明　細　書

発明の名称 ： アプタマー製剤

技術分野

[0001] 本発明は、アプタマー製剤、特に塩基性線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ２）に対するアプタマーを有効成分とするアプタマー製剤に関する。

背景技術

[0002] 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（登録商標）（一般名：ペガプタニブナトリウム）が加齢性黄斑変性症の治療薬として米国で承認され、本邦でも２００８年７月に承認された。Ｍａｃｕｇｅｎ（登録商標）は、ＶＥＧＦに対するアプタマーを活性本体とする。該アプタマーは２８個の核酸分子からなる合成オリゴヌクレオチドで構成され、その５’末端にポリエチレングリコール（ＰＥＧ）誘導体が結合している。

[0003] Ｍａｃｕｇｅｎ（登録商標）の剤形はプレフィルドシリンジ注射剤で、硝子体内に注射する。無色からわずかに着色した澄明な水性注射液であり、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、等張化剤及びｐＨ調整剤が添加されている。この製剤処方で２５±２℃の加速試験において６か月間、５±３℃の長期保存試験においても３６か月間にわたって、安定に存在することが示されている（非特許文献１）。

[0004] 一方、本願の出願時点において、Ｍａｃｕｇｅｎ（登録商標）以外にアプタマーを有効成分とする医薬品は存在せず、アプタマー製剤にどのような製剤処方が適切なのかは全く知られていない。

[0005] 出願人は、ＦＧＦ２に対するアプタマーを有効成分とし、加齢黄斑変性症や軟骨無形成症、また癌性疼痛を適応症とする医薬品を開発中である（特許文献１及び２）。本発明者らは、ＦＧＦ２アプタマー製剤の開発を進める過

程で、Ｍａｃｕｇｅｎ（登録商標）とおよそ同じと考えられる製剤処方や、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を媒体とした製剤処方では、ＦＧＦ２アプタマーの活性を維持できないという結果を得た。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第２０１１／０９９５７６号

特許文献2：国際公開第２０１５／１４７０１７号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：医薬品インタビューフォーム　加齢黄斑変性症治療剤　マクジェン（登録商標）硝子体内注射用キット０．３ｍｇ　２０１５年３月（改訂第５版）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008]　従って、本発明の目的は、アプタマー、特にＦＧＦ２に対するアプタマーの活性を長期間にわたって安定に保持し得る製剤処方を提供し、以てアプタマー、特にＦＧＦ２アプタマーを有効成分とする医薬製剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009]　本発明者らは、上記の目的を達成すべく鋭意検討を重ねた結果、ＦＧＦ２アプタマーにおける最適な製剤条件を見出すことに成功し、本発明を完成するに至った。

[0010]　即ち、本発明は以下のものを提供する。

［１］ＦＧＦ２に結合するアプタマー又はその塩と、非電解質である浸透圧調整剤とを含有してなる、該アプタマー又はその塩が長期間安定である水性液剤。

［２］前記アプタマー又はその塩以外に、実質的に電解質を含有しない、［１］に記載の水性液剤。

［３］前記アプタマーが、下式（１）：

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

（ここで、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）

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、以下の（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；

（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；

のいずれかである、［１］又は［２］に記載の水性液剤。

［４］前記アプタマーが、下式（３）：

$N^1GGAUACUAGGGCAUUAAUGUUACCAGUGUAGUCN^{62}$ （３）

（ここで、N^1及びN^{62}は、それぞれ独立して任意の０から数個の塩基を表す）

で表わされるヌクレオチド配列を含む、［１］又は［２］に記載の水性液剤。

［５］前記アプタマーが、配列番号３、８、９、１０又は１２で表わされるいずれかのヌクレオチド配列を含む、［１］又は［２］に記載の水性液剤。

［６］アプタマーの濃度が１～６０ｍｇ／ｍＬである、［１］～［５］のいずれかに記載の水性液剤。

［７］浸透圧調整剤の配合割合が、水性液剤全体の２～７．５％（ｗ／ｖ）である、［１］～［６］のいずれかに記載の水性液剤。

［８］浸透圧調整剤がマンニトールである、［１］～［７］のいずれかに記載の水性液剤。

［９］アプタマー１ｍｇに対して、マンニトールを１～５０ｍｇの割合で含有する、［８］に記載の水性液剤。

［１０］５℃以下で保存される、［１］～［９］のいずれかに記載の水性液剤。

［１１］４℃で３か月保存後の単量体アプタマーの割合が８０％以上である、［１］～［１０］のいずれかに記載の水性液剤。

［１２］注射剤である、［１］～［１１］のいずれかに記載の水性液剤。

［１３］血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛の予防又は治療用である、［１］～［１２］のいずれかに記載の水性液剤。

［１４］［１］～［１２］のいずれかに記載の水性液剤を対象に投与することを含む、血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛の予防又は治療方法。

［１５］、血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛の予防又は治療における使用のための、［１］～［１２］のいずれかに記載の水性液剤。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、有効成分であるＦＧＦ２に対するアプタマー又はその塩を、水性液剤の形態で長期間安定に保存することができるので、取扱いが容易なアプタマー製剤を提供することができる。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明は、ＦＧＦ２に対するアプタマー又はその塩を有効成分とし、該アプタマー又はその塩が長期間安定に保持される医薬製剤（以下、「本発明のアプタマー製剤」ともいう）を提供する。ここで「長期間安定」であるとは

