

明 細 書

発明の名称： A D A M T S 5 に対するアプタマー及びその使用

技術分野

[0001] 本発明は、ADAMTS5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] ADAMTS5 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5) はADAMTSファミリータンパク質の一つで、軟骨細胞や滑膜細胞で発現し、アグリカン分解酵素として機能し、軟骨病変における主要な原因タンパク質であることが知られている。よってADAMTS5阻害薬は、変形性膝関節症をはじめとする軟骨病変の治療剤として有用である可能性がある（非特許文献1～4）。

[0003] 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鋳型として用いる。この作業を10回程度繰り返すことにより、標的物質と特異的に結合するRNAアプタマーを取得すること

ができる場合がある。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開WO 91 / 1 9 8 1 3号パンフレット

特許文献2：国際公開WO 94 / 0 8 0 5 0号パンフレット

特許文献3：国際公開WO 95 / 0 7 3 6 4号パンフレット

非特許文献

[0005] 非特許文献1：J Biol Chem. 2002 Jun 21;277(25):22201-8

非特許文献2：Nature. 2005 Mar 31;434(7033):648-52

非特許文献3：Nat Clin Pract Rheumatol. 2008 Aug;4(8):420-7

非特許文献4：Osteoarthritis Cartilage. 2015 Aug;23(8):1254-66

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、ADAMTS5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

[0007] 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、ADAMTS5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。

[0008] 即ち、本発明は、以下のとおりである：

[1] A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5(ADAMTS5)に結合するアプタマーであって、以下の式(1)または式(2)

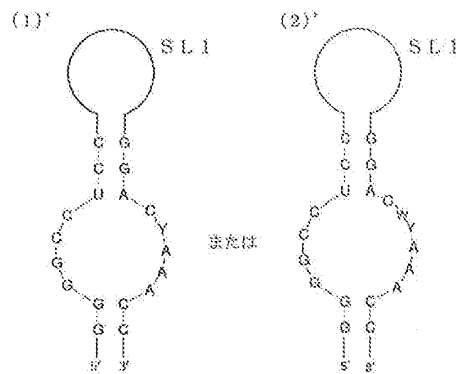
(1) G G G G C C U C C - N₁ - G G A C Y A A A C C

(2) G G G G C C U C C - N₁ - G G A C W Y A A A C C

(式中、N₁は、3～24個の長さの塩基であり、YはCまたはUを表し、WはAまたはUを表す)で表される配列(ただし、ウラシルはチミンであってもよい)を含む、アプタマー。

[2] 以下の式(1)'または式(2)'で表される潜在的二次構造を有する、[1]に記載のアプタマー：

[0009] [化1]



[0010] ここで、式(1)'および式(2)'における

[0011] [化2]



[0012] 部分は、バルジ構造を有していてもよいステムループ構造を示しかつ N_1 部分であり、YはCまたはUを表し、WはAまたはUを表す。

[3] ADAMTS5の活性を阻害する、[1]または[2]に記載のアプタマー。

[4] 塩基長が80以下である、[1]～[3]のいずれかに記載のアプタマー。

[5] WがUである、[1]～[4]のいずれかに記載のアプタマー。

[6] YがUである、[1]～[4]のいずれかに記載のアプタマー。

[7] N_1 が、式(3)



(式中、 N_2 は3～15個の任意の数のヌクレオチドであり、 X_1 および X_2 はA/U塩基の組み合わせまたはG/C塩基の組み合わせである)

で表される、[1]～[6]のいずれかに記載のアプタマー。

[8] N_2 のヌクレオチド数が4である、[7]に記載のアプタマー。

[9] 以下の(a)、(b)または(c)のいずれかのヌクレオチド配列を含む

、〔１〕に記載のアプタマー：

(a) 配列番号１、３～６、１０～１４、１６～４５のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但しウラシルはチミンであってもよい）；

(b) 配列番号１、３～６、１０～１４、１６～４５のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但しウラシルはチミンであってもよい）において、１～数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入あるいは付加されたヌクレオチド；または

(c) 配列番号１、３～６、１０～１４、１６～４５のいずれかから選択されるヌクレオチド配列（但しウラシルはチミンであってもよい）と７０％以上の同一性を有するヌクレオチド配列。

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

〔１１〕アプタマーに含まれる各ピリミジンヌクレオチドのリボース２'位のヒドロキシル基が、同一または異なって、無置換であるか、水素原子、フッ素原子およびメトキシ基からなる群より選ばれる原子または基で置換されている、〔１〕～〔１０〕のいずれかに記載のアプタマー。

〔１２〕アプタマーに含まれる各プリンヌクレオチドのリボース２'位のヒドロキシル基が、同一または異なって、無置換であるか、水素原子、フッ素原子およびメトキシ基からなる群より選ばれる原子または基で置換されている、〔１〕～〔１１〕のいずれかに記載のアプタマー。

〔１３〕〔１〕～〔１２〕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。

〔１４〕〔１〕～〔１２〕のいずれかに記載のアプタマーあるいは〔１３〕に記載の複合体を含む医薬。

〔１５〕アグリカンが過剰に分解されることで生じる疾患の治療薬である、〔１４〕に記載の医薬。

〔１６〕アグリカンが過剰に分解されることで生じる疾患が、関節炎または変形性膝関節症である、〔１５〕に記載の医薬。

[17] [1] ~ [12] のいずれかに記載のアプタマーあるいは [13] に記載の複合体を用いることを特徴とする、ADAMTS5の検出方法。

[18] [1] ~ [12] のいずれかに記載のアプタマー、[13] に記載の複合体、または[14]に記載の医薬を対象に投与することを含む、アグリカンが過剰に分解されることで生じる疾患の治療方法。

[19] アグリカンが過剰に分解されることで生じる疾患の治療における使用のための、[1] ~ [12] のいずれかに記載のアプタマー、[13] に記載の複合体、または[14]に記載の医薬。

[20] アグリカンが過剰に分解されることで生じる疾患の治療用の医薬の製造における、[1] ~ [12] のいずれかに記載のアプタマー、または [13] に記載の複合体の使用。

発明の効果

[0013] 本発明のアプタマー又は複合体は、関節炎や、変形性膝関節症の治療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、ADAMTS5の精製及び濃縮、ADAMTS5の標識、並びにADAMTS5の検出及び定量に有用であり得る。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]MFOLDプログラムから予想される、配列番号1で表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの二次構造を示す図である。

[図2]配列番号1で表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーがADAMTS5に結合することを示すセンサーグラムである。

[図3]MFOLDプログラムから予想される、配列番号3ないし9で表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの二次構造を示す図である。

[図4]MFOLDプログラムから予想される、配列番号10ないし12で表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの二次構造を示す図である。

[図5-1]MFOLDプログラムから予想される、配列番号16ないし19で表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの二次構造を示す図である。

[図5-2]MFOLDプログラムから予想される、配列番号20、21および25で

表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの二次構造を示す図である。

[図6]MFOLDプログラムから予想される、配列番号27ないし29で表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの二次構造を示す図である。

[図7-1]MFOLDプログラムから予想される、配列番号30ないし35で表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの二次構造を示す図である。

[図7-2]MFOLDプログラムから予想される、配列番号36ないし41で表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの二次構造を示す図である。

[図7-3]MFOLDプログラムから予想される、配列番号42ないし45で表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの二次構造を示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明は、ADAMTS5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、ADAMTS5の活性（アグリカナーゼ活性など）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、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。

[0017] 本発明は、ADAMTS5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、ADAMTS5に結合することによって、ADAMTS5の活性を阻害し得る。

[0018] ADAMTS5とは、軟骨細胞や滑膜細胞などが発現するタンパク質であり、例えば、UniprotKBにおいてQ9UNA0で表されるアミノ酸配列を持つタンパク質である。本発明におけるADAMTS5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ADAMTS5の「変異体」とは、公知のADAMTS5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ADAMTS5のアミノ酸配列の一部のアミノ酸配列からなるものであって、本来ADAMTS5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ADAMTS5はこれらの変異体を含む。

ADAMTS5はプロドメインが切断され活性型として分泌されるが、その後自己消化することによりC末端側Cys-richドメイン途中で切断されtruncate型としても存在する。本発明のアプタマーは、いずれのADAMTS5にも結合し、いずれのADAMTS5の活性も阻害し得る。

[0019] 一実施態様において、本発明は、

ADAMTS5に結合し、以下の式（１）または式（２）

（１）GGGGCCUCC-N₁-GGACYAAACC

（２）GGGGCCUCC-N₁-GGACWYAAACC

（式中、N₁は3～24個の任意の数のヌクレオチドであり、YはCまたはUを表し、WはAまたはUを表す）

で表される配列（ただし、ウラシルはチミンであってもよい）を含む、アプタマー：

を提供する。

[0020] ADAMTS5に対する阻害活性とは、ADAMTS5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、ADAMTS5はアグリカンを分解する活性を有することが知られている。従って、ADAMTS5に対する阻害活性とは、ADAMTS5によるアグリカンの分解を阻害する活性のことであり得る。

よって、本発明のアプタマーがADAMTS5に結合し、ADAMTS5によるアグリカン分解活性を阻害した場合、アグリカンが過剰に分解されることで生じるとされている疾患の治療に効果があると考えられる。

[0021] 本発明のアプタマーは、任意の哺乳動物に由来するADAMTS5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。

[0022] 本発明のアプタマーは、ADAMTS5には結合するが、同様のアグリカン分解能を有するADAMTS4には結合しないという、ADAMTS5への特異性を有するアプタマーであり得る。

ADAMTS5はADAMTS4よりも1000倍程度のアグリカン分解活性を有するとの報告があり(J. Biol. Chem. 2007, 282:18294-18306)、またADAMTS5は関節炎の発症において重要であることも報告されている(非特許文献2)。本発明のアプタマーは、ADAMTS5によってアグリカンが過剰に分解されることで生じるとされている疾患の治療に有用である。

[0023] 上記式(1)および式(2)中、 N_1 は、任意の数のヌクレオチドを表す。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 のヌクレオチド数は、式(1)および式(2)で表わされるヌクレオチド配列を含むアプタマーがADAMTS5に結合する限り特に限定されないが、好ましくは3~24個、5~18個、6~15個、8~15個、11~15個、13~15個などであり得る。より好ましくは6~15個、8~15個、11~15個、13~15個であり、最も好ましくは13~15個である。

N_1 のヌクレオチド数が3未満であると後述するように N_1 部分でループ構造が形成できず、 N_1 のヌクレオチド数が24を超えると N_1 部分の配列や構造がアプタマー全体の機能に影響しADAMTS5への結合活性を失う場合がある。

[0024] 好ましい実施態様において、上記式(1)および式(2)中、 N_1 は、ADAMTS5に結合し、ステムループ構造を形成するために必要な塩基数とヌクレオチド配列を有する。 N_1 で示されるヌクレオチド配列で形成されるステムループ構造におけるステム部分は、バルジ構造を採っていてもよい。

ここで、上記式(1)および式(2)中、GGGGCCUCC部分のUC

Cと、GGACYAAACCまたはGGACWYAAACC部分におけるGGAとが塩基対を形成しステム構造を採る。本発明のアプタマーがADAMTS5に結合するには、後述するように、上記式(1)および式(2)における N_1 とそれに隣接するUCCおよびGGAでステムループ構造を採ることが重要である。

