

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年1月14日(14.01.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/006305 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 48/00 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/026755

(22) 国際出願日: 2020年7月8日(08.07.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2019-126940 2019年7月8日(08.07.2019) JP

(71) 出願人: 株式会社リボミック(RIBOMIC INC.)
[JP/JP]; 〒1080071 東京都港区白金台三丁目16番13号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 中村 義一(NAKAMURA, Yoshikazu);
〒1080071 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 Tokyo (JP). 高橋理貴(TAKAHASHI, Masaki); 〒1088639 東京都港区白金台4-6-1 東京大学医科学研究所内 Tokyo (JP). 橋下 芳史(HASHIMOTO, Yoshifumi); 〒1088639 東京都港区白金台4-6-1 東京大学医科学研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime);
〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH,

KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: APTAMER FOR TGF-β1 AND USE OF SAME

(54) 発明の名称: TGF-β1に対するアプタマー及びその使用

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide an aptamer for TGF-β1. This aptamer, which has four consecutive sets of G bases and binds to TGF-β1 containing a combination of nucleotide sequences represented by formulae (I) and (II), may be useful as a preventive and/or therapeutic medicine, a diagnostic agent, or a labeling agent for various diseases associated with the activation of TGF-β1. Formula (I): UAAX Formula (II): ARACUU (In the formulae, X represents a bond or GU, and R represents A or G.)

(57) 要約: 本発明は、TGF-β1に対するアプタマーを提供することを目的とする。連続したG塩基の集合を4つ有し、かつ下記式(I)および式(II)で表されるヌクレオチド配列の組合せを含むTGF-β1に結合するアプタマーはTGF-β1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。式(I): UAAX 式(II): ARACUU (式中、Xは、結合またはGUを表し; Rは、AまたはGを表す)



WO 2021/006305 A1

明 細 書

発明の名称： T G F - β 1 に対するアプタマー及びその使用

技術分野

[0001] 本発明は、トランスフォーミング増殖因子 β 1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

[0002] トランスフォーミング増殖因子 β (T r a n s f o r m i n g G r o w t h F a c t o r - β : T G F - β) は、当初、線維芽細胞の形質転換を促進する増殖因子として同定された (非特許文献 1、2)。近年の研究において、数多くの細胞種に対し増殖抑制、細胞分化、細胞接着・遊走、アポトーシスの誘導などに寄与することが明らかとなっている。よって T G F - β は個体発生や組織再構築、創傷治癒、炎症や免疫、癌の湿潤転移など幅広い領域において重要な役割を果たしていると考えられている。T G F - β にはアミノ酸配列に 70~80%の相同性を有する 5つのアイソフォームの存在が知られ、このうち最初に発見されたものが T G F - β 1 である。T G F - β 1 を始めとして各アイソフォームは高分子量の不活性型 (潜在型) として分泌され、標的細胞の近傍で活性化を受けて作用を発揮する。細胞外マトリックス蛋白質の産生および沈着促進活性は、T G F - β 1 の生物活性の大きな部分を占めている。線維化をきたす各種疾患 (肺線維症、肝線維症、スキルス胃癌等) においては血漿中の T G F - β 1 値が上昇する。また、腎糸球体病変、骨疾患、虚血性疾患などとの関連も注目されている。

[0003] T G F - β 1 に結合し、その機能を阻害する分子がこれまでに幾つか報告されている。抗 T G F - β モノクローナル抗体である L Y 2 3 8 7 7 0 (T G F - β 1 を認識) や F r e s o l i m u m a b (G C 1 0 0 8 ; T G F - β 1、2、および 3 を認識) は標的である T G F - β 1 に結合し (非特許文献 3)、その機能阻害効果によって、数種の悪性新生物および特発性肺線維症に対する新たな治療薬として期待されている (N C T 0 0 3 5 6 4 6 0、

NCT00923169、NCT01472731、NCT01112293、NCT01401062；非特許文献4）。また、TGF- β 1に結合し、機能阻害効果を示すペプチドも報告されている（非特許文献5）。低分子では、TGF- β 1が結合するTGF- β 1型受容体に結合することで機能阻害効果を示すGalunisertib（LY2157299）などが報告されている。

[0004] また、ヒトTGF- β 1に特異的な抗体は、TGF- β 1糸球体腎炎（非特許文献6）、神経癒痕（neural scarring）（非特許文献7）、皮膚癒痕（非特許文献8）、および肺線維症（非特許文献9）の処置について動物モデルで有効であることが示されてきた。さらに、TGF- β 1、2および3に対する抗体は、肺線維症、放射線誘発線維症（特許文献5）、骨髄線維症、火傷、デュピュイトラン拘縮、胃潰瘍および関節リウマチ（非特許文献10）のモデルに有効であることが示されてきた。

[0005] ところで、アプタマーは標的分子（タンパク質、糖鎖、ホルモン等）に特異的に結合する核酸を意味する。一本鎖のRNA（又はDNA）がとる三次元立体構造によって、標的分子に結合する。その取得にはSELEX法（Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment）と呼ばれるスクリーニング法が用いられる（特許文献1～3）。SELEX法で得られるアプタマーは80ヌクレオチド程度の鎖長であり、その後標的分子の生理阻害活性を指標に短鎖化を図る。さらに生体内での安定性向上を目的に化学修飾を加え、医薬品としての最適化を図る。アプタマーは標的分子との結合特性が高く、同様な機能をもつ抗体と比較してもその親和性は高い場合が多い。さらに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。また同じ分子標的医薬の低分子においては、中には難溶性のものもあり

、その製剤化には最適化が必要である場合もあるが、アプタマーは水溶性が高いため、その点でも有利である。さらに化学合成により生産されるので、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。

[0006] TGF- β に対するアプタマーとしては、Gilead Sciences社が開発していたアプタマーが存在する。そして特許文献4には、上記SELEX法により得られたTGF- β に結合するアプタマーが記載されている。しかしながら当該アプタマーは、本明細書中に具体的に示されるアプタマーとは配列が異なる。またこの文献には本明細書中に具体的に示されるアプタマーについては何ら示唆されていない。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：国際公開W091/19813号パンフレット
- 特許文献2：国際公開W094/08050号パンフレット
- 特許文献3：国際公開W095/07364号パンフレット
- 特許文献4：国際公開W02005/113811号パンフレット
- 特許文献5：米国特許第5,616,561号

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：Roberts AB et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Sep;78(9):5339-43.
- 非特許文献2：Anzano MA. et al., Cancer Res. 1982 Nov;42(11):4776-8.
- 非特許文献3：Grutter C. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 23;105(51):20251-6.
- 非特許文献4：Neuzillet C. et al., Pharmacol Ther. 2015 Mar;147:22-31.
- 非特許文献5：Gallo-Oller G. et al., Cancer Lett. 2016 Oct 10;381(1):67-75.

非特許文献6 : Border WA. et al., Nature. 1990 Jul 26;346(6282):371-4.
非特許文献7 : Logan A. et al., Eur J Neurosci. 1994 Mar 1;6(3):355-63.
非特許文献8 : Shah M. et al., Lancet. 1992 Jan 25;339(8787):213-4.
非特許文献9 : Giri SN et al., Thorax. 1993 Oct;48(10):959-66.
非特許文献10 : 1554341459068_0 et al., J Exp Med. 1993 Jan 1;177(1):22
5-30.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、TGF- β 1に対するアプタマー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

[0010] 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、TGF- β 1に特異的に結合するアプタマーを製造することに成功し、このアプタマーがTGF- β 1の活性を阻害することを示した。特に本アプタマーの多くは、特徴的なモチーフ配列と連続したG塩基の集合を4つ有し、従来公知のTGFアプタマーとは全く異なる構造を持つアプタマーである点で新しいものであった。

[0011] 即ち、本発明は、以下の発明などを提供するものである：

[1] 連続したG塩基の集合を4つ有し、かつ下記式(1)および式(11)で表されるヌクレオチド配列の組合せを含む、TGF- β 1に結合するアプタマー。

式(1) : U A A X

式(11) : A R A C U U

(式中、Xは、結合またはGUを表し；Rは、AまたはGを表す)

[2] 式(1) : U A A Xで表されるヌクレオチド配列が4つのG塩基の集合の最もN末端側に位置し、式(11) : A R A C U Uで表されるヌクレオチド配列が2つ目のG集合と3つ目のG集合の間に位置する、[1]に記載のアプタマー。

[3] [1] または [2] に記載のアプタマーであって、下記式 (I I I)
式 (I I I) : U A A X G G R N G G S G A R A C U U G K G V N R G G
(式中、Xは、結合またはGUを表し；Nは、任意の塩基を表し；Rは、A
またはGを表し；Sは、CまたはGを表し；Kは、GまたはUを表し；Vは
、A、CまたはGを表し；Bは、C、GまたはUを表す。(ただし、G塩基
の集合が4つとなる組合せに限る))

で表されるヌクレオチド配列を含む、アプタマー。

[4] [1] または [2] に記載のアプタマーであって、下記式 (I I I ')
)
式 (I I I ') : U A A X G G R B G G S G A R A C U U G K G V B R G G
(式中、Xは、結合またはGUを表し；Rは、AまたはGを表し；Sは、C
またはGを表し；Kは、GまたはUを表し；Vは、A、CまたはGを表し；
Bは、C、GまたはUを表す。(ただし、G塩基の集合が4つとなる組合せ
に限る))

で表されるヌクレオチド配列を含む、アプタマー。

[5] [1] または [2] に記載のアプタマーであって、下記式 (I I I ' ')
')
式 (I I I ' ') : A U A A G G G H G G G G A G A C U U G U G G W G G
G

(式中、Wは、AまたはUを表し；Hは、A、CまたはUを表す)