、ガラス瓶中に当該製剤を封入し４℃で３か月間保存した後の単量体アプタマーの割合が７０％以上であることを意味する。単量体アプタマーの割合は、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて、以下の条件により単量体と多量体を分離・検出し、（単量体のピーク面積）／（単量体及び多量体のピーク面積の和）×１００（％）を算出した値である。

装置：Ｗａｔｅｒｓ社製　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ　Ｈ－Ｃｌａｓｓ　Ｂｉｏ

検出器：Ｗａｔｅｒｓ社製　ＴＵＶ検出器

カラム：Ｗａｔｅｒｓ社製　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ　ＢＥＨ２００　ＳＥＣカラム

サンプル濃度：０．２ｍｇ／ｍＬ

注入量：５μＬ

溶離液：１０％アセトニトリル／ＰＢＳ

流速：０．３ｍＬ／分

カラム温度：２５℃

本発明のアプタマー製剤は、有効成分としてのＦＧＦ２に対するアプタマー又はその塩と、非電解質である浸透圧調整剤とを含有する。

[0013] 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、該標的分子の活性を阻害し得る。本発明のアプタマー製剤の有効成分であるアプタマーは、ＦＧＦ２に対して結合活性を有するアプタマーである。好ましい実施態様において、該アプタマーは、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。すなわち、該アプタマーは、ＦＧＦ２に対する阻害活性を有する。

[0014] 本発明に用いられるアプタマーは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に用いられる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。

[0015] ＦＧＦ２に対するアプタマーは特に制限されないが、例えば、国際公開第２０１５／１４７０１７号に記載されたアプタマー、具体的には、下式（１）：

$N^1GGAN^2ACUAGGGCN^3UUAAN^4GUN^5ACCAGUGUN^6$ （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、以下の（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；

（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；

のいずれかである、アプタマーである。

[0016] 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。

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。

[0017] 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、

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。

[0018] 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、ＵＵＣN^{61}又はＡＧＵＣN^{62}（式中、N^{61}及びN^{62}は上記と同義で

ある）である。

[0019] 好ましい実施態様において、本発明に用いられるアプタマーは、下式（２）又は（３）：

ＧＧＧＡＡＡＣＵＡＧＧＧＣＧＵＵＡＡＣＧＵＧＡＣＣＡＧＵＧＵＵＵＣＮ^{61} （２）

Ｎ^{1}ＧＧＡＵＡＣＵＡＧＧＧＣＡＵＵＡＡＵＧＵＵＡＣＣＡＧＵＧＵＡＧＵＣＮ^{62} （３）

（式中、Ｎ^{1}、Ｎ^{61}及びＮ^{62}は前記と同義である）

で表されるヌクレオチド配列、より好ましくは、式（３）で表されるヌクレオチド配列を含む。

[0020] 好ましい実施態様において、本発明に用いられるアプタマーは、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）。

配列番号１：

ＧＧＧＡＵＡＣＵＡＧＧＧＣＡＵＵＡＡＵＧＵＵＡＣＣＡＧＵＧＵＡＧＵＣＵＣＧＡ

配列番号２：

ＧＧＧＡＡＡＣＵＡＧＧＧＣＧＵＵＡＡＣＧＵＧＡＣＣＡＧＵＧＵＵＵＣＵＣＧＡ

配列番号３：

ＧＧＧＡＵＡＣＵＡＧＧＧＣＡＵＵＡＡＵＧＵＵＡＣＣＡＧＵＧＵＡＧＵＣＣＣ

配列番号４：

ＧＧＡＵＡＣＵＡＧＧＧＣＡＵＵＡＡＵＧＵＵＡＣＣＡＧＵＧＵＡＧＵＣＣ

配列番号５：

ＧＧＧＧＡＵＡＣＵＡＧＧＧＣＡＵＵＡＡＵＧＵＵＡＣＣＡＧＵＧＵＡＧＵＣＣＣＣ

配列番号６：

ＡＧＧＧＡＵＡＣＵＡＧＧＧＣＡＵＵＡＡＵＧＵＵＡＣＣＡＧＵＧＵＡＧＵＣＣＣ

配列番号７：

ＧＧＧＡＡＡＣＵＡＧＧＧＣＧＵＵＡＡＣＧＵＧＡＣＣＡＧＵＧＵＵＵＣＣＣ

配列番号８：

ＣＧＧＡＵＡＣＵＡＧＧＧＣＡＵＵＡＡＵＧＵＵＡＣＣＡＧＵＧＵＡＧＵＣＣＧ

配列番号９：

ＣＣＧＡＵＡＣＵＡＧＧＧＣＡＵＵＡＡＵＧＵＵＡＣＣＡＧＵＧＵＡＧＵＣＧＧ

配列番号１０：

ＧＧＧＡＵＡＣＵＡＧＧＧＣＧＵＵＡＡＣＧＵＵＡＣＣＡＧＵＧＵＡＧＵＣＣＣ

配列番号１１：

ＧＧＧＡＵＡＣＵＡＧＧＧＣＣＵＵＡＡＧＧＵＵＡＣＣＡＧＵＧＵＡＧＵＣＣＣ

配列番号１２：

ＧＧＧＡＵＡＣＵＡＧＧＧＣＡＵＵＵＡＵＧＵＵＡＣＣＡＧＵＧＵＡＧＵＣＣＣ

好ましい一実施態様において、本発明に用いられるアプタマーは、配列番号１、３、４、５、６、８、９、１０又は１２、より好ましくは、配列番号３、８、９、１０又は１２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、本発明に用いられるアプタマーは、配列番号２又は７で表わされるヌクレオチド配列（上記式（２）に包含される）

