

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6634554号
(P6634554)

(45) 発行日 令和2年1月22日(2020.1.22)

(24) 登録日 令和1年12月27日(2019.12.27)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/115	(2010.01)	C 1 2 N	15/115	Z N A Z
A 6 1 K	31/712	(2006.01)	A 6 1 K	31/712	
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	19/08	
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	27/06	(2006.01)	A 6 1 P	27/06	

請求項の数 15 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-510402 (P2016-510402)
 (86) (22) 出願日 平成27年3月24日 (2015.3.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2015/058992
 (87) 国際公開番号 W02015/147017
 (87) 国際公開日 平成27年10月1日 (2015.10.1)
 審査請求日 平成30年3月23日 (2018.3.23)
 (31) 優先権主張番号 特願2014-60966 (P2014-60966)
 (32) 優先日 平成26年3月24日 (2014.3.24)
 (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 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宣
 (74) 代理人 100121212
 弁理士 田村 弥栄子
 (74) 代理人 100163658
 弁理士 小池 順造
 (74) 代理人 100174296
 弁理士 當麻 博文

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 FGF2に対するアダプター及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下式(1)で表わ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)を含むアダプターであって、以下(a)又は(b)のいずれかである、FGF2に結合するアダプター:



N¹及びN⁶は、それぞれ独立して任意の0から数個の塩基、
 N²、N³、N⁴及びN⁵は、独立して任意の一個の塩基を表す、

(a) 該アダプターに含まれるヌクレオチドにおいて、

(i) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位がフッ素原子であり、

(ii) 各プリンヌクレオチドのリボースの2'位がヒドロキシ基である、アダプター

;

(b) 該(a)のアダプターにおいて、

(i) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位のフッ素原子が、それぞれ独立して、無置換であるか、水素原子、ヒドロキシ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おり、

(ii) 各プリンヌクレオチドのリボースの2'位のヒドロキシ基が、それぞれ独立して、無置換であるか、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ている、アダプター。

【請求項 2】

N¹ は、G、GG、AG、C又はギャップ、
 N² は、A又はU、
 N³ は、G、C又はA、
 N⁴ は、G、C又はU、
 N⁵ は、G又はU、
 N⁶ は、UUCN^{6 1}又はAGUCN^{6 2}
 N^{6 1}及びN^{6 2}は、それぞれ独立して任意の0から数個の塩基である、
 請求項1記載のアプタマー。

【請求項 3】

下式(2)又は(3)で表わされるヌクレオチド配列を含む、請求項1又は2記載のアプタマー：

GGGAACUAGGGCGUUAACGUGACCAGUGUUUCN^{6 1} (式2)

N¹GGAUACUAGGGCAUUA AUGUUAACCAGUGUAGUCN^{6 2} (式3)。

【請求項 4】

配列番号2又は7で表わされるヌクレオチド配列を含む、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】

配列番号1、3、4、5、6、8、10又は11で表わされるヌクレオチド配列を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 6】

請求項1～5のいずれか一項に記載のアプタマーにおいて、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であって、

(a) 該アプタマーに含まれるヌクレオチドにおいて、

(i) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位がフッ素原子であり、

(ii) 各プリンヌクレオチドのリボースの2'位がヒドロキシ基である、アプタマー

；

(b) 該(a)のアプタマーにおいて、

(i) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位のフッ素原子が、それぞれ独立して、無置換であるか、水素原子、ヒドロキシ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おり、

(ii) 各プリンヌクレオチドのリボースの2'位のヒドロキシ基が、それぞれ独立して、無置換であるか、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ている、アプタマー。

【請求項 7】

ヌクレオチドの長さが45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 8】

FGF2とFGF受容体との結合を阻害する、請求項1～7のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 9】

少なくとも1つのヌクレオチドが修飾されている、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及び機能性物質を含む複合体。

【請求項 11】

機能性物質が、親和性物質、標識用物質、酵素、薬物送達媒体又は薬物である、請求項10記載の複合体。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項 10 又は 11 に記載の複合体を含む、医薬。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項 10 又は 11 に記載の複合体を含む、血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛の治療用又は予防用医薬。

【請求項 14】

血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛の治療又は予防に用いるための、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項 10 又は 11 に記載の複合体。

【請求項 15】

血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛の治療用又は予防用医薬を製造するための、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のアプタマーあるいは請求項 10 又は 11 に記載の複合体の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、FGF2 に対するアプタマー及びその利用方法などに関する発明である。

【背景技術】

【0002】

塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF2 又は bFGF) は種々の細胞から分泌される増殖因子であり、発生段階では細胞増殖や分化に深く関与し、成体では組織修復時や癌組織において高い発現が認められる。

20

【0003】

ヒト FGF2 は複数のアイソフォームを有するが、そのうち最も分子量の小さいアイソフォームのみが細胞外に分泌される。このアイソフォームは 154 アミノ酸から構成される約 18 kDa のタンパク質で、糖鎖は持たず、等電点は 9.4 と塩基性に傾いている。読み取り枠の異なる FGF2 の高分子量アイソフォーム (22、22.5、24、34 kD) の機能はまだ明らかではないが、核内移行シグナルを持ち、核内で機能すると考えられている。

【0004】

ヒト FGF ファミリータンパク質は、FGF1 から FGF23 までの 22 種類が知られている (FGF15 と FGF19 は同一分子であるため、現在は FGF19 に統一されている)。系統発生的解析により、FGF2 は FGF1 とともに FGF1 サブファミリーに分類される。FGF1 とのアミノ酸配列の相同性は全 FGF の中で最も高く、その値は 55% である。FGF の受容体 (FGFR) はチロシンキナーゼ型受容体であり、4 つのサブタイプに分類される。FGFR1 ~ 3 は、それぞれ b と c のアイソフォームが知られているが、FGF2 はこのうちの FGFR1b、FGFR1c、FGFR2c 及び FGFR3c、ならびに FGFR4 と結合して、これらの受容体を 2 量体化する。

30

【0005】

マウス線維芽細胞 (NIH-3T3 細胞) は細胞膜表面に FGFR1 を発現している細胞である。この FGFR1 はヒト FGF2 の結合により活性化されることが知られている。FGF2 が FGFR1 に結合すると、FRS2 (Fibroblast growth factor receptor substrate 2)、Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2)、SOS を介して MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase) 経路や PIK3 (phosphatidylinositol 3-kinase) / AKT1 (protein kinase B) 経路などが活性化され、最終的に VEGF (vascular endothelial growth factor precursor) - A、VEGF-C、HGF (hepatocyte growth factor)、angiopoietin-2、VEGFR、PDGFR- (platelet-derived growth factor beta recept

40

50

or -) など各種サイトカインや受容体遺伝子が発現誘導される。

【0006】

FGF2はヘパリン結合領域を持ち、他のFGFと同様、ヘパリンやヘパラン硫酸と結合する。細胞から分泌されたFGF2は一般に細胞外マトリックスのヘパラン硫酸に結合し、濃縮され、プロテアーゼからの保護を受けると考えられている。リガンドとして機能する際は、結合した細胞外マトリックスからの遊離が必要だが、これにはFGF-BP (FGF-binding protein) が関与し、FGFRへの誘導を補助するとの報告がなされている。

【0007】

FGF2は血管内皮細胞に対する強い増殖、遊走促進作用を持ち、腫瘍組織の血管新生にも深く関与していることがわかっている。例えば腎臓がんなど、血管の多い腫瘍において特にFGF2の血清濃度が高いことが報告されており、その他前立腺がん、乳がん、肺がん等、様々な腫瘍にも存在する。

10

【0008】

血管新生にはFGF2のほか、FGF1、VEGF、TNF- (tumor necrosis factor -)、PDGF、EGF (epidermal growth factor)、MMP (matrix metalloproteinase)、angiogeninなどの因子が関与している。これらの因子は腫瘍や血管芽細胞、支持細胞などから分泌され、オートクラインやパラクラインの成長因子として血管新生に寄与する。ただしFGF2は血管内皮細胞だけでなく、平滑筋細胞など、内皮細胞を取り囲む間葉系の細胞にも作用する点が他の因子と異なる。つまりFGF2は間葉系細胞を刺激してPDGFやPDGFR、VEGF、HGF等の発現を亢進させ、これらの因子が直接的な血管内皮細胞の増殖を促進すると考えられている。

20

【0009】

現在、腫瘍組織における異常型血管新生を阻害し、腫瘍組織への栄養供給経路の遮断を目的とした薬の開発が多く試みられている。実際に臨床の場で用いられている薬も存在し、例えばジェネンテック社により開発されたヒト型VEGFモノクローナル抗体 (アバスチン (登録商標)) は、大腸癌及び非小細胞肺癌に対する有効性が認められている。しかしながら、未だ強力な抗腫瘍薬は開発されていない。これらの薬の多くはVEGFやPDGFを標的としたものであるが、より上流で機能するFGF2を標的とすることで、異常血管新生の初期段階をブロックすることが期待される。

30

【0010】

また、異常血管新生は腫瘍のほか、歯周病、強皮症、新生血管性緑内障、関節炎等の慢性炎症、乾癬、加齢黄斑変性症などの疾患にも関与している。

【0011】

一方、FGF2の強い血管新生作用を、閉塞性血管障害に対する治療や創傷治癒に用いる試みがなされている。実際に、科研製薬株式会社によるヒトFGF2製剤 (フィブラスト (登録商標) スプレー) は、創傷治癒の促進薬として既に認可、販売されている。

【0012】

またFGF2は骨形成促進作用が知られているが、その一方で慢性関節リウマチ患者の関節破壊に関与するなど、骨吸収促進因子としても注目されている。自己免疫性関節炎を特徴とする慢性関節リウマチでは、破骨細胞が増加して骨吸収が亢進し、骨破壊が進行する。

