

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7264487号
(P7264487)

(45)発行日 令和5年4月25日(2023.4.25)

(24)登録日 令和5年4月17日(2023.4.17)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/115 (2010.01)
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 P 3/00 (2006.01)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/115
C 1 2 Q 1/68
A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 3/00
A 6 1 P 9/00

Z Z N A

請求項の数 15 (全48頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-557344(P2019-557344)
(86)(22)出願日 平成30年11月30日(2018.11.30)
(86)国際出願番号 PCT/JP2018/044132
(87)国際公開番号 WO2019/107532
(87)国際公開日 令和1年6月6日(2019.6.6)
審査請求日 令和3年10月20日(2021.10.20)
(31)優先権主張番号 特願2017-230503(P2017-230503)
(32)優先日 平成29年11月30日(2017.11.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
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
(74)代理人 100080791
弁理士 高島 一
(74)代理人 100136629
弁理士 鎌田 光直
(74)代理人 100125070
弁理士 土井 京子
(74)代理人 100121212
弁理士 田村 弥栄子
(74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文
(74)代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子

最終頁に続く

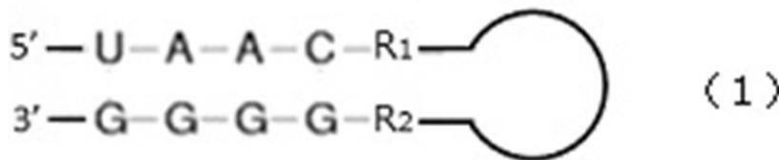
(54)【発明の名称】 キマーゼに対するアプタマー及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

キマーゼに結合するアプタマーであって、以下の式(1)で表される潜在的二次構造(ただし、ウラシルはチミンであってもよい)を有する、塩基長が28~89であるアプタマー。

【化1】



ここで、式(1)における

【化2】



部分は、ステム／ループ部分構造を示し、該ステム／ループ部分の塩基長が4～21であり、R₁およびR₂は任意の一つの塩基を示す。

【請求項2】

キマーゼの活性を阻害する、請求項1に記載のアプタマー。

【請求項3】

R₁とR₂との組み合わせがA/U、C/G、A/CまたはG/U（ただし、ウラシルはチミンであってもよい）である、請求項1または2に記載のアプタマー。

【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1～3のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項5】

配列U A A C R₁におけるUおよび/またはCが修飾または改変されている、請求項1～4のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項6】

【化3】



で表されるステム／ループ部分構造の配列が、UUGU、CUGGまたはAAUUである（ただし、ウラシルはチミンであってもよい）、請求項1～5のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項7】

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

(a) 配列番号1～11および14～33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1～11および14～33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～数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入あるいは付加されたヌクレオチド。

【請求項8】

アプタマーに含まれる少なくとも一つのヌクレオチドが修飾または改変されている、請求項7に記載のアプタマー。

【請求項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2'位のヒドロキシル基が、同一または異なって、無置換であるか、水素原子、フッ素原子およびメトキシ基からなる群より選ばれる原子または基で置換されている、請求項1に記載のアプタマー。

【請求項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2'位のヒドロキシル基が、同一または異なって、無置換であるか、水素原子、フッ素原子およびメトキシ基からなる群より選ばれる原子または基で置換されている、請求項1に記載のアプタマー。

【請求項11】

請求項1～10のいずれか一項に記載のアプタマーおよび機能性物質を含む複合体。

【請求項12】

請求項1～10のいずれか一項に記載のアプタマーまたは請求項11に記載の複合体を含む医薬。

【請求項13】

10

20

30

40

50

臓器または組織の線維化が関与する疾患、または循環器系疾患の治療薬である、請求項 1 2 に記載の医薬。

【請求項 1 4】

線維症の治療薬である、請求項 1 2 に記載の医薬。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のアプタマーまたは請求項 1 1 に記載の複合体を *in vitro* で用いることを特徴とする、キマーゼの検出方法。

【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。

【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 II (A n g I I) を産生する。

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 mast cell protease - 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 *hamster chymase - 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 *hamster chymase - 2* はエラスターゼ様活性を持ち、基質特異性が異なる。

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、 *large latent T G F - binding protein* (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 *latent T G F -* の細胞外マトリックスからの遊離、及び *latent 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。

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、肺泡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

10

20

30

40

50

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- β 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- β 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- β 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 I I I 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れた特徴である。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。

本発明者らは、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として、 $X_1GAUAGAN_1N_2UAAX_2$ （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アプタマーを製造した（特許文献 5（当該配列は、特許文献 5 において配列番号 21 で表される））。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

10

20

30

40

50

【文献】米国特許公報 6 5 0 0 8 3 5 号
 国際公開 WO 9 1 / 1 9 8 1 3 号パンフレット
 国際公開 WO 9 4 / 0 8 0 5 0 号パンフレット
 国際公開 WO 9 5 / 0 7 3 6 4 号パンフレット
 国際公開 WO 2 0 1 0 / 1 4 3 7 1 4 号パンフレット

【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。

10

【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、特許文献5に記載されたキマーゼアプタマーとは全く配列が異なり、かつ活性が著しく高いという特徴を有する、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】

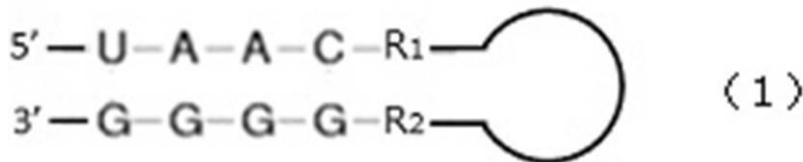
即ち、本発明は、以下の発明などを提供するものである：

[1] キマーゼに結合するアプタマーであって、該アプタマーが、U A A C R₁ N₁ R₂ G G G (式中、R₁およびR₂が任意の一つの塩基であり、N₁が3～30個の塩基である)で表される共通配列(ただし、ウラシルはチミンであってもよい)を含む、アプタマー。
 [2] キマーゼに結合するアプタマーであって、以下の式(1)で表される潜在的二次構造(ただし、ウラシルはチミンであってもよい)を有する、アプタマー。

20

【0008】

【化1】



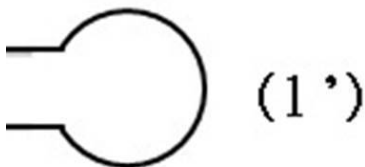
30

【0009】

ここで、式(1)における

【0010】

【化2】



40

【0011】

部分は、ステム/ループ部分構造を示し、R₁およびR₂は任意の一つの塩基を示す。

[3] キマーゼの活性を阻害する、[1]または[2]のアプタマー。

[4] R₁とR₂との組み合わせがA/U、C/G、A/CまたはG/U(ただし、ウラシルはチミンであってもよい)である、[1]～[3]のいずれかのアプタマー。

[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、[1]～[4]のいずれかのアプタマー。

[6] 配列U A A C R₁におけるUおよび/またはCが修飾または改変されている、[1

50

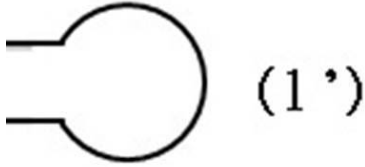
〕～〔 5 〕のいずれかのアプタマー。

〔 7 〕 (1 ') 部分のステム/ループ部分の塩基長が 3 ～ 2 1 である、〔 2 〕～〔 6 〕のいずれかのアプタマー。

〔 8 〕 N₁ または

【 0 0 1 2 】

【 化 3 】



10

【 0 0 1 3 】

で表されるステム/ループ部分構造の配列が、UUGU、CUGG または AAUU である (ただし、ウラシルはチミンであってもよい)、〔 1 〕～〔 7 〕のいずれかのアプタマー。

【 0 0 1 4 】

〔 9 〕以下の (a)、(b) または (c) のいずれかのヌクレオチド配列を含む、〔 1 〕または〔 2 〕のアプタマー。

(a) 配列番号 1 ～ 1 1 および 1 4 ～ 3 3 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) ;

20

(b) 配列番号 1 ～ 1 1 および 1 4 ～ 3 3 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 ～ 数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入あるいは付加されたヌクレオチド ; または

(c) 配列番号 1 ～ 1 1 および 1 4 ～ 3 3 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% 以上の相同性を有するヌクレオチド配列。

〔 1 0 〕アプタマーに含まれる少なくとも一つのヌクレオチドが修飾または改変されている、〔 9 〕のアプタマー。

〔 1 1 〕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 2 ' 位のヒドロキシル基が、同一または異なって、無置換であるか、水素原子、フッ素原子およびメトキシ基からなる群より選ばれる原子または基で置換されている、〔 1 〕または〔 2 〕のアプタマー。

30

〔 1 2 〕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 2 ' 位のヒドロキシル基が、同一または異なって、無置換であるか、水素原子、フッ素原子およびメトキシ基からなる群より選ばれる原子または基で置換されている、〔 1 〕または〔 2 〕のアプタマー。