を含む。

さらに別の好ましい実施態様において、本発明に用いられるアプタマーは、配列番号１、３、４、５、６又は８で表わされるヌクレオチド配列（上記式（３）に包含される）を含む。

[0021] 一実施態様において、本発明に用いられるアプタマーは、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ＦＧＦ２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。

[0022] 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ＦＧＦ２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ＦＧＦ２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（即ち、Ａ、Ｇ、Ｃ又はＵ）で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（即ち、N^1、N^2、N^3、N^4、N^5、N^6、N^{61}又はN^{62}）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。例えば、配列番号３で表されるヌクレオチド配列を元の配列とすると、配列番号１は、配列番号３の３’末端のＣＣがＵＣＧＡに置換されたものであり、配列番号４は、配列番号３の両末端がそれぞれ１ヌクレオチドずつ欠失したものであり、配列番号５は、配列番号３の５’末端にＧ、３’末端にＣをそれぞれ付加したものであり、配列番号６は、配列番号３の５’末端にＡを付加したものであり、配列番号８は、配列番号３の５’末端のＧをＣに、３’末端のＣをＧに、それぞれ置換したものであり、配列番号９は、配列番号３の５’末端のＧＧをＣＣに、３’末端のＣＣをＧＧに、それぞれ置換したものであり、配列番号１０は、配列番号３の１４番目のＡがＧに、１９番目のＵがＣに、それぞれ置換したものであり、配列番号１２は、配列番号３の１７番目のＡがＵに置換したものである。

[0023] 本発明に用いられる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。

よって本発明に用いられる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。

[0024] 本発明に用いられるアプタマーはまた、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もよい。リンカーとしては、ヌクレオチド鎖（例、１～約２０ヌクレオチド）、非ヌクレオチド鎖（例、－（CH_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。

[0025] 本発明に用いられる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（本明細書において、「修飾ヌクレオチド」と記載する場合がある）であり得る。

[0026] 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。本発明に用いられるアプタマーはまた、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。

[0027] 本発明に用いられる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。特に本発明に用いられるアプタマーの製造方法として、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アプタマーは、後述の方法で製造することができる。

[0028] 本発明に用いられる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アプタマーは、後述の方法で製造することができる。

[0029] 本発明に用いられる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。

本発明に用いられる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。

[0030] 好ましい実施態様において、本発明に用いられる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。

[0031] 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。

本発明に用いられる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。

[0032] 本発明に用いられる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。

[0033] 本発明に用いられる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。

[0034] 本発明に用いられるアプタマーは、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、－NH_2）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ことができる。本発明に用いられるアプタマーは、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、例えば、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、本発明に用いられるアプタマーは、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。

[0035] 本発明に用いられるアプタマーはまた、ＦＧＦ２に対する結合性、多量体化の防止、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－ブロモ又は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、本発明に用いられる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CH_2（ホルムアセタール）又は３’－アミン（－ＮＨ－CH_2－CH_2－）で置換されていてもよい〔ここで各々のＲ又はＲ’は独立して、Ｈであるか、あるいは置換されているか、又は置換されていないアルキル（例、メチル、エチル）である〕。

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

改変はまた、キャッピングのような３’及び５’の改変を含んでもよい。

[0036] 改変はさらに、ポリエチレングリコール（PEG）、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。

[0037] 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１０００～１００００、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。ＰＥＧの末端付加は後述するアプタマーの多量体化の防止に有用である。

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、本発明に用いられる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Ｐ

ＥＧ（ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ　ＧＬ２－４００ＧＳ　日油製）、分子量４００００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。

[0038] この場合、本発明に用いられるアプタマーは、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を本発明に用いられるアプタマーに付加することがより好ましい。

[0039] ＰＥＧと本発明に用いられる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　Ｉｃａａ　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、本発明に用いられるアプタマーとＰＥＧとをリンカーを介して結合することができる。

[0040] 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に用いられる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。

[0041] 本発明に用いられるアプタマーのより好ましい実施態様として、配列番号３で表されるヌクレオチド配列を含むアプタマーＩＤ１：
ＧＬ２－４００ＴＳ－Ｃ６－Ｇ（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）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）ＧＵ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ；

配列番号８で表されるヌクレオチド配列を含むアプタマーＩＤ２：ＧＬ２－４００ＴＳ－Ｃ６－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）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）ＧＵ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）－ｉｄＴ；

配列番号９で表されるヌクレオチド配列を含むアプタマーＩＤ３：ＧＬ２－４００ＴＳ－Ｃ６－Ｃ（Ｍ）Ｃ（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）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）ＧＵ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）－ｉｄＴ；

配列番号１０で表されるヌクレオチド配列を含むアプタマーＩＤ４：ＧＬ２－４００ＴＳ－Ｃ６－Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）ＧＣ（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）ＧＵ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ；