40

FGF2は間葉系細胞を刺激してPDGFやPDGFR、VEGF、HGF等の炎症性サイトカインや増殖因子の発現を亢進させると共に、血管新生を促進し、骨破壊を促す。すなわちFGF2は、慢性関節リウマチにおける重要な病態に関与する中心的分子であることがわかっている (非特許文献1参照)。

【0013】

破骨細胞分化抑制因子 (Osteoprotegerin; OPG) は、破骨細胞誘導因子であるRANKLのデコイ受容体であり、RANKと拮抗して破骨細胞への分化誘導

50

やその機能を抑制することが知られている（非特許文献2参照）。滑膜細胞から産生されるOPGはFGF2の刺激により抑制されることも知られている（非特許文献3参照）。さらにFGF2は骨芽細胞のRANKLの高発現を誘導することで骨芽細胞と破骨前駆細胞のカップリングを助長し、結果破骨細胞への分化と活性化を促進する（非特許文献4参照）。

FGF2の機能を制御する事ができれば、破骨細胞の活性化を介した関節破壊の治療薬としての効果も十分期待できると考えられ、実際に抗FGF2中和抗体をAIAモデルラットの関節に直接投与して症状が緩和することが知られている。しかしながらその発症の抑制効果はわずかであり、特に発症後の投与における治癒効果は確認されていない（非特許文献5）。

10

【0014】

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が加齢性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1～3参照）。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を選別してくる方法である。使用されるRNAは40残基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のみを回収する。回収したRNAはRT-PCRで増幅し、これを次のラウンドの鑄型として用いる。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。

20

【0015】

特許文献4には、上記SELEX法により得られた、FGF2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何ら示唆されていない。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

【特許文献1】国際公開第91/19813号

【特許文献2】国際公開第94/08050号

【特許文献3】国際公開第95/07364号

【特許文献4】国際公開第2011/099576号

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】Manabe N. et al. Rheumatology. 1999; 38; 714-720

40

【非特許文献2】Yasuda H. et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1998; 95; 3597-3602

【非特許文献3】Yano K. et al. J. Bone Miner Metab. 2001; 19; 365-372

【非特許文献4】Roccisana JL et al. J. Biol. Chem. 279: 10500-10507 (2004)

【非特許文献5】Yamashita A. et al. J. Immunol. 2002; 168; 450-457

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

本発明は、FGF2に対するアプタマー及びその利用方法などを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明者は、上記課題を解決するため、鋭意検討した結果、FGF2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。

【0020】

即ち、本発明は、以下のとおりである。

10

[1] 下式(1)で表わ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)を含むアプタマーであって、以下(a)又は(b)のいずれかである、FGF2に結合するアプタマー:

$$N^1 G G A N^2 A C U A G G G C N^3 U U A A N^4 G U N^5 A C C A G U G U N^6 \quad (式1)$$

N^1 及び N^6 は、それぞれ独立して任意の0から数個の塩基、

N^2 、 N^3 、 N^4 及び N^5 は、独立して任意の一個の塩基を表す、

(a) 該アプタマーに含まれるヌクレオチドにおいて、

(i) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位がフッ素原子であり、

(ii) 各プリンヌクレオチドのリボースの2'位がヒドロキシ基である、アプタマー

20

; (b) 該(a)のアプタマーにおいて、

(i) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位のフッ素原子が、それぞれ独立して、無置換であるか、水素原子、ヒドロキシ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おり、

(ii) 各プリンヌクレオチドのリボースの2'位のヒドロキシ基が、それぞれ独立して、無置換であるか、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ている、アプタマー。

[2] N^1 は、G、GG、AG、C又はギャップ、

N^2 は、A又はU、

N^3 は、G、C又はA、

N^4 は、G、C又はU、

N^5 は、G又はU、

N^6 は、 $UUCN^{61}$ 又は $AGUCN^{62}$

N^{61} 及び N^{62} は、それぞれ独立して任意の0から数個の塩基である、

[1]記載のアプタマー。

30

[3] 下式(2)又は(3)で表わされるヌクレオチド配列を含む、[1]又は[2]記載のアプタマー:

$$G G G A A A C U A G G G C G U U A A C G U G A C C A G U G U U U C N^{61} \quad (式2)$$

$$N^1 G G A U A C U A G G G C A U U A A U G U U A C C A G U G U A G U C N^{62} \quad (式3)$$

40

[4] 配列番号2又は7で表わされるヌクレオチド配列を含む、[1]~[3]のいずれかに記載のアプタマー。

[5] 配列番号1、3、4、5、6、8、10又は11で表わされるヌクレオチド配列を含む、[1]~[3]のいずれかに記載のアプタマー。

[6] [1]~[5]のいずれかに記載のアプタマーにおいて、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であって、

(a) 該アプタマーに含まれるヌクレオチドにおいて、

(i) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位がフッ素原子であり、

(ii) 各プリンヌクレオチドのリボースの2'位がヒドロキシ基である、アプタマー

50

;

(b) 該(a)のアプタマーにおいて、

(i) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位のフッ素原子が、それぞれ独立して、無置換であるか、水素原子、ヒドロキシ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おり、

(ii) 各プリンヌクレオチドのリボースの2'位のヒドロキシ基が、それぞれ独立して、無置換であるか、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ている、アプタマー。

[7]ヌクレオチドの長さが45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。

[8]FGF2とFGF受容体との結合を阻害する、[1]~[7]のいずれかに記載のアプタマー。

[9]少なくとも1つのヌクレオチドが修飾されている、[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及び機能性物質を含む複合体。

[11]機能性物質が、親和性物質、標識用物質、酵素、薬物送達媒体又は薬物である、[10]記載の複合体。

[12][1]~[9]のいずれかに記載のアプタマーあるいは[10]又は[11]に記載の複合体を含む、医薬。

[13][1]~[9]のいずれかに記載のアプタマーあるいは[10]又は[11]に記載の複合体を含む、血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛の治療用又は予防用医薬。

[14]血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛を治療又は予防する方法であって、有効量の[1]~[9]のいずれかに記載のアプタマーあるいは[10]又は[11]に記載の複合体を、対象に投与することを含む方法。

[15]血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛の治療又は予防に用いるための、[1]~[9]のいずれかに記載のアプタマーあるいは[10]又は[11]に記載の複合体。

[16]血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛の治療用又は予防用医薬を製造するための、[1]~[9]のいずれかに記載のアプタマーあるいは[10]又は[11]に記載の複合体の使用。

【発明の効果】

【0021】

本発明のアプタマー又は複合体は、血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛の治療薬又は予防薬、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又は複合体はまた、FGF2の精製及び濃縮、FGF2の標識、並びにFGF2の検出及び定量に有用であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、アプタマーID1及び2で表わされるアプタマーとヒトFGF2が結合することを示すセンサーグラムを示す。

【図2】図2は、アプタマーID1で表わされるアプタマーがヒトFGF2と4つの受容体の結合を阻害するセンサーグラムを示す。

【図3】図3は、アプタマーID3で表わされるアプタマーがヒトFGF1、EGF、NGF、VEGFに結合しないことを示すセンサーグラムを示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

一実施態様において、本発明は、
下式(1)

$N^1GGAN^2ACUAGGGCN^3UUAAN^4GUN^5ACCAAGUGUN^6$ (式1)

10

20

30

40

50

)
 N^1 及び N^6 は、それぞれ独立して任意の 0 から数個の塩基、
 N^2 、 N^3 、 N^4 及び N^5 は、独立して任意の一個の塩基を表す、
 で表わ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) を含むアプタマーであって、以下 (a) 又は (b)

(a) 該アプタマーに含まれるヌクレオチドにおいて、

(i) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの 2' 位がフッ素原子であり、

(ii) 各プリンヌクレオチドのリボースの 2' 位がヒドロキシ基である、アプタマー ; あるいは

(b) 該 (a) のアプタマーにおいて、

(i) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの 2' 位のフッ素原子が、それぞれ独立して、無置換であるか、水素原子、ヒドロキシ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おり、

(ii) 各プリンヌクレオチドのリボースの 2' 位のヒドロキシ基が、それぞれ独立して、無置換であるか、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ている、アプタマー

のいずれかである、FGF2 に結合するアプタマー :

を提供する。

【0024】

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、RNA、DNA、修飾核酸又はそれらの混合物であり得る。また本発明のアプタマーは、直鎖状又は環状の形態であり得る。

【0025】

本発明は、FGF2 に対して結合活性を有するアプタマーを提供する。一実施態様において、本発明のアプタマーは、FGF2 に結合し、FGF2 の活性を阻害し得る。すなわち、本発明のアプタマーは、FGF2 に対する阻害活性を有し得る。

【0026】

FGF2 に対する阻害活性とは、FGF2 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、FGF2 は FGF 受容体発現細胞に作用して、シグナル伝達を活性化し、各種細胞増殖因子やその受容体の産生を誘導する。従って、FGF2 に対する阻害活性とは、FGF 受容体を介した細胞内シグナル伝達を阻害する活性のことであり得る。また、これら各種細胞増殖因子やその受容体の発現は、結果的に細胞の増殖活性や遊走活性の亢進を導くので、FGF2 の阻害活性とはそれらの活性の阻害を意味する。

よって、本発明のアプタマーが FGF2 に結合し、FGF2 と FGF 受容体との結合を阻害した場合、FGF 受容体を介した細胞内シグナル伝達経路の活性化に伴う作用、例えば、細胞死の抑制、細胞増殖、osteoprotegerin (OPG) 産生の抑制などが阻害され得る。