したがって、 N_1 で示されるヌクレオチド配列で形成されるステムループ構造は、得られるアプタマーがADAMTS5に結合する限りにおいて、ループ構造だけであってもよい。すなわちループ部分の最小塩基数は3であり、ステム部分の最小塩基数は0(式(1)および式(2)中、GGGGCCUCC部分のUCCと、GGACYAAACCまたはGGACWYAAACC部分におけるGGAとがステム構造を形成し、 N_1 はループ部分のみ形成する)である。

[0025] ループ部分の長さは本発明のアプタマーがADAMTS5に結合する限りにおいて特に限定されず、例えば3～15個、3～11個、4～11個などであってよいが、好ましくは3～11個であり、より好ましくは3～8個であり、さらに好ましくは3～5個であり、最も好ましくは3個または4個である。

またループ部分のヌクレオチド配列は、本発明のアプタマーがADAMTS5に結合する限りにおいて可変である。

[0026] あるいは本発明のアプタマーは、下記(a)、(b)または(c)

(a) 配列番号1、3、4～6、10～44のいずれかから選択されるヌクレオチド配列；

(b) 配列番号1、3、4～6、10～44のいずれかから選択されるヌクレオチド配列において、GGGGCCUCC- N_1 -GGACYAAACCまたはGGGGCCUCC- N_1 -GGACWYAAACC(式中、 N_1 は3～24個の任意の数のヌクレオチドであり、YはCまたはUを表し、WはAまたはUを表す)におけるGGGGCCUCCおよびGGACYAAACCもしくはGGACWYAAACCで表される配列を除く1個又は数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入または付加されたヌクレオチド配列；あるいは

(c) 配列番号 1、3、4～6、10～44 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列と 70% 以上（好ましくは、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、96% 以上、97% 以上、98% 以上、99% 以上）の同一性を有する（但し、GGGGCCUCC-N₁-GGACYAAACC または GGGGCCUCC-N₁-GGACWYAAACC（式中、N₁、Y および W は上記と同様である）における GGGGCCUCC および GGACYAAACC もしくは GGACWYAAACC で表される配列は同一である）ヌクレオチド配列；のいずれかで表わされるヌクレオチド配列を含む、ADAMTS5 に結合するアプタマーであり得る。

[0027] より好ましい実施態様において、N₁ は、式 (3)



（式中、N₂ は 3～15 個の任意の数のヌクレオチドであり、X₁ および X₂ は A/U 塩基の組み合わせまたは G/C 塩基の組み合わせである）で表される。

ここで、式 (3) における X₁ C A G C と G C U X₂ とでステム構造（バルジ構造を含む）を形成し、N₂ 部分がループ構造を形成する。

N₂ のヌクレオチド数は、通常 3～15 個であり、好ましくは 3～11 個であり、より好ましくは 3～8 個であり、さらに好ましくは 3～5 個であり、最も好ましくは 4 個である。

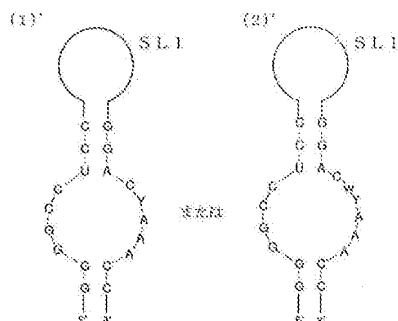
N₂ で示されるループ部分の配列は、式 (3) 全体としてステムループ構造を形成する限り特に限定されず、任意の塩基の組み合わせであってもよい。しかしながら好ましい態様において式 (3) における N₂ は、G C U C、U U C G、G U A A、A U U C のいずれかである。

また X₁ および X₂ は、A/U 塩基の組み合わせまたは G/C 塩基の組み合わせであるが、好ましくは X₁ が A で X₂ が U の組み合わせもしくは X₁ が G で X₂ が C の組み合わせである。より好ましくは、X₁ が A で X₂ が U の組み合わせである。

[0028] 上記 (1) または (2) で表される配列は、以下の式 (1)' または (2)

) ' :

[0029] [化3]



[0030] で表される潜在的二次構造を形成することができる。本発明のアプタマーは、上記（１）または（２）で表される配列部分において上記構造を採ること、種々の活性を有すると考えられる。なお式（１）' または（２）' の構造が、それぞれ上記式（１）または（２）に対応する。

また上記構造において、5'末端と3'末端それぞれに続く配列間の相互作用によって、好ましくはステム構造（バルジ構造を含む）が形成され得る。

本発明のアプタマーが種々の活性を有するためには、上記潜在的2次構造で示されるようなステムループ構造が維持されることが望ましい。ステム構造は相補的な塩基対によって形成されるが、塩基対の数は特に限定されない。またステム構造においては、全体としてステム構造を構成する限りにおいて、その一部において塩基対を形成しなくてもアプタマー活性は維持される。

[0031] 式(1)'または(2)'の上部にあるステムループ部分SL1は、式(1)および式(2)におけるN₁部分に相当する。

ここで、 N_1 が上記式(3)で表される配列をとることにより、式(1)'または(2)'で表されるステムループ構造がより安定に維持されると考えられる。即ち、式(3)におけるACAGCと、GCUUでステム構造(バルジ構造を含む)が式(1)'または(2)'におけるSL1部分のステム構造を形成し、式(3)における N_2 がSL1部分のループ構造を形成する

。

また式（１）および式（２）におけるGGGGCCUCC部分のUCCと、GGACYAAACCまたはGGACWYAAACC部分におけるGGAとが塩基対を形成しステム構造を形成し、さらにGGGGCCUCC部分における最初のGGとGGACYAAACCまたはGGACWYAAACC部分における最後のCCとがステム構造を形成し、残りの配列でインターナルループを形成する。

[0032] なお上記式（１）および式（２）における違いはWの有無のみである。そして式（１）' または（２）' から分かるように、塩基W周辺はインターナルループを構成している。そして実施例で十分に示されるようにWの有無が構造上および活性上の大きな違いにはならない。したがって式（１）および式（２）で表される配列を有する本発明のアプタマーは、全て同じ技術的思想に基づいて発明されたものである。

[0033] 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25ヌクレオチド以上（例、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ヌクレオチド以上、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25～約200ヌクレオチドであり得、好ましくは25～80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。

[0034] 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、ADAMTS5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、 $-OP(=O)(OH)-$ 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。

[0035] 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。

[0036] 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、 $-O-CH_2OH$ 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。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 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、ADAMTS5に対する結合性、ADAMTS5のアグリカン分解を阻害する活性、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。

[0042] 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。

- [0043] 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。
- [0044] 本発明のアプタマーはADAMTS5に結合するアプタマーであり、さらに好ましくはADAMTS5の活性を阻害することができるアプタマーである。本発明のアプタマーがADAMTS5に結合するか否かは、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、また本発明のアプタマーがADAMTS5の活性を阻害することができるか否かは、例えば実施例1等のアグリカンを利用した試験などによって評価することができる。
- [0045] 本発明のアプタマーは、ADAMTS5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' - S RNA、2' 位と4' 位とをメチレンを介して架橋したLNA (Locked Nucleic Ac

id)、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。

[0046] 本発明のアプタマーはまた、ADAMTS5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-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)NR₂(アミデート)、P(O)R、R(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〕。

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。

[0047] 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。

[0048] 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。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。

[0049] 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 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。

[0050] 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。

[0051] 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。

[0052] 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。

[0053] 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、SELEX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。ADAMTS5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と考えられる。

[0054] 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 10～30%程度のランダム配列をドープしたテンプレートを作製して、再度 S E L E Xを行うものである。

[0055] S E L E Xで得られるアプタマーは 80ヌクレオチド程度の長さがあり、これをそのまま医薬にすることは難しい。そこで、試行錯誤を繰り返し、容易に化学合成ができる長さ（例えば、化学合成ができるのは約 60ヌクレオチド以下であり、より好ましくは約 50ヌクレオチド程度以下、さらに好ましくは 45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。かかる背景に鑑み、通常の S E L E X法と比較して短い塩基長を有するアプタマーを得ることができる Tailored-S E L E X法 (Vater et al. Nucleic Acids Res. 31, 2003, e130; Jarosch et al. Nucleic Acids Res. 34, 2006, e86) や、Tailored-S E L E X法をさらに改良した Primer-less S E L E X法などを用いることもできる。

[0056] アプタマーは化学合成が可能であるので改変が容易である。アプタマーは MFOLD プログラムを用いて二次構造を予測したり、X線解析や NMR 解析によって立体構造を予測したりすることで、どのヌクレオチドを置換又は欠損することが可能か、また、どこに新たなヌクレオチドを挿入可能か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。

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 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。

[0060] 例えば、このようなアプタマーの製造方法は、下記：

[0061] [化4]



[0062] [上記において、(N) aはa個のNからなるヌクレオチド鎖を示し、(N) bは、b個のNからなるヌクレオチド鎖を示し、Nはそれぞれ、同一又は異なって、A、G、C、U及びT（好ましくは、A、G、C及びU）からなる群より選ばれるヌクレオチドである。a、bはそれぞれ、同一又は異なって、任意の数であり得るが、例えば1～約100、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。

[0063] 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、ピンクリスチン又はビンオレルビンなどのビ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。

[0064] 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、関節炎、変形性膝関節症といった軟骨疾患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。

[0065] 上記医薬の対象疾患としては、アグリカンが過剰に分解されることで生じるとされている疾患、例えば疼痛、慢性疼痛、神経因性疼痛、術後の疼痛、関節リウマチ、変形性関節症（例、変形性膝関節症等）、スポーツ外傷、関節炎（例、びらん性関節炎等）、強直性脊椎症、神経痛、神経障害、痛覚、神経損傷、虚血、神経変性、軟骨変性、脳卒中、失禁、炎症性疾患、過敏性腸症候群、歯周病、異常な血管新生、腫瘍の浸潤、および転移、角膜潰瘍、糖尿病の合併症といった、多くの疾患および病状などが挙げられる。

[0066] 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－グリコーラースターチ、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。

[0067] 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。

[0068] また、本発明の医薬は必要により、味のマスキング、腸溶性あるいは持続性などの目的のため、自体公知の方法でコーティングすることができる。コーティングに用いられるコーティング剤としては、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリオキシエチレングリコール、ツイーン 80、プルロニック F68、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシメチルセルロースアセテートサクシネート、オイドラギット（ローム社製、ドイツ、メタアクリル酸・アクリル酸共重合体）及び色素（例、ベンガラ、二酸化チタンなど）などが用いられる。当該医薬は、速放性製剤、徐放性製剤のいずれであってもよい。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。

[0069] 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。

[0070] 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Epicion（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Brij（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Brij（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Brij（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）、Epicion（エピクロン）、Brij（ブリジ）、Genapol（ゲナポル）及びSynperonic（シンペロニック）は商標である。

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、有効成分と混合し製剤化し使用する。

[0071] 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。

[0072] 本発明の医薬を軟骨疾患の予防及び治療用医薬として用いる場合、本発明の医薬は関節の炎症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。

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関節炎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。

[0073] 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。

[0074] 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、ADAMTS5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、ADAMTS5の分離精製用リガンドとしても使用され得る。

[0075] 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、ADAMTS5の精製、及びADAMTS5の検出、定量に有用であり得る。