配列番号１２で表されるヌクレオチド配列を含むアプタマーＩＤ５：ＧＬ２－４００ＴＳ－Ｃ６－Ｇ（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）Ｕ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）ＧＵ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ；及び

配列番号３で表されるヌクレオチド配列を含むアプタマーＩＤ６：
ｉｄＴ－Ｇ（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）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）ＧＵ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－Ｃ６－ＧＬ２－４００ＴＳ
（上記各式中、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、Ｍはメトキシ基を示す。）

これらのアプタマーは、いずれを用いたとしても本発明のアプタマー製剤の構成において安定に存在することができるため、本発明のアプタマー製剤の有効成分として適切である。

[0042] 本発明に用いられるアプタマーは、フリー体であってもよいし、医薬上許容されるその塩であってもよい。そのような塩としては、金属塩、アンモニウム塩、有機アミン付加塩、アミノ酸付加塩等が挙げられる。金属塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩等が挙げられる。アンモニウム塩としては、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム等の塩が挙げられる。有機アミン付加塩としては、トリスヒドロキシアミノメタン等の塩が挙げられる。アミノ酸付加塩としては、リジン、アルギニン、ヒスチジン、トリプトファン、オルニチン等の塩が挙げられる。

[0043] 本発明に用いられるＦＧＦ２に対するアプタマーの濃度は特に限定されず、本発明のアプタマー製剤が目的の効能効果を奏する限りどれだけ含まれていても良い。本明細書において「アプタマーの濃度」とは、アプタマー分子を構成する５’→３’リン酸結合で連結される核酸部分の重量の、製剤全体の体積に占める割合（ｍｇ／ｍＬ）を意味する。該アプタマーの濃度として、例えば、１～６０ｍｇ／ｍＬが挙げられる。

[0044] ＦＧＦ２に対するアプタマーの濃度が２０ｍｇ／ｍＬを超えると、通常の保存温度である４～５℃においても当該アプタマーの多量体が生じやすくな

る傾向にある。ＦＧＦ２に対するアプタマーは、単量体で存在する場合にＦＧＦ２に結合し、ＦＧＦ２の機能を阻害するとともにその薬効を発揮するが、多量体化しているとビアコアを用いたアッセイにおいてＦＧＦ２への結合は認められず、ＦＧＦ２の機能を阻害しないと考えられる（実施例４参照）。アプタマーの濃度が低い場合は分子間距離が遠く多量体化する傾向は低いが、アプタマー濃度が２０ｍｇ／ｍＬを超えると、通常の保存温度である４～５℃においても多量体化し、結果としてＦＧＦ２への結合活性が全体として低下する傾向にある（実施例５参照）。そのため、本発明のアプタマー製剤におけるＦＧＦ２アプタマー濃度の上限は、２０ｍｇ／ｍＬを超えない濃度であることが望ましい。また、本発明のアプタマー製剤のアプタマー濃度が低い場合、注射剤としての効果が得られない場合がある。そのため、本発明のアプタマー製剤におけるＦＧＦ２アプタマー濃度の下限は、注射剤としての効果が得られる濃度であれば特に限定されないものの、例えば１ｍｇ／ｍＬ以上の濃度であることが望ましい。

[0045] 本発明のアプタマー製剤の剤形は、水性液剤である限り特に限定されないが、好ましくは注射剤である。本発明のアプタマー製剤は水性液剤であるので、有効成分であるＦＧＦ２に対するアプタマーは、溶媒中に溶解して存在している。

[0046] 通常、アプタマーはその高次構造の維持に、強電解質である無機塩を必要とすることが良く知られている。現在上市されている唯一のアプタマー医薬品であるＭａｃｕｇｅｎ（登録商標）においても、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、等張化剤及びｐＨ調整剤が添加されている。この状態でＭａｃｕｇｅｎは２５±２℃の加速試験において６か月間、５±３℃の長期保存試験においても３６か月間にわたって安定に存在することが示されている。これらのことから、当業者であればアプタマーの高次構造を保ったまま安定に注射剤中で存在させるためには、無機塩（電解質）が必要であると考えるはずである。

[0047] しかしながら、後述する実施例で示すとおり、本発明における有効成分で

ある上記ＦＧＦ２に対するアプタマーは、溶媒としてＰＢＳや生理食塩水を使用すると、強電解質である無機塩の影響で安定性を失い、多量体を形成する傾向にあり、その結果として、ＦＧＦ２への結合活性を失うことが分かった。そこで、本発明者らは、溶媒として無機塩（電解質）を含まない水を用いたところ、予想外にもＦＧＦ２アプタマーの多量体化が抑制され、ＦＧＦ２アプタマーが単量体で存在する割合が増大することを見出した（実施例３参照）。

[0048] いかなる理論に拘束されることを望むものではないが、ＦＧＦ２アプタマーを水中に溶解した場合、実施例１に示されるとおりＦＧＦ２アプタマーのＴｍ値が測定できず、また、実施例２に示されるとおりＮＭＲにおけるプロトンシフトが観測できないことから、水中に溶解したＦＧＦ２アプタマーは、単量体で伸び切った状態で存在すると想定される。即ち、溶媒として無機塩を含まない水を用いることで、活性構築に必要と思われるアプタマーの高次構造が破壊され、変性して一本鎖状態で存在し、それにより失活（多量体化）を防ぐことができると考えられる。しかも、実施例４及び５に示されるとおり、電解質を含む溶液中に溶解して表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）アッセイを実施すると、ＦＧＦ２アプタマーはＦＧＦ２に対する結合活性を保持していたことから、水中に溶解したＦＧＦ２アプタマーを体内に投与すれば、体液中に存在する電解質の作用によりアプタマー活性に必要な高次構造が再構築され、活性を発揮できることが実証された。