【0027】

FGF2 とは、発生初期や分化、増殖、再生時に強く発現するタンパク質であり、例えば、Accession code EAX05222 や NP001997 で表されるアミノ酸配列を持つタンパク質である。FGF2 は、bFGF (basic FGF)、FGFB 又は HBGF-2 と呼ばれることもある。本発明における FGF2 は、動物体内で作られる他、マウスなどの哺乳細胞、昆虫細胞、大腸菌などの培養細胞を用いても作製することができ、更に、化学合成によっても作製することができる。培養細胞や化学合成によって作製する場合は、自体公知の方法で容易に変異体を作製することができる。ここで FGF2 の「変異体」とは、公知の FGF2 のアミノ酸配列からアミノ酸が 1 ~ 数個置換、欠失、付加等されたものや、公知の FGF2 のアミノ酸配列の一部分のアミノ酸配列からなるものであって、本来 FGF2 が有している活性の少なくとも一つ以上の活性を有しているタンパク質又はペプチドを意味する。アミノ酸が置換、付加される場合、当該アミノ酸

10

20

30

40

50

は天然のアミノ酸であってもよいし、非天然のアミノ酸であってもよい。本発明における FGF2 はこれらの変異体を含む。

【0028】

FGF2 受容体とは、FGF2 が結合する細胞表面タンパク質を意味する。FGF2 受容体としては、FGFR1b、FGFR1c、FGFR2c、FGFR3c 及び FGFR4 が知られている。本発明における FGF2 受容体とは、天然のアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよいし、その変異体であってもよい。ここで FGF2 受容体の「変異体」とは、アミノ酸が 1 ~ 数個置換、欠失、付加等されたものや、公知の FGF2 受容体のアミノ酸配列の一部分のアミノ酸配列からなるものであって、FGF2 に対して結合活性を有するタンパク質又はペプチドを意味する。一実施態様において、本発明は、FGF2 と FGF2 受容体との結合を阻害するアプタマーを提供する。

10

【0029】

本発明のアプタマーは、任意の哺乳動物に由来する FGF2 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）、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。

【0030】

一実施態様において、本発明のアプタマーは、FGF2 の活性を阻害し得るが、FGF1 の活性を阻害し得ないという特徴を有し得る。また、一実施態様において、本発明のアプタマーは、FGF2 と FGF2 受容体との結合は阻害するが、FGF1 と FGF1 受容体との結合は阻害しないという特徴を有し得る。FGF1 は FGF ファミリータンパク質であり、最も FGF2 に類似している。

20

【0031】

上記式(1)中、 N^1 及び N^6 は、それぞれ独立して任意の 0 から数個の塩基を表し、 N^2 、 N^3 、 N^4 及び N^5 は、独立して任意の一個の塩基を表す。本明細書において「塩基」とは、核酸を構成するアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、ウラシル(U)又はチミン(T)のいずれかを意味する。

N^1 の塩基数は、式(1)で表わされるヌクレオチド配列を含むアプタマーが FGF2 に結合する限り特に限定されないが、例えば、0 ~ 約 10 個、0 ~ 9 個、0 ~ 8 個、0 ~ 7 個、0 ~ 6 個、0 ~ 5 個、0 ~ 4 個、0 ~ 3 個、0 ~ 2 個などであってよく、好ましくは 0 ~ 2 個であり得る。

30

N^6 の塩基数についても N^1 と同様に特に限定されないが、例えば、0 ~ 約 10 個、0 ~ 9 個、0 ~ 8 個、0 ~ 7 個、0 ~ 6 個、0 ~ 5 個、0 ~ 4 個、0 ~ 3 個などであってよく、好ましくは 0 ~ 10 個、3 ~ 9 個、又は 5 ~ 8 個である。

【0032】

好ましい実施態様において、上記式(1)中、 N^1 は、G、GG、AG、C 又はギャップであり、 N^2 は、A 又は U であり、 N^3 は、G、C 又は A であり、 N^4 は、G、C 又は U であり、 N^5 は、G 又は U であり、

40

N^6 は、 $UUCN^{61}$ 又は $AGUCN^{62}$ (式中、 N^{61} 及び N^{62} は、それぞれ独立して任意の 0 から数個の塩基である) である。ここで、 N^1 が「ギャップ」であるとは、式(1)中に N^1 が存在しないこと、すなわち N^1 が 0 個の塩基であることを意味する。

N^{61} の塩基数は特に限定されないが、例えば、0 ~ 約 10 個、0 ~ 7 個、0 ~ 6 個、0 ~ 5 個、0 ~ 4 個などであってよく、好ましくは 0 ~ 5 個、1 ~ 5 個、又は 2 ~ 4 個であり得る。

N^{62} の塩基数についても特に限定されないが、例えば、0 ~ 約 10 個、0 ~ 7 個、0 ~ 5 個、0 ~ 4 個、0 ~ 3 個などであってよく、好ましくは 0 ~ 5 個、0 ~ 4 個、又は 0 ~ 3 個であり得る。

50

別の好ましい実施態様において、上記式(1)中、
 N^1 は、G、GG、AG又はギャップであり、
 N^2 は、A又はUであり、
 N^3 は、G又はAであり、
 N^4 は、C又はUであり、
 N^5 は、G又はUであり、
 N^6 は、UUC $N^{6\ 1}$ 又はAGUC $N^{6\ 2}$ (式中、 $N^{6\ 1}$ 及び $N^{6\ 2}$ は上記と同義である)
)である。

【0033】

好ましい実施態様において、本発明のアプタマーは、下式(2)又は(3)：
 $GGGA AACUAGGGCGUUAACGUGACCCAGUGUUUCN^{6\ 1}$ (式2)
 $N^1 GGUAACUAGGGCAUUA AUGUUACCCAGUGUAGUCN^{6\ 2}$ (式3)
 (式中、 N^1 、 $N^{6\ 1}$ 及び $N^{6\ 2}$ は前記と同義である)
 で表されるヌクレオチド配列を含み得る。

10

【0034】

好ましい実施態様において、本発明のアプタマーは、配列番号1~12のいずれかで表わされるヌクレオチド配列を含む。以下に、配列番号1~12で表わ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)を示す(以下、A、G、C及びUは、それぞれ、ヌクレオチドの塩基がアデニン、グアニン、シトシン及びウラシルであることを示す)：

20

配列番号1：

GGGAUACUAGGGCAUUA AUGUUACCCAGUGUAGUCUCGA、

配列番号2：

GGGA AACUAGGGCGUUAACGUGACCCAGUGUUUCUCGA、

配列番号3：

GGGAUACUAGGGCAUUA AUGUUACCCAGUGUAGUCCC、

配列番号4：

GGUAACUAGGGCAUUA AUGUUACCCAGUGUAGUCC、

配列番号5：

GGGGAUACUAGGGCAUUA AUGUUACCCAGUGUAGUCCCC、

30

配列番号6：

AGGGAUACUAGGGCAUUA AUGUUACCCAGUGUAGUCCCC、

配列番号7：

GGGA AACUAGGGCGUUAACGUGACCCAGUGUUUCCC、

配列番号8：

CGGAUACUAGGGCAUUA AUGUUACCCAGUGUAGUCCG、

配列番号9：

CCGAUACUAGGGCAUUA AUGUUACCCAGUGUAGUCGG、

配列番号10：

GGGAUACUAGGGCGUUAACGUGUACCCAGUGUAGUCCC、

40

配列番号11：

GGGAUACUAGGGCCUUAAGGUGUACCCAGUGUAGUCCC、

配列番号12：

GGGAUACUAGGGCAUUU AUGUUACCCAGUGUAGUCCC。

好ましい一実施態様において、本発明のアプタマーは、配列番号1、3、4、5、6、8、10又は11で表わされるヌクレオチド配列を含む。

別の好ましい実施態様において、本発明のアプタマーは、配列番号2又は7で表わされるヌクレオチド配列を含む。

さらに別の好ましい実施態様において、本発明のアプタマーは、配列番号1、3、4、

50

5又は6で表わされるヌクレオチド配列を含む。

【0035】

一実施態様において、本発明のアプタマーは、上記したいずれかのヌクレオチド配列において、依然としてF G F 2に結合する限り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んでよく、

(a) 該アプタマーに含まれるヌクレオチドにおいて、

(i) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位がフッ素原子であり、

(ii) 各プリンヌクレオチドのリボースの2'位がヒドロキシ基である、アプタマー

; (b) 該(a)のアプタマーにおいて、

(i) 各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位のフッ素原子が、それぞれ独立して、無置換であるか、水素原子、ヒドロキシ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おり、

(ii) 各プリンヌクレオチドのリボースの2'位のヒドロキシ基が、それぞれ独立して、無置換であるか、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ている、アプタマー

であってよい。ここで、上記置換、欠失、挿入又は付加されるヌクレオチド数は、置換、欠失、挿入又は付加後も依然としてF G F 2に結合する限り特に限定されないが、例えば1~約10個、好ましくは1~6個、より好ましくは1~5個、さらに好ましくは1~4個、さらに好ましくは1~3個、最も好ましくは1個又は2個であり得る。ヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加される部位も、置換、欠失、挿入又は付加後も依然としてF G F 2に結合する限り特に限定されないが、上記式(1)、(2)及び(3)中、1種のヌクレオチドに特定されている部位においては、1~3か所、好ましくは1又は2か所、より好ましくは1か所においてヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加される。一方、式(1)、(2)及び(3)中、複数種のヌクレオチドをとり得る部位においては、より多くのヌクレオチド(例えば、1~約10個、好ましくは1~6個、より好ましくは1~5個、さらに好ましくは1~4個)の置換、欠失、挿入又は付加も許容され得る。