[0076] 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。

[0077] 本発明はまた、ADAMTS5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ADAMTS5を他のADAMTS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ADAMTS5を吸着させ、吸着したADAMTS5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ADAMTS5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、ADAMTS5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。ADAMTS5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、NP40）、グリセリンを含むものであり得る。

本発明の精製及び濃縮方法はさらに、ADAMTS5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、EDTA）、Tris、酸、アルカリ、Transfer RNA、DNA、Tween（ツイーン）20などの表面活性剤、NaClなどの塩を含むものなどが挙げられる。本発明の精製及び濃縮方法はさらに、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。

[0078] 本発明のアプタマー又は複合体は、検出用プローブ、特にADAMTS5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。

[0079] 本発明はまた、ADAMTS5の検出及び定量方法を提供する。特に本発明はADAMTS5を他のADAMTS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）ADAMTS5を測定することを含み得る。ADAMTS5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（例、ウエスタンブロット法における二次抗体の代わりとしての使用）、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ADAMTS5量の測定、ADAMTS5が関連する疾患の診断に有用であり得る。

[0080] 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。

[0081] 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。

実施例

[0082] 実施例 1 : ADAMTS5に特異的に結合するRNAアプタマーの作製（1）

ADAMTS5に特異的に結合するRNAアプタマーはSELEX法を用いて作製した。SELEXはEllingtonらの方法（Ellington and Szostak, Nature 346, 818-822, 1990）及びTuerkらの方法（Tuerk and Gold, Science 249, 505-510, 1990）を参考にして行った。標的物質としてNHS-activated Sepharose 4

Fast Flow (GEヘルスケア社製)の担体に固相化したADAMTS5 (R & D systems社製)を用いた。担体へのADAMTS5の固相化方法はGEヘルスケア社の仕様書に沿って行った。固相化量は、固相化前のADAMTS5溶液と固相化直後の上清をSDS-PAGEにより調べることで確認した。SDS-PAGEの結果、上清からはADAMTS5のバンドは検出されず、使用したADAMTS5のほぼ全てがカップリングされたことが確認された。約73.2 μmolのADAMTS5が約3 μLの樹脂に固相化されたことになる。

[0083] 最初のラウンドで用いたRNA（40N）は、化学合成によって得られたDNAをDuraScribe™ T7 Transcription Kit（Epicentre社製）を用いて転写して得た。この方法によって得られたRNAはピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位がフルオロ化されたものである。DNA鋳型としては、以下に示す40ヌクレオチドのランダム配列の両端にプライマー配列を持った長さ80ヌクレオチドのDNAを用いた。DNA鋳型とプライマーは化学合成によって作製した。

[illegible]

[0085] プライマーFwd: 5' -TAATACGACTCACTATAGGGTA
CGACCGTTCGTACGAT-3' (配列番号47)

プライマーRev: 5' -GTACGCTAGGCGTTAGTCTC-3'
(配列番号48)

[0086] DNA 鋳型（配列番号 46）中の N の連続は任意の組み合わせの 40 個のヌクレオチド（40N：それぞれの N は、A、C、G 又は T である）であり、得られるアプタマー独特の配列領域を生じる。プライマー Fwd は T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を含んでいる。最初のラウンドで用いた RNA プールのバリエーションは理論上 10^{13} であった。

[0087] ADAMTS5が固相化された担体にRNAプールを加え、30分室温で保持した後、ADAMTS5に結合しないRNAを取り除くために、溶液Aで樹脂を洗浄した。

。ここで溶液Aは145 mM 塩化ナトリウム、5.4 mM 塩化カリウム、1.8 mM 塩化カルシウム、0.8 mM 塩化マグネシウム、20 mM トリス (pH 7.6)、0.05% Tween 20の混合溶液である。A DAMTS5に結合したRNAは、溶出液として溶液Bを加えて95℃で3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、20 mM トリス (pH 7.6)の混合溶液である。回収されたRNAは逆転写PCRで増幅し、DuraScribe™ T7 Transcription Kit で転写して次のラウンドのプールとして用いた。以上を1ラウンドとし、同様の作業を複数回繰り返し行った。SELEX終了後、次世代シーケンサーを用いて塩基配列の解析を行った。次世代シーケンサーには、Ion PGM™システム (Thermo社製)を用い、解析はThermo社の仕様書に沿って行った。

[0088] SELEXを7ラウンド実施した後、次世代シーケンサーによって78889種類のクローン配列を特定し、10068種類の配列に収束していることを確認した。それらのクローンの一部の配列を配列番号1～2に示す。配列番号1で表される配列は6, 711配列存在した。配列番号2で表される配列は1, 305配列存在した。配列番号1の配列には共通配列1が含まれていた。配列番号1と2は配列中の一塩基のみが異なっており、配列番号2では共通配列中の4つの連続G塩基の一つが欠失していた。共通配列1は、10, 068種類の配列中、138種類存在した。これらの配列の二次構造をMFOLDプログラム (M. Zukker, Nucleic Acids Res. 31 (13), 3406-3415, 2003)を用いて予測したところ、共通配列の部分がよく似たループ構造となった。配列番号1で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの二次構造を図1に示した。

[0089] 以下にそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は5' から3' の方向で表すものとし、プリン塩基 (A及びG) は2' -OH体であり、ピリミジン塩基 (U及びC) は2' -フ

ルオロ修飾体である。また、配列中の N_1 は3～24個の任意の長さのヌクレオチドを示し、YはCもしくはUを示す。

[0090] 配列番号1：

GGGUACGACCGUCGUACGAUUGGGGCCUCCACAG
CUGCUCAGCUUGGACUAAACCAUAAGAGACUAA
CGCCUAGCGUAC

[0091] 配列番号2：

GGGUACGACCGUCGUACGAUUGGGGCCUCCACAGC
UGCUCAGCUUGGACUAAACCAUAAGAGACUAAAC
GCCUAGCGUAC

[0092] 共通配列1

GGGGCCUCC- N_1 -GGACYAAAC

[0093] 配列番号1と2で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーのADAMTS5

に対する結合活性を表面プラズモン共鳴法により評価した。測定にはGEヘルスケア社製のBiacore T100を用いた。センサーチップにはストレプトアビジンが固定化されているSAチップを用いた。これに、5'末端にビオチンが結合している16ヌクレオチドのPoly dTを800RU程度結合させた。リガンドとなる核酸は3'末端に16ヌクレオチドのPoly Aを付加し、TとAのアニールングによりSAチップに固定化した。流速10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で核酸を30秒間インジェクトし、約300RUの核酸を固定化した。アナライト用のADAMTS5は0.1 μM に調製し、流速30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で60秒間インジェクトした。ランニングバッファーには溶液Cを用いた。ここで溶液Cは300mM 塩化ナトリウム、5.4mM 塩化カリウム、1.8mM 塩化カルシウム、0.8mM 塩化マグネシウム、20mM トリス (pH7.6)、0.05% Tween 20の混合溶液である。

[0094] 測定の結果、配列番号1で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーはADAMTS5に結合することがわかった(表1)。ネガティブコントロールとし

て用いた40ヌクレオチドのランダム配列を含む1ラウンド目に使用した核酸プール(40N)はADAMTS5との結合が認められなかった。配列番号2で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーはADAMTS5との結合は認められず、40Nと同程度であった。配列番号2は、共通配列中の連続した4つのG塩基が1塩基欠失した配列を持ち、結合活性測定の結果から、共通配列中の連続した4つのG塩基がアプタマーの活性に重要であることが示された。配列番号1で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーがADAMTS5に結合する様子を示すセンサーグラムを図2に示す。なお、表1中、“++”は、アプタマーのSAチップへの固定化量(RU値)に対するADAMTS5結合量(RU値)の割合が40%以上のもの、“+”は10%以上40%未満のもの、“-”は10%未満のものを表す。

[0095] [表1]

ADAMTS5に対する結合活性		
配列番号	長さ	Biacoreでの結合活性
1	80	++
2	79	-

[0096] 配列番号1で表されるヌクレオチド配列を有するアプタマーがADAMTS5の酵素活性を阻害するかどうかを、下記の方法により評価した。ADAMTS5の基質としてアグリカンのG1-IGD-G2ドメイン(R&D systems社製)を選択した。ADAMTS5はG1-IGD-G2ドメイン中の392番目のグルタミン酸と393番目のアラニンの間を特異的に切断し、二つの断片を生じる。これらの断片は未切断のG1-IGD-G2よりも電気泳動における移動度が速いため、SDS-PAGE電気泳動を実施し、G1-IGD-G2のバンド強度を定量することによりADAMTS5の酵素活性を測定することができる。アッセイは、反応液量を10 μ Lとし、溶液Aの緩衝液中で実施した。まず、溶液Aで希釈した核酸とADAMTS5の混合液を10 μ L調製し、25 $^{\circ}$ Cで15分間保温した。溶液Aで希釈した基質液5 μ Lに、核酸とADAMTS5の混合液5 μ Lを加えて、酵素反応を開始させた。反応溶液中の最終ADAMTS5濃度は5nM、最終基質濃度は50 μ g/mLである。反応溶液を37 $^{\circ}$ Cで2時

間保温した後、 $2\ \mu\text{L}$ の溶液Dを添加し、 95°C で2分間加熱し、ADAMTS5の酵素反応を停止した。ここで溶液Dは $0.25\ \text{M}$ トリス ($\text{pH } 6.8$)、 10% SDS、 50% グリセロール、 0.25% ブロモフェノールブルー、 20% 2-メルカプトエタノールである。加熱処理した反応溶液を 7.5% SDS-PAGEにより電気泳動し、SYPRO Orange (シグマアルドリッチ社製)により染色した。染色はシグマアルドリッチ社の仕様書に沿って行い、GEヘルスケア社製のSTORM840を用いて検出した。検量線として、未切断の基質 $1000\ \text{ng}$ 、 $400\ \text{ng}$ 、 $160\ \text{ng}$ 、 $64\ \text{ng}$ 、 $25.6\ \text{ng}$ 、 $10.24\ \text{ng}$ 、 $4.1\ \text{ng}$ を電気泳動し、同様に染色と検出を行った。各反応溶液における未切断の基質量をバンド強度と検量線から定量した。この反応条件でのADAMTS5の基質切断効率は $80\sim 100\%$ であった。被験物質の阻害率は次式を用いて算出した。

$$[0097] \text{ 阻害率 } (\%) = (S_{\text{apt}} - S_{\text{E}}) / (S_0 - S_{\text{E}}) \times 100$$

[0098] ここで、 S_{apt} は被験物質添加時の未切断基質量であり、 S_{E} はADAMTS5添加時の残存未切断基質量、 S_0 はADAMTS5非添加条件での未切断基質量である。

[0099] 酵素活性を 50% 阻害するのに要する阻害剤の濃度 (IC_{50}) を求めた。その結果を表2に示す。なお、 IC_{50} は4回測定の平均値を示す。

[0100] [表2]

ADAMTS5に対する阻害活性 (IC_{50})

配列番号	IC_{50} [nM]
1	16.8 ± 2.8

[0101] ネガティブコントロールである $40\ \text{N}$ は、最終核酸濃度 $30\ \text{nM}$ 条件下において阻害活性を示さなかった (阻害率 $5.6 \pm 4.7\%$)。また、ポジティブコントロールであるADAMTS5低分子阻害剤 ($\text{CAS } 929634-33-3$) (Merck社製) の IC_{50} 値は $90.5\ \mu\text{M}$ であった。