で表されるヌクレオチド配列を含む、アプタマー。

[6] 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されてい
る、[1] ~ [5] のいずれかに記載のアプタマー。

[7] 以下 (a) ~ (c) のいずれかのヌクレオチド配列を含む、TGF- β 1
に結合するアプタマー。

(a) 配列番号4~6、9、11、13、17~22、26~29または31
で表される配列

(b) 上記 (a) において、1ないし数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿

入又は付加された配列；または、

(c) 上記 (a) または (b) において、少なくとも一つのヌクレオチドが修飾された配列。

[8] ヌクレオチドの長さが55ヌクレオチド以下である、[1]～[6]のいずれかに記載のアプタマー。

[9] TGF- β 1とTGF- β 1の受容体との結合を阻害する、[1]～[8]のいずれかに記載のアプタマー。

[10] [1]～[9]のいずれかに記載のアプタマーおよび機能性物質を含む複合体。

[11] [1]～[9]のいずれかに記載のアプタマーまたは[10]に記載の複合体を含む医薬。

[12] [1]～[9]のいずれかに記載のアプタマーまたは[10]に記載の複合体を用いることを特徴とする、TGF- β 1の検出方法。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、TGF- β 1の活性を選択的に阻害することができる。従って、本発明によれば、TGF- β 1の過剰発現に起因する疾患等を治療することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、本発明のアプタマーがとり得る構造として予測される、連続したG塩基の集合を4つ有することで形成されるGカルテット構造及び特定の塩基配列（モチーフ配列）の位置関係を示す概略図である。黒い矢印は結合又は1又は複数の塩基を示す。白抜きの矢印は、Gカルテットを構成するグアノシンの4つの集合（本明細書において「G集合」と称することがある）を示す。なお本概略図では一例として平行型のGカルテット構造として表記しているが、他のGカルテット構造の型（アンチ平行型、ミックス型）や、また4重鎖以外の3重鎖やその他の立体構造を取り得る可能性を否定するものではない。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明を詳細に説明する。尚、本明細書において、核酸塩基の略号は以下の通りとする。

記号	意味	説明
A	A	アデニン
C	C	シトシン
G	G	グアニン
T	T	チミン
U	U	ウラシル
M	A又はC	アミノ
R	A又はG	プリン
W	A又はU	—
S	C又はG	—
Y	C又はU	ピリミジン
K	G又はU	ケト
V	A又はC又はG	—
H	A又はC又はU	—
B	C又はG又はU	—
N	A又はC又はG又はU	—

(小文字を使用した場合も同様である。)

[0015] 本発明は、TGF- β 1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、TGF- β 1の活性を阻害し得る。

[0016] 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、TGF- β 1に対して結合活性を有するアプタマーである。またTGF- β 1の活性を阻害し得るアプタマーであり得る。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。

[0017] TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) は、多機能性サイトカインであり、ほとんど全ての細胞で産生されるタンパク質である。TGF- β 1タンパク質は、前駆体ポリペプチド (UniProtKB-P01137、390アミノ酸残基：シグナルペプチド (1~29位)、LAP (30~278位)、成熟型 (或いは活性型) TGF- β 1 (279~390位)) として産生される。該前駆体ポリペプチドは、furin様プロテアーゼにより切断され、N末側のLAP (latency associated protein、249アミノ酸残基) およびC末側の成熟型TGF- β 1 (112アミノ酸残基) を生じる。LAP及び成熟型TGF- β 1部分は、ジスルフィド結合を介して各々ホモ二量体化する。かかるホモ二量体化した成熟型TGF- β 1とLAPは、非共有結合的に結合して複合体を形成する。ヒトを含む哺乳動物において、TGF- β には β 1、 β 2、 β 3の3つのアイソフォームが存在する。これらのアイソフォームの相同性は70~80%である。TGF- β 1は、細胞増殖、細胞分化の制御、上皮間葉転換の誘導、T細胞の分化制御を介した免疫系調節、血管新生の調節、細胞外基質の産生促進など多く機能を有することが知られている。上述した通り、TGF- β 1の阻害剤の投与により、がんや線維症等の疾患を治療し得ることが報告されている。

[0018] 本発明のアプタマーは、任意の哺乳動物に由来するTGF- β 1に対する結合活性を有する。また本発明のアプタマーは、任意の哺乳動物に由来するTGF- β 1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。尚、TGF- β 1のアミノ酸配列は野生型の配列に限定されず、野生型の配列に対して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。

[0019] 本発明のアプタマーは、生理的な緩衝液中でTGF- β 1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（実施例1参照）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、 $TGF-\beta 1$ へ特異的に結合するものである。

[0020] 結合強度の測定にはGEヘルスケア社製のBiacore T200等を用い得る。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（例、1500RU等）とする。アナライト用の $TGF-\beta 1$ 溶液は1nM~200nM（例、4nMまたは10nM等）に調製したものを20 μ Lインジェクトし、 $TGF-\beta 1$ のアプタマーへの結合を検出する。30~100ヌクレオチド（例、66、80、または90ヌクレオチド等）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 $TGF-\beta 1$ 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 $TGF-\beta 1$ への結合能を有すると判定することができる。

[0021] 別の測定方法としては、まずセンサーチップに $TGF-\beta 1$ を固定化する。固定化量は約1000RUとする。アナライト用のアプタマー溶液は10nM~200nM（例、20nMまたは100nM等）に調製したものを20 μ Lインジェクトし、アプタマーの $TGF-\beta 1$ への結合を検出する。30~100ヌクレオチド（例、66、80、または90ヌクレオチド等）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 $TGF-\beta 1$ 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 $TGF-\beta 1$ への結合能を有すると判定する。

[0022] $TGF-\beta 1$ に対する阻害活性とは、 $TGF-\beta 1$ 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、 $TGF-\beta 1$ の活性には、 $TGF-\beta$ 媒介シグナル伝達、細胞外マトリックス（ECM）沈着、上皮および内皮細胞増殖の阻害、平滑筋増殖の促進、コラーゲン発現の誘導、 $TGF-\beta$ 、フィブロネクチン、VEGFおよびIL-11の発現の誘導、腫瘍誘導免疫の

抑制、血管新生の促進、筋線維芽細胞の活性化、転移の促進、ならびにNK細胞活性の阻害等が含まれるが、これらに限定されない。本発明のアプタマーは、これらのTGF- β 1の活性の少なくとも1つを阻害する。

[0023] TGF- β 1の活性をアプタマーが阻害するか否かは、例えば、実施例に記載されるように、TGF- β の刺激によって活性化することが知られているSmadシグナリングパスウェイをモニターする細胞アッセイ系によって評価することができる。簡潔には、次のような手段により評価が可能である：プロモーター領域にSBE (Smad-binding element) を搭載したフォティナスルシフェラーゼをレポーターとして用いる。このSBE誘発フォティナスルシフェラーゼレポータープラスミドと共に、トランスフェクション効率の標準化コントロールとしてレニラルシフェラーゼ発現プラスミドを適切な比率（例えば20：1）で混合し、HEK293細胞にトランスフェクションする。トランスフェクションしたHEK293細胞を改めて96ウェルプレートにまき直しコンフルエントになるまで培養する。そこへTGF- β 1とT7 RNAポリメラーゼを用いて合成したアプタマーあるいは化学合成したアプタマーの混合液を適切な終濃度（例えば、10pM~100nM等）になるように添加し、1~8時間（例、3時間等）培養する。その後、適切な手段を用いてフォティナスルシフェラーゼとレニラルシフェラーゼの発現量を確認する。発現量を適宜補正した後に比較することで、TGF- β 1の活性をアプタマーが阻害するか否かを評価することができる。

[0024] 一態様において、本発明のアプタマーは、G塩基の集合を4つ有し、かつ、下記式(1)および式(11)で表されるヌクレオチド配列の組合せを含む、TGF- β 1に結合するアプタマーである。

[0025] 式(1)：U A A X

式(11)：A R A C U U

[0026] (式中、Xは、結合またはGUを表し；Rは、AまたはGを表す)。

尚、「結合」とは、Xの位置にはヌクレオチドが存在せず、Xの5'側に

隣接するヌクレオチド（即ち、アデノシン5' -リン酸）が、Xの3' 側に隣接するリボヌクレオチドとホスホジエステル結合でつながっている状態を意味する。

[0027] 一態様において、本発明のアプタマーは、前述したようにG塩基の集合を4つ有し、かつ、式(1) : U A A X、そして式(11) : A R A C U Uでそれぞれ表されるヌクレオチド配列も有するという特徴を有している。4つの「G塩基の集合」、「式(1)で表されるヌクレオチド」、「式(11)で表されるヌクレオチド」の並びは特に限定されるものではないが、好ましくは、本発明のアプタマーを構成する式(1) U A A Xで示されるモチーフは、最もN末端側に位置するG集合（以下、本発明のアプタマーに含まれる4つのG集合を、N末端側から「1つ目のG集合」、「2つ目のG集合」、「3つ目のG集合」、及び「4つ目のG集合」と称することがある）のN末端側に存在し、式(11) A R A C U Uで示されるモチーフは2つ目のG集合と3つ目のG集合の間に存在する。なお本概略図（図1）では一例として平行型のGカルテット構造として表記しているが、他のGカルテット構造の型（アンチ平行型、ミックス型）や、また4重鎖以外の3重鎖やその他の立体構造を取り得る可能性を否定するものではない。

[0028] 上記した「G塩基の集合」におけるG塩基の数は、2以上であればG塩基が連続している限りにおいて特に限定されないが、好ましくは5以下であり、より好ましくは2~4である。4つある全ての「G塩基の集合」が全て同じG塩基数となる必要はなく、本発明のアプタマーが所望の活性を有する限りにおいて適切なG塩基数を選択することができる。ただし「2つ目のG集合」のG塩基数は4であることが望ましく、「4つ目のG集合」のG塩基数は3であることが望ましい。

