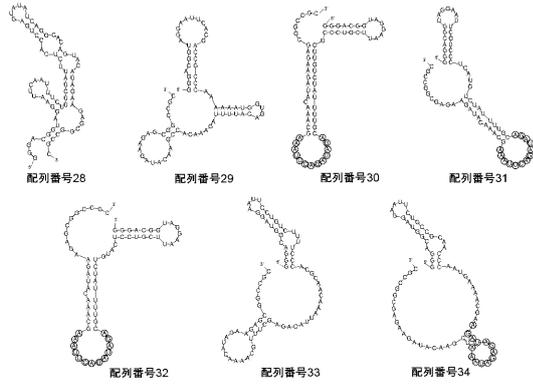
【 図 6 】



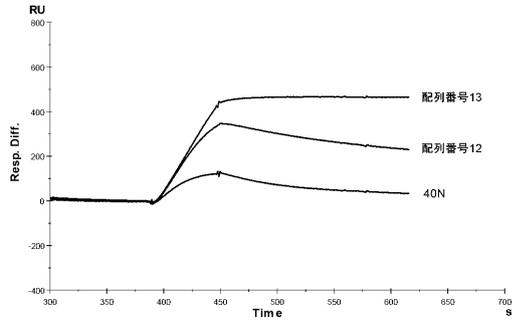
【 図 7 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 8 】



【配列表】

0005810356000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 49/00	(2006.01)	A 6 1 K 49/00	A
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 K 38/43	(2006.01)	A 6 1 K 37/48	
A 6 1 K 31/7088	(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	

(74)代理人 100122688

弁理士 山本 健二

(74)代理人 100117743

弁理士 村田 美由紀

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 中村 義一

東京都文京区本郷7丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 金 玲

東京都港区白金台三丁目16番13号 株式会社リボミック内

(72)発明者 山 崎 聡子

東京都港区白金台三丁目16番13号 株式会社リボミック内

(72)発明者 池田 寿子

東京都港区白金台三丁目16番13号 株式会社リボミック内

(72)発明者 村口 正宏

大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 大塚製薬株式会社内

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 米国特許出願公開第2002/0183338(US, A1)

Mol. Cell Biochem., 2008, Vol.310, p.159-166

Eur. J. Cardiothorac. Surg., 2008, Vol.33, p.25-31

Exp. Biol. Med., 2007, Vol.232, p.1213-1221

Br. J. Pharmacol., 2005, Vol.145, p.424-431

Drug Deliv. Syst., 2008, Vol.23, No.5, p.534-543

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/00 - 1/70

C12N 9/00 - 9/99

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)