〔 1 3 〕〔 1 〕～〔 1 2 〕のいずれかのアプタマーおよび機能性物質を含む複合体。

〔 1 4 〕〔 1 〕～〔 1 2 〕のいずれかのアプタマーまたは〔 1 3 〕の複合体を含む医薬。

〔 1 5 〕臓器または組織の線維化が関与する疾患、または循環器系疾患の治療薬である、〔 1 4 〕の医薬。

〔 1 6 〕線維症の治療薬である、〔 1 4 〕の医薬。

〔 1 7 〕〔 1 〕～〔 1 2 〕のいずれかのアプタマーまたは〔 1 3 〕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。

40

〔 1 8 〕〔 1 〕～〔 1 2 〕のいずれかに記載のアプタマー、〔 1 3 〕の複合体、または〔 1 4 〕の医薬を対象に投与することを含む、臓器または組織の線維化が関与する疾患、または循環器系疾患の治療方法。

〔 1 9 〕臓器または組織の線維化が関与する疾患、または循環器系疾患の治療における使用のための、〔 1 〕～〔 1 2 〕のいずれかのアプタマー、〔 1 3 〕の複合体、または〔 1 4 〕の医薬。

〔 2 0 〕臓器または組織の線維化が関与する疾患、または循環器系疾患の治療用の医薬の製造における、〔 1 〕～〔 1 2 〕のいずれかのアプタマー、または〔 1 3 〕の複合体の使用。

50

【発明の効果】

【0015】

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】

【0016】

【図1】配列番号1～6で表される配列のアプタマーの二次構造予測を示す図である。

【図2】配列番号7～8で表される配列のアプタマーの二次構造予測を示す図である。

10

【図3】配列番号9～10で表される配列のアプタマーの二次構造予測を示す図である。

【図4】配列番号14～18、20で表される配列のアプタマーの二次構造予測を示す図である。

【図5】最適化SELEXにおけるDNA鋳型のランダム配列部分を示す図である。

【図6】配列番号26～31で表される配列のアプタマーの二次構造予測を示す図である。

【図7】配列番号32～33で表される配列のアプタマーの二次構造予測を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

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。

20

【0018】

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。

【0019】

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。

30

【0020】

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。

40

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

50

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。

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0.01μg/μLに調製したものを20μL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。

【0021】

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- 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。

【0022】

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-、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)、アポリポプロテイン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。

【0023】

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。例として二つの方法を以下に示す。

【0024】

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」（配列番号41）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。

【0025】

アッセイには、96ウェルプレート（F16 Black Maxisorp Fluorunc、Nunc社製）を用い、反応液量を100μLとし、緩衝液（溶液C；後述する実施例1参照）中で反応を行う。まず、核酸は溶液C中に調製したものを、50μL用意する。そこに、溶液C中に調製した1mMの基質を10μL添加した後、プレート

10

20

30

40

50

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 で5分間保温する。一方で、0.05 μ gのキマーゼ (recombinant, SIGMA社製) を溶液C中に希釈したものを40 μ L用意し、37 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 で5分間、蛍光強度の変化を経時的に測定 (励起波長 380 nm、検出波長 460 nm) 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-メチルクマリン) 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 (IC₅₀) を求める。IC₅₀ 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

【0026】

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。

20

【0027】

アッセイにおける酵素反応の溶液量は50 μ Lとし、溶液C中で反応を行う。まず、0.3~0.75 ng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 μ L用意する。核酸は溶液C中に調製したものを、25 μ L用意する。キマーゼ溶液5 μ Lと核酸溶液25 μ Lを混和し、37 で5分間保温する。一方で、溶液C中に調製した125 μ MアンジオテンシンI (ペプチド研究所社製) を20 μ L用意し、37 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 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 μ L添加し、反応を停止させる。混合液全体を4、14000 rpmで10分間遠心し、その上清30 μ Lを次の蛍光誘導化反応に用いる。

30

【0028】

上記の上清30 μ 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 μ Lと、0.3M NaOH溶液170 μ Lを混和し、室温に10分間放置する。その後、3M HCl溶液を25 μ 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355 nm、蛍光波長460 nmの条件で蛍光強度を測定する。

【0029】

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 (IC₅₀) を求める。IC₅₀ 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

【0030】

後述する実施例で詳細に示されるように、本発明のアプタマーは、既に報告されている

50

WO 2 0 1 0 / 1 4 3 7 1 4 のキマーゼに対するアプタマーと比較して、およそ 1 0 ~ 1 0 0 倍の高いキマーゼに対する阻害活性を有する。具体的には、WO 2 0 1 0 / 1 4 3 7 1 4 に開示されたキマーゼに対するアプタマーは、0 . 1 μ M 以下の IC₅₀ 値を示すことで優れたアプタマーであるとしているが（段落 [0 1 0 5] など参照）、本発明のアプタマーでは、実施例 3（表 4）に示されるように 1 n M 以下の IC₅₀ 値を示すアプタマーも数多く存在した。

したがって発明者らは、本発明の完成時点でこのような良質なキマーゼに対するアプタマーが得られるとは予想だにしていなかった。以上のことから、本発明のアプタマーは、たとえ当業者であっても公知文献からは容易に想到し得ないほどの有利な効果を奏するアプタマーであるといえる。

【 0 0 3 1 】

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。

【 0 0 3 2 】

本発明のアプタマーの長さは特に限定されず、通常、約 2 5 ~ 約 2 0 0 ヌクレオチドであり得るが、例えば約 1 0 0 ヌクレオチド以下であり、好ましくは約 5 0 ヌクレオチド以下であり、より好ましくは約 4 0 ヌクレオチド以下であり、最も好ましくは約 3 5 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。一方で、本発明のアプタマーの長さは、通常、約 2 5 ヌクレオチド以上であり、好ましくは、約 2 8 ヌクレオチド以上であり得る。総ヌクレオチド数が少なすぎると以下で説明する共通配列を持ちえないし、潜在的 2 次構造が不安定となってしまう場合によっては活性を有しない場合もある。

【 0 0 3 3 】

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 - C O M e 基）、アミノ基（例、 - N H₂ 基）で置換されているヌクレオチドが挙げられる。

【 0 0 3 4 】

本発明のアプタマーは、U A A C R₁ N₁ R₂ G G G G で表される共通配列（以下、本発明の共通配列と称することがある）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することで、キマーゼの活性を阻害する。すなわちキマーゼの活性を阻害することが分かっているアプタマーは、キマーゼへの結合を確認するまでもなく、キマーゼに結合するアプタマーであることが明らかである。

【 0 0 3 5 】

上記共通配列中、R₁ および R₂ は任意の一つの塩基を示す。R₁ と R₂ との組み合わせは本発明のアプタマーがキマーゼに結合する限り特に限定されず、例えば、R₁ と R₂ との組み合わせとしては、A / U、C / G、A / C または G / U であり（但し、ウラシルはチミンであってもよい）、より好ましくは R₁ と R₂ とでワトソン - クリック塩基対を形成する組み合わせ（A / U または C / G）である。

【 0 0 3 6 】

上記 R₁ と R₂ との組み合わせは、本発明のアプタマーがキマーゼに結合する限り特に限定されず、R₁ と R₂ が入れ替わっていてもよい。すなわち R₁ と R₂ との組み合わせを A / U として示す場合、R₁ が A であり R₂ が U である場合と、R₁ が U で R₂ が A である場合とが含まれる。C / G、A / C または G / U においても同様である。

【 0 0 3 7 】

共通配列 U A A C R₁ N₁ R₂ G G G G における N₁ 部分の配列は本発明のアプタマーが

10

20

30

40

50

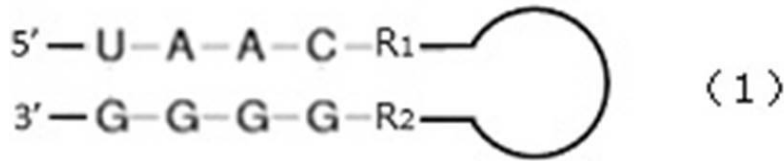
キマーゼに結合する限り特に限定されず、任意の配列を採りうる。当該部分の塩基長は、本発明のアプタマーがキマーゼに結合する限り特に限定されないが、通常3～30であり、好ましくは3～21であり、より好ましくは3～19である。

【0038】

また本発明のアプタマーは、以下の式(1)

【0039】

【化4】



10

【0040】

で表される潜在的二次構造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することで、キマーゼの活性を阻害する。

【0041】

上記式(1)中、U A A C R₁とR₂ G G G Gとの間でステム構造を形成する(A/G mismatchesを二つ含む)。すなわち共通配列におけるU A A C R₁とR₂ G G G Gとの間でステム構造が形成される。換言すれば、共通配列におけるN₁部分がループ構造を形成する。

20

【0042】

上記式(1)中、R₁およびR₂は任意の一つの塩基を示す。R₁とR₂との組み合わせとしては、上記式(1)中のU A A C R₁とR₂ G G G Gとの間でステム構造を形成する限りにおいて限定されない。しかしながらR₁とR₂との組み合わせとして好ましくは、A/U、C/G、A/CまたはG/Uであり(但し、ウラシルはチミンであってもよい)、より好ましくはR₁とR₂とでワトソン-クリック塩基対を形成する組み合わせ(A/UまたはC/G)である。