[0029] 上記した「G塩基の集合」と「式(1)で表されるヌクレオチド」、「式(11)で表されるヌクレオチド」のそれぞれは、本発明のアプタマーが所望の活性を有する限りにおいて直接隣接していてもよいし、隣接していなくても良い。隣接していない場合の間隔としては、特に限定されないものの、

1～数塩基、例えば1～9塩基、1～5塩基、1～3塩基程度が望ましい。2つの「G塩基の集合」の間には少なくとも1塩基のG以外の塩基が存在する。

[0030] 本発明のアプタマーがとり得る構造体として予測されるGカルテット構造とは、本技術分野において周知の構造であり、グアノシヌクレオチド(G)に富むDNA又はRNAにおける分子間及び分子内の四重鎖構造である。Gカルテット構造は、4つのグアノシン塩基が互いに隣接する2つのグアノシン塩基とフーグスティン型塩基対によって環状に4量体化した面を基本構造とする。最終的に2～3面積み重なり、安定な四重鎖構造を形成する(G-quadruplex)。

[0031] 本発明のアプタマーが有し得るGカルテット構造を図1に例証する。図1における白い矢印はGカルテット構造に関与する、連続する2個以上のG(「G集合」)を意味し、黒い矢印は結合又は1又は複数の塩基を意味する。

[0032] Gカルテット構造を有するアプタマーであることは、自体公知の測定手段によって確認することができる。例えば、CDスペクトルを用いて、所定の波形を確認することでGカルテット構造を有するアプタマーであると確認できる。より具体的には、アプタマーをTBS緩衝液(10mM Tris-HCl、150mM NaCl、5mM KCl、pH7.4)に溶解して試料液を調製し、温度20℃、波長200nm～320nm、走査速度100nm/分、積算回数10回の条件下でスペクトル測定したときのCDスペクトルにおいて、240nm近傍の極小値と260nm近傍での極大値の出現により確認できる。

[0033] 本発明のアプタマーは、別の一態様において、連続したG塩基の集合を4つ有し、かつ、下記式(111)で表されるヌクレオチド配列の組合せを含む、TGF-β1に結合するアプタマーである。

[0034] 式(111) : U A A X G G R N G G S G A R A C U U G K G V N R G G
(式中、Xは、結合またはGUを表し；Nは、任意の塩基を表し；Rは、AまたはGを表し；Sは、CまたはGを表し；Kは、GまたはUを表し；Vは

、A、CまたはGを表し；Bは、C、GまたはUを表す（ただし、G塩基の集合が4つとなる組合せに限る）。尚、「ただし、G塩基の集合が4つとなる場合に限る」とは、前記式中のG塩基の集合が4つとならない組合せを生じる塩基の組み合わせが除外されることを意味する。前記式中のG塩基の集合が4つとならない組合せを生じる塩基の組み合わせとしては、以下が例示されるがこれらに限定されない：

- (1) KがG、
- (2) 第1番目のRがGであり、且つ、第1番目のNがG、
- (3) K、V、第2番目のN、及び第3番目のRが全てG。

[0035] 一態様において、式(111)は以下の配列であり得る。

式(111-1) : UAAGGRNGGSGARACUUGKGVNRGG
(Xが結合である場合(配列番号49))、

式(111-2) : UAAGUGGRNGGSGARACUUGKGVNRGG
(XがGUである場合(配列番号50))

(式中、N、R、S、K、VおよびBは上述の通りであり、且つ、G塩基の集合が4つとなる組合せに限る。)

[0036] 本発明のアプタマーは、別の一態様において、連続したG塩基の集合を4つ有し、かつ、下記式(111')で表されるヌクレオチド配列の組合せを含む、TGF-β1に結合するアプタマーである。

[0037] 式(111') : UAAXGGRBGGSGARACUUGKGVBRGG
(式中、Xは、結合またはGUを表し；Rは、AまたはGを表し；Sは、CまたはGを表し；Kは、GまたはUを表し；Vは、A、CまたはGを表し；Bは、C、GまたはUを表す(ただし、G塩基の集合が4つとなる組合せに限る))。

[0038] 一態様において、式(111')は以下の配列であり得る。

式(111'-1) : UAAGGRBGGSGARACUUGKGVBRGG
(Xが結合である場合(配列番号51))；

式(111'-2) : UAAGUGGRBGGSGARACUUGKGVBRGG

RGG (XがGUである場合 (配列番号52))

(式中、R、S、K、VおよびBは上述の通りであり、且つ、G塩基の集合が4つとなる組合せに限る。)

[0039] 本発明のアプタマーは、別の一態様において、連続したG塩基の集合を4つ有し、かつ、下記式 (| | | ' ') で表されるヌクレオチド配列の組合せを含む、TGF-β1に結合するアプタマーである。

[0040] 式 (| | | ' ') : AUAAGGGHGGGGAGACUUGUGGWGG
G

(式中、Wは、AまたはUを表し；Hは、A、CまたはUを表す) (配列番号34)

[0041] また、本発明の別の一態様において、本発明のアプタマーには、以下のTGF-β1に結合する活性および/またはTGF-β1の生物学的活性を阻害する活性を有するアプタマーも含まれ得る：

(a) 配列番号4~6、9、11、13、17~22、26~29または31で表される塩基配列を含むアプタマー、

(b) (a) において、1ないし数個 (例、1個、2個、3個、4個、又は5個) のヌクレオチドが置換、欠失、挿入、または付加された配列を含むアプタマー、または

(c) (a) または (b) において、少なくとも一つのヌクレオチドが修飾された配列を含むアプタマー。

尚、ここに列挙したアプタマーには、上述の共通モチーフを含まないアプタマーも含まれ得る (即ち、配列番号：5、11、13、18、19、20、22、26、および27)。

[0042] 本発明の別の一態様において、本発明のアプタマーは以下のアプタマーである：

(a) 配列番号4~6、9、11、13、17~22、26~29または31で表される塩基配列からなるアプタマー、

(b) (a) において、1ないし数個 (例、1個、2個、3個、4個、又は

5個)のヌクレオチドが置換、欠失、挿入、又は付加された配列からなるアプタマー、または

(c) (a) または (b) において、少なくとも一つのヌクレオチドが修飾された配列からなるアプタマー。

[0043] 本発明のアプタマーの長さは特に限定されず、通常、約25～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55ヌクレオチド以下であり、より好ましくは約45ヌクレオチド以下であり、最も好ましくは約35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25ヌクレオチド以上であり、好ましくは、約28ヌクレオチド以上であり、より好ましくは約29ヌクレオチド以上であり、特に好ましくは約30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3次構造が不安定となってしまう場合は活性を有しない場合もある。

[0044] 本発明のアプタマーは、特異的にTGF- β 1に結合することで、TGF- β 1の活性を阻害する。本発明のアプタマーは、TGF- β 1の活性を阻害し得るものである限り、TGF- β 1のいずれの部分に結合するものであっても、またいかなる作用機序によってTGF- β 1の活性を阻害するものであってもよいが、一態様において、本発明のアプタマーは、TGF- β 1に結合することで、TGF- β 1とTGF- β 1の受容体との結合を阻害することにより、TGF- β 1の活性を阻害し得るものである。尚、TGF- β 1の活性を阻害することが分かっているアプタマーは、TGF- β 1への結合を確認するまでもなく、TGF- β 1に結合するアプタマーであることは明らかである。

[0045] また、本発明のアプタマーは、TGF- β 1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、 $-NH_2$ ）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）。

[0046] 一態様において、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（「OMe基」とも記載する場合がある））、-O-アシル基（例、-O-COMe基）、アミノ基（例、 $-NH_2$ 基）で置換されているヌクレオチドが挙げられる。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 本発明のアプタマーの修飾はさらに、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。このような修飾については、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。

[0051] 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。

[0052] 本発明のアプタマーは、本明細書中の開示する方法又は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、D

NA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。

[0053] 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OligoPilot100やOligoProcess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。

[0054] 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。

[0055] 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。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。

[0056] 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。

[0057] 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。

[0058] 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ピングしたテンプレートを作製して、再度SELEXを行うものである。

[0059] 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約50ヌクレオチド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、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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 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（以下、「本発明の複合体」と称することがある）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、クラドリビン又はフルダラビ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ビンなどのピリミジン類似体、ビンブラスチン、ビンクリスチン又はビンオレルビンなどのビンカア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、ドキシソルビシン、エピルビシン、イダルビ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、ブ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ザ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、イリノテカン及びビカルタミド）、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、トロンビ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。

[0065] 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。

[0066] 本発明のアプタマー及び複合体は、 $TGF-\beta 1$ の活性を選択的に阻害することができる。 $TGF-\beta 1$ は、細胞の増殖および分化、胚発生、細胞外基質形成、骨の発達、創傷治癒、造血、ならびに免疫反応および炎症反応に

関与している多機能性サイトカインである。従って、 $TGF-\beta 1$ の過剰発現は、ヒトにおいて、多数の状態、例えば、線維性疾患、がん、免疫媒介性疾患、創傷治癒、腎臓疾患等に関連があるとされている。従って、本発明のアプタマー及び複合体は、これらの疾患を治療又は予防するための医薬としても有用である。

[0067] 本発明のアプタマー及び複合体は、糸球体腎炎、神経癱瘓、皮膚癱瘓、肺線維症、放射線誘発線維症、肝線維症、骨髄線維症等の線維性疾患の治療又は予防に有用であり得る。