以上の結果より、配列番号1で示されるヌクレオチド配列を有するアプタ

マーはADAMTS5に対する優れた阻害効果を示すと言える。

[0102] 実施例 2 : アプタマーの短鎖化 1

配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの短鎖化を行った。短鎖化を行った配列を配列番号 3 ~ 9 に示す。配列番号 3 ~ 9 で表されるアプタマーの二次構造予測を図 3 に示す。図 3 中、共通配列を丸 (○) で囲った。また、共通配列の一部を欠失した配列については、その箇所を矢印 (黒三角形) で記した。

[0103] 以下に配列番号 3 ~ 9 で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げる個々の配列は、5' から 3' の方向に表すものとし、プリン塩基 (A 及び G) は 2' -OH 体であり、ピリミジン塩基 (U 及び C) は 2' -フルオロ修飾体である。

[0104] 配列番号 3 :

(配列番号 1 で表される配列を、共通配列を含む 44 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

GGAUUGGGGCCUCCACAGCUGCUCAGCUUGGACU
AAACCAAUCC

[0105] 配列番号 4 :

(配列番号 1 で表される配列を、共通配列を含む 44 ヌクレオチドの長さに短鎖化し、さらに 3 番目と 42 番目からなる AU 塩基対を CG 塩基対に置換した配列)

GGCUUGGGGCCUCCACAGCUGCUCAGCUUGGACU
AAACCAAGCC

[0106] 配列番号 5 :

(配列番号 4 で表される配列を、共通配列を含む 42 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

GGCUUGGGGCCUCCACAGCGCUCGCUUGGACUAA
ACCAAGCC

[0107] 配列番号 6 :

(配列番号4で表される配列を、共通配列を含む43ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

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

[0108] 配列番号7:

(配列番号4で表される配列の共通配列中の連続した3つのA塩基の一つを欠失した43ヌクレオチドからなる配列)

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

[0109] 配列番号8:

(配列番号4で表される配列の共通配列中のCG塩基対(13番目と31番目の塩基)を欠失した42ヌクレオチドからなる配列)

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

[0110] 配列番号9:

(配列番号3、5、6で表される配列を組み合わせた、共通配列を含む41ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

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

[0111] これらのアプタマーがADAMTS5の酵素活性を阻害するか、実施例1と同様の方法で検討した。ただし、核酸の最終濃度を30 nMに固定して評価した。その結果を表3に示す。

[0112]

[表3]

ADAMTS5に対する阻害活性

配列番号	長さ	阻害活性%
3	44	36.4
4	44	23
5	42	27
6	43	33.7
7	43	~2.3
8	42	~8.6
9	41	5.9

[0113] 配列番号3と4で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの結果より、3番目と42番目からなるAU塩基対はCG塩基対でも機能することが判った。また、配列番号5、6、9で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの結果から、共通配列中のN₁（ステムループ構造を示す）のステム領域は9塩基に、ループ領域は3塩基にそれぞれ短鎖化しても活性に影響はないが、これらを組み合わせると活性に顕著に影響することが判明した。以上の結果より、共通配列中のN₁は、少なくとも13塩基まで短くすることが可能であることが示された。

[0114] 実施例3：アプタマーの改変1

配列番号3で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマー（ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位はフルオロ化されている）のヌクレアーゼ耐性を高めるために、2'-O-メチル基を導入した改変体を作製した。また、改変を施した配列を配列番号3（1）～3（16）に示す。

[0115] 以下に配列番号3（1）～3（16）で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーそれぞれのヌクレオチド配列を修飾と共に示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表すものとし、大文字はRNAを示す。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O-メチル基を示す。

[0116] 配列番号3（1）：

(配列番号3で示される配列の共通配列以外の配列のうち六か所に2'-O-メチル修飾を導入した配列)

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

[0117] 配列番号3 (2) :

(配列番号3で示される配列の共通配列を含む配列のうち六か所に2'-O-メチル修飾を導入した配列)

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

[0118] 配列番号3 (3) :

(配列番号3で示される配列の共通配列以外の配列のうち六か所に2'-O-メチル修飾を導入した配列)

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

[0119] 配列番号3 (4) :

(配列番号3で表される配列の共通配列のうち一か所に2'-O-メチル修飾を導入した配列)

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

[0120] 配列番号3 (5) :

(配列番号 3 (1) ~ 3 (4) で表される配列の 2' - O - メチル修飾を全て組み合わせて導入した配列)

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

[0121] 配列番号 3 (6) :

(配列番号 3 (5) で表される配列の共通配列の二か所に 2' - O - メチル修飾を施した配列)

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

[0122] 配列番号 3 (7) : (配列番号 3 (5) で表される配列の共通配列以外の配列の一か所に 2' - O - メチル修飾を施した配列)

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

[0123] 配列番号 3 (8) :

(配列番号 3 (5) で表される配列の共通配列以外の配列の六か所に 2' - O - メチル修飾を施した配列)

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

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

[0124] 配列番号 3 (9) :

(配列番号 3 (8) で表される配列の共通配列に一か所、2' -O-メチル修飾を施した配列)

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

[0125] 配列番号 3 (10) :

(配列番号 3 (8) で表される配列の共通配列に一か所、2' -O-メチル修飾を施した配列)

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

[0126] 配列番号 3 (11) :

(配列番号 3 (8) で表される配列の共通配列以外の配列に一か所、2' -O-メチル修飾を施した配列)

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

[0127] 配列番号 3 (12) :

(配列番号 3 (8) で表される配列の共通配列に一か所、2' -O-メチル

修飾を施した配列)

G (M) G (M) A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F)
C (F) U (F) C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) U
(M) G (M) C (M) U (M) C (M) A (M) G (M) C (M) U (M)
) U (F) G (M) GAC (F) U (F) AA (M) AC (M) C (M) A
(M) A (M) U (M) C (M) C (M)

[0128] 配列番号 3 (13) :

(配列番号 3 (8) で表される配列の共通配列に一か所、2' -O-メチル
修飾を施した配列) G (M) G (M) A (M) U (M) U (M) G (M) G
(M) GGC (F) C (F) U (F) C (F) C (F) AC (F) A (M)
G (M) C (M) U (M) G (M) C (M) U (M) C (M) A (M) G (M)
C (M) U (M) U (F) GG (M) AC (F) U (F) AA (M) A
C (M) C (M) A (M) A (M) U (M) C (M) C (M)

[0129] 配列番号 3 (14) :

(配列番号 3 (8) で表される配列の共通配列に一か所、2' -O-メチル
修飾を施した配列)

G (M) G (M) A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F)
C (F) U (F) C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) U
(M) G (M) C (M) U (M) C (M) A (M) G (M) C (M) U (M)
) U (F) GGA (M) C (F) U (F) AA (M) AC (M) C (M) A
(M) A (M) U (M) C (M) C (M)

[0130] 配列番号 3 (15) :

(配列番号 3 (8) で表される配列の共通配列に一か所、2' -O-メチル
修飾を施した配列)

G (M) G (M) A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F)
C (F) U (F) C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) U
(M) G (M) C (M) U (M) C (M) A (M) G (M) C (M) U (M)
) U (F) GGAC (F) U (F) A (M) A (M) AC (M) C (M) A

(M) A (M) U (M) C (M) C (M)

[0131] 配列番号 3 (16) :

(配列番号 3 (8) で表される配列の共通配列に一か所、2' - O - メチル修飾を施した配列)

G (M) G (M) A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F)
C (F) U (F) C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) U
(M) G (M) C (M) U (M) C (M) A (M) G (M) C (M) U (M)
) U (F) GGAC (F) U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A
(M) A (M) U (M) C (M) C (M)

[0132] 配列番号 3 (1) ~ 3 (16) の核酸は全て化学合成により作製した。これらの核酸がADAMTS5の酵素活性を阻害するか、実施例 1 と同様の方法で行った。核酸の最終濃度は 10 nM 及び 30 nM にて評価した。その結果を表 4 に示す。表中、“n. d.” は未測定を表す。

[0133] [表4]

ADAMTS5に対する阻害活性

配列番号	核酸濃度	
	30 nM	10 nM
3	58.4	33.9
3 (1)	49.8	n. d.
3 (2)	53.6	n. d.
3 (3)	48.6	n. d.
3 (4)	53.1	n. d.
3 (5)	75	41.7
3 (6)	82.6	46.9
3 (7)	59.6	23.9
3 (8)	n. d.	52.8
3 (9)	n. d.	25.8
3 (10)	n. d.	25.6
3 (11)	n. d.	43.1
3 (12)	n. d.	67.5
3 (13)	n. d.	37
3 (14)	n. d.	1.2
3 (15)	n. d.	27.6
3 (16)	n. d.	53.6

[0134] 各アプタマーは、阻害活性に強弱はあるものの、阻害活性を示すことが判った。配列番号3(1)～3(4)で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの阻害活性は、配列番号3と概ね同程度に保持されており、配列番号3(1)～3(4)の修飾を全て組み合わせた配列番号3(5)で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの阻害活性は、配列番号3で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーのそれよりも向上することが示された。また、配列番号3(5)に更に修飾を導入した配列番号3(6)と3(8)で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーでは、更に阻害活性が向上したが、配列番号3(7)で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーでは阻害活性が低下することが示された。配列番号3(8)に更に修飾を導入した配列番号3(11)、3(12)、3(16)で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーでは阻害活性が保持されたが、配列番号3(9)、3(10)、3(13)、3(14)、3(15)では阻害活性が低下することが示された。

[0135] 以上の結果より、配列番号3で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーは安定性を向上させるため、様々な個所（少なくとも28か所）のヌクレオチドに修飾を導入したものであっても機能することが判った。また、共通配列中の5'側2塩基（G、G）と3'側4塩基（A、A、C、C）は2'-O-メチルなどの修飾を導入したものであっても機能することが判った。ヌクレオチドの修飾としては、2'-O-メチル修飾以外にも、例えば2'-アミノ修飾などが挙げられる。

[0136] 実施例4：アプタマーの短鎖化2

配列番号3(16)で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーについて、さらなる短鎖化を行った。短鎖化と修飾を行った配列を配列番号10～12に示す。配列番号10～12で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーの二次構造予測を図4に示す。図4中、共通配列を丸（○）で囲った。

[0137] 以下に配列番号10～12で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマ

—それぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5' から3' の方向で表すものとし、大文字はRNAを示す。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O-メチル基を示す。

[0138] 配列番号 10 :

(配列番号 3 (12) と配列番号 3 (16) で表される配列の2' -O-メチル修飾を組み合わせ、共通配列を含む40ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) U (M) G (M) C
(M) U (M) C (M) A (M) G (M) C (M) U (M) U (F) G (M)
) GAC (F) U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M)
U (M)

[0139] 配列番号 11 :

(配列番号 10 で表される配列を、共通配列を含む38ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M) U
(M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (F) G (M) GAC (F) U
(F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0140] 配列番号 12 :

(配列番号 10 で表される配列を、共通配列を含む36ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F) C (F)
C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M) U (M) C
(M) G (M) C (M) U (M) U (F) G (M) GAC (F) U (F) A
A (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M)