【0043】

上記R₁とR₂との組み合わせは、上記式(1)中のU A A C R₁とR₂ G G G Gとの間でステム構造を形成する限りにおいてR₁とR₂が入れ替わっていてもよい。すなわちR₁とR₂との組み合わせをA/Uとして示す場合、R₁がAでありR₂がUである場合と、R₁がUでR₂がAである場合とが含まれる。C/G、A/CまたはG/Uにおいても同様である。

30

【0044】

ここで、式(1)における

【0045】

【化5】



40

【0046】

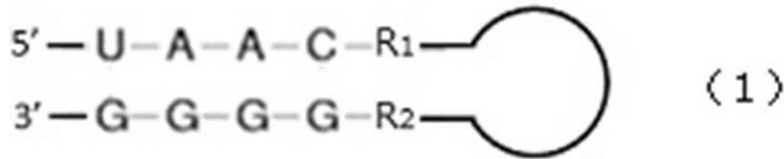
部分は、ステム/ループ部分構造を示す。当該部分構造の塩基長は、本発明のアプタマーがキマーゼに結合する限り特に限定されないが、通常3～30であり、好ましくは3～21であり、より好ましくは3～19である。当該部分構造の塩基長が3未満であるとループ構造が形成できず、30を超えると当該部分構造における塩基の影響が顕著となりアプ

50

タマーの活性が低下する場合がある。特に塩基長が2以上以下である場合に、安定したアプタマー活性を示す。当該ステム/ループ部分構造において、ステム構造は存在してもよいし、存在せず全てループ構造であってもよい。すなわち本発明のアプタマーがキマーゼに対する結合活性を有するには、以下の式(1)

【0047】

【化6】



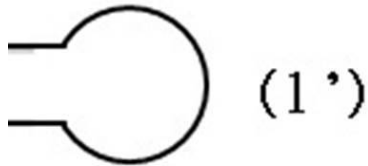
10

【0048】

の構造が全体としてステム/ループ構造を採ることが重要であり、U A A C R₁とR₂ G G Gとの間で既にステム構造が形成されているのであるから、式(1)における

【0049】

【化7】



20

【0050】

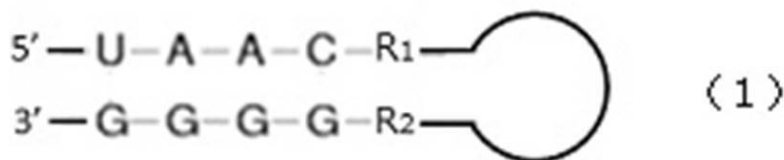
部分構造において、ステム構造が存在するか否かは重要ではない。一方でステム構造が存在する場合、当該ステム構造はバルジ構造を有していても良い。

【0051】

前述したとおり、本発明のアプタマーは式(1)

【0052】

【化8】



30

【0053】

の構造が全体としてステム/ループ構造を採ることがキマーゼに対するアプタマーとしての活性発現のうえで非常に重要である。すなわち本発明において、上記式(1)の構造を有し、かつキマーゼへの結合活性(あるいはキマーゼ阻害活性)を有する限りにおいて、式(1)における

【0054】

【化9】



40

50

【 0 0 5 5 】

で示されるステム/ループ部分構造における配列は特に限定されない。実際に後述する実施例で示されるように、上記ステム/ループ部分構造における配列は特定のものに限定されず、様々な配列において同様にステム/ループ部分構造を有し、かつキマーゼへの結合活性を有し得る。

しかしながら、上記式(1')における好ましい配列としては、UUGU、UUGC、CUGGまたはAAUUであり(ただし、ウラシルはチミンであってもよい)、より好ましくは、UUGUである。

【 0 0 5 6 】

さらに上記式(1)で示される構造の両側、すなわち5'末端側および3'末端側においてもその配列は特定のものに限定されず、様々な配列において同様のキマーゼへの結合活性(あるいはキマーゼ阻害活性)を有し得る。

【 0 0 5 7 】

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。特に共通配列と、式(1)で表される構造におけるUおよび/またはCは、好ましくはリボースの2'位において、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基で修飾される。

【 0 0 5 8 】

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。

【 0 0 5 9 】

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。

【 0 0 6 0 】

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。

【 0 0 6 1 】

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。

【 0 0 6 2 】

本発明のアプタマーはまた、
 (a) 配列番号1~11および14~33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1~11および14~33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1~11および14~33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

10

20

30

40

50

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；

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。

【0063】

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。

【0064】

本発明のアプタマーはまた、

(a')配列番号17(1)~17(25)および33(1)~33(18)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17(1)~17(25)および33(1)~33(18)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17(1)~17(25)および33(1)~33(18)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

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。

【0065】

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。

【0066】

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。

【0067】

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。

【0068】

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

10

20

30

40

50

ができる。

【0069】

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、-(CH₂)_n-リンカー、-(CH₂CH₂O)_n-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、-OPO₃-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)~(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。

10

【0070】

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、-NH₂)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) Nucle. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973) Biochemistry 12, 5138-5145参照)。

20

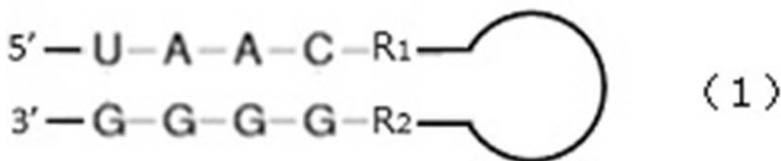
【0071】

本発明のアプタマーにおいて、本発明の共通配列または式(1)

【0072】

【化10】

30



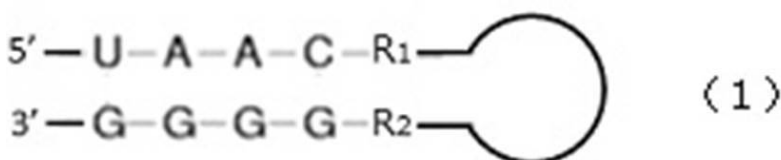
【0073】

で表される構造においても上記修飾がなされたものであってもよいが、UAACR₁N₁R₂GGGGにおけるGGGG部分の2番目のGは、糖残基の2'位においてO-メチル化(O-メチル修飾)されないことが望ましい。したがって、本発明のアプタマーはUAACR₁N₁R₂GGGGや式(1)

40

【0074】

【化11】



【0075】

50

の構造における G G G G 部分の 2 番目の G が O - メチル化 (O - メチル修飾) されないアプタマーでありうる。この場合、G G G G 部分の 2 番目の G は好ましくはフッ素原子で修飾されている (フルオロ化されている) ことが望ましい。

【 0 0 7 6 】

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、8-(Propyl)phenyl-rA (n-bz)-2'-tBDMS amidite での置換が挙げられる。

【 0 0 7 7 】

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) N R ₂ (アミデート)、P (O) C H ₃、P (O) B H ₃、P (O) R、R (O) O R '、C O 又は C H ₂ (ホルムアセタール) 又は 3 ' - アミン (- N H - C H ₂ - C H ₂ -) 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]。

【 0 0 7 8 】

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。

【 0 0 7 9 】

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 d T、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。

【 0 0 8 0 】

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、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。

【 0 0 8 1 】

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。

【 0 0 8 2 】

10

20

30

40

50

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。

【0083】

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。

【0084】

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。

【0085】

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。

【0086】

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マーを獲得するためのSELEX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プしたテンプレートを作製して、再度SELEXを行うものである。

【0087】

SELEX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。SELEX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、SELEX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28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。

【0088】

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MFOLDプログラムを用いて二次構造を予測したり、X線解析やNMR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。

【0089】

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。

10

【0090】

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。

【0091】

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。

【0092】

例えば、このようなアプタマーの製造方法は、下記：

20

【0093】

【化12】



【0094】

(上記において、(N)aはa個のNからなるヌクレオチド鎖を示し、(N)b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。

30

【0095】

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、リボソーム、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

40

50

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体、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、リア毒素及びペロ毒素)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。

10

【0096】

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。

【0097】

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のほかに、線維症や循環器系疾患を伴う疾患をも治療又は予防するための医薬として有用である。

20

【0098】

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、キマーゼのインビボイメージング、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、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。

30

【0099】

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。

【0100】

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。

【0101】

線維症とは、何らかの理由で臓器または組織の線維化が進行し、当該臓器や組織の機能が低下することに起因する疾患である。よって広義の線維症としては、臓器または組織の線維化が関与する疾患であるといえることができる。

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、手術後の癒痕、熱傷性癒痕、肥厚性癒痕、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、遺伝性腎疾患、動脈硬化末梢動脈炎などが挙げられる。他に、大腸炎、骨粗鬆症、アレルギー性結膜炎、劇症肝炎、皮膚血管炎、色素性蕁麻疹、掻痒、ヘルペス状皮膚炎、水疱性類天疱瘡、乾癬、食道炎、食道弛緩不全症、気道炎症、アテローム硬化症、静脈瘤なども挙げられる。