[0068] 本発明のアプタマー及び複合体は、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、胃がん、腎臓がん、膵臓がん、結腸直腸がん、皮膚がん、肺がん、子宮頸部がん、膀胱がん、グリオーマ、中皮腫、白血病、および肉腫等のがんの治療又は予防に有用であり得る。

[0069] 本発明のアプタマー及び複合体は、マクロファージ媒介感染に対する免疫応答の増強や、腫瘍やAIDS等によって引き起こされる免疫抑制の減少に有用であり得る。

[0070] また本発明のアプタマー及び複合体は、全身性硬化症、術後癒着、ケロイド、肥厚性癱瘓、角膜損傷、白内障、ペイロニー病、肝硬変、心筋梗塞後癱瘓、血管形成術後再狭窄、くも膜下出血後癱瘓、胆汁性肝硬変（硬化性胆管炎を含む）等の創傷を治療するために有用であり得る。

[0071] また、本発明のアプタマー及び複合体は、糖尿病性（I型およびII型）腎障害、放射線誘発性腎症、閉塞性腎症、遺伝性腎臓疾患（例えば、多発性嚢胞腎、海綿腎、馬蹄腎）、糸球体腎炎、腎硬化症、腎石灰化症、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、バージャー病、全身性または糸球体性高血圧、尿細管間質性腎炎、尿細管性アシドーシス、腎結核及び腎梗塞等の腎臓疾患の治療又は予防に有用であり得る。

[0072] 本発明のアプタマー及び複合体は、 $TGF-\beta 1$ に特異的に結合し得る。従って、本発明の別の一態様において、本発明のアプタマー及び複合体は、 $TGF-\beta 1$ 検出用プローブとして有用であり得る。該プローブは、 TGF

- $\beta 1$ 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、TGF- $\beta 1$ が関与する疾患（癌や線維症等）の診断薬、検査薬、試薬等として有用であり得る。

[0073] また、そのTGF- $\beta 1$ 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TGF- $\beta 1$ の分離精製用リガンドとして使用され得る。

[0074] 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。

[0075] 本発明のアプタマー又は本発明のアプタマーを含む複合体が配合される本発明の医薬は、さらに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、マンニット、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。

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] また、本発明の医薬は必要により、味のマス킹、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。

[0079] 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。

[0080] また、徐放製剤も好適な製剤として挙げるることができる。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。

- [0081] 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。
- [0082] 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体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、フロンー11、フロンー12、フロンー21、フロンー22、フロンー113、フロンー114、フロンー123、フロンー142c、フロンー134a、フロンー227、フロンー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。
- [0083] 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）、ステアシ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。

[0084] 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。

[0085] 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、TGF- β 1の精製、及びTGF- β 1の検出、定量に有用であり得る。

[0086] 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。

[0087] 本発明はまた、TGF- β 1の精製及び濃縮方法を提供する。特に本発明はTGF- β 1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TGF- β 1を吸着させ、吸着したTGF- β 1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TGF- β 1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、TGF- β 1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。TGF- β 1の溶出は、TGF- β 1の公知の特性を考慮して、適宜溶出液を選択すればよい。本発明の精製及び濃縮方法はさらに、TGF- β 1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。洗浄液は、TGF- β 1の公知の特性を考慮して適宜選択すればよい。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。

[0088] 本発明はまた、 $TGF-\beta 1$ の検出及び定量方法を提供する。特に本発明は $TGF-\beta 1$ 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） $TGF-\beta 1$ を測定することを含み得る。 $TGF-\beta 1$ 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 $TGF-\beta 1$ 量の測定、 $TGF-\beta 1$ が関連する疾患の診断に有用であり得る。

[0089] 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。

[0090] 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

[0091] [実施例1] $TGF-\beta 1$ に特異的に結合するRNAアプタマーの作製1

$TGF-\beta 1$ 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 (G

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 (pH7.6)、0.05% Tween 20の混合溶液である。TGF- β 1に結合したRNAは、溶出液として溶液Bを加えて90°Cで5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、5 mM EDTA、0.1 M トリス (pH7.6)の混合液である。回収されたRNAはRT-PCRで増幅し、T7 RNAポリメラーゼ (Y639F)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 α (TAKARA社製)をトランスフォーマーシオンした。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 (FASMAC社に委託)でクローンの塩基配列を調べた。

[0096] SELEXを5ラウンド行った後に88クローンの配列を調べたところ、配列に収束が見られた。2つ以上のクローンが得られた配列として配列番号4から13が得られた。

[0097] 以下に配列番号4~13のヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、実施例中に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表し、各ヌクレオチドは、プリン (A及びG)が2'-OH (天然RNA型)であり、ピリミジン (U及びC)が2'-フルオロ修飾体であることを意味している。また、プライマー結合配列は小文字で表記する。

[0098] 配列番号4 : g g g a u c c g c a u c u a g a g u a c U A A G G G U G
G G G A G A C U U G G G C C G G G C A G U C A G A C G C G U G A a a
c g u c u a c u g a a g c u a u c a

配列番号5 : g g g a u c c g c a u c u a g a g u a c A U C G U G G C
G G G A A A G C C G C C C C A U U C U C U C G G G U C C U A G A a a
c g u c u a c u g a a g c u a u c a

配列番号6 : g g g a u c c g c a u c u a g a g u a c U U G U A U A A

GUGGAGGGCGAGACUUGGGAGGGGCGAAUUGA a a
c g u c u a c u g a a g c u a u c a

配列番号7 : g g g a u c c g c a u c u a g a g u a c G A A U A G U A
A G G G A A U G A C U C U C G G A C C A A U G U A U U G C U A U a a
c g u c u a c u g a a g c u a u c a

配列番号8 : g g g a u c c g c a u c u a g a g u a c G A U G U G C U
U G U G C U G A A A U U A G A U U U C G C C G A C U U U C C C U a a
c g u c u a c u g a a g c u a u c a

配列番号9 : g g g a u c c g c a u c u a g a g u a c C A U A A G G G
U G G G A G A C U U G G G A G A G G G C A A A G A A G A C U A a a
c g u c u a c u g a a g c u a u c a

配列番号10 : g g g a u c c g c a u c u a g a g u a c G A U G C A U
G U U U U A U A A A G U A U U G U U A U G U A A U G C A U C A A a
a c g u c u a c u g a a g c u a u c a

配列番号11 : g g g a u c c g c a u c u a g a g u a c C G C G U G A
G C G G C G U C U U G C U A U G A C G U A A A G A A U C G U U A C a
a c g u c u a c u g a a g c u a u c a

配列番号12 : g g g a u c c g c a u c u a g a g u a c C U A G A G G
U G A C U U G G A C G C G A G U U A U A A G G G A A U A G U C C a
a c g u c u a c u g a a g c u a u c a

配列番号13 : g g g a u c c g c a u c u a g a g u a c A C U A G U C
A C A U U G C G U G U A C A U U A C U C U G C G C A A U C G A U A a
a c g u c u a c u g a a g c u a u c a

[0099] [実施例2] TGF- β 1 に特異的に結合するRNAアプタマーの作製2

ランダム配列が35ヌクレオチドで、プライマー配列が実施例1で用いたものと異なる鋳型を用いて、実施例1と同様のSELEXをおこなった。SELEXの標的物質としてNHS-activated Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare社製)の担体

に固相化したTGF- β 1 (Recombinant Human TGF- β 1、Peprotech社製)を用いた。使用した鋳型とプライマーの配列を以下に示す。DNA鋳型とプライマーは化学合成により作製した。

[0100] DNA鋳型配列：5' -GACTGACGTCGCACTNNAGCTCCAAGTTCTCCC-3' (配列番号14)

プライマーFwd：5' -TAATACGACTCACTATAGGGAGAACTTGGAGCT-3' (配列番号15)

プライマーRev：5' -GACTGACGTCGCACT-3' (配列番号16)

[0101] DNA鋳型(配列番号14)中のNは、ヌクレオチド(A、G、C又はT)の任意の組み合わせである。またプライマー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。

[0102] SELEXを7ラウンド行った後に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。その中から、代表的な配列として配列番号17~22が得られた。

[0103] 以下に配列番号17~22のヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、実施例中に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表し、各ヌクレオチドは、プリン(A及びG)が2'-OH(天然RNA型)であり、ピリミジン(U及びC)が2'-フルオロ修飾体であることを意味している。また、プライマー結合配列は小文字で表記する。

[0104] 配列番号17：gggagaaacuuggagcuGAUGUCUGGAGUCCCAUAUAUCACGUACAGUGUagugcgacgucaguc

配列番号18：gggagaaacuuggagcuCCCCUCGCACUAAUGGGUUCUGUGGCUGGAGAAagugcgacgucaguc

配列番号19：gggagaaacuuggagcuCCCCUCGCAU

[0107] DNA鋳型（配列番号23）中のNは、ヌクレオチド（A、G、C又はT）の任意の組み合わせである。またプライマー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。

[0108] SELEXを8ラウンド行った後に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。その中から、代表的な配列として配列番号26～28が得られた。

[0109] 以下に配列番号26～28のヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、実施例中に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表し、各ヌクレオチドは、プリン（A及びG）が2'-OH（天然RNA型）であり、ピリミジン（U及びC）が2'-フルオロ修飾体であることを意味している。また、プライマー結合配列は小文字で表記する。

[0110] 配列番号26 : g g g a a u g c a c u a g u g u u c a a C C C C G A C
C A A U A G C A G C C C G U C U U U A A C U A U U G G A A U C G C A
U A C G G G C C C a a g c u u g c a c g u c g a g u c a g

配列番号27 : g g g a a u g c a c u a g u g u u c a a C A U U U A G
C A A C A C A A G U C G U C C C C C A C G G C A A G C A G U C C U C
A A U C C U G A C a a g c u u g c a c g u c g a g u c a g