【0036】

本発明のアプタマーの長さは特に限定されず、通常、約10~約200ヌクレオチドであり得るが、例えば、約20ヌクレオチド以上(例、25ヌクレオチド以上、30ヌクレオチド以上、31ヌクレオチド以上、32ヌクレオチド以上、33ヌクレオチド以上)であり、好ましくは25ヌクレオチド以上であり、より好ましくは30ヌクレオチド以上であり、さらに好ましくは33ヌクレオチド以上であり得る。また、例えば、約100ヌクレオチド以下、通常約80ヌクレオチド以下、好ましくは約70ヌクレオチド以下、より好ましくは約60ヌクレオチド以下、さらに好ましくは約50ヌクレオチド以下、さらに好ましくは約45ヌクレオチド以下(例、44ヌクレオチド以下、43ヌクレオチド以下、42ヌクレオチド以下、41ヌクレオチド以下、40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。

よって本発明のアプタマーの長さとしては、通常約10~約200ヌクレオチドであり得、好ましくは20~80ヌクレオチドであり、より好ましくは25~60ヌクレオチドであり、さらに好ましくは25~50ヌクレオチドであり、最も好ましくは30~45ヌクレオチドである。

【0037】

本発明のアプタマーはまた、上記式(1)で表わされるヌクレオチド配列を含むアプタマー(アプタマー(A))の複数の連結物、上記式(1)で表わされるヌクレオチド配列において、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(アプタマー(B))の複数の連結物、並びに1又は複数のアプタマー(A)と1又は複数のアプタマー(B)との連結物、からなる群より選ばれる連結物で

あり得る。これらの連結物も、FGF2に結合し得る。

ここで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、 $-(CH_2)_n$ -リンカー、 $-(CH_2CH_2O)_n$ -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、 $-OPO_3-$ 結合を含むリンカー）が挙げられる。上記複数の連結物における複数とは、2以上であれば特に限定されないが、例えば2個、3個又は4個であり得る。

【0038】

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基を含むヌクレオチド（即ち、天然のリボヌクレオチド）であるか、あるいはリボースの2'位において、ヒドロキシ基が、任意の原子又は基で置換（修飾）されているヌクレオチド（本発明において、「修飾ヌクレオチド」と記載する場合がある）であり得る。

10

【0039】

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、 $-O-CHO$ 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。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、ヒドロキシ基及び $-O-Me$ 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）の基を含む修飾ヌクレオチドであり得る。

20

【0040】

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'位がフッ素原子であるヌクレオチドであるか、あるいは該フッ素原子が、同一又は異なって、無置換であるか、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。特に本発明のアプタマーの製造方法として、後述するDuraScribe™ T7 Transcription Kit（Epicentre社製）を用いた製造方法を適用した場合、全てのピリミジンヌクレオチドのリボース2'位がフルオロ化したアプタマーが得られる。フッ素原子がその他の上記原子又は基で置換されている本発明のアプタマーは、後述の方法で製造することができる。

30

【0041】

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'位がヒドロキシ基であるヌクレオチドであるか、あるいは該ヒドロキシ基が、同一又は異なって、無置換であるか、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。ヒドロキシ基がその他の上記原子又は基で置換されている本発明のアプタマーは、後述の方法で製造することができる。

40

【0042】

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'位のフッ素原子が上述した任意の原子又は基、例えば、水素原子、ヒドロキシ基及び $-O-Me$ 基からなる群より選ばれる同一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。

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'位のヒドロキシ基が上述した任意の原子又は基、例えば、水素原子、フッ素原子及び $-O-Me$ 基からなる群より選ばれる同一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。

【0043】

50

好ましい実施態様において、本発明のアプタマーに含まれる各ピリミジンヌクレオチドはいずれも、リボースの2'位においてフッ素原子を含むヌクレオチドであり、かつ各プリンヌクレオチドはいずれも、リボースの2'位においてヒドロキシ基を含むヌクレオチドである。別の実施態様において、上記各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位のフッ素原子は、それぞれ独立して水素原子、ヒドロキシ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てもよく、かつ上記各プリンヌクレオチドのリボースの2'位のヒドロキシ基は、それぞれ独立して水素原子、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ていてもよい。

【0044】

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への置き換えは、デオキシリボースの2'位の水素原子のXへの置き換えとして読み替えられる。

本発明のアプタマーにおいて、ウラシルをチミンに置換することによって、FGF2に対する結合性、FGF2とFGF受容体との結合阻害活性、アプタマーの安定性、薬物送達性、血液中での安定性等を高めることが可能である。

【0045】

本発明のアプタマーにおいてはまた、ヌクレオチドにおけるリン酸ジエステル結合の1又は数個、例えば、1~2個、1~3個、1~4個、1~5個のヌクレオチドが任意の置換基で修飾もしくは置換されていてもよい。例えば、リン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、アルキルホスホネート結合、ホスホロアミデート結合等に置換されていてもよい。ここで、例えば「ヌクレオチドがホスホロチオエート結合に置換されている」とは、隣接するヌクレオチド間の結合部位にあるリン酸基が硫黄化されている、すなわち、ホスホジエステル結合がホスホロチオエート結合に改変されていることを示す。

【0046】

本発明のアプタマーにおいてはまた、アプタマーを安定化し、その活性を向上させる目的で、1又は数個、例えば、1~2個、1~3個、1~4個、1~5個のヌクレオチドが架橋化核酸Bridged Nucleic Acid(BNA)又はLocked Nucleic Acid(LNA)で置換されていてもよい。ここで、「架橋化核酸」とは、核酸の自由度を分子内架橋で拘束することにより、相補配列に対する結合親和性を高め、かつヌクレアーゼ耐性を獲得する構造を持つものをいい、例えば、2',4'-BNA(LNA)、2'-O,4'-C-ethylene-bridged Nucleic Acid(ENA)などが挙げられるがこれらに限定されない。

【0047】

本発明のアプタマーはFGF2に結合するアプタマーであり、さらに好ましくはFGF2に結合してFGF2とFGF受容体との結合を阻害することができるアプタマーである。FGF2とFGF受容体との結合を本発明のアプタマーが阻害するか否かは、例えば実施例1等の表面プラズモン共鳴法を利用した試験により評価することができる。

【0048】

本発明のアプタマーは、FGF2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。他にも、4'位の酸素を硫黄に置き換えた4'-SRNA、2'位と4'位とをメチレンを介して架橋したLNA(Locked Nucleic Acid)、3'位の水酸基を

10

20

30

40

50

アミノ基に置き換えた3'-N-ホスホロアミデート核酸などを例として挙げる事ができる。本発明のアプタマーは、その製造方法からピリミジンヌクレオチドのリボース2'位の酸素原子が一定の修飾をもって製造される場合があり、後述するDuraScribe™ T7 Transcription Kit (Epicentre社製)を用いた製造方法を適用した場合、好ましくは全てのピリミジンヌクレオチドのリボース2'位がフルオロ化したアプタマーが製造される。したがって、得られたアプタマーに対しその後このような糖残基の改変を加えることで、塩基配列は同じであるが活性が高められた様々なバリエーションのアプタマーを製造することが可能である。以上のことから、本発明のアプタマーは、好ましくは少なくとも一つのヌクレオチドの糖残基が修飾されたアプタマーであり得る。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), Nucl. 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)。具体的には、全てのピリミジンヌクレオチドのリボース2'位の水酸基がフルオロ基に置換されたアプタマーをベースに、リボース2'位における水酸基を、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したアプタマーを製造することができる。

10

【0049】

本発明のアプタマーはまた、FGF2に対する結合性、安定性、薬物送達性等を高めるため、核酸塩基(例、プリン、ピリミジン)が改変(例、化学的置換)されたものであってもよい。このような改変としては、例えば、5位ピリミジン改変、6及び/又は8位プリン改変、環外アミンでの改変、4-チオウリジンでの置換、5-プロモ又は5-ヨード-ウラシルでの置換が挙げられる。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)R'(アミデート)、P(O)R、P(O)OR、CO又はCH₂(ホルムアセタール)又は3'-アミン(-NH-CH₂-CH₂-)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]。

20

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。

30

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。

【0050】

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

40

【0051】

特に、改変がPEGの末端付加によって行われる場合、PEGの分子量は特に限定されないが、好ましくは1000~100000、より好ましくは30000~90000である。PEGは、直鎖状であってもよいし、二つ以上の鎖に分岐したもの(マルチアームPEG)であってもよい。

このようなPEGとしては特に限定されず、当業者であれば市販あるいは公知のPEGを適宜選択して用いることができる(例えば、http://www.peg-drug.com/peg_product/branched.htmlを参照のこと)が、本発明のアプタマーに適用するPEGの好適例として具体的には、分子量40000の2分岐GS型PEG(SUNBRIGHT GL2-400GS 日油製)、分子量4000

50

0の2分岐TS型PEG(SUNBRIGHT GL2-400TS 日油製)、分子量40000の4分岐TS型PEG(SUNBRIGHT GL4-400TS 日油製)、分子量80000の2分岐TS型PEG(SUNBRIGHT GL2-800TS 日油製)、又は分子量80000の4分岐TS型PEG(SUNBRIGHT GL4-800TS 日油製)などが挙げられる。

【0052】

この場合、本発明のアプタマーは、PEGが末端に直接付加されていてもよいが、その末端にPEGと結合可能な基を有するリンカーなどが付加され、それを介してPEGを本発明のアプタマーに付加することがより好ましい。