[0141] 配列番号 10 ~ 12 の核酸は全て化学合成により作製した。これらの配列

で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーがADAMTS5の酵素活性を阻害するか、実施例1と同様の方法で検討した。核酸の最終濃度は10 nMにて評価した。その結果を表5に示す。配列番号10～12の短鎖化体はいずれも阻害活性が維持されていた。

[0142] [表5]

ADAMTS5に対する阻害活性

配列番号	長さ	阻害率% (10 nM アプタマー)
3 (12)	44	57.5
3 (16)	44	53.6
10	40	65
11	38	59.8
12	36	71.1

[0143] 以上の結果より、配列番号3で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーは、共通配列を含む36ヌクレオチドの長さでも機能することがわかった。

[0144] 実施例5：アプタマーの改変2

実施例4において作製した配列番号10、11で示されるヌクレオチド配列を有するアプタマーのヌクレアーゼ耐性を高めるために、末端修飾した改変体、2'-O-メチル基を導入した改変体、DNAを導入した改変体、その他にホスホロチオエートを導入した改変体を作製した。改変を施した配列を配列番号10(1)～10(8)(配列番号10系統)、11(1)～11(35)(配列番号11系統)に示す。また、配列を最適化するため、配列の一部を置換した改変体を作製した。配列置換を施した配列を、配列番号13～14に示す。また、ネガティブコントロールとして、共通配列の一部をランダムに置換したものを作製した。その配列を配列番号15に示す。

[0145] 以下に配列番号10(1)～10(8)、11(1)～11(35)、13～15で表されるそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表すものとし、大文字はRNAを示し、小文字はDNAを示す。ヌクレオチドにおける括弧

はリボースの2'位の修飾を示し、Fはフッ素原子、MはO-メチル基を示す。また、配列末端におけるidTはinverted-dTによる修飾を示し、PEGは40kDaの分岐型ポリエチレングリコールによる修飾を示す。配列中におけるsはヌクレオチド同士を連結するリン酸基がホスホロチオエート化されたことを示す。

[0146] 配列番号10(1) :

(配列番号10で表される配列の共通配列の一か所に2'-O-メチル修飾を導入した配列)

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

[0147] 配列番号10(2) :

(配列番号10で表される配列の共通配列の一か所に2'-O-メチル修飾を導入した配列)

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

[0148] 配列番号10(3) :

(配列番号10で表される配列の共通配列の一か所に2'-O-メチル修飾を導入した配列)

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

M) U (M)

[0149] 配列番号 10 (4) :

(配列番号 10 で表される配列の共通配列の一か所に 2' - O - メチル修飾を導入した配列)

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

[0150] 配列番号 10 (5) :

(配列番号 10 で表される配列の共通配列の一か所に 2' - O - メチル修飾を導入した配列)

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

[0151] 配列番号 10 (6) :

(配列番号 10 で表される配列の共通配列以外の配列の一か所に 2' - O - メチル修飾を導入した配列)

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

[0152] 配列番号 10 (7) :

(配列番号 10 で表される配列の共通配列の一か所に 2' - O - メチル修飾を導入した配列)

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

[0153] 配列番号 10 (8) :

(配列番号 10 で表される配列の共通配列の一か所に 2' - O - メチル修飾を導入した配列)

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

[0154] 配列番号 11 (1) :

(配列番号 11 で表される配列の共通配列以外の配列の一か所に 2' - O - メチル修飾を導入した配列)

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

[0155] 配列番号 11 (2) :

(配列番号 11 (1) で表される配列の共通配列に一か所、DNAを導入した配列)

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

[0156] 配列番号 11 (3) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の共通配列に一か所、DNAを導入した配列)

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

[0157] 配列番号 1 1 (4) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の共通配列に一か所、DNAを導入した配列)

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

[0158] 配列番号 1 1 (5) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の共通配列に一か所、DNAを導入した配列)

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

[0159] 配列番号 1 1 (6) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の共通配列に一か所、DNAを導入した配列)

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

[0160] 配列番号 1 1 (7) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の共通配列に一か所、DNAを導入した配列)

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

[0161] 配列番号 1 1 (8) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の共通配列に一か所、DNAを導入した配列)

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

[0162] 配列番号 1 1 (9) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の共通配列以外の配列に一か所、DNAを導入した配列)

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

[0163] 配列番号 1 1 (10) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の共通配列に一か所、DNAを導入した配列)

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

[0164] 配列番号 1 1 (11) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の共通配列に一か所、DNAを導入した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M) U
(M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) G a C (F) U
(F) A A (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0165] 配列番号 1 1 (1 2) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の共通配列に一か所、DNAを導入した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M) U
(M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) G A c U (F)
A A (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0166] 配列番号 1 1 (1 3) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の共通配列に一か所、DNAを導入した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M) U
(M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) G AC (F) t
A A (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0167] 配列番号 1 1 (1 4) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の共通配列に一か所、DNAを導入した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M) U
(M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) G AC (F) U
(F) a A (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0168] 配列番号 1 1 (1 5) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の共通配列以外の配列に一か所、D N Aを導入した配列)

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

[0169] 配列番号 1 1 (1 6) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

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

[0170] 配列番号 1 1 (1 7) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

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

[0171] 配列番号 1 1 (1 8) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

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

[0172] 配列番号 1 1 (1 9) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) sC (F) U (F)
) C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M)
U (M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F)
U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0173] 配列番号 1 1 (2 0) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) sU (F)
) C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M)
U (M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F)
U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0174] 配列番号 1 1 (2 1) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
sC (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M)
U (M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F)
U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0175] 配列番号 1 1 (2 2) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
C (F) sC (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M)
U (M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F)
U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0176] 配列番号 1 1 (2 3) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

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

[0177] 配列番号 1 1 (2 4) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

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

[0178] 配列番号 1 1 (2 5) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

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

[0179] 配列番号 1 1 (2 6) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

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

[0180] 配列番号 1 1 (2 7) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M) U
(M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) G_sAC (F)
U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0181] 配列番号 1 1 (28) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M) U
(M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GA_sC (F)
U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0182] 配列番号 1 1 (29) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M) U
(M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F) s
U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0183] 配列番号 1 1 (30) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M) U
(M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F) U
(F) sAA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0184] 配列番号 1 1 (31) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の一か所にホスホロチオエート修飾を導入した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M) U
(M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F) U
(F) A s A (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0185] 配列番号 1 3 :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の両末端の各 2 ヌクレオチドを他の配列に置換した配列)

G (M) C (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) C (M) U
(M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F) U
(F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) G (M) C (M)

[0186] 配列番号 1 4 :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列のループ領域 4 ヌクレオチドを他の配列に置換した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) U (M) U (M) C
(M) G (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F) U
(F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)

[0187] 配列番号 1 1 (3 2) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の 4 か所にホスホロチオエート修飾を導入し、3' 末端に i d T を付加した配列)

A (M) U (M) U (M) G (M) G (M) GGC (F) s C (F) s U (F)
s C (F) C (F) AC (F) s A (M) G (M) C (M) G (M) C
(M) U (M) C (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC
(F) U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) A (M) U (M)
— i d T

[0188] 配列番号 1 1 (3 3) :

(配列番号 1 1 (1) で表される配列の 5' 末端に 4 0 k D a ポリエチレングリコール、3' 末端に i d T を付加した配列)

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

[0189] 配列番号 1 1 (3 4) :

(配列番号 1 1 (1 9) で表される配列の 3' 末端に i d T を付加した配列)

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

[0190] 配列番号 1 1 (3 5) :

(配列番号 1 1 (1 9) で表される配列の 5' 末端に 4 0 k D a ポリエチレングリコール、3' 末端に i d T を付加した配列)

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

[0191] 配列番号 1 5 :

(配列番号 1 1 (3 4) で表される配列の共通配列をランダムに並び替えた配列)

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

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

[0192] 配列番号 10 (1) ~ 10 (8) 及び 11 (1) ~ 11 (35)、配列番号 13 ~ 15 で表される配列を有するアプタマーは全て化学合成により作製した。これらのアプタマーが ADAMTS5 の酵素活性を阻害するか、配列番号 10 (1) ~ 10 (8) 及び 11 (1) ~ 11 (33)、配列番号 13 及び 14 の配列で表される配列を有するアプタマーについては、実施例 1 と同様の方法（評価法 1）で検討した。核酸の最終濃度は 10 nM にて評価した。その結果を表 6 の評価法 1 に示す。

[0193] 一方、配列番号 11 (34) ~ 11 (35) 及び配列番号 15 の配列で表される配列を有するアプタマーについては、下記の方法（評価法 2）により評価した。ADAMTS5 による基質（アグリカン G1 – IGD – G2）の切断反応は、下記の点を除き、実施例 1 と同様に行った。相違点としては、ADAMTS5 及び基質の最終濃度は、それぞれ 0.2 nM と 400 nM (48 µg / mL) で実施した点、酵素反応時間を 30 分とした点である。反応後、ADAMTS5 低分子阻害剤を過剰量添加して反応を停止した。切断された基質の定量は 2 種類の抗アグリカン抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により実施した。抗アグリカン抗体には R & D systems 社製の MAB6489 とビオチン化した MAB1220 を用いた。MAB6489 は ADAMTS5 により切断されたアグリカンの切断面を特異的に認識する抗体であり、これを用いることにより切断された基質の量を定量することが可能になる。検出は、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化ストレプトアビジンを用いた標準的な ELISA 検出法により実施した。この反応条件での ADAMTS5 の基質切断効率は 7 % 前後であった。被験物質の阻害率は次式を用いて算出した。

[0194] 阻害率 (%) = $(P_E - P_{apt}) / (P_E - P_0) \times 100$

[0195] ここで、 P_E は ADAMTS5 添加時の切断基質量であり、 P_{apt} は被験物質添加時

の切断基質量、 P_0 はADAMTS5非添加条件での切断基質量である。

[0196] 配列番号 1 1 (3 4) ~ 1 1 (3 5) 及び配列番号 1 5 で表される配列を有するアプタマーの阻害活性測定の結果を表 6 の評価法 2 に示す。表中、“評価法 1”では、1 0 n M のアプタマー濃度条件下における阻害活性を示す。“評価法 2”では、2 n M のアプタマー濃度条件下における阻害活性を示す。“n. d.”は未測定を表す。

[0197]

[表6]

ADAMTS5に対する阻害活性

配列番号	阻害活性 (%)	
	評価法 1	評価法 2
10	65	n. d.
1 0 (1)	41.3	n. d.
1 0 (2)	12.6	n. d.
1 0 (3)	2	n. d.
1 0 (4)	3.6	n. d.
1 0 (5)	8.5	n. d.
1 0 (6)	61.8	n. d.
1 0 (7)	10.4	n. d.
1 0 (8)	12.8	n. d.
11	59.8	n. d.
1 1 (1)	62.8	n. d.
1 1 (2)	60.6	n. d.
1 1 (3)	19.5	n. d.
1 1 (4)	50.9	n. d.
1 1 (5)	34.2	n. d.
1 1 (6)	9.2	n. d.
1 1 (7)	23	n. d.
1 1 (8)	43.2	n. d.
1 1 (9)	60.8	n. d.
1 1 (10)	59.1	n. d.
1 1 (11)	32	n. d.
1 1 (12)	62.5	n. d.
1 1 (13)	20.3	n. d.
1 1 (14)	45.1	n. d.
1 1 (15)	50.4	n. d.
1 1 (16)	50.9	n. d.
1 1 (17)	70	n. d.
1 1 (18)	60.3	n. d.
1 1 (19)	81.1	n. d.
1 1 (20)	74.7	n. d.
1 1 (21)	80.3	n. d.
1 1 (22)	49.8	n. d.
1 1 (23)	47.9	n. d.
1 1 (24)	46.2	n. d.
1 1 (25)	76.4	n. d.
1 1 (26)	47.2	n. d.
1 1 (27)	48.2	n. d.
1 1 (28)	44.8	n. d.
1 1 (29)	56.5	n. d.
1 1 (30)	38.3	n. d.
1 1 (31)	56.3	n. d.
13	58.4	n. d.
14	60.5	n. d.
1 1 (32)	58.8	n. d.
1 1 (33)	55.5	n. d.
1 1 (34)	n. d.	84.1
1 1 (35)	n. d.	56
15	n. d.	16.5