配列番号28 : g g g a a u g c a c u a g u g u u c a a U A A A C A C
U A A G U G A U C C U C C U G C A A G C U A U G A A G A A C U U A A
C G G C U C G U A a a g c u u g c a c g u c g a g u c a g

[0111] [実施例4]アプタマーのTGF- β 1に対する阻害活性の測定1

配列番号4～13、17～22、26～28の核酸が、TGF- β 1の活性を阻害するかどうかを、TGF- β の刺激によって活性化することが知られているSmadシグナリングパスウェイをモニターする細胞アッセイ系によって評価した。具体的には、プロモーター領域にSBE（Smad-binding element）を搭載したフォティナスルシフェラーゼをレポーター（pGL4.48 [Luc2P/SBE/Hygro] Vector、Promega社）として用いた。このSBE誘発フォティナスルシ

フェラーゼレポータープラスミドと共に、トランスフェクション効率の標準化コントロールとしてレニラルシフェラーゼ発現プラスミド (pGL4.74 [hRLuc/TK] Vector, Promega社) を20:1の比率になるように混合し、HEK293細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションしたHEK293細胞を改めて96ウェルプレートにまき直しコンフルエントになるまで培養した。そこへ、TGF- β 1と、T7 RNAポリメラーゼ (Y639F) を用いて合成した配列番号4~13、17~22、26~28の核酸アプタマーの混合液を終濃度が、それぞれ80 pM、20 nMになるように添加し、3時間培養した。その後Dual-Luciferase (登録商標) Reporter Assay System (Promega社) を用いてフォティナスルシフェラーゼとレニラルシフェラーゼの発現量を確認した。各サンプルのフォティナスルシフェラーゼの測定値は、レニラルシフェラーゼの測定値で補正し、TGF- β 1を添加していないサンプルのフォティナスルシフェラーゼとレニラルシフェラーゼの比を1として各サンプルの相対的な発現量を算出した。さらにTGF- β 1のみを添加したサンプルの相対的な発現量を阻害率0%として、TGF- β 1を添加していないサンプルの相対的な発現量を阻害率100%と定義し、それぞれの核酸を添加した際の阻害活性を求めた。ネガティブコントロールとして、35 N、40 Nまたは50 Nの核酸プール (配列番号14、1、23)、ポジティブコントロールとして既知のTGF- β 抗体 (R&D社 MAB1835) を用いた場合も同様に処理し、測定を行った。その結果を表1に示す。

[0112] アプタマーのTGF- β 1に対する阻害活性の測定2

配列番号6、9、19、21、26の核酸がTGF- β 1のTGF- β レセプターへの結合を阻害するかどうかを、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 T200を用い、以下に示す方法で測定を行った。CM4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1500 RUのプロテインAを固定化

した。流速 $20 \mu\text{L}/\text{min}$ で、アナライトとして 30 nM に調整した Fc 融合 TRIL レセプター (R&D 社) を $20 \mu\text{L}$ インジェクトした。これにより Fc 融合 TRIL レセプターがプロテイン A を介して CM4 チップのセンサーチップ表面に固定化される。さらに TGF- β 1 (4 nM) または TGF- β 1 (10 nM) と核酸 (30 nM) の混合溶液をインジェクトした。ランニングバッファーには溶液 A を用いた。TGF- β 1 のみをインジェクトしたサンプルの RU 値と TGF- β 1 をインジェクトする前の RU 値を基準とし、核酸存在下で TGF- β 1 をインジェクトした際の RU 値の上昇抑制効果を TGF- β 1 の TRIL レセプターへの結合阻害効果として算出した。TGF- β 1 : 核酸 (Apt) = $10 \text{ nM} : 30 \text{ nM}$ の場合の結果を表 1 に示す。

[0113]

[表1]

	結合 +++ ≥ 50 RU ++ 31~50 RU + 11~30 RU - ≤ 10 RU	BIAcore阻害(%) TGF-β1:Apt= 10nM: 30nM	細胞(リンフェラーゼ アッセイ阻害率(%)) TGF-β1:Apt= 80pM: 20nM
配列番号1	-	not tested	8
配列番号14	-	not tested	25
配列番号23	-	not tested	0
TGF-β1抗体	not tested	not tested	100 (TGF-β1:抗体= 80pM:2.74nM)
配列番号4	not tested	not tested	63
配列番号5	++	not tested	11
配列番号6	not tested	74.98	98
配列番号7	-	not tested	21
配列番号8	-	not tested	22
配列番号9	not tested	70.25	80
配列番号10	-	not tested	15
配列番号11	++	not tested	32
配列番号12	-	not tested	14
配列番号13	+	not tested	19
配列番号17	+	not tested	7
配列番号18	++	not tested	16
配列番号19	not tested	92.71	91
配列番号20	++	not tested	16
配列番号21	+++	92.59	100
配列番号22	++	not tested	16
配列番号26	not tested	84.3	81
配列番号27	+	not tested	-9
配列番号28	++	not tested	-11

[0114] 表1に示される通り、配列番号5、11、13、17、18、20、21、22、27および28で表される塩基配列からなる核酸は、TGF-β1に特異的に結合した(表1の左のカラム)。

[0115] また、配列番号6、9、19、21および26で表される塩基配列からなる核酸は、TGF-β1のTGF-βレセプターへの結合を阻害した(表1

の中央のカラム)。

[0116] さらに、配列番号4、6、9、19、21および26で表される塩基配列からなる核酸は、細胞アッセイ系において強い阻害活性を示した(表1の右のカラム)。一方、配列番号5、7~8、10~13、17~18、20、22、27~28で表される塩基配列からなる核酸は、細胞アッセイ系においてはTGF- β 1に対する阻害活性を有さなかった。

[0117] 本結果において注目すべき点としては、配列番号4、6、9、21に共通する配列が含まれていたことが挙げられる。該配列を、本明細書において、共通配列1と称する。

[0118] 共通配列1 : U A A X G G R B G G S G A R A C U U G K G V B R G G
(Xは、結合またはGUを表し; Rは、AまたはGを表し; Sは、CまたはGを表し; Kは、GまたはUを表し; Vは、A、CまたはGを表し; Bは、C、GまたはUを表す)

[0119] 上記共通配列1で表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーは、表1に示されるように、TGF- β 1に対する顕著に強い阻害活性を示す。

[0120] 換言すれば、共通配列1で表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーは、TGF- β 1に特異的且つ顕著に強く結合するアプタマーであると考えられた。また共通配列1で表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーは、TGF- β 1の活性を阻害することができるアプタマーである可能性が高いと考えられた。

[0121] [実施例5] アプタマーの短鎖化

配列番号21のアプタマーの短鎖化を行った。これらの短鎖化体の配列を配列番号29~31に示す。

[0122] 以下にそれぞれのヌクレオチド配列を示す。下線は実施例1~4で見出した共通配列1部分を示す。特に言及がなければ、実施例中に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表し、各ヌクレオチドは、プリン(A及びG)が2'-OH(天然RNA型)であり、ピリミジン(U及びC)が2'-フルオロ修飾体であることを意味している。また、プライマー結合配列は

小文字で表記する。

[0123] 配列番号 29 : (配列番号 21 で表わされるアプタマーを、共通配列を含む 51 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

g g g a g a a c u u g g a g c u C C U G A A U A A G G G C G G G G A
A A C U U G U G G U G G G C U A A

配列番号 30 : (配列番号 21 で表わされるアプタマーを、共通配列の一部を含む 26 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

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

配列番号 31 : (配列番号 21 で表わされるアプタマーを、共通配列を含む 33 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

g g c A U A A G G G C G G G G A A C U U G U G G U G G G C U A A

[0124] 配列番号 29 ~ 31 の核酸は化学合成した T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を含んだ DNA 配列を鋳型とし、T7 RNA ポリメラーゼ (Y639F) を用いて転写することで得た。

[0125] これらの核酸が TGF- β 1 の TGF- β レセプターへの結合を阻害するかどうかを、実施例 4 と同様に TGF- β 1 (4 nM) または TGF- β 1 (10 nM) と核酸 (30 nM) の混合溶液をインジェクトし、表面プラズモン共鳴法により評価した。TGF- β 1 : 核酸 (Apt) = 10 nM : 30 nM (1 : 3) の場合の測定結果を表 2 に示す。

[0126] 配列番号 21、29、31 の核酸は化学合成した T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を含んだ DNA 配列を鋳型とし、T7 RNA ポリメラーゼ (Y639F) を用いて転写することで得た。これらの核酸が TGF- β 1 の活性を阻害するかどうかを、実施例 4 と同様にルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価した。測定結果を表 2 に示す。尚、表 2 中、ルシフェラーゼアッセイ阻害率の値については、2 回の独立試験の結果を併記した。

[0127]

[表2]

	結合 +++ ≥ 50 RU ++ 31~50 RU + 11~30 RU - ≤ 10 RU	BIACore阻害 (%) TGF-β1:Apt= 1: 3	細胞(ルシフェラーゼ アッセイ阻害率 (%)) TGF-β1:Apt= 80pM: 20nM
配列番号21	+++	74.54	96 / 95
配列番号29	not tested	75.86	91 / 94
配列番号30	-	-5.84	not tested
配列番号31	not tested	56.23	79 / 87

[0128] 表2に示されるように、共通配列周辺の配列を除いてもTGF-β1に対する阻害活性は維持されていた(配列番号29、31)。一方で、共通配列まで除いた場合TGF-β1に対する阻害活性は著しく低下した(配列番号30)。以上のことから、共通配列1がTGF-β1に対する結合活性や、TGF-β1に対する阻害活性を発揮するために重要であることが示された。