40

【0102】

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

50

、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。他に、肺高血圧症、大動脈弁狭窄症なども挙げられる。

【0103】

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-、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。

10

【0104】

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。

20

【0105】

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。

30

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。

【0106】

また、本発明の医薬は必要により、味のマスキング、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。

40

【0107】

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、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

50

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。

【0108】

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。

10

【0109】

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。

【0110】

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できる。

20

30

【0111】

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(商品名ゲナボル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

40

50

する。

【0112】

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。

【0113】

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。

【0114】

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。

【0115】

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、MgCl₂）、界面活性剤（例、Tween 20、Triton、NP 40）、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。

【0116】

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

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGGAUGAUCGGACAUAACA UUGU
UGGGGUGUCAAGGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA

【0133】

配列番号3

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGGAUGAUAACCA GUUGGGGGU
CAAUAACAUGGGACCUAUGCGUGCUAGUGUGA

【0134】

配列番号4

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGGAUGUAACUCUAUUGAGGGGC
AUCAGCACAGUAGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA

10

【0135】

配列番号5

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGGAUGAUGACCGAUUAUAGGUA
ACCACUUAUGGGGGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA

【0136】

配列番号6

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGGAUGUCAUGACUUAUAGGUAA
CCGAUAAUGGGGGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA

【0137】

[共通配列]UAA CR₁N₁R₂GGGG

20

【0138】

9ラウンドまで行った上記SELEXを同様の条件で継続し、10ラウンド目に8クローン、11ラウンド目に47クローン、合計55クロンの配列を調べた。それらクロンの一部の配列を配列番号7～8に示す。これらの配列には9ラウンド目と同様に共通配列が含まれていた。共通配列は55クローン中3クローンに含まれていた。配列番号7～8で表される配列のアプタマーの二次構造予測を図2に示す。ステム/ループ構造を四角()で囲った。それらは図1同様、全て特徴的なステム/ループ構造となった。

【0139】

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。

【0140】

配列番号7

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGGAUGUUUGGUAGUAACUGGAA
UAGGGGCUACAGGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA

【0141】

配列番号8

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGGAUGAUUGACGACUAUAGGUA
ACCUUUACGGGGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA

【0142】

40

配列番号1～8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-メチルクマリル)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100μLとし、溶液Cの緩衝液中で実施した。ここで溶液Cは145mM 塩化ナトリウム、5.4mM 塩化カリウム、1.8mM 塩

50

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。まず、核酸は溶液C中に段階希釈したものを、50 μ Lずつ用意した。そこに、溶液C中に調製した1 mMの基質を10 μ 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分間保温した。一方で、0.05 μ gのキマーゼ (recombinant, SIGMA社製) を溶液C中に希釈したものを40 μ 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16.7 nM、最終基質濃度は100 μ 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 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 (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 380 nm、検出波長 460 nm)。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、30 N (30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。

【0143】

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

【0144】

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1に示す。“> 0.5”は0.5 μ 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_{50} の値は2~3回測定の平均値を示す。

【0145】

【表1】

配列番号	長さ	IC_{50} [μ M]
1	72	0.0410
2	72	0.0310
3	72	0.0260
4	72	0.0108
5	72	0.0070
6	72	0.0055
7	72	0.0520
8	72	0.0350

【0146】

ネガティブコントロールである30 N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 μ M ~ 0.2 μ Mの値を示した。

以上の結果より、表1に記載された共通配列を含むアプタマーはキマーゼに対する阻害活性を示した。特に0.1 μ 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。またこの結果から、これら共通配列に含まれる R_1 と R_2 との組み合わせとしては A/U、C/G、A/C または G/U のどれでもよいことが示された。

【0147】

ランダム配列が30ヌクレオチドでプライマー配列が上記SELEXで用いたものと異なる鑄型を用いて、上記と同様のSELEXを行った。SELEXの標的物質としてNH₂-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 (recombinant、SIGMA社製)を用いた。使用した鑄型とプライマーの配列を以下に示す。DNA鑄型とプライマーは化学合成により作製した。

【0148】

DNA鑄型：5' - TCTGTCCTCAGTACTTGANNNGTCTGTCGCTTTCGT
TCCC - 3' (配列番号37)

10

プライマーFwd：5' - TAATACGACTCACTATAGGGAACGAAGCGACAGAC - 3' (配列番号38)

プライマーRev：5' - TCTGTCCTCAGTACTTGA - 3' (配列番号39)

【0149】

DNA鑄型 (配列番号37)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10¹⁴であった。

20

【0150】

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145mM 塩化ナトリウム、5.4mM 塩化カリウム、1.8mM 塩化カルシウム、0.8mM 塩化マグネシウム、20mM トリス (pH7.6)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7M Urea、3mM EDTA、100mM Tris-HCl (pH6.6)の混合液である。回収されたRNAはRT-PCRで増幅し、DuraScribeTMT7 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DH5α (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。

30

【0151】

SELEXを8ラウンド行った後に38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9~10に示す。そのうち、配列番号10で表される配列は2配列存在した。共通配列は38クローン中3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9~10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。ステム/ループ構造を四角 ()で囲った。

40

【0152】

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。

【0153】

配列番号9

GGGAACGAAGCGACAGACGUUCCAGCGUCUAAUAACGUGAA

50

U A A C C U G A U C G U A G G G G G U U C A A G U A C U G A G G A C A G A
【 0 1 5 4 】

配列番号 10

G G G A A C G A A G C G A C A G A C C G A A U C A G A A G U U C A A C A U G G A
C A U A A C A U C G A U G G G G U G U C A A G U A C U G A C G A C A G A
【 0 1 5 5 】

配列番号9および10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。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

【 0 1 5 6 】

アッセイにおける酵素反応の溶液量は50μLとし、溶液Cの緩衝液中で実施した。まず、native(Calbiochem社製)を溶液C中に希釈したものを5μL用意した。ここで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0.0027~2μMの濃度で段階希釈したものを、25μLずつ用意した。キマーゼ溶液5μLと核酸溶液25μLを混和し、37℃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20μL用意し、37℃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0.5nM、最終基質濃度は50μMである。37℃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25μL添加し、反応を停止させた。混合液全体を4℃、14000rpmで10分間遠心し、その上清30μLを次の蛍光誘導化反応に用いた。

20

【 0 1 5 7 】

上記の上清30μL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15μLと、0.3M NaOH溶液170μLを混和し、室温に10分間放置した。その後、3M HCl溶液を25μL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

【 0 1 5 8 】

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。

【 0 1 5 9 】

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

【 0 1 6 0 】

酵素活性を50%阻害するのに要する阻害剤の濃度(IC50)を求めた。その結果を表2に示す。表中、IC50の値は2~3回測定の平均値を示す。

40

【 0 1 6 1 】

【表2】

配列番号	長さ	IC ₅₀ [μM]
9	77	0.00022
10	76	0.00043

【 0 1 6 2 】

50

ポジティブコントロールに使用されるキモスタチンの IC_{50} 値は $0.35 \sim 0.5 \mu M$ 値であり、表 2 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。

【 0 1 6 3 】

実施例 2 : アプタマーの短鎖化

配列番号 2 で表されるアプタマーの短鎖化を行った。配列番号 2 で表されるアプタマーは共通配列を含む。短鎖化した配列を配列番号 1 1 ~ 2 0 に示す。配列番号 1 1 ~ 2 0 で表されるアプタマーの一部についての二次構造予測を図 4 に示す。図 4 中、共通配列を四角 () で囲った。

10

【 0 1 6 4 】

以下に配列番号 1 1 ~ 2 0 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' - O H 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 6 5 】

配列番号 1 1

(配列番号 2 で表される配列を、共通配列を含む 4 3 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

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

20

【 0 1 6 6 】

配列番号 1 2

(配列番号 2 で表される配列を、共通配列を含む 2 2 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

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

【 0 1 6 7 】

配列番号 1 3

(配列番号 2 で表される配列を、共通配列を含む 2 7 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

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

30

【 0 1 6 8 】

配列番号 1 4

(配列番号 2 で表される配列を、共通配列を含む 3 9 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

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

【 0 1 6 9 】

配列番号 1 5

(配列番号 2 で表される配列を、共通配列を含む 3 5 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

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

40

【 0 1 7 0 】

配列番号 1 6

(配列番号 2 で表される配列を、共通配列を含む 3 6 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

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

【 0 1 7 1 】

配列番号 1 7

(配列番号 2 で表される配列を、共通配列を含む 3 2 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

50

GAUGAUCGGACAUAACAUAUGUUGGGGUGUCA

【0172】

配列番号18

(配列番号2で表される配列を、共通配列を含む30ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

UGAUCGGACAUAACAUAUGUUGGGGUGUCA

【0173】

配列番号19

(配列番号2で表される配列を、共通配列を含む28ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

AUCGGACAUAACAUAUGUUGGGGUGUCA

【0174】

配列番号20

(配列番号2で表される配列を、共通配列を含む31ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

GAUGAUCGGACAUAACAUAUGUUGGGGUGUCA

配列番号11～20の核酸は全て化学合成により作製した。配列番号11～20の評価においては、実施例1で示したアンジオテンシン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評価方法と同様の方法を用いて測定した。測定の結果を表3に示す。表中、“>1”は1μM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。I₅₀の値は2～3回測定の平均値を示す。