【0053】

PEGと本発明のアプタマーのリンカーとしては特に限定されず、炭素鎖数や官能基などを結合部位やPEGの種類などに応じて適宜選択することができる。このようなリンカーとしては、例えばアミノ基を有するリンカーが挙げられ、具体的には、5'末端に付加する場合は、ssH Linker(SAFC)又はDMS(O)MT-AMINO-MODIFIER(GLENRESEARCH)が、3'末端に付加する場合は、TFA Amino C-6 lcaa CPG(ChemGenes)などが例示される。このリンカーを選択した場合、PEGには、例えばN-hydroxysuccinimideの活性基を付加した上で、これをリンカー側のアミノ基と反応させることで、本発明のアプタマーとPEGとをリンカーを介して結合することができる。

【0054】

なおPEGやリンカーとしては、市販のものを好ましく用いることができる。またPEG、リンカー及び本発明のアプタマーの結合に関する反応条件などは、当業者であれば適宜設定することが可能である。

【0055】

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化学合成することができる。アプタマーは、リン酸基の負電荷を利用したイオン結合、リボースを利用した疎水結合及び水素結合、核酸塩基を利用した水素結合やスタッキング結合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。

【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

10

20

30

40

50

して変異を入れることで、より多様性に富んだ S E L E X を行うことが可能となる。

【 0 0 5 7 】

S E L E X 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り、そのことは標的物質の活性部位に結合することを意味しない。従って、S E L E X で得られるアプタマーは必ずしも標的物質の機能に作用するとは限らない。F G F 2 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。活性部位に結合しないアプタマーはその標的物質の活性に影響を及ぼさない。実際、コントロールで用いた R N A は F G F 2 と F G F 2 受容体の結合を阻害しなかった。

【 0 0 5 8 】

このようにして選ばれた活性のあるアプタマーは、最適化 S E L E X を行うことで、更に高性能化することが可能である。最適化 S E L E X 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 1 0 ~ 3 0 % 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 S E L E X を行うものである。

【 0 0 5 9 】

S E L E X で得られるアプタマーは 8 0 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長さ（例えば、化学合成ができるのは約 6 0 ヌクレオチド以下であり、より好ましくは約 5 0 ヌクレオチド程度以下、さらに好ましくは 4 5 ヌクレオチド以下）まで短くすることが好ましい。

S E L E X で得られるアプタマーはそのプライマー設計に依存して、その後の最小化作業のしやすさが変わる。うまくプライマーを設計しないと、S E L E X によって活性のあるアプタマーが選別できたとしても、その後の開発が不可能となる。

【 0 0 6 0 】

アプタマーは化学合成が可能であるので改変が容易である。アプタマーは M F O L D プログラムを用いて二次構造を予測したり、X 線解析や N M R 解析によって立体構造を予測したりすることで、どのヌクレオチドを置換又は欠損することが可能か、また、どこに新たなヌクレオチドを挿入可能か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を既存のアッセイ系により確認することができる。

【 0 0 6 1 】

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。そして、新しい配列の長さは特に限定されるものではない。

【 0 0 6 2 】

さらに、既に述べたように、修飾に関しても配列と同様に高度に設計又は改変可能である。

【 0 0 6 3 】

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、ヘアピンループ部分及び一本鎖部分から選ばれる部分に対応する配列：以下、必要に応じて固定配列と省略する）を含むアプタマーを高度に設計又は改変可能である、アプタマーの製造方法を提供する。

【 0 0 6 4 】

例えば、このようなアプタマーの製造方法は、下記：

【 0 0 6 5 】

【化 1】

プライマー用配列(i) — (N)_a — 固定配列 — (N)_b — プライマー用配列(ii)

【 0 0 6 6 】

〔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

10

20

30

40

50

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、好ましくは1～約50、より好ましくは1～約30、さらにより好ましくは1～約20又は1～約10であり得る）で表されるヌクレオチド配列からなる単一種の核酸分子又は複数種の核酸分子（例、a、bの数等が異なる核酸分子のライブラリー）、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。

【0067】

本発明のアプタマーとして好ましくは、以下（a'）、（b'）又は（c'）のいずれかである、FGF2に結合し、FGF2とFGF受容体との結合を阻害するアプタマー：
（a'）配列番号1～7のいずれか（或いは、配列番号2もしくは7、又は、配列番号1及び3～6のいずれか）で表わ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）を含むアプタマーであって、該アプタマーに含まれるヌクレオチドにおいて、

（i）各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位がフッ素原子であり、

（ii）各プリンヌクレオチドのリボースの2'位がヒドロキシ基である、アプタマー；
（b'）配列番号1～7のいずれか（あるいは、配列番号2もしくは7、又は配列番号1及び3～6のいずれか）で表わ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（あるいは、1～4個、又は1～3個）のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を含むアプタマーであって、該アプタマーに含まれるヌクレオチドにおいて、

（i）各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位フッ素原子であり、

（ii）各プリンヌクレオチドのリボースの2'位がヒドロキシ基である、アプタマー；又は

（c'）該（a'）又は（b'）のアプタマーにおいて、

（i）各ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位のフッ素原子が、それぞれ独立して、無置換であるか、水素原子、ヒドロキシ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おり、

（ii）各プリンヌクレオチドのリボースの2'位のヒドロキシ基が、それぞれ独立して、無置換であるか、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ている、アプタマー、

であり、さらに好ましくは、上記アプタマーのうちヌクレオチド長が30～45ヌクレオチドであるアプタマーである。

【0068】

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、ピンプラスチン、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

【0069】

本発明のアプタマー又は複合体は、例えば、医薬又は診断薬、検査薬、試薬として使用され得る。特に、加齢黄斑変性症などの血管新生を伴う疾患、骨粗鬆症、関節リウマチ、変形性関節症、骨折などの骨・軟骨疾患、疼痛の治療用又は予防用の医薬、あるいは診断薬、検査薬、試薬として有用である。

【0070】

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

30

【0071】

経口投与に好適な製剤は、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等である。

【0072】

また、本発明の医薬は必要により、味のマスクング、腸溶性あるいは持続性などの目的のため、自体公知の方法でコーティングすることができる。コーティングに用いられるコーティング剤としては、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリオキシエチレングリコール、ツイーン80、ブルロニック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。徐放性製剤の基材としては、例えば、リポソーム、アテロコラーゲン、ゼラチン、ヒドロキシアパタイト、PLGAなどが挙げられる。

40

【0073】

50

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、経肺投与など）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。更に注射液剤以外にも、吸入剤、軟膏剤も可能である。吸入剤の場合、凍結乾燥状態の有効成分を微細化し適当な吸入デバイスを用いて吸入投与する。吸入剤には、更に必要に応じて従来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。

10

【0074】

ここで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レート、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Span（スパン）85）、ソルビタンモノオレエート（商品名Span（スパン）80）、ソルビタンモノラウエート（商品名Span（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Tween（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Tween（ツイーン）80）、天然資源由来のレシチン（商品名Epiclon（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Brig（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Brig（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Brig（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Genapol（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Synperonic（シンペロニック））等が挙げられる。Span（スパン）、Tween（ツイーン）、Epiclon（エピクロン）、Brig（ブリジ）、Genapol（ゲナポール）及びSynperonic（シンペロニック）は商標である。

20

30

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、有効成分と混合し製剤化し使用する。

【0075】

吸入剤は常法に従って製造することができる。すなわち、上記本発明のアプタマー又は複合体を粉末又は液状にして、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。

40

【0076】

本発明の医薬を上記疾患の予防及び治療用医薬として用いる場合、本発明の医薬は病変部位に直接投与するだけでなく、上記した他の方法によっても投与することができる。

50

本発明のアプタマーは1本鎖の核酸であるため、相補配列を含むヌクレオチドの投与による解毒も可能であり、投与後の動態制御が困難な中和抗体より安全性の高い医薬品となる可能性が高い。これは、抗体医薬治療などで起こりうる、体内における抗体の長い滞留時間に起因する感染症の問題を鑑みても極めて有利な点と言える。特に本発明の医薬を上記疾患の予防又は治療用医薬として用いる場合、疾患の重篤性と副作用のリスクとを考えると、体内動態を制御しやすいアプタマーを利用する方がより高い安全性を有する医薬を得られることは明白である。

【0077】

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。

【0078】

また本発明のアプタマー又は複合体は、薬物送達剤、インビボイメージング用プローブ、FGF2の血中濃度測定用プローブ、組織染色用プローブ、ELISA用プローブ、FGF2の分離精製用リガンドとしても使用され得る。

【0079】

本発明はまた、本発明のアプタマー又は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、FGF2の精製、及びFGF2の検出、定量に有用であり得る。

【0080】

本発明のアプタマー又は複合体は、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又は複合体に導入し、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、本発明のアプタマー又は複合体を固相担体に固定する方法、及びそうして得られる固相担体を提供する。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。

【0081】

本発明はまた、FGF2の精製及び濃縮方法を提供する。特に本発明の精製方法はFGF2を他のFGF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FGF2を吸着させ、吸着したFGF2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FGF2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、FGF2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。FGF2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、カリウム塩(例、KCl)、マグネシウム塩(例、MgCl₂)、界面活性剤(例、Tween(ツイーン)20、Triton、N

10

20

30

40

50

P 4 0)、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、F G F 2の吸着後、洗浄液を用いて当該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、E D T A)、T r i s、酸、アルカリ、T r a n s f e r R N A、D N A、T w e e n(ツイン) 2 0などの表面活性剤、N a C l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、当該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、当該固相担体の再生、滅菌が可能である。

【 0 0 8 2 】

本発明のアプタマー又は複合体は、検出用プローブ、特にF G F 2の検出用プローブとして利用することができる。アプタマーの標識方法としては特に限定されず、自体公知の方法が適用可能である。このような方法としては、例えば放射性同位元素による標識、蛍光色素や蛍光蛋白質による標識などが挙げられる。