[0129] [実施例6] 高活性TGF-β1アプタマーの作製1

配列番号31で表わされる配列のうち、共通配列1の一部をランダム配列にしたRNAプールを用いてSELEXをおこなった。SELEXは実施例1と同様におこなった。その鋳型と5'末端側のプライマー配列を以下に示す。また、プライマーRevは配列番号16の核酸を使用した。

[0130] DNA鋳型配列: 5' -gggagaaacttgagctcctgaNN
NNGGNNGGNNNNNNGTGGNGGGNNNNagtgcg
acgtcagtc-3' (配列番号32)

プライマーFwd: 5' -TAATACGACTCACTATAGGGAG
AACTTGGAGCTCCTGA-3' (配列番号33)

[0131] 0ラウンドから6ラウンド終了後のそれぞれのDNAライブラリープールをハイスループットシーケンサー(IonPGM™システム、ThermoFisher Scientific社)で調べたところ、2R以降の配列が共通配列2(配列番号34)を有していた。その中で、最もリード数が

多かった配列（配列番号35）と次に多かった配列（配列番号36）、最もリード数が多かった配列（配列番号35）と一塩基異なる配列（配列番号37、38）、配列番号35における共通配列2の部分を一塩基欠損した配列（配列番号39）、配列番号39とは異なる位置（3'末端側の最後のGGG）で一塩基欠損が生じた配列（配列番号41）とその欠損が生じなかった場合の配列（配列番号40）を以下に示す。配列番号35～40は全て本実験（実施例6）で検出された配列である。特に言及がなければ、実施例中に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表し、各ヌクレオチドは、プリン（A及びG）が2'-OH（天然RNA型）であり、ピリミジン（U及びC）が2'-フルオロ修飾体であることを意味している。また、プライマー結合配列は小文字で表記する。

[0132] 配列番号34：（本実験から得られた共通配列2）

AUAAGGGHGGGGAGACUUGUGGWGGG

（Hは、A、CまたはUを表し；Wは、AまたはUを表す）

[0133] 以下にそれぞれのヌクレオチド配列を示す。下線は共通配列2（配列番号34）に相当する部分を示す。特に言及がなければ、実施例中に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表し、各ヌクレオチドは、プリン（A及びG）が2'-OH（天然RNA型）であり、ピリミジン（U及びC）が2'-フルオロ修飾体であることを意味している。また、プライマー結合配列は小文字で表記する。

[0134] 配列番号35：（ハイスループットシーケンサーでリード数が最も多く検出された配列）

gggagaaacuuggagcuccuga AUAAGGGAGGGGA
GACUUGUGGAGGGCAAGagugcgacgucaguc

配列番号36：（ハイスループットシーケンサーでリード数が二番目に多く検出された配列）

gggagaaacuuggagcuccuga AUAAGGGAGGGGA
GACUUGUGGAGGGCAAAAgugcgacgucaguc

配列番号37：（最もリード数が多かった配列（配列番号35）と一塩基異なる配列）

g g g a g a a c u u g g a g c u c c u g a A U A A G G G A G G G G A
G A C U U G U G G U G G G C A A G a g u g c g a c g u c a g u c

配列番号38：（最もリード数が多かった配列（配列番号35）と一塩基異なる配列）

g g g a g a a c u u g g a g c u c c u g a A U A A G G G U G G G G A
G A C U U G U G G A G G G C A A G a g u g c g a c g u c a g u c

配列番号39：（配列番号35における共通配列2の部分から一塩基欠損した配列）

g g g a g a a c u u g g a g c u c c u g a A U A A G G G A G G G A G
A C U U G U G G A G G G C A A G a g u g c g a c g u c a g u c

配列番号40：（配列番号41での欠損が生じなかった場合の配列）

g g g a g a a c u u g g a g c u c c u g a A U A A G G G A G G G G A
G A C U U G U G G A G G G C A G A a g u g c g a c g u c a g u c

配列番号41：（配列番号35の共通配列2における3'末端側の最後のGGにおいて一塩基欠損が生じた配列）

g g g a g a a c u u g g a g c u c c u g a A U A A G G G A G G G G A
G A C U U G U G G A G G C A G A a g u g c g a c g u c a g u c

[0135] 配列番号35～41の核酸は化学合成したT7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含んだDNA配列を鋳型とし、T7 RNAポリメラーゼ（Y639F）を用いて転写することで得た。これらの核酸がTGF- β 1のTGF- β レセプターへの結合を阻害するかどうかを、実施例4と同様にTGF- β 1（10nM）と核酸（10nMまたは30nM）の混合溶液をインジェクトし、表面プラズモン共鳴法により評価した。TGF- β 1：核酸（Apt）=10nM：30nM、10nM：10nMの場合の測定結果を表3に示す。

[0136] さらにこれらの核酸がTGF- β 1の活性を阻害するかどうかを、実施例

1と同様に実施例4と同様なルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価した。測定結果を表3に示す。

[0137] [表3]

	結合 +++ ≥ 50 RU ++ 31~50 RU + 11~30 RU - ≤ 10 RU	BIAcore阻害(%) TGF- β 1:Apt= 10nM: 30nM	BIAcore阻害(%) TGF- β 1:Apt= 10nM: 10nM	細胞(ルシフェラーゼ アッセイ阻害率(%)) TGF- β 1:Apt= 80pM: 20nM
配列番号35	+++	98.8	51.3	100
配列番号36	not tested	100.5	45.5	101
配列番号37	not tested	97.8	45.8	100
配列番号38	not tested	95.4	43.4	100
配列番号39	-	5	1.9	15
配列番号40	+++	77.6	38	100
配列番号41	-	35.4	12.3	39

[0138] 表3に示されるように、共通配列2（配列番号34）で表されるヌクレオチド配列を含むアプタマーは、TGF- β 1に対する阻害活性を示した（配列番号35~38、40）。一方、共通配列2（配列番号34）の一部が欠損したアプタマーはTGF- β 1に対する阻害活性を有さなかった（配列番号39、41）。これらの結果から、共通配列2（配列番号34）で表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーは、TGF- β 1に結合し、TGF- β 1の活性を阻害することが明らかとなった。

[0139] [実施例7] 高活性TGF- β 1アプタマーの短鎖化と塩基置換

配列番号35で表わされる配列に対し、配列番号31を参考にした短鎖化を行い、配列番号42を得た。またハイスループットシーケンスの結果から、可変性が高いと考えられる2カ所の最適な塩基を決定するために配列番号42を基準に他の塩基に置換した配列を作成した（配列番号43~47）。またハイスループットシーケンスの結果を参考に、検出されたリード数が比較的多い配列の中で、配列番号43~47とはパターンが異なる配列番号48を作製した。

[0140] 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、実施例中に挙げられる個々の配列は、5' から3' の方向で表し、各ヌクレオチドは、プリン（A及びG）が2' -OH（天然RNA型）であり、ピリミジン（U及びC）が2' -フルオロ修飾体であることを意味している。[] は可変性が高いと考えられたヌクレオチドを示す。

[0141] 配列番号42：（配列番号35で表わされるアプタマーを、配列番号32を参考に33ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列）

GGCAUAAGGG[A]GGGGAGACUUGUGG[A]GGGCAA
G

配列番号43：（配列番号42で表わされるアプタマーの11番目のAをUに置換した配列）

GGCAUAAGGG[U]GGGGAGACUUGUGG[A]GGGCAA
G

配列番号44：（配列番号42で表わされるアプタマーの11番目のAをCに置換した配列）

GGCAUAAGGG[C]GGGGAGACUUGUGG[A]GGGCAA
G

配列番号45：（配列番号42で表わされるアプタマーの26番目のAをUに置換した配列）

GGCAUAAGGG[A]GGGGAGACUUGUGG[U]GGGCAA
G

配列番号46：（配列番号42で表わされるアプタマーの11番目のAをUに、26番目のAをUに置換した配列）

GGCAUAAGGG[U]GGGGAGACUUGUGG[U]GGGCAA
G

配列番号47：（配列番号42で表わされるアプタマーの11番目のAをCに、26番目のAをUに置換した配列）

GGCAUAAGGG[C]GGGGAGACUUGUGG[U]GGGCAA

G

配列番号48：（26番目のAがCである配列をハイスループットシーケンスの結果を参考に設計した配列番号42の類似配列）

GGCAUAAGGG[A]GGGGAGACUUGUGG[C]GGGUAA
A

[0142] 配列番号42～48の核酸は化学合成し、HPLCで精製したものを用いた。これらの核酸がTGF-β1のTGF-βレセプターへの結合を阻害するかどうかを、実施例4と同様にTGF-β1（4 nM）と核酸（4 nM）の混合溶液をインジェクトし、表面プラズモン共鳴法により評価した。TGF-β1：核酸（Apt）=4 nM：4 nM（1：1）の場合の測定結果を表4に示す。

[0143] さらにこれらの核酸がTGF-β1の活性を阻害するかどうかを、実施例4と同様に最終濃度がTGF-β1（80 pM）と核酸（312.5 pM）となるように培地に添加し、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価した。測定結果を表4に示す。

[0144] [表4]

	BIAcore阻害 (%) TGF-β1:Apt= 1:1	細胞(ルシフェラーゼ アッセイ阻害率(%)) TGF-β1:Apt= 80pM: 312.5pM
配列番号42	98.97	82.4
配列番号43	98.97	71.5
配列番号44	98.71	69.4
配列番号45	99.23	65.5
配列番号46	99.23	57.3
配列番号47	99.23	70.3
配列番号48	93.55	63.9

[0145] 表4に示されるように、共通配列2（配列番号34）で表されるヌクレオチド配列を含むアプタマーは、短鎖化してもTGF- β 1に対する阻害活性を示した（配列番号42）。