【0175】

【表3】

配列番号	長さ	IC ₅₀ 【μM】
2	72	0.0100
11	43	0.0547
12	22	>1
13	27	>1
14	39	0.0068
15	35	0.0014
16	36	0.0020
17	32	0.0014
18	30	0.0021
19	28	0.0144
20	31	0.0018

【0176】

表3に記載された配列番号2の短鎖化体の多くはキマーゼに対する阻害活性を示した。特に0.01μM以下のIC₅₀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18の結果より、共通配列を含む30ヌクレオチドに短鎖化したものであっても活性を維持していることがわかった。これは、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。

【0177】

実施例3：短鎖化したアプタマーの改変

配列番号17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17(1)~17(25)に示す。

【0178】

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、PHEは8-(Propyl)phenyl-rA(n-bz)-2'-tBDMS amiditeを示す。また、各配列末端におけるidTはinverted-dTによる修飾、Sはチオール基の修飾を示す。XはフェニルアラニンのC末端とシステインのN末端がペプチド結合することによるペプチド配列、YはフェニルアラニンのN末端とシステインのC末端がペプチド結合することによるペプチド配列を示す。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。ZはTC6F amiditeを示す。

【0179】

配列番号17(1)

配列番号17で表される配列の共通配列GGGGにおける最初のGと二番目のGに2'-O-メチル修飾を導入した配列

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

【0180】

配列番号17(2)

配列番号17で表される配列の5'末端及び3'末端にidT修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち12箇所に2'-O-メチル修飾を導入し、共通配列GGGGにおける2番目のG以外のGに2'-O-メチル修飾を導入した配列

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

【0181】

配列番号17(3)

配列番号17で表される配列の5'末端及び3'末端にidT修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち12箇所に2'-O-メチル修飾を導入し、共通配列GGGGにおける1番目のG以外のGに2'-O-メチル修飾を導入した配列

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

【0182】

配列番号17(4)

配列番号17で表される配列の5'末端及び3'末端にidT修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち12箇所に2'-O-メチル修飾を導入し、共通配列GGGGにおける2番目のG以外のGに2'-O-メチル修飾を導入した配列

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

【0183】

10

20

30

40

50

配列番号 17 (5)

配列番号 17 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 12 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

【 0 1 8 4 】

配列番号 17 (6)

配列番号 17 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 13 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

【 0 1 8 5 】

配列番号 17 (7)

配列番号 17 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 13 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

【 0 1 8 6 】

配列番号 17 (8)

配列番号 17 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 13 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における U に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

【 0 1 8 7 】

配列番号 17 (9)

配列番号 17 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 13 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における C に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

【 0 1 8 8 】

配列番号 17 (10)

配列番号 17 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 14 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

【 0 1 8 9 】

10

20

30

40

50

配列番号 17 (1 1)

配列番号 17 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 14 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

【 0 1 9 0 】

配列番号 17 (1 2)

配列番号 17 で表される配列の 5' 末端にフェニルアラニンの C 末端とシステインの N 末端がペプチド結合することによるペプチド配列の修飾をチオール基で導入し、3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 13 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

【 0 1 9 1 】

配列番号 17 (1 3)

配列番号 17 で表される配列の 5' 末端にフェニルアラニンの N 末端とシステインの C 末端がペプチド結合することによるペプチド配列の修飾をチオール基で導入し、3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 13 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

【 0 1 9 2 】

配列番号 17 (1 4)

配列番号 17 で表される配列の 5' 末端に i d T 修飾を導入し、3' 末端にフェニルアラニンの N 末端とシステインの C 末端がペプチド結合することによるペプチド配列の修飾をチオール基で導入し、共通配列以外の配列のうち 13 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

【 0 1 9 3 】

配列番号 17 (1 5)

配列番号 17 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 12 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、1ヶ所に 8 - (P r o p y l) p h e n y l - r A (n - b z) - 2' - t B D M S a m i d i t e 修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

【 0 1 9 4 】

配列番号 17 (1 6)

配列番号 17 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 12 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、1ヶ所に 8 - (P r o p y l) p h e n y l - r A (n - b z) - 2' - t B D M S a m i d i t e 修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

10

20

30

40

50

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

【 0 1 9 5 】

配列番号 1 7 (1 7)

配列番号 1 7 で表される配列の 5 ' 末端及び 3 ' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 2 箇所 に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、1ヶ所 に 8 - (P r o p y l) p h e n y l - r A (n - b z) - 2 ' - t B D M S a m i d i t e 修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2 ' - O - メチル修飾を導入した配列

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

10

【 0 1 9 6 】

配列番号 1 7 (1 8)

配列番号 1 7 で表される配列の 5 ' 末端及び 3 ' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 3 箇所 に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における U のヌクレオチド同士を結合するリン酸基をホスホロチオエート化し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2 ' - O - メチル修飾を導入した配列

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

20

【 0 1 9 7 】

配列番号 1 7 (1 9)

配列番号 1 7 で表される配列の 5 ' 末端及び 3 ' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 3 箇所 に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における 1 番目の A ヌクレオチド同士を結合するリン酸基をホスホロチオエート化し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2 ' - O - メチル修飾を導入した配列

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

【 0 1 9 8 】

30

配列番号 1 7 (2 0)

配列番号 1 7 で表される配列の 5 ' 末端及び 3 ' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 3 箇所 に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における 2 番目の A ヌクレオチド同士を結合するリン酸基をホスホロチオエート化し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2 ' - O - メチル修飾を導入した配列

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

【 0 1 9 9 】

配列番号 1 7 (2 1)

40

配列番号 1 7 で表される配列の 5 ' 末端及び 3 ' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 3 箇所 に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における 2 番目の A のヌクレオチド同士を結合するリン酸基をホスホロチオエート化し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、2 番目の G のヌクレオチド同士を結合するリン酸基をホスホロチオエート化した配列

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

【 0 2 0 0 】

配列番号 1 7 (2 2)

50

配列番号17で表される配列の5'末端及び3'末端にidT修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち19箇所(2'-O-メチル修飾)を導入し、1ヶ所に8-(Propyl)phenyl-rA(n-bz)-2'-tBDMS amidite修飾を導入し、共通配列UAACのU及びCに2'-O-メチル修飾を導入し、共通配列GGGGにおける2番目のG以外のGに2'-O-メチル修飾を導入した配列

idT - A(PHE)A(M)U(M)G(M)A(M)U(F)C(F)G(M)G(M)A(M)C(M)A(M)U(M)AAC(M)A(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)G(M)GG(M)G(M)TG(M)U(M)C(M)A(M)A(M) - idT

【0201】

10

配列番号17(23)

配列番号17で表される配列の5'末端及び3'末端にidT修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち11箇所(2'-O-メチル修飾)を導入し、1ヶ所に8-(Propyl)phenyl-rA(n-bz)-2'-tBDMS amidite修飾を導入し、共通配列GGGGにおける2番目のG以外のGに2'-O-メチル修飾を導入した配列

idT - G(M)A(PHE)U(F)G(M)A(M)U(F)C(F)G(M)G(M)A(M)C(F)A(M)U(F)AAC(F)AU(F)U(F)G(M)U(F)U(F)G(M)GG(M)G(M)U(F)G(M)U(F)C(F)A(M)A(M) - idT

【0202】

20

配列番号17(24)

配列番号17で表される配列の5'末端にTC6F amidite修飾を導入し、3'末端にidT修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち20箇所(2'-O-メチル修飾)を導入し、共通配列UAACのU及びCに2'-O-メチル修飾を導入し、共通配列GGGGにおける2番目のG以外のGに2'-O-メチル修飾を導入した配列

idT - ZA(M)U(M)G(M)A(M)U(F)C(F)G(M)G(M)A(M)C(M)A(M)U(M)AAC(M)A(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)G(M)GG(M)G(M)TG(M)U(M)C(M)A(M)A(M) - idT

【0203】

配列番号17(25)

30

配列番号17で表される配列の5'末端にTC6F amidite修飾を導入し、3'末端にidT修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち20箇所(2'-O-メチル修飾)を導入し、共通配列UAACのU及びCに2'-O-メチル修飾を導入し、共通配列GGGGにおける2番目のG以外のGに2'-O-メチル修飾を導入した配列

idT - ZA(M)U(M)G(M)A(M)U(F)C(F)G(M)G(M)A(M)C(M)A(M)U(M)AAC(M)A(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)G(M)GG(M)G(M)TG(M)U(M)C(M)A(M)A(M) - idT

【0204】

配列番号17(1)~17(25)の核酸は全て化学合成により作製した。配列番号17(1)~17(25)の評価においては、実施例1で示したアンジオテンシン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評価方法と同様の方法を用いて測定した。測定の結果を表4に示す。表中、IC₅₀の値は2~3回測定の平均値を示す。