- [0198] 2'-O-メチル化修飾を導入した改変体のうち、配列番号10(1)、10(6)(配列番号10系統)と配列番号11(1)(配列番号11系統)で表される配列を有するアプタマーでは、強弱はあるものの阻害活性が保持された。一方、配列番号10(2)~10(5)及び10(7)、10(8)で表される配列を有するアプタマーについては顕著に阻害活性が低下した。以上の結果より、共通配列の5'末端から5番目のC並びに3'末端から10番目のGは2'-O-メチル化修飾を導入したものであっても機能することが判った。また、共通配列中のインターナルループの大部分において、2'-O-メチル化修飾によりアプタマーの阻害活性が顕著に低下したことから、この領域がアプタマーの活性に重要である可能性が示唆された。
- [0199] また、DNAを導入した改変体(配列番号11系統)のうち、配列番号11(2)、11(4)、11(8)、11(9)、11(10)、11(12)、11(14)、11(15)で表される配列を有するアプタマーについては、活性の強弱はあるものの、阻害活性が保持された。以上の結果より、共通配列の5'末端から3番目のG、5番目のC、9番目のC並びに3'末端から9番目のG、7番目のC、5番目のAはDNAであっても機能することが判った。ヌクレオチドの修飾としては、2'-O-メチル修飾、DNA以外にも、例えば2'-アミノ修飾などが挙げられる。また、リン酸基にホスホロチオエート修飾を導入した配列番号11(16)~11(32)のうち、配列番号11(30)で表される配列を有するアプタマーを除くすべての配列において、活性の強弱はあるものの阻害活性が維持された。中でも配列番号11(19)~11(21)、11(25)で表される配列を有するアプタマーは阻害活性が向上した。配列番号13で表される配列を有するアプタマーの結果より、末端の二つの塩基対、AU対とUA対はそれぞれGC対とCG対に置換しても阻害活性に影響しないことが判った。また、配列番号14で表される配列を有するアプタマーの結果より、18番目から21番目の塩基で構成されるループ配列をGCU CからUUC Gに置換しても、阻害活性に影響しないことが判った。

[0200] 配列番号 11 (33) ~ (35) で表される配列を有するアプタマーの結果より、5' 末端に PEG、3' 末端に idT を付加しても阻害活性に影響しないことが判った。末端修飾としては、PEG、idT 以外にもペプチド、アミノ酸、糖、グリコサミノグリカン、あるいはビオチンなどが挙げられる。以上のことから、式 (1) または式 (1)' を含む本発明のアプタマーは様々な修飾が可能であることがわかった。

[0201] 実施例 6 : ADAMTS5 に特異的に結合する RNA アプタマーの作製 (2)

ランダム配列とプライマー配列が実施例 1 で用いたものとは異なる鋳型を用いて、実施例 1 と同様の SELEX を行った。SELEX の標的物質として NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (GEヘルスケア社製) の担体に固相化した ADAMTS5 (R&D systems 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。鋳型 DNA には配列番号 3 の配列を基に変異が導入されている。

[0202] DNA 鋳型 : 5' - TGCTCGATCTGGACT (G) (G) (A) (T) (T) (G) (G) (T) (T) (A) (G) (T) (C) (C) (A) (A) (G) (C) (T) (G) (A) (G) (C) (A) (G) (C) (T) (G) (T) (G) (G) (A) (G) (G) (C) (C) (C) (C) (A) (A) (T) (C) (C) AGTTACGCATGTCC C-3' (配列番号 49)

プライマー Fwd : 5' - TAATACGACTCACTATAGGGAC ATGCGTA ACT-3' (配列番号 50)

プライマー Rev : 5' - TGCTCGATCTGGACT-3' (配列番号 51)

[0203] DNA 鋳型 (配列番号 49) 中の括弧は変異導入を表しており、括弧内に示されたヌクレオチドが 76%、その他の 3 種類のヌクレオチドが各 8% ずつ含まれるようにデザインされている。プライマー Fwd は T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を含んでいる。最初のラウンドで用いた RN

A プールのバリエーションは理論上 10^{13} であった。

[0204] ADAMTS5が固相化された担体にRNAプールを加え、30分室温で保持した後、ADAMTS5に結合しないRNAを取り除くために、溶液Aで樹脂を洗浄した。ここで溶液Aは145 mM 塩化ナトリウム、5.4 mM 塩化カリウム、1.8 mM 塩化カルシウム、0.8 mM 塩化マグネシウム、20 mM トリス (pH 7.6)、0.05% Tween 20の混合溶液である。ADAMTS5に結合したRNAは、溶出液として溶液Bを加えて95℃で3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、20 mM トリス (pH 7.6) の混合溶液である。回収されたRNAは逆転写PCRで増幅し、DuraScribe™ T7 Transcription Kit で転写して次のラウンドのプールとして用いた。以上を1ラウンドとし、同様の作業を複数回繰り返し行った。SELEX終了後、PCR産物をpGEM-T Easyベクター (Promega社製) にクリーニングし、大腸菌株DH5α (Toyobo社製) をトランスフォーメーションした。シングルコロニーからプラスミドを抽出後、キャピラリーDNAシーケンサー (3130xl Genetic Analyzer、ABI社製) でクローンの塩基配列を調べた。また、次世代シーケンサーを用いて塩基配列の大規模解析も行った。次世代シーケンサーには、Ion PGM™システム (Thermo社製) を用い、解析はThermo社の仕様書に沿って行った。

[0205] SELEXを7ラウンド実施した後、キャピラリーDNAシーケンサーによって48クローンの配列を決定したところ、26クローンの配列において以下に示される共通配列1または2が含まれていた。これらのクローンの一部の配列を配列番号16～20に示す。

[0206] また、次世代シーケンサーによって47623種類のクローン配列を特定し、12728種類の配列に収束していることを確認した。それらのクローンの一部の配列を配列番号21～25に示す。配列番号21で表される配列は1, 045配列存在した。配列番号22で表される配列は595配列存在

した。配列番号23で表される配列は557配列存在した。配列番号24で表される配列は442配列存在した。配列番号25で表される配列は288配列存在した。これらの配列の二次構造をMFOLDプログラム(M. Zuker, Nucleic Acids Res. 31 (13), 3406-3415, 2003)を用いて予測したところ、共通配列の部分がよく似たループ構造となった。これらの配列の二次構造を図5-1、図5-2に示した。図5-1、図5-2中、共通配列を丸(○)で囲んだ。また、配列番号3と配列が異なる箇所を矢印(黒三角形)で示した。

[0207] 以下に配列番号16~25で表されるそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表すものとし、プリン塩基(A及びG)は2'-OH体であり、ピリミジン塩基(U及びC)は2'-フルオロ修飾体である。また、配列中のN₁は6~15個の任意のヌクレオチドを示し、WはAもしくはUを、YはCもしくはUを示す。

[0208] 配列番号16:

GGGACAUGCGUAACUUGAUAGGGGCCUCCGCAGC
UGAUCAGCUCGGACUCAAACCAUCAAGUCCAGAU
CGAGCA

[0209] 配列番号17:

GGGACAUGCGUAACUGUAUAGGGGCCUCCACAGC
UGAAAAGCUUGGACUCAAACCAUACAGUCCAGAU
CGAGCA

[0210] 配列番号18:

GGGACAUGCGUAACUGCAUCGGGGGCCUCCGCAGC
UGUUAAGCUCGGACUCAAACCAUGCAGUCCAGAU
CGAGCA

[0211] 配列番号19:

GGGACAUGCGUAACUUGAUAGGGGCCUCCACAGC

UGAUAAGCUUGGACUCAAAACCAUCAAGUCCAGAU
CGAGCA

[0212] 配列番号 20 :

GGGACAUGCGUAACUGUAUAGGGGCCUCCGCAGC
UAUUCAGCUCGGACAUAACCAUACAGUCCAGAU
CGAGCA

[0213] 配列番号 21 :

GGGACAUGCGUAACUAUAUAGGGGCCUCCACAGC
UGUAAAGCUUGGACUUAACCAUAUAGAGUCCAG
AUCGAGCA

[0214] 配列番号 22 :

GGGACAUGCGUAACUGCAUAGGGGCCUCCACAGC
UAUUCAGCUUGGACACAAACCAUGCAGUCCAGAU
CGAGCA

[0215] 配列番号 23 :

GGGACAUGCGUAACUGUAUAGGGGCCUCCACAGC
UGAAAAGCUUGGACUCAAAACCAUACAGUCCAGAU
CGAGCA

[0216] 配列番号 24 :

GGGACAUGCGUAACUUGAUAGGGGCCUCCACAGC
CGGUAGGCUUGGACUCAAAACCAUCAAGUCCAGAU
CGAGCA

[0217] 配列番号 25 :

GGGACAUGCGUAACUGCAUAGGGGCCUCCACAGC
UAUUCAGCUUGGACACAAACCAUGCAGUCCAGAU
CGAGCA

[0218] 共通配列 1 :

GGGGCCUCC-N₁-GGACYAAAC

共通配列 2 :

G G G G C C U C C - N₁ - G G A C W Y A A A C

[0219] 配列番号 16～25 で表される配列を有するアプタマーのADAMTS5に対する結合活性と酵素阻害活性を測定した。結合活性は表面プラズモン共鳴法により評価した。測定は実施例 1 で示した方法と同様の方法を用いて測定した。酵素阻害活性は実施例 1 で示した方法と同様の方法を用いて測定した。測定の結果を表 7 に示す。なお、表中、“++” 及び “+” は、ネガティブコントロールの核酸よりも有意にADAMTS5に結合するものを表す。ここでネガティブコントロールの核酸とは、S E L E X法の1ラウンド目に使用した核酸プールの事である。“++” は、アプタマーのS Aチップへの固定化量（R U 値）に対するADAMTS5結合量（R U 値）の割合が40%以上のもの、“+” は40%未満のものを表す。阻害活性の数値は、表中に示した各アプタマー濃度における酵素阻害活性を表す。“n. d.” は未測定を表す。

[0220] [表7]

ADAMTS5に対する結合活性と阻害活性					
配列番号	長さ	結合活性	阻害活性%		
			30 nM アプタマー	20 nM アプタマー	10 nM アプタマー
16	74	+	93.6	n. d.	46.3
17	74	+	88.2	n. d.	12.3
18	74	+	90.4	n. d.	2.9
19	74	+	93.5	n. d.	2.9
20	74	+	111.1	n. d.	15.5
21	76	++	n. d.	n. d.	56.9
22	74	++	n. d.	n. d.	14.8
23	74	++	n. d.	n. d.	14.5
24	74	++	n. d.	n. d.	20.2
25	74	++	n. d.	72.1	n. d.