10

【 0 0 8 3 】

本発明はまた、F G F 2の検出及び定量方法を提供する。特に本発明はF G F 2を他のF G F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)F G F 2を測定することを含み得る。F G F 2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用いることにより、酵素免疫測定法(E I A)(例、直接競合E L I S A、間接競合E L I S A、サンドイッチE L I S A)、放射免疫測定法(R I A)、蛍光免疫測定法(F I A)、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。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F G F 2量の測定、F G F 2が関連する疾患の診断に有用であり得る。

20

【 0 0 8 4 】

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。

【 0 0 8 5 】

以下は、本発明の実施のための特定の実施形態の例である。実施例は、説明のみを目的として提供し、本発明の範囲を制限することを決して意図しない。

30

【実施例】

【 0 0 8 6 】

実施例 1 : F G F 2 に特異的に結合する R N A アプタマーの作製

従来のS E L E X法では約3 0 m e r ~ 4 0 m e rのランダム配列の両末端に2 0 m e r前後のプライマーを付けたライブラリーが使用された。その場合、取得されるアプタマーの全長は約8 0 ~ 1 0 0 m e rであり、その後短鎖化の作業が必要であった。しかし、短鎖化は必ずしも簡単ではなく、活性が大きく低下してしまうことがしばしばであった。そこで、N O X X O N社によって開発されたT a i l o r e d - S E L E X法を参考にし

40

使用したD N A 鋳型とプライマー配列は以下の通りである。

D N A 鋳型 :

5 ' - T C G A G - 3 0 N - T C C C T A T A G T G A G T C G T A T T A G C A G C T C C A C A G G C T T - 3 ' (配列番号 1 3)

F o r w a r d l i g a t e :

5 ' - U A A U A C G A C U C A C U A U A - 3 ' (配列番号 1 4)

F o r w a r d p r i m e r :

50

5' - A A G C C T G T G G A G C T G C T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G A
- 3' (配列番号15)

Forward bridge :

5' - T C C C T A T A G T G A G T C G T A T T A - N H 2 - 3' (配列番号16)

Reverse bridge :

5' - T C T T G T T C A G C T T A G T T C T C T C G A G - 3' (配列番号17)

Reverse ligate :

5' - p - G A G A A C T A A G C T G A A C A A G A - N H 2 - 3' (配列番号18)
【0087】

標的物質としてヒトFGF2 (Peprotech社製)を用いた。FGF2はアミノ
カップリングによってアガロース樹脂 (NHS-activated Sepharose,
GEヘルスケア社製)に固定化した。アミノカップリングはGEヘルスケア社の仕様
書に沿って行った。固定化量は、固定化前のFGF2溶液と固定化直後の上清をSDS-
PAGEにより調べることで確認した。SDS-PAGEの結果、上清からはFGF2の
バンドは検出されず、使用したFGF2のほぼ全てがカップリングされたことが確認され
た。約290 pmolのFGF2が約5 μLの樹脂に固定化されたことになる。

【0088】

最初のラウンドで用いたRNA (30N-RNA)は、化学合成によって得られたDN
A鋳型をForward primerを用いて2本鎖にし、DuraScribe (商
標) T7 Transcription Kit (Epicentre社製)を用いて転
写して得た。この方法によって得られたRNAはピリミジンヌクレオチドのリボースの2
'位がフルオロ化されたものである。2ラウンド以後はDNAを2本鎖にした後、制限酵
素で3'側のプライマー配列を切断してから転写した。

【0089】

FGF2が固定化された樹脂にRNAプールを加え、1時間室温で保持した。その後、
FGF2に結合しないRNAを取り除くために、溶液Aで樹脂を洗浄した。ここで溶液A
は145 mM塩化ナトリウム、5.4 mM塩化カリウム、1.8 mM塩化カルシウム、0
.8 mM塩化マグネシウム、20 mMトリス (pH7.6)、0.05% Tween 20
の混合溶液である。FGF2に結合したRNAは、溶出液を加えて95、10分で回収
した。溶出液として7M Urea、3mM EDTAと0.1M トリスを混合しpH
6.6に調製したものをを用いた。回収されたRNAはRT-PCRで増幅し、DuraS
cribe (商標) T7 Transcription Kitで転写して次のラウンド
のプールとして用いた。以上を1ラウンドとし、同様の作業を7ラウンド行った。SEL
EX終了後、PCR産物をpGEM-T Easyベクター (Promega社製)にク
ローニングし、大腸菌株DH5 (Toyobo社製)に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 Ge
netic Analyzer、ABI社製)で塩基配列を調べた。

【0090】

SEL EXを7ラウンド行った後に配列を調べたところ、89クローンの内、79クロー
ンは収束しており、11種類に分類できた。残り10クローンはシングル配列であった
。

【0091】

収束した配列のうち、配列番号1及び2で表わされる核酸のFGF2に対する結合活性
を表面プラズモン共鳴法により評価した。以下に、配列番号1及び2で表されるヌクレオ
チド配列をリボースの2'位の修飾と共にアプタマーID1及び2として示す。各ヌクレ
オチドにおける括弧はリボースの2'位の修飾を示し、Fはフッ素原子を示す。具体的
には、C (F)はリボースの2'位がフッ素原子で置換されたシチジンを示し、U (F)は
リボースの2'位がフッ素原子で置換されたウリジンを示す。また各配列の先頭が5'末
端であり、後尾が3'末端である。

アプタマーID1 :

10

20

30

40

50

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

アプタマーID2:

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

【0092】

測定にはB I A c o r e社製のB I A c o r e 2 0 0 0を使用し、センサーチップとしてアミノ基と反応するC M 4を用いた。ヒトF G F 2は固定化溶液(10 mM酢酸ナトリウム、pH 6)に溶解し25~40 μg/mLとした。タンパク質側のアミノ基とチップ側のカルボキシル基の反応にはE t h y l - 3 - c a r b o d i i m i d e h y d r o c h l o r i d eとN - h y d r o x y s u c c i n i m i d eを用いた。反応後、e t h a n o l a m i n e - H C lによるブロッキングを行った。F G F 2の固定化量は2500~4000 RUとした。アナライト用のアプタマーは0.15 μM~0.5 μMに調製した。ランニングバッファーには溶液Aを用いた。再生用液として2 M N a C lを用いた。F G F 2はフローセルF_c2に固定化し、F_c1の結果を引くことで最終的なセンサーグラムとした。

10

【0093】

2配列の結合を測定したところ、顕著にF G F 2に結合することが分かった。アプタマーID1及び2で表わされるアプタマーとヒトF G F 2との結合の様子を示すセンサーグラムを図1に示す。以上より、これらの核酸はF G F 2に結合するアプタマーであることが示された。

20

【0094】

収束が見られた11クローンの内10クローンを選び、表面プラズモン共鳴法でF G F 2とF G F 受容体の結合を阻害するかどうかを調べた。測定にはB I A c o r e社製のB I A c o r e 2 0 0 0を使用した。B I A c o r e社のプロトコールに従って、C M 5センサーチップにP r o t e i n A (P I E R C E社製)を固定化した。そこに、I g GのF_c部分が融合したヒトF G F R 1 (I I I c)、R 2 (I I I c)、R 3 (I I I c)、R 4 (R & D S y s t e m s社製)をそれぞれ約1,000 RU固定化した。アナライトとしてF G F 2 (0.1 μM)、ヘパリン(0.1 μM)(P f i z e r社製)とアプタマー(0.15 μM)を混合したものを流した。阻害試験前にF G F 2とヘパリンの混合体が4種類の受容体と結合することを確認した。試験の結果、アプタマーID1及び2で表わされるアプタマーは強い阻害活性を示した。アプタマーID1で表されるアプタマーがF G F 2とF G F R 1 (I I I c)、2 (I I I c)、3 (I I I c)、4の結合を阻害していることを示すセンサーグラムを図2に示す。

30

【0095】

また、4種類の受容体に対してそれぞれの阻害率を求めた。阻害率はF G F 2とヘパリン混合体の最大結合量を0、インジュクシオンバッファーのみの時の結合量を100とした。ここでの結合量はセンサーグラムのピークトップのRU値を意味する。阻害率を計算したところ、アプタマーID1及び2で表わされるアプタマーはいずれの受容体に対しても50%以上の高い値であった。他のアプタマーの阻害率は50%以下であった。表1にその結果を示す。

40

【0096】

【表 1】

アプタマー ID 1 及び 2 で表わされるアプタマーがヒト FGF 2 と FGF 受容体の結合を阻害する時の阻害率

	阻害率 (%)			
	FGFR1 α (IIIc)	FGFR2 α (IIIc)	FGFR3 (IIIc)	FGFR4
アプタマー ID 1	89%	88%	80%	75%
アプタマー ID 2	89%	86%	75%	73%

10

【0097】

実施例 2：配列番号 1 及び 2 で表わされるアプタマーの短鎖化

配列番号 1 及び 2 で表わされるアプタマーの短鎖化を行った。MFOLD プログラム (Zuker, Nucleic Acids Res. 31, 3406-3415, 2003) を用いて RNA の 2 次構造を予測し、その構造を参考に短鎖化した。短鎖化体は、目的の配列の DNA を化学合成により作製し、DuraScribe T7 Transcription Kit を用いて転写することで得られた。以下に、実際に作製した短鎖化体のヌクレオチド配列 (配列番号 3 及び 7) をリボースの 2' 位の修飾と共にアプタマー ID 3 及び 7 として示す。