40

【0205】

50

【表 4】

配列番号	長さ	IC ₅₀ 【μM】
2	72	0.01000
17	32	0.00140
17(1)	32	0.04436
17(2)	32	0.00021
17(3)	32	0.00566
17(4)	32	0.00020
17(5)	32	0.00017
17(6)	32	0.00014
17(7)	32	0.00017
17(8)	32	0.00013
17(9)	32	0.00016
17(10)	32	0.00013
17(11)	32	0.00014
17(12)	32	0.00019
17(13)	32	0.00016
17(14)	32	0.00019
17(15)	32	0.00013
17(16)	32	0.00018
17(17)	32	0.00019
17(18)	32	0.00015
17(19)	32	0.00019
17(20)	32	0.00018
17(21)	32	0.00019
17(22)	32	0.00017
17(23)	32	0.00016
17(24)	32	0.00019
17(25)	32	0.00020

10

20

30

【0206】

表4に記載された配列番号17の改変体の多くはキマーゼに対する阻害活性を示した。特に0.001μM以下のIC₅₀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17(11)~配列番号17(14)の結果より、末端修飾による活性の影響はないことが示された。

40

【0207】

共通配列に含まれるヌクレオチドに関しては、配列番号17(1)や配列番号17(3)のように共通配列におけるGGGGの2番目のGを2'-O-メチル修飾すると、アプタマーとして十分な活性を有するものの活性が低下し、この部分の修飾態様の変化は活性に影響が認められることが示された。一方で配列番号17(2)のように共通配列におけるGGGGの2番目のG以外のGを2'-O-メチル修飾しても活性の影響はないことが示された。

【0208】

50

配列番号 17 (1) ~ 配列番号 17 (25) で表されるアプタマーの結果から、上記共通配列における G G G G の 2 番目の G 以外の修飾は安定性を向上させるため、本発明のアプタマーにおいては、活性を有する限り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。

【 0 2 0 9 】

以上より、配列番号 17 を化学修飾により改変することで、キマーゼに対するより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 2 1 0 】

実施例 4 : アプタマーのループ構造における塩基挿入の効果

10

配列番号 2 で表されるアプタマーのループ構造に塩基を挿入し、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 21 ~ 配列番号 25 に示す。

【 0 2 1 1 】

配列番号 21 ~ 25 の核酸は全て化学合成により作製した。以下に配列番号 21 ~ 25 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。

【 0 2 1 2 】

配列番号 21

20

配列番号 2 で表される配列のループ構造に 17 個の核酸塩基を挿入した配列
 G G C A G A U G A U C G G A C A U A A C A G G U U A G A U A G A G U U A A A A A
 C C U G G G G U G U C A A

【 0 2 1 3 】

配列番号 22

配列番号 2 で表される配列のループ構造に 15 個の核酸塩基を挿入した配列
 G G C A G A U G A U C G G A C A U A A C A G U U A G A U A G A G U U A A A A C
 U G G G G U G U C A A

【 0 2 1 4 】

配列番号 23

30

配列番号 2 で表される配列のループ構造に 13 個の核酸塩基を挿入した配列
 G G C A G A U G A U C G G A C A U A A C A G U A G A U A G A G U U A A A A C U G
 G G G U G U C A A

【 0 2 1 5 】

配列番号 24

配列番号 2 で表される配列のループ構造に 11 個の核酸塩基を挿入した配列
 G G C A G A U G A U C G G A C A U A A C A U A G A U A G A G U U A A A A U G G G
 G U G U C A A

【 0 2 1 6 】

配列番号 25

40

配列番号 2 で表される配列のループ構造に 9 個の核酸塩基を挿入した配列
 G G C A G A U G A U C G G A C A U A A C A A G A U A G A G U U A A A U G G G G U
 G U C A A

【 0 2 1 7 】

配列番号 21 ~ 25 の核酸は全て化学合成により作製した。

【 0 2 1 8 】

配列番号 21 ~ 25 の評価においては、キマーゼの量を 0.05 μg から 0.005 μg に変更した以外は実施例 1 で示した M C A を基質として用いた場合のキマーゼに対する阻害活性評価方法と同様の方法を用いて測定した。測定の結果を表 5 に示す。表中、I C₅₀ の値は 1 回の測定値を示す。

50

【 0 2 1 9 】

【表 5】

配列番号	ループ構造への挿入数	IC ₅₀ 【μM】
21	17	0.0057
22	15	0.0050
23	13	0.0078
24	11	0.0037
25	9	0.0058

10

【 0 2 2 0 】

表 5 に記載された配列はキマーゼに対する阻害活性を示した。何れも 0 . 0 1 μ M 以下の IC₅₀ 値を示しており阻害効果を維持していると言える。配列番号 2 のループ構造へは、17 塩基までの挿入であれば活性を維持していることがわかった。

【 0 2 2 1 】

実施例 5：最適化 S E L E X による RNA アプタマーの作製

キマーゼに特異的に結合し、より高い活性を有するアプタマーを獲得する目的で、最適化 S E L E X を実施した。最適化 S E L E X は、以下で記載する DNA 鋳型とプライマー以外は、実施例 1 で記載した S E L E X と同様である。

20

【 0 2 2 2 】

DNA 鋳型は、実施例 2 で取得した配列番号 17 を基に、一部をランダム配列とする 4 種類の DNA 鋳型を化学合成によって作製したものをを用いた。プライマーは、実施例 1 で使用した配列番号 35、配列番号 36 を使用した。DNA 鋳型のランダム配列部分（四角で囲った部分）を図 5 に示す。

【 0 2 2 3 】

DNA 鋳型：5' - T C A C A C T A G C A C G C A T A G G C C T T G A C A C C C C A A C A A T G T T A T G T C C G A T C A T C T G A C C T C T C T C C T G C T C C C - 3'（配列番号 40）

DNA 鋳型 1：配列番号 17 の四角で囲った部分に 9% のランダム配列（任意の組み合わせのヌクレオチドで A、G、C 又は T）をドーブした鋳型

30

DNA 鋳型 2：配列番号 17 の四角で囲った部分に 9% のランダム配列（任意の組み合わせのヌクレオチドで A、G、C 又は T）をドーブした鋳型

DNA 鋳型 3：配列番号 17 の四角で囲った部分に 15% のランダム配列（任意の組み合わせのヌクレオチドで A、G、C 又は T）をドーブした鋳型

DNA 鋳型 4：配列番号 17 の四角で囲った部分をランダム配列（任意の組み合わせのヌクレオチドで A、G、C 又は T）とした鋳型

【 0 2 2 4 】

DNA 鋳型 1、DNA 鋳型 2 を用いて S E L E X を 6 ラウンド行った後に各々 48 クローンの配列を調べたところ、配列に収束が見られた。同様に DNA 鋳型 3、DNA 鋳型 4 を用いて S E L E X を 3 ラウンド行った後に、各々 32 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 26 ~ 31 に示す。配列番号 26 ~ 31 で表される配列の二次構造予測を図 6 示す。式（1）で表されるステム / ループ構造を四角（ ）で囲った。

40

【 0 2 2 5 】

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' - O H 体であり、ピリミジン塩基（U 及び C）は 2' - フルオロ口修飾体である。

【 0 2 2 6 】

配列番号 26

50

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

【 0 2 2 7 】

配列番号 2 7

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

【 0 2 2 8 】

配列番号 2 8

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

10

【 0 2 2 9 】

配列番号 2 9

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

【 0 2 3 0 】

配列番号 3 0

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

【 0 2 3 1 】

配列番号 3 1

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

20

【 0 2 3 2 】

配列番号 2 6 ~ 3 1 の核酸は全て化学合成により作製した。そしてこれらの配列で表されるアプタマーには、実施例 2 で示されるアプタマーと同様の活性が認められた。

【 0 2 3 3 】

実施例 6 : 最適化 S E L E X で取得したアプタマーの短鎖化

配列番号 3 0 で表されるアプタマーの短鎖化を行った。配列番号 3 0 で表されるアプタマーは共通配列を含む。短鎖化した配列を配列番号 3 2 ~ 3 3 に示す。配列番号 3 2 ~ 3 3 で表されるアプタマーの二次構造予測を図 7 示す。図 7 中、式 (1) で表されるステム / ループ構造を四角 () で囲った。

30

【 0 2 3 4 】

以下に配列番号 3 2 ~ 3 3 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 ' - O H 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 2 3 5 】

配列番号 3 2

配列番号 3 0 で表される配列を、共通配列を含む 3 2 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列

40

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

【 0 2 3 6 】

配列番号 3 3

配列番号 3 0 で表される配列を、共通配列を含む 3 1 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列

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

【 0 2 3 7 】

配列番号 3 2 ~ 3 3 の核酸は全て化学合成により作製した。そしてこれらの配列で表されるアプタマーには、実施例 2 で示されるアプタマーと同様の活性が認められた。

【 0 2 3 8 】

50

実施例 7：最適化 S E L E X 及び短鎖化で取得したアプタマーの改変

配列番号 33 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 33 (1) ~ 33 (1 8) に示す。