[0049] このように、電解質を含まない溶媒中に溶解することで、あえてＦＧＦ２アプタマーの高次構造を崩壊させて伸び切った状態にすることにより、長期保存中も多量体化を防止し、投与後は生理的な塩濃度にさらされることで、高次構造が再構築されて薬効を発揮する製剤処方が、結果的にはＦＧＦ２アプタマーの活性を長期間維持できることが明らかとなった。本発明はこのような溶液中におけるアプタマーの存在様式を詳細に検証することによって完成したものであり、たとえ当業者であっても容易に想到し得ないものである。

[0050] 以上より、本発明のアプタマー製剤に用いられる溶媒としては、無機塩（電解質）を含まない水性溶媒が好ましく、特に好ましくは水である。

[0051] 本発明のアプタマー製剤は、上記したとおり無機塩（電解質）を含まない溶媒を用いるので浸透圧が低く、そのままでは注射剤として使用できない。そのため、本発明のアプタマー製剤は、血漿浸透圧に対する浸透圧比を１以上、好ましくは１～３に調整する目的で、非電解質である浸透圧調整剤（オスモライト）を含むことを特徴とする。

[0052] 本発明のアプタマー製剤に用いられる浸透圧調整剤としては、非電解質であれば特に限定されず、無機イオン類（カリウムイオン、塩化物イオンなど）を除き一般的に用いられる浸透圧調整剤であれば何を用いてもよい。このような浸透圧調整剤としては、多価アルコール（グリセロール、マンニトール、トレハロース、グルコース、スクロース、ソルビトール、イノシトールなど）、アミノ酸類（アラニン、グリシン、グルタミン酸、プロリン、ＧＡＢＡ、タウリン、エクトインなど）、メチルアンモニウム類（ＴＭＡＯ、コリン、アセチルコリン、グリシンベタイン、ＧＰＣ、ＤＭＳＰなど）、尿素類などが挙げられるが、好ましくは多価アルコールが用いられ、より好ましくはマンニトールが用いられる。

[0053] 浸透圧調整剤の量は特に限定されず、製剤中に含まれるＦＧＦ２アプタマーの量、使用する浸透圧調整剤の種類（分子量）、目的とする浸透圧に応じて、当業者であれば適宜変更することができる。例えば浸透圧調整剤としてマンニトールを使用し、生理食塩水に対する浸透圧比を約１とする場合、浸透圧調整剤の注射剤全体における配合割合は２～７．５％（ｗ／ｖ）となる。より具体的には、生理食塩水に対する浸透圧比を１とする場合、上記ＦＧＦ２アプタマーの濃度が２ｍｇ／ｍｌであれば、マンニトールの配合割合は４．９％となり、上記ＦＧＦ２アプタマーの濃度が２０ｍｇ／ｍｌであれば、マンニトールの配合割合は３．６％となる。

[0054] 本発明のアプタマー製剤は、有効成分であるＦＧＦ２に対するアプタマー又はその塩以外に、実質的に電解質を含有しないことが好ましい。ここで「

実質的に含有しない」とは、製剤中のＦＧＦ２アプタマーを長期間安定に保存し得る範囲で、少量の電解質を含有してもよいことを意味する。より好ましくは、本発明のアプタマー製剤は、有効成分であるＦＧＦ２に対するアプタマー又はその塩以外に電解質を含有しない。

[0055] 本発明のアプタマー製剤には、必要に応じて、医薬上許容される添加剤をさらに含有させることができる。そのような添加剤としては、例えば、安定化剤、保存剤、溶解補助剤、緩衝剤、ｐＨ調整剤、無痛化剤等が挙げられ、従来より注射剤用の添加剤として周知慣用の、非電解質である医薬添加物が好ましく用いられ得る。

[0056] 本発明のアプタマー製剤のｐＨは特に制限されないが、注射剤として使用される場合、中性付近のｐＨであることが望ましく、例えばｐＨ５～９、好ましくは６～８の範囲内で適宜選択することができる。有効成分であるＦＧＦ２に対するアプタマー又はその塩を水に溶解すると、溶液のｐＨは上記範囲内となるので、本発明のアプタマー製剤には、電解質であるｐＨ調整剤、緩衝剤を敢えて添加する必要はない。

[0057] 本発明のアプタマー製剤には、ＦＧＦ２アプタマーの活性や安定性に悪影響を及ぼさない限り、他の活性成分を配合してもよい。そのような活性成分としては、血管新生を伴う疾患等の治療薬としてのマクジェン（登録商標）、ルセンティス（登録商標）、アイリーア（登録商標）、アバスチン（登録商標）などのＶＧＥＦ阻害剤、ステロイドなどの抗炎症剤、骨疾患治療薬等としてのノルディトロピン（登録商標）、ジェノトロピン（登録商標）などのヒト成長ホルモン製剤、モルヒネなどの鎮痛・鎮静剤が含まれていても良い。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化合物が挙げられる。