20

【0098】

アプタマー ID 3：配列番号 1 で表わされるアプタマー改変体で 36 ヌクレオチドの長さのアプタマー

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

アプタマー ID 7：配列番号 2 で表わされるアプタマー改変体で 35 ヌクレオチドの長さのアプタマー

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

30

【0099】

これらの核酸が FGF 2 に対する結合活性を有しているかどうか、実施例 1 と同様の表面プラズモン共鳴法により調べた。表 2 にその結果を示す。アプタマー ID 3 及び 7 で表わされるアプタマーは顕著に FGF 2 に結合することが分かった。また、実施例 1 と同様に表面プラズモン共鳴法により FGF 2 と FGF 2 受容体の結合阻害活性を有しているかどうかを調べたところ、アプタマー ID 3 及び 7 で表されるアプタマーが高い阻害を有していることがわかった。

40

【0100】

【表 2】

アプタマー ID 3 及び 7 で表わされるアプタマーがヒト FGF 2 と FGF 受容体の結合を阻害する時の阻害率を示す。

	FGFR1 α (IIIc)
アプタマー ID 3	89%
アプタマー ID 7	85%

50

【 0 1 0 1 】

実施例 3 : アプタマー I D 3 で表わされるアプタマーの特異性

アプタマー I D 3 で表わされる F G F 2 アプタマーが同じ F G F ファミリーの F G F 1、又はいくつかの成長因子 E G F、 N G F、 V E G F に結合するかどうか表面プラズモン共鳴法で調べた。測定には B I A c o r e 社製の B I A c o r e 2 0 0 0 を用いた。センサーチップにはストレプトアビジンが固定化されている S A チップを用いた。これに、5 末端にビオチンが付加したアプタマー I D 3 で表わされるアプタマーを約 5 0 0 R U 程度結合させた。ビオチン付きアプタマーは化学合成によって作製した。リガンドとなるタンパク質は R & D 社製の F G F 1、E G F、N G F、V E G F を用いた。ランニングバッファーは実施例 1 で使用した溶液 A に最終濃度 0 . 3 M になるように塩化ナトリウムを添加したものをを用いた。その結果、アプタマー I D 3 で表わされるアプタマーは F G F 2 とは結合するが、他のタンパク質とは結合しないことがわかった。そのセンサーグラムを図 3 に示す。

10

以上より、アプタマー I D 3 で表わされるアプタマーは F G F 2 に特異的に結合することが判明した。

【 0 1 0 2 】

実施例 4 : 短鎖化したアプタマーの改変及び修飾

F G F 2 に対する結合性、安定性、薬物送達性などを高めるため、配列番号 3 で表わされるアプタマーを基にして、アプタマー I D 3 (1) - 3 (4 0)、アプタマー I D 4 及び 4 (1) 4 (4)、アプタマー I D 5 並びにアプタマー I D 6 で表わされる核酸を化学合成した。ここで、アプタマー I D 4 で表わされるアプタマーはアプタマー I D 3 (1 9) で表わされるアプタマーの 5 ' 末端の G (M) 及び 3 ' 末端の C (M) をそれぞれ一つ削ったものであった。アプタマー I D 5 で表わされるアプタマーはアプタマー I D 3 (1 9) で表わされるアプタマーの 5 ' 末端に G (M) 及び 3 ' 末端に C (M) をそれぞれ一つ追加したものであった。また、アプタマー I D 6 で表わされるアプタマーはアプタマー I D 3 (1 9) で表わされるアプタマーの 5 ' 末端に A (M) だけを追加したものであった。これらの核酸は化学合成により作製した。作製したアプタマーが F G F 2 と F G F 受容体の結合を阻害するかどうか実施例 1 と同様に調べた。ここでは、アプタマー、F G F 2、ヘパリンの濃度をすべて 0 . 1 μ M とした。実験の結果、測定した全てのアプタマーが F G F 2 と F G F R 1 (I I I c) 受容体の結合を強く阻害することがわかった。

20

30

表 3 にその結果を示す。

【 0 1 0 3 】

【表 3 - 1】

アプタマーがヘパリン存在下でFGF2とFGFR1 α (IIIc) 受容体との結合を阻害する時の阻害率を示す。

	阻害率(%)
アプタマーID3 (1)	84
アプタマーID3 (2)	89
アプタマーID3 (3)	87
アプタマーID3 (4)	89
アプタマーID3 (5)	87
アプタマーID3 (6)	78
アプタマーID3 (7)	89
アプタマーID3 (8)	84
アプタマーID3 (9)	89
アプタマーID3 (10)	89
アプタマーID3 (11)	88
アプタマーID3 (12)	89
アプタマーID3 (13)	88
アプタマーID3 (14)	87
アプタマーID3 (15)	86
アプタマーID3 (16)	87
アプタマーID3 (17)	88
アプタマーID3 (18)	89
アプタマーID3 (19)	93
アプタマーID3 (20)	96
アプタマーID3 (21)	97
アプタマーID3 (22)	98
アプタマーID3 (23)	91
アプタマーID3 (24)	90
アプタマーID3 (25)	90
アプタマーID3 (26)	99
アプタマーID3 (27)	99
アプタマーID3 (28)	91
アプタマーID3 (29)	91
アプタマーID3 (30)	99

10

20

30

40

【0104】

【表 3 - 2】

アダプターがヘパリン存在下でFGF2とFGFR1 α (IIIc) 受容体との結合を阻害する時の阻害率を示す (つづき)。

	阻害率(%)
アダプターID3 (31)	91
アダプターID3 (32)	91
アダプターID3 (33)	90
アダプターID3 (34)	91
アダプターID3 (35)	84
アダプターID3 (36)	98
アダプターID3 (37)	97
アダプターID3 (38)	97
アダプターID3 (39)	97
アダプターID3 (40)	97
アダプターID4	95
アダプターID4 (1)	93
アダプターID4 (2)	94
アダプターID4 (3)	96
アダプターID4 (4)	96
アダプターID5	94
アダプターID6	93

10

20

【0105】

以上より、上述のアダプターIDで表わされるアダプター全てがFGF2とFGF受容体との結合に対して高い阻害活性を有していることが示された。

30

【0106】

以下にそれぞれの配列を示す。大文字はRNA、小文字はDNA、idTはinverted dTを示す。なお、各ヌクレオチドにおける括弧は、その2'位の修飾を示し、Fはフッ素原子、MはO-メチル基を示す。sはホスホロチオエート結合を示す。C6は-(CH₂)₆-リンカー、ssHはssH Linker(-CH₂-CH₂-O-CO-NH-(CH₂)₆-)を示す。PEG40TS2は分子量40000の2分岐TS型ポリエチレングリコール(SUNBRIGHT GL2-400TS 日油社製)、PEG80TS4は分子量80000の4分岐TS型(SUNBRIGHT GL4-800TS 日油社製)、Y-NHS-40Kは分子量40000のY-Shape PEG NHS Esyer(Y-NHS-40K JenKem Technology U

40

【0107】

アダプターID3 (1)

GGGAU(F)AC(F)U(F)AGGGC(F)A(M)U(F)U(F)A(M)
A(M)U(F)G(M)U(F)U(F)AC(F)C(F)AGU(F)GU(F)

50

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

アブタマーID3 (2)

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

アブタマーID3 (3)

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

アブタマーID3 (4)

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

アブタマーID3 (5)

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

アブタマーID3 (6)

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

アブタマーID3 (7)

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

アブタマーID3 (8)

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

アブタマーID3 (9)

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

アブタマーID3 (1 0)

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

アブタマーID3 (1 1)

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

アブタマーID3 (1 2)

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

アブタマーID3 (1 3)

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

10

20

30

40

50

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

アプタマー-ID3 (3 4)

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

アプタマー-ID3 (3 5)

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

10

アプタマー-ID3 (3 6)

G L 4 - 8 0 0 T S - C 6 - G (M) G (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M)
) U (F) A (M) G (M) G (M) G C (M) A (M) U (M) U (F) A (M) A (M)
U (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) G U (F) G
U (F) A (M) G (M) U (M) C (M) C (M) C (M) - i d T

アプタマー-ID3 (3 7)

Y - N H S - 4 0 K - s s H - G (M) G (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M)
U (F) A (M) G (M) G (M) G C (M) A (M) U (M) U (F) A (M) A
(M) U (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) G U (F)
G U (F) A (M) G (M) U (M) C (M) C (M) C (M) - i d T

20

アプタマー-ID3 (3 8)

M E - 1 0 0 T S - C 6 - G (M) G (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M)
U (F) A (M) G (M) G (M) G C (M) A (M) U (M) U (F) A (M) A (M)
) U (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) G U (F) G U
(F) A (M) G (M) U (M) C (M) C (M) C (M) - i d T

アプタマー-ID3 (3 9)

P T E - 1 0 0 C S - C 6 - G (M) G (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M)
) U (F) A (M) G (M) G (M) G C (M) A (M) U (M) U (F) A (M) A (M)
U (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) G U (F) G
U (F) A (M) G (M) U (M) C (M) C (M) C (M) - i d T

30

アプタマー-ID3 (4 0)

G L 2 - 4 0 0 T S - s s H - G (M) G (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M)
U (F) A (M) G (M) G (M) G C (M) A (M) U (M) U (F) A (M) A
(M) U (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) G U (F)
G U (F) A (M) G (M) U (M) C (M) C (M) C (M) - i d T

アプタマー-ID4 : アプタマー-ID3 (1 9) で表わされるアプタマーの改変体で34ヌ
クレオチドの長さのアプタマー

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

40

アプタマー-ID4 (1)

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

アプタマー-ID4 (2)

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

50

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

アプタマーID4 (3)

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

アプタマーID4 (4)