[0146] さらにハイスループットシーケンスの結果から、可変性が高いと考えられる2カ所の塩基（一つ目のG集合と二つ目のG集合の間の塩基[A]（共通配列2におけるH）と、三つ目のG集合と四つ目のG集合の間の塩基[A]（共通配列2におけるW））を改変した場合であっても、TGF- β 1に対する阻害活性は維持された（配列番号42～47）。また四つ目のG集合の後ろのCAGGを別の配列に変えても、TGF- β 1に対する阻害活性は維持された（配列番号48）。以上のことから、TGF- β 1への結合活性と、TGF- β 1に対する阻害活性の発揮には、共通配列2（配列番号34）が重要であることが示された。

[0147] [実施例8] 高活性短鎖化アプタマーの化学修飾の最適化1

配列番号42で表わされる配列をもとに、ヌクレオチドのリボースが2'-OMeである化学修飾体への改変を行い、アプタマーのTGF- β 1阻害活性に対する影響を調べた。作製した改変体を配列番号42(1)～42(3)に示す。各ヌクレオチドは、プリン(A及びG)が2'-OH（天然RNA型）であり、(F)と記載されている塩基は2'-フルオロ修飾体であることを意味している。また(M)と記載されている塩基は2'-OMe修飾体であることを意味している。実施例中に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表している。

[0148] 配列番号42(1)：（配列番号42で表わされるアプタマーの1～3番目の塩基をOMe修飾塩基に置換した配列）

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

配列番号42(2)：（配列番号42で表わされるアプタマーの11番目の塩基をOMe修飾塩基に置換した配列）

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

) U (F) GU (F) GGAGGGC (F) AAG

配列番号42(3) : (配列番号42で表わされるアプタマーの26番目の塩基をOMe修飾塩基に置換した配列)

GGC (F) AU (F) AAGGGAGGGGAGAC (F) U (F) U (F) GU (F) GGA (M) GGGC (F) AAG

[0149] 配列番号42(1)~42(3)の核酸は化学合成し、HPLCで精製したものをを用いた。これらの核酸がTGF-β1のTGF-βレセプターへの結合を阻害するかどうかを、実施例4と同様にTGF-β1(4nM)と核酸(4nM)の混合溶液をインジェクトし、表面プラズモン共鳴法により評価した。TGF-β1:核酸(Apt)=4nM:4nM(1:1)の場合の測定結果を表5に示す。

[0150] またこれらの核酸がTGF-β1の活性を阻害するかどうかを、実施例4と同様に最終濃度がTGF-β1(80pM)と核酸(312.5pM)となるように培地に添加し、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価した。測定結果を表5に示す。

[0151] [表5]

	BIAcore阻害 (%) TGF-β1:Apt= 1:1	細胞(ルシフェラーゼ アッセイ阻害率(%)) TGF-β1:Apt= 80pM: 312.5pM
配列番号42	99.69	68%
配列番号42(1)	95.67	22%
配列番号42(2)	98.45	88%
配列番号42(3)	98.76	87%

[0152] 表5から示されるように、本発明のアプタマーにおいて、共通配列2(配列番号34)で表されるヌクレオチド配列以外の配列については、OMe修飾が可能であることが分かった(配列番号42(1))。

[0153] 一方、共通配列 2（配列番号 3 4）で表されるヌクレオチド配列においても、実施例 7（表 4）において検討した、ハイスループットシーケンスの結果から可変性が高いと考えられる 2 カ所の塩基は、OMe 修飾が可能であることが分かった（配列番号 4 2（2）、4 2（3））。

[0154] 高活性短鎖化アプタマーの化学修飾の最適化 2

配列番号 4 2（2）で表わされる配列をもとに、ヌクレオチドのリボースが 2' -OMe である修飾塩基への置換を行い、アプタマーの TGF- β 1 阻害活性に対する影響を調べた。作製した変異アプタマーの配列を配列番号 4 2（2-1）～4 2（2-8）に示す。下線は置換されたヌクレオチドを示す。各ヌクレオチドは、プリン（A 及び G）が 2' -OH（天然 RNA 型）であり、（F）と記載されている塩基は 2' -フルオロ修飾体であることを意味している。また（M）と記載されている塩基は 2' -OMe 修飾体であることを意味している。実施例中に挙げられる個々の配列は、5' から 3' の方向で表している。

[0155] 配列番号 4 2（2-1）：（配列番号 4 2（2）で表わされるアプタマーの 2 6 番目の塩基を OMe 修飾塩基に置換した配列）

GGC (F) AU (F) AAGGGA (M) GGGGAGAC (F) U (F)
U (F) GU (F) GGA (M) GGGC (F) AAG

配列番号 4 2（2-2）：（配列番号 4 2（2）で表わされるアプタマーの 1 番目の塩基を OMe 修飾塩基に置換した配列）

G (M) GC (F) AU (F) AAGGGA (M) GGGGAGAC (F)
U (F) U (F) GU (F) GGAGGGC (F) AAG

配列番号 4 2（2-3）：（配列番号 4 2（2）で表わされるアプタマーの 4 番目の塩基を OMe 修飾塩基に置換した配列）

GGC (F) A (M) U (F) AAGGGA (M) GGGGAGAC (F)
U (F) U (F) GU (F) GGAGGGC (F) AAG

配列番号 4 2（2-4）：（配列番号 4 2（2）で表わされるアプタマーの 1 6 番目の塩基を OMe 修飾塩基に置換した配列）

GGC (F) AU (F) AAGGGA (M) GGGGA (M) GAC (F)
U (F) U (F) GU (F) GGAGGGC (F) AAG

配列番号42 (2-5) : (配列番号42 (2) で表わされるアプタマーの
 17番目の塩基をOMe修飾塩基に置換した配列)

GGC (F) AU (F) AAGGGA (M) GGGGAG (M) AC (F)
U (F) U (F) GU (F) GGAGGGC (F) AAG

配列番号42 (2-6) : (配列番号42 (2) で表わされるアプタマーの
 31番目の塩基をOMe修飾塩基に置換した配列)

GGC (F) AU (F) AAGGGA (M) GGGGAGAC (F) U (F)
) U (F) GU (F) GGAGGGC (F) A (M) AG

配列番号42 (2-7) : (配列番号42 (2) で表わされるアプタマーの
 32番目の塩基をOMe修飾塩基に置換した配列)

GGC (F) AU (F) AAGGGA (M) GGGGAGAC (F) U (F)
) U (F) GU (F) GGAGGGC (F) AA (M) G

配列番号42 (2-8) : (配列番号42 (2) で表わされるアプタマーの
 33番目の塩基をOMe修飾塩基に置換した配列)

GGC (F) AU (F) AAGGGA (M) GGGGAGAC (F) U (F)
) U (F) GU (F) GGAGGGC (F) AAG (M)

[0156] 配列番号42 (2-1) ~42 (2-8) の核酸は化学合成し、HPLC
 で精製したものをを用いた。これらの核酸がTGF- β 1のTGF- β レセプ
 ターへの結合を阻害するかどうかを、実施例4と同様にTGF- β 1 (4 n
 M) と核酸 (4 nM) の混合溶液をインジェクトし、表面プラズモン共鳴法
 により評価した。TGF- β 1 : 核酸 (Apt) = 4 nM : 4 nM (1 : 1
) の場合の測定結果を表6に示す。またこれらの核酸がTGF- β 1の活性
 を阻害するかどうかを、実施例4と同様に最終濃度がTGF- β 1 (80 p
 M) と核酸 (312.5 pM) となるように培地に添加し、ルシフェラーゼ
 レポーターアッセイにより評価した。測定結果を表6に示す。

[0157]

[表6]

	BIACore阻害 (%) TGF- β 1:Apt= 1:1	細胞(ルシフェラーゼ アッセイ阻害率(%)) TGF- β 1:Apt= 80pM: 312.5pM
配列番号 42	81.66	44%
配列番号 42(2)	71.32	73%
配列番号 42(3)	80.88	64%
配列番号 42(2-1)	75.22	61%
配列番号 42(2-2)	76	66%
配列番号 42(2-3)	70.73	66%
配列番号 42(2-4)	84.2	64%
配列番号 42(2-5)	75.61	62%
配列番号 42(2-6)	81.85	72%
配列番号 42(2-7)	78.93	78%
配列番号 42(2-8)	83.02	72%

[0158] 表6の結果から、共通配列2（配列番号34）で表されるヌクレオチド配列において、

(1) 実施例7（表4）において検討した、ハイスループットシーケンスの結果から可変性が高いと考えられる2カ所の塩基は、いずれもOMe修飾が可能である（配列番号42（2-1））

(2) A U A AおよびA G A C U Uの各塩基についても、OMe修飾が可能である（配列番号42（2-4）および42（2-5））

ことが分かった。

産業上の利用可能性

[0159] 本発明のアプタマーは、線維症やがんなどのTGF- β 1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。

本出願は、日本で出願された特願2019-126940（出願日：2019年7月8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。

請求の範囲

[請求項1] 連続したG塩基の集合を4つ有し、かつ下記式(Ⅰ)および式(ⅠⅠ)で表されるヌクレオチド配列の組合せを含む、TGF-β1に結合するアプタマー。

式(Ⅰ) : U A A X

式(ⅠⅠ) : A R A C U U

(式中、Xは、結合またはGUを表し；Rは、AまたはGを表す)

[請求項2] 式(Ⅰ) : U A A Xで表されるヌクレオチド配列が4つのG塩基の集合の最もN末端側に位置し、式(ⅠⅠ) : A R A C U Uで表されるヌクレオチド配列が2つ目のG集合と3つ目のG集合の間に位置する、請求項1に記載のアプタマー。

[請求項3] 請求項1または2に記載のアプタマーであって、下記式(ⅠⅠⅠ)
式(ⅠⅠⅠ) : U A A X G G R N G G S G A R A C U U G K G V N R
G G