[0058] 本発明のアプタマー製剤は、上記の構成をとることにより、４℃においても３か月以上安定である。ここで「安定である」とは、上述のとおり、ガラス瓶中に当該製剤を封入し４℃で保管した後の、製剤中に存在する単量体ア

プタマーの割合が７０％以上であることを意味する。好ましくは、本発明のアプタマー製剤は、４℃において３か月保存後の製剤中の単量体アプタマーの割合が８０％以上である。また、本発明のアプタマー製剤は、白色蛍光灯や近紫外蛍光灯に晒された状態でも安定である。

従って、本発明のアプタマー製剤は、そのままの水性液剤の形態で、好ましくは、充填済みシリンジ剤やカートリッジ剤等の注射剤の剤形で、５℃以下での冷蔵保存により長期間安定に保存することができ、取扱いが極めて容易である。

[0059] 本発明のアプタマー製剤は、例えば、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として好ましく用いることができる。

[0060] 本発明のアプタマー製剤は、非経口的に（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、点眼投与など）投与することができる。本発明のアプタマー製剤の投与量は、ＦＧＦ２アプタマーの種類・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（アプタマーのオリゴヌクレオチド部分）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。

実施例

[0061] 以下に、実施例を示してより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0062] 実施例１（溶媒中でのＦＧＦ２アプタマーの構造解析：Ｔｍ値の決定）

アプタマーＩＤ１で表されるアプタマーの構造を以下に示す。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。Ｃ６は－（CH_2）$_6$－リンカー、ＰＥＧ４０ＴＳ２は分子量４００００の２分岐ＴＳ型ポリエチレングリコール（ＳＵＮＢＲ

ＩＧＨＴ　ＧＬ２－４００ＴＳ　日油製）である。

アプタマーＩＤ１：

ＧＬ２－４００ＴＳ－Ｃ６－Ｇ（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）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）ＧＵ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－ｉｄＴ

[0063] アプタマーＩＤ１で表されるアプタマーを０．１ｍｇ／ｍＬとなるように水で、０．０６ｍｇ／ｍＬとなるようにＰＢＳ又は生理食塩水で溶解させた。得られた溶液を９５℃で５分間加熱したのち室温まで冷却し、石英ガラス製のキュベットに充填した。温度を２０℃から９０℃まで変化させながら分光光度計でＵＶ吸収を測定してＴｍ値を決定した。

その結果、ＰＢＳ中では６０．１℃、生理食塩水中では６９．６℃であった。一方水中では特定のＴｍ値は観測されなかった。このことからアプタマーＩＤ１で表されるアプタマーは通常注射剤の溶媒となり得るＰＢＳや生理食塩水では分子間相互作用により高次構造を形成することが想定された。またアプタマーＩＤ１で表されるアプタマーは電解質を含まない水中では分子間、分子内で塩基対を形成せず、高次構造を作らないことが想定された。

[0064] 実施例２（重水中でのＦＧＦ２アプタマーの構造解析：ＮＭＲスペクトルの測定）

２０ｍｇのアプタマーＩＤ１で表されるアプタマーをガラス製バイアルに充填し、約１ｍＬの重水に溶解させて測定サンプルとした。Ｂｒｕｋｅｒ　Ａｖａｎｃｅ　６００　ＭＨｚ　ＮＭＲ　ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｅｒを用いて測定した。その結果、８ｐｐｍよりも低磁場に観測されるべき塩基対形成に由来するイミノプロトンシグナルが観測されなかった。

このことからアプタマーＩＤ１で表されるアプタマーは電解質を含まない水中では分子間、分子内で塩基対を形成せず、高次構造を作らないことが想定された。

[0065] 実施例３（電解質を含む溶液中でのＦＧＦ２アプタマーの構造解析：ＳＥＣ－ＭＡＬＳ測定）

アプタマーＩＤ１で表されるアプタマーを２０ｍｇ／ｍＬとなるように生理食塩水で溶解し、３７℃で２週間インキュベートして人工的に高次構造を形成するＦＧＦ２アプタマー製剤を調製した。これと調製後ただちに冷凍保存して高次構造の形成を最小限にしたサンプルとを０．２ｍｇ／ｍＬとなるように生理食塩水でそれぞれ希釈して分析に供した。

サイズ排除クロマトグラフィーにより単量体と多量体を分離しそれぞれの分子量をＷｙａｔｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社のＭＡＬＳ（Ｍｕｌｔｉ　Ａｎｇｌｅ　Ｌｉｇｈｔ　Ｓｃａｔｔｅｒｉｎｇ）検出器にて測定した。サイズ排除クロマトグラフィーはＷａｔｅｒｓ社製ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣにてＢＥＨ２００　ＳＥＣカラムを用いて実施した。

その結果、単量体と思われるピークの分子量は約６４０００、多量体からなる高次構造と思われるピークの分子量は約１２２０００と測定された。この結果からアプタマーＩＤ１で表されるアプタマーが電解質を含む水中で形成する高次構造は二量体であることが分かった。