[0221] 配列番号 16～25 で表される配列を有するアプタマーは、いずれもネガティブコントロールの核酸よりも有意にADAMTS5に結合するアプタマーであることが示された。また、活性に強弱はあるものの、いずれの核酸も阻害活性を示すことが判った。

[0222] また、配列番号 16～25 で表される配列を有するアプタマーの二次構造予測と結合活性、ならびに阻害活性の結果より、共通配列に隣接する末端のステム配列はバルジ構造を含んでも機能することが判った。バルジ構造とは、ステム構造内に塩基対を形成しない突出したヌクレオチド配列を持つ構造

を指す。配列番号 16～25 で表される配列を有するアプタマーのステム構造内にバルジ構造が含まれていた。

[0223] 実施例 7 : アプタマーの短鎖化 (3)

配列番号 21 と 25 で表される配列を有するアプタマーの短鎖化と塩基置換を行った。当該アプタマーの配列を配列番号 26～29 に示す。

[0224] 配列番号 27、28 及び 29 については、配列番号 11 (1) の修飾導入結果を基に、2' -O-メチル修飾を導入した上で短鎖化を実施した。配列番号 27～29 で表される配列を有するアプタマーの二次構造予測を図 6 に示す。図 6 中、共通配列を丸 (○) で囲った。以下に配列番号 26～29 で表されるそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5' から 3' の方向で表すものとし、大文字は RNA を示す。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 O-メチル基を示す。“i d T” は i n v e r t e d d T を示す。

[0225] 配列番号 26 :

(配列番号 21 で表される配列を、共通配列を含む 46 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

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

[0226] 配列番号 27 :

(配列番号 21 で表される配列に、配列番号 11 (1) の 2' 位の修飾を反映させる様に 2' -O-メチル修飾を導入し、共通配列を含む 40 ヌクレオチドの長さに短鎖化した配列)

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

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

[0227] 配列番号 28 :

(配列番号 27 で表される配列の両末端各 2 ヌクレオチドを他の配列に置換した配列)

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

[0228] 配列番号 29 :

(配列番号 25 で表される配列に、配列番号 11 (1) の 2' 位の修飾を反映させる様に 2' -O-メチル修飾を導入し、共通配列を含む 40 ヌクレオチドの長さに短鎖化して 3' 末端に i d T を付加した配列)

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

[0229] 配列番号 26 で表される配列を有するアプタマーは、T7 RNA ポリメラーゼによる転写により調製し、配列番号 27 ~ 29 で表される配列を有するアプタマーについては化学合成により調製した。これらのアプタマーが ADAMTS5 の酵素活性を阻害するかどうかを、実施例 1 と同様の方法を用いて評価した。測定の結果を表 8 に示す。なお、表中、“n. d.” は未測定を表す。

[0230] [表8]

ADAMTS5 に対する阻害活性

配列番号	調製方法	長さ	阻害活性%		IC ₅₀ (nM)
			30 nM アプタマー	10 nM アプタマー	
21	転写	73	78.8	n. d.	n. d.
26	転写	48	63.5	n. d.	n. d.
27	化学合成	38	n. d.	n. d.	5.9
28	化学合成	40	n. d.	n. d.	3.4
29	化学合成	40	n. d.	84	n. d.

[0231] 配列番号 26～29 で表される配列を有するアプタマーはいずれも阻害活性が維持された。以上の結果より、配列番号 21 と 25 で表されるアプタマーは、共通配列を含む 40 ヌクレオチドの長さで機能することが判った。配列番号 27 と 28 で表される配列を有するアプタマーの結果から、末端の二つの塩基対 U A 対と A U 対はそれぞれ C G 対と G C 対に置き換えても活性に影響しないことが判った。

[0232] 実施例 8 : アプタマーの改変 3

配列番号 28、29 で表される配列を有するアプタマーのヌクレアーゼ耐性を高めるために、末端修飾した改変体、2' -フルオロ基、2' -O-メチル基を導入した改変体を導入した改変体を作製した。改変を施した配列を配列番号 28 (1)～28 (18) (配列番号 28 系統)、29 (1)～29 (3) (配列番号 29 系統) に示す。

[0233] 以下に配列番号 28 (1)～28 (18)、29 (1)～29 (3) で表されるそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5' から 3' の方向で表すものとし、大文字は RNA を示す。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 O-メチル基を示す。また、配列末端における i d T は i n v e r t e d - d T による修飾を示し、P E G は 40 k D a の分岐型ポリエチレングリコールによる修飾を示す。

[0234] 配列番号 28 (1) :

(配列番号 28 で表される配列の共通配列以外の三か所に 2' -O-メチル修飾を導入した配列)

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

[0235] 配列番号 28 (2) :

(配列番号 28 で表される配列の共通配列以外の一か所に 2' - O - メチル修飾を導入した配列)

C (M) G (M) U (M) A (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F)
 U (F) C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) U
 (F) AAG (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F) U (F)
) U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) C (M) G (M)

[0236] 配列番号 28 (3) :

(配列番号 28 で表される配列の共通配列の一か所に 2' - O - メチル修飾を導入した配列)

C (M) G (M) U (M) AG (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
) C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) U (F)
 AAG (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F) U (M) U (F)
) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) C (M) G (M)

[0237] 配列番号 28 (4) :

(配列番号 28 で表される配列の共通配列の一か所に 2' - O - メチル修飾を導入した配列)

C (M) G (M) U (M) AG (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
) C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) U (F)
 AAG (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F) U (F) U (M)
) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) C (M) G (M)

[0238] 配列番号 28 (5) :

(配列番号 28 で表される配列の共通配列の四か所に 2' - O - メチル修飾を導入した配列)

C (M) G (M) U (M) A (M) G (M) G (M) GGC (F) C (F)
 U (F) C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) U
 (M) A (M) A (M) G (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC
 (F) U (F) U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) C (M)
) G (M)

[0239] 配列番号 28 (6) :

(配列番号 28 で表される配列の共通配列以外の一か所に 2' -フルオロ修飾を導入した配列)

C (M) G (M) U (M) A (F) G (M) G (M) GGC (F) C (F)
U (F) C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) U
(F) AAG (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F) U (F)
) U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) C (M) G (M)

[0240] 配列番号 28 (7) :

(配列番号 28 で表される配列の共通配列の一か所に 2' -フルオロ修飾を導入した配列)

C (M) G (M) U (M) AG (M) G (M) G (F) GC (F) C (F)
U (F) C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) U
(F) AAG (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F) U (F)
) U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) C (M) G (M)

[0241] 配列番号 28 (8) :

(配列番号 28 で表される配列の共通配列の一か所に 2' -フルオロ修飾を導入した配列)

C (M) G (M) U (M) AG (M) G (M) GG (F) C (F) C (F)
U (F) C (F) C (F) AC (F) A (M) G (M) C (M) G (M) U
(F) AAG (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F) U (F)
) U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) C (M) G (M)

[0242] 配列番号 28 (9) :

(配列番号 28 で表される配列の共通配列以外の一か所に 2' -フルオロ修飾を導入した配列)

C (M) G (M) U (M) AG (M) G (M) GGC (F) C (F) U (F)
) C (F) C (F) A (F) C (F) A (M) G (M) C (M) G (M) U
(F) AAG (M) C (M) U (M) U (M) G (M) GAC (F) U (F)
) U (F) AA (M) A (M) C (M) C (M) A (M) C (M) G (M)

[0243] 配列番号 28 (10) :

(配列番号 28 で表される配列の共通配列の一か所に 2' -フルオロ修飾を導入した配列)

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

[0244] 配列番号 28 (11) :

(配列番号 28 で表される配列の共通配列の一か所に 2' -フルオロ修飾を導入した配列)

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

[0245] 配列番号 28 (12) :

(配列番号 28 で表される配列の共通配列の一か所に 2' -フルオロ修飾を導入した配列)

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

[0246] 配列番号 28 (13) :

(配列番号 28 で表される配列の五か所に 2' -O-メチル修飾を導入し、3' 末端に i d T を付加した配列)

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

M) G (M) - i d T

[0247] 配列番号 28 (14) :

(配列番号 28 (13) で表される配列の共通配列の一か所に 2' -フルオ
口修飾を導入した配列)

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

[0248] 配列番号 28 (15) :

(配列番号 28 で表される配列の四か所に 2' -O-メチル修飾を導入し、
3' 末端に i d T を付加した配列)

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

[0249] 配列番号 28 (16) :

(配列番号 28 で表される配列の四か所に 2' -O-メチル修飾を導入し、
3' 末端に i d T を付加した配列)

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

[0250] 配列番号 28 (17) :

(配列番号 28 で表される配列の三か所に 2' -O-メチル修飾を導入し、
3' 末端に i d T を付加した配列)

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

[0251] 配列番号 28 (18) :

(配列番号 28 (15) で表される配列の 5' 末端に P E G を付加した配列
)

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

[0252] 配列番号 29 (1) :

(配列番号 29 で表される配列の共通配列の一か所に 2' - O - メチル修飾
 を導入した配列)

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

[0253] 配列番号 29 (2) :

(配列番号 29 で表される配列の共通配列の一か所に 2' - フルオロ修飾を
 導入した配列)

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

A (M) C (M) G (M) – i d T

[0254] 配列番号 29 (3) :

(配列番号 29 で表される配列の共通配列の二か所に 2' –フルオロ修飾を導入した配列)

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

[0255] 配列番号 28 (1) ~ 28 (18) (配列番号 28 系統) と配列番号 29 (1) ~ 29 (3) (配列番号 29 系統) で表される配列を有するアプタマーは全て化学合成により調製した。これらのアプタマーが ADAMTS5 の酵素活性を阻害するかどうかを、実施例 1 及び実施例 5 と同様の方法を用いて評価した。測定の結果を表 9 に示す。表中、“評価法 1” は検出方法を電気泳動法とした酵素阻害活性評価法であり、10 nM の核酸の最終濃度における阻害活性を示す。“評価法 2” は検出方法を ELISA 法とした酵素阻害活性評価法であり、2 nM の核酸の最終濃度における阻害活性並びに IC₅₀ 値を示す。“n. d.” は未測定を表す。

[0256]

[表9]

ADAMTS6に対する阻害活性

配列番号	阻害活性 (%)		IC ₅₀ (nM)
	評価法 1	評価法 2	評価法 2
28	81	n. d.	n. d.
28 (1)	76.6	n. d.	n. d.
28 (2)	68.7	n. d.	n. d.
28 (3)	77.5	n. d.	0.108
28 (4)	2.7	n. d.	n. d.
28 (5)	77.3	n. d.	n. d.
28 (6)	76.8	n. d.	n. d.
28 (7)	84.1	n. d.	n. d.
28 (8)	71.1	n. d.	n. d.
28 (9)	69.7	n. d.	n. d.
28 (10)	76.6	n. d.	n. d.
28 (11)	42.6	n. d.	n. d.
28 (12)	67.8	n. d.	n. d.
28 (13)	86.1	n. d.	n. d.
28 (14)	90.6	n. d.	n. d.
28 (15)	n. d.	98.1	0.084
28 (16)	n. d.	93.7	n. d.
28 (17)	n. d.	100	n. d.
28 (18)	n. d.	95.9	0.029
29	84	n. d.	n. d.
29 (1)	92.9	n. d.	0.17
29 (2)	89.8	n. d.	n. d.
29 (3)	80.9	n. d.	n. d.