【 0 2 3 9 】

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、P H E は 8 - (P r o p y l) p h e n y l - r A (n - b z) - 2' - t B D M S a m i d i t e を示す。また、各配列末端における i d T は i n v e r t e d - d T による修飾、P E G は 4 0 k D a の分岐型ポリエチレングリコールによる修飾、S はチオール基の修飾を示す。

10

【 0 2 4 0 】

配列番号 33 (1)

配列番号 33 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 5 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における U 及び C に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

20

【 0 2 4 1 】

配列番号 33 (2)

配列番号 33 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 3 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における U 及び C に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

30

【 0 2 4 2 】

配列番号 33 (3)

配列番号 33 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 7 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、1 箇所 に 8 - (P r o p y l) p h e n y l - r A (n - b z) - 2' - t B D M S a m i d i t e 修飾を導入し、共通配列 U A A C における U 及び C に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

40

【 0 2 4 3 】

配列番号 33 (4)

配列番号 33 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 5 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、1 箇所 に 8 - (P r o p y l) p h e n y l - r A (n - b z) - 2' - t B D M S a m i d i t e 修飾を導入し、共通配列 U A A C における U 及び C に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

50

A (M) G (M) G G (M) G (M) T G (M) T C (M) A (M) A (M) - i d T
 【 0 2 4 4 】

配列番号 3 3 (5)

配列番号 3 3 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 6 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、1 箇所 に 8 - (P r o p y l) p h e n y l - r A (n - b z) - 2' - t B D M S a m i d i t e 修飾を導入し、共通配列 U A A C における U 及び C に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

10

【 0 2 4 5 】

配列番号 3 3 (6)

配列番号 3 3 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 8 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における U 及び C に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

20

【 0 2 4 6 】

配列番号 3 3 (7)

配列番号 3 3 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 9 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における 2 番目の A 以外に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

30

【 0 2 4 7 】

配列番号 3 3 (8)

配列番号 3 3 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 9 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における 1 番目の A 以外に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

40

【 0 2 4 8 】

配列番号 3 3 (9)

配列番号 3 3 で表される配列の 5' 末端及び 3' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 9 箇所 に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における U 及び C に 2' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G に 2' - O - メチル修飾を導入した配列

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

50

i d T

【 0 2 4 9 】

配列番号 3 3 (1 0)

配列番号 3 3 で表される配列の 5 ' 末端及び 3 ' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 9 箇所 に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における U 及び C に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2 ' - O - メチル修飾を導入した配列

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

10

【 0 2 5 0 】

配列番号 3 3 (1 1)

配列番号 3 3 で表される配列の 5 ' 末端及び 3 ' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 8 箇所 に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における U 及び C に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2 ' - O - メチル修飾を導入した配列

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

20

【 0 2 5 1 】

配列番号 3 3 (1 2)

配列番号 3 3 で表される配列の 5 ' 末端及び 3 ' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 8 箇所 に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における U 及び C に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2 ' - O - メチル修飾を導入した配列

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

【 0 2 5 2 】

配列番号 3 3 (1 3)

配列番号 3 3 で表される配列の 5 ' 末端及び 3 ' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 2 0 箇所 に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における U 及び C に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2 ' - O - メチル修飾を導入した配列

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

30

【 0 2 5 3 】

配列番号 3 3 (1 4)

配列番号 3 3 で表される配列の 5 ' 末端及び 3 ' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 9 箇所 に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における U 及び C に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 G G G G における 2 番目の G 以外の G に 2 ' - O - メチル修飾を導入した配列

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

40

【 0 2 5 4 】

配列番号 3 3 (1 5)

配列番号 3 3 で表される配列の 5 ' 末端及び 3 ' 末端に i d T 修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち 1 9 箇所 に 2 ' - O - メチル修飾を導入し、共通配列 U A A C における U 及

50

びCに2'-O-メチル修飾を導入し、共通配列GGGGにおける2番目のG以外のGに2'-O-メチル修飾を導入した配列

i d T - A (M) U (M) G (M) A (M) U (F) C (F) G (M) G (M) A (M)
C (M) A (M) U (M) A A C (M) U (F) A (M) A (M) U (M) T (M) A (M)
G (M) G G (M) G (M) T G (M) U (M) C (M) A (M) A (M) - i d T
【 0 2 5 5 】

配列番号33(16)

配列番号33で表される配列の5'末端及び3'末端にidT修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち20箇所(10)に2'-O-メチル修飾を導入し、共通配列UAACにおけるU及びCに2'-O-メチル修飾を導入し、共通配列GGGGにおける2番目のG以外のGに2'-O-メチル修飾を導入した配列

i d T - A (M) U (M) G (M) A (M) U (F) C (F) G (M) G (M) A (M)
C (M) A (M) U (M) A A C (M) U (F) A (M) A (M) U (M) U (M) A (M)
G (M) G G (M) G (M) T (M) G (M) U (M) C (M) A (M) A (M) -
i d T
【 0 2 5 6 】

配列番号33(17)

配列番号33で表される配列の5'末端及び3'末端にidT修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち18箇所(20)に2'-O-メチル修飾を導入し、1箇所に8-(Propyl)phenyl-rA(n-bz)-2'-tBDMSamidite修飾を導入し、共通配列UAACにおけるU及びCに2'-O-メチル修飾を導入し、共通配列GGGGにおける2番目のG以外のGに2'-O-メチル修飾を導入した配列

i d T - A (P H E) U (M) G (M) A (M) U (F) C (F) G (M) G (M) A (M)
C (M) A (M) U (M) A A C (M) U (F) A (M) A (M) U (M) U (M)
A (M) G (M) G G (M) G (M) T G (M) U (M) C (M) A (M) A (M) - i
d T
【 0 2 5 7 】

配列番号33(18)

配列番号33で表される配列の5'末端に40kDaの分岐型ポリエチレングリコール修飾を導入し、3'末端にidT修飾を導入し、共通配列以外の配列のうち18箇所(30)に2'-O-メチル修飾を導入し、共通配列UAACにおけるU及びCに2'-O-メチル修飾を導入し、共通配列GGGGにおける2番目のG以外のGに2'-O-メチル修飾を導入した配列

P E G - A (M) U (M) G (M) A (M) U (F) C (F) G (M) G (M) A (M)
C (M) A (M) U (M) A A C (M) U (F) A (M) A (M) U (M) T A (M) G
(M) G G (M) G (M) T G (M) U (M) C (M) A (M) A (M) - i d T
【 0 2 5 8 】

配列番号33(1)~33(18)の核酸は全て化学合成により作製した。そしてこれらの配列で表されるアプタマーについて、実施例1で示したアンジオテンシン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評価方法と同様の方法を用いて測定した。結果を表6に示す。表中、IC₅₀の値は2~3回測定(40)の平均値を示す。

【 0 2 5 9 】

10

20

30

40

50

【表 6】

配列番号	長さ	IC ₅₀ 【μM】
2	72	0.010000
17	32	0.001400
33	32	0.000210
33(1)	31	0.000074
33(2)	31	0.000078
33(3)	31	0.000071
33(4)	31	0.000072
33(5)	31	0.000076
33(6)	31	0.000053
33(7)	31	0.000071
33(8)	31	0.000061
33(9)	31	0.001355
33(10)	31	0.000071
33(11)	31	0.000051
33(12)	31	0.000048
33(13)	31	0.000069
33(14)	31	0.000075
33(15)	31	0.000072
33(16)	31	0.000063
33(17)	31	0.000038
33(18)	31	0.000109

【0260】

表 6 に示されるように、改変体の多くはキマーゼに対する阻害活性を示した。特に 0.0001 μM 以下の IC₅₀ 値を示したアプタマーは非常に優れた阻害効果を示したと言える。以上のことから、配列番号 33 で表される配列に様々な修飾を施したアプタマーは安定性を向上させるため、本発明のアプタマーは、活性を有する限り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。

【0261】

共通配列に含まれるヌクレオチドに関しては、配列番号 33(9) のように共通配列における GGGG の 2 番目の G を 2'-O-メチル修飾すると、アプタマーとして十分な活性を有するものの、配列番号 33 で表される配列を有する他のアプタマー改変体と比較して活性が低下することが分かった。一方で、例えば配列番号 33(12) のように修飾しても活性に影響しなかった。

【0262】

配列番号 33(18) の結果より、PEG 結合アプタマーの活性は PEG が結合していないアプタマー（配列番号 33(12)）と比較しても、一定の活性が維持されていた。PEG を結合することで *in vivo* での薬物体内動態が大きく改善されるので、この結果より *in vivo* で効果を示すことが期待できる。

【0263】

以上の結果より、表 6 に含まれる、共通配列における G G G G の 2 番目の G を 2' - O - メチル修飾した核酸以外のすべての核酸は、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極めて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。

【産業上の利用可能性】

【 0 2 6 4 】

本発明のアプタマーは、線維症などの TGF - β の活性化が関与する各種疾患の予防および / または治療用医薬、診断薬または標識剤として有用であり得る。

【 0 2 6 5 】

本出願は、日本で出願された特願 2 0 1 7 - 2 3 0 5 0 3 (出願日 : 2 0 1 7 年 1 1 月 3 0 日) 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。