[0066] 実施例４（アプタマーの単量体含有率と結合活性との相関）

アプタマーＩＤ１で表されるアプタマーを２０ｍｇ／ｍＬ又は２ｍｇ／ｍＬとなるようにＰＢＳ、生理食塩水又は３．３％のマンニトール水溶液で溶解し、表１に示される保存条件下において様々な単量体含有率をしめすＦＧＦ２アプタマー製剤を調製した。ここで、調製した各ＦＧＦ２アプタマー製剤の単量体含有量はサイズ排除クロマトグラフィーにて決定した。その結果も表１に示す。

調製した各ＦＧＦ２アプタマー製剤のＦＧＦ２タンパク質への結合活性はＧＥ社製のＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００を用いて表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により測定した。センサーチップはアミノ基と反応するＣＭ４を用いた。ヒトＦＧＦ２は固定化溶液（１０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ６）に溶解し１０μｇ／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Ｅｔｈｙｌ－３－ｃａｒｂｏｄｉｉｍｉｄｅ　ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅとＮ－ｈｙｄｒｏｘｙｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅを用いた。反応後、ｅｔｈａｎｏｌａｍｉｎｅによるブロッキングを行った。ＦＧＦ２の固定化量は約１０００ＲＵとした。アナライト用のアプタマーは５μＭに調製した。ランニングバッファーには２９５ｍＭ塩化ナトリウム、５．４ｍＭ塩化カリウム、０．８ｍＭ塩化マグネシウム、１．８ｍＭ塩化カルシウム、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０，ｐＨ７．６）、再生用液として２Ｍ塩化ナトリウムを用いた。ＦＧＦ２はフローセルＦＣ２、又はＦＣ４に固定化し、ＦＣ１又はＦＣ３の結果を引くことで最終的なセンサーグラムとした。活性は電解質を含まない溶液にて用事調製した多量体含有量が極めて低いＦＧＦ２アプタマー製剤スタンダードに対する相対値として評価した。

各ＦＧＦ２アプタマー製剤の調製方法、単量体含有率及びＦＧＦ２タンパク質への結合活性の測定結果を表１に示す。この結果からＦＧＦ２アプタマー製剤の単量体の含有量とＦＧＦ２タンパク質への結合活性は相関していることが明らかとなった。

[0067]

[表1]

ＦＧＦ２アプタマー製剤の単量体含有率とＦＧＦ２タンパク質への結合活性

ＦＧＦ２アプタマー製剤	調製方法（保存条件）	単量体含有率（％）	結合活性（％）
２ｍｇ／ｍＬ　３．３％マンニトール製剤	用事調製	９８．７	９８．１
２０ｍｇ／ｍＬ　３．３％マンニトール製剤	用事調製	９１．３	９１．６
２０ｍｇ／ｍＬ　３．３％マンニトール製剤	２５℃　１週間	８０．５	７５．７
２０ｍｇ／ｍＬ　３．３％マンニトール製剤	２５℃　２週間	７１．５	６５．２
２０ｍｇ／ｍＬ　３．３％マンニトール製剤	２５℃　１カ月	６３．４	５７．２
２０ｍｇ／ｍＬ　３．３％マンニトール製剤	２５℃　３カ月	５０．２	５０．２
２ｍｇ／ｍＬ　生理食塩水	３７℃　２日	５６．９	５６．２
２ｍｇ／ｍＬ　ＰＢＳ	３７℃　２日	５７．２	６０．６
２０ｍｇ／ｍＬ　生理食塩水	３７℃　２日	１２．１	１８．３
２０ｍｇ／ｍＬ　ＰＢＳ	３７℃　２日	１１．３	１３．１

[0068] 実施例５（ＦＧＦ２アプタマー製剤の安定性試験）

アプタマーＩＤ１で表されるアプタマーを２０ｍｇ／ｍＬ又は２ｍｇ／ｍＬとなるように３．３％又は３．６％又は４．９％のマンニトール溶液に溶解して表２に示す様々な温度条件で３カ月間保存したのちサイズ排除クロマトグラフィー及びＳＰＲ法により単量体含有率と結合活性を測定した。結果を表２に示す。

この結果から電解質を含まないマンニトール水溶液により調製されたＦＧＦ２アプタマー製剤は安定であることが明らかとなった。

[0069]

[表2]

ＦＧＦ２アプタマー製剤の安定性試験結果

製剤濃度（ｍｇ／ｍＬ）	溶液	保存温度	単量体含有率（％）	結合活性（％）
２	３．３％マンニトール	－２０℃	９８．４	１０２．０
２	３．３％マンニトール	５℃	９９．１	１０２．７
２０	３．３％マンニトール	－２０℃	８９．２	９１．０
２０	３．３％マンニトール	５℃	８８．５	９０．８
２	４．９％マンニトール	－２０℃	９８．３	１０１．０
２	４．９％マンニトール	５℃	９８．０	１０３．１
２０	３．６％マンニトール	－２０℃	８８．８	８４．１
２０	３．６％マンニトール	５℃	８８．０	８１．８

[0070] 実施例６（他のＦＧＦ２アプタマー製剤における結果）

アプタマーＩＤ２～６で表されるアプタマーを、水（マンニトール水溶液）、生理食塩水又はＰＢＳで適切な濃度に溶解してＦＧＦ２アプタマー製剤を調製する。得られる各ＦＧＦ２アプタマー製剤を様々な温度条件や保存温度で数か月間保存したのち、サイズ排除クロマトグラフィー及びＳＰＲ法により単量体含有率と結合活性を測定する。