(式中、Xは、結合またはGUを表し；Nは、任意の塩基を表し；Rは、AまたはGを表し；Sは、CまたはGを表し；Kは、GまたはUを表し；Vは、A、CまたはGを表し；Bは、C、GまたはUを表す。(ただし、G塩基の集合が4つとなる組合せに限る))

で表されるヌクレオチド配列を含む、アプタマー。

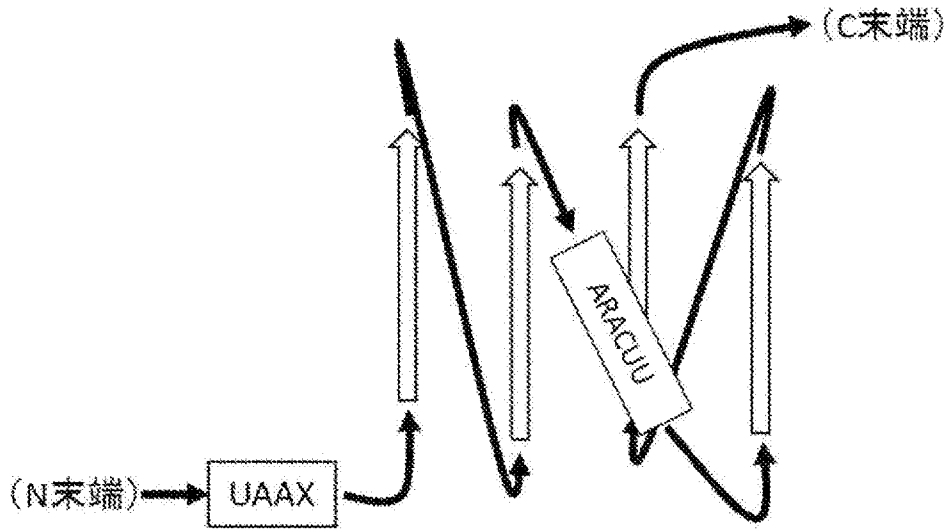
[請求項4] 請求項1または2に記載のアプタマーであって、下記式(ⅠⅠⅠ')
)
式(ⅠⅠⅠ') : U A A X G G R B G G S G A R A C U U G K G V B
R G G

(式中、Xは、結合またはGUを表し；Rは、AまたはGを表し；Sは、CまたはGを表し；Kは、GまたはUを表し；Vは、A、CまたはGを表し；Bは、C、GまたはUを表す。(ただし、G塩基の集合が4つとなる組合せに限る))

で表されるヌクレオチド配列を含む、アプタマー。

- [請求項5] 請求項1または2に記載のアプタマーであって、下記式 (I I I ' ')
式 (I I I ' ') : A U A A G G G H G G G G A G A C U U G U G G W G G G
(式中、Wは、AまたはUを表し；Hは、A、CまたはUを表す)
で表されるヌクレオチド配列を含む、アプタマー。
- [請求項6] 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されている、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 (a) ～ (c) のいずれかのヌクレオチド配列を含む、TGF- β 1に結合するアプタマー。
(a) 配列番号4～6、9、11、13、17～22、26～29または31で表される配列
(b) 上記 (a) において、1ないし数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加された配列；または、
(c) 上記 (a) または (b) において、少なくとも一つのヌクレオチドが修飾された配列。
- [請求項8] ヌクレオチドの長さが55ヌクレオチド以下である、請求項1～6のいずれか一項に記載のアプタマー。
- [請求項9] TGF- β 1とTGF- β 1の受容体との結合を阻害する、請求項1～8のいずれか一項に記載のアプタマー。
- [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および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または請求項10に記載の複合体を含む医薬。
- [請求項12] 請求項1～9のいずれか一項に記載のアプタマーまたは請求項10に記載の複合体を用いることを特徴とする、TGF- β 1の検出方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/026755

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 A61K 48/00(2006.01)i; C12N 15/115(2010.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i
 FI: C12N15/115 Z ZNA; A61K31/7088; G01N33/53 D; A61K48/00 ZNA
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 A61K48/00; C12N15/115; G01N33/53; A61K31/7088

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII);
 CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN);
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq; PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/048904 A1 (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC.) 30.09.1999 (1999-09-30) column 7, line 20 to column 8, line 13, column 16, lines 14-19, column 18, lines 23-31, tables 1, 3, 4, sequence table, page 24,	1, 6, 8-12
A	entire text	2-5, 7
A	IMASHIMIZU, M. et al., "Single-round isolation of diverse RNA aptamers from a random sequence pool", Biol. Methods Protoc., 2018, vol. 3(1):bpy004, pp. 1-13 page 1, abstract	1-12
A	WO 2005/113811 A2 (BOARD OF REGENTS THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 01.12.2005 (2005-12-01) claims, table 2	1-12
A	KANG, J. et al., "Combinatorial selection of a single stranded DNA thioaptamer targeting TGF-β1 protein", Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, vol. 18(6), pp. 1835-1839 entire text	1-12

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

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 08 September 2020 (08.09.2020)	Date of mailing of the international search report 06 October 2020 (06.10.2020)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/026755

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATHARU, Z. et al., "Detecting transforming growth factor- β release from liver cells using an aptasensor integrated with microfluidics", Anal. Chem., 2014, vol. 86(17), pp. 8865-8872 entire text	1-12
A	WO 2010/143714 A1 (RIBOMIC INC.) 16.12.2010 (2010-12-16) entire text	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/026755

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 99/048904 A1	30 Sep. 199	US 6124449 A column 5, line 61 to column 6, line 31, column 12, lines 16- 23, column 13, line 6 to column 14, line 6, column 101, examples, tables 1, 3-4	
WO 2005/113811 A2	01 Dec. 2005	(Family: none)	
WO 2010/143714 A1	16 Dec. 2010	US 2012/0165401 A1 entire text	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 48/00(2006.01)i; C12N 15/115(2010.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i FI: C12N15/115 Z ZNA; A61K31/7088; G01N33/53 D; A61K48/00 ZNA</p>																				
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K48/00; C12N15/115; G01N33/53; A61K31/7088</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq; PubMed</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年										
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																			
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年																			
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年																			
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年																			
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 99/048904 A1 (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC.) 30.09.1999 (1999 - 09 - 30) 第7欄第20行-第8欄第13行、第16欄第14-19行、第18欄第23-31行、実施例、表1、3-4、配列表第24頁</td> <td>1, 6, 8-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>全文</td> <td>2-5, 7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>IMASHIMIZU, M. et al., Single-round isolation of diverse RNA aptamers from a random sequence pool, Biol. Methods Protoc., 2018, Vol. 3(1):bpy004, pp. 1-13 第1頁要約</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2005/113811 A2 (BOARD OF REGENTS THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 01.12.2005 (2005 - 12 - 01) 特許請求の範囲、表2</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KANG, J. et al., Combinatorial selection of a single stranded DNA thioaptamer targeting TGF-β1 protein, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, Vol. 18(6), pp. 1835-1839 全文</td> <td>1-12</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <p>* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献</p>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	WO 99/048904 A1 (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC.) 30.09.1999 (1999 - 09 - 30) 第7欄第20行-第8欄第13行、第16欄第14-19行、第18欄第23-31行、実施例、表1、3-4、配列表第24頁	1, 6, 8-12	A	全文	2-5, 7	A	IMASHIMIZU, M. et al., Single-round isolation of diverse RNA aptamers from a random sequence pool, Biol. Methods Protoc., 2018, Vol. 3(1):bpy004, pp. 1-13 第1頁要約	1-12	A	WO 2005/113811 A2 (BOARD OF REGENTS THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 01.12.2005 (2005 - 12 - 01) 特許請求の範囲、表2	1-12	A	KANG, J. et al., Combinatorial selection of a single stranded DNA thioaptamer targeting TGF-β1 protein, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, Vol. 18(6), pp. 1835-1839 全文	1-12
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号																		
X	WO 99/048904 A1 (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC.) 30.09.1999 (1999 - 09 - 30) 第7欄第20行-第8欄第13行、第16欄第14-19行、第18欄第23-31行、実施例、表1、3-4、配列表第24頁	1, 6, 8-12																		
A	全文	2-5, 7																		
A	IMASHIMIZU, M. et al., Single-round isolation of diverse RNA aptamers from a random sequence pool, Biol. Methods Protoc., 2018, Vol. 3(1):bpy004, pp. 1-13 第1頁要約	1-12																		
A	WO 2005/113811 A2 (BOARD OF REGENTS THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 01.12.2005 (2005 - 12 - 01) 特許請求の範囲、表2	1-12																		
A	KANG, J. et al., Combinatorial selection of a single stranded DNA thioaptamer targeting TGF-β1 protein, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, Vol. 18(6), pp. 1835-1839 全文	1-12																		
<p>国際調査を完了した日</p> <p>08.09.2020</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>06.10.2020</p>																			
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>小田 浩代 4B 8377</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>																			

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MATHARU, Z. et al., Detecting transforming growth factor- β release from liver cells using an aptasensor integrated with microfluidics, Anal. Chem., 2014, Vol. 86(17), pp. 8865-8872 全文	1-12
A	WO 2010/143714 A1 (株式会社リボミック) 16.12.2010 (2010-12-16) 全文	1-12

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2020/026755

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	99/048904	A1	30.09.1999	US 6124449 A 第5欄第61行-第6欄第 31行、第12欄第16- 23行、第13欄第6-行 -第14欄第6行、第10 1欄、実施例、表1、3- 4、	
WO	2005/113811	A2	01.12.2005	(ファミリーなし)	
WO	2010/143714	A1	16.12.2010	US 2012/0165401 A1 全文	