10

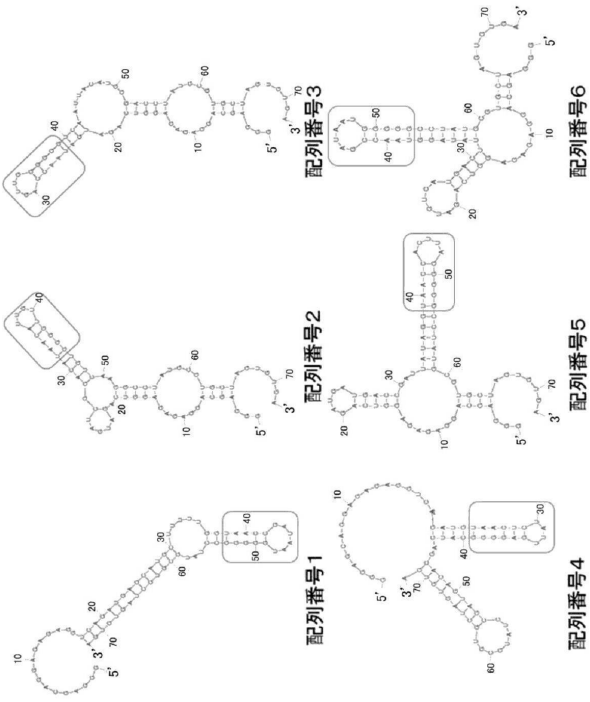
20

30

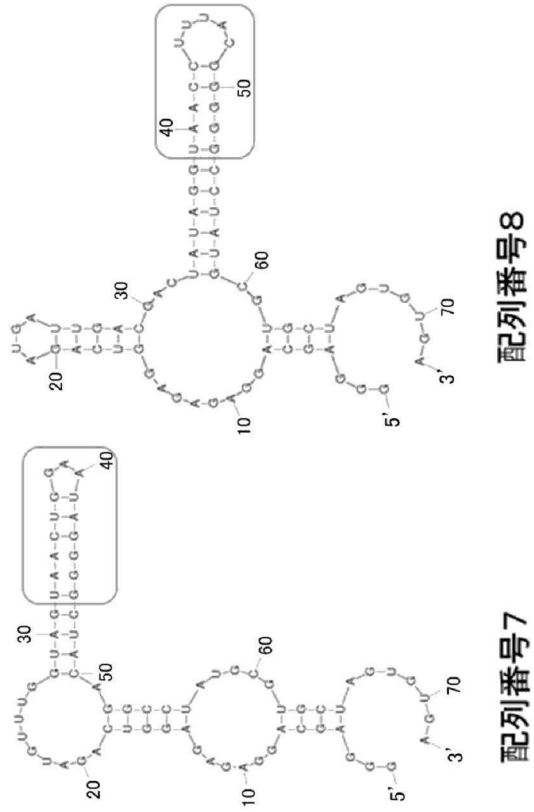
40

50

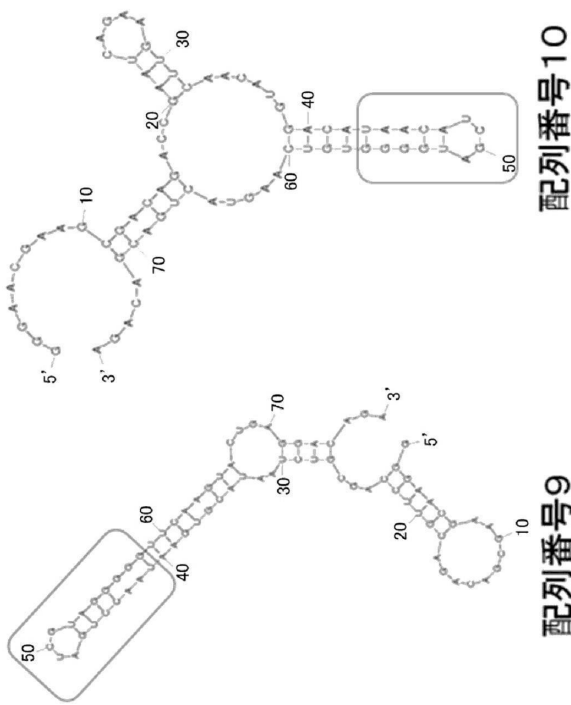
【図面】
【図 1】



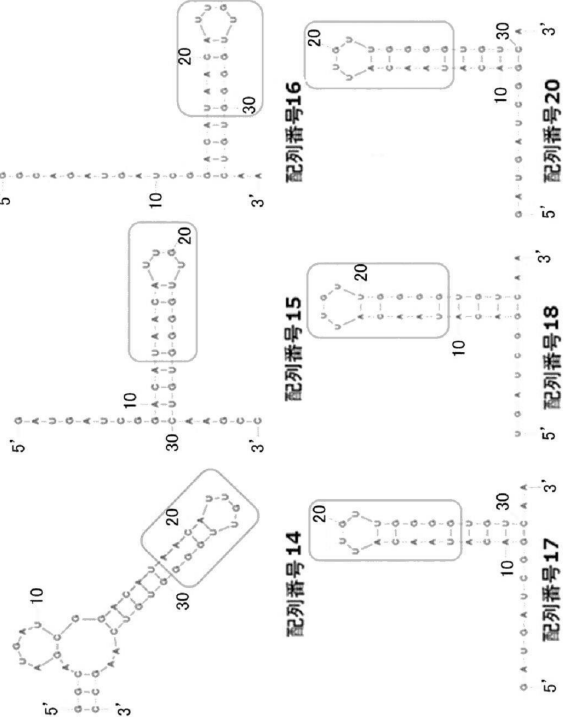
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

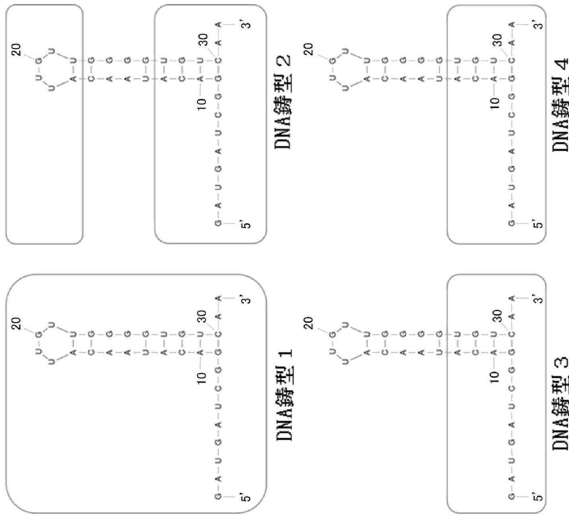
20

30

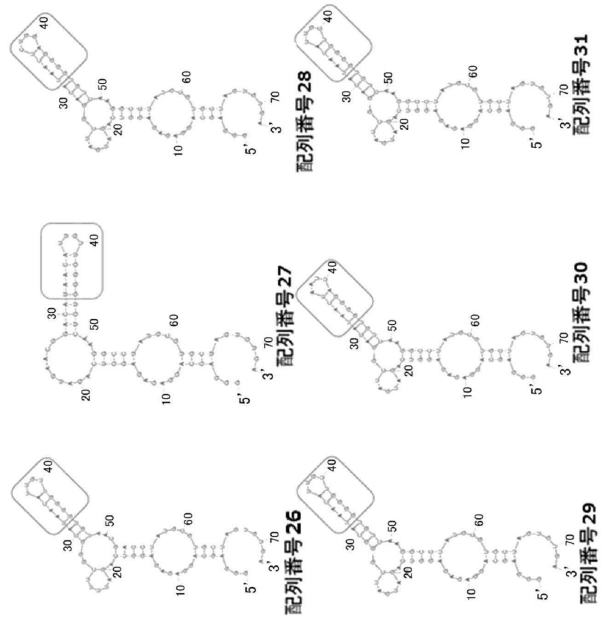
40

50

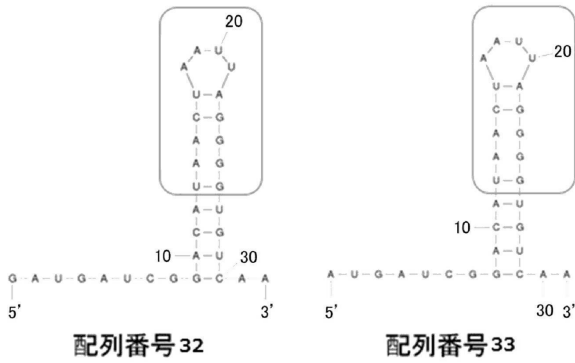
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

0007264487000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 31/7088(2006.01)

F I

A 6 1 K 31/7088

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(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 野中 洋介

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 中村 義一

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大手通3-2-27 大塚製薬株式会社内

(72)発明者 村田 香

大阪府大阪市中央区大手通3-2-27 大塚製薬株式会社内

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第2010/143714(WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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