アプタマーＩＤ２：

ＧＬ２－４００ＴＳ－Ｃ６－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）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）ＧＵ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）－ｉｄＴ；

アプタマーＩＤ３：

ＧＬ２－４００ＴＳ－Ｃ６－Ｃ（Ｍ）Ｃ（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）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）ＧＵ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）－ｉｄＴ；

アプタマーＩＤ４：

ＧＬ２－４００ＴＳ－Ｃ６－Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ａ

（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）ＧＣ（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）ＧＵ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）ｉｄＴ－；

アプタマーＩＤ５：

ＧＬ２－４００ＴＳ－Ｃ６－Ｇ（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）Ｕ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）ＧＵ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）ｉｄＴ－；及び

アプタマーＩＤ６：

ｉｄＴ－Ｇ（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）Ｕ（Ｆ）Ｕ（Ｍ）Ａ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ａ（Ｍ）ＧＵ（Ｆ）ＧＵ（Ｆ）Ａ（Ｍ）Ｇ（Ｍ）Ｕ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）Ｃ（Ｍ）－Ｃ６－ＧＬ２－４００ＴＳ

これらの結果から、その他のＦＧＦ２アプタマーにおいても電解質を含まないマンニトール水溶液により調製されたＦＧＦ２アプタマー製剤は安定であることが明らかとなる。

[0071] 比較例１（ＦＧＦ２アプタマー製剤の安定性試験）

アプタマーＩＤ１で表されるアプタマーを生理食塩水又はＰＢＳ　で２０ｍｇ／ｍＬとなるように溶解してＦＧＦ２アプタマー製剤を調製した。得られた各ＦＧＦ２アプタマー製剤を表３に示す様々な温度条件で３カ月間保存したのちサイズ排除クロマトグラフィーにより単量体含有率を測定した。結果を表３に示す。この結果から電解質を含む生理食塩水やＰＢＳにより調製されたＦＧＦ２アプタマー製剤は不安定であることが明らかとなった。

[0072]

[表3]

電解質を含む溶液で調製したＦＧＦ２アプタマー製剤の安定性試験結果

製剤濃度（ｍｇ／ｍＬ）	溶液	保存温度	単量体含有率（％）
２０	生理食塩水	－２０℃	６５．４
２０	生理食塩水	５℃	４４．５
２０	ＰＢＳ	－２０℃	６８．２
２０	ＰＢＳ	５℃	３６．８

産業上の利用可能性

[0073] 本発明のアプタマー製剤は、ＦＧＦ２に対するアプタマー又はその塩を、注射剤等の水性液剤の形態で、冷蔵保存によっても長期間安定に保存することができるので、ＦＧＦ２を阻害することで薬効を発揮し得る疾患（例、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）に対する治療又は予防剤として、取扱いに優れた製剤を提供できる点で極めて有用である。

本出願は、日本で出願された特願２０１８－１２４３９０（出願日：平成３０年６月２９日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

請求の範囲

[請求項1] ＦＧＦ２に結合するアプタマー又はその塩と、非電解質である浸透圧調整剤とを含有してなる、該アプタマー又はその塩が長期間安定である水性液剤。

[請求項2] 前記アプタマー又はその塩以外に、実質的に電解質を含有しない、請求項１に記載の水性液剤。

[請求項3] 前記アプタマーが、下式（１）：

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

（ここで、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）

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、以下の（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；

（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；

のいずれかである、請求項１又は２に記載の水性液剤。

[請求項4] 前記アプタマーが、下式（３）：

N^{1}GGAUACUAGGGCAUUAAUGUUACCAGUGUAGUCN^{62}　（３）

（ここで、N^{1}及びN^{62}は、それぞれ独立して任意の０から数個の塩基を表す）

で表わされるヌクレオチド配列を含む、請求項１又は２に記載の水性液剤。

[請求項5]　前記アプタマーが、配列番号３、８、９、１０又は１２で表わされるいずれかのヌクレオチド配列を含む、請求項１又は２に記載の水性液剤。

[請求項6]　アプタマーの濃度が１～６０ｍｇ／ｍＬである、請求項１～５のいずれか一項に記載の水性液剤。

[請求項7]　浸透圧調整剤の配合割合が、水性液剤全体の２～７．５％（ｗ／ｖ）である、請求項１～６のいずれか一項に記載の水性液剤。

[請求項8]　浸透圧調整剤がマンニトールである、請求項１～７のいずれか一項に記載の水性液剤。

[請求項9]　アプタマー１ｍｇに対して、マンニトールを１～５０ｍｇの割合で含有する、請求項８に記載の水性液剤。

[請求項10]　５℃以下で保存される、請求項１～９のいずれか一項に記載の水性液剤。

[請求項11]　４℃で３か月保存後の単量体アプタマーの割合が８０％以上である、請求項１～１０のいずれか一項に記載の水性液剤。

[請求項12]　注射剤である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の水性液剤。

[請求項13]　血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛の予防又は治療用である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の水性液剤。

[請求項14]　請求項１～１２のいずれか一項に記載の水性液剤を対象に投与することを含む、血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛の予防又は治療方法。

[請求項15]　血管新生を伴う疾患、骨・軟骨疾患又は疼痛の予防又は治療におけ

る使用のための、請求項１～１２のいずれか一項に記載の水性液剤。