[0257] 配列番号 28 (2) と 28 (6) で表される配列を有するアプタマーの結果より、5' 末端から 4 塩基目の A (ステム 1 でバルジ構造を形成している) は RNA のほか、2' -フルオロ修飾や 2' -O -メチル修飾でも機能することが判った。また、配列番号 28 (3) と 29 (1) で表される配列を有するアプタマーの結果より、共通配列の 3' 末端側から 7 番目の W (A または U) は RNA、2' -フルオロ修飾のほか、2' -O -メチル修飾でも機能することが判った。また、配列番号 28 (7)、28 (8)、28 (10)、28 (12)、29 (2) で表される配列を有するアプタマーの結果より、共通配列の 5' 末端から 3 塩基目と 4 塩基目の G、3' 末端から 10 塩基目の G、5 塩基目の A は RNA のほか、2' -フルオロ修飾でも機能することが判った。一方で、配列番号 28 (4)、28 (11) で表される配列を有するアプタマーの結果から、共通配列の 3' 末端から 6 番目の Y は、2' -O -メチル化修飾の導入によりアプタマーの阻害活性が著しく減弱

し、また、3'末端から9番目のAは、2'-フルオロ化修飾によりアプタマーの活性が低下することが判明した。

[0258] 配列番号28(13)～(18)(配列番号28系統)、29及び29(1)～29(3)(配列番号29系統)で表される配列を有するアプタマーの結果より、5'末端にPEG、3'末端にidTを付加しても阻害活性に影響しないことが判った。末端修飾としては、PEG、idT以外にもペプチド、アミノ酸、糖、グリコサミノグリカン、あるいはビオチンなどが挙げられる。

[0259] 実施例9：ADAMTS5に特異的に結合するRNAアプタマーの作製(3)

ADAMTS5に特異的に結合するRNAアプタマーを、VaterらのSELEX法(Vater et al., Nucleic Acid Research, 31, e130, 2003)の改良法を用いて作製した。SELEXの標的物質としてNHS-activated Sepharose 4 Fast Flow(GEヘルスケア社製)の担体に固相化したADAMTS5(R&D systems社製)を用いた。最初のラウンドで用いたRNAは、化学合成によって得られたDNAを実施例1と同様の方法で転写して得た。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。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。鋳型DNAは配列番号11の配列の共通配列以外のステムループ領域の配列に変異が導入されたデザインを持つ。

[0260] DNA鋳型：5'-ATATCTTTTGCTTATTCTCGAGAAAT
TGGTTTAGTCCANNNNNNNNNGTGGAGGCCCCA
ATACCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'(配列番号52)

[0261] プライマーFwd：5'-TAATACGACTCACTATAGGGT-
3'(配列番号53)

[0262] プライマーRev：5'-ATATCTTTTGCTTATTCTCGAG
-3'(配列番号54)

- [0263] DNA鋳型（配列番号）中のNの連続は任意の組み合わせの10個のヌクレオチド（それぞれのNは、A、C、G又はTである）である。プライマーFwdはT7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含んでいる。最初のラウンドで用いたRNAプールのバリエーションは理論上 10^{13} であった。
- [0264] ADAMTS5が固相化された担体にRNAプールを加え、30分室温で保持した後、ADAMTS5に結合しないRNAを取り除くために、溶液Aで樹脂を洗浄した。ここで溶液Aは145 mM 塩化ナトリウム、5.4 mM 塩化カリウム、1.8 mM 塩化カルシウム、0.8 mM 塩化マグネシウム、20 mM トリス（pH 7.6）、0.05% Tween 20の混合溶液である。ADAMTS5に結合したRNAは、溶出液として溶液Bを加えて95℃で3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、20 mM トリス（pH 7.6）の混合溶液である。回収されたRNAは、T7 RNA Ligase 2（New England Biolabs社製）を用いてプライマー配列を両末端に連結した後、逆転写PCRで増幅した。Revプライマーの3'末端側には制限酵素サイトXhoIが設計されており、PCR増幅産物をXhoI（New England Biolabs社製）で消化することでRevプライマー配列を取り除くことが可能である。制限酵素で消化したPCR増幅産物を鋳型にDuraScribe™ T7 Transcription Kitで転写し、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、次世代シーケンサーを用いて塩基配列の大規模解析を行った。次世代シーケンサーには、Ion PGM™システム（Thermo社製）を用い、解析はThermo社の仕様書に沿って行った。
- [0265] SELEXを3ラウンド実施した後、次世代シーケンサーによって7956種類のクローン配列を特定し、7676種類の配列に収束していることを確認した。それらのクローンの一部の配列を配列番号30～45に示す。配

列番号30で表される配列は4配列存在した。配列番号31～45で表される配列はそれぞれ3配列存在した。

[0266] これらの配列の二次構造をMFOLDプログラム(M. Zukker, Nucleic Acids Res. 31 (13), 3406-3415, 2003)を用いて予測したところ、共通配列の部分がよく似たループ構造となった。これらの配列の二次構造を図7-1、図7-2、図7-3に示した。図7-1、図7-2、図7-3中、共通配列を丸(O)で囲んだ。また、配列番号11と配列が異なる箇所を矢印(黒三角形)で示した。

[0267] 以下に配列番号30～45で表されるそれぞれのヌクレオチド配列を示す。特に言及がなければ、以下に挙げられる個々の配列は、5'から3'の方向で表すものとし、プリン塩基(A及びG)は2'-OH体であり、ピリミジン塩基(U及びC)は2'-フルオロ修飾体である。

[0268] 配列番号30:

GGGUAUUGGGGCCUCCACAAUAGAUAAAUGGACU
AAACCAACUCGA

[0269] 配列番号31:

GGGUAUUGGGGCCUCCACAGUUGAAGCUUGGACU
AAACCAAUUCUCGA

[0270] 配列番号32:

GGGUAUUGGGGCCUCCACAGAAAAAUCUUGGACU
AAACCAAUUCUCGA

[0271] 配列番号33:

GGGUAUUGGGGCCUCCACAGCCGAGGCUUGGACU
AAACCAAUUCUCGA

[0272] 配列番号34:

GGGUAUUGGGGCCUCCACAGAAAAAACUUGGACU
AAACCAACUCGA

[0273] 配列番号 35 :

GGGUAUUGGGGCCUCCACAGUAAGCACUUGGACU
AAACCAGCUCGA

[0274] 配列番号 36 :

GGGUAUUGGGGCCUCCACAGUUUAAACUUGGACU
AAACCAACUCGA

[0275] 配列番号 37 :

GGGUAUUGGGGCCUCCACAGUAAAUUCUUGGACU
AAACCAACUCGA

[0276] 配列番号 38 :

GGGUAUUGGGGCCUCCACGCUAGAAGGCUGGACU
AAACCAACUCGA

[0277] 配列番号 39 :

GGGUAUUGGGGCCUCCACGUAAACUAAACUGGACU
AAACCAACUCGA

[0278] 配列番号 40 :

GGGUAUUGGGGCCUCCACGCAAUGGUGCUGGACU
AAACCAACUCGA

[0279] 配列番号 41 :

GGGUAUUGGGGCCUCCACAUGGAUACA UUGGACU
AAACCAACUCGA

[0280] 配列番号 42 :

GGGUAUUGGGGCCUCCACAGUA AUUCUUGGACU
AAACCAACUCGA

[0281] 配列番号 43 :

GGGUAUUGGGGCCUCCACAGAAA AUUCUUGGACU
AAACCAACUCGA

[0282] 配列番号 44 :

GGGUAUUGGGGCCUCCACAGAACUUUCUUGGACU
AAACCAACUCGA

[0283] 配列番号45：

GGGUAUUGGGGCCUCCACAGAAAAGUCUUGGACU
AAACCAACUCGA

[0284] 配列番号30～45で表される核酸のADAMTS5に対する結合活性を測定した。結合活性は表面プラズモン共鳴法により評価した。測定は実施例1で示した方法と同様の方法を用いて測定した。測定の結果を表10に示す。表中、“++”は、アプタマーのSAチップへの固定化量（RU値）に対するADAMTS5結合量（RU値）の割合が40%以上のもの、“+”は10%以上40%未満のもの、“-”は10%未満のものを表す。

[0285] [表10]

ADAMTS5に対する結合活性

配列番号	結合活性
30	++
31	++
32	++
33	++
34	++
35	++
36	++
37	++
38	++
39	++
40	++
41	++
42	++
43	++
44	++
45	++

[0286] 測定の結果、測定した全ての配列がADAMTS5と結合することが判った。配列番号30～45の結果から、SELEX法で変異を導入した配列番号11の16番目のGから23番目のCまでの配列は2から3つの連続した塩基対を形成する傾向があるが、ヌクレオチド配列はランダムに変化する傾向が示された。

[0287] 実施例10：滑膜細胞におけるADAMTS5アプタマーのアグリカン切断阻害活性評価

配列番号11(34)、28(13)、28(15)、28(18)で表されるアプタマーについて、滑膜細胞におけるアグリカンの切断阻害活性を測定した。測定は、下記の方法により実施した。ヒト変形性膝関節症患者由来の滑膜細胞(HFLS-OA細胞)(Cell Application社製)を1ウェルあたり 2×10^4 細胞ずつ播種し、16～24時間培養した。培養方法はCell Application社の仕様書に従った。培養後、培地を取り除きBasal Medium(Cell Application社製)で細胞を洗浄し、基質としてBasal Mediumで希釈した500ngのアグリカンG1-IGD-G2(R&D systems社製)を添加した。アプタマーによる阻害評価を実施するサンプルについては、基質と同時にアプタマーを添加した。そのまま細胞を培養し、3日後に培養上清を回収した。添加した基質は、培養の間に、HFLS-OA細胞から分泌されるADAMTS5を始めとする基質切断酵素により切断される。培養上清中に含まれる切断基質断片量は、実施例5に記載したELISA法によって定量した。この評価系における基質切断効率は1～8%であった。ネガティブコントロールとして、配列番号15で表される核酸を用いた。測定の結果を表11に示す。

[0288]

[表11]

配列番号	阻害率 (%)		
	3 nM	30 nM	300 nM
15 ネガティブ コントロール	10	8	37
11 (34)	~8	15	58
28 (13)	42	62	79
28 (15)	40	63	80
28 (18)	45	63	78

[0289] 測定の結果、いずれのアプタマーもネガティブコントロールと比較して、顕著な阻害活性を示した。以上の結果から、本発明のアプタマーは滑膜細胞における基質切断に対して優れた阻害効果を示すと言える。

産業上の利用可能性

[0290] 本発明のアプタマー又は複合体は、変形性膝関節症などの軟骨疾患に対する医薬、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、ADAMTS5の精製及び濃縮、ADAMTS5の標識、並びにADAMTS5の検出及び定量に有用であり得る。

[0291] 本出願は、日本で出願された特願2017-216280（出願日：2017年11月9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。