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

10

アプタマーID5 : アプタマーID3 (19) で表わされるアプタマーの改変体で38ヌクレオチドの長さのアプタマー

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

アプタマーID6 : アプタマーID3 (19) で表わされるアプタマーの改変体で37ヌクレオチドの長さのアプタマー

20

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

【 0 1 0 8 】

実施例5 : ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を用いたアプタマーのFGF2依存的細胞増殖阻害活性評価

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (H U V E C) を96ウェル平底プレートに1ウェル当たり
 5×10^3 個播種し、2%ウシ胎児血清と成長因子を含んだ内皮細胞専用培地 E G M - 2
 B u l l e t K i t (C C - 3 1 6 2 L o n z a 社製) で一晩培養した。その後、培
 地を捨て、P B S バッファーで2回洗浄後、2%ウシ胎児血清を含んだ内皮細胞専用培地
 に溶解したアプタマーID3 (21) で表わされるアプタマー (5、2.5、1、0.5
 n M) と F G F 2 (最終濃度 0.5 n M) の混合液を添加した。72時間後に C e l l
 C o u n t i n g K i t - 8 を用いて生細胞数を調べた。吸光度測定にはマイクロプレ
 ートリーダー (450 nm) を使用した。1サンプルは n = 3 で測定した。ポジティブコ
 ントロールとして抗 F G F 2 抗体 A n t i - F G F , b a s i c (A b - 3) M o u s e
 m A b (3 H 3) (C a l b i o c h e m 社製) を用いた。F G F 2 のみの添加で
 細胞を3日間培養して得られた1ウェルあたりのOD値を阻害活性0%、F G F 2 無添加
 で3日間培養して得られた1ウェルあたりのOD値を阻害活性100%として、F G F 2
 とアプタマーの混合液を添加した場合に得られた1ウェルあたりのOD値から、アプタ
 マーの阻害活性を求めた。その結果、アプタマーID3 (21) で表わされるアプタマーが
 F G F 2 に対して高い阻害活性を有していることが示された。I C 5 0 値は約 1.0 n M
 であった。結果を表4に示す。

30

40

【 0 1 0 9 】

【表 4】

アプタマー ID3 (21) で表わされるアプタマーが FGF2 添加による HUVEC 細胞の増殖を抑制する表である。“—” は FGF2 を添加しなかったもの。

	阻害率(%)
—	100
FGF2 (500pM)	0
3H3 (25nM)+FGF2 (500pM)	100
3H3 (5nM)+FGF2 (500pM)	30
3H3 (1nM)+FGF2 (500pM)	8.5
アプタマー-ID3 (21) (5nM)+FGF2 (500pM)	100
アプタマー-ID3 (21) (2.5nM)+FGF2 (500pM)	86
アプタマー-ID3 (21) (1nM)+FGF2 (500pM)	47
アプタマー-ID3 (21) (0.5nM)+FGF2 (500pM)	0
スクランブル配列 (5nM)+FGF2 (500pM)	11

10

【0110】

20

以上より、アプタマー ID3 (21) で表わされるアプタマーは血管新生を阻害することが示唆された。

【0111】

上記と同様な方法で、96 ウェル平底プレートをコラーゲンコートされたものに変更して各種アプタマーの活性評価を行った。添加した FGF2 濃度は 0.58 nM であった。その結果を表 5 に示す。ネガティブコントロール RNA としては、PEG が付加されていない Macugen (登録商標) 配列であって、5' 末端に C6 修飾、3' 末端に idT 修飾したものを使用した。

【0112】

【表 5】

FGF2 添加によるHUVEC細胞の増殖を抑制するアプタマーのIC50値

アプタマーID	IC50 (nM)
3 (8)	27
3 (12)	21
3 (13)	15
3 (14)	12
3 (15)	14
3 (16)	7.9
3 (18)	2.6
3 (23)	5.3
3 (24)	7.3
3 (25)	5.1
3 (26)	3.0
3 (27)	3.7
3 (28)	4.0
3 (29)	3.1
3 (30)	3.3
3 (31)	10
3 (32)	4.0
3 (33)	4.0
4	5.0
4 (1)	3.8
4 (2)	5.1
4 (3)	4.6
4 (4)	4.5
5	2.6
6	3.1
ネガティブコントロールRNA	>400

10

20

30

【0113】

以上のことから、上記アプタマーIDで示されるアプタマーも同様に血管新生を阻害することが示唆された。

40

【0114】

実施例6：ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を用いたアプタマーのFGF2依存的細胞増殖阻害活性評価2

実施例5と同様な方法で、アプタマーID8から12で表されるアプタマーの阻害活性を測定した。その結果を表6に示す。

アプタマーID8～12のヌクレオチド配列はそれぞれ配列番号8～12で表される。

【0115】

アプタマーID8

NH₂-C(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)
G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)

50

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

アプタマーID9

NH2 - C (M) C (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M) U (F) A (M) G (M) G (M) G C (M) A (M) U (M) U (F) A (M) A (M) U (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) G U (F) G U (F) A (M) G (M) U (M) C (M) G (M) G (M) - i d T

アプタマーID10

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

10

アプタマーID11

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

アプタマーID12

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

20

【0116】

【表6】

表6：FGF2添加によるHUV EC細胞の増殖を抑制するアプタマーのIC50値

アプタマーID	IC50 (nM)
アプタマーID8	5.6
アプタマーID9	3.7
アプタマーID10	4.9
アプタマーID11	1.3
アプタマーID12	2.3
アプタマーID3 (19)	3.4

30

【0117】

実施例7：血管新生マウスモデル試験

ヒトFGF-2 (R&D社製)を含む0.76% (最終濃度)のクエン酸ナトリウム含有マトリゲル (BDマトリゲルTM)を8週令のC57BL/6Jマウス ()の皮下に麻酔下で注入した。7日後にマトリゲルを摘出し、血管新生の度合いをマトリゲル中のヘモグロビン量で評価した。ヘモグロビン量はDrabkin Reagent Kitを用いてシアンメトヘモグロビン法で定量した。アプタマーは1mM塩化マグネシウムを含んだリン酸緩衝液に溶解し、マトリゲル皮下投与直後から、一日1回腹腔内に投与した。投与群を表7に、結果を表8に示す。アプタマー1mg/kg群で顕著な血管新生阻害が観察された。以上より、本発明のアプタマーがモデル動物においても強い血管新生阻害活性を示すことが確認された。

40

【0118】

【表 7】

投与群の説明

	投与群	FGF-2 (μ g)	アプタマー投 与量 (mg/kg)	投与経路	投与回数	動物数 (匹)
1	コントロール群	0	0	腹腔内	一日一回	3
2	溶媒投与群	1	0	腹腔内	一日一回	3
3	アプタマーID3(21) 低用量群	1	0.1	腹腔内	一日一回	3
4	アプタマーID3(21) 高用量群	1	1	腹腔内	一日一回	3

10

【0119】

【表 8】

血管新生マウスモデル試験の結果

	投与群	ヘモグロビン量 (mg/mL)
1	コントロール群	0.19
2	溶媒投与群	2.2
3	アプタマーID3(21)低用量群	1.3
4	アプタマーID3(21)高用量群	0.29

20

【0120】

本出願は、日本で出願された特願2014-60966(出願日:2014年3月24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。

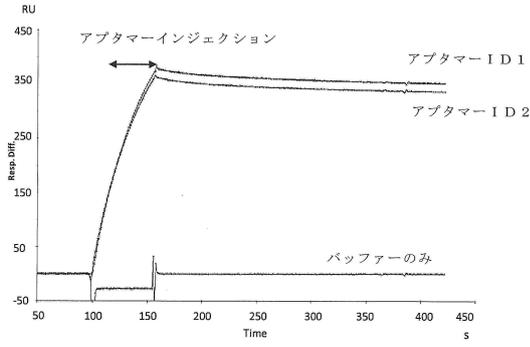
【産業上の利用可能性】

【0121】

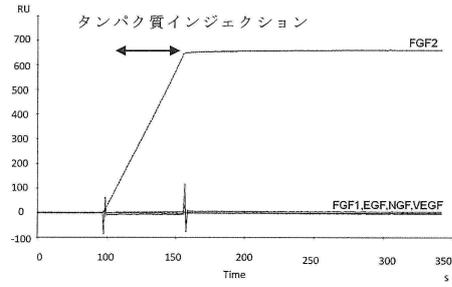
本発明のアプタマー又は複合体は、血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛などの疾患に対する医薬、あるいは診断薬、試薬として有用であり得る。本発明のアプタマー又は複合体はまた、FGF2の精製及び濃縮、FGF2の標識、並びにFGF2の検出及び定量に有用であり得る。

30

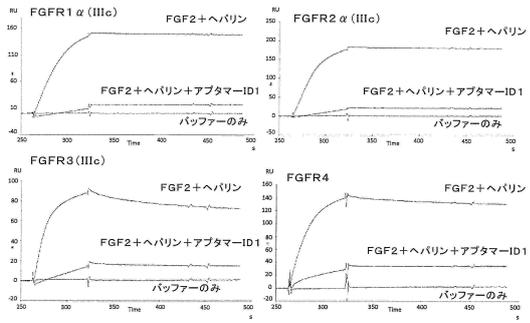
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



【 配列表 】

0006634554000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 17/06 (2006.01) A 6 1 P 17/06
A 6 1 P 19/02 (2006.01) A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 1/02 (2006.01) A 6 1 P 1/02

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 金 玲

東京都港区白金台三丁目16番13号 株式会社リボミック内

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 国際公開第2013/186857(WO, A1)

国際公開第2011/099576(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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

WPIDS/WPIX(STN)